(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0020669
(43) 공개일자 2022년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/98 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/988 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0101267
(22) 출원일자 2020년08월12일
심사청구일자 2020년08월12일

(71) 출원인
한국콜마주식회사
세종특별자치시 전의면 덕고개길 12-11, 한국콜마
(72) 발명자
이소정
서울특별시 서초구 헌릉로8길 61(내곡동)
한상근
서울특별시 서초구 헌릉로8길 61(내곡동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 프렌즈

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **프로폴리스 발효추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 발효 및 추출한, 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함함으로써, 현저히 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 구현할 수 있는 화장료 조성물과 이의 제조방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
A61K 2800/522 (2013.01)
A61K 2800/5922 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)
(72) 발명자
최형
서울특별시 서초구 헌릉로8길 61(내곡동)
이승재
서울특별시 서초구 헌릉로8길 61(내곡동)
박정미
서울특별시 서초구 헌릉로8길 61(내곡동)
이상용
서울특별시 서초구 헌릉로8길 61(내곡동)
배연수
서울특별시 서초구 헌릉로8길 61(내곡동)
김재민
서울특별시 서초구 헌릉로8길 61(내곡동)
윤재웅
경기도 수원시 권선구 동수원로145번길 24, 206동 402호(권선동, 수원아이파크시티2단지)
배해병
경기도 화성시 동탄대로9길 19, 2632동 1403호(송동, 동탄2신도시 하우스디 더 레이크)
김현수
경기도 수원시 권선구 장다리로 1, 403호(세류동)
안민정
인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 55, 2104동 901호(송도동, 송도 더샵 마스터뷰 21BL)

명 세 서

청구범위

청구항 1

골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 발효 및 추출한, 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 프로폴리스 복합물은

상기 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 0.1 ~ 5 : 0.1 ~ 5 의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 발효는

상기 프로폴리스 복합물을 락토바실러스 균주로 발효시키는 것임을 특징으로 하는, 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 락토바실러스 균주는

락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 피부 개선은

피부 보습 또는 피부 부드러움성 개선인 것을 특징으로 하는, 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 화장료 조성물은

총 중량 기준으로 상기 프로폴리스 발효추출물을 0.01 ~ 30 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는, 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 화장료 조성물은

유연화장수, 영양화장수, 수렴화장수, 스킨, 로션, 에센스, 세럼, 크림, 마사지 크림, 팩, 메이크업 베이스, 비비크림, 파운데이션, 파우더, 클렌징 폼, 클렌징 크림 및 클렌징 워터로 이루어진 군에서 선택된 하나의 제형인 것을 특징으로 하는, 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물.

청구항 8

골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 준비하는 준비단계;

상기 프로폴리스 복합물을 항아리에 담아 숙성하는 1차발효단계;

상기 1차발효된 발효물에 균주를 접종하여 발효하는 2차발효단계; 및

상기 2차발효된 발효물을 추출하여 프로폴리스 발효추출물을 형성하는 추출단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 프로폴리스 발효추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 프로폴리스는 꿀벌이 자신의 생존과 번식을 위해 여러 식물에서 뽑아낸 수지와 같은 물질에 자신의 침과 효소 등을 섞어서 만든 물질로 러시안 페니실린 또는 천연 페니실린이라고도 불린다. 프로폴리스는 꿀벌이 어떠한 식물을 통해 만드냐에 따라 구성 성분과 그 구성 성분의 함량에 많은 차이가 있으며, 특히, 국가별로 식물의 종류, 기후 등의 조건이 다르기 때문에, 채집 지역에 따라 많은 차이가 있다.

[0003] 통상적으로 프로폴리스는 플라보노이드류, 아미노산, 미네랄 등의 유효 성분을 다량 함유하고 있어, 항산화, 항염증, 면역 활성, 항균, 항암 등의 효과를 구현할 수 있다. 이에 따라, 대한민국 등록특허 제10-1247375호 개시된 바와 같이, 주로 섭취를 통해 인체의 기능을 활성화 시키는 식품, 건강식품 등의 재료로서 활용되고 있다.

[0004] 최근에는 이러한 프로폴리스를 화장료 조성물에 적용하고자 하는 다양한 시도들이 계속되고 있다.

[0005] 일례로, 대한민국 등록특허 제10-1884660호에서는 가수분해 효소처리 프로폴리스, 로얄젤리 및 꿀의 혼합추출물과 카바카바, 강황 및 카카오씨의 효소추출물을 유효성분으로서 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.1 ~ 10 중량% 함유하는 화장료 조성물에 대해 개시하고 있다. 또한, 대한민국 등록특허 제10-1835799호에서는 프로폴리스 추출물, 글리세린, 부틸렌 글라이콜 등을 포함하는 제1 제제와 프로폴리스 추출물, 아데노신, 베타글루칸, 헛개나무 추출물, 녹차 추출물, 검은콩 추출물 등을 포함하는 제2 제제를 동일한 비율로 혼합한 화장품 조성물 및 이를 포함하는 화장품에 대해 개시하고 있다.

[0006] 상기 특허를 비롯한 종래기술에서는 대부분 한 종류의 프로폴리스의 발효물 또는 추출물과 이외 유효 성분들을 혼합하여 피부 미용 효과를 구현하는 점에 대해서만 고려하고 있을 뿐, 서로 다른 종류의 프로폴리스를 혼합하여 사용하는 점에 대해서는 고려하고 있지 않은 실정이다. 즉, 프로폴리스는 식물의 종류, 기후 등에 따라 구성 성분과 그 함량에 현저한 차이가 있으나, 현재까지는 한 종류의 프로폴리스만을 사용하는 기술이 주로 활용되었을 뿐, 구성 성분과 함량이 다른 복수의 프로폴리스를 혼합함으로써 다양한 효과를 구현하기 위한 시도는 부족하였다.

[0007] 이에, 본 발명자는 특성이 서로 다른 복수의 프로폴리스를 구성하고 이를 발효 및 추출하는 조작을 실시하여,

항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 현저히 향상시킨 프로폴리스 발효추출물을 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1247375호

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1884660호

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-1835799호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 첫 번째 목적은 서로 다른 종류의 프로폴리스를 혼합하여 발효 및 추출한 프로폴리스 발효추출물을 포함함으로써, 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과가 현저히 우수한 화장료 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 두 번째 목적은 상기의 프로폴리스 발효추출물을 포함하여 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과가 우수한 화장료 조성물의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 목적은 상기된 바와 같은 기술적 과제로 한정되지 않으며, 이하의 설명으로부터 또 다른 기술적 과제가 도출될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 첫 번째 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 발효 및 추출한, 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는, 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 프로폴리스 복합물은 상기 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 0.1 ~ 5 : 0.1 ~ 5의 중량비로 포함할 수 있다.

[0014] 상기 발효는 상기 프로폴리스 복합물을 락토바실러스 균주로 발효시키는 것일 수 있다.

[0015] 상기 락토바실러스 균주는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 포함할 수 있다.

[0016] 상기 피부 개선은 피부 보습 또는 피부 부드러움성 개선인 것일 수 있다.

[0017] 상기 화장료 조성물은 총 중량 기준으로 상기 프로폴리스 발효추출물을 0.01 ~ 30 중량%로 포함할 수 있다.

[0018] 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 수렴화장수, 스킨, 로션, 에센스, 세럼, 크림, 마사지 크림, 팩, 메이크업 베이스, 비비크림, 파운데이션, 파우더, 클렌징 폼, 클렌징 크림 및 클렌징 워터로 이루어진 군에서 선택된 하나의 제형일 수 있다.

[0019] 상기 두 번째 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 준비하는 준비단계; 상기 프로폴리스 복합물을 항아리에 담아 숙성하는 1차발효단계; 상기 1차발효된 발효물에 균주를 접종하여 발효하는 2차발효단계; 및 상기 2차발효된 발효물을 추출하여 프로폴리스 발효추출물을 형성하는 추출단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 화장료 조성물은 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 발효 및 추출한, 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함함으로써, 현저히 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 구현할 수 있다.

[0021] 특히, 본 발명에서는 서로 다른 종류의 프로폴리스를 혼합하여 사용함으로써, 한 종류의 프로폴리스를 사용한

경우 보다, 더욱 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 구현할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명의 화장료 조성물의 제조방법에 따르면, 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 두 단계에 따라 이중 발효하여 프로폴리스 발효추출물을 수득함으로써, 현저히 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 구현하는 화장료 조성물을 제조할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였다.

[0024] 본 발명의 명세서 및 청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정 해석되지 아니하며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0025] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, "A 및/또는 B"는, A 또는 B, 또는 A 및 B를 의미한다.

[0028] 이하에서 본 발명을 구체적으로 설명하였으나, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] **본 발명에서는 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물을 제공한다.**

[0031] 본 발명의 일 실시예에서는 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 발효 및 추출한, 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함함으로써, 현저히 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 갖는 화장료 조성물을 제공한다.

[0032] 구체적으로, 본 실시예에서는 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 발효 및 추출한 것으로 폴리페놀, 아르테필린 C(Artepillin C) 등 유효 성분의 함량이 높은 프로폴리스 발효추출물을 포함함으로써, 현저히 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 갖는 화장료 조성물을 제공할 수 있다. 특히, 본 실시예에서는 서로 다른 종류의 프로폴리스를 혼합하여 사용함으로써, 한 종류의 프로폴리스를 사용한 경우 보다, 현저히 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 구현할 수 있다.

[0033] 상기 피부 개선 효과를 구현하는 것은, 피부 보습 개선 효과 및 피부 부드러움성 개선 효과를 구현함을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 실시예의 프로폴리스 발효추출물과 이를 포함하는 화장료 조성물은 항산화 및 항염증 효과를 가져, 피부 진피의 기능을 회복시킴으로써, 피부 보습, 피부 안색, 피부 부드러움성을 개선할 수 있다.

[0035] 상기 프로폴리스 복합물은 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함한다.

[0036] 골드프로폴리스(Gold propolis)는 브라운프로폴리스 또는 옐로우프로폴리스로도 불리며, 골드, 브라운 또는 옐로우 계열의 색을 띠는 프로폴리스를 의미한다. 상기 골드프로폴리스는 브라질, 뉴질랜드, 북미, 중국 등 다양한 나라에서 생산된다. 구체적으로, 본 실시예의 골드프로폴리스는 호주산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 그린프로폴리스(Green propolis)는 주로 바카리스 나무(Baccharis plant)의 수지를 주로 이용하여 제조되며, 녹색을 띠는 프로폴리스로서, 플라보노이드와 아르테필린 C(Artepillin C)를 고함량으로 포함하고 있어, 그 자체로 항균, 항암, 항산화 효과를 가질 수 있다. 구체적으로, 본 실시예의 그린프로폴리스는 브라질산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 레드프로폴리스(Red propolis)는 붉은색을 띠는 프로폴리스로서, 브라질 동북부 청정지역에서만 자라는 나무의 빨간 진액을 원료로 삼아 만들어진 것을 의미할 수 있다. 특히, 레드프로폴리스는 골드프로폴리스 및 그린프로

폴리스 보다 폴리페놀 함유량이 더 높고, 항산화 성분인 이소플라본을 포함하고 있어, 항산화, 피부 면역 강화 등의 효과를 가진다. 구체적으로, 본 실시예의 레드프로폴리스는 브라질산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 본 실시예에서는 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 각각 단독으로 포함하지 않고, 색깔이 서로 다른 세 종류의 프로폴리스를 모두 포함함으로써, 본 실시예의 프로폴리스 발효추출물은 폴리페놀, 아르테필린 C 등의 유효 성분을 고함량으로 포함할 수 있다. 이에 따라, 본 실시예의 화장료 조성물은 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 구현할 수 있다.

[0041] 특히, 본 실시예의 프로폴리스 복합물은 상기된 세 종류의 프로폴리스를 포함하되, 상기 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 0.1 ~ 5 : 0.1 ~ 5 의 중량비로 포함할 수 있다. 상기에 따라, 본 실시예의 프로폴리스 복합물이 상기 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 0.1 ~ 5 : 0.1 ~ 5 의 중량비로 포함할 때, 본 실시예의 프로폴리스 발효추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과가 향상될 수 있다.

[0042] 구체적으로, 본 실시예의 프로폴리스 복합물은 상기 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 2 ~ 4 : 1 의 중량비로 포함할 수 있다. 상기에 따라, 본 실시예의 프로폴리스 복합물이 상기 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 2 ~ 4 : 1 의 중량비로 포함할 때, 본 실시예의 프로폴리스 발효추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과가 더욱 향상될 수 있다. 특히, 본 실시예에서는 골드프로폴리스 및 레드프로폴리스 보다 그린프로폴리스를 더 높은 함량으로 포함함으로써, 상기와 같은 효과를 더욱 향상시킬 수 있다.

[0043] 더 구체적으로, 본 실시예의 프로폴리스 복합물은 상기 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 4 : 1 의 중량비로 포함할 수 있다. 상기에 따라, 본 실시예의 프로폴리스 복합물이 상기 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 4 : 1 의 중량비로 포함할 때, 본 실시예의 프로폴리스 발효추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과가 현저히 향상될 수 있다.

[0045] 상기 프로폴리스 발효추출물은 상기 프로폴리스 복합물을 발효 및 추출한 것이다.

[0046] 본 실시예의 프로폴리스 발효추출물은 상기 프로폴리스 복합물을 발효한 뒤 추출함으로써, 수득된 것일 수 있다.

[0047] 구체적으로, 상기 발효는 상기 프로폴리스 복합물에 발효에 적용 가능한 균주를 접종하여 발효함으로써, 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 더 구체적으로, 상기 발효는 상기 프로폴리스 복합물을 항아리에 담아 숙성하여 1차 발효한 뒤, 1차 발효된 발효물에 발효에 적용 가능한 균주를 접종하여 발효시키는 2차 발효함으로써 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 본 실시예의 프로폴리스 발효추출물은 세 종류의 프로폴리스가 혼합된 프로폴리스 복합물을 이중으로 발효함으로써, 폴리페놀, 아르테필린 C 등의 유효 성분을 더욱 고함량으로 함유할 수 있다. 이에, 상기의 프로폴리스 발효추출물을 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과는 현저히 향상될 수 있다.

[0049] 이때, 상기 발효에 적용 가능한 균주는 락토바실러스 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 구체적으로, 상기 발효에 적용 가능한 균주는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 더 구체적으로, 상기 발효에 적용 가능한 균주는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 본 실시예에서는 상기 균주로 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 포함함에 따라, 폴리페놀, 아르테필린 C 등의 유효 성분을 더욱 고함량으로 함유하는 프로폴리스 발효추출물을 제공할 수 있다. 이에 따라, 상기의 프로폴리스 발효추출물을 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과는 현저히 향상될 수 있다.

[0052] 상기 추출은 공지의 모든 추출법에 의해 실시될 수 있으며, 예를 들어, 추출은 열수 추출법, 상온교반 추출법, 환류냉각 추출법, 초음파 추출법, 고온가압 추출법 및 저온고압 추출법으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이

상의 추출법에 의해 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 본 실시예의 화장료 조성물은 상기 화장료 조성물 총 중량 기준으로 상기 프로폴리스 발효추출물을 0.01 ~ 30 중량%, 구체적으로는 0.1 ~ 20 중량%, 더 구체적으로는 1 ~ 10 중량%로 포함할 수 있다. 특히, 본 실시예의 화장료 조성물이 총 중량 기준으로 상기 프로폴리스 발효추출물을 0.01 ~ 30 중량%로 포함할 때, 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과가 우수하면서도 안정한 제형을 가지는 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

[0056] 본 실시예의 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 수렴화장수, 스킨, 로션, 에센스, 세럼, 크림, 마사지 크림, 팩, 메이크업 베이스, 비비크림, 파운데이션, 파우더, 클렌징 폼, 클렌징 크림 및 클렌징 워터로 이루어진 군에서 선택된 하나의 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 공지된 모든 화장료 조성물의 제형으로 구현될 수 있다.

[0057] 본 실시예의 화장료 조성물은 프로폴리스 발효추출물 이외에 각 제형의 제제화에 필요한 부형제 또는 첨가제 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 부형제 또는 첨가제는 계면활성제, 유화제, 유화보조제, 실리콘 폴리머, 안료, 색소, 향료, 방부제, 살균제, 산화안정제, 유기 용매, 증점제, 유연화제, 산화방지제, 자유 라디칼 파괴제, 불투명화제, 안정화제, 에몰리언트, 실리콘, 소포제, 보습제, 비타민, 곤충 기피제, 보존제, 소염제, 충전제, 중합체, 추진제, 염기성화제, 산성화제, 착색제, 농화제, 피부컨디셔닝제, 미백제, 항산화제, 주름 개선제 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] **또한, 본 발명에서는 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.**

[0060] 본 발명의 다른 실시예에서는, 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 준비하는 준비단계; 상기 프로폴리스 복합물을 항아리에 담아 숙성하는 1차발효단계; 상기 1차발효된 발효물에 균주를 접종하여 발효하는 2차발효단계; 및 상기 2차발효된 발효물을 추출하여 프로폴리스 발효추출물을 형성하는 추출단계;를 포함하는, 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0061] 특히, 본 실시예에서는 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 발효 및 추출한 것으로 폴리페놀, 아르테필린 C(Artepillin C) 등 유효 성분의 함량이 높은 프로폴리스 발효추출물을 제조할 수 있다. 이에 따라, 현저히 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 갖는 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

[0062] 특히, 본 실시예에서는 서로 다른 종류의 프로폴리스를 혼합한 프로폴리스 복합물을 추출 및 발효하여 프로폴리스 발효추출물을 제조함으로써, 한 종류의 프로폴리스를 사용한 경우 보다, 현저히 우수한 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과를 구현할 수 있다.

[0064] 이하에서는, 화장료 조성물의 제조방법을 구체적으로 설명하였다.

[0066] (1)골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 준비하는 준비단계;

[0067] 본 실시예의 준비단계에서는 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스 복합물을 준비한다. 이때, 본 실시예의 준비단계는 상온 조건에서 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 구체적으로, 본 실시예의 준비단계에서는 수지 상태의 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 포함하는 프로폴리스를 혼합하여 전처리함으로써, 프로폴리스 복합물을 준비할 수 있다.

[0069] 더 구체적으로, 본 실시예의 준비단계에서는 수지 상태의 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 혼합하고, 이를 유기 용매에 침지하여 왁스를 포함하는 하층과 상층으로 분리한 뒤, 상층을 여과 및 감압 농축하고, 동결건조함으로써, 분말 형태의 프로폴리스 복합물을 준비할 수 있다.

[0070] 상기 유기 용매는 공지의 모든 유기 용매를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 에탄올을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0072] (2)상기 프로폴리스 복합물을 항아리에 담아 숙성하는 1차발효단계;

[0073] 본 실시예의 1차발효단계에서는 상기 준비단계에 따라 준비된 프로폴리스 복합물을 항아리에 담아 숙성하는 1차발효를 실시한다. 특히, 상기 1차발효에서 항아리를 사용할 경우에는 항아리 특유의 통기성으로 인해 인위적인 미생물의 접종 없이도 효소 등의 활성에 의해 충분한 발효가 일어날 수 있다. 이때, 본 실시예의 1차발효단계는 상온 조건에서 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 구체적으로, 본 실시예의 1차발효단계에서는 프로폴리스 복합물을 유기 용매 및 물과 혼합한 뒤, 이를 항아리에 담아 일정 기간 동안 숙성함으로써, 1차발효를 실시할 수 있다. 상기 유기 용매는 공지의 모든 유기 용매를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 1,3-부틸렌 글리콜을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 본 실시예의 1차발효는 5 ~ 10 일, 구체적으로는 6 ~ 8 일 동안 실시될 수 있다. 만약, 상기 1차발효가 5 일 미만으로 실시되거나 10 일을 초과하여 실시될 경우에는, 상기 1차발효가 5 ~ 10일 동안 실시되는 경우 보다, 프로폴리스 발효추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과의 향상이 미미할 수 있다.

[0077] (3)상기 1차발효된 발효물에 균주를 접종하여 발효하는 2차발효단계;

[0078] 본 실시예의 2차발효단계에서는 상기 1차발효단계에 따라 1차발효된 발효물에 발효에 적용 가능한 균주를 접종하여 2차발효를 실시한다.

[0079] 구체적으로, 본 실시예의 2차발효단계에서는 1차발효된 발효물에 락토바실러스 균주를 접종하여 2차발효를 실시할 수 있다. 특히, 발효에 락토바실러스 균주를 이용함으로써, 본 실시예에 따라 제조되는 프로폴리스 발효추출물은 유효 성분을 고함량으로 함유하여, 이의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과는 우수할 수 있다.

[0080] 더 구체적으로, 본 실시예의 2차발효단계에서는 1차발효된 발효물에 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 접종하여 2차발효를 실시할 수 있다. 특히, 발효 균주로서 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 이용함으로써, 본 실시예에 따라 제조되는 프로폴리스 발효추출물은 유효 성분을 고함량으로 함유하여, 이의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과는 더욱 우수할 수 있다.

[0081] 가장 구체적으로, 본 실시예의 2차발효단계에서는 1차발효된 발효물에 락토바실러스 플란타럼 KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 접종하여 2차발효를 실시할 수 있다. 특히, 발효 균주로서 락토바실러스 플란타럼 KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 이용함으로써, 본 실시예에 따라 제조되는 프로폴리스 발효추출물내의 유효 성분 함량이 현저히 증가하여, 이의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과는 현저히 우수할 수 있다.

[0083] 본 실시예의 2차발효는 28 ~ 40 ℃, 구체적으로는 30 ~ 35 ℃ 의 온도 조건에서 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 만약, 본 실시예의 2차발효가 28 ℃ 미만에서 실시되거나 40 ℃ 초과에서 실시될 경우에는, 2차발효가 28 ~ 40 ℃에서 실시되는 경우 보다, 미생물의 활성이 억제되어, 프로폴리스 발효추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과의 향상이 미미할 수 있다.

[0084] 본 실시예의 2차발효는 pH 5.5 ~ 6.8, 구체적으로 pH 6 ~ 6.5 의 pH 조건에서 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 만약, 본 실시예의 2차발효가 pH 5.5 미만에서 실시되거나 pH 6.8 초과에서 실시될 경우에는, pH 5.5 ~ 6.8 인 경우 보다, 미생물의 활성이 억제되어, 프로폴리스 발효추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과의 향상이 미미할 수 있다.

[0085] 본 실시예의 2차발효는 5 ~ 10 일, 구체적으로는 6 ~ 8 일 동안 실시될 수 있다. 만약, 상기 2차발효가 5 일 미만으로 실시되거나 10 일을 초과하여 실시될 경우에는, 상기 2차발효가 5 ~ 10 일 동안 실시되는 경우 보다, 프로폴리스 발효추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물의 항산화, 항염증 또는 피부 개선 효과의 향상이 미미할 수 있다.

[0087] (4)상기 2차발효된 발효물을 추출하여 프로폴리스 발효추출물을 형성하는 추출단계;

[0088] 본 실시예의 추출단계에서는 상기 2차발효단계에 따라 2차발효된 발효물을 추출하여 프로폴리스 발효추출물을 형성한다.

[0089] 구체적으로, 본 실시예의 추출단계에서는 상기 2차발효단계에 따라 2차발효된 발효물을 열수 추출법, 상온교반 추출법, 환류냉각 추출법, 초음파 추출법, 고온가압 추출법 및 저온고압 추출법으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 추출법으로 추출한 뒤, 액상 성분을 여과하여 제거함으로써, 프로폴리스 발효추출물을 형성할 수 있다.

[0090] 더 구체적으로, 본 실시예의 추출단계에서는 상기 2차발효단계에 따라 2차발효된 발효물을 초음파 추출법으로 추출한 뒤, 액상 성분을 여과하여 제거함으로써, 프로폴리스 발효추출물을 형성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 초음파 추출은 15 ~ 20 ℃ 의 온도 조건에서 20 ~ 40 kHz 의 주파수로 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0092] 상기에 따라 수득된 프로폴리스 발효추출물에는 공지의 후처리가 더 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 후처리는 동결건조, 고온건조, 분쇄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0094] 이 후, 상기에 따라 수득된 프로폴리스 발효추출물에 제형의 제제화에 필요한 부형제 또는 첨가제 등을 혼합함으로써, 화장료 조성물을 제조할 수 있다.

[0095] 예를 들어, 상기 부형제 또는 첨가제는 계면활성제, 유화제, 유화보조제, 실리콘 폴리머, 안료, 색소, 향료, 방부제, 살균제, 산화안정제, 유기 용매, 증점제, 유연화제, 산화방지제, 자유 라디칼 파괴제, 불투명화제, 안정화제, 에몰리언트, 실리콘, 소포제, 보습제, 비타민, 곤충 기피제, 보존제, 소염제, 충전제, 중합체, 추진제, 염기성화제, 산성화제, 착색제, 농화제, 피부컨디셔닝제, 미백제, 항산화제, 주름 개선제 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0097] 본 실시예의 화장료 조성물의 제조방법은 상기의 '프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물'의 내용을 모두 포함한다.

[0099] 이하 실시예, 비교예, 및 실험예를 통하여 본 발명의 프로폴리스 발효추출물을 유효 성분으로 포함하는 항산화, 항염증 또는 피부 개선용 화장료 조성물 및 이의 제조방법에 대해 구체적으로 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0101] **[제조예 1 내지 9 : 프로폴리스 복합물의 준비]**

[0102] (1) 프로폴리스 복합물의 준비

[0103] 표 1[단위 : 중량비]에 따라 세 종류의 프로폴리스를 혼합하였다. 이 후, 혼합물을 에탄올에 침지시킨 다음, 원심분리하여 하층의 왁스상을 제거한 뒤, 상층을 여과하여 여과물을 수득하였다. 이때, 세 종류의 프로폴리스의 총 량은 동일하였다.

[0105] 상기에 따르는 프로폴리스 복합물의 준비는 하기 조건에서 실시되었다.

[0107] - 온도 : 40 ~ 50 ℃

[0108] - 교반 속도 : 50 ~ 100 rpm

[0109] - 진공도 : 750 mmHg

[0111] 이어서, 상기 여과물을 감압 농축하여 용매를 휘발시킨 다음, 이를 동결건조하여 프로폴리스 복합물(시료)을 준비하였다.

표 1

[0113]

	골드프로폴리스 (호주산)	그린프로폴리스 (브라질산)	레드프로폴리스 (브라질산)
제조예1	1	0.5	0.5
제조예2	1	2	1
제조예3	1	1	2
제조예4	1	0.3	0.3
제조예5	1	3	1
제조예6	1	1	3
제조예7	1	0.25	0.25
제조예8	1	4	1
제조예9	1	1	4

[0115] **[실시예 1 내지 9 : 락토바실러스 플란타럼 균주를 이용한 프로폴리스 발효추출물의 제조]**

[0116] 상기 제조예 1 내지 9에 따라 준비된 프로폴리스 복합물을 이용하여 하기에 따라 발효함으로써, 프로폴리스 발효추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물을 제조하였다.

[0118] **실시예 1**

[0119] (2)1차발효

[0120] 상기에 따라 준비된 제조예 1의 프로폴리스 복합물을 각각 항아리에 담아 7 일 동안 숙성시키면서 1차 발효를 실시하였다. 이때, 프로폴리스 복합물과 유기 용매 및 물을 혼합하여 사용하였으며, 이의 총량 기준으로 하여 상기 프로폴리스 복합물(분말) 1 중량%, 1,3-부틸렌 글라이콜 10 중량% 및 물 89 중량%를 혼합하여 발효를 실시하였다.

[0122] (3)2차발효

[0123] 상기에 따라 형성된 제조예 1의 1차 발효물 각각에 락토바실러스 플란타럼을 접종하여 7 일 동안 2차 발효를 실시하였다. 이때, 상기 2차 발효는 MRS Broth 배지(Difco 사)를 1L 당 55 g 투입한 뒤, 약 30 ~ 35 ℃ 및 pH 6 ~ 6.5 조건에서 7 일 동안 방치하면서 실시하였다.

[0124] 상기 2차발효에 이용된 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)은 하기의 것을 사용하였으며, 상기 1차 발효물에 대해 락토바실러스 플란타럼 0.5 ~ 1 %(농도 : 2×10^5 cfu/ml)로 접종하였다.

[0126] - 분양처 : KCTC(한국생물자원센터)

[0127] - 균주 번호 : 3108

[0129] (4)추출

[0130] 상기에 따라 형성된 제조예 1의 2차 발효물 각각을 초음파 추출한 뒤, 이를 여과함으로써, 최종적으로 실시예 1의 프로폴리스 발효추출물을 수득하였다. 상기 초음파 추출은 15 ~ 20 ℃ 의 온도에서 약 20 ~ 40 kHz 의 주파수 조건으로 2 시간 동안 실시되었다.

[0131] 상기 여과는 2차 발효물 각각을 초음파 추출한 뒤, 이를 순서대로 GFC(1 ~ 3 ㎛ 필터지), 0.8 ㎛ 필터지 및 0.2 ㎛ 필터지로 여과함으로써, 실시되었다.

[0133] **실시예 2 내지 9**

[0134] 상기와 동일하게 제조예 2 내지 9의 프로폴리스 복합물을 이용하여 실시예 2 내지 9 의 프로폴리스 발효추출물을 제조하였다.

[0136] - 실시예 2 : 제조예 2 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0137] - 실시예 3 : 제조예 3 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0138] - 실시예 4 : 제조예 4 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0139] - 실시예 5 : 제조예 5 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0140] - 실시예 6 : 제조예 6 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0141] - 실시예 7 : 제조예 7 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0142] - 실시예 8 : 제조예 8 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0143] - 실시예 9 : 제조예 9 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0145] **[실시예 10 내지 18 : 락토바실러스 플란타럼KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 이용한 프로폴리스 발효추출물의 제조]**

[0146] **실시예 10**

[0147] 제조예 1을 이용하되, 발효 균주로서 락토바실러스 플란타럼KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 프로폴리스 발효추출물을 제조하였다.

[0148] 상기 발효에 이용된 락토바실러스 플란타럼KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)의 기탁 기관은 다음과 같다.

[0150] - 기탁 기관 : 국립농업과학원 농업유전자자원센터

[0152] **실시예 11 내지 18**

[0153] 제조예 2 내지 9를 이용하여 실시예 10과 동일하게 프로폴리스 발효추출물을 제조하였다.

[0155] - 실시예 11 : 제조예 2 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0156] - 실시예 12 : 제조예 3 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0157] - 실시예 13 : 제조예 4 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0158] - 실시예 14 : 제조예 5 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0159] - 실시예 15 : 제조예 6 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0160] - 실시예 16 : 제조예 7 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0161] - 실시예 17 : 제조예 8 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0162] - 실시예 18 : 제조예 9 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0164] **[비교제조예 1 내지 3 : 프로폴리스 복합물의 준비]**

[0165] (1) 프로폴리스의 준비

[0166] 표 2[단위 : 중량비]에 따라 프로폴리스를 준비한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일하게 실시하였다.

표 2

[0168]

	골드프로폴리스	그린프로폴리스	레드프로폴리스
비교제조예1	1	-	-
비교제조예2	-	1	-
비교제조예3	-	-	1

[0170] **비교예 1 내지 3**

[0171] 비교제조예 1 내지 3의 프로폴리스를 각각 이용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0173] - 비교예 1 : 비교제조예 1 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0174] - 비교예 2 : 비교제조예 2 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0175] - 비교예 3 : 비교제조예 3 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0177] **비교예 4 내지 6**

[0178] 비교제조예 1 내지 3의 프로폴리스를 각각 이용한 것을 제외하고는 실시예 10과 동일하게 실시하였다.

[0180] - 비교예 4 : 비교제조예 1 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0181] - 비교예 5 : 비교제조예 2 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0182] - 비교예 6 : 비교제조예 3 의 프로폴리스 복합물 이용하여 제조

[0184] **[실험예]**

[0185] **실험예 1 : DPPH 라디칼 소거능(항산화)**

[0186] 상기 제조예 및 비교제조예의 프로폴리스 복합물(프로폴리스)과 실시예 및 비교예의 프로폴리스 발효추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 하기에 따라 평가한 뒤, 그 결과를 표 3[단위 : %]에 나타내었다.

[0188] 이때, DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같이 평가되었다.

[0189] 먼저, 시료 100 ㎕ 에 50 mM 의 DPPH 용액 50 ㎕ 을 가한 뒤, 상온에서 약 30 분 동안 반응시켜 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid(500 ㎍/㎖)를 사용하였으며, 각 시료의 DPPH 라디칼 소거

능은 아래의 식에 의해 계산하였다.

[0190] 상기 대조군인 L-ascorbic acid의 경우, 약 87.26 % 의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다.

[0192] DPPH 라디칼 소거능(%) = (1-시료 무첨가군의 흡광도/무처리군의 흡광도) * 100

표 3

[0194]

발효 전		락토바실러스 플란타럼 균주로 발효 후		락토바실러스 플란타럼KCC-32 (수탁번호 : KACC92135P)균주로 발효 후	
제조예1	37.74	실시예1	70.14	실시예10	76.13
제조예2	63.23	실시예2	80.32	실시예11	81.13
제조예3	53.39	실시예3	72.50	실시예12	78.71
제조예4	43.06	실시예4	71.35	실시예13	72.10
제조예5	59.03	실시예5	87.16	실시예14	88.06
제조예6	51.13	실시예6	72.68	실시예15	73.39
제조예7	43.55	실시예7	68.93	실시예16	70.65
제조예8	62.74	실시예8	96.41	실시예17	97.10
제조예9	48.39	실시예9	67.54	실시예18	71.61
비교제조예1	39.19	비교예1	50.10	비교예4	60.00
비교제조예2	33.55	비교예2	54.32	비교예5	66.45
비교제조예3	33.87	비교예3	59.65	비교예6	66.77

[0196] 표 3을 보면, 발효 전의 프로폴리스 복합물인 제조예 1 내지 9 보다, 발효를 실시한 실시예 1 내지 18 의 경우, DPPH 라디칼 소거능이 더 향상됨을 알 수 있다. 특히, 실시예 1 내지 9 및 실시예 10 내지 18을 비교하여 볼 때, 발효 균주로서 락토바실러스 플란타럼 KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 사용한 경우 그 효과가 현저히 향상됨을 알 수 있다.

[0197] 또한, 실시예 1 내지 18 및 비교예 1 내지 6을 비교하여 볼 때, 세 종류의 프로폴리스를 혼합하여 사용할 경우에 DPPH 라디칼 소거능이 더 우수함을 알 수 있다. 특히, 실시예 1 내지 18을 보면, 세 성분을 포함하되, 골드 프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 2 ~ 4 : 1의 중량비로 포함할 때, 그 효과가 더욱 향상됨을 알 수 있다.

[0199] **실험예 2 : 총 폴리페놀 함량 분석(항산화/항염증)**

[0200] 시료 50 ㎕ 에 Folin-ciocalteu reagent 50 ㎕ 를 혼합하고 암전 및 실온 조건에서 약 5 분간 반응시킨 다음, 여기에 10 % Na_2CO_3 용액을 50 ㎕ 처리하였다. 이어서, 실온에서 약 1 시간 동안 반응시킨 뒤, 640 nm 에서 흡광도를 측정하여, 총 폴리페놀 함량을 측정한 뒤, 그 결과를 표 4[단위 : mg/g]에 나타내었다.

[0201] 이때, 표준물질로는 Tannic acid(sigma chemical co.)를 사용하였다.

표 4

[0203]

발효 전		락토바실러스 플란타럼 균주로 발효 후		락토바실러스 플란타럼KCC-32 (수탁번호 : KACC92135P)균주로 발효 후	
제조예1	191.14	실시예1	348.00	실시예10	381.73
제조예2	179.37	실시예2	369.96	실시예11	398.20
제조예3	184.86	실시예3	329.18	실시예12	372.31
제조예4	155.84	실시예4	318.20	실시예13	370.75
제조예5	186.43	실시예5	368.39	실시예14	386.43
제조예6	184.08	실시예6	329.18	실시예15	372.31
제조예7	162.90	실시예7	309.57	실시예16	370.75
제조예8	201.33	실시예8	387.22	실시예17	427.22
제조예9	183.29	실시예9	327.61	실시예18	372.31
비교제조예1	146.43	비교예1	213.49	비교예4	283.29
비교제조예2	149.57	비교예2	266.82	비교예5	294.27
비교제조예3	140.94	비교예3	219.76	비교예6	255.06

[0205] 표 4를 보면, 발효 전의 프로폴리스 복합물인 제조예 1 내지 9 보다, 발효를 실시한 실시예 1 내지 18 의 경우, 총 폴리페놀 함량이 증가함을 알 수 있다. 특히, 실시예 1 내지 9 및 실시예 10 내지 18을 비교하여 볼 때, 발효 균주로서 락토바실러스 플란타럼 KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 사용한 경우, 총 폴리페놀 함량이 현저히 향상됨을 알 수 있다.

[0206] 또한, 실시예 1 내지 18 및 비교예 1 내지 6을 비교하여 볼 때, 전체 프로폴리스의 총 량은 동일하더라도 세 종류의 프로폴리스를 혼합하여 사용할 경우에 총 폴리페놀 함량이 높음을 알 수 있다. 특히, 실시예 1 내지 18을 보면, 세 성분을 포함하되, 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 2 ~ 4 : 1의 중량비로 포함할 때, 총 폴리페놀 함량이 현저히 증가함을 알 수 있다.

[0208] **실험예 3 : 아르테필린 C 함량 분석**

[0209] 시료를 High performance liquid chromatography (HPLC, YL9100 HPLC system; Younglin Instruments CO., Ltd., Gyeonggi, Korea) 로 분석하여, 시료 내의 아르테필린 C의 함량을 측정하고, 그 결과를 표 5[단위 : ppm]에 나타내었다. 이때, 체류시간 37 분에서 아르테필린 C가 검출되었다.

[0211] HPLC분석 조건은 다음과 같다.

[0212] - 분석 기기 : YL 9100 HPLC

[0213] - 분석 칼럼 : YL C18-4E (4.6 x 250mm) 5㎛

[0214] - 유량 : 1.0 ml/min(주입량 : 20 ㎕)

[0215] - 주입 농도 : 1000, 500, 250, 125, 62.5 ppm in Ethanol

[0216] - 검출 조건 : UV, 314 nm

[0217] - 칼럼 온도 : 40 ℃

[0218] - 이동상 : 2% Acetic acid in Acetonitrile 용매

표 5

[0220]

발효 전		락토바실러스 플란타럼 균주로 발효 후		락토바실러스 플란타럼KCC-32 (수탁번호 : KACC92135P)균주로 발효 후	
제조예8	0.557	실시예8	129.9635	실시예17	135.751
비교제조예1	0.011	비교예1	0.074	비교예4	0.018
비교제조예2	0.025	비교예2	16.907	비교예5	23.229
비교제조예3	0.095	비교예3	0.217	비교예6	0.068

[0222] 표 5를 보면, 발효 전의 프로폴리스 복합물인 제조예 8 보다, 발효를 실시한 실시예 8 및 17 의 경우, 아르테필린 C 함량이 높음을 알 수 있다. 특히, 실시예 8 및 17 을 비교하여 볼 때, 발효 균주로서 락토바실러스 플란타럼 KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 사용한 경우, 아르테필린 C 함량이 현저히 증가함을 알 수 있다.

[0223] 또한, 실시예 8 및 17과 비교예 1 내지 6을 비교하여 볼 때, 전체 프로폴리스의 총 량은 동일하더라도 세 종류의 프로폴리스를 혼합하여 사용할 경우에 아르테필린 C의 함량이 높음을 알 수 있다.

[0225] **실험예 4 : NO 생성 저해능**

[0226] Nitric oxide(NO) 함량은 cell의 supernatant에서의 nitric oxide(NO)의 생성량을 측정하였다. Nitrate로 환원된 후의 nitrite를 griess reagent(Sigam, USA)로 사용하였으며, 6 well plate에 2 X 10^6 개의 cell을 confluence 가 80% 일 때, PBS 로 2 번 washing 한 후, serum free 배지를 사용하여 12 시간 이상 배양시키고, LPS(lipopolysaccharide) 10 ㎍/ml을 처리하여 반응시켰다. 이어서, 약 2 시간이 지난 후, 시료(처리 농도 : 1 %)를 처리하여 실험하였다.

[0227] NO 생성량은 24 시간 후, supernatant를 모아 griess reagent로 30 분간 반응시킨 다음, 540nm에서 흡광도로 측정하였으며, 이를 통해 NO 생성 저해능을 계산하여 표 6[단위 : %]에 나타내었다.

표 6

[0229]

발효 전		락토바실러스 플란타럼 균주로 발효 후		락토바실러스 플란타럼KCC-32 (수탁번호 : KACC92135P)균주로 발효 후	
제조예1	20.36	실시예1	39.98	실시예10	41.94
제조예2	27.61	실시예2	42.81	실시예11	47.26
제조예3	21.46	실시예3	36.56	실시예12	38.41
제조예4	24.33	실시예4	35.45	실시예13	39.06
제조예5	28.41	실시예5	48.77	실시예14	52.36
제조예6	17.35	실시예6	36.48	실시예15	38.48
제조예7	24.31	실시예7	37.65	실시예16	40.14
제조예8	27.31	실시예8	57.46	실시예17	59.56
제조예9	19.40	실시예9	33.43	실시예18	38.91
비교제조예1	16.58	비교예1	27.65	비교예4	27.98
비교제조예2	19.81	비교예2	28.54	비교예5	30.34
비교제조예3	15.40	비교예3	17.65	비교예6	18.58

[0231] 표 6을 보면, 발효 전의 프로폴리스 복합물인 제조예 1 내지 9 보다, 발효를 실시한 실시예 1 내지 18 의 경우, NO 생성 저해능이 향상됨을 알 수 있다. 특히, 실시예 1 내지 9 및 실시예 10 내지 18을 비교하여 볼 때, 발효 균주로서 락토바실러스 플란타럼 KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)를 사용한 경우, NO 생성 저해 효과가 현저히 향상됨을 알 수 있다.

[0232] 또한, 실시예 1 내지 18 및 비교예 1 내지 6을 비교하여 볼 때, 전체 프로폴리스의 총 량은 동일하더라도 세 종류의 프로폴리스를 혼합하여 사용할 경우에 NO 생성 저해능이 향상됨을 알 수 있다. 특히, 실시예 1 내지 18을 보면, 세 성분을 포함하되, 골드프로폴리스, 그린프로폴리스 및 레드프로폴리스를 1 : 2 ~ 4 : 1의 중량비로 포함할 때, NO 생성 저해능이 현저히 향상됨을 알 수 있다.

[0234] **실험예 5 : TNF-α 활성 억제능**

[0235] 96 well plate에 1 X 10^4 cell/well의 섬유아세포(Fibroblast HS86)을 24시간 동안 배양하였다. 이후 serum free 배지로 교체하고 100 mM H_2O_2 를 30 분 처리한 다음, 시료를 농도 별로 처리하고, 약 24 시간 동안 배양하였다.

[0236] 이때, 양성대조군으로서 dexamethasone을 0.1%, 0.5% 및 1.0% 농도로 처리하였다. 무처리의 비교 배양액과 비교하여 시료(프로폴리스 발효추출물)을 처리한 배양액의 TNF-α의 농도(%)를 분석하였다.

[0237] 이때, 상기 TNF-α는 ELISA 법으로 측정하였으며, TNF-α 억제율(%)에 대한 결과를 표 7[단위 : %]에 나타내었다.

표 7

[0239]

		시료 농도(%)		
		0.1	0.5	1
락토바실러스 플란타럼 KCC-32 (수탁번호 : KACC92135P) 균주로 발효 후	실시예17	52.16	89.82	95.14
	비교예4	49.78	80.27	90.76
	비교예5	47.28	73.63	82.76
	비교예6	43.87	75.34	80.76
Dexamethasone		69.81	72.68	78.64

[0241] 표 7을 보면, 본 실시예에 따를 경우, TNF-α 억제 효과가 현저히 우수함을 알 수 있다.

[0243] **실험예 6 : 세포 보호능 평가**

[0244] 산화에 의한 시료의 세포에 보호효과는 MTT assay 방법을 응용하여 분석하였다.

[0245] 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 방법으로, 96 well plate에 1 X 10^4 cell/well의 섬유아세포(Fibroblast HS86)을 24시간 동안 배양하였다. 이후, serum free 배지로 교환하고 24 시간 배양 후, 100 mM의 H_2O_2를 30 분간 반응하였다. 이어서, 시료를 농도별로 처리하여 Well 당 20 ㎕의 MTT용액을 처리한 다음, 37 ℃ 5 % CO_2 조건하에서 4시간 동안 반응시킨 뒤, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도 변화를 측정하고, 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하여, 그 결과를 표 8[단위 : %]에 나타내었다.

[0246]

표 8

[0247]

		시료 농도(%)		
		0.1	0.5	1
락토바실러스 플란타럼 KCC-32 (수탁번호 : KACC92135P) 균주로 발효 후	실시예17	83.45	86.95	95.84
	비교예4	76.84	79.84	82.47
	비교예5	78.37	81.79	89.76
	비교예6	77.67	80.64	85.48
무처리군		100		
H_2O_2 500mM		68.24		

[0249] 표 8을 보면, 실시예 17 과 비교예 4 내지 6을 비교하여 볼 때, 전체 프로폴리스의 총 량은 동일하더라도 세 종류의 프로폴리스를 혼합하여 사용할 경우에 세포 보호 효과가 향상됨을 알 수 있다.

[0251] **[제형예]**

[0252] **제형예 1 : 크림**

[0253] 표 9[단위 : 중량%]에 따라 실시예 및 비교예의 프로폴리스 발효추출물을 포함하는 화장료 조성물을 제조하였다.

표 9

[0255]

원료명	함량(%)
실시예 또는 비교예의 프로폴리스 발효추출물	1
잔탄검	0.2
부틸렌글라이콜	10
글리세린	3
솔비탄올리베이트	2
카보머	미량
폴리솔베이트 80	1.5
세틸알코올	1
피이지-60 글리세릴스테아레이트	0.5
디메치콘	3
포도씨오일	4
시어버터	미량
알지닌	미량
1,2-헥산다이올	2
정제수	to. 100

[0257] **제형예 2 : 세럼**

[0258] 표 10[단위 : 중량%]에 따라 실시예 및 비교예의 프로폴리스 발효추출물을 포함하는 화장료 조성물을 제조하였다.

표 10

[0260]

원료명	함량(%)
실시예 또는 비교예의 프로폴리스 발효추출물	1
부틸렌글라이콜	10
하이드록시에틸셀룰로오스	미량
소듐시트레이트	미량
폴리솔베이트 80	1.5
카보머	미량
알지닌	미량
Alcohol	3
피이지-40 하이드로제네이티드캐스터오일	0.4
1,2-헥산다이올	2
WATER	to. 100

[0262] **실험예 7 : 화장료 조성물의 제형 안정성 평가**

[0263] 상기에 따라 제조된 화장료 조성물(크림 제형)의 안정성을 평가하여, 그 결과를 표 11에 나타내었다.

[0264] 안정성은 화장료 조성물을 각 온도에서 80 일 동안 방치한 뒤, 이의 제형 안정성을 육안으로 관찰하여 평가하여, 그 결과를 표 11에 나타내었다.

[0265] 구체적으로, 제형의 층분리가 없고, 변색 및 변취가 없는 경우에는 '없음'으로 표기하였으며, 제형의 층분리, 변색 또는 변취가 발생된 경우에는 '변화'로 표기하였다.

표 11

[0267]

		0℃	25℃	35℃	50℃
락토바실러스 플란타럼KCC-32(수탁번호 : KACC92135P)균주로 발효 후	실시예17	없음	없음	없음	없음

[0269] 표 11을 보면, 본 실시예에 따를 경우, 제형이 안정함을 알 수 있다.

[0271] **실험예 8 : 화장료 조성물의 피부 개선 효과 평가**

[0272] 상기에 따라 제조된 화장료 조성물(크림 제형)을 피부에 직접 도포하여, 피부 상태 개선의 정도를 하기에 따라 평가한 뒤, 그 결과를 표 12[단위 : 점수] 및 13에 나타내었다.

[0274] 실험은 각 그룹(여성 20 명으로 구성)에 세안 직후, 1 일 2 회로, 약 2 주 동안 도포하도록 하였으며, 피부 보습 개선 효과를 1 ~ 5 점으로 평가하도록 한 뒤, 그 평균값을 표 12에 나타내었다. 이때, 5 점에 가까울수록 피부 보습 효과가 우수함을 의미한다.

[0276] 또한, 상기와 동일한 방법으로 피부 부드러움성 개선 효과를 1 ~ 5 점으로 평가하도록 한 뒤, 그 평균값을 표

13에 나타내었다. 이때, 5 점에 가까울수록 피부 부드러움 개선 효과가 우수함을 의미한다.

표 12

[0278]

		피부 보습 개선
락토바실러스 플란타럼KCC-32 (수탁번호 : KACC92135P)균주로 발효 후	실시예17	4.10
	비교예4	2.95
	비교예5	3.15
	비교예6	2.75

표 13

[0280]

		피부 부드러움성 개선
락토바실러스 플란타럼KCC-32 (수탁번호 : KACC92135P)균주로 발효 후	실시예17	4.00
	비교예4	2.50
	비교예5	2.80
	비교예6	2.75

[0282] 표 12 및 13을 보면, 본 실시예에 따를 경우, 피부 보습 개선 효과와 피부 부드러움성 개선 효과가 우수함을 확인할 수 있다. 즉, 본 실시예에 따를 경우에는, 피부에 보습을 부여하고, 피부 표면을 부드럽게 하여, 피부의 상태를 개선함을 의미한다.

[0284] 실험예 1 내지 8을 보면, 본 실시예에 따르는 프로폴리스 발효추출물은 DPPH 라디칼 소거능이 우수하면서도 폴리페놀 및 아르테필린 C를 고함량으로 포함함에 따라, 항산화 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0285] 또한, 본 실시예에 따르는 프로폴리스 발효추출물은 NO 생성 및 TNF-α 활성을 억제하면서도 폴리페놀 및 아르테필린 C를 고함량으로 포함함에 따라, 항염증 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0286] 또한, 본 실시예에 따르는 프로폴리스 발효추출물은 DPPH 라디칼 소거능, NO 생성 억제능 및 TNF-α 활성 억제능이 우수하면서도 폴리페놀, 아르테필린 C 등의 유효 성분을 고함량으로 포함함에 따라, 피부 상태를 개선함을 알 수 있다.

[0287] 즉, 상기 내용을 종합할 때, 본 실시예에 따르는 프로폴리스 발효추출물은 세포 손상이 없으면서도 우수한 항산화, 항염증 및 피부 개선 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0289] 전술한 바와 같이, 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0290] 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.