



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년02월23일
(11) 등록번호 10-1492003
(24) 등록일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A61K 8/99 (2006.01)
A23C 9/127 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0047390
(22) 출원일자 2013년04월29일
심사청구일자 2013년04월29일
(65) 공개번호 10-2014-0128674
(43) 공개일자 2014년11월06일
(56) 선행기술조사문헌
JP2008179601 A
KR101106077 B1
KR101068815 B1
JP2005029577 A

(73) 특허권자
주식회사한국아쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
이동은
경기 용인시 수지구 용구대로 2742, 108동 1203호
(죽전동, 동성1차아파트)
김현미
경기 수원시 영통구 영통로 498, 149동 1502호 (영통동, 황골마을주공1단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
경일호

전체 청구항 수 : 총 12 항

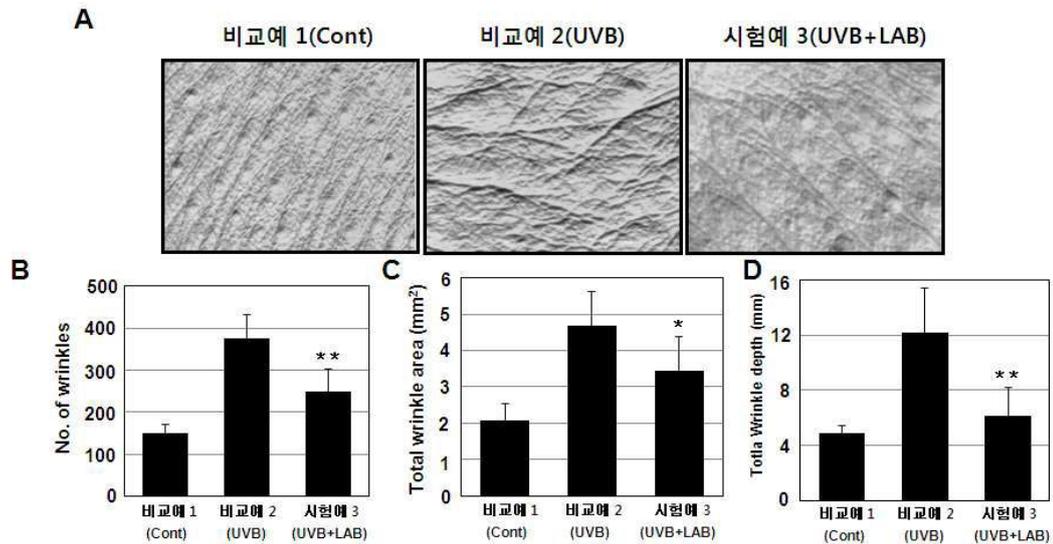
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 플란타룸 HY7714 및 이를 유효성분으로 함유하는 제형**

(57) 요약

본 발명은 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) HY7714 및 이를 유효성분으로 함유하는 제형에 관한 것으로서, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) HY7714는 세포 내 프로콜라겐(procollagen) 생성량 증가, 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 발현 회복, 자외선에 의해 유도된 MMP-1 발현 억제, 무모생귀를 이용한 광 손상 동물모델에서 피부주름 개선, 피부표피 두께 회복, MMP-13 발현 억제 및 보습 효과가 탁월하여 자연 노화 또는 광 손상에 의해 유도되는 피부 주름 개선 및 보습 효과를 나타내므로 주름 개선 및 보습 효능을 목적으로 한 약제, 식품, 화장품으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

박수동

경기 용인시 기흥구 고매로34번길 31, 205동 1003호 (고매동, 매화마을우림힐인원아파트)

김용태

경기도 성남시 중원구 제일로63번길 8-6 301호

김유진

경기 용인시 기흥구 금화로105번길 25, 202호 (상갈동)

정지용

서울 송파구 올림픽로43길 30, 5동 603호 (풍납동, 우성아파트)

이정희

서울 광진구 아차산로36길 13, 101동 102호 (자양동, 금강케이씨씨아파트)

명길선

서울 강남구 압구정로4길 20, 403호 (신사동, ㄱ레아빌)

장성식

경기 수원시 권선구 곡선로50번길 21-4, 403호 (곡반정동)

허철성

충남 천안시 동남구 터미널6길 12, 304동 505호 (신부동, 대림아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R0000452
부처명	지식경제부
연구관리전문기관	한국산업기술진흥원
연구사업명	광역경제권 연계협력사업
연구과제명	화장품 관련 기업 일류화 지원사업
기여율	1/1
주관기관	제주테크노파크
연구기간	2011.08.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

피부주름 개선 및 보습 효능을 가지는 신규 유산균인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 (기탁번호: KCTC 12400BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유산균은 세포내 프로콜라겐 생성증가, 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 발현 회복 및 자외선에 의해 증가된 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1) 발현 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유산균은 무모생쥐를 이용한 광 손상 동물모델에서 피부주름 개선, 피부표피 두께 회복, MMP-13(Matrix metalloproteinase-13) 발현 억제 및 피부보습 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 유효성분으로 함유하는 발효유.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 발효유는 총 조성물에 대하여 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 0.01~50중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 발효유.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 및 보습용 기능성 음료.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 기능성 음료는 총 조성물에 대하여 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 0.01~50중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 피부주름 개선 및 보습용 기능성 음료.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 및 보습용 건강기능식품.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 건강기능식품은 총 조성물에 대하여 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 0.01~50중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 피부주름 개선 및 보습용 건강기능식품.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 영양 크림, 수렴 화장수, 유연 화장수, 로션, 에센스, 영양젤, 립스틱, 파운데이션, 아이 셰도우, 팻취, 마스트 슈트, 마사지 크림 및 마스크 팩 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 총 조성물에 대하여 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714(기탁번호: KCTC 12400BP)를 0.01~50중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포 주에서 세포 내 프로콜라겐 (procollagen) 생성량 증가, 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 발현 회복, 자외선에 의해 증가된 MMP-1 발현 억제, 무모생쥐를 이용한 광 손상 동물모델에서 피부주름 개선, 피부표피 두께 회복, MMP-13 발현 억제 및 보습 효과를 나타냄으로써 자연 노화 또는 광 손상에 의해 유도되는 피부 주름 개선 및 보습 효능이 우수한 신규의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 태양 빛은 가시광선, 자외선, 적외선으로 구성된다. 이 중 자외선은 체내에서 비타민 D를 합성하고, 살균작용의 역할이 있으나, 피부염, 피부암, 일광 화상, 피부노화, 건조, 잔주름 등을 생기게도 한다. 자외선(Ultraviolet, UV)은 파장 길이에 따라 A, B, C의 3가지로 나뉘는데, 이 중 UVC는 오존층에서 차단되고 UVA와 UVB가 피부에 영향을 미친다.
- [0003] 특히, 중간 파장인 UVB(290~320nm)는 급성이나 만성적으로 노출되었을 경우, 심각한 피부 손상을 야기하는데, 피부 진피 내 구성성분인 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산 등을 파괴하여 피부의 탄력 소실을 유도하고 그 결과 굵은 주름이 생성된다.
- [0004] 피부의 노화는 광 노화와 자연노화로 나뉜다. 광 노화의 주요한 원인은 반복적인 자외선의 노출이며 자외선에 의해 생성되는 활성산소는 세포내 신호전달 체계를 손상시켜 피부에서 콜라겐(collagen)의 합성을 억제하며, 콜라겐을 분해하는 효소들의 발현을 증가시켜 불규칙적인 콜라겐을 형성한다. 이러한 특징적인 변화들은 광 노화를 유도하며 피부홍반, 거칠기, 깊은 주름 및 흑화를 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [0005] 사람의 피부 중 주요한 구성 성분은 콜라겐이며 특히 type I 콜라겐은 80%, type III 콜라겐은 15%를 차지한다. 정상 피부에서는 type I 콜라겐의 합성과 그 분해 효소인 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1)이 균형을 이루고 있다. 그러나 광 노화된 피부에서는 type I, III 콜라겐의 합성이 저하되고, MMP-1의 활성이 증가되어 있으며 이러한 변화는 콜라겐의 합성과 분해의 불균형을 가져와 피부에 깊은 주름을 가져온다.
- [0006] 또한, 나이가 들에 따라 생체 면역체계 및 생리활성 체계가 노화되어 콜라겐이 분해되는 등 피부 구성요소를 원활히 회복하지 못하여 피부의 탄력이 감소되고 건조 현상이 일어나 잔주름 등의 피부 노화가 일어난다. 그 중에서도 콜라겐의 소실은 주름 생성과 직결되므로 피부 자연노화 및 피부 광노화의 예방 및 개선제로써 프로콜라겐(procollagen) 생성을 증가시키고 MMP-1 발현을 억제시킬 수 있는 물질의 개발이 요구 된다.
- [0007] 장기간 자외선 노출 시 표피층의 비후가 일어나 자외선 각화증을 유발하고 진피 내 탄력섬유의 분해 및 무정형의 탄력섬유 증가로 탄력섬유증이 발생하게 된다. 따라서 자외선 조사에 의해 두꺼워진 피부 표피층은 노화의 한 지표로 여겨질 수 있다.
- [0008] 최근 자외선에 의해 분해된 콜라겐 절단체가 세포내 신호전달 경로를 변형시켜 피부에 존재하는 히알루론산의 합성을 저해하여 피부 보습력을 감소시킨다는 보고가 있다.
- [0009] 히알루론산은 수분과 쉽게 결합함으로써 수분유지 능력이 상당히 높고, 특히, 피부에는 몸 전체 히알루론산의 50% 이상이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 피부의 부피 팽창이나 대사체 및 영양소의 확산, 탄력 기능을 강화한다. 반대로 피부 진피(dermis)에서 히알루론산의 양은 노화와 함께 감소되며, 레티노익산(retinoic acid)과 같은 항 노화(Anti-aging) 물질의 처리 시 히알루론산 소실이 예방되어 피부 보습력이 회복된다는 보고가 있다. 따라서 자외선 조사는 콜라겐 소실을 초래함에 따라 피부주름 생성 뿐 아니라, 피부 보습 기능까지 악화시키는 요인이 된다.
- [0010] 최근에는 주름 개선 화장품으로써 유산균, 효모와 같은 미생물을 화장품 산업에 사용하는 예도 증가되고 있다.
- [0011] 유산균은 인체 내에서 유익한 역할을 하는 미생물로서 탄수화물과 같은 당을 발효시켜 젖산을 생성하는 균으로 지금까지 400여종이 발견되었으며, 그 중 상품성이 있는 것은 18종으로 알려져 있다. 이들 유산균은 면역증강, 특히, 위 장관 면역 증강의 생리활성을 가진다고 알려져 있으며, 최근에는 경구섭취 하였을 때 피부세포의 면역 조절에도 영향을 끼친다는 보고들이 있다. 더불어 인체에 유해하거나 화학성 물질의 사용을 자제하고자 하는 사회적 분위기와 친환경적이고 안전한 물질을 선호하는 추세가 강해져 유산균 배양액, 또는 식물 추출물 등을 특정 속의 유산균으로 발효시켜 얻어진 발효액의 개발이 활발하다. 하지만 유산균의 발효액, 배양액이 아닌 유산균 자체의 파쇄액 또는 생균의 섭취와 관련된 피부 주름 개선 효과에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 대한민국 출원공개 제10-2011-0113026호(발명의 명칭: 피부노화 억제용 조성물, 출원공개

일:2011.10.14.)

(특허문헌 0002) 대한민국 출원공개 제10-2009-0043491호(발명의 명칭: 주름형성 억제제, 출원공개 일:2009.05.06.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품, 화장품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인체 피부 섬유아세포 주에서 세포 내 프로콜라겐(procollagen) 생성량 증가, 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 발현 회복, 자외선에 의해 증가된 MMP-1 발현을 억제시키는 동시에 무모생취를 이용한 광 손상 동물모델에서 피부주름 개선, 피부표피 두께 회복, MMP-13 발현 억제 및 보습 활성을 가짐으로써 피부 주름 개선 및 보습 효능을 가지는 신규의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품, 화장품 조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명에 따른 균주를 분리하기 위하여 건강한 산모의 모유를 0.02% 소듐 아지드(Sodium azide)가 포함된 MRS 액체 배지에 넣고 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 10μl 백금이를 사용하여 배양액을 취하여 다시 0.02% 소듐 아지드가 포함된 MRS 한천평판배지에 도말하고 37℃에서 2일간 배양하였다. 이렇게 형성된 균락 중에서 프로콜라겐(procollagen) 생성 증진능을 시험하여 본 발명의 균주를 분리하였다.

[0017] 즉, 콜라겐은 피부 진피 세포 내 존재하여 피부 세포를 지지하고 탄력있는 피부를 유지하는 역할을 하는 단백질로써, 나이가 들거나 자외선 조사에 의해 발현이 점점 감소하여 피부 주름 생성에 기여하는 가장 중요한 단백질이라는 사실에 근거하여 상기 균락 중에 있는 여러 유산균 중에서 인간 피부 섬유아세포인 Hs68 세포주 내에 있는 프로콜라겐(procollagen)의 생성량을 증가시키는 활성을 갖는 균주를 분리하였다.

[0018] 이렇게 분리한 신규균주를 동정하고자 16S rDNA 분석을 통한 분자유전학적인 방법을 실시하여 결과를 하기의 표 1에 나타내었다.

표 1

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
X413792.1	Lactobacillus plantarum strain LN-9 16S ribosomal RNA gene, partial se	1166	1166	100%	0.0	100%
X270774.1	Lactobacillus sp. PC-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1166	1166	100%	0.0	100%
X232609.1	Lactobacillus plantarum strain S3 16S ribosomal RNA gene, partial se	1166	1166	100%	0.0	100%
X025073.1	Lactobacillus plantarum strain IR BL0076 16S ribosomal RNA gene, pa	1166	1166	100%	0.0	100%
X112898.1	Lactobacillus plantarum strain BBE7 16S ribosomal RNA gene, partial	1166	1166	100%	0.0	100%
X134607.1	Lactobacillus plantarum strain s4 16S ribosomal RNA gene, partial se	1166	1166	100%	0.0	100%

[0019]

[0020] 상기의 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 신규균주의 16S rDNA 유전자는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)의 16S rDNA 유전자와 100% 일치하는 것으로 확인되어 본 발명자들은 이를 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714로 명명하고, 2013년 4월 9일자로 한국생명공학연구원(기탁번호: KCTC 12400BP)에 기탁하였다.

[0021] 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 특성은 다음과 같다.

[0022] 1)균의 형태

[0023] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성

[0024] ①세포의 형태: 간균

[0025] ②운동성: 없음

[0026] ③포자형성능: 없음

[0027] ④그람(Gram) 염색: 양성

[0028] 2)균락의 형태

[0029] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균락의 형태

[0030] ①형상: 원형

[0031] ②용기: 불록

[0032] ③표면: 매끄러움(Smooth)

[0033] 3)생리적 성질

[0034] ①생육온도: 성장가능 생육온도 15~40℃

[0035] 최적 생장온도 37℃

[0036] ②생육 pH: 성장가능 생육 pH 5.0~7.5

[0037] 최적 pH 6.0~6.5

[0038] ③산소에 대한 영향: 통성혐기성

[0039] 4)카탈라제: -

[0040] 5)가스형성여부: -

[0041] 6)15℃에서 생육: -

[0042] 7)45℃에서 생육: +

[0043] 8)인돌생산: -

[0044] 9)젖산생산: +

[0045] 10)당 발효 실험 및 동정

[0046] Biomerieux 사의 API 50 CH kit를 이용하여 당 발효 실험을 한 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

표 2

당 0-24	사용 여부	당 25-49	사용 여부
0 Control	-	25 에스쿨린	+
1 글리세롤	-	26 살리신	+
2 Erythritol	-	27 셀로비오스	+
3 D 아라비노스	-	28 말토스	+
4 L 아라비노스	-	29 유당	+
5 리보스	-	30 멜리비오스	+

6 D 크실로스	-	31 자당	+
7 L 크실로스	-	32 트레할로스	+
8 아도니톨	-	33 이눌린	-
9 β-메틸-D-크실로시드	-	34 멜레지토스	+
10 갈락토스	+	35 라피노스	-
11 포도당	+	36 전분	-
12 과당	+	37 글리코겐	-
13 만노스	+	38 크실리톨	-
14 소르보스	-	39 겐티오비오스	+
15 람노스	+	40 D 투라노스	+
16 들시톨	-	41 D 라이소스	-
17 시노시톨	-	42 D 타가토스	-
18 만니톨	+	43 D 푸코스	-
19 소르비톨	-	44 L 푸코스	-
20 α-메틸-D-만노시드	+	45 D 아라비톨	-
21 α-메틸-D-글루코시드	-	46 L 아라비톨	-
22 N-아세틸-글루코사민	+	47 글루코나테	+
23 아미그달린	+	48 2-케토-글루코나테	-
24 아르부틴	+	49 5-케토-글루코나테	-

[0048] 한편, 본 발명의 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 약학적 조성물은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상적으로 사용되는 방법에 따라 정제, 캡슐제 등과 같은 제제형태로 제제화 하여 사용될 수 있다.

[0049] 사람의 경우, 통상적인 1일 투여량은 1~30mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 실제 투여량은 투여경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 건강상태 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.

[0050] 물론, 본 발명의 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 약학조성물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0051] 또한, 본 발명의 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등으로 사용될 수 있다. 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 또는 건강기능식품으로 사용되는 경우, 각종 식품류, 발효유, 육류, 음료수, 초콜렛, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료, 비타민 복합제, 주류 및 그 밖의 건강기능식품일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 특히, 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 발효유는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714, 유산균 배양액, 또는 유산균 초음파 파쇄액 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 발효유를 제조한다.

[0053] 또한, 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 효능을 갖는 기능성 음료는 혼합과즙시럽, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성 음료를 제조한다.

[0054] 또한, 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 신규의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 및 보습 효능을 갖는 건강기능식품은 상기 락토바실러스 플란타룸

(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 포함하는 것 이외에 영양보조 성분으로 비타민 B₁, B₂, B₅, B₆, E 및 초산 에스테르, 니코틴산 아미드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

[0055] 또한, 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물로 사용할 수 있다. 상기 화장료 조성물로 사용하는 경우에는 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 외에 기타 화장료의 제형 또는 사용목적 등에 맞게 임의로 선정된 물질을 첨가할 수 있다. 예를 들어, 정제수, 유분, 계면활성제, 보습제, 고급 알코올, 증저점제, 킬레이트제, 색소, 지방산, 산화방지제, 방부제, 왁스, pH 조절제, 향료 등이 첨가될 수 있다. 또한 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물의 제형은 특별히 제한되는 바가 없으며, 예를 들면, 영양 크림, 수렴 화장수, 유연 화장수, 로션, 에센스, 영양젤, 마사지 크림, 마스크 팩 등의 제형을 가질 수 있다.

[0056] 한편, 상기와 같이 최종적으로 제조된 약학적 조성물, 건강기능식품, 기능성 음료, 발효유, 건강기능식품, 화장료 조성물 중에 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 함량은 총 조성물 100중량%를 기준으로 0.01~50중량% 범위로 포함될 수 있다. 이때, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 함량이 0.01 중량% 미만이면 피부 주름 개선 및 보습 효과가 미비할 수 있고, 50중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 피부 주름 개선 및 보습 효과 증가가 미비하여 비경제적이다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714는 인체 피부 섬유아세포 주에서 세포내 프로콜라겐 생성 증가, 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 발현 회복, 자외선에 의해 증가된 MMP-1 발현 억제, 무모생취를 이용한 광 손상 동물모델에서 피부주름 개선, 피부표피두께 회복, MMP-13 발현 억제 및 보습 효과가 우수하여 자연 노화 또는 광 손상에 의해 유도되는 피부 주름 개선 효과를 가지므로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 및 보습 효과를 목적으로 한 약제, 발효식품, 음료, 건강기능식품, 화장료 조성물 등으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 인체 피부 섬유아세포 주에서 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 발현에 있어 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 회복 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 인체 피부 섬유아세포 주에서 자외선 조사에 의해 유도된 MMP-1 발현에 있어 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 억제 효능을 측정된 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 광 손상 동물모델에서 자외선 조사에 의해 마우스 등에 생성된 굽고 깊은 주름에 대해 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구섭취에 의한 피부 주름수, 피부주름 면적, 피부주름 깊이 개선 효능을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 광 손상 동물모델에서 자외선 조사에 의해 두꺼워진 표피 두께에 대해 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구섭취에 의한 피부 두께 억제 효능을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 광 손상 동물모델에서 자외선 조사에 의해 마우스 피부 조직에서 증가된 MMP-13 발현에 있어 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구섭취에 의한 MMP-13의 발현 억제 효능을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 광 손상 동물모델에서 자외선 조사에 의해 건조화된 마우스 피부 조직에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구섭취에 의해 수분증발량 억제 및 수분함유량 증가효능을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.
- [0060] <실시예 1>
- [0061] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 포함한 동결건조분말의 제조
- [0062] 식품원료용 Proteose peptone #3, Yeast Extract, Beef Extract, 그리고 포도당을 첨가한 액체배지를 제조한 후 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 37℃에서 약 20시간 배양한 후 배양액을 원심분리하고 멸균된 생리식염수로 세척한 다음 멸균유에 분산시켰다. 그런 다음, 다시 동결 건조하여 동결건조 분말 1그램(g)당 약 10^{11} CFU 균수를 얻었다.
- [0063] 한편, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714는 상기와 같이 동결 건조된 분말 형태 외에 배양물 형태로 제공될 수 있다.
- [0064] <실시예 2>
- [0065] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조
- [0066] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조 예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0067] 정제의 제조
- [0068] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 포함한 동결건조 분말 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 폴리비닐피롤리돈 97mg을 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 2mg을 가하여 혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.
- [0069] 캡슐제의 제조
- [0070] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 포함한 동결건조 분말 100mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전히 혼합한 후 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0071] <실시예 3>
- [0072] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0073] 유산균 배양액과 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 및 혼합과즙시럽으로 구성된 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0074] 먼저, 유산균 배양액은 원유 95.36중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6중량%를 교반하여 15℃에서의 비중은 1.0473~1.0475, 적정산도는 0.200~0.220%, pH는 6.65~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix^o)는 16.3~16.5% 정도가 되도록 혼합하였다. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 40℃로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각각 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP 배지에서의 총 유산균수가 1.0×10^9 cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.

- [0075] 그 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix^o 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0076] 그런 다음, 상기 유산균배양액 69.5중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 포함한 동결건조 분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유한 발효유를 제조하였다.
- [0077] <실시예 4>
- [0078] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0079] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 유산균 및 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0080] 먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix^o 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0081] 그리고 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 동결건조분말 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0082] <실시예 5>
- [0083] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0084] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 동결건조 분말 0.1중량%에 영양보조 성분(비타민 B₁, B₂, B₅, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 동결건조 분말 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물 100중량부에 대하여 평균 정제수 10중량부를 첨가·혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.
- [0085] <실시예 6>
- [0086] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 유효성분으로 함유하는 화장료의 제조
- [0087] 유연화장수
- [0088] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 동결건조 분말 0.01중량%, 글리세린 3중량%, 부틸렌 글리콜 2중량%, 프로필렌 글리콜 2중량%, 카복시비닐폴리머 0.1중량%, 에탄올 10중량%, 트리에탄올아민 0.1중량% 및 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수를 혼합하여 통상의 유연화장수 제조방법에 따라 제조하였다.
- [0089] 영양화장수
- [0090] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 동결건조분말 0.01중량%, 밀납 4중

량%, 폴리소르베이트 60 1.5중량%, 소르비탄세스퀴올레이트 0.5중량%, 유동과라핀 5중량%, 스쿠알란 5중량%, 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드 5중량%, 글리세린 3중량%, 부틸렌 글리콜 3중량%, 프로필렌 글리콜 3중량%, 카복시비닐폴리머 0.1중량%, 트리에탄올아민 0.2중량%, 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수를 혼합하여 통상의 영양화장수 제조방법에 따라 제조하였다.

[0091] 영양크림

[0092] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 동결건조분말 0.01중량%, 밀납 10중량%, 폴리소르베이트 60 1.5중량%, 소르비탄세스퀴올레이트 0.5중량%, 유동과라핀 10중량%, 스쿠알란 5중량%, 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드 5중량%, 글리세린 5중량%, 부틸렌 글리콜 3중량%, 프로필렌 글리콜 3중량%, 트리에탄올아민 0.2중량% 및 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수를 혼합하여 통상의 영양크림 제조방법에 따라 제조하였다.

[0093] 맛사지 크림

[0094] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 동결건조분말 0.01중량%, 밀납 10중량%, 폴리소르베이트 60 1.5중량%, 소르비탄세스퀴올레이트 0.8중량%, 유동과라핀 40중량%, 스쿠알란 5중량%, 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드 4중량%, 글리세린 5중량%, 부틸렌 글리콜 3중량%, 프로필렌 글리콜 3중량%, 트리에탄올아민 0.2중량% 및 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수를 혼합하여 통상의 맛사지크림 제조방법에 따라 제조하였다.

[0095] 팩

[0096] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 동결건조분말 0.01중량%, 폴리비닐알콜 13중량%, 소듐카복시메틸셀룰로스 0.2중량%, 알란토인 0.1중량%, 에탄올 5중량%, 노닐페닐에테르 0.3중량% 및 잔량의 방부제, 미량색소, 미량향료 및 미량정제수를 혼합하여 통상의 팩 제조방법에 따라 제조하였다.

[0097] <시험예 1>

[0098] 인간 피부 섬유아세포 주에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 세포내 프로콜라겐 생성 증가 및 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 생성 회복 효과 측정

[0099] 1-1. 세포내 프로콜라겐 생성 증가 효과 측정

[0100] 인간 피부 섬유아세포인 Hs68 세포[입수처: 미국세포주은행(ATCC)]를 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)에 페니실린 7.5mg/L, 스트렙토마이신 7.5mg/L를 함유하고 있는 DMEM 배지를 사용하여 5% 농도의 CO₂ 배양기에서 37°C로 24시간 배양하였다. 배지 조성물들은 모두 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA)사 제품을 사용하였다.

[0101] 인간 피부 섬유아세포에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714가 세포내 프로콜라겐 생성을 증가시키는지 측정하기 위해서 Procollagen Type I C-peptide(PIP) EIA kit(Takara, MK101)를 이용하여 Procollagen Type I C-peptide의 생성량을 정량하였다.

[0102] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 균주 5 x 10⁸ CFU/ml를 인간 피부 섬유아세포인 Hs68 세포에 처리하고 48시간 배양한 세포의 배지로부터 20μl을 취하여 배지로 분비된 프로콜라겐의 양을 측정하였다.

[0103] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0104] 도 1의 A는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 인체 섬유아세포에서 프로콜라겐 생성 증진 효과를 측정된 결과를 나타낸 것으로, 'Cont'는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714

를 처리하지 않은 무처리군, 'LAB'는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 5×10^8 CFU/ml 처리군을 나타낸다.

[0105] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 정상 상태에 존재하는 프로콜라겐의 생성량이 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 처리에 의해 더욱 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0106] 1-2. 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 생성 회복 효과 측정

[0107] 인간 피부 섬유아세포에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714가 자외선 조사에 의해 억제된 프로콜라겐 발현을 회복시키는지 측정하기 위해서 Procollagen Type I C-peptide(PIP) EIA kit(Takara, MK101)를 사용하여 Procollagen Type I C-peptide의 생성량을 정량하였다.

[0108] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 균주 5×10^8 CFU/ml를 인간 피부 섬유아세포인 Hs68 세포에 처리하고, 1시간 후 UVB 50mJ/cm²를 조사한 후 48시간 배양하였다. 상기 배양한 세포의 배지로부터 20 μ l을 취하여 배지로 분비된 프로콜라겐의 양을 측정하였다.

[0109] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0110] 도 1의 B는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 인간 섬유아세포에서 자외선에 의해 억제된 프로콜라겐 생성회복 효과를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 'UVB'는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 처리하지 않고 자외선만 조사한 자외선 조사군이며, 'UVB+LAB'는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 5×10^8 CFU/ml 처리한 후 자외선을 조사한 군을 나타낸다.

[0111] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자외선 조사에 의해 인간 피부 섬유아세포Hs68 세포 내 프로콜라겐의 생성량이 감소하였는데, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 처리함으로써 억제된 프로콜라겐의 생성량이 점차 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[0112] <시험예 2>

[0113] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 자외선 조사에 의해 유도된 MMP-1 발현 억제 효과

[0114] 인간 피부 섬유아세포인 Hs68 세포에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714가 자외선 조사에 의해 유도된 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1) 발현을 억제시키는지 측정하기 위해서 웨스턴 블랏팅 분석법(western blotting analysis)[Upham, B. L., Kang, K. S., Cho, H. Y., & Trosko, J. E. Carcinogenesis 18:37-42, 1997]을 이용하여 분석하였다.

[0115] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 균주(LAB)를 각각 5×10^8 CFU/ml(레인 3), 1×10^9 CFU/ml(레인 4)씩 처리하고 1시간 후 UVB 50mJ/cm²를 조사하고 48시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포로부터 단백질을 추출하기 위하여 RIPA buffer를 사용하였다. 단백질 함량은 DC assay kit[Bio-Rad Corp., Richmond, CA, USA]를 이용하여 결정하였다. 상기 각각의 단백질 추출물들로부터 약 10 μ g에 해당하는 단백질을 10% SDS-PAGE에 넣어 전기영동하여 분리한후 MMP-1 발현을 측정하였다.

[0116] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0117] 레인 1(Lane 1)은 무처리 대조군,

[0118] 레인 2(Lane 2)는 자외선(UVB 50mJ/cm²)조사 군,

[0119] 레인 3(Lane 3)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 5×10^8 CFU/ml과 자외선(50mJ/cm²)

처리군,

- [0120] 라인 4(Lane 4)는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 1×10^9 CFU/ml과 자외선(50mJ/cm²) 처리군을 나타낸다.
- [0121] 베타-액틴(β -actin)은 동일한 양의 세포로 실험했음을 나타낸다.
- [0122] MMP-1/ β -actin ratio는 MMP-1 또는 β -actin을 image J 프로그램을 이용하여 각각의 밴드 인텐시티(band intensity)를 측정하여 비율로 나타낸 것이다.
- [0123] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 무처리 군인 라인 1에 비하여 라인 2에서는 자외선 조사에 의해 세포 내 MMP-1의 발현이 현저히 증가한 반면, 라인 3과 라인 4에서와 같이 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 처리한 군에서는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 균주의 수가 증가함에 따라 MMP-1의 발현이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0124] <시험예 3>
- [0125] 무모생쥐의 광 손상 동물모델에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구투여를 통한 피부 주름 개선 효과 측정
- [0126] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 균주의 경구섭취가 자외선에 의해 형성되는 피부주름 및 피부건조에 미치는 영향을 조사하고자 무모생쥐(hairless mouse)를 동물모델로 선정하여 실험하였다.
- [0127] 6주령의 암컷 무모생쥐(SKH, HR-1)를 비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)로 그룹당 8마리씩으로 나누어 실험기간 동안 사육하였다.
- [0128] 비교예 1(Cont)은 무모생쥐 1마리당 0.1ml의 생리식염수만을 경구투여 하였고, 비교예 2(UVB)는 무모생쥐 1마리당 생리식염수 0.1ml 경구투여 30분 후 자외선(UVB)을 조사하였다.
- [0129] 시험예 3(UVB+LAB)은 무모생쥐 1마리당 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 1×10^9 CFU/ml을 0.1ml 생리식염수에 섞어 경구투여 30분 후 자외선(UVB)을 조사하였다.
- [0130] 상기 비교예 1 및 2와 시험예 3의 생리식염수 또는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 투여기간은 총 12주로 주 5일 투여하였으며, 비교예 2 및 시험예 3의 자외선(UVB) 조사 강도는 1주차는 1MED(Minimal Erythema Dose, 최소홍반량)인 25mJ/cm²를 조사하고 2주차는 2MED, 3주차에는 3MED, 4 내지 12주차까지는 4MED의 강도로 조사(照査)하였다.
- [0131] 주름 개선 효과의 정량적 관정을 위하여 무모생쥐의 등 쪽에서 실리콘 폴리머를 이용하여 피부 주형(replica)을 채취하였고, 피부 주름 측정 장치(VisioLine VL650, CK electronic GmbH, Germany)를 이용하여 사진 결과를 얻어 도 3의 A에 그 결과를 나타내었으며, 피부주름의 수, 피부주름의 면적, 피부주름의 깊이를 수치화하여 각각 도 3의 B(피부주름의 수), 도 3의 C(피부주름의 면적) 및 도 3의 D(피부주름의 깊이)에 나타내었다.
- [0132] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시험예 3(UVB+LAB)의 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 경구 투여한 무모생쥐의 피부 주름 정도가 비교예 2(UVB)의 자외선만을 조사한 무모생쥐에 비하여 피부주름 수(No. of Wrinkles), 피부주름 면적(Total Wrinkle area), 피부주름 깊이(Total Wrinkle depth) 모두에서 현저히 완화되어 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 균주가 자외선으로 유발된 피부 주름을 개선시키는 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0133] <시험예 4>
- [0134] 무모생쥐의 광 손상 동물모델에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구투여를 통한

피부 두께 억제 효과 측정

- [0135] 자외선의 반복적인 조사는 표피층의 비후가 일어나 자외선 각화증을 유발하고 진피 내 탄력섬유의 분해 및 무정형의 탄력섬유 증가로 탄력섬유증이 발생하게 된다. 본 시험에서는 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 섭취가 자외선 각화증에 따른 표피층 두께의 증가를 예방하는 효과를 가지는지 평가하기 위해 상기 시험에 3과 동일한 실험동물[비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)]의 등 피부 조직을 채취하여 10% 포르말린(formalin) 용액에 24시간 고정하였다. 수세 과정을 거쳐 제작한 슬라이드에 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-Eosin) 염색을 하여 사진 촬영을 하고 표피 두께를 측정하였다(도 4의 A 참조).
- [0136] 또한, 상기 비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)의 그룹당 8마리의 무모생쥐의 등 피부조직 슬라이드를 모두 현미경(ZEISS AX10, X100)으로 관찰 후 대표성 있는 부위를 사진 촬영한 후, 표피 두께를 1마리당 3부위에서 software(AxioVison. Rel. 4.6)를 이용하여 측정하고 이의 평균값을 구한 뒤, 8마리의 평균치를 다시 구하여 유의성을 평가하였다(도 4의 B 참조).
- [0137] 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0138] 도 4의 A는 비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)의 등 피부 조직의 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-Eosin) 염색을 한 후 찍은 사진이고, 도 4의 B는 비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)의 등 피부 조직의 표피 두께의 유의성을 평가한 그래프이다.
- [0139] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 무모생쥐에 자외선을 만성적으로 처리하였을 때 비교예 1(Cont)의 표피 두께 28 μ m에서 비교예 2(UVB)의 표피두께 64.7 μ m으로 2배 이상 표피두께가 증가함을 알 수 있었으며, 시험예 3(UVB+LAB)의 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구 투여로 표피두께가 41 μ m로 표피두께가 65% 억제되었음을 알 수 있었다.
- [0140] <시험예 5>
- [0141] 무모생쥐의 광 손상 동물모델에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구투여를 통한 MMP-13 발현 억제 효과 측정
- [0142] 인간세포에서는 MMP-1이 콜라겐 분해효소인 것과 달리 마우스 세포에서는 MMP-13(Matrix metalloproteinase-13)이 콜라겐 분해효소로 작용하므로 무모생쥐를 이용한 광 손상 모델에서 MMP-13 발현 억제 효과를 분석하였다.
- [0143] 상기 시험에 3과 동일한 실험동물[비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)]에서 적출한 등 피부 조직 0.2g을 RIPA buffer에 넣어 호모게나이저(homogenizer)로 곱게 분쇄한 뒤 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하여 단백질을 추출하였으며 DC assay kit[Bio-Rad Corp., Richmond, CA, USA]를 이용하여 단백질 정량을 하였다. 정량된 단백질 추출물들로부터 약 10 μ g에 해당하는 단백질을 10% SDS-PAGE에서 전기영동하여 분리하여 웨스턴블랏팅(Western blotting)을 이용하여 MMP-13 발현을 분석하였다.
- [0144] 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0145] 레인 1(Lane 1)은 무처리 대조군[비교예 1(Cont)],
- [0146] 레인 2(Lane 2)는 자외선 조사(UVB 50mJ/cm²)군[비교예 2(UVB)],
- [0147] 레인 3(Lane 3)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714 1x10⁹CFU/ml과 자외선(50mJ/cm²) 처리군[시험예 3(UVB+LAB)]을 나타낸다.
- [0148] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 레인 1[비교예 1(Cont)]에 비하여 레인 2[비교예 2(UVB)]에서 자외선 조사

에 의해 무모생쥐의 피부 조직내 MMP-13의 발현이 현저히 증가하였으나, 레인 3[시험예 3(UVB+LAB)]에서는 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714를 무모생쥐에 경구 투여함에 따라 피부 조직내 MMP-13의 발현이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

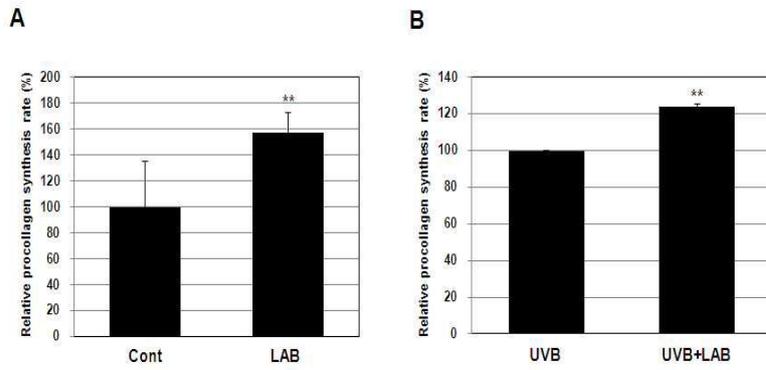
- [0149] <시험예 6>
- [0150] 무모생쥐의 광 손상 동물모델에서 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구투여에 의한 보습 효과 측정
- [0151] 만성적인 자외선 조사는 수분손실을 가져와 피부를 건조하게 하므로 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 보습효능을 측정하기 위하여 실험 종료 시점인 12주차에 상기 시험예 3과 동일한 실험동물[비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)]의 무모생쥐의 등 피부로부터 Tewameter TM300(CK electronic GmbH, Germany)을 이용하여 경표피수분 증발량을 측정하였다.
- [0152] 또한, Corneometer CM825(CK electronic GmbH, Germany)를 이용하여 피부표면의 수분 함유량을 측정하였다.
- [0153] 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0154] 도 6의 A는 비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)의 등 피부의 경표피수분증발량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 6의 B는 비교예 1(Cont), 비교예 2(UVB), 시험예 3(UVB+LAB)의 등 피부표면의 수분 함유량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0155] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자외선 조사시 표피의 수분 증발량을 나타내는 TEWL 값은 비교예 1(Cont)에 비해 비교예 2(UVB)에서와 같이 자외선 조사시 증가하였으나, 시험예 3(UVB+LAB)에서와 같이 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구 투여시 비교예 2에 비하여 수분증발량을 약 67% 억제함을 알 수 있었다(도 6A 참조).
- [0156] 또한, 자외선 조사시 표피의 수분 함유량을 나타내는 corneometer measurement values는 비교예 1(Cont)에 비해 비교예 2(UVB)에서와 같이 자외선 조사시 현저히 억제되었으며 시험예 3(UVB+LAB)에서와 같이 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714의 경구 투여시 비교예 2에 비하여 수분 함유량을 약 20% 회복하는 것을 알 수 있었다(도 6B 참조).
- [0157] 이상의 본 시험결과를 종합하여 볼 때, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7714는 자외선에 의해 건조화 된 피부에 보습 효능을 가짐을 확인할 수 있었다.

수탁번호

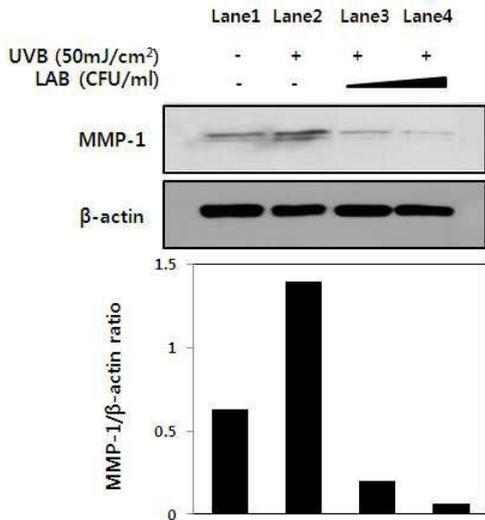
- [0158] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- 수탁번호 : KCTC12400BP
- 수탁일자 : 20130409

도면

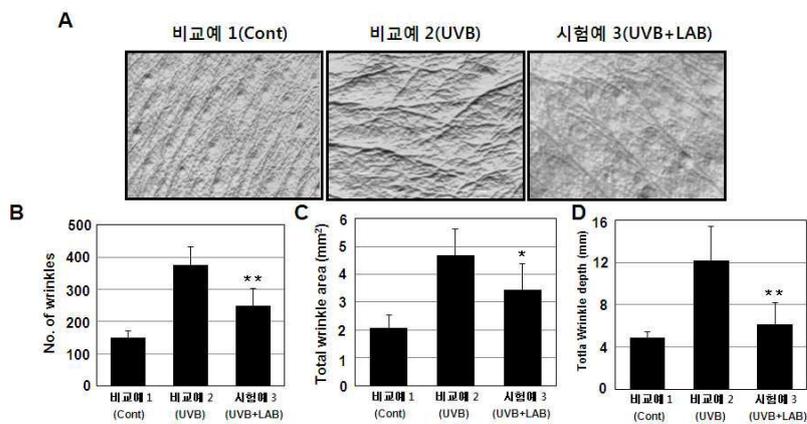
도면1



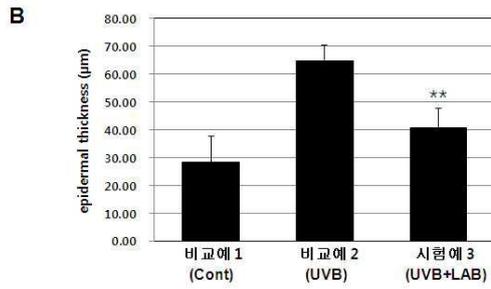
도면2



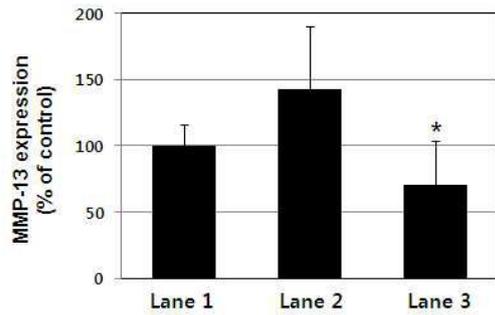
도면3



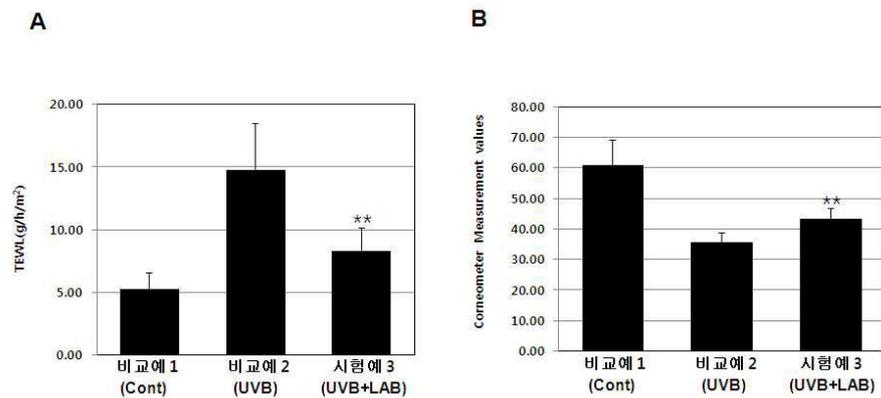
도면4



도면5



도면6



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제1항

【변경전】

신규의 락토바실러스

【변경후】

신규 유산균인 락토바실러스