(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년05월22일
(11) 등록번호 10-1981428
(24) 등록일자 2019년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/04 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/04 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2018-0045313
(22) 출원일자 2018년04월19일
심사청구일자 2018년04월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170090690 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
재단법인목포수산식품지원센터
전라남도 목포시 고하대로719번길 52 (연산동)
(72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 10 호반중흥1단지 아파트 105-203
윤효정
광주광역시 남구 제중로 11, 110동 701호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최석진

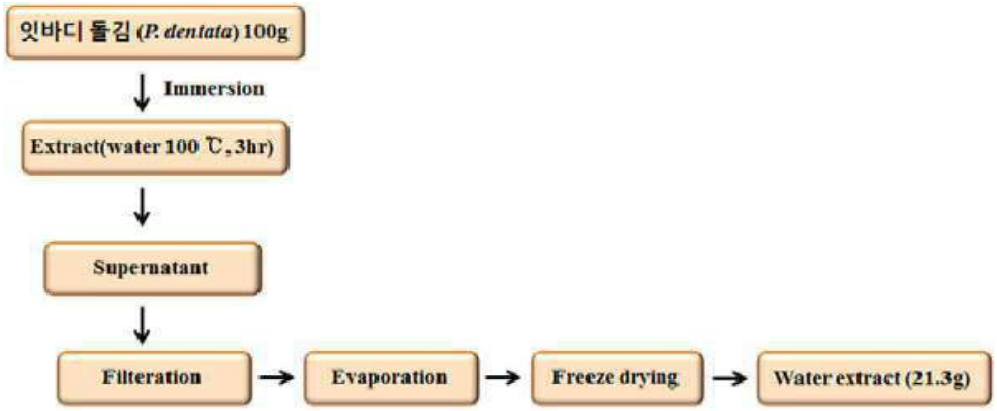
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 **김 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부재생용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 김에 함유된 유효물질인 단일 화합물 Dehydrated P-334가 강화된김 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부재생용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 김 추출물은 피부재생 유효성분의 함량을 증가시켰다. 김 추출물은 피부각질세포 (HACAT Cell)에 독성 없이 세포의 생장을 촉진 시켰다. 또한 피부상처치유 동물 모델에서 우수한 피부재생 효과를 나타내었다. 따라서 본 발명에 따른 김 추출물은 피부 흡수력 및 재생에 효과가 있는 피부재생용 약학적 조성물에 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 17/02 (2018.01)
(72) 발명자
김진영
광주 광역시 북구 문산로 81, 201동 1005호
조아라
광주광역시 남구 백양로 39번길 7-2, 푸르지오 301호
임소정
광주광역시 서구 화개1로78번길 8 (금호동, 금호5차호반리젠시빌) 505동 303호
김재용
전라남도 순천시 왕궁길 60 (조례동, 중흥3차아파트) 304동 207호
신자원
전라남도 장흥군 장흥읍 진골목길 4, 리치빌 306호
최성제
전라남도 완도군 완도읍 개포로135번길 26 무등그린빌6차 103호
성락선
전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39 (수창아트빌아파트) 203호
오병준
전라남도 목포시 원산 중앙로 108(연산주공2단지아파트) 203동 403호
김형균
전라남도 목포시 청호로136번길 22(라송센트럴카운티2차 아파트) 203동 601호
정재천
전라남도 무안군 삼향읍 남악4로34번길 7, 무안남악3휴먼시아 301동 1402호

명 세 서

청구범위

청구항 1

잇바디 돌김(*Porphyra. dentata*) 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부재생용 약학적 조성물

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 세포 재생 촉진, 상처 치유 촉진, 아토피 개선의 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 피부재생용 약학적 조성물

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 기능성 피부재생용 약학적 조성물은 김 추출물을 조성물 총 중량에 대해 0.001 내지 99 중량%로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부재생용 약학적 조성물

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 김 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부재생용 약학적 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 천연원료인 김 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 피부재생용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 피부는 체내의 근육들과 기관을 보호하는 다수의 상피 조직으로 이루어진 외피체계에서 가장 큰 조직이다. 피부는 몸의 가장 바깥쪽에 위치하여 외부환경을 접할 때에 병원균으로부터 신체를 보호하고, 단열과 체온조절기능, 감각기능, 비타민D의 합성과 비타민 B 엽산염의 보호 기능을 수행한다.

[0004] 피부는 중층 편평 상피인 표피와 촘촘한 결합 조직인 진피(眞皮), 느슨한 결합조직인 피하지방층으로 이루어진다. 표피층은 피부의 가장 바깥쪽에 위치하고 신체의 표면을 덮는 방수, 보호 막을 만들며 층상의 비늘 상피세포와 그 밑의 기저층으로 이루어진다. 표피에는 혈관이 없고, 중추신경계와 관련되어 미약하게나 신경이 존재한다. 표피를 만드는 주된 세포들의 종류로 각질형성세포, 멜라닌세포, 랑게르한스세포, 메르켈 세포가 존재한다.

[0005] 진피(dermis)는 연결조직으로 이루어진 표피 밑의 피부 층으로 완충작용을 하여 신체를 압력과 장력으로부터 보호한다. 진피는 기저막을 통해 표피와 단단히 연결되어 표피를 지지하고 영양분을 공급하며, 접촉과 열을 감지하는 복수의 신경 말단을 담고 있다. 표피와의 상호작용을 통해 피부의 재생을 돕는데, 이 상호 작용을 도와주는 것이 세포 대화 성분이다. 각질층은 피부 표피의 가장 바깥 부위에 있는 구성요소로 단백질이 풍부한 각질세포들로 이루어져 있다. 주로 피부 장벽이 손상된 경우 각질이 많이 생기기 시작하며, 이때 피부 장벽의 손상을 억제해줄 수 있는 성분들로 피부를 보습해줄 필요가 있다.

[0006] 한편, 김은 홍조식물문(Phylum Rhodophyta), 김파래홍조강(Class Bangiophyceae), 김파래목 (Order Bangiales), 김파래과(Family Bangiaceal)에 속하며, 김속(Genus Porphyra)과 돌김속(Genus Pyropia)로 나눌 수 있으며, 우리나라에는 김속에 7종, 돌김속에 13종이 서식하는 것으로 보고되어져 있다. 김은 한국과 일본이 주요 생산 및 소비국이며, 한국에서는 UPOV (International Union for the Protectionof New Varieties of

Plants) 협약에 의해 2012년에 해조류를 비롯한 모든 식물로 품종보호제도가 확대된다.

[0007] 일본은 방사무늬김(Porphyra yezoensis)을 주생산품으로 하며, 신흥 김 생산국인 중국은 방사무늬김(P.yezoensis)의 생산을 증대시키고 있으며, 한국은 참김(P. tenera), 방사무늬김, 잇바디돌김(P. dentata) 및 모무늬돌김(P. seriata)을 생산하고 있다.

[0008] 특히, 잇바디돌김(P. dentata Kjellman)은 조생종으로서 양식초기에 성장하며, 단(중성) 포자가 방출되지 않아 1~2회 채취 후 양식이 종료되어 지속적인 생산이 이루어지지 못해 생산시기 및 생산량의 편중으로 해마다 물김 생산과 가격이 불안정하다.

[0009] 잇바디 돌김 식물체는 검붉은색이며 막질이고 얇은 종이와 같으며 기다란 댕기모양으로 아랫부분은 뭉툭하고 윗부분은 좁아진다. 표면에서 보는 세포는 눈썹 모양인 것과 눈동자 모양인 것이 짝을 이루지만 그 두 세포 사이는 그다지 가깝지 않다. 식물체의 가장자리는 독특하게 경계를 이루며 갸름한 구슬모양의 세포들이 엉성하게 있다. 정자낭은 주로 8개로 나누어진다. 조간대 상부에 자란다.

[0010] 따라서 잇바디 돌김과 같은 천연물의 효능을 연구하여 피부에 부작용이 거의 없고 회복에 도움이 되는 물질을 개발하기 위해 노력하고 있으나, 아직까지는 잇바디 돌김에 대한 미용 및 생리활성 기능성에 대한 관련정보가 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 국내 공개특허공보 제10-2014-0097865호에는 티로시나제 활성 저해능, 멜라닌 합성 저해능, 콜라겐 합성능 및 MMP 활성 저해능이 우수하고, 각질형성세포 (HaCaT), 인간 섬유아세포(1064 SK) 및 피부암세포(B16F10)에서 거의 세포 독성을 나타내지 않으며, 비자극성이며, 감작성이 매우 약하고(등급 I), 광독성 및 광감작성을 유발하지 않는 김 추출물을 유효성분으로 함유하는 김 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 또는 주름 개선용 화장료 조성물에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0002) 국내 공개특허공보 제10-2016-0089911호에는 (a) 김의 유효성분을 증류수에서 1차 용출시키는 단계; (b) 용출액에서 1차 상층액을 분리한 후, 잔류물을 다시 증류수에서 2차 용출시키는 단계; (c) 2차 용출액에서 2차 상층액을 분리하는 단계; (d) 1차 및 2차 용출액을 혼합한 후, 여과하는 단계; 및 (e) 여과액을 멸균하여 염분도 0.7~1.2 psu로 희석시키는 단계를 포함하는 타우린 및 알라닌을 함유하는 김추출물의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0003) 국내 등록특허번호 제10-1195577호에는 홍조류에 속하는 김 또는 우뭇가사리 추출물과 꽃송이버섯(Sparassis crispa), 신령버섯(Agaricus blazeii), 저령(Polyporus umbellatus)으로 이루어진 혼합 추출물을 함유하는 피부염증 완화용 화장료 조성물에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0004) 국내 등록특허번호 제10-1128591호에는 자외선A를 흡수하여 피부에 자외선이 직접 조사되는 것을 억제하고 자외선에 의한 산화를 방지하고 세포재생을 통하여 피부손상을 회복시키는 해양 홍조류 추출 혼합물 및 이를 함유하는 화장료 조성물에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0005) 그러나 상기 선행문헌은 본 발명의 물, 탄소수 1내지 5의 알코올 또는 이의 혼합 용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용하고 조건별 아임계 추출법 (온도 0℃, 120℃, 150℃, 180℃, 210℃)으로 추출된 추출물을 유효성분으로 하여, 온도가 증가함에 따라 잇바디 돌김 단일 화합물 P-334의 함량은 감소하고, 잇바디 돌김 단일 화합물 Dehydrated P-334 의 함량이 증가되는, 잇바디 돌김(Porphyra. dentata) 추출물을 유효성분으로 하는 피부재생용 약학적 조성물에 관한 구성은 개시되지 않아 차이를 보인다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 김에 대한 미용 및 생리활성 기능성에 대한 관련정보가 부족한 상기 문제점을 해결하기 위해서, 천연원료인 김 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 피부재생용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 김 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부재생용 약학적 조성물을 제공하기 위하여, 첫 번째 추출방법은 잇바디 돌김 100g을 염분을 제거하기 위하여 증류수로 수세한 다음, 증류수 4,000ml를 첨가하고, 환류 추출기에서 3시간동안 100℃로 가열, 추출하였다. 여과지(whatman No.41)를 이용하여 여과하고 여액을 감압 및 농축하였다. 농축된 열수추출물을 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 -50℃에서 48시간 동안 동결 건조시켰다. 두번째, 추출 온도 및 시료에 따른 잇바디 돌김 단일 화합물 P-334, Dehydrated.P-334 함량을 얻는 아임계 추출 과정을 나타낸다. 김 20g을 염분을 제거하기 위하여 증류수로 수세한 다음, 증류수 200ml를 첨가하고, 온도 조건별 아임계 추출 (온도 0℃, 120℃, 150℃, 180℃, 210℃)을 이용하여 제조하였다. 추출물은 *in vitro* 실험에서 피부재생과 관련된 *p*-ERK 단백질 발현을 증가시킴으로써 피부각질세포 (HACAT cell)의 성장을 증가시켰으며, 아울러 *in vivo* 동물실험에서 상처치유에 대한 피부재생효과를 확인하였다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 김 추출물을 유효성분으로 하는 피부재생용 약학적 조성물을 추출함으로써 피부재생과 관련된 유효성분의 함량을 증가시켜 피부각질세포 (HACAT Cell) 및 상처치유 동물 모델에서 우수한 피부재생효과를 나타내었다.

[0018]

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 잇바디 돌김 열수추출물을 얻는 과정의 모식도를 나타낸다.

도 2은 잇바디 돌김 추출물의 온도 조건별 아임계 추출의 모식도를 나타낸다.

도 3는 잇바디 돌김 추출물의 추출온도에 따른 함량을 그래프로 나타낸 그림이다.

도 4는 잇바디 돌김 추출물에 대한 피부각질세포의 세포생장 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5은 잇바디 돌김 추출물에 대한 피부각질세포의 단백질 발현의 변화를 나타낸 그림이다.

도 6은 잇바디 돌김 추출물의 상처치유에 대한 피부재생 효과를 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 김 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부재생용 약학적 조성물과 관련한 구체적인 구성과 첨부한 도면을 참조하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0022] **1. 잇바디 돌김 열수추출물의 제조**

[0023] 잇바디 돌김 추출물은 물 또는 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이들의 혼합 용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용하여 제조한다.

[0024] 도 1은 잇바디 돌김 열수추출물을 얻는 과정의 모식도를 나타낸다. 건조된 김 100g을 염분을 제거하기 위하여 증류수로 수세한 다음, 증류수 4,000ml를 첨가하고, 환류 추출기에서 3시간동안 100℃로 가열, 추출하였다.

[0025] 여과지(whatman No.41)을 이용하여 여과하고 여액을 감압 및 농축하였다. 농축된 열수추출물을 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 -50℃에서 48시간 동안 동결 건조시켰다. 이상의 방법으로 잇바디 돌김 열수 추출물 21.3g(21.3%)를 수득하여 실험예의 시료로 사용하였다.

[0027] **2. 추출온도 및 시료에 따른 잇바디 돌김 단일 화합물 P-334, Dehydrated.P-334 의 함량**

[0028] 도 2는 잇바디 돌김 추출물의 온도 조건별 아임계 추출의 모식도를 나타낸다. 추출 온도 및 시료에 따른 잇바디 돌김 단일 화합물 P-334, Dehydrated. P-334의 함량을 얻는 아임계 추출과정을 나타낸다.

[0029] 잇바디 돌김 20g을 염분을 제거하기 위하여 증류수로 수세한 다음, 증류수 200ml를 첨가하고, 압력을을 3 MPa로 하고 온도 조건을 0 ~ 210℃의 조건별 아임계 추출(온도 0℃, 120℃, 150℃, 180℃, 210℃)을 이용하여 제조하였다.

[0030] 본 발명에 따른 아임계 추출법은(subcritical water extraction, SWE)은 상온의 온도 조절을 통하여 아임계 상

태로 만듦으로써 낮은 상대 유전율(1 < ε < 25)을 부여하므로 플라보노이드와 같은 비극성 화합물(non-polar compound)을 추출하는데 매우 효과적인 통상적인 방법을 지칭한다.

[0031] 도 3은 잇바디 돌김 추출물의 추출온도에 따른 함량을 그래프로 나타낸 그림이다. 상기에서 얻은 잇바디 돌김 단일화합물 P-334의 아임계 추출의 경우 추출 온도 조건이 증가함에 따라 함량이 감소하는 경향을 보였으며, 180℃, 210℃에서는 잇바디 돌김 단일화합물 P-334의 함량이 검출되지 않았다.

[0032] 잇바디 돌김 단일화합물 Dehydrated. P-334의 아임계 추출은 180℃ 온도에서 함량이 최대로 증가한 후 감소하였고, 잇바디 돌김 단일화합물 P-334와 서로 상반된 결과를 나타내었다.

[0034] **3. 잇바디 돌김 추출물에 대한 피부각질세포 (HACAT cell) 의 세포생장 변화**

[0035] 96 well plate에 $1X10^6$cells/well의 피부각질세포(HACAT cell)를 배양하여 well에 부착시킨 후 24시간 안정화 시킨다. 소태아혈청 (fetal bovine serum; FBS) 을 뺀 DMEM 배지와 함께 샘플을 농도 별로 처리하여 37℃, 5% CO_2에서 24시간 배양한다. 세포생장률 (Ez-cytox) 측정 시약을 10ul씩 넣고 37° 5% CO_2에서 4시간 동안 배양후 450㎚에서 흡광도를 측정한다.

[0036] 도 4는 잇바디 돌김 추출물에 대한 피부각질세포의 세포생장 변화를 나타낸 그래프이다. 잇바디 돌김, 방사무늬 돌김 추출물의 농도를 10, 50, 100ug/ml 로 처리한 결과, 농도 의존적으로 피부각질세포의 생장이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 추출온도 및 시료에 따른 잇바디 돌김 단일화합물 P-334, Dehydrated.P-334 의 농도를 1, 5, 10ug/ml 로 처리한 결과, 잇바디 돌김 단일화합물이 방사무늬 돌김 보다 세포생장이 2배정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0038] **4. 잇바디 돌김 추출물에 대한 피부각질세포의 단백질 발현 변화**

[0039] 세포를 60mm dish 에 3.5×10^5 세포로 균일하게 분포시킨 후 24시간 안정화 시킨다. 24시간 후 고갈 및 시료를 처리한다. 시료처리 24시간 후 PBS로 두 번 세척하여 1x lysis buffer로 용해한다. 상온에서 30분간 세포를 용해시킨 후, 4℃ 12000 rpm에서 15 분간 원심분리한다.

[0040] 원심분리 후 상층액만 모아 -20 ℃에서 보관하여 사용한다. 단백질분석기법 (Immunoblotting) 을 위해 단백질 25㎍/lane을 10% SDS-Polyacrylamide gel 상에서 전기영동하고, membrane은 5% Skim milk를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시킨다. 1차 항체 는 Tris Buffered saline에 1:1000 비율로 처리하였으며, 다음날 TBST (Tris Buffered saline-Tween 20)에 세 번 washing 후 2차 항체는 3% skim milk에 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody (2차 항체) 를 1:1000 비율로 1 시간 처리한 후 immunoblotting 한다.

[0041] 도 5는 잇바디 돌김 추출물에 대한 피부각질세포의 단백질 발현의 변화를 나타낸 그림이다. 피부각질세포에 양성대조군으로 EGF10ng/ml, 잇바디 돌김, 방사무늬 돌김 10, 50, 100ug/ml로 처리한 결과 방사무늬 돌김 보다 잇바디 돌김에서 양성대조군인 EGF10ng/ml 만큼 세포생장에 관여하는 P-ERK의 단백질의 발현이 농도별로 증가하였다.

[0042] 또한 온도 및 시료에 따른 잇바디 돌김 단일 화합물 P-334, Dehydrated.P-334 의 P-ERK의 단백질 발현이 양성대조군인 EGF 10ng/ml 만큼 농도별로 증가하였으며, P-ERK의 상위 신호전달인 EGFR의 단백질 발현이 잇바디 돌김 단일 화합물 Dehydrated.P-334에서 농도별로 증가하였다.

[0044] **5. 잇바디 돌김 추출물의 상처치유에 대한 피부재생 효과**

[0045] 피부재생효과를 확인하기 위하여 실험동물인 BLAB/C mouse의 등에 biopsy punch (6mm)를 이용하여 일정한 크기로 피부를 제거한 다음, 각 그룹에 해당하는 약물을 매일 2회(아침/저녁) 국소도포 하였다. 상처의 크기를 10일 동안 2일 간격으로 약물 처리 전에 면적(가로X세로)을 측정하여 첫 날의 상처크기를 100%로 설정하여 줄어드는 비율을 비교하였다.

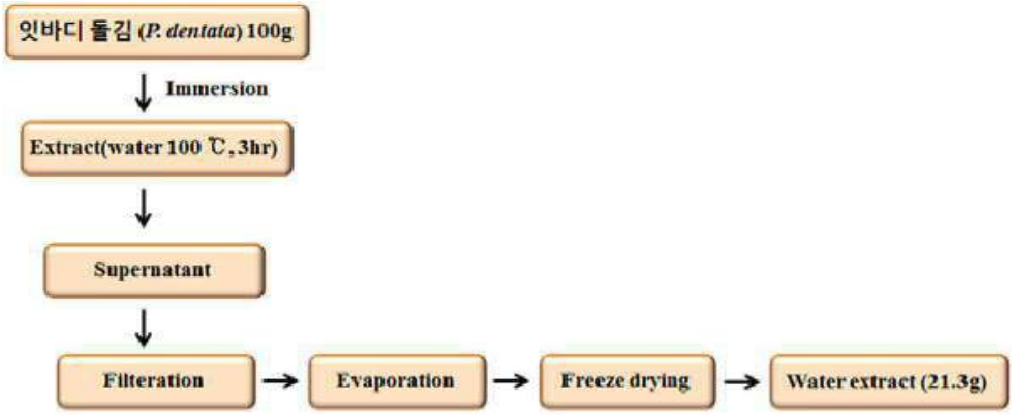
[0046] 도 6은 잇바디 돌김 추출물의 상처치유에 대한 피부재생 효과를 나타내는 그림을 나타낸다. 실험 4일 및 5일째 control 군(증류수만 처리한 그룹), 양성 대조군 (후시딘, 10mg), 잇바디 돌김추출물 처리군 (10, 50, 100 mg/ml)을 측정한 결과 잇바디 돌김 추출물 군 (10, 50, 100mg/ml)은 대조군에 비하여 유의적으로 상처치유 효과를 나타내었다. 또한 8일째에 양성대조군과 비교하여 잇바디 돌김 추출물 (10, 50, 100mg/ml) 에서 피부재생 효과가 뛰어남을 확인하였다.

산업상 이용가능성

[0048] 본 발명은 김 추출물을 유효성분으로 하는 피부재생용 약학적 조성물을 추출함으로써 피부재생에 관여하는 유효성분 함량을 증가시켜 피부각질세포 (HACAT Cell) 및 상처치유 동물 모델에서 우수한 피부재생효과에 도움이 되므로 피부 재생과 관련된 제품 생산 및 관련 사업자들의 이윤을 창출할 수 있어 산업상 이용가능성이 있다.

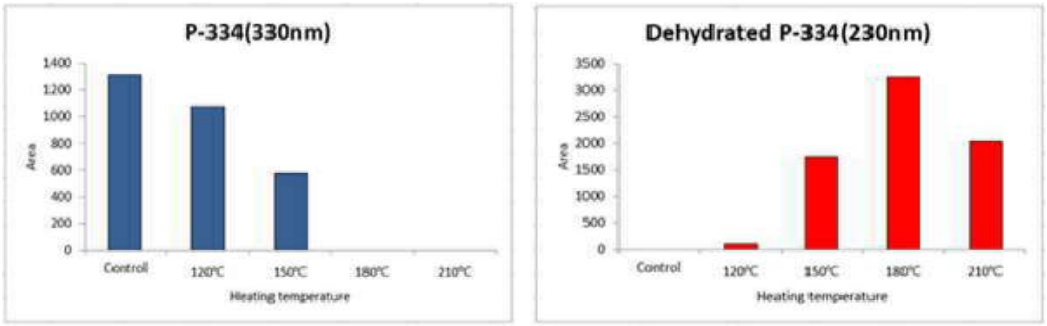
도면

도면1

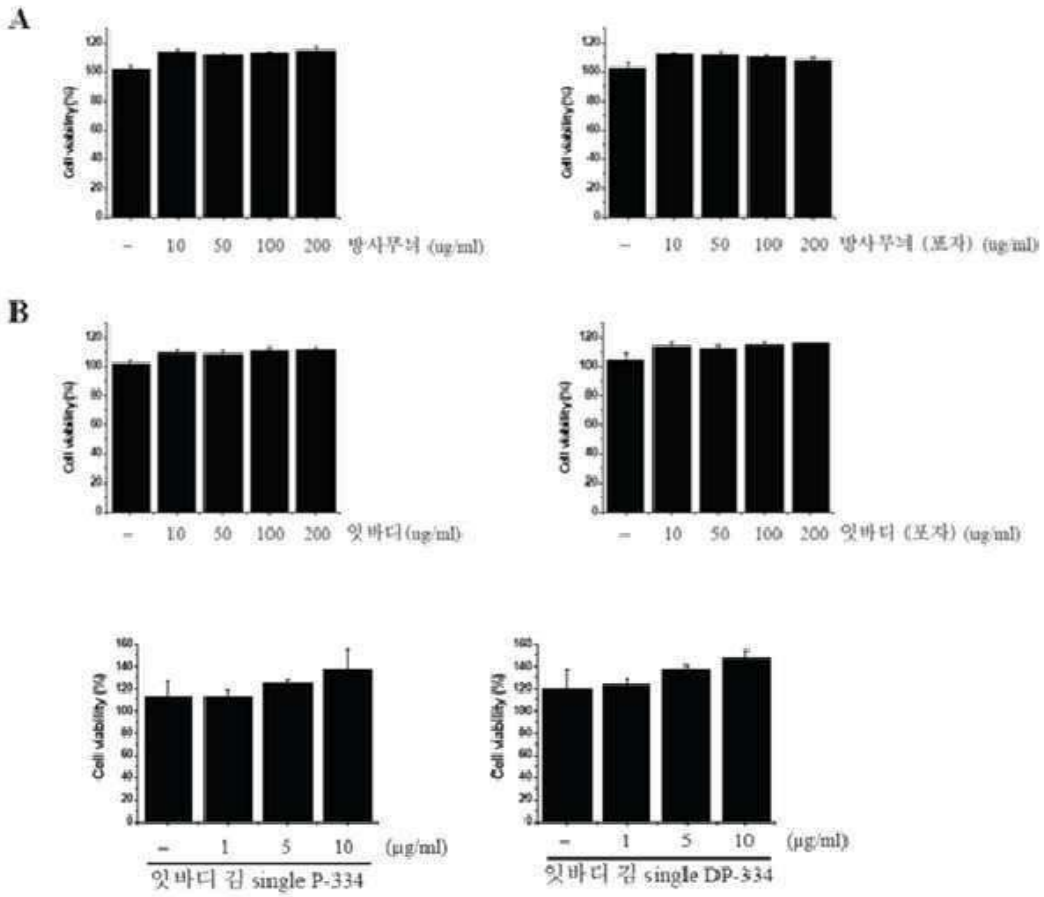


도면2

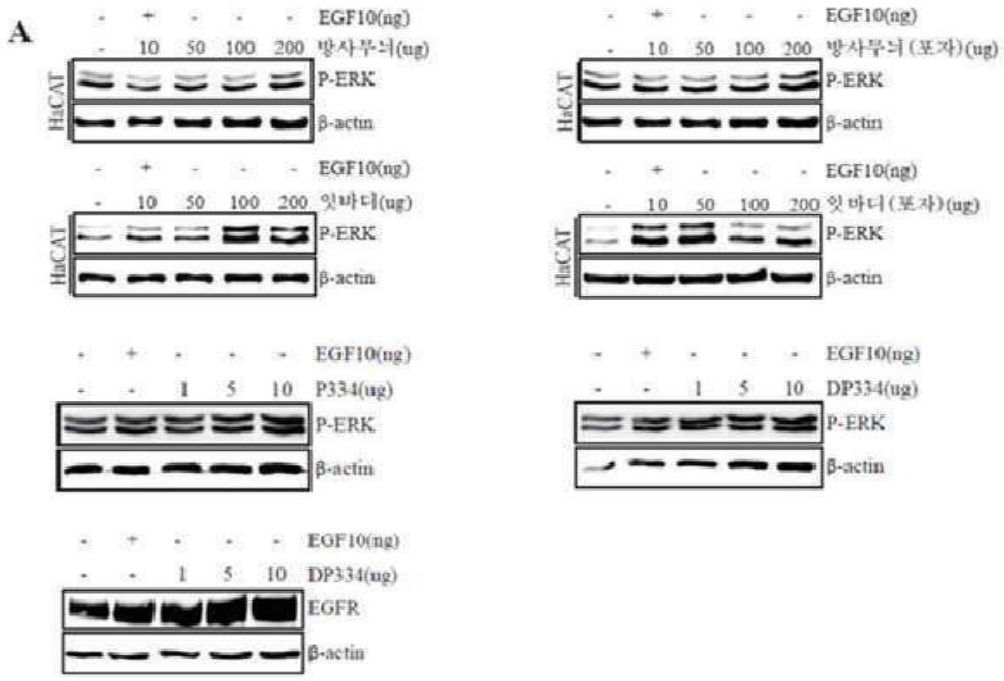
도면3



도면4


A
Cell viability(%)
- 10 50 100 200 방사무늬 (ug/ml)
- 10 50 100 200 방사무늬 (포자) (ug/ml)
B
Cell viability(%)
- 10 50 100 200 잇바디(ug/ml)
- 10 50 100 200 잇바디 (포자) (ug/ml)
Cell viability (%)
- 1 5 10 (μg/ml)
잇바디 김 single P-334
- 1 5 10 (μg/ml)
잇바디 김 single DP-334

도면5


A
EGF10(ng)
10 50 100 200 방사무늬(ug)
HaCAT
P-ERK
β-actin
EGF10(ng)
10 50 100 200 잇바디(ug)
HaCAT
P-ERK
β-actin
EGF10(ng)
1 5 10 P334(ug)
P-ERK
β-actin
EGF10(ng)
1 5 10 DP334(ug)
EGFR
β-actin
EGF10(ng)
10 50 100 200 방사무늬(포자)(ug)
HaCAT
P-ERK
β-actin
EGF10(ng)
10 50 100 200 잇바디(포자)(ug)
HaCAT
P-ERK
β-actin
EGF10(ng)
1 5 10 DP334(ug)
P-ERK
β-actin

도면6

Day	0,	2,	4,	8
Control				
Positive control (10mg)				
10mg				
50mg				
100mg				