(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0001850
(43) 공개일자 2013년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0062744
(22) 출원일자 2011년06월28일
심사청구일자 2011년06월28일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121, 건양대학교 산학협력단 (내동)
에치엔지화장품주식회사
충청남도 연기군 전의면 의당전의로 908
(72) 발명자
조영호
충청북도 청주시 흥덕구 진재로103번길 37, 신영지웰시티아파트 109동 2505호 (복대동)
이계원
대전광역시 서구 둔산북로 215, 15동 1106호 (둔산동, 가람아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **발효 지실 추출물을 함유하는 항노화 화장료 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체에 의해 생물전환된 지실(*Poncirus trifoliata*) 추출물을 함유하는 항노화 화장료 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 지실로부터 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 영지버섯 균사체 또는 영지버섯 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 영지버섯 균사체를 제거하는 단계;로부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항노화 기능성 화장료 조성물에 관한 것으로, 항산화 효과, 콜라겐 합성 촉진효과, 콜라게나제(MMP-1)의 활성 및 발현 저해효과 및 피부 잔주름 개선 효과를 나타낸다.

(72) 발명자

김민정

충청남도 홍성군 홍성읍 문화로 26

조철진

충청남도 천안시 동남구 서부대로 257-8, 대주피오레아파트 103동 602호 (신방동)

특허청구의 범위

청구항 1

지실(*Poncirin trifoliata*)로부터 추출물을 추출하는 단계;

상기 추출물에 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체 또는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 및

상기 본 배양 후, 본 배양액으로부터 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체를 제거하는 단계;로부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항노화 기능성 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 추출시 추출용매로 에탄올이 40~95%(v/v) 함유된 수용액을 사용하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 여과액의 함량이 화장료 조성물 전체에 대해 0.001~30.0중량%인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

청구항 1항에 있어서,

상기 추출물은 추출 후 감압농축 또는 동결건조된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 감압농축 또는 동결건조된 추출물은 정제수, 에탄올, 부틸렌글리콜 및 프로필렌글리콜 중 선택되는 어느 하나 이상의 용매에 0.001~30.0중량% 용해된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 본 배양단계는 배양액의 pH를 5.0~7.0으로 조정하고, 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체를 4~6%(v/v)되도록 접종한 후, 온도 22~32℃, 회전수 120~180rpm, 통기량 1.2~1.8vm 조건에서 5~7일간 배양하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 화장료 조성물은 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 기타 수중유 (O/W)형 및 유중수 (W/O)형의 기초화장료 제형과 수중유형 또는 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이새도, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류 등의 색조화장료 제형 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생물전환된 지실(*Poncirus trifoliata*) 추출물을 함유하는 항노화 화장료 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 지실 추출물을 발효시켜 수득한 여과액을 유효성분으로 함유하는 항노화 기능성 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사람의 피부는 나이를 먹으면서 끊임없이 변화하게 된다. 피부 노화는 크게 자연 노화(혹은 내인성 노화)와 외적 노화로 구분되며(EB Doris, Cosmetics & Toiletories, 1996; 111:31-37), 자연 노화(내인성 노화)는 유전적인 요소에 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 어려운 반면 외적 노화는 환경적인 요소에 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 비교적 용이하다. 대표적인 외적 노화인자로는 자외선을 들 수 있으며, 가장 두드러진 외적인 노화현상이 바로 주름 형성이다(HW Daniell, Ann Intern Med, 1971; 75(6):873-880, GL Grove et al., J Am Acad Dermatol, 1989; 21(3):631-637, CE Griffiths et al., Arch Dermatol, 1992; 128: 347-351).

[0003] 한편, 자외선에 의해 야기되는 광노화 메카니즘 중의 하나는 자유 라디칼 경로를 경유하는 것이다(D Harman, J Gerontol, 1956; 11(3):298-300). 자유 라디칼들은 피부 콜라겐 등의 결합조직형성 파괴, 세포막 기능 저해, DNA 변이 촉진, 단백질 작용 변형, 세포간 에너지 전이, 신진대사와 관련된 분자들의 변형 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(RM Lavker and AM Kligman, J Invest Dermatol, 1988; 90: 325-330). 노화에 자유 라디칼이 관여한다는 사실은 자유 라디칼을 불활성화 시키는 항산화제 또는 여러 가지 화학적 소거제들을 사용하여 노화과정을 지연시킬 수 있다는 것을 의미한다.

[0004] 한편, 생체 내에서 콜라겐과 같은 세포외기질의 합성과 분해는 적절하게 조절되나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하며 콜라겐을 분해하는 효소인 기질 금속단백질 분해효소 (matrixmetalloproteinase, 이하 'MMP' 라 칭함), 특히 콜라게나제(collagenase, 이하 'MMP-1' 이라 칭함)와 젤라티나제(gelatinase, 이하 'MMP-2' 라 칭함)의 발현이 촉진되어 피부의 탄력이 저하되고 주름이 형성된다. 또한 자외선 조사와 자유 라디칼에 의해 이러한 분해효소가 활성화되기도 한다.

[0005] MMP는 그 기질특이성에 따라 MMP-1, MMP-2, MMP-9로 크게 분류되는데, MMP-1은 간질의 효소인 섬유아세포 타입 콜라게나제이며 기질로는 콜라겐 타입 Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅶ, Ⅷ, Ⅹ 및 젤라틴이 있으며 원래 콜라겐 길이의 3/4이나 1/4 길이의 펩타이드로 잘라 비특이적인 효소(gelatinase)의 작용이 용이하게 한다. MMP-2는 72 kD의 젤라티네이즈(A)가 속하며 기질로는 젤라틴, 콜라겐 타입 Ⅳ,Ⅴ,Ⅶ,Ⅹ, 엘라스틴 및 파이브로넥틴을 분해한다.

[0006] 호중구 및 다형핵성 백혈구의 MMP는 산화과정에 의하여 일차적으로 활성화되는데 그 과정은 먼저 세포 내에서 과산화수소가 발생되면 염소이온의 존재 하에서 미엘로페록시다제(Myeloperoxidase)에 의하여 차아염소산으로 전환되고 이것이 MMP를 활성화시킨다.

[0007] 지금까지는 자외선에 의한 노화를 방지하기 위하여 자외선 차단제가 함유된 제품을 피부에 직접 도포하는 방법이 가장 일반화되어 있었으나, 1988년 레티노인산이 노화된 피부의 거칠음 및 잔주름의 완화에 효과가 있다고 보고된 이래(JS Weiss et al., J Am Acad Dermatol, 1988; 19(1):169-175), 전 세계적으로 피부 노화를 억제 혹은 개선시키는 물질을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 중 비타민 A, C, E 등 비타민류의 유도체 및 AHA(alpha -hydroxy acid)는 현재까지 알려진 대표적인 피부 노화 개선 물질이다(DS Rosenthal et al., J Invest Dermatol, 1990; 95:510-515, CM Ditre et al., J Am Acad Dermatol, 1996; 34(2):187-195). 하지만, 이들은 자연환경에서 매우 불안정하여 사용상 문제점이 있거나, 혹은 가시적 효과를 나타내기엔 다소 미흡하다는데 문제가 있다. 따라서 생체에 안전하고 자유 라디칼의 소거능 및 콜라게나제(MMP-1)의 활성 및 발현 저해능과 콜라겐 합성능이 우수한 새로운 피부 주름 개선 물질의 개발이 절실히 요망되고 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 천연에서 자생하는 식물들 중에서 항산화 효과가 우수한 지실 추출물의 효능을 더욱 증대시킬 수 있는 방법을 연구 노력한 결과 지실 추출물을 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체로 생물전환시킬 경우 항산화 효과, 콜라게나제(MMP-1)의 활성 및 발현 저해효과와 콜라겐 합성 촉진효과가 현저히 증가함을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명은 지실(*Poncirus trifoliata*) 추출물을 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체로 생물전환시켜 수득한 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항노화 기능성 화장료 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 지실로부터 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 영지버섯 균사체 또는 영지버섯 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 영지버섯 균사체를 제거하는 단계;로 부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항노화 기능성 화장료 조성물을 제공한다.

[0011] 이하 본 발명의 발효 지실 추출물을 함유하는 항노화 기능성 화장료 조성물에 대해 상세히 설명하고자 한다.

[0012] 지실을 용매로 단순 추출한 추출물의 경우 생체 외에서는 유효한 효능을 나타내지만, 이를 피부 화장료에 적용한 경우에는 실질적으로 그 효과가 만족스럽지 못한 문제점이 있다.

[0013] 한편, 본 발명자들은 상기 지실 추출물에서 효능효과를 나타내는 주요 성분이 플라보노이드임을 확인하였다. 식물에 풍부한 페놀성 화합물인 플라보노이드류, 탄닌 및 안토시아닌 등은 자외선으로 인해 손상된 피부를 보호할 수 있는 우수한 항산화 후보물질이며(T Shibamoto, American Chem Soc, 1994; 564:247-256), 특히, 플라보이드류 도는 이들의 유도체 성분들은 자외선으로 인해 발생한 라디칼 소거능, 지질과산화생성 억제능 등의 항산화 활성이 우수한 것으로 보고되고 있다(RJ Nijveldt et al., Am J Clin Nutr, 2001; 74:418-425).

[0014] 일반적으로, 친수성 물질보다는 소수성 물질이 피부투과에 효과적인데, 각질층 중에 분포되어 있는 세라마이드라는 성분이 소수성 물질로 친수성 물질보다는 소수성 물질과의 상호작용에 더 효과적이어서 소수성 물질이 보다 용이하게 피부 최외각 층을 통과할 수 있기 때문이다.

[0015] 한편, 플라보노이드류는 대부분 당이 한 분자 이상이 결합된 배당체로서 자연계에 존재하고 분자량이 상대적으로 크며, 수용성의 성질도 일부 지니기 때문에 각질층을 쉽게 통과하지 못하고 이에 따라 피부 내부로의 유입이 어렵게 되어 효과적으로 흡수가 어렵다는 문제점이 있다.

[0016] 따라서 본 발명은 피부투과율이 용이하여 피부 외용제로서의 효과적인 역할을 하는 피부 항노화 화장료 조성물을 제공하기 위해 지실로부터 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 영지버섯 균사체 또는 영지버섯 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 영지버섯 균사체를 제거하는 단계;로 부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는데, 상기의 단계를 통해 수득된 여과액은 지실로부터 추출한 추출물보다 총 페놀함량 및 총 플라보노이드 함량이 증가한 것을 본 실험에서 확인하였다.

[0017] 또한, 본 발명은 유효성분으로 함유되는 여과액은 항산화 효과, 콜라게나제(MMP-1)의 활성 및 발현 저해효과와 콜라겐 합성 촉진효과에 의한 주름개선효과가 우수한 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 추출물의 함량이 피부 화장료 조성물 전체에 대해 0.001~30.0 중량%인 것을 특징으로 하는 발효 지실 추출물을 함유하는 항노화 화장료 조성물에 관한 것이다. 상기 추출물이 0.001중량% 미만으로 포함되는 경우에는 피부개선효과가 거의 없으며, 30.0중량% 이상인 경우에는 함유량 증가에 대한 효과 증대 정도가 미미하여 경제적이지 못하다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 추출시 추출용매로 에탄올이 40~95%(v/v) 함유된 수용액을 사용하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 추출물은 추출 후, 감압농축 또는 동결건조된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 감암농축 또는 동결건조된 추출물은 정제수, 에탄올, 부틸렌글리콜 및 프로필렌글리콜 중 선택된 1종 이상의 용매에 0.001~30.0중량%로 용해된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 본 배양시 배양액의 pH를 5.0~7.0으로 조정하고, 영지버섯 균사체를 4.0~6.0%(v/v)되도록 접종한 후, 온도 22~32℃, 회전수 120~180rpm, 통기량 1.2~1.8vm 조건에서 5~7일간 배양하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0023] 또한, 본 발명은 발효 지실 추출물을 함유하는 항노화 기능성 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0024] 또한, 본 발명은 발효 지실 추출물을 함유하는 피부자극 완화 효능을 나타내는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 화장료 조성물이 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 기타 수중유(O/W)형 및 유중

수(W/O)형의 기초 화장료 제형과 수중유형 또는 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립글로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도, 치크칼라 및 아이브로우펜슬 중에서 선택된 화장료 조성물임을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 발효 지실 추출물을 함유하는 화장료 조성물은 자유 라디칼 소거효과, 콜라겐 합성 촉진 효과, 콜라게나제 (MMP-1)의 활성 및 발현 억제 등의 피부 주름 개선 효과와 같은 항노화 기능을 나타낸다.

[0027] 또한, 화장품 기재에 의해 야기되는 피부 자극을 감소시키는 피부세포사멸 억제효과와 피부자극 완화효과가 우수하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시적인 기재일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0029] **<비교예 1> 지실 추출물 제조**

[0030] 세절하여 음건한 지실 500g을 뜨거운 95%(V/V) 에탄올 수용액으로 3시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50℃ 이하에서 감압농축 및 동결건조한 후 90.5g의 에탄올 추출물을 얻었다. 감압 농축물 및 동결 건조물이 15.0중량% 함유되게 정제수, 에탄올, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 중에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 지실 추출물을 제조하였다.

[0031] **<실시예 1> 발효 지실 추출물의 제조**

[0032] 영지버섯 균사체를 포테이토덱스트로오즈 한천배지가 든 시험관에 사면배양하여 4℃에 보관하고 1개월마다 계대배양하여 사용하였다. 상기 사면배지에서 계대배양된 균사체를 무균적으로 균질화하여, 비교예 1에서 수득한 지실 추출물과 효모-맥아즙이 혼합된 배지에 영지버섯 균사체가 5%(v/v) 되도록 접종한 후 발효조 내에서 온도 25℃, 회전수 150rpm, 통기량 1.5vm, pH 7.0의 조건으로 6일간 배양하였다. 배양 후 배양액으로부터 영지버섯 균사체를 제거한 다음 발효 지실 추출물을 수득하였다.

[0033] **<실험예 1> 발효 지실 추출물에 함유된 성분 및 함량 측정**

[0034] 본 실험예 1에서는 상기 비교예 1에서 제조된 지실 추출물과 실시예 1에서 제조된 발효 지실 추출물의 주요 성분 중 페놀성 물질, 플라보노이드, 플라보노이드 배당체 등의 정성분석 및 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 비교하였다.

[0035] 먼저 페놀성 물질, 플라보노이드, 플라보노이드 배당체 등의 정성분석은 하기와 같이 수행하였다.

[0036] **(1) 페놀성 물질, 플라보노이드의 정성분석**

[0037] 비교예 1과 실시예 1의 추출물에 각각 2.5% $FeCl_3$ 에탄올 용액을 1~2 방울 떨어뜨려 방치할 때, 암녹색으로 정색하거나 침전의 생성 여부를 관찰하였다.

[0038] **(2) 플라보노이드 배당체의 정성분석**

[0039] 진한 황산법을 이용, 비교예 1과 실시예 1의 추출물에 각각 5㎖의 진한 황산을 침적하여 황색 및 황적색 침전의 생성을 관찰하였다.

[0040] **(3) 당의 정성분석**

[0041] 비교예 1과 실시예 1의 추출물에 각각 5% α-나프톨 알콜 시액 2~3방울을 넣은 후 농황산을 기벽을 통하여 가할 때 경계면에 적자색이 나타나는지 관찰하였다.

[0042] **(4) 총 페놀 함량 측정**

[0043] 비교예 1과 실시예 1의 추출물 1㎖에 각각 증류수 10㎖를 첨가한 후, 2㎖의 Folin-Ciocalteu phenol reagent를 첨가하여 혼합한 다음, 실온에서 5분간 반응하였다. 이 반응물에 20% 소듐 카보네이트를 2㎖ 첨가하여 혼합한 다음, 상온에서 1시간 반응시킨 후 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 지표물질은 탄닌산(tannic acid)을 사용하였다.

[0044] **(5) 총 플라보노이드 함량 측정**

[0045] 비교예 1과 실시예 1의 추출물 0.5㎖에 각각 10% aluminum nitrate 0.1㎖, 1M potassium acetate 0.1㎖, 에탄올 4.3㎖씩 넣고 혼합한 다음, 상온에서 40분간 반응시킨 후 415nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 지표물질은 퀘르세틴(quercetin)을 사용하였다.

표 1

[0046]

시료명	총 페놀 함량 (㎍/㎖ of extract)	총 플라보이드 함량 (㎍/㎖ of extract)
비교예 1	585	107.7
실시예 1	1021	589.4

[0047] 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과(표 1), 실시예 1의 추출물이 비교예 1의 추출물보다 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 높은 것을 확인할 수 있었는데, 특히 플라보노이드 함량은 5.5배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0048] 상기의 결과로부터 단순 추출에 의해 제조된 지실 추출물을 영지버섯 균사체에 의해 발효시킴으로써 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 증가시킬 수 있다는 사실을 확인할 수 있었고, 이를 바탕으로 영지버섯 균사체에 의해 발효된 지실 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 항노화 화장료 조성물을 제조하였다.

[0049] **<실험예 2> DPPH 라디칼을 이용한 항산화 효과 측정 실험**

[0050] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 물질의 항산화 효과를 측정하기 위하여 Yoshida 등(1989)이 사용한 방법을 약간 변형하여 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 소거 효과를 측정하였다. DPPH는 안정한 자유 라디칼로서 보라색을 나타내므로, 시료가 라디칼을 소거함에 따라 보라색이 제거되는 정도를 측정하는 것이다.

[0051] 먼저, DPPH를 1×10^{-4}M 농도로 메탄올에 녹여, 이 용액 0.15㎖를 시험관에 넣었다. 여기에 각 농도의 시료 0.15㎖을 넣고, 상온에서 20분간 반응 후 565nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로서는 실시예의 물질 대신 녹차 추출물을 사용하였다. 각 시료의 자유 라디칼 소거효과는 수학식 1을 이용하여 라디칼을 50% 소거하는 농도를 구하여 SC_{50}으로 표시하였다. 이때 음성 대조군으로는 시료를 처리하지 않은 액의 반응 흡광도로 하였다.

수학식 1

[0052]

$$\text{자유 라디칼 소거율(\%)} = [(\text{대조군의 흡광도} - \text{각 시료의 흡광도})/\text{대조군의 흡광도}]\times 100$$

표 2

[0053]

시료명	SC_{50}(㎍/㎖)
실시예 1	100
녹차 추출물	400

[0054] 표 2에서 나타난 바와 같이 본 발명의 발효 지실 추출물은 강력한 항산화제인 녹차 추출물과 비교할 때 녹차 추출물에 비해 4배 정도의 매우 강력한 활성을 나타내었다.

[0055] **<실험예 3> 활성산소 라디칼을 이용한 항산화 효과 측정 실험**

[0056] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 물질의 항산화 효과를 측정하기 위하여 Furuno 등(2002)이 사용한 방법을 약간 변형하여 크산틴-크산틴옥시다제 시스템(xanthine-xanthine oxidase system)에 의해 생성된 활성산소 라디칼(superoxide radical)에 대한 소거 효과를 측정하였다. 크산틴과 크산틴옥시다제 반응에 의해 생성되는 활성산소는 니트로블루테트라졸리움(Nitro Blue Tetrazolium;NBT)과 반응하여 청색을 나타내므로, 시료가 활성산소를 소거함에 따라 줄어든 청색의 진하기 정도를 측정하는 것이다.

[0057] 먼저, 각 농도별 시료에 3×10^{-3}M xanthine, 3×10^{-4}M EDTA, 7.5×10^{-4}M nitroblue tetrazolium(NBT), 0.15㎎/㎖의 BSA(bovine serum albumin) 용액을 각각 첨가하여 혼합한 다음, 상온에서 10분간 반응하였다. 그 후 각 시험관에 크산틴옥시다제(0.25U/㎖) 용액을 첨가하여 상온에서 20분간 반응한 다음, 565㎚에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로서는 실시예의 물질 대신 녹차 추출물을 사용하였다. 각 시료의 활성산소 라디칼 소거효과는 수학식 2를 이용하여 라디칼을 50% 소거하는 농도를 구하여 SC_{50}으로 표시하였다. 이때 음성 대조군으로는 시료를 처리하지 않은 액의 반응 흡광도로 하였다.

수학식 2

[0058]

$$\text{활성산소 라디칼 소거율}(\%) = [(\text{대조군의 흡광도} - \text{각 시료의 흡광도})/\text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

표 3

[0059]

시료명	SC_{50}(㎍/㎖)
실시예 1	50
녹차 추출물	340

[0060] 표 3에서 나타난 바와 같이 본 발명의 발효 지실 추출물은 녹차 추출물과 비교할 때 약 6.7배 정도의 매우 강력한 활성을 나타내었다.

[0061] 상기의 결과로부터 본 발명의 발효 지실 추출물의 우수한 항산화 효과를 확인할 수 있었고, 이로부터 본 발명의 우수한 항산화 효과를 추론할 수 있었다.

[0062] **<실험예 4> 콜라겐 합성 촉진효과 측정 실험**

[0063] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료들의 콜라겐 합성 촉진효과를 관찰하기 위해 인간으로부터 직접 채취하거나 상업적으로 구입한 인간의 섬유아세포에 처리하여 실험을 실시하였다.

[0064] 96공 평판배양기(96-well plate)에 2.5% 우태아 혈청이 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media)배지와 인간의 섬유아세포(5000세포/well)를 넣고, 70-80% 정도 자랄 때까지 배양하였다. 그 다음 시료를 각각 농도별로 1일 처리 후 세포배양액을 채취하였다. 채취한 세포배양액을 콜라겐 단백질 측정기구(Catalog N. : MK 101, Takara Shuzo Co. Ltd, Japan)를 이용하여 콜라겐 합성량을 측정하였다.

[0065] 측정 방법은 우선 1차 콜라겐 항체가 균일하게 도포된 96공 평판배양기에 채취된 세포 배양액을 넣고 3시간 동안 항원-항체 반응을 실시하였다. 3시간 후 발색단이 결합된 2차 콜라겐 항체를 96공 평판배양기에 넣고 15분간 반응시켰다. 15분 후 발색 유발물질을 넣어 실온에서 발색시키고, 1M 황산을 넣어 발색을 중지시켰다. 반응색의 색깔은 노란색을 띠며, 반응의 정도에 따라 진하기가 달라진다. 노란색을 띤 96공 평판배양기를 흡광광도계를 이용하여 450㎚에서 흡광도를 측정하고, 아래 수학식 3에 의해 콜라겐 합성 정도를 계산하였다. 이때 시료를 처리하지 않은 세포 배양액의 반응 흡광도를 대조군으로 하였다.

수학식 3

[0066] $$\text{콜라겐 합성효과}(\%) = [(\text{대조군의 반응 흡광도} - \text{시료의 세포 배양액의 반응 흡광도}) / \text{대조군의 반응 흡광도}] \times 100$$

표 4

[0067]

시료명(㎍/㎖)		콜라겐 합성효과(%)
실시예 1	200	40
	100	15

[0068] 표 4에서 나타난 바와 같이 본 발명의 발효 지실 추출물은 우수한 콜라겐 합성 촉진효과가 있음을 알 수 있었다.

[0069] **<실험예 5> 콜라게나제(MMP-1)의 활성 저해 측정 실험**

[0070] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료들의 콜라게나제(MMP-1)의 활성 저해 효과를 관찰하기 위해 시험관내에서 스크리닝 타입의 생화학적 모델에서 측정하였는데 이는 정제된 콜라게나제 및 이의 기질인 플루오레세인에 접합된 콜라겐의 이용을 기초로 한다(EnzChek, 콜라게나제 키트, 몰큘라프루브, 미국).

[0071] 먼저, 반응 완충액(0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl, 5mM $CaCl_2$, 0.02mM NaN_3, pH7.3) 100㎕에 0.25mg/㎖의 DQ 콜라겐 용해액 20㎕와 농도별 시료를 40㎕씩 첨가한 다음, 0.5 Unit의 콜라게나제 40㎕와 잘 혼합하여 암소, 상온에서 20분간 반응하였다. 그 후 형광 분광광도계를 이용하여 흡수파장 495㎚, 방출파장 515㎚에서 형광값을 측정하였다. 양성 대조군으로서는 실시예의 물질 대신 녹차 추출물을 사용하였다. 각 시료의 콜라게나제의 활성 저해효과는 수학식 4를 이용하여 효소활성을 50% 소거하는 농도를 구하여 IC_{50}으로 표시하였다. 이때 음성 대조군으로는 시료를 처리하지 않은 액의 형광값으로 하였다.

수학식 4

[0072] $$\text{기질 금속단백질 분해효소 활성 저해효과}(\%) = [(\text{대조군의 반응 형광값} - \text{시료의 반응 형광값}) / \text{대조군의 반응 형광값}] \times 100$$

표 5

[0073]

시료명	IC_{50}(㎍/㎖)
실시예 1	100
녹차 추출물	200

[0074] 표 5에서 나타난 바와 같이 본 발명의 발효 지실 추출물은 강력한 콜라게나제 활성 저해제인 녹차 추출물과 비교할 때 매우 강력한 저해활성을 나타내었다.

[0075] **<실험예 6> 콜라게나제(MMP-1)의 발현 억제효과 측정 실험**

[0076] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료의 UVA 조사에 의해 발현이 증가되는 콜라게나제의 발현 억제효과를 Petersen 등(1992)이 사용한 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)를 약간 변형하여 실시하였다.

[0077] 먼저, 자외선 챔버를 이용하여 인간 진피 섬유아세포에 UVA를 6.3J/cm^2의 에너지로 조사한 후 시료가 첨가된 배지로 교환하여 24시간 배양한 다음 배지를 회수하여 96공 평판배양기에 코팅하였다. 일차 항체 (MMP-1(Ab-5) 단일클론항체)를 처리하고 37℃에서 90분 반응시킨 다음, 3% BSA를 1시간 처리하여 결합되지 않은 부위를 블로킹하였다. 이차 항체인 항마우스 이뮤노글로불린 지(anti-mouse IgG, Whole mouse, alkaline phosphatase conjugated)를 다시 90분 정도 반응시킨 후, 알카린 포스파타제 기질 용액(1 mg/㎖ p-nitrophenyl phosphate in diethanolamine 완충용액)을 첨가하고 상온에서 30분간 반응시켰다. 흡광광도계를 이용하여 405㎚에서 흡광도를 측정하였다. 아래 수학식 5에 의해 MMP-1 활성 저해 정도를 계산하였다. 이때 시료를 처리하지 않은 세포 배양액의 반응 흡광도를 대조군으로 하였다.

수학식 5

[0078] $$\text{MMP-1 발현 억제율(\%)} = [(\text{대조군의 반응 흡광도} - \text{시료의 세포 배양액의 반응 흡광도})/\text{대조군의 반응 흡광도}] \times 100$$

표 6

[0079]

시료명(㎍/㎖)		발현 억제율(%)
실시예 1	100	78.3
녹차 추출물	100	75

[0080] 표 6에서 나타난 바와 같이 본 발명의 발효 지실 추출물은 녹차 추출물과 비슷한 정도의 강력한 콜라게나제의 발현 저해효과를 나타내었다.

[0081] **<실험예 7> 세포 배양기술을 이용한 자극완화 효과 평가**

[0082] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료의 자극완화 효과를 평가하기 위하여 세포 배양 기술을 이용하여 피부 자극을 유발하는 물질인 소듐라우릴썰페이트(Sodium Lauryl Sulfate:SLS)에 의한 세포 사멸을 저해시키는 정도로 자극완화 효과를 평가한 것이다.

[0083] SLS는 화장품 기재의 피부 자극 평가의 기준이 되는 물질로 세포막에 결합되어 세포대사 억제와 세포막을 파괴하여 피부자극을 유발하는 물질이다. 본 실험예는 사람 섬유아세포에 SLS와 시료를 동시에 첨가하였을 때 SLS에 의한 세포 사멸을 감소시키는 효과를 평가한 것이다. 본 실험예에 사용된 Hs68 섬유아세포는 사람의 피부 진피 세포로 ATCC (American Type Culture Collection, 기탁번호 1635)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양기술을 이용한 자극완화 평가 실험은 다음과 같이 행하였다.

[0084] 먼저, 사람 유래의 섬유아세포를 96공 평판배양기에 각 웰당 1×10^5농도로 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 0.01% SLS 단독, 0.01% SLS와 시료(0.01%)을 동시에 처리하고 24시간 동안 추가배양 하였다. 배양 후 MTT(Sigma 사) 시약을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 1 N NaOH/이소프로판올 용액을 첨가하여 20분간 교반한 후 흡광광도계로 565㎚에서 흡광도를 측정하여 시료의 SLS에 의한 세포사멸을 저해하는 효과를 측정하였다.

표 7

[0085]

시료명(㎍/㎖)	섬유아세포 생존율(%)
실시예 1(100) + SLS(100)	70
SLS(100)	23

[0086] 표 7에 나타난 바와 같이 발효 지실 추출물은 SLS에 의해서 유발되는 세포사멸을 억제시킴으로써 화장료 기재와 함께 처방하였을 때 화장료 기재로 일어날 수 있는 피부 자극을 감소시키는 자극완화 물질임이 밝혀졌다.

[0087] **<실시예 2>**

[0088] 본 실시예는 실시예 1에서 수득한 발효 지실 추출물을 함유한 화장료를 제조하여 사람을 대상으로 피부 잔주름 개선효과를 비교예 1과 비교실험을 행하여 평가하였다.

[0089] 비교실험에 사용된 화장료는 크림형태이고, 그 조성은 표 8에 나타낸 바와 같다. 우선 표 8에 기록되어 있는 나)상을 가열하여 70℃에 보존하였고, 나)상에 가)상을 가하여 예비유화 후 호모믹서로 균일하게 유화하고 다음에 서서히 냉각하여 크림 (실시예 2, 비교예 2)을 제조하였다.

표 8

[0090]

원료		실시예 2	비교예 2
가	스테아릴알콜	8	8
	스테아린산	2	2
	스테아린산콜레스테롤	2	2
	스쿠알란	4	4
	2-옥틸도데실알콜	6	6
	폴리옥시에틸렌(25몰부가) 알콜에스테르	3	3
	글리세릴모노스테아린산 아스테르	2	2
나	발효 지실 추출물	1	-
	프로필렌글리콜	5	5
	정제수	적량	적량

[0091] 주) 단위 : 중량%

[0092] 실험자(20세-35세의 여성) 20명을 대상으로 얼굴 오른쪽 부위에는 실시예 2에서 제조된 크림을 얼굴 왼쪽 부위에는 비교예 2에서 제조된 크림을 각각 1일 2회씩 연속 2개월간 도포하였다.

[0093] 실험완료 후 피부 잔주름 개선 효과는 제품 사용 전과 2개월간 사용 후에 안면 눈꼬리 주위의 주름을 실리콘 수지 복사물(레플리카)로 채취하고, 이것을 피부 미세 주름 장치(SV600, C+K, 독일)와 피부 영상 분석기로 눈가 잔주름의 상태를 비교하였다.

[0094] 표 9는 실시예 2에서 제조된 크림을 사용한 실험자의 눈가 평균 잔주름 깊이 및 주름 감소율을 비교예 2의 크림을 사용한 실험자와 비교한 것이다. 표 9에서 나타난 바와 같이 발효 지실 추출물을 함유한 크림을 도포한 실험자의 안면 눈주위 피부에서 피부 잔주름 개선 효과가 우수함을 알 수 있다.

표 9

[0095]

평가 항목	실시예 2		비교예 2	
	사용전	2개월후	사용전	2개월후
평균 잔주름 깊이	0.201	0.141	0.200	0.195
사용전 대비 주름 감소율(%)	29.9%		2.5%	

[0096] n=20, $p<0.01$

[0097] **<실험예 8> SLS에 의한 피부 자극 완화효과 측정**

[0098] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 발효 지실 추출물을 함유한 화장료의 자극 완화 효과를 인체 첩포 실험으로 평가한 것이다. 본 평가는 실험예 7에서 얻어진 결과를 인체에 직접 적용하여 얻어진 평가의 결과이다. 일반적 화장품 처방 (크림, 로션, 스킨, 에센스)에 자극을 일으키는 SLS(sodium lauryl sulfate)와 실시예 2에서 제조된 제품을 혼용하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 첩포하여 자극 유발지수를 바탕으로 자극완화 효과를 평가한

것이다.

[0099] 20-50세의 건강한 남녀 50명의 팔 상박부위에 FINN CHAMBER (FINLAND)를 이용하여 제품을 0.2㎎씩 첩포하고, 24시간 후 급성 자극 지수를 평가하였다. 평가 후 재차 동일한 부위에 동량의 제품을 첩포하고 48시간 및 72시간 후의 지연성 자극 지수를 평가하였다.

[0100] 시험 결과 발효 지실 추출물을 함유하는 제품을 첩포하고 24시간, 48시간, 72 시간 경과 후에도 아무런 피부 발적을 일으키지 않았다.

[0101] 이 평가의 결과는 발효 지실 추출물이 화장료에 혼용되었을 때 자극을 유발시키는 기재(계면 활성제, 향, 알콜)에 의한 피부 자극을 감소시킬 수 있는 유의한 효과가 있음을 나타낸다.

[0102] **<실시예 3> 발효 지실 추출물을 함유한 화장수 제조**

[0103] 95% 에탄올 8g에 폴리피로리돈 0.05g, 폴리올알콜 0.1g, 폴리옥시에틸렌모노올레이트 0.2g, 향료 0.2g, 파라옥시안식향산메틸에스테르 0.1g, 소량의 산화방지제, 소량의 색소를 혼합용해 한다. 실시예 1에서 수득한 발효 지실 추출물 0.05g, 글리세린 5g을 정제수 85.33g에 용해한 것에 상기 혼합액을 첨가한 후 교반하여 피부 개선효과가 있는 화장수를 얻었다.

[0104] **<실시예 4> 발효 지실 추출물을 함유한 유액의 제조**

[0105] 세틸 알콜(setyl alcohol) 1.2g, 스쿠알란 10g, 바세린 2g, 파라옥시안식향산에틸에스테르 0.2g, 글리세린모노에스테아리에트 1g, 폴리옥시에틸렌(20몰 부가)모노올레이트 1g 및 향료 0.1g을 70℃에서 가열혼합 용해하고, 실시예 1에서 수득한 발효 지실 추출물 0.05g, 디프로필렌글리콜 5g, 폴리에틸렌글리콜1500 2g, 트리에탄올아민 0.2g, 정제수 76.2g을 75℃로 가열하여 가열용해 시킨다. 양자를 혼합하여 유화시킨 후 냉각하여 수/유중계형의 피부 개선효과가 있는 유액을 제조하였ㄷ.

[0106] **<실시예 5> 발효 지실 추출물을 함유한 미용액의 제조**

[0107] 95% 에틸알콜 5g에 폴리옥시에틸렌솔비탄모노올레이트 1.2g, 키틀로오즈 0.3g, 히야론산나트륨 0.2g, 비타민 E-아세테이트 0.2g, 감초산 나트륨 0.2g, 파라옥시안식향산에스텔에스테르 0.1g, 실시예 1에서 수득한 발효 지실 추출물 각 1g 및 적량의 색소를 혼합하여 피부 개선효과가 있는 미용액을 얻었다.