



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0073313
(43) 공개일자 2020년06월24일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 8/9728</i> (2017.01) <i>A61K 8/9789</i> (2017.01)
 <i>A61Q 19/02</i> (2006.01) <i>A61Q 19/08</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 8/9728</i> (2017.08)
 <i>A61K 8/9789</i> (2017.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0160623
 (22) 출원일자 2018년12월13일
 심사청구일자 2018년12월13일</p> | <p>(71) 출원인
 (주) 에이텍
 대전광역시 대덕구 대화로52번안길 35 (대화동)</p> <p>(72) 발명자
 김지현
 대전광역시 서구 청사로 70 누리아파트 114동 1403호
 서은경
 대전광역시 대덕구 대덕대로 1555 금강엑슬루타워 111동 1301호
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인케이원</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 유성온천수를 이용한 능이와 신이의 온천수발효추출물 함유 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 유성온천수를 이용한 능이와 신이의 온천수발효추출물 함유 화장료 조성물에 관한 것이며 능이와 신이의 유성온천수 추출액을 능이버섯균사체로 발효시켜 추출한 온천수발효추출물을 유효성분으로 함유한다.

본 발명은 능이와 신이의 유성온천수발효추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 우수한 멜라닌생성 억제, 콜라겐 합성 증진, 및 항산화 활성을 가져, 피부 미백, 주름 개선과 탄력 증진, 및 노화 지연 효과가 뛰어나다.

(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2800/85 (2013.01)

(72) 발명자

남승욱

대전광역시 동구 우암로326번길 44 (가양동)

김유준

강원도 강릉시 남부로125번길 37 102동 608호 (내곡동, 삼익아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 P0002338

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 풀뿌리기업육성사업

연구과제명 대전 유성구 온천수를 활용한 뷰티.바이오 융합제품 육성사업

기 여 율 1/1

주관기관 대전대학교 산학협력단

연구기간 2018.04.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 유효성분이 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.01 ~ 20중량%를 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 능이 및 신이의 온천수 발효추출물은 능이 및 신이의 유성온천수 추출액을 능이버섯(*Sarcodon aspratus*) 균사체로 발효시킨 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 조성물이 피부 미백, 주름개선, 또는 항산화용 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 5

청구항1 내지 청구항 4 중 어느 하나의 항에 있어서, 조성물이 화장수, 유액, 크림, 에센스, 팩, 마스크, 파운데이션, 자외선차단제품, BB크림, 또는 피부세정제 제형인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 6

- 능이와 신이를 중량단위로 1 : 1의 비율로 혼합한 혼합물을 유성온천수로 추출하거나 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로부터 선택되는 하나 이상의 성분과 유성온천수의 혼합용액을 추출용매로 추출하여 능이와 신이의 온천수추출액을 얻는 제1공정,
- 제1공정에서 얻은 능이와 신이의 온천수 추출액을 능이버섯(*Sarcodon aspratus*) 균사체로 발효시켜 능이와 신이 온천수발효추출액을 제조하는 제2공정 및
- 제2공정에서 제조한 능이와 신이 온천수발효추출액을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제조하는 제3공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물의 제조방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 능이버섯(*Sarcodon aspratus*) 균사체는 유성온천수가 함유된 효모-맥아즙 한천배지를 이용하여 배양하여 수득하는 균사체인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 화장료 조성물에 관한 것이며, 구체적으로는 유성온천수를 이용한 능이와 신이의 온천수발효추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 피부의 노화는 내인성 노화(또는 연대학적 노화)와 외인성 노화(또는 광인성 노화)로 구분된다. 내인성 노화란 나이가 먹게 되면서 나타나는 생물학적인 노화로써, 진피층이 위축되고 피하 지방층이 감소되면서 미세한 주름이 관찰된다. 이에 반해 광인성 노화는 햇빛에 노출되는 부위에 일어나는 퇴행성 변화와 내인성 노화가 복합적으로 발생하는 것이다. 이 과정에서 거칠고 깊은 주름이 나타나며, 비정상적으로 탄력 섬유상 물질이 축적되어 피부가 가죽 같이 두꺼워진다. 이런 노화과정과 별개로 얼굴에 존재하는 근육의 분포와 근육의 움직임에 따라

주름이 발생한다. 얼굴에는 다양한 근육들이 균형을 이루어서 얼굴 윤곽을 만든다. 그 근육은 피부와 연결되어 밀접한 관련을 가지게 된다. 마치 텐트를 잡아주는 사방의 줄이 팽팽하지 않으면 텐트천이 늘어지는 것처럼 피부를 잡아주는 근육 조직이 약해지거나 멎어버리면 얼굴 주름이 발생하게 된다. 그래서 항상 얼굴에 짜증이 섞여있는 표정을 짓는 경우에는 이마에 내천자(川)와 굽은 주름이 생기며, 항상 웃고 있는 얼굴에는 눈 주위에 잔 주름이 많은 경향이 있다. 그래서, 주름 중에서 미간 사이에 내천자를 그리거나 석삼자(三)를 그리는 주름은 사람의 인상을 짜증내는 듯이 보이게 해서 안 좋은 주름이라고 본다. 따라서, 얼굴 근육들의 바른 상태를 만들어 주면 주름도 좋아지고 탄력도 생기는 것이다. 광인성 노화에서는 피부가 건조해지고 거칠어지며 두꺼워지는 반면 내인성 노화에서는 오히려 피부가 얇고 매끄러워진다. 이 밖에도 광인성 노화에서는 내인성 노화와는 다르게 깊은 주름이 생기고 이완, 얼룩진 과색소 침착과 저색소 침착, 모세혈관 확장, 자반, 가성 반흔 등이 나타난다. 이외에도 내인성 노화와 광인성 노화는 여러 가지 임상 양상의 차이를 가지고 있다. 광인성 노화를 발생시키는 주요 원인은 자외선이다. 자외선은 그 파장의 길이에 따라 UV-A, B, C로 나눌 수 있는데, 이중 UV-A는 피부에 대한 자극이 미약하여 UV-B보다는 피부에 해가 적지만 오랫동안 노출될 경우 기미나 검버섯 등의 색소 침착이 일어나고 피부노화를 심화시킬 뿐 아니라, 심한 경우 피부암까지 발생시킬 수 있다. 반면에 UV-B는 피부에 강한 자극을 일으켜 일광 화상이나 피부암을 일으키지만 유리를 투과할 수 없어 실내에서는 안전하다. UV-C는 X선과 근접한 파장을 가진 광선으로 발암성이 매우 높지만 오존층에 의해 모두 차단되므로 별도로 차단해야 할 필요는 없다. 현대의학은 노화의 물리적 징후를 완화시켜 줄 수 있는 수단을 제공하여 준다. 그러나 다음과 같은 점을 유의할 필요가 있다. 첫째, 전문가에게 항노화 관리를 원하는 대부분의 사람들은 전혀 새로운 사람의 형상을 원하기 보다는 젊었을 때의 모습을 회복하기를 원한다. 둘째, 노화에 대한 물리적 관리기술이 계속적으로 발달하는 데에도 불구하고, 노화과정을 중단할 수 있는 관리는 존재하지 않는다. 그러므로 노화를 방지하는 관리를 추구하는 사람들을 위하여 피부 전문가는 적합한 설정을 하여 관리를 하여야 한다.

[0003] 그러므로 피부노화 지연용 화장품을 만들기 위해서는 콜라겐합성 촉진 또는 세포재생 기능을 부여하거나 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제의 사용이 필요하다. 대표적인 항산화제로서는 수퍼옥사이드디스무타제(SOD)라는 효소와 비타민 C, 비타민 E(토코페롤), 플라보노이드 등이 있다. 또한 콜라겐합성 촉진물질로는 비타민 C, 비타민 A(retinoic acid), 피부성장인자(EGF) 등이 있다.

[0004] 앞서 설명한 항산화제들을 화장품에 적용함에 있어서의 문제점은 이들이 불안정하기 때문에 장기간의 유통기간을 갖는 화장품에 적용이 쉽지 않고 과량 사용 시 피부에 부작용을 일으킬 수 있는 문제점이 있다. 그러므로 주름개선이나 미백효과가 우수한 화장품을 개발하기 위해서는 제형 내에서 안정하면서 피부 부작용이 적은 성분들이 많이 개발되어 화장품에 이용되어야 할 것이다.

[0005] 본 발명과 관련한 선행 특허문헌으로서, 특허문헌1에는 유화제를 이용한 유화기술을 적용하여 아산지역 온천수를 함유하는 액정형 크림에 관한 것이 개시되어 있으며, 특허문헌2에는 수안보 온천수를 주성분으로 하는 피부개선용 화장료 조성물에 관한 것으로, 수안보 온천수, 에탄올, 장미향수, 부틸렌글라이콜, 글리세린, 베타인, 구연산나트륨, 메칠파라벤, 페녹시에탄올 및 시트르산을 포함하여 피부미용과 같은 피부 적합성을 확인할 수 있는 피부개선 화장료 조성물이 개시되어 있으며, 특허문헌3에는 수안보 온천수와 식물 추출물 및 누에 추출물을 주성분으로 하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 갈근, 고삼, 연, 감초 및 누에로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 추출물과 수안보 온천수, 에탄올, 장미향수, 부틸렌글라이콜, 글리세린, 베타인, 구연산나트륨, 메칠파라벤, 페녹시에탄올 및 시트르산을 포함하여 피부개선, 자외선차단, 노화방지, 미백과 같은 피부 적합성을 확인할 수 있는 화장료 조성물이 개시되어 있으며, 특허문헌4에는 감초, 당귀, 인삼, 황금, 및 백봉령으로 이루어지는 군으로부터 1종 이상 선택되는 약재의 버섯균 발효물을 효모 등으로 발효시켜 추출한 발효추출물을 포함하는 항산화 활성을 갖는 화장료 조성물이 개시되어 있으며, 특허문헌5에는 천연물을 약용 꽃으로 싸거나 덮어서 발효시켜 제조된 싹 발효 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물에 대해 개시되어 있다.

[0006] 상기한 선행 특허문헌들은 온천수를 화장품 제조시에 단순히 첨가하는 기술을 개시하고 있을 뿐 본 발명과 같은 조성의 온천수를 이용한 혼합생약의 추출물을 버섯균사체로 발효시킨 발효추출물에 대해서는 전혀 기재된 바 없다.

[0007] 본 발명의 발명자들은 피부에 안전하면서도, 피부 미백, 주름개선 및 노화지연 효과가 우수한 화장품을 개발하기 위하여 예의 연구를 거듭한 결과, 예로부터 전통적으로 한방 약재로 사용되어온 천연물질 중에서 몇 가지 생약의 복합물이 우수한 항산화능 및 콜라겐 합성능이 있는 것을 알게 되었으며, 특별히 이들 복합물의 발효추출물이 각각의 약재를 사용한 경우보다 그 효과가 현저히 상승하는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) KR 10-2012-0021766 A
(특허문헌 0002) KR 10-1463943 B
(특허문헌 0003) KR 10-1439206 B
(특허문헌 0004) KR 10-2013-0047778 A
(특허문헌 0005) KR 10-0910040 B

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 유성온천수를 이용한 능이와 신이의 온천수발효추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제공에 관한 것이며, 보다 상세하게는 능이버섯과 목련꽃봉우리로부터 얻어지는 신이(辛夷)를 유성온천수를 이용하여 추출 및 발효시켜 피부에 안전하면서도, 피부 미백, 주름개선 및 노화지연 효과가 우수한 능이와 신이 온천수발효추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제공을 목적으로 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명에 따른 과제의 해결수단으로 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물은 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 유효성분으로 포함하며, 노화 방지용, 피부 미백, 주름개선 또는 항산화용 화장료 조성물로 이루어진다.
- [0011] 본 발명에 따른 일 실시형태로 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 유효성분으로 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 0.01 ~ 20중량% 함유하는 것으로 이루어진다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 실시형태로 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물은 유효성분으로 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 포함하는 수렴화장수, 유연화장수, 액상제, 에센스, 유액, 크림, 로션, 파운데이션, 스프레이로부터 선택되는 어느 하나의 제형으로 이루어진다.
- [0013] 그리고 본 발명의 또 다른 목적 달성을 위한 해결수단으로 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조방법은 a). 능이와 신이를 유성온천수로 추출하거나 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로부터 선택되는 하나 이상의 성분과 유성온천수를 혼합한 혼합용액으로 추출하여 능이와 신이 온천수 추출물을 얻는 제1공정, b). 제1공정에서 얻은 능이와 신이 온천수 추출물을 능이버섯(*Sarcodon aspratus*) 균사체로 발효시켜 능이와 신이 온천수발효추출물을 제조하는 제2공정 및 제2공정에서 제조한 능이와 신이 온천수발효추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제조하는 제3공정을 포함하는 것으로 이루어진다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따른 유성온천수를 이용한 능이와 신이의 온천수발효추출물 함유 화장료 조성물은 약재로 사용되는 천연원료의 선택에 의해 독성이나 부작용 등이 없으므로 피부에 안전하면서도, 우수한 멜라닌생성 억제, 콜라겐 합성 증진, 및 항산화 활성을 가져, 피부 미백, 주름개선과 탄력 증진 및 노화지연에 우수한 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하에서는 본 발명은 실시하기 위한 구체적인 내용, <실시예>, <비교예> 및 <시험예>를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명하기로 하며, 아래 기재된 사항에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 상기한 본 발명에 따른 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 유효성분으로 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 0.01 ~ 20중량% 함유하는 것을 포함한다.

- [0017] 상기 본 발명에 따른 능이는 향이 매우 진해서 향이(향버섯)이라고도 부르고 있으며, 본래 이름은 웅이(熊茸)이고 방언으로는 능이(能耳)라고 한다고 19세기 중엽의 문헌인 이규경(李圭景)의 『오주연문장전산고(五洲衍文長箋散稿)』에 기록되어 있으며 피부노화를 늦춰주며, 혈액을 맑게 해주는 효능이 있다. 능(能)도 곰이라는 뜻이 있으므로 결국 우리말로 곰버섯이었던 버섯이 한자식으로 웅이 또는 능이로 불리다가 능이로 정착된 것으로 보인다.
- [0018] 상기 신이(辛夷, Magnolias Flos)는 목련과에 속한 낙엽관목인 자목련 혹은 백목련의 꽃피기 전의 꽃봉오리를 건조한 것으로 수렴작용, 모세혈관 확장작용, 함염증, 피부진균과 포도상구균 억제작용이 보고되고 있으며, 한약재로 널리 사용되고 있다. 겨울눈에 털이 많고, 잎은 어긋나 있다. 꽃은 4월과 5월경에 잎이 피기 전에 흰색으로 피고, 꽃잎은 6개, 꽃받침 조각은 3개이며 바늘 모양을 하고 있다. 열매는 원통형으로 적갈색이며, 익으면 흰 실같이 생긴 자루에 달린 붉은 종자가 나온다. 약재는 끝쪽이 약간 뾰족한 텃붓의 붓털 비슷한 모양을 이루고 길이는 1cm에서 4cm정도이며, 중간의 지름이 7mm에서 20mm정도이다.
- [0019] 본 발명에 따른 상기 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물은 능이와 신이의 혼합물을 유성온천수로 추출하거나 또는 탄소수 1 내지 4의 저급알코올로부터 선택되는 하나 이상의 성분과 유성온천수 혼합용액을 추출용매로 하여 추출한 추출물을 버섯 균사체로 발효시켜 제조하는 것으로 이루어지며, 상기 저급알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올로부터 선택된다.
- [0020] 상기 추출용매로 사용하는 유성온천수는 기초자치단체인 대전광역시 유성구가 직접 관리하고 있어 온천수 관리 품질이 매우 우수하며, 국내 최고의 이용객과 다시 방문하고 싶은 온천에 있어 최고의 평가를 받고 있음이 객관적 자료(2017 온천현황, 행정자치부)에 의해 입증되었다. 유성온천의 온천수 수질은 수온(31 ~ 35℃), pH 7.95의 약알칼리성으로 수질유형은 NaHCO₃ 형이며, 대장균 등 오염물에 노출되지 않은 것으로 나타났다. 또 대한온천학회 자료에 따르면 우리나라 온천성분을 평균이상으로 함유하고 있어 온천수화장품을 연구개발하기에 최적의 상태로 알려져 있다.
- [0021] 그리고 본 발명에 따른 유성온천수를 이용한 능이 및 신이의 온천수 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조방법은 a). 능이와 신이를 중량단위로 1 : 1의 비율로 혼합한 혼합물을 유성온천수로 추출하거나 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로부터 선택되는 하나 이상의 성분과 유성온천수의 혼합용액을 추출용매로 추출하여 능이와 신이의 온천수추출물을 얻는 제1공정, b). 제1공정에서 얻은 능이와 신이의 온천수 추출물을 능이버섯(*Sarcodon aspratus*) 균사체로 발효시켜 능이와 신이 온천수발효추출물을 제조하는 제2공정 및 c). 제2공정에서 제조한 능이와 신이 온천수발효추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제조하는 제3공정을 포함하는 것으로 이루어진다.
- [0022] 본 발명에 따른 상기 제1공정의 온천수 추출물은 능이와 신이의 총 중량을 기준으로 2 ~ 10배, 보다 바람직하게는 4 ~ 6배의 추출용매를 가하여, 10 ~ 100℃의 온도에서, 12시간 ~ 5일, 보다 바람직하게는 1일 ~ 3일, 가장 바람직하게는 24 ~ 48시간 추출하는 것이며, 추출시간이 12시간 미만이면 원하는 성분의 추출이 미흡하고 추출시간이 5일을 넘게 되면 추출성분의 농도에 변화는 없고 추출물이 변색되기 때문에 바람직하지 못하다.
- [0023] 본 발명에 따른 상기 제2공정의 온천수 발효추출물은 제 1공정에 수득한 능이와 신이의 온천수 추출물을 능이버섯(*Sarcodon aspratus*) 균사체를 이용하여 발효시켜 제조한다.
- [0024] 또 상기 제3공정은 제2공정에서 제조한 능이와 신이 온천수발효추출물을 유효성분으로 하여 화장료 조성물 총 중량을 기준으로 0.01 ~ 20중량% 포함하는 화장료 조성물을 제조하며, 유효성분이 화장료 조성물 총 중량을 기준으로 0.01중량% 미만에서는 만족할 만한 효능을 제공하기 어렵고, 20중량% 이상에서는 조성물의 냄새와 색상에 영향을 미쳐서 상품성이 떨어질 뿐 아니라 추가적인 효능도 나타나지 않으며 유효성분이 화장료 조성물 총 중량을 기준으로 1 ~ 5.0중량%로 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0025] 상기 본 발명에 따라 제조된 화장료 조성물은 화장료에 일반적으로 이용되는 보조성분 예를 들면 유화제, 점증제, 유제, 계면활성제, 윤활제, 알코올류, 수용성 고분자제, 겔화제, 안정화제, 비타민, 무기염류, 유화제, 향료 같은 성분을 포함할 수 있다.
- [0026] 또 상기 본 발명에 따라 제조된 화장료 조성물은 수렴화장수, 유연화장수, 액상제, 에센스, 유액, 크림, 로션, 파운데이션, 스프레이로부터 선택되는 어느 하나의 제형일 수 있으며, 제형에 특별하게 한정되는 것은 아니다. 또 피부 미백용, 주름 개선용, 항산화용, 피부 보습용, 또는 노화방지 용도의 제품에 적용될 수 있다.
- [0027] 이하에서는 <실시예>, <비교예> 및 <시험예>를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기로 한다.

- [0028] <실시예 1>
- [0029] (1). 능이와 신이의 온천수 추출물의 제조
- [0030] 시판하는 능이와 신이를 구입하여 정선한 다음 분쇄기에 능이 500g, 신이 500g을 투입하여 잘게 분쇄한 후 유성온천수 5000g을 가한 후, 22℃에서 24시간 동안 추출하였다. 상기 추출이 완료된 후, 추출물로부터 고형분을 제거하고, 여액만을 수거한 후 감압농축 및 동결건조하여 능이와 신이의 온천수 추출물로서 건조분말 17.5g을 얻었다.
- [0031] (2). 능이 균사체 배양 및 준비
- [0032] 능이버섯에서 분리한 균사체를 효모추출물 3g, 맥아즙 3g, 포도당 10g, 펩톤 5g, 한천 20g, 유성온천수 1ℓ로 조성된 효모-맥아즙 한천배지가 든 시험관에서 7일간 사면배양한 후 4℃에 보관하고 1개월마다 계대 배양하여 이로부터 능이버섯 균사체를 준비한다.
- [0033] (3). 능이와 신이의 온천수 발효추출물 제조
- [0034] 상기에서 수득한 능이와 신이의 온천수 추출물 10%(w/v) 수용액 100mℓ, 포도당 3g, 및 효모 추출물 1g을 혼합한 후, pH를 5.5로 조정하고 멸균하여 액체배지 조성물을 준비한다.
- [0035] 상기 준비한 액체배지에 상기 사면배지에서 자란 능이버섯 균사체를 무균적으로 균질화하여 5%(v/v)가 되게 첨가(순수균사체로 0.1g 포함됨)한 후, 온도 27℃, 회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vvm의 조건에서 7일간 배양하여, 혼합생약의 온천수 추출물을 발효시킨 다음, 발효물을 원심분리하여 능이버섯 균사체를 모두 제거하고 마이크로미터 멤브레인(membrane) 필터로 여과하여 분리한 여액을 감압농축 및 동결건조하여 능이와 신이의 온천수 발효추출물 12.2g을 얻었다.
- [0036] <비교예 1>
- [0037] 시판하는 능이 및 유성온천수를 이용하여 상기 <실시예 1>에서 온천수 추출물을 얻는 방법과 동일한 방법에 의해 능이 온천수 추출물을 준비하였다
- [0038] <비교예 2>
- [0039] 시판하는 신이 및 유성온천수를 이용하여 상기 <실시예 1>에서 온천수 추출물을 얻는 방법과 동일한 방법에 의해 신이 온천수 추출물을 준비하였다
- [0040] <비교예 3>
- [0041] 상기 <비교예 1>에서 준비한 능이 온천수 추출물, 유성온천수 및 상기 <실시예 1>에서 수득한 능이균사체를 이용하여 상기 <실시예 1>의 온천수 발효추출물과 동일한 방법에 의해 능이온천수 발효추출물을 수득하였다.
- [0042] <비교예 4>
- [0043] 상기 <비교예 2>에서 준비한 신이 온천수 추출물, 유성온천수 및 상기 <실시예 1>에서 수득한 능이균사체를 이용하여 상기 <실시예 1>의 온천수 발효추출물과 동일한 방법에 의해 신이온천수 발효추출물을 수득하였다.
- [0044] <시험예 1>피부세포에 대한 독성 측정
- [0045] 본 발명에 따른 <실시예 1>의 능이와 신이 온천수발효추출물과 <비교예 1>의 능이 온천수 추출물, <비교예 2>의 신이 온천수 추출물에 대하여 피부세포에 대한 독성 시험을 아래 와 같이 수행하고 그 결과를 아래 [표 1]에 나타내었다.
- [0046] 본 시험을 위해 사용된 세포주는 인간 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast; Lonza, Basel, Switzerland) 등 3종의 세포를 사용하였다. 상기의 세포들은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Gibco-BRL, Invitrogen; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)에 10% 소태아혈청(FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 µg/mL; Life Technologies)를 함유한 배지를 사용하여, 5% CO₂ 세포배양기 내에서 37℃의 온도 조건 하에서 배양하였다.
- [0047] WST-1(Water-soluble tetrazolium salt) 어세이는 세포 내 미토콘드리아성 NADH-탈수소화효소(mitochondrial NADH-dehydrogenase)의 활성을 측정하여 알아보는 방법으로써 테트라졸륨염(tetrazolium salt)을 살아있는 세포에 처리하게 되면 미토콘드리아에 있는 탈수소화효소에 의하여 유색의 포마잔(formazan)이 형성되게 된다. 형성

된 포마잔을 450nm 파장의 흡광도로 확인하면 살아있는 세포의 농도를 확인할 수 있다. 세포를 96-well plate에 2×10^3 cells/well의 세포를 분주하고 24시간 배양 후 시료를 적정농도에 맞게 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후 WST-1 어세이 용액을 배지양의 10%씩 처리하여 추가적으로 0.5 ~ 1시간 37° C에서 반응 후, iMark microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여, 450nm에서 흡광도를 측정하였으며 참조 흡광도는 650nm에서 측정하여 결과값을 보정하였다. 결과값은 세 번의 독립적 실험으로부터 평균값 ± 표준편차로 나타내었다. P<0.05는 Student's t-test를 통해 검증하였으며, 결과 값의 유의성을 나타낸다.

표 1

시료	농도(ppm)	세포생존율(%)
실시예1	100	99.8
	150	98.6
	200	98.4
비교예1	100	100.3
	150	100.5
	200	100.2
비교예2	100	97.5
	150	96.8
	200	96.9

상기 [표 1]에 나타낸 바와 같이 본 발명에 따른 <실시예 1>의 능이와 신이 온천수발효추출물과 <비교예 1>의 능이 온천수 추출물, <비교예 2>의 신이 온천수 추출물이 모두 피부세포에 독성을 주지 않는 안전한 것을 확인할 수 있다.

<시험예 2> 멜라닌색소 합성 저해 시험

본 발명에 따른 <실시예 1>의 능이와 신이 온천수발효추출물과 <비교예 1>의 능이 온천수 추출물, <비교예 2>의 신이 온천수 추출물, <비교예 3>의 능이 온천수 발효추출물, <비교예 4>의 신이 온천수 발효추출물에 대하여 멜라닌색소 합성 저해 시험을 아래와 같이 수행하였다.

16F10 세포를 60mm culture dish에 3×10^5 개로 분주 후, 실시예 1 및 비교예 1 ~ 4의 시료를 배지에 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하였다. 양성대조를 위해 멜라닌 합성을 촉진하는 호르몬인 α -MSH(Sigma-Aldrich)를 200nM의 농도로 동일세포에 처리하였다. 시료와 α -MSH를 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후, 실온에서 48시간 세포를 배양시킨 뒤에 세포를 수확하여 PBS로 2회 세척 후, 각 시료별로 멜라닌합성 저해율을 측정하고 그 결과를 아래 [표 2]로 나타내었다.

표 2

구분	실시예1	비교예1	비교예2	비교예3	비교예4
멜라닌합성 저해율(%)	53.8	22.5	33.2	36.3	38.7

상기 [표 2]에 나타낸 바와 같이 멜라닌합성 저해율에 있어서, 본 발명에 따른 <실시예 1>의 능이와 신이의 온천수 발효추출물이 상기 <비교예 1> 내지 <비교예 4>의 온천수 추출물 내지 온천수 발효추출물에 비해 멜라닌색소 합성 저해효과가 훨씬 우수한 것을 알 수 있다.

<시험예 3>인간피부세포에 대한 콜라겐 합성 촉진 시험

본 발명에 따른 <실시예 1>의 능이와 신이 온천수발효추출물과 <비교예 1>의 능이 온천수 추출물, <비교예 2>의 신이 온천수 추출물, <비교예 3>의 능이 온천수 발효추출물, <비교예 4>의 신이 온천수 발효추출물에 대하여 인간피부세포에 대한 콜라겐 합성 촉진 시험을 아래와 같이 수행하였고 그 결과를 아래 [표 3]에 나타내었다.

콜라겐과 콜라게네이즈(collagenase) 발현은 해당 대표적 유전자의 mRNA 양 변화를 qRT-PCR(quantitative real-time PCR) 분석법을 활용하여 측정하였다. 콜라겐 양은 타입 1 콜라겐의 대표적 구성 요소인 COL1A1 유전자의 발현수준 분석을 통해 확인하였으며, 콜라게네이즈는 타입 1 콜라겐 분해 작용을 하는 MMP1 유전자의 발현

수준 분석을 통해 확인하였다. 인간 진피 섬유아세포(Human dermal fibroblasts, Lonza, Basel, Switzerland)를 60mm culture dish에 5×10^5 개로 분주한 후, 24시간 배양하였다. 그 후 200 μ g/ml 농도로 실시예 1 및 비교예 1 내지 3의 시료를 첨가하여 24시간 추가적으로 배양하였다. 배양된 세포를 수확한 후, 1ml TRIzol reagent(Life Technology)를 첨가하여 세포 용해 및 total mRNA 추출을 수행하였다. Total mRNA의 농도 및 순도(A260/A280 and A260/A230 ratio)는 MaestroNano[®] microvolume spectrophotometer (Maestrogen, Las Vegas, NV, USA)을 이용하여 검증하였으며, 2.0 이상의 순도가 높은 total mRNA만을 선별하였다. Total mRNA는 M-MLV reverse transcriptase(Life Technologies, USA)를 이용하여 cDNA로 전환하여 qRT-PCR에 사용하였다. qRT-PCR은 HOT FIREPol EvaGreen PCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia)를 이용하여 수행하였으며, Line-Gene K software (Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China)를 이용하여 해당 유전자의 발현을 분석하였다.

[0058]

PCR반응 조건은, 94℃에서 5분간 denaturation 시킨 후 denaturation (94℃, 30초), annealing (60℃, 30초), polymerization (72℃, 30초) 과정을 40cycle 동안 진행하였다. 유전자 발현 변화는 β -ACTIN 대조군유전자 발현 양과 비교하여 측정하였다. 결과 값은 세번의 독립적 실험으로부터 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. P<0.05는 Student's t-test를 통해 검증하였으며 결과 값의 유의성을 나타낸다.

표 3

[0059]

구분	실시예1	비교예1	비교예2	비교예3	비교예4
콜라겐 생합성 증가율(%)	65.3	33.2	28.5	38.7	35.8

[0060]

상기 [표 3]에 나타낸 바와 같이 본 발명에 따른 <실시예 1>의 능이와 신이의 온천수 발효추출물이 상기 <비교예 1> 내지 <비교예 4>의 온천수 추출물 내지 온천수 발효추출물에 비하여 콜라겐 생합성 효능이 현저하게 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0061]

<시험예 4>항산화 효과 시험

[0062]

본 발명에 따른 <실시예 1>의 능이와 신이 온천수발효추출물과 <비교예 1>의 능이 온천수 추출물, <비교예 2>의 신이 온천수 추출물, <비교예 3>의 능이 온천수 발효추출물, <비교예 4>의 신이 온천수 발효추출물에 대한 항산화 활성을 측정하기 위하여 DCF-DA(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) 어세이를 실시하였다.

[0063]

시험물질을 처리한 다음 실리카(silica)로 자극한 세포 내에서 생성되는 활성산소의 양을 공시료액과 비교하여 활성산소 제거능을 평가하는 목적으로 사용되는 시험방법이다. 먼저 24시간 배양한 Raw 264.7 세포를 PBS로 1회 세척 후, 세포를 수확하였다. 해당 세포를 15ml PBS로 현탁 후, 15 μ l of 20mM DCF-DA 용액(Sigma-Aldrich)를 첨가하고 1시간 동안 반응시켰다. 1200 $\times$ g으로 2분간 원심분리한 후 PBS로 1회 세척하여 1×10^5 cells/ml로 희석한 다음, 시료를 200 μ g/ml 농도로 처리하고 10분간 반응시켰다. 그 후 20mg/ml의 실리카를 50 μ l 처리하여 1시간 동안 추가 반응시켰다. 6000 $\times$ g으로 5분간 원심분리하여 얻은 세포 펠렛(pellet)을 200 μ l PBS로 분산시킨 후 96-well plate에 접종하였다. 그 후 fluorescence microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 485nm excitation/535nm emission에서 형광도를 측정하여 ROS level를 결정하였다. 결과 값은 세번의 독립적 실험으로부터 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. P<0.05는 Student's t-test를 통해 검증하고 그 결과를 아래 [표 4]로 나타내었으며, 결과 값의 유의성을 나타낸다.

표 4

[0064]

구분	실시예1	비교예1	비교예2	비교예3	비교예4
항산화효과 (자유라디칼 소거율)(%)	73.8	32.3	38.9	43.4	45.6

[0065]

상기 [표 4]에 나타낸 바와 같이 본 발명에 따른 <실시예 1>의 능이와 신이의 온천수 발효추출물이 상기 <비교예 1> 내지 <비교예 4>의 온천수 추출물 내지 온천수 발효추출물에 비하여 항산화 활성이 현저하게 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0066]

<실시예 2> 및 <비교예5> 내지 <비교예 8>

[0067] 아래 [표 5]에 나타난 조성 및 비율에 따라 수중유형 유화(O/W emulsion) 타입의 크림 제형을 제조하였다.

표 5

[0068]

조성 성분	합량(중량부)						
	실시예2	비교예5	비교예6	비교예7	비교예8	비교예9	비교예10
세토스테아릴알코올	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
글리세릴스테아레이트	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
비즈왁스	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
폴리글리세릴-3 메틸 글루코시드스테아레이트	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
스쿠알란	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
카프릴릭/카프릭트리 글리세라이드	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
세틸에칠헥사노에이트	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
디메치콘	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
유성온천수	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100
부틸렌글라이콜	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
글리세린	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
1,2 헥산다이올	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
암모니움아크롤로일디메틸타 우레이트/브이피코폴리머	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
향료	-	적량	-	-	-	-	-
(실시예 1)능이+신이의 온천수 발효추출물	5.0	-	-	-	-	-	-
(비교예 1) 능이 온천수 추출물	-	-	5.0	-	-	-	-
(비교예 2) 신이 온천수 추출물	-	-	-	5.0	-	-	-
(비교예 3) 능이 온천수 발효추출물	-	-	-	-	5.0	-	1.25
(비교예 4) 신이 온천수 발효추출물	-	-	-	-	-	5.0	1.25

[0069] <시험예 5>화장료 크림의 피부자극성 시험

[0070] <실시예 2>, <비교예 5> 내지 <비교예 10>의 크림타입의 화장품에 대한 피부자극성 정도를 비교하기 위하여 인체에 대한 폐쇄접촉시험(closed patch test)을 실시하였다. 건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 하악부 안쪽에 각각의 시료를 0.2g씩 첩포하고 24시간 후 핀첵버를 제거하고 4시간 경과한 다음 육안으로 피부상태를 확인하였다. 피부자극도는 아래 [계산식]을 이용하여 계산하고 그 결과를 아래 [표 6]에 나타내었다.

[0071] [계산식]

[0072] 피부자극도= [(+ -)수×1} + {(+)수×2}{(+ +)수×3}]/피시험지수

표 6

[0073]

시료명	피시험자수	판정결과				자극도
		-	+-	+	++	
실시예 2	20명	20	0	-	-	0.00
비교예 5		19	1	-	-	0.02
비교예 6		19	1	-	-	0.02
비교예 7		20	0	-	-	0.00
비교예 8		19	1	-	-	0.02
비교예 9		20	0	-	-	0.00
비교예 10		19	1	-	-	0.02
-: 홍반이나 특이사항 없음 +-: 주위보다 약간 붉어짐 +: 주위보다 현저히 붉어짐 ++: 주위보다 심하게 붉어지고 부풀어 오름						

[0074] 상기 [표 6]에 나타낸 바와 같이 <실시에 2>, <비교예 5> 내지 <비교예 10>의 크림타입의 화장품 모두가 피부자극도가 매우 낮은 것으로 확인되었다.

[0075] <시험예 6> 피부탄력도 개선 시험

[0076] <실시에 2>, <비교예 5>, <비교예 10>의 크림타입의 화장품에 대한 피부탄력 개선 효과를 시험하기 위하여 아침과 저녁에 하루 2회씩 사용하도록 한 후, 사용 전과 사용 8주 후의 피부탄력도 변화를 측정하였다. 피부탄력도 측정은 피부탄력측정기(Cutometer SEM 575)를 이용하였으며, 온도 25도, 습도 75% 조건에서 측정하였다.

[0077] 30 ~ 55세의 건강한 여성 60명을 각각 20명씩 세 그룹으로 나누어 측정하였으며 그 결과를 아래 [표 7]에 나타내었다.

표 7

구분	실시에1	비교예5	비교예10
피부탄력 증가율(%)	18.7	11.4	13.8

[0079] 상기 [표 7]로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 <실시에 2>의 크림제형 화장품이 <비교예 5> 및 <비교예 10>에 비하여 피부탄력도 증가율이 높은 것을 알 수 있다.

[0080] <시험예 7> 크림제형 화장품의 인체 사용성 시험

[0081] <실시에 2>, <비교예 5> 및 <비교예 10>에 대하여 실제 사용 시 피부 미백효과 및 주름개선효과를 알아보기 위하여 건강한 30 ~ 55세 성인여성 100명에 대하여 각각 3그룹으로 나누어 인체 사용성 시험을 실시하였다.

[0082] 상기 <실시에 2>, <비교예 5> 및 <비교예 10>의 시험품 50그램씩을 설문지와 함께 나눠주고 아침과 저녁에 하루 2회씩 총 8주간 사용하게 한 후 설문지를 회수하여 분석하였다.

[0083] 총 100명의 시험대상자 중 중도 포기(3명) 및 부실한 설문지(2명)를 제외한 <실시에 2> 그룹의 32명, <비교예 5> 그룹의 32명 <비교예 10> 그룹의 각 31명, 총 95명의 설문지를 회수하여 분석한 결과를 아래 [표 8]에 나타내었다.

표 8

시험 항목	구분	응답자수				
		매우 악화됨	약간 악화됨	변화 없음	약간 좋아짐	매우 좋아짐
피부색 변화 정도	실시에 2	-	-	9	15	6
	비교예 5	-	2	21	7	-
	비교예 10	-	-	22	9	-
피부 탄력감 변화 정도	실시에 2	-	-	8	16	6
	비교예 5	-	1	23	6	-
	비교예 10	-	-	20	11	-
피부 주름 변화 정도	실시에 2	-	-	9	16	7
	비교예 5	-	-	25	6	-
	비교예 10	-	-	21	10	-

[0085] 상기 [표 8]로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 <실시에 2>의 크림은 <비교예 5>와 <비교예 10>의 크림에 비하여, 피부색, 피부탄력감, 피부주름개선 효능에 대한 사용자의 만족도가 높은 것을 알 수 있다.