



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월01일
(11) 등록번호 10-1863053
(24) 등록일자 2018년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0047833
(22) 출원일자 2017년04월13일
심사청구일자 2017년04월13일
(56) 선행기술조사문헌
JP2011519850 A
URL :
<https://blog.naver.com/gdhamsoa/220861561467>
(2016.11.14.)
생약학회지, Vol.44, No.1, pp.47-52 (2013)

(73) 특허권자
서울대학교 산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
이기원
서울특별시 관악구 난곡로 66, 107동 1504호(신림동, 대우신림2차푸르지오)
이하예라
서울특별시 관악구 관악로 304, 관악현대아파트 104동 1501호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 6 항

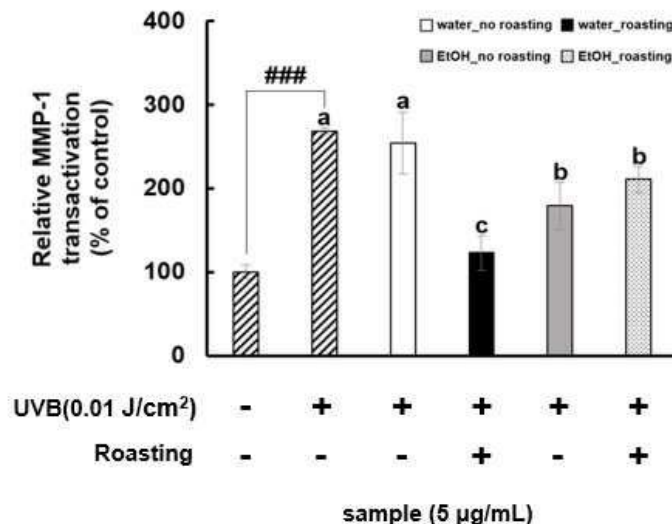
심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 로스팅된 오미자의 추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 로스팅된 오미자 추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 식품 조성물 및 화장품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 피부 주름 유도 단백질(Matrix metalloproteinase-1, MMP-1)의 활성을 억제하여 콜라겐의 분해를 감소시키기 때문에, 피부 조직의 탄력 유지와 주름 생성 예방에 탁월한 효과를 발휘한다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

양희

서울특별시 송파구 송이로15길 31 103동 1401호 (가락동, 쌍용2차아파트)

김중은

서울특별시 관악구 신림로12길 30-8 108호 (신림동)

김중훈

경기도 성남시 분당구 대왕판교로606번길 58, 푸르지오월드마크 101-1903

윤정환

강원도 춘천시 삭주로 89-6, 101동 101호 (후평동, 현대맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 514004032SB010

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림축산식품부

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 농업농촌 6차산업 혁신모델 사업단(기획운영)

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.24 ~ 2016.06.23

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

로스팅된 오미자의 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 로스팅된 오미자는,

오미자를 150~170℃에서 5~15분간 로스팅하여 제조된 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은,

열수 추출물인 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선용 화장품 조성물.

청구항 4

로스팅된 오미자의 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 로스팅된 오미자는,

오미자를 150~170℃에서 5~15분간 로스팅하여 제조된 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 추출물은,

열수 추출물인 것을 특징으로 하는 피부 주름 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 로스팅된 오미자의 추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 식품 조성물 및 화장품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 로스팅된 오미자의 열수추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 식품 조성물 및 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0003] 외모는 첫인상에 영향을 줄 수 있으며, 피부 상태에 많은 영향을 받기 때문에(윤영민, *et al.* 대한피부미용학회지. 2013) 피부 주름, 주근깨, 피부 건조 등에 따른 피부 관리가 필요하다. 피부에 영향을 미치는 요인은 외인적 요인과 내인적 요인으로 나뉘게 된다. 내인성 노화는 세월이 흘러감에 따라 자연적으로 발생하는 피부의 노화 현상으로, 인체의 일반적인 노화 원인에 의해 발생하게 된다. 외인성 노화는 광노화, 열노화, 흡연에 의한 피부노화, 갱년기노화 등으로 나뉘며 특히 광노화는 일정량의 췌었을 때는 긍정적인 영향을 끼치지만 지나치게 많은 영향을 받으면 색소침착, 피부암과 같은 피부 질환과 피부 건조 및 깊은 주름이 생기는 피부노화를 일으킨다 (Imokawa G, J. Invest. Dermatol. 2009).
- [0004] 자외선에 의한 노화를 광노화(photoaging)라고 하며, 자외선은 피부조직 내 활성 산소를 형성시켜 산화적 스트레스를 유발시키는 것으로 알려져 있다 (Darr D, *et al.* J Invest Dermatol. 1994). 피부가 자외선에 지속적으로 노출되면 피부의 구조와 기능에 부정적인 영향을 받으며, 자외선에 의해 노화된 피부에서는 세포 구성물과 세포 외 기질 구성 성분들의 변형이 관찰된다 (Lee, Ji-Hae, *et al.* Korean Journal of Food Science and Technology. 2005).
- [0005] 피부의 기질단백질들은 matrix metallo-proteinases (MMPs)의 종류인 콜라게나아제 (collagenase), 젤라티나아제(gelatinase), 엘라스테이스(elastase) 등에 의해 분해된다. 또한, 광노화에 의한 피부는 JNK와 p38 활성도가 증가하여 AP-1(activator protein-1)의 활성도가 증가한다고 알려져 있다. AP-1 활성도의 증가는 MMPs의 발현을 증가시켜 피부의 교원질 결핍을 초래한다고 알려져 있다 (Chung, Jin Ho, *et al.* Journal of investigative dermatology. 2000).
- [0006] 자외선은 파장에 따라 UVA(320-400 nm), UVB(280-320 nm), UVC(200-280 nm)로 나뉘며, UVA와 UVB는 각각 진피와 표피에 흡수되고 UVC는 오존층에 의해 걸러지게 된다 (Biniek, K., *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012). 특히 UVB는 표피에 영향을 주어 피부손상을 일으킨다고 알려져 있으며 (Fisher, G.J., *et al.* N Engl J med. 1997), 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 파장대이다. 피부 각질세포에 다량의 자외선이 조사되면 활성산소가 과다하게 생기게 되고, 항산화 인자로 조절할 수 있는 한계를 넘어서면 단백질, DNA 그리고 지질 산화(oxidation) 과정이 유도되어 세포에 해로운 영향을 끼치게 된다 (F'guter S., *et al.* Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2003).
- [0007] 지금까지 주름 개선 용도의 치료제나 약물로 이용되고 있는 것은 비타민 A와 비타민 A 유도체, 비타민 C와 비타민 C 유도체, 그 외 많은 항산화제가 있지만 화장품 적용 시 피부에 대한 안전성 문제가 있다. 따라서, 부작용이 비교적 적은 천연물로부터 주름개선 소재를 탐색하여 기능성 화장품 소재로 개발하고자 하는 노력이 있었다 (Park, Keum-Ju, *et al.* Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2010).
- [0008] 피부 미용이란 피부의 신진대사 및 생리활성을 촉진하고, 영양공급을 통해 건강하고 아름다운 피부를 관리하는 것이다. 피부에 직접 도포를 하는 화장품과 피부에 도움이 되는 유효성분이 포함된 식품을 섭취하는 건강기능식품이 피부 관리를 위해 사용되고 있다 (Kim EA. Food Science and Industry. 2007; Park CS. Food Science and Industry. 2007).
- [0009] 그 중 레티놀은 주름 개선 기능성을 가지는 물질로 가장 많이 사용되고 있으며, 식약처 고시형 원료로서 표피 세포의 분화 및 재생을 조절한다고 알려져 있다 (Griffiths, *et al.* New England Journal of Medicine. 1993). 레티놀은 몇몇 피부 질환에 국소치료제로 사용되며 만성적인 광노화에 대한 개선 효과를 가지지만, 국소적인 레티놀 사용은 피부자극을 일으켜 치료효과를 방해한다고 알려져 있다 (Saurat, J-H., *et al.* Dermatology. 1999).
- [0010] 소비자들의 피부와 관련된 기능성 화장품에 대한 관심 및 수요가 급증하고 있지만, 합성 소재 기능성 화장품의 부작용이 지속적으로 제기되면서 효과적이면서도 독성이 없는 천연물을 이용한 화장품 개발연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 천연 약용식물에는 유해한 활성산소종을 감소시키는 생리활성 물질을 포함한 것들이 다수 존재하므로 (Yang, Y.J. *et al.* Korean J. Plant Res. 2011; Cho, W.J. *et al.* Journal of Life Science. 2013), 안전함과 동시에 피부노화를 지연시키는 효과적인 화장품 소재로 광노화 기전 중에서 산화적 스트레스로 초래되는 피부 손상 과정에서 각질형성세포를 보호할 수 있는 기능성 천연물의 연구가 필요한 상태이다 (김태연, *et al.* Korean J. Plant Res. 2016).

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0050879호(공개일자 2011.05.17)에는, 오미자의 안토시아닌과 쉬잔드린을 포함하는 항산화성 조성물이 기재되어 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1195395호(2012.10.23)에는, 초석잠 추출물을 함유하는 주름개선용 한방화장료 조성물 제조방법 및 이로부터 제조된 한방 화장료 조성물이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 MMP-1의 활성을 억제하여 피부조직의 탄력을 유지하고, 주름 개선 효과가 뛰어난 로스팅된 오미자 추출물을 포함하는 식품 및 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 로스팅된 오미자의 추출물을 포함하는 하는 피부 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 로스팅된 오미자의 추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 조성물은 피부 주름 유도 단백질(Matrix metalloproteinase-1, MMP-1)의 활성을 억제하여 콜라겐의 분해를 감소시키는데, 피부 조직의 탄력 유지와 주름 생성 예방에 탁월하여 광노화 등으로 인한 주름을 효과적으로 개선할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 실험예에 의하면, 비로스팅 오미자 추출물은 피부 주름 개선 효과가 거의 없음에 반해, 로스팅 오미자 추출물은 현저히 높은 피부 주름 개선 효과를 나타내었다. 오미자를 로스팅하면, 페놀함량, 플라보노이드 함량이 증대되고, 항산화 효능, 피부주름 유도 단백질(MMP-1) 발현 억제능이 증대되기 때문인 것으로 판단되었다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 로스팅된 오미자의 '로스팅'은 바람직하게 150~170℃에서 5~15분간 수행하는 것이 좋다. 본 발명에서는 오미자를 로스팅할 시, 피부주름 개선능이 우수함을 확인하고, 로스팅 온도와 시간의 최적 조건을 하고자 하였는데, 그 결과, 150~170℃에서 5~10분간 로스팅하면 항산화 활성, 페놀함량, 플라보노이드 함량이 가장 높고, 주름을 유도하는 MMP-1 발현을 억제하는 효능이 가장 우수함을 확인할 수 있었다. 이때, 150℃ 미만으로 로스팅하면 로스팅 오미자의 효능이 감소하며, 170℃ 초과에서는 높은 온도로 인해 오미자가 재처리됨 까맣게 타고 부서지는 현상이 발생하기 때문에 상기 조건으로 로스팅하는 것이 바람직하다.
- [0019] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 로스팅된 오미자의 추출물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 의해 추출된 추출물일 수 있으나, 바람직하게 열수추출물인 것이 좋다. 하기 본 발명의 실험예에 의하면 주정추출물보다 열수추출물이 더욱 우수한 피부 주름 개선 효과를 나타내었다.
- [0020] 종래에 오미자의 피부 건강 개선에 대한 논문 및 특허는 주로 에탄올, 메탄올 추출물을 이용한 실험이었으며, 오미자의 열수추출물은 상대적으로 효능이 없다고 보고되어 왔다. 하지만, 본 발명에서는 로스팅한 오미자의 열수추출물이 에탄올(주정) 추출물에 비해, MMP-1의 발현 억제능이 우수한 것으로 나타났다.
- [0021] 이때, 상기 로스팅된 오미자의 열수추출물은 바람직하게 50~70℃에서 50~70분간 열수추출하여 제조되는 것이 좋다. 상기와 같이 낮은 온도에서 추출함으로써 로스팅된 오미자의 유용성분을 파괴하지 않고 추출할 수 있기 때문이다.
- [0022] 한편, 본 발명의 피부 주름은 바람직하게 광노화에 의한 것일 수 있다. 일반적으로 광노화가 일어나면 피부층이 붕괴하고, 교원질 및 탄력섬유 등의 기질 단백질이 손상된다. 광노화에 의한 피부 주름을 개선하기 위해서는 MMP-1 활성을 억제하는 것이 중요한데, 본 발명은 오미자를 로스팅하여 MMP-1 활성 억제능을 증가시킨 것이다. 따라서, 본 발명의 로스팅된 오미자 추출물을 함유하는 화장료 조성물 또는 식품 조성물은 광노화에 의한 피부 주름의 개선 효과가 우수하다.
- [0023] 한편, 본 발명은 조성물의 형태로 피부주름 개선용 식품 조성물을 제공하는데, 식품의 제형으로는 일례로 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반 음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 김류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 조성물의 형태로 피부주름 개선용 화장품 조성물을 제공하는데, 화장품 제형으로는 특정한 것에 한정하는 것은 아니고, 일례로 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형

으로 이루어진 기초화장료 제형, 수중유형 또는 유중수형의 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립 그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이세도, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진 색조 화장료제형 등이 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 로스팅된 오미자의 열수 추출물은, 주름을 유발하는 MMP-1의 활성을 억제하여 결합조직의 탄력저하와 주름생성 등에 직접적인 영향을 미치는 콜라겐의 분해를 감소시키기 때문에, 피부 조직의 탄력을 유지하여 우수한 피부 주름 개선 효과를 발휘한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 로스팅 오미자 추출물의 최적조건을 찾기 위해 수행한 항산화 효능 측정의 평균값과 표준편차 그래프이다.

도 2는 로스팅 오미자 추출물의 최적조건을 찾기 위해 수행한 페놀 함량 측정의 평균값과 표준편차 그래프이다.

도 3은 로스팅 오미자 추출물의 최적조건을 찾기 위해 수행한 플라보노이드 함량 측정의 평균값과 표준편차 그래프이다.

도 4는 로스팅 오미자 추출물의 최적조건을 찾기 위해 측정된 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1) 발현량의 평균값과 표준편차 그래프이다.

도 5는 160℃에서 5분간 로스팅된 오미자의 사진이다.

도 6는 인간피부각질형성세포 모델을 사용하여 수행한, 로스팅 오미자 열수추출물과 비로스팅 오미자 열수추출물의 처리 농도에 따른 세포 독성 비교 그래프이다.

도 7은 인간피부각질형성세포 모델을 사용하여 수행한, 로스팅 오미자 주정추출물과 비로스팅 오미자 주정추출물의 처리 농도에 따른 세포 독성 비교 그래프이다.

도 8은 로스팅 오미자의 열수추출물, 비로스팅 열수추출물, 로스팅 주정 추출물 및 비로스팅 주정 추출물의 피부 주름 개선 효과를 비교 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명자들은 열수 추출을 이용하면서도 피부 개선 효능을 극대화할 수 있는 추출에 대하여 연구하던 중, 예로부터 오미자는 볶거나 찌는 등의 가공처리를 거쳐 이용되어 온 것을 알 수 있었다.

[0030] 또한, 볶거나 찌는 등의 가공법은 약물 유효성분의 용출을 돕고 치료효과를 높이며 약물의 독성(毒性), 열성(烈性), 부작용을 저하 또는 제거하거나 약제의 저장성을 용이하게 하는 등의 목적을 위해 이용되어 온 것을 알 수 있었다 (Ju, Y. S. UNGOK HERBOLOGY pp. 232-240, 2013).

[0031] 이에 본 발명자들은 오미자에 대해 로스팅 전처리 방법을 도입해 보고자 하였으며, 그 결과 로스팅한 오미자의 피부 건강 개선 효능 평가하였을 때, 로스팅된 오미자의 열수추출물이 피부 주름 개선 효과가 탁월한 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0032] 또한, 본 발명의 실험에서는 오미자의 로스팅 온도와 시간의 최적조건을 확립한 결과, 150~170℃에서 5~10분간 로스팅을 수행하면 오미자의 항산화 활성, 페놀함량, 플라보노이드 함량이 증가하고, 주름을 유도하는 MMP-1 발현을 억제하는 효능이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다.

[0033] 또한, 본 발명의 실험에서는 로스팅된 오미자를 열수추출한 경우, 주름을 유발하는 MMP-1의 발현을 억제하는 효과가 현저히 우수함에 반해, 열수추출이 아닌 주정추출을 한 경우, MMP-1의 발현을 억제하는 효과가 오히려 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0034] 이하, 본 발명의 구성 및 작용에 대해 하기 실시예에서 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 로스팅 오미자의 제조]

[0037] 본 실시예에서는 오븐(LG, MA 324 BFS)을 이용하여 로스팅을 진행하였다. 로스팅을 진행하기전에 각 온도로 예

열을 한 후, 건오미자를 판 위에 놓고 140, 160, 180℃에서 5, 10, 15분간 로스팅을 진행하였다. 상온에서 10분간 방치 후 분쇄기를 이용하여 비로스팅 건오미자와 로스팅 건오미자를 통째로 직경 3 mm로 분쇄 후 코니칼 튜브에 담아 딥프리즈(deep freezer) -80℃에 보관하였다.

[0039] **[비교예 1: 비로스팅 오미자의 제조]**

[0040] 비로스팅 건오미자를 통째로 직경 3 mm로 분쇄 후 코니칼 튜브에 담아 딥프리즈(deep freezer) -80℃에 보관하였다.

[0042] **[실시예 2: 로스팅된 오미자의 열수추출물과 발효주정 추출물 제조]**

[0043] 상기 실시예 1에서 제조한, 140, 160, 180℃에서 5, 10, 15분간 로스팅한 오미자를 이용하여, 열수추출과 발효주정(95%) 추출을 각각 진행하였다.

[0044] 열수추출의 경우, 코니칼 튜브에 각 오미자 가루를 0.25 g을 넣고 25 mL의 멸균된 증류수를 넣어준 후 셰이킹 인큐베이터(Shaking incubator)에서 60℃, 220 rpm으로 60분간 3회 반복추출 하였다. 발효주정의 경우, 30% 발효주정으로 희석한 후 오미자 가루가 0.25 g 들어있는 코니칼 튜브에 25 mL씩 넣은 후, 셰이킹 인큐베이터에서 75℃, 220 rpm으로 5분간 3회 반복추출하였다.

[0045] 이후, 왓만 필터(Whatman filter) 110 mmØ을 이용하여 각 추출물을 여과를 하였다. 여과한 추출물들을 은박지를 씌운 코니칼 유브에 10~15 mL씩 분주한 후 딥프리즈에서 하루 동안 냉동시켰다. 냉동시킨 오미자 추출물을 동결건조기(일신랩, Bondiro)를 이용하여 -50℃ 이하, 진공상태에서 동결건조하였다. 진공 펌프를 이용하여 수분 등을 제거하고, 약 72시간 동결건조한 후 갈색 에펜 튜브에 담아 DMSO(dimethyl sulfoxide)을 이용하여 100 mg/mL 스탁(stock)으로 만들어 실험에 사용하였다.

[0047] **[실험예 1: 최적조건의 로스팅 오미자 추출물을 얻기 위한 항산화 효능, 페놀 함량, 플라보노이드 함량과 피부 주름 유도 단백질 발현 측정]**

[0048] 본 실험에서는 최적 추출조건을 찾기 위하여 각 온도, 시간별 추출물의 항산화 효능, 페놀 함량, 플라보노이드 함량과 피부주름 유도 단백질 발현을 측정하였다.

[0050] **(1) 로스팅 온도 및 시간별 로스팅 오미자 추출물의 항산화 효능 측정**

[0051] 항산화 효능을 측정하기 위해 DPPH assay가 이용되었다. 0.1 mM의 DPPH 용액을 80% 메탄올에 만들었다. 은박지를 두른 용액을 섞은 후 20분 동안 상온 방치하였다. 이후, 96 웰 플레이트(well plate)에 각 샘플을 넣은 후 ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 정도를 측정하였다. 시료액 대신 비타민 C를 컨트롤로 넣어 흡광도를 함께 측정하여 DPPH free radical 소거활성을 백분율로 나타내었고, 3회 반복하여 평균값과 표준편차로 나타내었다. 상기 실험의 평균값과 표준편차 그래프는 도 1과 같았다.

[0053] **(2) 로스팅 온도 및 시간별 로스팅 오미자 추출물의 페놀 함량 측정**

[0054] 페놀 함량을 측정하기 위하여, Folin-Ciocalteu reagent를 이용하였으며 Folin-Ciocalteu reagent와 증류수, 그리고 각 샘플을 넣어준 후 6분간 셰이킹하였다. 이후, 7 % sodium carbonate(Na₂CO₃)를 각 웰에 넣어준 후, 90분간 셰이킹하였다. 이후, 750 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 카테킨(catechin)을 사용하여 검량선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량은 시료 100 g 중의 'mg catechin(mg catechin/100 g)'로 나타내었다. 실험은 3회 반복하여 평균값과 표준편차로 나타내었다. 상기 실험의 평균값과 표준편차 그래프는 도 2와 같았다.

[0056] **(3) 로스팅 온도 및 시간별 로스팅 오미자 추출물의 플라보노이드 함량 측정**

[0057] 총 플라보노이드 함량의 측정을 위해, 5% 아질산나트륨(NaNO₂), 10% 염화알루미늄하이드레이트(AlCl₃·6H₂O), 그리고 1 M 수산화나트륨(NaOH)를 넣어준 후 멸균수를 전체 양이 200 μl가 되도록 넣어주었다. 이후, 510 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 카테킨(catechin)을 사용하여 검량선을 작성한 후, 총 플라보노이드 함량은 시료 100 g 중의 'mg catechin(mg catechin/100 g)'로 나타내었다. 실험은 3회 반복하여 평균값과 표준편차로 나타내었다. 상기 실험의 평균값과 표준편차 그래프는 도 3과 같았다.

[0059] **(4) 로스팅 온도 및 시간별 로스팅 오미자 추출물의 MMP-1 발현 측정**

[0060] 피부 주름의 주요 원인인 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1)이 도입된 인간피부각질형성세포 모델로 실험 진행을 하였다. 각 온도 및 시간별 로스팅 오미자 열수추출물이 UVB로 유도되는 MMP-1 활성화에 미치는 효과를 알아보

았다. 실험 방법은 하기 실험예 3에 기술한 방법과 동일하였다. 상기 실험의 평균값과 표준편차 그래프는 도 4와 같았다.

[0062] **(5) 로스팅 오미자의 로스팅 최적 조건**

[0063] 오미자 로스팅 시, 180℃의 경우, 높은 온도로 인해 오미자가 재처럼 까맣게 타고 부서지는 현상이 발생하였다. 상품화를 생각하였을 때 이는 적절하지 않는 것으로 판단하여 이후 실험에서 제외하였다.

[0064] 로스팅된 오미자에 관한 상기 실험을 종합적으로 판단하였을 때, 항산화 활성과 총 페놀, 라보노이드 함량이 높고, 주름을 유도하는 MMP-1 발현을 억제하는 효능이 우수한 160℃, 5분 로스팅의 오미자가 가장 적합한 것으로 나타나, 이후 실험에 사용하였다. 도 5는 상기 로스팅 최적조건으로 로스팅 된 오미자의 사진이다.

[0065]

[0066] **[실험예 2: 로스팅 오미자의 처리농도에 따른 세포 독성 측정]**

[0067] 본 실험예에서는 UVB(0.01 J/cm²)를 조사한 인간피부각질형성세포 모델을 사용하여 로스팅 오미자의 처리농도에 따른 세포 독성을 측정하고자 하였다.

[0068] 실험예 2의 모든 실험은 무균 실험대 안에서 진행하였으며, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 450 mL에 FBS(Fetal bovine serum) 50 mL를 넣고, 항생제(penicillin/streptomycin) 1 mL을 넣고 충분히 흔들어 주어 배양용 배지를 제조하였다. 또한, 혈청기아(serum starvation)을 위한, DMEM 배지를 준비하였다.

[0069] 그 후, 96 웰플레이트(well plate)를 사용하여 인간피부각질형성세포를 18X10⁴ cells/well 의 농도로 상기 제조한 배지와 함께 각 100 μl씩 넣어 배양하였다. 세포가 배양 접시에 60% 정도 차면 혈청기아(serum starvation) 배지에 16시간에서 24시간 배양한 후, 3.125 μg/mL, 6.25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL 각 농도별로 균을 나누어 추출물을 포함한 배지로 바꿔주어 1시간 동안 배양기에 넣었다. 1시간 후 컨트롤 균을 제외한 실험군에 UVB(0.01 J/cm²)를 조사하였고 48시간 동안 배양하였다.

[0070] 48시간 후 MTT(Tetrazolium-based colorimetric) 용액을 10%로 함유한 배지로 바꾸어주었다. 이때, MTT 용액은 빛에 민감하기 때문에 빛이 없는 곳에서 실험을 진행하였다. 2시간 배양기에서 배양한 뒤 배지를 제거하고 DMSO를 각 웰 당 200 μl씩 넣어 배양접시 밑에 남아있는 침전물을 녹여주었다.

[0071] 이후, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 독성을 평가하였으며, 3번 측정한 흡광도의 평균값으로 나타내었다.

[0072] 실험결과, 로스팅 오미자는 200 μg/mL까지 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서, 이를 바탕으로 하기 실험들을 진행하였다. 로스팅 오미자와 비로스팅 오미자 열수추출물의 세포독성비교 그래프와 로스팅오미자와 비로스팅 오미자 주정추출물의 세포독성비교 그래프는 각각 도 6, 7과 같았다.)

[0074] **[실험예 3: 로스팅 오미자 열수추출물, 비로스팅 오미자 열수추출물, 로스팅 오미자 주정추출물, 비로스팅 오미자 주정추출물의 피부 주름 개선 효과 비교]**

[0075] 상기 실험예 2를 통해 세포 독성이 없는 것으로 확인된 농도(5 μg/mL)로 실험을 진행하였다. 피부 주름의 주요 원인인 MMP-1(Matrix metalloproteinase-1)이 도입된 인간피부각질형성세포 모델로 실험 진행을 하여, 로스팅 오미자 열수추출물이 UVB로 유도되는 MMP-1 활성에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

[0076] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 450 mL에 FBS(Fetal bovine serum) 50 mL를 넣고, Puromycin 10 mg/mL을 최종농도 10 μg/mL이 되도록 넣은 후 충분히 흔들어 주어 배양용 배지를 제조하였다. 또한, 혈청기아(serum starvation)을 위한 DMEM 배지를 준비하였다.

[0077] 실험을 위해, 실험을 위해, MMP-1이 형질 주입된 인간피부각질형성세포를 20X10⁴ cell/well 농도로 24 웰 플레이트(well plate)에 배지와 함께 넣어 배양하였다. 세포가 배양 접시에 60% 정도 차면 혈청기아 배지에서 16시간에서 24시간 배양한 후, 5 μg/mL로 각 추출물을 포함한 배지로 바꿔주어 1시간 전처리 후 UVB(0.01 J/cm²)를 조사하였다. 7시간 동안 배양 후 배지를 버리고 루시퍼레이즈 어세이용 세포 용해 버퍼(lysis buffer-luciferase assay)를 넣어 은박지로 빛 차단을 한 후, 진탕배양기에 40~60분 동안 두었다. 그 후, 흰 96 웰 플레이트(well plate)에 상기 진행한 버퍼 용액을 30 μl씩 넣어주었다. 루시퍼레이즈 어세이에 쓰이는 기질(substrate) 버퍼 A와 B를 1:1로 잘 섞어 96 웰용 루미노미터(Luminometer)에 흰 96 웰 플레이트와 함께 넣어

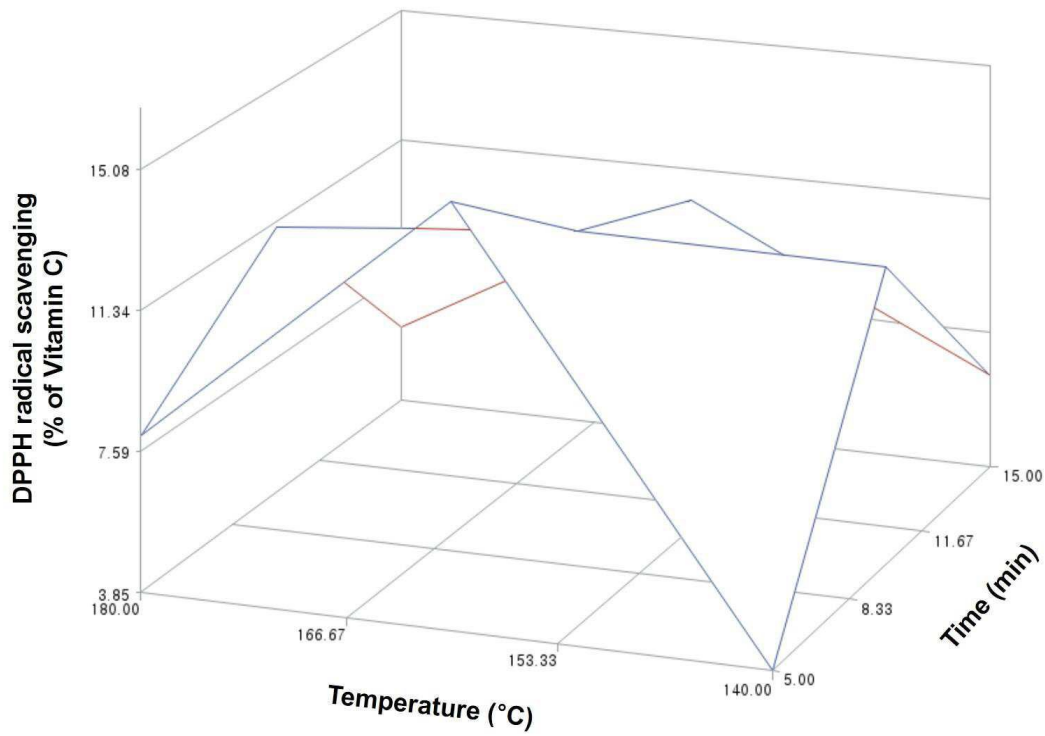
준 후, 기기를 작동시켰다.

[0078] 실험결과, UVB로 인해 유도된 MMP-1 활성이 비로스팅 오미자 열수추출물, 비로스팅/로스팅 오미자 주정 추출물 처리군보다 로스팅 오미자 열수 추출물처리군에서 크게 감소하는 것을 확인하였다.

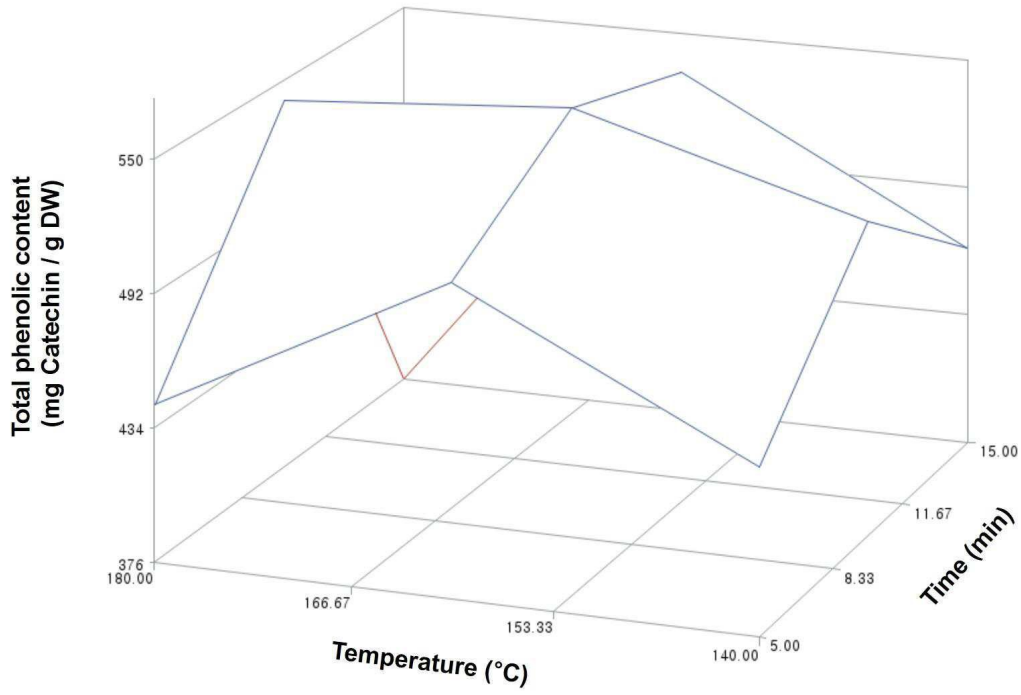
[0079] 이러한 결과로, 로스팅 오미자 열수 추출물의 피부 주름 개선 효능이 다른 추출물보다 우수한 것을 확인할 수 있었다 (도 8). 도 8은 로스팅 오미자의 열수추출물, 비로스팅 열수추출물, 로스팅 주정 추출물 및 비로스팅 주정 추출물의 피부 주름 개선 효과를 비교 측정한 그래프이다.

도면

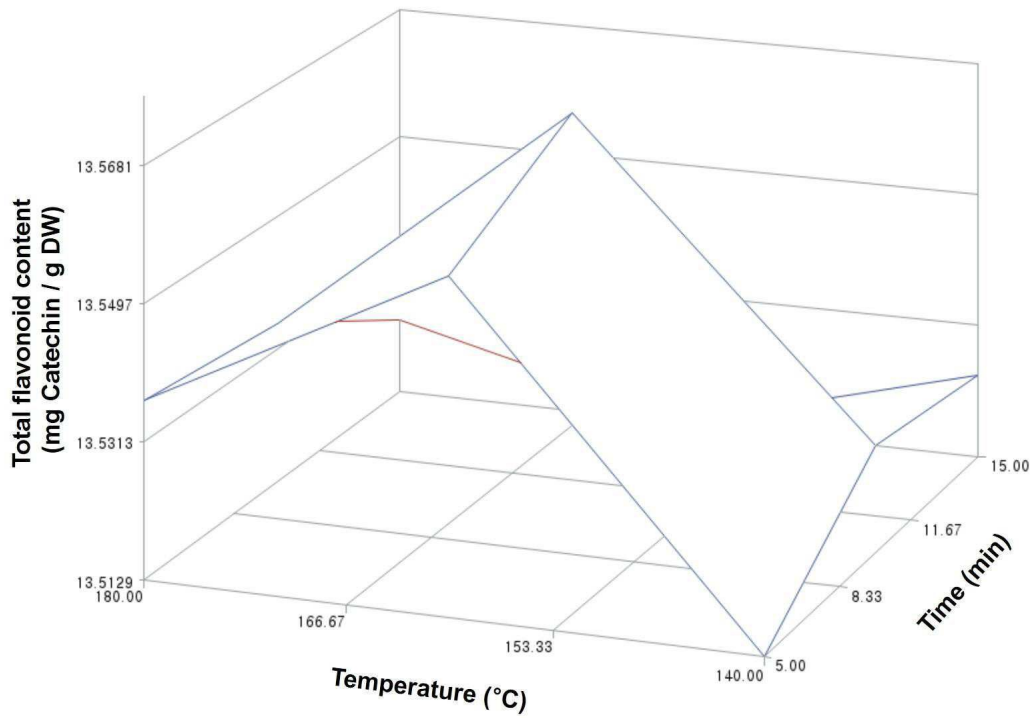
도면1



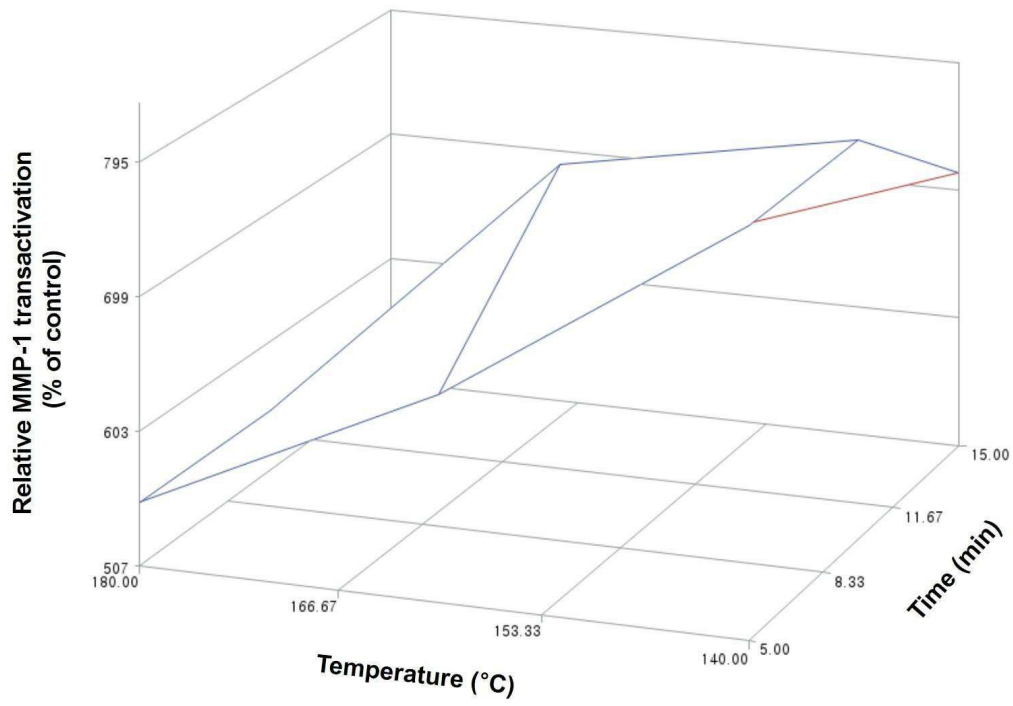
도면2



도면3



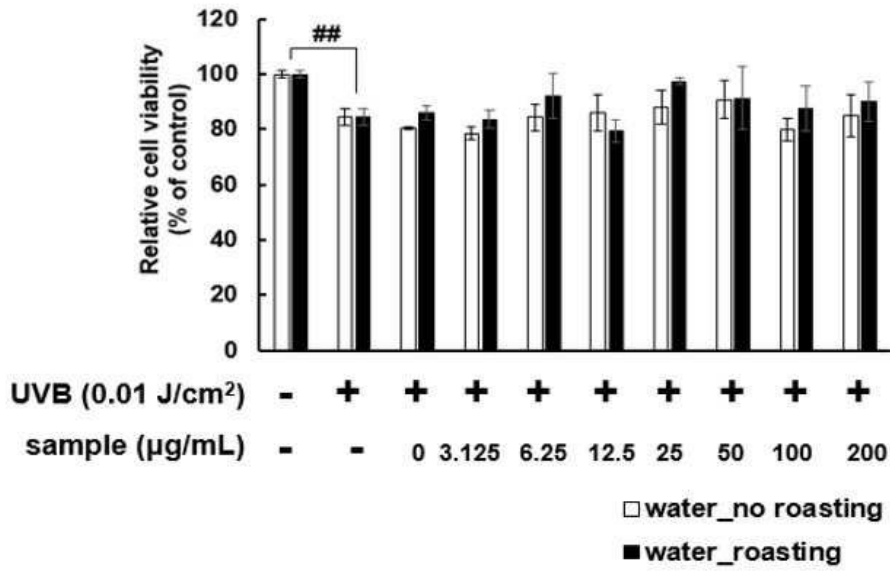
도면4



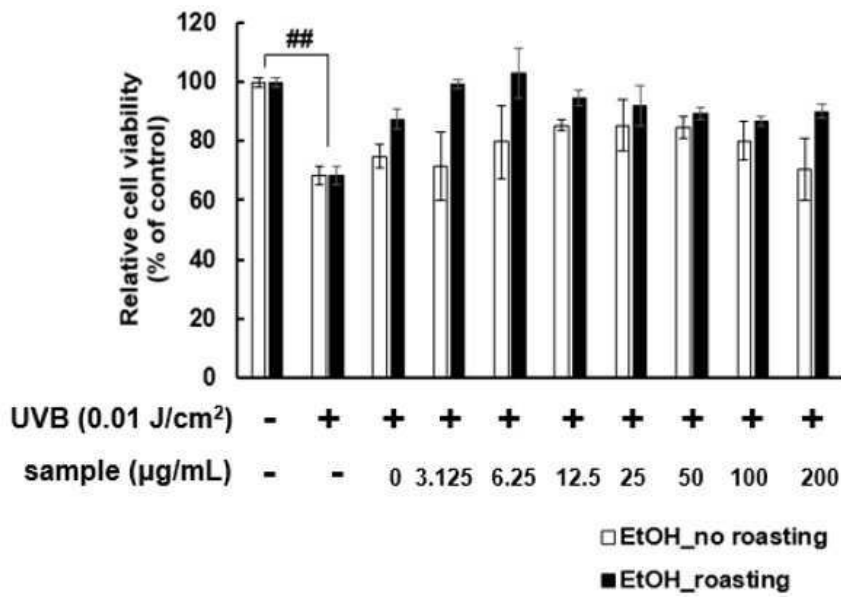
도면5



도면6



도면7



도면8

