



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0028456
(43) 공개일자 2013년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/258 (2006.01) A61K 36/8998

(2006.01)

A61K 8/97 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0092034

(22) 출원일자 2011년09월09일

심사청구일자 2012년09월05일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

이태후

서울특별시 서초구 잠원동 롯데캐슬아파트 202동 504호

양정은

경기도 의정부시 민락동 주공아파트 206동 1701호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 22 항

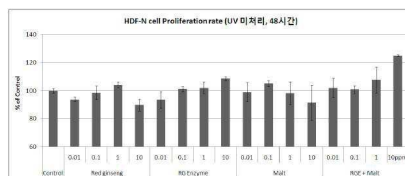
(54) 발명의 명칭 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 함유하는 피부노화방지 및 피부주름개선용 조성물

(57) 요약

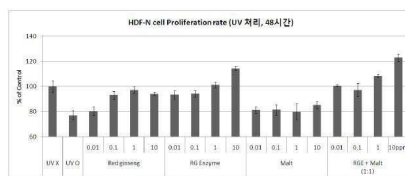
본 발명은 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아추출물을 포함하는, 피부노화방지 및 피부주름개선용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 콜라겐 생합성 촉진, MMP-1 억제를 통한 피부 노화방지 및 주름개선효과를 나타내며, 모공의 축소, 피지의 개선, 효능을 나타내는 동시에 세포 생존율의 변화를 나타내지 아니하여 우수한 안전성(safety)을 나타낸다. 특히, 본 발명의 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물을 배합한 조성물은 종래의 홍삼 추출물 및 효소-처리 홍삼 추출물과 비교하여 개선된 피부노화방지 및 주름개선 효과를 나타낸다.

대표도 - 도10

(A)



(B)



(72) 발명자

박상용

경기도 수원시 권선구 동수원로146번길 218-13,
305호 (곡반정동)

신현섭

경기도 수원시 영통구 영일로 8, 메가플러스 313호
(영통동)

신지연

인천광역시 남동구 용천로87번길 23, 1301동 904호
(구월동, 구월 힐스테이트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 810006-03-1-SB110

부처명 농림수산식품부

연구사업명 기술사업화지원사업

연구과제명 [인삼소재피부과학응용사업단]임상평가 프로세스 관리 및 인삼소재 및 제품의 탈모방지 효
능검증

주관기관 경희대학교

연구기간 2010.11.01 ~ 2011.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

누룩 곰팡이 유래 효소로 처리된 홍삼 추출물, 및 맥아추출물을 포함하는 피부노화방지 및 피부주름개선용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 누룩 곰팡이 유래 효소는

(a) 누룩 곰팡이를 인삼추출물 또는 인삼분말과 함께 배양하여 진세노시다제 생산량을 높이는 단계, 및

(b) 상기 배양물로부터 효소를 분리하는 단계를

포함하는 방법에 의하여 제조되는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 누룩 곰팡이는 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*) 균주인 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*) 균주는 아스페르길루스니게르 KACC 40280, 41018, 41858, 42589, 43547 또는 44333 균주인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 효소 처리 홍삼 추출물은 홍삼분말 또는 홍삼추출물을 누룩 곰팡이 유래 효소와 함께 배양 후 추출하여 얻어지는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 효소 처리 홍삼 추출물 대 맥아 추출물의 배합비율이 6:4 인 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 산제, 정제, 과립제, 환제, 경질캡셀제, 연질캡셀제 또는 액제 제형인 약학적 조성물.

청구항 8

누룩 곰팡이 유래 효소로 처리된 홍삼 추출물, 및 맥아추출물을 포함하는 피부 미용 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 누룩 곰팡이 유래 효소는

(a) 누룩 곰팡이를 인삼추출물 또는 인삼분말과 함께 배양하여 진세노시다제 생산량을 높이는 단계, 및

(b) 상기 배양물로부터 효소를 분리하는 단계를

포함하는 방법에 의하여 제조되는 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 누룩 곰팡이는 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*) 균주인 식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*) 균주는 아스페르길루스니게르 KACC 40280, 41018, 41858, 42589, 43547 또는 44333 균주인 식품 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 모공축소, 피지감소, 피부 미백, 피부 노화방지 또는 피부 주름개선을 위한 식품 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서, 효소 처리 홍삼 추출물은 홍삼분말 또는 홍삼추출물을 누룩 곰팡이 유래 효소와 함께 배양 후 추출하여 얻어지는 식품 조성물.

청구항 14

제8항에 있어서, 효소 처리 홍삼 추출물 대 맥아 추출물의 배합비율이 6:4 인 식품 조성물.

청구항 15

제8항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 파우치, 음료, 또는 차인 식품 조성물.

청구항 16

누룩 곰팡이 유래 효소 처리 홍삼 추출물, 및 맥아추출물을 포함하는 피부 미용 개선용 화장료 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 누룩 곰팡이 유래 효소는

- (a) 누룩 곰팡이를 인삼추출물 또는 인삼분말과 함께 배양하여 진세노시다제 생산량을 높이는 단계, 및
- (b) 상기 배양물로부터 효소를 분리하는 단계를

포함하는 방법에 의하여 제조되는 화장료 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 누룩 곰팡이는 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*) 균주인 화장료 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*) 균주는 아스페르길루스니게르 KACC 40280, 41018, 41858, 42589, 43547 또는 44333 균주인 화장료 조성물.

청구항 20

제16항에 있어서, 모공축소, 피지감소, 피부 미백, 피부 노화방지 또는 피부 주름개선을 위한 화장료 조성물.

청구항 21

제16항에 있어서, 효소 처리 홍삼 추출물은 홍삼분말 또는 홍삼추출물을 누룩 곰팡이 유래 효소와 함께 배양 후 추출하여 얻어지는 화장료 조성물.

청구항 22

제16항에 있어서, 효소 처리 홍삼 추출물 대 맥아 추출물의 배합비율이 6:4 인 화장료 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 천연 추출물을 함유하는 피부 미용 개선용 식품, 의약 또는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현대 사회에 크게 영향을 주고 있는 '웰빙' 추구 현상은 '잘 먹고 잘 살자'라는 일차적인 의미뿐만 아니라 '신체의 건강함이 피부의 아름다움으로 표현된다'라는 의미까지 내포하고 있다. 이러한 현상은 피부미용 분야에도

많이 나타나고 있으며 피부미용을 위한 접근은 이제 단편적인 효능을 추구하는 것에서 벗어나 복합적인 기능과 과학적인 접근을 필요로 하고 있다(김은영, 대한피부미용학회지, 2005).

- [0003] 피부노화는 크게 두 종류로 나눌 수 있다. 그 중 하나는 내인성 노화 (intrinsic aging)로서 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화 현상을 말한다. 두 번째는 광노화 (photoaging)로서 오랫동안 햇빛에 노출된 얼굴, 손등, 목뒤 등의 피부에서 관찰되는 노화현상을 말하는 것으로 내인성 노화 현상과 자외선에 의한 영향이 합쳐진 결과로 발생한다(박금주, J Korean Soc Food Sci Nutr, 2010).
- [0004] 모공은 얼굴 피부에 전체적으로 분포하나, 특히 코와 볼 부위는 육안으로 식별할 수 있고, 모공의 양상은 성별, 유전적, 노화, 여드름, 만성 자외선 노출 등의 내인성과 외인성 요인에 의해 개인차가 있다. 모공이 넓어지는 이유는 피지가 과도하게 분비되거나 피부노화가 시작되면서 모공 벽을 지지하고 있던 콜라겐 섬유와 탄력 섬유가 변성, 감소함에 따라 피부 탄력이 없어지고 처지기 때문이다(석지한, 대한피부미용학회, 2010).
- [0005] 이러한 피부 노화의 원인은 콜라겐 및 탄력섬유 등의 기질단백질이 손상되어 피부 내 콜라겐의 양이 부족해지고, 탄력 섬유가 변성되어 나타난다고 알려져 있다. 또한, 피부 노화가 진행되는 과정 중에는 다양한 신호전달 경로를 거쳐 콜라겐의 합성이 감소되고, 콜라겐을 비롯한 세포 외 기질단백질의 분해 효소인 매트릭스 메탈로프로테아나제 (matrix metalloproteinases: MMPs)의 발현이 증가된다고 알려졌다. 이와 같이 콜라겐은 피부노화와 관련된 주요 인자로 인식되어져 있으며, 콜라겐의 합성 증진 및 분해 억제는 피부노화 억제 및 피부미용과 관련하여 중요한 지표가 되고 있다(김남이, 고려인삼학회, 2007).
- [0006] 이렇듯 콜라겐 합성을 증진하고, 그 분해를 억제하여 피부 미용을 개선하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있으며, 특히, 화합물에 비하여 상대적으로 피부에 대한 안정성이 뛰어난 천연물이 관심을 받고 있다.
- [0007] 다양한 성분을 함유하고 있는 홍삼은 오래 전부터 한방에서는 약용으로 사용되어 왔으며, 현대에 이르러서는 자양강장, 항암 등의 각종 약리작용으로 인해 세계적으로 가장 우수한 건강식품으로 평가받고 있다.
- [0008] 홍삼의 주요 성분으로는 백삼과 같이 배당체(glycosides), 홍삼향성분(panacen), 폴리아세틸렌계 화합물, 함질소성분, 플라보노이드, 비타민(B군), 미량원소, 효소, 항산화물질과 유기산 및 아미노산 등이 함유되어 있다.
- [0009] 홍삼은 중추신경에 대해서 진정작용과 흥분작용이 있으며, 순환계에 작용하여 고혈압이나 동맥경화의 예방효과가 있다. 그러면서도 조혈작용(造血作用)과 혈당치(血糖値)를 저하시켜 주고, 간을 보호하며, 내분비계에 작용하여 성행동(性行動)이나 생식효과에 간접적으로 유효하게 작용하며, 항염(抗炎) 및 항종양작용(抗腫瘍作用)이 있고, 방사선에 대한 방어효과, 피부를 보호하며 부드럽게 하는 작용도 있는 것으로 알려져 있다.
- [0010] 아래 [선행기술문헌]에 기술한 바와 같이, 홍삼 및 홍삼 유래사포닌의 피부 관련 기능에 대한 연구보고와 특허 보고가 다수 존재하며, 이러한 홍삼 및 홍삼 유래사포닌의 피부 관련 기능에 대한 연구보고와 특허 보고와 같이 과거 약리학적으로 많은 연구가 진행된 홍삼은 최근 피부개선 분야에도 초점 맞춰져 활발한 연구가 진행되고 있다.
- [0011] 홍삼이 주름개선에 효과가 있다는 것은 이미 논문(김선여 등)을 통해 보고된 바 있으며, 또한, 수삼을 찌서 말린 홍삼이 주름개선에 효과가 있다고 보고되어 있다.(Kang TH et. al, J. Ethnopharmacology 123 446451, 2009).
- [0012] 맥아는 벼과 (Gramineae)에 속한 일년생 초본인 보리 (*Hordeum vulgare*)의 성숙한 과실을 발아시켜 건조한 것으로, 한의학에서는 강장제 및 각기병의 치료제로 이용되기도 했으며, 한방에서 소화제로 쓰이는 대표적인 약제이다.
- [0013] 맥아는 발아시킨 보리를 말하며 보리가 싹을 틔울 때 씨 속에 있는 녹말을 당분으로 바꾸는 효소가 생겨 단맛을 내게 되는데 그 단맛으로 식혜나 엿, 고추장을 만들 때 사용한다. 맥아에는 디아스타아제(diastase), 인버타아제(invertase), 비타민 B, 지방, 인지질 등이 함유되어 있다.
- [0014] 맥아(엿기름)을 피부 미백, 보습, 아토피를 위한 피부외용제로 이용한 예(대한민국 공개특허공보 특2002-0077616호, 2002.10.12.공개)가 있지만, 주름개선을 위한 화장품 및 식품으로 응용한 예는 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0015] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2011-0060001호 (2011.6.8. 공개)
 (특허문헌 0002) 한국공개특허공보 제10-2011-0048699호 (2011.5.12. 공개)
 (특허문헌 0003) 한국공개특허공보 제10-2011-063912호 (2011.6.15. 공개)
 (특허문헌 0004) 한국공개특허공보 제10-2011-0063916호 (2011.6.15. 공개)
 (특허문헌 0005) 한국공개특허공보 특2002-0077616호 (2002.10.12. 공개)

비특허문헌

- [0016] (비특허문헌 0001) Lee HJ 등, The Effect of Red Ginseng on Ultraviolet B-induced Skin Damages in Mouse, J. Ginseng Res. 2006 Vol. 30, No. 4, 194-198.
 (비특허문헌 0002) Cho S 등, Red ginseng root extract mixed with Torilus fructus and Corni fructus improves facial wrinkles and increases type I procollagen synthesis in human skin: a randomized, double-blind, placebo- controlled study. J Med Food. 2009 Dec;12(6):1252-9.
 (비특허문헌 0003) Kim H 등, Stimulatory effect of dietary red ginseng on epidermal hydration and ceramide levels in ultraviolet-irradiated hairless mice, J Med Food. 2009 Aug;12(4):746-54.
 (비특허문헌 0004) Kim S 등, Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin, Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 2;316(2):348-55
 (비특허문헌 0005) Kim YG 등, Effects of Red Ginseng extract on ultraviolet B-irradiated skin change in C57BL mice, Phytother Res. 2008 Nov;22(11):1423-7.
 (비특허문헌 0006) So SH 등, Mechanisms of Korean red ginseng and herb extracts(KTNG0345) for anti-wrinkle activity, 2008 J. Ginseng Res. Vol. 32, No. 1, 39-47.
 (비특허문헌 0007) Kim NM 등, Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-I activity in human dermal fibroblast, 2007 J. Ginseng Res. Vol. 31, No. 2, 86-92.
 (비특허문헌 0008) Hwang EY 등, Comparison of Phenolic Compounds Contents between White and Red ginseng and Their Inhibitory Effect on Melanin Biosynthesis, 2006 Journal of Ginseng Research, Vol.30 No.2, 82-87.
 (비특허문헌 0009) Lee HJ 등, Photoprotective effect of red ginseng against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse, Phytother Res. 2009 Mar;23(3):399-403.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명은 피부노화방지 및 피부주름개선을 위한 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
 [0018] 또한, 본 발명은 피부노화방지 및 피부주름개선을 위한 식품 조성물을 제공하고자 한다.
 [0019] 또한, 본 발명은 피부노화방지 및 피부주름개선을 위한 화장품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0020] 상기한 과제를 달성하기 위하여, 본 발명자들은 안전성이 우수한 천연물을 대상으로 피부노화를 억제하고, 피부주름을 개선할 수 있는 다양한 활성물질들을 검색한 결과, 놀랍게도 홍삼을 특정 효소로 처리하여 얻은 효소-처리 홍삼추출물과 맥아 추출물의 혼합물이 우수한 피부노화방지 및 피부주름개선 효과를 나타내는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

- [0021] 이에, 본 발명은 누룩 곰팡이 유래 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 포함하는, 피부노화방지 및 피부주름개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 누룩 곰팡이 유래 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 포함하는, 피부 미용 개선용, 특히는, 모공축소, 피지감소, 피부 미백, 피부노화방지 및 피부주름개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 누룩 곰팡이 유래 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 포함하는, 피부 미용 개선용, 특히는, 모공축소, 피지감소, 피부 미백, 피부노화방지 및 피부주름개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 효소는 누룩(곰팡이), 바람직하게는 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*) 균주, 보다 바람직하게는 아스페르길루스니게르 KACC 40280, 41018, 41858, 42589, 43547, 또는 44333, 가장 바람직하게는 아스페르길루스니게르 KACC 40280 균주를 배양하여 얻어진 효소이다. 상기 효소는 (a) 누룩 곰팡이를 홍삼추출물 또는 홍삼분말과 함께 배양하여 진세노사이드 생산량을 높이는 단계, 및 (b) 상기 배양물로부터 효소를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조될 수 있다.
- [0025] 상기 배양물로부터 효소의 분리는 원심분리 단계, 분리된 효소액에 에탄올, 아세톤, 이소프로판올 등과 같은 유기용매를 첨가하여 효소를 침전시키는 단계, 상기 침전된 효소를 인산 버퍼, 트리스 버퍼, 아세테이트 버퍼 등과 같은 완충용액으로 용출시켜 분획을 얻는 단계, 및 상기 용출된 효소 분획을 인삼과 반응시켜 활성을 나타내는 효소 분획을 얻는 단계를 포함하는 방법에 의하여 수행될 수 있다.
- [0026] 상기 홍삼은 인삼을 썰서 말리는 통상의 홍삼 제조 방식으로 제조된 홍삼을 물로 세척하여 사용하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 여기서, 상기 홍삼은 천삼, 지삼 및 양삼으로 이루어진 군으로부터 1 종 이상 선택될 수 있다.
- [0027] 상기 효소-처리 홍삼 추출물은 표준화된 가공법을 이용하여 홍삼에 효소를 처리하여 얻어질 수 있다. 상기 홍삼은 홍삼분말 또는 당 분야에서 일반적으로 행하여지는 방법으로 얻어지는 홍삼추출물을 이용할 수 있다. 상기 방법은 당 분야에 알려진 표준화된 통상의 효소 처리 방법(예컨대, 누룩을 이용한 가공법)으로 수행될 수 있으며, 일례로 본원 실시예에 기재된 방법을 사용할 수 있다.
- [0028] 상기 맥아 추출물은 당 분야에서 통상적으로 행하여지는 추출방법으로 얻어지거나 시판되는 것을 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 조성물은 인간의 피부섬유모세포(HDF: human dermal fibroblast)에서 콜라겐 생합성 촉진, MMP-1 억제 등을 통한 피부 노화방지 및 주름개선효과를 나타내며, 모공의 축소, 피지의 개선, 색소 침착 개선, 피부톤 개선 등의 효능을 나타내는 동시에 세포 생존율의 변화를 나타내지 아니하여 우수한 안전성(safety)을 나타낸다. 특히, 본 발명의 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아추출물의 조합은 종래의 홍삼 추출물과 비교하여 개선된 피부노화방지 및 주름개선 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 6종의 아스페르길루스니게르 균주(KACC 40280, 41018, 41858, 42589, 43547, 44333)로부터 얻은 효소액을 이용하여 순차적으로 홍삼의 형질전환활성을 확인한 TLC 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 2는 제조예 1의 효소처리 홍삼 추출물과 비교예 1의 홍삼 추출물의 진세노사이드 성분의 변화 및 당류 당지질의 변화를 분석한 TLC 결과 그래프이다.
- 도 3은 제조예 1의 효소처리 홍삼 추출물과 비교예 1의 홍삼 추출물의 진세노사이드 성분의 변화 및 당류 당지질의 변화를 분석한 HPLC 결과 그래프이다. [(A); 홍삼 추출물, (B); 효소-처리 홍삼 추출물]
- 도 4는 효소-미처리 홍삼추출물 음이온 분획물로부터 얻은 펠렛으로, QAE-컬럼에 결합된 메탄올/아세톤 불용성 분획물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 효소-미처리 홍삼추출물 양이온 분획물로부터 얻은 펠렛으로, QAE-컬럼에 미결합된 메탄올/아세톤 불용성 분획물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 효소-처리 홍삼추출물 음이온 분획물로부터 얻은 펠렛으로, QAE-컬럼에 결합하는 메탄올/아세톤 불용성 분획물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 효소-미처리 홍삼추출물 음이온 분획물로부터 얻은 상청액으로, QAE-컬럼에 결합하는 메탄올/아세톤 가용성 분획물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 효소-미처리 홍삼추출물 양이온 분획물로부터 얻은 상청액으로, QAE-컬럼에 결합하지 않는 메탄올/아세톤 가용성 분획물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 효소-처리 홍삼추출물 양이온 분획물로부터 얻은 상청액으로, QAE-컬럼에 결합하지 않고 메탄올/아세톤 가용성 분획물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 시험예 1에 따라 수행한 실시예 1의 효소-처리 홍삼 및 맥아추출물의 혼합조성물에 대한 세포 생존율 실험의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 시험예 2에 따라 수행한 실시예 1의 효소-처리 홍삼 및 맥아추출물의 혼합조성물을 사용하여 만든 환을 이용한 임상을 통해 주름개선 및 피부미용 개선 효과에 대한 다중안면검사카메라시스템 Janus(아람휴비스, 한국)을 실시한 결과이다.

도 12는 시험예 2에 따라 수행한 실시예 1의 효소-처리 홍삼 및 맥아추출물의 혼합조성물을 사용하여 만든 환을 이용한 임상을 통해 주름개선 및 피부미용 개선 효과에 대한 피실험자 설문조사 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 시험예 2에 따라 수행한 실시예 3의 효소-처리 홍삼 및 맥아추출물의 혼합조성물을 사용하여 만든 환을 이용한 임상에서 주름개선 및 피부미용 개선 효과에 대한 2인의 전문의의 임상소견을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명은 누룩 곰팡이 유래 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 포함하는, 피부노화방지 및 피부주름개선 용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0032] 상기 효소는 누룩(곰팡이), 바람직하게는 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*) 균주, 보다 바람직하게는 아스페르길루스니게르 KACC 40280, 41018, 41858, 42589, 43547, 또는 44333 균주, 가장 바람직하게는 아스페르길루스니게르 KACC 40280 균주를 배양하여 얻어진 효소이다. 상기 효소는 (a) 누룩 곰팡이를 인삼추출물 또는 인삼분말과 함께 배양하여 진세노시다제 생산량을 높이는 단계, 및 (b) 상기 배양물로부터 효소를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조될 수 있다.
- [0033] 상기 배양물로부터 효소의 분리는 원심분리 단계, 분리된 효소액에 에탄올, 아세톤, 이소프로판올 등과 같은 유기용매를 첨가하여 효소를 침전시키는 단계, 상기 침전된 효소를 인산 버퍼, 트리스 버퍼, 아세테이트 버퍼 등과 같은 완충용액으로 용출시켜 분획을 얻는 단계, 및 상기 용출된 효소 분획을 인삼과 반응시켜 활성을 나타내는 효소 분획을 얻는 단계를 포함하는 방법에 의하여 수행될 수 있다.
- [0034] 상기 홍삼은 인삼을 찌서 말리는 통상의 홍삼 제조 방식으로 제조된 홍삼을 물로 세척하여 사용하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 여기서, 상기 홍삼은 천삼, 지삼 및 양삼으로 이루어진 군으로부터 1 종 이상 선택될 수 있다.
- [0035] 상기 효소-처리 홍삼 추출물은 표준화된 가공법을 이용하여 홍삼에 효소를 처리하여 얻어질 수 있다. 이러한 방법은 당 분야에 알려진 표준화된 통상의 효소 처리 방법(예컨대, 누룩을 이용한 가공법)으로 달성될 수 있으며, 일례로 본원 실시예에 기재된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 분쇄된 홍삼 분말을 상기 효소와 적정 부피의 반응용액에서 반응시킨 후, 적절한 추출용매, 예컨대 에탄올을 이용하여 추출한 후 여과하여 불순물을 제거한 액상 형태로 얻거나, 얻어진 액상 형태의 추출물을 통상의 방법에 따라 감압농축 및/또는 건조하여 분말 형태로 얻을 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 추출공정은 필요에 따라, 유효성분의 함량이 높은 분획을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 1차 추출용매로 추출하여 얻어진 추출물을 물에 분산시킨 후, 적절한 2차 추출용매, 예컨대, 수포화 C4의 알콜로 추출하는 단계를 수행함으로써, 생성되는 추출물 중의 유효성분 함량을 더욱 높일 수 있다.
- [0037] 상기 맥아 추출물은 당 분야에서 통상적으로 행하여지는 추출방법으로 얻어지거나 시판되는 것을 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 0.01~80 중량%로 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물 내 함유되는 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물의 배합 비율(효소-처리 홍삼 추출

물:맥아추출물)은 10:1 내지 1:10 일 수 있으며, 바람직하게는 7:3 내지 5:5 이며, 보다 바람직하게는 약 6:4 이다.

- [0040] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 될 수 있다.
- [0041] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 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 및 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 약학 조성물이 경구용 고형 제제로 제제화된 경우 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 약학 조성물이 경구용 액상 제제화된 경우 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 약학 조성물이 비경구용 제제화된 경우 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [0045] 본 발명의 약학 조성물에 함유되는 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물의 혼합 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 1일 1 내지 10,000 mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 5000 mg/kg의 용량으로 투여 또는 적용될 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여 또는 적용될 수도 있다.
- [0046] 본 발명의 약학조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구로, 또는 복강 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여되거나, 필요한 부위에 직접 도포될 수 있다.
- [0047] 본 발명은 또한 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 포함하는, 피부 미용 개선용 식품 조성물을 제공한다. 특히는, 본 발명은 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 포함하는, 모공축소, 피지감소, 피부 미백, 피부 노화방지 및 피부주름개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0049] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0050] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0051] 본 발명의 식품 조성물은 피부 미용 개선용을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 효소-처리 홍삼 추출물을 0.01~80 중량% 로 포함할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물에 함유되는 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물의 혼합물은 을 상기 약학 조성물의 제조에서 언급된 추출방법과 동일한 방법으로 얻어질 수 있다.
- [0052] 본 발명의 식품 조성물 내 함유되는 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물의 배합 비율(효소-처리 홍삼 추출

물:맥아추출물)은 10:1 내지 1:10 일 수 있으며, 바람직하게는 7:3 내지 5:5 이며, 보다 바람직하게는 약 6:4 이다.

- [0053] 본 발명의 식품 조성물은 피부 미용 개선용을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환, 음료, 차, 파우치 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0054] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 효소-처리 홍삼 추출물, 맥아 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0055] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 효소-처리 홍삼 추출물, 맥아 추출물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 숙지황과 토사자 추출물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0056] 환 형태의 건강기능식품은 효소-처리 홍삼 추출물, 맥아 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0057] 과립형태의 건강기능식품은 효소-처리 홍삼 추출물, 맥아 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μm), 14호 (1410 μm) 및 45호 (350 μm) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 5.0 %이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.
- [0058] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0059] 본 발명은 또한 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 포함하는, 피부 미용 개선용 화장품 조성물을 제공한다. 특히는, 본 발명은 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 포함하는, 모공축소, 피지감소, 피부 미백, 피부노화방지 및 피부주름개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 화장품 조성물은 피부 미용 개선용을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물의 혼합물을 0.01~80 중량% 로 포함할 수 있다. 본 발명의 화장품 조성물에 함유되는 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물의 혼합물을 상기 약학 조성물의 제조에서 언급된 추출방법과 동일한 방법으로 얻어질 수 있다.
- [0061] 본 발명의 화장품 조성물 내 함유되는 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물의 배합 비율(효소-처리 홍삼 추출물:맥아추출물)은 10:1 내지 1:10 일 수 있으며, 바람직하게는 7:3 내지 5:5 이며, 보다 바람직하게는 약 6:4 이다.
- [0062] 본 발명의 화장품 조성물은 화장품 분야에서 통상적으로 제조되는 임의의 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등을 들 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 화장품 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징 폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클렌저의 제형을 포함한다.
- [0063] 본 발명의 화장품 조성물은 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물에 추가로 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산 화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제, 향료, 계면활성제, 보존제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 의한 효소-처리 홍삼추출물 및 맥아 추출물의 혼합물은 특정 홍삼사포닌 기질농도를 높이고, 다당류, 당단백질 및 당지질 등이 상대적으로 저분자량의 전환이 된 것으로서, 피부 노화억제, 피부 주름개선, 모공축

소, 피지감소, 피부 보습용 식품, 의약품 및 화장품으로 제형화될 수 있다.

[0065] 이하, 본 발명을 실시예 등을 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예, 시험예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0066] [제조예]

[0067] <제조예 1> 균주배양액을 이용한 효소의 제조

[0068] 6종의 아스페르길루스니게르 (*Aspergillus niger*.) (KACC 40280, 41018, 41858, 42589, 43547, 44333) 균주를 액체 혹은 고체 배양법으로 배양하였다. 액체 배양의 경우 쇠고기 추출물 1.5g/L, 펩톤 2.5g/L, Magnesium Sulfate 0.05g/L, 염화칼슘 0.05g/L가 함유된 배지에서 3-5일간 배양을 진행하였다 (30-37℃, 180rpm). 고체 배양의 경우, 맥아와 밀기울의 배합비를 1:1로 하고 총 중량의 30% 물을 첨가하여 배지를 만들어, 만들어진 고체 배지에 PDB(Potato dextrose broth) 배지에서 전배양시킨 균주를 5-10% 분사하여 균을 접종시킨 후 배지와 함께 잘 비벼주었다. 배양 온도는 30-37℃로 하고, 수분은 50-70%로 유지하여 균주 배양을 진행하였다. 배양시 인삼추출물 혹은 인삼분말을 넣어 진세노시다제(ginsenosidase)의 생산량을 높였다. 고체배양 후 완충용액에 담가두었다가 효소를 분리하였다. 액체배양 시 7000 rpm 에서 30 분간 원심 분리하여 조 효소액(crude enzyme)을 얻었다. 액체 배양 및 고체 배양을 통해 이미 얻은 조 효소액에 유기용매를 넣어 효소 단백질을 침전시켰다. 침전물을 완충용액에 용해시켜 투석한 후 잡질을 제거하여 조 효소액 농축액을 얻었다. 이를 이온교환수지에 로딩한 후 KCl 혹은 NaCl 완충용액으로 용출시켰다. 얻은 분획을 인삼과 반응시켰다. 이와 같은 방법으로 상기 나열한 6종의 균주에 따라 6종의 효소액을 얻어 순차적으로 인삼의 형질전환활성을 TLC를 이용하여 확인하였다 (도 1). 도 1에 나타난 바와 같이, 대조군(major saponin)에 비하여 상기 효소액을 반응시킨 반응물이 TLC 내의 점들이 위쪽으로 올라간 것(minor saponin의 생성)을 확인할 수 있었다. 이는 사포닌 조성이 전환되었음을 나타낸다. 확인 결과 6종의 균주가 모두 비슷한 결과를 보여 KACC 40280으로부터 얻어진 1번 효소액을 이용하여 이후 실험을 진행하였다.

[0069] <제조예 2> 효소-처리 홍삼 추출물의 제조 및 분석

[0070] 1. 효소-처리 홍삼 추출물의 제조

[0071] 인삼공사로부터 제공받은 홍삼을 20-40 메쉬로 분쇄하여 플라스크 또는 유리 용기에 담았다. 상기 제조예 1에서 얻은 효소를 홍삼 무게에 대하여 10-20%에 해당하는 중량으로 홍삼 무게 대비 10배 부피의 물에 녹여 홍삼이 담긴 플라스크에 넣고 잘 혼합하였다. 용기에 담긴 혼합물을 50-60℃ 에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 원심 분리를 통하여 상등액과 침전물을 구분하고 침전물에 50% EtOH을 중량비 10배의 무게로 첨가한 후 70℃에서 4시간 환류 추출 하였다. 추출 후 여과를 거쳐 농축하여 EtOH을 제거한 후 초기 반응 후 얻어진 상등액과 혼합하여 동결건조를 진행하였다.

[0072] 2. 효소-처리 홍삼 추출물의 분석

[0073] (1) 사포닌 변화 분석

[0074] 상기 제조예 1에서 얻은 효소-처리 홍삼 추출물과 하기 비교예 1에서 얻은 홍삼 추출물을 C18 sep-pak 카트리지를 이용하여 사포닌만을 분리한 후 TLC(thin-layer chromatography) 및 HPLC(high performance liquid chromatography) 분석을 수행하였다.

[0075] TLC분석에는 TLC용 plate(TLC silica gel 60F, merck,)에 분리한 사포닌을 점적한 후 이동상(Chloroform : Methanol : Water=65 : 35 : 10)을 이용하여 물질을 전개한 후 10% 황산용액을 이용하여 발색한 것으로 결과를 확인하였다 (도 2).

[0076] HPLC 분석에는 PDA HPLC system 기기와 Eclipse XDB-C18 column (4.6 X 250 mm, ID 5 μm)을 사용하였으며, 이동상은 물(H₂O, 100%)와 아세토나이트릴(CH₃CN, 100%)를 혼합하여 사용하였다. 기울기 용리(Gradient elution) 비율(물:아세토나이트릴)이 75:25, 68:32, 45:55, 40:60, 0:100, 0:100 및 75:25분일 때, 각각 0-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-27, 27-30 및 30-40로 조절하였다. 이동상의 유속은 1.2 ml/min으로 흘러주었으며, UV 탐지기(UV detector)를 이용하여 203 nm에서 홍삼의 성분을 분석하였다 (도 3).

[0077] 분석 결과, 도 2 및 3에서 확인되는 바와 같이, 효소-처리 홍삼 추출물에서는 홍삼의 주된 사포닌인 Rb1, Rc, Rd 등이 미량의 사포닌인 F2, C-K 등의 상대적 저분자 화합물로 전환된 양상을 보였다. 즉, 효소-처리 홍삼 추출물은 효소가 처리되지 않은 일반 홍삼 추출물과 비교하여 변화된 사포닌 조성 내지 함량을 나타내었다.

- [0078] 3. 효소-처리 홍삼 추출물과 효소-미처리 홍삼 추출물의 성분 비교 분석
- [0079] (1) 추출 및 음이온 분획물 분리
- [0080] 상기 제조예 1 및 하기 비교예 1에서 제조한 시료 5g을 20ml의 50 mM Tris-HCl pH 7.8를 넣고 잘 흔들어 상온에서 추출하였다. 이를 3번 반복하고 매 추출 후 원심분리(3500 rpm, 15 min)하여 펠렛과 용액으로 분리하였다. 추출물을 로딩한 컬럼(1x5 cm)을 QAE-세파텍스 A50과 결합시켰다. 컬럼을 5배 양의 완충액(50 mM Tris-HCl pH 7.8)으로 세척하고 결합된 부분은 충전제의 3배 양의 3M 암모늄 아세테이트 pH 8.0로 용출하였다. QAE컬럼의 용출액 중 고분자 화합물은 4배의 메탄올-아세톤 (1:2, -20 °C) 혼합물을 첨가하여 침전시켰다. 원심분리(3500 rpm, 15 min)하여 얻은 펠렛은 진공 건조기로 말리고, 상청액은 증발시켜 말렸다.
- [0081] (2) 양이온 분획물의 분리
- [0082] QAE-컬럼의 결합된 부분(loading buffer로 washing)이 없는 부분은 10x로 농축시키고, 양이온(중성포함) 생물 고분자 물질은 4배 볼륨의 메탄올-아세톤 (1:2, -20 °C) 혼합물을 첨가하여 침전시켰다. 원심분리(3500 rpm, 15 min)하여 얻은 펠렛을 진공 건조기로 말리고, 상청액은 증발시켜 말렸다.
- [0083] (3) 분자질량의 측정 및 RP-크로마토그래피
- [0084] 상기 얻어진 분획물 성분의 분자질량을 3개의 탠덤 컬럼 울트라히드로겔 1000, 500 및 250 상에서 HPLC 방법으로 분석하였다 (크로마토그래프 워터스 2690, 검출기 RID 486. 이동상 0.2M KNO₃ 유속 0.9 ml/min). 컬럼은 텍스트린 500, 20, 10 및 5 kDa에 더불어 폴리비닐 피롤리돈 (PVP) 100 및 40 kDa 로 보정했다.
- [0085] 메탄올/아세톤에 녹은 분획물의 성분을 RP-컬럼 상에서 HPLC 방법으로 수행하였다 (0.46x25 cm 울트라스피어 C18), 크로마토그래프 워터스 2690, 검출기 PDA 996 (scanerange 200-400 nm). 이동상 A-0.1% 수중 포름산; B-메탄올, 유속 1.0 ml/min.
- [0086] 위 결과를 도 4 내지 9 에 나타내었다.
- [0087] <제조예 3> 맥아 추출물의 제조
- [0088] 맥아를 플라스크 또는 유리 용기에 담았다. 맥아대비 20배의 50% EtOH을 플라스크에 넣고 잘 혼합하였다. 발효 용기에 담긴 혼합물을 55°C 에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 홍삼무게대비 10배의 EtOH을 첨가하여 70°C 에서 4시간 환류 추출하였다. 추출 후 여과를 거쳐 농축하여 EtOH을 제거한 후 동결건조를 진행하였다.
- [0089] [실시예]
- [0090] <실시예 1> 효소처리 홍삼 및 맥아추출물의 혼합물 제조
- [0091] 한국인삼공사에서 제공받은 20~40 메쉬로 분쇄한 국내산 홍삼가루를 상기 제조예 1과 같이 효소 처리하여 준비하고, 홈플러스에서 구입한 엿기름(맥아)가루는 제조예 2와 같이 수행하여 준비하였다. 상기 준비한 효소처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물을 추출 전 원물로 홍삼 (6) : 맥아 (4)의 중량비로 혼합하였다.
- [0092] [비교예]
- [0093] <비교예 1> 홍삼 추출물의 제조
- [0094] 효소 처리 과정을 제외하고, 상기 [제조예 1]과 동일한 방법으로 홍삼 추출물을 얻었다.
- [0095] [시험예]
- [0096] <시험예 1> 피부 노화 억제 및 주름 개선 효과 확인
- [0097] 1. 1형 프로콜라겐(Type-1 Procollagen) 합성 촉진 및 MMP-1 억제 효과 확인
- [0098] 인체섬유아세포를 60mm 세포 배양 접시에 3 ml의 배양액을 넣고 약 1×10^5 의 농도로 세포를 접종한 후, 37 °C, 5% CO₂ 환경에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 자외선 B를 20mJ/cm²로 조사한 후, 실시예 1의 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물의 혼합물 및 비교예 1의 홍삼 추출물 1, 10ppm을 포함한 배지로 교체하여 2일간 배양하였다. 배양 2일 후 세포를 회수(harvest)하여 RNA를 분리하여 RT-PCR 방법을 이용하여 1형 프로콜라겐 및 MMP-1의 mRNA 발현량을 확인하였다. RT-PCR의 방법은 국성호(J Appl Physiol, 2011) 등의 방법을 응용하여 실시하였으며, 1형 프로콜라겐 및 MMP-1 의 프라이머는 아래의 표와 같았다.

Gene	Primer Sequence	
Type-1 Procollagen	Forward	5'-CTCGAGGTGGACACCACCCT-3'
	Reverse	5'-CAGCTGGATGGCCACATCGG-3'
MMP-1	Forward	5'-ATTCTACTGATATCGGGGCTTTGA-3'
	Reverse	5'-ATGTCCTTGGGGTATCCGTGTAG-3'
GAPDH	Forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	Reverse	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

[0099]

[0100]

2. HDF-N-Cell을 이용한 피부노화 억제 효과 확인

[0101]

(1) 세포 배양

[0102]

인간 피부 섬유아세포인 HDF-N 세포를 모던셀엔티슈테크놀로지 (Modern Cell & Tissue Technology(MCTT), Seoul, Korea)로부터 구입하여 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다. HDF-N 세포를 세포 배양접시에 부착시키고 페니실린 및 스트렙토마이신이 함유된 1% 항균-항진균 용액(PAA, Canada)과 10% FBS (PAA, Canada)를 첨가한 DMEM (PAA, Canada)을 사용하여 배양하였다. HDF-N 세포의 배양시 습도는 95%, 온도는 37℃를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하였으며, 배양액은 2~3일에 한번 씩 교체하였다. 세포 접종시 세포를 혼합한 배지와 트리판 블루 용액을 1:1로 혼합하여 혈구계수기를 이용하여 트리판 블루에 의해 염색되지 않은 살아 있는 세포를 계수하여 사용하였다.

[0103]

(2) MTT 분석

[0104]

HDF-N cell의 증식 측정은 단시간에 대량 검색이 가능한 MTT 비색 분석법 (EZ-CyTox, Daeil-Lab Co., Korea)을 사용하여 이향복(KSBB Journal, 2009) 등의 방법을 응용하여 측정하였다. 96-웰 플레이트(ISS, Korea) 2판에 1×10^3 세포/웰로 세포를 분주한 다음 24시간 동안 37℃ CO₂ 인큐베이터에서 배양 한 후 시료 (상기 제조에 1와 비교예 1에서 제조된 효소-처리 홍삼 추출물과 일반 홍삼 추출물과 실시예 1의 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물의 혼합물을 농도별(0.01, 0.1, 1, 10μg/ml)로 처리하여 3일간 배양하였다. 2일째 되는 날(48h) 각 웰 당 MTT(10 μl/웰) 시약을 첨가하고 3시간 동안 37℃에서 배양한 후 MTT가 포르마잔으로 분해되는 양을 ELISA 판독기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 처리 군은 3 웰씩 3회 반복실험을 하였으며, 시료의 세포 증식효과는 3번 반복 실험의 평균값을 취한 후 아무것도 처리하지 않은 DMEM 용액에 배양한 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. 그 결과를 도 10A에 나타내었다. 도 10A에서 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1로 제조된 효소-처리 홍삼 추출물 10μg/ml 처리군은 일반 홍삼 추출물에 비하여 18% 가량 섬유아세포의 증식을 증가시키며 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물의 혼합물은 효소-처리 홍삼 추출물 처리군에 비하여도 16%이상 증식을 증가시키는 것으로 확인되었다. 이는 효소-처리 홍삼 추출물이 효소를 처리하지 않은 홍삼 추출물에 비하여 우수하며, 효소-처리 홍삼 및 맥아 추출물의 혼합물이 맥아를 미혼합한 효소-처리 홍삼 추출물보다 우수한 주름 예방 효과 및 피부 노화 억제 효과를 나타내는 것을 의미한다.

[0105]

상기 실험에 추가로, HDF-N 세포에 UVB 피크 범위 312nm, UV 용량 20 mJ/cm²의 조건으로 UVB를 조사한 후 세포 증식효과를 확인하는 실험을 진행하였다. 실험 방법은 세포 증식률을 확인하는 방법과 동일하지만, UVB를 조사하기 전에 시료를 농도별(0.01, 0.1, 1, 10μg/ml)로 전 처리한 후, 2일째 되는 날(48h) 각 웰 당 MTT(10 μl/well) 시약을 첨가하고 3시간 동안 37℃에서 배양한 후 MTT가 포르마잔으로 분해되는 양을 ELISA 판독기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 10B에 나타내었다. 상기 제조에 1로 제조된 효소-처리 홍삼 추출물은 효소-미처리 홍삼 추출물 처리군에 비해 26.12% 가량 섬유아세포의 증식을 증가시키는 것으로 확인되었으며, 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물을 배합한 조성물의 10μg/ml 처리군은 효소-처리 홍삼 추출물 처리군에 비해 11.18% 가량 섬유아세포의 증식을 증가시키는 것으로 확인되었다. 이는 효소-처리 홍삼 추출물이 효소를 처리하지 않은 홍삼 추출물에 비하여 자외선 노출 환경에서 보다 우수한 주름 예방 효과 및 피부 노화 억제 효과를 나타내며, 효소-처리 홍삼 및 맥아 추출물의 혼합물이 맥아를 미혼합한 효소-처리 홍삼 추출물보다 우수한 주름 예방 효과 및 피부 노화 억제 효과를 나타내는 것을 의미한다.

[0106]

<시험예 2> 인체적용시험을 통한 피부 노화 억제 및 주름 개선 효과 확인

[0107] 상기 제조예 1에서 얻은 효소-처리 홍삼 추출물과 제조예 2에서 얻은 맥아 추출액을 농축액 형태로 말토덱스트린과 일정비율로 혼합한 후 분무건조기를 이용하여 분무건조하였다. 이때, 말토덱스트린의 양은 농축 혼합물의 고형분과 동량으로 하였다. 이렇게 얻은 건조 분말에 결정셀룰로오스를 첨가하여 반죽하고 제환기를 이용하여 직경 2.5 mm 크기의 소환으로 제조하였다. 상기 소환을 60℃ 이하에서 수분함량이 10% 이하가 될 때까지 12시간 이상 건조하였다.

[0108] 이렇게 제조된 환을 이용하여 주름개선 및 피부미용 개선 효과에 대한 다중안면검사카메라시스템 Janus(아람휴비스, 한국)과 2인의 전문가의 임상소견과 피실험자 설문조사를 실시하였다. 20~40 세까지의 건강한 여성 및 남성 20 명을 대상으로 효소 처리 홍삼과 맥아를 이용하여 만든 환을 1 일 3 회 2주간 복용하도록 하였다.

[0109] 2주 후 피부주름의 개선정도 및 모공축소 정도, 피지감소 정도, 피부톤 개선 정도 등을 상기 조사를 통해 평가하였다. 피실험자의 피부 주름개선 및 모공축소, 피지감소, 피부톤 개선에 관하여 복용전과 비교하여 개선 없음, 약간의 개선, 상당한 개선의 3 단계로 판정하였다.

[0110] 그 결과를 아래 표 및 도 11 내지 13에 나타내었다.

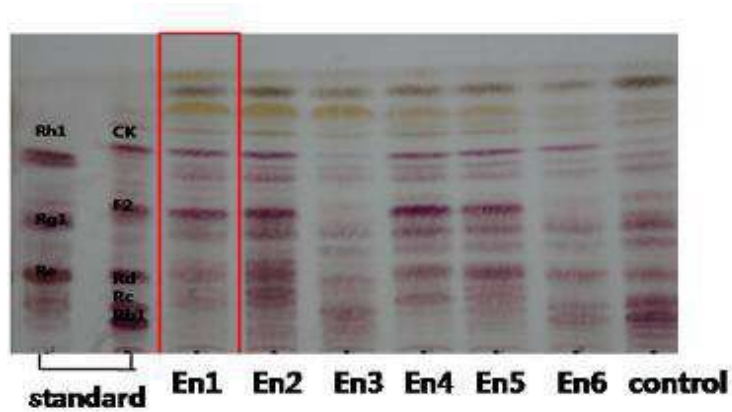
	이름	성별	나이	피부타입	주름	피지상태	모공	피부톤
1	박00	남	24	지성	++	+++	++	+
2	이00	여	26	건성	+++	++	+++	++
3	이00	여	25	지성	+	++	+	++
4	신00	여	27	중성	++	+++	+	++
5	김00	남	29	건성	+++	++	+++	+
6	김00	여	22	중성	++	++	++	+
7	한00	남	31	건성	+++	+	++	+
8	최00	남	36	지성	+++	++	+++	++
9	김00	여	32	중성	++	++	+++	++
10	송00	남	25	건성	++	+	++	+++
11	박00	여	33	지성	++	++	++	++
12	고00	여	29	건성	+++	++	++	+++
13	김00	남	30	중성	++	++	+++	++
14	강00	여	33	건성	++	+++	+	++
15	양00	남	36	지성	++	+	+++	++
16	황00	남	37	건성	+++	++	+++	+++
17	정00	여	22	중성	++	++	+	++
18	박00	남	33	지성	+++	++	++	+
19	손00	여	30	지성	++	+++	++	+++
20	강00	여	29	건성	+++	++	++	+++

[0111]

[0112] 도 11에서 확인되는 바와 같이, 주름감소, 피지감소, 색소침착 감소, 피부톤 개선이 관찰되었으며, 위 표 및 도 12, 13에서 나타난 바와 같이, 효소-처리 홍삼 추출물과 맥아 추출물의 배합 조성물을 복용 시 피부 주름 및 모공 크기의 감소, 색소침착 및 피지, 피부톤 등의 모든 질문에 대하여 80% 가량의 긍정적 답변을 확인하였다. 이로써, 실시예 1의 효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물의 혼합물이 피부미용 개선 효능을 가짐을 확인할 수 있었다.

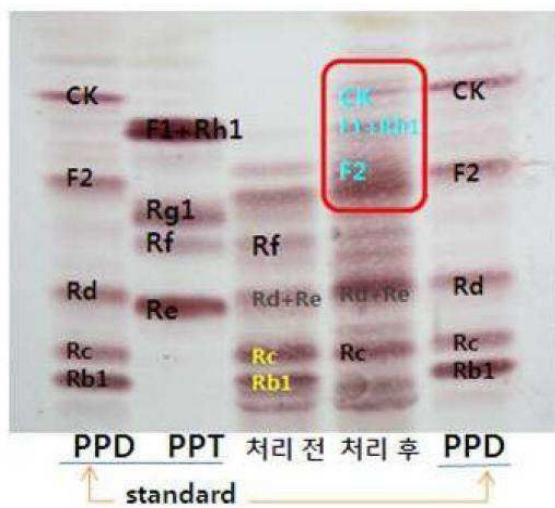
도면

도면1



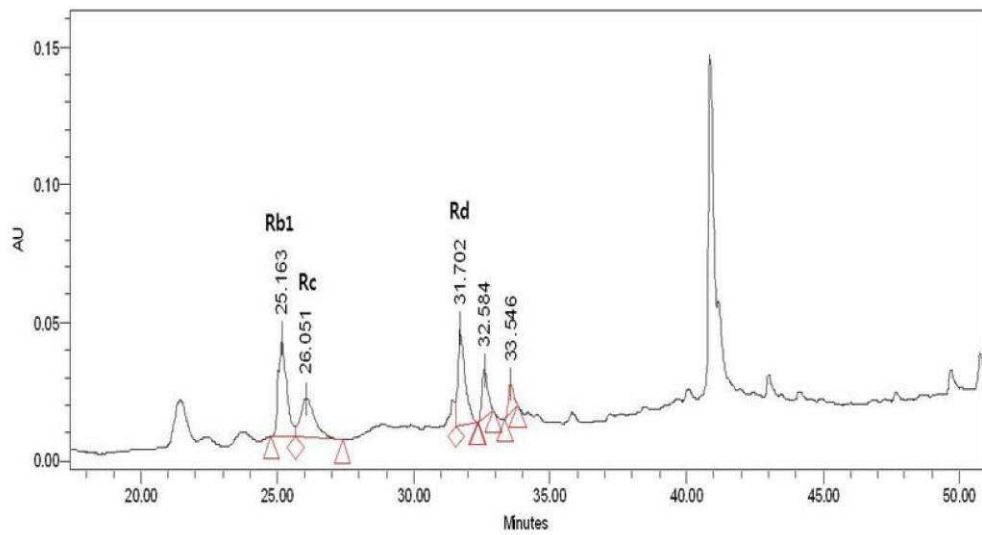
도면2

홍삼 추출물 및 효소처리 홍삼의 사포닌 변화 TLC data.

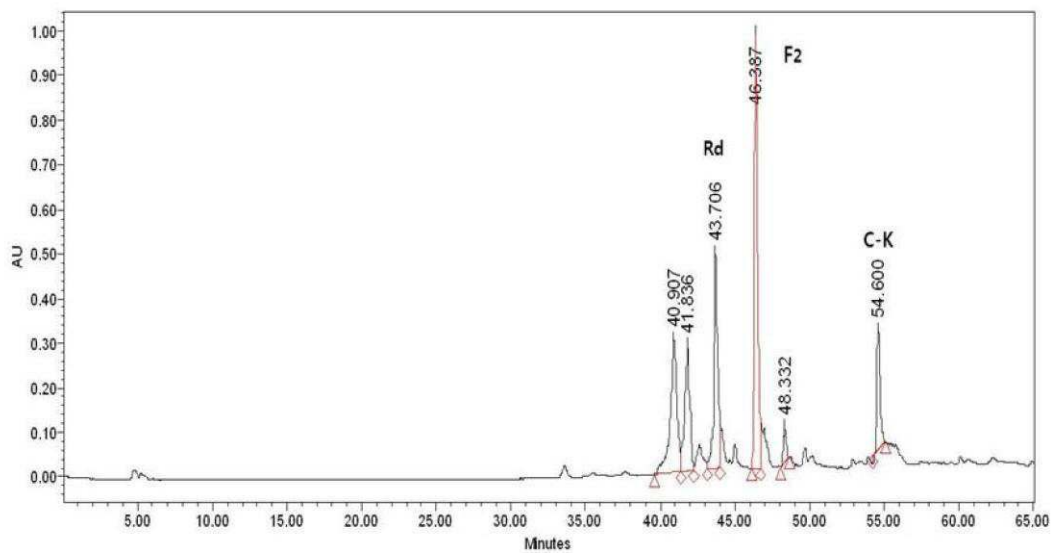


도면3

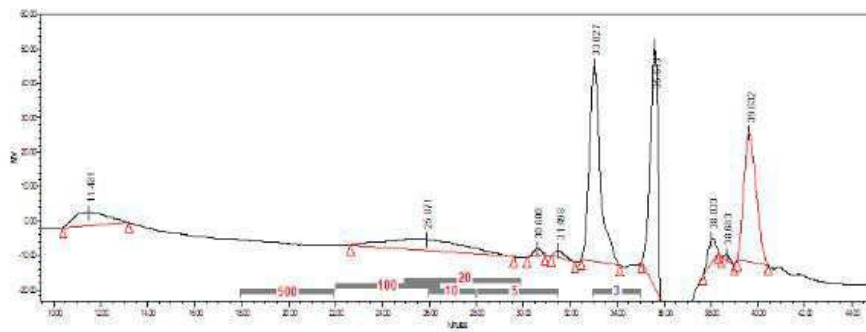
(A) 홍삼 추출물의 HPLC data



(B) 효소를 처리한 홍삼 추출물의 HPLC data



도면4



효소-미처리 홍삼추출물 음이온 분획물로부터 얻은 펄렛

QAE-컬럼에 결합된 메탄올/아세톤 불용성 분획물

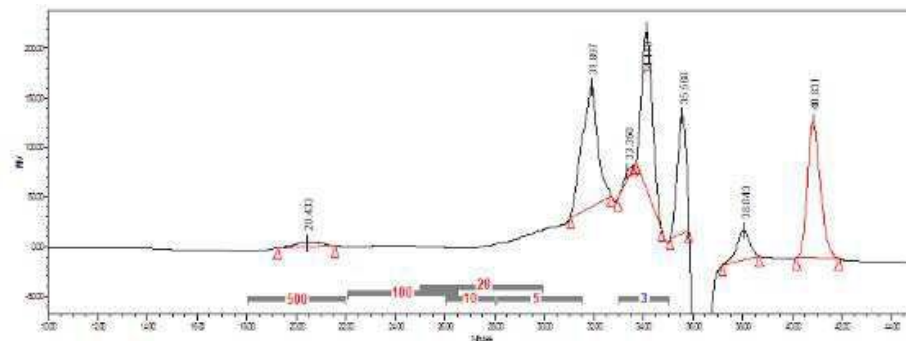
피크: 25.8'M~15-20 kDa (PS); 30.6', 31.4'M~3-5kDa (PS) - 흔적있음

주원피크: M~3.5-5 kDa(prot)

작은 분자무게를 갖는 성분 탐지 구간: 35.6'(~1000) 및

retention>38'(M<<1000)

도면5



효소-미처리 홍삼추출물 양이온 분획물로부터 얻은 펄렛

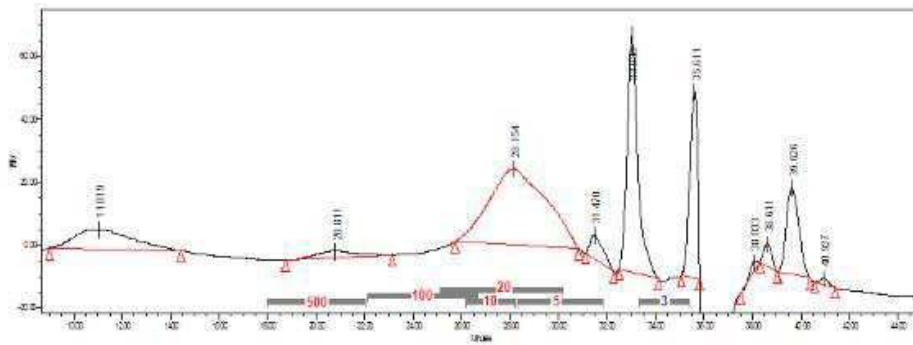
QAE-컬럼에 미결합된 메탄올/아세톤 불용성 분획물

피크: 고분자 성분들과 연관 높음

피크: 31.6M~3-5 kDa (PS) 및 33.4', 및 34.1~3 kDa (proteinscale)

작은 분자 (M<<1000) 성분은 retention time 38 과 40에 보여짐

도면6



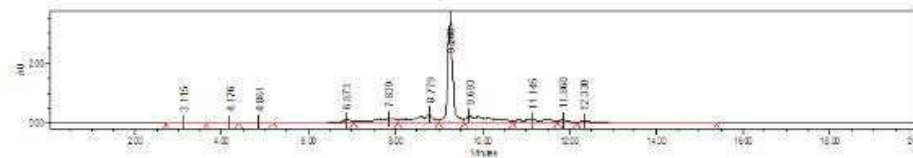
효소-처리 홍삼추출물 음이온 분획물로부터 얻은 펄렛

QAE-컬럼에 결합하고 메탄올/아세톤에 불용성인 분획물

피크: 20.8' M=300-400 kDa(PS); 28.1'(wide,main) M~5-15 kDa(PS);
31.4'~4 kDa; 33'~3.5; 35.6' M~1000

38'이 후, 작은 분자 무게를 가진 요소들이 검출됨

도면7

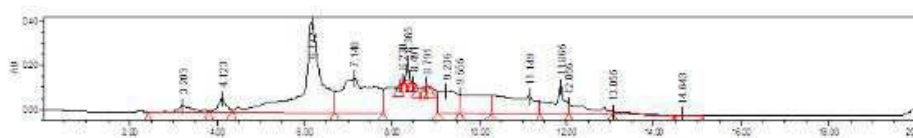


효소 미처리 홍삼추출물 음이온 분획물에서 얻은 상청액

QAE-컬럼에 결합하고 메탄올/아세톤에 가용성인 분획물

Main peak retention은 9.2'

도면8

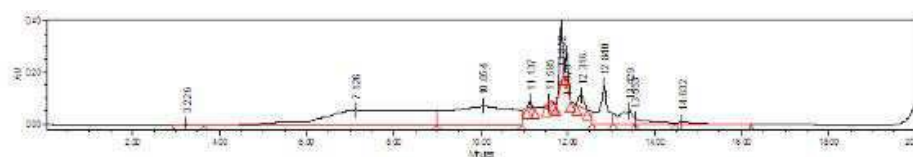


효소 미처리 홍삼추출물의 양이온 분획물에서 얻은 상청액

QAE-컬럼에 결합 하지 않고 메탄올/아세톤에 가용성인분획물

주된 피크는 retention 9.2' 이전에 나타나며, 보다 극성인 분자요소들이 연관됨

도면9



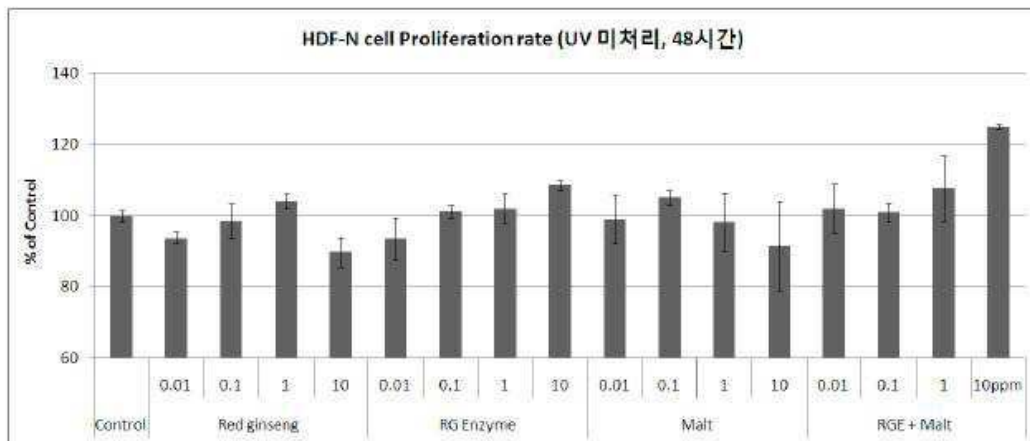
효소-처리 홍삼추출물의 양이온 분획물에서 얻은 상청액

QAE-컬럼에 결합하지 않고 메탄올/아세톤에 가용성인 분획물

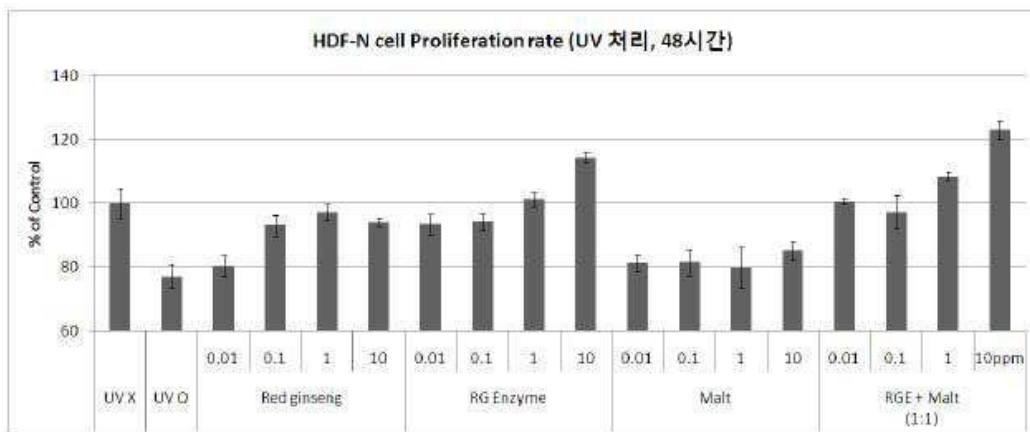
주된 피크가 보다 소수성인 요소들과 연관됨

도면10

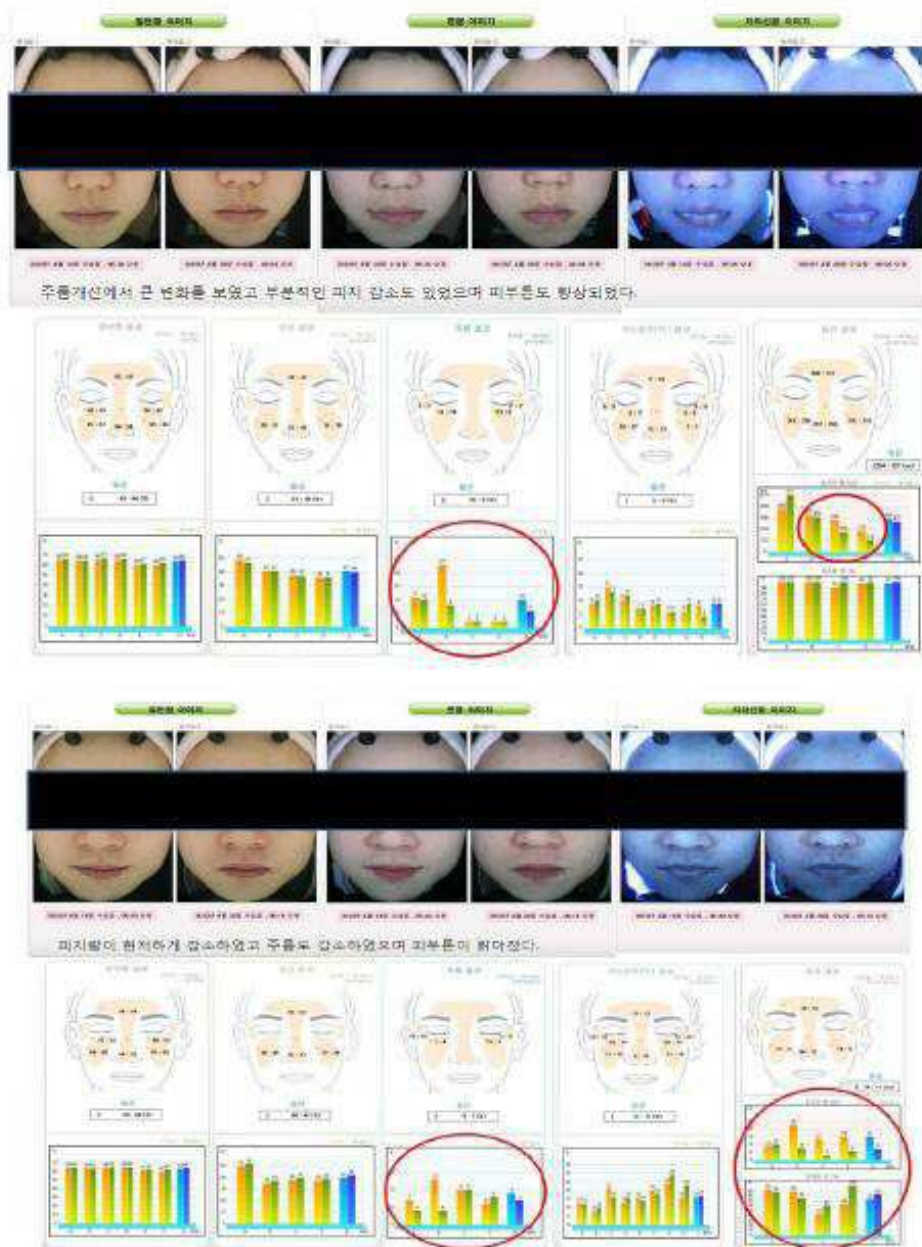
(A)



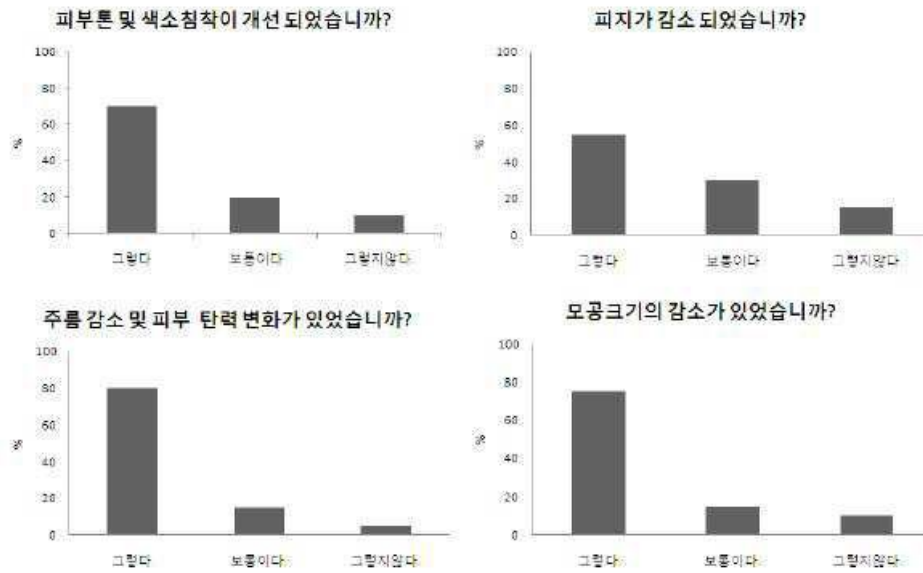
(B)



도면11



도면12



도면13

