



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0027822
(43) 공개일자 2013년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/258 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0091287

(22) 출원일자 2011년09월08일

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

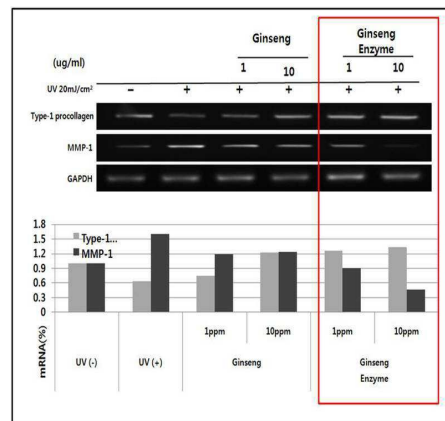
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 아스퍼질러스 나이지의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소, 이의 제조방법, 이를 이용한 효소처리 인삼 추출물, 효소처리 인삼 추출물의 제조방법 및 효소처리 인삼 추출물을 포함하는 피부미용 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아스퍼질러스 나이지의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소, 이의 제조방법, 이를 이용한 효소처리 인삼 추출물, 효소처리 인삼 추출물의 제조방법 및 효소처리 인삼 추출물을 포함하는 피부미용 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 효소는 인삼에 처리할 경우 특정 인삼사포닌 기질농도를 높이고, 다당류, 당단백질 및 당지질 등을 상대적으로 저분자량의 전환시킬 수 있으며, 상기 효소처리 인삼 추출물은 피부노화 억제, 피부주름 개선, 피지감소, 피부톤 개선 및 모공크기의 감소시켜 피부미용 개선용 식품 조성물, 약학적 조성물 또는 화장품 조성물 등으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

박상용

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

정지행

서울특별시 서초구 잠원동 롯데캐슬아파트 202동
504호

오도영

서울특별시 양천구 목동서로 70, 목동아파트 213동
203호 (목동)

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

아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아스퍼질러스 나이저는 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 40280), 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 41018), 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 41858), 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 42589), 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 43547) 및 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 44333) 균주로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 균주인 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아스퍼질러스 나이저는 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 40280) 또는 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 41018) 균주인 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에 인삼분말 또는 인삼 추출물을 첨가하는 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 제조방법.

청구항 5

아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소.

청구항 6

아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 인삼과 반응시켜 효소처리 인삼 추출물을 제조하는 방법.

청구항 7

아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 인삼과 반응시킨 효소처리 인삼 추출물.

청구항 8

아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 인삼과 반응시킨 효소처리 인삼 추출물을 포함하는 피부미용 개선용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 피부미용 개선은 피부노화 억제, 피부주름 개선, 피지감소, 피부톤 개선 및 모공크기의 감소로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상인 피부미용 개선용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 피부미용 개선용 조성물은 식품 조성물, 약학적 조성물 또는 화장품 조성물인 피부미용 개선용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 피부미용 개선용 조성물은 환제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 가지는 피부미용 개선용 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 피부미용 개선용 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 피부미용 개선용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*.)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소, 이의 제조방법, 이를 이용한 효소처리 인삼 추출물, 효소처리 인삼 추출물의 제조방법 및 효소처리 인삼 추출물을 포함하는 피부미용 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] [선행기술문헌]
- [0003] [특허문헌]
- [0004] [특허문헌 1] 한국출원특허, 진세노사이드 Re 및 진세노사이드 화합물 K를 함유하는 히알루론산 생성 촉진용 피부 외용제 조성물, 출원번호 제10-2009-0114511호, 공개일 2011.06.01
- [0005] [특허문헌 2] 한국출원특허, 산삼 또는 인삼을 포함한 인삼류의 형성층 유래 식물줄기세포주를 유효성분으로 함유하는 노화 방지 또는 항산화용 조성물, 출원번호 제10-2009-0052340호, 공개일 2009.12.17
- [0006] [특허문헌 3] 한국출원특허, 인삼 사포닌 Rg1을 이용한 주름개선용 한방화장품 및 이를 이용한 팩, 출원번호 제10-2008-0054758호, 공개일 2009.12.16
- [0007] [특허문헌 4] 한국출원특허, 길경, 홍삼 및 시호 사포닌을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 및 주름 생성 억제효과를 나타내는 피부 외용 조성물, 출원번호 제10-2009-0120279호, 공개일 2011.06.15
- [0008] [특허문헌 5] 한국출원특허, 홍삼과 대두에서 추출되는 식이섬유 단백질 성분인 유니테인과 한방생약제제를 주요 활성성분으로 하는 피부 케어 화장품 조성물 및 그 제조방법, 출원번호 제10-2009-0120288호, 공개일 2011.06.15
- [0009] [특허문헌 6] 한국출원특허, 홍삼 다당체 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물, 출원번호 제10-2009-0116466호, 공개일 2011.06.08
- [0010] [특허문헌 7] 한국출원특허, 홍삼발효 초고압 추출물을 함유하는 화장품 조성물, 출원번호 제10-2009-0105384호, 공개일 2011.05.12
- [0011] [비특허문헌]
- [0012] [비특허문헌 1] 남기열, 최신고려인삼(성분과 효능편), 1996
- [0013] [비특허문헌 2] Benishin CG et al., Effects of Ginsenoside Rb1 on Central Cholinergic Metabolism (1991)
- [0014] [비특허문헌 3] Elma ZT et al., Effect of ginsenoside Rg 1 on insulin binding in mice liver and brain membrane(1991)
- [0015] [비특허문헌 4] Kang SY et al., Dietary ginsenosides improve endothelium-dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit (1995)
- [0016] [비특허문헌 5] Hwang WI et al., Comparative Study on the Cytotoxic Activities of Red Ginseng of Korea and China, 10:27-35, 1996
- [0017] [비특허문헌 6] Smith M et al., Counseling cancer patients about herbal medicine, 1999
- [0018] [비특허문헌 7] 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, Cho S et al., J Med Food. 2009 Dec;12(6):1252-9.

- [0019] [비특허문헌 8] Stimulatory effect of dietary red ginseng on epidermal hydration and ceramide levels in ultraviolet-irradiated hairless mice, Kim H et al., J Med Food. 2009 Aug;12(4):746-54
- [0020] [비특허문헌 9] Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice, Kim YG et al., Eur J Pharmacol. 2009 Jan 5; 602(1):148-56. Epub 2008 Nov 19
- [0021] [비특허문헌 10] Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin, Kim S et al., Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 2;316(2):348-55
- [0022] [비특허문헌 11] Effects of Red Ginseng extract on ultraviolet B-irradiated skin change in C57BL mice, Kim YG et al., Phytother Res. 2008 Nov;22(11):1423-7
- [0023] [비특허문헌 12] Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice, Kang TH et al., J Ethnopharmacol. 2009 Jun 25;123(3):446-51. Epub 2009 Mar 26
- [0024] [비특허문헌 13] Panax ginseng induces human Type I collagen synthesis through activation of Smad signaling, Lee J et al., J Ethnopharmacol. 2007 Jan 3;109(1):29-34. Epub 2006 Jul 3
- [0025] [비특허문헌 14] Stimulatory effect of dietary red ginseng on epidermal hydration and ceramide levels in ultraviolet-irradiated hairless mice, Kim H et.al., J Med Food. 2009 Aug;12(4):746-54
- [0026] [비특허문헌 15] Photoprotective effect of red ginseng against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse, Lee HJ et al., Phytother Res. 2009 Mar;23(3):399-403
- [0027] [비특허문헌 16] Kang TH 등, Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice (2009)
- [0028] [비특허문헌 17] 김은영, 대한 피부 미용 학회지, 2005
- [0029] [비특허문헌 18] 박금주, J Korean Soc Food Sci Nutr, 2010
- [0030] [비특허문헌 19] 석지한, 대한피부미용학회, 2010
- [0031] [비특허문헌 20] 김남이, 고려인삼학회, 2007
- [0032] 인삼(Panax ginseng C.A Meyer: Ginseng radix)은 한의학적으로 주로 기허(氣虛)에 사용하는 가장 중요한 보기 약으로 알려져 있으며, 중국을 비롯한 우리나라의 많은 한방서에 수록되어 피로회복, 체력증강, 소화기계, 신경계, 대사계, 순환기계 등의 기능 조절을 위해 단독 또는 처방의 구성생약으로 활용되어 왔다(남기열, 최신고려인삼(성분과 효능편), 1996).인삼의 약효는 사포닌을 중심으로 많은 연구들이 이루어졌고, 중추신경계, 각종 스트레스, 항당뇨 작용, 심혈관계 장애 개선 작용 등에 관한 약리 작용이 밝혀졌다(Benishin CG et al., Effects of Ginsenoside Rb1 on Central Cholinergic Metabolism (1991), Elma ZT et al., Effect of ginsenoside Rg 1 on insulin binding in mice liver and brain membrane(1991), Kang SY et al., Dietary ginsenosides improve endothelium-dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit (1995)). 그러나 사포닌이외에도 인삼의 비사포닌계 성분인 폴리아세틸렌(polyacetylene) 성분들이 암세포 증식을 억제하는 것이 밝혀지면서 사포닌 이외 유효성분의 생리활성에 대한 연구가 이루어지게 되었다(Hwang WI et al., Comparative Study on the Cytotoxic Activities of Red Ginseng of Korea and China, 10:27-35, 1996).
- [0033] 이러한 한방효능에 근거하여 그 동안 수행된 많은 실험적 연구와 임상적 효능연구를 통해 인삼의 전래되어 온 다양한 효능이 제시되고 있다. 또한 유효성분 연구를 통해 인삼의 주요 약효 성분으로 배당체 성분인 30여종 이상의 진세노사이드(ginsenoside)를 비롯하여 비 사포닌계의 생리활성 물질로 폴리아세틸렌(polyacetylenes), 페놀성 화합물(phenolic compounds), 산성 다당체(acidic polysaccharide), 펩타이드(peptides), 알칼로이드(alkaloids), 아미노산(amino acids) 유도체 등이 발견 되었다. 그리고 인삼의 기타 성분으로 휘발성 오일(volatile oil), 당(sugar), 전분(starch), 펙틴(pectins), 미네랄(minerals) 등도 함유되어 있다(남기열, 최신고려인삼(성분과 효능편), 1996). 따라서 인삼의 역사성과 과학성에 근거하여 근래에는 동양뿐만 아니라 서구에서도 강장제 또는 건강식품, 그리고 대체의약으로서 인삼에 대한 관심이 증가되고 있다(Smith M et al., Counseling cancer patients about herbal medicine, 1999).
- [0034] 현재까지 인삼 및 홍삼 유래사포닌의 피부 관련 기능에 대한 기존 연구보고 및 특허 보고는 다음과 같다.

- [0035] 1. 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.
- [0036] 2. Stimulatory effect of dietary red ginseng on epidermal hydration and ceramide levels in ultraviolet-irradiated hairless mice.
- [0037] 3. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice
- [0038] 4. Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin.
- [0039] 5. Effects of Red Ginseng extract on ultraviolet B-irradiated skin change in C57BL mice.
- [0040] 6. Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice.
- [0041] 7. Panax ginseng induces human Type I collagen synthesis through activation of Smad signaling.
- [0042] 8. Stimulatory effect of dietary red ginseng on epidermal hydration and ceramide levels in ultraviolet-irradiated hairless mice.
- [0043] 9. Photoprotective effect of red ginseng against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse.
- [0044] 10. 한국출원특허, 출원번호 제10-2009-0114511호
- [0045] 11. 한국출원특허, 출원번호 제10-2009-0052340호
- [0046] 12. 한국출원특허, 출원번호 제10-2008-0054758호
- [0047] 13. 한국출원특허, 출원번호 제10-2009-0120279호
- [0048] 14. 한국출원특허, 출원번호 제10-2009-0120288호
- [0049] 15. 한국출원특허, 출원번호 제10-2009-0116466호
- [0050] 16. 한국출원특허, 출원번호 제10-2009-0105384호
- [0051] 상기 인삼 및 홍삼 및 인/홍삼 유래사포닌의 피부 관련 기능에 대한 연구보고와 특허 보고와 같이 과거 약리학 적으로 많은 연구가 진행된 인삼은 최근 피부개선 분야에도 초점 맞춰져 활발한 연구가 진행되고 있다. 그러나 피부의 주름 개선에 관한 인삼의 선행연구는 현재 많이 알려져 있지 않으며 수삼을 찌서 말린 홍삼만이 주름개 선에 효과가 있다고 보고되어져 있다(Kang TH 등, Effects of red ginseng extract on UVB irradiation- induced skin aging in hairless mice (2009)).
- [0052] 현대 사회에 크게 영향을 주고 있는 '웰빙'이라는 현상은 잘 먹고 잘 살자라는 일차적인 의미뿐만 아니라 '신체 의 건강함이 피부의 아름다움으로 표현된다'라는 의미까지 내포하고 있다. 이러한 현상은 피부미용 분야에 가장 많이 나타나고 있으며 피부미용은 이제 단편적인 효능을 벗어나 복합적인 기능과 과학적인 접근을 필요로 하고 있다(김은영, 대한 피부 미용 학회지, 2005).
- [0053] 피부노화는 크게 두 종류로 나눌 수 있다. 그 한 가지는 내인성 노화 (intrinsic aging)로서 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화 현상을 말한다. 두 번째는 광노화 (photoaging)로서 오랫동안 햇빛에 노출된 얼굴, 손 등, 목뒤 등의 피부에서 관찰되는 노화현상을 말하는 것으로 내인성 노화 현상과 자외선에 의한 영향이 합쳐진 결과로 발생한다(박금주, J Korean Soc Food Sci Nutr, 2010).
- [0054] 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 섬유 가 변성, 감소함에 따라 피부 탄력이 없어지고 처지기 때문이다(석지한, 대한피부미용학회, 2010).
- [0055] 이러한 피부노화의 원인은 콜라겐 및 탄력섬유 등의 기질단백질이 손상되어 피부 내 콜라겐의 양이 부족해지고, 탄력 섬유가 변성되어 나타난다고 알려져 있다. 또한, 피부노화가 진행되는 과정 중에는 다양한 신호전달 경로

를 거쳐 콜라겐의 합성이 감소되고, 콜라겐을 비롯한 세포 외 기질단백질의 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현이 증가된다고 알려졌다. 이와 같이 콜라겐은 피부노화와 관련된 주요 인자로 인식되어져 있어 콜라겐의 합성 증진 및 분해 억제제는 피부노화 억제 및 피부미용과 관련하여 중요한 지표가 되고 있다(김남이, 고려인삼학회, 2007).

[0056] 이에 본 발명자는 아스퍼질러스 나이지의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 이용하여 효소처리한 인삼 추출물이 인간의 피부섬유모세포(HDF: human dermal fibroblast)에서 콜라겐 생합성 촉진, MMP-1 억제를 통해 피부노화 억제 및 피부주름 개선효과에 대한 활성을 나타내며 모공크기 감소 및 피지 감소 등의 피부미용 개선 효과를 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0057] 본 발명의 목적은 우수한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소 및 이의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0058] 본 발명의 다른 목적은 상기 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 이용하여 우수한 피부미용 개선효과를 갖는 효소처리 인삼 추출물 및 이의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0059] 본 발명의 또 다른 목적은 우수한 피부미용 개선효과를 갖는 상기 효소처리 인삼 추출물을 포함하는 피부미용 개선용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0060] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스퍼질러스 나이지(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 제조방법을 제공한다.

[0061] 상기 배양액은 액체배양 또는 고체배양을 포함하는 개념이다.

[0062] 사포닌 전환활성은 인삼의 주요(major) 사포닌인 Rb1, Rc, Rd 등을 소량의(minor) 사포닌인 F2, C-K 등의 상대적 저분자 화합물로 전환시키는 활성을 의미한다.

[0063] 상기 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소는 인삼에 처리할 경우 특정 인삼사포닌 기질농도를 높이고, 다당류, 당단백질 및 당지질 등을 상대적으로 저분자량의 전환시킬 수 있다.

[0064] 상기 아스퍼질러스 나이지(*Aspergillus niger*)는 식용 가능한 균주인 누룩으로부터 분리될 수 있다.

[0065] 상기 균주는 식용 가능한 균주이므로 인체에 무해할 수 있고, 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 분리 시 균주가 완전히 제거하는 공정이 필요하지 않을 수 있다.

[0066] 상기 아스퍼질러스 나이지(*Aspergillus niger*)는 KACC(한국농업미생물자원센터)로부터 분양받은 *Aspergillus niger* 균주를 이용할 수 있다.

[0067] 상기 아스퍼질러스 나이지는 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 40280), 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 41018), 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 41858), 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 42589), 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 43547) 및 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 44333) 균주로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 균주일 수 있다.

[0068] 바람직하게는 상기 아스퍼질러스 나이지는 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 40280) 또는 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 41018) 균주일 수 있다. 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 40280) 또는 아스퍼질러스 나이지 (미생물 기탁번호 KACC 41018) 균주에서 분리된 효소가 특히 우수한 사포닌 전환활성을 나타낼 수 있다.

[0069] 상기 아스퍼질러스 나이지(*Aspergillus niger*)의 배양액에 인삼분말 또는 인삼 추출물을 첨가할 수 있다. 인삼분말 또는 인삼 추출물을 첨가함으로써 진세노시다제(ginsenosidase)의 생산량을 높여 상기 효소의 인삼 사포닌 전환활성 효율을 높일 수 있다.

[0070] 상기 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 제조방법은 아스퍼질러스 나이지(*Aspergillus niger*)를 배양액에서 배양하는 단계; 상기 배양액을 원심분리하여 정제되지 않은 효소액을 얻는 단계; 상기 효소액에 유기용매를 처리하여 효소 단백질을 침전시키는 단계; 상기 침전물을 완충용액에 용해시켜 투석하고 이물질을 제거하여 정제

되지 않은 효소 농축액을 얻는 단계; 및 상기 정제되지 않은 효소 농축액을 이온교환수지(이온교환수지와 양이온교환수지)에 로딩하고 완충용액으로 용리시켜 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 분획을 얻는 단계를 포함할 수 있다.

- [0071] 상기 유기용매는 에탄올, 이소프로판올, 아세톤 등일 수 있다.
- [0072] 상기 침전물에 처리하는 완충용액은 인산 완충용액(phosphate buffer), 아세트산 완충용액(acetate buffer), 트리스 완충용액(tris buffer) 등일 수 있다.
- [0073] 상기 용리 시 이용하는 완충용액은 KCl 완충용액 또는 NaCl 완충용액일 수 있다.
- [0074] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 제공한다.
- [0075] 상기의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 인삼과 반응시켜 효소처리 인삼 추출물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0076] 상기 아스퍼질러스 나이저는 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 40280), 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 41018), 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 41858), 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 42589), 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 43547) 및 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 44333) 균주로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 균주일 수 있다.
- [0077] 바람직하게는 상기 아스퍼질러스 나이저는 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 40280) 또는 아스퍼질러스 나이저 (미생물 기탁번호 KACC 41018) 균주일 수 있다.
- [0078] 상기 방법은 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소, 인삼 및 용매를 혼합하여 혼합물을 얻는 단계; 상기 혼합물과 인삼을 반응시켜 반응물을 얻는 단계; 상기 반응물을 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하는 단계; 상기 침전물에 용매를 첨가하여 환류 추출하는 단계; 환류 추출된 추출물을 여과하는 단계; 여과물을 농축하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0079] 상기 혼합물을 얻는 단계에 이용되는 용매는 물일 수 있다.
- [0080] 상기 침전물에 첨가되는 용매는 에탄올일 수 있다.
- [0081] 상기의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 인삼과 반응시켜 효소처리 인삼 추출물을 제공한다.
- [0082] 상기의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소를 인삼과 반응시킨 효소처리 인삼 추출물을 포함하는 피부미용 개선용 조성물을 제공한다.
- [0083] 상기 피부미용 개선은 피부노화 억제, 피부주름 개선, 피지감소, 피부톤 개선 및 모공크기의 감소 등의 효과일 수 있다.
- [0084] 상기 효소처리 인삼 추출물은 타입-1 프로콜라겐(Type-1 Procollagen)의 발현량을 증가시키고 콜라겐 분해 효소인 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase-1; MMP-1)의 발현량을 감소시켜 피부노화 억제 및 피부주름 개선효과를 가질 수 있다.
- [0085] 상기 효소처리 인삼 추출물은 피부섬유모세포 증식시켜 피부노화 억제 및 피부주름 개선효과를 가질 수 있다.
- [0086] 상기 효소처리 인삼 추출물은 피부섬유모세포의 생존율을 감소시키지 않으므로 우수한 안정성을 가질 수 있다.
- [0087] 상기 피부톤 개선은 피부의 색소침착 억제 등을 통해 피부미백 효과를 가지는 것을 의미한다.
- [0088] 상기 피부미용 개선용 조성물은 식품 조성물, 약학적 조성물 또는 화장품 조성물일 수 있다.
- [0089] 상기 약학 조성물은 본 발명의 효과를 해치지 않는 범위 안에서 약학적으로 허용 가능한 희석제, 결합제, 붕해제, 윤활제, pH 조절제, 산화방지제, 용해보조제 등의 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0090] 희석제는 슈가, 전분, 미결정셀룰로오스, 유당(유당수화물), 포도당, 디-만니톨, 알기네이트, 알칼리토금속류염, 클레이, 폴리에틸렌글리콜, 무수인산수소칼슘, 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있으며; 결합제는 전분, 미결정셀룰로오스, 고분산성 실리카, 만니톨, 디-만니톨, 자당, 유당수화물, 폴리에틸렌글리콜,

폴리비닐피롤리돈(포비돈), 폴리비닐피롤리돈 공중합체(코포비돈), 히프로멜로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 천연검, 합성검, 코포비돈, 젤라틴, 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.

- [0091] 봉해제는 전분글리콘산나트륨, 옥수수전분, 감자전분 또는 전호화전분 등의 전분 또는 변성전분; 벤토나이트, 몬모릴로나이트, 또는 비검(veegum) 등의 클레이; 미결정셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 카르복시메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류; 알긴산나트륨 또는 알긴산 등의 알긴류; 크로스카멜로스(croscarmellose)나트륨 등의 가교 셀룰로오스류; 구아검, 잔탄검 등의 검류; 가교 폴리비닐피롤리돈(crospovidone) 등의 가교 중합체; 중탄산나트륨, 시트르산 등의 비등성 제제, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0092] 윤활제는 탈크, 스테아린산, 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 라우릴설페이트나트륨, 수소화식물성오일, 나트륨벤조에이트, 나트륨스테아릴푸마레이트, 글리세릴 베헤네이트, 글리세릴 모노레이트, 글리세릴모노스테아레이트, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 콜로이드성 이산화규소 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.
- [0093] pH 조절제는 초산, 아디프산, 아스코르빈산, 아스코르빈산 나트륨, 에테르산 나트륨, 사과산, 숙신산, 주석산, 푸마르산, 구연산(시트르산)과 같은 산성화제와 침강 탄산 칼슘, 암모니아수, 메글루민, 탄산 나트륨, 산화 마그네슘, 탄산 마그네슘, 구연산 나트륨, 삼염기칼슘인산염과 같은 염기성화제 등을 사용할 수 있다.
- [0094] 산화방지제는 디부틸 히드록시 톨루엔, 부틸레이티드 히드록시아니솔, 초산 토코페롤, 토코페롤, 프로필 갈레이트, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 선방출성 구획에서, 용해보조제는 라우릴황산나트륨, 폴리소르베이트 등의 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테류, 도큐세이트 나트륨, 폴록사머(poloxamer) 등을 사용할 수 있다.
- [0095] 또한, 지연방출성 제제를 만들기 위해 장용성 고분자, 수불용성 중합체, 소수성 화합물, 및 친수성 고분자를 포함할 수 있다.
- [0096] 상기 장용성 고분자는 pH 5 미만의 산성 조건하에서 불용성이거나 또는 안정한 것으로, pH 5 이상인 특정 pH 조건하에서 용해되거나 또는 분해되는 고분자를 말하며, 예를 들어, 히프로멜로오스아세테이트숙시네이트, 히프로멜로오스프탈레이트(히드록시프로필메틸셀룰로오스 프탈레이트), 히드록시메틸에틸셀룰로오스프탈레이트, 셀룰로오스아세이트프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트숙시네이트, 셀룰로오스아세테이트말레이트, 셀룰로오스벤조에이트프탈레이트, 셀룰로오스프로피오네이트프탈레이트, 메틸셀룰로오스프탈레이트, 카르복시메틸에틸셀룰로오스 및 에틸히드록시에틸셀룰로오스프탈레이트, 메틸히드록시에틸셀룰로오스와 같은 장용성 셀룰로오스 유도체; 스티렌-아크릴산 공중합체, 아크릴산메틸-아크릴산 공중합체, 아크릴산메틸메타크릴산 공중합체(예컨대, 아크릴-이즈), 아크릴산부틸-스티렌-아크릴산 공중합체, 및 아크릴산메틸-메타크릴산-아크릴산옥틸공중합체과 같은 상기 장용성 아크릴산계 공중합체; 폴리(메타크릴산 메틸 메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 L, 유드라짓 S, 에보닉, 독일), 폴리(메타크릴산 에틸아크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 L100-55)와 같은 장용성 폴리메타크릴레이트 공중합체; 아세트산비닐-말레인산 무수물 공중합체, 스티렌-말레인산 무수물 공중합체, 스티렌-말레인산모노에스테르 공중합체, 비닐메틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 비닐부틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 아크릴로니트릴-크릴산메틸·말레인산 무수물 공중합체, 및 아크릴산부틸-스티렌-말레인산 무수물 공중합체와 같은 장용성 말레인산계 공중합체; 및 폴리비닐알콜프탈레이트, 폴리비닐아세탈프탈레이트, 폴리비닐부틸레이트프탈레이트 및 폴리비닐아세탈아세탈프탈레이트와 같은 장용성 폴리비닐 유도체가 있다.
- [0097] 상기 수불용성 중합체는 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되지 않는 고분자를 말한다. 예를 들어, 수불용성 중합체는 폴리비닐아세테이트(예컨대, 콜리코트 SR30D), 수불용성 폴리메타크릴레이트 공중합체[예컨대, 폴리(에틸아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 NE30D, 폴리(에틸아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트-트리메틸아미노에틸메타크릴레이트)공중합체(예컨대, 유드라짓RSP 0)등], 에틸셀룰로오스, 셀룰로오스 에스테르, 셀룰로오스 에테르, 셀룰로오스 아실레이트, 셀룰로오스 디아실레이트, 셀룰로오스 트리아실레이트, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 디아세테이트 및 셀룰로오스 트리아세테이트 등이 있다.
- [0098] 상기 소수성 화합물은 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되지 않는 물질을 말한다. 예를 들어, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 글리세릴 스테아레이트, 글리세릴 비헤네이트, 세틸 팔미테이트, 글리세릴 모노 올레이트 및 스테아린산과 같은 지방산 및 지방산 에스테르류; 세토스테아릴 알코올, 세틸알코올 및 스테아릴알코올과 같은 지방산 알코올류; 카르나우바왁스, 밀납, 및 미결정왁스와 같은 왁스류; 탈크, 침강탄산 칼슘, 인산일수소칼슘, 산화아연, 산화티탄, 카올린, 벤토나이트, 몬모릴로나이트 및 비검과 같은 무기질 물질

등이 있다.

- [0099] 상기 친수성 고분자는 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되는 고분자 물질을 말한다. 예를 들어, 텍스트린, 폴리텍스트린, 텍스트란, 펙틴 및 펙틴 유도체, 알긴산염, 폴리갈락투론산, 자일란, 아라비노자일란, 아라비노갈락탄, 전분, 히드록시프로필스타치, 아밀로오스, 및 아밀로펙틴과 같은 당류; 히프로멜로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스 및 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨과 같은 셀룰로오스 유도체; 구아검, 로커스트 콩 검, 트라가칸타, 카라기난, 아카시아검, 아라비아검, 젤란검, 및 잔탄검과 같은 검류; 젤라틴, 카제인, 및 제인과 같은 단백질; 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 및 폴리비닐아세탈디에틸아미노아세테이트와 같은 폴리비닐유도체; 폴리(부틸 메타크릴레이트-(2-디메틸아미노에틸)메타크릴레이트-메틸메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓E100, 에보닉, 독일), 폴리(에틸 아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트-트리에틸아미노에틸- 메타크릴레이트 클로라이드) 공중합체 (예컨대, 유드라짓 RL, RS, 에보닉, 독일)과 같은 친수성 폴리메타크릴레이트 공중합체; 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 옥사이드와 같은 폴리에틸렌 유도체; 카보머 등이 있다.
- [0100] 이외에도 착색제, 향료 중에서 선택된 다양한 첨가제로서 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 선택 사용하여 본 발명의 제제를 제제화할 수 있다.
- [0101] 본 발명에서 첨가제의 범위가 상기 첨가제를 사용하는 것으로 한정되는 것은 아니며, 상기한 첨가제를 선택에 의하여 통상 범위의 용량을 함유하여 제제화할 수 있다.
- [0102] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 통상의 방법에 따라 환제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0103] 본 발명은 또한 본 발명의 피부미용 개선용 조성물을 포유류를 포함하는 대상체에 투여하여 피부미용 개선 방법을 제공한다. 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상체에게 본 발명의 피부미용 개선용 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 피부미용 개선용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 내피 투여, 비내 투여, 폐내투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0104] 본 발명에 따른 피부미용 개선용 조성물은 일일 1회 또는 일정한 시간 간격을 두고 일일 2회 이상 투여될 수 있다.
- [0105] 본 발명의 피부미용 개선용 조성물의 투여량은 대상체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0106] 본 발명의 피부미용 개선용 조성물의 투여량은 본 발명의 피부미용 개선용 조성물의 활성, 성별, 투여 시간, 투여 경로, 치료 기간 및 횟수 등에 따라 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- [0107] 상기 피부미용 개선용 조성물은 환제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 가질 수 있다.
- [0108] 본 발명의 피부미용 개선용 조성물은 피부노화 억제, 피부주름 개선, 피지감소, 피부톤 개선 및 모공크기의 감소 효과가 있으므로, 피부미용 개선용 기능성 화장품으로 사용가능하다.
- [0109] 상기 피부미용 개선용 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 가질 수 있다.

발명의 효과

- [0110] 본 발명에 따른 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*.)의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소는 인삼에 처리할 경우 특정 인삼사포닌 기질농도를 높이고, 다당류, 당단백질 및 당지질 등을 상대적으로 저분자량의 전환시킬 수 있으며, 상기 효소처리 인삼 추출물은 피부노화 억제, 피부주름 개선, 피지감소, 피부톤 개선 및 모공크기의 감소시켜 피부미용 개선용 식품 조성물, 약학적 조성물 또는 화장품 조성물 등으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0111]

도 1은 본 발명의 실시예 1에 따라 아스페질러스 나이저(*Aspergillus niger*) (미생물 기탁번호 KACC 40280, KACC 41018, KACC 41858, KACC 42589, KACC 43547, KACC 44333 균주) 균주로부터 얻은 효소를 인삼과 반응시킨 후 TLC를 수행한 결과이다. 도 1에서 표준(Standard)은 PPT 계열의 saponin Re, Rg1, Rh1과 PPD계열의 saponin Rb1, Rc, Rd, F2, C-K를 TLC 시킨 것을 나타내며, En1는 KACC 40280로부터 얻은 효소처리, En2는 KACC 41018로부터 얻은 효소처리, En3는 KACC 41858로부터 얻은 효소처리, En4는 KACC 42589로부터 얻은 효소처리, En5는 KACC 43547로부터 얻은 효소처리, En6는 KACC 44333로부터 얻은 효소처리, Control(대조군)은 효소처리 하지 않은 인삼의 결과를 나타낸다.

도 2는 본 발명의 실험예 1에 따라 실시예 2의 인삼 추출물과 비교예 1의 인삼 추출물에서 인삼 사포닌을 분리한 후, TLC를 이용하여 측정된 결과를 나타낸다.

도 2에서 좌측의 사진은 인삼 추출물에 효소 1을 처리 전 및 처리 후를 보여주며, 우측의 사진은 인삼 추출물에 효소 2를 처리 전 및 처리 후를 보여준다. 도 2에서 PPT와 PPD는 각각 표준(Standard)으로써 PPD는 프로토파낙사디올(Protopanaxadiol) 계열의 인삼 사포닌을 의미하고 PPT는 프로토파낙사트리올(Protopanaxatriol) 계열의 사포닌을 의미하는데 변화된 사포닌을 비교하기 위한 것이다.

도 3은 본 발명의 실험예 1에 따라 비교예 1의 인삼 추출물에서 인삼 사포닌을 분리한 후, HPLC를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그래프이다. 도 3의 가로축의 시간[minutes; 분]은 확산시간을 나타내며, 세로축은 전압[mV]을 나타내며, 피크의 면적을 성분의 함량을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 실험예 1에 따라 실시예 2 중 효소 1을 처리한 인삼 추출물에서 인삼 사포닌을 분리한 후, HPLC를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그래프이다. 도 4의 가로축의 시간[minutes; 분]은 확산시간을 나타내며, 세로축은 전압[mV]을 나타내며, 피크의 면적을 성분의 함량을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 실험예 1에 따라 실시예 2 중 효소 2를 처리한 인삼 추출물에서 인삼 사포닌을 분리한 후, HPLC를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그래프이다. 도 5의 가로축의 시간[minutes; 분]은 확산시간을 나타내며, 세로축은 전압[mV]을 나타내며, 피크의 면적을 성분의 함량을 나타낸다.

도 6은 본 발명의 실험예 2에 따라 수행한 실시예 1의 효소처리 인삼 추출물과 비교예 1의 인삼 추출물로 배양한 인간의 피부섬유모세포에서의 Type-1 Procollagen 및 MMP-1의 mRNA 발현량을 확인 결과를 나타낸다. 도 6의 상부에는 RT-PCT 결과를 보여주며, 하부에는 Type-1 Procollagen 및 MMP-1의 mRNA 발현량을 보여주는 그래프이다. 도 5에서 (-), (+)는 자외선의 조사 유무를 나타내고, ug/ml은 처리된 추출물의 농도를 나타내며, mRNA(%)는 무처리 대조군(control)을 기준으로 정량한 값을 나타낸다.

도 7은 본 발명의 실험예 2에 따라 수행한 실시예 2의 효소처리 인삼 추출물 및 비교예 1의 인삼 추출물의 처리에 대한 세포 생존율 실험의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 7은 자외선을 처리하지 않고(UV-X) 실시예 2의 효소처리 인삼 추출물 및 비교예 1의 인삼 추출물의 처리하고 배양 후의 세포 생존율 실험의 결과를 나타내는 그래프로 증식률(%)은 무처리 대조군(control)을 기준으로 정량한 값을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 실험예 2에 따라 수행한 실시예 2의 효소처리 인삼 추출물 비교예 1의 인삼 추출물의 처리에 대한 세포 생존율 실험의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 8은 실시예 2의 효소처리 인삼 추출물 및 비교예 1의 인삼 추출물을 전 처리하고 자외선을 처리한 후(UV-0) 세포 생존율 실험의 결과를 나타내는 그래프로 증식률(%)은 자외선을 처리하지 않은(UV-X) 무처리 대조군(control)을 기준으로 정량한 값을 나타낸다.

도 9 및 도 10은 본 발명의 실험예 3에 따라 상기 실시예 3에 따라 제조된 환을 복용한 후 주름개선 및 피부미용 개선 효과를 확인하기 위한 다중안면검사카메라시스템 Janus(아람휴비스, 한국)를 실시한 결과이다.

도 11은 본 발명의 실험예 3에 따라 상기 실시예 3에 따라 제조된 환을 복용한 후 주름개선 및 피부미용 개선 효과에 대한 피실험자 설문조사 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명의 실험예 3에 따라 상기 실시예 3에 따라 제조된 환을 이용하여 주름개선 및 피부미용 개선 효과에 대한 2인의 전문의의 임상소견을 나타낸 그래프이다. 도 12에서 y축은 백분율로, 전문의가 개선 소견에 대한 점수를 0 내지 5점으로 기재한 것을 바탕으로 이를 5점을 100%로 하여 백분율로 환산한 값을 나타냅니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0112] 이하, 본 발명을 실시예, 비교예, 실험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0113] **실시예 1. 균주배양액을 이용한 효소의 제조**

[0114] 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양받은 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*) (미생물 기탁번호 KACC 40280, KACC 41018, KACC 41858, KACC 42589, KACC 43547 및 KACC 44333) 균주를 액체배양법으로 배양하였다. 액체 배양의 경우 소고기 추출물(Beef Extract) (Becton, Dickinson and Company(BD)) 1.5g/ℓ, 펩톤(Peptone) (BD) 2.5g/ℓ, 황산마그네슘(Magnesium Sulfate) (시그마사) 0.05g/ℓ, 염화칼슘(Calcium Chloride) (시그마사) 0.05g/ℓ가 함유된 배지에서 3-5일간 배양을 진행하였다(30-37℃, 180rpm). 배양 온도는 30-37℃로 하고, 수분은 50-70%로 유지하여 균주 배양을 진행하였다. 배양 시 인삼 추출물(70부피% 에탄올(EtOH)로 70℃에서 4시간동안 추출한 추출물)을 넣어(여기서, 인삼 추출물의 투여함량은 배지의 중량을 기준으로 0.5 내지 1중량%임) 진세노시다제(ginsenosidase)의 생산량을 높였다. 상기 배양액을 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 정제되지 않은 효소액(crude 효소액)을 얻었다. 정제되지 않은 효소액에 유기용매(에탄올, 이소프로판올, 아세톤 등이 이용될 수 있음)인 아세톤을 넣어 4℃에서 4시간동안 효소 단백질을 침전시켰다. 침전물을 인산 완충용액(posphate buffer) ((주) 바이오세상)에 용해시켜 투석한 후 이물질을 제거하여 정제되지 않은 효소(crude enzyme) 농축액을 얻었다. 이온교환수지(음이온교환수지QAE-sephadex A50(sigma)와 양이온교환수지Sp-sephadexC50(sigma))에 로딩(loading) 한 후 NaCl 완충용액(sigma사)으로 용리(elution)시켜 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 분획을 얻었다.

[0115] 상기 얻은 분획(fraction)을 인삼과 반응시켰다. 좀 더 상세하게는, 상기 얻은 분획을 인삼 무게에 대하여 10-20%에 해당하는 중량으로 인삼 무게 대비 10배 부피의 물에 녹여 인삼이 담긴 플라스크에 넣고 잘 혼합하였다. 용기에 담긴 혼합물을 50-60℃에서 24시간 반응시켰다. 이와 같은 방법으로 상기 나열한 6종의 균주에 따라 6종의 효소를 얻어 순차적으로 인삼과 반응시켜 사포닌 전환활성을 TLC로 확인하였다. TLC 분석에는 TLC(박막크로마토그래피)용 플레이트(TLC silica gel 60F, merck사)에 분리한 사포닌을 점적한 후 이동상(클로로포름(Chloroform) : 메탄올(Methanol) : 물(Water) = 65 : 35 : 10 (부피/부피)을 이용하여 물질을 전개한 후 10 (부피/부피)% 황산용액을 이용하여 발색한 것으로 결과를 확인하였다.

[0116] 측정된 결과 모두 사포닌 전환활성을 나타내었으나 그 중 1번과 2번 효소가 가장 눈에 띄는 활성을 가지고 있음을 확인하였다(도 1 참조). 사포닌 전환활성은 인삼의 주요(major) 사포닌인 Rb1, Rc, Rd 등을 소량의(minor) 사포닌인 F2, C-K 등의 상대적 저분자 화합물로 전환시키는 활성을 의미한다.

[0117] 도 1의 표준(Standard)에서 보는 바와 같이 주요(major) 사포닌은 소량의(minor) 사포닌에 비해 비교적 극성을 가지는 물질이므로 스팟(spot)이 아래에 머물러 있으며 이것이 효소에 의해 소량의(minor) 사포닌으로 전환되면 상대적으로 비극성화 되어 스팟(spot)이 위로 향하게 된다. 상기 TLC상에서 6가지 효소처리군에서 사포닌 전환활성을 나타낸 것을 확인할 수 있으나, 이 중 1번과 2번 효소에서 더욱 뚜렷한 전환활성을 보임을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

[0118] 고체배양법으로 배양하는 실시예는 하기와 같다.

[0119] 포테이토 덱스트로오즈 배지(potato dextrose broth, PDB, BD)와 곡물 배지(corn meal broth BD)가 1 : 1의 중량비로 혼합된 배지에 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*) (미생물 기탁번호 KACC 40280, KACC 41018, KACC 41858, KACC 42589, KACC 43547 및 KACC 44333) 균주를 접종한 후 30℃에서 3일간 배양하여 균주 현탁액을 준비한 다음 고체배지에 상기 균주 현탁액을 5-10중량%(여기서, 상기 고체배지 중량에 대한 균주 현탁액의 농도임) 첨가한 후 잘 혼합하였다. 상기 고체배지는 맥아(강화에서 구입)와 밀기울(합천에서 구입)의 중량 배합비를 1:1로 하고 맥아와 밀기울 배합물 총 중량의 30중량% 물을 첨가하여 혼합하고 건조시켜 고체 배지를 만든 것이다. 배양 온도는 30-37℃로 하고, 수분은 50-70%로 유지하여 균주 배양을 진행하였다. 배양 시 인삼 추출물(70부피% 에탄올(EtOH)로 70℃에서 4시간동안 추출한 추출물)을 넣어(여기서, 인삼 추출물의 투여함량은 배지의 중량을 기준으로 0.5 내지 1중량%임) 진세노시다제(ginsenosidase)의 생산량을 높였다. 고체배양 후 상기 고체배지를 고체배지의 총 중량의 2~5배 되는 인산 완충용액(posphate buffer) ((주) 바이오세상)에 3~6시간 동안 담가두었다. 완충용액으로 인산 완충용액 뿐만 아니라, 아세트산 완충용액, 트리스 완충용액 등이 이용될 수도 있다. 7,000 rpm에서 30 분간 원심 분리하여 정제되지 않은 효소액(crude enzyme)을 얻었다. 정제되지 않은 효소액에 유기용매(에탄올, 이소프로판올, 아세톤 등이 이용될 수 있음)인 아세톤을 넣어 4℃에서 4시간동안 효소

단백질(enzyme protein)을 침전시켰다. 침전물을 인산 완충용액(posphate buffer) ((주) 바이오세상)에 용해시켜 투석한 후 이물질을 제거하여 정제되지 않은 효소(crude enzyme) 농축액을 얻었다. 이온교환수지(음이온교환수지QAE-sephadex A50(sigma)와 양이온교환수지Sp-sephadexC50(sigma))에 로딩(loading) 한 후 NaCl 완충용액(sigma사)으로 용리(elution) 시켜 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소의 분획을 얻었다.

[0120] **실시예 2. 효소처리 인삼 추출물의 제조**

[0121] 국내산 강화 인삼을 20-40 메쉬로 분쇄하여 플라스크 또는 유리 용기에 담았다. 상기 제조예 1 에서 얻은 1번 효소(KACC 40280에서 추출해낸 진세노시나제)를 인삼 무게에 대하여 10-20%에 해당하는 중량으로 인삼 무게 대비 10배 부피의 물에 녹여 인삼이 담긴 플라스크에 넣고 잘 혼합하였다. 용기에 담긴 혼합물을 50-60℃에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 원심분리를 통하여 상등액과 침전물을 구분하고 침전물에 50부피% EtOH을 중량비 10배의 무게로 첨가한 후 70℃에서 4시간 환류 추출 하였다. 추출 후 여과지(filter paper) (4μm, watman)를 이용하여 여과를 거친 후 감압농축기(제품명: Coolace CCA-1100, 제조사: EVELA)를 이용하여 45℃에서, 6~12 시간 동안 감압 농축을 통해 농축액을 얻었다.

[0122] **비교예 1. 인삼 추출물의 제조**

[0123] 국내산 강화 인삼을 20-40 메쉬로 분쇄하여 플라스크 또는 유리 용기에 담았다. 인삼과 인삼무게 대비 10배의 물을 플라스크에 넣고 잘 혼합하였다. 용기에 담긴 혼합물을 50-60℃에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 원심분리를 통하여 상등액과 침전물을 구분하고 침전물에 50부피% EtOH을 중량비 10배의 무게로 첨가한 후 70℃에서 4시간 환류 추출 하였다. 추출 후 여과지(filter paper) (4μm, watman)를 이용하여 여과를 거친 후 감압농축기(제품명: Coolace CCA-1100, 제조사: EVELA)를 이용하여 45℃에서, 6~12 시간 동안 감압 농축을 통해 에탄올(EtOH)을 제거한 후 농축액을 얻었다.

[0124] **실시예 3. 효소처리 인삼 추출물을 이용한 환의 제조**

[0125] 상기 실시예 2에서 얻어진 효소처리 인삼 농축액 16.0kg, 27.5Bx(Brix)을 이용하여 분무건조를 진행하였다. 분무건조시 2ton 분무건조기(코리아메디 주식회사)를 이용하여 분무건조를 진행하였다. 상기 실시예 2에서 얻어진 효소처리 인삼 농축액 16.0kg과 말토덱스트린(DE 12, (주)인투푸드) 4.4kg을 배합하여 투입온도 170℃, 배출온도 90℃로 분무건조를 진행하여 총 1kg의 분말을 회수하였다. 분무건조된 분말자체로 환제제조를 위한 반죽이 불가능하여 비수용성 부형제로 결정셀룰로오스(신원무역상사)를 선택하고 10중량%, 20중량%, 30중량%까지 농도별(여기서, 상기 농도는 분무건조된 분말에 대한 중량% 농도임)로 반죽실험을 한 결과 30% 첨가군에서 반죽 및 제환이 가능함을 확인하였다. 반죽 후 제환기를 이용하여 2.5mm 직경의 소환제체로 제조하였다. 시광(polishing)은 정제수를 이용한 물시광으로 처리하였으며 60℃ 이하의 건조조건에서 12시간이상 건조하여 수분함량 10% 이하까지 건조하였다.

[0126] **실험예 1. 효소처리 인삼 추출물의 성분비교**

[0127] 1) 사포닌의 변화 분석

[0128] 실시예 2 및 비교예 1에서 각각 효소처리 인삼 추출물과 인삼 추출물을 제조한 다음 이들을 C18 sep-pak(상품명: Waters Sep-Pak Vac 6cc, 제조사: Waters Corporation)을 이용하여 사포닌만을 분리하였으며 방법은 다음과 같다. 인삼의 진세노사이드 분석을 위한 추출 및 전처리법 이용하였다(Geum Soog Kim 등, Extraction and preprocessing method for ginsenosides analysis of Panax ginseng C.A Mayer. (2008) 참조). TLC 분석에는 TLC용 plate(TLC silica gel 60F, merck사)에 분리한 사포닌을 점적한 후 이동상(클로로포름(Chloroform) : 메탄올(Methanol) : 물(Water) = 65 : 35 : 10 (v/v)을 이용하여 물질을 전개한 후 10%(v/v) 황산용액을 이용하여 발색한 것으로 결과를 확인하였다. HPLC(고성능 액체 크로마토그래피) 분석에는 PDA HPLC system 기기(waters사)와 XDB-C18 column (4.6 X 250 mm, ID 5 μm) (Eclipse사)을 사용하였으며, 이동상은 물(H₂O, 100%)과 아세트나이트릴(CH₃CN, 100%)를 혼합하여 사용하였다. 0-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-27, 27-30 및 30-40분일 때, 기울기 용리(Gradient elution) 비율(물 : 아세트나이트릴)은 각각 75 : 25, 68 : 32, 45 : 55, 40

: 60, 0 : 100, 0 : 100 및 75 : 25로 조절하였다. 즉, 물과 아세트나이트릴의 비율이 75 : 25인 용매를 0-10분 동안 흘려주고, 10-15분일 때 물과 아세트나이트릴의 비율이 68 : 32인 용매를 흘려주고, 15-20분일 때 물과 아세트나이트릴의 비율이 45 : 55로 흘려주는 것과 같이 조절하는 것이다. 이동상의 유속은 1.2ml/분으로 흘려주었으며, UV 탐지기(UV detector)를 이용하여 203nm에서 인삼의 성분을 분석한 결과 인삼의 주요(major) 사포닌인 Rb1, Rc, Rd 등이 소량의(minor) 사포닌인 F2, C-K 등의 상대적 저분자 화합물로 전환되는 양상을 보였다. 상기 수행 결과를 도 2 내지 5에 나타냈다.

[0129] **실험예 2. 피부노화 억제 및 주름 개선 실험**

[0130] 1) 타입-1 프로콜라겐(Type-1 Procollagen) 합성 촉진 및 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase-1; MMP-1) 억제 효과

[0131] 인간의 피부섬유모세포(Catalog No : MC1213, MCTT, 서울, 한국)를 60mm 세포 배양 접시에 3ml의 배양액(FGM-2 media, Catalog No : CC3132, Clonetics)을 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 1 및 비교예 1의 인삼 및 효소처리 인삼 추출물 1, 10ppm을 포함한 배지로 교체하여 2일간 배양하였다.

[0132] 배양 2일 후 세포를 회수(harvest)하여 RNA를 분리하여 역전사 PCR(Reverse Transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 방법을 이용하여 Type-1 Procollagen 및 MMP-1의 mRNA 발현량을 확인하였다. RT-PCR의 방법은 국성호(J Appl Physiol, 2011) 등의 방법을 응용하여 실시하였으며, 간략하게 요약하면 다음과 같다. 배양한 세포를 PBS(Phosphate buffered saline, (주)바이오세상)로 세척한 후 TRIzol Reagent (Invitrogen, Grand Island NY, USA) 1ml을 가하고 상온에서 10분간 반응시킨 다음 0.2ml의 CHCl₃를 첨가하여 15초간 완전히 섞은 뒤, 4°C, 12,000×g에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액 0.5ml 을 새로운 튜브에 옮기고 동량의 2-프로필 알콜(2-propyl alcohol)을 섞었다. 상온에서 10분간 반응시키고 4°C, 12,000×g에서 10분간 원심 분리하였다. RNA 침전물을 75부피% 에탄올로 세척하고, 상온에서 건조시킨 다음 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수에 녹인 후 60°C에서 10분간 반응시켜 RNA를 정제시켰다. 정제된 RNA를 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron Biotechnology, Korea)를 이용하여 RT-PCR을 진행하였으며 각각의 PCR 조건은 다음과 같다. 타입-1 프로콜라겐 : 94°C에서 5분간 초기반응, 94°C 1분, 56°C 1분, 72°C 1분의 과정으로 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 10분 연장, MMP-1 : 94°C에서 5분간 초기반응, 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분의 과정으로 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 10분 연장, GAPDH : 94°C에서 5분간 초기반응, 94°C 0.5분, 56°C 0.5분, 72°C 0.5분의 과정으로 25회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 10분 연장하여 진행하였다. PCR 산물을 2% 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동을 실시하여 밴드(band) 유무를 확인하였다. 본 실험에 사용되어진 타입-1 프로콜라겐(Type-1 Procollagen) 및 MMP-1 등의 프라이머(primer)는 Bioneer에서 oligo 합성을 의뢰하여 구입하여 사용하였으며, 각각의 프라이머는 하기의 표 1과 같다. 대개의 세포에서 동일한 수준으로 발현되는 유전자(house keeping 유전자)인 GAPDH로 동량의 단백질에 대해 분석되었는지를 보여주는 기준으로 사용되었다.

[0133] [표 1]

유전자	Genebank accession NO.	프라이머 정보	프라이머 서열	서열번호
타입-1 프로콜라겐	NM_ 000088	정방향 프라이머	5'-ctcgaggtggacaccaccct-3'	서열번호 1
		역방향 프라이머	5'-cagctggatggccacatcgg-3'	서열번호 2
MMP-1	NM_ 002421	정방향 프라이머	5'-attctactgatatcggggcttga-3'	서열번호 3
		역방향 프라이머	5'-atgtccttggggtatccgtgtag-3'	서열번호 4
GAPDH	BC_ 023632	정방향 프라이머	5'-accacagtccatgccatcac-3'	서열번호 5
		역방향 프라이머	5'-ccaccaccctgttgcgtgtag-3'	서열번호 6

[0134]

[0135] 상기 표 1의 프라이머 서열 등에 대해서는 Shin MH et al. 2005, J Invest Dermatol. 124:315-323을 참조하였습니다.

[0136] 자외선 B를 20mJ/cm²로 조사를 조사한 후, 효소처리 인삼 추출물을 1μg/ml의 농도로 처리한 경우 인삼 추출물을 1μg/ml의 농도로 처리한 경우보다 타입-1 프로콜라겐의 mRNA 발현량이 약 2배 정도로 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 자외선 B를 20mJ/cm²로 조사를 조사한 후, 효소처리 인삼 추출물을 10μg/ml의 농도로 처리한 경우 인삼 추출물을 10μg/ml의 농도로 처리한 경우보다 MMP-1의 mRNA 발현량이 60% 이상 감소하는 결과가 확인하였으며, 이는 콜라겐 분해 효소인 MMP-1의 발현을 감소시켜 피부에서의 주름의 생성을 억제하는 효과가 있음을 의미한다. 따라서, 효소처리 인삼 추출물은 주름 예방 효과의 의미를 가진다. 인삼 추출물의 경우, 농도 증가에 따른 MMP-1의 mRNA 발현량 감소의 효과가 미비함에 비해 효소처리 인삼 추출물의 경우 농도 증가에 따른 MMP-1의 mRNA 발현량 감소가 큼을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 도 6에 나타내었다.

[0137] 2) HDF-N-Cell을 이용한 피부노화 실험

[0138] (1)-1. 세포 배양

[0139] 인간의 피부섬유모세포(Human Dermal Fibroblast cell)인 HDF-N 세포는 Modern Cell & Tissue Technology사(MCTT, 서울, 한국)로부터 구입하여 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다. HDF-N 세포를 세포 배양 접시에 부착시키고 페니실린(penicillin) 및 스트렙토마이신(streptomycin)이 함유된 1% 항균-항진균 용액(antibacterial-antifungal solution)(PAA, 캐나다)과 10% FBS(PAA, 캐나다)를 첨가한 DMEM(PAA, 캐나다)을 사용하여 배양하였다. HDF-N 세포의 배양 시 습도는 95%, 온도는 37℃를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하였으며, 배양액은 2~3일에 한번 씩 교체하였다. 세포 시딩(seeding) 시 세포를 혼합한 배지와 0.4% 트립판 블루(Tryphan blue stain, Invitrogen) 용액을 1:1로 혼합하여 세포계수기(hemocytometer)를 이용하여 트립판 블루에 의해 염색되지 않은 살아 있는 세포를 계수하여 사용하였다.

[0140] (1)-2. MTT assay(MTT 분석)

[0141] HDF-N 세포(MCTT, 서울, 한국)의 증식 측정은 단시간에 대량 검색이 가능한 MTT colorimetric assay 방법(EZ-CyTox, Daeil-Lab Co., 한국)을 사용하여 이향복(KSBB Journal, 2009) 등의 방법을 응용하여 측정하였으며, 간략하게는 다음과 같다. 96-웰 플레이트(ISS, 한국) 2판에 1×10³ 세포수/웰로 세포를 분주한 다음 24시간 동안 37℃ CO₂ 배양기에서 배양한 후 샘플(상기 실시예 1과 비교예 1로 제조된 효소처리 인삼 추출물과 일반 인삼 추출물을 농도 별(0.01, 0.1, 1 및 10μg/ml)로 처리하여 3일간 배양하였다. 2일째 되는 날(48시간) 각 웰 당 MTT

(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, $10\mu\text{l}$ /웰) 시약을 첨가하고 3시간 동안 37°C 에서 배양한 후 MTT가 포마잔(formazan)으로 분해되는 양을 ELISA reader(VERSAmax, Molecular Devices)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0142] 각 처리 군은 3 웰 씩 3회 반복실험을 하였으며, 시료의 세포 증식효과는 3번 반복 실험의 평균값을 취한 후 아무것도 처리하지 않은 DMEM 용액에 배양한 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. 상기 실시예 2로 제조된 효소처리 인삼 추출물은 일반 인삼 추출물에 비하여 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 10% 가량 인간의 피부섬유모세포 증식(fibroblast의 Proliferation)을 증가시키는 것으로 확인되었으며 이는 주름 예방 효과의 의미를 가진다(도 7 참조).

[0143] 상기 실험에 추가하여 HDF-N 세포에 UVB 피크범위(Peak range)가 312nm, 자외선 선량(UV dose)이 $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ 의 조건으로 자외선-비(UVB)를 조사한 후 세포 증식효과를 확인하는 실험을 진행하였다. 실험 방법은 세포 증식률을 확인하는 방법과 동일하지만, UVB를 조사하기 전에 샘플을 농도 별(0.01, 0.1, 1 및 $10\mu\text{g}/\text{ml}$)로 전 처리한 후, 2일째 되는 날(48시간) 각 웰 당 MTT($10\mu\text{l}/\text{well}$) 시약을 첨가하고 3시간 동안 37°C 에서 배양한 후 MTT가 포마잔으로 분해되는 양을 ELISA reader(VERSAmax, Molecular Devices)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0144] 상기 실시예 2로 제조된 효소처리 인삼 추출물은 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 인삼 추출물에 비해 10% 가량 인간의 피부섬유모세포의 증식(Proliferation)을 증가시키는 것으로 확인되었으며 이는 주름 예방 효과의 의미를 가진다(도 8 참조).

[0145] 실험예 3. 피부노화 억제 및 주름 개선 인체적용시험 및 전문의 임상소견

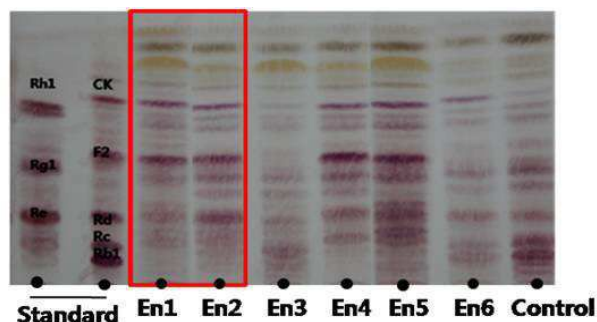
[0146] 상기 실시예 3에 따라 제조된 환을 복용 후 주름개선 및 피부미용 개선 효과를 확인하기 위한 다중안면검사카메라시스템 Janus(아람휴비스, 한국) (도 9 및 도 10 참조)과 2인의 전문가의 임상소견과 피실험자 설문조사를 실시하였다. 20~50세까지의 건강한 여성 및 남성 20명을 대상으로 상기 실시예 3에 따라 제조된 환을 1일 3회(1일 복용량 2-5g) 2주간 복용하도록 하였다.

[0147] 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 판정하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

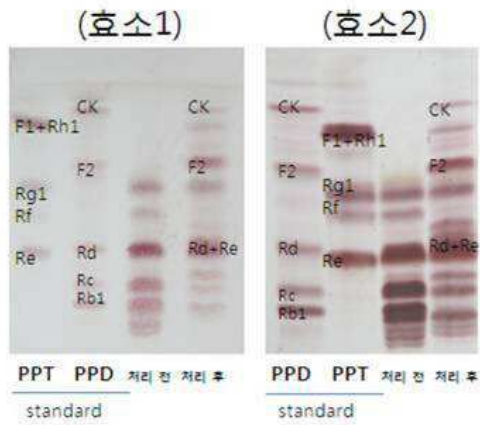
[0148] 도 11과 도 12의 결과로부터 상기 실시예 3에 따라 제조된 환 복용 시 피부 주름 및 모공 크기의 감소, 색소침착 및 피지, 피부톤 등의 모든 설문에 대하여 80% 가량의 긍정적 답변을 확인하므로 상기 실시예 3에 따라 제조된 환이 피부미용 개선 효능을 가짐을 알 수 있었다.

도면

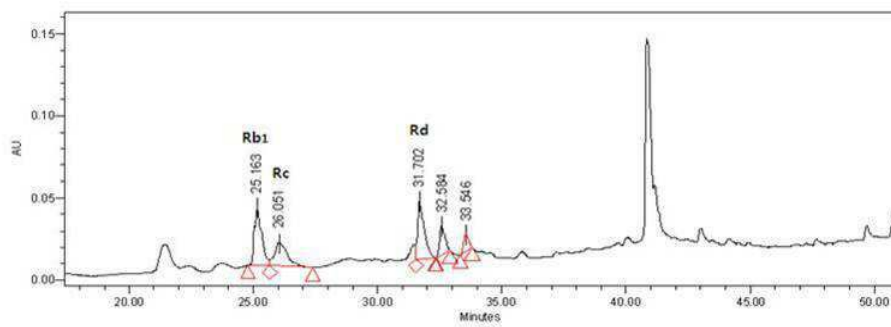
도면1



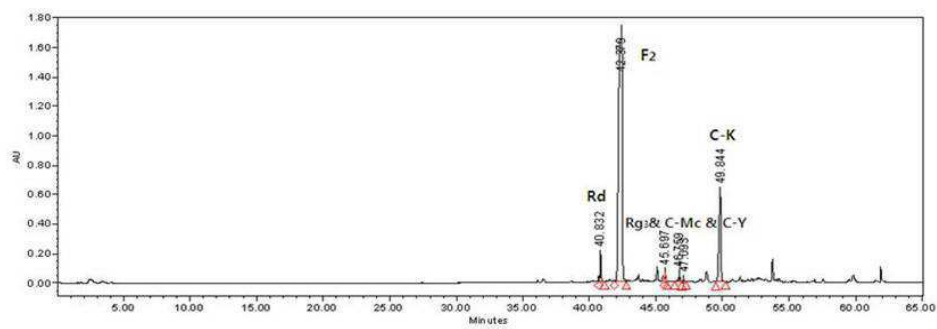
도면2



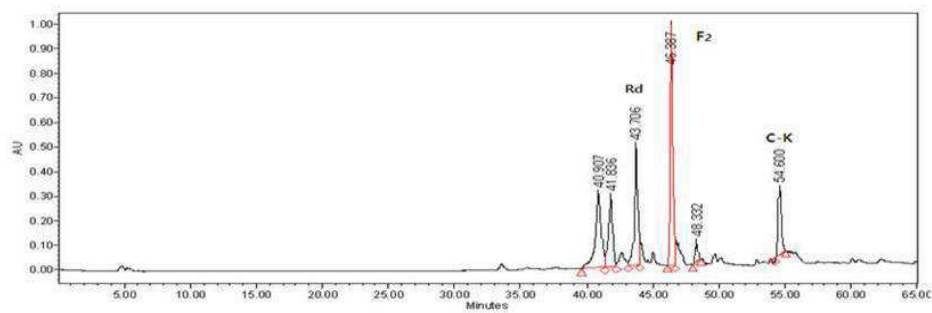
도면3



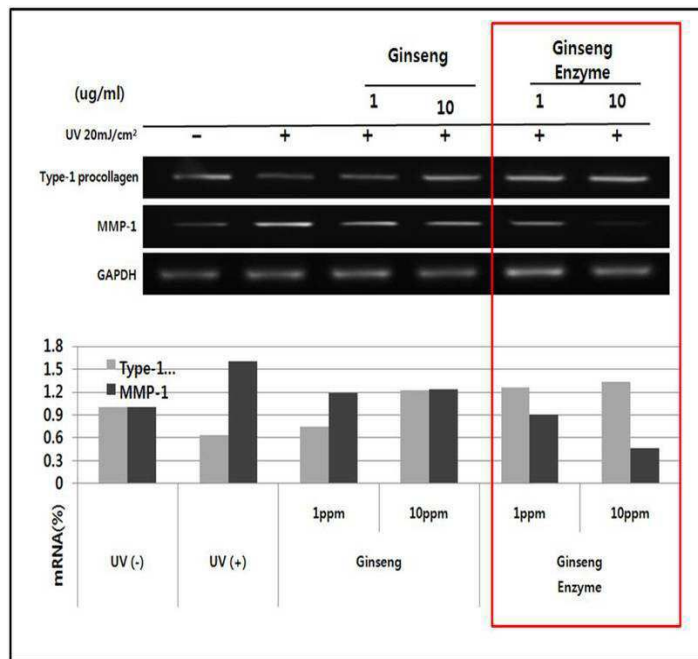
도면4



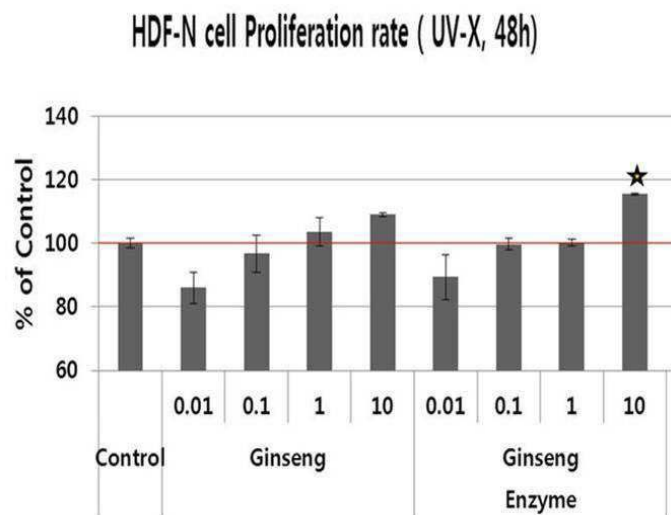
도면5



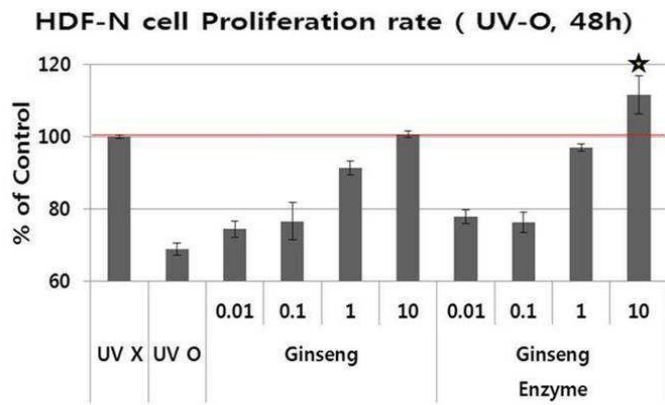
도면6



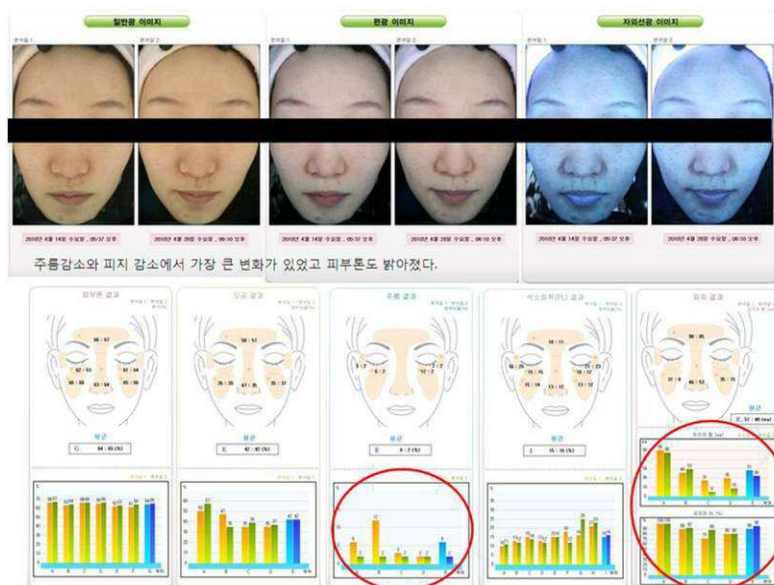
도면7



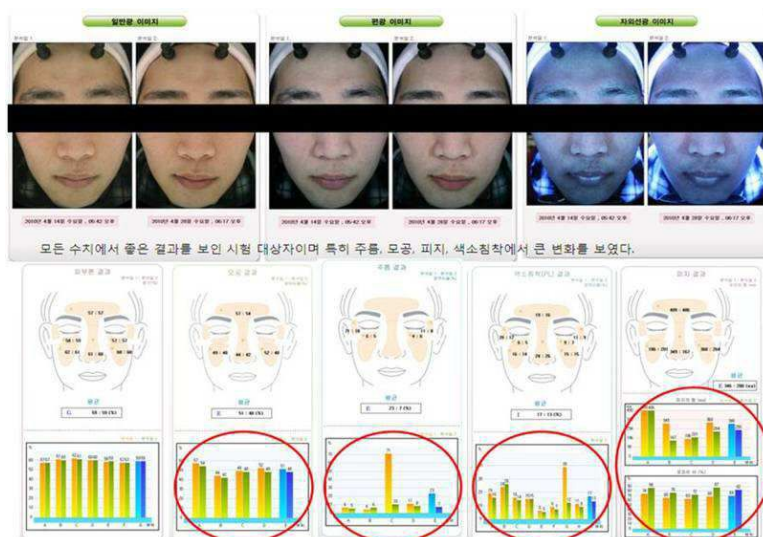
도면8



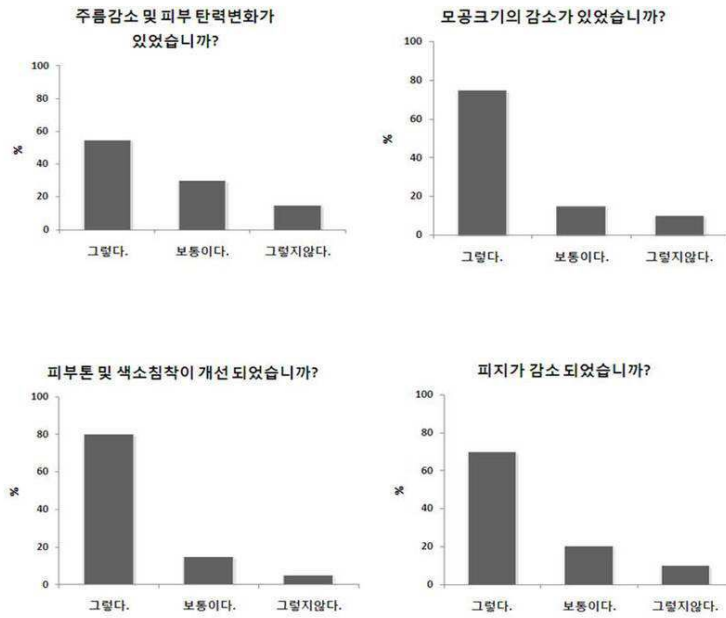
도면9



도면10



도면11



도면12

