



등록특허 10-2741692



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월13일

(11) 등록번호 10-2741692

(24) 등록일자 2024년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/99 (2017.01) A61K 8/06 (2006.01)
A61K 8/36 (2006.01) A61K 8/67 (2006.01)
A61K 8/92 (2006.01) A61K 8/9789 (2017.01)
A61K 8/9794 (2017.01) A61K 8/98 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/99 (2013.01)
A61K 8/064 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0033876

(22) 출원일자 2024년03월11일

심사청구일자 2024년03월11일

(56) 선행기술조사문헌

KR101791088 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 토브

경상북도 경산시 삼성현로 738, 304호(유곡동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

(72) 발명자

김세현

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 서관
214호

신민재

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 서관
214호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인해안

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 윤경원

(54) 발명의 명칭 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물

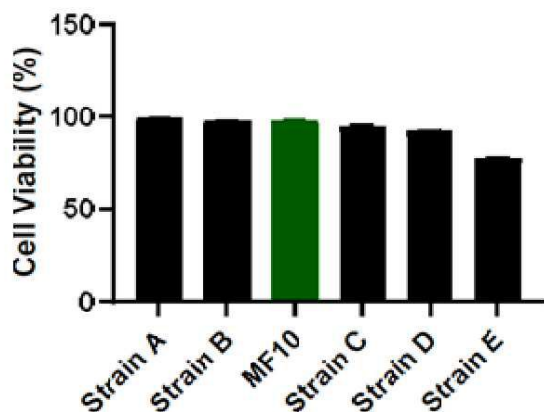
(57) 요약

본 발명은 김치유래 유산균의 일종인 락토바실러스 퍼멘텀을 포함하는 것으로 피부의 노화를 개선하며 염증을 방지할 수 있는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀 (*Lactobacillus fermentum*)을 배양하는 단계; 및 상기 배양이 완료된 이후 화장료 베이스와 혼합하는 단계를 포함하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도1

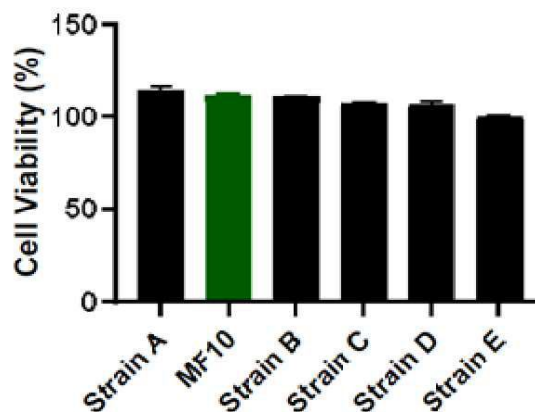
(a)

Acid Tolerance



(b)

Bile Tolerance



(52) CPC특허분류

A61K 8/361 (2013.01)
A61K 8/676 (2013.01)
A61K 8/678 (2013.01)
A61K 8/922 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 8/9794 (2017.08)
A61K 8/987 (2013.01)
A61Q 7/00 (2019.01)
A61K 2800/805 (2013.01)

(72) 발명자

장세진

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 서관
214호

김재영

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 서관
214호

천세진

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 서관
214호

이희진

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 서관
214호

김현진

서울특별시 강남구 선릉로 221, 406동 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0406002086
과제번호	B0080406002086
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술시험원
연구사업명	첨단 바이오 소재 사업화 지원
연구과제명	세포 유래 생리 활성 소재 제품화 및 양산화 지원
과제수행기관명	주식회사 토브
연구기간	2021.01.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)을 배양하는 단계; 및

상기 배양이 완료된 이후 화장료 베이스와 혼합하는 단계;

를 포함하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법에 있어서,

상기 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법은,

10~60 μ m의 크기를 가지는 해면 유래 스피쿨을 준비하는 단계;

구기자를 세척한 다음, 씨앗을 분리하는 단계;

상기 씨앗이 분리된 구기자 과육을 용기내에 장입한 다음 상기 과육 100중량부 대비 물 100~150중량부, 양배추 30~50중량부, 검은콩 50~70중량부, 상기 해면유래 스피쿨 5~20중량부 및 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 1~5중량부를 혼합하는 단계;

상기 과육이 장입된 용기를 밀봉한 다음, 25~35℃의 온도에서 20~50일간 배양하는 단계;

상기 배양이 완료된 이후 잔여물중 상기 과육, 양배추 및 콩을 제거하여 배양액 혼합물을 제조하는 단계;

상기 배양액 혼합물을 필터링 하여 배양 스피쿨과 배양액을 분리하는 단계;

상기 배양 스피쿨을 건조한 다음, 40~60℃의 온도의존성 오일에 침지하는 단계;

상기 온도의존성 오일을 필터링하고 10~30℃로 냉각하여 온도의존성 오일이 코팅된 스피쿨을 획득하는 단계;

상기 배양액을 동결 건조하여 유산균주 분말을 획득하는 단계; 및

화장료 베이스 100중량부 대비 상기 온도의존성 오일이 코팅된 스피쿨 0.1~2중량부, 상기 유산균주 분말 1~3중량부를 혼합하여 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제조하는 단계;

를 포함하며,

상기 온도의존성 오일은,

코코넛 오일을 50~60℃로 가열하는 단계;

상기 가열된 코코넛 오일 100중량부 대비, 호호바오일 20~40중량부, 포도씨 오일 5~10중량부, 올리브 오일 1~5중량부, 미리스틴산 50~80중량부, 카나우바 왁스 5~20중량부 및 비타민 E 0.1~1중량부를 혼합하여 혼합 오일을 제조하는 단계;

물 100중량부 대비 비타민 C 0.1~2중량부를 혼합하여 수용성 비타민 용액을 제조하는 단계; 및

상기 제조된 혼합오일 100중량부 대비 상기 수용성 비타민 용액 3~10중량부를 혼합한 다음 유화시켜 유중수적형 에멀전을 제조하는 단계;

를 포함하는 방법으로 제조되며,

상기 스피쿨은,

해면을 10~30중량%의 수산화나트륨 수용액에 침지한 다음, 60~80℃로 20~50분간 가열하여 단백질 성분을 분리하는 단계;

상기 단백질 성분이 분리된 다음, 물을 사용하여 2~5회 1차 세척하고 고형분을 분리하는 단계;

상기 분리된 고형분을 pH 1~5의 산에 10~15시간 동안 침지하고 초음파를 공급하여 이물질을 제거하는 단계;

상기 이물질이 제거된 고형분을 2~5회 물로 2차 세척하는 단계;

질소로 치환된 챔버에 상기 2차 세척된 고형분을 장입하고 챔버를 밀폐하는 단계;

상기 챔버 내부에 180~250℃의 수증기를 공급하며, 1.5~3기압을 30~60분간 유지하여 살균 및 이물질 제거를 수행하는 단계; 및

상기 이물질의 제거가 완료된 이후 100~150℃의 질소를 60~90분간 공급하여 고형분을 건조하는 단계;

를 포함하는 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 방법으로 제조되는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 김치유래 유산균의 일종인 락토바실러스 퍼넨텀을 포함하는 것으로 피부의 노화를 개선하며 염증을 방지할 수 있는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 의료기술의 발달로 평균수명이 연장되고 삶의 질 향상과 건강하고 아름다운 삶에 대한 욕구가 증가함에 따라 피부미용 및 건강에 대한 관심이 확대되고 있다. 이에 건강한 피부를 유지하고자 하는 목적에 따라 다양한미용 기능성 화장품이 개발되었으며, 특히 피부 주름형성 예방, 완화와 개선을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 아울러 최근 화장품의 성분이 피부진피에 도달하여 영양분을 공급하는데 한계가 있고, 식품으로 섭취하여 피부에 영양분 또는 기능성분을 공급하여 피부미용증진 효과를 나타낼 수 있다는 인식의 변화가 일어남에 따라 이너뷰티 식품소재들을 발굴하는 연구 또한 활발히 진행되고 있다.[0005] 피부는 외부환경의 자극으로부터 체내의 기관들을 보호해주며, 체온조절 등의 생체 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 이러한 피부는 노화가 진행됨에 따라 피부 탄력 감소, 피부색 변화, 피부주름 형성 등의 외형적인 변형이 함께 수반된다. 이러한 피부 노화 과정은 나이가 들어감에 따라 자연히 발생하는 내인성 노화(intrinsicaging 또는 자연노화)와 외인성 노화인 주위 환경, 특히 자외선(ultraviolet; UV)에 의한 광노화(photoaging)가 복합적으로 작용해 나타난다. 두 가지 노화 사이에는 주름이 생성되는 기전이 세부적으로 차이가 있지만 피부에서는 표피 세포의 증식이나 신진대사가 저하되며, 표피-진피 사이의 결합이 약해 조그만 자극에도 손상을 입기 쉽고, 콜라겐 합성 감소와 과도한 콜라겐 분해 효소인 MMPs(Matrix Metalloproteinases)의 발현 증가 등의 생리적 변화들이 나타나 피부가 건조해지며 표피, 진피 층의 구조적 변화로 인해 피부가 탄력성을 잃고 늘어져 보이며 점차적으로 주름이 깊어지게 된다. 이러한 피부 노화를 개선하는 다양한 방법이 사용되고 있지만, 제한적인 효과만을 가지고 있어 그 효과가 의문시 되고 있다.

[0003] 한편 유산균(lactic acid bacteria)은 기원전부터 인간이 이용하여 온 식품의 일종으로 영양적 가치뿐만 아니라 여러가지 생리적인 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 장(腸)내의 상피세포에 부착하여 병원균 증식을 억제하고, 면역세포로 하여금 면역 능력을 조절하는 물질을 생성시키며, 병원균과 경쟁하여 병원균의 증식을 억제하고, 이차적으로는 항생제 치료나 외부환경 변화에 대해 장내 세균총의 항상성을 유지하게 하는 것으로 보고되어 있다.

[0004] 최근 이러한 유산균의 새로운 적용을 위하여 피부의 노화나 염증을 개선시키는 다양한 방법이 사용되고 있다. 하지만 대부분의 유산균의 경우 장기간 외부에 노출하게 되면 사멸될 뿐만 아니라 단순히 피부에 적용하는 것만으로는 피부장벽인 각질층을 통과하기 어려워 제한적으로만 사용되고 있다.

[0005] 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위한 새로운 유산균을 활용한 피부개선 조성물이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) (0001) 대한민국 공개특허 제10-2024-0001759호
(특허문헌 0002) (0002) 대한민국 등록특허 제10-2457306호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 진술한 문제를 해결하기 위하여, 본 발명은 김치유래 유산균의 일종인 락토바실러스 퍼멘텀을 포함하는 것으로 피부의 노화를 개선하며 염증을 방지할 수 있는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제공하고 자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상술한 문제를 해결하기 위해, 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)을 배양하는 단계; 및 상기 배양이 완료된 이후 화장료 베이스와 혼합하는 단계를 포함하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법을 제공한다.
- [0009] 일 실시예에 있어서, 상기 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법은, 10~60 μ m의 크기를 가지는 해면 유래 스피쿨을 준비하는 단계; 구기자를 세척한 다음, 씨앗을 분리하는 단계; 상기 씨앗이 분리된 구기자 과육을 용기내에 장입한 다음 상기 과육 100중량부 대비 물 100~150중량부, 양배추 30~50중량부, 검은콩 50~70중량부, 상기 해면유래 스피쿨 5~20중량부 및 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 1~5중량부를 혼합하는 단계; 상기 과육이 장입된 용기를 밀봉한 다음, 25~35℃의 온도에서 20~50일간 배양하는 단계; 상기 배양이 완료된 이후 잔여물중 상기 과육, 양배추 및 콩을 제거하여 배양액 혼합물을 제조하는 단계; 상기 배양액 혼합물을 필터링 하여 배양 스피쿨과 배양액을 분리하는 단계; 상기 배양 스피쿨을 건조한 다음, 40~60℃의 온도의존성 오일에 침지하는 단계; 상기 온도의존성 오일을 필터링하고 10~30℃로 냉각하여 온도의존성 오일이 코팅된 스피쿨을 획득하는 단계; 상기 배양액을 동결 건조하여 유산균주 분말을 획득하는 단계; 및 화장료 베이스 100중량부 대비 상기 온도의존성 오일이 코팅된 스피쿨 0.1~2중량부, 상기 유산균주 분말 1~3중량부를 혼합하여 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제조하는 단계를 포함하며, 상기 온도의존성 오일은, 코코넛 오일을 50~60℃로 가열하는 단계; 상기 가열된 코코넛 오일 100중량부 대비, 호호바오일 20~40중량부, 포도씨 오일 5~10중량부, 올리브 오일 1~5중량부, 미리스틴산 50~80중량부, 카나우바 왁스 5~20중량부 및 비타민 E 0.1~1중량부를 혼합하여 혼합 오일을 제조하는 단계; 물 100중량부 대비 비타민 C 0.1~2중량부를 혼합하여 수용성 비타민 용액을 제조하는 단계; 및 상기 제조된 혼합오일 100중량부 대비 상기 수용성 비타민 용액 3~10중량부를 혼합한 다음 유화시켜 유중수적형 에멀전을 제조하는 단계를 포함하는 방법으로 제조되며, 상기 스피쿨은, 해면을 10~30중량%의 수산화나트륨 수용액에 침지한 다음, 60~80℃로 20~50분간 가열하여 단백질 성분을 분리하는 단계; 상기 단백질 성분이 분리된 다음, 물을 사용하여 2~5회 1차 세척하고 고형분을 분리하는 단계; 상기 분리된 고형분을 pH 1~5의 산에 10~15시간 동안 침지하고 초음파를 공급하여 이물질을 제거하는 단계; 상기 이물질이 제거된 고형분을 2~5회 물로 2차 세척하는 단계; 질소로 치환된 챔버에 상기 2차 세척된 고형분을 장입하고 챔버를 밀폐하는 단계; 상기 챔버 내부에 180~250℃의 수증기를 공급하며, 1.5~3기압을 30~60분간 유지하여 살균 및 이물질 제거를 수행하는 단계; 및 상기 이물질의 제거가 완료된 이후 100~150℃의 질소를 60~90분간 공급하여 고형분을 건조하는 단계를 포함하는 방법으로 제조될 수 있다.
- [0010] 본 발명은 또한 상기 방법으로 제조되는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 의한 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법은 기존의 유산균에 비하여 안정성을 높인 조성물을 제공하게 되므로 피부에 적용시 더욱 높은 효과를 가질 수 있다.
- [0012] 또한 본 발명에 의한 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법은, 김치유래 유산균중 특성 효과를 가지는 유산균을 선택적으로 포함함에 따라 높은 항염증작용 및 항산화 작용을 가지게 되므로 피부노화

에 뛰어난 효과를 가질 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 안정성 및 안전성 시험결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 의한 항산화능 평가결과를 나타낸 것이다.
- 도 3는 본 발명의 일 실시예에 의한 HT-29 장세포 모델에서의 항염증성 평가결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 의한 항생제 내성시험결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 의한 LDH독성시험결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 의한 HT-29 장세포 모델에서의 항염증성 시험결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 의한 쥐 각질세포(HaCaT)모델에서의 항염증성 시험결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 의한 구기자 발효물의 항산화능 평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 의한 모발생장 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 의한 모발주기 분석결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 본 발명의 일 실시예에 의한 모낭 조직 분석결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 상세하게 설명한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐리게 할 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략하기로 한다. 명세서 전체에서, 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한 복수의 표현을 포함하는 것으로 이해되어야 하고, “포함하다” 또는 “가지다” 등의 용어는 기술되는 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또, 방법 또는 제조 방법을 수행함에 있어서, 상기 방법을 이루는 각 과정들은 문맥상 명백하게 특정 순서를 기재하지 않은 이상 명기된 순서와 다르게 일어날 수 있다. 즉, 각 과정들은 명기된 순서와 동일하게 일어날 수도 있고 실질적으로 동시에 수행될 수도 있으며 반대의 순서대로 수행될 수도 있다.
- [0015] 본 명세서에 개시된 기술은 여기서 설명되는 구현예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 단지, 여기서 소개되는 구현예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 기술의 기술적 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 도면에서 각 장치의 구성요소를 명확하게 표현하기 위하여 상기 구성요소의 폭이나 두께 등의 크기를 다소 확대하여 나타내었다. 전체적으로 도면 설명시 관찰자 시점에서 설명하였고, 일 요소가 다른 요소 위에 위치하는 것으로 언급되는 경우, 이는 상기 일 요소가 다른 요소 위에 바로 위치하거나 또는 이들 요소들 사이에 추가적인 요소가 개재될 수 있다는 의미를 모두 포함한다. 또한, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명의 사상을 다양한 다른 형태로 구현할 수 있을 것이다. 그리고 복수의 도면들 상에서 동일 부호는 실질적으로 서로 동일한 요소를 지칭한다.
- [0016] 본 명세서에서, '및/또는'이라는 용어는 복수의 기재된 항목들의 조합 또는 복수의 기재된 항목들 중의 어느 항목을 포함한다. 본 명세서에서, 'A 또는 B'는, 'A', 'B', 또는 'A와 B 모두'를 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)을 배양하는 단계; 및 상기 배양이 완료된 이후 화장료 베이스와 혼합하는 단계를 포함하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법에 관한 것이다.
- [0018] 이를 상세히 살펴보면 상기 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법은, 10~60 μ m의 크기를 가지는 해면 유래 스피큘을 준비하는 단계; 구기자를 세척한 다음, 씨앗을 분리하는 단계; 상기 씨앗이 분리된 구기자 과육을 용기내에 장입한 다음 상기 과육 100중량부 대비 물 100~150중량부, 양배추 30~50중량부, 검은콩 50~70중량부, 상기 해면유래 스피큘 5~20중량부 및 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 1~5중량부를 혼합하는 단계; 상기 과육이 장입된 용기를 밀봉한 다음, 25~35℃의 온도에서 20~50일간 배양하는 단계; 상

기 배양이 완료된 이후 잔여물중 상기 과육, 양배추 및 콩을 제거하여 배양액 혼합물을 제조하는 단계; 상기 배양액 혼합물을 필터링 하여 배양 스피큘과 배양액을 분리하는 단계; 상기 배양 스피큘을 건조한 다음, 40~60℃의 온도의존성 오일에 침지하는 단계; 상기 온도의존성 오일을 필터링하고 10~30℃로 냉각하여 온도의존성 오일이 코팅된 스피큘을 획득하는 단계; 상기 배양액을 동결 건조하여 유산균주 분말을 획득하는 단계; 및 화장료 베이스 100중량부 대비 상기 온도의존성 오일이 코팅된 스피큘 0.1~2중량부, 상기 유산균주 분말 1~3중량부를 혼합하여 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 경우 후술할 유효성분의 경피 흡수율을 높이기 위하여 스피큘을 사용할 수 있다.

[0020] 상기 스피큘은 하이드로라이즈드 해면으로 불리는 것으로 해면의 침골만을 분리 정제하여 제조되는 성분이다. 이러한 스피큘은 침상형 구조를 가지고 있을 뿐만 아니라 표면에 많은 기공을 가지고 있으므로, 이 기공을 이용하여 모발 성장 개선 기능성 조성물의 캐리어로서 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 주요성분 중 하나인 유산균의 경우 경피내로 침투하게 되면 감염증상을 나타낼 수 있으므로 상기 스피큘을 사용하여 유산균 대사산물 및 기타 유효성분만을 선택적으로 경피내로 전달하며, 상기 유산균의 경우 경피의 외부에서 효과를 나타내게 되어 부작용을 최소화 할 수 있다.

[0021] 이를 상세히 살펴보면 상기 스피큘은 그 크기에 따라 메가스클레레스(Megascleres)와 마이크로스클레레스(Microscleres)로 두 가지로 구분되며, 메가스클레레스(Megascleres)는 60~2,000 μ m의 크기로 육안으로 구분 가능하며, 마이크로스클레레스(Microscleres)는 10~60 μ m의 크기로 현미경을 이용해서 관찰이 가능하다. 이러한 스피큘의 표면에는 많은 기공을 가지게 되므로 유효성분의 흡착이 가능하다. 하지만 상기 스피큘의 기공은 상기 유산균에 비하여 크기가 작으므로 상기 유산균의 경우 상기 스피큘의 기공 내부로 유입되지 않으며 다만 상기 유산균의 대사산물만이 상기 스피큘의 기공 내부로 침투될 수 있다. 이를 이용하여 본 발명의 경우 상기 스피큘에 침투한 상기 대사산물만을 선택적으로 경피의 내부로 전달하는 것이 가능하다.

[0022] 본 발명에서는 10~60 μ m의 크기를 가지는 마이크로 클래스 스피큘을 사용하는 것이 바람직하다. 이때 상기 스피큘의 크기가 10 μ m미만인 경우 공극률이 떨어져 유효성분의 전달능력이 떨어질 수 있으며, 60 μ m를 초과하는 경우 경피에 자극을 줄 수 있다.

[0023] 상기 스피큘은, 해면을 10~30중량%의 수산화나트륨 수용액에 침지한 다음, 60~80℃로 20~50분간 가열하여 단백질 성분을 분리하는 단계; 상기 단백질 성분이 분리된 다음, 물을 사용하여 2~5회 1차 세척하고 고형분을 분리하는 단계; 상기 분리된 고형분을 pH 1~5의 산에 10~15시간 동안 침지하고 초음파를 공급하여 이물질을 제거하는 단계; 상기 이물질이 제거된 고형분을 2~5회 물로 2차 세척하는 단계; 질소로 치환된 챔버에 상기 2차 세척된 고형분을 장입하고 챔버를 밀폐하는 단계; 상기 챔버 내부에 180~250℃의 수증기를 공급하며, 1.5~3기압을 30~60분간 유지하여 살균 및 이물질 제거를 수행하는 단계; 및 상기 이물질의 제거가 완료된 이후 100~150℃의 질소를 60~90분간 공급하여 고형분을 건조하는 단계를 포함하는 방법으로 제조될 수 있다.

[0024] 본 발명의 경우 상기 스피큘의 단백질 성분을 제거하는 단계를 먼저 수행할 수 있다. 상기 스피큘은 해면을 의미하므로, 대부분의 조직은 단백질로 구성되어 있다. 따라서 상기와 같은 단백질 제거를 먼저수행하는 것으로 후술할 과정에서 산의 사용을 최소화 할 수 있으며, 또한 적정량의 산을 사용하여 이물질 제거 및 중화 반응을 수행하는 것으로 상기 스피큘의 공극내부와 외부를 활성화하는 것이 가능하다.

[0025] 이때 단백질 제거를 위하여 사용되는 염기성 물질은 10~30중량%의 수산화나트륨 수용액을 사용할 수 있다. 상기 수산화나트륨의 경우 단백질을 분해하는 효과를 가지고 있으므로 상기 수산화나트륨을 사용하여 상기 해면의 조직을 분해하는 것이 바람직하다. 이때 사용되는 수산화나트륨 수용액이 10중량%미만의 농도를 가지는 경우 상기와 같은 단백질 분해효과를 기대하기 어려우며, 30중량%를 초과하는 경우 과도한 염기성을 가지게 되므로 스피큘이 분해될 수 있다.

[0026] 아울러 상기와 같은 고농도의 수산화나트륨을 적정시간 사용하는 것으로 상기 스피큘의 표면을 활성화시킬 수 있다. 상기 스피큘은 탄산칼슘을 주성분으로 하고 있으므로, 표면활성도가 떨어져 후술할 유효성분과의 혼합 및 유효성분의 공극내 진입이 어려울 수 있다. 따라서 상기와 같은 수산화나트륨을 사용하여 표면에 수산기(-OH)를 부착하는 것으로 상기 스피큘의 활성도를 증가시킬 수 있다.

[0027] 이러한 활성도의 증가는 후술할 산처리 과정에서 일정부분 감소되지만 너무 높은 활성도를 가지는 경우 후술할 유효성분 방출을 어렵게 만들게 되므로 산처리에 의하여 적절한 활성도를 가질 수 있다.

[0028] 상기와 같은 수산화나트륨 처리 이전 채취된 해면을 세척한 다음, 함수율이 10중량%미만이 되도록 건조하는 단계를 수행할 수 있다. 상기 해면은 자연에서 채취되는 것이므로 표면에 존재하는 이물질을 세척한 다음, 이를

건조하는 단계이다. 이때 상기 해면의 경우 함수율이 10중량%미만, 바람직하게는 7중량%미만이 되도록 건조될 수 있다. 이러한 건조를 통하여 상기 해면의 표면에 존재하는 점액성분이 더욱 쉽게 제거될 수 있으며 또한 상기와 같은 건조과정에서 해면에 포함된 유기성분의 분해 및 조직의 파괴가 일어나 이후에 있을 과정이 더욱 용이하게 진행될 수 있다.

[0029] 상기와 같이 수산화나트륨에 침지된 해면은 60~80℃로 20~50분간 가열하여 단백질 성분을 분리할 수 있다. 일반적으로 동물은 무기질의 골격을 제외하고 나머지 부분의 대부분은 단백질로 구성되어 있다. 이 단백질의 경우 상기 골격을 연결하는 역할을 수행하므로 매우 단단한 조직으로 구성되어 있지만 이를 가열하는 경우 단백질이 변성되어 상기 골격과 분리되기 쉽게 변할 수 있다. 본 발명의 경우 상기와 같은 가열을 통하여 상기 조직의 분해를 더욱 가속화시킴과 동시에 상기한 바와 같이 스피큘의 표면의 활성도를 높일 수 있다. 이때 상기온도 또는 상기 시간미만의 조건에서 가열하는 경우 상기와 같은 단백질 제거효과를 기대하기 어려우며, 상기범위를 초과하는 경우 수산화나트륨에 의하여 스피큘이 분해될 수 있다.

[0030] 상기와 같은 단백질 제거가 완료된 이후 물을 사용하여 2~5회 1차 세척하고 고형분을 분리할 수 있다. 상기와 같은 단백질이 분이된 이후 물을 사용하여 세척하는 것으로 상기 단백질 분해물 및 잔여 수산화나트륨을 제거할 수 있다. 이때 상기 세척을 2회 미만으로 수행하는 경우 상기와 같은 세척효과를 기대하기 어려우며, 5회를 초과하여 수행하는 경우 더 이상의 효과를 없이 비경제적이다.

[0031] 상기와 같은 세척이 완료되면 상기 고형분을 분리할 수 있다. 이때 상기 분리는 원심분리 또는 필터분리법을 사용하는 것이 바람직하며, 이외에도 상기 고형분을 물과 분리할 수 있는 방법을 사용하여 분리될 수 있다.

[0032] 상기 분리된 고형분을 pH 1~5의 산에 10~15시간 동안 침지하고 초음파를 공급하여 이물질을 제거할 수 있다. 일반적으로 생체에 존재하는 유기물을 단백질은 상기와 같은 수산화나트륨의 처리에 의하여 대부분이 제거될 수 있지만 점액성분과 같은 단백질 이외의 유기물 및 상기 수산화나트륨처리 이후의 잔여물들을 제거하기 위하여 산을 사용하여 세정하는 것이 바람직하다. 기존의 스피큘 제조방법에서는 주로 염산을 이용하여 이를 제거하였지만, 이는 스피큘의 다공부에 염산이 잔류하여 피부자극을 줄 수 있다는 문제점을 가질 수 있다. 따라서 본 발명에서는 레몬즙, 유자즙, 당유자즙, 오렌지즙 및 식초와 같은 천연 산성물질을 이용하여 상기 스피큘을 제조하는 것이 바람직하다.

[0033] 이때 상기 침지 기간이 10시간 미만인 경우 상기 유기물의 제거가 어려울 수 있으며 15일을 초과하는 경우 상기 침몰이 산에 의하여 분해될 가능성이 있으며, 상기 수산화나트륨에 의하여 높아진 표면활성도가 낮아질 수 있다. 또한 상기와 같이 산을 이용하여 유기물을 제거하는 경우 상기 침몰의 일부가 용해되어 상기 침몰의 다공성이 더욱 높아질 수 있다. 또한 상기 산성 용액이 pH1 미만인 경우 강한 산성으로 인하여 침몰이 분해되거나 잔류된 산성용액으로 인하여 피부에 자극을 줄 수 있으며, pH5를 초과하는 경우 상기와 같은 유기물의 분해가 어려울 수 있다.

[0034] 아울러 본 발명의 경우 상기와 같은 약산을 사용하게 되므로 이물질의 분해속도가 감소될 수 있다. 이를 개선하기 위하여 상기 산에 침지시 초음파를 공급하는 것이 바람직하다. 이때 상기 초음파는 20~130kHz의 진동수를 가질 수 있으며, 상기 진동수 범위에서만 상기와 같은 세척의 수행이 가능하다.

[0035] 아울러 상기와 같은 산처리 과정에서 사용되는 레몬즙, 유자즙, 당유자즙, 오렌지즙의 경우 많은 비타민 C를 함유하고 있으므로 상기 산처리 과정에서 상기 동공의 내부에는 상당량의 비타민 C가 잔류할 수 있다. 이러한 잔류 비타민 C의 경우 후술할 온도의존성 오일에 포함되는 비타민과 더불어 항산화작용을 수행하는 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0036] 상기 이물질이 제거된 고형분을 2~5회 물로 2차 세척할 수 있다. 상기 2차 세척의 경우 상기 1차 세척과 동일한 방법을 사용하므로 설명을 생략하기로 한다.

[0037] 질소로 치환된 챔버에 상기 2차 세척된 고형분을 장입하고 챔버를 밀폐할 수 있다. 상기와 같은 염기처리 및 산처리의 경우에도 상기 스피큘의 공극내부에는 상당량의 이물질이 남아 있을 수 있다. 본 발명의 경우 상기 공극의 내부에 유산균 배양 잔여물을 혼합하여 사용하게 되므로 상기 공극내부의 이물질을 제거하는 것이 바람직하다. 본 발명의 경우 수증기에 의한 열분해를 사용하여 이물질을 제거하는 것이 바람직하며, 이때 수증기는 고온 및 고압으로 공급되므로 상기 챔버의 내부를 질소로 치환하여 수증기에 의한 열분해를 막는 것이 바람직하다.

[0038] 상기 챔버 내부에 180~250℃의 수증기를 공급하며, 1.5~3기압을 30~60분간 유지하여 살균 및 이물질 제거를 수행할 수 있다. 상기 조건범위에서는 상기와 같은 살균 및 이물질 제거가 정상적으로 수행될 수 있지만 상기 조건 미만에서는 이물질제거 및 살균효과가 떨어질 수 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우 더 이상의 효과는 없으

며, 공급되는 수증기의 열과 압력으로 인하여 상기 스피큘이 분해될 수 있다.

- [0039] 상기 이물질의 제거가 완료된 이후 100~150℃의 질소를 60~90분간 공급하여 고형분을 건조할 수 있다. 상기와 같은 이물질의 제거가 완료된 이후 일반적인 공기를 공급하여 건조하게 되면 고온에서 산소와 접촉되므로 산화반응이 발생할 수 있다. 이러한 산화반응의 경우 상기 스피큘의 이취를 발생시킬 뿐만 아니라 스피큘을 산화시켜 분해될 수 있다. 따라서 상기와 같이 가열된 질소를 일정시간 공급하는 것으로 상기 스피큘에 존재하는 여분의 수분을 건조하는 것이 바람직하다. 이러한 건조로 인하여 상기 스피큘 표면의 수분이 건조될 뿐만 아니라 상기 스피큘 공극내의 수분까지 건조될 수 있다.
- [0040] 상기 구기자는 가지과에 속하는 낙엽관목인 구기자나무의 열매를 말한다. 긴 타원형의 붉은색 열매로 8~10월에 열린다. 상기 구기자는 피로회복과 간질환, 심혈관 질환 예방에 도움이 된다고 알려졌다. 구기자에 함유된 베타인(Betaine)은 지방이 간에 축적되는 것을 방지해 지방간 등 간질환을 예방한다. 또한, 심장질환을 유발하는 호모시스테인(homocysteine) 함량을 낮추는 기능도 있다. 구기자의 루틴(Rutin) 성분은 모세혈관을 강화해 혈관 건강에 도움을 줄 수 있다. 한방에서 구기자는 기력을 돋워주며, 간이나 눈에 유효한 약재로 알려졌다. 다만 구기자 씨의 경우 여타 다른 종류의 씨앗과 동일하게 청산 배당체를 함유하고 있으므로 본 발명의 경우 이러한 씨를 제거한 과육만을 사용하여 발효물을 제조하는 것이 바람직하다.
- [0041] 상기 씨앗이 분리된 구기자의 과육을 용기내에 장입한 다음 상기 과육 100중량부 대비 물 100~150중량부, 양배추 30~50중량부, 검은콩 50~70중량부, 상기 해면유래 스피큘 5~20중량부 및 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 1~5중량부를 혼합할 수 있다.
- [0042] 상기 양배추는 다량의 비타민을 함유하고 있으며, 섬유질, 칼륨등을 포함하고 있으므로, 피부에 좋은 효과를 가질 수 있다. 본 발명의 경우 상기 양배추를 사용하여 유산균을 배양하는 것으로 유산균에 의한 대사산물 뿐만 아니라 상기 양배추의 유효성분이 용출되어 사용될 수 있다. 다만 상기 양배추의 굵은 줄기 부분의 경우 후술할 배양시 효과가 떨어지며, 용기내 장입시 많은 공간을 차지하게 되므로 일부분만을 분리하여 사용하는 것이 바람직하다.
- [0043] 양배추를 세척한 다음, 일부분을 분리할 수 있다. 본 발명의 경우 후술할 바와 같이 유산균을 사용하고 있으며, 다량의 공급을 위하여 이를 배양하여 사용하는 것이 바람직하다. 일반적으로 유산균의 배양에는 당성분과 더불어 섬유질이 필요한 것으로 알려져 있으며, 본 발명의 경우 상기와 같이 양배추를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0044] 상기 검은 콩은 다량의 이소플라본 및 폴리페놀을 함유하고 있어 피부 및 부피 개선효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 경우 상기와 같은 검은 콩을 상기 양배추와 동시에 발효시키는 것으로 검은 콩에 의한 피부 및 두피개선효과를 기대할 수 있다. 아울러 기존의 방법의 경우 단순히 검은 콩을 분쇄하거나 일부 성분만을 추출하여 포함하고 있었지만, 본 발명의 경우 상기와 같은 유산균에 의한 세포벽 분해효과를 통하여 검은 콩 내부의 유효성분을 용출시키고 있으며, 이에 따라 기존의 검은콩 포함 조성물에 비하여 높은 효과를 기대할 수 있다.
- [0045] 상기 락토바실러스 퍼멘텀은 김치유래 유산균의 일종으로 한국인에게 장기간 노출되어 있는 유산균이므로 소화불량등의 부작용이 적은 것으로 알려져 있다. 본 발명의 경우 락토바실러스 퍼멘텀의 특정균주군을 사용하는 것으로 피부개선 효과를 더욱 극대화 할 수 있다.
- [0046] 이를 상세히 살펴보면 본 발명의 락토바실러스 퍼멘텀은 락토바실러스 퍼멘텀 (*Lactobacillus fermentum*) MF10 (KCTC 14698BP)일 수 있다. 상기 MF10의 경우 높은 항산화성을 가질 수 있으며, 또한 UVB에 의한 광노화 세포에 대한 항염증성이 높으므로 본 발명과 같은 피부 개선용 조성물에 적용하는 경우 세포의 활성 증가 및 노화방지 효과를 기대할 수 있다.
- [0047] 또한 기존의 유산균 포함 조성물의 경우 단순히 유산균을 혼합하여 사용하는 것에 그치고 있어 그 효과가 제한적이지만, 본 발명의 경우 상기 유산균의 대사산물을 스피큘에 함침하여 사용하는 것으로 경피내로 유효성분의 전달효과가 뛰어날 뿐만 아니라 유산균의 대사산물만을 선택적으로 전달하게 되므로 부작용 역시 최소화 될 수 있다.
- [0048] 상기 과육 100중량부 대비 물 100~150중량부, 양배추 30~50중량부, 검은콩 50~70중량부, 상기 해면유래 스피큘 5~20중량부 및 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 1~5중량부를 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 범위 내에서는 최적의 효과를 가질 수 있지만, 상기 범위를 벗어나는 경우 유효성분의 함량이 달라지게 되므로 효

과가 떨어질 수 있다.

- [0049] 상기 과육이 장입된 용기를 밀봉한 다음, 25~35℃의 온도에서 20~50일간 배양할 수 있다. 이때 상기 용기내에는 액상성분과 고형분이 혼합되어 있으며, 액상 성분에는 유산균 및 유산균 대사산물을 포함하는 유효성분이 혼합되어 있을 수 있다. 또한 상기 고형분에는 상기 규기자 과육, 양배추, 검은콩 및 스피큘을 포함할 수 있다.
- [0050] 상기와 같은 배양과정에서 물에는 상기 유산균의 대사산물과 상기 규기자 과육, 양배추 및 상기 검은 콩에서 용출되는 유효성분이 포함될 수 있다. 이때 상기 고형분에 포함되는 상기 스피큘의 공극 내부로는 상기 대사산물 및 상기 유효성분이 침투될 수 있으며, 상기 유산균의 경우 상기 공극의 크기보다 크므로 상기 공극내로 침투가 불가능하다.
- [0051] 아울러 상기 온도 미만 또는 상기 기간 미만 동안 배양하는 경우 충분한 배양이 이루어지지 않아 효과가 떨어질 수 있으며, 상기 온도 초과 및 상기 기간을 초과하여 배양하는 경우 잡균이 발생하여 이취가 생길 수 있다.
- [0052] 상기 배양이 완료된 이후 잔여물중 상기 규기자 과육, 양배추의 일부분과 콩을 제거하여 배양액 혼합물을 제조할 수 있다. 즉 상기 배양액 혼합물에는 유산균, 유산균 대사산물, 유효성분 및 스피큘을 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 배양액 혼합물을 필터링 하여 배양 스피큘과 배양액을 분리할 수 있다. 이 때 상기 스피큘의 공극내부에는 위에서 살펴본 바와 같이 유산균 대사산물 및 유효성분을 포함할 수 있다. 아울러 상기 배양 스피큘과 배양액의 분리과정에서는 원심분리를 사용하지 않고 필터링을 사용하여 분리하는 것이 바람직하다. 원심분리법의 경우 상기 배양 스피큘과 배양액을 빠른 시간내에 분리할 수 있지만, 배양 스피큘 공극내부에 위치하는 유산균 대사산물 및 유효성분의 외부로 유출될 수 있으므로, 본 발명의 경우 상기와 같은 필터링을 통하여 배양 스피큘과 배양액을 분리하는 것이 바람직하다.
- [0054] 상기 배양 스피큘을 건조한 다음, 40~60℃의 온도의존성 오일에 침지할 수 있다.
- [0055] 온도 의존성 오일은 상기 스피큘을 코팅하기 위하여 적용된 것으로서 바람직하게는 체온부근 또는 약물을 방출하여야 하는 부위에서 액상으로 녹거나 인체의 움직임에 따라 파괴되면서 효과적으로 약물 즉 천연추출물을 방출할 수 있는 온도 감응성 오일이 적용된다.
- [0056] 상기 온도의존성 오일은, 코코넛 오일을 50~60℃로 가열하는 단계; 상기 가열된 코코넛 오일 100중량부 대비, 호호바오일 20~40중량부, 포도씨 오일 5~10중량부, 올리브 오일 1~5중량부, 미리스틴산 50~80중량부, 카나우바 왁스 5~20중량부 및 비타민 E 0.1~1중량부를 혼합하여 혼합 오일을 제조하는 단계; 물 100중량부 대비 비타민 C 0.1~2중량부를 혼합하여 수용성 비타민 용액을 제조하는 단계; 및 상기 제조된 혼합오일 100중량부 대비 상기 수용성 비타민 용액 3~10중량부를 혼합한 다음 유화시켜 유중수적형 에멀전을 제조하는 단계를 포함하는 방법으로 제조
- [0057] 상기 코코넛 오일은 필리핀, 인도네시아, 말레이시아 등 널리 열대지방의 해안에 자생하는 야자나무 열매의 핵에서 채취되는 지방으로 일명 코프라 오일(copra oil)이라고도 하며 녹는점은 23 내지 28℃ 이고, C10, C12, C14의 포화지방산으로 이루어져 있다. 또한, 상기 코코넛 오일은 다나산(dynasan), 위텔폴(witepsol) 또는 콤프리톨(compritol)과 같은 준중합 지질(semisynthetic lipid)과 비교하여 더 높은 생분해성과 낮은 생체 내 독성을 가지고 있다.
- [0058] 상기 호호바 오일은 리포니아 주, 애리조나 주에 서식하는 관목인 호호바 열매의 씨앗에서 생성되는 액체를 의미한다. 이러한 호호바오일은 피부와 머리카락에 대한 다양한 효과를 가지고 있으며, 특히 항균선, 항진균성 및 항산화작용을 수행할 수 있어 피부에 적용시 피부의 손상을 개선하는 효과를 가질 수 있다.
- [0059] 상기 포도씨 오일은 포도씨에서 채취되는 오일을 의미하는 것으로 리놀레산, 베타카로틴, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 등 다양한 성분이 함유되어 있으며, 피부 수분과 탄력을 유지하는 것에 효능을 가지는 것으로 알려져 있다.
- [0060] 상기 올리브오일은 올리브를 압착하여 채취되는 오일로 산화방지효과 및 항염증 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다.
- [0061] 상기 미리스틴산은 동식물의 지방성분에서 발견되는 유기산의 한 종류로 피부장벽을 강화하는 효능을 가지고 있다. 상기 미리스틴산의 경우 높은 녹는 점(54~55℃)을 가지고 있으므로 상기와 같은 비율로 혼합하여 본 발명의 온도의존성오일의 녹는점을 높이는 역할을 수행할 수 있다.
- [0062] 상기 카나우바 왁스는 브라질의 자생식물이 카나우바의 잎에서 추출되는 왁스로 높은 녹는점을 가지고 있어 본

발명에서는 상기 온도의존성오일의 녹는점을 조절하는 것에 사용될 수 있다.

- [0063] 상기 비타민 E는 항산화효과를 가지는 유용성 비타민으로 본 발명의 온도의존성 오일에 포함되는 것으로 상기 스피클의 인체적용시 용해되어 피부의 항산화효과를 부여할 수 있으며, 또한 피부 재생에 도움을 줄 수 있다.
- [0064] 코코넛 오일을 50~60℃로 가열한 다음, 상기 가열된 코코넛 오일 100중량부 대비, 호호바오일 20~40중량부, 포도씨 오일 5~10중량부, 올리브 오일 1~5중량부, 미리스틴산 50~80중량부, 카나우바 왁스 5~20중량부 및 비타민 E 0.1~1중량부를 혼합하여 혼합 오일을 제조할 수 있다.
- [0065] 상기 코코넛오일의 경우 실온에서는 고상을 가지게 되므로 상기와 같이 가열한 다음, 상기 비율로 다른 오일성분을 혼합하여 온도의존성 오일을 제조할 수 있다. 이때 실온에서 액상인 호호바오일, 포도씨오일 및 올리브오일을 혼합하는 것으로 상기 온도의존성오일의 녹는점이 내려갈 수 있지만, 상기 미리스틴산 및 상기 카나우바 왁스의 혼합으로 인하여 상기 온도의존성 오일은 30~40℃에서 용해될 수 있다. 즉 본 발명의 온도의존성 오일은 상기와 같은 비율로 혼합됨에 따라 피부에 적용시 용해될 수 있으며, 주성분인 코코넛 오일을 비롯한 각종오일을 방출할 수 있다.
- [0066] 물 100중량부 대비 비타민 C 0.1~2중량부를 혼합하여 수용성 비타민 용액을 제조할 수 있다. 상기 온도의존성 오일에는 비타민 E가 포함될 수 있지만 높은 항산화력을 가지는 비타민 C의 경우 수용성을 가지므로 상기 온도의존성오일에 그대로 혼합이 어렵다. 따라서 상기와 같은 비율로 물에 혼합한 다음, 후술할 바와 같이 에멀전화를 하는 것으로 상기 온도의존성 오일의 내부에 상기 비타민 C를 혼합할 수 있다.
- [0067] 상기 제조된 혼합오일 100중량부 대비 상기 수용성 비타민 용액 3~10중량부를 혼합한 다음 유화시켜 유중수적형 에멀전을 제조할 수 있다. 상기한 바와 같이 상기와 같은 에멀전을 형성하는 경우 상기 온도의존성오일의 내부에 비타민 C를 혼합하는 것이 가능하며, 이에 따라 상기 온도의존성오일이 피부 표면에서 용해되는 경우 온도의존성오일에 혼합된 지용성의 비타민 E뿐만 아니라 수용성의 비타민 C역시 방출될 수 있다.
- [0068] 상기 온도의존성 오일을 필터링하고 10~30℃로 냉각하여 온도의존성 오일이 코팅된 스피클을 획득할 수 있다. 상기 온도의존성오일을 필터링하게 되면 상기 스피클의 표면에 온도의존성오일이 코팅된 상태로 분리될 수 있다. 이러한 온도의존성 오일의 경우 상기한 바와 같이 피부에 유분 및 지용성성분을 공급하는 것이 가능할 뿐만 아니라 상기 온도의존성 오일의 공극 내부에 존재하는 유산균 대사산물 및 유해성분을 외부로 유출되지 않도록 하는 일종의 보호층으로 사용될 수 있다.
- [0069] 상기와 같이 분리된 스피클은 냉각되어 온도의존성오일이 고화된 상태로 사용 및 보관될 수 있으며, 안정성 및 보관성을 높이기 위하여 피막물질을 사용하여 코팅되는 것도 가능하다.
- [0070] 상기 피막물질은 바람직하게는 보관조건에서는 고형상으로 존재하여 보관하는 동안 입자의 물리적인 안정성을 증가시키고, 입자내에 함유된 약물의 화학적인 안정성을 증대시키며, 체온부근 또는 약물을 방출하여야 하는 부위에서 액상으로 녹거나 인체의 움직임에 따라 파괴되어 효과적으로 약물을 방출할 수 있는 물질이 적용될 수 있다. 상기 피막물질은 메타크릴산계 물질, 셀락(Shellac)류, CAP(Cellulose acetate phthalate)류, PVAP(Polyvinyl acetate phtahalate)류, HPMCAS(Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate)류 중 적어도 어느 하나를 함유한 것이며 바람직하게는 메타크릴산계 물질인 유드라지트를 사용할 수 있다.
- [0071] 상기 배양액을 동결 건조하여 유산균주 분말을 획득할 수 있다. 상기 배양액의 경우 상기 유산균주 뿐만 아니라 대사산물 및 유효성분을 포함할 수 있음을 상기한 바와 같다. 본 발명의 경우 상기 배양액을 동결건조하는 것으로 분말상의 유산균주를 획득할 수 있다.
- [0072] 화장료 베이스 100중량부 대비 상기 온도의존성 오일이 코팅된 스피클 0.1~2중량부, 상기 유산균주 분말 1~3중량부를 혼합하여 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제조할 수 있다.
- [0073] 이때 상기 화장료 베이스는 기존에 판매되는 화장료 베이스 및 유효성분을 추가적으로 포함하는 것이 가능하며, 이는 본 발명의 기능성 조성물의 적용 부위 및 효과에 따라 적절히 가감될 수 있다.
- [0074] 일 예로서 상기 화장료 베이스는 오일, 물, 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 E, 비타민 K, 향료, 알코올, 보습제, 보존제, 증량제, 색소, 증점제 등을 포함할 수 있으며, 상기와 같은 비율로 온도의존성 오일이 코팅된 스피클 및 유산균주 분말을 혼합하여 사용함에 따라 높은 효과를 기대할 수 있다.
- [0076] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 첨부한 도면을 참조하여 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 설명하기로 한다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 공지의 구성에 대한

구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략하기로 한다. 그리고 도면에 제시된 어떤 특징들은 설명의 용이함을 위해 확대 또는 축소 또는 단순화된 것이고, 도면 및 그 구성요소들이 반드시 적절한 비율로 도시되어 있지는 않다. 그러나 당업자라면 이러한 상세 사항들을 쉽게 이해할 것이다.

[0078] 실험예 1

[0079] 락토바실러스 퍼멘텀 (*Lactobacillus fermentum*) MF10 (KCTC 14698BP)의 효능을 확인하기 위한 실험을 실시하였다.

[0080] 1) 실험 방법

[0081] (1) 후보균주(락토바실러스 퍼멘텀 MF10)의 안정성 및 안전성 검사.

[0082] 본 실시예에서는 후보 균주가 프로바이오틱스로도 활용이 가능한지 알아보기 위해 내산성 및 내담즙성 실험을 하였고, 안전성을 평가하기 위해 gelatinase 생성 여부 실험 및 urease 생성 여부 실험을 하였다.

[0083] ① 내산성 실험

[0084] 후보 균주를 섭취하였을 때 위에서의 생존성을 확인하기 위해 내산성 실험을 진행하였다. 준비된 균주를 인공위액에 접종시키고 37℃에서 배양시키면서 3시간 뒤의 생존 균수를 측정하였다. 이때 인공위액은 1N HCl을 사용하여 배지의 pH를 2.5로 조정하고 pepsin을 1000 unit/mL가 되도록 첨가 후 멸균시킨 것을 사용하였고, 생존 균수 측정은 배양액을 KH₂PO₄, Na₂HPO₄, L-cystein, HCl, Tween80 등이 함유된 phosphate buffer (pH 6.8)로 희석한 후 측정하였다. 이후 대조군과 생존 균수 차이를 계산하였다. 대조군으로는 인공위액을 첨가하지 않은 액체배지에 위와 같은 방법으로 실험하였다.

[0085] ② 내담즙성 실험

[0086] 후보 균주를 섭취하였을 때 생균상태로 위를 거쳐 췌장과 십이지장을 통과하여 장까지 도달할 수 있는지 확인하기 위해 내담즙성을 평가하였다. 실제 소화계와 비슷한 환경을 만들어주기 위해 상기 내산성 검증에서 수득한 배양액(인공위액을 거친 배양액)을 0.3%의 oxgall 이 함유된 MRS 멸균 액체배지에 접종시킨 후 37℃에서 배양시키면서 24시간 뒤에 생존 균수를 측정하였고, 대조군과 생존 균수 차이를 계산하였다. 대조군으로는 인공 담즙액을 첨가하지 않은 액체배지에 위와 같은 방법으로 실험하였다.

[0087] ③ gelatinase 생성 여부 실험

[0088] 후보 균주의 gelatinase의 생성여부를 확인하기 위하여, 젤라틴 영양 배지(beef extract 0.3%, peptone 0.5%, gelatin 12%)에 프로바이오틱스 균주들을 접종한 뒤 37℃에서 48시간 배양한 후 젤라틴 영양배지를 4℃에 약 4시간 동안 냉장 방치하여 배지의 응고 여부를 확인하였다. 이때, 배지가 응고되지 않으면 액화 반응 양성으로 판정하였다.

[0089] ④ urease 생성 여부 실험

[0090] 후보 균주의 urease 생성 여부를 확인하기 위하여, Urea agar base배지에 프로바이오틱스 균주들을 streaking한 다음 37℃에서 48시간 배양하였고, 배양액에 phenol red를 사용하여 변화를 관찰하였다. 후보 균주가 urease를 생성하면 urea가 분해되고, 배지의 pH가 높아지면 지시약으로 사용되는 phenol red가 황색에서 적색으로 변하는 것을 이용하여 판정하였다.

[0091] ⑤ 실험 결과

[0092] 상기의 4가지 실험의 결과, 후보 균주 중 안전성과 안정성이 우수한 균주 6종을 선발하였고, 하기 표 1 및 도 1과 같았다.

표 1

Strain	내산성	내담즙성	urease	grkat inase
MF10	98	118	-	-
A	101	110	-	-
B	99	109	-	-
C	97	100	-	-
D	96	98	-	-

E	79	86	-	-
---	----	----	---	---

- [0094] 상기 표 1 및 도 1을 보면, 6가지 선발 균주 모두 내산성 및 내담즙성 균주인 것을 확인할 수 있고, urease 및 gelatinase를 생성하지 않아 인체에 안전한 것을 확인할 수 있다.
- [0096] (2) 후보균주(락토바실러스 퍼넨텀 MF10)의 항산화효능 검증
- [0097] 선발 균주의 항산화 효능을 검증하기 위해 DPPH 라디칼 소거능(radical scavenging) 실험을 하였고, 인간 대장암 세포인 HT-29 cell line 및 인간 피부각질세포인 HaCaT cell line을 이용하여 항산화 효소 수치 분석 실험을 하였다.
- [0098] 이때, HT-29 cell line는 Korea Culture Type Collection (KCTC, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco), penicillin G (100 IU/ml), 그리고 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 medium (Gibco BRL, U.S.A.)을 이용하여 37℃, 5% CO₂의 대기 환경에서 배양하여 사용하였고, HaCaT cell line는 Korea Culture Type Collection (KCTC, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco), Penicillin G (100 IU/mL), streptomycin (100 mg/mL)가 첨가된 DMEM high glucose medium (Gibco, U.S.A.)를 이용하여, 37℃, 5% CO₂의 대기 환경에서 배양하여 사용하였다.
- [0099] ① DPPH 라디칼 소거능 (radical scavenging) 실험 방법
- [0100] 선발 균주를 멸균된 MRS broth에 1% 접종하여 37℃에서 18시간 배양시킨 후, 10,000 rpm, 5 min, 4℃에서 원심 분리하여 CFE (cell free extract)를 준비하였다. 준비된 CFE 500 μL에 3.0 mL의 2,2-DiPhenyl-2-Picrylhydrazyl hydrate (DPPH) 용액(5 mg/100 mL ethanol)을 섞어주었으며, 동일한 양의 ethanol, MRS용액, ascorbic acid (100 μg/mL)을 각각 대조군, blank, 비교군으로 사용하였다. 이후 DPPH용액과 섞은 후 암실에서 30분 배양하고, 517 nm 흡광도를 측정, 다음식을 사용하여 항산화능을 %로 환산하였으며, 계산식은 아래 수식식 1과 같았다.
- [0101] [식 1]
- $$DPPH\ free\ radical\ scavenging(\%) = \frac{Absorbance\ of\ control - Absorbance\ of\ sample}{Absorbance\ of\ control} \times 100$$
- [0102]
- [0103] ② HT-29 세포 또는 HaCaT 세포를 이용한 항산화 관련 효소 수치 분석 실험 방법
- [0104] H2O2 처리군 제조
- [0105] HT-29 세포를 12 well plate에 5 x 10⁵ cells/well의 조건으로 seeding하여 24시간 동안 배양 후, HT-29 세포에 열처리한 균주를 24시간 동안 사전 처리하였다. 이후 media를 제거한 후, 산화 스트레스를 유도하기 위해 Hydrogen peroxide (H2O2) (50 μM)를 처리하여, 2시간 동안 반응을 진행하였다. 이때의 그룹은 크게 Control, H2O2, 균주처리 그룹으로 설정하였으며, Control 그룹은 blank, H2O2 그룹은 H2O2만 처리, 균주처리 그룹은 균주처리 이후 H2O2를 처리하였다. 이때 균주처리 그룹을 제외한 Control, H2O2 그룹은 FBS와 antibiotics가 첨가되지 않은 medium을 균주처리 대신 처리하였다.
- [0106] 한편, HaCaT 세포를 12 well plate에 5 x 10⁵ cells/well의 조건으로 seeding하여 24시간 동안 배양 후, HaCaT 세포에 열처리한 균주를 24시간 동안 사전 처리하였다. 이후 media를 제거한 후, 산화 스트레스를 유도하기 위해 Hydrogen peroxide (H2O2) (800 μM)를 처리하여, 2시간 동안 반응을 진행하였다. 이때의 그룹은 크게 Control, H2O2, 균주처리 그룹으로 설정하였으며, Control 그룹은 blank, H2O2 그룹은 H2O2만 처리, 균주처리 그룹은 H2O2 처리 전 균주처리를 하였다. 이때, 균주처리 그룹을 제외한 Control, H2O2 그룹은 FBS와 antibiotics가 첨가되지 않은 medium을 처리하였다.
- [0107] 항산화 관련 효소 수치 분석
- [0108] RNA Extraction 및 cDNA 합성을 위해 각각의 plate well 내 media를 suction한 후, Trizol reagent (Invitrogen)을 500 μL 처리하였다. 이후, 세포를 완전히 떼어내고, chloroform 200 μL를 넣고 교반하였으며, 5분간 incubation 후 원심분리를 12000 rpm으로 15분간, 4℃에서 진행하였다. 이후, 생성된 상층

액을 1.5 mL ep tube에 분주한 후, 해당 튜브에 isopropanol 200 μ L를 넣고 10분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 원심분리를 12000 rpm으로 15분간, 4℃에서 진행하고 상층액을 제거하였으며, 이때 튜브 내에 있는 pellet을 75% EtOH로 워싱을 진행하고 원심분리를 7500 rpm으로 5분간 4℃에서 진행하여 상층액을 제거하고 이를 한 번 더 반복하였다. 그리고 5분간 air dry를 진행하고, DEPC 20 μ L 분주 후 나노드랍을 찍어 RNA concentration을 측정하였으며, 농도값을 바탕으로 RNA를 100 ng/ μ L로 희석한 후 cDNA kit (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR로 cDNA를 합성하였다. 이때 PCR은 25℃에서 10분, 37℃에서 2시간, 85℃에서 5분간 진행하였다. 합성된 cDNA는 100 ng/ μ L로 희석 후, 염증성 사이토카인의 유전자적 표현량을 qRT-PCR을 이용해 측정하였다. 이때 염증반응의 마커로는 CAT, SOD1, GPX4를 사용하여 측정하였고, 발현량 측정 결과는 GAPDH(housekeeping gene)을 사용하여 상대적인 값으로 비교하였다. 사용한 프라이머 서열은 표 2와 같았다.

표 2

Gene	-	Gene Sequence	Tm (℃)
GAPDH	F	5' -CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'	60.8
	R	5' -ATGACCACAGTCCATGCCATC-3'	
CAT	F	5' -TGGGATCTCGTTGGAAATAACAC-3'	60.8
	R	5' -TCAGGACGTAGGCTCCAGAAG-3'	
SOD1	F	5' -GGTGGGCCAAAGGATGAAGAG-3'	62.2
	R	5' -CCACAAGCAAACGACTTCC-3'	
GPX4	F	5' -GAGGCAAGACCGAAGTAACTAC-3'	62.2
	R	5' -CCGAAGTGGTTACACGGGAA-3'	

[0109] ③ 실험 결과

[0111] 상기 항산화 효능 실험을 통해 6종의 선발 균주 중 우수한 3가지 균주를 선발할 수 있었다. 선발된 균주의 실험 결과를 2에 나타내었다.

[0112] 도 2는 본 발명 균주의 DPPH 라디칼 소거능 (radical scavenging) 실험 결과를 보여주고, 도 2는 본 발명 균주 및 HT-29 세포를 이용하여 항산화 관련 효소 수치를 분석한 결과를 보여주고 있다. 도 2를 참조할 때 본 발명의 MF10의 경우 항산화 기능성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

[0114] (3) LPS 유도 염증 장세포 모델(HT-29)과 피부세포 모델에서 항염증 효능 평가

[0115] ① 실험방법

[0116] 항염증 효능을 검증하기 위해 in vitro 실험으로써 HT-29 (human colon cancer cell) cell line과 HaCaT (human keratinocyte) cell line을 사용하였다.

[0117] HT-29 세포를 12 well plate에 5 x 10⁵ cells/well의 조건으로 seeding하여 24시간 동안 배양 후, HT-29 세포에 열처리한 균주를 24시간 동안 사전 처리하였다. 이후 해당 media를 제거한 후, 염증반응을 유도하기 위해 Lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/mL)를 처리하여, 24시간 동안 반응을 진행하였다. 이때의 그룹은 크게 Control, LPS, 균주처리 그룹으로 설정하였으며, Control 그룹은 blank, LPS 그룹은 LPS만 처리, 균주처리 그룹은 LPS 처리 전 균주처리를 하였다. 이때, 균주처리 그룹을 제외한 Control과 LPS 그룹은 FBS와 antibiotics가 첨가되지 않은 medium을 균주처리 대신 처리하였다.

[0118] RNA Extraction 및 cDNA 합성을 위해 각각의 plate well 내 media를 suction한 후, Trizol reagent (Invitrogen)을 500 μ L 처리하였다. 이후, 세포를 완전히 떼어내고, chloroform 200 μ L를 넣고 교반하였으며, 5분간 incubation 후 원심분리를 12000 rpm으로 15분간, 4℃에서 진행하였다. 이후, 생성된 상층액을 1.5 mL ep tube에 분주한 후, 해당 튜브에 isopropanol 200 μ L를 넣고 10분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 원심분리를 12000 rpm으로 15분간, 4℃에서 진행하고 상층액을 제거하였으며, 이때 튜브 내에 있는 pellet을 75% EtOH로 워싱을 진행하고 원심분리를 7500 rpm으로 5분간 4℃에서 진행하여 상층액을 제거하고 이를 한 번 더 반복하였다. 그리고 5분간 air dry를 진행하고, DEPC 20 μ L 분주 후 나노드랍을 찍어 RNA concentration을 측정하였으며, 농도값을 바탕으로 RNA를 100 ng/ μ L로 희석한 후 cDNA kit (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR로 cDNA를 합성하였다. PCR은 25℃에서 10분, 37℃에서 2시간, 85℃에서 5분간 진행하였다. 합성된 cDNA는 100 ng/ μ L로 희석 후, 염증성 사이토카인의 유전자적 표현량을 qRT-PCR을 이용해 측정하였고, 염증반응의 마커로는 IL-8, IL-6, IFN- γ , COX-2를 측정하였고, 발현량 측정 결과는

GAPDH(housekeeping gene)를 사용하여 상대적인 값으로 비교하였다. 사용한 프라이머 서열은 표 3과 같았다.

표 3

Gene	-	Gene Sequence	Tm (°C)
GAPDH	F	5' -CCTGCTTACCACCTTCTTG-3'	60.8
	R	5' -ATGACCACAGTCCATGCCATC-3'	
IL-8	F	5' -ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC-3'	60.8
	R	5' -AACCTCTGCACCCAGTTTC-3'	
IL-6	F	5' -CCTGAACCTTCCAAGATGGC-3'	62.2
	R	5' -TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA-3'	
IFN-γ	F	5' -TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA-3'	62.2
	R	5' -TCGCTTCCCTGTTTATAGCTGC-3'	
COX-2	F	5' -CTGGCGCTCAGCCATACAG-3'	62.2
	R	5' -CGCACTTATACTGGTCAAATCCC-3'	

② 실험 결과

선발된 3가지 균주의 실험 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3은 본 발명 균주 및 HT-29 세포를 이용하여 염증성 사이토카인수치를 분석한 결과를 보여준다,

도 3을 보면, 선발 균주들은 모두 대조군에 비하여 염증 관련 사이토카인 발현량이 낮은 것을 확인할 수 있다.

(3) 항생제 내성 시험

① 실험방법

유산균주를 MRS broth에서 37℃에서 통성혐기조건으로 24시간 동안 배양한 후, 균주를 0.5 McFarland 농도 (1.5×10^8 CFU/ml)로 희석한 뒤 희석된 균주를 MRS배지에 lawn이 형성 되도록 streaking하고 10분 간 상온에서 정치하였다. MIC 측정에 문제가 생기지 않도록 strip끼리 충분한 거리를 유지하여 항생제strip을 MRS배지에 배치한 후, 37℃에서 통성혐기조건으로 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 MRS 배지에서 균이 자라지 않은 strip 부위의 가장 밑부분을 MIC로 확정하고, 9종류의 항생제 MIC에 대해서 EFSA MIC cut-off 기준과 비교하여 항생제 내성 여부를 판정하였다.(사용한 항생제 종류 AM: Ampicillin, VA: Vancomycin, GM: Gentamycin, KM: Kanamycin, SM: Streptomycin, EM: Erythromycin, CM: Clindamycin, TC: Tetracycline, CL: Chloramphenicol)

② 실험결과

항생제 내성 평가 결과, 항생제 내성을 보유하지 않은 것으로 알려진 LGG 균주는 9개 종류의 항생제에 대하여 내성을 보이지 않음. MF10 균주는 대부분의 유산균주에서 내성을 보이는 Gentamicin과 Kanamycin에 대한 내성을 나타냄. 이를 통해 실험법이 제대로 세팅되었음을 확인하였다(표 4 및 도 4).

표 4

Strain	AM	VA	GM	KM	SM	EM	CM	TC	CL
LGG	S	n.r.	R	R	R	S	S	S	R
MF10	S	n.r.	R	R	n.r	S	S	S	S

(4) LDH독성 평가

① 실험방법

멸균된 RPMI 1640배지에 오염을 방지하기 위해 Penicillin-streptomycin solution (100U/ml)을 첨가하여 인간 대장암 세포주 HT-29를 배양하였다. 활성화 시킨 HT-29를 1×10^4 cells/well의 농도가 되도록 96-well plate의 각 well에 100μl씩 접종하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well의 배지를 제거한 뒤 DPBS로 2회 washing후 새로운 세포 배지를 100μl씩 첨가하였다. 각 well에 유산균주를 농도별로 (1×10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/well) 접종한 후 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 비교군으로서 positive control 및 negative control을 준비하였다. 배양 후 positive control에 Lysis buffer 10μl, 다른 well에 DPBS 10μl첨가

후 45분간 CO₂ incubator에서 반응시켰다. 반응이 끝난 각 well의 상층액을 50 μ l씩 획득하여 새로운 96-well plate에 옮긴 뒤 각 well에 reaction mixture 50 μ l씩 첨가한 후 30분간 실온에서 반응시켰다. Stop solution을 50 μ l씩 각 well에 첨가한 후 섞어 반응을 멈추었다. Microplate reader를 이용하여 490nm와 680nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 cytotoxicity를 계산하였다. 독성을 나타내는 비교군 균주 Escherichia coli ATCC 25922 대비 정량값이 비슷하거나 유의적으로 높게 나오는지 판단하였다.

②실험결과

HT-29 세포에서 LDH assay를 통해 MF10의 세포 독성 검증을 진행하였다. 그 결과, 독성을 보유한 것으로 알려진 Escherichia coli 0157:H7 ATCC 43895는 세포 독성을 나타낸 반면, MF10 균주는 대조군과 비교하였을 때 유의하게 낮은 세포독성을 보이는 것으로 나타났다(표 5 및 도 5).

표 5

Strain	LDH Toxicity 여부
<i>E. coli</i>	(+)
MF10	(-)

(5) MF10의 발효물 선별

서리태 (BS), 구기자 (GB), 참당귀 (AG) 원물을 세척한 다음, 상기 MF10을 접종하고 30℃의 온도에서 30일간 배양하였다. 상기 배양이 완료된 이후 상기 원물의 압착 추출물과 상기 배양액(FBS, FGB, FAG)의 인간 장세포에서의 항염증성, 쥐 각질세포에서의 항염증성을 확인하였다. 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이 구기자(FGB)발효물의 항염증성이 가장 높은 것으로 나타났다.

상기 구기자 원물(FB) 및 구기자 발효물(FGB)의 항산화능을 상기와 동일한 방법으로 확인하였다. 도 8에 나타난 바와 같이 구기자 발효물의 한산화능이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이후 실험에서는 상기 구기자 발효물(FGB)를 사용하여 실험을 실시하였다.

실험예 2

1) 실험 동물의 사육

실험동물은 체중 20g 정도의 4주령의 C57BL/6 male 마우스를 두얼바이오텍 (DooYeol Biotech, Seoul, Korea)로부터 구매하였다. 각 실험동물은 3~4마리씩 케이지에서 사육하였으며, 실험기간 동안 물과 사료의 양은 자유로이 급여하였으며 항온, 항습이 가능한 사육장에서 실내온도 25℃, 습도 55±5%에서 명암 12시간을 주기로 실험 종료 시까지 일정한 사육 조건을 유지하였다.

2) 실험 방법

실험군은 총 5그룹으로 대조군(Control), Finasteride 처리군(FIN), MF10 처리군(MF10), 구기자 추출물 처리군(GB) 및 구기자 발효물 처리군(FGB)으로 나뉘었다. 2주간의 적응 기간을 거친 후 실험 시작 전 동물용 체모기를 사용하여 등 부위 체모를 진행하였다. 이후 Control에는 PBS(100 μ L/day)를 경구투여, FIN 그룹에는 Finasteride (1mg/kg, 100 μ L/day)를 경구투여, MF10 그룹에는 MF10(10¹⁰ CFU/kg, 100 μ L/day)을 경구투여, GB그룹에는 GB(250mg/kg)을 경구투여, FGB그룹에는 FGB(250mg/kg)을 경구투여하였다.

3) 육안평가 및 Bald Area Reduction Rate

등쪽 피부에 대한 사진 촬영은 주 3회 실시하였다. 촬영된 사진으로부터 모발이 재성장된 부위의 면적을 이미지 분석 프로그램 (ImageJ, National institutes of health, U.S.A.)을 사용하여 측정하였으며, Bald Area Reduction Rate (모발 재성장 부위 면적/최초 체모부위 면적)를 산출하였다.

그 결과 도 9에 나타난 바와 같이 FGB처리군의 경우 모발성장이 유의미하게 증가하는 것으로 나타났다.

4) 모낭세포의 성장주기 변화

각 처리군의 모발세포 성장주기 변화를 각각 측정하였다. 도 10에 나타난 바와 같이 본 발명의 FGB처리군의 경우 성장기(Anagen)모발의 수가 유의미하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 휴지기(telogne)나 과도기(Catagen)의 모발이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

- [0155] 5) 등피부내 모낭수 확인
- [0156] ① 실험방법
- [0157] 절제된 표본조직을 카세트에 담아 10% 포르말린에 담아 1일 동안 고정 및 조직 처리하였다. 고정된 표본조직은 12시간 동안 수세 과정을 거친 후, 조직 자동처리기 (Automatic Tissue processor, Leica)에서 탈수화 투명화 과정을 진행하였다. 파라핀이 조직 내로 침투되도록 24시간 처리하였다. 파라핀이 침투된 표본조직을 파라핀 블록 (Embedding cencer, LEICA, EG1150H)으로 제작한 후 냉장실에 1시간 동안 보관한 후, 박절기(LEICA, RM2135)를 이용하여 4-6 μ m로 절단 하였다. 절단한 조직을 온수 (Water bath, JISICO, J-NBT) 에 담도록 하여 주름을 펴고, 슬라이드로 떼서 슬라이드 Warmer (LEICA, HI1220) 에 물기 제거 및 파라핀이 슬라이드에 완전 밀착 되도록 하여 슬라이드를 제작하였다. Hematoxylin 및 Eosin 염색 시약을 통해 H&E 염색을 진행하였다. 염색된 슬라이드를 스캐너(MoticSlide Scanner, VM1)를 통해 촬영하였다.
- [0158] ②실험결과
- [0159] 도 11에 나타난 바와 같이 FGB처리군의 모낭수가 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다.
- [0161] **실시예 1**
- [0162] 상기 실험예 1 및 2에서 효능이 확인된 MF10의 구기자 발효물(FGB)을 이용한 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제조하였다.
- [0163] 해면을 25중량%의 수산화나트륨 수용액에 침지한 다음, 70℃로 30분간 가열하여 단백질 성분을 분리하였다. 상기 단백질 성분이 분리된 다음, 물을 사용하여 3회 1차 세척하고 고형분을 분리하였으며, 상기 분리된 고형분을 pH 2~2.5의 레몬즙에 12시간 동안 침지하고 초음파를 공급하여 이물질을 제거하였다. 상기 이물질이 제거된 고형분을 3회 물로 2차 세척하였다. 질소로 치환된 챔버에 상기 2차 세척된 고형분을 장입하고 챔버를 밀폐하였다. 상기 챔버 내부에 210℃의 수증기를 공급하며, 2기압을 40분간 유지하여 살균 및 이물질 제거를 수행하였다. 상기 이물질의 제거가 완료된 이후 120℃의 질소를 80분간 공급하여 고형분을 건조하는 것으로 평균 길이 50 μ m의 스피쿨을 제조하였다.
- [0164] 코코넛 오일을 55℃로 가열한 다음, 상기 가열된 코코넛 오일 100중량부 대비, 호호바오일 30중량부, 포도씨 오일 7중량부, 올리브 오일 3중량부, 미리스틴산 60중량부, 카나우바 왁스 8중량부 및 비타민 E 0.5중량부를 혼합하여 혼합 오일을 제조하였다. 물 100중량부 대비 비타민 C 1중량부를 혼합하여 수용성 비타민 용액을 제조하였으며, 상기 제조된 혼합오일 100중량부 대비 상기 수용성 비타민 용액 5중량부를 혼합한 다음 1시간동안 교반하는 것으로 유중수적형 에멀전을 제조하였다. 상기 유중수적형 에멀전을 50℃의 온도로 유지하며 온도의존성 오일로 사용하였다.
- [0165] 구기자를 세척한 다음 구기자 과육에서 씨앗을 분리하였으며, 양배추를 세척한 다음, 일부분을 분리하였다.
- [0166] 상기 분리된 일부분을 용기내에 장입한 다음 상기 구기자 과육 100중량부 대비 물 120중량부, 상기 양배추 잎 40중량부, 검은콩 60중량부, 상기 스피쿨 15중량부 및 상기 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum, MF10) 3중량부를 혼합하였다. 상기 장입된 용기를 밀봉한 다음, 30℃의 온도에서 30일간 배양하였다. 상기 배양이 완료된 이후 잔여물중 상기 구기자 과육, 양배추 일부분 및 콩을 제거하여 배양액 혼합물을 제조하였으며, 상기 배양액 혼합물을 필터링 하여 배양 스피쿨과 배양액을 분리하였다. 상기 배양 스피쿨을 건조한 다음, 상기 50℃의 온도의존성 오일에 침지하였다. 상기 온도의존성 오일을 필터링하고 15℃로 냉각하여 온도의존성 오일이 코팅된 스피쿨을 획득하였다. 상기 배양액을 동결 건조하여 유산균주 분말을 획득하였다. 화장료 베이스(크림베이스, 코스코코) 100중량부 대비 상기 온도의존성 오일이 코팅된 스피쿨 1중량부, 상기 유산균주 분말 2.5중량부를 혼합하여 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제조하였다.
- [0168] **실시예 2**
- [0169] 상기 실시예 1에서 스피쿨 제조시 레몬즙 대신 동일 pH의 염산을 사용한 것을 제외하고 동일하게 실시하였다.
- [0171] **실시예 3**
- [0172] 상기 실시예 1에서 스피쿨 제조시 챔버에 장입하고 수증기를 공급하여 가열하는 단계를 실시하지 않은 것을 제외하고 동일하게 실시하였다.
- [0174] **실시예 4**

[0175] 상기 실시예 1에서 온도의존성 오일로 코코넛 오일만을 사용한 것을 제외하고 동일하게 실시하였다.

[0177] **실시예 5**

[0178] 상기 실시예 1에서 스피클의 표면을 온도의존성 오일로 코팅하지 않은 것을 제외하고 동일하게 실시하였다.

[0180] **실시예 6**

[0181] 상기 실시예 1에서 배양 스피클 대신 배양액에 침지되지 않은 스피클을 사용한 것을 제외하고 동일하게 실시하였다.

[0183] **실시예 7**

[0184] 상기 실시예 1에서 스피클을 사용하지 않은 것을 제외하고 동일하게 실시하였다.

[0186] **실시예 8**

[0187] 상기 실시예 1에서 본 발명의 MF10대신 기존에 판매되는 락토바실러스 퍼넨텀(경남제약)을 사용한 것을 제외하고 동일하게 실시하였다.

[0189] **실시예 9**

[0190] 상기 실시예 1에서 본 발명의 MF10대신 기존에 판매되는 유산균 제품(종근당 건강)을 사용한 것을 제외하고 동일하게 실시하였다.

[0192] **실험예 3**

[0193] 상기 실시예 1~9에서 제조된 화장료 조성물의 효과를 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 사전에 훈련된 남녀 30명을 모집한 다음, 상기 실시예 1~9의 화장료 조성물 1g을 하박 내측 2cmX2cm의 부위에 일 1회 적용하였다. 또한 자외선에 손상된 부분의 회복효과를 확인하기 위하여 손등 부분에도 동일하게 적용하였다. 상기와 같은 방법으로 15일간 적용한 다음, 피부탄력, 피부색상, 주름개선, 전체적인 효과, 자극성, 기타 부작용의 항목을 대상으로 10점 만점으로 평가하였다. 평가가 완료된 이후 공정성을 높이기 위하여 최저점 2개 및 최고점 2개를 제외하고 평균을 내어 하기의 표 6에 나타내었다.

표 6

[0194]

	피부탄력	피부색상	주름개선	전체효과	자극성	부작용
실시예 1	9.8	9.5	9.4	9.6	9.1	9.7
실시예 2	9.5	9.0	9.4	9.2	8.1	6.0
실시예 3	9.1	9.2	9.2	9.2	9.0	7.5
실시예 4	8.6	8.2	8.5	8.5	9.1	9.5
실시예 5	8.0	7.5	7.6	8.1	9.0	9.4
실시예 6	6.8	6.5	6.7	6.5	9.0	9.4
실시예 7	6.8	6.4	6.8	6.5	9.3	9.7
실시예 8	4.3	5.5	5.4	5.2	9.0	9.5
실시예 9	4.2	4.3	4.5	4.2	9.1	9.5

[0195] 표 6에 나타난 바와 같이 본 발명의 실시예 1의 경우 높은 효과를 가지는 것으로 나타났다. 염산을 사용하여 처리한 실시예 2의 경우 자극성이 높아지고 자극에 의한 부작용이 높아지는 것으로 나타났으며, 수증기 처리를 하지 않은 실시예 3의 경우 잔여물 및 미생물에 의한 염증이 발생하여 부작용이 많아지는 것으로 나타났다.

[0196] 온도의존성 오일로 코코넛오일만을 사용한 실시예 4의 경우 피부개선효과가 감소하는 것으로 나타났으며, 스피클 표면을 오일로 코팅하지 않은 실시예 5역시 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

[0197] 배양액에 침지되지 않은 스피클을 사용하는 실시예 6의 경우에도 낮은 효과를 가지는 것으로 나타났으며, 이와는 반대로 스피클을 사용하지 않은 실시예 7의 경우 부작용 및 자극성은 실시예 1에 비하여 감소되었지만 그 효과가 떨어져 스피클의 효과를 직접적으로 확인할 수 있었다.

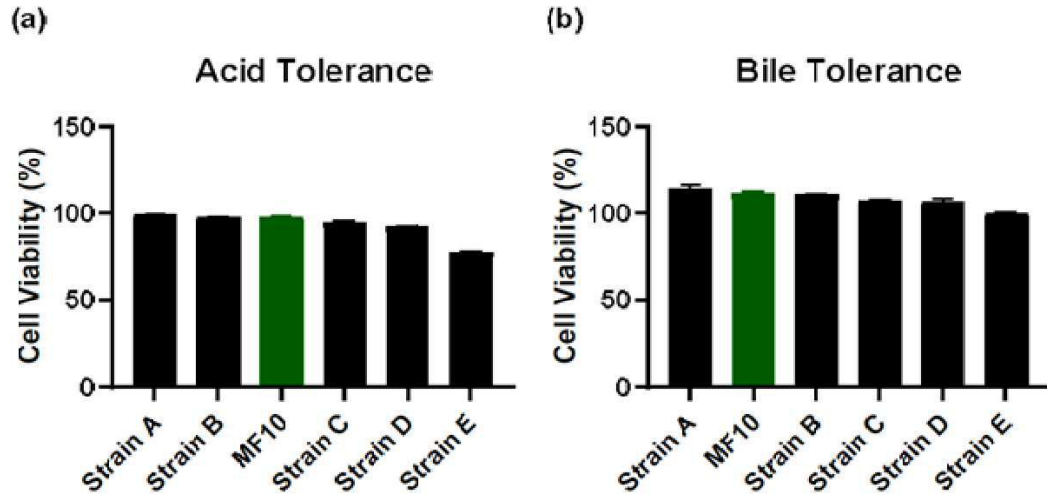
[0198] 기존의 유산균을 사용한 실시예 8 및 9의 경우 본 발명의 실시예 1에 비하여 전반적으로 효과가 대폭감소하는 것으로 나타났다.

[0200]

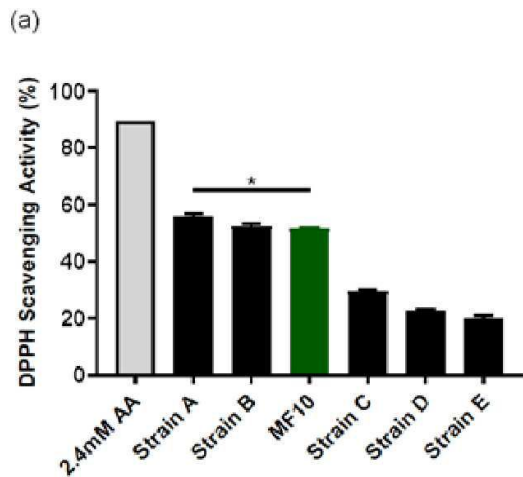
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

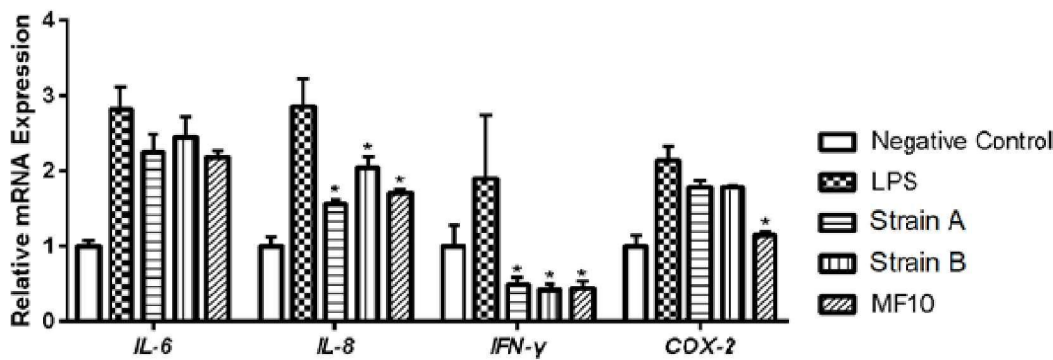
도면1



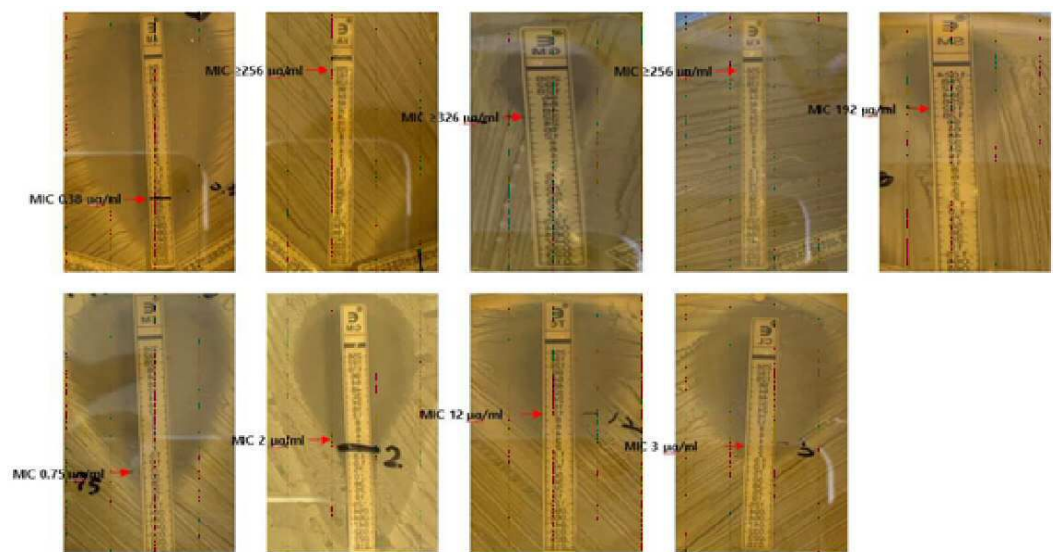
도면2



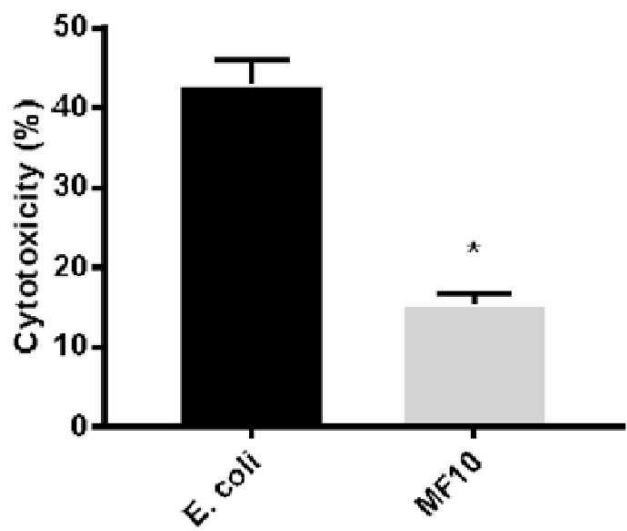
도면3



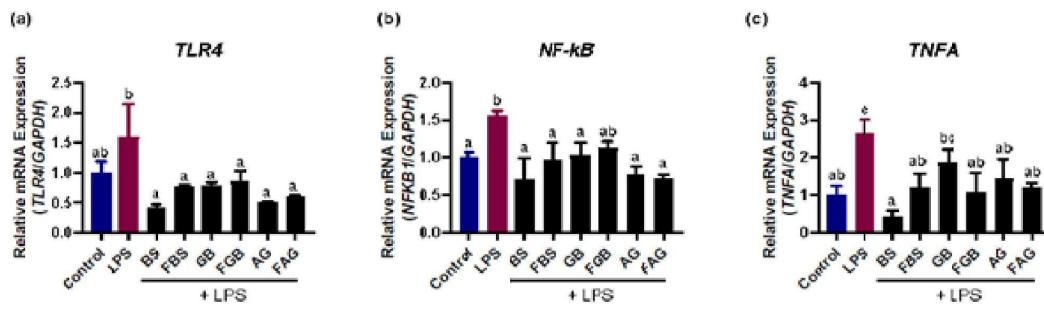
도면4



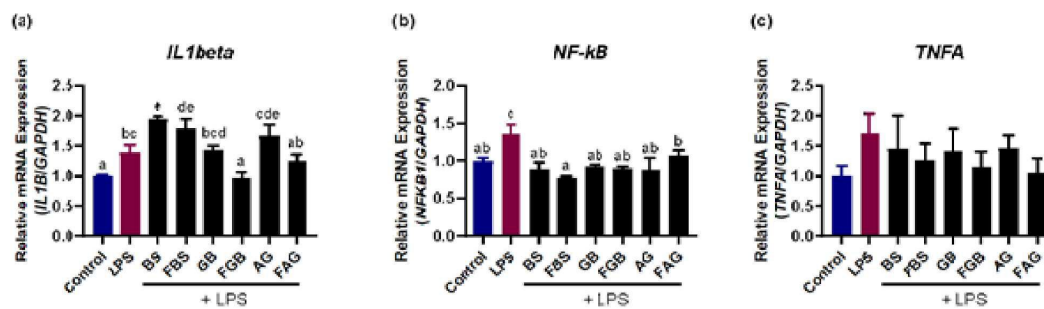
도면5



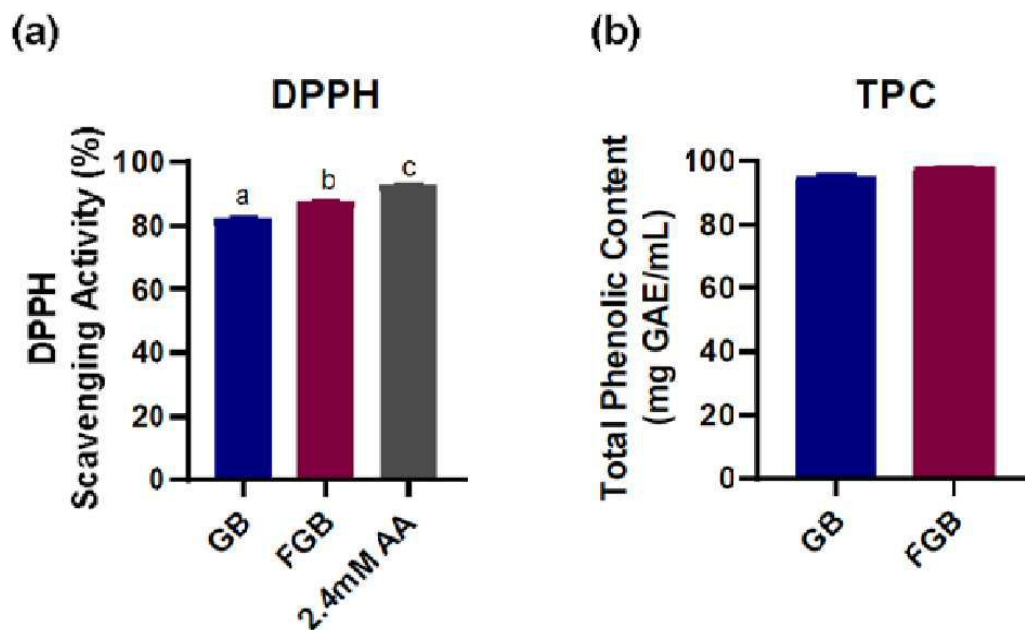
도면6



도면7



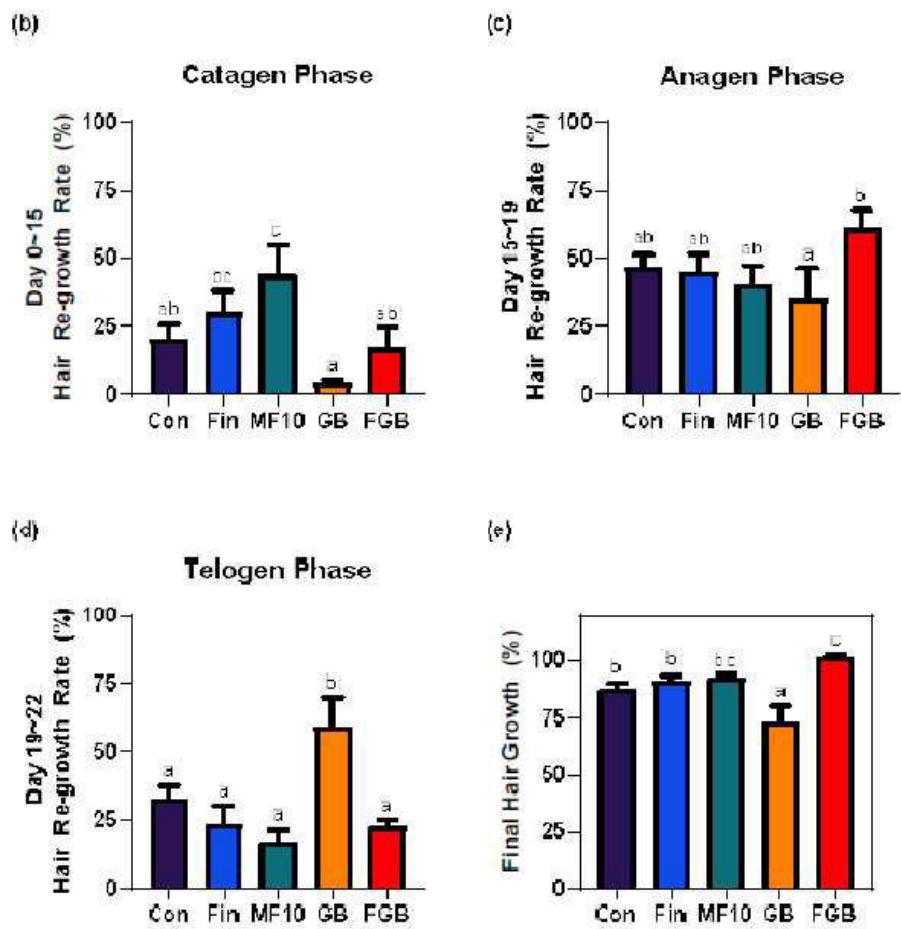
도면8



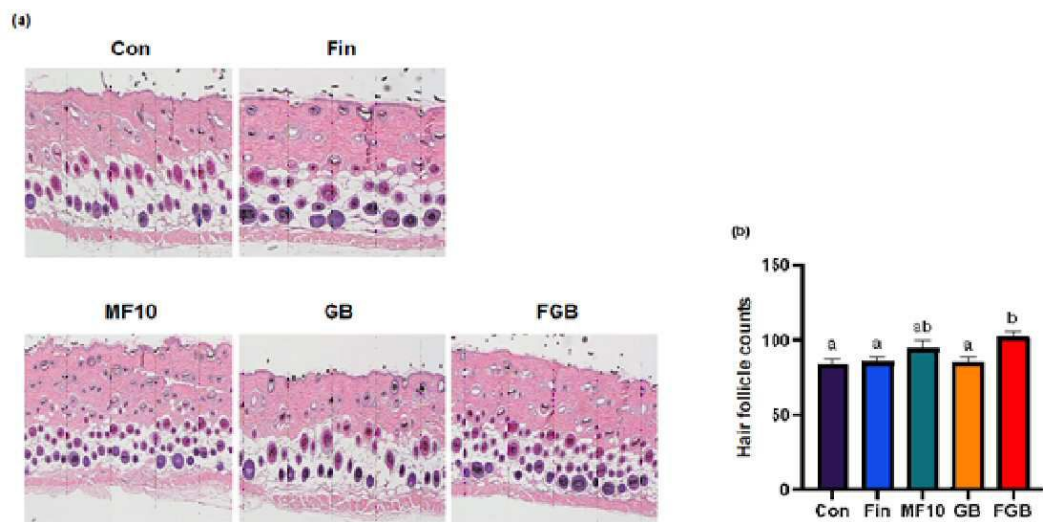
도면9

	Day 0	Day 8	Day 12	Day 15	Day 19	Day 22
Con						
Fln						
MF10						
GB						
FGB						

도면10



도면11



【심사관 직권보정사항】
【직권보정 1】
【보정항목】 청구범위
【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)을 배양하는 단계; 및

상기 배양이 완료된 이후 화장료 베이스와 혼합하는 단계;

를 포함하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법에 있어서,

상기 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법은,

10~60 μ m의 크기를 가지는 해면 유래 스피큘을 준비하는 단계;

구기자를 세척한 다음, 씨앗을 분리하는 단계;

상기 씨앗이 분리된 구기자 과육을 용기내에 장입한 다음 상기 과육 100중량부 대비 물 100~150중량부, 양배추 30~50중량부, 검은콩 50~70중량부, 상기 해면유래 스피큘 5~20중량부 및 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 1~5중량부를 혼합하는 단계;

상기 과육이 장입된 용기를 밀봉한 다음, 25~35℃의 온도에서 20~50일간 배양하는 단계;

상기 배양이 완료된 이후 잔여물중 상기 과육, 양배추 및 콩을 제거하여 배양액 혼합물을 제조하는 단계;

상기 배양액 혼합물을 필터링 하여 배양 스피큘과 배양액을 분리하는 단계;

상기 배양 스피큘을 건조한 다음, 40~60℃의 온도의존성 오일에 침지하는 단계;

상기 온도의존성 오일을 필터링하고 10~30℃로 냉각하여 온도의존성 오일이 코팅된 스피큘을 획득하는 단계;

상기 배양액을 동결 건조하여 유산균주 분말을 획득하는 단계; 및

화장료 베이스 100중량부 대비 상기 온도의존성 오일이 코팅된 스피큘 0.1~2중량부, 상기 유산균주 분말 1~3중량부를 혼합하여 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제조하는 단계;

를 포함하며,

상기 온도의존성 오일은,

코코넛 오일을 50~60℃로 가열하는 단계;

상기 가열된 코코넛 오일 100중량부 대비, 호호바오일 20~40중량부, 포도씨 오일 5~10중량부, 올리브 오일 1~5중량부, 미리스틴산 50~80중량부, 카나우바 왁스 5~20중량부 및 비타민 E 0.1~1중량부를 혼합하여 혼합 오일을 제조하는 단계;

물 100중량부 대비 비타민 C 0.1~2중량부를 혼합하여 수용성 비타민 용액을 제조하는 단계; 및

상기 제조된 혼합오일 100중량부 대비 상기 수용성 비타민 용액 3~10중량부를 혼합한 다음 유화시켜 유중수적형 에멀전을 제조하는 단계;

를 포함하는 방법으로 제조되며,

상기 스피큘은,

해면을 10~30중량%의 수산화나트륨 수용액에 침지한 다음, 60~80℃로 20~50분간 가열하여 단백질 성분을 분리하는 단계;

상기 단백질 성분이 분리된 다음, 물을 사용하여 2~5회 1차 세척하고 고형분을 분리하는 단계;

상기 분리된 고형분을 pH 1~5의 산에 10~15시간 동안 침지하고 초음파를 공급하여 이물질을 제거하는 단계;

상기 이물질이 제거된 고형분을 2~5회 물로 2차 세척하는 단계;

질소로 치환된 챔버에 상기 2차 세척된 고형분을 장입하고 챔버를 밀폐하는 단계;

상기 챔버 내부에 180~250℃의 수증기를 공급하며, 1.5~3기압을 30~60분간 유지하여 살균 및 이물질 제거를 수행하는 단계; 및

상기 이물질의 제거가 완료된 이후 100~150℃의 질소를 60~90분간 공급하여 고형분을 건조하는 단계;

를 포함하는 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법.

【변경후】

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)을 배양하는 단계; 및

상기 배양이 완료된 이후 화장료 베이스와 혼합하는 단계;

를 포함하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법에 있어서,

상기 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법은,

10~60 μ m의 크기를 가지는 해면 유래 스피쿨을 준비하는 단계;

구기자를 세척한 다음, 씨앗을 분리하는 단계;

상기 씨앗이 분리된 구기자 과육을 용기내에 장입한 다음 상기 과육 100중량부 대비 물 100~150중량부, 양배추 30~50중량부, 검은콩 50~70중량부, 상기 해면유래 스피쿨 5~20중량부 및 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 1~5중량부를 혼합하는 단계;

상기 과육이 장입된 용기를 밀봉한 다음, 25~35℃의 온도에서 20~50일간 배양하는 단계;

상기 배양이 완료된 이후 잔여물중 상기 과육, 양배추 및 콩을 제거하여 배양액 혼합물을 제조하는 단계;

상기 배양액 혼합물을 필터링 하여 배양 스피쿨과 배양액을 분리하는 단계;

상기 배양 스피쿨을 건조한 다음, 40~60℃의 온도의존성 오일에 침지하는 단계;

상기 온도의존성 오일을 필터링하고 10~30℃로 냉각하여 온도의존성 오일이 코팅된 스피쿨을 획득하는 단계;

상기 배양액을 동결 건조하여 유산균주 분말을 획득하는 단계; 및

화장료 베이스 100중량부 대비 상기 온도의존성 오일이 코팅된 스피쿨 0.1~2중량부, 상기 유산균주 분말 1~3중량부를 혼합하여 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물을 제조하는 단계;

를 포함하며,

상기 온도의존성 오일은,

코코넛 오일을 50~60℃로 가열하는 단계;

상기 가열된 코코넛 오일 100중량부 대비, 호호바오일 20~40중량부, 포도씨 오일 5~10중량부, 올리브 오일 1~5중량부, 미리스틴산 50~80중량부, 카나우바 왁스 5~20중량부 및 비타민 E 0.1~1중량부를 혼합하여 혼합 오일을 제조하는 단계;

물 100중량부 대비 비타민 C 0.1~2중량부를 혼합하여 수용성 비타민 용액을 제조하는 단계; 및

상기 제조된 혼합오일 100중량부 대비 상기 수용성 비타민 용액 3~10중량부를 혼합한 다음 유화시켜 유중수적형 에멀전을 제조하는 단계;

를 포함하는 방법으로 제조되며,

상기 스피쿨은,

해면을 10~30중량%의 수산화나트륨 수용액에 침지한 다음, 60~80℃로 20~50분간 가열하여 단백질 성분을 분리하는 단계;

상기 단백질 성분이 분리된 다음, 물을 사용하여 2~5회 1차 세척하고 고형분을 분리하는 단계;

상기 분리된 고형분을 pH 1~5의 산에 10~15시간 동안 침지하고 초음파를 공급하여 이물질을 제거하는 단계;

상기 이물질이 제거된 고형분을 2~5회 물로 2차 세척하는 단계;

질소로 치환된 챔버에 상기 2차 세척된 고형분을 장입하고 챔버를 밀폐하는 단계;

상기 챔버 내부에 180~250℃의 수증기를 공급하며, 1.5~3기압을 30~60분간 유지하여 살균 및 이물질 제거를 수

행하는 단계; 및

상기 이물질의 제거가 완료된 이후 100~150℃의 질소를 60~90분간 공급하여 고형분을 건조하는 단계;

를 포함하는 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 유산균주를 포함하는 모발 성장 개선 기능성 조성물 제조방법.

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.