(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A23L 1/29 (2006.01)
A23L 2/38 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년05월25일
(11) 등록번호 10-0721765
(24) 등록일자 2007년05월18일

(21) 출원번호 10-2006-0010167
(22) 출원일자 2006년02월02일
심사청구일자 2006년02월02일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

연세대학교 산학협력단
서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자 이상국
서울특별시 성동구 행당동 347번지 대림아파트 110-501

박헌주
서울 강남구 압구정동 414번지 미성아파트 2동 301호

정원윤
서울 마포구 토정동 한강삼성아파트 102동 908호

황재관
경기 고양시 덕양구 화정1동 858번지 달빛마을아파트 109동 604호

박광균
서울특별시 동대문구 휘경1동 106번지 신성아파트 104동 1901호

(74) 대리인 신동인

(56) 선행기술조사문헌
JP60109509 A
KR1019950007721 A
KR100519154 B1
KR1020030020811 A

심사관 : 이규안

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 미백 활성을 나타내는 도자 추출물을 함유하는 식품첨가제

(57) 요약

본 발명은 복숭아 나무 (*Prunus persica* (L.) BATSCH)의 과실, 즉 도자 (*Persicae fructus*)의 구성 중 도인 (amygdalin)을 제외한 과피 및 과육 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 시험관 내 (*in vitro*) 실험에서 우수한 티로시나제 저해활성을 나타내고, 생체 내 (*in vivo*) 실험에서 멜라닌 합성 저해 활성을 나타내는 본 발명의 도자 추출물은 미백용 식품첨가제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

세척한 도자 (*Persicae fructus*)의 도인 (amygdalin)을 제외한 과피 및 과육을 절단하여 80% 에탄올로 추출한 추출물을 전체 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 약 90 중량부 범위에서 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 미백용 식품첨가제.

청구항 2.
삭제

청구항 3.
삭제

청구항 4.
삭제

청구항 5.
삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 미백 활성을 갖는 도자 추출물을 함유하는 식품조성물에 관한 것이다.

동아시아 여성들 특히 한국, 일본, 중국의 여성들에게 가장 관심이 큰 화장품 분야중 하나는 피부 미백 분야이다. “피부 미백”이란 자외선, 스트레스, 호르몬 분비 이상 및 임신 등과 같은 환경 변화에 의해 피부 내에 색소의 생성이 과하게 일어나 발생하는 피부색의 변화를 정돈하여 주는 개념이라 할 수 있다. 이와 관련하여 가장 중요한 요소는 피부 색소인 멜라닌 (melanin)이다. 멜라닌은 표피 내 기저층에 존재하는 색소세포인 멜라노사이트 (melanocyte)에서 합성되고, 주변의 각질세포로 전이되어 피부색을 결정짓는다. 원래 멜라닌은 동물, 식물, 미생물 등에서 발견되는 검은 색소로 생육이나 발달에 필수적이진 않지만 어떤 환경에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질이며, 특히 동물에서의 멜라닌은 피부병 및 악성 흑색종 (melanomas)과 관계가 있으며, 티로시나제 (tyrosinase)에 의해 티로신(tyrosine)으로부터 생산되는 도파 멜라닌 (DOPA melanin) 외에도 1,8-디히드록시나프탈렌 멜라닌 (DHN melanin; 1,8-Dihydroxynaphtalene melanin), 오르쏘-디페놀 멜라닌 (GDHB melanin; *o*-diphenol melanin), 카테콜 멜라닌 (catechol melanin) 등이 보고되어 있다 (Bell AA

and Wheeler MH, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24, pp411-451, 1986). 멜라닌은 생물체에서 발견된 색소로는 특이하게 안정된 색소로서 거의 모든 용매에 불용이며, 추출이나 화학적인 취급이 쉽지 않다. 이 때문에 멜라닌의 화학적인 면에 대해 밝혀지지 않은 점들이 많고 연구의 진보도 부진한 편이다.

멜라닌 색소 합성 (melanogenesis) 과정은 멜라노사이트 (melanocytes)라고 하는 특별히 분화된 세포의 멜라노좀 (melanosome)이라는 소기관에서 일어나는 것으로 명확하게 밝혀지고 있다.

즉, 피부색은 멜라닌의 함량, 분포 등에 따라 결정되며 멜라노사이트 (melanocyte) 내에서 생성된 후 세포 외부로 방출되는 멜라노좀의 수와 분포에 연관되어 있다. 피부의 과색소침착 (hyperpigmentation)은 피부의 염증 반응 이후의 체내 호르몬 이상, 유전질환 및 자외선 조사 등 여러 요인에 의해 발생 될 수 있는데, 주된 요인은 멜라닌 색소 합성 이상 및 분포 이상에 의한 것이다. 멜라닌의 주요한 기능은 산소 라디칼을 제거하여 이에 의한 손상으로부터 피부를 보호하는 것으로 멜라닌이 많다는 것은 물리적, 화학적 독성 물질로부터 피부를 보호하기 위한 효과적인 대응체계를 가지고 있음을 의미한다.

피부에서 색소침착 방지는 다음의 세 가지 관점에서 연구가 가능하다. 1) 멜라닌 합성의 주효소인 티로시나제 (tyrosinase) 활성을 조절하기 위하여 티로시나제 합성 저해물질이나 티로시나제의 기질에 대한 길항제 (antagonist) 개발, 2) 동물의 멜라닌 생합성 장소인 멜라노사이트의 기능을 저하시키기 위해 멜라노사이트에 독성을 나타내는 물질 개발, 3) 3,4-디히드록시페닐알라닌 (DOPA; 3,4-dihydroxyphenylalanine)의 산화방지를 위해 3,4-디히드록시페닐알라닌 환원물질 개발 및 멜라닌 생성기구인 제 1효소 티로시나제와 도파크롬 (DOPAchrome)에서 5,6-디히드록시인돌-2-카르복시산 (DHICA; 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로의 변환을 촉매하는 제 2효소인 도파크롬 튜토머라제 (DOPAchrome tautomerase) 또는 5,6-디히드록시인돌-2-카르복실산에서 인돌-5,6-퀴논-2-카르복시산 (indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid)으로의 변환을 촉매하는 제 3의 효소의 활성 조절 등이 주목받고 있다.

과도한 멜라닌의 침착은 피부 등의 병리적 문제의 원인이 되기도 하지만, 기미, 주근깨, 점, 검버섯과 같은 미용적인 측면의 문제로 인식되고 있으며, 따라서 멜라닌 형성을 억제할 수 있는 미백제에 대한 관심이 증가되고 많은 연구가 진행되고 있다.

티로시나제 (tyrosinase ; monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 넓은 범위의 페놀화합물을 기질로 이용하는 구리함유 효소로서, 티로신 (tyrosine)을 기질로 이용하여 L-3,4-디하이드록시페닐알라닌 (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)을 생성시키고 이를 다시 도파퀴논 (L-DOPAquinone)으로 전이시키는 연속된 효소적 산화 (hydroxylation and oxidation)를 거쳐, 각 생성물의 중합반응에 의해 멜라닌 (melanin)이 생합성 된다. 자외선에 의하여 멜라노사이트의 유사분열이 일어나 멜라노사이트가 활성화되고, 활성화된 멜라노사이트에서는 티로시나제 합성이 촉진되어 멜라닌의 생성이 촉진되며 과량 생성된 멜라닌은 결국 표피 밖으로 운반 배출 되어 기미, 주근깨와 같은 색소 침착의 원인이 된다. 멜라닌이 비정상적으로 과잉 생산되면 기미나 주근깨를 생성하며, 이와 반대로 적게 생산되면 백반 등과 같은 피부 병변이 유발된다. 색소 침착은 외부로부터 자외선, 염증 등의 각종 자극에 의해 발생되며, 이 색소침착의 정도는 표피 기저층에 존재하는 멜라노사이트가 반응한 양이다. 색소침착 메커니즘의 중심이 되는 것은 티로시나제이다.

현재 티로시나제 저해제 (tyrosinase inhibitor)로 알려진 물질로는 알부틴 (α-arbutin), 알로에신 (aloesin), 히노키치올 (hinokitiol), 퀘르세틴 (quercetin), 신남산 (cinnamic acid), 안식향산 (benzoic acid), 시스테인 (cysteine), 클로로겐산 (chlorogenic acid) 등이 알려진 바 있으며 주로 여성의 기미치유에 사용되는 하이드로퀴논 (hydroquinone)을 비롯하여 멜라노스타틴 (melanostatin), 트로폴론 (tropolone), 코직산 (kojic acid), 알부틴 (arbutin) 등이 사용되어 왔으나, 안전성 등의 문제점이 있는 경우가 많으며 효과도 명확하거나 뚜렷하게 확인되고 있지는 못한 실정이다. 따라서 인간이 오랫동안 안전하게 먹어왔던 천연물로부터 티로시나제 저해능이 뛰어난 물질을 이용하려는 시도가 이루어지고 있다.

문화가 발달하고 경제적 여유가 생기면서 식품면에서 양적 증대와 더불어 질적 개선이 동반되었으며, 편리성에 대한 요구가 더욱 커졌다. 그 결과 대량생산되는 가공식품, 인스턴트식품 등이 식탁에 오르는 일이 많아졌고 매일 새로운 종류의 식품들이 쏟아져 나오고 있으며, 이러한 현상은 식품첨가제의 사용을 동반하고 있다.

식품 첨가제 (또는 식품 첨가물)는 식품의 제조, 가공, 또는 보존을 위해 식품에 첨가, 혼합, 침윤 기타의 방법에 의해 사용되는 물질을 말한다. 식품첨가제의 종류에는 천연물과 합성품의 두 종류가 있으며, 보통 그 기능과 용도에 따라 분류한다. 현재 한국에서 식품첨가물로 허가되어 있는 품목은 화학적 합성품 370 여종, 천연첨가물 50 여종이며, 주로 용도에 따라서 보존료, 살균제, 산화방지제, 착색료, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 착향료, 팽창제, 강화제, 개량제, 유화제, 증점제 (호료) 및 안정제, 피막제, 껌 기초제, 소포제, 용제, 이형제, 방충제, 품질개량제와 기타 식품제조용 첨가제 등으로 분류되어 쓰이고 있는 것들이다. 한편, 기능성식품은 식품의 1차 기능인 영양기능, 2차 기능인 감각기능 이외에 3차 기능인 생체

조절 기능이 잘 나타나도록 개발된 식품을 말한다. 기능성식품은 생체조절 기능에 의해 만성질환을 예방함으로써 삶의 질을 향상시키고, 개인 및 국가의 의료비를 경감하며, 건강사회 구현으로 풍요로운 복지국가를 형성하는데 직접적으로 기여한다. 식품이 나타낼 수 있는 생체조절 기능에는 항암, 혈압강하, 콜레스테롤 저하, 혈전 저해, 당뇨 예방, 노화억제 등이 있으며, 식품에 이러한 기능성을 부여하기 위하여 특정한 기능을 갖는 소재를 식품 첨가제로 사용할 수도 있다.

도자 (*Persicae fructus*)란 복숭아나무, 산복사나무의 과실로서, 복숭아나무 (*Prunus persica* (L.) BATSCH)는 중국을 원산으로 우리나라 각지나 일본, 중국에서 재배되는 장미과의 낙엽성의 소교목으로 과수 및 관상수로 널리 재배되고 있다. 복숭아나무의 과실인 도자는 백색 또는 황색의 과육이 단단하고 불규칙한 흑점 및 깊은 홈을 가진 종인 (도인, amygdalin)을 감싸고 있다. 맛은 달고 시며 성질은 온하다. 과육에는 100 g 당 단백질 0.8 g, 지방 0.1 g, 탄수화물 7 g, 조섬유 4.1 g, 전분 0.5 g, 칼슘 8 ㎎, 인 1.0 ㎎, 카로틴 (carotene) 0.01 ㎎, 비타민 B1 0.01 ㎎, 비타민 B2 0.02 ㎎, 니코틴산 0.7 ㎎, 비타민 C 6 ㎎이 함유되어있다. 또한 정유와 유기산이 함유되어 있는데 유기산은 주로 사과산과 구연산이다. 당분 중에는 포도당, 프럭토스 (fructose), 크실로스 (xylose)가 있다 (정보섭 및 신민교 저, 도해향약 대사전, 영림사, pp631-633, 1998). 알려진 성분별 생리활성으로는 식이 섬유는 변비 및 대장암 예방 효과가 있으며, 폴리페놀성 항산화제는 악취제거, 혈중 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 암 예방 및 항균작용을 하고, 도인은 기침억제 및 신경안정 활성이 있으며, 캄페롤은 이뇨작용을, 베타-카로틴은 암 및 신장병 예방 효과가 있고, 솔비톨은 변비를 예방하며 장내 유해균 억제, 비타민 및 미네랄 흡수를 촉진시키며, 비타민 C는 창상치유, 항종양성 작용, 해독작용, 발암성분 억제작용, 혈중 콜레스테롤 저하, 항피로, 철 흡수 향상, 항히스타민 작용 및 면역 기능 증강작용을 한다. 또한, 일반적으로 도자는 수분을 공급해 줌으로서 피부 미용에 효능이 있으며 밤에 식은땀을 흘릴 때 효과가 있고, 간기능을 도와주며 담배의 니코틴을 제거하는 효능 및 피를 맑게 하며, 위장기능 개선 효과가 있다고 알려져 있다.

이처럼 복숭아에는 다양한 기능이 있다고 알려졌으나, 과학적으로 증명된 결과는 제한된 상태이다. 과학적인 연구의 경우에도 복숭아 과육이 아닌 도화, 도인, 도엽 등에서 이루어진 상태이다. 또한, 복숭아와 관련된 특허로는 복숭아 과립 과즙 음료의 제조방법이 개시되어 있고 (한국특허등록 제10-107678호), 복숭아 발효음료 및 그 제조방법 (한국특허등록 제10-152687호), 복숭아 당과의 제조방법 (한국특허등록 제10-179331호), 탄산이 함유된 복숭아 과립 과즙 음료와 그 제조방법 (한국특허등록 제10-199441호), 야생 복숭아를 이용한 발효음료와 발효주 및 그의 제조방법 (한국특허등록 제10-499708호)이 개시되어 있으나, 상기 문헌의 어디에도 미백 활성을 갖는 도자 추출물을 함유한 조성물에 대한 어떠한 교시나 개시된 바는 없다.

이에 본 발명자들은 도자 추출물이 우수한 티로시나제 저해활성을 가짐을 시험관 내 및 생체 내 실험을 통해 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 우수한 티로시나제 저해활성을 가지는 도자 추출물을 식품첨가제로 사용하여 미백효과를 달성함과 동시에 별도의 미백 제제를 섭취하지 않으면서도 청소년, 성인 및 노인층의 광범위한 계층까지 간편하게 섭취가 가능한 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미백 활성을 갖는 도자 (*Persicae fructus*) 추출물을 함유하는 식품첨가제를 제공한다.

상기 추출물은 도자의 구성 중 도인 (amygdalin)을 제외한 나머지인 과피 및 과육의 추출물을 포함한다.

상기 추출물은 정제수를 포함한 물, 에탄올, 메탄올 등과 같은 C_1 내지 C_4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매에 가용한 추출물을 포함한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 도자 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

본 발명의 도자는 세척 후 씨를 제거하고 절단하여, 도자 시료 중량의 약 1 내지 30배, 바람직하게는 약 1 내지 15배에 달하는 부피의 물, 에탄올 및 메탄올 등과 같은 C_1 내지 C_4의 저급 알콜의 극성 용매로, 바람직하게는 물과 에탄올의 혼합용

매를 첨가하여 약 10 ℃ 내지 100 ℃에서 약 1시간 내지 4일, 바람직하게는 2시간 내지 2일 동안 열탕 추출, 환류 순환 추출, 침지 추출 또는 압력추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 열탕 환류 추출 및 침지 추출하여 원심분리, 감압여과, 농축 및 동결건조 하여 본 발명의 도자 추출물을 수득할 수 있다.

상기 추출방법에 의해 얻어진 도자 추출물의 티로시나제 저해활성을 측정한 결과, 미백효과가 탁월하여 미백용 식품첨가제로 유용하게 이용될 수 있다.

또한, 도자는 오랫동안 생약 및 식용으로 사용되어 오던 약재로서 이들로부터 추출된 본 발명의 추출물들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

본 발명의 도자 추출물을 함유하는 식품첨가제에는 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성피로인산염, 폴리인산염 (중합인산염) 등의 인산염이나 폴리페놀, 카테킨 (catechin), 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물 (rosemary extract), 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

상기의 식품첨가제용 도자 추출물은 20 내지 90 %의 고농축액이거나 분말 또는 과립형태일 수 있다.

마찬가지로, 본 발명의 도자 추출물을 함유하는 식품첨가제는 유당 카제인, 덱스트린, 포도당, 설탕, 솔비톨 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 추출물을 함유하는 식품첨가제를 식품에 보존료, 살균제, 산화 방지제, 향신료, 조미료, 감미료, 착향료, 팽창제, 강화제, 개량제, 유화제, 여러 가지 영양제, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색료, 발색제, 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 소포제, 용제, 이형제, 방부제, 품질 개량제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등 또는 기타 식품제조용 첨가제 및 식품소재(부원료)의 필수원료로 사용하는 것을 특징으로 하는 식품첨가제의 이용방법을 제공한다. 이때 식품첨가제는 식품에 침지, 분무 또는 혼합하여 상기 식품에 첨가할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 약 90 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

식품은 과일, 야채, 과일이나 야채의 건조제품이나 절단제품, 과일쥬스, 야채쥬스, 이들의 혼합쥬스이거나 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효유식품, 두류식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 중 어느 하나 또는 하나 이상이다.

이들을 각각 나누어 설명하면 아래와 같다.

껌 제조시, 본 발명의 식품첨가물 0.5 중량%, 껌베이스 25 중량%, 솔비톨 72 중량%를 60 내지 70 ℃로 예비 가열한 믹서에 넣어 혼합한 후, 믹서내부 온도를 55 ℃로 유지시키면서 페퍼민트 향료를 2.5 중량% 첨가한 다음 30분 혼합한 다음 추출하여 압연하고, 24-48시간 숙성시킨 후 재단하고 포장하여 껌을 제조할 수 있다.

또한 제과제빵 제조과정에서 반죽할 때 첨가 사용하며, 소스, 양념장에도 첨가 사용하고, 또한 발효유 또는 요구르트 등에 분말이나 액상을 첨가하여 기능성 또는 기호성 식품으로 사용할 수 있다. 생약 추출분말을 김치, 젓갈, 야채 가공에 직접 투입하여 맛 보존성, 항산화, 변색 방지의 목적으로 사용할 수도 있다. 육가공에서 햄, 소세지 등에 침지 또는 분무 살포하여 사용하며, 분말 또는 과립 형태의 본 발명에 따른 식품첨가물을 마늘, 파, 생강, 허브(herb), 감초 등을 섞어 향신료를 만들어 사용할 수 있고, 수산가공식품인 어묵, 생선, 조미어포, 젓갈 등에도 침지, 분무 및 첨가 방법으로 사용하며, 김치, 단무지, 깍두기, 야채 절임 등에도 침지, 분무 및 첨가할 수 있다.

이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

참고예 1. 동물세포주 배양

본 발명에 사용된 동물세포주인 마우스 유래의 멜라노사이트인 멜란-에이 (Melan-a) 세포주는 영국의 베넷박사 (Dr. D.C. Bennett, University of London)로부터 분양받았으며, 2 mM 글루타민 (glutamine), 100 U/㎖ 페니실린 G

(penicillin G), 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신 (streptomycin, Gibco, USA), 10 % 우태아혈청 (FBS, fetal bovine serum, Gibco, USA), 100 nM TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, Sigma, USA)를 포함하는 RPMI 1640 (Gibco, USA) 배지를 첨가하여 37 ℃의 10 % 이산화탄소 및 90 % 공기 조성의 배양기 (CO_2 incubator) 내에서 계대배양하면서 실험에 이용하였다.

실시예 1. 도자 추출물의 제조

본 발명에 사용한 도자는 충청도 장호원산 공시재료를 구입하여 세척한 후 씨를 제거하고 절단하여 사용하였다. 시료인 도자 (껍질을 포함한 복숭아 과육) 1 ㎏에 80 % 에탄올을 1: 5 (w/v)의 비율로 첨가하고 혼합 후 상온에서 48시간 동안 3회 반복 환류 추출하여 획득한 추출액을 여지 No.2 (Advantec TOYO, Japan)로 여과한 후 50 ℃에서 회전감압농축기 (Rotary vacuum evaporator ; Heidolph VV2011, Switzerland)로 감압농축한 후에 동결 건조하여 갈색의 도자 에탄올 추출물 304 g을 수득하였으며, -20 ℃에 보관하며 티로시나제 저해활성 분석을 위한 시료로 사용하였다 (이하 PFE라 명명함).

실험예 1. 도자 추출물의 티로시나제 저해활성 측정 (*in vitro*)

티로시나제 (Tyrosinase; monophenol monooxygenase, E.C.1.14.18.1, Sigma, USA) 저해 활성 측정은 티로시나제의 작용 결과 생성되는 도파크롬을 비색법에 의해 측정하는 마사모토 등 (Masamoto Y et al., *Planta Med.*, 40(4), pp361-365, 1980)의 방법을 일부 변형하여 실험하였다.

100 mM 인산나트륨완충액 (sodium phosphate buffer, pH 6.8) 1.8 ㎖과 버섯유래의 티로시나제 (mushroom tyrosinase, 120 unit, Sigma, USA) 40 ㎕와 증류수로 100 ㎎/㎖ 농도가 되도록 녹인 실시예 1의 PFE을 최종 농도가 1, 2, 5 ㎎/㎖이 되도록 첨가하고 최종 2.6 ㎖이 되도록 증류수로 보정하였다. 상기 혼합액을 실온에서 5분간 방치한 다음 기질로서 6.3 mM 디페닐알라닌 (DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine) 0.4 ㎖을 첨가한 후 분광광도계 (spectrophotometer; U-3000, Hitachi, Japan)로 475 nm에서 반응액 중 생성된 도파크롬 (Dopachrome)의 변화량을 실온에서 10분간 측정 (time scanning)하여 시료용액 대신 증류수를 첨가한 대조구의 흡광도와 비교하여 티로시나제 저해율(inhibition rate, %)을 구하여, 그 결과를 하기 표 1 및 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, PFE을 1 ㎎/㎖ 첨가시 12.5 %, 2 ㎎/㎖ 첨가시 34.5 %, 5 ㎎/㎖ 첨가시 43.1 % 티로시나제 활성을 저해하였다 (IC_{50}= 5.7 ㎎/㎖). 상기 결과로부터 도자 추출물은 탁월한 티로시나제 저해활성을 가짐을 확인할 수 있다.

[표 1]

PFE 처리 농도 (㎎/㎖)	티로시나제 저해활성 (%)
1	12.5
2	34.5
5	43.1

실험예 2. 도자 추출물의 티로시나제 저해 활성 측정 (*in vivo*)

생체 내 (*in vivo*) 티로시나제 저해 활성 측정은 도자 추출물을 처리한 마우스의 멜라노사이트 세포주인 멜란-에이 세포의 멜라닌 생성 억제 활성을 측정함으로써 이뤄졌다. 멜라닌 정량은 호소이 등 (Hosoi J et al., *Cancer Res.*, 45(4), pp1474-1478, 1985)의 방법을 변형하여 사용하였다.

마우스의 멜라노사이트 (melanocyte)인 멜란-에이 (Melan-a) 세포를 6-웰 플레이트 (6-well plate)에 3× 10^4 세포수/웰의 농도로 분주하고 48시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, PFE를 최종농도 1, 2, 5 ㎎/㎖이 되도록 처리하고 5일 동안 배양하였다. 배양세포를 염화칼슘 ($CaCl_2$), 염화마그네슘 ($MgCl_2$)이 들어있지 않은 인산염완충액 (DPBS; Dulbecco's Phosphated Buffered Saline)으로 2회 세척하고 트립신 (trypsin, Gibco, USA)을 처리하여 세포를 분리하여 각 군당 동일한 수의 세포를 수집하였다. 세포침전물을 염화칼슘 ($CaCl_2$), 염화마그네슘 ($MgCl_2$)이 들어있지 않은 인산염완충액

(DPBS; Dulbecco's Phosphated Buffered Saline)으로 세척하고 100 ㎕의 10% 디메틸술폭시화물 (DMSO)이 첨가된 1 노르말농도 (N)의 수산화나트륨 (NaOH) 용액으로 현탁한 후 60 ℃에서 30분간 처리하고 475 nm에서 흡광도를 측정하여 합성 멜라닌으로 작성된 표준곡선으로부터 멜라닌 양을 환산하여 표 2, 도 2 에 나타내었으며 PFE에 의해 갈색의 멜라닌 색소가 감소되는 것은 도 3에 나타내었다.

도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 PFE를 최종 농도가 1, 2, 5 ㎎/㎖이 되도록 배지에 첨가하여 배양한 마우스의 멜란-에이 세포주로 상기의 시험방법에 따라 멜라닌 양을 비교하여 티로시나제 (tyrosinase) 저해능을 알아본 결과, PFE을 1 ㎎/㎖ 첨가시 4.9 %, 2 ㎎/㎖ 첨가시 12.1 %, 5 ㎎/㎖ 첨가시 62.4 % 멜라닌 합성을 저해하였다. 상기 결과로부터 멜란-에이 세포주에서의 도자 추출물의 멜라닌 합성 저해활성에 따른 IC_{50}는 2.5 ㎎/㎖으로 나타났으며 이는 기존의 피부미백제로 사용되고 있는 알부틴과 유사함을 알 수 있었다. 또한 도 3에 나타난 바와 같이, PFE 첨가량이 증가함에 따라 갈색의 멜라닌 색소가 현저히 감소하였으며, 또한 도 4에서 기존 미백제로 사용되고 있는 2 mM 알부틴 (α-arbutin, Sigma, USA)의 티로시나제 저해활성과 유사한 결과를 얻어 본 발명의 PFE의 티로시나제 저해활성은 상당히 강력함을 확인할 수 있었다.

[표 2]

PFE 처리 농도 (㎎/㎖)	멜라닌 생성 억제 활성 (%)
1	4.9
2	12.1
5	62.4
2 ㎜ 알부틴	62.0

이하, 본 발명의 제형예로서 츄잉껌, 캔디, 비스켓, 아이스크림, 소세지 및 초콜렛의 제형을 예시하고 있으나, 본 발명의 식품 조성물을 포함하는 제형은 이에 한정되는 것은 아니다.

제형예 1 : 츄잉껌(A)의 제조

껌베이스 20 중량%

설탕 76.5 중량%

PFE 0.5 중량%

후르츠향 1 중량%

물 2 중량%

상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

제형예 2 : 츄잉껌(B)의 제조

껌 베이스 25 중량%

솔비톨 72 중량%

PFE 0.5 중량%

페퍼민트 후레버 2.5 중량%

상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

실시예 3 : 캔디(A)의 제조

설탕 54.5 중량%

물엿 45 중량%

PFE 0.4 중량%

오렌지향 0.1 중량%

상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 캔디를 제조하였다.

실시예 4 : 캔디(B)의 제조

말티톨 53.6 중량%

환원물엿 45 중량%

PFE 0.5 중량%

천연허브향 0.14 중량%

상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 캔디를 제조하였다.

실시예 5 : 비스켓의 제조

박력1급 밀가루 88 kg

중력1급 밀가루 76.4 kg

정백당 16.5 kg

식염 2.5 kg

포도당 2.7 kg

팜쇼트닝 40.5 kg

암모 5.3 kg

중조 0.6 kg

중아황산나트륨 0.55 kg

쌀가루 5.0 kg

비타민 B1 0.003 kg

비타민 B2 0.003 kg

밀크향 0.16 kg

물 71.1 kg

전지분유 4 kg

대용분유 1 kg

제일인산칼슘 0.1 kg

살포염 1 kg

분무유 25 kg

PFE 1.7 kg

상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 비스켓을 제조하였다.

실시예 6 : 아이스크림의 제조

유지방 10.0 중량%

무지유고형분 10.8 중량%

설탕 12.0 중량%

물엿 3.0 중량%

유화안정제(스팬,span) 0.5 중량%

향료(스트로베리) 0.15 중량%

물 63.05 중량%

PFE 0.5 중량%

상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 아이스크림을 제조하였다.

실시예 7 : 소세지의 제조

돈육 63.6%

계육 27.5%

전분 3.5%

대두단백 1.7%

식염 1.62%

포도당 0.5%

기타첨가물(글리세린) 1.34-1.46%

PFE 0.12-0.24%

상기와 같이 배합하여 미백효과가 있는 소세지를 제조하였다

실시예 8 : 초콜렛의 제조

설탕 34.5 중량%

코코아 버터 34 중량%

코코아 매스 15 중량%

코코아 파우다 15 중량%

레시틴 0.5 중량%

바닐라향 0.5 중량%

PFE 0.5 중량%

상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 초콜렛을 제조하였다.

발명의 효과

상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 도자 추출물은 시험관 내 (*in vitro*) 실험에서 우수한 티로시나제 저해활성을 나타내며 생체 내 (*in vivo*) 실험에서 우수한 멜라닌 합성 저해 활성을 나타내는 바 미백용 식품첨가제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 도자 추출물의 농도별 (1, 2, 5 ㎎/㎖) 티로시나제 억제 활성을 나타낸 그래프이고,

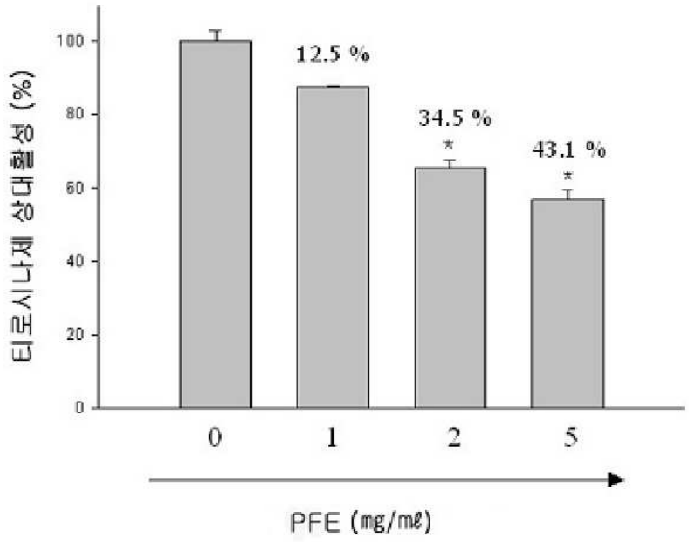
도 2는 마우스 멜라노사이트 세포주인 멜란-에이 (Melan-a)에 대한 도자 추출물의 농도별 (1, 2, 5 ㎎/㎖) 처리에 의한 멜라닌 색소 형성 억제율을 나타낸 그래프이며,

도 3은 마우스 멜라노사이트 세포주인 멜란-에이 (Melan-a)에 대한 도자 추출물의 농도별 (1, 2, 5 ㎎/㎖)처리 후 세포주가 형성한 멜라닌 색소의 변화를 나타낸 사진이다.

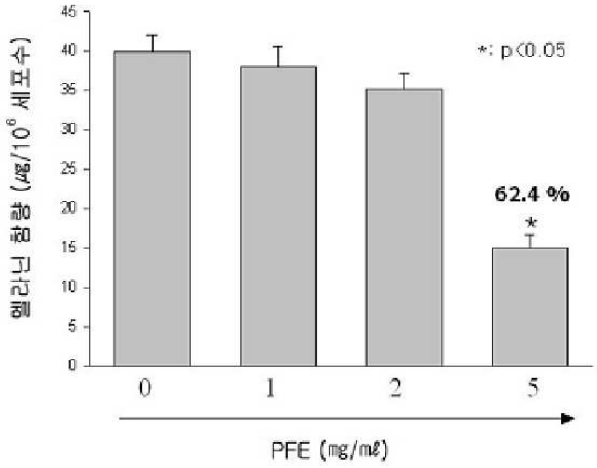
도 4는 마우스 멜라노사이트 세포주인 멜란-에이 (Melan-a)에 대한 알부틴 (α-arbutin)의 농도별 (0.5, 1, 2 mM) 처리에 의한 멜라닌 색소 형성 억제율을 나타낸 그래프이다.

도면

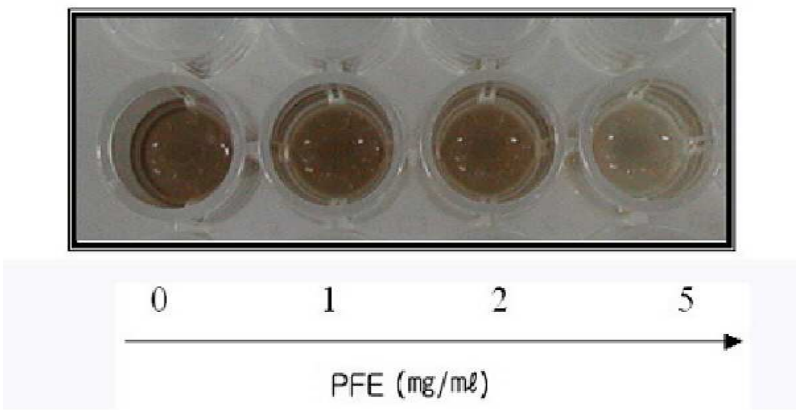
도면1


티로시나제 상대활성 (%)
100
80
60
40
20
0
12.5 %
34.5 %
*
43.1 %
*
0
1
2
5
PFE (㎎/㎖)

도면2


엘라닌 함량 (㎍/10⁶ 세포수)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*: p<0.05
62.4 %
*
0
1
2
5
PFE (㎎/㎖)

도면3


0
1
2
5
PFE (㎎/㎖)

도면4

