(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월06일
(11) 등록번호 10-2739246
(24) 등록일자 2024년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/99 (2017.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/747 (2015.01) *A61K 8/9789* (2017.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/99 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0018321
(22) 출원일자 2022년02월11일
심사청구일자 2022년02월11일
(65) 공개번호 10-2023-0121661
(43) 공개일자 2023년08월21일
(56) 선행기술조사문헌
KR101915463 B1*
KR101938801 B1*
KR102155717 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 잇츠한불
서울특별시 강남구 학동로 311 (논현동)
(72) 발명자
배수정
충청북도 제천시 내토로59길 31,105동 3402호(장락동, 신안실크밸리 스카이시티)
김진화
서울특별시 영등포구 신길로29길 17, 112동 2204호(신길동, 신길센트럴자이아파트)
이근수
경기도 이천시 안흥로 60, 302동 405호(갈산동, 갈산동 현진에버빌)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 윤경원

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 균주 혼합물을 유효성분으로 포함하는 피부 보호용 조성물**

(57) 요 약

피부 보호용 조성물에 관한 것으로, 미세먼지, 자외선, 유해병원성균 및 건조한 환경에 의해 손상된 피부의 개선에 탁월한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2400/11 (2023.08)
A61K 2800/591 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 사케이(*Lactobacillus Sakei*) 균주 및 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) 균주 혼합물의 발효물을 포함하는 화장료 조성물로서,

상기 발효물은 브로콜리 발효물, 브로콜리 새싹 발효물 또는 이들의 혼합물인 것인, 화장료 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus Sakei*) AMP 5104 균주(KCTC14319BP) 및 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) HB-8023 균주(KCTC13322BP)인 것인 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 피부 보습, 자외선에 의한 피부 노화, 피부 항균, 피부 염증, 피부 면역, 피부 미백 또는 피부 장벽 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

락토바실러스 사케이(*Lactobacillus Sakei*) 균주 및 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) 균주 혼합물의 발효물을 포함하는 피부 보습, 자외선에 의한 피부 노화, 피부 항균, 피부 염증, 피부 면역, 피부 미백 또는 피부 장벽 개선용 피부 외용제 조성물로서,

상기 발효물은 브로콜리 발효물, 브로콜리 새싹 발효물 또는 이들의 혼합물인 것인, 피부 외용제 조성물.

청구항 7

락토바실러스 사케이(*Lactobacillus Sakei*) 균주 및 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) 균주 혼합물의 발효물을 포함하는 피부 보습, 자외선에 의한 피부 노화, 피부 항균, 피부 염증, 피부 면역, 피부 미백 또는 피부 장벽 개선용 식품 조성물로서,

상기 발효물은 브로콜리 발효물, 브로콜리 새싹 발효물 또는 이들의 혼합물인 것인, 식품 조성물.

청구항 8

락토바실러스 사케이(*Lactobacillus Sakei*) 균주 및 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) 균주 혼합물의 발효물을 포함하는 피부 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 발효물은 브로콜리 발효물, 브로콜리 새싹 발효물 또는 이들의 혼합물인 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 피부 염증 질환은 피부 상처, 피부염, 아토피 피부염, 소양증, 습진성 피부질환, 건성 습진, 홍반, 두드러기, 건선, 약발진, 및 여드름으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 피부 보호용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세먼지와 황사 등으로 인해 호흡기 뿐만아니라, 민감성 피부에도 자극성 반응이 잦아지고 있다. 민감성 피부를 가진 사람들에게서 홍조나 칙칙해진 피부 톤 및 거칠어진 피부 결 등이 관찰되는데 표면적 트러블을 해결하기 위해 피부에 일부러 손상을 가해 재생 효과를 주는 시술들은 자칫 피부의 근본적인 회복 능력을 무너뜨릴 수 있어 주의가 필요하다.

[0003] 따라서, 각종 외부 환경 요인들로 인해 지친 피부의 근본적인 건강과 탄력을 회복해줄 수 있도록 피부 자극을 완화시키고 기능을 개선시킬 뿐만 아니라, 인체 유해물질을 차단할 수 있는 새로운 소재의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 일 양상은 락토바실러스 균주 혼합물을 유효성분으로 포함하는 피부 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 일 양상은 2 종의 락토바실러스 속(*Lactobacillus sp.*) 균주 혼합물, 그의 건조물, 파쇄물, 배양액, 배양액의 추출물, 용해물, 발효물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0006] 일 구체예에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus Sakei*), 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 불가리쿠스*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*), 락토바실러스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 산프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 김치(*Lactobacillus kimchi*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 등인 것일 수 있다.

[0007] 다른 구체예에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus Sakei*) AMP 5104 균주(KCTC14319BP) 및 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) HB-8023 균주(KCTC13322BP)의 혼합물인 것일 수 있다.

[0008] 본 명세서에서 용어"배양액"은 "배양 상층액", "조건 배양액" 또는 "조정 배지"와 호환적으로 사용될 수 있고, 락토바실러스 속 균주가 시험관 내에서 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 균주를 일정기간 배양하여 얻는 상기 균주, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 전체 배지를 의미할 수 있다. 또한, 상기 배양액은 균주를 배양하여 얻은 균체 배양액에서 균체를 제거한 배양액을 의미할 수 있다. 한편, 상기 배양액 중 균체를 제거한 액체를 "상등액"이라고도 하며, 배양액을 일정시간 가만히 두어 하층에 가라앉은 부분을 제외한 상층의 액체만을 취하거나, 여과를 통해 균체를 제거하거나, 배양액을 원심분리하여 하부의 침전을 제거하고 상부의 액체만을 취하여 획득할 수 있다. 상기 "균체"는 본 발명의 균주 자체를 의미하는 것으로 피부 샘플 등으로부터 분리하여 선별한 균주 자체 또는 상기 균주를 배양하여 배양액으로부터 분리한 균주를 포함한다. 상기 균체는 배양액을 원심분리하여 하층에 가라앉은 부분을 취하여 획득할 수 있고, 또는 중력에 의해 배양액의 하층으로 가라앉으므로 일정 시간동안 가만히 두었다가 상부의 액체를 제거함으로써 획득할 수 있다.

[0009] 상기 배양액은 균주를 배양하여 수득된 배양액 자체, 그의 농축물, 또는 동결건조물 또는 배양액으로부터 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액, 그의 농축물 또는 동결건조물을 포함할 수 있다.

[0010] 상기 배양액은 락토바실러스 속 균주를 배지(예를 들면, 액상의 락토바실리(Lactobacilli) MRS 브로스(broth) 배지, 유산균 배지 제외)에서 10 ℃ 초과 또는 40 ℃ 미만 중 어느 온도에서 일정 시간, 예를 들면, 4 내지 72

시간 동안 배양하여 수득된 것일 수 있다.

[0011] 일 구체예에서, 균주의 배양 상층액은 균주 배양액을 원심분리나 여과시켜 균주를 제거하는 단계에 의해 수득될 수 있다.

[0012] 다른 구체예에서, 농축물은 상기 균주 배양액 자체, 또는 상기 배양액을 원심분리나 필터를 이용하여 여과한 후 수득된 상층액을 농축하는 단계에 의해 수득될 수 있다.

[0013] 상기 락토바실러스 속 균주를 배양하기 위한 배양용 배지 및 배양 조건은 통상의 지식을 가진 자가 적절하게 선택하거나 변형하여 이용할 수 있다.

[0014] 본 명세서에서 용어, "파쇄물"은 균주 자체를 화학적 또는 물리적 힘에 의하여 균주의 세포벽을 파쇄하여 얻은 산물을 의미할 수 있으며, "용해물"과 혼용되어 사용될 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 용어, "배양액 추출물"은 상기 배양액 또는 그의 농축액으로부터 추출한 것을 의미하며, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물, 이를 분획한 분획물을 포함할 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어, "발효물"은 유효성분을 증대시키고자 하는 천연소재를 포함하는 기질에 상기 1종 이상의 락토바실러스 속 균주를 접종하여 배양한 것을 의미할 수 있으며, 일 구체예에 있어서, 상기 발효물은 브로콜리 발효물, 브로콜리 새싹 발효물 등인 것일 수 있다. 상기 브로콜리는 배추속의 한 종류는 브라시카 올레라케아에 속하는 채소의 일종으로서, 상기 브로콜리 새싹은 3~4일된 브로콜리인 것일 수 있다.

[0017] 일 실시예에서는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus Sakei*) AMP 5104 균주(KCTC14319BP) 및 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) HB-8023 균주(KCTC13322BP)의 혼합 용해물 또는 상기 균주 혼합물에 의해 발효된 브로콜리 새싹 발효물이 상기 균주 각각의 용해물 또는 브로콜리 새싹 추출물과 비교하여 자외선에 의한 광 독성 억제 효과, 병원성 균에 의한 세포보호, 항균, 항염, 가려움증 억제 효과, 미세먼지에 의한 항-오염, 미백, 염증 개선 효과 및 피부 보습, 피부장벽 개선, 미백 효과가 우수한 것을 확인하였다. 따라서, 상기 조성물은 자외선, 병원성 균, 미세먼지, 건조 등과 같은 외부환경으로부터 피부 상태 개선의 시너지 효과를 가질 수 있다. 또한, 상기 조성물은 피부 염증 질환의 예방 또는 치료의 시너지 효과를 가질 수 있다.

[0018] 상기 피부 상태 개선은 피부 노화 억제 또는 개선, 항주름, 피부 장벽 강화, 피부 탄력 또는 피부 보습인 것일 수 있다. 상기 피부 염증 질환은 예를 들어, 피부 상처, 피부염, 아토피 피부염, 소양증, 습진성 피부질환, 건성 습진, 홍반, 두드러기, 건선, 약발진, 여드름 등인 것일 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 용어 "피부 노화"란 나이가 들어가면서 피부에 나타나게 되는 유형과 무형상의 변화를 통틀어 말하는 것으로, 예컨대 표피 두께가 얇아지는 현상, 진피의 세포 수나 혈관 수, DNA 손상복구 능력, 세포교체주기, 상처 회복, 피부장벽기능, 표피의 수분 유지, 땀분비, 피지분비, 비타민D 생산, 물리적 손상방어, 화학물질 제거능력, 면역반응, 감각 기능, 체온조절의 감소를 말한다.

[0020] 상기 조성물은 외인성 요인 또는 내인성 요인에 의해 유발되는 피부 노화 개선용일 수 있다. 상기 외인성 요인은 여러 가지 외부 요인, 예컨대 자외선(광)을 말하고 내인성 요인은 연대기적 요인이라고도 지칭되며 주로 시간의 흐름에 의해 발생하는 요인을 말한다. 즉, 상기 피부 노화는 구체적으로는 자외선, 공해, 담배연기, 미세먼지, 화학물질 등에 의한 외부 자극에 의해 유도되는 조기 노화 증상 뿐만 아니라, 나이가 들어감에 의해 피부 세포의 증식이 감소함에 따라 발생하는 자연노화 현상을 포함하며 주름, 탄력 감소, 피부 처짐 및 건조 현상 등을 모두 포함하는 개념이다. 또한 주름은 내·외부 요인의 변화에 의한 자극이 피부조직을 구성하고 있는 성분을 변화시켜 주름을 유발하는 것을 포함한다. 상기 노화는 광노화일 수 있다. 용어 "광노화(Photoaging)"는 외부 환경적인 요인에 의해 유발되는 현상으로, 가장 대표적인 인자로는 자외선이 있다. 자외선은 단백질 분해효소의 활성화와 기질단백질의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합 등의 생체 구성 성분들의 손상을 가져오고, 이러한 메커니즘의 반복은 외관상으로도 확연한 피부노화를 초래하게 된다.

[0021] 본 명세서에서 용어 "주름"은 피부의 탄력성이 상실되어 느슨해진 상태를 의미하며, 예를 들면 피부가 접히는 것일 수 있다. 상기 "피부 주름 예방 또는 개선"이란 주름과 관련된 인자의 발현을 억제하여 주름을 방지 또는 개선하거나, 콜라겐 총량을 증가시키는 모든 작용을 의미할 수 있다.

[0022] 상기 "피부 장벽 강화"는 피부 가장 바깥쪽에 위치하여 수분과 영양 손실을 막아주는 피부 장벽의 기능이 증진되는 모든 작용을 의미할 수 있다. 피부 장벽 기능 손상은 피부 장벽의 기능이 저하되거나 손상되어 피부에 나타나는 모든 변화를 의미할 수 있다. 예를 들어, 피부 주름 증가, 건조, 피부염, 아토피 피부염, 알레르기성 피

부염, 여드름 등을 포함할 수 있다.

[0023] 상기 "피부 보습"은 피부 수분을 유지하거나 수분 손실을 방지하는 모든 작용을 의미할 수 있다.

[0025] 상기 조성물은 화장료 조성물일 수 있다.

[0026] 상기 화장료 조성물은 예를 들면, 유연화장수, 영양화장수, 마사지크림, 영양크림, 에센스, 팩, 젤, 앰플 또는 피부 점착 타입의 화장료 제형을 갖는 것일 수 있다.

[0027] 상기 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 조성물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0029] 또한, 상기 조성물은 피부외용제용 조성물일 수 있다.

[0030] 상기 피부외용제는 크림, 겔, 연고, 피부 유화제, 피부 현탁액, 경피전달성 패치, 약물 함유 붕대, 로션, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 피부외용제는 통상 화장품이나 의약품 등의 피부외용제에 사용되는 성분, 예를 들면 수성성분, 유성성분, 분말성분, 알코올류, 보습제, 증점제, 자외선흡수제, 미백제, 방부제, 산화방지제, 계면활성제, 향료, 색제, 각종 피부 영양제, 또는 이들의 조합과 필요에 따라서 적절하게 배합될 수 있다. 상기 피부외용제는, 에데트산이나트륨, 에데트산삼나트륨, 시트르산나트륨, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨, 글루콘산 등의 금속봉쇄제, 카페인, 탄닌, 벨라파밀, 감초추출물, 글라블리딘, 칼린의 과실의 열수추출물, 각종생약, 아세트산토코페롤, 글리틸리틴산, 트라넥삼산 및 그 유도체 또는 그 염등의 약제, 비타민 C, 아스코르브산인산마그네슘, 아스코르브산글루코시드, 알부틴, 코지산, 글루코스, 프룩토스, 트레할로스 등의 당류등도 적절하게 배합할 수 있다.

[0032] 또한, 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.

[0033] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 희석제는 유당, 옥수수 전분, 대두유, 미정질 셀룰로오스, 또는 만니톨, 활택제로는 스테아린산 마그네슘, 탈크, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 담체는 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 부형제는 미결정 셀룰로오즈, 유당, 저치환도 히드록시셀룰로오즈, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 붕해제는 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 전분글리콜산 나트륨, 무수인산일수소 칼슘, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 결합제는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오즈, 히드록시프로필셀룰로오즈, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 활택제는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 탈크, 또는 그 조합일 수 있다.

[0034] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여 제형으로 제형화될 수 있다. 경구 투여 제형은 과립제, 산제, 액제, 정제, 캅셀제, 건조시럽제, 또는 그 조합일 수 있다. 비경구 투여 제형은 주사제일 수 있다.

[0036] 또한, 상기 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다.

[0037] 상기 건강기능식품 조성물은 상기 조성물 단독 또는 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 명세서의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 건강기능식품의 종류 중 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 건강식품 조성물은 또한 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제, 또는 그 조합을 함유할 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물은 또한, 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육, 또는 그 조합을 함유할 수 있다.

[0039] 다른 양상은 유효한 양의 상기한 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 처리 또는 투여하는 단계를 포함하는 개체의 상태를 예방, 개선, 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0040] 상기 개체의 상태는 피부와 관련된 상태일 수 있다.

[0041] 본 명세서에서 용어, "투여하는", "도입하는", 및 "이식하는"은 상호교환적으로 사용되고 일 구체예에 따른 조

성물의 원하는 부위로의 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의한 개체 내로의 일 구체예에 따른 조성물의 배치를 의미할 수 있다.

[0042] 투여는 당업계에 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 투여는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 경구, 경피(transdermal), 점막, 코안 (intranasal), 기관내 (intratracheal) 또는 피하 투여와 같은 경로로, 임의의 수단에 의하여 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.

[0043] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 피부 상태 개선, 예를 들어 피부 보습, 피부 장벽 강화, 피부 상처 치료, 피부 주름 개선 효과를 필요로 하는 개체일 수 있다.

[0044] 상기 투여는 일 구체예에 따른 조성물을 개체당 일당 0.1 ㎎ 내지 1,000 ㎎, 예를 들면, 0.1 ㎎ 내지 500 ㎎, 0.1 ㎎ 내지 100 ㎎, 0.1 ㎎ 내지 50 ㎎, 0.1 ㎎ 내지 25 ㎎, 1 ㎎ 내지 1,000 ㎎, 1 ㎎ 내지 500 ㎎, 1 ㎎ 내지 100 ㎎, 1 ㎎ 내지 50 ㎎, 1 ㎎ 내지 25 ㎎, 5 ㎎ 내지 1,000 ㎎, 5 ㎎ 내지 500 ㎎, 5 ㎎ 내지 100 ㎎, 5 ㎎ 내지 50 ㎎, 5 ㎎ 내지 25 ㎎, 10 ㎎ 내지 1,000 ㎎, 10 ㎎ 내지 500 ㎎, 10 ㎎ 내지 100 ㎎, 10 ㎎ 내지 50 ㎎, 또는 10 ㎎ 내지 25 ㎎을 투여하는 것일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1일 1회 또는 임상적으로 용인 가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있으며, 매일 또는 2 내지 5일 간격으로 총 투여 일수는 한번 치료 시 1일에서 30일까지 투여될 수 있다. 필요한 경우, 적정 시기 이후에 동일한 치료를 반복할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, ㎏당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0045] 일 양상에 따른 조성물은 락토바실러스 균주 혼합물을 유효성분으로 포함함으로써, 미세먼지, 자외선, 유해병원성균 및 건조한 환경에 의해 손상된 피부의 개선에 탁월한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 일 양상에 따른 조성물에 의한 피부 보호 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0048] **[준비예]**

[0049] **준비예 1. 균주의 분리**

[0050] 제주도 전통 김치 10 g을 멸균수 100 ㎖에 넣어 37 ℃에서 1시간 동안 정치한 후, 식염수로 희석하였다. 이후, 희석액을 락토바실리(Lactobacilli) MRS 브로스(broth) 고체 배지(BD사, 288130)에 희석 단계별로 100 ㎕씩 분주하여 평면도말한 뒤 도말된 고체 배지를 37 ℃에서 2일 동안 배양하였다. 이후, 형성된 콜로니를 분취한 후, 공지된 27F, 338F, 518F, 785F, 518R, 805R, 907R, 및 1492R 프라이머를 사용하여 16s rRNA 유전자 서열 동정을 실시하였다. PCR 증폭은 95℃ 1분, 55℃ 1분, 75℃ 1분30초씩 30 사이클로 실시하였으며, 마지막으로 72℃에서 8분간 처리한 후 4℃에서 보관하였다. PCR 반응이 끝난 뒤 분리 배양된 종들의 DNA 서열은 ABI-3730XL(ABI, USA)를 이용하여 결정하였다. 분리 배양된 미생물 콜로니 중 결정된 16S rRNA부위의 염기서열을 미국 국립생물정보센터(NCBI, National Center for Biotechnology Information) 홈페이지에서 제공되는 BLAST 프로그램으로 등록된 다른 균주들과 비교 분석하였다. 상동성 97% 이하의 신규성 있는 종들만 선별하여 사용하였고, 그 중 상동성 94% 이하의 신규 미생물(이하 "AMP 5104"라 함)을 선별하였다. AMP 5104는 서열번호 1(complementary DNA)의 16s rRNA 서열을 갖는다. 이후, 상기 균주를 2020년 9월 23일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC14319BP를 부여받았다.

[0052] **[실시예]**

[0053] **실시예 1. 락토바실러스 균주 용해물의 제조**

[0054] 2종의 락토바실러스 균주를 공배양한 후, 이의 용해물을 제조하였다. 구체적으로, 김치로부터 분리된 락토바실러스 사케이(Lactobacillus sakei subsp. Sakei) AMP 5104 균주(KCTC 14319BP) 및 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) HB-8023 균주(KCTC 13322BP)를 Lactobacilli MRS Broth (BD사, 288130)에 접종하여 35~37℃에서 1~3일 동안 배양하였다. 이후, 호모게나이저(homogenizer)를 이용하여 균주의 세포벽을 파쇄하였다.

[0055] **실시예 2. 락토바실러스 균주로 발효한 브로콜리 새싹 발효물의 제조**

[0056] 락토바실러스 균주로 발효한 브로콜리 새싹 발효물을 제조하였다. 구체적으로, 멸균한 브로콜리 새싹 건조물이 1~20중량%로 포함된 배지에 상기 실시예 1의 락토바실러스 사케이 균주 및 락토바실러스 펜토서스 균주를 접종하여 35~37℃에서 1~3일 동안 배양하였다. 이후, 배양액에서 상기 균체를 제거하였다.

[0058] **[비교예]**

[0059] **비교예 1. 락토바실러스 사케이 균주 용해물의 제조**

[0060] 김치로부터 분리된 락토바실러스 사케이(Lactobacillus sakei subsp. Sakei) AMP 5104 균주(KCTC14319BP)를 단독 배양하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 용해물을 제조하였다.

[0061] **비교예 2. 락토바실러스 펜토서스 균주 용해물의 제조**

[0062] 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus Pentosus*) HB-8023 균주(KCTC13322BP)를 단독 배양하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 용해물을 제조하였다.

[0063] **비교예 3. 브로콜리 새싹 추출물의 제조**

[0064] 용매 전체 중량에 대하여 브로콜리 새싹 건조물 1~20 중량%을 1~4시간 동안 열수 추출한 후, 여과하여 브로콜리 새싹 추출물을 제조하였다.

[0066] **[제조예]**

[0067] **제조예 1~2. 화장료 조성물의 제조**

[0068] 하기 표 1의 성분 및 함량을 포함하는 화장료 조성물을 제조하였다. 구체적으로, A상의 성분을 혼합한 후 70℃에서 가열하여 보전하였다. 이후, B상의 성분을 A상에 가하여 예비 유화한 뒤, 호모믹서로 균일하게 유화하고 서서히 냉각하여 크림 제형의 화장료 조성물을 제조하였다. 본 명세서에서 다른 언급이 없는 한 함량은 중량%이다.

표 1

[0069]

성분		제조예 1	제조예 2
		To 100	To 100
A	스테아릴알코올	1	1
	스테아릭애씨드	1	1
	스쿠알란	3	3
	옥틸도데칸올	5	5
	폴리솔베이트20	2	2
	글리세릴스테아레이트	1	1
B	실시예 1	1	-
	실시예 2	-	1
	부틸렌글라이콜	5	5
	적량	잔량	잔량

[0071] **[비교 제조예]**

[0072] **비교 제조예 1~3. 화장료 조성물의 제조**

[0073] 하기 표 2의 성분 및 함량을 포함하였다는 점을 제외하고는 상기 제조예와 동일한 방법으로 화장료 조성물을 제조하였다.

표 2

[0074]

성분		비교 제조예 1	비교 제조예 2	비교 제조예 3
		To 100	To 100	To 100
A	스테아릴알코올	1	1	1
	스테아릭애씨드	1	1	1
	스쿠알란	3	3	3
	옥틸도데칸올	5	5	5
	폴리솔베이트20	2	2	2
	글리세릴스테아레이트	1	1	1
B	비교예 1	1	-	-
	비교예 2	-	1	-
	비교예 3	-	-	1
	부틸렌글라이콜	5	5	5
	적량	잔량	잔량	잔량

[0076] **[실험예]**

[0077] **세포 독성 확인**

[0078] 락토바실러스 균주 용해물 및 발효물의 세포 독성을 확인하였다. 구체적으로, 피부각질세포(keratinocyte cell, HaCaT)를 96-웰 플레이트에 4×10^4 세포/웰로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 2% FBS 함유 배지로 교환한 후, 상기 실시예 1~2 및 비교예 1~3을 농도별(0.3%, 0.6%, 2.5%, 5% 및 10%)로 처리하여 24시간 동안 추가로 배양하였다. 이후, MTT ASSAY로 세포 생존을 확인하고, 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 565 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

표 3

[0079]

	무처리	시료 함량에 따른 세포 생존율 (%)				
		0.30%	0.60%	2.50%	5%	10%
실시예 1	100	102.7	99.5	98.0	92.9	87.1
실시예 2	100	101.2	99.8	98.6	91.5	87.4
비교예 1	100	97.9	97.2	96.6	89.1	83.9
비교예 2	100	98.5	97.7	96.9	92.7	85.2
비교예 3	100	98.3	96.3	95.4	87.7	86.5

[0080] 그 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이, 실시예 1~2 및 비교예 1~3은 80% 이상의 세포 생존율을 나타냄에 따라 세포 독성이 없는 안전한 물질임을 확인할 수 있었다.

[0081] **광 독성 억제 효과 확인**

[0082] 자외선에 노출된 피부는 염증을 유발할 수 있는 바, 락토바실러스 균주 용해물 및 발효물에 의한 광 독성 억제 효과를 확인하였다. 구체적으로, 피부각질세포(keratinocyte cell, HaCaT)를 96-웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰을 PBS(Phosphate buffered saline)로 1회 세척하고 각 웰에 PBS를 넣어준 뒤, 자외선 B(UVB) 램프(Model: F15T8, UV B 15W, Sankyo Dennki사, Japan)를 이용하여 자외선 20mJ/㎠를 조사하였다. 이후, PBS를 덜어내고 10% FBS가 첨가된 DMEM 1㎖을 첨가하고, 상기 실시예 1~2 및 비교예 1~3을 농도별(0%, 0.1%, 0.5% 및 1%)로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거하고, 각 웰 당 세포배양 배지와 MTT 용액을 넣은 후 2시간 동안 37℃, CO_2 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거하고 마이크로플레이트 판독기에서 565 ㎚ 흡광도를 측정하였다.

표 4

[0083]

	무처리	UVB 10mJ/㎠			
		시료 함량에 따른 세포 생존률 (%)			
		0 %	0.10%	0.50%	1.00%
실시예 1	100	49.1	55.7	71.6	83.9
실시예 2	100	49.1	53.5	69.6	78.5
비교예 1	100	49.1	51.3	61.3	71.6
비교예 2	100	49.1	52.4	64.4	73.8
비교예 3	100	49.1	49.2	51.2	52.7

[0084] 그 결과, 표 4에 나타낸 바와 같이, 실시예 1~2 및 비교예 1~3은 0.1 내지 1% 농도에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히, 실시예 1은 락토바실러스 균주 단독 용해물인 비교예 1 또는 2에 비해 세포 생존율이 현저하게 증가하였다.

[0085] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물은 자외선에 의한 세포 손상을 억제할 수 있는바, 광 손상 방어 효과가 우수함을 알 수 있다.

[0086] **병원성 균에 의한 세포보호 효과 확인**

[0087] 병원성 균에 의한 피부세포 보호 효과를 확인하였다. 구체적으로, 피부각질세포(keratinocyte cell, HaCaT)를 48 웰-플레이트에 5×10^4 세포/웰로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 무혈청 배지에서 실시예 1~2 및 비교예 1~3을 처리하였다. 24시간 후, cell lysis buffer를 첨가하여 37 ℃, CO_2 배양기에서 30분 동안 추가로 배양하였다. 이후, 96-웰 플레이트에 세포 배양액과 LDH Working Solution을 동량 첨가하여 암 조건에서 30분 동안 반응시킨 뒤, 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 490 ㎚에서 흡광도를 측정하고, 황색포도상구균 처리시 나타내는 세포 독성을 기준으로 그 결과를 계산하였다.

표 5

[0088]

		세포독성 (%)	세포보호효과(%)
황색포도상구균 처리	무처리	100.0	0.0
	실시예 1	35.2	64.8
	실시예 2	38.2	61.8
	비교예 1	77.4	22.6
	비교예 2	40.9	59.1
	비교예 3	85.7	14.3

[0089] 그 결과, 표 5에 나타낸 바와 같이, 무처리 대조군 및 비교예 1~3과 비교하여 실시예 1~2의 경우, 세포독성이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 세포보호효과는 세포 손상 시 분비되는 LDH의 분비 감소를 의미하는 것으로, 실시예 1~2의 경우, 비교예 1~3과 비교하여 무처리 대조군 대비 세포보호효과가 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0090] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물은 병원성 균에 의한 세포 독성을 억제하고, 세포 보호 효과가 현저한 바, 황색포도상구균을 포함한 다양한 병원성 균으로부터 피부를 보호할 수 있다.

[0091] **항균 및 항염증 활성 확인**

[0092] 병원성 균에 의한 항균 펩타이드 생성능 및 염증개선 효과를 통하여 항균 및 항염증 활성을 확인하였다. 구체적으로, 피부각질세포(keratinocyte cell, HaCaT)를 48 웰-플레이트에 5×10^4 세포/웰로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 무혈청 배지에서 실시예 1~2 및 비교예 1~3을 처리하였다. 24시간 후, cell lysis buffer를 첨가하여 37 ℃, CO_2 배양기에서 30분 동안 추가로 배양하였다. 이후, RNeasy Mini Kit(Hilden, Germany)를 이용하여 RNA를 분리한 뒤 nanodrop으로 260 ㎚에서 RNA를 정량한 후, 각각 2 ㎍의 RNA를 사용하여 증폭기에서 cDNA를 합성하였다. LunaScript® RT Super Mix Kit (Massachusetts, U.S.A). 합성된 cDNA를 주형으로 타겟 유전자

인 항균 펩타이드 인자(LL37, RNase7, HBD-2)와 사이토카인 인자(IL-1α, IL-1β, IL-8, TNF-α)에 대하여 사이버그린 (Luna Universal qPCR Master Mix, New England BioLabs, 미국)을 프라이머 및 cDNA와 함께 첨가하여 real-time PCR(MIC 2, Queensland)을 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 유전자의 발현량은 RPL13A 유전자에 대한 보정을 통해 최종적으로 분석하였고, 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0093]

		무처리	황색포도상구균과 시료 처리에 따른 발현량					
			무처리	실시예 1	실시예 2	비교예 1	비교예 2	비교예 3
항균 펩타이드 Gene	LL37	1	2.3	3.5	3.1	2.4	3.0	2.2
	RNase7	1	7.8	11.8	9.4	6.0	9.0	7.7
	HBD-2	1	2.0	2.6	2.4	1.8	2.5	1.8
사이토카인 Gene	TNF-α	1	1.7	0.9	1.4	1.5	1.1	1.6
	IL-8	1	2.2	1.7	1.9	1.2	1.8	2.1
	IL-1α	1	4.1	2.4	2.7	3.7	2.6	3.8
	IL-1β	1	2.8	2.0	2.5	1.4	2.3	2.6

[0094] 그 결과, 표 6에 나타낸 바와 같이, 무처리 대조군 및 비교예 1~3과 비교하여 실시예 1~2의 경우, 항균 펩타이드 유전자의 발현량은 유의하게 증가하였으며, 사이토카인 유전자의 발현은 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0095] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물은 황색포도상구균에 의해 증가된 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키고, 항균 펩타이드 유전자의 발현을 증가시킴으로써 병원성 균에 의한 피부 항균 및 항염증 활성을 나타낼 수 있다.

[0096] **가려움증 억제 효과 확인**

[0097] TSLP는 다양한 생물학적 신호전달을 비정상적으로 하여 면역불균형을 유발하는 최상의 단백질로, 외부항원이나 미생물의 접촉 시 피부를 구성하는 각질형성세포, 섬유아세포 또는 비반세포(mast cell)에서 생산되는 단백질이다. TSLP는 지금까지 밝혀진 다양한 생물학적 이유들 중 아토피 피부염의 가장 강력한 상위 유도체라고 할 수 있다. 따라서, TSLP 발현의 감소율을 측정함으로써, 병원성 균에 의한 가려움증 억제 효과를 확인하였다. 구체적으로, 10%의 FBS가 첨가된 배지에 피부각질세포(keratinocyte cell, HaCaT) 3×10^5/㎖를 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, FBS 2% 함유된 배지에 Poly (I:C) 5 ㎍/㎖와 실시예 1~2 및 비교예 1~3을 각각 희석한 후 48시간 동안 추가 배양하였다. 배양 후 총 RNA 추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하였고, 합성된 cDNA 1 ㎍을 이용하여, PCR을 실시하였다. PCR에 의하여 생성된 산물을 image analyzer(Davinch k, Korea)로 확인하였다.

표 7

[0098]

	TSLP 발현량			무처리 대비 TSLP 감소율 (%)
	무처리	황색포도상구균 0.5% 처리		
		무처리	0.1% 시료 처리	
실시예 1	1	50.9	7.5	85.27
실시예 2			10.9	78.59
비교예 1			11.4	77.60
비교예 2			12.2	76.03
비교예 3			48.2	5.30

[0099] 그 결과, 표 7에 나타낸 바와 같이, 무처리 대조군과 비교하여 황색포도상구균 0.5%를 처리한 경우, TSLP의 발현량이 현저히 증가하였고, 실시예 1~2 또는 비교예 1~3 처리에 의해 TSLP의 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 실시예 1 및 실시예 2를 처리한 경우, TSLP이 각각 85.27% 및 78.59%로 감소하여 비교예 1~3과 비교하여 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0100] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물은 TSLP의 발현을 현저히 감소시킴으로써 아토피 피부염의 예방, 치료 또는 개선에 탁월한 효과가 있다.

[0101] **항-오염(Anti-pollution) 활성 확인**

[0102] 항-오염(Anti-pollution) 효능 성분으로 잘 알려진 설포라판은 천연물들 중 십자화과(Brassica Brassicaseae)에 존재하며, 글루코시노레이트 (glucosinolates)가 미로시나제(myrosinase)라는 효소에 의해 가수분해되어 생성된 이소티오지아네이트류(isothiocyanates) 물질이다. 이렇게 생성된 화합물들은 초식동물과 병원균에 대한 식물 방어 역할로 알려져 있으며, 인간에게는 암을 예방하는 중요한 물질 중 하나이다. 설포라판은 십자화과 작물 중 항암 및 항염 천연물로 잘 알려진 브로콜리 과 브로콜리새싹에 많이 함유되어 있다. 브로콜리에는 글루코시노레이트 성분으로 글루코라파닌(glucoraphanin)이 대표적으로 함유되어 있으며 미로시나제에 의해 이소티오지아네이트류인 설포라판이 된다. 따라서, 서로 다른 2종의 락토바실러스 균주로 발효한 브로콜리 새싹 발효물과 브로콜리 새싹 추출물의 글루코라파닌과 설포라판의 함량 변화에 따른 항-오염 활성을 확인하였다. 구체적으로, HPLC(Waters 2695 Alliance separation module (waters, Milford, MA)) 및 Photo Diode Array 2998 (Waters, Milford, MA)를 사용하여 실시예 1~2 및 비교예 1~3 내 글루코파라닌 및 설포라판의 함량을 측정하였다.

표 8

[0103]

	글루코라파닌 (PPM)	설포라판 (PPM)
실시예 1	15231	0
실시예 2	24345	450
비교예 1	13112	0
비교예 2	12601	0
비교예 3	14573	110

[0104] 그 결과, 표 8에 나타낸 바와 같이, 비교예 3의 브로콜리 추출물과 비교하여, 실시예 2의 브로콜리 발효물에서 글루코라파닌 및 설포라판의 함량이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0105] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 균주의 브로콜리 새싹 발효물은 글루코파라닌 및 설포라판의 함량을 증가시킴으로써 각종 배기가스, 담배연기, 황사, 미세먼지와 같은 오염 물질의 피부 부착을 방지 및 완화시킬 뿐만 아니라, 오염 물질에 의한 손상으로부터 피부를 보호할 수 있다.

[0106] **미백 활성 확인**

[0107] 미세먼지에 의한 색소 침착 개선 효과를 확인하였다. 구체적으로, 6-웰 플레이트에 1×10^5 cells/well씩 멜라닌 형성 세포주를 분주하였다. 24시간 동안 배양 플레이트의 바닥에 세포가 붙을 수 있도록 한 뒤 Trans well insert에 각질형성세포주(keratinocyte cell, HaCaT)를 3×10^5 cells/㎖씩 분주하여 멜라닌 형성세포와 24시간 동안 공배양 하였다. 배양 후 Trans well insert에 Keratinocyte serum free (KFM)배지에 growth supplements, PM2.5 50ppm, 실시예 1~2 및 비교예 1~3을 각각 첨가한 배지를 각질형성세포가 있는 Trans well insert에만 넣고, Medium 254 배지를 멜라닌 형성 세포가 있는 웰 플레이트에 넣어 Trans well insert를 플레이트에 장착하였다. 72시간 동안 공배양한 후 멜라닌 형성세포, 각질형성세포를 배양한 배지들을 수거하여 Melanin assay를 수행하고, 마이크로플레이트 판독기로 측정하여 멜라닌 함량을 측정하였다. 양성 대조군으로는 설포라판 5 μM을 사용하였다.

표 9

[0108]

	멜라닌 함량 (%)			
	무처리	PM 2.5 50 PPM 처리		
		무처리	0.1% 시료 처리	설포라판 5μM

실시예 1	1	100	59.42	49.78
실시예 2			57.85	
비교예 1			79.34	
비교예 2			79.11	
비교예 3			80.17	

[0109] 그 결과, 표 9에 나타낸 바와 같이, PM 2.5 50 PPM 처리에 의하여 멜라닌 함량이 증가하였으며 실시예 1~2 및 비교예 1~3의 처리에 의해 증가된 멜라닌의 함량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 실시예 1~2를 처리한 경우, 비교예 1~3과 비교하여 멜라닌 함량이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0110] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물 및 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물은 미세먼지에 의한 멜라닌 형성 억제 효과를 나타낼 수 있다.

[0111] **염증개선 확인**

[0112] 미세먼지에 의한 염증 개선 효과를 확인하였다. 구체적으로, 상기 실험예에서 수거한 각질형성세포의 RNA를 RNeasy Mini Kit(Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였다. 이후, nanodrop으로 260 nm에서 RNA를 정량한 후, 각각 2 ㎍의 RNA를 사용하여 증폭기에서 cDNA를 합성하였다. LunaScript® RT Super Mix Kit (Massachusetts, U.S.A). 합성된 cDNA를 주형으로 타겟 유전자인 사이토카인 인자(IL-1β, IL-6, TNF-α)에 대하여 사이버그린(Luna Universal qPCR Master Mix, New England BioLabs, 미국)을 프라이머 및 cDNA와 함께 첨가하여 real-time PCR(MIC 2, Queensland)에서 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 유전자의 발현량은 RPL13A 유전자에 대한 보정을 통해 최종적으로 분석하였고, 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

[0113]

사이토카인 gene	무처리	PM2.5 50 PPM 처리						
		무처리	실시예 1	실시예 2	비교예 1	비교예 2	비교예 3	설포라판 5μM
TNF-α	1	5.41	5.09	3.41	5.38	5.11	4.89	2.12
IL-6	1	12.89	12.14	5.97	12.85	12.42	9.14	3.26
IL-1β	1	5.66	5.48	2.06	5.61	5.55	4.52	1.73

[0114] 그 결과, 표 10에 나타낸 바와 같이, PM2.5 50 PPM 처리에 의해 염증성 사이토카인의 발현이 증가하였고, 실시예 1~2 및 비교예 1~3 처리에 의해 증가된 사이토카인의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 락토바실러스 균주 각각의 용해물인 비교예 1 및 2와 비교하여 균주 혼합 용해물인 실시예 1에서 사이토카인의 발현이 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 브로콜리 새싹 추출물인 비교예 3과 비교하여 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물인 실시예 2에서 사이토카인의 발현이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0115] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물과 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물은 미세먼지에 의한 증가된 사이토카인의 발현을 억제함으로써, 염증 개선에 탁월한 효과가 있다.

[0116] **피부 보습 개선 효과 확인**

[0117] 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물과 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물의 피부 보습 개선 효과를 확인하였다. 구체적으로, 20~40대 여성 20명을 대상으로 측정 부위 두 곳을 정한 뒤, 피부 수분량을 각각 3회에 걸쳐 측정하였다. 이후, 제조예 1~2 및 비교 제조예 1~3을 측정 부위에 적량 도포한 후, 시간별(도포 30분 후, 60분 후, 90분 후 및 120분 후) 피부 수분량을 코네오미터(CM 825, C+K, Germany)로 측정하였다.

표 11

[0118]

시험군	도포 후 경과시간에 따른 피부수분량 (AU)				
	도포 전	도포 30분 후	도포 60분 후	도포 90분 후	도포 120분 후

제조예 1	40	82	79	75	70
제조예 2	40	80	77	73	68
비교 제조예 1	40	75	72	69	64
비교 제조예 2	40	78	74	71	66
비교 제조예 3	40	70	65	61	55

[0119] 그 결과, 표 11에 나타낸 바와 같이, 제조예 1 및 2의 경우, 비교 제조예 1~3과 비교하여 초기 수분량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도포 2시간 경과 후의 피부 수분량이 일정 함량 이상 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0120] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물과 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물은 도포 후의 피부 수분량을 현저히 증가시키며, 보습 지속력이 우수하여 피부 보습 개선 효과가 탁월하다.

[0121] **피부 장벽 개선 효과 확인**

[0122] 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물과 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물의 피부 장벽 개선 효과를 확인하기 위하여 경피 수분 손실량(TEWL: Trans Epidermal Water Loss)을 측정하였다. 구체적으로, 20~40대 여성 20명을 대상으로 측정 부위 두 곳을 정한 뒤, 제조예 1~2 및 비교예 1~3을 측정 부위에 적량 도포하도록 하였다. 이후, TEWL 프로브를 피검자의 측정 부위에 올려 놓아 1~3분 뒤 일정해 지는 값을 측정하였다.

표 12

[0123]

시험군	경피수분손실량(g/㎡/h)		
	도포 전	도포 후	△ TEWL
제조예 1	14.87	9.14	-5.73
제조예 2	14.76	9.71	-5.05
비교 제조예 1	14.83	11.49	-3.34
비교 제조예 2	14.92	11.37	-3.55
비교 제조예 3	15.03	12.22	-2.81

[0124] 그 결과, 표 12에 나타낸 바와 같이, 제조예 1~2는 비교 제조예 1~3과 비교하여 도포 전 후의 경피수분 손실량의 감소가 유의하게 적은 것을 확인할 수 있었다.

[0125] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 용해물과 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물은 경피 수분 손실량을 억제함으로써 피부 장벽 개선 효과를 나타낼 수 있다.

[0126] **피부 미백 효과 확인**

[0127] 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물의 피부 장벽 개선 효과를 확인하였다. 구체적으로, 20~35세 여성 20명을 대상으로 제조예 2 및 비교 제조예 3을 각각 1일 2회씩 2개월 동안 얼굴 좌우 양편에 도포하도록 하였다. 2개월 후, 도포 부위의 피부를 화상 분석기 및 크로마미터 (Minolta CR300)를 이용하여 색의 밝기변화(L)를 측정하고, 복수의 숙련자에 의한 객관적 육안 관찰과 피검자에 의한 주관적 육안 관찰을 실시하여 하기 등급 분류에 따라 효과를 측정하였다.

[0128] * -3: 매우 악화, -2: 악화, -1: 약간 악화, 0: 변화 없음, 1: 약간 개선, 2: 개선, 3: 매우 개선

표 13

[0129]

시험군	평균 값		
	피부색의 밝기 변화 (L)	숙련자의 객관적 평가	피검자의 주관적 평가
제조예 2	5.45	3.7	2.8
비교 제조예 3	1.75	2.1	1.8

[0130] 그 결과, 표 13에 나타낸 바와 같이, 제조예 2의 경우, 비교 제조예 3과 비교하여 피부색의 밝기가 현저히 변화

된 것을 확인할 수 있었으며, 육안으로 관찰한 결과에서도 피부 밝기가 개선된 것을 확인할 수 있었다.

[0131] 따라서, 일 구체예에 따른 락토바실러스 혼합 균주의 브로콜리 새싹 발효물은 유해한 외부 환경으로부터 피부 미백 개선 효과가 있다.

[0133] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 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.

도면

도면1

