(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0066056
(43) 공개일자 2021년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A23L 19/10* (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01) *A23L 5/00* (2016.01)
A23L 5/10 (2016.01) *A23L 5/20* (2016.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 19/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0154196
(22) 출원일자 2019년11월27일
심사청구일자 2019년11월27일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
함양군
경상남도 함양군 함양읍 고운로 35
(72) 발명자
조계만
경상남도 진주시 진주대로 829번길 21, 103동 2501호
김수철
경상남도 진주시 대신로389번길 6-5
조두용
경상남도 양산시 회현1길 3, 101동 306호
(74) 대리인
조영신

전체 청구항 수 : 총 6 항

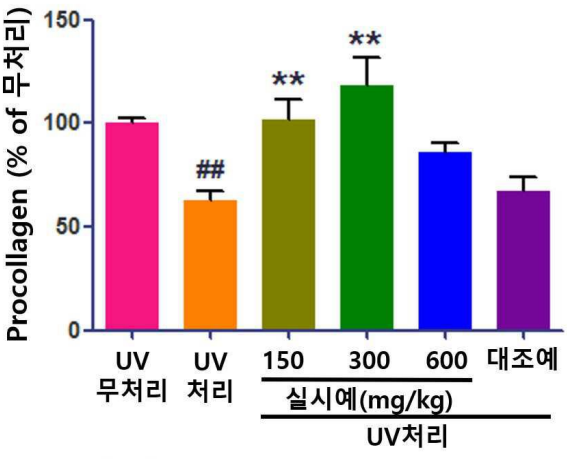
(54) 발명의 명칭 **복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명에서는 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 식품 및 화장료 조성물이 개시된다.

본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 조성물은 자외선으로 손상된 피부의 주름, 피부탄력 및 피부보습 개선 효능이 우수하여, 자외선에 의한 피부 손상 개선용 이너뷰티 식품 또는 화장품의 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A23L 5/13 (2016.08)
A23L 5/23 (2016.08)
A23L 5/51 (2016.08)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/004 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017023A00-1720-BA01
부처명 산림청,한국임업진흥원
과제관리(전문)기관명 한국임업진흥원
연구사업명 산림생명자원 소재발굴연구사업
연구과제명 지리적 표시제 관련 산양삼을 활용한 유효성분 극대화 및 기반 기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경남과학기술대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.31 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 R0006207
부처명 중소기업벤처부,한국산업기술진흥원
과제관리(전문)기관명 한국산업기술진흥원
연구사업명 풀뿌리기업육성사업
연구과제명 함양 산양삼 기반 항노화 블록버스터급 상품 고도화 사업
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경남과학기술대학교 산학협력단
연구기간 2017.04.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 식품 조성물로,

상기 복합발효 산양삼전초 추출농축물은

ⅰ) 산양삼 전초를 100℃에서 30~120분간 증숙하여 60~80℃에서 2~5일 숙성하는 단계;

ii) 수탁번호 KACC 92157P로 기탁된 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주와 수탁번호 KACC91848P로 기탁된 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주의 복합유산균으로 발효하는 단계; 및

iii) 에탄올로 추출하여 가용성 고형분이 12~18 brix가 되도록 농축하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것인 자외선에 의한 피부 손상 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 자외선에 의해 손상된 피부 수분 함량을 30 a.u 이상으로 증가시키고, 경피 수분 증발량을 4 g/m^2 이하로 감소시키고, 피부 탄력성을 80% 이상으로 개선시키고, 피부 주름을 70 a.u 이하로 감소시키고, 피부 진피를 구성하는 히알루론산 함량을 160% 이상 및 프로콜라겐 타입 I 함량을 60% 이상으로 증가시키고, 피부 표피층 두께를 50 ㎛ 이하로 감소시키고, 진피층의 주요성분인 콜라겐을 110% 이상으로 증가시켜서 자외선에 의해 손상된 피부 주름, 피부 탄력 및 피부 보습의 개선하는 것을 특징으로 하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 인체흡수형 진세노사이드 Rd2, F2, Rg3와 컴파운드 K가 각각 1.02 mg/ml 이상, 1.59 mg/ml 이상, 0.92 mg/ml 이상, 및 2.21 mg/ml 이상으로 함유하는 것을 특징으로 하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 액상 스틱 제품, 분말 과립, 캡슐, 음료, 및 젤리로 구성되는 어느 하나의 형태로 가공된 것인 피부 손상 개선용 식품 조성물.

청구항 5

복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 화장료 조성물로,

상기 복합발효 산양삼전초 추출농축물은

ⅰ) 산양삼 전초를 100℃에서 30~120분간 증숙하여 60~80℃에서 2~5일 숙성하는 단계;

ii) 수탁번호 KACC 92157P로 기탁된 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주와 수탁번호 KACC91848P로 기탁된 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주의 복합유산균으로 발효하는 단계; 및

iii) 에탄올로 추출하여 가용성 고형분이 12~18 brix가 되도록 농축하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것인 자외선에 의한 피부 손상 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 조성물은 인체흡수형 진세노사이드 Rd2, F2, Rg3와 컴파운드 K가 각각 1.02 mg/ml 이상, 1.59 mg/ml 이상, 0.92 mg/ml 이상, 및 2.21 mg/ml 이상으로 함유하는 것을 특징으로 하는 것인 자외선에 의한 피부 손상 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 조성물에 관한 것으로, 더 상세하게는 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하여, 자외선에 의해 손상된 피부의 주름, 피부탄력 및 피부보습 개선 효능이 우수한, 이너뷰티 식품 조성물 및 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 최근 삶의 질이 증가함에 따라서 이너뷰티 식품에 대한 관심이 증대되고 있다. 이너뷰티 식품은 내면의(Inner) 아름다움(Beauty)을 위한 식품을 뜻하는 말로 화장품을 바르는 등의 일시적, 인위적인 방법으로 미용효과를 얻는 것이 아니라 음식섭취를 통해 건강과 아름다움을 가꾸는 것을 의미한다. 국내 이너뷰티 식품 시장은 수천억 원 규모로 매년 꾸준히 성장해왔으며, 연평균 68.2%의 성장률 기록하고 있다.

[0004] 자외선에 노출은 피부 표피 및 진피를 구성하고 있는 주요성분의 파괴와 생성 저하로 피부 보습력 저하 및 주름 증가로 피부 노화의 주원인으로 작용한다. 자외선(UV)에 의해 유도되는 산화적 스트레스는 체내의 자유라디칼을 증가시키고, 콜라겐(Collagen)을 분해하는 콜라게나제의 활성 증가 및 히알루론산 (Hyaluronic acid)을 분해하는 히알루론다제(Hyaluronidase)의 활성 증가로 피부 표피 및 진피 손상이 야기된다.

[0005] 식품의약품안전처는 자외선에 의한 피부 손상으로부터 피부건강을 유지에 대한 건강기능식품 기능성 원료로서 엽록소 함유 식물, 포스파티딜세린, 히알루론산, 클로렐라, NAG(엔에이지,N-acetylglucosamine), 곤약감자추출물, 스피루리나, 알로에 겔을 인증하고 있다.

[0006] 최근 자외선 노출에 의한 피부 손상에 대한 기전 연구를 기초로 하여 생화학적 효능 및 효과를 나타내는 화장료 및 식품의 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 식물유래 소재는 안전성 측면에서 우수하여 기능성 소재 개발이 몇몇 이루어져 있으며, 일례로서 산수국 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부의 UV-B 노출에 의해 생기는 인간 표피세포 및 진피세포 손상을 개선하는 조성물이 개발되어 있으나 (등록특허 10-1902911호), 여전히 효능이 우수한 새로운 천연 소재 개발이 요구되어 있는 실정이다.

[0007] 산양삼은 「산지관리법」 제2조 제1호에서 정의하고 있는 산지에서 차광막 등 인공시설을 설치하지 아니하고 생산되는 삼으로 약리성분은 인삼보다 함량이 높은 것으로 알려져 있어, 산양삼을 이용한 기능성 식품 또는 약품 소재 개발이 이루어지고 있으나 (특허 10-1917128호), 새로운 기능성 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0008] 또한 산양삼 단순 추출물로는 산양삼에 함유된 다량의 생리활성성분이 인체 흡수형으로 존재하지 않아서 그 효과가 제한적이었던바, 인체 흡수형 생리활성성분을 강화시키는 방법의 개발이 시도되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 종래 기술의 요구에 부응하기 위한 연구를 지속한 결과, 산양삼 전초를 증숙과 숙성을 수행한 후 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주와 락토바실러스 플란타륨 P1201 균주의 복합유산균으로 발효한 후 추출농축하여 얻은 조성물이, 자외선에 의해 손상된 피부의 주름, 피부탄력 및 피부보습 개선 효능이 탁월하다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 식품 조

성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 복합발효 산양삼전초 추출농축물은 하기 단계들을 포함하는 제조방법에 의하여 제조된다:

[0016] ⅰ) 산양삼 전초를 100℃에서 30~120분간 증숙하여 60~80℃에서 2~5일 숙성하는 단계;

[0017] ii) 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주의 복합유산균으로 발효하는 단계; 및

[0018] iii) 에탄올로 추출하여 가용성 고형분이 12~18 brix가 되도록 농축하는 단계.

[0019] 단계 ⅰ): 산양삼 증숙 및 숙성

[0020] 산양삼 전초를 100℃에서 30~120분간 증숙하여 60~80℃에서 2~5일 숙성한다.

[0021] 본 발명에서 산양삼 전초를 사용한다. 전초는 뿌리, 줄기 및 잎을 모두 포함하는 것을 의미한다. 산양삼은 뿌리 이외에도 잎 등에 다량의 생리활성성분이 함유되어 있으며 무농약으로 재배되는 특성에 따라서 전초 사용시도 안전하다.

[0022] 산양삼 전초는 3년근 이상을 사용한다. 산양삼 전초를 흐르는 물에 3회 세척하고 물기를 제거한 후 증숙한다.

[0023] 증숙는 통상의 찜기와 같은 증숙기를 사용하여 수행할 수 있으며, 100℃에서 30~120분간 수행한다. 증숙 시간이 30분 미만인 경우 충분한 증숙가 진행되지 않아 숙성 또는 발효와 같은 후속 단계가 원활하지 않을 수 있고 잡균의 오염이 발생될 수 있다. 120분 초과하여 증숙될 경우는 오랜 열처리로 산양삼 전초의 영양성분이 파괴될 수 있다.

[0024] 증숙된 산양삼 전초를 60~80℃에서 2~5일간 숙성시킨다. 숙성 온도가 60℃ 미만이거나 숙성 기간이 2일 미만인 경우, 숙성이 원활히 이루어지지 않으며, 숙성온도가 80℃ 초과하거나 숙성 기간이 5일 초과의 경우 생산된 생리활성물질이 분해되어 함량이 감소될 수 있다.

[0025] 증숙과 숙성의 1~3회 반복될 수 있으며, 가장 바람직하게는 3회 반복 수행한다.

[0026] 단계 ii) 복합발효

[0027] 단계 ⅰ)로부터의 증숙 및 숙성된 산양삼 전초를 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주의 복합유산균으로 발효한다.

[0028] 본 발명에서 복합유산균을 구성하는 하나의 균주인 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주는 본 발명자가 김치로부터 분리/동정하여 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 2016년 12월 12일에 기탁한 균주(수탁번호 KACC92157P)로, 가바(GABA)의 생산성 및 진세노사이드 컴파운드 케이(compound K) 생산성이 탁월하다 (특허출원 10-2017-0152033).

[0029] 본 발명에서 복합유산균을 구성하는 또 다른 하나의 균주인 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주는 본 발명자가 발효식품으로부터 분리/동정하여 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 2013년 7월 19일에 기탁한 균주(수탁번호 KACC91848P)로서, 생균제제능이 우수하고 생리활성물질 생산성이 우수한 특성을 갖는다 (등록특허 10-154418호).

[0030] 본 발명의 복합종균을 구성하는 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주는 발효 특성이 상호 보완되어 상승작용을 나타낸다. 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주는 이형유산발효 (hetero-lactic acid fermentation) 유산균으로 단독 발효 시 유산 생성이 충분하지 않고, 락토바실러스플란타룸 P1201 균주는 동형유산발효(homo-lactic acid fermentation) 유산균으로 단독 발효 시 유산이 과다하게 생성되는데, 놀랍게도 산양삼 전초를 이들 두 가지 유산균을 함께 사용하여 복합발효시 양 균주의 발효 특성이 상호 보완되

고 기호성이 우수하면서 자외선으로 손상된 피부의 주름, 피부탄력 및 피부보습 개선 효능이 현저히 증진되었다(시험예 2~8).

[0031] 본 발명에서 복합유산균은 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주와 락토바실러스 플란타륨 P1201 균주 각각 별도의 배양액으로서 첨가될 수도 있으며, 혼합 배양된 혼합 배양액으로서 첨가될 수도 있다.

[0032] 복합유산균에서 상기 2종의 균주의 혼합 비율은 3 : 1 ~ 1 : 3(v/v)으로 혼합될 수 있으며, 바람직하게는 1 : 1(v/v)로 혼합한다.

[0033] 발효는 복합유산균 배양액을 증숙 및 숙성된 산양삼 전초에 2~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~40℃에서 2~7일간 발효시키는 것으로 수행될 수 있다.

[0034] 복합유산균 접종량이 2%(v/w) 미만일 경우는 발효 속도가 지연될 수 있고, 발효 온도가 25℃ 미만일 경우는 발효 기간이 길어져 잡균의 오염을 초래하고 40℃를 초과할 경우는 균주의 생육이 정지될 수 있고, 발효 기간이 2일 미만일 경우는 발효 기간이 충분하지 않아 생리활성물질 등의 생성이 저조하게 될 수 있으며 7일 초과의 경우는 과 발효되어 생성된 생리활성물질이 분해될 수 있다.

[0035] 단계 iii) 추출 및 농축

[0036] 복합발효된 산양삼 전초를 에탄올로 추출하여 가용성 고형분이 12~18 brix가 되도록 농축한다.

[0037] 복합발효된 산양삼 전초는 바람직하게는 50~55℃에서 2~3일간 열풍건조한 후 분쇄기로 분쇄하여 분말을 제조하여 추출한다.

[0038] 본 발명에서 추출은 상기와 같이 제조된 분말에 40~60% 에탄올을 10~20배(w/v)를 첨가한 후 40~70℃에서 4~8시간 동안 교반하여 여과지로 여과하여 수행한다. 추출은 2회 반복할 수 있다.

[0039] 상기 에탄올로는 바람직하게는 발효주정을 사용한다.

[0040] 추출액을 감압농축기를 이용하여 가용성 고형분이 12~18 brix가 되도록 농축하여 복합발효 산양삼 전초 추출농축물을 얻는다.

[0041] 필요에 따라서, 여과지로 여과한 후 살균하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 조성물은 유산 생성이 적정하게 이루어져 기호성이 우수하면서 자외선으로 손상된 피부의 주름, 피부탄력 및 피부보습 개선 효능이 현저히 증진되어 탁월하다 (도 4 ~ 도 12b).

[0043] 특히 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물은 자외선에 의해 손상된 피부 수분 함량을 25 a.u 이상으로 증가시키고, 경피 수분 증발량을 4 g/m^2 이하로 감소시키고, 피부 탄력성을 80% 이상으로 개선시키고, 피부 주름을 70 a.u 이하로 감소시키고, 피부 진피를 구성하는 히알루론산 함량을 160% 이상으로, 프로콜라겐 타입 I 함량을 60% 이상으로 증가시키고, 피부 표피층 두께를 50 ㎛ 이하로 감소시키고 진피층의 주요성분인 콜라겐을 110% 이상으로 증가시켜서 자외선에 의해 손상된 피부 주름, 피부 탄력 및 피부 보습의 개선하였다 (도 4 ~ 도 12b).

[0044] 또한 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물은 인체흡수형 진세노사이드 Rd2, F2, Rg3와 컴파운드 K가 각각 1.02 mg/ml 이상, 1.59 mg/ml 이상, 0.92 mg/ml 이상, 및 2.21 mg/ml 이상으로 함유한다 (표 1, 도 2b).

[0045] 본 발명에서 식품은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 그대로 포함하는 액상 스틱 제품으로 가공하거나, 이를 분말화하여 이용하거나, 과립, 캡슐, 음료, 젤리 등의 다양한 형태의 제품으로 가공될 수 있다.

[0046] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0047] 복합발효 산양삼전초 추출농축물은 상기에서 정의된 바와 같다.

[0048] 본 발명에서 화장료 조성물은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 그대로 또는 분말화하여, 마스크팩, 스킨, 크림, 로션, 미스트 등의 다양한 화장품 형태의 제품으로 가공될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 복합발효 산양삼전초 추출농축물 이외에, 통상의 화장품 제형시 사용되는, 보습제, 에몰리언트제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는

제한제를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 조성물은 자외선으로 손상된 피부의 주름, 피부탄력 및 피부보습 개선 효능이 우수하다.

[0052] 따라서 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 함유하는 조성물은 자외선에 의한 피부 손상 개선용 이너뷰티 식품 또는 화장품의 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물을 제조하는 제조공정의 일례이다.

도 2는 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다. 도 2a는 진세노사이드 표준물질 21종의 HPLC 크로마토그램이며, 도 2b는 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램이다.

도 3은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 피부 수분량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 경피 수분 손실량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 피부 탄력 정도를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 피부 거칠기(주름) 정도를 나타낸 것이다. 도 7a는 동물 피부 표피를 촬영한 사진이며, 도 7b는 동물 피부의 피부 거칠기(주름) 정도를 분석한 그래프이다.

도 8은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 프로콜라겐(procollagen) 함량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 히알루론산 함량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 콜라게나제(collagenase) 활성 변화를 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 동물 피부의 콜라겐 정도를 나타낸 것이다. 도 11a는 동물 피부의 콜라겐 두께를 확대 촬영한 사진며, 도 11b는 동물 피부의 콜라겐 두께를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 동물 피부 두께 정도를 나타낸 것이다. 도 12a는 동물 피부의 두께를 확대 촬영한 사진이며, 도 12b는 동물 피부의 두께를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.

[0056] **제조예: 복합발효 산양삼전초 추출농축물 제조**

[0057] 5~8월 사이에 수확한 3년근 이상 산양삼 전초 5 kg을 흐르는 물에 3회 세척하고 완전히 물기를 제거한 후, 찜기통에 담은 후 100℃에서 1시간 증숙한 후 70℃에서 3일간 숙성하는 증숙-숙성 과정을 3회 반복(총 9일 숙성)하

여 증숙 및 숙성된 산양삼 전초를 제조하였다. 제조된 증숙 및 숙성된 산양삼 전초에 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주 및 락토바실러스 브레비스 BMK484 균주를 각각 맥아엑기스 액체배지에서 종균으로 배양하며 1:1비율로 혼합한 복합유산균을 5% (v/w)로 접종하고 30~35℃에서 5일간 발효시켜 복합발효 산양삼 전초를 얻었다.

[0058] 복합발효 산양삼 전초를 50℃에서 3일간 건조한 후 100 메쉬 이하로 분쇄하여 분말화하였다. 얻어진 분말에 20배(w/v)의 50% 발효주정을 첨가하여 70℃에서 4시간 추출하고 냉각한 80mm 여과지로 여과한 여과액과, 여과물에 다시 20배(w/v)의 50% 발효주정을 첨가하여 40℃에서 4시간 추출하고 냉각한 후 치즈크로스(8mm 여과지)로 여과한 여과액을 모아서 감압농축기를 이용하여 12 브릭스가 되게 농축하여 복합발효 산양삼 전초 추출농축물 (실시예)을 제조하였다 (도 1).

[0060] **시험예 1: 인체 흡수형 진세노사이드 Rd2, F2, Rg2와 컴파운드 K 함량 분석**

[0061] 제조예에서 제조한 복합발효 산양삼 전초 추출농축물 (실시예)을 0.45 ㎛ 멤브레인 필터로 여과한 후 분석시료로 사용하였다.

[0062] 진세노사이드 함량 분석은 기능성식품 분석법에 기술된 방법을 변형하여 고압액체크로마토그래피(HPLC, high press liquid chromatograph)로 분석하였다. 분석 컬럼은 TSKgel ODS-100Z을 사용하여 시료 주입량 10㎕, 온도는 30℃ 측정파장은 203 nm, 유속은 1.0 ml/min으로 하였고 이동상으로는 A용액은 HPLC water, B용액은 아세토니트릴을 사용하였다. HPLC 분석 조건은 이동상 용액은 0분때 A용액81% : B용액 19%로 흘려주고 15분때에는 A용액 80% : B용액 20%로 흘려주고 40분때 A용액 77% : B용액 23%, 42분때 A용액 70% : B용액 30%, 75분때에 A용액 65% : B용액 35%, 80분때에 A용액 30% : B용액 70%, 90분때에 A용액 10% : B용액 90%로 이동상을 흘려주었다. 그 결과 HPLC 크로마토그램을 도 2b에 나타냈고, 분석을 5회 반복하여 각 진세노사이드 함량을 산출하여 표 1에 나타내었다.

표 1

[0063]

함량 mg/ml (피크번호)	복합발효 산양삼 전초 추출농축액(실시예)					
	1	2	3	4	5	평균
Ginsenoside Rd2 (15)	1.12	1.13	1.12	1.09	1.02	1.1±0.03
Ginsenoside F2 (16)	1.97	1.98	1.99	1.96	1.59	1.9±0.04
Ginsenoside Rg3 (17)	0.92	0.93	0.93	0.93	0.92	0.93±0.03
Ginsenoside C.K (19)	2.22	2.21	2.21	2.24	2.23	2.22±0.02

[0064] 도 2b와 표 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼전초 추출농축물은 인체 흡수형 진세노사이드 Rd2, F2, Rg2와 컴파운드 K 함량이 각각 1.1±0.03 mg/ml, 1.9±0.04 mg/ml, 0.93±0.03 mg/ml, 및 2.22±0.02 mg/ml로 높게 나타났다.

[0066] **참고예: 동물 식이 시험을 위한 동물모델 및 시험방법**

[0067] 본 발명에서 하기 시험예에서 사용한 동물은 SKH-1 헤어리스 마이스(hairless mice)로 오리엔트바이오(경기도 성남시 중원구 갈마치로 322)에서 구입하여 사용하였다. 본 동물모델은 피부 관련 시험에 널리 사용되고 있으며 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 있어, 시험결과의 해석 및 평가에 활용에 용이하여 선택하였다.

[0068] 사용한 SKH-1 헤어리스 마이스는 약 6 주령된 암컷 90 마리이며 입수 당일 미생물 검사성적서와 동물의 외관을 검사하였다. 시험은 입수 후 5일 이상의 순화를 거치며, 순화 기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 투여개시 전 일에 체중을 측정하고 엑셀 프로그램(Excel program)을 이용하여 순위화한 체중을 이용한 무작위법에 의하여 군 분리를 실시하였다. 개체식별은 미부 표시법 및 사육상자별 개체식별카드 표시법을 이용하였다. 동물실의 입구에는 시험번호, 시험 제목, 동물실 사용 기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실 사용 기록지를 부착하였다. 해당 시험은 (재)한국건설생활환경시험연구원 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 : IA18-00939)을 거쳐 수행되었다.

[0069] 동물 사육은 SKH-1 헤어리스 마이스의 SPF 사육구역 4호실에서 온도 22±3℃, 상대습도 50±20%, 환기횟수 15회/hr, 형광등조명 아침 8시 점등과 20시 소등, 조도는 250 Lux, 소음은 52 dB, 암모니아 농도는 13 ppm, 사육상자 및 사육 밀도는 검역, 순화 및 투여 기간에 폴리카보네이트 케이지(200W×260L×130H ㎜)에 5마리 이하로

수용하였다. 사료는 일반사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet, ENVIGO Co. Ltd., USA)를 두열바이오텍(서울시 서초구 양재천로 17 길 14 두열 빌딩)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유 섭취시켰고, 물은 음용 상수도 물을 정수시킨 후 폴리카보네이트제 물병에 넣고 자유 섭취시켰다.

[0070] 자외선에 의한 피부 손상을 유도하기 위하여 UVB (5 Sankyo Denki G5T5E lamps, Sankyo Denki Co., Japan)가 장착된 UV-Irradiation system(LK3500, Korea)을 이용하여 UV를 조사하여 유도하고, UV 조사량은 UV radiometer를 이용하여 측정하였다. MED(minimal erythemal dose) 측정은 예비시험을 통하여 최초의 홍반이 나타나는 자외선 조사량을 조사하였다. UV 조사를 시작한 첫째 주에 1 MED, 둘째 주에 2 MED, 셋째 주에 3 MED, 넷째 주에서 열째 주까지 4 MED를 조사하였다. 3회/주(월, 수, 금), 총 10주간 UVB 조사를 실시하여 자외선에 의한 피부 손상을 유도하였다.

[0071] 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예) 투여는 시험 동물의 경배부 피부를 잡아 보정한 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구 투여하였다. 투여횟수 및 시각은 1회/일, 7일/주, 10주간, 투여 당일 오전 중에 투여함을 원칙으로 하였다. 투여량은 가장 최근에 측정한 체중을 기준으로 10 ㎖/kg으로 투여량을 계산하였으며, 투여 용량은 시험물질인 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)의 최고용량을 600 mg/kg 고용량 투여군으로 하고, 공비를 2로 두어 중용량 (300 mg/kg) 및 저용량 (150 mg/kg)을 설정하였고, 히알루론산(HA) 60 mg/kg을 투여하는 양성대조군(대조예)을 두었다. 또한 부형제만을 투여하는 정상 대조군 (UV 무처리) 및 유도대조군 (UV 처리)을 두었다. 각 동물모델 군의 실험과 투여는 표 2와 같이 구성하였다.

표 2

[0072]

군		성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (㎖/kg)	투여용량 (mg/kg)
UV 무처리	정상대조군	암컷	5	G101~G108	10	0
UV 처리	UV 대조군	암컷	5	G201~G208	10	0
실시예	UV 시험군	암컷	5	G301~G308	10	150
	UV 시험군	암컷	5	G401~G408	10	300
	UV 시험군	암컷	5	G501~G508	10	600
대조예	UV 양성대조군	암컷	5	G901~G908	10	60

[0074] **시험예 2: 동물모델의 체중 변화**

[0075] 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물의 동물 식이에 따른 10주간 체중 변화를 분석하였다.

[0076] 구체적으로는 각 군의 동물에 참고예와 같은 투여에 따른 10주간 체중 변화를 측정하여 비교하였다. 체중 측정은 모든 동물에 대하여 입수 시, 군 분리 시, 투여개시일, 투여 후 주 1회 및 부검일에 측정하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 동물 식이 기간 동안 모든 군에서 사망 동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.

[0077] 도 3에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물의 식이에 따른 통계학적으로 유의한 체중 변화는 관찰되지 않았다.

[0078] 따라서 복합발효 산양삼 전초 추출농축물은 섭취 시 안전성이 있는 것으로 판단된다.

[0080] **시험예 3: 피부표면 수분 함량 분석**

[0081] 모든 동물에 대하여 표피(피부표면) 수분함량의 변화를 살펴보기 위하여 Corneometer CM825(Courage & Khazaka Electronics, Cologne, Germany)를 이용하여 자외선 조사 전, 자외선 조사 1, 3, 6 및 10 주차에 측정하였으며 10주차 결과를 도 4에 나타내었다.

[0082] 도 4에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두, UV 처리군에 비하여 표피 수분 함량이 25 a.u 이상으로 증가하였고, 고용량(600 mg/kg) 투여군과 중용량 (300 mg/kg) 투여군은 히알루론산 60 mg/kg을 투여한 양성대조군(대조예)에 필적하는 표피 수분 함량을 나타냈고, 특히 중용량 (300 mg/kg) 투여군은 UV 무처리한 정상대조군에 가까운 정도로 표피 수분 함량을 개선하였다.

[0084] **시험예 4: 경피 수분 손실량 분석**

[0085] 모든 동물에 대하여 경피 수분 증발량(손실량)의 변화를 살펴보기 위하여 Tewameter TM 300(Courage & Khazaka Electronics, Cologne, Germany)를 이용하여 자외선 조사 전, 자외선 조사 1, 3, 6 및 10 주차에 측정하였으며 10주차 결과를 도 5에 나타내었다.

[0086] 도 5에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두 UV 처리군에 비하여 용량의존적으로 경피 수분 증발량은 4 g/m^2 이하로 감소하였고, 고용량(600 mg/kg) 투여군과 중용량 (300 mg/kg) 투여군은 히알루론산 60 mg/kg을 투여한 양성대조군(대조예) 보다 더 높은 경피 수분 증발량을 감소시켰다.

[0088] **시험예 5: 피부 탄력성 분석**

[0089] 모든 동물에 대하여 피부 탄력성의 변화를 살펴보기 위하여 Cutometer MPA580(Courage & Khazaka Electronics, Cologne, Germany)를 이용하여 자외선 조사 전, 자외선 조사 1, 3, 6 및 10 주차에 측정하였으며 10주차 결과를 UV 무처리군 대비 상대비율(%)로 산출하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0090] 도 6에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두 UV 처리군에 비하여 용량의존적으로 피부 탄력성을 70% 이상 개선하였으며, 고용량(600 mg/kg) 투여군과 중용량 (300 mg/kg) 투여군은 UV 무처리한 정상대조군에 가까운 정도로 피부 탄력성을 개선하였다.

[0092] **시험예 6: 피부 표피 주름 분석**

[0093] 모든 동물에 대하여 부검 전 피부 표피의 주름 생성 정도를 살펴보기 위하여 Visioscan VC98(Courage & Khazaka Electronics, Cologne, Germany)를 이용하여 피부 표피를 사진 촬영하여 그 결과를 도 7a 나타냈고, 각 이미지를 분석하여 피부 거칠기(주름) 정도를 평가하여 그 결과를 도 7b에 나타내었다.

[0094] 도 7a에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두, UV 처리군에 비하여 피부 표피 주름이 상당히 개선됨을 확인할 수 있고, 히알루론산 60 mg/kg을 투여한 양성대조군(대조예)에서 보이는 피부 표피 주름과 유사한 양상을 보였다.

[0095] 또한 도 7b에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두 UV 처리군에 비하여 피부 거칠기 정도 70 a.u 이하로 유의하게 개선되었고, 히알루론산 60 mg/kg을 투여한 양성대조군(대조예)에 필적하는 피부 표피 주름을 개선하는 효과를 확인할 수 있다.

[0097] **시험예 7: 프로콜라겐 타입-I 함량, 히알루론산 함량 및 콜라게나제 (MMP-3) 활성 분석**

[0098] 모든 동물에 대하여 경부 탈구(cervical dislocation)의 방법으로 희생시키고 피부조직을 절취하여 진피를 아래 방향으로 넣은 후 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)와 Dispase 용액(grade II, 2.4 unit/mL)을 1 : 1 비율로 혼합한 용액을 첨가하여 4℃에서 18시간 동안 반응시켜 표피를 분리하였다. 단, 본관용 피부 조직은 표피와 진피를 분리하지 않은 상태로 부검 즉시 액체질소에 동결 보관하였다.

[0099] 채취된 표피 조직을 단백질 용해 버퍼로 분쇄하여 ELISA kit를 이용하여 프로콜라겐 타입-I 함량, 히알루론산 함량 및 콜라게나제 (MMP-3) 활성을 측정하여 그 결과를 도 8, 도 9 및 도 10에 나타내었다.

[0100] <프로콜라겐 타입-I의 함량 분석>

[0101] 콜라겐은 전구물질의 형태(pro-collagen)로 합성되는데 프로콜라겐 타입-I은 콜라겐의 주요구성 성분이다.

[0102] 도 8에 나타낸 바와 같이, 프로콜라겐 타입-I의 함량은 UV 조사에 의해 감소됨을 알 수 있다 (UV 처리군).

[0103] 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두, UV 처리군에 비하여 프로콜라겐 타입-I의 함량이 60% 이상이었으며, 거의 UV 무처리한 정상대조군에 가까운 정도로 프로콜라겐 타입-I의 함량이 개선되었고, 특히 150 및 300 mg/kg 투여군에서는 UV 무처리군에 비하여 더 증진된 프로콜라겐 타입-I의 함량을 나타냈다 ($p<0.01$).

[0104] <히알루론산 함량 분석>

[0105] 히알루론산은 자외선 조사에 따라서 일정 기간 동한 피부 방어 기작에 의하여 일정 기간 진피층의 히알루론산의 증가를 보이고 계속적인 UV 노출에 의하여 감소하게 된다. 자외선 조사 1, 3, 6 및 10 주차에 측정하였으며 10 주차 결과를 UV 무처리군 대비 상대비율(%)로 산출하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0106] 도 9에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두 히알루론산 60 mg/kg을 투여한 양성대조군(대조예)에 상당하는 히알루론산 함량을 나타내어 개선을 보였고, 특히 150 mg/kg 투여군의 경우는 양성대조군(대조예)에 비하여도 현저히 증진된 히알루론산 함량을 나타냈다 (p<0.01).

[0107] <콜라게나제 (MMP-3) 활성 분석>

[0108] 콜라겐은 피부, 골, 인대, 연골 및 치아 등에 높은 농도로 존재하고 트립신과 같은 단백질 분해효소의 작용을 받지 않으나 콜라게나아제에 의해 분해된다. MMP는 zinc이온을 요하는 엔도프로테아제로 세포외기질 단백질을 분해하는 효소이다. AP-1에 의해 발현이 조절되는 MMP중 MMP-1은 콜라게나제 1으로 알려져 있으며, type Ⅰ와 Ⅲ 콜라겐을 기질로 한다. MMP-3는 스트로멜리신 1이라고도 하며, 기저막의 type Ⅳ 콜라겐을 분해하며 자이모겐인 proMMP-1을 활성화시킨다. MMP-9은 ㄱ겔라티나제 B로 콜라게나제에 의해 분해된 산물을 더 작게 가수분해한다. 자외선에 의하여 MMP-1가 섬유소(fibillar) 콜라겐 (types Ⅰ와 Ⅲ)으로 쪼개면서 콜라겐을 분해시키고, 연이어 MMP-3, MMP-9를 증가시킨다. 자외선 조사 1, 3, 6 및 10 주차에 측정하였으며 10주 차 결과를 UV 무처리군 대비 상대비율(%)로 산출하여 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0109] 도 10에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군에서 고용량(600 mg/kg) 투여군과 중용량 (300 mg/kg) 투여군은 히알루론산 60 mg/kg을 투여한 양성대조군(대조예) 보다 더 감소된 콜라게나제 활성으로 개선하였다.

[0111] **<u>시험예 8: 콜라겐 및 표피 두께 분석</u>**

[0112] 모든 동물에 대하여 부검 후 피부조직을 절취하여 조직병리학적 검사를 실시하였다. 피부 조직 내 콜라겐 및 표피 두께를 확인하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 실시하여 육안으로 콜라겐 및 표피 두께가 가장 큰 3부분을 200배로 촬영하여 그 결과를 각각 도 11a 및 도 12a에 나타냈다.

[0113] 촬영된 이미지는 Axio Vision SE64 (ZEISS)를 이용하여 콜라겐 및 표피 두께를 측정하였고, Axio Vision SE64 (ZEISS)를 이용하여 이미지를 분석하여 결과에 반영하여 도 11b 및 도 12b에 나타내었다.

[0114] <콜라겐 두께>

[0115] 콜라겐은 진피층의 주요성분으로 피부의 보습, 주름 및 탄력에 중요한 작용을 한다.

[0116] 도 11a 및 도 11b에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두 UV 처리군에 비하여 용량의존적으로 콜라겐 두께를 110% 이상 개선하였으며, 특히 고용량(600 mg/kg) 투여군과 중용량 (300 mg/kg) 투여군은 양성대조군과 UV 무처리한 정상대조군 보다도 증진된 콜라겐 두께를 보여 개선 효과가 현저함을 알 수 있다.

[0117] <표피 두께>

[0118] 도 11a 및 도 11b에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물(실시예)을 투여한 동물군은 모두 UV 처리군에 비하여 용량의존적으로 표피층 두께를 50 ㎛ 이하로 감소시켜 개선하였으며, 고용량(600 mg/kg) 투여군과 중용량 (300 mg/kg) 투여군은 히알루론산 60 mg/kg을 투여한 양성대조군(대조예)에 상당하는 개선 효과를 나타냈다.

[0119] 상기 결과들을 종합해 보면, 자외선 조사로 피부 손상이 유도된 동물모델에 본 발명에 따른 복합발효 산양삼 전초 추출농축물을 10주 경구 투여한 결과, 피부 수분 함량은 증가하고 수분 증발량은 감소하고, 피부 탄력성이 개선되고 피부 주름이 감소하였으며, 피부 진피를 구성하는 히알루론산 및 프로콜라겐 타입 I이 증가하였으며, 조직 병리검사에서 피부 표피층 두께의 감소와 진피층의 주요성분인 콜라겐은 증가하였다. 이와 같은 결과는 표피층의 과도한 각질 세포의 축적방지와 진피층의 히알루론산의 증가는 피부 보습의 증가시켰고, 진피층의 프로콜라겐 타입 I 및 콜라겐 증가는 피부탄력 증대와 피부 주름을 방지시킨다. 따라서 본 발명의 따른 복합발효 산

양삼 전초 추출농축물은 자외선에 의한 피부 손상의 개선 효과가 현저하다는 것을 알 수 있다.

수탁번호

[0121]

기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC92157P

수탁일자 : 20161212

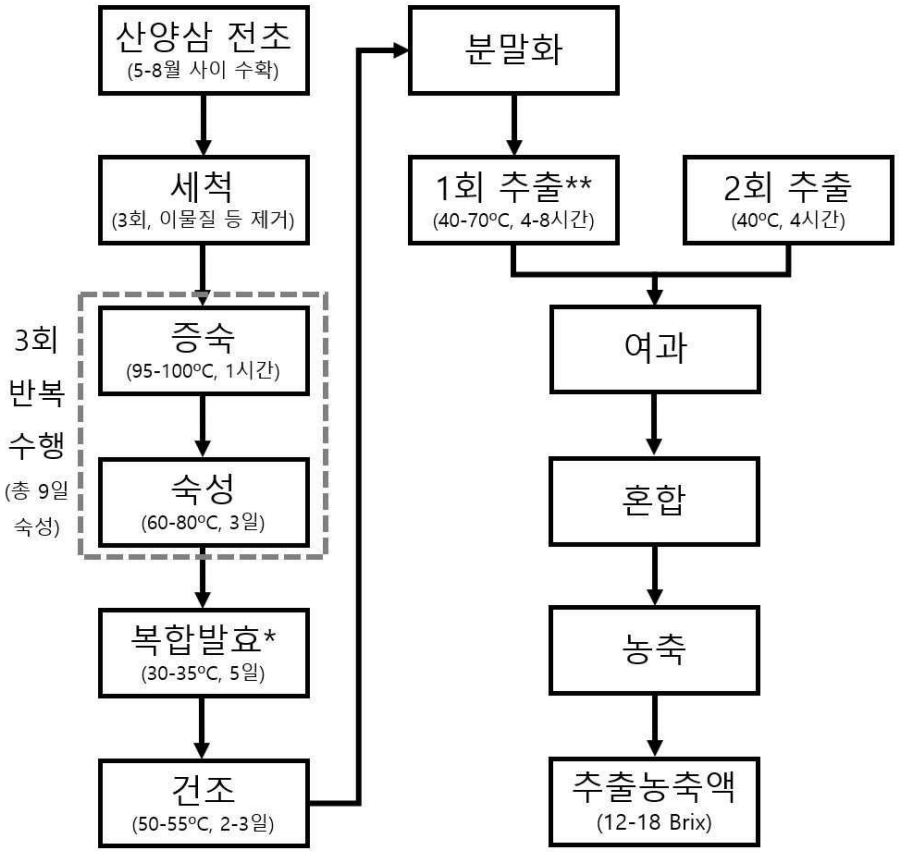
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91848P

수탁일자 : 20130719

도면

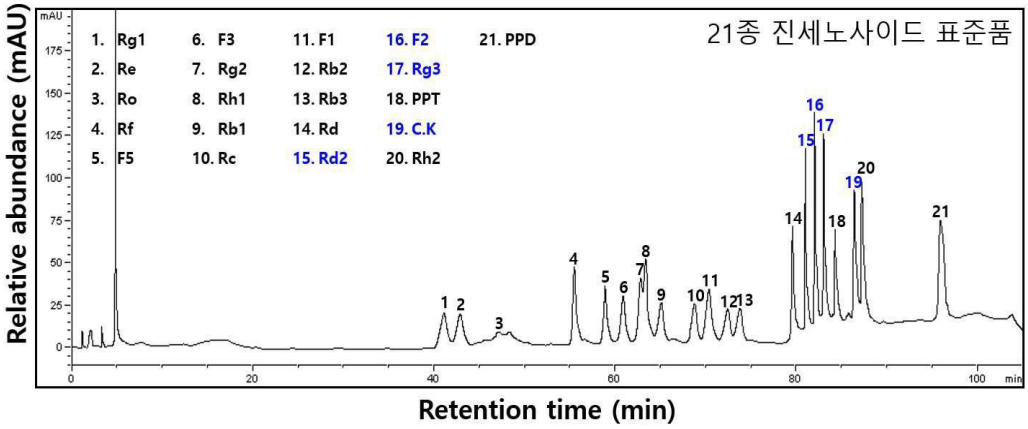
도면1



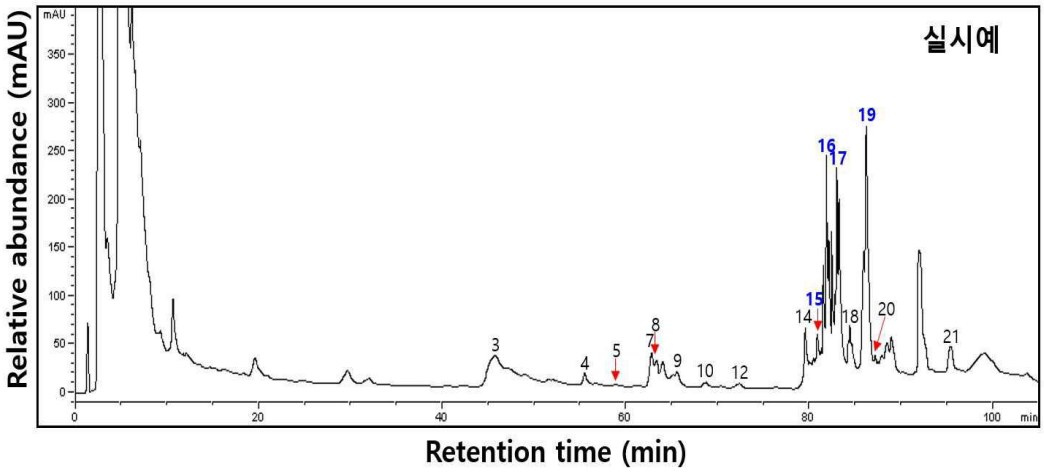
***복합발효** : *Lactobacillus plantarum* P1201과 *Lactobacillus brevis* BMK484의 복합유산균을 사용
접종량 5%

****추출** : 50% 발효주정을 복합발효 산양삼 전초 분말 중량에 20배 가하여 추출

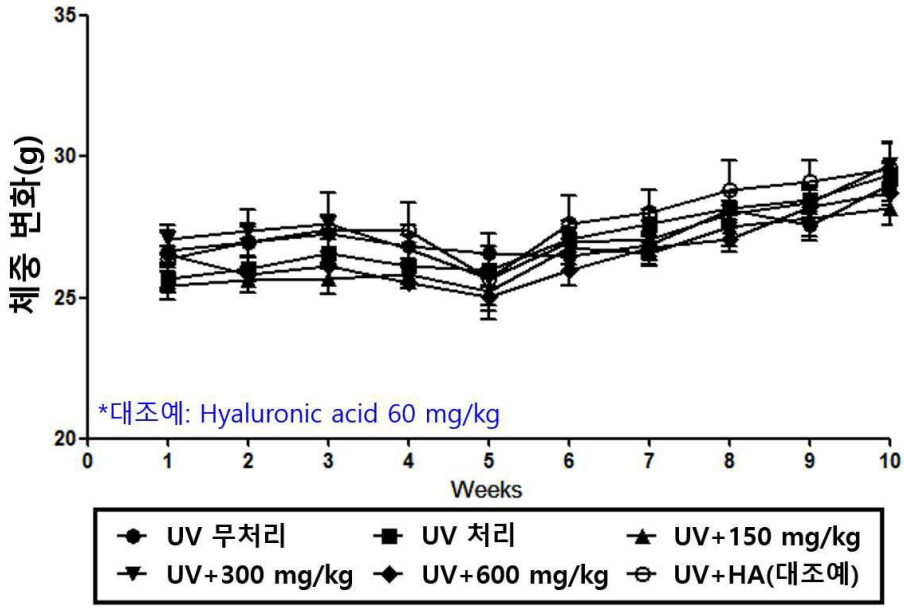
도면2a



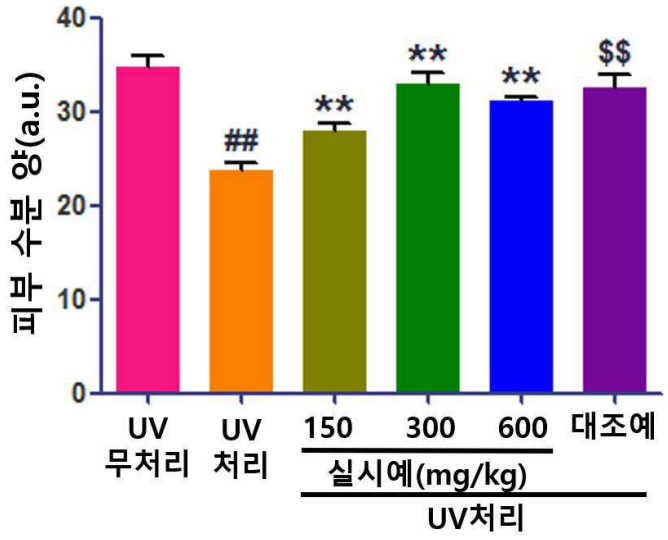
도면2b



도면3

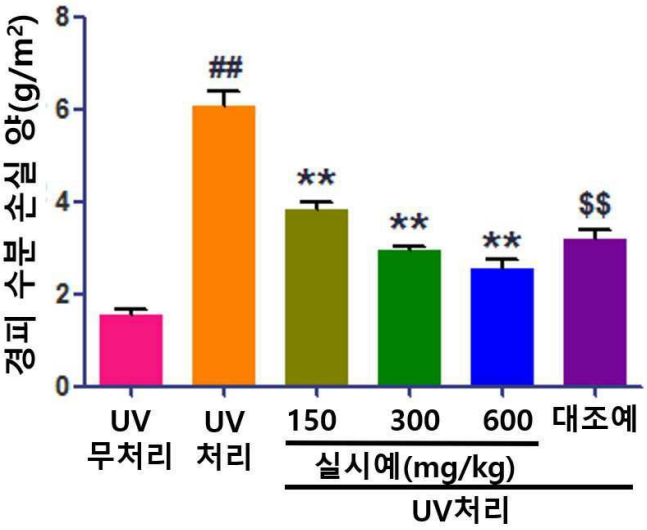


도면4



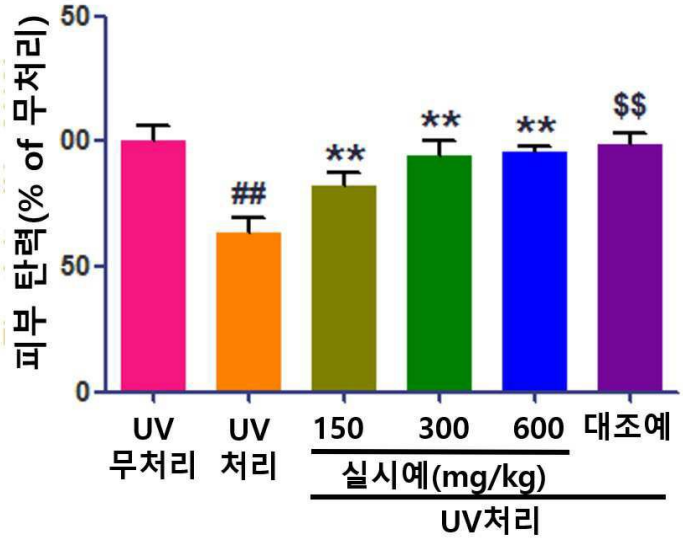
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면5



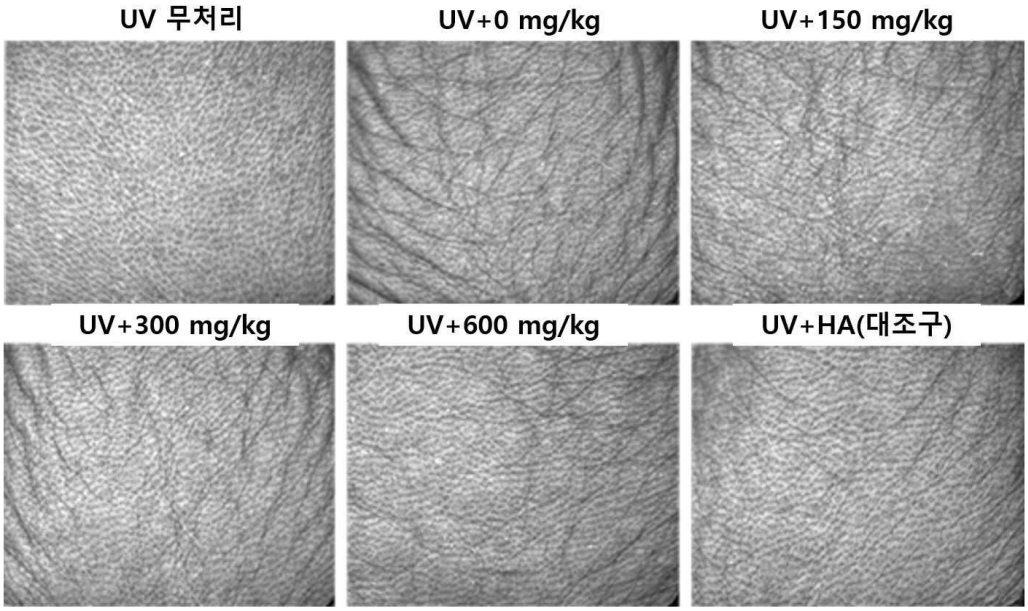
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면6



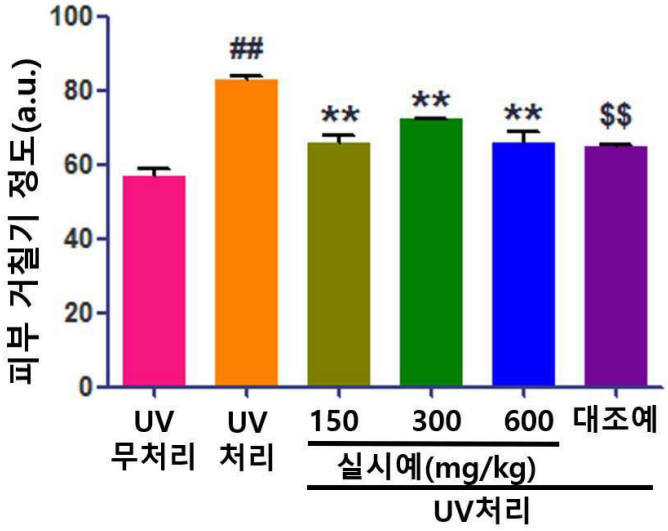
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면7a



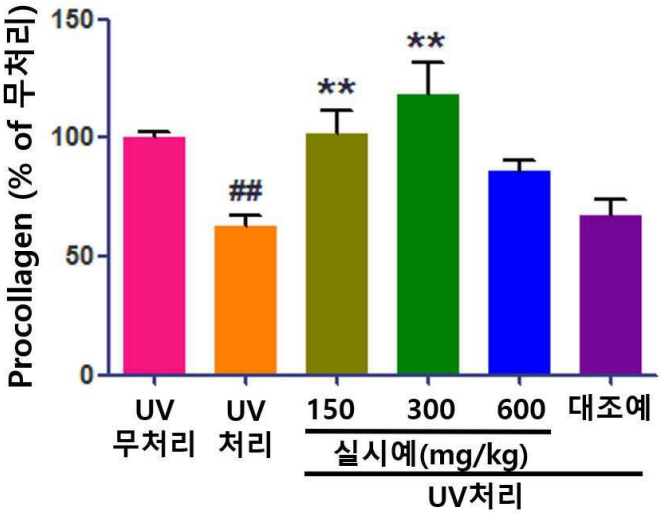
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면7b



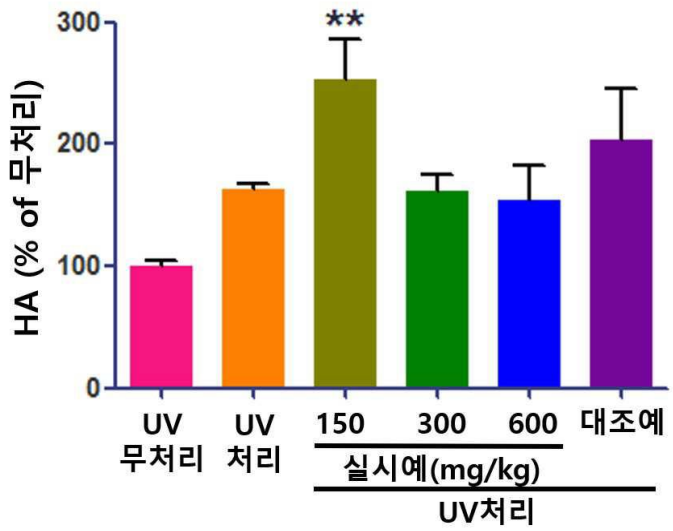
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면8



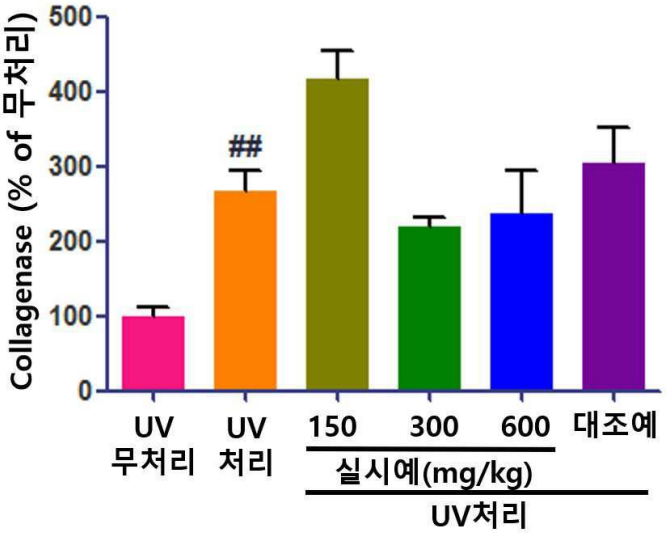
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면9



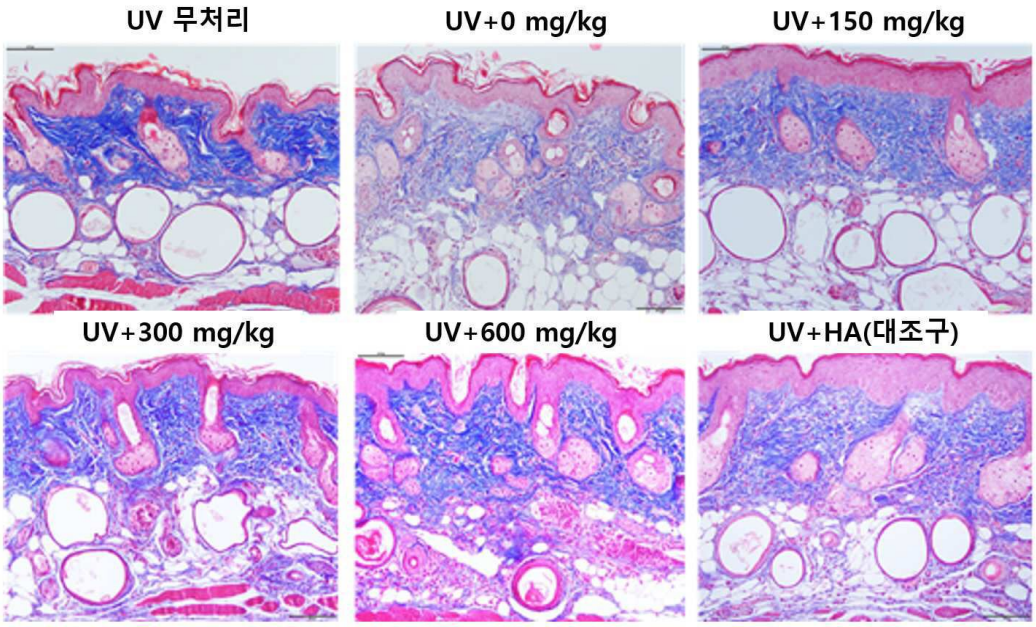
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면10



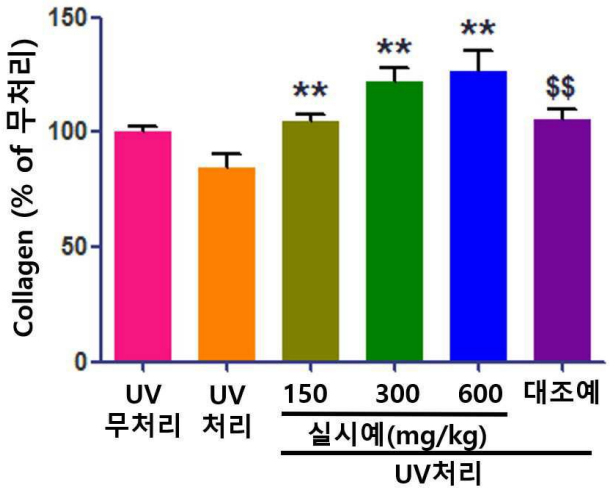
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면11a



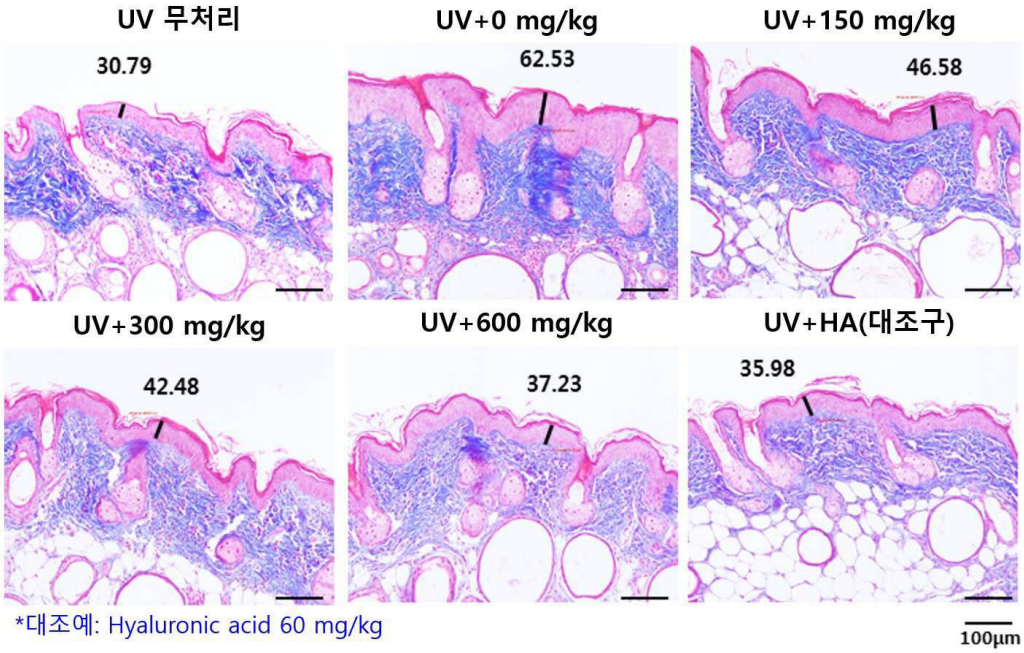
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면11b



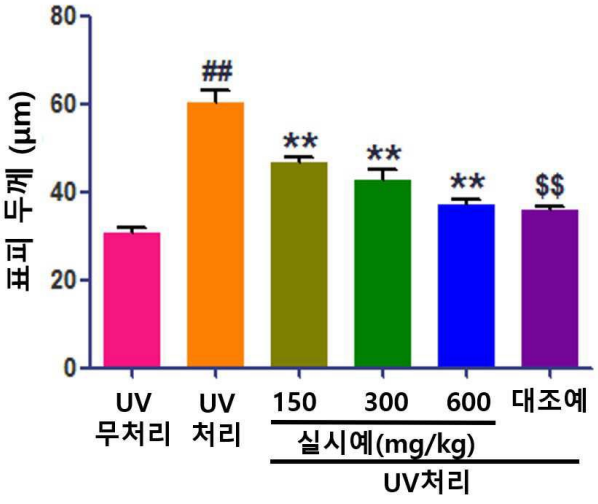
*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면12a



*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg

도면12b



*대조예: Hyaluronic acid 60 mg/kg