



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0108954
(43) 공개일자 2022년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 65/06 (2009.01) A01N 65/36 (2009.01)
A01N 65/44 (2009.01) A61K 36/14 (2006.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/9794 (2017.01)
A61Q 17/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 65/06 (2013.01)
A01N 65/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0012062

(22) 출원일자 2021년01월28일

심사청구일자 2021년01월28일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

김배환

대구광역시 수성구 청수로 213, 1107동 1201호(황금동, 캐슬골드파크1단지)

이현이

울산광역시 동구 양지4길 7, 202호(화정동, 원진하우징)

(74) 대리인

특허법인태백

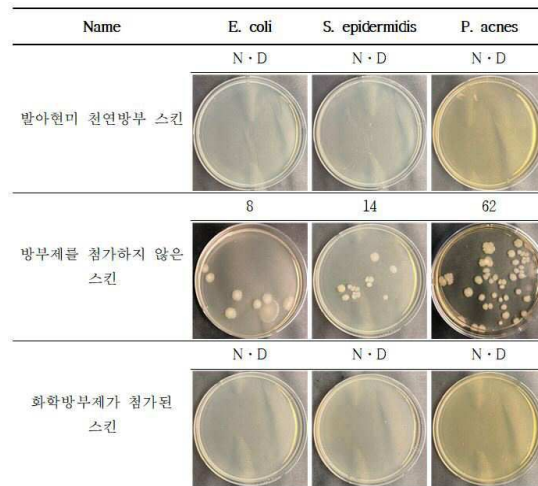
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연복합방부제

(57) 요약

본 발명은 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연복합방부제 조성물에 관한 것으로, 상기 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물로 이루어진 복합조성물은 각각의 추출물보다 표피포도상구균 (Staphylococcus epidermidis), 여드름균 (Propionibacterium acnes), 대장균 (Escherichia coli) 및 잣빛곰팡이균 (Botrytis cinerea)에 대한 향상된 항균 및 항진균 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 복합조성물은 화장품 방부제 또는 농업용 살균제로 제공될 수 있다.

대표도 - 도7



* N · D: Not Detect

(52) CPC특허분류

A01N 65/44 (2013.01)
A61K 36/14 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 8/9794 (2017.08)
A61Q 17/005 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61K 2800/524 (2013.01)
A61K 2800/5922 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345323332
과제번호	2020DG038010106
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	사회맞춤형 산학협력 선도대학(LINC+) 육성사업
연구과제명	발아현미 복합추출물 등 천연추출물을 활용한 방부제로서의 가능성 평가
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연복합방부제.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물은 0.5~2:0.5~2:3~9 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는 천연복합방부제.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 천연복합방부제는 표피포도상구균 (Staphylococcus epidermidis), 여드름균 (Propionibacterium acnes) 및 대장균 (Escherichia coli)에 대한 항균활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 천연복합방부제.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 천연복합방부제는 잿빛곰팡이균 (Botrytis cinerea)에 항진균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 천연복합방부제.

청구항 5

청구항 1항 내지 청구항 4항 중 어느 한 항의 천연복합방부제를 포함하는 화장품 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 천연복합방부제는 화장품 조성물 총 100 중량부에 대하여, 0.1 내지 5 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 화장품 조성물은 수렴화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지, 크림, 에센스, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 샴푸, 린스, 팩 또는 보디오일, 수중유형 또는 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 메이크업제품, 헤어팩 및 헤어에센스로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 8

자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 포함하는 농업용 살균제.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물은 1:1~8 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는 농업용 살균제.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 살균제는 편백나무 추출물을 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 농업용 살균제.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연복합방부제 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 생활주변에서 널리 이용되는 식품, 의약품, 화장품 등의 많은 제품에는 내부 물성의 변화를 방지하고, 일정 기간 동안의 보존을 위해서 필수적으로 방부제가 첨가되어 있다. 또한 제조과정 뿐만 아니라 보관상 오염 또는 사용시 오염을 방지하기 위하여 화학방부제를 첨가하는 것은 일반적이다.
- [0003] 오래전부터 화장품의 내용물에는 다양한 균등의 오염으로부터 제품의 방부를 위해서 클로르페네신, 헥실글리세린(Hexyl glycerin), 카프릴릭글라이콜, 에틸헥실글리세린, 1,2-헥산다이올 등 다양한 방부제들을 다양한 제품에 적용하였다. 이 제형들의 목적은 유화나 가용화, 파우더 팩트 제품들에서 보존성분들의 안전한 피부전달과 고온, 저온 등에서도 제품 보존기능의 유지이다. 방부제 (Preservatives)는 화장품에 배합되어 외부로부터 화장품을 오염시키는 미생물의 증식을 억제함으로써 제품의 변화를 방지하는 목적으로 사용되는 것으로서, 특히 항균 스펙트럼에도 박테리아, 진균, 세균류에도 탁월한 방부효과를 나타낼 수 있다.
- [0004] 하지만 기존의 화장품용 방부제는 화학적 방법에 의해서 제조된 화학방부제가 대부분으로, 이러한 화학방부제는 인체 피부에 장기적으로 사용되는 경우 피부 노화 촉진, 피부 자극, 발암 및 내분비계의 교란시킬 수 있는 문제점과 생분해성 결여 등의 문제점이 있어 인체에 안전하며, 환경친화적인 천연물 유래의 방부제의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2009-0075282호 (2009.07.08. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 인체에 안전하고 친환경적이며 우수한 향균 및 항진균 효과를 나타내는 천연복합방부제 및 살균제로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연복합방부제를 제공한다.
- [0008] 본 발명은 상기 천연복합방부제를 포함하는 화장품 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 포함하는 농업용 살균제를 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명에 따르면, 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물로 이루어진 복합조성물은 각각의 추출물보다 표피포도상구균 (Staphylococcus epidermidis), 여드름균 (Propionibacterium acnes), 대장균 (Escherichia coli) 및 잣빛곰팡이균 (Botrytis cinerea)에 대한 향상된 향균 및 항진균 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 복합조성물은 화장품 방부제 또는 농업용 살균제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 표 2의 천연추출물 14종의 대장균(E. coli)에 대한 향균 효과를 확인한 디스크 확산법 결과이다.
- 도 2는 표 2의 천연추출물 14종의 표피포도상구균(S. epidermidis)에 대한 향균 효과를 확인한 디스크 확산법 결과이다.
- 도 3은 표 2의 천연추출물 14종의 여드름균(P. acnes)에 대한 향균 효과를 확인한 디스크 확산법 결과이다.
- 도 4는 표 4의 천연복합추출물의 향균 효과를 확인한 디스크 확산법 결과로, 도 4A는 대장균(E. coli)에 대한 향균 효과를 확인한 결과이며, 도 4B는 표피포도상구균(S. epidermidis)에 대한 향균 효과를 확인한 결과이며,

도 4C는 여드름균(*P. acnes*)에 대한 항균 효과를 확인한 결과이다.

도 5는 표 5의 천연추출물 7종의 잿빛곰팡이균 (*B. cinerea*)에 대한 항진균 효과를 확인한 디스크 확산법 결과이다.

도 6은 표 6의 발아현미 및 자몽씨 추출물 복합추출물의 잿빛곰팡이균 (*Botrytis cinerea*)에 대한 항진균 효과를 확인한 디스크 확산법 결과이다.

도 7은 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물로 이루어진 천연복합추출물, 방부제가 포함되지 않은 화장품 및 화학방부제가 포함된 화장품의 방부력을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

식품, 화장품, 농업생산물, 임산물 등의 장기보존, 또는 유통기한의 증가를 위해, 미생물에 의한 부패를 방지하고자 방사선 멸균, 화학방부제 및 화학살균제가 사용되고 있으나, 방사선 멸균, 화학방부제 및 화학살균제는 돌연변이 및 암 유발과 같은 안전성에 대한 문제점이 발생함에 따라, 본 발명의 발명자들은 인체에 안전하며 의약품 및 식품에 대한 변성을 초래하지 않는 방부제 및 살균제 발을 위해 연구하던 중 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물로 이루어진 천연복합추출물의 향상된 항균 및 항진균 효과를 확인함에 따라 본 발명을 완성하였다.

본 발명은 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연복합방부제를 제공할 수 있다.

상기 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물은 0.5~2:0.5~2:3~9 중량비로 포함되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 편백나무 추출물, 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물은 1:1:4 중량비로 포함되는 것일 수 있다.

상기 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매에 의해 추출되는 것일 수 있다.

또한, 상기 추출물의 추출방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 진공 추출, 초음파 추출, 열수 환류 추출, 냉수 환류 추출, 증기 추출 등을 들 수 있으며, 이들은 1종 이상의 추출방법이 사용될 수 있다.

상기 천연복합방부제는 표피포도상구균 (*Staphylococcus epidermidis*), 여드름균 (*Propionibacterium acnes*) 및 대장균 (*Escherichia coli*)에 대한 항균활성을 나타내는 것일 수 있다.

상기 천연복합방부제는 잿빛곰팡이균 (*Botrytis cinerea*)에 항진균 활성을 나타내는 것일 수 있다.

본 발명은 상기 천연복합방부제를 포함하는 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

상기 천연복합방부제는 화장품 조성물 총 100 중량부에 대하여, 0.1 내지 5 중량부로 포함되는 것일 수 있다.

상기 화장품 조성물은 수렴화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지, 크림, 에센스, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 샴푸, 린스, 팩 또는 보디오일, 수중유형 또는 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨케어, 메이크업제품, 헤어팩 및 헤어에센스로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

상기 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리

콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0028] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 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.

[0029] 또한, 본 발명은 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물을 유효성분으로 포함하는 농업용 살균제를 제공할 수 있다.

[0030] 상기 자몽씨 추출물 및 발아현미 추출물은 1:1~8 중량비로 포함되는 것일 수 있다.

[0031] 상기 살균제는 편백나무 추출물을 추가로 더 포함하는 것일 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0035] <실험예>

[0036] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0038] 1. 균주 및 균주 배양

[0039] 표 1과 같은 균주를 KCTC(한국생명공학연구원 생물자원센터)에서 제공받아 표 1과 같은 조건으로 배양하였다.

[0040] 항균활성 실험에 사용된 세균은 그람양성균인 표피포도상구균 (*Staphylococcus epidermidis*) 및 여드름균 (*Propionibacterium acnes*)과 그람음성균인 대장균 (*Escherichia coli*)을 공시균주로 사용하였으며, 진균으로 껌빛곰팡이균 (*Botrytis cinerea*)을 사용하였다.

[0041] 상기 균주의 생육배지로 세균은 Nutrient broth와 agar, Tryptic soy broth와 agar를 사용하고, 혐기성 균주인 *P. acnes* 및 *B. cinerea* 곰팡이는 Potato dextrose broth와 agar를 사용하였으며 각 균주는 해당배지에서 적정 온도와 CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다.

표 1

Type	Bacterial strain	Liquid culture medium	Solid culture medium	Temperature
Gram-positive	<i>S. aureus</i> (KCTC 1621)	Nutrient broth	Nutrient agar	37℃
	<i>S. epidermidis</i> (KCTC 1917)	Trypticase soy broth	<i>Trypticase soy agar</i>	37℃
	<i>P. acnes</i> (KCTC 3314)	Gam semisolid	Gam semisolid + agar	30-37℃
Gram-negative	<i>E. coli</i> (KCTC 1039)	Nutrient broth	Nutrient <i>agar</i>	37℃
Fungi	<i>B. cinerea</i> (KCTC 42932)	Potato Dextrose broth	Potato Dextrose agar	25℃

[0044] 2. 디스크 확산법 (Disk diffusion method)을 이용한 항균활성 확인

[0045] 시험물질의 항균 활성은 disk diffusion method를 이용하여 확인하였다. 3차 활성을 끝낸 균액을 1×10⁶ CFU/mL 농도로 균액을 희석 시킨 후 고체배지에 100 μL씩 spreader를 사용하여 균등하게 도말한 후 직경 8 mm의 멸균

된 paper disc(ADVANTEC, Japan)를 균이 도말된 고체배지에 올려두고 음성대조균인 증류수와 시험물질을 20 μ L씩 흡수시켰다. Dish를 뒤집어 37℃ 배양기에서 호기성균은 24시간, 혐기성균은 48시간 배양하였다. 그 후 paper disc 주변에 생성된 생육저해환(clear zone)의 직경(mm)을 측정하여 항균 활성을 비교하였다.

[0046] 젯빛곰팡이 진균의 경우 3차 활성이 끝난 병원균의 균사 끝부분을 코르크보러를 이용하여 agar plug로 떼어내어 새 PDA배지 가운데 접종하였다. 이후 25℃ 배양기에서 3일간 배양한 후 발아현미 추출물 및 각 추출물을 일정한 간격으로 배치한 paper disc에 추출물을 20 μ L씩 접종하여 5일간 추가 배양하여 disc와 균사 끝 부분까지의 길이를 측정하였다.

[0048] 3. 최소생육저지농도 (Minimum Inhibitory Concentration) 확인

[0049] 최소생육저지농도를 확인하기 위해 Minimum Inhibitory Concentration(MIC) test를 수행하였다. 상기 표 1의 조건으로 활성 배양된 각 균주를 생리식염수에 희석하여 McFarland standards 1×10^6 CFU/mL의 값으로 조절하여 접종 균액을 준비하였다.

[0050] 이때 각각의 균수는 시험 균액의 대조균(control)을 준비하여 10 배 연속희석법으로 실제 투입된 정확한 균수를 측정하였다. 발아현미 추출물 및 각 추출물은 배지를 이용해 농도별로 희석하여 사용하였으며, 세균은 고체배지에 100 μ L씩 spreader를 사용하여 균등하게 도말하였다. 직경 8 mm의 멸균된 paper disc(ADVANTEC, Japan)를 균이 도말된 고체배지에 올려두고 시험물질을 20 μ L씩 흡수시킨 후 37℃에서 24시간 배양하였다. 이후 각 균주의 생장을 억제하는 추출물의 최소 농도를 확인하여 MIC를 확인하였으며 모든 실험은 3회 반복 수행되었다.

[0052] 4. 추출물 시너지 효과 확인

[0053] 추출물의 시너지효과를 확인하기 위해, 상기 MIC 결과를 바탕으로 농도와 균을 설정하였다. 상기 표 1의 조건으로 활성 배양된 각 균주를 생리식염수에 희석하여 McFarland standards 1×10^6 CFU/mL의 값으로 조절하여 접종 균액을 준비하였다. 이때 각각의 균수는 시험 균액의 대조균(control)을 준비하여 10 배 연속희석법으로 실제 투입된 정확한 균수를 측정하였다. 세균은 고체배지에 100 μ L씩 spreader를 사용하여 균등하게 도말하였다. 직경 8 mm의 멸균된 paper disc(ADVANTEC, Japan)를 균이 도말된 고체배지에 올려두고 2가지 시험물질을 10 μ L씩 흡수시킨 후 37℃에서 24 시간 배양하여 나타난 생육저해환의 길이를 측정하였다.

[0055] <실시예 1> 발아현미 및 천연물 추출물 준비

[0056] 1. 현미발아 및 열수추출물 준비

[0057] 현미 350g을 37℃, 차광상태에서 24시간동안 발아배지에 침지시켜 발아시키고, 현미의 윗면이 마르지 않도록 20분 간격으로 1분 동안 침지된 발아배지를 급수펌프를 이용하여 전체적으로 분사하였다. 현미발아 종료 후 37℃, 차광상태에서 2시간동안 발아된 현미를 건조시켰다.

[0058] 건조된 발아현미를 동결건조하여 분말로 제작한 후 분말중량대비 10배의 증류수를 가하여 40℃의 조건에서 3 내지 24 시간 동안 유효성분을 추출한 후 filter paper로 감압여과 하고, 동결건조를 통해 추출물을 얻었다.

[0060] 2. 천연물 열수추출물 준비

[0061] 천연물 분말 200g에 분말중량대비 10배의 증류수를 가하여 40℃의 조건에서 3 내지 24 시간 동안 유효성분을 추출한 후 filter paper로 감압여과하고, 여과액은 동결건조를 통해 추출물을 얻어 사용하였다.

[0063] <실시예 2> 항균효과를 나타내는 추출물 선별

[0064] 1. 디스크 확산법에 따른 항균추출물 확인

[0065] 14종의 천연추출물의 항균활성을 확인하기 위해 디스크 확산법을 수행하였다.

[0066] 먼저, 그람양성균인 *S. epidermidis*(*Staphylococcus epidermidis*), *P. acnes*(*Propionibacterium acnes*) 그람음성균인 *E. coli*(*Escherichia coli*)를 공시균주로 사용하여 1차 스크리닝을 수행하였다.

[0067] 그 결과, 표 2와 도 1 내지 도 3과 같이 편백나무, 자몽씨, 미모사 및 발아현미 추출물이 상기 3종의 균에서 모두 항균효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 천연 항균제로 알려진 자몽씨 추출물에서 강한 항균 효과가 확인되었다.

표 2

No.	Name	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>
1	편백나무 (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)	++	+++	++
2	티트리 (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	+	-	+
3	자몽씨 (<i>Grapefruit seed</i>)	+++	++++	++++
4	녹차(<i>Green tea</i>)	-	+	-
5	붉나무 (<i>Japanese sumac</i>)	-	-	-
6	미모사 (<i>Mimosa pudica</i>)	+	++	+
7	발아현미 (<i>Germinated brown rice</i>)	++	+	+
8	국화 (<i>Dendranthema morifolium</i>)	-	-	-
9	검은콩 (<i>Black soybean</i>)	-	-	-
10	계피(<i>Cinnamomum japonicum</i>)	+	+	+
11	라벤더 (<i>Lavandula species</i>)	-	-	-
12	스피루리나 (<i>Spirulina</i>)	-	-	-
13	고삼 (<i>Sophora flavescens</i>)	+	+	+
14	비트 (<i>Beetroot</i>)	-	-	-

[0069] * Determined by measuring the average diameter of the clear zone of inhibition: +, < 5 mm; ++, 6-10 mm; +++, 11-15 mm; +++, > 15 mm.

[0071] 2. 최소 생장억제농도 확인

[0072] 각 병원균별로 선발된 식물추출물의 유기농자재의 농도에 따른(250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm 및 2000 ppm) 최소 생장억제농도를 확인하기 위해, 농도별로 첨가된 배지에 병원균을 접종하고 최소 생장억제농도를 확인하였다.

[0073] 그 결과, 표 3과 같이 편백나무 및 자몽 씨 추출물에서는 최소농도인 250 ppm에서도 억제하는 것으로 나타났으며, 발아현미 추출물에서는 1000 ppm 농도에서 3균주 모두 생장을 억제효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0074] 상기 결과로부터 상대적으로 저렴한 국산농산물인 발아현미 추출물을 고농도로 첨가하여 다음 연구를 수행하였다.

표 3

Name	Concentration	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>
편백나무 (<i>Chamaecyparis obtusa</i>)	250	+	+	+
	500	++	++	++
	1000	++	+++	++
	2000	++	+++	++
자몽씨 (<i>Grapefruit seed</i>)	250	++	+	+
	500	++	++	+++
	1000	+++	+++	+++
	2000	+++	++++	++++
발아현미 (<i>Germinated brown rice</i>)	250	-	-	-
	500	+	-	-
	1000	+	+	+
	2000	++	+	+

[0076] * Determined by measuring the average diameter of the clear zone of inhibition: +, < 5 mm; ++, 6-10 mm; +++, 11-15 mm; +++, > 15 mm.

[0078] **3. 복합추출물의 시너지 효과 확인**

[0079] 추출물의 시너지 효과를 확인하기 위해, 디스크 확산법을 이용하여 4개의 실험군 (편백+자몽씨, 자몽씨+발아현미, 편백+발아현미, 편백+자몽씨+발아현미)의 항균 시너지 효과를 확인하였다.

[0080] 각 추출물의 농도는 편백나무 500 ppm, 자몽씨 500 ppm 및 발아현미 2000 ppm으로 항균효과를 확인하였다.

[0081] 그 결과, 표 4와 도 4A 내지 도 4C와 같이 P. acnes에 편백나무+발아현미 추출물 처리군을 제외하고 기존 단일 추출물을 처리한 경우 보다 복합추출물의 항균활성이 향상된 것을 확인할 수 있었으며, 세 추출물을 모두 포함한 군에서는 3개의 군 모두에서 높은 항균 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

표 4

[0082]

No.	Name	E. coli	S. epidermidis	P. acnes
1	편백나무+자몽씨	+++	+++	+++
2	자몽씨+발아현미	+++	+++	+++
3	편백나무+발아현미	+++	+++	++
4	편백나무+자몽씨+발아현미	++++	++++	++++

[0083] * Determined by measuring the average diameter of the clear zone of inhibition: +, < 5 mm; ++, 6-10 mm; +++, 11-15 mm; +++, > 15 mm.

[0085] **<실시예 3> 항진균 효과를 나타내는 추출물 선별**

[0086] **1. 디스크 확산법에 따른 항진균 추출물 확인**

[0087] 추출물의 화장품 방부제로서 뿐만 아니라 농사용 제균제로서의 가능성을 확인하기 위해 앞선 실험에서 항균 효과가 나타난 추출물을 2,000 ppm 농도로 이용하여 잣빛곰팡이균(Botrytis Cinerea)의 생장 억제 효과를 확인하였다.

[0088] 그 결과, 표 5 및 도 5와 같이 자몽씨 및 발아현미 추출물에서 항진균 효과가 확인되었다. 상기 결과로부터 높은 항진균 효과가 확인된 자몽씨 및 발아현미 추출물을 선별하고 다음연구를 수행하였다.

표 5

[0089]

No.	Name	B. cinerea
1	편백나무 (Chamaecyparis obtusa)	-
2	발아현미 (Germinated brown rice)	+
3	자몽씨 (Grapefruit seed)	+
4	미모사 (Mimosa pudica)	-
5	티트리 (Melaleuca alternifolia)	-
6	계피(Cinnamomum japonicum)	-
7	고삼 (Sophora flavescens)	-

[0090] * Determined by measuring the average diameter of the clear zone of inhibition: +, < 5 mm; ++, 6-10 mm; +++, 11-15 mm; +++, > 15 mm.

2. 복합추출물의 시너지 효과 확인

앞선 항진균 스크리닝을 통해 선발한 발아현미 추출물과 자몽 씨 추출물의 젓빛곰팡이균에서 시너지효과를 확인하기 위해 디스크 확산법을 수행하였다.

그 결과, 표 6 및 도 6과 같이 발아현미 추출물의 농도가 증가할수록 자몽씨 추출물과의 시너지효과가 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

표 6

No.	Name	B. cinerea
1	발아현미 (2000 ppm)	+
2	자몽씨 (250 ppm)	+
3	자몽씨(250 ppm)+발아현미(250 ppm)	++
4	자몽씨(250 ppm)+발아현미(500 ppm)	++
5	자몽씨(250 ppm)+발아현미(1000 ppm)	++
6	자몽씨(250 ppm)+발아현미(2000 ppm)	++

* Determined by measuring the average diameter of the clear zone of inhibition: +, < 5 mm; ++, 6-10 mm; +++, 11-15 mm; +++, > 15 mm.

<실시예 3> 화장품 방부제로서의 효과 확인

천연 복합추출물이 함유된 화장품에 대한 방부력을 방부제의 유효성 측정에 사용되는 방법 중 미국화장품 협회의 방법인 CTFA (The cosmetics, Toiletry, and Fragrance Association)법을 기준으로 확인하였다.

표 7과 같은 성분으로 천연 복합추출물을 2% 함유한 스킨을 제조하고 대조군으로 방부제를 첨가하지 않은 스킨과, paraben 계열의 화학방부제가 첨가된 스킨을 제조하여 실험에 사용하였다.

표 7

목록	성분명	함량(%)
1	Water	80
2	EDTA-2Na	0.1
3	Sodium Hyaluronate 1%	5
4	Glycerin	5.2
5	DPG-K2	0.1
6	Adenosine	0.05
7	Niacinamide	2
8	Aminocoat	0.1
9	Allantoin	0.1
10	Hydrol-HDE	0.05
11	HCO-60	0.1
12	Vitamin E Acetate	0.15
13	Fragrance	0.05
14	Germination Brown rice Extract 2%	3
15	Grapefruit seed Extract 1%	2
16	Chamaecyparis obtusa Extract 1%	2

균주를 표 8과 같은 배양 조건으로 37℃에서 24시간 동안 전 배양하여 활성화시킨 후 McFarland standards가 1×10^6 CFU/mL 되도록 새 액체 배지에 희석하였다.

표 8

Type	Bacterial strain	Liquid culture medium	Solid culture medium
Gram-positive	S. aureus (KCTC 1621)	Nutrient broth	Nutrient agar
	S. epidermidis (KCTC 1917)	Trypticase soy broth	Trypticase soy agar
Gram-negative	E. coli (KCTC 1039)	Nutrient broth	Nutrient agar

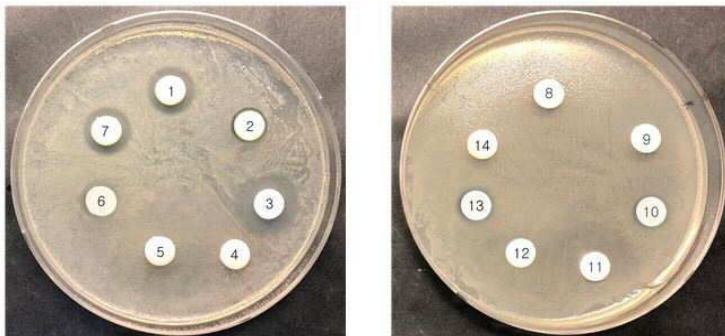
[0106] 사용된 균주는 그람양성균 중 피부상재균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, 그람음성균 중 대장균인 *Escherichia coli*을 사용하였으며, 제조한 스킨 100g에 희석 균주를 100 μ L 접종한 뒤 액체배지와 1:9 비율로 희석하여 균질화하였다. 한천평판배지에 검체를 100 μ L 접종하고 멸균 spreader로 고르게 도말한 뒤 37°C에서 24시간 배양하여 형성된 균의 집락수 (colony)를 측정하여 균주의 사멸 정도를 확인하였다. CTFA의 guidelines에 따라 7일 후 집락수가 처음 균 수 보다 99.9% 사멸하는지를 확인하여 방부력을 측정하였다.

[0107] 그 결과, 도 7과 같이 발아현미 복합추출물과 화학방부제가 첨가된 스킨에서는 균주가 검출되지 않는 것이 확인되었다.

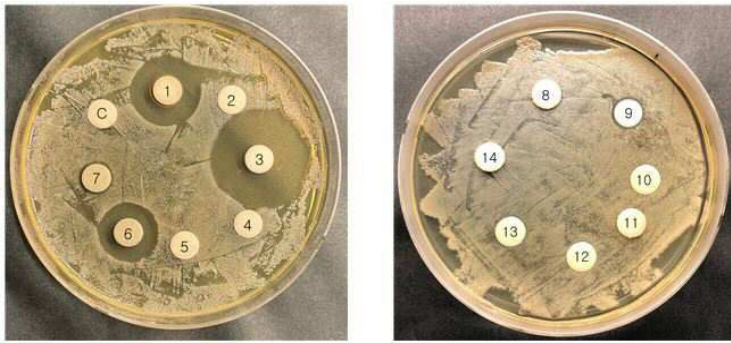
[0109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

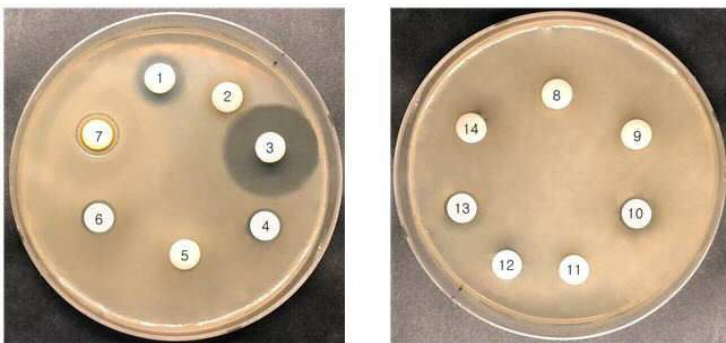
도면1



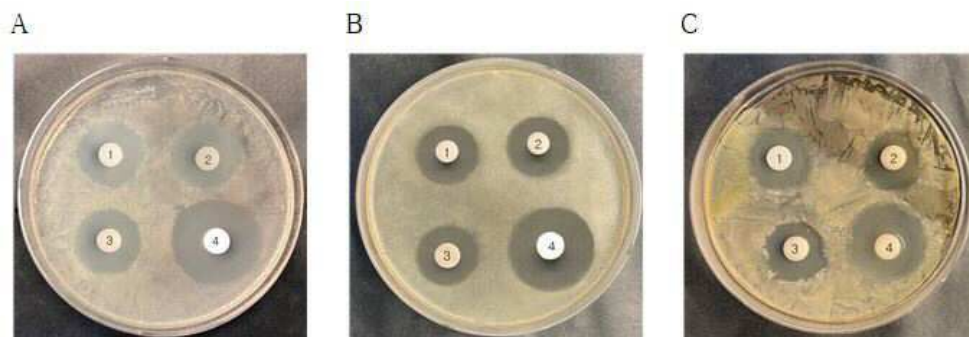
도면2



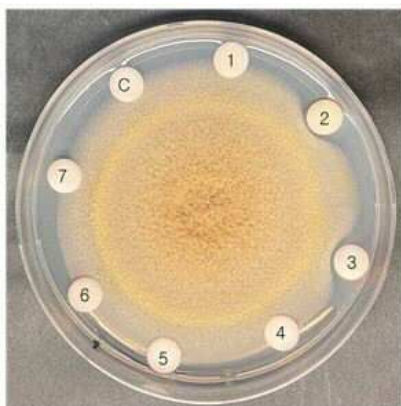
도면3



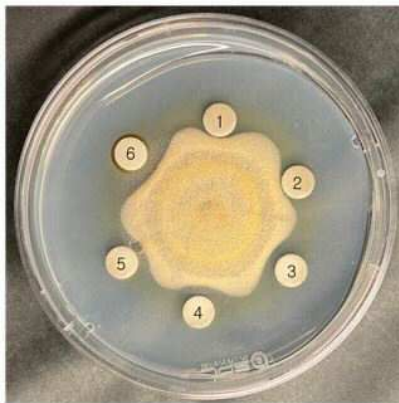
도면4



도면5



도면6



도면7

Name	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>
	N · D	N · D	N · D
발아현미 천연방부 스킨			
	8	14	62
방부제를 첨가하지 않은 스킨			
	N · D	N · D	N · D
화학방부제가 첨가된 스킨			

* N · D: Not Detect