(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월02일
(11) 등록번호 10-1995384
(24) 등록일자 2019년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/28 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0004538
(22) 출원일자 2018년01월12일
심사청구일자 2018년01월12일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080094456 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
육홍선
대전광역시 서구 둔산남로 127, 305동 307호 (둔산동, 목련아파트)
김경희
대전광역시 서구 청사서로 11, 105동 204호 (월평동, 무지개아파트)
(74) 대리인
최규환

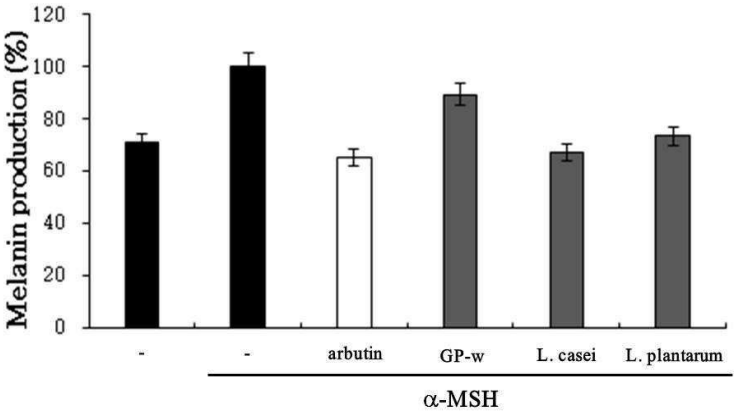
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 정영선

(54) 발명의 명칭 **명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 항산화용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 명월초 발효물은 명월초 물 추출물에 비해 증진된 항산화효과 및 미백효과를 나타내므로, 본 발명의 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 항산화용 조성물은 미백용 기능성 화장품, 멜라닌 색소 과다 침착 질환 및 항산화용 건강기능식품 또는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 36/28 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 17/005 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 또는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 이용하여 발효한 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 화장료 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 명월초 발효물은 항균활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 피부 미백 및 항산화용 화장료 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항균활성은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 균에 대한 항균활성인 것을 특징으로 하는 피부 미백 및 항산화용 화장료 조성물.

청구항 6

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 또는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 이용하여 발효한 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 또는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 이용하여 발효한 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 멜라닌 색소 과다 침착 질환은 주근깨, 노인성 반점, 간반, 기미, 갈색 또는 흑점, 일광색소반, 푸른흑피증(cyanic melasma), 약물 사용 후의 과다 색소 침착; 찰상, 화상 또는 피부염으로 인한 염증 후 과다 색소 침착; 및 임신성 갈색반(gravidic chloasma) 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대인은 자외선, 인스턴트 가공식품, 공해 등의 유해물질, 스트레스 등으로 인한 체내 과다한 산화물질의 발생으로 각종 질병의 위험에 노출되어 있다. 특히, 자외선에 의한 피부손상은 피부노화, 흑반 등을 일으켜, 미용상의 불편뿐만 아니라 심리적인 위축감을 가져와 사회생활에 있어 부정적인 영향을 주게 되며, 심하게는 피부암과 같은 질환에 이르는 문제를 야기하게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위해 적절한 자외선 차단제를 함유한 화장료의 사용 이외에도 자외선으로부터 생성되는 산화물질의 활성을 억제하여 피부의 손상을 억제하고, 세포 내 멜

라닌 생성을 차단하는 물질을 사용할 수 있으며, 최근에는 항산화 및 미백효과가 있는 신규 원료 및 제품 개발이 활발하게 진행되고 있다.

[0003] 자외선에 의해 일어나는 피부 현상 중 직접적인 영향으로 인한 화상 등의 피부손상 이외에도 자외선으로 인해 체내 생성되는 산화물질, 즉 활성산소에 의한 2차적인 현상들이 지속적으로 체내에서 이루어질 경우, 더 큰 문제를 발생시킬 수 있다. 피부 내 형성된 활성산소는 세포의 DNA 손상 및 이에 따른 면역세포의 손상, DNA 복제 및 회복 기능의 손상으로 인한 돌연변이 세포의 발생, 홍반 반응으로 인한 각질세포 변형을 일으키며, 결과적으로 피부 세포의 사멸과 광노화 진행을 발생시킨다. 또한, 색소 생성 세포를 자극하여 멜라닌 색소를 생성하여 색소 침착을 일으키는 원인이 되어, 자외선에 의해 발생된 활성산소에 의해 비정상적인 염증 물질이 케라티노사이트(Keratinocyte)에서 발현되고, 발현된 염증유발 물질은 멜라닌 생성세포인 멜라노사이트(Melanocyte)를 활성화시켜 멜라노좀(Melanosome) 내 멜라닌의 합성을 촉진시킨다.

[0004] 또한, 티로시나아제(Tyrosinase) 및 TRP-1(Tyrosinase related protein-1), TRP-2 효소와 이들의 역할에 대한 연구가 진행되어짐에 따라 멜라닌 합성에서 이들의 활성을 억제하거나 발현을 저해하는 효과를 나타내는 물질의 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 최근의 자외선과 관련되어 피부에 발생하는 문제점들을 해결하려는 노력들은 이러한 활성산소의 작용을 얼마나 억제시키는가에 그 초점이 맞추어져 있으나, 아직 뚜렷한 대안이 제시되지 못하는 실정이다. 현재 미백 화장료로 사용되고 있는 알부틴, 하이드로퀴논, 코직산 등의 경우, 근본적인 원인이 되는 활성산소의 활성 억제가 아닌 멜라닌 색소의 생성 억제 또는 제거에 초점이 맞추어져 있어, 근본적인 해결방법이 될 수 없을뿐더러, 그 사용에 있어 효능 및 안전성에 문제를 나타내거나, 제품 내에서의 그 효능의 유지가 어려운 실정이다. 또한, 아스코르빈산의 경우, 제품 적용 시 제품 안정성에 큰 영향을 주기 때문에 그 사용에 있어 제한적인 것이 현실이다.

[0005] 따라서 피부에 손상을 주는 근본적인 원인인 활성산소를 제거하는 항산화효과와 미백효과를 두루 가지면서 안전한 신규 원료 및 이를 이용한 제품 개발이 필요한 실정이다. 또한, 천연물은 안전성이 우수하며, 다양한 활성성분을 함유하고 있어 종래에 사용되었던 원료가 갖는 문제점을 해결하기에 적합하여 이들로부터 유효한 성분을 추출하여 이를 적용하는 연구가 진행되어 왔다.

[0006] 한편, 명월초(*Gynura procumbens*)는 과꽃과의 일종으로, 중국에서는 전통 약초로 사용하고 있으며, 삼붕냐와라고도 불리운다. 중국 및 동남아 전통의학에 따르면 명월초는 기침, 기관지염, 폐결핵, 혈액순환, 타박상에 효능이 있다고 알려져 있으며, 동남아시아 및 인도네시아에서 건강 유지 및 증진을 위해서 식용으로 이용하고, 건강증진을 위한 특정 야채로 간주되어 귀빈 접대용으로 이용되었다.

[0007] 한편, 발효는 미생물이 자신이 가지고 있는 효소를 이용해 유기물을 분해시키는 과정이다. 발효공정을 거치게 되면 미생물의 분해 작용을 통해 새로운 유기산 및 각종 분해 산물로 인한 활성 성분의 생성, 풍미 향상, 독성의 감소 등과 같은 많은 장점을 가지고 있어, 발효제품의 인기가 점점 높아지고 있다. 이에 본 발명자들은 발효를 이용하여 명월초의 다양한 효능을 더욱 증진시키고자 하였다.

[0008] 한편, 한국공개특허 제2012-0137907호에는 삼붕냐와(명월초) 추출물을 함유하는 피부 노화 완화용 화장료 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 조성물에 관해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 조성물을 제공하고, 상기 명월초 발효물이 명월초 물 추출물에 비해 필수아미노산, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 증가하고, 항산화, 항균 및 미백효과가 증진되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 화장료 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 명월초 발효물은 명월초 물 추출물에 비해 필수아미노산, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 증가하고, 항산화 활성을 나타내는 DPPH 라디칼 소거활성 및 FRAP 활성이 증진되며, 티로시나아제 및 멜라닌 합성을 억제하는 효과가 우수하였다. 또한, 병원성 세균에 대한 항균작용을 나타내는 효과가 있어, 본 발명의 조성물은 미백 및 항산화용 화장료 조성물, 건강기능식품 조성물 및 멜라닌 색소 과다 침착 질환용 약학 조성물로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 명월초 물 추출물 및 명월초 발효물의 세포독성을 확인한 결과이다. GP-w는 명월초 물 추출물 처리군이고, *L. casei*는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei* KCTC 2180)를 이용하여 발효한 명월초 발효물 처리군이고, *L. plantarum*은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum* KCTC 3104)을 이용하여 발효한 명월초 발효물 처리군이다.

도 2는 명월초 발효물의 멜라닌 생성 저해효과를 확인한 결과이다. α-MSH를 처리하여 멜라닌의 합성을 유도하였다. 알부틴(arbutin)은 양성대조군이고, GP-w는 명월초 물 추출물 처리군이고, *L. casei*는 락토바실러스 카제이를 이용하여 발효한 명월초 발효물 처리군이고, *L. plantarum*은 락토바실러스 플란타럼을 이용하여 발효한 명월초 발효물 처리군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0016] 상기 명월초 발효물은 유산균을 이용하여 발효하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 또는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 이용하여 발효하는 것이지만, 이에 한정하지 않는다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 명월초 발효물은

[0018] 1) $0.5\sim1.5\times10^{5}$CFU/㎖의 발효균주 10 부피부에 대하여 음건한 명월초 80~120 중량부를 혼합한 후 30~45℃에서 12~48시간 동안 발효하여 발효물을 제조하는 단계;

[0019] 2) 상기 단계 1)의 발효물을 여과한 후 100~150℃에서 10~30분 동안 멸균하는 단계; 및

[0020] 3) 상기 단계 2)의 멸균된 발효물을 동결건조하는 단계;를 포함하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 상기 제조방법으로 제조된 명월초 발효물은 필수아미노산 함량, 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량이 증가하고, 티로시나아제 합성 및 멜라닌의 생성을 억제한다.

[0022] 또한, 본 발명의 명월초 발효물은 항균활성, 더욱 바람직하게는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 균에 대한 항균활성을 나타내지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에서 피부 미백효과란, 자외선 노출, 호르몬 밸런스의 변화, 유전적 프로그램 등의 각종 요인에 의해 발생하는 거뭇한 피부나 기미, 주근깨, 다크서클을 개선 또는 방지하는 효과, 피부를 투명감 있는 아름다운 것으로 하는, 혹은 투명감 있는 아름다운 피부를 유지하는 효과, 피부의 칙칙함을 경감하여 윤기·팽팽함을 증가시키는 효과 등을 의도하고 있다. 일반적으로, 거뭇한 피부나 기미, 주근깨, 다크서클은 자외선에 의한 자극이나 호르몬 밸런스의 변화 등에 의해 멜라노사이트(melanocyte)가 자극되고, 이로 인해 생합성된 멜라닌 색소가 피부에 침착하여 발생한다고 알려져 있다. 따라서, 멜라닌의 생성을 억제할 수 있다면, 거뭇한 피부나 기미, 주근깨, 다크서클을 예방·개선하는 것이 가능하다.

[0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 화장료 조성물에 있어서, 상기 피부 미백용 화장료 조성물은 스킨, 스킨 소프트너, 스킨 토너, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 아이크림, 모이스처크

림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 클렌징폼, 클렌징워터, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌져, 비누 및 파우더 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 각 제형으로 이루어진 화장료 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종의 기제와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수 있다.

[0025] 본 발명의 화장료 조성물은 유효성분 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 피부 미백 활성 성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 피부 미백 활성 성분으로는 코지산 및 이의 유도체, 알부틴, 아스코르브산 및 이의 유도체, 하이드로퀴논 및 이의 유도체, 레조르시놀, 사이클로알카논, 메틸렌디옥시페닐 알칸올, 2,7-디니트로인다졸 또는 덩굴귤 추출물, 쌀 추출물, 감초 추출물과 같은 식물 추출물 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판-부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0029] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 아세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 화장료 조성물은 형광물질, 살진균제, 굴수성 유발물질, 보습제, 방향제, 방향제 담체, 단백질, 용해화제, 당 유도체, 일광차단제, 비타민, 식물 추출물 등을 포함하는 부형제를 추가로 함유할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.

[0034] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0035] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라

이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0036] 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0037] 또한, 본 발명은 명월초 발효물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0038] 본 명세서에서 사용되는 용어 "멜라닌 색소 과다 침착(hyperpigmentation)"은 피부 또는 손발톱의 특정 부위에서 멜라닌의 과도한 증가에 의해 다른 부위에 비해 검게 또는 어둡게 되는 것을 의미한다. 상기 멜라닌 색소 과다 침착 질환은 주근깨, 노인성 반점, 간반, 기미, 갈색 또는 흑점, 일광 색소반, 푸른흑피증(cyanic melasma), 약물 사용 후의 과다 색소 침착; 찰상, 화상 또는 피부염으로 인한 염증 후 과다 색소 침착; 또는 임신성 갈색반(gravidic chloasma) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0039] 본 발명의 약학조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 이러한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 약학조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학조성물이 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 치료 또는 예방을 위해 적용되는 점을 감안하면, 피부에 국소적으로 도포되어 이루어지는 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며, 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0043] 본 발명의 약학조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 주사제, 크림, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0044] 이하, 제조예 및 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 제조예 및 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0045] **제조예 1. 명월초 발효물의 제조**

[0046] 본 발명에 사용한 명월초는 (주)미산약초농장에서 구입하여 사용하였다.

[0047] 1) 균주 배양

[0048] 발효에 사용된 균주 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei* KCTC 2180, LC) 및 락토바실러스 플란타럼

(*Lactobacillus plantarum* KCTC 3104, LP)은 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, LC 및 LP는 락토바실리 MRS 배양액(Lactobacilli MRS broth)에서 37℃ 온도조건 하에 24시간 주기로 3회 계대 배양한 후 600nm에서 흡광도 값이 0.4~0.6(1×10^5 CFU/mℓ) 범위 안에 들게 하여 발효 균주로 사용하였다.

[0049] 2) 명월초 발효물의 제조

[0050] 20g의 글루코오스(glucose)와 5g의 펩톤(peptone)을 1ℓ의 3차 증류수(DW)에 혼합한 후, 121℃에서 15분 동안 가압 고온 멸균하고, 이후 실온에서 서서히 식힌 다음 상기 배양하여 활성화시킨 발효 균주를 각각 10mℓ씩 넣은 후 음건한 명월초 100g씩을 넣고, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 여과지(Whatman No. 4)로 여과시키고, 상기 여액을 121℃에서 15분 동안 가압 고온 멸균시켰다. 멸균된 배양액을 -75℃에서 12시간 동안 두었다가 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 동결 건조하였다.

[0051] 무 발효 대조군으로는, 음건한 명월초 100g당 10배량(w/v)의 물을 첨가하여 24시간 동안 3회 추출한 후 여과지(Whatman No. 4)로 여과한 다음 동결 건조하여 얻은 명월초 물 추출물을 사용하였다.

[0052] 동결건조한 명월초 발효물 및 명월초 물 추출물은 티로시나아제 억제활성 실험에서는 물에 용해하였으며, 멜라닌 합성 측정실험에서는 시료 50g 당 10배량(w/v)의 50%(v/v) 에탄올을 가하여 상온에서 24시간 동안 3회 추출한 후 추출액을 여과(Whatman No. 4) 농축한 다음 PBS에 용해하여 사용하였다. 그 외의 실험은 50%(v/v) 에탄올에 용해하여 사용하였다.

[0053] **실시예 1. 명월초 발효물의 구성 아미노산 분석**

[0054] 아미노산은 인체를 구성하고 있는 주요한 구성성분으로서 생리활성의 조절, 삼투압의 항상성 유지 및 완충 작용을 하며 생명현상을 유지하는 중요한 역할을 한다.

[0055] 구성 아미노산의 분석을 위해 제조예 1의 시료 100mg을 2mℓ의 6N HCl에 녹인 후 질소가스(N_2 gas)를 1분간 충진하고, 110℃에서 24시간 동안 반응시켜 가수분해 하였다. 그 후, 회전식 진공 증발기(rotary vacuum evaporator)로 감압농축(40℃)한 후 0.02N HCl(pH 2.2)용액으로 일정비율로 희석하여 0.2μm 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과한 뒤 아미노산 자동분석기로 총 16종의 구성아미노산을 분석·정량 하였다.

[0056] 그 결과, 명월초 발효물의 구성 아미노산 함량은 표 1에 나타낸 바와 같다. 티로신(tyrosine, Tyr), 시스테인(cystein, Cys) 및 메티오닌(methionine, Met)을 제외한 명월초 발효물의 구성 아미노산의 함량은 명월초 물 추출물에 비해 증가하였다. 특히 감칠맛에 영향을 미치는 글루탐산(glutamic acid, Glu)과 아스파르트산(aspartic acid, Asp)의 함량이 증가하였고, LC 발효군에 비해 LP 발효군에서 대부분의 필수 아미노산 함량이 더욱 증가하는 것을 확인하였다.

[0057] 따라서 명월초 발효물, 특히 명월초 LP 발효군 섭취 시 필수 아미노산이 다량 존재하여 에너지 대사 및 단백질의 이용에 긍정적인 방향으로 기여할 수 있다.

표 1

[0058] 구성 아미노산 (mg/100 g)

아미노산	명월초 물 추출물	*L. casei*(LC)	*L. plantarum*(LP)
Asp	1250.23	2134.99	2168.90
Thr	575.74	647.73	666.25
Ser	554.66	607.65	622.18
Glu	1328.76	1585.23	1684.21
Pro	985.59	1306.65	1325.75
Gly	695.23	1392.30	1433.90
Ala	709.08	982.67	1040.31
Val	651.90	677.89	712.36
Ile	592.78	595.70	617.60
Leu	1015.10	1044.93	1085.98
Tyr	234.88	229.36	283.61

Phe	727.67	795.63	828.08
Lys	669.18	685.15	703.07
His	241.61	250.78	254.15
Arg	520.55	773.05	814.93
Cys	222.18	189.69	220.85
Met	143.05	106.48	181.54
Total	1118.20	14005.88	14643.67

[0059] **실시예 2. 명월초 발효물의 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 분석**

[0060] 1) 총 폴리페놀 함량 분석

[0061] 총 폴리페놀 함량은 폴린-시오칼투 방법에 따라 측정하였다. 50%(v/v) 에탄올에 용해하여 희석한 제조예 1의 시료 0.2㎖에 폴린-시오칼투 페놀 시약과 증류수를 1:2의 부피비로 혼합한 혼합액 0.2㎖를 첨가하여 3분간 방치한 후 10%(w/v) Na_2CO_3 3㎖를 가하여 1시간 동안 암실에서 반응시킨 뒤 765㎚에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀의 함량은 표준물질인 갈산(gallic acid)을 이용하여 얻은 표준곡선(standard curve)의 검량식에 흡광도를 적용하여 구하였으며, 시료 1g에 대한 mg GAE(gallic acid equivalents)로 나타내었다.

[0062] 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이 명월초 물 추출물은 9.97±0.05mg GAE/g으로 가장 낮은값을 보였으며, 명월초 *L. casei* 발효군이 18.74±0.02mg GAE/g, 명월초 *L. plantarum* 발효군이 15.93±0.08mg GAE/g의 함량을 나타내어 명월초 물 추출물에 비해 1.6~1.9배 증가하였다.

표 2

[0063] 총 폴리페놀 함량(mg GAE/g)

시료	총 폴리페놀 함량(mg GAE/g)
명월초 물 추출물	9.97±0.05
L. casei(LC)	18.74±0.02
L. plantarum(LP)	15.93±0.08

[0064] 2) 총 플라보노이드 함량 분석

[0065] 총 플라보노이드는 Kwon 등의 방법을 참고하여 측정하였다. 50%(v/v) 에탄올에 용해하여 희석한 시료 1.25㎖를 취하여 5%(w/v) $NaNO_2$ 75㎕를 넣고 5분간 방치한 후 10%(w/v) $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 150㎕를 넣고 6분간 방치하였다. 그 후 1M NaOH 500㎕를 가하여 11분 동안 반응한 후, 510㎚에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드의 함량은 표준물질을 케르세틴(quercetin)으로 하여 얻은 표준곡선의 검량식에 흡광도를 적용하여 구했으며, 시료 1g에 대한 mg CE(catechin)로 나타내었다.

[0066] 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이 명월초 물 추출물이 0.91±0.02mg CE/g의 함량을 나타내었으며, 명월초 *L. plantarum* 발효군은 1.69±0.03mg CE/g의 높은값을 나타내었고, 명월초 *L. casei* 발효군도 1.25±0.03mg CE/g의 함량을 나타내어 발효에 의해 총 플라보노이드 함량이 명월초 물 추출물과 비교하여 1.4~1.9배 정도 증가하는 것으로 확인하였다.

표 3

[0067] 총 플라보노이드 함량(mg CE/g)

시료	총 플라보노이드 함량(mg CE/g)
명월초 물 추출물	0.91±0.02
L. casei(LC)	1.25±0.03
L. plantarum(LP)	1.69±0.03

[0068] **실시예 3. 명월초 발효물의 항산화 효과 확인**

[0069] 1) DPPH 라디칼 소거활성

[0070] DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성은 Blois의 방법에 따라 평가하였다. 50%(v/v) 에탄올에 용해하여 희석한 제조예 1의 시료 1㎖에 0.2mM DPPH 용액 1㎖를 가하여 10초 동안 진탕하고 암소에서 30분 동안 방치한 후 517nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 시료 무 첨가구는 시료를 처리하지 않고 시료 희석 용매인 50%(v/v) 에탄올만 첨가하여 상기와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 아스코르브산(ascorbic acid)으로 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성은 하기 식 1에 따라 백분율로 나타낸 후 50%의 소거능을 나타내는 시료 농도인 IC_{50}(inhibitory concentration)값을 구하였다.

[0071] [식 1]

[0072] DPPH 라디칼 소거활성(%)=[1-(시료 첨가구의 흡광도)/(시료 무 첨가구의 흡광도)]×100

[0073] 그 결과, 표 4에 나타난 바와 같이 명월초 *L. casei* 발효군의 IC_{50}값은 1.03±0.01mg/㎖, 명월초 *L. plantarum* 발효군의 IC_{50}값은 1.31±0.02mg/㎖로 명월초 물 추출물(3.48±0.07mg/mL)에 비하여 높은 라디칼 소거활성을 나타냈다. 이를 통해 명월초를 발효하였을 때 비 발효군(명월초 물 추출물)에 비해 라디칼 소거활성이 증가하는 것을 확인하였다.

표 4

[0074] DPPH 라디칼 소거활성

시료	DPPH IC_{50}(mg/㎖)
명월초 물 추출물	3.48±0.07
L. casei(LC)	1.03±0.01
L. plantarum(LP)	1.31±0.02
아스코르브산	0.03±0.01

[0075] 2) FRAP 활성

[0076] FRAP 분석은 Benzie와 Strain의 방법에 준하여 측정하였다. 시약은 0.3M 아세테이트 완충액(pH 3.6), 40mM HCl을 용매로 하여 제조한 10mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine(TPTZ) 용액 및 20mM $FeCl_3$를 사용하였다. 미리 제조된 아세테이트 완충액, TPTZ 용액 및 $FeCl_3$ 용액을 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 37℃에서 10분 동안 반응시켜 FRAP 시약을 준비한 후, 50%(v/v) 에탄올에 용해하여 희석한 제조예 1의 시료 30㎕에 FRAP 시약 900㎕와 증류수 90㎕를 가하여 진탕하며 혼합한 후, 37℃에서 10분 동안 방치한 뒤, 593nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP 값은 $FeSO_4 \cdot 6H_2O$(iron sulfate hexahydrate)를 표준물질로 사용하여 얻은 표준곡선의 검량식에 흡광도를 적용하여 구했으며, 시료 1g에 들어있는 황산철 수화물(iron sulfate hexahydrate)의 mM 함량으로 나타내었다.

[0077] 명월초 발효물의 FRAP 활성 측정 결과, 표 5에 나타난 바와 같이 5mg/㎖ 시료 농도에서 FRAP 값은 명월초 물 추출물이 57.33±0.31mM/g을 나타내었으며, 명월초 *L. casei* 발효군이 139.40±1.64mM/g, 명월초 *L. plantarum* 발효군이 95.13±0.64mM/g을 나타내어 명월초를 발효함으로써 증가된 FRAP 활성에 의해 항산화 활성이 증가하는 것을 확인하였다.

표 5

[0078] FRAP 값(mM/g)

시료	FRAP 값(mM/g)
명월초 물 추출물	57.33±0.31
L. casei(LC)	139.40±1.64
L. plantarum(LP)	95.13±0.64

[0079] **실시예 4. 명월초 발효물의 항균활성 측정**

[0080] 항균활성은 각 균주를 대상으로 디스크 확산법(disc diffusion assay)으로 측정하였다. 항균활성 측정에 사용된 균주는 그람 양성균인 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus, B. cereus*) KCTC 1012, 고초균(*Bacillus subtilis,*

B. subtilis) KCTC 1022, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus, S. aureus*) KCTC 3881과 그람 음성균인 엔테로박터 클로아세(*Enterobacter cloacae, E. cloacae*) KTCT 1685, 대장균(*Escherichia coli, E. coli*) KTCT 2441, 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica, S. enterica*) KTCT 1925, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa, P. aeruginosa*) KTCT 1636으로, 총 7종의 균주를 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea) 및 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

[0081] 분양받은 균주는 영양 배지(nutrient broth)에서 3회 계대 배양하여 600nm에서 측정한 흡광도 값이 0.4~0.6(1×10^5 CFU/㎖) 범위 안에 들게 한 후 항균활성 측정을 위한 균주로 사용하였다. 각 균주를 한천배지(nutrient agar)에 100㎕씩 분주한 뒤 멸균 면봉으로 도말하여 항균시험용 평판배지를 준비하였다. 제조예 1의 시료는 디스크(disc)당 25, 50mg이 되도록 원형 여과지(paper disc, 8mm)에 천천히 흡수시킨 후 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 뒤, 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 24시간 동안 30~37℃의 배양기에서 배양한 후 디스크 주변에 생성된 생육 저해환(Clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

[0082] 그 결과, 표 6에 나타난 바와 같이 명월초 물 추출물의 경우 상기 7종의 모든 균주에 대해 항균활성을 나타내지 않았으며, 명월초 *L. casei* 발효군의 경우 *B. cereus*(8.5mm), *E. coli*(8.1mm), *S. enterica*(10mm)의 생육 저해환을 나타내어 항균활성을 보였고, 명월초 *L. plantarum* 발효군은 *S. aureus*(8.1mm), *E. coli*(8.4mm), *S. enterica*(10mm)에 대해 항균활성을 나타내었다.

[0083] 유산균을 이용한 항균제는 병원성 세균들의 생육을 저해함과 동시에 인체에 안전하기 때문에 식품 및 화장품 제조과정에서 유용하게 사용될 수 있다.

표 6

[0084] 항균활성 측정

Strains	Clear zone(mm)					
	명월초 물 추출물		*L. casei*(LC)		*L. plantarum*(LP)	
	25mg/disc	50mg/disc	25mg/disc	50mg/disc	25mg/disc	50mg/disc
B. cereus	-	-	-	8.5	-	-
B. subtilis	-	-	-	-	-	-
S. aureus	-	-	-	-	-	8.1
E. coli	-	-	-	8.1	-	8.4
E. cloacae	-	-	-	-	-	-
S. enterica	-	-	9	10	9.5	10
P. aureginosa	-	-	-	-	-	-

[0085] -는 항균활성이 나타나지 않았다는 것을 의미한다.

[0086] **실시예 5. 명월초 발효물의 미백효과 확인**

[0087] 1) 티로시나아제 저해활성 평가

[0088] 티로시나아제 저해능은 티로시나아제의 작용결과 생성되는 도파크롬(dopachrome)을 비색법을 이용하여 측정하였다. 0.5㎖의 0.1M 인산 칼륨 완충용액(potassium phosphate buffer, pH 6.8), 제조예 1의 시료 0.2㎖, 0.2㎖의 기질 10mM L-DOPA(dihydroxy phenylalanine)를 혼합한 혼합액에 효소액(mushroom tyrosinase, 100unit/㎖)을 0.1㎖ 첨가하여 37℃에서 15분 동안 반응시켜 475nm에서 도파크롬의 변화를 측정하고 저해능으로 환산하였다. 양성 대조군으로는 코지산(kojic acid)을 사용하였다. 티로시나아제 저해능은 하기 식 2에 의하여 계산하였다.

[0089] [식 2]

[0090] 티로시나아제 저해능(%)=[1-(A-B)/C]×100

[0091] A: 효소액을 첨가한 시료 처리구의 흡광도

[0092] B: 효소액을 첨가하지 않은 시료 처리구의 흡광도

[0093] C: 효소액을 첨가한 후 시료 대신 시료 희석액을 첨가한 처리구의 흡광도

[0094] 그 결과, 표 7에 나타난 바와 같이 명월초 물 추출물에 비해 명월초 발효물의 티로시나아제 저해활성이 우수하였으며, 특히 명월초 *L. casei* 발효군의 저해활성이 가장 우수하였다.

표 7

[0095] 티로시나아제 저해활성

시료	티로시나아제 저해활성(%)
명월초 물 추출물	31.92±2.67
L. casei(LC)	67.39±0.92
L. plantarum(LP)	47.68±0.14
코지산	88.83±2.84

[0096] 2) 멜라닌 생성 저해효과

[0097] 명월초 발효물의 미백활성에 대한 정확한 평가를 위해 B16F10 멜라노마 세포(melanoma cell)의 생존율에 미치는 영향을 먼저 평가하였다.

[0098] B16F10 세포를 96 웰 플레이트에 각 웰 당 3.0×10^3개의 세포수로 분주한 후, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양하면서 세포가 플레이트에 완전히 부착된 것을 확인한 다음 명월초 발효물을 5, 10㎍/㎖로 처리한 후 72시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 72시간 이후 각 웰에 EZ-Cytox를 10㎕씩 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

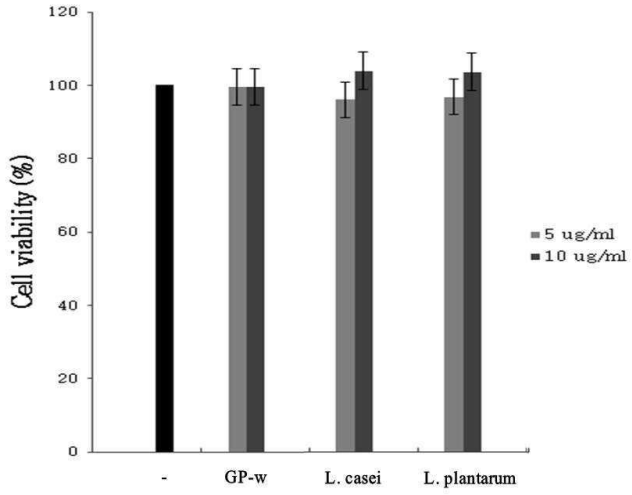
[0099] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군에서의 생존능을 100%로 비교하였을 때 명월초 물 추출물 및 명월초 발효물을 5 및 10㎍/㎖로 처리하였을 경우에도 95% 이상의 생존을 나타내어 세포의 사멸이 관찰되지 않았다. 따라서 이후 실험에서는 10㎍/㎖ 농도의 명월초 물 추출물 및 명월초 발효물을 사용하였다.

[0100] 세포 내 멜라닌 생성 저해효과를 확인하기 위해 6 웰 플레이트에 각 웰 당 5.0×10^4개의 세포를 접종한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양하면서 세포가 플레이트에 완전히 부착된 것을 확인한 후 제조예 1의 시료를 10㎍/㎖로 처리하였다. B16F10 세포의 세포 내 멜리닌 과생성을 유도하기 위하여 100nM의 α-MSH를 처리하고 72시간 후 원심분리하여 세포 펠렛을 모은 뒤 1%(v/v) Triton X-100을 함유한 10mM 인산 완충용액(phosphate buffer, pH 6.8)를 100㎕ 가하고 5분 동안 교반한 후 원심 분리하여 멜라닌 정량에 사용하였다. 분리된 펠렛에 200㎕의 1N NaOH를 가해 60℃에서 1시간 동안 반응하여 완전히 녹인 후 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로부터 얻은 검량선을 이용하여 각 웰에서 생성된 멜라닌의 양을 산출하였다. 멜라닌 생성량은 α-MSH 단독 처리군 대비 백분율(%)로 표기하였다.

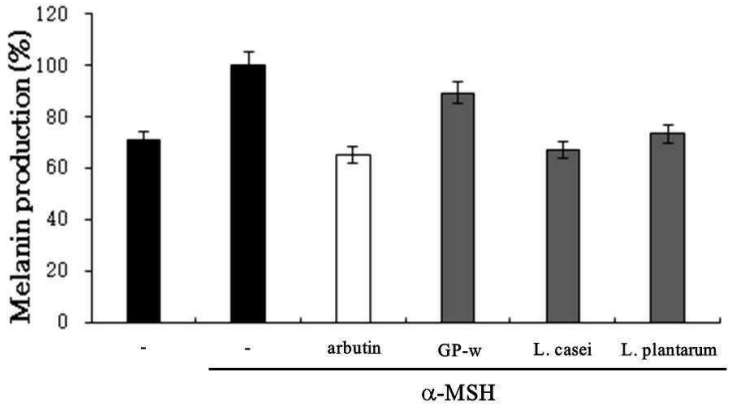
[0101] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 α-MSH의 처리에 의해 증가된 멜라닌 생성량은 명월초 물 추출물 처리에 의해 감소하였으며, 명월초 발효물을 처리하였을 경우 명월초 물 추출물 처리군에 비해 멜라닌 생성량이 더욱 감소하였다. 특히 명월초 *L. casei* 발효물 처리군의 멜라닌 생성량 감소효과가 가장 우수하였다.

도면

도면1


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
5 ug/ml
10 ug/ml
-
GP-w
L. casei
L. plantarum

도면2


120
100
80
60
40
20
0
Melanin production (%)
-
-
arbutin
GP-w
L. casei
L. plantarum
α-MSH