

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0085114
(43) 공개일자 2020년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9789 (2017.01) *A23L 29/00* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 29/065 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0001243

(22) 출원일자 2019년01월04일

심사청구일자 2019년01월04일

(71) 출원인

박병희

서울특별시 서초구 서초중앙로 188, B동 2805호
(서초동, 아크로비스타)

(72) 발명자

박병희

서울특별시 서초구 서초중앙로 188, B동 2805호
(서초동, 아크로비스타)

(74) 대리인

특허법인한남

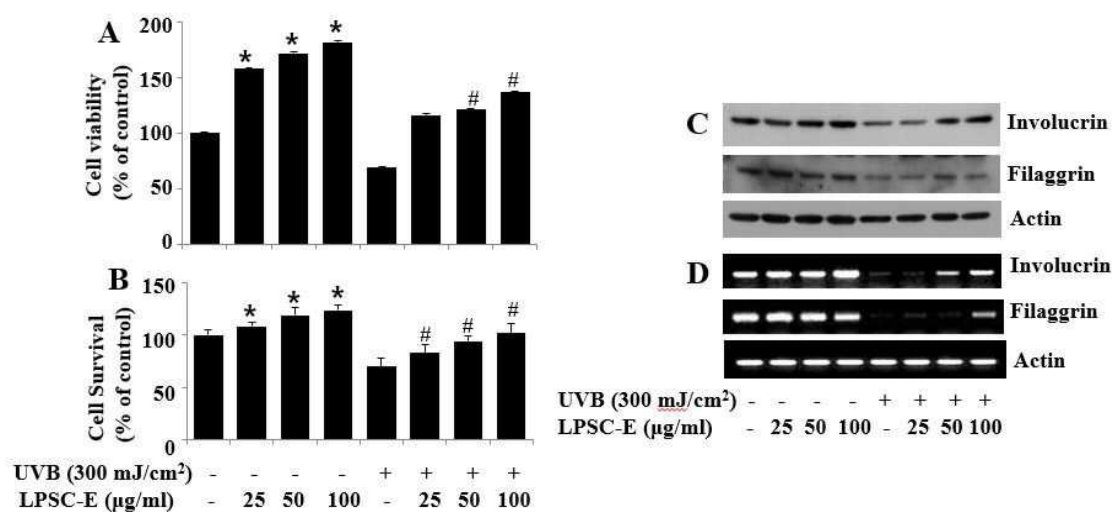
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 오미자 발효추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물을 제공한다. 본 발명의 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물은 낮은 세포독성을 가지며, 피부의 산화 및 염증을 억제하고, 피부장벽기능을 개선함으로써, 피부보습력을 강화하고, 피부트러블을 방지하거나 또는 피부노화를 방지하는 효과가 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61Q 19/00 (2013.01)

A61Q 19/007 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

A61K 2800/85 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부장벽기능 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 피부보습 강화, 피부트러블 방지 및 피부노화 방지로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 용도를 가지는, 피부장벽기능 개선용 화장료 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 오미자 발효추출물은 오미자 열수 추출물의 발효물인, 피부장벽기능 개선용 화장료 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 오미자 발효추출물은 피키아 쿠드리아브제비(*Pichia kudriavzevii*), 사카로마이콥시스 피불리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*), 락토바실러스 부치네리(*Lactobacillus buchneri*), 락토바실러스 파라카제이 톨레랑스(*Lactobacillus paracasei* sub. *Tolerans*) 및 락토바실러스 하비넨시스(*Lactobacillus harbinensis*)로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 균주로 발효한 것인, 피부장벽기능 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 오미자 발효추출물은 상기 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.1 내지 5 중량% 함유되는 것인, 피부장벽기능 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 오미자 발효추출물은 간 및 위장관 보호 효과를 가지는 것인, 피부장벽기능 개선용 화장료 조성물.

청구항 7

오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부장벽기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 오미자 발효추출물은 간 및 위장관 보호 효과를 가지는 것인, 피부장벽기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부장벽기능 개선용 의약외품 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 오미자 발효추출물은 간 및 위장관 보호 효과를 가지는 것인, 피부장벽기능 개선용 의약외품 조성물.

청구항 11

오미자 추출물에 피키아 쿠드리야브제비(*Pichia kudriavzevii*), 사카로마이콥시스 피불리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*), 락토바실러스 부치네리(*Lactobacillus buchneri*), 락토바실러스 파라카제이 톨레랑스(*Lactobacillus paracasei* sub. *Tolerans*) 및 락토바실러스 하비넨시스(*Lactobacillus harbinensis*) 로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 균주를 접종하고 발효시키는 단계를 포함하는, 피부장벽기능 개선용 오미자 발효추출물의 제조방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 발효는 24 내지 72 시간 수행되는 것인, 피부장벽기능 개선용 오미자 발효추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오미자 발효추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 외부 환경과 항상 접하고 있는 기관으로 외부의 물리적 손상 및 화학물질 등으로부터 인체를 보호하고, 세균, 곰팡이, 바이러스 등이 피부로 침범하는 것을 방지하며, 수분 손실을 막는 보호장벽 역할을 수행한다. 피부는 표피, 진피, 피하지방 등 3개의 층으로 구성되고 표피는 위 3개의 층 중 가장 얇은 층으로 피부의 보습과 보호를 담당하는 중요한 기능을 한다. 특히 표피의 각질층에 존재하는 수분에 의해 피부가 탄력을 가지게 되며 부드럽게 되는데, 각질층의 탄력성이 유지되려면 10% 이상의 수분 함유가 필수적인 것으로 알려져 있다.

[0003] 피부의 수화작용(skin hydration)은 표피에서 진피로의 삼투압에 의한 수분이동과 증발작용에 의한 표피의 수분 손실의 평형에 의해서 결정된다. 임상적으로 건성피부는 피부 표면이 건조하고 탄력이 떨어지며, 각질탈리(scaling)가 일어나기 쉽고 거칠다. 또, 가려운 증상이 나타나기도 하고 경우에 따라서는 건조증, 갈라짐 등의 증상이 동반되기도 한다. 표피의 보습수준은 각질세포간 지질, 각질층결합단백질(corneodesmosom), 천연보습인자(natural moisturizing factor: NMF)에 크게 의존한다.

[0004] 인볼루크린(involucrin)은 인체의 편평상피세포에서 합성되는 일종의 세포질 단백질로 정상 표피에서는 상부 유극층과 과립층에서부터 나타나기 시작하고 합성된 후에는 세포막 가까이에 위치하여 트랜스글루타미다제(trasnglutamidase)에 의해 막단백질에 결합되어 지지체 역할을 하는 각화세포피(cornified cell envelope)의

주요한 구조 구성단백질로서, 피부장벽 기능을 수행함으로써 피부 보습력을 유지시킨다.

[0005] 필라그린(filaggrin)은 표피단백질의 일종으로서, 피부가 수분과 보습성분을 유지하도록 하는 기능을 수행할 뿐 아니라 외부로부터 세균과 독소가 침투하지 못하도록 억제하는데 필수적인 단백질이다. 먼저 필라그린의 전구체인 프로필라그린(profilaggrin) 형태로 분비된 다음 필라그린 단량체(monomer)로 분해되고, 이는 각질층 내에서 케라틴 중간미세섬유를 응집하여 불용성인 케라틴 기질을 형성한다. 이 기질을 뼈대로 하여 각질세포의 세포막 바로 아래에 각화세포피(cornified cell envelope)가 형성된다. 그리고 필라그린은 더 분해되어 친수성 아미노산인 NMF로 분해된다. NMF는 강력한 보습제로서 각질층의 수분공급에 중요한 역할을 하고 각질층의 pH를 낮추어 항균효과를 갖게 한다.

[0006] 본 발명에서는 천연물질인 오미자로부터 유래한 발효추출물을 이용하여 인볼루크린(involucrin)과 필라그린(filaggrin) 단백질의 발현을 증가시킴으로써 피부장벽기능을 개선할 수 있는 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물을 제공하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 피부장벽기능 개선용 오미자 발효추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부장벽기능 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 오미자 추출물에 피키아 쿠드리야브제비(Pichia kudriavzevii), 사카로마이콕시스 피불리게라(Saccharomycopsis fibuligera), 락토바실러스 부치네리(Lactobacillus buchneri), 락토바실러스 파라카제이 톨레랑스(Lactobacillus paracasei sub. Tolerans) 및 락토바실러스 하비넨시스(Lactobacillus harbinensis) 로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 균주를 접종하고 발효시키는 단계를 포함하는, 피부장벽기능 개선용 오미자 발효추출물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른, 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 화장품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 의약품 조성물은 낮은 세포독성을 가지며, 피부의 산화 및 염증을 억제하고, 피부장벽기능을 개선함으로써, 피부보습력을 강화하고, 피부트러블을 방지하거나 또는 피부노화를 방지하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 RAW264.7 세포에 오미자 발효추출물을 처리하였을 때, 세포 생존율(A)과 NO생성(B)을 나타낸 그래프이다.

도 2는 RAW264.7 세포에 오미자 발효추출물을 처리하였을 때, 염증성 사이토카인(cytokine)인 IL-6(A), IL- β (B) 및 TNF- α 의 mRNA(C) 발현을 나타낸 그래프이다.

도 3은 오미자 발효추출물을 UVB 조사된 HaCaT(각질형성세포)에 처리했을 때, 인볼루크린, 필라그린 및 mRNA의 발현 감소가 억제되는 것을 나타낸 것이다.

도 4는 오미자 발효추출물이 UVB 300mJ/cm², 5h 조사시킨 HaCaT 세포 내 ERK-1/2 단백질 인산화(활성화)증가와, c-Fos 단백질 및 mRNA 발현 증가를 나타낸 것이다.

도 5는 간독성 약물에 의해 발생하는 간세포 사멸, 괴사로 인하여 발생하는 간 크기 감소 현상에 의한 간독성 실험 결과 및 오미자 발효추출물을 처리하였을 때 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 간독성 약물에 의해 발생하는 간세포 사멸, 괴사로 인하여 발생하는 간 크기 감소 현상에 의한 간독성 실험 결과 및 오미자 발효추출물을 처리하였을 때 GFP 형광에 근거한 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 제브라피쉬의 장손상을 유발한 뒤 유출되는 형광을 측정하여 장을 통한 단백질유출을 정량적으로 측정한 결과 및 오미자 발효추출물을 처리하였을 때 실험 결과(흡광도)를 나타낸 것이다.

도 8은 제브라피쉬의 장손상을 유발한 뒤 유출되는 형광을 측정하여 장을 통한 단백질유출을 정량적으로 측정한 결과 및 오미자 발효추출물을 처리하였을 때 실험 결과(%비교)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0019]

인볼루크린(involucrin)은 인체의 편평상피세포에서 합성되는 일종의 세포질 단백질로 정상 표피에서는 상부 유극층과 과립층에서부터 나타나기 시작하고 합성된 후에는 세포막 가까이에 위치하여 트랜스글루타미다제(trasnglutamidase)에 의해 막단백질에 결합되어 지지체 역할을 하는 각화세포피(cornified cell envelope)의 주요한 구조 구성단백질이다.

[0020]

필라그린(filaggrin)은 표피단백질의 일종으로서, 피부가 수분과 보습성분을 유지하도록 하는 기능을 수행할 뿐 아니라 외부로부터 세균과 독소가 침투하지 못하도록 억제하는데 필수적인 단백질이다. 먼저 필라그린의 전구체인 프로필라그린(profilaggrin) 형태로 분비된 다음 필라그린 단량체(monomer)로 분해되고, 이는 각질층 내에서 케라틴 중간미세섬유를 응집하여 불용성인 케라틴 기질을 형성한다. 이 기질을 뼈대로 하여 각질세포의 세포막 바로 아래에 각화세포피(cornified cell envelope)가 형성된다. 그리고 필라그린은 더 분해되어 친수성 아미노산인 NMF로 분해된다. NMF는 강력한 보습제로서 각질층의 수분공급에 중요한 역할을 하고 각질층의 pH를 낮추어 항균효과를 갖게 한다.

[0021]

한편, 피부장벽기능을 유지 및 강화하는 기능을 가진 것으로 알려진, 인볼루크린과 필라그린은 각질형성세포에서 피부의 보습과 수화과 관련된 천연보습인자로서, 본 발명에 따른 오미자 발효추출물은 인볼루크린(involucrin)과 필라그린(filaggrin) 단백질의 발현을 증가시킴으로써 피부장벽기능을 개선하여, 피부보습력을 강화하고, 피부트러블을 방지하거나 또는 피부노화를 방지하는 효과가 있다.

[0023]

이에, 본 발명의 일실시예에 따르면, 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 화장품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 일실시예에 따르면 구체적으로 상기 화장품 조성물은 피부보습 강화, 피부트러블 방지 및 피부노화 방지로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 용도를 가지는 것일 수 있다.

[0024]

본 발명에 있어서, 오미자는 오미자과의 덩굴성 낙엽수 나무에서 열리는 과일로서, 달고 쓰고 시고 맵고 짠 다섯 가지의 맛이 난다고 하여 오미자라고 불린다. 오미자는 일반적으로 혈류 개선, 고혈압, 뇌졸중, 심혈관 질환 예방, 면역력 개선, 당뇨병 예방, 간기능 개선, 원기 회복, 호흡기 질환 개선 효능이 있는 것으로 알려져 있다.

[0025]

본 발명에 있어서, 오미자 발효추출물은 오미자의 다양한 기관 또는 부분으로부터 추출 및 발효하여 얻은 것일 수 있고, 일례로 오미자청 부산물을 열수 추출하여 얻은 추출물을 특정 균주로 발효한 오미자 열수 추출물의 발효물일 수 있다.

[0026]

본 발명의 일실시예에 있어서 사용되는 특정 균주는 피키아 쿠드리야브제비(Pichia kudriavzevii), 사카로마이콥시스 피불리게라(Saccharomycopsis fibuligera), 락토바실러스 부치네리(Lactobacillus buchneri), 락토바실러스 파라카제이 톨레랑스(Lactobacillus paracasei sub. Tolerans) 및 락토바실러스 하비넨시스

(*Lactobacillus harbinensis*) 로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 균주일 수 있다.

- [0028] 한편, 본 발명의 일실시예에 따른 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로 제조되는 데에 제한이 있는 것은 아니며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 화장수, 영양 크림, 수분 크림, 에센스, 아이 크림, 로션, 팩, 에센스와 같은 기초 화장품인 기능성 화장품을 제조하는 데 적용이 가능하다.
- [0029] 한편, 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 발효추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 및 담체를 포함할 수 있다.
- [0030] 한편, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 오미자 발효추출물은 상기 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.1 내지 5 중량% 함유되는 것일 수 있으며, 상기 중량% 범위 내에서 피부장벽기능 개선 효과가 있고, 상기 중량% 범위 미만에서는 피부장벽기능 개선 효과가 미미한 문제점이 있을 수 있다.
- [0032] 한편, 본 발명의 일실시예에 따르면, 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상술한 화장료 조성물과 마찬가지로, 상기 건강기능식품 조성물 역시 피부보습 강화, 피부트러블 방지 및 피부노화 방지로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 용도를 가지는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일실시예에 따른 상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 건강기능식품 종류에 특별한 제한은 없으며, 일례로 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등일 수 있고, 통상적인 의미에서 식품을 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [0034] 한편, 상기 식품 조성물은 상기 발효추출물 이외에 건강기능식품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 또는 그 조합을 포함할 수 있다.
- [0036] 한편, 본 발명의 일실시예에 따르면, 오미자 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽기능 개선용 의약품 조성물을 제공한다. 상술한 화장료 조성물과 마찬가지로, 상기 의약품 조성물 역시 피부보습 강화, 피부트러블 방지 및 피부노화 방지로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 용도를 가지는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어인 "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약품이란 의약품 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람 또는 동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제 품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등을 포함한다.
- [0038] 상기 의약품 조성물은 피부장벽기능 개선 목적으로, 더욱 상세하게는 피부보습 강화, 피부트러블 방지 및 피부노화 방지 목적으로 사용되는 것으로, 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면, 유연화장수, 영양화장수, 마사지크림, 영양크림, 팩, 마스크팩, 마스크시트, 젤 또는 피부 점착타입 화장료의 제형을 갖는 조성물일 수 있으며, 또한, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 또는 분무제와 같은 경피투여형 제형을 갖는 조성물일 수 있다.
- [0039] 한편, 상기 의약품 조성물은 상기 발효조성물 이외에 예컨대, 점증제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 및 담체 등을 필요에 따라 적절하게 추가로 배합하여 포함할 수 있다.
- [0041] 한편, 본 발명의 일실시예에 따르면, 오미자 추출물에 피키아 쿠드리야브제비(*Pichia kudriavzevii*), 사카로마 이콥시스 피블리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*), 락토바실러스 부치네리(*Lactobacillus buchneri*), 락토바

실러스 파라카제이 톨레랑스(*Lactobacillus paracasei* sub. *Tolerans*) 및 락토바실러스 하비넨시스(*Lactobacillus harbinensis*)로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 균주를 접종하고 발효시키는 단계를 포함하는 피부장벽기능 개선용 오미자 발효추출물의 제조방법을 제공한다.

[0042] 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따른 오미자 추출물은 오미자 부산물을 준비한 다음, 상기 오미자 부산물 중량대비(wt%) 대비 10 배의 정제수를 넣고, 70 내지 90℃ 온도 조건에서 4 내지 30 시간 동안 열수 추출한 것일 수 있다. 만약 상기 단계에서 온도 조건이 70 ℃ 미만인 경우 추출이 효과적으로 수행되기 어려운 문제점이 있을 수 있고, 온도 조건이 90℃ 초과인 경우 유효 성분이 파괴될 수 있는 문제점이 있다.

[0043] 한편, 상기 발효는 OD 600 흡광도 값에서 2.0 내지 7.0의 균수에서 미생물을 접종하고, 25 내지 37 ℃ 조건에서 24 내지 72 시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 구체적으로, OD 600 흡광도에서 2.0 보다 적은 균으로 발효를 수행하는 경우 균이 성장되지 않을 수 있는 문제점이 있고, OD 600 흡광도에서 7.0 보다 많은 균으로 발효를 수행하면 오염된 균이 접종될 수 있는 문제점이 있다.

[0044] 한편, 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 발효는 24 내지 72 시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 구체적으로 24 시간 미만으로 발효되는 경우 발효가 효과적으로 수행되기 어려운 문제점이 있을 수 있고, 72 시간을 초과하여 발효되는 경우 오염이 문제될 수 있다.

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] 실시예

[0051] 실시예 1. 오미자 발효추출물의 제조

[0052] 오미자 음료 제조에 사용하고 남은 오미자청 부산물 100 g을 준비하고, 다음으로 상기 오미자 부산물을 1000 g의 물에 혼합한 다음 80 ℃ 온도에서 24 시간 동안 열수 추출하여 오미자 열수 추출물을 수득하였다.

[0053] 상기 열수 추출물에 락토바실러스 파라카제이 톨레랑스(*Lactobacillus paracasei* sub. *Tolerans*) 균주를 접종하여 오미자 발효추출물을 수득하였다. 상기 발효 시 균수는 OD 600 흡광도 값을 4.0 내지 6.0에서 하여 접종하였고, 오미자 부산물을 10wt% 비율로 제조하고, 배양액의 1 내지 2%의 균(OD 600 흡광도 값 0.1)을 접종하고, 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다. 배양액은 30분간 원심분리하여 균이 없는 상층액을 포집하였고, 포집된 상층액은 필터로 필터링(5 μm pore size)하여 최종적으로 오미자 발효추출물을 수득하였다.

[0055] 실시예 2. 오미자 발효추출물 30% 에탄올 추출물

[0056] 실시예 1에 따라 제조된 오미자 발효추출물을 PB-600 흡착레진을 이용하여 추출하여 오미자발효 추출물 30% 에탄올 추출물을 수득하였다. 상기 추출 시 PB-600 흡착레진 300g을 준비하고, 오미자 발효추출물을 1000ml 흘려준다. 그리고, DW, 10% 에탄올, 30% 에탄올을 순차적으로 500ml씩 흘려주었다. 최종적으로 30% 에탄올을 흘려주어 나온 오미자 발효추출물 30% 에탄올 추출물을 수득하였다.

[0058] [실험 1. 오미자 발효추출물의 세포독성 실험]

[0059] 대식 세포주 RAW264.7은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 10% FBS와 1% 항생제(페니실린/스트렙토마이신)를 첨가한 DMEM 배지(Welgene, Gyeongsan, Korea)를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37℃ 배양기에서 2~3회 계대 배양한 후 사용하였다.

[0061] **세포 생존율 측정**

[0062] 세포 생존율 측정을 위해 Raw 264.7 세포를 48 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주하고 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 및 1 mg/mL 농도로 처리후 2시간 뒤 LPS 1 ug/mL 처리하여 배양하였다. 24시간 뒤 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하고 4시간 반응 후 형성된 포르마잔(formazan)에 DMSO (dimethyl sulfoxide) 용액을 첨가하여 녹인 뒤, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 1 참조).

[0064] **NO(Nitric Oxide) 측정**

[0065] 세포에서 생성되는 NO의 양을 측정하기 위해 Raw 264.7 세포에 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 처리하고 LPS 1 ug/mL로 자극한 다음 24시간 배양 후 세포 배양액과 동등량의 Griess 시약(1% sulfanilamine, 0.1% naphthylethylene diamine di-hydrochloride, 2% phosphoric acid)을 넣고 반응시킨 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 NaNO_2 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다(도 1 참조).

[0067] **사이토카인(cytokine) 측정**

[0068] 세포에서 생성되는 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 β 과 TNF- α 의 mRNA의 발현양을 측정하기 위해 Raw 264.7 세포에 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 처리하고 LPS 1ug/mL로 자극한 다음 24시간 배양 후 배양 상층액을 얻었다. 사이토카인 농도는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 각 사이토카인에 대한 포획 항체(capture antibody)를 96 well plate에 100 μ L씩 각각 코팅한 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 방치하였다. 이 plate를 0.05% tween-20TM이 함유된 PBS(phosphate-buffered saline)로 세정 후 10% FBS를 함유한 PBS로 1시간동안 블로킹(blocking)하였다. 다시 세정한 후 얻은 세포 배양액을 첨가하고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 각 well을 다시 세정하고 검출 항체(detection antibody)와 효소반응액(SAV-HRP reagent)을 첨가한 후 기질인 ABTS 용액을 첨가하여 반응시켰다. 발색반응은 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다(도 2 참조).

[0070] **실험 결과**

[0071] 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물의 함량에 따른 RAW264.7 대식세포주의 NO 생성에 대한 억제 효과 측정 결과, 동일 농도에서의 오미자 발효추출물의 함량이 증가함에 따라 NO 생성이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 오미자 발효추출물의 농도에 비례하여 항염증 효능이 증가함을 알 수 있었다. 한편, 오미자 발효추출물의 NO 생성억제 효과는 세포독성이 없는 최대 농도 0.5mg/ml에서 87% NO 생성억제효과를 나타내는 것으로 확인되었다(도 1 참조).

[0072] 한편, 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 β 과 TNF- α 의 mRNA의 발현양은 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물의 농도증가에 따라 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다(도 2 참조).

[0074] **[실험 2. 오미자 발효추출물의 피부장벽기능 유지인자 단백질 및 mRNA 발현 촉진 실험]**

[0076] **세포 증식률 및 생존율 측정**

[0077] 세포독성 테스트는 cell count와 MTS assay 방법으로 수행하였고, 구체적으로 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물의 농도를 25, 50, 100 ug/ml 농도로 각각 처리하고, Cell Counter로 확인하였다(도 3 참조).

[0079] **Western blot 실험**

[0080] UVB를 조사한 HaCaT 세포에서 인블루크린, 필라그린 단백질의 발현을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯팅(Western

blotting)을 통해 확인하였다.

[0081] 구체적으로 인간의 각질형성세포 HaCaT를 접종하여 24시간 후, 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을, 양성 대조군으로 EGF를 각각 첨가하여 DMEM 배지, 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 24시간 배양 후 세포를 회수한 후 파쇄하여 단백질을 추출하여 -40℃에 보관하였다. 추출된 단백질은 BCA assay를 통해 단백질을 정량 하였다. 각각의 시료의 단백질량 30g으로 희석한 후 12% SDS-겔에서 전기영동한 후 PVDF membrane 으로 옮겼다. 1차 항체(rabbit anti-aquaporins-3 antibody)와 반응시킨 후 남은 항체를 세척하여 제거하고 2차 항체(rabbit HRP-coupled anti-IgG antibody)와 반응시켰다. 남은 항체를 제거한 후 항체와 반응하여 발색 반응을 일으키는 시약(oxidase substrate and chromogen solution)을 첨가하였다. 발색된 밴드는 이미지 분석(BioRad, Universal Hood, USA)을 통해 측정하였다(도 3 참조).

[0083] RT-PCR 실험

[0084] 먼저 인간의 HaCaT(Human keratinocytes) 각질세포에 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 첨가하여 DMEM 배지, 37℃, 5%, CO₂에서 배양하였다. 24시간 배양 후 세포를 회수한 후 RNA를 추출하여 역전사 효소(reverse transcriptase) 와 cDNA(complementary DNA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 스탠다드로 GAPDH를 사용하였다. 아가로스 겔의 전기영동을 통하여 발현되는 밴드는 이미지 분석(BioRad, Universal Hood, USA)를 통해 측정하였다(도 4 참조).

[0086] 실험 결과

[0087] 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물의 농도에 따른 세포 증식률과 세포 생존율의 경우 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[0088] 한편, UVB를 미조사한 HaCaT 세포 내 인볼루크린 및 필라그린 단백질 및 mRNA의 발현양은 오미자 발효추출물 첨가에 따라 아무런 변화가 나타나지 않았으나, UVB를 조사한 조건에서는 인볼루크린 및 필라그린 단백질 및 mRNA 또한 농도 의존적으로 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[0090] 또한, UVB 조사 시 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 100 ug/ml 농도로 처리한 경우, 특히 적으로 UVB 300 mJ/cm², 5h 조사시킨 HaCaT 세포 내 ERK-1/2 단백질 인산화 (활성화) 증가와 c-Fos 단백질 및 mRNA 발현 증가를 초래하는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

[0092] [실험 3. 오미자 발효추출물의 간보호 및 위장관 보호 실험]

[0094] 간보호 실험

[0095] 간독성 약물에 의해 발생하는 간세포 사멸, 괴사로 인하여 발생하는 간의 크기가 감소하는 현상에 의거, 간독성 약물인 아세트아미노펜(acetaminophen)에 의한 간 크기 변화의 표준데이터를 바탕으로 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 전처리한 뒤에 아세트아미노펜을 처리함으로써 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물의 간보호 효과를 확인하고자 하였다.

[0096] 구체적으로, 시험에 사용되는 성체 제브라피쉬는 출처가 분명하고 건강한 AB strain과 유전자 조작을 통하여 수립된 LFABP-GFP 동형 형질전환주를 이용하였다.

[0097] 수정 후 48시간 LFABP-GFP 배아를 부화시킨 후 24 well 플레이트에 well 당 5 개체씩 옮겼다. Well의 볼륨은 1ml가 되도록 조정하였다. 실험은 아래의 4개 군으로 진행하였다.

[0099] 대조군: 무처리군

[0100] 실험군 1: 아세트아미노펜 처리군

[0101] 실험군 2 - 4: 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물 전처리 후 아세트아미노펜 처리군

[0103] 구체적으로, 시험하는 well 마다 처리하는 약물의 농도를 일일이 기입하였으며, 2일째 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 농도에 맞추어 첨가하였고, well 플레이트를 원형으로 조심스럽게 돌려서 첨가한 약물이 골고루 섞이도록 하였다. 다음으로 항온배양기로 옮겨서 24시간 동안 배양한 다음, 3일째 아세트아미노펜을 첨가하였다. 4일 및 5일째 형광현미경으로 관찰하여 간의 크기와 모양을 측정하였으며, 10마리에서 얻은 데이터를 평균하여 Mean±SD 결과를 얻었다(도 5 및 도 6 참조).

[0105] **위장관 보호 실험**

[0106] KR68766은 알부민과 결합하는 형광물질로 제브라피쉬 배아 염색 후 장손상을 유발하면 배지로 유출되는 형광을 측정하여 장을 통한 단백유출을 정량적으로 측정하고자 하였다.

[0107] 구체적으로 제브라피쉬 성체는 28.5℃에서 낮 14시간, 밤 10시간의 명암으로 조절하여 사육하였다. 전날 오후에 암수 한쌍을 전용 mating cage에 넣어준 후, 다음날 오전에 수정란을 수집하였다. 수집된 수정란은 petri dish로 옮겨 28.5℃의 배양기에서 발생시키며, 발생과정은 해부현미경을 통해 관찰하였다.

[0108] 24 well 플레이트에 수정 후 3일째의 발생배아를 well 당 15마리씩 넣었다. 실험군과 대조군으로 구분한 다음, 실험군에는 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 24시간 전처리 하였다. 다음날, KR68766으로 염색한 뒤 indomethacin을 24시간 처리하여 장손상을 유발하였다. 다음날, 배지를 취하여 형광흡광도를 측정하였다(도 7 및 8 참조).

[0110] **실험 결과**

[0111] 실시예 2의 오미자 발효추출물의 30% 에탄올 추출물을 처리한 경우, 약물농도 10ug/ml 농도에서 아세트아미노펜에 의한 간손상 보호효과를 보이는 것으로 확인되었으며, 농도가 증가함에 따라 간 보호 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 다만, 100ug/ml 단독 처리 군에서 liver size가 감소하였고, 100ug/ml + 아세트아미노펜 군에서는 모두 치사를 보였다(도 5 및 6 참조).

[0112] 위장관 보호 효과의 경우 간독성 실험과 유사하게 약물 농도가 증가함에 따라 보호 효과가 증가하였으나, 1ug/ml의 농도에서는 유의한 차이는 아니었으며, 100ug/ml 단독 처리 군에서 drug toxicity가 보이고, 100ug/ml + 인도메타신(Indomethacin) 군은 모두 치사를 보였다(도 7 및 8 참조).

[0113] 따라서, 약물농도 1-10 ug/ml에서 유의한 간 및 위장관 보호 효과를 보이는 것을 판단되었다.

[0115] **제형예 1. 유연화장수**

[0116] 유연화장수의 제형예는 통상의 방법에 따라 다음 표 1과 같이 제조하였다.

표 1

성분	함량(단위: 중량%)
오미자 발효추출물	1.0 ~ 3.0
글리세린	5.0
1,3-부틸렌글리콜	3.0
PEG 1500	1.0
알란토인	0.1
DL-판테놀	0.3
이.디.티.에이-2NA	0.02
벤조페논-9	0.04
소듐 히알루로네이트	5.0
에탄올	10.0
옥틸도데세스-16	0.2
폴리솔베이트 20	0.1
방부제, 향, 색소	미량
증류수	잔량
합계	100

[0118]

[0120] 제형예 2. 에센스

[0121] 에센스의 제형예는 통상의 방법에 따라 다음 표 2와 같이 제조하였다.

표 2

성분	함량(단위: 중량%)
오미자 발효추출물	1.0 ~ 5.0
글리세린	10.0
베타인	5.0
PEG 1500	2.0
알란토인	0.1
DL-판테놀	0.3
이.디.티.에이-2NA	0.02
벤조페논-9	0.04
히드록시에틸 셀룰로오스	0.1
소듐 히알루로네이트	8.0
카르복시비닐폴리머	0.2
트리에탄올아민	0.18
옥틸도데칸올	0.3
옥틸도데세스-16	0.4
에탄올	6.0
방부제, 향, 색소	미량
증류수	잔량
합계	100

[0123]

[0125] 제형예 3. 팩

[0126] 팩의 제형예는 통상의 방법에 따라 다음 표 3과 같이 제조하였다.

표 3

성분	함량(단위: 중량%)
오미자 발효추출물	1.0 ~ 3.0
폴리비닐알콜	15.0
셀룰로오스 겜	0.15
글리세린	3.0
PEG 1500	2.0
사이클로텍스트린	0.15
DL-판테놀	0.4
알란토인	0.1
글리시리진산모노암모늄	0.3
니코틴아미드	0.5
에탄올	6.0
PEG 40 경화피마자유	0.3
방부제, 향, 색소	미량
증류수	잔량
합계	100

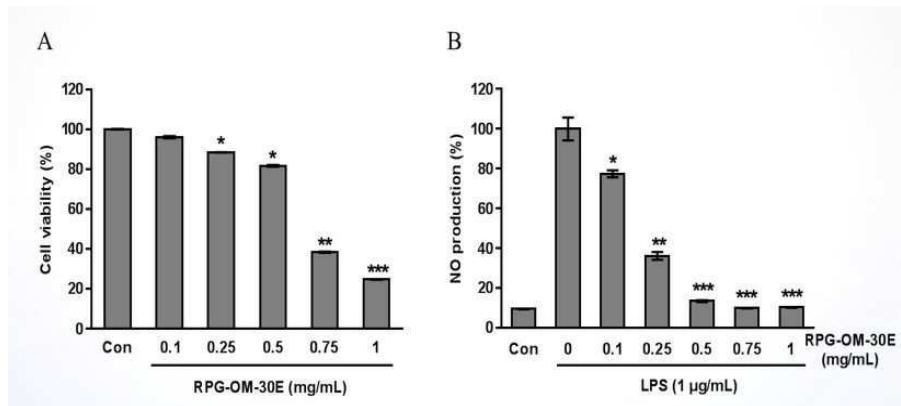
[0128]

[0130]

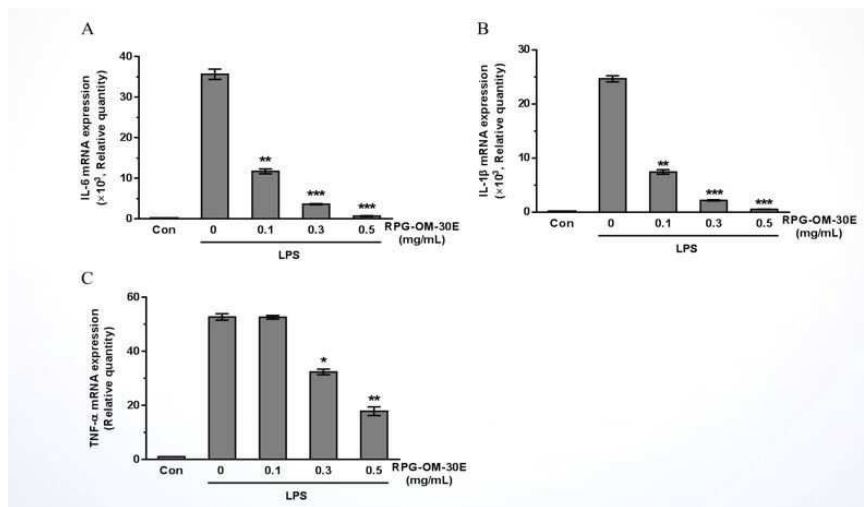
이상 본 발명의 실험예에 따르면 실시예들에 따른 본 발명의 오미자 발효추출물의 경우, 피부장벽기능을 유지 및 강화하는 기능을 가진 것으로 알려진 인볼루크린(involucrin)과 필라그린(filaggrin) 단백질의 발현을 증가 시킴으로써 피부장벽기능을 개선하는 효과가 있음을 확인할 수 있었고, 이에 따라 낮은 세포독성을 가지며, 피부의 산화 및 염증을 억제하고, 피부장벽기능을 개선함으로써, 피부보습력을 강화하고, 피부트러블을 방지하거나 또는 피부노화를 방지하는 효과에 의해 화장품 원료로 사용할 수 있음을 확인하였다.

도면

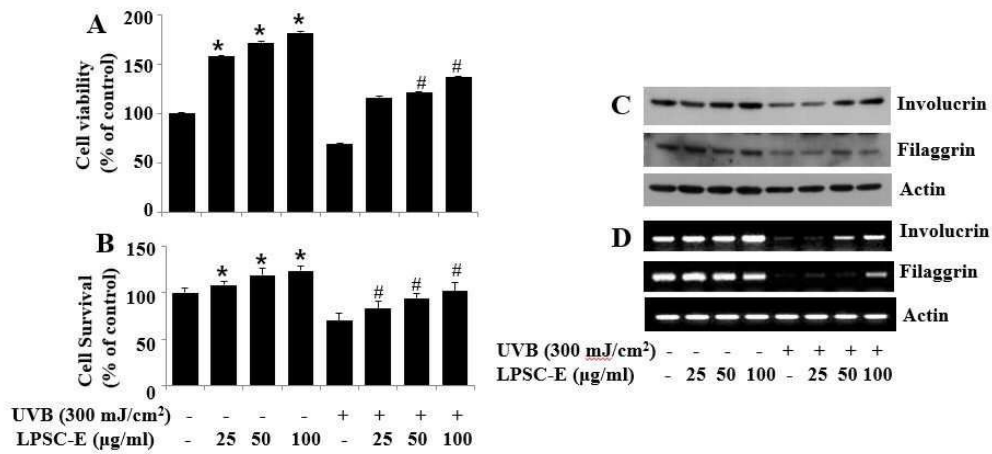
도면1



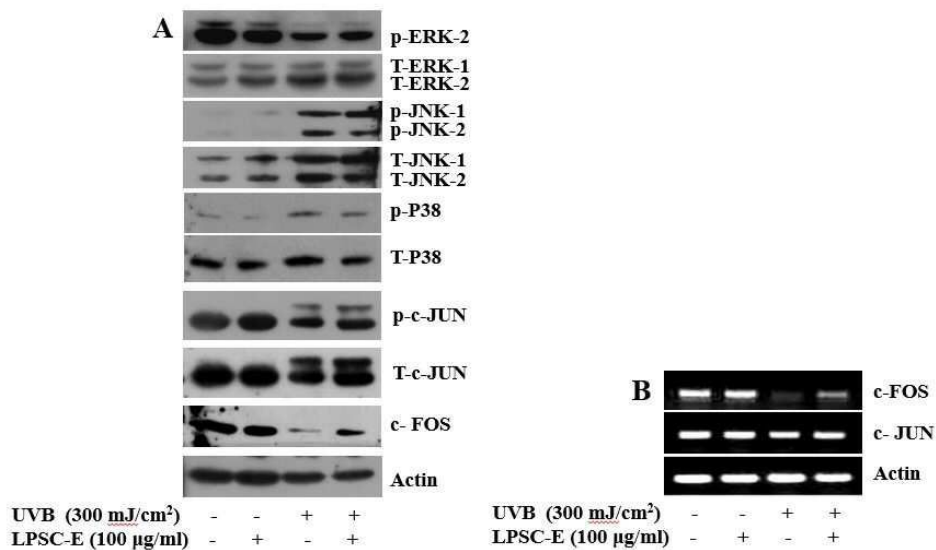
도면2



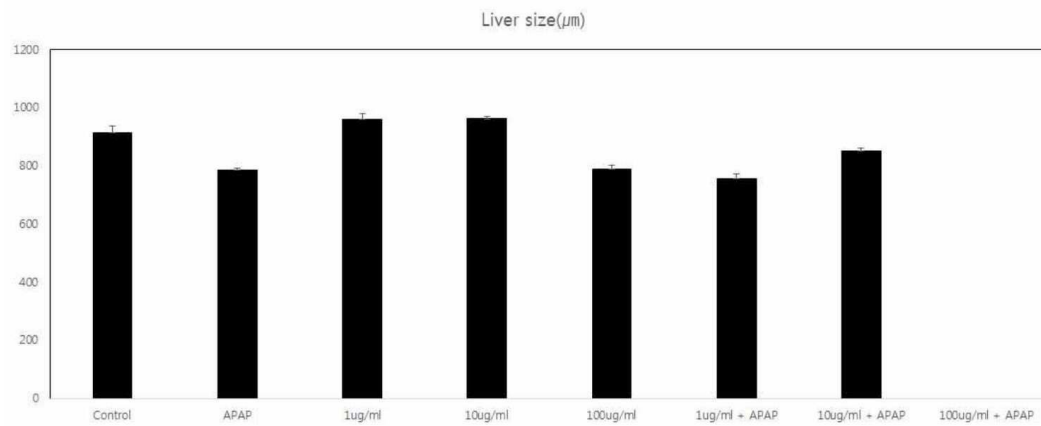
도면3



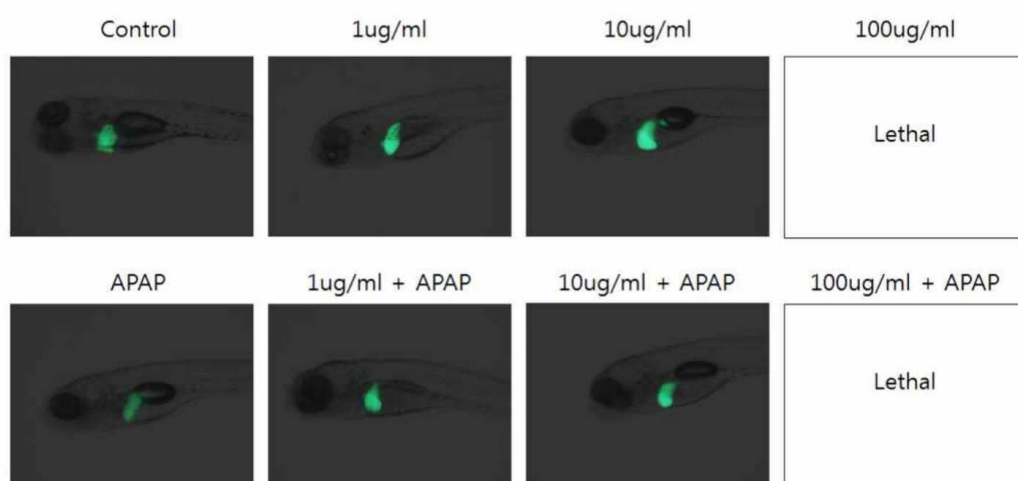
도면4



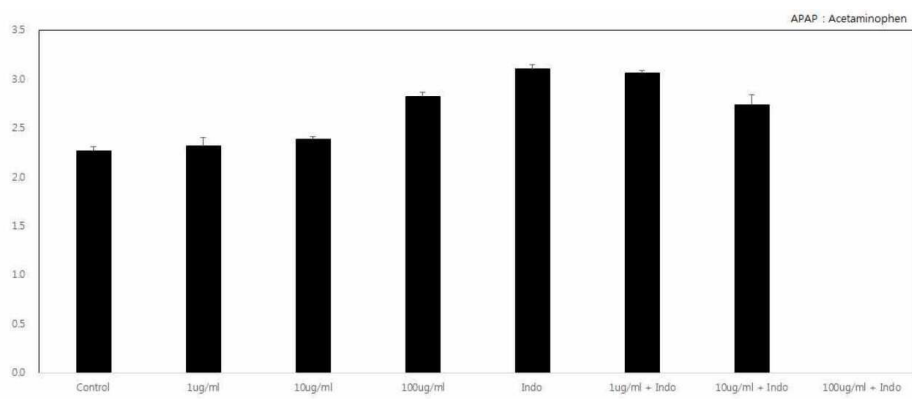
도면5



도면6



도면7



도면8

