



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0036676
(43) 공개일자 2020년04월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/92 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/922 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0126608
(22) 출원일자 2018년10월23일
심사청구일자 2018년10월23일
(30) 우선권주장
1020180116539 2018년09월28일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
주식회사 벤스랩
경기도 화성시 봉담읍 와우안길 17, 첨단과학기술
연구원 내 115호 (수원대학교)
(72) 발명자
정종문
경기도 용인시 수지구 성북2로 184, 207동 804호
(성북동, 성동마을 수지자이2차)
이승숙
경기도 용인시 수지구 성북2로 184 207동 804호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
성낙훈

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 감마-리놀렌산 함량이 높은 식물성 오일을 효소처리하여 티로시나제를 분해하는 유리 지방산을 만들어냄으로써 멜라닌 생성 억제 효능을 극대화시켜 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장품 조성물에 관한 것으로서, 식물성 오일을 리파아제 효소로 효소처리시켜 유리감마-리놀렌산을 포함함을 특징으로 한다.

대표도 - 도1a

1,3-BG : 오일	효소처리 전					효소처리 후				
	9:1	7:3	5:5	3:7	1:9	9:1	7:3	5:5	3:7	1:9
동백 오일										
로즈힙 오일										
보라지 오일										

(52) CPC특허분류

A61K 2800/85 (2013.01)

(72) 발명자

박수영

경기도 수원시 권선구 서수원로 589 304동 302호

오현근

경기도 수원시 팔달구 일월로42번길 8-29 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2687182

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 2018년도 기술전문기업 협력기술개발사업

연구과제명 멜라닌합성효소(티로시나제)의 분해를 통한 미백 고기능성 발효식물오일 화장품 소재의 개

발

기 여 율 1/1

주관기관 주식회사 벤스랩

연구기간 2018.11.01 ~ 2019.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

식물성 오일을 리파아제 효소로 효소처리시켜 유리감마-리놀렌산을 포함함을 특징으로 하는 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 식물성 오일을 효소처리시키는데 사용되는 리파아제 효소가 리조푸스속 미생물 유래의 리파아제 효소임을 특징으로 하는 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 리파아제 효소가 수지에 고정시킨 고정화 효소임을 특징으로 하는 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 효소처리 식물성 오일을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합하여 용해시킨 후, 지방산을 포함하는 수성층으로 회수된 것임을 특징으로 하는 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 식물성 오일이 보라지 오일, 달맞이꽃 오일, 블랙커런트 오일 및 이들 중 2 이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일.

청구항 6

식물성 오일을 효소처리시켜 효소처리 식물성 오일을 제조하는 방법에 있어서,

(1) 10 내지 40℃의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일을 수지에 고정시킨 리파아제 효소와 10 내지 80시간 동안 접촉시키는 조건에서 효소처리시키는 효소처리단계; 및

(2) 효소처리를 완료하여 수득되는 효소처리물을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합한 후, 용해시켜 지방산을 포함하는 수성층을 회수하는 분획단계;

를 포함함을 특징으로 하는 효소처리 식물성오일의 제조방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 효소처리 식물성 오일을 피부외용제 총 중량 대비 0.001% 내지 90%로 포함함을 특징으로 하는 피부미백용 피부 외용제.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 피부 외용제가 연고, 패치, 젤, 크림, 미스트 혹은 분무제의 제형임을 특징으로 하는 피부미백용 피부 외용제.

청구항 9

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 효소처리 식물성 오일을 화장품 조성물 총 중량 대비 0.001% 내지 90%로 포함함을 특징으로 하는 피부미백용 화장품 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 화장료 조성물이 화장수, 유액, 로션, 크림, 세럼, 에센스, 에멀전, 화장연고, 스프레이, 젤, 팩, 마스크팩, 선크림, 메이크업 베이스, 파운데이션, 파우더, 클렌저 혹은 세정제의 제형임을 특징으로 하는 피부미백용 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 특히, 감마-리놀렌산 함량이 높은 식물성 오일을 효소처리하여 티로시나제를 분해하는 유리 지방산을 만들어 냄으로써 멜라닌 생성 억제 효능을 극대화시켜 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 생활수준이 향상됨에 따라 현대인들은 건강한 신체를 유지하는 것에 더하여 건강한 피부를 유지하는 데에도 많은 관심을 기울이고 있다. 따라서 피부미용 증진과 피부노화 방지에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0003] 인체의 가장 큰 기관으로서 전체 인체 부피의 약 16%를 차지하고 있는 피부는 외부환경과 직접 접해 있으면서, 인체 안으로 침입하려는 많은 유해인자, 예를 들면, 온도, 습도 및 자외선 등으로부터 인체를 보호하는 중요한 보호막 역할을 담당한다. 그러나, 나이가 들어감에 따라 각종 오염물질, 강한 자외선, 스트레스 및 영양결핍 등으로 인해 피부 세포들이 서서히 손상을 입게 되고, 세포 증식이 제대로 이루어지지 않게 되어 피부에 주름, 탄력 손실 및 각질화 등이 발생한다.

[0004] 한편, 기미, 주근깨 등의 생성은 피부 내 멜라닌의 발현과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 멜라닌은 아미노산의 일종인 티로신(tyrosine)에 티로시나제(tyrosinase)라는 효소가 작용하여 도파(DOPA), 도파퀴논(dopaquinone)으로 바뀐 후 비효소적인 산화반응을 거쳐 만들어진다. 그러나, 멜라닌이 만들어지는 경로는 알려져 있지만, 티로시나제가 작용하는 이전 단계인 멜라닌 합성을 유도하는 메카니즘(mechanism)이 무엇인지에 대해서는 아직도 자세히 밝혀지지 않고 있다. 이와 같은 멜라닌의 합성이 피부 내에서 과도하게 일어나면, 피부톤을 어둡게 하고, 기미, 주근깨 등을 발생시킨다. 따라서, 피부 내의 멜라닌 색소의 합성을 저해시키면, 피부톤을 밝게 하여 피부미백을 실현할 수 있을 뿐만 아니라 자외선, 호르몬 및 유전적인 원인에 기인하여 발생하는 기미, 주근깨 등의 피부 과색소 침착증을 개선시킬 수 있다.

[0005] 따라서, 최근에는 피부 주름개선 또는 피부미백을 위한 피부 생리학적 연구가 많이 행하여지고 있으며, 비타민 C 등과 같이 항산화 효과를 나타내는 성분을 포함하는 화장료 등이 제시되고 있다.

[0006] 또한, 화학물질로 이루어진 미용 조성물들은 많은 부작용이 있어, 천연물질 등을 이용하여 장기간 사용 시에도 안정성이 높은 피부노화 방지 및 개선 물질을 개발할 필요성이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[0007] 대한민국 등록특허공보 등록번호 제10-1449577호(발명의 명칭: 가르시니아 캄보지아 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 화장료 조성물)는 "본 발명은 가르시니아 캄보지아(Garcinia cambogia) 추출물을 유효 성분으로 함유하는 피부미백용 화장료 조성물에 관한 것으로, 멜라닌 생성과정 중의 일부 반응을 저해함으로써, 멜라닌 생성을 억제하여 미백에 효과가 있다."고 기술하고 있다.

[0008] 대한민국 등록특허공보 등록번호 제10-0357402호(발명의 명칭: 죽내피 추출물을 함유한 미백화장료)는 "본 발명은 미백화장료에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 미백 유효성분으로서 대나무 속내피로부터 추출된 죽내피(竹内皮) 추출물을 함유하는 미백화장료에 관한 것이다. 본 발명에 의한 죽내피 추출물을 함유하는 미백화장료는 종래의 알부틴이나 코지산을 단독으로 사용한 미백화장료에 있어서 티로시나제 효소의 활성을 억제하는 작용과 그에 따른 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 작용에 의한 미백효과에 비해 우수할 뿐만 아니라, 제조과정 중 또는 제품의 보관중의 경시변화 등의 문제점을 극복하고 피부에 자극이 없다는 장점이 있다."고 기술하고 있다.

[0009] 대한민국 등록특허공보 등록번호 제10-1774860호(발명의 명칭: 잣외종피 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미백

또는 모공수축용 화장료 조성물)는 "본 발명은 잣외종피 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물 및 이를 포함하는 피부 외용제에 관한 것이다. 또한 본 발명은 잣외종피 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물 및 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 상기 잣외종피 추출물은 항산화, 미백 또는 주름개선에 높은 효과를 나타내는 바, 본 발명에 따른 잣외종피 추출물은 항산화, 미백 및 주름개선 효과에 유용한 기능성 원료로 이용될 수 있다."고 기술하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 감마-리놀렌산 함량이 높은 식물성 오일을 리파아제 효소로 효소처리하여 유리된 감마-리놀렌산의 멜라닌 생성 억제 효능을 극대화시켜 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명에 따른 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일은, 식물성오일을 리파아제로 효소처리시켜 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일을포함한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 감마-리놀렌산함량이 높은 식물성 오일을 고정화된 리파아제로 효소처리하여 식물성 오일의 유리된 감마-리놀렌산의 멜라닌 생성 억제 효능을 극대화시켜 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 효과가 있다. 또한, 효소처리를 통해 1,3-부틸렌글리콜에 대한 용해도를 높여 식물성 오일의 활용도 및 제조공정을 향상시킨 고효율의 피부미백용 화장료 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 효소처리 전 식물성 오일과 효소처리 후 식물성 오일을 각각 1,3-부틸렌글리콜(1,3-BG)(도 1a)과 프로판디올(도 1b)에 대해 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 1:9의 비율로 혼합하여 용해도에 따른 층분리를 관찰한 사진이다.

도 2 내지 도 4는 오일의 효소처리 전후의 세포 내외의 멜라닌 양 측정한 결과를 나타내는 그래프로, 세포 내 멜라닌 양을 도 2에, 세포 외로 분비된 멜라닌을 도 3(사진)과 도 4(그래프)에 각각 나타내었다.

도 5는 효소처리 식물성오일에 의한 티로시나제 활성 변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6 및 도 7은 효소처리 식물성 오일에 의한 세포 내 티로시나제의 분해도 증가를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8 및 도 9는 B16F10세포 외로 분비된 멜라닌의 모습(도 8)과 양(도 9)을 나타낸 도면이다.

도 10은 B16F10세포 내의 티로시나제를 정량하여 그 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11 및 도 12는 감마-리놀렌산에 의한 세포 내 티로시나제의 분해도의 결과를 나타내는 도면으로서, 티로시나제의 분해량을 확인하여 도 11에 나타내었고, 티로시나제의 활성을 도 12에 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예를 참조하여 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명에 따른 높은 피부미백효과를 지닌 고농도 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일은, 식물성 오일을 고정화된 리파아제로 효소처리하여 유리 감마-리놀렌산을 포함하는 효소처리 식물성 오일을 포함함을 특징으로 한다.

[0016] 즉, 본 발명에 따르면, 효소처리를 통하여 감마-리놀렌산, 알파-리놀렌산, 리놀레산, 올레산 등과 같은 유리 필수 불포화지방산의 함량을 증대시키고, 멜라닌 색소의 생성을 억제하며, 세포 내 티로시나제를 분해시켜 피부미백에 중요한 역할을 하는 효소처리 식물성 오일 및 이를 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 점에 특징이 있다. 또한, 균주로부터 분리한 효소를 고정화하여 효소처리(발효)에 적용하여 생산시간 단축, 효소처리 후 정제의 단순화를 통해 제조공정을 간소화하고, 발효취가 나지 않도록 하여 발효의 단점을 최소화시키는 제조공정을 제공

한다.

- [0017] 감마-리놀렌산(GLA: γ -linolenic acid)은 불포화지방산인 오메가 6 지방산의 일종으로, 보통 식물성 유지에서 발견되며, 천연에서는 달맞이꽃 오일, 블랙커런트씨유, 보라지 오일 등에 함유되어 있다. 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮추는 데 효과적인 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생체 내 합성에 필수적인 물질이며, 또한 혈당강하, 항염증, 항암, 체중 감소, 골다공증, 류마티스성 관절염, 폐경기 증후군, 월경증후군 등에 효과적인 것으로 알려져 있다.
- [0018] 알파-리놀렌산(ALA: α -linolenic acid)은 불포화지방산인 오메가 3 지방산의 일종으로 체내에서 EPA(eicosapentaenoic acid)와 DHA(docosahexaenoic acid)로 전환되는 전구물질(Precursor)인데, EPA와 DHA의 경우 생선에 많이 들어있으며, 아마씨유(flexed-seedoil)나 호두 기름과 같은 식물성 유지 등에 많이 들어있다. 알파-리놀렌산과 오메가 6 지방산인 리놀렌산의 경우, 인체에서 합성되지 않는 필수지방산으로서 부족할 경우 두뇌와 망막에 필요한 DHA가 부족해 학습능력과 시각 기능이 떨어지게 되는 것으로 알려져 있다. 오메가 3 지방산은 인체 안에서 세포를 보호하고, 세포구조를 유지시키며 원활한 신진대사를 돕는다. 또한 혈액의 피막형성을 억제하고, 뼈의 형성을 촉진 및 강화하는 효과가 있다. 오메가 3 지방산이 부족하면 두뇌와 망막에 필요한 DHA가 부족해 학습능력과 시각기능이 떨어지게 된다고 알려져 있다. 최근 연구된 결과에 의하면 알파-리놀렌산이 염증의 마커인 C-반응성 단백질을 감소시켰다는 임상연구결과가 보고되었으며, 알파-리놀렌산을 섭취하면 혈중 콜레스테롤이 저하되고 심혈관계 질환 발생 위험성을 감소시켜 주며 동맥의 기능이 보호되는 효과 등을 얻을 수 있다고 알려져 있다.
- [0019] 리놀렌산(linoleic acid)은 2개의 이중결합을 가지는 불포화지방산으로 물에 녹지 않고, 에테르, 알코올에는 녹으며 연성(軟性) 비누의 원료로 쓰인다. 9,12-옥타데카디엔산이라고도 한다. 글리세롤과는 에스터결합으로 식물유 중에서 콩기름, 면실유 등에 많이 함유되어 있다. 공기 중에서 산화되기 쉬운 건성유(乾性油)는 이 리놀렌산과 리놀렌산이 주성분이다. 동물 체내에서는 인지질을 구성하는 지방산으로서 약간 발견된다. 동물 중에는 스스로 합성할 수 없어 필수 영양소로서 요구하는 것도 있는데, 리놀렌산 등과 함께 비타민 F(지방산의 F)라 불리기도 한다. 연성비누의 원료로 쓰이고 있다.
- [0020] 올레산(oleic acid)은 올리브유에 포함되어 있는 지방산의 주성분으로 오메가-9 불포화지방산이다. 올리브유에서 혈압 저하 역할을 담당하고 있다. 중성지방의 구성성분인 지방산의 종류에 따라 포화지방산, 불포화지방산으로 분류되고, 불포화지방산은 탄소 이중 결합의 수에 따라 단가(mono) 불포화지방산, 다가(poly) 불포화지방산으로 분류된다. 올레산은 탄소 원자 사이에 이중결합을 1개만 가지고 있는 단가 불포화지방산에 속한다. 올리브유, 카놀라유와 같은 식물성 기름 뿐만 아니라 소, 돼지와 같은 동물의 유지에도 함유된, 동식물에 널리 존재하는 지방산이다. 물에는 거의 녹지 않으나, 에탄올, 벤젠, 클로로포름 등에는 녹는다. 백금촉, 니켈 등을 촉매로 하여 수소로 환원시키면 수소첨가반응에 의해 이중결합이 없는 포화지방산 스테아르산이 만들어진다. 순수한 것은 무색, 무취의 액체이지만 공기 중에서 산화되어 노란색 또는 갈색으로 변하며 썩는 냄새가 난다. 혈청 콜레스테롤 농도는 낮추고 고밀도 콜레스테롤(HDL-콜레스테롤)의 농도는 저하시키지 않아 고지혈증 환자에게 특히 유익하며, 모유에도 가장 많이 함유된 지방산으로 아기의 성장, 발달을 돕는다. 동물에서는 글리세린과 에스터를 형성하여 피하지방이나 간에 저장되며, 비누의 원료나 천의 방수제로서 이용된다.
- [0021] 식물성 오일은 보라지 오일, 달맞이꽃 오일, 블랙커런트 오일 및 이들 중 2이상의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0022] 보라지 오일은 보라지(학명: *Borago officinalis*) 식물에서 유래하는 오일로서, 보라지 오일은 감마-리놀렌산이 풍부한 것으로 알려져 있으며, 혈당강하, 항염증, 체중 감소, 골다공증 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 여성들의 폐경기 증후군과 월경 증후군을 감소시켜 주는 것으로 보고되고 있다.
- [0023] 달맞이꽃 오일은 달맞이꽃(학명: *Oenothera biennis*)의 종자유로서, 달맞이꽃 오일은 달맞이꽃의 씨앗을 압착하여 추출한 식물성 오일로 피부 보습, 재생 효과가 뛰어나고 월경 전 증후군, 월경통, 갱년기 증상 완화에 효과적인 것으로 알려져 있다. 아로마테라피에서 캐리어 오일로 흔히 쓰인다. 아메리카가 원산지이며, 17세기 초 유럽에 소개되어 지중해 전역에서 재배가 이루어졌다. 아메리카 원주민들은 이것을 약용으로 다양하게 사용하였는데, 달맞이꽃 식물 전체를 찧어 타박상에 바르고, 물에 달여 피부염과 종기를 치료하였다. 또 뿌리는 달여서 감기 증상에 사용하였고, 잎은 가벼운 상처와 위장 장애를 치료하기 위해 애용하였다. 오늘날 갱년기와 아토피 증상 등의 개선을 위해 건강보조식품으로 이용되며, 크림, 비누, 샴푸 등 화장품 원료로 많이 쓰인다. 달맞이꽃 오일은 체내에서 생성되지 않지만 건강유지를 위해서 몸에 꼭 필요한 필수지방산인 리놀렌산이 약 70%, 감마-리놀렌산이 약 9%로 구성되어 있고, 약간의 점성이 있다. 피부 장벽을 강화하고, 피부를 재생시키는 효과로 습진,

건선, 비듬 등 피부 질환 완화에 도움을 주며, 호르몬의 균형을 도와 월경 전 증후군(PMS), 월경통, 갱년기 증상에 효과적이다. 이외 류머티즘과 관절염 완화에 사용한다.

- [0024] 블랙커런트 오일은 블랙커런트(학명: *Ribes nigrum*)의 종자유로서, 블랙커런트는 까치밥나무 속에 속하는 낙엽 관목으로 유럽 북서부가 원산지이고, 씨앗이 작고 즙이 많고 신맛이 나고, 열매에도 비타민 C, 플라보노이드 등의 다양한 영양성분이 있다. 블랙커런트 오일에는 감마-리놀렌산(오메가-6)이 많이 들어있어 폐경기 증후군, 월경 증후군 및 혈중 콜레스테롤 농도 감소, 혈당 강하, 항염증, 항암, 체중 증가, 골다공증, 류마티스 관절염 등에 효과를 볼 수 있는 것으로 알려져 있다.
- [0025] 본 발명에 따르면 상기 식물성 오일을 효소처리시키는 데 사용되는 것으로서, 리파아제 효소는 특히 리조푸스속 미생물 유래의 리파아제를 바람직하게는 수지에 고정시킨 고정화 효소를 사용하여 배치식으로 효소처리시킨 후, 원심분리에 의하여 효소 잔여물과 수지를 분리 및 여과하고, 수득된 효소처리액을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합한 후, 층분리시켜 지방산을 포함하는 수성층과 효소미처리된 식물성 오일을 포함하는 유성층을 분획하여 지방산을 포함하는 수성층은 후속하여 가공하여 화장료 조성물의 원료로 사용하고, 효소미처리된 식물성 오일을 포함하는 유성층은 회수하여 다시 효소처리공정에 도입시킬 수 있다. 본 발명에서는 지방산을 포함하는 수성층을 효소 처리물로부터 회수하기 위하여 특히 1,3-부틸렌글리콜을 사용하며, 1,3-부틸렌글리콜은 화장료 원료로 널리 사용되는 것으로서, 특히 오일의 효소처리에 의해 산출되는 지방산 및 글리세롤을 용해시킬 수 있을 뿐만 아니라 일반 화장료의 각종 원료들의 용매로서 사용될 수 있으며, 따라서 1,3-부틸렌글리콜로 회수된 지방산을 포함하는 수성층을 그대로 화장료 원료로 사용할 수 있어 오일류를 화장품에 적용할 때 통상 사용하는 피부 자극이 있는 유화제를 따로 사용할 필요가 없다.
- [0026] 상기 리파아제는 상기 리조푸스속 미생물을 배지에 배지 용적 대비 10중량%의 양으로 접종시키고, 호기조건, pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35℃의 배양조건에서 배양시킨 후, 1 내지 10℃에서 800 내지 1200 rpm으로 원심분리시켜 수득된 상등액을 황산암모늄(Ammonium sulfate)으로 침전 농축시킨 다음, 투석시켜 수득되는 투석물일 수 있으며, 이러한 리조푸스속 미생물의 배양 농축물을 사용하는 것에 의해 직접 미생물로 사용하는 것에 비해 불포화 필수지방산의 생성량을 크게 증대시킬 수 있고, 발효취를 없앨 수 있다는 것이 본 발명자들에 의해 확인되었다.
- [0027] 이때, 상기 배지는 2 내지 10중량%의 감자 전분, 0.5 내지 3중량%의 덱스트로즈 및 잔량으로서 물을 포함하는 PDB(Potato Dextrose Broth)일 수 있다. 상기 PDB를 사용하는 배양은 바람직하게는 5.1±0.2의 pH에서 그리고 호기조건에서 수행될 수 있으며, 상기 PDB는 바람직하게는 PDB 총 중량을 기준으로 0.1 내지 10중량%의 올리브 오일을 더 포함할 수 있다.
- [0028] 특히, 상기 리조푸스속 미생물의 배양 농축물의 배양조건에서 발효배양시간은 80 내지 150시간의 범위 이내에서 배양될 때 리파아제 활성이 가장 우수하다는 것이 본 발명자들에 의해 확인되었다.
- [0029] 리조푸스속(*Rhizopus* sp.) 미생물은 접합균아문 털곰팡이목(*Mucorales*)의 곰팡이의 1속(屬)으로서, 포복사(stolon)가 옆으로 퍼져 신장하여, 이것을 배지에 접하는 점, 즉 절부(node)로부터 1 내지 수 개의 포자낭병과 가근(rhizoid)이 총생한다. 포자낭은 크고, 보통 검은색이다. 주축(columella)은 반구상이고, 균사는 다량으로 발생하며, 또한 길게 신장하여 페트리접시 뚜껑까지 가득 찬다. 유성적으로는 2개의 배우자낭이 접촉융합하여 접합포자를 형성한다. 토양, 과일 등에 존재하며, 드물게 사람, 동물, 특정 종의 식물에 병원성이 있는 것도 있다. 전분당화력이 강하고, 극소량이지만 알코올 발효력, 단백질 분해력이 있으며, 젖산, 푸마르산 등 유기산 생성능도 강하기 때문에 발효공업에 이용하는 종류도 많다. 예를 들어, 중국술의 양조나 동남아시아의 미주(米酒) 제조에 이용한다. 리조푸스 텔레마르(*R. delemar*), 리조푸스 자포니쿠스(*R. japonicus*)는 알코올 제조용 아밀로균으로 중요하다. 리조푸스 니그리칸스(*R. nigricans*)는 복숭아, 딸기 등의 과실이나, 곡류, 빵에 잘 발생하고, 고구마 연부병의 원인도 되지만 푸말산 생성능이 강한 것으로도 알려져 있다.
- [0030] 상기 리조푸스속 미생물의 배양 농축물은 리파아제(Lipase)를 포함하며, 상기 리파아제는 오일을 글리세롤과 지방산으로 분해하는 효소를 의미한다.
- [0031] 상기 식물성 오일의 효소처리는 10 내지 40℃의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일을 수지에 고정시킨 리파아제 효소와 10 내지 80시간, 바람직하게는 15 내지 50시간, 보다 바람직하게는 20 내지 30시간 동안 접촉시키는 반응조건에서 효소 반응시키는 것으로 수행될 수 있으며, 상기 리조푸스속 미생물은 바람직하게는 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*)가 될 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명에 따른 효소처리 식물성 오일의 제조방법은, 식물성 오일을 효소처리하여 효소처리 식물성 오일

을 제조하는 방법에 있어서, (1) 10 내지 40℃의 범위 이내의 온도로 예열된 식물성 오일을 수지에 고정시킨 리파아제 효소와 10 내지 80시간 동안 접촉시키는 효소처리조건에서 효소반응 시키는 효소처리단계; 및 (2) 효소 처리단계에서 수득되는 효소 처리물을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합한 후, 충분리시켜 지방산을 포함하는 수성층을 회수하는 분획단계;를 포함함을 특징으로 한다.

[0033] 리파아제 효소는 특히 리조푸스속 미생물 유래의 리파아제를 바람직하게는 수지에 고정시킨 고정화 효소를 사용하여 배치식으로 효소처리시킨 후, 원심분리에 의하여 수지를 포함한 효소 잔여물을 분리 및 여과하고, 수득된 효소 처리물을 1,3-부틸렌글리콜과 혼합한 후, 충분리시켜 지방산을 포함하는 수성층과 효소미처리된 식물성 오일을 포함하는 유성층을 분획하여 지방산을 포함하는 수성층은 후속하여 가공하여 화장품 조성물의 원료로 사용하고, 효소미처리된 식물성 오일을 포함하는 유성층은 회수하여 다시 효소처리공정에 도입시킬 수 있다.

[0034] 효소처리에 사용되는 리파아제 효소, 특히 상기 리조푸스속 미생물 유래 리파아제 효소, 상기 효소의 제조에 사용되는 배지 및 배양조건과 배양시간 등은 앞서 설명한 바와 동일 및/또는 유사한 것으로서 반복되는 설명은 피하기로 하며, 상기 리조푸스속 미생물은 바람직하게는 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*)가 될 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 상기 효소처리 식물성 오일은 상기한 방법으로 효소처리함으로써 효소처리하기 전보다 유리 필수불포화지방산 함량이 월등히 높은 특징을 가진다.

[0036] 상기 유리 필수불포화지방산은 감마-리놀렌산(GLA), 알파-리놀렌산(ALA), 리놀렌산(LA: Linoleic Acid) 및 올레산(OA: Oleic Acid)을 포함한다.

[0037] 감마-리놀렌산은 여성의 모유와 일부 식물에만 존재하는 불포화지방산 성분으로서, 체내 활성물질로 알려진 프로스타글란딘을 합성하는데 꼭 필요한 전구체이다. 체내에 감마-리놀렌산이 부족하게 되면 생리활성물질인 프로스타글란딘이 합성되지 않기 때문에, 필수아미노산을 비롯한 신체의 정상적인 기능에 필요한 성분이 잘 형성되지 못해 면역체계의 이상이 생기게 된다.

[0038] 상기 유리 필수불포화지방산은 지방산이 글리세라이드 형태로 글리세롤에 결합되지 않은 형태를 의미한다. 유리 필수불포화지방산의 함량이 높아짐에 따라 끈적임이 줄어들고 피부 흡수력이 향상된다.

[0039] 본 발명에 따르면, 상기한 바의 효소처리 식물성 오일을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 화장품 조성물이 제공될 수 있으나, 본 발명이 이들로 제한되는 것으로 의도되는 것은 아님은 당업자에게는 이해될 수 있는 것이다.

[0040] 상기 피부미백용 화장품 조성물은 크림, 로션, 에멀전, 화장수, 에센스, 미스트, 젤, 팩, 마스크팩, 오일, 색조 화장품, 비누, 바디워시, 샴푸, 린스, 입욕제, 스크럽제 등 다양한 제형으로 제조될 수 있다.

[0041] 상기 피부미백용 화장품 조성물은 정제수, 유분, 계면활성제, 보습제, 안정화제, 알코올, 중점제, 킬레이트제, 색소, 방부제 및 향료로 이루어지는 군으로부터 적어도 1종 이상 선택된 첨가제를 더 포함할 수 있다.

[0042] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시예 및 비교예들이 기술되어질 것이다.

[0043] 이하의 실시예들은 본 발명을 예증하기 위한 것으로서 본 발명의 범위를 국한시키는 것으로 이해되어져서는 안 될 것이다.

[0044] 제조예 1. 효소처리에 필요한 고정화 효소의 정제.

[0045] 식물성 오일을 효소처리하기 위하여 리조푸스 속 미생물로서 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*)를 배지에서 먼저 배양시켰다. 사용된 배지는 2중량% 올리브 오일, 4중량% 감자전분, 1중량% 텍스트로스 및 잔량으로서 멸균수로 조성되었다.

[0046] 배양조건은 pH 6.0, 온도 28℃이었고, 배양은 120시간 동안 수행되었으며, 미생물 배양이 종료되면 8000 rpm으로 원심분리 하여 미생물 군체를 가라앉히고 상등액만 회수한 다음, 여기에 70% 황산암모늄을 4℃ 조건에서 천천히 첨가하여 조효소 혼합물을 침전시켰다. 그 후에 4℃, 12000 rpm의 조건에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 침전물을 0.05 M 인산 완충용액(pH 7.0)에 녹인 후, 투석막을 이용하여 4℃조건에서 투석시켜 이클리파아제 농축액으로 사용하였다.

[0047] 효소 고정화에 사용되는 흡착성 수지(resin)는 폴리프로필렌 분말(polypropylene powder), Amberlite XAD-7, 다공질 유리(porous glass), 음이온교환수지(anion exchange resins), CaCO₃, 다공질 키토산 비드(porous chitosan beads) 등이 알려져 있으며, 이중 열과 물리적 충격에 비교적 안정적인 Amberlite XAD-7 수지(Sigma-

aldrich)를 사용하였다. 이 수지를 에탄올과 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 씻은 후, 37℃에서 1시간 교반하고 필터로 여과하였다. PierceTM Bicinchoninic acid(BCA) Protein Assay kit(Thermo scientific)을 사용해 제조사가 제공하는 방법으로 단백질을 정량하여 0.01 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.6)을 사용해 총 단백질 양을 10mg/ml로 맞춘 효소농축액을 사용하였다. 해당 효소농축액을 여과를 마친 Amberlite XAD-7 수지에 첨가한 후 37℃, 200 rpm 진탕배양기에서 10시간 동안 반응시키고, 이 반응물을 3000rpm으로 5분간 원심분리하여 Amberlite XAD-7 수지층을 분리하였고, 이를 0.01 M Tris-HCl 완충용액(pH8.6)으로 3번 수세하여 진공 건조기(vacuum desiccator)를 사용하여 수 시간 동안 완전히 건조시킨 후, 고정화 효소로 사용하였다.

[0048] 실시예 1. 효소처리 식물성 오일의 제조.

[0049] 효소반응혼합물(reaction mixture)을 제조하기 위하여, 3 g의 고정화 효소를 pH 7.0의 인산염 완충용액(Sodium phosphate buffer, 50 mM) 57 g에 희석하여 사용하였다. 즉, 상기 제조에 1의 고정화 효소를 인산염 완충용액에 5중량%로 희석한 고정화 효소액과 식물성 오일(로즈힙 오일, 보라지 오일, 동백 오일, 올리브 오일 혹은 모링가 오일)을 60:40의 비율로 혼합한 후, 300 rpm, 37℃에서 60시간 동안 효소처리하였다. 고정화된 효소처리를 마친 식물성 오일은 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 리파아제가 고정화된 수지를 분리하고, 다시 0.22 μ m의 기공 크기(pore size)를 갖는 여과막을 통과시켜 고정화된 효소가 처리된 효소처리 식물성 오일(로즈힙 오일, 보라지 오일, 동백 오일, 모링가 오일, 올리브 오일) 5종을 수득하였다.

[0050] 실험예 1. 효소처리에 따른 식물성 오일의 1,3-부틸렌글리콜에 대한 용해도 변화 확인.

[0051] 화장품 원료로서 오일의 가장 큰 단점은 주요 화장품 용매에 대한 낮은 용해도에 따른 층분리 현상과 식물성 오일을 유화시켜 화장품에 사용하기 위한 기존 유화제의 피부자극이다. 이와 관련하여, 주요 화장품 용매 중 1,3-부틸렌글리콜(1,3-butylene glycol)과 프로판디올(propanediol)에 대해 효소처리 전후의 용해도 차이를 확인하였다. 효소처리 전 식물성 오일과 효소처리 후 식물성 오일을 각각 1,3-부틸렌글리콜(1,3-BG)(도 1a)과 프로판디올(도 1b)에 대해 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 1:9의 비율로 혼합하여 용해도에 따른 층분리를 관찰하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0052] 도 1의 결과로, 효소처리 전 대비 효소처리 후에 모든 식물성 오일들의 1,3-부틸렌글리콜에 대한 용해도가 비율에 관계없이 현저하게 향상되었음을 확인할 수 있었다. 반면, 프로판디올은 효소처리 전 후, 오일 종류에 관계없이 층분리가 나타나 거의 대부분 용해되지 않았음을 확인할 수 있었다. 이에 따라, 효소처리를 통해 오일성 화장품 원료의 최대 단점인 용해도를 극복하였으며, 1,3-부틸렌글리콜이 적용가능한 모든 화장품 조성물에 효소처리 식물성 오일들이 쉽게 활용될 수 있다. 이 때, 1,3-부틸렌글리콜에 용해시킨 효소처리 식물성 오일에 미세한 오일층이 형성되기도 한다. 이것은 효소처리 공정 중 효소처리가 완료되어 유리지방산과 글리세롤, 모노아실글리세롤 혹은 디아실글리세롤 상태로 전환된 것과 아직 글리세롤과 지방산이 전혀 유리되지 않은 트리글리세라이드 형태의 것과 분리하여 나타나는 것으로 보인다. 이 분층을 활용하여, 원심분리를 통해 효소처리가 완전히 종료된 효소처리 식물성 오일을 정제하기 수월하다는 장점이 발생한다. 따라서, 효소처리 식물성 오일은 1,3-부틸렌글리콜에 고농도로 용해시킬 수 있어 불완전 효소처리에 의한 트리글리세라이드 형태를 쉽게 제거할 수 있어 고순도의 유리지방산을 포함하는 효소처리 식물성 오일을 제조할 수 있고, 제조 공정의 간편화와 다양한 제형의 화장품 조성물 제조에 큰 이점을 지닌다.

[0053] 실험예 2. 유리지방산 함량 분석.

[0054] 유리지방산 함량 분석에 사용된 표준품은 알파-리놀렌산(α -Linolenic acid, ALA, Sigma-aldrich), 감마-리놀렌산(γ -Linolenic acid, GLA, Sigma-aldrich), 리놀레산(Linoleic acid, LA, Sigma) 및 올레산(Oleic acid, OA, Sigma-aldrich) 4종이다. 분석에 사용된 이소프로판올(DUKSAN) 및 아세토니트릴(Acetonitrile, DAEJUNG)은 HPLC 등급이고, 시료 및 표준품은 이소프로판올(Isopropanol, DUKSAN)에 용해시킨 후, 0.22 μ m 멤브레인 필터(membrane filter; PVDF Syringe Filter, 13 mm, FUTECs Co., Ltd)로 여과한 후, C18 column (250 x 4.6 mm, Gemini 5 μ m, Phenomenex,)을 사용하여 유리지방산을 분석하였다. 유속은 1.0 ml/분, 시료주입량은 10 μ l로 하였으며, 210 nm 파장의 자외선으로 측정하였고, 이동상(mobile phase)으로는 아세토니트릴 중의 0.005% 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid, Millipore Co.) : 물 중의 0.005% 트리플루오로아세트산을 이동상의 기울기 조건으로는 80 : 20 (v/v)로 시작하여 45분 동안 경사(gradient) 분석법으로 지방산들을 분석하였다.

[0055] 효소처리 식물성 오일(로즈힙 오일, 동백 오일, 보라지 오일, 올리브 오일, 모링가 오일)의 유리지방산의 함량을 분석한 결과를 다음 표 1(효소처리 식물성오일의 주요 유리지방산 함량)에 나타내었다.

표 1

	오일 종류	주요 유리지방산 함량(%)				
		ALA	GLA	LA	OA	[ALA+GLA+LA+OA]
1	효소처리 로즈힙오일	9.60	0.90	21.65	66.84	98.99
2	효소처리 보라지오일	0.17	17.98	29.94	11.75	59.84
3	효소처리동백오일	N.D.	0.05	1.57	50.32	51.94
4	효소처리 올리브오일	N.D.	0.02	0.86	23.34	24.22
5	효소처리 모링가오일	0.22	1.94	17.01	7.99	27.16
N.D.는 검출되지 않았음을 의미함.						

[0056]

[0057]

상기 표 1의 지방산 분석결과에 따라 유리지방산 총 함량이 높은 1 내지 3(효소처리 로즈힙 오일, 효소처리 보라지 오일 및 효소처리 동백 오일)까지 선정하여 미백관련 *In vitro* 실험을 진행하였다.

[0058]

실험예 3. 오일의 효소처리 전후의 세포 내외의 멜라닌 양 측정.

[0059]

B16F10세포를 6웰 플레이트(well plate)에 2×10^5 셀/웰이 되게 접종하고, 24시간이 지난 후, 페놀레드(Phenol Red) 무첨가 배지로 교체하였다. 효소처리 전후의 식물성 오일을 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich)에 10중량%로 완전히 용해시킨 뒤, 최종농도가 1000 ppm이 되도록 각각 배지에 처리하고, α -MSH(Melanocyte-stimulating hormone, 200 nM)를 처리하여 37°C CO₂ 배양기에서 96시간 배양하였다. 대조군은 1부피%의 DMSO를 사용하였다. 배지를 새 튜브로 옮긴 후, 세포를 회수하여 셀 펠렛(cell pellet)을 얻었고, 여기에 1N NaOH 300 μ l를 첨가하여 60°C에서 3시간 동안 용해하였다. 회수한 배지 및 용해된 세포를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 마이크로플레이트(Microplate)를 사용하여 상층액의 흡광도를 490 nm에서 측정하였다. 멜라닌 양은 일정 단백질당 멜라닌 양으로 환산하였고 대조군을 기준으로 하여 멜라닌 생성량을 하기 수학적 식 1로 계산하여 세포 내 멜라닌 양을 도 2에, 세포 외로 분비된 멜라닌을 도 3과 도 4에 각각 나타내었다.

수학적 식 1

멜라닌 함량 (%) = (실험군의 흡광도-공시료액의 흡광도)/(대조군의 흡광도-공시료액의 흡광도) X

100

[0060]

[0061]

도 2에서, **는 대조군과 비교한 0.01 <p를, #은 효소처리 전후를 비교한 0.05 <p를, ##은 효소처리 전후를 비교한 0.01 <p를 각각 의미한다.

[0062]

도 4에서, **는 대조군과 비교한 0.01 <p를, #은 효소처리 전후를 비교한 0.05 <p를 각각 의미한다.

[0063]

도 2, 도 3 및 도 4의 결과로, 실험에 포함된 모든 식물성 오일들이 효소처리 후 그 효과가 크게 증대되며, 이중 리놀레산과 감마-리놀렌산을 다량 함유하는 보라지오일이 가장 멜라닌 생성 및 분비를 감소시키는데 효과적 이었으며, 리놀레산과 알파-리놀렌산을 다량 함유하는 로즈힙 오일이 그 뒤를 따랐다. 그러나 올레산이 대부분인 동백오일은 그 효과가 크지 않았음을 확인할 수 있었다.

[0064]

실험예 3의 결과에 따라, 감마-리놀렌산과 리놀레산을 함유하는 효소처리 보라지 오일의 미백효과가 가장 뛰어난 것으로 예상된다.

[0065]

실험예 4. 효소처리 식물성오일에 의한 티로시나제 활성 변화.

[0066]

효소처리 식물성 오일의 세포 내외의 멜라닌 감소효과를 확인하기 위하여, *In vitro* 티로시나제 활성 측정을 시행하였다. 최종농도 기준으로, 0.5 mM L-Tyrosine(Sigma-Aldrich), 100 단위/ml 머쉬룸 티로시나제(Sigma-Aldrich) 그리고 효소처리 전후의 식물성 오일들을 1000ppm으로 각각 0.1 M 인산칼륨 완충용액(potassium phosphate buffer ; pH6.8)에 용해 및 교반하여 제조하였다. 효소처리 전후의 식물성 오일을 통한 티로시나제 활성을 계산하기 위해, 0, 125, 250, 500, 1000 ppm의 알부틴(Arbutin)을 사용해 표준곡선을 작성하여 반영하였

다. 각 반응혼합물 300 μ l를 각각 96웰 플레이트에 넣은 후, 37℃에서 15분간 반응시켜 마이크로플레이트를 사용해 475 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0067] 도 5의 결과를 통해, 효소처리 전후에 관계없이 식물성 오일들은 티로시나제의 활성에 크게 영향을 주지 못함을 확인하였다.

[0068] **실험예 5. 효소처리 식물성 오일에 의한 세포 내 티로시나제의 분해도 증가.**

[0069] B16F10세포를 6웰 플레이트에 2×10^5 셀/웰이 되게 접종하고, 실험예 3과 같이 효소처리 식물성 오일(1000 pp m)을 처리한 뒤, α -MSH(200 nM)를 처리하였고, 대조군으로 DMSO를 사용하였다. 37℃ CO₂ 배양기에서 96시간 배 양한 후, 배양된 세포를 회수하여 PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 각 웰에 200 μ l의 RIPA 완충용액(150 mM NaCl, 500 mM Tris-Cl(pH 8.0), 1% Triton-X100, Protease inhibitor cocktail)를 사용하여 10분간 세포를 용해하였 고, 4℃ 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 세포 내 티로시나제의 양을 Tyrosinase ELISA KIT(CSB-EL025394MO, Cusabio)를 사용하여 제조사가 제시하는 방법을 근거로 정량하였다. B16F10세포 내 티로시나제를 정량하여 도 6에 나타내었다.

[0070] 도 6에서, **는 대조군과 비교한 0.01 <p를, #은 α -MSH를 처리한 실험군과 비교한 0.05 <p를, ##은 α -MSH를 처리한 실험군과 비교한 0.01 <p를 각각 의미한다.

[0071] 도 6의 결과로, α -MSH로 유도되는 티로시나제의 발현 증가가 효소처리 식물성 오일에 의해 실험예 3과 실험예 4에서 보여진 효소처리 식물성 오일에 의한 멜라닌의 감소가 티로시나제의 양적 감소를 통한 것임을 알 수 있다. 해당 티로시나제의 양적 감소가 발현 양상의 변화인지, 분해 양상의 변화인지 확인하기 위하여, 각 1000 ppm의 효소처리 식물성 오일들과 함께 단백질 신합성 저해제인 시클로헥시미드(cycloheximide)를 1 μ g/ml씩 각 각 처리하였다. 대조군으로 DMSO를 사용하였고, 0시간부터 12시간까지 4시간 단위로 티로시나제의 양적 변화를 비교하였으며, 이때 실험예 5와 같은 방법으로 세포 내 단백질을 수득하고 Tyrosinase ELISA KIT(CSB-EL025394MO, Cusabio)를 사용하여 정량하였다.

[0072] 도 7에서, *는 12시간에서 대조군과 비교한 0.05 <p를, **는 대조군과 비교한 0.01 <p를 의미한다.

[0073] 시클로헥시미드를 사용하여 단백질 신합성을 막았을 때, 효소처리 보라지 오일이 가장 우수한 세포 내 티로시나 제의 양적 감소를 유발하였다. 이는 효소처리 보라지 오일에 의해 티로시나제의 분해가 증가함을 의미하며, 효 소처리 보라지 오일에 의한 티로시나제의 분해를 통해 결국 멜라닌 생성 및 분비 감소가 이루어져 뛰어난 미백 효과를 보이는 것으로 예상된다.

[0074] **실험예 6. 감마-리놀렌산에 의한 세포 내 티로시나제의 분해도.**

[0075] 실험군 중 효소처리 보라지 오일의 멜라닌 감소효과와 티로시나제 분해도가 가장 우수하였으며, 이는 효소처리 보라지 오일에 유일하게 풍부한 감마-리놀렌산의 미백효과로 추측된다. 따라서, 감마-리놀렌산의 미백효과를 리 놀렌산과 비교 확인하였다. B16F10세포를 6 웰 플레이트에 2×10^5 셀/웰이 되게 접종하고, DMSO에 25 mM로 제조 한 감마-리놀렌산을 사용하여 최종농도가 0, 5, 10, 25 μ M이 되도록 처리하고, α -MSH(200 nM)를 처리하여 37 °C CO₂ 배양기에서 96시간 배양하였다. 대조군으로는 0.1용적% DMSO를 사용하였다. 배양액을 회수하여 멜라닌 생성도를 확인하였고, 배양된 세포는 PBS(pH 7.4)로 두 번 세척하였다. 세척된 세포에 200 μ l의 RIPA 완충용액 (150 mM NaCl, 500 mM Tris-Cl(pH 8.0), 1% Triton-X100, Protease inhibitor cocktail)를 사용하여 10분간 세포를 용해하였고, 4℃ 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 세포 내 티로시나제의 발현 은 Tyrosinase ELISA KIT(CSB-EL025394MO, Cusabio)를 사용하여 제조사가 제시하는 방법을 근거로 정량하였다.

[0076] B16F10세포 외로 분비된 멜라닌의 모습과 양을 도 8 및 도 9에 나타내었고, 세포 내의 티로시나제를 정량하여 도 10에 나타내었다. 또한, 실험예 5와 같은 방법으로 시간 별 세포 내 티로시나제의 분해능을 알아보고자 25 μ M 감마-리놀렌산과 25 μ M 리놀렌산과 함께 1 μ g/ml 시클로헥시미드를 처리하여 4, 8, 12시간 동안 티로시나제의 분해량을 확인하여 도 11에 나타내었고, 티로시나제의 활성을 실험예 4와 같은 방법으로 측정하여 도 12에 나타 내었다.

[0077] 도 9에서, **는 대조군과 비교한 0.01 <p를, #은 감마-리놀렌산과 리놀렌산을 처리한 실험군을 각각 비교한 0.05 <p를 의미한다.

[0078] 도 10에서, **는 대조군과 비교한 0.01 <p, #은 α -MSH를 처리한 실험군과 비교한 0.05 <p, ##은 α -MSH를 처리

한 실험군과 비교한 0.01 <p를 각각 의미한다.

[0079] 도 11에서, *는 12시간에서 대조군과 비교한 0.05 <p를, **는 대조군과 비교한 0.01 <p를 의미한다.

[0080] 도 8과 도9를 통해, 리놀렌산 대비 우수한 감마-리놀렌산의 멜라닌 감소능을 확인하였다. 또한, 도 10, 도 11 및 도 12의 결과를 통해, 효소처리 보라지 오일과 마찬가지로 티로시나제의 활성화에는 영향이 없었으나, 리놀렌산 대비 우수한 티로시나제의 분해능이 감마-리놀렌산에서 검출되었다. 따라서, 감마-리놀렌산에 의한 티로시나제의 분해를 통해 멜라닌의 생성 및 분비가 감소하여 효소처리 보라지 오일의 우수한 미백효과가 보여짐을 확증하였다.

[0081] 실험예 7.관능 시험을 통한 효소처리 보라지 오일의 피부 투명도(색소침착 지수) 측정

[0082] 본 발명에 따른 효소처리 보라지 오일을 이용하여 피부 투명도(색소침착 지수)를 알아보고자 관능 시험을 실시하였다.

[0083] 피험자는 20 내지 50세의 약간의 색소침착(지수: 40 내지 54)을 갖고 있는 남녀 10명을 대상으로 하여 기초 화장품만 바른 상태에서 피부 투명도를 측정한 후, 8주간(2주에 한번 측정) 효소처리 보라지 오일을 볼에 1 내지 2 방울 정도 떨어뜨려 바른 뒤, 바른 직후 피부측정기인 '아로모티에스(Aramo TS, ARAM HUVIS Co., Ltd.)'를 사용하여 측정하였다. 본 관능 시험에 사용된 피부측정기인 아로모티에스는 피부 표면의 색소침착 지수를 자동 분석하는 피부 진단 시스템으로 색소침착이 적을수록 즉 투명도가 높을수록 수치가 낮다.

[0084] 종합적인 시험 결과는 하기 표 2에 기록하였다.

표 2

구분	피부 투명도(색소침착 지수) 테스트					
	0주	2주	4주	6주	8주	최종 감소
A	40	41	35	33	30	-10
B	42	42	41	37	35	-7
C	44	43	40	34	31	-13
D	45	45	45	44	42	-3
E	50	46	44	44	43	-7
F	43	45	39	40	38	-5
G	44	46	40	35	30	-14
H	42	42	35	26	28	-14
I	52	50	44	44	40	-10
J	54	54	45	42	41	-13

[0085]

[0086] 관능 시험 결과, 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 피험자 모두 효소처리 보라지 오일의 사용으로 색소침착이 개선되는 경향을 나타내었다.

부호의 설명

[0087] (도면 부호 없음)

도면

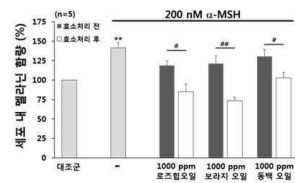
도면1a

1,3-BG : 오일	효소처리 전					효소처리 후				
	9:1	7:3	5:5	3:7	1:9	9:1	7:3	5:5	3:7	1:9
동백 오일										
로즈힙 오일										
보라지 오일										

도면1b

프로판디올 : 오일	효소처리 전					효소처리 후				
	9:1	7:3	5:5	3:7	1:9	9:1	7:3	5:5	3:7	1:9
동백 오일										
로즈힙 오일										
보라지 오일										

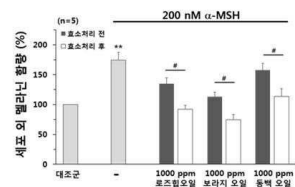
도면2



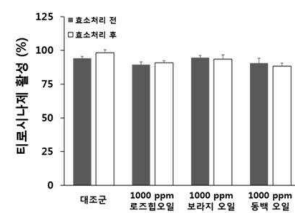
도면3



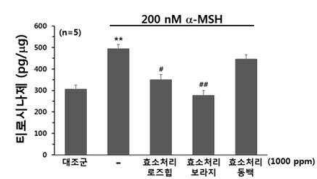
도면4



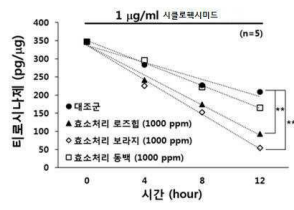
도면5



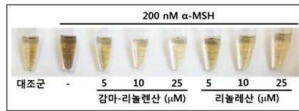
도면6



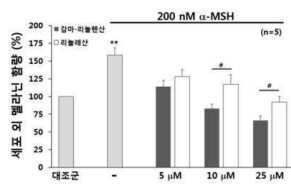
도면7



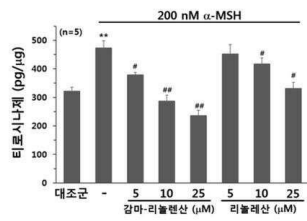
도면8



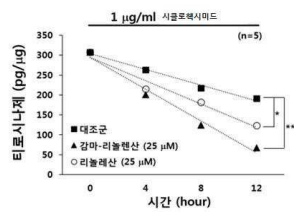
도면9



도면10



도면11



도면12

