



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월30일
(11) 등록번호 10-2032116
(24) 등록일자 2019년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0161008
(22) 출원일자 2017년11월28일
심사청구일자 2017년11월28일
(65) 공개번호 10-2019-0062034
(43) 공개일자 2019년06월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140141083 A*
동아일보 기사,
<http://news.donga.com/3/all/20170823/85952606/1> (2017.08.24)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
코스맥스 주식회사
경기도 화성시 향남읍 제약공단2길 46
주식회사 웅진빌리에뜨
서울특별시 종로구 창경궁로 120(인의동, 종로플레이스)
(72) 발명자
이동걸
경기도 안양시 동안구 동안로159번길 14, 503동 1007호(비산동, 은하수한양아파트)
윤석균
경기도 성남시 분당구 수내로 206, 315동 105호(수내동, 푸른마을 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 11 항

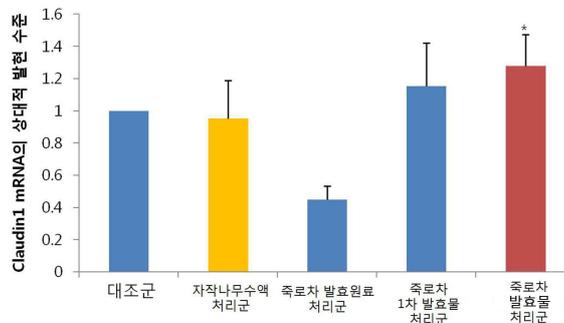
심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 차 발효물의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물

(57) 요약

차 발효물의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다. 일 양상에 따른 피부개선용 화장료 조성물에 따르면, 죽로차를 유산균으로 발효시킨 죽로차 발효물을 피부 상처 치유, 피부 장벽 강화, 또는 보습 용도로 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2800/85 (2013.01)

(72) 발명자

김민지

경기도 수원시 팔달구 장다리로306번길 45, 1309호
(인계동, 수정아파트)

김하영

경기도 성남시 분당구 판교로 255, E동 9층(
삼평동)

강승현

서울특별시 강남구 영동대로 230, 1동 1205호(대치
동, 우성1차아파트)

김연준

서울특별시 서초구 서초대로65길 13-10, 102동 70
4호(서초동, 서초래미안아파트)

김보라

서울특별시 강남구 압구정로 113, 24동 1203호(압
구정동, 미성아파트)

김선영

서울특별시 은평구 연서로46길 50, 1102동 401호(
진관동, 기자촌 11단지)

명세서

청구범위

청구항 1

죽로차를 유산균으로 발효시킨 발효물에 옥을 침지시킨 후 저온에서 숙성시켜 추가적으로 발효시킨 죽로차 발효물을 유효성분으로 포함하는 피부개선용 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) 및 락토바실러스 델브루에키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus*)로 구성된 군에서 선택되는 것인 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 죽로차를 유산균으로 발효시킨 발효물은 죽로차를 35℃ 내지 37℃에서 25일 내지 35일 동안 100 rpm 내지 150 rpm인 조건에서 유산균으로 발효시킨 것인 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 추가적으로 발효시킨 죽로차 발효물은 죽로차를 유산균으로 발효시킨 후 옥을 침지시키고 2℃ 내지 7℃에서 65일 내지 75일 동안 추가적으로 발효시킨 것인 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 죽로차 발효물은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 10 중량%로 포함되는 것인 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상처 개선 효과, 피부 장벽 강화 효과, 또는 보습 효과를 갖는 것인 화장료 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 클라우딘 1(claudin 1), 필라그린(filagrin), 또는 HAS3(hyaluronic acid synthase 3)의 발현을 증가시키는 것인 화장료 조성물.

청구항 8

죽로차를 유산균으로 발효시켜 1차 발효물을 제조하는 단계; 및

상기 1차 발효물에 옥을 침지시킨 후 저온에서 숙성시켜 2차 발효물을 제조하는 단계를 포함하는 죽로차 발효물을 제조하는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) 및 락토바실러스 델브루에키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus*)로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 1차 발효물을 제조하는 단계에서 발효는 35℃ 내지 37℃에서 25일 내지 35일 동안 100 rpm 내지 150 rpm인 조건에서 수행되는 것인 방법.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 2차 발효물을 제조하는 단계에서 숙성은 2℃ 내지 7℃에서 65일 내지 75일 동안 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 차 발효물의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 역사적으로 녹차는 중국과 인도 지역에서 처음으로 재배하여 왔으며, 그 이후 자바, 실론, 미얀마, 태국 등의 동남아시아 지역과 한국, 일본의 동아시아 지역으로 전파되어 왔고, 주로 북위 35℃이하의 아시아 지역에 재배되어 왔다. 녹차는 학명이 *Camellia sinensis* L.로 기록되어 있고, 차나무 과에 속하는 다년생 종자식물로 천연의 향기, 천연의 색상, 천연의 맛을 내는 특성과 항균 작용, 항산화 작용, 암 발생 억제작용, 항 알레르기 작용, 혈압 강하 작용, 항 당뇨작용, 이뇨 및 해독 작용 등 인체 내 약리적 특성이 있는 것으로 알려져 있으며 세계에서 가장 많이 소비되고 있는 기호 식품 중 가장 오래된 것 중의 하나이다. 녹차는 오랜 역사를 거치면서 여러 가지 질병치료제로 사용되었고 재배, 제조기술이 발전되고 있으며, 녹차가 건강을 유지하고 암과 같은 질병 발생을 억제시킨다는 사실이 보고됨에 따라 녹차에 대한 관심이 증가되고 있다. 녹차는 다양한 성분으로 구성되어 있으며 카페인, 탄닌, 클로로필, 비타민, 카테킨 등의 성분들이 다양하게 함유되어 있다.

[0003] 녹차 카테킨은 자연적인 항산화제로서 항염, 항알레르기 및 항암 등 다양한 생리활성 작용을 지닌 것으로 알려져 있다. 최근 차는 단순히 마시는 음료뿐만 아니라 차엽으로부터 기능성 성분을 추출하여 음식, 의약품, 건강식품, 화장품 등의 첨가제로서 많이 사용되고 있다. 이와 같은 용도로 사용하기 위한 차 추출물은 차의 생업을 증제식 또는 덩유식 공정으로 가공하여 건조 차를 만든 후 열수추출하여 추출액을 사용하여 왔으나 여러 가공단계를 거침으로써 공정이 복잡하고 에너지가 많이 소비되는 등의 원가상승 요인이 크다는 문제점이 지적된다.

[0004] 따라서 녹차의 기능성 성분의 추출효율이 향상된 고품질의 추출물을 얻기 위해 효소처리를 하여 새로운 형태의 차추출물을 제조하고자 하고 이러한 제조방법이 기능성성분을 다량 함유함을 확인하였을 뿐만 아니라 이러한 녹차 발효물이 주름개선, 피부장벽 강화, 및 보습 효과가 탁월함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 죽로차를 유산균으로 발효시킨 죽로차 발효물을 유효성분으로 포함하는 피부개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 죽로차 발효물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 죽로차를 유산균으로 발효시킨 죽로차 발효물을 유효성분으로 포함하는 피부개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0008] 상기 피부개선은 피부 주름 개선, 보습, 미백, 항염증, 상처 치유, 또는 피부 장벽 강화일 수 있다. 죽로차를 유산균으로 발효시킨 죽로차 발효물은 발효시키지 않은 죽로차 추출물에 비해 피부 주름 개선 효과, 보습 효과, 상처 치유 효과, 또는 피부 장벽 강화 효과가 우수하므로, 상기 죽로차 발효물을 포함하는 조성물은 피부 주름 개선, 보습, 상처 치유 또는 피부 장벽 강화용 조성물로 사용될 수 있다.

[0009] 용어, "피부 주름 개선"이란 주름과 관련된 인자의 발현을 억제하여 주름을 방지 또는 개선하거나, 콜라게나제 활성을 억제하여 콜라겐 총량을 증가시키는 모든 작용을 의미할 수 있다.

- [0010] 용어, "피부 보습"이란 피부 수분을 유지하거나 수분 손실을 방지하는 모든 작용을 의미할 수 있다.
- [0011] 용어, "항염증"이란 "염증 억제 또는 개선"과 혼용될 수 있으며, 면역 반응이 완화되어 NO 생성이 억제되는 모든 작용을 의미할 수 있다.
- [0012] 용어, "상처 치유"란 상처로부터 유발되는 손상된 조직의 치유 및/또는 재생을 의미할 수 있다. 상기 상처 치유는 피부 재생의 의미를 포함할 수 있다. 또한, 상기 치유는 손상된 조직의 원래 조성을 유지하는 것일 수 있다. 또한, 상기 치유는 상처와 관련된 질환의 합병증 및/또는 흉터를 최소화하면서 상기 손상된 조직을 치유 및/또는 재생을 촉진하는 것일 수 있다.
- [0013] 용어, "피부 장벽 강화"란 손상된 피부 장벽 기능을 향상시키는 모든 작용을 의미할 수 있다.
- [0014] 용어, "개선"이란 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0015] 상기 "죽로차"는 차의 일종으로, 대나무 이슬을 먹고 자란 찻잎으로 만든 차를 지칭하는 것이다. 경상남도 하동군 화개면 쌍계사 부근 차재배지, 경상남도 사천시 곤명면 다솔사 뒤편의 야생 녹차밭, 전라남도 담양군 담양읍 죽녹원(竹綠園)의 죽로차밭, 전라남도 보성군 보성읍과 회천면 지역의 차재배지, 전라남도 순천시 주암면 승주 조승훈가옥 주변의 죽로차밭 등에서 생산된다. 죽로차는 대나무 숲의 대나무 사이에서 나기 때문에 반그늘 상태가 만들어지고, 반그늘이 차나무의 생육에 좋은 환경인 온습을 자연스럽게 형성하여 차의 쓰고 떫은 맛이 줄어들게 된다. 본 발명의 일 구현체예에서, 상기 죽로차는 파동지역에서 생산되는 죽로차일 수 있다.
- [0016] 일 구체예에 따른 조성물에서, 상기 죽로차는 일광건조에 의해 완전히 건조하는 단계; 상기 건조된 죽로차를 이슬이 형성되는 야간에 노출시켜 자연발효시키는 단계; 및 상기 자연발효된 죽로차를 고온에서 살균처리하는 단계에 의해서 제조되는 죽로차일 수 있다. 상기 야간에 노출은 약 일주일 동안 노출되는 것일 수 있고, 상기 고온에서 살균처리하는 약 90 내지 110℃에서 약 3분 내지 약 10분 동안 처리되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 당해 기술분야에서 통상적인 방법으로 수행할 수 있다.
- [0017] 상기 "유산균"은 락토바실러스 속이면 제한 없이 포함할 수 있다. 구체적으로는, 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) 및 락토바실러스 델브루에키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus*)로 구성된 균에서 선택될 수 있다. 상기 유산균은 자연에서 분리한 것일 수 있고, 분양 받을 수도 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 일 구체예에 따른 조성물에서, 상기 유산균은 식물성 유산균일 수 있다. 본 발명에서 '식물성 유산균'은 유산균이 분리된 원재료가 식물인 유산균을 지칭할 수 있다. 구체적으로, 상기 유산균은 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*)일 수 있다.
- [0019] 상기 죽로차 발효물은 죽로차를 약 30℃ 내지 약 40℃, 약 32℃ 내지 약 39℃, 약 33℃ 내지 약 38℃, 약 34℃ 내지 약 37.5℃, 또는 35℃ 내지 약 37℃에서 발효시킨 것일 수 있다.
- [0020] 상기 죽로차 발효물은 죽로차를 약 25일 내지 약 35일, 약 26일 내지 약 34일, 약 27일 내지 약 33일, 약 28일 내지 약 32일, 또는 약 29일 내지 약 31일 동안 발효시킨 것일 수 있다.
- [0021] 상기 죽로차 발효물은 죽로차를 약 90 rpm 내지 약 150 rpm, 약 100 rpm 내지 약 140 rpm, 또는 약 110 rpm 내지 약 130 rpm에서 발효시킨 것일 수 있다. 상기 발효 조건은 죽로차의 발효를 통한 상처 치유 효과, 보습 효과, 피부 장벽 강화 효과를 증가시키기 위하여, 발효 온도, rpm, 및 시간을 적절히 선택할 수 있다.
- [0022] 예를 들어, 상기 죽로차 발효물은 죽로차를 35℃ 내지 37℃에서 25일 내지 35일 동안 100 rpm 내지 150 rpm인 조건에서 유산균으로 발효시킨 것일 수 있다.
- [0023] 상기 발효는 유산균을 배양한 배양배지를 죽로차에 접종함으로써 수행될 수 있다.
- [0024] 상기 유산균의 배양배지는 MRS(Man Rogosa Sharpe), 락토오스, YM(Yeast and Mold), M17 또는 ART(Asparagine Enrichment Broth) 배지를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 유산균은 죽로차 약 1kg에 대하여 약 0.1×10^8 내지 약 1×10^9 세포, 약 0.5×10^8 내지 약 2×10^8 세포, 또

는 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 세포로 접종될 수 있다.

- [0026] 상기 접종 조건은 죽로차의 발효를 통한 상처 치유 효과, 보습 효과, 피부 장벽 강화 효과를 증가시키기 위하여, 접종시 사용되는 배지, 균주 수를 적절히 선택할 수 있다.
- [0027] 예를 들어, 상기 유산균은 MRS(Man Rogosa Sharpe) 배지에서 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 세포로 접종되는 것일 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 따른 조성물에서, 상기 죽로차 발효물은 죽로차를 유산균으로 발효시킨 후 저온숙성에 의해서 추가적으로 발효시킨 것일 수 있다.
- [0029] 상기 저온숙성은 상기 죽로차 발효물에 옥을 침지시키고 약 2°C 내지 약 7°C, 또는 약 3°C 내지 약 6°C에서 숙성시키는 것일 수 있다.
- [0030] 상기 저온숙성은 상기 죽로차 발효물에 옥을 침지시키고 약 65일 내지 약 75일, 약 67일 내지 약 73일, 또는 약 68일 내지 약 72일 동안 추가적으로 발효시키는 것일 수 있다.
- [0031] 예를 들어, 상기 저온숙성은 죽로차를 유산균으로 발효시킨 후 옥을 침지시키고 2°C 내지 7°C에서 65일 내지 75일 동안 추가적으로 발효시키는 것일 수 있다.
- [0032] 일 구체예에 따른 조성물은 상처 치유 효과, 피부 장벽 강화 효과, 또는 보습 효과를 갖는 것일 수 있다.
- [0033] 일 구체예에 따른 조성물은 클라우딘 1(claudin 1), 필라그린(filagrin), 또는 HAS3(hyaluronic acid synthase 3)의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0034] 일 구체예에 따른 조성물은 클라우딘 1(claudin 1), 필라그린(filagrin), 또는 HAS3(hyaluronic acid synthase 3)의 발현을 증가시킴으로써 상처 치유 효과, 피부 장벽 강화 효과, 또는 보습 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0035] 일 구체예에 따른 조성물은 상기 죽로차 발효물을 유효한 양, 또는 유효 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 유효한 양은 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강, 성별, 개체의 추출물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0036] 예를 들어, 상기 죽로차 발효물은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 약 0.001 중량% 내지 약 10 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 일 구체예에 따른 피부개선용 화장료 조성물은 화장품학적으로, 허용가능한 부형제 또는 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 부형제는 미결정 셀룰로오스, 유당, 저치환도 히드록시셀룰로오스, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 붕해제는 전분글리콜산 나트륨, 무수인산일수소 칼슘, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 결합제는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 활택제는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 탈크, 또는 그 조합일 수 있다.
- [0038] 상기 조성물은 비경구 투여 제형으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여 제형은 주사제, 또는 피부외용제일 수 있다. 피부외용제는 크림, 젤, 연고, 피부 유화제, 피부 현탁액, 경피전달성 패치, 약물 함유 붕대, 로션, 또는 그 조합일 수 있다.
- [0039] 상기 피부외용제는 통상 화장품이나 의약품 등의 피부외용제에 사용되는 성분, 예를 들면 수성성분, 유성성분, 분말성분, 알코올류, 보습제, 증점제, 자외선흡수제, 미백제, 방부제, 산화방지제, 계면활성제, 향료, 색제, 각종 피부 영양제등을 필요에 따라서 적절하게 배합할 수 있다.
- [0040] 상기 피부외용제는, 에데트산이 나트륨, 에데트산삼나트륨, 시트르산나트륨, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨, 글루콘산 등의 금속붕쇄제, 카페인, 탄닌, 벨라파밀, 감초추출물, 글라블리딘, 칼린의 과실의 열수추출물, 각종 생약, 아세트산토코페롤, 글리틸리틴산, 트라넥삼산 및 그 유도체 또는 그 염등의 약제, 비타민 C, 아스코르브산인산마그네슘, 아스코르브산글루코시드, 알부틴, 코지산, 글루코스, 프룩토스, 트레할로스 등의 당류등도 적절하게 배합할 수 있다.
- [0041] 일 구체예에 따른 조성물은 화장수(스킨로션), 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양 로션, 마사지크림, 영양 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양 에센스, 팩, 비

누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 현탁액, 겔, 분말, 페이스트, 마스크팩 또는 시트 또는 에어로졸 조성물을 포함하는 제형으로 제조될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야에서 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 화장료 조성물은 보존제, 안정화제, 계면활성제, 용해제, 보습제, 에몰리언트제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한제 등을 더 포함할 수 있다. 상기 보습제 등의 추가 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 조성물 전체 중량을 기준으로 약 0.001 내지 약 10 중량%, 구체적으로 약 0.01 내지 약 3 중량%일 수 있다.

- [0042] 다른 양상은 상기 조성물을 개체에 적용하는 단계를 포함하는 개체의 피부를 개선시키는 방법을 제공한다. 상기 조성물에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [0043] 상기 방법은 구체적으로, 개체의 피부 장벽을 강화하는 방법, 개체의 피부 보습을 위하여 피부 수분을 유지 또는 수분 손실을 효율적으로 방지하는 방법, 개체의 상처 치유를 향상시키는 방법일 수 있다.
- [0044] 용어, "적용하는", "투여하는", "도입하는" 및 "이식하는"은 상호교환적으로 사용되고 일 구체예에 따른 조성물의 원하는 부위로의 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의한 개체 내로의 일 구체예에 따른 조성물의 배치를 의미할 수 있다. 일 구체예에 따른 조성물의 발효물 또는 발효물 성분의 적어도 일부를 생존하는 개체 내에서 원하는 위치로 전달하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0045] 투여는 당업계에 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 투여는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 경구, 경피(transdermal), 점막, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal) 또는 피하 투여와 같은 경로로, 임의의 수단에 의하여 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.
- [0046] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 피부상태 개선, 예를 들어 피부 주름 개선, 보습, 피부 장벽 강화, 또는 피부 상처 치유를 필요로 하는 개체일 수 있다.
- [0047] 상기 죽로차 발효물의 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1일 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있으며, 매일 또는 2 내지 5일 간격으로 총 투여 일수는 한번 치료 시 1일에서 30일까지 투여될 수 있다. 필요한 경우, 적정 시기 이후에 동일한 치료를 반복할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다.
- [0048] 다른 양상은 죽로차를 유산균으로 발효시켜 1차 발효물을 제조하는 단계; 및 상기 1차 발효물에 옥을 침지시킨 후 저온에서 숙성시켜 2차 발효물을 제조하는 단계를 포함하는 죽로차 발효물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0049] 상기 죽로차, 유산균, 유산균으로 발효, 옥을 침지, 저온숙성, 및 죽로차 발효물에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [0050] 일 구체예에 따른 방법에서 상기 유산균은 락토바실러스 속이면 제한 없이 포함할 수 있다. 구체적으로는, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) 및 락토바실러스 델브루에키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus*)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 상기 유산균은 자연에서 분리한 것일 수 있고, 분양 받을 수도 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 상기 유산균은 식물성 유산균일 수 있다. 본 발명에서 '식물성 유산균'은 유산균이 분리된 원재료가 식물인 유산균을 지칭할 수 있다. 구체적으로, 상기 유산균은 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)일 수 있다.
- [0052] 일 구체예에 따른 방법에서, 상기 1차 발효물을 제조하는 단계에서 발효는 35℃ 내지 37℃에서 25일 내지 35일 동안 100 rpm 내지 150 rpm인 조건에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0053] 일 구체예에 따른 방법에서, 상기 2차 발효물을 제조하는 단계에서 숙성은 2℃ 내지 7℃에서 65일 내지 75일 동안 수행되는 것일 수 있다.

[0054] 일 구체예에 따른 방법에서, 상기 2차 발효물을 원심분리하는 단계, 상등액을 취하는 단계, 또는 여과하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 원심분리, 상등액을 취하기, 또는 여과는 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0055] 상기 방법에 의해 제조된 죽로차 발효물은 클라우딘 1(claudin 1), 필라그린(filagrin), 또는 HAS3(hyaluronic acid synthase 3)의 발현을 증가시켜 피부의 상처를 치유할 수 있고, 피부 장벽을 강화시키며, 우수한 보습 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 죽로차 발효물의 피부 장벽 강화 효과, 보습 효과, 또는 피부 상처 치유 효과는 발효시키지 않은 죽로차에 비해서 현저하게 증가되었다. 따라서, 상기 방법에 의해 제조된 죽로차 발효물은 화장품, 식품, 약학 조성물 등 다양한 용도로 활용될 수 있다.

발명의 효과

[0056] 일 양상에 따른 피부개선용 화장품 조성물에 따르면, 죽로차를 유산균으로 발효시킨 죽로차 발효물을 피부 상처 치유, 피부 장벽 강화, 또는 보습 용도로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 클라우딘 1(claudin 1) mRNA의 상대적 수준을 나타낸 결과이다. 대조군: 아무것도 처리하지 않은 HaCaT 세포; 자작나무수액처리군: 자작나무수액을 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 발효원료 처리군: 발효하기 전의 죽로차를 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 1차 발효물 처리군: 실시예 2에서 제조한 죽로차 1차 발효물을 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 발효물 처리군: 본 발명의 죽로차 발효물을 처리한 HaCaT 세포.

도 2는 필라그린(filagrin) mRNA의 상대적 수준을 나타낸 결과이다. 대조군: 아무것도 처리하지 않은 HaCaT 세포; 자작나무수액처리군: 자작나무수액을 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 발효원료 처리군: 발효하기 전의 죽로차를 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 1차 발효물 처리군: 실시예 2에서 제조한 죽로차 1차 발효물을 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 발효물 처리군: 본 발명의 죽로차 발효물을 처리한 HaCaT 세포.

도 3은 HAS3 mRNA의 상대적 수준을 나타낸 결과이다. 대조군: 아무것도 처리하지 않은 HaCaT 세포; 자작나무수액처리군: 자작나무수액을 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 발효원료 처리군: 발효하기 전의 죽로차를 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 1차 발효물 처리군: 실시예 2에서 제조한 죽로차 1차 발효물을 처리한 HaCaT 세포; 죽로차 발효물 처리군: 본 발명의 죽로차 발효물을 처리한 HaCaT 세포.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 실시예 1. 죽로차 및 죽로차 발효원료의 준비

[0060] 죽로차는 하동지역의 홍소솔 죽로차 농장에서 채취 후 분쇄하여 준비하였다. 분쇄한 죽로차를 일광건조 하고 완전히 건조된 차를 이슬이 형성되는 야간에 실외에 노출시켜 약 1주일 동안 자연발효가 진행되도록 하였다. 자연 발효된 차를 회수하여 자작나무 수액(강원도 인제) 1000g에 회수한 죽로차 5g을 첨가하여 혼합하였다. 상기 혼합물을 발효조에 넣고 약 100℃에서 약 5분간 살균처리한 후 약 37℃까지 온도를 낮추어 발효원료를 준비하였다.

[0061] 실시예 2. 유산균을 이용한 죽로차 발효원료의 1차 발효

[0062] 상기 실시예 1에서 준비한 죽로차 발효원료를 유산균으로 발효하였다.

[0063] 구체적으로, 유산균으로는 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*: KFCC11028)를 직접 분리하였다. 상기 유산균을 MRS(Man Rogosa Sharpe: BD) 배양배지에서 액상배양하여 배양액을 얻었다. 상기 실시예 1에서 준비한 발효원료 약 1kg당 유산균이 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 세포로 포함되도록 상기 유산균의 배양액 200ml을 접종하였다. 접종 후, 약 35 내지 약 37℃, pH 7, 교반속도 약 100-120 rpm의 발효 조건으로 약 30일 동안 발효하였다.

[0064] 상기에서 얻은 발효물을 원심분리한 후 침전물과 균체를 제거하여 발효액을 얻었다. 발효액에 증류수 900 g을 첨가하고 이를 냉각 콘덴서가 달린 추출기에 넣고 약 80℃로 약 6시간 동안 가열한 후 증류되어 나오는 증류액 800 L를 회수하였다. 상기에서 얻은 발효물은 300메쉬 여과지로 1차 여과하고 1주일간 실온에서 방치한 후

150mm 여과지로 2차 여과시켜 1차 발효물을 제조하였다.

[0065]

실시예 3. 죽로차 발효물의 2차 발효

[0066]

상기 실시예 2에서 제조한 1차 발효물을 2차 발효하기 위하여 저온 숙성하였다.

[0067]

구체적으로, 1차 발효를 중단한 후 제조된 발효물을 회수하고 약 100℃에서 약 5분 동안 고압멸균 처리된 옥을 침지시켰다. 이때 발효물과 옥을 용기로 이동시키고 용기를 약 4℃ 저온이 유지되는 항온 냉장고에서 약 70일 동안 보관하면서 저온 숙성을 진행하여 2차 발효물을 제조하였다.

[0068]

실시예 4. 죽로차 발효물의 제조

[0069]

상기 실시예 3에서 제조한 2차 발효물을 약 14000rpm으로 약 1시간 동안 원심분리하여 발효 부산물인 침전물과 균체를 제거하고 발효액만을 회수하였다. 원심분리를 통하여 얻은 발효물에서 상층액을 취하여 0.2µm 필터로 1차 여과하고 약 1주일 동안 실온에서 방치한 후, 0.2µm 필터로 2차 여과하여 죽로차 발효물을 제조하였다.

[0070]

실험예 1. 죽로차 발효물의 피부 상처 치유 효능, 피부 장벽 강화 효능, 보습 효능 평가

[0071]

상기 실시예 4에서 제조한 죽로차 발효물의 피부 상처 치유 효능, 피부 장벽 강화 효능, 및 보습 효과를 평가하기 위한 실험을 하였다.

[0072]

구체적으로, 인간 각질형성 세포주(human keratinocyte)인 HaCaT 세포를 10% 우혈청 (fetal bovin serum)을 포함한 DMEM 배지(Dulbecco' smodified Eagle' s Medium, Gibco 1210-0038)에서 배양하였고, 배양은 모두 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 수행하였다. 상기 배양된 세포주에 양성 대조군으로서, 레티놀을 1mM 용량으로 처리하였다. 죽로차 발효물은 1.0%의 농도로 처리하였다.

[0073]

이후, HaCaT 세포를 24시간 동안 추가로 배양한 후, 회수하여 트리졸 (RNA iso, DAKARA, 일본) 1ml을 첨가하여 RNA를 분리하였다. 또한, RT-PCR을 위해, Nanodrop 2000 (Thermo, USA)을 이용해 RNA를 정량한 후, 42℃에서 55분, 70℃에서 15분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다(Reverse Transcriptase Mix, ELPIS biotech, 한국).

[0074]

RT-PCR은 피부 상처 치유, 피부 장벽 강화 및 보습과 관련된 인자인 필라그린(filagrin), HAS3 (hyaluronic acid synthase3), 클라우딘 1(claudin 1) 유전자의 발현량을 RT-PCR로 확인하였다. Step One Plus(Applied Biosystems, 미국)를 이용하였고, 사이버그린(SYBR Green supermix, Applied Biosystems, 미국)을 프라이머 및 cDNA와 함께 첨가하여 94℃에서 5분 동안 증합효소를 활성화한 후, 95℃ 30초, 54℃ 1분, 72℃ 1분간 40 사이클로 증합반응 하였다. 사용한 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다. 증합 완료 후 클라우딘 1, 필라그린, HAS3 유전자의 mRNA 발현량을 β-actin의 mRNA 발현량으로 정규화하여 상대적인 발현량을 계산하였다.

표 1

[0075]

유전자	서열번호	프라이머 명칭	프라이머 방향	프라이머 서열
Claudin 1	1	Claudin 1-F	정방향	5'-GCTCTAGAATTCTCACACGTAGTCTTTCCCGCT-3'
	2	Claudin 1-R	역방향	5'-GCTCTAGAATTCTCACACGTAGTCTTTCCCGCT-3'
filagrin	3	filagrin -F	정방향	5'-AGTGCCTCAGGGGGCTACA-3'
	4	filagrin -R	역방향	5'-CCGGCTTGGCCGTAATGTGT-3'
HAS3	5	HAS3-F	정방향	5'-CTTAAGGGTTGCTTGCTTGC-3'
	6	HAS3-R	역방향	5'-GTTGCTGGGAGATGAAGGAA-3'
β-Actin	7	Beta actin-F	정방향	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
	8	Beta actin-R	역방향	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

[0076]

도 1은 클라우딘 1 mRNA의 상대적 수준을 나타낸 결과이다. 왼쪽에서부터 첫 번째 막대는 아무것도 처리하지 않은 HaCaT 세포(대조군), 두 번째 내지 네 번째 막대는 각각 자작나무수액을 처리한 HaCaT 세포(자작나무수액 처리군); 발효하기 전의 죽로차를 처리한 HaCaT 세포(죽로차 발효원료 처리군); 실시예 2에서 제조한 죽로차 1차 발효물을 처리한 HaCaT 세포(죽로차 1차 발효물 처리군); 및 본 발명의 죽로차 발효물을 처리한 HaCaT 세포(죽로차 발효물 처리군) 에서의 클라우딘 1의 상대적 mRNA 수준을 나타낸다.

[0077]

도 2는 필라그린 mRNA의 상대적 수준을 나타낸 결과이다. 왼쪽에서부터 첫 번째 막대는 아무것도 처리하지 않은 HaCaT 세포(대조군), 두 번째 내지 네 번째 막대는 각각 자작나무수액을 처리한 HaCaT 세포(자작나무수액 처리군); 발효하기 전의 죽로차를 처리한 HaCaT 세포(죽로차 발효원료 처리군); 실시예 2에서 제조한 죽로차 1차 발

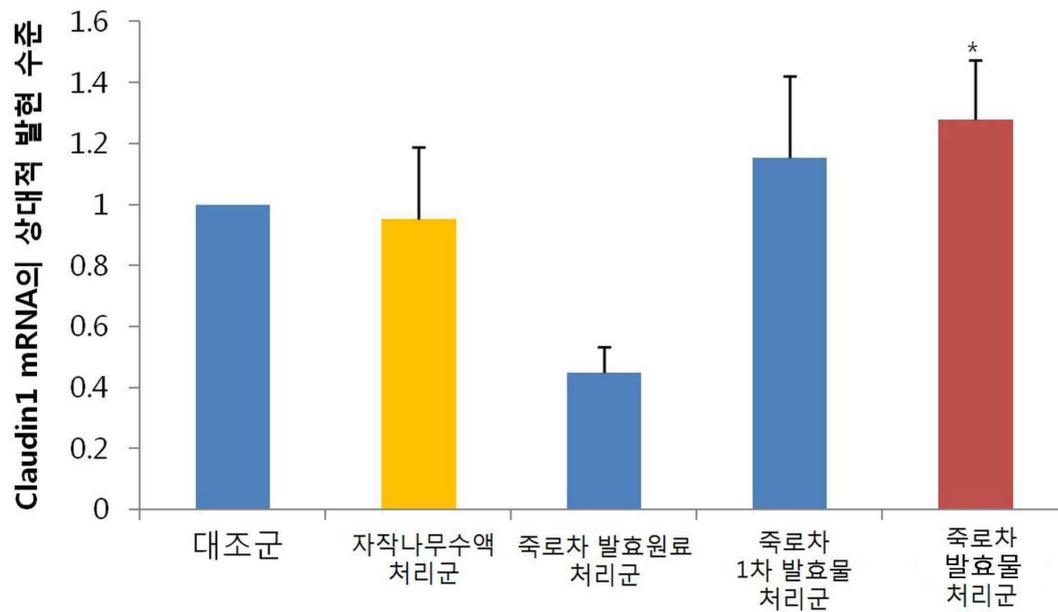
효물을 처리한 HaCaT 세포(죽로차 1차 발효물 처리군); 및 본 발명의 죽로차 발효물을 처리한 HaCaT 세포(죽로차 발효물 처리군) 에서의 필라그린의 상대적 mRNA 수준을 나타낸다.

[0078] 도 3은 HAS3 mRNA의 상대적 수준을 나타낸 결과이다. 왼쪽에서부터 첫 번째 막대는 아무것도 처리하지 않은 HaCaT 세포(대조군), 두 번째 내지 네 번째 막대는 각각 자작나무수액을 처리한 HaCaT 세포(자작나무수액 처리군); 발효하기 전의 죽로차를 처리한 HaCaT 세포(죽로차 발효원료 처리군); 실시예 2에서 제조한 죽로차 1차 발효물을 처리한 HaCaT 세포(죽로차 1차 발효물 처리군); 및 본 발명의 죽로차 발효물을 처리한 HaCaT 세포(죽로차 발효물 처리군) 에서의 HAS3의 상대적 mRNA 수준을 나타낸다.

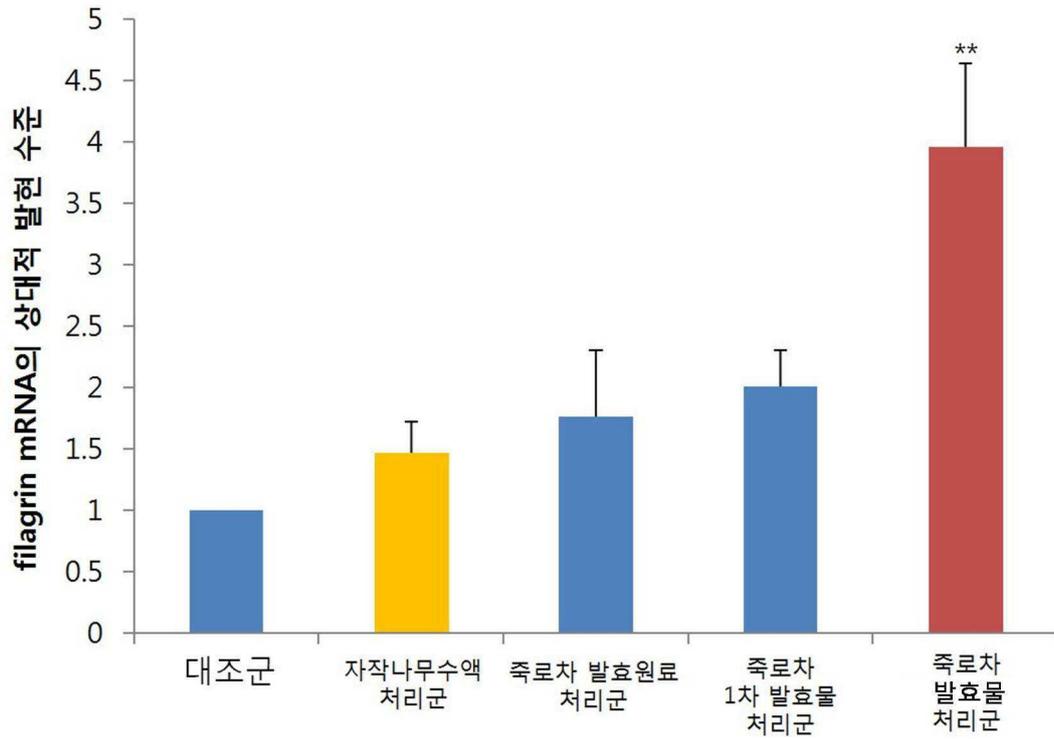
[0079] 도 1 내지 도 3에 나타난 바와 같이, 인간 각질형성 세포주에 죽로차 발효원료 또는 죽로차 1차 발효물을 처리한 경우 피부 상처 치유, 피부 장벽 강화 및 보습과 관련된 인자인 클라우딘 1, 필라그린, 및 HAS3 유전자가 대조군인 자작나무수액의 경우와 유사하거나 이보다 더 낮은 수준의 상대적 mRNA 발현 수준을 나타내는 것을 확인하였다. 반면, 본 발명의 죽로차 발효물은 다른 물질을 처리한 경우에 비하여 유의적으로 높은 mRNA 발현량을 나타내어, 피부 상처 치유 효과, 피부 장벽 강화 효과 및 피부 보습 효과가 매우 우수함을 알 수 있다.

도면

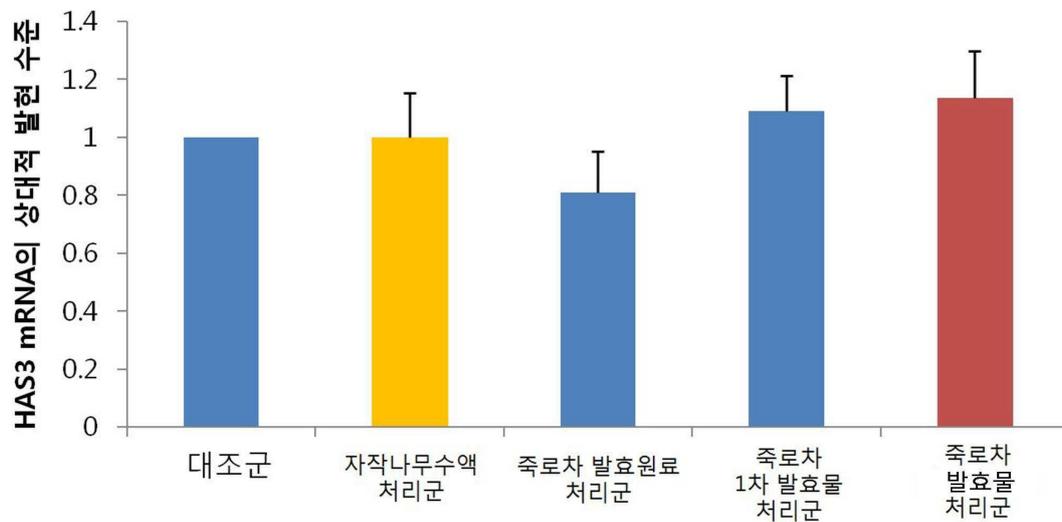
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Cosmax Co., Ltd.
- <120> Method for preparing tea fermented materials and cosmetic composition comprising the same
- <130> PN120339
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Claudin 1-F primer
 <400> 1
 gctctagaat tctcacacgt agtctttccc gct 33
 <210> 2
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Claudin 1-R primer
 <400> 2
 gctctagaat tctcacacgt agtctttccc gct 33
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> filagrin-F primer
 <400> 3
 agtgcactca gggggctcac a 21
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> filagrin-R primer
 <400> 4
 ccggcttggc cgtaatgtgt 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HAS3-F primer
 <400> 5

cttaagggtt gcttgcttgc	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HAS3-R primer	
<400> 6	
gttcgtggga gatgaaggaa	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Beta actin-F primer	
<400> 7	
agagctacga gctgcctgac	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Beta actin-R primer	
<400> 8	
agcactgtgt tggcgtacag	20