



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0035561
(43) 공개일자 2019년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9794 (2017.01) A61Q 19/02 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9794 (2017.08)
A61Q 19/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0113581
(22) 출원일자 2018년09월21일
심사청구일자 2018년09월21일
(30) 우선권주장
1020170124489 2017년09월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
임승택
서울특별시 도봉구 해동로 32, 106동 303호
오수진
제주특별자치도 서귀포시 안덕면 한창로 104
릿티봇 난티니
57/2 무.10 산라이 소이.8 티.싼캄팽 에이.싼캄
팽, 치앙 마이, 50130, 태국
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 8 항

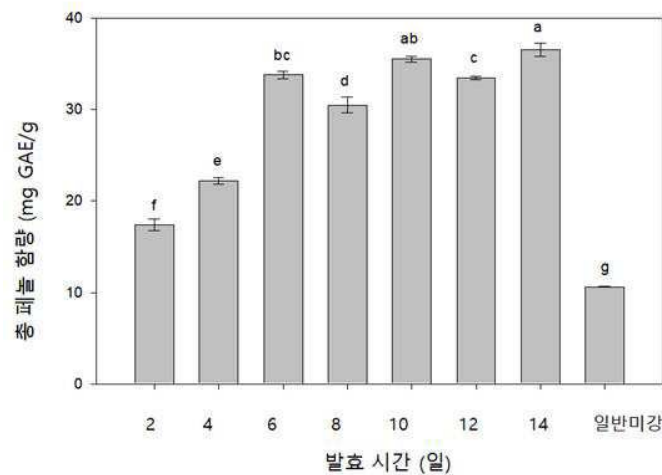
(54) 발명의 명칭 발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 이용하면 발효, 추출 및 분획 과정을 통해 쌀 부산물의 총 페놀 함량 증가, 높은 항산화 능력, 피부 미백, 주름 개선의 효과가 우수한 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2800/85 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발효된 쌀 부산물 추출물은 간장국균(*Aspergillus sojae*), 누룩균(*Aspergillus oryzae*), 흑국균(*Aspergillus awamori*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 및 홍국균(*Monascus pilosus*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 진균을 접종하여 발효된 후 추출된 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 발효는 6 내지 14일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 발효는 상기 쌀 부산물 100 중량부에 대하여 진균 0.1 내지 20 중량부를 접종한 후, 20 내지 45 °C에서 배양함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 발효된 쌀 부산물 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매로 추출된 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 분획물은 발효된 쌀 부산물 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획하여 수득된 것을 특징으로 하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제 함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 이루어지는 군에서 선택된 제형을 갖는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장료 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 쌀 부산물은 쌀눈 또는 미강인 것을 특징으로 하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부 노화는 크게 내적 요인에 의한 노화와 외적 요인에 의한 노화로 나눌 수 있으며 그 요인에 따라 피부의 구조적, 기능적 변화를 초래한다. 피부는 외부 환경에 항상 노출되어 있으므로 노화에 따른 피부 변화의 많은 부분이 자외선과 같은 외부의 영향을 받는다. 노화가 진행함에 따라 피부는 건조해지고 피부색이 어두워지며 탄력을 잃어 주름이 발생하게 된다.

[0003] 노화의 주된 원인 중 하나인 활성산소 (oxygen free radical)는 산소가 필요한 대사과정에서 불가피하게 발생한다. 활성산소는 매우 불안정한 상태로 존재하게 되므로 체내의 조직을 공격하여 세포를 산화시키고 손상시켜 노화를 유발한다.

[0004] 활성산소는 체내의 단백질을 산화시키거나 세포막의 지질을 산화시키게 되면서 인체 기능이 저하되고 DNA를 손상시켜 돌연변이나 암을 유발하는 원인이 될 수도 있다. 또한, 피부에 탄력을 주는 콜라겐 (collagen)과 피부 섬유질을 공격하여 피부 노화가 진행되어 피부가 처지고 늘어져 주름이 생기게 된다.

[0005] 체내에는 SOD (Superoxide Dismutase)처럼 과잉 활성 산소를 제거하는 방어 효소 시스템이 있는데 20대까지는 인체의 항산화 효소의 방어시스템이 활발하여 신체를 건강하게 지켜나가는데 무리가 없으나 이후 점차 나이가 들어감에 따라 급속히 항산화 효소의 기능이 약화되면서 인체는 활성산소에 더욱 쉽게 노출되며 노화의 진행이 가속화되므로, 안티에이징을 위해 활성산소의 적절한 제거가 필요하다.

[0006] 노화에 의해 나타나는 조직적인 변화로는 피부의 각 구조별로 차이가 있겠으나 일반적으로 표피의 두께가 얇아지고 표피와 진피의 경계부가 편평해지며 탄력섬유의 수도 감소하게 되어 주름이 생기게 된다.

[0007] 또한, 피부의 주름형성은 근본적으로 나이가 들거나 자외선의 영향으로 피부의 노화가 진행됨으로써 진피층의 콜라겐과 엘라스틴의 변화에 관련한다. 피부의 콜라겐 (collagen)과 엘라스틴 (Elastin)이 줄어들게 되면 피부의 탄력이 감소하게 되어 결국 주름이 형성되게 된다.

[0008] 인체에서의 멜라닌은 아민, 유리기, 금속이온 등과 같은 세포 독성 물질에 대한 보호 기능을 수행하지만 과잉 생산 시에는 기미, 주근깨 등의 색소 침착을 형성하고 피부노화를 촉진한다.

[0009] 멜라닌 (melanin)은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체다. 멜라닌은 멜라노사이트 (melanocyte) 내에서 티로신(tyrosine)이라는 아미노산으로부터 출발하여 도파 (DOPA)가 생성되었다가, 다시 산화하여 도파퀴논 (DOPA-quinone)이 생성되는 단계에서 산화효소인 티로시나아제(tyrosinase)가 관여한다. 그 후 자동산화 반응을 거치면서 흑갈색의 멜라닌을 만들어낸다. 때문에 화이트닝 화장품은 티로시나아제의 효소활성 저해를 통해 멜라닌 생성을 억제함으로써 화이트닝 효과를 기대할 수 있다.

[0010] 한편, 미강(rice bran)은 현미를 백미로 도정할 때 얻어지는 과피, 종피 및 호분층의 분쇄물을 말하는데 쌀이 가지고 있는 영양분의 95%는 미강과 쌀눈에 포함되어 있으며 현미의 호분층에 기능성분이 함유되어 있음이 잘 알려져 있다. 미강은 양질의 단백질, 식이섬유, 각종 비타민과 미네랄이 함유되어 있을 뿐만 아니라 생리 활성인 페놀 화합물(phenolic ompound), 플라보노이드 화합물(flavonoid compound), 감마-오리자놀(γ -oryzanol), 감마-아미노부틸산(γ -aminobutyricacid, GABA), 세라마이드(ceramide), 토코트리엔올(tocotrienol), 식물성스테롤(phytosterols) 등의 천연 항산화 물질, 수용성 비타민, 칼슘, 인, 철 등의 미네랄이 풍부하다.

[0011] 이처럼 미강을 포함한 쌀 부산물에 다양한 기능 성분이 함유되어 있음에도 불구하고 종래에는 대부분 쌀 부산물을 버리거나 가축의 비료로 한정하여 사용하고 있었다. 그러나 최근 들어 미강을 식품산업에 응용한 미강유 등이 개발되고 있고, 미강을 비롯한 쌀 부산물에 대한 다양한 기능성 연구를 통해 식품 및 화장품 산업에 이용하

는 기술들이 개발중에 있으나 아직까지 개발 수준은 미약한 실정이다.

[0012] 관련 선행기술로서, 대한민국 공개특허 제10-2012-0117539호에는 미강 추출물을 함유하는 미백 및 주름개선용 조성물이 개시되어 있으나, 미백 및 주름개선 효과가 만족할만한 수준을 보이지 못한다는 문제가 있다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 미강을 비롯한 쌀 부산물의 효능에 대해 연구하던 중, 쌀 부산물을 발효 및 추출한 추출물 또는 이의 분획물을 이용할 경우 항산화 효과, 피부미백 및 주름개선 효과가 현저히 향상됨을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0016] 발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에 따르면, 상기 발효된 쌀 부산물 추출물은 간장국균(*Aspergillus sojae*), 누룩균(*Aspergillus oryzae*), 흑국균(*Aspergillus awamori*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 및 홍국균(*Monascus pilosus*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 진균을 접종하여 발효된 후 추출된 것일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 발효는 6 내지 14일 동안 수행될 수 있다.

[0019] 또한, 상기 발효는 상기 쌀 부산물 100 중량부에 대하여 진균 0.1 내지 20 중량부를 접종한 후, 20 내지 45 ℃에서 배양함으로써 수행될 수 있다.

[0020] 본 발명에 따르면, 상기 발효된 쌀 부산물 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매로 추출된 것일 수 있다.

[0021] 본 발명에 따르면, 상기 분획물은 발효된 쌀 부산물 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획하여 수득된 것일 수 있다.

[0022] 본 발명에 따르면, 상기 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제 함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 이루어지는 군에서 선택된 제형을 가질 수 있다.

[0023] 본 발명에 따르면, 상기 쌀 부산물은 쌀눈 또는 미강일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 이용하면 발효, 추출 및 분획 과정을 통해 쌀 부산물의 총 페놀 함량 증가, 높은 항산화 능력, 피부 미백, 주름 개선의 효과가 우수한 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 발효 기간에 따른 총 페놀 함량 변화 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 발효 기간에 따른 DPPH 라디칼 소거 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 발효 기간에 따른 미백활성 측정을 위한 티로시나제 저해 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 발효 기간에 따른 주름개선 효과 측정을 위한 엘라스타아제 억제 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 280nm에서 표준 화합물(Standard compound)의 HPLC 측정 결과를 나타낸 것으로서, (1)은 갈산(gallic acid), (2)는 4-하이드록시벤조익산(4-hydroxybenzoic acid), (3)은 바닐릭산(vanillic acid)의 피크를 나타낸다.

도 6은 320nm에서 표준 화합물(Standard compound)의 HPLC 측정 결과를 나타낸 것으로서, (1)은 카페익산(caffeic acid), (2)는 쿠마린산(coumaric acid), (3)은 시나프산(sinapic acid), (4)는 페룰산(ferulic acid)의 피크를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 생리활성물질 확인을 위한 자외선 검출파장 280 nm에서의 HPLC 측정 결과를 나타낸 것으로서, A는 발효되지 않은 미강 추출물, B는 2일, C는 4일, D는 6일, E는 8일, F는 10일, G는 12일, H는 14일 동안 발효 시의 결과를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 생리활성물질 확인을 위한 자외선 검출파장 320 nm에서의 HPLC 측정 결과를 나타낸 것으로서, A는 발효되지 않은 미강 추출물, B는 2일, C는 4일, D는 6일, E는 8일, F는 10일, G는 12일, H는 14일 동안 발효 시의 결과를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 생리활성물질 확인을 위한 자외선 검출파장 360 nm에서의 HPLC 측정 결과를 나타낸 것으로서, A는 발효되지 않은 미강 추출물, B는 2일, C는 4일, D는 6일, E는 8일, F는 10일, G는 12일, H는 14일 동안 발효 시의 결과를 나타낸다.

도 10은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 쌀 부산물 추출물의 분획물 제조 과정을 도시한 것이다.

도 11은 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 분획물들의 미백활성 측정을 위한 티로시나제 저해 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명의 실시예에 따른 발효된 미강 추출물의 분획물들의 주름개선 효과 측정을 위한 엘라스타아제 억제 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0027] 본 발명은 발효된 쌀 부산물 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 향산화, 피부 미백 및 주름 개선용 복합 기능성 화장품 조성물을 제공한다.
- [0028] 이때, 상기 발효된 쌀 부산물 추출물은 간장국균(*Aspergillus sojae*), 누룩균(*Aspergillus oryzae*), 흑국균(*Aspergillus awamori*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 및 홍국균(*Monascus pilosus*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 진균을 접종하여 발효된 후 추출하는 것이 바람직하다. 특히, 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이, 간장국균(*Aspergillus sojae*)으로 발효 과정을 수행함으로써, 발효된 쌀 부산물 추출물의 총 페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity, DPPH), 향산화 활성, 티로시나아제 활성 저해능 및 엘라스타아제 활성 저해능 등을 현저히 향상시킬 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 발효는 6 내지 14일 동안 수행되는 것이 바람직하며, 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이 발효 기간이 상기 기간 미만이면 총 페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity, DPPH), 향산화 활성, 티로시나아제 활성 저해능 및 엘라스타아제 활성 저해능 향상 효과가 미미하며, 상기 기간을 초과하면 더 이상 진술한 효과들이 향상되지 않는다는 문제가 있다.
- [0030] 또한, 상기 발효는 상기 쌀 부산물 100 중량부에 대하여 진균 0.1 내지 20 중량부를 접종한 후, 20 내지 45 °C에서 배양함으로써 수행하는 것이 바람직하다.
- [0031] 또한, 상기 발효된 쌀 부산물을 추출시 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매로 추출하여 제조되며, 물, 탄소수 1 내지 4의 무수알코올 또는 함수알코올, 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 용매로 추출되는 것이 더욱 바람직하다. 이때, 상기 탄소수 1 내지 4의 알코올은 메탄올, 에탄올, n-프로판

올, iso-프로판올, n-부탄올, tert-부탄올 등이 있다. 이들 추출용매 중 합수 에탄올 또는 메탄올이 가장 바람직하며, 함유된 에탄올 또는 메탄올의 양은 30 내지 90 부피%인 것이 바람직하여, 40 내지 70 부피%인 것이 더욱 바람직하다.

- [0032] 또한 상기 분획물은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미하며, 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 발효된 쌀 부산물을 추출하여 얻은 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 수득할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데에 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 에탄올 및 부탄올을 비롯한 알코올 등의 극성 용매; 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 아세톤(acetone), 클로로포름(chloroform) 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 발효된 미강을 95% 에탄올로 추출한 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물로 분획한 분획물을 확보하였으며, 특히 발효된 미강 에탄올 추출물의 헥산 및 에틸아세테이트 분획물이 다른 분획물에 비해 우수한 티로시나제 저해 활성 및 엘라스타아제 억제 활성을 갖는 것을 확인하였다.
- [0035] 또한, 본 발명의 조성물에서 상기 발효된 쌀 부산물 추출물은 화장료 조성물의 총 중량에 대하여 분말형태 또는 액상형태로 0.01 내지 40 중량% 함유될 수 있으며, 바람직하게는 화장료 조성물 총 중량에 대하여 분말형태 또는 액상형태로 0.1 내지 10 중량% 함유될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 상기 쌀 부산물은 쌀눈 또는 미강일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [0040] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리이미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테

르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0046] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0048] 실시예 1. 발효된 미강 추출물의 제조

[0049] (1) 발효 미강의 제조

[0050] 간장국균인 *Aspergillus sojae* KCCM 60354를 포자충이 형성될 때까지(14일) potato dextrose agar (PDA)에서 배양하였다. 포자를 수집하고 두 번 씻어서 추가로 사용하기 위해 80 °C에서 보관하였다. 미강은 1:1 (w/w)의 비율로 물과 혼합하고 autoclave (121 °C, 20 분)를 사용하여 살균하였다. 멸균된 미강을 petri dish에 옮기고 미강 100 중량부에 대하여 1 중량부의 곰팡이 포자(미강 100 g, 곰팡이 포자 1 ml spore solution(1×10^6 spores/ml))를 혼합하여 잘 섞은 다음 14일 동안 25 °C에서 배양하였으며, 배양 2일 간격으로 샘플을 수집하고 추가 분석을 위해 20 °C에서 보관하였다.

[0051] (2) 발효 미강 추출물의 제조

[0052] 상기 배양 기간별로 수집된 발효 미강 각각을 95 % 에탄올로 추출하고, 100 rpm, 25 °C에서 24 시간 동안 진탕하였다. 시료를 여과하고 3500 rpm으로 15 분간 원심분리 하였다. 추출 단계를 2 회 반복하였다. 상등액을 수집하고 증발 및 동결 건조시켜 발효 미강 추출물을 제조하였다.

[0054] 실시예 2. 발효 미강 추출물의 분획물 제조

[0055] 발효 6 일째 미강 에탄올 추출물 (FRB-D6: 95% 에탄올) 시료를 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 및 물을 단계적으로 사용하여 각각의 용매로 1:10 (v/v)의 비율로 활성 물질을 분획하였다 (도 10). 헥산 (FRB-H), 클로로포름 (FRB-C), 에틸 아세테이트 (FRB-E), 부탄올 (FRB-B) 및 물 (FRB-W) 분획을 수집하고, 증발시키고 추가 실험을 위해 동결 건조시켰다.

[0057] 실험예 1. 총 페놀 함량(Total phenolic content, TPC) 측정

[0058] 발효 미강 추출물의 총 페놀 함량 (TPC)은 Ainsworth and Gillespie의 방법을 변형하여 측정하였다. 구체적으로 100 μ l의 발효 미강 추출물 시료에 10 % (v/v) Folin-Ciocalteu reagent 200 μ l 및 700 mM Na₂CO₃ 800 μ l를 혼합한 다음, 상기 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 방치하였다. 그 후, TPC는 분광 광도계를 사용하여 765nm의 흡광도를 측정하고 gallic acid standard curve를 사용하여 계산하고, 그 결과를 하기 도 1에 나타내었다.

[0059] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따라 간장국균(*Aspergillus sojae*)에 의해 발효된 미강 추출물은 모두 일반 미강보다 더 많은 총 페놀 함량을 나타냈으며, 발효 기간이 늘어날수록 총 페놀 함량 또한 높아지는 경향을 보임을 확인하였다. 특히 발효가 14일 동안 진행될 경우의 총 페놀 함량(36.5 ± 0.7 mgGAE/g)은 일반 미강(10.6 ± 0.1 mgGAE/g)보다 약 3배 이상 높은 것으로 확인되었다.

[0061] 실험예 2. 항산화 활성 측정

[0062] 발효 미강 추출물의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거 활성(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical

scavenging activity) 측정을 통해 관찰하였다. 구체적으로, 50 μ l의 발효 미강 추출물 시료에 100mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4) 450 μ l 및 0.1mM DPPH 용액 1ml을 혼합한 다음 어두운 조건에서 30분 동안 실온에서 방치하였다. 그 후, 분광 광도계를 사용하여 517nm에서 흡광도를 판독하였으며, DPPH 라디칼 소거 활성의 백분율은 하기 [식 1]을 사용하여 계산하였으며, 그 결과는 하기 도 2에 나타내었다.

[식 1]

DPPH 라디칼 소거 활성 (%) = (공시료 흡광도 - (시료 흡광도/공시료 흡광도) × 100

도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따라 간장국균(*Aspergillus sojae*)에 의해 발효된 미강 추출물은 모두 일반 미강보다 DPPH 라디칼 소거 활성이 향상되는 것으로 나타났으며, 특히 발효가 10일 동안 진행된 미강 추출물의 경우 일반 미강(15.7 $\pm$ 0.2%)보다 약 4배 이상 높은 DPPH 라디칼 소거능 (63.9 $\pm$ 0.9%)을 나타내었다.

실험예 3. 미백 활성 측정

(1) 발효 미강 추출물의 미백 활성을 티로시나제 저해 활성(Tyrosinase inhibition activity) 측정을 통해 관찰하였다. 구체적으로, pH 6.5 및 40 μ l의 티로시나제 (240 U/ml)에 용해된 40 μ l의 발효 미강 추출물 시료와 5% DMSO, 50 mM potassium phosphate buffer (P-buffer) 80 μ l을 혼합한 다음 25 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 배양하고, 0.85 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 40 μ l를 첨가하였다. 다음으로, 상기 혼합물을 25 $^{\circ}$ C에서 5분간 연속 배양하고 microplate spectrophotometer(Bio-Tek)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 티로시나제 저해 활성(%)은 하기 [식 2]에 따라 계산하였으며, 그 결과를 하기 도 3에 나타내었다.

[식 2]

티로시나제 저해 활성 (%) = (((A-B)-(C-D))/(A-B))×100

A = 티로시나제가 포함된 공시료

B = 티로시나제가 포함되지 않은 공시료

C = 티로시나제가 포함된 시료

D = 티로시나제가 포함되지 않은 시료

도 3에 나타난 바와 같이, 일반 미강의 경우 티로시나제 저해 활성이 약 27.8%로 매우 낮은 반면, 발효가 2 내지 10일 동안 진행된 미강 추출물의 경우 티로시나제 저해 활성이 향상됨을 확인하였으며, 특히 발효가 6일 동안 진행된 미강 추출물의 경우 티로시나제 저해 활성이 약 100%로, 약 3.6배 이상 높은 티로시나제 저해 활성 (IC₅₀ 값 1.55 mg/ml)을 나타내었다.

(2) 발효 6 일제 미강 에탄올 추출물 (FRB-D6: 95% 에탄올)의 분획물들의 미백 활성을 티로시나제 저해 활성 (Tyrosinase inhibition activity) 측정을 통해 관찰하였다. 실험 방법은 상기 (1)에서 설명한 바와 같으며, 측정 결과를 하기 도 11 및 표 1에 나타내었다.

표 1

Fraction	IC ₅₀ (mg/ml)
FRB-D6	1.55
FRB-H	1.27
FRB-C	5.56
FRB-E	0.59
FRB-B	-
FRB-W	-

도 11에 나타난 바와 같이, FRB-D6, FRB-H 및 FRB-E의 티로시나제 저해 활성은 약 97% 이상으로 매우 우수한 것으로 나타났다. 그러나 이들은 상기 표 1에 나타난 바와 같이 IC₅₀ 값에 유의한 차이를 보였으며, 특히 FRB-E의 IC₅₀은 0.59 mg/ml로 조추출물(FRB-D6)보다 2.6배 낮아짐을 확인하였다.

[0080] **실험예 4. 주름개선 측정**

[0081] (1) 발효 미강 추출물의 주름개선 능력을 엘라스타아제 억제 활성(Elastase inhibition activity) 측정을 통해 관찰하였다. 구체적으로, 30 μ l의 발효 미강 추출물 시료에 2mM Tris 완충액 (pH 8.0) 100 μ l 및 엘라스타아제 (1.1U / ml) 10 μ l을 혼합한 다음 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하고, 3mg/ml N-Succ-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (SANA) 40 μ l를 첨가하였다. 상기 혼합물을 25 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 연속 배양하고, microplate spectrophotometer (Bio-Tek)를 사용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 엘라스타아제 억제 활성(%)은 하기 [식 3]에 따라 계산하였으며, 그 결과를 하기 도 4에 나타내었다.

[0082] [식 3]

[0083] 엘라스타아제 억제 활성(%) = (((A-B)-(C-D))/(A-B)) $\times$ 100

[0084] A = 엘라스타아제가 포함된 공시료

[0085] B = 엘라스타아제가 포함되지 않은 공시료

[0086] C = 엘라스타아제가 포함된 시료

[0087] D = 엘라스타아제가 포함되지 않은 시료

[0088] 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따라 간장국균(*Aspergillus sojae*)에 의해 발효된 미강 추출물은 모두 90% 이상의 엘라스타아제 억제 활성을 보여, 약 42%의 엘라스타아제 억제 활성을 보인 일반 미강보다 엘라스타아제 억제 활성이 향상되는 것으로 나타났으며, 특히 발효가 6일 동안 진행된 미강 추출물의 경우 가장 높은 엘라스타아제 억제 활성을 보였으며, IC₅₀ 값은 3.70 mg/ml로 측정되었다.

[0089] (2) 발효 6 일째 미강 에탄올 추출물 (FRB-D6: 95% 에탄올)의 분획물들의 주름개선 능력을 엘라스타아제 억제 활성(Elastase inhibition activity) 측정을 통해 관찰하였다. 실험 방법은 상기 (1)에서 설명한 바와 같으며, 측정 결과를 하기 도 12 및 표 2에 나타내었다.

표 2

[0090]

Fraction	IC ₅₀ (mg/ml)
FRB-D6	3.7
FRB-H	0.11
FRB-C	1.34
FRB-E	0.12
FRB-B	0.67
FRB-W	2.43

[0091] 도 12에 나타난 바와 같이, FRB-H를 제외한 모든 분획물들의 엘라스타아제 억제 활성은 94% 이상으로 매우 우수한 것으로 나타났다. 그러나 이들은 상기 표 2에 나타난 바와 같이 IC₅₀ 값에 유의한 차이를 보였으며, 특히 FRB-H의 IC₅₀은 0.11 mg/ml로 가장 낮은 것으로 나타났으며, FRB-E의 IC₅₀ 또한 조추출물(FRB-D6)보다 33배 낮은 0.12 mg/ml임을 확인하였다.

[0093] **실험예 5. 생리활성물질 확인**

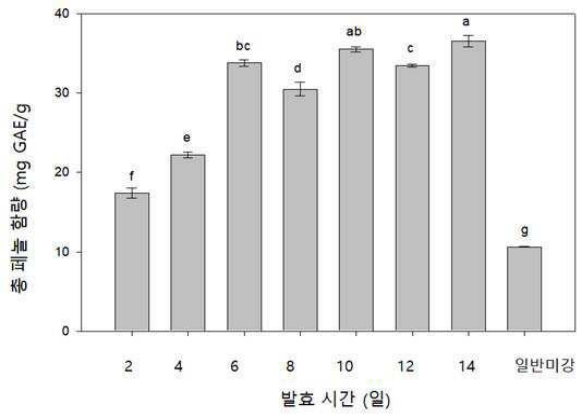
[0094] 본 발명에 따라 간장국균(*Aspergillus sojae*)에 의해 발효된 미강 추출물에 포함된 생리활성물질 프로파일은 HPLC 분석(HPLC analysis)을 이용하여 측정하였다. 구체적으로 각 발효 미강 추출물 시료를 0.2 μ m 필터로 여과하였으며, HPLC 분석은 DIONEX UltiMate 3000 (Thermo Scientific, CA, USA) 및 역상 Acclaim™ 120 C18 (5 μ m) 컬럼 (4.6 x 250mm, Thermo Scientific, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 이동상은 0.05 % phosphoric acid (용액 A) 및 acetonitrile (용액 B)의 구배였다. gradient program은 다음과 같다(0min, 0 %B; 10min, 7 %B; 20min, 10%B; 30min, 12 %B; 50min, 23%B; 70min, 35 %B; 80min, 50%B; 90min, 0%B. The flow rate was 0.5ml/min). 온도는 40 $^{\circ}$ C로 설정하였으며, UV-Vis 검출기를 사용하여 자외선 검출파장 280, 320 및 360nm에서 측정하였으며, 그 결과를 하기 도 5 내지 도 9에 나타내었다.

[0095] 도 5 및 도 7에 나타난 바와 같이 자외선 검출 파장(UV) 280nm에서, 발효 6일 이후부터 gallic acid, 4-

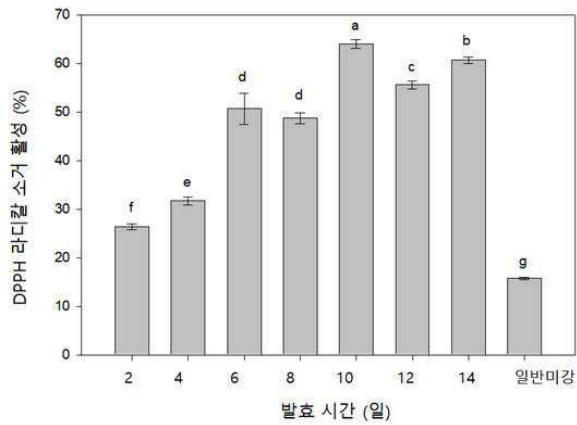
hydroxybenzoic acid 및 vanillic acid가 검출되었다. 또한, 도 6 및 도 8에 나타난 바와 같이 자외선 검출 파장(UV) 320nm에서, phenolic acids (caffeic acid, coumaric acid, sinapic acid 및 ferulic acid)가 검출되었다. 또한, 도 9에 나타난 바와 같이 자외선 검출 파장(UV) 360nm에서도 다양한 플라보노이드 화합물이 검출됨을 확인하였다.

도면

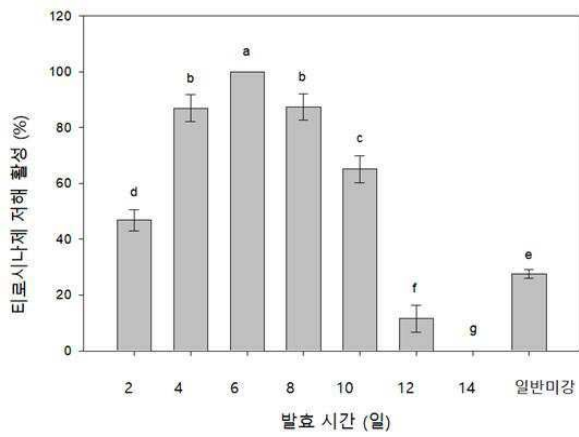
도면1



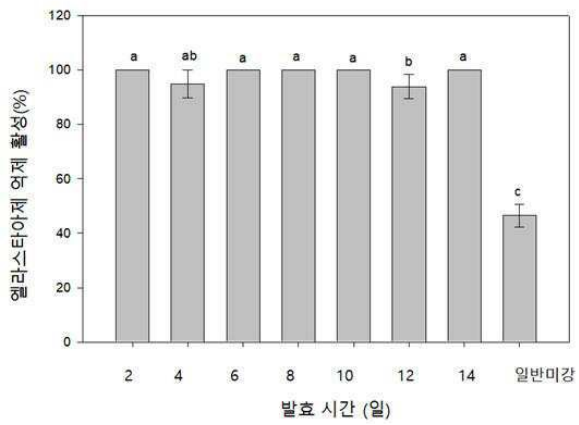
도면2



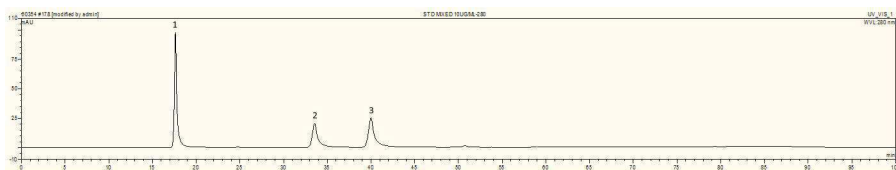
도면3



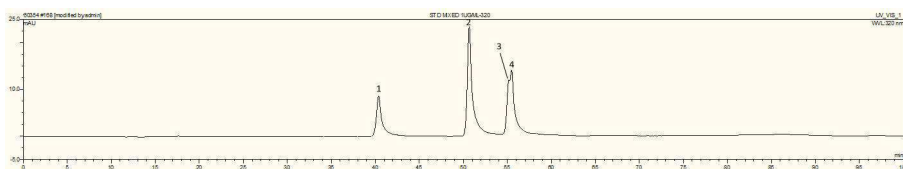
도면4



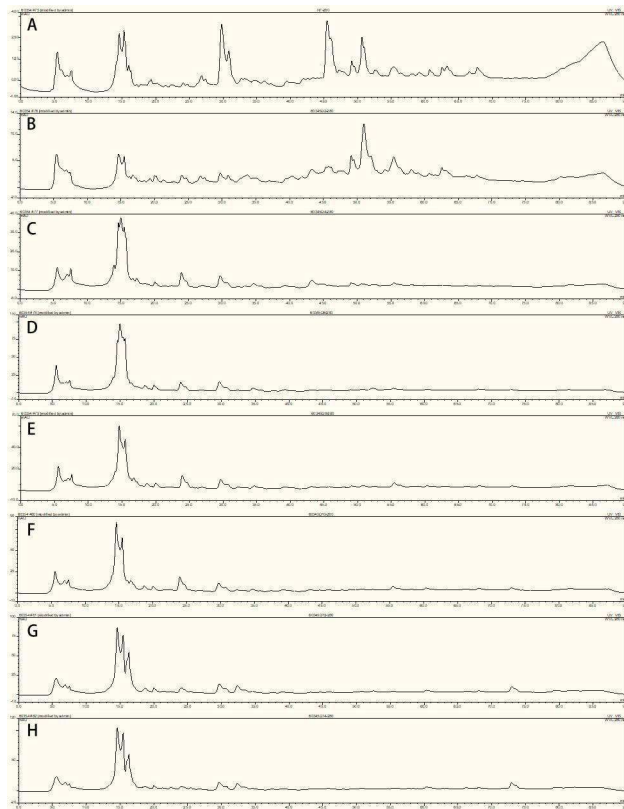
도면5



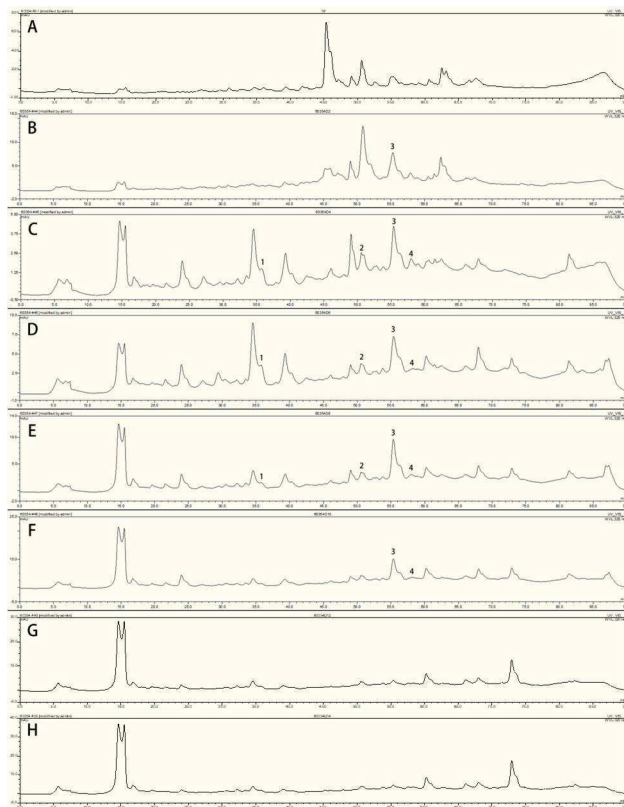
도면6



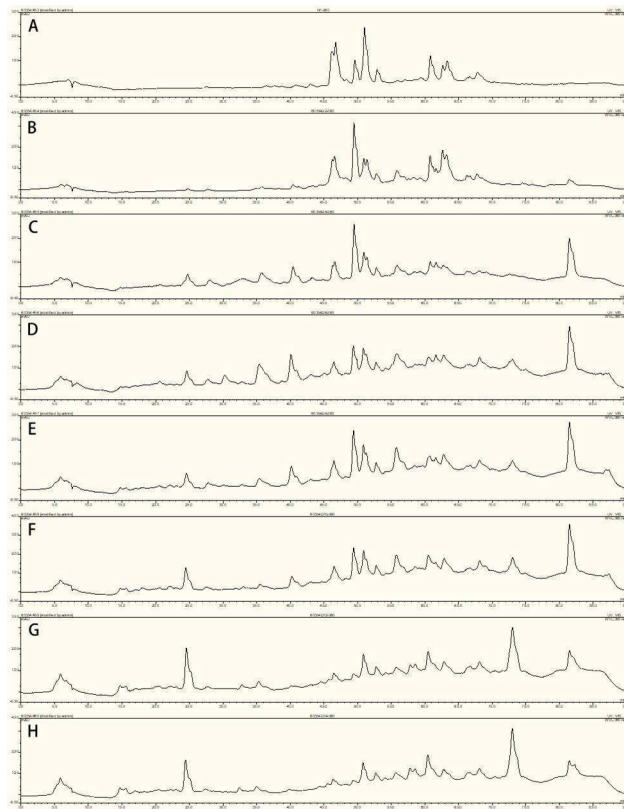
도면7



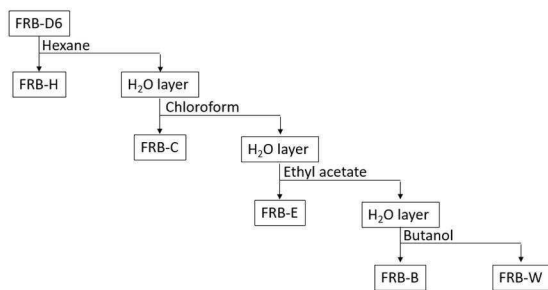
도면8



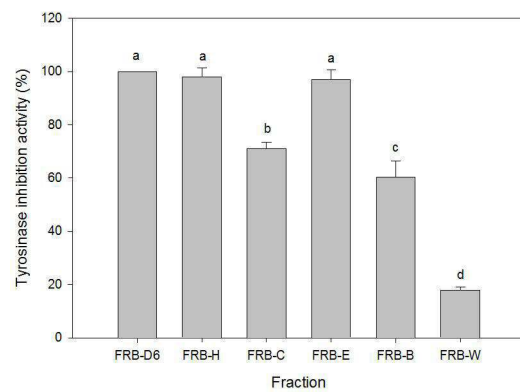
도면9



도면10



도면11



도면12

