



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월07일
(11) 등록번호 10-2553740
(24) 등록일자 2023년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9794 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9794 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0042595
(22) 출원일자 2021년04월01일
심사청구일자 2021년04월01일
(65) 공개번호 10-2022-0136667
(43) 공개일자 2022년10월11일
(56) 선행기술조사문헌
JP2714663 B2*
KR1020150013994 A*
KR1020190135506 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
임태규
경기도 성남시 분당구 내정로165번길 35, 517동
1605호(수내동, 양지마을한양아파트)
신학동
서울특별시 관악구 관악로 304, 102동 104호(봉천동, 현대아파트)
(74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 11 항

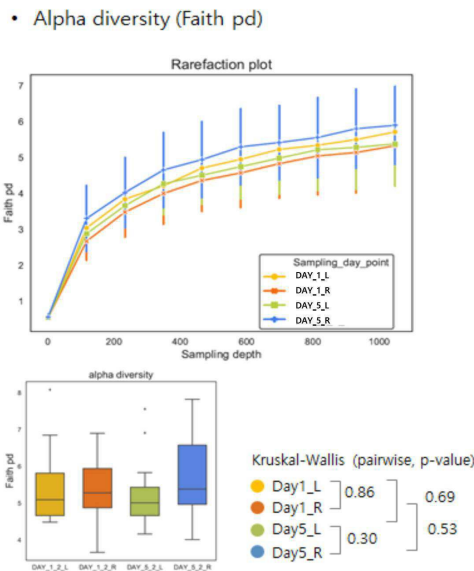
심사관 : 조혜인

(54) 발명의 명칭 피부 마이크로바이옴 조절용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 피부 마이크로바이옴 조절용 화장품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 흑마늘 추출물을 포함함으로써 피부 유익균을 증진시키고 피부 유해균을 억제시킬 수 있고, 궁극적으로는 색소 침착 억제, 모공 축소, 유분 감소 또는 주름 개선 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711115551
과제번호	2020R1C1C1004670
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	피부노화관련 표적 단백질 발굴 및 Computer modeling기반 천연소재 개발 연구
기여율	1/1
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

흑마늘 추출물을 포함하는 안면 피부 내 마이크로바이옴의 종 다양성 증가용 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 마이크로바이옴의 유익균은 증진시키는 것인, 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 유익균은 박테로이테테스(*Bacteroidetes*), 악티노박테리아(*Actinobacteria*) 및 푸소박테리아(*Fusobacteria*) 문으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 유익균은 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 알리스티페스(*Alistipes*), 바네시엘라(*Barnesiella*) 및 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 속으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 마이크로바이옴의 유해균은 억제시키는 것인, 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 유해균은 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 및 피르미쿠테스(*Firmicutes*) 문으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 화장료 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 유해균은 에스케리치아(*Escherichia*), 쉬겔라(*Shigella*) 및 리스테리아(*Listeria*) 속으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 화장료 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부 보습 유지 효과, 피부 건조 증상 개선 효과, 유분 감소 효과, 주름 개선 효과 및 피부 탄력 개선 효과로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 효과를 나타내는 것인, 화장료 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 흑마늘 추출물은 상기 조성물 전체 중량 대비 0.0001 내지 10 중량% 포함된 것인, 화

장료 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 흑마늘 추출물은 흑마늘을 C1 내지 C6의 알코올 용매에 침지시켜 추출하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된 것인, 화장료 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 방법은 상기 추출 후 동결건조하는 단계를 더 포함하는 것인, 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피부 마이크로바이옴 조절용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 흑마늘은 생마늘을 일정기간 동안 숙성시킨 것으로, 생마늘에 비해 당분이 더 증가하고, 산미가 생성되며, 젤리와 유사한 물성을 가지므로 생마늘에 비해 그 자체로 섭취할 수 있는 양이 많으며, 관능적인 기호도가 더 높다는 장점이 있다. 또한, 흑마늘은 숙성과정에서 생성되는 갈색화 반응 물질에 의해 높은 항산화 활성을 지니며, 암 예방, 콜레스테롤 저하, 동맥경화 개선, 심장질환 예방 및 산화 스트레스와 관련된 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.

[0004] 마이크로바이옴 (Microbiome)은 미생물군집(microbiota) 및 유전체(genome)의 합성어로서 인간, 동식물, 토양, 바다, 호수, 암벽, 대기 등에 공존하는 미생물 군집과 유전체 전체를 의미한다. 기존에는 장내 미생물 군집을 조절하여 건강을 개선하거나 질병을 예방/치료하고자 하는 소재의 개발이 주를 이루었으나, 최근에는 피부 마이크로바이옴을 조절하여 피부를 개선시키는 소재의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러나 현재까지 피부 마이크로바이옴을 직접적으로 조절함으로써 피부의 기능성 증진에 관련된 소재의 발굴은 미비한 실정이다. 따라서 피부 마이크로바이옴을 직접적으로 조절함으로써 피부의 기능성 증진시킬 수 있는 소재의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2020-0018879호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 피부 마이크로바이옴 조절용 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 1. 흑마늘 추출물을 포함하는 피부 내 마이크로바이옴 조절용 화장료 조성물.
- [0010] 2. 위 1에 있어서, 상기 마이크로바이옴 조절은 피부 내 유익균을 증진시키는 것인, 화장료 조성물.
- [0011] 3. 위 2에 있어서, 상기 유익균은 박테로이데테스(*Bacteroidetes*), 악티노박테리아(*Actinobacteria*) 및 푸소박테리아(*Fusobacteria*) 문(phylum)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 화장료 조성물.
- [0012] 4. 위 3에 있어서, 상기 유익균은 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 알리스티페스(*Alistipes*), 바네시엘라(*Barnesiella*) 및 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 속(genus)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 화장료

조성물.

- [0013] 5. 위 1에 있어서, 상기 마이크로바이옴 조절은 피부 내 유해균을 억제시키는 것인, 화장료 조성물.
- [0014] 6. 위 5에 있어서, 상기 유해균은 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 및 피르미쿠테스(*Firmicutes*) 문으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 화장료 조성물.
- [0015] 7. 위 6에 있어서, 상기 유해균은 에스케리치아(*Escherichia*), 쉬겔라(*Shigella*) 및 리스테리아(*Listeria*) 속으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 화장료 조성물.
- [0016] 8. 위 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부 장벽 강화 효과, 피부 보습 유지 효과, 피부 건조 증상 개선 효과, 피부 색소 침착 억제 효과, 모공 축소 효과, 유분 감소 효과, 주름 개선 효과 및 피부 탄력 개선 효과로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 효과를 나타내는 것인, 화장료 조성물.
- [0017] 9. 위 1에 있어서, 상기 흑마늘 추출물은 상기 조성물 전체 중량 대비 0.0001 내지 10 중량% 포함된 것인, 화장료 조성물.
- [0018] 10. 위 1에 있어서, 상기 흑마늘 추출물은 흑마늘을 C1 내지 C6의 알코올 용매에 침지시켜 추출하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된 것인, 화장료 조성물.
- [0019] 11. 위 10에 있어서, 상기 방법은 상기 추출 단계 후 동결건조하는 단계를 더 포함하는 것인, 화장료 조성물.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 조성물은 피부 유익균을 증진시키고 피부 유해균을 억제시킬 수 있고, 궁극적으로는 색소 침착 억제, 모공 축소, 유분 감소 또는 주름 개선 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 흑마늘 추출물 함유 제형에 의한 피부 미생물 군집의 알파 다양성 증가를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 흑마늘 추출물 함유 제형에 의한 피부 미생물 군집의 알파 다양성 증가를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 흑마늘 추출물 함유 제형에 의한 피부 미생물 분포 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 흑마늘 추출물을 포함하는 피부 내 마이크로바이옴 조절용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0025] 용어 “흑마늘”은 생마늘을 일정기간 동안 알맞은 온도 및 습도 조건에서 숙성시켜 검은색으로 변한 것을 의미한다. 흑마늘은 생마늘에 비해 높은 항산화 효과, 암 예방, 콜레스테롤 저하, 동맥경화 개선, 심장 질환의 예방 등의 효과를 나타낸다. 또한 흑마늘은 마늘을 숙성시킨 것으로 냄새의 원인이 되는 휘발성 유황화합물이 줄어들기 때문에 생마늘에 비해 냄새에 의한 불쾌감이 없는 특징이 있다.
- [0026] 흑마늘 추출물은 화장료 조성물 전체 중량 대비 0.0001 내지 10 중량% 포함된 것일 수 있다.
- [0027] 예컨대, 흑마늘 추출물은 화장료 조성물 전체 중량 대비 0.0001 내지 10 중량%, 0.0005 내지 5 중량%, 0.001 내지 1 중량%, 0.001 내지 0.1 중량% 또는 0.001 내지 0.01 중량% 로 포함된 것일 수 있다.
- [0028] 흑마늘 추출물은 흑마늘을 C1 내지 C6의 알코올 용매에 침지시켜 추출하는 단계를 포함하는 추출방법으로 제조된 것일 수 있고, 구체적으로 C1 내지 C3의 알코올 용매에 침지시켜 추출하는 단계를 포함하는 추출방법으로 제조된 것일 수 있다.
- [0029] 상기 추출하는 단계는 20℃ 내지 60℃, 25℃ 내지 55℃, 30℃ 내지 50℃, 35℃ 내지 45℃에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0030] 상기 추출방법은 상기 추출하는 단계 후 동결건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 용어 “마이크로바이옴(microbiome)”은 미생물군집(microbiota) 및 유전체(genome)의 합성어로서 인간, 동식물, 토양, 바다, 호수, 암벽, 대기 등에 공존하는 미생물 군집과 유전체 전체를 의미한다.
- [0032] 그 중 “피부 내 마이크로바이옴”은 피부 내에 존재하는 미생물과 미생물, 숙주와 미생물 간의 복잡한 상호관계를 이루는 미생물군으로서, 인간 마이크로바이옴의 일부를 일컫는다. 구체적으로 피부 내에는 최대 2cm² 당

1000가지 종류의 200만 개 이상의 미생물이 존재한다.

- [0033] 용어 “피부 내 마이크로바이옴 조절”은 피부 내 유익균의 활성이나 생존을 증진 및/또는 피부 내 유해균의 증식이나 활성을 억제하는 것을 의미하고, 이를 통해 피부 내 미생물 군집의 균형을 적절히 유지시킬 수 있다. 한편 피부 내 마이크로바이옴 균형 유지는 피부 상태 개선에 중요한 요소 중 하나이나, 노화 또는 자외선, 미세먼지, 호르몬, 식단 등 각종 생활습관, 환경적인 요인들에 의해 그 균형이 깨지기 쉽기 때문에 피부 내 미생물을 조절하여 미생물 군집의 균형을 적절하게 유지시킬 수 있는 화장품의 필요성이 점차 증가하고 있다.
- [0034] 피부 내 마이크로바이옴 조절은 피부 내 유익균을 증진시키거나 피부 내 유해균을 억제시키는 것일 수 있다.
- [0035] 용어 “피부 내 유익균 증진”은 피부 내 유익균의 증진을 촉진시키거나 유익균의 생육을 활성화시키는 것을 의미한다.
- [0036] 상기 유익균은 박테로이데테스(*Bacteroidetes*), 악티노박테리아(*Actinobacteria*) 및 푸소박테리아(*Fusobacteria*) 문으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0037] 상기 유익균은 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 알리스티페스(*Alistipes*), 바네시엘라(*Barnesiella*) 및 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 속으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0038] 본 발명 일 실시예에서 본 발명의 화장료 조성물이 피부 유익균의 증진을 촉진시키는 것을 확인하였고, 피부 유익균의 증진을 통해 피부 상태를 효과적으로 개선시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0039] 용어 “피부 유해균 억제”는 피부 내 유해균의 증진을 억제하거나 유해균의 생육을 불활성화시키는 것을 의미한다.
- [0040] 상기 유해균은 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 및 피르미쿠테스(*Firmicutes*) 문으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0041] 상기 유해균은 에스케리치아(*Escherichia*), 쉬겔라(*Shigella*) 및 리스테리아(*Listeria*) 속으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에서 본 발명의 화장료 조성물이 피부 내 유해균을 억제시키는 것을 확인하였으며, 피부 내 유해균 억제를 통해 피부 상태 개선에 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [0043] 본 발명 화장료 조성물은 피부 내 마이크로바이옴을 조절하고, 피부상태를 개선시키는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0044] 피부상태 개선 효과는 피부 장벽 강화 효과, 피부 보습 유지 효과, 피부 건조 증상 개선 효과, 피부 색소 침착 억제 효과, 모공 축소 효과, 유분 감소 효과, 주름 개선 효과, 피부 탄력 개선 효과 등일 수 있다.
- [0045] 본 발명 화장료 조성물은 따끔거림, 부종, 홍반 등의 부작용 없이 우수한 피부개선 효과를 나타낼 수 있다.
- [0046] 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [0049] 화장료 조성물의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0050] 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 사용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비

탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0051] 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0052] 화장료 조성물은 피부에 직접 도포하거나 살포하는 등의 경피 투여 방법으로 사용될 수 있으며, 투여 경로는 목적조직에 도달할 수 있는 한 그 방법은 제한되지 않는다.

[0053] 본 발명의 화장료 조성물의 사용량은 연령, 병변의 정도 등의 개인 차이나 제형에 따라 적절하게 조절될 수 있으며, 1일 1회 내지 수회 적당량을 피부에 도포하여 1 주일 내지 수개월 사용될 수 있다.

[0055] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0057] **흑마늘 추출물을 포함하는 화장료 조성물 제조**

[0058] **1. 실시예 1**

[0059] (주)남해군 흑마늘에서 확보한 흑마늘 100 g을 70% 에탄올 500ml에 침지시키고 40℃에서 12시간 교반하여 추출하였다. 12시간 후 증발기(Evaporator)를 이용하여 에탄올을 제거하고 동결건조를 통하여 흑마늘 추출분말을 수득하였다.

[0060] 정제수, 글리세린, 부틸렌글라이콜, 식물성스쿠알란, 하이드로제네이티드레시틴, 나이아신아마이드, 1,2-헥산디올, 디메치콘, 피탄트리올, 피토스핑고신, 세라마이드엔피, 바틸알코올, 3-O-에틸아스코빅에씨드, 알란토인, 센티드체라늄오일, 광곽향오일 및 일량일량꽃오일에 흑마늘 추출분말을 첨가하여, 크림 제형의 화장료 조성물을 제조하였다. 흑마늘 추출분말은 조성물 전체 중량 대비 0.005 중량 %로 첨가하였다.

[0062] **2. 비교예 1**

[0063] 실시예 1과 동일하되, 흑마늘 추출물을 첨가하지 않고 크림 제형의 화장료 조성물을 제조하였다.

[0065] **실험예 1: 피부 안면 미생물 군집의 분석**

[0066] 12명의 여성을 대상으로 총 5일 동안 매일 아침 세안 후, 저녁 세안 후 하루 2회씩 안면 양쪽 볼에 비교예 1(왼쪽, L)과 실시예 1(오른쪽, R)을 각각 처리하였다. 매일 제형 처리 6시간 후 양쪽 볼에서 피부 마이크로바이옴을 채취하여 분석을 수행하였다. 구체적으로 피실험자의 양쪽 얼굴 볼 피부 2 x 2 cm 영역으로부터 피부 마이크로바이옴 시료를 채취하였다. 실험에 참여한 5일 동안 안면 세안 직후 1일차(day1_control, day1_experimental) 및 5일차(day5_control, day5_experimental) 오전에 시료를 채취하였다.

[0067] DNA 추출, PCR 증폭 및 시퀀싱은 표준화된 마이크로바이옴 연구를 위한 Earth Microbiome Project (EMP)의 표준 프로토콜(<https://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/dna-extraction-protocol>)을 따랐다. 계놈 DNA는 76개 제조사가 제공한 지침에 따라 DNeasy Power Soil HTP 96 웰 키트(Qiagen Inc, CA, 미국)로 추출하였다. (<https://www.protocols.io/view/emp-dna-extraction-protocol-nutdewn>).

[0068] 구체적으로, 확보된 피부 마이크로바이옴 시료에서 16S rRNA의 V4 영역을 515F/806R 프라이머를 이용해 증폭시켰다. 증폭 반응은 12 ul PCR-grade water (Sigma-Aldrich, MO, USA), 10 ul Gold hot-start Taq PCR master mix (Bioneer, Daejeon, Korea), 1 ul 각 5 uM 정프라이머 및 역프라이머, 및 1ul 주형 DNA를 사용하여 수행되었다. 총 반응 부피가 25ul인 모든 시료를 3배 증폭시켰다. 94 °C에서 3분 동안 변성하였고, 94 °C에서 45초, 50 °C에서 60초, 72 °C에서 90초의 증폭 사이클을 35회 반복하였다. Quant-iT PicoGreends DNA 검사 키트 (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 PCR 산물을 정량화하고, 마이크로플레이트 리더(BioTek, Winouski, 미국)를 사용하여 형광 강도를 측정하였다. 그런 다음, a NucleoSpin PCR clean-up kit (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany)를 사용하여 그 산물을 clean-up하였다. an Illumina Miseq platform (San Diego, CA, USA)을 이용해 최종 증폭 산물을 시퀀싱하였다. 시퀀싱은 Sanigen (안양, 대한민국)에서 수행하였다.

[0069] Quantitative Insights Into Microbial Ecology (Qiime2, version 2020.2) 파이프라인을 이용하여 Miseq 시퀀싱 데이터를 분석하였다. QIIME2 demux plugin을 사용하여 고유 바코드 시퀀스에 따라 관독을 역다중화하였다. QIIME2 DADA2를 사용하여 역다중화 시퀀스를 클러스터링하여 앰플리콘 서열 변이(amplicon sequence variants, ASVs) 테이블을 생성하였다. QIIME2 alignment plugin 을 사용하여 각 앰플리콘 서열 변이의 대표 서열을 정렬하였다. 다음으로 rooted phylogenetic tree를 구축하기 위해 QIIME2 phylogenetic plugin을 적용하여 FastTree program을 사용하였다. Silva database (Quast et al. 2012)에 대한 99% identity를 사용하여 QIIME2 feature classifier plugin으로 분류학적 분석을 수행하였다. QIIME2 plugins alignment, phylogeny, diversity, and emperor를 사용하여 알파 다양성(alpha diversity)과 베타 다양성(beta diversity) 분석을 수행하였다. ASVs 테이블의 alpha rarefaction과 beta diversity를 플롯하기 위해 계통 발생적 다양성(phylogenetic diversity)을 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 기능적 메타게놈을 예측하기 위해 The phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2 (PICRUSt2) v 2.3.0 bioinformatics software package를 사용하였다. ASVs 테이블과 대표적인 서열을 사용하여, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) orthology (KO) 메타게놈 풍부도를 예측하였다. 그런 다음, 예측된 기능 프로파일을 사용하여 KEGG pathway 풍부도를 추론하였다. Linear discriminant analysis effect size (LefSe) algorithm을 사용하여 그룹간의 유의한 차이를 판별하였다(LDA score > 2.0-fold).

[0070] non-parametric Kruskal-Wallis test를 이용하여 그룹 간 알파 다양성의 유의한 차이를 측정하였다. permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)를 사용하여 PCoA 플롯에서 그룹 간의 통계적 유의성을 측정하였고, non-parametric t-tests를 사용하여 그룹간의 거리를 평가하였다. linear discriminant analysis (LDA) effect size (LefSe)를 사용하여 그룹간 세균 조성의 상대적 풍부도의 유의한 차이를 확인하였다. factorial Kruskal-Wallis test의 α 값은 0.05이고, LDA score의 임계값은 3.0이었다. 그룹 간 다른 ASVs 빈도수의 통계적 비교는 Kruskal-Wallis tests를 통해 QIIME에서 확인되었다. Spearman 상관계수는 QIIME을 통해 계산되어 피부의 생물학적 매개 변수와 세균의 풍부함 사이의 상관 관계를 추정하였다.

[0071] 안면 왼쪽 볼에서 확보된 미생물 군집(비교예 1 처리군)과 안면 오른쪽 볼에서 확보된 미생물 군집(실시에 1 처리군)의 phylogenetic diversity (PD) 차이를 확인한 결과, 유의한 값으로 안면 오른쪽에서 확보된 미생물 군집의 phylogenetic diversity값이 높은 것을 확인하였다(DAY_1_R v.s. DAY_1_L 및 DAY_5_R v.s. DAY_5_L) (도 1 참조). 또한 처리 1일차에 확보된 미생물 군집과 처리 5일차에 확보된 미생물 군집의 phylogenetic diversity 차이를 확인한 결과 처리 5일차에 확보된 미생물 군집의 phylogenetic diversity값이 높은 것을 확인하였다(DAY_1_L v.s. DAY_5_L 및 DAY_1_R v.s. DAY_5_R) (도 2 참조). 즉, 흑마늘 추출물을 함유한 실시에 1이 처리된 안면이 높은 수준의 phylogenetic diversity값을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 60-70대 여성의 피부 마이크로바이옴보다 20-30대 여성의 피부에서 높은 알파 다양성(alpha diversity)을 나타낸다는 기존 연구결과에 기초하여(Sci Rep. 2019 Nov 14;9(1):16748), 흑마늘 함유 제형의 처리에 의해 피시험자의 피부 마이크로바이옴이 젊은층 피부와 유사하게 마이크로바이옴이 조절될 수 있을 것으로 확인하였다.

[0072] 또한, 흑마늘 추출물을 함유하는 화장품 조성물을 처리하는 하는 경우 피부 마이크로바이옴 변화를 문(phylum) 수준 및 속(genus) 수준에서 확인한 결과, 비교예 1을 처리한 왼쪽 볼(도 3의 LEFT) 대비 흑마늘 추출물을 함유한 실시에 1을 처리한 오른쪽 볼(도 3의 RIGHT)에서 유익균인 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 알리스티페스(*Alistipes*), 바네시엘라(*Barnesiella*) 및 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 속이 증가하고, 유해균인 에스케리치아(*Escherichia*), 쉬겔라(*Shigella*) 및 리스테리아(*Listeria*) 속이 억제되는 것을 확인하였다(도 3 참조)

[0074] **실험예 2: 피부 상태 개선 효과 확인**

[0075] 흑마늘 추출물을 포함하는 화장품 조성물이 피부 상태를 개선시키는 효과를 확인하였다. 구체적으로 12명의 여성을 대상으로 총 5일 동안 매일 아침 세안 후 안면 양쪽 볼에 비교예 1(왼쪽, L)과 실시에 1(오른쪽, R)을 각각 처리하였다. 제형 처리 1일차 및 5일차에 12명의 여성의 피부 상태 개선 효과를 확인하였다. 피부 상태 개선 효과는 볼텍전자의 A-One simple기기를 이용하여 측정하였으며 시험기간동안 매일 마이크로바이옴 분석을 위한 샘플링 후 바로 피부 상태를 측정하였다. 외부 습도의 변화의 영향을 최소화 하기 위하여 50% 수준의 습도를 유지하고 피부 상태 개선 효과를 측정하였다. 아래 표 1은 본 발명 흑마늘 추출물을 포함하는 화장품 조성물을 오른쪽 볼에 도포한 후 1일 및 5일째 주름개선 효과와 U존 유분 감소 효과를 측정한 결과를 평균 값으로 나타내었다. 표 1의 각 수치는 측정 기기의 Index로, 가장 피부가 좋은 상태를 0으로 산정하고 그를 기준으로 하여 비교한 값을 의미한다.

표 1

	DAY 1	DAY 5	p-value
주름 개선	3.28	2.83	0.15
U 존 유분 감소	231	151	0.25

[0076]

[0078]

실험예 3: 부작용, 효능 및 사용감 평가

[0079]

12명의 여성을 대상으로 흑마늘 추출물을 포함하는 실시예1을 처리한 후, 12명의 중 부작용이 나타난 사람의 수에 기초하여 부작용이 나타나는 비율(%)을 확인하였다 (표 2 참조). 부작용 평가 결과 12명의 여성 중 약 90% 이상이 부작용을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

표 2

	홍반	부종	인설	통증	뺨뺨함	따끔거림
없음	83	92	100	92	92	92
약한정도	0	0	0	8	0	8
중간정도	8	0	0	0	0	0
심한정도	8	8	0	0	8	0

값= (해당 정도의 부작용이 나타난 사람수/ 시험 대상 사람수)* 100, 단위: %

[0080]

[0081]

또한, 12명의 여성을 대상으로 흑마늘 추출물을 포함하는 실시예1을 처리한 후, 표면 수분감과 피부 속 수분감의 개선률을 평가하여 그 평균 값을 산출하였다. 그 결과 수분감과 피부 속 수분감이 약 20% 개선된 것으로 평가되었다(표 3 참조).

표 3

	표면 수분감	피부 속 수분감
피부 개선률	21	21

값=시험대상 각각의 수분감 개선율(%) / 시험 대상 사람수, 단위: %

[0082]

[0083]

또한, 12명의 여성을 대상으로 흑마늘 추출물을 포함하는 실시예1을 처리한 후, 흑마늘 추출물을 포함하는 화장품의 사용감 평가를 수행하였다 (표 4 참조). 관능 평가 결과 12명의 여성 중 약 50% 이상이 만족도를 나타내었다.

표 4

	촉촉함	발림성	흡수력	유분감	만족도
매우 불만족	0	0	0	0	0
불만족	0	0	25	17	25
보통	33	17	50	50	25
만족	58	67	25	25	50
매우만족	8	17	0	8	0

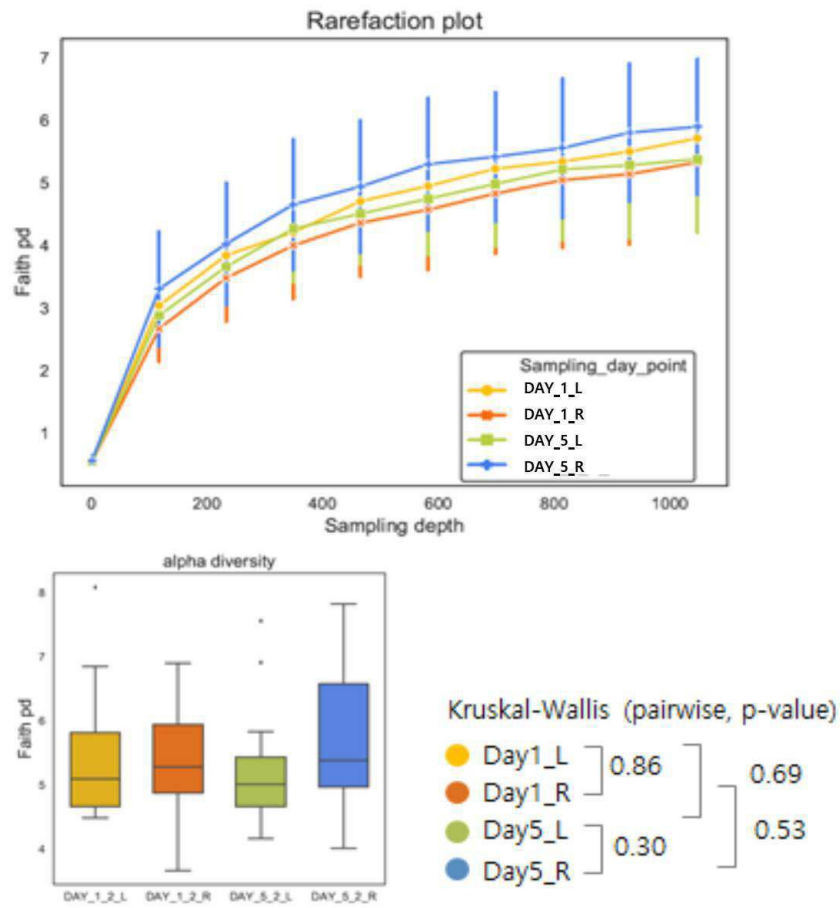
값= (해당 정도의 만족도를 갖는 사람수/ 시험 대상 사람수)* 100, 단위: %

[0084]

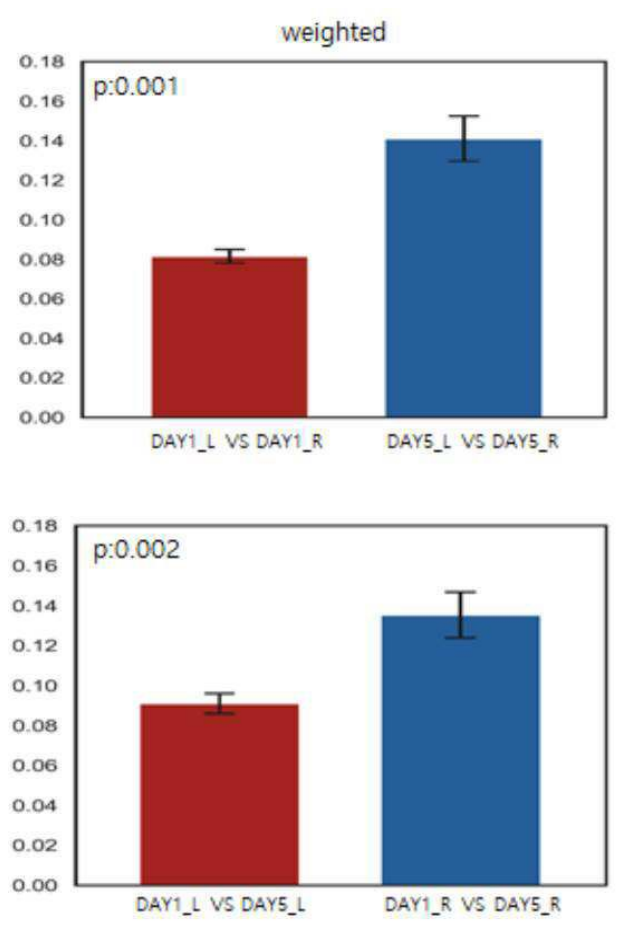
도면

도면1

- Alpha diversity (Faith pd)



도면2



도면3

