



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0103807
(43) 공개일자 2023년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/232 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/30 (2006.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/232 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0024289

(22) 출원일자 2022년02월24일

심사청구일자 2022년02월24일

(30) 우선권주장

1020210193074 2021년12월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

주식회사 코스모젠

경기도 수원시 영통구 덕영대로1556번길 16, 비동604호(영통동, 디지털엠펜이어)

(72) 발명자

김기영

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)

김지영

경기도 광주시 곤지암읍 광여로313번길 33-43
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

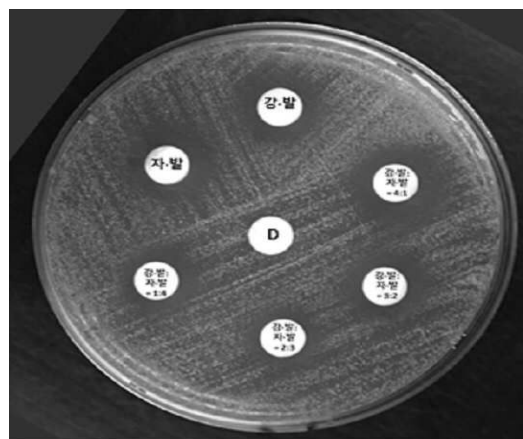
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 균주를 이용한 강활 및 자초 추출물의 발효물을 유효성분으로 포함하는 향균 조성물

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 균주(*Lactobacillus* spp.)를 이용한 강활(*Angelica koreana*) 및 자초(*Arnebia euchroma*) 추출물의 발효물을 유효성분으로 포함하는 향균 조성물에 관한 것으로, 강활(*Angelica koreana*) 및 자초(*Arnebia euchroma*) 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효함으로써, 상기 발효물이 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 향균 활성 증가 및 바이오필름 형성 저해 효과를 나타내는 것을 확인함에 따라, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/30 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61P 31/04 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

(72) 발명자

차윤지

경기도 수원시 영통구 영통로153번길 72-3, A동
 201호(망포동, 태성빌라)

김재구

경기도 화성시 동탄원천로 315-13, 732동 102호(능
 동, 동탄능동마을 주공아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425153495
과제번호	S2975821
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발(일반, R&D)
연구과제명	강활 및 자근 발효 추출물을 이용한 피부 상재균제어, 염증 완화 및 피부기능 증진
소재와 제품 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 코스모젠
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.30

명세서

청구범위

청구항 1

강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 병원성 질환은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 구강질환 또는 피부질환인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 내지 C4 알콜 또는 이의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 발효물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 락토바실러스 균은 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) KACC 12419, 락토바실러스 에시디페리네(*Lactobacillus acidifarinae*) KACC 16342 및 락토바실러스 에시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*) KACC 12394로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 발효물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 바이오필름 형성 저해 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 발효물은 30 내지 40℃에서 12 내지 96시간 발효한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 발효물은 강활 발효물 60 내지 80 중량% 및 자초 발효물을 20 내지 40 중량%로 혼합한 혼합 발효물을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 병원성 질환은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 피부질환인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클렌저로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 균주(*Lactobacillus* spp.)를 이용한 강활(*Angelica koreana*) 및 자초(*Arnebia euchroma*) 추출물의 발효물을 유효성분으로 포함하는 향균 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 소득수준의 향상과 웰빙 생활을 추구하는 소비자들이 증대됨에 따라 건강에 대한 관심이 높아져 화학합성의 식품 보존제에 대한 거부감이 커지고 있으므로, 우수한 효능의 천연 향균제 개발의 필요성이 증대되고 있다. 더욱이 천연향균제 개발과 관련하여 미생물 또는 미생물이 생산하는 배양물질의 향균능력에 대한 관심도가 높아지고, 보다 중요한 것은 일반적으로 안전하다고 인정하는 물질(GRAS, generally recognized as safe)인 유산균 중에서 향균력이 우수한 균주를 개발하는 데 관심이 집중되고 있다. 그러나 유산균의 경우 좁은 향균 스펙트럼으로 식품에 천연향균제로 적용이 어렵고, 병원성 세균뿐 아니라 효모나 곰팡이와 같은 진균에 향균효능이 있는 유산균 개발이 시급히 요구되고 있다. 유산균 중에서 비교적 안전성이 우수하다고 알려진 락토바실러스속 균주는 사람과 동물의 장관에 일정한 균총을 생성하고 면역증진작용, 유해독소의 중화, 영양분의 소화흡수의 증대 및 생리활성에 유익한 것으로 이미 잘 알려져 있어 여러 가지 형태로 복용되고 있다.

[0003] 강활(*Angelica Koreana* Maxim)은 동의보감 등에서 산한, 산풍, 제습, 지통, 도통, 풍습, 비통 및 견배산통을 다스리는 약재로 널리 사용되어 왔다. 특히, 구미강활탕은 육과준승방으로 동의보감 및 의학입문에 수록된 처방으로 사시를 막론하고 감모풍한일 때 응용되는 생약복합제 중 하나이다. 보고된 바에 따르면, 강활은 진통, 해열, 진경작용 등과 메탄을 추출물에서 약한 진통 작용이 있으며, 혈소판 응집억제 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 항염증작용의 결과도 최근 보고되고 있다.

[0004] 자초(*Arnebia euchroma* Johnst.)는 지치 또는 지초라고도 하며, 지치과(Boraginaceae)에 속하는 지치(*Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini), 신강자초(新疆紫草, *Arnebia euchroma* Johnst) 또는 내몽자초(内蒙紫草, *Arnebia guttata* Bunge)의 뿌리이다. 자초는 랑혈, 활혈, 해독하는 효능이 있어 항염 또는 항과민작용이 필요한 피부 질환에 주로 사용된다.

[0005] 그러나 강활 및 자초 추출물을 락토바실러스 균으로 발효한 발효물의 향균 효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 제10-0894411호(2009.01.30. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 락토바실러스 균주(*Lactobacillus* spp.)를 이용한 강활(*Angelica koreana*) 및 자초(*Arnebia euchroma*) 추출물의 발효물을 유효성분으로 포함하는 향균 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따르면, 강활(*Angelica koreana*) 및 자초(*Arnebia euchroma*) 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물이 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성 증가 및 바이오필름 형성 저해 효과를 나타내는 것을 확인함에 따라, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus* CCARM3505)에 대한 강활 및 자초 추출물의 항균 효과를 disk diffusion test를 통해 측정한 결과이다.
- 도 2는 *Lactobacillus* spp.(AD, AF, AP)를 이용한 강활(A) 및 자초(B) 발효물의 항균 효과를 disk diffusion test를 통해 측정한 결과이다.
- 도 3은 *L. acidifarinae*(AF)를 이용한 강활 및 자초 발효물(각각 강·발(A), 자·발(B))의 시간별(24~96h) 항균효과를 disk diffusion test를 통해 측정한 결과이다.
- 도 4는 *L. acidifarinae*(AF)를 이용한 강활 및 자초 발효물(각각 강·발, 자·발)의 혼합 비율에 따른 항균 효과를 disk diffusion test를 통해 측정한 결과이다.
- 도 5는 *L. acidifarinae*(AF)를 이용한 강활 발효물, 자초 발효물 및 발효혼합물(강·발:자·발=3:2)을 통한 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus* CCARM3505)의 바이오필름 형성 정도를 측정한 결과이다.
- 도 6은 강활 추출물 및 *L. acidifarinae*로 72시간 동안 발효한 강활 발효물에서 각각 생물전환 전, 후 물질에 대해 LC-MS를 수행한 결과이다.
- 도 7은 자초 추출물 및 *L. acidifarinae*로 72시간 동안 발효한 자초 발효물에서 각각 생물전환 전, 후 물질에 대해 LC-MS를 수행한 결과이다.
- 도 8은 동물세포인 HaCaT에 대한 강활 및 자초 추출물과 *L. acidifarinae*(AF)를 이용한 강활 및 자초 발효물의 세포생존능 변화를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0015] 본 발명은 강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토바실러스 균(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 병원성 질환은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 구강질환 또는 피부질환인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 상기 추출물은 물, C1 내지 C4 알콜 또는 이의 혼합용매로 추출할 수 있고, 바람직하게는 70 내지 80% 에탄올로

추출한 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0018] 상기 발효물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 락토바실러스 균은 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) KACC 12419, 락토바실러스 에시디피리네(*Lactobacillus acidifarinae*) KACC 16342 및 락토바실러스 에시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*) KACC 12394로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 락토바실러스 에시디피리네(*Lactobacillus acidifarinae*) KACC 16342일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 상기 발효물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 바이오필름 형성 저해 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 또한, 상기 발효물은 30 내지 40℃에서 12 내지 96시간 발효한 것을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 상기 발효물은 강활 발효물 60 내지 80 중량% 및 자초 발효물을 20 내지 40 중량%로 혼합한 혼합 발효물을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 자연계에 널리 분포되어 있는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 세계적으로 널리 알려진 식중독균 중의 하나로, 황금색 색소를 생성하고 용혈성을 가지며 응고효소(coagulase)를 생성하는 종으로, 화농성질환, 창상감염 등의 피부감염, 골관절염, 폐렴, 패혈증 등을 일으키는 병원성 높은 대표적인 유해세균으로 알려져 있다.
- [0024] 항생제 오남용 등의 원인으로, 최근 미국이나 네덜란드 등의 국가에서는 항생제 내성을 가지는 황색포도상구균이 발견되었으며, 이를 슈퍼박테리아로 불리기 시작하였다.
- [0025] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0026] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.
- [0028] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 외용제 형태로 제형화될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양

할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

- [0032] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토 바실러스 군(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능 식품"이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 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 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0037] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0038] 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.
- [0039] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0040] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0041] 본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 “개선”이란 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0043] 또한, 본 발명은 강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토 바실러스 군(*Lactobacillus* spp.)으로 발효한 발효물을 유효성분으로 포함하는, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 병원성 질환 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0044] 상기 병원성 질환은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유발 피부질환인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 화장품 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클렌저로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로 제형화할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0046] 상기 “유효성분으로 포함하는”은 피부 개선 효과를 나타낼 수 있는 유효량을 함유하는 것을 의미할 수 있다.
- [0047] 구체적으로, 상기 화장료 조성물은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형으로 제조할 수 있다. 예컨대, 유연 화장수 또는 영양 화장수 등의 화장수; 웨이셜 로션, 바디로션 등의 유액; 영양 크림, 수분 크림, 아이 크림 등의 크림; 에센스; 화장연고; 스프레이; 젤; 팩; 선 스크린; 메이크업 베이스; 액체 타입, 고체 타입 또는 스프레이 타입 등의 파운데이션; 파우더; 클렌징 크림, 클렌징 로션, 클렌징 오일 등의 메이크업 제거제; 또는 클렌징 폼, 비누, 바디워시 등의 세정제로 제형화될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 피부 외용제는, 연고, 패치, 젤, 크림 또는 분무제로 제형화될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 상기 화장료 조성물은 각각의 제형에 있어서 상기 필수성분 외에 제형의 종류 또는 사용 목적 등에 따라 본 발명에 따른 목적을 저해하지 않는 범위 내에서 다른 성분들이 적절히 배합될 수 있다.
- [0049] 상기 화장료 조성물은 통상적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있으며, 예컨대 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 상기 허용 가능한 담체는 제형에 따라 달리할 수 있다. 예컨대, 연고, 페이스트, 크림 또는 젤로 제형화될 때 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 또는 이들의 추출물이 사용될 수 있다.
- [0051] 상기 화장료 조성물은 파우더 또는 스프레이로 제형화될 때, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 또는 이들의 추출물이 사용될 수 있고, 스프레이의 경우 클로로플루오로히드로카본, 프로판, 부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 더 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 화장료 조성물은 용액 또는 유탁액으로 제형화될 때, 담체 성분으로서 용매, 용해화제, 또는 유탁화제가 사용될 수 있고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일이 사용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 사용될 수 있다.
- [0053] 상기 화장료 조성물은 현탁액으로 제형화될 때, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리 옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 사용될 수 있다.
- [0054] 상기 화장료 조성물이 비누로 제형화될 때, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 사용될 수 있다.
- [0055] 상기 화장료 조성물은 최종 제품의 품질이나 기능에 따라 업계에서 통상적으로 사용되는 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉 채제, 킬레이트화제, 보존제, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 추가적으로 함유할 수 있다.
- [0056] 다만, 상기 보조제 및 그 혼합 비율은 본 발명에 따른 화장료 조성물의 바람직한 성질에 영향을 미치지 않도록 적절히 선택할 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명은 강활(*Angelica koreana*) 또는 자초(*Arnebia euchroma*)에서 선택된 하나 이상의 추출물을 락토 바실러스 군(*Lactobacillus* spp.)으로 발효하는 단계를 포함하는 강활 및 자초 발효물 제조방법을 제공한다.
- [0059] 상기 제조방법은
- [0060] (1) 강활 및 자초에 증류수를 첨가하는 단계;
- [0061] (2) 20 내지 30℃에서 20 내지 24시간 동안 추출 및 여과하여 추출물을 제조하는 단계;
- [0062] (3) 상기 제조한 추출물의 농도를 8 내지 15 중량%로 조절하는 단계;

[0063] (4) 상기 제조한 추출물 중량에 대해 0.5 내지 2.0% 중량%로 락토바실러스 균을 접종하고, 30 내지 40℃에서 12 내지 96시간 발효하여 발효물을 제조하는 단계; 및

[0064] (5) 상기 발효물을 특정 중량 비율로 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0068] **[제조예 1] 강활 및 자초 추출물의 제조**

[0069] 강활 및 자초 각각의 에탄올 추출물은 다음의 과정을 통해 추출하였다. 강활 뿌리 건조물 및 자초 뿌리 건조물에 70~80%(v/v) 각각 에탄올을 5~10배수 가하여 실온에서 24시간 추출하는 과정을 2~3회 반복하였다. 추출물을 와트만 여과지(No. 2)로 감압 여과하여 불순물을 제거한 후, 여과된 추출물을 회전 농축기에서 감압 농축하고 건조시켜 강활 및 자초 추출물 각각의 고형분을 얻었다.

[0071] **[제조예 2] 강활 및 자초 발효물 제조**

[0072] 상기 제조예 1의 추출물을 증류수에 10%의 농도로 준비하고, 발효 미생물인 락토바실러스 에시도필러스 KACC 12419(*Lactobacillus acidophilus* KACC 12419; 이하 AD라 함), 락토바실러스 에시디페리네 KACC 16342(*Lactobacillus acidifarinae* KACC 16342; 이하 AF라 함) 및 락토바실러스 에시디피시스 KACC 12394(*Lactobacillus acidipiscis* KACC 12394; 이하 AP라 함)를 각각 MRS 배지에서 37℃에서 밀봉하여 하루 동안 배양하였다. 발효 미생물이 1.0×10^7 CFU/mL 농도가 되도록 추출물에 첨가한 후, 37℃에서 밀봉하여 1~4일 동안 250rpm으로 교반하면서 배양하였다. 발효가 완료된 발효물은 3000rpm으로 10분간 원심 분리하여 고형성분을 갈아 앉혔고, 상층액은 syringe filter를 이용하여 여과하였다. 여과된 발효물을 동결 건조하였고 건조된 발효물을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다.

[0074] **[실시예 1] 디스크 확산 검사(Disk diffusion test)를 이용한 추출물의 항균력 비교**

[0075] 본 실험에서는 피부에서 흔히 검출되는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*; 이하 *S. aureus*라 함)에 대한 상기 제조예의 추출물 및 발효물의 항균 활성을 측정하였다. 상기 균은 항생제내성균주은행에서 구입하였다.

[0076] 8mm 직경 종이 디스크를 준비하고 상기 제조예 1에서 제조한 각 추출물을 한 방울 떨어뜨린 후, 종이 디스크를 *S. aureus*가 도말된 TSA 배지에 일정한 간격으로 두었다. TSA 배지를 37℃에서 24시간 배양하고, 디스크 주변에 클리어존(Clear zone)이 형성되는 것을 확인하여 그 직경(mm)을 측정하였다. 세균 감염증 치료 목적으로 널리 사용하는 암피실린(Ampicillin)을 양성 대조군으로 사용하였다.

표 1

Strains	Extracts	Clear zone(mm)
<i>S. aureus</i> (CCARM3505)	Ampicillin	26.0 ± 0
	강활 추출물	15.5 ± 1.1
	자초 추출물	15.9 ± 2.2

[0078] 강활 및 자초 추출물의 항균력을 측정한 결과, *S. aureus*에 대해서 각각 15.5 ± 1.1 , 15.9 ± 2.2 mm의 clear zone을 보였으며 우수한 항균 활성을 나타내었다(표 1 및 도 1).

[0080] **[실시예 2] 디스크 확산 검사(Disk diffusion test)를 통한 발효균에 따른 발효물의 항균력 비교**

[0081] 상기 식물들로부터 얻은 추출물을 *Lactobacillus* spp.을 이용하여 발효한 발효물의 항균력을 비교하기 위해 디스크 확산 검사 방법을 이용하였다.

[0082] 구체적으로, 실시예 1과 같이 디스크 확산 검사를 이용하되, 각 식물 추출물에 대해 서로 다른 *Lactobacillus* spp.을 이용하여 발효하였다. 발효 미생물이 1.0×10^7 CFU/mL 농도가 되도록 추출물에 첨가한 후, 37℃에서 밀봉하여 3일 동안 250rpm으로 교반하면서 배양하였다. 발효물을 여과 후 동결 건조하였고 건조된 발효물을 DMSO에 녹여 사용하였다.

표 2

Extracts	Fermentation Strains	Clear zone(mm)
		<i>S. aureus</i>
Ampicillin	-	26.0 ± 0.2
강활 발효물	<i>L. acidophilus</i> (AD)	18.7 ± 3.2
	<i>L. acidifarinae</i> (AF)	19.2 ± 2.3
	<i>L. acidipiscis</i> (AP)	12.0 ± 0
자초 발효물	<i>L. acidophilus</i> (AD)	15.0 ± 2.1
	<i>L. acidifarinae</i> (AF)	16.6 ± 1.5
	<i>L. acidipiscis</i> (AP)	12.0 ± 0

[0084] 발효균에 따른 강활 및 자초 발효물의 항균력을 측정된 결과, *S. aureus*에 대해서 AF 균주로 3일 동안 발효하였을 때 각각의 식물 발효물에 대해, 19.2±2.3, 16.6±1.5mm의 clear zone을 보이며, 추출물의 비해 더 우수한 항균 활성을 나타내었다(표 2 및 도 2).

[실시예 3] 디스크 확산 검사(Disk diffusion test)를 통한 발효 시간에 따른 발효물의 항균력 비교

[0087] 상기 발효물 중 AF 균주를 이용하여 발효 시간에 따른 발효물의 항균력을 비교하기 위해 디스크 확산 검사 방법을 이용하였다.

[0088] 구체적으로, 실시예 1과 같이 디스크 확산 검사를 이용하되, 각 식물 추출물에 대해 AF 균주를 이용하여 발효하였다. 발효 미생물이 1.0×10^7 CFU/mL 농도가 되도록 추출물에 첨가한 후, 37℃에서 밀봉하여 1~4일 동안 250rpm으로 교반하면서 배양하였다. 발효물을 여과 후 동결 건조하였고 건조된 발효물을 DMSO에 녹여 사용하였다.

표 3

Strains		Clear zone(mm)			
		Fermentation time(h)			
		24	48	72	96
<i>S. aureus</i> (CCARM3505)	강활+AF 발효물	15.6	15.3	17.8	15.2
	자초+AF 발효물	15.6	15.4	16.4	14.5

[0090] 발효 시간에 따른 강활 및 자초 발효물의 항균력을 측정된 결과, *S. aureus*에 대해서 3일(72h) 동안 발효하였을 때 각각의 식물 발효물에 대해, 17.8, 16.4mm의 clear zone을 보이며, 가장 우수한 항균 활성을 나타내었다(표 3 및 도 3).

[실시예 4] 디스크 확산 검사(Disk diffusion test)를 통한 발효물 비율에 따른 항균력 비교

[0093] 상기 발효물 중 AF 균주를 이용한 발효물의 비율에 따른 항균력을 비교하기 위해 디스크 확산 검사 방법을 이용하였다.

[0094] 실시예 1과 같이 디스크 확산 검사를 이용하였으며, 3일 동안 250rpm으로 교반하면서 배양하며 발효물을 준비하였다. 발효물을 여과 후 동결 건조하였고 건조된 발효물을 DMSO에 녹여 사용하였다. 각각의 발효물을 하기 표 4와 같은 비율로 종이 디스크에 떨어뜨려 사용하였다.

표 4

강활+AF:자초+AF 중량비율	Clear zone(mm)
	<i>S. aureus</i>
5:0	14.9
4:1	16.1
3:2	16.4
2:3	14.2
1:4	14.5
0:5	15.5

[0096] 발효물 비율에 따른 강활 및 자초 발효물의 항균력을 측정한 결과, *S. aureus*에 대해서 AF 균주에 의해 3일 (72h) 발효한 강활 발효물 및 자초 발효물의 비율이 3:2일 때 가장 큰 clear zone을 보이며(16.4mm) 우수한 항균 활성을 나타내었다(표 4 및 도 4).

[0098] [실시예 5] Crystal violet을 이용한 발효물로 인한 바이오필름(Biofilm) 형성 분석

[0099] 상기 AF를 이용한 발효물의 *S. aureus*의 바이오필름 형성 정도를 확인하기 위해, crystal violet solution을 이용하여 측정하였다.

[0100] 6 웰 플레이트(well plate)를 발효물과 함께 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 200 μ L의 PBS로 두 번 부드럽게 세척하여 모든 부유 세포를 제거하였다. 부유 세포를 제거한 후 바이오필름을 에탄올로 고정한 후 200 μ L 0.2% crystal violet solution(Thermo Fisher Scientific, USA)으로 5분 동안 염색하였다. 염색용액을 제거한 후, PBS로 여러 번 세척하고 건조하였다. 건조 후 33% 아세트산을 첨가하고 10분 동안 상치하여 용출액을 통해 바이오필름 형성의 정량적 평가를 수행하였다. 용출액의 흡광도는 마이크로플레이트 리더(Microplate reader)를 사용하여 OD₅₇₀의 값을 측정하였다.

[0101] 상기 AF를 이용한 발효물의 바이오필름 형성을 측정한 결과, *S. aureus*의 바이오필름 형성을 확인하였고, 자초 추출 발효물에서 가장 큰 바이오 필름 형성 저해 효능을 나타냈고, 강활 추출 발효물과 강활 및 자초 발효 혼합물에서는 50% 이상의 바이오필름 형성 저해 효능을 나타냈다(도 5).

[0103] [실시예 6] 강활 및 자초 추출물과 AF 균주를 이용한 발효물의 생물전환 성분 분석

[0104] 상기 생물 전환된 물질의 규명을 위한 LC-MS(Liquid chromatography massspectrometry) 분석은 상등액을 Ethyl acetate(EtOAc) 및 1-Butanol(n-BuOH, Bu)에 용해시키고 Turbolon Spray source(AB SCIEX) 및 ACQUITY UPLC BEH C18 Column(130 Å, 1.7 μ m, 2.1mm $\times$ 100mm)을 이용하여 수행되었다. 컬럼은 95% 아세트산암모늄 10mM을 포함한 물(A) 및 5% 아세토나이트릴(B)을 1.0mL/min의 유속으로 샘플은 처음 3분 동안 95% A를 흘려준 후 3분에서 15분까지 95%에서 75%까지 A 농도를 순차적으로 감소시켰으며, 15분에서 26분까지 72% A로 유지시키고, 26분에서 30분까지 20% A로 감소시켰다. 32분에서 35분까지 95%까지 A 농도를 유지시키며 측정하였다(표 5).

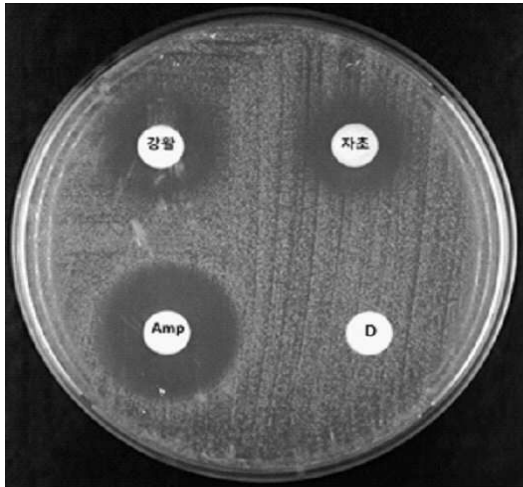
표 5

Time	Flow(ml/min)	A(%)	B(%)
	1	95	5
3	1	95	5
6	1	85	15
12	1	75	25
15	1	75	25
18	1	72	28
26	1	72	28
30	1	20	80
32	1	95	5
35	1	95	5

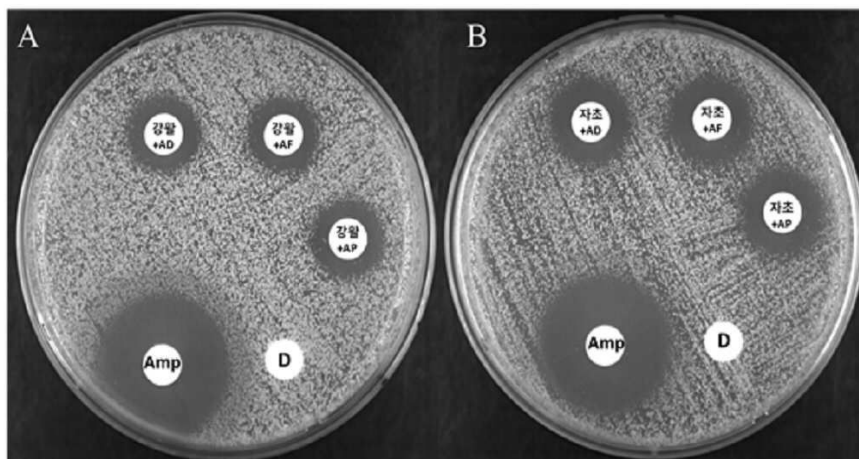
- [0106] 추출물 및 발효물에서의 전환된 성분을 분석하기 위해 HPLC를 수행한 결과, 강활 EtOAc(EA) fraction TIC chromatogram 상에서 22.688, 29.596 min의 major peak가 강활 발효물 상에서는 관측되지 않고, 5.845, 9.000, 11.715, 12.917, 14.041 min에서 major peak가 새로이 관측되는 것을 확인하여, 발효로 인해 변화가 생긴 것으로 관측되었다. 강활 n-BuOH(Bu) fraction TIC chromatogram 상에서 22.662, 25.498, 29.596 min의 major peak가 강활 발효물 상에서는 관측되지 않는 것을 확인하여, 발효로 인해 변화가 생긴 것으로 관측되었다(도 6).
- [0107] 자초 EtOAc(EA) fraction TIC chromatogram 상에서 28.835 min의 major peak가 자초 발효물 상에서는 관측되지 않고, 10.168 min에서 major peak가 새로이 관측되는 것을 확인하여, 발효로 인해 변화가 생긴 것으로 관측되었다. 자초 n-BuOH(Bu) fraction TIC chromatogram 상에서 29.596 min의 major peak가 자초 발효물 상에서는 관측되지 않고, 5.386, 6.830 min에서 major peak가 새로이 관측되는 것을 확인하여, 발효로 인해 변화가 생긴 것으로 관측되었다(도 7).
- [0109] **[실시예 7] MTT를 이용한 발효물로 인한 동물세포의 세포생존능 측정**
- [0110] 상기 추출물 및 AF 균주를 이용한 발효물을 통한 동물세포의 세포생존능을 확인하기 위해, MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.
- [0111] 혈청이 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)을 사용하여 HaCaT 세포를 10⁴ 개 세포 밀도로 96 웰 플레이트에서 뿌려 24시간 동안 배양하였다. 배양액 제거 후 추출물 또는 발효물을 함유하는 무혈청 배지를 웰에 첨가하였다. 24시간 추가 배양 후 MTT(Sigma)를 첨가하고 37℃에서 3시간 동안 반응하였다. 용액을 버리고 100 µL의 DMSO(Dimethyl Sulfoxide, Junsei, Japan)에 10분 동안 반응시켜 용해하였다. 용해액의 흡광도는 마이크로플레이트 리더(Microplate reader)를 사용하여 OD₅₄₀의 값을 측정하였다.
- [0112] 상기 추출물 및 발효물에 대한 세포생존능을 측정한 결과, 강활 추출물 250 µg/mL 이상에서 생존능이 크게 저해되었고, 자초 추출물은 실험에 사용한 모든 농도 범위에서 HaCaT의 생존능에 차이를 보이지 않았다. 각각 추출물의 발효물의 경우, 강활 발효물에서는 생존능을 저해하는 효과가 크게 개선되었고, 자초 발효물에서는 추출물과 비슷하게 생존능에 영향을 끼치지 않았다(도 8).
- [0114] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.
- [0115] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

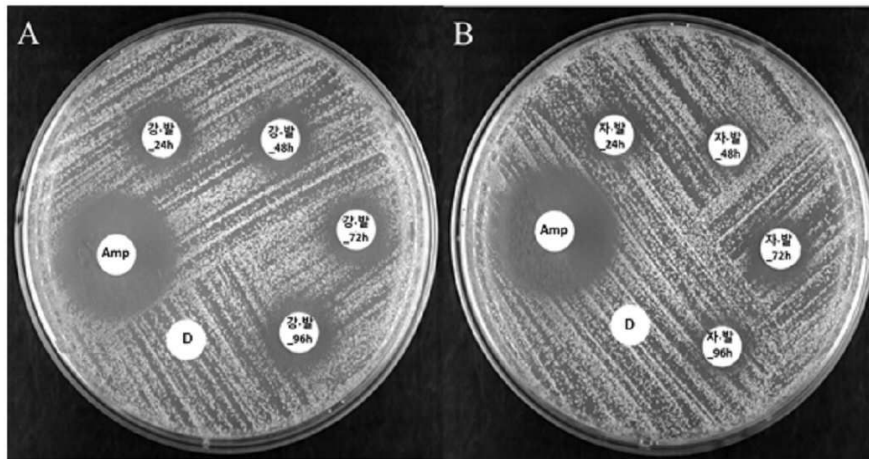
도면1



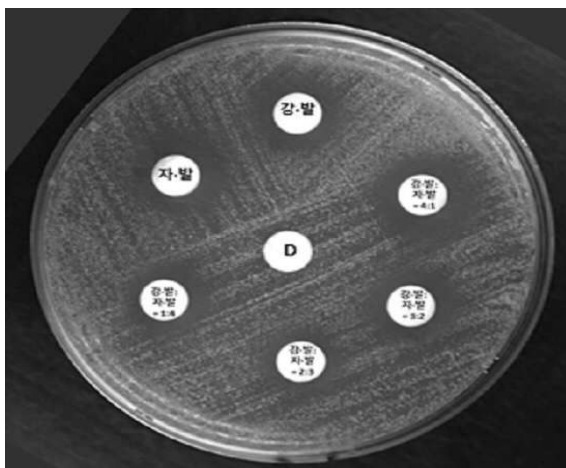
도면2



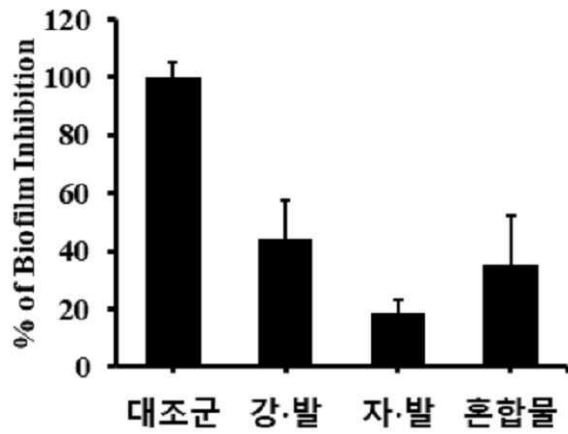
도면3



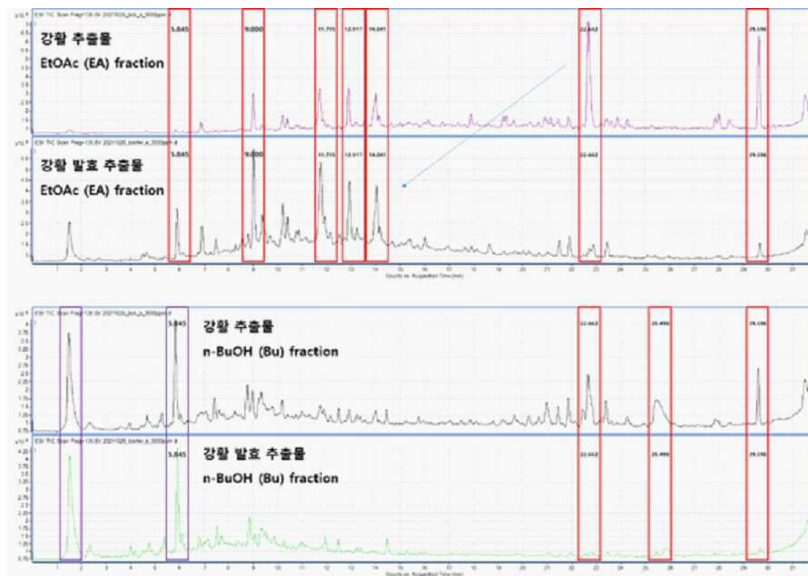
도면4



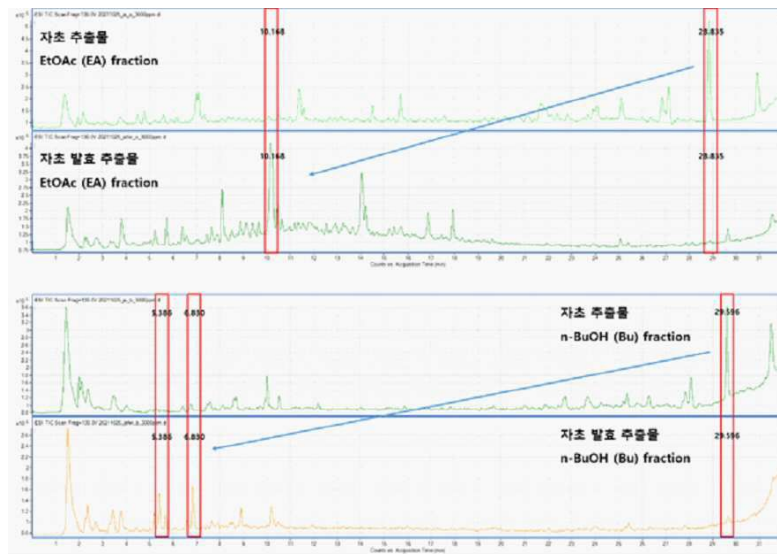
도면5



도면6



도면7



도면8

