



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0062433
(43) 공개일자 2017년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/48 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 8/97 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/48 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0065297(분할)
(22) 출원일자 2017년05월26일
심사청구일자 2017년05월26일
(62) 원출원 특허 10-2015-0122772
원출원일자 2015년08월31일
심사청구일자 2015년08월31일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김영철
대구광역시 달서구 호산로 125, 209동 1305호 (파
호동, 삼성명가타운)
홍성희
대구광역시 남구 효성중앙길 2, 201호 (봉덕동,
해피그린타운아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

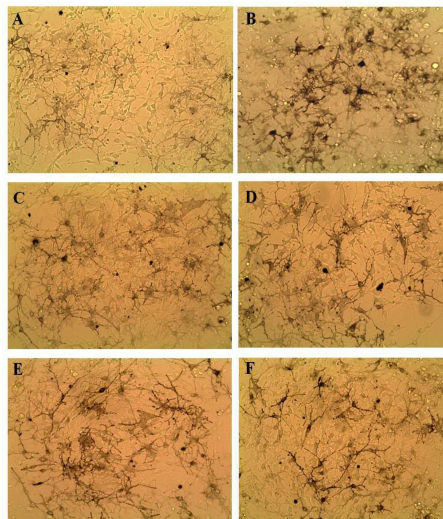
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 여우콩 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 활성 및 멜라닌 합성 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 여우콩, 쥐눈이콩 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 추출물을 유효성분으로 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물과 이의 백반증 또는 백모 예방 또는 치료용 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 건강식품의 용도에대한 것으로, 상기 여우콩 또는 쥐눈이콩의 잎과 열매 에탄올 추출물은 멜라닌합성에 영향을 미치는 티로시나아제의 활성을 증가시키고, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2 및 MITF-M의 유전자 전사와 단백질 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 증가시키므로 백반증 또는 백모의 개선 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 8/97 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

박민아

인천광역시 연수구 새말로 49번길 14, 203호

황지연

경상북도 상주시 경상대로 2930-10, 110동 114호
(낙양동, 낙양동명지아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

여우콩 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 활성 및 멜라닌 합성 촉진 활성을 갖는 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 여우콩 열매 추출물은 에탄올, 메탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 항산화 활성 및 멜라닌 합성 촉진 활성을 갖는 화장품 조성물.

청구항 3

여우콩 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 활성 및 멜라닌 합성 촉진 활성을 갖는 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 여우콩 열매 추출물은 에탄올, 메탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 항산화 활성 및 멜라닌 합성 촉진 활성을 갖는 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 천연물질인 여우콩 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 활성 및 멜라닌 합성 촉진용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 백반증은 피부 표피에 존재하는 멜라닌 세포에서 멜라닌이 오랫동안 생성되지 않아 하얀색 패치가 유발되는 색소 결핍증이다. 백반증이 유발되는 원인은 아직까지 정확하게 알려진 것은 없지만 유전적인 요인, 산화 활성 등의 자극에 의한 신경세포의 비정상적인 작용, 자가면역 파괴 등 멜라닌 세포의 기능을 감소시키는 것에 대한 가설들이 제시되고 있다.

[0003] 최근에는 이러한 가설들이 복합적으로 작용하여 백반증이 유발된다는 설이 주목받고 있다. 백반증을 가진 많은 환자들에 있어서 하얀 반점은 삶의 질에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 최근 신문기사에 의하면 백반증 환자의 취업문제, 대인관계 문제가 심각한 것으로 보도되었다. 이는 백반증이 작은 장애로 보일 수 있지만 정도가 심한 색소 부족 질병을 가진 사람에게는 심리학적 자아 존중감 및 사회 활동에 영향을 줄 수 있다는 것을 의미한다.

[0004] 백반증과 유사한 질병인 백모도 최근 경제 성장에 따른 문화 수준향상으로 외모에 대한 관심이 높아지면서 주목받고 있다. 백모는 모발색이 밝은 백인에 비해 흑인 모발을 가진 동양인에게 더욱 뚜렷이 나타나기 때문에 보건비용, 심리적인 면에서 연구대상이 되고 있다. 백모가 많을수록 백반증과 마찬가지로 심리적으로 우울하거나 스트레스가 증가하며 대인관계나 사회활동에서 불편함을 느끼고 있다.

[0005] 이러한 백반증 또는 백모를 치료하기 위하여 색소 세포인 멜라닌 세포를 활성화 하는 것이 중요하며 멜라닌 세포의 활성화로 인한 멜라닌의 합성이 색소 재침착(repigmentation)에 큰 역할을 한다. 따라서 백반증 및 백모 치료의 목표는 주변 정상부 또는 병변 내부의 모낭에 존재하는 비활동성 멜라닌 세포 또는 색소 모세포를 자극하여 분화, 증식 및 이동을 촉진시키고 멜라닌을 생성하게 하는 것이다.

- [0006] 멜라닌 합성은 멜라닌 세포에서 멜라닌의 합성을 촉매 하는데 중요한 효소로 알려진 티로시나아제(tyrosinase)가 티로신(tyrosine)과 반응하여 도파(dopa)로, 도파가 다시 티로시나아제와 반응하여 도파-퀴논(dopa-quinone)으로 변환함으로써 최종적으로 멜라닌이 생성된다. 멜라닌은 검은색과 갈색을 띠는 유멜라닌(eumelanin)과 빨간색과 노란색을 띠는 페오멜라닌(pheomelanin)으로 나뉘며 페오멜라닌의 경우 아미노산인 시스테인과 반응하면 생성되는 것으로 알려져 있다. 백반증 치료의 경우 검은색을 띠는 유멜라닌의 생성이 높을수록 효과적이다.
- [0007] 현재, 백반증의 치료에 있어서 국부의 코르티코스테로이드, 칼시뉴린 억제제, 비타민 D 파생물, 광선치료(UVA, narrow band UVB, 광화학치료), 정상적인 멜라닌 세포를 가지고 있는 표피를 이식하는 수술적인 치료, 국부적인 치료와 광선치료의 조합을 포함한 다양한 치료들이 사용되고 있지만 비흑색종 피부암과 흑색종의 발생정도를 증가시키는 등 부작용을 가지고 있다.
- [0008] 더불어 백모 억제에 관한 연구에 사용되는 아이소부틸 메틸잔틴(isobutyl-methylxanthine, IBMX)은 멜라닌 생성을 촉진시키고 MITF-M(Microphthalmia-associated transcription factor-M)와 티로시나아제의 단백질 수준을 증가시켜 백모를 억제하는 효능을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다. 현재 백모 해결방안으로 다양한 모발 염모제가 사용되고 있는 실정이다. 그러나 이런 영구 염모제는 식물성 염모제, 금속성 염모제, 합성 염모제 등으로 이루어지기 때문에 화학작용으로 인하여 모발과 두피에 손상, 자극 등의 부작용을 가지고 있다.
- [0009] 따라서 부작용이 적으며 멜라닌 생성에 효과적인 천연물에 대한 연구와 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 10-1144991호.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서 본 발명은 부작용이 적은 천연물질을 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 여우콩, 쥐눈이콩 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 추출물을 유효성분으로 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따르면, 여우콩 또는 쥐눈이콩의 잎과 열매 에탄올 추출물은 멜라닌합성에 영향을 미치는 티로시나아제(tyrosinase)의 활성을 증가시키고, 티로시나아제, 티로시나아제 관련 단백질-1(tyrosinase related protein-1, TRP-1), TRP-2, MITF-M의 유전자 전사 및 단백질 발현을 증가시킴으로써, 멜라닌 생성을 증가시키므로 백반증 또는 백모의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 건강기능식품으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명에 따른 쥐눈이콩의 열매 에탄올 추출물(Rhynchosia nulubilis bean ethanol extract, RNBEE) 및 잎 에탄올 추출물(Rhynchosia nulubilis leaf ethanol extract, RNLEE), 여우콩의 열매 에탄올 추출물(Rhynchosia volubilis bean ethanol extract, RVBEE) 및 잎 에탄올 추출물(Rhynchosia volubilis leaf ethanol extract, RVLEE)의 항산화 능력을 확인한 결과이고,

도 2는 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE의 전자공여능을 확인한 결과이고,

도 3은 색소합성세포인 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 다양한 농도로 처리한 후 세포의 성장

를 확인한 결과이고,

도 4는 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 처리하고 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과이고,

도 5는 melan-a세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 다양한 농도로 처리한 후 멜라닌 생성량을 확인한 결과이고,

도 6은 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 다양한 농도로 처리한 후 티로시나아제 활성을 확인한 결과이고,

도 7은 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 티로시나아제(tyrosinase) mRNA 발현을 확인한 결과이고,

도 8은 melan-a세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 티로시나아제 관련 단백질-1(tyrosinase related protein-1, TRP-1) mRNA 발현을 확인한 결과이고,

도 9는 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 TRP-2 mRNA 발현을 확인한 결과이고,

도 10은 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 MITF-M mRNA 발현을 확인한 결과이고,

도 11은 melan-a세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 티로시나아제 단백질 발현을 확인한 결과이고,

도 12는 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 TRP-1 단백질 발현을 확인한 결과이고,

도 13은 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 TRP-2 단백질 발현을 확인한 결과이고,

도 14는 melan-a 세포에 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE을 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 MITF-M 단백질 발현을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0016]

본 발명의 발명자들은 백반증 또는 백모의 개선 또는 치료 효과를 보이는 천연물질에 대해 연구하던 중, 여우콩 또는 쥐눈이콩 잎과 열매 추출물이 멜라닌 생성 주 효소인 티로시나아제(tyrosinase)의 활성을 증가시키고, 티로시나아제, 티로시나아제 관련 단백질-1(tyrosinase related protein-1, TRP-1), TRP-2, MITF-M의 유전자 전사 및 단백질 발현을 증가시킴으로써, 최종적으로 멜라닌 생성을 유의하게 증가시키는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0017]

상기 여우콩(Rhynchosia volubilis Lour.)은 콩 과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생초본으로서 이명으로는 녹곽(鹿藿, Rhynchosiae Herba)이라고도 하며, 한국, 일본, 중국, 필리핀에 분포한다. 우리나라 중부 이남의 산이나 들에 나는 덩굴성 다년초이다. 잎은 호생, 잎자루는 길고, 3출엽, 작은 잎은 도란형, 난상 마름모꼴이다. 길이는 3-5 cm, 양면에 털이 밀생, 뒷면에 황갈색의 선점이 있고, 가장자리는 밋밋하다. 꽃은 8-9월에 피고 황색으로 나비모양이 결실하며 협과이다. 꼬투리는 편평한 타원형이고 길이는 15mm 정도로서 2개의 종자가 들어 있으며, 성숙하면 붉은빛이 돌고 터진 다음에도 종자가 달려있다(원색한국식물도감, (주)교학사, 398p(1998)).

[0018]

상기 쥐눈이콩(Rhynchosia nulubilis)은 검은콩류의 하나로 서리태보다 작고 윤기가 흐르는 콩이며 약재상에서 '약콩'이라 부른다. 쥐눈이콩에는 일반식품에서는 볼 수 없는 특징적인 성분으로 이소플라본(isoflavone)류에 속하는 제네스테인(genistein), 다이드제인(daidzein)등과 함께 사포닌, 지방류, 비타민류, 무기질류 등이 많이 함유되어 있으며, 쥐눈이콩에는 다른 일반 콩에 비해 이소플라본이 많이 함유되어 있다. 쥐눈이콩은 이소플라본(isoflavone) 함량이 노란콩보다 높을뿐만 아니라, 종피에 항산화 효과가 탁월한 글리시테인(glycitein)과 안토시아닌(anthocyanin) 성분 중 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside)가 풍부하여 뇌혈관 및 심장질환의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0019]

그러나 상기 여우콩과 쥐눈이콩의 멜라닌 합성 효과에 대해 보고된 바는 없다.

- [0020] 따라서 본 발명은 여우콩, 쥐눈이콩 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 추출물을 유효성분으로 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 실시예에 따르면, 여우콩 추출물이 쥐눈이콩 추출물보다 더 높은 멜라닌 생성 효과를 보였으며, 잎 추출물이 열매 추출물보다 더 높은 생성 효과를 보였다.
- [0022] 상기 추출물은 에탄올, 메탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하며, 에탄올을 사용하는 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 조성물은 여우콩 추출물 0.001 내지 30 중량% 및 쥐눈이콩 추출물 0.002 내지 30 중량%를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 만약 상기 범위를 벗어나게 되면 여우콩 또는 쥐눈이콩 추출물의 멜라닌 생성 효과가 제대로 발휘되지 않는 문제가 야기될 수 있다.
- [0025] 상기 조성물은 멜라닌 형성 장애에 의하여 발생하는 백반증 또는 백모의 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.
- [0026] 상기 조성물은 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 건강기능식품으로써 제공될 수 있다.
- [0027] 상기 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 겔제, 유제, 주사제, 산제, 과립제, 에어로솔제, 페이스트제, 경피흡수제 및 패치제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 제형으로 제공될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 상기 여우콩 추출물 또는 쥐눈이콩 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 화장품 조성물은 유효성분인 여우콩 추출물 또는 쥐눈이콩 추출물 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 샴푸, 썸 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0034] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

- [0035] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로포름, 오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0037] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 예컨대 실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0038] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품은 유효성분인 여우콩 추출물 또는 쥐눈이콩 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0039] 상기 건강기능식품에 함유된 여우콩 추출물 또는 쥐눈이콩 추출물의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0040] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0042] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0044] <참고예 1> 시약 및 실험기구
- [0045] 디메틸설폭시화물(Dimethyl sulfoxide, DMSO), 2,6-디-터트-뷰틸레이트 하이드록시톨루엔(2,6-di-tert-butylate hydroxytoluene, BHT), 3,4-디하이드록시-L-페닐-알라닌(3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine, L-DOPA), 1,1-디페닐-2-피크릴-하이드라질(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH), 아이소부틸 메틸 잔틴(isobutylmethylxanthine, IBMX), 탄닌산(tannic acid), L-티로신(L-tyrosine), 폴린-시오칼토 페놀 시약(Folin-Ciocalteu's phenol reagent), 3-(4,5-디메틸-티아졸-2-일)-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 및 12- σ -테트라데칸오일-포르볼-13-아세테이트(12- σ -tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA)는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.
- [0046] RPMI-1640 배지(Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium), 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신 혼합물(penicillin/streptomycin mixture, P/S)은 론자(Lonza, Cascade, MD, USA)에서 구매하였다.
- [0047] 도립 현미경(Inverted microscope, CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 세포의 성장을 관찰하였고, 각 세포는 CO₂ 배양기(MCO-17AC, Sanyo electric, Osaka, Japan)에서 배양하였다.
- [0049] <실시예 1> 쥐눈이콩 에탄올 추출물과 여우콩 에탄올 추출물 제조
- [0050] 쥐눈이콩(*R. nulubilis*)의 열매와 잎은 예천, 경북에서 얻었고, 여우콩(*R. volubilis*)의 열매와 잎은 꽃자왈(제

주도)에서 얻었으며, 분쇄하여 실험에 사용하였다.

[0051] 각각의 분상의 샘플(50 g)을 플라스크에 넣고 25℃에서 24시간 동안 80% 에탄올 500 mL로 3 회 추출하였다. 추출물은 필터 페이퍼로 여과하고 회전식 진공 증발기(rotary vacuum evaporator)를 이용하여 농축한 후 동결건조하였다.

[0052] 쥐눈이콩의 열매 에탄올 추출물(*Rhynchosia nulubilis* bean ethanol extract, RNBEE)과 잎 에탄올 추출물(*Rhynchosia nulubilis* leaf ethanol extract, RNLEE)의 수율은 각각 10.1% 및 16.8%이었고, 여우콩의 열매 에탄올 추출물(*Rhynchosia volubilis* bean ethanol extract, RVBEE)과 잎 에탄올 추출물(*Rhynchosia volubilis* leaf ethanol extract, RVLEE)의 수율은 각각 11.0% 및 9.8%이었다.

[0054] <실시예 2> 항산화 능력 측정

[0055] 2.1 총 폴리페놀(polyphenol)와 총 플라보노이드(flavonoid) 농도 측정

[0056] 상기 실시예 1에서 제조한 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE의 총 폴리페놀 농도를 측정하기 위하여, 먼저 각 추출물 0.2 mg을 1 mL 증류수에 용해하고 이를 시험관에 넣은 후, 1 mL의 폴린-시오칼도 페놀 시약을 첨가하고 3 분간 방치하였다. 3분이 지나고 1 mL의 10% Na₂CO₃을 넣고 힘차게 흔들어준 후, 60분간 방치하였다. 그 후, 725nm에서 폴리페놀 농도를 측정하고 탄닌산을 이용한 표준 곡선으로 정량화하였다.

[0057] 다음으로 플라보노이드 농도를 측정하기 위하여, 추출물 0.2 mg을 1 mL DMSO에 용해하고 이 용액 100 μL를 시험관에 들어있는 1mL의 디-에틸렌 글리콜 시약(di-ethylene glycol reagent)과 100 μL의 1N NaOH에 혼합하였다. 그런 후 힘차게 흔들어준 후, 60분간 37℃에서 반응시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였고 이를 루틴(rutin)을 이용한 표준 곡선으로 정량하였다.

[0058] 그 결과 도 1과 같이, RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE의 폴리페놀의 농도는 각각 16.0, 57.7, 365.9 또는 260.1 mg/g이었고 플라보노이드의 농도는 각각 40.4, 91.7, 84.7 또는 216.5 mg/g이었다.

[0060] 2.2 전자-공여능(Electron-donating ability)

[0061] 상기 실시예 1에서 제조한 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE의 전자공여능을 측정하기 위하여, 각각을 최종 농도(125, 250, 500 또는 1000 μg/mL)가 되도록 증류수에 용해하였다.

[0062] 그런 후 각각 1 mL씩 시험관에 넣고, 이에 4 mL의 4×10^{-4} M DPPH를 첨가하였다.

[0063] 이를 힘차게 흔들어 혼합한 후 60℃에서 10초간 반응시킨 후, 525 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 아스코르브산(Ascorbic acid)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0064] 각 용액의 자유 라디칼-소거 활성(free radical-scavenging activity)은 하기 수학적 식 1을 따라 억제율로써 산출하였다.

[0065] [수학적 식 1]

[0066] % 전자공여능 = $[1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}})] \times 100$

[0067] 상기 A_{sample} 은 혼합 샘플의 흡광도이고, A_{blank} 은 대조군 시약의 흡광도이다.

[0068] 1,000 μg/mL의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE의 전자 공여능은 도 2와 같이, 각각 32.4%, 12.7%, 83.5% 또는 84.5%이었으며, 특히 RVBEE 및 RVLEE의 경우 높은 전자공여능을 보여주었다.

[0070] <실시예 3> 멜라닌 생성 능력

[0071] 3.1 세포 배양

[0072] 30 내지 37번 계대배양한 색소합성세포인 melan-a 세포를 도로시 베네트 박사(Dr. Dorothy Bennett, St. George's Hospital, UK)로부터 얻었다. 많은 색소를 가진 영속세포는 C57BL/6 마우스로부터 분리하였다. 각 세

포들은 RPMI-1640 배지에서 배양하였으며, 10% FBS, 1% P/S 및 200 nM TPA를 보충해주었고 37℃ 및 10% CO₂의 배양기에서 72시간 동안 배양하였다.

[0074] 3.2 MTT 분석

[0075] 세포의 생장률을 MTT 분석을 통해 확인하였다. melan-a 세포를 96-웰 플레이트에 0.5×10^4 cell/well만큼 분주하고 24시간 동안 37℃ 및 10% CO₂의 배양기에서 배양하였다.

[0076] 200 μ L의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE를 RPMI-1640 배지에 6.25, 12.5, 25, 50, 100 또는 200 μ g/mL의 농도로 희석하고 이를 각 웰마다 넣어준 후 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

[0077] 48시간이 지난 후 세포들을 0.5 μ g/mL MTT를 포함하는 배지에 넣은 후 3시간 동안 배양하고, 200×g의 속도로 10분간 원심분리하여 세포를 정착시키고 배지를 모두 제거하였다.

[0078] 이에 200 μ L의 DMSO를 각 웰에 첨가해주고 플레이트-레이더에서 15분간 세포를 재현탁시킨 후, 플레이트 리더기(680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생장률은 측정값을 대조군 시약의 흡광도로 나누어 백분율로 산출하였다.

[0079] 그 결과 도 3과 같이, RNBEE는 6.25 내지 200 μ g/mL의 농도에서 melan-a 세포의 생장률은 80% 이상이었으며 RNLEE는 6.25 내지 100 μ g/mL의 농도에서 세포의 생장률은 80% 이상이었다. 반면, 200 μ g/mL의 농도에서는 40.7% 세포의 생장률이 감소되었다.

[0080] RVBEE 및 RVLEE는 50 μ g/mL의 농도에서 80% 이상의 생장률을 보였지만, 100 μ g/mL의 농도에서는 각각 47.6% 또는 35.7% 생장률이 감소하였다.

[0081] 이를 통해 각 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE의 농도의 허용가능한 최대 수준(maximum permissible level, MPL)은 각각 200, 100, 50 또는 50 μ g/mL인 것을 확인하였다.

[0083] 3.3 Melan-a 세포의 형태학적 관찰

[0084] Melan-a 세포에 12.5 μ g/mL의 IBMX와 50 μ g/mL의 RNBEE, RNLEE 또는 RVBEE를 각각 처리해주고 48시간동안 37℃ 및 10% CO₂배양기에서 배양한 후, 배지를 교체해주고 도립 현미경(inverted microscope)으로 형태를 관찰하여 도 4에 나타내었다.

[0085] 도 4 중 A는 대조군이며, 도 4 중 B는 IBMX를 처리한 실험군, 도 4 중 C는 RNBEE를 처리한 실험군, 도 4 중 D는 RNLEE를 처리한 실험군, 도 4 중 E는 RVBEE를 처리한 실험군, 도 4 중 F는 RVLEE를 처리한 실험군이다.

[0086] 본 발명에 따른 RNBEE, RNLEE, RVBEE 및 RVLEE는 50 μ g/mL의 농도에서 melan-a 세포의 멜라닌(melanin) 축적 및 수상돌기(dendrites)의 발달을 증가시켰다.

[0088] 3.4 멜라닌 분석

[0089] Melan-a 세포를 48-웰 플레이트에 각 웰당 2×10^4 세포/웰만큼 분주하고 37℃ 및 10% CO₂배양기에서 24시간동안 배양하였다. 이에 12.5 μ g/mL의 IBMX(PC)와 다양한 농도(6.25, 12.5, 25 또는 50 μ g/mL)로 RPMI-1640 배지에 희석한 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE를 각각 500 μ L씩 첨가해준 후 37℃ 및 10% CO₂배양기에서 72시간 배양하고 세척하였다. 그런 후, 한번 더 이 과정을 반복하였다.

[0090] 그런 후, 멜라닌을 1N NaOH에 용해시키고, 플레이트 리더기를 이용하여 490 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였고, 멜라닌 함량의 변화는 측정값을 대조군 시약의 흡광도로 나누어 백분율로 산출하였다.

[0091] 그 결과 도 5와 같이, 50 μ g/mL 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군의 멜라닌 농도는 30.4%, 32.1%, 35.5% 또는 37.4%로 본 발명에 따른 쥐눈이콩 에탄올 추출물과 여우콩 에탄올 추출물은 멜라닌을 유의하게($p < 0.01$) 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[0093] **3.5 세포내 티로시나아제(tyrosinase) 활성 분석**

[0094] melan-a 세포를 60 mm 세포 배양 접시에 4×10^5 세포/웰만큼 분주하고 24시간동안 배양한 후, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 IBMX(PC)와 다양한 농도(6.25, 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$)로 RPMI-1640 배지에 희석한 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE를 각각 5 mL씩 첨가해주고 48시간 더 배양하였다.

[0095] 각 세포들을 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 세척한 후, 200 μL 의 1% 트리톤 X-100으로 세포를 접시 바닥에서 떼어내어 에펜도르프 튜브(Eppendorf tube)로 옮기고 이를 10분 간격으로 6번 교반하면서 얼음 위에서 추출하였다.

[0096] 그 후 4°C에서 18,000 $\times$ g의 속도로 20분간 원심분리하고, 100 μL 의 0.2% L-도파(L-DOPA)를 첨가해 1시간 동안 37°C 및 10% CO₂배양기에서 배양한 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0097] 티로시나아제 활성은 측정값을 대조군 시약의 흡광도로 나누어 백분율로 산출하였고, 이 결과를 도 6에 나타내었다.

[0098] 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군은 각각 18.4%, 21.8%, 21.5% 또는 21.1% 유의하게($p < 0.01$) 증가된 세포내 티로시나아제 활성을 보여주었다.

[0100] **3.6 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)**

[0101] 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 IBMX(PC)와 12.5, 25 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 각 추출물이 처리된 melan-a 세포의 총 RNA는 트리졸 시약(Trizol-reagent, Invitrogen, New York, NY, USA)을 이용하여 제조사의 지침을 따라 추출하였다.

[0102] 추출한 5 μg 의 RNA를 8 μL 의 몰로니 생쥐 백혈구 바이러스 역전사효소(Molony murine leukemia virus Reverse Transcriptase, M-MLV RT) 5 $\times$ 버퍼, 3 μL of 10 mM 디옥시리보뉴클레오타이드 3인산염(deoxyribonucleotide triphosphates, dNTPs), 0.45 μL 의 40 U/ μL 리보뉴클레아제 억제제(RNasein inhibitor), 0.3 μL 의 200 U/ μL M-MLV RT(Promega, Madison, WI, USA) 및 1.5 μL 의 50 μM 올리고 dT(oligo dT, Bioneer, Daejeon, Korea)를 포함하는 40 μL 볼륨의 혼합액을 이용하여 역전사하였다.

[0103] 단일가닥 cDNA는 PCR을 이용하여 증폭하였으며, 이때 4 μL 의 5 $\times$ 그린 Go 태그 플렉시 버퍼(green Go Taq flexi buffer), 0.4 μL 의 10 mM dNTPs, 0.1 μL 의 5 U/ μL 태그 폴리머레이즈(Taq polymerase), 1.2 μL 의 25 mM MgCl₂(Promega)를 이용하였고, 하기 표 1의 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, MITF-M 또는 β -액틴(β -actin)에 대한 프라이머 0.4 μL (20 μM)를 사용하여 증폭하였다.

표 1

[0104]

명칭	방향	시퀀스	서열번호
티로시나아제	정방향	CAT TTT TGA TTT GAG TGT CT	1
	역방향	TGT GGT AGT CGT CTT TGT CC	2
TRP-1	정방향	GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC	3
	역방향	AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT	4
TRR-2	정방향	GGA TGA CCG TGA GCA ATG GCC	5
	역방향	CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC	6
MITF-M	정방향	TAC AGA AAG TAG AGG GAG GAG GAC TAA G	7
	역방향	CAC AGT TGG AGT TAA GAG TGA GCA TAG CC	8
β -Actin	정방향	ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG	9
	역방향	TAC GGA TGT CAA CGT CAC AC	10

[0105] 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, MITF-M 또는 β -액틴의 PCR 생성물의 예상 사이즈는 각각 1192, 268, 1044, 326 및 528 염기쌍(base pairs)이었다.

[0106] PCR은 다음과 같이 수행하였다. 티로시나아제 및 TRP-1은 94°C에서 60초간 변성(denaturation), 56°C에서 60초간 풀림(annealing), 72°C에서 60초간 연장(extension)으로 28 회(cycle) 수행하였다.

- [0107] TRP-2는 94℃에서 60초간 변성, 64℃에서 60초간 풀림, 72℃에서 60초간 연장으로 28회 수행하였다.
- [0108] MITF-M는 94℃에서 30초간 변성, 54℃에서 30초간 풀림, 72℃에서 30초간 연장으로 30회 수행하였다.
- [0109] β -액틴은 94℃에서 30초간 변성, 51℃에서 30초간 풀림, 72℃에서 30초간 연장으로 30회 수행하였다.
- [0110] 이를 통해 생성된 PCR 생성물은 1.2% 아가로즈 겔을 이용하여 분석하였다. β -액틴을 대조군으로 사용하여 티로시나아제와 TRP-1, TRP-2 및 MITF-M의 상대적인 발현을 평가하였다.
- [0111] 그 결과 도 7과 같이, 50 μ g/mL 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군의 티로시나아제 mRNA는 각각 7.8%, 22.4%($p<0.05$), 21.5%($p<0.05$) 또는 28.4%($p<0.05$) 증가하여, RNLEE, RVLEE 및 RVBEE는 티로시나아제 mRNA를 유의하게 증가시켰다.
- [0112] 또한 도 8과 같이, 50 μ g/mL 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군은 각각 34.6%($p<0.05$), 37.2%($p<0.05$), 44.9%($p<0.01$) 또는 39.7%($p<0.01$) TRP-1 mRNA가 유의하게 증가하였다.
- [0113] 더불어 도 9와 같이, 50 μ g/mL 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군의 TRP-2 mRNA의 발현은 각각 12.9%, 21.0%($p<0.05$), 9.7% 또는 6.2% 증가하여 RNLEE가 유일하게 유의한 증가를 보였다.
- [0114] 더불어 도 10과 같이, 50 μ g/mL 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군의 MITF-M mRNA 발현은 각각 17.2%, 48.3%($p<0.01$), 12.6% 또는 19.5%($p<0.05$) 증가하여 RNLEE 및 RVLEE가 유의한 증가를 보여주었으며 또한, 25 μ g/mL의 RNLEE도 대조군과 비교하였을 때 MITF-M mRNA의 발현을 유의하게($p<0.05$) 증가시켰다.
- [0115] 그러나 12.5 및 25 μ g/mL의 RVBEE는 대조군과 비교하여 MITF-M mRNA 발현을 감소시킨 것을 확인할 수 있었다.
- [0117] **3.7 웨스턴 블롯**
- [0118] Melan-a 세포에 12.5 μ g/mL의 IBMX(PC)와 12.5, 25 또는 50 μ g/mL의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE를 처리하고, 1% 노니데트 P-40(NP-40), 0.01% 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS) 및 단백질가수분해효소 억제제 혼합물(protease inhibitor cocktail, Roche, Mannheim, Germany)을 포함하는 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) 버퍼에서 초음파 분해하였다.
- [0119] 세포 용해물의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad Laboratories USA, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용해서 측정하였고, 표준(standard)으로 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 사용하였다.
- [0120] 동등한 양의 단백질(10 μ g)을 각 레인 상에 로딩하고, 10% 폴리아크릴 아마이드 겔(polyacrylamide gel) 상에서 전기영동을 통해 분리하였다.
- [0121] 이를 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, 산타크루즈(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)에서 구매한 항-티로시나아제(anti-tyrosinase, SC 15341, 1:1,000 희석), 항-TRP-1(anti-TRP-1, SC 25543, 1:1,000 희석), 항-TRP-2(anti-TRP-2, SC 25544, 1:1,000 희석), 및 항-MITF-M(anti-MITF-M, SC 10999, 1:500 희석) 항체와 함께 배양하였다.
- [0122] 그런 후, 이를 TBST(Tween 20을 포함하는 Tris-Buffered Saline)으로 세척하고 2차 항체인 항-레빗 IgG(anti-rabbit IgG, 1:1,000 희석, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)와 함께 배양하였다.
- [0123] 면역 반응을 보이는 밴드는 강화된 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL, Amersham, Bucks, UK) 시스템을 이용하여 검출하였다.
- [0124] 밴드의 강도는 이미지 J 프로그램(Image J program, NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 측정하였고, 이때 β -액틴을 내부 대조군으로 정하여 밴드 강도를 평가하였다.
- [0125] 그 결과 도 11과 같이, 50 μ g/mL 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군은 각각 17.3%($p<0.01$), 31.6%($p<0.01$), 50.9% ($p<0.001$) 또는 34.8%($p<0.01$) 유의하게 증가된 티로시나아제 단백질 발현을 보여주었다.
- [0126] 더불어 도 12와 같이, 50 μ g/mL 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군은 각각 41.2%($p<0.001$), 44.7%($p<0.001$), 23.2%($p<0.01$) 또는 30.5%($p<0.01$) 유의하게 증가된 TRP-1 단백질 발현을 보였으며, 도 13과 같이 50 μ g/mL 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군은 각각

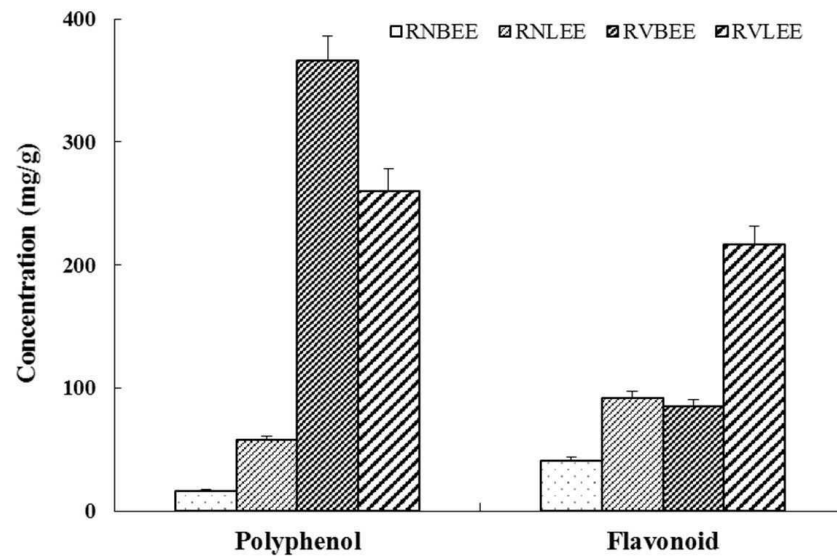
66.8%($p<0.05$), 44.7%($p<0.05$), 36.6% 또는 108.8%($p<0.001$) TRP-2 단백질 발현이 증가하여 RNBEE, RNLEE 및 RVLEE는 유의한 증가를 보였다.

[0127] 또한 도 14와 같이, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 RNBEE, RNLEE, RVBEE 또는 RVLEE가 처리된 실험군은 각각 14.6%($p<0.01$), 41.9%($p<0.001$), 43.3%($p<0.01$) 또는 43.4%($p<0.01$) MITF-M 단백질 발현이 유의하게 증가하였다.

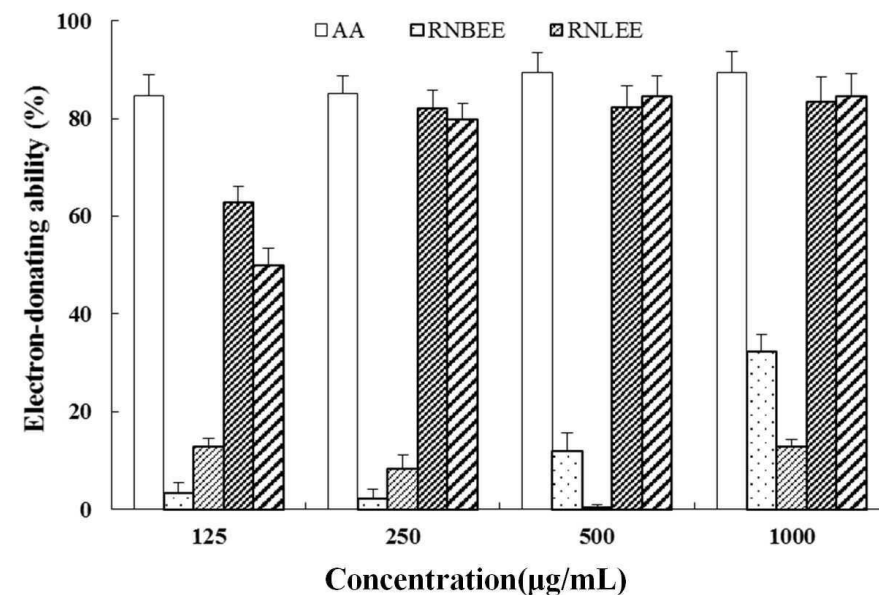
[0129] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

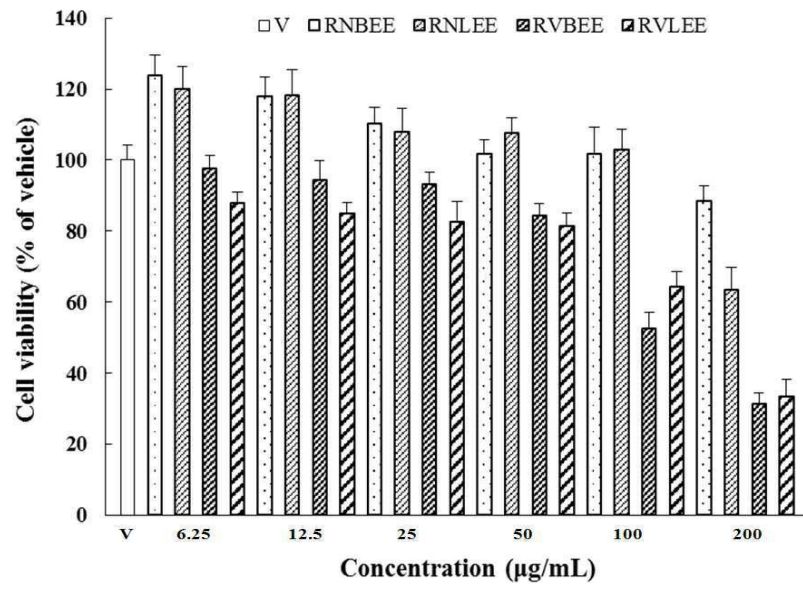
도면1



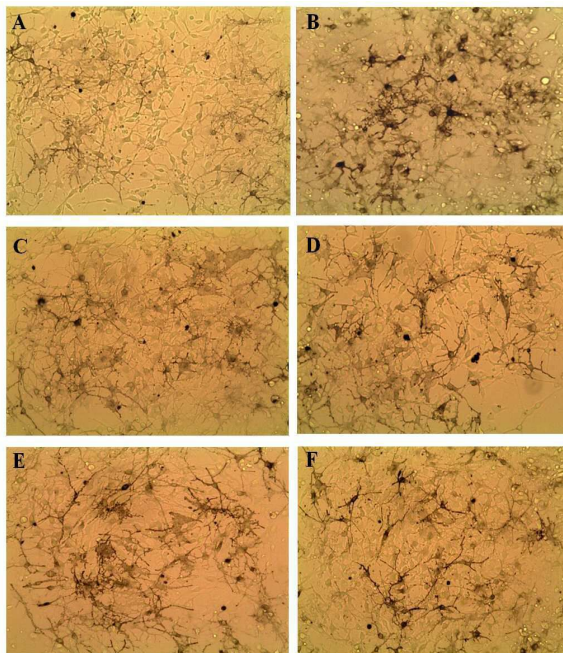
도면2



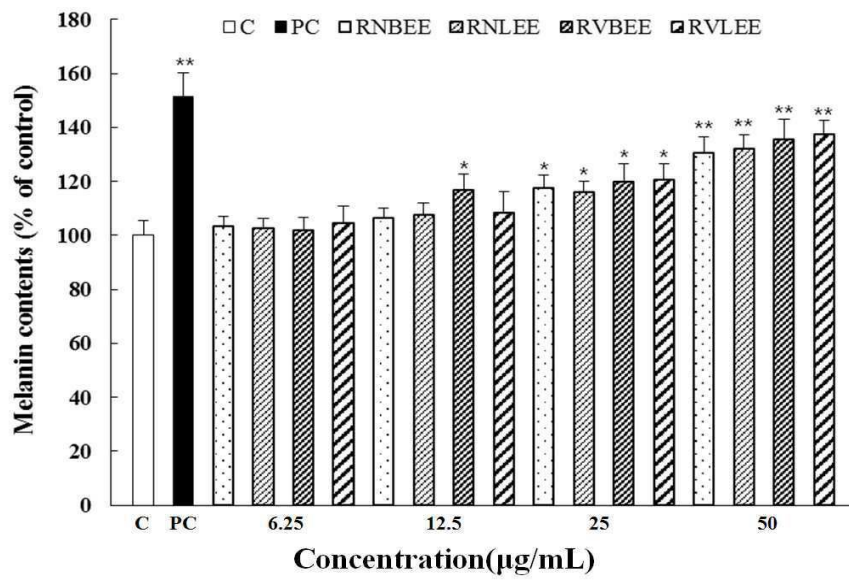
도면3



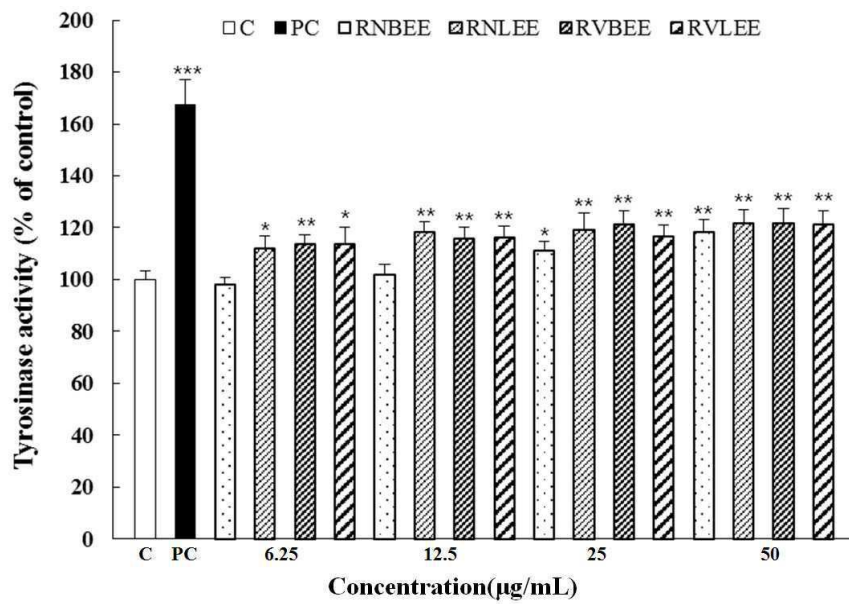
도면4



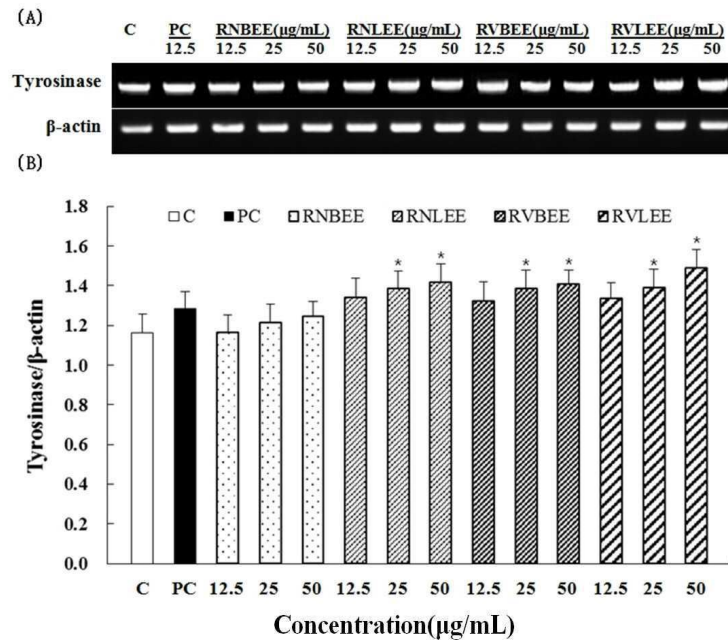
도면5



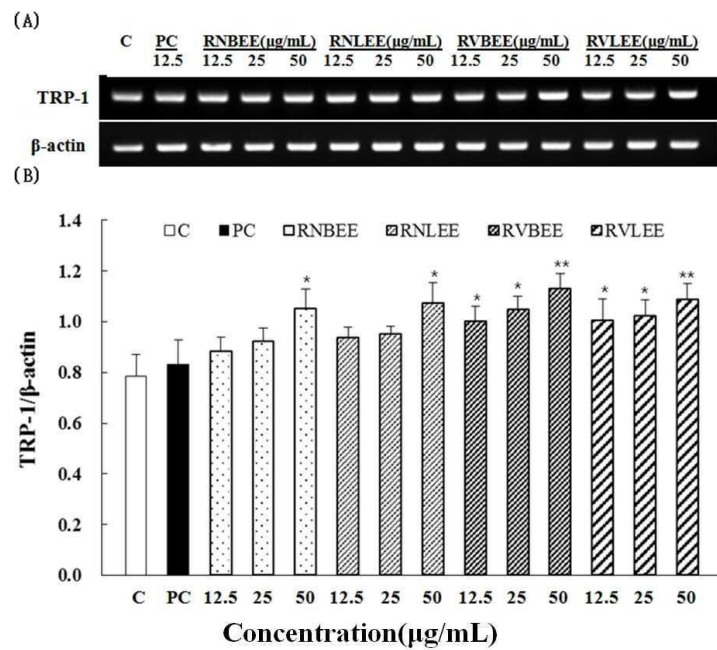
도면6



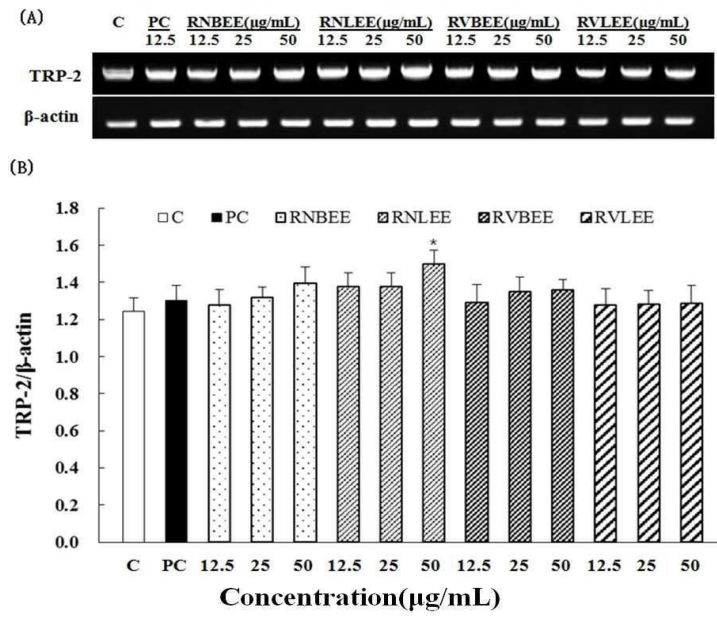
도면7



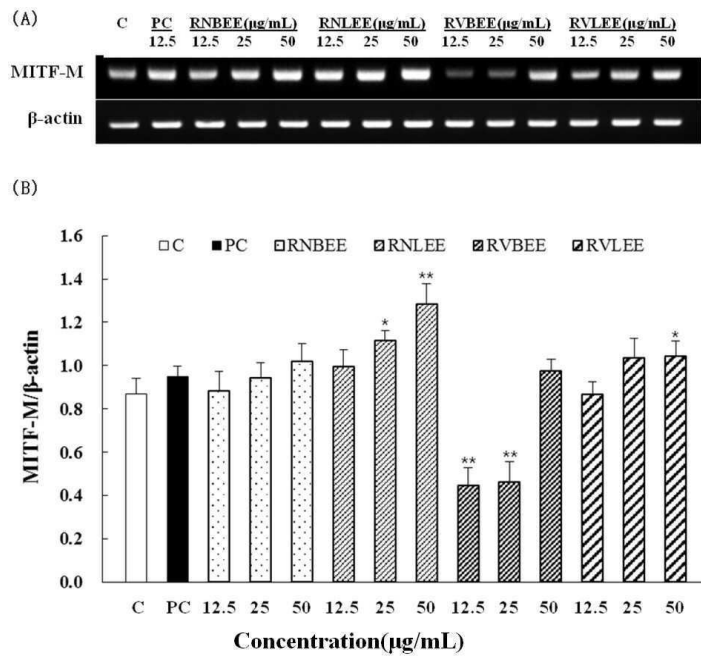
도면8



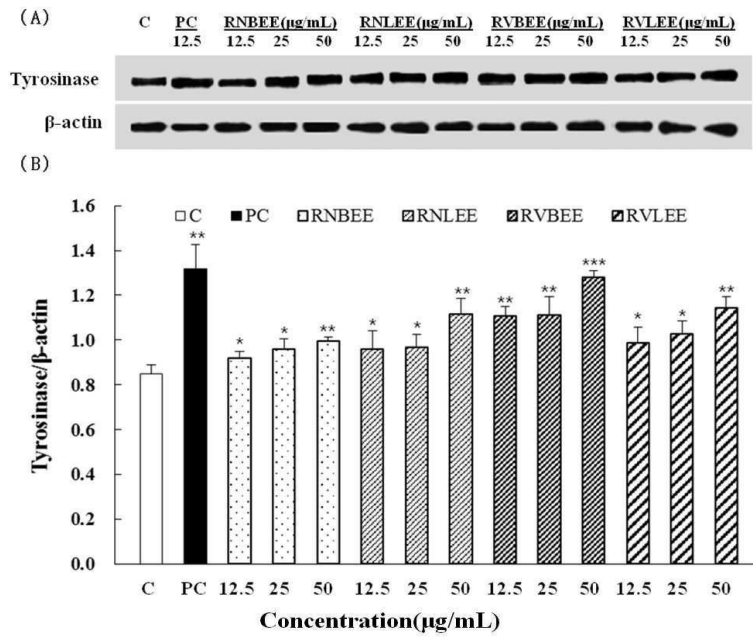
도면9



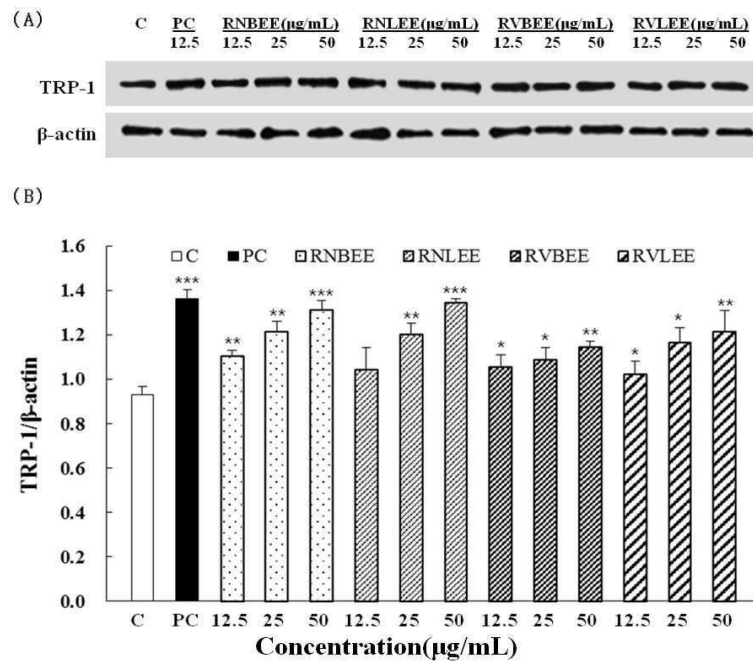
도면10



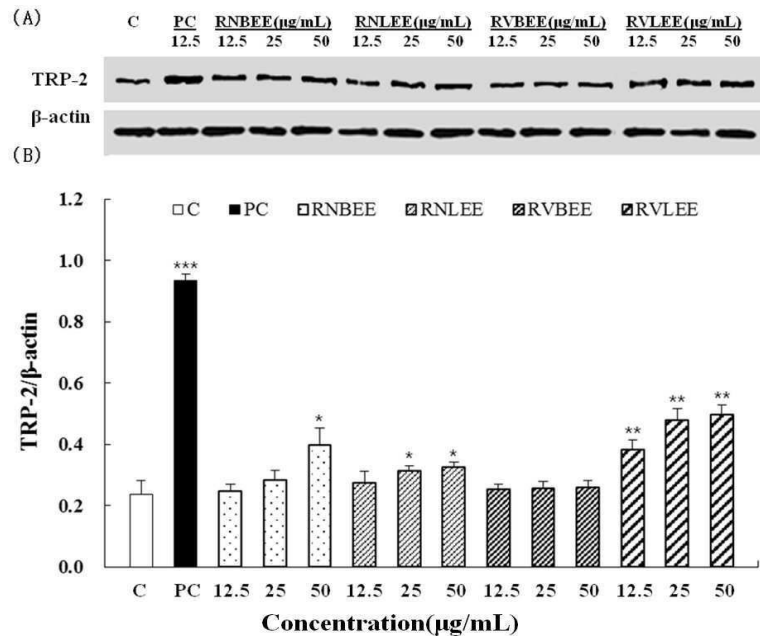
도면11



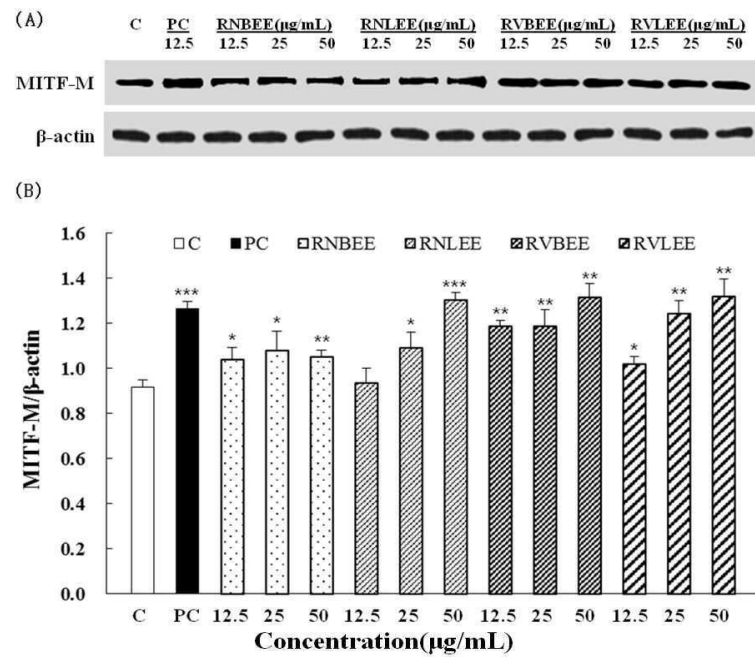
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Composition for promoting antioxidant activity and melanin synthesis comprising Rhynchosia volubilis bean extract
- <130> ADP-2017-0231
- <160> 10
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tyrosinase forward primer
 <400> 1
 catttttgat ttgagtgtct 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tyrosinase reverse primer
 <400> 2
 tgtggtagtc gtctttgtcc 20
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TRP-1 forward primer
 <400> 3
 gctgcaggag ccttctttct c 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TRP-1 reverse primer
 <400> 4
 aagacgtgc actgctggtc t 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TRR-2 forward primer

<400>	5	
ggatgaccgt gagcaatggc c		21
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TRR-2 reverse primer	
<400>	6	
cggttgtgac caatgggtgc c		21
<210>	7	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MITF-M forward primer	
<400>	7	
tacagaaagt agagggagga ggactaag		28
<210>	8	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MITF-M reverse primer	
<400>	8	
cacagttgga gttaagagtg agcatagcc		29
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin forward primer	
<400>	9	
accgtgaaaa gatgaccag		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin reverse primer

<400> 10

tacggatgtc aacgtcacac

20