(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0078338
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0135123
(22) 출원일자 2009년12월31일
심사청구일자 2009년12월31일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
정대균
경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교 생명과학관 308호
김태락
경기도 용인시 기흥구 서천동 경희대학교 생명과학관 308호
(74) 대리인
특허법인다울

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 시금치 추출물의 효모발효액을 함유하는 주름 예방 및 노화방지용 피부외용제 조성물

(57) 요 약

본 발명은 시금치 추출물에 효모를 접종하고 배양시켜 얻은 시금치 추출물의 효모발효액을 활성성분으로 함유하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물에 관한 것이다. 상기 시금치 추출물의 효모발효액은 프로콜라겐(procollagen)의 합성을 촉진하고 콜라게네이즈(collagenase)의 생성을 억제하는 효과가 있다.

대 표 도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 RIC 07-06-04
부처명 지식경제부
연구관리전문기관
연구사업명 지역혁신센터 사업
연구과제명 피부생명
기여율
주관기관 경희대 피부생명공학센터
연구기간 2009.07.01~2010.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

시금치 추출물에 효모를 접종하고 배양시켜 얻은 시금치 추출물의 효모발효액을 활성성분으로 함유하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 시금치 추출물의 효모발효액은 프로콜라겐의 합성을 촉진하고 콜라겐네이즈의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 시금치 추출물은 추출 용매 또는 초임계 유체추출법을 통하여 추출물을 획득하는 단계; 및 상기 획득된 추출물을 역삼투압 막에 통과시켜서 탈색시키는 단계;를 거쳐서 얻어지는 것을 특징으로 하는, 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 시금치 추출물은 추출 용매로서 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 트리메틸렌글리콜, 디클로로메탄 및 헥산 중에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 추출함으로써 얻어지는 것을 특징으로 하는, 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 시금치 추출물은 초임계 이산화탄소 및 보조용매로 글리콜을 사용한 초임계 유체추출법을 통해 얻어지는 것을 특징으로 하는, 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 초임계 유체추출법에서 추출 온도는 40℃ 내지 80℃, 추출 압력은 200 내지 400 bar 및 글리콜의 농도는 0.1 내지 5 부피%인 것을 특징으로 하는, 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 효모는 한세눌라 폴리모파(*Hansenula polymorpha*) 또는 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*)로 이루어지는 군으로부터 1 종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 시금치 추출물은 상기 시금치 추출물 및 효모를 포함하는 배양액 총량에 대하여 0.1 내지 10 부피%로 첨가되고, 30℃ 내지 37℃의 온도에서 6 내지 48 시간 배양되는 것을 특징으로 하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 시금치 추출물의 효모발효액은 상기 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 30 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스 및 바디 세정제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형을 가지는 화장료 조성물임을 특징으로 하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 연고 겔, 크림, 패취 및 분무제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형을 가지는 의약용 조성물임을 특징으로 하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 시금치 추출물은 시금치 어린잎 추출물을 사용하는 것을 특징으로 하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시금치 추출물을 이용한 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사람의 피부는 노화가 진행됨에 따라 내적으로 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고 면역세포 및 피부세포의 기능과 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역단백질 및 생체구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되어 생기는 내인성노화(intrinsic aging)가 일어난다.

[0003] 또한, 외적으로 각종 오염물질과 자외선에 의한 광노화로 인해 주름증가, 탄력감소, 피부건조의 증가로 기미, 주근깨 및 건버선 등의 생성으로 인해 노화가 일어나게 된다.

[0004] 피부는 표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있는데, 그 중 진피는 섬유성과 기질 성분으로 구성되어 있으며, 진피의 대부분을 차지하는 콜라겐(collagen)은 피부에 강도와 장력을 주고 피부를 보호하는 역할을 한다.

[0005] 나이가 들어감에 따라 결합조직의 기질 내에서 섬유성분을 합성 분비하는 섬유아세포(fibroblast)의 작용과 세포수의 감소로 인해 섬유성분(콜라겐)의 합성량이 줄어들고 피부세포 내 수분이 손실되며 각질층의 구조가 변화하게 된다.

[0006] 또한, 피부의 주요 구조적 성분인 콜라겐을 분해하는 콜라게네이즈(collagenase)의 작용이 증가하여 콜라겐의 가교된 형태가 증가함으로써 매끄러움, 보습, 팽팽함이 감소하게 된다.

[0007] 따라서, 피부를 구성하는 주요 구조적 성분인 콜라겐(collagen)을 분해하는 MMPs(Matrix metalloproteinase) 생합성을 억제하고, 콜라겐의 전구물질인 프로콜라겐(procollagen) 생성을 촉진 할 수 있는 물질을 이용하여 피부 노화를 완화할 수 있는 천연물에 대한 관심이 고조되고 있다.

[0008] 그 예로 동충하초, 가시오가피, 영지버섯, 녹용, 인삼, 우슬, 당귀, 구기자, 토사자, 차풀, 녹황색 야채 등의 다양한 천연물이 이용되고 있다.

[0009] 녹황색 야채 중 시금치(spinach) 추출물은 세포의 산화스트레스 억제, DNA 손상의 예방 및 감소, 미토콘드리아의 손상과 막 유동성(membrane fluidity) 상실의 수복 및 예방의 기능이 있어서 기능성 화장품의 원료로 이용되고 있다.

[0010] 최근, 소비자의 안티-에이징(anti-aging)에 대한 미적 욕구가 상승함에 따라, 소비자의 항노화 성분이 함유된 제품에 대한 구매 욕구가 커져 가고 있다. 아울러, 이런 기능성 제품에 대한 소비자의 관심이 늘어남에 따라 그 수요량도 급증하고 있다.

[0011] 이에 기능성 제품을 생산하는 업체는 효능이 향상된 주름 개선 및 노화 방지 효과를 갖는 조성물을 이용하여 피부 노화를 완화할 수 있는 천연 소재의 개발에 많은 관심과 투자를 하고 있다.

[0012] 이에 본 발명자들은 천연물을 이용하여 주름 개선 및 노화방지 효능이 보다 향상된 피부외용제 조성물에 대하여 연구하던 중, 시금치 추출물을 효모로 배양하여 얻은 효모발효액이 주름 개선 및 노화 방지 효능이 우수하다는 것을 알게 되어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 시금치 추출물을 이용하여 주름 예방 및 노화방지 효과가 있는 피부외용제 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 시금치 추출물의 효모발효액을 포함하는 주름 예방 및 노화방지 효과가 있는 피부외용제 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 시금치 추출물을 효율적으로 추출하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

[0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시금치 추출물에 효모를 접종하고 배양시켜 얻은 시금치 추출물의 효모발효액을 활성성분으로 함유하는 주름개선 및 노화 방지용 피부외용제 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 시금치 추출물은 물, 에탄올, 글리콜 등 특정용매를 이용한 추출법 이나 초임계 유체추출법을 이용하여 추출할 수 있으며, 상기 효모는 한세눌라 폴리모파 (*Hansenula polymorpha*) 또는 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*)로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택될 수 있다.

[0018] 상기 시금치 추출물은 시금치 어린잎을 이용하여 얻을 수 있다.

[0019] 상기 효모는 안전성 평가에서 GRAS(Generally Recognised As Safe) 등급을 받은 균주로서 시금치 추출물과 효모발효액은 천연 물질로 피부에 사용시 부작용이 적고 안정성은 높다.

[0020] 상기 시금치 추출물은 시금치 추출물 및 효모를 포함하는 배양액 총량에 대하여 0.1 내지 10 부피%로 첨가되고, 30℃ 내지 37℃에서 48 시간 배양될 수 있다. 상기 시금치 추출물이 0.1 부피% 미만으로 첨가되는 경우 시금치 추출물의 효모발효액을 만들기 어렵고, 10 부피%를 초과하는 경우 효모의 생육에 영향을 미치기에 상기 범위 내에서 배양함이 바람직하다.

[0021] 아울러, 상기 온도는 효모가 생육하기 좋은 온도로서 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*)는 30℃, 한세눌라 폴리모파 (*Hansenula polymorpha*)는 37℃가 최적의 생육 조건이다. 또한, 배양 시간이 48 시간을 초과하는 경우에는 발효 생성물에 변화가 없기에 이 시간을 초과하여 배양하는 것은 바람직하지 않을 수 있다.

[0022] 그리고 상기 시금치 추출물의 효모발효액은 상기 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 30 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물이다.

[0023] 상기 시금치 추출물의 효모발효액이 0.001 중량% 미만인 경우 본 발명의 목적을 달성할 수 없는 문제점이 발생할 수 있고, 30 중량%를 초과하는 경우 효모의 생육에 영향을 미치기에 상기 범위 내로 한정함이 바람직하다.

[0024] 아울러, 상기 배양은 회분식 배양(batch culture), 연속배양(continuous culture), 유가배양(fed-batch culture)을 이용할 수 있다.

[0025] 회분식 배양(batch culture)는 초기에 한 번 배지를 채운 후 더 이상의 영양물질을 공급하지도 생산물을 제거하지도 않으면서 세포를 발효시키는 방식이다. 연속배양(continuous culture)은 새로운 영양배지가 반응기에 연속적으로 공급되면서 세포가 발효조에 유출되며 생장과 물질생산이 장기간 유지되는 방식이다.

[0026] 유가배양(fed-batch culture)은 균체 성장이 저해 받지 않도록 초기 당 농도를 낮게 하여 배양을 시작한 후 발효가 진행되면서 필요한 양 만큼의 당을 추가로 첨가해 줌으로써 전 발효과정 중 당 농도를 낮게 유지하면서 미생물을 배양하는 방법이다.

[0027] 이는 기질 저해를 적게 받아 발효공업(제빵 효모, amino acid antibiotics)에 널리 이용된다. 본 발명은 유가배양을 이용하여 효모발효액을 생산하는 것이 좋으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 상기 시금치 추출물의 효모발효액은 콜라겐(collagen)의 전구물질인 프로콜라겐(procollagen)의 합성을 촉진하고 콜라겐의 분해 효소인 콜라게네이즈(collgenase)의 생성을 억제하는 효과를 가진다. 이는 후술하게 될 실시예를 통해 확인 가능하다.

[0029] 또한, 상기 시금치 추출물의 효모발효액은 시금치 추출물의 효모발효액 이외 피부노화 억제 및 피부주름생성 억제효과에 유해한 효과를 끼치지 않는 한, 공지된 피부노화 억제 및 피부주름생성 억제 효과를 갖는 활성 물질을 추가하여 포함할 수 있다. 또한, 효모의 사용으로 보다 환경 친화적이면서도 유효성분을 대량생산할 수 있다는 장점이 있다.

[0030] 한편, 상기 시금치 추출물은 추출 용매 또는 초임계 추출법을 통하여 추출물을 획득하는 단계; 및 상기 획득된 추출물을 역삼투압 막에 통과시켜서 탈색시키는 단계를 거쳐 얻을 수 있다.

[0031] 상기 추출 용매에 의한 추출은 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 트리메틸렌글리콜, 디클로로메탄 및 헥산 중에서 선택된 1종 이상의 용매를 이용할 수 있다.

[0032] 특히, 상기 트리메틸렌글리콜(1,3-Propanediol)을 용매로 사용하는 경우, 이에 물을 첨가하여도 유효성분의 용출 또는 침전현상이 일어나지 않아 주정(ethanol)에 비해 높은 추출 효율을 갖게 된다. 이에 본 발명에서는 트리메틸렌글리콜(1,3-Propanediol)을 사용하였으나 이에 반드시 제한되는 것은 아니다.

[0033] 또 다른 추출방법으로 초임계 유체추출법을 들 수 있다. 여기서 '초임계유체' 란, 상온에서는 기체 상태이지만 임계 온도와 임계 압력 이상에서는 유체인 것을 말한다.

[0034] 보다 상세하게, 초임계 유체추출시 상기 초임계 유체로서 이산화탄소, 질소, 메탄, 에틸렌, 프로판 또는 프로필렌 등을 사용할 수 있다. 특히, 이산화탄소는 대량구입이 가능하고, 비교적 저렴하며, 비폭발성이고, 식품가공용으로 충분히 안전하다는 장점이 있다.

[0035] 하지만, 비극성 성질을 갖는 이산화탄소는 극성 물질을 추출하는 데 한계가 있다. 반면, 글리콜은 극성의 성질을 가지고 있어 시금치 속 극성 물질을 보다 용이하게 추출할 수 있는 특징이 있다.

[0036] 이에 본 발명은 시금치 속 극성 물질과 비극성 물질의 추출 효율성을 높이기 위해 이산화탄소에 보조용매로 글리콜을 사용하여 초임계 추출을 수행하였다.

[0037] 상기 보조용매로 사용되는 글리콜은 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 트리메틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 사용될 수 있다. 본 발명에서는, 특히 트리메틸렌글리콜(1,3-Propanediol)이 바람직하나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 상기 임계 추출 온도는 40℃ 내지 80℃, 추출 압력은 200 내지 400 bar, 글리콜의 농도는 0.1 내지 5 부피% 인 것을 특징으로 한다.

[0039] 보다 상세하게, 상기 온도가 40℃ 미만인 때에는 초임계 이산화탄소가 잘 형성되지 않을 염려가 있고, 80℃를 초과하는 때에는 열에 민감한 유효성분이 파괴될 우려가 있어 상기 범위 내에서 추출한다. 추출압력이 200 bar 미만인 때에는 초임계 이산화탄소가 잘 형성되지 않을 염려가 있고, 400 bar를 초과하는 때에는 추출 수율의 증가와는 상관없이 불필요하게 압력을 높이는 결과가 되어 공정비용이 증가하는 문제가 있다. 따라서, 상기 범위 내에서 추출함이 바람직하다.

[0040] 또한, 글리콜 농도가 0.1 부피% 미만인 경우에는 시금치 속 극성 물질을 추출하기 어렵고, 5 부피%를 초과하는

경우에는 최대치 유효성분 추출량의 변화가 없기에 상기 범위 내에서 추출하는 것이 바람직하다. 즉, 상기 범위는 보조용매의 사용량을 최소로 하고 유효성분을 최대로 추출할 수 있는 범위인 것이다.

[0041] 다시 말해, 시금치 추출물은 특정 추출용매를 이용하거나 초임계 유체추출을 이용할 수 있다. 다음으로, 본 발명에 따른 시금치 추출물은 천연물 소재의 상품을 제작하기 위해 탈색을 하여야 하는바, 후속공정으로 역삼투압-막분리 공정을 통해, 시금치 추출물을 탈색할 수 있다.

[0042] 일반적으로 용해된 물질은 다양한 종류의 선택적인 막을 이용하여 그 용매로부터 분리할 수 있는바, 이러한 막의 일례로 정밀여과막, 한외여과막, 나노분리막, 역삼투분리막 등이 있다. 그 중 역삼투분리막을 이용한 분리는 에너지 소비량이 적고, 운전이 간편하며, 자동화가 용이하다는 장점이 있다.

[0043] 이에 본 발명은 역삼투압-막분리 공정을 이용한다. 이로써, 시금치 추출물 속 분자량이 작은 유효성분도 분리 및 농축될 수 있으며, 탈색 및 탈염도 함께 진행되어 목적 물질을 보다 효율적으로 제작할 수 있다.

[0044] 결국, 상기 추출방법에 의해 추출된 시금치 추출물에 효모를 접종하여 얻은 효모발효액은 주름 개선 및 노화 방지용 피부외용제 조성물을 제공할 수 있다.

[0045] 보다 상세하게, 상기 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스 및 바디 세정제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형을 가지는 화장료 조성물로 이용될 수 있다.

[0046] 또한, 상기 조성물은 연고 겔, 크림, 패취 및 분무제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형을 가지는 의약용 조성물로 이용될 수 있다.

[0047] 상기 화장료로 조성물로 사용시 화장료의 제형에 맞게 물질을 더 첨가할 수 있다. 예를 들어, 정제수, 보습제, 유분, 계면활성제, 고급 알코올, 중저점제, 킬레이트제, 색소, 지방산, 산화방지제, 방부제, 왁스, pH조절제, 향료 등이 첨가될 수 있다.

[0048] 상기 보습제로는 글리세린, 프로필렌 글라이콜, 부틸렌 글라이콜, 헥실렌 글라이콜, 디글리세린, 솔비톨, 베타인, 글리세레스-26 등이 사용될 수 있다.

[0049] 상기 유분으로는 미네랄오일, 사이클로메치콘, 스쿠알란, 옥틸도데실 미리스테이트, 올리브오일, 마카다미아 너트오일, 글리세릴 옥타노에이트, 캐스터오일, 에칠헥실 이소노나노에이트, 디메치콘, 사이크로펜타실록산, 선플라워씨드오일 등이 사용될 수 있다.

[0050] 상기 계면활성제로는 소르비탄세스퀴놀리에이트, 폴리솔베이트 60, 글리세릴 스테아레이트, 친유형 글리세릴스테아레이트, 소르비탄 올리에이트, 소르비탄 스테아레이트, 디에이-세틸포스페이트, 소르비탄스테아레이트/슈크로스코코에이트, 글리세릴스테아레이트/폴리에틸렌글라이콜-100 스테아레이트, 세테아레스-6 올리베이트, 라키딜알코올/베헤닐알코올/아라키딜 글루코사이드, 폴리프로필렌글라이콜-26-부테스-26/폴리에틸렌글라이콜-40 하이드로제네이티드 캐스터오일 등이 사용될 수 있다.

[0051] 상기 고급 알코올로는 세틸알코올, 스테아릴 알코올, 옥틸도데칸올, 이소스테아릴 알코올 등이 사용될 수 있다.

[0052] 상기 중저점제로는 산탄검, 카보머, 마그네슘알루미늄실리케이트, 셀룰로오스검, 덱스트린 팔미테이트 등이 사용될 수 있다.

[0053] 상기 킬레이트제로는 디소듐이디티에이, 테트라소듐이디티에이 등이 사용될 수 있다. 상기 색소로는 청색1호, 적색40호, 황색4호, 황색 5호 등이 사용될 수 있다.

[0054] 상기 지방산으로는 스테아릴애씨드, 미리스틱애씨드, 팔미틱애씨드, 이소스테아릭애씨드, 라우릭애씨드 등이 사용될 수 있다.

[0055] 상기 산화방지제로는 토코페릴아세테이드, 부틸레이티드하이드록시톨루엔 등이 사용될 수 있다.

[0056] 상기 방부제로는 메칠파라벤, 부틸파라벤, 프로필파라벤, 페녹시에탄올, 이미다졸리디닐우레아, 클로르페네신등이 사용될 수 있다.

[0057] 상기 왁스로는 카나우바왁스, 칸데닐라왁스, 밀납, 경납 등이 사용될 수 있다.

[0058] 상기 pH조절제로는 트리에탄올아민, 씨트릭애씨드 등이 사용될 수 있다.

[0059] 상기 향료로는 천연향료, 조합향료 등이 사용될 수 있다.

[0060] 본 발명의 조성물로 제조되는 화장료의 제형은 화장수, 에센스, 로션, 젤, 크림 등 특별히 제한을 받지 않는다.

효 과

[0061] 본 발명은 시금치 추출물 및 그 효모발효액을 이용하여 주름 예방 및 노화 방지 효능이 있는 피부외용제 조성물을 제공하는 효과를 가진다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0062] 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0063] **실시예 1: 시금치 추출물의 제조**

[0064] **1-1: 트리메틸렌글리콜(1,3-Propanediol)을 이용한 시금치 추출물 제조**

[0065] 시중에서 구입한 시금치 분말 1 g에 트리메틸렌글리콜(1,3-Propanediol, PD, Dupont, 미국) 100 ml를 첨가하여 20 시간 상온에서 교반하였다. 상기 교반이 끝난 물질을 여과지를 이용하여 여과하였고, 고속액체크로마토그래피(HPLC)(C-18/258nm/Acetonitrile, Agilent)를 이용하여 추출물의 패턴을 비교하였다.

[0066] **1-2: 열수수출법을 이용한 시금치 추출물 제조**

[0067] 트리메틸렌글리콜(1,3-Propanediol) 대신 열수(40℃) 100 ml을 첨가한 것을 제외하는 상기 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여 시금치 추출물을 얻었고, 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 고속액체크로마토그래피를 이용하여 추출물의 패턴을 비교하였다.

[0068] 도 1에 나타난 것과 같이, 실시예 1-1의 글리콜(1,3-Propanediol) 추출물과 실시예 1-2의 열수추출에서 각각 특징적인 성분들이 나타났음을 알 수 있다. 즉, 열수추출하여 성분 분석한 32-1(Spinch1+DWext) 및 33-1(Spinch 2+DWext)과; 및 글리콜(1,3-Propanediol) 추출하여 성분 분석한 30-1(Spinch2+PDext) 및 31-1(Spinch2+PDext)의 피크 패턴을 확인할 수 있다. 본 발명에서 이 추출물들은 모두 효모발효 반응의 원료로 이용된다. 그리고 시금치 추출물의 효모발효액은 모두 주름 예방 및 노화 방지에 효능이 있다.

[0069] **실시예 2: 초임계 유체추출법을 이용한 시금치 추출물의 제조**

[0070] 초임계 유체추출조건은 아래 표 1과 같이 8 종으로 진행하였으며 초임계 유체로 이산화탄소와 글리콜(1,3-Propanediol)을 사용하여 온도, 압력 변화에 따라 추출하였다. #1 내지 #8의 조건으로, 시료 (시금치분말) 2.5 g을 사용하여 추출하고, 추출물은 에탄올과 MC(methylene chloride)를 사용하여 용해시킨 후 건조하였다.

[0071] [표 1] 1차 초임계 유체추출 조건

[0072]

시료	T(℃)	P(bar)	Modifier (PD,% v/v)	Extraction Time (min)	샘플 weight
#1	40	250	-	180	2.5
#2		400	-	180	2.5
#3		400	-	180	2.5
#4		400	5	180	2.5
#5	80	250	-	180	2.5
#6		400	-	180	2.5
#7		400	5	180	2.5
#8	60	400	-	180	2.5

[0073] 상기 표 1의 결과를 통해, 추출 온도 40℃ 내지 80℃, 추출 압력 200 내지 400 bar에서 추출효율이 높음을 알 수 있다. 또한, 글리콜을 보조 용매로 사용시 추출 효율이 상대적으로 더 높음을 알 수 있다.

[0074] 위 1차 추출 조건의 재현성을 확인하고 좀 더 구체적인 초임계 추출조건을 확보하기 위하여, 1차 추출시 사용한 시료(시금치분말)를 이용하여 아래 표 2의 조건으로 2차 추출을 진행하였다.

[0075] 아래 표 2에서 "1-1, 1-2"의 샘플 번호의 의미는, 많은 양의 시료 (시금치분말)를 사용하였기 때문에 1번 시료를 동일한 조건으로 동일한 조건으로 2회에 걸쳐서 추출한 것을 의미한다. "2-1, 2-1, 3-1 및 3-2"의 시료 번호의 의미도 동일하다. 2차 추출 결과, 초임계 추출물에 사용한 원물 대비 약 2% 수준의 추출물을 획득하는 조건을 확보하였다. 도 2는 초임계 유체추출물 1차(a), 2차(b) 샘플 사진이다.

[0076] [표 2] 2차 초임계 유체추출 조건

[0077]

# Samples	T(℃)	P(bar)	CO_2 flowrate (ml/min)	Modifier (PD,% v/v)	CO_2 Used (g)	Extract Weight (g)	추출샘플 사용무게 (g)	추출물(g)/샘플(g)
1-1	40	400	2.85	0.15	564	0.1697	9	0.0298
1-2	40	400	2.85	0.15	564	0.0985		
2-1	60	400	3	-	593.7	0.1252	12	0.0210
2-2	60	400	3	-	593.7	0.1265		
3-1	80	250	3	-	572	0.1337	12	0.0213
3-2	80	250	3	-	572	0.1222		
4	60	250	3	-	572	0.0627	3	0.0209
5	60	250	0.5	-	95.4	0.0514	3	0.0171

[0078] **실시예 3: 시금치 추출물의 효능 테스트**

[0079] **3-1: 초임계 유체 추출물의 프로콜라겐 합성 촉진 활성 테스트**

[0080] 인간 유래 HDF (human dermal fibroblast) cell(Modern Cell & Tissue Technologies)을 페니실린 (100 units/㎖), 스트렙토마이신 (100 ㎍/㎖), 10% FBS가 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(WelGENE, Inc. 한국)를 첨가하여 5% 이산화탄소를 포함하는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양한 섬유아세포를 48웰 플레이트(well plate)에 5 X 10^4 cells/ml의 농도로 200 ㎕씩 접종하여 24시간 배양하였다.

[0081] 24 시간 배양시킨 섬유아세포를 PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 1회 세척 후 무혈청 DMEM 배지(serum free -Dulbecco's Modified Eagle Medium)(WelGENE, Inc. 한국)로 교환하여 6 시간 동안 배양하였다. 섬유아세포의 배지를 제거하여 PBS로 1회 세척한 후 무혈청 DMEM 배지(WelGENE, Inc. 한국)에, DMSO 에 녹인 초임계 유체추출물을 10 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖의 농도로 희석하고 200 ㎕씩 처리하여 72 시간 동안 배양하였다. 배양액을 수거하여 프로콜라겐(procollagen)을 측정하였다.

[0082] 프로콜라겐(procollagen)은 프로콜라겐 생합성 정도를 측정할 수 있는 프로콜라겐 타입 I-펩타이드 EIA 키트(procollagen Type I C-Peptide EIA, Takara Biomedical Co.)을 사용하여 사용법에 따라 측정한다.

[0083] 대조군으로서, 초임계 유체 추출물을 첨가하지 않고 섬유아세포 배양한 배지(media) 및 성장촉진인자(TGF-beta)가 포함된 배지에 섬유아세포를 배양한 것을 사용하였다.

[0084] 도 3를 통해, 본 발명에 따른 1차 추출물 중 #1 내지 #8 초임계 유체추출물에는 프로콜라겐 합성을 촉진하는 효능이 있음을 알 수 있다.

[0085] 특히, #4, #7 및 #8 샘플의 섬유아세포가 프로콜라겐(procollagen)을 더욱 많이 합성하였음을 확인할 수 있다.

[0086] **3-2: 초임계 유체 추출물의 세포독성 테스트 (Cytotoxicity Test)**

[0087] 인간 유래 HDF (human dermal fibroblast) cell(Modern Cell & Tissue Technologies)을 페니실린 (100 units/㎖), 스트렙토마이신 (100 ㎍/㎖), 10 % FBS(fetal bo-vine serum)가 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium)를 첨가하여 5% 이산화탄소를 포함하는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양한 섬유아세포를 96웰 플레이트(well plate)에 1 X 10^4 cells/ml의 농도로 200 ㎕씩 접종하여 24시간 배양하였다.

[0088] 배지를 제거한 후 PBS로 1회 세척한 섬유아세포에 무혈청 DMEM 배지(serum free -Dulbecco's Modified Eagle Medium, WelGENE, Inc. 한국)에 10 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖의 농도로 희석한 초임계 유체추출물을 200 ㎕씩 처리하여 20 시간 배양하였다. 각 처리군의 세포 배양액을 제거하고, PBS로 1회 세척 한 뒤, 세포의 증식이나 생존을 측정하는 방법(Western blot analysis)에서 사용되는 WST-1용액을 1/10로 무혈청 DMEM 배지에 희석하여 200 ㎕씩 첨가하여 1~6 시간 동안 배양한다.

[0089] 그 후 단백질 정량, 항체에 효소를 결합시켜 항원-항체 반응을 확인하는 방법(ELISA) 등을 한 번에 분석할 수 있는 장치인 마이크로플레이트-리더(microplate-reader; TECAN Group Ltd, 스위스)를 이용하여 450~590 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0090] 도 4를 참고하여 볼 때, 대조군 배지(medium) 및 세포의 분화를 결정하는 데 중요한 역할을 하는 TGF-beta(성장촉진인자)가 존재하는 배지에서 자란 섬유아세포가 생산한 배양액의 세포독성도 수치와 #1 내지 #8 샘플의 세포독성도 수치를 비교시, 대조군과 #1 내지 #8 샘플의 독성도가 유사하게 나옴을 알 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 추출물은 세포독성이 거의 없다고 볼 수 있다.

[0091] **실시예 4: 역삼투압-막분리 공정을 통해 얻은 추출물의 효능 테스트**

[0092] **4-1: 역삼투압-막분리 공정을 이용한 추출물 제조**

[0093] 실시예 1-1에서 얻은 추출물을 역삼투압-막(PHILOSEP Membrane System, PHILOS, 한국)을 통과시켜서 탈색된 추출물을 얻었다(도 5의 우측 분획물 참고). 이와 같이 수집한 추출물을, 이 기술 분야에서 널리 알려진 방법인, 감압 증류법을 통하여 농축하였다.

[0094] **4-2: 프로콜라겐 합성 촉진 활성 테스트**

[0095] 상기 4-1에서 얻은 추출물의 효능을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 인간 유래 HDF(human dermal fibroblast, Modern Cell & Tissue Technologies) 세포를 페니실린(100 units/㎖), 스트렙토마이신(100 ㎍/㎖). 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 첨가하여 5% 이산화탄소를 포함하는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양한 섬유아세포를 48웰 플레이트(well plate)에 5 X 10^4 cells/ml의 농도로 200 ㎕씩 접종하여 24시간 배양하였다.

[0096] 24 시간 배양시킨 섬유아세포를 PBS로 1회 세척 후 무 혈청 DMEM 배지(WelGENE, Inc. 한국)로 교환하여 6 시간 동안 배양하였다. 섬유아세포의 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척 한 후 무혈청 DMEM 배지 (WelGENE, Inc. 한국)에, DMSO에 녹인 막분리 분획물을 10 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖의 농도로 희석하고 200 ㎕씩 처리하여 72 시간 동안 배양한다.

[0097] 배양액을 수거하여 프로콜라겐을 측정한다. 프로콜라겐은 프로콜라겐 생합성 정도를 측정할 수 있는 프로콜라겐 타입 I-펩타이드 EIA 키트(Takara Biomedical Co., 일본)를 사용하여 기계의 사용 방법에 따라 수치를 측정하였다.

[0098] 또한, 실시예 1-1에서 얻은 시금치 추출물을 이용하여 상기 언급한 것과 같이 섬유아세포를 배양한 후 프로콜라겐 생합성 정도를 측정하였다.

[0099] 대조군으로서, 시금치 추출물을 첨가하지 않고 섬유아세포만 배양한 배지(media)와, DMSO 0.1% 배지, 피리딘(pyridine) 0.1% 배지 및 성장촉진인자(TGF-beta)가 포함된 배지 각각에 섬유아세포를 배양한 것을 사용하였다.

[0100] 도 6을 통해 배양액에 시금치 추출물이나 역삼투압-막분리 공정을 통한 추출물을 넣어 섬유아세포를 배양한 경우, 프로콜라겐(procollagen)의 합성이 높았다. 이로써, 역삼투압-막분리 공정을 통해 얻은 추출물에는 프로콜

라겐 합성 촉진할 수 있는 물질이 상대적으로 더 많이 포함되어 있음을 알 수 있다.

[0101] **4-3: 세포독성 테스트**

[0102] 인간 유래 HDF(human dermal fibroblast, Modern Cell & Tissue Technologies) 세포를 페니실린(100 units/㎖), 스트렙토마이신(100 ㎍/㎖), 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 첨가하여 5% 이산화탄소를 포함하는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양한 섬유아세포를 96웰 플레이트(well plate)에 1 X 10^4 cells/ml의 농도로 200 ㎕씩 접종하여 24시간 배양한다. 배지를 제거한 후 PBS로 1회 세척 한 후 무혈청 DMEM 배지(WelGENE, Inc. 한국)에, DMSO에 녹인 초임계 유체추출물을 10 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖의 농도로 희석하고 200 ㎕씩 처리하여 20 시간 배양하였다.

[0103] 각 처리군의 세포 배양액을 제거하고, PBS로 1회 세척 한 뒤, WST-1용액을 1/10로 무혈청 DMEM 배지에 희석하여 200 ㎕씩 첨가하여 1~6 시간동안 배양하였다. 그 후 마이크로플레이트-리더기를 이용하여 450~590 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0104] 도 7을 통해 역삼투압-막분리 공정을 거친 분획의 세포독성도(Cytotoxicity)와 다른 대조군에서 나타낸 세포독성도 정도와 유사한 것으로 보아, 역삼투압-막분리 공정을 통해 얻은 시금치 추출물 분획은 세포독성도에 대한 안정성이 인정됨을 알 수 있다.

[0105] **실시예 5: 시금치 추출물의 효모발효액의 효능 테스트**

[0106] **5-1: 시금치 추출물의 효모발효액 제조**

[0107] GRAS 등급을 받은 산업용 효모로서 인비트로젠사(미국)에서 판매하는 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*)(Invitrogen, Cat. No. K1740-01)를 구입하여, 배지(glycerol 10 g/l, yeast nitrogen base without amino acid 13.4 g/l, biotin 4 g/l)에서 종배양하였다. 그 다음 상기 배양 효모가 포함된 복합배지(효모 추출물 2 중량%, 글리세롤 1 중량% 포함)에 실시예 1-2에서 얻은 시금치 열수추출물을 배양액 총량에 대하여 10 %(v/v) 함유되도록 첨가하여 유가배양(fed-batch) 시스템을 이용하여 30℃에서 48 시간 배양하였다.

[0108] **5-2: 시금치 추출물의 효모발효액의 콜라게네이즈(Collagenase) 발현 저해 효과 측정**

[0109] 인간 유래 각질 형성 세포주 HaCaT 세포(아모레퍼시픽 주식회사, 한국)를 페니실린(100 IU/ml), 스트렙토마이신(100 g/ml), 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 넣고 5% 이산화탄소를 포함하는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양한 각질 형성 세포를 96웰 플레이트(well plate)에 1 X 10^4 cells/ml로 접종하여 1일 배양하였다.

[0110] 배양 후 배지를 제거한 다음, 실시예 5-1 과정을 통해 생산된 시금치 추출물의 효모발효액 및 유산균 파쇄액(도 8의 1 내지 3)을 각각 10 /ml과 100 /ml의 농도로 DMEM 배지에 첨가하여 20시간 배양하였다.

[0111] 그 후, 콜라게네이즈(MMP-1)의 발현을 유도하기 위하여, 배지를 제거한 후 세포 배양에 사용되는 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)를 넣고, UV-B를 15 mJ로 조사하였다.

[0112] 24 시간 배양 후, 배지를 수거하였다. 단백질 추출실험 브래드포드 어세이(Bradford Assay)를 통하여 총 단백질량을 정량한 후, 각 처리군의 총 단백질량을 보정하여 웨스턴 블랏용 시료를 제조하였다. 준비한 시료는 10% 단백질 전기영동(SDS-PAGE)에서 단백질의 크기에 따라 분리되고, 이는 멤브레인으로 옮겨, 항체(MMP-1 항체로서 Human MMP-1 Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat Ig, R&D systems 및 2차 항체로서 donkey anti-goat IgG-HRP, Santa cruz biotechnology)를 사용하여 엑스레이 필름에서 가시화시켰다.

[0113] 도 8를 통해, 대조군과 #1 내지 #3 샘플의 띠의 굵기를 비교하여 볼 때 #1 내지 #3 샘플은 모두 콜라게네이즈의 생성이 억제되었음을 알 수 있다.

[0114] 상기 실시예를 통해 시금치 추출물의 효모발효액은 프로콜라겐(procollagen)의 합성을 촉진하고 콜라게네이즈(Collagenase)의 생성을 억제하여 효능이 더욱 개선된 주름 예방 및 노화 방지용 피부외용제 조성물을 구현할 수 있음을 알 수 있다.

[0115] **제조예 1: 효모발효액을 포함하는 화장료**

[0116] **A. 효모발효액을 함유한 화장수**

[0117] a) 유연 화장수

[0118] 효모발효액을 함유한 유연 화장수의 제조예는 하기 표1에 나타낸 바와 같다. 수성 성분에 정제수를 가하고 실온에서 용해시켜 수상을 제조한다. 효모발효액, 유상성분, 유화제, 방부제, 향을 실온에서 용해시킨 후, 수상에 첨가하여 혼합하고 여과한다.

[0119] [표 3]

[0120]

성분	함량 (중량%)
효모발효액	0.10
EDTA	0.05
피이지 1500	4.00
카보머	0.16
1,3 부틸렌 글라이콜	3.00
폴리옥시에틸렌 하이드로제네이티드 캐스터오일	0.45
트리에탄올아민	0.12
프로필파라벤 및 인공향료 및 황색 4호	0.10
정제수	92.02
합계	100

[0121] b) 수렴 화장수

[0122] 효모발효액을 함유한 유연 화장수의 제조예는 하기 표2에 나타낸 바와 같다. 수성 성분에 정제수를 가하고 실온에서 용해시켜 수상을 제조한다. 효모발효액, 유상성분, 유화제, 방부제, 향에 에탄올을 가하여 실온에서 용해시켜 알코올 상을 제조한 다음 수상에 첨가하여 혼합하고 여과한다.

[0123] [표 4]

[0124]

성분	함량 (중량%)
효모발효액	0.10
EDTA	0.05
글리세린	2.00
에탄올	7.00
1,3 부틸렌 글라이콜	3.00
폴리옥시에틸렌 하이드로제네이티드 캐스터오일	0.40
프로필파라벤 및 인공향료 및 황색 4호	0.10
정제수	86.35
합계	100

[0125] **B. 로션**

[0126] 효모발효액을 함유한 로션의 제조예는 하기 표3에 나타낸 바와 같다. 수상인 정제수, 트리에탄올 아민, 부틸렌 글리콜을 70℃로 가열하여 용해시키고, 여기에 유상인 지방산, 유성성분, 유화제 및 방부제를 70℃로 가열하여 용해한 액을 첨가하여 유화시킨다. 유화가 완료된 후 친수성 증점제인 산탄검 2% 용액을 첨가하여 전체에 대해 0.05 중량%가 되도록 조절한다. 상기 용액을 45℃로 냉각시킨 후, 효모발효액, 향 및 색소를 첨가하고 혼합한 다음 30℃로 냉각한다.

[0127] [표 5]

[0128]

성분	함량 (중량%)
효모발효액	0.10
글리세린	3.00
카보머	0.10
산탄검	0.05
1,3 부틸렌 글라이콜	3.00
폴리글리세린-3 메칠글루코스 디스테아레이트일	1.50
글리세린 스테아레이트	0.50
세테아릴 알코올	0.30
호호바 오일	3.00
유동 파라핀	2.00
스쿠알란	3.00
디메치콘	0.50
토코페릴아세테이트	0.20
트리에탄올아민	0.10
프로필파라벤 및 인공향료 및 황색 4호	0.10
정제수	82.55
합계	100

[0129] C. 겔

[0130] 효모발효액을 함유한 겔의 제조예는 하기 표4에 나타낸 바와 같다.

[0131] [표 6]

[0132]

성분	함량 (중량%)
효모발효액	0.10
글리세린	5.00
카보머	0.60
EDTA	0.02
1,3 부틸렌 글라이콜	4.00
하이드록시에틸 셀룰로오스	0.15
트리에탄올 아민	0.50
트리클로산	0.20
에탄올	5.00
폴리옥시 에틸렌 하이드로제네이티드 캐스터오일	4.00
프로필파라벤 및 인공향료 및 황색 4호	0.10
정제수	80.33
합계	100

[0133] D. 에센스

[0134] 효모발효액을 함유한 에센스의 제조예는 하기 표5에 나타낸 바와 같다. 정제수에 점증제를 천천히 교반하면서 가하여 균일하게 분산시킨다. 수상 성분들을 혼합하여 수상을 제조한다. 유화제, 피부 유연제, 향, 방부제에 에탄올을 가하여 용해시킨다. 수상에 알코올상을 교반하면서 가하고 알칼리제를 첨가한다. 최종적으로 효모발효액과 색소를 첨가한다.

[0135] [표 7]

[0136]

성분	함량 (중량%)
효모발효액	0.10
EDTA	0.05

포타슘-세틸포스페이트	0.30
글리세린	5.00
1,3 부틸렌 글라이콜	4.00
글리세릴스테아레이트/피이지-100 스테아레이트	0.50
소르비탄 스테아레이트	0.30
마카데미아 넛 오일	0.50
호호바 오일	0.50
토코페릴에사테이트	0.50
부틸레이티드하이드록시 톨루엔	0.50
디메치콘	3.00
폴리아크릴아마이드/C13-14 이소파라핀/라우레쓰-7	1.50
글리세릴폴리메타아크릴레이트/프로필렌 글라이콜	5.00
에탄올	3.00
프로필파라벤 및 인공향료 및 황색 4호	0.10
정제수	75.15
합계	100

[0137] **E. 효모발효액을 함유한 크림**

[0138] 효모발효액을 함유한 영양 크림의 제조예는 하기 표6에 나타낸 바와 같다. 수상인 정제수, 트리에탄올아민, 글리콜(1,3-Propanediol)을 70℃로 가열하고 용해시키고, 여기에 유상인 지방산, 유성성분, 유화제 및 방부제를 70℃로 가열하여 용해한 액을 첨가하여 유화시킨다. 유화가 완료된 후 상기 용액을 45℃로 냉각시키고 효모발효액과 향을 첨가하고 분산시킨 다음 30℃로 냉각한다.

[0139] [표 8]

[0140]

성분	**함량 (중량%)**
효모발효액	0.10
호호바 오일	5.00
유동파라핀	7.00
세틸아릴 알코올	2.00
폴리글리세릴-3 메칠 글루코스 디스테아레이	2.00
글리세릴스테아레이트	0.50
스쿠알란	3.00
프로필렌글리콜	4.00
글리세린	5.00
트리에탄올 아민	0.30
카르복시 비닐폴리머	0.30
토코페릴 아세테이트	0.20
프로필파라벤 및 인공향료 및 황색 4호	0.10
정제수	70.5
합계	100

[0141] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0142] 도 1은 시금치 열수추출물 및 글리콜 추출물을 고속액체크로마토그래피(HPLC) 패턴을 비교한 것이다.

[0143] 도 2는 1차 초임계 유체추출 조건 하에서의 #1 내지 #8 샘플의 사진(a) 및 2차 초임계 유체추출 조건 하에서의 #1-1 내지 #5 샘플의 사진(b)이다.

[0144] 도 3는 초임계 유체추출물의 프로콜라겐 합성 촉진 활성 실험 결과이다.

[0145] 도 4는 초임계 유체추출물의 세포독성 실험 결과이다.

[0146] 도 5는 막분리 공정 전(좌측), 후(우측) 분획 비교 그림이다.

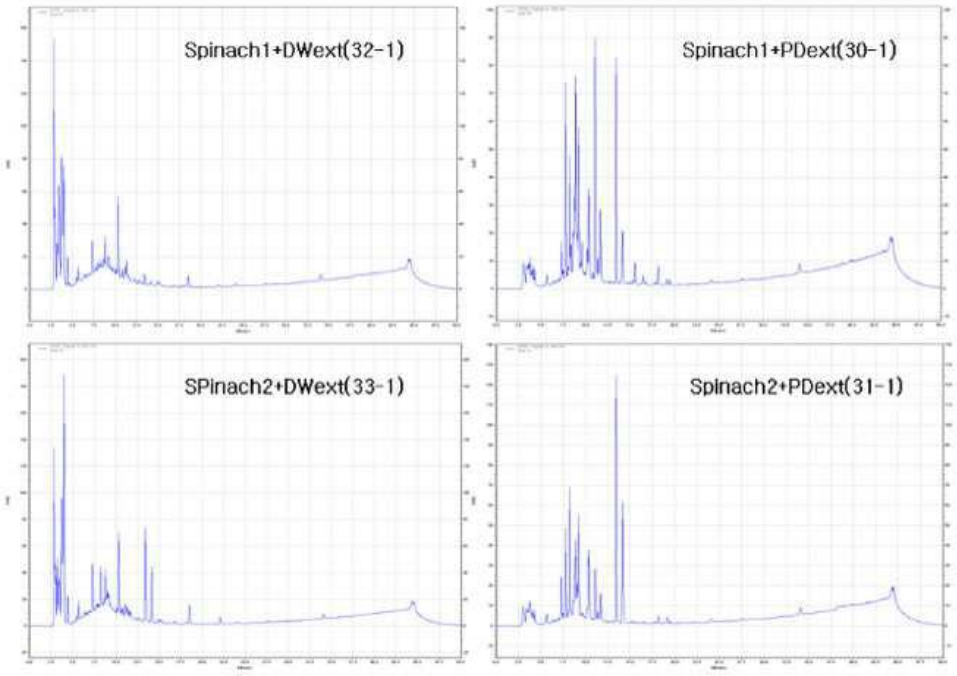
[0147] 도 6는 역삼투압 막 통과 분획의 프로콜라겐 합성 촉진 활성 검사 결과이다.

[0148] 도 7은 역삼투압 막 통과 분획의 세포독성 실험 결과이다.

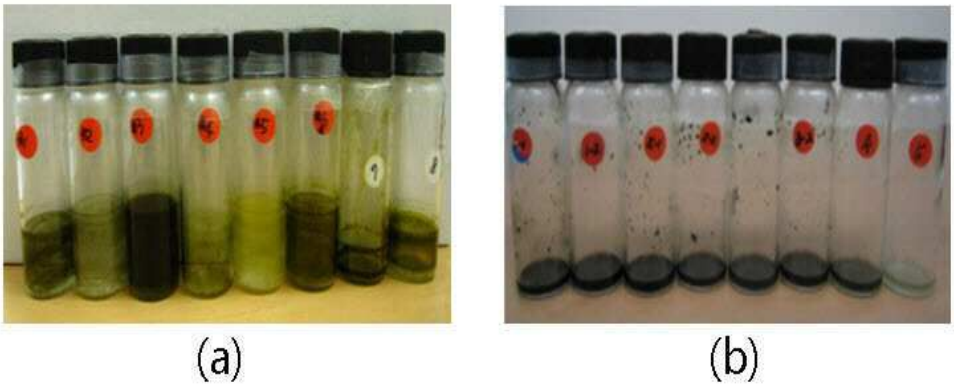
[0149] 도 8은 효모발효액을 첨가한 배지에 균주에 따른 MMP-1 발현을 가시화한 엑스레이 필름 결과이다: 1은 *L. bulcaricus* (KCTC 3188)이고, 2는 *L.casei*(KCTC3109)이고, 3은 *P.pastoris*(Invitrogen, Cat. No. K1740-01)임.

도면

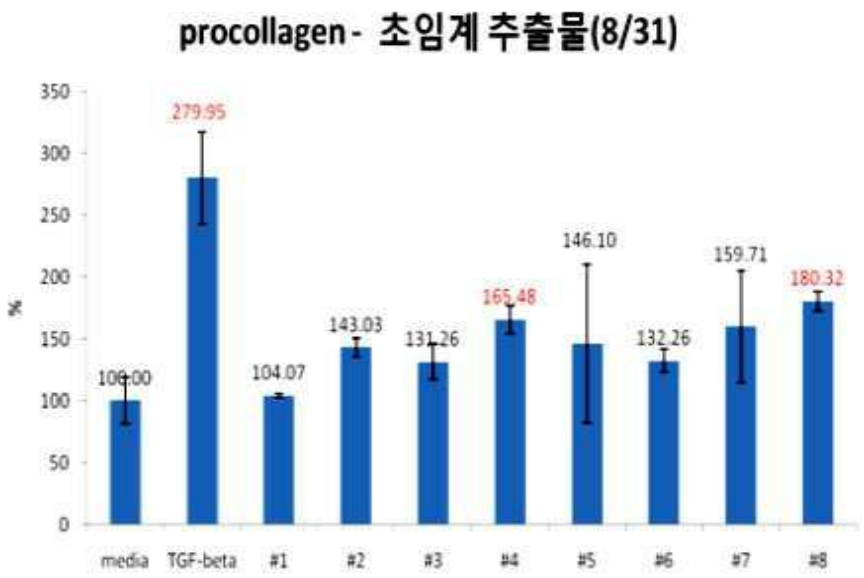
도면1



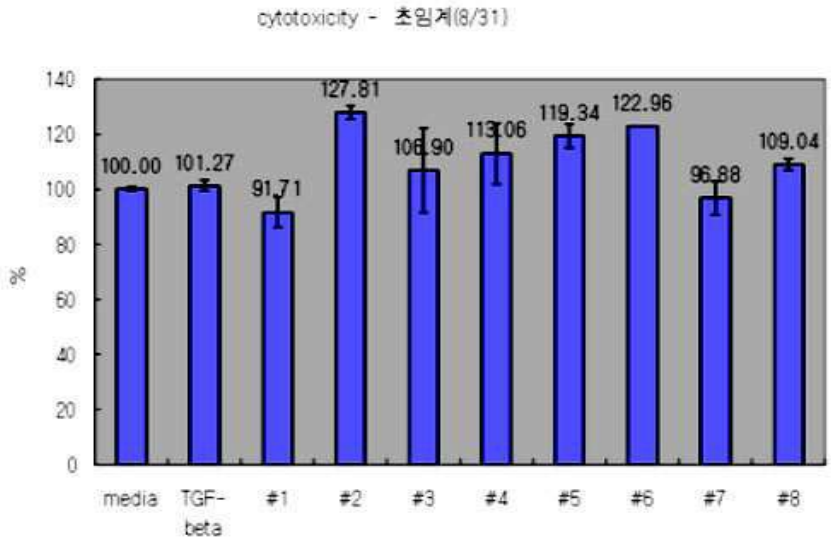
도면2



도면3


procollagen - 초임계 추출물(8/31)
%
350
300
250
200
150
100
50
0
279.95
146.10
159.71
180.32
165.48
143.03
131.26
132.26
104.07
media
TGF-beta
#1
#2
#3
#4
#5
#6
#7
#8

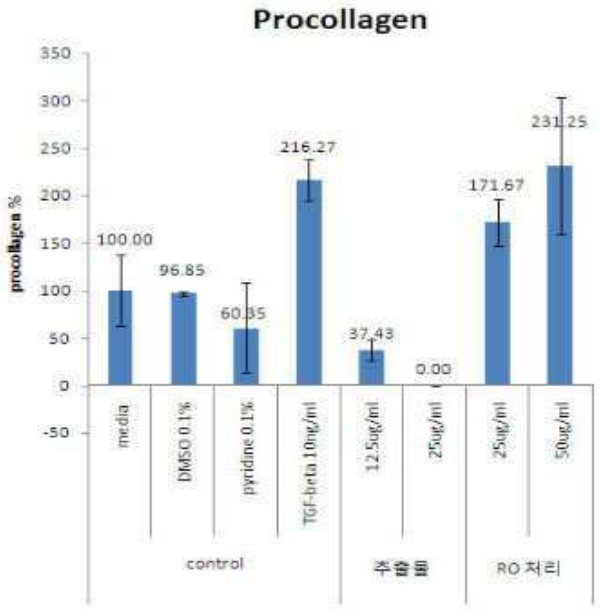
도면4


cytotoxicity - 초임계(8/31)
%
140
120
100
80
60
40
20
0
100.00
101.27
91.71
127.81
106.90
113.06
119.34
122.96
96.88
109.04
media
TGF-beta
#1
#2
#3
#4
#5
#6
#7
#8

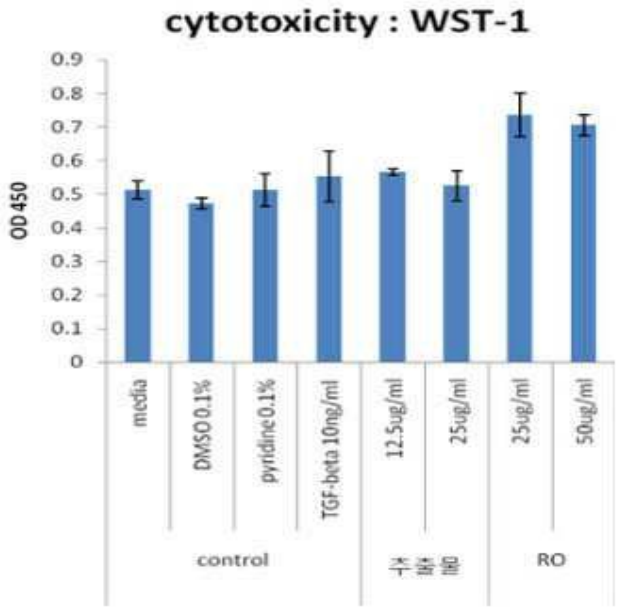
도면5



도면6


Procollagen
procollagen %
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
100.00
96.85
60.35
216.27
37.43
0.00
171.67
231.25
media
DMSO 0.1%
pyridine 0.1%
TGF-beta 10ng/ml
12.5ug/ml
25ug/ml
25ug/ml
50ug/ml
control
추출물
RO 처리

도면7


cytotoxicity : WST-1
OD 450
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
media
DMSO 0.1%
pyridine 0.1%
TGF-beta 10ng/ml
12.5ug/ml
25ug/ml
25ug/ml
50ug/ml
control
RO

도면8


–
1
2
3