

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0066089

(43) 공개일자 2020년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/92 (2006.01) A61K 8/36 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/922 (2013.01)

A61K 8/361 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0153169

(22) 출원일자 2018년11월30일

심사청구일자 2018년11월30일

(71) 출원인

주식회사 벤스랩

경기도 화성시 봉담읍 와우안길 17, 첨단과학기술
연구원 내 115호 (수원대학교)

정종문

경기도 용인시 수지구 성북2로 184, 207동 804호
(성북동, 성동마을 수지자이2차)

(72) 발명자

정종문

경기도 용인시 수지구 성북2로 184, 207동 804호
(성북동, 성동마을 수지자이2차)

이승숙

경기도 용인시 수지구 성북2로 184 207동 804호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

성낙훈

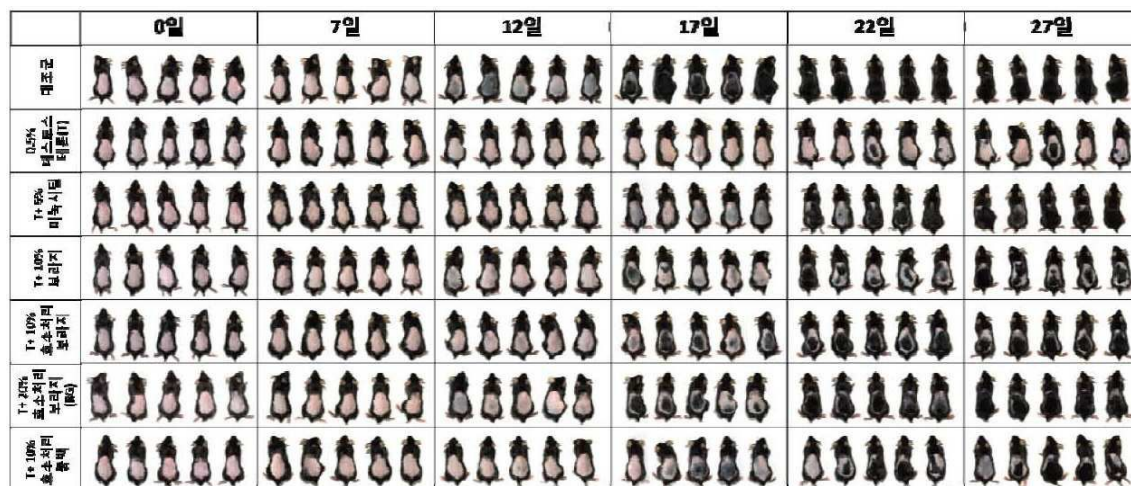
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 높은 탈모개선효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일, 이
의 제조방법 및 이를 포함하는 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 감마-리놀렌산 함량이 높은 보라지 오일을 효소처리하여 5알파-환원효소를 억제하여 높은 탈모개선효과 즉, 탈모 및 모낭세포 회복 효과가 우수한 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장품 조성물에 관한 것으로서, 보라지 오일을 리파아제 효소로 효소처리시켜 유리 감마-리놀렌산을 포함함을 특징으로 한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61Q 7/00 (2019.01)

C12P 7/6427 (2013.01)

A61K 2800/782 (2013.01)

(72) 발명자

오현근

경기도 수원시 팔달구 일월로42번길 8-29 203호

박수영

경기도 수원시 권선구 서수원로 589, 304동 302호

명세서

청구범위

청구항 1

보라지 오일을 리파아제 효소로 효소처리시켜 유리 감마-리놀렌산을 포함함을 특징으로 하는 높은 탈모개선효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 보라지 오일을 효소처리시키는데 사용되는 리파아제 효소가 리조푸스속 미생물 유래의 리파아제 효소임을 특징으로 하는 높은 탈모개선효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 리파아제 효소를 수지에 고정시킨 고정화 효소임을 특징으로 하는 높은 탈모개선효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 효소처리 보라지 오일을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합하여 용해시킨 후, 지방산을 포함하는 분층으로 회수된 것임을 특징으로 하는 높은 탈모개선효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일.

청구항 5

보라지 오일을 효소처리시켜 효소처리 보라지 오일을 제조하는 방법에 있어서,

(1) 10 내지 40℃의 범위 이내의 온도로 예열된 보라지 오일을 수지에 고정시킨 리파아제 효소와 10 내지 100시간 동안 접촉시키는 조건에서 효소처리시키는 효소처리단계; 및

(2) 효소처리를 완료하여 수득되는 효소처리물을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합한 후, 용해시켜 지방산을 포함하는 분층을 회수하는 분획단계;

를 포함함을 특징으로 하는 효소처리 보라지 오일의 제조방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 효소처리 보라지 오일을 피부외용제 총 중량 대비 0.001% 내지 90%로 포함함을 특징으로 하는 탈모개선용 피부 외용제.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 피부 외용제가 연고, 패치, 젤, 크림, 미스트 혹은 분무제의 제형임을 특징으로 하는 탈모개선용 피부 외용제.

청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 효소처리 보라지 오일을 화장료 조성물 총 중량 대비 0.001% 내지 90%로 포함함을 특징으로 하는 탈모개선용 화장료 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 화장료 조성물이 화장수, 유액, 로션, 크림, 세럼, 에센스, 에멀전, 화장연고, 스프레이, 젤, 팩, 클렌저, 비누, 샴푸, 린스, 입욕제, 혹은 세정제의 제형임을 특징으로 하는 탈모개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 높은 탈모개선효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것으로 특히, 감마-리놀렌산 함량이 높은 보라지 오일을 효소처리 하여 5알파-환원효소를 억제하여 높은 탈모개선효과 즉, 탈모 및 모낭세포 회복 효과가 우수한 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대체로 인간모발의 수는 약 10만개에서 15만개로 추정하고 있다. 모발은 하루에 50개에서 100개 정도 빠지게 되며, 하루 100개 이상이 계속 빠졌을 때 탈모증(hair loss)이 시작되었다고 한다. 탈모의 원인은 매우 다양하며 사람마다 양상이 다르게 나타난다. 특히 남성의 머리카락은 20대를 절정으로 점점 얇아지는 경향이 있다. 탈모의 여러 증상들 중에서 가장 흔하게 나타나는 남성형 탈모증(Male Pattern Baldness, MPB)은 유전적인 특징이 크며, 또 다른 큰 이유는 남성호르몬의 이상에 의해 모근이 약해지고 피지 분비가 과다하게 되면서 두피에 염증을 일으켜 모발이 빠지게 된다.

[0003] 상기 남성형 탈모의 가장 큰 원인(약 90% 이상)은 남성호르몬의 이상(androgenic alopecia)이다. 전립선 비대증과 마찬가지로 5-알파 환원효소에 의해 디하이드로테스토스테론이 과량 합성되게 되면 디하이드로테스토스테론이 모낭 주변의 안드로겐 수용체에 결합하여 점점 모낭을 축소 및 황폐화하여 결국 모발의 성장기 기간을 축소하게 된다. 축소된 성장기 때문에 모발의 뿌리, 즉 모근이 충분히 발육하지 못하고 동시에 색소축적도 충분하지 못하게 된다. 이렇게 힘이 없는 미성숙의 모발이 자주 두피에서 빠져나와 결국 탈모가 시작된다. 계속 축소된 모낭은 결국 죽게 되고 이에 영구적인 탈모가 발생하게 되는데 이때가 되면 모발이식 이외 치료가 어려워진다. 디하이드로테스토스테론은 모발의 성장 주기 중 성장기를 짧게 하고 휴지기를 길게 하여 결국 성장주기를 거듭할수록 모발의 크기가 점점 작아지게 만드는 요인을 제공하는 것이다. 탈모가 진행되는 동안 모낭은 점점 수축되고 대신 피지선은 점점 커져서 머리카락은 점점 가늘고 작아지며, 대체로 기름기는 점점 많아져 뽀루지 또는 염증을 만들기도 한다. 가늘고 작아진 머리는 솜털로 변하고 우리 눈에 보이지 않게 되어 머리 속 두피가 들여다 보이기 시작한다. 빠지고 다시 나면서 이전보다 더 가늘어지는 반복과정을 20회 정도 하고 나면 모낭은 영원히 죽게 되고 어떤 치료수단도 이를 다시 회복시키지 못하게 되는 것이다. 테스토스테론은 주로 겨드랑이 털과 음모의 성장에 영향을 주고 있는 반면, 디하이드로테스토스테론은 턱수염과 대머리에 영향을 미치고 있다고 알려져 있지만 확실치는 않다.

[0004] 전립선 비대증 및 남성형 탈모를 치료하기 위한 약물들도 많이 알려져 있다. 그러나 근본적인 치료를 위해서는 5-알파 환원효소를 억제하는 것이 가장 중요하다.

[0005] 5-알파 환원효소 합성 억제제에는 피나스테리드(Finasteride)와 두타스테리드(Dutasteride) 등이 있다. 테스토스테론은 전립선 조직 내에서 5-알파 환원효소에 의해 디하이드로테스토스테론으로 전환된다. 따라서 디하이드로테스토스테론의 변환을 효율적으로 막는 5-알파 환원효소 억제제를 복용하면 전립선의 크기를 줄일 수 있다는 것이다. 보통 6개월 정도 사용하면 전립선의 크기가 최대로 줄어드는 것으로 알려져 있다. Merck사가 개발한 5-알파 환원효소의 경쟁적 억제자인 피나스테리드는 1형도 억제하지만 주로 2형 5-알파 환원효소를 억제하여 전립선과 혈중에 존재하는 디하이드로테스토스테론을 감소시킨다. 두타스테리드는 피나스테리드에 비해 반감기가 길고, 1형 효소에 대하여 45배, 2형에 대하여는 2.5배 더 강력한 결합력을 갖는다. 대부분 간에서 대사가 이루어져 간부전 환자에서는 사용을 제한해야 한다. 이들 5-알파 환원효소의 합성 억제제는 전립선 비대증의 근본적인 치료 방법이라고 할 수는 있으나 5 mg/일씩 4 내지 6개월 장기간 복용해야 환자가 효과를 볼 수 있으며 복용을 중단하면 재발하는 문제점이 제시되고 있다. 부작용으로 발기부전, 성욕감퇴, 여성형 유방, 사정장애 등이 보고되고 있다.

[0006] 또한 남성형 탈모를 치료하기 위해서도 피나스테리드가 사용된다. 피나스테리드는 본래 전립선 비대증을 치료하기 위해 처음 사용되었다가 탈모 치료효과도 미국식품의약안전청에 의해 인정되어 복용량을 다르게 하루 1 mg 씩 처방, 탈모 치료제(상품명, 프로페시아)로 판매되고 있다. 상기한 대로 이 약품도 두피에 존재하는 5-알파 환원효소를 억제하는 기전을 통해 탈모 치료효과를 나타낸다. 그러나 최소 3 내지 5개월은 지나야 효과가 있으며 복용하다가 중단하면 12개월 이내에 원상태로 돌아가는 단점이 있다. 또한, 원래 피나스테리드의 구조 자체가 테스토스테론이나 프로게스테론 호르몬들과 같은 성호르몬과 비슷해서 여성들에게서 부작용이 종종 발견되며 특히, 기형아 출산의 위험성 때문에 산모의 사용을 엄격히 제한하고 있다. 심지어 피나스테리드를 생산하는 공장에서는 여자가 직접 생산에 참여치 못하도록 법으로 금지하고 있다.

- [0007] 미녹시딜 또한 고혈압 치료를 위해 개발되었다가 고혈압 환자에게서 탈모 억제현상을 관찰하고 발모제로 개발, 시판되었다. 미녹시딜의 작용기전은 명확하지 않으나 두피의 혈관을 팽창하여 산소와 영양분을 모낭에 수월하게 공급하여 머리카락 생성과 발육을 촉진하는 것으로 볼 수 있다. 부작용은 거의 없으나 최대효과를 내려면 6 개월 이상 오랜 기간 도포해야 하며 사용을 중지하였을 때에 그 효과가 사라진다. 또한 5-알파 환원효소의 억제제가 아니어서 디하이드로테스토스테론의 농도를 낮추지 못한다.
- [0008] 최근에는 기존의 전립선 비대증과 남성형 탈모를 치료하기 위한 약물 치료법의 부작용과 단점을 보완하기 위해 생약요법이 많이 대두되고 있다. 생약요법은 전립선 비대증 및 남성형 탈모 치료에 다른 가능성을 보여주기는 하지만, 현재까지 위약 대조군과 비교한 장기간의 임상결과가 축적되어 있지 않다.
- [0009] 미국에서만 2백만 명 이상이 이용하고 있는 것으로 보고된 쏘팔메토는 톱아자 나무의 열매에서 추출한 것으로서 전립선 비대증에 가장 흔히 사용되는 대표적인 천연물 유래 기능성 식품이다. 과거 인디언들은 쏘팔메토 열매를 비뇨생식기계의 치료제로 사용했던 기록되어 있다. 쏘팔메토의 주성분은 트리글리세라이드(triglycerides)형의 여러 지방산과 피토스테롤(phytosterols)으로서, 5-알파 환원효소억제제 작용을 하여 전립선 비대증을 개선하고 탈모를 개선하는 것으로 추정된다. 국내에서는 쏘팔메토가 전립선 비대증을 개선하는 효과가 인정되어 개별인정형 제품으로 시판되고 있다. 최근에는 쿠쿠르비트 종자유를 유효성분으로 하여 전립선 비대증 치료제로 제조 판매되고 있다. 실제로 이 종자유는 유럽의 호박씨 추출유로서 유럽 제약회사로부터 수입하고 있다. 이것의 작용기전으로 제약회사 측은 쿠쿠르비트 종자유가 전립선 비대를 일으키는 혈중 콜레스테롤을 억제하고 남성호르몬의 변화를 막아 전립선 비대에 의한 배뇨장애를 치료한다고 설명하고 있다.
- [0010] 동백은 겨울의 장미라고도 불리며 중국의 산둥지방, 대만, 한국의 남쪽지방, 일본 등에서 자란다. 해발 300 내지 1,100 m에서 주로 자라고 보통 키가 1.5-6m 정도이다. 1월에서 3월에 꽃을 피운다. 한국에서는 통영과 제주도에서 재배된다. 특히, 국내 통영지방에서 생산되는 동백 오일은 일본 아토피성 피부염 전문회사에서 수입하여 판매되고 있다. 동백유는 차나무과(*Theaceae*)의 동백나무(*Camellia japonica L.*) 및 그 동속식물의 종자에서 채취되는 지방유로서 구성 지방산이 올리브 오일과 유사하여 올레산(Oleic acid)이 82-86%까지 함유되어 있어서 올리브유와 비슷한 용도로 크림, 유액 등에 사용되고 있으며, 특히 두발용으로 많이 사용되고 있다. 160 내지 220℃의 고온에서도 잘 변질되지 않는다. 동백유에 많이 함유되어 있는 올레산(Oleic acid)은 몸에 해로운 저밀도 콜레스테롤인 LDL 콜레스테롤의 수치는 낮추는 반면, 몸에 좋은 고밀도 콜레스테롤인 HDL 콜레스테롤의 수치는 높여주어 고혈압과 심장병 등을 예방해 준다. 암 예방 효과와 노화로 인한 기억력 감퇴 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [0011] 그러나 자연계에는 자유 올레산(free oleic acid)으로 존재하지 않고 대개 에스테르(ester)형으로 글리세롤(glycerol)에 공유결합되어 있다. 시중의 올레산은 거의 오일의 비누화로 이루어진 K^+ 혹은 Na^+ 가 붙어있는 형태이거나 가에탄올 분해(ethanolysis)를 통한 에틸 에스테르(ethyl ester)형이거나, 혹은 여러 단계의 공업적 과정을 거쳐 제조한 것이다.
- [0012] 이에, 본 발명자 등은 필수 불포화지방산인 올레산과 리놀레산 등을 풍부하게 함유하고 있는 동백 오일을 흡수와 이용에 용이하도록 발효하여, 다른 화학적 처리를 전혀 하지 않으면서 글리세롤 골격분자에서 유리된 올레산과 리놀레산 등을 포함한 필수지방산의 함량을 높여 생기는 5-알파 환원효소 억제능으로, 전립선비대증 및 남성형 탈모를 예방하고 개선하는 효과를 가지는 발효 천연오일을 제조하고, 이를 대한민국 특허청에 출원하여 등록번호 제10-1452320호로 특허등록한 바 있다.
- [0013] 한편, 탈모개선효과와 관련한 선행기술들이 다수 존재하고 있다.
- [0014] 예를 들어, 대한민국 공개특허공보 공개번호 제10-2009-0076671호(발명의 명칭: 탈모방지 및 발모촉진용 조성물의 제조방법)는 "본 발명은 우수한 탈모 방지, 모발 성장 효과를 지니는 탈모 방지 및 발모 촉진용 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 모근세포의 소멸, 위축과 관련하여 이를 개선시킬 수 있는 천연물 중 신모세혈관 생성을 촉진시키는 전엽 음양곽, 하늘타리, 강진향, 뽕무 및 조구 등의 알코올추출물 또는 열수추출물 또는/그리고 산화 인지질(Oxidized 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, OxPAPC)의 단일 또는 복합조성물을 포함한다. 또한 공통적으로 하수오, 검은콩, 구기자, 감초의 천연물의 알코올추출물 또는 열수추출물을 함유하여 모발을 굵고 튼튼하게 유지시켜주는 양모효과를 가지는 것을 특징으로 한다."고 개시하고 있다.
- [0015] 대한민국 공개특허공보 공개번호 제10-2011-0127447호(발명의 명칭: 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물)는 "본 발명은 인지질을 유효성분으로 포함하는 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 동물로부터 추출된 인지질을 유효성분으로 포함하는 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물에 관한 것이다."고 개시하

고 있다.

[0016] 또한, 대한민국 공개특허공보 공개번호 제10-2012-0102111호(발명의 명칭: 탈모의 감소 및 / 또는 육모 및 / 또는 발모의 촉진 방법)는 "본 발명은 탈모의 지연 또는 육모 및/또는 발모의 촉진 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로는, 본 발명은 포유류에 있어서 경모 성장 속도 및/또는 발모 속도를 증가시키기 위한 개시된 조성물의 사용 방법에 관한 것이다."고 개시하고 있다.

[0017] 그러나, 높은 탈모개선효과를 갖는 화장료 조성물의 개발에 대한 요구는 여전히 존재하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 감마-리놀렌산 함량이 높은 보라지 오일을 효소처리하여 5알파-환원효소를 억제하여 높은 탈모개선효과 즉, 탈모 및 모낭세포 회복 효과가 우수한 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명에 따른 높은 탈모개선효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일은, 보라지 오일을 리파아제로 효소처리시켜 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일을 포함한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따르면, 감마-리놀렌산 함량이 높은 보라지 오일을 효소처리하여 5알파-환원효소를 억제하여 높은 탈모개선효과 즉, 탈모 및 모낭세포 회복 효과가 우수한 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 효과가 있다. 특히, 본 발명은 감마-리놀렌산 함량이 높은 보라지 오일을 고정화된 리파아제로 효소처리하여 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하여 높은 5알파-환원효소 억제능을 통해 모낭 세포를 파괴하는 디하이드로테스토스테론(Dihydrotestosterone, DHT)의 생성을 효율적으로 차단하는 효소처리 보라지 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 유리 지방산의 5알파-환원효소활성 억제의 실험결과로서, 5알파-환원효소에 의해 생성된 DHT를 정량한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 기존 5알파-환원효소 억제제인 쏘팔메토 및 피나스테리드와 효소처리 식물성 오일의 억제능을 비교한 결과로서, 5알파-환원효소에 의해 생성된 DHT를 정량한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 효소처리 보라지 오일의 모낭세포 성장 촉진을 실험한 결과로서, 일반 대조군과 0.1% DMSO에 대한 대조군으로 나누어 실험하며, 세포 생존율(%)을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 효소처리 보라지 오일의 피부 흡수력 증가를 측정을 위한 사전 실험의 결과로서, 보라지 오일, 효소처리 보라지 오일 및 효소처리 보라지 오일과 부틸렌글리콜(BG: 1,3-Butylene glycol), 프로판디올(Propandiol) 혹은 글리세린(GC: Glycerin)에 1:1 비율로 혼합시켜 용해도를 비교 실험한 결과를 나타낸 사진이다.

도 5는 효소처리 보라지 오일의 테스토스테론 유도성 탈모 모델 쥐의 발모력 증가를 실험한 결과로서, 디지털 카메라(Nikon D90)를 이용하여 사진촬영을 하여 실험의 진행과정을 나타낸 사진이다.

도 6은 도 5와 관련한 발모에 대한 육안평가를 점수화하기 위한 기준이다.

도 7은 도 6의 진행과정을 도 6의 점수화를 위한 기준으로 점수화한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 모든 실험이 종료된 27일차에 재생된 털의 일부를 핀셋으로 뽑아 해부현미경을 이용해 임의적으로 선택된 50가닥의 털 길이를 측정한 결과이다.

도 9는 재생된 털의 총 무게를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예를 참조하여 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명에 따른 높은 탈모개선효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일은, 보라지 오일을 리파아제로 효소처리시켜 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 보라지 오일을 포함함을 특징으로 한다.
- [0024] 즉, 본 발명에 따르면, 효소처리를 통하여 감마-리놀렌산, 알파-리놀렌산, 리놀레산, 올레산 등과 같은 유리 필수 불포화지방산의 함량을 증대시키고, 5알파-환원효소에 대한 억제력이 높은 고농도의 유리 감마-리놀렌산이 포함된 조성물을 얻고, 이에 따라 기존 탈모 개선 및 치료용 조성물 대비 향상된 효과를 제공하는 점에 특징이 있다. 또한, 균주로부터 분리한 효소를 고정화하여 효소처리(발효)에 적용하여 생산시간 단축, 효소처리 후 정제의 단순화를 통해 제조공정을 간소화하고, 발효취가 나지 않도록 하여 기존 발효 공법의 단점을 최소화시키는 제조공정을 제공한다.
- [0025] 감마-리놀렌산(GLA: γ -linolenic acid)은 불포화지방산인 오메가 6 지방산의 일종으로, 보통 식물성 유지에서 발견되며, 천연에서는 달맞이꽃 오일, 블랙커런트씨유, 보라지 오일 등에 함유되어 있다. 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮추는 데 효과적인 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생체 내 합성에 필수적인 물질이며, 또한 혈당 강하, 항염증, 항암, 체중 감소, 골다공증, 류마티스성 관절염, 폐경기 증후군, 월경증후군 등에 효과적인 것으로 알려져 있다.
- [0026] 알파-리놀렌산(ALA: α -linolenic acid)은 불포화지방산인 오메가 3 지방산의 일종으로 체내에서 EPA(eicosapentaenoic acid)와 DHA(docosahexaenoic acid)로 전환되는 전구물질(Precursor)인데, EPA와 DHA의 경우 생선에 많이 들어있으며, 아마씨유(flexed-seedoil)나 호두 기름과 같은 식물성 유지 등에 많이 들어있다. 알파-리놀렌산과 오메가 6 지방산인 리놀레산의 경우, 인체에서 합성되지 않는 필수지방산으로서 부족할 경우 두뇌와 망막에 필요한 DHA가 부족해 학습능력과 시각 기능이 떨어지게 되는 것으로 알려져 있다. 오메가 3 지방산은 인체 안에서 세포를 보호하고, 세포구조를 유지시키며 원활한 신진대사를 돕는다. 또한 혈액의 피막형성을 억제하고, 뼈의 형성을 촉진 및 강화하는 효과가 있다. 오메가 3 지방산이 부족하면 두뇌와 망막에 필요한 DHA가 부족해 학습능력과 시각기능이 떨어지게 된다고 알려져 있다. 최근 연구된 결과에 의하면 알파-리놀렌산이 염증의 마커인 C-반응성 단백질을 감소시켰다는 임상연구결과가 보고되었으며, 알파-리놀렌산을 섭취하면 혈중 콜레스테롤이 저하되고 심혈관계 질환 발생 위험성을 감소시켜 주며 동맥의 기능이 보호되는 효과 등을 얻을 수 있다고 알려져 있다.
- [0027] 리놀레산(LA: linoleic acid)은 2개의 이중결합을 가지는 불포화지방산으로 물에 녹지 않고, 에테르, 알코올에는 녹으며 연성(軟性) 비누의 원료로 쓰인다. 9,12-옥타데카디엔산이라고도 한다. 글리세롤과는 에스터결합으로 식물유 중에서 콩기름, 면실유 등에 많이 함유되어 있다. 공기 중에서 산화되기 쉬운 건성유(乾性油)는 이 리놀레산과 리놀렌산이 주성분이다. 동물 체내에서는 인지질을 구성하는 지방산으로서 약간 발견된다. 동물 중에는 스스로 합성할 수 없어 필수 영양소로서 요구하는 것도 있는데, 리놀렌산 등과 함께 비타민 F(지방산의 F)라 불리기도 한다. 연성비누의 원료로 쓰이고 있다.
- [0028] 올레산(OA: oleic acid)은 올리브유에 포함되어 있는 지방산의 주성분으로 오메가-9 불포화지방산이다. 올리브유에서 혈압 저하 역할을 담당하고 있다. 중성지방의 구성성분인 지방산의 종류에 따라 포화지방산, 불포화지방산으로 분류되고, 불포화지방산은 탄소 이중 결합의 수에 따라 단가(mono) 불포화지방산, 다가(poly) 불포화지방산으로 분류된다. 올레산은 탄소 원자 사이에 이중결합을 1개만 가지고 있는 단가 불포화지방산에 속한다. 올리브유, 카놀라유와 같은 식물성 기름 뿐만 아니라 소, 돼지와 같은 동물의 유지에도 함유된, 동식물에 널리 존재하는 지방산이다. 물에는 거의 녹지 않으나, 에탄올, 벤젠, 클로로포름 등에는 녹는다. 백금촉, 니켈 등을 촉매로 하여 수소로 환원시키면 수소첨가반응에 의해 이중결합이 없는 포화지방산 스테아르산이 만들어진다. 순수한 것은 무색, 무취의 액체이지만 공기 중에서 산화되어 노란색 또는 갈색으로 변하며 썩는 냄새가 난다. 혈청 콜레스테롤 농도는 낮추고 고밀도 콜레스테롤(HDL-콜레스테롤)의 농도는 저하시키지 않아 고지혈증 환자에게 특히 유익하며, 모유에도 가장 많이 함유된 지방산으로 아기의 성장, 발달을 돕는다. 동물에서는 글리세린과 에스터를 형성하여 피하지방이나 간에 저장되며, 비누의 원료나 천의 방수제로서 이용된다.
- [0029] 보라지 오일은 보라지(학명: *Borago officinalis*) 식물에서 유래하는 오일로서, 보라지 오일은 감마-리놀렌산이 풍부한 것으로 알려져 있으며, 혈당강하, 항염증, 체중 감소, 골다공증 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 여성들의 폐경기 증후군과 월경 증후군을 감소시켜 주는 것으로 보고되고 있다.
- [0030] 본 발명에 따르면 상기 보라지 오일을 효소처리시키는 데 사용되는 것으로서, 리파아제 효소는 특히 리조푸스속

미생물 유래의 리파아제를 바람직하게는 수지에 고정시킨 고정화 효소를 사용하여 배치식으로 효소처리시킨 후, 원심분리에 의하여 효소 잔여물과 수지를 분리 및 여과하고, 수득된 효소처리액을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합한 후, 층분리시켜 지방산을 포함하는 분층과 효소미처리된 보라지 오일을 포함하는 유성층을 분획하여 지방산을 포함하는 분층은 후속 가공하여 화장료 조성물의 원료로 사용하고, 효소미처리된 보라지 오일을 포함하는 유성층은 회수하여 다시 효소처리공정에 도입시킬 수 있다. 본 발명에서는 지방산을 포함하는 분층을 효소 처리물로부터 회수하기 위하여 특히 1,3-부틸렌글리콜을 사용하며, 1,3-부틸렌글리콜은 화장료 원료로 널리 사용되는 것으로서, 특히 오일의 효소처리에 의해 산출되는 지방산 및 글리세롤을 용해시킬 수 있을 뿐만 아니라 일반 화장료의 각종 원료들의 용매로서 사용될 수 있으며, 따라서 1,3-부틸렌글리콜로 회수된 지방산을 포함하는 분층을 그대로 화장료 원료로 사용할 수 있어 오일류를 화장품에 적용할 때 통상 사용하는 피부 자극이 있는 유화제를 따로 사용할 필요가 없다.

- [0031] 상기 리파아제는 상기 리조푸스속 미생물을 배지에 배지 용적 대비 10용적%의 양으로 접종시키고, 호기조건, pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35℃의 배양조건에서 배양시킨 후, 1 내지 10℃에서 800 내지 1200 rpm으로 원심분리시켜 수득된 상등액을 황산암모늄(Ammonium sulfate)으로 침전 농축시킨 다음, 투석시켜 수득되는 투석물일 수 있으며, 이러한 리조푸스속 미생물의 배양 농축물을 사용하는 것에 의해 직접 미생물로 사용하는 것에 비해 불포화 필수지방산의 생성량을 크게 증대시킬 수 있고, 발효취를 없앨 수 있다는 것이 본 발명자들에 의해 확인되었다.
- [0032] 이때, 상기 배지는 2 내지 10중량%의 감자 전분, 0.5 내지 3중량%의 텍스트로즈 및 잔량으로서 물을 포함하는 PDB(Potato Dextrose Broth)일 수 있다. 상기 PDB를 사용하는 배양은 바람직하게는 6.0±0.2의 pH에서 그리고 호기조건에서 수행될 수 있으며, 상기 PDB는 바람직하게는 PDB 총 중량을 기준으로 0.1 내지 10중량%의 올리브 오일을 더 포함할 수 있다.
- [0033] 특히, 상기 리조푸스속 미생물의 배양 농축물의 배양조건에서 발효배양시간은 80 내지 150시간의 범위 이내에서 배양될 때 리파아제 활성이 가장 우수하다는 것이 본 발명자들에 의해 확인되었다.
- [0034] 리조푸스속(*Rhizopus* sp.) 미생물은 접합균아문 털곰팡이목(*Mucorales*)의 곰팡이의 1속(屬)으로서, 포복사(stolon)가 옆으로 퍼져 신장하여, 이것을 배지에 접하는 점, 즉 절부(node)로부터 1 내지 수 개의 포자낭병과 가근(rhizoid)이 총생한다. 포자낭은 크고, 보통 검은색이다. 주축(columella)은 반구상이고, 균사는 다량으로 발생하며, 또한 길게 신장하여 페트리접시 뚜껑까지 가득 찬다. 유성적으로는 2개의 배우자낭이 접촉융합하여 접합포자를 형성한다. 토양, 과일 등에 존재하며, 드물게 사람, 동물, 특정 종의 식물에 병원성이 있는 것도 있다. 전분당화력이 강하고, 극소량이지만 알코올 발효력, 단백질 분해력이 있으며, 젖산, 푸마르산 등 유기산 생성능도 강하기 때문에 발효공업에 이용하는 종류도 많다. 예를 들어, 중국술의 양조나 동남아시아의 미주(米酒) 제조에 이용한다. 리조푸스 텔레마르(*R. delemar*), 리조푸스 자포니쿠스(*R. japonicus*)는 알코올 제조용 아밀로균으로 중요하다. 리조푸스 니그리칸스(*R. nigricans*)는 복숭아, 딸기 등의 과실이나, 곡류, 빵에 잘 발생하고, 고구마 연부병의 원인도 되지만 푸말산 생성능이 강한 것으로도 알려져 있다.
- [0035] 상기 리조푸스속 미생물의 배양 농축물은 리파아제(Lipase)를 포함하며, 상기 리파아제는 오일을 글리세롤과 지방산으로 분해하는 효소를 의미한다.
- [0036] 상기 보라지 오일의 효소처리는 10 내지 40℃의 범위 이내의 온도로 예열된 보라지 오일을 수지에 고정시킨 리파아제 효소와 10 내지 80시간, 바람직하게는 15 내지 50시간, 보다 바람직하게는 20 내지 30시간 동안 접촉시키는 반응조건에서 효소 반응시키는 것으로 수행될 수 있으며, 상기 리조푸스속 미생물은 바람직하게는 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*)가 될 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명에 따른 효소처리 보라지 오일의 제조방법은, 보라지 오일을 효소처리하여 효소처리 보라지 오일을 제조하는 방법에 있어서, (1) 10 내지 40℃의 범위 이내의 온도로 예열된 보라지 오일을 수지에 고정시킨 리파아제 효소와 10 내지 80시간 동안 접촉시키는 효소처리조건에서 효소반응 시키는 효소처리단계; 및 (2) 효소처리단계에서 수득되는 효소 처리물을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합한 후, 층분리시켜 지방산을 포함하는 분층을 회수하는 분획단계;를 포함함을 특징으로 한다.
- [0038] 리파아제 효소는 특히 리조푸스속 미생물 유래의 리파아제를 바람직하게는 수지에 고정시킨 고정화 효소를 사용하여 배치식으로 효소처리시킨 후, 원심분리에 의하여 수지를 포함한 효소 잔여물을 분리 및 여과하고, 수득된 효소 처리물을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합한 후, 층분리시켜 지방산을 포함하는 분층과 효소미처리된 보라지 오일을 포함하는 유성층을 분획하여 지방산을 포함하는 분층은 후속하여 가공하여 화장료 조성물의 원료로

사용하고, 효소미처리된 보라지 오일을 포함하는 유성층은 회수하여 다시 효소처리공정에 도입시킬 수 있다.

- [0039] 효소처리에 사용되는 리파아제 효소, 특히 상기 리조푸스속 미생물 유래 리파아제 효소, 상기 효소의 제조에 사용되는 배지 및 배양조건과 배양시간 등은 앞서 설명한 바와 동일 및/또는 유사한 것으로서 반복되는 설명은 피하기로 하며, 상기 리조푸스속 미생물은 바람직하게는 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*)가 될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 상기 효소처리 보라지 오일은 상기한 방법으로 효소처리함으로써 효소처리하기 전보다 유리 필수불포화지방산 함량이 월등히 높은 특징을 가진다.
- [0041] 상기 유리 필수불포화지방산은 감마-리놀렌산(GLA), 알파-리놀렌산(ALA), 리놀레산(LA: Linoleic Acid) 및 올레산(OA: Oleic Acid)을 포함한다.
- [0042] 감마-리놀렌산은 여성의 모유와 일부 식물에만 존재하는 불포화지방산 성분으로서, 체내 활성물질로 알려진 프로스타글란딘을 합성하는데 꼭 필요한 전구체이다. 체내에 감마-리놀렌산이 부족하게 되면 생리활성물질인 프로스타글란딘E1과 E2가 합성되지 않기 때문에, 필수아미노산을 비롯한 신체의 정상적인 기능에 필요한 성분이 잘 형성되지 못해 면역체계의 이상이 생기게 된다.
- [0043] 상기 유리 필수불포화지방산은 지방산이 글리세라이드 형태로 글리세롤에 결합되지 않은 형태를 의미한다. 유리 필수불포화지방산의 함량이 높아짐에 따라 끈적임이 줄어들고 피부 흡수력이 향상된다.
- [0044] 본 발명에 따르면, 상기한 바의 효소처리 보라지 오일을 유효성분으로 함유하는 탈모개선용 조성물이 제공될 수 있으나, 본 발명이 이들로 제한되는 것으로 의도되는 것은 아님은 당업자에게는 이해될 수 있는 것이다.
- [0045] 상기 탈모개선용 조성물은 크림, 로션, 에멀전, 화장수, 에센스, 미스트, 젤, 팩, 마스크팩, 오일, 색조화장료, 비누, 바디워시, 샴푸, 린스, 입욕제, 스크럽제 등 다양한 제형으로 제조될 수 있다.
- [0046] 상기 탈모개선용 조성물은 정제수, 유분, 계면활성제, 보습제, 안정화제, 알코올, 중점제, 킬레이트제, 색소, 방부제 및 향료로 이루어지는 군으로부터 적어도 1종 이상 선택된 첨가제를 더 포함할 수 있다.
- [0047] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시예 및 비교예들이 기술되어질 것이다.
- [0048] 이하의 실시예들은 본 발명을 예증하기 위한 것으로서 본 발명의 범위를 국한시키는 것으로 이해되어져서는 안 될 것이다.
- [0049] **제조예 1. 효소처리에 필요한 고정화 효소의 정제**
- [0050] 보라지 오일 등 식물성 오일을 효소처리하기 위한 리파아제를 얻기 위하여, 먼저 리조푸스 속 미생물과 칸디다 속 미생물로서 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*), 칸디다 루고사(*Candida rugosa*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescense*) 그리고 슈도지마 속(*Pseudozima sp.*)을 각각 배양하였다. 리조푸스 오리제 배양에 사용된 배지의 조성은 2% 올리브오일, 4% 감자전분, 1% 텍스트로스로 제조하여, 온도 28℃, pH 6.0에서 120시간 동안 배양하였다. 칸디다 루고사 배양에 사용된 배지의 조성은 2% 올리브 오일(olive oil), 0.3% 효모 추출물, 0.3% 맥아 추출물(Malt extract), 0.5% 펩톤(peptone), 1% 텍스트로스(dextrose), pH 7.0으로 제조하여, 30℃에서 90시간 동안 배양하였다. 슈도모나스 플루오레센스 배양에는 영양배지(Nutrient broth)에 0.5% 펩톤, 0.5% 효모 추출물, 0.8% 식염을 첨가하여 pH 7.0으로 제조하고, 28℃에서 32시간 배양하였다. 슈도지마 속 배양에 사용된 배지는 0.01% 글루코스, 0.1% 올리브 오일, 0.003% 효모 추출물, 0.003% 맥아 추출물, 0.003% 펩톤, 0.003% 콩가루, 0.02% 황산암모늄, 0.001% 인산칼륨, 0.005% 황산마그네슘, 0.001% 염화칼슘과 0.0001% 염화나트륨이 사용하여 pH 7.0으로 제조하였고, 37℃에서 24시간 배양하였다. 이 후, 각각의 균주 배양액을 8000 rpm으로 원심분리 하여 미생물 군체를 침전시켜 상등액만 회수한 다음, 여기에 4℃에서 70% 황산암모늄을 천천히 첨가하여 조효소 혼합물을 침전시켰다. 그 후에 4℃, 12000 rpm의 조건에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전물을 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에 녹인 후, 투석막을 이용하여 4℃ 조건에서 투석시켜 이를 리파아제 농축액으로 사용하였다.
- [0051] 효소 고정화에 적합한 흡착성 수지(resin)에는 Amberlite XAD-7, 음이온교환수지(anion exchange resins), 다공질 유리(porous glass), 다공질 키토산 비드(porous chitosan beads), 폴리프로필렌 분말(polypropylene powder), CaCO₃ 등이 사용되고 있으며, 이중 열과 물리적 충격에 비교적 안정적인 Amberlite XAD-7 수지(Sigma-aldrich)를 사용하였다. Amberlite XAD-7 수지를 에탄올과 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 수세하고, 37℃에서 1시간 교반하고 필터로 여과하였다. PierceTM Bicinchoninic acid(BCA) Protein Assay kit(Thermoscientific)을 사용해 제조사가 제공하는 방법으로 단백질을 정량하여 0.01 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.6)을 사용해 총 단백질

양을 10 mg/ml로 맞춘 효소농축액을 사용하였다. 해당 효소농축액을 여과를 마친 Amberlite XAD-7 수지에 첨가한 후, 37℃ 200 rpm 진탕배양기에서 10시간 동안 반응시키고, 이 반응물을 3000 rpm으로 5분간 원심분리하여 Amberlite XAD-7 수지층을 분리한 후, 0.01 M Tris-HCl 완충용액(pH8.6)으로 3번 수세하였다. 이를 진공 건조기(vacuum desiccator)로 수 시간 동안 완전히 건조시킨 후, 고정화 효소로 사용하였다.

[0052] 실시예 1. 효소처리 식물성 오일의 제조

[0053] 상기 제조예 1에서 준비된 고정화 효소를 이용하여 식물성 오일을 효소처리 하였다. 3 g의 고정화 효소를 pH 7.0의 인산염 완충용액(Sodium phosphate buffer, 50 mM) 57 g에 희석하여 효소반응혼합물(reaction mixture)을 제조하였다. 즉, 효소처리에는 고정화 효소를 인산염 완충용액에 5%로 희석한 고정화 효소반응혼합물과 식물성 오일(보라지 오일 혹은 동백 오일)을 4:6의 비율로 혼합한 후, 300 rpm, 37℃에서 60시간 동안 시행하였다. 고정화 효소처리를 마친 식물성 오일은 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 리파아제가 고정화된 수지를 분리하고, 다시 0.22 μ m의 기공 크기(pore size)를 갖는 여과막을 통과시켜 고정화된 효소가 처리된 효소처리 보라지 오일과 효소처리 동백 오일을 각각 수득하였다.

[0054] 실험예 1. 효소처리 식물성 오일의 지방산 함량

[0055] 실시예 1에서 효소처리 된 식물성 오일의 유리지방산 함량을 분석하기 위해 HPLC를 실시하였다. 이에 사용된 표준품은 알파-리놀렌산(ALA: α -Linolenic acid, Sigma-aldrich), 감마-리놀렌산(GLA: γ -Linolenic acid, Sigma-aldrich), 리놀레산(LA: Linoleic acid, Sigma-aldrich) 및 올레산(OA: Oleic acid, Sigm-aldrich)이다. 분석에 사용하는 용매는 HPLC 등급의 이소프로판올(DUKSAN) 및 아세토니트릴(Acetonitrile, DAEJUNG)이고, 시료 및 표준품은 이소프로판올(Isopropanol, DUKSAN)에 용해시킨 후, 0.22 μ m 멤브레인 필터(membrane filter ; PVDF Syringe Filter, 13 mm, FUTECS Co., Ltd.)로 여과하고, C18 컬럼(250 x 4.6 mm, Gemini 5 μ Phenomenex)을 사용하여 유리지방산을 분석하였다. 1.0 ml/분의 유속에서 10 μ l의 시료를 주입하였으며, 210 nm 파장의 자외선으로 측정하였다. 이동상(mobile phase)으로는 아세토니트릴 중의 0.005% 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid, Millipore Co.) : 물 중의 0.005% 트리플루오로아세트산을 이동상의 기울기 조건으로는 80 : 20 (v/v)로 시작하여 45분 동안 경사(gradient) 분석법으로 지방산들을 분석하였다.

[0056] 효소처리 식물성 오일의 유리지방산의 함량을 분석한 결과를 다음 표 1에 나타내었다.

[0057] 유리지방산의 함량 분석 결과, 리조푸스 오리제를 통해 리파아제를 고정화 하였을 때, 타 균주로 리파아제를 고정화 시킨 것에 비해 유리지방산의 총 함량에서 월등한 것으로 나타났다. 또한, 동백 오일과 보라지 오일의 감마-리놀렌산, 리놀레산, 올레산의 비율이 효소 분리 균주에 따라 차이를 보였으며, 감마-리놀렌산의 함량 및 비율 역시 리조푸스 오리제의 리파아제를 사용하였을 때 가장 우수하였다. 따라서, 이후 실험에 리조푸스 오리제의 리파아제를 통해 보라지 오일의 효소처리를 시행하였고, 또한, 차후 감마-리놀렌산 함유량이 적은 식물성 오일과 비교하기 위하여, 같은 방법으로 리조푸스 오리제의 리파아제로 효소처리 동백 오일을 제조하였고, 표 1에 그 함량을 표기하였다.

표 1

	오일 종류	효소 분리 균주	함량(%)				
			ALA	GLA	LA	OA	[ALA+GLA+LA+OA]
1	효소처리 보라지오일	리조푸스 오리제	0.2	23.0	27.2	15.6	65.84
2		칸디다 루고사	N.D.	4.6	13.5	8.5	26.6
3		슈도모나스 플루오레센스	N.D.	3.1	10.2	6.5	19.8
4		슈도지마 속	N.D.	12.2	18.6	11.8	42.6
5	효소처리 동백 오일	리조푸스 오리제	N.D.	0.05	1.57	50.32	51.94
N.D.는 검출되지 않았음을 의미함.							

[0059] 실험예 2. 효소처리 식물성 오일의 5알파-환원효소활성 억제

[0060] 각 유리지방산의 효율을 확인하기 위하여, 감마-리놀렌산, 리놀레산, 올레산의 5알파-환원효소 억제율을 먼저 실험하였다. Sprague Dawley Rat(SD rat)을 (주)샘타코로부터 분양 받아 복강수술 후, 전립선을 적출하였다. 전립선의 무게를 측정하고, 1x 인산염-완충 식염수(PBS: Phosphate-buffered saline) 완충용액으로 2회 세척하였다. 세척된 전립선은 같은 무게의 0.25 M 슈크로스 용액을 넣고 수술용 가위로 분쇄하였다. 이 후, 유리 균질기(glass homogenizer)로 분쇄된 전립선 용액을 옮겨 균질화 시키고, 1000 g로 4℃에서 20분 동안 원심 분리하여 전립선 상등액을 회수하였다. 전립선 상등액 무게의 3배 질량의 0.1 M 인산칼륨 완충용액(potassium phosphate buffer, pH 6.8)을 혼합하고, 최종농도 기준 20 μ M의 테스토스테론, 200 μ M β -니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트(NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)가 되도록 추가적으로 첨가하여 반응 혼합물(reaction mixture)을 제조하였다. 해당 전립선 균질액을 사용한 반응혼합물에 DMSO에 용해한 각 지방산을 1, 5, 10, 15, 25 ppm의 농도로 각각 처리하였다. 이때, 양성대조군은 반응 혼합물에 DMSO만을 넣었고, 음성대조군에는 테스토스테론과 β -NADPH는 첨가하지 않은 반응 혼합물을 따로 준비하고 4℃에 보관하여 반응이 일어나지 않도록 하였다. 각 반응혼합물의 5알파-환원효소 반응은 37℃에서 1시간 동안 이루어졌으며, 이후 DHT(Dihydrotestosterone) ELISA Kit(MyBioSource)를 사용하여 제조사가 제공하는 실험법에 따라 5알파-환원효소에 의해 생성된 DHT를 정량 하였다. 해당 결과는 도 1에 나타내었다.

[0061] 음성대조군은 SD rat의 전립선에 내재적으로 존재하는 DHT의 양이므로, 이를 차감한 후, 새롭게 생성된 DHT의 양을 계산해 양성대조군 DHT 생성량의 50% 저해농도(The half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)를 계산하여 표 2에 나타내었다.

[0062] 그 결과, 감마-리놀렌산은 올레산 대비 약 7.89배, 리놀레산 대비 약 6.14배의 IC₅₀을 나타내 5알파-환원효소의 활성 저해율이 가장 우수한 것으로 나타났다. 따라서, 효소처리된 식물성 오일 중 감마-리놀렌산의 비율과 함량이 우수한 것으로, 리조푸스 오리제에서 분리 및 고정화시킨 리파아제로 효소처리하여 수득한 효소처리 보라지 오일의 5알파-환원효소의 억제효율이 가장 좋을 것으로 판단되어 이를 검증하기로 하였다.

표 2

	감마-리놀렌산	리놀레산	올레산
IC ₅₀ (ppm)	2.37	14.56	18.71

[0063] 다음으로, 기존 5알파-환원효소 억제제인 쏘팔메토 및 피나스테리드와 효소처리 식물성 오일의 억제능을 비교하였다. 위와 같은 방법으로 제조한 전립선 균질액을 통한 반응 혼합물에 쏘팔메토, 보라지 오일, 효소처리 보라지 오일, 동백 오일 그리고 효소처리 동백 오일을 디메틸설폭사이드(DMSO: Dimethyl sulfoxide)에 희석하여 최종 농도가 1, 2.5, 5, 10, 50, 100 ppm이, 피나스테리드 역시 DMSO에 희석하여 최종 농도가 0.1, 0.25, 0.5, 1, 10 ppm이 되도록 반응 혼합물에 넣어주었다. 각 반응혼합물의 5알파-환원효소반응은 37℃에서 1시간 동안 실행되었고, 마찬가지로 DHT(Dihydrotestosterone) ELISA Kit(MyBioSource)를 사용하여 제조사가 제공하는 실험법에 따라 5알파-환원효소에 의해 생성된 DHT를 정량 하였다. 해당 결과는 도 2에 나타내었고, IC₅₀값을 계산하여 표 3에 보였다.

[0065] 피나스테리드는 1형과 2형 5알파-환원효소의 IC₅₀ 값은 각각 300 내지 500 nM과 3 내지 10 nM의 범위 내에서 보고되어 있으며, 이를 ppm으로 환산하면 약 0.12 내지 0.18 ppm과 0.02 내지 0.04 ppm이 된다. 도 1과 표 2의 결과와 비교하였을 때, 본 실험에서는 1형 5알파-환원효소의 IC₅₀값 보다 다소 높은 0.37 ppm이 기록되었으며, 이 값은 2형 5알파-환원효소는 모두 억제되고, 주로 1형 5알파-환원효소에 대한 IC₅₀ 값과 유사한 것으로 보인다. 선행 연구자들에 의해 보고되었던 값과 다소 차이가 나는 것은 순수하게 정제된 효소가 아닌 전립선 균질액을 이용하여 실험하였기 때문에 나타난 오차로 보인다. 효소처리에 의해 동백 오일과 보라지 오일의 5알파-환원효소 억제율이 증가하는 것을 확인하였고, 더욱이 감마-리놀렌산의 비율과 함량이 풍부한 효소처리 보라지 오일의 5알파-환원효소 저해율이 쏘팔메토와 올레산이 대부분인 효소처리 동백 오일 대비 우수한 효과를 보였다.

표 3

	피나스테 리드	쏘팔메토	보라지오일	효소처리 보라지오일	동백오일	효소처리 동백오일
IC ₅₀ (ppm)	0.37	8.56	41.79	4.61	76.79	31.76

실험예 3. 효소처리 보라지 오일의 모낭세포 성장 촉진

인간 모유두세포(Human Dermal papilla cell)를 이용하여 보라지 오일과 효소처리 보라지 오일의 세포 성장능을 측정하였다. 세포배양은 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포의 생존율은 MTT(3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma) 측정으로 분석하였다. 모유두세포를 96 웰 플레이트의 각 웰 당 1 x 10⁴ cells/ml로 분주하고, 37℃, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 배양에 사용된 배지를 제거하고 보라지 오일과 효소처리 보라지 오일을 DMSO에 녹인 뒤 농도별로 각각 1, 10, 100, 1000 ppm이 되도록 처리하여 37℃, 5% CO₂에서 5시간과 24시간 배양하였다. 이 후, 각 웰 당 0.2% MTT 용액을 20 µl 씩 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 상등액을 모두 제거하고 DMSO 150 µl 씩을 첨가하여 10분간 상온에서 생성된 포르마잔(formazan)을 모두 녹이고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. DMSO에 대한 영향을 알아보기 위해 일반 대조군과 0.1% DMSO에 대한 대조군으로 나누어 실험하며, 세포 생존율(%)은 수학적 1을 사용하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 그 결과, 보라지 오일은 세포의 성장에는 큰 영향을 주지 않는 것을 확인하였고, 이와 대조적으로 효소처리 보라지 오일은 100 ppm 이상 처리하였을 때 오히려 모유두세포의 성장을 촉진하였고, 이는 효소처리 보라지 오일이 두피세포 회복에도 도움이 됨을 의미한다.

수학적 1

세포성장율(%)=시료처리군의 흡광도/대조군의 흡광도×100

실험예 4. 효소처리 보라지 오일의 피부 흡수력 증가

식물성 오일의 도포용 제제로서의 단점 중 하나는 낮은 피부 흡수력이다. 이를 개선하기 위해 보라지 오일, 효소처리 보라지 오일 및 효소처리 보라지 오일과 부틸렌글리콜(BG: 1,3-Butylene glycol), 프로판디올(Propandiol) 혹은 글리세린(GC: Glycerin)에 1:1 비율로 혼합시켜 비교 실험하였다. 이 중, 효소처리 보라지 오일을 충분히 용해시킬 수 있는 용매는 부틸렌글리콜 뿐이었으며, 도 4에 나타난 바와 같이 프로판디올과 글리세린은 층분리 현상이 뚜렷하여 피부 흡수력 실험에서 제외하였다. 피부 흡수력을 알아보기 위하여 Franz diffusion cell 방법을 이용하여 피부 흡수력 실험을 진행하였다. 피부흡수력 실험은 흑색 마우스 피부조직(C57BL/60, ㈜샘타코)을 이용하여 흡수력을 확인하였고, Donor와 receptor phase 사이에 약 2 x 2 cm 넓이의 흑색 마우스 피부조직(C57BL/60)을 고정하였으며, 준비된 Franz diffusion cell에 6 ml의 각 시료를 투여하고 항온수조를 이용해 온도를 약 32.5℃로 유지하였다. 24시간 동안 각 시료를 흡수되도록 하였고, 24시간 경과 후, receptor phase를 회수하여 그 무게를 측정하고, 시간 및 피부면적 당 흡수된 각 시료의 무게를 비교하여 표 4에 나타내었다. 그 결과, 효소처리에 의해 보라지 오일 자체의 피부 흡수력이 1.46배 증가하였으며, 더욱이 효소처리 보라지 오일을 부틸렌글리콜에 용해하였을 때, 2.63배의 피부 흡수력이 증가하여 보다 우수한 피부 흡수력을 갖게 되었음을 확인할 수 있었다.

표 4

시료	흡수량 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	흡수 증가율
보라지 오일	0.97 ± 0.08	1.00
효소처리 보라지 오일	1.42 ± 0.11	1.46
효소처리 보라지 오일(BG)	2.56 ± 0.14	2.63

실험예 5. 효소처리 보라지 오일의 테스토스테론 유도성 탈모 모델 쥐의 발모력 증가

생후 7주된 암컷 C57BL/6 마우스를 (주)샘타코로부터 분양 받아 1주간 순응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 중의 실험 동물은 격리용 마우스 케이지(mouse cage)에 사육하였고, 사육실 환경조건은 실내온도 $25 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$, 조명 주기는 12시간씩 밤낮을 유지하였으며, 실험 전 기간 동안 물(Tap water)과 실험동물용 고형 사료(㈜샘타코)는 자유섭취 하도록 하였다. 마우스 털은 Cutting Length Adjustable Pro Hair Clipper(조아스, JC-5000)의 기기를 이용하여 1차로 제거한 후, 니크린 제모크림(일동제약)을 1분간 처리하고 3차례 정제수로 씻어 제거하였다. 제모된 마우스들은 5마리씩 2개의 대조군과 5개의 실험군으로 나누어 사육하였고 이를 표 5에 나타내었다. 실험이 진행된 27일간 매일 테스토스테론과 각 시료들을 도포하였다. 테스토스테론은 50% 에탄올에 0.5% 농도로 용해시켜 마우스의 등에 $150 \mu\text{l}$ 도포하여 탈모상태를 유도하였다. 테스토스테론이 피부에 충분히 흡수된 1 시간 후, 각 시료들을 각각 $150 \mu\text{l}$ 도포해 주었다. 보라지 오일, 효소처리 보라지 오일, 효소처리 동백 오일을 탈모개선에 효과가 없는 것으로 알려진 올리브오일에 10%로 희석하였고, 효소처리 보라지 오일을 부틸렌글리콜에 1:1비율로 용해시킨 시료(효소처리 보라지 오일(BG))는 올리브 오일에 20%가 되도록 희석하여 사용하였다. 각 농도는 하기 표 5에 표기하였다. 기존 탈모용 약물과 효소처리 식물성 오일의 효과를 비교하기 위해 0.5% 테스토스테론 도포하고 한 시간 후에 5% 미녹시딜을 $150 \mu\text{l}$ 도포하였다. 양성 대조군은 50% 에탄올을 도포하고, 한 시간 후에 올리브 오일을 도포하여 주었고, 음성 대조군은 0.5% 테스토스테론을 도포하고 한 시간 후에 마찬가지로 올리브 오일을 도포하였다. 실험이 진행된 후, 0일, 7일, 12일, 17일, 22일, 27일에 모든 마우스를 에틸에테르로 흡입 마취를 시킨 후 디지털 카메라(Nikon D90)를 이용하여 사진촬영을 하여 실험의 진행과정을 도 5에 나타내었다. 발모에 대한 육안평가는 도 6에 표기된 사항을 바탕으로 점수화 시켰으며, 그 결과를 도 7에 그래프로 보였다. 모든 실험이 종료된 27일차에 재생된 털의 일부를 핀셋으로 뽑아 해부현미경을 이용해 임의적으로 선택된 50가닥의 털 길이를 측정한 결과를 도 8에, 재생된 털을 다시 제모하여 마우스 당 재생된 털의 무게의 평균을 도 9에 그래프로 비교하였다. 도 5와 도 7의 결과로, 효소처리 보라지 오일(BG)이 높은 흡수력에 기인하여 탈모 개선 효과가 실험 12일차부터 전반적으로 고르게 나타나 가장 빠르게 개선됨을 보였으며, 최종적으로 실험 27일차에는 대조군과 가장 가까운 발모력을 나타냈다. 효소처리 보라지 오일의 단독 효과도 기존 탈모 치료제인 미녹시딜에 근접한 우수함을 보였다. 도 8의 재생된 털의 길이는 평균적으로 대조군에 가깝게 성장하였으나, 도 9의 재생된 털의 총 무게는 털의 재생면적에 따라 차이를 보였고, 이 때 역시 효소처리 보라지 오일(BG)이 가장 우수함을 확인할 수 있었다.

표 5

		용매
양성 대조군		올리브 오일, 50% 에탄올
0.5% 테스토스테론 (50% 에탄올 중)	음성 대조군	올리브 오일
	5% 미녹시딜	완제품 (현대약품)
	10% 보라지 오일	올리브 오일
	10% 효소처리 보라지 오일	올리브 오일
	20% 효소처리 보라지 오일(BG)	올리브 오일/50% 부틸렌글리콜
	10% 효소처리 동백 오일	올리브 오일

[0076] 실험예 6. 탈모개선을 위한 효소처리 보라지 오일의 간이 임상 시험

[0077] 효소처리 보라지 오일의 직접적인 탈모 개선 효과를 시험하기 위해, 30세부터 58세까지 경증 탈모증(탈모가 진행되 하루 평균 50개 이상의 모발이 빠지는 것을 자각)을 보이는 남성 18명을 대상으로 하여 간이 임상 시험을 진행하였다. 6명을 3그룹으로 나누어 각각 5 ml의 보라지 오일, 효소처리 보라지 오일 그리고 효소처리 보라지 오일(BG)을 1일 1회 취침 전 탈모 부위에 도포하고, 다음 날 아침 머리를 감는 방식으로 진행하였다. 총 8주 동안 진행되었으며, 효과의 판정은 머리를 감은 후, 평균 탈모 모발 수, 육안 평가, 피시험자의 개인 소견을 평가 척도로 하여 표 6을 기준으로 점수화하였다. 종합적인 시험 결과는 표 7에 보였다. 위약(Placebo) 그룹인 보라지 오일 대비 개선효과를 효소처리 보라지 오일과 효소처리 보라지 오일(BG)에 대하여 각각 계산하고 비교란에 순차적으로 표기하였다. 간이 임상 시험의 결과로, 효소처리 보라지 오일은 종합적으로 33%의 개선 효과를 보였고, 효소처리 보라지 오일(BG)의 경우, 이 보다 앞선 41%의 종합개선 효과가 확인되었다.

표 6

판정 점수	육안평가	개인소견	탈모수
1	악화	악화	증가
2	변화 없음	변화 없음	변화 없음
3	조금 개선	조금 개선	약간 감소
4	보통 개선	보통 개선	보통 감소
5	많이 개선	많이 개선	많이 감소

[0078]

표 7

	보라지 오일	효소처리 보라지 오일	효소처리 보라지 오일(BG)	비고
육안평가	2.7	3.2	3.5	18%, 29%
개인소견	2.8	3.8	4.0	35%, 42%
탈모수	2.6	3.7	3.9	42%, 50%
종합개선	2.7	3.6	3.8	33%, 41%

[0079]

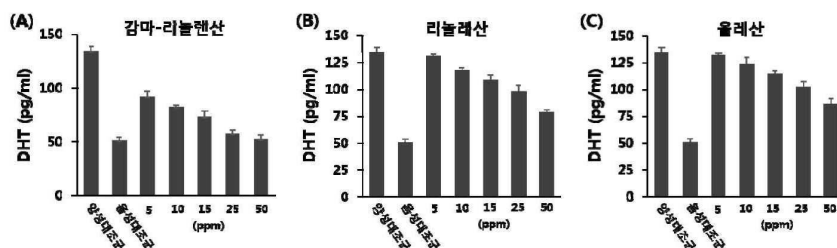
[0080] 이상에서 본 발명은 기재된 구체예에 대해서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속함은 당연한 것이다.

부호의 설명

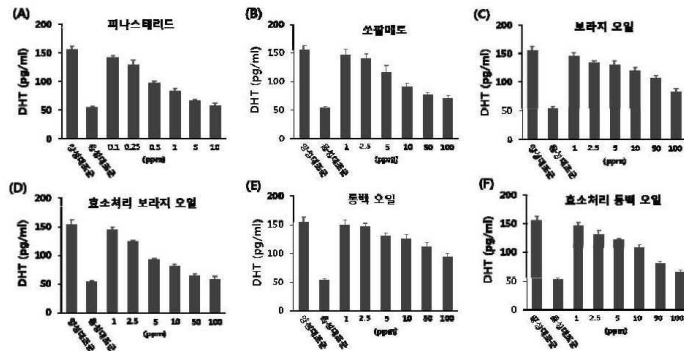
[0081] (도면 부호 없음)

도면

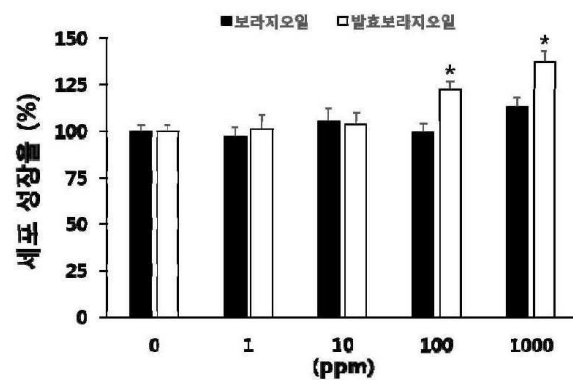
도면1



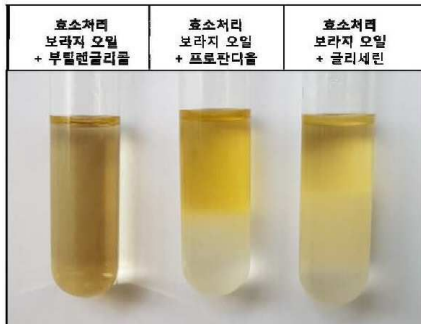
도면2



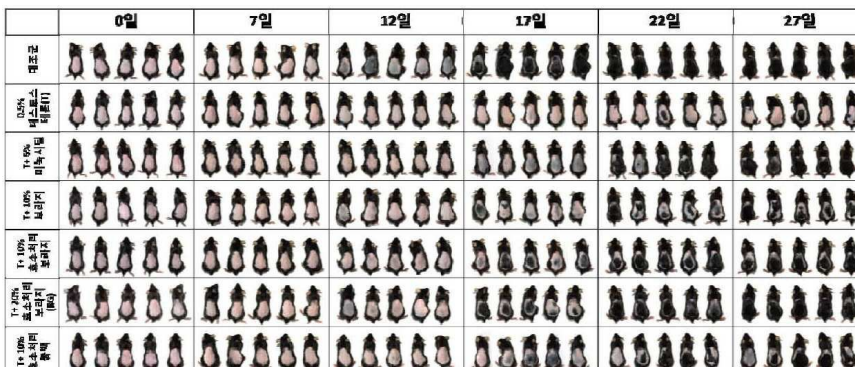
도면3



도면4



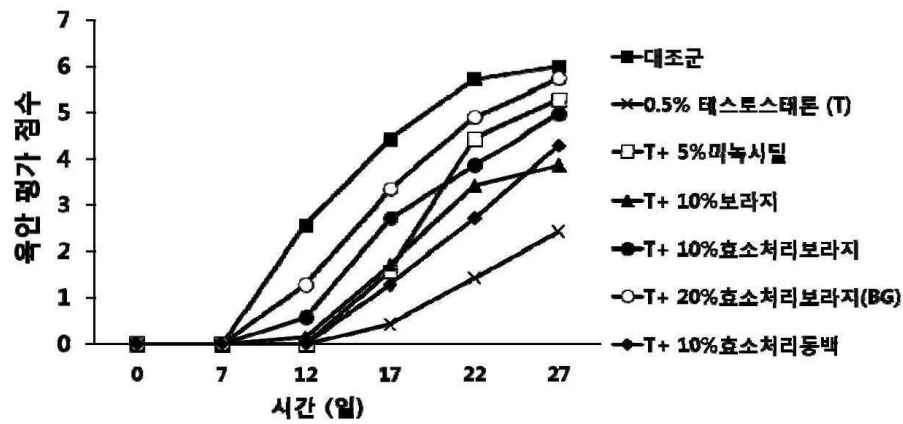
도면5



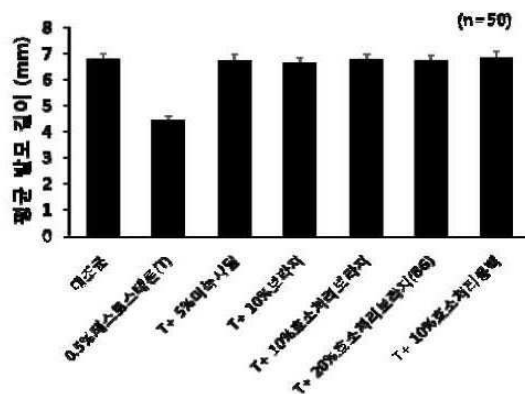
도면6

등급	조건	양상 예시
0	변화 없음	
1	<30% 모근형성	
2	30%~70% 모근형성, 모발 성장 없음	
3	>70% 모근형성 혹은, <30% 모발 성장	
4	>70% 모근형성 및 30~70% 모발 성장	
5	>70% 모근형성 및 >70% 모발 성장	
6	>90% 모발 성장	

도면7



도면8



도면9

