



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0088832
(43) 공개일자 2011년08월04일

(51) Int. Cl.

A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0008531

(22) 출원일자 2010년01월29일

심사청구일자 2010년01월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이성준

서울특별시 강남구 청담동 삼성청담공원@ 104-402

이호정

서울특별시 강남구 대치동 900-33 401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

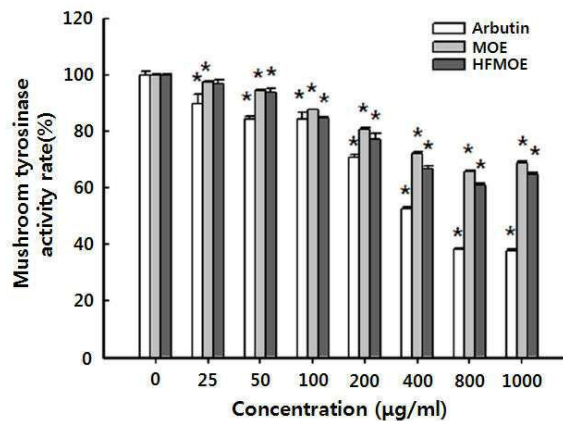
(54) 레몬밤 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 레몬밤 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 개선용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 자외선 조사된 레몬밤의 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부미백 개선용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 피부미백용 화장품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 레몬밤에 자외선을 조사시켜 플라보노이드의 함량이 증가된 레몬밤 추출물을 제조할 수 있다. 본 발명의 레몬밤 추출물은 일반 레몬밤 추출물에 비해 플라보노이드의 함량이 증가하여 항산화 효능이 높아졌으며, 베타 티로시나제의 활성을 억제함을 확인하였다. 또한 마우스 멜라닌 세포의 멜라닌 합성량을 감소시킬 뿐만 아니라 멜라닌 색소 형성에 관여하는 유전자 및 단백질의 발현을 동시에 억제하였다. 따라서 본 발명의 레몬밤 추출물은 피부미백 효과가 탁월하며, 이를 이용한 피부미백용 화장품 조성물의 활용이 기대된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

김경현

경기도 성남시 분당구 삼평동 봇들마을 907동 170
4호

노미란

경기도 평택시 장안동 319-2

김동우

강원도 춘천시 후평동 198-60 춘천바이오벤처플라
자 2층 2호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 107100033SB030

부처명 농림기술관리센터

연구관리전문기관

연구사업명 농림수산특정연구개발사업

연구과제명 레몬밤내 단일 물질의 피부 기능성 평가

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009년 05월 30일 ~ 2010년 05월 29일

특허청구의 범위

청구항 1

레몬밤 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 개선용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 레몬밤은 자외선 조사된 레몬밤인 것을 특징으로 하는 피부미백 개선용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 레몬밤 추출물은 알코올 용매추출을 이용하여 추출된 것을 특징으로 하는 피부미백 개선용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 레몬밤 추출물은 활성산소종을 제거시킴으로서 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 피부미백 개선용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 레몬밤 추출물은 멜라닌의 합성을 저해시킴으로서 피부미백 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 피부미백 개선용 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 화장품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 레몬밤 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 개선용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 자외선 조사된 레몬밤의 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부미백 개선용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 피부미백용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 레몬밤은 향기를 지닌 초본류 허브로써 향을 가미하거나 시각적으로 식욕을 돋우는 부향제의 용도로 사용되어 왔다 [de Sousa A.C, et al., Journal of Pharmacy and Pharmacology 2004, 56, 677-681]. 최근 들어서는 의약품으로서 우울증, 불면증, 두통, 불안증과 같은 비교적 가벼운 정신신경계 질환의 치료 등의 목적으로 한 아로마테라피 용도로도 사용되고 있다 [Tagashira M, Ohtake Y, Planta Med 1998, 64, 555-558]. 레몬밤 유효성분으로는 터르페노이드, 플라보노이드, 리그넨, 폴리페놀, 카로티노이드 등의 다양한 구조들이 밝혀져 있으며 [Herodez S, et al., Food chemistry 2009, 80, 275-282; Lamaison J.L, et al., Acta Helv 1991, 66(7), 185-188], 이들의 유효성에 대한 탐구가 다각도로 이루어지고 있으며 이들 성분들이 항산화제로 작용하고 [Ribeiro M, et al., Journal of Supercritical Fluids 2001, 21, 51-60], 면역보강 효과를 나타내며

[Pereira, et al., Neurochemical Research 2009, 34, 973-983], DNA 이상을 억제하는 등의 결과들이 보고되고 있다. 이러한 레몬밤을 비롯한 허브의 의학적 사용은 식품공전에 등록된 안전한 소재로서 부작용이 거의 없으면서도 질환의 개선효과가 뚜렷하다는 점에서 장점이 있다. 특히 항산화 효능이 있는 물질은 활성산소로부터 피부 보호효과가 있으며 여러 가지 식물성 화합물이 피부건강에 도움을 주는 것으로 알려져 있다 [Kim B, Jeong M, Food Sci Biotechnol 2003, 12, 631-638; Stefania Briganti C, et al., Pigment Cell Research 2003, 16, 101-110]. 피부건강 중 미백은 부가가치와 시장성이 가장 큰 분야로 천연물 허브를 이용한 새로운 미백소재의 개발은 중요한 기술분야이다.

[0003] 인간의 피부 색깔은 환경, 인종, 성별 등의 영향을 받으나 일반적으로 갈색의 멜라닌의 함량에 의해 결정된다. 멜라닌 색소는 사람의 피부색을 결정하는 가장 큰 인자이며, 자외선을 흡수 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는데 큰 역할을 한다 [Gertrude-E. Costin, et al., The FASED Journal 2001, 21, 976-994; Yuji Yamaguchi, et al., Journal of Biological Chemistry 2007, 282, 27557-27561]. 그러나 자외선 등 각종 환경요인 및 피부노화 등에 의해 피부의 기저층에 존재하는 멜라닌이 과다생성되면 피부 색소 침착이 증가된다 [Iwata M, et al., J Invest Dermatol 1990, 95, 9-15]. 이러한 피부색의 이상을 초래하는 질환은 기미(melasma), 주근깨(freckle), 검버섯(seborrheic keratosis) 등을 일으키며, 이러한 색소 침착은 미용적인 문제, 피부노화, 피부암과 같은 건강상의 문제를 야기하게 된다 [FR De Gruijl, European Journal of Cancer 1999, 35, 2003-2009; Bruce K. Armstrong, Anne Kricker, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2001, 63, 8-18]. 따라서 피부노화와 멜라닌 색소형성을 효과적으로 억제할 수 있는 안전한 천연물 피부건강 미백 소재를 개발하는 것이 중요한 문제이다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 자외선 조사된 레몬밤을 이용하여 레몬밤 추출물을 제조하는 경우, 항산화 활성을 갖으며, 멜라닌의 합성을 저해시켜 피부미백 효과를 갖을 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서 본 발명의 주된 목적은 항산화 활성 및 멜라닌 합성 저해 효과를 갖는 레몬밤 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 개선용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 레몬밤 추출물을 이용한 피부미백용 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 레몬밤 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 개선용 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 레몬밤은 자외선이 조사된 레몬밤인 것을 특징으로 한다. 본 발명에서는 레몬밤 추출물을 제조하기 전, 레몬밤 식물체에 10 ~ 30 일간 자외선을 조사한 후 추출과정을 진행하였으며, 구체적으로 UB-B 자외선을 20 일간 조사하였다. 본 발명의 레몬밤 추출물은 상기 자외선 조사에 의해, 일반 레몬밤 추출물에 비해 플라보노이드의 함량이 증가하였고, 티로시나제 활성 및 멜라닌 합성량이 더욱 감소하였으며, 이를 본 발명의 실시예에서 확인하였다.

[0009] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 레몬밤 추출물은 레몬밤으로부터 다양한 추출방법, 예컨대 용매추출(solvent extraction), 증류(hydrodistillation) 및 수증기 증류(steam distillation) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 용매추출을 이용하여 추출하는 것을 특징으로 한다. 또한 상기 용매추출은 바람직하게는 알코올 용매 추출을 이용하며, 보다 바람직하게는 70 ~ 90 %의 주정을 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 레몬밤 추출물은 활성산소종을 제거시킴으로서 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 레몬밤 추출물은 자외선이 조사된 레몬밤을 이용함으로써 항산화 성분인 플라보노이드의 함량을 증가시켰으며, 그로 인해 상기 추출물의 항산화 활성이 일반 레몬밤 추출물에 비해 더 높았다.

[0011] 구체적으로 본 발명에 따른 레몬밤 추출물은 본 발명의 실시예에서 확인한 바와 같이, DPPH의 라디칼 소거능을

측정하는 경우 대조군으로 사용된 비타민 E와 유사한 수준의 강력한 항산화 효능을 나타내었다. 따라서 본 발명의 레몬밤 추출물은 활성산소로부터 피부를 보호하므로 피부건강에 도움을 준다.

- [0012] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 레몬밤 추출물은 멜라닌의 합성을 저해시킴으로서 피부미백 효과를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 구체적으로 본 발명에 따른 레몬밤 추출물은 본 발명의 실시예에서 확인한 바와 같이, 피부 멜라닌 합성에 영향을 미치는 율속단계 효소인 버섯 티로시나제(mushroom tyrosinase)를 효과적으로 저해시켰으며, 또한 마우스의 멜라닌 세포에 본 발명의 레몬밤 추출물을 처리하는 경우 멜라닌 세포의 멜라닌 합성량을 감소시켰다. 또한 멜라닌 색소 형성에 관여하는 유전자 및 단백질의 발현을 측정하는 경우, 티로시나제 및 TRP(tyrosinase related protein)-1, TRP-2의 유전자 및 단백질의 발현을 동시에 억제하였다. 따라서 본 발명의 레몬밤 추출물은 멜라닌의 과다생성을 예방할 수 있으며, 멜라닌 과다생성으로 발생할 수 있는 여러 질환 예컨대, 기미, 주근깨, 검버섯 등을 예방하여 피부미백 효과를 나타낸다.
- [0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 화장품 조성물에 있어서, 상기 피부미백용 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바이로션 및 바디클렌저의 제형으로 구성된 그룹에서 선택된 제형임을 특징으로 한다. 상기 제형들은 당업계에 종래 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 추출물 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 레몬밤 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 레몬밤 추출물의 버섯 티로시나제의 활성평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 레몬밤 추출물 처리에 따른 마우스 멜라닌 세포의 독성평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 레몬밤 추출물 처리에 따른 마우스 멜라닌 세포의 티로시나제 활성평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 레몬밤 추출물 처리에 따른 마우스 멜라닌 세포의 멜라닌 함량 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 레몬밤 추출물 처리에 따른 마우스 멜라닌 세포의 멜라닌 합성에 관여하는 유전자들의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 증폭된 티로시나제 유전자의 양을 정량한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 증폭된 TRP-1 유전자의 양을 정량한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 증폭된 TRP-2 유전자의 양을 정량한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 레몬밤 추출물 처리에 따른 마우스 멜라닌 세포의 멜라닌 합성에 관여하는 단백질들의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 발현된 티로시나제 단백질의 양을 정량한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 발현된 TRP-1 단백질의 양을 정량한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 13은 발현된 TRP-2 단백질의 양을 정량한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0019] **실시예 1. 레몬밤 추출물 제조**

[0020] 본 발명의 레몬밤 추출물을 제조하기 위해, 먼저 레몬밤 식물체에 20 일간 자외선 조사(UB-B 자외선, $7 \text{ Wm}^{-2} \text{ s}^{-2}$)하여 플라보노이드 생성을 증가시켰으며, 스크리닝을 통해 가장 발현이 증가된 개체를 선별하였다.

[0021] 건조시킨 일반 레몬밤과 상기 자외선 조사하여 선별된 레몬밤 식물체의 잎 조직을 각각 채취하여 분쇄기로 분쇄하고 분쇄된 시료를 80 % 주정에 넣어서 24 시간 동안 환류시켜 추출하였다. 추출 후, 상층액을 $0.45 \mu\text{m}$ 의 여과지 2장(whatman#1)을 겹쳐서 여과한 후, 냉장보관 하였다. 상기의 추출방법을 총 3회에 걸쳐 상층액을 제조한 후, 조성물 용액을 증류기로 78°C 이상의 조건에서 용매를 제거하고 고형분을 수거하여 동결건조 하여 일반 레몬밤 추출물 및 자외선 처리한 레몬밤 추출물을 제조하였다. 상기 동결건조된 시료를 이후의 실험에 사용하였다.

[0022] **실시예 2. 플라보노이드 함량 측정**

[0023] 레몬밤 추출물의 플라보노이드의 함량을 측정하기 위해, 상기 실시예 1에서 추출한 각각의 추출물 0.1 ml에 80 % 주정 0.9 ml를 첨가한 후, 상기 혼합액 0.5 ml에 10 % aluminum nitrate 0.1 ml, 1 M potassium acetate 0.1 ml 및 80 % 주정 4.3 ml를 각각 첨가하였다. 이후, 상기 반응액을 상온에서 40 분간 반응시킨 후, 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 이때 표준물질로 퀘세틴(quercetin)을 사용하여 표준곡선을 작성하였으며, 이를 바탕으로 시료의 함량을 계산하였다. 상기 플라보노이드 함량 측정 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

[0024] 하기 표 1에 나타난 것과 같이, 자외선 조사한 레몬밤 추출물의 플라보노이드 함량이 일반 레몬밤 추출물에 비해 약 11 % 정도 증가하였음을 관찰할 수 있다. 플라보노이드는 항산화 성분이므로, 자외선 조사한 레몬밤 추출물은 항산화 효능이 높을 것으로 사료된다.

[0025] [표 1, 플라보노이드 함량]

추출물	총 플라보노이드 함량($\mu\text{g}/\text{mg}$)
일반 레몬밤 추출물(MOE)	74.3 ± 0.1
자외선 조사한 레몬밤 추출물(HFMOE)	82.8 ± 0.0

[0027] **실시예 3. DPPH 라디칼 소거 활성 평가**

[0028] 상기 실시예 1에서 추출한 레몬밤 추출물들의 항산화 효능을 알아보기 위해, 각각의 추출물들의 DPPH 라디칼 소거능 검사를 수행하였다.

[0029] 먼저, 각각의 추출물들을 100 % 주정에 용해시키고, $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액을 제조하였다. 이후, 상기 용해시킨 추출물을 각각 DPPH 용액에 첨가한 후, 37°C 항온수조에서 30 분간 반응시켰다. 반응이 완료된 후, DPPH-추출물 혼합액을 자외선-분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 추출물의 라디칼 소거 활성을 평가하였다. 이때, 비타민 E를 대조군으로 정하여 활성을 비교하였다. 상기 활성 평가 결과는 도 1에 나타내었다.

[0030] 도 1에 나타난 것과 같이, 각각의 레몬밤 추출물의 모든 농도에서 항산화 작용을 나타내었다. 특히, 자외선 조사로 플라보노이드가 과발현된 레몬밤 조성물(HFMOE)에서는 일반 레몬밤 추출물(MOE)보다 라디칼 소거작용이 증가하였으며, 양성 대조군으로 사용한 비타민 E와 유사한 수준의 강력한 항산화 효능을 나타내었다.

[0031] **실시예 4. 티로시나제(tyrosinase) 활성 평가**

[0032] 본 발명의 레몬밤 추출물에 따른 티로시나제 활성을 측정하기 위해, 버섯 티로시나제(mushroom tyrosinase)와 도파(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)를 기질로 사용하여 활성 평가를 수행하였다.

- [0033] 먼저, 도파(DOPA) 50 μ l, 0.03 % (w/v)의 티로신 용액(tyrosine solution) 및 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 6.8)의 혼합용매에 상기 실시예 1에서 추출한 레몬밤 추출물을 각각 농도별(각각 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml)로 첨가하고 25 μ l의 버섯 티로시나제(400 unit/ml, 0.1 M phosphate buffer)를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 20 분간 반응시킨 후, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과는 도 2에 나타내었다.
- [0034] 도 2에 나타난 것과 같이, 각각의 레몬밤 추출물을 100 μ l/ml 이상 첨가한 경우, 대조군(arbutin)에 비해 일반 레몬밤 추출물(MOE)과 자외선을 조사한 레몬밤 추출물(HFMOE)에서 첨가 농도에 의존적으로 티로시나제 활성이 억제되는 것을 관찰할 수 있다. 특히, HFMOE를 200 μ l/ml 첨가하는 경우 티로시나제 활성 억제 효과가 유의적으로 증가하였다.
- [0035] 티로시나제는 피부 멜라닌 합성의 율속단계 효소로서 이를 저해하면 피부세포 멜라닌 합성량을 조절할 수 있다. 티로시나제는 피부세포의 멜라노솜(melanosome) 내에서 티로신(tyrosine) 기질을 산화시켜 도파(DOPA)를 만드는 티로신 가수분해효소(tyrosine hydroxylase)를 활성화 시키며, 또한 도파를 다시 산화시켜 도파크롬(DOPA chrome)을 만드는 도파 산화효소(DOPA oxidase)를 활성화 시키는 두 가지 활성을 가지고 있으며, 티로시나제는 최종적으로 멜라닌 중합체로 생합성 된다. 따라서 본 발명의 레몬밤 추출물은 멜라닌 색소를 형성하는 티로시나제를 효과적으로 억제하므로 멜라닌 과다 생성에 의한 피부 색소 침착 등을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.
- [0036] **실시예 5. 멜라닌 세포의 세포배양 및 MTT 분석**
- [0037] 마우스의 B16-F1 멜라닌 세포(B16-F1 murine melanocytes, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)를 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)에 10 %의 FBS(fetal bovine serum)와 100 U/ml의 페니실린, 0.1 mg/ml의 스트렙토마이신을 첨가한 배지에 37 $^{\circ}$ C, 95 % air/5 % CO₂ 조건에서 배양하였다.
- [0038] 이후, MTT 분석을 수행하였다. 상기 MTT 분석은 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)가 포르마잔(formazan)으로 환원되는 원리를 이용하여 세포 독성을 판단할 수 있는 분석이다. 먼저, 상기 배양한 B16-F1 멜라닌 세포에 실시예 1에서 추출한 각각의 레몬밤 추출물을 농도별(각각 0, 50, 100, 200, 400 μ g/ml)로 72 시간 동안 처리한 후, MTT 용액을 첨가한 배양배지에서 분석하였다. 레몬밤 추출물을 처리한 멜라닌 세포에 MTT 용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 3 시간 동안 반응시킨 후, 생성된 포르마잔을 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 용해시켰다. 그 후, 용해된 용액을 570 nm에서 흡광도로 측정하여 세포 생존율(cell viability)을 측정하였다. 측정 결과는 도 3에 나타내었다.
- [0039] 도 3에 나타난 것과 같이, 일반 레몬밤 추출물(MOE)을 처리하는 경우 모든 농도에서 세포 독성이 없었으며, 자외선을 조사한 레몬밤 추출물(HFMOE)을 0 ~ 200 μ g/ml로 처리하는 경우 크게 독성이 없었으나 400 μ g/ml를 처리하는 경우 세포독성이 크게 증가하였다. 따라서 이러한 결과로 피부미백 효과가 있으면서 세포독성에 영향을 주지 않는 추출물의 처리농도 범위를 선별하였다.
- [0040] **실시예 6. 멜라닌 세포의 티로시나제(tyrosinase) 활성 평가**
- [0041] 마우스의 B16-F1 멜라닌 세포의 티로시나제의 활성을 평가하기 위해, 도파 산화 활성을 평가하여 측정하였다.
- [0042] 먼저, B16-F1 멜라닌 세포에 실시예 1에서 추출한 각각의 레몬밤 추출물을 3 일동안 처리한 후, PBS 완충용액(4 $^{\circ}$ C)으로 두 번 세척해주고 20 mmol/L Tris-0.1 %, Triton X-100(pH 7.5)를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 이후, 0.1 % L-도파 140 μ l, 0.1 M sodium phosphate(pH 6.0) 및 70 μ l의 효소액(버섯 티로시나제)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 그 후, 도파의 산화에 의해 도파크롬으로 바뀌면서 일어나는 색변화를 475 nm로 흡광도를 측정하여 티로시나제의 활성을 측정하였다. 흡광도는 2 시간 동안 일정한 시간간격으로 측정하였으며, 측정 시간 동안 흡광도 값이 일직선상으로 증가하는 구간을 정하여 효소활성을 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포의 티로시나제 활성을 기준으로 레몬밤 추출물을 처리한 세포의 효소활성을 백분율로 나타내어 상대적 효소활성을 측정하였다. 측정 결과는 도 4에 나타내었다.
- [0043] 도 4에 나타난 것과 같이, 각각의 레몬밤 추출물을 처리하였을 때, 처리한 농도가 증가할수록 티로시나제의 활성이 억제되었으며, 특히 자외선 조사로 플라보노이드 활성이 증가한 레몬밤 추출물을 100 μ g/ml를 처리한 세포에서 티로시나제 활성이 대조군에 비해 22 % 억제되었으며, 200 μ g/ml를 처리한 경우에는 티로시나제의 활성이 45 % 정도 억제됨을 확인하였다.

[0044] **실시예 7. 멜라닌 세포의 멜라닌 함량 측정**

[0045] 각각의 레몬밤 추출물 처리에 따른 B16-F1 멜라닌 세포의 멜라닌 함량 변화를 측정하기 위해, 실시예 6에서와 같이 레몬밤 추출물을 멜라닌 세포에 처리한 후 PBS 완충용액으로 세척하고 20 mmol/L Tris-0.1 %, Triton X-100(pH 7.5)를 첨가하여 세포를 용해하였다. 상기 세포용해물을 4 °C에서 5 분간 원심분리(12,000×g)시켜 펠렛(pellet)을 회수하였다. 회수한 펠렛을 1 N NaOH로 60 °C에서 1 시간 동안 용해시키고 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 합성 멜라닌을 사용한 표준곡선과 비교하여 멜라닌 함량을 측정하였으며, 세포내 멜라닌의 양은 샘플의 총 단백질 함량으로 보정하여 표준화하였다. 측정 결과는 도 5에 나타내었다.

[0046] 도 5에 나타낸 것과 같이, 각각의 레몬밤 추출물을 처리하였을 때, 멜라닌의 합성이 농도 의존적으로 억제되었으며, 특히 자외선을 처리한 레몬밤 추출물(HFMOE)을 100 µg/ml을 처리한 세포의 경우 멜라닌 합성량이 약 10 % 정도 감소하였으며, 200 µg/ml을 처리한 경우에는 멜라닌 합성량이 약 50 % 정도 감소하였다.

[0047] **실시예 8. RT-PCR을 이용한 유전자 발현 측정**

[0048] 각각의 레몬밤 추출물을 처리에 따른 B16-F1 멜라닌 세포의 멜라닌 합성에 관여하는 유전자의 발현량을 측정하기 위해 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용하였다.

[0049] 먼저, 실시예 6에서와 같이 레몬밤 추출물을 처리한 멜라닌 세포의 세포내 총 RNA를 TRIzol 용액법으로 추출하였다. 이후, cDNA를 합성하기 위해 mRNA의 2 µg으로부터 올리고 dT 프라이머(oligo dT primer)(Bioneer, Seoul, Korea)와 Superscript II 역전사효소(Invitrogen, USA)를 사용하여 역전사 반응을 실시하였다. 역전사 반응은 90 분 동안 42 °C에서 실시한 후, 70 °C에서 15 분간 반응을 수행하였다. 그 결과로 cDNA를 얻었으며, 상기 cDNA를 증폭시키기 위해 cDNA 시료, 10× PCR 완충용액, 2.5 mM dNTPs, 각각의 10 mM 정방향 및 역방향 프라이머, DNA 중합효소(DNA polymerase) 및 증류수를 혼합한 조건에서 cDNA 증폭을 수행하였다. 이후, PCR 반응 후, 반응물을 전기영동하여 증폭된 유전자의 양을 정량하였으며, β-액틴과의 상대적 비율로 표준화 하였다. 상기에서 사용된 프라이머들은 하기 표 2에 나타내었다. 상기 유전자 발현 측정 결과는 도 6, 7, 8 및 9에 나타내었다.

[0050] 도 6은 얻어진 각각의 유전자 반응물들의 전기영동 결과를 나타낸 것이며, 도 7 ~ 9는 증폭된 유전자의 양을 정량한 결과이다. 도 7에 나타낸 것과 같이, 일반 레몬밤 추출물(MOE)을 처리한 경우에는 티로시나제 유전자의 발현이 20 % 억제되었으며, 자외선을 조사한 레몬밤 추출물(HFMOE)을 200 µg/ml의 농도로 처리한 경우 티로시나제 유전자의 발현이 43 % 감소하였다. 도 8에 나타낸 것과 같이, HFMOE를 200 µg/ml의 농도로 처리하는 경우 TRP-1 유전자의 발현이 20 % 감소하였다. 또한 도 9에 나타낸 것과 같이, MOE를 처리하는 경우 TRP-2 유전자의 발현이 10 % 정도 감소하였으며, HFMOE를 200 µg/ml의 농도로 처리하는 경우 유전자의 발현이 20 % 정도 억제시키는 효과를 보였다. 티로시나제 유전자 발현의 경우, 일반 레몬밤 조성물을 처리한 것에 비해 자외선을 조사한 레몬밤 추출물을 처리하였을 때 유전자 발현 억제 효과가 높았으며, TRP-1 및 TRP-2 유전자의 경우에는 두 종류의 레몬밤 추출물의 유전자 발현 억제 효과가 유사하였다.

[0051] [표 2. 프라이머]

		프라이머(5' → 3')
티로시나제	정방향	GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT
	역방향	TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC
TRP-1	정방향	GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC
	역방향	AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT
TRP-2	정방향	GGA TGA CCG TGA GCA ATG GCC
	역방향	CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC
MITF	정방향	GTA TGA ACA CGC ACT CTC TCG A
	역방향	CTT CTG CGC TCA TAC TGC TC
β-액틴	정방향	TGC TGT CCC TGT ATG CCT CT
	역방향	AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG

[0052]

[0053] **실시예 9. 웨스턴 블롯(Western blot)을 이용한 단백질 발현 분석**

[0054] 각각의 레몬밤 추출물을 처리에 따른 B16-F1 멜라닌 세포의 멜라닌 합성에 관여하는 단백질의 발현량을 측정하기 위해 웨스턴 블롯 분석(western blot assay)을 이용하였다.

[0055] 실시예 6에서와 같이 레몬밤 추출물을 멜라닌 세포에 72 시간 동안 처리한 후, 상기 세포를 단백질을 분해효소 저해제(protease inhibitor cocktail, Sigma, St. Louis, MO USA)를 첨가한 RIPA 완충용액(10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1 % NP-40, 0.1 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)으로 용해시켰다. 이후, 얻어진 세포 용해물을 4 °C에서 5 분간 12,000×g으로 원심분리한 후, 단백질 키트(Bio-Rad protein kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다. 세포에서 추출한 단백질에 전기영동용 완충용액(sample buffer)을 첨가하고 100 °C에서 5 분간 가열한 후 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하였다. 전기영동 후, 분자량별로 분리된 단백질은 젤에서 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)에 전이시키고 니트로셀룰로스 막에서 정량하였다. 이때, 비특이적 반응을 최소화하기 위해 완충용액(phosphate buffered saline; PBS(pH 7.4), 0.1 % Tween 20, 5 % skimmed milk)을 1 시간 동안 상온에서 반응시킨 후, 1차 항체를 다음과 같이 희석하여 사용하였다. 항체 희석은 5 % 탈지우유(not-fat dry milk) 용액을 이용하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켜 희석하였으며, 희석 비율은 anti-티로시나제 항체 1:500, anti-TRP-1 항체 1:500, anti-TRP-2 항체 1:500, anti-MITF 항체 1:500, anti-alpha-tubulin 항체 1:500 였다. 반응 후, 세척 완충액(0.1 % Tween-20, PBS)으로 5 분간 3 ~ 4회 세척한 후 1:2000으로 희석시킨 2차 항체(HRP-conjugated anti-goat IgG antibody, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)용액으로 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 2차 항체 반응 후, ECL(enhanced chemiluminescence) 시약을 사용하여 분석 대상 단백질 밴드를 발색시켜 정량하였다. alpha-tubuline 발현량을 이용하여 각 시료의 단백질량을 표준화하였다. 측정 결과는 도 10, 11, 12 및 13에 나타내었다.

[0056] 도 10은 단백질들의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이며, 도 11 ~ 13은 발현된 단백질량을 정량하여 나타낸 것이다. 도 11에 나타낸 것과 같이, 일반 레몬밤 조성물(MOE)을 고농도(200 µg/ml)로 처리하였을 경우 티로시나제의 발현이 75 % 감소시켰으며, 자외선을 조사한 레몬밤 조성물(HFMOE)의 경우에는 저농도(100 µg/ml)에서는 67 %, 고농도(200 µg/ml)에서는 56 % 감소시켜 유의적으로 발현 억제 효과를 보였다. 도 12에 나타낸 것과 같이, 레몬밤 추출물들을 멜라닌 세포에 처리함으로써 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 TRP-1 단백질 합성이 감소하였다. 특히 일반 레몬밤 추출물(MOE)을 100 µg/ml 처리한 경우에는 77 % 단백질 발현이 감소되었으며, 자외선을 조사한 레몬밤 추출물(HFMOE)을 200 µg/ml 처리한 경우에는 73 % 억제시키는 효과를 나타내었다. 또한 도 13에 나타낸 것과 같이, 일반 레몬밤 추출물(MOE)을 100 µg/ml 처리한 경우에는 TRP-2 단백질의 발현이 40 % 감소되었으며, 자외선을 조사한 레몬밤 추출물(HFMOE)을 100 µg/ml 처리한 경우에는 76 %의 단백질 억제 효과를 나타내었다.

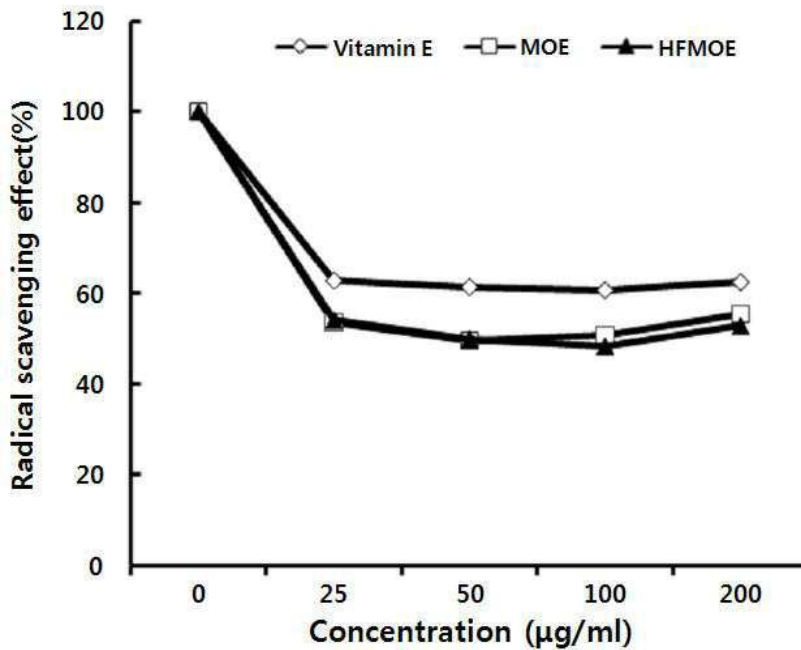
산업상 이용가능성

[0057] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 레몬밤을 이용하여 레몬밤 추출물을 제조할 수 있으며, 상기 레몬밤에 자외선을 조사시켜 플라보노이드의 함량이 증가된 레몬밤 추출물을 제조할 수 있다.

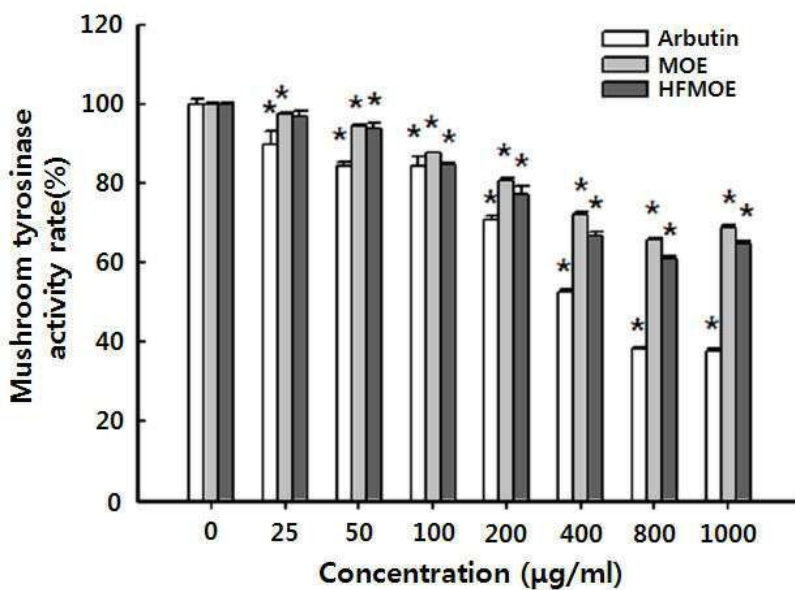
[0058] 상기 실시예에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 레몬밤 추출물은 일반 레몬밤 추출물에 비해 플라보노이드의 함량이 증가하여 항산화 효능이 높아졌으며, 버섯 티로시나제의 활성을 억제함을 확인하였다. 또한 마우스 멜라닌 세포의 멜라닌 합성량을 감소시킬 뿐만 아니라 멜라닌 색소 형성에 관여하는 유전자 및 단백질의 발현을 동시에 억제하였다. 따라서 본 발명의 레몬밤 추출물은 피부미백 효과가 탁월하며, 이를 이용한 피부미백용 화장품 조성물의 활용이 기대된다.

도면

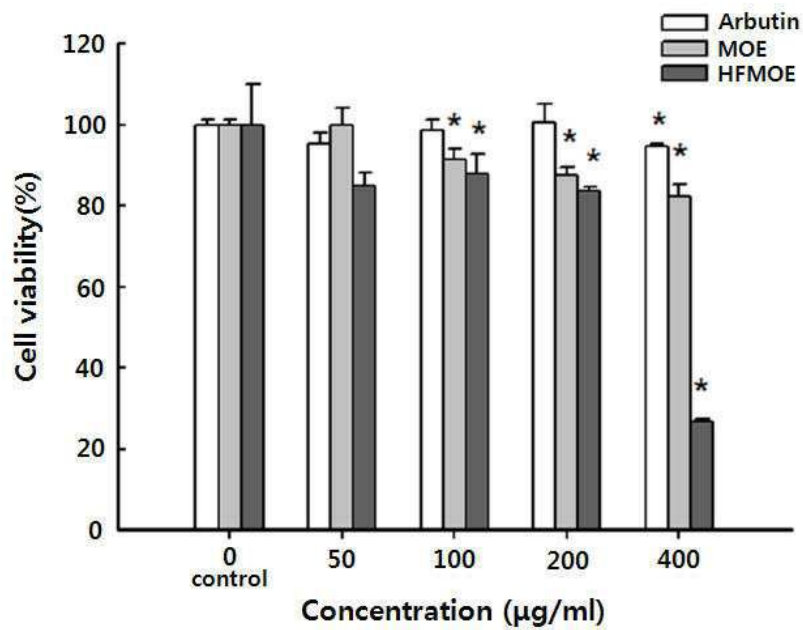
도면1



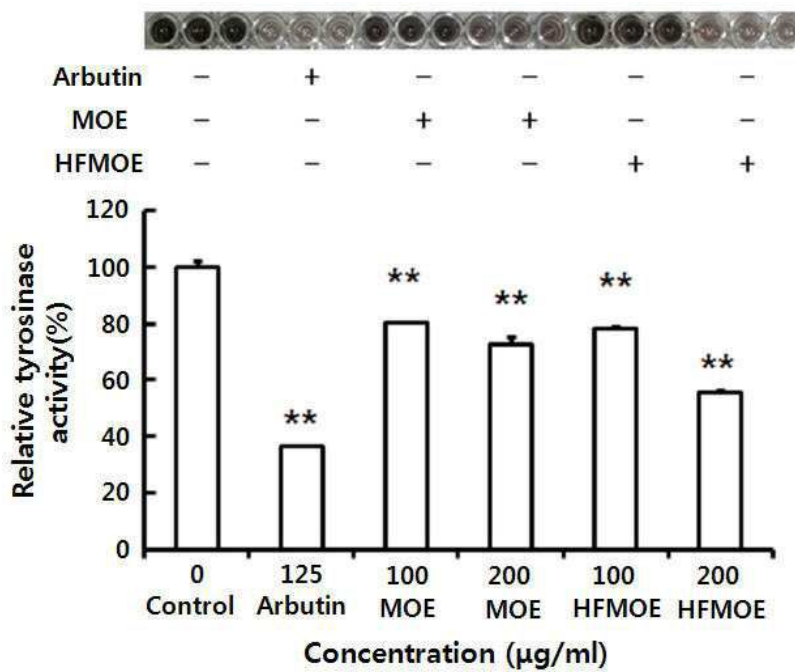
도면2



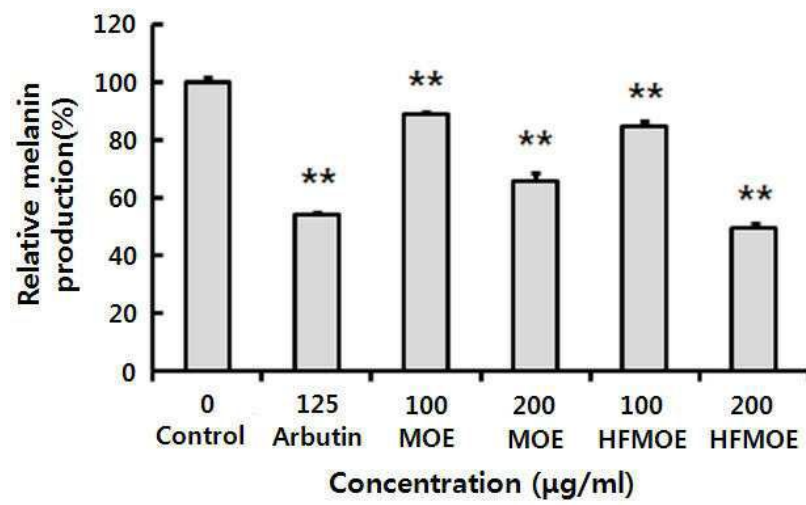
도면3



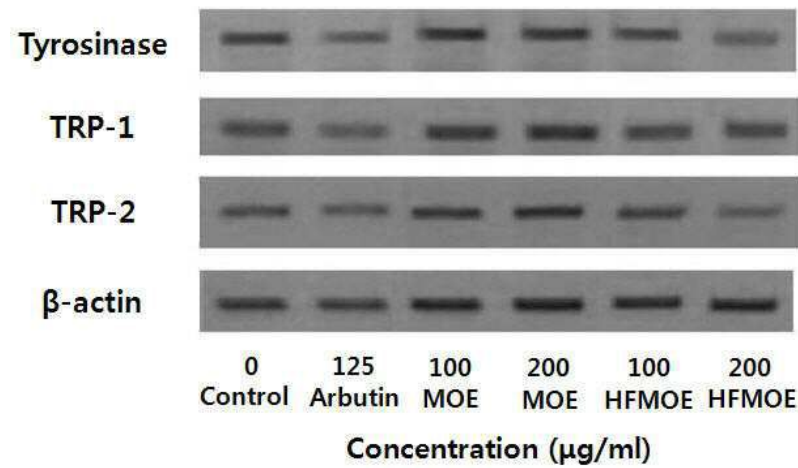
도면4



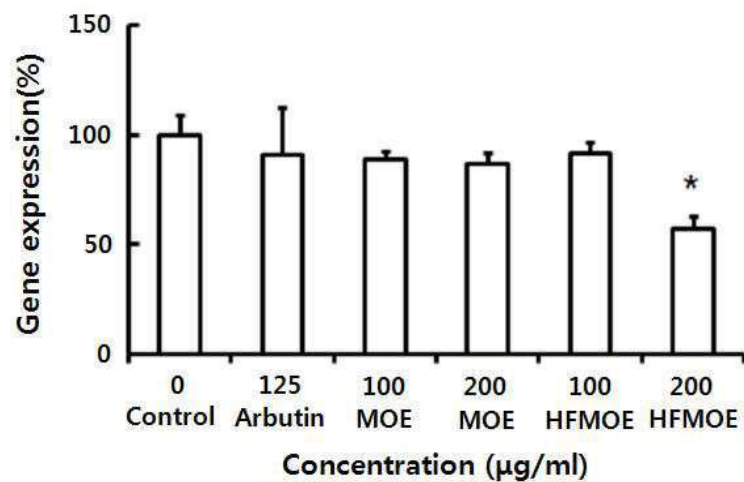
도면5



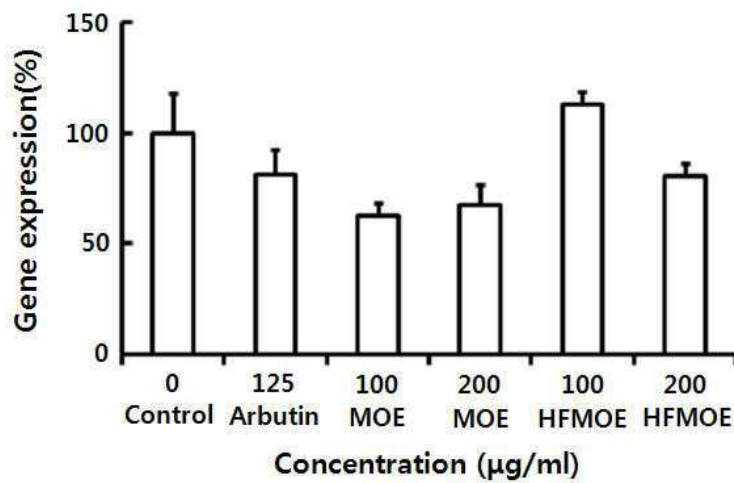
도면6



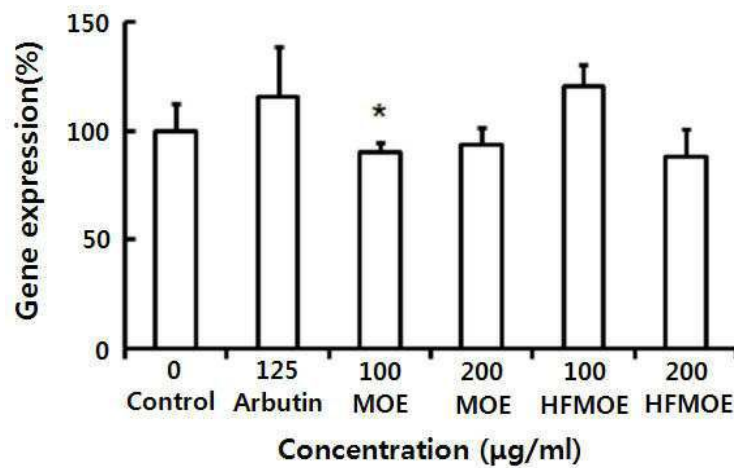
도면7



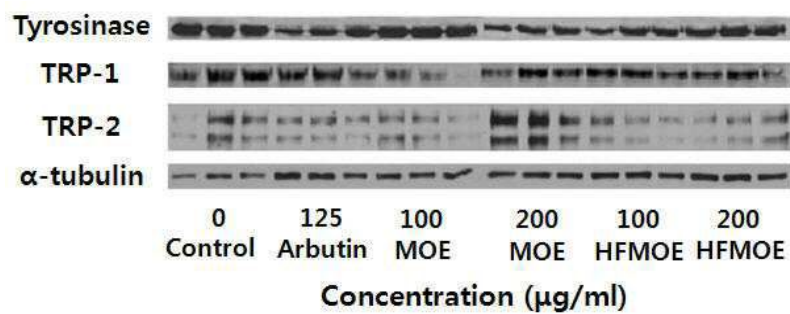
도면8



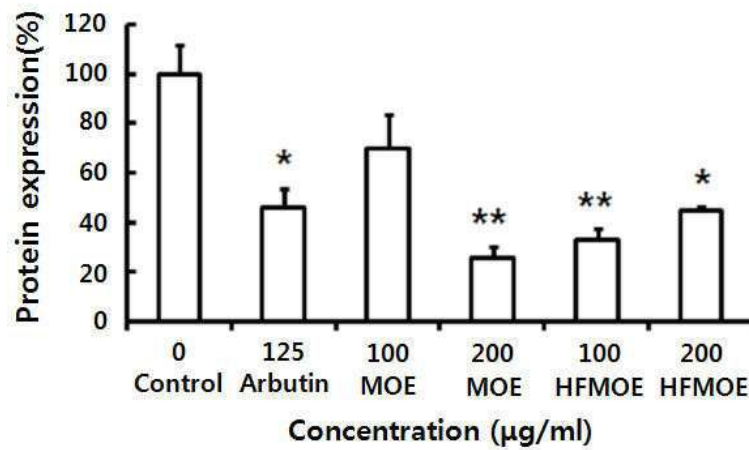
도면9



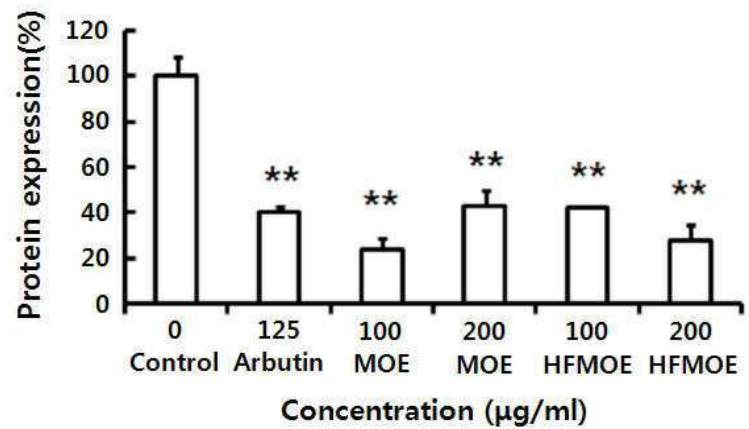
도면10



도면11



도면12



도면13

