



등록특허 10-2493311



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월30일

(11) 등록번호 10-2493311

(24) 등록일자 2023년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9717 (2017.01) A61K 8/99 (2017.01)
A61Q 17/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 8/9717 (2017.08)
A61K 8/99 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0015645

(22) 출원일자 2022년02월07일

심사청구일자 2022년02월07일

(30) 우선권주장
1020210191198 2021년12월29일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020110099950 A*
KR102133689 B1*
Journal of Investigative Cosmetology, Vol.16,
No.3, pp.249-257(2020.09.30.) 1부.*
KR1020210094867 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조선대학교 산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자
이숙영
광주광역시 남구 봉선중앙로 46, 108동 201호(봉선동, 삼익아파트)
김세윤
광주광역시 광산구 첨단중앙로 181번길 16 벽산아파트 103동 104호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 강신건

(54) 발명의 명칭 4종의 해조류 추출물을 포함하는 항산화용 또는 항균용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 4종의 해조류 추출물을 포함하는 항산화 또는 항균용 화장품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함함으로써 우수한 항산화 또는 항균효과를 나타낼 수 있고, 궁극적으로 피부 개선 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61Q 17/005 (2013.01)
A61K 2800/522 (2013.01)
A61K 2800/5922 (2013.01)

(72) 발명자
김춘성
광주광역시 남구 서문대로678번길 7, 101동 1002호(진월동, 대주아파트)

최다인
광주광역시 광산구 첨단중앙로181번길 42-14, 202동 1411호(월계동, 일신아파트)

황은주
광주광역시 남구 대남대로237번길 19-12(주월동)
정영일
전라남도 화순군 화순읍 칠층로 23, 102동 1004호(화순청미래아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1525011797
과제번호	202106562
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	빅데이터기반해양바이러스제어및마린바이오틱스개발(R&D)
연구과제명	해조류 기반 바이오 헬스케어 유효성 소재 실증 지원
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교 산학협력단
연구기간	2021.04.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 추출물, 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*) 추출물, 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 추출물 및 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 추출물을 3 내지 5: 3 내지 5: 1: 1의 중량비로 포함하고,

셀레늄이 포함된 배지에서 유산균을 배양 후 유산균은 필터로 제거된 배양여액을 더 포함하는 향산화 또는 항균용 화장료 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 꼬시래기 추출물은 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 꼬물꼬시래기 추출물은 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 돌가사리 추출물은 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 불등풀가사리 추출물은 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물인, 향산화 또는 항균용 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 프로투스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)에 대한 항균활성을 나타내는, 향산화 또는 항균용 화장료 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 꼬시래기 유래 녹색소 및 꼬시래기 유래 자색소를 더 포함하는, 향산화 또는 항균용 화장료 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 핸드케어용인, 향산화 또는 항균용 화장료 조성물.

청구항 9

꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 혼합하여 혼합물을 얻는 단계; 및

셀레늄이 포함된 배지에서 유산균을 배양하여 유산균 배양액을 얻고, 상기 배양액에서 유산균이 제거된 배양여액을 상기 혼합물에 첨가하는 단계;를 포함하는 항산화 또는 항균용 화장료 조성물의 제조방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 포함하고,

셀레늄이 포함된 배지에서 유산균을 배양 후 유산균이 제거된 배양여액을 더 포함하는 항산화 또는 항균용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항산화 또는 항균용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 피부는 신체의 가장 큰 기관으로서 외부환경과 직접 접해 있으면서 신체 안으로 침입하려는 외부의 다양한 유해인자, 예를 들면, 온도, 습도 및 자외선 등으로부터 신체를 보호하는 역할을 할 뿐만 아니라, 몸의 체온을 조절해주는 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나 이러한 피부는 각종 오염물질, 강한 자외선, 스트레스 및 영양결핍 등으로 인해 피부 세포들이 손상을 입게 되고, 세포 증식이 제대로 이루어지지 않게 되어 피부에 주름, 탄력 손실 및 각질화 등의 문제가 발생하게 된다.

[0004] 예를 들어, 자외선은 피부노화의 주된 요인으로서 생체 내 항산화제를 감소시키고 체내에 과잉의 유해한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 지속적으로 생성시키고 축적시킨다. 활성산소종은 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion radical($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxy radical($\text{ROO}\cdot$)과 같은 산소중심의 라디칼과 singlet oxygen($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroperoxide(ROOH) 등의 비라디칼 종들이 있다. 이러한 자유라디칼에 의해 유발된 산화적 스트레스는 lipopolysaccharide로 유도된 염증반응계에서 ROS의 조절에 관여한다. 항산화물질은 자유라디칼에 의한 산화적 손상을 보호하고 면역조절계의 preinflammatory 활성제의 활성을 저해한다. 산화적 스트레스는 생체내의 산화적 손상 및 항상성의 붕괴를 통하여 피부 노화를 가속시킨다. 생체 내에 ROS가 과잉 생산될 경우 생체 내에서 지질과산화 반응, 피부노화가 촉진된다. ROS는 세포 구성성분들을 비가역적으로 파괴함으로써 암이나 각종 염증, 심혈관계 질환 등의 원인으로 작용하며 피부질환이나 노화의 직간접적인 원인으로 작용하게 된다. ROS에 의한 피부손상에 대항하기 위한 항산화 방어기전이 있다. 효소적 항산화제인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase(CAT), ascorbate-specific peroxidase(APX)와 비효소적 항산화제인 flavonoid, 비타민 C, 비타민 E 등이 활성산소를 소거함으로써 항상성을 유지한다. 최근 약용식물을 비롯한 천연물질에서 항산화제 성분을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다. Butylated hydroxyanisole(BHA)나 butylated hydroxytoluene(BHT) 같은 합성 산화제는 효능과 경제성은 높으나 안전성 문제가 제기되어 있고 vitamin E(tocopherol) 같은 천연 항산화제는 합성 산화제와 비교하여 안전성은 높으나 효능이 낮고 가격이 비싸다는 단점을 가지고 있어 천연물질로부터 기능성이 있는 생리활성물질에 관한 연구가 요구되고 있다.

[0005] 다른 예를 들어, 피부상재균에 의하여 피부질환이 발생할 수 있다. . 대표적인 피부상재균은 Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Propionibacterium acnes, Plasmodium ovale, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis 등이 있으며, 상기 균들은 피부에 악영향을 주고 있어 이들을 조절하기 위하여 항생제나 합성방부제가 사용되고 있다. 하지만 합성방부제는 피부자극이나 안전성 문제를 나타낼 수 있어 인체에 무해하고 저렴한 천연

항균제나 방부제의 개발이 요구된다.

[0007] 한편, 해양 거대조류(macroalgae)인 해조류는 재생 가능한 다 세포 원생생물로, 바다의 깊이와 색소의 구성에 따라 녹조류 (green algae), 갈조류(brown algae), 홍조류(red algae)로 분류되며 구성성분의 차이가 있다. 그 중 가장 많이 연구되고 있는 갈조류는 전 세계에 약 1,500종이 발견되어 있으며 해조류 중 가장 발달된 체계를 가지고 있다. 갈조류는 fucoidan, laminaran, alginic acid 등의 다당류 및 폴리페놀류와 같은 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있으며, 플로로탄닌(phlorotannin)이라는 독특한 폴리페놀 2차 대사산물을 함유하고 있어 해조류의 다양한 생리활성에 기여한다. 해조류는 열량이 낮고 식이섬유, 비타민, 무기질 등이 풍부하며 생리활성 물질을 다량 함유하고 있다. 최근에는 천연해양식물 중에 함유된 다양한 생리활성 물질에 관한 연구가 관심을 끌고 있으나 갈조류 기능성 물질 탐색이 주류를 이루어 홍조류의 항산화, 항염증, 항균 작용에 대한 연구는 미미한 실정이다.

[0008] 홍조류(紅藻類)는 조류로 분류되는 원생생물의 한 갈래로, 전 세계에 약 600속의 2,000종 정도가 알려져 있으며 김과 꼬시래기, 우뚝가사리가 대표적이다. 모두 분홍색이나 암홍색 색소체를 가지며, 엽록소 a, d와 카로틴(carotene), 크산토폴(xanthophyll), 피코빌린(phycobiline)이 주된 색소류이며, 광합성 작용에 의해 홍조 녹말을 만든다. 홍조류는 극히 일부가 단세포체이거나 군체를 이루고, 대부분은 다세포체이며, 지리적으로 온대 및 열대 해역에 많은 종류가 분포하며, 세포벽은 셀룰로오스(cellulose), 펙틴(pectin) 이외에 한천(agar), 카라기난(carrageenan)과 같은 콜로이드 물질로 되어 있다. 김이나 풀가사리 무리처럼 얕은 바다에서 생육하는 것도 있지만, 대부분의 홍조식물은 간조선보다 더 깊은 곳에서 자란다. 특히, 우뚝가사리는 약 10m 정도의 깊은 곳에서 많이 자라며, 이 밖에 100m 이상의 깊은 곳에서 자라는 종류도 매우 많다. 홍조식물이 이렇게 깊은 곳에서 자랄 수 있는 것은 체내에 있는 홍조소가 약 0.5m μ 부근의 단파장 빛을 광합성에 이용하기 때문이다. 빛은 바다 수심이 깊어짐에 따라 적색·주황색·황색·자색·남색·녹색·청색의 순서로 흡수되므로, 가장 깊은 곳까지 도달될 수 있는 것은 청색과 녹색이다. 따라서, 홍조식물은 깊은 바다에 위치하면서 자신의 몸 빛깔과 보색 관계에 있는 청색이나 녹색빛을 광합성에 이용한다. 한편, 얕은 곳에서 자라는 진두발 등은 전체적으로 녹색을 띠므로, 홍조식물이 아니라고 생각되기도 하는데, 이것은 적색이나 황색의 장파장 빛을 광합성에 잘 이용한 결과 녹색 엽록소량은 늘어난 반면 홍조소는 감소된 보색 적응 현상 때문이다.

[0009] 홍조류를 구성하고 있는 성분들의 함량은 종류에 따라 다양하지만 일반적으로 탄수화물 40~60%, 단백질 26.4%, 지방 0.8%, 회분 17.5% 등으로 구성되어 있으며 카라기난과 비타민A, 식이섬유가 풍부하다. 갈조류와 녹조류의 탄수화물의 함량이 40~50%인데 반해, 우뚝가사리나 꼬시래기 같은 홍조류는 탄수화물 함량이 높아 바이오매스로 충분히 활용가능하며 전세계적으로 분포되어 있어 활발하게 연구되고 있다. 홍조류의 대표적인 탄수화물 저장형태는 한천, 셀룰로오스, 카라기난이다. 계절에 따라 홍조류의 한천 함량 변동이 있지만, 전체적으로 33~35% (건물기준) 정도이며 한천은 그 자체가 식품, 과자에 사용되기도 하지만, 여러 가지 용도로 광범위하게 사용되고 있다. 홍조류는 탄수화물, 무기질, 단백질 등이 풍부하여 장 활동을 원활하게 하고 중금속 배출, 혈관 내 콜레스테롤이 쌓이는 것을 방지하는 등의 효과가 있다. 이는 열량이 낮고 혈액순환을 돕기 때문에 다이어트를 할 때 먹어도 좋고, 칼륨이 풍부해 고혈압 환자에게도 도움이 된다. 또한 카라기난 성분은 항바이러스 작용과 면역력 증진에 효과가 있는 물질이다. 홍조류는 다른 해조류에 비해 건조중량당 칼슘함량이 50%이상으로 함유되어 있으며 해조칼슘은 무미, 무취하며 oil 및 수분흡수력이 우수한 벌집형의 다공질 구조이다. 다공질 구조의 특징은 소화흡수율이 우수하고 Buffering Capacity가 탁월하여 입안의 젖산을 중화하여 주름을 예방하고 이산화탄소 발생을 느리게 하고 식감(뽕가루를 씹는 듯한 이물감)이 전혀 없으며 식물성이라 여성에게 특히 좋다. 또한, 중금속함량(특히 납)이 매우 낮아 요즘 중금속 오염문제로 심각한 논란이 제기되고 있는 타 칼슘제의 대체 원료로도 각광받고 있다.

[0010] 홍조류에 속하는 해조류 중 하나인 꼬시래기는 한천의 주원료가 되고 있고, 열대에서 온대에 걸쳐 세계 각지에 생육하며 홍조식물문 홍조강 꼬시래기목 꼬시래기과에 속하며 전세계적으로는 110종이 알려져 있으며, 따뜻한 지역의 깊이 얕은 바다에서 서식하며, 조간대의 사니질 속에 묻혀 있는 돌, 조개 껍데기뿐만 아니라 조하대의 바위 위에서 생육한다. 국내의 경우, 주로 장흥과 완도, 해남, 진도 지역에서 자라나는 해초로, 우뚝가사리와 섞어 한천 재료로 사용하기도 하지만 해초 자체로도 훌륭한 식재료이다. 엽체는 원반상의 부착기에서 단독으로 생기며, 원주상으로 가는 끈과 같은 형태로 성장하며, 매우 촘촘하게 깃모양으로 분기하고 가지는 한쪽 면으로 편생하여 나며, 가지 기부는 가늘고, 정단부도 가는 형태이다. 엽체의 색은 자갈색이며 건조하면 암자색 또는 암갈색으로 되며, 크기는 10~30cm 정도이고, 굵기는 2~3mm 정도로 성장한다. 꼬시래기에는 단백질 1.8%, 지방 0.2%, 탄수화물 5.9%, 섬유질 0.3%, 무기질 2.7% 등이 함유되어 있으며 비타민A, 비타민 B2, 비타민C도 풍부하다. 본초강목에 나와있는 꼬시래기의 특성은 맛은 달며 성질은 차고 독이 없고 소변을 배출시키고 내열을 제거

하는 것으로 기록되어 있다. 발육 촉진, 골다공증 예방, 체내 중금속 배출 등에도 효능이 있으며 고혈압, 당뇨 등의 성인병 예방과 변비에도 효과가 높다. 꼬시래기는 요오드 함량이 높으므로 갑상선 종양이나 갑상선기능 항진증에 사용해 왔고 체내의 중금속 배출 효과 또한 뛰어나다. 풍부한 식이섬유는 몸에 쌓인 과다지방 및 노폐물을 배출하는데 도움을 주고 낮은 칼로리로 인해 다이어트에 도움이 되면서도 골다공증이나 고지혈증 등에도 효과가 있다. 꼬시래기 유래 천연물은 화장품원료로 등재되어 있다.

[0011] 홍조류에 속하는 해조류 중 하나인 꼬물꼬시래기는 홍조식물문 꼬시래기목 꼬시래기과에 속하며, 엽체는 적갈색의 연골질로 꾸불꾸불한 채적모양이며 길고 짧은 가지를 나선 모양으로 다발을 이룬다. 식물체의 크기는 30~40cm 이며 피층은 가름한 구슬모양의 세포가 1~2겹으로 쌓여 이루어졌고, 수조직은 대단히 크고 둥근 세포로 이루어졌다. 사분포자낭은 피층조직에 들어있으며 타원형으로 나누어지며 정자낭집은 수조직에 이르기까지 깊이 들어간 향아리 모양이며, 생육지 조간대의 모래밭 근처 돌에 붙어 자란다. 주요 용도는 초절임, 해초샐러드, 한천의 원료, 한약재로 이용되고 있으며, 주요 유효성분은 citrulline, taurine vercoyosin, lectin, prostaglandin을 함유하고 있으며, vercoyosin은 항 stress 케양 활성이 있고, lectin은 세포응집 활성, 혈압강하, 혈소판응집억제, 위액분비 억제, 장관운동 항진, 기관지 확장, 자궁 수축, 이뇨; 갑상선종, 폐결핵, 향균, 위장질환, 비뇨기질환, 수종에 효과가 있는 성분이다. 꼬물꼬시래기 유래 천연물은 화장품원료로 등재되어 있다.

[0012] 한편, 셀레늄은 세포막의 손상을 야기하는 과산화수소를 파괴하는 작용을 갖는 글루타치온 퍼옥시다제를 활성화하고, 세포막의 과산화에 의한 손상을 방지하여 노화를 지연시키는 작용을 하며 또한 여러가지 중금속에 의한 중독을 해독하는 등 우수한 성질을 나타낸다고 알려져 있다. 특히 셀레늄은 암을 비롯한 여러가지 종양성 질환을 예방하는 성질을 갖고 있으며, 동물실험에 의하여 쥐에 셀레늄을 식이로 섭취시켰을 경우 암 발생을 40~60% 감소시켰다는 결과와 유방암 환자에서 혈액 내 셀레늄 농도와 암발생 빈도가 반비례한다는 결과가 보고되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1519234호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 항산화 또는 항균용 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0016] 본 발명은 항산화 또는 항균용 화장료 조성물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0018] 1. 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 추출물, 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*) 추출물, 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 추출물 및 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 추출물을 포함하는 항산화 또는 항균용 화장료 조성물.

[0019] 2. 위 1에 있어서, 상기 꼬시래기 추출물, 상기 꼬물꼬시래기 추출물, 상기 돌가사리 추출물 및 상기 불등풀가사리 추출물을 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 포함하는, 항산화 또는 항균용 화장료 조성물.

[0020] 3. 위 1에 있어서, 상기 꼬시래기 추출물은 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 꼬물꼬시래기 추출물은 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 돌가사리 추출물은 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물이고, 상기 불등풀가사리 추출물은 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물인, 항산화 또는 항균용 화장료 조성물.

[0021] 4. 위 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 프로피오니박테리움 아크네스

(*Propionibacterium acnes*)에 대한 항균활성을 나타내는 항산화 또는 항균용 화장료 조성물.

- [0022] 5. 위 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 셀레늄이 포함된 배지에서 유산균을 배양하여 얻어진 유산균 배양액을 더 포함하는, 항산화 또는 항균용 화장료 조성물.
- [0023] 6. 위 5에 있어서, 상기 유산균 배양액은 상기 배양 후 유산균이 제거된 배양여액인, 항산화 또는 항균용 화장료 조성물.
- [0024] 7. 위 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 꼬시래기 유래 녹색소 및 꼬시래기 유래 자색소를 더 포함하는, 항산화 또는 항균용 화장료 조성물.
- [0025] 8. 위 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 핸드케어용인, 항산화 또는 항균용 화장료 조성물.
- [0026] 9. 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 혼합하여 혼합물을 얻는 단계;를 포함하는 항산화 또는 항균용 화장료 조성물의 제조방법.
- [0027] 10. 위 9에 있어서, 셀레늄이 포함된 배지에서 유산균을 배양하여 유산균 배양액을 얻고, 상기 유산균 배양액을 상기 혼합물에 첨가하는 단계;를 더 포함하는 항산화 또는 항균용 화장료 조성물의 제조방법.
- [0028] 11. 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 항산화 또는 항균용 의약외품 조성물.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 조성물은 우수한 항산화 또는 항균효과를 나타낼 수 있고, 궁극적으로 피부 개선 효과를 나타낼 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 모두 포함함으로써 이들을 단독으로 포함하는 경우에 비해 우수한 항산화 또는 항균 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 일 실시예에 따른 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 복합물의 항균 효과를 확인한 결과이다.
- 도 2는 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물의 SOD 활성, APX 활성, CAT 활성 효능을 확인한 결과이다.
- 도 3은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물의 세포내 활성산소(ROS) 생성 억제 효능을 확인한 결과이다.
- 도 4는 분리된 꼬시래기 유래 녹색소 및 자색소를 나타낸다.
- 도 5는 일 실시예에 따른 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 복합물, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 조성물의 SOD 활성 효과를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 본 발명은 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 추출물, 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*) 추출물, 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 추출물 및 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 추출물을 포함하는 항산화 또는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 출원의 발명의 설명 및 도면에서 꼬시래기는 *G. verrucosa* 또는 *G. verru*; 꼬물꼬시래기는 *G. vermiculophylla* 또는 *G. vermin*; 돌가사리는 *C. tenellus* 또는 *C. tene*; 불등풀가사리는 *G. furcata* 또는 *G. furc*으로도 표현될 수 있다.
- [0036] 용어 “추출물”은 추출 대상 물질을 용매에 녹여 분리한 물질을 의미하고, 구체적으로 추출대상의 추출처리에 의하여 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 동결건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등의 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성가능한 모든 제형의 추출물을 포함할 수 있다.

- [0037] 추출방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 예컨대 추출방법은 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등일 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.
- [0038] 꼬시래기 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물일 수 있다. 꼬물꼬시래기 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물일 수 있다. 돌가사리 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물일 수 있다. 불등풀가사리 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물일 수 있다. 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있다.
- [0039] 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 C1 내지 C4의 저급알코올과 물이 혼합된 혼합물인 C1 내지 C4의 저급 알코올 수용액일 수 있다. C1 내지 C4의 알코올 수용액은 10%이상 내지 100%(v/v)미만, 20%이상 내지 100%(v/v)미만, 30%이상 내지 100%(v/v)미만, 40%이상 내지 100%(v/v)미만, 50%이상 내지 100%(v/v)미만, 60%이상 내지 100%(v/v)미만, 70%이상 내지 100%(v/v)미만, 80%이상 내지 100%(v/v)미만 또는 90%이상 내지 100%(v/v)미만의 C1 내지 C4의 저급알코올 수용액일 수 있다.
- [0040] 일 실시예에 따르면, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물은 꼬시래기, 꼬물꼬시래기, 돌가사리 및 불등풀가사리 건조 분말 각각에 95% 에탄올을 첨가하여 추출한 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 화장료 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 1.5 내지 6.5:1.5 내지 6.5:1:1 중량비, 2 내지 6: 2 내지 6:1:1의 중량비, 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비 또는 4:4:1:1 중량비로 포함할 수 있고, 구체적으로 2 내지 6: 2 내지 6:1:1의 중량비로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비로 포함할 수 있다.
- [0042] 일 구현예에 따르면, 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물 및 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물을 4:4:1:1의 중량비로 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 화장료 조성물은 4종의 해조류 추출물 중 꼬시래기 추출물 및 꼬물꼬시래기 추출물을 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물 보다 높은 함량으로 포함함으로써 우수한 항산화 및/또는 항균 효과를 나타낼 수 있다.
- [0044] 본 발명의 화장료 조성물은 전술한 4종의 해조류 추출물 외에 셀레늄이 포함된 배지에서 배양된 유산균 배양액 (또는 유산균 발효 배양액)을 더 포함할 수 있다.
- [0045] 유산균은 당업계에서 공지된 유산균이면 제한되지 않는다. 일 실시예에 따르면, 유산균은 락토바실러스 델브루키 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*)일 수 있다.
- [0046] 배지는 당업계에서 공지된 배양 배지일 수 있고, 예컨대 MRS 배지일 수 있다. 일 실시예에 따르면, 셀레늄은 소듐 셀레네이트 무수물일 수 있다. 상기 배지는 소듐셀레네이트 무수물을 10 내지 100mg/L 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 유산균 발효 배양액은 유산균을 포함하지 않는 것일 수 있다. 즉, 상기 유산균 배양액은 상기 배양 후 유산균이 제거된 배양여액일 수 있다. 구체적으로, 유산균 발효 배양액은 유산균 배양 후 필터를 통해 멸균 과정을 거쳐 균을 제거하여 얻어진 배양액일 수 있다.
- [0048] 배지에 포함된 셀레늄은 피부 염증을 막는 중요한 효소인 글루타치온을 재생하는데 중요한 역할을 할 수 있다. 유산균 발효 과정을 거치면서 합성된 여러 가지 비타민, 단백질, 유당, 유산 기타 무기물 등은 피부에 흡수되어 피부 개선 효능을 나타낼 수 있다. 또한, 발효 과정에서 나타나는 유익균은 유효성분을 나노미터 (10억분의 1m) 크기의 입자로 잘게 분해해 유효성분을 효과적으로 피부 내부로 전달할 수 있다. 이에, 본 발명의 화장료 조성물은 셀레늄을 포함하는 배지에서 배양된 유산균 발효 배양액을 포함함으로써 셀레늄과 발효 배양액에 포함된 다양한 성분들이 피부 개선 효과를 나타낼 수 있다.
- [0049] 본 발명의 화장료 조성물은 총 중량에 대하여 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물; 및 유산균 발효 배양액;이 혼합된 복합 조성물을 0.1 내지 10 중량%로 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 화장료 조성물은 전술한 4종의 해조류 추출물 외에 꼬시래기 유래 녹색소 또는 꼬시래기 유래 자색소 중 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.
- [0051] 꼬시래기 유래 녹색소 및 꼬시래기 유래 자색소는 색소의 용출속도 차이를 이용하여 분리할 수 있다.

- [0052] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 꼬시래기 유래 녹색소 및 꼬시래기 유래 자색소를 포함함으로써 녹색소와 자색소 본연의 바이오활성을 높일 수 있다.
- [0053] 녹색소는 상처로 인한 염증 개선, 박테리아 감염예방, 항바이러스, 대상포진으로부터 피부 보호, 피부암 예방, 타입 I 콜라겐 합성, UVS에 의해 유도되는 ROS의 발생을 저해, 및/또는 피부의 콜라겐, 탄력 섬유 등 기질 단백질을 분해하는 효소인 MMPs의 발현 또는 활성 억제 효능을 나타낼 수 있다.
- [0054] 자색소는 활성산소 억제, 항염증, 항균 효능을 나타낼 수 있다. 또한 자색소는 천연 산화방지제 효능을 보유하고 있어, 화장료 조성물이 산화되는 것을 방지함으로써 유통기간 중 안정성을 높일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 화장료 조성물은 최종 제품의 품질이나 기능에 따라 당업계에서 통상적으로 사용되는 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온붕쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 차단제, 습윤화제, 필수오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 추가적으로 함유할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 화장료 조성물은 비누, 클렌징 폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 목욕제, 스킨, 로션, 크림, 에센스, 토너, 아스트린젠트, 유액, 젤, 립스틱, 분무제, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 바디클렌저, 팩, 마사지제, 페이스파우더, 콤팩트, 파운데이션, 투웨이케이이크 및 메이크업베이스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명의 화장료 조성물은 핸드케어용으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 실시예에 따르면, 본 발명의 화장료 조성물은 화장수, 에센스, 크림, 클렌저, 손소독제일 수 있다.
- [0058] 본 발명의 화장료 조성물은 천연물 추출물 또는 이로부터 분리된 성분을 유효성분으로 하기 때문에 거의 독성을 가지지 않으며, 인체에 무해하다.
- [0059] 본 발명의 화장료 조성물은 우수한 SOD 활성, APX 활성, CAT 활성 또는DPPH 라디칼 소거 활성을 나타낼 수 있다. 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 세포 내 활성산소 생성을 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 화장료 조성물은 우수한 항균효과를 나타낸다. 구체적으로 본 발명의 화장료 조성물은 그람 양성균(예컨대, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 또는 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*))또는 그람 음성균(예컨대 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 프로투스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*))에 대한 항균활성을 나타낼 수 있다.
- [0061] 용어 "개선"은 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0062] 본 발명의 화장료 조성물은 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 추출물, 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*) 추출물, 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 추출물 및 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 추출물을 모두 포함함으로써, 이들 4종의 추출물을 단독으로 포함하는 조성물에 비해 우수한 항균 및 항산화 효과를 나타낼 수 있다.
- [0063] 일 실시예에서, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 화장료 조성물이 피부에 상재하는 대표적인 박테리아인 황색포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 화장료 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 또는 불등풀가사리 추출물을 단독으로 포함하는 화장료 조성물에 비해 현저히 우수한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0064] 또한, 일 실시예에서, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 4:4:1:1의 중량비로 포함하는 화장료 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 1:1:1:1의 중량비로 포함하는 화장료 조성물에 비해 현저히 우수한 황색포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0065] 일 실시예에서, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 화장료 조성물이 SOD, APX, CAT의 활성화 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시

래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 포함하는 화장료 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 또는 불등풀가사리 추출물을 단독으로 포함하는 화장료 조성물에 비해 현저히 우수한 SOD 활성 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

[0066] 또한, 일 실시예에서, 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 4:4:1:1의 중량비로 포함하는 화장료 조성물은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 1:1:1:1의 중량비로 포함하는 화장료 조성물에 비해 현저히 우수한 SOD, APX, CAT 활성화 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0068] 또한, 본 발명은 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물 및 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물을 포함하는 향산화 또는 향균용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0069] 4종의 해조류 추출물, 향산화 또는 향균에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[0070] 용어 “의약외품”은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람 또는 동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

[0071] 의약외품 조성물은 코팅제, 물티슈, 바디 클렌저, 폼, 비누, 마스크, 연고제, 크림, 로션, 에센스 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 의약외품 조성물은 경구 또는 비경구의 여러가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명은 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물을 혼합하여 혼합물을 얻는 단계;를 포함하는 향산화 또는 향균용 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0075] 꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물, 향산화 또는 향균, 화장료 조성물에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[0076] 상기 혼합물을 얻는 단계는 상기 꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 상기 꼬물꼬시래기 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물, 상기 돌가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물 및 상기 불등풀가사리 C1 내지 C4의 저급 알코올 추출물을 1.5 내지 6.5:1.5 내지 6.5:1:1 중량비, 2 내지 6: 2 내지 6:1:1의 중량비, 3 내지 5: 3 내지 5:1:1의 중량비 또는 4:4:1:1의 중량비로 혼합하여 혼합물을 얻는 것일 수 있다.

[0077] 본 발명의 제조방법은 상기 혼합물을 얻는 단계를 수행하기 전 꼬시래기, 꼬물꼬시래기, 돌가사리 및 불등풀가사리 각각을 추출하는 단계;를 더포함할 수 있다.

[0078] 본 발명의 제조방법은 셀레늄이 포함된 배지에서 유산균을 배양하여 유산균 배양액을 얻고, 상기 유산균 배양액을 상기 혼합물에 첨가하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0079] 상기 유산균 배양액은 셀레늄이 포함된 배지에서 유산균을 배양시켜 수득한 배양액일 수 있다. 상기 배양액은 배양 과정 후 필터를 이용해 균이 제거된 것일 수 있다.

[0081] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0083] 1. 화장료 조성물 제조

[0084] (1) 4종의 해조류 추출물 제조

[0085] 제주 연안 자생 홍조류인 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*), 꼬물꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*), 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*), 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 4종의 건조 분말을 (주) 파라제주에서 구입하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 상기 4종의 홍조류의 건조 분말 각각에 에탄올을 첨가하여 에탄올 추출물을 수득하였다. 구체적으로, 각 홍조류 100g당 10배량의 95% 에탄올 1L를 첨가한 후 shaker를 이용하여 실온에서 120 rpm으로 24시간 동안 추출하였다. 추출액은 다시 여과지(Whatman NO. 2) 여과하여 38℃에서 rotary evaporator로 감압 농축한 다음 농축된 시료를 freeze dryer로 수분을 제거시키고 분말화하여 -20℃에서

보관하였다. 동결 건조된 추출물을 용매에 녹여 후속 실험에 사용하였다. 최종적으로 얻어진 추출물(동결건조시료)의 수율은 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 돌가사리, 불등풀가사리에서 각각 1.80%, 2.31%, 1.24%, 0.03%로 확인되었다.

[0087] (2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조

[0088] 아래의 표 1 및 2에 기재된 바와 같이 4종의 해조류 추출물(동결건조물) 사이의 중량비가 상이한 두 가지 복합 조성물(복합물 A 및 B)을 제조하였다.

[0089] 구체적으로, 위 '1.(1) 4종의 해조류 추출물 제조'에서 수득한 4종의 해조류 유래 동결건조물(꼬시래기 추출물, 꼬물꼬시래기 추출물, 돌가사리 추출물 및 불등풀가사리 추출물)을 분말상태로 아래 표 1의 함량비로 미니 믹서기를 사용하여 혼합하였다. 분말상태의 혼합물을 막자사발에 옮겨 액체질소를 첨가한 다음 유봉으로 5분간 그라인딩하였다. 그라인딩되어 4종의 해조추출물이 고르게 안정적으로 혼합된 4종의 해조류 추출물의 분말 혼합물(powder mixture) 10g을 새로운 막자사발(50℃ 수조에서 위밍업 된 상태)에 옮겼다. 상기 막자사발에 옮겨진 분말 혼합물에 셀레늄이 포함된 배지에서 배양된 유산균 발효 배양액(40℃ 수조에서 가온된 상태)을 10mL 첨가한 후 분말 혼합물이 발효액에 의해 물리적으로 엉기지 않고, 공기흡수로 방울이 형성되지 않도록 유봉으로 천천히, 부드럽게 배합 용해 시켰다. 유산균 발효 배양액이 최종 90mL까지 첨가될 수 있도록 단계별(9단계)로 10mL씩 첨가하면서 배합, 용해 시켰다(총 용량이 50mL 이상인 단계에서는 유봉 대신에 소형 핸드믹서를 사용해도 됨). 용해가 완료된 복합 조성물이 물리화학적으로 안정될 수 있도록 하고 용해과정에서 형성된 기포를 제거하기 위하여, 용해물을 약 10℃에서 24시간 정치시킨 후 복합 조성물을 수득하였다.

표 1

복합물 A			
구성성분		4종의 해조류 추출물 사이의 중량비	4종의 해조류 추출물과 배양액 사이의 혼합비
4종의 해조류 추출물	꼬시래기 추출물	1	10g
	꼬물꼬시래기 추출물	1	
	돌가사리 추출물	1	
	불등풀가사리 추출물	1	
셀레늄 유산균 발효 배양액		-	90mL

표 2

복합물 B			
구성성분		4종의 해조류 추출물 사이의 중량비	4종의 해조류 추출물과 배양액 사이의 혼합비
4종의 해조류 추출물	꼬시래기 추출물	4	10g
	꼬물꼬시래기 추출물	4	
	돌가사리 추출물	1	
	불등풀가사리 추출물	1	
셀레늄 유산균 발효 배양액		-	90mL

[0093] 상기 복합 조성물에 포함되는 유산균 발효 배양액은 아래의 방법으로 제조되었다.

[0094] 유산균은 한국생명공학연구원 생명자원센터(대전)에서 분양받은 *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus* 을 사용하였다. 1L 기준으로 55g의 MRS media를 혼합하여 121℃ 15분간 멸균한 후 상온에서 27℃까지 냉각한 후, 소듐 셀레네이트(Na_2SeO_3) 무수물(Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA))을 첨가하여 녹여준 배지에 동결 건조 보관된 유산균을 100 μL 접종하였다. 소듐 셀레네이트 무수물은 10mg/L~100mg/L의 농도로 배지에 첨가하는 것을 특징으로 한다. 최적의 배양을 위해 교반하지 않은 상태에서 37℃ 항온이 되는 배양기에 약 5일간 배양 및 숙성 기간을 거쳤다. 배양이 완료된 후 배양액은 0.2 μm 필터 멸균을 실시하였으며, 필터가 완료된 셀레늄 유산균 발효 배양액을 수득하였다.

[0096] 2. 4종의 해조류 추출물을 포함하는 화장료 조성물의 항균 활성 확인

[0097] (1) 시험 균주 및 배양 조건

[0098] 항균 활성 확인 시험에 사용된 균주는 그람 양성균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(KCCM 11764), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)(KCCM 11326), 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)(KCCM 35494)와 그람 음성균인 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)(KCCM 11234), 프로투스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*)(KCCM 40888), 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)(KCCM 41747)를 한국 미생물보존센터에서 분양받아 사용하였다. 스태필로코커스 아우레우스와 스태필로코커스 에피더미디스는 피부 상재균으로 알려져 있고, 마이크로코커스 루테우스는 피부 발진을 일으키는 것으로 알려져 있다. 프로피오니박테리움 아크네스는 여드름을 일으키는 것으로 알려져 있고, 프로투스 미라빌리스는 피부감염을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이들 균주는 사용하기 전 3회 계대 배양하여 사용하였고 각 균주들을 배양하는데 필요한 배지 및 배양조건은 아래 표 3과 같다.

표 3

Strains		Media	Temperature(℃)
Gram positive	<i>S. aureus</i>	Nutrient	37
	<i>M. luteus</i>	Nutrient	30
	<i>S. epidermidis</i>	Nutrient	37
Gram negative	<i>E. coli</i>	Nutrient	37
	<i>P. mirabilis</i>	Nutrient	37
	<i>P. acnes</i>	Actinomyces	37

[0099]

[0101] (2) 4종의 해조류 추출물 항균 활성 확인

[0102] 4종의 해조류 추출물들의 항균 활성을 확인하기 위해 agar-dilution method를 이용하여 최소발육저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)와 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 균주는 각각 1.5×10^6 CFU/mL로 현탁하였고 4종의 해조류 추출물은 3차 증류수를 사용하여 연속적으로 2배 희석하여 사용하였다. 96-well plate에 농도별 홍조류 추출물 50 μ L와 각 균주의 배양액 50 μ L를 첨가하여 37℃에서 24시간 배양한 후 영양 아가(nutrient agar) 배지에 각 40 μ L씩 도말하였다. 37℃에서 24시간 배양 후 균의 생장이 저해되는 농도를 MIC, 균의 생장이 보이지 않는 최소 농도를 MBC로 결정하였다.

[0103] 4종류의 해조류 에탄올 추출물에 대한 MIC를 확인한 결과 각 추출물들은 0.4 내지 6.25 mg/mL의 MIC를 나타내었다. 그 중 꼬시래기(*G. verrucosa*)와 불등풀가사리(*G. furcata*) 에탄올 추출물의 MIC 값은 각각 0.625~2.5mg/mL와 1.25~5mg/mL으로 강력한 항균 활성을 나타내었다. 이들 추출물은 특히 그람 음성균인 프로투스 미라빌리스(*P. mirabilis*)에 대해 강한 항균활성을 나타내었다(표 4 참조).

표 4

Strain		Concentration of extract (mg/mL)			
		<i>G. verrucosa</i>	<i>G. vermiculophylla</i>	<i>C. tenellus</i>	<i>G. furcata</i>
Gram positive	<i>S. aureus</i>	1.25	3.125	6.25	1.25
	<i>M. luteus</i>	2.5	3.125	3.125	1.25
	<i>S. epidermidis</i>	0.625	3.125	3.125	1.25
Gram negative	<i>E. coli</i>	0.625	3.125	6.25	1.25
	<i>P. mirabilis</i>	0.625	0.4	1.562	1.25
	<i>P. acnes</i>	2.5	3.125	6.25	5

[0104]

[0105] 4종류의 해조류 에탄올 추출물에 대한 MBC를 확인한 결과 각 추출물들은 0.4 내지 6.25 mg/mL의 MBC를 나타내었다. 그 중 꼬시래기(*G. verrucosa*)와 꼬물꼬시래기(*G. vermiculophylla*) 에탄올 추출물의 MBC 값은 각각 1.25 내지 5 mg/mL, 0.8 내지 6.25 mg/mL로 강한 항균 활성을 나타내었다(표 5 참조).

표 5

Strain		Concentration of extract (mg/mL)			
		<i>G. verrucosa</i>	<i>G. vermiculophylla</i>	<i>C. tenellus</i>	<i>G. furcata</i>
Gram positive	<i>S. aureus</i>	2.5	6.25	12.5	2.5
	<i>M. luteus</i>	5	6.25	6.25	2.5
	<i>S. epidermidis</i>	1.25	6.25	6.25	2.5
Gram negative	<i>E. coli</i>	1.25	6.25	12.5	2.5
	<i>P. mirabilis</i>	1.25	0.8	3.125	2.5
	<i>P. acnes</i>	5	6.25	12.5	10

[0106]

[0108] (3) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 조성물의 항균 활성 확인

[0109]

paper disc법을 이용해 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)에 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 (‘복합물 A’ 및 ‘복합물 B’)의 항균활성을 비교 분석하였다. 또한, 4종의 해조류 추출물을 모두 포함하는 상기 복합 조성물과 효과 차이를 비교하기 위해서, 4종의 해조류 추출물을 각각 포함하는 4종의 조성물(이하, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물 포함하는 조성물, 및 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물)의 항균활성을 확인하였다. 피부에 상재하는 대표적인 박테리아인 스타필로코커스 아우레우스는 독소를 분비하여 면역세포인 T세포에 슈퍼항원으로 작용하여 아토피 피부염을 악화시킨다.

[0110]

상기 4종의 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 4종의 해조류 추출물의 분말 혼합물(powder mixture) 대신 4종의 해조류 추출물 각각을 10g씩 사용하여 제조하였다. 구체적으로, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 분말 혼합물(powder mixture) 대신 꼬시래기 추출물 10g에 유산균 발효 배양액을 첨가하여 제조하였다. 꼬물꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 분말 혼합물(powder mixture) 대신 꼬물꼬시래기 추출물 10g에 유산균 발효 배양액을 첨가하여 제조하였다. 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 분말 혼합물(powder mixture) 대신 돌가사리 추출물 10g에 유산균 발효 배양액을 첨가하여 제조하였다. 불등돌가사리 추출물을 포함하는 조성물은 위 '1.(2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물 제조'에 기재된 방법과 동일하게 제조하되, 분말 혼합물(powder mixture) 대신 불등돌가사리 추출물 10g에 유산균 발효 배양액을 첨가하여 제조하였다.

[0111]

paper disc법을 이용해 스타필로코커스 아우레우스에 대한 항균활성을 분석한 결과, 4종의 해조류 추출물을 각각 포함하는 4종의 조성물(이하, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물 포함하는 조성물, 및 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물)에 비해 4종의 해조류 추출물을 모두 포함하는 복합물들의 *S. aureus* 증식 저해 효능이 현저히 우수하였다. 특히, 복합물 B는 3개 농도군(0.5, 0.25, 0.125mg/mL) 모두에서 *S. aureus*의 증식을 효과적으로 억제하였으며, 복합물 A 보다 낮은 농도(1/2의 농도)를 처리하더라도 우수한 항균력을 나타내었다(도 1 및 아래 표 6 참조).

표 6

[0112]

시료	시료의 농도(mg/mL)		
	0.5	0.25	0.125
	Diameter of inhibition zone (mm)		
복합물 A	5.0	3.5	1.5
복합물 B	10.5	6.5	4.0
꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물	1.5	0.5	-
꼬물꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물	1.0	0.5	-

돌가사리 추출물을 포함하는 조성물	1.5	1.0	0.5
불등 풀가사리 추출물을 포함하는 조성물	1.1	0.5	-

[0114] 3. 4종의 해조류 추출물을 포함하는 화장료 조성물의 항산화 활성 확인

[0115] (1) 4종의 해조류 추출물의 항산화 활성 확인

[0116] 1) SOD 활성, APX 활성, CAT 활성 측정

[0117] 4종의 해조류 추출물들의 SOD 활성, APX 활성, CAT 활성을 확인하였다.

[0118] SOD 유사 활성은 Beauchamp & Fridovich(1971)의 방법을 응용해 nitroblue tetrazolium(NBT)의 환원 억제력을 측정함으로써 확인하였다. 즉, 50 mM potassium phosphate pH 7.0, 1 mM xanthine, 0.025 mM NBT 용액 0.2 mL 에 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 농도로 증류수에 녹인 4종의 해조류 추출물들 각각을 10 μL 혼합하였다. 그 다음 3.3×10^{-6} mM xanthine oxidase를 10 μL 첨가한 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 효소 활성은 다음의 수학적 식 1로 환산하였다. SOD 유사 활성은 xanthine/xanthine oxidase 의해 생성된 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 는 NBT를 환원시킴으로써 560 nm에서 측정된다. SOD는 NBT와 경쟁적으로 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 를 소거시키기 때문에 NBT의 환원억제력을 측정하여 4종의 해조류 추출물에서의 SOD 유사활성을 확인하였다.

[0119] [수학적 식 1]

$$\text{SOD inhibition rate(\%)} = (\text{A}-\text{B}) / \text{A} \times 100$$

A : 시료 무첨가구의 흡광도 B : 시료 첨가구의 흡광도

$$\text{SOD activity(unit)} = \text{SOD inhibition rate(\%)} / 50 \quad (\text{SOD 1 unit} = 50\% \text{ inhibition rate})$$

$$\text{SOD activity(unit/mg)} = \text{SOD unit} / \text{total sample}(\mu\text{g}) \times \text{dilution factor} \times 1000$$

[0120]

[0121] APX 활성은 Nakano & Asada(1981)의 방법을 변형하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate pH 7.0, 0.5 mM ascorbate, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM H_2O_2 용액 0.2 mL에 2.5 mg/mL 농도로 증류수에 녹인 4종의 해조류 추출물들 각각 20 μL 혼합하여 다음 37°C에서 5분간 반응시킨 후 10분 뒤 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 290 nm에서 혼합액의 흡광도를 측정하였다. 여기서, 2.8은 290 nm에서 ascorbate의 extinction coefficient이며 APX 활성은 다음과 아래의 수학적 식 2로 계산하였다. APX는 H_2O_2 소거능을 나타내는 것으로 알려진 효소로, ascorbate를 전자 공여체로써 사용하여 H_2O_2 를 소거시킨다. 이에 본 실험에서는 4종의 해조류 추출물을 통한 290 nm에서 측정되는 H_2O_2 의 감소량을 측정하여 APX의 활성을 확인하였다.

[0122] [수학적 식 2]

$$\text{APX activity (Unit/mg)} = ((\text{A}-\text{B})/2.8) \times \text{dilution factor} / \text{total sample}(\mu\text{g}) \times 1000$$

A : 0 min 때의 흡광도 B : 10mins 때의 흡광도

[0123]

[0124] 카탈라아제(Catalase, CAT) 활성은 Aebi(1984)의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM potassium phosphate pH 7.0, 10 mM H_2O_2 용액 0.2 mL에 2.5 mg/mL 농도로 증류수에 녹인 4종의 해조류 추출물들 각각 10 μL 혼합한 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 240 nm에서 흡광도를 측정하였다. 여기서, 43.6은 240 nm에서 H_2O_2 의 extinction coefficient이며 catalase 활성은 다음의 수학적 식 3으로 계산하였다. CAT는 APX와 동일하게 H_2O_2 소거능을 갖는 것으로 알려진 효소이다. 이에 4종의 해조류 추출물에서의 CAT 활성을 확인하기 위해 240 nm에서 관측되는 H_2O_2 의 감소량을 측정하여 활성을 확인하였다.

[0125] [수학식 3]

$$\text{Catalase activity (Unit/mg)} = \frac{(B-A) \times \text{dilution factor} \times 1000}{43.6 \times \text{total sample}(\mu\text{g})}$$

[0126] A : 시료 무첨가구의 흡광도 B : 시료 첨가구의 흡광도

[0128] 상기 방법들로 SOD, APX, CAT 활성을 측정한 결과, 꼬시래기 에탄올 추출물, 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물, 불등풀가사리 에탄올 추출물의 SOD 유사활성은 각각 39.85 ± 3.32 , 71.95 ± 1.92 , 32.10 ± 5.07 unit/mg으로 나타났으며 돌가사리 에탄올 추출물은 121.76 ± 1.92 unit/mg로 가장 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. 또한, 꼬시래기의 에탄올 추출물, 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물, 불등풀가사리 에탄올 추출물의 APX 활성은 각각 4.83 ± 0.68 unit/mg, 4.52 ± 0.48 unit/mg, 2.20 ± 0.18 unit/mg으로 나타났으며, 돌가사리 에탄올 추출물은 6.13 ± 0.68 unit/mg으로 가장 높은 APX 활성을 나타내었다. 또한, 꼬시래기의 에탄올 추출물, 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물, 돌가사리 에탄올 추출물의 CAT 활성은 각각 0.35 ± 0.13 unit/mg, 0.40 ± 0.11 unit/mg, 0.25 ± 0.07 unit/mg으로 나타났으며, SOD 유사활성과 APX 활성과는 다르게 불등풀가사리 에탄올 추출물이 0.66 ± 0.11 unit/mg으로 가장 높은 CAT 활성을 나타냈고, 돌가사리에서 가장 낮은 활성을 나타냈다.

[0129] 특히 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) 에탄올 추출물이 121.76 ± 1.92 unit/mg으로 가장 높은 SOD 유사활성을 나타내었고, 6.13 ± 0.68 unit/mg으로 가장 높은 APX 활성을 나타냈다. 또한, 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) 에탄올 추출물이 0.66 ± 0.11 unit/mg으로 가장 높은 CAT 활성을 나타내었다(표 7 및 도 2 참조).

표 7

Scientific name	Enzyme activity(unit/mg)		
	SOD	APX	CAT
Gracilaria verrucosa	$39.85 \pm 3.32c$	$4.83 \pm 0.68b$	$0.35 \pm 0.13b$
Gracilaria vermiculophylla	$71.95 \pm 1.92b$	$4.52 \pm 0.48b$	$0.40 \pm 0.11b$
Chondracanthus tenellus	$121.76 \pm 1.92a$	$6.13 \pm 0.68a$	$0.25 \pm 0.07b$
Gloiopeltis furcata	$32.10 \pm 5.07c$	$2.20 \pm 0.18c$	$0.66 \pm 0.11a$

Values represent means $\pm$ SD (n=3). Means with different letters (a,b,c) in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test (p<0.05).

[0130]

[0131] 꼬시래기 에탄올 추출물, 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물, 불등풀가사리 에탄올 추출물은 각각 39.85 ± 3.32 , 71.95 ± 1.92 , 32.10 ± 5.07 unit/mg의 SOD 유사활성을 나타냈으며, 돌가사리 에탄올 추출물이 121.76 ± 1.92 unit/mg로 가장 높은 SOD 유사활성을 나타냈다(표 7 참조).

[0133] 2) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

[0134] 4종의 해조류 추출물들의 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였다.

[0135] DPPH 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 DPPH에 대한 전자공여 효과로 시료의 환원력을 측정하였다. 5×10^{-4} M DPPH 용액 0.99 mL에 12.5, 25, 50, 100 mg/mL의 4종의 해조류 추출물 각각 10 μ L를 가하여 혼합한 다음 암조건에서 30분간 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 합성 항산화제인 BHT를 사용하여 동일한 방법으로 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내고 다음의 수학식 4에 의하여 계산하였다.

[0136] [수학식 4]

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = (1 - (A/B)) \times 100$$

A : 시료 첨가구의 흡광도 B : 시료 무첨가구의 흡광도

[0137]

[0138] 꼬시래기 에탄올 추출물, 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물, 돌가사리 에탄올 추출물, 불등풀가사리 에탄올 추출물의

DPPH 라디칼 소거능 차이를 확인하기 위하여 농도별로 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과를 아래 표 8에 나타내었다.

[0139] 양성 대조군으로는 합성 항산화제로 알려진 BHT를 사용하였으며, 양성 대조군과 4종 해조류 추출물을 농도별로 처리하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다. 그 결과 양성 대조군과 4종의 해조류 에탄올 추출물 모두 농도 의존적으로 활성이 증가함을 확인하였다. 4종 해조류 에탄올 추출물 모두 BHT보다 DPPH 라디칼 소거활성이 낮았으나 최고농도인 100 mg/mL에서 불등풀가사리 에탄올 추출물은 $9.05 \pm 4.20\%$ 로 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였고 그 다음으로는 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물과 돌가사리 에탄올 추출물이 각각 $8.09 \pm 6.16\%$ 와 $6.49 \pm 3.16\%$ 로 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다. 꼬시래기 에탄올 추출물은 $5.00 \pm 1.71\%$ 로 가장 낮은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다.

표 8

Sample concentration (mg/mL)	12.5	25	50	100
Gracilaria verrucosa	0.64±3.23	1.54±1.83	4.09±1.26a	5.00±1.71
Gracilaria vermiculophylla	0.34±3.43	1.14±6.13	4.47±0.88a	8.09±6.16
Chondracanthus tenellus	0.47±0.93	1.28±0.85	2.64±0.96b	6.49±3.16
Gloiopeltis furcata	0.32±2.48	0.56±1.76	3.33±3.15a	9.05±4.20
Sample concentration (mg/mL)	0.1	0.25	0.5	1
BHT	0.84±0.31	2.02±0.20	8.05±0.55	14.17±0.15

Values represent means $\pm$ SD (n=9). Means with different letters (a,b) in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test ($p < 0.05$).

[0140]

[0141] 3) 세포내 활성산소(ROS) 생성 억제 효능 확인

[0142] 4종의 해조류 추출물들의 세포내 활성산소 생성 억제 효능을 확인하였다.

[0143] DCF-DA assay를 시행한 후 confocal microscopy를 이용하여 분석하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorodihydrofluorescein(DCF)이 된다. 세포가 70-80% 자라면 4종의 해조류 추출물을 각각 1시간 전처리한 뒤 DCF-DA를 10 μ M의 농도로 15분간 세포에 염색하였다. 세포를 꺼낸 뒤 PBS로 세척한 뒤 UVB(5 mJ/cm²)를 조사하고 현미경 슬라이드에 고정시킨 뒤 4',6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 카운터 염색하였다. laser scanning microscope로 confocal microscopy를 사용하여 이미지를 시각화하고 LSM 5 browser imaging software를 사용하여 분석하였다.

[0144] 해조류 추출물을 전처리 하지 않고 자외선만 조사된 세포에서는 형광 강도가 강하게 발색되었다. 꼬시래기 에탄올 추출물, 꼬물꼬시래기 에탄올 추출물, 돌가사리 에탄올 추출물, 불등풀가사리 에탄올 추출물을 각각 전처리한 뒤 자외선이 조사된 세포에서는 형광강도가 약하게 발색되었다(도 3 참조). 이는 4종의 해조류 추출물의 전처리가 자외선에 의한 활성산소 생성을 효과적으로 억제하는 것을 의미한다. 도 3은 세포 내 활성 산소종(녹색 형광)의 발현을 나타내는 공초점 현미경 분석 결과이다. 4종의 해조류 추출물 각각은 UVB 자극된 HEK293 세포에서 활성산소 분해 활성을 나타내었다. 핵은 DAPI(청색 형광)로 염색되었다.

[0146] (2) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 조성물의 항산화 활성 확인

[0147] 위 '3.(1).1) SOD 활성, APX 활성, CAT 활성 측정'에 기재된 방법과 동일한 방법으로 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합 조성물('복합물 A' 및 '복합물 B')의 SOD 활성, APX 활성, CAT 활성을 측정하였다. 또한, 4종의 해조류 추출물을 모두 포함하는 상기 복합 조성물과 효과 차이를 비교하기 위해서, 4종의 해조류 추출물을 각각 포함하는 4종의 조성물(이하, 꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물 포함하는 조성물, 및 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물)의 SOD 활성을 측정하였다. 상기 4종의 조성물은 위 1(2)의 복합 조성물 제조방법과 동일하게 제조하되, 4종의 해조류 추출물의 분말 혼합물(powder mixture) 대신 4종의 해조류 추출물 각각을 10g씩 사용하여 제조하였다. 구체적인 방법은 위 '2. (3) 4종의 해조류 추출물을 포함하는 조성물의 항균 활성 확인'에 기재된 내용과 동일하다.

[0148] 4종의 해조류 추출물을 모두 포함하는 복합물들은 4종의 해조류 추출물을 각각 포함하는 4종의 조성물(이하, 꼬

시래기 추출물을 포함하는 조성물, 꼬물꼬시래기 추출물 포함하는 조성물, 및 돌가사리 추출물을 포함하는 조성물)에 비해 SOD 활성 효능이 현저히 우수하였다(아래 표 9 및 도 5 참조).

[0149] 또한, 4종의 해조류 추출물들의 혼합 비율이 상이한 복합물 A와 복합물 B를 비교한 결과 복합물 B가 복합물 A에 비해 우수한 SOD 활성, APX 활성, CAT 활성을 나타내었고, 특히 피부 내 유해 활성산소를 억제하는 SOD의 활성이 매우 높게 나타남을 확인하였다.

표 9

[0150]

4종 추출물의 복합물	Enzyme activity(unit/mg)		
	SOD	APX	CAT
복합물 A	85.15±1.92	6.52±0.84	0.60±0.14
복합물 B	206.25±1.27	8.31±0.86	0.75±0.70
꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물	37.58±3.42	-	-
꼬물꼬시래기 추출물을 포함하는 조성물	51.75±1.28	-	-
돌가사리 추출물을 포함하는 조성물	70.67±1.29	-	-
불등돌가사리 추출물을 포함하는 조성물	35.10±5.72	-	-

[0151]

(Values represent means ± SD (n=3), -: 미측정)

[0153]

4. 4종의 해조류 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정

[0154]

폴리페놀 화합물은 OH기를 가지고 있어 안정화된 구조를 보이는 이차대사산물로 항산화, 항균작용, 항염효과 및 면역력 증진 등 다양한 기능성이 밝혀져 있고, 플라보노이드는 활성산소 제거, 항염증, 항바이러스 등의 효능을 나타냄이 알려져 있다. 이에, 본 발명자들은 4종의 해조류(꼬시래기(*G. verrucosa*), 꼬물꼬시래기(*G. vermiculophylla*), 돌가사리(*C. tenellus*), 불등돌가사리(*G. furcata*))의 90% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 tannic acid와 quercetin을 표준물질로 하여 측정하였다. 구체적으로, 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 비색 정량 방법(Folin & Denis, 1912)을 변형하여 측정하였다. 95% ethanol을 이용해 10 mg/mL의 농도로 만든 4종의 해조류 추출물 80 µL에 Folin-Denis reagent 80 µL를 혼합하여 실온에서 3분간 반응시킨 후 10% sodium carbonate 80 µL를 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 최종농도 1, 10, 25, 50, 100, 200 µg/mL으로 표준검량곡선을 작성하여 나타내었다. 플라보노이드 함량은 Nieva-Moreno et al.(2000)의 방법을 변형하여 측정하였다. 95% EtOH을 이용해 10 mg/mL의 농도로 만든 홍조류 추출물 20 µL에 10% aluminum nitrate 20 µL와 1M potassium acetate 20 µL 그리고 80% ethanol 0.94 mL을 혼합하여 실온에서 40분간 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 최종농도 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL을 가지고 표준검량곡선을 작성하여 나타내었다.

[0155]

분석 결과, 총 폴리페놀 함량은 27.79±15.15 내지 66.94±6.12 mg/g 범위로, 총 플라보노이드 함량은 4.60±0.88 내지 8.08±1.04 mg/g 범위로 나타났다. 다른 해조류 추출물에 비해 불등돌가사리 추출물에서 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 각각 66.94±6.12와 8.08±1.04 mg/g로 가장 높은 함량을 나타내었고, 돌가사리 추출물이 가장 낮은 함량을 나타내었다(표 10 참조).

표 10

	Scientific name	Total polyphenols (mg/g)	Total flavonoids (mg/g)
	<i>Gracilaria verrucosa</i>	29.84±2.36 ^c	6.99±1.11 ^a
Red seaweed	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	38.54±13.75 ^b	5.75±0.70 ^b

Values represent means ± SD (n=9). Means with different letters (a,b,c) in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test ($p<0.05$).

5. 4종의 해조류 추출물을 포함하는 복합물을 포함하는 화장료 제형 제조

(1) 화장료 제형 제조

위 1.(2)에서 제조된 복합물을 가볍게 흔들어(10rpm으로 stirring) 침전현상을 해소시킨 후 화장료 조성물에 첨가하여, 아래 표 11 내지 15의 제형(제형에 1 내지 5)을 제조하였다.

표 11

제형예 1(핸드 토너)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+셀레늄 유산균 발효 배양액)	1.0
꼬시래기 유래 클로로필	0.02
꼬시래기 유래 자색소	0.02
디프로필렌글라이콜	5.00
피이지-60 하이드로제네이티드캐스터오일	0.60
잔탄검	0.10
글리세린	3.00
펜틸렌글라이콜	2.00
1,2-헥산다이올	2.00

표 12

제형예 2(핸드 에센스)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+셀레늄 유산균 발효 배양액)	1.0
꼬시래기 유래 클로로필	0.02
꼬시래기 유래 자색소	0.02
소듐하이알루로네이트	0.50
글리세린	3.00
부틸렌글라이콜	1.00
카보머	0.35
알지닌	0.18
1,2-헥산다이올	2.00

표 13

제형예 3(핸드 크림)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)

복합물 B (4종의 추출물+셀레늄 유산균 발효 배양액)	1.00
꼬시래기 유래 클로로필	0.02
꼬시래기 유래 자색소	0.02
암모늄아크릴로일디메틸타우레이트/브이피코폴리머	0.03
카보머	0.60
펜틸렌글라이콜	2.00
비즈왁스	2.00
세테아릴알코올, 세테아릴글루코사이드	3.50
폴리솔베이트60	0.50
소르비탄세스퀴올리에이트	0.40
스쿠알란	0.50
해바라기씨오일	3.00
디메치콘	2.00
폴리아크릴레이트-13, 폴리아이소부텐, 폴리솔베이트20	0.50
알지닌	0.50
1,2-헥산다이올	2.00

표 14

[0163]

제형예 4(핸드 클렌저)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+셀레늄 유산균 발효 배양액)	1.0
꼬시래기 유래 클로로필	0.1
꼬시래기 유래 자색소	0.1
소듐라우레스설페이트	35.00
글리세린	8.00
다이소듐이디티에이	0.10
다이소듐라우레스설펜포석시네이트	5.00
피이지-120메틸글루코사이드올리에이트	1.50
디프로필렌글라이콜	5.00
코카미도프로필베타인	10.00
염화나트륨	1.50

표 15

[0164]

제형예 5(핸드 소독젤)	
구성 성분	중량%
정제수	잔량(to 100)
복합물 B (4종의 추출물+셀레늄 유산균 발효 배양액)	1.0
꼬시래기 유래 클로로필	0.1
꼬시래기 유래 자색소	0.1
에탄올	62.40
글리세린	5.00
폴리소르베이트60	1.00
카보머	0.50
트라이에탄올아민	0.40

[0166]

(2) 제형 안정성 테스트

[0167]

위 5.(1)에서 제조된 홍조류 4종의 추출물을 포함하는 복합물을 1% 함유하는 제형예 1 내지 5의 안정성 시험을 진행하였다.

[0168]

안정성 시험은 2주 동안 실온의(1-30° C) 조건에서 색상(외관, 색상), pH, 점도 변화를 관찰하였다. 제조 후 3일의 숙성 기간 후 색상(외관, 색상) 기준과 pH 값의 범위를 설정하여 시험기준으로 정하였다 (변화 없음: ○,

조금 변화: △, 심하게 변화: ×). 그 결과 각 제형 모두 2주 동안 변화 없음으로 기준 범위 내에서 안정한 것을 확인하였다 (아래 표 16 내지 20 참조). 표 16 내지 20은 각각 순서대로 제형에 1 내지 5의 안정성 확인 결과이다.

표 16

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	무색의 투명한 액상	실온(1-30°C)	○	○	○	○
pH (3회측정 평균값)	pH 7.0±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

[0169]

표 17

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	무색의 투명한 액상	실온(1-30°C)	○	○	○	○
점도, pH (3회측정 평균값)	점도 5000±300(cps) <S06, 30rpm, 10s> pH 6.3±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

[0170]

표 18

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	유색의 크림상	실온(1-30°C)	○	○	○	○
점도, pH (3회측정 평균값)	점도 35000±3000(cps) <S07, 30rpm, 10s> pH 7.3±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

[0171]

표 19

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	무색의 투명한 점조성 겔	실온(1-30°C)	○	○	○	○
점도, pH (3회측정 평균값)	점도 4000±500(cps) <S06, 30rpm, 10s> pH 6.2±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

[0172]

표 20

시험 항목	기준	조건	시험일			
			1 일	3 일	1주(7일)	2주(14일)
성상 (외관, 색상)	무색의 투명한 점조성 겔	실온(1-30°C)	○	○	○	○
점도, pH (3회측정 평균값)	점도 4000±500(cps) <S06, 30rpm, 10s> pH 5.0±1.0	실온(1-30°C)	○	○	○	○

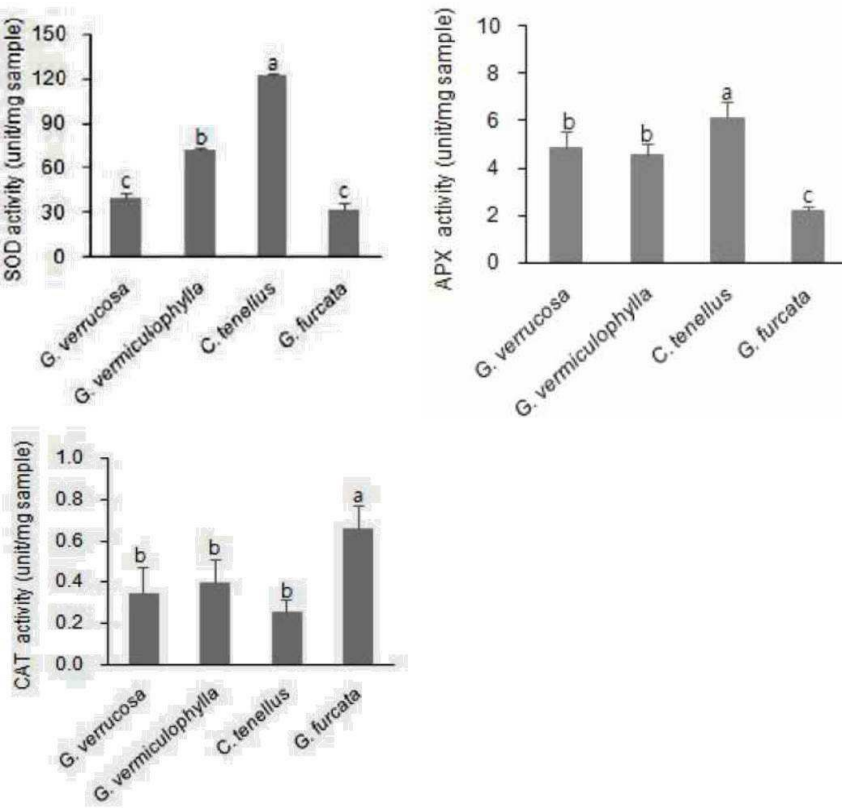
[0173]

도면

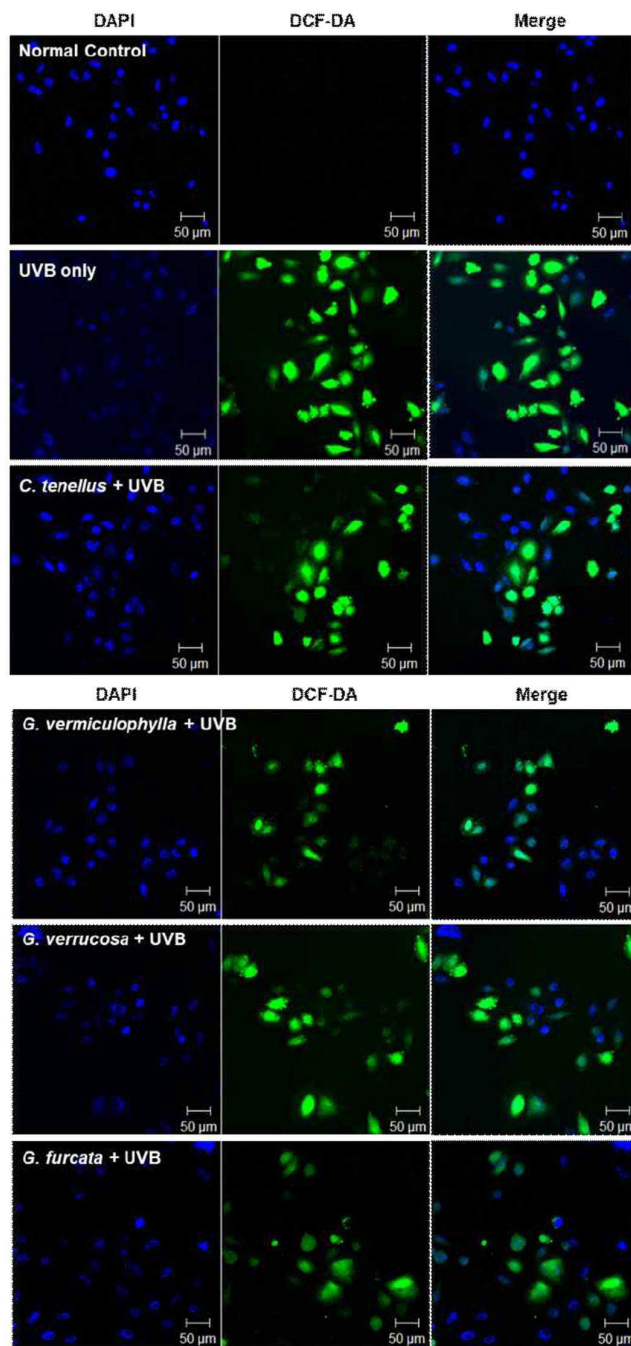
도면1



도면2



도면3



도면4



도면5

