

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0071711

(43) 공개일자 2022년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) *A23L 19/10* (2016.01)*A23L 29/00* (2016.01) *A61K 36/258* (2006.01)*A61K 8/9789* (2017.01) *A61P 29/00* (2006.01)*A61Q 19/00* (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)*A23L 19/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0159158

(22) 출원일자 2020년11월24일

심사청구일자 2020년11월24일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김연주

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 생명과학대학 508호

(74) 대리인

특허법인한얼

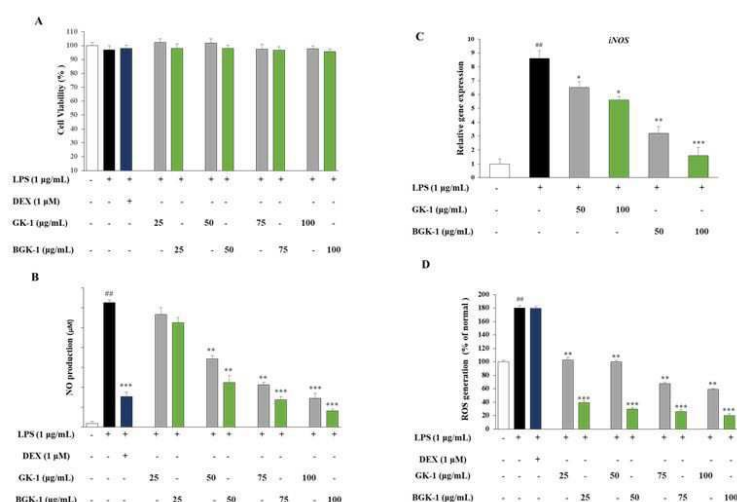
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 인삼 열매를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는, 건강기능식품 조성물, 화장품 조성물, 및 약학조성물을 제공하여 미백제 및 항염증제 개발에 이용될 수 있는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23L 29/06 (2016.08)
A61K 36/258 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61P 29/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110161
과제번호	2019R1A2C1010428
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	신장 및 간세포에서 uric acid 축적을 억제하는 신규 희귀사포닌 금나노 곤충 펩타이드 결합체 대량생산 및 작용메카니즘 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395063006
과제번호	PJ013173012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	시스템생물학 기반 유용신소재 생산을 위한 소포체스트레스 방어기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 건강기능식품 조성물은 미백 개선용; 또는 염증 예방 또는 개선용인 것인, 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 효소는 베타 글루코시다아제 단백질 1(beta-glucosidase protein 1, BGP1)인 것인, 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 염증은 세포의 손상이나 외부 감염원에 의해 발생하는 것인, 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 염증은 대장염인 것인, 건강기능식품 조성물.

청구항 6

그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 미백 개선용; 또는 염증 예방 또는 개선용인 것인, 화장료 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 효소는 베타 글루코시다아제 단백질 1(beta-glucosidase protein 1, BGP1)인 것인, 화장료 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,
상기 염증은 세포의 손상이나 외부 감염원에 의해 발생하는 것인, 화장료 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,
상기 염증은 대장염인 것인, 화장료 조성물.

청구항 11

그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,
상기 효소는 베타 글루코시다아제 단백질 1(beta-glucosidase protein 1, BGP1)인 것인, 염증 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,
상기 염증은 세포의 손상이나 외부 감염원에 의해 발생하는 것인, 염증 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,
상기 염증은 대장염인 것인, 염증 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제11항의 상기 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 예방 또는 치료 방법.

청구항 16

그린베리 인삼 열매를 수확하는 제1단계;
상기 인삼 열매를 통해 인삼 열매 추출물을 추출하는 제2단계; 및
상기 인삼 열매 추출물에 효소 처리하는 제3단계;를 포함하는, 인삼 열매 추출물의 효소 처리 추출물의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 수확은 개화기로부터 14일 내지 21일 후 인삼 열매를 수확하는 것인, 제조방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 효소는 베타 글루코시다아제 단백질 1(beta-glucosidase protein 1, BGP1) 제조합 효소인 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인삼 열매를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 신규한 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물의 피부세포에 대한 미백 및 항염 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인삼은 다년생 반음지성 식물로 오가피과에 속하는 것으로서 중국, 한국의 다양한 의서에서 그 효능이 널리 알려져 있어 예로부터 많은 분야의 한약재로 사용 하고 있다. 현대에 와서 인삼에 대해 널리 연구한바, 인삼에는 다량의 진세노사이드(Saponin)이 함유되어 있는 것으로 알려져 예로부터 사용되는 약재 이외에도 근래에는 식품에 적용하여 건강식품의 재료로 많이 사용하고 있다. 인삼은 보통 재배기간이 4년 이상 소요되며, 또한 최고 품질의 인삼을 얻기 위해서는 6년간 재배하여야 하는데 재배기간이 오래 걸리고, 또한 재배하는 동안 각종 병충해, 자연재해 등 여러 가지 이유로 인해 최초 재배량 보다 수확량이 적게 되어 가격이 비싸며, 인삼을 얻기 까지 많은 시간이 소요되는 단점이 있다. 인삼은 땅 밑에 뿌리와 뇌두가 있으며, 땅 위에는 줄기, 잎, 열매로 이루어져 있다. 보다 상세하게는 땅 밑의 세근, 지근 및 주근의 뿌리와 뇌두, 뇌두에서 연결된 줄기(경), 줄기로부터 뻗은 잎, 줄기 끝의 열매(화, 과실) 및 상기 줄기와 열매사이를 이어주는 부분으로 작은 가지인 화병이 있다. 인삼은 3년차 이상에서 인삼의 꽃이 피기 시작하며, 5월경에는 초록빛 색깔의 열매가 생기게 된다. 7월 중순이 되면 인삼의 초록빛 열매가 무르익으면서 붉게 변하면서 결실하게 된다. 진세노사이드(Ginsenoside)는 인삼에 함유된 사포닌(Saponin)을 의미하며, 인삼에는 다양한 종류의 진세노사이드 성분이 함유되어 있다. 인삼의 진세노사이드는 파낙사디올(Panaxadiol, PD)계, 파낙사트리올(Panaxatriol, PT)계, 올레안(Oleanane)계 등이 있다. 또한 인삼에는 상기 진세노사이드 성분 이외에도 비진 세노사이드 물질로서 전분 등의 탄수화물, 폴리아세틸렌의 항산화성방향족 화합물, 간장을 보호하는 고미신(Gomisin N-A), 유사 인슐린 작용을 하는 산성 펩티드 등이 있다. 진세노사이드의 주요 약리작용은 중추신경계를 비롯하여, 내분비계, 면역계, 대사계등에 영향을 미쳐 신체조절기능에 다양한 효과를 발휘한다. 그 이외에도 진세노사이드(ginsenoside)은 (1)지방분해력이 크고, 영양분흡수와 소화를 촉진시키며, (2)세포내의 효소활성화로 신진대사촉진, (3)에너지를 증가시켜 원기회복, 피로, 무력감, 식욕부진 개선, (4)혈청단백질 합성을 촉진 등의 효과가 있다고 알려져 있다.

[0004] 인삼의 줄기와 잎은 광합성을 통해 뿌리 발달에 영향을 주지만, 열매는 오히려 영양분을 소모하여 뿌리 생육을 저해하여 폐기되는 부산물이다. 따라서, 인삼재배 농가에서는 인삼의 뿌리를 주로 활용하기 때문에 생식 성장보다는 뿌리의 성장을 촉진하기 위해 개화기를 전후하여 인삼화퇴를 제거한 후 버리고 있다. 그러나, 최근 인삼 열매의 진세노사이드 함량이 뿌리보다 높다는 연구결과가 밝혀져 이를 활용할 수 있는 방안이 연구되고 있다.

[0005] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 인삼 열매 추출물이 미백, 항염에 사용될 것으로 판단하고 종래의 문제를 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 그린베리 인삼 열매의 우수한 미백 및 항염 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 본 발명의 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 그린베리 인삼 열매를 수확하는 제1단계, 상기 인삼 열매를 통해 인삼 열매 추출물을 추출하는 제2단계 및 상기 인삼 열매 추출물을 효소 처리하는 제3단계를 포함하는, 인삼 열매 추출물의 효소 처리 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0015] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 제1양태는, 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명의 제2양태는 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명의 제3양태는 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명의 제4양태는 본 발명의 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명의 제5양태는 그린베리 인삼 열매를 수확하는 제1단계, 상기 인삼 열매를 통해 인삼 열매 추출물을 추출하는 제2단계 및 상기 인삼 열매 추출물을 효소 처리하는 제3단계를 포함하는, 인삼 열매 추출물의 효소 처리 추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.
- [0023] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 실시 양태는 본 발명에 따른 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물은 우수한 염증 억제 효과를 나타내므로, 미백 개선용, 염증 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품 조성물에 포함될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에, 미백 개선 또는 염증을 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 용어, "그린베리 인삼 열매(green berry cultivar K-1, GK-1)"는 K-1 또는 GK-1으로 표기될 수 있고, 그린베리의 인삼에서 수확되는 인삼 열매를 의미한다.

- [0026] 본 발명의 용어, "추출물"은 액체 또는 고체 혼합물로부터 용매에 의해 통상적인 방법으로 얻어낸 분리된 물질을 의미한다.
- [0027] 상기 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합물인 용매로 추출되는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 알코올은 에탄올 또는 메탄올일 수 있으나, 이에 한정되지 않고 공지된 용매로 추출 가능할 수 있다. 보다 구체적으로는, 물 또는 증류수를 용매로 하여 추출되는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파 추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 열수추출 방법으로는 1회 내지 5회 추출할 수 있고, 구체적으로는 3회 반복 추출할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 상기 추출용매는 건조된 인삼에 0.1 내지 10배 첨가할 수 있으며, 구체적으로는 0.3 내지 5배 첨가할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출온도는 구체적으로 20℃ 내지 40℃일 수 있으나 이에 한정하지 않으며, 추출시간은 구체적으로 12 내지 48시간일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 상기 효소 처리는 재조합 효소를 통해 수행하는 것이고, 상기 재조합 효소는, 베타 글루코시다아제 단백질 1(beta-glucosidase protein 1, BGP1)인 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 용어, "효소 처리"는 인삼 열매에 포함된 진세노사이드를 부작용 없이 경제적 가치가 높은 진세노사이드로 변환 시키는 것을 의미한다.
- [0032] 구체적으로, 본 발명의 효소처리는 포도당 단위의 가수분해를 통해 진세노사이드 Re가 진세노사이드 Rg2로 변환되는 것일 수 있고, 진세노사이드 Rg2는 Re 대비 더 강력한 신경보호 및 비만예방 특성이 나타나고, 식의약 및 화장품 소재로의 경제적 가치가 높아 재조합 효소 처리로 변환하여 항염 및 미백효과를 제공 하는 것일 수 있다.
- [0033] 구체적인 일 실시예에서는, 효소처리하지 않은 그린베리 인삼 열매 추출물(GK-1)과 효소처리된 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물(BGK-1)을 비교한 결과, 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물(BGK-1)이 NF- κ B, TNF- α , iNOS, NO 생성을 연쇄적으로 억제하여 항염효과가 더욱 우수하고, 멜라닌 생성 및 티로시나아제 활성을 억제하여 미백 효과가 더욱 우수하고, NO 생성을 억제하는 등 항염 효과가 우수한 것을 확인할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 한편, 건강식품은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품은 건강 보조 목적의 식품을 의미하는데, 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물은 그대로 첨가되거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 방부제, 살균제, 산화방지제, 착색제, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 향료, 팽창제, 강화제, 유화제, 증점제, 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 식품의 제형은 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 염증의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0040] 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물은 미백 개선, 염증의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 식품 조성물에 다양한 중량%로 포함될 수 있다. 구체적으로 식품 조성물의 총 중량대비

0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 건강 및 위생 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

- [0042] 본 발명의 용어, "미백"은 피부톤을 밝게 하여 투명한 피부로 개선해 주는 것을 의미한다. 구체적으로, 멜라닌 합성에 관여하는 티로시나아제(tyrosinase) 활성 억제 및 멜라닌 생산을 억제하여 미백효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 용어, "멜라닌(melanin)"은 색소중 하나로 흑갈색 또는 검은색을 띄며 표피 기저층에 존재하는 멜라닌 세포에서 생성되는 것을 의미한다. 구체적으로, 멜라닌이 많이 생성되면 피부의 색상이 짙어질 수 있다.
- [0045] 본 발명의 용어, "티로시나아제(tyrosinase)"는 분자상 산소에 의한 티로신을 산화하여 멜라닌을 생성하는 효소를 의미한다.
- [0046] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물이 멜라닌 생성, 및 티로시나아제 활성 억제 효능을 가짐으로써 미백 효과가 있는 것을 확인하였다.
- [0048] 본 발명의 용어, "항염증"은 염증 발생을 억제 또는 방지하는 것을 의미하는 것으로서, 특별히 제한되지는 않으나, 세포의 손상이나 외부 감염원에 의해 발생하는 것일 수 있다.
- [0050] 상기 "염증"은 조직(세포)의 손상이나 외부 감염원(박테리아, 바이러스, 곰팡이, 다양한 종류의 알레르기 유발 물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화 염증 매개 물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열, 통증 등 외적 증상을 나타낸다. 정상인 경우 염증 반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능 회복을 하지만 항원이 제거되지 않거나 내부 물질이 원인이 되어 염증 반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환에 이른다. 더욱 구체적으로, 염증은 대장염을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 본 발명에서 용어, "염증 관련 질환"은 염증을 주병변으로 하는 질병을 의미한다. 염증은 선천 면역에 의해 매개되는 비특이적 반응으로, 병원체에 의해 일어나는 경우 병원체의 종류나 이전 감염 여부에 관계없이 일어난다. 선천 면역뿐만 아니라 일부 국소적 적응면역 역시 염증에 관여한다. 염증은 감염을 치유하거나 조직의 재생을 증진시키는 보호 기능을 가지지만, 동시에 염증의 결과로 조직의 손상이나 질병이 일어날 수 있다. 프롤로테라피 등과 같이 의도적으로 염증 반응을 유도하여 조직의 재생을 꾀하는 방법도 있다. 구체적으로, 대장염, 베체트병, 크론병, 류마티스관절염, 모소낭, 지루성 피부염, 건선, 루피스, 만성폐색성폐질환, 과민성장 질환, 소화지방변증, 혈관염 등을 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물이 NO생성 억제활성, 및 염증관련 사이토카인(TNF- α) 활성 억제 효능을 가지는 것을 확인하였다.
- [0055] 본 발명의 용어 "NO생성 억제"는 염증상태에서 나타나는 NO가 생성으로 혈관 투과성, 부종 등 염증 반응을 촉진시키는 것을 억제하는 것을 의미한다. 구체적으로, NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하고 혈관을 확장시키거나 암 조직의 성장을 억제하고, 바이러스나 세균들의 증식을 저해하거나 직접 사멸시키는 등 인체 면역 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 따라서, 항염증 활성을 가지는 물질에 대해서 NO생성 억제에 대한 검토는 필수적으로 수행되고, NO생성 억제율로 항염효과를 확인할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 용어 "사이토카인(cytokine)"은 면역 세포가 분비하는 단백질을 통틀어 일컫는 말이다. 사이토카인은 세포로부터 분비된 후 다른 세포나 분비한 세포 자신에게 영향을 줄 수 있다. 즉, 대식세포의 증식을 유도하거나

나 분비 세포 자신의 분화를 촉진하기도 한다. 사이토카인은 수용체를 통해서 작용하며, 면역계에서 특히 중요하다. 사이토카인은 건강 유지와 질병에도 중요한데, 특히 감염, 면역반응, 염증, 외상, 폐혈증, 암 및 생식 등에 대한 신체의 반응에 중요하다.

[0057] 병원균, 바이러스들이 숙주 안에 들어오면, 병원균을 인식하고 신호를 보내 전사인자인 NF- κ B를 활성화시키고 이는 염증 유전자 물질(사이토카인)을 유도하여 여러 질병을 유발한다. 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물은 NO생성 억제, 사이토카인(예를 들어, TNF- α) 활성을 억제하여 항염효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0058] 따라서, 상기 구체적인 일 실시예를 통하여 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물이 항염증 용도를 가지는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 나아가 염증 관련 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 용도로 사용될 수 있음을 시사한다.

[0060] 본 발명의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 염증의 발병을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0061] 본 발명의 용어, "개선"은 본 발명에 따른 조성물을 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0062] 본 발명의 용어, "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 염증의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0064] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 실시 양태는 본 발명에 따른 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물은 우수한 염증 억제 효과를 나타내므로, 미백 개선용, 염증 예방 또는 개선을 목적으로 화장품 조성물에 포함될 수 있으며, 상기 화장료 조성물은 일상적으로 도포하는 것이 가능하기 때문에 염증의 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있다.

[0065] 이때, 상기 "그린베리 인삼 열매", "미백", "염증", "개선", "치료", 및 "예방"에 대한 설명은 상기 서술한 바와 같다.

[0066] 본 발명의 용어, "화장료 조성물"은 상기 화합물을 포함하는 조성물로서 그 제형은 어떠한 형태라도 가능하다. 이러한 제형의 예를 들면 상기 조성물을 이용하여 제조된 화장료는 영양크림, 아이크림, 마사지크림, 클렌징 크림과 같은 크림류, 팩류, 영양로션과 같은 로션류, 에센스류, 유연화장수, 영양 화장수와 같은 화장수류, 파우더류, 파운데이션류 및 메이크업 베이스류 등이고, 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 이러한 제형 중 어떠한 형태로도 제조되어 상용화될 수 있으며, 상기 예들에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물에는 통상의 화장료 제조 방법으로 제형화할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 화장료는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 팩, 마스크팩, 마스크시트, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 및 아이섀도로 구성된 그룹에서 선택된 어느 하나의 제형을 가지는 것일 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물 또는 이에 더하여 부형제, 담체 등 기타 첨가제를 포함할 수 있으며, 일반 피부 화장료에 배합되는 보통의 성분을 필요한 만큼 적용 배합하는 것이 가능하다.

[0067] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 경피 침투 강화제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, 경피 침투 강화제란 피부의 혈관세포 내로 원하는 성분이 높은 흡수율로 침투할 수 있게 해주는 조성물이다. 바람직하게는 레시틴 화장품에 사용되는 다른 인지질 성분, 리포솜 성분 등이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 또한, 유상 성분으로서 주로 사용될 수 있는 오일로는 식물성 오일, 광물성 오일, 실리콘유 및 합성유 중에서 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 미네랄오일, 사이크로메치콘, 스쿠알란, 옥틸도데실 미리스테이트, 올리브오일, 비티스 비니페라 씨드 오일, 마카다미아너트오일, 글리세릴옥타노에이트, 캐스터오일, 에칠헥실 이소노나노에이트, 디메치콘, 사이크로펜타실록산 및 설플라워씨드 오일 등을 사용할 수 있다. 또한, 유화 능력을 보장하기 위하여 계면활성제, 고급 알콜 등을 0.1 내지 5 중량% 첨가할 수 있다. 이러한 계면 활성제로는 비이온 계면활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제, 인지질 등과 같은 통상적인 계면활성제를 사용할 수 있으며, 구체적으로, 소르비탄세스퀴놀리에이트, 폴

리솔베이트 60, 글리세릴 스테아레이트, 친유형 글리세릴스테아레이트, 소르비탄 올리에이트, 소르비탄 스테아레이트, 디이에이-세틸포스페이트, 소르비탄스테아레이트/슈크로스코코에이트, 글리세릴스테아레이트/폴리에틸렌글라이콜-100 스테아레이트, 세테아레스-6 올리베이트, 아라키딜알코올/베헤닐알코올/아라키딜 글루코사이드, 폴리프로필렌글라이콜-26-부테스-26/폴리에틸렌글라이콜-40 하이드로제네이티드 캐스터오일 등을 사용할 수 있다. 고급 알코올로는 탄소수가 12 내지 20인 알코올, 예컨대 세틸알코올, 스테아릴 알코올, 옥틸도데칸올, 이소스테아릴 알코올 등을 단독으로 또는 1종 이상 혼합하여 사용할 수 있다. 수상 성분은 수상의 점도 또는 경도를 조절하기 위하여 카보머, 잔탄검, 벤토나이트, 마그네슘알루미늄실리케이트, 셀룰로오스검, 텍스트린 팔미테이트 등과 같은 1종 이상의 점증제를 0.001 내지 5 중량% 더 첨가할 수 있다. 또한, 본 발명의 화장료 조성물에는 필요에 따라 고급 지방산, 비타민 등의 약효 성분과 자외선 차단제, 산화방지제(부틸히드록시아니솔, 갈릭산프로필, 엘리스르빈산, 토크페릴아세테이트, 부틸레이티드하이드록시톨루엔등), 방부제(메칠파라벤, 부틸파라벤, 프로필파라벤, 페녹시에탄올, 이미다졸리디닐우레아, 클로르페네신 등), 착색제, pH 조절제(트리에탄올아민, 씨트릭애씨드, 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등), 보습제(글리세린, 솔비톨, 프로필렌 글라이콜, 부틸렌 글라이콜, 헥실렌 글라이콜, 디글리세린, 베타인, 글리세레스-26, 메칠글루세스-20 등), 유효제 등의 성분을 더 첨가할 수 있다. 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 피부에 필수 영양소를 보조적으로 제공할 수 있는 물질을 추가로 포함하는데, 바람직하게는 천연향, 화장품향, 또는 한약재가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 보조제를 함유할 수 있다.

[0069] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 실시 양태는 본 발명에 따른 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 염증 관련 질환의 예방 또는 치료용인 것을 특징으로 한다.

[0070] 이때, 상기 " 그린베리 인삼 열매", "염증 관련 질환", "염증", "개선", "치료", 및 "예방"에 대한 설명은 상기 서술한 바와 같다.

[0071] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 통상적으로 금속염, 유기염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기염기와 염으로는 트리에탄올아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

[0073] 본 발명의 약학 조성물은, 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있는데, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturallyoccurring carrier)를 포함할 수 있다.

[0074] 구체적으로, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리락틱엑시드(Poly Lactic Acid), 폴리-L-락틱엑시드(poly-L-lactic acid), 광물유 등을 들 수 있다. 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 담체의 형태로는 각종 부형제의 담체, 마이크로 스피어, 나노파이버 등을 포함할 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 유효제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는

현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함된 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 특별히 제한되지 않는다. 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 실시 양태는 상기 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [0076] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 그린베리 인삼 열매를 수확하는 제1단계, 상기 인삼 열매를 통해 인삼 열매 추출물을 추출하는 제2단계 및 상기 인삼 열매 추출물을 효소 처리하는 제3단계를 포함하는, 인삼 열매 추출물의 효소처리 추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0077] 구체적으로, 상기 제조방법으로 제조된 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물은 종래 추출물을 제조하는 방법 대비 진세노사이드를 부작용 없이 식의약 및 화장품 소재로의 경제적 가치가 높은 진세노사이드로 변환하는 효과를 제공할 수 있다.
- [0078] 상기 수확은 개화기로부터 14일 내지 21일 후 인삼 열매를 수확하는 것일 수 있다. 수확이 개화기로부터 14일 미만 및 21일 초과할 경우 그린베리 인삼 열매에 포함된 총 진세노사이드 함량이 낮아 미백 및 항염 효과가 미비할 수 있다.
- [0080] 상기 효소는 베타 글루코시다아제 단백질 1(beta-glucosidase protein 1, BGP1) 재조합 효소인 것일 수 있다.
- [0081] 본 발명의 용어, "효소 처리"는 인삼 열매에 포함된 진세노사이드를 부작용 없이 경제적 가치가 높은 진세노사이드로 변환 시키는 것을 의미한다.
- [0082] 구체적으로, 본 발명의 효소처리는 포도당 단위의 가수분해를 통해 진세노사이드 Re가 진세노사이드 Rg2로 변환되는 것일 수 있고, 진세노사이드 Rg2는 Re대비 더 강력한 신경보호 및 비만예방 특성이 나타나고, 식의약 및 화장품 소재로의 경제적 가치가 높아 재조합 효소 처리로 변환하여 항염 및 미백효과를 제공 하는 것일 수 있다. 구체적인 일 실시예에서는, 효소처리하지 않은 그린베리 인삼 열매 추출물(GK-1)과 효소처리된 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물(BGK-1)을 비교한 결과, 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물(BGK-1)이 NF- κ B, TNF- α , iNOS, NO 생성을 연쇄적으로 억제하여 항염효과가 더욱 우수하고, 멜라닌 생성 및 티로시나아제 활성을 억제하여 미백 효과가 더욱 우수한 것을 확인할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 용어, "진세노사이드"는 인삼속에 특이적으로 존재하는 스테로이드 사포닌과 트리테르펜 사포닌을 통칭하고, 진세노사이드는 인삼의 약리 효과를 나타내는 주요 활성성분을 의미한다.
- [0086] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 인삼 열매 추출물의 제조방법으로 제조된 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.
- [0088] 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물의 NF- κ B, TNF- α , iNOS, NO 생성을 연쇄적으로 억제 및 멜라닌 생성 및 티로시나아제 활성을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0089] 따라서, 상기 구체적인 일 실시예를 통하여 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물 또는 이의 효소 처리 추출물은 항염 및 미백효과를 가지는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 나아가 건강기능식품 조성물, 화장품 조성물, 약학 조성물로 사용될 수 있음을 시사한다.

발명의 효과

[0091] 본 발명에 따르면, 기존에 버려지던 인삼 열매를 활용하여 경제적 가치가 높은 건강기능 식품 또는 화장품으로 응용할 수 있고, 본 발명의 그린 베리 인삼 열매 추출물을 포함하는 조성물은 미백 및 항염효과를 제공하는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0093] 도 1의 A는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(K-1) 인삼 열매의 성장시간에 따른 사진, B는 성장 시간에 따른 열매 무게를 나타낸 그래프, C는 성장시간에 따른 인삼 뿌리 무게 증가 비율을 나타낸 그래프 D는 성장시간에 따른 진세노사이드 함량을 나타낸 그래프이다.

도 2의 E는 재조합 효소에 의해 진세노사이드 Re가 Rg2로 변화하는 생물학적 변화를 나타낸 반응식, F는 재조합 효소를 나타낸 구조식, G는 TLC로 진세노사이드 함량을 분석한 사진, H는 4년된 그린베리 인삼 열매(GK-1)의 재조합 효소 처리 후(BGK-1) 진세노사이드의 변화를 나타낸 HPLC 그래프, 및 I는 5년된 그린베리 인삼 열매(GK-1)의 재조합 효소 처리 후(BGK-1) 진세노사이드의 변화를 나타낸 HPLC 그래프이다.

도 3는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(GK-1) 및 효소 처리된 그린베리 인삼 열매(BGK-1)의 미백효과를 나타낸 그래프이다.

도 4의 B는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(GK-1), 효소 처리된 그린베리 인삼 열매(BGK-1), Arbutin, 및 α -MSH의 멜라닌 함량을 나타낸 그래프, C는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(GK-1), 효소 처리된 그린베리 인삼 열매(BGK-1), Arbutin, 및 α -MSH의 티로시나제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 5의 A는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(GK-1) 및 효소 처리된 그린베리 인삼 열매(BGK-1)의 세포독성을 나타낸 그래프, B는 NO억제를 나타낸 그래프, C는 iNOS 유전자 발현을 나타낸 그래프, D는 ROS 생성 분석을 나타낸 그래프이다.

도 6의 E는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(GK-1) 및 효소 처리된 그린베리 인삼 열매(BGK-1)의 면역 형광 염색을 통한 산화 스트레스 검출을 나타낸 사진, F는 과산화물 검출을 나타낸 사진이다.

도 7의 G는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(GK-1) 및 효소 처리된 그린베리 인삼 열매(BGK-1)의 ROS 및 Mito-SOX 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

도 8의 A는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(GK-1) 및 효소 처리된 그린베리 인삼 열매(BGK-1)의 핵전자의 면역 형광 분석을 나타낸 사진, C는 I κ B α , p-I κ B α , NF- κ B 및 p-NF- κ B의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 사진, D는 p-I κ B α 및 I κ B α 의 반응성 단백질 수준을 나타낸 그래프이다.

도 9의 B는 본 발명의 그린베리 인삼 열매(GK-1) 및 효소 처리된 그린베리 인삼 열매(BGK-1)의 NF- κ B 형광 강도를 나타낸 그래프, E는 p-NF- κ B/NF- κ B의 반응성 단백질 수준을 나타낸 그래프, F는 NF- κ B 유전자 발현을 나타낸 그래프, G는 TNF- α 유전자 발현을 나타낸 그래프, H는 IL-1 β 유전자 발현을 나타낸 그래프, I는 IL-6 유전자 발현을 나타낸 그래프이다.

도 10은 물리화학적 특성으로 본 발명의 4년된 그린베리 인삼 열매(K-1)의 숙성 9주 동안 환원당 (A), 플라보노이드 (B), 페놀 (C), 산성 다당류 (D), 본 발명의 5년된 그린베리 인삼 열매(K-1)의 숙성 9주 동안 환원당 (E), 플라보노이드 (F), 페놀 (G), 및 산성 다당류 (H)를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0096] 실시예 1: 그린베리 인삼 열매 추출물 및 이의 효소 처리 추출물의 제조

[0097] 4년 내지 5년산 인삼의 개화 후 2 내지 4주에 수확된 그린베리 인삼 열매는 대한민국 경기도 농업 기술원에서 제공되었다. 그린베리 인삼 열매(green berry cultivar K-1, GK-1) 인삼 열매를 세척하고 건조한 다음 분쇄하고 70% 에탄올로 추출한 후 재조합 효소(베타글루코시다아제, bgp-1)를 처리하여 그린베리 인삼 열매 추출물과 그

린베리 인삼 열매 추출물의 효소 처리 추출물(BGK-1)을 제조하였다.

- [0099] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 그린베리 인삼 열매(K-1)는 4 내지 5년산 인삼에서 수확되고 개화 후 1주 내지 9주차로 수확한 열매로, 이의 진세노사이드 함량, 뿌리무게, 열매무게를 비교한 결과, 2주 내지 3주차에 수확된 미숙과 열매에서의 총 진세노사이드 함량, 그 중에서도 특히 Re가 가장 많이 포함되어 있는 것을 확인하였다.
- [0100] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 재조합 효소를 처리하면, 부작용 없이, 포도당 단위의 가수분해를 통해 진세노사이드 Re가 진세노사이드 Rg2로 변환되는 것을 알 수 있었다. 진세노사이드 Rg2는 Re 대비 더 강력한 신경보호 및 비만예방 특성을 나타내고, 식의약 및 화장품 소재로의 경제적 가치가 높아, 재조합 효소의 처리로 보다 우수한 항염 및 미백효과를 제공 할 수 있음을 확인하였다.
- [0101] 따라서, 본 발명의 그린베리 인삼 열매(K-1) 추출물을 재조합 효소 처리한 그린베리 인삼 열매 추출물의 효소 처리 추출물은 진세노사이드 Rg2의 함량이 높아, 이를 활용하여 경제적 가치가 높은 건강기능 식품 또는 화장품으로 응용할 수 있음을 알 수 있다.
- [0103] **실시예 2: HPLC-QTOF / MS 및 TLC 분석**
- [0104] 그린베리 인삼 열매에서의 다양한 진세노사이드 프로파일링을 질량 분광법 (QTOF/MS) 접근법을 통해 수행하였다. 이 분석은 Waters Xevo G2-S QTOF MS (Waters Corp., Milford, MA, USA)에서 음이온 모드로 실행하였다.
- [0105] 진세노사이드 함량을 HPLC (Agilent 1260, Palo Alto, CA, USA)로 확인하였다. 구체적으로, 인삼 열매 분말을 70% 에탄올로 추출한 다음, 40℃에서 증발시킨 후 메탄올 1ml에 용해시켰다. 이후 진세노사이드 분석은 1.0ml/min 유속으로 203nm C18 컬럼에서 HPLC로 분석하였다.
- [0106] TLC 평가는 부피비가 65:35:10 (v / v / v) 인 클로로포름-메탄올-물 용매 혼합물에서 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)의 실리카겔 60 F254 플레이트를 현상액으로 사용하여 확인하였다. TLC 플레이트의 스팟은 에탄올 (10:90, v/v)에 황산을 분사한 후 110℃에서 10분동안 반응시켜 염색하였다.
- [0108] **실시예 3: 식물화학 분석**
- [0109] 본 발명의 그린베리 인삼 열매의 당함량 감소는 디니트로살리실산(dinitrosalicylic acid, DNS)시약 접근법을 통해 측정하였다. 상기 실시예 1로 제조된 추출물과 DNS 시약을 혼합하고 5분간 끓인 후 냉각하였다. 상기 혼합물의 흡광도를 포도당을 기준으로 하여 UV-reader(Bio-Tek, Winooski, VT)로 550nm에서 측정하였다.
- [0110] K-1 추출물의 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 접근법으로 평가하였다. 메탄올 1ml에 녹인 K-1 추출물을 10% 탄산나트륨과 3분동안 혼합하였다. 그 후, 1ml의 Folin-Ciocalteu 시약을 30분 동안 배양하였다. 인삼 열매 샘플의 총 페놀 함량을 750nm에서 UV관독기를 사용하여 측정하였으며 갈산을 기준으로 하는 검량선을 기반으로 결정하였다.
- [0112] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 5년산된 그린베리 인삼 열매를 2주차에 수확하였을 때 총 진세노사이드, 환원당 및 산성 다당류가 가장 많이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0114] **실시예 4: 세포배양 및 생존력 분석**
- [0115] B16 및 RAW 264.7세포를 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)(100x)이 보충된 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)에서 37℃의 온도, 95% 가습공기 및 5% CO₂ 분위기에서 배양하였다.
- [0116] 세포 증식은 MTT 접근법으로 확인하였다. 상기 세포를 24시간 동안 처리한 후, 100 μL의 0.5mg/ml MTT 시약을 첨가하고 추가로 3시간 동안 37℃에서 배양하였다. 다음으로, 100 μL의 DMSO를 추가하고 SpectraMax ® ABS Plus 마이크로 플레이트 리더 (Molecular Devices, San Jose, California, USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도

를 측정했다.

[0118] **실시예 5: 세포 멜라닌 함량 및 티로시나(tyrosinase)활성 분석**

[0119] B16 세포를 α -MSH (100 nM), GK-1, BGK-1 (25 및 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) 추출물로 72 시간 동안 처리한 후 B16세포의 멜라닌 농도를 평가했다. 세포를 수집하고 펠렛을 1시간 동안 80°C에서 10% DMSO와 함께 500 μL 의 NaOH에 용해시켰다. 이후 흡광도를 마이크로플레이트 리더를 사용하여 475nm에서 확인하였다.

[0120] 한편, 멜라닌 합성의 속도를 억제하는 티로시나아제(tyrosinase)의 활성은 L-DOPA 산화 효소 접근법을 사용하여 측정하였다. B16 세포를 처리한 후 1% Triton X-100을 포함하는 PBS로 세포를 용해시키고 -80°C에서 15분 동안 동결-해동 시켰다. 120,000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후, 10 μL 의 15mM L-DOPA를 90 μL 의 용해물 상층액에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 티로시나아제 활성을 마이크로 플레이트 판독기로 475nm에서 흡광도를 확인하였다.

[0122] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, B16 세포에 효소를 처리하지 않은 그린베리 인삼 열매 추출물(GK-1), 그린베리 인삼 열매에 재조합 효소 처리하여 제조한 그린베리 인삼 열매의 효소 처리 추출물(BGK-1)을 MTT로 세포독성 평가하였을 때, 상기 추출물의 모든 처리 농도에서 독성효과가 없는 것을 확인하였다.

[0123] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 멜라닌 생산은 추출물의 용량에 의존적으로 감소하는 것을 확인하였고, 티로시나아제 활성 또한 효과적으로 억제하는 것을 확인하여 본 발명의 GK-1 추출물 및 BGK-1 추출물이 미백에 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도, 효소를 처리한 BGK-1 추출물이 효소를 처리하지 않은 GK-1 추출물 대비 효과가 더 우수한 것을 알 수 있었다.

[0125] **실시예 6: 항염 활성 분석**

[0126] NO의 과잉생산은 ROS와 반응하여 세포손상을 유발하는 염증성 발병 기전이다. 이러한 NO의 생성은 Griess 시약을 사용하여 아질산염 수준을 측정하여 확인하였다. 구체적으로 RAW.264.7 세포를 다양한 농도의 GK-1 추출물, BGK-1 추출물(25-100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) 또는 1 μM dexamethasone (DEX)으로 전처리하였다. 1시간 후, 세포를 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 의 LPS로 자극하고, 24 시간 배양 후, 상층액을 동일한 부피의 Griess 시약과 혼합했다. 이 후 520nm 에서 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 NO 수준을 측정하고 표준 곡선을 참조하여 아질산 나트륨 농도를 계산했다.

[0127] 한편, ROS의 세포 내 축적은 검은색 96-웰 플레이트에서 배양을 실행하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 처리한 후 10 μm 5-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate를 어두운 조건에서 30 분 동안 배양했다. 방출 파장은 각각 485nm 및 535nm 였다. 세포 내 ROS 생성을 추가로 확인하기 위해 세포 ROS 검출 분석키트를 적용하였다. 24시간 동안 GK-1 및 BGK-1로 처리된 Raw264.7 세포 0.4 $\mu\text{L}/\text{ml}$ 산화스트레스 검출 및 과산화물 검출 시약을 세포에 첨가하였다. 30분 동안 배치한 후, 레이저 스캐닝 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)으로 형광을 측정하고 Image J 소프트웨어를 사용하여 정량화했다.

[0129] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 효소처리 하지 않은 그린베리 인삼 열매 추출물(GK-1), 및 그린베리 인삼 열매를 재조합 효소 처리하여 제조한 그린베리 인삼 열매의 효소 추출물(BGK-1)은 RAW 264.7 세포에 대해 유의한 세포 독성 효과를 나타내지 않았다. 또한, lipopolysaccharide (LPS)에 의해 발현이 유도된 iNOS는 NO 생성을 촉매하고, 과다한 NO 생성은 염증 반응을 심화시켜 조직의 손상시키는데, 본 발명의 GK-1 및 BGK-1 추출물, 그 중에서도 특히 BGK-1은 iNOS, 및 NO 모두 생성을 용량 의존적으로 억제하는 것을 확인하여, 항염 효과가 있는 것을 확인하였다.

[0130] 아울러, 도 6 내지 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 효소 처리하지 않은 그린베리 인삼 열매 추출물(GK-1) 및 그린베리 인삼 열매를 재조합 효소 처리하여 제조한 추출물(BGK-1)은 LPS로 유도된 ROS의 생성을 억제하는 것을 확인하였다. ROS는 산소와 화학적으로 반응하는 분자와 함께 세포내 신호 전달 및 항상성의 중요한 조절자이고 ROS는 LPS에 노출되는 동안 축적되어 치명적인 세포손상을 초래하는데, 본 발명의 GK-1 및 BGK-1, 그 중에서도 특히 BGK-1은 ROS 생성 감소 효과에 우수하였다. 결론적으로, GK-1 및 BGK-1은 대식세포에서 LPS로 유도된 ROS의 축적을 억제할 수 있어 항염에 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

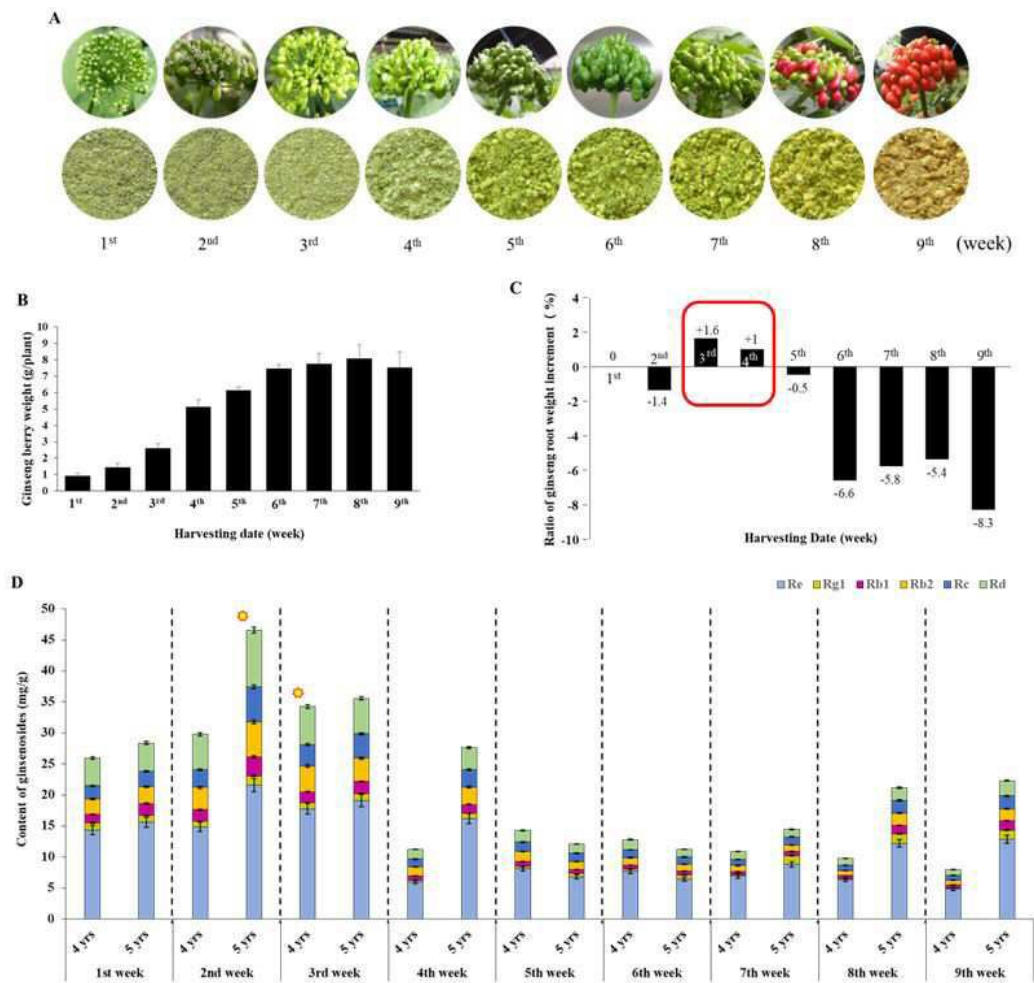
[0131] 또한, 도 8 내지 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명의 효소처리 하지 않은 그린베리 인삼 열매 추출물(GK-1) 및 그린베리 인삼 열매를 재조합 효소 처리하여 제조한 추출물(BGK-1)은 NF- κ B의 활성화를 억제하는 것을 확인하였다. LPS로 자극된 RAW264.7 세포는 염증반응이 유도되어 염증반응의 전사인자로 알려진 NF- κ B가 활성화 됨으로 TNF- α 과 같은 사이토카인이 염증촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하고 이들이 iNOS 및 NO를 생성하여 염증을 악화시킨다. 본 발명의 GK-1 및 BGK-1 모두 농도 의존적으로 NF- κ B, TNF- α , iNOS, NO 생성을 연쇄적으로 억제하는 것을 확인하였다. 특히, BGK-1은 GK-1 대비 염증억제에 더 효과적인 것으로 확인되었다.

[0133] 본 발명의 실시예 1 내지 실시예 6을 종합하면, 본 발명의 그린베리 인삼 열매 추출물(GK-1)과 그린베리 인삼 열매를 재조합 효소 처리하여 제조한 그린베리 인삼 열매 효소 처리 추출물(BGK-1)은 모두 미백 및 항염 효과를 가짐을 알 수 있으며, 특히 그린베리 인삼 열매를 재조합 효소처리 하지 않은 추출물(GK-1) 대비 BGK-1 추출물은 보다 효과적으로 NO 생성 억제 멜라닌 색소를 억제하고 타이로시나아제 활성을 억제하여, 보다 효과가 우수한 항염 및 미백 조성물로 제공할 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

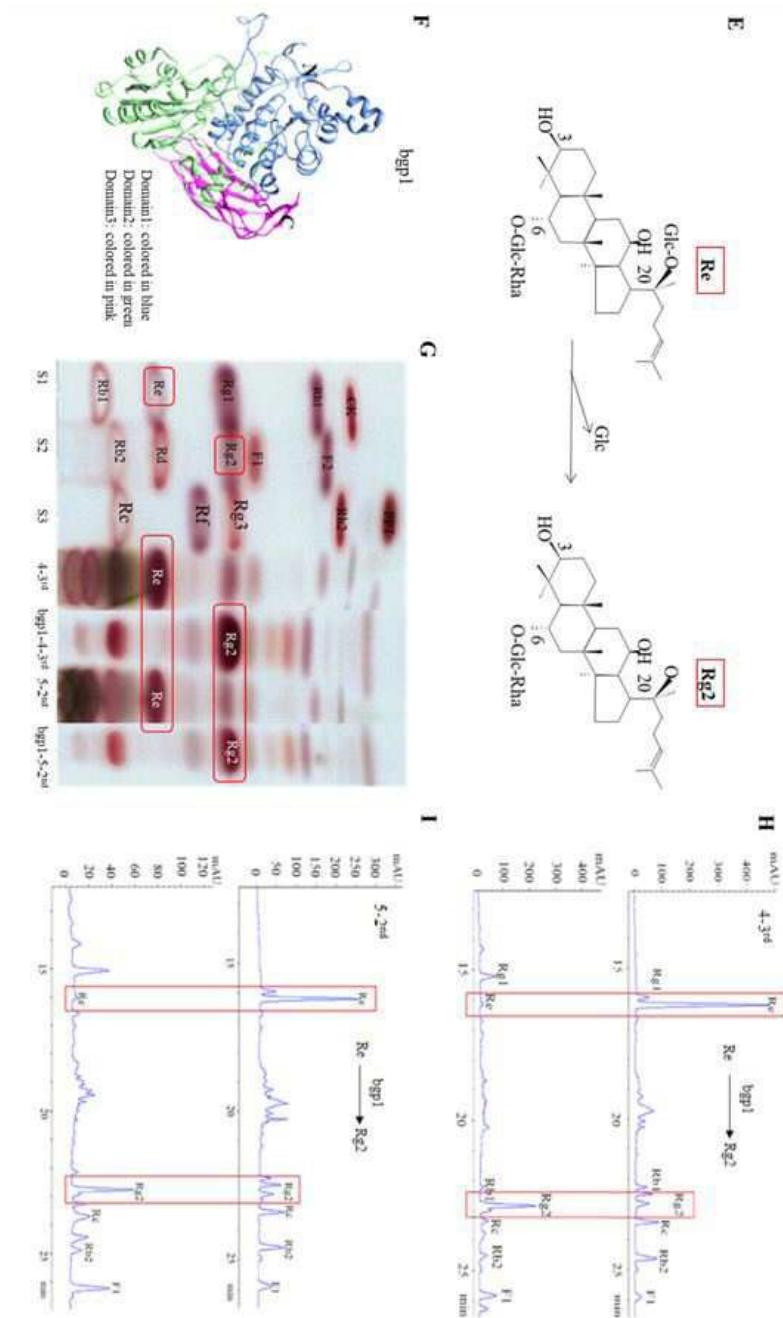
[0135] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

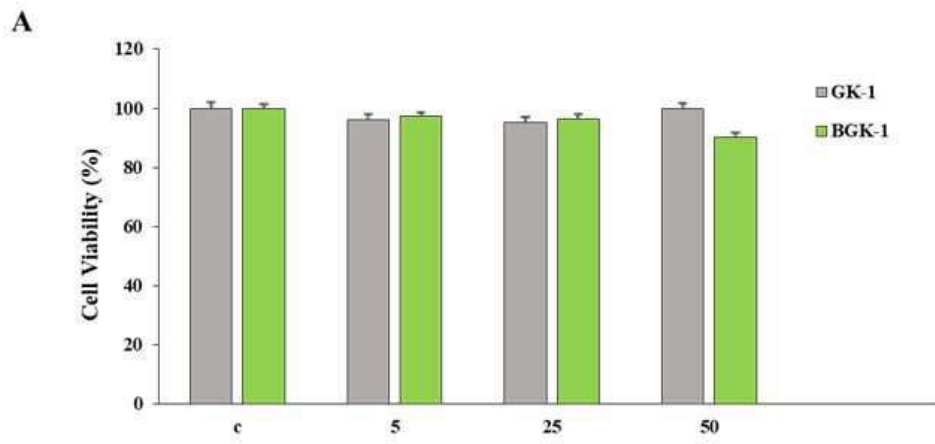
도면1



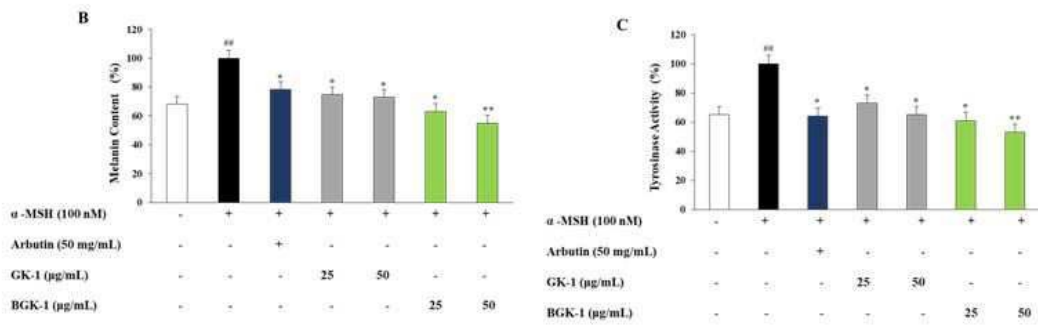
도면2



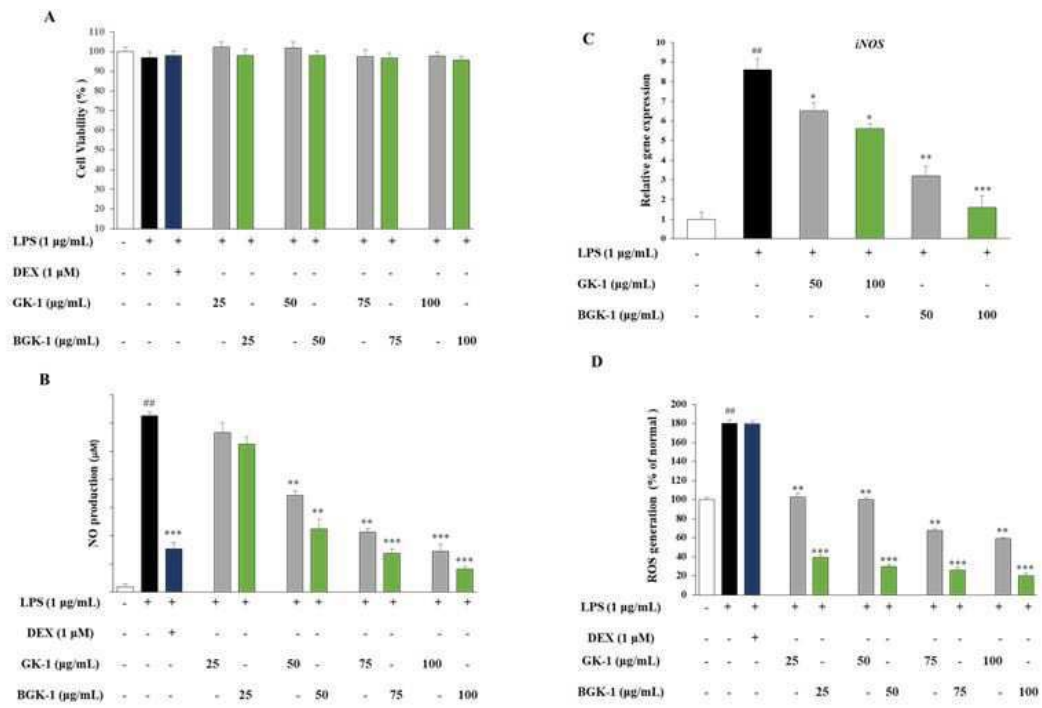
도면3



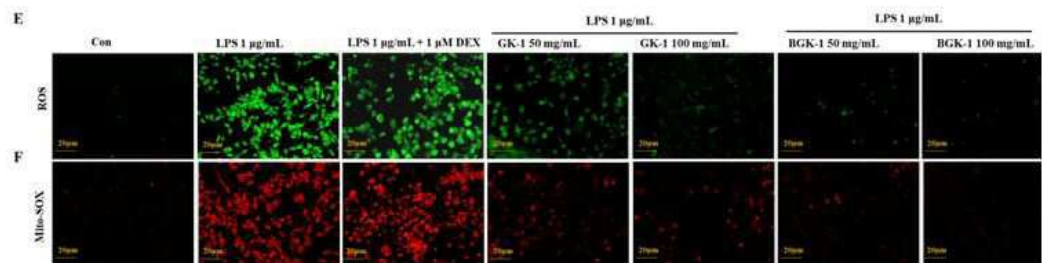
도면4



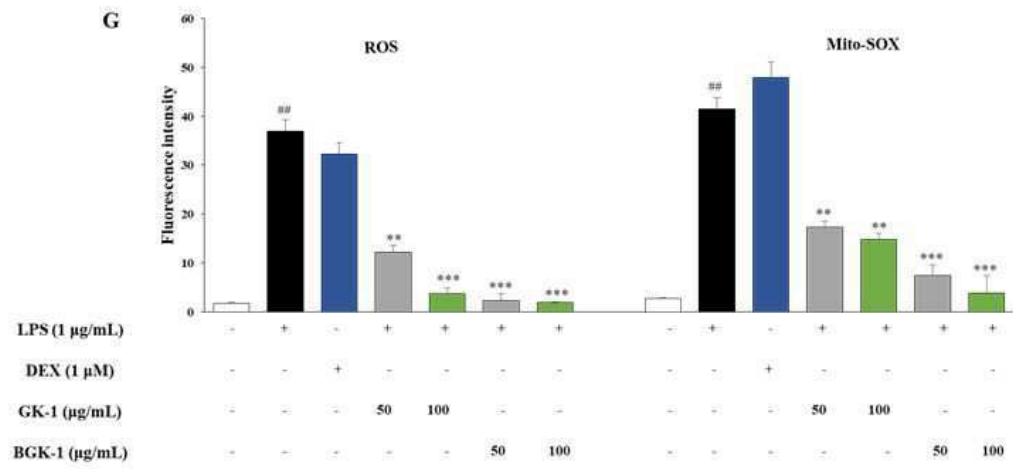
도면5



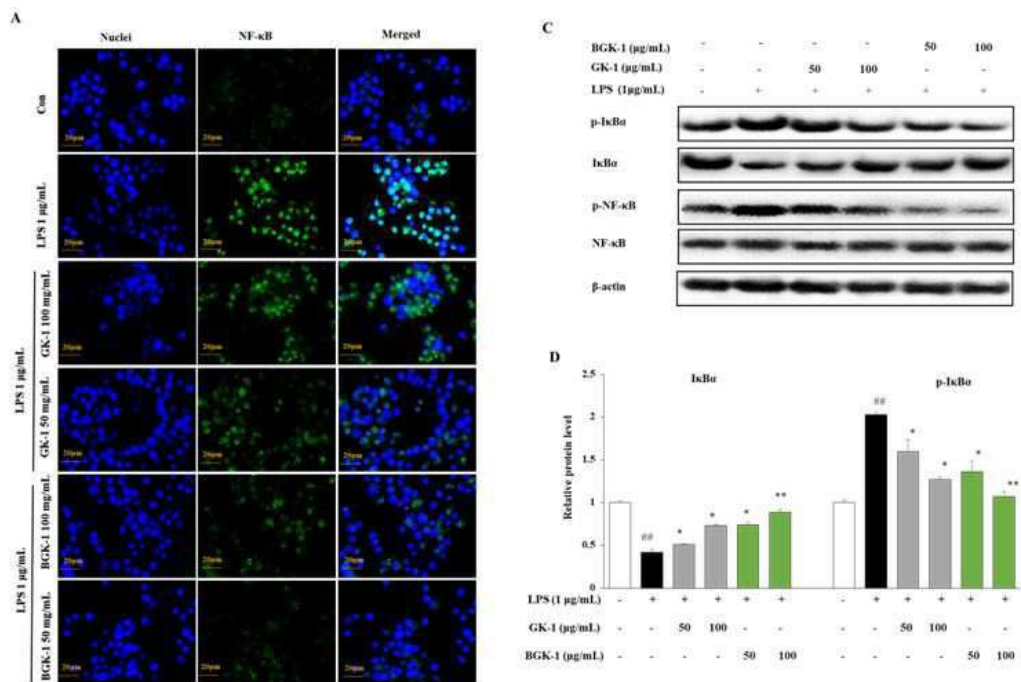
도면6



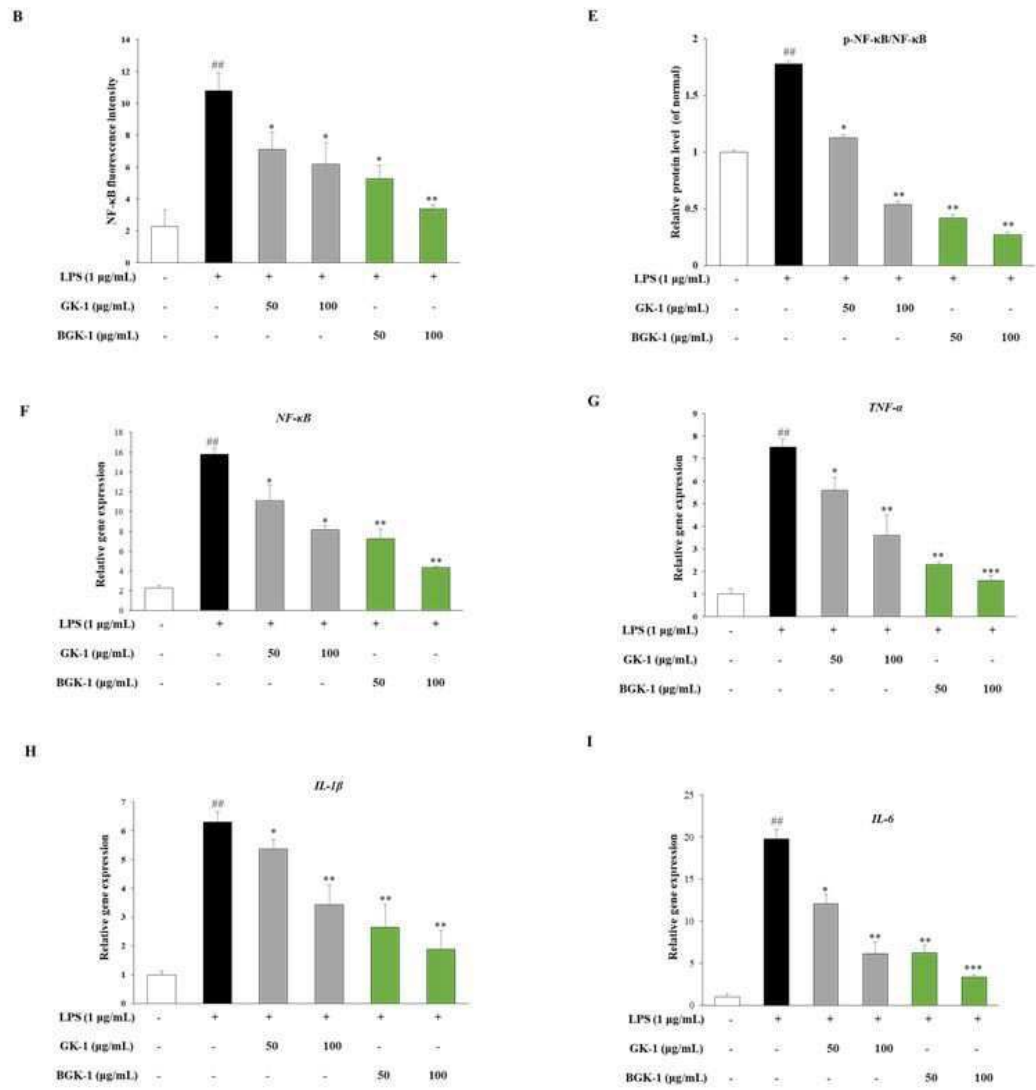
도면7



도면8



도면9



도면10

