



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0057083
(43) 공개일자 2016년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/98 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0157812

(22) 출원일자 2014년11월13일

심사청구일자 2014년11월13일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

최병대

경상남도 통영시 진남2길 43-10, 장원썬비치 905호 (미수동)

줄리아티

경상남도 통영시 한실4길 18, 한실원룸 302호 (인평동)

박시향

경상남도 통영시 한실4길 18

(74) 대리인

정홍식, 이현수, 김태현

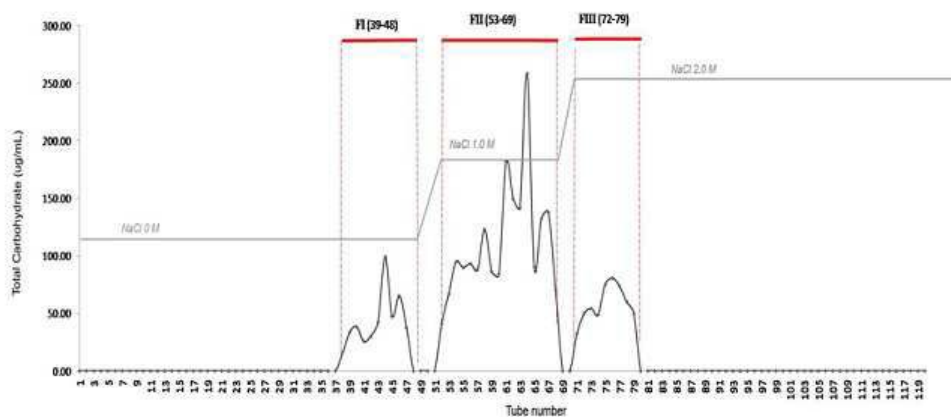
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 어류의 알 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물

(57) 요약

화장료 조성물이 개시된다. 본 화장료 조성물은 물메기 알(Liparis tessellatus egg) 추출물을 유효성분으로 포함한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345146045

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원

연구과제명 물메기 알로부터 고부가가치 글리코사미노글리칸의 활용기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

물매기 알(Liparis tessellatus egg) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 피부 주름 개선, 피부 탄력 증진, 피부 재생 촉진 또는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은,

물매기 알에 단백질 가수분해효소(protease)를 투입하여 추출된 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은,

글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)을 포함하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 글리코사미노글리칸은,

히알루론산(hyaluronic acid)인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 화장품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 어류의 알 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대 의학과 과학의 발전으로 인하여 평균 수명이 늘어나고 여유로워짐에 따라 사람들은 겉으로 보여지는 피부에도 많은 관심을 가지게 되었다. 피부의 노화 요인으로는 여러 가지 환경적 요인과 심리적 스트레스, 호르몬의 변화 등 여러 가지가 있지만, 크게 내인성 노화와 광 노화로 나눌 수 있는데, 내인성 노화는 시간이 흘러감에 따라 생기는 노화이고 광 노화는 오랫동안 햇빛에 노출되어서 생기는 노화로 자외선의 노출을 피하면 예방할 수 있는 노화이다.

[0003] 많은 양의 자외선에 노출되면 멜라닌 생성이 촉진되고, 콜라겐(collagen) 및 탄력섬유(elastin fiber) 등의 기질단백질이 손상되어 피부 내 콜라겐의 양이 부족해지고 탄력섬유가 변성되어 주름살이 유발된다.

[0004] 콜라겐은 피부의 진피를 구성하는 주요 단백질로 피부구조의 탄력을 유지하는 역할을 하고 있다. 자외선을 사람 피부에 조사하게 되면 복잡한 경로를 거쳐서 콜라겐의 합성이 감소되고, 콜라겐이 감소하게 되며 세포 외 기질 단백질의 분해 효소인 Matrixmetalloproteinase(MMPs)의 발현이 증가되는데, MMP-1들이 진피 층의 콜라겐을 붕괴시킨다.

[0005] 또한 자외선을 받게 되면 피부에 색소침착이 증가되어 검게되는데, 이는 멜라닌 세포가 피부에 해가 되는 자외선이 진피 내에 흡수되는 것을 막기 위하여 멜라닌을 형성하기 때문이다. 멜라닌의 전구물질은 Tyrosine 이라는 단백질로 Tyrosine에 의해 L-DOPA(L-3, 4-dihydroxyl-Phenylalanine)로 L-DOPA는 다시 산화과정을 거쳐서 최종적으로 멜라닌이 형성이 된다. 과도한 멜라닌의 생성은 기미, 주근깨, 검버섯뿐 아니라 피부의 노화를 야기

시키는 주범이 되고 있다.

[0006] 현재 과학의 발달로 의학적 효능을 강화한 화장품들이 지속적으로 개발되면서 과학과 의학을 접목시킨 뛰어난 기능성 화장품들이 생산되고 있으며, 화학합성 화장품의 부작용과 과민 반응 등이 보고되면서 화장품의 원료를 다시 천연 원료로부터 얻으려는 연구가 시도되고 있지만, 아직도 다양한 천연 원료에 대한 연구는 비교적 많이 진행되지 않고 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상술한 필요성에 따른 것으로, 본 발명의 목적은 어류의 알 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 이상과 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시 예에 따른 화장료 조성물은, 물메기 알(*Liparis tessellatus* egg) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 피부 주름 개선, 피부 탄력 증진, 피부 재생 촉진 또는 피부 미백용도의 화장료 조성물이다.

[0009] 이 경우, 상기 추출물은, 물메기 알에 단백질 가수분해효소(protease)를 투입하여 추출된 가수분해물일 수 있다.

[0010] 한편, 상기 추출물은, 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)을 포함할 수 있다.

[0011] 이 경우, 상기 글리코사미노글리칸은, 히알루론산(hyaluronic acid)일 수 있다.

발명의 효과

[0012] 이상의 다양한 실시 예에 따른 화장료 조성물은 생체에서 안전성이 확보되고, 피부 미백, 피부 세포 재생, 피부 탄력 증진, 피부 노화 지연, 피부 주름 개선 등의 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 일 실시 예에 따른 물메기 알 추출물의 분획물(F1, F2, F3)을 설명하기 위한 도면,

도 2는 상기 분획물의 단당류 조성을 GC/MS로 분석한 결과,

도 3 내지 도 8는 상기 분획물을 다양한 효소로 가수분해하여 얻어진 HPLC 결과,

도 9는 F3 분획물에서 얻어진 피크와 표품을 permethylation하여 ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry)로 분석한 결과, 그리고,

도 10은 F3 분획물을 ESI-MS/MS에 의하여 분석된 HA의 구조를 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 썸치과(Family Liparidae)에는 분홍썸치(*Careproctus rastrinus*), 원두썸치(*Careproctus furcellus*), 물미거지(*Crystallichthys matsushimae*), 썸치(*Liparis tanakai*), 물메기(*Liparis tessellatus*), 미거지(*Liparis ochotensis*), 아가씨물메기(*Liparis agassizii*), 노랑물메기(*Liparis chefuensis*), 보라물메기(*Liparis megacephalus*), 잉크썸치(*Paraliparis grandis*) 등이 있다.

[0015] 본 발명은, 썸치과에 속하는 어류의 알 추출물을 유효 성분으로 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 썸치과에 속하는 어류의 알에서 유래한 글리코사미노글리칸 (glycosaminoglycan, GAG)을 유효 성분으로 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0016] 이하에선, 본 발명에서 이용된 썸치과에 속하는 어류의 알의 일반 성분, 무기질 함량, 아미노산 조성, 지방산 조성, 중금속 함량에 대해 살펴보고자 한다. 이하의 분석에선 물메기 알(*Liparis tessellatus* egg, LTE)이 사용되었다. 사용된 물메기 알은 추도의 물메기 가공공장에서 제공받은 것으로서, 이것을 흐르는 수돗물에 잘 씻어서 흙과 이물질을 제거한 다음 증류수에 행궤내어 -25℃ 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

1) 물메기 알의 일반성분의 분석

물메기 알 시료의 화학적 성상을 파악하기 위하여 수분은 상압가열건조 법(AOAC, 1990), 조단백질은 semi-micro Kjeldahl 법, 조지방은 Bligh and Dyer 법(1959), 회분은 550℃에서 건식회화법, 당의 함량은 페놀황산법으로 측정하였다. 측정 결과, 물메기 알의 수분함량은 73.1%, 단백질함량은 7.6%, 지질함량은 0.3%, 회분함량은 0.6%, 탄수화물함량은 18.4%로 일반 어류 육에 함유된 당함량 1%에 비하여 현저히 높은 당함량을 보여주는 반면, 단백질함량은 7.6%로 매우 낮은 함량을 보여주고 있어 물메기 알에는 다량의 당이 함유되어 있는 특징을 보여주었다(표 1).

표 1. Proximate composition of *Liparis tesellatus* eggs

Parameters	Percent Composition
Moisture	73.1±1.9
Crude Protein	7.6±0.8
Lipid	0.3±0.1
Ash	0.6±0.0
Carbohydrate	18.4

Values are expressed as means±standard deviation (n=3).

The carbohydrate content was calculated as 100-(protein+ash+lipid+moisture).

2) 물메기 알의 무기질 함량 분석

물메기 알 시료의 무기질 분석은 유도결합 플라즈마 원자방출 분광법(inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy, ICPAES, Optima 4300DV, Perkin Elmer Co., Waltham, MA, USA)을 이용하여 분석하였다. 시료 2 g을 550℃ 전기 회화로에서 6시간 회화시켜 방냉한 뒤 탈이온수 10방울을 첨가하고 묽은 질산(1:1 HNO₃) 4 mL를 넣어준 후 전열기(120℃)에서 수분을 제거시켜 550℃ 전기 회화로에서 1시간 회화하고 방냉하였다. 묽은 염산(1:1 HCl) 10 mL를 첨가하고 50 mL 정용플라스크에 옮겨 탈이온수로 정용한 뒤 여과하여 분석하였다. 각 원소의 표준용액은 0, 1, 10 ppm의 농도로 조제하였고 ICP-AES의 조건은 power: 1.0 KW for aqueous, sheath gas flow: 0.3 L/min, cooling gas: 12 L/min, nebulizer pressure: 3.5 bar for meinhard type c, aerosol flow rate: 0.3 L/min이었다.

분석 결과, 물메기 알에 함유된 가장 풍부한 무기질은 인(P)으로 49.2 mg/L, 그 다음으로는 Na 23.0 mg/L, Mg 15.4 mg/L, K 19.5 mg/L 이고 해양생물임에도 불구하고 Ca 함량이 매우 낮아 9.1 mg/L로 나타났다. 막을 구성하는 물질 중의 하나인 P의 함량이 높은 것이 특징이었다(표 2).

표 2. Mineral composition of *Liparis tesellatus* eggs

Element	Concentration (mg/L)
Fe	1.3±0.1
Mn	0.03±0.0
Cu	0.05±0.0
Zn	0.7±0.1
K	19.5±1.6
Ca	9.1±1.4
Mg	15.4±1.4
Na	23.0±2.2
P	49.2±3.2

Values are expressed as means±standard deviation (n=3).

3) 물메기 알의 구성아미노산 조성의 분석

물메기 알 시료의 구성아미노산 종류와 함량은 Je 등 (2005)의 방법에 준하여 측정하였다. 시료 1 g정도를 취해 시험관에 넣고 6 N HCl 용액을 15 mL 가하여 감압밀봉한 후 110℃의 dry oven에서 24시간 동안 산가수분해 시켰다. 가수분해시킨 분해액을 Glass filter로 여과하고 염산과 물을 완전히 증발시키기 위해 얻은 여액을 55℃에

서 감압농축하였다. 농축된 시료를 sodium citrate buffer (pH 2.2)로 정용하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 후, 아미노산 자동분석기(Biochrom 20, Pharmacia Biotech. Ltd, UK)를 이용하여 구성아미노산 조성을 구하였다.

[0026] 물메기 알 및 효소분해 후의 아미노산 조성을 분석한 결과를 표 3에 나타내었다. 물메기 알의 총 아미노산 함량은 248.9 nmol/40 µL이었고, 이를 Protamex로 효소분해 하였을 때 PLE는 152.2 nmol/40 µL로 약간 감소하는 경향이였다. 단백질 효소에 의하여 40% 이상의 단백질이 제거되었다.

표 3. Amino acid composition of *L. tesellatus* eggs (LTE) and polysaccharides from *L. tesellatus* eggs (PLE)

Amino Acids	Concentration (nmol)	
	LTE	PLE
Serine	18,582	9,739
Glycine	-	-
Alanine	-	-
Valine	31,149	4,690
Methionine	7,252	0,830
Isoleucine	17,173	1,113
Leucine	39,525	5,533
Tyrosine	19,011	4,082
Phenylalanine	22,875	-
Histidine	11,865	8,739
Lysine	20,391	15,999
Ammonia	39,767	85,765
Arginine	21,290	15,726
Total	248.88	152.23

[0027]

[0028] 4) 물메기 알의 지방산조성

[0028]

[0029] Bligh and Dyer의 방법(1959)에 따라 총지질을 추출하고, AOCS법(1990)에 따라 검화및 methylester화 시킨 다음, GC 분석용 시료를 조제한 후 이를 capillary column (Omegawax-320, 30 m×0.25 mm i.d., Supelco Ltd.)이 장착된 GC(Shimadzu GC-17A, Kyoto, Japan)로써 분석하였다. 각 구성 지방산의 동정은 표준품과의 머무름 시간(RT)의 비교 및 equivalent chain length법(1995)에 의해 동정하였다.

[0030] 물메기 알의 지방산 조성은 표 4와 같다. 포화지방산 중 C16:0의 함량이 가장 높아 24.2% 중에서 18.8%를 차지하였고, 모노엔산 20.9% 중에서 C18:1n-9 및 C18:1n-7이 각각 9.6% 및 6.9%로 80.9%를 차지하였다. 고도불포화지방산 함량은 54.9%를 차지하였으며 이중 EPA 및 DHA의 함량이 43.8%에 이르러 알의 부화 및 생존에 필수적인 역할을 하는 것으로 여겨진다. 그러나 물메기 알에 함유된 지방의 함량이 낮아 식품자원으로서는 부가가치가 낮음에도 불구하고 예로부터 해안가의 주민들이 식용해 왔으므로 그 이유를 밝혀내는 것이 중요하다고 여겨진다.

표 4. Fatty acid composition of *Liparis tesellatus* eggs

Fatty acids	Area percent(%)
14:0	0.1±0.0
16:0	18.8±0.6
16:1n-9	2.2±0.1
16:1n-7	0.1±0.0
16:2n-4	0.2±0.0
18:00	5.3±0.0
18:1n-9	9.6±0.7
18:1n-7	6.9±1.4
18:1n-5	0.4±0.0
18:2n-6	1.0±0.0
18:2n-4	0.2±0.0
18:3n-6	0.2±0.0
18:3n-4	0.1±0.0
18:3n-3	0.1±0.0
18:4n-3	0.1±0.0
20:0	0.1±0.0
20:1n-9	1.2±0.3
20:1n-7	0.4±0.0
20:2n-6	0.2±0.0
20:3n-6	5.9±0.1
20:4n-3	0.3±0.0
20:5n-3	19.1±0.5
22:4n-6	0.3±0.0
22:5n-6	0.5±0.0
22:5n-3	2.0±0.1
22:6n-3	24.7±0.9
Saturates	24.2
MUFAs	20.9
PUFAs	54.9
n-3/n-6	0.8

*Values are expressed as means ± standard deviation (n=3).

*MUFAs, total monounsaturated fatty acids; PUFAs, total polyunsaturated fatty acids; EPA, eicosapentaenoic acid (20:5n-3); DHA, docosahexaenoic acid (22:6n-3).

5) 물메기 알의 중금속 함량

물메기 알로부터 당단백질을 정제하여 사용하게 될 것이므로 물메기 알 시료에 포함된 중금속의 함량은 최종 제품의 스펙을 결정하는데 중요한 인자가 될 수 있다. 중금속 함량을 측정하여 Table 6에 나타내었다. As, Cd, Hg 함량은 스펙 기준치 10 ppm이하였다(표 5).

표 5. Heavy metal composition of *L. tesellatus* eggs (LTE)

Heavy metal	Concentration (mg/L)
As	0.01±0.0
Cd	0.01±0.0
Hg	0.08±0.0

Values are expressed as means±standard deviation (n=3).

이상에선 물메기 알의 일반 성분, 무기질 함량, 아미노산 조성, 지방산 조성, 중금속 함량에 대해 살펴보았다. 이하에선 물메기 알로부터 글리코사미노글리칸(GAGs)를 추출하는 방법에 대해 설명하도록 한다.

구체적으로, 동결 건조하여 마쇄한 물메기 알을 지질 제거를 위해 아세톤에 침지한 다음 탈이온수로 여러 번 세척하고 동결건조 하였다. 탈지된 시료에 단백질 가수분해효소(protease)를 투입하여 가수분해하였다. 이때 사용될 수 있는 효소에는 Alcalase, Flavourzyme, Protamex등이 있다.

Alcalase 는 *Bacillus licheniformis* 에서 분리한 내열성 액화 효소로, 55 ℃ 내지 70 ℃, pH 6.5 내지 8.5의

범위에서 활성이 가장 우수하며, 전분당, 물엿, 약주 등의 제조에 사용될 수 있다.

[0038] Flavourzyme 은 *Aspergillus oryzae* 에서 기원된 복합효소로 N-말단에서부터 단백질을 아미노산 단위로 분해하는 효소이다. Flavourzyme은 50 ℃, pH 5.0 내지 7.0 에서 활성을 나타낸다.

[0039] Protamex 는 *bacillus* 균주에서 분리한 protease complex로 구성된 내열성 액화 효소로 식품내 단백질의 가수분해 및 새로운 식품 개발에 주로 이용되며, 35 ℃ 내지 60 ℃, pH 5.5 내지 7.5 에서 활성을 나타낸다. Protamex 는 단백질을 무작위로 분해하는 endoprotease와 단백질 말단에서 아미노산 단위로 분해하는 exoprotease 중에서 endoprotease의 비율이 더 높아 단백질의 분해력이 우수하다.

[0040] 이 효소들 중, Protamex로 E/S 농도 1.34%, pH 6.6, 47℃의 조건에서 26.5시간 가수분해하였다. 효소활성을 억제하기 위하여 90℃에서 20분간 가열한 다음 원심분리하고 상등액에 대하여 60%가 되도록 Na₂SO₄를 첨가하여 단백질을 원심분리(4,000 rpm, 30분)하여 제거하였다. 투석막(MW 10,000)으로 염을 제거하고 Brix 9가 될 때까지 농축한 다음 4배량의 에탄올을 혼합하여 다당류를 침전시켰다.

[0041] 이상과 같이 추출된 다당류(polysaccharides from *L. tessellatus* eggs, 이하 'PLE')는 Mauro et al.(1998)의 방법에 따라 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에 용해시킨 후(50 mg/mL), 같은 완충액으로 평형화시킨 DEAE-Sephacrose fast flow resin column(1.6 x 15 cm)에 2 mL를 넣고, 칼럼 부피와 동량의 A용매 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 세척한 후, B용매 2 M NaCl을 포함한 같은 buffer로 선형균배 하여 0-30 min; A, 100%, 30-60 min; A→B, 100%, 60-90 min; B, 100%, 90-120 min; B→A 100%, 120-150 min; A, 100%의 조건으로, 유속 1 mL/min, 254 nm에서 분취하였다.

[0042] 도 1에 도시한 바와 같이 분취된 시험관의 일련번호에 따라 총 당의 함량을 phenol-sulfuric acid 방법으로 측정하여 F1(39-48), F2(53-69) 및 F3(72-79)의 세 획분으로 분취하였다. 분취된 세 획분을 모아서 투석하고 동결 건조한 다음 각 조성을 분석하였다(표 6).

표 6 . Sugars composition of PLE, F1, F2, and F3

Samples	Compounds tested (%)			
	Total sugar	Sulfated glycans	Uronic acids	Hexosamines
PLE	43.2	12.0	23.9	1.7
F1	88.5	26.8	34.5	23.5
F2	83.0	23.2	38.2	19.0
F3	78.0	20.2	45.0	7.5

[0043]

[0044] F1 획분(0.5 M NaCl)의 수율은 27.0%, F2 획분(1.0 M NaCl)의 수율은 38.2%, F3 획분(2.0 M NaCl)의 수율은 22.2%였다. 총 당의 함량은 획분에 따라 차이가 있어 78.0~88.5%였고, 황 함량은 20.2~26.8%, 우론산 함량은 34.5~45.0% 그리고 아미노당 함량은 7.5~23.5%였다. 이들 획분의 단당류 조성을 GC/MS로 분석하여 도 2에 나타내었다. 도 2A는 단당류의 표준의 분석결과로 mannose, galactose, glucuronic acid, glucose 및 N-acetylglucosamine 등이 검출되었다. 그리고 각 획분의 단당 분석결과를 도 2B(F1), 도 2C(F2) 및 도 2D(F3)에 각각 나타내었다. 가장 함량이 높은 성분인 glucuronic acid는 26.2~28.7%, 다음으로는 glucose 19.3~24.4%, N-acetylglucosamine 17.4~22.6%, mannose 11.2~14.9% 그리고 Galactose 10.7~11.7%로 나타났다(표 7).

표 7. Monosaccharide composition of polysaccharide fractions

Monosaccharides	Composition (%)		
	F1	F2	F3
Mannose	14.9	11.2	12.8
Galactose	11.6	10.7	11.7
Glucose	19.3	23.0	24.4
Glucuronic acid	26.2	26.9	28.7
N-acetylglucosamine	22.6	21.9	17.4

[0045]

[0046]

F1, F2, F3 각 획분에 대하여 SAX-HPLC에 의한 disaccharides 분석을 수행하였다. 구체적으로, 건조된 시료(50 µg)를 chondroitin sulfate ABC lyase, chondroitin sulfate AC lyase, hyaluronidase, heparinase I, II, III로 37℃에서 15시간 동안 가수분해하였다. 그 후에 100℃에서 2분 동안 실활 시키고 14,000 rpm에서 20분간 원심분리한 뒤 탈이온수로 평형화된 SAX column(Phenosphere 5 µ SAX 80A, 25x0.46 cm, Phenomenex Co., Torrance, CA, USA) 상에서 2 M NaCl(pH 3.5) 용액으로 선형 균배하여 232 nm에서 검출하였다. 표준품으로는 heparin/heparan sulfate disaccharide kit(Seikagaku, Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

[0047]

도 3은 Chondroitinase AC로 가수분해하여 얻어진 HPLC의 결과이다. chondroitinase AC로 가수분해된 PLE(도 3B), F1(도 3C), F2(도 3D) 획분에서는 Ch-OS 및 Ch-6S의 피크가 나타났으나, 도 3A(mixture of disaccharide standards: Ch-OS, Ch-4S, and Ch-6S (labelled peaks))와 비교하였을 때 F3 획분(도 3E)에서는 단지 Ch-6S 피크만 검출되었다. (도 3F: Cleavage of chondroitinase AC between galactosamine and glucuronic acid of chondroitin sulfates)

[0048]

도 4는 Chondroitin ABC로 가수분해하여 얻어진 HPLC의 결과이다. PLE(도 4B), F1(도 4C), F2(도 4D) 및 F3 획분(도 4E)에서 Ch-4S(dermatan sulfate) 존재를 확인하기 위하여 Chondroitin ABC lysae로 가수분해하여 표품(도 4A)인 Ch-OS, Ch-4S, Ch-6S와 비교한 결과 모든 획분의 가수분해물에서 Ch-OS만 검출되어 Chondroitin ABC에 의해서는 가수분해가 일어나지 않는 것으로 나타났다. (도 4F: Cleavage of chondroitinase ABC between galactosamine and glucuronic acid of chondroitin sulfates)

[0049]

도 5는 Heparinase I으로 가수분해하여 얻어진 HPLC의 결과로서, 도 5A(mixture of disaccharide standards)와 비교하였을 때, PLE(도 5B)과 분획물 F1(도 5C), F2(도 5D), F3(도 5E)는 peak 1과 2로 구성되어 있는 것으로 나타나, 물메기 알로부터 정제된 GAGs는 ΔGlyUA→4GlcNAc 및 ΔGlyUA→4GlcNS의 반복구조로 된 것으로 추정된다. (Peak 1, ΔGlyUA→4GlcNAc; peak 2, ΔGlyUA→4GlcNS; peak 3, ΔGlyUA→4GlcNAc(6S); peak 4, ΔGlyUA→4GlcNS(6S); peak 5, ΔGlyUA(2S)→4GlcNS, peak 6, ΔGlyUA(2S)→4GlcNS(6S))

[0050]

도 6은 Heparinase II로 가수분해하여 얻어진 HPLC의 결과로서, 도 6A(mixture of disaccharide standards)와 비교하였을 때, PLE(도 6B)과 분획물 F1(도 6C), F2(도 6D), F3(도 6E)는 peak 1, 2, 3, 4, 5, 6으로 구성되어 있는 것으로 나타나, 물메기 알로부터 정제된 PLE의 GAGs는 주성분이 ΔGlyUA→4GlcNAc로 나타났고, F1은 ΔGlyUA→4GlcNAc와 ΔGlyUA→4GlcNS, F2는 ΔGlyUA→4GlcNAc와 ΔGlyUA→4GlcNS(6S), F3는 ΔGlyUA→4GlcNAc가 주성분이고 ΔGlyUA→4GlcNAc(6S), ΔGlyUA→4GlcNS (6S), ΔGlyUA(2S)→4GlcNS(6S)의 반복구조로 된 것으로 추정된다. (Peak 1, ΔGlyUA → 4GlcNAc; peak 2, ΔGlyUA → 4GlcNS; peak 3, ΔGlyUA → 4GlcNAc (6S); peak 4, ΔGlyUA → 4GlcNS (6S); peak 5, ΔGlyUA (2S) → 4GlcNS, and peak 6, ΔGlyUA (2S) → 4GlcNS (6S)), (도 6F: Cleavage of heparinase II between glucosamine sulfate and iduronic acid of heparin).

[0051]

도 7은 Heparinase III로 가수분해하여 얻어진 HPLC의 결과로서, 도 7A(mixture of disaccharide standards)와 비교하였을 때, PLE(도 7B)과 분획물 F1(도 7C), F2(도 7D), F3(도 7E)는 peak 1, 2, 3, 4, 5, 6으로 구성되어 있는 것으로 나타났으나, GAGs의 주성분은 ΔGlyUA→4GlcNAc로 나타났다. (Peak 1, ΔGlyUA → 4GlcNAc; peak 2, ΔGlyUA → 4GlcNS; peak 3, ΔGlyUA → 4GlcNAc (6S); peak 4, ΔGlyUA → 4GlcNS (6S); peak 5, ΔGlyUA (2S) → 4GlcNS, and peak 6, ΔGlyUA (2S) → 4GlcNS (6S)), (도 7F: Cleavage of heparinase II between glucosamine sulfate and iduronic acid of heparin (F))

[0052]

도 8은 Hyaluronidase로 가수분해하여 얻어진 HPLC의 결과로서, 도 8A(mixture of disaccharide standards)와 비교하였을 때, PLE(도 8B)과 분획물 F1(도 8C), F2(도 8D), F3(도 8E)는 peak 1, 2, 3, 4, 5, 6으로 구성되어 있는 것으로 나타났으나, GAGs의 주성분은 ΔGlyUA→4GlcNAc로 나타났다. (도 8F: Cleavage of hyaluronidase

between glucosamine and glucuronic acid of hyaluronic acid)

- [0053] 도 9는 F3획분에서 얻어진 피크와 표품을 permethylation하여 ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry)로 분석한 자료이다(F1과 F2에 대한 결과는 도시하지 않았다).
- [0054] 도 9(a)는 히알루론산(hyaluronic acid)의 반복단위를 보여주며, 도 9(b)는 반복단위에 의한 히알루론산의 분자량을 보여준다. 히알루론산 표품의 MS 자료는 도 9(c)에 나타내었으며, 반복단위 1~4개로 구성되어 있는 형태이다. PLE 획분 F3에서 얻어진 MS 자료는 도 9(d)에 나타내었다.
- [0055] PLE 획분 F3를 ESI-MS/MS에 의하여 분석된 히알루론산의 구조는 도 10에 나타내었다. 도 10(a)는 m/z 500.8에서의 MS/MS spectra이고, 도 10(b)는 m/z 996.5에서의 MS/MS spectra이다. 도 10(a)에 나타난 바와 같이 m/z 356.1에서 2,5A2 교차 링의 피크가 나타났고, 0,2A2 피크는 메칠그룹이 소실되었을 때 나타나는 피크이다. 메칠화 되지 않은 히알루론산의 0,2A2 피크는 아주 흔한 피크이며 히알루론산을 동정하는데 매우 유용한 피크이다. F3 획분에서 검출된 uronic acid를 구성하는 당의 4,5 위치에 불포화가 일어난 것은 효소가수 분해하는 동안 glycosidic bond에서 제거반응이 일어났을 가능성이 매우 높다(도 9). 이와 같이 분자로부터 제거반응에 의하여 불포화가 일어나는 경우를 Linker et al.(Linker A, Meyer K, Hoffman P. 1956. The Production of unsaturated uronides by bacterial hyaluronidases. J Biolog Chem 219, 13-25.)이 제안한 바 있다.
- [0056] 이상의 내용을 종합하자면, Protomex로 효소분해한 물메기 알로부터 추출된 다당류(PLE)를 겔럼을 통해 정제하여 F1, F2, F3 획분을 얻을 수 있었고, 각 획분의 이당류 조성을 파악하기 위하여 HPLC 분석한 결과, chondroitin sulfates, non-sulfated chondroitin, heparin 화합물, hyaluronic acid 등이 검출되었다. 그리고, 각 종 효소로 분해하여 이당류 표품과 비교한 결과 $\Delta\text{GlyUA} \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, $\Delta\text{GlyUA} \rightarrow 4\text{GlcNS}$, $\Delta\text{GlyUA} \rightarrow 4\text{GlcNAc}(6\text{S})$, $\Delta\text{GlyUA} \rightarrow 4\text{GlcNS}(6\text{S})$ 등이 검출되었다. 그리고, 가수분해된 피크의 ESI-MS/MS 분석결과 m/z 996.5 분자량을 갖는 히알루론산(hyaluronic acid) 이당류를 동정하였다.
- [0057] 이하에선, 물메기 알로부터 분리정제한 물질(F1, F2, F3 획분)에 의한 피부 미백 효과, 피부 주름 개선 효과, 피부 탄력 증진 효과 및 피부 세포 재생 효과효과를 보여주는 실험 예들을 설명하도록 한다.
- [0058] <실험 예 1> 미백효능의 측정을 위한 Tyrosinase활성 저해능 측정
- [0059] 자외선 조사의 증가는 피부에 기미, 주근깨와 같은 색소 침착, 피부 노화 및 피부암까지도 유발할 수가 있다. 이러한 과색소 침착은 표피 내의 멜라닌 생성세포 (melanocyte)에서 만들어지며(Prota G. 1980. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, J Invest Dermatol 75, 122-127.), tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성을 억제함으로써 멜라닌 색소의 형성을 막아 피부의 색소 침착을 막을 수 있다. Tyrosinase활성 저해능 측정법은 식약청에서 고시한 ‘기능성 화장품 효력을 측정하기 위한 가이드라인’에 따라 실시하였다.
- [0060] Tyrosinase활성 저해능을 실험하기 위하여 물메기 알에서 추출된 획분을 탈이온수에 녹여 0.1, 1, 10, 50 mg/mL의 농도로 희석하였다. 96 Well plate에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 220 μL 와 시료액 20 μL , 그리고 mushroom tyrosinase (1,500~2,000 units/mL, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 용액 20 μL 를 순서대로 넣었다. 여기에 1.5 mM L-tyrosine 용액 40 μL 를 넣고 37°C에서 10분 동안 반응을 시킨 뒤 ELISA microplate reader (SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1987, Inhibition of mushroom-tyrosinase by Aloe extract, Planta Med 53, 515-517.)
- [0061] [Tyrosinase 활성 저해율(%)=100-(시료액의 흡광도/대조군의 흡광도) x 100]
- [0062] 물메기 알 분획물(F1, F2, F3)을 각각 0.1, 1, 10 및 50 mg/mL의 농도로 하여 저해 활성을 측정해 본 결과, F2 획분 50 mg/mL의 농도에서 11.8%의 저해활성을, F3 획분 50 mg/mL의 농도에서는 20.1%의 유의적인 활성 저해능이 나타났다(표 8).

표 8. Tyrosinase inhibition activity of fractions extracted from glassfish eggs

Samples		Tyrosinase inhibition (%) ^a
Ascorbic acid (μg/mL)	10	17.8±10.2*
	50	35.2±7.3*
F1 (mg/mL)	0.1	1.7±2.4
	1	2.8±1.4
	10	3.9±0.9
	50	5.6±1.6
F2 (mg/mL)	0.1	4.4±5.3
	1	6.4±1.4
	10	8.8±2.1
	50	11.8±4.8*
F3 (mg/mL)	0.1	6.2±1.2
	1	5.7±1.4
	10	11.4±2.8
	50	20.1±4.2*

^aEach value represents the mean±SD (n=3) of three independent experiments.

*p<0.05; compared with control group.

[0063]

[0064] <실험 예 2> 미백효능의 측정을 위한 L-DOPA 산화활성 저해능 측정

[0065] 멜라닌 생성 과정을 살펴보면, 멜라닌 생성세포 내의 멜라노솜이라는 소포체에서 먼저 tyrosinase 효소에 의해 티로신이 도파(L-DOPA)를 거쳐 도파퀴논(DOPA quinone)으로 전환되고, 도파퀴논으로부터 자동산화반응과 효소반응으로 도파크롬(DOPA chrome)을 거쳐 공중합체인 멜라닌이 생성된다(Alaluf et al., 2001). 멜라닌 합성과정의 속도결정단계를 촉매하는 tyrosinase의 DOPA 산화반응에 대한 활성저해를 측정하여 미백 성분의 효과를 평가하는 것이다(Choi et al., 2001). 이 과정에서 티로시나아제의 활성이 억제된다면 멜라닌의 생성을 저해할 수가 있다.

[0066] Tyrosinase활성 억제효능 실험과 같이 물메기 알에서 추출된 획분을 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 0.1, 1, 10, 50 mg/mL의 농도로 희석하였다. 시험관에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 850 μL와 시료액 50 μL, 그리고 mushroom tyrosinase (1,500~2,000 units/mL)용액 50 μL를 순서대로 넣고 37℃에서 6분 동안 반응시킨 다음 0.06 mM L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) 50 μL를 넣고 37℃에서 1분 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 ELISA microplate reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다(Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1987, Inhibition of mushroom-tyrosinase by Aloe extract, Planta Med 53, 515-517.).

[0067] [L-DOPA 활성저해율(%) = 100-(시료액의 흡광도/대조군의 흡광도) x 100]

[0068] 물메기 알로부터 분획된 성분을 대상으로 하여 L-DOPA 산화반응 저해활성을 측정하여 표 9에 나타내었다. 추출물의 농도 0.1, 1, 10 및 50 mg/mL에서 분획물 F1의 L-DOPA 산화억제활성은 각각 11.9%, 20.1%, 15.1%, 16.0%, F2의 L-DOPA 산화억제활성은 각각 10.2%, 14.7%, 14.6%, 24.4% 그리고 F3의 L-DOPA 산화억제활성은 각각 16.7%, 17.0%, 14.5%, 28.6%로 나타났다. 특히 F2 및 F3 획분의 50 mg/mL 농도에서는 유의성 있는 결과를 나타내었다(p<0.05).

표 9. L-DOPA oxidation inhibitory activity of fractions extracted from glassfish eggs

Samples (mg/mL)		L-DOPA inhibition (%)
F1	0.1	11.9±0.8
	1	20.1±3.8
	10	15.1±1.1
	50	16.0±1.6
F2	0.1	10.2±3.2
	1	14.7±2.7
	10	14.6±6.3
	50	24.4±5.5*
F3	0.1	16.7±7.1
	1	17.0±5.3
	10	14.5±4.5
	50	28.6±8.2*

^aEach value represents the mean±SD (n=3) of three independent experiments.

*p<0.05; compared with control group.

[0069]

[0070]

<실험 예 3> Collagenase활성 저해능 측정

[0071]

피부의 진피 층은 90%가 콜라겐으로 구성되어 있으며, 생리적인 노화 현상이나 자외선 등에 의해 발생한 활성 산소들에 의해 collagenase의 발현이 증가된다.

[0072]

Collagenase활성 저해능은 EnzChek[®] Gelatinase/Collagenase assay kit (InvitrogenTM, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 사용하였고, substrate로는 DQTM gelatins from pig skin, fluorescein conjugate 를 이용하여 측정하였다. 시료는 96 well plate에 reaction buffer 150 μ L, 농도별 시료 20 μ L, collagenase (10 units/mL) 20 μ L, gelatin (100 μ g/mL) 20 μ L를 가하여 잘 섞어준 후 37℃ 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 실험결과는 fluorescence microplate reader (SpectraMax M2, USA)를 사용하여 495/515 nm에서 측정하였다.

[0073]

물메기 알로부터 분획한 시료의 collagenase 저해효과를 측정한 결과는 표 10과 같다. 구체적으로, 물메기 알로부터 얻어진 F1 분획물에서는 50 mg/mL 농도에서 5.9%를, F3 분획물의 50 mg/mL 농도에서는 10.6%로 유의성이 있는 결과를 나타내었다(p<0.05).

표 10. Collagenase inhibitory activity of fractions extracted from glassfish eggs

Samples (mg/mL)	Collagenase inhibitory activity(%) ^a	
Adenosine	0.1	19.3±0.0*
	1	25.5±0.0*
	10	34.7±0.0*
F1	0.01	—
	0.1	—
	1	—
	10	—
	50	5.9±0.7*
F2	0.01	—
	0.1	—
	1	—
	10	1.6±0.5
	50	1.8±0.6
F3	0.01	1.3±0.4
	0.1	1.2±0.3
	1	2.7±0.7
	10	1.8±0.8
	50	10.6±0.8*

^aEach value represents the mean±SD (n=3) of three independent experiments.

—; trace. *p<0.05; compared with control group.

[0074]

[0075]

<실험 예 4> 진피세포 CCD 986sk 세포독성의 측정

[0076]

세포독성을 확인하기 위하여 CCD 986sk cell (American Type Culture Collection, ATCC, VA, USA)에서 분양받아 96 well plate에 2×10⁴ cells/well의 농도로 100 μL씩 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 시료의 최종 농도가 0.1, 1, 10, 100 및 200 μg/mL가 되도록 조제한 배지를 분주한 세포에 100 μL씩 가하여 24시간 동안 배양하고 세포 생존율을 측정하였다. 세포주의 생존율을 측정하기 위해 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Co., Kumamoto, Japan)을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 시약을 처리한 후 microplate reader (Perkin Elmer 1420, VICTORTM X Multilabel Plate Readers, Waltham, MA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

[0077]

CCD 986sk cell에 대한 처리 농도를 결정하기 위하여 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 활성을 활용하는 법에 의하여 생성된 formazan 양으로 세포의 생존율을 검정하는 MTT assay를 한 결과는 표 11과 같다. CCD 986sk 세포주를 각 well에 넣어준 다음 물메기 알로부터 분획한 시료를 서로 다른 농도(0.1, 1, 10, 50 및 200 μg/mL)로 첨가하여 진피세포 재생효능 및 프로콜라겐 생성 효능을 측정하기 위하여 CCD 986sk cell의 세포 독성을 측정하였다. 그 결과 물메기 알로부터 분획된 시료에서는 농도에 따른 독성은 나타내지 않았다.

표 11. Cell toxicity of fractions extracted from glassfish eggs by CCD 986sk

Samples (μg/mL)		Cell toxicity (%) ^a
Control		100.0±14.0
F1	0.1	101.3±2.2
	1	101.4±2.5
	10	101.6±3.1
	100	106.7±16.1
	200	101.1±5.6
F2	0.1	107.6±2.9
	1	108.4±3.5
	10	104.1±2.1
	100	103.1±2.9
	200	100.9±2.8
F3	0.1	98.9±2.3
	1	101.8±8.3
	10	100.1±2.0
	100	104.2±3.4
	200	103.8±5.6

^aEach value represents the mean±SD (n=3) of three independent experiments.

[0078]

[0079]

<실험 예 5> 진피세포 CCD 986sk cell의 재생효능 측정

[0080]

피부의 진피 층에서는 섬유아세포에 의해 피부 주름과 탄력에 영향을 주는 collagen과 elastine이 합성된다. 또한 피부의 노화 방지에 주요한 역할을 하는 수분의 균형 유지에 관여하는 천연 보습인자인 히알루론산을 합성하는 역할을 한다.

[0081]

세포 증식능을 확인하기 위하여 CCD 986sk cell을 96 well plate에 12% fetal bovine serum (FBS, Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland)이 함유된 IMDM (Iscore's Modified Dulbeccos Medium, Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland) 배지에 1×10⁴ cells/well의 농도로 100 μL씩 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 새로운 배지에 시료를 최종 농도가 0.1, 1, 10, 100 및 200 μg/mL가 되도록 녹여 세포주에 처리한 후 3일 동안 배양하였다. 세포주의 생존율을 측정하기 위해 MTT[(3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 이용하여 ELISA microplate reader(Molecular Devices Co., USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

[0082]

물매기알 추출 분획물의 섬유아세포의 재생효능을 측정하여 표 12에 나타내었고, 매우 높은 피부 재생효능을 확인할 수 있었다. F1은 24시간 배양에서 100 μg/mL 이상의 농도에서 유의적인(p<0.05) 재생효능을 확인할 수 있었고, 48시간의 배양에서는 1 μg/mL 이상의 농도에서 10% 이상의 피부 재생효능을 나타내었다. F2에서도 피부 재생효능을 확인할 수 있었는데 48시간 배양시 200 μg/mL의 농도에서 19.8%의 피부 재생효능을 확인하였다. F3의 경우는 24시간 배양시 1 μg/mL의 농도에서 20%의 재생효능을 보였으며, 농도가 증가함에 따라 높은 재생효능을 확인할 수 있었다. 48시간의 배양에서는 200 μg/mL에서 57%가 넘는 재생효능을 보여 분획물 중에서 가장 높은 활성을 보여주었다. 또한 분획물과 구조적 특성이 가장 유사하다고 여겨진 히알루론산과 재생효능을 비교해본 결과 24시간과 48시간 모두에서 분획물 F1과 비슷한 재생효능을 보여주었고, F3보다는 재생효능이 높지 않았다. 히알루론산보다 높은 재생효능을 나타내어 화장품 원료로서의 활용 가능성이 높은 것으로 추정된다.

[0083]

종래에, 곰피추출물(0.8% methanol) 시료(1,000 mg/mL 함유)를 2배 희석하여 처리한 결과 CCD 986sk 사람피부 계대세포의 수효가 약 200% 더 증가한다고 하여 곰피추출물의 강력한 세포생리 활성효과를 보여준다고 하였지만, 어떤 성분인가에 대하여는 설명이 없었고(Whang EK, Cho MH, Park CS, Kim MH, Park KJ. 2008. In vitro Effect of Ecklonia stolonifera okamura extract on the Cell Growth in CCD-986sk Human Fibroblast and Melanin Formation Inhibition in Clone M-3 Mouse Melanocyte Cell Line. Korean J Environ Biol 26,

30-35.), 노간주나무 ethanol 추출물이 섬유아세포의 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 58.8%의 세포 생존율을 나타내어 실험에 사용할 양을 최소한으로 하였다고 하여(Jun HJ, Lee Y, Kim JH, An BJ, Lee JY. 2013. Anti-wrinkling Effects of Juniperus rigida Sied. Korean J Microbiol Biotechnol 41, 449-455.), 독성 때문에 다량의 시료를 사용할 수 없는 것으로 여겨진다. 그러나 물메기 알에서 분획한 F3 분획물은 고농도에서도 활용이 가능하다는 장점이 있다.

표 12. Cell proliferation of fractions extracted from glassfish eggs by CCD 986sk

Samples ($\mu\text{g/mL}$)		Cell proliferation (%) ^a	
		24 hrs	48 hrs
Control		100.0 $\pm$ 4.1	100.0 $\pm$ 3.7
F1	0.1	104.1 $\pm$ 7.8	108.7 $\pm$ 4.1*
	1	105.6 $\pm$ 13.6	110.5 $\pm$ 7.0*
	10	107.3 $\pm$ 7.5	115.4 $\pm$ 11.3
	100	107.7 $\pm$ 2.8*	124.8 $\pm$ 8.2*
	200	109.4 $\pm$ 4.1*	126.5 $\pm$ 7.2*
F2	0.1	114.6 $\pm$ 2.1*	110.1 $\pm$ 3.9*
	1	107.7 $\pm$ 7.1	110.2 $\pm$ 3.2*
	10	106.9 $\pm$ 6.4	111.0 $\pm$ 11.3
	100	117.1 $\pm$ 10.3*	116.5 $\pm$ 3.4*
	200	125.0 $\pm$ 15.0*	119.8 $\pm$ 4.1*
F3	0.1	111.9 $\pm$ 8.1	113.4 $\pm$ 15.5
	1	120.6 $\pm$ 9.8*	107.9 $\pm$ 6.5
	10	120.9 $\pm$ 5.4*	114.1 $\pm$ 8.6*
	100	136.4 $\pm$ 7.0*	131.2 $\pm$ 9.7*
	200	137.0 $\pm$ 8.7*	157.1 $\pm$ 11.2*
Hyaluronic acid	0.1	104.1 $\pm$ 7.0	106.3 $\pm$ 5.7
	1	104.3 $\pm$ 12.1	115.9 $\pm$ 11.3
	10	113.7 $\pm$ 5.6*	119.0 $\pm$ 9.9*
	100	114.3 $\pm$ 13.5	124.2 $\pm$ 6.8*
	200	119.7 $\pm$ 6.0*	120.1 $\pm$ 4.4*

^aEach value represents the mean $\pm$ SD (n=3) of three independent experiments.

*p<0.05; compared with control group.

<실험 예 6> Procollagen type I C-peptide 생성량의 측정

피부를 이루는 주 단백질인 콜라겐은 피부조직의 진피에 존재하는 섬유아세포에서 합성되는데, 먼저 procollagen이 합성되고 활성 collagen은 procollagen에 결합된 C-peptide가 분해되어 형성된다. 그래서 피부 균질물을 가수분해하여 C-peptide의 함량을 측정하면 활성화된 콜라겐 함량을 측정할 수가 있다(Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM. 1987. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. J Bone Miner Res 2, 427-436.).

콜라겐의 전구물인 프로콜라겐(Procollagen) 생성능을 측정하기 위해, 인간 피부 유래 진피세포인 섬유아세포(CCD 986sk)를 10% FBS가 함유된 IMDM배지(Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였으며, 배양하는 동안 2~3일에 한번 씩 배지를 교환해 주었다. CCD 986sk 는 48 well plate에 10% FBS를 함유한 배지에서 배양한 후, well당 5x 10⁴이 되도록 분주하였다. 24시간 동안 같은 조건으로 배양한 후, FBS free 배지에 시료를 녹여 세포에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 취해 procollagen type 1 C-peptide ELISA kit (Takara Bio, Japan)로 생성량을 측정하여 콜라겐의 생성 정도를 비교하였다.

분획물의 콜라겐 생합성량 변화를 알아보기 위해, 콜라겐의 전구물인 프로콜라겐에서 분리된 C-peptide의 함량

을 측정하여 표 13에 나타내었다. 대조군의 콜라겐 생합성량은 19.8 ng/mL (100%)이었으며, 분획물 F1은 100 μ g/mL과 200 μ g/mL의 농도에서 30% 이상의 높은 콜라겐 생합성 효능을 나타내었다. F2의 경우에도 고농도에서 유의적인 콜라겐 생합성 효능을 확인할 수 있었으나, F1보다는 낮았다. F3의 경우에도 100 μ g/mL 이상의 농도에서 각각 5.1%, 11.0%의 콜라겐 생합성 효능을 보여주었으나 F1에는 미치지 못하는 못하였다. 양성 대조군으로 실험한 히알루론산의 콜라겐 생합성 효능은 10 μ g/mL 이상의 농도에서 19.1%의 높은 생성량 증가를 보여주었으며, 200 μ g/mL 에서는 41.9%가 넘는 높은 생성량의 증가를 보여주었다.

[0089] 종래에, 노간주나무 ethanol 추출물의 collagen 생합성량은 50 μ g/mL 농도에서 51.5%의 촉진효과를 나타내었고 (Jun HJ, Lee Y, Kim JH, An BJ, Lee JY. 2013. Anti-wrinkling Effects of Juniperus rigida Sied. Korean J Microbiol Biotechnol 41, 449-455.), 도화 열수 및 에탄올, 아세톤 추출물의 collagen 생합성량은 100 μ g/mL 에서 27.7%, 37.7%, 41.0%의 효과(Lee JY. 2007. Anti-wrinkle, whitening constituents of Prunus persica Flos and an application for functional cosmetics. Ph.D. dissertation, Daegu Haany University, Gyeongbuk, Korea.)와 구멍갈파래 추출물에 의한 노화된 섬유아세포의 collagen 합성증가는 250 μ g/mL 농도에서 24%였으나 노화세포에서는 103%의 유의적인 증가를 보였다(Ko HJ, Kim GB, Lee DH, Lee GS, Pyo HB. 2013. The Effect of Hydrolyzed Jeju Ulva pertusa on the Proliferation and Type I Collagen Synthesis in Replicative Senescent Fibroblasts. . So. Cosme. Scientists Kore, 39, 177-186.). 이로 미루어볼 때 대부분의 식물성 및 해양성 소재는 섬유아세포의 콜라겐 항상성 파괴 및 기능저하를 효율적으로 방어하여 노화를 지연시키고 주름 개선 화장품 원료로 사용가능한 것으로 나타났으므로 경제성 있으며 쉽게 구할 수 있는 소재로서 활용성이 높을 것으로 여겨진다.

표 13. Procollagen formation of fractions extracted from glassfish eggs by CCD 986sk

Sample (μ g/mL)	Procollagen formation ^a	
	ng/mL	%
Control	19.8 $\pm$ 0.1	100.0 $\pm$ 0.7
F1	0.1	21.3 $\pm$ 0.6
	1	23.4 $\pm$ 2.3
	10	21.0 $\pm$ 1.4
	100	26.6 $\pm$ 1.6*
	200	26.1 $\pm$ 1.9*
F2	0.1	20.4 $\pm$ 0.9
	1	21.1 $\pm$ 0.3*
	10	21.5 $\pm$ 0.7
	100	23.5 $\pm$ 0.2*
	200	21.7 $\pm$ 0.5*
F3	0.1	20.7 $\pm$ 1.8
	1	19.6 $\pm$ 0.1
	10	20.3 $\pm$ 0.3
	100	20.8 $\pm$ 0.1*
	200	22.0 $\pm$ 0.7*
Hyaluronic acid	0.1	20.7 $\pm$ 1.0
	1	22.1 $\pm$ 0.9
	10	22.0 $\pm$ 0.3*
	100	22.0 $\pm$ 0.6*
	200	28.1 $\pm$ 1.5*

^aEach value represents the mean $\pm$ SD (n=3) of three independent experiments.

*p<0.05; compared with control group.

[0090]

[0091] 따라서, 물메기 알 추출물을 함유한 화장품 조성물은, 피부 미백, 피부 세포 재생, 피부 노화 지연, 피부 주름 개선 등의 목적으로 피부에 도포될 수 있다.

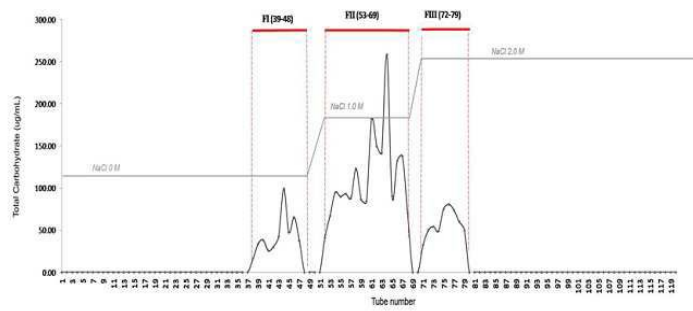
[0092] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서 상기 유효성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으

로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

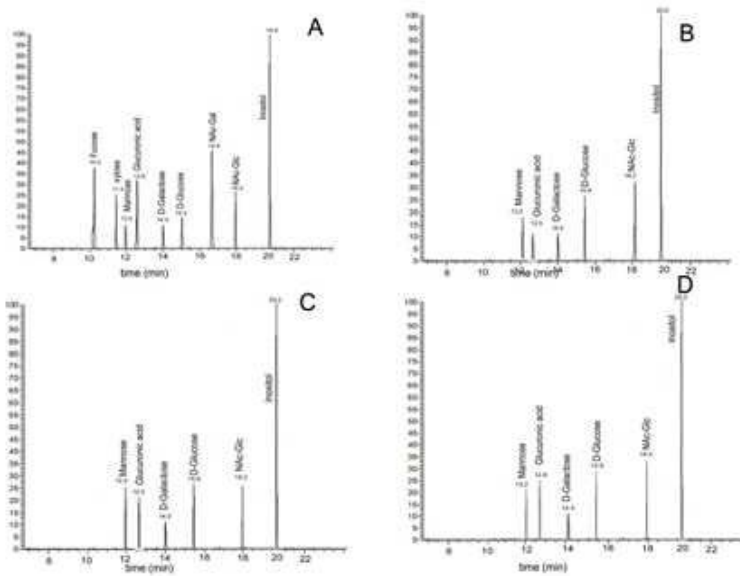
- [0093] 본 발명의 화장료 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0094] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0095] 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.
- [0096] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용될 수 있고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0097] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0098] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0099] 본 발명의 화장료 조성물은 단독 또는 중복 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복도포하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 피부 보호 효과가 우수한 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.
- [0100] 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0101] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시 예에 대하여 설명하였지만, 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 누구든지 본 발명의 기술적 사상 및 범위를 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명의 바람직한 실시 예를 다양하게 변경할 수 있음은 물론이다. 따라서 본 발명은 특허청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어나지 않는다면 다양한 변형 실시가 가능할 것이며, 이러한 변형 실시들은 본 발명의 기술적 사상이나 전망으로부터 개별적으로 이해되어져서는 안될 것이다.

도면

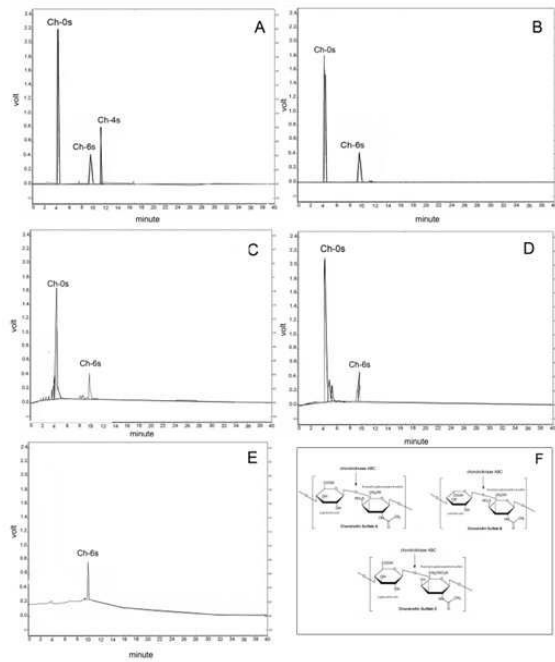
도면1



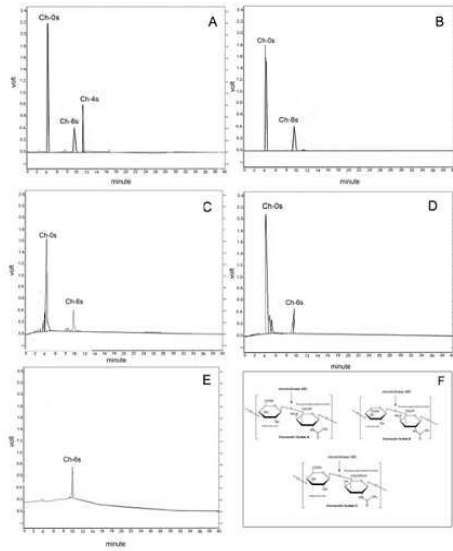
도면2



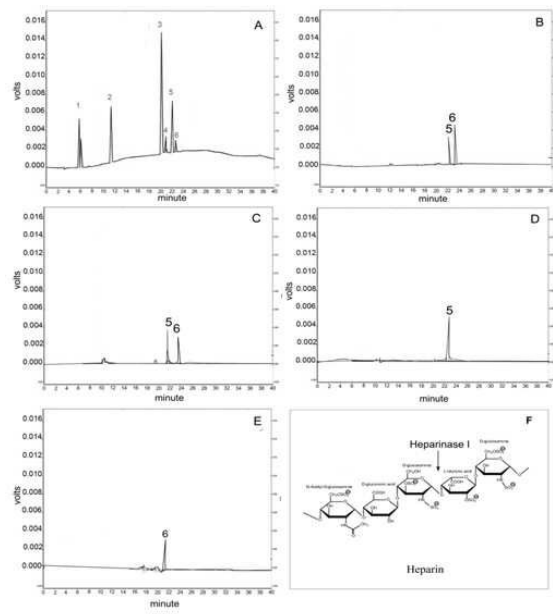
도면3



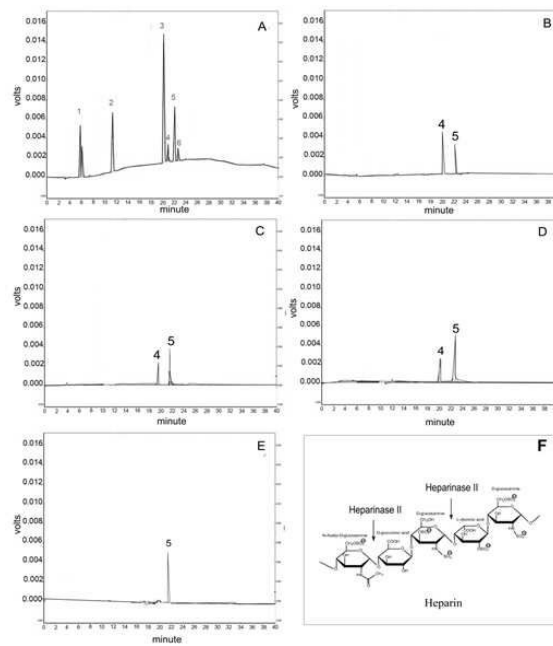
도면4



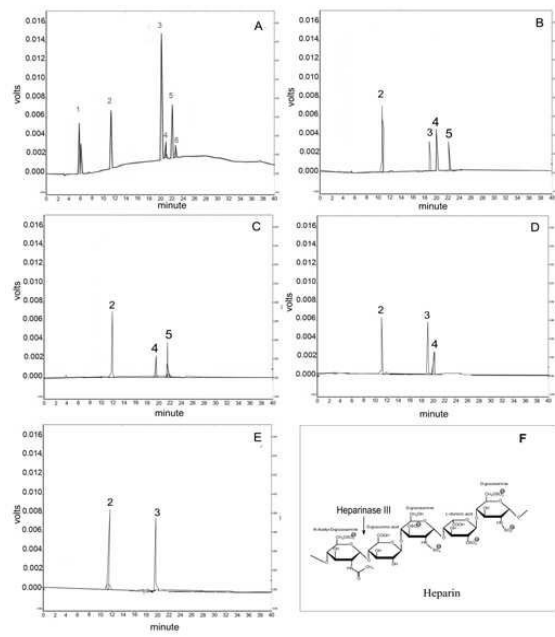
도면5



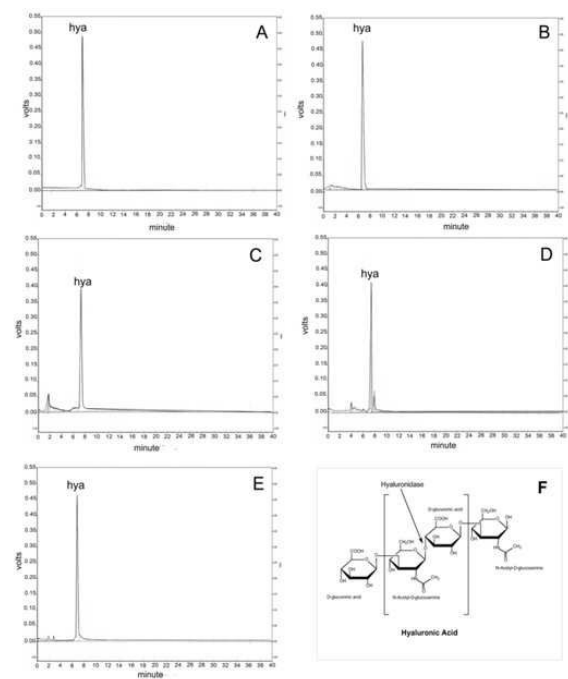
도면6



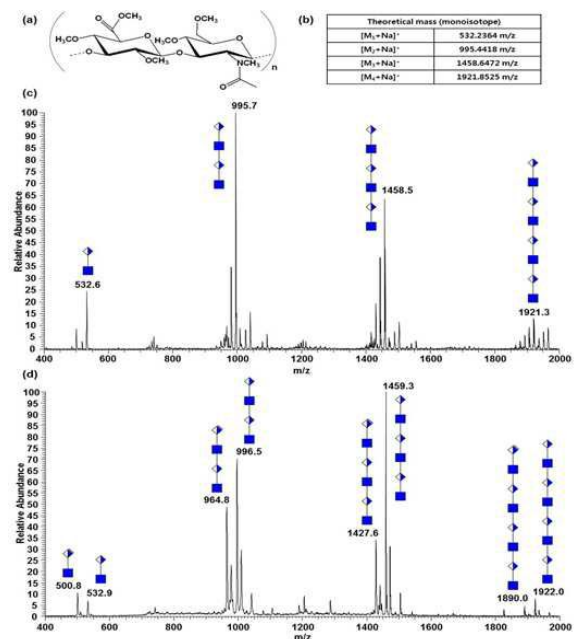
도면7



도면8



도면9



도면10

