



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0152257
(43) 공개일자 2023년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9789 (2017.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/815 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 29/065 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0051764

(22) 출원일자 2022년04월27일

심사청구일자 2022년04월27일

(71) 출원인

전문대학교 산학협력단

충청남도 아산시 탕정면 전문로221번길 70 (전문대학교)

한스텍주식회사

충청남도 청양군 정산면 충의로 1576-16 ()

(72) 발명자

이상철

충청남도 아산시 배방읍 배방로 58-43, 103동 704호(배방한성필하우스)

이영수

경기도 평택시 평택로 17, 104동 1103호(평택동, 롯데인벤스 스카이)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

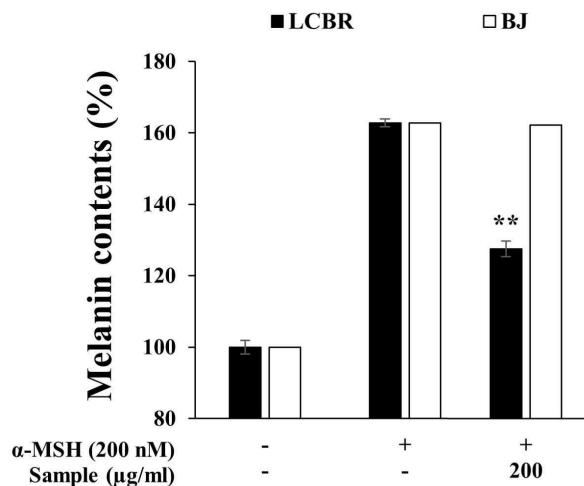
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물

(57) 요약

본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 생물전환법을 통해 제조된 구기자 잎의 생물전환 추출물은 세포독성이 없으며, 구기자 잎 추출물에 대비하여 멜라닌의 생성 및 티로시나아제의 활성을 억제시키는 효과가 우수하므로, 피부 미백을 위한 기능성 화장품, 피부 색소 침착 질환을 예방 또는 개선시킬 수 있는 식품 또는 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/815 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

(72) 발명자

김승영

충청남도 천안시 서북구 불당11로 82, 614동 1101호(불당동, 대원칸타빌아파트)

장이섭

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6113동 302호(이의동, e편한세상 광고)

정한수

충청남도 청양군 정산면 충의로 1576-16

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0018337
과제번호	P0018337
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술진흥원
연구사업명	시군구지역연고산업육성사업 (비R&D)
연구과제명	구기자 산업의 경쟁력 강화를 위한 사업화 지원사업
기 여 율	1/1
과제수행기관명	선문대학교 산학협력단
연구기간	2021.06.30 ~ 2022.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 구기자 잎의 생물전환 추출물은 구기자 잎 추출물에 미생물을 혼합하여 생물전환 반응을 유도하여 제조하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 미생물은 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매를 이용하여 추출한 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 중에서 선택되는 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 6

구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 멜라닌 색소 과다 침착 질환은 주근깨, 노인성 반점, 간반, 기미, 갈색 또는 흑점, 일광 색소반, 푸른흑피증(cyanic melasma), 약물 사용 후의 과다색소침착, 임신성 갈색반(gravidic chloasma), 또는 찰상 및 화상을 비롯한 상처 또는 피부염으로 인한 염증 후 과다 색소 침착인 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 신체조직 중 직접적으로 외부환경에 노출되어 있으며, 인체의 내부와 외부환경 사이의 방어벽 역할을 하여 화학물질이나 자외선을 포함한 외부 환경오염 물질 및 미생물의 침입을 방어함으로써 주위환경으로부터 생체를 보호한다. 또한 피부는 멜라닌, 헤모글로빈(hemoglobin), 카로틴(carotene) 등에 의해 색이 결정되는데 이 중에서도 멜라닌이 가장 중요한 역할을 한다. 멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 것 이외에도 자외선 흡수 작

용, 자유 라디칼 소거제(free radical scavenger) 등과 같은 피부 보호 작용을 수행한다. 그러나 자외선의 과다 노출, 대기 오염, 스트레스 등과 같은 외부의 환경 변화에 의하여 멜라닌이 과다하게 생성되면 피부 내에서 색소 침착 현상을 일으켜 피부의 흑화(melanism) 또는 기미, 주근깨 등의 원인이 된다. 피부의 흑화는 내적 및 외적 요인에 대한 피부 세포의 반응에 의하여 발생하는 것으로, 대표적인 요인은 자외선 노출로 인한 것이다. 즉, 피부가 자외선에 노출되면 티로시나아제(tyrosinase)가 활성화되는데, 상기 티로시나아제가 피부조직에 존재하는 티로신에 작용하여 도파(DOPA) 및 도파퀴논(dopaquinone)을 생성시키는 산화 과정에 의하여, 피부 색소 세포인 멜라노사이트(melanocyte) 내의 멜라노좀(melanosome)에서 멜라닌이라는 중합체가 합성되며, 이러한 멜라닌이 피부의 각질 형성 세포인 케라티노사이트(keratinocyte)로 전달되고 각질화 과정에 의해 피부 표면에 도달하여 자외선으로부터 피부를 보호하게 된다. 따라서, 멜라닌은 우리 인체에 없어서는 안 되는 자외선 방어제이며, 또한 단백질, 지질, 핵산 등과 같은 생체성분을 변형시키는 다양한 라디칼을 제거하는 효과적인 자유 라디칼 소거제의 역할을 담당하고 있다. 그러나 멜라닌이 국소적으로 과다하게 합성되거나, 피부 병변 및 노화에 따른 피부의 생리 기능이 떨어지게 되면, 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 유발하게 된다. 상기한 바와 같이 피부 흑화의 원인과 기작이 밝혀지면서, 미백 화장품의 제조에 있어 피부 흑화 과정에 관여하는 효소인 티로시나아제의 활성 저해 효과를 갖는 물질들을 화장품에 배합하거나, 멜라닌 생성 과정에서 일부 반응을 저해함으로써 멜라닌의 생성을 감소시키는 방법이 일반적으로 사용되고 있다.

[0003] 일반적으로 알려진 미백 성분으로서, 코지산(Kojic acid), 알부틴(Arbutin) 등과 같은 티로시나아제 효소활성을 억제하는 물질, 하이드로퀴논(Hydroquinone), L-아스코르브산(L-Ascorbic acid) 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물이 있다. 이들은 멜라닌 색소의 합성을 저해함으로써, 피부 톤을 밝게 하여 피부 미백을 실현할 수 있을 뿐만 아니라, 자외선, 호르몬 또는 유전에 기인한 기미나 주근깨 등의 피부 과색소 침착증의 개선이 가능하다. 그러나 피부 적용 시, 자극과 발적 등의 안전성의 문제로 사용량의 제한이 있거나, 효과가 미미하여 실질적인 효과를 기대할 수 없는 문제점이 있다. 따라서, 생체에 안전하고, 유효성분이 안정하며, 무엇보다도 미백 효과가 우수한 물질의 개발이 절실히 요망되고 있다.

[0004] 생물전환법(biorenovation)이란 미생물이 가지고 있는 효소적 기능을 이용하여 전구물질로부터 원하는 산물을 생산 또는 제조하는 방법을 말하며, 미생물 발효 또는 효소처리 등의 생물학적 방법을 통해 물질의 구조적 변화를 유도시키는 방법을 통칭한다. 상기 변화로 인하여 유효성분의 함량이 증가하거나 흡수율이 개선되고, 새로운 기능성분이 생성된다는 사실이 새롭게 알려지고 있으며 이러한 기법을 이용한 소재 개발이 전 세계적으로 주목을 받고 있다.

[0005] 한편, 구기자(*Lycium chinense* Miller)는 가지과의 구기자속의 목본식물로 우리나라를 비롯한 중국, 대만, 일본, 유럽 등지에 자생하거나 재배되고 있는 생약재이다. 구기자는 열매, 잎, 뿌리를 부위별로 이용하며, 구기자 열매, 잎, 뿌리 등에는 베타인(betaine), 루틴(rutin), 쿠코아민 A(kukoamine A), 베타시토스테롤(-sitosterol)과 같은 기능성 성분이 다량 함유되어 있다.

[0006] 피부 미백 관련 선행기술로는 한국등록특허 제2111648호에 '왕벚나무 잎 생물전환추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 피부미백용 화장품 조성물'이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제2371360호에 '꿀, 오미자, 구기자 및 녹차 원적외선 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 보습 효과를 갖는 화장품 조성물'이 개시되어 있다. 하지만, 본 발명의 '구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물을 제공하고, 생물전환법을 통해 제조된 구기자 잎의 생물전환 추출물이 세포독성이 없으며, 구기자 잎 추출물에 대비하여 멜라닌의 생성 및 티로시나아제의 활성을 억제하는 효과가 현저한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또

는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 생물전환법을 통해 제조된 구기자 잎의 생물전환 추출물은 세포독성이 없으며, 구기자 잎 추출물에 대비하여 멜라닌의 생성 및 티로시나아제의 활성을 억제시키는 효과가 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 구기자 잎의 생물전환 추출물을 농도별로 B16F10 세포에 처리하였을 때, 세포 생존율(cell viability)을 확인한 결과이다. LC는 구기자 잎 추출물 처리군이고, LCBR은 구기자 잎의 생물전환 추출물 처리군이며, BJ는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) JD3-7 균주 현탁액 처리군이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone) 및 구기자 잎의 생물전환 추출물을 농도별로 B16F10 세포에 처리하였을 때, 멜라닌의 함량을 측정한 결과이다. LCBR은 구기자 잎의 생물전환 추출물 처리군이고, BJ는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) JD3-7 균주 현탁액 처리군이다. **는 α -MSH 단독 처리군 대비 본 발명의 구기자 잎의 생물전환 추출물 처리군(LCBR)의 멜라닌 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.01$ 이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone) 및 구기자 잎의 생물전환 추출물을 농도별로 B16F10 세포에 처리하였을 때, 티로시나아제 활성을 측정한 결과이다. LCBR은 구기자 잎의 생물전환 추출물 처리군이고, BJ는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) JD3-7 균주 현탁액 처리군이다. **는 α -MSH 단독 처리군 대비 본 발명의 구기자 잎의 생물전환 추출물 처리군(LCBR)의 티로시나아제 활성이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.01$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 용어 "생물전환" 또는 "생물전환법"은 미생물을 이용하여 기질 또는 전구물질로부터 인산화(phosphorylation), 글리코실화(glycosylation) 등의 구조적 변화를 유도한 화합물을 생산, 제조하는 방법을 의미한다. 상기 인산화는 인산화효소(kinase)의 작용에 의하여 인산기(phosphoric acid group, $\text{HOPO}(\text{OH})\text{O}^-$)가 기질의 수소 원자와 치환됨으로써 기질에 결합하는 것을 의미하며, 상기 글리코실화는 기질에 단당체, 다당체 등의 당류(glucoside)가 첨가되는 것을 의미한다.

[0015] 상기 구기자 잎의 생물전환 추출물은 구기자 잎 추출물에 미생물을 혼합하여 생물전환 반응을 유도하여 제조할 수 있으며, 바람직하게는 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[0016] (1) 구기자 잎에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0017] (2) 단계 (1)의 추출물을 여과하고 감압 농축하는 단계;

[0018] (3) 단계 (2)의 감압 농축한 추출물과 미생물을 혼합하여 생물전환 반응을 유도하는 단계;

[0019] (4) 단계 (3)의 생물전환 반응물을 원심분리한 후 상등액을 수득하는 단계.

[0020] 상기 단계 (1)에서 추출용매는 물, $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ 의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 물이지만 이에 한정하지 않는다. 상기 단계 (3)에서 미생물은 바람직하게는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주일 수 있으며, 더 바람직하게는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) JD3-7 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다

[0021] 상기 조성물은 멜라닌(melanin)의 생성 또는 티로시나아제(tyrosinase)의 활성을 억제하는 특징이 있다.

[0022] 한편, 미백 효과란, 자외선 노출, 호르몬 밸런스의 변화, 유전적 프로그램 등의 각종 요인에 의해 발생하는 거뿔한 피부나 기미, 주근깨, 다크서클을 개선 또는 방지하는 효과, 피부를 투명감 있는 아름다운 것으로 하는,

혹은 투명감 있는 아름다운 피부를 유지하는 효과, 피부의 칙칙함을 경감하여 윤기·팽팽함을 증가시키는 효과 등을 의도하고 있다. 일반적으로, 거뭇한 피부나 기미, 주근깨, 다크서클은 자외선에 의한 자극이나 호르몬 밸런스의 변화 등에 의해 멜라노사이트(melanocyte)가 자극되고, 그래서 생합성된 멜라닌 색소가 피부에 침착하여 발생한다고 알려져 있다. 따라서, 멜라닌의 생성을 억제할 수 있다면, 거뭇한 피부나 기미, 주근깨, 다크서클을 예방·개선하는 것이 가능하다.

- [0023] 본 발명의 화장료 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 중에서 선택되는 제형으로 제조되는 것이 바람직하다.
- [0024] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 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
- [0025] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라카칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드록카본, 프로판-부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 아세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 화장료 조성물은 유효성분 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 피부 미백 활성 성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 피부 미백 활성 성분으로는 코지산 및 이의 유도체, 알부틴, 아스코르브산 및 이의 유도체, 하이드로퀴논 및 이의 유도체, 레조르시놀, 사이클로알카논, 메틸렌디옥시페닐 알칸올, 2,7-디니트로인다졸 또는 덩굴굴 추출물, 쌀 추출물, 감초 추출물과 같은 식물 추출물 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 화장료 조성물은 형광물질, 살진균제, 굴수성 유발물질, 보습제, 방향제, 방향제 담체, 단백질, 용해 화제, 당 유도체, 일광차단제, 비타민, 식물 추출물 등을 포함하는 부형제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "멜라닌 색소 과다 침착(hyperpigmentation)"은 피부 또는 손·발톱의 특정 부위에서 멜라닌의 과도한 증가에 의해 다른 부위에 비해 검게 또는 어둡게 되는 것을 의미한다. 상기 멜라닌 색소 과다 침착 질환은 주근깨; 노인성 반점; 간반; 기미; 갈색 또는 흑점; 일광 색소반; 푸른 흑피증(cyanic melasma); 약물 사용 후의 과다색소 침착; 임신성 갈색반(gravidic chloasma); 및 상처에 의한 염증 또는 피부염으로 인한 과다 색소 침착; 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조

제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등이 해당되는데, 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 구기자 잎의 생물전환 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0038] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 구기자 잎의 생물전환 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취하는 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0039] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합체 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0040] 본 발명의 조성물을 건강 음료로 사용할 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마린, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린 또는 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g이다. 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물은 100중량부 당 0.01~0.1중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0041] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] [재료 및 방법]

[0043] 1. 추출물 제조

[0044] 건조 분쇄한 구기자(*Lycium chinense*) 잎 1g에 500mL의 증류수를 첨가하여 70℃에서 24시간 동안 2회 반복하여 추출하여 회수한 1차 추출물 및 2차 추출물을 혼합하여 5.0 μ m의 공극 크기를 갖는 필터(TOYO, Japan)로 여과하여 추출물을 수득하였다. 이후, 여과한 추출물에 2배의 에틸 아세테이트를 가하여 분획한 다음, 회수한 에틸 아세테이트 층을 감압 농축하여 시료(구기자 잎 추출물)를 제조하였다.

[0045] 2. 미생물 배양 및 생물전환 반응

[0046] 생물전환(Biorenovation)을 위한 미생물은 제주도 콩 재래 간장에서 분리한 바실러스 속 JD3-7(*Bacillus* sp. JD3-7, KACC 92346P) 균주를 분양받아 사용하였으며, LB 액체배지를 이용하여 30℃에서 18시간 동안 배양하였다. 이후, 4,000rpm에서 15분간 원심분리하여 회수한 균체를 2회 세척한 뒤 100mL의 PG 버퍼(50 mM Phosphate buffer, 2% Glycerin)에 현탁하였으며, 기질을 넣지 않고 바실러스 속 JD3-7 균체를 현탁한 대조군(BJ)과 구기자 잎 추출물 100mg에 바실러스 속 JD3-7 균체를 첨가한 실험군(LCBR) 플라스크를 30℃에서 72시간 동안 동일한 조건하에 생물전환 반응을 수행하였다. 반응 종료 후, 원심분리하여 펠렛과 상등액을 분리한 뒤, 펠렛을 제거한 상등액(이하 '구기자 잎의 생물전환 추출물'이라 함)을 -110℃에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

[0047] 3. 실험 재료 및 세포배양

[0048] α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone) 및 L-DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, B16F10 멜라노마 세포는 ATCC사(American Type Cell Culture, USA)에서 분양받아 사용하였다. B16F10 세포는 100 units/mL의 페니실린-스트렙토마이신과 10% FBS(fetal bovine serum)가 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, 3일마다 계대 배양하여 안정화한 후 실험에 사용하였다.

[0049] 4. 세포 독성

[0050] B16F10 세포에 대한 구기자 잎의 생물전환 추출물의 세포 독성은 MTT 분석을 이용한 세포 생존율 분석을 통해 측정하였다. 24-웰 플레이트에 1.0 $\times 10^4$ cells/mL의 농도로 분주하여 24시간 동안 전 배양한 뒤, 구기자 잎의 생물전환 추출물과 α -MSH(200nM)를 동시에 처리하여 72시간 동안 반응시켰다. 이후, 각 웰에 MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue) 시약을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 다음, 각 웰에 형성된 포르마잔 블루(formazan blue)에 DMSO를 첨가하여 용해한 뒤, ELISA 리더를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0051] 5. 멜라닌 생성 억제 활성

[0052] B16F10 세포(4.0 $\times 10^4$ cells/well)를 24시간 동안 전 배양한 후, 구기자 잎의 생물전환 추출물과 α -MSH(200nM)를 동시에 처리하여 72시간 배양하였다. 이후 세포를 PBS 버퍼(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 1회 세척하고, 0.5% trypsin-EDTA(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 처리하여 회수하였으며, 회수한 세포는 800rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 상등액을 제거한 펠렛에 1% 프로테아제 억제제(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 함유한 RIPA(radioimmunoprecipitation assay) 버퍼(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μ L를 첨가한 뒤, 용해 버퍼로 1시간 동안 용해시킨 후 13,000rpm에서 30분 동안 원심분리하여 펠렛을 분리하였다. 이후, 펠렛에 1N NaOH(10% DMSO) 500 μ L를 첨가하여 90℃에서 1시간 동안 가열한 후, 96-웰 플레이트에 옮겨 담아 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0053] 6. 티로시나아제 생성 억제 활성

[0054] B16F10 세포(4.0 $\times 10^4$ cells/well)를 24시간 동안 배양한 후 구기자 잎의 생물전환 추출물과 α -MSH(200nM)를 동시에 처리하여 72시간 배양하였다. 이후, 세포에 용해 버퍼로 1시간 동안 용해시킨 후, 원심분리하여 단백질을 상등액을 분리하였으며, 회수한 상등액의 단백질은 BCA 키트(Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였다. 정량한 단백질에 L-DOPA를 가하여 2시간 동안 암반응 시킨 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0055] 7. 통계처리

[0056] 모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며 그 결과는 평균값±표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 각 처리 구간의 유의성($p<0.01$)을 검증을 위해 분산분석(analysis of variance, ANOVA)후 student's t-test로 다중 비교를 실시하였다.

[0057] **실시예 1. 세포 생존율 분석**

[0058] α -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포에서 본 발명의 구기자 잎의 생물전환 추출물, 구기자 잎 추출물 및 바실러스 속 JD3-7 균주 현탁액의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT 분석을 수행하였다. 각 시료를 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 본 발명의 구기자 잎의 생물전환 추출물(LCBR)은 모든 처리농도에서 세포 생존율이 유지되었으며, 바실러스 속 JD3-7 균주 현탁액(BJ)도 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 반면에, 구기자 잎 추출물(LC)은 농도의존적으로 세포 독성을 나타내었다.

[0059] **실시예 2. 멜라닌 합성 억제 효과**

[0060] α -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포에서 본 발명의 구기자 잎의 생물전환 추출물의 멜라닌 합성에 대한 억제 효과를 확인하였다.

[0061] 그 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 구기자 잎의 생물전환 추출물 처리군(LCBR)에서 멜라닌 합성 억제 효과가 α -MSH 단독 처리군에 대비하여 통계적으로 유의미하게 감소된 것을 확인하였다.

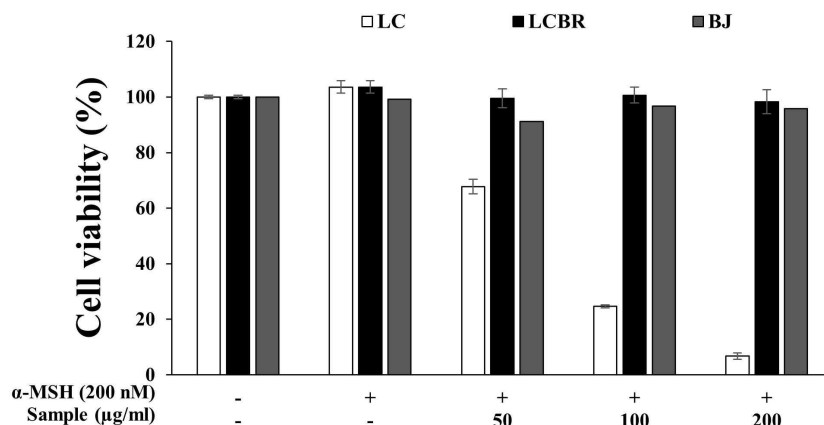
[0062] **실시예 3. 티로시나아제 활성 억제 효과**

[0063] α -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포에서 본 발명의 구기자 잎의 생물전환 추출물의 티로시나아제 활성에 대한 억제 효과를 확인하였다.

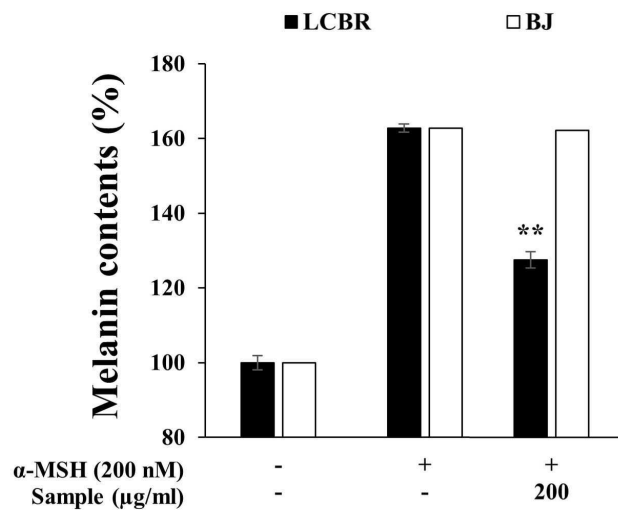
[0064] 그 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 구기자 잎의 생물전환 추출물 처리군(LCBR)에서 티로시나아제 활성 억제 효과가 α -MSH 단독 처리군에 대비하여 통계적으로 유의미하게 감소된 것을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

