



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월04일
(11) 등록번호 10-1894807
(24) 등록일자 2018년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/73 (2006.01) A61Q 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0054821
(22) 출원일자 2017년04월28일
심사청구일자 2017년04월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160008862 A*
한국식품저장유통학회 1998년도 정기총회 및 제1
3차 학술발표회 진행표 및 발표 논문 초록집.,
pp. 73-74 (1998)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김의경
경상남도 진주시 가호로 26, 204동 703호(가좌동,
가좌주공아파트)
황두현
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교 (가좌
동)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

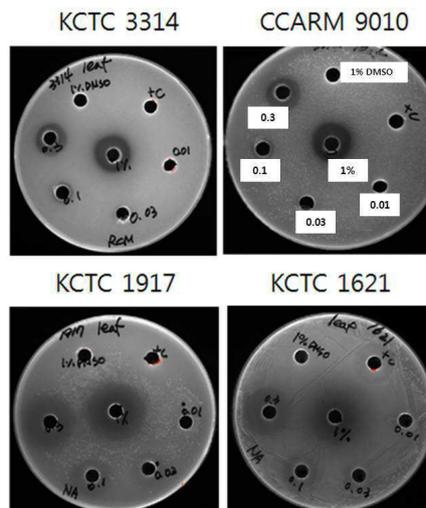
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 생열귀나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물

(57) 요약

본 발명의 생열귀나무 추출물은 여드름 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 및 항생제 내성을 가진 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)와 피부 상재균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)에 대해 우수한 항균 활성을 나타내며, 기존의 항생물질과는 달리 식용으로 사용하고 있는 천연유래의 물질로서 부작용 등이 문제가 되지 않으므로, 항균용 및 여드름 개선용 화장품과 여드름 질환의 예방, 개선 및 치료용 의약품 및 건강기능식품에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 36/73 (2013.01)

A61Q 17/005 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

생열귀나무(*Rosa davurica*) 및 추출물을 유효성분으로 함유하는 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 및 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)에 대한 항균용 화장품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생열귀나무 및 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매를 이용하여 추출한 것을 특징으로 하는 항균용 화장품 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)는 클린다마이신(Clindamycin)에 대해 내성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균용 화장품 조성물.

청구항 6

생열귀나무(*Rosa davurica*) 및 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 개선용 화장품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 및 아이섀도로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 여드름 개선용 화장품 조성물.

청구항 8

생열귀나무(*Rosa davurica*) 및 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

생열귀나무(*Rosa davurica*) 및 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생열귀나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부에는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 등 여러 상재균이 존재하며, 이들 상재균은 정상시에는 땀에서 분비되는 면역항체와 결합하여 피부 면역력을 높여준다. 건강한 피부에서는 유익균이

80%, 유해균이 20%의 비율을 유지하며 약산성(pH 5.5)을 이룬다. 약산성이 유지될 때 건강한 피부막은 피부를 촉촉하게 유지하며 몸의 장벽으로 작용하여 수분의 유출을 막지만, 스트레스나 세정제 등의 과다 사항 등으로 신체의 리듬이 변화하면 피부의 항상성이 깨지고 이들 피부 상재균이 과다 증식하게 된다. 이들 피부 상재균은 피부 상에 분비된 피지나 땀을 분해시켜 냄새를 유발하며, 지루성 피부염, 습진, 가려움, 여드름, 두피염 등을 유발한다고 보고되어 있다.

[0003] 특히, 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)는 지방산 분해효소인 리파아제(lipase)를 이용하여 피지를 분해시켜서 유리지방산을 생성시킨다. 이들 유리지방산은 피부에 자극을 줄 뿐만 아니라 여드름에서 볼 수 있는 붉은 발진인 구진, 농포, 결절 등의 염증성 병변을 유발시킨다. 이러한 세균들에 대한 항균성 물질로서 트리클로카반(triclocarban), 트리클로산(triclosan) 등 항균성 화합물이 사용되어 왔으나 장기간 사용시 피부 작열감, 화끈거림, 피부 발적 등의 피부 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 생열귀(*Rosa davurica* Pall.)는 장미과에 속하는 다년생 식물로서, 한국 중북부, 일본, 만주 및 시베리아 등에 분포하는 낙엽활엽관목이다. 높이 1~1.5m이며 기는 곧게 서고, 적갈색이며 가시가 있다. 잎은 우상복엽으로 나며 타원형 또는 장타원형으로 양끝이 뾰족하며 길이 1~3cm로서 가장자리에 톱니가 있고 뒷면에 선점이 있다. 꽃은 장미색으로 향기가 짙다. 과실은 구형이며 9월에 황홍색으로 익는다. 민간에서는 과실을 식용으로 쓰고 있으며, 뿌리는 당뇨병에 과실은 위통에 사용하여 왔다. 또한, 민간에서는 비타민 결핍증과 여러 질병에 대한 저항성 증가, 간기능 보호약 등으로도 사용하여 왔다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2015-0049078호는 광천수 함유 배지에서 배양된 생열귀 캘러스 함유 화장료 조성물을 개시하고 있으며, 한국공개특허 제2016-0008862호는 생열귀 에틸아세테이트 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 자극 완화, 피부 장벽 강화 및 염증 억제용 조성물을 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 생열귀나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 향균용 조성물에 대해 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 생열귀나무의 열매, 잎, 줄기 및 뿌리로부터 각각의 추출물을 제조하여 여드름 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) KCTC 3314 균주 및 항생제 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) CCARM 9010 균주와 피부 상재균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) KCTC 1621 균주 및 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*) KCTC 1917 균주에 처리한 결과, 생열귀나무의 열매, 잎, 줄기 및 뿌리 추출물에서 항균 활성을 나타내었으며, 특히 생열귀나무 잎 추출물에서 우수한 항균 활성을 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 생열귀나무(*Rosa davurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 향균용 화장료 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 생열귀나무(*Rosa davurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 생열귀나무(*Rosa davurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 생열귀나무(*Rosa davurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 생열귀나무 추출물은 여드름 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 및 항생제 내성을 가진 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)와 피부 상재균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*)에 대해 우수한 항균 활성을 나타내며, 기존의 항생물질과는 달리 식용으로 사용하고 있는 천연유래의 물질로서 부작용 등이 문제가 되지 않으므로, 향균용 및 여드름 개선용 화장품과 여드름 질환의 예방, 개선 및 치료용 의약품 및 건강

기능식품에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 생열귀나무 부위별 추출물들의 농도별 처리에 따른 환원력을 확인한 결과이다. 비타민 C(Vit C)는 양성대조군이다.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 생열귀나무 부위별 추출물들의 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) KCTC 3314 균주 및 클린다마이신(Clindamycin) 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) CCARM 9010 균주와 피부 상재균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) KCTC 1621 균주 및 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) KCTC 1917 균주에 대한 항균활성을 확인한 결과이다. C는 음성대조군이며, +C는 양성대조군이며, L은 생열귀나무 잎이며, R은 생열귀나무 뿌리이며, S는 생열귀나무 줄기이며, F는 생열귀나무 열매이다.
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 생열귀나무 잎 추출물의 농도별 처리에 따른 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) KCTC 3314 균주 및 클린다마이신(Clindamycin) 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) CCARM 9010 균주와 피부 상재균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) KCTC 1621 균주 및 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) KCTC 1917 균주에 대한 항균활성을 확인한 결과이다. 1% DMSO는 음성대조군이며, +C는 양성대조군이며, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 및 1%는 생열귀나무 잎 추출물의 처리농도를 나타낸 것이다.
 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 생열귀나무 잎 추출물의 처리농도 및 시간에 따른 세포생존율(cell viability)을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생열귀나무(*Rosa davurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 향균용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 향균용 화장품 조성물에서, 상기 생열귀나무 추출물은 열매, 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 추출물일 수 있으며, 바람직하게는 생열귀나무 잎 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 또한, 상기 생열귀나무 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매를 이용하여 추출한 것일 수 있으며, 바람직하게는 메탄올을 이용하여 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 또한, 상기 항균 활성은 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)로 구성된 균에서 선택된 하나 이상의 미생물에 대한 항균 활성일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 또한, 상기 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)는 암피실린(Ampicillin), 클린다마이신(Clindamycin), 에리스로마이신(Erythromycin), 리네졸리드(Linezolid), 테트라사이클린(Tetracycline) 및 반코마이신(Vancomycin)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 것일 수 있으며, 바람직하게는 클린다마이신에 대해 내성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 또한, 본 발명은 생열귀나무(*Rosa davurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 화장품 조성물은, 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 및 아이새도로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나의 제형으로 제조되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 또한, 상기 화장품 조성물은 유효성분인 생열귀나무 추출물에 추가로 지방 성분, 유기용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나그 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

- [0021] 또한, 본 발명은 생열기나무(*Rosa davurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 추출물을 함유하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 추출물의 약학적 투여 형태는 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 추출물을 함유하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 함유하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 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 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 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, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 생열기나무(*Rosa davurica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 여드름 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 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. 유효성분은 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 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.
- [0030] 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.
- [0031] 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 포함시킬 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라

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

[0032] 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, 알콜, 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.

[0033] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 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.

[0034] **제조예 1. 생열귀나무 부위별 추출물의 제조**

[0035] 본 발명에 사용한 생열귀나무는 강원도 정선군 정선 생열귀 영농조합(강원도 정선군 정선읍 용탄리) 및 정선군 농업기술센터에서 재배한 것을 채집하여 부위별(열매, 잎, 줄기 및 뿌리)로 분류한 다음, 계절 후 음건하여 사용하였다. 생열귀나무를 부위별로 분쇄기로 분말화한 다음, 약 10g의 생열귀 부위별 분말에 200ml의 메탄올(v/v)을 첨가하여 상온(25±1℃)에서 250rpm으로 교반시키면서 3일 동안 2회 반복 추출하여 생열귀나무 부위별 메탄올 추출물들을 획득하였다. 상기 획득한 생열귀나무 부위별 메탄올 추출물들을 각각 여과지(No. 2, Whatman, Maidstone, England)가 깔려있는 부흐너 깔때기(Buchner funnel)에 통과시켜 잔재물을 제거한 후, 감압 여과하여 회전 진공 증발기(rotary vacuum evaporator, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 완전 농축한 다음, 동결건조하여 분말화한 후 -20℃의 냉동고에서 보관하면서 하기 실시예 2 내지 5에 사용하였다.

[0036] **실시예 1. 실험균주 및 배양**

[0037] 본 발명에 사용한 여드름 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) KCTC 3314 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받았으며, 클린다마이신(Clindamycin) 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) CCARM 9010 균주는 한국내성균주은행에서 분양 받아 사용하였다. 대표적인 피부 상재균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) KCTC 1621 균주 및 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) KCTC 1917 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다.

[0038] 배양된 균주를 장기 보존하기 위해, 글리세롤(glycerol)과 3:7의 비율로 잘 혼합하여 -70℃에 보관하였으며, 냉동고에 보관된 균주는 실험시작 3일 전에 활성화시킨 후, 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) KCTC 3314 균주 및 클린다마이신(Clindamycin) 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) CCARM 9010 균주는 RC(Reinforced clostridial) 고체배지에 접종하여 5% 수소(H₂)와 95% 질소(N₂)가 공급되는 혐기성 배양기(Vision Scientific CO., LTD, Korea)에서 48시간 동안 37℃에서 배양하였으며, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) KCTC 1621 균주 및 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) KCTC 1917 균주는 NA(Nutrient agar) 배지를 이용하여 37℃에서 24시간 동안 호기성 배양하였다(표 1 및 표 2).

표 1

여드름 원인균 및 이의 배양조건

[0039]

여드름 원인균	배양배지	배양조건
프로피오니박테리움 아크네스(<i>Propionibacterium acnes</i>) KCTC 3314	RC(Reinforced clostridial)	37℃에서 24시간 동안 혐기적 조건에서 배양
항생제 저항성 프로피오니박테리움 아크네스 (antibiotic-resistant <i>Propionibacterium acnes</i>) CCARM 9010		

표 2

[0040]

피부 상재균 및 이의 배양조건

피부 상재균	배양배지	배양조건
스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>) KCTC 1621	Nutrient agar(NA)	37℃에서 24시간 동안 호기적 조건에서 배양
스타필로코커스 에피더미디스 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) KCTC 1917		

[0041]

실시예 2. 환원력(reducing power) 측정

[0042]

본 실시예 2에서는 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여, 본 발명의 생열귀나무 부위별 추출물(이하 '시료'라 함)의 환원력을 측정하여 항산화능을 확인하였다. 0.5ml의 시료에 pH 6.6의 0.2M의 인산나트륨 버퍼용액(sodium phosphate buffer solution)과 1%의 페리시안화칼륨(potassium ferricyanide)을 2.5ml씩 각각 차례로 첨가하여 교반한 후, 50℃에서 20분 동안 반응시켰다. 이 혼합물에 10%의 TCA(trichloroacetic acid) 용액을 2.5ml 첨가하여 원심분리(1790×g 및 10분)한 후, 2.5ml의 상등액에 2.5ml의 증류수 및 0.5ml의 염화제2철(ferric chloride)을 첨가하여 혼합한 다음, 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA USA)를 이용하여 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력에서의 흡광도 수치는 그 자체가 그 시료의 환원력을 나타내며, 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도의 수치가 높게 나타나며, 환원력은 시료가 항산화제로서 사용될 수 있음을 나타내는 지표이기도 하다. 본 발명의 생열귀나무 부위별 추출물의 환원력을 측정한 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 생열귀나무의 모든 부위별 추출물에서 농도의존적으로 높은 환원력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0043]

실시예 3. 생열귀나무 부위별 추출물의 성장 정지환 측정

[0044]

본 실시예 3에서는 상기 제조예 1에서 제조된 생열귀나무의 잎, 뿌리, 열매 및 줄기 부위로부터 각각 추출된 메탄올 추출물들의 여드름균 및 피부 상재균에 대한 항균활성을 측정하였다. 구체적으로, 한천배지 확산분석(agar well diffusion assay)에 의한 항균효과 검정은 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) KCTC 3314 균주 및 클린다마이신(Clindamycin) 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) CCARM 9010 균주와 피부 상재균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) KCTC 1621 균주 및 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) KCTC 1917 균주를 미리 배지에 접종하여 만든 아가 플레이트(agar plate)에 6mm의 직경으로 구멍을 낸 후 생열귀나무 부위별 추출물(잎, 뿌리, 줄기 및 열매)을 적정 농도로 희석한 후 60μl씩 로딩하였으며, 상기 균주의 배양 조건에서 다시 배양시킨 후, 형성된 성장 정지환을 측정하였고, 상기 실험을 3회 반복하여 결과를 확인하였다. 이때, 상기 생열귀 부위별 추출물들의 항균활성을 비교 및 대조하기 위해, 양성대조군(positive control)으로 100ppm의 트리클로산(TRICLOSAN)을 사용하였다. 본 발명의 생열귀나무 부위별 추출물의 항균 활성을 측정한 결과, 도 2 및 표 3에 개시한 바와 같이 생열귀나무 부위별 모든 추출물에서 프로피오니박테리움 아크네스 KCTC 3314 균주 및 클린다마이신 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스 CCARM 9010 균주와 피부 상재균인 스태필로코커스 아우레우스 KCTC 1621 균주 및 스태필로코커스 에피더미디스 KCTC 1917 균주에 대해 항균 활성을 보였으며, 특히 생열귀나무 잎 추출물에서 높은 항균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

표 3

[0045]

생열귀나무 부위별 추출물의 항균력(mm)

균주	생열귀나무 부위별 추출물				트리클로산 (Triclosan)
	잎	뿌리	줄기	열매	
프로피오니박테리움 아크네스 KCTC 3314	24	17	14	9	9
항생제 저항성 프로피오니박테리움 아크네스 CCARM 9010	29	21	15	11	9
스타필로코커스 아우레우스 KCTC 1621	24	19	17	12	11
스타필로코커스 에피더미디스 KCTC 1917	25	20	15	13	10

[0046]

실시예 4. 생열귀나무 잎 추출물의 농도별 성장 정지환 측정

[0047] 상기 실시예 3에서 확인한 항균 활성이 우수한 생열귀나무 잎 추출물을 농도별(0.01%, 0.03%, 0.1%, 0.3% 및 1%)로 프로피오니박테리움 아크네스 KCTC 3314 균주 및 클린다마이신 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스 CCARM 9010 균주와 피부 상재균인 스타필로코커스 아우레우스 KCTC 1621 균주 및 스타필로코커스 에피더미디스 KCTC 1917 균주에 처리하여 성장 정지환을 측정하여 항균 활성을 확인하였다. 이때, 상기 생열귀 추출물들의 항균활성을 비교 및 대조하기 위해, 양성대조군(positive control)으로 100ppm의 트리클로산(Triclosan)을 사용하였다. 본 발명의 생열귀나무 잎 추출물의 농도별로 항균 활성을 측정한 결과, 도 3 및 표 4에 개시한 바와 같이 생열귀나무 잎 추출물의 모든 농도에서 프로피오니박테리움 아크네스 KCTC 3314 균주 및 클린다마이신 내성균주인 프로피오니박테리움 아크네스 CCARM 9010 균주에 대하여 양성대조군과 유사하거나 우수한 항균 활성을 보였으며, 피부 상재균인 스타필로코커스 아우레우스 KCTC 1621 균주 및 스타필로코커스 에피더미디스 KCTC 1917 균주의 경우에도 양성대조군과 유사하거나 우수한 항균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

표 4

[0048] 생열귀나무 잎 추출물의 항균력(mm)

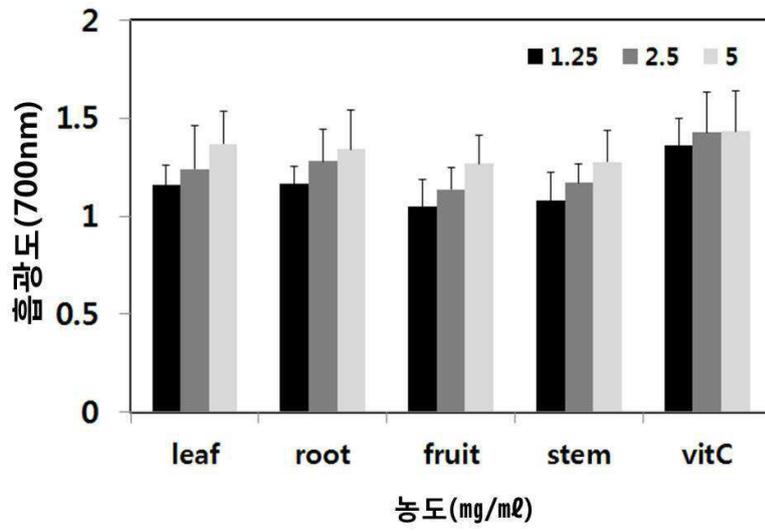
균주	생열귀나무 잎 추출물					트리클로산 (Triclosan)
	1%	0.3%	0.1%	0.03%	0.01%	
프로피오니박테리움 아크네스 KCTC 3314	19	15	11	8	8	9
항생제 저항성 프로피오니박테리움 아크네스 CCARM 9010	20	15	11	8	8	12
스타필로코커스 아우레우스 KCTC 1621	26	21	16	12	0	12
스타필로코커스 에피더미디스 KCTC 1917	28	22	18	13	0	13

[0049] 실시예 5. 생열귀나무 잎 추출물의 세포생존율(cell viability) 분석

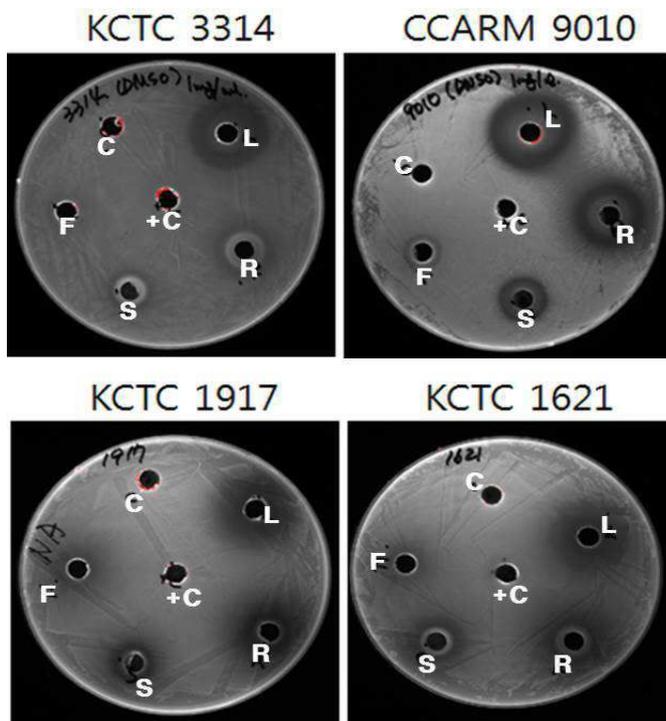
[0050] 본 실시예 5에서는 피부세포에 대한 생열귀나무 잎 추출물의 세포독성을 확인하기 위해, 무혈청배지에서 HDF(human dermal fibroblast) 세포를 배양하여 생열귀나무 잎 추출물을 농도별로 처리한 후, 피부 섬유아세포의 세포독성을 MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-데펜테트라졸리움 프로미드) 비색법을 이용하여 확인하였다. 섬유아세포를 150ml의 플라스크를 이용하여 10% 혈청이 함유된 FTM(Fluid Thioglycollate medium)에서 배양하였다. 배양된 세포주들을 0.05%의 트립신 용액으로 플라스크 바닥에서 떼어낸 후, 원심분리하여 세포만을 모았으며, 이를 24-웰 조직 배양용 평판에 각 웰당 1×10^5 cell/ml 세포가 되도록 처리하고, 24시간 동안 37°C 및 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 24시간 후에 무혈청배지로 교환한 뒤 생열귀나무 잎 추출물을 농도별(10, 30, 100, 300 및 1000ng/ml)로 각각 처리하여 24, 48 및 72시간 동안 37°C 및 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 24, 48 및 72시간 후 배양액에 MTT 용액을 처리하고 3시간 동안 배양한 다음, ELISA 리더로 595nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다. 흡광도는 각 처리에 하여 3회 이상 반복 실험한 평균값이다. 생열귀나무 잎 추출물의 처리시간 및 농도에 따른 세포생존율을 확인한 결과, 도 4에 개시한 바와 같이 독성을 보이지 않았으며, 오히려 시간이 지남에 따라 세포생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

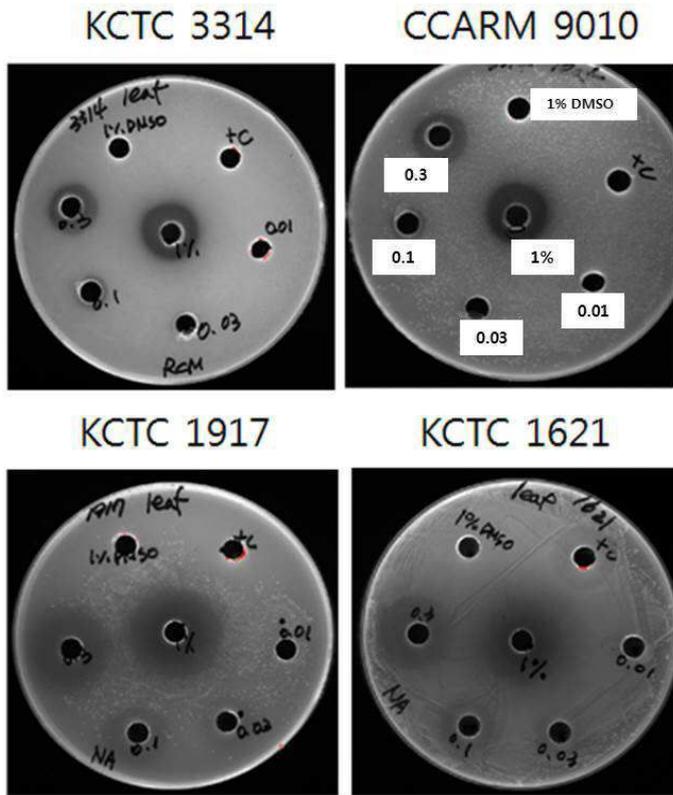
도면1



도면2



도면3



도면4

