

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 10월 5일 (05.10.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/171423 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
A61K 8/368 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/003472
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 30일 (30.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0038168 2016년 3월 30일 (30.03.2016) KR
- (71) 출원인: (주)셀트리온 (CELLTRION INC.) [KR/KR];
22014 인천시 연수구 아카데미로 51번길 23, Incheon (KR). (주)바이오에프디엔씨 (BIO-FD&C CO., LTD) [KR/KR]; 21990 인천시 연수구 송도미래로 30, Incheon (KR).
- (72) 발명자: 김연숙 (KIM, Yeon Sook); 14508 경기도 부천시 도약로 36, 2313-1704, Gyeonggi-do (KR). 김정연 (KIM, Jung Yeon); 21653 인천시 남동구 논현역로 6, 1302, Incheon (KR). 김재훈 (KIM, Jae Hun); 10407 경기도 고양시 일산동구 산두로 65-9, 202, Gyeonggi-do (KR). 김형미 (KIM, Hyeong Mi); 17001 경기도 용인시 기흥구 평촌 1로 8번길 6-1, 301, Gyeonggi-do (KR). 배정수 (BAE, Jung Soo); 08846 서울시 관악구 양산길 27, Seoul (KR). 김정윤 (KIM, Jung Yun); 21982 인천시 연수구 송도과학로 27번길 55, 101-2406, Incheon (KR). 김주연 (KIM, Ju Yeon); 22008 인천시 연수구 아트센터대로 203, B-1414, Incheon (KR). 임주혁 (LIM, Joo Hyuck); 21986 인천시 연수구 송도문화로 28번길, 106-1605, Incheon (KR). 이승기 (LEE, Seung Ki); 21986 인천시 연수구 송도문화로 28번길, 105-4003, Incheon (KR). 문성호 (MOON, Sung Ho); 16990 경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 527번길 80, 115-204, Gyeonggi-do (KR). 장신재 (CHANG, Shin Jae); 22003 인천시 연수구 센트럴로 232, 103-4202, Incheon (KR). 모상현

(MOH, Sang Hyun); 13596 경기도 성남시 분당구 성남대로 449, A-806, Gyeonggi-do (KR). 이정훈 (LEE, Jeong Hun); 12252 경기도 남양주시 도농로 71, 703-501, Gyeonggi-do (KR). 서효현 (SEO, Hyo Hyun); 21982 인천시 연수구 송도과학로 27번길 55, 103-3103, Incheon (KR). 모지홍 (MOH, Ji Hong); 21911 인천시 연수구 학나래로 5번길 62, Incheon (KR). 김수윤 (KIM, Soo Yun); 21592 인천시 남동구 장승로 63-4, Incheon (KR). 박정곤 (PARK, Jeong Gon); 17814 경기도 평택시 포승읍 새원길 63, Gyeonggi-do (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))



WO 2017/171423 A2

(54) Title: NELUMBO NUCIFERA CALLUS EXTRACT HAVING INCREASED CONTENT OF GALLIC ACID, METHOD FOR PREPARING SAME, AND WHITENING COSMETIC COMPOSITION CONTAINING SAME

(54) 발명의 명칭 : 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 미백용 화장품 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to *Nelumbo nucifera* callus having an increased content of gallic acid or an extract thereof and to a method for preparing the same. The *Nelumbo nucifera* callus extract according to the present invention has an excellent whitening effect by containing a large amount of gallic acid, and thus can be advantageously used as a cosmetic composition.

(57) 요약서: 본 발명은 갈릭산(Gallic acid) 함량이 증진된 연 켈러스 또는 그 추출물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 연 켈러스 추출물은 갈릭산이 다량 함유되어 있어, 미백 효과가 우수하여 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 미백용 화장품 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 갈릭산 함량이 증진된 연(*Nelumbo Nucifera*) 켈러스 추출물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 추출물을 포함하는 피부 미백 효과가 우수한 화장품 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 피부의 흑화(Melanism)는 내적, 외적 요인에 대한 피부세포의 반응에 의하여 발생하는 것으로, 대표적인 요인은 피부가 자외선에 노출됨으로 인한 것이다. 즉, 피부가 자외선에 노출되면 티로시나제(Tyrosinase)가 활성화되고, 이것은 피부조직에 존재하는 아미노산의 일종인 티로신에 작용하여 도파(dopa)를 생성시킨다. 이후 다시 도파퀴논(dopaquinone)을 생성시키는 산화과정을 통해 피부 색소세포인 멜라노사이트(Melanocyte) 내의 멜라노솜(Melanosome)에서 멜라닌이라는 중합체가 합성된다. 이 멜라닌은 피부의 각질형성세포인 케라티노사이트(Keratinocyte)로 전달되며, 각질화 과정에 의해 피부 표면에 도달하여 자외선으로부터 피부를 보호하게 된다.

[4]

- [5] 멜라닌은 우리 인체에 없어서는 안 되는 자외선 방어제이며, 단백질, 지질, 핵산 등과 같은 생체성분을 변형시키는 다양한 라디칼을 제거하는데 효과적인 프리 라디칼 소거제의 역할을 담당한다. 하지만, 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나 피부병변 및 노화에 따른 피부의 생리기능이 떨어지게 되면, 멜라닌이 피부 표면에 침착 되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소침착을 유발하게 된다.

[6]

- [7] 이러한 피부 흑화의 원인과 기작이 밝혀지면서, 피부 흑화 과정에 관여하는 티로시나제의 활성 저해 효과를 갖는 물질들을 화장품에 배합하거나, 멜라닌 생성과정 중의 일부 반응을 저해함으로써 멜라닌의 생성을 감소시키는 방법이 피부 흑화를 방지하기 위해 일반적으로 사용되고 있다. 이러한 목적으로 사용되고 있는 대표적인 물질로는 알부틴, 아스코르빈산, 히드로퀴논 등이 있다. 그러나 알부틴의 경우, 우수한 티로시나제 활성 저해작용을 갖는 반면, 화장품에 배합 시 변색 및 경시변화에 따른 역가 저하 등 안정성에 문제점이 있으며, 피부자극이 커 사용상 한계가 있다. 아스코르빈산은 티로시나제 활성 저해 효과가 낮고, 분자 자체의 안정성이 낮아 멜라닌 생성 억제제로 적합하지 않은 문제가 있다. 히드로퀴논은 피부에 대한 자극이 높아 안전성 문제로 현재 화장품

배합 시에 그 사용성이 제한되는 문제가 있다.

[8]

[9] 한편, 천연 유래의 식물 추출물에 다양한 생리활성을 나타내는 유효 성분들이 함유되어 있음이 밝혀지면서, 상기 미백 물질을 대체할 적절한 미백 효과를 나타내는 식물 추출물에 대한 관심이 생기고 있다.

[10]

[11] 미백 효과를 나타내는 식물 추출물을 찾기 위한 일환으로 연 추출물의 이용에 관한 연구(대한민국 등록특허 제0828193호)가 있으나, 이를 위해서는 연을 직접 재배하는 과정이 필요하여 시간적, 공간적 제약이 있으며, 단순한 추출로는 유효 물질이 미비하다는 문제가 있었다.

[12]

[13] 또한, 상기 한계를 극복하기 위해 연 켈러스를 이용에 관심이 고조되고 있으나 일반적인 연 켈러스 추출물은 저농도에서 효과가 없으며, 실제 사람 피부에 대한 임상 시험시 미백효과가 미약하다는 문제가 있었다.

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[15] 이에, 본 발명자들은 미백 효과를 극대화한 연 켈러스 추출물을 획득하기 위한 연구를 수행한 결과, 연 조직으로부터 유도된 연 켈러스를 메틸자스몬산(Methyl Jasmonic acid)이 첨가된 배지에서 배양하여, 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물을 제조하였고, 상기 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물에서 우수한 미백 효능을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[16]

[17] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 갈릭산(Gallic acid)의 함량이 증진된 연(*Nelumbo Nucifera*) 켈러스 또는 그 추출물을 제공하는 것이다.

[18]

[19] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 연 켈러스 또는 그 추출물의 갈릭산 함량을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[20]

[21] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 갈릭산의 함량이 증진된 연 켈러스 추출물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[22]

[23] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 상기 갈릭산의 함량이 증진된 연 켈러스 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[24]

과제 해결 수단

- [25] 상기 과제를 해결하고자, 본 발명은 갈릭산 함량이 증진된 연 캘러스 또는 그 추출물 및 이의 제조방법, 및 상기 추출물을 포함하는 피부 미백 효과가 우수한 화장료 조성물을 제공한다.
- [26]
- [27] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.
- [28]
- [29] 본 발명은 갈릭산(Gallic acid)의 함량이 증진된 연(*Nelumbo Nucifera*) 캘러스 또는 그 추출물을 제공한다.
- [30]
- [31] 상기 연(*Nelumbo Nucifera*)은 연못에서 자라는 다년초이다. 뿌리는 옆으로 길게 뻗으며 원주형이고 마디가 많으며 가을철에 끝부분이 특히 굽어진다. 잎은 근경에서 나와 물위에 높이 솟고 원형에 가까우며 엽맥이 사방으로 퍼지며 직경 40 cm 정도이며 물에 잘 젖지 않으며 엽병에 가시 같은 돌기가 있다. 7~8월에 홍색, 백색의 꽃이 피고, 직경 15~20 cm이고, 화경은 엽병처럼 가시가 있고 끝에 1개의 꽃이 달린다. 10월에 열매가 익으며 견과는 타원형이고 길이 2 cm 정도로서 먹을 수 있다. 연의 과실 또는 종자를 연자, 연의 성숙한 종자의 녹색의 배아를 연자심, 연의 성숙한 종자의 하얀 알맹이가 연자육, 연의 수술을 연수, 잎을 하엽, 근경(뿌리줄기)을 우, 근경의 마디를 우절이라고 한다. 연 잎인 하엽은 설사, 두통, 어지럼증, 토혈, 산후 어혈 치료, 야뇨증, 해독작용에 쓰이는 것으로 잘 알려져 있다.
- [32]
- [33] 본 발명에서 사용되는 연 캘러스는 "아라홍련"이라고 불리는 연의 종자로부터 유도된 것이나 이에 한정되는 것은 아니다. "아라홍련"은 경남 함안의 성산산성에서 발굴된 연씨로부터 700여 년 만에 발아하여 꽃을 피운 것을 지칭하는 것으로서, 함안연꽃이라고도 한다. 아라홍련은 고려시대의 불화에서 볼 수 있는 꽃잎이 길고 색깔이 엷은 선홍색 꽃이다. 꽃잎을 오므렸다가 다시 펼칠 때마다 색깔이 점점 엷어져 나중에는 꽃잎 끝에만 진한 선홍색이 남는 것이 특징이다. 꽃잎뿌리의 새하얀 색깔이 꽃잎을 따라 점점 선홍색을 더해가는 데다 긴 꽃잎의 수수하면서도 우아한 형태가 지금의 연꽃과는 비교할 수 없는 고고한 자태를 뽐내고 있다.
- [34]
- [35] 상기 캘러스(Callus)는 식물체에서 잘라낸 조직을 옥신을 함유한 배지에서 배양하거나, 어떤 종류의 식물에 상처를 내거나, 상처 부위를 옥신으로 처리하거나 할 때에 생기는 특수한 조직 또는 세포덩어리를 말한다. 보통 캘러스는 정상적인 기관형성이나 조직분화를 일으키는 능력을 잃은 무정형의 조직 또는 세포덩어리로 대부분 유세포로 되어 있다. 넓은 의미로는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 등의 감염에 의해서 생기는 식물종양조직도 포함시키기도 한다.

[36]

[37] 즉, 식물체내의 세포는 증식하면 즉시 방향이 정해져서 특정한 조직뿐 만 아니라 기관으로 규칙적으로 조립되어 간다. 그러나, 조직배양을 통해 형성된 미분화 세포 덩어리인 캘러스는 외부로부터 다양한 식물 성장 호르몬 등의 자극을 주게 되면 그때까지 유지되어 왔던 통제가 해제되어 세포가 무작위로 증식하는 것으로 해석된다.

[38]

[39] 탈분화에 의해 얻어진 캘러스를 같은 조성을 가진 액체배지에 넣어서 진탕 배양하면 세포는 따로 떨어져 현탁 상태로서 증식을 계속한다. 이 캘러스나 배양세포는 새로운 배지에 계대 배양함으로써 영구적으로 분열 및 증식할 수 있게 되어 완전 식물체가 노화해서 죽어가는 분화세포와는 본질적으로 차이가 있다. 몇 세대 정도 계대 배양한 캘러스 또는 배양세포를 다양한 식물 성장 호르몬을 제거한 고휘 배지에 도포해두면 눈과 뿌리가 나와서 개체 식물이 복원된다. 이 재생식물은 한 개의 배양세포의 분열증식에서 유래한 것이며, 그 배양세포의 근원을 말하면 배축이나 수조직에서 유도한 것이다.

[40]

[41] 본 발명에 있어서, "연 캘러스"는 연의 어느 부위로부터 유도된 것이든 모두 가능하나, 일 구체예로, 연 종자의 발아된 유묘로부터 자엽(떡잎)을 절취하여 유도시킨 캘러스일 수 있고, 연의 어느 조직이든지 일부 잘라내어 옥신 및 사이토키닌의 함량을 조절한 배지에 놓아두면 캘러스가 형성될 수 있다.

[42]

[43] 본 발명에 있어서, "연 캘러스 배양물"은 연 캘러스를 배지에 배양시킨 것이다. 상기 배지는 기술분야에서 캘러스 배양에 일반적으로 사용되고 있는 배지가 있다면, 제한 없이 사용 가능하다.

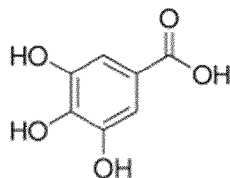
[44]

[45] 상기 갈릭산(Gallic acid)은 갈산 또는 몰식자산이라고도 불리며, 하기 [화학식 1]로 표시되는 구조를 가진다.

[46]

[47] [화학식 1]

[48]



[49] 상기 갈릭산은 식물 세포의 정상적인 대사 과정에서 부차적으로 생산되어 세포 내 특수한 장소에 축적되는 이차 대사산물의 일종으로 미백 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[50]

[51] 본 발명에 있어서, 상기 갈릭산 함량이 증진된 연 캘러스는

메틸자스몬산(Methyl Jasmonic acid)을 첨가한 배지에서 연 켈러스를 배양하여 제조될 수 있으며, 상기 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물은 메틸자스몬산을 첨가한 배지에서 연 켈러스를 배양한 후 추출하여 제조될 수 있다.

[52]

[53] 상기 메틸자스몬산은 이차대사산물인 갈릭산 함량을 높이기 위하여 사용하는 유인체로서, 연 켈러스를 메틸자스몬산이 100 내지 400 μM 첨가된 배지에서 배양할 수 있고, 구체적으로 100 내지 250 μM 첨가된 배지에서 배양할 수 있으며, 보다 구체적으로 200 μM 첨가된 배지에서 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 배지에 첨가된 메틸자스몬산의 농도가 100 μM 미만인 경우 생리활성물질 함량 변화에 큰 영향이 없는 반면 메틸자스몬산의 농도가 400 μM 을 초과할 경우, 연 켈러스가 갈변되어 켈러스의 유지가 어렵다.

[54]

[55] 본 발명에 있어서, "유인제(elicitor)"는 식물면역활성물질로, 식물의 여러 가지 방어 기작을 증가시키는 요소이다.

[56] 상기 갈릭산의 함량이 증진된 연 켈러스 또는 그 추출물은 갈릭산을 추출물 총 중량에 대하여 0.01 내지 10 중량% 함유할 수 있고, 보다 구체적으로 0.1 내지 3 중량% 함유할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[57]

[58] 상기 갈릭산의 함량이 증진된 연 켈러스, 그 파쇄물, 그 추출물 또는 그 배양물은 조성물에 포함시켜 제조될 수 있다.

[59]

[60] 본 발명에 있어서, "파쇄물"은 켈러스를 화학적 또는 물리적 방법 등으로 파쇄하여 얻은 세포 용해물을 의미하며, "추출물"은 켈러스를 용매에 녹여 분리한 물질로서, 증류 또는 증발을 이용하여 농축시킬 수 있다. 또한, "배양물"은 배양액 및/또는 배양된 켈러스를 포함하는 물질이다.

[61]

[62] 본 발명의 일 구체예에서, 연 켈러스를 메틸자스몬산을 첨가한 배지에서 배양하여 추출한 연 켈러스 추출물에서 갈릭산의 함량이 증진됨을 확인하였고, 특히, 메틸자스몬산 200 μM 을 첨가한 배지에서 배양한 연 켈러스 추출물의 갈릭산 함량이 가장 높음을 확인하였다.

[63]

[64] 본 발명의 일 구체예에서, 메틸자스몬산을 첨가한 배지에서 배양한 연 켈러스(*Nelumbo Nucifera*) 추출물의 갈릭산 함량은 메틸자스몬산 미첨가 배지에서 배양한 연 켈러스에 비해 10배 이상 증진됨을 확인하였다.

[65]

[66] 또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물의 제조방법을 제공한다:

- [67] (a) 연 (*Nelumbo Nucifera*) 종자를 발아시키는 단계;
 [68] (b) 상기 발아된 연 조직으로부터 연 캘러스를 유도하는 단계;
 [69] (c) 상기 연 캘러스를 메틸자스몬산(Methyl Jasmonic acid)이 첨가된 배지에서 배양하는 단계; 및
 [70] (d) 상기 갈릭산 함량이 증진된 연 캘러스 배양물을 추출하는 단계.

[71]

[72] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 (b)에서 연의 종자를 발아시켜 캘러스를 유도하기 위해 적절한 배지를 선택할 수 있다. 기술분야에서 캘러스 배양에 일반적으로 사용되고 있는 배지가 있다면, 제한 없이 사용 가능하다. 식물에서는 일반적으로 MS(Murashige-Skoog)배지, B5 배지 등을 주로 사용하고, 일 예로, MS 기초 고체 배지(Murashige and Skoog 1962, Duchefa 사, Cat No. M0221)의 조성(1L 기준)은 NH_4NO_3 1650 mg, KNO_3 1900 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg, KH_2PO_4 170 mg, KI 0.83 mg, H_3BO_3 6.2 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8 mg, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.3mg, Myoinositol 100 mg, Nicotinic acid 0.5 mg, Pyridoxine-HCl 0.5 mg, Thiamine-HCl 0.5 mg, Glycine 2mg, Sucrose 30000 mg 이다.

[73]

[74] 본 발명의 일 구체예에서, 연 종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 배지로서, 상기 MS 기초 고체 배지에 Sucrose 40.0 g/L, Agar 5~10.0 g/L, α -나프탈렌아세트산(NAA) 0.5 mg/L, 6-벤질아미노퓨린(BAP) 1.0 mg/L를 첨가한 배지를 이용할 수 있다. 여기서, 상기 배지의 pH는 5.5 ~ 6.0이고, 보다 구체적으로 pH 5.7 ~ 5.8이다.

[75]

[76] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 (c)에서 이차대사산물인 갈릭산 함량을 높이기 위하여 연 캘러스를 메틸자스몬산이 100 내지 400 μM 첨가된 배지에서 배양할 수 있고, 구체적으로 100 내지 250 μM 첨가된 배지에서 배양할 수 있으며, 보다 구체적으로 200 μM 첨가된 배지에서 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[77]

[78] 상기 메틸자스몬산이 첨가된 배지는 기술분야에서 캘러스 배양에 일반적으로 사용되고 있는 배지가 있다면, 제한 없이 사용 가능하다.

[79]

[80] 본 발명의 일 구체예에서, 일반 연 캘러스 추출물 대비 유인제로 메틸자스몬산을 첨가한 배지에서 배양한 연 캘러스 추출물의 갈릭산 함량이 증진됨을 확인하였고, 특히, 메틸자스몬산 200 μM 을 첨가한 배지에서 배양한 연 캘러스 추출물의 갈릭산 함량이 가장 높음을 확인하였다.

[81]

[82] 상기 단계 (c)에서 배양 시작일로부터 4내지 6주차에 메틸자스몬산을 배지에 첨가하는 바람직하다. 4주차보다 일찍 첨가할 경우, 연 세포가 충분히 배양되지 않아 갈릭산을 포함하는 캘러스가 충분히 생성되지 않을 수 있고, 6주차보다 늦게 첨가할 경우, 연 세포의 양이 많아 연 세포를 캘러스화 하기에 적절하지 않을 수 있다. 보다 바람직하게는 배양 시작일로부터 5주차에 메틸자스몬산을 배지에 첨가할 수 있다.

[83]

[84] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 (d)에서 추출방법은 여과법, 열수 추출, 에탄올 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출, 초임계 추출일 수 있고, 보다 구체적으로 열수 추출일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[85]

[86] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 (d)에 의해 얻어진 추출물은 갈릭산을 추출물 총 중량에 대하여 0.01 내지 10 중량% 함유할 수 있고, 보다 구체적으로 0.1 내지 3 중량% 함유할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[87]

[88] 또한, 본 발명은 갈릭산의 함량이 증진된 연 캘러스 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[89]

[90] 상기 조성물에서 갈릭산의 함량이 증진된 연 캘러스 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 30 중량%로 함유될 수 있다. 상기 추출물의 함량이 0.1 중량% 미만인 경우에는 피부 미백 개선 효과가 나타나지 않으며, 30 중량%를 초과하는 경우에는 함유량 증가에 대한 피부 미백 개선 효과 증대 정도가 미미하고, 제형 상의 안전 및 안정성에 문제가 있으며, 경제적이지 않다.

[91]

[92] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[93]

[94] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 일 예로 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있다.

[95]

[96] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화

이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라가칸트 등이 이용될 수 있다.

[97]

[98] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 하이드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[99]

[100] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[101]

[102] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 계면활성제 함유된 클렌징 제형 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형 또는 비누일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 일 예로, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비 함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[103]

[104] 본 발명의 화장료 조성물은 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.

[105]

[106] 본 발명에 의한 화장료 조성물은 연 조직으로부터 켈러스를 유도한 후 특정 농도의 메틸자스몬산을 첨가한 배지에서 배양하여 추출한, 갈릭산의 함량이 증진된 연 켈러스 추출물을 유효성분으로 함유하여 멜라닌 생성을 억제함으로써 피부 미백 효과가 우수하다.

[107]

[108] 본 발명에 있어서, "연 켈러스"는 연의 어느 부위로부터 유도된 것이든 모두 가능하나, 일 구체예로, 연 종자의 발아된 유묘로부터 자엽을 절취하여 유도시킨 켈러스일 수 있고, 연의 어느 조직이든 일부 잘라내어 옥신 및 사이토키닌의

함량을 조절한 배지에 놓아두면 캘러스가 형성될 수 있다.

[109]

[110] 본 발명에 있어서, "연 캘러스 배양물"은 연 캘러스를 특정 배지에 배양시킨 것이다.

[111]

[112] 본 발명에 있어서, "유인제(elicitor)"는 식물면역활성물질로, 식물의 여러 가지 방어 기작을 증가시키는 요소이다.

[113]

[114] 본 발명에 있어서, "유효성분으로 함유하는"의 의미는, 화장품 조성물로서 피부 미백효과를 나타낼 수 있는, 예컨대, 피부 세포의 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 정도로 함유하는 것을 의미한다.

[115]

발명의 효과

[116] 본 발명의 갈릭산(Gallic acid) 함량이 증진된 연 캘러스 또는 그 추출물은 갈릭산이 다량 함유되어 있어 멜라닌 생성을 억제하여 피부 미백에 효과가 있다. 따라서 본 발명은 미백용 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[117]

도면의 간단한 설명

[118] 도 1은 비교예 1에 의해 제조된 연(*Nelumbo Nucifera*) 캘러스 추출물의 갈릭산(Gallic acid) 함량을 HPLC를 통해 분석한 결과이다.

[119] 도 2는 실시예 2-2에 의해 제조된 연 캘러스 추출물의 갈릭산 함량을 HPLC를 통해 분석한 결과이다.

[120] 도 3은 캘러스화 하지 않은 연 추출물(비교예 5 내지 7)의 갈릭산 함량을 HPLC를 통해 분석한 결과이다.

[121] 도 4는 연 캘러스 추출물(200 μ M 메틸자스몬산 처리) 동결 건조물 0.5% 함유 크림을 안면에 도포하여, 피부 밝기(L value)의 변화를 측정된 결과이다.

[122] 도 5는 연 캘러스 추출물(200 μ M 메틸자스몬산 처리) 동결 건조물 0.5% 함유 크림을 안면에 도포하여, 피부 멜라닌 수치의 변화를 측정된 결과이다.

[123]

발명의 실시를 위한 형태

[124] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

[125] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[126]

[127] 참고예: 연 종자 입수

[128] 본 실시예에서는 연 중에서 2009년 함안 성산산성에서 발굴된 약 700년된 고려시대 연 종자를 재배하여 2010 ~ 2012년 3년 동안 수확한 연 종자 30알을

경남 함안군 가야읍에 위치한 함안박물관으로부터 입수하여 사용하였다.

[129]

[130] 실시예 1. 연 켈러스의 제조

[131] 무균 처리한 연(*Nelumbo Nucifera*)의 종자를 호르몬이 첨가되지 않은

MS(Murashige-Skoog) 기초 고체 배지(Murashige and Skoog 1962, Duchefa 사, Cat No. M0221)에 파종하여 25~28°C 에서 18시간의 일장조건(장일)으로 발아시켰다.

[132] 발아된 유묘에 붙은 자엽을 예리한 칼로 3 ~ 5 cm 정도 절취하여 MS 기초 고체 배지(Murashige and Skoog 1962, Duchefa 사, Cat No. M0221)에 수크로오스 40.0 g/L, 한천 5 ~ 10.0 g/L, α -나프탈렌아세트산 0.5 mg/L 및 6-벤질아미노퓨린 1.0 mg/L를 함유한 pH 5.8의 MS 기초 고체배지에 치상하였다. 약 2주 후 자엽으로부터 켈러스와 함께 싹(shoot)이 생성되어, 루트 선별배지로 계대 배양하면서 켈러스를 유지시켰다.

[133]

[134] 상기에서 제조된 MS 기초 고체 배지에 수크로오스 40.0 g/L, 한천 5 ~ 10.0 g/L, α -나프탈렌아세트산 0.5 mg/L 및 6-벤질아미노퓨린 1.0 mg/L의 식물 성장 조절 물질을 첨가한 배지에 25°C 배양조건으로 4주간 배양하고, 그 후 배양 5주차에 메틸자스몬산(Methyl Jasmonic acid)을 각각 100 uM, 200uM, 400 uM 농도로 배지에 첨가하여 배양하였다.

[135]

[136] 실시예 2. 연 켈러스 추출물의 제조

[137] 상기에서 수득한 각각의 연 켈러스를 수확하여 여러 번 수세하고, 진공동결건조기(Ilshin, Cat no. LP-50)에서 3일간 건조하였다. 건조된 연 켈러스 1 kg을 용기에 담고 100 L의 정제수를 넣은 후 90 ~ 120 °C에서 48시간 열수 추출 하였다. 추출 후 여과하여 고형분을 제거하고 연 켈러스 추출물을 제조하였다.

[138]

[139] 메틸자스몬산 100 uM, 200 uM, 400 uM을 첨가한 배지에서 배양한 연 켈러스 실시예 각각을 실시예 2-1, 실시예 2-2, 실시예 2-3으로 명명하였다.

[140]

[141] 비교예 1 내지 4. 유인제 처리에 따른 비교예 제조

[142] 유인제인 메틸자스몬산을 첨가하지 않거나, 메틸자스몬산 대신 살리실산(Salicylic acid, SA)을 100 uM, 200 uM, 400 uM 을 각각 배지에 첨가하는 것을 제외하고는 상술한 실시예 1 및 2와 동일한 방법으로 연 켈러스를 제조하고 열수 추출하여 연 켈러스 추출물을 제조하였다.

[143]

[144] 메틸자스몬산 비포함 배지에서 배양한 연 켈러스 추출물을 비교예1, 살리실산 100 uM, 200 uM 또는 400 uM을 첨가한 배지에서 배양한 연 켈러스 추출물을 각각 비교예 2, 비교예 3 또는 비교예 4로 명명하였다.

[145]

[146] 비교예 5 내지 7. 연 부위별 비캘러스화 비교예 제조

[147] 연꽃 씨앗 및 연 잎은 함안 지역에서 수득하였다. 연 잎을 55 °C에서 8시간 동안 건조시키고 믹서로 분쇄하여 중량 50g에 추출 용매로 물 750ml를 가하여 6시간 동안 추출하였다. 이는 비교예 5로 명명하였다.

[148]

[149] 비교예 6과 7을 얻기 위해, 연꽃 씨앗을 잘라서 각각 연자심, 연자육으로 분리하였고, 이에 물을 가하여 6시간 동안 추출하였다. 그 후, 1% 여과 보조제 투입하여 여과한 뒤 80 °C에서 건조 시켰다. 연자심의 물 추출물은 비교예 6, 연자육의 물 추출물은 비교예 7로 명명하였다.

[150]

[151] 실험예 1. 유인제 종류 및 농도에 따른 연 캘러스 추출물의 갈릭산 함량 증진 확인

[152] 유인제 종류 및 농도에 따른 연 캘러스의 갈릭산 함량 증진 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2 및 비교예 1 내지 4에 의해 제조된 연 캘러스 추출물에 대하여 HPLC를 통해 갈릭산 함량을 측정하였다.

[153]

[154] 구체적으로, 상기 실시예 2-1, 2-2 및 2-3에 의해 제조된 연 캘러스 추출물의 동결건조물 0.1 g 각각을 정제수로 용해하여 10 ml 검액을 획득하였다. 또한, 갈릭산($C_7H_6O_5$; 170.12) 표준품 10 mg을 정제수로 100 ml가 되도록 용해한 후, 이 중 0.5 ml를 정제수로 100 ml가 되도록 다시 용해하고 1/2, 1/4 로 희석하여 표준액을 획득하였다. 상기 검액 및 표준액 20 μ l씩을 가지고 HPLC 분석을 수행하였다.

[155] HPLC를 통한 분석은 Agilent 1260 Infinity(Agilent, USA)을 이용하였다. 컬럼은 CAPCELL PAK C18 UG120 250mm x 4.6mm, 5 μ m을 사용하였다. 이동상으로는 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)와 0.1% 아세토니트릴(acetonitrile; B)의 혼합용액을 이용하였으며, 35 분에 걸쳐 B의 함량을 0%에서 90%로 일정한 구배로 증가시키면서 진행하였다. 유속은 분당 1.0 ml였고, 자외선 검출기의 검출파장은 270 nm로 설정하였다. HPLC를 통해 측정된 연 캘러스 추출물 각각의 갈릭산 함량을 도 1, 도 2 및 표 1에 나타내었다.

[156]

[157] [표1]

연 켈러스 추출물	메틸자스몬산 농도(uM)	살리실산 농도(uM)	갈릭산(ug/ mg)	중량%
실시예 2-1	100	-	7.36	0.74
실시예 2-2	200	-	27.83	2.78
실시예 2-3	400	-	14.18	1.42
비교예 1	-	-	0.00	0.00
비교예 2	-	100	0.00	0.00
비교예 3	-	200	0.00	0.00
비교예 4	-	400	0.00	0.00

[158]

[159] 그 결과, 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 상기 비교예 1에 의해 제조된 연 켈러스 추출물은 갈릭산이 검출되지 않는 반면(도 1), 실시예 2-2의 메틸자스몬산을 처리한 연 켈러스 추출물은 갈릭산이 검출됨을 확인하였다(도 2).

[160]

[161] 또한 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 비교예 1에 의해 제조된 연 켈러스 추출물뿐만 아니라, 살리실산을 처리한 비교예 2 내지 4에 대한 HPLC 결과에서도 갈릭산을 나타내는 피크가 나오지 않아, 살리실산 처리한 연 켈러스 추출물에서도 갈릭산이 검출되지 않았음을 확인하였다.

[162] 반면, 메틸자스몬산을 처리하여 제조된 연 켈러스 추출물인 실시예 2-1 내지 2-3에서는 갈릭산 함량이 증진되는 것을 확인하였으며, 특히 200 uM 메틸자스몬산을 첨가한 배지에서 배양한 연 켈러스 추출물(실시예 2-2)의 갈릭산 함량이 가장 높음을 확인하였다.

[163]

[164] 실험예 2. 비켈러스화된 연 부위별 추출물의 갈릭산 함량 확인

[165] 상기 실시예 2-2와 비교예 5 내지 7 추출물 샘플을 가지고 갈릭산 함량을 측정하기 위하여 HPLC 분석을 수행하였다.

[166] HPLC를 통한 분석은 Agilent 1260 Infinity(Agilent, USA)을 이용하였다. 컬럼은 CAPCELL PAK C18 UG120 250mm x 4.6mm, 5um을 사용하였다. 이동상으로는 0.1% 트리플루오로아세트산 (trifluoroacetic acid, TFA)와 0.1% 아세토니트릴 (acetonitrile; B)의 혼합용액을 이용하였으며, 35 분에 걸쳐 B의 함량을 0%에서 90%로 일정한 구배로 증가시키면서 진행하였다. 유속은 분당 1.0 ml였고, 자외선 검출기의 검출파장은 270 nm로 설정하였다. 비교예 5 내지 7 추출물 각각의 갈릭산 함량은 HPLC로 측정되어 도 3에 나타내었다.

[167]

[168] [표2]

실험군	갈릭산(ug/mg)
실시에 2-2(메틸자스몬산 200uM 처리 연 켈러스 추출물)	27.83
비교예 5(연 잎 물 추출물)	0.00
비교예 6(연자심 물 추출물)	0.00
비교예 7(연자육 물 추출물)	0.00

[169]

[170] 그 결과, 실시에 2-2에 의해 제조된 연 켈러스 추출물은 갈릭산이 검출되는 반면(도 2 참조), 켈러스화 하지 않은 비교예 5 내지 7의 추출물은 갈릭산이 검출되지 않음을 확인하였다(도 3 참조). 실시에 2-2와 비교예 5 내지 7의 갈릭산 함량은 상기 표 2에 나타내었다.

[171]

[172] 실험예 3. 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물의 미백 효과 확인

[173] 상기 실시에 2)에서 제조된 메틸자스몬산 처리를 통해 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물의 미백 효과를 확인하기 위하여, B16F1 멜라닌 형성 세포에 대한 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였다.

[174]

[175] 구체적으로, B16F1 멜라닌 형성 세포는 마우스에서 유래한 세포군으로, ATCC(American Type Culture Collection)로부터 분양 받아 사용하였다. 상기 B16F1 멜라닌 형성 세포를 6웰 플레이트에 각 웰 당 2×10^5 농도로 분주하고, 세포를 부착시킨 후 독성을 유발하지 않는 농도로 분주하였다. 이후, 상기 비교예 1에 의해 제조된 연 켈러스 추출물의 동결건조물 300 ug/ml와 실시에 2에 의해 제조된 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물의 동결건조물을 300 ug/ml 처리하여 72 시간 동안 37°C 조건, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 대조군으로 멜라닌세포 자극호르몬(α -Melanocyte-stimulating hormone, α -MSH) 10 nM을 사용하였고, 실험군과 동일하게 배양하였다. 72 시간 배양 후, 세포를 트립신-EDTA로 떼어내고, 세포 수를 측정한 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포 내 멜라닌의 정량은 로탄(Lotan: Cancer Res., 40: 3345-3350, 1980)의 방법을 변형하여 실시하였다. 셀 펠릿을 PBS로 1회 세척한 후 균질화 버퍼액(50 mM 소듐 포스페이트, pH6.8, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF) 1 ml를 첨가하여 5 분간 와류하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리(3,000rpm, 10분)하여 얻은 세포 여액에 1N NaOH(10% DMSO)를 첨가하여 추출된 멜라닌을 용해한 후, 마이크로 플레이트 판독기로 490 nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정한 다음 멜라닌을 정량하고, 단백질 양을 측정하였다.

[176] 시료의 멜라닌 생성율(%)은 단위 단백질당 멜라닌 양을 계산하여 대조군 대비

변화한 양을 하기 수학적 식 1에 의하여 계산하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[177]

[178] [수학적 식 1]

[179] 멜라닌 생성율(%)= B/A*100

[180] A: 대조군 웰(대조군)의 멜라닌 양/총 단백질

[181] B: 연 캘러스 추출물을 첨가한 웰(실시예)의 멜라닌 양/총 단백질

[182]

[183] [표3]

대상	메틸자스몬산(uM)	Conc(ug/ml)	aMSH level (mM)	Melanin/protein(% Control)
대조군	-	-	10	100%
비교예 1	-	300		97%
실시예 2-1	100			84%
실시예 2-2	200			80%
실시예 2-3	400			125%

[184]

[185] 그 결과, 상기 표 3에 나타낸 바와 같이 비교예 1의 연 캘러스 추출물의 동결건조물은 멜라닌 합성 저해 효과가 약 3% 정도로서 미미한 것과 비교해서 실시예의 갈릭산 함량이 증진된 연 캘러스 추출물의 동결건조물 중 유인제로 100 uM 또는 200 uM 메틸자스몬산을 처리한 실시예 2-1 및 2-2에서 약 20% 정도의 멜라닌 합성을 저해하는 것을 확인하였다. 반면, 유인제로 400 uM 메틸자스몬산을 처리한 군에서는 수치상으로 멜라닌 합성이 증가한 결과를 얻었는데, 이는 세포 독성이 높아 세포 수가 감소함으로써 상대적으로 멜라닌 합성이 증가한 것처럼 보이는 것으로 확인되었다.

[186]

[187] 실험예 4. 인체 피부에 대한 미백 효과 시험

[188] 건강한 24명의 20~60세의 여성을 대상으로 연 캘러스 추출물(200 uM 메틸자스몬산 처리)의 동결 건조물 0.5% 함유 크림의 미백 개선 효과를 확인하였다. 선정된 대상자의 안면부를 클렌저로 세안 후 실내온도 실내온도 22±2°C, 습도 50±10%의 항온항습 조건의 대기실에서 30 분간 안정을 취하여 피부표면 온도와 습도를 측정공간의 환경에 적응하게 하였다.

[189]

[190] 연 캘러스 추출물의 동결 건조물 0.5%를 포함한 크림과 플라시보 크림으로 미백 효과 실험을 진행 하였다. 첫 방문 시 안면 좌/우 무작위로 실험군과 대조군 크림을 배정하고, 피부 밝기를 측정하였다. 그 후 정해진 크림 제형은 좌/우

구분해서 아침/저녁으로 사용하도록 하였다.

- [191] 각 크림 사용 4주와 8주 경과 후 CM-2600d(Minolta, Japan)를 사용하여 피부의 밝기(L-value)를 정량적으로 측정하였고, 피부 멜라닌 값은 Mexameter와 Narrow-band reflectance spectrophotometer로 probe에서 568nm(green), 660nm(red), 880nm(infrared)의 빛을 방출해 피부에서 반사되는 빛을 측정하여 평가하였다.
- [192] 상기 L-value는 brightness parameter(밝기 인자)이며, L-value 중 L은 명도(brightness)를 나타낸다. L-value는 0에서 100까지 수로 표시한다.
- [193] 기기적 평가는 방문 시 실시하였으며, 시험부위를 Chromameter로 3회 측정 후 평균값을 구하여 평가하였다. Chromameter를 이용한 피부 밝기 증가율은 다음의 수학적식2를 이용하였다.
- [194] [수학적식 2]
- [195] $L\text{-value의 증가율}(\%) = ((\text{시료 적용 후 } L\text{-value}) - (\text{시료 적용 전 } L\text{-value})) / (\text{시료 적용 전 } L\text{-value}) * 100$
- [196]
- [197] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 연 켈러스 추출물 0.5% 함유 크림을 도포한지 8주 경과 후 피부 밝기 측정값은 사용 전 평균 값 59.8에서, 사용 8주 경과 후 61.8으로 3.4% 증가 하였으며, 정규성 검정에 따라 모수적 방법인 Paired samples t-test로 검정하였을 때 사용 8주 후 값의 P-value가 0.05 미만으로, 통계적으로 유의한 수준으로 증가됨을 확인할 수 있었다.
- [198] 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 피부 멜라닌 값은 사용 전 평균 값 197.7에서, 사용 8주 경과 후 174.9으로 11.8% 감소 하였으며, 정규성 검정에 따라 모수적 방법인 Paired samples t-test로 검정하였을 때 사용 8주 후 값의 P-value가 0.05 미만으로, 통계적으로 유의한 수준으로 감소됨을 확인할 수 있었다.
- [199]
- [200] 제형예: 화장품 조성물의 안정성 확인을 위한 제형의 제조
- [201] 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물을 함유하는 화장품 조성물의 안정성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2-2 연 켈러스 추출물의 동결건조물을 함유하는 제형(가용화 제형, 에센스 제형, 크림 제형)을 하기 제형예 1) 내지 제형예 3)에 따라 제조하였다.
- [202]
- [203] 제형예 1) 가용화 제형의 제조
- [204]

[205] [표4]

상	성분	함량 (%)
수상	정제수	To 100
	글리세린	10 ~ 25
	디프로필렌글라이콜	
	베타인	
	D-판테놀	
	소듐히알루로네이트	
	점증제	
	금속이온 봉쇄제	적량
가용화상	피이지-60하이드로제네이티드캐스터오일	0 ~ 2
	피이지-40하이드로제네이티드캐스터오일	0 ~ 2
	다가알코올	0 ~ 10
	향료	적량
	에탄올	0 ~ 20
첨가 I	실시예 2-2의 200 uM 메틸자스몬산을 처리한 연 캘러스 추출물의 동결 건조물	0.5
첨가 II	보존제	적량
	기타 첨가제	적량

[206]

[207] <제조방법>

[208] (1) 수상과 가용화상을 각각 균일하게 혼합 및 용해시켰다.

[209] (2) 수상에 가용화상을 넣고 혼합 및 가용화 시켰다.

[210] (3) 첨가 I은 실시예 2-2의 200 uM 메틸자스몬산을 처리한 연 캘러스 추출물의 동결건조물을 함유한 상으로 가용화 한 후 투입하여 혼합시킨 후 첨가 II를 혼합하여 완료하였다.

[211]

[212] 제형예 2) 에센스 제형의 제조

[213]

[214] [표5]

상	성분	함량 (%)
수상	정제수	To 100
	세테아리스-6올리베이트	0.1 ~ 3
	글리세린	10 ~ 25
	1,2-프로판디올	
	소듐히알루로네이트	
	점중제	적량
	금속이온 봉쇄제	적량
유상	피이지-100스테아레이트	0.1 ~ 1
	글리세릴스테아레이트	0.1 ~ 1
	폴리소르베이트 60	0.1 ~ 1
	세틸알코올	0.1 ~ 1
	베헤닐알코올	0.1 ~ 1
	스쿠알란	5 ~ 20
	토코페릴아세테이트	0.1 ~ 0.5
첨가상 I	실시에 2-2의 200 uM 메틸자스몬산을 처리한 연 캘러스 추출물의 동결 건조물	0.5
첨가상 II	향	적량
	보존제	적량
	기타 첨가제	적량

[215]

[216] <제조방법>

[217] (1) 수상과 유상을 가온 하여 각각 균일하게 혼합 및 용해시켰다.

[218] (2) 75°C 에서 수상에 유상을 넣고 혼합시켜 유화시켰다

[219] (3) 첨가상 I은 실시에 2-2의 200 uM 메틸자스몬산을 처리한 연 캘러스
추출물의 동결 건조물을 함유한 상으로 50°C에서 투입하고 혼합시킨 후 첨가상
II를 혼합하였다.

[220]

[221] 제형예 3) 크림 제형의 제조

[222]

[223] [표6]

상	성분	함량 (%)
수상	정제수	To 100
	글리세린	10 ~ 25
	베타인	
	소듐히알루로네이트	
	점중제	적량
	금속이온 봉쇄제	적량
유상	피이지-100스테아레이트	0.1 ~ 2
	글리세릴스테아레이트	0.1 ~ 2
	폴리소르베이트 60	0.1 ~ 2
	스테아릭애씨드	0.1 ~ 2
	세테아릴알코올	0.1 ~ 2
	카프릭카프릴릭트리글리세라이드	10 ~ 30
	토코페릴아세테이트	0.1 ~ 0.5
첨가 I	실시예 2-2의 200 uM 메틸자스몬산을 처리한 연 캘러스 추출물의 동결 건조물	0.5
첨가 II	향	적량
	보존제	적량
	기타 첨가제	적량

[224]

[225] <제조방법>

[226] (1) 수상과 유상을 가운 하여 각각 균일하게 혼합 및 용해시켰다.

[227] (2) 75°C에서 수상에 유상을 넣고 혼합시켜 유화시켰다

[228] (3) 첨가상 I은 실시예 2-2의 200 uM 메틸자스몬산을 처리한 연 캘러스 추출
동결 건조물을 함유한 상으로 50°C에서 투입하고 혼합시킨 후 첨가상 II를
혼합하였다.

[229]

[230] 실험예 5. 갈릭산 함량이 증진된 연 캘러스 추출물을 함유하는 화장료 조성물의
안정성 확인

[231]

[232] 1) 갈릭산 함량이 증진된 연 캘러스 추출물의 원료 안정성 확인

[233] 원료 안정성을 확인하기 위하여, 상기 제형에 1) 내지 제형에 3)의 가용화 제형,

에센스 제형, 크림 제형을 4°C, 30°C, 45°C, 일광의 조건에 12주 동안 보관한 후, 상기 실험에 1과 동일한 방법으로 HPLC 분석을 통해 갈릭산 함량이 증진된 연캘러스 추출물의 동결 건조물의 갈릭산 성분의 경시 변화를 관찰하였고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

[234]

[235] [표7]

경과 시간	갈릭산(초기 함량 대비 %)											
	가용화 제형				에센스 제형				크림 제형			
	4°C	30°C	45°C	일광	4°C	30°C	45°C	일광	4°C	30°C	45°C	일광
초기	99.9	100	99	99.2	99	99.8	100	99.3	100	99.5	99.3	100
1주	96.2	96.7	97.2	97	97.3	96.6	96	97.7	97	96.2	95.7	94.4
3주	97	97.6	97.3	94.3	97	98.1	98.5	97.1	96.7	97.7	98.3	92.4
5주	97.6	98.2	97.7	90.9	96.1	96.1	98.8	96.3	95.8	96.8	99.4	92
8주	96.6	99	94.6	86.4	94.3	96	96.6	96.9	96.4	95.2	100.2	90.9
12주	94.9	94.2	98.7	92.3	97	95.7	98.1	94.2	95.9	93.9	101.7	88.9
결과	안정	안정	안정	안정	안정	안정	안정	안정	안정	안정	안정	안정

[236]

[237] 그 결과, 상기 표 7에 나타낸 바와 같이, 가용화 제형, 에센스 제형 및 크림 제형 모두 고온 조건 및 일광 조건에서 갈릭산 함량이 증진된 연캘러스 추출물 동결 건조물의 유효성분인 갈릭산의 안정성이 우수함을 확인하였다.

[238]

[239] 2) 갈릭산 함량이 증진된 연캘러스 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제형 안정성 확인

[240] 제형 안정성을 확인하기 위하여, 상기 제형에 1) 내지 제형에 3)의 가용화 제형, 에센스 제형, 크림 제형을 4°C, 30°C, 45°C, 일광의 조건에 12주 동안 보관한 후, 육안평가와 관능평가를 통해 색, 취, 제형 변화를 관찰하였으며, 그 결과를 하기 표 8 내지 표 10에 나타내었다. 이때, 색, 취 제형 변화 정도는 하기의 평가 기준에 따라 분류하여 평가하였다.

[241]

[242] <평가 기준>

[243] 변화 무: ○

[244] 약간의 변화: △

[245] 유의적 변화: X

[252]

[253] 그 결과, 상기 표 8 내지 표 10에 나타낸 바와 같이, 가용화 제형, 에센스 제형 및 크림 제형 모두 고온 조건 및 일광 조건에서 안정성이 우수함을 확인하였다.

[254]

[255] 실험예 6. 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 피부 자극 확인

[256]

[257] 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 피부 자극을 확인하기 위하여, 상기 제형예 3)의 크림 제형의 피부 자극에 대한 평가를 실시하였다.

[258]

[259] 구체적으로, 성인 30명을 대상으로 등 부위에 5X20 cm 크기로 상기 제형예 3에서 제조한 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출 동결 건조물을 농도의존적으로 함유하는 크림 제형의 일정량(20 μ l)을 24시간 동안 첩포한 후, 제거하고, 1시간, 24시간 경과 후 육안으로 피부 상태 변화를 관독하였으며, 그 결과를 표 11에 나타내었다. 이때, 피부상태의 변화 정도는 하기의 피부상태 평가 기준에 따라 분류하여 평가하였다.

[260]

[261] <피부 상태 평가 기준>

[262] 0: 변화 없음

[263] 1: 극히 조금 변함

[264] 2: 조금 변함

[265] 3: 조금 심하게 변함

[266] 4: 심하게 변함

[267] 5: 극히 심하게 변함

[268]

[269] [표11]

피검자(성별, 피부타입)	경과시간	추출물 함량에 따른 피부 상태		
		3.2%	6.4%	16%
1(남, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
2(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
3(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
4(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
5(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
6(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
7(남, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
8(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
9(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
10(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
11(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
12(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
13(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
14(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0

15(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	1
16(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
17(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
18(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
19(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
20(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
21(남, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
22(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
23(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	1
24(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
25(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
26(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
27(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
28(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0
29(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	0

30(여, 중성)	1시간	0	0	0
	24시간	0	0	1

[270]

[271] 그 결과, 상기 표 11에 나타낸 바와 같이, 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물을 포함한 크림 제형에서도 피부 자극이 없는 것을 확인하였다.

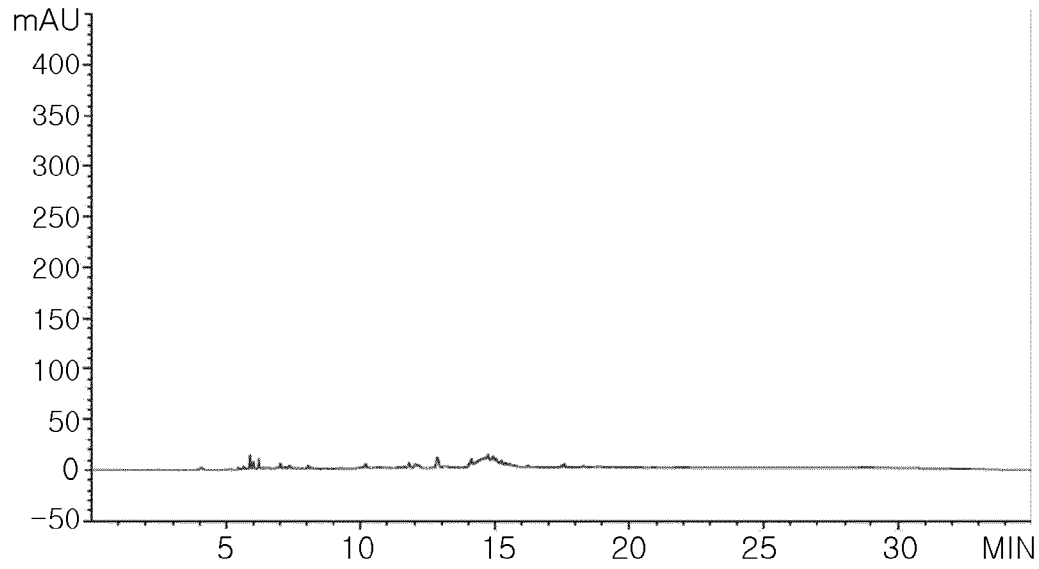
청구범위

- [청구항 1] 메틸자스몬산(Methyl Jasmonic acid)을 첨가한 배지에서 배양하여 갈릭산(Gallic acid)의 함량이 증진된 연 (*Nelumbo Nucifera*) 켈러스 추출물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 메틸자스몬산은 100 내지 400 μM 인 것을 특징으로 하는 연 켈러스 추출물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 갈릭산의 함량은 메틸자스몬산 미첨가 배지에서 배양한 연 켈러스에 비해 10배 이상 증진되는 것을 특징으로 하는 연 켈러스 추출물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 갈릭산의 함량은 추출물 총 중량에 대하여 0.01~10.0 중량%로 함유되는 것을 특징으로 하는 연 켈러스 추출물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 연 켈러스는 아라홍련의 종자로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 연 켈러스 추출물.
- [청구항 6] 메틸자스몬산(Methyl Jasmonic acid)을 첨가한 배지에서 배양하여 갈릭산 (Gallic acid)의 함량이 증진된 연(*Nelumbo Nucifera*) 켈러스, 그 파쇄물, 그 추출물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 미백용 화장품 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 연 켈러스, 그 파쇄물, 그 추출물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 30.0 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 미백용 화장품 조성물.
- [청구항 8] 메틸자스몬산(Methyl Jasmonic acid)을 첨가한 배지에서 연 켈러스를 배양하는 단계를 포함하는 연 켈러스 또는 그 추출물의 갈릭산 함량 증진 방법.
- [청구항 9] 다음의 단계를 포함하는 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 추출물의 제조 방법:
(a) 연(*Nelumbo Nucifera*) 종자를 발아시키는 단계;
(b) 상기 발아된 연 조직으로부터 연 켈러스를 유도하는 단계;
(c) 상기 연 켈러스를 메틸자스몬산이 첨가된 배지에서 배양하는 단계; 및
(d) 상기 갈릭산 함량이 증진된 연 켈러스 배양물을 추출하는 단계.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 방법에서 처리된 메틸자스몬산은 100 내지 400 μM 인 것을 특징으로 하는 연 켈러스 추출물 제조 방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 방법에 의한 추출물의 갈릭산 함량은 메틸자스몬산을 미첨가

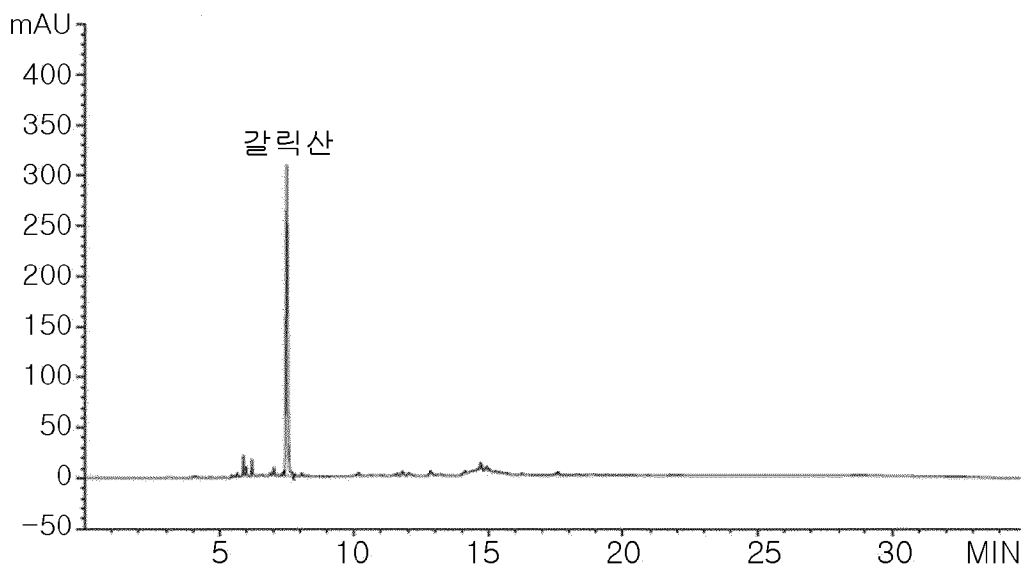
배지에서 배양한 연 캘러스에 비해 10배 이상 증진되는 것을 특징으로 하는 연 캘러스 추출물의 제조 방법.

- [청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 연은 아라홍련인 것을 특징으로 하는 연 캘러스 추출물 제조 방법.
- [청구항 13] 제9항에 있어서,
단계 (c)에서 배양 시작일로부터 4내지 6주차에 메틸자스몬산을 배지에 첨가하는 것을 특징으로 하는 연 캘러스 추출물 제조 방법.

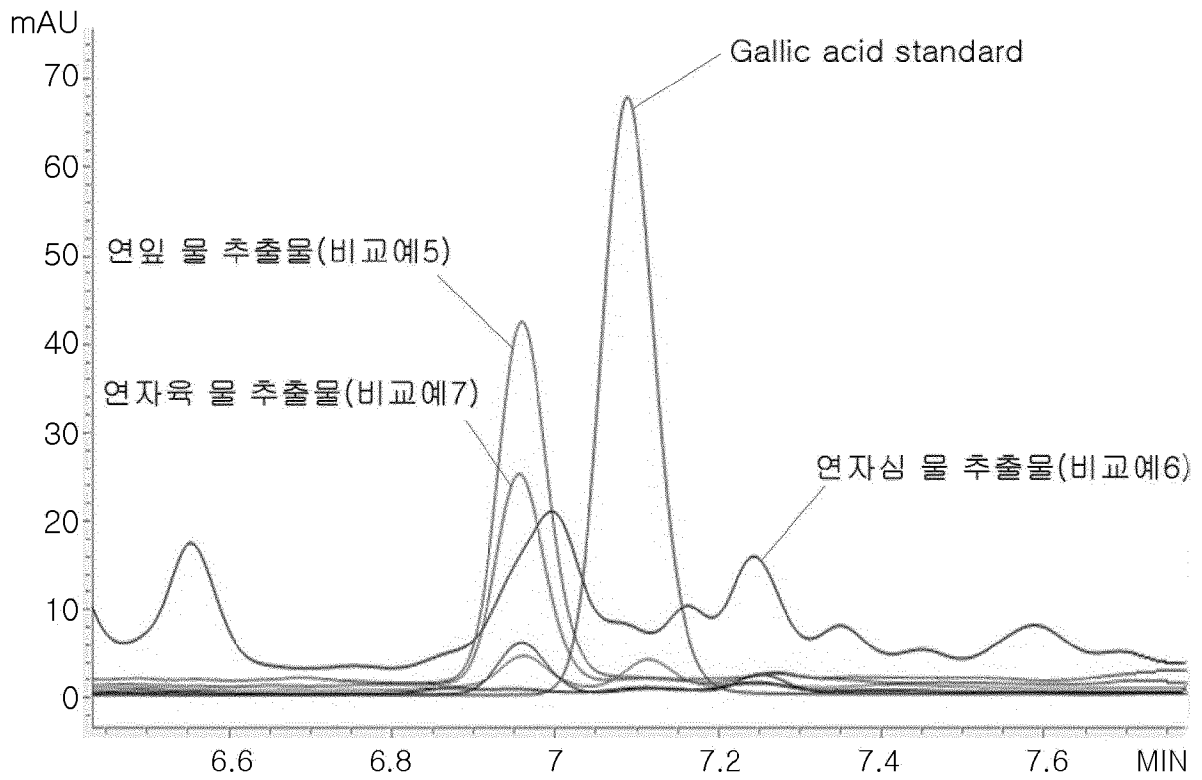
[도1]



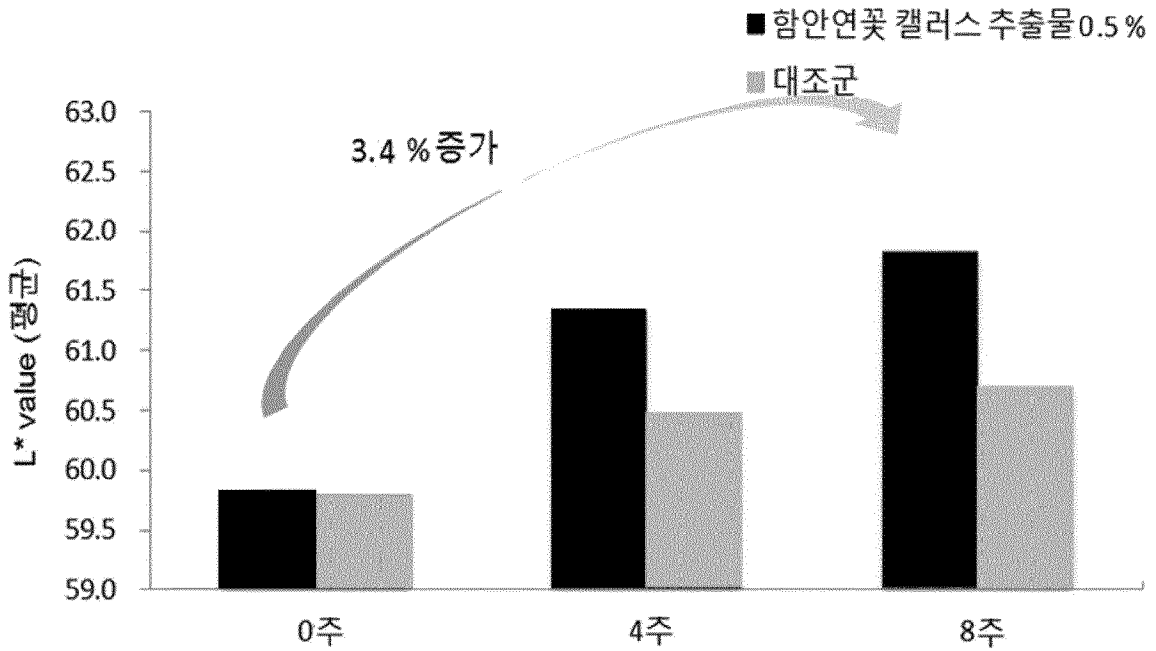
[도2]



[도3]



[도4]



[도5]

