(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0055367
(43) 공개일자 2024년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61Q 11/00 (2006.01) *A61Q 17/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0135575
(22) 출원일자 2022년10월20일
심사청구일자 2022년10월20일

(71) 출원인
아레즈 주식회사
대전광역시 유성구 테크노11로 55-8, 2층 (탑립동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
송규용
대전광역시 유성구 상대복용로29번길 51, 208동 3301호(상대동, 대전아이파크시티 2단지)
이지현
대전광역시 서구 청사로 281, 201동 506호(둔산동, 샘머리아파트2단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 공간

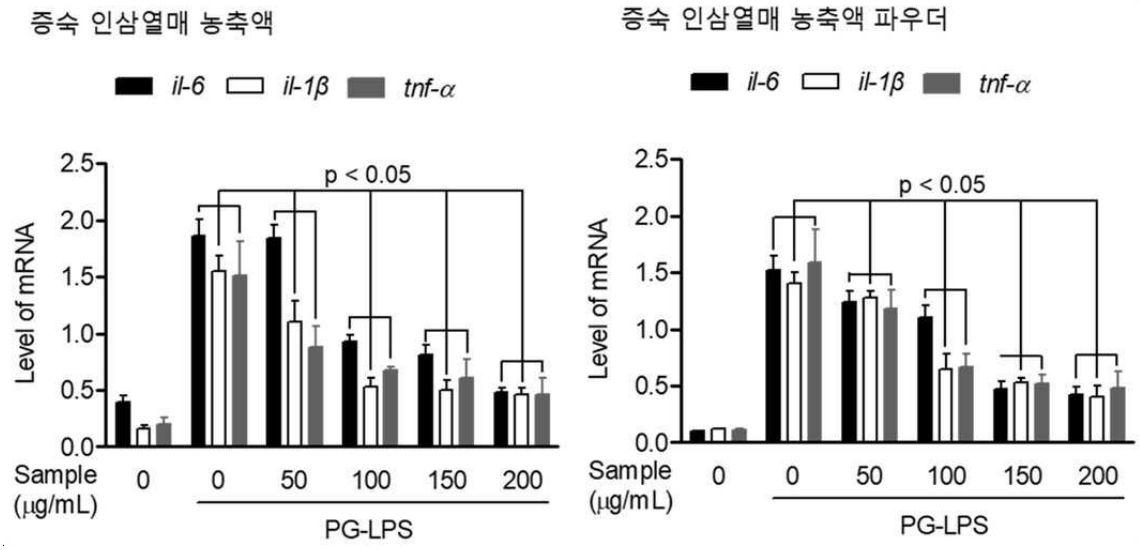
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 치주인대세포에서 IL-6, IL-1β 또는 TNF-α의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, 조골세포의 분화를 유도하며, 항산화 활성을 나타내어 구강질환의 예방과 치료에 유용하게 사용 가능하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61Q 11/00 (2013.01)
A61Q 17/005 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/312 (2013.01)
A23V 2250/2124 (2013.01)
A23V 2300/24 (2013.01)
(72) 발명자
정길생
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 125, 311호
김은남
대전광역시 유성구 문화원로 133(봉명동, 스톤빌), 505호
최희지
대전광역시 서구 문정로170번길 92(둔산동), 301호
백동혁
대전광역시 유성구 대학로 59, 710호(봉명동)
조수현
대전광역시 서구 둔산북로 215, 8동 102호(둔산동, 가람아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	미부여
과제번호	121015-3
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	질환*대상별 맞춤형 기능성 소재 발굴 및 대량생산 기술 개발
과제수행기관명	아레즈 주식회사
연구기간	2021.04.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 증숙 인삼열매 추출물은 인삼열매의 50% 주정 추출물을 100~130℃ 온도, 0.11~15㎫ 압력에서 4~12시간 동안 증숙한 것임을 특징으로 하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 증숙 인삼열매 추출물은 인삼열매의 50% 주정 추출물을 300~400㎾, 2.5~3.5㎫ 조건에서 110~130℃로 30~90분 동안 처리한 동안 마이크로웨이브를 조사하여 마이크로웨이브 증숙처리한 것임을 특징으로 하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 증숙 인삼열매 추출물은 진세노사이드 Rg6 0.5~2중량%, 진세노사이드 Rg4 0.5~2중량%, 및 진세노사이드 Rh4 0.5~5중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 구강질환은 치아우식증, 치주염 또는 치은염인 것을 특징으로 하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 균주에 대한 항균 효과가 있는 것을 특징으로 하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 치주인대세포에서 IL-6, IL-1β 또는 TNF-α의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 치주인대세포에서 조골세포의 분화를 유도하는 것을 특징으로 하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조골세포의 분화 유도는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP) 또는 오스테오칼신

(osteocalcin, OCN)의 발현을 증가시키거나 매트릭스 메탈로프로티나제(Matrix metalloproteinase, MMP)의 발현을 억제하는 것임을 특징으로 하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 치주인대세포에서 초과산화물 불균등화효소(Superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(Catalase, CAT) 또는 글루타티온 과산화효소(Glutathione Peroxidase, GPx)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 치약, 구강세정제, 구강청정제, 껌, 캔디류, 구강스프레이, 구강용 젤, 구강용 연고제, 구강용 바니쉬, 잇몸 마사지 크림 및 구강용 패치로 이루어진 군으로부터 1이상 선택되는 것으로 특징으로 하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주염 예방 또는 치료용 조성물을 포함하는 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 구강질환은 구강 내에서 발생하는 질환으로, 치주질환(periodontal disease, 풍치)과 치아우식증(dental cavities, 충치) 등 누구에게나 발병할 수 있으며, 통증, 지적기능 장애, 치주조직의 파괴, 구취 및 시린이와 같은 다양한 증상을 유발하고 치아상실을 초래하는 주된 요인으로 알려져 있다.

[0003] 치주질환은 성인 10명 중 7명 이상이 이환되어 있는 매우 유병률이 높은 만성질환이다. 치주질환은 크게 치은염과 치주염으로 나뉘며, 잇몸 즉, 연조직에만 국한된 형태를 치은염이라 하고, 이러한 염증이 잇몸과 잇몸 뼈 주변까지 진행된 경우를 치주염이라고 한다.

[0004] 진지발리스와 같은 치주염균에 의한 복합적인 유발원인으로 발생되는 치주염은 치아지지구조의 염증과 동시에 치주인대의 파괴와 치조골의 소실을 초래하기 때문에, 항균 및 항염증, 조골세포 분화의 촉진 등의 복합적 치료방법이 필요하다. 현재 치주염의 가장 효과적인 치료법은 약물치료와 외과적 수술을 병행하는 것이나 이러한 치료 방법은 치료 예후가 좋지 않고 환자에게 통증과 부작용을 유발할 수 있다. 또한 항균, 항염제 등 구강질환의 치료에 사용되는 약물은 근본적인 치주질환의 치료제가 아니며 장기복용에 따른 부작용을 동반하고 있다. 이에 따라 치주염 예방 및 치료를 위한 천연물 소재를 확보 및 생약/천연물 신소재 발굴이 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 인삼의 열매는 가장 젊은 시기의 4년생 인삼에서 5~7월에 열리는 희귀한 열매이다. 기존에는 단순히 인삼 씨앗으로만 인식되어 왔으나 미국, 일본, 한국 등 의학계의 임상실험 및 연구 결과를 통해 인삼의 사포닌인 진세노사이드(ginsenoside)가 다량 함유되어 있음이 밝혀졌다. 그러나 열매를 수확한 지 하루 만에 시들어버리는 인삼 열매의 특성상 단시간에 집중적인 수확을 필요로 하기 때문에 재배 및 관리에 어려움이 따르는 문제가 있었다.

[0006] 종래 기술로, 한국등록특허 제10-2008-0113504호에는 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 구강세균억제용 조성물이 기재되어 있으며, 한국공개특허 제10-2016-00065472호, 인삼 열매의 과육 및 과피는 제거하고 종자만을 볶아 미세분말로 제조하는 인삼 열매의 종자 가공방법이 개시되어 있다. 그러나, 인삼 열매의 적절한 가공을 통해 인삼 열매의 이용률을 높이고 약효성분을 증강시켜 새로운 용도를 발굴하는 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2008-0113504호, 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 구강세균억제용 조성물, 2014년 05월 07일, 등록.

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2016-00065472호, 인삼 열매의 종자 가공방법, 2016년 01월 19일, 공개.

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-0963465호, 사포닌을 유효성분으로 포함하는 치주질환의 치료용 조성물, 2010년 06월 07일, 등록.

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Bonaldo, P. et al., Cellular and molecular mechanism of muscle atrophy, Dis Model Mech., 6(1), 25-39, 2013.

(비특허문헌 0002) Conboy, I. M. et al., Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle, Science, 302(5650), 1575-1577, 2003.

(비특허문헌 0003) Kim, Y. S. et al., Differential expression of protein kinase C subtypes during ginsenoside Rh2-lnduced apoptosis in SK-NBE(2) and C6Bu-1 cells, Arch Pharm Res., 23(5), 518-524, 2000.

(비특허문헌 0004) Lee, M. K. et al., Pyropia yezoensis peptide PYP1-5 protects against dexamethasone-induced muscle atrophy through the downregulation of atrogin1/MAFbx and MuRF1 in mouse C2C12 myotubes, Mol Med Rep., 15(6), 3507-3514, 2017.

(비특허문헌 0005) Morgan, J. E. et al., Muscle satellite cells, Int J Biochem Cell Biol., 35(8), 1151-1156, 2003.

(비특허문헌 0006) Nozaki, T. et al., A novel in vitro model of sarcopenia using BubR1 hypomorphic C2C12 myoblasts, Cytotechnology, 68(5), 1705-1715, 2016.

(비특허문헌 0007) Shibata, S., Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds, J Korean Med Sci., 16(suppl), S28-37, 2001.

(비특허문헌 0008) Son, Y. H. et al., Dexamethasone downregulates caveolin-1 causing muscle atrophy via inhibited insulin signaling, J Endocrinol., 225(1), 27-37, 2015.

(비특허문헌 0009) Tachikawa, E. et al., In vitro inhibition of adrenal catecholamine secretion by steroidal metabolites of ginseng saponins, Biochem Pharmacol., 66(11), 2213-2221, 2003.

(비특허문헌 0010) Tsai, S. C. et al., Stimulation of the secretion of luteinizing hormone by ginsenoside-Rb1 in male rats, Chin J Physiol., 46(1), 1-7, 2003.

(비특허문헌 0011) Wagatsuma, A. et. al., Vitamin D signlaing in Myogenesis: Potential for Treatment of Sarcopenia, Biomed Res Int., 2014, 121254, 2014.

(비특허문헌 0012) Lee, Soo-Yeon, et al. Black ginseng activates Akt signaling, thereby enhancing myoblast differentiation and myotube growth. Journal of ginseng research 42.1 (2018): 116-121.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제의 해결을 위하여 본 발명은 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 증숙 인삼열매 추출물은 농축된 형태의 농축물로 이용할 수 있으며, 상기 증숙 인삼열매 농축물은 증숙 인삼열매 농축액 또는 증숙 인삼열매 농축액을 동결건조한 파우더 형태로 이용될 수 있다.

[0012] 상기 증숙 인삼열매 추출물은 인삼열매의 물, 저급알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올), 저급알코올 수용액, 또는 유기용매(클로로포름, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 디메틸설폭사이드, 헥산등)의 추출 농축물을 100~130℃, 0.11~15㎫, 및 4~12시간 동안 증숙한 증숙인삼열매 농축물을 포함하며, 상기 인삼열매의 추출 용매로 바람직하게는 물, 저급알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올), 저급알코올 수용액이며, 더욱 바람직하게는 30~99% 에탄올이다.

[0013] 상기 증숙 인삼열매 추출물은 인삼열매의 50% 주정 추출물을 100~130℃ 온도, 0.11~15㎫ 압력에서 4~12시간 동안 증숙한 것일 수 있다.

[0014] 본 발명은 상기 증숙 인삼열매 추출물은 고온고압에서 마이크로웨이브 처리하여 증숙한 증숙인삼열매 농축물일 수 있다. 상기 고온고압에서 마이크로웨이브 처리하여 증숙한 증숙인삼열매 농축물은 인삼열매의 물, 저급알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올), 또는 저급알코올 수용액의 추출 농축물을 300~400W, 2.5~3.5㎫, 110~130℃, 및 30~90분 동안 고온고압에서 마이크로웨이브 처리하여 증숙한 증숙인삼열매 농축물이다.

[0015] 본 발명은 상기 고온고압으로 증숙 또는 고온고압에서 마이크로웨이브 처리하여 증숙한 증숙인삼열매 농축물은 활성성분인 진세노사이드 Rg6 0.5~2중량%, 진세노사이드 Rg4 0.5~2중량%, 및 진세노사이드 Rh4 0.5~5중량%를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명에서 구강질환은 치아우식증, 치주염 또는 치은염일 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서 “치아 우식증(dental cavities)”이란 치아면에 서식하는 세균으로 인한 감염성 질환으로서, 충치라고도 하며 구체적으로 치아의 머리 부분 표면을 덮고 있고, 치아 상아질을 보호하는 유백색의 반투명하고 단단한 물질인 치아 법랑질 또는 에나멜질이 입 안에 서식하는 구강병원균에 의해 설탕, 전분 등의 분해 중 생성되는 산에 의해 손상되어 발생한다.

[0018] 본 발명에 있어서 “치주염(periodontitis)”은 치아를 받치고 있는 치은과 치주인대 및 골조직에 염증이 생기는 질환이다.

[0019] 본 발명에 있어서 “치은염(gingivitis)”은 잇몸 즉, 연조직에만 국한된 형태의 치주 질환이다.

[0020] 치주염, 또는 치은염 등의 치주질환을 일으키는 원인균으로, 구체적으로는 악티노바실루스 악티노마이세템코미탄스 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), 포피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 타네렐라 포르시시아(*Tannerella forsythia*), 트레포네마 덴티콜라 (*Treponema denticola*) 및 푸소박테리움 누클리아툼(*Fusobacterium nucleatum*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 균일 수 있으며, 보다 구체적으로는 포피로모나스 진지발리스일 수 있다.

[0021] 상기 포피로모나스 진지발리스는 박테로이드(Bacteroide) 유연균의 일종으로 그람음성균이고, 혐기성균이며, 치주질환이 발생한 구강 내에서 발견되며, 그 외에도 위장관 상부, 호흡기 및 결장에서도 발견된다. 만성 치주질환 환자는 상기 균의 콜라게네이즈 효소에 의해 콜라겐이 분해되며, 상기 균은 치은 섬유아세포에 침입할 수 있으며, 상당한 농도의 항생제 하에서도 생존할 수 있다. 또한, 상기 균은 치은상피세포에 침입하여 장시간 생존할 수 있다.

[0022] 본 발명의 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물은 치주질환을 일으키는 원인균에 대한 항균효과를 가지며, 특히 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 균주에 대한 항균 효과가 있는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 인삼열매는 고려인삼(*Panax ginseng*), 미국인삼(*Panax quinquefolius*), 전칠삼(삼칠삼; *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonicus*), 삼엽삼(미국왜삼; *Panax trifolius*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*), 베트남삼 (*Panax vietnamensis*)의 열매를 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물은 치주인대세포

등에서 IL-6, IL-1β 또는 TNF-α의 염증성 사이토카인의 발현을 억제할 수 있다. 또한 상기 조성물은 치주인대세포에서 조골세포의 분화를 유도할 수 있으며, 상기 조골세포의 분화 유도는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP) 또는 오스테오칼신(osteocalcin, OCN)의 발현을 증가시키거나 매트릭스 메탈로프로티나제(Matrix metalloproteinase, MMP)의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물은 치주인대세포에서 항산화 활성을 통하여 구강질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0026] 상기 항산화 활성은 치주인대세포 등에서 초과산화물 불균등화효소(Superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(Catalase, CAT) 또는 글루타티온 과산화효소(Glutathione Peroxidase, GPx)의 발현을 증가시킴으로써 나타날 수 있으며, 활성산소종(ROS)의 생성을 억제한다.

[0027] 본 발명에 따른 조성물은 약학 조성물로 제공될 수 있으며, 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. “약학적으로 허용 가능”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 또한, 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0028] 바람직하게 본 발명의 조성물은 치약, 구강세정제, 구강청정제, 껌, 캔디류, 구강스프레이, 구강용 젤, 구강용 연고제, 구강용 바니쉬, 잇몸 마사지 크림 및 구강용 패치로 이루어진 군으로부터 1이상 선택되는 형태로 제형화할 수 있다.

[0029] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로즈, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아라비아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산프로필, 탈크, 스테아르산마그네슘 및 광물유를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 안정화제, 결합제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 진세노사이드에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 미결정셀룰로오스, 수크로스 또는 락토오스, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 히프로멜로오스 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아르산마그네슘, 탈크 같은 활택제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 유동파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 진세노사이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 멸균되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질과 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다.

[0030] 상기 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여시간, 투여경로, 약물의 흡수, 분포 및 배설률, 사용되는 다른 약물의 종류 및 처방자의 판단 등에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 5000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0031] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 증숙인삼열매 농축물을 포함하는 구강질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0032] 상기 건강기능식품은 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 또는 가공한 식품을 지칭하는 것으로, 예를 들어 건강보조식품, 기능성 식품, 영양제, 보조제 등을 모두 포함한다.

[0033] 상기 증숙인삼열매 농축물은 전체 건강기능식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001중량% 내지 50중량%, 더 바람직하게는 0.001중량% 내지 40중량%, 가장 바람직하게는 0.001중량% 내지 30중량%로 하여 첨가될 수 있다. 상기 첨가량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 및 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명 진세노사이드를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명은 증숙 인삼열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 치주인대세포에서 IL-6, IL-1β 또는 TNF-α의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, 조골세포의 분화를 유도하며, 항산화 활성을 나타내어 구강질환의 예방과 치료에 유용하게 사용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 PS-LPS로 처리한 인간 치주인대세포에서 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더의 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 PS-LPS로 처리한 인간 치주인대세포에서 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액의 조골세포 분화에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 PS-LPS로 처리한 인간 치주인대세포에서 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액 파우더의 조골세포 분화에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 PS-LPS로 처리한 인간 치주인대세포에서 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액의 항산화 활성에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 PS-LPS로 처리한 인간 치주인대세포에서 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액 파우더의 항산화 활성에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액의 포피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 MIC test를 보여주는 결과이다.

도 7은 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액 파우더의 포피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 MIC test를 보여주는 결과이다.

도 8은 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액의 포피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 MBC test를 보여주는 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 증숙 인삼열매 농축액 파우더의 포피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대한 MBC test를 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0038] **<실시예 1. 고온고압으로 증숙한 증숙인삼열매 농축물 제조>**

[0039] 인삼열매 50kg에 50% 주정 600kg을 첨가하여 85℃ 온도에서 6시간 동안 2회 추출하였다. 그 다음 상기 추출물을 여과하여 70brix로 농축하였다. 이를 121℃ 온도 및 0.13㎫ 압력에서 4시간 동안 증숙하여 증숙인삼열매 농축물을 얻었다. 하기 표 1에 70brix로 농축한 증숙인삼열매 농축물 내의 진세노사이드 성분 종류와 그 함량을 정리하였다.

[0040] **<실시예 2. 고온고압에서 마이크로웨이브 증숙처리한 증숙인삼열매 농축물 제조>**

[0041] 인삼열매 50kg에 50% 주정 600kg을 첨가하여 85℃ 온도에서 6시간 동안 2회 추출하였다. 그 다음 상기 추출물을 여과하여 70brix로 농축하였다. 이를 400W, 3.0㎫ 조건에서 130℃로 60분 동안 마이크로웨이브를 조사하여 마이크로웨이브 증숙처리한 증숙인삼열매 농축물을 얻었다. 하기 표 1에 고온고압에서 마이크로웨이브를 조사하여

중숙처리한 증숙인삼열매 농축물 내의 진세노사이드 성분 종류와 그 함량을 정리하였다.

[0042] **<비교예 1. 증숙하지 않은 인삼열매 농축물 제조>**

[0043] 인삼열매 50kg에 50% 주정 600kg을 첨가하여 85℃ 온도에서 6시간 동안 2회 추출하였다. 그다음 상기 추출물을 여과하여 70brix로 농축하여 인삼열매 농축물을 얻었다. 하기 표 1에 증숙과정을 거치지 않고 70brix로 농축한 인삼열매 농축물 내의 진세노사이드 성분 종류와 그 함량을 정리하였다.

표 1

[0044]

진세노사이드	**비교예 1.** 증숙 처리전 인삼열매농축물 중 진세노사이드 함량 (mg/g)	**실시예 1.** 고온고압으로 증숙한 인삼열매농축물 중 진세노사이드 함량 (mg/g)	**실시예 2.** 고온고압에서 마이크로웨이브 증숙처리한 인삼열매농축물 중 진세노사이드 함량 (mg/g)
Re+Rg1	64.93	5.61	0
Rb1	21.97	4.88	0
Rc	17.64	5.71	0
Rb2	15.68	6.71	0
Rd	16.23	13.21	0
Rg2-S	2.87	14.19	7.37
Rh1-S	0	1.37	3.04
Rg2-R	0	5.01	3.98
Rh1-R	0	1.03	2.35
Rg6	**0**	**10.38**	**10.15**
Rg4	**0**	**11.31**	**10.99**
Rh4	**0**	**11.98**	**30.08**
Rg3-S	0	7.78	9.18
Rg3-R	0	7.18	9.33
Rk1	0	6.03	14.42
Rg5	0	8.66	19.44
총량	139.32	121.04	120.33

[0045] 상기 표 1에 인삼열매 농축 후 처리에 따른 진세노사이드 성분 종류와 그 함량을 정리하였다.

[0046] 증숙 전의 인삼열매 농축물(비교예 1)은 진세노사이드 Re+Rg1을 많이 함유하는 반면, 고온고압으로 증숙한 인삼열매 농축물(실시예 1)에서는 증숙 전에 존재하던 진세노사이드 성분들이(Re+Rg1, Rb1, Rc, Rb2, Rd) 줄어들고 저분자의 진세노사이드 Rg6, Rg4, Rh4, Rg2, Rh1, Rg3, Rk1, Rg5 등이 생성되었으며, 특히 진세노사이드 Rg6, Rg4 및 Rh4 성분이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 고온고압에서 마이크로웨이브 증숙한 인삼열매 농축물(실시예 2)에서는 증숙 전에 존재하던 진세노사이드 성분들은 완전히 소멸하였으며, 진세노사이드 Rg6, Rg4 및 Rh4 성분이 현저히 강화된 증숙인삼열매 농축물을 만들 수 있었다.

[0047] 이에 따라 이후 실험은 실시예 2에 따른 고온고압에서 증숙처리한 인삼열매 농축물을 실험에 사용하였으며, 고온고압으로 증숙처리한 증숙인삼열매 농축액 및 보관과 유통에 용이하도록 상기 증숙 인삼열매 농축액을 동결건조한 증숙 인삼열매 농축액 파우더를 사용하여 실시하였다.

[0048] **<실험예 1. 증숙 인삼열매 농축물의 항염 효과 확인>**

[0049] 구강 세균 중 대표적인 치주질환 병원균(periodontal pathogens)에는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola, Prevotella intermedia*), 아그레가티박터 액티노미세템코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 등이 있으며, 이들 미생물이 형성하는 lipopolysaccharides (LPS) 내 독소 혹은 대사산물은 조직과 면역세포에서부터 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 분비를 증가시킨다. 이러한 전염증성 사이토카인은 치주조직을 손상시키며 매트릭스 메탈로프로테나제(Matrix metalloproteinase, MMP)와 같은 효소 활성을 유도함으로써 결합조직 파괴하여 치주조직을 손상시킨다. 따라서 치주염에서 이러한 전염증성 사이토카인의 억제는 치주염 억제에 중요한 치료전략이다. 이에 따라 *Porphyromonas gingivalis*-LPS (PG-LPS)로 자극된 인간치주인대세포에서 치주염증의 대표적

염증성 사이토카인 조절에 증숙 인삼열매 농축물이 미치는 효과를 평가하였다.

[0050] 인간 치주인대세포는 경북대학교 치과대학에서 기증받아 사용하였다. 인간 치주인대 (Human preiodontal ligament, HPDL) 세포를 5×10^3 cell/mL의 농도로 96-well plate에 37 ℃의 온도, 5% CO_2 배양조건하에 24시간 배양하였다. 이후, 증숙 인삼열매 농축액 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더를 0, 50, 100, 150 및 200 μg/mL의 농도로 처리하고 37 ℃의 온도, 5% CO_2 배양조건하에 6시간 배양하였다. 이후 PG-LPS로 6시간 자극한 다음, TRIzol/chloroform reagent를 이용하여 추출된 총 cDNA를 나노드롭(nanodrop)으로 정량 후 PrimeScript-RT reagent kit (SYBR Premix Ex Taq)를 이용하여 염증성 사이토카인 IL-6, IL-1β 및 TNFα 유전자를 증폭하여 분석하였다. 각 표적 유전자의 역치 (Ct) 값을 housekeeping gene인 GAPDH 수치로 정규화하고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0051] 도 1에서 보는 바와 같이, 증숙 인삼열매 농축액 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더 모두 농도의존적으로 IL-6, IL-1β 및 TNFα의 발현을 억제하였다. 특히 증숙 인삼열매 농축액 파우더는 증숙 인삼열매 농축액보다 더 낮은 농도에서 IL-6의 발현을 유의하게 하향 조절하였다. 이와 같이, 증숙 인삼열매 농축액 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더은 인간 치주인대세포에서 PG-LPS에 의해 증가된 염증성 매개인자와 사이토카인을 효과적으로 하향 조절하여 치주염증 억제효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0052] **<실험예 2. 증숙 인삼열매 농축물의 조골세포 분화 유도 효과 확인>**

[0053] 초기 치은염이 만성염증으로 장기화되면 잇몸뿐만 아니라 잇몸 아래 치조골까지 침식하게 되며 이를 치주염이라 한다. 일단 치조골이 소실되면 원래 상태로의 회복이 어려우며, 치주염이 진행될수록 치조골 소실이 증가하게 된다. 골세포의 활성 지표로 활용되는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)와 오스테오칼신(osteocalcin, OCN)의 발현은 인간 치주인대세포의 치조골 형성에 중요한 요인으로 알려져 있으며, 이에 따라 치주염으로 손실된 이들 골세포 분화 활성지표의 회복은 치주염 치료에 또 하나의 중요한 치료전략이 되고 있다. 따라서 PG-LPS로 자극된 인간 치주인대세포에서 증숙 인삼열매 농축물에 의한 조골분화능을 평가하여 인간 치주인대세포의 재생에 미치는 영향을 평가하였다.

[0054] **2.1 인간 치주인대세포의 조골분화 유도효과 평가**

[0055] 인간 치주인대 (Human preiodontal ligament, HPDL) 세포를 5×10^2 cell/mL의 농도로 24-well plate에 37 ℃의 온도, 5% CO_2 배양조건하에 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 제거한 다음, 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicilline, 100 μg/mL streptomycin, 50 μg/mL ascorbic acid, 10 mM β-glycerophosphate가 함유된 α-MEM으로 배양액을 교체하여 조골분화를 유도하였다. 조골분화 유도와 함께 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)를 0, 50, 100, 150 및 200 μg/mL의 농도로 처리한 후, PG-LPS (1 μg/mL)을 처리 후 37 ℃의 온도, 5% CO_2 배양조건하에 14일간 배양하였다. 배양 종료 후 세포를 4 % formaldehyde로 30분 동안 고정하고 0.1 % Alizarin Red S (pH 4.3)로 1시간 염색 후 실온에서 30 분 동안 탈이온수로 세척한 다음, 현미경을 통해 광물화된 결절(mineralized nodules) 형성을 확인 후 10% 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride) 400 uL로 녹여 흡광 (570nm)을 측정하여 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0056] 도 2 및 도 3에서 보는 바와 같이, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder) 모두 PG-LPS로 인해 조골분화가 억제된 인간 치주인대 세포의 조골분화능을 증가시켰으며, 인간 치주인대세포의 광물화(mineralization)를 효과적으로 유도하였다.

[0057] **2.2 인간 치주인대세포의 조골분화 특이적 유전자 발현 유도효과 평가**

[0058] 인간 치주인대 (Human preiodontal ligament, HPDL) 세포를 5×10^5 cell/mL의 농도로 6-well plate에 37 ℃의 온도, 5% CO_2 배양조건하에 24시간 배양하였다. 이후, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)를 0, 50, 100, 150 및 200 μg/mL의 농도로 6시간 처리한 후, PG-LPS (1 μg/mL)로 12시간 자극하였다. 그 후 TRIzol/chloroform reagent를 이용하여 추출된 총 cDNA를 nanodrop으로 정량 후 PrimeScript-RT reagent kit (SYBR Premix Ex Taq)를 이용하여 alp, ocn 및 mmp9의 유전자를 증폭하여 분석하였다. 이 후 각 유전자의 역치(Ct) 값을 GAPDH 수치로 정규화하여 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0059] 도 2 및 도 3에서 보는 바와 같이, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder) 모두

PG-LPS로 인해 손실된 골 활성 지표인 alp, 및 ocn 유전자의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다. 또한, mmp9조골분화가 억제된 인간 치주인대 세포의 조골분화능을 증가시켰으며, 인간 치주인대세포의 광물화(mineralization)를 효과적으로 유도하였다. 또한 잇몸의 결합조직을 파괴하는 MMP9(Matrix metalloproteinase9)효소의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.

[0060] **<실험예 3. 증숙 인삼열매 농축물의 항산화 효과 확인>**

[0061] 치주염의 원인 또는 진행 과정 중 발생하는 활성산소는 치주조직을 손상시켜 치주질환을 유발하거나 진행 중인 치주질환을 악화시키는 작용을 한다. 유해산소로 알려진 활성산소는 과산화지질을 형성하므로, 이러한 활성산소의 과산화지질이 정상적으로 소거되지 않았을 때, 치주염을 포함한 다양한 염증반응을 일으킨다. 따라서, 항산화 작용을 통한 산화적 스트레스의 생성 억제는 치주염 개선의 중요 작용기전으로 알려져 있다. 이에 따라 PG-LPS로 자극된 인간 치주인대세포에서 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)의 활성산소 (reactive oxygen species, ROS) 제거 및 항산화 효소 (Superoxide Dismutase, SOD), (Catalase, CAT) 생성 수준에 미치는 영향을 평가하였다.

[0062] **3.1 항산화능 평가**

[0063] 인간 치주인대 (Human preiodontal ligament, HPDL) 세포를 5×10^3 cell/mL의 농도로 6-well plate에 37 ℃의 온도, 5% CO_2 배양조건하에 24시간 배양하였다. 이후, 0, 50, 100, 150 및 200 μg/mL의 증숙 인삼열매 농축액 (EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder) 및 PG-LPS (1 μg/mL)를 처리 후 37 ℃의 온도, 5% CO_2 배양조건 하에 2시간 배양하였다. 배양 종료 후 10 μM 디클로로플로레신 디아세테이트(Dichlorofluorescin diacetate, DCF-DA)가 첨가된 배지를 세포에 처리하여 30 min 간 37 ℃의 온도, 5% CO_2 배양조건 하에 배양하였고, 배양한 세포는 PBS로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리한 후 세포를 수확하고, 다시 PBS 로 세척하여 처리하여 30 min 간 배양과 동시에 Incucyte® Live-Cell 분석 시스템을 이용하여 ROS의 변화량을 측정하여 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0064] 도 4 및 도 5에서 보는 바와 같이, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder) 모두 PG-LPS로 인해 증가된 활성산소종(ROS) 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 이들 활성산소는 세포구성 성분인 인지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 나타냄으로써 치주염을 일으킨다. 따라서, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)는 항산화 작용을 통한 산화적 스트레스 억제효과를 측정하여 치주염을 개선시킴을 알 수 있다.

[0065] **3.2 항산화 효소 보호효과 평가**

[0066] 초과산화물 불균등화효소(Superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(Catalase, CAT) 및 글루타티온 과산화효소(Glutathione Peroxidase, GPx)는 항산화 효능을 촉매하는 효소로 활성산소에 의한 세포 손상에 대응하는 첫 번째 방어 라인을 구성한다. 본 발명에서는 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)가 PG-LPS로 자극된 인간 치주인대세포의 손실된 이들 항산화 효소의 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하였다.

[0067] 인간 치주인대 (Human preiodontal ligament, HPDL) 세포를 5×10^5 cell/mL의 농도로 6-well plate에 37℃의 온도, 5% CO_2 배양조건하에 24시간 배양한 후, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)를 0, 50, 100, 150 및 200 μg/mL의 농도로 6시간 처리 후 PG-LPS로 12시간 자극하였다. 그 다음 세포 용해 완충액 (RIPA buffer)로 용해 후, 23,000×g에서 15분 동안 원심분리 후, Bradford assay를 실시하여 각 군별 단백질 농도를 정량하고, 정량된 단백질은 SDS/12% 폴리아크릴아미드 겔의 각 웰에 20 μg을 로딩한 후 PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 이후, PVDF 멤브레인 스킴밀크 실온에서 1시간 동안 블로킹 후 SOD, CAT 및 GPx의 1차 항체를 4℃에서 24시간 동안 각각 반응시킨 후 순차적으로 각 해당 1차 항체에 대한 2차 항체를 반응시켰다. 각 항체에 결합하여 활성화된 단백질은 ECL 웨스턴 블롯팅 검출 이미징 시스템을 사용하여 측정하고 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0068] 도 4 및 도 5에서 보는 바와 같이, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)는 PG-LPS로 자극된 인간 치주인대세포의 손실된 이들 항산화 효소 SOD, CAT 및 GPx의 단백질 발현을 농도 의존적으로 상향 조절하였다. 이러한 연구결과는 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX

powder)가 항산화 작용을 통해 산화적 스트레스를 억제효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0069] **<실험예 4. 증숙 인삼열매 농축물의 항균 효과 확인>**

[0070] 치주염을 일으키는 주요한 원인은 구강 내 존재하는 세균으로, 치태 내에 존재하는 수 종의 세균에 의한 혼합감염으로 치주조직의 반응에 따른 염증진행에 의하여 치주질환이 발생된다. 이러한 세균 중 특히 레드 콤플렉스(red complex)에 속하는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)는 치주질환의 가장 중요한 원인균으로 알려져 있다. *P. gingivalis*는 그람 음성 혐기성 세균으로 치주질환자의 병소에서 그 수가 증가되며 치주질환이 진행됨에 따라 열구상피에서도 종종 발견된다. *P. gingivalis*는 숙주조직과 세포에 부착 또는 침투하는 과정에서 대사산물 또는 독소를 만들어 치주 조직에 직접 해를 미치기도 하지만 *P.gingivalis*와 반응 하는 세포에서 생산되는 사이토카인(cytokine), 그리고 사이토카인에 반응하는 숙주세포에서 생산된 물질이 치주 조직을 더욱 파괴시킴으로써 치주염을 가속화시킨다. 따라서 치주염을 일으키는 원인 세균 중 대표적인 균인 *P. gingivalis*에 대한 증숙 인삼열매 농축물의 항균효과를 조사하였다.

[0071] **4.1 증숙 인삼열매 농축물의 최소저해농도 평가**

[0072] 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)는 항균력을 측정하는 가장 기초적인 지표로, 시험관내 세균 감수성 검사(*in vitro* sensitivity test)에서 미생물의 번식을 억제할 수 있는 최소의 시험물질 농도이다.

[0073] *P. gingivalis* (KCTC 5352) 균주는 한국생명공학연구원 전북분원 생물자원센터에서 분양 받았다. TSA(Tryptic Soy Agar) 헤민 메나디온 배지(hemin menadione medium)에 1×10^5 [CFU]/mL의 농도로 주입 후 증숙 인삼열매 농축액(EX) 또는 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)를 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 및 220 μg/mL의 농도로 처리하고 37 ℃의 온도 혐기성 조건에서 배양하였다. 배양 종료 후 마이크로플레이트 분석기를 이용하여 600 nm 파장으로 흡광을 분석하여 MIC를 분석하고 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0074] 도 6 및 도 7에서 보는 바와 같이, 증숙 인삼열매 농축액(EX)은 160 μg/mL, 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)는 160 μg/mL부터 *P. gingivalis* 의 증식이 관찰되지 않아 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)의 *P. gingivalis*에 대한 최소억제농도(MIC)는 각각 160 μg/mL 및 180 μg/mL 이었다.

[0075] **4.2 증숙 인삼열매 농축물의 최소살균농도 평가**

[0076] 최소저해농도(MIC)가 세균의 가시적인 성장을 억제하는데 필요한 항균제의 최저 농도를 의미한다면 최소살균농도(Minimal Bicteriocidal Concentration, MBC)는 세균을 사멸시키는 항균제의 최소 농도이다.

[0077] 상기 실시예 4.1에서 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)의 *P. gingivalis*에 대한 최소살균농도(MBC)를 확인하기 위하여 160부터 220 μg/mL 처리군 시료를 재배양하고 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다. 도 8 및 도 9에서 보는 바와 같이, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder) 모두에서 180 μg/mL부터 균주가 자라지 않음을 확인하였다. 이에 따라 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)의 *P. gingivalis*에 대한 최소살균농도(MBC)는 동일하게 180 μg/mL임을 확인하였다.

[0078] 상기와 같이, 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)는 치주질환을 일으키는 주요 원인 세균인 *P. gingivalis* 균주에 대한 항균 및 살균 효과를 나타내는 것으로 확인되었으며, 이러한 증숙 인삼열매 농축액(EX) 및 증숙 인삼열매 농축액 파우더(EX powder)의 항균 및 살균효과는 상기 확인한 항염, 조골세포 분화 유도 및 항산화 효과와 함께 치주염 조절에 중요한 역할을 할 것이라 판단된다.

[0079] **<제제예 1. 정제의 제조>**

[0080] 본 발명 증숙인삼열매 농축물 20g을 각각 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0081] **<제제예 2. 파우더의 제조>**

[0082] 본 발명 증숙인삼열매 농축물 20g에 덱스트린 50g과 혼합한 후 통상의 파우더 제조방법에 따라 상기 성분을 혼합하고 스프레이 드라이하여 파우더를 제조하였다.

[0083] **<제제예 3. 캡슐제의 제조>**

[0084] 본 발명 증숙인삼열매 농축물 100㎎, 옥수수전분 100㎎, 유당 100㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2㎎을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0085] **<제제예 4. 건강기능식품의 제조>**

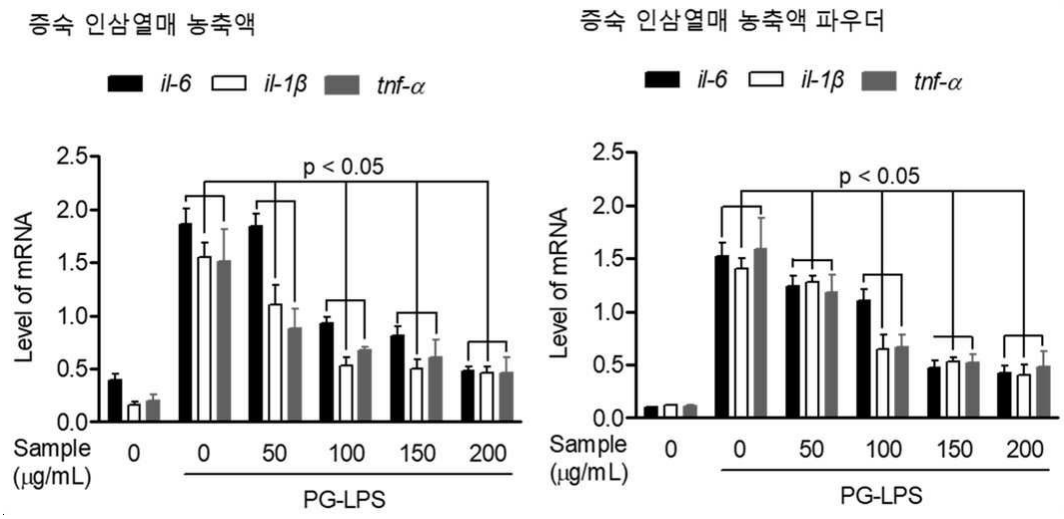
[0086] 본 발명 증숙인삼열매 농축물 20g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70㎍, 비타민 E 1.0㎎, 비타민 B1 0.13㎎, 비타민 B2 0.15㎎, 비타민 B6 0.5㎎, 비타민 B12 0.2㎍, 비타민 C 10㎎, 비오틴 10㎍, 니코틴산아미드 1.7㎎, 엽산 50㎍, 판토텐산 칼슘 0.5㎎, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75㎎, 산화아연 0.82㎎, 탄산 마그네슘 25.3㎎, 제1인산칼륨 15㎎, 제2인산칼슘 55㎎, 구연산칼륨 90㎎, 탄산칼슘 100㎎, 염화마그네슘 24.8㎎을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0087] **<제제예 5. 건강기능성 음료의 제조>**

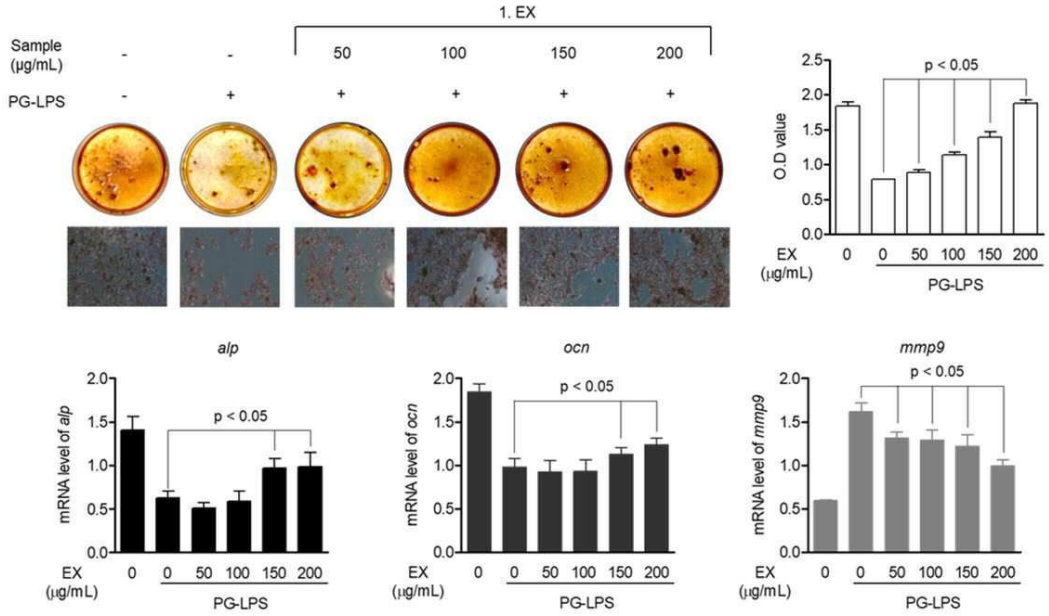
[0088] 본 발명 증숙인삼열매 농축물 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

도면

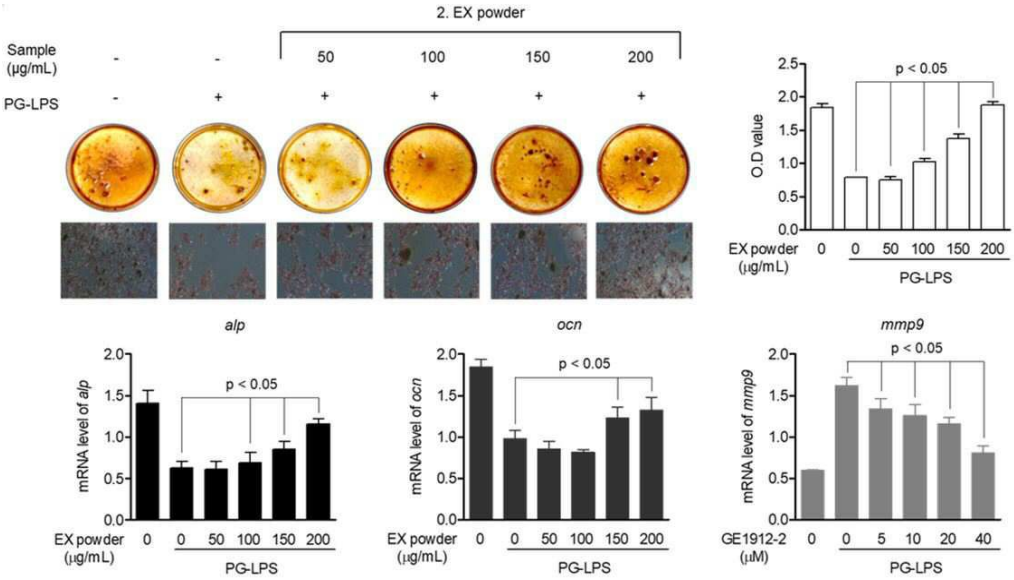
도면1



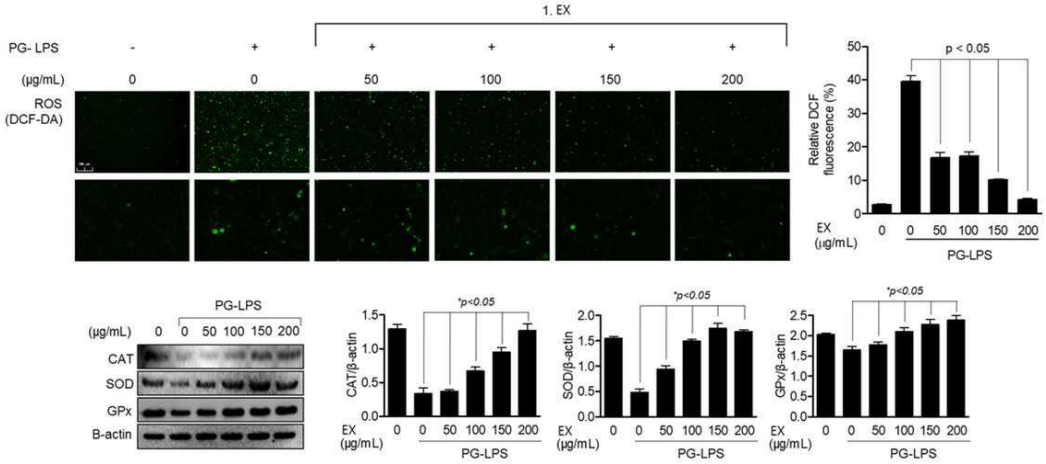
도면2


1. EX
Sample (μg/mL)
PG-LPS
50
100
150
200
O.D value
p < 0.05
EX (μg/mL)
PG-LPS
alp
ocn
mmp9
mRNA level of alp
mRNA level of ocn
mRNA level of mmp9

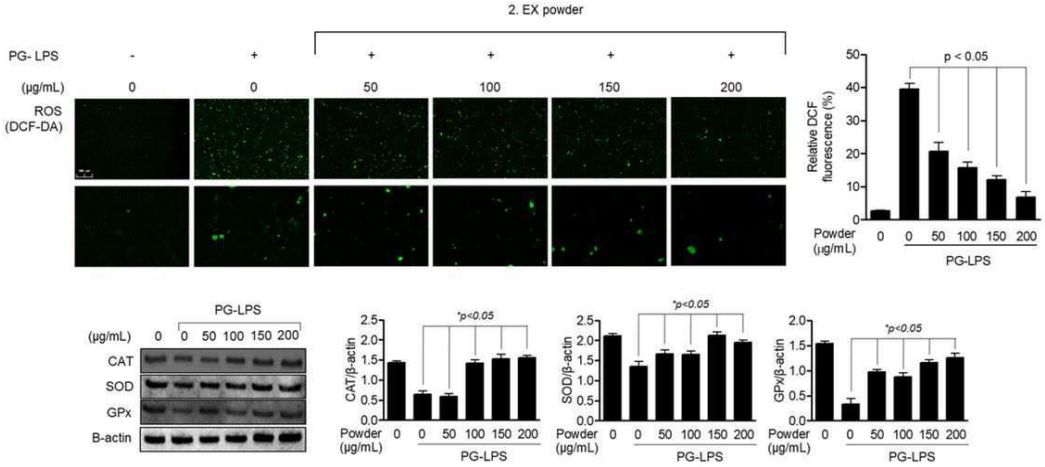
도면3


2. EX powder
Sample (μg/mL)
PG-LPS
50
100
150
200
O.D value
p < 0.05
EX powder (μg/mL)
PG-LPS
alp
ocn
mmp9
mRNA level of alp
mRNA level of ocn
mRNA level of mmp9
GE1912-2 (μM)

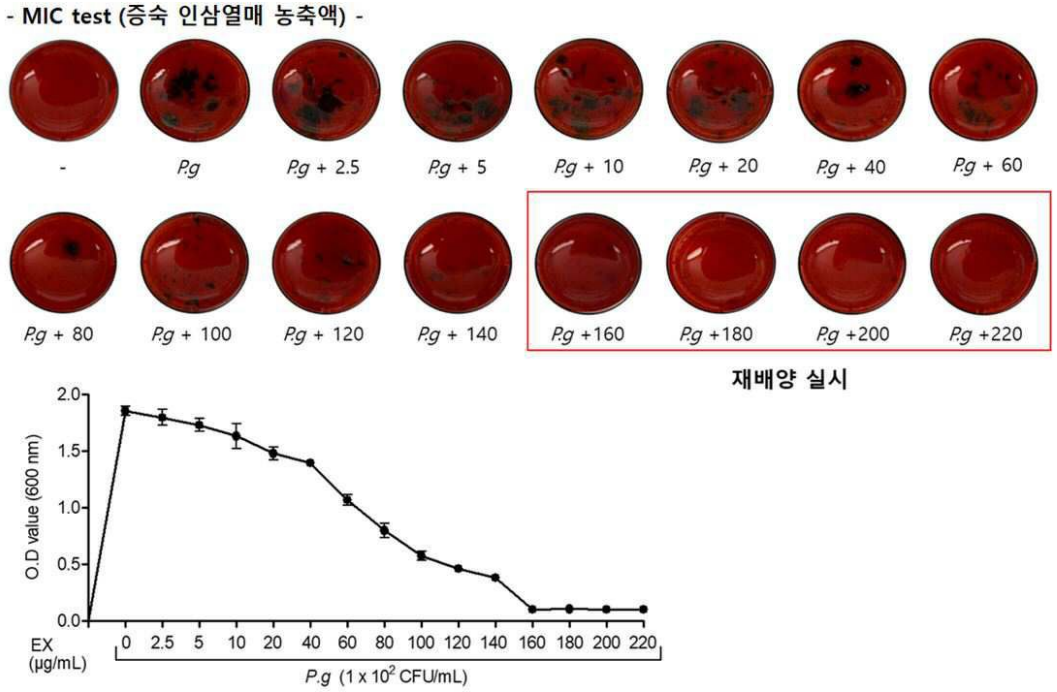
도면4


1. EX
PG- LPS
(μg/mL)
ROS
(DCF-DA)
Relative DCF fluorescence (%)
p < 0.05
EX (μg/mL)
PG-LPS
CAT
SOD
GPx
B-actin
CAT/β-actin
SOD/β-actin
GPx/β-actin
*p<0.05

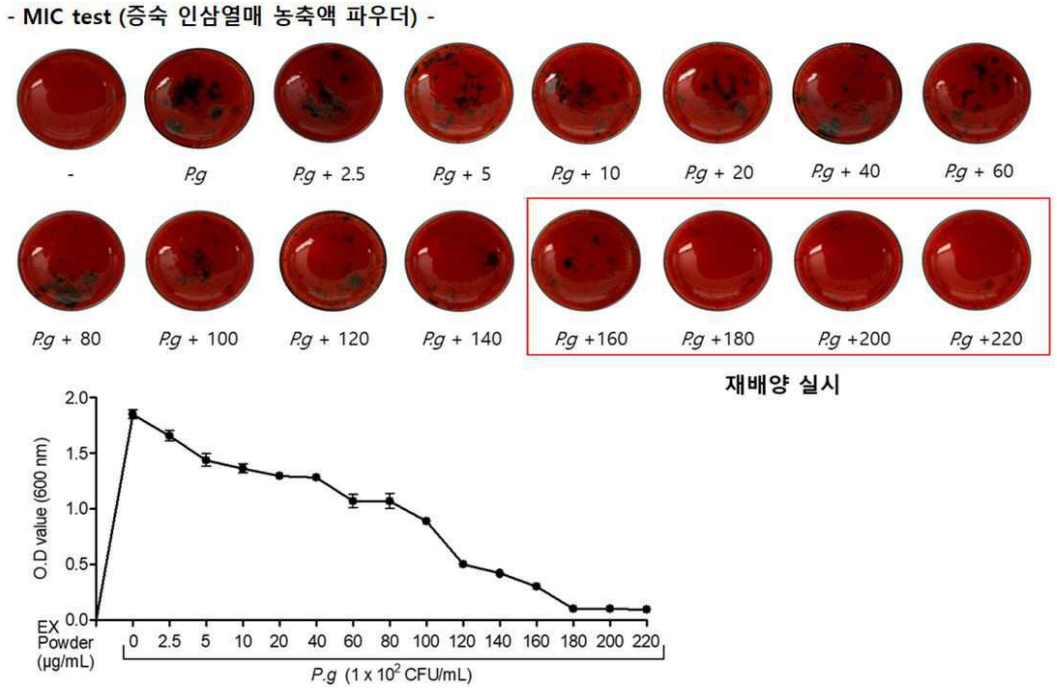
도면5


2. EX powder
PG- LPS
(μg/mL)
ROS
(DCF-DA)
Relative DCF fluorescence (%)
p < 0.05
Powder (μg/mL)
PG-LPS
CAT
SOD
GPx
B-actin
CAT/β-actin
SOD/β-actin
GPx/β-actin
*p<0.05

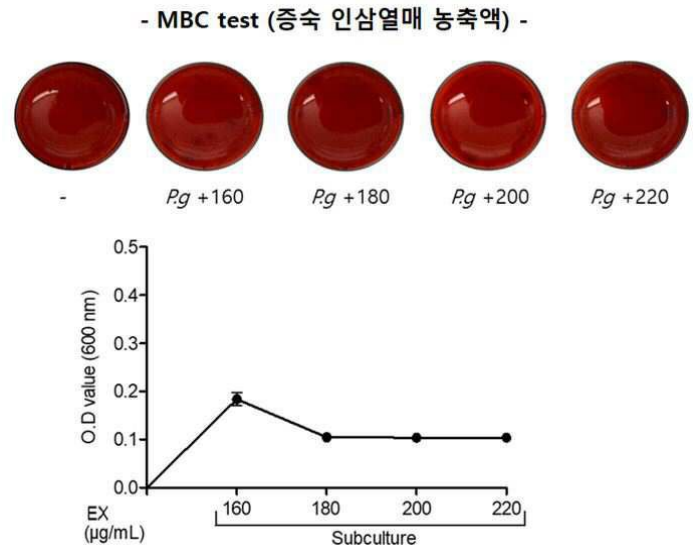
도면6


- MIC test (증숙 인삼열매 농축액) -
-
P.g
P.g + 2.5
P.g + 5
P.g + 10
P.g + 20
P.g + 40
P.g + 60
P.g + 80
P.g + 100
P.g + 120
P.g + 140
P.g +160
P.g +180
P.g +200
P.g +220
재배양 실시
O.D value (600 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
EX (μg/mL)
0 2.5 5 10 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220
P.g (1 x 10² CFU/mL)

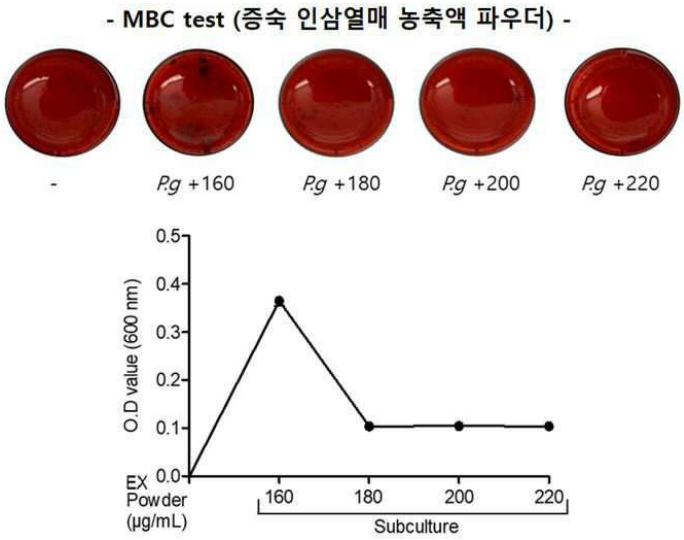
도면7


- MIC test (증숙 인삼열매 농축액 파우더) -
-
P.g
P.g + 2.5
P.g + 5
P.g + 10
P.g + 20
P.g + 40
P.g + 60
P.g + 80
P.g + 100
P.g + 120
P.g + 140
P.g +160
P.g +180
P.g +200
P.g +220
재배양 실시
O.D value (600 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
EX Powder (μg/mL)
0 2.5 5 10 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220
P.g (1 x 10² CFU/mL)

도면8


- MBC test (증숙 인삼열매 농축액) -
-
P.g +160
P.g +180
P.g +200
P.g +220
O.D value (600 nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
EX
(μg/mL)
160
180
200
220
Subculture

도면9


- MBC test (증숙 인삼열매 농축액 파우더) -
-
P.g +160
P.g +180
P.g +200
P.g +220
O.D value (600 nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
EX
Powder
(μg/mL)
160
180
200
220
Subculture