



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0083290
(43) 공개일자 2015년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A61K 8/63* (2006.01)

C12P 33/16 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0002872

(22) 출원일자 2014년01월09일

심사청구일자 2014년01월09일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

양덕춘

경기 용인시 기흥구 용구대로 1842, 111동 301호 (보라동, 현대모닝사이드2차아파트)

김연주

경기 화성시 영통로27번길 53, 212동 505호 (반월동, 신영통현대2차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

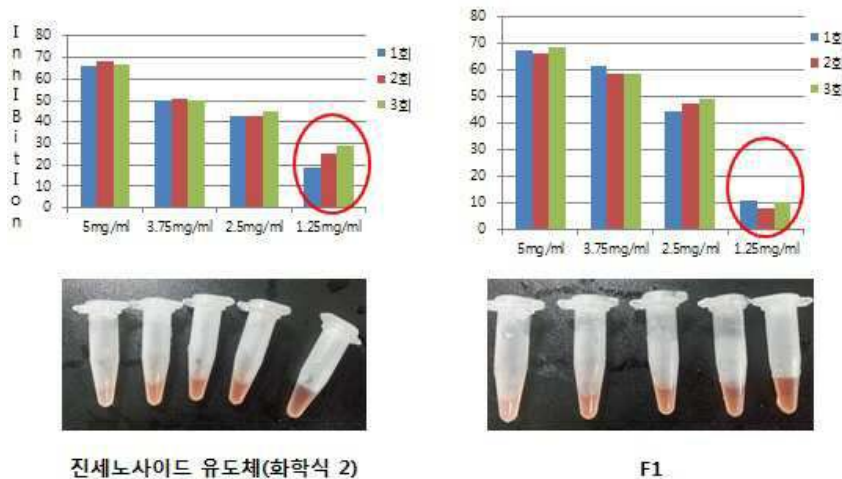
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 진세노사이드 유도체의 제조방법 및 이에 의해 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드 유도체의 제조방법 및 이에 의해 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 진세노사이드가 첨가된 배지에서 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevis*) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하는 단계를 포함하는 진세노사이드 유도체의 제조방법 및 이에 의해 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 진세노사이드 유도체는 멜라닌 생성을 효율적으로 억제할 수 있어 미백 및 주름개선 효과가 뛰어나며, 안정성이 높아 피부 부작용이 없다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

정선영

충남 예산군 삼교읍 두리4길 27-1,

민진우

경기 화성시 동탄중앙로 213, 241동 1503호 (반송
동, 시범한빛마을금호어울림아파트)

양동욱

대전 유성구 엑스포로 448, 509동 701호 (전민동,
엑스포아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313038-03-1-CG000

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발

연구과제명 한국형 토종 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00952903

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오품

연구과제명 Probiotic(LAB)을 이용한 신규 유용사포닌의 합성 및 핵심 GT유전자 pool구축

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

진세노사이드가 첨가된 배지에서 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevis*) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 유도체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배양단계는, 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 케톤화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 유도체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배양단계는, 케톤화 단계 이전에 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 생성된 글루코시다아제(glucosidase) 효소에 의해 탈당화하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 유도체의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 진세노사이드는 Rb1, Rd, F1, Fe, Rg1, F2, 화합물 K(CK), Rg3, Re, Rh1, Rh2, Rg5, Rk1 및 PPD 중 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 진세노사이드 유도체의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

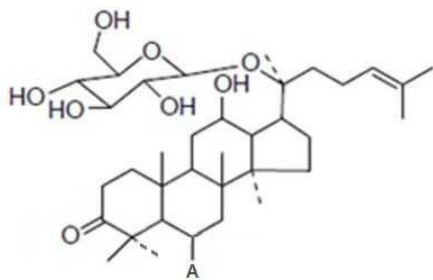
상기 진세노사이드 유도체는 Rb1, Rd, F1, Fe, Rg1, F2, 화합물 K(CK) 및 PPD 중 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 진세노사이드 유도체의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 진세노사이드 유도체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 진세노사이드 유도체의 제조방법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

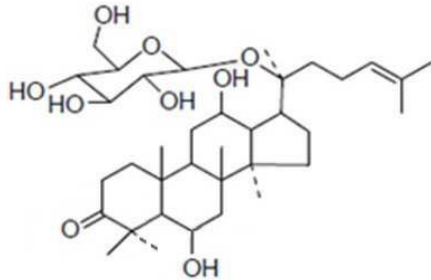
A는 H, OH, glucose, glucose-glucose 또는 glucose-rhamnose이다.

청구항 7

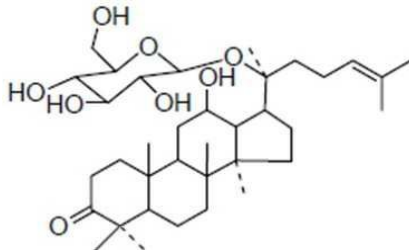
제1항에 있어서,

상기 진세노사이드 유도체는 하기 화학식 2, 화학식 3 및 이들의 조합 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 진세노사이드 유도체의 제조방법:

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 8

제1항 기재의 방법으로 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 미백 및 주름 개선용 화장품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 진세노사이드 유도체는 화장품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~20중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 미백 및 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 클린징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 중 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 11

제1항 기재의 방법으로 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 미백 및 주름 개선용 약학 조성물.

청구항 12

제1항 기재의 방법으로 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 미백 및 주름 개선용 식품 조성물.

청구항 13

케톤화된 사포닌 생성능을 가지는 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevis*) DCY 65 균주 (KACC 91723P).

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 진세노사이드 유도체의 제조방법 및 이에 의해 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인삼 자연발효액으로부터 분리된 진세노사이드가 첨가된 배지에서 신규주인 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevis*) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하는 단계를 포함하는 진세노사이드 유도체의 제조방법 및 이에 의해 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인간의 피부는 인체의 일차 방어막으로서 온도 및 습도의 변화, 자외선, 공해물질과 같은 외부 환경의 자극으로부터 체내의 기관을 보호해 주는 기능을 하며, 나이가 들어감에 따라 여러 가지 내적, 외적 요인에 의해 변화를 겪는다. 즉, 내적으로는 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 세포들의 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되며, 외적으로는 오존층 파괴로 인하여 태양광선 중 지표에 도달하는 자외선의 함량이 증가하고 환경오염이 더욱 심화됨에 따라 자유라디칼 및 활성 유해 산소 등이 증가함으로써, 피부의 두께가 감소하고, 주름이 증가하며, 탄력이 감소될 뿐 아니라 피부 혈색도 칙칙해지고, 피부 트러블이 자주 발생하며, 기미와 주근깨 및 검버섯 또한 증가하고, 혈색이 나빠지고 피부톤도 어두워지는 등 여러 가지 변화를 일으키게 된다.

[0003]

이러한 피부 내적 및 외적 요인에 의한 피부 상태의 변화를 방지하고, 건강한 피부 상태를 유지하기 위해서 기존에 알려진 각종 동물, 식물, 미생물 등으로부터 얻은 생리 활성 물질들을 화장품에 부가하여 사용함으로써 피부 상태를 개선시키기 위한 노력이 있어 왔다.

[0004]

한편, 인삼은 인삼속(*Panax*)에 속하는 다년생 반음지성 식물로서 한국, 중국 등 동아시아 지역에서 적어도 2,000년 이상의 오랜 역사를 가지고 있으며, 생약 중 가장 고귀한 약재로 이용된 약용식물이다. 그 간의 많은 연구 결과에 의해 다양한 효능이 점차 과학적으로 입증됨에 따라 건강증진을 위한 인삼의 가치가 동양뿐 아니라 서양에서도 인정되어, 지금은 세계 각국에서 의료용 또는 건강식품으로 널리 활용되고 있다. 인삼의 중요한 약리 성분인 진세노사이드(ginsenoside)는 현재까지 약 40여 종이 분리되었으며, 사포닌 외에 산성다당체, 아미노당, 폴리아세틸렌, 페놀산 등의 생리활성물질이 인삼에 함유되어 있다.

[0005]

주요 사포닌인 진세노사이드(ginsenoside) Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re 및 Rg₁을 포함한 6종의 사포닌이 총 사포닌의 약 90 %를 차지하는데, 주요 사포닌이 가수분해되어 생성된 소량의 희귀 사포닌인 진세노사이드 Rg₃, Rh₂, 화합물 K는 마우스에서 암세포 전이저해, *in vitro* 암세포 침투 저해, 암세포 아포토시스 유발, 혈관 확장을 통한 혈압 강하, 카테콜아민(catecholamine) 분비 억제를 통한 신경안정 효과 및 진통제 활성 등의 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다. 이러한 고효능을 가진 주요 사포닌 생성을 위하여 산처리, 열처리, 미생물 및 효소를 이용한 전환방법이 시도되었으며, 이 중 효소를 이용한 전환방법은 낮은 온도에서 진행할 수 있고 조작이 간편하며 효소의 기질특이성 때문에 부산물이 적다는 장점이 있고, 미생물의 종류에 따라 사포닌의 전환 산물 및 그 경로가 다양하여 특정사포닌을 선택적으로 생산할 수 있다. 하지만 미생물 및 효소의 전환방법은 단일 진세노사이드로만 반응시킨 연구가 대부분이며 사포닌 외에 비사포닌계의 생리활성물질의 변화에 관한 연구 또한 비교적 적다.

[0006]

상기한 바와 같이, 사포닌 성분을 다량 함유한 인삼에 대해 미생물 및 효소를 이용한 전환방법에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2013-0095949호
(특허문헌 0002) 국내공개특허 제10-2007-0115458호

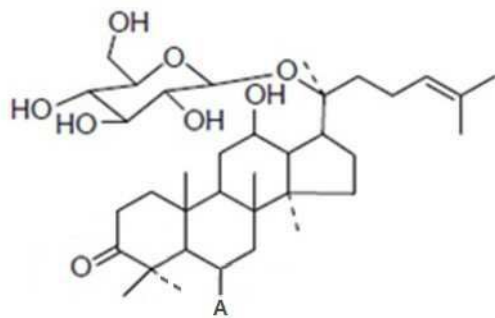
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자, 본 발명은 저온 저장된 인삼 발효액으로부터 분리된 신킨주인 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 이용하여 진세노사이드 유도체를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 항산화 활성이 우수하여 멜라닌 생성을 효율적으로 억제할 수 있고, 미백 및 주름개선 효과가 뛰어나며, 세포독성이 없어 안정성이 우수하고, 피부 부작용이 없는 진세노사이드 유도체의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한 본 발명은 상기 방법으로 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 화장품, 약학 및 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 진세노사이드가 첨가된 배지에서 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하는 단계를 포함하는 진세노사이드 유도체의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 상기 배양단계는 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 케톤화하는 단계를 포함한다.
- [0013] 또한 상기 배양단계는, 상기 케톤화 단계 이전에 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 생성된 글루코시다아제(glucosidase) 효소에 의해 탈당화하는 단계를 더 포함한다.
- [0014] 상기 진세노사이드 유도체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.
- [0015] [화학식 1]



- [0016]
- [0017] 상기 화학식 1에서,
- [0018] A는 H, OH, glucose, glucose-glucose 또는 glucose-rhamnose이다.
- [0019] 또한 본 발명은 상기 방법으로 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 방법으로 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 약학 및 식품 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 전환활성을 가지는 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 제공한다.

발명의 효과

[0022]

본 발명에 따른 진세노사이드 유도체는 멜라닌 생성을 효율적으로 억제할 수 있어 미백 및 주름개선 효과가 뛰어나며, 안정성이 우수하며, 피부 부작용이 없어 화장품 조성물에 사용하기 적합하다. 또한, 상기 진세노사이드 유도체는 피부상태 개선용 약학 조성물 및 식품 조성물에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 제조한 화학식 2의 진세노사이드 유도체의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 제조한 화학식 3의 진세노사이드 유도체의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)를 이용하여 진세노사이드 Rg1을 탈당화한 중간체와(F1), 상기 탈당화된 중간체를 케톤화하여 제조한 진세노사이드 유도체(화학식 2)의 티로시나아제 저해 활성을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)를 이용하여 진세노사이드 Rg1을 탈당화한 중간체와(F1), 상기 탈당화된 중간체를 케톤화하여 제조한 진세노사이드 유도체(화학식 2)의 MTT법에 의해 측정된 세포생존율을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 제조한 진세노사이드 유도체(화학식 2)의 MMP-1 발현 저해 활성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025]

본 발명의 진세노사이드 유도체는 진세노사이드가 첨가된 배지에서 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하는 단계를 포함하여 제조할 수 있다.

[0026]

상기 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)는 저온 자연 숙성된 인삼 발효액으로부터 분리한 균주를 5% 진세노사이드를 포함하는 MRS 아가 배지를 사용하여 37℃에서 3일간 배양하여 분리하였다.

[0027]

상기 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)는 케톤화된 사포닌 생성능을 가진다.

[0028]

상기 균주는 BLAST 프로그램을 사용하여 EzTaxon 서버로부터 얻은 16S rRNA 서열과 비교하여 16S rRNA 유전자 서열을 분석한 결과, 락토바실라과 락토바실러스속에 포함됨을 확인하였다. 유전자 서열은 공시 균주인 락토바실러스 브레비스 14687^T와 95.9%, 락토바실러스 파라브레비스 AM158249^T와 94.3%, 락토바실러스 코렌시스 EJ904277^T와 94.3%, 락토바실러스 센마이주케이 AB297927^T와 94.0%, 락토바실러스 함메시 AJ632219^T와 94.7%의 상동성을 가짐이 판명되었다. 이에 본 발명자는 상기 수득된 신규한 균주를 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주로 명명하고, 2012년 7월 31일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 수탁번호 KACC 91723P로 기탁하였다.

[0029]

상기 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)는 그람 염색 양성, 운동성, 카탈라아제 음성, 조건적 혐기성, 비포자생성, 활동운동의 간균(넓이 1.2~2.0 μm 및 길이 3.0~4.9 μm)으로, 15~42℃(바람직하게는 37℃), pH 3.0~7.0(바람직하게는 pH 7.0)에서 생존할 수 있으며, 플렉시루빈(Flexirubin)형 색소 생성, 카탈라아제 음성 및 산화효소 부정 그리고 에스쿨린, 젤라틴, 전분 티로신, 우레아 및 트윈80 분해 활성을 가진다. 또한 상기 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)는 D-젖산과 L-젖산을 65:35(v/v) 비율로 생성한다.

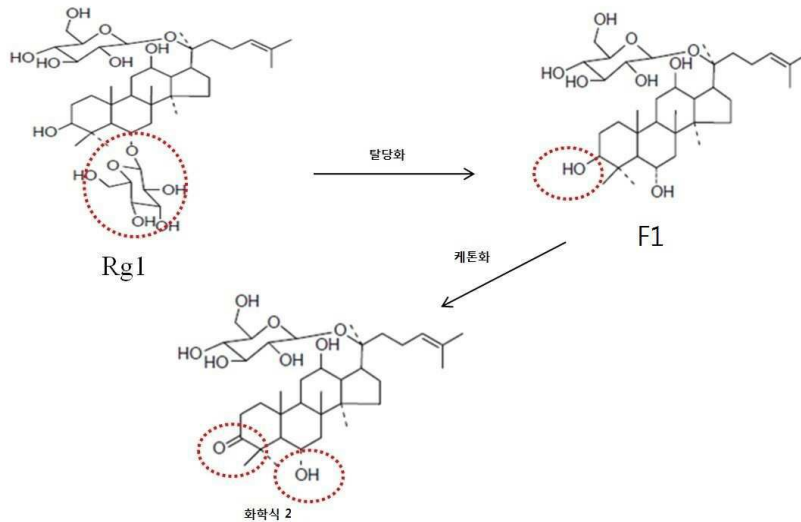
[0030]

상기 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)는 발명 전반에 걸쳐 균주 자체로 이용될 수도 있고, 그 배양물의 형태로 이용될 수도 있다. 상기 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)는 저온 인삼 자연 발효액으로부터 분리한 유산균으로 생균을 섭취하더라도 안전하다.

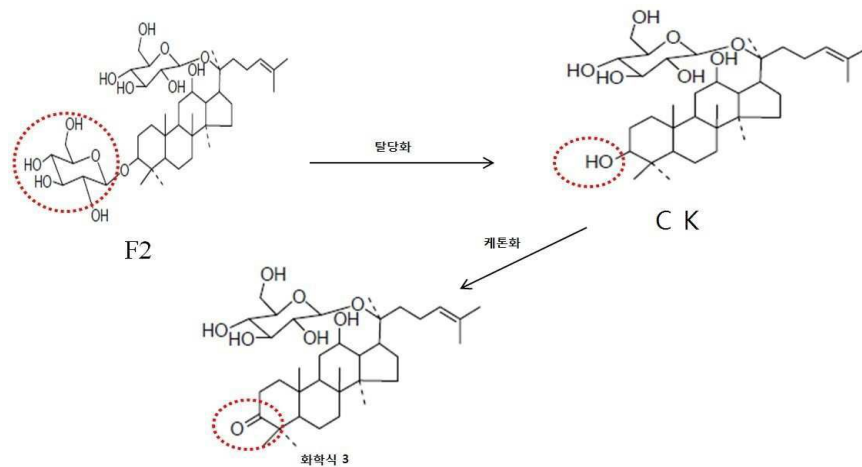
- [0031] 상기 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)의 배양은 당업계에서 알려진 적당한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 세포의 성장방식에 따라 구분되는 현탁배양과 배양방법에 따라 회분식, 유가식, 연속배양식 등의 방법을 사용하여 배양할 수 있다. 상기 배양물은 액체배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 균주를 제거한 여액(원심분리한 상등액) 등을 포함할 수 있다. 상기 배양 조성물 내 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65의 함량은 조성물의 용도 및 제형에 따라 달라질 수 있다.
- [0032] 상기 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하기 위한 배지는 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)가 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택 배지를 모두 포함하는 개념이다.
- [0033] 구체적으로, 상기 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)의 배양 배지로는 펩톤 1.0중량%, 달걀 추출물 0.8중량%, 효모추출물 0.4중량%, 글루코오스 2.0중량%, 아세트산 나트륨-3수화물 0.5중량%, 폴리소르베이트 80 0.1중량%, 디포타슘 하이드로젠 포스페이트 0.2중량%, 트리암모늄 시트레이트 0.2중량%, 황산마그네슘 7수화물 0.02중량%, 황산마그네슘 4수화물 0.005중량% 및 아가 1.0중량%를 포함하는 MRS-agar 배지에 진세노사이드를 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 진세노사이드가 첨가된 배지에는 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양한다.
- [0035] 상기 진세노사이드는 통상의 진세노사이드라면 그 종류에 제한없이 사용될 수 있음은 물론이며, 상기 진세노사이드는 인삼 식물체에서 추출될 수도 있고, 당업계에 공지된 방법에 따라 합성하여 사용할 수도 있으며, 상업적으로 시판되는 것을 사용할 수도 있다. 또한 진세노사이드는 인삼 추출물에서 수득할 수 있다. 이 때 사용되는 인삼의 종류는 특별히 제한되지 않고, 수삼, 홍삼, 백삼, 태극삼, 미삼 등을 사용할 수 있다. 또한 상기 인삼 추출물은 인삼으로부터 침출, 전출하여 얻은 침출액 뿐 아니라 침출액을 다시 일부 또는 전부 농축하여 얻은 농축물 또는 상기의 농축물을 다시 건조시켜 제조한 침체, 전제, 정기, 유동 액기스 중에 함유되어 주 효과를 발휘하는 화학 물질은 물론 식물 그 자체를 모두 포함하며, 줄기, 뿌리, 잎, 꽃, 열매 등 인삼의 모든 부분으로부터의 추출물이 사용가능하고 어느 특정 부분의 추출물로 한정되지 않는다. 또한 인삼 추출물로부터 진세노사이드를 추출하는 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.
- [0036] 구체적으로, 상기 진세노사이드는 Rb1, Rd, F1, Fe, Rg1, F2, 화합물 K(CK), Rg3, Re, Rh1, Rh2, Rg5, Rk1, PPD 등을 사용할 수 있으며, 특히 Rb1, Rd, F1, Fe, Rg1, F2, 화합물 K(CK) 및 PPD를 사용하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 F1, Rg1, F2, 화합물 K(CK)를 사용하는 것이다.
- [0037] 상기와 같이 진세노사이드가 첨가된 배지에 배양된 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)는 케톤화 생성과 관련된 효소를 생성하여 진세노사이드에 결합된 특이적인 당 위치에서 진세노사이드의 케톤화를 일으킨다. 이때, 진세노사이드의 케톤화는 특이적인 위치의 당 부분에서 일어나게 되는데, 이를 위하여 진세노사이드의 케톤화에 앞서 진세노사이드의 탈당화가 이루어질 수도 있다. 특히, 진세노사이드로 PPD를 사용할 경우 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 생성된 유산균 내효소에 의해 PPD 아글리콘(aglycon)을 케톤화할 수 있다.
- [0038] 즉, 진세노사이드에 존재하는 당이 다수일 경우 케톤화를 발생시키기 위한 당 위치 이외에서는 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 발생한 베타 글루코시다아제(β -glucosidase)에 의해 탈당화가 이루어지며, 이러한 탈당화 이후에 특이적인 당 위치에서 케톤화가 이루어져 본 발명에서 목적하는 케톤화된 진세노사이드 유도체를 얻을 수 있다. 또한, 진세노사이드에 존재하는 당의 케톤화를 발생시키기 위한 특이적인 위치에만 존재하는 경우에는 별도의 탈당화 없이 케톤화가 진행된다.
- [0039] 상기와 같이 진세노사이드의 케톤화만으로 진세노사이드 유도체를 제조할 수 있는 진세노사이드는 특이적인 위치에 1개의 당이 부착된 구조의 진세노사이드로, 예를 들어 F1, 화합물 K(CK), Rh1, Rh2 등이 있다.
- [0040] 또한, 진세노사이드를 탈당화한 후 케톤화하여 진세노사이드 유도체를 제조할 수 있는 진세노사이드로는 2개 이상의 당이 부착된 구조의 진세노사이드로, 예를 들어 Rg1, F2, Rf, Rb3 등이 있다. 뿐만아니라 당이 하나포함된 진세노사이드에 케톤화가 일어나고 다시 당분자가 떨어져나간 물질 즉 PPD 의 케톤화 된 물질도 포함된다.
- [0041] 본 발명의 일실시예에 따른 진세노사이드가 첨가된 배지에 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC

91723P)를 배양하여 탈당화, 케톤화를 통해 진세노사이드 유도체를 제조하는 방법은 대표적으로 하기 반응식 1 또는 반응식 2로 나타낼 수 있다. 이하 반응식 1 및 2에서는 본 발명의 구체적인 일례로서 진세노사이드 Rg1, F1, F2, 화합물 K(CK)를 첨가한 배지를 사용한 경우를 예를 들어 설명하나, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[반응식 1]



[반응식 2]



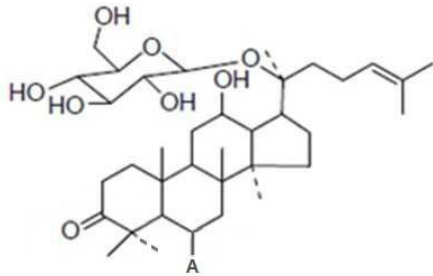
상기 반응식 1을 참조하여 설명하면, 반응식 1의 진세노사이드 Rg1은 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 C-6번에서 탈당화가 진행되고(진세노사이드 F1), 탈당화된 진세노사이드(즉, 진세노사이드 F1)는 이후 C-3번에서 케톤화를 형성하여 화학식 2의 진세노사이드 유도체를 얻게 된다. 또한, 진세노사이드 F1의 경우에는 탈당화 없이 C-3번에서의 케톤화만으로 화학식 2의 진세노사이드 유도체를 얻을 수 있다.

또한 반응식 2는 진세노사이드 F2가 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 진세노사이드 Rg1의 C-3번에서 탈당화가 진행되고(진세노사이드 화합물 K(CK)), 상기 탈당화된 진세노사이드(즉, 진세노사이드 화합물 K)의 C-3번에서 케톤화를 형성하여 화학식 3의 진세노사이드 유도체를 얻게 된다. 또한, 진세노사이드 화합물 K의 경우에는 탈당화 없이 C-3번에서의 케톤화만으로 화학식 3의 진세노사이드 유도체를 얻을 수 있다.

즉, 본 발명에서는 진세노사이드의 당 개수에 따라 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 케톤화, 또는 탈당화 후 케톤화를 통하여 목적하는 진세노사이드 유도체를 얻을 있게 되는 것이다.

[0049] 상기와 같은 과정을 거쳐 제조된 본 발명의 진세노사이드 유도체는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[0050] [화학식 1]



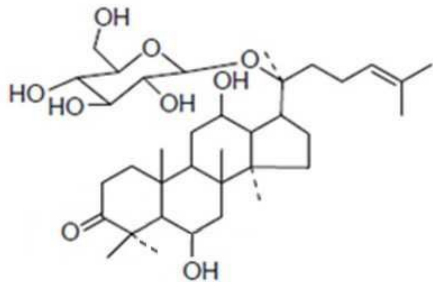
[0051]

[0052] 상기 화학식 1에서,

[0053] A는 H, OH, glucose, glucose-glucose 또는 glucose-rhamnose이다.

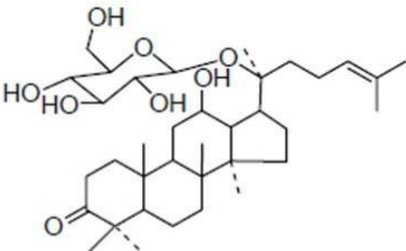
[0054] 특히, 본 발명의 진세노사이드 유도체는 하기 화학식 2로 표시되는 6 α ,12 β -디하이드록시다마르-3-온-20(S)-O- β -D-글루코피라노사이드(6 α ,12 β -dihydroxydammar-3-one-20(S)-O- β -D-glucopyranoside) 또는 화학식 3으로 표시되는 12 β -하이드록시다마르-3-온-3-20(S)-O- β -D-글루코피라노사이드(12 β -dihydroxydammar-3-one-20(S)-O- β -D-glucopyranoside)인 것이 바람직하다.

[0055] [화학식 2]



[0056]

[0057] [화학식 3]



[0058]

[0059] 상기와 같이 저온 인삼 자연발효액으로부터 분리한 신균주인 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 케톤화된 본 발명의 진세노사이드 유도체는 항산화 활성이 우수하고, 진세노사이드 자체일 경우 가지는 독성까지도 현격히 저하시켜 세포독성이 없어 안정하게 사용될 수 있다.

[0060] 또한 본 발명은 상기와 같이 제조된 화학식 1의 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0061] 상기 진세노사이드 유도체는 티로시나아제 활성을 저해하고 멜라닌 생성을 억제함으로써 우수한 미백 효과를 가지는 화장품 조성물로 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 진세노사이드 유도체는 콜라겐 분해효소의 발현을 저해하여 주름개선, 피부손상 억제 및 항피부노화용 화장품 조성물로도 사용될 수 있다.

[0062] 상기 진세노사이드 유도체는 화장품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 20중량%로 포함되는 것이 바람직하며,

더욱 바람직하게는 0.1 내지 10중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 미백 및 주름개선, 피부손상 억제 및 항피부노화 효과가 미미할 수 있으며, 20중량%를 초과할 경우에는 사용량 대비 미미할 수 있다.

[0063] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 진세노사이드 유도체를 그대로 사용할 수도 있고 필요에 따라 희석하여 사용할 수도 있다. 또한 상기 화장료 조성물에는 진세노사이드 유도체 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 사용되는 성분들을 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체가 포함될 수 있다.

[0064] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 영양 크림, 수렴 화장수, 유연 화장수, 로션, 에센스, 영양젤 또는 마사지 크림의 제형으로 제조될 수 있다.

[0065] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 첨가될 수 있다.

[0066] 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 추진제를 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예를 들어 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0068] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 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.

[0069] 본 발명의 제형이 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 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.

[0070] 또한 본 발명은 상기 화학식 1의 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 약학 조성물을 제공한다.

[0071] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 예를 들면, 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골순, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다.

[0072] 이와 같은 임상 투여를 위해 본 발명의 약학 조성물은 공지의 기술을 이용하여 경구투여, 비경구 투여용, 주사용 등의 적합한 제형으로 제제화 할 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 제제화에 필요한 통상의 성분들과 혼합되어 섭취형 정제, 흡수 정제, 트로키제(troches), 로진지(lozenge), 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 엘릭시르(elixirs), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 이때, 정제, 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해 락토오스, 사카로오스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제; 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유 등을 혼합할 수도 있다. 캡슐 제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 혼합할 수도 있다.

[0073] 또한, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 흉부내 주사 주입방식과 점막, 또는 국소에

적용되는데, 분산제, 좌제, 분제, 에어로졸(비강 스프레이 또는 흡입제), 겔, 현탁액제(수성, 또는 비수성 액상 현탁액, 수중유 에멀전 또는 유중수 에멀전), 용액제 등 비경구 투여에 적합한 액상 투여 형태 등에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제화 할 수 있다.

[0074] 상기와 같은 본 발명의 약학 조성물의 유효투입량은 환자의 연령, 신체적 조건, 몸무게 등의 상태를 고려하여 임상 의 판단에 따라 필요한 범위로 조절될 수 있다. 일반적으로, 상기 약학 조성물의 유효투입량은 성인 환자 체중 1kg 당 1 내지 20mg/일이고, 바람직하기로는 5 내지 10mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간 간격으로 1일 수회, 바람직하기로는 하루 2회 내지 5회 분할 투여될 수 있다.

[0075] 또한 본 발명은 상기 화학식 1의 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0076] 상기 식품의 종류는 한정되는 것은 아니나, 예를 들어 통상적인 기호성 식품 즉, 라면, 생면 등의 면류, 두부, 시리얼, 빵류, 휴잉 껌, 사탕, 과자류 등에 첨가하여 통상적으로 알려진 방법에 의하여 각종 식품으로 제조할 수 있고, 식용가능한 색소로서 적용할 수도 있다. 또한, 정제, 과립제, 환제, 경질캡셀제, 연질캡셀제 또는 액제 제형 등 일반적인 제형으로 제형화 될 수 있으며, 생즙, 파우치, 음료, 또는 다류 등으로 제조될 수도 있다. 상기한 성분 이외에 다른 성분은 제형에 따라 당업자가 적절하게 선택하여 배합할 수 있음은 물론이다.

[0077] 또한, 본 발명의 식품 조성물에 포함되는 진세노사이드 유도체는 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 효과적으로 방지할 수도 있어 통상의 각종 식품류에 배합함으로써 이들 식품류를 보존하거나 식품의 신선도 및 품질을 장기간에 걸쳐 유지하기 위해 사용할 수도 있다.

[0078] 상기 식품류로는 전형적인 식품뿐만 아니라, 음료(알콜성 음료도 포함함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용 식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소오스 등) 등을 포함함은 물론이다.

[0079] 또한 본 발명은 케톤화된 사포닌 생성능을 가지는 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 제공한다.

[0080] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이나. 이들 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것으로 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0081] 이하 하기 실시예들에서 사용되는 MRS-agar 배지는 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevi*s) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하기 위한 배지로는 펩톤 1.0중량%, 달걀 추출물 0.8중량%, 효모추출물 0.4중량%, 글루코오스 2.0중량%, 아세트산 나트륨-3수화물 0.5중량%, 폴리소르베이트 80 0.1중량%, 디포타슘 하이드로젠 포스페이트 0.2중량%, 트리암모니움 시트레이트 0.2중량%, 황산마그네슘 7수화물 0.02중량%, 황산마그네슘 4수화물 0.005중량% 및 아가 1.0중량%를 포함하도록 준비하였다.

[0082] 실시예 1. 화학식 2의 진세노사이드 유도체 제조

[0083] (1)균주 분리

[0084] 저온 인삼 자연발효액을 수집하여 멸균된 튜브에 넣은 시료를 멸균수로 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 의 농도로 희석하고 MRS agar plate에 100 μ l씩 도말한 후 30℃에서 24시간 동안 배양하여 유산균을 분리하였다. 배지 상에 나타난 서로 다른 색상, 형태를 가진 균주들을 1차로 선별한 후 2~3회의 계대배양을 거쳐 단일 균주로 확인된 균주 6종을 선별하였다.

[0085] 상기 선별된 6종의 균주를 MRS 배지를 사용하여 30℃, 190 rpm에서 현탁 배양하였다. MRS broth에서 O.D₆₀₀ 값이 1.0이 되도록 배양한 후 1mM 진세노사이드 Rb1, Rg1, F1과 각각 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하고 30℃, 190rpm에서 72시간 동안 각각 반응시켰다. 동량의 수포화부탄올로 추출하고 TLC plate에 점적하여 진세노사이드 패턴의 변화를 확인하여 균주를 선별하였다.

[0086] 상기 저온 인삼 자연발효액으로부터 분리한 균주의 16S rRNA 염기서열은 Phred/Phrap program을 사용하는 Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer의 Big Dye terminator 방식으로 분석하였다.

[0087] 상기 저온 인삼 자연발효액으로부터 분리한 균주의 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 공시 균주인 락토바실러스 브레비스 14687^T와 95.9%, 락토바실러스 파낙시브레비스 AM158249^T와 94.3%, 락토바실러스 코렌시스 EJ904277^T와 94.3%, 락토바실러스 셀마이주케이 AB297927^T와 94.0%, 락토바실러스 함메시 AJ632219^T와 94.7%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다.

[0088] (2)진세노사이드 분리

[0089] 진세노사이드 Rg1, F2, F1, 화합물 K, Rb1, Rd 및 Re를 분리하기 위하여 실리카 겔 60 컬럼을 사용하여 인삼 잎 사포닌과 농축액으로부터 사포닌을 분리하였다. 사포닌을 메탄올에 녹인 후 다시 실리카 겔 60 컬럼을 이용하여 다시 순수분리하였다. 그 다음 TLC 분석을 통하여 단일 진세노사이드가 함유된 분획들은 모아 감압농축하고 잔여물은 실리카 겔 60 컬럼(Φ5×50cm)에 다시 흡착시켜 CHCl₃/MeOH(15:1~9:1, v/v)인 혼합용매를 이동상으로 순수하게 분리된 분액만 감압농축하여 반응기질로 사용하였다.

[0090] (3)진세노사이드 유도체 제조

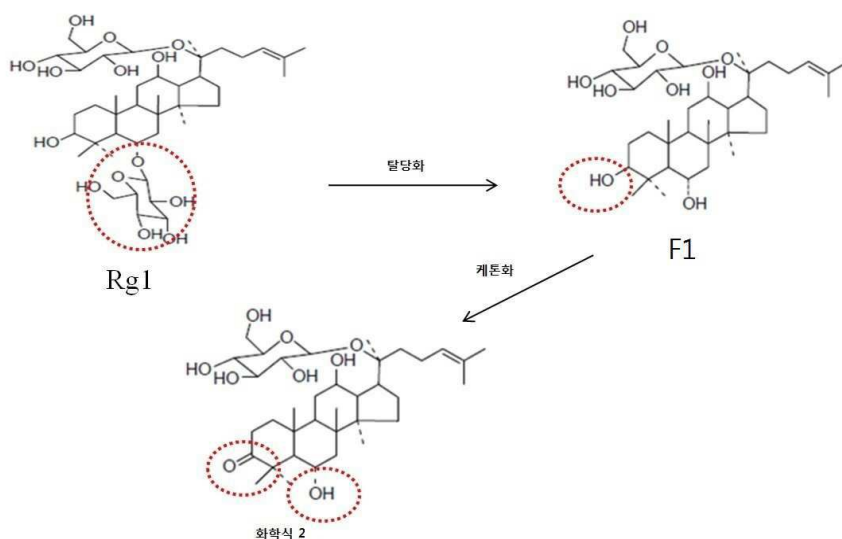
[0091] 락토바실러스 파낙시브레비스(*Lactobacillus panaxibrevis*) DCY 65 균주(KACC 91723P)를 전술한 바와 같은 MRS-agar 배지를 사용하여 30℃, 190rpm에서 현탁배양하였다. 세포 내외 효소를 얻고자 균배양액은 4℃에서 15,000×g로 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 균주의 세포를 1M 인산염 완충액(pH 6.8)에 녹여서 5분간 초음파 분해한 후 원심분리하여 세포 내 효소를 분리하였다. 상층액은 4배의 냉각 에탄올을 첨가하여 충분히 혼합시킨 후 0℃에서 40분간 방치하여 단백질을 침전시켰다. 이 용액은 4℃에서 10,000×g로 40분간 원심분리한 후 상등액은 버리고 침전물은 인산염 완충액(pH 6.8)에 용해시켜 조 효소액으로 사용하였다.

[0092] 상기 제조한 조효소액은 1mM 진세노사이드 Rg1과 1:1(v/v)의 비율로 혼합하고 30℃, 190rpm에서 72시간 동안 반응시켰다. 반응과정 중 24시간 간격으로 반응 혼합물을 1.5ml씩 취하여 동량의 수포화부탄올로 추출하고 TLC plate에 점적하여 전환여부를 확인하였다. 점적한 TLC plate를 CHCl₃/MeOH/H₂O(65:35:10, v/v/v, 하층) 혼합용매로 5.5cm가 되도록 전개한 후 10% H₂SO₄를 분무하여 가열을 통해 발색시켜 확인하였다.

[0093] 진세노사이드 Rg1이 첨가된 배지에서 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하여 얻어진 진세노사이드 유도체를 ¹H NMR 및 ¹³C NMR 스펙트럼을 이용하여 구조를 분석하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0094] 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 얻어진 진세노사이드 유도체는 화학식 2의 6α,12β-디하이드록시다마르-3-온-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드(6α,12β-dihydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside)로, 진세노사이드 Rg1의 C-6번의 위치에서 탈당화된 후(F1), C-3번 위치에서 케톤화하여 얻어진 화합물임을 확인할 수 있었다.

[0095] [반응식 1]



[0096]

[0097]

백색 분말(MeOH); IR_{max}: 3250, 2965, 1702, 1380, 1029cm⁻¹ positive FAB/MS, *m/z* 637 [M+H]⁺ ¹H-NMR(400 MHz, pyridine-*d*₅, δ_H) 5.26 (1H, dd, *J*=6.0, 6.4 Hz H-24), 5.16 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1'), 4.47 (1H, dd, *J*=12.0, 1.2 Hz, H-6' a), 4.29 (1H, dd, *J*=12.0, 5.2 Hz, H-6' b), 4.18 (2H, m, H-3', 4'), 3.09 (1H, dd, *J*=8.0, 8.0 Hz, H-2'), 3.90 (1H, m, H-5'), 1.66 (3H, s, H-28), 1.63 (3H, s, H-21), 1.61 (3H, s, H-29), 1.59 (6H, s, H-26, 27), 1.01 (3H, s, H-18), 0.97 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, s, H-30); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅, δ_C) 218.5 (C-3), 131.0 (C-25), 125.9 (C-24), 98.2 (C-1'), 83.3 (C-20), 79.3 (C-3'), 78.2 (C-5'), 75.1 (C-2'), 71.8 (C-4'), 70.9 (C-12), 66.8 (C-6), 63.0 (C-6'), 59.1 (C-5), 51.6 (C-17), 51.3 (C-14), 49.8 (C-9), 49.1 (C-13), 47.7 (C-4), 47.4 (C-7), 41.1 (C-8), 39.3 (C-10), 39.3 (C-1), 36.0 (C-22), 33.3 (C-2), 31.9 (C-21), 30.8 (C-11), 30.7 (C-15), 26.5 (C-16), 25.6 (C-26), 23.15 (C-23), 22.3 (C-21), 17.8 (C-27), 17.8 (C-30), 17.7 (C-19), 17.3 (C-18), 16.3 (C-29).

[0098]

실시예 2. 화학식 3의 진세노사이드 유도체 제조

[0099]

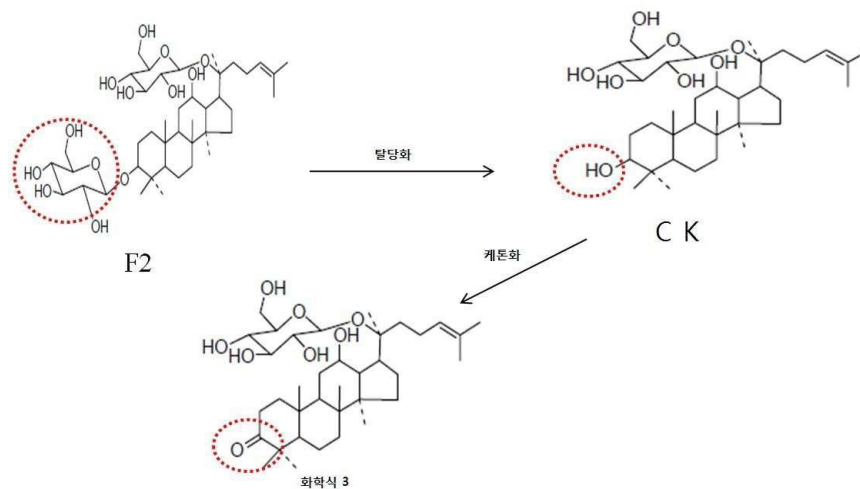
상기 실시예 1에서 진세노사이드 유도체 제조 시 진세노사이드 Rg1을 대신하여 진세노사이드 F2가 첨가된 배지를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일하게 실시하였으며, HPLC 및 ¹H NMR 및 ¹³C NMR 스펙트럼을 이용한 분석결과 도 2에 나타내었다.

[0100]

도 2에 나타낸 바와 같이, 진세노사이드 F2가 첨가된 배지에서 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)를 배양하여 얻어진 화합물은 하기 반응식 2와 같이 진세노사이드 F2의 C-3번의 당을 끊어 탈당화한 후, C-3번에 케톤화한 화학식 3의 12β-하이드록시다마르-3-온-3-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드(12β-dihydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside)임을 확인할 수 있었다.

[0101]

[반응식 2]



[0102]

[0103]

실시예 3~7

[0104]

상기 실시예 1에서 하기 표 1과 같이 진세노사이드를 달리 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 실시하였다.

표 1

[0105]

구분	진세노사이드	생성물질
실시예 1	Rg1	6α, 12β-디하이드록시다마르-3-온-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드
실시예 2	F2	12β-하이드록시다마르-3-온-3-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드
실시예 3	F1	6α, 12β-디하이드록시다마르-3-온-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드
실시예 4	화합물 K	12β-하이드록시다마르-3-온-3-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드
실시예 5	Rb1	-

실시예 6	Rd	-
실시예 7	Re	-

[0106]

실험예 1. 티로시나아제 저해 활성

[0107]

티로시나아제 효소는 버섯류(Mushroom)로부터 추출된 것으로 시그마(SIGMA)사의 것을 사용하였다. 먼저 기질인 티로신을 증류수에 용해시켜 0.3mg/ml의 용액으로 만들고 그 용액을 1.0ml씩 시험관에 넣은 다음, 여기에 포타슘-포스페이트 완충용액(0.1mol 농도, pH 6.8) 1.0ml 및 증류수 0.7ml를 첨가하였다.

[0108]

상기 실시예 1에서 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)를 이용하여 진세노사이드 Rg1을 탈당화한 중간체와(F1), 상기 탈당화된 중간체를 케톤화하여 제조한 진세노사이드 유도체(화학식 2)를 각각 에탄올 용액에 적당한 농도로 혼합하고, 이 혼합액을 각각 5, 3.75, 2.5, 1.25mg/ml로 반응액에 넣은 다음, 37℃ 항온조에서 10분 동안 반응시켰다. 이때 대조군은 각 시료액 대신 용매만을 넣은 것으로 준비하였다. 이 반응액에 2,500유닛/ml의 티로시나아제 용액 0.1ml씩을 넣고 다시 37℃ 항온조에서 10분 동안 반응시켰다. 이 반응액이 든 시험관을 얼음물속에 넣어서 급냉시켜 반응을 중지시키고 광전분광분석계로 파장 475nm에서의 흡광도를 측정하였다. 저해율은 아래와 같이 계산하고, 티로시나아제 활성을 50% 저해하는 농도를 구하여 이를 IC₅₀ 값으로 하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0109]

[수학식 1]

$$\text{티로시나아제 저해율(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{시험물질의 반응흡광도}}{\text{대조군의 반응흡광도}} \times 100 \right)$$

[0110]

[0111]

도 3에 도시한 바와 같이, 실시예 1에서 진세노사이드 Rg1이 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 탈당화된 중간체(F1)와, 탈당화된 중간체를 케톤화하여 얻어진 화학식 2의 진세노사이드 유도체는 티로시나아제 저해율이 높게 나타났으며, 이같은 결과는 공지된 티로시나아제 저해제인 아스코르브산(52%)보다 훨씬 높은 결과로, 본 발명에 따른 진세노사이드 유도체는 매우 우수한 미백 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0112]

실험예 2. 세포생존율 측정(MTT법)

[0113]

본 발명의 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)를 이용하여 진세노사이드 Rg1을 탈당화한 중간체와(F1), 상기 탈당화된 중간체를 케톤화하여 제조한 진세노사이드 유도체(화학식 2)의 사람피부세포에 대한 세포 생존율을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0114]

1. 세포 배양

[0115]

본 실험에 사용한 사람 진피의 섬유아 세포주인 HDF(Human dermal fibroblast)는 (주)영사이언스(MCTT, Modern Cell & Tissue Technologies)로부터 분양받았다. 세포배양은 HDF를 T-75 세포배양 플라스크에 배지와 세포를 넣어준 뒤, 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 배양하고, 현미경과 혈구계(hematocytometer)를 이용하여 세포 배양 상태와 세포 수를 측정하였다. 세포에 영양분을 공급해주는 배지로는 DMEM(dulbecco's modified eagles's medium)에 10% 열 불활성화된 FBS(Hyclone)와 1% 항생제(penicillin-streptomycin)(Hyclone)가 첨가된 배지를 제조하여 세포 배양액으로 사용하였다. 모든 실험에 사용되는 HDF의 계대(passage)는 6~10을 넘기지 않았다.

[0116]

2. 세포 생존율 측정

[0117]

세포 생존율 측정은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 방법을 사용하였고, 대조군과 상대적인 %를 측정하였다. HDF를 96-웰 플레이트에 세포수가 웰당 2×10^4 이 되도록 옮겨준 후, 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 실시예 1에서 진세노사이드 Rg1을 탈당화한 중간체와(F1), 상기 탈당화된 중간체를 케톤화하여 제조한 진세노사이드 유도체(화학식 2)를 FBS와 1% 항생제가 함유된 DMEM에 첨가하여 (1/2)¹⁷까지 연속 희석법으로 처리하여 시료용액을 제조하였다. 24시간 후 배양중인 배지를 제거한 뒤 F1 및 진세노사이드 유도체 용액을 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10mg/ml씩 가해준 뒤, 24시간 동안 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 시료용액 처리 24시간 후 세포에 MTT 용액(5 mg/ml)을 가하여 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT 용액을 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide) 용액을 200μl씩 가하여 블루 포마잔(blue formazan)을 용해시킨 뒤 ELISA 판독기를 사용하여 570 nm에서 대조군과 각 시료들의 흡광

도 값을 측정하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0118] 도 4에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 진세노사이드 Rg1이 락토바실러스 파낙시브레비스 DCY 65 균주(KACC 91723P)에 의해 탈당화된 중간체(F1)와, 탈당화된 중간체를 케톤화하여 얻어진 화학식 2의 진세노사이드 유도체는 0.1mg/ml의 농도에서도 거의 세포독성을 나타내지 않아 세포 생존율이 거의 100%에 달함을 확인할 수 있었다.

[0119] 실험예 3. MMP-1 발현 저해 활성

[0120] 유아 포경에서 절제된 피부 진피층에서 분리 및 배양하여 수득한 인간 정상 피부섬유아세포(Human normal dermal fibroblast)를 6웰 플레이트(6-well plate)의 각 웰(well)에 18×10^5 개수의 세포가 되도록 접종한 후 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 인산염 완충액(Phosphate buffered saline, PBS)을 이용하여 세포를 3회 수세한 다음 피부노화를 유발하기 위하여 자외선을 조사하였다. 이때, 자외선은 자외선 A 램프(Sankyo Denki FL8BL lamp, Sankyo Denki Co., Japan)를 이용하여 1초당 27mW/cm²의 에너지 양으로 총 50mJ/cm²를 조사하였다. 자외선 조사 직후, 세포를 다시 인산염 완충액으로 수세하고 우태아 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지에 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체(화학식 2)를 0.1, 0.2, 0.5, 1mg/ml의 농도로 첨가하여 24시간 더 배양하였다. 실험 그룹은 무처리군(control, 자외선 및 진세노사이드를 모두 처리하지 않음), 자외선 단독 처리군(UVA, 자외선만을 처리), 대조군(자외선 및 EGCG 처리), 실험군(자외선 및 진세노사이드 유도체 모두 처리)으로 나누었다.

[0121] 축합형 탄닌 유도체이며 녹차 카테킨의 주 구성성분인 EGCG(epigallocatechin-3 gallate)의 MMP-1 발현 억제에 국내특허에 보고되어 있으므로 이를 대조군으로 이용하였다. 배양 후 피부노화 여부를 확인하기 위하여 피부 세포간 기질 구성성분인 타입 I 프로콜라겐(type I procollagen)의 분해효소인 MMP-1의 발현정도를 MMP-1 ELISA 키트(MMP-1 human, ELISA system, Biotrak Assay, Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. MMP-1의 농도는 총 세포배양액 1ml 당 단백질 mg으로 나타내었다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0122] 도 5에 나타난 바와 같이, 인간 정상 피부섬유아세포에 자외선을 조사하는 경우(자외선 단독 처리군) MMP-1의 발현은 증가됨을 확인할 수 있었다. 그리고 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체(화학식 2)를 처리한 경우 MMP-1의 발현 감소가 농도 의존적으로 나타남을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명에 따른 실시예 1의 진세노사이드 유도체의 효과가 이미 보고된 EGCG의 mmp-1 발현 저해 효과보다 우수하게 나타남을 확인할 수 있었다.

[0123] 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 실시예 1의 진세노사이드 유도체는 자외선 조사에 의해 증가된 MMP-1의 발현을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

[0124] 제조예 1. 크림 제조

[0125] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 1.0중량%, 아세트 에시드 2.2중량%, 벤토나이트 2.8중량%, 부틸렌 글리콜 4.0중량%, 페녹시 에탄올 3.0중량%, 트리에탄올아민 2.0중량%, 메틸파라벤 1.5중량%, 에틸파라벤 1.2중량%, 부틸파라벤 1.2중량%, 에칠파라벤 1.1중량%, 이소부틸파라벤 1.0중량%, 프로필파라벤 1.0중량% 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법에 따라 크림을 제조하였다.

[0126] 제조예 2. 팩 제조

[0127] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 0.5중량%, 에틸알코올 3.0중량%, EDTA-2Na 0.05중량%, 프로필렌 글리콜 5.0중량%, 글리세린 4.5중량%, 카보폴 1.5중량%, 폴리옥사이드 0.2중량%, 미량의 향과 방부제 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법에 따라 팩을 제조하였다.

[0128] 제조예 3. 연고제 제조

[0129] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 2.0중량%, 밀납 10중량%, 폴리솔베이트 60 5.0중량%, 피이지 60 경화피마자유 2.0중량%, 솔비탄세스퀴올레이트 0.5중량%, 유동파라핀 10.0중량% 및 잔량의 바셀린을 혼합하여 통상의 방법에 따라 연고제를 제조하였다.

[0130] 제조예 4. 산제 제조

[0131] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 5.0중량%, 글루코사민염 20.0중량%, 콘드로이친황산 14중량%, 콜라겐 10중량%, 비타민C 1.0중량%, 비타민A 0.1중량% 및 비타민E 0.1중량%를 혼합하여 통상의 방법에 따라 산

제를 제조하였다.

[0132] 제조예 5. 액제 제조

[0133] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 5.0중량%, 글루코사민염 25.0중량%, 콘드로이친황산 20.0중량%, 콜라겐 10.0중량%, 비타민C 5중량%, 비타민A 0.5중량%, 비타민E 0.5중량%, 아스파탐 1중량% 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법으로 액제를 제조하였다.

[0134] 제조예 6. 음료 제조

[0135] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 2.0중량%, 이성화당 15.33중량%, 구연산 0.1중량%, 비타민C 0.04중량%, 향료 0.1중량%, 상기 실시예 2의 조성물 15.0중량% 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 음료 제조 방법에 따라 기능성음료를 제조하였다.

[0136] 제조예 7. 스킨로션

[0137] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 0.5중량%, 녹나무 오일 2.5중량%, 1,3-부틸렌글리콜 5.2중량%, 올레일알코올 1.5중량%, 에탄올 3.2중량%, 폴리솔베이트 20 3.2중량%, 벤조페논-9 2.0중량%, 카르복실비닐폴리머 1.0중량%, 글리세린 3.5중량%, 미량의 향과 방부제 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법에 따라 스킨로션을 제조하였다.

[0138] 제조예 8. 밀크로션(영양로션)

[0139] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 1.0중량%, 세토스테아릴 알코올 1.0중량%, 글리세릴모노스테아레이트 0.8중량%, 소르비탄모노스테아레이트 0.3중량%, 포로필파라벤 0.1중량%, 폴리솔베이트 60 1.0중량%, 미네랄오일 5.0중량%, 사이크로메티콘 3.0중량%, 디메티콘 0.5중량%, 알란토인 0.1중량%, 글리세린 5.0중량%, 알코올 2중량%, 프로필렌글리콜 3.0중량%, 미량의 향과 방부제 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법에 따라 밀크로션(영양로션)을 제조하였다.

[0140] 제조예 9. 에센스

[0141] 상기 실시예 1에서 제조한 진세노사이드 유도체 0.5중량%, 1,3-부틸렌글리콜 4.0중량%, 글리세린 10중량%, 알란토인 0.5중량%, 판테놀 0.1중량%, EDTA-2Na 0.01중량%, 에탄올 2.0중량%, 트리에탄올아민 1.5중량%, 스쿠알란 2.0중량%, 밀납 2.5중량%, 폴리솔베이트 60 3.5중량%, 카르복실비닐폴리머 1.0중량%, 솔비탄세스퀴올레이트 2.5중량%, 미량의 향과 방부제 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법에 따라 에센스를 제조하였다.

[0142] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

수탁번호

[0143]

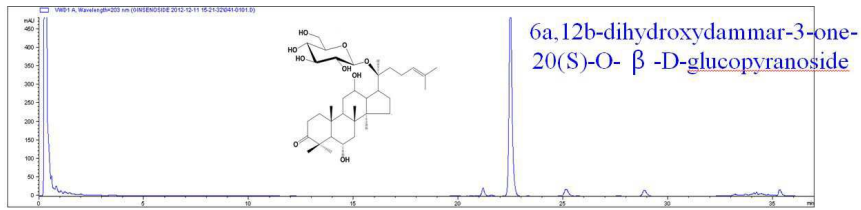
기탁기관명 : 국립농업과학원 농업유전자원센터

수탁번호 : KACC91723P

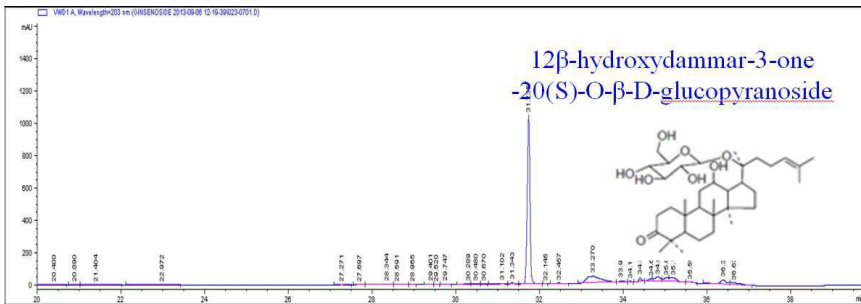
수탁일자 : 20120612

도면

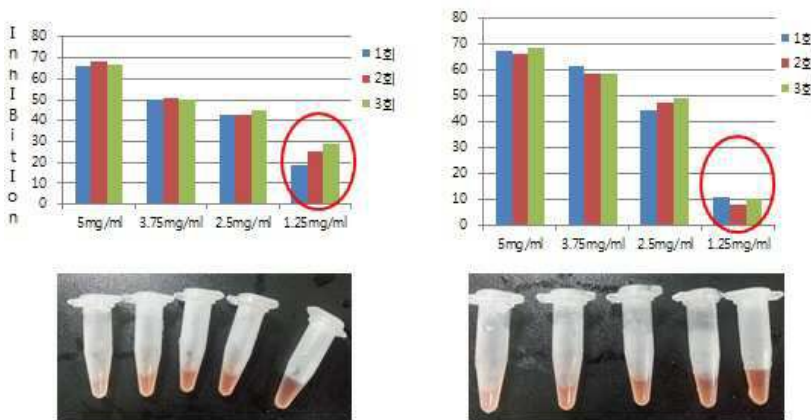
도면1



도면2



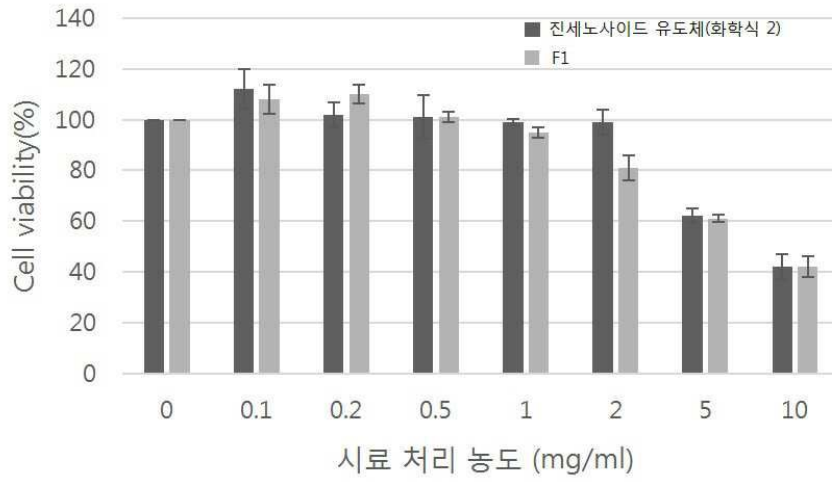
도면3



진세노사이드 유도체(화학식 2)

F1

도면4



도면5

