(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0090608
(43) 공개일자 2009년08월26일

(51) Int. Cl.
A61K 8/99 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0015928
(22) 출원일자 2008년02월21일
심사청구일자 2008년02월21일

(71) 출원인
닥터후 주식회사
서울 강남구 신사동 586-6 평화빌딩
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
이태후
서울 서초구 잠원동 50-1 롯데캐슬아파트 202-502호
박승국
경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지 경희대학교 생명과학대학 식품공학과
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
오국진

전체 청구항 수 : 총 6 항

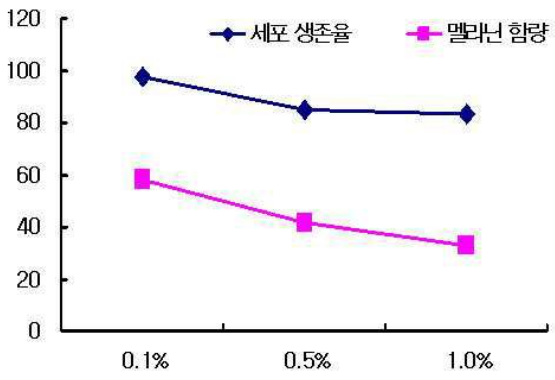
(54) 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법 및이를 함유하는 조성물

(57) 요 약

본 발명은 (a) 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모를 25 ~ 35 ℃에서 배양하는 단계; 및 (b) 단계 (a)에서 얻어진 배양액을 40 ~ 70 ℃의 온도에서 추가로 배양하여 상기 효모의 자가소화를 유도하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 배양액으로부터 효모의 자가소화물을 분리하는 단계를 포함하는, 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 얻어진 효모 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물 또는 화장료 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 효모 추출물의 제조방법은 사카로마이세스 속(*Saccharomyces sp.*) 효모의 생육조건을 특정 온도 범위로 조절하여 추가의 배양을 수행함으로써 자연적인 자가소화를 유도할 수 있으므로, 제조공정이 크게 단축되어 산업적 규모의 대량생산에 용이하게 적용될 수 있다. 또한, 제조비용을 크게 낮춤으로써 상업적으로 매우 유용하다. 특히, 종래의 에탄올 및/또는 식염을 사용하는 자가소화 공정 수행에 따른 잔류 에탄올 및 염류에 의하여 발생하는 문제를 회피할 수 있으며, 침전체 제조 및 재용해 공정을 수행할 필요가 없으므로, 효모 배양액에 함유된 여러 활성성분들의 변성 및 변화 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 또한 최종 생산물의 수득율을 높이고 강산과 강염기등의 독성화공약품의 사용에 따른 위험성 및 산업 폐기물의 양을 획기적으로 줄일 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

정지행

서울 강남구 신사동 586-6 평화빌딩

이강진

서울 강남구 도곡동 168번지 SK리더스뷰 507호

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모를 25 ~ 35 ℃에서 배양하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서 얻어진 배양액을 40 ~ 70 ℃의 온도에서 추가로 배양하여 상기 효모의 자가소화를 유도하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 배양액으로부터 효모의 자가소화물을 분리하는 단계를 포함하는, 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모가 사카로마이세스 세레비제 (*Sacchromyces cerevisiae*), 사카로마이세스 칼스베르제네시시 (*Sacchromyces carlsbergenesis*), 또는 사카로마이세스 바야누스 (*Saccharomyces bayanus*)인 것을 특징으로 하는 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계(c)의 상기 분리가 단계(b)의 배양액을 여과하여 여액을 취하거나 또는 단계(b)의 배양액을 원심분리하여 상등액을 취함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 여액 또는 상등액을 농축; 건조; 또는 농축 및 건조하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 제조방법으로 얻어진 효모 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 또는 주름개선용 약학 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 제조방법으로 얻어진 효모 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 또는 주름개선용 화장료 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 미백 및 주름개선 활성을 갖는 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모 추출물의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 효모 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 또는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 멜라닌(melanin)은 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 지니는 페놀류의 생체 고분자 물질로서, 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기 중에 노출될 때 발생하는 갈변 또는 동물의 외피, 깃털, 피부, 머리, 눈 등에서 관찰된다. 그러나 멜라닌이 과잉 생산되는 경우, 피부에 기미, 주근깨 등이 형성되고 피부 노화도 촉진되며, 피부암도 유발될 수 있고 또한 식품에서는 채소, 과일, 생선 등의 품질을 저하시키는 작용도 한다.

<3> 멜라닌은 주로 티로시나제의 작용에 의하여 생합성되는 것으로 보고되고 있다. 티로시나제는 구리와 결합한 효소로서, 동물, 식물, 미생물 및 사람 등에 넓게 분포되어 있고, 모노하이드록시 또는 디하이드록시 페닐알라닌(dihydroxy-phenylalanine, DOPA) 등의 페놀 화합물에서 호기적 산화를 촉진시키고, 자외선에 심하게 노출된 피부에 멜라닌토스(melanintorth)를 침착시켜 피부의 노화나 손상을 유발시키는 작용을 한다. 또한 야채 또는 과실류에서도 티로시나제 등과 같은 폴리페놀 옥시다제(polyphenol oxidase)가 식품의 갈변화 현상을 초래한다.

<4> 멜라닌의 생합성 기전은 피부암과 관련하여 최근 집중적으로 연구되고 있고, 이로부터 다양한 멜라닌 생성 저해제 등이 개발되어 의약품 산업에서 피부 질환 치료제, 화장품 산업에서 기미, 주근깨 등을 예방 및 치료하는 피부 미백제 또는 식품 산업에서 갈변 방지제 등으로 적용되고 있다.

<5> 지금까지 멜라닌 생성 저해제의 연구는 주로 티로시나제 저해제를 개발하는 방향으로 집중되어 왔고, 대표적인 티로시나제 저해제로는 티로시나제 활성부위의 구리 이온에 대한 킬레이트 형성물질, 퀴논류를 페놀류로 환원시키는 아스코빅산 등의 환원제 그리고 티로시나제 자체를 변성시키는 바이설파이트(bisulfites) 제제 등을 들 수 있다. 이와 같이 티로시나제 저해제가 다양한 미백제 등으로 개발되어 현재 사용되고 있지만, 여러 가지 문제점도 동시에 제기되고 있다.

<6> 한편, 대한민국 특허 제10-0616445호는 배양된 사카로마이세스 속(*Saccharomyces sp.*) 효모를 파쇄한 후, 에탄올 및/또는 식염을 가하여 자가소화시킨 다음, 상대적으로 에탄올(예를 들어, 50-70%의 에탄올)을 가하여 침전체를 얻은 후, 이를 물로 재용해하여 불용성 부분을 제거하는 단계, 더 나아가, 이와 같이 제조된 추출물에 대하여 35%의 강염산 10%-20%를 첨가하여 10-20분 동안 산분해 시키고 이후 pH를 중성으로 보정한 뒤 탈염시키는 단계로 이루어진 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법을 개시한 바 있다.

<7> 그러나, 상기 제조방법은 효모 파쇄, 에탄올 및/또는 식염에 의한 자가소화, 에탄올-침전, 재용해, 염산과 같은 강산으로 산분해 및 중성화와 탈염과정 등으로 이루어진 복잡한 단계를 수행하여야 하므로, 제조공정이 복잡할 뿐만 아니라 비용(cost)이 많이 소요됨으로써 실제 생산현장에 적용하기가 곤란하다. 특히, 추출물 제조공정에 있어서, 에탄올 및/또는 식염을 사용하여 자가소화를 유도함으로써 잔류 에탄올 및 염류에 의하여 활성이 저하될 수 있으며, 침전-재용해 공정과 강산에 의한 분해와 중금속 등의 잔류물질에 의한 따른 효모 배양액 내의 활성성분 변화 및 변성 등의 문제가 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명자들은 상기한 종래기술의 문제점을 해결할 수 있는 효모 추출물의 제조방법으로서, 다량의 에탄올과 같은 유기용매나 염산과 같은 강산성 화공약품을 사용하지 않는 천연적인 방법에 의한 효모 추출물의 제조방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하였다. 그 결과, 사카로마이세스 속(*Saccharomyces sp.*) 효모의 배양 조건을 조절할 경우, 즉 별도의 영양분 추가 없이 사카로마이세스 속(*Saccharomyces sp.*) 효모의 생육조건을 특정 온도 범위로 조절하여 추가의 배양을 수행할 경우, 상기 효모가 자연적으로 자가소화물을 생성하며, 또한, 얻어진 자가소화물이 우수한 미백 및 주름개선 활성을 갖는다는 것을 발견하였다.

<9> 따라서, 본 발명은 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<10> 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 얻어진 효모 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물 또는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

<11> 본 발명의 일 태양에 따라, (a) 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모를 25 ~ 35 ℃에서 배양하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서 얻어진 배양액을 40 ~ 70 ℃의 온도에서 추가로 배양하여 상기 효모의 자가소화를 유도하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 배양액으로부터 효모의 자가소화물을 분리하는 단계를 포함하는, 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법이 제공된다.

<12> 상기 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모는 사카로마이세스 세레비제 (*Sacchromyces cerevisiae*), 사카로마이세스 칼스베르제네시시 (*Sacchromyces carlsbergenesis*), 또는 사카로마이세스 바야누스 (*Saccharomyces bayanus*)일 수 있다. 또한, 단계(c)의 상기 분리는 단계(b)의 배양액을 여과하여 여액을 취하거나 또는 단계(b)의 배양액을 원심분리하여 상등액을 취함으로써 수행될 수 있으며, 필요에 따라, 상기 여액 또는 상등액을 농축; 건조; 또는 농축 및 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.

<13> 또한, 본 발명의 다른 태양에 따라, 상기 제조방법으로 얻어진 효모 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 또는 주름개선용 약학 조성물 또는 화장료 조성물이 제공된다.

효 과

<14> 본 발명에 따른 효모 추출물의 제조방법은 사카로마이세스 속(*Saccharomyces sp.*) 효모의 생육조건을 특정 온도 범위로 조절하여 추가의 배양을 수행함으로써 자연적인 자가소화를 유도할 수 있으므로, 제조공정이 크게 단축되어 산업적 규모의 대량생산에 용이하게 적용될 수 있다. 또한, 제조비용을 크게 낮춤으로써 상업적으로 매우 유용하다. 특히, 종래의 에탄올 및/또는 식염을 사용하는 자가소화 공정 수행에 따른 잔류 에탄올 및 염류에 의하여 발생하는 문제를 회피할 수 있으며, 침전체 제조 및 재용해 공정을 수행할 필요가 없으므로, 효모 배양액에 함유된 여러 활성성분들의 변성 및 변화 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 또한 최종 생산물의 수득율을 높이고 강산과 강염기등의 독성화공약품의 사용에 따른 위험성 및 산업 폐기물의 양을 획기적으로 줄일 수 있다.

<15> 또한, 본 발명의 제조방법에 따라 얻어진 효모 추출물은 높은 항산화 활성 및 티로시나제 저해활성을 가짐으로써 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하므로 피부미백 효과가 우수하다. 또한, 피부세포의 콜라겐의 생성과 분해에 관여하여 피부 노화를 지연시킴으로써 우수한 주름개선 활성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 제조방법에 따라 얻어진 효모 추출물은 미백 및/또는 주름개선용 약학 조성물 또는 화장료 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<16> 본 발명은 (a) 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모를 25 ~ 35 ℃에서 배양하는 단계; 및 (b) 단계 (a)에서 얻어진 배양액을 40 ~ 70 ℃의 온도에서 추가로 배양하여 상기 효모의 자가소화를 유도하는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 배양액으로부터 효모의 자가소화물을 분리하는 단계를 포함하는, 미백 및 주름개선 활성을 갖는 효모 추출물의 제조방법을 제공한다.

<17> 본 명세서에서, 상기 "사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모"는 호기적 또는 혐기적으로 배양되는 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*)의 효모로서, 통상의 맥주 제조시 사용되는 맥주 효모(예를 들어, 사카로마이세스 칼스베르제네시시 (*Sacchromyces carlsbergenesis*) 등) 혹은 전통주 제조시 사용되는 전통주 효모 (예를 들어, 사카로마이세스 세레비제 (*Sacchromyces cerevisiae*) 등)을 제한 없이 포함한다. 특히 상기 "사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모"는 맥주, 전통주 등의 주류 제조시 사용되는 효모를 바람직하게 포함하며, 예를 들면, 사카로마이세스 세레비제 (*Sacchromyces cerevisiae*), 사카로마이세스 칼스베르제네시시 (*Sacchromyces carlsbergenesis*), 또는 사카로마이세스 바야누스 (*Saccharomyces bayanus*) 등을 포함한다. 상기 효모(들)는 맥주, 전통주, 와인 등의 제조 후 폐기되게 되며, 본 발명은 상기 폐기되는 효모(들)를 미백 및 주름개선용 약학 조성물 또는 화장료 조성물로서 이용할 수 있도록 함으로써, 자원 재활용의 장점을 제공한다.

<18> 본 발명의 제조방법에 있어서, 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모를 25 ~ 35 ℃에서 배양하는 단계 [즉, 단계(a)]는 통상의 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모의 배양 방법에 따라 수행될 수 있다. 즉, 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모의 생육조건인 25 ~ 35 ℃에서 배양을 수행할 수 있으며, 그 배지로는 분쇄한 맥아를 고온에서 당화시킨 맥즙 (wort) 등의 배지를 사용할 수 있다.

<19> 본 발명의 제조방법은 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모가 자가소화를 유도할 수 있는 조건에서 추가로 배양함으로써, 자연적인 자가소화를 유도하는 배양단계를 포함한다. 즉, 본 발명의 제조방법은 단계(a)에서 얻어진 배양액을 50 ~ 70 ℃의 온도에서 추가로 배양하여 상기 효모의 자가소화를 유도하는 단계를 포함한다.

<20> 본 발명자들은 영양분 성분의 조절 등을 포함한 다양한 방법을 시도하여 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모의 자연적인 자가소화 조건을 검색하였으며, 그 결과 놀랍게도 특정 온도에서 배양을 수행할 경우, 별도의 배지 조성을 변경시킴이 없이 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces sp.*) 효모의 배양액을 그대로 사용하면서 효모의 자가소화를 유도할 수 있음을 발견하였다.

<21> 상기 자가소화 유도를 위한 온도는 40 ~ 70 ℃가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 55 ~ 65 ℃, 특히 바람직하게는 약 60 ℃ 내외의 온도가 바람직하다. 상기 자가소화 유도를 위한 온도가 70 ℃를 초과할 경우, 배양액 내에 함유된 여러 효소 및 유기물들의 열변성 및 분해 등의 문제가 발생할 수 있으며, 40 ℃ 미만일 경우, 효모균 자체의 자가소화 (autolysis)가 충분히 일어나지 않아 유효 성분의 용출이 부족한 문제가 발생할 수 있다.

<22> 상기 자가소화 유도를 위한 배양 시간은 크게 제한되지 않는다. 즉, 배양액 중의 효모 농도, 배양 온도 등에 따라 상기 배양 시간은 상이할 수 있으나, 예를 들어 12시간 이상, 바람직하게는 24시간 이상일 수 있으며, 필요할 경우 24시간 내지 수개월의 기간 범위(예를 들어 약 1 주일)에서 선택될 수 있다. 더욱 구체적으로는 약 10 ~ 50 중량% 정도의 효모 농도를 유지하면서 배양액은 40 ~ 70 ℃에서 1주일 이상의 기간 동안 배양함으로써 자가소화를 유도할 수 있다. 또한, 균질화장치(homogenizer)를 사용할 경우 자가소화 유도를 위한 배양기간을

더욱 단축할 수 있다.

<23> 본 발명의 상기 자가소화를 유도시킨 배양액으로부터 효모의 자가소화물을 분리하는 단계를 포함한다. 즉, 본 발명은 단계(b)에서 얻어진 배양액으로부터 효모의 자가소화물을 분리하는 단계[단계(c)]를 포함한다.

<24> 상기 분리는 단계(b)에서 얻어진 배양액을 여과하여 여액을 취하거나 또는 단계(b)에서 얻어진 배양액을 원심분리하여 상등액을 취함으로써 수행될 수 있다. 또한, 상기 여액 또는 상등액은 통상의 방법에 따라 추가로 농축; 건조; 또는 농축 및 건조될 수도 있다. 상기 농축 과정에서 효모의 발효 산물인 알코올이 자연적으로 제거될 수 있다. 상기 농축은 통상의 감압농축 등을 포함하며, 상기 건조는 통상의 자연 건조, 열풍 건조, 동결 건조 등을 포함한다.

<25> 본 발명은 상기 제조방법으로 얻어진 효모 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 또는 주름개선용 약학 조성물을 포함한다. 즉, 본 발명은 치료학적 유효량의 상기 효모 추출물 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 약학 조성물을 제공한다.

<26> 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 패취제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 락토즈, 덱스트로즈, 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, 광물유, 및 전통 고약 제조법의 천연물 농축액 등을 포함한다. 또한, 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다. 경구용 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구용 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<27> 본 발명의 약학조성물에 함유되는 상기 효모 추출물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 효모 추출물은 1일 0.0001 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 1000 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 효모 추출물을 0.001 내지 50 % 중량백분율로 포함할 수 있다.

<28> 본 발명은 상기 제조방법으로 얻어진 효모 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 또는 주름개선용 화장료 조성물을 포함한다.

<29> 본 발명의 화장료 조성물은 본 발명의 제조방법에 따라 얻어진 효모 추출물을 사용하여 통상의 화장료 제조방법에 따라, 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화장료 조성물은 상기 효모 추출물을 함유하는 목욕액의 형태로 제조될 수 있으며, 이는 통상의 목욕물, 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석하여 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 밀크로션(영양로션), 영양크림, 영양에센스 등의 형태로 제조될 수도 있다.

<30> 이하, 본 발명을 실시예, 시험예 및 제조예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예, 시험예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

<31> 실시예 1. 효모 추출물의 제조

<32> 사카로마이세스 세레비제(*Sacchromyces cerevisiae*)(KCTC 1201) 효모를 분쇄한 맥아를 고온에서 당화시킨 맥즙(wort)으로 이루어진 배지 중에서 약 30 ℃에서 약 1 주일 동안 배양하였다 (1차 배양). 상기 배양액을 40 ℃에서 약 4 주 동안 배양하여(2차 배양) 상기 효모의 자가소화를 유도하였다. 얻어진 배양액을 맴브레인 필터로 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 발효 부산물인 알코올이 제거된 효모 추출물을 제조하였다.

<33> 실시예 2. 효모 추출물의 제조

<34> 60 ℃의 온도에서 2차 배양을 실시한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 효모 추출물을 제조하였다.

<35> 실시예 3. 효모 추출물의 제조

<36> 65 ℃의 온도에서 2차 배양을 실시한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 효모 추출물을 제조하였다.

<37> 실시예 4. 효모 추출물의 제조

<38> 70 ℃의 온도에서 2차 배양을 실시한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 효모 추출물을 제조하였다.

<39> 실시예 5. 효모 추출물의 제조

<40> 75 ℃의 온도에서 2차 배양을 실시한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 효모 추출물을 제조하였다. 그러나, 고온에서의 자가소화 유도는 배양액 내에 함유된 여러 효소 및 유기물들의 열변성 및 분해 등의 문제점이 발생하여 효능이 감소되였다. 따라서, 효모 자가소화의 원활한 유도와 효능의 유지를 위해서는 70 ℃ 이하의 조건에서 2차 배양을 실시하는 것이 바람직함을 알 수 있다.

<41> 실시예 6. 효모 추출물의 제조

<42> 효모의 자가소화를 유도하여 얻어진 배양액을 원심분리한 다음, 얻어진 상층액을 감압농축한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 효모 추출물을 제조하였다.

<43> 실시예 7. 효모 추출물의 제조

<44> 효모의 자가소화를 유도하여 얻어진 배양액을 원심분리한 다음, 얻어진 상층액을 감압농축한 후, 동결건조한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 효모 추출물을 제조하였다.

<45> 실시예 8. 효모 추출물의 제조

<46> 사카로마이세스 칼스베르겐시스(*Sacchromyces carlsbergensis*)(TISTR : 태국과학기술연구원 5195) 효모를 분쇄한 맥아를 고온에서 당화시킨 맥즙(wort)으로 이루어진 배지 중에서 약 25 ℃에서 약 1 주일 동안 배양하였다(1차 배양). 상기 배양액을 40 ℃에서 약 4 주 동안 배양하여(2차 배양) 상기 효모의 자가소화를 유도하였다. 얻어진 배양액을 맴브레인 필터로 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 발효 부산물인 알코올이 제거된 효모 추출물을 제조하였다.

<47> 시험예 1. 항산화 활성 측정

<48> DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, USA)의 환원력을 이용하는 상 등의 문헌 (Sang S *et al.*, J. Agric. Food Chem. 50(8), p2459-2463, 2002)에 기재된 방법에 따라, 본 발명에 따른 효모 추출물의 항산화 활성을 측정하였다.

<49> 메탄올에 녹인 0.2mM DPPH 용액 180 ul와 증류수 20ul에 녹인 시료(실시예 6 및 8에서 제조한 효모 추출물) (1, 5, 10%)를 96-웰 마이크로플레이트에 넣고 37 ℃에서 30 분간 배양한 후, 환원된 DPPH의 양을 분광광도계(Precision microplate reader; Molecular Devices, VersaMax)를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 가하지 않는 무첨가 대조군과 활성을 비교하였다. 상기 시험은 3회 반복하였으며, 그 결과는 다음 표 1과 같다.

표 1

<50>

시료	농도 (%)	저해율 (%)
효모 추출물 (실시예 6)	1	59.1 ± 10.0
	5	79.1 ± 10.1
	10	81.0 ± 14.1
효모 추출물 (실시예 8)	1	27.8 ± 2.5
	5	50.6 ± 9.4
	10	66.6 ± 6.2

<51> 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따라 제조된 효모 추출물은 용량-의존적으로 우수한 항산화 활성을 나타내며, 미백 및 주름개선 활성를 가질 것으로 기대된다.

<52> 실험예 2. 버섯 유래 티로시나제에 대한 저해활성 측정

<53> 이시하마 등의 문헌 (Ishihara Y *et al*. J. Antibiot(Tokyo). 44(1), p25-32, 1991)에 기재된 활성 실험법을 변형하여, 멜라닌 생합성에 관여하는 버섯 유래 티로시나제 저해활성을 측정하였다.

<54> 0.3 %의 티로신 용액 50 ul (0.1M 인산 완충액 pH6.8에 용해시킴임)와 증류수 50 ul에 녹인 시료(실시예 6 및 8에서 제조한 효모 추출물) (1, 5, 10%)를 96-웰 마이크로플리에트에 넣고 버섯 추출 티로시나제 (200U/ml, 0.1M 인산 완충액 pH6.8에 용해시킴) 50 ul를 첨가하였다. 37 ℃에서 10분간 배양한 후, 생성된 도파 크롬의 양을 분광광도계 (Precision microplate reader; Molecular Devices, VersaMax)를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 티로시나제 저해활성은 마쯔다 등의 문헌 (Matsuda H *et al*. Biol. Pharm. Bull. 19(1), p153-156, 1996)에 따라 다음 식에 따라 계산하였으며, 시료를 가하지 않는 대조군을 기준으로 하였다. 상기 시험은 3회 반복하였으며, 그 결과는 다음 표 2와 같다.

<55> * 티로시나제 억제활성(%)

<56> = {(대조군 OD_{475} - 시료 OD_{475}) / 대조군 OD_{475}} X 100

표 2

<57>

시료	농도 (%)	저해율 (%)
효모 추출물 (실시예 6)	1	48.6 ± 6.2
	5	85.6 ± 2.6
	10	107.4 ± 5.9
효모 추출물 (실시예 8)	1	13.7 ± 5.3
	5	42.5 ± 3.6
	10	64.6 ± 3.0

<58> 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따라 제조된 효모 추출물은 용량-의존적으로 우수한 티로시나제에 대한 저해 활성을 가지므로, 우수한 미백 활성을 가진다. 이는 대한민국 특허 제10-0616445호의 결과와 대조적이며, 따라서 본 발명에 따라 제조되는 효모의 자가소화물, 즉 효모 추출물은 상기 대한민국 특허 제10-0616445호에 따라 얻어진 추출물과 상이한 조성을 갖는 것으로 추정된다.

<59> 시험예 3. B16F10 멜라노마 (melanoma)에 대한 효능 실험

<60> 알레나 등의 문헌 (Alena F *et al*., Cancer Res. 50(12), p3743-3747, 1990)에 기재된 방법을 참조하여, 아래와 같이 B16F10 멜라노마를 이용한 멜라닌 생성 억제 활성을 측정하였다.

<61> (1) 세포배양

<62> B16F10 생쥐 유래 멜라노마 세포주 (B16F10 murine melanoma cell line)(ATCC CRL-9475)를 10% 우태아혈청 (Fetal bovine serum)이 함유된 DMEM 배지 (Dulbecco's modified essential medium)에서 배양하였다. 100 mm 세포 배양 접시에 10 ml의 배양액을 넣고 약 5 X 10^5의 농도로 세포를 접종한 후, 37 ℃, 5% CO_2 환경에서 배양하였다. 약 3 ~ 4일 후, 세포가 충분히 생장하면, 24-웰 플레이트에 7 X 10^4 세포/웰로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 흑색종화 (melanogenesis)를 촉진하는 것으로 알려진 alpha-MSH (alpha-melanin stimulating hormone)를 배지에 첨가하였다. 웰당 990 ul의 배양액을 매일 갈아주고, 농도에 맞춘 10 ul의 시료(실시예 6의 효모 추출물)를 3일간 처리한 후, 1일간 더 배양하였다.

<63> (2) 멜라닌 함량 측정

<64> 상기 (1)에서 배양한 세포에서 배지를 제거한 후, 세포를 10mM 인산완충액 (PBS, pH7.4)으로 세척한 다음 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 10mM 인산완충액으로 다시 세척하고 원심분리하여 얻어진 세포 펠렛(cell pellet)에 10% DMSO (dimethyl sulfoxide)가 포함된 1N 수산화나트륨 용액을 첨가한 후, 60 ℃에서 2시간 동안 배양하여 멜라닌을 용해시킨 후, 400 내지 405 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하여, 멜라닌 함량을 측정하였다.

<65> (3) 세포 생존율 측정

<66> (1)에서 배양한 세포에서 배지를 제거하고, 세포를 10mM 인산완충액 (PBS, pH7.4)으로 세척한 후, 크리스탈 바이올렛 염색제 (Crystal violet 0.1%, 10% 에탄올, 나머지 PBS)를 200 ul를 첨가하여 5분간 상온에서 배양한 후, 물로 2회 세척하였다. 에탄올 1 ml을 첨가하여 상온에서 20분간 진탕한 후, 590 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하여, 세포 생존율을 측정하였다.

<67> (4) 시험결과

<68> 상기와 같이 멜라닌 함량 및 세포 생존율을 측정한 결과는 도 1과 같다. 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라 얻어진 효모 자가소화물은 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제시킬 뿐만 아니라, 세포독성 또한 낮아 우수한 미백용 약학 조성물 및 미백용 화장료 조성물로 사용할 수 있음을 확인할 수 있다.

<69> 시험예 4. 피부섬유아 세포에서의 콜라게나제 억제 활성 측정

<70> (1) 세포 배양

<71> 유아 포경에서 절제된 피부 진피층에서 분리 및 배양하여 수득한 인간 정상 피부섬유아세포(Human normal dermal fibroblast)(MCTT : Mordern Cell & Tissue Technologies, Seoul, Korea, Cataloge No. MC1213)를 6웰 플레이트(6-well plate)의 각 웰(well)에 1 x 10^5 개수의 세포가 되도록 접종한후, 우태아 혈청(fetal bovine serum)이 10 % 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 24시간 동안 배양하였다.

<72> (2) 자외선 조사 및 효모 자가소화물의 처리

<73> (1)에서 배양된 세포에 인산 완충액(Phosphate buffered saline, PBS)을 이용하여 세포를 3회 세척한 다음, 다음과 같이 자외선 A 또는 자외선 B를 조사하여 피부노화를 유발하였다. 자외선 A: 자외선 A 램프(Sankyo Denki FL8BL lamp, Sankyo Denki Co., Japan)를 이용하여 1초당 27 mW/cm^2의 에너지 양으로 총 50 mJ/cm^2를 조사; 자외선 B: 자외선 B 램프(Sankyo Denki G9T5E lamp, Sankyo Denki Co., Japan)를 이용하여 1초당 1.15 mW/cm^2의 에너지 양으로 총 100 mJ/cm^2를 조사. 자외선 조사 직후, 세포를 다시 인산 완충액으로 세척하고 우태아 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지에 효모 자가소화물(실시예 6의 효모 추출물)을 0.5, 1% 의 농도로 첨가하여 48 시간 동안 추가로 배양하였다. 시험군은 다음과 같이 나누었다:

<74> - 무처리군 - 자외선 및 효모 자가소화물 모두 처리하지 않음

<75> - 자외선 단독 처리군 - 자외선만 처리

<76> - 실험군 - 자외선 및 효모 자가소화물(0.5 또는 1%)을 처리

<77> (3) RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

<78> 전체 RNA (Total RNA) 분리는 통상적인 TRIZOL 방법을 이용하였고, RNA 퀄리티와 퓨리티는 A260/280 비를 구하여 계산하였다. 또한 1.5% 아가로스 젤 영동을 이용해 RNA의 안정성을 확인하였다. RT-PCR은 One-step RT-PCR PreMix Kit (Cat No. 25101, 인트론 바이오테크놀로지, 한국)을 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 수행하였다.

<79> 프라이머 올리고뉴클레오티드 서열은 인간 유래 MMP-1 (Matrix metalloproteinase type I)에 작용하는 것으로 보고된 서열을 상동성 (homology) 확인을 거쳐 이용하였다. 즉, 정방향 MMP-1 프라이머는 3'-ATTCTACTGATATCGGGGCTTTGA-5'이고, 역방향 MMP-1 프라이머는 5'-ATGTCCTTGGGGTATCCGTGTAG-3' 이다. 이는 약 409bp의 DNA 프래그먼트를 증폭시키는 것으로 나타났다. 휴먼 베타-액틴 유전자(human beta-actin gene)에 대한 GAPDH의 프라이머(정방향: 5'-TGGAAATCCCATCACCATTT-3', 역방향: 5'-GGAGGCATTGCTGATGATCT-3')는 Bioneer (Daegu, Korea)로부터 구입하였다. 이는 약 240bp의 DNA 프래그먼트를 증폭시키는 것으로 나타났다. 또한 측정 시료 각각의 mRNA 양을 확인하기 위하여 사용하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시한 후, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide, EtBr) 염색을 실시하였다.

<80> (4) 시험결과

<81> 인간 정상 피부섬유아세포에 자외선을 조사한 경우(자외선 단독 처리군) MMP-1의 발현은 증가하였으나, 본 발명에 따라 얻어진 효모 자가소화물 처리에 의하여 MMP-1의 발현은 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서, 본 발명에 따라 얻어진 효모 추출물은 콜라겐의 생성과 분해에 관여하는 콜라게나제(MMP-1)의 유전자 발현을 억제함으로써 우수한 주름개선 활성을 가짐을 알 수 있다.

<82> 제제예 1. 목욕액

<83> DL-락트산나트륨 21 g, 피루브산 나트륨 8 g, 실시예 1에서 제조한 효모 자가소화물 5 g, 에탄올 40 g, 정제수 26 g, 적당량의 색소와 향료를 혼합하여 목욕액을 제조하였다. 얻어진 목욕액은 사용시 목욕물 중에 약 100-10,000 배로 희석하여 사용할 수 있다. 또한, 얻어진 목욕액은 목욕물 대신 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석하여 사용할 수도 있다.

<84> 제제예 2. 스킨로션

<85> 정제수 100 ml에 글리세린 3 g, 부틸렌글리콜 2g, 프로필렌 글리콜 2 g, 방부제를 투입하여 교반하여 용해시킨 후, 폴리옥시에칠렌(60) 경화 피마자유 1 g를 60 ℃정도 가열하여 용해시킨 후 향료를 투입 교반한 다음, 정제수 80.9 g에 투입하였다. 실시예 6에서 제조한 효모 자가소화물 1 g, 에탄올 10 g, 트리에탄올 아민 0.1 g, 색소를 투입하여 충분히 교반하여 스킨로션을 제조하였다.

<86> 제제예 3. 밀크로션(영양로션)

<87> 시토스테롤 1.7 g, 폴리글리세릴 2-올레이트 1.5 g, 세라마이드 0.7 g, 세테아레스-4 1.2 g, 콜레스테롤 1.5 g를 65 ℃에서 균질화하고 실시예 6에서 제조한 효모 자가소화물 1 g 및 디세틸 포스페이트 0.4 g, 농글리세린 5.0 g, 선플라우어 오일 10 g, 카르복시비닐폴리머 0.2g, 산탄검 0.3g, 방부제를 가열 용해시키고, 이 용액에 정제수 76.5 g를 가한 후 균질화기에서 유화시킨 다음, 적당량의 향료를 가하고 다시 교반 혼합하여 밀크로션을 얻었다.

<88> 제제예 4. 영양크림

<89> 시토스테롤 4 g, 폴리글리세릴 2-올레이트 3 g, 세라마이드 0.7 g, 세테아레스-4 2 g, 콜레스테롤 3 g를 65 ℃에서 균질화하고 실시예 6에서 제조한 효모 자가소화물 3 g 및 디세틸포스페이트 0.4 g, 농글리세린 5.0, 선플라우어 오일 22 g, 카르복시비닐폴리머 0.5 g, 방부제를 가열 용해시키고, 이 용액에 정제수 56.4 g를 가한 후 균질화기에서 유화시킨 다음, 적당량의 향료를 가하고 다시 교반 혼합하여 영양크림을 제조하였다.

<90> 제제예 5. 영양에센스

<91> 시토스테롤 1.7 g, 폴리글리세릴 2-올레이트 1.5 g, 세라마이드 0.7 g, 세테아레스-4 1.2 g, 콜레스테롤 1.5 g를 65 ℃에서 균질화하고 여기에 실시예 6에서 제조한 효모 자가소화물 5 g 및 디세틸포스페이트 0.4 g, 농글리세린 5.0, 선플라우어 오일 15 g, 카르복시비닐폴리머 0.2 g, 산탄검 0.2 g, 방부제를 가열 용해시키고, 이 용액에 정제수 67.6 g을 가한 후 균질화기에서 유화시킨 다음, 적당량의 향료를 가하고 다시 교반 혼합하여 영양에센스를 제조하였다.

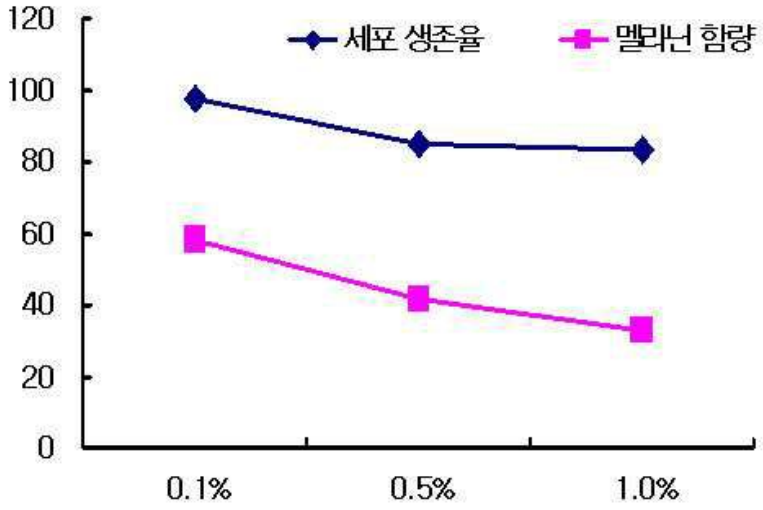
도면의 간단한 설명

<92> 도 1은 본 발명에 따라 제조된 효모 자가소화물이 B16F10 생쥐 멜라노마 세포주에서 멜라닌 생성량과 세포 생존율에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타내고,

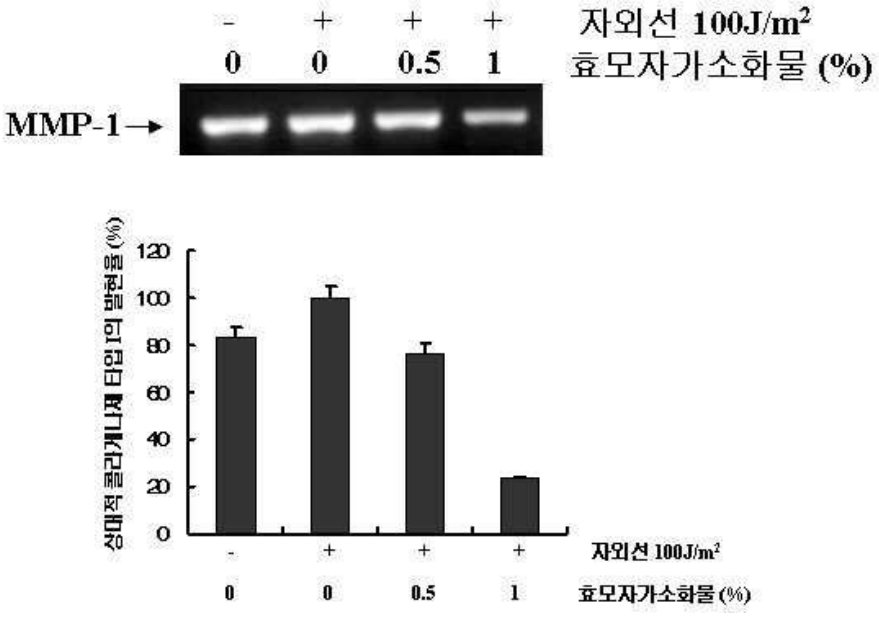
<93> 도 2는 본 발명에 따라 제조된 효모 자가소화물이 피부 섬유아세포에서 콜라겐의 분해에 관여하는 콜라게나제 타입 I의 발현 변화를 측정한 결과를 나타낸다.

도면

도면1


세포 생존율
멜라닌 함량
120
100
80
60
40
20
0
0.1%
0.5%
1.0%

도면2


- + + +
자외선 100J/m²
0 0 0.5 1
효모자가소화물 (%)
MMP-1
상대적 콜라겐 I 형 mRNA 단일 밴드의 발현율 (%)
120
100
80
60
40
20
0
- + + +
자외선 100J/m²
0 0 0.5 1
효모자가소화물 (%)