



등록특허 10-2192446



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월18일

(11) 등록번호 10-2192446

(24) 등록일자 2020년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9728 (2017.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61K 36/07 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01) A61Q 17/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9728 (2017.08)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0025553

(22) 출원일자 2020년02월28일

심사청구일자 2020년02월28일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130131968 A*

KR1020180114782 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

조선대학교 산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

김춘성

광주광역시 남구 서문대로678번길 7(진월동, 대주 아파트)

이숙영

광주광역시 남구 봉선중앙로 46(봉선동, 삼익아파트)

(74) 대리인

특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 7 항

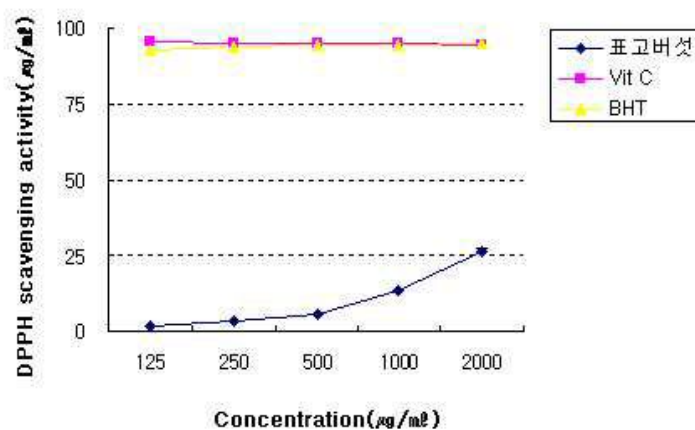
심사관 : 강신권

(54) 발명의 명칭 화장료 조성물, 약학 조성물 및 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 화장료 조성물, 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로 피부노화 억제, 미백, 항균, 항염 또는 혈전용해 활성이 우수하다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 36/07 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61P 39/06 (2018.01)
A61Q 17/005 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

표고버섯의 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 유산균 발효물의 추출물을 포함하는 향산화, 미백, 항염 또는 항균용 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*)인, 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 60~80 부피% 에탄올 추출물인, 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 조성물 총 중량의 0.1 내지 3 중량% 포함되는 것인, 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 항균 활성은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 아밀로리 퀘페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*), 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 중 어느 하나 이상에 대한 것인, 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 스킨, 로션, 토너제, 미용비누, 바디워시, 세럼, 클렌징로션, 에센스, 영양크림, 팩, 마사 지 크림으로 이루어진 군에서 선택된 제형을 갖는, 화장료 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

표고버섯의 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 유산균 발효물의 추출물을 포함하는 향산화, 미백, 항염 또는 항균 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 화장료 조성물, 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0003] 표고는 담자균류 주름버섯목 느타리과에 속하는 버섯으로 한국, 일본, 중국, 타이완 등에서 참나무류, 밤나무, 서어나무와 같은 활엽수의 마른나무에 자생하는 식물이다. 표고버섯의 갓은 지름 4~10cm로 처음에는 반구 모양이지만 점차 퍼져서 편평해진다. 버섯대는 3~6cm 정도로 표면의 위쪽이 흰색, 아래쪽이 갈색이고 섬유처럼 질기다. 한국, 일본, 중국에서는 생표고 또는 건표고를 버섯 중에서 으뜸가는 상품의 식품으로 이용할 만큼 그 가치가 높다. 표고버섯은 예로부터 핏속의 콜레스테롤 수치를 내리는 역할, 혈압저하, 고혈압 예방, 동맥경화 예방 등에 효능이 있음이 알려져 있는데, 이는 표고버섯 속의 에리다데민이라는 물질에 의해 발생한다고 알려져있다.

[0004] 종래의 발효 버섯에 관한 기술들은 대부분 버섯 자체의 추출물을 이용한 화장료 조성물에 대해 기술하거나, 버섯을 발효 균사체로 이용하여 기타추출물을 발효한 추출물의 조성물로의 용도에 대해 발표되어 있다. 그러나, 버섯 자체를 발효한 발효물을 이용하는 피부미용 개선용 조성물에 대한 연구는 많지 않은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0863890호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 다양한 활성 효능을 갖는 천연물 유래 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 다양한 활성 효능을 갖는 천연물 유래 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 1. 표고버섯의 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 유산균 발효물의 추출물을 포함하는 향산화, 미백, 항염 또는 항균용 화장료 조성물.

[0011] 2. 위 1에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)인, 화장료 조성물.

[0012] 3. 위 1에 있어서, 상기 추출물은 60~80 부피% 에탄올 추출물인, 화장료 조성물.

[0013] 4. 위 1에 있어서, 상기 추출물은 조성물 총 중량의 0.1 내지 3 중량% 포함되는 것인, 화장료 조성물.

[0014] 5. 위 1에 있어서, 상기 항균 활성은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 아밀로리퀘페시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*), 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 중 어느 하나 이상에 대한 것인, 화장료 조성물.

[0015] 6. 위 1에 있어서, 스킨, 로션, 토너제, 미용비누, 바디워시, 세럼, 클렌징로션, 에센스, 영양크림, 팩, 마사지 크림으로 이루어진 군에서 선택된 제형을 갖는, 화장료 조성물.

[0016] 7. 표고버섯의 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 유산균 발효물의 추출물을 포함하는 향산화, 미백, 항염 또는 항균 약학 조성물.

[0017] 8. 표고버섯의 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 유산균 발효물의 추출물을 포함하는 향산화, 미백, 항염 또는 항균 건강기능식품.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 화장료 조성물은 피부노화 억제, 미백, 항균 활성이 우수하다.

[0020] 본 발명의 약학 조성물 및 건강기능식품은 피부노화 억제, 미백, 항균, 항혈전 활성이 우수하다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 표고버섯 갓(cap)의 주름살(gill) 미세구조를 관찰한 사진이다.
- 도 2는 표고버섯 갓의 표면 부위의 미세구조를 관찰한 사진이다.
- 도 3은 표고버섯 줄기(stem) 표면 부위의 미세구조를 관찰한 사진이다.
- 도 4는 표고버섯 발효물의 농도 및 시간에 따른 변화양상이다.
- 도 5는 표고버섯 발효물의 농도 및 시간에 따른 변화양상이다.
- 도 6은 표고버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인한 것이다.
- 도 7은 표고버섯 추출물의 농도에 따른 티로시나아제 활성을 확인한 것이다.
- 도 8은 표고버섯 추출물의 농도에 따른 melanoma cell의 생존율을 분석한 것이다.
- 도 9는 표고버섯 추출물의 농도에 따른 인간 각질형성세포의 생존율을 분석한 것이다.
- 도 10은 표고버섯 추출물의 인간 각질형성세포에서 과산화수소수에 의한 산화적 스트레스 완화 효과를 확인한 것이다.
- 도 11은 표고버섯 추출물의 농도에 따른 쥐(murine) 대식세포의 생존율을 분석한 것이다.
- 도 12는 1% 탈지우유 아가로스 플레이트 상에서 표고버섯 추출물 유래 조효소액의 단백질분해활성을 확인한 사진이다.
- 도 13은 표고버섯 조효소액의 혈전용해활성을 확인한 도이다.
- 도 14는 SDS-PAGE에 의한 표고버섯으로부터 추출한 단백질의 분자량을 분석한 도이다.
- 도 15는 표고버섯 조효소액의 피브린 자이모그래피에 의한 혈전용해활성을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 표고버섯의 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 유산균 발효물의 추출물을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 "표고버섯(*Lentinula edodes*)"은 담자균류 주름버섯목 느타리과에 속하는 버섯으로, 참나무류, 밤나무, 서어나무와 같은 활엽수의 마른나무에 자생하는 것으로 알려져 있다. 상기 표고버섯은 통상적으로 입수할 수 있는 방법에 의해 얻은 것일 수 있고, 예를 들어 시장에서 판매하는 것을 구입한 것일 수 있다. 상기 표고버섯은 생 표고버섯 또는 건표고버섯일 수 있다. 생표고버섯은 평균 수분함량이 65~75%이므로 추가로 가수하지 않고 사용할 수 있으나, 건표고버섯은 추가로 가수가 필요할 수 있다. 상기 표고버섯은 멸균된 표고버섯을 사용할 수 있으며, 멸균 방법은 당해 기술분야에서 통상적인 방법으로 수행할 수 있다.
- [0027] 표고버섯은 자실체 또는 균사체일 수 있으나, 바람직하게는 자실체를 사용할 수 있다.
- [0028] 표고버섯은 분말화된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 흑국균(*Aspergillus niger*)은 누룩곰팡이의 일종으로, 통상 주정제조에 사용된 균으로서 식품, 토양, 바다 등에서 분리한 것일 수 있다.
- [0030] 유산균은 유산균으로서 공지된 모든 미생물이 포함될 수 있으며, 소장 유산균뿐만 아니라 대장 유산균도 포함할 수 있다. 특히, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 에시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 스트렙토코쿠스 더모필루스(*Streptococcus thermophilus*) 및 스트렙토코쿠스 피시움(*Streptococcus pythium*)의 유산균 중에서 선택된 하나 또는 이들의 혼합 균주를 사용할 수 있다. 바람직하게는 상기 유산균으로는 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)가 사용될 수 있다.
- [0031] 발효는 표고버섯이 충분히 발효되어 활성 효능을 극대화 할 수 있도록 온도, 시간을 적절히 선택할 수 있다. 예

를 들어, 상기 발효는 30 내지 45℃에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 35 내지 40℃에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 발효는 24시간 내지 96시간 수행될 수 있다. 구체적으로 상층액의 투명도가 높고, 상층 표면에 검정포자가 함유된 부유물이 형성될 때까지 수행될 수 있다.

[0032] 추출물은 당 분야에 공지된 방식으로 추출된 것일 수 있고, 예를 들면, 열수 추출물, 냉침 추출물, 환류 추출물, 용매 추출물, 수증기증류 추출물, 초음파 추출물일 수 있으나, 발효 표고버섯 내 유효 성분을 적정량 포함하여 항산화, 미백, 항염, 항균 및 항혈전 효능을 발휘하도록 할 수 있다면 특별히 제한되지 않는다.

[0033] 구체적으로 에탄올 추출물일 수 있고, 상기 에탄올은 60 내지 80부피%의 에탄올일 수 있고, 바람직하게는 65 내지 75부피%일 수 있다.

[0034] 또한, 상기 에탄올은 발효물의 건조 중량의 5 내지 20배 첨가될 수 있고, 바람직하게는 8 내지 15배 첨가될 수 있다.

[0035] 필요에 따라 상기 추출물을 여과하고 회전 진공 증발기(rotatory vacuum evaporator)로 감압농축할 수 있다.

[0036] 상기 추출물은 조성물 총 중량의 0.1 내지 3 중량% 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 화장료 조성물은 항산화, 미백, 항염 또는 항균용일 수 있다.

[0038] '항산화'란 활성산소를 없애주는 작용으로 대표적인 활성산소의 증가요인은 스트레스, 자외선, 방사선 등이 있다. 항산화 작용을 도와주는 대표적인 성분은 베타카로틴, 안토시아닌, 폴리페놀, 코엔자임 등이 있으며, 건과류, 과일류, 채소 등에 많이 포함되어 있다. 항산화 기능의 측정방법은 총 폴리페놀 함량이나 DPPH radical 소거 활성을 통하여 측정될 수 있으나 ABTS radical을 이용하거나 환원력 측정, 금속이온 제거능 측정, 총 카로테노이드 화합물의 함량 측정, 비타민 C의 함량 측정법이 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0039] '미백'이란 멜라닌의 합성을 저해하여 피부 침착을 억제하거나 방지하는 모든 작용을 의미할 수 있다.

[0040] '항염'이란 "염증 억제 또는 개선"과 혼용될 수 있으며, 면역 반응이 완화되어 NO 생성이 억제되는 모든 작용을 의미할 수 있다.

[0041] '항균'이란 미생물, 예컨대 피부질환 관련 세균의 생장을 억제하는 효능을 의미할 수 있다.

[0042] 항균 활성은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 아밀로리퀴페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 프로피오니 박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*), 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 중 어느 하나 이상에 대한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 피부 상재균과 피부오염(질환)을 유발할 가능성이 있는 미생물을 포함할 수 있다.

[0043] 화장료 조성물은 스킨, 로션, 토너제, 미용비누, 바디워시, 세럼, 클렌징로션, 에센스, 영양크림, 팩, 마사지크림 등으로 제형화 될 수 있고, 그 외 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 아이크림, 아이에센스, 클렌징폼, 클레징 워터, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 샴푸 또는 린스 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 화장료 조성물로 사용시, 피부 외용제 또는 화장료의 제형에 맞게 물질을 더 첨가할 수 있다. 예를 들어, 이에 한정되는 것은 아니나 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있고, 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있으며, 특히, 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 또한 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되는데, 바람직하게는 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으며, 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸

리튬 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0046] 본 발명은 표고버섯의 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 유산균 발효물의 추출물을 포함하는 향산화, 미백, 항염, 항균 또는 항혈전용 약학 조성물을 제공한다.
- [0047] 항혈전은 혈관 투과성 및 혈전 용해를 증가시키는 모든 작용을 의미할 수 있다.
- [0048] 상기 추출물을 포함하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 상기 추출물을 함유하는 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로즈, 수크로스, 텍스트린, 말토덱스트린, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면 활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며 이에 제한되지는 않으나, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [0051] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약학적 조성물에서 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg당 1 내지 6000 mg, 바람직하게는 60 내지 600 mg을 1회 또는 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0054] 상기 표고버섯 발효물, 이의 추출물 및 그 효능에 관련된 구체적인 설명은 상술한 바와 같다.
- [0056] 본 발명은 표고버섯의 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 유산균 발효물의 추출물을 포함하는 향산화, 미백, 항염, 항균 또는 항혈전용 건강기능식품을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 건강기능식품이라 함은, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0059] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정

이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0060] 식품 첨가물 공전에 수제된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 상기 추출물을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0062] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 상기 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 상기 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0063] 환 형태의 건강기능식품은 상기 추출물과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0064] 과립 형태의 건강기능식품은 상기 추출물과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0065] 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0066] 건강기능식품은 영양제의 용도로 경구 적용될 수 있으며, 적용 형태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면 경구 투여되는 경우, 하루 섭취량은 5000mg 이하인 것이 바람직하고, 하루 섭취량이 2000mg 이하인 것이 보다 바람직하며, 하루 섭취량이 500 내지 1500mg, 또는 650mg인 것이 가장 바람직하다. 캡슐제 또는 정제로 제제화하는 경우, 1일 1회 1정을 물과 함께 투여할 수 있다.

[0067] 상기 표고버섯 발효물, 이의 추출물 및 그 효능에 관련된 구체적인 설명은 상술한 바와 같다.

[0069] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0071] 1. 표고버섯 자실체의 미세구조 분석을 통한 화장료 소재로서 품질 검증

[0072] 1-1. 관찰용 시료의 준비

[0073] 관찰할 시료는 장흥산 표고버섯을 부위별(균모(갓; pileus)의 표면조직, 주름살(lamellae) 조직, 대(stipe) 조직)로 1×1×0.5cm 크기로 가능한 한 작게 절단하여 신속히 고정액에 침지시켰다.

[0075] 1-2. 시료의 고정(fixation)

[0076] 세포의 효소작용에 의한 자기분해(autolysis)를 방지하고 세포성분을 응고, 경화시킬 뿐만 아니라 조직 내의 단백질 및 지질과 결합하여 조직을 제자리에 고정시킴으로써 살아있는 상태의 세포의 구조를 잘 보존하고, 변화를 최소화하기 위하여 전 고정과 후 고정 단계로 시료를 처리하였다.

[0077] 전 고정으로 2.5% 글루타르알데하이드(0.1M phosphate buffer solution)에서 2시간 동안 냉장 온도에서 고정 후 완충액으로 10-20분 간격으로 2회 흔들어 섞으면서 3회 수세하였다.

[0078] 후 고정으로 용기 내에서 1g OsO₄ 애플을 넣고 깨뜨린 후 증류수 50ml를 넣어 녹여서 2% 스탁 용액을 제조하여 냉장 보관하였다. 사용 시 같은 양의 2% OsO₄ 용액과 완충액을 섞어서 최종 0.05M 인산염 버퍼의 1% OsO₄ 용액으로 제조하여 1-2시간 동안 냉장 온도에서 고정 후 역시 완충액으로 10-20분 간격으로 3회 수세하였다.

[0080] 1-3. 후처리 과정

[0081] 탈수(dehydration), 임계점 건조(CPD, Critical Point Drying), 금박 코팅(Au coating)을 순차적으로 수행한 후 투과전자현미경(SEM; Jeol, JSM-6300)으로 관찰하였다.

[0082] 관찰 결과는 도 1 내지 도 3에 나타내었다. 도 1은 갓(cap)의 주름살(gill)의 미세구조를 이미지

영상장치(40배) 및 투과전자현미경으로 관찰한 것이고, 도 2는 갓(cap) 표면 부위의 미세구조를 이미지 영상장치(40배, 80배) 및 투과전자현미경으로 관찰한 것이며, 도 3은 줄기(stem) 표면 부위의 미세구조를 이미지 영상장치(40배, 80배) 및 투과전자현미경으로 관찰한 것이다.

2. 표고버섯 추출물의 효능 검증

2-1. 표고버섯 추출물의 제조

본 실험에서 사용된 표고버섯(*Lentinus edodes*)은 전남 장흥군에서 재배된 것이며, 외관적으로 최적의 품질로 판단된 자실체를 사용하였다. 표고버섯을 잘 씻은 후 2mm 두께로 세절하여 -50℃에서 48시간 동안 동결건조하여 마쇄하고 100 mesh 이하의 분말로 제조하여 냉장 보관하였다.

상기 냉장보관한 분말을 각 10, 20, 30%로 희석하여 표고버섯 분말액을 제조하고, 흑국균(*Aspergillus niger*) 및 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*) 배양액을 각각 0.5%씩 첨가한 후, 37℃에서 24, 48, 72, 96시간 동안 진탕배양(150~200rpm) 하였다.

도 4 내지 도 5는 각 표고버섯 분말액 농도 및 시간에 따른 발효액의 양상을 나타낸 것이다.

24시간 배양 결과(도 4A)는 배양 후 시간이 지남에 따라 하층에 침전물이 발생하고 상층액은 불투명한 양상을 보였다. 48시간 배양 결과(도 4B)는 하층의 침전물 양상에는 유의미한 변화가 없었으나 상층액의 색상에 약간의 변화가 나타났으며, 침전물의 색상이 점차 연갈색으로 변하였다. 72시간 배양 결과(도 5A)는 모든 발효액의 상층액의 색상이 전반적으로 황색을 띄고, 상층액의 투명도가 높아졌으며 특히, 30% 발효액이 매우 투명한 양상을 보였다. 상층 표면에 백색의 부유물이 형성되고, 침전물의 색상이 황백색으로 변하였다. 96시간 배양 결과(도 5B)는 모든 발효액의 상층액의 색상이 전반적으로 황갈색을 띄고, 상층액의 투명도가 매우 높아졌으며 특히, 30% 발효액의 투명도가 가장 높았다. 침전물의 색상은 거의 백색으로 변하였고, 10% 발효액의 상층 표면에 검정 포자가 함유된 부유물이 형성되었고, 20%, 30% 발효액의 상층 표면에 백색포자가 함유된 부유물이 형성되었으며, 모든 발효액의 상층 유리면에 백색띠가 부착되어 있었다.

상기의 발효과정에서 미생물이 가장 활발하게 작용한 30% 발효액을 최종적으로 동결건조 한 후, 70%의 주정알콜을 추출용매로 사용하였으며, 발효액 건조 중량의 10배의 70% 주정알콜을 첨가하여 추출을 진행하였다. 추출 과정에서 열에 민감한 유효 성분의 증발을 방지하기 위하여 상부에 환류 냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크로 구성된 멘틀을 사용하였다. 70℃에서 5시간 용출하여 모아진 추출액은 여과지(Whatman filter paper No 2)로 여과한 다음 회전식 진공 증발기(rotatory vacuum evaporator)로 감압농축한 후 동결건조하고, 수분을 제거한 후 냉동 보관하면서 효능 분석을 위한 시료로 사용하였다.

2-2. 항산화 활성 분석

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

추출물 0.1g에 메탄올 10ml를 가하여 70℃에서 30분 동안 추출한 후 10mg/ml로 만들어서 사용하였다. 검액 50μl에 증류수 650μl를 넣은 후 Folin-Denis 시약을 50μl 가하여 3분 동안 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 후 10% Na₂CO₃ 포화용액을 100μl를 첨가하고, 최종 볼륨을 1ml로 맞추기 위해 증류수 150μl를 넣어 잘 혼합시켰다. 37℃ 수조(water bath)에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis 분광광도계(spectrophotometer)를 사용하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 메탄올 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 탄닌산(tannic acid, Sigma Co., USA)의 농도를 0~500 μg/ml 이 되도록 하고 이로부터 총 페놀함량을 구하였다.

그 결과 표고버섯 추출물에 함유된 총 함량은 82.42 ± 0.021 μg/ml로 상당히 높았다.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Davis 변법에 따라 추출물 0.1g을 메탄올 10ml를 가하여 70℃에서 30분 동안 추출한 후 1mg/ml로 만들어 사용하였다. 검액 100 μl에 1ml의 다이에틸렌 글라이콜(diethylene glycol)을 첨가하고 다시 1N-NaOH 100μl를 넣어 잘 혼합시켜 37℃ 수조에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis 분광광도계를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 메탄올 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 나린긴(naringin, Sigma Co., USA)의 농도를 0~400μg/ml 이 되도록 하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

그 결과 표고버섯 추출물의 총 플라보노이드 농도는 16.5±0.94 μg/ml로 높게 나타났다.

[0101] (3) DPPH 라디칼 소거능

[0102] 전자공여능(EDA)은 지질 과산화 반응의 연쇄반응에 관여하는 산화성 자유 라이칼에 전자를 제공하여 연쇄반응을 반응 초기나 반응 중간에 정지시키는 능력이다. DPPH법은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 보라색이 탈색되는 정도를 나타내는 것으로 항산화능을 나타내는 척도가 된다고 알려져 있다.

[0103] 1×10^{-4} M DPPH와 농도 별 추출물을 각각 100 μ l씩 취하여 혼합하여 30분간 암 상태에서 방치한 후 잔존 라디칼 농도를 ELISA Reader(Bio-RAD, USA)를 이용하여 517nm에서 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(Scavenging activity)으로 표시하며, RC_{50} 은 DPPH 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양(μ g)으로 나타내었으며 양성 대조군은 항산화 물질로 잘 알려진 BHT(butylated hydroxytoluene)와 Vitamin C(ascorbic acid)를 사용하였다.

[0104] 그 결과는 도 6에 나타내었으며, DPPH 라디칼 소거능에 대한 항산화 활성을 측정한 결과 최고 농도인 2mg/ml에서 약 25%의 소거능을 보였다.

[0106] (4) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성

[0107] Superoxide dismutase 유사활성 평가는 superoxide와 반응하여 갈변물질을 만드는 피로갈롤(pyrogallol) 자동 산화를 측정하는 Marklund 방법을 변형하여 측정하였다. 일정농도의 시료 0.2ml에 pH 8.5 로 보정한 tris-HCl 버퍼(50mM tris hydroxymethyl amino-methane+10mM EDTA, pH 8.5) 2.6ml와 7.2mM 피로갈롤 0.2ml를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응 시킨 후 1N HCl 0.1ml 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 피로갈롤의 양은 420nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 $1 - \{(\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100\}$ 으로 나타내었다.

[0108] 그 결과 표 1과 같다. 발효하지 않은 표고버섯 추출물의 경우, 1000 μ g/ml 농도에서 SOD-유사 활성이 측정이 되지 않았고, 100 μ g/ml에서 3.14% 활성을 나타냈으며 500 μ g/ml 농도에서 2.94%의 활성을 나타냈다. 한편, 표고버섯 분말이 30% 함유된 72시간 발효액의 경우, 비발효 표고버섯에 비하여 탁월하게 높은 SOD 활성을 보였으며, 100 μ g/ml 일때 3.99%, 500 μ g/ml 일때 4.49%, 1000 μ g/ml 일때 5.39%의 활성을 나타내었다. 또한, 양성 대조군인 Vit C 보다 높은 활성을 보이므로써 식약처에서 이미 인정된 SOD 효소함유 항산화 화장품 소재로서의 활용 가능성을 보였다.

표 1

시료	SOD 유사활성 (%)		
	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
비발효 표고버섯 추출물	3.14 $\pm$ 4.50	2.94 $\pm$ 5.09	ND
30%, 72시간 발효한 표고버섯 추출물	3.99 $\pm$ 4.50	4.49 $\pm$ 2.50	5.39 $\pm$ 2.56
Ascorbic acid	4.07 $\pm$ 2.57	3.09 $\pm$ 1.57	3.54 $\pm$ 1.40

[0112] (5) Catalase(CAT) 활성

[0113] 72시간 발효한 30% 표고버섯 발효추출물을 동결건조하고 추출 버퍼(50 mM phosphate buffer, pH 7.0; 1% Triton X-100; 1% PVP-40)에 1:4의 비율로 혼합한 후 균질화시 12,000 rpm 에서 20분 동안 원심분리 한 후 상층액을 취하여 항산화 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 사용하여 Bradford(1976) 방법에 따라 측정하였다.

[0114] 50 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 10 mM H₂O₂ 와 추출물을 가한 후 240 nm에서 2분 간의 흡광도 변화를 관찰하였다. 이때 1분 동안에 1 μ M의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

[0115] 그 결과 표고버섯 발효물로부터 분리된 조효소 추출물은 11.28 $\pm$ 0.25 U/mg protein의 CAT 활성을 나타내었다.

[0117] (6) Ascorbate peroxidase(APX) 활성

[0118] 72시간 발효한 30% 표고버섯 발효추출물을 동결건조하고 추출 버퍼(50 mM phosphate buffer, pH 7.0; 1%

Triton X-100; 1% PVP-40)에 1:4의 비율로 혼합한 후 균질화시키고 12,000 rpm 에서 20분 동안 원심분리 한 후 상층액을 취하여 항산화 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 사용하여 Bradford방법에 따라 측정하였다.

50mM potassium phosphate(pH 7.0), 0.5mM ascorbate, 0.1mM H₂O₂, 0.1 mM EDTA 에 추출물을 가하여 37℃에서 5분 간 반응시킨 후 290 nm에서 2분 간 흡광도의 변화를 측정하였다.

그 결과 표고버섯 발효물로부터 분리된 조효소 추출물의 APX 활성은 8.57±0.07U/mg protein으로 확인되었다.

2-3. 미백 활성 분석

(1) tyrosinase 저해효과 분석

0.175M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5mℓ에 10 mM L-DOPA 0.2mℓ 및 시료용액 0.1mℓ의 혼합액에 버섯 티로시나아제 (110 U/mℓ) 0.2mℓ를 첨가하여 37℃에서 2분 간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475nm파장에서 측정하였다. 티로시나아제 저해효율은 시료용액의 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[수학식 1]

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무 첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

본 실험에서는 티로시나아제 저해효과가 좋다고 알려진 알부틴과 표고버섯의 에탄올 추출물을 농도별로 티로시나아제 저해 효과를 살펴보았다.

그 결과는 표 2 및 도 7에 나타내었으며, 표고버섯의 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 티로시나아제 활성 억제율이 통계적으로 유의하게 증가하였다.

표 2

농도 (μg/ml)	티로시나아제 활성 억제(%)	
	알부틴	Lentinula edodes
25	37.75	3.02
50	44.00	11.00
100	51.20	37.43
200	61.21	47.91
400	62.46	65.75
800	76.69	71.22

(2) melanoma cell (B16F10) 에서의 멜라닌 합성 억제

B16F10 melanoma cell은 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 10% 소태아혈청(FBS, Gibco)과 1% Antibiotic-Antimycotic을 첨가하여 MEM(Modified Eagles's Medium, Gibco, U.S.A.)로 세포배양하였다. 이를 37℃, 5% CO₂의 습윤화된 배양기에서 배양하여 세포가 배양 접시의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 세척하여 Trypsin-EDTA (Gibco/BRL)을 처리하여 2~3일마다 계대배양하였다.

이후, 96 well plate에 3×10⁴ Cells 100μℓ로 분주하고 24시간 후 부착된 것을 확인한 후 시료를 첨가하여 48시간 후 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 세포 배양이 끝난 후 MTT을 0.5mg/ml가 되도록 넣은 후 37℃에 4시간 동안 반응시킨 후 DMSO로 용해하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 2mg/ml의 농도에서 약 33%의 저해율을 보였고 그 이하의 농도에서는 약 80% 이상의 세포생존율을 보였다(도 8).

(3) 멜라닌 합성 억제능

세포의 생존율이 80% 이상으로 나타난 유효농도 범위 (2.0, 1.5, 1.0, 0.5 mg/ml) 에서 표고버섯 추출물에 의한 세포 내의 멜라닌 생합성 억제 효과를 분석하였으며 하단의 식에 의해 산출하였다.

[0139] [수학적식 2]

$$\text{멜라닌 생성 저해율(\%)} = \frac{\text{대조군} - \text{실험군}}{\text{대조군}} \times 100$$

[0140]

[0141] 그 결과는 표 3과 같다. 표고버섯 추출물의 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성 저해율이 통계적으로 유의하게 증가하였다.

표 3

[0143]

시료	농도(mg/ml)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
<i>Lentinula edodes</i> 추출물	10.2 %	15.4 %	17.8 %	20.1 %
Arbutin	13.5 %	20.3 %	26.7 %	30.2 %

[0145]

2-4. 피부의 산화적 스트레스에 대한 보호 효과 검증

[0146]

(1) 세포주 및 세포 배양

[0147]

본 실험에 사용된 세포주는 인간유래 피부 각질형성세포(keratinocyte)인 HaCaT 세포주로 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에 10% 소태아혈청(FBS)과 항생제 (Antibiotic-antimycotic)를 첨가하여 생육배지로 사용하였고, 37℃, 5% CO₂의 습윤화된 배양기에 적응시켜 배양하였다. 세포는 2~3일마다 배양 접시의 80% 정도까지 자랐을 때 계대배양하였다.

[0149]

(2) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

[0150]

96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 세포를 1×10^4 cell/well의 농도로 분주 후 24시간 배양하여 부착화 및 안정화시켰다. 24시간의 배양이 끝난 후 추출물을 최종 농도가 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 각 well에 MTT용액 (5 mg/ml in PBS) 10 μl 씩을 가해주고, 다시 37℃, 5% CO₂의 습윤 배양기에서 4시간 동안 반응하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 DMSO 150 μl 로 잘 녹여서 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0152]

(3) 산화적 스트레스 요인에 의한 세포 손상 보호 효과 측정

[0153]

96 well plate에 HaCaT 세포를 well당 1×10^5 cell/ well로 분주하고, 24시간을 배양하여 부착 및 안정화시켰다. 24시간의 배양이 끝난 후, 추출물을 4시간 동안 전 처리하여 배양액을 씻어낸 후, 산화적 스트레스를 유발하여 세포 생존율을 감소시키는 것으로 알려져 있는 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂) 500 μM 를 투여하여 24시간 동안 반응시킨 다음 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 광도를 측정하였다.

[0155]

(4) 실험결과

[0156]

표고버섯 추출물이 직접적으로 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 인간 유래 HaCaT세포에 10, 20, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 표고버섯을 투여하고 24시간 후, 세포 생존율을 측정된 결과, 각각 102.49%, 96.45%, 84.02%, 82.48%, 68.79%, 53.59%의 생존율이 확인 되었다(도 9)

[0157]

산화적 스트레스를 유발하여 세포 생존율을 감소시키는 것으로 알려져 있는 과산화수소(hydrogen peroxide H₂O₂)에 의해 유발된 세포 손상으로부터 표고버섯 추출물이 HaCaT 세포를 보호할 수 있는 살펴보았다. 실험 결과 과산화수소 500 μM 처리군의 세포 생존율은 41.05 $\pm$ 0.12%를 보였으며, 표고버섯 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 전처리 군에서는 각각 49.54 $\pm$ 0.38%, 63.22 $\pm$ 0.16%의 생존율이 확인 되었다. 표고버섯 추출물은 과산화수소 처리 군에 비해서 유의한 수준으로 생존율 감소를 억제하는 것으로 나타났다(도 10).

[0159]

2-5. 항염 활성 분석

[0160] (1) 세포주 및 세포 배양

[0161] 본 실험에 사용된 세포주는 Murine macrophage RAW264.7 세포주로 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에 10% 소태아혈청(FBS)과 항생제 (Antibiotic-antimycotic)를 첨가하여 생육배지로 사용하였고, 37℃, 5% CO₂의 습윤화된 배양기에 적응시켜 배양하였다. 세포는 2~3일마다 배양 배지의 80% 정도까지 자랐을 때 계대배양하여 세포생존율이 80% 이상인 추출물의 농도를 결정한 후, 염증 인자인 산화질소(NO) 생성에 대한 억제 효과를 분석하였다.

[0163] (2) 세포 생존율 분석

[0164] Murine macrophage RAW264.7 세포에 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μ g/ml의 농도로 표고버섯 추출물을 투여하고 24시간 후, 세포 생존율을 측정한 결과 각각 101.1 $\pm$ 3.0%, 102.7 $\pm$ 4.0%, 100.9 $\pm$ 1.0%, 100.3 $\pm$ 2.9%, 73.6 $\pm$ 4.2%, 18.4 $\pm$ 2.8%의 생존율이 확인 되었으며, 추출물의 농도 12.5~100 μ g/ml의 범위에서 항염 활성 분석이 가능한 것으로 나타났다(도 11).

[0166] (3) LPS 처리 및 농도별 NO 생성률 분석

[0167] LPS 처리를 통한 염증세포를 유도한 후, 세포생존율이 80% 이상인 추출물의 농도 (12.5, 25, 50, 100 μ g/ml) 로 처리하여 NO 생성률을 분석한 결과, 추출물의 농도가 증가할수록 항염 활성도가 비례적으로 높아짐을 알 수 있었다(표 4).

표 4

시료	농도(μ g/ml)			
	12.5	25.0	50.0	100
	NO 생성율(%)			
대조군 (LPS 미처리)	0			
대조군 (LPS 처리)	100			
LPS 처리 + 표고버섯 추출물	90	85	82	75

[0171] 2-6. 단백분해활성 및 혈전용해 활성분석

[0172] (1) 조효소액 추출

[0173] 표고버섯 자실체 절편 100g을 멸균수로 균질화하여 성분이 잘 추출되도록 하기 위해 15분 동안 초음파 처리한 후 하루 동안 냉장 보관하였다. 6,000 rpm에서 30분 동안 4℃에서 원심분리한 후 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70℃로 처리된 100% 에탄올을 천천히 가하며 최종적으로 에탄올 농도를 50%로 적정하여 1시간 동안 4℃에서 교반하여 6,000 rpm에서 4℃에서 30분동안 원심분리 후 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70℃로 처리된 동량의 100% 에탄올을 천천히 가하며 최종적으로 에탄올 농도를 75%로 적정하여 1시간 동안 4℃에서 교반하여 12,000 rpm에서 40분동안 0℃에서 원심분리 후 형성된 침전물을 20 mM Tris-HCl pH 7.4 완충용액에 현탁하고 불순물을 제거하기 위하여 10,000 rpm에서 10분 간 원심분리하여 상층액을 회수 후 시료로 사용하였다.

[0175] (2)단백질 분해활성

[0176] 2% agarose용액 5ml에 동량의 0.6% 탈지우유 용액 5ml를 첨가하여 혼합한 후 유리판에 부어 1시간 동안 실온에서 고화시켜 탈지우유 아가로스 플레이트를 제조하였다. 단백질 분해 작용을 검색하기 위하여 탈지우유 아가로스 플레이트에 구멍을 내어 조효소액 추출물 20 μ l를 침적한 후 37℃에서 15시간 반응시키고 난 다음 형성된 투명환의 크기로 활성의 정도를 비교하였다. 양성 대조군으로는 트립신을 사용하였고 음성 대조군은 20 mM Tris-HCl(pH 7.4)완충용액을 사용하였다.

[0177] 그 결과는 도 12에 나타내었으며, 1% 탈지우유를 함유한 탈지우유 아가로스 플레이트에서 단백질 분해활성을 측정한 결과, 표고버섯 조효소액 추출물의 경우, 11mm의 투명환을 관찰할 수 있으며, 대조군인 트립신의 직경과 유사한 강한 단백질 분해 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0179] (3) 피브리노 용해 활성

[0180] 피브리노겐의 농도가 1%가 되도록 20 mM Tris-HCl(pH 7.4)완충용액에 용해시킨 용액 2ml에 트롬빈(100 NIH/unit) 용액을 첨가하여 잘 혼합한 다음 2% 아가로스 용액을 첨가하여 다시 잘 혼합하고 유리판에 부어 상온

에 1시간 방치하여 피브린 아가로스 플레이트를 제조하였다. 그 후, 구멍을 내어 20 μ l의 조효소액 추출물을 침적한 후 37℃에서 15시간 반응 시키고 난 다음 형성된 투명환의 크기로 활성의 정도를 비교하였다. 양성 대조군은 정제된 혈전용해효소인 plasmin (1.0U/ml, Calbiochem Co.)을 사용하였고 음성대조군은 20 mM Tris-HCl(pH 7.4)완충용액을 사용하였으며, 다음과 같은 방법으로 혈전용해활성을 산출하였다.

[수학식 3]

$$\text{Fibrin 용해활성(\%)} = \frac{\text{시료의 용해영역}}{\text{Plasmin의 용해영역}} \times 100$$

그 결과, 단백질 분해활성과 비례적인 경향을 보였으며, 양성 대조군의 80.6%로 비교적 강한 혈전용해 활성을 나타내었다(도 13 및 표 5).

표 5

시료	혈전용해 활성(%)*
20mM Tris-HCl pH7.0 (NC)	-
Plasmin 1.0 unit (PC)	100
표고버섯 조효소액 추출물	80.6

(4) SDS-PAGE에 의한 혈전용해효소의 분자량 분석

12% separating gel 과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE에 각 단백질 시료와 5× Sample buffer (60mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 혼합하여 100℃에서 10분 간 증탕하여 전기영동을 수행하였으며 Color protein marker를 사용하였다. 전기영동된 겔은 쿠마시 블루(Coomassie blue R-250)로 염색하였다.

그 결과는 도 14에 나타내었으며, A는 color protein marker, B는 표고버섯 조효소액 추출물의 SDS-PAGE 수행 결과이다.

(5) Fibrin- zymography에 의한 혈전용해효소의 활성 분석

0.1% 피브리노겐과 100 μ l의 트롬빈 용액(100NIH U/ml)을 함유한 12% 폴리아크릴아마이드 겔에 20 μ g의 조효소액 추출물을 sample buffer(5X)와 혼합하여 loading한 다음 12mA로 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔은 2.5% Triton X-100을 함유한 20mM Tris-HCl(pH7.4)에 상온에서 30분간 침적하여 단백질을 활성화시킨 후 Triton X-100을 제거하기 위하여 멸균수로 15분씩 2회 세척을 하였다. 다시 효소반응 완충용액에 넣어 37℃에서 12~15시간 반응시킨 다음 염색하고 탈색하여 확인하였다.

도 15를 참조하면, 표고버섯 추출물 유래 단백질이 활성을 나타냄을 확인할 수 있으며, 표고버섯 조효소액 추출물의 혈전용해효소는 피브린 응집에 직접적으로 작용하는 혈전용해효소임을 알 수 있었다.

2-7. 항균 활성 분석

(1) 사용 균주

표고버섯 추출물을 화장품 소재로 사용할 경우, 피부상재균과 오염가능한 미생물에 대한 항균력을 분석하였다. 항균력 검색 실험에 사용한 공시 균주는 Gram 양성균 2종과 Gram 음성균 2종을 사용하였다. 균주의 종류와 배지 및 배양조건은 표 6과 같다.

표 6

균주		배양 조건	
		Media	Temp.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC13565	Gram(+)	TSB	37℃
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KCCM12090		TSB	37℃
<i>Escherichia coli</i> ATCC43895	Gram(-)	LB	26℃
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM11862		LB	30℃
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919	피부상재균	BHI	37℃

<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 31874
<i>Candida albicans</i> KCCM12553

TSB	37℃
YM	24℃

(2) Paper disc를 이용한 항균력 테스트

순수 분리된 각 균주의 단일집락을 취해 10ml의 균 생육 액체배지에 접종하여 각각 균주의 생육 적온에서 18~24 시간씩 3회 배양한 후 항균활성 시험균주로 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각 균주의 15%의 한천이 첨가된 생육배지를 멸균하여 페트리접시에 15ml씩 분주하여 기층용 배지를 응고시키고, 항균성 시험용 평판배지 조제는 각각의 시험균 농도를 650nm에서 광학밀도(optical density, OD) 값이 0.4(10^6 CFU/ml)가 되게 한 후 0.7% 한천이 첨가된 중층용 배지에 무균적으로 가하여 잘 혼합한 다음 기층용 배지 위에 분주한 다음 고르게 응고시켜 2중의 균 접종 중층배지를 만들었다. 각각의 표고버섯 에탄올 추출물을 125, 250, 500, 1000 μ g/ml로 희석하여 멸균된 8mm paper disc를 넣고 용액을 30 μ l씩 disc에 흡수시킨 다음 37℃에서 12~24시간 동안 배양한 후 disc 주위의 clear zone을 관찰하였다.

표고버섯 에탄올 추출물은 표 7과 같이 저농도 시료에서는 항균 활성이 나타나지 않았고, 추출물의 농도가 500, 1000 μ g/ml일 때, 전반적으로 항균활성을 나타내었다.

표 7

균주	억제 부위(mm)			
	125 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	3mm
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-	-	10mm
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	2mm
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	2mm	3mm
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	2mm	3mm
<i>Candida albicans</i>	-	-	1mm	1mm

3. 화장품 조성물의 제조

하기의 화장품 제형은 각 제형의 성분 및 함량에 따라 화장품 제조분야의 통상적인 방법에 따라 제조하였다.

제형예 1: 토너제

하기 표 8의 성분 및 함량에 따라 토너제를 제조하였다.

표 8

성분	함량(중량%)
표고버섯 유래 천연물	1.0
글리세린	3.0
부틸렌 글리콜	2.0
폴리옥시에틸렌(60) 경화 피마자유	0.5
폴리솔페비트80	0.5
에탄올	10.0
방부제	미량
향료	미량
정제수	잔량

제형예 2: 미용비누

물 330mL와 NaOH 175g을 혼합하여 완전히 용해시킨 후, 표고버섯 추출물 각 5g을 약 30분 동안 조금씩 첨가하면서 혼합하였다. 상기 혼합물을 그늘지고 바람이 잘 통하는 곳에서 건조시켰다.

제형예 3: 바디워시

[0219] 표고버섯 추출물 5g을 약 60℃가 되도록 가열한 후 천일염을 넣어 포화용액을 만들고 물을 증발시켰다. 상기 용액을 실온에서 냉각시킨 후 급속냉동시켜 동결건조하였다. 상기 동결건조된 고형제를 분말화하여 목욕제를 제조하였다.

[0221] 제형예 4: 클렌징 로션

[0222] 하기 표 9의 성분과 함량에 따라 클렌징 로션을 제조하였다.

표 9

성분	함량(중량%)
표고버섯 추출물	1.0
에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.02
파라옥시안식향산메칠	0.2
글리세린	4
소듐히아루로닉에씨드	2
프로필렌글리콜	3
카보머	5
세테아릴알코올	0.7
글리세릴스테아레이트	0.5
웨어버터	1
파라옥시안식향산프로필	0.1
마카다미아넛오일	1
세스퀴올레인산	0.5
글리세릴스테아레이트	1
모노올레인산폴리옥시에칠소르비탄	2
폴리데센	5
미네랄오일	20
디메치콘	5
스테아릴디메치콘	2
트리에탄올아민	0.05
향료	적량
색소	적량
정제수	잔량

[0226] 제형예 5: 스킨

[0227] 하기 표 10의 성분과 함량에 따라 스킨을 제조하였다.

표 10

성분	함량(중량%)
표고버섯 추출물	1.0
파라옥시안식향산메칠	0.2
에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.02
1,3-부틸렌글리콜	0.02
알란토인	3
소듐히아루로닉에씨드	5
카보머	0.1
세토스테아릴알코올	0.7
파라옥시안식향산프로필	0.1
소르비탄올리베이트	1.5
소이레스틴	0.2
디메치콘	0.2
세칠옥타노에이트	0.2
웨어버터	0.2
소듐폴리아크릴레이트	3
트리에탄올아민	0.1
이미다졸리디닐우레아	0.3

향료	적량
색소	적량
정제수	잔량

[0231] 제형예 6: 세럼

[0232] 하기 표 11의 성분과 함량에 따라 세럼을 제조하였다.

표 11

[0234]	성분	함량(중량%)
	표고버섯 추출물	1.0
	호호바	5
	블랙썬서미	2
	스윗아몬드	3
	이멀싱파잉왁스	1
	비타민E	1
	글리세린	2
	히아루론산	1
	마린 엘라스틴	1

[0236] 제형예 7: 로션

[0237] 하기 표 12의 성분과 함량에 따라 로션을 제조하였다.

표 12

[0239]	성분	함량(중량%)
	표고버섯 추출물	1.0
	파라옥시안식향산메칠	0.2
	에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.02
	1,3-부틸렌글리콜	0.02
	알란토인	3
	소듐히아루노닉에씨드	5
	카보머	0.1
	세토스테아릴알코올	0.7
	파라옥시안식향산프로필	0.1
	소르비탄올리베이트	1.5
	소이레스틴	0.2
	디메치콘	0.2
	세칠옥타노에이트	0.2
	웨어버터	0.2
	소듐폴리아크릴레이트	3
	트리에탄올아민	0.1
	이미다졸리디닐우레아	0.3
	향료	적량
	색소	적량
	정제수	잔량

[0241] 제형예 8: 에센스

[0242] 하기 표 13의 성분과 함량에 따라 에센스를 제조하였다.

표 13

[0244]	성분	함량(중량%)
	표고버섯 추출물	1.0
	알란토인	0.05

에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.02
트리에탄올아민	0.2
소듐히아루로닉에씨드	7
이미다졸리디닐우레아	0.15
소듐폴리아크릴레이트	0.4
카보머	0.2
에탄올	3
모노스테아린산폴리옥시에틸렌소르비탄	0.2
파라옥시안식향산메칠	0.2
향료	적량
색소	적량
정제수	잔량

[0246] 제형예 9: 영양크림

[0247] 하기 표 14의 성분과 함량에 따라 영양크림을 제조하였다.

표 14

[0249]

성분	함량(중량%)
표고버섯 추출물	1.0
에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.02
알란토인	0.1
글리세린	5
파라옥시안식향산메칠	0.2
소듐히아루로닉에씨드	6
카보머	0.1
세토스테아릴알코올	1.7
폴리데센	2
스쿠알란	2
파라옥시안식향산프로필	0.1
부틸렌글리콜디카프릴레이트	3
세틸옥타노이에이트	5
마이크로크리스탈린납	0.1
트리에칠펜탄디올	0.1
쉐어버터	0.2
소르비탄올리베이트	0.3
사이클로메치콘	0.3
스테아릴디메치콘	0.5
이미다졸리디닐우레아	0.15
향료	적량
색소	적량
정제수	잔량

[0251] 제형예 10: 팩

[0252] 하기 표 15의 성분과 함량에 따라 팩을 제조하였다.

표 15

[0254]

성분	함량(중량%)
표고버섯 추출물	1.0
에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.02
베타인	3
글리세릴폴리메타크릴레이트	2
알란토인	0.1
소듐히아루로닉에씨드	2
글리세린	3

디프로필렌글리콜	5
파라옥시안식향산메칠	0.2
폴리비닐알코올	10
모노올레인산폴리옥시에틸렌소르비탄	0.9
세스퀴올레인산	0.3
호호바에스테르	2
세테아릴알코올	1.5
페트로라툼	0.5
향료	적량
색소	적량
정제수	잔량

[0256] 제형예 11: 마사지크림

[0257] 하기 표 16의 성분과 함량에 따라 마사지크림을 제조하였다.

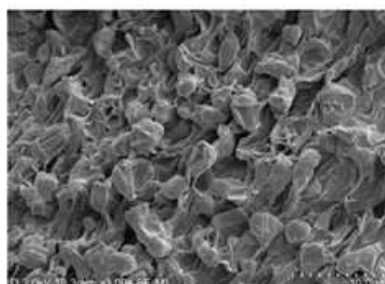
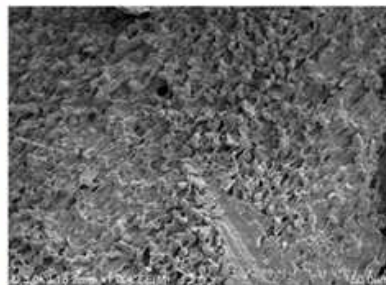
표 16

[0259]

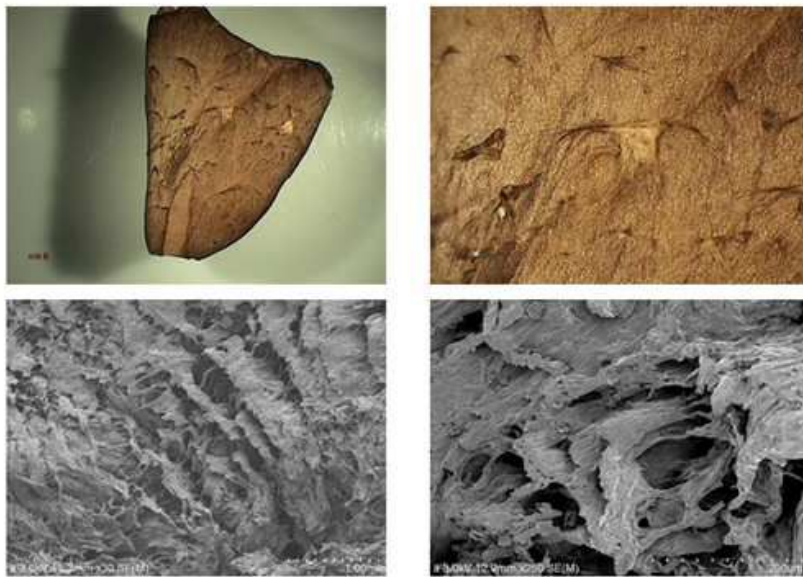
성분	함량(중량%)
표고버섯 추출물	1.0
글리세린	4.0
바셀린	3.5
트리에탄올 아민	0.5
유동 파라핀	24.5
스쿠알란	2.5
밀납	2.1
토코페릴아세테이트	0.1
카바폴	1.0
솔비탄세스퀴올레이트	3.1
향	미량
방부제	미량
정제수	잔량

도면

도면1



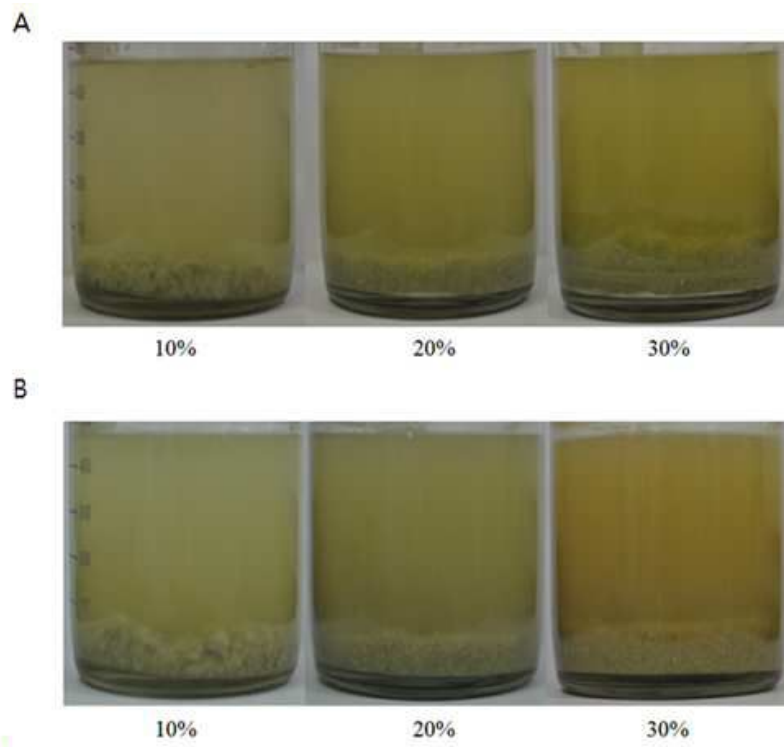
도면2



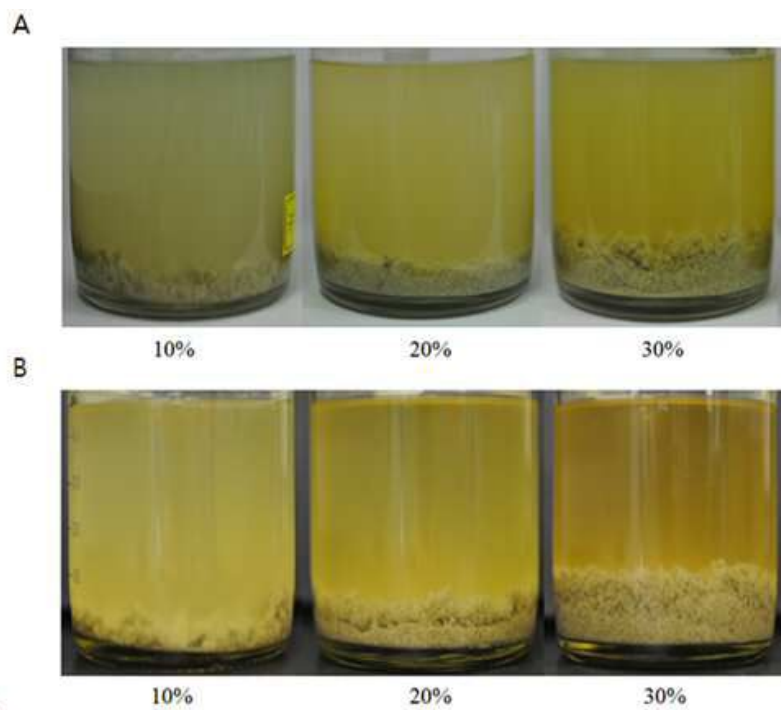
도면3



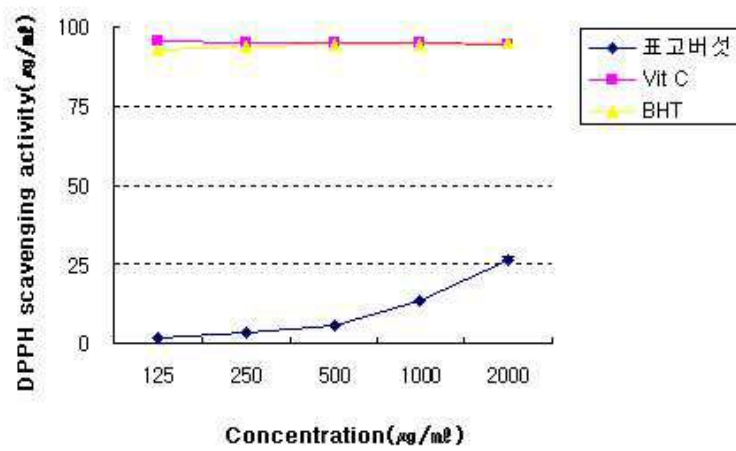
도면4



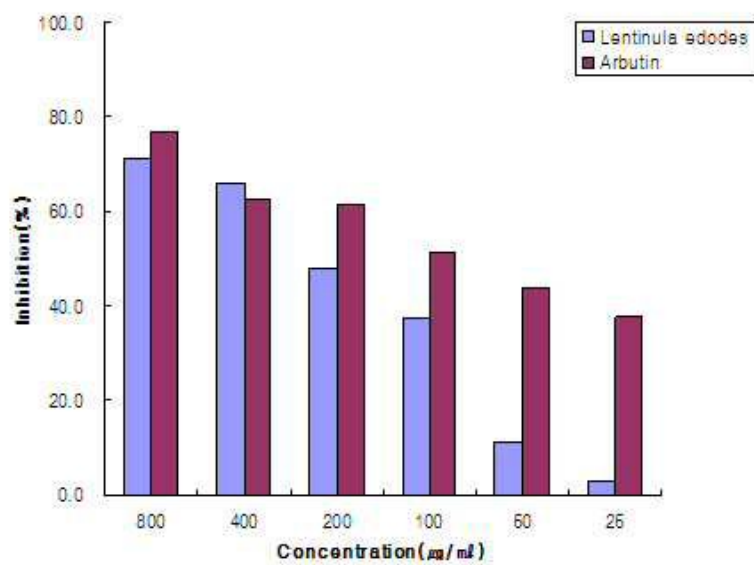
도면5



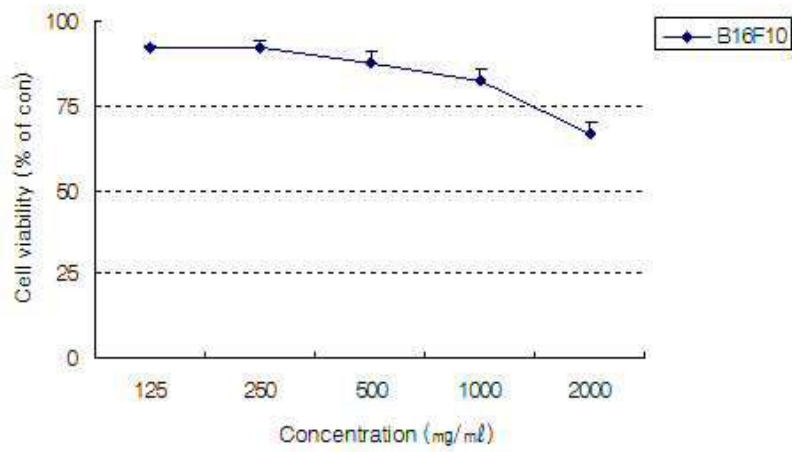
도면6



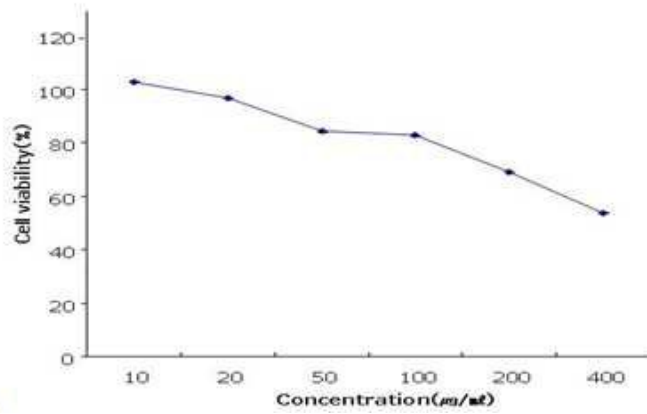
도면7



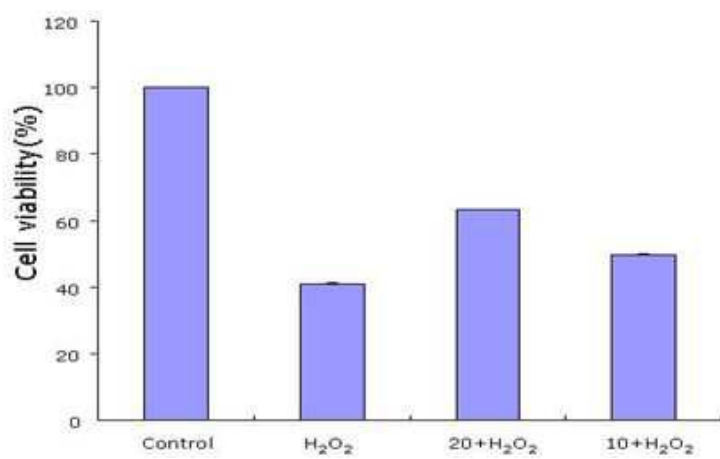
도면8



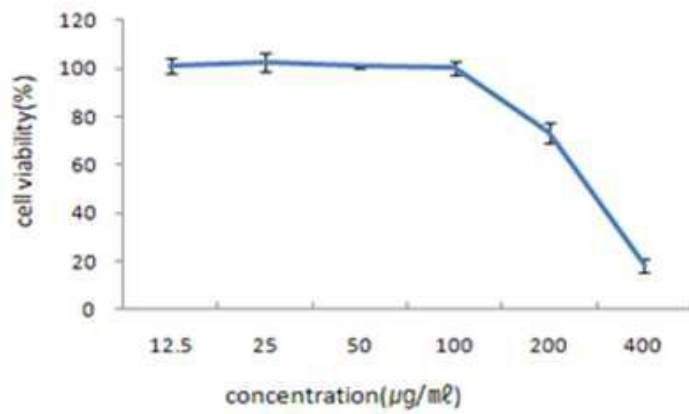
도면9



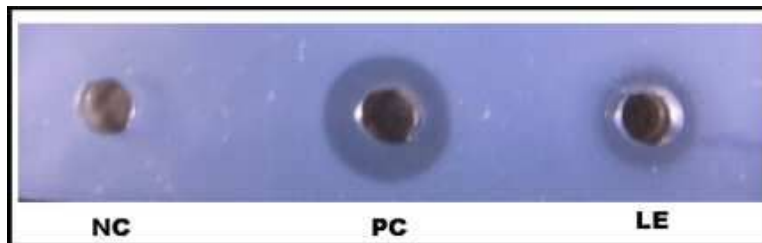
도면10



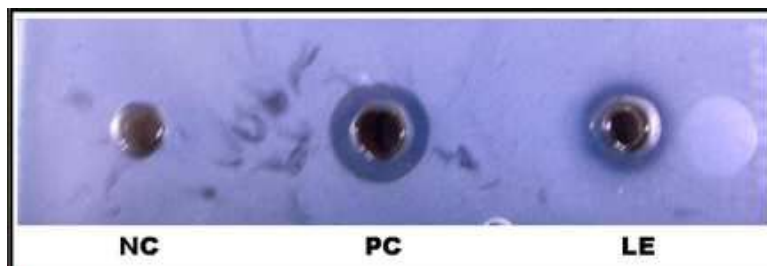
도면11



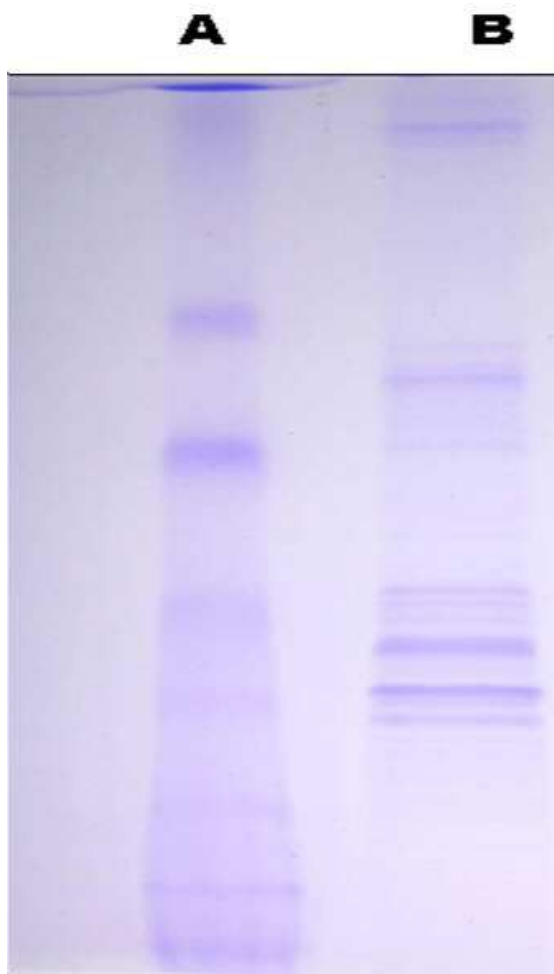
도면12



도면13



도면14



도면15

