

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0069743

(43) 공개일자 2025년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9794 (2017.01) A61K 36/899 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9794 (2017.08)

A61K 36/899 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0155370

(22) 출원일자 2023년11월10일

심사청구일자 2023년11월10일

(71) 출원인

국립순천대학교산학협력단

전라남도 순천시 중앙로 255(매곡동)

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

백소현

전라남도 순천시 중앙로 255 농생명과학과

김진숙

전라남도 순천시 원가곡길 75 양우내안애아파트  
103동 1706호

진중현

경기도 화성시 수노을1로 236, 604동 1003호

(74) 대리인

정성중

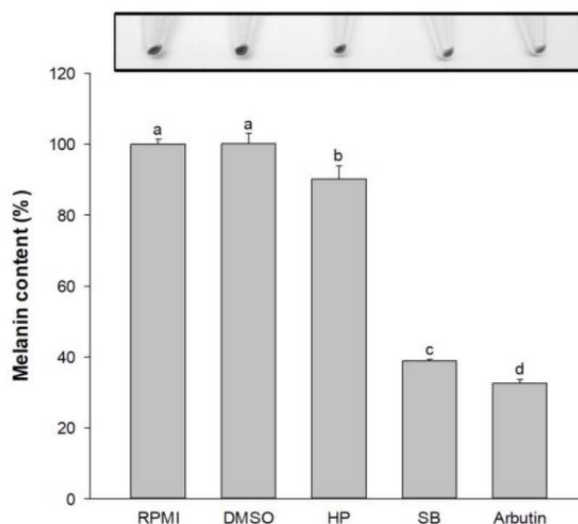
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 세복 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 또는 미백용 조성물

## (57) 요약

본 발명은 벼 싼품종인 세복 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화용 또는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분인 세복 추출물은 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 현저히 높으며, 항산화 및 멜라닌 생성 억제 효과가 매우 우수하다. 따라서, 본 발명의 세복 추출물은 항산화 및/또는 피부 미백을 위한 약학적, 식품, 화장품, 또는 피부 외용제 조성물로서 매우 유용하게 사용 가능하다.

## 대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

*A61P 17/00* (2018.01)  
*A61Q 19/00* (2013.01)  
*A61Q 19/02* (2013.01)  
*A61Q 19/02* (2013.01)  
*A23V 2002/00* (2023.08)  
*A23V 2200/318* (2013.01)  
*A23V 2250/21* (2013.01)  
*A61K 2800/522* (2013.01)  
*A61K 2800/782* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                    |
|-------------|------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1345361731                         |
| 과제번호        | 2020R1I1A3071908                   |
| 부처명         | 교육부                                |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                             |
| 연구사업명       | 이공학학술연구기반구축                        |
| 연구과제명       | 인삼 사포제닌 생합성 벼 식물세포의 바이오헬스케어 소재화 연구 |
| 기 여 율       | 80/100                             |
| 과제수행기관명     | 순천대학교                              |
| 연구기간        | 2023.03.01 ~ 2024.02.29            |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                 |
|-------------|---------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711200506                      |
| 과제번호        | 2021K1A3A1A61003040             |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                       |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                          |
| 연구사업명       | 전략형국제공동연구사업(R&D)                |
| 연구과제명       | 인산결핍 저항성 증진 유전자 활용 기후변화대응벼 분자유종 |
| 기 여 율       | 20/100                          |
| 과제수행기관명     | 세종대학교                           |
| 연구기간        | 2022.10.29 ~ 2023.10.28         |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

며 신품중 세복(Sebok)(기탁번호 KACC 98132P) 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화 또는 피부 미백용 화장품 조성물.

#### 청구항 2

며 신품중 세복(Sebok)(기탁번호 KACC 98132P) 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화 또는 피부 미백용 식품 조성물.

#### 청구항 3

며 신품중 세복(Sebok)(기탁번호 KACC 98132P) 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화 또는 피부 미백용 피부 외용제 조성물.

#### 청구항 4

며 신품중 세복(Sebok)(기탁번호 KACC 98132P) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 약학적 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 세복 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화용 또는 미백용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 새로운 며 품종인 세복 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화용 또는 미백용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 인간의 피부는 신체에서 가장 큰 기관이다. 미생물, 방사선, 유해물질, 체수분 손실 등 각종 내·외부 유해물질로부터 숙주를 보호한다. 멜라닌 생성은 자외선으로부터 피부를 보호하는 피부 조직의 방어 메커니즘이다. MITF(Microphthalmia-associated transcription factor)는 티로시나제(tyrosinase), 티로시나제 관련 단백질(tyrosinase-related protein; TRP)-1 및 TRP-2의 생산을 향상시키는 멜라닌 생성에 관여하는 전사 인자이다[1-3]. MITF의 발현은 또한 MAPK(mitogen-activated Protein Kinase)의 인산화(p)와도 연관되어 있다[4-6]. p-p38 MAPK 및 p-JNK의 활성화와 p-ERK 1/2의 억제제는 멜라닌 생성 과정에서 MITF 및 멜라닌 생성 관련 효소의 활성을 촉진한다[7-9]. 멜라닌 생성은 자외선으로부터 숙주 피부를 보호하지만, 피부 조직에 멜라닌이 과잉 생산되고 과도하게 축적되면 기미, 주근깨, 피부 변색, 어두운 피부 패치 및 염증 후 흑색증과 같은 피부 질환이 발생한다[1, 10-12].

[0003] 폴리페놀은 야채(예: 케일, 브로콜리, 당근), 곡물 및 씨앗(예: 귀리, 아몬드, 보리, 밀), 과일(예: 베리, 사과, 포도), 음료(녹차, 적포도주, 커피 등)에 존재하는 2차 대사물질이다. 이는 자외선 차단[13], 항바이러스[14], 상처 치유[15,16], 항염증, 및 항균 등 특성과 같은 잠재적인 건강상의 이점을 나타낸다. 폴리페놀의 가장 큰 그룹인 플라보노이드는 폴리페놀 구조를 포함하는 천연 2차 대사산물이다[17-19]. 플라보노이드는 항산화[20], 항라디칼[21], 항바이러스[22], 및 항염증[23] 활동과 같은 여러 가지 생물학적 건강상의 이점을 가진다.

[0004] 육종은 수확량 증가, 기후 변화에 대한 저항성, 해충 방제 및 질병 저항성을 목적으로 작물 품종을 개발하는 방법 중의 하나이다[24]. 본 발명자는 작물 품종을 개발하고자 육종을 다양하게 시도하였으며, 그 결과 호품(Hopum)과 비교하여 매우 높은 수준의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있는 신품중(세복, Sebok)을 개발하였으며, 그 신품중 버는 향산화 및 항멜라닌 생성 활성이 우수함을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

### 선행기술문헌

#### 비특허문헌

[0005]

- (비특허문헌 0001) 1. Chung, Y.C.; Lee, J.N.; Kim, B.S.; Hyun, C.-G. Anti-melanogenic effects of *Paederia foetida* L. extract via MAPK signaling-mediated MITF downregulation. *Cosmetics* 2021, 8, 22.
- (비특허문헌 0002) 2. Yu, F.; Lu, Y.; Zhong, Z.; Qu, B.; Wang, M.; Yu, X.; Chen, J. Mitf involved in innate Immunity by activating tyrosinase-mediated melanin synthesis in *Pteria penguin*. *Front. Immunol.* 2021, 12, 626493.
- (비특허문헌 0003) 3. Wang, Y.; Duan, T.; Hong, M.; Zhou, Y.; Huang, H.; Xiao, X.; Zheng, J.; Zhou, H.; Lu, Z. Quantitative proteomic analysis uncovers inhibition of melanin synthesis by silk fibroin via MITF/tyrosinase axis in B16 melanoma cells. *Life Sci.* 2021, 284, 119930.
- (비특허문헌 0004) 4. Chung, Y.C.; Kim, Y.B.; Kim, B.S.; Hyun, C.-G. Anti-melanogenic effects of bergamottin via mitogen-activated protein kinases and protein kinase B signaling pathways. *Nat. Prod. Commun.* 2019, 14, 1934578X19862105.
- (비특허문헌 0005) 5. Choi, H.; Yoon, J.-H.; Youn, K.; Jun, M. Decursin prevents melanogenesis by suppressing MITF expression through the regulation of PKA/CREB, MAPKs, and PI3K/Akt/GSK-3 cascades. *Biomed. Pharmacother.* 2022, 147, 112651.
- (비특허문헌 0006) 6. Alam, M.B.; Park, N.H.; Song, B.-R.; Lee, S.-H. Antioxidant potential-rich betel leaves (*Piper betle* L.) exert depigmenting action by triggering autophagy and downregulating MITF/tyrosinase in vitro and in vivo. *Antioxidants* 2023, 12, 374.
- (비특허문헌 0007) 7. Lee, M.S.; Chung, Y.C.; Moon, S.-H.; Hyun, C.-G. Lincomycin induces melanogenesis through the activation of MITF via p38 MAPK, AKT, and PKA signaling pathways. *J. Appl. Biol. Chem.* 2021, 64, 323-331.
- (비특허문헌 0008) 8. Uto, T.; Ohta, T.; Yamashita, A.; Fujii, S.; Shoyama, Y. Liquiritin and liquiritigenin induce melanogenesis via enhancement of p38 and PKA signaling pathways. *Medicines* 2019, 6, 68.
- (비특허문헌 0009) 9. Siddiqui, M.F.; Jeon, S.; Kim, M.-M. CRISPR/Cas9 system mediated SIRT7 gene knockout promotes melanogenesis by MITF via MAPKS and BMP activation in melanoma cells. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2023, 59, 122-131.
- (비특허문헌 0010) 10. Yurpolsky, D.; Lagunov, A.; Golyshev, A. Development of device for analysis problem skin zones of the circumpolar region population. *AIP Conf. Proc.* 2019, 2174, 020267.
- (비특허문헌 0011) 11. Zhao, X.; Fan, Z.; Zhu, C.; Zhang, W.; Qin, L. Melanin inspired microcapsules delivering immune metabolites for hepatic fibrosis management. *Mater. Today Bio.* 2023, 21, 100711.
- (비특허문헌 0012) 12. Lee, M.; Park, H.Y.; Jung, K.H.; Kim, D.H.; Rho, H.S.; Choi, K. Anti-melanogenic effects of kojic acid and hydroxycinnamic acid derivatives. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2020, 25, 190-196.
- (비특허문헌 0013) 13. Marabini, L.; Melzi, G.; Lolli, F.; Dell'Agli, M.; Piazza, S.; Sangiovanni, E.; Marinovich, M. Effects of *Vitis vinifera* L. leaves extract on UV radiation damage in human keratinocytes (HaCaT). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2020, 204, 111810.
- (비특허문헌 0014) 14. Chojnacka, K.; Skrzypczak, D.; Izydorczyk, G.; Mikula, K.; Szopa, D.; Witek-Krowiak, A. Antiviral properties of polyphenols from plants. *Foods* 2021, 10, 2277.
- (비특허문헌 0015) 15. Mssillou, I.; Bakour, M.; Slighoua, M.; Laaroussi, H.; Saghrouchni, H.; Ez-Zahra Amrati, F.; Lyoussi, B.; Derwich, E. Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: A review. *J. Ethnopharmacol.* 2022, 298, 115663.
- (비특허문헌 0016) 16. Orlowski, P.; Zmigrodzka, M.; Tomaszewska, E.; Ranoszek-Soliwoda, K.; Pajak, B.; Slonska, A.; Cymerys, J.; Celichowski, G.; Grobelny, J.; Krzyzowska, M. Polyphenol-conjugated bimetallic Au@AgNPs for improved wound healing. *Int. J. Nanomed.* 2020, 15, 4969-4990.

- (비특허문헌 0017) 17. Latos-Brozio, M.; Masek, A. Structure-activity relationships analysis of monomeric and polymeric polyphenols (quercetin, rutin and catechin) obtained by various polymerization methods. *Chem. Biodivers.* 2019, 16, e1900426.
- (비특허문헌 0018) 18. Nani, A.; Murtaza, B.; Sayed Khan, A.; Khan, N.A.; Hichami, A. Antioxidant and anti-inflammatory potential of polyphenols contained in mediterranean diet in obesity: Molecular mechanisms. *Molecules* 2021, 26, 985.
- (비특허문헌 0019) 19. Sarker, U.; Oba, S. Polyphenol and flavonoid profiles and radical scavenging activity in leafy vegetable *Amaranthus gangeticus*. *BMC Plant Biol.* 2020, 20, 499.
- (비특허문헌 0020) 20. Shen, N.; Wang, T.; Gan, Q.; Liu, S.; Wang, L.; Jin, B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem.* 2022, 383, 132531.
- (비특허문헌 0021) 21. Obluchinskaya, E.D.; Pozharitskaya, O.N.; Zakharov, D.V.; Flisyuk, E.V.; Terninko, I.I.; Generalova, Y.E.; Shikov, A.N. Biochemical composition, antiradical potential and human health risk of the Arctic edible brown seaweed *Fucus spiralis* L. *J. Appl. Psychol.* 2023, 35, 365-380.
- (비특허문헌 0022) 22. Badshah, S.L.; Faisal, S.; Muhammad, A.; Poulson, B.G.; Emwas, A.H.; Jaremko, M. Antiviral activities of flavonoids. *Biomed. Pharmacother.* 2021, 140, 111596.
- (비특허문헌 0023) 23. Khan, A.; Ikram, M.; Hahm, J.R.; Kim, M.O. Antioxidant and anti-inflammatory effects of citrus flavonoid hesperetin: Special focus on neurological disorders. *Antioxidants* 2020, 9, 609.
- (비특허문헌 0024) 24. Hickey, L.T.; Hafeez, A.N.; Robinson, H.; Jackson, S.A.; Leal-Bertioli, S.C.M.; Tester, M.; Gao, C.; Godwin, I.D.; Hayes, B.J.; Wulff, B.B.H. Breeding crops to feed 10 billion. *Nat. Biotechnol.* 2019, 37, 744-754.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 하나의 목적은 벼 신품종인 세복 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화용 또는 피부 미백용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 향산화용 또는 피부 미백용 조성물을 포함하는 약학적, 식품, 또는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 피부 미백용 조성물을 개체에 투여하여 개체의 피부 미백을 예방, 개선, 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0009] 하나의 양태로서, 본 발명은 벼 신품종인 세복 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화 또는 미백용 조성물에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명에 있어서, 벼 신품종인 “세복(Sebok)”은 자포니카 품종인 호품(Hopum) 벼를 모본으로 하고, IR64-DTY (IRRI, GID: 4537776)/ Matatag 1 (IRRI, GID: 4537724)// IR64-PUP1 (IRRI, GID: 4537756)의 3원교배체 자식 계통을 부분으로 하여 이를 인공교배시켜 얻어진 신규한 벼 품종으로, 대조품종인 호품 벼에 비하여 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량이 증가되고, 인산 무시비 조건에서 종자 생산성이 증가되었으며, 벼 통그로바이러 스병 저항성 유전자를 가지고 있는 자포니카 벼(*Oryza sativa* subsp. *japonica*)의 신품종이다(도 1 참조).
- [0011] 상기 “세복” 벼 품종은 국립농업과학원 농업유전자센터에 2022년 12월 19일자 기탁번호 KACC 98132P로 기탁된 신품종이며, 2022년 12월 12일자로 한국 특허출원 제10-202209172952호로 출원된 신품종이다.
- [0012] 보다 구체적으로, 상기 신품종 “세복”의 육성에 사용된 모본 품종인 호품 벼는 고품질의 자포니카 벼로, 국립

종자원 품종보호권 등록번호 제3299호의 벼 자원이다. 또한, 부분으로 사용된 IR64-DTY/ Matatag 1// IR64-PUP1의 3원교배체 자식 계통은, IR64-DTY를 모본으로 Matatag 1을 부분으로 하여 인공교배시켜 얻어진 F<sub>3</sub> 식물체를 다시 모본으로 하고 IR64-PUP1을 부분으로 하여 인공교배시켜 얻어진 F<sub>3</sub> 식물체로, 인디카 벼이다.

- [0013] 본 발명의 벼 신품종 '세복'의 종자는 항산화 활성을 가지는 기능성 물질인 플라보노이드와 폴리페놀을 높은 수준으로 함유하고 있는데, '세복' 종자의 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량은 각각  $14.1 \pm 1.5$  mg QE/g ext. 및  $21.6 \pm 1.2$  mg TAE/g ext.으로 대조품종인 호품 벼의 종자와 비교하여, 총 플라보노이드 함량은 3.0 내지 8.0배, 바람직하게는 4.55배, 총 폴리페놀 함량은 0.5 내지 2.0배, 바람직하게는 1.73배 높은 것이 특징이다. 뿐만 아니라, '세복' 종자의 항산화 기능성 물질 함량은 유색미인 적진주(국립종자원 품종보호권 등록번호 제318호)의 종자보다 총 플라보노이드 함량은 1.37배, 총 폴리페놀 함량은 1.89배 높다.
- [0014] 본 발명에 있어서, “세복 추출물”은 세복 쌀의 추출물일 수 있다. 상기 “쌀”은 벼의 종자를 의미한다. 이는 종자인 경우, 미도정, 반도정(현미), 전도정(백미) 여부를 불문하고 모든 상태를 포함한다.
- [0015] 상기 세복 추출물은 세복의 종자를 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간 동안 추출, 분획하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 세복 추출물은 물 또는 다양한 유기용매 등으로 추출하여 수득할 수 있다. 이때, 사용되는 유기용매는 반드시 이로 제한되는 것은 아니나, 물, 극성용매 또는 비극성용매를 사용할 수 있다. 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(에탄올, 메탄올, 프로판올 또는 부탄올 등), 이들의 혼합용매 등을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 물, 에탄올, 메탄올, 또는 이의 용매 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 추출물을 수득하기 위한 방법은 특별히 제한되지 않으며, 열수 추출, 냉침 추출, 초음파 추출, 또는 환류 냉각 추출 방법 등을 이용할 수 있다. 바람직하게는 초음파 추출을 사용할 수 있다.
- [0018] 상기 초음파 추출은 진동수가 1초에 20,000번 이상인 진동소자를 사용하여 각종 천연소재로부터 유용성분을 물리적인 힘을 가해 상온에서 추출하는 방법으로, 용매 추출, 식물성 오일 추출 또는 수증기 증류 추출과 달리 상온에서 천연소재가 함유하고 있는 유효성분을 파괴하지 않고 고농도로 추출할 수 있는 장점이 있다.
- [0019] 상기 수득한 세복 추출물은 이에 제한되지는 않으나, 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하여 감압농축될 수 있다. 또한 감압농축 후 이에 제한되지는 않으나, 동결건조, 감압건조, 진공건조, 비등건조, 또는 분무건조를 통해 건조될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 세복 추출물은 종래의 자포니카 품종인 호품(Hopum) 추출물에 비하여 총 폴리페놀 함량이 0.5 내지 2.0배 높고, 총 플라보노이드 함량이 3.0 내지 8.0배 높게 함유하고 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 세복 추출물은 건조중량 기준으로 폴리페놀을 20 내지 23 mg TAE/g으로 함유하고 있으며, 플라보노이드를 12 내지 16 mg QE/g 함유하고 있다.
- [0022] 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량%, 0.01 중량%, 0.05 중량%, 0.1 중량%, 0.5 중량%, 1.0 중량%, 3 중량%, 5 중량%, 10 중량%, 20 중량%, 30 중량%, 40 중량%, 50 중량%, 60 중량%, 70 중량%, 80 중량% 및 90 중량% 중 선택되는 임의의 두 수치의 범위로 표시되는 세복 추출물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 약 0.001 중량% 내지 약 95 중량%, 약 0.01 중량% 내지 약 90 중량%, 약 0.01 중량% 내지 80 중량%, 약 0.01 중량% 내지 70 중량%, 약 0.01 중량% 내지 60 중량%, 약 0.01 중량% 내지 약 50 중량%, 약 0.01 중량% 내지 약 30 중량%, 약 0.05 중량% 내지 25 중량%, 약 0.05 중량% 내지 15 중량%, 약 0.05 중량% 내지 5 중량%, 약 0.1 중량% 내지 약 20 중량%, 약 1.0 중량% 내지 10 중량%, 약 1.0 중량% 내지 약 5 중량%, 약 5 중량% 내지 약 50 중량%, 약 5 중량% 내지 약 40 중량% 또는 약 10 중량% 내지 약 50 중량%의 세복 추출물을 포함할 수 있다.
- [0023] 하나의 구체적 예로서, 본 발명의 세복 추출물은 종래 벼 품종인 호품 추출물에 비하여 현저히 증가된 ABTS 라디칼 소거 능력 및 VCEAC를 나타내어 항산화 활성이 우수하였다. 또는 형질전환으로 프로토포낙사디올을 생합성하는 다른 벼로부터 얻어지는 쌀 및 이의 추출물에 비하여 ABTS 라디칼 소거 및 VCEAC의 비율이 현저히 더 높아 항산화 효과가 우수하였다.
- [0024] 또 하나의 구체적 예로서, 본 발명의 세복 추출물은 종래 벼 품종인 호품 추출물에 비하여 멜라닌 합성 효소인 티로시나제의 발현 및 생성을 현저히 억제할 뿐만 아니라 유멜라닌 합성에 관여하는 주요 효소인 TRP-1 및 TRP-

2의 발현을 현저히 억제하였다.

- [0025] 또 하나의 구체적 예로서, 본 발명의 세복 추출물은 종래 벼 품종인 호품 추출물에 비하여 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2의 생성을 조절하는 멜라닌 합성에 중요한 전사 인자이면서 MAPK 및 PI3K/Akt 관련 단백질의 인산화와 관련된 MITF의 발현을 현저히 억제하였다.
- [0026] 또 하나의 구체적 예로서, 본 발명의 세복 추출물은 종래 벼 품종인 호품 추출물에 비하여 p-p38 MAPK(멜라닌 생성 프로모터)의 발현을 유의하게 하향 조절하고 p-ERK 1/2 및 p-Akt(MITF 분해 유도제)의 발현을 상향 조절하여 항멜라닌 생성을 강화하였다.
- [0027] 또 하나의 구체적 예로서, 본 발명의 세복 추출물은 종래 벼 품종인 호품 추출물에 비하여 멜라닌 생성을 현저히 억제하였으며, 그에 따라 세포성 멜라닌 분포와 멜라닌 함유 세포 수를 감소시켜 멜라닌-a 세포의 형태학적 외관에도 영향을 주었다.
- [0028] 따라서, 본 발명의 새로운 벼 품종인 세복의 추출물은 항산화용 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 새로운 벼 품종인 세복의 추출물은 멜라닌 생성을 예방, 개선, 및 치료하는 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다. 상기 멜라닌 생성을 예방, 개선, 및 치료하는 조성물은 달리 말하면 피부 미백용 조성물일 수 있다.
- [0031] 하나의 구체적 양태로서, 본 발명의 상기 항산화 또는 미백용 조성물은 항산화 또는 피부 미백을 위한 약학적 조성물일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 하나의 구체적 예로, 본 발명의 약학적 조성물은 경구형 제형으로 경구 투여 방식으로 사용될 수 있다. 또 하나의 구체적 예로, 본 발명의 약학적 조성물은 피부에 직접 도포 또는 산포하는 등의 방법에 의해 사용될 수 있다.
- [0033] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 담체를 추가로 포함하여 제조할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0035] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하여 피부세포의 멜라닌 생성을 억제하거나 피부의 미백을 증진하여 피부 색상을 정상 또는 정상에 가깝게 조절할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸트, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 방부제, 수화제, 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제와 같은 보

조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.

- [0038] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 미백제를 병행하여 투여할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 경구적으로 또는 정맥내, 피하, 비강내 또는 복강내 등과 같은 비경구적으로 사람과 동물에게 투여될 수 있다. 경구 투여는 설하 적용도 포함한다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육내 주사 및 정맥 주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다.
- [0041] 다른 하나의 구체적 양태로서, 본 발명의 상기 항산화 또는 미백용 조성물은 항산화 또는 피부 미백을 위한 식품 조성물일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 식품 조성물은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있으며, 기능성 식품, 건강기능식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다.
- [0043] 본 발명의 용어 "기능성 식품"은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0044] 또한, 본 발명의 용어 "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 세복 추출물을 식품 조성물로 사용하는 경우, 이들 성분 이외에 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물은 포도당 및 과당 당의 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 올리고당 등의 디사카라이드, 텍스트린 및 사이클로텍스트린 등의 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 이의 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 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0047] 본 발명의 식품이 음료일 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0048] 상기 식품은 상술한 성분 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일주스, 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0050] 또 다른 하나의 구체적 양태로서, 본 발명의 상기 항산화 또는 피부 미백용 조성물은 항산화 또는 피부 미백을 위한 화장료 조성물일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 화장료 조성물은 유효성분으로서의 상기 세복 추출물 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 첨가되는 성분, 예컨대 항산화제, 안정화제, 가용화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 및 담체를 추가로 첨가할 수 있다.

- [0052] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 영양 크림, 수렴 화장수, 유연 화장수, 로션, 에센스, 영양젤 또는 마사지 크림의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라가칸트 검, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 가용화제 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.
- [0056] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 검등이 이용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 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.
- [0059] 또 다른 하나의 구체적 양태로서, 본 발명의 상기 향산화 또는 피부 미백용 조성물은 향산화 또는 피부 미백을 위한 피부 외용제 조성물일 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 피부 외용제 조성물은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유하여 제형화될 수 있다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로서, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는, 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이, 팩 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 포말(foam)의 형태로 또는 압축된 추진체를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0061] 또한, 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물은 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 상기 보조제는 화장품학 또는 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입된다.
- [0063] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 피부가 색소침착된 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 피부의 과다색소침착을 예방, 개선, 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0064] 본 발명에서 상기 피부가 색소침착된 개체는 피부에 멜라닌 색소가 정상에 비하여 과도하게 분비되어 피부에 검은 반점이 형성된 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 세복 추출물을 포함하는 약학적 조성물을 피부가 과다색소침착된 개체, 구체적으로 멜라닌 색소 농도가 정상과 대비하여 높거나 높을 가능성이 있는 개체 또는 피부 미백이 필요한 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.

- [0065] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 피부가 색소침착된 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 치료 방법은 세복 추출물을 포함하는 약학적 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0069] 한편, 본 발명의 유효성분인 세복 추출물은 세포독성이 없으므로, 상기한 약학적, 식품, 화장품, 또는 피부외용제 조성물의 유효성분으로 안전하게 사용 가능하다.

### 발명의 효과

- [0070] 본 발명의 벼 신품종인 세복의 추출물은 일반 벼 및 종래 우수한 품질로 알려진 자포니카 품종인 호품 벼에 비하여 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 현저히 높으며, 항산화 및 멜라닌 생성 억제 효과가 매우 우수하다. 따라서, 본 발명의 세복 추출물은 항산화 및/또는 피부 미백을 위한 약학적, 식품, 화장품, 또는 피부 외용제 조성물로서 매우 유용하게 사용 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

- [0071] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 새로운 신품종 벼 “세복”의 육종계보도를 나타낸 그림이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 총 폴리페놀 함량 측정을 위한 탄닌산의 검량선을 나타낸 그림이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 총 플라보노이드 함량 측정을 위한 케르세틴의 검량선을 나타낸 그림이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴의 농도에 따른 ABTS 라디칼 소거 활성을 비교한 그림이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 아스코르브산(비타민 C)의 표준곡선이다. 상기 표준곡선은  $3.9065 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서 선형이었다. 회귀 방정식은  $y = 3.7463x + 3.3284$  ( $R^2 = 0.9968$ )이며, y는 소거 활성 값(%)이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴의 초기 ABTS<sup>•+</sup> 농도를 50% 감소시키는 데 필요한 농도(IC<sub>50</sub>)를 비교한 그림이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴의 비타민 C 등가 항산화 능력(VCEAC)을 비교한 그림이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴에 의한 melan-a 세포의 생존율을 비교한 그림이다.
- 도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴에 의한 세포 내 멜라닌 함량을 비교한 그림이다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴에 의한 세포의 멜라닌 분비율(%)을 비교한 그림이다.
- 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴을 처리한 세포에 대한 L-DOPA 염색 결과이다. 반점은 멜라닌 함유 세포이다(빨간색 화살표). HP, SB 및 알부틴 농도는 100ug/mL였다. DMSO 농도는 0.1%였다.
- 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴이 세포의 티로시나제 활성에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.
- 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴을 melan-a 세포에 처리하고 Fontana-Masson 염색 방법을 사용하여 확인된 멜라닌 함유 세포의 수를 관찰한 그림이다. 멜라닌 함유

melan-a 세포는 현미경으로 1000개 세포를 관찰하여 계수하였다. 빨간색 화살표는 멜라닌 함유 melan-a 세포를 나타낸다. HP, SB 및 알부틴 농도는 100  $\mu$ g/mL였다. DMSO 농도는 0.1%였다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴이 melan-a 세포의 형태학적 외관에 미치는 영향을 관찰한 그림이다. HP, SB 및 알부틴 농도는 100  $\mu$ g/mL였다. DMSO 농도는 0.1%였다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴이 melan-a 세포의 멜라닌 생성 매개체의 mRNA 발현에 미치는 영향 수준을 나타낸 그림이다. (a) MITF, (b) 티로시나제, (c), TRP-1 및 (d) TRP-2의 발현 수준. HP, SB 및 알부틴 농도는 100  $\mu$ g/mL였다. DMSO 농도는 0.1%였다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴이 멜라닌 생성 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 확인한 그림이다. HP, SB 및 알부틴 농도는 100  $\mu$ g/mL였다. DMSO 농도는 0.1%였다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 세복 추출물, 호품 추출물, 및 양성대조군인 알부틴이 MAPK 및 PI3K/Akt 신호 전달 경로에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 확인한 그림이다. HP, SB 및 알부틴 농도는 100  $\mu$ g/mL였다. DMSO 농도는 0.1%였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

### [0074] 실시예 1: 벼 품종 “세복(Sebok)의 육종

[0075] 고품질 및 다중 스트레스 저항성 벼 품종을 확립하기 위해 우수한 품질로 알려진 엘리트 자포니카 품종인 호품(Hopum)에 *Pup1*(phosphorus uptake), QTL(Quntitative trait locus) 및 *RTSV*(rice tungro virus resistance) 유전자를 도입하였다. 육종 접근법에는 몇 가지 주요 단계가 포함되어 있다. 먼저, IR64-DTY(IRRI, GID 4537776)와 Matatag 1(IRRI, GID 4537724) 사이의 교배에서 파생된 F<sub>3</sub> 개체군 중에서 유망 개체인 15F1001-4-3(IR64-DTY+RTSV)을 선택하였다. 다음으로, 이 개체는 IR64-Pup1(IRRI, GID 4537756)과 교배하였다. 마커 보조 선택을 사용하여 Pup1 및 RTSV 유전자를 보유하는 개체를 식별하였다. 벼 육종계통 개발 과정에서 탈곡된 벼에 색선(colored line)이 관찰되었다. 추가 분석에서는 호품에 비해 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 더 높은 것으로 나타났다. BC<sub>2</sub>F<sub>7</sub>에서 '세복'이라는 벼 품종이 개발되었다(도 1 참조).

[0076] 상기 새로이 개발된新品种 “세복” 벼는 국립농업과학원 농업유전자센터에 2022년 12월 19일자 기탁번호 KACC 98132P 기탁되었다.

### [0078] 실시예 2: 시약 및 재료의 준비

[0079] ABTS는 Roche(Basel, Switzerland)에서 구입하였다. 알부틴, 과황산칼륨, TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), L-DOPA, Folin-Ciocalteu 페놀 시약, NaOH 및 포름알데히드는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 탄닌산과 케르세틴은 천연물과학기술원(안성, 한국)에서 구입하였다. RPMI-1640 배지와 소태아 혈청(FBS)은 Gibco™Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA에서 구입하였다. EZCyTox Cell Viability Kit는 DoGenBio(대한민국 서울)에서 구입하였다. 페니실린/스트렙토마이신(P/S)은 Hyclone Laboratories, Inc(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Triton X-100은 R&D Systems, Inc.(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Bradford 시약은 WELGENE, Inc.(대한민국 경상북도)에서 구입하였다. TRI 시약™은 Invitrogen(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Power cDNA 합성 키트와 RealMOD™GreenW2 2X qPCR mix는 Intron Biotechnology(대한민국 성남시)에서 구입하였다. Fontana-Masson 키트는 BIOGNOST, Ltd.(크로아티아 자그레브)에서 구입하였다. RIPA(Radioimmunoprecipitation assay buffer)은 GeneAll Biotechnology(대한민국 서울)에서 구입하였다. Protease Inhibitor Cocktail Kit 5는 (주)바이오메디컬사이언스(대한민국 서울)에서 구입하였다. MITF(97800S),

인산화된(p)-ERK 1/2(4377S), p-p38 MAPK(4511S), p-Akt(9271S) 및 ERK 1/2(4695S)에 대한 1차 항체는 Cell Signaling(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 티로시나제(sc-20035), TRP-1(sc-166857), TRP-2(sc-74439), Akt(sc-5298), p38 MAPK(sc-7972) 및 GAPDH(sc-32233)에 대한 1차 항체 )는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. Goat anti-rabbit IgG(H+L)-HRP(SA002-500)는 GenDEPOT(Baker, TX, USA)에서 구입하였고 m-IgG BP-HRP(sc-516102) 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, 미국 텍사스)에서 구입하였다. Charity™Western ECL 기질, ChemiDoc Imaging System 및 CFX Connect Real-Time PCR 시스템은 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)에서 구입하였다. SpectraMax® ABS Plus 마이크로플레이트 판독기는 Molecular Devices(San Jose, CA, USA)에서 구입하였다. Epoch 마이크로플레이트 리더는 미국 버몬트주 Winooski 소재 BioTek에서 구입하였다. IM-3 시리즈 현미경은 Optika(이탈리아 베르가모)에서 구입하였다. Statistix(버전 8.1)는 Statistix(Tallahassee, FL, USA)에서 구입하였다.

[0081] 한편, 본 명세서에 기재된 실험의 평균  $\pm$  표준 편차로 표시하였다. 통계 분석은 Statistix(버전 8.1, Statistix, Tallahassee, FL, USA)를 사용하여 수행되었다. 데이터 분석은 일원 분산 분석과 사후 Duncan의 다중 범위 테스트가 포함되었다. 두 그룹 간의 차이는  $p < 0.05$ 의 유의 수준에서 t-테스트를 사용하여 평가되었다.

### [0083] 실시예 3: 세복 추출물의 제조 및 양성 대조군의 준비

[0084] 세종대학교 연구농장에서 생산된 호품(Hopum, HP)과 세복(Sebok, SB) 쌀을 각각 믹서기를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄된 각 시료 분말 5g을 100% 메탄올에 첨가하고 1시간 동안 초음파 처리하고, 5  $\mu$ m 여과지(현대 마이크로, 서울, 한국)로 여과하였다. 여과된 용액을 회전증발기를 이용하여 50℃에서 용매를 제거하여 농축하였고, 동결 건조법을 이용하여 추출물을 동결건조하였다. 이하의 실험을 위해 DMSO(dimethyl sulfoside)를 사용하여 상기 제조한 추출물을 10, 25, 50, 100 mg/mL 농도로 조정하였다.

[0085] 한편, 알부틴은 하이드로퀴논과 D-글루코스의 화합물이다. 여러 연구에서  $\alpha$ -MSH로 자극된 B16 세포에서 멜라닌 생성과 과다 색소 침착이 억제되는 알부틴의 항멜라닌 생성 활성이 입증되었다. 멜라닌 함량과 세포내 티로시나제 활성도 쥐 흑색종 B16 세포에서 감소하였다. 따라서 본 실험에서는 알부틴을 양성 대조군으로 사용하였다. 알부틴은 10, 25, 50, 100mg/mL의 농도로 제조되었다.

### [0087] 실시예 4: 세복 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석

[0088] SB 및 HP의 총 폴리페놀 함량은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 구체적으로, 60ul의 SB 추출물을 40ul의 2N Folin-Ciocalteu 페놀 시약과 혼합하였다. 이어서, 혼합물에 7.5% 탄산나트륨 용액 100ul를 첨가하고, 암조건에서 30분간 배양하였다. 샘플의 흡광도는 Epoch 마이크로플레이트 리더를 사용하여 760 nm에서 측정되었다. 마지막으로 탄닌산을 기준으로 검량선을 작성하고(도 2), 총 폴리페놀 함량을 정량화하였다.

[0089] SB 및 HP의 총 플라보노이드 함량은 다음과 같은 방법으로 측정되었다. 1 mg/mL SB 추출물 100ul를 2%  $AlCl_3$  100ul와 혼합하였다. 용액을 10분 동안 배양한 후 Epoch 마이크로플레이트 리더를 사용하여 430nm에서 흡광도를 측정하였다. 퀘르세틴을 표준품으로 사용하여 검량선을 작성하고(도 3), 총 플라보노이드 함량을 결정하였다.

[0090] 이에 대한 결과를 하기 표 1에 나타내었다. SB 추출물은 추출물 1g 당 21.6mg 탄닌산 당량(TAE)/1g 및 14.1mg 퀘르세틴 당량(QE)/1g 추출물을 함유하고 있었다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 상관 계수는  $r^2 = 0.99$ 로 두 분석 모두 매우 정확하였는데, 이는 분석에서 얻은 낮은 값을 표준으로 글리콜산 단위로 표현한 반면, 페놀 흡광도 값을 표준단위로 표현하였기 때문에 발생했을 가능성이 높다.

표 1

[0091]

| 추출물 | 총 폴리페놀 함량<br>(mg TAE/g Extract) | 총 플라보노이드 함량<br>(mg QE/g Extract) |
|-----|---------------------------------|----------------------------------|
| HP  | 12.5 $\pm$ 0.6                  | 3.1 $\pm$ 1.1                    |
| SB  | 21.6 $\pm$ 1.2                  | 14.1 $\pm$ 1.5                   |

[0093] 실시예 5: 세복 추출물의 항산화 활성 분석

[0094] ABTS 라디칼 소거능( $ABTS^{\cdot+}$ )을 측정하여 폴리페놀 및 플라보노이드가 강화된 버 종자 추출물의 항산화 활성을 측정하였다.  $ABTS^+$  양이온( $ABTS^{\cdot+}$ ) 탈색 분석 방법은 다음과 같이 수행되었다.

[0095]  $ABTS^{\cdot+}$ 는 ABTS를 각각 7.0 및 2.4mM의 최종 농도로 과황산칼륨과 혼합하여 제조되었다. 혼합물을 암조건 하에 실온에서 16시간 동안 배양하였다. 그런 다음 100% 에탄올에 희석하여 734nm에서 흡광도 값 0.70~0.02를 얻었다 ( $ABTS^{\cdot+}$  작업 용액). 다양한 농도(10u1)의 추출물을 1mL의  $ABTS^{\cdot+}$  작업 용액과 함께 실온에서 어두운 조건에서 7분 동안 배양하였다. 이후, 시료의 흡광도를 734nm에서 측정하였으며, 증류수 10u1와  $ABTS^{\cdot+}$  작업 용액 1mL를 대조군으로 하였다. 실험은 3회 수행되었다. ABTS 라디칼 소거능(%)은 하기 수학적 식 1에 따라 계산되었다.

[0096] [수학적 식 1]

[0097]  $ABTS$  라디칼 소거율(%) = [(대조군 734nm에서의 흡광도 - 시료 734nm에서의 흡광도) / 대조군 734nm에서의 흡광도] X 100

[0098] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, HP, SB 및 알부틴(arbutin)의 항산화 활성은 모든 처리구에서 농도 의존적으로 증가하였다. 100mg/mL의 농도에서 SB는 가장 높은 수준의 ABTS 라디칼 소거능을 나타냈으며 이는 양성 대조군인 알부틴과 동일한 수준이었다.

[0100] ABTS 라디칼 소거 분석법을 사용하여 다양한 농도의 아스코르브산을 측정하고, ABTS 라디칼 소거(Y)에 대한 아스코르브산(X)의 표준 곡선을 작성하여(도 5) 비타민 C(아스코르브산) 등가 항산화 능력(VCEAC)을 계산하였다. VCEAC는 하기 수학적 식 2를 사용하여 평가되었다.

[0101] [수학적 식 2]

[0102]  $VCEAC(mg/g \text{ 건조 중량}) = (Y - 3.3284) / 3.7463$

[0103] 여기서 Y는 ABTS 라디칼 소거를 나타낸다.

[0104] 초기  $ABTS^{\cdot+}$  농도를 50% 감소시키는 데 필요한 샘플 농도( $IC_{50}$ )는 다양한 농도의 추출물(Y)에 대한 소거율(X)을 플롯팅하여 결정되었다.  $IC_{50}$ 은  $Y=AX+B$ 의 회귀식에 X값을 50으로 대입하여 계산하였다.

[0105] 이에 대한 결과를 도 6 및 7에 나타내었다. 초기  $ABTS^{\cdot+}$  농도를 50% 감소시키는 데 필요한 샘플 농도( $IC_{50}$ )는 낮을수록 항산화 활성이 더 높다는 것을 나타내는데, SB와 알부틴이 HP보다 더 높은 항산화 활성을 나타냄을 도 6에 의하여 알 수 있었다. 또한,  $0.39065 \times 10^{-2} \sim 25 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$  범위의 아스코르빈산(비타민 C) 농도에 대한 ABTS 라디칼 소거 활성의 표준 곡선을 사용하여 결정된 비타민 C(아스코르브산) 등가 항산화 능력(VCEAC)은 SB와 알부틴이 우수함을 알 수 있었다(도 7).

[0107] 실시예 6: 세복 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향 분석

[0108] Melan-a 세포를 RPMI-1640 배지(10% FBS, 1% P/S 및 20nM TPA 보충)에서 배양하고 5%  $CO_2$ , 37°C에서 배양하였다. 세포를  $2 \times 10^4$ 개 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 시딩하고 5%  $CO_2$ , 37°C에서 배양하였다. 24시간 후, 배양 배지를 다양한 농도의 추출물(배양 배지에 희석됨)로 교체하였다. 세포를 동일한 조건 하에서 72시간 동안 추가로 배양하였다. 배양액을 버리고 EZ-CyTox(1XPBS에 10배 희석) 110u1를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 그런 다음 EZ-CyTox 용액 100u1를 새로운 96웰 플레이트에 옮기고 SpectraMax<sup>®</sup> ABS Plus Microplate Reader를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. melan-a 세포 생존율은 하기 수학적

3에 따라 결정되었다.

[0109] [수학식 3]

[0110]  $\text{Melan-a 세포 생존율}(\%) = (\text{처리군 } A_{450} / \text{대조군 } A_{450}) \times 100$

[0111] 여기서  $A_{450}$ 은 450nm에서의 흡광도를 나타낸다. RPMI 처리된 세포(처리 없음) 그룹을 대조군으로 사용하였다.

[0112] 그 결과, 도 8에서 볼 수 있듯이, 무처리군(RPMI)과 비교하여 SB는 melan-a 세포 생존율에 유의한 차이가 없었다. 0.1% DMSO 처리에서는 RPMI 그룹과 비교하여 melan-a 세포에 대한 세포독성이나 증식효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 0.1% DMSO, HP, SB 또는 알부틴(최대 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 처리가 RPMI 그룹(무처리 그룹)에 비해 melan-a 세포 생존율에 영향을 미치지 않음을 의미한다.

#### [0114] 실시예 7: 세복 추출물이 멜라닌 합량 및 멜라닌 분비에 미치는 영향 분석

[0115] 세포를  $5 \times 10^5$  개 세포/웰의 밀도로 6웰 플레이트에 시딩하고 5%  $\text{CO}_2$  하에 37°C에서 배양하였다. 24시간 후, 세포를 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 추출물로 처리하였다. 플레이트를 5%  $\text{CO}_2$  하에서 37°C에서 72시간 동안 추가로 배양하였다. 배양 배지와 세포를 별도로 수집하고, 세포로부터 멜라닌 합량을 분석하였으며, 배양 배지는 멜라닌 분비를 조사하는 데 사용하였다.

[0116] 멜라닌 분비량을 측정하기 위해 배양액을 2000 rpm에서 3분간 원심분리하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 분비량 평가에는 하기 수학식 4를 이용하였다.

[0117] [수학식 4]

[0118]  $\text{멜라닌 분비율}(\%) = (\text{처리구의 } 405\text{nm 흡광도} / \text{대조구의 } 405\text{nm 흡광도}) \times 100$

[0119] 배양된 세포를 계수하여 세포수를  $1 \times 10^5$  세포/처리로 조정하였다. 세포를 1N NaOH 용액으로 80°C에서 4시간 동안 파괴하였다. 처리군과 대조군의 흡광도는 405 nm에서 측정하였다. 멜라닌 합량은 하기 수학식 5를 이용하여 계산되었다.

[0120] [수학식 5]

[0121]  $\text{멜라닌 합량}(\%) = (\text{처리구의 } 405\text{nm 흡광도} / \text{대조구의 } 405\text{nm 흡광도}) \times 100$

[0122] 실험은 독립적으로 3회 수행되었다. RPMI 처리된 세포를 대조군으로 사용하였다.

[0123] 이에 대한 결과를 도 9 및 10에 나타내었다. 멜라닌 합량은 HP, SB, 알부틴 처리 세포에서 처리하지 않은 그룹에 비해 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ , 도 9). 100 $\mu\text{g/mL}$  농도의 SB로 처리하면 펠렛의 어두운 색이 감소하고(육안 관찰) HP 그룹에 비해 세포 멜라닌 합량이 크게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 또한, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 SB 처리 세포는 HP 그룹과 비교하여 멜라닌 생성과 관련된 멜라닌 분비를 유의하게 억제하였다( $p < 0.05$ , 도 10). 이러한 결과는 100 $\mu\text{g/mL}$  농도의 SB 처리가 일반 쌀 종자 추출물(HP)에 비해 세포 멜라닌 합량 및 멜라닌-a 세포의 멜라닌 분비를 더 크게 감소시켰음을 의미한다.

#### [0125] 실시예 8: L-DOPA 염색 및 세포성 티로시나제 활성 분석

[0126] L-DOPA 염색은 다음과 같이 수행되었다. Melan-a 세포를  $2 \times 10^4$  개 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 시딩하고 37°C 5%  $\text{CO}_2$ 에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 세포에 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 추출물을 처리하고 72시간 동안 추가로 배양하였다. 1XPBS로 세척한 후 세포를 10% 포름알데히드로 실온에서 20분간 고정시키고 1XPBS로 세척하였다. 이어서, 2mg/mL L-DOPA 100 $\mu\text{l}$ 를 각 웰에 첨가하였다. 염색은 37°C에서 3시간 동안 수행하였다. 용액을 제거하고 세포를 1XPBS로 2회 세척하였다. 건조 후 IM-3 시리즈 현미경을 이용하여 melan-a 세포의 색소침착을 관찰하고 영상화하였다.

[0127] 티로시나제 활성을 측정하기 위해 처리된 세포를 수집하고 얼음 위에서 30분 동안 1% Triton X-100을 함유한 0.1M 인산나트륨(pH 6.8)으로 용해시켰다. 튜브를 13,000 rpm, 4°C에서 30분 동안 원심분리하였다. 상층액을 수

집하고, 브래드포드(Bradford) 방법을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 또한, 각 처리에서 얻은 단백질을 40ug을 총 부피 80ul의 용해 완충액으로 조정하였다. L-DOPA 2mg/mL(20ul) 첨가하고 샘플을 37℃에서 1시간 동안 배양한 다음, 흡광도는 475 nm에서 측정하였다. 세포 내 티로시나제 활성(%)을 결정하기 위해 하기 수학적 공식을 사용하였다.

[수학적 공식 6]

세포내 티로시나제 활성(%) = [(RPMI 그룹의 475nm 흡광도 - 시료의 475nm 흡광도) / RPMI 그룹의 475nm 흡광도] X 100

이에 대한 결과를 도 11 및 12에 나타내었다. 도 10에서, 검은 반점은 RPMI, DMSO 및 HP 처리 세포에서 주로 발생한 멜라닌 함유 세포를 나타낸다. SB 처리는 HP 처리에 비해 검은 반점을 감소시키고 밝은 반점을 증가시켰다. 검은 반점의 감소는 세포 내 티로시나제 활성의 감소로 확인되었다(도 12). RPMI 그룹과 비교하여, DMSO 처리 및 HP 처리 세포에서는 세포 내 티로시나제 활성에 유의한 차이가 관찰되지 않았다( $p < 0.05$ ). HP 그룹과 비교하여, SB 처리는 세포의 티로시나제 활성을  $95.70\% \pm 1.77\%$ 에서  $44.20\% \pm 2.70\%$  ( $53.81 \pm 2.82\%$  감소)로 효과적으로 감소시켰다. 이러한 발견은 SB가 세포 내 티로시나제 활성을 유의하게 감소시켰고, 그 결과 멜라닌-a 세포의 검은 반점(멜라닌 함유 세포)이 감소했음을 의미한다.

### 실시예 9: 세복 추출물이 멜라닌 함유 세포에 미치는 영향 및 형태학적 외관 분석

72시간 배양 후, 제조사의 지침에 따라 Fontana-Masson 키트를 사용하여 처리된 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 모니터링하고 IM-3 시리즈 현미경을 사용하여 총 1000개의 세포를 계수하였다. 멜라닌 함유 세포의 수를 기록하였다. 총 100개의 멜라닌 함유 세포를 무작위로 계수하고 하기 표 2에 기술된 점수 시스템을 사용하여 형태학적 외관에 따라 4개 그룹(1+, 2+, 3+ 및 4+)으로 분류하였다(표 2).

표 2

| 판단기준                                                          | 점수 |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 세포 크기가 50 $\mu\text{m}$ 미만이고 색소침착이 세포질 면적의 50% 미만이며 분포가 낮음.   | 1+ |
| 세포 크기는 50 $\mu\text{m}$ 미만이고 색소 침착은 세포질 면적의 50% 이상이며 분포가 더 높음 | 2+ |
| 세포 크기는 51 $\mu\text{m}$ 보다 크고 세포질 영역 전체에 색소 침착이 있음            | 3+ |
| 세포 크기는 51 $\mu\text{m}$ 보다 크고 세포질 전체에 색소가 촘촘하게 차 있음           | 4+ |

도 13은 Fontana-Masson 염색 방법을 사용하여 확인된 멜라닌 함유 세포의 수를 나타낸다. 검은 점은 melan-a 세포에 염색된 멜라닌이 있음을 나타낸다. RPMI 처리 세포와 DMSO 처리 세포 사이의 멜라닌 함유 세포 수는 각각  $810 \pm 6.7$  및  $809 \pm 7.2$  세포/1000 세포로 유의미한 차이가 없었다( $p < 0.05$ , 도 5). HP, SB, 알부틴( $100 \mu\text{g/mL}$ ) 처리는 RPMI 처리에 비해 멜라닌 함유 세포 수를 유의하게 감소시켰다. SB 처리는 HP 처리( $752 \pm 13.5$  세포/1000 세포)에 비해 멜라닌 함유 세포 수( $330 \pm 12.7$  세포/1000 세포)를 효과적으로 감소시켰으며, 양성대조군( $306 \pm 13.1$  세포/1000 세포)과 비교하여 유사한 수준의 멜라닌 함유 세포 수를 나타내었다.

도 14는 멜라닌 함유 세포를 계수하고 100개 세포의 분화 점수를 기준으로 4개 그룹으로 분류하고, 각 분화 점수별로 각 처리군의 멜라닌 함유 세포 수를 RPMI 군과 비교한 결과이다. 처리하지 않은 그룹과 비교하여 HP 처리는 분화 점수 4+의 세포 집단을 크게 감소시켰고 1+ 및 2+의 세포 집단을 증가시켰다( $p < 0.05$ ). SB 처리는 HP에 비해 3+ 및 4+의 세포 집단을 현저히 감소시켰고 1+ 및 2+의 세포 집단을 증가시켰다( $p < 0.05$ ). 이러한 결과는 폴리페놀 및 플라보노이드가 풍부한 세복 벼 종자 추출물로 처리하면 멜라닌-a 세포의 멜라닌 함유 개체군, 크기 및 멜라닌 기여도가 현저히 감소됨을 의미한다.

### 실시예 10: 세복 추출물이 멜라닌 관련 유전자 발현에 미치는 영향

멜라닌의 최종 형태에 따라 두 가지 멜라닌 생성 경로가 있다. 첫 번째 형태는 노란색에서 붉은색 색소를 나타

내는 페오멜라닌(pheomelanin)이고, 두 번째 형태는 짙은 갈색/검은색 색소를 나타내는 유멜라닌(eumelanin)이다. 유멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 가장 일반적인 형태의 멜라닌이다. L-tyrosine은 L-DOPA(L-dihydroxyphenylalanine)로 수산화되고, 이는 tyrosinase에 의해 DOPA-quinone으로 산화된다. 유멜라닌 합성에는 멜라닌 생성 경로의 두 가지 주요 효소인 TRP-2와 TRP-1이 필요하다.

[0142] TRI reagent™을 사용하여 처리된 세포에서 총 RNA를 추출하고 뉴클레아제가 없는 물에 용해하였다. 분리된 RNA의 농도를 측정하고 SpectraMax® ABS Plus Microplate Reader를 사용하여 품질을 결정하였다. RNA의 품질은 260 및 280 nm의 흡광도(A260:A280)와 260 및 230 nm의 흡광도(A260:A230)의 비율로 평가되었으며 허용 가능한 범위(1.80-2.00)에 있었다. Power cDNA 합성 키트를 사용하여 총 RNA(1000ng)를 합성하였다. qPCR 반응은 제조업체의 지침에 따라 RealMOD™GreenW2 qPCR Mix에서 0.375M의 각 프라이머(정방향 및 역방향, 표 3)와 5ng의 주형(합성 cDNA)으로 구성되었으며 CFX Connect Real- 타임 PCR 시스템으로 수행하였다. PCR 조건은 95℃에서 10분 동안 1사이클; 변성(20초 동안 95℃어닐링(20초 동안 60℃ 및 신장(30초 동안 72℃의 40주기; 72℃에서 5분 동안 1회의 최종 신장 주기로 하였다. 상대적인 유전자 발현 수준은 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로 글리세르알데히드 3-인산 탈수소효소(GAPDH)를 사용하는 CFX Connect Real-Time PCR 프로그램을 사용하여 결정하였다.

표 3

[0143]

| Gene              | Accession Number | Sequence(5'-3')                                                            | Target Size(bp) |
|-------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>MITF</i>       | NM_001113198.2   | Forward: AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG<br>Reverse: CCT TAG CTC GTT GCT GTT CC | 239             |
| <i>Tyrosinase</i> | D00131.1         | Forward: CCA GAA GCC AAT GCA CCT AT<br>Reverse: CCA GAT ACG ACT GGC CTT GT | 193             |
| <i>TRP-1</i>      | NM_031202.3      | Forward: TCT GGC CTC CAG TTA CCA AC<br>Reverse: TCA GTG AGG AGA GGC TGG TT | 223             |
| <i>TRp-2</i>      | X63349.1         | Forward: ACC CTG TGT TTG TGG TCC TC<br>Reverse: GTT GCT CTG CCG TTA GGA AG | 186             |
| <i>GAPDH</i>      | NM_001289726.2   | Forward: AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG<br>Reverse: ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA | 223             |

[0144] 도 15에 나타난 바와 같이, 무처리군과 비교하여 SB 처리는 멜라닌 생성 관련 유전자(MITF, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2)의 발현을 유의하게 감소시켰다( $p < 0.05$ ). 또한, SB 처리는 HP 처리 세포에 비해 MITF, 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2의 수준이 상당히 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 폴리페놀과 플라보노이드가 풍부한 세복 벼 종자 추출물 처리가 melan-a 세포의 멜라닌 생성을 효과적으로 억제한다는 것을 의미한다.

#### [0146] 10. 세복 추출물이 멜라닌 생성 관련 단백질 및 MAPK 및 PI3K/Akt 신호 전달 경로에 미치는 영향

[0147] 처리된 세포를 얼음 위에서 1X Protease inhibitor Cocktail kit 5를 함유하는 RIPA 완충액에서 30분 동안 용해시키고 4℃에서 30분 동안 13,000rpm으로 원심분리하였다. 용액을 새로운 미세원심분리 튜브로 옮겼다. 브래드포드(Bradford) 방법을 사용하여 단백질 농도를 측정하고 소 혈청 알부민 표준 곡선과 비교하였다. 단백질을 30 µg/treatment로 조정하고 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 실시하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 옮기고 이를 블로킹한 후 MITF, TRP-1, TRP-2, 인산화(p)-ERK 1/2, p-p38 MAPK, p-Akt, ERK 1/2, p38 MAPK, Akt 및 GAPDH에 특이적인 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 세척 후, 막을 2차 항체(Goat anti-rabbit IgG(H+L)-HRP 또는 m-IgG BP-HRP)와 함께 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 단백질 신호는 Clarity™ Western ECL Substrate를 사용하여 검출되었다. ChemiDoc Imaging System을 사용하여 단백질 신호를 포착하고 정량화하였다.

[0149] 상기 실시예 9에서 확인한 바와 같이, RPMI 및 DMSO 처리 세포는 멜라닌 생성 과정 중의 TRP-1, TRP-2 및 티로시나제 발현을 조절하는 전사 인자인 MITF의 발현이 가장 높았다. MITF의 높은 발현은 또한 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2 단백질의 높은 발현을 가져왔다(도 16). RPMI 및 HP 처리와 비교하여 100µg/L SB 처리는 MITF 단백질의 발현을 하향 조절하였고, 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2의 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 SB 처리가 MITF

의 발현을 하향 조절하여 멜라닌 생성을 유의하게 억제하여 melan-a 세포에서 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2의 수준이 감소했음을 의미한다.

[0150] MITF의 조절은 ERK 1/2, p38 MAPK 및 Akt 신호 전달 경로와 연관되어 있다. 따라서 p-ERK 1/2, p38 MAPK 및 Akt 단백질을 조사하였다. 도 17에 나타난 바와 같이, SB 처리는 RPMI 또는 HP 처리에 비해 p-ERK 1/2 및 p-Akt의 발현을 유의하게 증가시켰다( $p < 0.05$ ). 또한, RPMI 또는 HP 처리와 비교하여 SB 처리는 SB 처리 세포에서 p-p38 MAPK의 발현을 현저하게 감소시켰다( $p < 0.05$ ). SB 처리된 세포에서 이러한 단백질 수준의 조절은 알부틴 처리된 세포와 유사한 경향을 나타내었다.

## 수탁번호

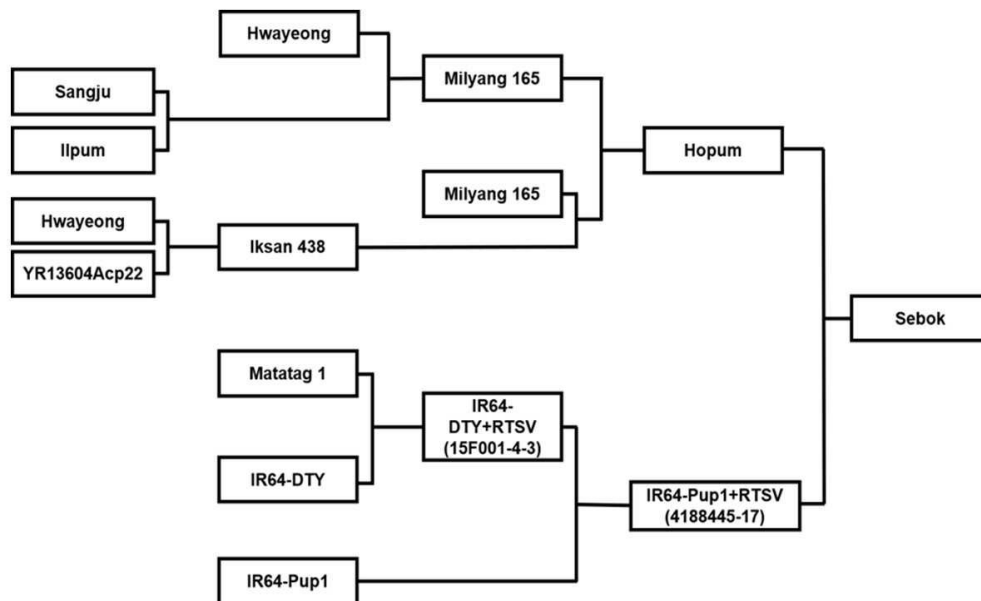
[0152] 기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)

수탁번호 : KACC98132P

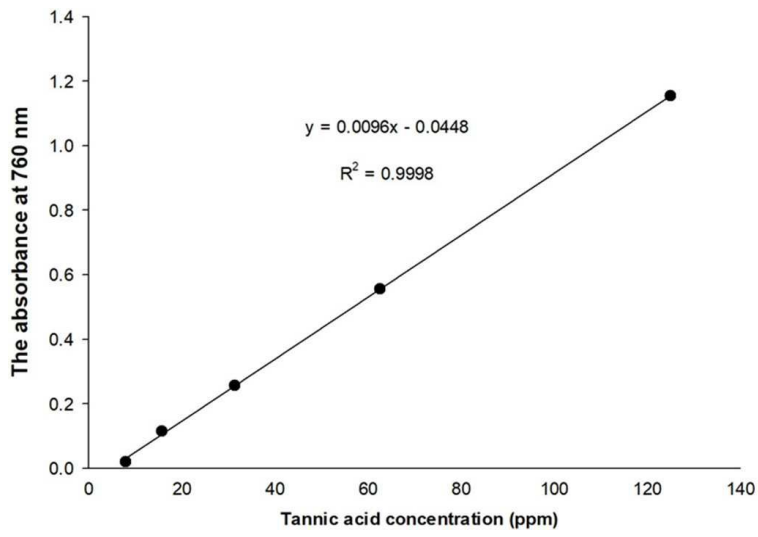
수탁일자 : 20221031

## 도면

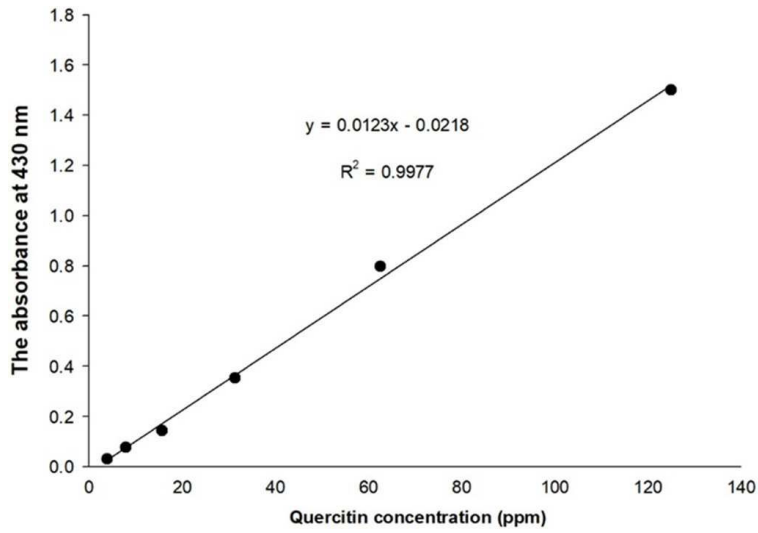
### 도면1



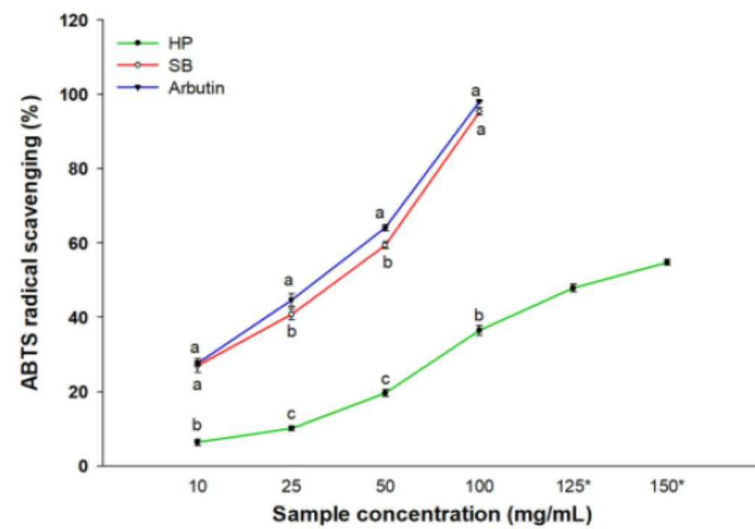
도면2



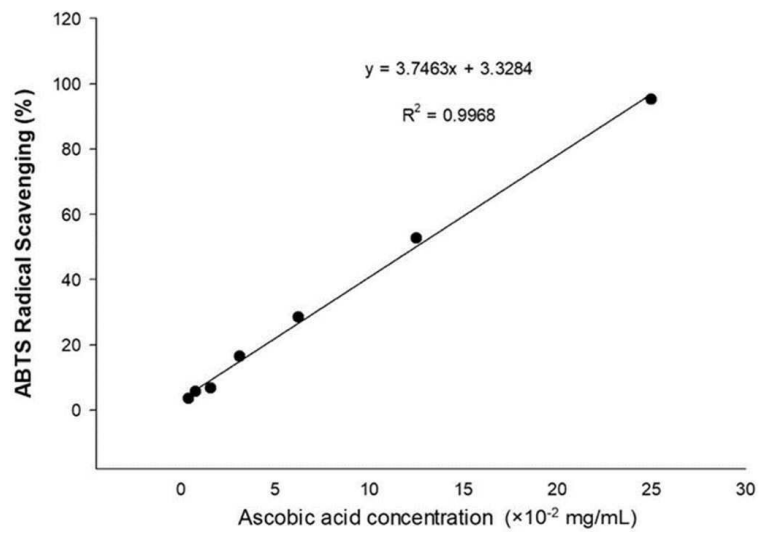
도면3



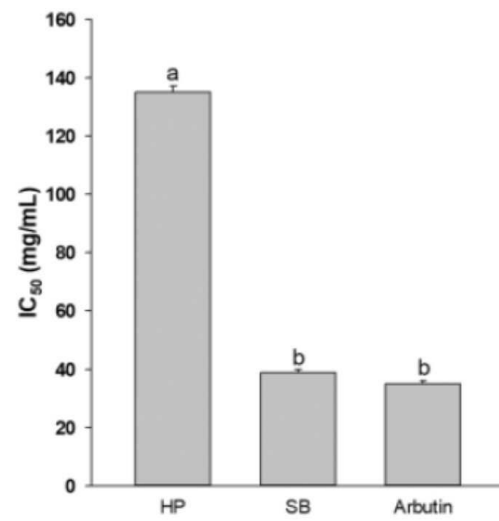
도면4



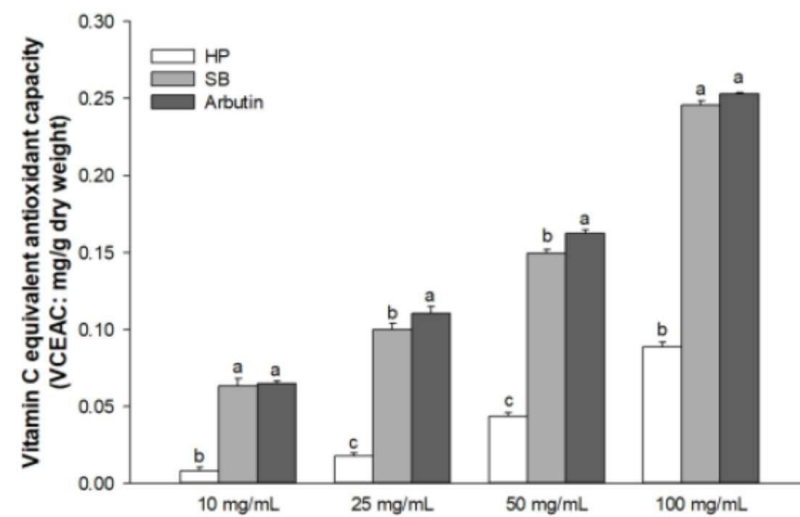
도면5



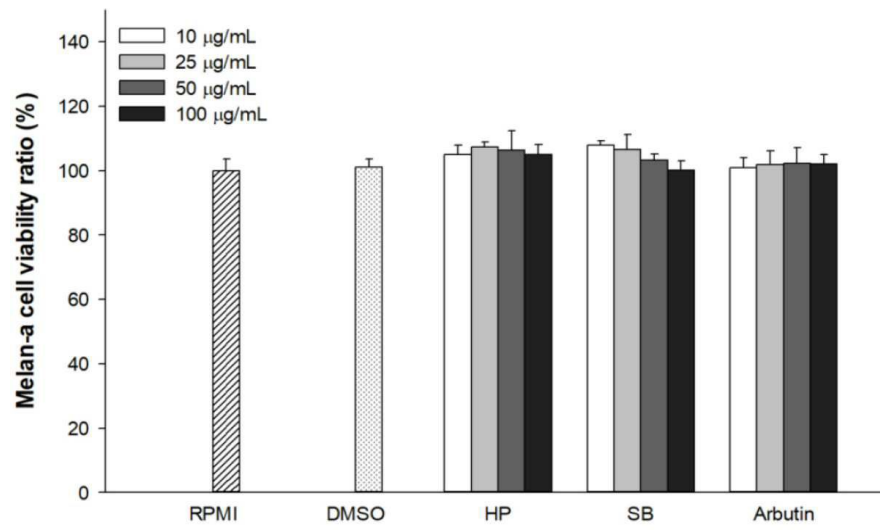
도면6



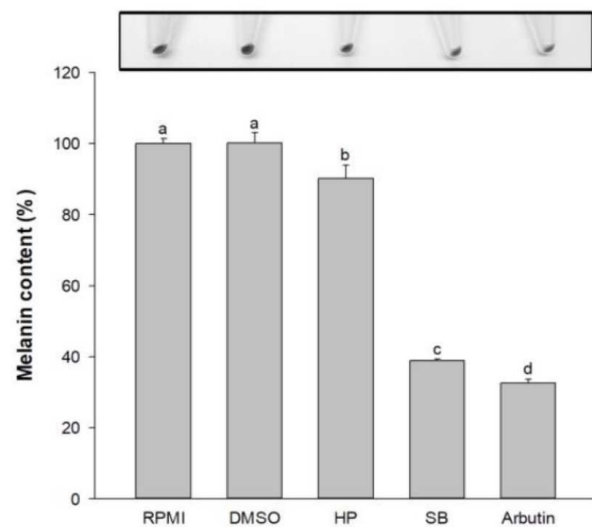
도면7



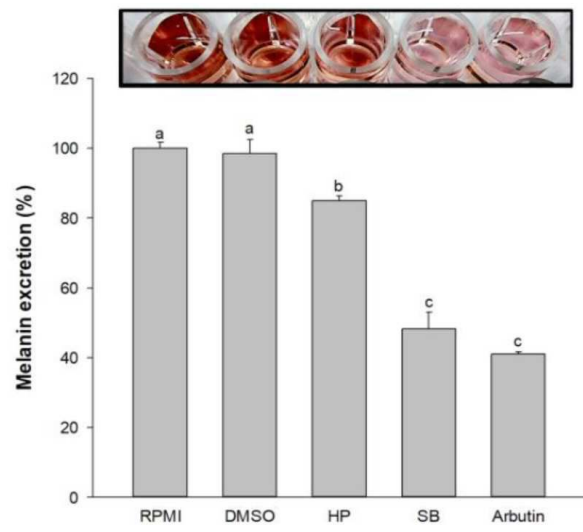
도면8



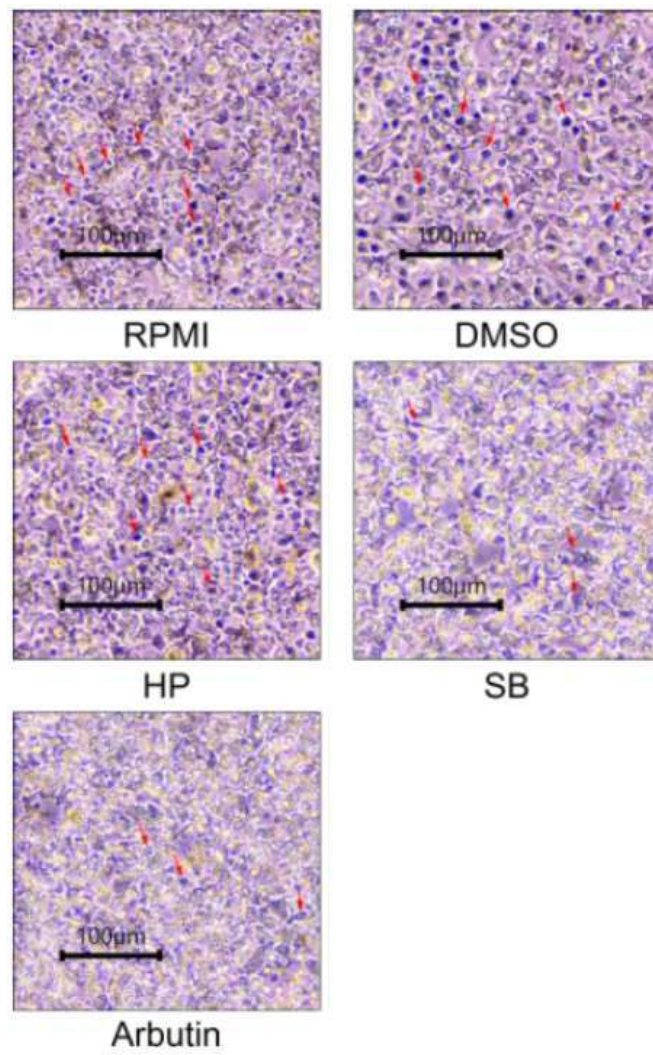
도면9



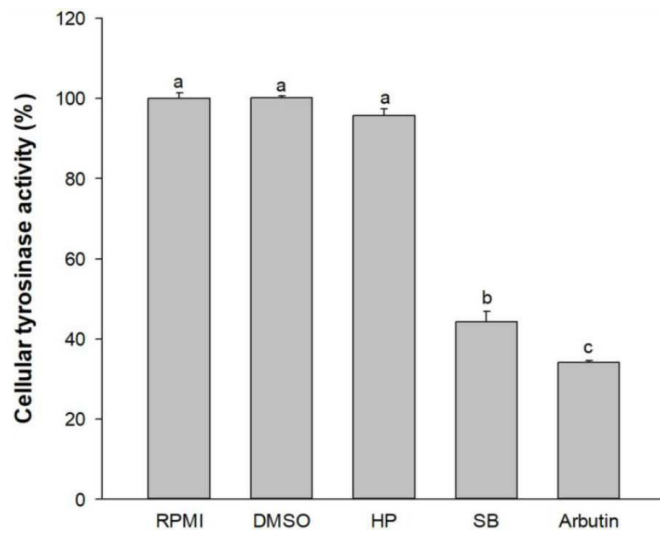
도면10



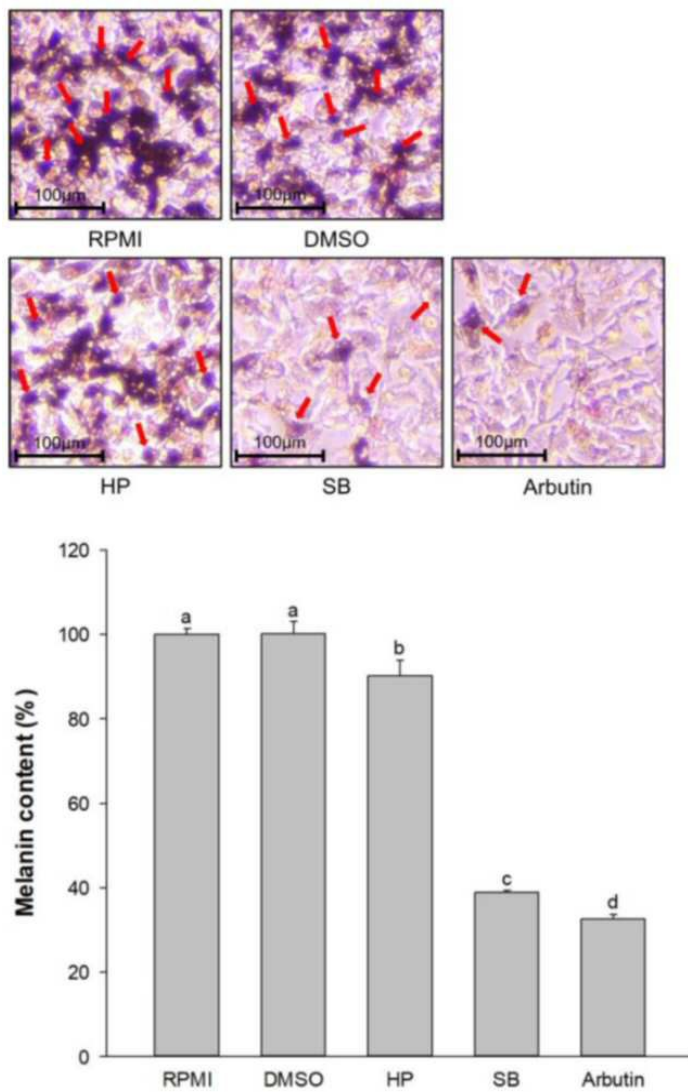
도면11



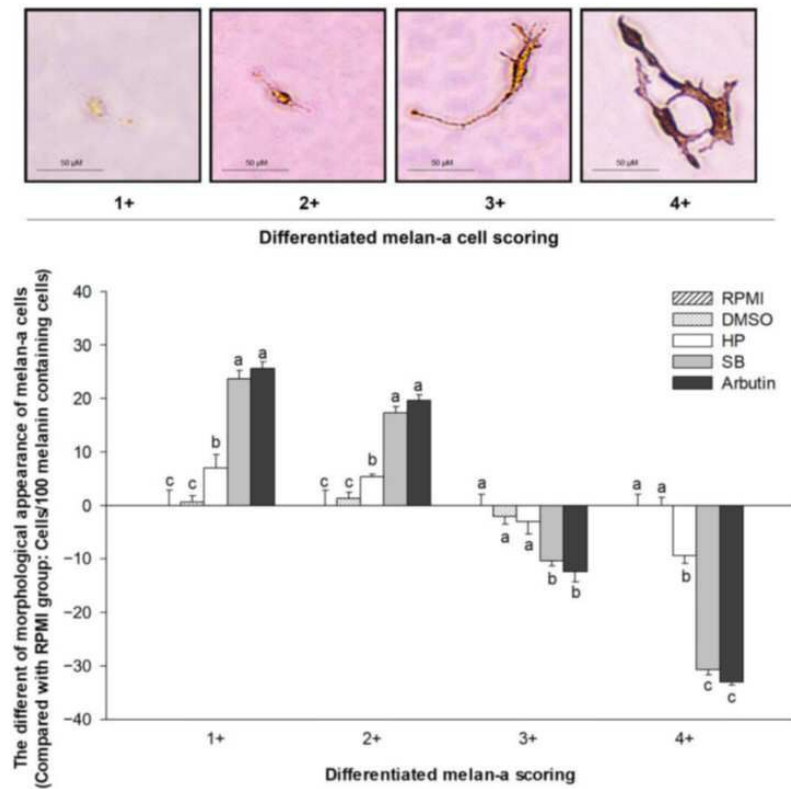
도면12



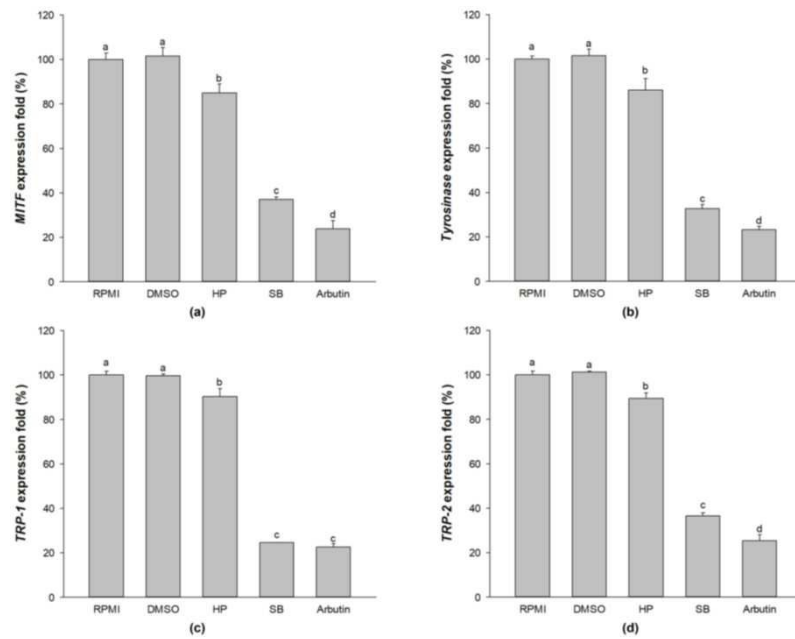
도면13



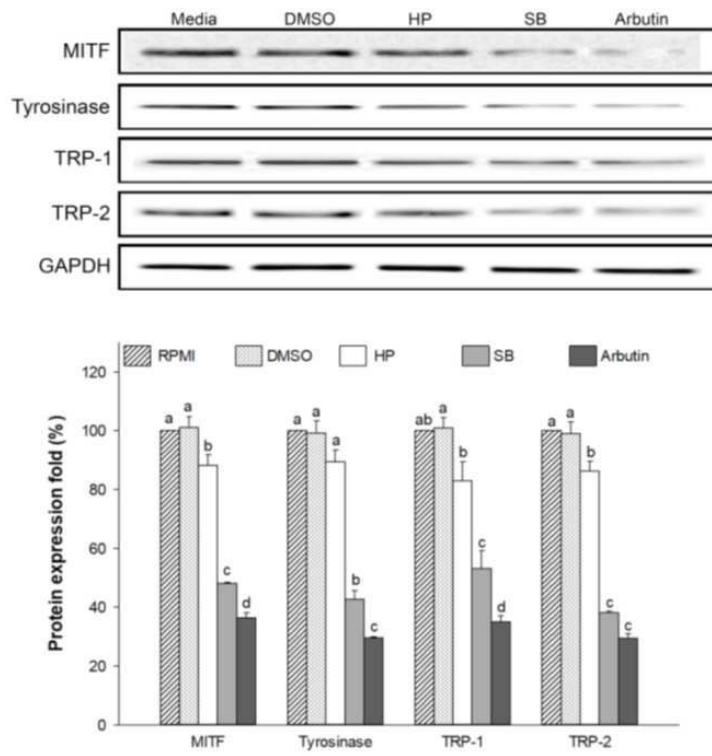
도면14



도면15



도면16



도면17

