

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국(43) 국제공개일
2015년 7월 30일 (30.07.2015)(10) 국제공개번호
WO 2015/111902 A9

(51) 국제특허분류:

A61K 36/30 (2006.01) A61K 8/92 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2015/000594

(22) 국제출원일:

2015년 1월 21일 (21.01.2015)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2014-0007260 2014년 1월 21일 (21.01.2014) KR
10-2014-0187359 2014년 12월 23일 (23.12.2014) KR

(71) 출원인: 주식회사 벤스랩 (BEN'S LAB. CO. LTD.)
[KR/KR]; 445-743 경기도 화성시 봉담읍 와우안길 17
첨단과학기술연구원 115호 (수원대학교), Gyeonggi-do
(KR).

(72) 발명자; 겸

(71) 출원인: 정종문 (JEONG, Jong Moon) [KR/KR]; 448-
756 경기도 용인시 수지구 정평로 89 204-802 (풍덕천
동, 신정마을현대프라임아파트), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 이승숙 (LEE, Seung Sook); 448-756 경기도 용
인시 수지구 정평로 89, 204-401 (풍덕천동, 신정마을),
Gyeonggi-do (KR). 김성희 (KIM, Seong Hee); 626-756
경상남도 양산시 신명로 87, 202-1004, Gyeongsangnam-
do (KR).

(74) 대리인: 성낙훈 (SEONG, Nak Hoon); 135-910 서울시
강남구 논현로 503, 1601 (역삼동, 송촌빌딩), Seoul
(KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

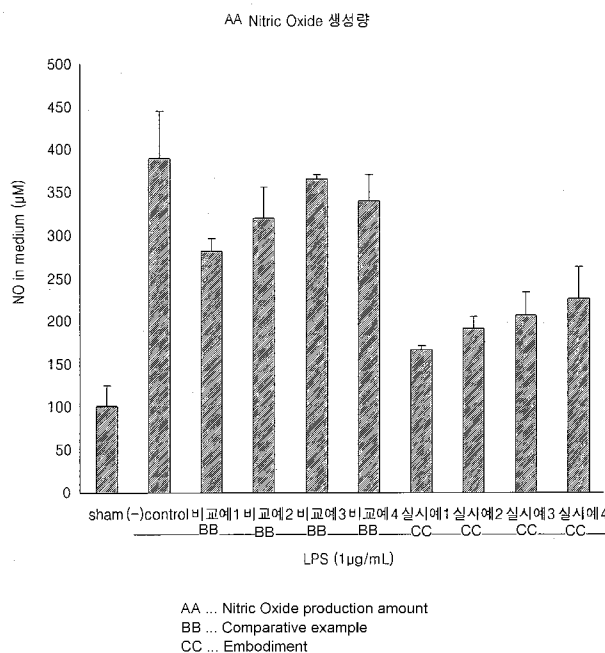
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: FERMENTED VEGETABLE OIL HAVING HIGH CONTENT OF FREE ESSENTIAL UNSATURATED FATTY ACID AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭 : 유리 필수불포화지방산 함량이 높은 발효 식물성 오일 및 그 제조방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to fermented vegetable oil and a method for preparing same, wherein the oil is prepared by fermenting vegetable oil with a culture concentrate of a microorganism of *Rhizopus sp.* to thereby prepare fermented vegetable oil rich in free essential unsaturated fatty acid for the alleviation of itchy skin and atopic dermatitis, a moisturizing effect, and the prevention of cell membrane damage. The present invention is characterized by being obtained by fermenting, using a culture concentrate of a microorganism of *Rhizopus sp.*, vegetable oil selected from the group consisting of borage oil, moringa oil, evening primrose seed oil, camellia oil, olive oil, sunflower seed oil, and a mixture of two oils from among the oils. Also provided is a topical skin agent or a cosmetic composition containing the fermented vegetable oil for the alleviation of itchy skin and atopic dermatitis, a moisturizing effect, and the prevention of cell membrane damage.

(57) 요약서: 본 발명은 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 식물성 오일을 발효시켜 유리 필수불포화지방산이 풍부한 발효 식물성 오일을 제조함으로써 피부 가려움증 및 아토피성 피부염 개선, 보습효과 및 세포막 손상방지를 위한 식물성

[다음 쪽 계속]



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일:

2016 년 4 월 28 일

(15) 정정사항에 관한 정보:

2016 년 4 월 28 일 자 공지 참조

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

발효오일 및 그 제조 방법에 관한 것으로서, 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2 이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 식물성 오일을 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 발효시켜 수득되는 것을 특징으로 하며, 상기 발효 식물성 오일을 함유하는 피부 가려움증 및 아토피성 피부염 개선, 보습효과 및 피부세포막 손상방지를 위한 피부 외용제 또는 화장료 조성물이 또한 제공된다.

명세서

발명의 명칭: 유리 필수불포화지방산 함량이 높은 발효 식물성 오일 및 그 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 식물성 오일을 발효시켜 유리 필수불포화지방산이 풍부한 발효 식물성 오일을 제조함으로써 피부 가려움증 및 아토피성 피부염 개선, 보습효과 및 세포막 손상방지를 위한 식물성 발효오일 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 페이스 오일(facial oil)이 많은 관심을 받고 있다. 페이스 오일이 피부의 유·수분막을 회복시켜 보습력을 강화시켜 주기 때문이다.
- [3] 화장품용 오일의 사용 효과는 피부 면에 소수성 피막을 형성하여 외부로부터 유해물질의 침투를 방지하고, 피부 표면의 수분의 증발을 억제한다. 또한 화학적 자외선 차단제, 지용성 비타민 등의 용매로 사용된다. 유지는 함유하는 지방산의 종류에 따라 세라마이드 및 비타민의 전구체가 될 수 있다. 따라서 오일에 함유된 필수불포화지방산에 대한 관심 또한 높아지고 있다.
- [4] 사람의 정상적인 발육과 생체항상성 유지에 필수적이지만 체내에서 합성할 수 없는 다가불포화지방산을 필수불포화지방산이라고 한다. 일반적으로 감마리놀렌산(Gamma-Linolenic Acid; GLA)은 다른 종류의 필수불포화지방산인 리놀레산(LA)으로부터 체내에서 만들어진다. 감마리놀렌산은 오메가-6 지방산으로서 체내에서 염증과 알레르기 반응을 억제하고 면역반응을 조절하며, 세포막의 형성과 유지에 중요한 역할을 한다. 올레산(Oleic acid, OA)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.
- [5] 피부에서 표피의 최상층부인 각질층은 지방산, 콜레스테롤 및 세라마이드로 구성되는데, 필수불포화지방산이 중요한 이유는 피부 보습인자 역할을 수행하는 세라마이드 또는 스펡고신과 필수불포화지방산이 결합된 지질 구조로 이루어져 있기 때문에 필수불포화지방산이 피부 건강의 핵심 성분이라고 할 수 있다. 피부 표피층의 세라마이드층과 표피 세포막을 형성하는 필수불포화지방산인 리놀레산(LA)이 정상적으로 감마리놀렌산으로 전환되지 않으면, 표피를 통한 과다한 수분 상실을 초래하여 건강한 각화세포를 유지하지 못해 건조한 피부를 갖게 된다.
- [6] 또한, 진피층의 피부 세포막들은 상당부분 필수불포화지방산으로 이루어져 있어, 만약 탄력적인 지방산이 부족하게 되면, 피부 건조, 손톱 갈라짐, 피부

비듬, 지루성 피부염, 탈모 현상들이 발생하게 된다. 진피층에서 생성된 피부 세포는 약 4주간의 주기로 각질 세포로 소멸되어 가는 각질화(Keratinization) 과정을 거치게 되는데, 이때 필수불포화지방산이 부족하게 되면 진피 세포의 생성이 어려워져 피부 트러블과 염증 발생의 원인이 된다.

- [7] 그러나 글리세롤과 지방산이 결합한 형태로 있는 지방은 피부로 빠른 흡수가 어려우므로 흡수가 용이한 형태의 유리된 필수불포화지방산이 필요하다. 유리된 필수불포화지방산을 생산하기 위해서는 발효와 같은 공정이 필요하다. 기존의 오일의 발효방법은 유지종자를 발아시키고 균을 접종하여 고체 발효한 후, 지질을 분리, 추출하는 방법과 미생물을 식물성 오일에 첨가하여 발효하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 고체 발효하는 것은 시간이 오래 걸릴 뿐만 아니라 유리 필수불포화지방산의 생산 효율이 떨어지고 지질을 추출해 내는 과정이 필요하기 때문에 공정비가 높아지는 단점이 있고, 식물성 오일에 미생물을 직접 첨가하여 발효하는 방법은 발효 후, 화장품에 사용하기 부적합한 냄새가 많이 나는 단점을 지니고 있다. 또한 고체발효와 미생물 직접발효의 공통된 단점은 발효에 사용된 미생물의 완전한 제거가 어렵기 때문에 재오염의 가능성이 상존한다는 것이다.

- [8] 한편, 리파아제(Lipase)는 지질을 지방산(Fatty acid)과 글리세롤(Glycerol)로 가수분해 하는 효소이다. 리파아제는 미생물에서 유래한 것과 돼지와 같은 동물의 췌장에서 유래한 것에 따라 특이성이 조금은 다르다. 리파아제를 생성하는 몇 가지 균의 특징은 다음과 같다. 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*)는 리파아제를 생성하는 산업적으로 중요한 자원이 되는 균이다. 또한 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*)를 포함한 리조푸스 균종은 인체에 무해하기 때문에 식품산업과 식품에 널리 사용되어지고 있으며 리파아제를 많이 생성하는 균으로 알려져 있다.

- [9] 이에 본 발명자들은 고체 발효 및 미생물 발효의 단점을 보완하여 발효기간이 단축되고, 화장품에 사용하기 부적합한 냄새가 없으며, 재오염의 가능성이 없으며, 필수불포화지방산을 효율적으로 생산하기 위하여 리파아제를 다량 생산하는 것으로 알려진 미생물의 배양농축물, 특히 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 이용하여 대량의 식물성 오일을 발효시킴으로써 유리 필수불포화지방산의 함량을 높여 손상된 피부 세포막을 재생하고, 보습효과가 뛰어나며, 가려움증 개선 및 아토피성 피부염 개선 효과를 지니는 오일을 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명의 하나의 목적은 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 식물성 오일에 첨가하고, 상기 오일을 발효시켜 유리 필수불포화지방산이 다량 함유하는 발효 식물성 오일을 제공하는 것이다.

- [11] 본 발명의 다른 하나의 목적은 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 식물성 오일에 첨가하고, 상기 오일을 발효시켜 유리 필수불포화지방산이 다량 함유하는 발효 식물성 오일의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기한 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 피부 외용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기한 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기한 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 의약외품을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명에 따른 발효 식물성 오일은 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 식물성 오일을 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 발효시켜 수득된다.
- [16] 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물이 상기 리조푸스속 미생물을 배지에 배지 용적 대비 10용적%의 양으로 접종시키고, 호기조건, pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35°C의 배양조건에서 배양시킨 후, 1 내지 10°C에서 800 내지 1200rpm으로 원심분리시켜 수득된 상등액을 염색시켜 수득되는 석출물일 수 있다.
- [17] 상기 배지는 2 내지 10중량%의 감자 전분, 10 내지 20중량%의 텍스트로즈 및 잔량으로서 물을 포함하는 PDB(Potato Dextrose Broth)일 수 있다.
- [18] 상기 PDB는 PDB 총 중량을 기준으로 0.1 내지 10중량%의 오일을 더 포함할 수 있다.
- [19] 상기 배양조건에서 배양시간은 80 내지 150시간의 범위 이내가 될 수 있다.
- [20] 상기 식물성 오일의 발효는 10 내지 40°C의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일 10 내지 80중량%에 잔량으로서 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 첨가하고, 5.0 내지 8.0의 범위 이내의 pH, 25 내지 50°C의 범위 이내의 온도, 50 내지 500rpm의 범위 이내의 교반을 포함하는 발효조건에서 발효시키는 것으로 수행될 수 있다. 상기한 바와 같이 발효가 완료된 오일과 배양농축물을 원심분리하여 분리하고, 여과하는 공정이 더 수행될 수 있으며, 이러한 원심분리 및 여과 공정들은 당업자에게는 용이하게 실시할 수 있을 정도로 공지된 것으로 이해될 수 있는 것이다.
- [21] 상기 리조푸스속 미생물은 바람직하게는 리조푸스 오리제(미생물자원센터 수탁번호 KCTC6106)가 될 수 있다.

- [22] 또한, 본 발명에 따른 발효 식물성 오일의 제조방법은, 식물성 오일을 발효시켜 발효 식물성 오일을 제조하는 방법에 있어서, (1) 10 내지 40°C의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일 10 내지 80중량%에 잔량으로서 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 첨가하는 혼합단계; 및 (2) 5.0 내지 8.0의 범위 이내의 pH, 25 내지 50°C의 범위 이내의 온도, 50 내지 500rpm의 범위 이내의 교반을 포함하는 발효조건에서 발효시키는 발효단계;를 포함하며, 여기에서 상기 식물성 오일이 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이다.
- [23] 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물은 상기 리조푸스속 미생물을 배지에 배지 용적 대비 10용적%의 양으로 접종시키고, 호기조건, pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35°C의 배양조건에서 배양시킨 후, 1 내지 10°C에서 800 내지 1200rpm으로 원심분리시켜 수득된 상등액을 염석시켜 수득될 수 있다.
- [24] 상기 배지는 2 내지 10중량%의 감자 전분, 0.5 내지 3중량%의 덱스트로즈 및 잔량으로서 물을 포함하는 PDB(Potato Dextrose Broth)일 수 있다.
- [25] 상기 배양조건에서 배양시간은 80 내지 150시간의 범위 이내가 될 수 있다.
- [26] 상기 리조푸스속 미생물은 바람직하게는 리조푸스 오리제가 될 수 있다.
- [27] 본 발명에 따르면, 상기한 바의 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 피부 외용 약학적 조성물이 제공된다.
- [28] 본 발명에 따르면, 상기한 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 화장품 조성물이 제공된다.
- [29] 또한, 본 발명에 따르면, 상기한 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 의약외품이 제공된다.

발명의 효과

- [30] 본 발명에 따르면 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 식물성 오일을 발효시켜 유리 필수불포화지방산이 풍부한 발효 식물성 오일을 제조함으로써 피부 가려움증 및 아토피성 피부염 개선, 보습효과 및 세포막 손상방지를 위한 식물성 발효오일 및 그 제조 방법이 제공되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 본 발명에 따른 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일 및 동백 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 NO 생성 억제 효과를 대조군 및 비교예 1 ~ 4와 비교하여 나타낸 그래프이다.
- [32] 도 2는 본 발명에 따른 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일 및 동백 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 COX-2 활성 억제 효과를 비교예 1

~ 4와 비교하여 나타낸 그래프이다.

- [33] 도 3은 본 발명에 따른 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일 및 동백 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 히스타민 생성억제 효과를 대조군 및 비교예 1 ~ 4와 비교하여 나타낸 그래프이다.
- [34] 도 4는 본 발명에 따른 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일 및 동백 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 비만세포의 활성화억제 및 탈과립 억제 효과를 비교하기 위하여, 대조군 및 비교예 1 ~ 4가 비만세포의 활성화 및 탈과립에 미치는 효과와 비교한 그림이다.
- [35] 도 5는 본 발명에 따른 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일 및 동백 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 비만세포의 활성화억제 및 탈과립 억제 효과를 나타내는 그림이다.
- [36] 도 6은 본 발명에 따른 보라지 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 세포 안전성을 나타내는 그래프이다.
- [37] 도 7은 본 발명에 따른 모링가 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 세포 안전성을 나타내는 그래프이다.
- [38] 도 8은 본 발명에 따른 달맞이꽃 종자 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 세포 안전성을 나타내는 그래프이다.
- [39] 도 9는 본 발명에 따른 동백 오일을 발효하여 제조된 발효 식물성 오일의 세포 안전성을 나타내는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 본 발명에 따른 발효 식물성 오일은 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 식물성 오일을 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 발효시켜 수득된다.

발명의 실시를 위한 형태

- [41] 본 발명에 따른 발효 식물성 오일은 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 식물성 오일을 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 발효시켜 수득되는 것임을 특징으로 한다.
- [42] 본 발명에 따른 발효 대상인 상기 식물성 오일은 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 본 발명이 이들로 제한되는 것으로 의도되는 것은 아니며, 바람직하게는 식물성 오일 중에서도 불포화지방산을 많이 함유하는 식물성 오일들 또한 본 발명의 범주에 속하는 것으로 이해되어야 한다.
- [43] 상기 보라지 오일은 감마리놀레산이 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.

- [44] 상기 모링가 오일은 아르간 오일, 사카잉키 오일과 더불어 피부노화에 좋은 3대 오일 중 하나로 알려져 있다. 특히 피부 정화 작용이 우수해서 마사지에 많이 이용되고 있으며, 피부의 수분을 잘 유지시켜 건조함을 막아준다. 또한 비타민과 아미노산이 풍부해서 거칠고 노화된 피부에 잘 맞는 것으로 알려져 있다.
- [45] 상기 달맞이꽃 종자 오일은 인디언들이 야생 달맞이꽃을 채취하여 통째로 갈아서 민간약제로 사용하여왔다. 혈중 콜레스테롤을 낮춰주는 효과와 혈압 조절 및 아토피성 피부염 완화와 같은 효과를 지니는 것으로 연구되고 있다.
- [46] 상기 동백 오일은 차나무과(Theaceae)의 동백나무(*Camellia Japonica L.*) 및 그 동속식물의 종자에서 채취되는 지방유로서 올리브 오일과 비슷한 용도로, 크림, 유액 등에 사용되고 있으며, 특히 두발용으로 많이 사용되고 있다.
- [47] 상기 올리브 오일은 올리브나무(감람나무)의 열매에 함유된 30~70%의 기름이며, 압착법 및 추출법 등으로 채유한다. 지방산의 주성분은 불포화산인 올레산(oleic acid)으로, 함량은 65~85% 정도이며, 포화지방산으로는 팔미트산이 주성분이다. 식용유로는 샐러드유나 기름절임용에 주로 쓰이고, 요리에선 마요네즈, 샐러드용 드레싱, 튀김용, 볶음용으로 널리 이용된다. 식용유 중에서 최고급품으로 세계적으로 귀중하게 사용되는데, 특히 그리스, 에스파냐, 이탈리아에서 요리에 가장 널리 사용되고 있다. 또한, 요리는 물론 화장이나 치료를 할 때도 사용된다. 올리브오일이 각종 피부염과 궤양을 치료하고 피부를 좋게 만들어주는 효과가 있기 때문이다. 특히 올리브오일을 이용한 지중해식 식이요법은 고혈압, 당뇨병, 심장병 등을 예방하고 치료하는 데 효과적이라고 한다. 지중해식 식이요법의 핵심은 올리브오일을 자주 먹는 것이고, 따라서 한때 건강에 관심이 많은 일본에서 매일 아침 한 스푼 정도의 올리브오일을 마시는 건강법이 유행하기도 했다. 지금까지 알려진 올리브오일의 효능은 다음과 같다:
- [48] (1) 노화를 방지한다: 올리브오일은 불포화지방산과 항산화 성분인 비타민 E, 토코페롤, 폴리페놀 등을 많이 함유하고 있어 노화 방지에 탁월한 효과가 있다.
- [49] (2) 암을 예방한다: 암의 발병 원인은 세포의 산화작용이기 때문에 항산화 물질이 풍부한 올리브오일이 큰 도움이 된다. 특히 소화기 계통 암 예방에 효과적이다.
- [50] (3) 콜레스테롤을 억제해 성인병을 예방한다: 불포화지방산, 토코페롤 등 항산화 성분이 풍부해 몸에 유해한 콜레스테롤 생성을 억제, 동맥경화를 막는다. 심장 질환과 고혈압 예방에도 효과적이다.
- [51] (4) 소화를 돕고 위통을 치료한다: 위액의 분비를 조절해 궤양을 치료하고 복통을 완화하며 소화를 돕는다.
- [52] (5) 간 기능을 돕는다: 간에서 생성하는 유익한 콜레스테롤(HDL)의 분비를 촉진해 간 기능을 돕고 담석이 생기는 것을 막는다. HDL은 정력제의 원료가 되기도 한다.
- [53] (6) 변비를 치료, 예방한다: 식물성 지방 성분이 대장의 배변운동을 촉진해

변비를 치료하고 변을 부드럽게 한다.

[54] (7) 당뇨병을 예방한다: 혈당을 조절해 당뇨병을 예방하는 효과가 있다.

[55] (8) 아이들의 성장과 두뇌발달을 돕는다: 비타민과 필수 미네랄 성분이 태아와 성장기 어린이들의 뼈와 뇌 발달에 도움을 준다.

[56] (9) 다이어트에 효과적이다: 올리브오일은 비만의 원인이 되는 트랜스지방산이 함유되어 있지 않아 비만 예방 및 다이어트에 특효가 있다.

[57] (10) 피부를 보호한다: 올리브오일에 함유된 비타민 E와 프로비타민이 피부 노화를 막고 노폐물과 독소를 배출해 피부를 맑고 윤기 있게 가꿔준다.

[58] (11) 피부 트러블을 진정시킨다: 올리브오일은 자체적으로 살균 정화 능력을 갖고 있다. 피부 트러블이 생긴 곳에 살짝 바르면 트러블이 진정된다.

[59] 상기 해바라기씨 오일은 해바라기 씨에서 얻어지는 오일로서, 해바라기 씨 효능엔 엽산으로 인한 빈혈을 예방하는 효과, 특히 엽산이 결여되기 쉬운 임산부에게 좋은 식품이고, 피부 유지와, 노화를 막는 항산화 효과, 풍부한 불포화지방산과 피토스테롤 그리고 마그네슘(해바라기씨에는 피토스테롤과 토마토보다 무려 18배되는 엽산 성분이 함유)으로 인하여 꾸준히 섭취하게 되면 혈관 내에 축적된 나쁜 콜레스테롤을 배출하는 데 도움을 주고, 심장질환을 예방하는데 좋고, 특히나 동맥경화예방에 효과적인 식품으로 알려져 있으며, 상기 풍부한 마그네슘 성분은 혈압을 상승하는데 막아주어 고혈압 증상을 완화 및 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 항혈증, 항산화, 콜레스테롤을 제거하는 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 해바라기씨 오일 중의 미네랄로는 다량원소와 미량원소로 구분되는데 그중에서도 해바라기씨에는 셀레늄이 다량 함유되어 있다. 우리나라 성인 남녀의 셀레늄 평균필요량은 하루 42mg이며, 권장섭취량은 50mg인데, 인체에서 이처럼 소량만 있으면 충분하지만, 신체노화를 방지하는 항산화 효능은 탁월하고, 특히, 활성산소의 생성을 억제하는 능력이 비타민 E의 무려 2000배에 이른다고 알려져 있다. 셀레늄은 피부노화방지와 염증치료에 좋은 것으로 알려져 있는 데, 이 역시 항산화 효능이 뛰어나기때문인 것으로 알려져 있다.

[60] 본 발명에 따르면 상기 식물성 오일을 발효시키는 데 사용되는 것으로서 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 사용한다는 점에 특징이 있다.

[61] 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물은 상기 리조푸스속 미생물을 배지에 배지 용적 대비 10용적%의 양으로 접종시키고, 호기조건, pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35°C의 배양조건에서 배양시킨 후, 1 내지 10°C에서 800 내지 1200rpm으로 원심분리시켜 수득된 상등액을 염석시켜 수득되는 석출물일 수 있으며, 이러한 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 사용하는 것에 의해 직접 미생물로 사용하는 것에 비해 불포화필수지방산의 생성량을 크게 증대시킬 수 있다는 것이 본 발명자들에 의해 확인되었다.

[62] 이때, 상기 배지는 2 내지 10중량%의 감자 전분, 0.5 내지 3중량%의 덱스트로즈 및 잔량으로서 물을 포함하는 PDB(Potato Dextrose Broth)일 수 있다. 상기 PDB를

사용하는 배양은 바람직하게는 5.1 ± 0.2 의 pH에서 그리고 호기조건에서 수행될 수 있으며, 상기 PDB는 바람직하게는 PDB 총 중량을 기준으로 0.1 내지 10중량%의 오일을 더 포함할 수 있다.

- [63] 특히, 본 발명에 따라 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물의 배양조건에서 발효배양시간은 80 내지 150시간의 범위 이내에서 배양될 때 리파아제 활성이 가장 우수하다는 것이 본 발명자들에 의해 확인되었다.
- [64] 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 유기산생성능도 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.
- [65] 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물은 리파아제(Lipase)를 포함하며, 상기 리파아제는 글리세롤과 지방산으로 분해하는 효소를 의미한다.
- [66] 상기 식물성 오일의 발효는 10 내지 40°C의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일 10 내지 80중량%에 잔량으로서 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 첨가하고, 5.0 내지 8.0의 범위 이내의 pH, 25 내지 50°C의 범위 이내의 온도, 50 내지 500rpm의 범위 이내의 교반을 포함하는 발효조건에서 발효시키는 것으로 수행될 수 있으며, 상기 리조푸스속 미생물은 바람직하게는 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*)가 될 수 있다.
- [67] 또한, 본 발명에 따른 발효 식물성 오일의 제조방법은, 식물성 오일을 발효시켜 발효 식물성 오일을 제조하는 방법에 있어서, (1) 10 내지 40°C의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일 10 내지 80중량%에 잔량으로서 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 첨가하는 혼합단계; 및 (2) 5.0 내지 8.0의 범위 이내의 pH, 25 내지 50°C의 범위 이내의 온도, 50 내지 500rpm의 범위 이내의 교반을 포함하는 발효조건에서 발효시키는 발효단계;를 포함하며, 여기에서 상기 식물성 오일이 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 균으로부터 선택됨을 특징으로 한다.
- [68] 상기 (1)의 혼합단계는 10 내지 40°C의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일

10 내지 80중량%에 잔량으로서 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 첨가하는 것으로 이루어진다.

[69] 상기 (2)의 발효단계는 5.0 내지 8.0의 범위 이내의 pH, 25 내지 50°C의 범위 이내의 온도, 50 내지 500rpm의 범위 이내의 교반을 포함하는 발효조건에서 발효시키는 것으로 이루어진다.

[70] 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물, 상기 배양농축물의 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.

[71] 본 발명에 따른 상기 발효 식물성 오일은 상기한 방법으로 발효함으로써 발효되기 전보다 유리 필수불포화지방산 함량이 높은 특징을 가진다.

[72] 상기 유리 필수불포화지방산은 감마 리놀렌산(Gamma Linolenic Acid, GLA), 리놀렌산(Linoleic Acid, LA) 및 올레산(Oleic Acid, OA)을 포함한다.

[73] 감마리놀렌산은 여성의 모유와 일부 식물에만 존재하는 불포화지방산 성분으로서, 체내 활성물질로 알려진 프로스타글란딘을 합성하는데 꼭 필요한 전구체이다. 체내에 감마리놀렌산이 부족하게 되면 생리활성물질인 프로스타글란딘이 합성되지 않기 때문에, 필수아미노산을 비롯한 신체의 정상적인 기능에 필요한 성분이 잘 형성되지 못해 면역체계의 이상이 생기게 된다. 따라서 상기의 문제를 해결 할 수 있는 본 발명의 발효 오일은 필수불포화지방산의 함량이 높아짐에 따라 가려움증 개선 및 아토피성 피부염 개선효과가 우수해진다.

[74] 상기된 유리 필수불포화지방산은 지방산이 글리세라이드로 결합되지 않은 형태를 의미한다. 유리 필수불포화지방산의 함량이 높아짐에 따라 끈적임이 줄어들고 피부 흡수력이 향상된다.

[75] 본 발명에 따르면, 상기한 바의 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 피부 외용 약학적 조성물; 상기한 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 화장품 조성물; 및/또는 상기한 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 의약품이 제공될 수 있으나, 본 발명이 이들로 제한되는 것으로 의도되는 것은 아니며, 필수불포화지방산의 함량을 높인 발효 식물성 오일을 유효성분으로 포함하는 각종의 제형으로의 제조가 가능하며, 포유동물, 특히 인간의 피부 등에 적용되는 의약품 및 의약부외품을 포함하여 다종다양한 제품으로의 가공이 가능함은 당업자에게는 이해될 수 있는 것이다.

[76] 또한, 본 발명에 따른 발효 식물성 오일의 제조방법에 있어서, 발효단계의 종료 이후, 발효를 마친 오일은 500 내지 3000rpm으로 원심분리 후, 상기한 바의

발효에 사용된 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 여과에 의해 분리하여 발효가 완료된 발효 식물성 오일을 수득할 수 있다. 수득된 발효 식물성 오일은 다량의 필수불포화지방산을 함유할 수 있다.

[77] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 피부 외용 약학적 조성물을 제공한다.

[78] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[79] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 의약외품을 제공한다.

[80] 본 발명에 따른 발효 식물성 오일은 유리 필수불포화지방산이 풍부하고, NO 생성 억제, COX-2 활성억제, 히스타민의 생성억제 및 비만세포의 활성화 억제 및 탈과립 억제 효과를 가지며, 세포독성이 거의 없으므로, 피부 가려움증 및 아토피성 피부염 개선, 보습효과 및 손상된 세포막 재생을 위한 피부 외용제, 화장품 조성물 또는 의약외품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[81] 상기 기능성 조성물은 피부 외용 연고, 크림, 로션, 에멀전, 화장수, 에센스, 미스트, 젤, 팩, 오일, 색조화장품, 비누, 바디워시, 샴푸, 린스, 입욕제, 스크럽제 등 다양한 제형으로 제조될 수 있다.

[82] 상기 기능성 조성물은 정제수, 유분, 계면활성제, 보습제, 안정화제, 알코올, 중점제, 킬레이트제, 색소, 방부제 및 향료로 이루어지는 군으로부터 적어도 1종 이상 선택된 첨가제를 더 포함할 수 있다.

[83] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 상세히 설명하면 다음과 같으며, 본 발명의 범위가 아래의 실시예들로 한정되는 것은 아니다.

[84] <실험예 1> 미생물 별 리파아제 활성의 비교 실험

[85] 본 발명에 따른 리조푸스속 미생물의 배양농축물의 리파아제 활성을 다른 미생물들과 비교하는 실험을 수행하였다.

[86] 대조 미생물들로서는 버크홀데리아 멀티보란(*Burkholderia multivorans*)은 1중량% 펩톤(Peptide), 0.5중량% 효모 추출물(Yeast extract), 0.02중량% 황산마그네슘, 0.1중량% 인산칼륨(Potassium phosphate dibasic), 1중량% 올리브 오일(Olive oil)의 조성을 갖는 배지를 사용하였고, 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescense*)는 영양배지(Nutrient broth: 수육 또는 어육의 추출액을 일반적으로 사용하는 세균배지의 일종으로, 주로 부생 유기영양의 세균배양에 사용하며, 보통 시판되는 스프용 또는 특히 세균학용 추출액 0.3중량%에 펩톤 0.5중량%, 경우에 따라서는 0.5중량% 효모 침출물, 0.8중량% 식염 등을 첨가하여 pH 7 정도로 조정한 것으로서, 기본배지로 사용됨)에 1중량% 올리브 오일(Olive oil)을 사용하였고, 칸디다 루고사(*Candida rugosa*)는 배지로서

YMB(효모 추출물 1.5g, 맥아 추출물 1.5g, 펩톤 2.5g, 덱스트로즈 5.0g 및 증류수 500ml로 조성되는 배지)에 올리브 오일을 상기 배지 총량의 1중량%로 첨가한 것을 사용하였다. 슈도지마속(*Pseudozyma sp.*)의 배지는 0.01중량% 글루코오스, 0.1중량% 올리브 오일, 0.003중량% 효모 추출물, 0.003중량% 맥아 추출물, 0.003중량% 펩톤, 0.003중량% 콩가루, 0.02중량% 황산암모늄, 0.001중량% 인산칼륨, 0.005중량% 황산마그네슘, 0.001중량% 염화칼슘 및 0.0001중량% 염화나트륨의 조성을 사용하였다.

- [87] 리파아제의 활성을 측정하기 위해서 비누화 반응을 통한 발색법을 사용하였다. 미생물을 배양 후, 12,000rpm에서 원심분리하여 상등액을 조효소액(crude enzyme solution)으로 사용하였다. 기질은 1% 폴리비닐알콜(polyvinylalcohol)에 10% 올리브 오일(Olive oil)이 포함되도록 하여 조효소액과 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 생성된 유리 필수불포화지방산(fatty acid)을 구리-아세테이트-피리딘(Cu-acetate-pyridine)과 반응시켜 구리화 반응이 일어나면서 발색하게 되는데, 발색된 정도를 715 nm에서 흡광도를 측정한다. 리파아제 활성은 unit 단위로 표시하였으며 1U은 1분간 생성된 지방산의 마이크로몰(μmol)로 정의하였다.

- [88] 각각의 미생물에 따라 리파아제의 활성이 가장 높은 pH와 시간을 하기 표 1에 나타내었다.

- [89] 표 1

[Table 1]

	pH	시간	리파아제 활성 (U/ml)
리조푸스 오리제(<i>Rhizopus oryzae</i>)	6.0	120	4.3
버크홀테리아 멀티보란(<i>Burkholderia multivorans</i>)	7.8	36	0.8
슈도모나스 플루오레센스(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	7.0	32	1.2
칸디다 루고사(<i>Candida rugosa</i>)	7.2	100	1.6
슈도지마 속(<i>Pseudozyma sp.</i>)	7.0	24	2.8

- [90] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 사용되는 리조푸스 오리제가 배양에 의해 가장 높은 리파아제 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

- [91] <실험예 2> 배양시간 별 리파아제 활성의 비교 실험

- [92] 상기 실험예 1에서 가장 높은 리파아제 활성을 나타낸 리조푸스 오리제의 배양시간에 따른 리파아제 활성을 측정하였다. 배양시간을 달리하는 것을 제외하고는 상기 실험예 1에서와 같은 배양조건으로 실험하였으며, 그 결과를

하기 표 2에 나타내었다.

[93] 표 2

[Table 2]

균주	배양시간	리파아제 활성 (U/ml)
리조푸스 오리제(Rhizopus oryzae)	90 시간	4.15
	120 시간	4.30
	140 시간	4.22

[94] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 리조푸스 오리제의 경우, 배양시간 120시간에서 리파아제 활성이 가장 높게 나타나고, 그 이후에는 다시 시간의 경과에 따라 서서히 감소하는 것으로 나타났다.

[95] <실험예 3> 배양액으로부터 생성된 리파아제의 농축 및 리파아제의 활성 측정

[96] 미생물을 배양 후, 8000rpm으로 원심분리하여 얻게 된 각각의 배양액에 20 내지 100중량% 포화농도의 황산암모늄(ammonium sulfate)으로 4°C 조건에서 처리하여 리파아제(Lipase)를 침전시켰다. 그 후에 4°C, 12,000rpm의 조건에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 침전물을 0.05M 인산 완충용액(pH 7.0)에 녹인 후 투석막을 이용하여 4°C 조건에서 농축된 리파아제를 얻었다.

[97] 리파아제 침전에 사용한 황산암모늄의 포화농도에 따른 리파아제의 활성은 하기 표와 같다.

[98] 표 3

[Table 3]

황산암모늄의 농도	리파아제 활성 (U/ml)
0 ~ 20%	3.54
20 ~ 40%	10.22
40 ~ 60%	14.84
60 ~ 80%	15.33
80 ~ 100%	14.18

[99] 상기 표에서 알 수 있듯이, 리파아제 침전에 사용한 황산암모늄의 포화농도가 80 ~ 100%일 때 리파아제의 활성이 가장 높았다.

[100] <실험예 4> 발효 온도에 따른 필수불포화지방산 생산 수율 측정

[101] 효소가 반응하기 최적의 온도 조건을 설정하기 위해 보라지 오일의 온도를 37°C로 설정한 후 <실험예 3>의 농축된 효소(60 ~ 80% 황산암모늄 사용)를 pH 5.0 ~ 8.0의 인산 완충용액(Phosphate buffer)에 혼합하였다. 그 후 효소액 50%중량대비 보라지 오일 50% 중량비의 비율로 혼합하고 회전수 300 rpm,

반응온도 25 ~ 50°C에서 72시간 동안 발효하였다.

[102] 표 4

[Table 4]

발효온도(°C)	함량 (%)		
	감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid) (GLA)	리놀레산(Linoleic acid) (LA)	올레산(Oleic acid) (OA)
25	1.15	8.74	5.77
37	1.87	14.51	25.35
50	1.46	11.29	13.08

[103] 실험결과, 발효 온도가 37°C에서 가장 높은 필수불포화지방산 생산 수율을 보였다.

[104] <실험예 5> pH에 따른 필수불포화지방산 생산 수율 측정

[105] 효소가 반응하기 최적의 pH 조건을 설정하기 위해 보라지 오일의 온도를 37°C로 설정한 후 <실험예 3>의 농축된 효소(60~80% 황산암모늄 사용)를 pH 5.0 ~ 8.0의 인산 완충용액(Phosphate buffer)에 혼합하였다. 그 후 효소액 50%중량 대비 보라지 오일 50% 중량비의 비율로 혼합하고 회전수 300 rpm, 반응온도 37°C에서 72시간 동안 발효하였다.

[106] 표 5

[Table 5]

발효 pH	함량 (%)		
	감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid) (GLA)	리놀레산(Linoleic acid) (LA)	올레산(Oleic acid) (OA)
5.0	0.94	8.12	9.74
6.0	1.33	10.66	13.55
7.0	1.87	14.51	25.35
8.0	1.42	10.61	17.35

[107] 실험결과, 발효 pH가 7.0에서 가장 높은 필수불포화지방산 생산 수율을 보였다.

[108] <실험예 6> 효소액과 오일의 중량비에 따른 필수불포화지방산 생산 수율 측정

[109] 효소가 반응하기 최적의 효소액과 오일의 중량비 조건을 설정하기 위해 보라지 오일의 온도를 37°C로 설정한 후 <실험예 3>의 농축된 효소(60 ~ 80% 황산암모늄 사용)를 pH 5.0 ~ 8.0의 인산 완충용액(Phosphate buffer)에 혼합하였다. 그 후 효소액 20% ~ 80%중량 대비 보라지 오일 80% ~ 20% 중량비의 비율로 혼합하고 회전수 300 rpm, 반응온도 37°C에서 72시간 동안 발효하였다.

[110] 표 6

[Table 6]

효소액 : 오일(중량비, %)	함량 (%)		
	감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid) (GLA)	리놀레산(Linoleic acid) (LA)	올레산(Oleic acid) (OA)
20 : 80	1.35	11.51	17.68
50 : 50	1.87	14.51	25.35
80 : 20	1.08	6.53	10.35

[111] 실험결과, 효소액과 오일의 중량비가 50 : 50%에서 가장 높은 필수불포화지방산 생산 수율을 보였다.

[112] <실험예 7> 발효 시간에 따른 필수불포화지방산 생산 수율 측정

[113] 효소가 반응하기 최적의 발효 시간 조건을 설정하기 위해 보라지 오일의 온도를 37°C로 설정한 후 <실험예 3>의 농축된 효소(60 ~ 80% 황산암모늄 사용)를 pH 7.0의 인산염 완충용액(Sodium phosphate buffer)(50 mM)에 혼합하였다. 그 후 효소액 50%중량 대비 보라지 오일 50% 중량비의 비율로 혼합하고 회전수 300 rpm, 반응온도 37°C에서 24 ~ 120시간 동안 발효하였다.

[114] 표 7

[Table 7]

발효시간(hour)	함량 (%)		
	감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid) (GLA)	리놀레산(Linoleic acid) (LA)	올레산(Oleic acid) (OA)
24	0.64	3.54	8.52
48	1.26	9.52	16.27
72	1.87	14.51	25.35
96	1.96	14.85	26.72
120	2.05	15.03	27.38

[115] 실험결과, 발효 시간이 길어질수록 가장 높은 필수불포화지방산 생산 수율을 보였으나 72시간 이후에는 필수불포화지방산의 생산 수율 증가율이 감소하였다. 따라서 필수불포화지방산 생산의 경제적인 면과 효율을 고려하여 발효 시간은 72시간이 적당하다.

[116] <제조예 1> 리조푸스속 미생물의 배양농축물의 제조

[117] 리조푸스속 미생물로서 리조푸스 오리제(Rhizopus oryzae)를 4중량%의 감자 전분, 1중량%의 덱스트로즈, 1중량% 올리브 오일 및 잔량으로서 물을 포함하는 PDB(Potato Dextrose Broth)에 배지 용적 대비 10용적%의 양으로 접종시키고,

호기조건, pH 6.0, 30°C의 배양조건에서 배양시킨 후, 1 내지 10°C에서 800 내지 1200rpm으로 원심분리시켜 수득된 상등액을 염석시켜 수득되는 석출물을 수득하고, 이를 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 하였다.

[118] <실시에 1 및 대조구 1 내지 2> 미생물들(슈도지마속 미생물 및 리조푸스 오리제) 및 리조푸스 오리제 배양농축물 간의 발효성능 비교 실험

[119] 상기 제조예 1의 본 발명에 따른 리조푸스속 미생물(리조푸스 오리제)의 배양농축물(실시에 1)과 대조군으로서 배양농축하지 않은 미생물 자체로서 슈도지마속 미생물(*Pseudozima sp.*)(대조구 1)과 리조푸스 오리제(대조구 2)를 사용하여 식물성 오일로서 보라지 오일을 발효시켰을 때의 지방산 함량의 차이가 있는지를 실험하였다. 단, 리조푸스 오리제의 배양농축물은 상기 제조예 1에서 수득된 것을 pH 7.0의 인산염 완충용액(Sodium phosphate buffer)(50mM)에 혼합시켜 사용하였다.

[120] 대조구들로서의 미생물 자체로 발효시킨 경우로서의 슈도지마속 미생물과 리조푸스 오리제는 분양 받은 상태의 미생물들을 상기 PDB 배지에 배지 용적 대비 10용적%의 양으로 접종시켜 확대배양한 후, 확대배양물 그리고 리조푸스 오리제 배양농축물 각 50중량%에 식물성 오일로서 보라지 오일 50중량%의 비율로 혼합하고, 회전수 300rpm, 37°C에서 72시간 동안 발효시켰으며, 발효를 마친 오일은 4000rpm으로 20분간 원심분리 후, 여과하여 발효 식물성 오일을 수득하였다. 발효 후의 지방산 함량을 측정하고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

[121] 표 8

[Table 8]

	함량 (%)		
	감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid)(GLA)	리놀레산(Linoleic acid)(LA)	올레산(Oleic acid)(OA)
대조구 1	0.95	7.19	12.82
대조구 2	0.58	4.29	7.82
실시에 1	1.87	14.51	25.35

[122] 상기 표 8에 나타난 바와 같이, 미생물 자체를 이용하여 발효시킨 경우에 비해, 본 발명에 따른 리조푸스 오리제의 배양농축물로 발효시킨 경우에서 동일한 보라지 오일을 발효시켜도 더 높은 지방산 함량을 포함(약 2배)하는 발효 식물성 오일을 수득할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[123] 또한, 상기 실시에 1 및 대조구 1 내지 2들에서 수득된 발효 식물성 오일들에 대하여 관능평가를 수행하였다. 냄새의 관능평가는 성인남녀 15명을 대상으로 하여 실험하였으며, 상기 실시에 1 및 대조구 1 내지 2의 발효 식물성 오일들을

구분하여 3회 실시하였다. 평가용기는 동일하게 하고, 50ml씩 제공하여 평가하였다. 시료는 평가자들이 알아 볼 수 없도록 표시 한 후, 냄새의 정도를 평가하도록 하였다. 평가 점수는 1 내지 6점으로, 아주 나쁘다가 1이고, 아주 좋다를 6으로 기입하도록 하였으며, 그 결과를 평균하여 하기 표 9에 나타내었다.

[124] 표 9

[Table 9]

	평가 점수
대조구 1	2.65±0.6
대조구 2	2.5±1.5
실시예 1	4.4±0.9

[125] 상기 표 9에 나타난 바와 같이, 미생물로 직접 발효시킨 대조구 2에 비하여 본 발명에 따라 배양농축물로 발효시켰을 때 냄새에 대한 거부감이 적은 것으로 나타났다.

[126] <실시예 2 내지 4>

[127] 상기 실시예 1과 같은 조건으로 하되, 발효대상인 식물성 오일로 모링가 오일(실시예 2), 달맞이꽃 종자 오일(실시예 3) 및 동백 오일(실시예 4)들을 본 발명에 따른 리조푸스 오리제의 배양농축물로 발효시켰다.

[128] 실시예 1 내지 4에서 수득된 각 발효 식물성 오일의 필수지방산 함량을 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[129] 표 10

[Table 10]

오일종류	함량 (mg/g)		
	감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid) (GLA)	리놀레산(Linoleic acid) (LA)	올레산(Oleic acid) (OA)
실시예 1	1.87	14.51	25.35
실시예 2	1.35	12.86	6.82
실시예 3	1.21	15.13	32.65
실시예 4	2.02	20.44	9.07

[130] <비교예 3 내지 6>

[131] 대조군으로서 미발효된 각 오일들 즉, 미발효 보라지 오일(비교예 3), 미발효 모링가 오일(비교예 4), 미발효 달맞이꽃 종자 오일(비교예 5) 및 미발효 동백 오일(비교예 6)들을 사용하였다.

[132] <실험예 8> 피부 염증유발물질(NO) 생성 억제 효과 확인

- [133] 각 실시예의 샘플이 피부 염증유발물질인 NO(nitric oxide: 일산화질소)의 생성을 억제하는 작용 효과를 확인하기 위해, 마우스 대식세포에 LPS(lipopolysaccharide: 지질다당류)를 처리함으로써 생성되는 배양액 내의 아질산염(nitrite) 농도를 그리아스(Griess) 반응을 이용하여 측정하였다.
- [134] 구체적으로, 우태혈청(FBS)과 항생제가 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: 돌베코 변성 이글 배지)를 이용하여 96웰 배양플레이트(96 well culture plate)에 1×10^4 세포/웰의 마우스 대식세포 유래의 RAW 264.7 세포를 분주 후 37°C , 5% CO_2 항온기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 이전 배양에 사용된 배지를 제거하고 FBS와 항생제가 함유되지 않은 새로운 DMEM 배지를 분주한 후 각 샘플을 처리하였다. 1시간 후 $1\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 동안 생성된 NO는 Griess시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 전체 NO_2^- 의 농도로 측정하였는데, 세포배양 상층액 $50\mu\text{l}$ 와 Griess시약 $50\mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 엘리사 판독기(ELISA reader: 효소면역측정 판독기)를 이용하여 540nm 에서 흡광도를 측정하였다.
- [135] 그 결과는 도 1 및 표 11에 나타낸 바와 같다.
- [136] 표 11

[Table 11]

NO(nitric oxide) 생성량 (μM)	
sham	37.66 ± 7.16
(-) 대조군	387.94 ± 56.83
비교예 1	280.11 ± 16.44
비교예 2	318.73 ± 36.51
비교예 3	364.25 ± 4.82
비교예 4	339.24 ± 30.94
실시예 1	64.52 ± 6.02
실시예 2	88.91 ± 16.42
실시예 3	105.94 ± 26.88
실시예 4	124.06 ± 8.83

- [137] 실험결과, 본 발명의 실시예 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일을 사용한 경우 마우스 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 피부 염증유발물질의 하나인 NO의 생성이 현저히 억제됨을 알 수 있었다(도 1 및 표 11).
- [138] <실험예 9> COX-2의 활성 저해 효과 확인
- [139] 각 샘플이 피부 염증유발효소인 COX-2(Cyclooxygenase-2)의 활성을 저해하는 효능을 알아보기 위해서, 이러한 효소의 기질인 아라키돈산(arachidonic acid)을

사용하여 헤마틴(hematin)의 산화를 유도하여 변색되는 현상을 이용하여 측정하였다.

- [140] 구체적으로, 아라키돈산을 기질로 하여 프로스타그란딘을 생성하는 COX-2의 효소반응을 일으키기 위하여 먼저, 1.5 mL 튜브에 COX-2 효소(30 units/mL) 10 μ l, heme 용액(150 uM/mL) 10 μ l, 반응 완충액(0.1M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 2 mM phenol, pH 8.0) 950 μ l을 넣고 여기에 순차적인 농도별로 희석된 샘플 20 μ l 첨가한 후 5분간 37°C에서 안정화하였다. 여기에 아라키돈산 10 μ l을 넣고 2분간 37°C에서 반응시킨 후 1M HCl 50 μ l를 넣고 반응을 정지하였다. SnCl₂ 용액(50 mg/ml) 100 μ l를 넣고 잘 섞어준 후 상온에서 5분간 반응시켰다.
- [141] 상기 반응에서 생성된 프로스타그란딘으로 경쟁적 ELISA를 실시하기 위하여 먼저, 상기 반응액을 EIA 완충액으로 2000배 및 4000배 희석하고 이를 프로스타그란딘 항체가 코팅된 96 well plate에 50 μ l 분주 후 PGs screening AChE tracer 50 μ l와 항혈청(Antiserum)을 50 μ l를 첨가한 후 18시간 동안 상온에서 반응시켰다. 96 well을 완충액으로 5회 세척한 후 Ellman's reagent를 200 μ l씩 넣고 60분간 발색한 후 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.
- [142] COX-2 활성억제의 정도는 제조사의 방법을 준용하여 50% 억제하는 농도인 IC₅₀(ppm)값으로 나타내었다. 실험결과는 2회 반복하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.
- [143] 그래프는 본 발명의 실시예 1, 2, 3 내지 4 및 비교예 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일이 COX-2 효소를 50% 저해하는 IC₅₀값을 ppm의 농도단위로 나타낸 것이다.
- [144] 그 결과는 도 2 및 표 12에 나타낸 바와 같다.
- [145] 표 12

[Table 12]

COX-2의 IC ₅₀ (ppm)	
비교예 1	316.49 $\pm$ 53.64
비교예 2	264.22 $\pm$ 39.49
비교예 3	294.16 $\pm$ 8.66
비교예 4	285.42 $\pm$ 29.48
실시예 1	164.94 $\pm$ 11.38
실시예 2	155.82 $\pm$ 5.51
실시예 3	167.51 $\pm$ 27.94
실시예 4	159.03 $\pm$ 14.67

- [146] 실험결과, 본 발명의 실시예 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일을 사용한 경우 피부염증유발효소인 COX-2의 활성이 현저히 억제됨을 알 수 있었다(도 2 및 표

12).

[147] <실험예 10> 히스타민(histamine) 생성 억제 효과 확인

[148] 피부 가려움 및 피부 염증유발물질인 히스타민의 생성 억제를 측정하기 위하여 SD계 흰쥐의 복강에서 분리한 비만세포에 탈과립 유도 물질인 compound 48/80을 처리한 후 각 시료를 농도별로 처리하고 세포 배양액에 존재하는 히스타민의 양을 ELISA기법을 사용하여 측정하였다.

[149] 구체적으로, SD계 흰쥐를 에테르로 마취시켜 희생시킨 후 HEPES-Tyrode buffer(136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0.6 mM NaH₂PO₄, 2.75 mM MgCl₂, 5.4 mM HEPES, 1.0 mg/mL 소혈청알부민, 1.0 mg/mL 글로코즈, pH 7.4) 10 mL를 랫드의 복강 내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지하였다. 복벽 중앙선을 절개하고 복강 세척액을 스포이드로 채취하여 4°C에서 200×g로 10분간 원심분리시킨 뒤 상층 부유액을 버리고, HEPES-Tyrode buffer로 비만세포 수가 1×10⁶ cells/mL이 되도록 재부유 하였다. Isotonic Percoll 용액(10×Hank's 용액 1 mL + Percoll 9 mL) 3.5 mL에 세포 부유액 0.75 mL와 HEPES-Tyrode buffer 0.5 mL를 첨가하여 4°C에서 125×g로 15분간 원심분리시켜 상층액을 버리고 HEPES-Tyrode buffer로 2번 세척하여 순수한 비만세포 부유액을 만들었다. 분리된 비만세포를 5×10⁴ cells/mL이 되도록 HEPES-Tyrode buffer로 부유한 후 각 시료를 처리하였다. 10분 후 음성대조군(PBS 처리군)를 제외한 양성대조군(compound 48/80 처리군)과 시료 처리군에 compound 48/80(1 μg/mL)을 처리하여 20분간 반응시켰다. 세포에서 분비된 히스타민 측정을 위해 400×g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액으로 히스타민 분비 억제율을 구하기 위해 히스타민 측정 키트를 이용하여 경쟁적 ELISA 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 각 농도별 표준 히스타민과 시료를 항히스타민 항체가 코팅된 96 well plate에 50 μL로 분주하고 효소 컨쥬게이트(conjugate)를 50 μL 첨가한 후 상온에서 45분간 반응시켰다. 완충액으로 4회 세척한 후 효소의 기질을 150 μL 분주하고 상온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA plate reader를 이용하여 650 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 히스타민 분비량(ng/mL)은 유리된 히스타민이 항히스타민 항체에 결합한 비율[(실험군의 흡광도 / 최대 효소 컨쥬게이트 군의 흡광도) X 100]을 ELISA 키트 제조사가 제공하는 히스타민의 표준 곡선에 대입하여 구하였다.

[150] 그 결과는 도 3 및 표 13에 나타낸 바와 같다.

[151] 표 13

[Table 13]

배지에서 분리된 히스타민 (ng/ml)	
sham	14.64 ± 2.49
(-) 대조군	51.85 ± 6.16
비교예 1	39.15 ± 2.42
비교예 2	44.16 ± 4.55
비교예 3	42.64 ± 1.05
비교예 4	41.55 ± 3.88
실시예 1	28.45 ± 1.15
실시예 2	32.81 ± 1.52
실시예 3	35.11 ± 5.43
실시예 4	33.47 ± 1.68

- [152] 실험결과, 본 발명의 실시예 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일을 사용한 경우 피부 가려움 및 피부 염증유발물질인 히스타민의 활성이 현저히 억제됨을 알 수 있었다(도 3 및 표 13).
- [153] <실험예 11> 비만세포(mast cell)의 탈과립 억제 확인
- [154] 비만세포 표면에 존재하는 IgE의 수용체인 FcεRI에 IgE가 결합되면서 비만세포의 탈과립이 유도되고 세포 내 과립에 저장되어 있던 히스타민이 체내로 유리된다. 이렇게 유리된 히스타민은 혈관확장과 근육수축을 일으켜 즉각적인 알레르기 증상을 유발한다.
- [155] 비만세포의 히스타민 유리 억제 측정 실험에서와 동일한 방법으로 SD계 원추의 복강에서 순수 분리한 비만세포를 사용하였다. 분리된 비만세포를 5×10⁴ cells/mL이 되도록 HEPES-Tyrode buffer로 부유한 후 각 시료를 처리하였다. 10분 후 음성대조군(PBS 처리)를 제외한 양성대조군과 시료 처리군에 compound 48/80 (1 μg/mL)를 처리하여 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 비만세포가 들어 있는 복강 부유액 20 μl를 슬라이드글라스 위에 올려놓은 후 비만세포가 침전될 수 있도록 실온에서 10분간 정착시킨다. 광학현미경으로 400배의 배율 하에서 비만세포를 관찰하여 정상형과 탈과립형으로 구분하여 관찰하였다.
- [156] 그 결과는 도 4, 도 5 및 표 14에 나타낸 바와 같다.
- [157] 표 14

[Table 14]

배지에서 분비된 히스타민 (ng/ml)	
sham	5.16 ± 0.54
(-) 대조군	78.14 ± 7.52
비교예 1	72.84 ± 9.33
비교예 2	69.62 ± 11.52
비교예 3	70.06 ± 2.85
비교예 4	75.45 ± 8.85
실시예 1	25.11 ± 3.54
실시예 2	22.97 ± 6.99
실시예 3	18.49 ± 2.57
실시예 4	35.86 ± 1.05

[158] 실험결과, 본 발명의 실시예 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일을 사용한 경우 피부가려움 및 피부염증유발물질인 히스타민의 유리를 유도하는 비만세포의 활성화 및 탈과립이 현저히 억제됨을 알 수 있었다(도 4, 도 5 및 표 14).

[159] <실험예 12> 세포(3T3) 안전성 측정

[160] 본 발명의 <실시예> 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일의 마우스 섬유아세포주인 3T3 세포에 대한 독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다.

[161] 구체적으로, 마우스 섬유아세포에 대한 독성 측정은 MTT [(3-(4,5- dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(Sigma, MO, 미국)] 측정으로 분석하였다. 3T3 세포를 96 well의 각 well 당 1×10^4 cells/mL로 분주한 다음, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 이전 배양에 사용된 배지를 제거하고 시료를 DMSO에 녹인 뒤 DMSO의 최종농도가 1%가 되도록 배지로 희석하여 추출물의 농도별(μ g/mL)로 각각 37°C, 5% CO₂에서 5시간과 24시간 동안 각각 처리하였다. 처리 후 각 well 당 0.2% MTT 용액을 20 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 상등액을 모두 제거하고 DMSO 150 μ l씩을 첨가하고 10분간 상온에서 생성된 포르마잔(formazan)을 모두 녹이고 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. DMSO에 대한 영향을 알아보기 위해 일반 대조군과 1% DMSO에 대한 대조군으로 나누어 실험하며, 세포 생존율(%)은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었다.

[162] 세포 생존율(%)=(샘플처리군의 흡광도/대조군의 흡광도)×100

[163] 그 결과는 도 6 내지 도 9에 나타낸 바와 같다.

[164] 실험결과, 본 발명의 실시예 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일에 대한

세포독성은 500 ppm 이하의 농도에서 독성이 없음을 알 수 있었다(도 6 내지 도 9).

[165] <실험예 13> 피부자극 측정

[166] 본 발명의 <실시예> 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일의 피부자극 정도를 측정하기 위하여 일반인 20명을 대상으로 팔 안쪽 피부의 직경 3×3 cm² 면적에 시료를 도포하여 24시간 및 48시간 후 육안검사 하였다.

[167] 피부자극도의 평가 수치 산정방법 및 측정결과는 하기 표 15 및 표 16과 같다.

[168] 표 15

[Table 15]

자극 정도	평가점수
자극 없음	10
아주 약한 자극	8
약한 자극	6
보통 자극	4
약간 강한 자극	2
강한 자극	0

[169] 표 16

[Table 16]

구분	24시간	48시간
대조군	9.8 ± 0.6	9.7 ± 1.2
실시예 1	9.6 ± 1.6	9.8 ± 1.4
실시예 2	9.9 ± 2.5	10.0 ± 0.0
실시예 3	10.0 ± 0.0	9.8 ± 1.4
실시예 4	9.8 ± 1.2	9.6 ± 0.6

[170] 실험결과, 상기 표에서 보는 바와 같이, 본 발명에 의하여 제조된 실시예 1, 2, 3 내지 4에 의해 제조된 오일에 대한 피부자극이 없는 것을 알 수 있었다(표 15 및 표 16).

[171] <실험예 14> 미생물 직접 발효 시의 시간 경과에 따른 지방산 함량의 변화 측정

[172] 본 발명에 대한 참고실험으로서 농축하지 않은 미생물 배양액(리조푸스 오리제 사용하여 배양하되, 배양은 상기 합성예 1과 동일하게 수행하고, 단지 농축(즉, 염석을 수행하지 않음)을 하지 않은 것을 사용하되, 이때 발효시간을 본 발명에 비해 더 늘려서 실험하면서 지방산 함량 변화를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 17 및 도 10에 나타내었다.

[173] 표 17

[Table 17]

미생물 배양액을 이용하여 발효시간	함량 (%)		
	감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid) (GLA)	리놀레산(Linoleic acid) (LA)	올레산(Oleic acid) (OA)
24	0.16	1.46	2.25
48	0.25	2.15	4.57
72	0.58	4.29	7.82
96	0.62	4.35	7.92
120	0.71	4.75	8.01

- [174] 상기 표 17 및 도 10에 나타난 바와 같이, 농축하지 않은 미생물 배양액을 사용하는 경우, 약 72시간의 경과 후에는 더 이상 지방산 함량에 큰 변화를 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

청구범위

- [청구항 1] 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 식물성 오일을 리조푸스속 미생물의 배양농축물로 발효시켜 수득되는 것을 특징으로 하는 발효 식물성 오일.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물이 상기 리조푸스속 미생물을 배지에 배지 용적 대비 10용적%의 양으로 접종시키고, 호기조건, pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35°C의 배양조건에서 배양시킨 후, 1 내지 10°C에서 800 내지 1200rpm으로 원심분리시켜 수득된 상등액을 염석시켜 수득되는 석출물임을 특징으로 하는 발효 식물성 오일.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 배지가 2 내지 10중량%의 감자 전분, 0.5 내지 3중량%의 텍스트로즈 및 잔량으로서 물을 포함하는 PDB(Potato Dextrose Broth)임을 특징으로 하는 발효 식물성 오일.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 PDB가 PDB 총 중량을 기준으로 0.1 내지 10중량%의 오일을 더 포함함을 특징으로 하는 발효 식물성 오일.
- [청구항 5] 제 2 항에 있어서,
상기 배양조건에서 배양시간이 80 내지 150시간의 범위 이내임을 특징으로 하는 발효 식물성 오일.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 식물성 오일의 발효가 10 내지 40°C의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일 10 내지 80중량%에 잔량으로서 상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물을 첨가하고, 5.0 내지 8.0의 범위 이내의 pH, 25 내지 50°C의 범위 이내의 온도, 50 내지 500rpm의 범위 이내의 교반을 포함하는 배양조건에서 배양시키는 것으로 수행됨을 특징으로 하는 발효 식물성 오일.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 리조푸스속 미생물이 리조푸스 오리제(Rhizopus oryzae)임을 특징으로 하는 발효 식물성 오일.
- [청구항 8] 식물성 오일을 발효시켜 발효 식물성 오일을 제조하는 방법에 있어서,
(1) 10 내지 40°C의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일 10 내지 80중량%에 잔량으로서 상기 리조푸스속 미생물의

배양농축물을 첨가하는 혼합단계; 및

(2) 5.0 내지 8.0의 범위 이내의 pH, 25 내지 50°C의 범위 이내의 온도, 50 내지 500rpm의 범위 이내의 교반을 포함하는

배양조건에서 배양시키는 배양단계;

를 포함하며,

여기에서 상기 식물성 오일이 보라지 오일, 모링가 오일, 달맞이꽃 종자 오일, 동백 오일, 올리브 오일, 해바라기씨 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 발효 식물성 오일의 제조방법.

[청구항 9]

제 8 항에 있어서,

상기 리조푸스속 미생물의 배양농축물이 상기 리조푸스속 미생물을 배지에 배지 용적 대비 10용적%의 양으로 접종시키고, 호기조건, pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35°C의 배양조건에서 배양시킨 후, 1 내지 10°C에서 800 내지 1200rpm으로 원심분리시켜 수득된 상등액을 염석시켜 수득됨을 특징으로 하는 발효 식물성 오일의 제조방법.

[청구항 10]

제 9 항에 있어서,

상기 배지가 2 내지 10중량%의 감자 전분, 0.5 내지 3중량%의 덱스트로즈 및 잔량으로서 물을 포함하는 PDB(Potato Dextrose Broth)임을 특징으로 하는 발효 식물성 오일의 제조방법.

[청구항 11]

제 9 항에 있어서,

상기 배양조건에서 배양시간이 80 내지 150시간의 범위 이내임을 특징으로 하는 발효 식물성 오일의 제조방법.

[청구항 12]

제 8 항에 있어서,

상기 리조푸스속 미생물이 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*)임을 특징으로 하는 발효 식물성 오일.

[청구항 13]

제 1항 내지 제 7 항 중의 어느 한 항에 따른 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 피부 외용 약학적 조성물.

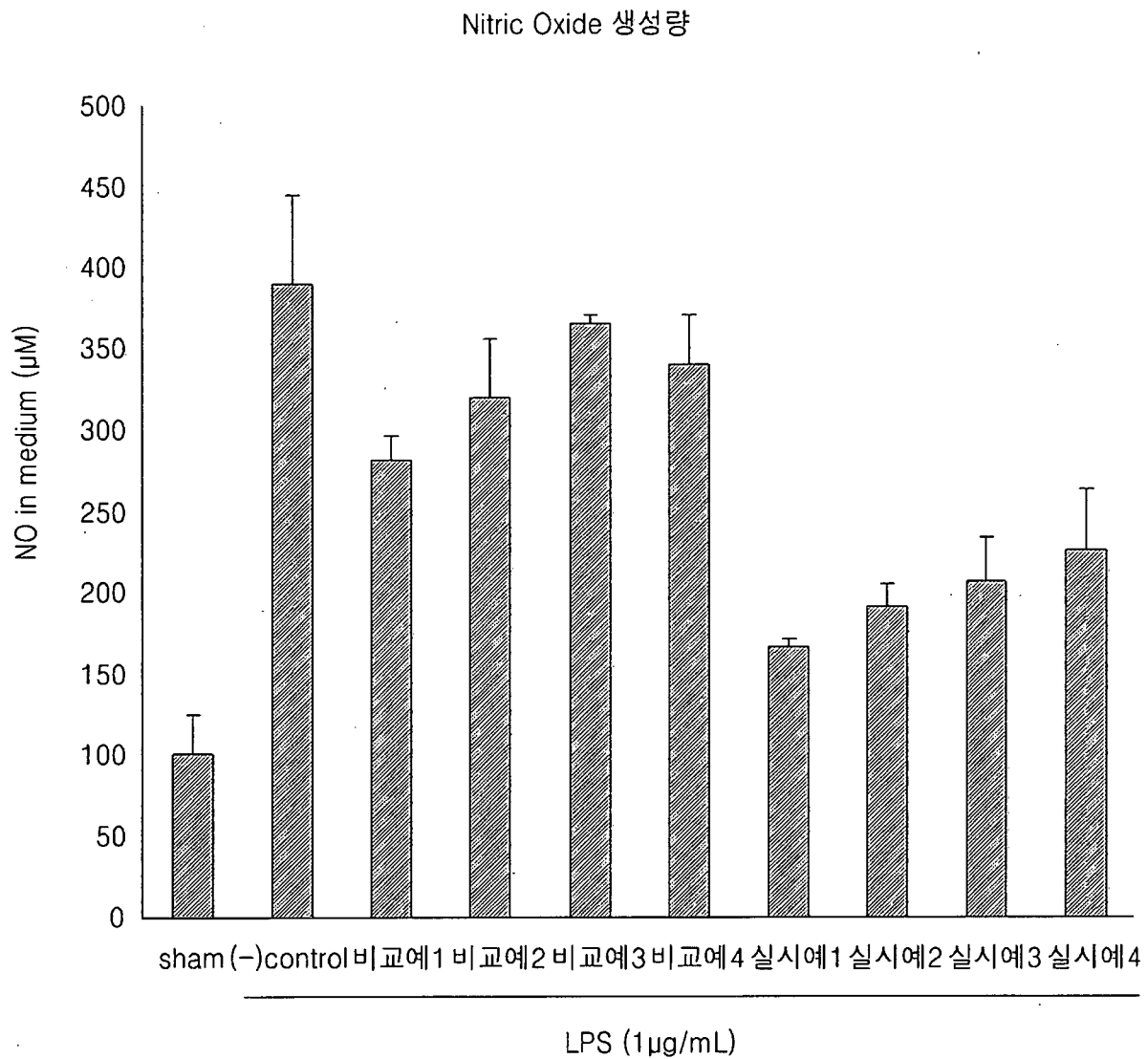
[청구항 14]

제 1항 내지 제 7 항 중의 어느 한 항에 따른 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 화장품 조성물.

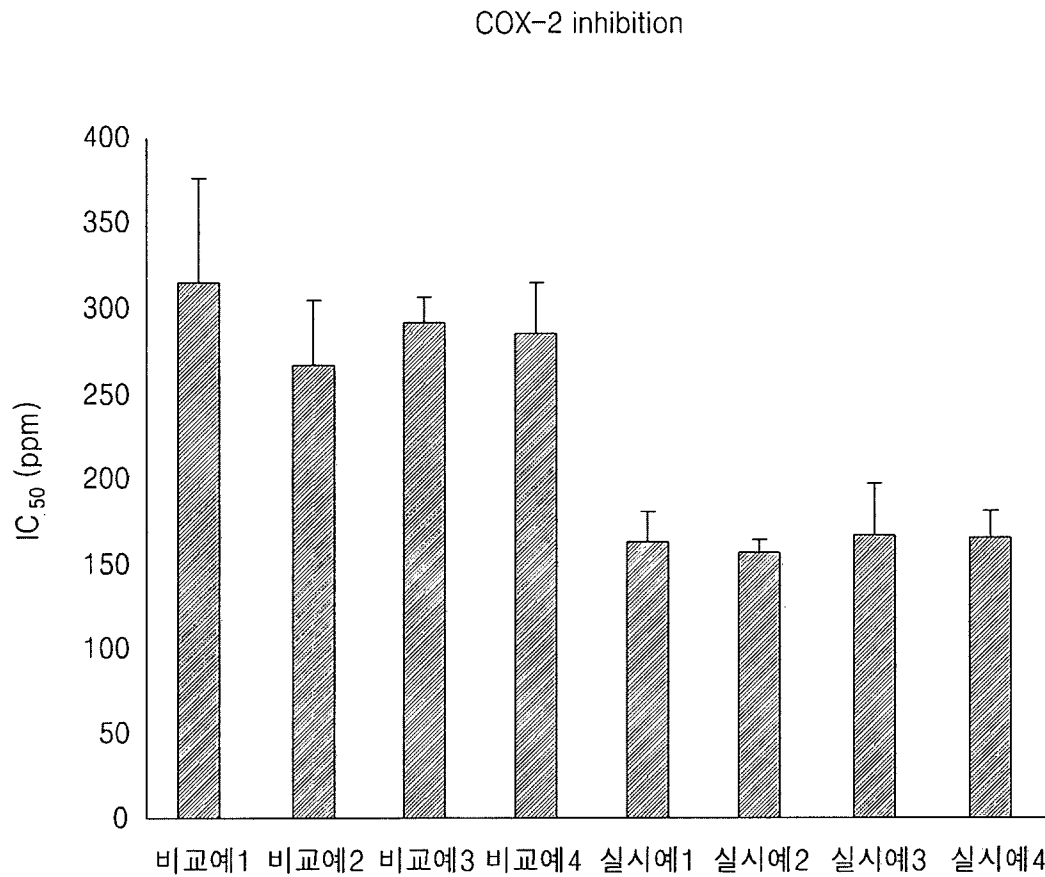
[청구항 15]

제 1항 내지 제 7 항 중의 어느 한 항에 따른 발효 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부세포막 손상방지, 아토피성 피부염 개선, 피부 가려움증 개선, 보습, 염증성 피부트러블 예방 및 개선용 의약품.

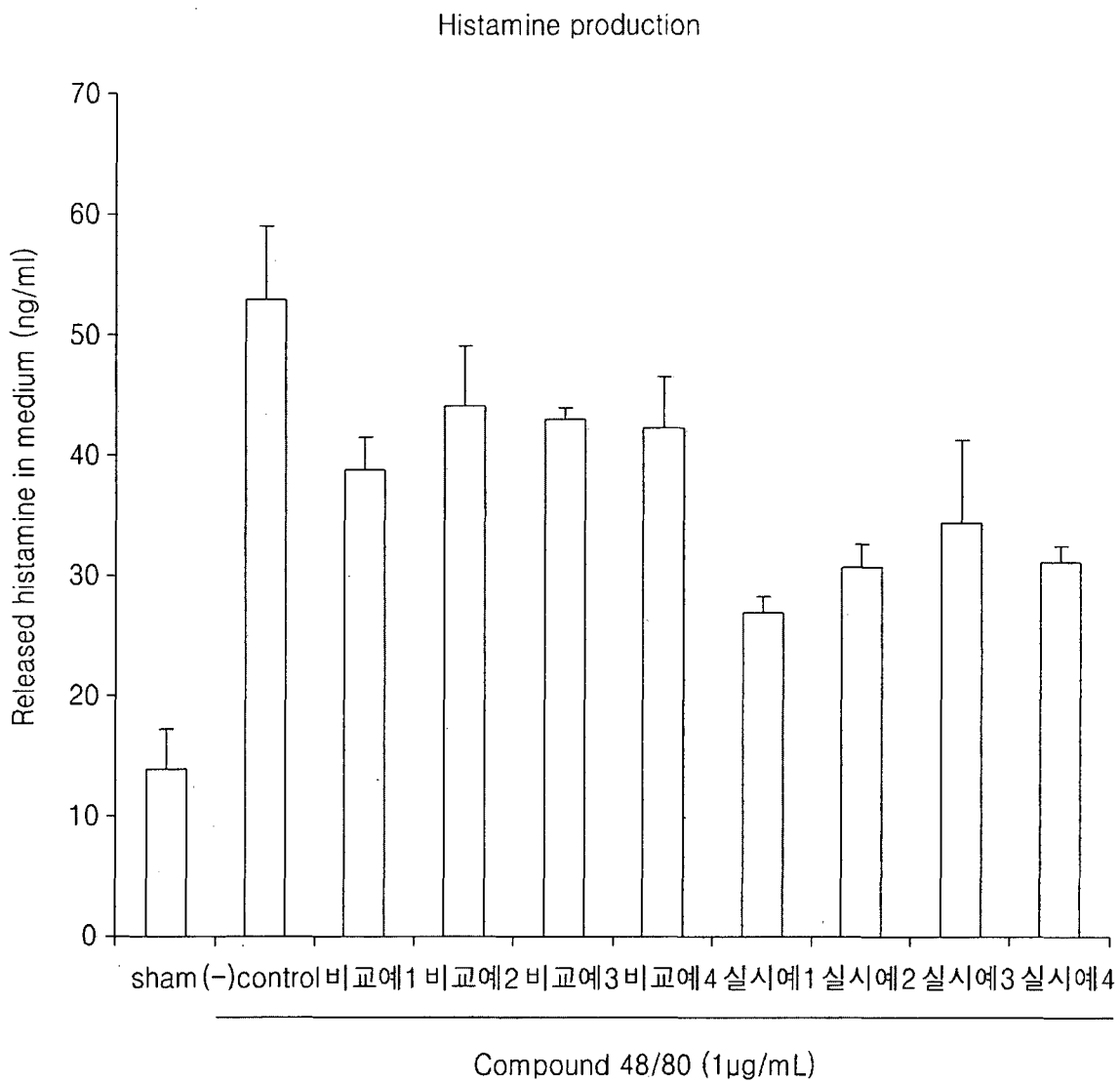
【Fig. 1】



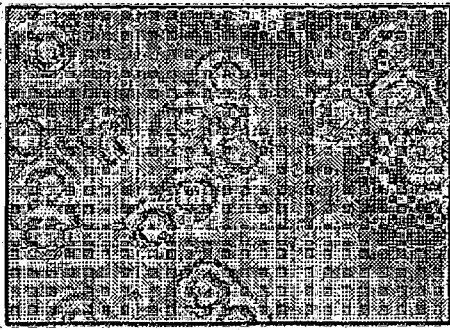
【Fig. 2】



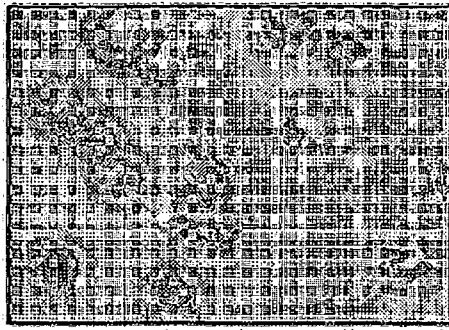
【Fig. 3】



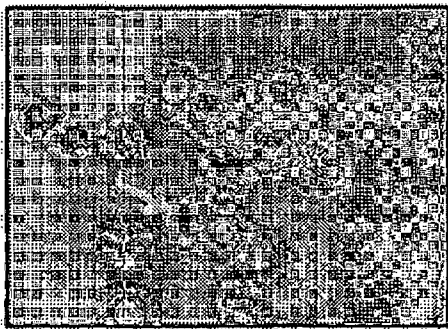
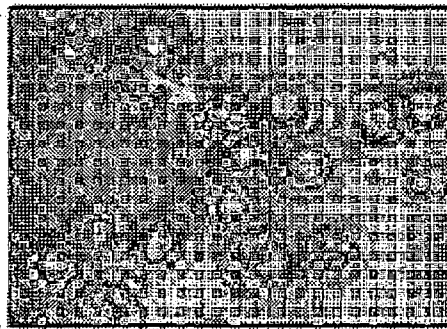
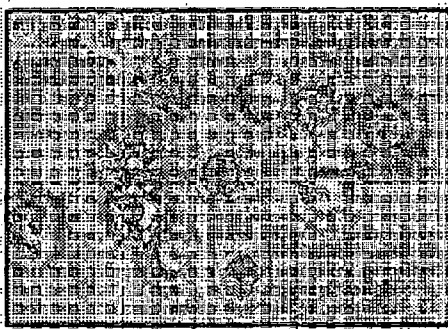
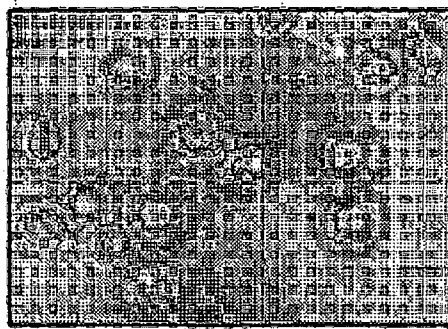
[Fig. 4]



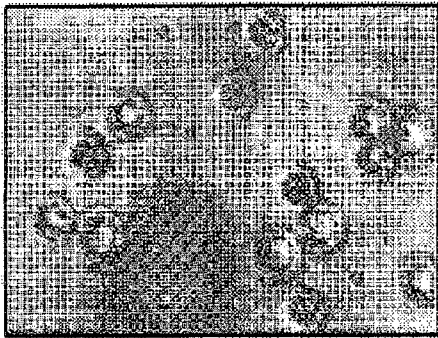
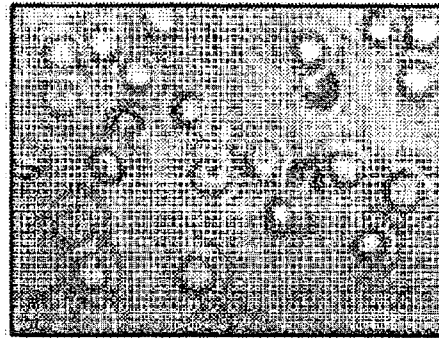
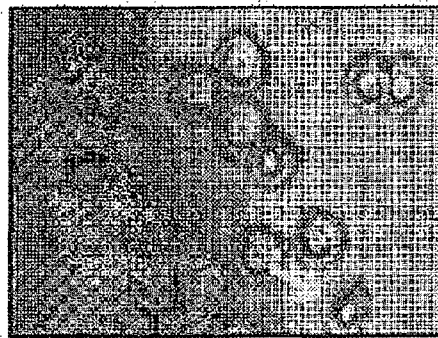
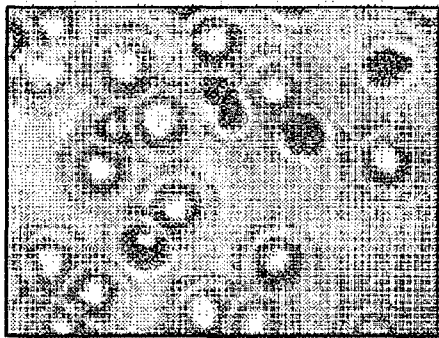
Sham



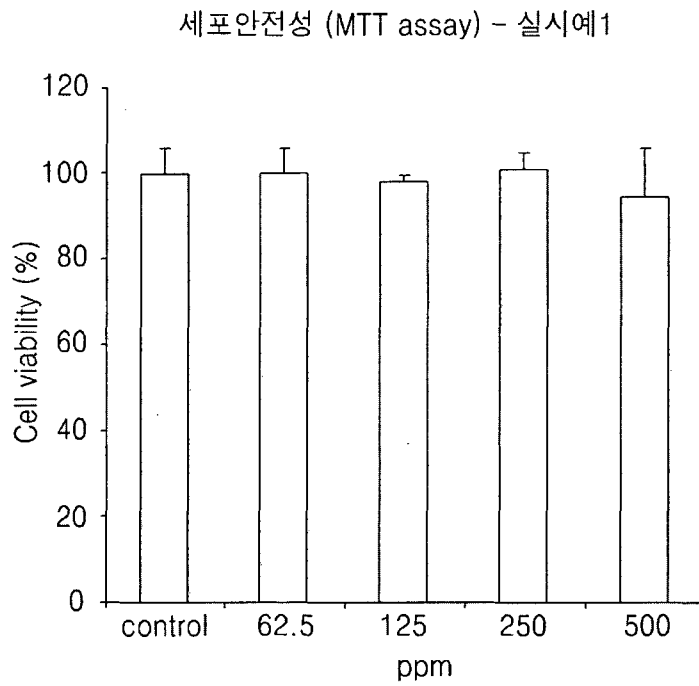
Compound 48/80 (1 µg/mL) only

Compound 48/80 (1 µg/mL) +
비교예1Compound 48/80 (1 µg/mL) +
비교예2Compound 48/80 (1 µg/mL) +
비교예3Compound 48/80 (1 µg/mL) +
비교예4

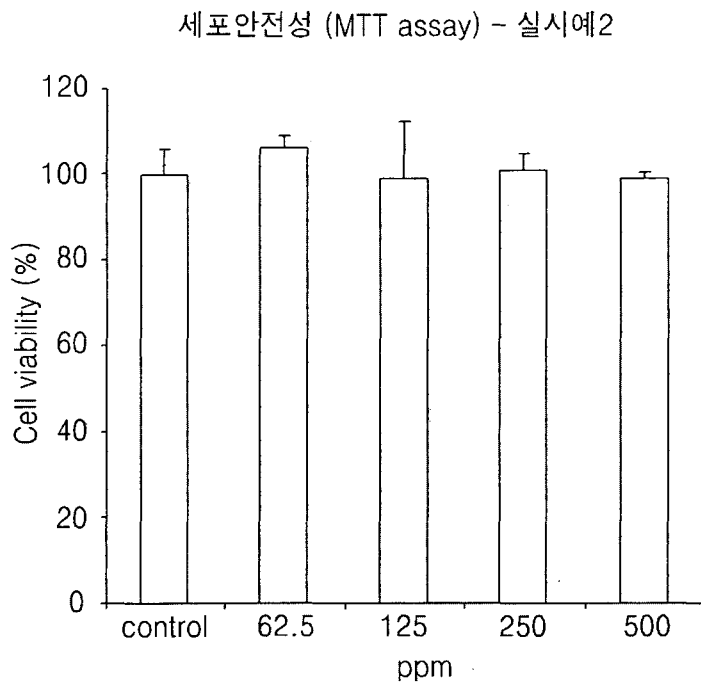
【Fig. 5】

Compound 48/80 (1 µg/mL) +
실험예1Compound 48/80 (1 µg/mL) +
실험예2Compound 48/80 (1 µg/mL) +
실험예3Compound 48/80 (1 µg/mL) +
실험예4

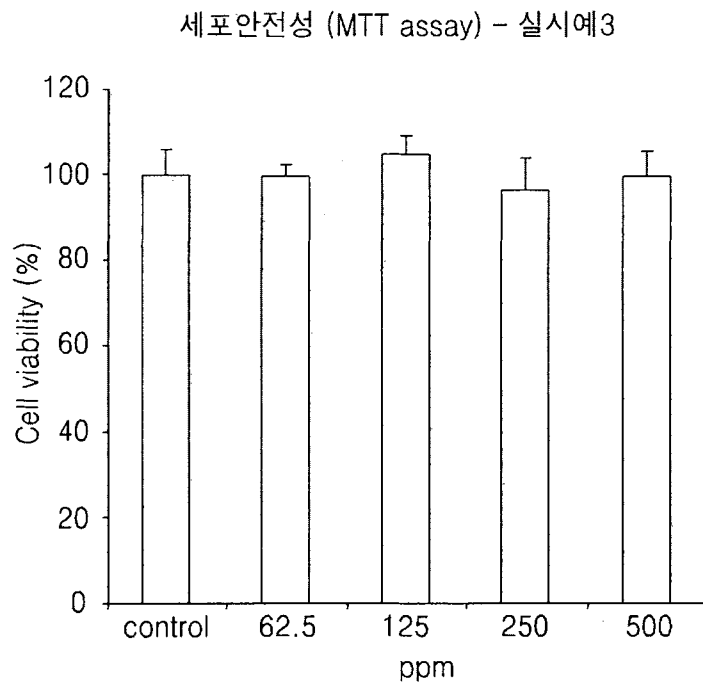
【Fig. 6】



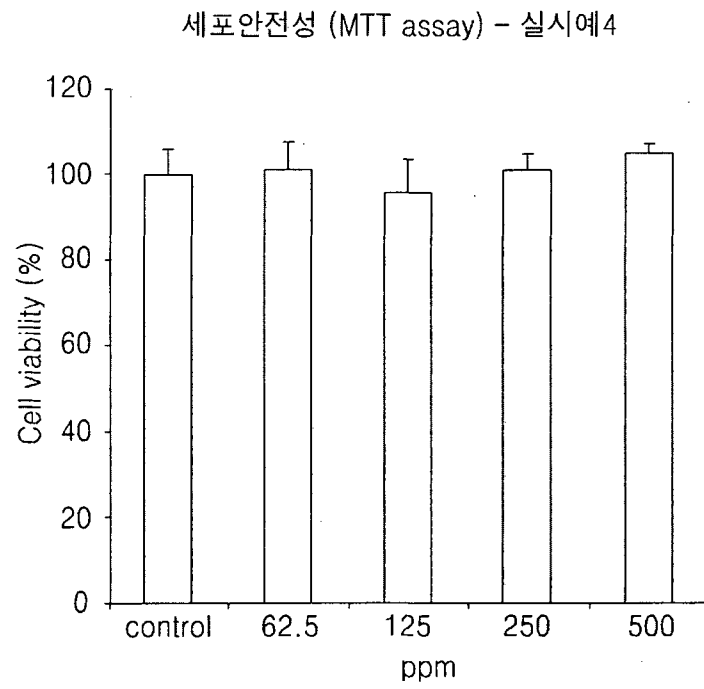
【Fig. 7】



【Fig. 8】



【Fig. 9】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/000594**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 36/30(2006.01)i, A61K 36/48(2006.01)i, A61K 36/185(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61K 8/92(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/30; A61K 8/92; A61K 8/99; C12P 7/02; C12P 7/20; A61K 8/60; A61K 8/99; A61K 36/48; A61K 36/185; A61K 8/97; A61P 17/00; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: vegetable oil, borage oil, moringa oil, camellia japonica oil, rhizopus, microorganism, skin problem, atopy.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0023162 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY et al.) 07 March 2013 See abstract, claim 1, pages 7-10.	1-15
A	WO 2007-075079 A1 (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA et al.) 05 July 2007 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2008-0072743 A (TOYOBO CO., LTD. et al.) 06 August 2008 See the entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 MAY 2015 (22.05.2015)

Date of mailing of the international search report

22 MAY 2015 (22.05.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/000594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0023162 A	07/03/2013	EP 2749651 A2	02/07/2014
		JP 2014-525245 A	29/09/2014
		US 2014-0194513 A1	10/07/2014
		WO 2013-032189 A2	07/03/2013
		WO 2013-032189 A3	13/06/2013
WO 2007-075079 A1	05/07/2007	AT 443773 T	15/10/2009
		DE 602006009367 D1	05/11/2009
		DE 602006019912 D1	10/03/2011
		EP 1803819 A2	04/07/2007
		EP 1803819 A3	11/07/2007
		EP 1803819 B1	23/09/2009
		EP 1966387 A1	10/09/2008
		EP 1966387 A4	11/11/2009
		EP 1966387 B1	26/01/2011
		ES 2333461 T3	22/02/2010
		ES 2357690 T3	28/04/2011
		HK 1124366 A1	03/02/2012
		JP 2007-175049 A	12/07/2007
		JP 2009-521920 A	11/06/2009
		MY 142033 A	16/08/2010
		US 07943335 B2	17/05/2011
		US 2007-0148745 A1	28/06/2007
		US 2008-0312342 A1	18/12/2008
		WO 2007-075079 A8	03/04/2008
KR 10-2008-0072743 A	06/08/2008	CN 101316574 A	03/12/2008
		CN 102973418 A	20/03/2013
		EP 1964546 A1	03/09/2008
		JP 4926056 B2	09/05/2012
		US 2010-0004472 A1	07/01/2010
		US 2011-0257116 A1	20/10/2011
		WO 2007-060956 A1	31/05/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/30(2006.01)i, A61K 36/48(2006.01)i, A61K 36/185(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61K 8/92(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i														
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/30; A61K 8/92; A61K 8/99; C12P 7/02; C12P 7/20; A61K 8/60; A61K 8/99; A61K 36/48; A61K 36/185; A61K 8/97; A61P 17/00; A61Q 19/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 식물성오일, 보라지오일, 모링가오일, 동백오일, 리조푸스, 미생물, 피부 질환, 아토피.														
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2013-0023162 A (한국생명공학연구원 외 1명) 2013.03.07 요약, 청구항 1, 페이지 7-10 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2007-075079 A1 (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA 외 1명) 2007.07.05 문헌 전체 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2008-0072743 A (토요 보세키 가부시기가이샤 외 1명) 2008.08.06 문헌 전체 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	KR 10-2013-0023162 A (한국생명공학연구원 외 1명) 2013.03.07 요약, 청구항 1, 페이지 7-10 참조.	1-15	A	WO 2007-075079 A1 (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA 외 1명) 2007.07.05 문헌 전체 참조.	1-15	A	KR 10-2008-0072743 A (토요 보세키 가부시기가이샤 외 1명) 2008.08.06 문헌 전체 참조.	1-15
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항												
X	KR 10-2013-0023162 A (한국생명공학연구원 외 1명) 2013.03.07 요약, 청구항 1, 페이지 7-10 참조.	1-15												
A	WO 2007-075079 A1 (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA 외 1명) 2007.07.05 문헌 전체 참조.	1-15												
A	KR 10-2008-0072743 A (토요 보세키 가부시기가이샤 외 1명) 2008.08.06 문헌 전체 참조.	1-15												
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.														
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌														
국제조사의 실제 완료일 2015년 05월 22일 (22.05.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 05월 22일 (22.05.2015)												
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 7140		심사관 고일영 전화번호 +82-42-481-8286 												

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0023162 A	2013/03/07	EP 2749651 A2 JP 2014-525245 A US 2014-0194513 A1 WO 2013-032189 A2 WO 2013-032189 A3	2014/07/02 2014/09/29 2014/07/10 2013/03/07 2013/06/13
WO 2007-075079 A1	2007/07/05	AT 443773 T DE 602006009367 D1 DE 602006019912 D1 EP 1803819 A2 EP 1803819 A3 EP 1803819 B1 EP 1966387 A1 EP 1966387 A4 EP 1966387 B1 ES 2333461 T3 ES 2357690 T3 HK 1124366 A1 JP 2007-175049 A JP 2009-521920 A MY 142033 A US 07943335 B2 US 2007-0148745 A1 US 2008-0312342 A1 WO 2007-075079 A8	2009/10/15 2009/11/05 2011/03/10 2007/07/04 2007/07/11 2009/09/23 2008/09/10 2009/11/11 2011/01/26 2010/02/22 2011/04/28 2012/02/03 2007/07/12 2009/06/11 2010/08/16 2011/05/17 2007/06/28 2008/12/18 2008/04/03
KR 10-2008-0072743 A	2008/08/06	CN 101316574 A CN 102973418 A EP 1964546 A1 JP 4926056 B2 US 2010-0004472 A1 US 2011-0257116 A1 WO 2007-060956 A1	2008/12/03 2013/03/20 2008/09/03 2012/05/09 2010/01/07 2011/10/20 2007/05/31