



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월26일

(11) 등록번호 10-2709570

(24) 등록일자 2024년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/99 (2017.01) *A61K 8/9789* (2017.01)
A61Q 19/02 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 8/99 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2022-0126389
- (22) 출원일자 2022년10월04일
 심사청구일자 2022년10월04일
- (65) 공개번호 10-2024-0047133
- (43) 공개일자 2024년04월12일
- (56) 선행기술조사문헌
 KR101991830 B1
 KR101405429 B1

- (73) 특허권자
 (주)정코스메틱
 충청남도 아산시 신창면 행목로 11-19, 1동
- (72) 발명자
 배세철
 충청남도 아산시 온양역길 18(온천동, 빌앤드림A)
- (74) 대리인
 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 윤경원

(54) 발명의 명칭 온천수를 이용하여 배양된 프로바이오틱스 및 식물 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 온천수를 포함하는 배지에서 배양된 락토바실러스(Lactobacillus) 속 균주를 포함하는 배양물; 도고온천수를 포함하는 배지에서 배양된 비피도박테리움(Bifidobacterium) 속 균주를 포함하는 배양물; 및 개비름(Amaranthus lividus) 잎 추출물, 바랭이(Digitalia ciliaris) 줄기 추출물 및 마디풀(Polygonum aviculare L.) 추출물을 포함하는 식물 복합 추출물;을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 화장료 조성물은 MMP-1 단백질의 생성을 억제하고 콜라겐 생성을 촉진하며, 티로시나제 억제와 멜라닌 생성 억제능이 있어 피부 미백, 주름생성 억제 및 주름 개선 효과가 우수하다.

(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2800/591 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

온천수를 포함하는 배지에서 배양된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 포함하는 배양물;
 온천수를 포함하는 배지에서 배양된 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주를 포함하는 배양물; 및
 개비름(*Amaranthus lividus*) 잎 추출물, 바랭이(*Digitaria ciliaris*) 줄기 추출물 및 마디풀(*Polygonum aviculare L.*) 추출물을 포함하는 식물 복합 추출물;을 유효성분으로 포함하고,
 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)이고,
 상기 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
 상기 식물 복합 추출물은 까마중(*Solanum nigrum*) 잎 추출물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,
 상기 식물 복합 추출물은 물, 탄소수 1-4의 알코올, 또는 이들의 혼합용매에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,
 상기 온천수를 포함하는 배지는 온천수를 10 내지 40 %(v/v) 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,
 상기 화장료 조성물에서 상기 식물 복합 추출물은 50 내지 70%(v/v) 포함된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,
 상기 화장료 조성물에서 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 포함하는 배양물과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주를 포함하는 배양물은 10:5 내지 10:15의 부피비로 포함되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 피부 미백, 주름생성 억제 또는 주름 개선용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 온천수를 이용하여 배양된 프로바이오틱스 및 식물 복합 추출물을 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 신체 중 가장 큰 기관으로 항상 외부환경과 직접 접하고 있으면서 여러가지 자극이나 건조한 환경으로부터 생체를 보호하는 보호막의 역할을 하고 있으며, 다른 기관에 비하여 새로운 세포의 생성과 소멸이 활발히 일어난다. 또한, 물리적인 찰과상으로부터 생체를 보호하고, 신체 내부의 수분 손실을 막아주며 태양에서 발생하는 자외선으로부터 보호해줄 뿐만 아니라, 몸의 체온을 조절해주는 매우 중요한 역할을 담당하고 있다.

[0003] 이러한 피부는 여러 가지 물리적 요인, 외부환경적 요인, 감염 등으로 인해 피부의 오염과 건조, 트러블, 피부 면역체계 이상 등의 문제가 발생한다. 특히, 현대의 급격한 산업발전에 따라, 대기공해, 수질공해 등의 공해문제가 심각해지고, 주거환경의 개선에 따른 거주공간의 강한 냉난방에 의해 피부의 거칠어짐, 건조, 노화 등과 같이 피부가 외부환경으로부터 큰 영향을 받고 있다. 인간의 피부는 내인성 노화(intrinsic aging)와 광노화에 의해 점차 피부가 얇아지고 주름이 증가하며, 탄력이 감소될 뿐만 아니라 자외선 노출에 의해 기미와 주근깨가 증가하게 된다. 특히, 내인성 노화는 호르몬 분비가 감소하거나 면역세포의 기능과 활성이 저하됨에 따라 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들면서 발생하는데 이는 활성산소 증가에 따라 급속히 진행된다.

[0004] 인간은 대사과정에서 끊임없이 활성산소종(Reactive Oxygen Species)을 발생시키며 이는 직·간접적인 노화의 원인물질로 작용한다고 알려져 있다. 피부노화를 방지하기 위해 화장품에는 다양한 항산화제가 사용되고 있는데 대표적인 합성 항산화제로 BHT(butylatedhydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole)와 tertiary butylhydroquinone(TBHQ) 등이 있다. 일반적으로 합성 항산화제는 우수한 효과와 낮은 가격으로 인해 폭넓게 사용되고 있지만 경구 또는 피부접촉 시 자체 독성뿐만 아니라 간비대증, 지방변이 및 암을 유발하는 것으로 알려져 사용이 제한받고 있다.

[0005] 미백 기능성 화장품 원료로 이용되는 나이아신아마이드와 알부틴, 그리고 주름 개선 기능성 화장품 원료로 사용되는 레티놀 등은 산화에 의한 성분파괴와 피부 자극 유발로 인한 배합량 제한에 따라 미백 효과가 저하되는 문제가 있다. 최근에는 천연물질을 이용한 다양한 화장료 조성물이 시장에 나오면서 기존에 화학물질로 이루어진 제품들 보다는 천연물질을 이용한 제품에 소비자들이 관심을 가지게 되고, 이에 따라 다양한 천연물질을 이용한 화장료 조성물이 제조되고 있다.

[0006] 또한, 화장품에 의한 주름개선 효과는 보습인자들에 의한 보습에 의한 일시적 효과 이외에도 다양한 유효성분들에 의한 진피층 개선 효과를 그 기전으로 하며, 대표적인 주름개선 화장품의 원료들인 레티놀, 비타민C, EGF 등의 성장인자 성분들은 인간 진피 섬유아세포로부터 콜라겐 신생성을 증가시킴으로써 주름 개선 효능을 보이는 것으로 잘 알려져 있다. 이러한 현상을 방지하고 보다 건강하고 아름다운 피부를 유지하기 위해서, 기존에 알려진 각종 동물, 식물, 미생물 등으로부터 얻은 생리 활성 물질들을 화장품에 부가하여 사용함으로써 피부의 고유 기능을 유지시키고 피부세포를 활성화시켜 피부노화를 효과적으로 억제시키기 위한 노력이 있어왔다.

[0007] 화장품 분야에서는 미백, 주름 개선효과를 갖는 기능성 화장품에 대한 연구 및 개발이 활발하게 진행되고 있으며, 특히 피부에 독성이나 자극을 주지 않기 위하여 천연 물질을 이용한 연구가 계속되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1991830호
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1405429호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 온천수를 이용하여 배양된 프로바이오틱스 배양물과 통상적으로 잡초로 간주되는 식물 성분을 이용하여 피부 미백, 주름생성 억제 또는 주름 개선 효과가 있는 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 하나의 측면에 따르면,
- [0011] 온천수를 포함하는 배지에서 배양된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 포함하는 배양물; 온천수를 포함하는 배지에서 배양된 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주를 포함하는 배양물; 및 개비름(*Amaranthus lividus*) 잎 추출물, 바랭이(*Digitaria ciliaris*) 줄기 추출물 및 마디풀(*Polygonum aviculare L.*) 추출물을 포함하는 식물 복합 추출물;을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물이 제공된다.
- [0012] 상기 식물 복합 추출물은 까마중(*Solanum nigrum*) 잎 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0013] 상기 식물 복합 추출물 추출물은 물, 탄소수 1-4의 알코올, 또는 이들의 혼합용매에 의해 추출될 수 있다.
- [0014] 상기 온천수를 포함하는 배지는 온천수를 10 내지 40 %(v/v) 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 화장품 조성물에서 상기 식물 복합 추출물은 50 내지 70%(v/v) 포함될 수 있다.
- [0016] 상기 화장품 조성물에서 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 포함하는 배양물과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주를 포함하는 배양물은 10:5 내지 10:15의 부피비로 포함될 수 있다.
- [0018] 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 하비넨시스(*Lactobacillus harbinensis*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0019] 상기 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 비피도박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*), 및 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0020] 상기 화장품 조성물은 피부 미백, 주름생성 억제 또는 주름 개선용일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 온천수를 이용하여 배양된 프로바이오틱스 및 식물 복합 추출물을 포함하는 화장품 조성물은 MMP-1 단백질의 생성을 억제하고 콜라겐 생성을 촉진하며, 티로시나제 억제와 멜라닌 생성 억제능이 있어 피부 미백 및 주름 개선 효과가 우수하다. 또한, 식물 복합 추출물의 원료로서 잡초로 인식되는 개비름, 바랭이, 마디풀, 까마중을 사용함으로써 원료의 수급이 용이하고 비용이 절감되며 버려지는 잡초의 유용한 기능성 성분을 활용할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0024] 이하, 본 발명의 온천수를 이용하여 배양된 프로바이오틱스 및 식물 복합 추출물을 포함하는 화장품 조성물에 대해 설명하도록 한다.
- [0025] 본 발명의 화장품 조성물은 온천수를 포함하는 배지에서 배양된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 포함하

는 배양물; 및 온천수를 포함하는 배지에서 배양된 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주를 포함하는 배양물; 개비름(*Amaranthus lividus*) 잎 추출물, 바랭이(*Digitaria ciliaris*) 줄기 추출물 및 마디풀(*Polygonum aviculare*) 추출물을 포함하는 식물 복합 추출물;을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0026] 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 포함하는 배양물 및 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주를 포함하는 배양물은 배양된 균주를 제거하지 않고 과쇄된 상태로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 식물 복합 추출물은 까마중(*Solanum nigrum*) 잎 추출물을 추가로 포함할 수 있다. 까마중 잎 추출물을 포함함으로써 미백 기능성, 주름개선 효과를 더욱 향상시킬 수 있다.
- [0028] 상기 식물 복합 추출물은 물, 탄소수 1-4의 알코올, 또는 이들의 혼합용매에 의해 추출된 것일 수 있고, 바람직하게는 열수추출물 일 수 있다.
- [0029] 개비름(*Amaranthus lividus*)은 개비름은 비름과의 한해살이풀이다. 유럽 원산으로 알려져 있으며, 줄기는 약하고 높이는 25~80cm 가량이다. 기부가 땅을 기거나 비스듬히 서고, 가지가 많이 갈라진다. 잎은 마름꼬풀의 달걀 모양으로 어긋나 있고, 끝이 오목하게 들어가는 형태이며 길이는 4~8cm, 너비는 2~4cm 가량으로 잎자루가 길다. 7~11월이 되면 녹색의 작은 꽃이 잎겨드랑이나 가지 끝에서 작은 이삭꽃차례를 이루면서 달린다. 3개씩의 꽃덮이 조각·수술을 가지고 있고, 암술은 1개이며 열매는 달걀 모양으로 주름이 조금 있으며 터지지 않는다. 씨는 지름이 약 1mm이고 짙은 갈색이다. 논, 밭이나 길가에서 흔히 볼 수 있는 잡초이다.
- [0030] 바랭이(*Digitaria ciliaris*)는 벼과의 한해살이풀로서 전 세계에 널리 퍼진 잡초이다. 밭, 밭둑, 길옆 등에서 흔히 자라고, 땅 위를 기면서 줄기 밑 부분의 마디에서 새 뿌리가 나와 아주 빠르게 퍼져 나간다. 줄기의 윗부분은 곧게 서는데 키는 30~70cm 정도이다. 줄기 아래에 나는 잎은 길이 8~20cm, 너비 5~15mm 정도이며 털이 있다. 꽃차례의 길이는 4~8mm 정도로 아주 가늘고 곧은데 줄기에서 3~8개의 가지로 갈라진다. 꽃차례는 불그스레하거나 자줏빛을 띤다.
- [0031] 마디풀(*Polygonum aviculare*)은 마디풀은 북반구 온대·아열대에 분포하는 한해살이풀이다. 전체에 털이 없고, 줄기는 갈라져 위로 뻗고, 세로줄이 많고 마디는 부풀어 있으며 높이 10~40 cm 정도이다. 잎은 짧은 자루가 있고 어긋나며 긴 타원형으로 길이 2~4 cm, 털이 없고 뒷면은 가운데맥이 도드라진다. 잎집은 막질이며 불규칙적으로 가늘게 찢어지고, 가는 맥이 있다. 7~9월에 잎겨드랑이에 녹색의 작은 꽃에 다발로 핀다. 꽃덮이 조각은 5장이며 가장자리는 흰색 또는 분홍빛을 띠고, 열매는 수과로 가는 주름이 있고 꽃덮이 조각으로 싸여 있다.
- [0032] 까마중(*Solanum nigrum*)은 가지과의 한해살이풀로, 한국 및 온대·열대 지역에 걸쳐 널리 분포한다. 높이는 20~90 cm 이고, 가지가 옆으로 많이 퍼지며 원줄기에는 약간의 능선이 나타난다. 잎은 어긋나고 달걀꼴이며 가장자리는 밧밧하거나 물결모양의 톱니가 있다. 꽃은 5~7월에 피며 회고 지름이 6~7 밀리미터이다. 꽃받침은 5갈래로 갈라지고, 꽃부리도 옆으로 퍼지며 5갈래로 갈라지고, 1개의 암술과 5개의 수술이 있다. 열매는 장과로서 둥글며 검게 완전히 익으면 단맛이 있으나 약간 독성이 있는 솔라닌(*Solanine*)을 함유하므로 주의해야 한다.
- [0033] 상기 화장료 조성물에서 상기 식물 복합 추출물은 50 내지 70%(v/v) 포함된 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 55 내지 65%(v/v) 포함된 것이 바람직하다. 상기 범위를 벗어나는 경우 피부 미백, 주름 개선 효과가 저하될 수 있다.
- [0034] 상기 화장료 조성물에서 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 포함하는 배양물과 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주를 포함하는 배양물은 10:5 내지 10:15의 부피비인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 10:7 내지 10:13의 부피비일 수 있고, 더욱 더 바람직하게는 10:9 내지 10:11의 부피비일 수 있으며, 가장 바람직하게는 1:1의 부피비일 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우 피부 미백, 주름 개선 효과가 저하될 수 있다.
- [0035] 상기 온천수를 포함하는 배지는 상기 온천수를 10 내지 40 %(v/v) 포함하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 25 내지 35 %(v/v) 포함시킬 수 있다. 10 %(v/v) 미만인 경우에는 주름 개선 또는 미백 효과가 저하될 수 있고, 40 %(v/v)을 초과하는 경우에는 프로바이오틱스의 배양이 어려울 수 있다.
- [0036] 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 하비넨시스(*Lactobacillus harbinensis*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 페멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)

중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 일 수 있다.

- [0037] 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 인체에 유용한 대사산물을 만들어내고 식품 원료로도 사용될 정도로 안전한 균이다. 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 배양 추출물은 상기 락토바실러스 플란타룸을 배양하여 호모게나이저로 세포를 파쇄하여 얻은 것으로서, 락토바실러스 플란타룸의 대사성분, 세포질, 세포벽 성분, 다당체 등이 함유되어 있는 발효 용해물이다.
- [0038] 또한, 상기 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속 균주는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 비피도박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*), 및 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*) 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 일 수 있다.
- [0039] 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)은 인간의 위장관에 존재하는 그람 양성 유산균으로 인체에서 분리되어 안정성이 입증되었으며, 장 환경을 개선하는 유익균으로도 알려져 있다.
- [0040] 상기 온천수는 칼슘(Ca) 55 내지 65 mg/L, 나트륨(Na) 25 내지 35 mg/L, 실리콘(Si) 10 내지 20 mg/L, 리튬(Li) 0.001 내지 0.05 mg/L 및 스트론튬(Sr) 1.0 내지 2.0 mg/L를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0041] 본 발명의 화장료 조성물은 피부 미백, 피부주름 억제 또는 주름 개선용인 것을 특징으로 한다.
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 “추출물”은 추출용매를 처리하여 얻은 조추출물뿐만 아니라 추출물의 가공물도 포함한다. 예를 들어, 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명의 식물 복합 추출물은 광의로는 제형화된 가공물, 예컨대, 식물 복합 추출물 분말도 포함하는 의미를 갖는다. 비록 본 발명에서 식물 복합 추출물로 실험을 진행하긴 하였으나, 식물 복합 추출물 가공물과 같은 형태로도 목적하는 효과를 달성할 수 있음은 당업자라면 예상 가능할 것이다.
- [0044] 한편, 본 명세서에서 용어 “유효성분으로 포함하는”이란 프로바이오틱스 배양물을 포함하는 성분의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 일례로, 상기 프로바이오틱스 배양물을 포함하는 10 내지 1500 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 100 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 사용된다. 프로바이오틱스 배양물은 천연물로서 과량 피부에 적용하여도 인체에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 프로바이오틱스 배양물의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 사용된 용어인 "피부 미백"이란, 피부를 희게 하는 것으로서, 사람의 피부색은 피부 내부의 멜라닌(melanin) 농도와 분포에 따라 결정되는데, 유전적인 요인 외에도, 태양 자외선이나 피로, 스트레스 등의 환경적 또는 생리적 조건에 의해서도 영향을 받는다. 멜라닌은 피부 표피층에 있는 멜라노사이트에서 합성되는데, 멜라노사이트 내 소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 아미노산의 일종인 티로신(tyrosine)에 티로시나제(tyrosinase)라는 효소가 작용하여 도파(DOPA), 도파퀴논(dopaquinone)으로 바뀐 후 비효소적인 산화반응을 거쳐 만들어진다. 이와 같은 멜라닌의 합성이 피부 내에서 과도하게 일어나면, 피부 톤을 어둡게 하고, 기미, 주근깨 등을 발생시킨다. 따라서, 피부 내의 티로시나제 활성을 저해하여 멜라닌 색소의 합성을 저해시키면, 피부 톤을 밝게 하여 피부 미백을 실현할 수 있을 뿐만 아니라 자외선, 호르몬 및 유전적인 원인에 기인하여 발생하는 기미, 주근깨 등의 피부 과색소 침착증을 개선시킬 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명에서 용어, "주름"이란, 피부가 쇠하여 생긴 잔줄을 의미하는데, 유전자에 의한 원인, 피부 진피에 존재하는 콜라겐의 감소, 외부 환경 등에 의해 유발될 수 있다. 본 발명에서 "주름 개선"이란, 피부에 주름이 생성되는 것을 억제 또는 저해하거나, 이미 생성된 주름을 완화시키는 것을 말한다.
- [0047] 피부 섬유아세포의 주된 기능으로 세포외기질 합성과 증식을 통한 손상된 피부 조직 재생 등을 들 수 있는데, 광노화와 같은 외인성 노화 요인 또는 유리 산소에 의한 손상 누적, 텔로미어 단절로 인한 세포 노화 등에 따른 내인성 노화 요인들은 진피층 내에 있는 피부섬유아세포의 생리 활성 기능을 저하시키게 된다. 피부 세포외기질 중 95% 이상을 차지하고, 세포의 부착분자(adhesion molecule) 및 세포 골격(cytoskeleton) 등과의 상호 작용과 신호 교류를 통해 섬유아세포의 생리 활성에 매우 주요한 부분을 담당하는 제I형 콜라겐의 합성이 저하될 경우, 피부 조직 내 콜라겐 양이 감소되고, 이에 따라 표면 장력이 감소되어 피부 탄력이 저하되고 피부 주름이 형성될 뿐만 아니라, 세포의 증식 및 재생 기능을 포함하는 생리 활성 기능이 감소하는 악순환의 원인이 된다.
- [0048] 따라서, 피부섬유아세포의 콜라겐은 피부 재생, 피부 탄력, 피부 주름 형성 및 피부 손상 시 조직의 수복 또는

재생과 직접적인 관련이 있다고 볼 수 있다. 즉, 피부 섬유아세포의 콜라겐 또는 프로콜라겐의 합성이 촉진되거나, 콜라겐을 분해하는 기질 단백질 분해효소(matrix metallo-proteinase, 이하 'MMP'라 함)의 합성이 저해되면, 피부 탄력 개선, 피부 재생, 피부 주름 개선, 상처 치유, 손상된 피부 조직의 수복 및 재생; 및 피부 노화 방지 등의 효과를 얻을 수 있다.

- [0049] 본 발명의 화장료 조성물은 타입 I 프로콜라겐 단백질의 발현을 증가시키고, MMP-1 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 본 발명의 상기 화장료 조성물은 콜라겐 분해를 촉진시키는 기질 단백질 분해 효소-1(matrix metallo-proteinase)의 발현을 억제시키면서, 타입 I 프로콜라겐의 생성을 증가시키는데, 피부 탄력 증가, 피부 재생, 피부 주름 개선, 상처 치유, 손상된 피부 조직의 수복 및 재생; 및 피부 노화 방지 등의 효과 등을 가질 수 있다. 즉, 피부주름의 예방 또는 개선의 효과를 가질 수 있다.
- [0050] 이외에도 본 발명의 화장료 조성물은 수용성 비타민, 지용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스 등을 더 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 수용성 비타민으로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 엽산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민 C, 비타민 H 등을 들 수 있으며, 그들의 염(티아민염, 아스코르빈산나트륨염 등)이나 유도체(아스코르빈산-2-인산나트륨염, 아스코르빈산-2-인산마그네슘염 등)도 본 발명에서 사용할 수 있는 수용성 비타민에 포함된다. 상기 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물 배양물의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 수득할 수 있다.
- [0052] 상기 지용성 비타민으로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체(팔미틴산아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산dl-알파 토코페롤, 니코틴산dl-알파 토코페롤비타민 E, DL-판토텐일알코올, D-판토텐일알코올, 판토텐일에틸에테르 등) 등도 본 발명에서 사용되는 지용성 비타민에 포함된다.
- [0053] 상기 고분자 펩티드로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 콜라겐, 가수 분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수 분해 엘라스틴, 케라틴 등을 들 수 있다. 상기 고분자 펩티드는 미생물 배양액의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 정제 취득할 수 있으며, 또는 통상 돼지나 소 등의 진피, 누에의 견 섬유 등의 천연물로부터 정제하여 사용할 수 있다.
- [0054] 상기 고분자 다당에는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 히드록시에틸셀룰로오스, 크산탄검, 콘드로이틴 황산 또는 그 염(나트륨염 등) 등을 들 수 있다. 예를 들어, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 등은 통상 포유동물이나 어류로부터 정제하여 사용할 수 있다.
- [0055] 상기 스펅고 지질로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 세라미드, 피토스핑고신, 스펅고당 지질 등을 들 수 있다. 상기 스펅고 지질은 통상 포유류, 어류, 패류, 효모 또는 식물 등으로부터 통상의 방법에 의해 정제하거나 화학 합성법에 의해 취득할 수 있다.
- [0056] 상기 해초 엑기스로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 갈조 엑기스, 홍조엑기스, 녹조 엑기스 등을 들 수 있으며, 또한, 이들의 해초 엑기스로부터 정제된 칼라기난, 아르긴산, 아르긴산나트륨, 아르긴산칼륨 등도 본 발명에서 사용되는 해초 엑기스에 포함된다. 해초 엑기스는 해초로부터 통상의 방법에 의해 정제하여 취득할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 화장료 조성물에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합할 수 있다.
- [0058] 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 자외선 흡수제, pH 조정제, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0059] 상기 유지 성분으로는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.
- [0060] 상기 에스테르계 유지로는 트리2-에틸헥산산글리세릴, 2-에틸헥산산세틸, 미리스틴산이소프로필, 미리스틴산부틸, 팔미틴산이소프로필, 스테아르산에틸, 팔미틴산옥틸, 이소스테아르산이소세틸, 스테아르산부틸, 리놀레산에틸, 리놀레산이소프로필, 올레인산에틸, 미리스틴산이소세틸, 미리스틴산이소스테아릴, 팔미틴산이소스테아릴, 미리스틴산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 세바신산디에틸, 아디핀산디이소프로필, 네오펜탄산이소알킬, 트리(카프릴, 카프린산)글리세릴, 트리2-에틸헥산산트리메틸올프로판, 트라이소스테아르산트리메틸올프로판, 테

트라2-에틸헥산산펜타엘리글리콜, 카프릴산세틸, 라우린산데실, 라우린산헥실, 미리스틴산데실, 미리스틴산미리스틸, 미리스틴산세틸, 스테아르산스테아릴, 올레인산데실, 리시노올레인산세틸, 라우린산이소스테아릴, 미리스틴산이소트리데실, 팔미틴산이소세틸, 스테아르산옥틸, 스테아르산이소세틸, 올레인산이소데실, 올레인산옥틸도데실, 리놀레산옥틸도데실, 이소스테아르산이소프로필, 2-에틸헥산산세토스테아릴, 2-에틸헥산산스테아릴, 이소스테아르산헥실, 디옥탄산에틸렌글리콜, 디올레인산에틸렌글리콜, 디카프린산프로필렌글리콜, 디카프릴산프로필렌글리콜, 디카프린산네오펜틸글리콜, 디옥탄산네오펜틸글리콜, 트리카프릴산글리세릴, 트리운데실산글리세릴, 트리아소팔미틴산글리세릴, 트리아소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오펜칸산헥실데실, 네오펜칸산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트리아소세틸, 시트르산트리아소알킬, 시트르산트리아소옥틸, 락트산라우릴, 락트산미리스틸, 락트산세틸, 락트산옥틸데실, 시트르산트리에틸, 시트르산아세틸트리에틸, 시트르산아세틸트리부틸, 시트르산트리아옥틸, 말산다이소스테아릴, 히드록시스테아르산 2-에틸헥실, 숙신산디2-에틸헥실, 아디핀산다이소부틸, 세바신산다이소프로필, 세바신산디옥틸, 스테아르산콜레스테릴, 이소스테아르산콜레스테릴, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 올레인산콜레스테릴, 올레인산디히드록콜레스테릴, 이소스테아르산피트스테릴, 올레인산피트스테릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소세틸, 12-스테알로일히드록시스테아르산스테아릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소스테아릴 등의 에스테르계 등을 들 수 있다.

- [0061] 상기 탄화 수소계 유지로는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동 이소파라핀, 폴리부텐, 마이크로 크리스탈린 왁스, 와셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.
- [0062] 상기 실리콘계 유지로는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산 메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산 메틸스테알록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리콘유, 아미노 변성 실리콘유 등을 들 수 있다.
- [0063] 상기 불소계 유지로는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.
- [0064] 상기 동물 또는 식물 유지로는 아보카도유, 아르몬드유, 올리브유, 참깨유, 쌀겨유, 대두유, 옥수수유, 유채유, 행인유, 팜핵유, 팜유, 피마자유, 해바라기유, 포도종자유, 면실유, 야자유, 쿠쿠이너트유, 소맥배아유, 쌀 배아유, 시아버터, 월견초유, 마커데미아너트유, 난황유, 우지, 마유, 밍크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔데리러왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.
- [0065] 상기 보습제로는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.
- [0066] 상기 수용성 저분자 보습제로는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피롤리돈-카르복실산나트륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜B(중합도 n = 2 이상), 폴리프로필렌글리콜(중합도 n = 2 이상), 폴리글리세린B(중합도 n = 2 이상), 락트산, 락트산염 등을 들 수 있다.
- [0067] 상기 지용성 저분자 보습제로는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.
- [0068] 상기 수용성 고분자로는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산탄검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성키틴, 키토산, 텍스트린 등을 들 수 있다.
- [0069] 상기 지용성 고분자로는 폴리비닐피롤리돈 에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈 헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 텍스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.
- [0070] 상기 에몰리엔트제로는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.
- [0071] 상기 자외선 흡수제로는 파라아미노벤조산, 파라아미노벤조산에틸, 파라아미노벤조산아밀, 파라아미노벤조산옥틸, 살리실산에틸렌글리콜, 살리신산페닐, 살리신산옥틸, 살리신산벤질, 살리신산부틸페닐, 살리신산호모멘틸, 계피산벤질, 파라메톡시계피산-2-에톡시에틸, 파라메톡시계피산옥틸, 디파라메톡시계피산모노-2-에틸헥산글리세릴, 파라메톡시계피산이소프로필, 디이소프로필·디이소프로필계피산에스테르 혼합물, 우로카닌산, 우로카닌산에틸, 히드록시메톡시벤조페논, 히드록시메톡시벤조페논술폰산 및 그 염, 디히드록시메톡시벤조페논, 디히드록시메톡시벤조페논디술폰산나트륨, 디히드록시벤조페논, 테트라히드록시벤조페논, 4-tert-부틸-4'-메톡시디벤조일메탄, 2,4,6-트리아닐리노-p-(카르보-2'-에틸헥실-1'-옥시)-1,3,5-트리아진, 2-(2-히드록시-5-메틸페닐)벤조트리아졸 등을 들 수 있다.

- [0072] 상기 pH 조정제로는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.
- [0073] 상기 pH 조정제로는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.
- [0074] 본 발명의 화장료 조성물을 함유하여 제조된 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.
- [0075] 또한, 본 발명의 상기 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 성분 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 안료 및 천연향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 화장료 조성물은 피부 미백 또는 주름개선 효과를 갖는 화장품 또는 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, BB크림, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 자외선 차단크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 마스크팩 등과 같은 화장품류와 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클렌저 등이 있다.
- [0078] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 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.
- [0080] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0081] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 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.
- [0083] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.
- [0085] **[실시예]**
- [0086] **제조예 A: 개비름 잎 추출물**
- [0087] 개비름(*Amaranthus lividus*)의 잎을 잘게 잘라 물과 1:10(w/v)의 비율로 100 °C에서 4시간 동안 열수추출한 후 부직포로 여과하여 불순물을 제거하고, 고형분 함량이 15% 이상이 되도록 감압 농축하여 개비름 추출물을 제조하였다.
- [0089] **제조예 B: 바랭이 줄기 추출물**
- [0090] 개비름 잎 대신에 바랭이(*Digitaria ciliaris*)의 가운데가 비어있는 줄기를 사용한 것을 제외하고는 제조예 A와 동일한 조건으로 추출하여 바랭이 줄기 추출물을 제조하였다.
- [0092] **제조예 C: 마디풀 잎 추출물**
- [0093] 개비름 잎 대신에 마디풀(*Polygonum aviculare*) 잎을 사용한 것을 제외하고는 제조예 A와 동일한 조건으로 추출하여 마디풀 잎 추출물을 제조하였다.
- [0095] **제조예 D: 까마중 잎 추출물**

- [0096] 개비름 잎 대신에 까마중(*Solanum nigrum*) 잎을 사용한 것을 제외하고는 제조예 A와 동일한 조건으로 추출하여 까마중 잎 추출물을 제조하였다.
- [0098] **제조예 1: 온천수를 이용한 락토바실러스 플란타룸 배양물**
- [0099] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주를 MRS Broth 액체배지 70ml, 도고 지역의 온천수 30ml로 혼합된 혼합배지에 락토바실러스 플란타룸 10^8 CFU/ml) 1ml를 접종하여, 37 °C에서 30시간 발효시킨 후 배양물을 호모게나이저로 균체를 파쇄하여 락토바실러스 플란타룸 배양물을 수득하였다.
- [0101] **제조예 2: 온천수를 이용한 비피도박테리움 롱검 배양물**
- [0102] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 대신에 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주를 사용한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 조건으로 배양하여 비피도박테리움 롱검 배양물을 수득하였다
- [0104] **비교제조예 1: 온천수를 이용한 락토바실러스 플란타룸 균체 제거 배양물**
- [0105] 발효 후 배양물을 호모게나이저로 처리하여 균체를 파쇄하는 대신에, 배양물을 원심분리하여 균체를 제거한 여액을 수득한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 락토바실러스 플란타룸 배양물을 제조하였다.
- [0107] **비교제조예 2: 온천수를 이용한 비피도박테리움 롱검 균체 제거 배양물**
- [0108] 발효 후 배양물을 호모게나이저로 처리하여 균체를 파쇄하는 대신에, 배양물을 원심분리하여 균체를 제거한 여액을 수득한 것을 제외하고는 제조예 2와 동일한 방법으로 비피도박테리움 롱검 배양물을 제조하였다.
- [0110] **비교제조예 3: 온천수를 이용하지 않은 락토바실러스 플란타룸 배양물**
- [0111] 온천수를 포함하지 않은 배지를 사용한 것을 제외하고는 제조예 2와 동일한 방법으로 락토바실러스 플란타룸 배양물을 제조하였다.
- [0113] **비교제조예 4: 온천수를 이용하지 않은 비피도박테리움 롱검 배양물**
- [0114] 온천수를 포함하지 않은 배지를 사용한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 비피도박테리움 롱검 배양물을 제조하였다.
- [0116] **실시예 1: 프로바이오틱스 복합 배양물 + 식물 복합 추출물**
- [0117] 제조예 1의 락토바실러스 플란타룸 배양물, 제조예 2의 비피도박테리움 롱검 배양물 및 식물 복합 추출물을 1:1:3의 부피비로 혼합하여 화장료 조성물을 제조하였다. 여기서 식물 복합 추출물은 제조예 A의 개비름 잎 추출물, 제조예 B의 바랭이 줄기 추출물 및 제조예 C의 마디풀 잎 추출물을 1:1:1의 부피비로 혼합한 것이다.
- [0119] **실시예 2: 프로바이오틱스 복합 배양물 + 식물 복합 추출물**
- [0120] 제조예 1의 락토바실러스 플란타룸 배양물, 제조예 2의 비피도박테리움 롱검 배양물 및 식물 복합 추출물을 1:1:3의 부피비로 혼합하여 화장료 조성물을 제조하였다. 여기서 식물 복합 추출물은 제조예 A의 개비름 잎 추출물, 제조예 B의 바랭이 줄기 추출물, 제조예 C의 마디풀 잎 추출물 및 제조예 D의 까마중 잎 추출물을 1:1:1:1의 부피비로 혼합한 것이다.
- [0122] **비교예 1: 프로바이오틱스 단일 배양물 + 식물 복합 추출물**
- [0123] 제조예 1의 락토바실러스 플란타룸 배양물을 사용하지 않은 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0125] **비교예 2: 프로바이오틱스 단일 배양물 + 식물 복합 추출물**
- [0126] 제조예 2의 비피도박테리움 롱검 배양물을 사용하지 않은 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0128] **비교예 3: 균체 제거 프로바이오틱스 복합 배양물 + 식물 복합 추출물**
- [0129] 제조예 1의 락토바실러스 플란타룸 배양물과 제조예 2의 비피도박테리움 롱검 배양물 대신에, 비교제조예 1의 균체 제거된 락토바실러스 플란타룸 배양물과 비교제조예 2의 균체 제거된 비피도박테리움 롱검 배양물을 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0131] **비교예 4: 온천수를 이용하지 않은 프로바이오틱스 복합 배양물 + 식물 복합 추출물**

[0132] 제조예 1의 락토바실러스 플란타룸 배양물과 제조예 2의 비피도박테리움 롱검 배양물 대신에, 비교제조예 3의 온천수를 이용하지 않은 락토바실러스 플란타룸 배양물과 비교제조예 4의 온천수를 이용하지 않은 비피도박테리움 롱검 배양물을 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0134] **비교예 5: 프로바이오틱스 복합 배양물 + 식물 단일 추출물**

[0135] 4종의 식물 복합 추출물 대신에 제조예 A의 개비름 잎 추출물 1종만 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0137] **비교예 6: 프로바이오틱스 복합 배양물 + 식물 단일 추출물**

[0138] 4종의 식물 복합 추출물 대신에 제조예 B의 바랭이 줄기 추출물 1종만 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0140] **비교예 7: 프로바이오틱스 복합 배양물 + 식물 단일 추출물**

[0141] 4종의 식물 복합 추출물 대신에 제조예 C의 마디풀 잎 추출물 1종만 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0143] **비교예 8: 프로바이오틱스 복합 배양물 + 식물 단일 추출물**

[0144] 4종의 식물 복합 추출물 대신에 제조예 D의 까마중 잎 추출물 1종만 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0146] **비교예 9: 프로바이오틱스 복합 배양물**

[0147] 식물 복합 추출물을 사용하지 않은 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0149] **비교예 10: 식물 복합 추출물**

[0150] 제조예 1의 락토바실러스 플란타룸 배양물과 제조예 2의 비피도박테리움 롱검 배양물을 사용하지 않은 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 조건으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0152] 상기 실시예 1, 2 및 비교예 1 내지 10의 화장료 조성물의 제조 조건을 아래의 표 1에 정리하였다.

표 1

[0153]

구분	배지에 온천수 포함여부	배양균주		식물 추출물				배양물 균체 포함여부
		락토바실러스 플란타룸	비피도박테리움 롱검	개비름 잎	바랭이 줄기	마디풀 잎	까마중 잎	
실시예 1	0	0	0	0	0	0	X	0
실시예 2	0	0	0	0	0	0	0	0
비교예 1	0	X	0	0	0	0	0	0
비교예 2	0	0	X	0	0	0	0	0
비교예 3	0	0	0	0	0	0	0	X
비교예 4	X	0	0	0	0	0	0	0
비교예 5	0	0	0	0	X	X	X	0
비교예 6	0	0	0	X	0	X	X	0
비교예 7	0	0	0	X	X	0	X	0
비교예 8	0	0	0	X	X	X	0	0
비교예 9	0	0	0	X	X	X	X	0
비교예 10	-	X	X	0	0	0	0	0

[0155] **[실험예]**

[0156] 모든 통계 분석은 SPSS 버전 18.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다. Duncan의 post-hoc test를 이용한 일원 분산 분석(one-way ANOVA)을 사용하여 실험군 간의 평균값의 차이(p < 0.05)를 결정하였다. 각각의 실험데이터는 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시하였다.

[0157] **실험예 1: 세포독성 분석**

[0158] 세포 독성은 MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. 배양된 HaCaT 세포를 DMEM 배지에 잘 혼합한 후 1×10^5 cells/mL로 조정된 다음, 24-well 배양판에 준비된 세포를 1 mL씩 첨가한 후 3일간 배양하였다. 세포가 80% 정도 성장했을 때 우태아 혈청과 항생제를 첨가하지 않은 배지에 농도별로 실시예 1, 2 및 비교예 3의 시료(0, 25, 50, 100, 300, 400, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리한 후, 24시간 더 배양을 하고 배양이 끝난 세포의 생존율을 MTT 환원 방법을 이용하여 측정하였다.

[0159] 각 웰에 MTT 용액(5 mg/mL)을 성장배지 부피의 1/10 가량 가한 후, 다시 37 °C에서 4시간 더 배양하였다. 이후, MTT를 환원시켜 생성된 포르마잔(formazan)이 손실되지 않도록 조심하며 배지를 제거하고, 남아 있는 배지를 완전히 제거하기 위해 실온에서 30분간 방치한 후 DMSO를 이용하여 시료를 용해시킨 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 하기 식 1에 따라 계산한 후, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[0160] [식 1]

[0161] 세포 생존율 (%) = [시료처리군의 흡광도/대조군의 흡광도] x 100

표 2

[0162]

구분	농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	10	100
무처리	99 \pm 0.8	
실시예 1	97.0 \pm 1.1	93.2 \pm 1.2
실시예 2	96.9 \pm 0.8	93.6 \pm 0.8
비교예 3	97.4 \pm 0.5	93.3 \pm 1.3

[0164] 이에 따르면, 본 발명의 실시예 1 및 2의 시료 뿐만 아니라 비교예 3의 시료 역시 인간 피부에 안전하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 비교예 1, 2 및 4 내지 10의 시료 또한 실시예 1, 2 또는 비교예 3의 성분에 포함되므로 별도의 세포독성은 실시하지 않았다.

[0166] **실험예 2: MMP-1 합성 저해 효과 분석**

[0167] CCD-986sk를 1.5×10^5 cells/mL의 농도로 35 mm dish에서 약 80% confluency에 도달할 때까지 배양하였다. 그리고 원래의 배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거한 다음, 필터를 장착한 UV 광원기(Coralife, 35W, UV)를 이용하여 UVA(6. 3J/cm²)를 24시간 동안 조사하였다. UVA 조사 후 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에 본 발명의 실시예 또는 비교예의 시료를 10 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도별로 각각 투여한 후 24시간 동안 배양하였다. 이와 같이 배양한 배지를 96 웰 플레이트에 분주하고 4 °C 에서 하룻밤 동안 반응시켰다. UVA 조사에 의해 유도되는 MMP-1 발현량 측정은 Dunsmore 등이 사용한 방법을 이용하여 실시하였다.

[0168] 먼저, 상기 배지를 TBS(phosphate bufferdsaline + 0.05% Tween20)로 3회 세척한 후, 3% PBS로 37 °C에서 1시간 동안 블로킹하였다. 이후, 1차 항체(monoclonal anti-MMP-1 antibody)를 blocking buffer로 1 : 3000의 부피비로 희석한 용액을 가하고 37 °C에서 90분간 반응시켰다. 이후, PBS로 세척한 다음 2차 항체(alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse IgG)를 블로킹 버퍼로 1 : 3,000의 부피비로 희석한 용액을 첨가하고 37 °C에서 90분간 반응시켰다. 이후, PBS로 세척한 다음 alkaline phosphatase 기질용액(1 mg/mL, p-mitrophenylphosphate in diethanolamine buffer)을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 3N NaOH로 반응을 중지시켰다. 다음으로, microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 아래의 표 3에 나타내었다.

표 3

[0169]

구분	농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	10	100
무처리	8854 \pm 28	
실시예 1	6120 \pm 48	5025 \pm 80
실시예 2	5302 \pm 52	4120 \pm 39
비교예 1	7140 \pm 90	6806 \pm 72
비교예 2	7590 \pm 101	7278 \pm 45

비교예 3	7904±45	7095±87
비교예 4	6808±51	5609±23
비교예 5	7840±110	6740±76
비교예 6	7857±75	6003±57
비교예 7	7724±40	6927±49
비교예 8	7926±68	7090±87
비교예 9	7663±58	7123±98
비교예 10	7520±61	7090±113

[0170] 이에 따르면, 프로바이오틱스 2종의 복합 배양물과 4종의 식물 복합 추출물을 포함하는 실시예 2의 시료가 MMP-1 단백질의 합성 저해 효과가 다른 실험군에 비해 가장 높게 측정되었고, 프로바이오틱스 2종의 복합 배양물과 3종의 식물 복합 추출물을 포함하는 실시예 1의 시료 또한 비교예들에 비하여 유의적으로 높은 MMP-1 단백질의 합성 저해 효과를 나타내었다. 이에 반해, 배양물에서 균체를 제거한 비교예 3의 배양물의 경우에는 균체를 포함하는 실시예 1 및 2에 비하여 MMP-1 단백질의 합성 저해 효과가 낮게 측정되었으며, 발효 균주를 1종만 사용한 비교예 1과 2 또한 콜라겐 분해효소인 MMP-1 단백질의 합성 저해 효과가 상대적으로 낮게 측정되었다. 따라서 실시예 1 및 2의 화장료 조성물은 비교예들의 화장료 조성물에 비하여 주름 생성을 억제하는데 효과적일 것으로 보인다.

[0172] **실험예 3: 콜라겐 합성 촉진 효과 분석**

[0173] 실시예 1, 2 및 비교예 1 내지 10의 시료에 대한 피부주름 개선효능을 확인하기 위해, 피부의 탄력을 유지하는 단백질 콜라겐의 생성량을 측정하였다. 섬유아세포를 48 웰 플레이트에 1×10^4 cells/well의 밀도로 분주하고, 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후에, 실시예 또는 비교예의 시료를 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하고 무혈청 배지에서 24시간 추가로 배양하였다. 배양 후, 각 웰의 상층액을 모아 procollagen type I C-peptide EIA kit(MK101, Takara, Japan)을 이용하여 프로콜라겐(procollagen) 타입 I C-펩타이드(PICP) 양을 측정하여 ng/ml 으로 환산하였으며, 이에 의해 합성된 콜라겐 양을 측정하여 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

[0174]

구분	농도($\mu\text{g/ml}$)	
	50	100
무처리	40.1±0.8	
실시예 1	75.8±0.7	85.5±1.2
실시예 2	82.2±1.2	92.4±0.8
비교예 1	58.8±1.2	63.9±1.1
비교예 2	57.7±0.7	65.2±0.3
비교예 3	57.5±1.1	66.8±0.8
비교예 4	80.5±0.7	88.2±0.6
비교예 5	49.5±1.3	64.7±0.4
비교예 6	48.6±0.9	58.8±0.6
비교예 7	51.8±1.0	63.5±1.6
비교예 8	53.5±0.7	65.8±2.1
비교예 9	58.9±1.5	67.0±0.7
비교예 10	47.3±1.2	59.0±0.6

[0175] 이에 따르면, 본 발명의 실시예 1 또는 2에 따라 제조된 시료는 무처리군 및 비교예들에 비하여 콜라겐의 생성 촉진 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다. 또한, 온천수를 사용하지 않은 배양물을 포함하는 비교예 4의 경우에도 실시예 1 또는 2와 유사한 수준의 콜라겐 생성 촉진 효과를 나타내었다. 이에 반해, 프로바이오틱스의 단일 배양물을 가지는 비교예 1, 2, 균체를 제거한 배양물을 포함하는 비교예 3, 식물 단일 추출물을 포함하는 비교예 5 내지 8, 프로바이오틱스 복합 배양물만 포함하는 비교예 9, 식물 복합 추출물만 포함하는 비교예 10의 경우에는 콜라겐 생성 촉진 효과가 상대적으로 낮게 나타났다.

[0177] **실험예 4: 티로시나아제 저해 활성 분석**

[0178] 실시예 1, 2 및 비교예 1 내지 10의 시료에 대하여 티로시나아제 억제능을 Yagi 등(1986)의 방법에 의하여 측정

하였다. 멜라닌은 표피 기저층에 존재하며, 멜라닌 합성은 melanocyte의 세포 내 멜라노솜(melanosome)에서 티로시나아제에 의해 조절되고, 따라서 티로시나아제 활성을 억제하면 멜라닌 합성과 색소 침착을 줄일 수 있다. 시험관에 pH 6.8의 1.15M sodium phosphate buffer 0.5 ml에 10 mM L-DOPA을 녹인 기질액 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml를 넣은 혼합액에 110 Unit/ml mushroom tyrosinase 0.2 ml를 첨가하였다. 이후 25℃에서 2분간 반응시키고 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 티로시나아제 저해 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었으며, 그 결과를 아래의 표 5에 나타내었다.

표 5

구분	처리농도(%(w/v))	
	50	100
실시예 1	6.5±1.4	10.4±0.5
실시예 2	6.9±0.8	11.5±1.0
비교예 1	4.5±0.5	6.5±0.8
비교예 2	3.5±1.2	5.5±0.4
비교예 3	3.8±0.4	6.8±0.9
비교예 4	6.3±0.5	9.7±0.7
비교예 5	3.1±0.6	6.8±0.7
비교예 6	4.2±0.3	5.9±0.3
비교예 7	3.3±0.2	6.7±0.8
비교예 8	2.9±1.3	5.8±1.1
비교예 9	3.9±0.9	5.9±0.6
비교예 10	3.0±0.9	5.6±0.5

[0179]

[0180]

이에 따르면, 본 발명의 실시예 1 또는 2의 시료가 티로시나아제 저해 활성이 가장 높은 것으로 나타났으며, 온천수를 사용하지 않은 배양물을 포함하는 비교예 4의 경우에도 실시예 1 또는 2와 유사한 수준의 티로시나아제 저해 활성을 나타내었다. 이에 반해, 프로바이오틱스의 단일 배양물을 가지는 비교예 1, 2, 균체를 제거한 배양물을 포함하는 비교예 3, 식물 단일 추출물을 포함하는 비교예 5 내지 8, 프로바이오틱스 복합 배양물만 포함하는 비교예 9, 식물 복합 추출물만 포함하는 비교예 10의 경우에는 티로시나아제 저해 활성이 상대적으로 낮게 나타났다.

[0182]

실험예 5: 멜라닌 생성 억제능 분석

[0183]

마우스 유래 melanocyte인 B16F1 세포는 멜라닌(melanin)을 생성하며, 멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte내의 소기관인 melanosome에서 생합성되고 이는 가시광선 영역대의 흡광도를 측정함으로써 생성량을 비교할 수 있다. B16F1 세포 접종 후 3일간 시료를 처리하고 배지를 제거한 다음 세포를 PBS로 세척하고, 각 well당 1 ml의 1 N NaOH를 첨가한 후 교반하여 세포막을 용해함으로써 멜라닌 성분을 녹여 나오게 하여, 가시광선 영역대 중 가장 파장이 짧은 푸른색 가시광선영역인 400 nm에서 흡광도를 측정함으로써 생성된 멜라닌의 양을 측정하였다.

[0184]

상기 멜라닌 양은 단위 세포수당(10^6 cell)의 흡광도로 나타내는 방법으로 측정하였으며, 대조군(무처리군)에 대한 상대적인 멜라닌 생성량을 저해율(%)로 계산하고 결과를 표 6에 정리하였다.

표 6

구분(단위: %)	농도($\mu\text{g/ml}$)	
	50	100
무처리	41.2±0.5	
실시예 1	68.7±0.4	70.6±0.8
실시예 2	66.2±0.7	74.5±1.1
비교예 1	44.5±0.4	47.7±0.2
비교예 2	53.0±1.2	59.2±0.8
비교예 3	43.7±0.9	52.5±1.0
비교예 4	60.4±0.5	72.2±0.5
비교예 5	36.2±0.9	45.7±0.8
비교예 6	42.0±0.2	54.7±0.5

[0185]

비교예 7	38.5±0.5	53.6±0.9
비교예 8	42.1±1.0	49.3±0.4
비교예 9	48.0±1.1	48.7±1.2
비교예 10	50.1±0.5	56.1±0.4

[0186] 이에 따르면, 실시예 1 및 2의 시료가 멜라닌 생성 억제능이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 온천수를 사용하지 않은 배양물을 포함하는 비교예 4의 경우에도 실시예 1 또는 2와 유사한 수준의 멜라닌 생성 억제능을 나타내었다. 이에 반해, 프로바이오틱스의 단일 배양물을 가지는 비교예 1, 2, 균체를 제거한 배양물을 포함하는 비교예 3, 식물 단일 추출물을 포함하는 비교예 5 내지 8, 프로바이오틱스 복합 배양물만 포함하는 비교예 9, 식물 복합 추출물만 포함하는 비교예 10의 경우에는 멜라닌 생성 억제능이 상대적으로 낮게 나타났다.

[0188] 본 발명을 적용하기에 적합한 화장료 조성물의 제제예를 제시한다.

[0190] **제제예 1: 화장수**

[0191] 실시예 2의 화장료 조성물을 이용한 화장수의 제제예는 하기 표 7과 같다.

표 7

[0192]

성분	함량(중량%)
실시예 2의 조성물	5.0
글리세린	6.0
1,3-부틸렌글라이콜	3.0
피이지1500	1.0
알란토인	0.1
DL-판테놀	0.3
EDTA-2Na	0.02
벤조페논-9	0.04
소듐하이알루로네이트	5.0
에탄올	10.0
폴리소르베이트20	0.2
방부제, 향, 색소	미량
증류수	잔량
합계	100

[0193] **제제예 2: 로션**

[0194] 실시예 2의 화장료 조성물을 이용한 로션의 제제예는 하기 표 8과 같다.

표 8

[0195]

성분	함량(중량%)
실시예 2의 조성물	3.0
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	1.2
토코페릴아세테이트	3.0
유동 파라핀	5.0
스쿠알란	3.0
마카다미너트오일	2.0
폴리소르베이트 60	1.5
소르비탄세스퀴올레이트	1.0
카르복시비닐폴리머	1.0
방부제, 향, 색소	미량
증류수	잔량
합계	100

[0197] **제제예 3: BB 크림**

[0198] 실시예 2의 화장품 조성물을 이용한 BB 크림의 제제예는 하기 표 9와 같다.

표 9

[0199]

성분	함량(중량%)
실시예 2의 조성물	1.0
친유형 모노스테아린산글리세린	1.5
세테아릴 알코올	1.5
스테아린산	1.0
폴리소르베이트 60	1.5
소르비탄 스테아레이트	0.6
이소스테아릴이소스테아레이트	5.0
스쿠알란	5.0
광물유	35.0
디메치콘	0.5
하이드록시에틸셀룰로오스	0.12
글리세린	6.0
트리에탄올아민	0.7
방부제, 향, 색소	미량
증류수	잔량
합계	100

[0201] **제제예 4: 에센스**

[0202] 실시예 2의 화장품 조성물을 이용한 에센스의 제제예는 하기 표 10과 같다.

표 10

[0203]

성분	함량(중량%)
실시예 2의 조성물	1.5
글리세린	10.0
베타인	5.0
PEG 1500	2.0
알란토인	0.1
DL-판테놀	0.3
EDTA-2Na	0.02
벤조페논-9	0.04
하이드록시에틸셀룰로오스	0.1
소듐하이알루로네이트	8.0
카르복시비닐폴리머	0.2
트리에탄올아민	0.18
옥틸도데칸올	0.3
옥틸도데세스-16	0.4
에탄올	6.0
방부제, 향, 색소	미량
증류수	잔량
합계	100

[0205] **제제예 5: 마스크 팩용 유액**

[0206] 실시예 2의 화장품 조성물을 이용한 마스크 팩용 유액의 제제예는 하기 표 11과 같다.

표 11

[0207]

성분	함량(중량%)
실시예 2의 조성물	1.0
폴리비닐알코올	15.0

셀룰로오스 겜	0.15
글리세린	3.0
PEG 1500	2.0
사이클로덱스트린	0.15
DL-판테놀	0.4
알란토인	0.1
글리시리진산모노암모늄	0.3
니코틴아마이드	0.5
에탄올	6.0
PEG 40 경화 피마자유	0.3
방부제, 향, 색소	미량
증류수	잔량
합계	100

[0209] 이상, 본 발명의 실시예들에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.