



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0049081
(43) 공개일자 2015년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/49 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0129135

(22) 출원일자 2013년10월29일

심사청구일자 2013년10월29일

(71) 출원인

더마텍코리아(주)

경상북도 경산시 삼풍로 27, 경북테크노파크 글로벌벤처동 5층 2509호 (삼풍동)

(72) 발명자

양재황

대구 수성구 청수로 214, 1507동 801호 (황금동, 캐슬골드파크5단지)

장민정

경상북도 경산시 삼성현로91길 45, 108동 1002호(사동, 사동2지구 화성파크드림)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

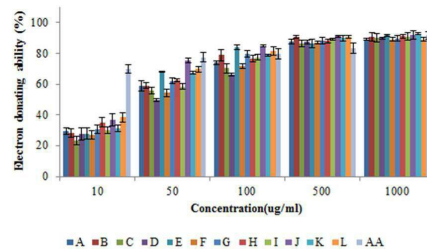
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 발효 밤송이 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화, 또는 항염용 조성물

(57) 요약

본 발명은 발효 밤송이 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 우수한 티로시나제 저해활성을 나타내고, 수렴활성실험 및 각종 항산화 및 항염실험에서 탁월한 피부 미백, 항산화, 또는 항염 활성을 나타내는 바 본 발명의 발효 밤송이 추출물은 피부 미백 및 항산화, 또는 항염용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



Electron donating ability of extracts of fermentation by Lactobacillus casei in chestnut bur.

A : ethanol extracts of 1day fermentation by Lactobacillus casei(0%) in chestnut bur
B : ethanol extracts of 1day fermentation by Lactobacillus casei(1%) in chestnut bur
C : ethanol extracts of 1day fermentation by Lactobacillus casei(5%) in chestnut bur
D : ethanol extracts of 1day fermentation by Lactobacillus casei(10%) in chestnut bur
E : ethanol extracts of 3day fermentation by Lactobacillus casei(0%) in chestnut bur
F : ethanol extracts of 3day fermentation by Lactobacillus casei(1%) in chestnut bur
G : ethanol extracts of 3day fermentation by Lactobacillus casei(5%) in chestnut bur
H : ethanol extracts of 3day fermentation by Lactobacillus casei(10%) in chestnut bur
I : ethanol extracts of 6day fermentation by Lactobacillus casei(0%) in chestnut bur
J : ethanol extracts of 6day fermentation by Lactobacillus casei(1%) in chestnut bur
K : ethanol extracts of 6day fermentation by Lactobacillus casei(5%) in chestnut bur
L : ethanol extracts of 6day fermentation by Lactobacillus casei(10%) in chestnut bur
AA : Ascorbic acid. Result are means $\pm$ S.D. of triplicate data.

(72) 발명자

박동우

경북 경산시 삼풍로4길 4, 205호 (삼풍동, 9696빌)

백성환

대구 서구 서대구로18길 22, 301호 (평리동, 동성빌)

이진태

대구광역시 수성구 용학로 272, 102동 303(범물동, 범물한라맨션)

전동하

경상북도 경산시 백천동로 5, 109동 1206호(백천동, 부영 초록마을)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0019259

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 산학연협회

연구사업명 산학연협력 기업부설연구소 지원사업

연구과제명 바이오전환기술을 이용한 유실수 부산물의 산업화연구

기 여 율 1/1

주관기관 더마텍코리아(주)

연구기간 2012.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

발효 밤송이 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화, 또는 피부 염증성 질환의 치료 및 예방용 피부외용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 밤송이는 카스타네아 크레나타 (*Castanea crenata*), 카스타네아 몰리시마 (*Castanea mollissima*), 카스타네아 다비디 (*Castanea davidii*, China), 카스타네아 헨리 (*Castanea henryi*), 카스타네아 세귀니 (*Castanea seguinii*), 카스타네아 덴타타 (*Castanea dentata*), 카스타네아 푸밀라 (*Castanea pumila*), 카스타네아 알니폴리아 (*Castanea alnifolia*), 카스타네아 애셰 (*Castanea ashei*), 카스타네아 플로리다나 (*Castanea floridana*), 카스타네아 파우피스피나 (*Castanea paupispina*), 또는 카스타네아 사티바 (*Castanea sativa*) 밤송이임을 특징으로 하는 피부외용 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 발효 밤송이 추출물은 발효 밤송이 상등액 또는 침전물 추출물인 피부외용 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 발효 밤송이 추출물은 물, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 헥산, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 함수부틸렌글리콜, 함수프로필렌글리콜, 함수글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 피부외용 약학조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 발효는 액체배양을 거쳐 활성화된 유산균을 시료 중량의 1-30%(v/v) 용량이 되도록 접종하여 15 내지 50℃ 온도 범위의 온도에서 1 일 내지 2주일 동안 계대배양을 수행함을 특징으로 하는 피부외용 약학조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 액체 배양은 Sucrose 10 내지 30.0 g/l, Glucose 1 내지 10.0 g/l, Soypeptone 3 내지 20.0 g/l, Yeast extract 1 내지 100 g/l, CH_3COONa 1 내지 5.0 g/l, K_2HPO_4 0.1 내지 0.6 g/l, 및 MgCl_2 0.01 내지 0.05 g/l 범위 조성을 넣은 혼합액배지를 pH 4.00 내지 7.00 범위로 보정하고 멸균처리하여 발효를 수행함을 특징으로 하는 피부외용 약학조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 염증성 피부 질환은 염증성 피부염, 건선증, 상처, 아토피성 질환인 피부외용 약학조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형인 것을 특징으로 하는 피부외용 약학조성물.

청구항 9

발효 밤송이 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화, 또는 피부 염증성 질환의 개선 및 예방용 화장료 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효 밤송이 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화, 또는 항염용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] [문헌 1] Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. *Cosmetic & Toiletries*. 111, 51-58
- [0003] [문헌 2] Aroca, P., et al. 1993. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol Chem* 268, 25650-25655
- [0004] [문헌 3] Chin, J. E., et al. 2005. Effects of Houttuynia cordata extracts on tyrosinase gene expression. *J. Korean Soc Food Sci Nutr* 34, 1284-1288
- [0005] [문헌 4] Oikarinen A, Karvonen J, Uitto J, Hannuksela M., Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation. *Photodermatol.* 2(1), pp.15-26, Review, 1985
- [0006] [문헌 5] Hirobe T., Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.* 18(1), pp.2-12. Review, 2005
- [0007] [문헌 6] McKay IA, Leigh IM., Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol.* 124(6), pp.513-8, Review, 1991
- [0008] [문헌 7] Kim HH, Cho S, Lee S, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH., Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo. *J Lipid Res.* 47(5), pp.921-30, 2006
- [0009] [문헌 8] Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A., The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol Cell Biochem.* 305(1-2), pp.255-64, Review, 2007
- [0010] [문헌 9] Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG., Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 11(1), pp.112-7, Review, 2006
- [0011] [문헌 10] Traidl-Hoffmann C, MI, Ring J, Behrendt H., Impact of desloratadine and loratadine on the crosstalk between human keratinocytes and leukocytes: Implications for anti-inflammatory activity of antihistamines. *Int Arch Allergy Immunol.* 140(4), pp.315-20, 2006
- [0012] [문헌 11] Cannon JG, Tatro JB, Reichlin S, Dinarello CA., Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol.* 137(7), pp.2232-6, 1986
- [0013] [문헌 12] Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T., Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J Immunol.* 164(12), pp.6174-9, 2000
- [0014] [문헌 13] Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifemberger J, Fischer JW., Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol.* 171(5), pp.1451-61, 2007. 9-10
- [0015] [문헌 14] Willoughby DA. (1975) Human arthritis applied to animal models. Towards a beter therapy. *Annals of the Rheumatic Disease.* 34, 471-478
- [0016] [문헌 15] Higuchi M, Hisgahi N, Taki H and Osawa T. (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major

cytolytic mechanisms of activated macrophages. *The Journal of Immunology*. 144, 1425-1431

- [0017] [문헌 16] Yun HJ, Heo SK, Yi HS, Kim CH, Kim BW and Park SD. (2008) Anti-inflammatory effect of injinho-tang in Raw264.7 Cells. *Kor. J. Herbology*. 23(2), 169-178.
- [0018] [문헌 17] Roterta, R., P. Nicoletta, P. Anna, P. Ananth, Y. Min and R.E. Catherine. 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237
- [0019] [문헌 18] Jayaprakasha, G. K., R. L. Jaganmohan, and K. K. Sakariah. 2004. Antioxidant activities of flavidin in different in vitro moder systems. *Bioorganic & Medicinal Chem.*12, 5141-5146
- [0020] [문헌 19] Marcocci, L., J. J. Maguire, M. T. Droylefaix, and L. Packer. 1994. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract Egb 761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 748-755

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 현대인들은 자외선, 스트레스 등의 여러 가지 내외적인 요인에 의해 각종 피부 트러블 유발로 기미, 주근깨, 피부 색소 침착 등의 피부 노화 현상을 촉진한다(1.Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. *Cosmetic &Toiletries*. 111, 51-58.). 피부의 색소 침착은 멜라닌 색소가 생합성에서 tyrosinase 효소를 비롯하여 DHICA oxidase(TRP-1)등의 L-tyrosine을 DOPA(3,4-dihydroxyphenyla-lanine)으로 DOPA에서 DOPA quinone으로 초기반응을 조절하는 것으로 알려져 있다(2.Aroca, P., et al. 1993. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol Chem* 268, 25650-25655.). 이를 바탕으로 티로시나제(tyrosinase) 효소의 활성을 저해하여 멜라닌 생합성의 억제에 영향을 미칠 수 있는 천연물 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 결과 어성초 추출물을 이용하여 티로시나제(tyrosinase) 유전자 발현 억제 효과(3. Chin, J. E., et al. 2005. Effects of Houttuynia cordata extracts on tyrosinase gene expression. *J. Korean Soc Food Sci Nutr* 34, 1284-1288.) 등 천연물을 활용한 연구가 활발히 이뤄지고 있다. 그 외 현재 알려져 있는 항산화 및 미백원료는 아르부틴(Arbutin), 코지산(Kojic acid), 아스코르브산(Ascorbic acid) 등의 물질이 대표적이고 상백피, 닥나무, 감초 등의 식물 추출물이 널리 알려져 있다.
- [0022] 최근 들어, 미백, 노화방지, 피부개선, 항암 및 항균 등 복합 기능성을 가진 화장품으로써 한약재는 제품 유형과 제형에 관계없이 다양하게 이용되어지고 있으며, 화장품에 천연물을 직접 이용한 것은 1973년 아모레 퍼시픽이 인삼을 주원료로 한 진생상미라는 제품을 선보인 것이 원조라 할 수 있고 이 후 산삼, 홍삼, 감초, 녹두, 흑두, 한란, 단풍잎, 대나무, 닥나무, 주목(朱木), 굴나무, 오가피, 야자수, 생강, 영지버섯, 녹차, 우엉, 뽕나무 등 다양한 식물자원으로부터 효능 성분을 추출하여 화장품 개발에 적극적으로 활용하고 있으며, 소재개발로 이루어지고 있으며, 현재 세계 화장품 시장 규모 05년 약 2,500억불에서 매년 10% 성장세를 보이고 있으며, 단순미용에서 질병치료 개념으로 진화, 고기능 다기능성으로 확대, 한방화장품 시대로 변화하고 있는 상황이며, 천연 기능성 소재의 세계시장 규모는 연간 판매액 150억 달러에 달하며 최근 매년 평균 10% 이상의 성장률을 보이고 있다. 피부 천연물 소재의 개발 시 세계적으로 연간 1조 원 ~2조 원의 매출과 매출의 20 ~ 50%의 순이익 창출이 가능할 것으로 예상됩니다.
- [0023] 환경의 파괴로 인한 자외선 증가 및 각종 산화성 물질의 증가는 피부 손상과 단백질의 합성능 저하를 유발할 수 있다. 이러한 피부 세포의 손상이나 기능 저하는 피부 탄력의 감소, 피부 주름살의 증가, 기미와 주근깨 생성 등 피부 미용에 치명적인 현상들을 유발한다. 피부 탄력성은 진피조직의 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 히알루론산(hyaluronic acid) 등에 의해 유지되며, 콜라겐(collagen)을 합성하는 섬유아세포(fibroblast)는 핵심적인 역할을 한다(Oikarinen A, Karvonen J, Uitto J, Hannuksela M., Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation. *Photodermatol.* **2(1)**, pp.15-26, Review, 1985.). 섬유아세포 기능은 각종 성장인자(growth factor) 뿐만 아니라 케라티노사이트(keratinocyte)나 멜라노사이트(melanocyte)와 같은 피부 세포들에서 분비되는 싸이토카인(cytokine)에 의해서도 조절된다(Hirobe T., Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of

mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.* 18(1), pp.2-12. Review, 2005; McKay IA, Leigh IM., Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol.* 124(6), pp.513-8, Review, 1991.. 정상적인 상태에서 유리되는 케라티노사이트의 TGF- β , T β RII, SGad3는 피부 섬유아세포 (dermal fibroblast)로 부터 프로콜라겐(procollagen), 피브릴린(fibrillin-1), tropoelastin의 발현을 증가시켜 콜라겐 생성을 증가시키며, MMPs의 발현을 억제하여 콜라겐 분해를 억제하는 것으로 보고되었다(Kim HH, Cho S, Lee S, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH., Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo. *J Lipid Res.* 47(5), pp.921-30, 2006; Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A., The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol Cell Biochem.* 305(1-2), pp.255-64, Review, 2007)UV에 의해 케라티노사이트가 손상되면 TGF- β (transforming growth factor) 외에도 TNF- α (tumor necrosis factor), PGE₂ (prostaglandin E₂), α -MSH(melanocyte stimulating hormone), GSF(granulocyte stimulating factor), IL-1(interleukin-1), IL-6, IL-8, IL-10 등의 유리가 유발한다(문헌 6] Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG., Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 11(1), pp.112-7, Review, 2006; Traidl-Hoffmann C, MI, Ring J, Behrendt H., Impact of desloratadine and loratadine on the crosstalk between human keratinocytes and leukocytes: Implications for anti-inflammatory activity of antihistamines. *Int Arch Allergy Immunol.* 140(4), pp.315-20, 2006.). 이중 α -MSH와 PGE₂는 멜라노사이트를 자극하여 멜라닌 생성을 촉진하여, 이 멜라닌은 피부 세포의 항산화 작용을 증강시켜 피부세포가 자외선으로 인해 손상되는 것을 방어하게 한다(Cannon JG, Tatro JB, Reichlin S, Dinarello CA., Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol.* 137(7), pp.2232-6, 1986.). IL-1, TNF- α (tumor necrosis factor) 등은 fibroblast에 작용하여 procollagen 발현을 억제하며, MMP-1 (matrix metalloproteinase-1), MMP-2, MMP-3, 히알루로니다아제(hyaluronidase)등의 활성을 증가시켜 콜라겐 분해를 촉진하게 된다(Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T., Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J Immunol.* 164(12), pp.6174-9, 2000; Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifemberger J, Fischer JW., Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol.* 171(5), pp.1451-61, 2007. 9-10). 또한, UV에 의해 직접적으로 섬유아세포 (fibroblast)가 상해를 받는 경우에도 콜라겐 관련 유전자는 억제되고 분해에 관련되는 MMPs류 발현은 촉진되어 주름살은 증가하게 된다. 따라서, 진피 섬유아세포 (dermal fibroblast)의 증식과 콜라겐 합성을 증가시키거나, MMPs를 억제하는 것은 주름살을 생성을 억제하는 수단이 될 수 있다.

[0024]

염증 반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복 재생하려는 기전이다[1]. 일단 자극이 가해지면 국소적으로 염증성 성분과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발하지만 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 여러 질환을 발생시키는 원인이 된다[Willoughby DA. (1975) Human arthritis applied to animal models. Towards a beter therapy. *Annals of the Rheumatic Disease.* 34, 471-478.]. 대식세포는 선천면역 뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 nitric oxide (NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다[Higuchi M, Hisgahi N, Taki H and Osawa T. (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanismsact synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *The Journal of Immunology.* 144, 1425-1431.]. 포유동물 세포의 nitric oxide synthase (NOS)의 경우, 유사형태가 3가지 존재하는데 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), 그리고 inducible NOS (iNOS)이다. 그 중에서 특히 iNOS가 염증반응에 관여한다. nNOS와 eNOS는 항상 발현되어 있으며, iNOS의 경우 Interferon- γ , lipopolysaccharide (LPS) 그리고 여러 가지 염증성 사이토카인의 자극이 있을 때 발현된다. 또한 NO는 급성, 만성 염증반응을 조절하기도 한다. PGE₂는 cyclooxygenase (COX)에 의해서 arachidonic acid로부터 생산된다. COX에 대해서는 1990년대 초반에 주로 연구되었는데, 이 또한 유사형태가 2가지 존재한다. COX-1은 거의 모든 조직에 발현되어 있고, prostaglandin을 생산하여 신장의 혈액흐름을 조절하거나 위장의 세포를 보호하는 등의 생리적인 기능을 조절한다. 반대로 COX-2의 경우는 미생물에 의한 감염이나 손상 혹은 여러 요인의 스트레스에 반응한 대식세포 (Macrophage)에서 발현된다. 즉 iNOS와 COX-2의 발현과 NO, PGE₂는 면역세포의 대표적인 염증인자이다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인

(proinflammatory cytokine)인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)등이 포함된다[Yun HJ, Heo SK, Yi HS, Kim CH, Kim BW and Park SD. (2008) Anti-inflammatory effect of injinho-tang in Raw264.7 Cells. *Kor. J. Herbology*. 23(2), 169-178.].

[0025] 밤(Chestnut)은 참나무과(Fagaceae)에 속한 낙엽교목으로서, 밤나무의 과실을 율자(栗子)라 하여 식품으로 사용하고, 그 성분으로는 단백질, 전분, 지방, 탄수화물, 무기성분, 비타민, 리파제(lipase) 등의 성분이 알려져 있으며, 그 잎을 율엽(栗葉)이라 하고, 그 꽃을 율화(栗花)라 하며, 밤의 외과피를 율각(栗殼); 밤의 내과피를 율부(栗)라고 하며, 주로, 설사, 혈변, 천식, 골절상 등에 민간에서 사용되어 왔다 (정보섭외, 도해향약대사전, p806-808, 영림사, 1998년).

[0026] 밤 가공에서 수작업에 의해 발생하는 밤송이는 부산물로서 산업 이용도가 개발되지 않아 대부분 폐기처분하고 실정으로서 이러한 환경이 해로운 폐기물을 환경보호 및 부산물 재활용차원에서 밤송이에 대한 다양한 악리활성을 연구하여 이를 재활용한다면 산업적으로나 환경적으로 큰 기여를 할 것으로 판단된다.

[0027] 이에 본 발명자들은 발효 밤송이 추출물에 대하여 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS radical 소거능 측정, hydrogen peroxide 소거능 측정 등의 항산화 활성 실험; 헤모글로빈 단백질을 이용한 수렴 효과 활성 측정실험; Nitric Oxide (NO) radical 소거능 측정실험 등의 항염 활성 실험; Tyrosinase 저해활성 실험 등의 미백활성 실험; 항균 실험 등의 다양한 실험을 수행한 바, 비발효 밤송이 추출물보다 상기 발효 시료들이 강력한 피부노화방지, 주름개선, 미백활성, 수렴 활성, 항염 및 항균 활성 등을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0028] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 발효 밤송이 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화, 또는 피부 염증성 질환의 치료 및 예방용 피부외용 약학조성물을 제공한다.

[0029] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 발효 밤송이 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 항산화, 또는 피부 염증성 질환의 예방 및 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0030] 본원에서 정의되는 “추출물”은 발효 밤송이 상등액 및 침전물 추출물을 포함하며, 구체적으로는, 물, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 헥산, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 함수부틸렌글리콜, 함수프로필렌글리콜, 함수글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 에탄올 혼합용매, 가장 바람직하게는 60% 내지 80% 에탄올 가용 추출물을 포함한다.

[0031] 본원에서 정의되는 염증성 피부 질환은 염증성 피부염, 건선증, 상처, 아토피성 질환, 바람직하게는 건선증, 상처, 아토피성 질환, 염증성 피부염 보다 바람직하게는 아토피성 질환 또는 염증성 피부염을 포함한다.

[0032] 상기 발효 밤송이 추출물은 피부외용 약학조성물은 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%으로 포함함을 특징으로 한다.

[0033] 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형을 포함한다.

[0034] 또한, 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 포함한다.

[0035] 본원에서 정의되는 상기 밤송이는 카스타네아 크레나타(Castanea crenata), 카스타네아 몰리시마(Castanea mollissima), 카스타네아 다비디(Castanea davidii, China), 카스타네아 헨리(Castanea henryi), 카스타네아 세귀니(Castanea seguinii) 등의 아시아산; 카스타네아 덴타타(Castanea dentata), 카스타네아 푸밀라(Castanea pumila), 카스타네아 알니폴리아(Castanea alnifolia), 카스타네아 애셰이(Castanea ashei), 카스타네아 플로리다나(Castanea floridana), 카스타네아 파우피스피나((Castanea paupispina) 등의 미국산; 카스타네아 사티바(Castanea sativa) 등의 유럽산 밤의 밤송이부위를 포함함을 특징으로 한다.

- [0036] 본원에서 정의되는 상기 발효는 액체배양을 거쳐 활성화된 유산균, 바람직하게는 유산균, 보다 바람직하게는, 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 속 균주, 보다 더 바람직하게는, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*,) 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 락토바실러스 불가리쿠스(*L. bulgaricus*), 락토바실러스 비페르메탄스(*L. bifermentans*), 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*), 락토바실러스 아질리스(*L. agilis*), 락토바실러스 케피르(*L. kefir*), 락토바실러스 아밀로필러스(*L. amylophilus*), 락토바실러스 아시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 바바리우스(*L. bavarius*), 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*), 락토바실러스 페르멘텀(*L. fermentum*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*L. helveticus*), 락토바실러스 존소닐(*L. johnsonii*), 락토바실러스 파라카세이 (*L. paracasei*), 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*), 락토바실러스 로우테리(*L. reuteri*), 및 락토바실러스 살리바리우스(*L. salivarius*)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 균주, 보다 더 바람직하게는, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*,) 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 및 락토바실러스 불가리쿠스(*L. bulgaricus*)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 균주를 시료 중량의 1-30%(v/v), 바람직하게는 1-10%(v/v) 용량이 되도록 접종하여 15 내지 50℃, 바람직하게는, 20 내지 40℃ 온도 범위의 온도에서 1 일 내지 2주일, 바람직하게는 2일 내지 6일, 보다 바람직하게는 36시간 내지 56시간 동안 계대배양을 수행하여 본 발명의 발효 배양액을 수득함을 특징으로 한다.
- [0037] 또한, 구체적으로, 본원에서 정의되는 상기 액체 배양은 혼합액체배지, 바람직하게는, Sucrose 10 내지 30.0 g/l, Glucose 1 내지 10.0 g/l, Soyptone 3 내지 20.0 g/l, Yeast extract 1 내지 100 g/l, CH₃COONa 1 내지 5.0 g/l, K₂HPO₄ 0.1 내지 0.6 g/l, 및 MgCl₂ 0.01 내지 0.05 g/l, 바람직하게는, Sucrose 20.0 내지 25.0 g/l, Glucose 3.0 내지 7.0 g/l, Soyptone 8.0 내지 15.0 g/l, Yeast extract 1.0 내지 8.0 g/l, CH₃COONa 1.0 내지 3.0 g/l, K₂HPO₄ 0.1 내지 0.3 g/l, 및 MgCl₂ 0.01 내지 0.04 g/l 범위 조성을 넣은 혼합액배지를 pH 4.00 내지 7.00, 바람직하게는, pH 5.5 내지 pH 6.50 범위로 조정하고 멸균처리하여 발효를 수행함을 특징으로 한다.
- [0038] 구체적으로, 본 발명의 발효 추출물을 제조하는 방법을 설명한다.
- [0039] 예를 들어 본 발명의 발효 추출물은 세척 및 건조 상태의 배양액 원재료를 액체배양을 거쳐 활성화된 유산균, 바람직하게는 유산균, 보다 바람직하게는, 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 속 균주, 보다 더 바람직하게는, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*,) 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 락토바실러스 불가리쿠스(*L. bulgaricus*), 락토바실러스 비페르메탄스(*L. bifermentans*), 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*), 락토바실러스 아질리스(*L. agilis*), 락토바실러스 케피르(*L. kefir*), 락토바실러스 아밀로필러스(*L. amylophilus*), 락토바실러스 아시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 바바리우스(*L. bavarius*), 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*), 락토바실러스 페르멘텀(*L. fermentum*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*L. helveticus*), 락토바실러스 존소닐(*L. johnsonii*), 락토바실러스 파라카세이 (*L. paracasei*), 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*), 락토바실러스 로우테리(*L. reuteri*), 및 락토바실러스 살리바리우스(*L. salivarius*)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 균주, 보다 더 바람직하게는, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*,) 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 및 락토바실러스 불가리쿠스(*L. bulgaricus*)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 균주를 시료 중량의 1-30%(v/v), 바람직하게는 1-10%(v/v) 용량이 되도록 접종하여 15 내지 50℃, 바람직하게는, 20 내지 40℃ 온도 범위의 온도에서 1 일 내지 2주일, 바람직하게는 2일 내지 6일, 보다 바람직하게는 36시간 내지 56시간 동안 정지배양을 수행하여 발효 배양액을 수득하는 제 1단계; 상기 발효 배양액이 시료 중량의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 2 내지 20배에 달하는 부피의 물, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 헥산, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 합수부틸렌글리콜, 합수프로필렌글리콜, 합수글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 에탄올 혼합용매, 가장 바람직하게는 60% 내지 80% 에탄올을 가하여 20 내지 120℃, 바람직하게는 30 내지 80℃에서 약 1 내지 14일, 바람직하게는 2 내지 6일 동안에서 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 냉침 추출하는 추출법을 반복하여 추출하는 제 2단계; 상기 추출 용액을 여과하여 이들을 상등액 및 침전물로 각각 분류하고 이들을 각각 감압여과 및 농축하는 제 3단계 공정을 통하여 본 발명의 발효 배양액 상등액 및 침전물 추출물을 수득할 수 있다.
- [0040] 본 발명은 상기 제조방법 및 상기 제조방법으로 수득된 발효 배양액 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화, 항염증, 미백, 주름억제 효과를 갖는 피부외용 약화조성물 및 화장료 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명자들은 본 발명의 발효 배양액 추출물에 대하여 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS

radical 소거능 측정, hydrogen peroxide 소거능 측정 등의 항산화 활성 실험; Nitric Oxide (NO) radical 소거능 측정실험 등의 항염 활성 실험; 티로시나제(Tyrosinase) 저해활성 실험 등의 미백활성 실험; 항균 실험 등의 다양한 실험을 수행한 바, 미발효 밤송이 추출물보다 상기 시료들이 강력한 피부노화방지, 미백활성, 항염 및 항균 활성 등을 나타냄을 확인하여 상기 조성물을 피부 미백 및 항산화, 또는 항염증용 피부외용 약학조성물 또는 화장품 조성물로 유용함을 확인하였다.

[0042] 또한, 밤은 오랫동안 생약 및 식용으로 사용되어 오던 약재로서 이들로부터 추출된 본 발명의 발효 밤송이 추출물 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없으며, 피부 첩포 시험에서 무자극 시료임이 입증되었으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 발효 밤송이 추출물을 함유하는 피부외용 약학조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용제 형태의 약학조성물로 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0044] 본 발명의 발효 밤송이 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 발효 밤송이 추출물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 발효 밤송이 추출물은 피부 미백 및 항산화, 또는 항염증 효과를 갖는 화장품 및 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.

[0046] 본 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 맛사지크림, 에센스, 팩 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.

[0047] 본 발명의 화장료는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함한다.

[0048] 수용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 엽산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민 C, 비타민 H 등을 들 수 있으며, 그들의 염 (티아민염산염, 아스코르빈산나트륨염 등)이나 유도체 (아스코르빈산-2-인산나트륨염, 아스코르빈산-2-인산마그네슘염 등)도 본 발명에서 사용할 수 있는 수용성 비타민에 포함된다. 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.

[0049] 유용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E (d1-알파 토크페롤, d-알파 토크페롤, d-알파 토크페롤) 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체 (팔미틴산아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산 d1-알파 토크페롤, 니코틴산 d1-알파 토크페롤비타민 E, d1-판토텐닐알코올, D-판토텐닐알코올, 판토텐닐에틸에테르 등) 등도 본 발명에서 사용되는 유용성 비타민에 포함된다. 유용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.

[0050] 고분자 펩티드로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 콜라겐, 가수 분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수 분해 엘라스틴, 케라틴 등을 들 수 있다. 고분자 펩티드는 미생물의 배양액으로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 정제 취득할 수 있으며, 또는 통상 돼지나 소 등의 진피, 누에의 견섬유 등의 천연물로부터 정제하여 사용할 수 있다.

[0051] 고분자 다당으로서의 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 히드록시에틸셀룰로오스, 크산탄검, 히알루론산나트륨, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 (나트륨염 등) 등을 들 수 있다. 예를 들어, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 등은 통상 포유동물이나 어류로부터 정제하여 사용할 수 있다.

[0052] 스펅고 지질로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 세라미드, 피토스핑고신, 스펅고당지질 등을 들 수 있다. 스펅고 지질은 통상 포유류, 어류, 패류, 효모 또는 식물 등으로부터 통상의 방법에 의해 정제하거나 화학 합성법에 의해 취득할 수 있다.

- [0053] 해초 엑기스로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 갈조 엑기스, 홍조 엑기스, 녹조 엑기스 등을 들 수 있으며, 또, 이들의 해초 엑기스로부터 정제된 칼라기난, 아르긴산, 아르긴산나트륨, 아르긴산칼륨 등도 본 발명에서 사용되는 해초 엑기스에 포함된다. 해초 엑기스는 해초로부터 통상의 방법에 의해 정제하여 취득할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 화장료에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다.
- [0055] 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0056] 유지 성분으로서는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.
- [0057] 에스테르계 유지로서는 트리2-에틸헥산산글리세릴, 2-에틸헥산산세틸, 미리스틴산이소프로필, 미리스틴산부틸, 팔미틴산이소프로필, 스테아르산에틸, 팔미틴산옥틸, 이소스테아르산이소세틸, 스테아르산부틸, 리놀레산에틸, 리놀레산이소프로필, 올레인산에틸, 미리스틴산이소세틸, 미리스틴산이소스테아릴, 팔미틴산이소스테아릴, 미리스틴산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 세바신산디에틸, 아디핀산디이소프로필, 네오펜탄산이소알킬, 트리(카프릴, 카프린산)글리세릴, 트리2-에틸헥산산트리메틸올프로판, 트라이소스테아르산트리메틸올프로판, 테트라2-에틸헥산산펜타엘리글리콜, 카프릴산세틸, 라우린산데실, 라우린산헥실, 미리스틴산데실, 미리스틴산미리스틸, 미리스틴산세틸, 스테아르산스테아릴, 올레인산데실, 리시노올레인산세틸, 라우린산이소스테아릴, 미리스틴산이소트리데실, 팔미틴산이소세틸, 스테아르산옥틸, 스테아르산이소세틸, 올레인산이소데실, 올레인산옥틸도데실, 리놀레산옥틸도데실, 이소스테아르산이소프로필, 2-에틸헥산산세토스테아릴, 2-에틸헥산산스테아릴, 이소스테아르산헥실, 디옥탄산에틸렌글리콜, 디올레인산에틸렌글리콜, 디카프린산프로필렌글리콜, 디(카프릴, 카프린산)프로필렌글리콜, 디카프릴산프로필렌글리콜, 디카프린산네오펜틸글리콜, 디옥탄산네오펜틸글리콜, 트리카프릴산글리세릴, 트리운데실산글리세릴, 트라이소팔미틴산글리세릴, 트라이소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오데칸산헥실데실, 네오데칸산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트라이소세틸, 시트르산트라이소알킬, 시트르산트라이소옥틸, 락트산라우릴, 락트산미리스틸, 락트산세틸, 락트산옥틸데실, 시트르산트리에틸, 시트르산아세틸트리에틸, 시트르산아세틸트리부틸, 시트르산트리옥틸, 말산디이소스테아릴, 히드록시스테아르산 2-에틸헥실, 숙신산디2-에틸헥실, 아디핀산디이소부틸, 세바신산디이소프로필, 세바신산디옥틸, 스테아르산콜레스테릴, 이소스테아르산콜레스테릴, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 올레인산콜레스테릴, 올레인산디히드로콜레스테릴, 이소스테아르산피트스테릴, 올레인산피트스테릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소세틸, 12-스테알로일히드록시스테아르산스테아릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소스테아릴 등의 에스테르계 등을 들 수 있다.
- [0058] 탄화 수소계 유지로서는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동 이소파라핀, 폴리부텐, 마이크로크리스탈린왁스, 와셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.
- [0059] 실리콘계 유지로서는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산·메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산·메틸스테알록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리콘유, 아미노 변성 실리콘유 등을 들 수 있다.
- [0060] 불소계 유지로서는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.
- [0061] 동물 또는 식물 유지로서는 아보카도유, 아르몬드유, 올리브유, 참깨유, 쌀겨유, 새플라워유, 대두유, 옥수수유, 유채유, 행인(杏仁)유, 팜핵유, 팜유, 피마자유, 해바라기유, 포도종자유, 면실유, 야자유, 쿠쿠이너트유, 소맥배아유, 쌀 배아유, 시아버터, 월견초유, 마커데이미아너트유, 메도흙유, 난황유, 우지(牛脂), 마유, 밍크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔데리러왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀린, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.
- [0062] 보습제로서는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.
- [0063] 수용성 저분자 보습제로서는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피콜리돈-카르복실산나트륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜B(중합도 $n = 2$ 이상), 폴리프로필렌글리콜(중합도

n = 2 이상), 폴리글리세린B(중합도 n = 2 이상), 락트산, 락트산염 등을 들 수 있다.

- [0064] 지용성 저분자 보습제로서는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.
- [0065] 수용성 고분자로서는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산탄검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성 키틴, 키토산, 텍스트린 등을 들 수 있다.
- [0066] 지용성 고분자로서는 폴리비닐피롤리돈·에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈·헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 텍스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.
- [0067] 에몰리엔트제로서는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.
- [0068] 계면 활성제로서는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0069] 비이온성 계면 활성제로서는 자기 유화형 모노스테아르산글리세린, 프로필렌글리콜지방산에스테르, 글리세린지방산에스테르, 폴리글리세린지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, POE (폴리옥시에틸렌)솔비탄지방산에스테르, POE 솔비탄지방산에스테르, POE 글리세린지방산에스테르, POE 알킬에테르, POE 지방산에스테르, POE 경화피마자유, POE 피마자유, POE·POP (폴리옥시에틸렌·폴리옥시프로필렌) 공중합체, POE·POP 알킬에테르, 폴리에테르변성실리콘, 라우린산알카놀아미드, 알킬아민옥시드, 수소첨가대두인지질 등을 들 수 있다.
- [0070] 음이온성 계면 활성제로서는 지방산비누, 알파-아실술포산염, 알킬술포산염, 알킬알릴술포산염, 알킬나프탈렌술포산염, 알킬황산염, POE 알킬에테르황산염, 알킬아미드황산염, 알킬인산염, POE 알킬인삼염, 알킬아미드인산염, 알킬로일알킬타우린염, N-아실아미노산염, POE 알킬에테르카르복실산염, 알킬술포옥신산염, 알킬술포아세트산나트륨, 아실화 가수분해 콜라겐펩티드염, 퍼플루오로알킬인산에스테르 등을 들 수 있다.
- [0071] 양이온성 계면 활성제로서는 염화알킬트리메틸암모늄, 염화스테아릴트리메틸암모늄, 브롬화스테아릴트리메틸암모늄, 염화세토스테아릴트리메틸암모늄, 염화디스테아릴디메틸암모늄, 염화스테아릴디메틸벤질암모늄, 브롬화베헤닐트리메틸암모늄, 염화벤잘코늄, 스테아르산디에틸아미노에틸아미드, 스테아르산디메틸아미노프로필아미드, 라놀린 유도체 제 4급 암모늄염 등을 들 수 있다.
- [0072] 양성 계면 활성제로서는 카르복시베타인형, 아미드베타인형, 술포베타인형, 히드록시술포베타인형, 아미드술포베타인형, 포스포베타인형, 아미노카르복실산염형, 이미다졸린 유도체형, 아미드아민형 등의 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0073] 유기 및 무기 안료로서는 규산, 무수규산, 규산마그네슘, 탱크, 세리사이트, 마이카, 카올린, 벵갈라, 클레이, 벤토나이트, 티탄피막운모, 옥시염화비스무트, 산화지르코늄, 산화마그네슘, 산화아연, 산화티탄, 산화알루미늄, 황산칼슘, 황산바륨, 황산마그네슘, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 산화철, 군청, 산화크롬, 수산화크롬, 칼라민 및 이들의 복합체등의 무기 안료 ; 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리우레탄, 비닐수지, 요소수지, 페놀수지, 불소수지, 규소수지, 아크릴수지, 멜라민수지, 에폭시수지, 폴리카보네이트수지, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 실크파우더, 셀룰로오스, CI 피그먼트옐로우, CI 피그먼트오렌지 등의 유기 안료 및 이들의 무기 안료와 유기 안료의 복합 안료 등을 들 수 있다.
- [0074] 유기 분체로서는 스테아르산칼슘 등의 금속비누 ; 세틸린산아연나트륨, 라우릴린산아연, 라우릴린산칼슘 등의 알킬인산금속염 ; N-라우로일-베타-알라닌칼슘, N-라우로일-베타-알라닌아연, N-라우로일글리신칼슘 등의 아실아미노산 다가금속염 ; N-라우로일-타우린칼슘, N-팔미토일-타우린칼슘 등의 아미드술포산 다가금속염 ; N-엡실론-라우로일-L-리진, N-엡실론-팔미토일리진, N-알파-파리토일올니틴, N-알파-라우로일아르기닌, N-알파-경화우지지방산아실아르기닌 등의 N-아실염기성아미노산 ; N-라우로일글리실글리신 등의 N-아실폴리펩티드 ; 알파-아미노카프릴산, 알파-아미노라우린산 등의 알파-아미노지방산 ; 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 나일론, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리스티렌, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 사불화에틸렌 등을 들 수 있다.
- [0075] 자외선 흡수제로서는 파라아미노벤조산, 파라아미노벤조산에틸, 파라아미노벤조산아밀, 파라아미노벤조산옥틸, 살리실산에틸렌글리콜, 살리신산페닐, 살리신산옥틸, 살리신산벤질, 살리신산부틸페닐, 살리신산호모멘틸, 게피산벤질, 파라메톡시게피산-2-에톡시에틸, 파라메톡시게피산옥틸, 디파라메톡시게피산모노-2-에틸헥산글리세릴, 파라메톡시게피산이소프로필, 디이소프로필·디이소프로필게피산에스테르 혼합물, 우로카닌산, 우로카닌산에틸,

히드록시메톡시벤조페논, 히드록시메톡시벤조페논술폰산 및 그 염, 디히드록시메톡시벤조페논, 디히드록시메톡시벤조페논디술폰산나트륨, 디히드록시벤조페논, 테트라히드록시벤조페논, 4-*tert*-부틸-4'-메톡시디벤조일메탄, 2,4,6-트리아닐리노-*p*-(카르보-2'-에틸헥실-1'-옥시)-1,3,5-트리아진, 2-(2-히드록시-5-메틸페닐)벤조트리아졸 등을 들 수 있다.

[0076] 살균제로서는 히노키티올, 트리클로산, 트리클로로히드록시디페닐에테르, 크로르헥시딘글루콘산염, 페녹시에탄올, 레조르신, 이소프로필메틸페놀, 아줄렌, 살리칠산, 진크필리티온, 염화벤잘코늄, 감광소 301 호, 모노니트로콰이어콜나트륨, 운데시렌산 등을 들 수 있다.

[0077] 산화 방지제로서는 부틸히드록시아니솔, 갈릭산프로필, 엘리스르빈산 등을 들 수 있다.

[0078] pH 조정제로서는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.

[0079] 알코올로서는 세틸알코올 등의 고급 알코올을 들 수 있다.

[0080] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하지만, 총중량에 대하여 바람직하게는 0.01 - 5 % 중량, 보다 바람직하게는 0.01 - 3 % 중량로 배합된다.

[0081] 본 발명의 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.

[0082] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 발효 발송이 추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.

[0083] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등을 들 수 있다.

[0084] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형을 포함한다.

[0085] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0086] 본 발명의 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.

[0087] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0088] 본 발명의 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.

[0089] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 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.

발명의 효과

[0090]

본 발명의 발효 배양액 추출물은 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS radical 소거능 측정, hydrogen peroxide 소거능 측정 등의 항산화 활성 실험; Nitric Oxide (NO) radical 소거능 측정실험 등의 항염 활성 실험; Tyrosinase 저해활성 실험 등의 미백활성 실험; 항균 실험 등의 다양한 실험을 수행한 바, 미발효 배양액 추출물보다 상기 시료들이 강력한 피부노화방지, 미백활성, 항염 및 항균 활성 등을 나타냄을 확인하여 상기 조성물을 피부 미백 및 항산화, 또는 항염용 피부외용 약학조성물 또는 화장품 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0091]

도 1은 발효 배양액의 발효조건에 따른 생균수 변화를 나타낸 도이며;

도 2는 발효 배양액의 발효조건에 따른 pH 변화를 나타낸 도이며;

도 3은 발효 배양액 추출물의 전자 공여능 억제활성을 나타낸 도이고(여기에서 A 는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; B는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; C 는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; D는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; E 는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; F는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; G는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; H는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; I 는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; J는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; K 는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; L는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; AA : Ascorbic acid이며, 결과는 삼중치의 평균(means) $\pm$ S.D.을 표시함);

도 4은 발효 배양액 추출물의 ABTS⁺ 양이온 라디칼 소거능 활성을 나타낸 도이며(여기에서 A 는 *Lactobacillus casei* (0%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; B는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; C는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; D는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; E는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; F는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; G는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; H는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; I는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; J는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; K는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; L는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; AA : Ascorbic acid이며, 결과는 삼중치의 평균(means) $\pm$ S.D.을 표시함);

도 5은 발효 배양액 추출물의 과산화 수소(Hydrogen peroxide) 소거능 활성을 나타낸 도이며(여기에서 A 는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; B는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; C 는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; D는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; E 는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; F는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; G는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; H는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; I는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; J는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; K는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; L는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; AA : Ascorbic acid이며, 결과는 삼중치의 평균(means) $\pm$ S.D.을 표시함);

도 6은 발효 배양액 추출물의 Nitric oxide 소거능 활성을 나타낸 도이며(여기에서 A 는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며; B는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며, C는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며, D는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 1일 발효 후 발효 배양액 추출물이며, E는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며, F는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며, G는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며, H는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 3일 발효 후 발효 배양액 추출물이며, I는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 6일 발효 후 발효 배양액 추출물이며, J는 *Lactobacillus*

casei(1%) 로 6일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, K는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 6일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, L는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 6일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, AA : Ascorbic acid이며, 결과는 삼중치의 평균(means) $\pm$ S.D.을 표시함);

도 7은 발효 밤송이 추출물의 티로시나제 활성 억제 효과를 나타낸 도이다(여기에서 A 는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 1일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며; B는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 1일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, C는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 1일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, D는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 1일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, E는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 3일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, F는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 3일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, G는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 3일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, H는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 3일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, I는 *Lactobacillus casei*(0%) 로 6일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, J는 *Lactobacillus casei*(1%) 로 6일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, K는 *Lactobacillus casei*(5%) 로 6일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, L는 *Lactobacillus casei*(10%) 로 6일 발효 후 발효 밤송이 추출물이며, AA : Ascorbic acid이며, 결과는 삼중치의 평균(means) $\pm$ S.D.을 표시함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 발효 밤송이 추출물의 제조

1.1. 식물자원

본 실험에 사용된 밤송이는 경남 함천군 대병면 양리 일대 밤나무 자생 야산에서 채취하여 실험 재료로 사용하였다. 채취된 밤송이는 세척 후 분쇄하여 분말화 한 후, 실온에 보관하여 본 실험의 시료로 사용하였다.

1.2. 발효조건 설정

발효 조건을 설정하기 위해 액체발효물의 상등액과 침전물을 추출하는 두가지 방법으로 실험을 진행하였다.

1.3. 스타터(Starter)의 배양과 접종

밤송이의 유산발효에 starter로 사용된 *Lactobacillus casei*은 혼합액체배지(Sucrose 22.0 g/l, Glucose 5.0 g/l, Soyptone 11.0 g/l, Yeast extract 5.0 g/l, CH₃COONa 2.0 g/l, K₂HPO₄ 0.2 g/l, MgCl₂ 0.02 g/l)에서 계대배양하여 실험에 사용 하였다.

1.4. 최적추출조건 확립

액체발효물의 상등액과 침전물 추출액의 항산화 실험결과 실험변수 고정과 대량생산의 간편성을 고려하여 침전물 추출물을 이용하기로 하고 다음 실험을 진행하였다.

분말 밤송이 50g에 10배 중량(W/V)의 혼합액체배지(Sucrose 22.0 g/l, Glucose 5.0 g/l, Soyptone 11.0 g/l, Yeast extract 5.0 g/l, CH₃COONa 2.0 g/l, K₂HPO₄ 0.2 g/l, MgCl₂ 0.02 g/l)를 넣고 pH 6.00으로 보정후 멸균하였다. 그 후 균주(유산균: *Lactobacillus casei*, ATCC 393)를 0, 1, 5, 10%(v/v)로 접종하여 1, 3, 6일간 35℃에서 발효하였다.

1.5. 발효 추출물

상기 단계에서 각각의 발효가 완료되면 발효한 밤송이에 10배의 80% ethanol 첨가하여 4일간 실온에서 추출하여

상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였으며, 여과하여 상등액과 침전물을 분리하고 이들을 농축 및 동결건조하여 본 발명의 밤송이 발효 추출물을 얻고, 이하, 4℃냉장실에 보관하여 본 실험의 시료로 사용하여 화장품약리활성 평가를 통해 최적 추출조건을 결정하였다.

실시예 2. 발효 및 추출조건 선정 실험

2.1. pH측정

pH 측정은 Thermo(Orion 3-Star, Thermo scientific, Singapore)사의 pH meter를 이용하여 측정하였다. 측정하기 전에 유리전극은 미리 염기성 완충액이나 증류수에 수시간 담궈 두고 pH meter는 전원에 연결하고 10분 이상 두었다가 사용하였다. 검출부는 물로 잘 씻어 가볍게 닦아낸 다음 사용하였다.

2.2. 발효물의 생균수 및 pH의 변화

밤송이에 10배 중량의 혼합액체배지를 혼합하여 배양액을 0, 1, 5, 10%로 접종 후 0, 1, 3, 6 일간 발효한 결과 접종 3일차에 정지기에 도달하였으며 1% 접종시 1일차에 pH가 5.00으로 떨어져 변화가 없었으며 5, 10% 접종시 pH는 시간이 지날수록 계속 낮아지는 것으로 나타났다.

침전물을 이용하기 위한 발효의 경우 1, 3, 4, 7일의 pH와 생균수를 측정하였으며, 발효 5% 접종군과 비슷한 양상을 나타내었다. (도 1 참조)

2.3. 발효밤송이 추출물의 생균수 및 pH의 변화

밤송이에 10배 중량의 혼합액체배지를 혼합하여 배양액을 1, 5, 10%로 접종 후 1, 3, 6 일간 발효한 결과 3일차에 대수증식기에 도달하였다. 접종균액이 많을수록 pH는 시간변화에 따라 계속 낮아지는 것으로 나타났으나, 균 증식에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. (도 2 참조)

2.4. 발효밤송이 추출물의 수율

발효 밤송이의 80% ethanol 추출물의 수율은 다음과 같이 나타났다. 비발효군에 비해서 접종 배양액 함량이 높을수록 수율이 높게 나타났으며, 발효일수에 따른 수율은 비슷하게 나타났다. 그중 배양액 10%를 접종한 1일 발효군의 수율이 24.12%로 가장 높게 측정되었으며, 6일 발효시 모두 20% 이상의 수율을 나타냈다.(표 1 참조)

표 1

Yield rate of fermentation by *Lactobacillus casei* in chestnut bur.

	Inoculation (%)	Yield rate
1 Day	0%	20.16%
	1%	21.44%
	5%	19.64%
	10%	24.12%
3 Day	0%	16.28%
	1%	19.80%
	5%	19.32%
	10%	18.82%
6 Day	0%	19.28%
	1%	20.80%
	5%	20.16%
	10%	22.00%

실험예 1. 항산화 효과 확인

1-1. 전자 공여능 (electron donating ability) 측정

상기 실시예 시료의 전자공여능을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 Blois의 방법을 변형하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Blois MS. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. 26, 1199-1120.)

각 시료용액 2ml에 0.2mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 1ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자 공여능은 시료용액의 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

1,1 Diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) 라디칼을 이용한 항산화능 측정법은 주로 phenolic 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용되는 방법이다. DPPH alcohol 용액은 517nm에서 가장 강한 UV 흡수가 있으며 실온에서 매우 안정한 유리 라디칼이다. 전자공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 됨으로써 517nm에서 나타났던 DPPH의 특이적인 흡수 band가 사라지게 된다. 가시적인 DPPH의 보라색은 안정해진 분자의 몰수에 비례하여 노란색으로 변하게 된다.

상기 실험 결과, 발효밤송이 추출물 모두 100ug/ml 66% 이상의 전자 공여능의 활성을 나타내었다. 1,000ug/ml 농도에서 균주 5% 접종 후 6일간 배양액 한 추출물이 92.9%로 가장 높은 전자공여능 활성을 나타내었다(도 3).

1-2. ABTS 라디칼 양이온 소거능 저해활성 측정

상기 실시예 시료의 ABTS 라디칼 양이온 탈색화(radical cation decolorization) 법에 의한 항산화 효능을 시험하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다(Roterta, R., P. Nicoletta, P. Anna, P. Ananth, Y. Min and R.E. Catherine. 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237.)

ABTS 라디칼 소거능은 추출물들의 상대적인 항산화효과 측정인 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다.

또한 수상(aqueous phase) 모두에 적용이 가능하며 표준물질 사용으로 추출물의 상대비교가 가능하도록 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS⁺ free radical이 추출물속의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한다. ABTS⁺ radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법에 따라 측정하였다.

7mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.4mM potassium persulfate를 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺을 형성시킨 후 ethanol로 희석 하여 ABTS+100ul 에 시료 100ul를 가하여 1분 동안 방치한 후 732nm에서 흡광도를 측정 하였다.

ABTS 라디칼 소거능은 추출물들의 상대적인 항산화효과 측정인 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다. 또한 aqueous phase 모두에 적용이 가능하며 표준물질 사용으로 추출물의 상대비교가 가능하도록 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS⁺ free radical이 추출물속의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한다.

본 실험 결과, 발효밤송이 추출물 모두 50ug/ml 53% 이상의 ABTS 라디칼 소거능의 활성을 나타내었다. 100ug/ml 농도에서 균주 10%접종 후 3일간 배양액 추출물이 83.2%로 가장 높은 전자공여능 활성을 나타내었다(도 4).

1-3. Hydrogen peroxides 소거능측정

상기 실시예 시료의 Hydrogen peroxides 소거능 활성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 Hydrogen peroxides assay 방법을 변형하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Jayaprakasha, G. K., R. L. Jaganmohan, and K. K. Sakariah. 2004. Antioxidant activities of flavidin in different in vitro moder systems. *Bioorganic & Medicinal Chem.* 12, 5141-5146.)

농도별 시료용액 1000ul와 phosphate-buffer saline(PBS at pH 7.4)에 녹인 40 mM hydrogen peroxide solution 2000ul를 37℃에서 10분 간 반응시킨 후 반응액 중에 저해된 hydrogen peroxide의 양을 230nm에서 흡광도를 측

정하였다. 합성항산화물질인 BHA와 활성을 비교해보았다.

[0133] Hydrogen peroxide는 산소의 환원대사물질로서 미토콘드리아나 peroxisome 등의 정상세포로부터 형성 되거나 다양한 외부 요소에 의해 형성되는데, DNA 및 단백질 손상을 유발하거나 생체막 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화 지질을 생성함으로써 생체기능저하 또는 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0134] 본 실험결과, 발효밤송이 추출물은 hydrogen peroxide의 소거활성 결과로서 농도 의존적인 저해 활성을 나타내었으며, 100ug/ml의 농도에서 균주 5% 접종 후 6일간 배양액 추출물이 72.1%의 높은 hydrogen peroxides 소거능을 확인할 수 있었다.(도 5)

[0135] 1-4. 항산화 실험 결과

[0136] 밤송이 발효 상등액과 밤송이 발효 침전물 에탄올 추출물을 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능 법을 통하여 항산화 활성 변화를 경시적으로 검토하였다. 유산발효시킨 상등액의 경우 DPPH radical 소거능에서는 대조군으로 사용한 BHA는 50ug/ml 의 농도에서 79.9%의 소거능을 나타낸 반면 발효균과 비발효균 모두가 대조군보다 낮은 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, ABTS raical 소거능에서는 대조군과 비슷한 ABTS raical 소거능을 나타내었다. 침전물의 에탄올 추출물은 발효하지 않은 에탄올 추출물과 비교시 DPPH radical 소거능에서는 5ug/ml 농도에서 발효물의 항산화능이 2배 높은 것으로 나타났으며, 50ug/ml 농도에서는 비슷한 항산화능을 가지는 것으로 나타났다. ABTS raical 소거능에서는 10ug/ml 발효물은 59.3%, 비발효물은 39.5%의 ABTS raical 소거능을 나타내어 발효시 1.5배의 항산화능이 높아진 것으로 나타났다. (도 3-5 참조)

[0137] 실험결과 항산화 효능에서 상등액은 발효 전후의 활성변화가 나타나지 않았으며, 농축의 과정을 거치지 않은 상태로 발효 대사산물의 농축도가 낮으며 대량생산시 원료의 품질관리를 위해 발효 침전물 에탄올 추출물을 이용하여 최적추출조건을 확립하고자 다음 실험을 진행하였다.

[0138] 실험예 2. 항염 효과 검증실험

[0139] 상기 실시예에서 수득한 시료들의 항염효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 문헌에 개시된 Nitric oxide 저해활성 방법에 따라 측정하였다(Marcocci, L., J. J. Maguire, M. T. Droylefaix, and L. Packer. 1994. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 748-755.)

[0140] Nitric oxide radical 소거능 측정은 각 시료용액 50ul와 20mM sodium phosphater buffer(pH 7.4)에 녹인 10mM Sodium nitroferricyanide(III) dihydrate (sigma 228710) 50ul을 첨가하여 25℃에서 150분간 반응시킨 후 이 반응액을 취하여 Griess 시약 100ul를 가한 후 혼합하고, 292 nm에서 흡광도를 측정하여 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0141] Nitric oxide (NO)는 gas상의 단순한 무기 radical로 자연계에 존재하고 있다. 또한, endothelium-derived relaxing factor (EDRF)로서 혈관 평활근의 이완작용, 중추말초 신경계의 신경 정보 물질로 작용한다. NO는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 만들어지며, NOS는 항상성 유지에 필요한 NO를 생성하는 endothelial NOS (eNOS) 및 neuronal NOS (nNOS)와 염증성 인자 등에 의해 유도되는 inducible NOS (iNOS)로 분류할 수 있다. iNOS (inducible nitric oxide synthase)는 macrophage, 혈관내피세포, 혈관 평활근 세포, 소화관 상피세포, 간세포 등에서 많이 발현되어 장시간 동안 NO를 형성하며, 생성된 NO는 염증반응에 있어서 중요한 mediator로 작용한다. 고농도의 NO는 DNA에 손상을 줄 수 있으며, superoxide ion과 반응 시에 peroxynitrite를 만드는데, peroxynitrite는 hydroxyl radical을 형성하여 조직의 파괴를 일으킬 수 있다.

[0142] 염증과 관련된 nitric oxide radical 소거능을 측정한 결과를 도 6과 같이 나타내었다. 발효 밤송이 추출물의 경우 100, 500, 1,000ug/ml에서 균주 5% 접종 후 6일간 배양액 추출물이 각각 36.5%, 58.3%, 68.8%의 우수한 nitric oxide radical 소거능을 나타내었다.

[0143] 실험예 3. 미백 활성 실험

- [0144] 실시예에서 얻은 시료들의 티로시나제 (Tyrosinase) 저해활성을 시험하기 위하여 문헌에 개시된 Yagi 등의 티로시나제 저해활성 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 [Yagi A, Kanbara T and Morinobu N. (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Media*. 3981, 517-519.]
- [0145] 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5ml에 10mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2ml 및 시료용액 0.1ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110U/ml) 0.2ml을 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.
- [0146] Tyrosinase는 L-tyrosine과 dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)를 산화시켜 DOPA와 DOPA-quinone을 생성한다. Melanocyte가 생성하는 melanin은 eumelanin과 pheomelanin으로 대별되며, eumelanin은 DOPA chrom을 거쳐서 생성되며 pheomelanin은 melanin polymer의 생성 과정에서 DOPA chrome을 거쳐서 생성된다. 자외선에 의하여 melanocyte의 유사분열이 일어나고 이어서 melanocyte가 활성화 된다. 활성화 된 melanocyte 에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 melanin의 생성이 항진되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 되어 기미, 주근깨와 같은 색소침착이 일어나게 된다. 그러므로 tyrosine 활성 억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성억제 실험은 유용한 평가법으로 인정되고 있다.
- [0147] 본 실험 결과, 발효 밤송이 추출물의 미백효과는 도 7와 같이 1,000ug/ml에서 균주 1% 접종 후 1일 배양액과 균주 5% 접종 후 6일간 배양액 추출물이 각각 23.3%, 21.1%의 tyrosinase 저해 활성을 나타냈다.
- [0148] **통계처리**
- [0149] 실험 결과는 3회 반복 측정 후 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. 통계분석은 SAS program (SAS Institue, Cary, NC, USA)을 이용하여 분석한 후 Duncan의 다중검정을 실시하였으며, 상관관계를 분석하였다.
- [0150] 이하, 본 발명의 제형예로서 크림, 맛사지크림, 로션, 스킨로션, 에센스, 팩, 클렌징폼의 제형을 예시하고 있으나, 본 발명의 화장품 조성물을 포함하는 제형은 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0151] **제형예 1. 크림조성물**

[0152] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	1.0
2	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
4	마이크로 스탈린 납	2.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.2
6	파라옥시안식향산프로필	0.1
7	밀납	2.0
8	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	2.0
9	모노스테아린산 소르비탄	1.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	5.0
11	액상 리놀린	5.0
12	미리스틴산 옥틸도데실	8.0
13	스쿠알란	8.0
14	농글리세린	5.0
15	1,3-부틸렌글리콜	5.0
16	알란토인	0.1
17	발효밤송이 추출물	10.0
18	향료	미량
19	황색4호	미량
20	정제수	잔량

[0153]

[0154] 제형예 2. 마사지크림 조성물

[0155] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 용해 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.5
4	파라옥시안식향산메틸	0.2
5	파라옥시안식향산프로필	0.1
6	바셀린	3.5
7	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	3.5
8	세스퀴올레인산 소르비탄	1.8
9	유동 파라핀	35.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	3.0
11	옥틸도데칸올	5.0
12	스쿠알렌	2.0
13	농글리세린	5.0
14	발효밤송이 추출물	5.0
15	히아루로닉애씨드추출물	1.0
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0156]

[0157] 제형예 3. 로션 조성물

[0158] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합 유화한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	스테아린산	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	1.0
4	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	2.0
5	바셀린	1.0
6	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	1.5
7	세스퀴올레인산 소르비탄	1.0
8	유동 파라핀	5.0
9	스쿠알렌	5.0
10	파라옥시안식향산프로필	0.2
11	파라옥시안식향산메틸	0.2
12	농글리세린	5.0
13	발효밤송이 추출물	15.0
14	트리에탄올아민	0.5
15	카르복시비닐폴리머	0.2
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0159]

[0160] 제형예 4. 스킨로션 조성물

[0161] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

번호	원료명	중량 %
1	글리세린	2.0
2	1,3-부틸렌글리콜	2.0
3	구연산	0.01
4	에탄올	15.0
5	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
6	발효밤송이 추출물	25.0
7	향료	미량
8	위치하젤추출물	1.0
9	정제수	잔량

[0162]

[0163] 제형예 5. 에센스 조성물

[0164] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

번호	원료명	중량 %
1	농글리세린	15.0
2	1,3-부틸렌글리콜	5.0
3	알란토인	0.1
4	에탄올	7.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.15
6	트리에탄올아민	0.15
7	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
8	초산토코페롤	0.5
9	카르복시비닐폴리머	0.15
10	발효밤송이 추출물	30.0
11	향료	미량
12	정제수	잔량

[0165]

[0166] 제형예 6. 펙 조성물

[0167] 수상과 에탄올상을 각각 분산 용해하여 혼합시킨 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	폴리비닐알코올	15.0
2	카르복시메틸셀룰로오스나트륨	0.3
3	농글리세린	3.0
4	알란토인	0.1
5	에틸렌디아민테트라초산디나트륨	0.01
6	폴리에틸렌글리콜	1.0
7	에탄올	6.0
8	파라옥시안식향산메틸	0.15
9	타라옥시안식향산프로필	0.05
10	디엘판테놀	0.1
11	폴리옥시에틸렌 (12) 노닐페닐에테르	0.5
12	발효밤송이 추출물	45.0
13	향료	미량
14	정제수	잔량

[0168]

[0169] 제형예 7. 클렌징폼 조성물

[0170]

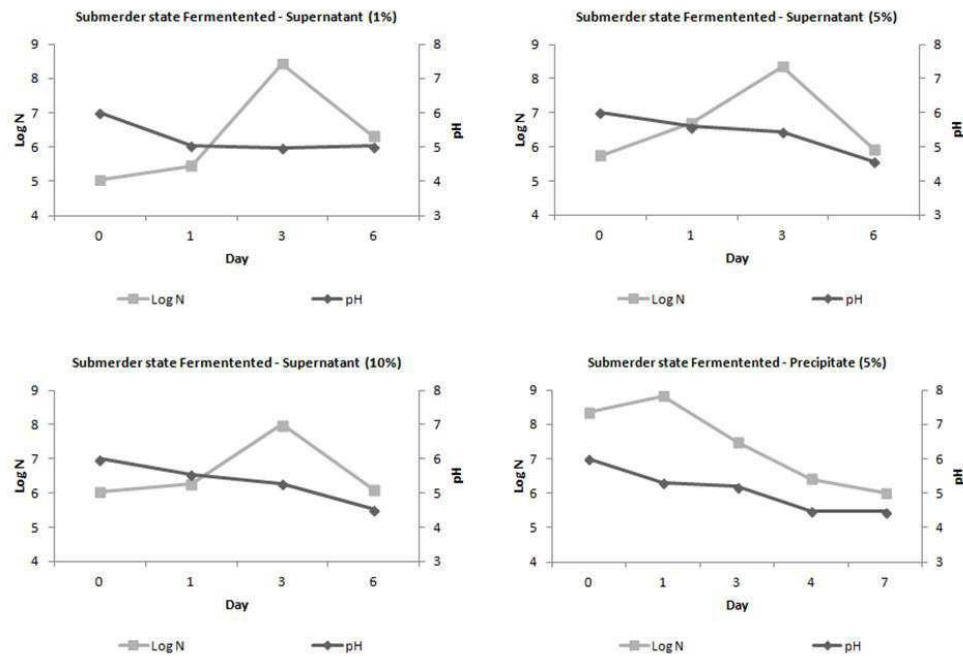
수상과 오일상을 각각 분산 용해하여 혼합 검화한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	스테아린산	6.5
2	미리스틴산	28.0
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	3.0
4	프로필렌 글리콜	5.0
5	농글리세린	10.0
6	수산화나트륨	7.0
7	에틸렌디아민 테트라초산나트륨	0.1
8	태반 추출물	0.5
9	발효밤송이 추출물	15.0
10	향료	미량
11	정제수	잔량

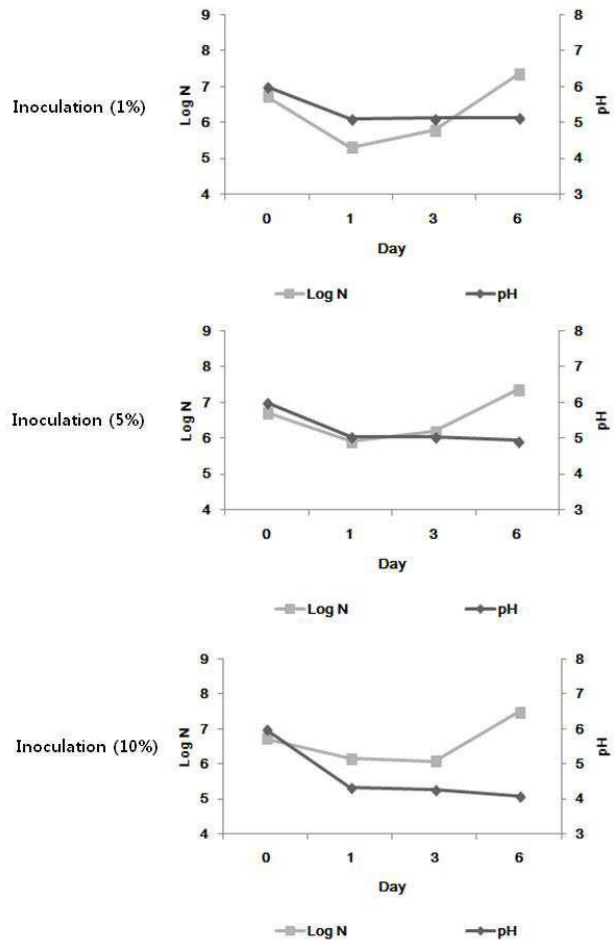
[0171]

도면

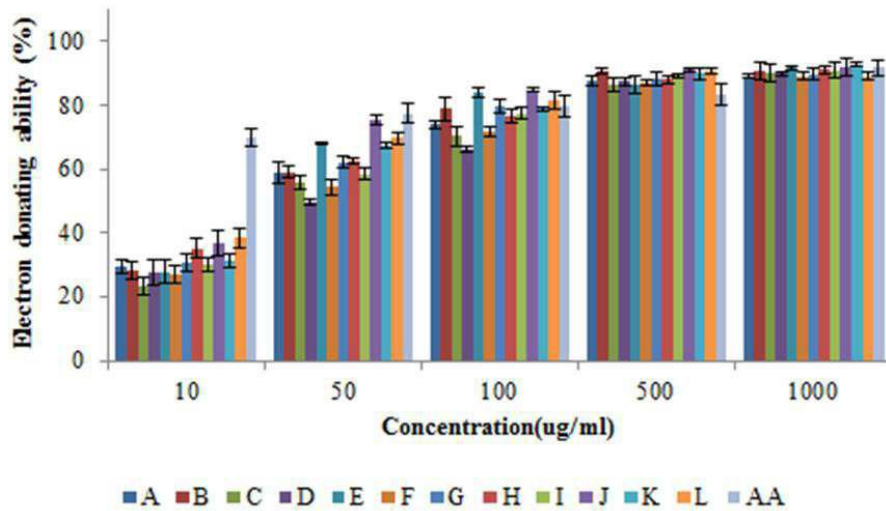
도면1



도면2



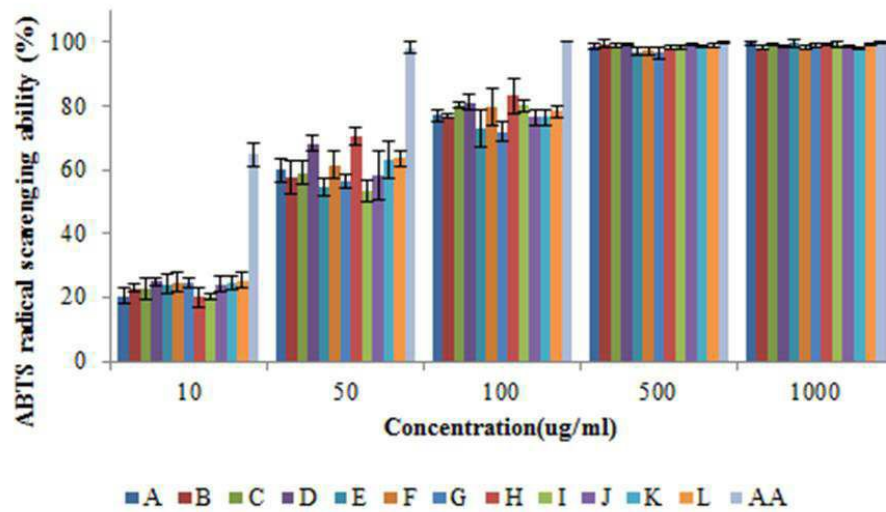
도면3



Electron donating ability of extracts of fermentation by *Lactobacillus casei* in chestnut bur.

A : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 B : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 C : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 D : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 E : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 F : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 G : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 H : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 I : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 J : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 K : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 L : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 AA : Ascorbic acid. Result are means $\pm$ S.D. of triplicate data.

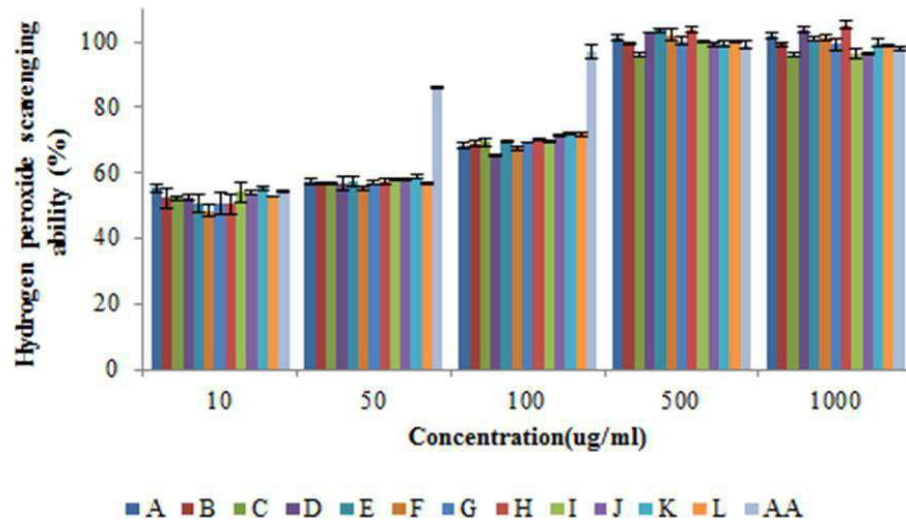
도면4



ABTS+ cation radical scavenging activity of extracts of fermentation by *Lactobacillus casei* in chestnut bur.

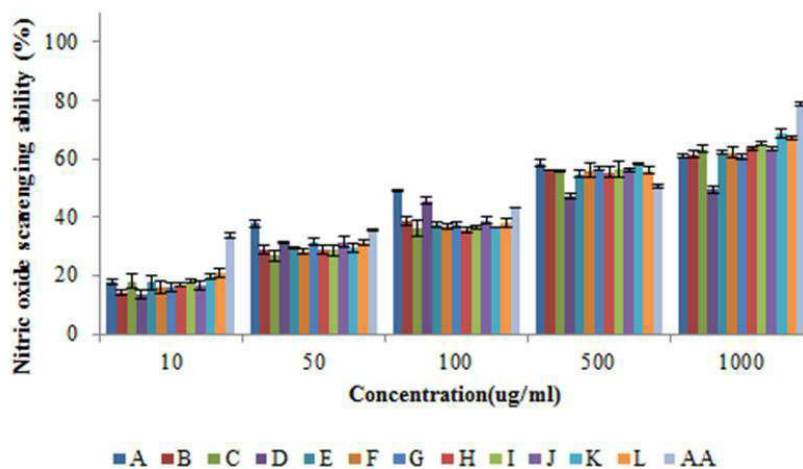
A : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 B : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 C : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 D : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 E : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 F : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 G : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 H : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 I : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 j : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 K : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 L : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 AA : Ascorbic acid. Result are means $\pm$ S.D. of triplicate data.

도면5



Hydrogen peroxide scavenging activity of extracts of fermentation by *Lactobacillus casei* in chestnut bur.

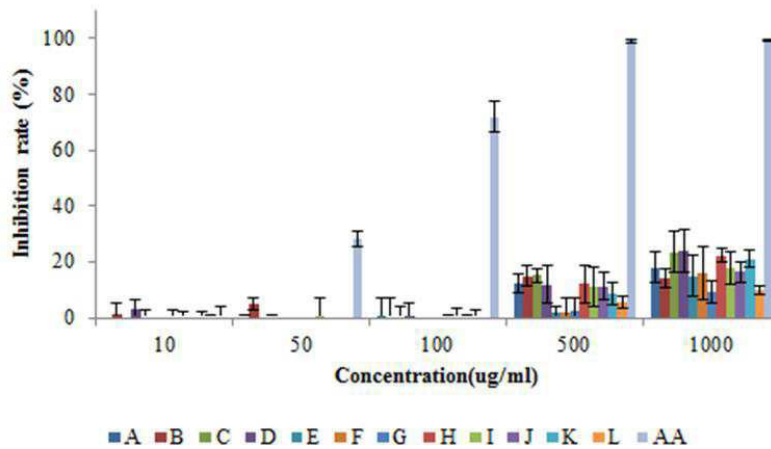
도면6



Nitric oxide scavenging ability of extracts of fermentation by *Lactobacillus casei* in chestnut bur.

A : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 B : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 C : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 D : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 E : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 F : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 G : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 H : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 I : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 J : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 K : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 L : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 AA : Ascorbic acid. Result are means $\pm$ S.D. of triplicate data.

도면7



Tyrosinase inhibition rate of extracts of fermentation by *Lactobacillus casei* in chestnut bur.

A : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 B : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 C : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 D : ethanol extracts of 1day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 E : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 F : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 G : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 H : ethanol extracts of 3day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 I : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(0%) in chestnut bur
 J : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(1%) in chestnut bur
 K : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(5%) in chestnut bur
 L : ethanol extracts of 6day fermentation by *Lactobacillus casei*(10%) in chestnut bur
 AA : Ascorbic acid. Result are means $\pm$ S.D. of triplicate data.