

[별지 19]

# 최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p data-bbox="183 1411 391 1523">주 의 (편집순서 8)</p>	<p data-bbox="502 481 534 593">과 제 번 호</p> <p data-bbox="502 705 534 1489">고 랭 지 자 생 딱 지 꽃 을 활 용 한 기 능 성 제 품 개 발</p> <p data-bbox="502 1780 534 1937">농 림 축 산 식 품 부</p>	<p data-bbox="590 481 1380 526">보안과제( ), 일반과제(○) 과제번호 11- 1543000- 001097- 01</p> <p data-bbox="686 683 1332 840">고랭지 자생 딱지꽃을 활용한 기능성 제품 개발 (Functional Product Development using Alpine Meadow Plant, <i>Potentilla chinensis</i>)</p> <p data-bbox="893 1265 1117 1299">정선군농업기술센터</p> <p data-bbox="885 1724 1125 1758">농림축산식품부</p>
---	---	---

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고랭지 자생 딱지꽃을 활용한 기능성 제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 12 월 일

주관연구기관명 : 정선군농업기술센터

주관연구책임자 : 여 진 희

연 구 원 : 전 찬 우

연 구 원 : 최 유 순

연 구 원 : 박 기 원

협동연구기관명 : (주)바이오에프디엔씨

협동연구책임자 : 이 정 훈

협동연구기관명 : 배성영농조합법인

협동연구책임자 : 최 도 순

## 요 약 문

I. 제 목 : 고랭지 자생 딱지꽃을 활용한 기능성 제품 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

□ 연구개발 목표 및 성과

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표								연구기반지표							
	지식 재산권		기술이전	사업화				기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구용 등)	
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출		투자유치	논문			정채 활용	홍보 전시		
										SCI						비 SCI
최종목표	1		완료		1				2	1				6	4	
연구기간 내 달성실적	상표출원		시제품제작												인허가	
달성율(%)			완료													

III. 연구개발의 목적 및 필요성

딱지꽃(Potentilla chinensis Ser.)은 장미과의 여러해살이풀임. 생약명으로 위릉채(萎陵菜)라고 한다. 높이 30~60센티미터까지 자라며, 잎은 깃겹잎임. 쪽 잎은 깃 모양으로 깊이 갈라진 버들잎 모양이며, 줄기와 잎에 털이 있음. 꽃은 노란색이고 가지 끝에 모여 피며. 우리나라 각지의 산비탈, 길가, 밭 부근, 산림의 풀밭, 들판 특히 개울가의 모래땅에서 잘 자람. 어린이들이 종이를 접어 납작하게 만든 딱지를 닮았다고 하여 딱지꽃이라고 하며, 딱지꽃 잎의 생김새가 지네를 닮았다고 하여 지네풀, 오공초(蜈蚣草)라고도 부른다.

딱지꽃은 약재로 널리 오래동안 사용되어 왔으며, 다른 이름은 오공초[蜈蚣草=wú gōng cǎo=우공초], 합마초:蛤口草: 동북약식지(東北藥植誌), 위릉채[萎陵菜, 번백채:翻白菜: 구황본초(救荒本草)], 근두채[根頭菜, 야구방화:野鳩旁花: 식물명회(植物名匯)], 황주백두옹[黃州白頭翁: 중국약식지(中國藥植誌)], 용아초[龍牙草: 남경민간약초(南京民間藥草)], 천청지백[天靑地白, 소모약:小毛藥, 호조채:虎爪菜: 귀주민간방약집(貴州民間方藥集)], 노아령

[老鴉翎, 노아조:老鴉爪: 산동중약(山東中藥)], 지구초[地區草: 의약위생(醫藥衛生)], 호미초(虎尾草), 호랑이눈썹풀, 딱지꽃, 지네초 등으로 부른다.

딱지꽃의 전초와 뿌리에 많은 양의 플라보노이드, 뿌리에 흔적의 사포닌이 있으며, 같은 속 식물의 뿌리에서는 캄페롤, 시아니딘, 여러 가지 카테킨이 분리되어짐. 잎에는 220~300밀리그램 퍼센트, 뿌리 줄기에서 약 106밀리그램 퍼센트의 아스코르브산, 전초 뿌리 줄기에서 10~18퍼센트의 타닌질, 정유, 그리고 플라보노이드로서 미리세틴, 쿠에르세틴, 캄페롤, 델피니딘, 시아니딘 등이 분리되어짐. 또한 P-쿠라르산, 페룰라산, 엘라그산, 수지, 쓴맛물질이 있다고 보고된다.

딱지꽃에 들어 있는 다가페놀 물질은 티푸스막대균, 적리막대균, 포도알균에 대한 살균작용이 있고 항염증작용, 모세혈관 강화작용이 있다. 이것은 히알루로니다아제의 활성을 낮추는 것과 관련되어 있으며, 동의치료에서 뿌리 줄기를 열내림약, 아메바적리 치료약으로 씀. 또한 월경주기가 고르지 못할 때에도 쓴다. 전초는 피멧이약으로 각혈과 설사, 대장염 고장에 쓰며 염증약으로 감기, 위장질병, 진통진경약으로 관절류머티즘, 통풍, 기관지천식, 기침 등에 쓰인 것으로 알려져있다.

이와 같이 많이 알려진 딱지꽃의 약리 작용 및 쉽게 구할수 있는 재료임에도 불구하고, 현재까지 딱지꽃을 이용한 건강 식품이나 화장품과 같은 특정 제품이 출시된 경우가 전혀 없으며, 어떠한 가공품도 만들어지지 않는다.

식물조직배양은 식물의 세포 및 기관을 연중 균일하게 대량생산하는 가장 보편적인 방법으로 균일한 품질관리가 필요한 산업시장의 원료로 공급하기 위하여 식물조직배양을 이용하여 대량생산하는 것이 수요자의 욕구를 만족시킬 수 있는 효과적인 생산방법이다.

특히, 기존 조직배양의 단점을 보완한 생물반응기 배양은 액체배지에 생물반응기 내부로 적정수준의 공기를 꾸준히 공급하며 세포, 조직, 기관 및 식물체를 배양하는 방식으로 배양체의 성장량을 크게 촉진시킬 수 있으며 대량화가 가능하다.

최근 약용식물의 세포, 체세포배, 부정근 등의 식물조직을 생물반응기를 이용하여 생리활성물질을 생산하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

새로운 조직배양 기술로 개발된 초분류 및 목분류 켈러스 추출물들은 고기능성 생리활성소재의 경우 원천적인 지적재산권 확보로 기능성 소재로서도 전 세계시장 대상 상업화 가능하다.

확립된 조직배양 기술에 의한 생리활성 소재의 유도체 개발 기술을 기반으로 하여 타 분 야 및 타 대상 식물에 응용하여 보다 많은 부가가치 제품 및 소재 개발 가능하다.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

- 딱지꽃 추출물에 세포내 독성 테스트
- 딱지꽃 추출물 및 캘러스의 국제화장품 원료협회 (Personal Care Products Council) 인허가
- 고랭지 자생 딱지꽃의 부위별 추출물의 유효 피토케미컬의 기전연구(유효성 평가)
- 고랭지 자생 딱지꽃 식물의 노지에서 대량재배 기술 확립
- 딱지꽃 추출물을 이용한 최적화된 화장품 조성 및 제형개발
- 딱지꽃 추출물을 함유한 제형에 대한 안정성 평가
- 딱지꽃 추출물이 함유된 시제품 2종(에센스, 크림) 제작
- 대량 재배된 고랭지 자생 딱지꽃 식물의 부위별 및 추출 공정 확립
- 딱지꽃 추출물의 효율적인 유효성분 추출방법 확립
- 딱지꽃 추출물에 대한 주성분의 표준화 확립
- 딱지꽃 추출물 주성분에 대한 기준 및 시험법 확립 (표준화 확립)
- 고랭지 자생 딱지꽃 추출물을 활용한 화장품 마케팅 전략 수립
- 판로 확보 및 사업화 계획

#### V. 연구개발결과

대량재배기술을 적용한 기반으로 딱지꽃을 균일한 생리활성물질을 생산할 수 있는 최적화 대 량생산 공정을 확립하였다. 또한, 생리활성물질의 분석 표준화, 유효성분 분리·동정 및 유효성 평가를 통하여 화장품 기능성 원료로서의 신소재 개발을 체계적으로 확립하였다. 강원도 정선 고 랭지에서 자생하는 딱지꽃 추출물로부터 유래된 고부가성 물질은 타 지역의 딱지꽃과 비교하 여 생리활성 유효성분 함량보다 현저히 높았으며, 유효성분 분리·정제 및 분석법을 확립하여 그 효율성을 증가시켰다. 화장품 원료로서의 유효성 평가를 통하여 주름개선 등의 안티에이징 효과가 뛰어난 인체적용임상시험을 통하여 확인하였고, 또한 *In vitro* 실험 및 임상실험을 통하여 안전성 및 기능성을 확인하였다. 미국 국제화장품원료협회(PCPC)에 딱지꽃 추출물 유 래 물질 추가 원료 소재 국제 인증을 득하여 화장품 원료 소재로서 등록하였고, 딱지꽃 추출물 을 함유한 화장품 시제품 2종(아리아리 크림 및 에센스)을 제작하여 우수한 제형으로 개발하 였다.

#### VI. 연구 성과 및 성과활용 계획

본 기술과 관련하여 기존 출원된 특허는 대부분이 다수의 생약재 또는 약용식물의 혼합

추출물을 기능성 화장품, 피부 외용제의 원료로 사용할 수 있다는 내용이 개시되어 있었고, 딱지꽃 추출물 단독 또는 딱지꽃 유래 유용물질을 유효성분으로 함유하는 피부개선 및 항스트레스 활성을 갖는 기능성 화장품 개발에 대한 연구는 미비한 것으로 판단되는 바, 본 연구과제에서는 딱지꽃으로부터 유용 물질을 분리 및 동정하고 다양한 기능(기능성 화장품 소재용도를 위한 기능)을 규명하여 국내 출원을 진행함으로써 원천기술 확보

또한, 생물반응기를 이용한 체세포배 대량 증식 기술과 관련해서는 관련 특허가 소수만 존재하고 있으며, 물푸레나무, 나리류, 산삼 등 소수 식물을 대상으로 한 특허만이 검색되었고 딱지꽃의 체세포배를 대량 생산하는 기술에 대해서는 관련 특허가 부재하므로, 딱지꽃의 체세포배를 생물반응기를 이용하여 대량생산할 수 있는 최적 조건을 확립하여 이러한 내용을 국내 및 국외에 출원하여 지적재산권을 확보할 예정

딱지꽃 추출물로부터 지표성분 물질 분리 및 정제 조건 기술 확보 및 피부 세포내 효능을 토대로 새로운 메커니즘 제시와 사업화를 위한 학술적 데이터 마련

미국 국제화장품원료협회(PCPC)에 딱지꽃 추출물 유래 물질 추가 원료 소재 국제 인증과 특허기반 추가 기술이전을 통한 일본, 중국을 비롯한 다국적 기업에 적극적 프로모션 진행할 계획

기능성 화장품으로 인증받기 위한 개별품목 심사(1.안전성, 유효성 또는 기능입증자료 2. 기준 및 시험방법에 관한 자료 3. 신규원료 규격 및 안전성 입증자료) 서류를 포함한 기준 및 시험방법에 관한 자료를 구비하여 심사진행하여 공정 개선 기술, 공정화 반응 기술, 정제 기술, 안정화 기술, 제품 응용 기술 등 다양하게 응용하여 신약, 향노화 소재, 미백 소재, 항염 소재, 항산화 소재 개발 뿐만 아니라 다른 소재들과의 Formulation Technology 등 응용연계 가능성을 높여 의료, 제약, 화장품 및 식품 분야 등에 기여

본 연구개발소재인 딱지꽃 추출물을 활용한 '아리아리' 화장품 완제품 판매를 통한 매출 증대와 국내 OEM/ODM 기업으로 기 구축되어 있는 유통망을 통하여 판로를 확보 계획

화장품으로의 상품화 활용방안 1. 국내 최대 OEM/ODM 기업으로 구축되어 있는 유통망(거 래처 약 300여 업체)를 통한 화장품 시장 적용 2. 기능성 주름개선 및 미백 화장품에 적용: 식물 태좌 조직배양체 유래 유효성분 함유 주름개선 기능성 화장품 또는 미백 기능성 화장품 적용 3. 자외선에 의한 피부 보호용 화장품 적용: 자외선 차단 기능성 화장품 내 피부 보호제 및 After skin care 제품 적용 4. 여드름, 아토피 등 피부질환 완화 화장품에 적용: 여드름 및 아토피 완화 화장품 등 피부과 판매 제품으로의 적용 5. 기타 기능성 화장품 및 의약외품 소재로의 적용: 염증 완화, 가려움 완화 등의 독특한 기능성 화장품 및 발모, 양모 등의 의약외 품 소재로의 적용과 이를 이용한 제품 적용 6. 화장품 및 제약기술의 fusion을 통한 독특한 제약 제조 기술 및 KGMP생산 설비 및 기유통망을 이용한 의약품 소재 및 제품으로의 적용 7. 항염 및 항알러지 연고류 소재 및 제품 적용 8. 탈모 및 여드름 치료제로의 소재 및 제품 적용

우수한 생리활성 성분을 함유하고 있으나 원재료의 수급 문제, 수확 시기 또는 장소에 따른 불규칙한 함량 등으로 인하여 제품에 활용되지 못하는 식물유래 고기능성 생리활성소재에 대하여 식물 조직배양 기술을 이용한 표준화 생산 기술을 개발하는 경우 적용범위가 광범위하여 막대한 효과가 예상

국내 시장에 수입되는 약용식물로부터의 기능성 화장품 원료를 대체하는 효과 및 이를 이용한 주름 방지 및 미백 등의 기능성 화장품 시장의 활성화 및 수출증대 기여

새로운 조직배양 기술로 개발된 식물 태좌 조직 배양체 유래 고기능성 생리활성 소재의 경우 원천적인 지적재산권 확보로 기능성 소재로서도 전세계 시장 대상 상업화 가능

확립된 조직배양 기술에 의한 생리활성 소재의 유도체 개발 기술을 기반으로 하여 타 분야 및 타대상 식물에 응용하여 보다 많은 부가가치 제품 및 소재를 개발가능

TOAKASEI를 통하여 일본콜마 R&D Skin Care 팀의 Manager인 Shunsuke Tokunaga와 딱지꽃 신소재를 소개

식물조직배양기술을 통하여 대두의 태좌조직을 대량생산, 표준화된 지표물질 분석법 등을 2015년 5월 일본 요코하마에서 개최된 CITE JAPAN 2015에 참가하여 딱지꽃 추출물 소재를 제안하였고, 기술적인 지원을 현재에도 진행

TOAKASEI를 통하여 NOF H&B Products research group의 Takashi Matsufufi, Takeshi Tamura 에게 딱지꽃 추출물 신소재 소개

Company	상담내용
Cosmetic japan ltd.	딱지꽃 캘러스 유도관련 관심, 8월까지 유도 가능 여부 문의, PCPC 인허가 가능 여부
Nikkol Roundex	중국 전 지역 내 유통 가능여부, 디테일 자료 요청 (이메일로 문의시)
PROYA cosmetics co. ltd	광저우 distributor, 딱지꽃 추출물 소개
Ajinomoto co., inc.	딱지꽃 추출물 원료에 관심
Kracie	딱지꽃 식물세포에 관심
LEXIA INC.	화장품 제조회사로 자사소유의 농장이 있고 딱지꽃 캘러스 유도에 관심
Chifure Corporation	화장품제조사
AVON products co., ltd	열,pH,색등안전성관련일반적인캘러스및딱지꽃추출물내용설명
CUORE	딱지꽃 캘러스에 관심, 캘러스 유도에 대해서도 관심
Kinoshitapharmaceuticalco.,ltd	딱지꽃 식물세포 개별소개(카달로그)
Katsuri Inc.	food supplement & cosmetics 회사(삿포로), 식물캘러스, 딱지꽃 추출물 소개
한국콜마(주)	웹타이드 안정화 및 딱지꽃 캘러스 관련 문의
P&G	딱지꽃식물세포에 관심, 중국사용 가능한 캘러스 문의
Shiseido	헤어케어 제품(salon 위주)

Orion Cosmetics Industry co.,ltd	딱지꽃 추출물에 관심
Taisho pharmaceutical co., ltd.	딱지꽃 켈러스 유도 및 phytoplacenta에 관심
Brenntag Ingredients, Inc.	딱지꽃, 포도켈러스에 관심, 인도네시아 Incsmetickorea참석예정

식물조직배양기술을 통하여 딱지꽃을 대량생산, 생리활성물질 극대화하는 유인제 처리법, 표준화된 지표물질 분석법 등을 2015년 5월 일본 요코하마에서 개최된 CITE JAPAN 2015에 참가하여 딱지꽃 추출물 소재를 제안

LG 생활건강, 미샤, 올리브영, 네이처리퍼블릭, 코스맥스, 코스메카코리아, 한국콜마 등의 국내 화장품업사, 코스메슈티칼 브랜드 보유 피부과, 보령메디앙스 등 기초제품 전라인 및 그 밖의 국내 OEM업체를 통해 안전성 분야를 강화하여 이를 통한 브랜드 시장 진출 계획

## SUMMARY

*Potentilla chinensis* Ser. is a perennial plant that belongs to Rosaceae family. It is widely distributed in Asian countries including Korea and has been used as a traditional medicine for a long time. In particular, it has been used to prevent the bacterial infection and treat hemorrhage, inflammation, cold, etc. According to the previous reports, there are various kinds of phytochemicals such as an ascorbic acid, saponin, quercetin, etc.

In this study, we established the best condition to grow *Potentilla chinensis* Ser. and evaluated the biological effects of the extracts from each part of the plant on human skin cells in vitro. As a result, the extracts from leaves demonstrated inflammation inhibitory effects by blocking COX-2 expression, whereas the extracts from stems showed wrinkle improvement effects through inhibition of collagen disruption and stimulation of elastin expression. Also, the extracts from roots improved wrinkles, skin hydration, and skin whitening by promoting elastin production, stimulating AQP3 expression, and repressing melanin synthesis, respectively. These results suggest that *Potentilla chinensis* Ser. reserves the potential as a functional cosmetic material for anti-inflammatory, wrinkle improvement, skin hydration and whitening effects. We registered "Potentilla Chinensis Extract" on Personal Care Product Council and launched two products for a prototype cosmetic brand, "Ariari", containing the extract as a main anti-aging active ingredient. We have also been culturing *Potentilla chinensis* plant cells after callus induction and have registered "Potentilla Chinensis Callus Extract".

## CONTENTS

Chapter I. Introduction -----	12
Chapter II. Current status of technology development in domestic and overseas --	15
Chapter III. Contents and result of research -----	16
Chapter IV. Achievement to the project targets and contribution to the related fields--	91
Chapter V. Applications and utilization of researched results-----	92
Chapter VI. Scientific and technological information from abroad-----	98
Chapter VII. Current status of research facilities and instruments-----	99
Chapter VIII. Scientific and technological information from abroad-----	100

## 목 차

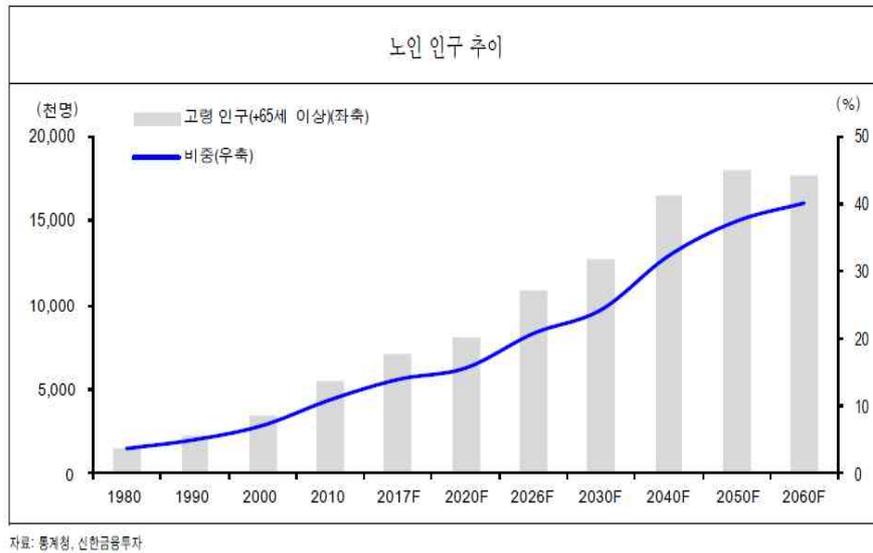
제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	15
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	16
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	91
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	92
제 7 장	연구시설장비 현황 -----	98
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적 -----	99
제 9 장	참고문헌-----	100

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 웰빙 열풍과 자연주의의 확산으로 천연 화장품 소재가 소비자들에게 각광을 받기시작하면서 기존의 화학제품에 대체할 수 있는 천연 향장소재에 대한 필요성이 증가하고 있다.

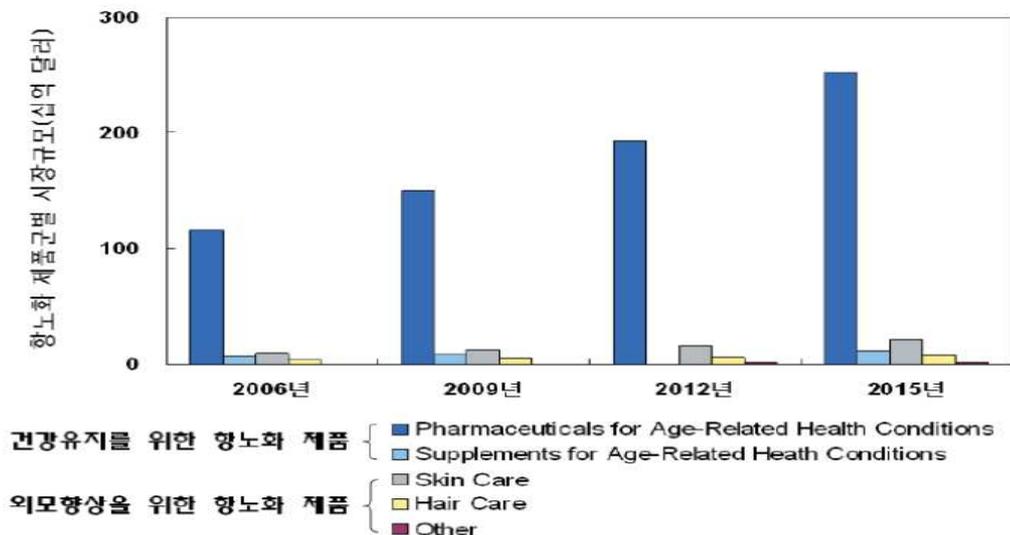
국내 기능성 소재 시장은 개별인정형 품목을 중심으로 빠르게 성장하고 있으며 이 중, 14개 소재가 정부로부터 피부 기능성을 인정받고 있다.

초고령화 사회로 진입하면서 항노화 산업의 지속적인 성장이 예상되며 항노화 시장을 중심으로 건강식품과 화장품이 복합 활용되어 피부관리 및 몸매관리를 하는 먹는 화장품 개념의 미용식품(이너뷰티, Inner Beauty)로 발전하고 있다.



[그림] 고령 노인 인구 추이 및 비중 (통계청, 신한 금융 투자)

천연 향장소재로 각광받고 있는 한방 화장품 시장은 국내 화장품시장에서 기능성화장품과 함께 또 하나의 영역을 형성하고 있는 분야로 40-50대 뿐만 아니라 20-30대 젊은 여성층까지 사용 범위가 확대되고 있다.



## □ 개발의 필요성

딱지꽃(Potentilla chinensis Ser.)은 장미과의 여러해살이풀임. 생약명으로 위릉채(萎陵菜)라고 한다. 높이 30~60센티미터까지 자라며, 잎은 깃겹잎임. 쪽 잎은 깃 모양으로 깊이 갈라진 버들잎 모양이며, 줄기와 잎에 털이 있음. 꽃은 노란색이고 가지 끝에 모여 피며. 우리나라 각지의 산비탈, 길가, 밭 부근, 산림의 풀밭, 들판 특히 개울가의 모래땅에서 잘 자람. 어린이들이 종이를 접어 납작하게 만든 딱지를 닦았다고 하여 딱지꽃이라고 하며, 딱지꽃 잎의 생김새가 지네를 닦았다고 하여 지네풀, 오공초(蜈蚣草)라고도 부른다.

딱지꽃은 약재로 널리 오래동안 사용되어 왔으며, 다른 이름은 오공초[蜈蚣草=wú gōng cǎo=우공초], 합마초:蛤口草: 동북약식지(東北藥植誌), 위릉채[萎陵菜, 번백채:翻白菜: 구황본초(救荒本草)], 근두채[根頭菜, 야구방화:野鳩旁花: 식물명회(植物名匯)], 황주백두옹[黃州白頭翁: 중국약식지(中國藥植誌)], 용아초[龍牙草: 남경민간약초(南京民間藥草)], 천청지백[天靑地白, 소모약:小毛藥, 호조채:虎爪菜: 귀주민간방약집(貴州民間方藥集)], 노아령[老鴉翎, 노아조:老鴉爪: 산동중약(山東中藥)], 지구초[地區草: 의약위생(醫藥衛生)], 호미초(虎尾草), 호랑이눈썹풀, 딱지꽃, 지네초 등으로 부른다.

딱지꽃의 전초와 뿌리에 많은 양의 플라보노이드, 뿌리에 흔적의 사포닌이 있으며, 같은 속 식물의 뿌리에서는 캄페롤, 시아니딘, 여러 가지 카테킨이 분리되어짐. 잎에는 220~300밀리그램 퍼센트, 뿌리 줄기에서 약 106밀리그램 퍼센트의 아스코르브산, 전초 뿌리 줄기에서 10~18퍼센트의 타닌질, 정유, 그리고 플라보노이드로서 미리세틴, 쿠에르세틴, 캄페롤, 델피니딘, 시아니딘 등이 분리되어짐. 또한 P-쿠라르산, 페룰라산, 엘라그산, 수지, 쓴맛물질이 있다고 보고되었다.

딱지꽃에 들어 있는 다가페놀 물질은 티푸스막대균, 적리막대균, 포도알균에 대한 살균작용이 있고 항염증작용, 모세혈관 강화작용이 있다. 이것은 히알루로니다아제의 활성을 낮추는 것과 관련되어 있으며, 동의치료에서 뿌리 줄기를 열내림약, 아메바적리 치료약으로 씀. 또한 월경 주기가 고르지 못할 때에도 쓴다. 전초는 피멧이약으로 각혈과 설사, 대장염 고장에 쓰며 염증 약으로 감기, 위장질병, 진통진경약으로 관절류머티즘, 통풍, 기관지천식, 기침 등에 쓰인 것으로 알려져 있다.

그러나, 이와 같이 많이 알려진 딱지꽃의 약리 작용 및 쉽게 구할수 있는 재료임에도 불구하고, 현재까지 딱지꽃을 이용한 건강 식품이나 화장품과 같은 특정 제품이 출시된 경우가 전혀 없으며, 어떠한 가공품도 만들어지지 않은 상황이다.

## □ 육종 및 식물조직배양을 통한 딱지꽃 식물세포의 대량 생산 필요성

식물조직배양은 식물의 세포 및 기관을 연중 균일하게 대량생산하는 가장 보편적인 방법으로 균일한 품질관리가 필요한 산업시장의 원료로 공급하기 위하여 식물조직배양을 이용하여 대량 생산하는 것이 수요자의 욕구를 만족시킬 수 있는 효과적인 생산방법이다.

특히, 기존 조직배양의 단점을 보완한 생물반응기 배양은 액체배지에 생물반응기 내부로 적정수준의 공기를 꾸준히 공급하며 세포, 조직, 기관 및 식물체를 배양하는 방식으로 배양체의 성장량을 크게 촉진시킬 수 있으며 대량화가 가능하다.

최근 약용식물의 세포, 체세포배, 부정근 등의 식물조직을 생물반응기를 이용하여 생리활성 물질을 생산하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

새로운 조직배양 기술로 개발된 초분류 및 목분류 캘러스 추출물들은 고기능성 생리활성 소재의 경우 원천적인 지적재산권 확보로 기능성 소재로서도 전 세계시장 대상 상업화 가능하다.

확립된 조직배양 기술에 의한 생리활성 소재의 유도체 개발 기술을 기반으로 하여 타 분야 및 타 대상 식물에 응용하여 보다 많은 부가가치 제품 및 소재 개발이 가능하다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

딱지꽃 기술은 한국의 생물반응기를 이용한 딱지꽃 체세포배 대량생산 기술과 피부개선과 항스트레스를 증점을 둔 딱지꽃 및 딱지꽃 유래 유용물질을 이용한 기능성 화장품 기술을 본 연구팀에서 연구하여 국내외 60%정도의 기술수준을 보유하고 있다.

특허분석에 따른 본 연구과제와의 현황을 분석하면 생물반응기를 이용한 딱지꽃 체세포배 대량생산 기술개발 관련 특허로는 3건이 한국에서 2014년 녹차캘러스 추출물을 함유하는 항염증 화장료 조성물의 제조방법 과 딱지꽃 및 딱지꽃 유래 유용물질을 이용한 기능성 화장품개발기술은 식물 종자로부터 캘러스를 유도하여 증식한 후, 생물반응기를 이용하여 대량배양생산 한다는 내용을 개시하고 있다는 점에서 유사하나 핵심특허는 대량생산의 대상이 녹차인 반면 본 기술은 딱지꽃 체세포배라는 점에 차이가 있으며, 딱지꽃 체세포배의 배양을 위해 생물반응기를 이용한다는 내용이 개시된 선행문헌은 검색되지 않았다.

또한 딱지꽃 및 딱지꽃 유래 유용물질을 이용한 기능성 화장품(피부개선 & 항스트레스) 개발은 2013년 한국이 보유하고 있는 위릉채 추출물을 포함하는 모공축소 또는 피지분비 억제용 조성물기술이 있으며 위릉채 추출물을 포함하는 모공축소 또는 피지분비 억제용 조성물이라는 핵심특허의 관련성이 있으며 위릉채 추출물을 기능성 화장품의 소재로 활용할 수 있다는 내용이 개시되어 있고, 모공축소 또는 피지분비 억제 효과를 갖는다는 내용이 개시되어 있어 궁극적으로 기능성 화장품의 소재로 딱지꽃(위릉채) 추출물을 사용할 수 있다는 내용이 개시되어 있다는 점에서 유사하나 선행기술에는 딱지꽃 추출물의 항스트레스 개선 효과에 대한 내용이 개시되어 있지 않고, 딱지꽃에 함유된 유용물질의 분리 내용 및 유용물질의 기능성 화장품 원료로서의 사용가능성에 대한 내용도 개시되어 있지 않다. 또한, MMPs 억제 효능 평가, 염증 유발 유전자 억제 효능 평가 및 Mitochondria 활성관여 유전자 테스트에 대한 내용도 언급되어 있지 않아 본 연구와 차이점을 갖고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

과 제 명	고랭지 자생 딱지꽃을 활용한 기능성 제품 개발
-------	---------------------------

○ 연구개발 목표

강원도 정선 고랭지 자생식물인 딱지꽃의 우수종의 육종을 통한 대량재배 및 부위별 추출물질을 분석하고, 노화된 피부의 개선을 유도하는 안티 에이징 화장품 개발을 목표로 한다.

○ 연구내용

- 강원도 정선 고랭지 자생식물인 딱지꽃의 육종, 식물자원 수집 및 포장 조성  
딱지꽃 및 딱지꽃 근연종 전국적, 지대별 자원 수집(개소별 10점)  
수집자원의 지역적응성 및 내병성 우수계통 선발
- 대량 재배된 딱지꽃으로부터 부위별 및 추출용매에 따른 성분분리, 정제 공정 기술개발
- 딱지꽃 추출물로부터 분리·정제된 지표물질 확인을 통한 유효성 평가  
(다양한 스트레스 요인에 의해 상처 받은 피부세포 기능 회복)
- 딱지꽃 추출물의 화장품 원료로서의 적용유무 판단을 위한 독성 및 효능 평가
- 딱지꽃을 활용한 제품의 마케팅 및 고부가가치 창출을 위한 식물조직배양기술을 통한 캘러스 유도 및 Bioreactor내 세포 배양기술 개발

세부과제명	딱지꽃 재배기술 연구
-------	-------------

최근 웰빙 열풍과 자연주의의 확산으로 천연 화장품 소재가 소비자들에게 각광을 받기시작하면서 기존의 화학제품에 대체할 수 있는 천연 향장소재에 대한 필요성이 증가하고 있음. 국내 기능성 소재 시장은 개별인정형 품목을 중심으로 빠르게 성장하고 있으며 이 중, 14개 소재가 정부로부터 피부 기능성을 인정받고 있음.

딱지꽃(*Potentilla chinensis* Ser.)은 장미과의 여러해살이풀임. 생약명으로 위릉채(萎陵菜)라고 한다. 높이 30~60센티미터까지 자라며, 잎은 깃겹잎임. 쪽 잎은 깃모양으로 깊이 갈라진 버들잎 모양이며, 줄기와 잎에 털이 있음. 꽃은 노란색이고 가지 끝에 모여 피며. 우리나라 각지의 산비탈, 길가, 밭 부근, 산림의 풀밭, 들판 특히 개울가의 모래땅에서 잘 자람. 어린 이들이 종이를 접어 납작하게 만든 딱지를 닮았다고 하여 딱지꽃이라고 하며, 딱지꽃 잎의 생김새가 지네를 닮았다고 하여 지네풀, 오공초(蜈蚣草)라고도 칭한다.

## 연구내용

### 1) 딱지꽃 종자 발아생리 연구

- 딱지꽃 종자 특성 조사
  - 종자의 천립중, 크기, 과피색 등 조사
- 딱지꽃 종자 발아온도 조사
  - 발아온도 및 광처리 : 15, 20, 25, 30℃ 210일 저장 종자
- 딱지꽃 종자발아 전처리 효과 구명
  - 전처리 : 4℃ 1주일 저온처리, 3일 습윤처리 후 20℃ 생육상 조사
- 딱지꽃 종자 휴면 검정
  - 채종 정선 처리 후 발아율 조사
- 딱지꽃 종자 수명 검정
  - 채종 후 300일, 350일 발아율 조사

### 2) 딱지꽃 재배화를 위한 육묘기술 개발

- 육묘용 트레이 선발
  - 72, 105, 128, 162, 200공 트레이 규격별 생육조사
- 육묘용 트레이 규격별 정식 후 생육
  - 72, 105, 128, 162, 200공 트레이 규격별 정식 후 60일 생육조사
- 육묘용 적정 상토 선발
  - 유기상토 및 일반상토에서의 생육조사
  - 75일 육묘묘의 정식 60일 후 생육조사

### 3) 딱지꽃 재배기술 개발

- 딱지꽃 재배를 위한 적정 재식밀도 구명
  - 재식거리 : 20×20, 30×20, 30×30, 30×40cm 4수준(16, 12, 8, 6주/m<sup>2</sup>)
  - 조사항목 : 엽수, 엽장, 엽폭 등
- 딱지꽃 재배를 위한 적정 차광효율 구명
  - 차광처리 : 무처리, 0, 35, 55, 70%
  - 재배방법 및 처리 : 재식거리 30x30cm
  - 1년차 : 정식 직 후 차광
  - 2년차 : 5월 하순부터 차광실시
  - 조사항목 : 엽수, 엽장, 엽폭 등

#### 4) 딱지꽃 대량생산을 위한 시비방법 개발

- 딱지꽃 재배를 위한 1년생 묘의 적정 퇴비 시용량 구명
  - 퇴비량 : 무처리, 500, 1,000, 1,500, 2,000 kg/10a
  - 퇴비조성 : 유기물 30%, 유기물 대 질소의 비 40이하, 돈분30%, 계분 25%, 톱밥35%, 고토 5%, 폐사료 4%, 미생물제 1%
  - ※ 밑거름 : 2015.7.10, 정식 : 2015.7.20, 생육조사 : 2015.9.20
- 딱지꽃 재배를 위한 2년차 묘의 적정 추비 회수 구명
  - 추비횟수(N-K : 21-7) : 채소작물 기준 준용
  - 1차 추비(5월말), 2차 추비(6월말), 3차 추비(7월말)
  - 조사항목 : 염수, 엽장, 엽폭 등 생육 및 토양 분석

### 3. 연구결과

#### 1) 딱지꽃 종자 발아생리 연구

- 딱지꽃 종자 특성 조사

표 딱지꽃 종자특성

종명	천립중(g)	L중(g)	L당 립수	과피색	길이(mm)	넓이(mm)
딱지꽃	0.42	558	1,328,000	황갈색	1.42	0.86



그림 딱지꽃 종자의 현미경사진

- 딱지꽃 종자 발아온도 조사

표 상온저장 후 처리 온도별 발아율 조사

온도(°C)	처 리 기 간(일, %)						발아시
	5	10	15	20	25	30	
10	0	0	0	0	0	0	0
15	1.4	15.0	37.0	39.4	42.0	45.7	4
20	7.0	37.0	73.0	76.0	78.4	81.4	3
25	6.0	11.0	22.5	23.4	25.0	25.0	3
30	0	3.4	6.0	7.4	9.0	9.0	7

- 딱지꽃 발아의 적정온도는 20°C에서 발아율이 가장 높았음

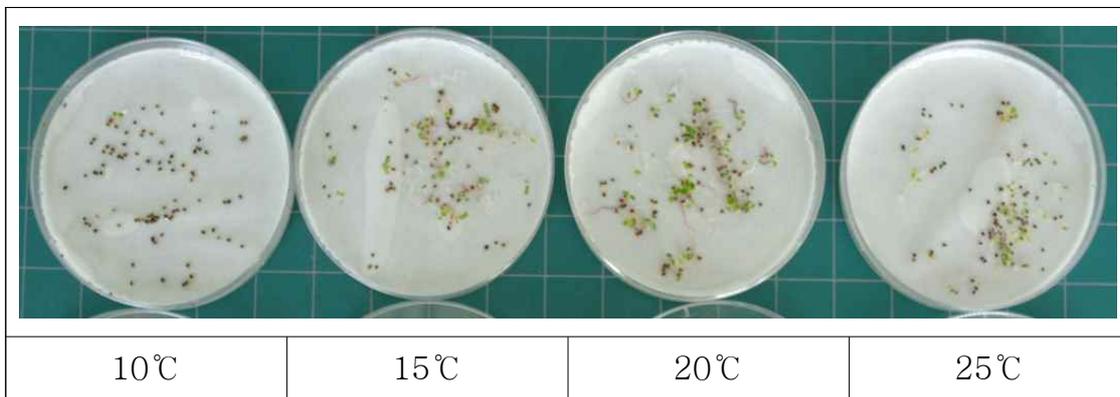


그림 파종 20일 후 온도별 발아 양상

○ 딱지꽃 종자발아 전처리 효과 구명

표 저온처리 후 처리 온도별 발아율 조사

온도(°C)	처 리 기 간(일, %)						발아시
	5	10	15	20	25	30	
10	0	0	0.7	2.0	2.0	4.7	15
15	0	9.4	20.4	24.7	26.7	28.0	8
20	18.4	25.7	32.0	36.0	40.0	43.4	3
25	16.4	34.0	55.0	58.4	62.4	62.4	3
30	5.0	22.0	28.4	32.7	34.7	37.4	4

처리조건 : 4°C 7일

표 습윤처리 후 처리 온도별 발아율 조사

온도(°C)	처 리 기 간(일, %)						발아시
	5	10	15	20	25	30	
10	0	0	0	0	0	2.7	28
15	0	10.4	27.4	31.0	32.7	36.7	8
20	22.0	24.4	29.4	32.0	34.7	38.7	3
25	15.4	35.0	47.0	50.0	52.4	52.4	4
30	5.4	8.4	16.0	21.0	22.0	25.0	4

처리조건 : 3일간 침지

표 상온저장 후 명암에 따른 발아율 조사(20°C)

조건	처 리 기 간(일)						발아시
	5	10	15	20	25	30	
명	7.0	37.0	73.0	76.0	78.5	81.7%	4
암	0.0	7.4	7.4	8.2	8.6	8.6%	8

처리조건 : 20°C 생육상

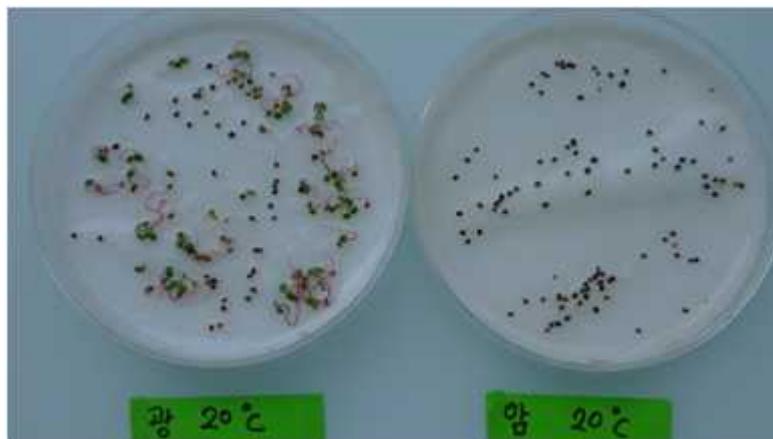


그림 상온저장 종자 명암처리별 발아 양상

- 딱지꽃 발아를 위한 전처리는 발아를 억제하는 효과가 나타나므로 상온저장 후 파종이 알맞음.

○ 딱지꽃 종자 수명 검정

표 종자 휴면성 검정

조건	처 리 기 간(일)						발아시
	5	10	15	20	25	30	
채종(8.30)	60.0	65.0	71.0	76.7	79.7	83.0	3
파종(9.25)							

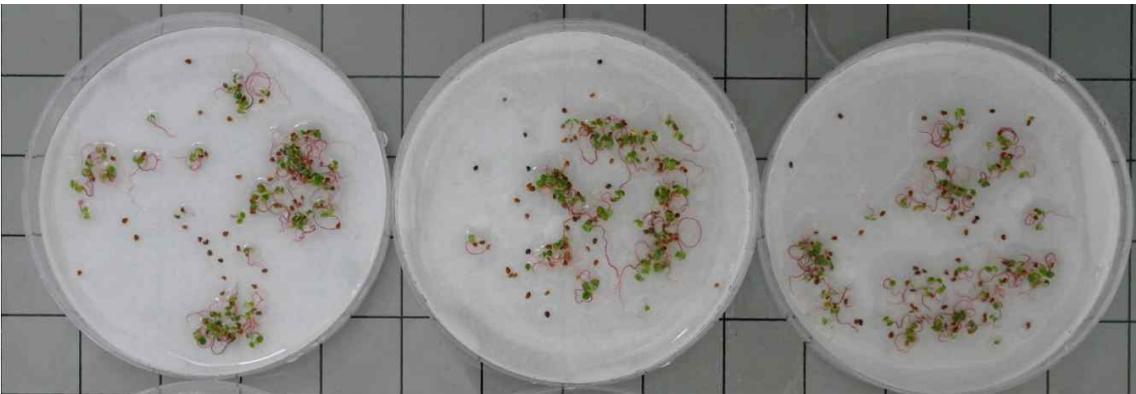


그림 채종 정선 후 직파시 휴면성검정 양상

- 채종 직후 파종하여도 휴면이 없어 발아는 문제가 없고 발아율도 높았음

○ 딱지꽃 종자 수명 검정

표 딱지꽃 종자 수명 조사

조건	처 리 기 간(일)						발아시
	5	10	15	20	25	30	
300	0	38.0	41.7	43.6	45.0	45.3	7
350	0	27.7	33.7	38.0	41.0	43.0	8

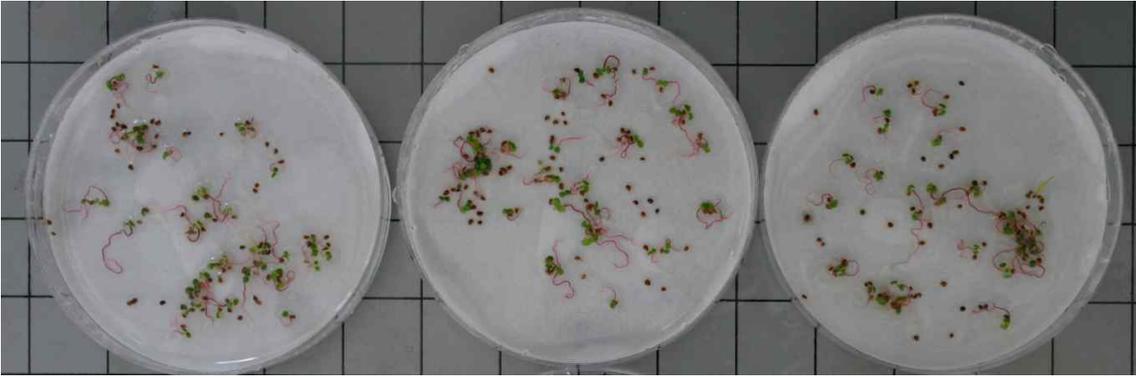


그림 채종 350일 후 종자수명 검정(8.28 파종)

- 시간이 경과함에 따라 종자 생존율이 떨어지는 것으로 조사

## 2) 딱지꽃 재배화를 위한 육묘기술 개발

○ 육묘용 트레이 선발

표 딱지꽃 육묘용 적정 트레이 크기별 요소질

구 분	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽 수 (개)	엽두께 (mm)	초 폭 (cm)	뿌리길이 (cm)	무게 (g)	매트형성 (0~5) <sup>x</sup>
72공	2.1	2.1	7.0	0.2	4.9	20.9	0.4	4
105공	1.8	1.8	7.0	0.2	3.8	12.6	0.3	3
128공	1.8	1.7	7.0	0.2	3.9	9.3	0.2	2
162공	1.1	1.1	6.3	0.1	2.7	8.1	0.2	2
200공	1.2	1.2	7.00	0.2	2.7	8.1	0.1	3

<sup>2</sup>파종 : 2015. 5.6, 조사 : 2015.7.20.

<sup>x</sup>네트형성정도 : 0: 전혀 형성 안됨, 1: 아주 나쁨, 2: 나쁨, 3: 보통, 4: 좋음, 5: 아주 좋음

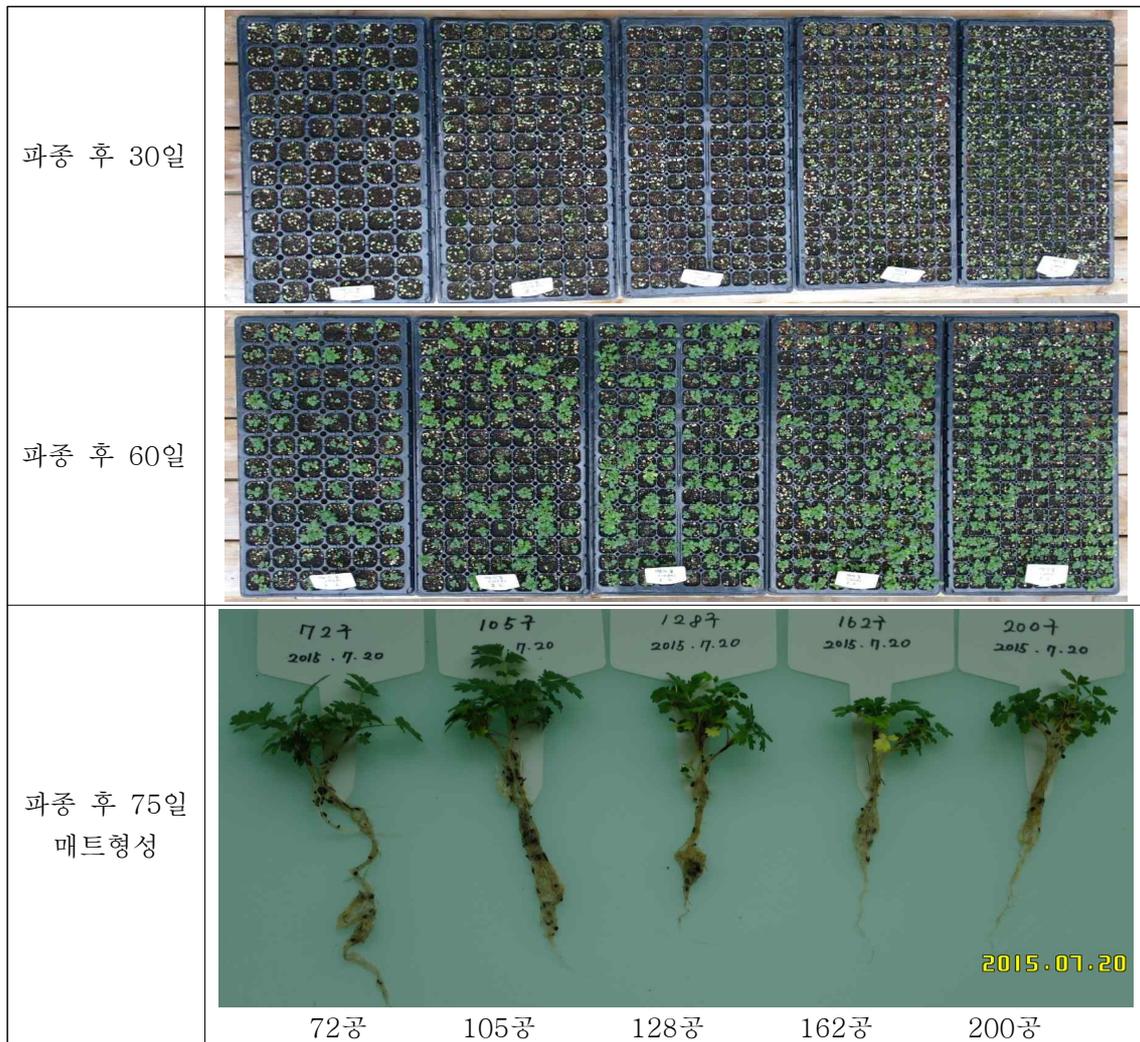


그림 트레이 규격별 생육상황

표 플러그트레이 크기별 딱지꽃의 정식후 생육

구 분	활착율	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽 수 (개)	엽두께 (mm)	초 폭 (cm)	엽록소 (SPAD)
72공	100	15.3	9.6	28.7	0.3	33.2	48.8
105공	100	15.6	10.1	34.0	0.3	31.0	32.9
128공	99	14.7	9.1	33.0	0.2	31.7	43.0
162공	100	14.7	8.6	31.0	0.3	29.7	31.0
200공	98	12.8	7.8	28.3	0.3	27.7	44.4

\* 정식일 : 7.20일, 조사일 : 9.20일



그림 트레이 규격별 정식 후 생육상황(60일 후)

- 생육 및 면적 고려시 105공 트레이 육묘 권장

○ 육묘용 적정 상토 선발

표 공시상토별 구성성분

	성분	상품명
유기상토 1	코코피트, 피트모스, 질석, 제올라이트, 펄라이트, 지렁이분변토	리틀팜
유기상토 2	피트모스, 질석, 펄라이트, 제올라이트, 구아노, 목초액	반딧불이
유기상토 3	커피박, 코코피트, 피트모스, 질석, 소성황토	커피배양토
일반상토	코코피트, 피트모스, 질석, 펄라이트, 제올라이트	더존상토

표 유기상토별 딱지꽃 생육 및 묘소질

구분	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (개)	엽두께 (mm)	초폭 (cm)	뿌리길이 (cm)	무게 (g/주)	매트형성 (0~5) <sup>x</sup>
유기상토1	1.9	1.8	7.0	0.2	4.8	11.1	0.2	4
유기상토2	1.6	1.7	7.0	0.2	4.5	7.8	0.2	2
유기상토3	1.9	2.0	7.0	0.2	4.5	6.2	0.1	2
일반상토	2.0	1.8	7.0	0.2	4.9	9.5	0.2	4

파종 : 2015.5.6, 조사 : 2015. 7.20.

<sup>x</sup>매트형성정도 : 0: 전혀 형성 안됨, 1: 아주 나쁨, 2: 나쁨, 3: 보통, 4: 좋음, 5: 아주 좋음

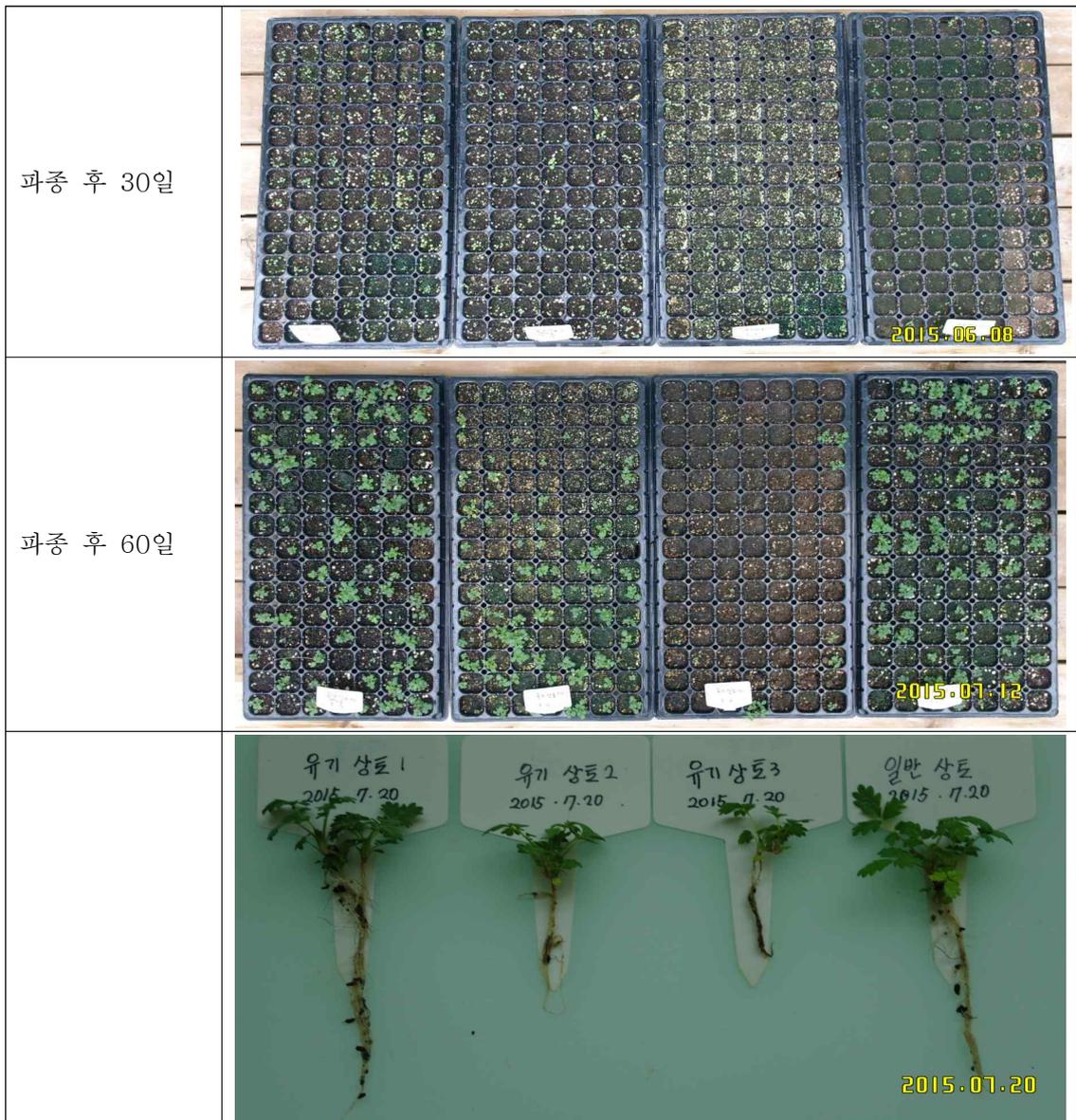


그림 유기상토 육묘시 생육특성

표 유기상토 육묘 딱지꽃의 정식후 생육

구 분	활착율	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽 수 (개)	엽두께 (mm)	초 폭 (cm)	엽록소 (SPAD)
유기상토1	97	14.9	8.9	31.7	0.2	29.3	48.6
유기상토2	98	15.8	8.3	30.7	0.3	30.7	49.1
일반상토	100	15.6	10.1	34.0	0.3	31.0	32.9

\* 정식일 : 7. 20일, 조사일 : 9.20일



그림 여러 가지 상토 육묘 후 정식시 생육(60일 후)

- 일반상토에서 육묘한 묘의 생육 및 정식 후 활착이 좋았음



그림 파종방법

### 3) 딱지꽃 재배기술 개발

○ 적정 재식 밀도 구명

표 . 1년생묘 재식거리 별 생육특성(봉평)

구 분	활착율	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽 수 (개)	엽두께 (mm)	초 폭 (cm)	엽록소 (SPAD)
20×20	100	16.2	9.4	29.0	0.2	32.8	37.3
30×20	100	17.8	11.5	33.7	0.3	35.3	56.0
30×30	100	17.8	11.0	43.0	0.2	35.3	53.0
30×40	100	15.1	13.2	31.0	0.2	33.3	41.9

\* 정식일 : 7. 20일, 조사일 : 9.20일

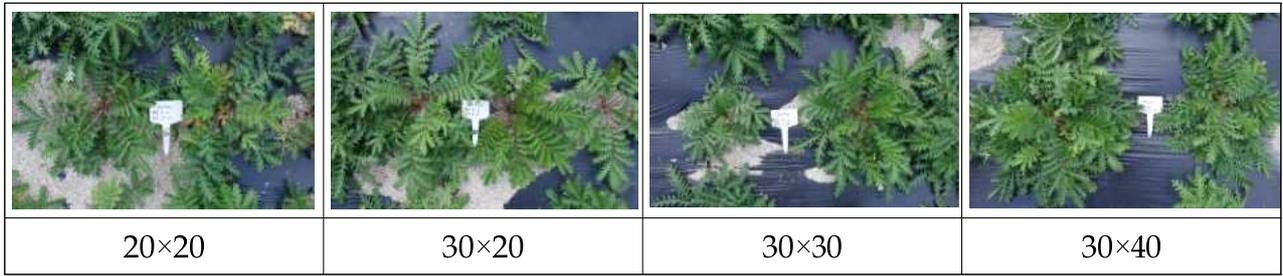


그림 재식거리별 생육

- 적정 재식밀도는 차년도 생육을 고려할 때 30 × 30cm이었음

○ 적정 차광효과 구명

표 . 1년생 묘의 차광처리 효과(봉평)

구 분	활착율	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽 수 (개)	엽두께 (mm)	초 폭 (cm)	엽록소 (SPAD)
0	100	17.8	11.0	43.0	0.2	35.3	53.0
35	100	14.3	9.9	20.3	0.2	30.5	50.0
55	100	18.2	11.0	22.3	0.2	38.7	52.4
70	100	16.5	10.5	22.3	0.2	34.3	47.6

\* 정식일 : 7. 20일, 조사일 : 9.20일



그림 1년생묘의 차광 처리별 생육

표 . 2년생 묘의 차광처리 효과(정선)

차 광(%)	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽 수 (개)	엽두께 (mm)	엽록소 (SPAD)	엽 중 (g/주)	근 중 (g/주)
0	62.5	14.9	7.8	0.2	31.2	87.3	3.9
35	81.1	19.9	8.9	0.2	38.2	98.2	7.7
55	84.9	19.1	9.1	0.2	26.1	120.6	7.8
70	83.2	17.6	9.9	0.2	37.2	143.5	9.1

\* 조사일 : 8.27일



그림 딱지꽃 2년생의 차광 처리별 생육

- 차광처리는 유의성이 없었으므로 무처리가 효과적일 것으로 판단됨.

#### 4) 딱지꽃 대량생산을 위한 시비방법 개발

표 . 딱지꽃 육묘 묘의 적정 퇴비 시비량 구명(봉평)

시비량	활착율	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽 수 (개)	초 폭 (cm)	엽록소 (SPAD)
무처리	100	17.8	11.0	43.0	35.3	53.0
500 kg/10a	100	15.7	9.9	26.7	33.7	57.7
1,000 kg/10a	100	16.4	10.0	31.3	32.7	42.5
1,500 kg/10a	100	17.0	9.5	37.3	34.3	46.3
2,000 kg/10a	100	13.8	9.0	29.7	30.3	52.5

\* 정식일 : 7. 20일, 조사일 : 9.20일



그림 딱지꽃 퇴비 처리별 생육

표. 딱지꽃 기비에 따른 토양성분 분석

퇴비량	pH	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Ca	K (cmol(+)/kg)	Mg	Na	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	NO <sub>3</sub> (mg/kg)
무처리	7.10	0.13	16.68	4.12	0.45	1.10	0.10	388	5.51
500 kg/10a	6.94	0.17	15.58	4.11	0.45	1.10	0.10	332	9.26
1,000 kg/10a	7.04	0.18	20.84	4.20	0.61	1.26	0.09	424	6.98
1,500 kg/10a	6.84	0.93	22.82	4.67	0.90	1.53	0.36	540	25.80
2,000 kg/10a	6.85	0.21	17.66	3.35	0.47	0.99	0.18	426	7.16

시료채취 9.20

표 . 딱지꽃 2년생 적정 추비 횟수 구명(정선) 8월조사

추비 횟수	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽 수 (개)	엽두께 (mm)	엽록소 (SPAD)	엽 중 (g/주)	근 중 (g/주)
무처리	62.5	14.9	7.8	0.2	31.2	77.3	3.2
1회	64.5	15.9	10.2	0.2	35.5	78.4	3.3
2회	67.6	19.7	9.2	0.3	31.7	120.3	6.8
3회	71.7	17.3	8.4	0.3	33.1	133.1	8.2

\* 조사일 : 8.27일



-추비처리전



- 추비 처리후

그림 딱지꽃 2년생의 추비 횟수별 생육

표. 딱지꽃 추비에 따른 토양성분 분석

추비횟수	pH	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Ca	K (cmol(+)/kg)	Mg	Na	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	NO <sub>3</sub> (mg/kg)
시험전	7.27	0.21	23.42	5.00	0.31	1.03	0.06	77	1.82
무처리	7.38	0.09	24.69	5.69	0.23	1.06	0.06	40	0.35
1회	7.65	0.12	18.51	3.59	0.28	1.02	0.06	52	0.16
2회	7.90	0.11	16.93	5.52	0.23	0.77	0.06	50	0.25
3회	7.64	0.14	19.78	5.48	0.28	1.01	0.06	60	0.63

\* 시료채취 : 8.27일

- 시비처리는 1, 2년차 모두에서 기존에 충분한 양분을 함유하고 있어 유의성이 없었으며 자생지 환경과 연관되어 판단해 보면 척박지에서도 잘 자라므로 2년차 이후 생육상황에 따라 추비를 약하게 하는 것이 유리할 것으로 판단됨.

## 제 1협동기관 : (주)바이오에프디엔씨

과 제 명	딱지꽃 추출물 분석을 통한 기시법 확립과 딱지꽃 소재 원료 산업화
-------	--------------------------------------

### ○ 협동 과제의 목표

- 딱지꽃 추출물에 대한 주성분의 표준화 확립
- 딱지꽃 추출물 주성분에 대한 기준 및 시험법 확립
- 판로 확보 및 사업화 계획
- 생리활성물질의 함량 극대화를 위한 딱지꽃 추출조건 확립

### ○ 연구내용

<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 딱지꽃 추출물에 대한 주성분의 표준화 확립</li> <li>■ 딱지꽃 추출물 주성분에 대한 기준 및 시험법 확립</li> <li>■ 정선 고랭지 자생 딱지꽃 추출물 소재의 피부세포에서 효능평가 진행</li> <li>■ 판로 확보 및 사업화 계획</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 딱지꽃 추출물에 대한 주성분 규명</li> <li>- 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 통한 주성분의 정제</li> <li>- 질량분석기(Mass spectrometry)를 통한 주성분의 분자량 확인</li> <li>- 핵자기공명분광법(NMR)을 이용한 분자 구조 분석</li> <li>- 액체크로마토그래피질량분석(LC-MS/MS)을 통한 분자조각(Fragments) 확인</li> <li>- 주성분에 대한 기준 및 시험 항목 설정 (순도, 성상, 건조 함량 등)</li> <li>- 주성분에 대한 시험 성적서 작성</li> <li>- 주성분에 대한 분석법 확립(HPLC 분석 조건 확립)</li> <li>- 주성분에 대한 안정성 확인(열 및 pH에 대한 안정성등 확인)</li> <li>- DPPH 자유라디칼 소거능을 통한 항산화 시험</li> <li>- 보습 관련 AQP3 발현 비교 시험</li> <li>- 콜라겐 합성에 관한 유전자(Procollagen, Elastin) 발현 시험</li> <li>- 미백과 관련된 유전자 및 melanin 함량의 변화 비교</li> <li>- 염증 관련 COX-2 발현 저해 시험</li> <li>- 원료소재화를 통한 국내판매 및 해외시장 진출</li> <li>- 해당 연구개발소재를 활용한 화장품 완제품 판매를 통한 매출 증대</li> </ul>
--	--

### 1. 연구개발 수행 내용 및 결과

#### 연구내용

#### 가. 딱지꽃 추출물에 대한 주성분의 표준화 확립

- HPLC를 이용한 딱지꽃 추출물에 대한 주성분 분석

정선에서 재배된 딱지꽃 원물을 건조하여 꽃, 잎, 줄기, 종자로 구별하여 분류하고 각각 추출하여 부위에 따른 주성분을 분석하였다. 추출에 사용된 용매는 정제수, 메탄올, 에틸 아세테이트, 부탄올, 헥산이며, 각각 부위별로 추출하여 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 아래와 같다.

- 분석기기 : Waters 1525u Binary Pump
- 검출기 : Waters 996 Photodiode Array Detector
- 컬럼 : Phenomenex Gemini(C18, 4.6\*250mm, 5 $\mu$ m, 110Å)
- 유속 : 1ml/min
- 용매 : 용매 A (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O), 용매 B (0.1% TFA in Acetonitrile)
- 용매 기울기 조건 (2%/min)
- 파장 : 254nm

시간 (min)	용매A (%)	용매B (%)
0	100	0
35	30	70
40	30	70
45	100	0
50	100	0

■ NMR(Nuclear Magnetic Resonance) 및 Mass 분석

정제된 딱지꽃 뿌리 추출물 main peak를 동결건조 시킨 후 연한 노란색의 파우더를 확보한 다음 NMR(Bruker, 400MHz, CDCl<sub>3</sub>, )과 MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight; Voyager-De STR(Perceptive Biosystem), Matrix(CHCA))를 사용하여 구조 분석을 실시하였다. 정제된 딱지꽃 뿌리 추출물 주요 피크를 동결건조 시킨 후 연한 노란색의 파우더를 확보한 다음 CDCl<sub>3</sub>에 녹여 분석을 수행하였고, 정제된 딱지꽃 뿌리 추출물 주요 피크를 동결건조 시킨 후 연한 노란색의 파우더를 확보한 다음 메탄올에 녹인 후  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid 와 섞고 MALDI-TOF MS를 이용하여 분석을 수행하였다.

나. 정선 고랭지 자생 딱지꽃 추출물 소재의 피부세포 효능평가

효능평가는 정선 고랭지 자생 딱지꽃의 꽃, 잎, 줄기, 뿌리 4가지의 부위별 열수 추출물로 진행하였다.

■ DPPH 자유라디칼 소거능을 통한 항산화 시험

본 시험 방법은 에탄올상에서 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma, Cat.# D9132-1G)가 발생시키는 자유 라디칼에 대한 소거능을 시험함으로써 항산화 효과의 직접적인 작용 정도를 파악할 수 있다. 화합물 DPPH는 에탄올 내에서 자유 라디칼을 발생한다. 이에 일정 농도의 시험물질과 혼합하여 자유 라디칼의 양이 어느 정도 감소하는지 확인할 수 있다. 구체적으로는

에탄올 0.4ml에 0.1mM의 DPPH용액 0.5ml, 그리고 일정농도로 희석된 시험물질 0.1ml를 첨가한다. 10초간 강하게 vortexing 후 냉암소에서 30분간 반응시킨다. Spectrophotometer를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하며, 항산화능의 정도는 에탄올을 사용한 대조군의 흡광도를 기준으로 백분율로 표시하며, 양성대조군으로 Vitamin C를 사용한다.

Free radical 활성 저해율(%)

$$= 100 - \left\{ \frac{\text{각시료액의 반응흡광도}}{\text{공시료액의 반응흡광도}} \times 100 \right\}$$

#### ■ 보습 관련 AQP3 발현 비교 시험

##### ① 세포배양

인간 각질형성세포주(HaCaT)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic (GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm<sup>2</sup> culture dish에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양한다. 인간각질형성세포가 80% 이상 confluence 될 때 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well 분주한 후 세포배양 조건에서 confluence가 80%이상 도달 될 때까지 배양하고, 80% 이상의 confluence가 되면 배지를 DMEM free 배지(FBS를 포함하지 않는 배지)로 교환 후 시험물질을 처리한다. 물질처리 후 24 시간동안 추가 배양하여 각 물질이 Aquaporin3의 발현에 어떠한 영향이 있는지 본다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다.

##### ② RNA Isolation & Reverse transcription

RNA isolation과 cDNA 합성은 SuperPrep™ cell lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO Cat.# SCQ-101)이용한다. 배지를 제거한 세포는 DPBS로 한번 wash하고, 50μl cell lysis mixture (lysis buffer에 gDNA remover를 첨가한 mixture)을 넣고 실온에서 5분간 incubation 한 후 stop buffer를 넣어 반응을 멈추게 하여 ice에 보관한다. RT reaction mixture 32μl에 추출한 mRNA 8μl를 취하여 넣고 PCR를 수행하여 cDNA를 합성한다. PCR 조건은 37°C 15min, 50°C 5min, 98°C 5min에서 수행한다.

##### ③ Real-time PCR 분석

유전자의 발현을 비교분석하기 위하여 상기에서 합성한 cDNA를 template로하여 Thunderbird™ SYBR qPCR Mix (TOYOBO Cat.# QPS-201)의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen)으로 진행한다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primerassays(Aquaporin3, Cat.# QT00212996)를 사용하였다. 상대적인 발현율은 Housekeeping gene (GAPDH, Cat.# QT01192646)로 Normalization였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같다.

< Real-time cycler conditions >Step	Time	Temperature
Reverse transcription	30 min	50 °C
PCR initial activation step	15 min	95 °C
3-step cycling		
Denaturation	15 s	94 °C
Annealing	30 s	60 °C
Extension	30 s	72 °C
Number of cycles	45	

발현율(fold) = (시료처리군의발현율)/(대조군의발현율)

■ 콜라겐 합성에 관한 유전자(Procollagen, Elastin) 발현 시험

① 세포배양

인간섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic (GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm<sup>2</sup>culture dish에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양한다.

인간섬유아세포가 100%이상 confluence 될 때 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well 분주한 후 세포배양 조건에서 confluence가 80%이상 도달 될 때까지 배양하고, 80% 이상의 confluence가 되면 배지를 제거한 다음 DMEM free 배지(FBS를 포함하지 않는 배지)로 교환 후 시험물질을 처리한다. 그 후 24시간 세포배양 조건에서 추가 배양하여 각 물질이 UV 조사로 유도된 주름 관련 유전자인 Procollagen C-endopeptidase enhancer(PCOLCE), Elastin의 발현에 어떠한 영향이 있는지 본다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다.

② RNA Isolation & Reverse transcription

RNA isolation과 cDNA 합성은 SuperPrep™ cell lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO Cat.# SCQ-101)이용한다. 배지를 제거한 세포는 DPBS로 한번 wash하고, 50μl cell lysis mixture (lysis buffer에 gDNA remover를 첨가한 mixture)을 넣고 실온에서 5분간 incubation 한 후 stop buffer를 넣어 반응을 멈추게 하여 ice에 보관한다. RT reaction mixture 32μl에 추출한 mRNA 8μl를 취하여 넣고 PCR를 수행하여 cDNA를 합성한다. PCR 조건은 37°C 15min, 50°C 5min, 98°C 5min에서 수행한다.

③ Real-time PCR 분석

유전자의 발현을 비교분석하기 위하여 상기에서 합성한 cDNA를 template로 하여 Thunderbird™ SYBR qPCR Mix (TOYOBO Cat.# QPS-201)의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen)으로 진행한다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primerassays (PCOLCE, Cat.#QT01005725 / Elastin, Cat.#QT00034594)를 사용하였다. 상대적인 발현율은 Housekeeping genes (GAPDH, Cat.#QT01192646)로 Normalization하였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같다.

< Real-time cycler conditions > <b>Step</b>	<b>Time</b>	<b>Temperature</b>
Reverse transcription	30 min	50 °C
PCR initial activation step	15 min	95 °C
3-step cycling		
Denaturation	15 s	94 °C
Annealing	30 s	60 °C
Extension	30 s	72 °C
Number of cycles	45	

발현율(fold) = (시료처리군의발현율)/(대조군의발현율)

■ 미백 관련 유전자의 발현 시험

① 세포배양

Mouse skin melanoma cells(B16F10, melanoma)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic (GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm<sup>2</sup> culture dish에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양한다. Melanoma cell이 70%이상 confluence 될 때 48well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well 분주한 후 다음 날 배지를 제거한 다음 fresh한 FBS를 포함한 DMEM 배지로 교체한 후 α-MSH(1μM)와 함께 시험물질을 농도별로 동시 처리한다. 그 후 72시간 추가 배양하여 각 물질이 α-MSH로 유도된 melanin 관련 유전자인 tyrosinase와 MITF의 발현에 어떠한 영향이 있는지 본다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다.

② RNA Isolation & Reverse transcription

RNA isolation과 cDNA 합성은 SuperPrep™ cell lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO Cat.# SCQ-101)이용한다. 배지를 제거한 세포는 DPBS로 한번 wash하고, 50μl cell lysis mixture (lysis buffer에 gDNA remover를 첨가한 mixture)을 넣고 실온에서 5분간 incubation 한 후 stop buffer를 넣어 반응을 멈추게 하여 ice에 보관한다. RT reaction mixture 32μl에 추출한 mRNA 8μl를 취하여 넣고 PCR를 수행하여 cDNA를 합성한다. PCR 조건은 37°C 15min, 50°C 5min, 98°C 5min에서 수행한다.

③ Real-time PCR 분석

유전자의 발현을 비교분석하기 위하여 상기에서 합성한 cDNA를 template로 하여 Thunderbird™ SYBR qPCR Mix (TOYOBO Cat.# QPS-201)의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen)으로 진행한다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primerassays (Tyrosinase, Cat.# QT00080815 / MITF, Cat.# QT00037737)를 사용하였다. 상대적인 발현율은 Housekeeping genes (GAPDH, Cat.#QT01192646)로 Normalization하였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같다.

< Real-time cyler conditions >Step	Time	Temperature
Reverse transcription	30 min	50 °C
PCR initial activation step	15 min	95 °C
3-step cycling		
Denaturation	15 s	94 °C
Annealing	30 s	60 °C
Extension	30 s	72 °C
Number of cycles	45	

발현율(fold) = (시료처리군의발현율)/(대조군의발현율)

## 연구결과

가. 딱지꽃 추출물에 대한 주성분의 표준화 확립

- HPLC를 이용한 딱지꽃 추출물에 대한 주성분 분석

### <딱지꽃 부위별 추출물의 주요성분 비교분석>

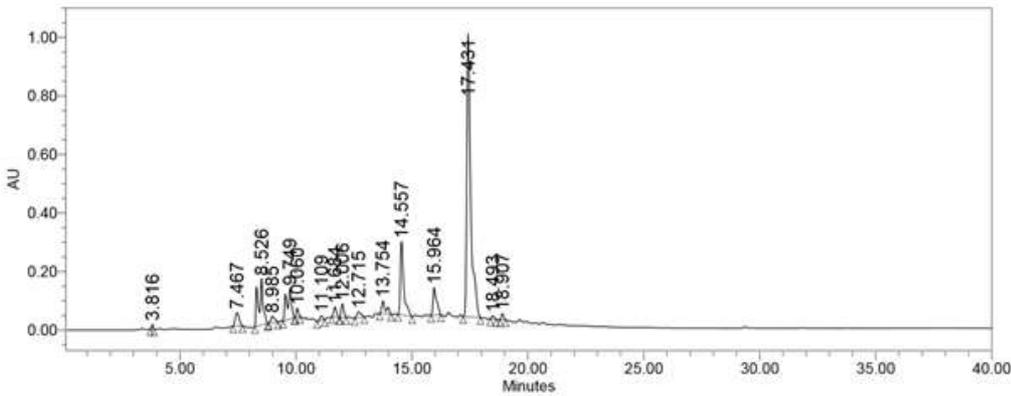
협동기관인 배성영농조합법인으로부터 받은 정선에서 자생하고 있는 딱지꽃의 시료를 아래와 같이 확보하였고, 부위별로 나누어 추출시료로 사용하였다.



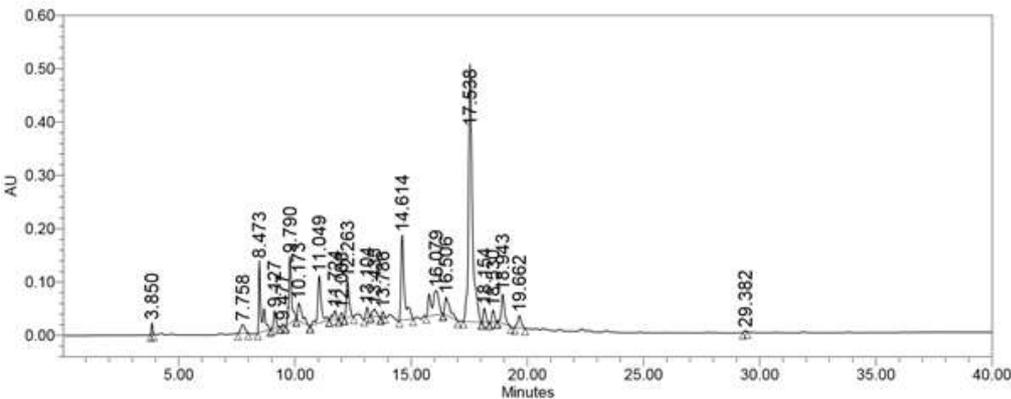
- 꽃

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 5가지 용매 추출물 모두 17.2 -17.5분대 주요한 peak가 나타나는 것을 확인하였다. 정제수와 메탄올이 비슷한 경향의 peaks 패턴을 보였고, 에틸 아세테이트와 헥산이 비슷한 경향의 peaks 패턴을 보였다. 반면에 부탄올의 경우 17.255분 peak를 제외하고는 뚜렷한 peaks를 보이지 않았다.

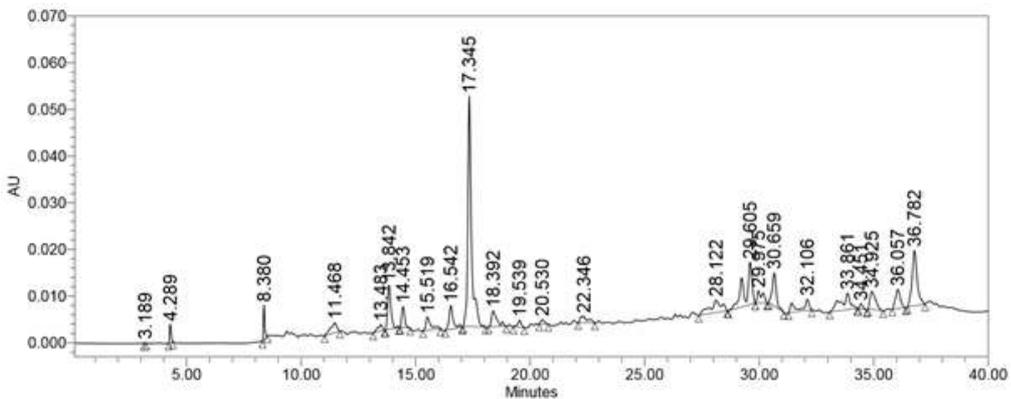
① 정제수



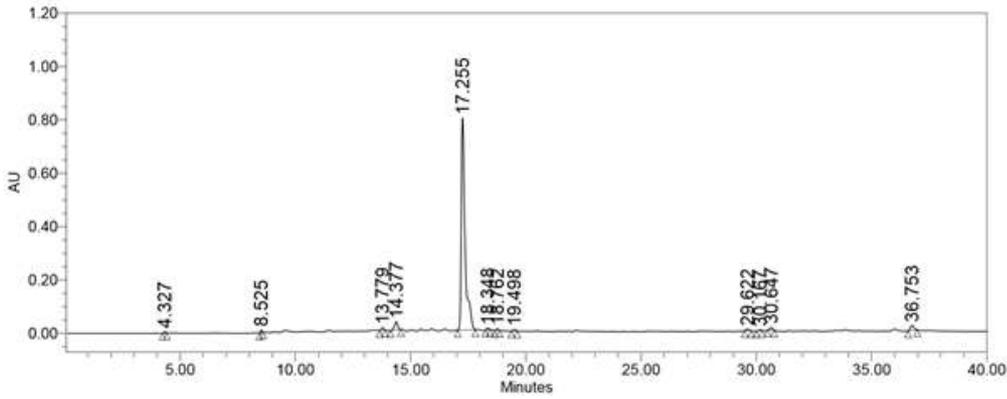
② 메탄올



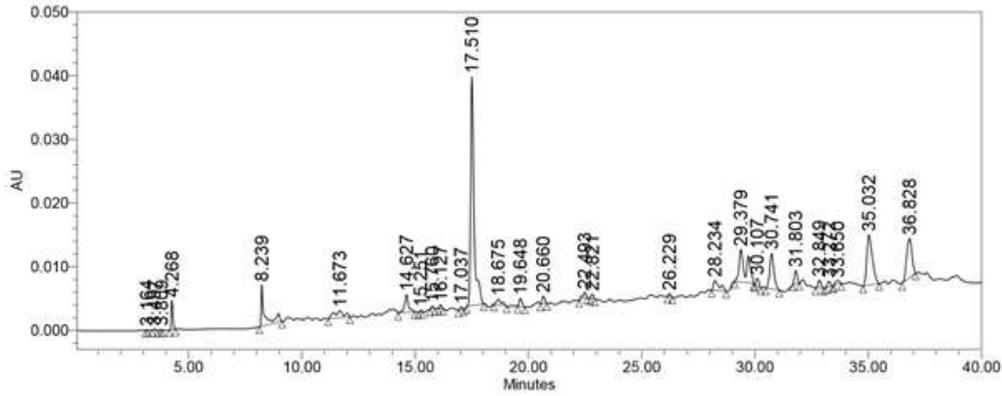
③ 에틸 아세테이트



④ 부탄올



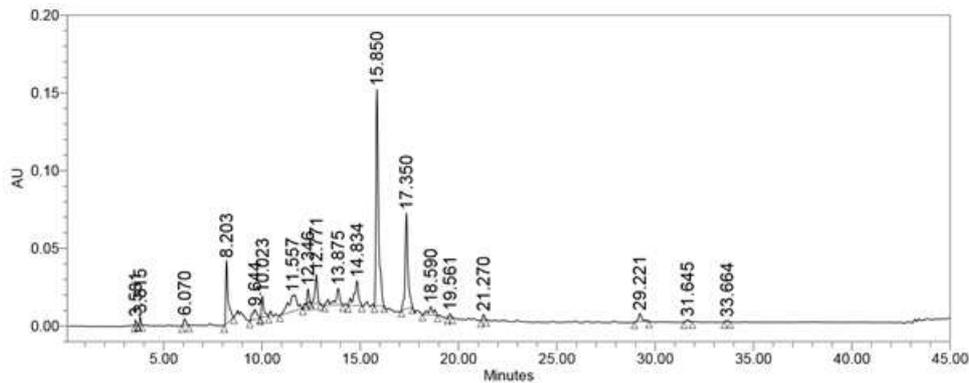
⑤ 헥산



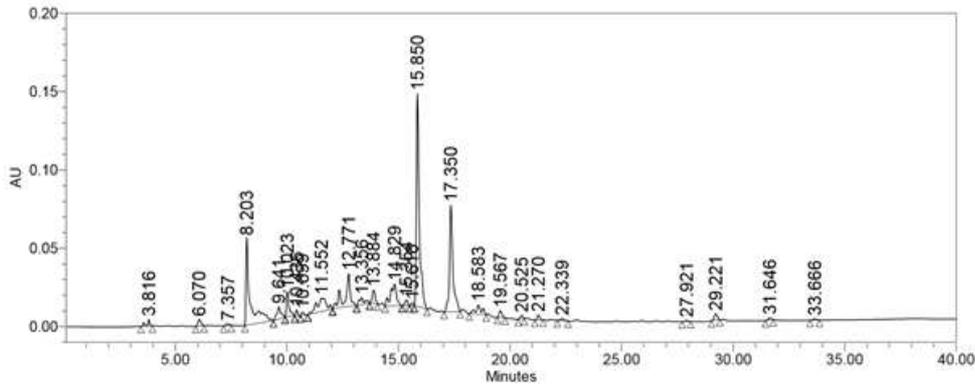
- 요

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 헥산을 제외한 4가지 용매 추출물에서 15.5 - 15.8분대 주요한 peak가 나타남을 확인하였다. 또한 에틸 아세테이트, 부탄올, 헥산으로 추출한 추출물의 경우 34.3 - 34.9분대 주요한 peak을 보임을 확인하였다. 정제수와 메탄올 추출물이 비슷한 peaks 패턴을 보이고, 에틸 아세테이트와 부탄올이 비슷한 peaks 패턴을 보였다.

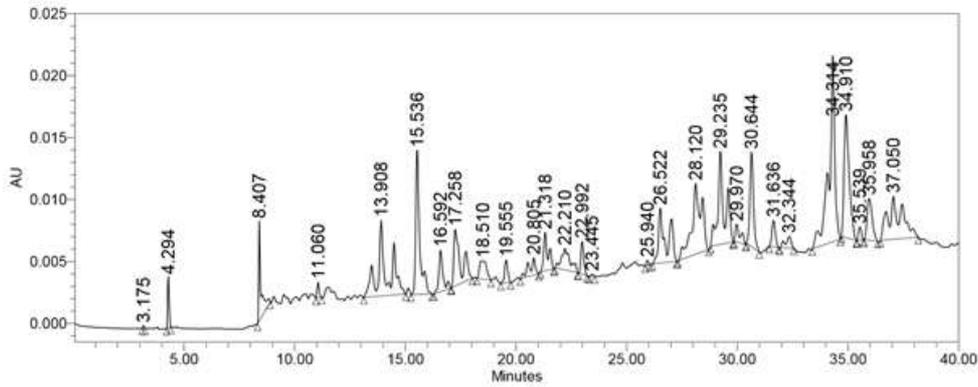
① 정제수



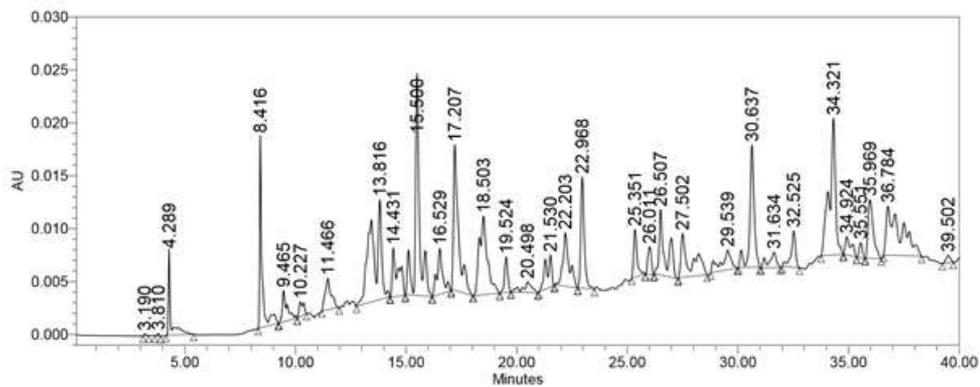
② 메탄올



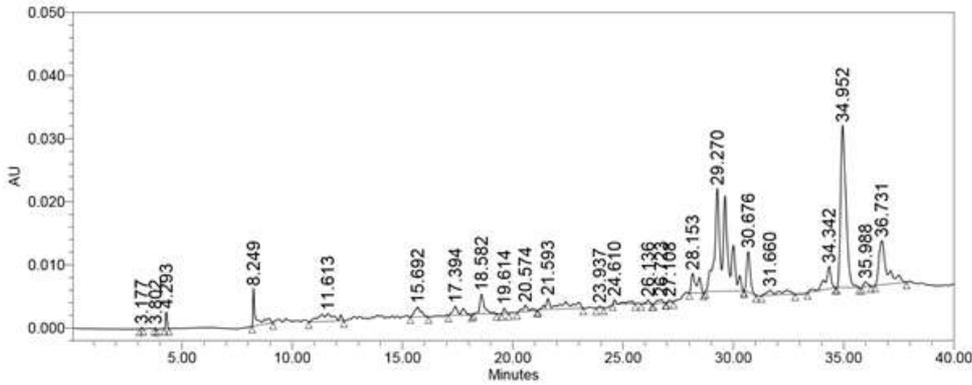
③ 에틸 아세테이트



④ 부탄올



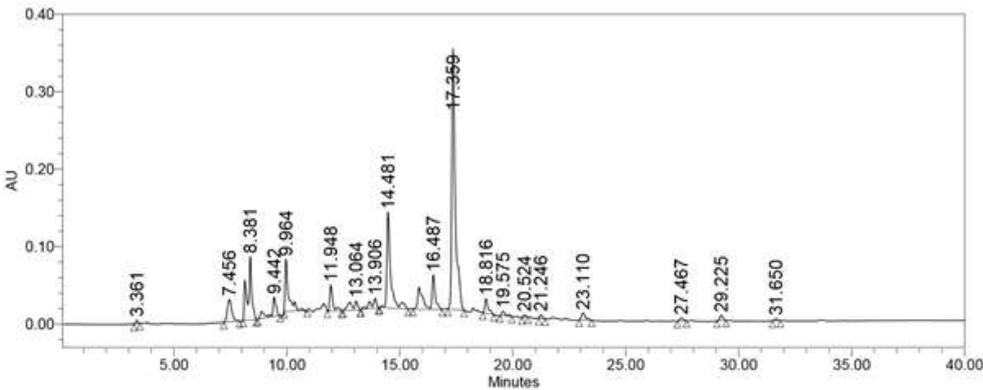
⑤ 헥산



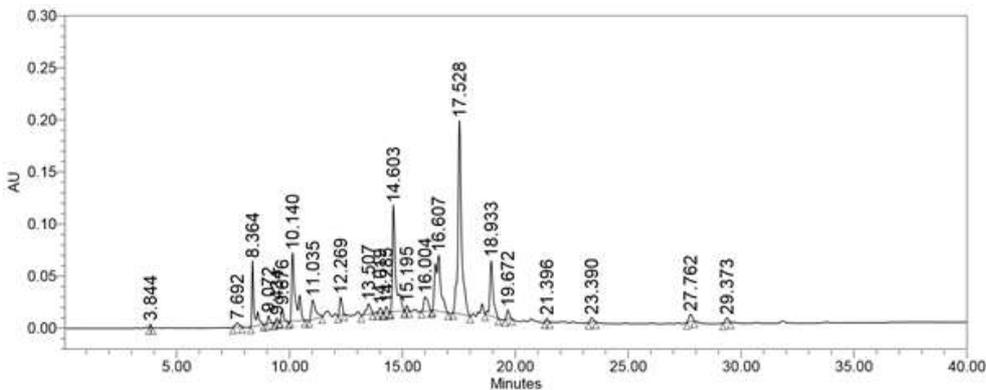
- 줄기

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 5가지 용매 추출물에서 모두 17.3 - 17.5분대 가장 큰 peak가 나타났고, 그 다음으로 14.4 - 14.6분대 peak가 주요하게 나타났다. 또한 에틸 아세테이트와 헥산의 경우 30.6분대 큰 peak가 나타나는 것을 확인하였다. 정제수와 메탄올, 부탄올 용매 추출물이 비슷한 양상을 보였고, 에틸 아세테이트와 헥산이 비슷한 peaks 패턴을 보였다.

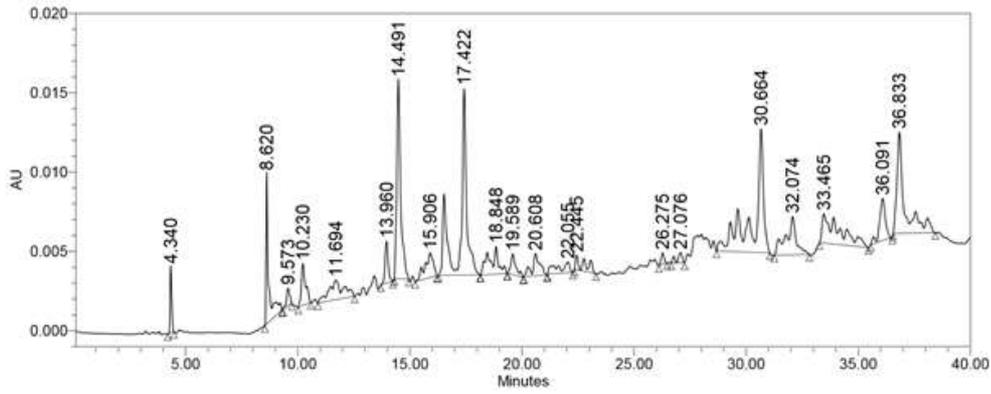
① 정제수



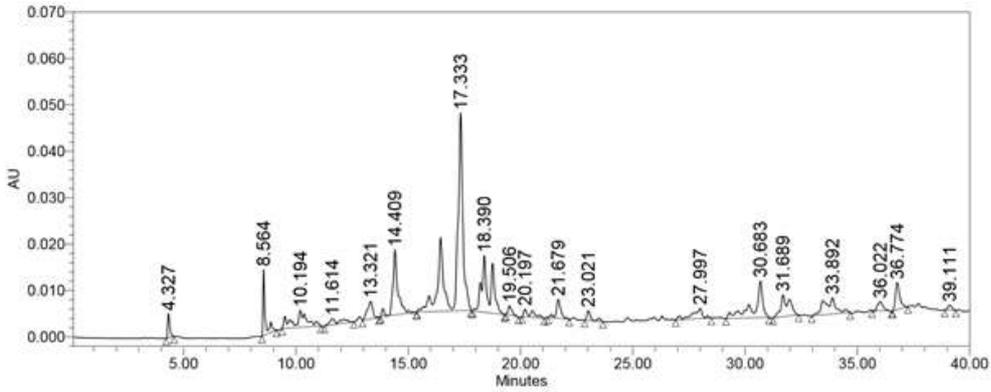
② 메탄올



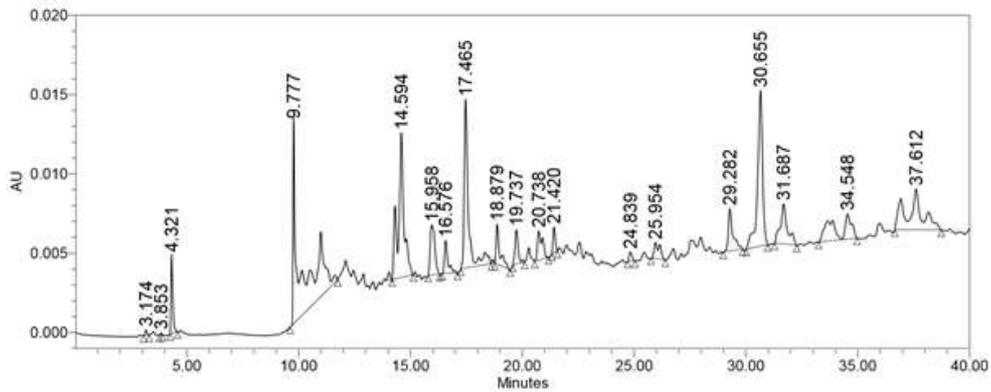
③ 에틸 아세테이트



④ 부탄올



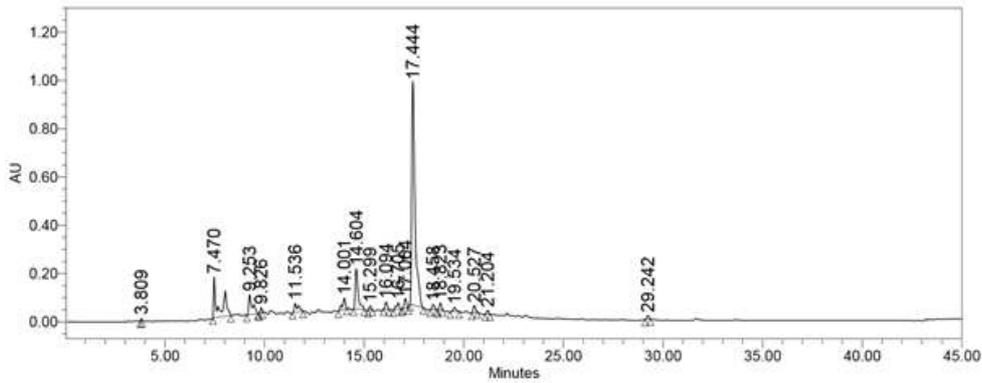
⑤ 헥산



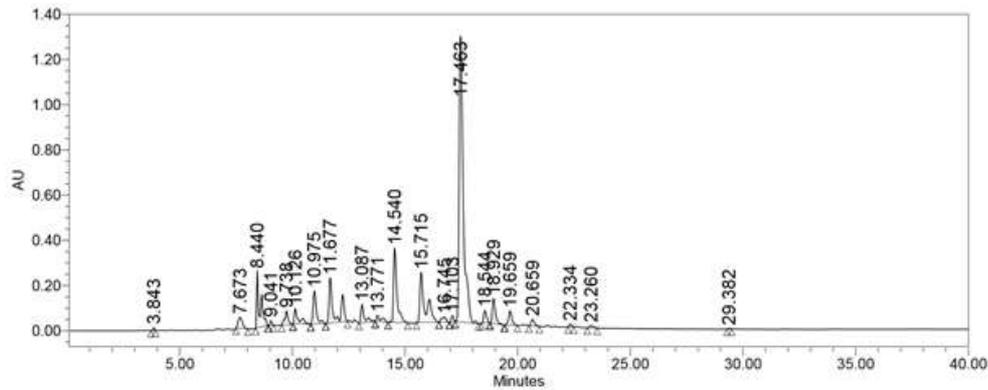
- 종자

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 부탄올을 제외한 4가지 용매 추출물에서 17.4 - 17.5 분대 주요한 peak가 나타났고, 부탄올의 경우 36.8분대 가장 큰 peak가 나타났다. 정제수와 메탄올 추출물이 비슷한 peaks 패턴을 보였고, 딱지꽃의 다른 부위에 비해 상대적으로 단일 peak를 나타내는 경향을 보였다.

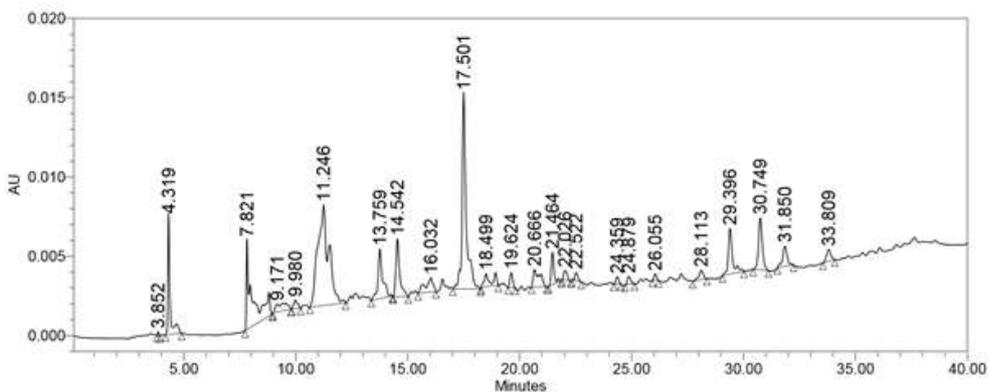
① 정제수



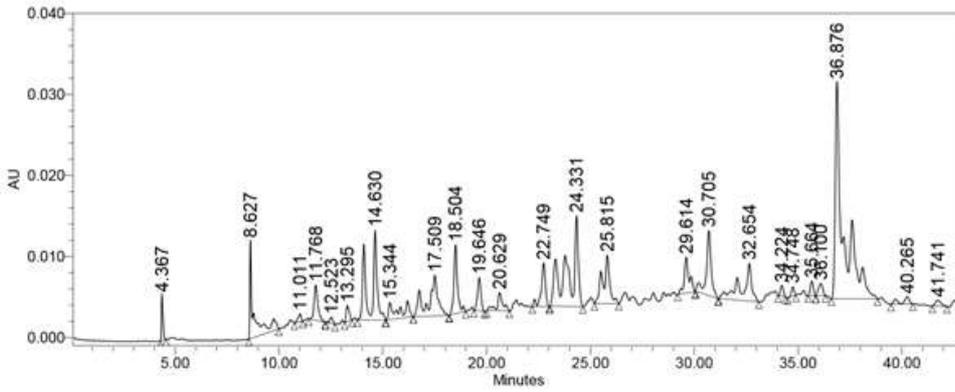
② 메탄올



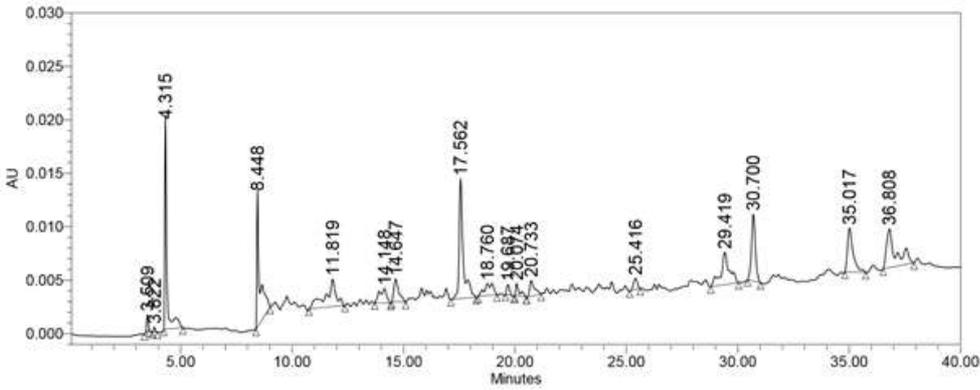
③ 에틸 아세테이트



④ 부탄올



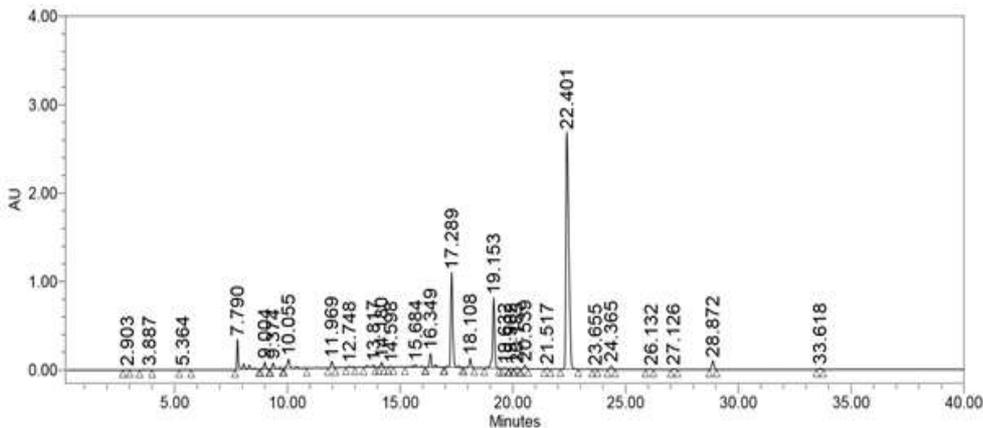
⑤ 헥산



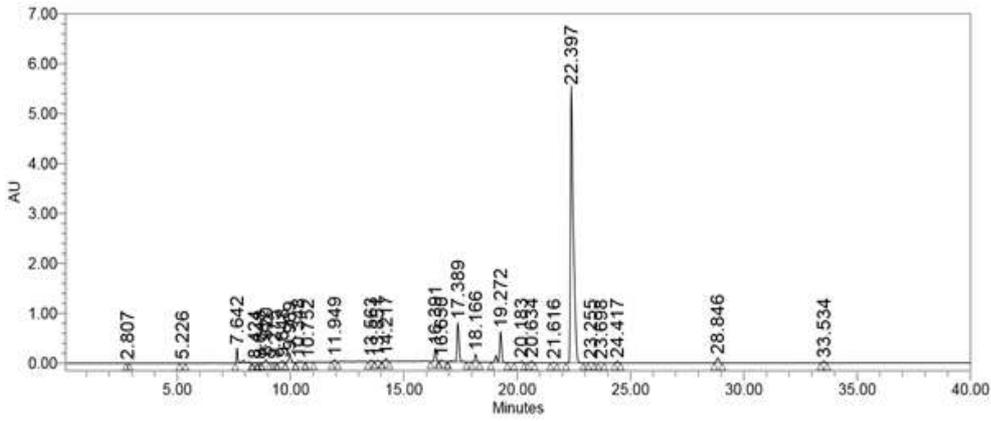
- 뿌리

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 에틸 아세테이트와 헥산을 제외하고 가지 용매에서 22.2 - 22.4분대 주요한 peak가 나오는 것을 확인하였다. 에틸 아세테이트의 경우 7.5, 16.9, 32.6분대 큰 peak가 나타났고, 헥산의 경우 7.6분대에서 큰 peak가 나타나 다른 용매 추출물과 약간 다른 경향을 보였다. 정제수와 메탄올, 부탄올은 비슷한 peak 패턴을 보였지만 주요성분의 함량은 메탄올 추출물이 가장 많음을 확인할 수 있었다.

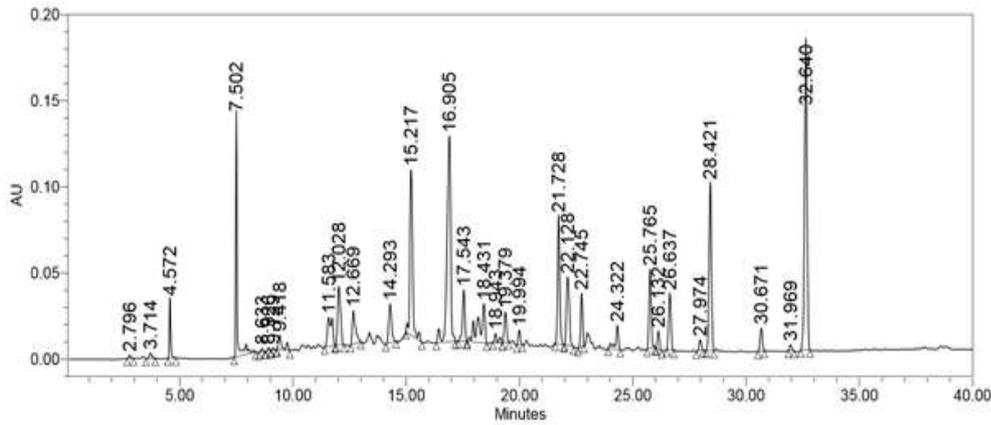
① 정제수



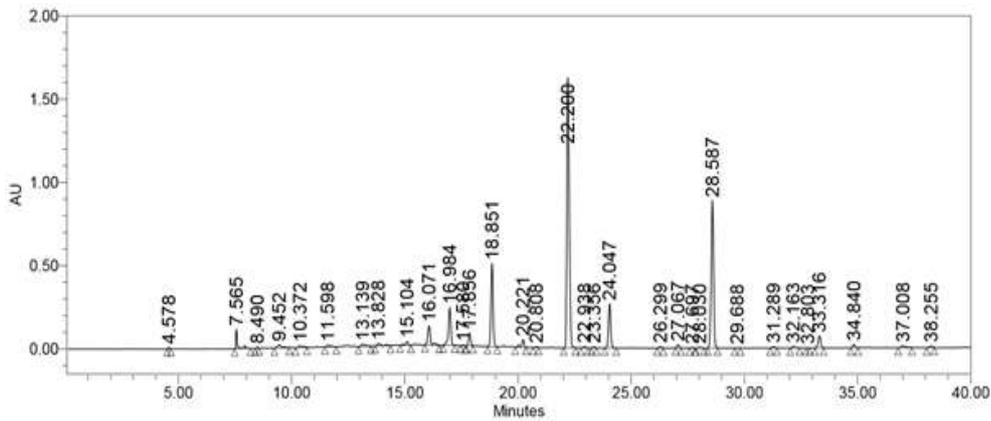
② 메탄올



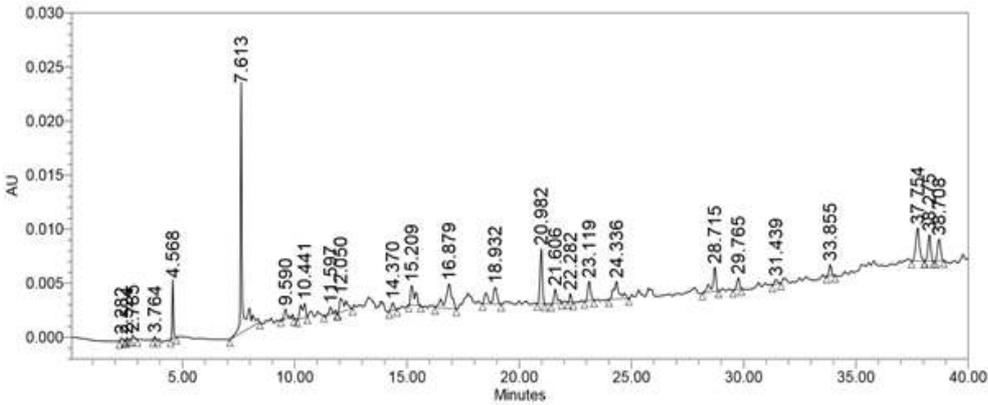
③ 에틸 아세테이트



④ 부탄올



⑤ 핵산



상기에 딱지꽃을 부위별로 추출하여 추출용매에 따른 주요성분을 분석하였다. 분석결과를 토대로 딱지꽃의 부위에 따른 주요성분 peak를 비교해보면 잎과 뿌리를 제외한 꽃, 줄기, 종자의 경우 17.3 -17.5분대에서 모두 주요 peak가 검출되었다. 반면 잎의 경우 15.5 - 15.8분대와 34.3 -34.9분대에서 주요한 peak이 나타났고, 뿌리 추출물은 22.2 - 22.4분대 큰 peak이 나타나는 것을 확인하였다. 그 밖에 줄기 추출물에서 30.6분대, 종자 추출물에서 36.8분대에 주요 peak가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 딱지꽃의 부위에 따라 주요성분에 다소 차이를 보일 것으로 예측할 수 있다.

**<지리적 특성에 따른 딱지꽃 추출물의 유효성분 비교분석>**

딱지꽃의 서식환경에 따른 식물내 유효성분의 차이를 비교하고자 위탁기관인 영농조합법인 이노플랜트를 통하여 확보한 진주에서 재배한 딱지꽃을 얻어 위와 동일한 방법으로 부위별, 용매별로 추출하여 HPLC로 주요성분을 분석하였다.

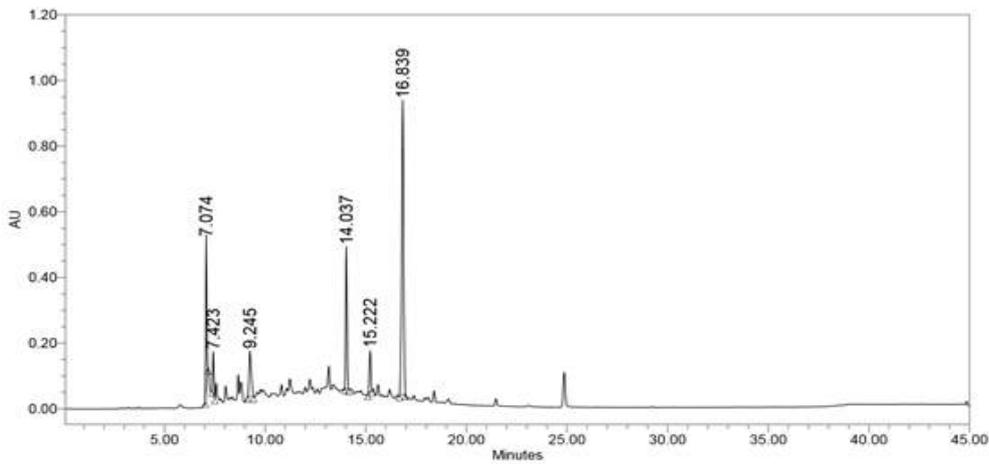




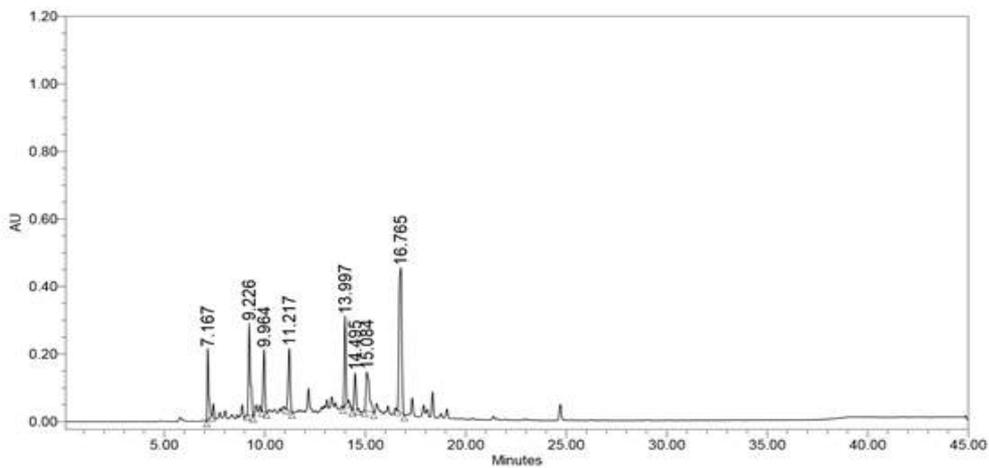
- 꽃

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 에틸 아세테이트와 헥산을 제외한 3가지 추출물의 경우 16.7 - 16.8분대 가장 큰 peak가 나타나는 것을 확인하였다. 앞의 정선 고랭지 자생 딱지꽃 꽃 추출물과 비교하면 정선 딱지꽃 꽃 추출물은 15분대 주요 peak가 나타나는데 반해 진주 딱지꽃 추출물은 16분대 주요 peak이 나와 약간의 차이를 보였고 전반적으로 정선 딱지꽃 꽃 추출물에서 더 많은 peaks를 가짐을 비교확인할 수 있다.

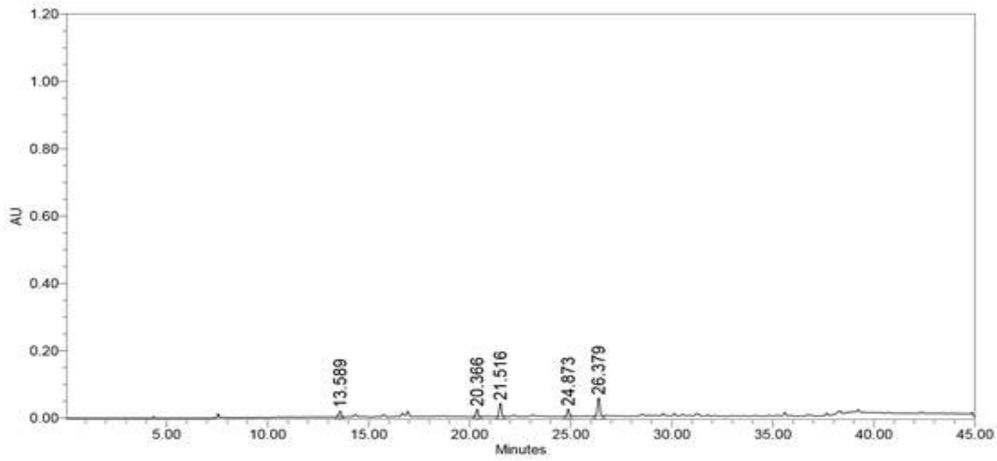
① 정제수



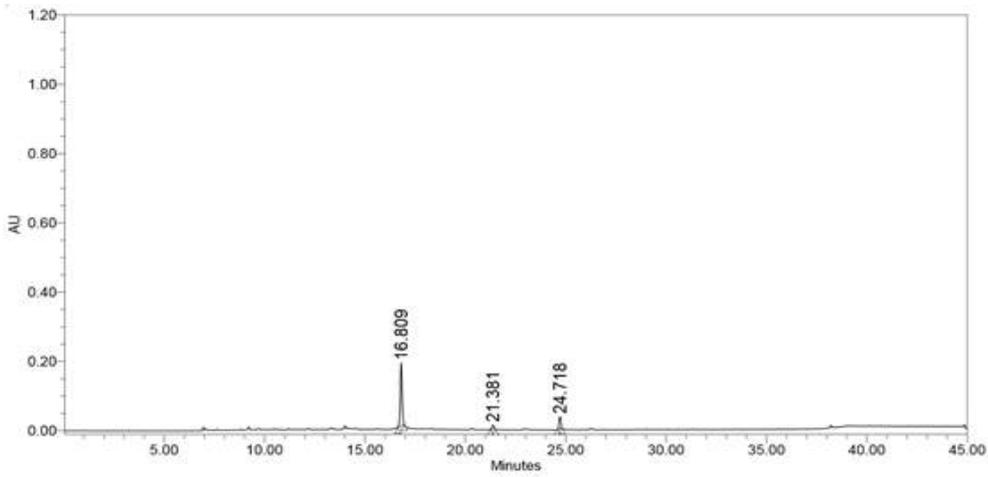
② 메탄올



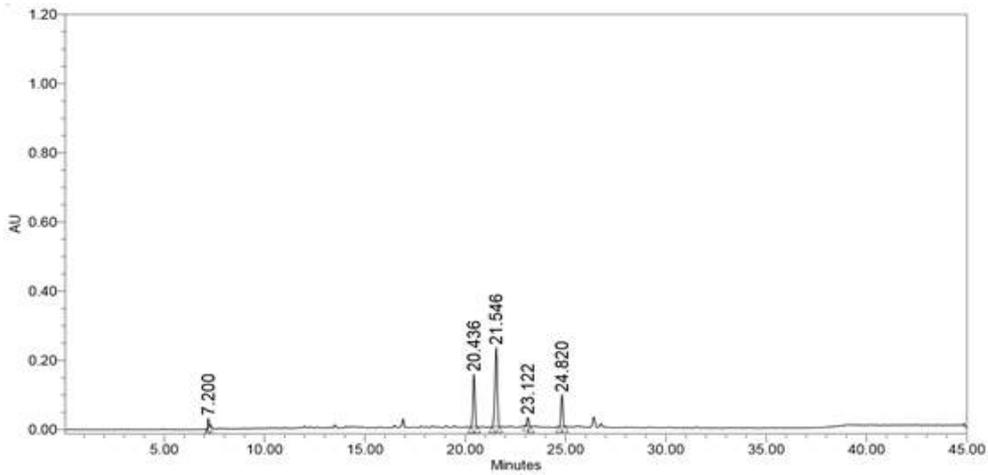
③ 에틸 아세테이트



④ 부탄올



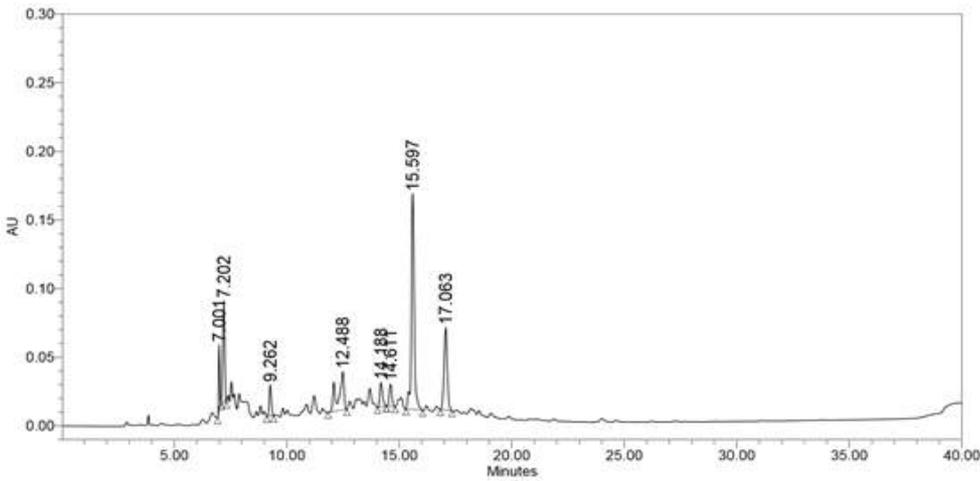
⑤ 헥산



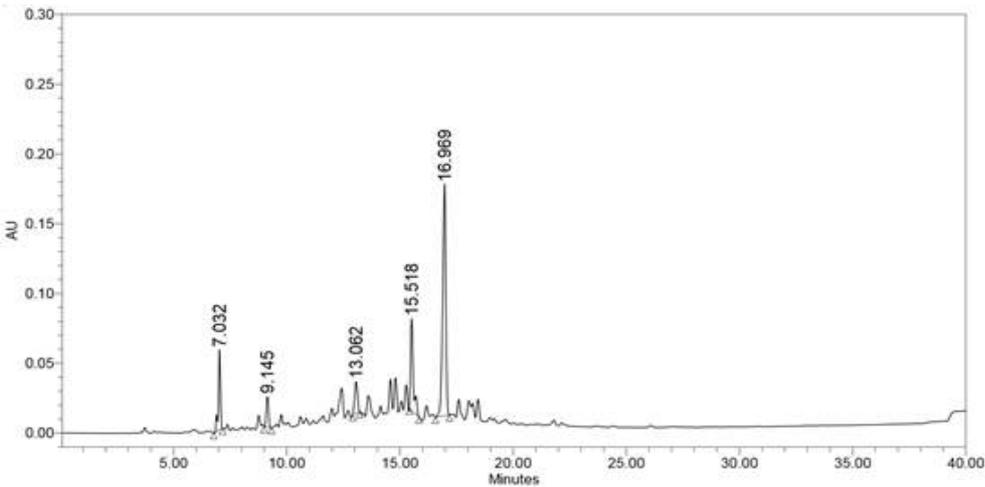
- 앞

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 정제수와 메탄올에서 15.5분대와 16.9 - 17.0분대 주요한 2개의 peaks가 나타나는 것을 확인하였고, 정제수 추출물의 경우 15.5분대의 peak이 더 크고 메탄올의 경우 그 반대로 16.9분대 peak가 크게 나타나는 것을 보았다. 반면에 에틸 아세테이트의 경우 약하게 peaks이 나타나지만 뚜렷하게 큰 peak은 없었고, 부탄올과 헥산의 경우 거의 유효성분이 없는 것과 같은 결과를 보였다. 정선 딱지꽃 잎 추출물과 비교하면 15.5 - 15.8분대 주요한 peak이 나오는 비슷한 경향을 보이지만 그 밖의 다른 peak 패턴에서는 차이를 보이는 것을 확인할 수 있다.

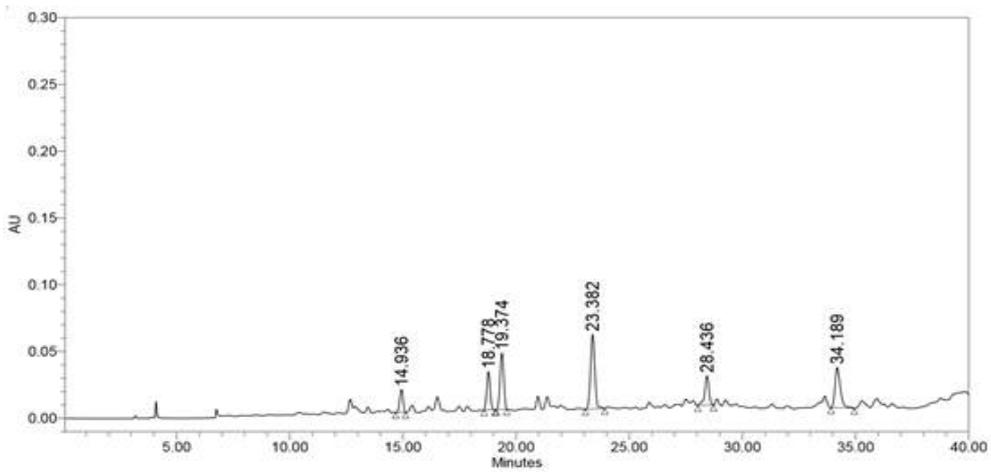
① 정제수



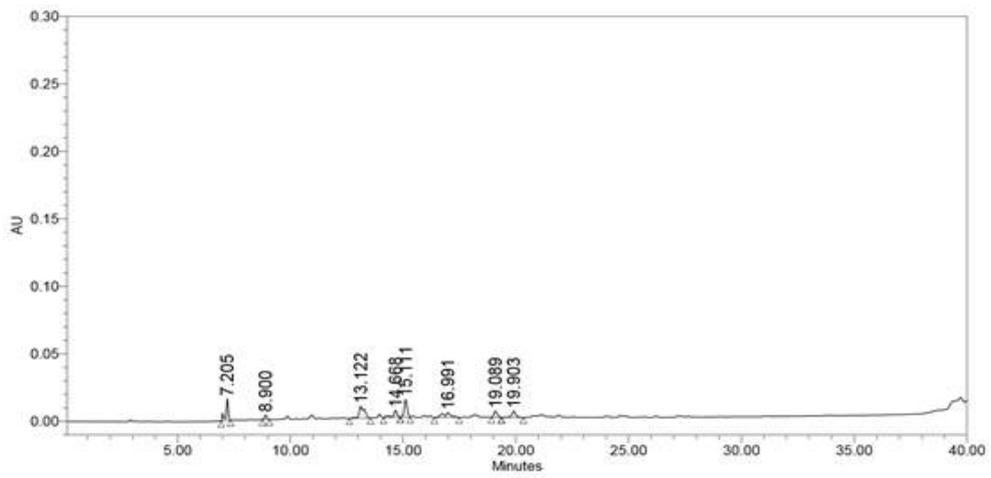
② 메탄올



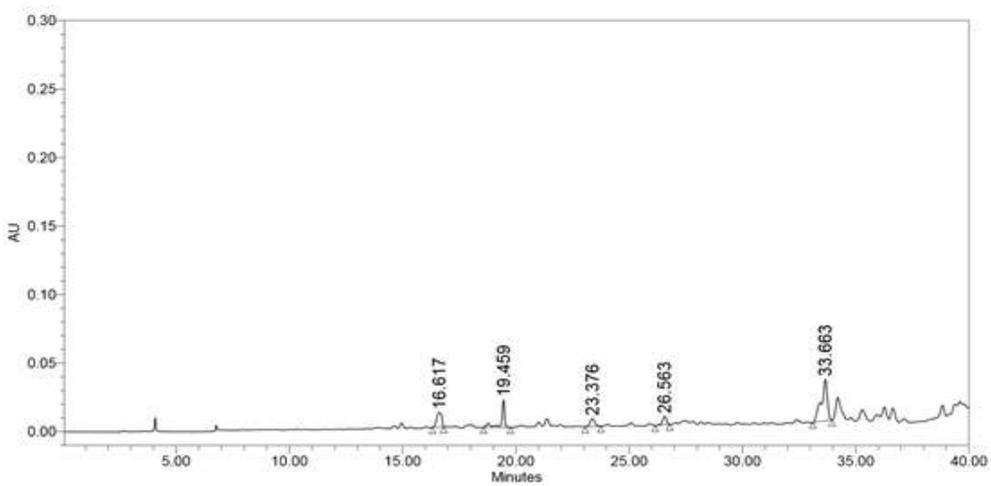
③ 에틸 아세테이트



④ 부탄올



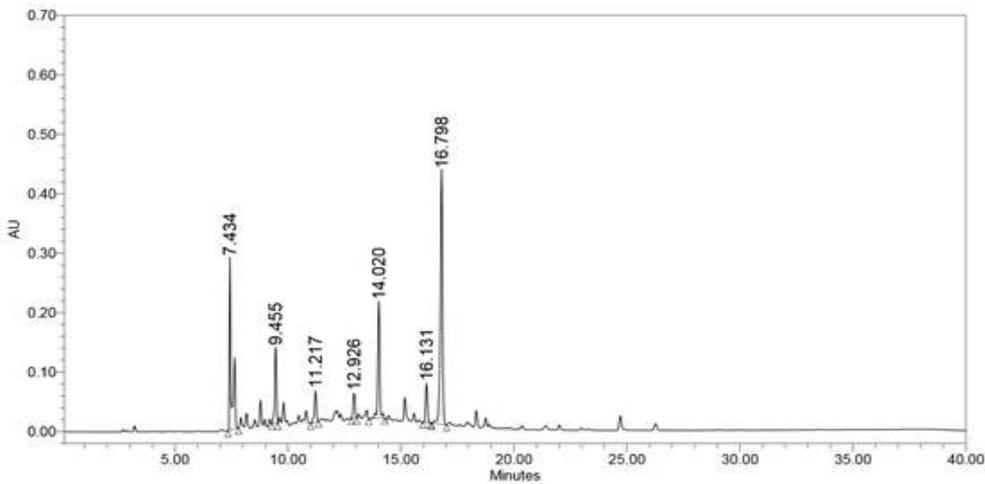
⑤ 헥산



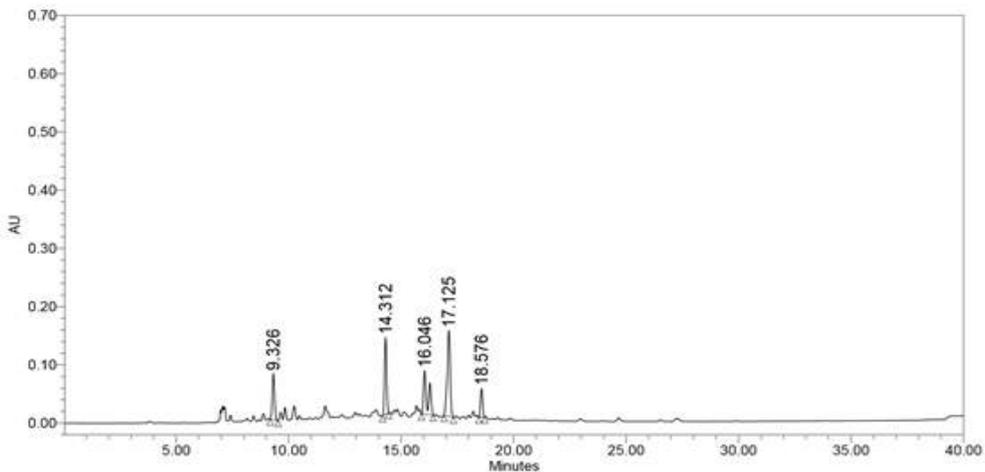
- 줄기

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 정제수 추출물에서 16.79분에 주요한 peak이 나타남을 확인하였다. 반면에 다른 4가지 추출물의 경우 특정 peak이 두드러지게 나타나지 않았다. 정선 딱지꽃 줄기 추출물과 비교해 보면 정선 딱지꽃 줄기 추출물의 경우 17.3 - 17.5분대 주요 peak이 나타났고, 진주 딱지꽃 줄기 추출물은 16.79분으로 이보다 약간 빠른 retention time을 보였다. 또한 전반적인 peak 패턴이 정선 딱지꽃 줄기 추출물에 비해 유효한 peak의 수가 감소함을 비교하였고, 이를 통해 정선 딱지꽃 줄기 추출물에 더 많은 유효성분이 존재함을 예측할 수 있다.

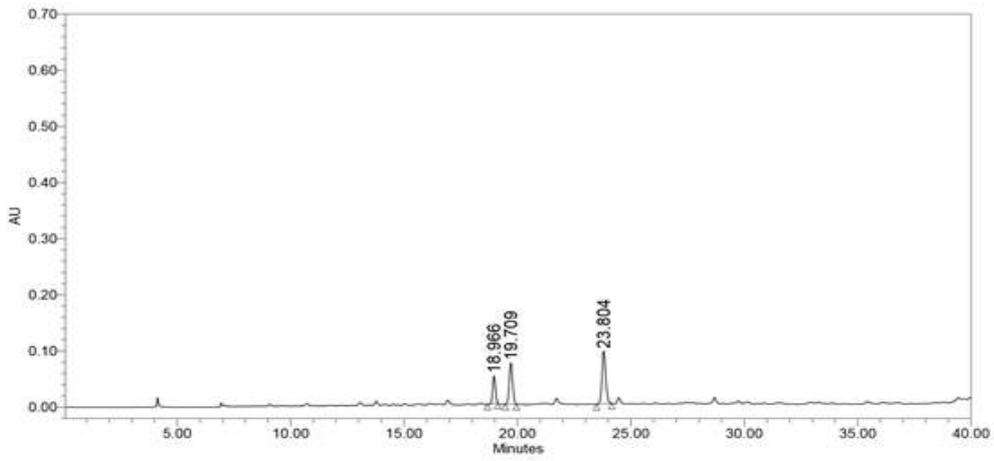
① 정제수



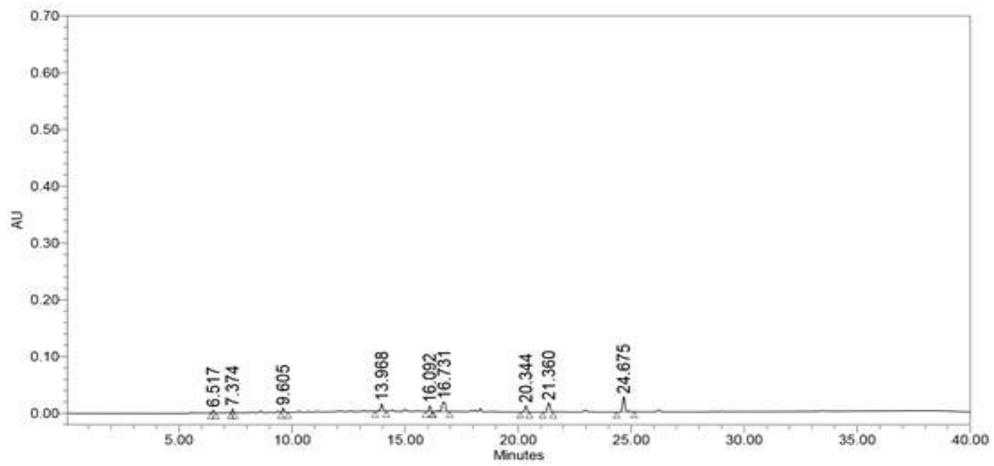
② 메탄올



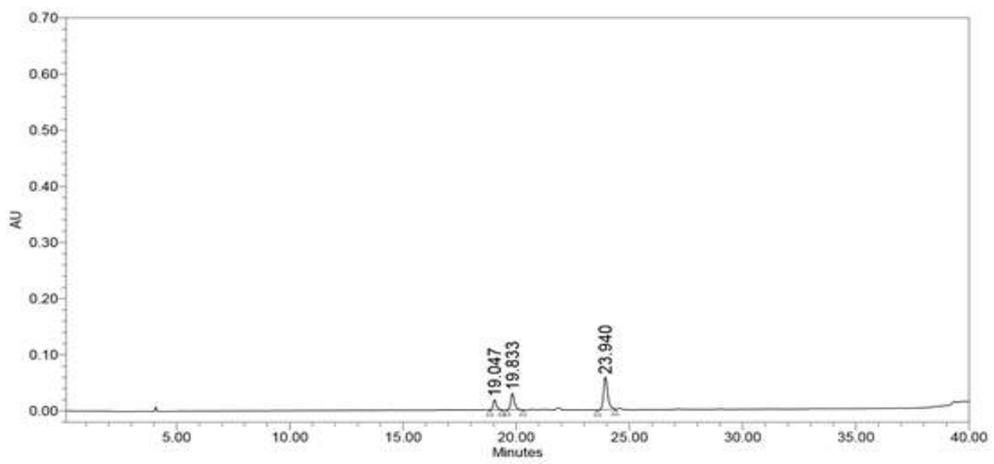
③ 에틸 아세테이트



④ 부탄올



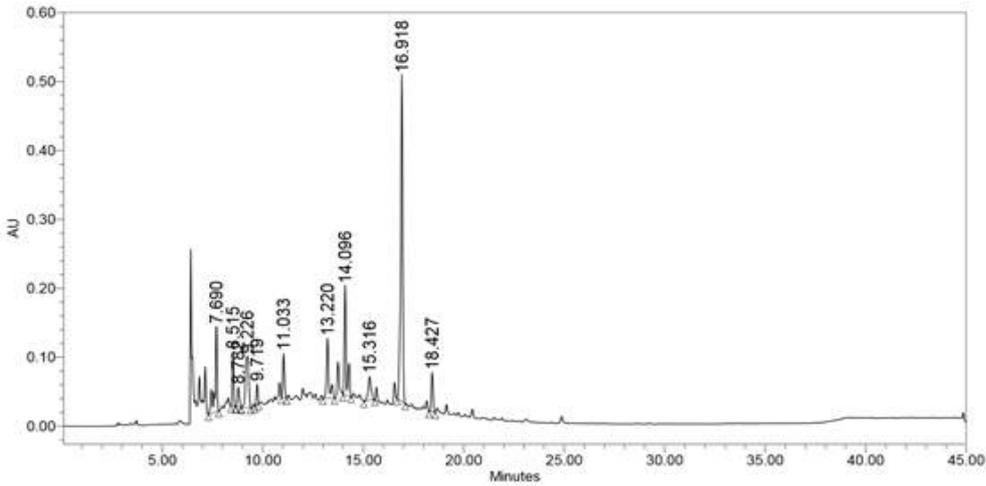
⑤ 헥산



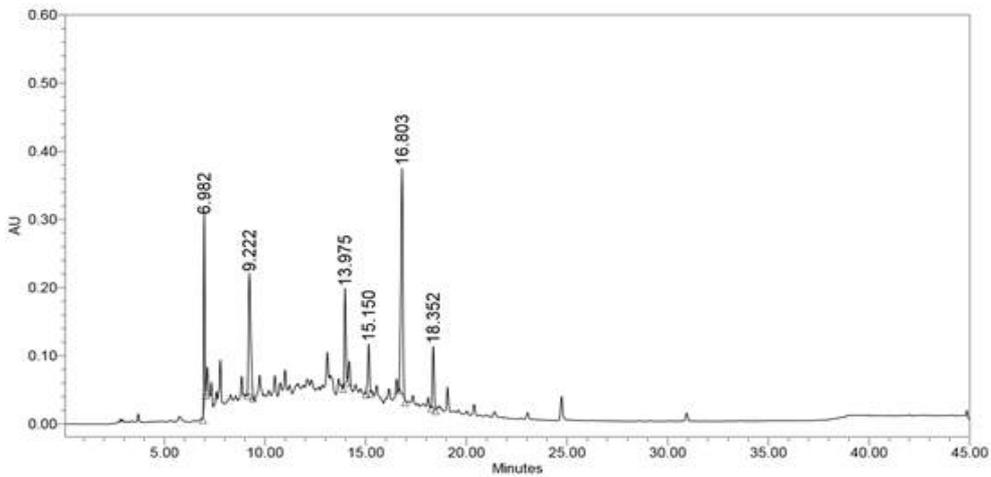
- 종자

용매별 추출물의 주요성분을 분석한 결과 에틸 아세테이트와 헥산을 제외한 3가지 용매 추출물에서 16.8 - 16.9분대 주요한 peak이 나타나는 것을 확인하였다. 또한 부탄올 추출물에서는 38 - 39분대 peaks이 나타났다. 반면에 에틸 아세테이트와 헥산 추출물에서는 뚜렷하게 증가하는 peak이 없음을 확인하였다. 정선 딱지꽃 종자 추출물 주요 peak은 17.4 - 17.5분대로 진주 딱지꽃 종자 추출물보다 약간 느린 retention time을 가짐을 알 수 있다.

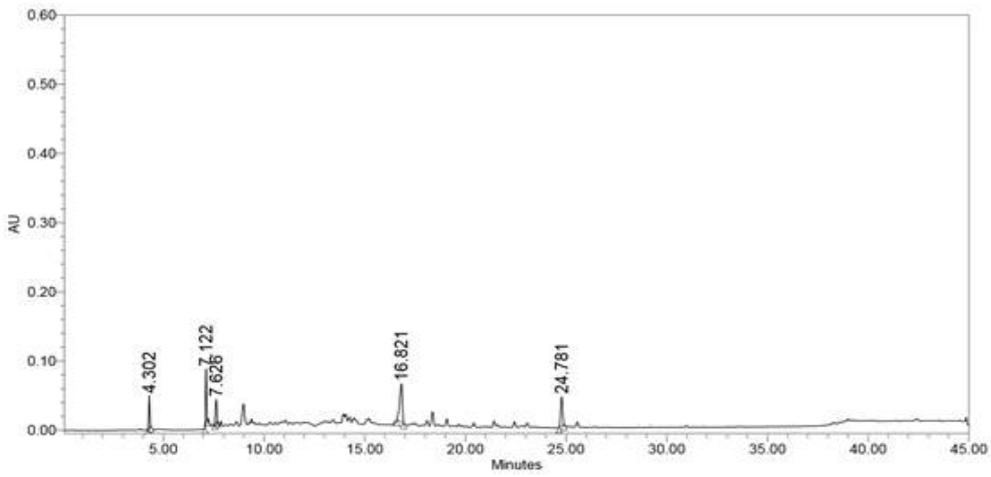
① 정제수



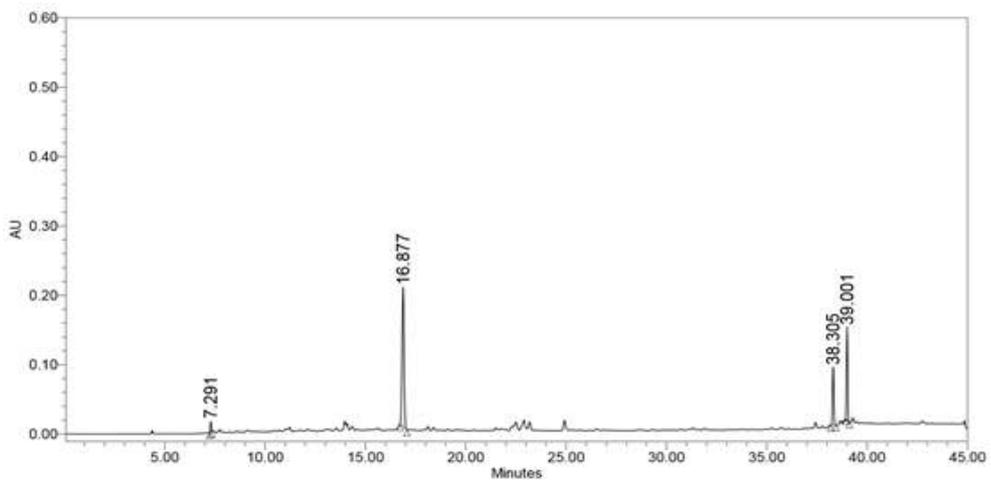
② 메탄올



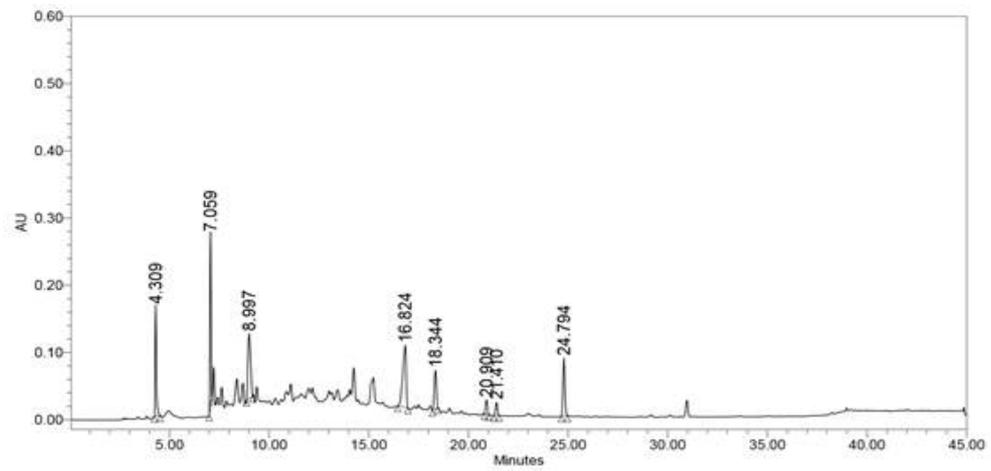
③ 에틸 아세테이트



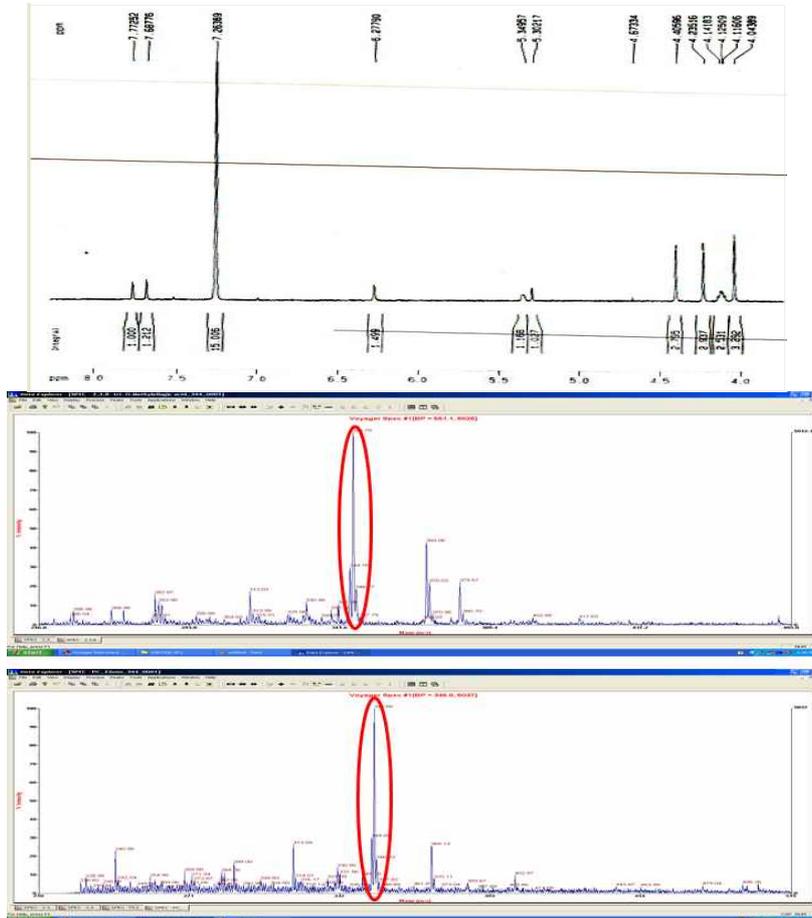
④ 부탄올



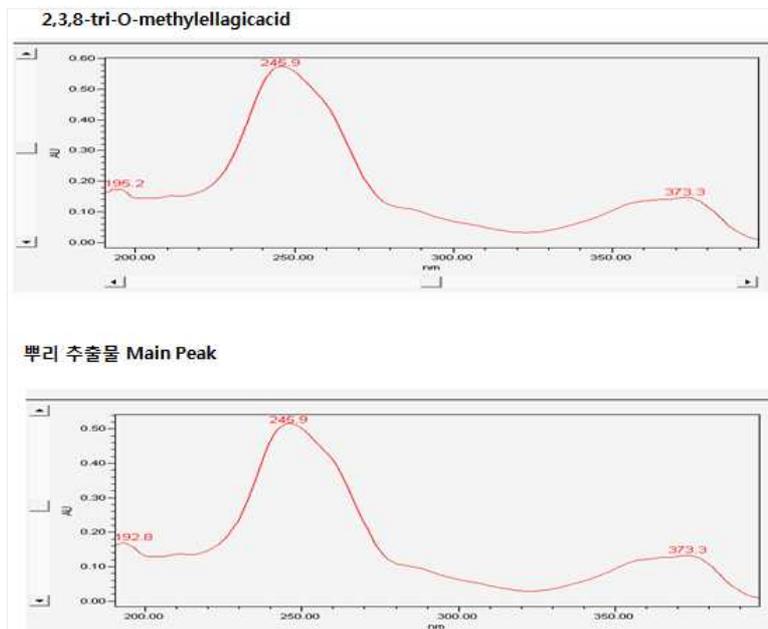
⑤ 헥산



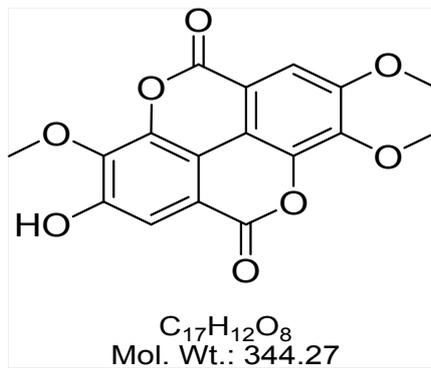




< Mass spectrum of *Potentilla chinensis* Ser. root extract's main peak and 2,3,8-Tri-O-methylelagic acid >  
 보다 명확한 구조를 확인하기 위해 자외선 분광법(UV Spectrum)을 이용하여 동일물질임을 확인하였다.



< UVspectrum of *Potentilla chinensis* Ser. root extract's main peak and 2,3,8-Tri-O-methylelagic acid ( $\lambda_{max}=245.9$  nm) >



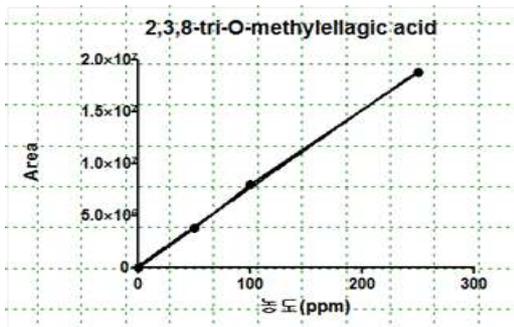
< Structure of 2,3,8-Tri-O-methylelagic acid >

< 딱지꽃 뿌리추출물에서의 2,3,8-tri-O-methylelagic acid의 함량 분석 >

용매에 따른 딱지꽃 뿌리추출물에서의 2,3,8-Tri-O-methylelagic acid의 함량을 분석하기 위해 표준품을 100, 200, 300 ppm농도로 제조 후 HPLC로 분석한 다음 동일한 조건에서 용매별 추출물을 분석하여 검량검선을 이용하여 함량을 확인하였다.

함량 확인 결과 메탄올 643.5ppm, 물(3차 증류수) 319.0 ppm, 부탄올 153.1 ppm, 에칠아세테이트 2.8 ppm, 헥산 0 ppm등으로 극성용매에서 보다 많이 추출됨을 알 수 있었다.

2,3,8-Tri-O-methylelagic acid concentration of *Potentilla chinensis* Ser. root extract

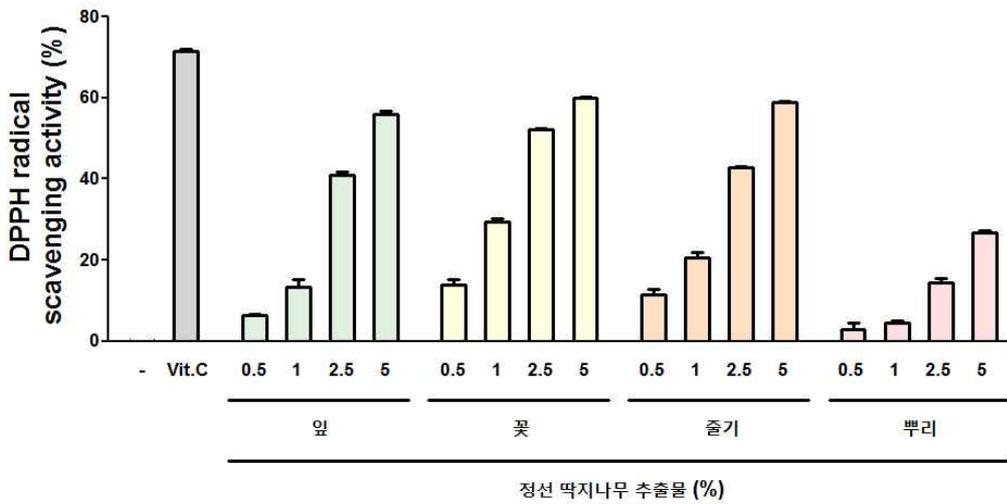


		X	A
		X Total	Data Set-A
	*	X	Y
1	3차수	319.013	2.405e+007
2	MeOH	643.512	4.838e+007
3	EA	2.837	344245.000
4	Butanol	153.123	1.161e+007
5	Hex	-1.694	4549.000

나. 정선 고랭지 자생 딱지꽃 추출물 소재의 피부세포 효능평가

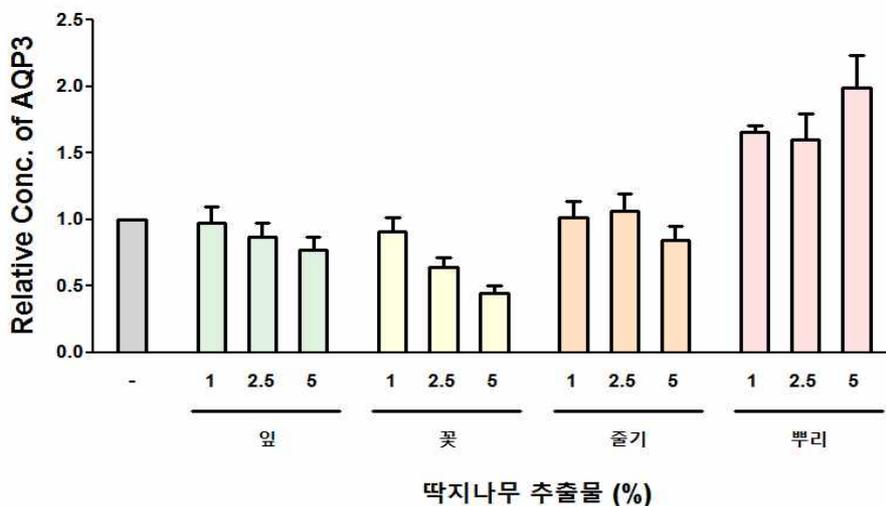
효능평가는 정선 고랭지 자생 딱지꽃의 꽃, 잎, 줄기, 뿌리 4가지의 부위별 열수 추출물로 진행하였다. 용매별 추출물의 HPLC 분석 결과 대부분에서 용매에 따른 큰 차이 없이 주요 peak이 비슷한 retention time을 보였고, 피부세포 처리시 용매의 영향을 최소화하기 위해 부위별 열수 추출물을 딱지꽃 추출물의 효능평가 시료로 사용하였다.

■ DPPH 자유라디칼 소거능을 통한 항산화 시험



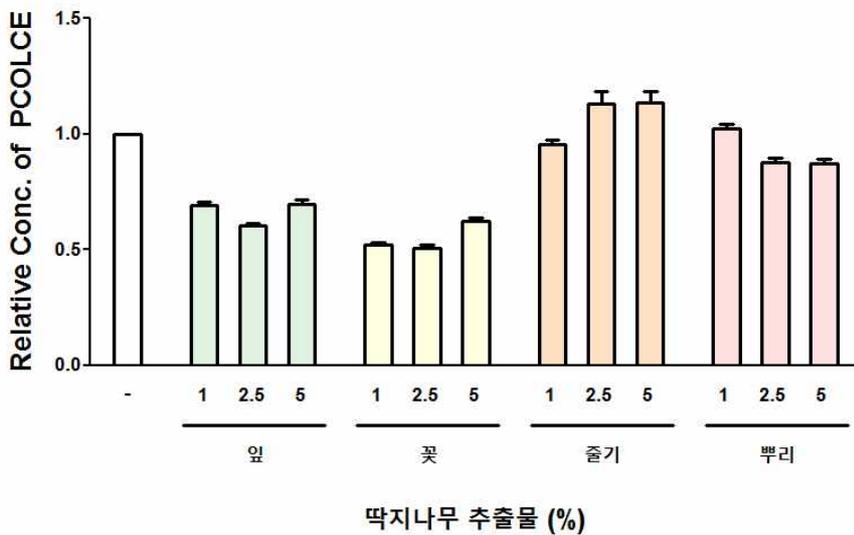
딱지꽃을 부위별로 열수 추출하여 얻은 추출물의 항산화 효과를 시험하고자 DPPH radical scavenging activity assay를 수행하였다. 그 결과 4가지 부위별 추출물 모두 처리농도가 증가할수록 DPPH radical scavenging activity가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 뿌리를 제외한 잎, 꽃, 줄기의 경우 5%의 농도로 처리하였을 때 약 60%정도의 우수한 자유라디칼 소거능을 보였다. 반면에 뿌리 추출물의 5% 농도로 처리하면 약 20% 정도의 자유라디칼 소거능을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 뿌리를 제외한 나머지 3가지 부위에서 우수한 항산화 효과를 가짐을 알 수 있다.

■ 보습 관련 AQP3 발현 비교 시험



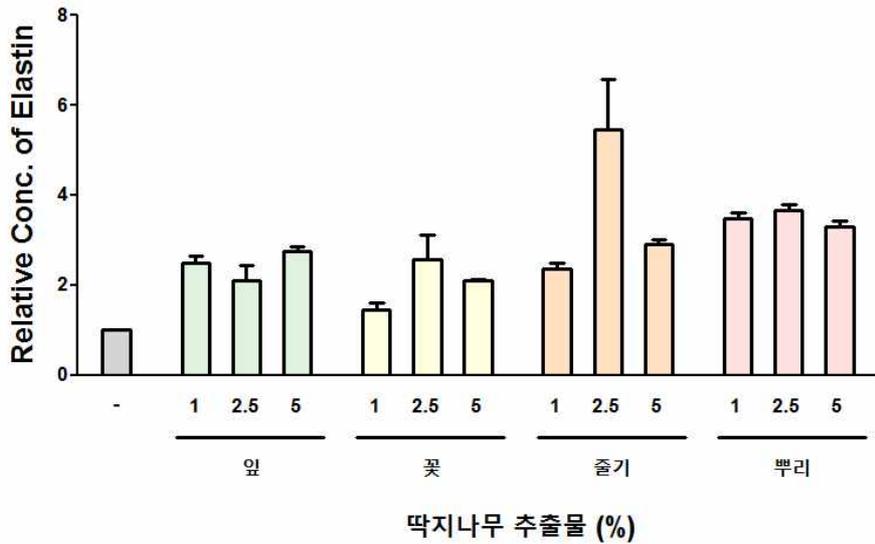
딱지꽃 추출물의 보습 관련 효능을 평가하고자 딱지꽃 부위별 열수추출물에 의한 AQP3의 발현을 비교하였다. 그 결과 잎, 꽃 추출물은 처리농도가 증가할수록 AQP3의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 줄기 추출물의 경우 AQP3의 발현에 크게 영향을 미치지 않았다. 반면에 뿌리 추출물의 경우 처리농도가 증가할수록 AQP3의 발현이 증가하는 양상을 보였고, 5%로 처리한 경우 약 2배정도 AQP3의 발현이 증가하는 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 통해 딱지꽃 추출물은 부위에 따라 효과가 차이를 보이며 꽃 추출물의 경우 AQP3 발현을 감소시키지만 뿌리 추출물은 AQP3의 발현을 약 2배까지 증가시켜 보습에 좋은 효과가 있음을 예상할 수 있다.

- 콜라겐 합성에 관한 유전자(PCOLCE, Elastin) 발현 시험
  - Procollagen C-endopeptidase enhancer(PCOLCE)



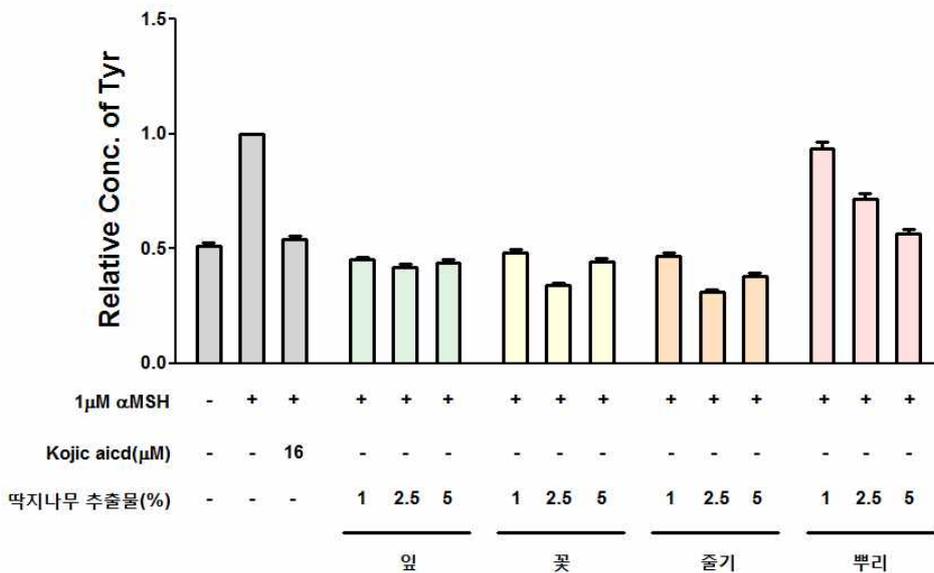
딱지꽃 추출물의 주름 개선 효능을 시험하고자 각각의 부위별 추출물의 procollagen 합성에 관여하는 PCOLCE의 발현을 확인하였다. 그 결과 잎, 꽃 추출물을 처리한 경우 PCOLCE의 발현이 감소하는 것을 확인하였고, 뿌리 추출물의 경우 PCOLCE의 발현에 큰 영향을 주지 않았다. 반면 줄기 추출물의 경우 처리농도가 증가할수록 PCOLCE의 발현이 약간 증가하였고, 5%의 농도로 처리하였을 때 약 15%정도 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 확연하게 발현이 증가하지 않아 효과가 있다고 말하기 어렵다. 상기의 결과를 통해 딱지꽃 추출물이 주름 개선을 위한 procollagen 합성에 큰 효과가 없음을 예상할 수 있다.

· Elastin



주름 개선 효능을 평가하기 위해 딱지꽃을 부위별 열수 추출물을 처리하여 피부세포에서 elastin의 발현을 비교하였다. 그 결과 모든 추출물에서 대조군보다 elastin의 발현이 증가하였다. 잎 추출물, 꽃 추출물은 각각 약 3, 2.5배정도 증가하였고, 줄기 추출물은 2.5%로 처리하였을 때 약 5배정도 증가하였다. 또한 뿌리 추출물의 경우 약 4배정도 elastin의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과를 통하여 딱지꽃의 잎, 꽃, 줄기, 뿌리 추출물에서 모두 elastin의 발현을 증가시키므로 주름 개선에 효과적일 것으로 예상되고 특히 줄기 추출물이 우수한 효능을 가짐을 알 수 있다.

■ 미백 관련 유전자(Tyrosinase)의 발현 시험



딱지꽃 추출물의 미백관련 효능을 평가하고자 각각 부위별 추출물의 tyrosinase 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 효능평가를 진행한 결과 잎, 꽃, 줄기, 뿌리 추출물 모두 tyrosinase 발현을 저해시킴을 확인하였다. 잎, 꽃, 줄기 추출물의 경우 tyrosinase 발현을 50% 이상 저해하는 것을 보았고, 뿌리 추출물의 경우 처리 농도가 증가할수록 tyrosinase 발현이 감소하였고 약 40% 정도 감소하였다. 위와 같은 결과를 통해 딱지꽃 추출물이 미백에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

#### [효능평가 요약]

요약하면, 그 동안 좋은 활성에도 불구하고 산업적응용이 거의 되지 않았던 딱지꽃 뿌리 추출물을 피부세포에 처리함에 따라 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다. 딱지꽃 뿌리 추출물 처리시 30% 정도 COX-2 발현양을 조절함에 따라 염증억제효과를 확인하였고, 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1의 발현을 40%정도 저해하고 엘라스틴 발현양을 3배 정도 증가시킴으로써 주름개선 효과를 확인하였다. 또한 보습에 주요한 막단백질인 AQP-3 발현양을 2배 증가시킴으로써 보습효과를 확인하였고 melanin 양을 40% 정도 감소시킴에 따라 미백효과를 확인하였다. 따라서 딱지꽃 뿌리 추출물이 항염증, 주름개선, 보습 그리고 미백 효과를 보임에 따라 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

## 제 2협동기관 : 배성영농조합법인

과 제 명	딱지꽃 대량재배기술 정립 및 화장품 제형연구를 통한 시제품 생산
-------	-------------------------------------

### ○ 협동 과제의 목표

- 강원도 정선 고랭지 자생식물인 딱지꽃의 우수종의 육종을 통한 대량재배
- 부위별 추출물질을 분석하고, 노화된 피부의 개선을 유도하는 안티 에이징 화장품 개발

### ○ 연구내용

<ul style="list-style-type: none"> <li>- 강원도 정선 고랭지 자생식물인 딱지꽃의 육종, 식물자원 수집 및 포장 조성</li> <li>- 대량 재배된 딱지꽃으로부터 부위별 및 추출용매에 따른 성분분리, 정제 공정 기술개발</li> <li>- 딱지꽃 추출물로부터 분리·정제된 지표물질 확인을 통한 유효성 평가 ( 다양한 스트레스 요인에 의해 상처 받은 피부세포 기능 회복)</li> <li>- 딱지꽃 추출물의 화장품 원료로서의 적용유무 판단을 위한 독성 및 효능 평가</li> </ul>
--

### □ 연구결과

#### 1. 고랭지 자생 딱지꽃 식물의 노지 대량 재배 및 원료공급

	<p>비닐하우스 설치 자재 입고</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 비닐하우스 100평</li> <li>- 스프링 쿨러 설치</li> </ul>
	<p>비닐하우스 설치후 딱지꽃 파종 작업</p>



딱지꽃 파종후 수경 재배 전경



대량재배 부지정지 및 부직포 설치작업



천연거름 입고 및 살포작업



딱지꽃 성수기 모습

## 2. 주름 개선 인체적용 임상시험

## 1) 임상시험 : 신뢰성 보증 확인서

### 신뢰성 보증 확인서

시 험 명 : 배성영농조합법인 아리아리 딥 모이스처라이징 바이탈 에센스 및  
아리아리 컴플리트 리페어 바이탈 크림 병행 사용의 눈기주름 개선  
효과 인체적용 시험에 관한 연구

시험 번호 : EL-150421187A026

본 연구는 표준작업지침서에 따라서 연구책임자에게 보고서를 제출하였으며, 신  
뢰성 보증업무 책임자가 점검하였다.

단계	날짜
시험계획서 승인일	2015년 4월 30일
기관생명윤리위원회 심의면제 통과	2015년 4월 30일
시험기간	2015년 5월 6일 ~ 2015년 6월 2일
데이터 점검	2015년 6월 8일
보고서 초안 검수	2015년 6월 15일
최종 보고서 검수	2015년 6월 19일
연구책임자의 보고일	2015년 4월 30일, 2015년 6월 2일 2015년 6월 15일, 2015년 6월 19일

본 연구는 식품의약품안전처의 화장품 인체적용 시험 가이드라인에 따라서 실시  
하였고, 엘리트의 시험 계획서 및 표준 작업 지침서에 따라 시험을 정확하게  
실시하였으며, 보고된 결과는 기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 확인함.

2015년 6월 19일  
신뢰성 보증 책임자

공학박사 김보라



본 서류는 엘리트의 보안관리서로서 엘리트에 그 소유권이 있으며, 제3자에게 무단으로 양도, 도용, 공개 및 복사를 금합니다.

## 2) 임상실험 연구결과 요약서

### 연구결과 요약서

연구 제목	배성영농조합법인 아리아리 딥 모이스처라이징 바이탈 에센스 및 아리아리 컴플리트 리페어 바이탈 크림 병행 사용의 눈가주름 개선효과 인체적용 시험에 관한 연구
보고 번호	EL-150421187A026
의뢰 기관	배성영농조합법인 강원도 정선군 정선읍 동강로 2501-2
연구 기관	㈜엘리드 경기도 성남시 분당구 황새울로 325
연구 기간	2015년 4월 30일 ~ 2015년 6월 19일
시료 명	아리아리 딥 모이스처라이징 바이탈 에센스 및 아리아리 컴플리트 리페어 바이탈 크림
시험 방법	<p>㈜엘리드 표준 운용 절차 (EL-P-7400)에 따라 시험함</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 시험 대상자: 23명 (30~60세, 여성)</li> <li>2) 시험기간: 4주 (사용 전, 사용 2주 후, 사용 4주 후)</li> <li>3) 시료 사용방법: 1일 2회 (아침, 저녁) 세안 후 평소 사용하던 기초제품으로 피부를 정돈하고, 에센스-크림 순으로 눈가 지경 부위에 발라준다.</li> <li>4) 평가 방법: <ul style="list-style-type: none"> <li>- PRIMOS High Resolution 를 이용한 눈가주름 평가</li> <li>- 시험 대상자에 의한 주관적 설문평가</li> <li>- 피부과 전문의와 시험 대상자에 의한 이상반응 평가</li> </ul> </li> </ol>
연구 결과	<p>배성영농조합법인에서 의뢰한 아리아리 딥 모이스처라이징 바이탈 에센스 및 아리아리 컴플리트 리페어 바이탈 크림은 PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 부위의 Roughness 변수 별 측정값을 분석한 결과 Ra값의 경우 시료 사용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 (<math>p &lt; 0.05</math>)으로 사용 2주 후, 사용 4주 후 각각 4.07%, 5.26% 감소하였으며, Rt값의 경우 시료 사용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 (<math>p = 0.05</math>)으로 사용 2주 후, 사용 4주 후 각각 3.17%, 6.05% 감소하였다. 따라서 시료는 사용 2주 후, 사용 4주 후 눈가주름 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.</p> <p>배성영농조합법인에서 의뢰한 시료는 평가 기간 동안 특별한 피부 이상반응[itching (가려움) 등의 환자가 호소하는 증상과 vesicle (수포) 등의 인체적 징후]을 나타나지 않았다.</p>
보고서 작성일	2015년 6월 19일
연구책임자	피부과 전문의                      문태기
신뢰성보증책임자	공학박사                              김보라
연구자	정호영 / 박정준



### 3) 임상실험 눈가주름 부위 Rt 측정값

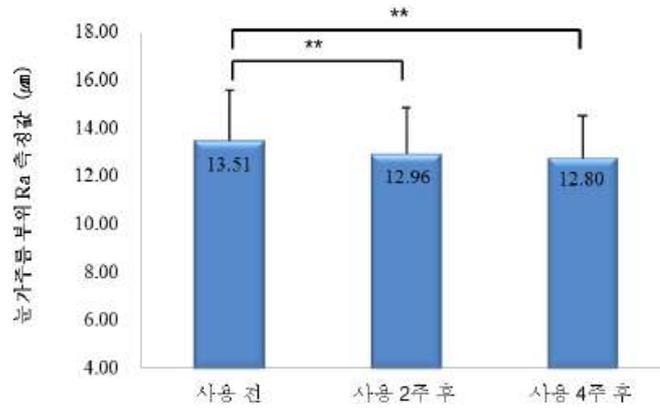


그림 2. 눈가주름 부위의 Ra 측정결과

Probability p (Repeated measures ANOVA, significant: \*\* $p < 0.01$ )

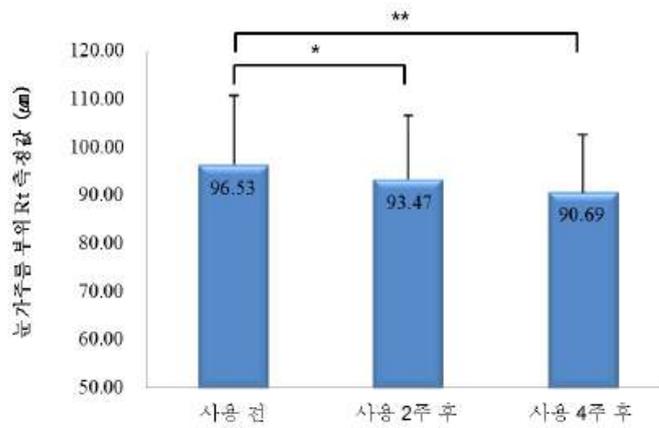


그림 3. 눈가주름 부위의 Rt 측정결과

Probability p (Repeated measures ANOVA, significant: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )



### 3) 임상시험 시험대상자 정보

#### 1. 시험 대상자 기본정보

본 인체적용 시험에 참가한 사람은 최종 23명의 여성으로 시험 대상자의 평균연령은 다음과 같다.

표 1. 시험 대상자 정보

등록 시험 대상자 (명)	23 명
최종 완료 시험 대상자 (명)	23 명
평균연령 (표준편차)	50.0 (3.5)
성별	여

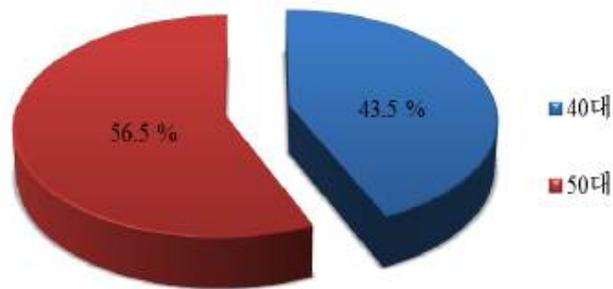


그림 1. 시험 대상자 연령별 구분

# 딱지꽃 추출물 함유한 재형에 대한 안정성 평가

연구방법 : 인체 적용 시험

## 연구방법

### 1. 인체적용 시험일정 및 시험 방법 개요

시험 대상자는 본 인체적용 시험기간 중 ㈜엘리드에 총 3회 (인체적용 시험 시트 사용 전, 사용 2주 후, 사용 4주 후) 방문하였다.

시험 대상자는 방문 12시간 전부터 기초제품 사용 및 화장을 금지하였다. 인체적용 시험은 공기의 이동이 없고 직사광선이 없는 항온항습 (20 ~ 24°C, 40 ~ 60% RH) 조건에서 시행하였으며, 세안 한 후 30분간 항온항습 조건에서 안정을 취하고 시험을 진행하였다. 측정은 아래와 같은 순서로 진행하였다.

1) 첫 번째 방문 (시트 사용 전): 첫 방문 시 시험 대상자는 연구자로부터 연구에 대한 목적과 개요, 시험 방법 및 인체적용 시험 참가에 따른 위험성과 피부 이상반응에 대하여 충분한 설명을 들은 후 자신의 인적 사항과 인체적용 시험 연구 동의서를 작성하고 성별, 연령, 연락처 및 병력과 같은 시험 대상자의 기초정보와 자신의 피부상태에 대한 설문지를 작성하였다.

- PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 평가
- 시트 지급 및 시트 사용 방법 설명
  - 시트 사용방법 : 1일 2회 (아침, 저녁) 세안 후 평소 사용하던 기초제품으로 피부를 정돈하고, 에센스-크림 순으로 눈가 지정 부위에 발라준다.

2) 두 번째 방문 (사용 2주 후):

- PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 평가
- 시험 대상자에 의한 주관적 설문평가
- 피부과 전문의와 시험 대상자에 의한 이상반응 평가

3) 세 번째 방문 (사용 4주 후):

- PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 평가
- 시험 대상자에 의한 주관적 설문평가



본 서부는 ㈜엘리드의 보안문서로서 ㈜엘리드에 그 소유권이 있으며, 제6자에게 무단으로 양도, 도용, 공개 및 복사를 금합니다.

## 피부과 전문의 평가

### 1. 통계분석 방법

- 1) 통계분석 결과는 95% 신뢰구간에서 시료 사용 전/후 간의 유의성 여부를 Repeated measures ANOVA를 통해 가설 평균 5%( $p < 0.05$ )로 확인 하였다.
- 2) 통계분석 프로그램은 SPSS statistic 21(SPSS,Chicago,IL,USA)Software를 이용하였다

### 2. 피부과 전문의와 시험 대상자에 의한 이상반응 평가

피부과 전문의는 시험 대상자의 피부 이상반응 여부를 면밀히 관찰하고 이상반응이 나타날 시 중증도에 따라 등급을 표시 하였다. 이상반응에 대한 평가는 erythema (홍반), edema (부종), scaling(인설), itching(가려움), stinging(자통), burning(작열감), tightness (뻣뻣함), prickling (따끔거림) 등의 유무를 함께 판정 하였다.

#### ▶ 시험대상자 피부 이상반응 유무

	없음(0)	약함(1)	중등도(2)	심함(3)
erythema (홍반)	23			
edema (부종)	23			
scaling (인설)	23			
itching (가려움)	23			
stinging (자통)	23			
burning (작열감)	23			
tightness (뻣뻣함)	23			
prickling (따끔거림)	23			

딱지꽃 추출물이 함유한 시제품 생산



▶ 용기 디자인  
에센스 + 크림



▶ 포장재 및 시제품



▶ 시제품 입고 사진

홍보물 : 홍보용 책자를 제작하여 마케팅에 매진하고 있으며 2018년 동계올림픽공식 개최도시지역 상품으로 자리매김 하고자 동계올림픽 조직위와 강원도 지자체와 긴밀히 협의 하고 있는 상황임



## □ 위탁기관 : 연세대학교

과 제 명	딱지꽃의 부위별 추출물의 유효 피토케미컬 기전규명
-------	-----------------------------

○ 위탁과제의 목표 : 딱지꽃 추출물 유래 유효 피토케미컬의 기전연구

○ 연구내용

본 연구에서는 딱지꽃 소재의 유효물질 추출과 유효물질을 가진 제품 개발을 위하여 딱지꽃 추출물에 대한 항산화 및 상처치유, 주름 생성 억제 기전 규명하고 항장 소재 및 상처치유제로서의 유효성 효능을 분석하였음.

### 1. 연구개발 수행 내용 및 결과

#### 연구내용

갈릭산은 폴리페놀산의 한 종류로써 3,4,5-trihydroxybenzoic acid 이다. 갈릭산은 오배자를 포함한 다양한 식물 추출물에서 발견되고 있으며, 그 효과는 항산화, 항염, 간기능 보호, 심지어 항암 효과에 대한 다양한 연구가 발표되었다.

본 연구진은 이번 연구를 통하여 인간 피부 각질형성세포에서 낮은 용량의 갈릭산이 항산화 효과와 더불어 상처치유 효과를 확인하였다. 이와 함께, 상처 치유 속도가 더더지는 고혈당 환경에서의 갈릭산 처리는 상처 치유 속도의 증가를 보임을 확인하였다.

본 연구를 통하여 갈릭산이 인간 피부 각질형성세포에서 항산화 작용의 역할을 할 뿐만 아니라 강력한 wound healer로써 만성 피부 상처치유의 새로운 치료제로 사용이 가능할 것을 시사한다.

#### ▪ 갈릭산 분리

딱지꽃 켈러스 유도로부터 gallic acid (GA, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid)를 지표 폴리페놀을 분리 정제함.

#### ▪ 세포배양

인간 각질형성세포인 HaCaT 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin(100 unit/mL)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 2-3일마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양환경은 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

- MTT assay

갈릭산의 독성평가 및 세포 생존능력을 평가하기 위하여

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) assay를 진행하였다. 인간 각질형성세포인 HaCaT를 96-well microplates에 분주하여 10% FBS가 포함된 배양액에서 배양하였다. 24시간 이후, 과산화수소를 포함 또는 미포함하는 조건에서 HaCaT에 갈릭산과 N-acetylcysteine (NAC, 대표적인 항산화 물질)을 각각 처리하였다. 24시간 경과 후 배양액을 걷어내고 MTT 용액 (세포 배양액 당 0.5 mg/mL)을 각 well에 100  $\mu$ L씩 채우고, 37°C에서 4시간 반응시킨다. 4시간 반응 후에 MTT 용액을 제거하고, MTT formazan을 100  $\mu$ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 용해시킨다. Spectrophotometry를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험을 통해 평균표준오차를 나타낸 값이다.

- Methylene blue staining

세포를 24시간 동안 6-well plates에 배양한 후, 과산화수소를 포함 또는 미포함하는 조건에서 NAC 및 다양한 농도의 갈릭산을 처리하였다. 4시간 경과 후 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척하고, 차가운 95% (v/v) 에탄올을 2mL 넣어 5분간 반응하여 고정시켰다. 고정 후, 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 2mL의 차가운 methylene blue 용액 (2%)을 이용하여 20초간 염색시킨다. 염색 후 증류수로 세포를 세척하고 공기건조 시킨다. 사진은 AxioObserver FL 현미경 (Advanced Microscopy Group, Bothell, WA)을 이용하여 10 배율에서 촬영하였다.

- DPPH free radical assay

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 515nm 파장에서 안정된 자유 라디칼로, 다른 라디칼을 scavenge하는 역할을 한다. 항산화 화합물에 의해 DPPH 라디칼의 중화가 일어나면 515nm에서 흡광도가 감소하게 되고, 감소된 흡광도 값은 항산화 화합물에 의한 라디칼 소거능 척도로 사용된다. DPPH는 Sigma (MO, USA)를 통하여 구입하였다.

DPPH stock 용액은 에탄올에 녹여 제조하고, 최종 농도가 0.1mM이 되도록 희석하였다. 라디칼 소거능을 측정하고자 하는 샘플을 각각 0.5mL씩 준비하고 0.1mM DPPH 용액을 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료된 후, Multiskan Go Spectrophotometer (분광 광도 측정기, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하여 517nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

- Wound healing and Migration assay

HaCaT 세포를 6-well plate에 분주하여 37°C 조건에서 배양한다. 배양한 세포를 한 번 세척 후, 2mL의 배양액을 넣어주고 EGF (성장인자), 갈릭산 혹은 대조군을 처리한 다음, P100 파이펫 tip을 이용하여 세포 단층에 상처를 가하였다. Migration assay (세포 이동 측정 실험)를 위하여, 세포에 mitomycin C (세포 분화 억제제)를 포함한 EGF, 갈릭산 혹은 대조군이 포함된 2mL의 배양액을 넣어주고 P100 파이펫 tip을 이용해 상처를 가하였다. 이미지는 10배율로 AxioObserver FL 현미경을 사용하여 지정된 시간에 촬영하였다. 상처 및 이동거리의 폭은 세 개 이상의 위치에서 측정하고, 상처 치유 영역 및 이동거리의 비율은 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 각 실험은 독립적으로 세 번 수행되었다.

- Western Blot Assay

세포를 PBS로 한 번 세척하고, RIPA 완충액 (150mM NaCl, 50mM Tris, 1% Triton-X-100, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS)으로 용해시켰다. RIPA 완충액은 protease와 phosphatase inhibitor (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 포함하고 있다. 단백질을 추출물을 분리하기 위해 용해된 세포를 5분간 12,000g에서 원심 분리하였다. 단백질 농도는 바이오라드 단백질 분석 시약 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 로딩하고, 전기영동을 통해 분리하여 nitrocellulose 막으로 옮겼다. 0.1% Tween 20을 포함한 Tris-buffered saline (TBS)에 5% skim milk를 녹여 실온에서 1시간동안 nitrocellulose 막을 blocking 하였다. Blocking 후, 4°C에서 하루 동안 일차 항체와 반응시키고 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 이차 항체와 실온에서 1시간 반응한다. Blot은 Chemiluminescence Western Blot Detection System (BioSpectrum 600 Imaging System, CA USA)를 이용하여 시각화하였다. 사용된 일차 항체는 다음과 같다. pErk, pJNK, and pFAK 항체들은 Cell Signaling (Danvers, MA, USA), GAPDH는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였다.

- Quantitative RT-PCR

Total RNA 분리는 TRIzol reagent 제조사의 방법 (Invitrogen, USA)을 토대로 진행하였다. RT-PCR을 위해, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. superoxide dismutase 2 (SOD2), catalase (CAT), glutathione peroxidase 1 (Gpx1) 각각의 primer로 mRNA를 증폭하였다. Real-time PCR은 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 세 번 진행되었다. 18S는 표준화를 위해 사용된 유전자이다.

## 연구결과

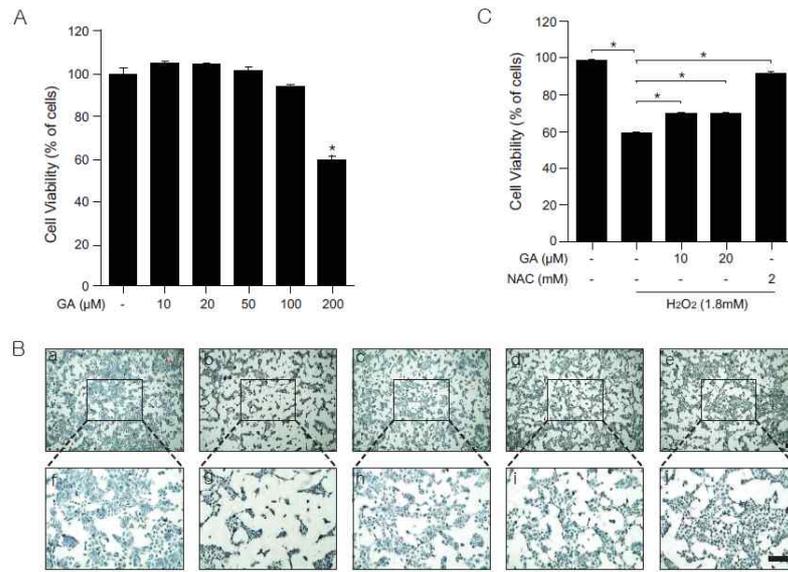


Figure 1

폴리페놀은 redox homeostasis 조절을 통해 피부에 이로운 효과를 주는 것으로 알려져 있으나 갈릭산의 이로운 효과를 증명하기 이전에 독성평가를 진행함으로써 피부에 적용하기 위한 적정 농도를 평가하였다 (그림 1). 갈릭산의 농도별 처리에 의한 세포 생존율을 MTT 분석방법 (그림 1A)을 이용하여 측정한 결과이다. 결과에서 보듯이 갈릭산의 농도 증가에 따라 세포 생존율이 미미하게 감소하는 것으로 보이고, 고농도 (200  $\mu$ M)에서는 세포 생존율이 40% 이상 감소함을 보였다. 따라서 저농도의 갈릭산이 피부세포에 독성을 미치지 않는 것을 확인하여, 10  $\mu$ M의 갈릭산을 적정농도로 적용하였다. 그림 1B와 C는 갈릭산의 항산화능을 평가하는 것으로, Methylene blue staining (그림 1B)과 MTT assay (그림 1C)를 이용하여 과산화수소에 의한 피부세포 생존율 감소가 갈릭산 처리에 의하여 보완됨을 확인하였다.

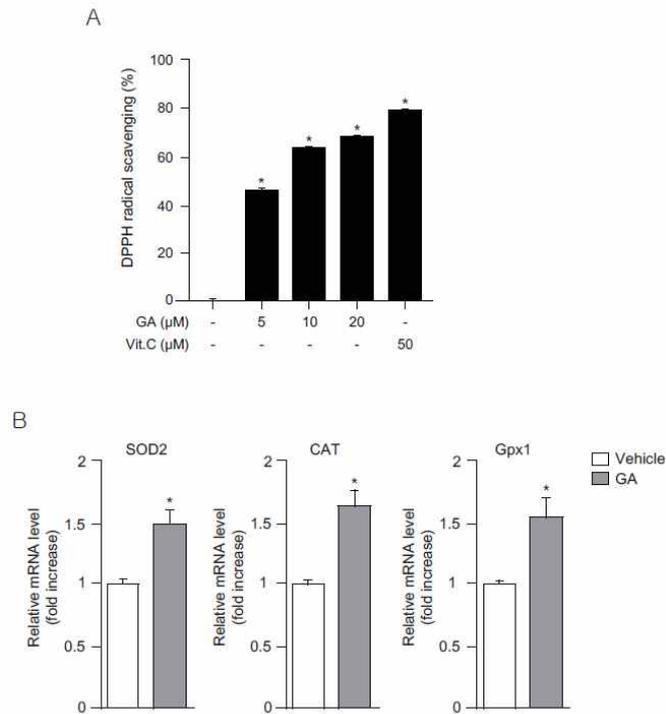


Figure 2

갈릭산의 항산화능 활성정도를 측정하기 위해 DPPH assay (그림 2A)를 진행하여 갈릭산 농도 증가에 따른 라디칼 소거능을 입증하였다. 이와 함께 갈릭산의 항산화 효과가 직접적인 항산화 관련 유전자를 조절하는 지 조사하기 위해 갈릭산을 처리한 후 Quantitative RT-PCR를 진행하였다. 갈릭산에 의해 SOD2, CAT, Gpx1 유전자 발현양이 유의하게 증가함을 확인하였다 (그림 2B). 이는 갈릭산이 항산화 관련 유전자 발현양을 조절하여 피부 각질형성세포에서 항산화 효과를 보임을 시사한다.

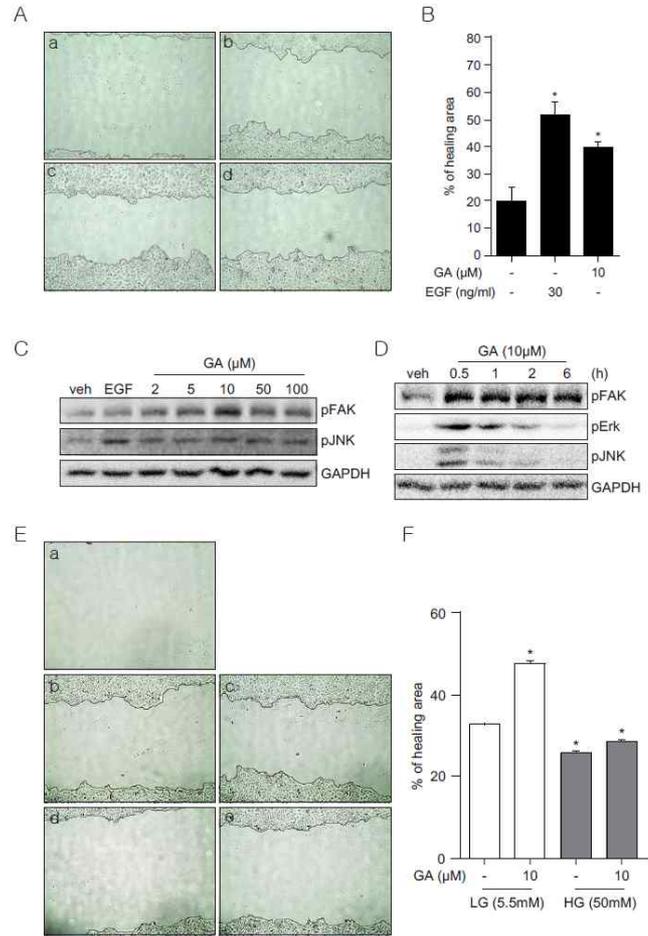


Figure 3

갈릭산의 항산화 작용과 더불어 본 연구진은 갈릭산의 상처 치유효과를 검증하고자 Wound healing assay (그림 3A과 B)를 진행하였다. 갈릭산의 처리에 의하여 피부 각질형성세포에서 유의하게 상처 치유효과를 확인할 수 있었고, 이러한 효과는 세포분화 및 이동에 관여하는 단백질 FAK (focal adhesion kinases)와 JNK (c-Jun N-terminal kinases)의 활성화에 의해서 일어남을 Western blot (그림 3C와 D)을 통해 증명하였다.

높은 함량의 파이토케미컬 또는 폴리페놀이 첨가된 식품을 섭취하는 것이 당뇨병과 그 합병증의 위험을 낮춘다는 보고가 있다. 최근 폴리페놀은 당뇨병환자의 신진대사에 유의한 효과를 줄 수 있기 때문에 기능성 식품으로 주목받고 있다. 해서 본 연구진은 당뇨병 환자에서 보이는 상처 치유 지연현상과 비슷한 환경 (고혈당 환경)을 세포에 가하여, 고혈당 환경에서 상처 치유 지연 현상이 나타나는 것이 갈릭산 처리에 의해 지연현상을 낮출 수 있는 지 Wound healing assay를 통해 확인하였다 (그림 3E와 F). 대조군 (vehicle)의 경우 고혈당 환경으로 인해 상처 치유가 더뎠는 것에 비해, 갈릭산 처리군에서는 고혈당 환경에서도 상처 치유 속도가 증가되는 것을 확인하였다.

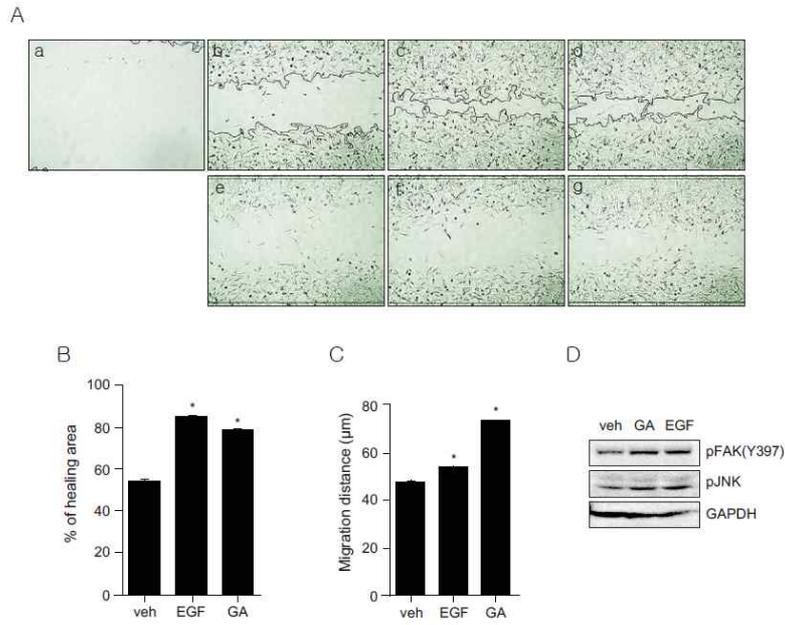


Figure 4

피부 각질형성세포에서 갈릭산의 상처 치유 효과를 보았기 때문에, 우리는 또 다른 세포형성체인 섬유아세포 (MEF, mouse embryonic fibroblast)에서도 갈릭산의 효과를 확인하였다. 갈릭산은 섬유아세포에서 상처 치유효과를 보였으며 (그림 4A와 B), 이러한 효과는 갈릭산이 세포이동을 촉진하여 이루어진 것이다 (그림 4C). 각질형성세포에서와 같이, 섬유아세포에서 갈릭산의 상처 치유 효과는 FAK과 JNK 단백질의 활성화에 의해 일어남을 확인하였다 (그림 4D).

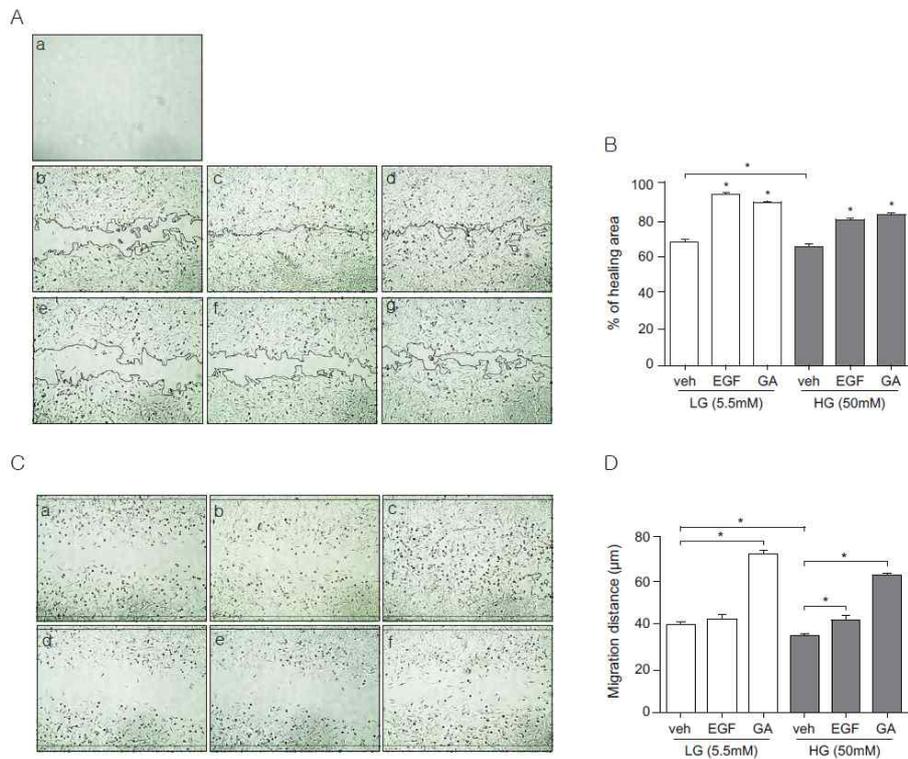


Figure 5

본 연구진은 갈릭산이 고혈당 환경에서 각질형성세포의 상처 치유 지연을 막는 것을 확인했다. 이러한 효과를 섬유아세포에서도 확인하기 위해 Wound healing assay (그림 5A와 B)를 진행하였으며, 갈릭산의 처리에 의한 유의한 효과를 얻었다. 또한 Migration assay (그림 5C와 D)를 통해 상처 치유 효과가 세포이동 증진을 통해 이루어짐을 확인하였다.

요약하자면, 본 연구를 통하여 우리는 피부세포에서 갈릭산의 항산화 효과를 확인하였고, 이와 함께 갈릭산의 상처 치유 효과가 각질형성세포뿐만 아니라 섬유아세포에서도 유의하게 나타남을 확인할 수 있었다. 특히 고혈당 환경에서의 유의한 효능은 비만이나 당뇨 등의 대사증후군을 앓는 환자에게서 나타나는 만성 피부 상처치유의 새로운 치료제로 사용이 가능할 것을 시사한다.

## □ 위탁기관 : 휴제스

과 제 명	딱지꽃 및 딱지꽃 켈러스 인허가 및 세포독성평가
-------	----------------------------

○ 위탁과제의 목표: 딱지꽃 및 딱지꽃 켈러스 인허가 및 세포독성평가

○ 연구내용

<p>○ 딱지꽃 추출물의 세포내 독성 테스트          딱지꽃 추출물에 대하여 피부 안전성의 평가를 위해서 피부세포를 사용하여 시험한다.</p> <p>○ 딱지꽃 추출물 및 켈러스의 국제화장품 원료협회 (Personal Care Products Council) 인허가(딱지꽃 추출물 및 켈러스가 화장품 원료로서 사용되기 위하여 미국 국제화장품 원료협회에 INCI Name 등재 신청 및 허가를 획득하여야만 한다.)</p>
---

### 1. 연구개발 수행 내용 및 결과

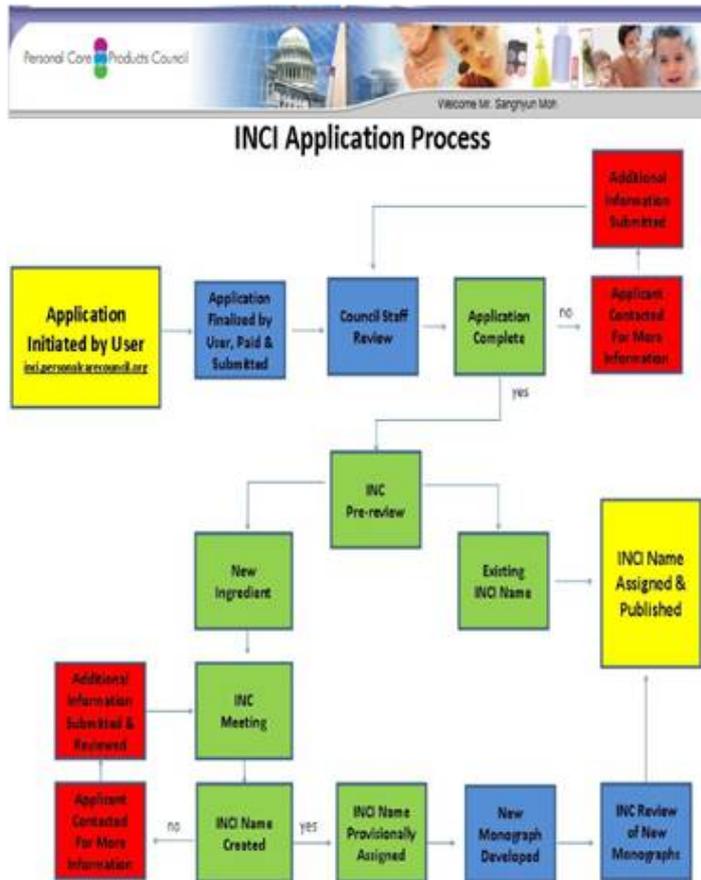
#### 연구내용

##### 1) 딱지꽃 추출물의 세포내 독성 테스트

인간 각질형성세포인 HaCaT 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin(100 unit/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 2-3일마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양환경은 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 인간 각질형성세포를 1x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 24 well plate에 넣고 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 HaCaT 세포에서 배양배지를 제거하고 인산완충액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 세척한 후 신선한 FBS를 포함하지 않은 신선한 세포배양배지로 교체하였다. M-Gly, AS330-PNE, P-334, SH, SH-PNE를 농도별로 처리하여 시료를 처리하고 24시간 추가 배양하였다. 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, 96 well plate로 옮긴 후 595 nm에서 Spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

나. 딱지꽃 추출물 및 켈러스의 국제화장품 원료협회 (Personal Care Products Council) 인허가

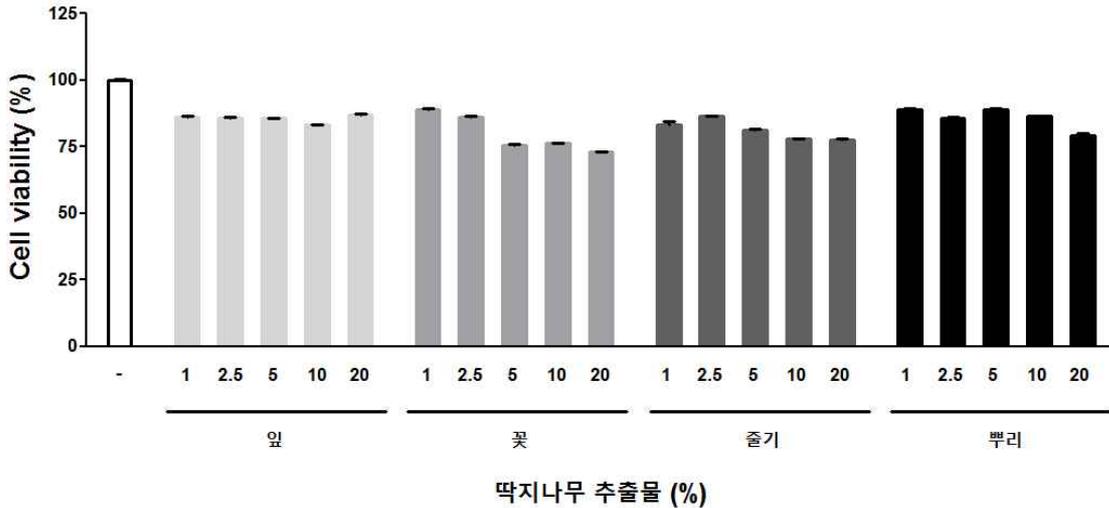
화장품 및 의약외품의 원료로서 딱지꽃 추출물 및 켈러스를 화장품 원료로서 사용하기 위하여 미국 국제화장품원료협회(Personal Care Products Council, PCPC)에 INCI Name 등재 신청



< 국제화장품원료협회(PCPC)에서 신규소재 INCI Name 획득 인허가 절차 >

## 연구결과

### 가. 딱지꽃 추출물에 세포내 독성 테스트



정선군에서 재배된 딱지꽃 추출물의 세포내 독성을 시험하였다. 시험을 위해 딱지나무를 잎, 꽃, 줄기, 뿌리 4가지 부위로 나누어 열수 추출하여 시료를 준비하였다. 준비한 각각 부위별 추출물을 피부세포에 처리하여 세포내 안전성을 평가한 결과 4가지 추출물 모두 약간의 세포 독성을 보임을 확인하였다. 전체적으로 약 80% 정도의 cell viability를 보였다. 시료의 처리농도가 증가함에 따라 cell viability가 감소하는 것을 확인하였다. 약 80% 정도의 cell viability를 보이는 농도에서 딱지나무 부위별 추출물의 유효성 평가를 진행하도록 한다.

### 나. 딱지꽃 추출물 및 캘러스의 국제화장품 원료협회 (Personal Care Products Council) 인허가

화장품 및 의약외품의 원료로써 딱지꽃 추출물 및 캘러스를 화장품 원료로서 사용하기 위한 INCI Name 등재 신청하여 4건의 인허가 완료

	Submit Date	Application #	Trade Name	INCI Name
1	02/03/2015	2-01-2015-3176	Potentilla-X	Potentilla chinensis Extract
2	02/03/2015	2-01-2015-3177	Postem Cell	Potentilla Chinensis Callus Culture Conditioned Media
3	02/03/2015	2-01-2015-3178	Ari Phytoplacenta	Potentilla Chinensis Phytoplacenta Extract
4	02/03/2015	2-01-2015-3179	Aristem Cell	Potentilla Chinensis Callus Extract

March 31, 2015

Rep. Yu, Yeong-Wook

RE: Application No. 2-01-2015-3176

Dear Rep. Yu, Yeong-Wook:

In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is detailed on the attachment.

Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, the web-based Dictionary of INCI, and the Council's On-Line INFOBASE. If your application indicates the trade name is "not for publication," it is noted on the attachment and the data will not be published.

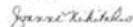
It is important to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be retained in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. You will be contacted on an approximate annual basis to update the current status of your company listings. This communication will include only trade names and addresses; therefore it is imperative that you maintain accurate records of all INCI name assignments.

To petition for a change in an INCI name assignment, a request to the INC can be sent via email to my attention. The petition should include the current INCI name, trade name, application number, requested revision, and technical rationale to support the petition, e.g., supporting composition information, and/or manufacturing details, and analytical data where appropriate.

In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INC for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.

Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.

Sincerely,



Joanne M. Nikitakis  
Director, Cosmetic Chemistry  
nikitakis@personalcarecouncil.org  
Enclosure

Page 2

March 31, 2015

Application No. 2-01-2015-3176

Submitted By:

Rep. Yu, Yeong-Wook

Manufactured By:

Hugex Co., LTD  
22-4, Yeosu-ro 15beon-gil  
Jungwon-gu, Seongnam-si  
Gyeonggi-do  
462-100  
KOREA (SOUTH)

Trade Name:

Potentilla-X

Assigned INCI Name:

Water (and) Potentilla Chinenalis Extract

May 13, 2015

Rep. Yu, Yeong-Wook

RE: Application No. 2-01-2015-3177

Dear Rep. Yu, Yeong-Wook:

In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is detailed on the attachment.

Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, the web-based Dictionary of INCI, and the Council's On-Line INFOBASE. If your application indicates the trade name is "not for publication," it is noted on the attachment and the data will not be published.

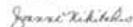
It is important to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be retained in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. You will be contacted on an approximate annual basis to update the current status of your company listings. This communication will include only trade names and addresses; therefore it is imperative that you maintain accurate records of all INCI name assignments.

To petition for a change in an INCI name assignment, a request to the INC can be sent via email to my attention. The petition should include the current INCI name, trade name, application number, requested revision, and technical rationale to support the petition, e.g., supporting composition information, and/or manufacturing details, and analytical data where appropriate.

In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INC for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.

Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.

Sincerely,



Joanne M. Nikitakis  
Director, Cosmetic Chemistry  
nikitakis@personalcarecouncil.org  
Enclosure

Page 2

May 13, 2015

Application No. 2-01-2015-3177

Submitted By:

Rep. Yu, Yeong-Wook

Manufactured By:

Hugex Co., LTD  
22-4, Yeosu-ro 15beon-gil  
Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do  
462-100  
KOREA (SOUTH)

Trade Name:

Postim Cell

Assigned INCI Name:

Potentilla Chinenalis Callus Culture Conditioned Media

May 13, 2015

Rep. Yu, Yeong-Wook

RE: Application No. 2-01-2015-3178

Dear Rep. Yu, Yeong-Wook:

In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is detailed on the attachment.

Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, the web-based Dictionary wINCI, and the Council's On-Line INFOBASE. If your application indicates the trade name is "not for publication," it is noted on the attachment and the data will not be published.

It is important to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be retained in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. You will be contacted on an approximate annual basis to update the current status of your company listings. This communication will include only trade names and addresses; therefore it is imperative that you maintain accurate records of all INCI name assignments.

To petition for a change in an INCI name assignment, a request to the INC can be sent via email to my attention. The petition should include the current INCI name, trade name, application number, requested revision, and technical rationale to support the petition, e.g., supporting composition information, and/or manufacturing details, and analytical data where appropriate.

In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INC for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.

Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.

Sincerely,



Joanne M. Nikitakis  
Director, Cosmetic Chemistry  
nikitakis@personalcarecouncil.org  
Enclosure

Page 2

May 13, 2015

Application No. 2-01-2015-3178

Submitted By:

Rep. Yu, Yeong-Wook

Manufactured By:

Hugex Co., LTD  
22-4, Yeosu-ro 15beon-gil  
Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do  
462-100  
KOREA (SOUTH)

Trade Name:

Ari Phytoplacenta

Assigned INCI Name:

Potentilla Chinesis Phytoplacenta Extract

April 15, 2015

Rep. Yu, Yeong-Wook

RE: Application No. 2-01-2015-3179

Dear Rep. Yu, Yeong-Wook:

In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is detailed on the attachment.

Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, the web-based Dictionary wINCI, and the Council's On-Line INFOBASE. If your application indicates the trade name is "not for publication," it is noted on the attachment and the data will not be published.

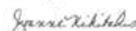
It is important to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be retained in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. You will be contacted on an approximate annual basis to update the current status of your company listings. This communication will include only trade names and addresses; therefore it is imperative that you maintain accurate records of all INCI name assignments.

To petition for a change in an INCI name assignment, a request to the INC can be sent via email to my attention. The petition should include the current INCI name, trade name, application number, requested revision, and technical rationale to support the petition, e.g., supporting composition information, and/or manufacturing details, and analytical data where appropriate.

In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INC for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.

Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.

Sincerely,



Joanne M. Nikitakis  
Director, Cosmetic Chemistry  
nikitakis@personalcarecouncil.org  
Enclosure

Page 2

April 15, 2015

Application No. 2-01-2015-3179

Submitted By:

Rep. Yu, Yeong-Wook

Manufactured By:

Hugex Co., LTD  
22-4, Yeosu-ro 15beon-gil  
Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do  
462-100  
KOREA (SOUTH)

Trade Name:

Aristem Cell

Assigned INCI Name:

Potentilla Chinesis Callus Extract

□ 위탁기관 : 영농조합법인 이노플랜트

과 제 명	딱지꽃 켈러스 유도 및 생물반응기를 이용한 대량생산
-------	------------------------------

○ 위탁과제의 목표 : 유도된 딱지꽃 켈러스를 생리활성 물질 함량을 증대시킬 수 있도록 생물반응기를 이용하여 대량 생산 조건 최적화 및 생산 공정도 확립

○ 연구내용

- 딱지꽃 켈러스 유도 - 딱지꽃 켈러스 계대배양 - 대량생산을 위한 생물반응기 조건 확립
--

1. 연구개발 수행 내용 및 결과

연구내용

가. 딱지꽃 켈러스 유도 및 계대배양

- 대상 식물의 종자소독

딱지꽃 켈러스 유도하기 위하여, 딱지꽃 식물의 종자의 표면 살균을 위해 70% 에탄올(Ethanol)에 30초간 침지, 0.3 % 차아염소산나트륨(Sodium hypochlorite)에 10-15분 진탕하여 살균 후 멸균수로 세척하였다. 무균상태의 딱지 종자를 기본 MS 배지에서 20 일 동안 키워 발아를 유도하였다.

- 켈러스 유도배지

딱지꽃 식물이 발아배지에서 10일 정도 후 발아하면, 너무 어리거나 너무 자란 상태의 자엽이 아닌, 적당히 자란 자엽을 잘라서 식물생장조절물질(Plant Growth Regulator)이 포함된 배지 치상하여 켈러스를 유도한다.

- 켈러스 유도에 사용된 배지 조성

각각의 식물생장조절물질이 함유된 배지에 치상한 후, 23±2 °C의 배양실에서 4주에서 10 주간 배양하고, 유도된 켈러스는 4주 간격으로 계대 배양하여 증식하였다.

## 나. 생물반응기를 이용한 대량생산 조건 확립

### - 대량생산 시스템의 개요

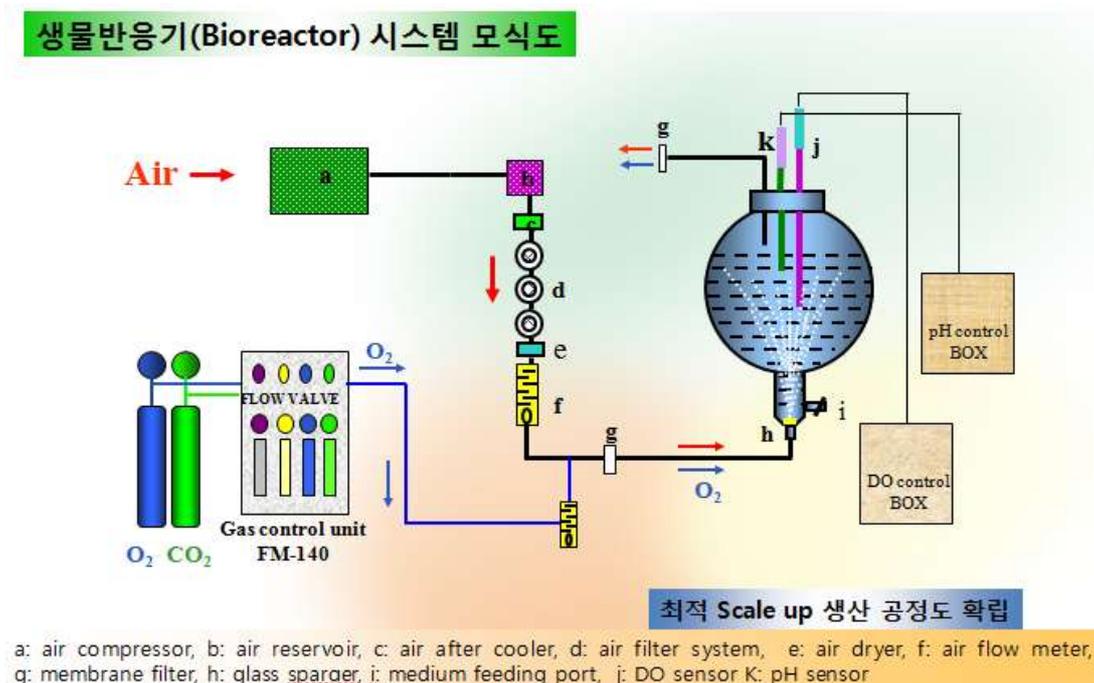
공기용적이 20L인 풍선형 생물반응기에 각 식물성장조절물질이 함유된 15L의 MS의 기본배지를 이용하여 유도된 캘러스를 4주 간격으로 유지 및 증식시킨다.

배지는 1N NaOH를 이용하여 pH5.8로 조절한 후, 121°C 1.2기압에서 35분간 멸균하여 사용하였다. 배양은 5주간 배양한 캘러스를 1~1.5 cm로 절단하여 생체중을 기준으로 5g/L 접종밀도로 캘러스를 접종한 후 22±1 °C가 유지되는 암조건에서 배양하였다. 공기공급량은 배양 전 기간 동안 0.1vvm으로 일정하게 조절하였으며, 생물반응기 내부로 공급하는 공기는 일정한 온도 유지를 위하여 압축공기를 응축시킬 수 있는 공기압축기와 불순물을 제거할 수 있는 필터 및 공기 건조기 등을 순차적으로 통과시킨 후 기름을 사용하지 않는 공기 압축기를 이용하여 생물반응기 내부로 공급하였다.

### - 대량생산 시스템의 이용

MS액체배지를 100ml 분주한 삼각플라스크에서 증식된 캘러스를 수확하여 클린벤치 내에서 20L의 생물반응기에 접종한다.

4주 간격으로 증식된 캘러스를 20L 생물반응기로 계대배양하면서 유지한다.



## < 딱지꽃 캘러스 대량생산을 위한 생물반응기 시스템 모식도 >

### - 대량생산 공정도

최고의 품질을 달성하기 위하여 제품의 입고에서 출하까지 철저한 품질 및 환경인증 시스템 ISO14001:2008, ISO9001:2008을 활용하고 있다.

- 켈러스 대량생산 작업표준서
- 대량생산된 켈러스의 수확 및 건조 작업표준서
- 대량생산의 품질관리(QC 제조 공정도)
- 켈러스 성분검사 작업표준서

## 연구결과

### 1) 딱지종자로부터의 발아

딱지나무종자로부터 켈러스를 유도하기 위하여, 1/2MS배지에 멸균된 종자를 치상하여 20일 후 발아를 유도하였다.



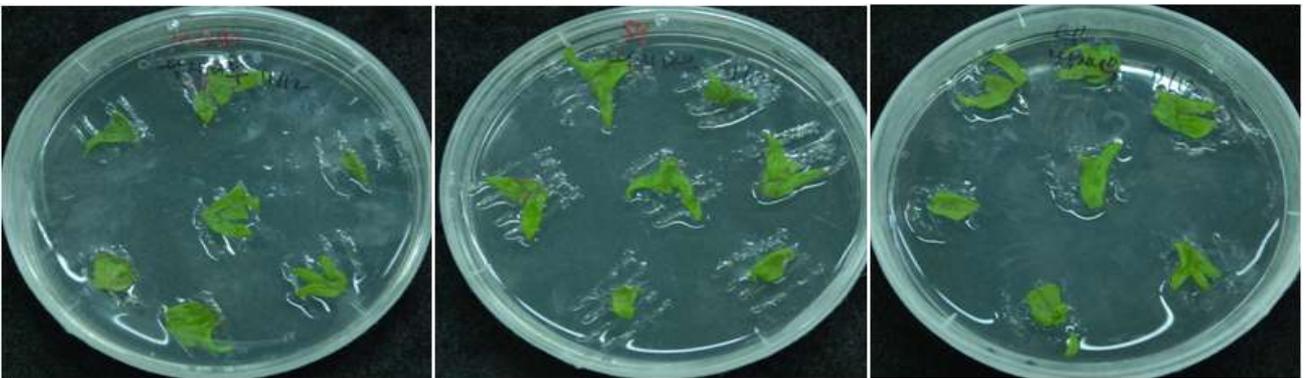
< 딱지나무 종자로부터의 발아 >

### 2) 딱지꽃 켈러스 유도 및 계대배양

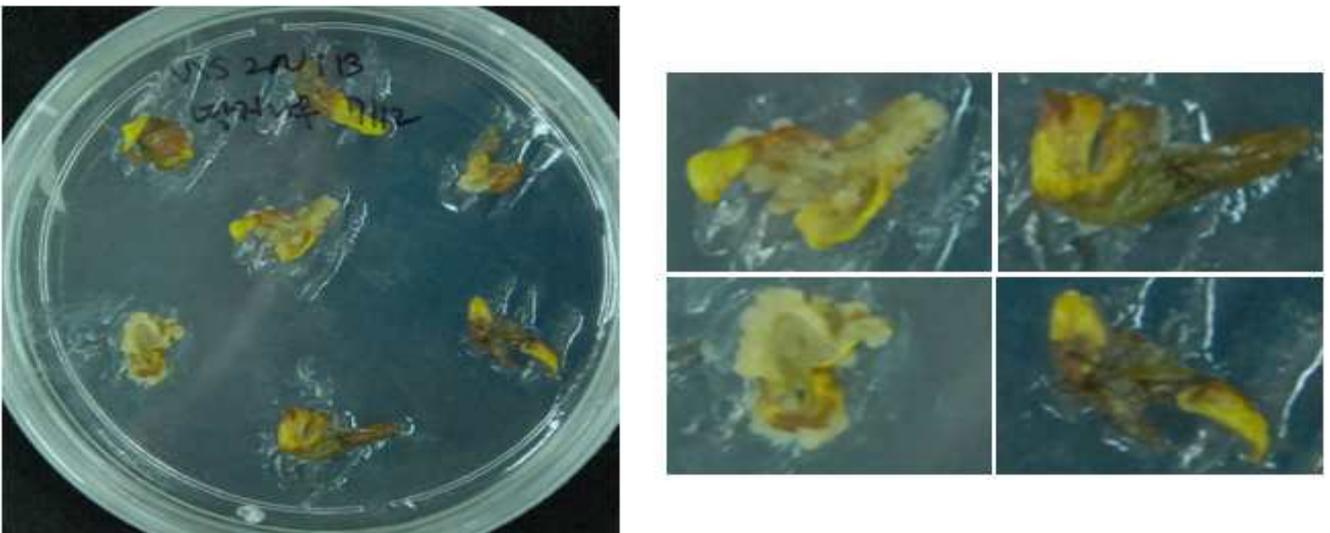
딱지꽃의 켈러스를 유도하기 위해 아래의 1/2MS, SH, 5BAP0.5D, MS2N1B 및 N2K1의 5가지 종류의 배지를 사용하였다. 그 결과 2N1B 배지에서 유도된 딱지꽃 켈러스가 가장 좋은 상태로 유도됨을 확인하였고, 2N1B 배지의 조성으로 켈러스를 계대배양 및 증식하였다.

	1	2	3	4	5
-	1/2MS	SH	5BAP0.5D	2N1B	N2K1
배지 조성	MS 2.2 g MES 0.5 g Sucrose 30 g	MS 4.4 g MES 0.5 g Sucrose 30 g	MS 4.4 g MES 0.5 g Sucrose 30 g	MS 4.4 g MES 0.5 g Sucrose 30 g	MS 4.4 g MES 0.5 g Sucrose 30 g
식물 성장 조절 물질 조성		2,4-D 0.5 mg CPA 2 mg Kinetin 0.1 mg	BAP 5 mg, 2,4-D 0.5 mg	NAA 2 mg BAP 1 mg	NAA 2mg Kinetin 1mg

< 딱지꽃 캘러스를 유도하기 위한 배지 다양한 배지조성표 >



< 딱지꽃 캘러스를 유도하기 위하여 자엽 절단 후 배지에 치상 >



< 딱지꽃 캘러스 유도 >



< 딱지꽃 캘러스 증식 >

### 3) 생물반응기를 이용한 대량생산

공기용적이 20 L인 풍전형 생물반응기에 2 mg NAA, 1 mg BAP의 식물성장조절물질이 함유된 15L의 MS의 기본배지를 이용하여 유도된 딱지꽃 캘러스를 4주 간격으로 유지 및 증식시켰다. 증식시킨 캘러스를 수확하여 스테인레스 채로 걸러 배지를 분리해내고 깨끗한 티슈로 충분히 수분을 제거한 후 60℃로 2일간 건조하였다. 건조된 캘러스는 진공 포장하여 보관하였다.



< 20L 생물반응기를 이용한 딱지꽃 캘러스 대량생산 >

4) 딱지꽃 켈러스 대량생산 작업표준서

		작업표준서		결재	작성	검토	승인
					제품명	켈러스 생산	
작업내용	공정관리			사용자재 및 기구	비고		
	관리항목	검사항목					
	배지의 pH (5.6~5.8) 배지 및 기기의 멸균 (1.2Kgf/cm <sup>2</sup> , 120 °C, 30~50 min) 배양온도 (20~25°C) 반응기내 압력 Aeration	멸균기의 압력 게이지 멸균기 내부 청결도 pH 측정기의 보정				가압 멸균기 증류수 제조기 배지 제조기 생물 반응기 저울	
배지성분혼합 ↓ 배지 및 반응기 멸균 ↓ 켈러스 접종(입고) ↓ 생물 반응기 배양 ↓ 배양 완료	특기사항	작업시 주의사항		사고발생시 처리요령			
		작업시 균에 의한 오염방지 생물반응기 사용전후 청결유지 생물반응기 및 부대 시설 관리 (고장유무)		열에 의한 화상 발생시 물로 수차례 수세 후 알코올로 소독			

5) 대량생산된 딱지꽃 켈러스의 수확 및 건조 작업표준서

		작업표준서		결재	작성	검토	승인
					제품명	수확 및 건조	
작업내용	공정관리			사용자재 및 기구	비고		
	관리항목	검사항목					
	건조시 온·습도 점검 (70 °C, 12 %) 분쇄기 점검	건조기 내부 온도 검사 청결여부 검사				전자저울 열풍건조기 분쇄기	
생산물의 수세 및 탈수 ↓ 생체중 측정 ↓ 열풍 건조 ↓ 건물중 총량 ↓ 분쇄	특기사항	작업시 주의사항		사고발생시 처리요령			
		분쇄시 열에 의한 유효성분의 변성 방지					

6) 대량생산의 품질관리(QC 제조 공정도)

		QC 공정도					결재	작성	검토	승인
제품명										
공정 번호	공정명	Flow Chart	작업내용	사용기구	측정장미	점검항목	기록물	실시부서	이상처리	
1	캘러스 유도		작업표준서 참고	중류수 제조기 고압멸균기	계량 저울	상용상태 (무계)		생산부	재검출	
2	캘러스 생산		작업표준서 참고	상용반응기 중류수 제조기 배지 조제기 고압 멸균기	용안 점검	유용상태	생산계획서	생산부	재검출	
3	수확 및 건조		작업표준서 참고	열풍 건조기 전자저울	수분 측정기	건조상태 점검	생산계획서	생산부	반품	

7) 캘러스 성분검사 작업표준서

		작업표준서		결재	작성	검토	승인
제품명		성분검사					
작업내용	공정 관리		사용자재 및 기구	비고			
	관리항목	검사항목					
	추출 용매 필터 상태	필터의 파손 여부 HPLC 펌프 작동 여부 컬럼의 오염 여부			Hood (후드) 동결 건조기 HPLC		
Sampling ↓ 추출 ↓ 농축 ↓ HPLC에 의한 성분분석	특기사항	사고발생시 처리요령					
		추출시 온도 및 시간 엄수 (50 ~ 100 °C, 1hr) HPLC 관리 (고장유무, Column 상태)					

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술

평가항목	단위	전체목차에서 차지하는 비중(%)	세계최고 수준 보유국/보유기업	연구개발 전 국내수준	개발 목표치	달성도(%)
			성능수준	성능수준	당해년도	
딱지꽃 노지재배 조건 확립	%	10	중국/상하이대 80%	70%	90%	
딱지꽃 추출물 유효성 평가	%	10	미국/Amgen 60%	60%	대조군 대비 50%	
유효성분 추출 공정 및 분석 표준화/기준 및 시험방법 확립	유무	10	한국/충북대 40%	40%	40%	
유효성분 함유 안정화 제형개발	%	10	스위스/미벨 40%	20%	대조군 대비 40%	
국제화장품원료협회(PCPC) 인허가	허가여부	10	-	-	2건	
조성물 특허 출원	출원여부	10	-	-	1건	
비SCI 논문발표	발표여부	10	-	-	3건	
딱지꽃 추출물을 이용한 임상시험	시험여부	10	-	-	1건	
딱지꽃 추출물을 이용한 시제품 제작	제작여부	10	-	-	3건	
소재 산업화	유무	10	-	-	3건	

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### ○ 기술적 측면

딱지꽃 추출물의 유용성분 분석 및 표준화 기술을 확립하여 다른 고부가 가치 기능성 소재의 기준 및 시험법을 확립할 수 있는 기반을 다짐으로써 향후 화장품 소재 개발에 커다란 영향을 줄 것으로 기대되며 본 과제의 연구개발내용인 딱지꽃 추출물을 이용하여 고순도의 천연성분을 생산함으로써 향후 새로운 의약품 생산의 기틀을 마련하였다.

또한 딱지꽃 추출물을 이용하여 과량의 유용성분을 추출함으로써 효능이 향상된 고기능성 소재를 개발함으로써 강원도 정선의 청정지역에서의 친환경재배 시스템 구축을 통한 국제 경쟁력뿐만 아니라 국가 경쟁력 향상에 이바지 할 것으로 기대된다.

### ○ 경제 산업적 측면

고랭지 자생 딱지꽃 식물 유래 고기능성 생리활성 소재의 경우 원천적인 지적재산권 확보로 기능성소재로서도 전 세계시장 대상 상업화 가능하며 국내 시장에 수입되는 기능성 화장품 원료를 대체하는 효과 및 이를 이용한 주름 방지 및 미백 등의 기능성 화장품 시장의 활성화 및 수출증대 기여하고 있다.

딱지꽃의 대량재배기술과 관련된 효율적 공정개발을 통한 생산 비용 절감하고 확립된 딱지꽃 대량재배 기술에 의한 생리활성 소재 개발 기술을 기반으로 하여 타 분야 및 타 대상물질에 응용하여 보다 많은 부가가치 제품 및 소재를 개발할 수 있다.

우수한 생리활성 성분을 함유하고 있으나 원재료의 수급 문제, 수확시기 또는 장소에 따른 불규칙한 함량 등으로 인하여 제품에 활용되지 못하는 식물유래 고기능성 생리활성소재에 대하여 표준화 생산 기술을 개발하는 경우 적용범위가 광범위하여 막대한 파급효과와 함께 유용성분 함량 증진기술의 지식재산권 확보하여 기술 우위를 확보할 것이다.

### ○ 연구개발(R&D)역량 측면

향후 아토피피부염 등 다양한 질환의 소재로 활용도 증대한 효능 탐색기법 개발과 식물조직 배양기술 이용한 딱지꽃 캘러스 배양시 피토케미칼(Phytochemical)을 활용한 유용한 이차대사산물(Secondary metabolite)의 축적 기술을 확립할 것이다.

또한 식물조직 배양시 배양세포 혹은 조직에 온도, 빛 등 다양한 물리적, 화학적 스트레스 증가에 따른 유용성분 변화도 측정 가능하였으며 식물조직배양기술과 관련된 효율적 공정개발에 따른 전담 인적 인프라의 기술력 향상이 필요한 상황이다.

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과					
① 딱지꽃 추출물의 세포내 독성 테스트	정선군에서 재배된 딱지꽃 추출물의 세포내 독성을 딱지꽃의 잎, 꽃, 줄기, 뿌리 4가지 부위로 열수 추출하여 확인함. 약 80% 정도의 cell viability를 보이는 농도에서 딱지꽃 부위별 추출물의 유효성 평가를 진행함.					
② 딱지꽃 추출물 및 캘러스의 국제화장품 원료협회 (Personal Care Products Council) 인허가	<p>딱지꽃 추출물 및 캘러스가 화장품 원료로서 사용되기 위하여 미국 국제화장품원료협회에 4건의 INCI Name 등재 및 허가완료</p> <table border="1" data-bbox="823 600 1406 779"> <thead> <tr> <th data-bbox="823 600 1406 629">INCI Name</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="823 629 1406 658">Potentilla chinensis Extract</td> </tr> <tr> <td data-bbox="823 658 1406 712">Potentilla Chinensis Callus Culture Conditioned Media</td> </tr> <tr> <td data-bbox="823 712 1406 741">Potentilla Chinensis Phytoplacenta Extract</td> </tr> <tr> <td data-bbox="823 741 1406 779">Potentilla Chinensis Callus Extract</td> </tr> </tbody> </table>	INCI Name	Potentilla chinensis Extract	Potentilla Chinensis Callus Culture Conditioned Media	Potentilla Chinensis Phytoplacenta Extract	Potentilla Chinensis Callus Extract
INCI Name						
Potentilla chinensis Extract						
Potentilla Chinensis Callus Culture Conditioned Media						
Potentilla Chinensis Phytoplacenta Extract						
Potentilla Chinensis Callus Extract						
③ 딱지꽃 추출물에 대한 주성분의 표준화 확립	딱지꽃 원료 수확 표준화 방법과 더불어 딱지꽃 뿌리 추출물로부터 3,3',4'-Trimethyl ether ellagic acid 지표성분을 HPLC, LC-MS/MS 및 NMR 조건을 표준화함.					
④ 딱지꽃 추출물 주성분에 대한 기준 및 시험법 확립	딱지꽃 추출물 제품의 Appearance, Odour, pH, Index Component, Loss on Drying, Microbes 및 Heavy Metals (Pb, As) 등에 대한 규격 설정 후 시험 성적서를 완성하고, 딱지꽃 추출물 30%가 함유된 제품내에 지표물질인 3,3',4'-Trimethyl ether ellagic acid 300 ppm 이상으로 규격 설정함. 또한, 주성분인 3,3',4'-Trimethyl ether ellagic acid가 함유된 딱지꽃 추출물을 로션, 크림 및 에센스 제형에 적용하여 화장품의 안정성을 평가함.					
⑤ 정선 고랭지 자생 딱지꽃 추출물 소재의 피부세포에서 효능평가 진행	딱지꽃 뿌리 추출물을 피부세포에 처리함에 따라 화장품 소재로써의 가능성을 확인함. 즉, 딱지꽃 뿌리 추출물 처리시 30% 정도 COX-2 발현 억제를 통한 염증억제효과 확인, 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1의 발현 40% 저해, 엘라스틴 발현양을 3배 정도 증가시킴으로써 주름개선 효과 확인 및 보습에 주요한 막단백질인 AQP-3 발현양을 2배 증가시킴으로써 보습효과 확인, melanin 양을 40% 정도 감소시킴에 따라 미백효과 확인. 따라서, 딱지꽃 뿌리 추출물이 항염증, 주름개선, 보습 그리고 미백 효과를 보임에 따라 화장품 소재로써의 가능성을 확인함.					
⑥ 판로 확보 및 사업화 계획	'CITE JAPAN 2015' 및 'In-cosmetics Asia 2015'에 참가하여 (주)바이오에프디엔씨의 회사소개 및 딱지꽃 추출물 원료소재 소개를 한국콜마(주), 일본을 포함한 다국적 기업들인 P&G, Shiseido, Brenntag Ingredients, Inc. 등의 회사에 소개하고 딱지꽃 효능을 토대로 원료수출을 위한 미팅 마련 기회 또한, 화장품 원료회사인 (주)피토메카를 통하여 딱지꽃 추출물 매출 9,700,000원 발생을 통하여 사업화 시작함.					

⑦ 딱지꽃 캘러스 유도 및 계대배양	딱지꽃의 캘러스를 유도하기위해 아래의 1/2MS, SH, 5BAP0.5D, MS2N1B 및 N2K1의 5가지 종류의 배지를 사용하여 딱지꽃 캘러스를 유도하기에 가장 최적의 적합한 배지조성 확보하여 딱지꽃 캘러스를 계대배양 및 증식함.
⑧ 대량생산을 위한 생물반응기 조건 확립	생물반응기를 이용한 대량생산을 위하여, 딱지꽃 캘러스 대량생산 작업표준서, 대량생산된 딱지꽃 캘러스의 수확 및 건조 작업표준서, 대량생산의 품질관리(QC 제조 공정도), 캘러스 성분검사 작업표준서를 확보하여 대량생산 배양 조건을 확립함.
⑨ 고랭지 자생 딱지꽃 식물의 노지에서의 대량 재배 기술 확립	고랭지 자생 딱지꽃 대량재배 기술확립으로 농민소득 증대에 할수 있는 기반
⑩ 딱지꽃 추출물을 이용한 최적화된 화장품 조성 및 제형 개발	딱지꽃 추출물 함유량 10%로 화장품 생산으로 딱지꽃 활용 제품에 우수성 입증
⑪ 딱지꽃 추출물을 함유한 제형에 대한 안정성 평가	딱지꽃 추출물에 대한 안정성 평가를 보다 많은 제품에 함유량을 활용할수 있게 됨으로써 딱지꽃 식물에 중요성 부각됨.
⑫ 딱지꽃 추출물이 함유된 시제품 2종(크림, 에센스)제작	시제품 2종 제작으로 각종 박람회 출품 및 시제품 홍보로 실제시장 진입에 총력에 기울이고 있음 당초목표 이상으로 딱지꽃 활용할 수 있는 기반 조성

□ 연구개발결과의 성과 및 활용목표

(단위 : 건수)

성과목표	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
연구수행시 성과목표(A)	1			3		1	3	3			1	3	
연구종료후 성과목표(B)		1						4		4	1	4	
종료 1차년도													
종료 2차년도								1		1		1	
종료 3차년도		1						1		1	1	1	
종료 4차년도								1		1		1	
종료 5차년도								1		1		1	
합 계(A+B)	1	1		3		1	3	7		4	2	7	

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용		기타 (타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창업	고용창업	투자유치		논문		학술발표			정채 활용	홍보 진시	
			SCI						비 SCI								
최종목표	1			1		1					2	1				6	4
연구기간 내 달성실적	상표 출원			시제품 제작													인허가
달성율(%)				완료													

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	자생 딱지꽃의 종자 발아생리 연구, 육묘기술 개발, 재배기술 개발 및 시비방법 개발을 통한 지역 농가 소득원 창출을 위한 기반 마련
②	딱지꽃 유용성분 분석으로 다양한 제품개발로 농민소득증대 및 여러 가지 식품에 활용할수 있는 근거 마련.
③	딱지꽃 추출물로부터 지표성분 물질 분리 및 정제 조건 기술 확보

#### □ 핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과

본 기술과 관련하여 기존 출원된 특허는 대부분이 다수의 생약재 또는 약용식물의 혼합 추출물을 기능성 화장품, 피부 외용제의 원료로 사용할 수 있다는 내용이 개시되어 있었고, 딱지꽃 추출물 단독 또는 딱지꽃 유래 유용물질을 유효성분으로 함유하는 피부개선 및 항스트레스 활성을 갖는 기능성 화장품 개발에 대한 연구는 미비한 것으로 판단되는 바, 본 연구과제에서는 딱지꽃으로부터 유용 물질을 분리 및 동정하고 다양한 기능(기능성 화장품 소재용도를 위한 기능)을 규명하여 국내 출원을 진행함으로써 원천기술 확보

또한, 생물반응기를 이용한 체세포배 대량 증식 기술과 관련해서는 관련 특허가 소수만 존재하고 있으며, 물푸레나무, 나리류, 산삼 등 소수 식물을 대상으로 한 특허만이 검색되었고 딱지꽃의 체세포배를 대량 생산하는 기술에 대해서는 관련 특허가 부재하므로, 딱지꽃의 체세포배를 생물반응기를 이용하여 대량생산할 수 있는 최적 조건을 확립하여 이러한 내용을 국내 및 국외에 출원하여 지적재산권을 확보할 예정

딱지꽃 추출물로부터 지표성분 물질 분리 및 정제 조건 기술 확보 및 피부 세포내 효능을 토대로 새로운 메커니즘 제시와 사업화를 위한 학술적 데이터 마련

미국 국제화장품원료협회(PCPC)에 딱지꽃 추출물 유래 물질 추가 원료 소재 국제 인증과

특허기반 추가 기술이전을 통한 일본, 중국을 비롯한 다국적 기업에 적극적 프로모션 진행할 계획

기능성 화장품으로 인증받기 위한 개별품목 심사(1.안전성, 유효성 또는 기능인증자료 2. 기준 및 시험방법에 관한 자료 3. 신규원료 규격 및 안전성 입증자료) 서류를 포함한 기준 및 시험방법에 관한 자료를 구비하여 심사진행하여 공정 개선 기술, 공정화 반응 기술, 정제 기술, 안정화 기술, 제품 응용 기술 등 다양하게 응용하여 신약, 향노화 소재, 미백 소재, 항염 소재, 항산화 소재 개발 뿐만 아니라 다른 소재들과의 Formulation Technology 등 응용연계 가능성을 높여 의료, 제약, 화장품 및 식품 분야 등에 기여

본 연구개발소재인 딱지꽃 추출물을 활용한 ‘아리아리’ 화장품 완제품 판매를 통한 매출 증대와 국내 OEM/ODM 기업으로 기 구축되어 있는 유통망을 통하여 판로를 확보 계획

화장품으로의 상품화 활용방안 1. 국내 최대 OEM/ODM 기업으로 구축되어 있는 유통망(거 래처 약 300여 업체)를 통한 화장품 시장 적용 2. 기능성 주름개선 및 미백 화장품에 적용: 식물 태좌 조직배양체 유래 유효성분 함유 주름개선 기능성 화장품 또는 미백 기능성 화장품 적용 3. 자외선에 의한 피부 보호용 화장품 적용: 자외선 차단 기능성 화장품 내 피부 보호제 및 After skin care 제품 적용 4. 여드름, 아토피 등 피부질환 완화 화장품에 적용: 여드름 및 아토피 완화 화장품 등 피부과 판매 제품으로의 적용 5. 기타 기능성 화장품 및 의약외품 소재로의 적용: 염증 완화, 가려움 완화 등의 독특한 기능성 화장품 및 발모, 양모 등의 의약외 품 소재로의 적용과 이를 이용한 제품 적용 6. 화장품 및 제약기술의 fusion을 통한 독특한 제약 제조 기술 및 KGMP생산 설비 및 기유통망을 이용한 의약품 소재 및 제품으로의 적용 7. 항염 및 항알러지 연고류 소재 및 제품 적용 8. 탈모 및 여드름 치료제로의 소재 및 제품 적용

우수한 생리활성 성분을 함유하고 있으나 원재료의 수급 문제, 수확 시기 또는 장소에 따른 불규칙한 함량 등으로 인하여 제품에 활용되지 못하는 식물유래 고기능성 생리활성소재에 대하여 식물 조직배양 기술을 이용한 표준화 생산 기술을 개발하는 경우 적용범위가 광범위하여 막대한 효과가 예상

국내 시장에 수입되는 약용식물로부터의 기능성 화장품 원료를 대체하는 효과 및 이를 이용한 주름 방지 및 미백 등의 기능성 화장품 시장의 활성화 및 수출증대 기여

새로운 조직배양 기술로 개발된 식물 태좌 조직 배양체 유래 고기능성 생리활성 소재의 경우 원천적인 지적재산권 확보로 기능성 소재로서도 전세계 시장 대상 상업화 가능

확립된 조직배양 기술에 의한 생리활성 소재의 유도체 개발 기술을 기반으로 하여 타 분야 및 타대상 식물에 응용하여 보다 많은 부가가치 제품 및 소재를 개발가능

TOAKASEI를 통하여 일본콜마 R&D Skin Care 팀의 Manager인 Shunsuke Tokunaga와

딱지꽃 신소재를 소개

식물조직배양기술을 통하여 대두의 태좌조직을 대량생산, 표준화된 지표물질 분석법 등을 2015년 5월 일본 요코하마에서 개최된 CITE JAPAN 2015에 참가하여 딱지꽃 추출물 소재를 제안하였고, 기술적인 지원을 현재에도 진행

TOAKASEI를 통하여 NOF H&B Products research group의 Takashi Matsufufi, Takeshi Tamura 에게 딱지꽃 추출물 신소재를 소개

Company	상담내용
Cosmetic japan ltd.	딱지꽃 켈러스 유도관련 관심, 8월까지 유도 가능 여부 문의, PCPC 인허가 가능 여부
Nikkol Roundex	중국 전 지역 내 유통 가능여부, 디테일 자료 요청 (이메일로 문의시)
PROYA cosmetics co. ltd	광저우 distributor, 딱지꽃 추출물 소개
Ajinomoto co., inc.	딱지꽃 추출물 원료에 관심
Kracie	딱지꽃 식물세포에 관심
LEXIA INC.	화장품 제조회사로 자사소유의 농장이 있고 딱지꽃 켈러스 유도에 관심
Chifure Corporation	화장품제조사
AVON products co., ltd	열,pH,색등안전성관련일반적인켈러스및딱지꽃추출물내용설명
CUORE	딱지꽃 켈러스에 관심, 켈러스 유도에 대해서도 관심
Kinoshitapharmaceuticalco.,ltd	딱지꽃 식물세포 개별소개(카달로그)
Katsuri Inc.	food supplement & cosmetics 회사(삿포로), 식물켈러스, 딱지꽃 추출물 소개
한국콜마(주)	웹타이드 안정화 및 딱지꽃 켈러스 관련 문의
P&G	딱지꽃식물세포에 관심, 중국사용 가능한 켈러스 문의
Shiseido	헤어케어 제품(salon 위주)
Orion Cosmetics Industry co.,ltd	딱지꽃 추출물에 관심
Taisho pharmaceutical co., ltd.	딱지꽃 켈러스 유도 및 phytoplacenta에 관심
Brenntag Ingredients, Inc.	딱지꽃, 포도켈러스에관심,인도네시아 Incosmetickorea참석예정

식물조직배양기술을 통하여 딱지꽃을 대량생산, 생리활성물질 극대화하는 유인제 처리법, 표준화된 지표물질 분석법 등을 2015년 5월 일본 요코하마에서 개최된 CITE JAPAN 2015에 참가하여 딱지꽃 추출물 소재를 제안

LG 생활건강, 미샤, 올리브영, 네이처리퍼블릭, 코스맥스, 코스메카코리아, 한국콜마 등의 국내 장업사, 코스메슈티칼 브랜드 보유 피부과, 보령메디안스 등 기초제품 전라인 및 그 밖의 국내 OEM업체를 통해 안전성 분야를 강화하여 이를 통한 브랜드 시장 진출 계획

구 분		사 업 화 년 도 (단위:백만원)				
		(2016년) 과제종료후 1년	(2017년) 과제종료후 2년	(2018년) 과제종료후 3년	(2019년) 과제종료후 4년	(2010년) 과제종료후 5년
사 업 화 품 목		화장품 소재 및 완제품				
투 자 계 획	인 건 비	20	20	30	70	100
	재료비 및 설비투자비	2	4	7	8	10
	경상운영비	1	2	3	4	6
	계	4	8	13	19	26
생 산 계 획		100	200	500	1000	15000
판매계획	내 수	5	10	13	18	20
	수 출	5	10	15	22	40
	계	10	20	28	40	60

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

천연 기능성화장품의 경우 핵심성분으로 사용되고 있는 많은 것들이 생물자원에서 얻은 것들이라는 사실로 미루어 기능성 화장품의 소재를 계속적으로 탐색하고 효능을 검증해서 대량생산으로 연결시키는 일은 차별화된 농업과 경쟁력 있는 농업으로 우리의 농업을 개선시킬 수 있는 계기를 만들어 줄 수 있다. 기능성 화장품은 화장품과 의약품의 중간적인 성격을 갖는 제품이라 볼 수 있다. 일반 화장품이 안전성을 강조한데 비해 기능성 화장품은 안전성외에 특히 효능 효과를 강조하는 것이 특징이 있다. 농업생물자원으로부터 기능성화장품 소재가 탐색되면 대량생산, 분리, 정제과정을 거쳐 기능성을 갖는 화장품으로 개발할 수 있을 것이다. 워낙 소비자들의 욕구가 강하고 사용범위가 여성 중심에서 남성으로까지 확대되고 있고, 남녀노소 구분 없이 화장품의 사용범위가 확대되고 있는 추세이어서 농업생물자원으로부터의 기능성화장품 개발 분야에서 산-학-연-관이 힘을 모아 확실한 제품 몇 개를 개발하는 선택이 필요하다.

제 7 장 연구시설장비 현황

기자재/시설/장비명	구입년월	규 격	구입가격 (백만원)	수 량	용 도
HPLC	2006. 09	Agilent (1200 series)	73	1	분석지원용
HPLC/MS/MS	2007. 10	Applide Biosystem (3200QTRAP)	211	1	분석지원용
동결건조기	2007. 07	100kg	179	1	시제품제작
추출여과설비	2009. 09	실험용	76	1	생산지원
교반농축설비	2009. 09	한성Eng. (주문제작)	88	1	생산지원
이온교환수제조기	2009. 11	HS-R/O-25	30	1	효능평가
Real Time PCR	2012. 07	Rotor-Gene Q	30	1	효능평가
TLC system	2010. 06	Merck.	32	1	효능평가
Prep-LC	2011. 09	Varian	85	1	분석지원용
Speed Vac Dryer	2011.10	LABCONCO 7811000/7810 000	10	1	분석지원용

## 제 8 장 참고문헌

1. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 333-338 (2004)
2. *The Plant Cell, Regulation of Ovule Development* (2004) 16: 32-45
3. *Trend in Plant Science, Molecular Control of Ovule Development* (1996) 1:228-232
4. *Journal of Plant Physiology, Effects of Endosperm and Placenta on Development of Capsella Embryos in Ovules cultivated in vitro* (1985) 118(2): 127-137
5. *Plant Physiology, Comparative Transcriptional Profiling of Placenta and Endosperm in Developing Maize Kernels in Response to Water Deficit* (2003) 131: 568-582
6. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology, Accumulation of Capsaicin in Seed, Pericarp and Placenta of Capsicum annum L Fruit* (2008) 17(1): 23-27
7. Hong Yunho. *Food Physiological Active Substance Science*. Chonnam National University Press. Gwangju, Korea pp. 13-72 (2009)
8. Kalt W. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidant. *J. Food Sci.* 70: 11-19 (2005)
9. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Agr. Food Chem.* 63: 1035-1042 (2000)
10. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 53: 75-100 (2009)
11. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 78: 2872-2888 (2006)

<첨부>

## 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

<b>신청과제명</b>	고령지 자생 딱지꽃을 활용한 기능성제품개발		
<b>주관연구책임자</b>	여진희	<b>주관기관</b>	정선군 농업기술센터

### 1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
생물반응기를 이용한 딱지꽃 체세포배 대량생산 기술개발	한국	60%	80%	90%	본 연구팀이 리드하는 수준임
딱지꽃 및 딱지꽃 유래 유용물질을 이용한 기능성 화장품(피부개선 & 항스트레스) 개발	한국	60%	80%	90%	본 연구팀이 오랜 경험을 가지고 있음

### 2. 특허분석

#### 가. 특허분석 범위

<b>대상국가</b>	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
<b>특허 DB</b>	FOCUST( <a href="http://focust.wisdomain.net/">http://focust.wisdomain.net/</a> ), 특허정보원 DB( <a href="http://www.kipris.or.kr">www.kipris.or.kr</a> )
<b>검색기간</b>	최근 5년간(2009.5.23~2014.7.17)
<b>검색범위</b>	제목 및 초록, 청구범위

#### 나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	생물반응기를 이용한 딱지꽃 체세포배 대량생산 기술개발	딱지꽃 및 딱지꽃 유래 유용물질을 이용한 기능성 화장품(피부개선 & 항스트레스) 개발
Keyword	(딱지꽃 or 위릉채 or 근두채 or 번백채 or 번백초 or 소모약 or 야구방화 or 이 질초 or 천정지백 or 호조채 or "Potentilla chinensis" or "고령지 자생 식물") and (생물반응기 or 체세포배 or 대량생산 or 캘러스 or bioreactor or somatic embryo or mass production or callus)	(딱지꽃 or 위릉채 or 근두채 or 번백채 or 번백초 or 소모약 or 야구방화 or 이 질초 or 천정지백 or 호조채 or "Potentilla chinensis" or "고령지 자생 식물") AND (피부 or 스트레스 or 화 장*)
검색건수	14	20

유효특허건수		3	5
핵심특허 및 관련성	특허명	녹차캘러스 추출물을 함유하는 항염증 화장료 조성물의 제조방법	위릉채 추출물을 포함하는 모공축소 도는 피지분비 억제용 조성물
	보유국	한국	한국
	등록년도	2014	2013년
	관련성(%)	50%	60%
	유사점	식물 종자로부터 캘러스를 유도하여 증식한 후, 생물반응기를 이용하여 대량배양생산 한다는 내용을 개시하고 있다는 점에서 유사함	위릉채 추출물을 기능성 화장품의 소재로 활용할 수 있다는 내용이 개시되어 있고, 모공축소 또는 피지분비 억제 효과를 갖는다는 내용이 개시되어 있어 궁극적으로 기능성 화장품의 소재로 딱지꽃(위릉채) 추출물을 사용할 수 있다는 내용이 개시되어 있다는 점에서 유사함
	차이점	핵심특허는 대량생산의 대상이 녹차인 반면 본 기술은 딱지꽃 체세포배라는 점에 차이가 있으며, 딱지꽃 체세포배의 배양을 위해 생물반응기를 이용한다는 내용이 개시된 선행문헌은 검색되지 않았음	선행기술에는 딱지꽃 추출물의 항스트레스 개선 효과에 대한 내용이 개시되어 있지 않고, 딱지꽃에 함유된 유용물질의 분리 내용 및 유용물질의 기능성 화장품 원료로서의 사용가능성에 대한 내용도 개시되어 있지 않음. 또한, MMPs 억제 효능 평가, 염증 유발 유전자 억제 효능 평가 및 Mitochondria 활성관련 유전자 테스트에 대한 내용도 언급되어 있지 않음

참고문헌(딱지꽃)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술료사업 (*해당사업 표기*)의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술료사업(11-1543000-001097-01)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.