(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월09일
(11) 등록번호 10-1685121
(24) 등록일자 2016년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/49 (2006.01) *A61K 8/97* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0055674
(22) 출원일자 2014년05월09일
심사청구일자 2014년05월09일
(65) 공개번호 10-2015-0128372
(43) 공개일자 2015년11월18일
(56) 선행기술조사문헌
KR101304677 B1
한국식품영양과학회지(2013)
석사학위논문(2012)

(73) 특허권자
더마텍코리아(주)
경상북도 경산시 삼풍로 27, 경북테크노파크 글로벌벤처동 5층 2509호 (삼풍동)
(72) 발명자
양재황
경상북도 경산시 삼풍로 13-7 109동 1005호 (삼풍동 태왕드림하이츠)
장민정
경상북도 경산시 삼성현로91길 45 , 108동 1002호(사동, 사동2지구 화성파크드림)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

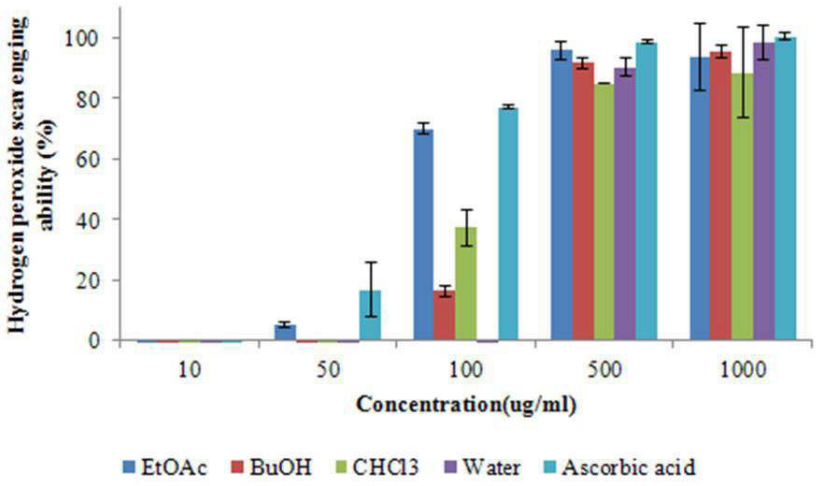
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 **발효 밤송이 추출 정제물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 또는 항염용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 발효 밤송이 추출 정제물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS 라디칼(radical) 소거능 측정, 과산화 수소(hydrogen peroxide) 소거능 측정 등의 항산화 활성 실험; Nitric Oxide (NO) radical 소거능 측정실험 등의 항염 활성 실험 등의 다양한 실험을 수행한 바, 상기 발효 시료들이 강력한 항산화, 또는 피부 염증성 질환 등을 나타냄을 확인함으로써 상기 조성물을 항산화, 또는 항염증용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

박동우

경상북도 경산시 압량면 대학로 73길 28 501호

백성환

대구광역시 서구 서대구로18길 22(평리동) 동성빌 301호

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 산업화 연구
기 여 율	1/1
주관기관	더마텍코리아(주)
연구기간	2012.06.01 ~ 2014.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

세척 및 건조 상태의 밤송이 원재료를 액체배양을 거쳐 활성화된 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*, KCTC2180) 균주를 시료 중량의 1-30%(v/v) 용량이 되도록 접종하여 15 내지 50℃ 온도 범위의 온도에서 1 일 내지 2주일 동안 정치배양을 수행하여 발효 밤송이를 수득하는 제 1단계; 상기 발효 밤송이 시료 중량의 1 내지 100배에 달하는 부피의 60% 내지 80% 에탄올을 가하여 20 내지 120℃에서 1 내지 14일 동안에서 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출방법을 사용하여 추출하는 제 2단계; 상기 추출 용액을 여과하여 이들을 상등액 및 침전물로 각각 분류하고 이들을 각각 감압여과 및 농축하여 발효 조추출물을 수득하는 제 3단계 공정; 상기 3단계에서 얻은 조추출물 중량의 0.0005 내지 50배 부피 (v/w%)의 물을 가한 후, 클로로포름 또는 에틸아세테이트 용매를 이용한 통상적인 분획과정을 수행하는 제 4단계 공정을 포함한 제조공정으로 수득되는 클로로포름 또는 에틸아세테이트 용매 가용 추출 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부염의 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 헨리이 (Castanea henryi), 카스타네아 세귀니이 (Castanea seguinii), 카스타네아 덴타타(Castanea dentata), 카스타네아 푸밀라 (Castanea pumila), 카스타네아 알니폴리아(Castanea alnifolia), 카스타네아 애쉐이 (Castanea ashei), 카스타네아 플로리다나(Castanea floridana), 카스타네아 파우피스피나 (Castanea paupispina), 또는 카스타네아 사티바 (Castanea sativa) 밤송이임을 특징으로 하는 피부외용 약학조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 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/l범위 조성을 넣은 혼합액배지를 pH 4.00 내지 7.00 범위로 보정하고 멸균처리하여 발효를 수행함을 특징으로 하는 피부외용 약학조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제

또는 카타플라스마제 제형인 것을 특징으로 하는 피부외용 약학조성물.

청구항 10

세척 및 건조 상태의 밤송이 원재료를 액체배양을 거쳐 활성화된 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*, KCTC2180) 균주를 시료 중량의 1-30%(v/v) 용량이 되도록 접종하여 15 내지 50℃ 온도 범위의 온도에서 1 일 내지 2주일 동안 정치배양을 수행하여 발효 밤송이를 수득하는 제 1단계; 상기 발효 밤송이 시료 중량의 1 내지 100배에 달하는 부피의 60% 내지 80% 에탄올을 가하여 20 내지 120℃에서 1 내지 14일 동안에서 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출방법을 사용하여 추출하는 제 2단계; 상기 추출 용액을 여과하여 이들을 상등액 및 침전물로 각각 분류하고 이들을 각각 감압여과 및 농축하여 발효 조추출물을 수득하는 제 3단계 공정; 상기 3단계에서 얻은 조추출물 중량의 0.0005 내지 50배 부피 (v/w%)의 물을 가한 후, 클로로포름 또는 에틸아세테이트 용매를 이용한 통상적인 분획과정을 수행하는 제 4단계 공정을 포함한 제조공정으로 수득되는 클로로포름 또는 에틸아세테이트 용매 가용 추출 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 또는 피부 염증성 질환의 개선 및 예방용 화장료 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 발효 밤송이 추출 정제물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 또는 항염용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 tyrosinse 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, Reifenberger 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 activatged 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

[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 tyrosinse 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 화장료로써 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, 흑두한란, 단풍잎, 대나무, 닥나무, 주목(朱木), 귤나무, 오가피, 야자수, 생강, 영지버섯, 녹차, 우엉, 뽕나무 등 다양한 식물자원으로부터 효능 성분을 추출하여 화장품 개발에 적극적으로 활용하고 있으며, 소재개발로 이루어

지고 있으며, 현재 세계 화장품 시장 규모 05년 약 2,500억불에서 매년 10% 성장세를 보이고 있으며, 단순미용에서 질병치료 개념으로 진화, 고기능 다기능성으로 확대, 한방화장품 시대로 변화고 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, TβRII, 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), PGE_2 (prostaglandin E_2), 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 Investig 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 PGE_2는 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 (martrix 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, Reifenberger 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, MMPs을 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 activatged 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. PGE_2는 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 (Macrphage)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-1β (IL-1β), 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 발생되는 밤송이는 부산물로서 산업 이용도가 개발되지 않아 대부분 폐기처분하고 실정으로서 이러한 환경이 해로운 폐기물을 환경보호 및 부산물 재활용차원에서 밤송이에 대한 다양한 약리활성을 연구하여 이를 재활용한다면 산업적으로나 환경적으로 큰 기여를 할 것으로 판단된다.

[0027] 본 발명자들은 이러한 연구의 일환으로 발효 밤송이 추출물의 피부노화방지, 항염 활성 등을 확인하여 피부 미백 및 항산화, 또는 피부 염증성 질환의 치료 및 예방용 조성물로 특허출원을 하였으며 (한국특허출원 제 10-2013- 129135호), 상기 발효 밤송이 추출물에 대한 후속연구로서 보다 강력한 효능을 갖는 분획정제물을 대상으로 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 등의 다양한 실험을 수행한 바, 상기 발효 시료들이 강력한 항산화, 또는 피부 염증성 질환 등을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

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

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

[0030] 본원에서 정의되는 “추출 정제물”은 발효 밤송이 조추출물을 추가로 추출분획을 수행하여 추출 정제물, 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 가용한 조추출물을 추가로 추출분획하여 얻은 비극성용매 가용 추출 정제물 및 극성용매 가용 추출 정제물을 포함한다.

[0031] 본원에서 정의되는 조추출물은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 10~100%(v/v) 에탄올, 보다 더 바람직하게는 10~50%(v/v) 에탄올에 가용한 추출물임을 특징으로 한다.

[0032] 본원에서 정의되는 비극성용매 가용 추출 분획물은 본원의 조추출물로부터 헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 또는 에틸아세테이트, 바람직하게는 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제한 비극성 용매에 가용한 추출 분획물들을 포함한다.

[0033] 본원에서 정의되는 극성용매 가용 추출물은 상기 조추출물로부터 비극성용매 가용분획물들을 제거하고 남은 물, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택되어진 용매, 바람직하게는 물 또는 부탄올, 보다 바람직하게는 부탄올에 가용한 추출 분획물을 포함한다.

[0034] 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.

[0035] 상기 발효 밤송이 추출 정제물은 피부외용 약학조성물은 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%으로 포함함을 특징으로 한다.

[0036] 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형을 포함한다.

[0037] 또한, 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 포함한다.

[0038] 본원에서 정의되는 상기 밤송이는 카스타네아 크레나타(Castanea crenata), 카스타네아 몰리시마(Castanea mollissima), 카스타네아 다비디(Castanea davidii, China), 카스타네아 헨리이(Castanea henryi), 카스타네아 세귀니이(Castanea seguinii) 등의 아시아산; 카스타네아 덴타타(Castanea dentata), 카스타네아 푸밀라(Castanea pumila), 카스타네아 알니폴리아(Castanea alnifolia), 카스타네아 애쉐이(Castanea ashei), 카스타네아 플로리다나(Castanea floridana), 카스타네아 파우피스피나((Castanea paupispina) 등의 미국산; 카스타네아 사티바(Castanea sativa) 등의 유럽산 밤의 밤송이부위를 포함함을 특징으로 한다.

[0039]

[0040] 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. amylophillus), 락토바실러스 아시도필러스(L. acidophilus), 락토바실러스 바바리우스(L. bavarius), 락토바실러스 람노서스(L. rhamnosus), 락토바실러스 페르멘텀(L. fermentum), 락토바실러스 헬베티쿠스(L. helveticus), 락토바실러스 존소닐(L. johnsonil), 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 밤송이를 수득함을 특징으로 한다.

[0041] 또한, 구체적으로, 본원에서 정의되는 상기 액체 배양은 혼합액체배지, 바람직하게는, 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, 바람직하게는, Sucrose 20.0 내지 25.0 g/l, Glucose 3.0 내지 7.0 g/l, Soypeptone 8.0 내지 15.0 g/l, Yeast extract 1.0 내지 8.0 g/l, CH_3COONa 1.0 내지 3.0 g/l, K_2HPO_4 0.1 내지 0.3 g/l, 및 $MgCl_2$ 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 보정하고 멸균처리하여 발효를 수행함을 특징으로 한다.

[0042] 구체적으로, 본 발명의 발효 추출 정제물을 제조하는 방법을 설명한다.

[0043] 예를 들어 본 발명의 발효 추출물은 세척 및 건조 상태의 밤송이 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 비페르멘탄스(L. bifermentans), 락토바실러스 브레비스(L. brevis), 락토바실러스 아질리스(L. agilis), 락토바실러스 케피르(L. kefir), 락토바실러스 아밀로필러스(L. amylophillus), 락토바실러스 아시도필러스(L. acidophilus), 락토바실러스 바바리우스(L. bavarius), 락토바실러스 람노서스(L. rhamnosus), 락토바실러스 페르멘텀(L. fermentum), 락토바실러스 헬베티쿠스(L. helveticus), 락토바실러스 존소닐(L. johnsonil), 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 정치배양를 수행하여 발효 밤송이를 수득하는 제 1단계; 상기 발효 밤송이 시료 중량의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 2 내지 20배에 달하는 부피의 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% 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 농축하여 발효 조추출물을 수득하는 제 3단계 공정; 상기3단계에서 얻은 조추출물, 바람직하게는 10 내지 90% 에탄올 조추출물 중량의 약 0.0005 내지 50배, 바람직하게는 0.05 내지 5배 부피 (v/w%)의 물을 가한 후, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 또는 에틸아세테이트, 바람직하게는 에틸아세테이트 용매를 이용한 통상적인 분획과정을 수행하는 제 4단계 공정을 포함한 제조공정으로 헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 또는 에틸아세테이트, 바람직하게는 에틸아세테이트 용매 등의 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물; 및 상기 비극성 용매 가용 추출 분획물을 제거하여 부탄올, 물 등의 극성용매에 가용한 극성용매 가용 추출 분획물을 각각 수득할 수 있다.

[0044] 본 발명은 상기 제조방법 및 상기 제조방법으로 수득된 발효 밤송이 추출 정제물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 항염증, 미백, 주름억제 효과를 갖는 피부외용 약학조성물 및 화장료 조성물을 제공한다.

[0045] 본 발명자들은 본 발명의 발효 밤송이 추출 정제물에 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 등의 다양한 실험을 수행한 바, 상기 발효 시료들이 강력한 항산화, 또는 피부 염증성 질환 등을 나타냄을 확인함으로써 상기 조성물을 항산화, 또는 항염증용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물로 유용함을 확인하였다.

[0046] 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 사용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0047] 본 발명의 발효 밤송이 추출 정제물을 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.

[0048] 본 발명의 발효 밤송이 추출 정제물의 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 추출 정제물은 1일 0.0001 내지 100 ㎎/㎏으로, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏으로 투여

하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 발효 밤송이 추출 정제물은 화장품 및 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.

[0050] 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.

[0051] 본 발명의 화장료는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스핑고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함한다.

[0052] 수용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 염산피리독신, 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 수득할 수 있다.

[0053] 유용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E (dl-알파 토코페롤, d-알파 토코페롤, d-알파 토코페롤) 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체 (팔미틴산아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산 dl-알파 토코페롤, 니코틴산 dl-알파 토코페롤비타민 E, dl-판토테닐알코올, D-판토테닐알코올, 판토테닐에틸에테르 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.

[0054] 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.

[0055] 고분자 다당으로서는 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.

[0056] 스핑고 지질로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 세라미드, 피토스핑고신, 스핑고당지질 등을 들 수 있다. 스핑고 지질은 통상 포유류, 어류, 패류, 효모 또는 식물 등으로부터 통상의 방법에 의해 정제하거나 화학 합성법에 의해 취득할 수 있다.

[0057] 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.

[0058] 본 발명의 화장료에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다.

[0059] 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.

[0060] 유지 성분으로서는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.

[0061] 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-에틸헥산산트리메틸롤프로판, 트리이소스테아르산트리메틸롤프로판, 테트라

2-에틸헥산산펜타엘리슬리톨, 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, 트리이소팔미틴산글리세릴, 트리이소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오데칸산헥실데실, 네오데칸산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트리이소세틸, 시트르산트리이소알킬, 시트르산트리이소옥틸, 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.

[0062] 탄화 수소계 유지로서는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동 이소파라핀, 폴리부덴, 마이크로크리스탈린왁스, 와셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.

[0063] 실리콘계 유지로서는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산・메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산・메틸스테알록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리콘유, 아미노 변성 실리콘유 등을 들 수 있다.

[0064] 불소계 유지로서는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.

[0065] 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, 메도홈유, 난황유, 우지(牛脂), 마유, 밍크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔데리러왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀린, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.

[0066] 보습제로서는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.

[0067] 수용성 저분자 보습제로서는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피롤리돈-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.

[0068] 지용성 저분자 보습제로서는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.

[0069] 수용성 고분자로서는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산탄검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성 키틴, 키토산, 덱스트린 등을 들 수 있다.

[0070] 지용성 고분자로서는 폴리비닐피롤리돈・에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈・헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 덱스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.

[0071] 에몰리엔트제로서는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.

[0072] 계면 활성제로서는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.

[0073] 비이온성 계면 활성제로서는 자기 유화형 모노스테아르산글리세린, 프로필렌글리콜지방산에스테르, 글리세린지방산에스테르, 폴리글리세린지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, POE(폴리옥시에틸렌)솔비탄지방산에스테르, POE 솔비트지방산에스테르, POE 글리세린지방산에스테르, POE 알킬에테르, POE 지방산에스테르, POE 경화피마자유, POE 피마자유, POE・POP (폴리옥시에틸렌・폴리옥시프로필렌) 공중합체, POE・POP 알킬에테르, 폴리에테르변성실리콘, 라우린산알카놀아미드, 알킬아민옥시드, 수소첨가대두인지

질 등을 들 수 있다.

[0074] 음이온성 계면 활성제로서는 지방산비누, 알파-아실술폰산염, 알킬술폰산염, 알킬알릴술폰산염, 알킬나프탈렌술폰산염, 알킬황산염, POE 알킬에테르황산염, 알킬아미드황산염, 알킬인산염, POE 알킬인삼염, 알킬아미드인산염, 알킬로일알킬타우린염, N-아실아미노산염, POE 알킬에테르카르복실산염, 알킬술포숙신산염, 알킬술포아세트산나트륨, 아실화 가수분해 콜라겐펩티드염, 퍼플루오로알킬인산에스테르 등을 들 수 있다.

[0075] 양이온성 계면 활성제로서는 염화알킬트리메틸암모늄, 염화스테아릴트리메틸암모늄, 브롬화스테아릴트리메틸암모늄, 염화세토스테아릴트리메틸암모늄, 염화디스테아릴디메틸암모늄, 염화스테아릴디메틸벤질암모늄, 브롬화베헤닐트리메틸암모늄, 염화벤잘코늄, 스테아르산디에틸아미노에틸아미드, 스테아르산디메틸아미노프로필아미드, 라놀린 유도체 제 4급 암모늄염 등을 들 수 있다.

[0076] 양성 계면 활성제로서는 카르복시베타인형, 아미드베타인형, 술포베타인형, 히드록시술포베타인형, 아미드술포베타인형, 포스포베타인형, 아미노카르복실산염형, 이미다졸린 유도체형, 아미드아민형 등의 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.

[0077] 유기 및 무기 안료로서는 규산, 무수규산, 규산마그네슘, 탤크, 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.

[0078] 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 아미드술폰산 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.

[0079] 자외선 흡수제로서는 파라아미노벤조산, 파라아미노벤조산에틸, 파라아미노벤조산아밀, 파라아미노벤조산옥틸, 살리실산에틸렌글리콜, 살리신산페닐, 살리신산옥틸, 살리신산벤질, 살리신산부틸페닐, 살리신산호모멘틸, 계피산벤질, 파라메톡시계피산-2-에톡시에틸, 파라메톡시계피산옥틸, 디파라메톡시계피산모노-2-에틸헥산글리세릴, 파라메톡시계피산이소프로필, 디이소프로필·디이소프로필계피산에스테르 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.

[0080] 살균제로서는 히노키티올, 트리클로산, 트리클로로히드록시디페닐에테르, 크로르헥시딘글루콘산염, 페녹시에탄올, 레조르신, 이소프로필메틸페놀, 아줄렌, 살리칠산, 진크필리티온, 염화벤잘코늄, 감광소 301 호, 모노니트로과이어콜나트륨, 운데시렌산 등을 들 수 있다.

[0081] 산화 방지제로서는 부틸히드록시아니솔, 갈릭산프로필, 엘리소르빈산 등을 들 수 있다.

[0082] pH 조정제로서는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.

[0083] 알코올로서는 세틸알코올 등의 고급 알코올을 들 수 있다.

[0084] 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.

[0085] 본 발명의 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.

[0086] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 발효 밤송이 추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.

[0087] 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.

[0088] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형을 포함한다.

[0089] 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.

[0090] 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.

[0091] 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.

[0092] 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.

[0093] 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

[0094] 본 발명의 발효 밤송이 추출 정제물은 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 등의 다양한 실험을 수행한 바, 상기 발효 시료들이 강력한 항산화, 또는 피부 염증성 질환 등을 나타냄을 확인함으로써 상기 조성물을 항산화, 또는 항염증용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0095] 도 1은 발효 밤송이 추출 정제물의 전자 공여능 억제활성을 나타낸 도이고 (여기에서 EtOAC : 에틸아세테이트 분획물이며, BtOH은 부탄올 분획물이며, CHCl3 은 클로로포름 분획물이며, Water는 물 분획물이며, BHA는 Butylated Hydroxyanisole를 의미하며, 결과는 삼중치의 평균(means) ± S.D.을 표시함);,

도 2은 발효 밤송이 추출 정제물의 $ABTS^{+}$ 양이온 라디칼 소거능 활성을 나타낸 도이며(여기에서 EtOAC : 에틸아세테이트 분획물이며, BtOH은 부탄올 분획물이며, CHCl3 은 클로로포름 분획물이며, Water는 물 분획물이며, BHA는 Butylated Hydroxyanisole를 의미하며, 결과는 삼중치의 평균(means) ± S.D.을 표시함);

도 3은 발효 밤송이 추출 정제물의 과산화 수소(Hydrogen peroxide) 소거능 활성을 나타낸 도이며(여기에서 EtOAC : 에틸아세테이트 분획물이며, BtOH은 부탄올 분획물이며, CHCl3 은 클로로포름 분획물이며, Water는 물

분획물이며, BHA는 Butylated Hydroxyanisole를 의미하며, 결과는 삼중치의 평균(means) ± S.D.을 표시함);

도 4는 발효 밤송이 추출 정제물의 수퍼옥시드 음이온 라디칼 (**Superoxide anion radical**) 소거능 활성을 나타낸 도이며(여기에서 EtOAC : 에틸아세테이트 분획물이며, BtOH은 부탄올 분획물이며, CHCl3 은 클로로포름 분획물이며, Water는 물 분획물이며, BHA는 Butylated Hydroxyanisole를 의미하며, 결과는 삼중치의 평균(means) ± S.D.을 표시함);

도 5는 발효 밤송이 추출 정제물의 Nitiric oxide 소거능 활성을 나타낸 도이다 (여기에서 EtOAC : 에틸아세테이트 분획물이며, BtOH은 부탄올 분획물이며, CHCl3 은 클로로포름 분획물이며, Water는 물 분획물이며, BHA는 Butylated Hydroxyanisole를 의미하며, 결과는 삼중치의 평균(means) ± S.D.을 표시함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0096] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0097] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0098] **실시예 1. 발효 밤송이 추출 정제물의 제조**

[0099] **1.1. 식물자원**

[0100] 본 실험에 사용된 밤송이는 경남 합천군 대병면 양리 일대 밤나무 자생 야산에서 채취하여 실험 재료로 사용하였다. 채취된 밤송이는 세척 후 분쇄하여 분말화 한 후, 실온에 보관하여 본 실험의 시료로 사용하였다.

[0101] **1.2. 발효조건 설정**

[0102] 발효 조건을 설정하기 위해 액체발효물의 상등액과 침전물을 추출하는 두가지 방법으로 실험을 진행하였다.

[0103] **1.3. 스타터(Starter)의 배양과 접종**

[0104] 밤송이의 유산발효에 starter로 사용된 *Lactobacillus casei*은 혼합액체배지(Sucrose 22.0 g/l, Glucose 5.0 g/l, Soypeptone 11.0 g/l, Yeast extract 5.0 g/l, CH_3COONa 2.0 g/l, K_2HPO_4 0.2 g/l, $MgCl_2$ 0.02 g/l)에서 계대배양하여 실험에 사용 하였다.

[0105] **1.4. 최적추출조건 확립**

[0106] 액체발효물의 상등액과 침전물 추출액의 항산화 실험결과 실험변수 고정과 대량생산의 간편성을 고려하여 침전물 추출물을 이용하기로 하고 다음 실험을 진행하였다.

[0107] 분말 밤송이 50g에 10배 중량(W/V)의 혼합액체배지(Sucrose 22.0 g/l, Glucose 5.0 g/l, Soypeptone 11.0 g/l, Yeast extract 5.0 g/l, CH_3COONa 2.0 g/l, K_2HPO_4 0.2 g/l, $MgCl_2$ 0.02 g/l)를 넣고 pH 6.00으로 보정후 멸균하였다. 그 후 균주(유산균: *Lactobacillus casei,* KCTC2180)를 0, 1, 5, 10%(v/v)로 접종하여 1, 3, 6일간 35℃에서 발효하였다.

[0108] **1.5. 발효 추출물**

[0109] 상기 단계에서 각각의 발효가 완료되면 발효한 밤송이 1.0kg에 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 추출물 201.6g을 얻고(이하, CB라 함, 추출율: 20.16%), 이하, 4℃냉장실에 보관하여 본 실험의 시료로 사용하여 화장품약리활성 평가를 통해 최적 추출조건을 결정하였다.

[0110] 1.6. 추출 정제물의 제조

[0111] 상기 1-5 단계에서 얻은 밤송이 발효 CB 추출물 100g에 정제수 1L을 가하여 현탁시키고 1L의 클로로포름을 가하여 3회 추출 분획을 수행하여 클로로포름 가용 분획 정제물 6.39g (이하, CHCl3라 함, 추출율: 6.396%)을 얻고, 남은 잔사에 1L의 에틸아세테이트를 가하여 3회 추출분획을 수행하여 에틸아세테이트 가용 분획 정제물 2.52g (이하, EtOAC라 함, 추출율: 2.523%)을 얻고, 다시 남은 잔사에 1L의 n-부탄올을 가하여 3회 추출분획을 수행하여 n-부탄올 가용 분획 정제물 9.91g (이하, BtOH라 함, 추출율: 9.912%)을 얻고, 남은 잔사로서 물에 가용한 물가용 분획 정제물 81.62g (이하, Water라 함, 추출율: 81.629%)을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0112] **실험예 1. 항산화 효과 확인**

[0113] 1-1. 전자 공여능 (electron donating ability) 측정

[0114] 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.)

[0115] 시료용액 2ml에 0.2mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(Sigma D9132, DPPH) 1ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여 능은 시료용액의 첨가구와 무 첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0116] 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.

[0117] 상기 실험 결과, 발효밤송이 추출 에틸아세테이트 분획물에서 10, 50ug/ml의 농도에서 각각 80%, 90% 이상으로 가장 높은 전자공여능 활성을 나타내었다(도 1).

[0118] 1-2. ABTS 라디칼 양이온 소거능 저해활성 측정

[0119] 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.)

[0120] 7mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid(Sigma A1888, ABTS)와 2.4mM potassium persulfate(Sigma P5592)를 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+을 형성시킨 후 ethanol로 희석 하여 ABTS+100ul 에 시료 100㎕를 가하여 1분 동안 방치한 후 732nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0121] 본 실험 결과, 발효밤송이 추출 에틸아세테이트 분획물에서 10, 50ug/ml의 농도에서 각각 87%, 98% 이상의 ABTS 라디칼 소거능의 활성을 나타내었다(도 2).

[0122] 1-3. Hydrogen peroxides 소거능측정

[0123] 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.)

[0124] 농도별 시료용액 1,000ul와 phosphate-buffer saline(PBS at pH 7.4)에 녹인 40mM hydrogen peroxide

solution(Sigma 216763) 2,000ul를 37℃에서 10분 간 반응시킨 후 반응액 중에 저해된 hydrogen peroxide의 양을 230 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화물질인 Ascorbic acid(Sigma A0278)와 활성을 비교해보았다.

[0125] 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.

[0126] 본 실험결과, 도 3은 발효밤송이 추출 분획물의 hydrogen peroxide의 소거활성 결과로서 농도 의존적인 저해 활성을 나타내었으며, 에틸하세테이트 분획물이 100ug/ml의 농도에서 69.8%의 높은 hydrogen peroxides 소거능을 확인 할 수 있었다.(도 3)

[0127] 1-4. Superoxide anion radical 소거능 활성

[0128] 상기 실시예 시료의 Superoxide anion radical 소거능 활성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 Superoxide anion radical 방법을 변형하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Fridovich, I Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthin oxidase. J. Biol. Chem. 1970;245: 4053-4057.)

[0129] 각 시료용액 0.1ml와 0.1M potassium phosphate buffer (Sigma 32048, pH 7.5) 0.6mL에 xanthine (Sigma X0626) 0.4mM)과 NBT (Sigma N5514) 0.24mM)을 녹인 기질액 1ml를 첨가하고 xanthine oxidase (Sigma X4875, 0.049U/ml) 1ml를 가하여 37℃에서 20분간 반응시킨 후 1N HCl 1ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 superoxide anion radical의 양을 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0130] 항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutase(SOD)는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical(O2-)과 반응하여 hydrogen peroxide (H2O2)를 생성하는 효소로, 산소를 소비하는 모든 생물 종에 존재하여 생체 내에서 활성산소 장애에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다. 또한 산소분자가 환원되어 생기는 superoxide anion radical (O2-2O2+2e-→2O2-)을 제거하는 첫 번째 방어 메카니즘에 관여하는 중요한 효소(2O2-+2H+→H2O2+O2-)이며, 가장 독성이 강한 hydroxy radical의 생성을 예방하는 작용을 하여 현재 항염증소재나 피부 노화방지를 위한 미용소재로 화장품 등의 첨가제로서 사용되어지고 있다. (Antioxidant and analgesic activities of turpentine of Pinus nigra Arn. subsp. pallsiana (Lamb.) Holmboe Original Research Article., Journal of Ethnopharmacology, Volume 86, Issue 1, May 2003, Pages 51-58,. G, M.Emin B, MOktay, K)

[0131] 이러한 피부 노화방지와 밀접한 관련이 있는 superoxide anion radical 소거능을 측정한 결과 도 4)과 같이 나타내었다. 발효밤송이 추출 에틸아세테이트 분획물은 500ug/ml의 농도에서 95.3%로 물 분획물(70.8%), 부탄올 분획물(87.0%)보다 높은 superoxide anion radical 소거능을 나타내었고, 대조군인 BHA (85.8%)보다도 높은 저해능을 나타냄을 확인하였다.

[0132] **실험예 2. 항염 효과 검증실험**

[0133] 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.)

[0134] 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.

[0135] 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 nitiric oxide synthase)는 macrophage, 혈관내피세포, 혈관 평활근세포, 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 .(Marcocci, P.L., Sckaki, A., Albert, G.M. 1994 Antioxidant action of Ginkgo biloba extracts EGP761. Methods in Enzymology 234, 462-475)

[0136] 염증과 관련된 nitric oxide radical 소거능을 측정한 결과를 도 5과 같이 나타내었다. 발효 밤송이 클로르포름 분획물의 경우 500, 1,000ug/ml의 농도에서 각각 74.8%, 80.9%의 우수한 nitric oxide radical 소거능을 나타내었다.

[0137] **통계처리**

[0138] 실험 결과는 3회 반복 측정 후 평균 ± SD로 나타내었다. 통계분석은 SAS program (SAS Institue, Cary, NC, USA)을 이용하여 분석한 후 Duncan의 다중검정을 실시하였으며, 상관관계를 분석하였다.

[0139] 이하, 본 발명의 제형예로서 크림, 맛사지크림, 로션, 스킨로션, 에센스, 팩, 클렌징폼의 제형을 예시하고 있으나, 본 발명의 화장품 조성물을 포함하는 제형은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0140] **제형예 1. 크림조성물**

[0141] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

[0142]

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	EtOAC 추출물	10.0
18	향료	미량
19	황색4호	미량
20	정제수	잔량

[0143] **제형예 2. 맛사지크림 조성물**

[0144] 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	BtOH 추출물	5.0
15	히아루로닉애씨드추출물	1.0
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0145]

[0146] **제형예 3. 로션 조성물**

[0147] 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	EtOAC 추출물	15.0
14	트리에탄올아민	0.5
15	카르복시비닐폴리머	0.2
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0148]

[0149] **제형예 4. 스킨로션 조성물**

[0150] 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	EtOAC 추출물	25.0
7	향료	미량
8	위치하젤추출물	1.0
9	정제수	잔량

[0151]

[0152] **제형예 5. 에센스 조성물**

[0153] 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	CHC13 추출물	30.0
11	향료	미량
12	정제수	잔량

[0154]

[0155] **제형예 6. 팩 조성물**

[0156] 수상과 에탄올상을 각각 분산 용해하여 혼합시킨 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	폴리비닐알코올	15.0
2	카르복시메틸셀룰로이스나트륨	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	BtOH 추출물	45.0
13	향료	미량
14	정제수	잔량

[0157]

[0158] **제형예 7. 클렌징폼 조성물**

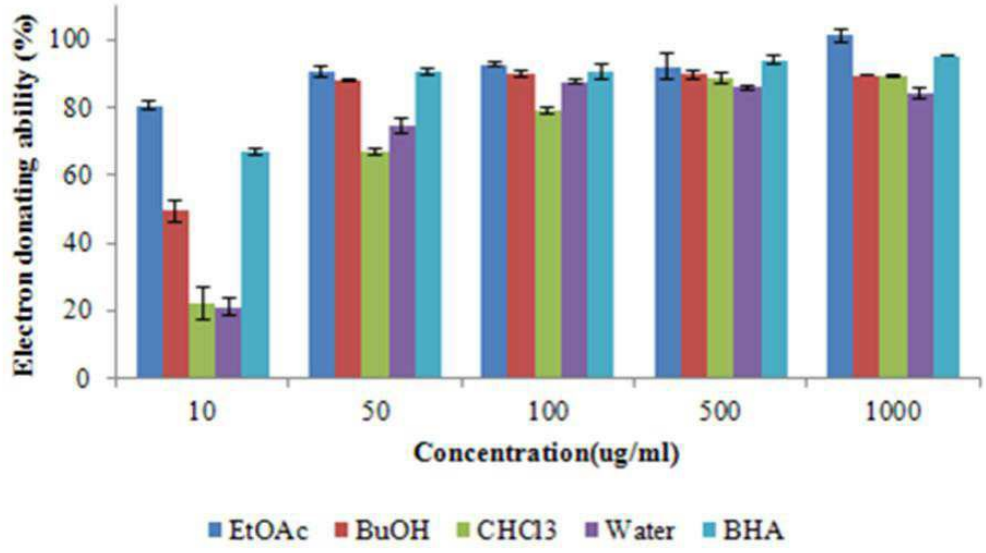
[0159] 수상과 오일상을 각각 분산 용해하여 혼합 검화한 후 실온으로 냉각한다.

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	에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.1
8	태반 추출물	0.5
9	Water 추출물	15.0
10	향료	미량
11	정제수	잔량

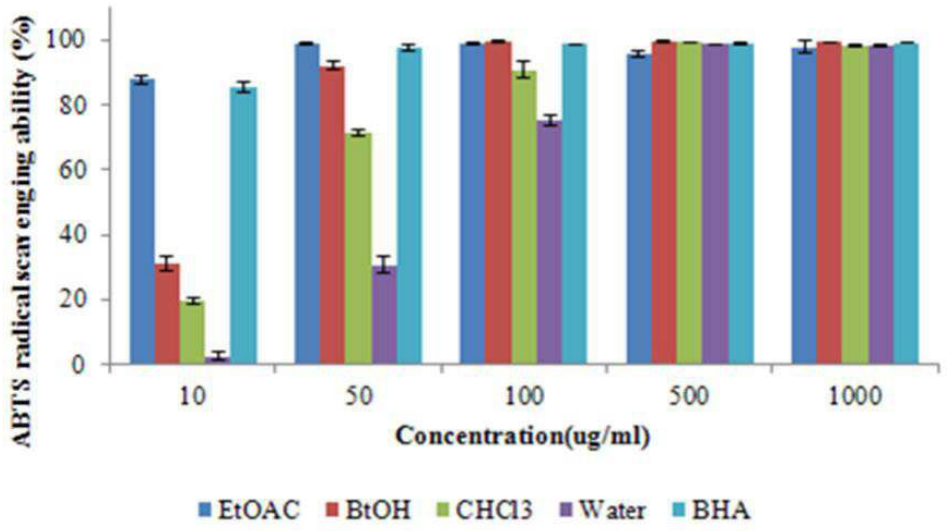
[0160]

도면

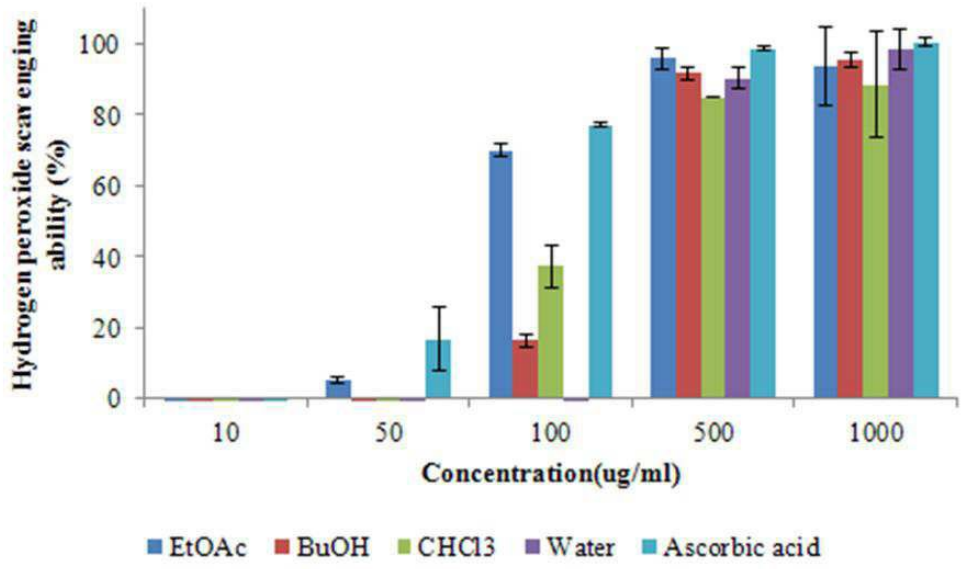
도면1



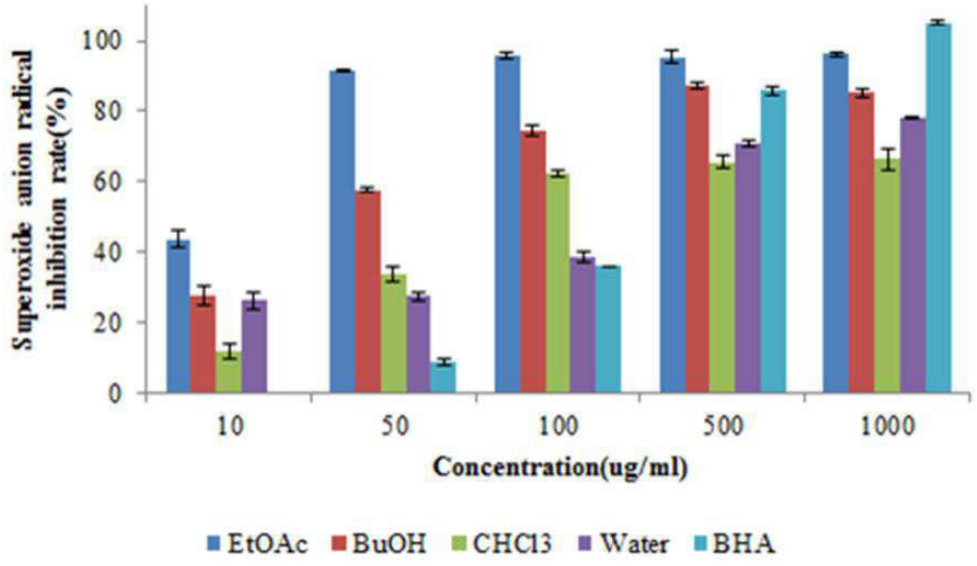
도면2


ABTS radical scavenging ability (%)
100
80
60
40
20
0
10
50
100
500
1000
Concentration(ug/ml)
EtOAC
BtOH
CHCl3
Water
BHA

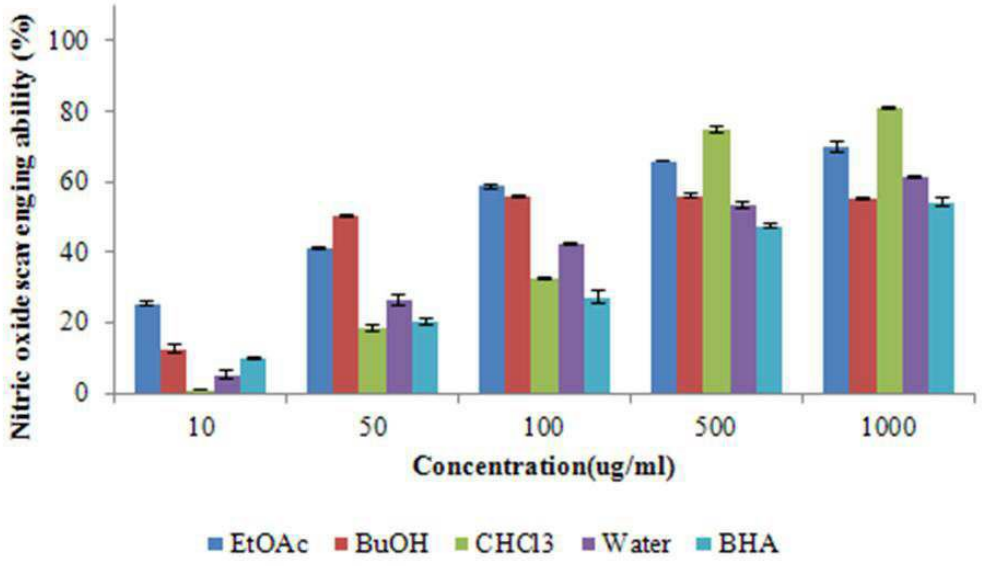
도면3


Hydrogen peroxide scavenging ability (%)
100
80
60
40
20
0
10
50
100
500
1000
Concentration(ug/ml)
EtOAc
BuOH
CHCl3
Water
Ascorbic acid

도면4


Superoxide anion radical inhibition rate(%)
100
80
60
40
20
0
10
50
100
500
1000
Concentration(ug/ml)
EtOAc
BuOH
CHCl3
Water
BHA

도면5


Nitric oxide scavenging ability (%)
100
80
60
40
20
0
10
50
100
500
1000
Concentration(ug/ml)
EtOAc
BuOH
CHCl3
Water
BHA