



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월25일
(11) 등록번호 10-1972462
(24) 등록일자 2019년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) A61K 36/61 (2006.01)
A61K 8/66 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A61K 36/61 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0048154
(22) 출원일자 2016년04월20일
심사청구일자 2016년04월20일
(65) 공개번호 10-2017-0119898
(43) 공개일자 2017년10월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150115515 A*
US08435541 B2*
KR1020150068713 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)에스디생명공학
서울특별시 강서구 공항대로61길 29, c동 301호(등촌동, 신기술창업센터)
(72) 발명자
이태후
서울특별시 강남구 논현로 807 정지행한의원
황은선
경기도 용인시 기흥구 서천로172번길 21-3, 202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안창우, 조정환

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 안규정

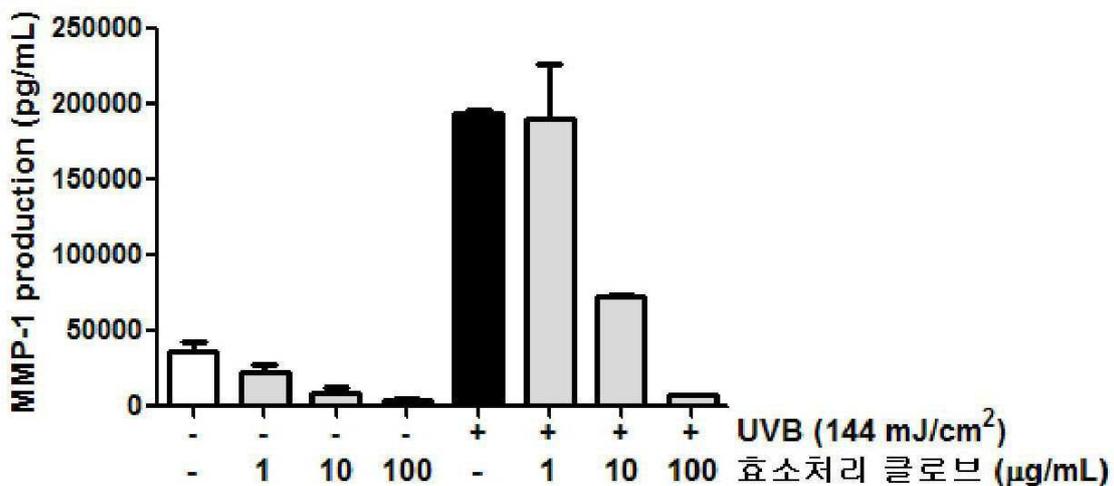
(54) 발명의 명칭 **효소처리 클로브 추출물을 함유하는 조성물**

(57) 요약

본 발명은 클로브 원재료에 대한 추출과 여과 및 농축을 거쳐 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 포함하도록 생성됨을 특징으로 하며, 세부구성으로서 상기한 효소처리의 클로브 추출물은 물, C1 내지 C2의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하고, 또 다른 본 발명의 세부구성으로서 상기한 저급알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하며, 상기 과정에서 추출된 조성물은 당분해제, 지질분해제, 펙틴분해제를 선택적으로 첨가하여 효소 활성을 소실시키는 것을 특징으로 한다.

이러한 본 발명에 따르면, DPPH 억제활성, 인간의 피부섬유 모세포(HDF:human dermal fibroblast)에서 Type-1 procollagen 생성촉진, MMP-1 및 MMP-3 의 생성을 억제시키는 효과를 통한 피부노화방지 및 주름개선 효능을 나타냄과 동시에 세포생존율의 변화를 나타내지 아니하여 우수한 안전성(safety)을 확보하는 효과가 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 8/66 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

박봄

경기도 수원시 영통구 이의동 센트럴타운로 76,
6103동 701호

서슬아

경기도 수원시 권선구 세지로42번길 25-17 중앙하
이즈빌라 11동 301호

조진경

경기도 오산시 여계산로 10, 금암마을 휴먼시아
706동 505호

양정은

경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로196번길 21

명세서

청구범위

청구항 1

알파 갈락토시다아제 또는 셀룰라아제에서 선택되는 하나 이상의 효소와 20-40메쉬(mesh)로 분쇄된 클로브, 및 물을 혼합하여 50 내지 60℃에서 24시간 반응하여 생성된 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 포함하되, 상기 효소, 클로브, 및 물은 0.1 내지 0.2: 1: 10의 중량부로 혼합된 것을 특징으로 하는 주름개선용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 주름개선용 조성물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항의 주름개선용 조성물을 유효성분으로 함유하는 건강식품 조성물.

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 화장료 등의 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하여 피부주름 개선 및 피부노화 방지를 도모하는 효소처리 클로브 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 사람의 피부는 크게 표피층, 진피층, 피하지방층으로 구성되어 있다. 피부의 가장 기본적인 역할은 우리 몸으로부터 수분이 증발되는 것을 막아주고, 외부로부터 유해성분이 침입하는 것을 막아주는 것이다. 이러한 피부는 항상 외부자극에 노출되어 있기 때문에 다양한 방어능력을 가지고 있다.

[0003] 또한, 피부는 아름다움을 나타내는 표상으로써 피부가 건강하고 깨끗함은 곧 사람의 아름다움으로 인식되는 경우가 많다. 최근 들어, 여성뿐만 아니라 남성들도 피부노화 등 여러 가지 피부트러블들에 대한 관심이 많아지면서 이와 관련된 제품들이 많이 개발되고 있다.

[0004] 피부 노화는 크게 두 종류로 나눌 수 있다. 첫 번째는 내인성노화(intrinsic aging)로서, 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화현상을 말한다. 두 번째는 광노화(photoaging)로서, 오랫동안 햇빛에 노출된 얼굴, 손등, 목 뒤 등의 피부에서 관찰되는 노화현상을 말하는 것으로 내인성 노화 현상과 자외선에 의한 영향이 합쳐진 결과로 발생한다.

[0005] 이러한 피부노화의 원인은 콜라겐 및 탄력섬유 등의 기질단백질이 손상되어 피부 내 콜라겐의 양이 부족해지고, 탄력섬유가 변성되어 나타난다고 알려져 있다. 또한, 피부노화가 진행되는 과정 중에는 다양한 신호전달경로를 거쳐 콜라겐의 합성이 감소되고, 콜라겐을 비롯한 세포의 기질단백질의 분해효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현이 증가된다고 알려졌다. 이와 같이 콜라겐은 피부노화와 관련된 주요인자로 인식되어 있어 콜라겐의 합성증진 및 분해억제는 피부노화억제 및 피부미용과 관련하여 중요한 지표가 되고 있

다.

- [0006] 이러한 MMP는 다형핵성호중구(Polymorphonuclear neutrophil), 대식세포(Macrophage), 섬유아세포(Fibroblast) 등과 같은 세포로부터 분비되는 칼슘 및 아연 의존성 엔도펩티다제(Endopeptidase)로 중성 pH에서 작용하며, 기질로서 여러 가지세포의 기질을 이용한다. 주로 피부에서는 MMP-1, MMP-3, MMP-9 이외에 여러 가지 효소들이 작용하는데, 콜라겐 분해와 관련되어 가장 근본적으로 작용하는 효소는 MMP-1이다.
- [0007] 일반적으로 콜라겐 합성을 촉진하는 종래의 물질로는 레티노이드(RE36068), TGF-β(transforming growth factor), 베틀린산(JP8-208424) 등이 있으며, MMP-1의 생성을 억제하는 물질로는 TGF-β(transforming growth factor)가 대표적으로 알려져 있으며, 그 외에도 다양한 천연물들이 MMP-1 생합성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 주름생성을 억제하는 방법은 콜라겐합성을 촉진하거나, 또는 콜라겐 분해효소의 생성 및 활성을 억제하는 방법을 사용할 수 있으며, 보다 효과적이고 용이하며 안전한 주름개선을 위한 화장료의 개발이 절실히 요구되고 있다.
- [0008] 최근 연구에 의하면, 자외선에 의하여 자극된 사이토카인(IL-6 등)의 발현이 MMP-1 및 MMP-3 등의 노화지표에 영향을 미친다는 보고가 있다. (Hwang E, Kim SH, Lee S, Lee CH, Do SG, Kim J, Kim SY. A Comparative Study of Baby Immature and Adult Shoots of Aloe Vera on UVB-Induced Skin Photoaging in vitro. Phytother Res. 2013 Mar 15) 자외선조사에 의하여 Type-1 Procollagen의 발현 또한 억제되는 것으로 보고되고 있다.
- [0009] 국내에서는 클로브(Syzygiumaromaticum)의 본초학적 연구를 바탕으로 향산화, 항비만, 항 당뇨효과가 보고된 바 있다. 클로브는 정향나무과포도속에 속하는 나무로 원산지는 인도네시아이지만, 현재는 인도, 말레이시아, 스리랑카, 브라질 등의 해안가 지역에서 고루 재배되고 있다. 클로브의 연구와 더불어 추출물을 화장품, 의약품, 식품 등에 활용하려는 노력도 시도되고 있다.
- [0010] 이와 관련하여 참조할 수 있는 선행기술문헌으로서 한국 등록특허공보 제2015-0115515호(선행문헌 1), 한국 등록특허공보 제1456052호(선행문헌 2) 등이 알려져 있다.
- [0011] 선행문헌 1은 (a) 정향을 용매로 추출하여 정향 용매추출물을 수득하는 단계; (b) 상기 정향 용매추출물에서 용매를 제거하는 단계; 및 (c) 상기 용매가 제거된 추출물을 가수분해효소로 처리하여, 효소 처리된 정향추출물을 수득하는 단계;를 포함한다.
- [0012] 선행문헌 2는 감초, 고분, 광향, 길경, 녹용, 당귀, 대추, 동충하초, 목향, 백복령, 백지, 사인, 사향초, 석류, 석창포, 송로버섯, 송이, 영지, 오약, 용담, 인삼, 작약, 정향, 조각자, 진피, 창출, 천산설연화, 천화분, 축초, 행인 및 홍삼으로 이루어지는 군으로부터 1 종 이상 선택되는 약재의 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 주름개선용 화장료 조성물을 제안한다.
- [0013] 그러나 선행문헌 1의 경우 향산화능의 발현을 요지로 하므로 주름개선 효능에 대해서는 미지수이고, 선행문헌 2의 경우 정향에 특화되지 않은 범용적 약재를 기반으로 하면서 화장료에 한정되는 한계성을 드러낸다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0014] (특허문헌 0001) 1. 한국 등록특허공보 제2015-0115515호 “정향의 효소처리 추출물을 함유하는 향산화용 조성물” (공개일자 : 2015.10.14.)
- (특허문헌 0002) 2. 한국 등록특허공보 제1456052호 “주름개선용 화장료 조성물” (공개일자 : 2008.10.23.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 상기와 같은 종래의 문제점들을 개선하기 위한 본 발명의 목적은, 피부주름, 노화방지 등의 측면에서 우수한 기능을 나타내면서 화장품은 물론, 식품이나 의약품 등에서 안정적인 효능을 발휘할 수 있는 효소처리의 클로브 추출물을 함유하는 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 클로브 원재료에 대한 추출과 여과 및 농축을 거쳐 효소처리의 클로브 추출물을 유효성분으로 포함하도록 생성된다.
- [0017] 본 발명의 세부구성으로서, 상기한 효소처리의 클로브 추출물은 물, 여러 종류의 저급알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 세부구성으로서, 상기 저급알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 세부구성으로서, 상기 과정에서 추출된 조성물은 당분해제, 지질분해제, 펙틴분해제를 선택적으로 첨가하여 효소 활성을 소실시키는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 세부구성으로서, 상기 효소는 알파 갈락토시다아제(Alpha-Galactosidase), 펙라이브(Pecllyve) LI (pecinase, cellulase), 필터라아제(Filterase) Premium L, Tannase KTFH, 셀룰라아제(cellulase) KN, 크리스탈자임(Crystalzyme PMLX), 셀루이베(Celluyve) AN 3500 (cellulase), 래피디아아제(Rapidase) FP super(pectin methyl esterase), Bio Win G (P-L), 서미자임(Sumizyme) AC 인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 세부구성으로서, 상기한 조성물은 화장품의 경우에 완제품 기준으로 총 중량에 대해 1 내지 15 중량%로 첨가하고, 의약품의 경우에는 완제품 기준으로 총 중량에 대해 0.001 내지 50 중량%로 첨가되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0022] 이러한 본 발명에 의하면, DPPH 억제활성, 인간의 피부섬유 모세포(HDF:human dermal fibroblast)에서 Type-1 procollagen 생성촉진, MMP-1 및 MMP-3 의 생성을 억제시키는 효과를 통한 피부노화방지 및 주름개선 효능을 나타냄과 동시에 세포생존율의 변화를 나타내지 아니하여 우수한 안전성(safety)을 확보하는 효과가 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 제조방법에 따라 얻어진 효소처리 클로브 추출물은 화장품은 물론 식품, 의약품 등에 부가되는 조성물로서 유용하게 활용 가능한 작용 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 효소의 미처리 클로브 추출물과 효소처리 클로브 추출물의 HLPC 분석 결과를 나타낸 도면이고,
 도 2는 시험에 1에 따라 수행한 효소처리 클로브 추출물의 DPPH radical 억제활성을 나타낸 그림이며,
 도 3은 시험에 2에 따라 수행한 효소처리 클로브 추출물에 대한 자외선 조사 후 세포생존율 실험의 결과를 나타내는 그래프이고,
 도 4는 시험에 3에 따라 수행한 효소처리 클로브 추출물에 대한 MMP-1의 발현량을 확인한 결과를 나타내는 그림이며,
 도 5는 시험에 4에 따라 수행한 효소처리 클로브 추출물에 대한 MMP-3의 발현량을 확인한 결과를 나타내는 그림이고,
 도 6은 시험에 4에 따라 수행한 효소처리 클로브 추출물에 대한 IL-6의 발현량을 확인한 결과를 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 첨부된 도면에 의거하여 본 발명의 실시예를 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0026] 본 발명은 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선화장품, 식품, 의약품의 조성물을 제공한다. 본 출원인은 종래의 피부주름개선용 화장품, 식품, 의약품의 조성물에 관하여 예의 연구하던 중, 효소처리 클로브 추출물을 사용하는 경우에는 우수한 피부노화방지 활성을 나타낸다는 것을 살피게 되어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0027] 보다 상세하게는 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 함유함으로써 DPPH 억제활성, Type-1 procollagen 생성촉진, MMP-1 및 MMP-3의 생성을 감소시키는 효과를 통한 피부노화방지 및 주름개선 효과를 나타내어 피부주름 개선에 도움을 주는 식품, 의약품, 화장품의 조성물에 관한 것이다.

- [0028] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기한 추출물은 효소처리 클로브를 추출 용매로서 물, C1~C4 알코올, 또는 C1~C4 알코올과 물의 혼합용매로 추출하는 것을 포함하는 추출방법에 의해 얻어질 수 있다. 하나의 구현 예에서, 상기 추출용매는 에탄올 수용액이다.
- [0029] 상기 효소는 Alpha-Galactosidase, Pectlyve LI (pectinase, cellulase), Filterase Premium L, Tannase KTFH, cellulase KN, Crystalzyme PMLX, Celluyve AN 3500 (cellulase), Rapidase FP super (pectin methyl esterase), Bio Win G (P-L), Sumizyme AC인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출물에 대해서는 5 g(ml) ~ 20 g(ml)/100 ml로 첨가하는 것이 바람직하고, 10g(ml)/100 ml로 첨가하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 효소는 pH 5.0 ~ 6.5, 40 ~ 50°C 의 조건에서 반응시키는 것이 바람직하고, pH 5.2 ~ 6.0, 42 ~ 45°C의 조건에서 반응시키는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 반응시간은 1 ~ 3시간인 것이 바람직하고, 1.5시간인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 상기한 효소처리 클로브 추출물은 유기용매를 각각, 또는 물과 혼합한 것을 용매로 하여 추출한 후, 당분해제, 지질분해제 및 펙틴분해제를 첨가하여 효소 활성을 소실시키는 것이 바람직하다.
- [0031] 상기 효소처리 클로브 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0032] 1) 효소처리 클로브에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0033] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계;
- [0034] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축하는 단계; 및
- [0035] 4) 단계 3)의 농축된 추출물을 건조 분말화하는 단계.
- [0036] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 효소처리 클로브는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 효소처리 클로브는 잎, 종자, 열매, 뿌리 또는 지상부(aerial part)를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0037] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 추출물은 효소처리 클로브를 추출용매로서 물, C1~C4 알코올, 또는 C1~C4 알코올과 물의 혼합용매로 추출하는 것을 포함하는 추출방법에 의해 얻어질 수 있다. 하나의 구현 예에서, 상기 추출용매는 에탄올수용액, 예를 들어 95 중량%의 에탄올 수용액일 수도 있다.
- [0038] 상기한 추출용매의 사용량은 크게 제한되는 것은 아니며, 예를 들어 효소처리 클로브 1kg에 대하여 약 1 내지 10리터 부피, 바람직하게는 약 1 내지 5리터 부피의 비율로 사용될 수 있다. 또한, 상기한 추출과정은 약 30분 내지 48시간, 바람직하게는 약 30분내지 24시간동안, 실온에서의 추출, 열수추출, 초음파추출, 환류냉각추출 등의 추출방법으로 수행될 수 있다. 하나의 구현 예에서, 상기 추출은 약 80°C에서 환류냉각추출 방법으로 수행될 수 있다. 또 상기한 추출과정은 단회 또는 복수회로 수행할 수 있고, 바람직하게는 약 3회 정도 반복 수행할 수 있다. 추출액은 필요에 따라 통상의 방법, 예를 들어 약 30 내지 70°C에서, 감압 농축하거나 감압 건조함으로써, 액상, 반고체 또는 분말 형태로 얻을 수 있다.
- [0039] 본 발명은 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로서 함유하는 피부주름의 개선효능이 있는 식품이나 의약품 및 화장품의 조성물을 제공한다. 따라서 피부노화를 억제하고 주름을 개선하는 등의 효능을 나타내기 위해서, DPPH radical 억제활성, Type-1 procollagen 생성촉진, MMP-1, MMP-3의 생성감소를 필요로 한다.
- [0040] 효소처리 클로브 추출물은 우수한 항산화 효과 및 MMP-1의 억제활성을 가지고 있어, 세포보호 효과 및 주름억제 효과가 우수하므로, 피부주름 개선에 효과적인 화장료 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다. 또한 본 발명에 의한 효소처리 클로브 추출물을 함유하는 식품이나 의약품 및 화장품의 조성물은 피부노화 억제용, 피부주름 개선용 식품, 의약품 및 화장품으로 제형화될 수 있다.
- [0041] 상기한 화장료조성물은, 예를 들면 용액, 겔, 고체 또는 반죽무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 폼(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다. 또 상기한 화장료 조성물은, 본 발명의 효소처리 클로브 추출물에 추가로 지방물질, 유기용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수오일, 염료, 안

료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

[0042] 본 발명의 효소처리 클로브 추출물을 함유하는 화장품 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장품 조성물에 본 발명의 추출물이 1 내지 15 중량%, 바람직하게는 2 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 효소처리 클로브 추출물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방물질, 유기용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질소낭 또는 피부용 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 상기한 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 상기한 효소처리 클로브 추출물 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학조성물 형태일 수 있다. 상기 약학조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 및 멸균주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘스테아레이트 및 광물유 등을 포함한다. 또한, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면 활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다. 경구용 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구용 액상제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제를 포함하며, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브오일과 같은 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다.

[0045] 상기 약학조성물에 함유되는 효소처리 클로브 추출물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기한 효소처리의 클로브 추출물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여 할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 상기의 약학조성물은 조성물 총중량에 대하여 효소처리의 클로브 추출물을 0.001 내지 50 중량%로 포함할 수 있다. 상기한 약학조성물은 인간 등의 포유동물에 있어서 다양한 경로로, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 또는 피하주사에 의해 투여될 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 효소처리의 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선용 건강식품을 제공한다.

[0047] 본 발명에 따른 효소처리의 클로브 추출물은 우수한 항산화효과 및 MMP-1의 억제활성을 가지고 있어, 세포보호 효과 및 주름억제효과가 우수하므로 피부주름 개선용 건강식품으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 건강식품은 효소처리 클로브 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기한 효소처리의 클로브 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스펙류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0049] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아추출물과 같은 천연감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03g 이다.

[0050] 상기 외에 본 발명의 효소처리 클로브 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성콜로이드중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 효소처리 클로브 추출물은 천연과일주

스, 과일주스음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당, 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0051] 이하, 본 발명은 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명되고 이해될 수 있다. 그러나 이들 시험예 및 제조에는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0052] <효소-처리 클로브 추출물의 제조 및 분석>

[0053] 1. 효소처리 클로브 추출물의 제조

[0054] 클로브를 20-40메쉬(mesh)로 분쇄하여 플라스크 또는 유리 용기에 담았다. 별도의 과정으로 얻은 효소를 클로브 무게에 대하여 10-20%에 해당하는 중량으로 클로브 무게 대비 10배 부피의 물에 녹여 클로브가 담긴 플라스크에 넣고 잘 혼합하였다. 용기에 담긴 혼합물을 50-60℃에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 원심분리를 통하여 상등액과 침전물을 구분하고 침전물에 50% EtOH을 중량 비 10배의 무게로 첨가한 후, 70℃에서 4시간 환류 추출 하였다. 추출 후 여과를 거쳐 농축하여 EtOH을 제거한 후, 초기 반응 후에 얻어진 상등액과 혼합하여 동결건조를 진행하였다.

[0055] 2. 효소처리 클로브 추출물의 분석

[0056] (1) HPLC를 이용한 성분 변화 분석

[0057] HPLC 분석에는 PDA HPLC system 기기와 Eclipse XDB-C18 column (4.6 X 250 mm, ID 5 μ m)을 사용하였으며, 이동상은 물(H₂O, 100%)와 아세트나이트릴(CH₃CN, 100%)를 혼합하여 사용하였다. 기울기 용리(Gradient elution) 비율(물:아세트나이트릴)이 75:25, 68:32, 45:55, 40:60, 0:100, 0:100 및 75:25분일 때, 각각 0-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-27, 27-30 및 30-40로 조절하였다. 이동상의 유속은 1.2ml/min으로 흘려주었으며, UV 탐지기(UV detector)를 이용하여 203nm에서 성분을 분석하였다 (도 1).

[0058] 실시예 1: 추출물의 제조

[0059] 효소처리 클로브 500g에 50중량%의 에탄올수용액 10L를 가하고, 80℃에서 30분 동안 환류 추출하였다. 추출액을 여과한 후, 얻어진 여액을 45℃ 이하에서 진공 농축하여 반고체 형태의 추출물 약 60g을 얻었다.

[0060] 시험예 1: 항산화효과

[0061] 산화적 스트레스는 피부가 자외선에 노출되었을 때, 세포가 반응하는 신호전달 체계를 작동시키고 과산화수소 등의 활성산소종의 발생을 증가시키며, 항산화효소의 발현을 감소시킨다. 이러한 활성산소종의 증가는 유전자와 단백질의 구조를 변화시켜 세포내외의 항상성이 파괴되어 피부의 손상을 유발하여 피부노화를 촉진 시킨다. 이와 같은 피부노화를 촉진시키는 활성산소종의 하나인 DPPH radical의 억제활성은 항산화효능을 평가하는 중요한 지표가 된다.

[0062] DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, USA)의 환원력을 이용하는 상등의 문헌(Sang S et al., J.Agric. Food Chem. 50(8), p2459-2463, 2002)에 기재된 방법에 따라, 본 발명에 따른 효모추출물의 항산화 활성을 측정하였다.

[0063] 메탄올에 녹인 0.2mM DPPH 용액 180 μ l와 증류수 20 μ l에 녹인 효소처리 클로브 및 Arbutin(양성제조군) (0.1, 1, 10, 100, 250 μ g/ml)를 96-웰마이크로 플레이트에 넣고 37℃에서 30분간 배양한 후, 환원된 DPPH의 양을 분광 광도계(Precision microplate reader; Molecular Devices, VersaMax)를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 가하지 않는 무첨가 대조군과 활성을 비교하였다. 상기 시험은 3회 반복하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0064] 시험예 2: 세포생존율 측정

[0065] 효소처리 클로브 추출물이 사람의 섬유아세포의 세포성장 효과에 미치는 영향을, 사람섬유아세포(human dermal fibroblast, HDF) (MCTT사, 서울, 한국)을 사용하여 평가하였다. 10% FBS (fetal bovine serum, Cambrex)가 포함된 DMEM (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지에 HDF를 40mm 디쉬에 1.2x10⁵ /디쉬로 씨딩한 다음 1일을 배양하고, 배지제거 후 300 μ l의 PBS를 넣고 UV를 조사한 다음, 무혈청 DMEM 배지로 희석한 효소처리 클로브를 72시간동안 처리하여 배양하였다.

[0066] 이후 1ml 배양액은 따로 취하여 원심분리 후 보관하고, 1mg/ml의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyl tetrazolium bromide) 시약 100 μ l를 상기 배양액에 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 습윤 조건하에서 4시간동안 배양하였다. 배양 시, 살아있는 세포에는 보라색의 크리스탈이 형성된다. 2시간 배양 후 배지를 제거하고, DMSO 800 μ l를 넣어 10분 동안 셰이킹 인큐베이터(shaking incubator)에서 크리스탈을 녹인 후, 570nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장의 정도를 측정하였다. 상기 시험은 3회 반복하였으며, 얻어진 결과는 도 3와 같다. 도 3의 결과로부터, 효소처리 클로브가 세포독성을 갖고 있지 않음을 알 수 있다. 상기 얻어진 결과의 통계처리는 GraphPad Prism 프로그램을 사용하여 실시하였으며, one-way analysis of vatiance(ANOVA)를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

[0067] 시험예 3: MMP-1, MMP-3 및 IL-6 억제효과

[0068] 인간섬유아세포를 40mm 세포배양접시에 2ml의 배양액을 넣고 약 1.2x10⁵의 농도로 세포를 접종한 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 환경에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 자외선 B를 144mJ/cm² 로 조사한 후, 효소처리 클로브 추출물을 (1, 10, 및 100 μ g/ml)을 포함한 배지로 교체하여 3일간 배양하였다. 이후 배양액을 회수(harvest)하여 4 $^{\circ}$ C, 7500rpm 환경에서 5분간 원심분리(centrifuge)한 뒤, ELISA 방법을 이용하여 MMP-1, MMP-3 및 IL-6 (Human Total MMP-1 kit; Human Total MMP-3 kit; Human Total IL-6 kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)의 발현량을 확인하였다. 그 결과는 도 4, 도5 및 도6에 나타내었다. 도 4, 5, 6의 결과로부터 자외선조사에 의하여 자극된 MMP-1, MMP-3 및 IL-6 생성이 효소처리 클로브 추출물에 의해 억제된 것을 확인하였다. 다음의 결과로부터 췌기풀의 광노화 억제효과가 있음을 확인하였다.

[0069] **제조예 1: 효소처리의 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료의 제조**

[0070] <1-1> 유연화장수의 제조

[0071] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 유연화장수는 하기 [표 1]과 같이 제조하였다.

[0072] [표 1]

원료함량	(중량 부)
효소처리 클로브 추출물	10.00
1,3-부틸렌글리콜	1.00
디소듐이디티에이	0.05
알란토인	0.10
디포타슘글리시리제이트	0.05
시트릭에씨드	0.01
소듐시트레이트	0.02
글리세레스-26	1.00
알부틴	2.00
하이드로제네이티드케스터오일	1.00
에탄올	30.00
보존제	미량
착색제	미량
착향제	미량
정제수	잔량

[0073]

[0074] <1-2> 영양크림의 제조

[0075] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 함유한 영양크림은 하기 [표 2]의 조성과 같이 제조하였다.

[0076] [표 2]

원료함량	(중량 부)
효소처리 클로브 추출물	10.0
1,3-부틸렌글리콜	7.0
글리세린	1.0
D-판테놀	0.1
식물추출물	3.2
마크레알루미늄실리케이트	0.3
PEG-40 스테아레이트	1.2
스테아릭에씨트	2.0
폴리소르베이트 60	1.5
친유형글리세릴스테아레이트	2.0
소르비탄세스퀴올레이트	1.5
세테아릴알코올	3.0
미네랄오일	4.0
스쿠알란	3.8
카르릴릭/카프리트리글리세라이드	2.8
식물성오일	1.8
디메치콘	0.4
디포타슘글리시리케이트	미량
알란토인	미량
소듐하이드로록시드	미량
토코페릴아세테이트	적량
트리에탄올아민	적량
보존제	적량
착향제	적량
정제수	잔량

[0077]

[0078] **제조예 2: 효소처리의 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 약제의 제조**

[0079] <2-1> 시럽제의 제조

[0080] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 시럽제는 하기 [표 3]의 조성파 같이 제조하였다.

[0081] [표 3]

구성성분함량	(중량 부)
효소처리 클로브 추출물	2
사카린	0.8
당	25.4
글리세린	8
향미료	0.04
에탄올	4
소르브산	0.4
증류수	60

[0082]

[0083] **제조예 2: 효소처리의 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 약제의 제조**

[0084] <2-1> 시럽제의 제조

[0085] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 시럽제는 하기 [표 3]의 조성파 같이 제조하였다.

[0086] [표 4]

구성성분함량	(중량 부)
효소처리 클로브 추출물	250
락토오스	175.9
감자전분	180
콜로이드성 규산	32
10% 젤라틴용액	5
감자전분	160
활석	50
스테아르산마그네슘	5

[0087]

[0088] 상기 <실시예 1>에 따른 효소처리 클로브 추출물의 250 중량부, 락토오스 175.9 중량부, 감자전분 180 중량부 및 콜로이드성 규산 32 중량부와 혼합하였다. 상기 혼합물에 10% 젤라틴용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 매쉬 체를 통과시켰다. 이것을 건조하고, 여기에 감자전분 160 중량부, 활석 50 중량부 및 스테아린산 마그네슘 5 중량부를 첨가하여 얻은 혼합물을 정제로 제조하였다.

[0089] **제조예 3: 효소처리의 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강식품의 제조**

[0090] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0091] <3-1> 밀가루식품의 제조

[0092] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0093] <3-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0094] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강증진용 육가공제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0095] <3-3> 그라운드비프(ground beef)의 제조

[0096] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물 10 중량부를 그라운드비프에 첨가하여 건강증진용 그라운드비프를 제조하였다.

[0097] <3-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0098] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0099] <3-5> 선식의 제조

[0100] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬(mesh)의 분말로 제조하였다.

[0101] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후, 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다.

[0102] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물을 진공농축기에서 감압 농축하고, 분무 및 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0103] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 실시예 <1-3>의 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0104] 곡물류(현미 30 중량부, 울무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0105] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0106] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물(3 중량부),

[0107] 영지(0.5 중량부),

[0108] 지황(0.5 중량부)

[0109] **제조예 4: 효소처리된 클로브 추출물을 유효성분으로 함유하는 음료의 제조**

[0110] <4-1> 건강음료의 제조

[0111] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와, 본 발명에 따른 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물 5g을 균질하게 배합하여 순간살균한 후, 이를 유리병, 팩트병 등의 소포장용기에 포장하여 제조하였다.

[0112] <4-2> 야채주스의 제조

[0113] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물 5g을 토마토 또는 당근주스 1,000ml에 가하여 야채주스를 제조하였다.

[0114] <4-3> 과일주스의 제조

[0115] 상기 <실시예 1>의 효소처리 클로브 추출물 1g을 사과 또는 포도주스 1,000ml에 가하여 과일주스를 제조하였다.

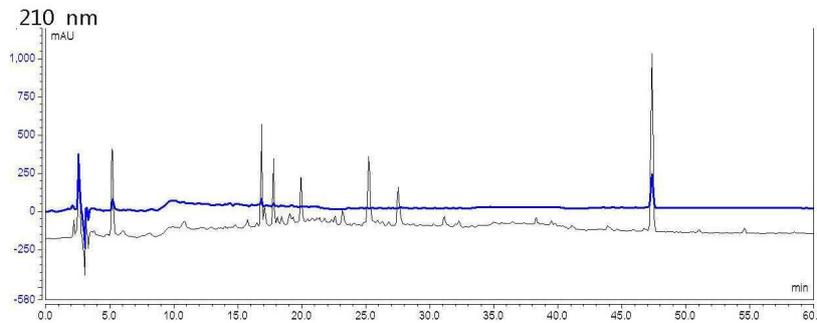
[0116] 이러한 실시예에 따라 나타나고 있는 본 발명의 작용 효과 면을 살펴보면, DPPH 억제활성, 인간의 피부섬유 모세포(HDF:human dermal fibroblast)에서 Type-1 procollagen 생성촉진, MMP-1 및 MMP-3의 생성을 억제시키는 효과를 통한 피부노화방지 및 주름개선 효능을 나타냄과 동시에 세포생존율의 변화를 나타내지 아니하여 우수한 안전성(safety)을 확보하는 효과가 있을 뿐만 아니라, 본 발명의 제조방법에 따라 얻어진 효소처리된 클로브 추출물을 화장품과 식품 및 의약품 등지에 추가되는 조성물로서 유용하게 활용 가능한 효과가 있다 할 것이다.

[0117] 덧붙여 본 발명은 기재된 실시예에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양하게 수정 및 변형할 수 있음은 이 기술의 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 따라서 그러한 변형예 또는 수정예들은 본 발명의 특허청구범위에 속한다 해야 할 것이다.

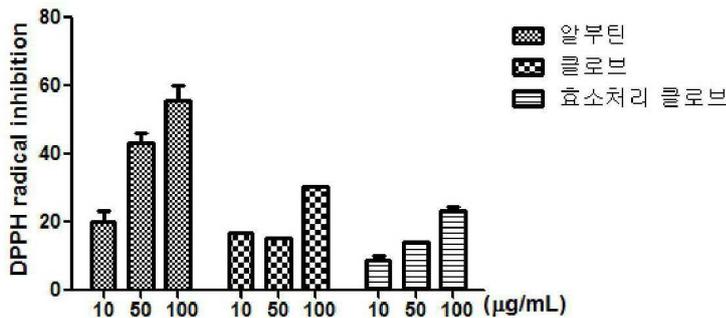
도면

도면1

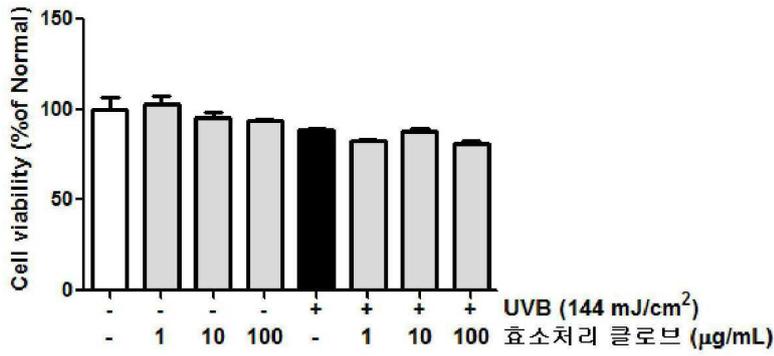
추출물/ 발효물



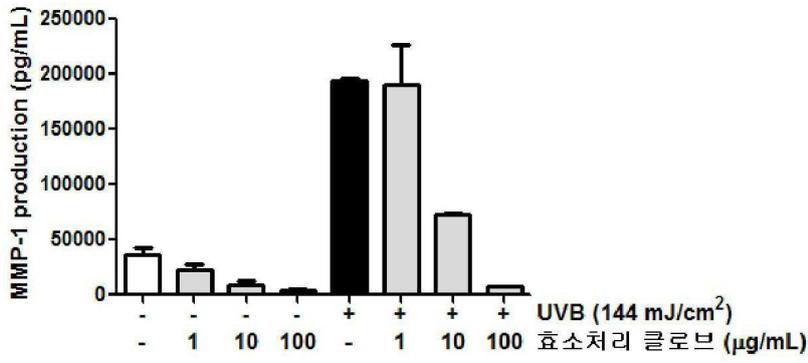
도면2



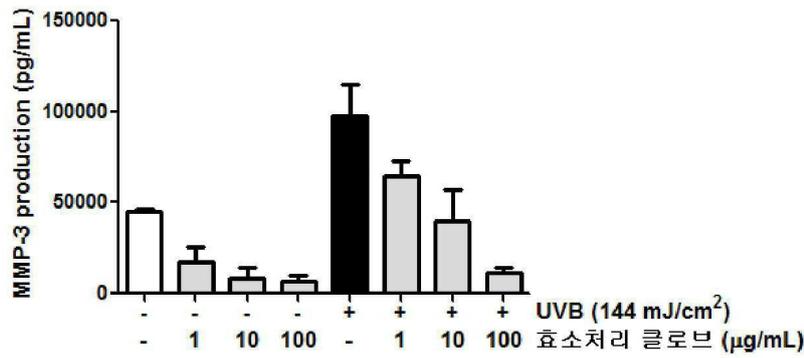
도면3



도면4



도면5



도면6

