

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 11월 16일 (16.11.2023) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2023/219300 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 1/12 (2006.01)

A23L 33/10 (2016.01)

A61K 8/9722 (2017.01)

A61K 36/05 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/005428

(22) 국제출원일:

2023년 4월 21일 (21.04.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0057400 2022년 5월 10일 (10.05.2022) KR

(71) 출원인: 주식회사 엘지생활건강 (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) [KR/KR]; 03184 서울특별시 종로구 새문안로 58, Seoul (KR).

(72) 발명자: 권민정 (KWON, Minjung); 07795 서울특별시 강서구 마곡중앙10로 70, Seoul (KR). 이소영 (LEE, So Young); 07795 서울특별시 강서구 마곡중앙10로 70, Seoul (KR). 진무현 (JIN, Mu hyun); 07795 서울특별시 강서구 마곡중앙10로 70, Seoul (KR). 황성환 (HWANG, Sunghwan); 07795 서울특별시 강서구 마곡중앙10로 70, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울특별시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL CHLORELLA VULGARIS STRAIN AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규한 클로렐라 불가리스 균주 및 이의 용도

(57) Abstract: The present invention relates to: a Chlorella vulgaris strain deposited with accession number KCTC14768BP; a cosmetic composition, a quasi-drug composition and a food composition for skin improvement, all of which comprise any one or more from among the strain, a culture product of the strain, a fermentation product of the strain, a culture solution of the strain, an extract of the strain, and a lysate of the strain; a skin improvement method of the composition; and skin improvement use. The Chlorella strain, and the culture product, the fermentation product, the culture solution, the extract or the lysate of the strain have an excellent skin improvement effect, and thus can be effectively used as a cosmetic composition, a quasi-drug composition and a food composition for skin improvement. Therefore, various industrial applications such as that of cosmetics, quasi-drugs, and foods can be expected.

(57) 요약서: 본 발명은 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (Chlorella vulgaris) 균주; 및 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물, 의약품 조성물, 식품조성물; 상기 조성물의 피부 개선 방법; 피부 개선 용도에 관한 것으로, 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 발효물, 배양액, 추출물 또는 파쇄물은 우수한 피부 개선 효과가 있으므로, 피부 개선용 화장품 조성물, 의약품 조성물, 및 식품 조성물로서의 활용도가 높다. 이에, 화장품, 의약품, 식품 등의 다양한 산업적 활용을 기대할 수 있다.



WO 2023/219300 A1

명세서

발명의 명칭: 신규한 클로렐라 불가리스 균주 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주; 및 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물, 의약품 조성물, 식품조성물; 상기 조성물의 피부 개선 방법; 피부 개선 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 미세조류는 지구에서 가장 오래된 생물체이자 지구 산소 50%를 생산하는 생태계의 근본이 되는 생물이다. 건조물 기준 50%가 넘는 단백질을 함유하고 있으며 카로티노이드, 비타민, 클로로필 등 다양한 생리 활성물질이 풍부하여 오랜 시간 동안 건강기능식품으로 사랑 받아 왔으며, 슈퍼 푸드, 미래 식량으로도 선정되어 지속적인 연구와 소비자 요구는 더욱 높아질 것으로 예상된다. 또한 천연물 연구의 주 소재인 육지 식물이 재배를 위해 노동력, 시간, 경작지 등이 필요한 것에 비해 미세조류는 분리와 배양을 통해 영구적인 보존과 활용이 가능하다는 특징이 있다.
- [4] 화장품 성분은 일반적으로 피부에 염증이나 뾰루지, 부종 등 각종 트러블을 발생시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 기능성 화장품의 원료로 사용되는 다양한 물질들도 피부에 대한 낮은 안정성 또는 미미한 효과를 나타내는 문제점이 있다. 일 예로, 피부 주름 개선 및 탄력 개선 화장품으로 레티노이드, 아테노신 및 동물 태반유래 단백질 등이 알려져 있다. 가장 널리 알려진 레티놀은 피부 적용 시 자극 등의 안전성 문제로 사용량 제한이 있다.
- [5] 미세조류 종류에 속하는 두날리엘라 살리나 추출물 (한국공개특허 KR 10-2016-0146370 A), 나노클로롭시스 오세아니카 추출물 (한국공개특허 KR 10-2018-0076791 A) 등을 이용하여 화장품 원재료로 사용하고자 하는 연구가 진행 중지만, 미세조류를 응용한 산업분야는 아직까지 풍부한 종에 비해 그 규모와 다양성 면에서 극히 제한적이므로, 적용 분야의 확대가 요구된다 할 것이다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 천연 자원물로부터 보다 안전하고 피부 개선 효과가 우수한 원료에 관한 연구를 수행하였으며, 미세조류인 클로렐라 불가리스가 피부 개선 효과가 현저히 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 본 발명의 목적은 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 개체에 도포 또는 투여하는 단계를 포함하는, 피부 개선 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는 조성물의 피부 예방 또는 개선 용도를 제공하는 것이다.

[15]

발명의 효과

- [16] 본 발명의 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 발효물, 배양액, 추출물 또는 파쇄물은 우수한 피부 개선 효과가 있으므로, 피부 개선용 화장품 조성물, 의약품 조성물, 및 식품 조성물로서의 활용도가 높다. 이에, 화장품, 의약품, 식품 등의 다양한 산업적 활용을 기대할 수 있다.

[17]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [18] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [19] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[20]

- [21] 본 발명의 하나의 양태는 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주를 제공한다.
- [22]
- [23] 본 발명의 용어, "클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*)"는 선캄브리아기 시대부터 지구에 존재했던 녹조식물문 클로렐라 속에 속하는 녹색 미세조류이다. 클로렐라 불가리스는 엽록소는 물론, 단백질, 비타민, 미네랄 등 영양소가 풍부하여, 첨가제, 착색제 또는 식품 유제로 사용되기는 하지만, 역한 냄새 때문에 식품으로는 널리 사용되지 않는다. 본 발명자들은 클로렐라 불가리스에 속하는 신규한 균주를 분리하여 이를 클로렐라 불가리스 LGH20483으로 명명하였고, 이를 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁하였다. 상기 균주는 울릉도 용출수에서 분리한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [24] 상기 균주는 항산화, 미백, 항노화, 피부탄력 개선, 마이크로바이옴 개선, 피부보습, 피부 진정, 염증 개선, 및 피부 장벽 강화 등의 피부개선 효과를 가질 뿐만 아니라, 다른 클로렐라 불가리스 균주와 비교해서도 우수한 피부개선 효과를 가진다. 이와 같은 KCTC14768BP로 기탁된 균주의 피부 개선 효과에 기초하여 이를 이용한 화장품, 의약품, 식품 등의 개발에 이용할 수 있다.
- [25]
- [26] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 KCTC14768BP로 기탁된 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [27]
- [28] 본 발명의 용어, "균주 (strain)"는 한 개의 세포에서 유래한, 무성생식을 통해 증식하여 동질의 유전적 특징을 갖는 개체들의 집합을 의미하며, 하나의 종 (species) 안에는 유전적 특징이 서로 다른 여러 개의 균주들 (genetic variants)이 존재한다. 본 발명에서 균주는 클로렐라 불가리스를 의미하며, 구체적으로 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [29] 본 발명에서, 상기 균주는 클로렐라 불가리스 균주의 균체, 건조된 균체 등을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 건조된 균체는 분무 건조균, 동결 건조균, 진공 건조균, 드럼 건조균 등의 건조균일 수 있다.
- [30]
- [31] 본 발명의 용어, "배양물"은 상기 균주를 배지에서 배양하여 수득한 산물을 의미한다. 그 예로 본 발명의 배양물은 클로렐라 불가리스의 배양 배지에서 상기 균주를 수확한 후 남은 배지에 잔존한 성분을 포함하거나, 균주를 포함하는 배양 배지의 성분을 포함할 수 있다. 본 발명의 "배양액"은 상기 배양물에서 균주를 제외한 부분을 의미한다. 그 예로 본 발명의 배양액은 클로렐라 불가리스의 배양

배지에서 원심분리 후 상기 균주를 제외한 배양상등액 또는 배양상등액에서 과쇄물을 제외한 부분을 포함할 수 있다.

- [32] 상기 배양물은 상기 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 전체 배양물, 배양 배지, 이들의 분획물 등이 될 수 있다. 상기 배양액은 상기 클로렐라 불가리스 균주의 배양상등액 등이 될 수 있다. 이때, 상기 배양상등액은 상기 균주의 배양물을 원심분리하여 수득할 수 있고, 상기 분획물은 상기 균주, 상기 배양물, 배양상등액 등을 원심분리, 크로마토그래피 등의 방법에 적용하여 수득할 수 있다.
- [33] 본 발명의 균주의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 클로렐라 속 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용될 수 있으며, 구체적으로는 본 발명의 균주를 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 또는 혐기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [34] 본 발명에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루타메이트, 메티오닌, 라이신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있고, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있다.
- [35] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [36] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다.
- [37] 그 외에 상기 배지에는 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 균주의 배양 배지에는 L-아미노산 등이 첨가될 수 있다. 구체적으로는 글리신(glycine), 글루타메이트(glutamate), 및/또는 시스테인(cysteine) 등이 첨가될 수 있고, 필요에 따라서는 라이신(lysine) 등의 L-아미노산이 더 첨가될 수 있으나 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [38] 상기 배지 또는 전구체는 배양물 또는 배양액에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [39] 본 발명에서, 균주의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배양물 또는 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물 또는 배양액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물 또는 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 또는 배양액 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.
- [40]
- [41] 본 발명의 용어, "발효물"은 미생물을 배지에서 일정 기간 동안 배양하여 수득한 균주, 그의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 배지, 상기 배지로부터 균주를 제거한 배양액을 상기 배지 또는 배양액의 회석물 또는 농축물, 또는 이들의 건조물을 포함할 수 있다. 상기 "발효"는 미생물이 자신이 가지고 있는 효소를 이용하여 유기물을 분해시키는 과정 중 부패 반응이 아닌 것을 의미한다.
- [42] 본 발명에서, 상기 균주로부터 발효물을 수득하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야 또는 유사 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수득할 수 있다.
- [43] 본 발명에서, 상기 균주로부터 수득한 발효물은 발효된 물질 자체뿐만 아니라, 균주 및 배양물이 공존하는 균주의 배양 배지, 상기 배양 배지로부터 균주를 여과시킨 발효물, 상기 배양 배지를 원심분리하여 균주를 제외한 상등액, 상기 배양 배지로부터 균주를 멸균처리하고 이를 여과시킨 발효물, 상기 발효물 또는 이를 포함하는 배양 배지를 추출한 추출물, 상기 발효물 또는 이의 추출물을 회석시킨 회석액, 상기 발효물 또는 이의 추출물을 건조시킨 건조물, 상기 균주의 균체를 포집해서 파쇄시킨 용해물 등, 상기 균주로부터 발생한 발효물을 포함하는 모든 종류의 물질을 포함한다.
- [44] 본 발명에서, 클로렐라 불가리스 발효물의 농도는 0.01% 내지 100%, 구체적으로 0.03% 내지 30%, 더욱 구체적으로 0.05% 내지 10%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [45]
- [46] 본 발명의 용어, "추출물" 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온, 저온 또는 가온 상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상 성분, 상기 액상 성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 회석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다. 이에 따라, 본 발명에서 제공하는 클로렐라 불가리스 추출물은 이를 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

- [47] 본 발명의 클로렐라 불가리스를 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.
- [48] 상기 추출에 사용되는 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 에테르, 초산에틸, 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 클로로포름, 아세톤, 벤젠, 헥산, 디에틸에테르 및 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있고, 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합하여 사용될 수 있으며, 구체적으로 물이 사용될 수 있다. 알코올을 용매로 사용하는 경우에는 구체적으로 탄소수 1 내지 4의 알코올을 사용할 수 있다.
- [49] 본 발명에서 추출물은 상기 배양물, 발효물, 배양액, 파쇄물 또는 균주 (pellet)의 추출물일 수 있고, 구체적으로, 배양물을 원심분리한 후 상등액을 제거한 균주를 감압농축하여 추출한 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [50] 본 발명에서, 클로렐라 불가리스 추출물의 농도는 0.001% 내지 30%, 구체적으로 0.001% 내지 15%, 더욱 구체적으로 0.001% 내지 10%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [51] 본 발명의 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 발효물, 배양액, 추출물, 파쇄물 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물은 다른 클로렐라 불가리스 균주, 이의 배양물, 발효물, 배양액, 추출물 또는 파쇄물 등을 포함한 조성물에 비해 우수한 피부 개선효과를 갖는다.
- [52]
- [53] 본 발명의 용어, "파쇄물"은 균주 자체를 물리적·화학적으로 처리, 고압멸균 또는 초음파 처리하여 수득한 것이거나, 균주의 배양물을 원심분리하여 얻은 상등액, 발효물 또는 배양액을 파쇄하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [54]
- [55] 본 발명의 용어, "피부 개선"은 항산화, 미백, 항노화, 피부탄력 개선, 마이크로바이옴 개선, 피부 보습, 피부 진정, 염증 개선, 및 피부 장벽 강화로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [56] 본 발명의 용어, "개선"은 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미하며, 항산화, 미백, 항노화, 피부탄력 개선, 마이크로바이옴 개선, 피부 보습, 피부 진정, 염증 개선, 및 피부 장벽 강화 중 어느 하나 이상을 모두 포함할 수 있다.
- [57] 상기 피부 개선은 라디칼 소거 증가, 멜라닌 색소 함량감소, 타이로시네즈 활성 증가, 콜라겐 합성 촉진, 유익균 생장 증가, 유해균 생장 억제, 아쿠아포린

3 (AQP3)의 발현 증가, NO생성 억제, 인볼루크린(IVL) 발현 증가 및 로리크린(LOR)의 발현 증가를 통해 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[58]

[59] 본 발명의 용어, "항산화"는 산화의 억제를 의미하며, 세포의 노화 과정과 그에 대한 예방법을 설명할 때 많이 등장하는 개념이다. 즉, 세포의 노화가 세포의 산화를 의미하기 때문에 사람의 호흡을 통해 체내로 들어온 산소는 인체에 필요한 에너지를 만드는 등 이로온 작용도 하지만, 이 과정에서 몸에 좋지 않은 여분의 산소인 활성산소가 생성된다. 활성산소는 체내의 정상 세포를 공격하여 노화나 각종 질병의 원인으로 작용한다. 따라서 이 활성산소를 제거하는 것이 세포의 산화(노화)를 막는 방법이며, 이러한 세포의 산화를 억제하는 것을 의미한다. 구체적으로, 항산화는 라디칼 소거 활성 증가에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[60] 본 발명의 용어, "라디칼(radical)"은 1개의 쌍 안 지은 전자를 갖는 원자 혹은 분자를 의미한다. 활성산소들은 화학적인 반응성이 뛰어나며 이들에 의해 유도되는 자유 라디칼은 생체 내의 각종 반응에 영향을 미치고 노화 등을 야기한다. 생물체는 자유 라디칼들에 의해 일어나는 유해성에 항상 노출되어 있으며, 세포의 연령증가에 따라 유해성이 점진적으로 축적되어 다양한 질병들을 일으킨다. 따라서, 자유라디칼 저해는 항산화 효과에 중요한 역할을 한다.

[61] 본 발명에서 라디칼 소거 활성 증가는 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 파쇄물 또는 이들의 혼합물에 의한 것일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 상기 라디칼 소거 활성에 의해 항산화 효과를 가질 수 있다.

[62] 본 발명의 일 구현예에서는 본 발명에 따른 클로렐라 불가리스 추출물의 라디칼 소거 활성 효과는 종래 알려진 클로렐라 불가리스 비교 균주 AG10002 추출물보다 우수함을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명의 클로렐라 불가리스 추출물은 비교 균주 추출물 대비 항산화 등에 현저한 효과가 있음을 확인하였다 (표 1).

[63]

[64] 본 발명의 용어, "미백"은 멜라닌 등의 색소의 과다로 인하여 명도가 감소된 피부의 명도를 증가시키거나 또는 피부의 명도를 일정 수준으로 유지하는 방법, 상기 방법으로 형성된 명도가 증가된 피부 등을 포괄하여 의미하는 것으로서, 구체적으로는 피부 미백을 의미할 수 있다. 구체적으로, 피부 미백은 타이로시나제 활성 저해에 따른 결과로서 이해될 수 있으며, 구체적으로 타이로시나제 활성이 저해됨에 따라 멜라닌의 생성이 저해되어 멜라닌의 증가에서 비롯되는 증상, 예컨대 기미, 주근깨 개선으로서 이해될 수 있다.

[65] 본 발명의 용어, "멜라닌"은 멜라닌은 자연계에서 흔히 발견되는 색소 중 하나로써 흑갈색 또는 검은색을 띠며, 멜라닌의 양에 따라 피부색이 결정되는데, 멜라닌의 양이 많을수록 검은 피부색을 띤다. 아미노산 중 하나인 타이로신(tyrosine)으로부터 합성되며 폴리페놀(polyphenol) 중합체를 이루어 매우 안정적

인 구조를 이루고 있다. 이러한 구조적 특징 때문에 열과 화학물질에 대한 내성, 항산화 능력과 더불어 자외선과 같은 방사선에 대해 저항성을 가지고 있다.

[66] 본 발명의 용어, "타이로시네즈"는 멜라닌의 생성을 조절하는 산화 효소이다. 이것은 피부의 멜라닌세포에서 합성되는 멜라닌소체에서 발견 될 수 있다.

[67] 본 발명에서 멜라닌 색소 함량 감소 및/또는 타이로시네즈 활성 증가는 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 파쇄물 또는 이들의 혼합물에 의한 것일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 상기 멜라닌 색소 함량 감소 및/또는 타이로시네즈 활성 증가에 의해 미백 효과를 가질 수 있다.

[68] 본 발명의 일 구현에서는 본 발명에 따른 클로렐라 불가리스 발효물의 멜라닌 색소 함량 감소 및/또는 타이로시네즈 활성 증가가 종래 알려진 클로렐라 불가리스 비교 균주 AG10002 발효물 보다 우수함을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명의 클로렐라 불가리스 발효물은 비교 균주 발효물 대비 미백 등에 현저한 효과가 있음을 확인하였다 (표 2).

[69]

[70] 본 발명의 용어, "노화"는 시간의 흐름에 따라 생체 구조와 기능이 쇠퇴하는 현상을 의미하며, 본 발명의 "항노화"는 노화를 예방, 억제, 지연 시키는 등 노화가 개선된다면 그 정도 등에 제한되지 않는다. 상기 항노화는 피부 탄력 개선, 피부 재생, 주름 개선 등을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[71] 본 발명의 용어, "피부 탄력"은 피부를 손가락으로 눌렀을 때 팽팽하게 버티는 힘으로, "탄력 개선" 또는 "탄력 증진"은, 개체의 피하 지방층 구조를 강화시켜 피부의 탄력을 높이는 것을 의미로서, 본 발명의 조성물을 이용하여 피부의 탄력을 높이는 것을 의미할 수 있다. 구체적으로, 항노화 및 탄력 개선은 콜라겐 합성 촉진에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[72] 본 발명의 용어, "콜라겐(Collagen)"은 대부분의 동물, 특히 포유 동물에서 많이 발견되는 섬유 단백질로, 피부와 연골 등 체내의 모든 결합 조직의 대부분을 차지하며, 체내에서 가장 흔한 세포인 섬유아세포 (fibroblasts)가 콜라겐을 생성 분비한다. 요리, 혹은 식품과 의약산업에서 널리 이용되는 젤라틴은 콜라겐을 비가역적으로 가수분해 한 것이다. 콜라겐의 감소는 주름을 유발하고, 피부의 탄력을 감소시키는 주된 원인이므로, 콜라겐의 합성은 주름 개선 및 탄력 증진을 위해 필수적이다.

[73] 본 발명에서 콜라겐 합성 촉진은 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 파쇄물 또는 이들의 혼합물에 의한 것일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 상기 콜라겐 합성 촉진에 의해 피부탄력 개선 효과를 가질 수 있다.

[74] 본 발명의 일 구현 예에서는 본 발명에 따른 클로렐라 불가리스 발효물의 콜라겐 합성 촉진 효과가 비교 균주 AG10002 발효물 보다 우수함을 확인하였으며, 이

를 통해 본 발명의 클로렐라 불가리스 발효물은 비교 균주 발효물 대비 항노화 및 피부탄력 개선 등에 현저한 효과가 있음을 확인하였다 (표 3).

[75]

[76] 본 발명의 용어, "마이크로바이옴 (Microbiome)" 인체에 서식하는 미생물의 유전정보 전체나 미생물 자체를 일컫는 용어로서, 인간의 몸에 서식하며 공생하는 미생물인 마이크로바이오타 (Microbiota)와 게놈 (Genome) 의 합성어이다.

[77] 본 발명의 용어, "마이크로바이옴 개선"은 마이크로바이옴 밸런스 유지로 혼용될 수 있고, 상기 마이크로바이옴 균형 유지를 의미하는 것으로서, 유익균 성장을 촉진하면서 유해균 성장을 억제하는 방식으로 마이크로바이옴의 균형을 유지할 수 있으며, 마이크로바이옴 밸런스가 무너질 경우 피부 장벽이 약해짐으로써 유해 미생물의 증식이 쉬워지게 된다. 구체적으로, 마이크로바이옴 개선은 유익균 성장 증가 및/또는 유해균 성장 억제에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[78] 본 발명의 용어, "유익균"은 피부 재생 효과를 증진시킴으로써 피부 방어력을 증진시키고, 유해균의 세포막 파괴(사멸) 및 성장 억제를 통해 피부 재생을 증진시킴으로써, 피부 항상성을 유지하는 데 도움을 주는 균주를 의미한다. 상기 유익균을 예를 들어, 표피포도구균 (*Staphylococcus epidermidis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[79] 본 발명의 용어, "유해균"은 피부에 염증 반응 또는 여드름 등을 일으키는 균을 의미한다. 상기 유해균은 예를 들어, 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[80] 본 발명에서 유익균의 성장 속도 증가 및/또는 유익균의 성장 속도 억제는 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 파쇄물 또는 이들의 혼합물에 의한 것일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 상기 유익균 성장 증가 및/또는 유해균 성장 억제에 의해 마이크로바이옴 개선 효과를 가질 수 있다.

[81] 본 발명의 일 구현예에서 본 발명에 따른 클로렐라 불가리스 발효물은 유익균의 성장 속도는 비교 균주 AG10002 발효물 보다 증가시키는 반면, 유해균의 생장은 억제시킴으로써, 본 발명의 클로렐라 불가리스 발효물은 비교 균주 발효물 대비 마이크로바이옴 개선에 현저한 효과를 갖는 것을 확인하였다 (표 4, 표 5).

[82]

[83] 본 발명의 용어, "피부 보습"은 피부에 수분을 공급하거나 수분의 증발을 차단하여 피부의 유연성을 유지하고 균일한 각질 탈락을 유도하여 매끈한 표면을 유지하게 하는 모든 작용을 의미하며, "건조"란 이러한 피부 보습이 충분하지 않은 상태를 의미한다. 피부 보습 효과는 피부의 주름개선, 탄력도 증가에 도움을 줄 수 있다. 구체적으로, 피부 보습은 아쿠아포린3 (AQP3) 발현 증가에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [84] 본 발명의 용어, "아쿠아포린3 (Aquaporin 3, AQP3)"은 세포막에서 채널을 형성하여 물 분자들의 수동 수송을 유도하는 내재 막 단백질로서, 다른 물질들의 이동은 제한하면서 물 분자만을 선택적으로 통과시킨다.
- [85] 본 발명에서 아쿠아포린3의 발현 증가는 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 파쇄물 또는 이들의 혼합물에 의한 것일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 상기 아쿠아포린3 발현 증가에 의해 피부 보습 효과를 가질 수 있다.
- [86] 본 발명의 일 구현예에서는 본 발명에 따른 클로렐라 불가리스 발효물의 아쿠아포린3 발현 증가 효과는 무침가 대조군 및 비교 균주 AG10002 발효물 보다 우수함을 확인하였으며, 이를 통해 클로렐라 불가리스 발효물은 비교 균주 발효물 대비 항노화, 피부 보습 등에 현저한 효과가 있음을 확인하였다 (표 6).
- [87]
- [88] 본 발명의 용어, "피부 진정"은 홍반 또는 자극 받은 피부 부위 등을 완화시키고 가라앉히는 것을 의미하며, 피부 자극 완화를 포함하는 개념일 수 있다. 예를 들어, 피부의 수분 손실 감소 및/또는 붉은기 감소를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [89] 본 발명의 용어, "염증"은 특정 조직의 손상 또는 감염에 대한 일종의 생체 내 반응이며, 주요 매개체는 면역세포이다. 이러한 염증의 목적은 조직의 손상을 최대한 억제하고, 감염체를 제거하며 조직 재생을 목적으로 하고 있다. 구체적으로, 피부 진정 및 항염증은 NO 생성 억제 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [90] 본 발명의 용어 "NO(nitric oxide, 아질산)"는 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 하지만, 염증 반응이 일어나게 되면 관련 세포들에서 iNOS(유도성 일산화질소 합성효소)의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성되고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하며, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다. 염증이 유발된 세포들에서 NO 생성이 증가하는 반면, 피부 진정이 되면 NO 생성이 억제되는바, 이들은 필수적 상관관계가 존재한다.
- [91] 본 발명에서 NO 생성 억제는 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 파쇄물 또는 이들의 혼합물에 의한 것일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 상기 NO 생성 억제에 의해 피부 진정 및 염증 개선 효과를 가질 수 있다.
- [92] 본 발명의 일 구현예에서는 본 발명에 따른 클로렐라 불가리스 발효물의 NO 생성 억제 효과는 비교 균주 AG10002 발효물 보다 우수함을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명의 클로렐라 불가리스 발효물은 비교 균주 발효물 대비 피부 진정 및 염증 개선 효과가 우수함을 확인하였다 (표 7).
- [93]

- [94] 본 발명의 용어, "피부 장벽"은 피부, 특히 표피의 각질층이 외부로의 수분 유출을 방지하고, 외부로부터의 물질 출입을 통제하는 등 외부와의 차단층 역할을 수행하는 모든 기능을 의미한다. 구체적으로, 피부 장벽 강화는 인볼루크린(IVL), 로리크린(LOR) 발현 증가에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [95] 본 발명의 용어, "인볼루크린 (involucrin, IVL)", "로리크린 (loricrin, LOR)"은 각질세포 내 존재하는 각질세포형성의 구조단백질로서, 상기 단백질외막 구성 단백질이 각질세포 외부의 지질과 공유결합하여 형성함으로써, 피부장벽에서 벽돌구조를 만드는데 중요한 역할을 담당한다.
- [96] 본 발명에서 인볼루크린 또는 로리크린의 발현 증가는 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 파쇄물 또는 이들의 혼합물에 의한 것일 수 있으며, 본 발명의 조성물은 상기 인볼루크린 또는 로리크린 발현 증가에 의해 피부 장벽 강화 효과를 가질 수 있다.
- [97] 본 발명의 일 구현예에서는 본 발명에 따른 클로렐라 불가리스 발효물의 인볼루크린 또는 로리크린 발현 증가 효과는 무침가 대조군 및 비교 균주 AG10002 발효물 보다 우수함을 확인하였으며, 이를 통해 클로렐라 불가리스 발효물은 비교 균주 발효물 대비 피부 장벽 강화 등에 현저한 효과가 있음을 확인하였다 (표 8, 9).
- [98]
- [99] 본 발명의 용어, "화장료 조성물"은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 향수, 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, 패취 및 스프레이로 구성되는 군에서 선택되는 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100] 본 발명의 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 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 제한되지 않는다.
- [101] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 상기 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [102] 본 발명의 화장료 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, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [103] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 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 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 사용될 수 있다.

[104] 본 발명의 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 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[105] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[106] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 또는 이들의 혼합물이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있다.

[107] 한편, 본 발명에 기재된 모든 성분이 바람직하게는 화장품 안전기준 등에 관한 규정 및 중국 '화장품 안전·기술 규범'에서 규정한 최대 사용치를 초과하지 않는 범위 내에서 본 발명의 조성물에 포함될 수 있다.

[108]

[109] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[110] 상기 "클로렐라 불가리스", "균주", "배양물", "배양액", "파쇄물", "발효물", "추출물", "피부 개선" 및 "개선"은 전술한 바와 같다.

[111]

[112] 본 발명의 용어, "의약품"은 바디 클렌저, 소독 청결제, 세정제, 주방용 세정제, 청소용 세정제, 치약, 가글제, 물티슈, 세제, 비누, 핸드워시, 헤어 세정제, 헤어 유연제, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 및 필터 충전제로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[113] 본 발명의 의약품 조성물에는 상기 성분 외에 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 본 발명의 효과를 해하지 않는 한 제한되지

않으며, 예를 들어 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

- [114] 본 발명의 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제의 대표적인 예로는, 락토즈, 덱스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 글리세린, 아카시아 고무, 알지네이트, 칼슘포스페이트, 칼슘카보네이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 주사 가능한 에스테르, 위텟솔, 마크로콜, 트윈 61, 카카오지, 라우리지 등을 들 수 있다.
- [115] 본 발명의 군주, 상기 군주의 배양물, 발효물, 배양액, 추출물 또는 파쇄물을 의약외품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 예컨대, 공지의 피부 유익균 증진, 피부 유해균 억제, 피부 진정, 피부 염증 개선, 피부 미백, 피부 재생, 상처 치유성분을 포함할 수 있을 것이다. 추가적인 주름 개선, 피부 미백, 피부 트러블 개선, 피부 보습 성분을 포함하게 되면 본 발명의 조성물의 항산화, 미백, 항노화, 피부탄력 개선, 마이크로바이옴 개선, 피부 보습, 피부 진정, 염증 개선, 및 피부 장벽 강화 효과는 더욱 증가될 수 있을 것이다. 상기 성분 추가 시에는 복합 사용에 따른 피부 안전성, 제형화의 용이성, 유효성분들의 안정성을 고려할 수 있다.
- [116] 본 발명의 의약외품 조성물은 당업계에서 공지된 당업계에 공지된 피부 노화 방지 성분으로서, 레티노산, TGF, 동물 태반 유래의 단백질, 베틀린산 및 클로렐라 추출물; 당업계에서 공지된 항염증 성분으로서, 비스테로이드계로 플루페남산, 이부프로펜, 벤지다민, 인도메타신, 프레드니솔론, 덱사메타손, 알란토인, 아즈엔, 하이드로코티손; 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 추가 성분은 전체 조성물 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로 포함될 수 있을 것이며, 상기 함량 범위는 피부 안전성, 본 발명의 군주, 군주의 배양물, 발효물, 배양액, 추출물 또는 파쇄물의 제형화 시의 용이성 등의 요건에 따라 조절될 수 있을 것이다.
- [117] 의약외품의 제제화 방법, 용량, 이용방법, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있다.
- [118]
- [119] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 군주, 상기 군주의 배양물, 상기 군주의 발효물, 상기 군주의 배양액, 상기 군주의 추출물 및 상기 군주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [120] 상기 "클로렐라 불가리스", "군주", "배양물", "배양액", "파쇄물", "발효물", "추출물", "피부 개선" 및 "개선"은 전술한 바와 같다.
- [121]

- [122] 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합체, 건강기능식품 등의 통상적인 의미의 식품을 모두 포함하며, 본 발명의 클로렐라 불가리스, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물을 포함할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다. 또한 본 발명에 따른 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 발효물, 배양액, 추출물 및 파쇄물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있으며, 환제, 분말, 과립, 제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함할 수 있다.
- [123] 상기 건강기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 면역 증진 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [124] 상기 건강 식품(health food)은 일반 식품에 비해 적극적인 건강 유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)는 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.
- [125] 구체적으로 상기 건강 기능 식품은 클로렐라 불가리스, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [126] 상기 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [127] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg),

망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

- [128] 또한, 상기 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [129] 상기 클로렐라 불가리스, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합 양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [130] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강 음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [131] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [132] 구체적으로 클로렐라 불가리스, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 식품 조성물의 총중량 대비 0.00001 내지 100 중량%로 포함할 수 있다.
- [133]
- [134] 본 발명의 다른 하나의 양태는 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물의 피부 예방 또는 개선 방법을 제공한다.
- [135] 상기 "클로렐라 불가리스", "균주", "배양물", "배양액", "파쇄물", "발효물", "추출물", "피부 개선" 및 "개선"은 전술한 바와 같다.
- [136]
- [137] 본 발명의 다른 하나의 양태는 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 도포 또는 투여하는 단계를 포함하는, 피부 개선 방법을 제공한다.
- [138] 상기 "클로렐라 불가리스", "균주", "배양물", "배양액", "파쇄물", "발효물", "추출물", "피부 개선" 및 "개선"은 전술한 바와 같다.
- [139]
- [140] 본 발명에서 상기 조성물은 화장료 또는 식품 조성물일 수 있다.
- [141] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [142] 본 발명의 상기 예방 또는 개선 방법은 구체적으로, 피부 개선 가능성이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [143] 본 발명에서, 용어 "도포"는 어떠한 적절한 방법으로 개체의 피부에 본 발명에 따른 조성물을 접촉시키는 모든 방법을 의미하며, 이를 통해 해당 조성물을 피부 내부로 흡수시키는 것을 목적으로 한다.
- [144] 본 발명의 조성물을 개체의 피부에 도포하는 경우, 항산화, 미백, 항노화, 피부 탄력 개선, 마이크로바이옴 개선, 피부 보습, 피부 진정, 염증 개선 또는 피부 장벽 강화 효과를 가질 수 있으며, 개체에 상기 조성물을 상기 효과를 나타내기에 유효한 양으로 도포 또는 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [145] 본 발명에서, 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 제공하는 것을 총칭하는 의미로서, 상기 투여 경로는 목적이 되는 피부에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [146]

[147] 본 발명의 다른 하나의 양태는 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물의 피부 예방 또는 개선 용도를 제공한다.

[148] 상기 "클로렐라 불가리스", "균주", "배양물", "배양액", "파쇄물", "발효물", "추출물", "피부 개선" 및 "개선"은 전술한 바와 같다.

[149]

발명의 실시를 위한 형태

[150] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[151]

[152] 실시예 1. 울릉도 용출수로부터 신규 클로렐라 불가리스 균주의 분리

[153]

[154] 울릉도의 용출수에서 항산화, 항염, 피부 미백 등의 효과를 갖는 신규한 클로렐라 불가리스 균주를 다음과 같은 과정으로 분리하였다.

[155] 먼저, 용출수가 흐르는 바위에 플랑크톤 네트 (대한캠랩, 카탈로그 넘버 CL-NP2020)을 하루 동안 설치하여 미세조류를 모았고, 상기 모은 미세조류는 BG-11 배지 (Sigma-aldrich, 카탈로그 넘버 C3061-500ML)에 섞은 후, 분리 작업 해주었다. 분리 작업은 희석법 (dilution method)를 이용하였으며 클로렐라 불가리스가 하나의 세포로 확보 될 때까지 실험을 수행하였다.

[156] 상기 분리된 균주의 ITS 서열 (서열번호 1)을 NCBI blast 분석한 결과, 기존 균주들과의 일치도가 98.67%의 동일성을 가지므로, 상기 분리된 균주는 기존 균주들과 상이한 신규한 균주임을 확인하였다.

[157] 상기 신규 균주는 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) LGHNNH20483으로 명명하였으며, 부다페스트조약 하의 기탁기관인 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에 2021년 11월 11일자로 기탁하여 기탁 번호 KCTC14768BP 를 부여받았다.

[158]

[159] 실시예 2. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483의 발효물 및 추출물 제조

[160]

[161] 실시예 2-1. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483의 발효물 제조

[162] 클로렐라 불가리스 신규 균주인 LGHNNH20483 균의 전배양 및 본배양을 각각 14일 내지 28일 동안 실시하였다.

[163] 구체적으로, 상기 전배양은 BG-11배지 (Sigma-aldrich, 카탈로그 넘버 C3061-500ML)를 사용하였다. 상기 BG-11 배지의 구성 성분은 다음과 같다. NaNO_3 1.5 g/L, K_2HPO_4 0.04 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g/L,

Citric acid 0.006 g/L, Ferric ammonium citrate 0.006 g/L, Disodium magnesium salt 0.001 g/L, Na₂CO₃ 0.02 g/L, Trace metal mix A5 1 mL(H₃BO₃ 2.86 g, MnCl₂·4H₂O 1.81 g, ZnSO₄·7H₂O 0.222 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 g, CuSO₄·5H₂O 0.079 g, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.0494 g/L).

[164] 전배양 및 본배양 각각에서 클로렐라 불가리스 균주인 LGHNNH20483를 배지에 접종하고, 25°C에서 광원의 세기는 200~2000 lux 수준으로 16시간: 8시간의 명암 주기로 배양하였다.

[165] 이후, 상기 배양물을 원심분리하여 상등액을 취하였으며, 취한 상등액은 본 발명 LGHNNH20483 균주의 배양액 및 본배양물을 파쇄하여 수득한 파쇄물을 포함하고, 상기 원심분리한 상등액은 균주가 유기화합물을 분해한 결과 제조되는 것이므로 클로렐라 불가리스 LGHNNH20483 균주 발효물에 해당한다.

[166]

[167] 실시예 2-2. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483의 추출물 제조

[168] 실시예 2-1.에서 배양물을 원심분리한 후 수득한 균주 (pellet)만을 확보하였다. 이후, 상기 균주 (pellet)를 증류수로 3회 이상 세척하였으며, 동결건조를 통해 수분을 제거하였다. 준비된 클로렐라 불가리스 가루 질량의 10배에 해당하는 메탄올 용액을 가하여 상온에서 3일간 추출한 후 감압 여과하였다. 여과한 추출물을 회전 증발기 (rotary evaporator, Buchi, Switzerland)로 농축, 건조하여 추출물을 제조하였다.

[169]

[170] 실시예 3. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483의 항산화 효과 확인

[171]

[172] 실시예 2-2. 방법으로 제조한 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483의 추출물을 이용하여 항산화 효과를 확인하였으며, 양성 대조군 (아스코르브산) 및 비교 균주의 추출물 (클로렐라 불가리스 균주 AG10002 추출물)에 의한 라디칼 소거 활성을 측정하여 항산화 효과를 비교하였다. 상기 비교 균주인 AG10002는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에서 분양 받은 균주로, 실시예 2-2. 방법으로 추출물을 제조하였다.

[173] DPPH (Sigma-aldrich)는 0.2 mM이 되도록 95% 에탄올에 녹여 사용하였다.

DPPH 용액과 희석된 균주 추출물을 각각 1:1로 혼합하여 30분간 실온의 암실에서 반응시킨 후, ELISA reader를 이용해 517 nm 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성 (Radical scavenging activity)은 하기 식과 같이 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었으며, standard의 경우에는 균주 추출물과 95% 에탄올을 각각 1:1로 혼합하여 사용하였다.

[174]

[175] DPPH 라디칼 소거 활성 (%) =

$$\left\{ 1 - \frac{\text{OD}_{517\text{nm}}(\text{sample}) - \text{OD}_{517\text{nm}}(\text{standard})}{\text{OD}_{517\text{nm}}(\text{control})} \right\} \times 100$$

[176]

[177] [표1]

DPPH 라디칼 소거 활성 (%)	농도(%)	
	0.2%	0.1%
LGHNH20483 추출물	82.1%	63.1%
AG10002 추출물	52.1%	32.0%
Ascorbic acid 0.0016%	86.8%	

[178] - 양성 대조군: ascorbic acid 0.0016%

[179]

[180] 상기 표 1의 결과에서 나타나듯이, 실험 농도 0.2%, 0.1%에서 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 추출물은 비교 균주인 AG10002의 추출물보다 DPPH 라디칼 소거 활성이 30%이상 증가하였는바, 이를 통해 본 발명의 클로렐라 불가리스 추출물은 높은 라디칼 소거 활성을 갖는다는 것을 확인하였다.

[181] 그에 따라, 본 발명의 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 추출물은 항산화에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[182]

[183] 실시예 4. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 미백 효과 확인

[184]

[185] 실시예 2-1. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 발효물을 이용하여 미백 효과를 확인하였으며, 음성 대조군, 양성 대조군 (알부틴) 및 비교 균주의 발효물 (클로렐라 불가리스 균주 AG10002 발효물)에 의한 세포 내의 멜라닌 (Melanin) 색소의 양 및 타이로시네이즈 활성 (Tyrosinase activity) 정도를 측정하여 미백 효과를 비교하였다. 상기 비교 균주인 AG10002는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에서 분양 받은 균주로, 실시예 2-1. 방법으로 발효물을 제조하였다.

[186] MNT-1 멜라닌 세포 (Melanocyte, ATCC, 카탈로그 넘버 CRL-3450)를 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 $1 \sim 2 \times 10^5$ cells/ml의 농도로 분주하고 24시간 배양하였다. 제조한 발효물 또는 양성 대조군 시료를 표 2에 해당하는 농도로 희석하여 처리하고 72시간 배양한 후, 세포를 회수하였다. 13,000 rpm으로 1분간 원심 분리하고 상층액을 제거한 후, 펠렛에 0.5% triton X-100 용액 300 μ l를 첨가하여 세포를 용해하였다. 이를 다시 13,000 rpm으로 3분간 원심 분리하고 펠렛과 상층액을 따

로 회수하였다. 세포 펠렛은 0.5N NaOH를 100 μ l 첨가하고 밤새 배양하여 멜라닌을 녹여낸 후, ELISA reader를 이용하여 450 nm 흡광도를 측정하였다.

[187] 타이로시네이즈 활성을 측정하기 위해 상기 회수한 세포 용해 상층액 100 μ l를 취하고, 여기에 1 mM L-DOPA (Sigma-aldrich) 용액을 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응액은 ELISA reader를 이용하여 450 nm 흡광도를 측정하였다

[188]

[189] [표2]

	무첨가 대조군	Arbutin 200 μ g/mL	LGHNH20483 발효물 2.0%	AG10002 발 효물 2.0%
멜라닌 함량(%))	100	82.9	68.6	90.5
타이로시네이 즈 활성(%)	100	51.0	34.2	81.1

[190] - 양성 대조군: 알부틴(Arbutin) 200 μ g/mL

[191]

[192] 상기 표 2의 결과에서 나타나듯이, 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물이 처리된 멜라닌 세포의 멜라닌 함량은 무첨가 대조군 대비 약 31%이상 감소하였고, 타이로시네이즈 활성은 무첨가 대조군 대비 약 65%이상 감소하였으며, 멜라닌 함량 감소 및 타이로시네이즈 활성 감소는 양성 대조군보다도 감소하였음을 확인하였다. 또한, 본 발명의 균주 LGHNH20483의 발효물은 비교 균주인 AG10002 발효물 보다도 현저한 멜라닌 생합성 저해 효과를 갖는 것을 확인하였다.

[193] 그에 따라, 본 발명의 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물은 미백에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[194]

[195] 실시예 5. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 항노화 및 피부탄력 효과 확인

[196]

[197] 실시예 2-1. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 발효물을 이용하여 항노화 및 피부탄력 효과를 확인하였으며, 음성 대조군, 양성 대조군 (TGF- β) 및 비교 균주의 발효물 (클로렐라 불가리스 균주 AG10002 발효물)에 의한 콜라겐 농도 변화를 측정하여 제 1 형 콜라겐 합성 촉진에 따른 항노화 및 피부탄력 효과를 비교하였다.

[198] 구체적으로, 상용 DMEM 에 10% FBS 를 첨가한 배지를 이용하여 48-well plate 에 2~5 x 10⁴ cells/ml의 농도로 분주하고 24시간 동안 섬유아세포 (fibroblasts)를 배양하였다. 기존 배양액을 제거하고, 제조한 발효물 또는 양성 대조군 시료를 무혈청 배지에 아래 표 3에 해당하는 농도로 희석하여 24 시간 동안 처리하였다.

이후, 세포 배양액을 수득하여 ELISA assay 를 사용하여 제 1 형 콜라겐 합성 촉진 효과를 측정하였다. 합성된 콜라겐은 Human Pro-Collagen I α 1/COLIA1 (R&D systems, 카탈로그넘버 DY6220-05)을 이용하여 수치화하였으며, 시료의 콜라겐 합성률은 대조군 (무혈청 배지)에 대비하여 증가한 비율을 계산하여 산출하였다.

[199]

[200] [표3]

콜라겐 농도(%)	무첨가 대조군	TGF- β 5 ng/mL	LGHNH20483 발효물 0.05%	AG10002 발효물 0.05%
	100	156.5	124.6	116.78

[201] - 양성 대조군: TGF- β 5 ng/mL

[202]

[203] 상기 표 3의 결과에서 나타나듯이, 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물이 처리된 섬유아세포의 콜라겐 농도는 무첨가 대조군 대비 약 24% 이상 증가하는 것을 확인하였으며, 비교 균주인 AG10002 발효물 보다 현저한 콜라겐 합성 촉진 효과를 갖는 것을 확인하였다.

[204] 그에 따라, 본 발명의 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물은 항노화 및 피부탄력에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[205]

[206] 실시예 6. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 마이크로바이옴 개선 효과 확인

[207]

[208] 실시예 2-1. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 발효물을 이용하여 마이크로바이옴 개선 효과 (*In vitro* 프리바이오틱 능력)를 확인하였으며, 대조군 및 비교 균주의 발효물 (클로렐라 불가리스 균주 AG10002 발효물)에 의한 유익균 및 유해균의 성장 속도 변화를 측정하여 마이크로바이옴 개선 효과를 비교하였다.

[209] 피부상재균 중 대표적인 유익균으로 표피포도구균 (*Staphylococcus epidermidis*, *S. epidermidis*)를 선정하였으며, 대표적인 유해균은 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)를 선정하였다.

[210]

[211] 실시예 6-1. 유익균 (*S. epidermidis*)의 성장 속도 평가

[212] 상용 TSB (Tryptic soy broth, Difco) 배지를 이용하여 멸균 액상 배지를 제조하였으며, *S. epidermidis* 글리세롤 보존액을 멸균 액상 TSB 배지에 접종하여, 30-37°C에서 6-18 시간 동안 전배양하였다. 이러한 전배양은 1-2회 실시하였다. 이후, 멸균 액상 TSB 배지에 각각의 발효물을 첨가하고, 상기 전배양 용액을 접종하여, 30-37°C에서 6-18 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 접종 직후의 흡광도 (OD)와 성장정체기 (stationary phase) 때의 흡광도를 측정하여, 그 값의 비율 (성장률)을 통

계의 변수로 사용하였다. 상기 추출물을 처리 하지 않은 대조군 대비, 처리한 실험군의 생장률을 비교하여, 시료가 균의 생장에 유의미한 효과를 주는지 판단하였다.

[213]

[214] [표4]

<i>S. epidermidis</i> 생장률 (%)	무첨가 대조군	LGHNH20483 발효 물 1.0%	AG10002 발효물 1 .0%
	0	6.43	0.97

[215]

[216] 상기 표 4의 결과에서 나타나듯이, 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물이 처리된 유익균 (*S. epidermidis*)의 생장률은 비교 균주인 AG10002 발효물 대비 약 7배 이상 증가함을 확인하였다.

[217]

[218] 실시예 6-2. 유해균 (*S. aureus*)의 생장 속도 평가

[219]

[220] 유해균인 *S. aureus*의 생장 속도를 평가하였으며, 평가 조건 및 방법은 상기 실시예 6-1. 유익균의 생장 속도 평가 조건 및 방법과 동일하게 진행하였다.

[221]

[222] [표5]

<i>S. aureus</i> 생장률 (%)	무첨가 대조군	LGHNH20483 발효 물 1.0%	AG10002 발효물 1 .0%
	0	-8.28	-0.92

[223]

[224] 상기 표 5의 결과에서 나타나듯이, 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물이 처리된 유해균 (*S. aureus*)의 생장률은 비교 균주인 AG10002 발효물 대비 약 9 배 이상 억제됨을 확인하였다. 그에 따라, 본 발명의 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물은 마이크로바이옴 개선에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[225]

[226] 실시예 7. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 피부 보습 효과 확인

[227]

[228] 실시예 2-1. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 발효물을 이용하여 피부 보습 효과를 확인하였으며, 대조군 및 비교 균주의 발효물 (클로렐라 불가리스 균주 AG10002의 발효물)에 의한 아쿠아포린3 (aquaporin3, AQP3)의 발현 증가 정도를 측정하여 피부 보습 효과를 비교하였다.

[229] 피부각질형성세포 (keratinocyte)는 표피성장인자 (epidermal growth factor, EGF)와 bovine pituitary extract (BPE)가 첨가된 keratinocyte-SFM (Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 넘버 17005042)배지를 이용하였으며, 상기 피부 각질형성 세포를 $2 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml 농도로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 제조한 발효물을 EGF와 BPE가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24시간 동안 처리하였다. 배양된 세포로부터 RNA를 분리하기 위해 Easy Blue™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON, 카탈로그 넘버 17061)를 이용하였으며, 분리한 RNA는 M-MLV 역전사 효소 (Reverse Transcriptase, ELPIS-Biotech, 카탈로그 넘버 EBT-1027)로 cDNA 합성을 수행한 후, 이를 주형으로 중합 효소 연쇄 반응 (real-time PCR, Bio-Rad, CFX Connect Real-Time PCR detection system)을 수행하였다. Real-time PCR에 이용한 AQP3 프라이머의 염기 서열은 5'-ACCTTTGCCATGTGCTTCCT-3'(서열번호 2), 5'-GCGTCTGTGCCAGGGTGTA-3'(서열번호 3)이고, 하우스키핑 유전자는 (housekeeping gene) β -actin 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTCC-3'(서열번호 4), 5'-GGTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'(서열번호 5)를 기준으로 하였다. 시료의 AQP3 유전자의 발현 정도는 무첨가 대조군의 mRNA 발현량을 기준으로 수치화 하였다.

[230]

[231] [표6]

	무첨가 대조군	LGHNH20483 발효물 2.0%	AG10002 발효물 2.0%
AQP3 mRNA 농도 증가(배수)	1.0	2.29	1.45

[232]

[233] 상기 표 6의 결과에서 나타나듯이, 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483 발효물이 처리된 피부각질형성세포의 AQP3 유전자 발현 정도는 비교 균주인 AG10002 발효물 대비 약 1.6배 이상 증가함을 확인하였다. 그에 따라, 본 발명의 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483 발효물은 피부 보습에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[234]

[235] 실시예 8. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483의 피부 진정 및 염증 개선 효과 확인

[236]

[237] 실시예 2-1. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483의 발효물을 이용하여 피부 진정 및 염증 개선 효과를 확인하였으며, 양성 대조군 (L-NMMA) 및 비교 균주의

발효물 (클로렐라 불가리스 균주 AG10002의 발효물)에 의한 NO생성 억제율을 측정하여 피부 진정 및 염증 개선 효과를 비교하였다.

- [238] DMEM에 10% FBS 를 첨가하여 성장 배지로 이용하였으며 마우스 대식세포주인 Raw264.7 세포 (ATCC, 카탈로그 넘버 CRL-2788)를 $1 \sim 2 \times 10^5$ cells/ml 농도로 분주하고 5% CO₂ 인큐베이터에서 하루 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 무혈청배지로 12시간 starvation 시킨 후, 제조한 발효물 및 양성 대조군을 처리하여 30분 동안 전처리 하였다. 이후, 500 ng/ml의 LPS (Lipopolysaccharides, SIGMA, 카탈로그 넘버 L43901)를 처리하고 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 취해 96-well 조직 배양 플레이트에 옮기고, GREISS 시약 (SIGMA, 카탈로그 넘버 G4410)를 가해 상온에서 15분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후, NO 정량 키트를 이용하여 NO 생성 억제능을 하기 식과 같이 평가하였다.

[239]

[240]

$$\text{NO 생성 억제능(\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{시료첨가시 NO 생성량}}{\text{시료무첨가시 NO 생성량}} \right\} \times 100$$

[241]

[242] [표7]

NO생성 억제율(%)	농도			
	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%
LGHNH20483 발효물	10.6	21.1	35.1	66.5
AG10002 발효물	5.21	8.93	12.27	18.43
L-NMMA 100 μ M	60.5%			

[243] - 양성 대조군: L-NMMA 100 mM

[244]

[245] 상기 표 7의 결과에서 나타나듯이, 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물이 처리된 Raw264.7 세포의 NO 생성 억제율은 비교 균주인 AG10002 발효물 대비 약 2배 내지 약 3.6배 이상 증가함을 확인하였다.

[246] 그에 따라, 본 발명의 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483 발효물은 피부 진정 및 염증 개선에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[247]

[248] 실시예 9. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 피부 장벽 강화 효과 확인

[249]

[250] 실시예 2-1. 클로렐라 불가리스 균주 LGHNH20483의 발효물을 이용하여 피부 장벽 강화 효과를 확인하였으며, 대조군 및 비교 균주의 발효물 (클로렐라 불가리스 균주 AG10002의 발효물)에 의한 인볼루크린 (involucrin, IVL), 로리크린 (loricrin, LOR)의 발현 증가 정도를 측정하여 피부 장벽 강화 효과를 비교하였다.

[251] 피부각질형성세포(keratinocyte)는 표피성장인자 (epidermal growth factor, EGF)와 bovine pituitary extract (BPE)가 첨가된 keratinocyte-SFM (Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 넘버 17005042)배지를 이용하여 배양하였다. 60-mm 배양 플레이트 (SPL, 카탈로그 넘버 카탈로그 넘버 20060)에 피부각질형성 세포를 $2 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml 농도로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 제조한 발효물을 EGF와 BPE가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24시간 동안 처리하였다. 배양된 세포로부터 RNA를 분리하기 위해 Easy Blue™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON, 카탈로그 넘버 17061)를 이용하였으며, 분리한 RNA는 M-MLV 역전사 효소 (Reverse Transcriptase, ELPIS-Biotech, 카탈로그 넘버 EBT-1027)로 cDNA 합성을 수행한 후, 이를 주형으로 중합 효소 연쇄 반응 (real-time PCR, Bio-Rad, CFX Connect Real-Time PCR detection system)을 수행하였다. Real-time PCR에 이용한 IVL 프라이머의 염기 서열은 5'-TGGTCTGGGTTTTCTGCTTT-3'(서열번호 6), 5'-GATGTCCCAGCAACACACAC-3'(서열번호 7)이며 LOR 프라이머의 염기 서열은 5'-TAGAGACGCCTCCGTAGCTC-3'(서열번호 8), 5'-AGTGGACTGCGTGAAGACCT-3'(서열번호 9)이다. 하우스키핑 유전자는 GAPDH(5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'(서열번호 10), 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'(서열번호 11)를 기준으로 하였다. 시료의 involucrin 및 loricrin 유전자의 발현 정도는 무첨가 대조군의 mRNA 발현량을 기준으로하여 수치화하였다.

[252]

[253] [표8]

	무첨가 대조군	LGHNH20483 발효물 1.0%	AG10002 발효물 1.0%
IVL mRNA 농도 증가 (배수)	1.0	1.77	1.26

[254]

[표9]

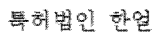
	무첨가 대조군	LGHNH20483 발효물 0.5%	AG10002 발효물 0.5%
LOR mRNA 농도 증가(배수)	1.0	2.36	1.81

[255]

[256] 상기 표 8, 9의 결과에서 나타나듯이, 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483 발효물이 처리된 피부각질형성세포의 IVL 유전자 발현 정도는 비교 균주인 AG10002 발효물 대비 약 1.4배 이상 증가, LOR 유전자 발현 정도는 1.3배 이상 증가함을 확인하였다. 그에 따라, 본 발명의 클로렐라 불가리스 균주 LGHNNH20483 발효물은 피부 장벽 강화에 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[257]

[258] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.



청구범위

- [청구항 1] 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주.
- [청구항 2] 제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 피부 개선은 항산화, 미백, 항노화, 피부탄력 개선, 마이크로바이옴 개선, 피부 보습, 피부 진정, 염증 개선, 및 피부 장벽 강화로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 화장품 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 라디칼 소거 증가, 멜라닌 색소 함량감소, 타이로시네즈 활성 증가, 콜라겐 합성 촉진, 유익균 생장 증가, 유해균 생장 억제, 아쿠아포린3 (AQP3)의 발현 증가, NO생성 억제, 인볼루크린 (IVL) 및 로리크린 (LOR)의 발현 증가로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 효과를 갖는 것인, 화장품 조성물.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 제조한 것인, 화장품 조성물.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 추출물은 상기 배양물, 발효물, 배양액 또는 파쇄물을 추출한 것인, 화장품 조성물.
- [청구항 7] 제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 의약품 조성물.
- [청구항 8] 제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 도포 또는 투여하는 단계를 포함하는, 피부 개선 방법.
- [청구항 10] 제9항항에 있어서, 상기 조성물은 화장품 또는 식품 조성물인 것인, 방법.
- [청구항 11] 기탁 번호 KCTC14768BP로 기탁된 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 발효물, 상기 균주의 배양액, 상기 균주의 추출물 및 상기 균주의 파쇄물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물의 피부 예방 또는 개선 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/005428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 1/12(2006.01)i; A61K 8/9722(2017.01)i; A61Q 19/00(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A61K 36/05(2006.01)i; C12R 1/89(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/12(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 31/74(2006.01); A61K 36/02(2006.01); A61K 8/9706(2017.01); A61K 8/9789(2017.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 클로렐라 불가리스(Chlorella vulgaris), 항산화(anti-oxidant), 미백(whitening), 항노화(anti-aging), 화장품(cosmetic)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2276935 B1 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 12 July 2021 (2021-07-12) See claims 1, 4, 5 and 9-11; and paragraphs [0050], [0061] and [0077].	1-8,11
A	TAKYAR, M. B. T. et al. Evaluation of antioxidant properties of Chlorella vulgaris and Spirulina platensis and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout(Oncorhynchus mykiss) fillets during refrigerated storage. LWT-Food Science and Technology. 2019, vol. 100, pp. 244-249. See entire document.	1-8,11
A	KR 10-2301576 B1 (LEE, Yujeong) 10 September 2021 (2021-09-10) See entire document.	1-8,11
A	US 8114413 B2 (MAJMUDAR, G.) 14 February 2012 (2012-02-14) See entire document.	1-8,11
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 August 2023		Date of mailing of the international search report 07 August 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/005428

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PSZCZOTKOWSKA, A. et al. POTENTIAL OF CHLORELLA VULGARIS CULTURE FOR WASTE TREATMENT FROM ANAEROBIC BIOMASS BIODIGESTION AT THE PIASZCZYNA (POLAND) INTEGRATED FACILITY. Journal of Phycology. 2019, vol. 55, pp. 816-829. See entire document.	1-8, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/005428

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/005428

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **9, 10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 9 and 10 pertain to a method comprising a step for a direct medical procedure of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/005428

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2276935	B1	12 July 2021	US	2021-0246414	A1	12 August 2021
KR	10-2301576	B1	10 September 2021	KR	10-2022-0122452	A	02 September 2022
				KR	10-2022-0122453	A	02 September 2022
				KR	10-2499073	B1	13 February 2023
				KR	10-2499077	B1	13 February 2023
US	8114413	B2	14 February 2012	AR	049764	A1	06 September 2006
				AU	2004-296787	A1	23 June 2005
				BR	PI0417370	A	10 April 2007
				CA	2547074	A1	23 June 2005
				CN	101076252	A	21 November 2007
				EA	200601107	A1	26 October 2007
				EP	1696733	A2	06 September 2006
				KR	10-2007-0015502	A	05 February 2007
				MX	PA06006374	A	25 January 2007
				MY	140581	A	31 December 2009
				TW	200528133	A	01 September 2005
				US	10668008	B2	02 June 2020
				US	11406586	B2	09 August 2022
				US	2005-0123499	A1	09 June 2005
				US	2006-0210523	A1	21 September 2006
				US	2008-0206274	A1	28 August 2008
				US	2010-0255025	A1	07 October 2010
				US	2012-0087941	A1	12 April 2012
				US	2012-0087942	A1	12 April 2012
				US	2013-0164324	A1	27 June 2013
				US	2018-0104176	A1	19 April 2018
				US	2020-0246250	A1	06 August 2020
				US	2022-0331229	A1	20 October 2022
				US	7025966	B2	11 April 2006
				US	7303753	B2	04 December 2007
				US	7758864	B2	20 July 2010
				US	8318178	B2	27 November 2012
				US	8388978	B2	05 March 2013
				US	9877914	B2	30 January 2018
				WO	2005-055736	A2	23 June 2005
				WO	2005-055736	A3	23 June 2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/12(2006.01)i; A61K 8/9722(2017.01)i; A61Q 19/00(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A61K 36/05(2006.01)i; C12R 1/89(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/12(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 31/74(2006.01); A61K 36/02(2006.01); A61K 8/9706(2017.01); A61K 8/9789(2017.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 클로렐라 볼가리스(<i>Chlorella vulgaris</i>), 항산화(anti-oxidant), 미백(whitening), 항노화(anti-aging), 화장품(cosmetic)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2276935 B1 (한양대학교 산학협력단) 2021.07.12 청구항 1, 4, 5, 9-11; 단락 [0050], [0061], [0077]	1-8,11
A	TAKYAR, M. B. T. 등, "Evaluation of antioxidant properties of <i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Spirulina platensis</i> and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout(<i>Oncorhynchus mykiss</i>) fillets during refrigerated storage", LWT-Food Science and Technology, 2019, 100권, 페이지 244-249 전체 문헌	1-8,11
A	KR 10-2301576 B1 (이유정) 2021.09.10 전체 문헌	1-8,11
A	US 8114413 B2 (MAJMUDAR, G.) 2012.02.14 전체 문헌	1-8,11
A	PSZCZOTKOWSKA, A. 등, "POTENTIAL OF CHLORELLA VULGARIS CULTURE FOR WASTE TREATMENT FROM ANAEROBIC BIOMASS BIODIGESTION AT THE PIASZCZYNA (POLAND) INTEGRATED FACILITY", Journal of Phycology, 2019, 55권, 페이지 816-829 전체 문헌	1-8,11
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년08월07일(07.08.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년08월07일(07.08.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **9, 10**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 9, 10은 인체에 대한 직접적인 의료 시술 단계를 포함하는 방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2276935 B1	2021/07/12	US 2021-0246414 A1	2021/08/12
KR 10-2301576 B1	2021/09/10	KR 10-2022-0122452 A	2022/09/02
		KR 10-2022-0122453 A	2022/09/02
		KR 10-2499073 B1	2023/02/13
		KR 10-2499077 B1	2023/02/13
US 8114413 B2	2012/02/14	AR 049764 A1	2006/09/06
		AU 2004-296787 A1	2005/06/23
		BR PI0417370 A	2007/04/10
		CA 2547074 A1	2005/06/23
		CN 101076252 A	2007/11/21
		EA 200601107 A1	2007/10/26
		EP 1696733 A2	2006/09/06
		KR 10-2007-0015502 A	2007/02/05
		MX PA06006374 A	2007/01/25
		MY 140581 A	2009/12/31
		TW 200528133 A	2005/09/01
		US 10668008 B2	2020/06/02
		US 11406586 B2	2022/08/09
		US 2005-0123499 A1	2005/06/09
		US 2006-0210523 A1	2006/09/21
		US 2008-0206274 A1	2008/08/28
		US 2010-0255025 A1	2010/10/07
		US 2012-0087941 A1	2012/04/12
		US 2012-0087942 A1	2012/04/12
		US 2013-0164324 A1	2013/06/27
		US 2018-0104176 A1	2018/04/19
		US 2020-0246250 A1	2020/08/06
		US 2022-0331229 A1	2022/10/20
		US 7025966 B2	2006/04/11
		US 7303753 B2	2007/12/04
		US 7758864 B2	2010/07/20
		US 8318178 B2	2012/11/27
		US 8388978 B2	2013/03/05
		US 9877914 B2	2018/01/30
		WO 2005-055736 A2	2005/06/23
		WO 2005-055736 A3	2005/06/23