

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 9월 17일 (17.09.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/137652 A1

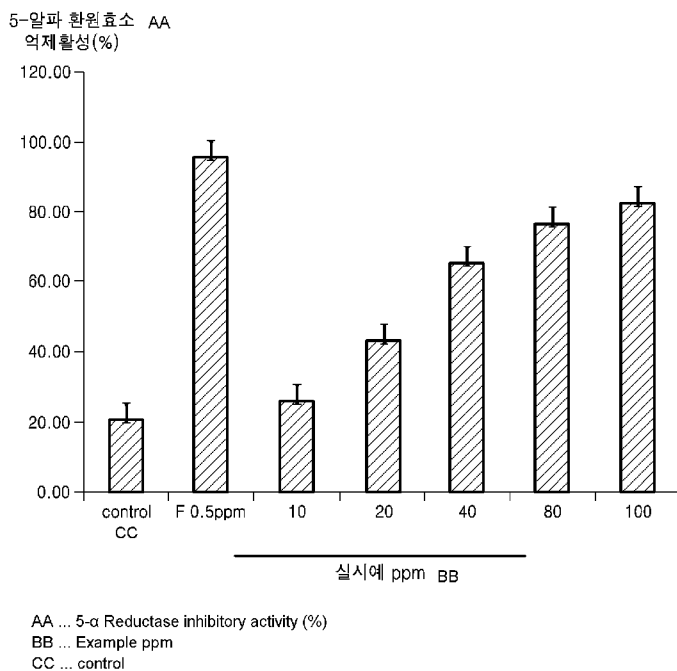
- (51) 국제특허분류:
C12P 7/64 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/001925
- (22) 국제출원일: 2015년 2월 27일 (27.02.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0028160 2014년 3월 11일 (11.03.2014) KR
- (71) 출원인: 주식회사 벤스랩 (BEN'S LAB. CO. LTD.)
[KR/KR]; 445-743 경기도 화성시 봉담읍 와우안길 17
첨단과학기술연구원 115호 (수원대학교), Gyeonggi-do
(KR). 주식회사 코스벤 (COSBEN CO., LTD.)
[KR/KR]; 445-743 경기도 화성시 봉담읍 와우안길 17,
1007호 (수원대학교 첨단과학기술원), Gyeonggi-do
(KR).
- (72) 발명자: 겸
- (71) 출원인: 정종문 (JEONG, Jong Moon) [KR/KR]; 448-
756 경기도 용인시 수지구 정평로 89 204-802 (풍덕천
동, 신정마을현대프라임아파트), Gyeonggi-do (KR).

- (72) 발명자: 이승숙 (LEE, Seung Sook); 448-756 경기도 용
인시 수지구 정평로 89, 204-401 (풍덕천동, 신정마을),
Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 성낙훈 (SEONG, Nak Hoon); 135-910 서울시
강남구 논현로 503, 1601 (역삼동, 송촌빌딩), Seoul
(KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: 5-ALPHA REDUCTASE INHIBITING FERMENTED *CAMELLIA JAPONICA* SEED OIL FOR ALLEVIATING BENIGN PROSTATIC HYPERTROPHY AND BALDNESS

(54) 발명의 명칭: 전립선 비대증 및 탈모를 개선하는 5-알파 환원효소 억제용 발효 동백오일



(57) Abstract: The present invention relates to a use of fermented *Camellia japonica* seed oil which is high in the content of free essential fatty acids, and more specifically, to a medicine, a dietary supplement or a cosmetic product for preventing and alleviating benign prostatic hypertrophy and male-pattern baldness, containing fermented *Camellia japonica* seed oil as an active ingredient since the fermented *Camellia japonica* seed oil, which is prepared by fermenting *Camellia japonica* seed oil, is rich in free essential fatty acids and has remarkable 5- α reductase inhibitory activity, thereby preventing and alleviating benign prostatic hypertrophy and male-pattern baldness. According to the present invention, the effects of essential fatty acids can be maximized by increasing the content of essential fatty acids, which are isolated so as to facilitate absorption and *in vivo* utilization, through the indirect fermentation of *Camellia japonica* seed oil. In addition, according to the present invention, the fermented *Camellia japonica* seed oil has a similar activity to finasteride, which prevents and alleviates benign prostatic hypertrophy and male-pattern baldness by having little toxicity as a result of a single-dose toxicity test and cytotoxicity check, having an effect of lowering dihydrotestosterone by inhibiting 5- α reductase, exhibiting an effect of restoring the size of the prostate to a normal level with respect to benign prostatic hypertrophy, promoting the growth of hair follicle cells and exhibiting an effect of alleviating baldness phe-

nomenon of examinees as a result of simple clinical trials, and thus can be applied, prepared, and sold as a cosmetic product, a dietary supplement or a pharmaceutical composition by using a fermented natural oil including fermented *Camellia japonica* seed oil having identical or similar efficacy and effects to natural product-derived one.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/137652 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, **공개:**

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 유리 필수지방산 함량이 높은 발효 동백오일의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 동백오일을 발효시켜 제조된 발효 동백오일이 유리 필수지방산이 풍부하고 5-알과 환원효소의 현저한 억제 효과를 가짐에 따라 전립선 비대증 및 남성형 탈모를 예방하고 개선할 수 있으므로, 이런 발효 동백오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 및 남성형 탈모를 예방 및 개선을 위한 약제, 건강기능식품 또는 화장품에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 동백오일을 간접 발효하여 흡수하기 쉽고 체내 이용이 쉽도록 유리된 필수 지방산의 함량을 높여 필수지방산이 가지고 있는 효과를 극대화할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면 발효 동백오일은 단위 독성 시험과 세포독성을 확인한 결과, 독성이 거의 없고 5-알과 환원효소를 억제하여 디하이드로테스토스테론 (dihydrotestosterone)을 낮추는 효과를 지니며 전립선 비대증에 대하여는 전립선의 크기를 정상수준으로 회복시켜 주는 효과를 나타내고, 또한 모낭 세포의 성장을 촉진하고 간지 임상 시험 결과 피험자들의 탈모 현상을 개선하는 효과를 나타냄으로써, 전립선 비대증 및 남성형 탈모를 예방하고 개선하는 피나스테라이드와 유사한 활성을 가지므로 천연물 유래의 동일 내지 유사한 효능효과를 갖는 발효 동백오일을 포함한 발효 천연오일로 화장품, 건강 기능성 식품, 혹은 약학조성물로 응용, 제조 및 판매할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 전립선 비대증 및 탈모를 개선하는 5-알파 환원효소 억제용 발효 동백오일

기술분야

- [1] 본 발명은 5-알파 환원효소(5- α reductase)를 억제하여 전립선 비대증과 탈모를 개선 및 예방하는 기능성 식품, 약학 조성물 및 화장품 원료에 관한 것으로, 보다 자세하게는 유리된 올레산을 포함한 필수 불포화지방산이 풍부한 발효 동백오일(Camellia japonica seed oil)을 포함한 발효 천연오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료, 및 탈모 예방 및 개선용 기능성 식품, 약학 조성물 및 화장품 원료에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 전립선은 샘조직과 섬유근조직으로 구성된 부속 생식샘이다. 전립선은 정액을 생성, 분비하는 역할을 하며 방광 바로 아래에 위치하여 요도를 둘러싸고 있다. 전립선의 기능은 정액의 약 40%를 담당하고 정자의 생존과 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 또한 전립선은 정자에 영양분을 공급하고 적절한 이온농도와 산성을 유지하게 하며, 아연성분이 있어 세균 감염을 방지하는 역할을 한다.
- [3] 이러한 중요한 기능을 하는 전립선은 나이가 들면서 크기가 점차 증가하게 된다. 따라서 중년 이후 가장 흔하게 나타나는 전립선질환은 전립선 비대증(Benign Prostatic Hyperplasia, BPH)이다.
- [4] 전립선 비대증은 전립선이 비정상적으로 커져 방광 아래쪽 소변이 나오는 통로를 막거나 요도를 압박하여 소변의 원활한 배출을 막고 방광을 위로 밀어 올려 이로 인해 나타나는 하루 8회 이상 소변을 보는 빈뇨, 야간 빈뇨, 강하고 갑작스런 요의(오줌이 마려운 느낌)를 느끼면서 소변이 마려우면 참을 수 없는 절박뇨 등의 방광 저장 증상과 지연뇨(소변을 볼 때 땀을 들여야 소변이 나오는 현상), 단절뇨(소변의 흐름이 끊기는 현상), 배뇨 시 힘을 주어야 하는 현상 등 방광의 배출 장애를 나타내는 증상을 통칭한 하부 요로증상을 통칭한다. 나이가 들수록 전립선 비대증은 증가하고 60대 이상의 남성에서 50%이상, 85세 남성의 90%이상에서 전립선 비대가 나타난다.
- [5] 전립선 비대증의 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않았고, 다른 만성 질환과 마찬가지로 여러 가지 복합적인 요인이 작용하는 것으로 알려져 있다. 전립선의 비대는 남성호르몬을 만드는 정상 고환을 가지고 있는 40대 이상의 남성에서 주로 발생하며 현재 가장 중요한 원인의 하나로 지목되는 것은 테스토스테론(testosterone)의 변화와 노화 간의 상관관계이다.
- [6] 전립선 비대증의 기전을 간략히 설명하면 다음과 같다. 혈액 내에서 테스토스테론이 과다하게 존재하면 전립선 조직에 존재하는 5-알파 환원효소에

의해 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)으로 다량 변환 합성하게 된다. 이 DHT는 테스토스테론에 비해 훨씬 전립선의 기질세포(stromal cell)와 상피세포(epithelial cell)의 세포분열을 활발하게 하여 결국 전립선 비대로 발전하게 만든다.

- [7] 노년기가 되면 테스토스테론의 수치는 점차 낮아지지만 상대적으로 전립선 비대증은 더 많이 발생하게 된다. 그 이유는 바로 이 전립선의 세포수를 증가시키는 디하이드로테스토스테론 때문이다. 남성호르몬은 테스토스테론과 디하이드로테스토스테론의 두가지 형태로 존재하는데 전립선의 성장에 더 중요한 것은 디하이드로테스토스테론이다. 테스토스테론과 디하이드로테스토스테론은 전립선에서 유사한 비율로 동일한 남성호르몬 수용체와 결합하지만, 디하이드로테스토스테론-남성호르몬 수용체 복합체가 테스토스테론-남성호르몬 수용체 복합체보다 더 안정적이기 때문에 전립선 내의 대부분 남성호르몬 수용체는 테스토스테론보다 디하이드로테스토스테론과 결합한 상태로 존재하게 된다. 또한, 디하이드로테스토스테론은 테스토스테론과 달리 나이가 들어도 양에는 크게 줄지 않아 내분비계 균형을 유지하기 위해 전립선 세포의 안드로젠 수용체가 증가하게 되며 결국 나이가 들어도 전립선의 증식을 유도하는 다른 성장인자들을 지속적으로 자극하여 전립선비대가 발생하게 되는 것이다.
- [8] 테스토스테론을 디하이드로테스토스테론으로 전환시키는 5-알파환원효소는 미소소체(microsome)의 NADPH 의존성 3-oxo-5 α -steroid-dehydrogenase로서 테스토스테론과 같은 이중 결합 스테로이드를 환원시킨다. 이 효소는 신체에서 크게 bile acid 합성 및 androgen과 estrogen의 물질대사에 관여한다. 5-알파 환원효소는 1형과 2형, 그리고 3형의 아형을 가지며 1형은 주로 피부와 간조직 등의 여러 장기에 존재하고, 2형은 간과 전립선을 포함한 요로생식기에 주로 존재한다. 테스토스테론은 전립선 조직 내에서 5-알파 환원효소에 의해 90% 이상 디하이드로테스토스테론으로 변환되며 디하이드로테스토스테론이 테스토스테론의 대략 10배 이상의 활성도로 전립선 성장을 촉진한다. 따라서, 5-알파 환원효소를 효율적으로 억제하게 되면 생리적 활성이 강한 디하이드로테스토스테론의 합성을 감소시켜 결국, 전립선 비대증을 개선 내지 치료할 수 있다.
- [9] 대체로 인간모발의 수는 약 10만개에서 15만개로 추정하고 있다. 모발은 하루에 50개에서 100개정도 빠지게 되며 하루 100개 이상이 계속 빠졌을 때 탈모증(hair loss)이 시작되었다고 한다. 탈모의 원인은 매우 다양하며 사람마다 양상이 다르게 나타난다. 특히 남성의 머리카락은 20대를 절정으로 점점 얇아지는 경향이 있다. 탈모의 여러 증상들 중에서 가장 흔하게 나타나는 남성형 탈모증(Male Pattern Baldness, MPB)은 유전적인 특징이 크며 또 다른 큰 이유는 남성호르몬의 이상에 의해 모근이 약해지고 피지 분비가 과다하게 되면서 두피에 염증을 일으켜 모발이 빠지게 된다.

- [10] 상기 남성형 탈모의 가장 큰 원인(약 90% 이상)은 남성호르몬의 이상(androgenic alopecia)이다. 전립선 비대증과 마찬가지로 5-알파 환원효소에 의해 디하이드로테스토스테론이 과량 합성되게 되면 디하이드로테스토스테론이 모낭 주변의 안드로겐 수용체에 결합하여 점점 모낭을 축소 및 황폐화하여 결국 모발의 성장기 기간을 축소하게 된다. 축소된 성장기 때문에 모발의 뿌리, 즉 모근이 충분하게 발육하지 못하고 동시에 색소축적도 충분하지 못하게 된다. 이렇게 힘이 없는 미성숙의 모발이 자주 두피에서 빠져나와 결국 탈모가 시작된다. 계속 축소된 모낭은 결국 죽게 되고 이에 영구적인 탈모가 발생하게 되는데 이때가 되면 모발이식 이외 치료가 어려워진다. 디하이드로테스토스테론은 모발의 생장 주기 중 생장기를 짧게 하고 휴지기를 길게 하여 결국 생장주기를 거듭할수록 모발의 크기가 점점 작아지게 만드는 요인을 제공하는 것이다. 탈모가 진행되는 동안 모낭은 점점 수축되고 대신 피지선은 점점 커져서 머리카락은 점점 가늘고 작아지며, 대체로 기름기는 점점 많아져 뽀루지 또는 염증을 만들기도 한다. 가늘고 작아진 머리는 솜털로 변하고 우리 눈에 보이지 않게 되어 머리 속 두피가 들여다 보이기 시작한다. 빠지고 다시 나면서 이전보다 더 가늘어지는 반복과정을 20회 정도 하고 나면 모낭은 영원히 죽게 되고 어떤 치료수단도 이를 다시 회복시키지 못하게 되는 것이다. 테스토스테론은 주로 겨드랑이 털과 음모의 성장에 영향을 주고 있는 반면, 디하이드로테스토스테론은 턱수염과 대머리에 영향을 미치고 있다고 알려져 있지만 확실치는 않다.
- [11] 전립선 비대증 및 남성형 탈모를 치료하기 위한 약물들도 많이 알려져 있다. 그러나 근본적인 치료를 위해서는 5-알파 환원효소를 억제하는 것이 가장 중요하다.
- [12] 5-알파 환원효소 합성 억제제에는 Finasteride와 Dutasteride 등이 있다. 테스토스테론은 전립선 조직 내에서 5-알파 환원효소에 의해 디하이드로테스토스테론으로 전환된다. 따라서 디하이드로테스토스테론의 변환을 효율적으로 막는 5-알파 환원효소 억제제를 복용하면 전립선의 크기를 줄일 수 있다는 것이다. 보통 6개월 정도 사용하면 전립선의 크기가 최대로 줄어드는 것으로 알려져 있다. Merck사가 개발한 5-알파 환원효소의 경쟁적 억제자인 Finasteride는 1형도 억제하지만 주로 2형 5-알파 환원효소를 억제하여 전립선과 혈중에 존재하는 dihydro테스토스테론을 감소시킨다. Dutasteride는 Finasteride에 비해 반감기가 길고, 1형 효소에 대하여 45배, 2형에 대하여는 2.5배 더 강력한 결합력을 갖는다. 대부분 간에서 대사가 이루어져 간부전 환자에서는 사용을 제한해야 한다. 이들 5-알파 환원효소의 합성 억제제는 전립선 비대증의 근본적인 치료 방법이라고 할 수는 있으나 5 mg/일씩 4~6개월 장기간 복용해야 환자가 효과를 볼 수 있으며 복용을 중단하면 재발하는 문제점이 제시되고 있다. 부작용으로 발기부전, 성욕감퇴, 여성형 유방, 사정장애 등이 보고되고 있다.
- [13] 또한 남성형 탈모를 치료하기 위해서도 finasteride가 사용된다. Finasteride는

전립선 비대증을 치료하기 위해 처음 사용되었다가 탈모 치료효과도 미국식품의약안전청에 의해 인정되어 복용량을 다르게 하루 1 mg 씩 처방, 탈모 치료제(상품명, 프로페시아)로 판매되고 있다. 상기한 대로 이 약품도 두피에 존재하는 5-알파 환원효소를 억제하는 기전을 통해 탈모 치료효과를 나타낸다. 그러나 최소 3-5개월은 지나야 효과가 있으며 복용하다가 중단하면 12개월 이내에 원상태로 돌아가는 단점이 있다. 또한, 원래 finasteride의 구조 자체가 테스토스테론이나 프로게스테론 호르몬들과 같은 성호르몬과 비슷해서 여성들에게서 부작용이 종종 발견되며 특히, 산모의 사용을 엄격히 제한하고 있다. 심지어 finasteride를 생산하는 공장에서는 여자가 직접 생산에 참여치 못하게 하고 있다.

- [14] 미녹시딜 또한 고혈압 치료를 위해 개발되었다가 고혈압 환자들에게서 탈모 억제현상을 관찰하고 발모제로 개발, 시판되었다. 미녹시딜의 작용기전은 명확하지 않으나 두피의 혈관을 팽창하여 산소와 영양분을 모낭에 수월하게 공급하여 머리카락 생성과 발육을 촉진하는 것으로 볼 수 있다. 부작용은 거의 없으나 최대효과를 내려면 6개월 이상 오랜 기간 도포해야 하며 사용을 중지하였을 때에 그 효과가 사라진다. 또한 5-알파 환원효소의 억제자가 아니어서 디하이드로테스토스테론의 농도를 낮추지 못한다.
- [15] 최근에는 기존의 전립선 비대증과 남성형 탈모를 치료하기 위한 약물 치료법의 부작용과 단점을 보완하기 위해 생약요법이 많이 대두되고 있다. 생약요법은 전립선 비대증 및 남성형 탈모 치료에 다른 가능성을 보여주기에는 하지만 현재까지 위약 대조군과 비교한 장기간의 임상결과가 축적되어 있지 않다.
- [16] 미국에서만 2백만 명 이상이 이용하고 있는 것으로 보고된 쏘팔메토는 톱아자 나무의 열매에서 추출한 것으로서 전립선 비대증에 가장 흔히 사용되는 대표적인 천연물 유래 기능성 식품이다. 과거 인디언들은 쏘팔메토 열매를 비뇨생식기계의 치료제로 사용했던 기록되어 있다. 쏘팔메토의 주성분은 TG형의 여러 지방산과 피토스테롤(phytosterols)으로서, 5-알파 환원효소억제제 작용을 하여 전립선 비대증을 개선하고 탈모를 개선하는 것으로 추정된다. 국내에서는 쏘팔메토가 전립선 비대증을 개선하는 효과가 인정되어 개별인정형 제품으로 시판되고 있다. 최근에는 쿠쿠르비트 종자유를 유효성분으로 하여 전립선 비대증 치료제로 제조 판매되고 있다. 실제로 이 종자유는 유럽의 호박씨 추출유로서 유럽 제약회사로부터 수입하고 있다. 이것의 작용기전으로 제약회사 측은 쿠쿠르비트 종자유가 전립선 비대를 일으키는 혈중 콜레스테롤을 억제하고 남성호르몬의 변화를 막아 전립선 비대에 의한 배뇨장애를 치료한다고 설명하고 있다.
- [17] 동백은 겨울의 장미라고도 불리며 중국의 산둥지방, 대만, 한국의 남쪽지방, 일본 등에서 자란다. 해발 300-1,100m에서 주로 자라고 보통 키가 1.5-6m 정도이다. 1월에서 3월에 꽃을 피운다. 한국에서는 통영과 제주도에서 재배된다. 특히, 국내 통영지방에서 생산되는 동백 오일은 일본 아토피성 피부염

전문회사에서 수입하여 판매되고 있다. 동백유는 차나무과(Theaceae)의 동백나무(*Camellia japonica* L.) 및 그 동속식물의 종자에서 채취되는 지방유로서 구성 지방산이 올리브 오일과 유사하여 올레산(Oleic acid)이 82-86%까지 함유되어 있어서 올리브유와 비슷한 용도로 크림, 유액 등에 사용되고 있으며, 특히 두발용으로 많이 사용되고 있다. 섭씨 160-220도의 고온에서도 잘 변질되지 않는다. 동백유에 많이 함유되어 있는 올레산(Oleic acid)은 몸에 해로운 저밀도 콜레스테롤인 LDL 콜레스테롤의 수치는 낮추는 반면, 몸에 좋은 고밀도 콜레스테롤인 HDL 콜레스테롤의 수치는 높여주어 고혈압과 심장병 등을 예방해 준다. 암 예방 효과와 노화로 인한 기억력 감퇴 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

- [18] 그러나 자연계에는 자유 올레산(free oleic acid)로 존재하지 않고 대개 에스테르(ester)형으로 글리세롤(glycerol)에 공유결합되어 있다. 시중의 올레산은 거의 오일의 비누화로 이루어진 K^+ 혹은 Na^+ 가 붙어있는 형태이거나 가에탄올 분해(ethanolysis)를 통한 에틸 에스테르(ethyl ester)형이거나, 혹은 여러 단계의 공업적 과정을 거쳐 제조한 것이다.
- [19] 이에, 필수 불포화지방산인 올레산과 리놀레산 등을 풍부하게 함유하고 있는 동백오일을 흡수와 이용에 용이하도록 발효하여, 다른 화학적 처리를 전혀 하지 않으면서 글리세롤 골격분자에서 유리된 올레산과 리놀레산 등을 포함한 필수지방산의 함량을 높여 생기는 5-알과 환원효소 억제능으로, 전립선비대증 및 남성형 탈모를 예방하고 개선하는 효과를 가지는 발효 천연오일을 제조함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [20] 본 발명의 목적은, 동백 오일을 포함한 천연 오일을 선 미생물배양, 후 효소발효방법이란 가장 완화된 공정을 통해 지방산(Fatty acid)과 글리세롤(Glycerol)로 분리시켜 결국 이로 인해 새로 생긴 여러 생화학적 기능을 추가하여 제조하는 것을 목적으로 한다.
- [21] 또한, 본 발명의 목적은, 동백오일의 글리세롤 골격분자에서 필수 불포화지방산을 떼어내는 리파아제의 고기능을 가진 미생물 균주를 선별하고 이를 리파아제 유도배지에서 배양한 후, 고역가의 리파아제를 함유하는 배양액을 황산암모늄을 이용, 효소단백질을 침전, 농축 및 투석하여 미생물의 배양시 생겨 최종 발효제품을 오염시킬 수 있는 여러 대사 최종물질들을 배제하고 직접 발효에 의해 생기는 발효냄새를 없애며 나아가 최종 발효제품에서 미생물의 오염을 원천 차단할 수 있도록 리파아제 농축발효액을 이용하여 동백오일을 발효한다.
- [22] 또한, 본 발명의 목적은, 유리 필수지방산이 다량 함유된 발효오일을 제조하여 5-알과 환원효소를 억제하도록 함으로써 전립선 비대증 및 탈모를 예방하고

개선하기 위한 용도를 제공하는 것이다.

- [23] 또한, 본 발명의 목적은, 발효 천연오일을 제조하여 전립선 비대증을 위해서는 경구용으로 개발하고, 탈모 예방 및 치료를 위해서는 경구용 및 피부 도포용으로 제조하여 시너지 효과를 갖게 하는 것이다.

과제 해결 수단

- [24] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 동백오일을 발효하여 올레산을 포함, 유리된 필수 지방산을 풍부하게 함유하는 발효 동백오일을 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 동백오일로부터 발효효소 또는 발효효소조성물을 이용하여 발효시키는 공정을 포함하는 발효 동백오일의 제조방법을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 동백오일 외에 올리브오일, 카놀라오일, 올리브오일, 유채씨오일, 모링가유 또는 해바라기씨유 중 하나 이상을 포함하는 식물성 오일을 발효하여 올레산 등의 유리된 필수 지방산을 풍부히 함유하고 있는 발효 천연오일을 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 상기 다양한 식물성 오일로부터 발효효소 또는 발효효소조성물을 이용하여 발효시키는 공정을 포함하는 발효 천연오일의 제조방법을 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 유리된 필수 지방산을 풍부히 포함하는 발효 동백오일을 유효성분으로 하여 5-알파 환원효소를 억제, 전립선 비대증 및 탈모를 개선 및 예방하는 약학적 조성물, 또는 건강기능성 식품을 제공한다.
- [29] 또한 본 발명은 유리된 필수 지방산을 풍부히 포함하는 발효 동백오일을 유효성분으로 하여 5-알파 환원효소를 억제, 탈모를 개선 및 예방하는 피부 외용제, 화장료 조성물, 또는 그외 의약외품을 제공한다.
- [30] 또한, 본 발명은 유리된 필수 지방산을 풍부히 포함하는 발효 천연오일을 유효성분으로 하여 5-알파 환원효소를 억제, 전립선 비대증 및 탈모를 개선 및 예방하는 약학적 조성물, 또는 건강기능성 식품을 제공한다.
- [31] 아울러, 본 발명은 유리된 필수 지방산을 풍부히 포함하는 발효 천연오일을 유효성분으로 하여 5-알파 환원효소를 억제, 전립선 비대증 및 탈모를 개선 및 예방하는 피부 외용제, 화장료 조성물, 또는 그외 의약외품을 제공한다.

발명의 효과

- [32] 본 발명에 따르면, 발효 동백오일은 올레산을 포함한 필수 지방산을 다른 발효 전 오일에 비교하여 대량 함유하고 있어 유효한 효과를 나타낸다.
- [33] 또한, 본 발명에 따르면 리파아제를 생산하는 미생물을 유도배지에서 먼저 유도배양한 다음, 리파아제를 함유한 배양액을 황산암모늄을 이용하여 침전, 농축 및 투석과정을 거쳐 고역가의 발효액과 동백오일을 물리적 유화 방법으로 믹싱한 후 최적조건에서 발효과정을 거치기 때문에 직접발효시 생기는 미생물의 폐기물질 오염, 발효 특유의 냄새 등을 없앨 수 있었으며 유리 불포화지방산의 생산효율도 훨씬 높일 수 있다.

- [34] 또한, 본 발명에 따르면 발효 동백오일은 5-알파 환원효소를 억제하는 능력으로 혈중 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone)을 낮추어 전립선 비대증을 치료, 개선 또는 예방하는 효과를 나타낸다.
- [35] 또한, 본 발명에 따르면 발효 동백오일이 함유한 풍부한 유리된 필수지방산들은 5-알파 환원효소를 억제하여 남성형 탈모를 예방 또는 개선하는 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

- [36] 도 1은 발효 동백오일의 전립선 무게 감소 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [37] 도 2는 발효 동백오일의 5-알파 환원효소의 억제 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [38] 도 3은 발효 동백오일의 모낭세포의 성장 촉진 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [39] 도 4는 발효 동백오일의 마우스 유래 대식세포에 대한 세포독성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [40] 도 5는 발효 동백오일의 마우스에 대한 단회 독성시험에 따른 암컷 마우스의 장기무게 변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [41] 도 6은 발효 동백오일의 마우스에 대한 단회 독성시험에 따른 수컷 마우스의 장기무게 변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [42] 도 7은 발효 동백오일의 마우스에 대한 단회 독성시험에 따른 암컷 및 수컷 마우스의 체중 변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 본 발명은 동백오일을 발효하여 올레산을 포함, 유리된 필수 지방산을 풍부하게 함유하는 발효 동백오일을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [44] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [45] 본 발명은 동백오일을 발효하여 유리 필수 지방산을 풍부하게 함유하는 발효 동백오일을 제공한다.
- [46] 상기 동백오일의 학명은 *Camellia japonica* seed oil로 이 원료는 동백나무 *Camellia japonica* Linne(*Theaceae*)의 종피를 제거한 종자에서 얻은 지방유이다. 동백오일을 추출제조하는 방법에는 크게 상온에서 압착하여 얻어내는 냉압(cold pressing), 고온에서 압착하여 추출하는 열추출(heat extraction), 그리고 고온고압에서 에탄올이나 헥산을 이용하여 추출하는 용매 추출(solvent extraction) 방법 등이 있다. 동백오일은 특이하게 올레산을 80%이상 함유하고 있으며 팔미트산, 리놀레산, 리놀렌산 등을 함유하고 있다. 피부 흡수력이 좋으며 피부 진정효과를 지니고 있다. 또한, 황색포도상구균의 성장을 억제하며 아토피 피부염, 피부 가려움증 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

- [47] 본 발명에 사용된 발효 동백오일의 유효성분은 필수 불포화지방산으로서, 특히 올레산을 다량 함유한 오일을 의미한다
- [48] 상기 필수 지방산은 유리된 올레산과 리놀레산, 감마리놀렌산 등을 다량 함유하는 것이 바람직하다. 또한, 유리된 필수 지방산을 다량 함유한 발효 동백오일은 5-알파 환원효소를 억제하는 효과가 있는 것이 바람직하다.
- [49] 상기 올레산은 다른 지방산에 비해 쉽게 산화하지 않고 과산화지질을 생성하지 않는다. 올레산은 리놀레산이나 알파-리놀렌산처럼 혈액속의 LDL-콜레스테롤을 제거하여 동맥경화나 심장질환을 예방하는 것으로 알려져 있으며 항암작용도 하는 것으로 보고되고 있다. 또한 모유에도 가장 많이 함유된 지방산으로 아기의 성장, 발달을 돕는다.
- [50] 상기 발효효소는 리조푸스속 또는 칸디다속 미생물 유래 리파아제, 또는 식물 및 동물에서 추출, 황산암모늄처리 및 투석 과정을 거쳐 농축된 천연식물 발효용 발효효소농축액인 것이 바람직하다.
- [51]
- [52] 또한, 본 발명은 발효 동백오일의 제조방법을 제공한다.
- [53] 본 발명에 사용된 발효 동백오일은 다음과 같이 제조될 수 있다. 목적을 달성하기 위한 발효 동백오일의 제조방법은 미생물이 생산하는 리파아제를 포함한 발효농축액을 이용하여 오일을 구성하는 골격분자인 글리세롤에서 지방산들을 분리하여 얻는다. 발효를 함으로써 발효 전보다 유리된 필수지방산의 함량이 풍부해진다.
- [54] 보통, 오일 발효를 위해서는 리파아제를 다량으로 생산하는 균주인 미생물 배양액을 직접 오일에 첨가하고 인공 유화제를 소량 넣어 오일이 쉽게 발효될 수 있도록 유화한 다음, 미생물 성장을 최대로 끌어올릴 수 있도록 미생물 배양을 위한 여러 가지 적정 영양분을 넣고 최적조건에서 장시간 충분히 배양한다. 배양이 종료되면 대개 미생물 균체와 오일 배양액을 분리하기 위해 원심분리한다. 이렇게 생산된 미생물 직접 발효오일은 대개 미생물 발효 특유의 냄새가 심하며, 배양된 미생물을 발효오일로부터 분리시켜야 하는 번거로움이 있으며 또한, 발효미생물과 발효하는 동안 생성된 미생물의 여러 부가적 최종 폐기 생성물들이 최종 발효오일 제품에 오염되어 있을 가능성도 높다. 이를 위해 최종 발효오일을 다시 흡착컬럼에 통과시키든지 증류식 혹은 여과식 공정을 추가하여 냄새 및 오염물질을 제거해야 한다. 특히, 미생물이 성장하면서 내놓는 화합물로서 지용성이 높은 물질은 쉽게 최종 발효오일에 오염되고 나중에 발효오일에서 쉽게 제거하기도 어려워 결국 제품성이 떨어지는 경우가 많다.
- [55] 따라서, 본 발명에서는 발효미생물을 리파아제 유도배지에서 선배양한 후 배양액만을 회수하고 농축한 다음 여기서 얻어진 고역가의 리파아제 함유 배양액과 오일을 물리적 방법으로 유화시켜 발효하는 함으로써 첫째, 발효로부터 오는 특유의 발효냄새를 최소화할 수 있고 둘째, 유리 불포화지방산을 최대로 생산할 수 있도록 하며 셋째, 최종 발효오일제품의

미생물 오염문제를 최소화할 수 있으며 넷째, 인공유화제나 기타 화학공정에 의존하지 않기 때문에 몸에 해롭거나 소비자에게 좋지 않은 인상을 줄 수 있는 화학물질의 오염이 없으며 다섯째, 가장 자연스러운 방법으로 유리된 필수불포화지방산을 최대량 생산할 수 있어 다른 발효제품에 비해 경쟁력을 높일 수 있으며 여섯째, 발효여액을 황산암모늄으로 농축하고 완충용액으로 간단하게 투석함으로써 발효 중에 부산물로 생성되는 미생물이 만든 지용성이면서 낮은 분자량의 여러 화합물들을 미연에 제거하여 순수한 발효오일만을 제조할 수 있는 등 여러 장점들을 제공한다.

- [56] 본 발명에 사용된 발효효소는 리파아제(Lipase)인 것이 바람직하고, 상기 발효효소 조성물은 리파아제를 포함하는 조성물인 것이 바람직하며, 특히 리파아제를 생성할 수 있는 미생물을 선배양하고 얻게 되는 효소여액을 농축한 것이 바람직하다. 미생물에서 유래한 리파아제 발효농축액에 한정시키지 않고 식물이나 동물에서 유래한 리파아제도 본 발명의 제조에 포함될 수 있다.
- [57] 발효 동백오일의 제조방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [58] 본 발명에 사용된 발효 동백오일의 제조방법은 i) 동백오일에 발효 효소 또는 발효효소 조성물을 1:8에서 8:1의 중량비로 혼합하는 단계; ii) 상기 단계 i)의 혼합물을 믹서기에서 5 ~ 10분 동안 블렌딩한 후, 조음과 처리를 30 ~ 60분 동안하여 물리적으로 유화시키는 단계; iii) 상기 단계 ii)의 혼합물을 발효온도 섭씨 25 ~ 45도, pH 5.0 ~ 8.0 및 발효시간 48 ~ 120 시간 동안 300 ~ 400 rpm에서 믹싱하면서 발효시키는 단계; 및 iv) 상기 단계 iii)의 발효물을 원심분리하고 한외여과하여 발효오일을 발효농축액으로부터 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [59] 본 발명에 사용된 발효효소의 제조방법은 a) 미생물(리조푸스속 혹은 칸디다속 미생물을 포함함)을 특정 유도조건에서 배양하여 리파아제 효소가 고역가로 다량 첨가된 발효배양액을 얻는 단계; b) 배양액에서 얻어진 효소여액을 농축하고 투석하는 단계; c) 상기 미생물 발효 배양액과 식물성 오일을 첨가하고 최적조건(물리적 유화, 최적 pH, 최적 온도, 최적 믹싱 rpm과 발효시간)에서 발효하는 단계; 및 d) 발효가 끝난 오일을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [60] 상기 방법에 있어서, 단계 a)는 미생물을 호기 조건에서 1차 리파아제를 고역가로 최대한 많이 생산하도록 유도배양하는 단계이다.
- [61] 상기 방법에 있어서, 단계 b)는 1차 배양을 마친 배양액에서 균체를분리하고 효소를 농축 투석하는 단계이다.
- [62] 상기 방법에 있어서, 배양한 각각의 균주 배양액을 4°C, 10,000 rpm의 조건에서 원심분리하여 균체를 배양액으로부터 분리한 후, 상등액은 4°C에서 황산 암모늄(ammonium sulfate)을 처리하여 단백질을 침전시킨 다음, 효소가 함유된 단백질을 회수한 후, 농축된 효소를 pH 7.0인 완충용액(sodium phosphate buffer, 50 mM)에 녹이고 동일 완충용액에 투석하여 농축된 리파아제를 획득할 수 있다.
- [63] 상기 방법에 있어서, 단계 c)는 얻어진 리파아제 농축 용액과 식물성 오일을

첨가하여 발효하는 단계이다.

- [64] 여기서, 오일의 온도는 40°C가 적당하다. 또한 첨가하는 발효효소액의 pH는 pH 7.0이 바람직하다. 식물성 오일과 발효효소액의 혼합 비율은 발효효소액 50%중량 대비 식물성 오일 50% 중량비의 비율이 바람직하다. 식물성 오일과 발효효소액을 혼합할 때는 믹서기로 약 10분 정도 블렌딩하고 10-60분 정도 초음파 처리한 다음, 발효조에 넣고 발효시킨다. 혼합 회전수는 350rpm이 바람직하다. 발효하는 시간은 120시간이 바람직하다. 발효하는 온도는 40°C가 바람직하다. 이는 리파아제와 식물성 천연오일이 충분히 반응할 수 있도록 발효하여 유리된 필수지방산이 최대로 생산될 수 있도록 해야 하기 때문이다.

[65]

- [66] 또한, 본 발명은 동백오일 외에 올리브오일, 카놀라오일, 올리브오일, 유채씨오일, 모링가유 또는 해바라기씨유 중 하나 또는 둘 이상을 포함하는 식물성 오일을 발효하여 올레산 등의 유리된 필수 지방산을 풍부히 함유하고 있는 발효 천연오일을 제공한다.

- [67] 상기 필수 지방산은 유리된 올레산, 리놀레산 또는 감마리놀렌산 등을 다량 함유하고 있으며, 유리된 필수 지방산을 다량 함유한 발효 동백오일은 5-알파 환원효소를 억제하는 효과가 있는 것이 바람직하다.

- [68] 또한, 본 발명은 올리브오일, 카놀라오일, 올리브오일, 유채씨오일, 모링가유 또는 해바라기씨유 중 하나 또는 둘 이상을 발효효소 또는 발효효소 조성물을 처리하여 발효시키는 공정을 포함하는 올레산 등의 유리된 필수 지방산을 풍부히 함유하고 있는 발효 천연오일의 제조방법을 제공한다.

[69]

- [70] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 발효 동백오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 전립선 비대증 예방 및 개선용 건강기능식품, 화장품 조성물 또는 의약외품을 제공한다.

- [71] 이런 조성물은 발효 동백오일을 주성분으로 하고, 약학적, 식품학적 또는 화장품학적으로 허용가능한 담체, 예를 들면 비타민 등으로부터 이루어진 선택된 조합을 부가성분으로 포함할 수 있다.

- [72] 이런 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

- [73] 구체적으로 이런 조성물에는 동백오일에만 한정되지 않고 필수지방산 중 올레산 혹은 리놀레산을 다량 함유하고 있는 식물성 오일을 포함할 수 있다. 여기에는 올리브오일, 카놀라오일, 유채씨오일, 해바라기씨 오일, 피칸오일, 티트리오일 등이 포함될 수 있다. 이들을 발효하여 유리된 필수 불포화지방산을 다량 포함하게 하면 발효 동백오일과 유사한 효과를 가질 수 있다.

- [74] 이런 조성물은 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 제형화될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

- [75] 이런 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 조성물의 양을 기준으로 약 0.0001 내지 10 g/kg일 수 있으며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- [76] 본 발명에서 전립선 비대증을 치료, 개선 및 예방하기 위한 조성물이라 함은 5-알파 환원효소를 효과적으로 억제하여 5-알파 환원효소에 의해 과량으로 만들어지는 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone)에 의한 전립선 비대증을 개선 혹은 치료, 예방하는 것을 의미하며 그 임상적 효과는 전립선 비대증으로 인해 비대해진 전립선을 정상의 크기로 회복하는 것을 의미한다.
- [77]
- [78] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 발효 동백오일을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 탈모 예방 및 개선용 건강기능식품, 화장품 조성물 또는 의약외품을 제공한다.
- [79] 이런 조성물은 발효 동백오일을 주성분으로 하고, 약학적, 식품학적 또는 화장품학적으로 허용가능한 담체, 예를 들면 비타민 등으로부터 이루어진 선택된 조합을 부가성분으로 포함할 수 있다.
- [80] 구체적으로 이런 조성물에는 동백오일에만 한정되지 않고 필수지방산 중 올레산 혹은 리놀레산을 다량 함유하고 있는 식물성 오일을 포함할 수 있다. 여기에는 올리브오일, 카놀라오일, 유채씨오일, 해바라기씨 오일, 피칸오일, 티트리오일 등이 포함될 수 있다. 이들을 발효하여 유리된 필수 불포화지방산을 다량 포함하게 하면 발효 동백오일과 유사한 효과를 가질 수 있다.
- [81] 이런 조성물은 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 제형화될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [82] 이런 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 조성물의 양을 기준으로 약 0.0001 내지 10 g/kg일 수 있으며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- [83] 본 발명에서 탈모 치료, 개선 및 예방하기 위한 약학적 조성물이라 함은 5-알파 환원효소를 효과적으로 억제함으로써, 5-알파 환원효소에 의해 과량으로 만들어지는 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone)에 의해 발생하는 남성형 탈모를 개선, 치료 및 예방하는 것을 의미하며 조성물을 경구투여하거나 두피에 직접도포 시 탈모가 치료되는 것을 의미한다.
- [84] 특히, 본 발명은 발효한 동백오일을 화장품 조성물이나 도포용으로 사용함으로써 두피에 빠르게 흡수되어 더욱 효과적인 남성형 탈모 개선 효과를 가지는 것을 의미한다.
- [85]
- [86] 또한, 본 발명은 동백오일 외에 올리브오일, 카놀라오일, 올리브오일,

유채씨오일, 모링가유 또는 해바라기씨유 중 하나 이상을 포함하는 식물성 오일을 발효하여 올레산 등의 유리된 필수 지방산을 풍부히 함유하고 있는 발효 천연오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 전립선 비대증 예방 및 개선용 건강기능식품, 화장품 조성물 또는 의약외품을 제공한다.

[87] 또한, 본 발명은 동백오일 외에 올리브오일, 카놀라오일, 올리브오일, 유채씨오일, 모링가유 또는 해바라기씨유 중 하나 이상을 포함하는 식물성 오일을 발효하여 올레산 등의 유리된 필수 지방산을 풍부히 함유하고 있는 발효 천연오일을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 탈모 예방 및 개선용 건강기능식품, 화장품 조성물 또는 의약외품을 제공한다.

[88]

[89] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 상세히 설명하면 다음과 같으나, 본 발명의 범위가 아래의 실시예에 의해 한정된 것은 아니다.

[90]

[91] <실시예 1> 리파아제를 생성하는 미생물과 배지 조성 및 침전, 농축, 투석과정을 거친 고농축 발효효소액 제조

[92] 동백오일을 발효하기 위하여 리파아제를 생성하는 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 또는 다른 칸디다속 미생물 배양의 배지는 2% 올리브 오일(olive oil), 0.3% 효모 추출물, 0.3% 맥아 추출물(Malt extract), 0.5% 펩톤(peptone), 1% 덱스트로스(dextrose)의 조성을 사용하였고, pH 7.0, 섭씨 30도에서 배양하였으며, 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*) 또는 다른 리조푸스속 미생물 배양의 배지는 2% 올리브 오일, 4% 감자전분, 1% 덱스트로스의 조성을 사용하였고, pH 6.0, 섭씨 30도에서 배양하여 리파아제가 다량 생산분비된 고역가 발효농축액 제조에 사용하였다. 미생물의 배양 시간은 칸디다 균주인 경우 70-90시간 배양하였고, 리조푸스 균주인 경우에는 100-120시간 동안 배양하였다. 미생물 배양이 종료되면 8,000 rpm으로 원심분리하여 미생물 균체를 가라앉히고 상등액만 회수한 다음 여기에 60-80% 황산암모늄을 섭씨 4도에서 서서히 첨가하면서 저어주어 배양액 속 단백질을 침전시켰다. 침전된 효소 단백질을 섭씨 4도에서 12,000 rpm으로 원심분리하여 가라앉히고 상등액을 제거한 다음, 여기에 50 mM 인산염 완충용액(sodium phosphate buffer)(pH 7.0)을 넣어 녹였다. 이렇게 농축된 효소 단백질은 동일 완충용액으로 섭씨 4도에서 2-4회 반복 투석하여 분자량이 적은 물질들을 제거하였다. 이렇게 하여 획득한 고역가의 농축 발효효소액의 리파아제 역가를 측정하기 위해 비누화 반응을 통한 발색법을 사용하였다. 구리 아세테이트-피리딘 시약의 제조는 5%(w/v) cupric acetate(Sigma)가 되게 만들고 피리딘(Merck)을 사용하여 pH를 6.1로 맞추어 제조하였다. 기질은 1% 폴리비닐알코올(polyvinylalcohol)에 10% 올리브 오일을 포함하도록 만들고 기질 2.5ml과상기 농축발효효소액 1 ml을 섭씨 37도에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 5 ml 아세톤(acetone)으로 반응을

종료시켰다. 생성된 유리된 지방산은 2.5 ml 이소옥탄(isooctane)을 넣어 녹이고 구리-아세테이트-피리딘 1ml을 넣고 구리화 반응을 시켜 발색시켰다. 이때 발색된 정도는 715nm에서 흡광도를 측정하였다. 리파아제의 지방분해 활성은 unit 단위로 표시하며 1 unit은 생성된 지방산의 1 μmol 로 정의하였다.

[93] 표 1

[Table 1]

	균체 무게 (g/100 ml)	리파아제 활성 (U/ml)
칸디다 루고사(<i>Candida rugosa</i>)	2.7	4.8
리조푸스 오리제(<i>Rhizopus oryzae</i>)	2.9	3.2

[94] <실시예 2> 고농축 발효효소액을 이용한 동백 오일의 발효

[95] 효소가 반응하는 최적의 온도 조건을 잡기 위해 동백오일의 온도를 37°C로 설정한 후, 미생물 배양에 의해 생산되고 고농축된 발효효소액을 pH 7.0의 인산염 완충용액(Sodium phosphate buffer, 50 mM)에 투석한 후 서로 섞어 사용하였다. 즉, 고농축 발효효소액(리파아제 포함) 50% 중량 대비 오일 50% 중량비의 비율로 혼합한 후, 믹서기에서 10분간 블렌딩한 다음 다시 30분 동안 초음파 처리하여 물리적 유화과정을 마친 후, 회전수 350 rpm, 37°C에서 72시간 동안 발효하였다. 발효를 마친 오일은 10,000 rpm으로 20분간 원심분리 후 발효효소액과 효소 잔여물을 분리하고 한외여과하여 발효된 천연오일만을 수득하였다.

[96]

[97] <비교예 1> 발효한 올리브오일

[98] 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 발효한 올리브오일을 수득하였다.

[99] <비교예 2> 발효한 카놀라오일

[100] 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 발효한 카놀라오일을 수득하였다.

[101] <비교예 3> 발효하지 않은 동백오일

[102] <비교예 4> 발효하지 않은 올리브오일

[103] <비교예 5> 발효하지 않은 카놀라오일

[104]

[105] <실험예 1> 발효한 동백 오일의 유리된 필수지방산 생산 수율 측정

[106] HPLC를 이용하여 필수지방산 함량을 측정하였다. 이때 각각의 필수지방산의 함량을 정량할 때는 각 지방산에 대한 표준시약을 구하여 HPLC로 표준곡선을 먼저 구하고 발효한 동백오일을 분석한 후 이 표준곡선과 비교하여 정량하였다. 사용한 HPLC 컬럼은 (C18, 250 x 4.6 mm ID)를 사용하였고 이동상(mobile phase)으로는 0.005% TFA in acetonitrile:0.005% TFA in water를 부피비로 8:2로 섞어 사용하였으며 유속은 1.0 ml/min, 시료주입량은 0.01 ml을 사용하였으며 UV 210 nm의 파장에서 측정하였다. 이동상의 기율기 조건으로는 20:80 (v/v)로

시작하여 30분간 유지시켜주다가 이후 극성을 높여가며 지방산들을 분석하였다.

- [107] 하기 표 3에 표시한 것은 본 발명을 위해 사용한 동백오일(통영, 한국), 카놀라오일(퀘벡, 캐나다), 올리브유(그리스산)의 성적서에 기재된 지방산의 함량을 나타낸 것이다. 이들 지방산은 99% 이상 글리세롤 골격분자에 에스테르 결합되어 있으며 유리된 지방산의 전체함량은 1% 미만이었다.

- [108] 표 2

[Table 2]

본 발명에 사용하기 위해 구입한 천연오일의 총지방산 함량

	올레산	리놀레산	리놀렌산	팔미트산	스테아린산
동백오일(통영)	85-87%	4.5%	0.3%	8.5%	1.1%
올리브유 (Henry Lamotte 사)	72-75%	5.0-6.0%	0.6%	3.7%	11.5%
카놀라유 (캐나다산)	63.4-66.0%	17.0-21.2%	8.7-9.2%	4.2-4.5%	1.6%

- [109] 표 3

[Table 3]

동백오일, 올리브유, 카놀라유의 발효 전과 발효 후 지방산 함량

발효	함량 (%)		
	올레산(Oleic acid) (OA)	리놀레산(Linoleic acid) (LA)	감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid) (GLA)
실시예2(발효 동백오일)	38.76	2.06	0.10
비교예1(발효 올리브 오일)	25.35	1.02	0.02
비교예2(발효 카놀라 오일)	19.25	0.95	0.05
비교예3(발효전 동백오일)	Not detected	Not detected	Not detected
비교예4(발효전 올리브 오일)	Not detected	Not detected	Not detected
비교예5(발효전 카놀라 오일)	Not detected	Not detected	Not detected

[110] 상기 된 표 3에서 알 수 있듯이 발효하지 않은 오일에서는 유리된 필수지방산이 거의 측정되지 않았고 발효한 식물성 오일에서만 유리된 필수지방산들을 검출할 수 있었으며, 이들 중 발효 동백오일에서 유리된 필수지방산의 함량이 가장 높은 것을 알 수 있다. 또한 필수지방산 중에서도 유리된 올레산이 가장 많음을 확인할 수 있다.

[111]

[112] <실험예 2> 생체내(*in vivo*) 실험을 통한 동백 발효오일의 전립선 무게 변화 측정

[113] 실험에 사용할 동물은 260~300g의 7주령 수컷 Sprague Dawley계 흰쥐(샘타코, 오산, Korea)를 이용하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 1주일 간의 적응기간을 두었으며 이들 랫트들은 섭씨 18-22도, 습도 약 40-50%, 그리고 12시간의 암조건과 12시간의 명조건에서 키우면서 실험하였다. 비교군으로는 전립선 비대증에 대하여 치료효과를 나타내는 피나스테라이드를 사용하였다. 랫트 자신의 내부 테스토스테론의 영향을 배제하기 위해 정상군을 제외하고 수컷 SD계 흰쥐를 에테르로 마취 후 복부 정중 절개를 통하여 복강내부를 확인하고 복강 내로 고환을 위치시킨 다음 3-0 silk suture 실을 이용하여 측부 복벽에 고환을 고정시켰다. 1주일간 안정을 취하게 한 후, 각 개체의 군은

정상군, 호르몬 자극에 의한 전립선 비대 유도군(대조군), 호르몬 자극에 의한 전립선 비대 유도 후 본 발명에 따른 조성물(발효 동백오일)을 투여한 실험군 1, 호르몬 자극에 의한 전립선 비대 유도 후 피나스테라이드를 투여한 비교군, 및 조성물의 기타 효과 및 독성여부를 확인하기 위한 본 발명의 조성물(발효 동백오일)을 투여한 실험군 2로 각각 분류하였다. 각 그룹은 몸무게 기준으로 각 그룹당 몸무게가 거의 동일하게 6마리씩 배정하였으며 전립선 비대를 유도하기 위해 프로피온산 테스테스테론(testosterone)(TP)은 3주간 5 mg/kg/일 씩 피하주사하고 본 발명의 조성물의 효과를 보기 위해 발효 동백오일을 100 mg/kg/일 또는 400 mg/kg/일의 양으로 실험군에 경구투여하였고 비교군에서는 피나스테라이드를 2 mg/kg/일을 3주간 경구 투여하였다.

[114] 표 4

[Table 4]

실험군	시료 및 일일투여량 (21일)	
정상		Vehicle
대조군	TP (5 mg/kg/일)	Vehicle
실험군 1		실시예2 발효동백 (100 mg/kg/일)
		실시예2 발효동백 (400 mg/kg/일)
비교군		피나스테라이드 (2 mg/kg/일)
실험군 2		실시예2 발효동백 (100 mg/kg/일)
		실시예2 발효동백 (400 mg/kg/일)

[115] 상기 표 4에 나타난 대로 경구투여를 3주간 실시한 후 쥐를 희생하여 결과를 확인하였다. 결과는 하기 표 5과 도 1에 나타내었다.

[116] 표 5

[Table 5]

실험군	전립선 무게 (g/kg)
정상	0.534 ± 0.075
대조군	0.890 ± 0.053
실험군 1	0.685 ± 0.081
	0.595 ± 0.045
비교군	0.572 ± 0.039
실험군 2	0.525 ± 0.031
	0.553 ± 0.047

[117] 실험한 결과 도 1에 나타난 것과 같이, 대조군은 정상군의 전립선 무게보다

대조군의 무게가 약 60% 정도 증가하였으며 <실시예 2>를 투여한 실험군 1, 2는 각각 23.1%, 33.2%의 비대증 억제효과를 나타내었다. 또한 전립선 비대를 유도하지 않은 실험군 2는 정상군과 비슷한 수준으로 나타나 발효 동백오일은 건강한 전립선에 어떠한 부작용이나 전립선 발달을 억제하지는 않는 것으로 보인다.

[118]

[119] <실험예 3> 발효 동백 오일의 5-알파 환원효소의 억제효과 측정

[120] 5-알파 환원효소 억제 효과는 Hirosumi의 방법대로 실시하였다. 마이크로 튜브에 40 mM potassium phosphate, 0.2 mM NADPH의 완충용액에 효소와 상기 <실시예 2>에서 제조된 발효 동백오일 시료 및 1 mM DTT, 120 nCi[1.2.6.7-3H]T를 혼합하여 최종 용량을 500 μ l로 맞추고 잘 혼합한 후, 37°C에서 60분간 반응시켰다. 그 뒤 1 ml의 에틸아세테이트를 넣어 반응을 종료시킨 후에 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 상층액을 얻었다. 상층액은 60°C에서 완전히 건조시키고 50 μ l 에틸아세테이트를 넣어 녹인 후 TLC에서 전개하였다. TLC의 분리조건에 사용한 용매는 50% 사이클로 헥산, 50% 에틸아세테이트로 하였다. TLC 상에 나타나는 생성물인 테스토스테론은 254 nm에서 UV 조사기로 확인하고 10% 황산을 뿌려 디하이드로테스토스테론을 확인하였다. 정량적인 분석을 위해 테스토스테론과 디하이드로테스토스테론 부위를 오려 낸 후 10 ml의 Ultima GoldTM cocktail(PerkinElmer, Massachusetts, USA)을 넣어 Liquid scintillation analyzer(Packard Bioscience, Meriden, USA)로 측정하였다. 5-알파 환원효소에 의한 테스토스테론의 전환율은 다음 식으로 계산하였다.

[121] 5-알파 전환효소 억제활성(%)

[122]
$$= \{1 - (\text{디하이드로테스토스테론} / \text{테스토스테론} + \text{디하이드로테스토스테론})\} \times 100$$

[123] 실험한 결과 도 2에 나타난 것과 같이, 발효 동백오일이 5-알파 환원효소를 억제하는지를 보는 본 실험에서 양성대조군으로 사용한 finasteride는 0.5 ppm의 농도에서 약 98% 억제할 수 있었다. Finasteride의 논문에 보고된 IC₅₀값은 69 nM (type II 5-alpha reductase), 360 nM (type I 5-alpha reductase)이다. 분자량이 372.5 dalton임을 감안하면 0.03-0.13 ppm 농도에서 IC₅₀값을 가진다. 반면 발효 동백오일의 IC₅₀ 값은 발효전 동백오일의 음성대조군(control)의 값을 고려하면 약 80 ppm이다.

[124]

[125] <실험예 4> 모낭세포의 성장 촉진 효과 측정

[126] 모유두세포는 모공보다 아래 있는 모낭의 아래부분에서 발모명령을 내리는 세포이다. 따라서 발효 동백 오일에 의해 모유두 세포의 성장이 촉진되는지 실험하였다.

[127] 실험에 사용하는 세포주로 인간 모유두세포(Human Dermal papilla cell)를 이용하였다. 세포배양은 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5%

CO₂에서 배양하였다. 세포를 96 well의 각 well 당 1×10^5 cells/mL로 분주한 다음 24시간 배양하였다. 24시간 후 이전 배양에 사용된 배지를 제거하고 시료를 DMSO에 녹인 뒤 DMSO의 최종농도가 1%가 되도록 배지로 희석하여 발효 오일의 농도별($\mu\text{g/mL}$)로 각각 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 각각 처리하였다. 양성대조군으로는 finasteride를 0.5 ppm으로 처리하였다. 처리 후 각 well 당 0.2% MTT용액을 20 μL 씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 상등액을 모두 제거하고 DMSO 150 μL 씩을 첨가하고 10분간 상온에서 생성된 포르마잔(formazan)을 모두 녹이고 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. DMSO에 대한 영향을 알아보기 위해 일반 대조군과 1% DMSO에 대한 대조군으로 나누어 실험하며, 세포 성장율(%)은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었다.

[128] 세포 성장율(%)=(샘플처리군의 흡광도/대조군의 흡광도) $\times$ 100

[129] 실험한 결과 도 3에 나타난 것 같이, 발효 동백오일의 400 ppm에서 모유두 세포의 성장 증식 효과가 우수하였으며 대조군에 비하여 $120 \pm 4.5\%$ 정도 모유두 세포가 더 성장하였다. 발효 동백오일 400 ppm은 양성 대조군으로 사용한 0.5 ppm finasteride의 $104.5 \pm 3.3\%$ 보다 더 증가 효과가 높게 나타났다.

[130]

[131] <실험예 5> 세포 안전성 측정

[132] 본 발명의 발효 동백오일의 마우스 유래 대식세포주인 Raw264.7 세포에 대한 독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다.

[133] 대식세포에 대한 독성 측정은 MTT [(3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(Sigma, MO, 미국)] 측정으로 분석하였다. Raw264.7 세포를 96 well의 각 well 당 1×10^4 cells/mL로 분주한 다음, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 이전 배양에 사용된 배지를 제거하고 시료를 DMSO에 녹인 뒤 DMSO의 최종농도가 1%가 되도록 배지로 희석하여 발효 오일의 농도별($\mu\text{g/mL}$)로 각각 37°C, 5% CO₂에서 5시간과 24시간 동안 각각 처리하였다. 처리 후 각 well 당 0.2% MTT용액을 20 μL 씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 상등액을 모두 제거하고 DMSO 150 μL 씩을 첨가하고 10분간 상온에서 생성된 포르마잔(formazan)을 모두 녹이고 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. DMSO에 대한 영향을 알아보기 위해 일반 대조군과 1% DMSO에 대한 대조군으로 나누어 실험하며, 세포 생존율(%)은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었다.

[134] 세포 생존율(%)=(샘플처리군의 흡광도/대조군의 흡광도) $\times$ 100

[135] 실험한 결과 도 4에서 보는 바와 같이, 본 발명에 의하여 제조된 발효 동백오일에 대한 세포독성은 1000 ppm이라는 고농도에서도 독성이 없음을 알 수 있다.

[136]

[137] <실험예 6> 단회 독성 측정

- [138] 실험동물은 6주령 Sprague Dawley(SD) 계통의 rat(샘타코, 한국)로, 시험군은 암컷과 수컷 각 5마리씩 대조군과 실험군으로 정하였다. 이 동물들은 인수 시 및 적응기간 동안 일반증상의 이상이 관찰되지 않았다. 사육조건은 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $45 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(오전 6시 ~ 오후 6시)으로 설정한 뒤 수행하고, 실험동물용 고형사료(샘타코, 한국)와 정수시스템을 이용한 물(Tap water)을 자유섭취 하도록 하였다. 발효 동백 오일의 단 회 독성시험에서 실험군은 발효 동백 오일을 증류수에 용해하여 투여하고, 대조군은 증류수를 투여하였으며, rat는 시료 투여 12시간 전에 절식시키고 통상 건강기능성 식품의 단회 독성 경구 투여 농도로 사용되는 농도인 2 g/kg 으로 1회 경구투여 한 후 14일 동안 관찰하였다. 임상증상 관찰은 식품의약품안전청의 독성시험기준 및 OECD test guideline 420(TG 420)에 따라서 실시하였다. 즉, 모든 실험동물은 투여 당일 날에 투여 후 6시간 동안 매 시간마다 관찰하였으며, 다음날부터 14일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상의 발현 및 사망유무를 관찰하였다. 또한 시험물질 투여 당일과 14일째의 체중변화를 측정하였다. 시험 종료 후 실험동물을 마취하고 치사시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.
- [139] 실험한 결과 도 5 내지 도 7에서 보는 바와 같이, 시료를 투여에 따른 수컷과 암컷에서 사망한 개체는 없었고 당일 4회 관찰 및 다음날부터 14일간 매일 1회 육안 관찰을 한 결과, 대조군에 비해서 동백발효오일 투여군에서 특이적인 행동 변화가 없었다. 또한, 도 5 내지 도 7에서 알 수 있듯이 시료 투여 14일 후 체중 변화측정과 부검 후 장기 무게의 변화도 대조군에 비교하여 유의한 변화가 없었다. 따라서 발효 동백 오일은 동물 단회 독성이 없음을 알 수 있다.
- [140]
- [141] <실험예 6> 간이임상 시험
- [142] 본 발명의 발효 동백오일을 이용하여 탈모증이 있는 남성 대상자를 선정하여 간이임상 시험을 실시하였다.
- [143] 피험자는 33세에서 55세까지의 경증의 탈모증(대략 하루 평균 빠지는 모발 수가 50개 이상으로 본인 스스로 탈모가 진행되고 있음을 자각함)이 있는 성인 남성 12명을 대상으로 하여 6명씩 한 그룹으로 설정하여 한 그룹은 발효 동백오일을 1일 1회(취침전)에 5 ml씩 머리에 도포하고 다음날 머리를 감는 식으로 진행하였으며, 다른 그룹은 placebo그룹으로 발효 전 동백오일을 1일 1회, 5 ml씩 동일 기간(4주) 동안 머리에 도포하고 그 결과를 관찰하였다. 효과의 판정은 머리를 감은 후 평균 탈모 모발 수, 육안평가, 피험자의 개인 소견을 평가척도로 선정하고 5단계로 평가하였으며, 점수는 5점을 만점으로 하여 1점 단위로 판정점수를 매기도록 하였다. 더 자세히는 다음 표 6에 나타난 것과 같다. 종합적인 시험 결과는 각 판정 점수의 평균으로 나타내었다.
- [144] 표 6

[Table 6]

본 발명의 임상시험 평가 지표

판정 점수	육안평가	개인소견	탈모수
1	악화	악화	증가
2	변화 없음	변화 없음	변화 없음
3	약간 개선	약간 개선	약간 감소
4	보통 개선	보통 개선	보통 감소
5	많이 개선	많이 개선	많이 감소

[145] 표 7

[Table 7]

본 발명의 임상시험 결과

판정 점수	실시예 2(발효 동백오일)	비교예 3(발효 전 동백오일)	비교
육안평가	3.4	2.7	21%
개인소견	4.1	3.2	28%
탈모수	3.9	2.5	36%
종합 개선	3.8	2.8	27%

[146] 본 발명의 간이 임상 시험 결과는 상기 표 7에서 보는 바와 같이 발효하지 않은 동백오일인 <비교예 3>에 비하여 육안평가, 개인소견, 탈모수에서 21 ~ 36%의 개선효과가 있었으며 종합적으로 27%의 개선효과가 있음을 알 수 있었다.

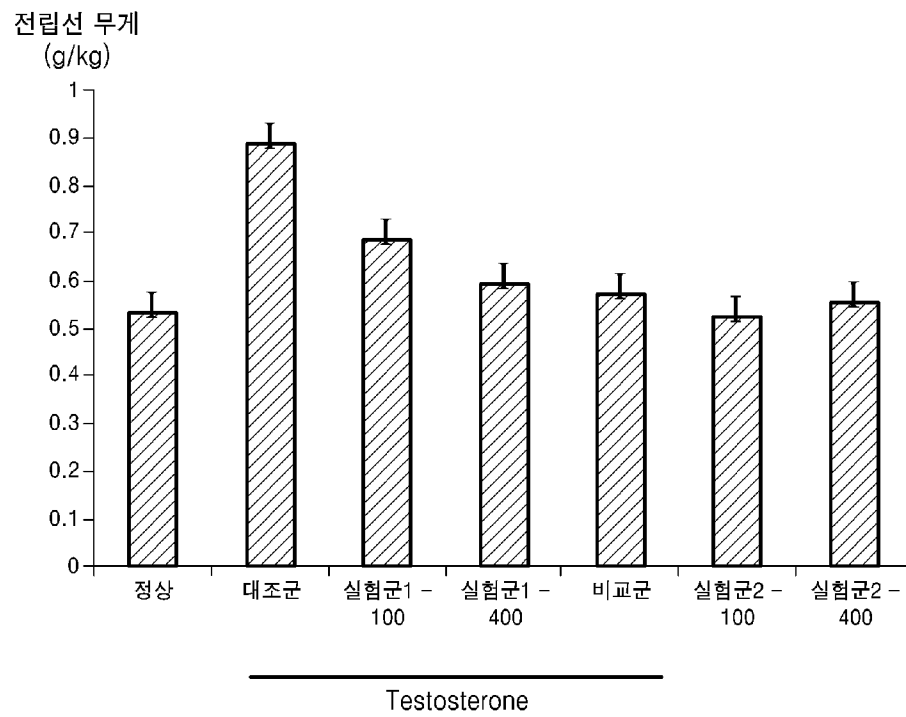
[147]

청구범위

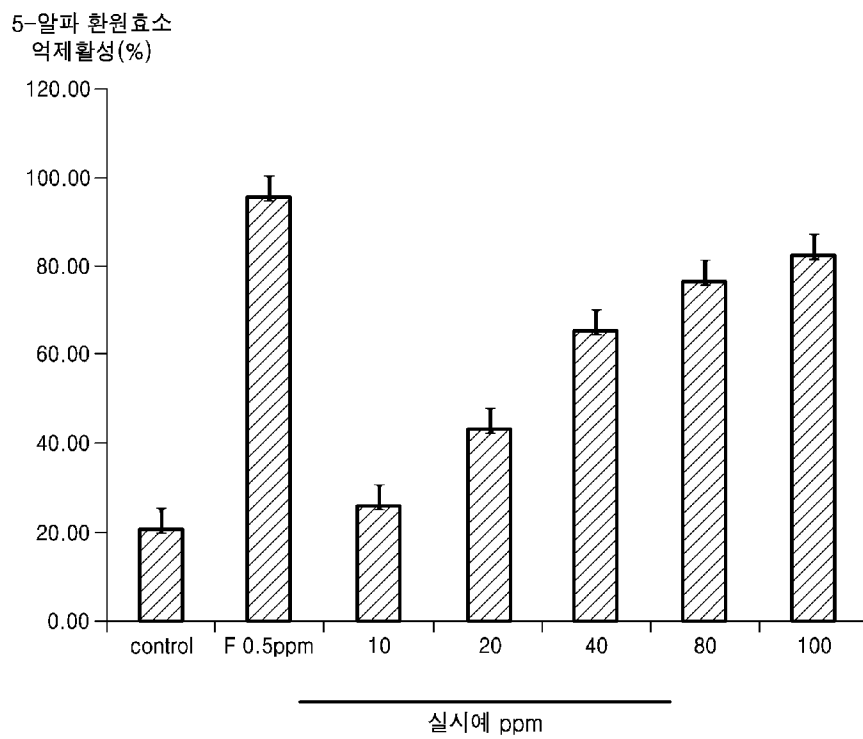
- [청구항 1] 동백오일에 발효효소 또는 발효효소 조성물을 처리하여 발효시킨 발효 동백오일.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 발효 동백오일은 유리 필수불포화지방산인 올레산(Oleic Acid, OA), 리놀레산(Linoleic acid, LA) 또는 감마-리놀렌산(gamma-Linolenic acid, GLA)을 고함량으로 포함하는 것을 특징으로 하는 발효 동백오일.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 발효효소는 리조푸스속 또는 칸디다속 미생물 유래 리파아제(lipase), 또는 식물 및 동물에서 추출, 황산암모늄처리 및 투석 과정을 거쳐 농축된 천연식물 발효용 발효효소농축액인 것을 특징으로 하는 발효 동백오일.
- [청구항 4] 올리브오일, 카놀라오일, 올리브오일, 유채씨오일, 모링가유 또는 해바라기씨유 중 하나 또는 둘 이상의 식물성 오일을 발효효소 또는 발효효소 조성물을 처리하여 발효시킨 발효 천연오일.
- [청구항 5] i) 동백오일에 발효 효소 또는 발효효소 조성물을 1:8에서 8:1의 중량비로 혼합하는 단계;
 ii) 상기 단계 i)의 혼합물을 믹서기에서 5 ~ 10분 동안 블렌딩한 후, 초음파 처리를 30 ~ 60분 동안하여 물리적으로 유화시키는 단계;
 iii) 상기 단계 ii)의 혼합물을 발효온도 섭씨 25 ~ 45도, pH 5.0 ~ 8.0 및 발효시간 48 ~ 120 시간 동안 300 ~ 400 rpm에서 믹싱하면서 발효시키는 단계; 및
 iv) 상기 단계 iii)의 발효물을 원심분리하고 한외여과하여 발효오일을 발효농축액으로부터 분리하는 단계를 포함하는, 발효 동백오일의 제조방법.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 단계 i)에서 사용한 발효효소 또는 발효효소 조성물은
 a) 리파아제 생산 미생물을 유도배지에서 배양하는 단계; 및
 b) 상기 배양액에서 발효가 종료된 미생물 균체를 원심분리와 여과를 통해 제거한 후, 배양액 내의 단백질을 황산암모늄으로 침전시켜 농축하는 단계; 및
 c) 상기 침전 및 농축된 단백질을 완충용액(50 mM, sodium phosphate buffer, pH 7.0)으로 투석한 후 효소발효액을 회수하는 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 발효 동백오일의 제조방법.
- [청구항 7] 제 5항에 있어서, 상기 단계 1)의 발효효소는 리조푸스 오리제(Rhizopus oryzae)를 포함한 리조푸스속 균주 또는 칸디다 루고사(Candida rugosa)를 포함한 칸디다속 균주로부터 분리한

- 리파아제, 또는 식물류와 동물체장에서 추출 농축한 리파아제 효소인 것을 특징으로 하는 발효 동백오일의 제조방법.
- [청구항 8] 제 1항의 발효 동백오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 또는 탈모 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 1항의 발효 동백오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 또는 탈모 예방 및 개선용 건강기능식품.
- [청구항 10] 제 1항의 발효 동백오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 또는 탈모 예방 및 개선용 화장료 조성물.
- [청구항 11] 제 1항의 발효 동백오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 또는 탈모 예방 및 개선용 의약품.
- [청구항 12] 제 4항의 발효 천연오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 또는 탈모 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제 4항의 발효 천연오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 또는 탈모 예방 및 개선용 건강기능식품.
- [청구항 14] 제 4항의 발효 천연오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 또는 탈모 예방 및 개선용 화장료 조성물.
- [청구항 15] 제 4항의 발효 천연오일을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 또는 탈모 예방 및 개선용 의약품.

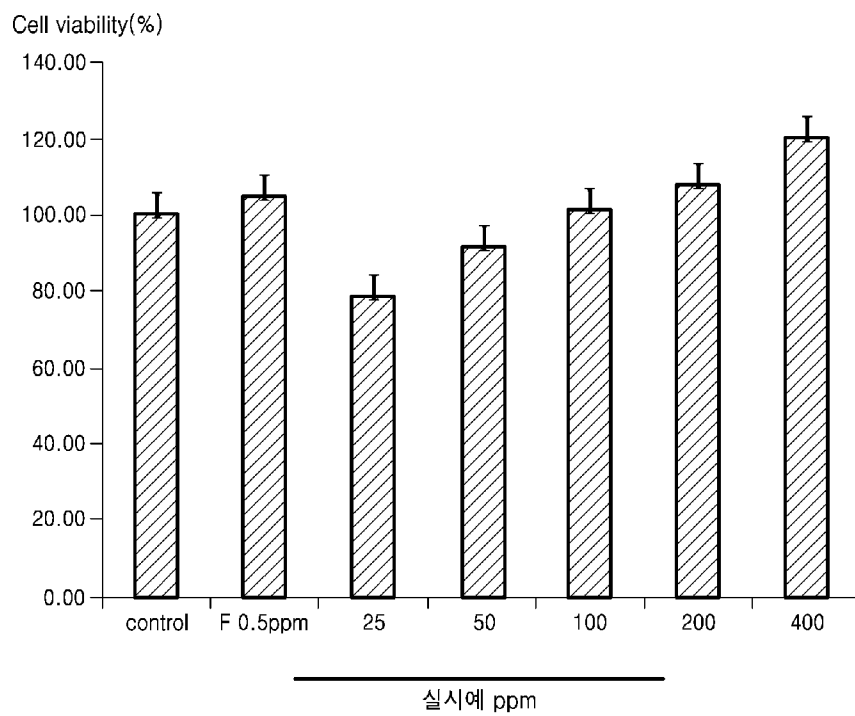
[Fig. 1]



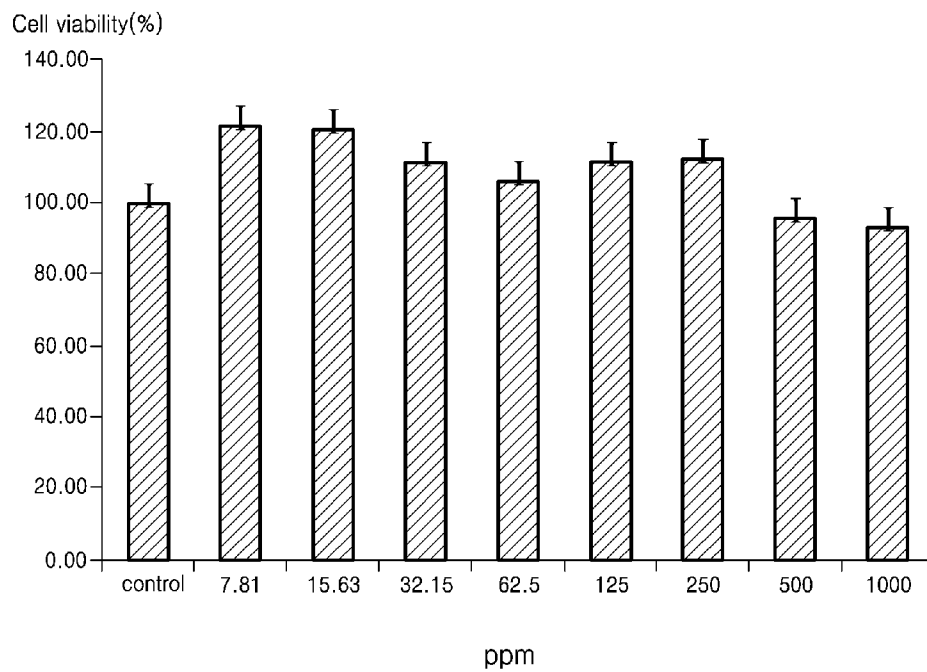
[Fig. 2]



[Fig. 3]

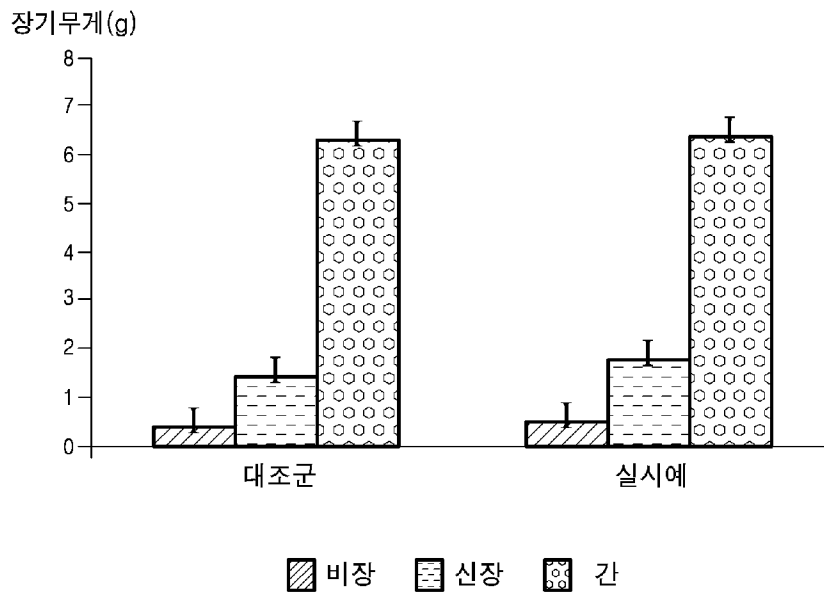


[Fig. 4]



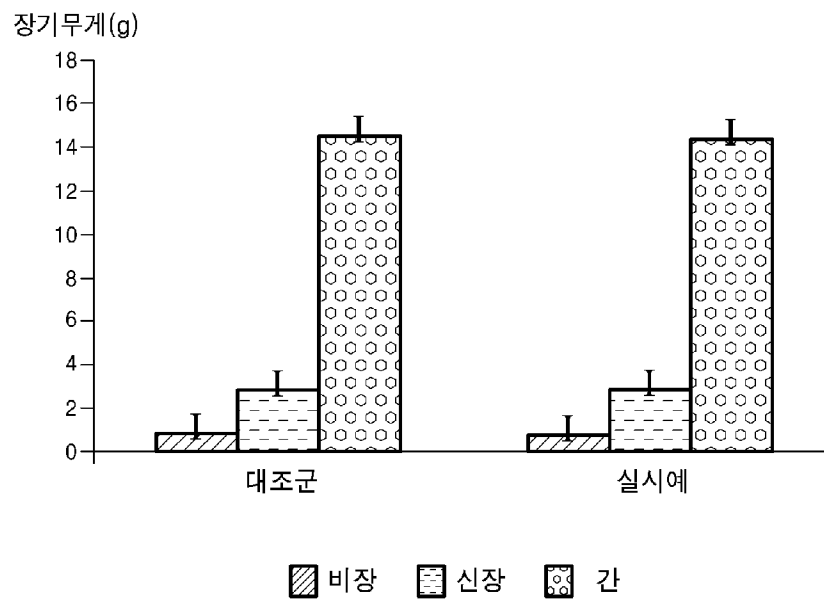
[Fig. 5]

동물 단회독성검사(장기무게-암컷)

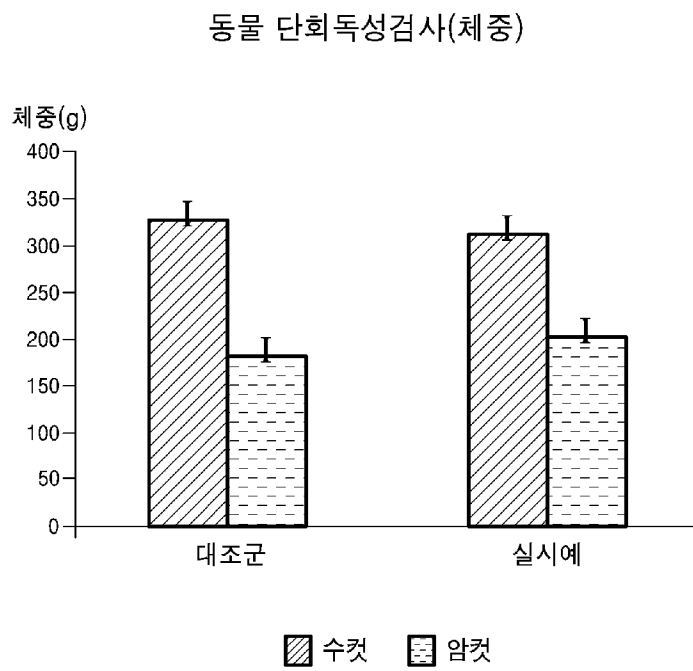


[Fig. 6]

동물 단회독성검사(장기무게-수컷)



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/001925**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12P 7/64(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P 7/64; A61K 36/18; C10L 1/02; A61K 8/99; C11C 1/06; A61K 8/92; A61K 8/97; A61Q 19/02; A23L 1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Camellia japonica seed oil, enzyme, fermentation, hair loss prevention, benign prostatic hyperplasia prevention, olive oil, canola oil**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009-521920 A (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA, GOLDEN HOPE RESEARCH SENDIRIAN BERHAD) 11 June 2009 See abstract and Detailed Description of the Invention	1,3,4,5
Y		2,6-15
Y	JP 2011-105695 A (BHN KK.) 02 June 2011 See abstract and the claims	2
Y	KR 10-0673837 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 24 January 2007 See abstract and the claims	6-7
Y	KR 10-1238706 B1 (NATURALSOLUTION CO., LTD. et al.) 04 March 2013 See abstract and Detailed Description of the Invention	8-15
A	KR 10-2013-0023162 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY et al.) 07 March 2013 See abstract and the claims	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 JUNE 2015 (29.06.2015)

Date of mailing of the international search report

29 JUNE 2015 (29.06.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/001925

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2009-521920 A	11/06/2009	AT 443773 T	15/10/2009
		AT 497012 T	15/02/2011
		DE 602006009367 D1	05/11/2009
		DE 602006019912 D1	10/03/2011
		EP 1803819 A2	04/07/2007
		EP 1803819 A3	11/07/2007
		EP 1803819 B1	23/09/2009
		EP 1966387 A1	10/09/2008
		EP 1966387 A4	11/11/2009
		EP 1966387 B1	26/01/2011
		ES 2333461 T3	22/02/2010
		ES 2357690 T3	28/04/2011
		HK 1124366 A1	03/02/2012
		JP 2007-175049 A	12/07/2007
		JP 2009-521920 T	11/06/2009
		MY 142033 A	16/08/2010
		US 2007-0148745 A1	28/06/2007
		US 2008-0312342 A1	18/12/2008
		US 7943335 B2	17/05/2011
		WO 2007-075079 A1	05/07/2007
		WO 2007-075079 A8	03/04/2008
JP 2011-105695 A	02/06/2011	JP 5617110 B2	05/11/2014
KR 10-0673837 B1	24/01/2007	NONE	
KR 10-1238706 B1	04/03/2013	NONE	
KR 10-2013-0023162 A	07/03/2013	EP 2749651 A2	02/07/2014
		JP 2014-525245 A	29/09/2014
		KR 1485315 B1	16/01/2015
		US 2014-0194513 A1	10/07/2014
		WO 2013-032189 A2	07/03/2013
		WO 2013-032189 A3	13/06/2013
		WO 2013-032189 A9	07/03/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 7/64(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12P 7/64; A61K 36/18; C10L 1/02; A61K 8/99; C11C 1/06; A61K 8/92; A61K 8/97; A61Q 19/02; A23L 1/30

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 동백오일, 효소, 발효, 탈모예방, 전립선 비대증 예방, 올리브오일, 카놀라오일

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2009-521920 A (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA, GOLDEN HOPE RESEARCH SENDIRIAN B ERHAD) 2009.06.11 요약 및 발명의 상세한 설명 참조	1,3,4,5
Y		2,6-15
Y	JP 2011-105695 A (BHN KK) 2011.06.02 요약 및 청구항 참조	2
Y	KR 10-0673837 B1 (고려대학교 산학협력단) 2007.01.24 요약 및 청구항 참조	6-7
Y	KR 10-1238706 B1 (주식회사 내추럴솔루션 외 1명) 2013.03.04 요약 및 발명의 상세한 설명 참조	8-15
A	KR 10-2013-0023162 A (한국생명공학연구원 외 1명) 2013.03.07 요약 및 청구항 참조	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 06월 29일 (29.06.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 06월 29일 (29.06.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



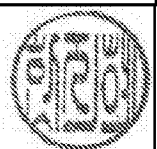
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

한지혜

전화번호 +82-42-481-3335



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2009-521920 A	2009/06/11	AT 443773 T AT 497012 T DE 602006009367 D1 DE 602006019912 D1 EP 1803819 A2 EP 1803819 A3 EP 1803819 B1 EP 1966387 A1 EP 1966387 A4 EP 1966387 B1 ES 2333461 T3 ES 2357690 T3 HK 1124366 A1 JP 2007-175049 A JP 2009-521920 T MY 142033 A US 2007-0148745 A1 US 2008-0312342 A1 US 7943335 B2 WO 2007-075079 A1 WO 2007-075079 A8	2009/10/15 2011/02/15 2009/11/05 2011/03/10 2007/07/04 2007/07/11 2009/09/23 2008/09/10 2009/11/11 2011/01/26 2010/02/22 2011/04/28 2012/02/03 2007/07/12 2009/06/11 2010/08/16 2007/06/28 2008/12/18 2011/05/17 2007/07/05 2008/04/03
JP 2011-105695 A	2011/06/02	JP 5617110 B2	2014/11/05
KR 10-0673837 B1	2007/01/24	없음	
KR 10-1238706 B1	2013/03/04	없음	
KR 10-2013-0023162 A	2013/03/07	EP 2749651 A2 JP 2014-525245 A KR 1485315 B1 US 2014-0194513 A1 WO 2013-032189 A2 WO 2013-032189 A3 WO 2013-032189 A9	2014/07/02 2014/09/29 2015/01/16 2014/07/10 2013/03/07 2013/06/13 2013/03/07