

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0008491 (43) 공개일자 2008년01월24일
(51) Int. Cl.		(71) 출원인
A61K 8/97 (2006.01) A61K 36/73 (2006.01)		주식회사 참 존
A61Q 19/08 (2006.01)		서울특별시 강남구 청담동 106-16
(21) 출원번호 10-2006-0067815		(72) 발명자
(22) 출원일자 2006년07월20일		강병찬
심사청구일자 2006년07월20일		강원 원주시 무실동 1640 요진보네르APT 102동 1005호
		서원상
		경기 성남시 분당구 수내동 112-6
		(뒷면에 계속)
		(74) 대리인
		서종완

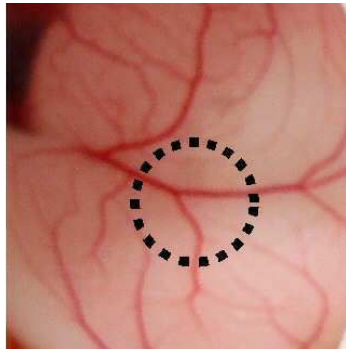
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 복분자 발효물 및 이를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 복분자 발효물에 관한 것이다. 본 발명의 복분자 발효물은 복분자를 유산균, 효모, 황국균, 홍국균, 고초균에서 선택된 1종 이상의 균주를 이용하여 발효한 것으로 주름개선 효능, 건선완화 효능, 항암 및 항조완화 효능 그리고 정장 효능을 나타낸다. 따라서 본 발명은 이러한 효능을 나타내는 복분자 발효물을 포함하는 각각의 화장료 조성물; 의약 조성물; 식품 조성물; 그리고 사료 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1b



(72) 발명자

김광년

경기 성남시 분당구 구미동 까치마을 신원APT 303
동 703호

최명준

경기 성남시 분당구 이매동 아름마을 선경APT
604-801호

김종현

강원 원주시 흥업면 매지리 745-6번지 3통 1반

특허청구의 범위

청구항 1

복분자에, 유산균류, 효모류, 고초균류, 황국균류 및 홍국균류 중에서 선택된 1종 이상의 미생물을 접종하고 발효하여 얻은 것인 복분자 발효물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 복분자가 복분자 자체 또는 그의 마쇄분말, 혹은 복분자의 추출물인 것인 복분자 발효물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 효모류가 사카로마이세스 세레비세 (*Saccharomyces cerevisiae*) CBI-YB41 균주(기탁번호 KCCM10763P)인 것인 복분자 발효물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 복분자와 함께 영양성분 또는 정제수를, 혹은 영양성분 및 정제수 모두를 추가로 사용하여 발효전 혼합물을 형성시킨 후 얻은 것인 복분자 발효물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 발효전 혼합물 중 복분자의 함량이 복분자 건조중량 기준으로 0.01~10 중량%인 것인 복분자 발효물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 영양성분이 효모 추출물, 대두 단백질, 맥아 추출물, 펩톤, 타이로신, 시스테인, 피틴산, 글루코스, 말토스, 락토스, 수크로스 및 엽류 중에서 선택된 1종 이상의 성분인 것인 복분자 발효물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 원심분리 또는 막분리하여 균체 및 불용성 물질을 제거한 후 살균 또는 제균하는 공정을 추가로 거쳐 얻는 것인 복분자 발효물.

청구항 8

제 1항의 복분자 발효물을 포함하는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 9

제 1항의 복분자 발효물을 포함하는 건선완화용 화장품 조성물.

청구항 10

제 1항의 복분자 발효물을 포함하는 항피부암 및 홍조완화용 화장품 조성물.

청구항 11

제 1항의 복분자 발효물을 포함하는 주름개선용, 건선완화용, 항암 및 홍조완화용 또는 정장용 의약 조성물.

청구항 12

제 1항의 복분자 발효물을 포함하는 주름개선용, 건선완화용, 항암 및 홍조완화용 또는 정장용 식품 조성물.

청구항 13

제 1항의 복분자 발효물을 포함하는 건선완화용, 항암 및 홍조완화용 또는 정장용 사료 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> 복분자 발효물 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- <3> 복분자에 대한 학술적 연구는 항산화 효과에 대한 것이 많이 있다. 복분자의 항산화 효과는 폴리페놀성 물질에 기인하는 것으로 복분자에서 coreanoside F1, suavissimoside, nigaichigoside F1, F2 등의 triterpenosides가 발견되었으며(Young-Hee Kim, et al., *Arch. Pharm. Res.* 16: 109-113 (1993)), epicatechin, catechin, procyanidin B-4, sanguin H-4 등의 탄닌류가 발견되어 있는 등(Yeon-Ah Lee, et al., *Kor. J. Pharmacogn.* 26: 27-30 (1995)) 복분자에는 약리 물질로 다양한 폴리페놀성 물질이 있는 것으로 알려져 있다.
- <4> 복분자의 폴리페놀성 물질의 성분은 복분자의 성숙도에 따라 변화하는데 안토시아닌은 복분자의 성숙에 따라 현저히 증가하는 반면 폴리페놀성 물질의 총량은 거의 변화하지 않거나 감소한다고 알려져 있다.(Hwan-Soo Cha, et al., *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 409-415 (2001), Kong-Sik Shin, et al., *Korean J. Plant. Res.* 16: 109-117 (2003))
- <5> 이러한 성분 변화에 따라 복분자의 약리효과도 변화하며 특히 항산화 효과는 복분자 성숙과에서 현저히 감소한다고 보고되었다.(Kong-Sik Shin, et al., *Korean J. Plant. Res.* 16: 109-117 (2003))
- <6> 복분자의 유효성에 대한 연구는 전술한 바와 같이 주로 항산화 효과에 대한 것이 많으며(In Yoon, et al., *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 499-502 (2003), Jong-Won Lee, et al., *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 943-947 (2000), In Yoon, et al., *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 898-904 (2002)) 특히 가수분해성 탄닌의 항산화 작용에 대한 보고가 있다(Kwang-Ho Kim, Et al., *Yakhak Heoji* 44: 354-357 (2000). 항산화 효과 이외의 유효성에 대해서는 최근에 혈압 상승을 유도하는 angiotensin 1 converting enzyme(ACE)에 대한 억제효과, 혈당 상승에 관여하는 α -glucosidase 활성 억제효과에 대한 보고(Mi-Kyoung Lee, et al., *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 11: 5-12 (2003))와, 항균 효과(Hwan-Soo Cha, et al., *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 409-415 (2001)), 항 히스타민 효과(Guang-Zhao Li, et al., *Korean J. Phys. Anthropol.* 17: 99-107 (2004)) 등 다양한 유효성이 보고되어 있다.
- <7> 관련된 특허로는 유리기 소거 능력이 우수한 생약제 엑기스 및 엑기스 건조분말의 제조방법(대한민국 특허청, 공고번호 특0141650), 자유라디칼 소거능 또는 세포내 항산화계에 대한 보호능이 있는 피부 외용제 조성물(대한민국 특허청, 출원번호 10-2002-0027050) 등 항산화 효과에 대한 것이 가장 많으며, 식물추출물을 함유하는 치주질환치료용 조성물(대한민국 특허청, 등록번호 10-0431170) 등 항균효과에 대한 특허, 당뇨병병증에 유효한 복분자 추출물(대한민국 특허청, 등록번호 10-0393908), 아토피성 피부염 치료용 화장료 조성물(대한민국 특허청, 등록번호 10-0451444), 피부자극 및 염증완화 효과를 갖는 라스베리 잎 또는 열매추출을 함유한 피부 외용제 조성물(대한민국 특허청, 등록번호 10-0444599), 여성초와 복분자의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 조성물(대한민국 특허청, 출원번호 10-2004-0007404) 등 아토피 등 피부 질환에 대한 특허가 있으며, 자외선에 의해 증가하는 프로스타글란딘을 억제하는 성분과 멜라닌 합성을 억제하는 성분을 동시에 함유하는 미백 화장료 조성물(대한민국 특허청, 등록번호 10-0406124) 등 다양한 특허가 출원 또는 등록되어 있다. 그러나 복분자의 발효에 대한 연구는 복분자주의 풍미를 개선하기 위한 것이 대부분으로 복분자를 발효함으로써 산업적 이용성이 있는 새로운 효능을 증진시킨 연구는 미미하다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <8> 본 발명의 목적은 복분자 발효를 통해 종래에 알려져 있지 않은 산업적 이용성이 높은 효능을 갖는 복분자 발효물을 제공하며, 나아가 이러한 효능을 갖는 의약품, 식품, 화장품 및 사료를 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <9> 본 발명은, 복분자에, 유산균류, 효모류, 고초균류, 황국균류 및 홍국균류 중에서 선택된 1종 이상의 미생물을 접종하고 발효하여 얻은 복분자 발효물에 관한 것이다.
- <10> 상기에서 복분자는 예를들면 복분자 자체 또는 그의 마쇄분말, 혹은 복분자의 추출물 등의 형태로서 적용가능하

다.

- <11> 기존의 복분자 발효의 대표적인 예는 복분자주로 복분자 완숙과즙을 효모를 이용해 발효함으로써 주류로서의 기호성을 높인 것이다. 본 발명의 최종 목적은 약리적 효능이 높은 발효물을 제공하는 것이므로 복분자 완숙과즙 대신 식물의 주요 기능성 물질인 폴리페놀의 함량이 완숙과즙에 비해 높은 복분자 미숙과를 이용하였다. 따라서 본 발명에서 기재하고 있는 "복분자"는 특별히 언급이 없는 한 "복분자 미숙과"를 지칭한다. 아울러 본 발명의 복분자 발효물은 전혀 새로운 것이다. 복분자 미숙과는 생 복분자 미숙과와 건조된 복분자 미숙과 모두 사용가능하지만 일반적으로 복분자 미숙과는 건조된 상태로서 한약재료로서 유통되고 있다.
- <12> 상기에서 효모류가 사카로마이세스 세레비세 (*Saccharomyces cerevisiae*) CBI-YB41 균주(기탁번호 KCCM10763 P)인 것이 바람직하다.
- <13> 상기 발효물의 제조시 바람직하게는, 복분자와 함께 영양성분 또는 정제수를 추가로 사용하여, 더욱 바람직하게는 영양성분과 정제수를 함께 추가로 사용하여 발효전 혼합물을 형성시킨 후 발효할 수 있다.
- <14> 상기 발효전 혼합물 중 복분자의 함량은 복분자 건조중량 기준으로 0.01~10 중량%인 것이 바람직하다. 여기에서 복분자 추출물의 경우에도 마찬가지로 복분자 건조중량 기준으로 0.01~10 중량% 해당량을 의미한다.
- <15> 상기 영양성분은 효모 추출물, 대두 단백질, 맥아 추출물, 펩톤, 타이로신, 시스테인, 피틴산, 글루코스, 말토스, 락토스, 수크로스 및 염류 중에서 선택된 1종 이상의 성분인 것이 바람직하다.
- <16> 또한, 발효온도 및 시간은 발효균주의 종류 및 접종량에 따라 변화될 수 있지만 발효조에서 1~7일간 25~45℃에서 시키는 것이 바람직하다.
- <17> 상기에서 얻어진 발효물은 바람직하게는, 균체 및 불용성 물질을 예를들어 원심분리 또는 막분리하여 제거한 후 살균 또는 제균하여 사용할 수 있다.
- <18> 본 발명의 다른 태양은 상기의 복분자 발효물을 포함하는 주름개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- <19> 또한 본 발명은, 상기의 복분자 발효물을 포함하는 건선완화용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- <20> 또한 본 발명은, 상기의 복분자 발효물을 포함하는 항피부암 및 홍조완화용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- <21> 또한 본 발명은, 상기의 복분자 발효물을 포함하는 주름개선용, 건선완화용, 항암 및 홍조완화용 또는 정장용 의약 조성물에 관한 것이다.
- <22> 또한 본 발명은, 상기의 복분자 발효물을 포함하는 주름개선용, 건선완화용, 항암 및 홍조완화용 또는 정장용 식품 조성물에 관한 것이다.
- <23> 또한 본 발명은, 상기의 복분자 발효물을 포함하는 건선완화용, 항암 및 홍조완화용 또는 정장용 사료 조성물에 관한 것이다.
- <24> 본 발명자들은 상기 복분자 발효물의 신규한 효능을 찾는 연구를 하였다. 복분자 발효물로부터 (1) 주름개선에 관련되는 탁월한 콜라겐 생성촉진 효과 및 매트릭스메탈로프로테이네이즈-1(MMP-1) 생성억제 효과를 발견하였으며 계속된 연구를 통해 (2) 콜라겐 생성과 건선 등의 피부질환의 주요한 요인으로 알려진 Th1 세포의 활성화를 억제하는 효능 즉 인터페론감마 생성 억제효과를 발견하였으며, (3) 매트릭스메탈로프로테이네이즈-1의 생성억제 효과는 암세포의 증식 및 전이와 안면 홍조를 유발하는 신생혈관의 형성을 억제할 수 있으므로 신생혈관 형성 억제 효능을 확인하였으며, (4) 정장작용과 관련이 있는 비피더스균 성장 촉진효과를 발견하였다. 따라서 복분자 발효물의 (a)주름개선, (b)건선 등 T세포 과활성화에 의한 질환의 완화, (c) 피부암 등에 대한 항암효과 및 안면 등에 대한 홍조 완화, 그리고 (d) 정장 효과를 얻기 위한 화장품, 의약품, 식품 및 사료로서의 용도를 제공하게 되었다.
- <25> 한의학 문헌에 기록된 복분자 열매의 효능은 다음과 같다.
- <26> - 성미는 달며 평하고 독이 없다. 간, 신경에 들어간다
- <27> - 기운을 돕고 몸을 가볍게 하며 머리털을 희여지지 않게 한다.(명의별록)
- <28> - 허한을 보하며 성기능을 높이고 속을 덥게 하며 기운을 세게 한다.(당본본초)
- <29> - 간을 보하고 눈을 밝게 한다.(당본본초)

- <30> - 남자의 신기부족, 정액고갈, 음위증을 낮게 한다. 또한 여자가 이것을 먹으면 아이를 가질 수 있게 된다. (약성론)
- <31> - 간과 신을 보하며 오줌량을 줄이며 폐의 허한증을 낮게 한다. (본초종신록)
- <32> 앞서 기술분야에서 기재한 여러 연구 논문들에서만 뿐만 아니라 상기 한의한 문헌들의 정보에서도 알 수 있듯이, 본 발명에서 밝힌 복분자 발효물의 효능에 관하여서는 항히스타민 효능을 제외하고는 복분자의 효능으로 알려진 바가 없는 전혀 새로운 효능들이다.
- <33> 본 발명에 포함된 주름개선, 항암, 홍조완화와 건선 등 T세포 과활성화에 의한 질환의 완화, 비피더스균 성장 촉진 효능 등을 목적으로 하는 복분자 발효물은 발효물 그 자체에 한정되는 것이 아니고, 이의 재가공물 및 복분자 발효물에 함유되어 상기의 효능을 발휘하는 화학물질 그 자체를 포함하는 것이다.
- <34> 본 발명의 복분자 발효물, 및 이들의 조성물은 주름개선, 항암, 홍조완화, 건선 등 T세포 과활성화에 의한 질환의 완화, 비피더스균 성장을 촉진시킬 목적으로 사용되며, 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없이, 예를 들면, 고상, 액상, 분무상, 겔상, 줄상, 크림상, 패치상일 수 있다. 또한 용도에 있어서도 특별히 한정되지 않으며 의약품, 식품, 화장품 또는 사료일 수 있다. 또한 각각의 제형에 있어서 상기한 필수성분 이외의 다른 성분들은 사용목적에 따라 선정하여 배합할 수 있다. 본 발명의 복분자 발효물은 해당 제품에 그대로 적용할 수도 있지만 동결건조나 분무건조등의 방법으로 건조시킨 후 보관 및 제품화할 수 있다.
- <35> 본 발명의 복분자 발효물을 포함하는 의약조성물의 경우 그 투여방법은 경구투여, 경피투여 뿐만 아니라 발열성 물질 제거 등 제조조건만 만족한다면 주사로도 가능하여 크게 제한받지 않는다. 본 발명의 복분자 발효물은 본래 오래전부터 식품으로 널리 이용되던 복분자를 전통 발효식품류에 이용되던 발효균주로 발효한 것이기 때문에 투여시 독성은 없다. 투여량은, 사용목적에 따라 크게 달라질 수 있으나 약효를 얻기 위해서는 본 발명의 복분자 발효물 건조중량으로 60kg의 성인을 기준으로하루 10~10,000 mg을 기본으로 하는 것이 바람직하다.
- <36> 이하 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 작용효과를 보다 구체적으로 설명하였으나, 본 발명이 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.
- <37> **실시예 1. 복분자 추출물**
- <38> 복분자 마쇄 분말 10 g에 정제수 1L를 가하고 가압조건에서 110℃에서 2시간 추출한 후, 400 메쉬 (mesh)로 고상물질을 제거한 후 0.4 μ m 막 분리기로 제균하여 복분자 추출물을 제조하였다.
- <39> **실시예 2. 복분자 추출물**
- <40> 복분자 마쇄 분말 10 g에 70% 에탄올 1L를 가하고 24시간 추출한 후, 400 메쉬로 고상물질을 제거한 후 0.4 μ m 막 분리기로 제균하여 복분자 추출물을 제조하였다.
- <41> **실시예 3. 복분자 발효물**
- <42> 5L 발효조에 실시예 1의 복분자 추출물 2L와 맥아 추출물 10g과 포도당 50g을 첨가하고 110℃에서 30분간 살균하여 복분자 발효배지를 제조하고 37℃로 냉각하였다. 여기에 막걸리로부터 분리한 사카로마이세스 세레비세 (*Saccharomyces cerevisiae*) CBI-YB41 균주(기탁번호 KCCM10763P)를 접종하여 37℃, 200rpm에서 3일간 혐기 발효하였다. 발효 종료 후 400 메쉬로 고상물질을 제거한 후 0.4 μ m 막 분리기로 제균하여 복분자 발효물을 제조하였다.
- <43> **실시예 4. 복분자 발효물**
- <44> 복분자 미숙과 마쇄 분말 20g과 맥아 추출물 10g과 포도당 50g을 정제수 2L에 첨가하고 110℃에서 30분간 살균하여 복분자 미숙과 발효배지를 제조하고 37℃로 냉각하였다. 여기에 막걸리로부터 분리한 사카로마이세스 세레비세 (*Saccharomyces cerevisiae*) CBI-YB41 균주(기탁번호 KCCM10763P)를 접종하여 37℃, 200rpm에서 3일간 혐기 발효하였다. 발효 종료 후 400 메쉬로 고상물질을 제거한 후 0.4 μ m 막 분리기로 제균하여 복분자 미숙과 발효물을 제조하였다.
- <45> **비교예 1. 복분자 완숙과 추출물**
- <46> 복분자 완숙과를 열풍 건조하고 마쇄한 분말 10 g에 정제수 1L를 가하고 가압조건에서 110℃에서 2시간 추출한 후, 400 메쉬 (mesh)로 고상물질을 제거한 후 0.4 μ m 막 분리기로 제균하여 복분자 완숙과 추출물을 제조하였다.

<47> **비교예 2. 복분자 완숙과 발효물**

<48> 5L 발효조에 비교예 1의 복분자 완숙과 추출물 2L와 맥아 추출물 10g과 포도당 50g을 첨가하고 110℃에서 30분간 살균하여 복분자 발효배지를 제조하고 37℃로 냉각하였다. 여기에 막걸리로부터 분리한 사카로마이세스 세레비세 (*Saccharomyces cerevisiae*) CBI-YB41 균주(기탁번호 KCCM10763P)를 접종하여 37℃, 200rpm에서 3일간 혐기 발효하였다. 발효 종료 후 400 메쉬로 고상물질을 제거한 후 0.4μm 막 분리기로 제균하여 복분자 완숙과 발효물을 제조하였다.

<49> **화장료 처방예 1~2.**

<50> 실시예 3 또는 4의 결과물을 함유한 화장료 중 유연 화장수(스킨)의 조성은 다음과 같다.

원 료	함량(중량%)
실시예 3 또는 4의 결과물	10.0
글리세린	3.0
부틸렌 글리콜	2.0
프로필렌 글리콜	2.0
카르복시비닐 폴리머	0.1
에탄올	10.0
트리에탄올아민	0.1
방부제	0.4
색소	0.001
향료	0.1
정제수	잔량

<52> **화장료 처방예 3~4.**

<53> 실시예 3 또는 4의 결과물을 함유한 화장료 중 영양화장수(로손)의 조성은 다음과 같다.

원 료	함량(중량%)
실시예 3 또는 4의 결과물	10.0
밀납	4.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄 세스퀴올레이트	0.5
유동 파라핀	5.0
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	5.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
카르복시비닐 폴리머	0.1
트리에탄올아민	0.2
방부제	0.4
색소	0.001
향료	0.1
정제수	잔량

<55> **화장료 처방예 5~6.**

<56> 실시예 3 또는 4의 결과물을 함유한 화장료 중 영양크림의 조성은 다음과 같다.

원 료	함량(중량%)
실시예 3 또는 4의 결과물	10.0
폴리옥시에틸렌소르비탄모노스테아레이트	0.7
솔비탄세스퀴올레이트	0.5
세틸알코올	0.6

스테아린산	0.75
글리세릴모노스테아레이트	0.6
유동파라핀	15.0
카르복시비닐폴리머	10.0
트리에탄올아민	0.2
방부제	0.4
색소	0.001
향료	0.1
정제수	잔량

<58>

<59> 화장료 처방예 7~8.

<60> 실시예 3 또는 4의 결과물을 함유한 화장료 중 팩의 조성은 다음과 같다.

<61>

원 료	함량(중량%)
실시예 3 또는 4의 결과물	10.0
폴리비닐알코올	13.0
소듐 카르복시메틸셀룰로스	0.2
알란토인	0.1
에탄올	5.0
노닐페닐 에테르	0.3
방부제	0.4
색소	0.001
향료	0.1
정제수	잔량

<62> 화장료 처방예 9~10.

<63> 실시예 3 또는 4의 결과물을 함유한 화장료 중 맛사지 크림의 조성은 다음과 같다.

<64>

원 료	함량(중량%)
실시예 3 또는 4의 결과물	10.0
밀납	10.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄 세스퀴올레이트	0.8
유동 파라핀	40.0
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	4.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.2
방부제	0.4
색소	0.001
향료	0.1
정제수	잔량

<65> 의약 제제예 1~2 : 정제

<66> 실시예 3 또는 4의 동결건조물 250.0 mg

<67> 락토오스 BP 250.0 mg

<68> 전분 BP 30.0 mg

- <69> 전젤라틴화 옥수수 전분 BP 15.0 mg
- <70> 스테아르산 마그네슘 1.0 mg
- <71> 실시예 3 또는 4의 동결건조물을 채질하고, 락토오스, 전분 및 전젤라틴화 옥수수 전분과 혼합한 후, 적합한 용적의 정제수를 첨가하고 분말로 과립화시켰다. 과립을 건조시킨 후 스테아르산마그네슘과 혼합하고 압착하여 정제를 각각 제조하였다.
- <72> **의약 제제예 3~4 : 캡슐제**
- <73> 실시예 3 또는 4의 동결건조물 250.0 mg
- <74> 전분 1500 100.0 mg
- <75> 스테아르산마그네슘 BP 1.0 mg
- <76> 실시예 3 또는 4의 동결건조물을 채질하고 전분 및 스테아르산마그네슘과 혼합한 후, 젤라틴 캡슐중에 충전하여 캡슐제를 각각 제조하였다.
- <77> **의약 제제예 5~6 : 액제**
- <78> 실시예 3 또는 4의 결과물 200.0 g
- <79> 백당 637.5 g
- <80> 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 2.0 g
- <81> 메칠파라벤 0.28 g
- <82> 프로필파라벤 0.12 g
- <83> 에탄올 20 ml
- <84> 정제수 500 ml에 백당을 용해시킨 용액에 카르복시메틸셀룰로오스나트륨을 정제수 400 ml에 용해시킨 용액을 가하여 혼합하였다. 여기에 메칠파라벤과 프로필파라벤을 가하여 용해시킨 후 에탄올을 가하고 정제수를 더 가하여 1000 ml로 하였다. 여기에 실시예 3 또는 4의 결과물을 혼합시켜 액제를 각각 제조하였다.
- <85> **의약 제제예 7~8 : 주사제**
- <86> 실시예 3 또는 4의 결과물 200.0 mg
- <87> 묽은 수산화나트륨 pH 7.5 ~8.5
- <88> 주사용 염화나트륨 BP 최대 2ml
- <89> 실시예 3 또는 4의 결과물을 적당한 용적의 묽은 수산화나트륨 용액에 용해하여 pH 7.5~8.5로 조절하고, 이어서 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고, 철저히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 2ml 타입 앰플중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부격자하에 봉입시키고 이어서 오토클레이브에서 살균하여 주사제를 각각 제조하였다.
- <90> **식품 처방예 1~2 : 음료**
- <91> 실시예 3 또는 4의 결과물 10 ml를 증류수로 희석하여 80 ml로 한 후, 여기에 액상 과당을 7~10 중량 %, 구연산을 0.1~0.2 중량 % 가하여 100 ml의 혼합음료를 각각 제조하였다.
- <92> **사료 처방예 1~2 : 분말사료**
- <93> 실시예 3 또는 4의 동결건조물을 일반 분말상 사료에 1:100 중량비로 혼합하여 분말 사료로서 사용한다.
- <94> **사료 처방예 3~4 : 액상사료**
- <95> 실시예 3 또는 4의 결과물을 일반 액상 사료 혹은 식수에 1:100 중량비로 혼합하여 액상 사료로서 사용한다.
- <96> **실험예 1. 콜라겐 생성 촉진 효과**
- <97> 복분자 발효물의 콜라겐 생성 촉진효과를 평가하기위하여 초대배양 인간섬유아세포를 FGM-2(Clonetics사) 배지에서 계대배양하고 trypsin-EDTA를 처리하여 배양용기의 바닥에서 떼어낸 후 시험배지로 사용한 DMEM(0.2% FBS,

0.1% BSA) 배지로 교체하여 5×10^4 cells/ml 이 되도록 한 후 96공 마이크로플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 신선한 시험배지 135 μ l로 교체한 후 PBS로 적절히 희석한 복분자 추출물 및 복분자 발효물시료를 15 μ l 첨가하고 3일간 추가 배양하였다. 세포로부터 생성된 콜라겐을 측정하기 위하여 ELISA를 이용하였으며 상세하게는 세포배양액 50 μ l를 새로운 96공 마이크로플레이트에 옮겨 37℃에서 2시간 동안 코팅하고 세척한 후 0.5% BSA로 블로킹(blocking)한 후 1차항체로 항-타입 1 프로콜라겐 항체 (anti-type 1 procollagen antibody: TaKaRa사)를 처리하여 항원과 결합하게 하고 다시 세척한 후 2차 항체로 항-IgG 항체 콘주게이트(포스파타제) [anti-IgG antibody conjugate(phosphatase): sigma사]를 처리하여 1차 항체와 결합하게 한 후 세척하고 기질용액인 pNPP 용액을 첨가하고 30분간 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정한 후 시료를 처리하지 않은 배양액의 흡광도와 비교하여 콜라겐 생성율을 계산하였다.

표 1

콜라겐 생성 촉진 효과(시료의 농도는 부피%)

실험 물질	콜라겐 생성율 (%)
비교예 2 (0.5%)	145.3
실시예 3 (0.5%)	307.3
실시예 4 (0.5%)	306.9
TGF- β 1 (5 ng/ml)	159.2

상기 표 1로부터 복분자 완숙과 발효물(비교예 2), 복분자 발효물(실시예 3, 4)은 모두 콜라겐 생성 촉진효과가 있음을 알 수 있었으나, 본 발명의 복분자 발효물(실시예 3, 4)이 현저히 높은 콜라겐 생성 촉진 효능을 나타냈으며, 이는 콜라겐 생성 조절의 주요한 사이토카인으로 알려진 TGF- β 1의 최대 유효 농도에서의 콜라겐 생성 촉진 효능보다도 현저히 높은 효능으로 본 발명의 발효물이 산업적 가치가 높은 주름개선 화장품임을 알 수 있었다.

실험예 2. MMP-1 생성 억제 효과

메트릭스메탈로프로테이네이즈-1(MMP-1) 생성억제 효능을 평가하기 위하여 초대배양 인간섬유아세포를 FGM-2(Clonetics사) 배지에서 계대배양하고 trypsin-EDTA를 처리하여 배양용기의 바닥에서 떼어낸 후 시험배지로 사용한 DMEM(2% FBS, 0.1% BSA) 배지로 교체하여 2×10^4 cells/ml 이 되도록 한 후 96공 마이크로플레이트에 100 μ l씩 분주하고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 신선한 시험배지 135 μ l로 교체한 후 PBS로 적절히 희석한 복분자 추출물 및 복분자 발효물 시료를 15 μ l 첨가하고 3일간 추가 배양하였다. 세포로부터 생성된 MMP-1을 측정하기 위하여 ELISA를 이용하였으며 상세하게는 세포배양액 50 μ l를 새로운 96공 마이크로플레이트에 옮겨 37℃에서 2시간 동안 coating하고 세척한 후 0.5% BSA로 블로킹한 후 1차항체로 항-매트릭스 메탈로프로테아제-1 항체 (anti-matrix metalloproteinase-1 antibody: Sigma사)를 처리하여 항원과 결합하게 하고 다시 세척한 후 2차항체로 항-IgG 항체 콘주게이트(포스파타제) [anti-IgG antibody conjugate(phosphatase): Sigma사]를 처리하여 1차 항체와 결합하게 한 후 세척하고 기질용액인 pNPP 용액을 첨가하고 30분간 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정한 후 시료를 처리하지 않은 배양액의 흡광도와 비교하여 생성율을 계산하였다.

표 2

MMP-1 생성 억제 효과

실험물질	MMP-1 생성율 (%)	실험물질	MMP-1 생성율 (%)
실시예 3 (1.000 v/v%)	23.1	실시예 4 (1.000 v/v%)	24.3
실시예 3 (0.100 v/v%)	25.7	실시예 4 (0.100 v/v%)	25.1
실시예 3 (0.010 v/v%)	49.1	실시예 4 (0.010 v/v%)	48.7
실시예 3 (0.001 v/v%)	76.5	실시예 4 (0.001 v/v%)	77.1

표 2로부터 본 발명의 복분자 발효물(실시예 3, 4)이 매우 낮은 농도(0.001 v/v%)에서도 MMP-1 생성억제 효능이 있음을 알 수 있었다. MMP-1은 콜라겐을 분해하는 효소로서 MMP-1의 억제는 화장품 업계에서 주름개선원료의 효능 평가 지표의 하나로 이용되고 있으며, 또한 MMP-1이 암전이의 필수과정인 신생혈관 형성과 부종 및 안면홍조

의 원인인 혈관확장을 유도한다고 밝혀져 있다. 따라서 본 발명의 복분자 발효물은 주름개선 효능뿐 아니라 암 전이 억제 및 안면홍조 완화 효능을 갖음을 알 수 있다.

<104> 실험예 3. 신생혈관형성 억제 효능

<105> 신생혈관형성 억제 효능을 평가하기 위하여 CAM(chorioallantoic membrane) 검정법을 이용하였으며 상세하게는 닭의 유정란을 37℃에서 3일간 배양한 후 계란 흰자5ml를 제거하고 계란 윗부분의 난각을 도려낸 후 3일간을 추가 배양하고 형성된 CAM에 시료를 점적하여 말린 커버슬라이드 (coverslip)를 올리고 2일간 추가 배양하여 신생 혈관형성 억제 효능을 평가하였다.

표 3

<106> 신생혈관형성 억제 효능

시료	시험량	억제효능이 나타난 계란의 수 / 시험한 계란의 수
대조군(PBS)	10 μ l	0/10
실시예 3의 10배 희석액	10 μ l	9/10
실시예 4의 10배 희석액	10 μ l	9/10

<107> 표 3의 결과로부터 본 발명의 복분자 발효물(실시예 3, 4)이 신생혈관형성 억제 효능이 있음을 알 수 있었다.

<108> 실험예 4. 인터페론감마 생성 억제 효과

<109> INF- γ 생성억제 효능을 평가하기 위하여 생쥐의 비장 (spleen) 세포를 1 X 10⁶ cells/ml이 되도록 RPMI(10% FBS) 배지에 현탁하고 INF- γ 를 유도하기 위해 0.5ug/ml 농도의 PHA(Phytohemagglutinin)와 25ng/ml 농도의 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)를 첨가한 후 96공 마이크로플레이트에 150 μ l 씩 분주한 후 시료를 15 μ l 첨가하고 24시간 배양하였다. 배양액 중 INF- γ 의 측정은 바이오소스사 (Biosource)의 ELISA kit를 이용하였다.

표 4

<110> 인터페론감마 생성 억제 효과

실험물질	INF- γ 생성율 (%)	실험물질	INF- γ 생성율 (%)
실시예 3 (2.27 v/v%)	21.12	실시예 4 (2.27 v/v%)	22.18
실시예 3 (0.57 v/v%)	31.86	실시예 4 (0.57 v/v%)	29.25
실시예 3 (0.14 v/v%)	43.21	실시예 4 (0.14 v/v%)	44.54

<111> 표 4로부터 본 발명의 복분자 발효물(실시예 3, 4)은 인터페론감마 생성억제 효과가 있음을 확인하였다. 인터페론감마는 생체내에서 콜라겐 생성을 억제하는 인자로 알려져 있으므로 인터페론감마의 생성 억제물질은 주름개선 효능을 갖음을 알 수 있다. 또한 인터페론감마는 건선의 주요 요인으로 알려져 있으므로 본 발명의 복분자 발효물은 건선완화 효능도 갖음을 알 수 있다.

<112> 실험예 5. 항 히스타민 효과

<113> 항 히스타민 효능을 평가하기 위하여 비만세포인 ATCC TIB-64를 수정된 DMEM(10% FBS) 배지에서 48시간 전배양 하고 완충용액으로 3회 세척한 후 5 X 10⁵ cells/ml이 되도록 하여 96공 마이크로플레이트에 분주하고 복분자 추출물 및 복분자 발효물을 첨가한 후 30분간 반응시키고 히스타민 방출 유도를 위해 C48/80을 첨가한 후 히스타민 정량 키트(Oxford Biomedical Research사)를 이용하여 방출된 히스타민의 양을 측정하였다.

표 5

<114> 항 히스타민 효과

실험물질	히스타민 분 비율 (%)	실험물질	히스타민 분비율 (%)	실험물질	히스타민 분 비율 (%)
실시예 1 (4.17 v/v%)	35.2	실시예 3 (4.17 v/v%)	29.9	실시예 4 (4.17 v/v%)	30.2
실시예 1 (1.04 v/v%)	31.6	실시예 3 (1.04 v/v%)	28.2	실시예 4 (1.04 v/v%)	31.3
실시예 1 (0.52 v/v%)	65.6	실시예 3 (0.52 v/v%)	36.1	실시예 4 (0.52 v/v%)	34.6

<115> 표 5로부터 복분자 추출물(실시예 1)과 복분자 발효물(실시예 3, 4)은 모두 항 히스타민 효과가 있으며 복분자의 효모 발효에 의해 항 히스타민 효능이 향상됨을 알 수 있었다. 복분자 추출물이 항 히스타민 효능을 갖고 있다는 것은 이미 알려져 있는 사실이며, 본 발명의 복분자 발효물은 복분자 추출물의 효능을 증진시킨 것이다.

<116> 실험예 6. 비피더스 성장 촉진 효과

<117> 비피더스 성장 촉진 효능을 평가하기 위하여 비피도박테리움 아돌레센티스 (*Bifidobacterium adolescentis*)를 뇌심장 조직 주입 액체 배지 (brain heart infusion broth)에서 전배양 한 후 동일 배지에 1% 부피로 접종한 후 복분자 발효물의 희석액을 첨가하고 16시간 37℃에서 배양한 후 630nm에서 흡광도를 측정하여 비피더스 성장 촉진 효능을 평가하였다.

표 6

<118> 비피더스 성장 촉진 효과

실험물질	흡광도	실험물질	흡광도
실시예 3 (5.000 v/v%)	0.206	실시예 4 (5.000 v/v%)	0.212
실시예 3 (2.500 v/v%)	0.171	실시예 4 (2.500 v/v%)	0.169
실시예 3 (1.250 v/v%)	0.133	실시예 4 (1.250 v/v%)	0.135
실시예 3 (0.625 v/v%)	0.118	실시예 4 (0.625 v/v%)	0.121
실시예 3 (0.313 v/v%)	0.115	실시예 4 (0.313 v/v%)	0.113
실시예 3 (0.156 v/v%)	0.109	실시예 4 (0.156 v/v%)	0.111
실시예 3 (0.078 v/v%)	0.108	실시예 4 (0.078 v/v%)	0.108
실시예 3 (0.039 v/v%)	0.105	실시예 4 (0.039 v/v%)	0.106
실시예 3 (0.020 v/v%)	0.104	실시예 4 (0.020 v/v%)	0.104
실시예 3 (0.000 v/v%)	0.101	실시예 4 (0.000 v/v%)	0.102

<119> 표 6으로부터 복분자 발효물(실시예 3, 4)이 비피더스 성장 촉진효능이 있음을 알 수 있었다.

발명의 효과

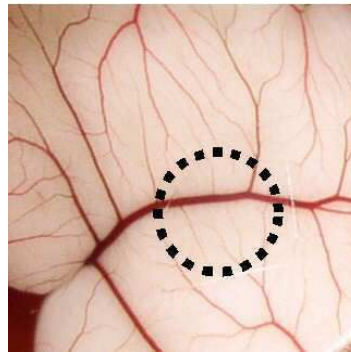
<120> 본 발명에 의해 독성이 없는 천연성분으로서 복분자 발효물을 포함하는 주름개선 효능, 건선완화 효능, 항암 및 홍조완화 효능 그리고 정장 효능을 나타내는 각각의 여러 가지 조성물, 즉 각각의 화장료 조성물; 의약 조성물; 식품 조성물; 그리고 사료 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

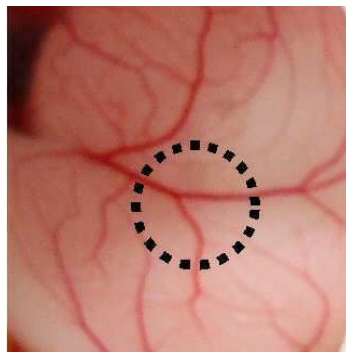
<1> 도 1은, 닭 유정란을 대조군(도 1a), 실시예 3 투여군(도 1b), 실시예 4 투여군(도 1c) 으로 나누어 코리올란란도의 맴브레인 검정법을 실시한 결과를 보여주는 사진이다.

도면

도면1a



도면1b



도면1c

