



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월25일
(11) 등록번호 10-1972531
(24) 등록일자 2019년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0139874
(22) 출원일자 2017년10월26일
심사청구일자 2017년10월26일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080098731 A*
KR1020160014321 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
박세진
충청남도 공주시 공주대학로 93 2층 (신관동)
(72) 발명자
조영호
세종특별자치시 마은로 181, 1013동 101호(고운동, 가락마을 10단지)
이계원
대전광역시 서구 둔산북로 215, 15동 1106호(둔산동, 가람아파트)
박세진
충청남도 공주시 공주대학로 93 2층 (신관동)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 이현석

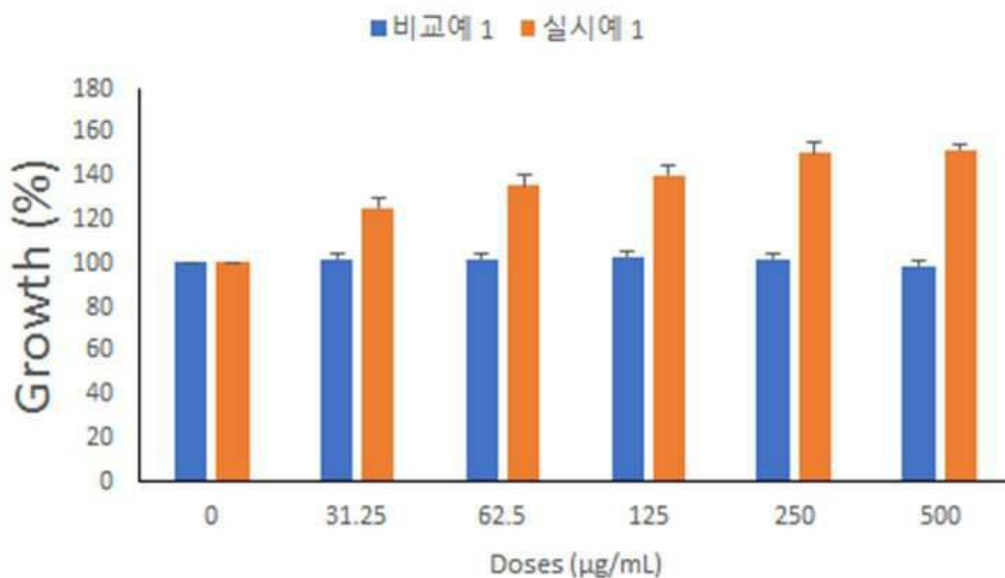
(54) 발명의 명칭 생물전환 밤 추출물을 함유하는 피부 보습 화장품 조성물

(57) 요약

과제: 효과가 우수한 피부 보습 화장품 조성물을 제공하는 것.

해결수단: 본 발명은 참쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체에 의해 생물전환된 밤(Chestnut) 추출물을 함유하는 피부 보습 화장품 조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 밤나무(*Castanea crenata*) 열매인 밤으로부터 추출 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 찹쌀떡 군사체 또는 찹쌀떡버섯 군사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 찹쌀떡버섯 군사체를 제거하는 단계;로부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 화장료 조성물은 피부세포에서 각질층의 분화를 촉진하고, 손상된 피부의 장벽기능을 회복시키며, 수분과 글리세롤을 피부로 옮겨주는 단백질인 아쿠아포린-3 및 히알루론산 합성효소의 합성을 촉진하고, 인체실험에서도 피부 수분량 증가 및 경피수분손실량(TEWL) 감소에 현저히 우수한 효과를 나타낸다.

(52) CPC특허분류

A61K 2800/84 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0444425

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 산학협력기술개발사업

연구과제명 발효 밤 추출물을 함유하는 고보습 항노화 천연화장품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

밤나무(*Castanea crenata*) 열매인 밤의 과육, 내피 및 외피로부터 에탄올이 40~95%(v/v) 함유된 수용액을 사용하여 추출물을 추출하는 단계;

상기 추출물에 찹쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체 또는 찹쌀떡버섯 균사체의 전 배양액을 혼합하여 찹쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체가 4~6%(v/v)가 되도록 접종한 후, pH 5.0~7.0, 온도 22~32℃, 회전수 120~180rpm, 통기량 1.2~1.8vm 조건에서 5~7일간 본 배양하는 단계; 및

상기 본 배양 후, 본 배양액으로부터 찹쌀떡버섯 균사체를 제거하는 단계;로부터 수득된 여과액을 유효성분으로 0.001~30.0중량% 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 화장품 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 화장품 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, 아이섀도, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물전환된 밤(*Chestnut*) 추출물을 함유하는 피부 보습 화장품 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 밤 추출물을 찹쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체로 생물전환하여 수득한 여과액을 유효성분으로 함유하는 피부 보습 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 사람의 피부는 외부환경으로부터 인체를 보호하는 막으로서 중요한 역할을 하며 수분의 건조를 막기 위하여 표피층에서 분화과정을 통하여 수분을 함유한 얇은 각질층으로 발달하게 된다. 외부 환경과 직접 접촉하는 피부 최외각층인 각질층은 외부로부터 유해한 성분의 침입을 방어하고, 내부 수분이 손실되는 것을 막아주는 기능과 동시에 적당한 수분을 보유하여 유연성을 유지하고 있다.
- [0003] 피부의 수분량은 통상 진피에서 70% 정도이나 표피로 가면서 감소하여 최외각층인 각질층에서는 약 10~30%가 되며, 진피에서 공급된 수분은 주로 수동적 확산에 의해 각질층 상부로 확산되어 외부로 손실된다.
- [0004] 각질층 중에는 피부의 보습에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 천연보습인자(Natural Moisturizing Factor, NMF)라고 하는 친수성 물질이 존재하여 각질층의 유연성을 유지할 수 있다.
- [0005] 그러나, 피부의 이러한 기능에도 불구하고 피부는 바람, 추운 날씨, 햇빛 등과 같은 외부환경과 면도, 실내 난방 등과 더불어 오염된 대기에 노출되고, 노화라는 인자가 더해져서 쉽게 수분을 잃게 되어 건조하고 거친 피부가 되기 쉬우므로 이를 막기 위해 피부 보습제의 필요성이 증가하고 있다.
- [0006] 따라서, 이러한 보습을 목적으로 사용되고 있는 보습제로는 글리세린, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜 등과 같은 폴리올류, 히알루론산염, 콘드로이친설페이트, 키토산 등의 생체 고분자물질, 아미노산, 피롤리돈카르본산염, 젖산염 등과 같은 천연보습인자 등이 있다 (AV Rawlings, *J Invest Dermatol*, 1994, 103(5):731-740).
- [0007] 하지만, 종래 화장품에 보습제로 가장 많이 사용되는 수용성 폴리올류 중 글리세린과 솔비톨의 경우 뛰어난 보습력에 반해 끈적임이 심하여 사용시 불편감을 느끼게 하며, 부틸렌글리콜과 프로필렌글리콜은 피부자극을 유발하기 쉽고 보습능력이 다소 떨어진다는 문제점들을 가지고 있다.
- [0008] 또한, 천연보습인자인 피롤리돈카르본산염, 젖산염, 요소 등은 전해성이 강하여 유화 안정성을 해치는 문제점이 있으며, 생체 고분자물질인 히알루론산염, 콘드로이친설페이트 등도 보습능력이 있다고 하나, 보습능력에 한계가 있는 실정이다.
- [0009] 최근 들어 천연 식물에 대한 관심이 점차 증가하고 있는 것과 동시에 인체에 안전한 천연 생약재로부터 인체에 유용한 성분을 얻고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- [0010] 이에 본 발명자들은 천연에서 자생하는 식물들 중에서 피부 보습 효과를 가진 성분을 탐색하던 중 밤 추출물이 피부 각질 분화 촉진과 장벽기능 개선 효과가 우수함을 발견하고, 이러한 밤 추출물의 보습 효능을 더욱 증대시킬 수 있는 방법을 연구 노력한 결과 밤 추출물을 참쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체로 생물전환할 경우 피부 보습력 증가 및 경피수분손실량 감소 효과가 현저히 증가함을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서, 본 발명은 밤나무(*Castanea crenata*) 열매인 밤 추출물을 참쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체로 생물 전환시켜 수득한 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 화장품 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 밤나무 열매인 밤의 외피, 내피 및 과육으로부터 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 참쌀떡버섯 균사체 또는 참쌀떡버섯 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 참쌀떡버섯 균사체를 제거하는 단계;로부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 화장품 조성물을 제공한다.
- [0014] 이하 본 발명의 생물전환 밤 추출물을 함유하는 피부 보습 화장품 조성물에 대해 상세히 설명하고자 한다.
- [0015] 밤나무 열매인 밤을 용매로 단순 추출한 추출물의 경우 생체 외에서는 유효한 효능을 나타내지만, 이를 피부 화장품에 적용한 경우에는 실질적으로 그 효과가 만족스럽지 못한 문제점이 있다.
- [0016] 한편, 본 발명자들은 상기 밤 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, 플라보노이드류 또는 이들의 유도체 성분들은 자외선으로 인해 발생한 라디칼 소거능, 지질과산화물 생성 억제능 등의 항산

화 활성이 우수한 것으로 보고되고 있다(RJ Nijveldt et al., *Am J Clin Nutr*, 2001, 74:418-425).

- [0017] 일반적으로, 친수성 물질보다는 소수성 물질이 피부투과에 효과적인데, 각질층 중에 분포되어 있는 세라마이드라는 성분이 소수성 물질로 친수성 물질보다는 소수성 물질과의 상호작용에 더 효과적이어서 소수성 물질이 좀 더 용이하게 피부 최외각 층을 통과할 수 있기 때문이다.
- [0018] 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.
- [0019] 따라서 본 발명은 피부투과율이 용이하여 피부 외용제로서의 효과적인 역할을 하는 피부 보습 화장품 조성물을 제공하기 위해 외피와 내피 및 과육을 모두 포함하는 밤으로부터 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 찹쌀떡버섯 균사체 또는 찹쌀떡버섯 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 찹쌀떡버섯 균사체를 제거하는 단계;로부터 얻은 여과액을 유효성분으로 함유하는데, 상기 단계를 통해 얻은 여과액은 밤으로부터 일반추출을 통해 얻은 추출물보다 총 페놀함량 및 총 플라보노이드 함량이 증가한 것을 본 실험에서 확인하였다.
- [0020] 또한, 본 발명은 유효성분으로 함유되는 여과액이 피부 각질세포 분화촉진, 장벽기능 개선, 아쿠아포린-3(Aquaporin-3) 단백질 합성 촉진 및 HAS-2(Hyaluronic acid synthase-2) 합성 촉진효과에 의한 피부 보습개선 효과가 우수한 것을 특징으로 한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 추출물의 함량이 피부 화장품 조성물 전체에 대해 0.001~30.0중량%인 것을 특징으로 하는 생물 전환 밤 추출물을 함유하는 피부 보습 화장품 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.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 추출시 추출용매로서 에탄올이 40~95%(v/v) 함유된 수용액을 사용하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 추출물이 추출 후, 감압농축 또는 동결건조된 것을 특징으로 하는 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 감압농축 또는 동결건조된 추출물이 정제수, 에탄올, 부틸렌글리콜 및 프로필렌글리콜 중 선택된 1종 이상의 용매에 0.001~30.0중량%로 용해된 것을 특징으로 하는 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 본 배양시 배양액의 pH를 5.0~7.0으로 조정하고, 찹쌀떡버섯 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 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 밤 추출물이 밤의 과육, 내피 및 외피를 포함하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 생물전환 밤 추출물을 함유하는 피부 보습 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 화장품 조성물이 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 기타 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형의 기초 화장품 제형과 수중유형 또는 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨케어, 립스틱, 립글로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도, 치크칼라 및 아이브로우펜슬 중에서 선택된 화장품 조성물임을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 생물전환 밤 추출물을 함유하는 화장품 조성물은 피부 각질세포 분화촉진, 장벽기능 개선, 아쿠아포린-3 (Aquaporin-3) 단백질 합성 촉진 및 HAS-2 (Hyaluronic acid synthase-2) 합성 촉진효과에 의한 피부 보습 개선효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 본 발명의 실시예 1과 비교예 1의 각질세포 분화능을 나타낸 것이다.
- 도 2는 AQP-3과 HAS-1 단백질 합성 촉진효과를 나타낸 것이다. (a)는 AQP-3와 HAS-2 단백질 발현량에 대한 웨스

턴 블랏 밴드를 나타낸 것으로 밴드가 진할수록 발현량이 많다는 것을 의미한다. (b)는 밴드의 진하기를 농도계로 정량하여 β -액틴에 대한 상대적인 양으로 표시한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 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.

[0033] 비교예 1: 밤 추출물 제조

[0034] 세절하여 음건한 밤 열매(외피, 내피 및 과육 포함) 500g을 뜨거운 70%(V/V) 에탄올 수용액으로 3시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50℃ 이하에서 감압농축 및 동결건조한 후 60.51g의 에탄올 추출물을 얻었다. 감압 농축물 및 동결 건조물이 10.0중량% 함유되게 정제수, 에탄올, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 중에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 밤 추출물을 제조하였다.

[0036] 실시예 1: 생물전환 밤 추출물 제조

[0037] 찹쌀떡버섯 균사체를 포테이토텍스트로오즈 한천배지가 든 시험관에 사면배양하여 4℃에 보관하고 1개월마다 계대배양하여 사용하였다. 상기 사면배지에서 계대배양된 균사체를 무균적으로 균질화하여, 비교예 1에서 수득한 밤 추출물과 효모-맥아즙이 혼합된 배지에 찹쌀떡버섯 균사체가 5%(v/v) 되도록 접종한 후 발효조 내에서 온도 25℃, 회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vm, pH 7.0의 조건으로 6일간 배양하였다. 배양 후 배양액으로부터 찹쌀떡버섯 균사체를 제거한 다음 생물전환 밤 추출물을 수득하였다.

[0039] 실험예 1: 생물전환 밤 추출물에 함유된 성분 및 함량 측정

[0040] 상기 비교예 1에서 제조된 밤 추출물과 실시예 1에서 제조된 생물전환 밤 추출물의 주요 성분 중 페놀성 물질, 플라보노이드, 플라보노이드 배당체 등의 정성분석 및 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 비교하였다.

[0041] 먼저 페놀성 물질, 플라보노이드, 플라보노이드 배당체 등의 정성분석은 하기와 같이 수행하였다.

[0043] (1) 페놀성 물질, 플라보노이드의 정성분석

[0044] 비교예 1과 실시예 1의 추출물에 각각 2.5% FeCl_3 에탄올 용액을 1~2 방울 떨어뜨려 방치할 때 암녹색으로 정색 하거나 침전이 생성되는지를 관찰하였다.

[0046] (2) 플라보노이드 배당체의 정성분석

[0047] 진한 황산법을 이용하여 비교예 1과 실시예 1의 추출물에 각각 5ml의 진한 황산을 침적하여 황색 및 황적색 침전의 생성을 관찰하였다.

[0049] (3) 당의 정성분석

[0050] 비교예 1과 실시예 1의 추출물에 각각 5% α -나프톨 알콜 시액 2~3방울을 넣은 후 농황산을 기벽을 통하여 가할 때 경계면에 적자색이 나타나는지 관찰하였다.

[0052] (4) 총 페놀 함량 측정

[0053] 비교예 1과 실시예 1의 추출물 1ml에 각각 증류수 10ml를 첨가한 후, 2ml의 Folin-Ciocalteu phenol reagent를 첨가하여 혼합한 다음, 실온에서 5분간 반응하였다. 이 반응물에 20% 소듐 카보네이트를 2ml 첨가하여 혼합한 다음, 상온에서 1시간 반응시킨 후 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 지표물질로 탄닌산(tannic acid)을 사용하였다.

[0055] (5) 총 플라보노이드 함량 측정

[0056] 비교예 1과 실시예 1의 추출물 0.5ml에 각각 10% 질산알루미늄 (aluminum nitrate) 0.1 ml, 1M 초산칼륨 (potassium acetate) 0.1ml, 에탄올 4.3ml씩 넣고 혼합한 다음, 상온에서 40분간 반응시킨 후 415nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 지표물질로 퀘르세틴(queracetin)을 사용하였다.

표 1

[0057]

시료명	총 페놀 함량 ($\mu\text{g/ml}$ of extract)	총 플라보이드 함량 ($\mu\text{g/ml}$ of extract)
비교예 1	323.66	42.16
실시예 1	333.74	79.41

[0059]

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 1.88배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0060]

상기 결과로부터 단순 추출에 의해 제조된 밤 추출물을 찹쌀떡버섯 균사체에 의해 생물전환함으로써 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 증가시킬 수 있다는 사실을 확인하였고, 이를 바탕으로 찹쌀떡버섯 균사체에 의해 생물전환된 밤 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 피부 보습 화장품 조성물을 제조하였다.

[0062]

실험예 2: 피부 각질세포 분화촉진 효과

[0063]

실시예 1에서 수득한 물질의 피부 각질세포 분화에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석을 Mosmann의 방법(1983)을 약간 변형하여 실시하였다. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 포르마잔으로 변환시키는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 포르마잔의 양은 살아있는 세포수에 비례한다.

[0064]

먼저, HaCaT 세포를 5×10^4 cells/well의 농도로 96-웰 플레이트에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 동안 부착한 후 혈청이 없는 배지로 갈아준 다음 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. 배양 후 MTT 분석을 통하여 세포 생존율을 측정하였다. 대조군은 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 각질세포의 분화능은 다음의 식에 따라 계산하였다.

수학식 1

[0065]

$$\text{각질세포 분화능(\%)} = \text{각 시료의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도} \times 100$$

[0066]

도 1에서 나타난 바와 같이 본 발명의 실시예 1은 비교예 1과 비교할 때 실시예 1이 비교예 1에 비해 25~50% 정도 높은 각질세포 분화능을 나타내었다.

[0068]

실험예 3: 아쿠아포린-3 및 히알루론산 합성효소 단백질 합성 촉진효과

[0069]

실시예 1에서 수득한 시료들의 아쿠아포린-3 (Aquaporin-3, AQP-3) 단백질 및 히알루론산 합성효소(Hyaluronic acid synthase-2, HAS-2) 단백질 합성 촉진효과를 관찰하기 위해 웨스턴 블랏 분석을 실시하였다.

[0070]

HaCaT 세포를 10% FBS를 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media)에 1×10^6 cells/well의 농도로 6-웰 플레이트에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 동안 부착한 후 혈청이 없는 배지로 갈아준 다음 시료를 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. 배양한 세포를 PBS로 세척하여 E-tube에 옮기고 세포침전물에 Pro-prep (protein extraction solution)을 첨가하여 세포를 파괴한 후 4°C에서 15,000rpm으로 20분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 BCA 방법에 따라 정량한 후 12% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 사용하여 전기영동한 다음, PVDF 막에 옮겼다. 막을 5% 탈지유로 1시간 동안 블로킹한 뒤 1차 항체로 상온에서 3~4시간 동안 반응시키고, HRP(Horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체로 처리하였다. ECL 키트를 이용하여 발색된 밴드의 강도를 확인하였다. β -액틴은 각각의 시료에 동량의 단백질이 들어있는지 확인하기 위한 대조군으로 사용하였다. 또한, 양성 대조군으로 AQP-3 합성을 촉진하는 것으로 알려진 EGF(Epidermal Growth Factor)를 사용하였다.

[0071]

도 2의 (a)는 AQP-3와 HAS-2 단백질 발현량에 대한 웨스턴 블랏 밴드를 나타낸 것으로 밴드가 진할수록 발현량이 많다는 것을 의미한다. 도 2의 (b)는 밴드의 진하기를 농도계로 정량하여 β -액틴에 대한 상대적인 양으로

표시한 결과이다.

도 2에서 나타난 바와 같이 본 발명의 실시예 1은 우수한 AQP-3와 HAS-1 단백질 합성 촉진효과가 있음을 알 수 있었다.

실시예 2: 생물전환 밤 추출물을 함유한 크림 제조

실시예 1에서 수득한 생물전환 밤 추출물을 함유한 화장료를 제조하여 사람을 대상으로 수분 보유량과 수분 손실량을 측정하여 비교예 1과 비교실험을 행하여 피부 보습 개선효과를 평가하였다.

비교실험에 사용된 화장료는 크림형태이고, 그 조성은 표 2에 나타난 바와 같다. 우선 표 2에 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 2

원료		실시예 2	비교예 2
가	스테아릴알콜	8	8
	스테아린산	2	2
	스테아린산콜레스테롤	2	2
	스쿠알란	4	4
	2-옥틸도데실알콜	6	6
	폴리옥시틸렌(25몰부가) 알콜에스테르	3	3
	글리세틸모노스테아린산 아스테르	2	2
나	생물전환 밤 추출물	5	-
	프로필렌글리콜	5	5
	정제수	적량	적량

주) 단위: 중량%

시험예 1: 피부보습 개선효과 (수분 보유량 평가)

실시예 2 및 비교예 2의 화장료 조성물의 피부보습 개선효과를 평가하기 위하여, 상기 화장료 조성물을 도포한 후 수분 보유량을 평가하는 방법을 사용하였다. 이때 사용된 기기는 피부의 전기전도도를 측정하는 피부수분량 측정기(Corneometer CM 825, C+K electronic사)로 피부 각질층의 수분함량을 측정하는 기기이다. 항온 항습실 (온도 25℃, 상대습도 50%)에서 실시예 2 및 비교예 2의 크림을 각각 피시험자(20세-35세의 여성) 20명의 하박 안쪽에 일정량(2mg/cm²)을 도포한 후 잘 문지르고, 0시간의 수분 보유량을 기준으로 도포 1시간 후, 도포 3시간 후의 수분증가율(%)을 측정하여 단기보습효과를 평가하였다. 그리고 누적 도포된 수분 보유량을 평가하기 위하여, 3일간의 보습효과를 측정하였다. 실제 생활하는 방법으로 1일 2번 크림을 바르고 샤워를 한 후 다음날 수분 증가율을 측정한 후, 다시 크림을 도포하는 과정으로 3일간 실시하였다. 이때 얻어진 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

구분	수분 증가율 (%)				
	도포 1시간 후	도포 3시간 후	도포 1일 후	도포 2일 후	도포 3일 후
실시예 2	22.98	22.50	20.95	27.32	32.11
비교예 2	13.50	12.85	11.80	15.20	16.40

표 3에 나타난 바와 같이 실시예 2 크림의 도포 1시간 후와 도포 3시간 후의 수분 증가율이 비교예 2 크림에 비해 1.6~1.7배 정도 높았고, 3일간 피부에 누적 도포시 수분 증가율이 2배 이상 높아짐을 확인하였다.

시험예 2: 피부 보습 개선효과 (경피수분손실량 평가)

실시예 2 및 비교예 2의 화장료 조성물의 피부보습 개선효과를 평가하기 위하여, 상기 화장료를 도포한 후 경피수분손실량(TEWL)을 평가하는 방법을 사용하였다. 이때 사용된 기기는 피부의 수분손실량을 측정하는 경피수분손실량 측정기(Tewameter TM 300, C+K electronic사)로 피부 각질층의 수분손실량을 측정하는 기기이다. 항온

항습실(온도 25℃, 상대습도 50%)에서 실시예 2 및 비교예 2의 크림을 각각 피시험자(20세-35세의 여성) 20명의 하박 안쪽에 일정량($2\text{mg}/\text{cm}^2$)을 도포한 후 잘 문지르고, 2분 간격으로 경피수분손실량 측정기를 이용하여 10분 간 피부의 수분손실량을 측정하였다. 그리고 제품을 사용하면서 누적된 효과를 알아보기 위하여 3일간의 경피수분손실량을 측정하였다. 실제 생활하는 방법으로 1일 2번 크림을 바르고 샤워를 한 후 다음날 제품을 바르기 전과 바른 후 10분간의 경피수분손실량을 측정하는 과정으로 3일간 실시하였다. 이때 얻어진 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

구분	수분 손실량 (%)			
	도포 10분 후	도포 1일 후	도포 2일 후	도포 3일 후
실시예 2	15.15	15.99	14.05	13.45
비교예 2	38.50	39.90	38.30	37.50

표 4에 나타난 바와 같이 실시예 2 크림은 비교예 2 크림과 수분 손실량 비교시 도포 10분 후에 2.54배, 도포 1일 후 2.4배, 도포 2일 후에 2.7배, 도포 3일 후에 2.78배 정도 수분 손실량이 크게 낮아지는 것으로 보아 피부 건조 개선에 현저한 효과가 있는 것을 확인할 수 있다.

실시예 3: 생물전환 밤 추출물을 함유한 화장수 제조

95% 에탄올 8g에 폴리피로리돈 0.05g, 폴리올알콜 0.1g, 폴리옥시에틸렌모노올레이트 0.2g, 향료 0.2g, 파라옥시안식향산메틸에스테르 0.1g, 소량의 산화방지제, 소량의 색소를 혼합, 용해하였다. 실시예 1에서 수득한 생물전환 밤 추출물 0.05g, 글리세린 5g을 정제수 85.33g에 용해한 것에 상기 혼합액을 첨가한 후 교반하여 피부 개선효과가 있는 화장수를 얻었다.

실시예 4: 생물전환 밤 추출물을 함유한 유액의 제조

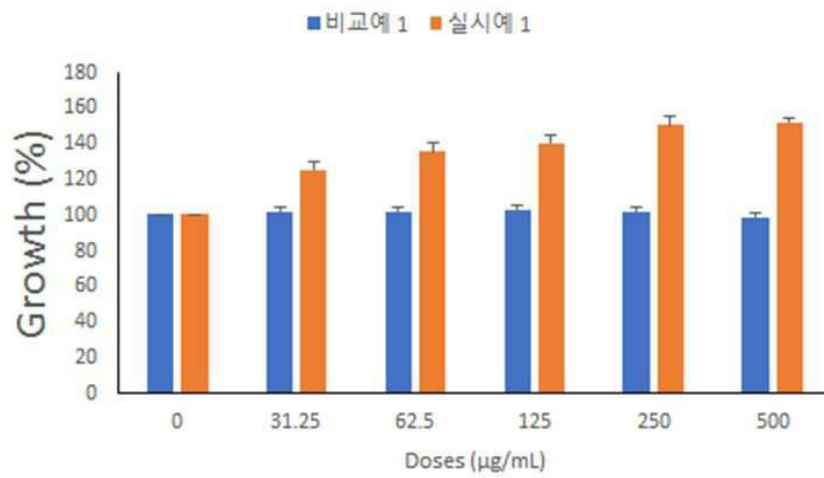
세틸 알콜(setyl alcohol) 1.2g, 스쿠알란 10g, 바세린 2g, 파라옥시안식향산에틸에스테르 0.2g, 글리세린모노에스테아리에트 1g, 폴리옥시에틸렌(20몰 부가)모노올레이트 1g 및 향료 0.1g을 70℃에서 가열, 혼합, 용해하고, 실시예 1에서 수득한 생물전환 밤 추출물 0.05g, 디프로필렌글리콜 5g, 폴리에틸렌글리콜1500 2g, 트리에탄올아민 0.2g, 정제수 76.2g을 75℃로 가열하여 용해하였다. 양자를 혼합하여 유효한 후 냉각하여 수/유중 계형의 피부 개선효과가 있는 유액을 제조하였다.

실시예 5: 생물전환 밤 추출물을 함유한 미용액의 제조

95% 에틸알콜 5g에 폴리옥시에틸렌솔비탄모노올레이트 1.2g, 키토로오즈 0.3g, 히야론산나트륨 0.2g, 비타민 E-아세테이트 0.2g, 감초산 나트륨 0.2g, 파라옥시안식향산에스테르에스테르 0.1g, 실시예 1에서 수득한 생물전환 밤 추출물 각 1g 및 적량의 색소를 혼합하여 피부 개선효과가 있는 미용액을 얻었다.

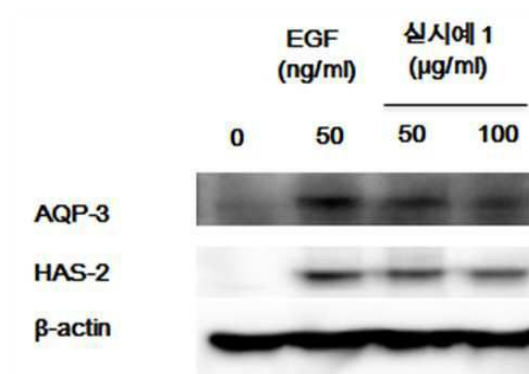
도면

도면1



도면2

(a)



(b)

