



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월09일
 (11) 등록번호 10-1693923
 (24) 등록일자 2017년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
 A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0094609
 (22) 출원일자 2014년07월25일
 심사청구일자 2014년07월25일
 (65) 공개번호 10-2016-0013385
 (43) 공개일자 2016년02월04일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020030086933 A*
 JP2004521947 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 주식회사 바이오에프디엔씨
 인천광역시 연수구 송도미래로 30 , 에이동 509호, 510호, 511호((송도동, 스마트밸리))
 (72) 발명자
모상현
 경기도 용인시 기흥구 한보라1로43번길 22, 505동 2102호 (보라동, 한보라마을휴먼시아)
이정훈
 경기도 김포시 김포한강2로 229 506동 1601호 (장기동, 고창마을한강호반베르디움아파트)
 (뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 **잘피 식물 세포 배양 추출물을 함유한 항염 및 항노화 효과를 지닌 피부 외용제 조성물 및 그 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 잘피(*Zostera marina*) 식물 세포 배양 추출물을 함유한 항염 및 항노화 효과를 지닌 피부 외용제 조성물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 희귀식물인 잘피 식물체로부터 유도된 식물 세포 배양물, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유한 항염, 항노화 피부 외용제 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 잘피 식물 세포 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유한 피부 외용제 조성물은 피부 세포에 독성이 없으면서도 피부 주름개선, 미백, 모공수축, 피지분비 억제, 여드름 개선 등의 효능을 가지고 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김형식

인천광역시 연수구 학나래로46번길 15, 329호

서효현

인천광역시 연수구 원인재로 237 대우1차아파트
103동 901호

송미영

경기도 부천시 소사구 부광로42번길 45, 나동 405
호(괴안동, 대현아파트)

정해수

인천광역시 남동구 예술로 172번길 9 룩소르 404호

신동선

인천광역시 남구 승학길104번길 30 인천주안한신희
플러스아파트 106동 604호

조문진

인천광역시 부평구 경인로667번길 62 (십정동, 라
비캐슬)

김은애

인천광역시 계양구 봉오대로743번길 8 103동 301호
(작전동, 현대1차아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

잘피(*Zostera marina*)의 식물 세포 또는 부정근 배양물, 또는 그 추출물을 함유하는 모공축소용 또는 자외선에 의한 피부 손상 억제용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 주름 억제 또는 개선용도를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 미백용도를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부의 염증 완화 또는 개선용도를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 피지 억제용도를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 여드름 억제 또는 개선용도를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 잘피(*Zostera marina*) 식물 세포 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유한 제1항에 따른 화장품 조성물의 제조방법:

- (a) 잘피 식물의 잎, 또는 줄기조직을 분리하여 식물 세포 또는 부정근으로 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 잘피 식물세포 배양물 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 화장품 조성물을 제조하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a)단계는,

- (i) 상기 잘피 식물의 잎 또는 줄기 조직을 분리하여 6-벤질아미노퓨린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP), 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)을 함유한 배지에서 배양함으로써 식물 세포 배양물을 얻는 단계이거나,

(ii) 상기 잘피 식물의 잎 또는 줄기 조직을 분리하여 인돌부티르산(IBA)을 함유한 배지에서 배양함으로써 부정근 배양물을 얻는 단계,
 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (a)단계에서 배양시, UVA를 3 내지 6시간 처리하거나, 시킴산을 150uM~400uM 함유한 배지에 추가하여 배양하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 (b)단계는, (a)단계에서 얻어진 잘피 식물세포 배양물 또는 부정근 배양물을 건조하고, 분말화하여 정제수에 혼합시켜 조성물을 제조하거나, 분말화하여 정제수에 혼합시킨 다음, 초음파 추출 또는 열수 추출하여 조성물을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 잘피(*Zostera marina*) 식물 세포 배양 추출물을 함유한 항염, 항노화 피부 외용제 조성물 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 잘피 식물체로부터 유도된 식물 세포 배양물, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유한 항노화, 미백, 항염, 피지억제, 여드름 억제, 자외선으로부터의 피부 손상 보호 효과를 지닌 피부 외용제 조성물 및 그 제조 방법에 관한 것이다

배경 기술

[0002] 인간의 피부는 시간이 지남에 따라 내적으로는 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 세포들의 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되어 생기는 내인성 노화(intrinsic aging)와, 외적으로는 각종 오염물질과 자외선에 의한 광노화(photoaging)에 의해, 피부가 얇아지며 (내인성 노화의 경우), 탄력이 감소하게 되며 자외선 조사에 노출됨에 따라 표피 내 각질형성세포와 멜라닌세포가 UVB에 의해 세포손상을 받게 된다. 피부 노화는 태양광선에 노출되지 않는 부위에서 나타나는 연대학적 노화 (chronologic aging)와 태양광선의 노출부에서 일어나는 퇴행성 변화가 연대학적 노화와 복합되어 일어나는 광인성 노화 (actinic ageing) 로 구분된다. 연대학적 노화에서는 특징적인 임상 피부 소견으로 미세한 주름, 진피의 위축, 피하지방층의 감소 등이 관찰된다. 광노화 과정에서는 거칠고 깊은 주름 (coarse wrinkling and furrowing)이 나타나고 비정상적인 탄력질량 물질(elastotic material)이 축적되어 피부가 가죽같이 두터워지며 느슨해진다. 만성적 일광손상을 입은 피부에서 볼 수 있는 현상은 진피의 상부 쪽 교원질의 비정상적인 탄력질량 물질의 침착 (solar elastosis)과 프로테오글리칸 (proteoglycan)이 증가되고 진피

의 주단백질인 콜라겐이 현저히 감소되는 것이다. 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여하며 이로 인해 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부와 노화와 밀접한 관계를 가지고 있다. 피부를 구성하는 세포에서는 내인성 노화나, 광노화에 의해 세포활성이 떨어지고, 신호전달체계가 불완전해지면서 피부조직을 분해하는 효소인 MMPs (matrix metalloproteinases)의 생합성이 증가하고, 콜라겐의 생합성이 감소하여 주름살이 생기고 탄력이 감소하고, 피부후화를 초래하는 멜라닌 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 피부 세포를 증식시키거나, 피부를 구성하는 기질물질을 증가시킴으로써 피부를 두껍게 할 수 있는 물질, 피부를 구성하는 기질 물질인 콜라겐을 분해하는 MMPs의 생합성을 억제할 수 있는 물질, 멜라닌 생합성을 억제할 수 있는 물질 등이 주름, 탄력 상실, 피부후화 등의 피부 증상을 완화시키는 것으로 밝혀져 있다.

[0003] 미백, 노화방지, 항염 효과를 가진 물질들에 관한 연구가 활발히 진행되었으나, 기존의 화학물질들은 독성, 저활성, 용도의 한계성 및 과량복용에 따른 부작용 등의 여러 가지 문제로 사용에 제한을 받고 있어 부작용 가능성이 적은 소재를 개발하려는 일환으로 천연 식물에서의 유효 성분 추출하는 연구가 활발하다. 하지만 천연물 경우에도 안전성, 안정성 변색 가능성 등의 측면에서 화장품이나 의약품에 유효농도 이상으로 사용하는 데는 많은 문제점이 있으며, 만족할 만한 효과를 내지 못하는 실정이다.

[0004] 한편, 잘피는 해양현화식물로 해수에 적응되어 사는 식물을 통칭해서 말하며 우리나라는 총 8종의 잘피가 서식하고 있다. 잘피는 높은 생산력을 바탕으로 연안 및 하구생태계에서 경제적 가치를 지닌 많은 해양 동물들에게 먹이, 서식처와 산란장 등을 제공해줌으로써 연안의 수산생산력 향상에 매우 중요한 역할을 하고 있으며 또한, 지상부 조직을 통해 해수내의 영양염을 흡수 제거하고, 지하부 조직은 저질을 안정화시켜 수질향상 및 연안환경정화에 매우 중요한 역할을 하며, 잘피연구의 시작은 전 세계적으로 불과 몇 십년 밖에 안되었으며 국내에서는 연구가 거의 미미한 실정이다.

[0005] 최근 들어 식물성 자원을 이용한 기능성 식품 개발 및 화장품 소재로서의 활용에 많은 연구가 이루어지고 있으나, 잘피에 관해서는 잘피 추출물을 화장품 조성물의 유효성분으로 사용하는 선행 특허(특허문헌 1)이 있을 뿐, 그로부터 배양한 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물에 관한 화장품 소재로서의 연구는 전무한 수준이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국공개특허 제10-2003-0086933호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 잘피의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물이 항염, 항노화, 미백 등에 효능이 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 잘피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부개선용 피부 외용제 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명에 있어서, 상기 피부개선용은 피부 주름 개선용, 미백용, 피부 염증 완화, 억제, 개선용, 피지 분비 억제, 여드름 억제 또는 개선, 자외선에 의한 피부 손상 방지, 완화, 경감, 회복용을 포함한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 잘피의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부개선용 피부 외용제 조성물의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 잘피의 식물체의 증식방법 및 이식방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 잘피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

- [0013] 본 발명은 또한, 갈피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 주름 억제 또는 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 갈피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 갈피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부의 염증 완화 또는 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 갈피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 모공 축소용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 갈피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피지 억제용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 갈피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 억제 또는 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 갈피(*Zostera marina*)의 식물세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 자외선에 의한 피부 손상 방지, 완화, 경감, 회복용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 다음의 단계를 포함하는 갈피 (*Zostera marina*) 식물 세포 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유한 피부개선용 피부 외용제 조성물의 제조방법을 제공한다:
- [0021] (a) 갈피 식물의 잎, 또는 줄기 조직을 분리하여 식물 세포 또는 부정근으로 배양하는 단계; 및 (b) 상기 갈피 식물세포 배양물 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물을 제조하는 단계.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계는,
- [0023] (i) 상기 갈피 식물의 잎 또는 줄기 조직을 분리하여 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP), 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)을 함유한 배지에서 배양함으로써 식물 세포 배양물을 얻는 단계이거나,
- [0024] (ii) 상기 갈피 식물의 잎 또는 줄기 조직을 분리하여 인돌부티르산(IBA)을 함유한 배지에서 배양함으로써 부정근 배양물을 얻는 단계,
- [0025] 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계에서 배양시, UVA를 3 내지 6시간 처리하거나, 시킵산을 150uM~400uM 배지에 추가하여 배양하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계는, (a)단계에서 얻어진 갈피 식물세포 배양물 또는 부정근 배양물을 건조하고, 분말화하여 정제수에 혼합시켜 조성물을 제조하거나, 분말화하여 정제수에 혼합시킨 다음, 초음파 추출 또는 열수 추출하여 조성물을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명은, 다음의 단계를 포함하는, 갈피(*Zostera marina*)의 식물 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 갈피 식물체의 증식 방법을 제공한다:
- [0029] (a) 갈피 식물체의 잎 또는 줄기 절편을 적출하는 단계;
- [0030] (b) 적출된 잎 또는 줄기 절편을 0.5-1 mg/L 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine), 0.3-0.6mg/L 2,4-D, 함유한 MS배지(Murashige and Skoog)에서 명배양하여 제1항에 따른 갈피 식물세포 배양물을 얻는 단계;
- [0031] (c) 제아틴 0.2-0.5 mg/L 함유 MS배지에 상기 (b)단계의 갈피 식물세포 배양물을 명배양하여 신초를 유도하는 단계; 및
- [0032] (d) 상기 (c)단계에서 유도된 신초를 0.2-0.5 mg/L의 인돌부티르산(Indole-3-butyric acid (IBA) 함유 MS 배지에서 명배양하여 뿌리를 유도하는 단계.
- [0033] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 얻어진 갈피 식물체를 강 또는 바다에 이식하는 것을 특징으로 하는 갈피 식물체의 이식방법을 제공한다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에 따른 잘피 식물 세포 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유한 피부 외용제 조성물은 피부 세포에 독성이 없으면서도 피부 주름 개선, 모공 축소, 피부 미백, 피지 억제, 여드름 억제, 자외선에 의한 피부 손상 방지 효능 등을 가지고 있다. 또한 본 발명에 따른 잘피 식물체 증식방법을 통해 대량 증식이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 잘피 성체 식물체의 모습을 나타낸 사진이다.
 도 2는 잘피 식물체 증식 과정을 나타낸 사진이다.
 도 3은 본 발명에 따른 잘피 식물체로부터의 유도한 식물세포 사진이다.
 도 4는 본 발명에 따른 잘피 식물체로부터의 유도한 식물세포를 5 L 생물반응기 내에서의 대량배양과정을 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 발명은 잘피(*Zostera marina*)의 식물 세포 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

[0037] 본 발명은 일 관점에서, 잘피(*Zostera marina*)의 식물 세포 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 개선용 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

[0038] 본 발명에 있어서, "피부 개선용"이란, 피부의 상태를 개선, 예컨대, 항염의 경우, 염증의 완화, 방지, 경감, 항노화, 피부 주름 개선, 미백, 모공 축소, 피부 탄력 증진, 자외선에 의한 피부 손상 억제, 피지억제, 여드름 억제 등을 모두 포함하는 것이다.

[0039] 본 발명에 있어서, "유효성분으로 함유하는"의 의미는, 피부 외용제 조성물으로써 상기와 같은 다양한 피부 개선 효과, 예를 들어, 주름 개선, 항산화능을 통한 미백, 항염 등의 효능을 나타낼 수 있는 정도의 유효량을 함유하는 것을 의미한다.

[0040] 본 발명에 있어서, 잘피 식물 세포 배양물은 잘피 식물체의 일부, 예컨대, 줄기, 또는 잎의 전체 또는 일부를 잘라 유도 배지에서 배양을 통해 얻어지는 것이다.

[0041] 이와 같은 배양 유도는 식물 조직 배양에 관한 것으로, 식물조직배양은 살아있는 작은 식물 조직을 기내(*in vitro*)에서 무균적으로 배양하여 배양 목적에 따라서 식물 세포, 기관 및 식물체를 증식 시키는 기술이다. 식물 조직배양에는 식물이 지니는 기본적인 특성을 이용한다고 볼 수 있다. 식물조직배양 기술은 식물이 지니는 독특한 특징인 식물의 체세포로부터 식물체를 재생시킬 수 있는 분화전능성(*totipotency*)을 이용하는 것을 기반으로 하는 기술이다. 즉, 식물의 단세포(원형질체 포함), 잎 및 뿌리 절편을 특정 영양물질 및 성장 조절제가 첨가된 배지에 배양하면 이들 세포 및 조직으로부터 식물체가 재생될 수 있다. 이러한 식물이 분화전능성(*totipotency*)을 지니는 능력은 식물이 지니는 특성인 고착 생활과 장기간 생존을 위하여 열악한 환경 및 초식동물의 피해로부터 생존을 하기 위한 전략이다. 따라서 식물은 잃어버린 기관을 다시 재생시키기 위한 능력을 갖게 되었다고 볼 수 있다. 모식물체로부터 분리된 식물조직세포는 적정배양환경에서 배양하면 완전한 식물체로 재생될 수 있는 잠재력 즉, 전형성능을 가지고 있는 식물은 발생학 등의 학술적인 중요성은 물론이지만 화장품 원료 등의 실용화를 위해서도 활용가치가 크다.

[0042] "식물 세포 배양물"은 식물체에서 잘라낸 조직을 옥신을 함유한 배지에서 배양하거나, 어떤 종류의 식물에 상처를 내거나, 상구를 옥신으로 처리하거나 할 때에 생기는 특수한 조직 또는 세포덩어리를 말한다. 보통 캘러스는 정상적인 기관형성이나 조직분화를 일으키는 능력을 잃은 무정형의 조직 또는 세포덩어리로 대부분 유세포로 되어 있다. 넓은 의미로는 아그로박테리움(*agrobacterium*) 등의 감염에 의해서 생기는 식물종양조직도 포함시키기도 한다.

[0043] 따라서, 본 발명에 따른 잘피의 줄기, 잎 등의 어느 부위로부터 유도된 것이든 모두 가능하나, 일 구체예로, 잘피의 줄기와 잎의 조직 일부, 또는 잘피 종자의 발아된 유도로부터 자엽을 절취하여 유도시킨 식물세포일 수 있고, 잘피의 어느 조직이든지 일부 잘라내어 옥신 및 사이토키닌의 함량을 조절한 배지에 놓아두면 식물세포가 형성될 수 있다. 부정근 배양의 경우는 식물 세포 배양 과정과 동일하게 진행되나, 다만, 부정근이 유도될 수

있도록 식물 호르몬의 조합을 달리한다.

- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 잘피의 식물 세포 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물은 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 10 중량%로 함유할 수 있다.
- [0045] 이러한 비율은 단지 바람직한 범위일 뿐이며, 예컨대, 하기 실시예에서는 0.1 중량% 내지 5중량%의 경우를 실험한 결과를 포함하고 있으나, 5% 이상, 10%에서도 우수한 효능을 가지고 있는 것을 확인하였으며, 세포 생존율 또한 10%에서도 영향이 없음을 확인하였다. 이 이외에 20%, 30% 이상 경우도, 우수한 피부개선효과, 주름개선, 미백, 항염 기능 등을 가짐은 당업자에게 자명하다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 피부개선용은 항염, 항노화, 피부 주름 개선, 미백, 피부 탄력 증진, 자외선에 의한 피부 손상 억제, 피지억제, 여드름 억제용을 포함한다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 잘피의 식물 세포 또는 부정근 배양물 (배양체) 자체를 사용하거나, 배양물을 여과하여 사용하거나, 배양물을 파쇄하여 사용하거나, 배양물을 건조시켜 분말화한 다음, 정제수에 녹여 사용할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서, "추출물"은 상기 잘피의 식물 세포 또는 부정근 배양물 추출물을 분말화하거나, 냉수추출법, 열수추출법, 에탄올, 호호바오일 추출법 등 종래 알려진 다양한 추출법에 의해 수득한 추출물을 의미한다.
- [0049] 본 발명에서 추출 방법은 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 냉침 추출, 초음파 추출, 환류 추출, 열수 추출, 호호바오일 추출 등이 있다. 여기서, 열수추출의 경우, 열탕증류기에서 8~ 48시간동안, 80~ 100℃ 로 가열하여 열수 추출물을 얻는다.
- [0050] 냉수 추출의 경우, 예컨대, 냉수 (15~25℃)에 상기 배양물 자체 또는 그것의 건조된 분말을 혼합하여 3일동안 추출하여 냉수추출물을 얻는다.
- [0051] 또는, 물, 유기 용매, 또는 이의 혼합 용매를 사용하여 추출하는 방법으로 제조될 수 있다. 추출한 액은 바로 사용하거나 또는 농축 및/또는 건조하여 사용할 수 있다. 유기용매를 사용하여 추출하는 경우, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N, N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합용매인 유기용매를 사용하며 생약의 유효 성분이 파괴되지 않거나 최소화된 조건에서 실온 또는 가온하여 추출할 수 있다. 추출하는 유기용매에 따라 약제의 유효성분의 추출정도와 손실정도가 차이가 날 수 있으므로, 알맞은 유기용매를 선택하여 사용하도록 한다. 특히, 본 발명에 있어서는 에탄올 추출물, 바람직하게는 20-50% 에탄올 추출물, 일 구체예로써 50% 에탄올 추출물이 바람직하며, 추출방법은 실시예에 기재된 바와 같이, 50% 에탄올에 섞은 후 3일동안 교반하여 얻는다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 농축, 또는 희석하여 사용할 수 있고, 추출물의 증류액을 사용할 수도 있다.
- [0053] 본 발명은 다른 관점에서, 잘피(*Zostera marina.*) 식물의 식물 세포 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유한 피부개선용 피부 외용제 조성물의 제조방법을 제공한다:
- [0054] (a) 잘피 식물의 잎, 또는 줄기 조직을 분리하여 식물 세포 또는 부정근으로 배양하는 단계; 및
- [0055] (b) 상기 잘피 식물세포 배양물 또는 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물을 제조하는 단계.
- [0056] 상기 (a)단계는 잘피 식물로부터 분리된 일부 조직을 가지고, 식물 조직배양물, 즉, 식물 세포 배양물, 또는 부정근 배양물을 얻는 과정이다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 잘피 식물체의 잎, 또는 줄기 조직을 분리하여 사용할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 분리한 조직으로부터 식물 세포 배양물, 부정근 배양물을 유도를 위해서 적절한 배지를 선택할 수 있다. 상기 (a)단계에서, 구체적으로는 잘피 식물 세포 또는 부정근 배양하기 위해 적절한 배지를 선택할 수 있다. 기술 분야에서 식물조직배양에 일반적으로 사용되고 있는 배지가 있다면, 제한 없이 사용가능하다. 식물에서는 일반적으로 MS배지, B5배지 등을 주로 사용하고, 일 예로, MS배지의 조성(1L기준시)은 NH_4NO_3 1650 mg, KNO_3 1900 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg, KH_2PO_4 170 mg, KI 0.83 mg, H_3BO_3 6.2 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8 mg, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.3 mg, Myoinositol 100 mg, Nicotinic acid 0.5 mg, Pyridoxine-HCl 0.5

mg, Thiamine-HCl 0.5 mg, Glycine 2 mg, Sucrose 30000 mg 이다.

- [0059] 식물 잎 유래, 식물 줄기 유래 등으로부터의 식물 세포 배양 유도시, 기본적인 MS 배지 조성의 차이는 거의 없으나, 식물 세포, 부정근 유도에 있어서 가장 중요한 식물 생장 호르몬의 종류는 상이하다.
- [0060] 본 발명에 따른 식물 세포 배양의 경우, 잎 또는 줄기 유래의 식물 세포 배양의 경우, 6-벤질아미노푸린 (Benzylaminopurine) (6-BAP), 2,4-디클로로페녹시아세트산 (Dichlorophenoxyacetic acid) (2,4-D)을 함유시켜 배양함으로써 식물 세포 배양물을 얻을 수 있다.
- [0061] 각각의 호르몬의 조합 비율은 6-Benzylaminopurine (6-BAP) 및 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)이 1:0.4-0.8, 또는 1:0.5-0.6인 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 6-벤질아미노푸린 (6-BAP) 100 중량부에 대하여, 2,4-디클로로페녹시아세트산 40 내지 80중량부, 또는 50 내지 60중량부인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0062] 예컨대, 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, 6-BAP) 및 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)은 각각 0.5-1mg/ml, 및 0.3-0.6mg/ml 함유될 수 있다.
- [0063] 한편, 부정근 배양의 경우에는, 인돌부티르산(Indole-3-butyric acid, IBA)을 함유시켜 배양함으로써 부정근 배양물을 얻을 수 있다. 예컨대, 0.2-1mg/ml IBA를 함유시켜 부정근 배양물을 얻을 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계에서 배양시, UVA를 3 내지 6시간 처리하거나, 시킵산을 150uM~400uM 배지에 추가하여 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 미백, 항노화, 항염, 피지억제, 여드름 개선, 자외선에 의한 피부 손상 방지 등의 효능을 증가시키기 위해, 유인제 처리하는 과정을 포함할 수 있다.
- [0066] 이러한 유인제 처리는 UVA 처리, 시킵산 처리를 포함하며 페놀성 화합물, 카로티노이드, 플라보노이드 함량 증가 또한 가능하다. 상세 조건은 다음과 같다.
- [0067] 1. UVA: 물리적 유인제인 UV-A 형광 램프(20W, Sankyo Denki, Japan)를 매일 0.5 시간 ~ 8 시간씩 처리하며 배양한다.
- [0068] 2. 시킵산: 200 ~ 600 M 시킵산(Shikimic acid)을 MS배지에 넣어서 배양한다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계에서 있어서, (a)단계의 배양을 통해 얻어진 식물 세포 또는 부정근 배양물 그 대로를 포함하는 조성물을 적절한 형태의 피부 외용제 조성물로 제조하거나, 또는 상기 배양물을 공지된 추출 방법을 통해 추출물 형태로 수득하여 적절한 형태의 피부 외용제 조성물로 제조할 수 있다.
- [0070] 예컨대, 상기 (b)단계는, (a)단계에서 얻어진 잘피의 식물 세포 또는 부정근 배양물을 건조하고, 분말화하여 정제수에 혼합시켜 조성물을 제조하거나,
- [0071] (a)단계에서 얻어진 잘피의 식물 세포 또는 부정근 배양물을 건조하고, 분말화하여 정제수에 혼합시킨 다음, 냉수 추출, 열수 추출, 호호바오일을 비롯한 식물성 오일을 이용한 추출, 무기용매를 이용한 추출 또는 에탄올을 비롯한 알코올 등의 유기용매를 이용한 추출하여 조성물을 제조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0072] 또 다른 예로, 상기 (a)단계에서 얻어진 배양물을 열풍 건조후 분말화하여 수분을 증발시켜 제조할 수 있다.
- [0073] 또한 본 발명에 따른 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물은 우수한 멜라노생성 저해능을 가져, 미백 용으로써 활용될 수 있다.
- [0074] 또한 본 발명에 따른 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물은 모공축소용으로써 활용될 수 있다.
- [0075] 또한 본 발명에 따른 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물은 피지분비억제, 여드름 억제 또는 개선, 자외선에 의한 피부 손상 방지 효능을 가진다.
- [0076] 또한 본 발명에 따른 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물은 iNOS 활성 저해를 통한 항염, 즉 염증의 완화, 경감, 억제 등의 효과를 가진다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 피부 외용제 조성물은 화장료 조성물 또는 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0078] 상기 화장료 조성물에 있어서는, 화장품 제제에 있어서 수용가능한 담체를 포함할 수 있다. 여기서, "화장품 제제에 있어서 수용가능한 담체"란 화장품 제제에 포함될 수 있는 이미 공지되어 사용되고 있는 화합물 또는 조성물이거나 앞으로 개발될 화합물 또는 조성물로서 피부와의 접촉시 인체가 적응 가능한 이상의 독성, 불안정성

또는 자극성이 없는 것을 말한다.

- [0079] 상기 담체는 본 발명의 피부 외용제 조성물에 그것의 전체 중량에 대하여 약 1 중량 % 내지 약 99.99 중량 %, 바람직하게는 조성물의 중량의 약 90 중량% 내지 약 99.99 중량 %로 포함될 수 있다. 그러나 상기 비율은 본 발명의 피부 외용제 조성물이 제조되는 후술한 바의 제형에 따라 또 그것의 구체적인 적용 부위(얼굴, 목 등)나 그것의 바람직한 적용량 등에 따라 달라지는 것이기 때문에, 상기 비율은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0080] 상기 담체로서는 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선산란제, 자외선흡수제, 발색제, 향료 등이 예시될 수 있다. 상기 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선산란제, 자외선흡수제, 발색제, 향료로 사용될 수 있는 화합물/조성물 등은 이미 당업계에 공지되어 있기 때문에 당업자라면 적절한 해당 물질/조성물을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 일 구현예로써, 본 발명에 따른 피부 외용제 조성물은 상기 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물 이외에 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 에탄올, 트리에탄올아민 등을 포함할 수 있으며, 방부제, 향료, 착색료, 정제수 등을 필요에 따라 미량 포함할 수 있다.
- [0082] 본 발명에 따른 피부 외용제 조성물은, 다양한 형태로 제조될 수 있는데, 예컨대, 화장수, 에센스, 젤, 에멀전, 로션, 크림(수중유적형, 유중수적형, 다중상), 용액, 현탁액(무수 및 수계), 무수 생성물(오일 및 글리콜계), 젤, 마스크, 팩, 분말, 또는 젤라틴 등의 피막이 있는 캡셀(소프트 캡셀, 하드 캡셀) 제형 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0083] 본 발명에 있어서의 피부는 얼굴 뿐만 아니라, 두피, 전신도 포함되는 개념으로, 이러한 두피에 적용될 수 있는 피부 외용제 조성물로서, 샴푸, 린스, 트리트먼트, 발모제 등이 있고, 전신에 적용될 수 있는 바디클렌저 등의 용도로써 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유 피부 외용제 조성물의 제조방법은 전술한 제조방법에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 제조방법을 일부 변형시킨 방법으로도 본 발명에 따른 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물을 함유 피부 외용제 조성물을 제조할 수 있다.
- [0085] 특히, 상기 피부 외용제 조성물은 본 발명에 특별히 개시된 제조방법 이외에도, 통상적으로 알려진 제조방법을 이용하여, 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조될 수 있다.
- [0086] 피부 외용제 조성물로 제조될 경우, 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 피부과학적으로 허용가능한 매질 또는 기체를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소적용 또는 전신적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다.
- [0087] 또한, 적합한 화장품의 제형으로는, 예를 들면 용액, 젤, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [0088] 또한, 본 발명의 피부 외용제 조성물은 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온붕쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 그리고, 상기의 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [0089] 이러한, 본 발명에 따른 피부 외용제 조성물은 피부 수렴, 항염, 창상 치유, 항노화 등의 기능성 화장품의 형태를 포함한다.
- [0090] 본 발명에 있어서, 약제학적 조성물의 경우, 하기 실시예에서 제시하는 피부 상태 개선을 위한 약제학적 조성물로서 기능할 수 있다.
- [0091] 이러한 약제학적 조성물은 유효성분인 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물 외에, "약학적으로 허용

가능한 담체"를 포함할 수 있으며, 이러한 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 봉해제, 감미제, 안정제 및 방부제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 약학 조성물은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 상기 첨가제로 향료, 비타민, 및 항산화제가 포함될 수 있다. 상기 담체로 약제학적으로 허용 가능한 담체는 모두 가능하며, 예를 들면, 희석제로는 유당, 텍스트린, 타피오카(tapioca) 녹말, 옥수수 전분, 대두유, 미정질 셀룰로오스, 또는 만니톨, 활택제로는 스테아린산 마그네슘 또는 탈크, 결합제로는 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필셀룰로오스일 수 있다. 또한, 봉해제로는 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 전분글리콜산나트륨, 폴라크틸린칼슘, 또는 크로스포비돈, 감미제로는 백당, 과당, 솔비톨, 또는 아스파탐, 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 베타-사이클로덱스트린, 또는 잔탄검, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 또는 솔빈산 칼륨일 수 있다.

- [0092] 상기 약제학적 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 약제학적 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 경구 투여제제, 주사제, 좌제, 경피 투여제제, 및 경비 투여제제의 제형으로 제제화되어 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 제형은 액제, 현탁제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 또는 엑스제와 같은 경구 투여용 제형일 수 있다.
- [0093] 또 다른 관점에서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, 상기 잘피(*Zostera marina*)의 식물 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 잘피 식물체의 증식 방법에 관한 것이다:
- [0094] (a) 잘피 식물체의 잎 또는 줄기 절편을 적출하는 단계;
- [0095] (b) 적출된 잎 또는 줄기 절편을 0.5-1 mg/L 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine), 0.3-0.6mg/L 2,4-D, 함유한 MS배지(Murashige and Skoog)에서 명배양하여 잘피 식물세포 배양물을 얻는 단계;
- [0096] (c) 제아틴 0.2-0.5 mg/L 함유 MS배지에 상기 (b)단계의 잘피 식물세포 배양물을 명배양하여 신초를 유도하는 단계; 및
- [0097] (d) 상기 (c)단계에서 유도된 신초를 0.2-0.5 mg/L의 인돌부티르산(Indole-3-butyric acid (IBA) 함유 MS 배지에서 명배양하여 뿌리를 유도하는 단계.
- [0098] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 식물세포 배양은 피부 외용제 조성물에 함유되는 식물세포 배양 과정을 따르되, 배양 조건을 명배양으로 수행한다.
- [0099] 구체적으로, 본 발명에서는 아래와 같은 과정을 통하여 잘피 식물체를 대량으로 배양, 증식할 수 있다 (도 2).
- [0100] 1) 잎 절편을 적출하는 단계
- [0101] 본 발명에서 사용되는 잘피의 잎 절편은 무균상태에서 생장한 잘피의 잎 절편 또는 외부환경에서 생육한 잘피의 잎 절편을 포함하고 바람직하게는 외부환경에서 1년 이상 생육한 잘피를 잎절편을 사용하는 것이 바람직하다. 잘피로부터 잎 절편을 적출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 적출된 잎 절편은 증류수를 이용하여 잎 절편에 묻어있던 이물질을 제거한 후 사용하는 것이 바람직하다.
- [0102] 줄기 절편도 마찬가지로 과정을 거친다.
- [0103] 2) 살균단계
- [0104] 무균상태에서 생장한 잘피의 잎 절편을 사용하는 경우 살균단계를 거칠 필요가 없으나, 외부환경에서 1년 이상 생육한 잘피의 잎 절편을 사용하는 경우에는 살균단계를 거치는 것이 바람직하다. 살균단계는 명조건 또는 암조건에서 적출된 잎 절편을 70% 에탄올에 30초 동안 침지한 후 멸균수로 세척하고 다시 소독액 (30% 락스 +Tween20)으로 20분 소독한 후 멸균수로 3회 수세하여 살균하는 것을 특징으로 한다. 상기 살균된 잎 절편은 증류수로 세척한 후 적절한 크기로 잘라 식물세포를 유도하는 단계에서 사용된다.
- [0105] 3) 식물세포를 유도하는 단계
- [0106] 살균된 잎 절편으로부터 식물세포를 유도하는 단계는 살균된 잎 절편을 1mg/L 6-Benzylaminopurine, 0.3mg/L 2,4-D, 3% Sucrose 및 agar 8g/L 가 포함된 기본 MS배지(Murashige and Skoog 1962, Duchefa 사, Cat No. M0221)에서 25℃, 습도 70% 의 생장상 조건으로 명배양하며 초기 식물세포를 유도한다. 각각의 배지는 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 5.8 로 조정하였다. 계대배양은 2주간격으로 수행한다.
- [0107] 4) 신초를 유도하는 단계
- [0108] 신초를 유도하는 단계는 유도된 식물세포나 증식된 식물세포를 고체 배지에 치상한 후 명조건에서 배양하는 것

으로 구성되며, 배양 온도는 특별히 제한되지 않으나, 25±2 ℃인 것이 바람직하다.

[0109] 신초를 유도하는 단계의 배지는 MS 기본배지에 Sucrose 30 g/L, Gelite 2.0 g/L 을 첨가하고, 성장조절물질 0.2 ~ 0.5 mg/L Zeatin 을 첨가하여 을 포함하고 pH 5.7~5.8로 조정된 MS(Murashige & Skoog) 배지를 사용하고 25±2 ℃의 배양실에서 4주동안 온도 25℃, 습도 70% 의 성장상 조건으로 명배양하며 배양한다. 바람직하게는 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 5.8 로 조정하여 사용한다.

[0110] 5) 뿌리를 유도하는 단계

[0111] 뿌리를 유도하는 단계는 유도된 신초를 고체 배지에 치상한 후 배양하는 것으로 구성되고, 더욱 구체적으로는 신초 주위의 식물세포등 필요 없는 조직은 버리고 식물세포에서 다수로 발생한 신초를 여러 개의 신초로 나누어 각각의 배지에 계대배양하는 것으로 구성되며, 배양 온도는 특별히 제한되지 않으나, 25±2 ℃인 것이 바람직하다.

[0112] 뿌리를 유도하는 단계의 배지는 MS 기본배지에 Sucrose 30 g/L, Gelite 2.0 g/L 을 첨가하였고, 성장조절물질 0.2 ~ 1 mg/L Indole-3-butyric acid (IBA) 을 첨가를 사용하고 25±2℃ 의 배양실에서 4주 동안 온도 25℃, 습도 70% 의 성장상 조건으로 명배양하며 유도한다. 바람직하게는 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 5.8 로 조정하여 사용한다.

[0113] 6) 잘피 식물체의 증식 단계

[0114] 잘피 식물세포로부터 Shoot Regeneration 및 Root Regeneration이 유도된 식물체를 증식하기 위하여, MS 기본 배지에 Sucrose 10 ~ 30 g/L, Gelite 2.0 g/L 을 첨가하여 25±2℃ 의 배양실에서 배양한다. 25±2℃ 의 배양실에서 4주 동안 온도 25℃, 습도 70% 의 성장상 조건으로 명배양하며 키운다.

[0115] 7) 기내에서 분화된 식물체를 순화하는 단계

[0116] 기내에서 분화된 식물체를 순화하는 단계는 기내에서 분화된 식물체를 모래와 질석이 1:1로 섞인 배양토에 옮겨 심고 22~28℃의 온도와 60~90%의 상대습도를 유지하면서 1차 순화하는 단계;로 구성되며, 추가적으로 1차 순화하는 단계 이후에 15~25℃의 온도와 60~90%의 상대습도를 유지하면서 2차 순화하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0117] 온도가 일정하고 습도 및 영양분이 최적인 기내에서 식물조직배양을 통하여 증식된 개체를 외부환경으로 옮기는 경우 대부분의 개체가 열악한 환경에 적응하지 못하고 고사하므로 조직배양 과정 중 순화처리도 중요한 부분을 차지한다. 0.5-2g/L정도의 소금물을 추가하여 기내 순화할 수 있다.

[0118] 또한, 본 발명의 다른 관점에서, 위와 같이 얻어진 잘피 식물체를 강 또는 바다에 이식하는 것을 특징으로 하는 잘피 식물체의 이식방법에 관한 것이다. 이러한 식물체의 이식 방법에 관해서는, 본 기술분야에 잘 알려져 있는 식물체의 이식 과정이 모두 포함된다.

[0119] 구체적으로, 상기 증식방법 단계에 추가적으로 포함한다:

[0120] 8) 식물체 강 또는 바다 이식하는 단계

[0121] 증식된 잘피 식물체를 강 또는 바다 속의 모래나 토양에 이식하여 키울 수 있다.

[0122] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0123] 특히, 이하의 실시예에서는 잘피 식물 세포, 부정근 배양물 또는 그 추출물에 관한 효능을 확인하였으나, 추출물이 아닌 배양물 자체에 대해서도 이러한 효과가 있음은 당업자에게 자명할 것이다.

실시예 1

[0124] 실시예 1-1: 본 발명에 따른 잘피로부터의 식물세포 유도

[0125] 본 발명에 사용된 잘피는 인천광역시 꽃게 RIS사업단으로부터 받아서 사용한 것으로, 잘피 식물체를 70% 에탄올에 30초 동안 침지한 후 멸균수로 세척하고 다시 소독액 (30% 락스 +Tween20)으로 20분 소독한 후 멸균수로 3회 수세하였다. 날카로운 칼을 이용하여 단번에 상처를 내어 1mg/L 6-Benzylaminopurine, 0.3mg/L 2,4-D, 3% Sucrose 및 agar 8g/L 가 포함된 기본 MS배지(Murashige and Skoog 1962, Duchefa 사, Cat No. M0221)에서 25℃, 습도 70% 의 성장상 조건으로 암배양하며 초기 식물세포를 유도하였다. 각각의 배지는 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 5.8 로 조정하였다. 계대배양은 2주간격으로 수행하였다. 이렇게 얻어진 식물세포 배양 결과 모습은 도 3과 같았다.

[0126] 실시예 1-2: 본 발명에 따른 잘피 식물체 부정근 유도

[0127] 잘피 식물세포로부터 부정근을 유도하기 위하여 MS 기본배지에 Sucrose 30 g/L, Gelite 2.0 g/L 을 첨가하였고, 성장조절물질 IBA(indole-3-butyric acid) 0.5 mg/L 을 첨가하여 25±2℃ 의 배양실에서 4주간 배양하였다. 유도한 부정근의 정단부를 약 1 cm 정도 절단하여 1/2 MS 배지에 0.5 mg/L의 IBA(indole-3-butyric acid), Sucrose 50 g/L 을 첨가한 액체배지에 접종하였다. 25±2℃ 의 배양실에서 4주간 배양하였다. 수확한 부정근은 스테인레스 채로 걸러 배지를 분리해내고 깨끗한 티슈로 충분히 수분을 제거한 후 60℃ 로 2일간 건조한 후 실험에 사용하였다. 각각의 배지는 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 5.8 로 조정하였다.

[0128] 실시예 1-3: 본 발명에 따른 잘피 식물세포 및 부정근의 대량생산

[0129] 잘피 식물체로부터 무균적으로 유도되어 배양된 잘피 식물세포 및 잘피 부정근을 대량생산하기 위하여, 상기와 같이, 잘피 식물세포의 경우, MS배지에 1mg/L 6-Benzylaminopurine, 0.3mg/L 2,4-D가 함유된 배지에서 배양하였고, 잘피 부정근의 경우, 1/2 MS 배지에 IBA(indole-3-butyric acid) 0.5 mg/L, Sucrose 50 g/L가 함유된 배지에서 25±2℃ 의 배양실에서, 습도 70% 조건으로 20L 풍선행 생물반응기((주)삼성과학)에 공기공급량 0.1 vvm 정도로 5주간 배양하였다. 이와 같은 대량 생산 모습은 도 4와 같다.

[0130] 실시예 1-4: 본 발명에 따른 잘피 식물세포 및 부정근 유인제 처리

[0131] 본 발명의 목적은 잘피 식물세포 및 부정근의 이차대사산물인 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀성 화합물의 함량을 높이기 위한 방법으로

[0132] 1. 물리적 유인제인 UV-A 형광 램프(20W, Sankyo Denki, Japan)를 매일 0.5h ~ 8h 씩 처리하며 배양한다.

[0133] 2. 화학적 유인제인 200 ~ 600 M 시킵산(Shikimic acid)을 MS배지에 넣어서 배양한다.

[0134] 이차대사산물인 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀성 화합물의 함량을 측정하는 방법은 다음과 같다.

[0135] 총 카로티노이드 함량은 AOAC법에 따라 측정하였다. 즉, 동결건조 잘피 식물세포 및 부정근 시료에 아세톤:헥산 (3:7, v/v) 혼합액을 가하여 추출한 뒤 여과하여 얻은 추출액을 증류수로 세척하고, 황성화 마그네시아:규조토 (1:9, v/v)의 혼합물로 크로마토칼럼을 만든 뒤 추출액을 주입하고 흡인하면서 아세톤:헥산(1:9, v/v) 혼합액으로 436 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0136] 총 플라보노이드 함량은 Colorimetric 방법에 기초한 Sakanaka 등(2005)의 방법에 따라 측정하였다. 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물과 표준물질용액 0.25ml에 증류수 1.25ml을 첨가한 뒤, 5%(w/v) NaNO₂ 용액 0.075ml을 첨가하였다. 6분 뒤 혼합액에 10%(w/v) AlCl₃용액 0.15ml을 첨가한 후, 5분간 방치한 다음 1N NaOH용액 0.5ml을 첨가하였다. 혼합액의 최종 부피가 2.5ml이 되도록 증류수를 첨가한 뒤 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 (+/-) catechin standard solution (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며 총 플라보노이드함량은 mgg⁻¹DW로 나타내었다.

[0137] 총 페놀 함량은 Foline-Ciocalteu reagent가 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물의 총 페놀물질에 의해 환원되

면서 몰리브덴 청색으로 발색하는 Foline-Ciocalteu 방법(Folin와 Ciocalteu, 1927)에 기초한 Ali 등 (2006a)의 방법을 이용하여 총 페놀 함량을 측정하였다. 추출액과 표준물질용액 0.05ml에 증류수 2.55ml을 첨가한 뒤, 2N Folin-Ciocalteu reagent 용액(10 time dilution; Sigma chemical CO., St. Louis, MO, USA) 0.1 ml을 첨가하였다. 6분뒤 혼합액에 20%(w/v) Na2CO3용액 0.5ml을 첨가한 후 30분간 암상태로 방치한 다음 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 garlic acid를 사용하였으며, 총 페놀 함량은 mgg^{-1}DW 로 나타내었다.

[0138] (1) 물리적 유인제인 UV-A의 영향

[0139] MS 기본배지에 1 mg/L, Zeatin 0.2 mg/L 의 성장조절물질을 첨가하여 25℃ 배양 온도로 5 주간 배양하였다. 배양 제 6주부터는 UV-A 형광 램프(20W, Sankyo Denki, Japan) 를 이용하여 매일 0h(hour, 시간), 0.5h, 1h, 4h 및 8h으로 조사하였다.

표 1

(단위: mgg^{-1})

[0140]

UV-A	카로티노이드 함량	플라보노이드 함량	페놀 화합물 함량
0h	34	32	45
0.5h	37	37	63
2h	43	36	72
4h	46	37	72
8h	54	38	79

[0141] (2) 화학적 유인제인 시킵산의 영향

[0142] 이와 같은 사실에 기초하여 MS 기본배지에 IAA 0.5 mg/L, Zeatin 0.2 mg/L 의 성장조절물질을 첨가하여 25℃ 배양 온도로 5 주간 배양하였다. 시킵산을 배양 제 6주에 200, 400 및 600 μM 의 농도로 각각 배지에 첨가하여 배양하였다.

표 2

(단위: mgg^{-1})

[0143]

시킵산 농도 (μM)	카로티노이드 함량	플라보노이드 함량	페놀 화합물 함량
0	43	37	57
100	42	39	67
200	45	36	80
400	46	35	89
600	42	35	62

[0144]

실시예 1-5: 본 발명에 따른 잘피 식물세포 배양 추출물 제조

[0146] 실시예 1-3에서 배양하여 얻은 잘피 식물세포 및 부정근 배양물을 수확하여 깨끗한 티슈로 충분히 수분을 제거한 후 60℃로 2일 동안 건조기에서 건조하였다. 건조된 잘피 식물세포 및 부정근 배양물 분말 50g을 용기에 담고, 1L의 정제수를 넣은 후 90 ~ 120℃에서 48시간 열수추출하였다. 추출 후, mesh로 여과하여 고형분을 제거하고, 여과하여 나온 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물을 본 발명에 사용하였다. 비교실험을 위하여, 잘피 추출물을 같은 방법으로 열수추출하여 비교하였다.

실시예 2

[0147] **본 발명에 따른 식물조직배양기술을 이용한 잘피 식물체의 증식방법**

[0148] 상기 실시예 1에 기재된 식물세포 유도 과정에 따르면, 성장상 조건 중 암배양 대신 명배양을 식물세포를 얻고, 다음의 과정을 거쳐 잘피 식물체를 증식하였다.

[0149] 2-1. 잘피 식물세포로부터 싹초 생성(Shoot Regeneration) 유도 과정

[0150] 상기에서 얻어진 잘피 식물세포로부터 Shoot Regeneration을 유도하기 위하여 MS 기본배지에 Sucrose 30 g/L, Gelite 2.0 g/L 을 첨가하였고, 성장조절물질 제아틴(Zeatin) 0.2 mg/L 을 첨가하여 252 의 배양실에서 배양하였다. 증식되고 있는 식물세포에서 Shoot Reneration을 유도하여 252 의 배양실에서 4주동안 온도 25, 습도 70% 의 성장상 조건으로 명배양하며 배양하였다. 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 5.8 로 조정하였다.

[0151] 2-2. 뿌리 생성 (Root Regeneration) 유도 과정

[0152] Shoot Regeneration이 유도된 부위에서 Root Regeneration을 유도하기 위하여 MS 기본배지에 Sucrose 30 g/L, Gelite 2.0 g/L 을 첨가하였고, 성장조절물질 Indole-3-butyric acid (IBA) 0.2 mg/L 을 첨가하여 25±2℃ 의 배양실에서 배양하였다. Shoot Regeneration이 유도된 부위에서 하나의 식물체로 성장하기 위한 영양분을 흡수할 수 있는 Root Regeneration을 25±2℃ 의 배양실에서 4주 동안 온도 25℃, 습도 70% 의 성장상 조건으로 명배양하며 유도하였다. 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 5.8 로 조정하였다.

[0153] 2-3. 잘피 식물체의 증식 과정

[0154] 잘피 식물세포로부터 Shoot Regeneration 및 Root Regeneration이 유도된 식물체를 증식하기 위하여, MS 기본 배지에 Sucrose 30 g/L, Gelite 2.0 g/L 을 첨가하여 25±2℃ 의 배양실에서 배양한다. 25±2℃ 의 배양실에서 4주 동안 온도 25℃, 습도 70% 의 성장상 조건으로 명배양하며 키운다. 4주후에 강이나 바다로 이식하여 키운다 (도 2).

[0155] **실험예 1: 잘피 식물세포 및 부정근 배양 추출물의 세포독성(Cytotoxicity)**

[0156] 실시예 1-5에서 제조한 조성물에 대한 피부 세포 생존율을 알아보기 위하여, 인간섬유아세포(Human Skin Fibroblast, CCD-986Sk)는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분주 받아서 배양하였다. 각 세포를 1 × 10⁴ cells/ml의 농도로 하여 24 well 배양판에 접종하였다. 배지는 10 % FBS를 함유한 DMEM(Dubelcco'S Modified Eagle Medium, BRL,USA)을 사용하였다. 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 48시간 배양하여 배양용기 표면적의 25 ~ 30%만큼 배양되면, 실시예 1-5에서 제조된 조성물이 0.1 ~ 5 %가 함유된 FBS-free DMEM으로 교체하여 24시간 더 배양하였다. 배양 후 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브롬화물 (MTT, Sigma M5655, USA) 용액 (2.5 mg/ml)을 50μl 첨가하고 3시간동안 추가로 배양한 후 상등액을 제거하고, 각 well 당 200μl 의 Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma D2650, USA)용액을 가한 후 20분간 교반하여 형성된 포르마잔 (formazan) 결정을 녹인 다음, 100μl 씩을 96 well 로 취하여 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)로 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 피부 세포의 생존율 정도는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광 강도를 기준으로 하기 수학적식에 따라 계산하여 백분율로 표시하였고, 결과는 표 3에 나타난 바와 같았다.

[0157] [수학적식 1]

[0158] 세포증식효과(%) = [(실험군 흡광도 - 대조군 흡광도)/대조군의 흡광도] × 100

표 3

[0159]

	처리농도(%)	세포 독성율 % (Cytotoxicity)
	대조군	98
잘피 추출물	0.5%	82
	1.0%	81
	5.0%	75
잘피 식물세포 배양추출물	0.5%	100
	1.0%	102
	5.0%	105
잘피 부정근 배양추출물	0.5%	100
	1.0%	103
	5.0%	108

[0160]

상기 인간각질형성 세포를 이용한 Cytotoxicity(세포독성)에 미치는 영향시험 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 0.5 %, 1.0 % 및 5.0 % 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물에 의하여 세포독성을 보이지 않았다. 즉, 세포생존율에 영향을 미치지 않았다. 반면, 잘피 추출물의 경우 처리농도에 따라 20~30% 세포독성율을 보였다.

[0161]

실험예 2: 잘피 식물세포 및 부정근 배양 추출물의 머쉬룸 티로시나제 활성 측정 미백 효과 (Mushroom Tyrosinase Inhibition Assay)

[0162]

티로시나제(Tyrosinase)의 L-DOPA 산화활성(oxidation activity)은 ELISA reader로 측정되었다. 머쉬룸 티로시나제(Mushroom tyrosinase)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 5 mM L-dopa 10 μ l, 90 μ l 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), 다양한 농도의 모과 켈러스를 96-well plate에 넣었다. 마지막으로 40 μ l의 티로시나제 효소를 넣고 mix한 후, 37 $^{\circ}$ C 에서 15분간 반응하였다. 반응물로부터 Dopachrome 형성의 초기 비율은 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도의 증가로 측정한다.

[0163]

티로시나제는 멜라닌 합성에서 중요한 티로신을 L-DOPA로 전환하고, 도파퀴논(Dopaquinone)을 형성하도록 L-DOPA를 산화시킨다. 도파 옥시다제 활성(DOPA oxidase activity)은 머쉬룸 티로시나제로 측정되었고, 다양한 농도의 시험 원료를 넣어줌으로써 억제되었다.

[0164]

[수학식 2]

[0165]

$$\text{Inhibition of Tyrosinase (\%)} = [1 - (\text{Ab sample}/\text{Ab control})] \times 100$$

표 4

[0166]

	처리농도(%)	Tyrosinase Activity (% of control)
	정제수 (음성 대조군)	100
잘피 추출물	0.5%	97
	1.0%	94
	5%	90
잘피 식물세포 배양추출물	0.5%	95
	1.0%	90
	5%	80
잘피 부정근 배양추출물	0.5%	95
	1.0%	92
	5%	83

[0167]

5%까지의 잘피 추출물, 잘피 식물세포 배양추출물 및 잘피 부정근 배양추출물의 티로시나제 저해활성을 조사한 결과, 표 4에 나타난 바와 같이, 잘피 식물세포배양추출물 및 부정근 배양추출물의 처리에 의해 대조군과 비교

하여 티로시나제 활성이 억제됨을 확인하였다.

[0168] **실험예 3: 잘피 식물세포 및 부정근 배양 추출물의 Procollagen 합성 증진 시험**

[0169] 인간섬유아세포(Human Skin Fibroblast)를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 일정한 습도를 유지하는 세포 배양기내에서 10% FBS, Penicillin(50U/ml), Streptomycin(50/ml)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)으로 배양하여, 1x10⁵ cell/ml로 48 well plate에 500μl 씩 분주한 다음 24시간 배양하였다. 대조군(DMEM 배지)과 0.1~5 % 농도의 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물을 함유한 배지를 넣고 48시간동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 48시간 후, 배지의 상층액을 각각 20μl 을 취해 Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit(PICP, Takara, Cat No. MK101)를 이용하여 측정함으로써 새로 합성된 콜라겐 양을 측정하였다. 하기 수학적식에 따라 계산하여 그 결과는 표에 나타나 있다.

[0170] [수학적식 3]

[0171]
$$\text{콜라겐 생합성 증가율(\%)} = \left[\frac{\text{시험군 콜라겐양}}{\text{대조군 콜라겐양}} \right] \cdot 1 \times 100$$

표 5

[0172]

	처리농도(%)	Procollagen 생합성량 (% of control)
	대조군	100
잘피 추출물	0.5%	99
	1.0%	105
	5%	110
잘피 식물세포 배양추출물	0.5%	108
	1.0%	125
	5%	130
잘피 부정근 배양추출물	0.5%	105
	1.0%	115
	5%	135

[0173] 상기 표에서 볼 수 있듯이, 본 발명의 조성물 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물 함량이 증가함에 따라 콜라겐의 생합성량이 증가함을 알 수 있고, 이에 본 발명의 조성물이 탁월한 콜라겐 합성 증진 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0174] **실험예 4: 잘피 식물세포 및 부정근 배양 추출물의 MMP-1 발현 억제에 의한 주름개선 효과**

[0175] 피부의 주름은 콜라겐의 합성과 분해의 불균형에 기인하는데 보통 피부에서 type I 콜라겐의 합성과 그 분해 효소인 MMP-1이 균형을 이루고 있다. 그러나 광노화된 피부에서는 type I, III 콜라겐의 합성이 저하되고, MMP-1의 활성이 증가된다. 이러한 MMPs(matrix metalloproteinases)는 단백분해효소로 세포외 기질(extracellular matrix)을 분해하는 기능을 나타내며 정상적인 상태에서는 상처치유나 조직재생과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0176] 본 발명의 조성물이 MMP-1 생성 억제 효과가 있는지를 확인하기 위해, 아래와 같은 실험을 하였다.

[0177] 인간섬유아세포(Human Skin Fibroblast)를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 일정한 습도를 유지하는 세포 배양기내에서 10% FBS, Penicillin(50U/ml), Streptomycin(50/ml)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)으로 배양하여, 1×10⁶ 개/ml로 48 well plate에 분주한 다음 24시간 배양한 후, UVB를 조사하였다. 대조군(DMEM 배지)과 0.1 ~ 5.0 %의 농도의 잘피 식물세포 및 부정근 세포배양추출물을 함유한 배지를 넣고 48 시간동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 48시간 후, 배지의 상층액을 각각 20μl을 취해 Matrix Metalloproteinase-1, Biotrack Activity(Amersham, Cat No. RPN2629)를 이용하여 측정함으로써 새로 합성된

MMP-1의 양을 측정된 뒤, mg/ml 환산하여, 하기 수학적식에 따라 계산하여 그 결과는 표에 나타나 있다.

[0178] [수학적식 4]

$$\text{MMP-1 생성억제율(\%)} = \left\{ \frac{\text{시험군 MMP-1의 양}}{\text{대조군 MMP-1의 양}} \right\} \times 100$$

[0179]

표 6

[0180]

UVB 처리유무		처리농도(%)	MMP-1 생합성 억제율(%)
-		정제수 (음성 대조군)	0
+		1% Ascorbic Acid (양성 대조군)	30
	잘피 추출물	0.5%	3
		1.0%	5
		5%	19
	잘피 식물세포 배양추출물	0.5%	12
		1.0%	20
		5%	32
	잘피 부정근 배양추출물	0.5%	8
		1.0%	15
	5%	30	

[0181]

상기 표 6에서와 같이, MMP-1 생합성 억제 효과는 0.1 ~ 5.0 % 농도의 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물 처리에 의하여 우수한 MMP-1 억제 효과를 보였다. 특히, 잘피 추출물보다 잘피 식물세포 및 부정근 배양 추출물에 의한 MMP-1 생합성 유전자 발현을 억제하여 더 뛰어난 효과를 보여준다.

[0182]

실험예 5: iNOS 활성 저해에 의한 항염효과 실험

[0183]

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻형태로서 Griess시약을 이용하여 측정하였다. 1g LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 NO 생성 억제를 측정하기 위해, 상기 실시예 1에서 얻어진 0.1 ~ 5.0% 농도의 잘피 식물세포 및 부정근 세포배양추출물을 함유한 배지를 처리한 실험군과 대조군을 24시간 세포배양 한 후 Griess reagent를 세포배양 상층액 100μl와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 1% naphthylamide in H₂O)100l를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

표 7

[0184]

LPS 처리유무	시 료	농도 (%)	Cell Viability (%)	NO Production (M)
-	대조군(정제수)		100	1.3

+	대조군(정제수)		760	3.6
	잘피 추출물	0.5	99	3.6
		1.0	100	3.5
		5.0	101	3.4
	잘피 식물세포 배양 추출물	0.5	101	3.4
		1.0	100	3.3
		5.0	101	3.2
	잘피 부정근 배양 추출물	0.5	100	3.3
		1.0	102	3.2
		5.0	105	3.1
	Indomethacin	100M	95.8	3.1

[0185] 상기 표 7에서와 같이, iNOS의 활성은 0.1 ~ 5.0 % 농도의 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물 처리에 의하여 대조군과 비교하여 NO 생산을 저해하며 매우 우수한 염증 억제 효과를 보였다. 특히, 잘피 추출물 보다 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물이 iNOS활성에 의한 염증 억제효과가 더 뛰어났다.

[0186] **실험예 6: 모공 축소효과 시험 (In vitro Test)**

[0187] 본 발명의 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물 조성물의 모공 축소 효과를 측정하기 위해 상기 실시예에서 제조된 조성물을 대상으로 피부를 대신할 단백질로 헤모글로빈을 사용하여 모공 축소효과를 시험하였다.

[0188] 0.9% Phosphate Buffer Saline (0.1mM, pH 7.4)으로 헤모글로빈 용액(0.05g/50ml)을 제조하여 헤모글로빈 용액 2 ml에 상기 실시예 1에서 얻어진 잘피 식물세포 및 부정근 세포배양추출물 2 ml을 가한 후, 30초 동안 진탕 혼합한 다음 3,500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 그 상등액 1 ml에 정제수 2 ml을 가하여 407 nm에서 UV-Visible spectrum으로 측정하였다.

[0189] 대조군으로는 PBS(Phosphate Buffer Saline) 2 ml을 가하였다.

표 8

	농도 (%)	헤모글로빈의 침전 (%)
PBS (음성 대조군)	0	0.1
탄닌산 (양성 대조군)	1	35
잘피 추출물	0.5	1
	1.0	3
	5.0	5
잘피 식물세포 배양추출물	0.5	10
	1.0	17
	5.0	30
잘피 부정근 배양추출물	0.5	5
	1.0	20
	5.0	33

[0191] 0.1 ~ 0.5 % 농도의 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물 조성물을 함유한 조성물의 헤모글로빈의 침전량을 측정하여 수축효과를 평가하였고, 헤모글로빈의 침전(%)가 높을수록 모공수축 효과가 우수한 것으로 판별하였다. 즉, 잘피 추출물과 비교하여 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물이 모공축소효과가 뛰어남을 확인하였다.

[0192] **실험예 7: 피지 억제효과 실험**

[0193] 잘피 식물세포 및 부정근배양추출물의 피지억제효과를 확인하기 위하여, 피시험자 10명의 4주 후에 피부 유분

측정기(Sebum meter SM810)를 이용하여 피부의 피지분비량을 측정하였다. 실험은 22±2℃, 40±5% humidity에서 이루어졌다. 지성 피부인 경우 측정값이 220 µg/cm² 이상이고, 정상 피부인 경우 100~220 µg/cm²이다. 대조군으로 정제수를 사용하였고, 실험결과는 표 9와 같다.

표 9

	시 료	피지 억제효과	
		0 일 (사용 전)	28 일 (사용 후)
	대조군	230	225
1	1% 잘피 추출물	231	195
2	1% 잘피 식물세포 배양 추출물	230	171
3	1% 잘피 부정근 배양 추출물	232	165

[0194]

[0195]

상기 표 9의 결과에서 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하여, 1% 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물이 잘피 추출물보다 뛰어난 피지분비 억제효과를 보였다.

[0196]

실험예 8 : 여드름 개선 효과

[0197]

여드름이 발생한 남녀 10명으로 대상으로 화장수를 아침, 저녁으로 4주간 얼굴 전체에 실시예 1에서 제조한 1% 농도의 잘피 식물세포 배양 추출물을 고루 바르도록 하였다. 여드름 개선 효과의 판정은 실험에 참가한 본인이나 느끼는 정도에 따라 하기 판정기준을 참고로 1-3점으로 시험전 상태를 평가한 뒤 여드름 치유 효과를 평가하도록 하여 그 결과를 표에 나타내었다.

[0198]

<시험전 상태의 평가>

[0199]

1 = 여드름 조금 있음 2 = 여드름 약간 있음 3 = 여드름 심함

[0200]

<여드름 효과 판정>

[0201]

- : 효과 거의 없음, + : 약간의 효과 있음, ++ : 많이 완화,

[0202]

+++ : 완전히 치유됨

표 10

[0203]

피험자	시험전 상태	2주 경과후 효과	4주 경과 후 효과
피험자1	2	+	+
피험자2	1	+	++
피험자3	1	-	+
피험자4	2	-	-
피험자5	2	+	++
피험자6	2	+	+
피험자7	3	++	+++
피험자8	2	-	++
피험자9	3	+	+
피험자10	2	+	++

[0204]

상기의 표 10에서 알 수 있듯이, 1% 잘피 식물세포 배양 추출물 화장수를 4주간 사용한 후 대다수 피험자들에서 여드름의 개선 효과를 확인할 수 있었다.

[0205]

실험예 9: 자외선 조사에 의한 세포보호 효과

[0206] UV 조사에 사용할 광원으로는 302 nm 파장의 자외선을 방출하는 ultraviolet crosslinker CL-1000 (Ultra-Violet Products, CA)을 사용하였다. 피부각질형성세포인 HaCaT 세포를 1×10^5 cells/ml 농도로 24-well plate에 넣고 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 인산완충액으로 세척하였다. 인산완충액을 500 L 첨가한 다음 자외선을 10 mJ/cm로 조사 후 FBS를 포함하지 않은 신선한 세포배양배지로 교체하고 실시예 1에서 얻어진 잘피 식물세포 배양 추출물, 부정근 배양 추출물 시료를 1% 농도로 처리한 다음 24시간 추가배양하였다. 여기에, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) 5 mg/ml를 첨가한 후 배양기에서 3시간 배양한 후 형성된 fomazan을 DMSO로 녹이고, 96well plate로 옮긴 후 595 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 자외선 조사 후 시료를 처리하지 않은 대조군과 세포생존율을 비교하였다.

표 11

UV조사 유무	처리농도		자외선 조사에 의한 세포 보호 효과 (% of Control)
UV (-)	대조군	-	1.0
UV (+)	대조군	-	0.5
	1 %	잘피 추출물	0.52
		잘피 식물세포 배양추출물	0.72
		잘피 부정근 배양추출물	0.81

[0208] 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물의 각질형성세포 보호 효과를 평가하기 위하여, 인간각질형성세포 (Keratinocytes, HaCaT)를 자외선 조사 20 mJ/cm에 노출시킨 뒤 24시간 추가 배양한 뒤 세포생존율을 확인할 수 있는 MTT assay를 수행한 결과, 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물은 1% 농도 처리에 의하여 자외선을 조사한 대조군에 비교하여 세포 생존율(Cell Viability)가 증가하였다. 따라서, 잘피 식물세포 및 부정근 배양추출물이 자외선조사에 의한 세포보호효과를 확인할 수 있었다.

실시예 3

[0209] 피부 외용제 조성물의 제조

[0210] 본 발명의 잘피 식물, 부정근 배양 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장품으로 영양화장수, 크림, 에센스 등의 유화 제형의 화장품 및 유연화장수 등의 가용화 제형의化妆품을 제조하였다.

[0211] 제조예 3-1: 화장수

[0212] 다음 처방에 따라 통상의 화장수 제조 방법에 따라 제조하였다.

표 12

원료명	중량 %(w/w)
글리세린	5.0
디프로필렌글리콜	3.0
히아루론산	0.5
폴리옥시에틸렌 경화피마자유	0.1
폴리에틸렌 올레일에틸	0.1
에탄올	5.0
방부제	0.15
향료	적량
착색료	적량
잘피 식물, 부정근 배양 추출물	2.0
정제수	to 100

[0214] 제조예 3-2: 에센스

[0215] 다음 처방에 따라 통상의 에센스 제조 방법에 따라 제조하였다.

표 13

원료명	중량 %(w/w)
세토스테아릴알코올	1.0
자기유화형모노스테아린산	1.0
밀납	0.5
스쿠알란	5.0
이소세틸옥타노에이트	3.0
디메틸실록산	0.3
모노스테아린산소르비탄	0.5
모노스테아린산폴리에틸렌글리콜	8.0
글리세린	4.0
프로필렌글리콜	0.2
카르복시폴리머	0.22
트리에탄올아민	0.25
방부제	적량
향료	적량
착색료	적량
잘피 식물, 부정근 배양 추출물	7.0
정제수	to 100

[0217] 제조예 3-3: 로션

[0218] 다음 처방에 따라 통상의 로션 제조 방법에 따라 제조하였다.

표 14

원료명	중량 %(w/w)
세토스테아릴알코올	0.8
자기유화형모노스테아린산	1.0
밀납	0.5
스테아린산	0.5
유동과라핀	7.0
스쿠알란	5.0
마카데미아오일	3.0
이소세틸옥타노에이트	2.0
디메틸실록산	0.3
모노스테아린산소르비탄	0.5
모노스테아린산폴리에틸렌글리콜	1.2
글리세린	4.0
프로필렌글리콜	4.0
베타인	4.0
카르복시폴리머	0.12
트리에탄올아민	0.15
방부제	0.25
향료	적량
착색료	적량
잘피 식물, 부정근 배양 추출물	5.0
정제수	to 100

[0220] 제조예 3-4: 크림

[0221] 다음 처방에 따라 통상의 크림 제조 방법에 따라 제조하였다.

표 15

[0222]

원료명	중량 %(w/w)
세토스테아릴알코올	3.0
자기유화형모노스테아린산	1.5
친유형모노스테아린산	1.5
밀납	0.5
유동파라핀	8.0
스쿠알란	7.0
이소세틸옥타노에이트	4.0
정제호호바유	4.0
디메틸실록산	0.3
모노스테아린산소르비탄	1.0
모노스테아린산폴리에틸렌글리콜	1.2
글리세린	6.0
프로필렌글리콜	4.0
베타인	4.0
산탄검	0.06
트리에탄올아민	0.10
방부제	0.25
향료	적량
착색료	적량
잘피 식물, 부정근 배양 추출물	7.0
정제수	to 100

[0223] 제조예 3-5: 젤

[0224] 다음 처방에 따라 통상의 젤 제조 방법에 따라 제조하였다.

표 16

[0225]

원료명	중량 %(w/w)
글리세린	4.0
프로필렌글리콜	4.0
에탄올	10
폴리옥시에틸렌경화피마자유	0.1
카르복시폴리머	0.30
트리에탄올아민	0.30
방부제	적량
향료	적량
착색료	적량
잘피 식물, 부정근 배양 추출물	1.0
정제수	to 100

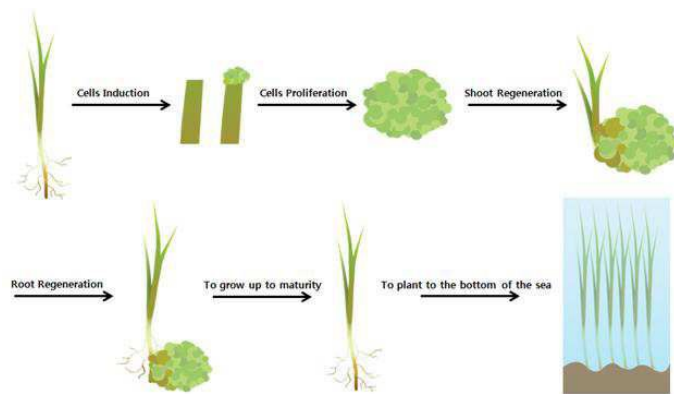
[0226] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3



도면4

