

317067-3

유용 미생물을 활용한 탈모치료용  
혈행 개선식품 핵심소재 발굴 및  
산업화 기술개발 최종보고서

2020

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
고부가가치식품기술개발사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003586-01

# 유용 미생물을 활용한 탈모치료용 혈행 개선식품 핵심소재 발굴 및 산업화 기술개발 최종보고서

2021. 07. 15.

주관연구기관 / (주)한지  
협동연구기관 / 경성대학교  
신라대학교  
위탁연구기관 / 경상남도 농업기술원

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

최종보고서										보안등급		
										일반[ ], 보안[ ]		
중앙행정기관명						사업명						
전문기관명 (해당 시 작성)						내역사업명 (해당 시 작성)						
공고번호						총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
						연구개발과제번호						
기술 분류	국가과학기술 표준분류		LB1801	45 %	LB1703	15%	LB0202	10%				
	농림식품과학기술분류		PA0201	40 %	PA0102	15%	AA0201	10%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)			국문									
			영문									
연구개발과제명			국문		유용 미생물을 활용한 탈모치료용 혈행 개선식품 핵심소재 발굴 및 산업화 기술개발							
			영문		Development of Industrialization Technology and Excavation of Main Active Material Related with Blood Circulation Food for Treating Hair Loss using Useful Microorganism							
주관연구개발기관			기관명		(주)한지		사업자등록번호		605-81-39463			
			주소		(46986)부산광역시 사상 구 새벽시장로 146		법인등록번호		180111- 0332203			
연구책임자			성명		양 한 조		직위		대표이사			
			연락처	직장전화		051-317-9006		휴대전화				
				전자우편		hanji88@daum.net		국가연구자번호				
연구개발기간		전체		2017. 11. 01 - 2021. 04. 30(3년6개월)								
		단계		1단계		2017. 11. 01 - 2021. 04. 30(3년6개월)						
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금		
		현금		현금		현금		현금		합계		
		현물		현물		현물		현물		합계		
총계		675,000		30,000		195,000				705,000 195,000 900,000		
1단계	1년차		225,000		10,000		65,000				235,000 65,000 300,000	
	2년차		225,000		10,000		65,000				235,000 65,000 300,000	
	3년차		225,000		10,000		65,000				235,000 65,000 300,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		
		경성대 학교산학협력단		강재선		교수				공통 대학		
		신라대 학교산학협력단		김미령		교수				공통 대학		
		경상남도농업기술원		문진성		농업연구사				위탁 국립연		
연구개발담당자 실무담당자		성명		양우진		직위		연구실장				
		연락처	직장전화		051)317-9006		휴대전화					
			전자우편		hanji88@daum.net		국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2021년 07월 15일

연구책임자: 양 한 조 (인)

주관연구개발기관의 장: 양 한 조 (직인)  
 공동연구개발기관의 장: 신 강 원 (직인)  
 공동연구개발기관의 장: 손 창 식 (직인)  
 위탁연구개발기관의 장: 하 인 종 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유용 미생물을 활용한 탈모치료용 혈행 개선식품 핵심소재 발굴 및 산업화 기술개발”(개발기간 : 2017. 11. ~ 2021. 04.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 07. 15

주관연구기관명 : (주)한지 (대표자) 양한조

협동연구기관명 : 경성대학교 산학협력단 (대표자) 신강원 (인)

협동연구기관명 : 신라대학교 산학협력단 (대표자) 손창식 (인)

위탁연구기관명 : 경상남도 농업기술원 (대표자) 하인종



주관연구책임자 : 양한조

협동연구책임자 : 강재선

협동연구책임자 : 김미령

위탁기관책임자 : 문진성

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명						총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1801	45%	LB1703	15%	LB0202	10%	
	농림식품 과학기술분류	PA0201	40%	PA0102	15%	AA0201	10%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)								
연구개발과제명		유용 미생물을 활용한 탈모치료용 혈행 개선식품 핵심소재 발굴 및 산업화 기술개발						
전체 연구개발기간		2017.11.01. - 2021.04.30.						
총 연구개발비		총 900,000 천원 (정부지원연구개발비: 675,000 천원, 기관부담연구개발비 : 현금 30,000 천원 현물 195,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계		기초[ ] 응용[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용	최종목표	○ 유용 미생물을 이용한 혼합 적양파 발효물의 탈모 치료제 선도물질 소재개발 및 산업화						
	전체내용	현재 시판되고 있는 대표적인 발모제로 미녹시딜과 피나스테라이드 등이 있음. 하지만 이는 충분한 효과를 보여주지 못할 뿐만 아니라 심각한 부작용 (발기부전, 저혈압 환자의 혈압저하, 태아의 기형 등)을 나타내므로 천연물 추출물 및 이들의 복합제를 활용하여 화학 발모제보다 효과는 우수하고 부작용은 개선된 천연물 유래 발모제를 개발하고자 함. 발모를 위해서는 혈행개선을 통해 모낭으로의 영양공급 활성화가 필요한데 이를 위해 개발하고자 하는 천연물들의 혈행개선 효과를 중점적으로 연구하여 모발에 도움을 주는 제품을 개발하고자 함.						
	목표	○ 1단계(스타제품 육성을 위한 작물의 기원정립 및 가공표준화) ○ 2단계(안전성, 기능성 평가) ○ 3단계(건강기능성제품 개발)						
	내용	○ 1단계(스타제품 육성을 위한 작물의 기원정립 및 가공표준화) - 스타제품 원재료의 제품화 단계를 위한 원료 생산 및 표준화 - 국내 주요 적양파 생산지별 기원 정립 현장 적용 및 표준화 정보를 지닌 데이터 확보 (Quercetin의 추출 정제 표준화) - 발효 전후에 적양파에 존재하는 기능성 flavonoid, 단백질 및 펩티드 분리 추출 시스템 개발 - 발효 전후 분리 추출된 기능성 flavonoid 및 단백질, 펩티드들의 탈모치료 관련 생리활성 측정 비교 ○ 2단계(안전성, 기능성 평가) - 효능 활성이 확인된 혼합 적양파 발효물의 동물 시험 확인 - 선도물질의 제품화를 위한 공정 기술 개발 재정립 및 안전성 평가 실시 (in vitro, in vivo효능 평가 및 작용기전 규명) - 식품의약품안전처 모듬 회의를 통한 기능성 인증 관련 지침 재확인 ○ 3단계(건강기능성제품 개발) - 국내 건강기능식품 개별 인정형 소재로 인증 신청 및 일반 건강식품 제품화						

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pilot 생산(sacle-up)</li> <li>- 기준 및 시험법 설정 (분석법 설정)</li> <li>- 임상시험 승인 신청</li> <li>- 수출, 제품 홍보 전략 마련</li> <li>- 식품 및 화장품 분야 파생제품 제품개발 및 사업화</li> </ul>
--	--

연구개발성과	<p>&lt;핵심성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ (사업화지표) 특허출원 3건, 특허등록 2건, 제품화 5건 및 매출 발생 등 상용화 목표 성과 달성</li> <li>○ (연구기반지표) SCI급 1편, KCI 급 5편 게재</li> </ul> <p>&lt;전략성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효물질의 혈관내 중성지방 감소 및 저밀도 콜레스테롤 저감 관련 기능성 소재 2건 이상 발굴</li> <li>○ 발효물질 유효성분 기전연구 2건 이상 실행 (혈행개선, 발모)</li> <li>○ 건강기능식품 기능성원료 개발</li> </ul>
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제품화에 따른 원자재 안정적 대량 구매 및 지역특화 농가 소득 증대 기여</li> <li>○ 본 기술개발의 최종목표는 유용 미생물을 이용한 탈모치료용 기능성 소재개발과 및 기술개발 완료시 기술을 이전하거나 원료를 독점 공급하는 방안을 모색하여 사업화 라인 구축</li> <li>○ 발효 후 제품에 존재하는 기능성 flavonoid, macrolactin, 단백질 및 펩티드들의 간편한 대량 분리 시스템 개발 및 이들 생리활성 물질의 물성에 대한 기초연구</li> <li>○ 검증된 소재는 당뇨개선, 항산화, 항비만 관련 식품관련 신제품 및 화장품 관련 제품 개발에 활용함으로 연속적인 유사제품 개발이 가능할 것으로 기대되며, 기업의 경쟁력 강화 및 수입증대</li> <li>○ 추출한 기능성 성분을 이용한 탈모개선 기능성 제품 개발 및 치료제 개발 등의 제약 산업화에 기여</li> <li>○ 중소기업 매출 증대를 통한 식품산업관련 일자리 창출 효과 기대</li> </ul>
---------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건 수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	6	2						생명 정보	생물 자원		정보	실물

연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호

국문핵심어 (5개 이내)	스쿠알렌 합성효소	생물전환	항트리글리세라이드혈증	생균제	기능성식품
영문핵심어 (5개 이내)	Squalene Synthase	Bioconversion	Antitriglyceridemia	probiotics	Functional food

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

# 1. 연구개발과제의 개요

## (1) 연구개발의 목적

### 1) 탈모

- 탈모는 정상적으로 모발이 존재해야 할 부위에 모발이 없는 상태로, 일반적으로 두피의 성모가 빠지는 것을 의미함. 탈모의 원인으로는 유전적 원인과 남성 호르몬인 안드로겐(androgen)이 중요한 인자로 생각되고 있음. 원형 탈모증은 자가 면역 질환으로 생각되고 있으며, 휴지기 탈모증은 내분비 질환, 영양 결핍, 약물 사용, 출산, 발열, 수술 등의 심한 신체적, 정신적 스트레스 후 발생하는 일시적인 탈모로 모발의 일부가 생장 기간을 다 채우지 못하고 휴지기 상태로 이행하여 탈락되어 발생함.

- 현재 탈모 치료는 남성형 탈모, 여성형 탈모의 치료를 위해서는 미녹시딜 등의 바르는 약, 피나스테라이드 등의 먹는 약, 모발 이식술 등이 이용되고 있으며 원형 탈모증의 치료를 위해서는 국소 스테로이드 제제나 전신 스테로이드 제제, 면역 요법 등이 이용되고 있음. 휴지기 탈모증은 원인이 제거되면 모발이 회복되므로 원인을 확인하고 치료하는 것이 중요하다고 함.

- 남성형 탈모증의 원인은 크게 유전적인 원인과 안드로겐을 원인으로 들 수 있는데, 유전적 원인은 가족 중에 탈모의 가족력이 있는 사람은 유전적으로 정해진 시점에서 적정량의 안드로겐이 모낭에 작용하면 탈모가 진행됨. 남성형 탈모가 이른 나이에 시작된 경우에는 심한 대머리로 진행되는 경우가 많음. 안드로겐의 이유로는 털집에 도달하게 되면 5 $\alpha$ -환원효소에 의해 더욱 강력한 안드로겐인 디하이드로테스토스테론으로 변환하게 되어 탈모가 발생하게 됨. 탈모가 발생하는 원인인 안드로겐은 그 양 때문에 일어나는 것보다는 탈모부위에서 5 $\alpha$ -환원효소가 유독 높은 작용을 하게 되면 탈모가 진행되는 것임. 여성형 탈모는 남성형 탈모처럼 '완벽한 대머리'는 되지 않지만 앞머리 이마선은 유지된 채 20대 중반부터 시작되는 경우가 많음. 여성형 탈모의 원인으로는 호르몬 불균형으로 나이가 들면서 호르몬이 줄게 되고 모발이 많이 빠지게 되고, 다른 호르몬의 이유는 갑상선에 이상이 생기게 되면 호르몬의 불균형이 원인이 됨. 또 다른 이유는 스트레스로 인해 탈모가 발생할 수 있으며 여성형 탈모에서 가장 주된 원인임. 자율신경이나 교감신경을 자극하고 아드레날린이 분비되어 혈관을 수축시키고 두피가 긴장되어 모근에 영양공급이 불량해져 탈모를 일으키게 됨.

- 손발 저림, 시림, 만성피로, 앓았다 일어날 때 현기증의 증상이 자주 나타난다면 혈액순환장애를 의심해봐야 함. 대부분의 사람들이 이런 증상을 대수롭지 않게 여기는 경우가 많지만 원활하지 않은 혈액순환은 만병의 원인이라고 불릴 만큼 위험하므로 평소 경각심을 가지고 혈행 개선에 노력을 가해야 함.

- 우리 몸에서 혈액은 주요 장기와 세포 활동에 산소와 에너지를 공급해주는 중요한 역할을 하는 공급 수단으로, 쉬지 않고 끊임없이 순환해야지만 정상적인 생활이 가능해짐. 하지만 혈액 속에 노폐물이 쌓여 혈전이 생김으로 인해 혈관이 좁아지게 되면 혈액순환 장애로 인해 동맥경화나 뇌경색과 같은 치명적인 혈관 질환으로 이어지게 됨.

- 혈액의 순환을 통해 두피에 공급되어야 할 영양과 수분이 혈액순환 장애로 제대로 공급되지 못해 두피, 모근, 모발이 영양을 잃고 탈모 현상을 나타냄. 이렇듯 두피, 탈모관리는 순전히 머리카락이 빠지는 것을 관리하고 개선하는 것도 중요하지만 그보다 앞서 우리 몸의 순환을 정상화 시키고 아울러 혈액순환을 원활하게 해줌으로써 두피, 탈모관리의 효과를 극대화 시키는 게 우선이 되어야함.

- 따라서 본 사업을 통해 비용을 줄이고, 혈행 개선에 도움을 주어 탈모를 미리 예방하고 탈모에 도움을 줄 수 있으며 사용하기 간편하고 일상생활에서도 흔히 접할 수 있는 발효양파를 이용한 발모제를 개발하여 탈모방지 및 건강한 모발 촉진에 도움을 줄 수 있는 제품을 개발하고자 함.

### 2) 소재의 중요성

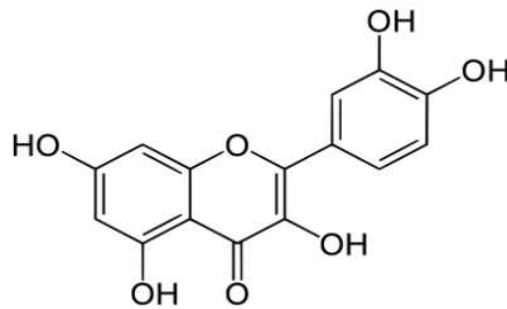
#### (1) 연구 주재료인 적양파의 중요성

- 적양파(*Allium cepa* L.)는 백합과에 속하는 다년생 식물로 동서양을 막론하고 채소와 향신료로 널리 이용하고 있으며, 항산화 작용을 하는 quercetin, quercitrin, rutin 등 flavonoid 계 색소와 체내 축적된 지방분해 작용을 하는 allyl propyl disulfide 및 diallyl disulfide 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있

음. 적양파의 효능에 대한 연구로는 중금속 해독작용, 항균효과, 혈당 저하효과, 심·혈관계질환 예방효과, 잔틴 산화효소 저해작용, 항산화작용, 항암효과에 대한 연구보고가 있음.

- 비타민 B1, C, 칼슘, 인, 무기질 등이 혈액순환을 촉진시켜 위장 기능을 강화하며 콜레스테롤 제거 및 고혈압, 고지혈증을 예방하고 적양파는 흰양파에 비해 항산화 물질인 안토시아닌과 퀘르세틴 함량이 훨씬 높은 편이며 항산화능이 높을수록 발모촉진 효과도 크게 나타남.

- 앞서 언급한 바와 같이 적양파의 성분 중 퀘르세틴(Quercetin)이라는 성분은 최근 많은 연구를 통해 혈관 벽을 튼튼하게 해 동맥경화, 고혈압 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 우리 몸의 체내에서 강력한 항산화 작용 및 전신적인 염증 반응을 유발하는 사이토카인의 분비를 억제하는 항염증 효과도 있는 것으로 보고되고 있음.



퀘르세틴(Quercetin) 구조형태

- 적양파의 기능성에 대한 연구는 지속적으로 진행되고 있으며, 적양파는 양파의 품종 중 플라보노이드가 가장 풍부하게 함유된 것으로 알려져 식용 또는 한약재 첨가물 형태의 제품화가 시도되고 있고, 발효조건에 따라 발효되는 퀘르세틴 함량이 달라 퀘르세틴 함량을 극대화할 수 있는 발효조건 확립이 필요함.

- 적양파 생산량은 매년 증가하고 있으며 소비방법은 대부분 생식에 의존하고 있어 안정적인 소비시장 확보를 위한 가공품 개발이 요구됨.

- 한국인 건강 전문가 100명에게 건강에 가장 좋은 식품 1위가 발효식품이고 2위가 적양파였으며(TV천기누설) 금번 개발 과제의 성과로 적양파를 발효시킨 고 퀘르세틴 제품은 한국인의 건강뿐만 아니라 성인병예방 식품으로 수출까지 가능한 잠재력이 풍부한 연구 과제임.

## (2) 연구재료 호박의 중요성



- 호박에는 식이섬유, 미네랄, 카로티노이드 등이 함유되어 있어 변비에 효과적이며, 혈압을 조정해주는 데 많은 도움을 줌. 또한 호박씨에는 필수아미노산과 비타민E가 함유돼 뇌의 혈액순환, 두뇌 발달에 도움을 줌.

- 영양 연구 리뷰에 실린 연구논문에 의하면 호박은 2형 당뇨병 환자들의 혈당을 낮춰 인슐린 분비를 촉진함으로써 당뇨병 환자들에게 효과적이며 유방암의 발병률을 현저히 낮춰주는데 많은 도움이 됨.



- 2011년에 발표된 연구 자료에 의하면 12주 동안 매일 호박씨 기름 2g을 먹은 노인 여성들은 좋은 콜레스테롤이 크게 증가했는데 확장기 혈압은 감소한 것으로 나타났으며 호박을 자주 섭취하는 사람은 관절통과 두통이 적다는 연구 결과도 발표됨. 또한 호박유에는 식물 에스트로겐이 함유되어 있어 폐경기 이후 에스트로겐 감소와 연관된 심혈관 질환을 예방하는 것으로 알려짐.
- 호박은 천연 에스트로겐 성분인 오메가-3 지방산과 리그난의 일종인 리놀레산이 들어 있는데 이런 성분들이 유방암 발병을 막아주는 것으로 분석됨. 또한 호박은 유방암 이외에도 폐암이나 위암, 대장암 위험을 감소시키는 것으로 알려져 있음.
- 호박에는 베타-카로틴이 풍부, 베타-카로틴을 섭취하면 비타민 A로 전환되므로 베타-카로틴은 비타민 A로서의 기능을 기대 할 수 있음. 비타민 A는 세포분화의 기능과 상피세포 성장인자로서 세포의 재생을 촉진하는 기능을 가지고 있어 두피세포 생성을 자극함. 이러한 비타민 A가 부족 할 경우 피부가 건조해지고 비듬이 생성되고, 탈모가 일어날 수 있음. 이러한 베타-카로틴이 풍부한 호박을 섭취하면 탈모를 예방하는 것으로 알려짐.
- 2014년 우리나라의 한 연구에 의하면 대머리 남성들을 대상으로 한 실험에서 24주 동안 매일 400mg의 호박씨 기름을 섭취한 사람들은 머리털이 40% 더 생긴 것으로 나타나며 호박은 5 $\alpha$ -환원효소의 활동을 억제하는데 이 효소는 대머리와 관련된 주요 호르몬인 테스토스테론의 생산과 관련 있다고 함.

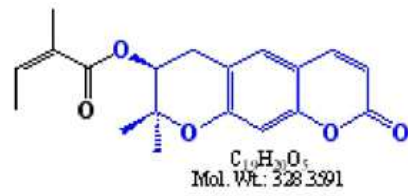
(3) 연구재료 참당귀의 중요성



- 당귀는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 유용 식물자원으로 우리나라에서 생산되는 참당귀 또는 토당귀(*Angelica gigas* Nakai), 중국당귀(*Angelica acutiloba* Kitagaw)와 일본당귀(*Angelica sinensis* Diels)로 한국, 중국 그리고 일본에서 생산되는 한방 생약제 중의 하나이며, 다양한 약리학적 효과가 있는 것으로 알려져 있음. 예로부터 당귀는 특히 부인과 질환에 많이 사용되며, 대표적으로는 빈혈치료, 진적작용, 진통효과, 면역증강작용, 항산화작용, 관절염 치료, 항암작용, 알코올 대사 촉진작용 및 간질환 개선작용 등이 있음.
- 동의학에 따르면 당귀는 부족한 피를 보충하고 월경이상을 조절하는 보혈조경(補血調經), 피를 활발하게 순환시켜 통증을 멈추게 하는 활혈지통(活血止痛), 대장을 윤택하게 하여 부드럽게 하는 윤장(潤腸) 세가지로 표현함.
- 참당귀의 주요성분인 decursin은 일본에서 바디나물(*Angelica decursiva* Fr. et Sav.)의 에테를 추출액으로부터 최초로 분리된 피라노쿠마린(pyranocoumarin) 계열의 천연물 성분으로 분자량 328.35이며, 분자식이 C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>임. 참당귀의 뿌리, 줄기에는 쿠마린(Coumarin)계의 decursin, decursinol angelate, nodakenetin, nodakenin,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -sitosterol 등이 함유되어 있으며, 주성분은 pyranocoumarin계열의 decursin과 decursinol angelate 임.



**Decursin**



**Decursinol angelate**

참당귀 에탄올 추출 농축 정제물 (Agnex)에 함유되어 있는 성분들

- 본 과제 협력 1 연구책임자는 참당귀 연구를 약 18년간 진행하였고, decursin과 decursinol angelate를 함유하는 에탄올 추출 농축 정제물(*Angelica gigas Nakai* ethanol extract: Agnex)전 작용, 고지혈증 치료효과에 관한 특허를 15건 이상 보유하고 있음. Agnex는 정제능이 떨어지면 고혈압을 유발할 수 있기 때문에 적어도 70% 이상의 decursin과 decursinol angelate를 함유해야 함. 또한 본 연구자는 주성분이 95% 이상 함유토록 하는 참당귀 추출물의 추출법과 이를 이용한 항산화 효과에 대해 밝힌 바 있으며 국내 특허로 등록하였음(대한민국등록특허 제 10-0893779호).

- 참당귀 추출물은 고온, 1년 이상 장기보존연구에서도 안정성을 유지한 것으로 확인되어 안정성이 매우 높은 물질임.

### 3) 유용 미생물을 이용한 발효의 중요성

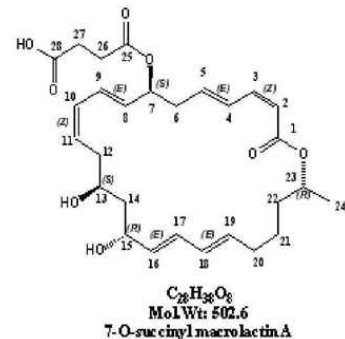
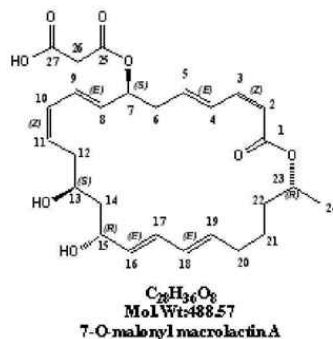
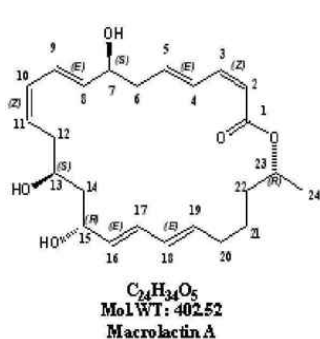
- 본 과제 협력 1 연구책임자는 종균등록하여 보관하고 있는 균주(*Bacillus polyfermenticus* KJS-2(이하 BP2라 함), *Bacillus mojavensis* KJS-3, *Bacillus velezensis* 5종)를 이용하여 천연물연구를 시도하여 왔음.

- 본 과제에서는 상기 균주를 모두 이용하되 한국미생물보존센터에 기탁되어 있는 BP2(종균등록번호 K)CCM10769P)를 이용하여 적양파의 quercetin 생산량을 증가시키는 동시에 BP2와 복합 발효 시 생성되는 유효 성분들을 이용하고자 함.

- BP2는 다양한 소화효소를 분비하며, 포자를 생성함으로써 섭취 시 소화관에서 매우 안정함. 또 비타민과 유산은 항바이러스 효과, 항균성, 항암효과 등의 활성을 가짐. 대사산물로 macrolactin A(MA), 7-O-malonyl macrolactin A(MMA), 7-O-succinyl macrolactin A(SMA), macrolactin E(ME) 등의 macrolactin 화합물을 생산함.

- MA는 human 유래의 squalene synthase(SQS)에 대하여 저해효과가 있어 콜레스테롤 생합성을 억제하는 효과가 있음. SQS는 acetyl-CoA에서 시작하여 콜레스테롤이 합성되는 생합성 과정 중에서 farnesyl pyrophosphate(FPP)가 squalene 으로 전환되는 단계를 촉매하는 효소임. BP2의 SQS 저해는 HMG-CoA reductase 저해제와는 달리 콜레스테롤 생합성 단계의 하류에 해당하는 효소를 저해하는 것으로, 이소프레노이드(isoprenoid) 물질의 합성에는 영향을 주지 않으며 콜레스테롤 합성을 차단할 수 있음.

- 강재선 교수 연구팀은 BP2의 macrolactin 생산 수율을 최대화할 수 있는 노하우를 보유하고 있음.



BP2로부터 생성된 macrolactin A 및 유도체의 화학적 구조

#### 4) 발효의 중요성

- 초산발효를 통한 발효 식초는 높은 혈압을 내리는 작용을 도우며 활성산소 소거작용, 종양세포 증식 억제 효과가 있어 암세포 증식 억제를 도움. 높은 혈중 콜레스테롤의 수치를 내려주며 발효 식초의 신맛이 야채와 과일에 있는 비타민C 분해효소 아스코로비나제의 작용을 억제해서 칼슘 흡수를 좋게 함. 또한 구연산으로 바뀌어서 구연산 사이클로 피로물질인 젖산과 피루브산을 분해하는 역할을 함. 혈액을 깨끗하게 하는 것은 구연산회로에서 젖산과 피루브산등의 분해가 진행되기 때문에 혈행이 좋아지는 것으로 어깨 결림과 손발 저림이 좋아지고 신진대사에도 효과가 좋아져 혈액정화작용을 도움.
- 발효는 미생물의 활동으로 특히 probiotics가 당질을 이용하여 발효 산물인 알코올, 유기산, 탄산가스 등 분해산물을 생성하는 작용으로 발효를 통해 생성되는 유기산 및 분해산물들이 건강에 좋다는 연구 결과가 발표되면서 식품, 건강기능식품, 화장품 등 바이오계통 제품화에 적극 활용되고 있으며, 주로 천연물 발효 전 단위 공정으로써 적용되고 있음.
- 최근에 한국 전통 발효식품이 건강에 좋다는 것이 과학적으로 증명되고 있으며 건강식품 5가지 중 3가지가 발효식품이며 김치와 장류 그리고 요구르트가 선정되어 국제적으로도 발효식품은 건강식품으로 인식되고 있음.
- 발효과정은 여러 가지 자연 성분(isoflavons, saponins, phytosterols, phenols)을 함유하여 생물학적 활성을 높인다고 보고되고 있음.
- 발효에 사용되는 probiotic strains는 생체에 유익한 효과를 주고 또한 안전하다고 보고되고 있음.
- 발효식품의 우수성은 기질로부터 오는 건강기능물질, 즉 파이토케미칼을 소화시키기 좋게 또는 활성을 더 높이는 역할을 하므로 결국 건강기능성이 증진됨. 발효과정을 통해 건강기능은 더 증진되므로 좋은 재료, 좋은 발효 미생물, 발효 조건, 발효 방법 등을 잘 조절하면 고품질의 건강기능식품의 개발이 이루어지리라고 봄.
- 본 연구에서는 1차 발효된 적양파 식초에 천연물 호박을 넣고 2차 발효를 통해 생산된 발효액을 제품에 혼합하여 사용함.
- 이에 본 연구과제에서는
  - 1) 미생물 혼합 발효 적양파, 전통방식을 응용한 초산 발효된 호박, 고순도 참당귀 추출물인 Agnex를 혼합하여 3종 원료의 혼합물을 이용하여 탈모예방 혈행개선 건강기능식품 개발
  - 2) 발효에 효과적인 균주 선정과 대량 생산에 활용할 수 있도록 발효 시간을 단축할 수 있는 공정 개발.
  - 3) 다양한 기능성분을 함유하고 있는 적양파를 주원료로 하여 혈행개선에 유용한 대사산물을 생산하는 미생물을 복합발효하여 지표성분을 최대 생산할 수 있는 발효조건 확립.
  - 4) 호박의 기능성 물질을 증대시키기 위하여 적양파 식초와 혼합발효 기술을 통해 발모 효과 기능성을 부각시킴
  - 5) 혈행개선 및 항혈전 효과, 고지혈증 억제 등 다양한 기능성을 가지고 있는 Agnex를 일정비율 첨가하여 탈모지연, 억제, 치료용 제품을 개발.
  - 6) 적양파 원료 소비 촉진은 물론 경남 특산품으로 지정받아 지역경제 활성화 및 농가소득 증대에 이바지 하고자 함.

## (2) 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### 1) 기술수준

- 국내 발모 케어는 발모제, 발모토닉, 발모 샴푸 린스 등의 의약부외품이 시장의 60% 이상을 차지하며, 일반용 의약품 발모제, 의료용 의약품 남성형 탈모증 치료제가 각각 20% 정도를 차지함.
- 식품의약품안전처의 자료에 따르면 의약외품으로 허가받은 탈모방지샴푸 가이드라인이라 불리는 식약처 임상시험을 거친 제품은 단 4개에 불과했으며, 양모제 효력평가 시험법 가이드라인은 탈모방지 및 양모(모발 굵기 증가)의 효능을 평가하는 시험법을 표준화한 지침으로 지난 2009년 11월에 마련되었음.

○ 국내에서 가장 많이 팔리는 먹는 약인 프로페시아는 전립선 비대증 치료에 사용하다 그 부작용에 착안해 만들어진 발모제로 계속 복용해야 하며 중단 땀 새로 난 굵은 머리털도 6개월 내에 다시 가늘어지면서 짧은 솜털로 바뀌게 되고, 이 약은 남성전용으로 사용되며, 여성이 복용하는 것을 금하고 있음.

## 2) 시장현황

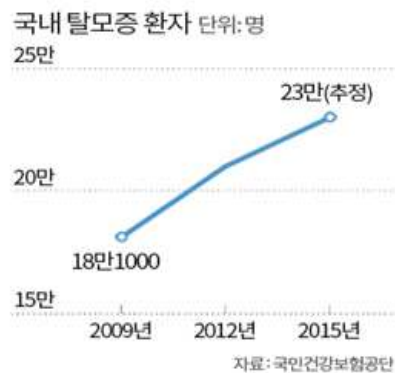
○ 현재 탈모와 안티에이징에 관한 국민적인 관심은 사회적인 화두로 자리 잡은 지 오래이고, 특히 식습관의 영향으로 비만 등 높은 콜레스테롤 수치로 인한 혈행장애와 그로인한 탈모는 중요이슈임.

○ 현재 탈모시장은 일반의약품과 전문의약품, 샴푸나 비누, 화장품 등을 포함한 공산품 및 의약품, 가발 및 두피 서비스 등의 모발 관리, 모발이식기술 등 다양한 시장 군을 형성하며 매년 급속한 성장속도와 무수한 관련 제품 및 서비스 확대 중에 있음.

○ 최근에는 탈모관련 모발 팩, 탈모관련 앱(App), 운동을 통한 탈모치료 등 다양한 분야에서 서비스가 새롭게 창출됨.

○ 현대사회로 갈수록 고령화가 급속히 진행되어가며, 탈모제품 수요계층이 노인층에서 젊은층으로 점차 확산되어져 가며, 보다 더 건강하고 젊게 보여 지고 싶은 열망은 갈수록 심화되어지고 있으며 Anti-aging제품의 다양화, 심도 깊은 연구를 기반 한 제품의 수요는 갈수록 늘고 있음.

○ 최근 20~30대의 젊은 남성과 여성에게 탈모 질환이 발생하는 비율이 큰 폭으로 증가하고 있음. 하지만 젊은 남성과 여성은 전문가와의 상담을 통해 구입해야 하는 의약품을 선호하지 않음.

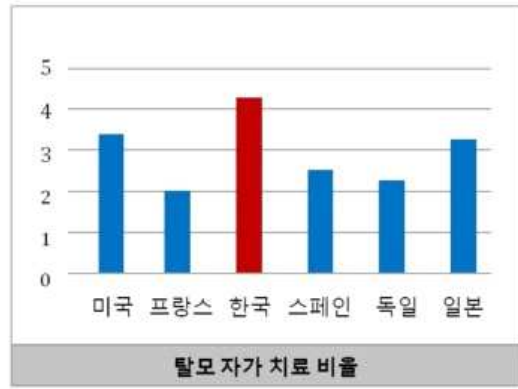
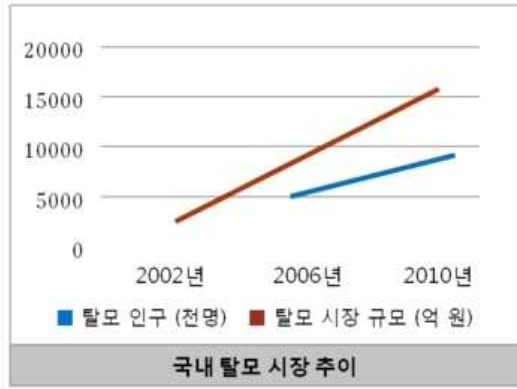


○ 고령화와 맞물려, 소비자의 눈높이는 보다 더 까다로워지고, 효과와 더불어 좀 더 안전하고, 건강한 제품을 찾고 있으며 이로 인해 의약품보다 더 자연스러운 치유와 몸의 밸런스(Balance)를 갈구하고 있음.

○ 최근 고령화로 인한 소비자들의 건강관련 인식 증가와 건강한 먹거리, 식습관의 변화로 인한 필수영양섭취부족, 비만 등의 이유로 기능성 식품에 대한 수요는 나날이 증대되고 있음.

○ 무엇보다 외국에 비해 모발에 관심이 많은 동양국가들 중에서도 단연히 한국은 경제성장과 더불어 그 시장 역시 더욱 더 증대되고 있는 실태이며, 국민보건관리 공단 2009년도 발표와, 이코노믹리뷰 2012. 06. 15 발표에 따르면 그 시장 규모는 약 3조 원대를 형성하고 있으며, 이 또한 매년 증대되고 있음.

○ 국내 탈모인구는 매년 증가세, 2010년 이미 900만 명을 넘어섰고, 탈모인구 증가와 함께 탈모시장 또한 급속도로 성장, 2010년 1조 5000억 원 달성, 2014년에는 탈모 인구 1000만 명 시대를 맞이했고 탈모치료제 수입, 생산액만 590억 원(2004년 대비 4배 이상 증가), 탈모관련 제품시장 규모는 3조~4조 원에 달함.



- 탈모시장의 증대와 더불어 기능성 식품시장의 증대 역시 더불어 상승 중에 있으며, 수출 및 내수시장을 위한 획기적인 제품의 출현이 기대되고 있음을 알 수 있음.
- 도표와 같이 한국은 외국들에 비해 자가 치료비율이 높은 편으로써 현재 1천만 명의 탈모환자들의 수요와 맞물려 다양한 제품들이 경쟁중이며 그 시장은 더욱 더 증가되고 있는 추세이며, 본격적인 의학적 치료시장분야의 향후 성장 가능성을 의미함.
- 대한 모발학회 연구 결과 ‘가족력의 영향을 받지 않는 남성 환자’는 전체의 41.8% 여성 환자는 47.9%로 유전 이외의 원인으로 탈모진행을 증명함.
- 국내·외 시장현황

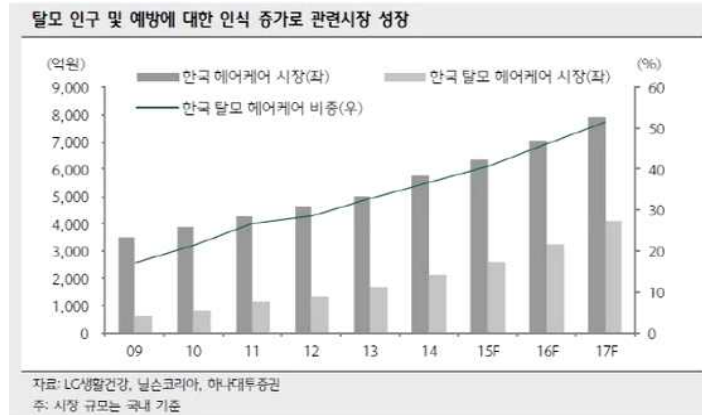
(단위 :억 원)

구 분	현재의 시장규모(2016년)	예상 시장규모(2017년)
세계 시장규모	914,100	938,300
국내 시장규모	7,100	8,000
산출 근거	※ Statista, LG생활건강, 닐슨코리아, 하나대투증권	

[세계 헤어 케어 시장]



출처: Statista, 2014



### 3) 경쟁기관현황

경쟁사명	제품명	판매가격 (천원)	연 판매액 (천원)
(주)탈모닷컴	TS삼푸	89	350,000,000
(주)케어젠	헤어필러	133	42,000,000
현대영농조합법인	하루에 발효흑적양파즙	69	140,000,000

- 탈모관련 제품의 타킷은 주로 헤어나 두피에 직접 적용하는 방식이 대부분임.
- 국내에 시판되고 있는 적양파즙 식품의 경우 탈모관련 제품이 아닌 단순 건강기능식품으로 개발된 것임.
- 현재 발모에 도움을 주는 건강기능식품은 부족한 현황임. 주관기관에서는 이미 적양파와 5종의 천연물 복합발효를 이용한 탈모개선 건강기능식품 ‘양파를 발효하다 검은깨((주)한지)’를 개발하였음. 이 제품의 선행연구를 통해 이미 탈모지연, 방지 및 발모 효과를 관찰하였고, 2016년 중소기업청 첫걸음과제의 연구결과에 비추어 5가지 원료 중 적양파와 늙은 호박이 핵심원료라는 것을 알게 됨. 이에 더불어 제품개발을 하던 중 우리나라 참당귀 분야의 전문가이자 미생물 권이자인 본 과제 제 1협력 기관 연구책임자의 오랜 노하우를 기반으로 기존 제품을 개선할 수 있는 방법을 모색함.

경쟁사명	제품명	섭취량	주성분/주원료
GNM자연의품격	건조맥주효모분말	1회 3~5g 1~3회/1일	비오틴, 셀레늄, 식물성단백질, 크롬
참다움맥주효모환	Chamdawoom	1회 40환 1~2회/1일	비오틴,식이섬유,식물성단백질
뉴TS탈환	(주)탈모닷컴OEM/ (주)수내츄럴	1회 1포 3회/1일	어성초, 자엽초, 다시마 등 74가지 물질 함유

- 국내에서 개발된 천연물 발효를 이용한 탈모 개선식품들은 유용미생물을 이용한 과학적인 표준화가 된 제품은 전무하고 대부분 전통적인 발효 방식을 이용하므로 공정 시 균주의 정체성, 균수, 발효 시간 등이 부정확한 경우가 대부분임. 따라서 과학적인 발효공정을 거친 관련 제품개발이 필요함.
- 국내에서 개발된 상기 탈모관련 제품은 환이나, 분말의 형태로 개발된 제품이고 탈모에 효능이 있다고 알려진 주성분을 소량 포함하면서 일반적인 건강기능보조식품으로 개발된 것임.

4) 지식재산권현황

4-1) 적양파 PI신청

지식재산권명	출원인/발명자	출원국/출원(등록)번호
① 적양파를 이용한 잼의 제조방법	김종천	한국/1020140140659 (1015210550000)
① 적양파 발효액 및 그 제조방법	박 선 희 김 문 동	한국/1020100133580
② 적양파 식초 및 그 제조방법	현대영농조합법인	한국/1020000086198
③ 고품질 발효 적양파즙 및 이의 제조방법	주식회사 피케이원	한국/1020100030826
④ 탈모방지 및 발모촉진용 음료	박 현 속 신 환 섭	한국/1020110065842
⑤ 적양파 껍질을 이용한 발효식초 제조방법	주식회사 샘넷식품 농업회사법인	한국/1020130089804
⑥ 적양파 농축액 조성물과 제조방법	농업회사법인 주식회사 다연	한국/1020120088262

○ 기존 주식회사 샘넷식품 농업회사법인에서 출원한 적양파 껍질을 이용한 발효 식초의 제조방법 (출원번호 : 10-2013-008-9084)은 양파속보다 풍부한 영양소를 가지고 있는 양파껍질의 퀘르세틴 성분을 용이하게 추출하여 더욱 높은 항산화물질 수치와 고혈압억제성분을 가지는 양파껍질을 이용한 발효식초를 제조하는 방법에 관한 것으로, 타사에서 특허출원하였으나 최종거절 되었음. 이와 관련하여 주관기관 (주)한지에서는 퀘르세틴(quercetin) 함량이 풍부한 빨간 양파와, 그리고 다시마를 주성분으로 하여 환을 제조함으로써, 건강보조식품으로 사람들이 쉽게 섭취할 수 있도록 한 것을 특징으로 하는 빨간 양파 환 및 그 제조방법에 관하여 특허를 등록받은 바 있음(등록번호 : 10-1312957).

4-2) 참당귀 PI분석

지식재산권명	출원인/발명자	출원국/출원(등록)번호
참당귀로부터 데커신 및 데커시놀안젤레이트를 추출하는 방법	(주)바이넥스/ 강재선 외	한국/1005098430000
유해 활성 산소 소거효과가 있는 참당귀 추출물의 추출방법	인제대학교 산학협력단, 한국생명건강(주)/ 강재선 외	한국/1008937790000
잔틴 산화효소 저해효과 및 염증 유발 효소 저해효과가 있는 참당귀 추출물을 포함하는 통풍 치료용 조성물	한국생명건강(주)/ 강재선 외	한국/1020080132592(출원)
정자수 증가용 경구투여제	경성대학교 산학협력단, 한국생명건강(주), (주) 유영제약/ 강재선 외	한국/1011447150000
당뇨 치료용 조성물	경성대학교 산학협력단/ 강재선 외	한국/1013475330000

정자수 감소 억제 및 감소된 정자수 회복에 유용한 약학 조성물	경성대학교 산학협력단/ 강재선 외	한국/1020140011556(출원)
참당귀 추출물을 유효성분으로 하여 항암제 투여에 의하여 유발되는 백혈구 감소증 치료에 유용한 약학 조성물	경성대학교 산학협력단/ 강재선 외	한국/1020150118068(출원)
운동수행능력 증강용 조성물	경성대학교 산학협력단/ 강재선 외	한국/1015574100000
데커시놀을 유효성분으로 하는 주사용 현탁제제 및 그 제조방법	경성대학교 산학협력단/ 강재선 외	한국/1016009610000
지질대사 개선효과가 있는 데커신 및 데커시놀안젤레이트를 유효성분으로 하는 참당귀 및 세발당귀추출물과 그 추출방법	한국생명건강(주)/ 강재선외	한국/1009958910000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는당귀추출물을 포함하는 간기능 치료제 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1012135990000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는당귀추출물을 포함하는 헤르페스 감염 치료제 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1012136010000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는당귀추출물을 포함하는 조혈증강제 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1012135980000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는당귀추출물을 포함하는 신기능 치료제 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1012136000000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는 당귀추출물을 포함하는 항암 치료보조제 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1013204860000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는당귀추출물을 포함하는 항암제 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1013204850000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는당귀추출물을 포함하는 배뇨장애 치료제 및 부종 치료제조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1010721750000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는 당귀추출물을 포함하는 항암 치료보조제 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1012453310000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트, 또는 데커신및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는 당귀추출물을 포함하는 항암제 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1012453280000



데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트 또는 데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는 당귀추출물, 쌀눈 추출물, 무말랭이 추출물을 유효성분으로 포함하는 운동에 기한 피로 또는 스트레스의 예방 또는 회복용 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1016892590000
데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트 또는 데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는 당귀추출물, 쌀눈 추출물, 무말랭이 추출물을 유효성분으로 포함하는 알코올성 숙취 예방, 숙취 해소, 간장 보호 또는 피로 회복용 조성물	최영득, 한상필, 최백희, 유의재, (주) 아스터젠	한국/1016455890000
참당귀로부터 뿌리배양을 이용하여 항암활성 물질데커시놀 안젤레이트를 생산하기 위한 배양, 추출 및 분석방법	학교법인 정석인하학원	한국/1003850920000

○ ‘당귀\*데커신\*추출’의 키워드 검색을 통해 정제당귀 천연소재의 기술 동향 및 수준을 분석하였음.

○ 당귀의 주요 성분인 데커신(decursin), 데커시놀 안젤레이트(decursin angelate), 데커시놀(decursinol)을 포함하는 당귀추출물의 다양한 약리작용이 연구되었다. 당귀의 이와 같은 유용물질은 백혈병 암세포 치료, 진통작용, 폐암 및 간암에 유효, 신경보호작용 등에 효과가 있음이 보고되고 있음. 따라서, 국내의 당귀 추출물을 대상으로 한 기술동향에서도 당귀가 가진 풍부한 데커신 및 데커시놀 안젤레이트 등의 성분을 이용하여 항암, 감염치료, 간기능 치료, 피로회복 등 인체에 유익한 조성물 및 제품을 개발하는 데에 초점을 맞추고 있음. 이 밖에도 당귀에 풍부한 데커신 성분은 전립선암의 발생원인 중 하나인 전립선특이항원 및 안드로겐 수용체를 세포수준과 전령리보핵산(mRNA) 수준에서 억제했고 세포 성장시기인 세포주기 g1의 정지효과를 보였으며 신경내분비 분화를 억제해 암화를 유도하는 남성 호르몬인 안드로겐의 역할을 유효하게 억제함이 연구되었음(Cancer Research. 2006). 하지만 현재까지 국내에서 당귀의 데커신 성분을 이용하여 탈모에 도움을 주는 제품의 연구 및 제품 개발은 진행되지 않았음.

## 2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### 1) 기술수준

○ Finasteride를 주원료로 하는 Propecia는 Maker에서 개발하여 제조한 최후의 경구용 탈모치료제로서 1997년 하반기에 남 성형 탈모 치료용으로 FDA 승인을 받았음. 18~41세의 남성 1,879 명을 대상으로 한 2년 동안의 임상실험 결과 83%에서 탈모 방지 효과를 보았고, 66%에서 발모 현상이 보이는 등 효능이 입증되었음.

○ Minoxidil은 본래 고혈압치료제로 복용 시 부작용으로 머리, 팔, 다리 등의 전신에 털이 성장하는 것에 착안하여 바르는 화 학발모제로서 1988년 FDA에 의해 세계 최초로 승인 받았음.

○ Minoxidil의 작용 메커니즘은 첫째, 말초혈관에 작용하여 피부에 국소적 혈류 증가를 유발시켜 모발의 성장을 촉진시키며, 둘째, 직접적으로 모낭에 작용하여 모발의 성장을 유발시키는 것임. 현재 5% 농도까지 시판이 허용되고 있으며 경구 투여 시 수액정체, 빈맥, 오심, 호흡곤란 및 남성에게서 여성형 유방 등의 전신적 부작용이 발생할 수 있다. 또한 두피건조, 소양감, 홍반 등의 두피자극 증상 및 알레르기성 접촉 피부염 등의 부작용이 발생되기도 함.

○ Minoxidil 용액은 환자 본인이 직접 환부에 바르는 약 제이기 때문에 의료인의 정확한 지시가 있기 전에는 개개인의 습관과 취향에 따라 약제 사용 농도, 용량, 범위 등이 제각각일 수밖에 없음.

### 2) 시장현황

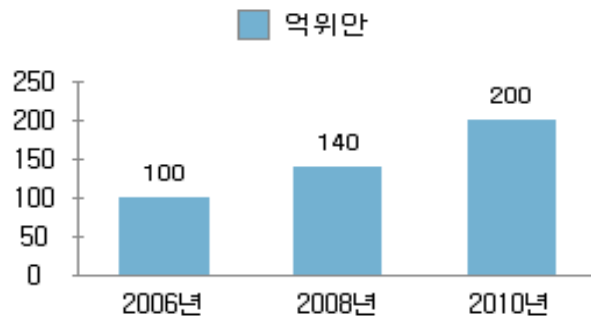
○ 세계적인 불경기와 실업난으로 현대인들의 스트레스가 가중되어 탈모 현상 및 탈모에 대한 관심이 증가되고 있으며, 이는 국내뿐 아니라 전 세계적인 문제로 부각되고 있음. 일본의 육모제 관련업계 발

표에 의하면 '일본 욱모제 시장의 연간 규모는 남성용 중심으로 약 350억 엔에 달하는 것으로 추정되며, 탈모증 남성인구의 10%에 달하는 여성층도 욱모제를 필요로 하는 새로운 고객층으로 대두되고 있다'고 발표하였음.

○ 대만의 경우 리서치 전문기관 TNS의 대만 시장조사에 따르면 18~54세 성인소비자 중 3명당 1명 탈모로 고민하고 있는 것으로 파악되고 있음. 미국의 경우 2003년 한해 미국 내에서 판매된 프로페시아가 1억 달러 이상이고 한해 시행되는 모발이식수술이 2만 9천 건 이상이 되는 세계 최대 탈모시장임.

○ 중국 모발시장 규모 및 전망

최근 중국은 급격한 경제 성장으로 인해 미용성형과 고급의료에 관심이 높으나 중국 내 전문의료시설 부족으로 의료 관광에 대한 수요가 높음. 2014년 중국의 탈모환자는 1억 명 정도로 추산되고 있으며 잠재적 모발이식환자 수요는 500만 명 이상 되는 것으로 예상됨. 또한 2013년 중국보건기구와 탈모의 약협회 공동으로 한 설문조사에서 전체 탈모인의 60%가 간편하고 빠른 탈모 방지 제품을 사용 중이며 9.5%의 응답자가 미용실 혹은 전문치료기관에서 시술을 받는다고 응답함. 중국의 탈모용품 시장규모는 2011년 200억 위안에서 2013년 약 240억 위안으로 지속적으로 증가했으나 탈모의 근본적 해결방안이 아닌 기능성 모발관리제품으로 설문조사 결과 효과에 대한 불신 정도가 높게 나타남.



3) 경쟁기관현황

○ 국외의 경우 탈모관련 식품보다는 의약품 개발이 주를 이루고 있음.

○ 국외의 경우 탈모 치료제 개발이 활성화되어 있으며, 현재 상용화되고 있는 제품 및 기술동향을 간략히 요약하면 다음과 같음

： FDA승인 제품

- 비 천연 제제

① 상품명 : 마이녹실

[특징] 고혈압치료제 개발 중 발명된 제품 40대 중년 여성일부에서만 효과

부작용: 피부질환 사용을 중단하면 다시 머리카락이 빠짐

② 피나스테라이드 (상품명 : 프로페시아, 프로스카)

[특징] 전립선 치료제 개발과정에서 발명된 제품, 유전성 탈모의 경우 효과

부작용: 여성의 경우 손에 물질이 닿기만 해도 남아의 성기 기형을 초래, 간수치 증가, 고혈압, 성기능 장애등

- 천연 제제

① 원료 식물 아르가니아스피노사로부터의 천연 단백질을 포함하는 제제

[특징] 피부 및 모발에 대한 재생 및 재활 효과

② 활성 성분으로서 잔토실룸 분게아눔(Zanthoxylum bungeanum) 추출물

[특징] 모발 보호 화장품 조성물은 가려움증(itching sensation), 열얼함(stinging), 작열감(buring), 반(redness)등의 자극성을 방지, 감소 효과 (인용: 한국기술거래소: 【기술및시장동향】 두피 및 모발의 개선 효과 활성을 갖는 조성물)

제품명	제조사	섭취량	주성분
시스티판 (Cystiphane)	bailleul-Biorga	1회 2정 2회/1일	비타민 B6, L-시스틴, 아연, 알기닌,
뉴트리캡	Laboratoires Nutrisante (프랑스 이브퐁루아 자회사)	1회 2정 1회/1일	주원료: 비타민B2,B6, 비오틴 부원료: 밀추출물, 씨드기추출분말, 판토텐산, 철
DYR 비오 5000	DYR	1회 1정 1회/1일	주원료: 비오틴 부원료: 맥주효모, L-시스틴
Nourkrin woman	파마메디코(덴마크)	1회 1정 1회/1일	비오틴, 말렉스
BIO - CHROMA PLUS	Natura Bio Healthcare(캐나다)	1회 1정 2회/1일	건조효모 86%
Hairking	(주)웰어스	1병/100ml	토사자, 구기자

○ 상기 탈모관련 건강기능식품의 경우 액상이 아닌 정제의 형태로 섭취하도록 제조되었고, 주성분 또한 발효에 의한 것이 아니라 기존 시판 성분의 단순한 혼합의 형태로 제조되어 본 과제를 통해 생산하고자 하는 제품과는 차이가 남.

#### 4) 지식재산권현황

지식재산권명	출원인	등록여부	출원국/출원(등록)번호
① 탈모제 DEPILATORY AGENT	KASHIWA KAGAKU KOGYO:KK	출원	일본/63042551

### (3) 연구개발의 중요성

#### 1) 연구개발 배경 및 중요성

문제점 및 현황	장점 및 목표
<ul style="list-style-type: none"> <li>유용 미생물과 적양파 혼합 발효물을 기본으로 하는 천연 소재 배합 전무</li> <li>약물의 장기복용에 의한 부작용 심각</li> <li>천연물 단순가공품(추출물)으로 생산·소비</li> <li>기존의 약물은 단순 탈모 개선 효과로 복용을 중단하면 효과가 사라짐.</li> <li>본 사의 기존 제품을 개선하기 위해 탈모 지표물질 극대화, 과학화 및 표준화를 통해 기능이 우수한 제품개발 필요.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>원재료 공급 확보, 제조 기술 보유</li> <li>직접 종균분리 한 유용 미생물을 사용하여 천연물 발효를 함으로써 지표성분 극대화</li> <li>미생물이 생산하는 유용 대사산물을 이용</li> <li>장기간 참당귀 소재연구에 의한 특허 보유로 기존 특허 회피가능</li> <li>Agnex의 정제율을 높여 혈행개선 최대화 및 부작용 최소화</li> <li>호박의 초산발효를 통해 두피세포 생성을 자극하는 유용성분 생산</li> <li>탈모인구의 needs에 맞춘 제품개발을 통한 고부가가치 건강기능식품 생산</li> <li>두발 건강에 입각한 발모 메커니즘 구명</li> <li>원료의 수입대체 효과 및 해외수출 기대</li> </ul>

- 탈모는 노화가 진행됨에 따라 나타나는 자연스러운 현상이지만 현대인의 삶의 질이 개선되고 미적욕구가 증대됨에 따라 하나의 질병으로 인식되고 있음. 탈모의 원인은 아토피, 비 특이적 면역, 자가 면역 반응, 스트레스, 유전적 요인 등으로 추측할 수 있음. 이 중 남성형 탈모의 정확한 원인은 밝혀지지 않았으나 유전적 요인과 더불어 남성호르몬에 의한 것으로 추측하고 있음. Testosterone은 남성호르몬 중 가장 많은 양을 차지하고 있는 것으로 5 $\alpha$ -Reductase에 의해 보다 활성이 강한 Di-hydro-testosterone으로 환원되며, 남성호르몬 수용체에 대한 친화도는 Testosterone의 5배 정도로 남성형 탈모의 가장 큰 원인으로 작용함. 그러므로 남성형 탈모를 방지하기 위한 방법으로 5 $\alpha$ -Reductase를 저해하기 위한 연구가 많이 진행되고 있음. 이에 대한 효과가 알려져 있는 물질로는 Finasteride, Cyproterone acetate 등이 있으며 최근에는 부작용 없는 천연 추출물을 이용한 시도가 다수 이루어지고 있음.
- 현재 시판되고 있는 탈모억제 및 발모효과를 가지는 물질로 적양파의 발효물을 주원료로 하는 제품은 없음.
- 강재선 교수팀이 직접 분리하여 종균등록한 균주를 이용하여 적양파와 혼합발효를 통해 지표성분을 극대화하고, 균주 발효 시 생산되는 유용 물질(Macrolactin)은 SQS를 억제하여 콜레스테롤 합성을 차단하며 중성지방 농도를 저하하고, 지질과산화물인 MDA(Malon dialdehyde)의 생성억제 효과를 통해 항동맥경화 활성도 보고된 바 있음.
- 천연물을 혼합 비율을 특허화하여 독점권을 확보 한 후 제품을 판매하거나 원료를 국내외 식품회사 등에 공급할 수 있음.
- 발효액의 고농축화를 통한 분말화 공정은 다양한 형태 (타블릿, 과립 등)의 기능성 제품 개발이 가능함.
- 효소적 발효를 통한 발효물중의 지표성분 생산성을 향상시켜 고품질 제품개발을 할 수 있음.
- 노령화 사회 진입과 소비자의 건강 관심 고조에 따라 건강제품의 수요는 계속 증가할 추세이며, 이러한 산업의 새로운 소재로 이용이 가능함.
- 적양파와 유용 미생물의 복합발효물과 호박, 당귀와 같은 천연물을 혼합한 제품 개발과 제품화를 통해 기업의 기술력, 매출, 고용 증대 부분까지 모두 상승효과를 줄 것으로 예상됨.
- 개발된 소재는 건강보조식품, 분말과립, 효소생식 첨가물, 캡슐 등의 다양한 기능성 식품소재로도 활용가능하며 향후 국내외에서 판매계획임
- 적양파 원료를 활용한 가공제품 개발로 생산 농가의 소득향상 도모 및 관련 산업 고용창출 기대

## 2) 국내 문제점 보완

- 천연물인 적양파와 호박, 안정성 및 안전성이 확보된 미생물 발효대사산물, 정제율을 높인 고순도 참당귀 에탄올 추출물(agnex)를 혼합하여 상품화 하므로 부작용이 없음.
- 여성들도 사용할 수 있는 발모 촉진 효과가 있는 제품을 개발하여 젊은 20~30대를 위해 전문가와의 상담 없이도 손쉽게 구매 할 수 있도록 함.
- 단순한 영양공급이 아닌 원활한 신진대사를 통한 혈류의 흐름을 원활하게 해 줌으로써 궁극적으로 모근에 필요한 영양을 공급하여 모발이 가늘어지는 것을 막고 탈모의 예방과 동시에 새로운 모낭을 자극하여 발모를 촉진함.
- 본 연구과제에서 개발하고자 하는 '탈모 방지 효과를 갖는 발효 혼합물'과 관련하여 강재선 교수 연구팀은 당귀관련 주요 특허를 보유하고 있으므로 필요 시 기술이전 등을 통해 기존 특허 회피 가능하며, 신규 특허출원도 가능함.

## 3) 국외 문제점 보완

- 환경 친화적인 관리 시스템 도입 및 대체 의학을 접목한 다양한 매뉴얼을 모색하여 안전하게 탈모 방지에의 천연물질에 대한 연구들이 지속적으로 이루어져야 함.
- 미녹시딜 용액과 같은 의약품의 사용으로 나타날 수 있는 부작용을 최소화 하고, 혈행 개선을 통해 모발의 성장을 촉진시킬 수 있도록 방안을 마련함.

**4) 본 과제에서의 특허 회피전략**

- 주관기관에서는 기 등록받은“적양파와 다시마를 주성분으로 하는 환 제조방법”에서는 적양파 발효식초를 이용하여 개발한 천연물 혼합 발효를 통해 탈모 방지 및 육모 제품을 생산하였으나, 기존 제품의 개선을 위해 혈행개선에 탁월한 유용물질을 생산하는 미생물과의 복합발효를 통해 적양파의 지표물질 추출을 극대화하고자 함. 또한 적양파 식초를 이용한 호박의 발효로 두피세포생성을 자극하는 유용물질의 생산을 극대화하고, 순수정제한 참당귀 추출물을 첨가하여 항혈전, 고지혈증 억제 효과를 발휘하기 위한 최적의 배합비율과 발효조건(온도, PH, 시간, 당도)을 표준화 하는 것이 목적임. 이를 통해 기존의 자사 특허를 업그레이드 하고 타사의 특허와 차별화함으로써 등록가능성을 높이고자 함.
- 본 연구과제에서 사용하고자 하는 참당귀와 종균에 관한 특허는 국내에서 제 1협력기관 연구책임자의 등록특허가 주를 이루고 있어 과제 수행 이후 신규특허 출원 및 등록이 유리함.
- 국내외 특허분석에 따르면 적양파를 주원료로 하는 탈모개선 및 치료 가능 후보 물질은 부족한 실정임.

**(4) 연구개발 범위**

구분	세부연구목표	연구개발의 범위
1차년도 (2017 ~ 2018)	발효 적양파 혼합물의 탈모예방용 혈행개선 기능성 소재 개발	<p>○ 주관연구기관 ((주)한지)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-원료 수급 및 전처리 기술 확보</li> <li>-적양파 및 천연혼합물 (호박, 당귀) 전처리 기술 확립</li> <li>-발효 적양파 제조공정 개발</li> <li>-발효 공정을 통해 이취 제거</li> <li>-휴대 및 섭취가 간편하게 과립형 제제로 개발할 예정</li> <li>-천연 혼합물 배합비의 최적화</li> </ul> <p>○ 협동 1기관 (경성대학교)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-미생물을 이용한 적양파 발효물의 제조 및 최적 발효조건 확립</li> <li>-참당귀 에탄올 추출 정제물(Agnex)과 호박추출물의 생산 최적화</li> <li>-발효 적양파 혼합물의 기능성 성분 분석</li> </ul> <p>○ 협동 2기관 (신라대학교)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-적양파 발효물, Agnex, 호박추출물의 <i>in vitro</i> 생리활성 검증</li> <li>-발효 적양파 혼합물의 <i>in vitro</i> 생리활성 검증 및 혼합비율 결정</li> </ul> <p>○ 위탁기관 (경상남도 농업기술원 양파연구소 )</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-적색양파 품종별 기능성 성분함량 분석 및 선발</li> <li>-다양한 유전자원수집, 기능성분 분석 및 특성조사</li> <li>-선발 품종원료 양파 안정적 생산용 모구생산</li> </ul>
2차년도 (2018 ~ 2019)	발효 적양파 혼합물의 탈모예방용 혈행개선 기능성 소재 안전성 유효성 확보	<p>○ 주관연구기관 ((주)한지)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-적양파 발효조건 확립</li> <li>-발효 적양파 혼합물의 배합조건 확립</li> <li>-발효 적양파 혼합물의 제형화 조건 확립 (과립제제 개발 계획)</li> <li>-발효 적양파 혼합물의 생산 공정 개발</li> <li>-발효 적양파 혼합물 대량생산 체계 확립</li> <li>-발효 적양파 혼합물의 건강기능성 식품 제형개발</li> <li>-대량생산 공정 표준화</li> <li>-발효 적양파 혼합물에 기능성 원료를 추가하여 증상별 맞춤형 제품 개발</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>-임상시험 IRB 승인 신청</li> <li>-임상시험 1 타겟 선정 (임상시험기관: 전북대학교 병원 기능성식품 임상 지원센터)</li> <li>○ 협동 1기관 (경성대학교) <ul style="list-style-type: none"> <li>-발효 적양과 혼합물의 탈모에방용 혈행개선 기능성 유효성분 분리 정제</li> <li>-발효 적양과 혼합물의 세포독성 시험</li> <li>-발효 적양과 혼합물의 배합조건 확립을 위한 <i>in vitro</i> 생리활성 평가</li> </ul> </li> <li>○ 협동 2기관 (신라대학교) <ul style="list-style-type: none"> <li>-발효 적양과 혼합물의 탈모에방용 혈행개선 기능성 검사 (<i>in vivo</i>)</li> <li>-발효 적양과 혼합물의 탈모에방용 혈행개선 안전성 검사 (<i>in vivo</i>)</li> <li>-시제품을 동물실험에 적용하여 발모 기능 여부를 확인.</li> </ul> </li> <li>○ 위탁기관 (경상남도 농업기술원 양파연구소 ) <ul style="list-style-type: none"> <li>-기능성 적색양파 안정적 생산방법 연구</li> <li>-적색양파 재배 지역적응성 검정</li> <li>-적색양파 모구증식 및 종자채종</li> <li>-수집자원 유용 성분분석 및 증식, 채종</li> <li>-기능성 적색양파 품종출원</li> </ul> </li> </ul>
<p>3차년 도 (2019 ~ 20 20)</p>	<p>발효 적양과 혼합물을 함유한 건강기능식품 임상시험 신청 승인, 대량생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주관연구기관((주)한지) <ul style="list-style-type: none"> <li>-제품의 표준화</li> <li>-시제품생산</li> <li>-발효 적양과 혼합물의 혈행개선에 대한 건강기능식품 개별인정 신청</li> <li>-마케팅 인프라 구축 및 확보</li> <li>-발효 적양과 혼합물 시제품 대량생산</li> <li>-제품의 표준화</li> <li>-소비자 기호도 조사를 위해 블라인드 테스트 실시하고 결과를 제품 개발에 반영.</li> <li>-임상시험 피험자 모집</li> <li>-발효 적양과 혼합물의 혈행개선에 대한 임상시험 진행. (임상시험기관: 전북대학교 병원 기능성식품 임상 지원센터)</li> </ul> </li> <li>○ 협동 1기관 (경성대학교) <ul style="list-style-type: none"> <li>-시제품의 안정성 시험</li> <li>-시제품의 유효성분 분석방법 validation 확립</li> </ul> </li> <li>○ 협동 2기관 (신라대학교) <ul style="list-style-type: none"> <li>-시제품의 세포독성 시험</li> <li>-시제품의 혈행개선 mechanism</li> </ul> </li> </ul>

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 제 1 절 추출물의 성분 연구

#### 가. 적양파 발효전환물의 지표물질 함량 비교

##### ▶ 적양파의 생물전환

적양파는 경상남도 농업기술원 양파연구소(경상남도 창원)로부터 공급받아 건조분말 2 kg을 1 L의 주정에탄올에 투입하고 하룻밤 동안(12시간) 정치시킨 다음, 여과지(Whatman No.2, GE Helathcare, Boston, USA)를 이용하여 여과한 후, 여액을 농축한 것을 Red-Q라고 명명하였고, 이를 생물전환하기 위한 재료로 사용하였다. 생물전환은 *Bacillus subtilis* KJ-3 (종균등록번호 KCCM11523P, 이하 BS3), *Bacillus mojavensis*-KJS3 (종균등록번호 KCCM10961P, 이하 Moja3), *Bacillus polyfermenticus*-KJS2 (종균등록번호 KCCM10769P, 이하 BP2)를 각각 사용하여 quercetin으로의 전환율을 비교하였다. 균주의 콜로니 2~3개를 취하여 tryptic soy broth (TSB) 배지 5 mL에 접종한 다음 42°C, 150 rpm의 속도로 16시간 배양하여 종균으로 사용하였다. 종균 5 mL를 미네랄 배지(corn starch 1.5 g, yeast extract 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g, KCl 0.05 g, NaCl 0.03 g, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g, MnSO<sub>4</sub> 0.003 g, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g 함유) 100 mL에 중간 접종하였다. 이를 40°C의 온도를 유지하며 4시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양하여 미생물 배양액을 제조하였다. 이 배양액에 100 mL 기준으로 건조 적양파 추출물(Red-Q) 20 g을 넣고 55°C의 온도를 유지하며 2 시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양한 후 상온에서 하룻밤 동안(12시간) 150 rpm으로 배양하였다. 8,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리(LABOGENE, scanspeed 1735R, Daejeon, Korea)에 의해 상등액과 침전물로 분리하고, 침전물을 주정에탄올에 투입하여 용해시킨 다음 여과지(No.2)를 이용하여 여과시킨 후 농축하여 적양파 생물전환물(Red-BCQ)을 제조하였다. 동일한 방법에 의해 Red-BCQ를 제조하되, 사용한 미생물을 Moja-3와 BP2로 각각 대체하여 사용하였고 균주 종류에 따른 quercetin 전환율을 비교하였다. 균주 배양에 사용된 Bacto™ tryptic Soy Broth와 Bacto™ agar는 Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. 발효 배양기는 Ecell3000(Ecell)을 사용하였고, shaking incubator는 Seyoung SH-803R(Seyoung Scientific Co., Seoul, Korea)을 사용하였다.

##### ▶ 적양파 추출물(Red-Q) 및 적양파 생물전환물 (Red-BCQ)의 quercetin 함량 분석조건

Red-Q 및 Red-BCQ의 quercetin 함량 분석을 위해 HPLC (Waters 2690, San diego, Clalifornia, USA)를 사용하였다. quercetin 표준품을 이용하여 검량선을 작성하였고 시료를 500 µg/ml으로 하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 다음 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다. column은 ZorbaxEclipse XDB-C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)을 사용하였고, column 온도는 35°C로 하였다. 이동상은 2% acetic acid (A)와 Acetonitrile (ACN) (B)을 혼합한 용액을 60:40 (v/v) 사용하였으며, 유속은 1.3 mL/min, 주입량은 20 µL, 검출기는 photo diode array detector, 파장은 370 nm에서 분석하였다.

#### 나. 참당귀 추출물의 지표물질 함량 비교

참당귀는 심마니 산삼농협(경상남도 함양군)에서 구입하였다. 총 15 kg의 건조 참당귀 분말에 75 L의 알코올에 첨가하여 40°C에서 3시간 동안 보관한 후, 하우징 필터(포어 크기: 25 µm)로 여과하였다. 여과물에 2배 부피의 물을 넣어 pH를 5로 조정된 뒤 6시간 후 원심분리(14,981 xg, 15분)하여 침전물을 얻었다. 침전물에 70% (v/v) 에탄올을 5배 부피로 첨가하여 녹인 후 여과액을 농축하여 함량을 분석하였다. D와 DA의 검출에 대한 최적 조건은 HPLC (Agilent Technologies, 1100 series, USA), column (Agilent Zorbax SB-C18, 250 mm×4.6 mm, 5 µm), UV 검출기(Photo-Diode Array UV/Vis detector, Agilent Technologies, 1100 series, USA)를 이용하여 329 nm의 파장에서 분석하였다. Column의 온도는 상온으로

유지하였고, 이동상은 아세트산과 아세토나이트릴을 70:30(v/v)으로 혼합한 용액에 포말산을 0.1% (v/v)가 되도록 첨가하여 사용하였다.

#### 다. 호박 추출물의 지표물질 함량 비교

##### ▶ 실험방법1

호박은 엄궁 농산물 도매시장(부산)에서 구입하여 60℃에서 24시간 동안 건조 후 건조분말 5 kg을 25 L의 주정에탄올에 투입하고 하룻밤 동안(12시간 동안) 정치시킨 다음, 여과지 No.2 (Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과한 후 여액을 농축하였다. 농축물에 동량의 증류수를 넣고 냉장고에 12 시간 정치한 뒤 원심분리 (8000 rpm, 20분, 4℃) 후 침전물을 동결건조(EYELA, FDU-1200, dokyو, Japan)하여 실험에 사용하였다.  $\beta$ -carotene 분석은  $\beta$ -carotene 표준품을 이용하여 검량선을 작성하였고, 시료를 500  $\mu$ g/ml로 하여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과한 다음 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다. column은 Supersil ODS-II column (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m)을 사용하였고, column 온도는 40℃로 하였다. 이동상은 ACN과 Methanol을 8:15 (v/v)로 혼합한 용액(A)와 dichloromethane (DCM) (B)를 사용하였으며, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 20  $\mu$ L, 검출기는 photo diode array detector, 파장은 450 nm에서 분석하였다.

##### ▶ 실험방법2

앞서 실험한 호박추출물의 경우 지표물질을 안정하게 얻기 힘든 조건이므로 호박 분말 자체 또는 기존의 (주)한지의 공법으로 개발한 호박초산발효분말에서  $\beta$ -carotene이 안정하게 유지되는지를 알아보기 위해서 가속시험 (open/close)을 시행하였다. 만약 상기 시료에서  $\beta$ -carotene이 안정하게 잘 유지가 된다면 호박추출물 대신 호박분말 자체 또는 호박초산발효 분말로 대체하여 사용할 수 있는지 여부를 평가하기 위하여 실험을 진행하였다. 시료를 아래표와 같이 라벨링하고 7일간 40℃, 75% 습도를 유지하여 각각의 조건대로 보관한 뒤 샘플을 2g 씩 취하여 10 ml 에탄올을 넣고 실온에서 12시간 shaking incubation하여 여과 후 여액을 농축하여 분석에 사용하였다. 상기 방법대로 HPLC를 이용하여  $\beta$ -carotene 함량을 분석하였다.

A	호박분말
B	호박초산발효분말
A-1	호박분말 가속시험 (open)
B-1	호박초산발효분말 (open)
A-2	호박분말 가속시험 (close)
B-2	호박초산발효분말 (close)

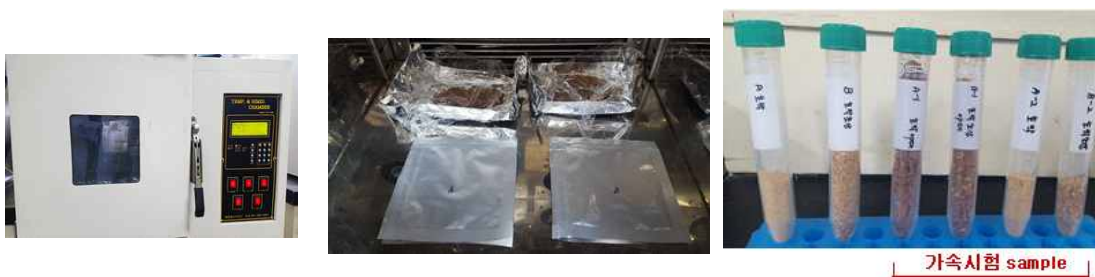


Fig. 1. 호박분말 및 호박초산발효분말의 가속시험



## 제 2 절 재료의 혼합비율 설정을 위한 생리활성 연구

### 가. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성 측정

#### ▶ 실험방법

DPPH radical 소거활성 측정은 Blois의 방법을 변형하여 실험하였다. 시료의 농도별 희석액 50  $\mu$ L에 0.15 mM DPPH 용액 또는 ethanol 150  $\mu$ L를 첨가한 후 실온에서 30분간 반응시킨다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid (Sigma-Aldrich Co., frnakfrut, Germany)를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - \{(S - SB) / (C - CB)\}] \times 100$$

S: Absorbance of sample

SB: Absorbance of sample blank

C: Absorbance of ethanol

CB: Absorbance of ethanol blank

### 나. Total flavonoid 함량 측정

#### ▶ 실험방법

Total flavonoid는 Davis의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료와 naringin을 0.01 g/ml의 용량으로 제조한 용액 100  $\mu$ L에 diethylene glycol 1 mL, 1 N NaOH 10  $\mu$ L 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Naringin을 사용하여 표준검량곡선을 작성하여 naringin equivalents (mg) / sample (g) 로 나타내었다.

### 다. Total polyphenol 함량 측정

#### ▶ 실험방법

Total polyphenol 함량은 Folin-Denis법에 따라 비색 정량하였다. 시료의 농도별 희석액 500  $\mu$ L에 1 N folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma, USA) 500  $\mu$ L와 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 500  $\mu$ L를 혼합하여 암실에서 1시간 동안 반응시킨 후 96 well plate에 200  $\mu$ L씩 분주하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용하여 표준검량곡선을 작성하였고 결과 값은 gallic acid equivalents (mg) / sample (g)으로 나타내었다.

### 라. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

#### ▶ 실험방법

RAW 264.7 세포(KCLB NO.40071)는 한국세포주은행(Korean cell line bank, KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS (Fetal bovine serum)와 1% penicillin을 포함한 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 계대 배양할 때에는 PBS (Phosphate buffer solution)을 사용하여 세척하고 계대하였다. Raw 264.7 세포로부터 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 생성되는 Nitric oxide (NO) 생성량 측정은 Griess법을 변형하여 측정하였다. RAW 264.7세포를 well 당 10<sup>5</sup> 되도록 세포를 포함한 DMEM 배지를 이용하여 incubator (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 배양하였다. LPS 처리하여 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 유발한 뒤 각 농도별 시료를 처리하고 150분간 상온에서 반응을 한 후 Griess 용액 1 mL를 혼합하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite 표준곡선을 이용하여 NO 생성량을 측정하였다.

## 마. 세포 생존을 측정

### ▶ 실험방법

세포 생존을 확인을 위해 Park 등의 방법을 변형하여 실험하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate 에 well 당  $10^5$  되도록 세포를 포함한 DMEM 배지를 0.5 mL씩 분주하여 incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 시료를 1000, 500, 250, 125 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 24시간 동안 다시 배양하였다. 배양 후 Phosphate buffer solution (PBS)에 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 2 mg/mL의 농도로 제조한 시약을 처리한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 3시간 동안 배양하였다. 그 다음 배지를 제거하고 well당 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 350 µL를 분주한 후 15분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같은 식으로 세포생존율을 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{대조구의 흡광도} / \text{시료처리구의 흡광도}) \times 100$$

## 제 3 절 고지혈증 효능실험

### 가. *in vitro* 혈소판 응집 억제작용

#### ▶ 실험방법

혈소판 응집억제작용은 whole blood aggregometer (Chrono-log, Havertown, PA, USA)를 사용하여 평가하였다. 세척한 혈소판( $5 \times 10^8$  cell/mL)은 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.36 mM NaHCO<sub>3</sub>를 포함하는 버퍼에서 현탁하였다. 검체를 혈소판에 첨가하여 혼합한 뒤 2.5 µL의 콜라겐(1 mg/mL)을 첨가한 후 37°C에서 12분간 배양했다. 임피던스 변화를 모니터링하고 진폭 및 기울기와 함께 곡선 아래 영역을 Aggrolink 프로그램(Aggrolink 5.2.3, Chrono-log, PA, USA)을 사용하여 계산했다. 진폭은 혈소판 응집의 최대 범위로 표현되었고 반응 속도는 곡선의 가장 가파른 부분을 통해 접선을 그려서 결정되었다. ROC (receiver operation characteristics) 곡선(AUC) 아래의 영역은 혈소판 응집 곡선에 따라 계산되었다. 혈소판 응집율은 (시료 AUC / DMSO의 AUC) × 100으로 계산한다. 아스피린이 COX-1을 억제하고 감소시키므로 항혈소판 응집의 양성 대조군으로 사용되었다. 낮은 농도(100 mg/day)에 Thromboxane A<sub>2</sub>를 감소시킨다.

### 나. 혈액응고 억제평가

#### ▶ 실험방법

샘플들은 처음에 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 용해되었다. 응고 활성을 평가하기 위해 트롬빈(TT: 트롬빈 시간), 프로트롬빈(PT: Prothrombin time), 응고 계수(aPTT: 활성 부분 트롬보플라스틴 시간)의 활성화에 필요한 응고 시간을 측정하였다. TT, PT, aPTT는 제조사의 프로토콜 (Ameulungcoagulometer, Lemgo, Germany)에 따라 수행되었다. 아스피린(1.5 mg/mL, 아세틸살리실산, 시그마, 세인트루이스, MO, USA)은 고농도(300~500 mg/kg)에서 트롬빈 생성과 응고 형성을 억제하는 역할을 했기 때문에 양성 대조군으로 사용하였다. 모든 데이터는 3번 실험의 평균 ± SD 값으로 제시하였다.

### 다. 항비만 활성 세포실험

#### ▶ 실험방법

##### a. 3T3-L1 세포 배양과 분화

3T3-L1 전지방세포는 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였고, 10% bovine calf serum(BCS), 1X

penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM을 이용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 전지방세포의 분화는 세포분화를 위해 각 well 에 세포를 배양한 후 100% confluency가 되면 2일간 그대로 유지시켰다. 전지방세포에 1 µg/mL insulin, 0.5 mM Isobuthylmethylxanthine (IBMX), 1 µM Dexamethasone를 포함한 10% FBS DMEM 배지로 지방세포분화를 유도하고 2일 후 1 µg/mL insulin 이 함유된 10% FBS DMEM으로 이를 동안 배양하였다. 그 후 2일 간격으로 1 µg/mL insulin이 함유된 10% FBS DMEM로 배양액을 교체하여 지방세포분화를 유도하였다. 지방세포 분화 유도 기간 동안 시료를 0, 1, 10 100 1 µg/mL 농도로 처리하고 분화가 완성되는 시점인 8일째에 Oil Red O 염색 실험을 수행하였다.

#### b. 세포독성 평가

96 well plate에 3T3-L1 cell을  $2 \times 10^5$  cell/well로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 각 물질을 1, 10, 100, 500, 1000 µg/ml 농도로 처리하여 48, 72시간동안 배양하였다. 배양 후 각 well에 20 µl MTS solution 첨가 후 37 °C 배양기에서 1시간 반응 시킨 후 490 nm에서 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하여 비교하였다.

#### c. Oil Red O 염색

3T3-L1 세포 내 지방축적량을 측정하고자 각각의 시료를 처리하여 6well plate에서 8일 동안 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후, 4% paraformaldehyde 용액 500 µL를 첨가하여 15분간 실온에서 방치한 뒤 제거하였다. 그 후 60% isopropanol 용액 500 µL로 세척하여 세포를 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 세포들은 미리 제조해 둔 Oil red O working solution (Oil red O : DW = 6 : 4)으로 세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색한 후, 증류수를 이용하여 세포를 3~4회 세척하고 완전히 건조시켰다. 세포 내 축적된 지방 성분과 결합한 Oil red O는 100% isopropanol을 이용하여 모두 용출 시킨 후, ELISA를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 라. 항염 세포 실험

### ▶ 실험방법

#### a. 세포배양

RAW264.7cell은 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 cell 10% FBS, 1X penicillin-streptomycin를 첨가한 DMEM media에서 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 조건으로 배양하였다.

#### b. 세포독성평가

96well plate에 RAW 264.7 cell을  $2 \times 10^5$  cell/well로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 각 물질을 1, 10, 100, 500, 1000 µg/ml 농도로 처리하여 24시간동안 배양하였다. 배양 후 각 well에 20 µl MTS solution 첨가 후 37 °C 배양기에서 1시간 반응 시킨 후 490 nm에서 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하여 비교하였다.

#### c. *In vitro* 항염증 활성 평가

48well plate에 RAW 264.7 cell을  $5 \times 10^5$  cell/well로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 LPS 3 µg/ml을 처리하고 각 물질을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 well의 상등액 100 µl를 96 well plate에 분주하고 Griess solution을 100 µl 분주하여 실온 암실에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### d. 염증 지표 단백질 발현량

Raw264.7세포에 LPS 3 µg/mL로 분주 후 각 물질을 농도별로 (1-100 µg/mL)으로 24 시간 동안 처리 후 harvest 하였다. 단백질은 protease inhibitors (Sigma)를 포함하는 RIPA 완충액으로 분리하고 bicinchoninic acid (BCA) 분석 (Thermo Scientific)을 사용하여 정량화하였다. 정량한 단백질은

SDS-PAGE gel (10 %, Invitrogen)에서 분리하고 iBlot 시스템 (Thermo Scientific)을 사용하여 membrane으로 옮겼다. membrane을 Tween 20이 함유된 Tris-Buffered Saline로 5% skin milk를 만들어 membrane을 blocking한 다음 primary antibody와 함께 4 °C에서 overnight 하였다. 이어서, membrane을 세척하고 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit이나 anti-mouse antibodies (Pierce, Rockford, IL, USA)와 함께 배양 하였다. 정량 분석은 ImageJ 소프트웨어 (NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 수행되었으며 단백질 대 로딩 컨트롤의 비율로 계산하였다.

#### e. Prostaglandin E2 assay

ProstaglandinE2release은 Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 측정하였다. 시료는 RAW 264.7 cell을 6 well plate에서 24시간 배양 후 LPS 3 µg/ml를 처리하고 각 물질을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 well의 상등액을 3배 희석하여 사용하였다.

### 마. in vitro HMG-Co A reductase inhibition activity

#### ▶ 실험방법

콜레스테롤 합성 저해 활성은 HMG-CoA reductase assay kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 *in vitro*에서 측정하였다. 각 시료는 10 µg/ml에서 활성을 측정하였으며, HMG-CoA reductase에 의해 HMG-CoA가 mevalonate로 환원될 때 NADPH가 NADP+로 산화되는 정도를 340 nm에서 10분간 흡광도의 변화로 측정하였다. Pravastatin을 positive control로 사용하여 시료의 저해 활성과 비교하였다.

### 바. 고지혈증 유발동물모델을 이용한 혈중 지질 변화

#### ▶ 실험방법

#### ○ 사용동물

(1) 종 및 계통 : SD rat

(2) 공급 및 생산처

명칭 : (주) 샘타코 바이오 코리아

주소 : 경기 오산시 서량로 105

(3) 입수 시 주령(성별) 및 체중범위 : 6주령(수컷), 180~200 g

(4) 순화방법 및 기간

일주간의 검역, 순화기간 중에 매일 1회 일반증상 관찰을 실시. 반입 시 검역, 순화기간 종료 시 체중을 측정하여 시험 실시에 적합한 건강한 동물을 선발하였음.

(5) 군분리

투여 전일에 체중을 측정하고 excel program을 이용하여, 각 군간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 분리하였음.

(6) 개체식별

개체식별은 미부 표시법 및 사육상자 별 개체식별카드 표시법을 이용하였다.

#### ○ 환경조건

(1) 온습도 범위 : 온도 22±2°C, 상대습도 45±10%

(2) 환기횟수 : 10~15 회/시간

(3) 조명시간 및 명암주기 : 형광등조명 12 hr

(4) 조도 : 150 ~ 205 Lux

(5) 소음 : 50 dB이하

(6) 사육 상자 및 사육밀도

폴리카보네이트 사육상자 (280 W × 420 L × 180 H (mm), Jeung-Do B&P), cage당 2~3마리씩 수용하였음.

(7) 사료 및 음수의 공급

사료는 일반식이, 음수는 필터와 유수살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수를 폴리카보네이트제 음수병(250 mL)에 넣어 자율 급이 하였음.

○ 사료

(1) 일반식이 : EP 형태 (조단백 20% 이상, 조지방 5% 이상, 칼슘 0.7% 이상, 인 1% 이하, 조섬유 7% 이하, 조회분 10% 이상)

(2) 사료 명칭 및 공급처

명 칭 : 실험용 동물사료 1

공급처 : 제일사료주식회사 (대전광역시 대덕구 대화동 40-36)

○ Triton WR-1339로 유도한 고지혈증 동물모델 확립 및 그룹화

실험동물은 크게 정상군(CON), Triton WR-1339를 투여하는 음성대조군(NCON), atorvastatin을 투여하고 Triton WR-1339를 투여한 그룹을 양성대조군(PCON), Red-BCQ (0.83 mg/kg body weight)를 투여하고 Triton WR-1339를 투여한 실험군(RA), Agnex (12.5 mg/kg body weight)를 투여하고 Triton WR-1339를 투여한 실험군(AG), Red-BCQ (0.83 mg/kg body weight)와 Agnex (12.5 mg/kg body weight)를 혼합투여하고 Triton WR-1339를 투여한 실험군(RAG) 등 총 6 그룹으로 구성하고 각 그룹당 5 개체씩 배치하였각 시험물질은 2주동안 매일 1회 투여하였다. Triton WR-1339는 0.15% KCl에 희석하여 사용하였고, 투여용량은 300 mg/kg의 용량으로 복강투여 하였다. 약물 및 시험물질은 매일 오전 일정한 시간에 경구투여 하였고 2~3일마다 사료복용량, 음용수량, 체중을 측정하였다. 실험 종료 15시간 전에는 사료의 공급을 중단하고 실험종료 시점에서 복대정맥에서 혈액시료를 채취하여 혈청을 분리한 시료는 생체지표 측정에 사용하였다. 본 연구는 SUACUC (Silla University, Animal Care and Use Committee)의 승인(SUACUC-2018-003)을 받아 지침에 따라 관리하였다.

○ 주요 대사기능 평가, 혈액내 지질 수준 변화 측정 및 동맥경화 지수

혈중 아스파테이트 트랜스아미네이즈(aspartate transaminase, AST), 알라닌 트랜스아미네이즈(alanine transaminase, ALT), 요소질소 농도(blood urea nitrogen; BUN), creatinine은 아산제약(주) (Seoul, Korea) kit를 사용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 측정하였다. 혈중 지질 수준 측정을 위해 복대정맥에서 채혈 직후 상용 혈청분리튜브(Vacurette<sup>®</sup> Tube, Greiner Bio-One GmbH, Austria)를 이용하여 원심분리 후 -80℃에 보관한 혈청을 사용하였다. TG는 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI)에서 제공한 분석법에 따라 혈청을 사용하여 측정하였다. TC, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 Abcam사(Cambridge, MA, UK)에서 제공한 분석법에 따라 혈청을 사용하여 측정하였다. 지질 수준변화를 이용하여 동맥경화 지수를 계산하였다.

사. 고지혈증 유발동물모델의 조직 중 항산화 효소 활성 변화

▶ 실험방법

동물실험 종료 후 간을 적출하여 간 무게의 5배에 해당하는 PBS (phosphate buffer solution 0.05 M pH 7.4)를 넣고 간을 균질화한 후 실험재료로 사용하였다. 단백질 정량은 Lowry법으로 740 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준단백질시료로 bovine serum albumin (BSA)를 사용하였다. **Malone dealdehyde (MDA)**를 정량하기 위하여 간균질액을 시험관에 각각 0.5 ml씩 triplicate로 분취한 뒤 thiobarbituruce acid (TBA)방법으로 7% SDS (sodium dodesyl sulfete)로 용해시켜 여기에 0.67% acetic acid 혼합시약을 2 ml를 첨가하여

95°C water bath에서 50분간 가온시킨 후 즉시 급냉시키고 butanol 5 ml를 넣고 원심분리 (150 × g, 10분)한 뒤 상등액을 채취해 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,4,4-tetra-ethoxypropane를 사용하여 표준검량선을 작성한 후 MDA 값을 정량하였다. **SOD 활성 측정**은 Fridovich법을 변형하여 측정하였다. Potassium phosphate buffer 용액(100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM KCl, 10 mM EDTA, pH 7.4)과 1 mM xanthine, 1% deoxycholate (DOC), 1.5 mM potassium cyanate (KCN), 0.2 mM cytochrome C를 혼합한 후에 간균질액을 첨가하였다. 마지막으로 xanthine oxidase (XOD)를 첨가하여 550 nm의 파장에서 2분간 효소활성을 측정하였다. **CAT 활성 측정**은 Aebi법으로 측정하였다. 0.05 M PBS (pH 7.0) 완충액 1.9 ml에 간균질화 시료 0.1 ml를 혼합하였다. 여기에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 1 ml를 첨가한 뒤 240 nm에서 1분 30초간 효소 활성을 측정하였다.

## 제 4 절 발모효능실험

### 가. 실험동물 및 시료처리 후 육안적 평가에 의한 발모효과 분석

#### ▶ 실험방법

#### ○ 사용동물

(1) 종 및 계통 : C57BL/6

(2) 공급 및 생산처

명 칭 : (주)샘타코 바이오 코리아

주 소 : 경기 오산시 서량로 105

(3) 입수 시 주령(성별) 및 체중범위 : 6주령(수컷), 15-18 g

(4) 순화방법 및 기간

일주간의 검역, 순화기간 중에 매일 1회 일반증상 관찰을 실시. 반입 시 검역, 순화기간 종료시 체중을 측정하여 시험 실시에 적합한 건강한 동물을 선발하였음.

(5) 군분리

투여 전일에 체중을 측정하고 excel program을 이용하여, 각 군간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 분리하였음.

(6) 개체식별

개체식별은 미부 표시법 및 사육상자 별 개체식별카드 표시법을 이용하였다.

#### ○ 환경조건

(1) 온습도 범위 : 온도 22±2°C, 상대습도 45±10%

(2) 환기횟수 : 10~15 회/시간

(3) 조명시간 및 명암주기 : 형광등조명 12 hr

(4) 조도 : 150 ~ 205 Lux

(5) 소음 : 50 dB이하

(6) 사육 상자 및 사육밀도

폴리카보네이트 사육상자(210 W × 270 L × 127 H (mm), Jeung-Do B&P), cage당 2~3마리씩 수용하였음.

(7) 사료 및 음수의 공급

사료는 일반식이, 음수는 필터와 유수살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수를 폴리카보네이트제 음수병(250 mL)에 넣어 자율 급이 하였음.

## ○ 사료

(1) 일반식이 : EP 형태 (조단백 20% 이상, 조지방 5% 이상, 칼슘 0.7% 이상, 인 1% 이하, 조섬유 7% 이하, 조회분 10% 이상)

(2) 사료 명칭 및 공급처

명 칭 : 실험용 동물사료 1

공급처 : 제일사료주식회사 (대전광역시 대덕구 대화동 40-36)

6주령 15 g 내외의 웅성 마우스 C57BL/6는 (주)샘타코 바이오 코리아(서울, 한국)에서 분양 받아 동물 사육실 내 실험동물용 케이지에서 1주일의 적응기간을 거친 후 4주간의 실험에 투입하였다. Ethyl ether로 가볍게 마취시킨 다음 동물용 제모기를 이용하여 마우스의 등 부위의 털을 제거하였고, 피부 속에 남아있는 모낭과 미세한 털을 제거하기 위하여 제모제(Niclean, Ildong Pharmaceutical, Co., LTD, Seoul, Korea)를 피부에 도포하여 3분간 방치 후 제모를 완료하였다. 24시간 후부터 saline을 경구투여한 음성대조군(CON), 5% minoxidil이 함유된 경구용 제제인 pancidil을 투여한 양성대조군(PCON), Red-BCQ(1.7 mg/kg body weight)를 경구투여한 실험군(RA), Agnex (25 mg/kg body weight)를 경구투여한 실험군(AG), Red-BCQ와 Agnex 혼합물을 경구투여한 실험군(RAG)으로 분리하여 각각의 약물을 매일 1회 4주간 경구투여 하였다. 각 그룹당 개체수는 5마리로 실험하였으며 총 25마리의 실험동물을 사용하였다. 실험 종료 16시간 전에는 사료의 공급을 중단하여 이 후 대사에 영향을 미치지 않도록 하였다. 실험종료 시 복대정맥에서 혈액시료를 채취하고 혈청을 분리하여 이 후 생체지표 측정에 사용하였다. 또한, 조직분석과 면역화학적 분석을 위해 간 조직과 등 피부를 적출 후 전처리하여 바로 실험에 사용하였다. 모든 동물실험은 SUACUC (Silla University, Animal Care and Use Committee)의 승인(SUACUC-2018-012)을 받아 진행하였다. 육안적 발모효과 평가는 실험 시작 후 1, 2, 3, 4주차에 털이 자라는 상태를 확인하기 위하여 가볍게 ethyl ether로 마취시킨 후 사진촬영을 하였다. 털이 자란 상태를 육안적으로 판단하여 점수화하기 위해 각 군별로 비교하였다. 육안으로 관찰한 결과를 다음과 같은 기준으로 점수화하였다(2주, 4주차). 80-100% (5점), 60-70% (4점), 40-59% (3점), 20-39% (2점), 0-19% (1점). 10명의 평가자에 의해 평가하여 기록하였으며, 각 평가자들의 점수를 합산하여 각 군별로 평균치를 산정하였다.

## 나. 조직검사에 의한 발모효과

### ▶ 실험방법

실험종료 시점에 perfusion에 의하여 혈액을 제거하고 mouse의 등 피부조직을 적출하였다. 적출한 조직 중 일부분을 취하여 10% formaldehyde (pH 7.4 인산완충용액으로 용해) 용액에 48시간 고정시킨 후, 70%, 80%, 90%, 100% (v/v) ethanol에서 순차적으로 각각 탈수시켰다. 탈수시킨 조직을 xylene으로 투명화 과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하고 microtome을 이용하여 5  $\mu$ m의 조직절편을 제작하였다. Hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색한 후에 봉입하여 광학현미경으로 조직을 관찰하였다.

## 다. 조직 중 항산화 효소 측정

### ▶ 실험방법

동물실험 종료 후 간을 적출하여 간 무게의 5배에 해당하는 PBS (phosphate buffer solution 0.05 M pH 7.4)를 넣고 간을 균질화한 후 실험재료로 사용하였다. 단백질 정량은 Lowry법[19]으로 740 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준단백질시료로 bovine serum albumin (BSA)를 사용하였다. **Malone dealdehyde (MDA)**를 정량하기 위하여 간균질액을 시험관에 각각 0.5 ml씩 triplicate로 분취한 뒤 thiobarbituric acid (TBA)변법으로 7% SDS (sodium dodecyl sulfate)로 용해시켜 여기에 0.67% acetic acid 혼합시약을 2 ml를 첨가하여 95°C water bath에서 50분간 가온시킨 후 즉시 급냉시키고 butanol 5 ml를 넣고 원심분리 150 × g, 10분)한 뒤 상등액을 채취해 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,4,4-tetra-ethoxypropane를 사용하여 표준검

량을 작성한 후 MDA 값을 정량하였다. **SOD 활성 측정**은 Fridovich법을 변형하여 측정하였다[3]. Potassium phosphate buffer 용액(100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM KCl, 10 mM EDTA, pH 7.4)과 1 mM xanthine, 1% deoxycholate (DOC), 1.5 mM potassium cyanate (KCN), 0.2 mM cytochrome C를 혼합한 후에 간균질액을 첨가하였다. 마지막으로 xanthine oxidase (XOD)를 첨가하여 550 nm의 파장에서 2분간 효소활성을 측정하였다. **CAT 활성 측정**은 Aebi법으로 측정하였다[1]. 0.05 M PBS (pH 7.0) 완충액 1.9 ml에 간균질화 시료 0.1 ml를 혼합하였다. 여기에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 1 ml를 첨가한 뒤 240 nm에서 1분 30초간 효소 활성을 측정하였다.

## 라. 모발성장인자, 탈모유발인자의 발현측정

### ▶ 실험방법

Mouse 피부 조직에서 단백질을 추출하기 위해 털을 제거하고 피부 조직을 차가운 PBS로 세척한 뒤, PI cocktail (Cat No. P8340, Lot No. 037M4055V, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)이 함유된 RIPA buffer (Cat No. R2002, Lot No. R0219R29S, 바이오세상, 서울, 한국) 300 µl/100 mg tissue 을 첨가하여 균질화하였다. 이후 BCA protein assay kit (Cat No. 23227, Lot No. RG235629, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 각 샘플의 단백질을 정량하였다. Western blot을 수행하기 위해, 추출한 단백질과 loading buffer를 첨가하여 동일 농도의 단백질을 함유하는 시료를 준비하여 Western blot을 실시하였다. 15%(w/v) SDS-PAGE gel을 만든 후, well 당 동량의 sample을 로딩 후 nitrocellulose membrane에 blotting 하였다. 이후 skim-milk와 BSA를 사용하여 membrane을 blocking한 후, TBS-T를 이용하여 membrane을 세척하였다. 세척 후 1차 항체는 TGF-β1 (Cat No. ab92486, Lot No. GR3237963-7, Abcam, Cambridge, MA, USA) 1:500, IGF-1 (Cat No. ab9572, Lot No. GR21525-66, Abcam, Cambridge, MA, USA) 1:1,000, β-actin (Cat No. #8457s, Lot No. 6, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 1:1,000의 농도로 처리하여 4℃에서 15시간 동안 반응하였다. 다음 날 TBS-T를 이용하여 membrane을 세척한 후 2차 항체 (#7074, Lot No. 28, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 TGF-β1 membrane, IGF-1 membrane 및 β-actin membrane에 각각 1:6,000, 1:4,000 및 1:20,000의 농도로 90분동안 반응시켰다. TBS-T를 이용하여 각각의 membrane을 세척한 후 Super Signal West Pico (Cat No. 34577, Lot No. TA262523, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Super Signal West Femto (Cat No. 34095, Lot No. QL227785B, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질 band를 확인하였다. 산출된 band의 intensity는 Alpha Ease FC software (Alpha Innotech, San Leandro, CA)를 이용하여 정량화 하였다.

## 마. 5-α Reductase의 정량

### ▶ 실험방법

실험종료 후 EDTA tube에 모은 혈액을 원심분리(1,348 xg, 4℃, 10분)하여 plasma를 분리한 후 분석을 위한 시료로 사용하였다. 5-α reductase의 측정은 steroid 5-α reductase를 정량하기 위한 Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kit (Mybiosource, San Diego, USA, cat. no. MBS2021309)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 측정하였다.

## 바. 피부조직 중 Alkaline phosphatase(ALP)와 γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT) 활성 측정

### ▶ 실험방법

실험종료 후 적출한 피부조직에 그 무게의 4배에 해당하는 PBS를 첨가하여 조직균질기로 파쇄하였다. 그 후 원심분리(3000 rpm, 4℃, 10분)하여 상등액을 채취해 실험에 사용하였다. Alkaline phosphatase colorimetric assay kit (Genetex: GTX85593)를 이용하여 ALP 활성을 측정하였고, gamma glutamyl transferase activity colorimetric assay kit (biovision: K784-100)를 이용하여 γ-GT 활성을 측정하였다. 모두 제조사의







mg/mL (Solution B).

3) Filter 'Solution B' using a syringe filter (0.45 mm).

4) Analyze 'Solution B' using HPLC under the following conditions.

- Column : C<sub>18</sub> column (5 mm, 4.6 × 250 mm)
- Eluent : 70% acetonitrile containing 0.1% formic acid
- Detector : UV detection at 320 nm
- Flow rate : 1 mL/min
- Injection volume : 10 µL
- Column oven temperature : 30°C
- Gradient mode : Isocratic elution
- Analysis time : 10 min

5) Add peak areas of decursin (PA<sub>D</sub>) and decursinol angelate (PA<sub>A</sub>) together (Fig. 1).

$$PA_{D+A} = PA_D + PA_A$$

6) Calculate a total concentration (CB<sub>D+A</sub>, mg/mL) of decursin and decursinol angelate in 'Solution B' using PA<sub>D+A</sub> from a decursin calibration curve (refer to Technical Note #121). (Note: the concentration of decursinol angelate is regarded as that of decursin because a calibration curve of decursinol angelate is almost similar to decursin)

7) Calculate a content (C<sub>D+A</sub>, mg/g of extract) of decursin and decursinol angelate in AGNEX EX™ using the following equation.

$$C_{D+A} (\text{mg/g of extract}) = CB_{D+A} (\text{mg/mL}) \times 200 \times 10^{-3} \times 10$$

8) C<sub>D+A</sub> of AGNEX EX™ should be more than 700 mg/g of extract when produced properly.

$$C_{D+A} (\text{mg/g of extract}) \times 700$$

Fig. 1. HPLC analysis of AGNEX

(A) Chromatogram; (B) Mass spectrum of decursin.

**Validation procedure of AGNEX EX™**

1) Dissolve 1 g of AGNEX EX™ granules in 10 mL of ethanol thoroughly.

2) Take a supernatant (Solution A) after a centrifugation of the solution (10,000 rpm, 10 min).

3) Dilute 'Solution A' 200 times with ethanol (Solution B).

4) Filter 'Solution B' using a syringe filter (0.45 mm).

5) Analyze 'Solution B' using HPLC under the following conditions.

- Column : C<sub>18</sub> column (5 mm, 4.6 × 250 mm)
- Eluent : 70% acetonitrile containing 0.1% formic acid
- Detector : UV detection at 320 nm
- Flow rate : 1 mL/min
- Injection volume : 10 µL
- Column oven temperature : 30°C
- Gradient mode : Isocratic elution
- Analysis time : 10 min

6) Add peak areas of decursin (PA<sub>D</sub>) and decursinol angelate (PA<sub>A</sub>) together (Fig. 1).

$$PA_{D+A} = PA_D + PA_A$$

7) Calculate a total concentration (CB<sub>D+A</sub>, mg/mL) of decursin and decursinol angelate in 'Solution B' using PA<sub>D+A</sub> from a decursin calibration curve (refer to Technical Note #101). (Note: the concentration of decursinol angelate is regarded as that of decursin because a calibration curve of decursinol angelate is almost similar to decursin)

8) Calculate a content (C<sub>D+A</sub>, mg/g of granule) of decursin and decursinol angelate in AGNEX EX™ using the following equation.

$$C_{D+A} (\text{mg/g of granule}) = CB_{D+A} (\text{mg/mL}) \times 200 \times 10^{-3} \times 10$$

9) C<sub>D+A</sub> of AGNEX EX™ should be more than 84 mg/g of granule when produced properly.

$$C_{D+A} (\text{mg/g of granule}) \times 84$$

Fig. 1. HPLC analysis of AGNEX.  
(A) Chromatogram; (B) Mass spectrum of decursin.

Quercetin

■ 표준시험법 | ■ 저: 식약처 허가도판의 변경가능성을 시험법  
□ 검사시험법 | □ 시험법별 특성상 (원재료의) 자료 제공 여부

☐ 시험법별 특성

1. '용량' 범위 및 스펙

- 1.1 부피불량(10 mL, 50 mL)
- 1.2 액상량(200 mL)
- 1.3 양적불량
- 1.4 정량 불충분
- 1.5 예과용 용액의 원료 및 디스크형 용액의 원료
- 1.6 액체크로마토그래피용 용액
- 1.7 수욕(water bath)

2.2 분석법

- 2.1 분석법 범위 및 스펙
- 2.2.2 자외선흡광도 검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드 배열 검출기(Photodiode Array Detector)
- 2.2.3 CapcoLab C<sub>6</sub> UV50 용량(정확도 45 mm, 200 mm, 200 mm) 3.1 µm 이하의 900 nm
- 2.3 분석법의 원리

2.2.2 자외선흡광도 0.1% 인산용 완충액 이온화(0.1% 인산용액 49 : 50으로 혼합하여 분량 1.0 mL씩 출량)으로서 용량과 기기를 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반사항

- 3.1 표준물질
- 3.1.1 제조사: 이수화학(Quercetin dihydrate)
- 3.1.2 CAS No.: 338-77, CAS No.: 6151-05-3

3.1.2 퀘르세틴(Quercetin) 분자식: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>, 분자량: 302.04, CAS No.: 520-18-3

3.1.3 퀘르세틴염(Quercetin salt) 분자식: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>, 분자량: 316.26, CAS No.: 480-19-3

3.2 일반사항

- 3.2.1 원료(Material, HPLC grade)
- 3.2.2 용매(Solvent, acid)
- 3.2.3 증류수(Distilled water)
- 3.2.4 염산(Hydrochloric acid)
- 3.2.5 에탄올(Ethanol)

4. 시험과정

- 4.1.1 분석용액의 조제: '물' : '인산' = 50 : 20 ; 8, v/v(1000 mL, 1000 mL)에 '에탄올' 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조상상태를 약 16 mL를 넣는다.
- 4.2 표준용액의 조제
- 4.2.1 원재료인 이수화학 100 mg를 정량용 용액에 100 mL 부피플라스크에 취한 후 용액의 용도에 맞게 용액(이수화학)을 300:300 = Quercetin(mg).
- 4.2.2 정량을 100 mg를 정량용 용액에 100 mL 부피플라스크에 취한 후 용액의 용도에 맞게 용액한다.
- 4.2.3 이수화학의 25 mg를 정량용 용액에 100 mL 부피플라스크에 취한 후 용액의 용도에 맞게 용액한다.
- 4.2.4 원료의 표준용액(에탄올로 적정)으로 분석하여 표준용액으로 사용한다.
- 4.3 원재료인 이수화학, 퀘르세틴, 이수화학(염) 시험용액 제조
- 5.1 용액의 300 mg를 정량용 용액에 300 mg를 취한 후 10 mL, 원재료(염)

기준치

4.3.2 90°C 수욕에서 1시간 동안 가수분해한다.

4.3.3 약 50 mL 부피플라스크에 넣고 후 에탄올로 표상하지 않는다.

4.3.4 약 0.45 µm 필터를 이용해 필터로 여과하여 시험용액으로 만든다.

5. 분석 및 계산

5.1 기구분석

표 1. 고체액(Quercetin)의 조제(배합)

항목	조건
용량	20 µL
용액의 용량	370 mL
용액의 온도	35°C
이용액	0.1% 인산용 완충액 이온화(0.1% 인산용액 49 : 50)
용액	1.0 mL/분

5.2 계산

5.2.1 Quercetin 함량률 계산한다.

각각의 용량(농도) 배합량 (flavonol glycosides) 함량 (mg/g) = (A × B × C × D) / E

A : 시험용액의 각각의 용량(농도) 배합량 (mg/mL)

B : 시험용액의 용량(mL)

C : 분석용액

D : 원료 (Quercetin: 2.586, Quercetin: 2.504, Isorhamnetin: 2.437)

E : 시험용액

6. 유효물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

6.1. 유효물질 규격(한국, 미국, 유럽, 호주)의 규격 및 근거

☐ 식약처(한국)는 2018-09-05 안전기준을 가능하게 하는 기준 - 규격 인정에 관한 규정 제14호(제2차의 내용 및 요건) 제6호 유효물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 중 '가, 용액 또는 제조과정으로 인한 유효물질의 오염 또는 잔류 가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 유효물질의 규격을 결정한다. 나, 유효물질의 시험방법은 「중금속 검출량 기준 및 규격」, 「식품의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」(Codex Alimentarius Commission, CAC) 규정, AOAC 방법 등을 따라 국내에서 공인된 방법을 사용하여 만든다. 다만, 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 인정되는 경우 신청자가 제시하는 시험방법을 사용할 수 있다. 이 경우에는 검사시 시험방법의 타당성을 평가한다. 다, 표준용 유효물질의 규격과 시험방법의 타당성을 검토하기 위하여 식약처(식품안전관리처)에 자료가 인정된 국내의 검사기관의 시험결과를 제출하여야 한다. 단, 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 있는 경우에는 「수업식용 농약에 관한 규정」, 「정밀검사 대상 잔류농약 검사방법에 대한 예」에 준하여 5가지 농약(아세트산, 디알데하이드, 알데하이드, CDIT)에 대한 시험결과를 분석자료를 제출하여야 한다.」에 따라 제출자료를 작성하였다.

6.2. 유효물질 규격, 미생량(잔류농약)의 시험법 및 분석기준

항목	시험법	시험 기준 및 규격
규격항목	인산	인산의 양
	Decursin	100 mg/g
	Quercetin	4 mg/g
	농도	10
	농도	10
	농도	10
규격 시험법	미생물	시험법
	중금속	시험법(Codex)
	잔류농약	시험법
항목	중금속	시험법
	중금속	시험법
	중금속	시험법

7. 안전성에 관한 자료

7.1 섭취금지 정보

☐ 2.3. 국내의 인정 허가 현황 및 2.4. 국내의 사용용량 같다.

7.2 기능성 또는 관능성(영양성분)의 안전성(비독성) 평가 결과

☐ 원료: 원재료는 식용의 원료로 사용 가능(식품안전관리처) '정량'으로 식용 원료에 사용된 분량, 식용원료 DB 검색결과 '정량'으로 등재되어 있다.

☐ 원재료 '작용'은 식용의 원료로 사용 가능(식품안전관리처) '정량'으로 식용 원료에 사용된 분량, 식용원료 DB 검색결과 '정량'으로 등재되어 있다.

☐ 용량: 원재료는 한방과 민간에서 사용 및 식용으로 인정되어 있으며, 관련 제품이 다양하게 유통되어 섭취되고 있다.

7.3 섭취량 평가 정보

☐ 섭취량: 원재료는 1.5 g/일

☐ 원재료인 '정량'은 「식품안전」에 등재된 식용 원재료로, 「식품 안전성 시험법」에 사용될 수 있는 원료의 목록에 등재(사용목적: 무균(무균), 알) 되어 있으며, 식용원료 DB 검색결과 정량기는 식용 가능한 것으로 등재되어 있다.

☐ 원재료인 '작용'은 「식품안전」에 등재된 식용 원재료(원재료명: 양파)로, 「식품 안전성 시험법」에 사용될 수 있는 원료의 목록에 등재(사용목적: 무균(무균), 알, 씨앗) 되어 있으며, 식용원료 DB 검색결과 정량기는 식용 가능한 것으로 등재되어 있다.

☐ 원재료인 '작용'은 「식품안전」에 등재된 식용 원재료(원재료명: 양파)로, 「식품 안전성 시험법」에 사용될 수 있는 원료의 목록에 등재(사용목적: 무균(무균), 알, 씨앗) 되어 있으며, 식용원료 DB 검색결과 정량기는 식용 가능한 것으로 등재되어 있다.

☐ 원재료인 '작용'은 「식품안전」에 등재된 식용 원재료(원재료명: 양파)로, 「식품 안전성 시험법」에 사용될 수 있는 원료의 목록에 등재(사용목적: 무균(무균), 알, 씨앗) 되어 있으며, 식용원료 DB 검색결과 정량기는 식용 가능한 것으로 등재되어 있다.

☐ 원재료인 '작용'은 「식품안전」에 등재된 식용 원재료(원재료명: 양파)로, 「식품 안전성 시험법」에 사용될 수 있는 원료의 목록에 등재(사용목적: 무균(무균), 알, 씨앗) 되어 있으며, 식용원료 DB 검색결과 정량기는 식용 가능한 것으로 등재되어 있다.

☐ 원재료인 '작용'은 「식품안전」에 등재된 식용 원재료(원재료명: 양파)로, 「식품 안전성 시험법」에 사용될 수 있는 원료의 목록에 등재(사용목적: 무균(무균), 알, 씨앗) 되어 있으며, 식용원료 DB 검색결과 정량기는 식용 가능한 것으로 등재되어 있다.

☐ 원재료인 '작용'은 「식품안전」에 등재된 식용 원재료(원재료명: 양파)로, 「식품 안전성 시험법」에 사용될 수 있는 원료의 목록에 등재(사용목적: 무균(무균), 알, 씨앗) 되어 있으며, 식용원료 DB 검색결과 정량기는 식용 가능한 것으로 등재되어 있다.

정량(정량)으로 150 mL, 기능성: 알코올 용액(정량)에 대한 정보를 줄 수 있음)

☐ 용량: 원재료 및 원재료로 인한 비안전성 및 안전성시험에서 PT, aPTT, 혈소판 응집도, platelet aggregation 및 혈행 계 관련 지표들이 유익하므로 개선되었다(2018).

☐ 따라서 섭취량 및 안전성연구결과를 토대로 본 연구에서는 정량기 적당량 출량(정량)으로 1.5 g/일 섭취량으로 설정하고자 한다.



## 제 6 절 임상시료 제조(시제품 생산)

### 가. 각 추출물을 혼합한 시제품 개발

#### ▶ 참당귀 적양파 추출 혼합물의 제조 (분말/과립)



Fig. 2. 참당귀 적양파 추출물 원료의 분말화

각 원료의 유효농도를 설정하고 각각의 분말화를 진행하였다. Red-BCQ powder는 1번 형태로 만들 경우 분말 색이 진하고 맛이 썼다. 2번에 비해 분말이 약간 뭉치는 경향이 있었다. 2번의 조성으로 만들었을 경우 색이 적당하고 분말이 아주 곱게 잘 유지되었다(Fig. 2). Agnex의 경우 lysine을 첨가하여 분말화한 4번의 경우 건조 후 분말화가 잘 되지 않고 딱딱한 덩어리가 있어서 상품화하기 어려울 것 같아 Lysine을 빼고 Starch 함량을 높인 3번 분말의 형태로 제조하니 색이나 향이 마일드하였고 분말화가 잘 유지되었다(Fig. 3). 하지만 분말형태로는 섭취시 호불호가 큰 편이어서 과립으로도 제조하였다(Fig. 3). stick 포장에 1.5 g (4 mg quercetin/g 함량의 Red-BCQ 1g + 120 mg D/DA/g 함량의 Agnex 0.5 g)으로 하여 1일 1, 1회 1포를 섭취하는 용량으로 개발하였다.



Fig. 3. 참당귀 적양파 추출물 원료의 과립화

#### ▶ 참당귀 적양파 추출 혼합물의 제조 (액상)

- Agnex 와 적양파 추출물 모두 액상으로 조제시 침전물이 생기므로 가용화가 쉽지 않아 액상제제로 개발이 어려움.

- lysine을 사용하여 가용화 하면 침전물이 생기지 않고 가용화가 안정화되어 액상제제 개발이 가능해짐. 구체적으로는 5~8% ethanol, 1% polyoxyethylene sorbitan mono-oleate (tween 80), 1.8% Lysine 을 이용하여 완전히 가용화 하였음.

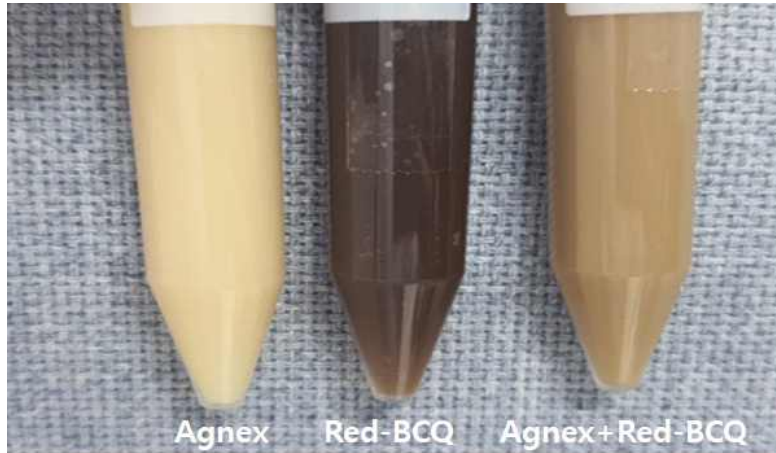


Fig.4. 참당귀 적양파 추출 혼합물의 가용화 제제

▶ 포장지 및 포장단위 선정

- 최소 포장 단위를 확정하기 위해 플라스틱 통, 비닐 포장 등 다양한 포장 형태를 고려하였고, 이 중 섭취 및 휴대가 간편한 비닐 포장으로 선택하여 진행하였음.



Fig. 5. 최종 포장지 및 포장단위

- pouch 포장 용량을 1.0g, 1.5g, 2.0g 등 다양한 형태로의 개발을 고려하였고, 앞서 기술한 바와 같이 분말의 색깔, 맛, 1일 투여용량 등을 고려하여 최종 1.5g 단위로 비닐 파우치 포장 후 박스포장 (30EA/1box) 하는 것으로 최종 결정하였다(Fig. 5).

나. 제품의 표준화 및 규격화

▶ 제조법 표준화 공정

참당귀 건조분말을 추출, 여과, 농축, 건조 과정을 통해 참당귀 추출 분말(Agnex)을 제조하며, 적양파 건조분말을 추출, 여과, 농축, 발효(혼합), 여과, 농축, 건조 과정을 통해 적양파 추출 분말(Red-BCQ)을 제조 후 참당귀 추출 분말(Agnex)과 적양파 추출 분말(Red-BCQ)을 1:2 비율로 혼합하여 참당귀 적양파 추출 혼합물을 제조하였다.



Fig. 6. 제품 제조법 표준화

#### 다. 유효성분 분석방법 validation

##### ▶ Agnex

##### Calibration Curve of Decursin

1) Dissolve a pure decursin with ethanol to make standard solutions having the following concentrations.

0.01 mg/mL, 0.025 mg/mL, and 0.05 mg/mL

2) Filter the decursin standard solutions using a syringe filter (0.45 µm).

3) Analyze the decursin standard solutions using HPLC under the following conditions.

- Column : C18 column (5 mm, 4.6 ´ 250 mm)

- Eluent : 70% acetonitrile containing 0.1% formic acid
  - Detector : UV detection at 329 nm
  - Flow rate : 1 mL/min – Injection volume : 10 mL
  - Column oven temperature : 30°C
  - Gradient mode : Isocratic elution – Analysis time : 10 min
- 4) Draw a calibration curve of decursin and determine the parameters of 'a' and 'b' by a linear regression.

$$\text{Peak area} = a \cdot \text{Concentration (mg/mL)} + b$$

### Validation procedure of AGNEX EXT<sup>TM</sup>

- 1) Dissolve 0.1 g of AGNEX EXT<sup>TM</sup> in 10 mL of ethanol thoroughly (Solution A).
- 2) Dilute 'Solution A' 200 times with ethanol to make a final concentration of 0.05 mg/mL (Solution B).
- 3) Filter 'Solution B' using a syringe filter (0.45 mm).
- 4) Analyze 'Solution B' using HPLC under the following conditions.
  - Column : C18 column (5 mm, 4.6 × 250 mm)
  - Eluent : 70% acetonitrile containing 0.1% formic acid
  - Detector : UV detection at 329 nm
  - Flow rate : 1 mL/min – Injection volume : 10 mL
  - Column oven temperature : 30°C
  - Gradient mode : Isocratic elution – Analysis time : 10 min
- 5) Add peak areas of decursin (PAD) and decursinol angelate (PADA) together (Fig. 7).

$$\text{PAD+DA} = \text{PAD} + \text{PADA}$$

- 6) Calculate a total concentration (CBD+DA, mg/mL) of decursin and decursinol angelate in 'Solution B' using PAD+DA from a decursin calibration curve (refer to Technical Note #101). (Note: the concentration of decursinol angelate is regarded as that of decursin because a calibration curve of decursinol angelate is almost similar to decursin)
- 7) Calculate a content (CD+DA, mg/g of extract) of decursin and decursinol angelate in AGNEX EXT<sup>TM</sup> using the following equation.

$$\text{CD+DA (mg/g of extract)} = \text{CBD+DA (mg/mL)} \cdot 200 \cdot 10 \cdot 10$$

- 8) CD+DA of AGNEX EXT<sup>TM</sup> should be more than 700 mg/g of extract when produced properly.

$$\text{CD+DA (mg/g of extract)} \geq 700$$

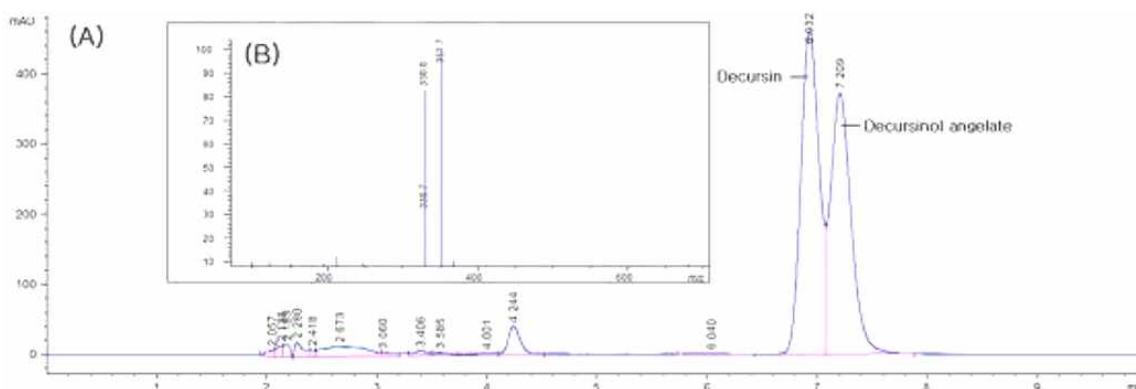


Fig. 7. HPLC analysis of AGNEX.



(A) Chromatogram; (B) Mass spectrum of decursin.

### Validation procedure of AGNEX120™

- 1) Dissolve 1 g of AGNEX120™ granules in 10 mL of ethanol thoroughly.
- 2) Take a supernatant (Solution A) after a centrifugation of the solution (10,000 rpm, 10 min).
- 3) Dilute 'Solution A' 200 times with ethanol (Solution B).
- 4) Filter 'Solution B' using a syringe filter (0.45 μm).
- 5) Analyze 'Solution B' using HPLC under the following conditions.
  - Column : C18 column (5 μm, 4.6 × 250 mm)
  - Eluent : 70% acetonitrile containing 0.1% formic acid
  - Detector : UV detection at 329 nm
  - Flow rate : 1 mL/min – Injection volume : 10 μL
  - Column oven temperature : 30°C
  - Gradient mode : Isocratic elution
  - Analysis time : 10 min
- 6) Add peak areas of decursin (PAD) and decursinol angelate (PADA) together (Fig. 8).

$$\text{PAD+DA} = \text{PAD} + \text{PADA}$$

- 7) Calculate a total concentration (CBD+DA, mg/mL) of decursin and decursinol angelate in 'Solution B' using PAD+DA from a decursin calibration curve (refer to Technical Note #101). (Note: the concentration of decursinol angelate is regarded as that of decursin because a calibration curve of decursinol angelate is almost similar to decursin)
- 8) Calculate a content (CD+DA, mg/g of granule) of decursin and decursinol angelate in AGNEX120™ using the following equation.

$$\text{CD+DA (mg/g of granule)} = \text{CBD+DA (mg/mL)} \times 200 \times 10$$

- 9) CD+DA of AGNEX120™ should be more than 84 mg/g of granule when produced properly.

$$\text{CD+DA (mg/g of granule)} \geq 84$$

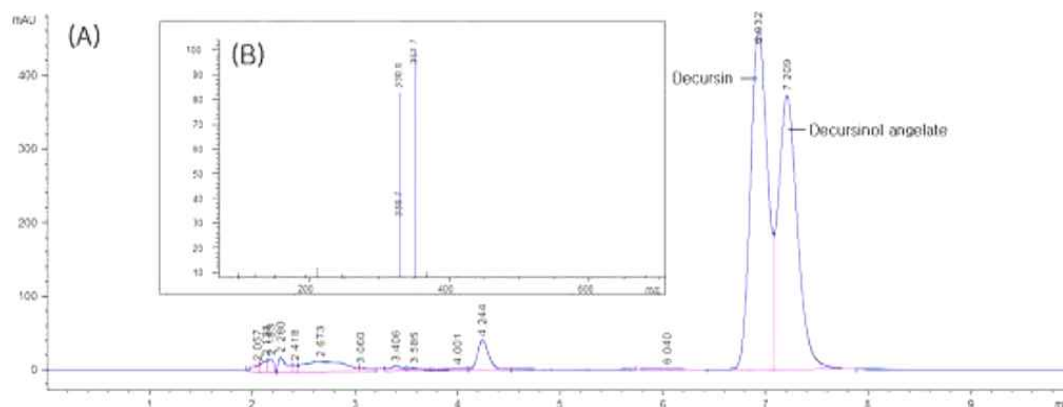


Fig. 8. HPLC analysis of AGNEX.

(A) Chromatogram; (B) Mass spectrum of decursin.

### ► Red-BCQ (Quercetin)

#### 1. 장비와 재료

##### 1.1 실험실 장비 및 소모품

##### 1.1.1 부피플라스크(10 mL, 50 mL)

1.1.2 메스실린더(200 mL)

1.1.3 삼각플라스크

1.1.4 용매용 일회용 실린지

1.1.5 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

1.1.6 액체크로마토그래피용 유리병

1.1.7 수욕조(water bath)

1.2 분석장비

1.1.1 고속액체크로마토그래피

1.1.2 자외부흡광광도 검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)

1.1.3 Capcellpak C18 UG120 컬럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전입자크기 5 μm) 또는 이와 동등한 것

1.3 분석장비의 준비

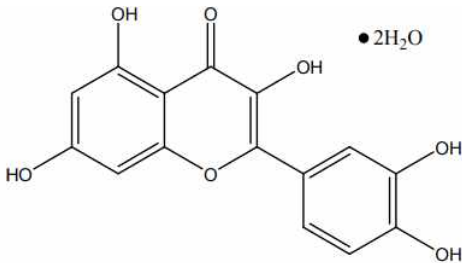
이동상으로서 0.1% 인산을 함유한 아세토니트릴과 0.1% 인산용액을 40 : 60으로 혼합하여 분당 1.0 mL씩 흘려줌으로서 칼럼과 기기를 안정화 시킨다.

## 2. 표준물질 및 일반시약

### 2.1 표준물질

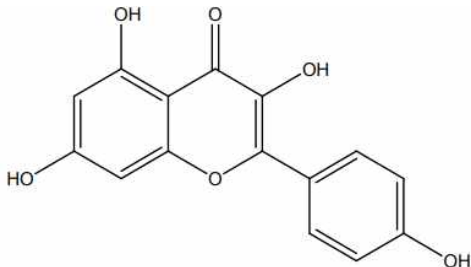
#### 2.1.1 퀘르세틴 이수화물(Quercetin dihydrate)

분자식 : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O, 분자량 : 338.27, CAS No. : 6151-25-3



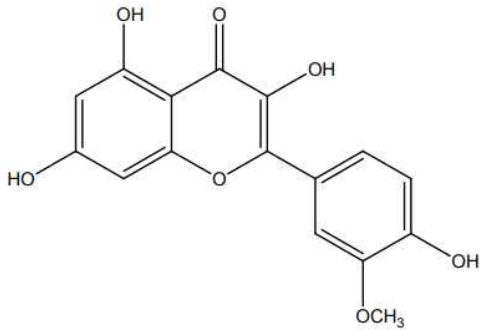
#### 2.1.2 캄페롤(Kaempferol)

분자식 : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 분자량 : 286.24, CAS No. : 520-18-3



#### 2.1.3 이소람네틴(Isorhamnetin)

분자식 : C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>, 분자량 : 316.26, CAS No. : 480-19-3



## 2.2 일반시약

2.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

2.2.2 인산(Phosphoric acid)

2.2.3 증류수(Distilled water)

2.2.4 염산(Hydrochloric acid)

2.2.5 에탄올(Ethanol)

## 3. 시험과정

### 3.1 희석용액의 조제

3.1.1 희석용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v) 200 mL 메스실린더에 에탄올 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 염산 16 mL를 넣는다.

### 3.2 표준용액의 조제

3.2.1 퀘르세틴 이수화물 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다(퀘르세틴 이수화물(mg) × 302/338 = Quercetin(mg)).

3.2.2 캄페롤 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올 가하여 정용한다.

3.2.3 이소람네틴 25 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다. 4.2.4 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

### 3.3 플라보놀 배당체(캄페롤, 퀘르세틴, 이소람네틴) 시험용액 제조

3.3.1 시료 약 300 mg을 칭량하여 가수분해용 삼각플라스크에 취한 후 10 mL 희석용액을 가한다.

3.3.2 90°C 수용상에서 1시간 동안 가수분해한다.

3.3.3 위의 용액을 50 mL 부피플라스크에 넣은 후 메탄올로 표선까지 맞춘다.

3.3.4 위의 시험용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

## 4. 분석 및 계산

### 4.1 기기분석

Table 2. 고속액체크로마토그래피 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μL
검출기 파장	370 nm
컬럼온도	35°C
이동상	0.1% 인산을 함유한 아세토니트릴 : 0.1% 인산 용액 = 40 : 60
유속	1.0 mL/분

### 4.2 계산

4.2.1 Quercetin 함량을 계산한다.

각각의 플라보놀 배당체 (flavonol glycosides) 함량 (mg/g) = ( A × B × C × D ) / E

- A : 시험용액중의 각각의 플라보놀배당체의 농도(mg/mL)
- B : 시험용액 전량(mL)
- C : 희석배수
- D : 전환 계수(kaempferol= 2.588, quercetin = 2.504, isorhamnetin = 2.437)
- E : 시료무게(g)

## 제 7 절 임상시료의 가속시험

▶ 임상시료 제품을 무작위로 6개의 stick 선택하여 3개의 stick은 가속시험 전 지표물질의 함량측정을 하고, 3개의 stick은 7일간 40 ℃, 75% 습도를 유지한 뒤 지표물질의 함량 변화유무를 HPLC로 측정하였다. 모두 3번 반복 시험하여 함량을 분석하였다.



Fig. 9. 임상시료의 가속시험

## 제 8절 기능성 적색양파 육성 및 선발

### 가. 적색양파 기능성 성분함량 분석 및 품종선발

적색양파 중 기능성이 뛰어난 품종을 선발하기 위하여 시판품종과 양파연구소 육성 계통 54종(R1 ~ R54)를 사용하여 적색양파의 엽 생육, 구 특성 및 수량성을 조사하고, 기능성 성분을 분석하였다. 17/9/7 에 파종하고 17/11/2 정식하였으며 18/5/11부터 18/6/7 동안 도복 진행에 따라 개별 수확하였다. 기능성 성분인 퀘세틴, 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 등을 측정하기 위하여 각 품종을 건조한 후 분쇄하여 분말을 얻은 후, 건조 분말을 10배의 에탄올로 추출하여 감압 농축한 것을 분석 샘플로 사용하였다.

### 나. 선발된 품종의 안정적 생산 기술 구축

1차년도에 선발된 5종의 적색양파 품종에 대하여 수확시기 3시기(도복100%, 황화50%, 황화100%)와 저장시기 3시기(수확직후, 저장1개월, 저장3개월)에 대한 수량 및 기능성성분 함량을 분석하고, 채종 및 지역 적응성을 검정하였다.

## 제 9 절 제품의 제조공정 개선 및 신제품 개발

### 가. 기존 제품의 제조공정 개선

주관기관에서 판매 중이던 적양파, 늙은 호박 등을 주원료로 한 과립형태의 건강식품(양파를 발효하다 검은깨, 누에, 석류 등) 제품의 제조공정을 개선하였다. 구체적으로 원재료 분말을 초산발효 후 혼합, 제형화 하던 공정에서, 에탄올 추출을 이용하여 유효성분을 추출하는 공정을 부가하여 기능성을 높일 수 있도록 하였다.

### 나. 신제품 개발

#### a. 기능별 과립 제품 개발

판매중인 적양파, 늙은 호박 등을 주원료로 한 과립제품에 기능별로 부원료를 부가하여 과립제품을 개발하였다. 이 제품들을 제조하는 공정에도 에탄올을 추출 하는 공정을 수행하여 기능성을 높일 수 있도록 하였다.

#### b. 샴푸, 헤어젤, 헤어에센스 용 추출액 개발

적양파 추출물, 참당귀 추출물, 늙은 호박 추출물이 동물실험에서 발모효과가 있는 것을 확인하였고, 식품소재의 활용도를 다양화 하기 위하여 위 혼합물들을 샴푸 등 화장품 원료로 개발하여 생산한 추출물을 화장품 회사에 납품 하여 OEM 방식으로 샴푸, 헤어젤, 헤어 에센스 등을 개발함.

## 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

### 1) 연구수행 결과

#### (1) 정성적 연구개발성과

##### 제 1 절 추출물의 성분 연구

---

#### 가. 적양파 발효전환물의 지표물질 함량 비교 결과

예로부터 우리 식생활에 뿌리깊이 자리잡고 있는 적양파는 그 다양한 효능효과가 알려져 있다. 양파에 주로 함유되어 있는 flavonoid로는 quercetin 4'-glucoside, quercetin 3,7-diglycoside, quercetin 4',7-diglycoside, 3,4'-diglycoside, quercetin, quercetin aglycone, isorhamnetin monoglycoside, kaempferol monoglycoside등이 있으며 이 중 약 80%가 quercetin diglycoside, monoglycoside, quercetin aglycone으로 존재한다. 양파의 겉껍질 부분에는 껍질중량 대비 약 6.5%의 quercetin이 함유되어 있으며 양파 속부분은 중량대비 0.01%의 quercetin이 있어서 상대적으로 겉껍질 쪽의 quercetin 함량이 높은 것으로 보고되어 있다. 또한 껍질의 색이 백색인 것 보다는 진한 색을 가진 것일수록 quercetin 함량이 높다고 보고되어 있다. 본 연구에서는 적양파의 quercetin 함량을 증가시키기 위해서 1차적으로 Red-Q를 제조한 다음 미생물을 사용하여 Red-BCQ를 얻었다. Quercetin의 피크는 3.89분 이었으며, 500 µg/mL의 시료를 이용하여 측정된 결과 Red-Q에서 quercetin은 39.7 µg/mL으로 나타났다(Fig. 10 A). Red-Q를 BP2, Moja3, BS3의 세 가지 균주를 이용하여 각각 생물전환한 후 분석을 하였다. BP2를 이용하여 생물전환한 것은 quercetin 함량이 55.78 µg/mL, Moja3는 64.75 µg/mL, BS3는 90.86 µg/mL으로 생물전환하기 전보다 quercetin 함량이 각각 40.5%, 63.1%, 128.9% 증가하였다. 이는 생물전환하기 전보다 rutin, quercitrin, quercimeritrin등의 O-link된 당이 균주가 분비하는 효소에 의해 유리되어 상대적으로

인 quercetin 순도는 더욱 높아진 결과이며, Red-BCQ 1 g 당 180 mg quercetin을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

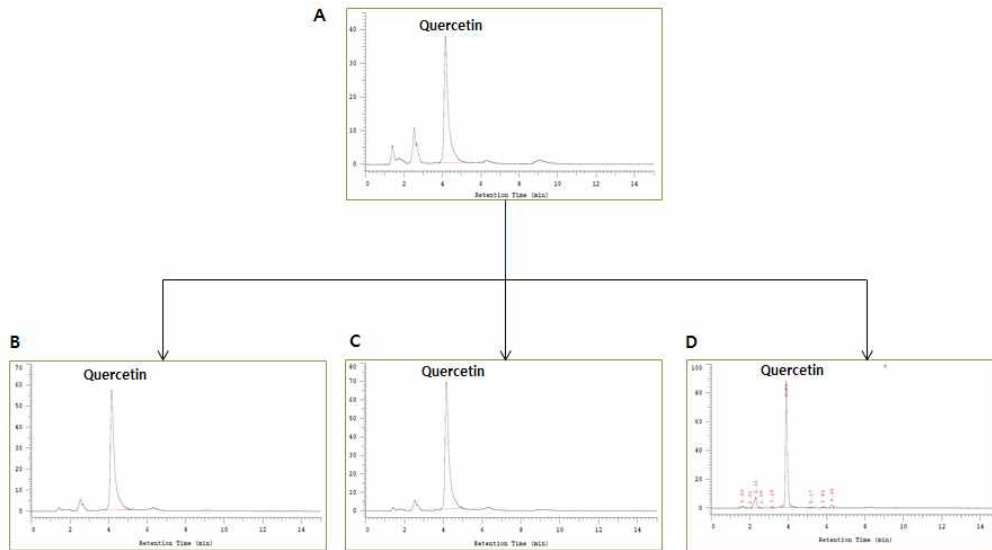


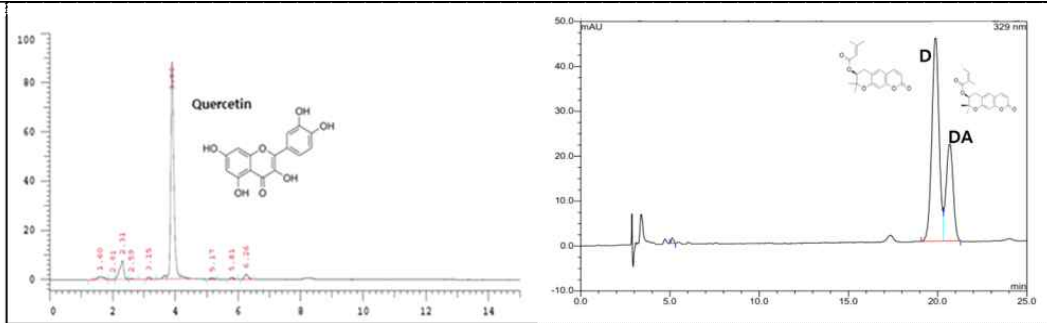
Fig. 10. HPLC diagram of quercetin. (A) Red-Q, sample loading 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B) Red-BCQ, quercetin bioconverted by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2, sample loading 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (C) Red-BCQ, quercetin bioconverted by *Bacillus mojavensis*-KJS3, sample loading 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (D) Red-BCQ, quercetin bioconverted by *Bacillus subtilis* KJ-3, sample loading 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$

#### 나. 참당귀 추출물의 지표물질 함량 비교 결과

본 연구에 사용된 참당귀는 김 등의 논문의 방법을 이용하여 추출하여 decursin 및 decursinol angelate를 얻었다. 한국산 참당귀는 다양한 약리학적 효과가 입증된 한약재로 일본의 당귀와는 달리 자줏빛 꽃을 가지고 있는 것이 특징이다. 특히 참당귀는 피의 생성과 순환에 관계되는 보혈, 활혈, 거어, 항암작용 등에 효과가 좋으며 대표물질인 decursin과 decursinol angelate는 항노화 치매 예방효과가 기대되고 있어 최근에 다시한번 더 주목받고 있는 원료이다. ‘대한민국 약전’에 따르면, 한약재로 사용하는 당귀에는 지표 성분인 decursin과 decursinol angelate가 함유돼 있어야 한다. 참당귀에는 이 지표 성분이 있어 한약재로 사용할 수 있지만, 일당귀에는 이 성분이 없거나 현저히 적다. 참당귀 추출물의 유효성분인 decursin과 decursinol angelate를 HPLC를 이용하여 표준품의 표준검량선을 작성하였다. 그 결과 1 g 속에 decursin은 0.4146 g, decursinol angelate는 0.3659 g으로 약 78%의 순도로 확인되었다. 분석결과를 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Quercetin content of Red-Q, Red-BCQ and decursin/ decursinol angelate (D and DA) content in Agnex

Extract	mg of quercetin <sup>a</sup> ±SD
Red-Q	2.91±0.02 / g-extract
Red-BCQ	21.62±0.03 / g-extract
Extract	mg of (D + DA) <sup>a</sup> ±SD
Agnex	780.5±0.02 / g-extract



n=3, triplicate injection, Red-Q: Crude ethanol extract obtained from red *Allium cepa*. Red-BCQ: Extract obtained by bioconversion of Red-Q using BS3 strains. Agnex: Extract obtained from *Angelica gigas* Nakai.

#### 다. 호박 추출물의 지표물질 함량 비교 결과

##### ▶ 결과 1

늙은 호박은  $\beta$ -carotene 성분을 추출하여 실험에 사용하였다. 에탄올 추출하여 농축한 뒤 당을 제거하기 위하여 증류수로 washing한 것을 시료로 사용하였고, 이렇게 얻은 시료를 동결건조하여  $\beta$ -carotene 함량을 HPLC로 측정하였다. 시험방법은 식약처의 건강기능식품공정 시험법에 따라 측정하였다. 그 결과 농축물 중의  $\beta$ -carotene 함량은 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다(Fig. 11). 농축물 1 g 중의 함량은 0.2 mg으로 나타나 매우 적은 양임을 알 수 있었다.

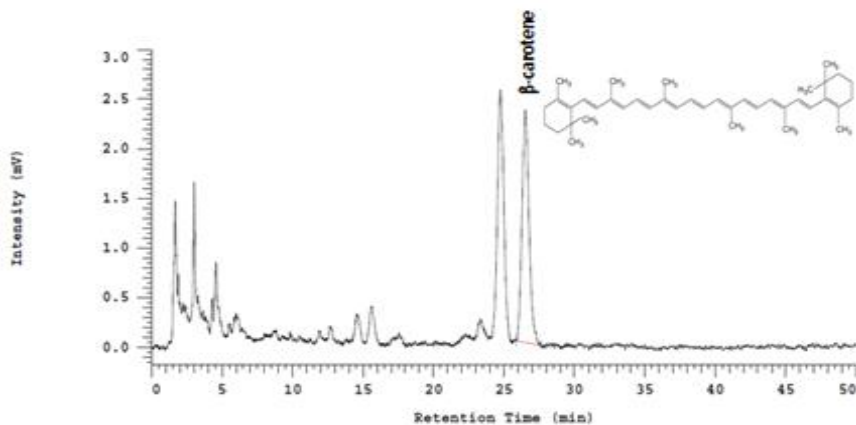


Fig. 11. HPLC diagram of  $\beta$ -carotene, sample loading 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

##### ▶ 결과 2

가속시험 전 후 호박분말과 호박초산발효물의  $\beta$ -carotene 함량을 비교한 결과 호박초산발효물에서는  $\beta$ -carotene이 전혀 검출되지 않았다. 호박분말은 조금 검출되긴 하였으나 호박추출물 보다 적은 양이었다. open 가속시험 시 close 가속시험보다 더 불안정하여 호박에  $\beta$ -carotene을 지표물질로 하는 제품을 생산 하는 데는 한계가 있다고 판단하였고 용량설정을 위한 in vitro 연구 결과  $\beta$ -carotene의 비율이 여러 가지 생리활성에 크게 영향을 미치지 않은 것을 확인하였다. 따라서 최종 시제품 개발 및 임상연구에서는 호박을 제외하기로 하였다.

Table 4. Contents of  $\beta$ -carotene, sample loading 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

	$\beta$ -carotene ppm		$\beta$ -carotene ppm
Sample A	1.4	Sample B	0
	1.41		0
Sample A-1	0.89	Sample B-1	0
	0.89		0
Sample A-2	1.25	Sample B-2	0
	1.3		0

## 라. 결론

상기 세 가지 원료의 지표성분의 함량을 측정하였고, 각각 추출물들의 효과 및 유효농도를 측정 한 뒤 임의의 비율로 혼합한 재료의 효능을 비교하였다. 각각의 시료들은 적양파 생물전환물(RA), 호박 추출물(CM), 참당귀 추출물(AG)과 이들을 각각 5:2:3 (M1), 3:5:2 (M2), 3:2:5 (M3)로 혼합 하여 실험에 사용하였다.

## 제 2 절 재료의 혼합비율 설정을 위한 생리활성 연구

### 가. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성측정 결과

시료의 항산화 활성을 평가하는 대표적인 방법 중 하나가 DPPH radical 소거반응이다. 시료 분자 내 radical과 보라색의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 시약이 반응하여 수소나 전자를 받아 색깔이 변하는 원리를 이용한 방법으로 비교적 간단하여 널리 이용되고 있는 방법이다. 적양파는 안토시아닌 등의 생리활성 성분이 다량 함유 되어 있어 일반 흰 양파보다 기능성이나 당도가 높으며, 항산화작용을 가진 flavonoid계 성분 또한 다량 함유하고 있다. 특히 구조 중 hydroxyl group을 포함하고 있는 polyphenol과 같은 물질들은 DPPH radical과 반응하기에 적합한 입체구조를 가지고 있어 높은 DPPH radical 소거활성을 보인다. 본 연구에서 각각의 추출물 RA, CM, AG 및 이들의 혼합물인 M1, M2, M3의 DPPH radical 소거활성을 positive control인 ascorbic acid와 비교하였고, 시료농도는 1,000, 500, 250, 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 하여 실험하였다. 그 결과를 Fig. 12에 나타내었다. 동일한 농도인 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 비교했을 때 positive control은 93.51% 소거활성을 가졌으며, 혼합물 M3은 109.49%로 ascorbic acid보다 항산화 효능이 뛰어난 것으로 나타났다. 반면, 호박, 양파, 당귀는 같은 농도에서 비교하였을 때 53.92%, 54.22%, 59.67%의 소거활성을 가지는 것으로 나타났다. 각각의 추출물과 혼합물 M1, M2는 비슷하게 나타났으나, 참당귀 추출물이 가장 많이 배합된 M3의 경우 DPPH 소거 활성이 가장 높게 나타난 것을 알 수 있었다. Lee 등의 연구에 따르면 생양파와 열처리한 양파 모두 EtOAc 분획물에서 높은 ABTS, DPPH, hydroxyl, superoxide 라디칼 및 hydrogen peroxide 소거능을 갖는 것으로 보고한 바 있다. Rha 등의 연구에 따르면 발효 윗 추출물의 DPPH radical 소거활성은 1 mg/mL의 농도에서  $43.34 \pm 1.41\%$ 의 활성을 나타내었다. 본 실험에서 나타난 결과로 볼 때 항산화 효과를 나타내는 대표적인 물질인 페놀성 화합물이 양파껍질에 다량 함유되어 있고, 참당귀의 에탄올 추출물에도 페놀성 화합물 함량이 높아 단일 물질보다는 혼합물에서 radical 소거활성 또한 높은 것으로 나타났다. 이러한 연구결과는 실험에 사용된 시료 중 참당귀 추출물이 가장 많은 비율로 혼합된 M3가 DPPH 활성 라디칼을 가장 많이 저해시켜 산화적 스트레스의 방어기작으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.



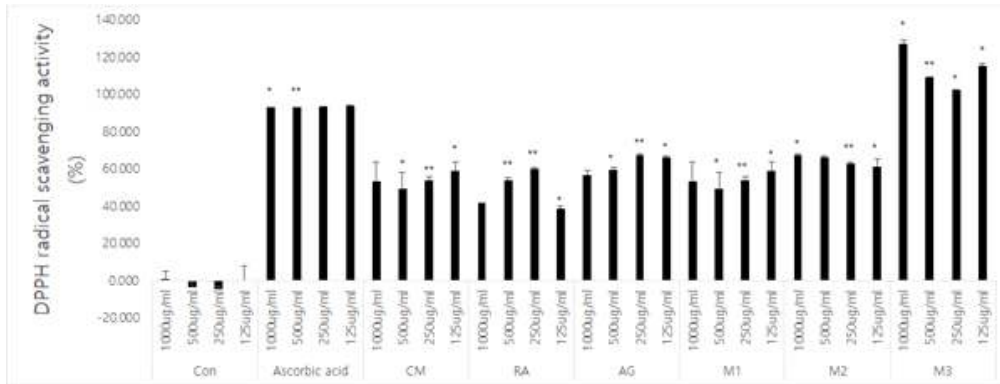


Fig. 12. DPPH radical scavenging effect of Mixtures. CON: vehicle (10% ethanol + 1.5% Lysine + 1% tween 80), Positive Con: ascorbic acid, CM: cucurbita moschata Duch, RA: red allium cepa, AG: angelica gigas Nakai, M1 (RA:CM:AG = 5:2:3), M2 (RA:CM:AG = 3:5:2), M3 (RA:CM:AG = 3:2:5). All the values were expressed as means  $\pm$  SD. Significant difference from control value with \*( $P < 0.01$ ) and \*\*( $P < 0.05$ ) (Student's t-test).

#### 나. Total flavonoid 함량측정 결과

페놀 화합물들은 일반적으로 우수한 효능들이 많이 보고되었는데 특히 다양한 생리활성, 항산화, 항비만, 항염 등의 효과를 갖는다고 알려져 있다. 각 추출물과 혼합물의 flavonoid 함량을 측정한 결과는 Fig. 13과 같다. 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 비교하였을 때 RA는 36.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , CM은 29.58  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , AG는 27.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, M1, M2, M3는 각각 34.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 26.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 21.66  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 양과 함량이 가장 높은 비율로 혼합된 M1에서 높은 값을 나타내었다. 이는 CM이나 AG보다는 RA에 flavonoid류인 quercetin이 다량 함유되어 있기 때문인 것으로 사료되며, 이는 미생물 생물전환에 의해 quercitrin, quercimeritrin 등이 quercetin으로 전환된 결과라 할 수 있다. 여기에 AG와 CM이 추가로 혼합됨으로 인한 synergy효과는 없는 것으로 나타났다. RA가 가장 많이 함유된 혼합물인 M1에서 총 플라보노이드 함량이 가장 높은 것으로 보아 총 플라보노이드 함량은 주로 RA의 양에 기인하는 것으로 판단된다. RA의 총 플라보노이드 함량 증가는 BS3에 의한 대사과정을 통한 생물전환에 기인한 것이라 사료된다.

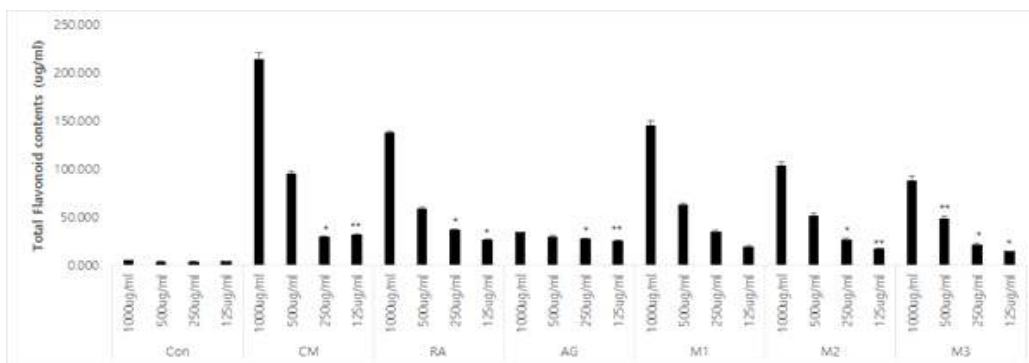


Fig. 13. Total flavonoid contents. CON: vehicle (10% ethanol + 1.5% Lysine + 1% tween 80), CM: cucurbita moschata duch, RA: red allium cepa, AG: angelica gigas Nakai, M1 (RA:CM:AG = 5:2:3), M2 (RA:CM:AG = 3:5:2), M3 (RA:CM:AG = 3:2:5). All the values were expressed as means  $\pm$  SD. Significant difference from control value with \*( $P < 0.01$ ) and \*\*( $P < 0.05$ ) (Student's t-test).

#### 다. Total polyphenol 함량측정 결과

식물계에 널리 분포되어 되어 있는 물질로 다양한 구조와 분자량을 가지는 페놀성 화합물은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있으며, 이 작용기가 물질의 단백질과 같은 분자와의 결합을 통해 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 각 추출물과 혼합물의 polyphenol 함량을 측정한 결과는 Fig. 14에 나타내었다. 500 µg/mL의 농도에서 총 폴리페놀 함량을 비교하였을 때 RA는 82.05 µg/mL, CM은 79.97 µg/mL, AG는 71.19 µg/mL 이었으며, M1, M2, M3은 각각 113.23 µg/mL, 111.49 µg/mL, 108.75 µg/mL인 것으로 나타났다. 전체적으로 추출물 각각 보다는 혼합물에서 비슷한 비율로 다소 높게 나타났다. 양파의 quercetin 성분, 참당귀의 decursin과 decursinol angelate 또한 phenolic hydroxyl기를 함유한 방향족 화합물들이 많이 포함되어 있을 것이며, 이 결과로 유추해 볼 때 이들은 radical 소거 등과 같은 강력한 환원력을 가지고 있을 것이라 예상된다.

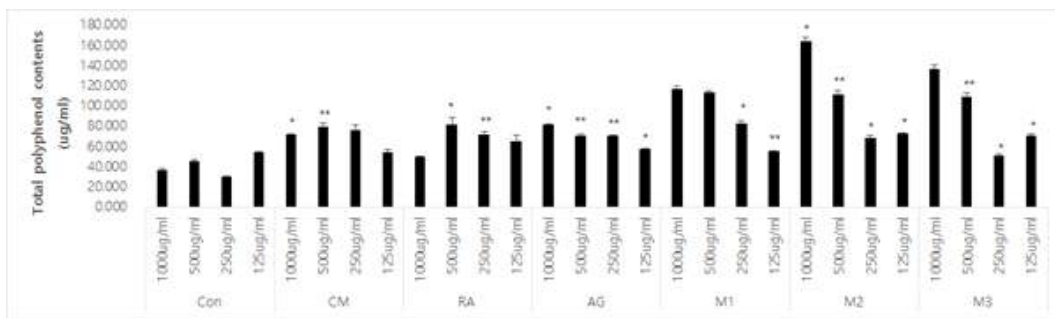


Fig. 14. Total polyphenol contents. CON: vehicle (10% ethanol + 1.5% Lysine + 1% tween 80), CM: cucurbita moschata duch, RA: red allium cepa, AG: angelica gigas Nakai, M1 (RA:CM:AG = 5:2:3), M2 (RA:CM:AG = 3:5:2), M3 (RA:CM:AG = 3:2:5). All the values were expressed as means ± SD. Significant difference from control value with \*(P<0.01) and \*\*(P<0.05) (Student's t-test).

#### 라. Nitric oxide (NO) 생성량 측정 결과

LPS는 그람음성세균의 endotoxin으로 알려져 있다. LPS는 여러 염증성 인자인 NO, 염증성 cytokine과 같은 물질들을 생성하여 염증 반응을 조절하는 병리학적 반응을 일으킨다. 염증반응에서 iNOS (inducible nitric oxide synthase)에 의해서 생성된 NO는 정상 상태에서는 혈관조절, 방어 작용, 신경전달 등의 기능을 하지만, 고농도의 NO 생성은 염증 자극제 역할을 하는 peroxynitrite, nitrogen dioxide와 같은 유해물질을 생성하여 대식세포를 활성화 한다. 따라서 본 연구에서는 당귀 3종 혼합추출물들의 항염증 효과를 알아보기로 하자, RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발하고 이와 함께 다양한 농도의 물질들을 첨가하여 NO 생성 억제 효과를 관찰하였다. 그 결과를 Fig. 15에 나타내었다. 모든 물질들이 대조물질인 ascorbic acid와 비슷한 수준으로 NO 생성을 억제하였으나, 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다.

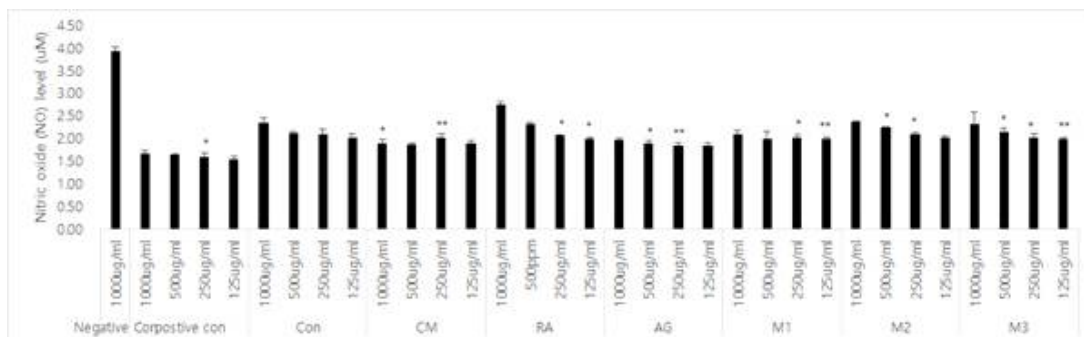


Fig. 15. The inhibitory effect on LPS-induced NO production in RAW 264.7 Cell. Negative CON: LPS + vehicle (10% ethanol + 1.5% Lysine + 1% tween 80), Positive Con: LPS + Ascorbic Acid, CM: LPS + cucurbita moschata duch, RA: LPS + red allium cepa, AG: angelica gigas Nakai, M1: LPS + (RA:CM:AG = 5:2:3), M2: LPS + (RA:CM:AG = 3:5:2), M3: LPS + (RA:CM:AG = 3:2:5). All the values were expressed as means  $\pm$  SD. Significant difference from control value with \*(P<0.01) and \*\*(P<0.05) (Student's t-test).

#### 마. 세포 생존을 측정 결과

각 시료물질 모두 세포증식능이 증가하여 세포독성을 가지지 않는 것이 확인되었다(Fig. 16). 특히 대조군인 ascorbic acid 보다 비슷하거나 높은 세포생존율을 가졌으며, 비처리군에 대해서는 각각 1000  $\mu$ g/mL에서 비교하였을 때, RA는 141.97%, CM은 133.07%, AG는 141.27%, M1, M2, M3는 각각 135.36%, 137.41%, 139.53%의 높은 세포생존율을 나타내었다. 따라서 모든 시료처리군은 비처리군에 비해 약 1.3~1.4배의 세포생존율이 증가되었음을 알 수 있었다. Scutellariae radix 추출물과 Ligustri lucidi fructus 추출물 또한 RAW 264.7 세포에서 세포생존율이 증가하였으며, 이에 독성을 가지지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서는 고농도인 1000  $\mu$ g/mL에서도 낮은 농도와 비슷한 세포생존율을 나타내는 것으로 보아 이 농도에서도 세포독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

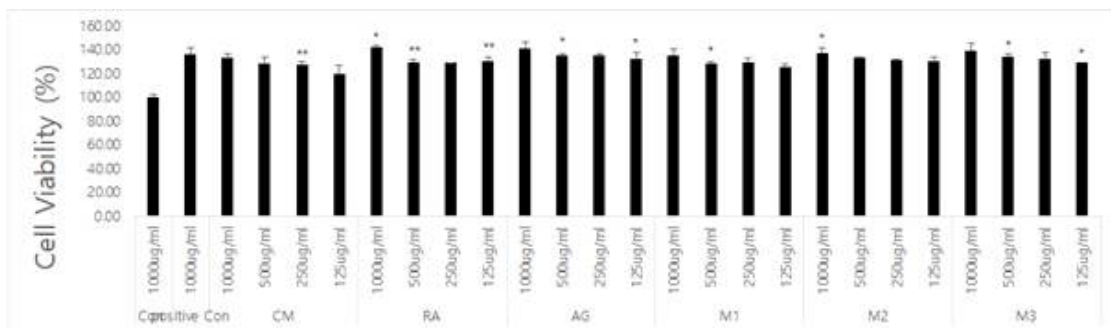


Fig. 16. The effect of mixtures on cell viability of RAW 264.7 cells. CON: vehicle (10% ethanol + 1.5% Lysine + 1% tween 80), Positive Con: ascorbic acid, CM: cucurbita moschata duch, RA: red allium cepa, AG: angelica gigas Nakai, M1 (RA:CM:AG = 5:2:3), M2 (RA:CM:AG = 3:5:2), M3 (RA:CM:AG = 3:2:5). All the values were expressed as means  $\pm$  SD. Significant difference from control value with \*(P<0.01) and \*\*(P<0.05) (Student's t-test).

#### 바. 결론

높은 호박의 지표물질인 beta-carotene은 불안정할 뿐만 아니라 추출 yield가 낮아서 상품 화하기에는 어려움이 있겠다는 판단 하에 CRO 기관과 여러 차례 회의 끝에 적양파 생물전환물과 참당귀 추출물을 복합물로 하여 고지혈증 효능과 발모효능을 관찰하는 것이 바람직하겠다고 의견을 모았다. 상기 실험결과에 의하여 추출물 혼합비율 대비 Red-BCQ의 지표물질인 quercetin과 Agnex의 지표물질인 Decursin 및 Decursinol angelate의 함량을 환산해 보았다. Red-BCQ는 quercetin 함량기준 4 mg/kg body weight/day, Agnex는 decusin과 decusinol angelate 함량기준 60 mg/kg body weight/day로 동물실험에 적용하여 연구를 진행하였다.

### 제 3 절 고지혈증 효능실험

#### 가. in vitro 혈소판 응집 억제작용 결과

RA만으로는 혈소판 응집을 촉진하였다(Table 5). 그러나, AG 단독처리 또는 RA와 AG의 복합처리 후에 혈소판 응집이 저해되었다. 근본적인 메커니즘을 명확히 하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다. 아스피린에 의해 혈소판 응집이 강하게 억제된다는 결과를 바탕으로 아스피린 처리에 대응하는 PAR(혈소판 응집율)의 변화를 파악했다. 아스피린 250 µg/ml에서 PARs는 비처리 후 관찰된 것과 비교하여 44.32%가 되었다(Table 5, Fig. 17). RA (250 µg/ml) 단독 처리 시 오히려 혈소판 응집이 활성화 되는 것이 확인되었다. AG와 RAG의 PAR은 비처리 시료 대비 각각 62.63%, 68.36%로 나타났다. RA 처리(250 µg/ml)는 혈소판 응집을 저하시키기 못했다. 따라서 AG를 결합 처리했을 때, 혈소판 응집 억제 효과는 AG의 작용에 의해 촉진된다.

Table 5. Effect of the RA, AG, and their mixture on platelet aggregation

Samples / Chemicals	Concentration (µg/ml)	Amplitude (ohm)	Slope	Lag time (sec)	Area under	PAR (%)
DMSO	-	14	3	36	106.5	100.00
Aspirin	250	8	1	128	47.2	44.32
RA	250	18	2	30	125.1	117.46
AG	250	11	1	56	66.7	62.63
RAG	250	11	2	48	72.8	68.36

PAR: Platelet Aggregation Ratio. Data are presented as representative results relative to three independent determinations. Amplitude is expressed as ohms by maximum extent of platelet aggregation, and slope (rate of reaction) is determined by drawing a tangent through the steepest part of curve. Area under the curve (AUC) was calculated from the platelet aggregation curve. Aspirin: Positive Control, RA: Red-BCQ powder, AG: Agnex powder, RAG: Mixture of RA and AG (RA : AG = 2:1)

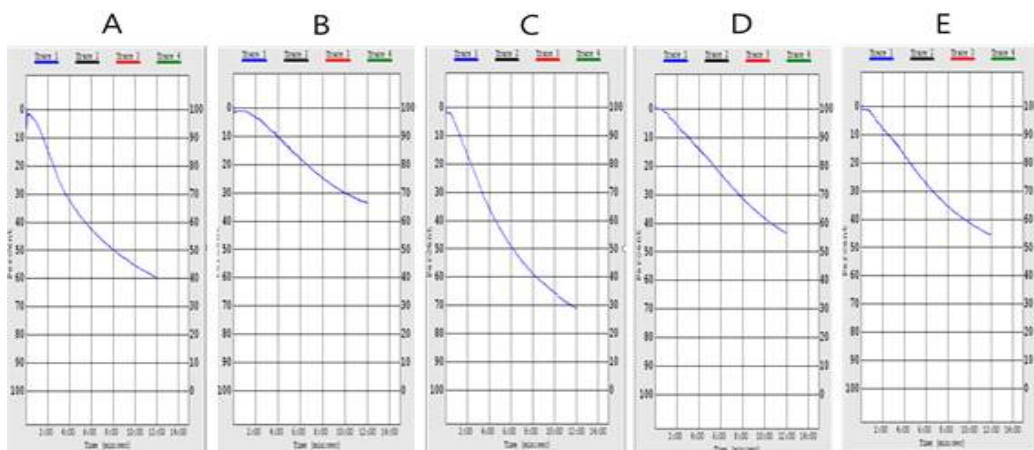


Fig. 17. Impedance changes during platelet aggregation after the addition of aspirin and the RA and AG into a whole blood aggregometer. (A) DMSO, (B) aspirin (250 µg/ml), (C) RA (Red-BCQ powder, 250 µg/ml), (D) AG (Agnex powder, 250 µg/ml), (E) RAG (RA : AG = 2:1, 250 µg/ml), respectively.

#### 나. 혈액응고 억제평가

Wang 등은 산화 스트레스가 RBC 용혈과 섬유소의 수정을 증가시킬 것을 제안하였다. 과도한 혈액 응고가 동종 요인의 규제에 해로울 수 있다는 지식을 바탕으로 PT와 aPTT가 측정된 응고 인

자에 대한 RA, AG 및 RAG의 유의미한 영향을 조사하였다. 응고 매개변수(aPTT, TT, PT)에 대한 RA, AG, RAG의 영향은 Table 6과 같다. 본 연구에서, RA와 AG는 PT를 크게 확장함으로써 외부 응고 경로에 유의한 효과를 보였으며, 이러한 화합물은 피브린 형성을 방해할 수 있다. 다만 RA와 AG의 조합은 시너지 효과가 약한 것으로 평가된다. 시료의 응고 방지 활동은 TT, PT 및 aPTT를 평가하여 측정하였다. 양성 대조군으로 아스피린(1.5 mg/mL)을 사용한 치료는 비처리 검체의 응고 시간(용제 조절로서의 DMSO) 대비 응고 시간을 TT의 경우 1.83배, PT의 경우 1.29배, aPTT의 경우 1.48배까지 확장했다(Table 6). 고농축 아스피린(5 mg/mL)을 사용한 치료는 비처리 시 관찰된 응고 시간에 비해 TT, PT, aPTT의 응고 시간을 15배 이상으로 연장했다. RA (5.0 mg/mL)로 처리하면 PT (1.29배)와 aPTT (1.39배)가 크게 확장되는 것으로 나타났다. AG (5.0 mg/mL) 치료는 PT의 경우 응고 시간을 1.23배, aPTT의 경우 1.23배 연장했다. 그러나 RA, AG와의 결합 치료는 시너지 효과가 약했다(Table 6).

Table 6 . Effect of the RA, AG, and their mixture on blood coagulation

Extract/ Chemicals	Concentration (mg/ml)	Anticoagulation Activity (Multiplication of Control)		
		TT	PT	aPTT
DMSO	-	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.00
Aspirin	1.5	1.83 ± 0.03**	1.29 ± 0.03**	1.48 ± 0.03**
Aspirin	5	>15.0	>15.0	>15.0
RA	5	1.01 ± 0.03**	1.29 ± 0.00	1.39 ± 0.13
AG	5	0.97 ± 0.08**	1.23 ± 0.19	1.23 ± 0.23
RAG	5	0.99 ± 0.08**	1.02 ± 0.00**	1.37 ± 0.02*

Anti-coagulation activity was calculated using the clotting time of a given sample divided by the clotting time of the solvent control in blood coagulation assays. TT: thrombin, PT: prothrombin, aPTT: activated partial thromboplastin times, Aspirin: Positive Control, RA: Red-BCQ powder, AG: Agnex powder, RAG: Mixture of RA and AG (RA : AG = 2:1). Data are means ± SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate statistically significant differences (\*\*p<0.005, \* p<0.05).

#### 다. 항비만 활성 세포실험결과

지방세포로 분화된 3T3-L1 세포의 지질축적량을 Oil-red O 염색을 통해 확인하였다. 8일간의 지방세포 분화유도에 의해 지방세포가 잘 유도되었음을 확인할 수 있었다. 지방세포 분화 과정 동안 RA, AG를 1, 10, 100, 500 mg/mL로 처리한 결과, 붉은 색소 침착이 줄어들어 육안 상으로 확인할 수 없었다. 또한 지질의 양을 정량적으로 평가하기 위하여 isopropyl alcohol로 지질염색에 사용된 색소를 유리시켜서 흡광도를 측정한 결과, 육안 상으로 관찰했을 때와 마찬가지로 RA, AG를 처리하여도 색소의 양이 감소하지 않았다. 따라서 AG와 RA는 지방세포 분화 억제에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

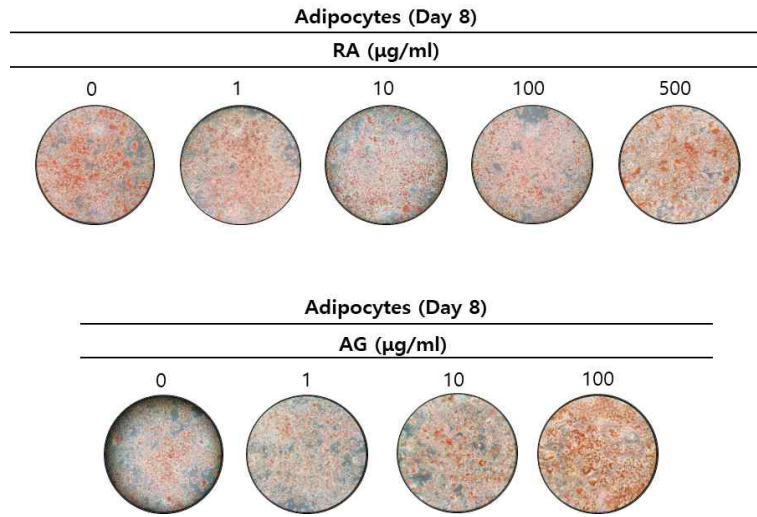


Fig. 18. AG, RA의 농도에 따른 adipocyte 분화 정도 비교

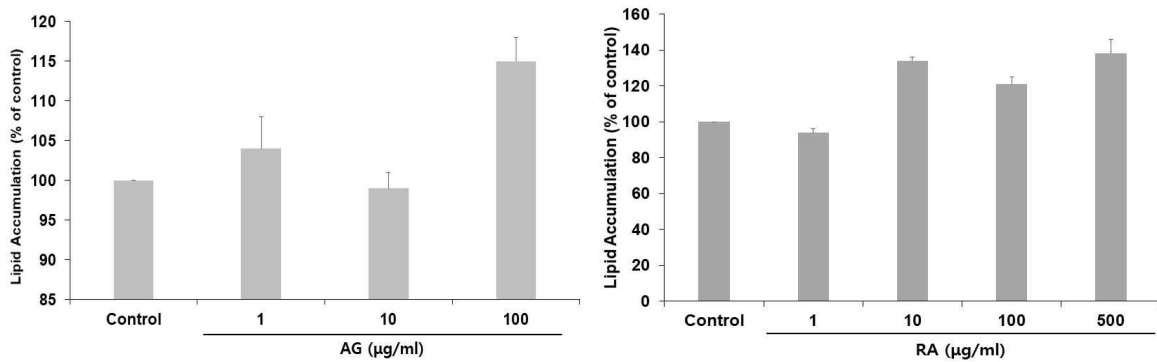


Fig. 19. AG, RA의 농도에 따른 adipocyte 분화시 지방구 축적 정도 비교

## 라. 항염 활성 세포실험 결과

### a. RAW 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향

RAW 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 AG, RA, RAG를 농도별 (1, 10, 100, 500, 1,000 µg/mL)로 처리한 후, MTS assay를 이용하여 cell viability를 측정하였다. 측정 결과는 Fig. 17과 같으며, 대조군에 비해 1-100 µg/ml까지는 독성이 나타나지 않았다(Fig. 20). 이 결과를 바탕으로 각 시료의 1, 10, 100 µg/ml의 농도에서 NO 생성 억제 및 항염증 관련 단백질 변화량 측정을 진행하였다.

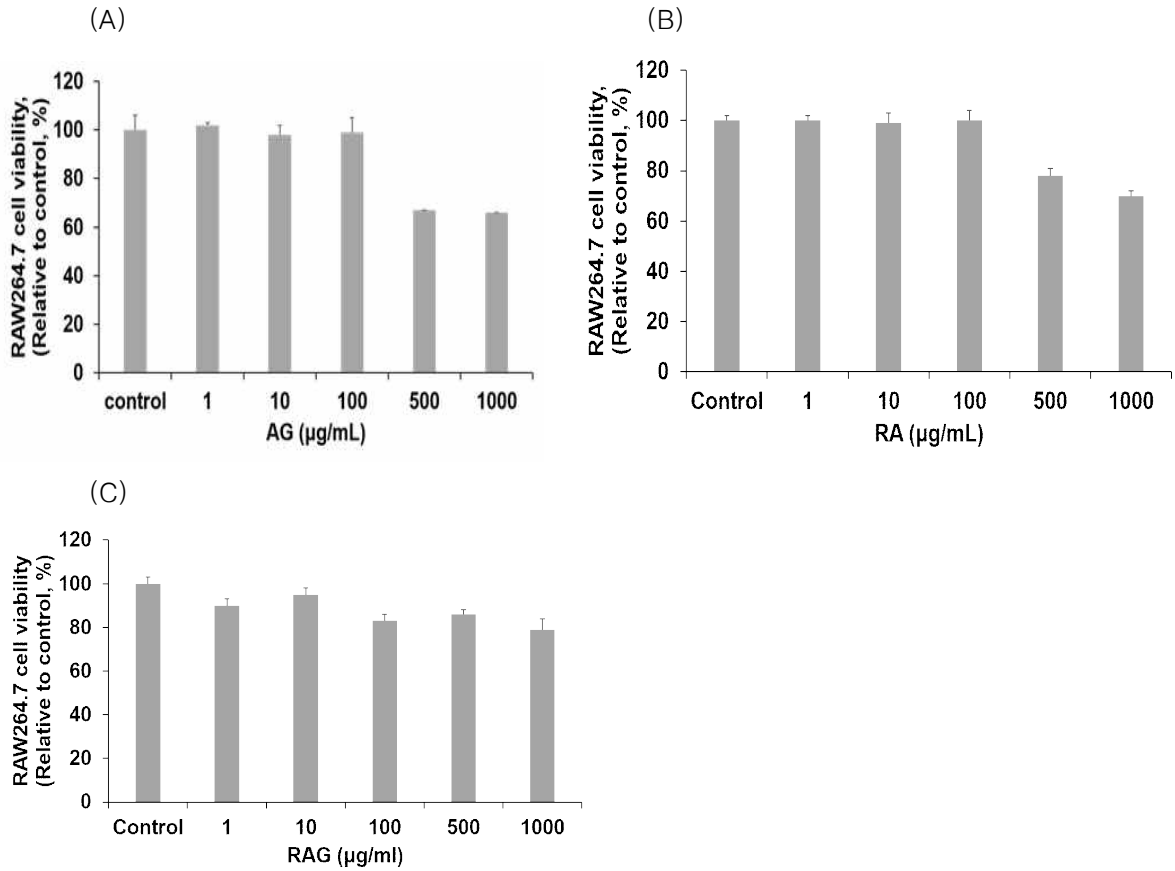
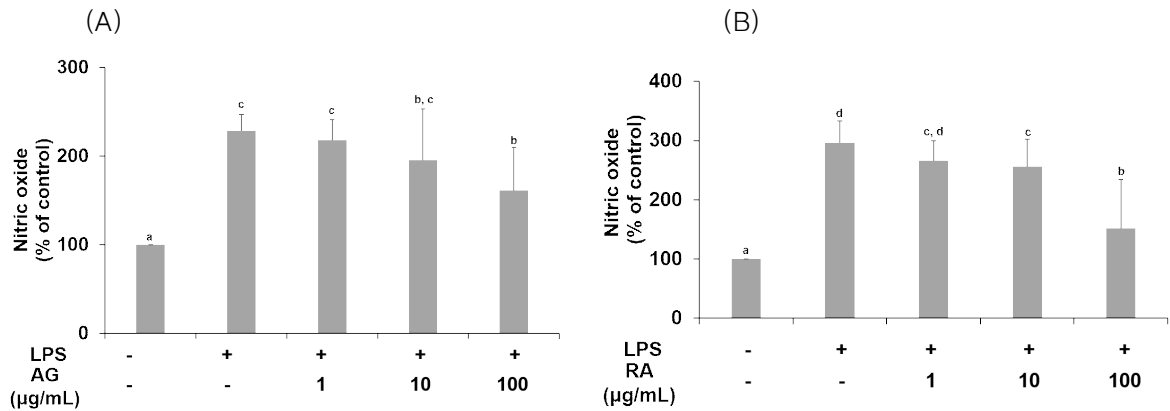


Fig. 20. AG, RA, RAG의 농도에 따른 RAW 264.7 cell 생존률 평가

### b. 항염증 활성

세포수준에서의 항염증 활성을 조사하기 위해 Raw 264.7 cell에서 염증 유발 물질인 LPS로 염증을 유도하고, AG, RA, RAG를 각각 농도별 처리하여 NO 생성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, LPS 처리군은 LPS를 처리하지 않은 군에 비해서 NO 농도가 유의하게 증가하였다. 또한 AG와 RA를 처리한 결과, 농도 의존적으로 NO 생성 억제능을 나타내었으며, 100 µg/ml에서 유의한 NO 생성 억제능을 보였다.(Fig. 21A, 21B) 그러나 RAG 처리에 의해서는 농도별로 NO 생성 억제능을 보였으나 LPS 처리군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다 (Fig. 21C).



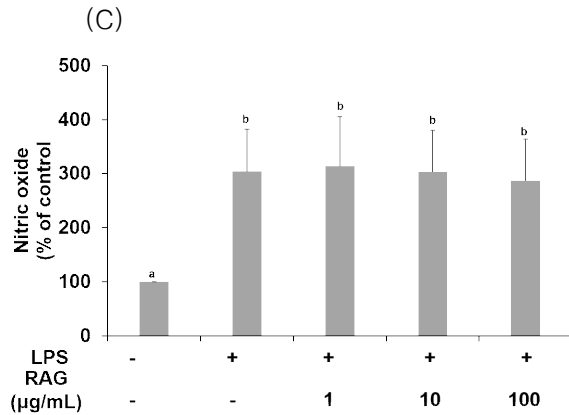


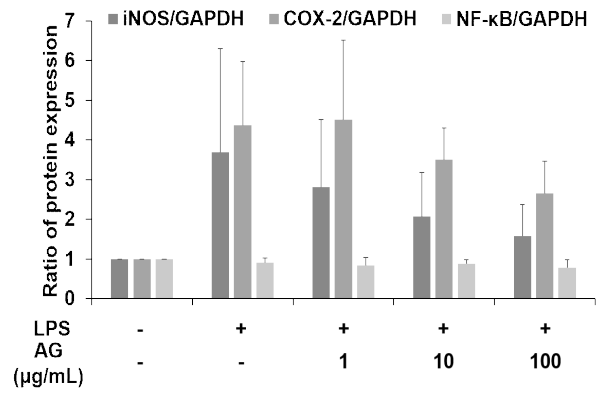
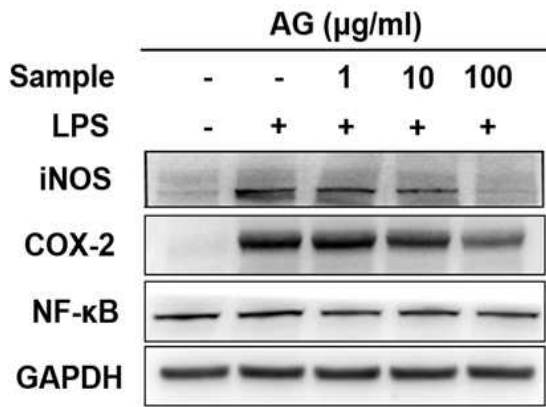
Fig. 21. AG, RA, RAG의 항염증 활성 평가

### c. 염증 관련 분자지표 단백질 발현

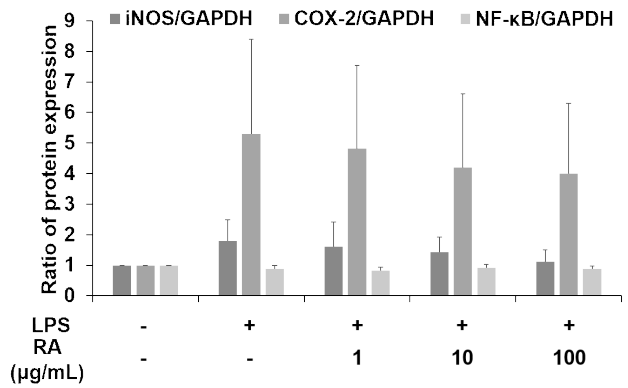
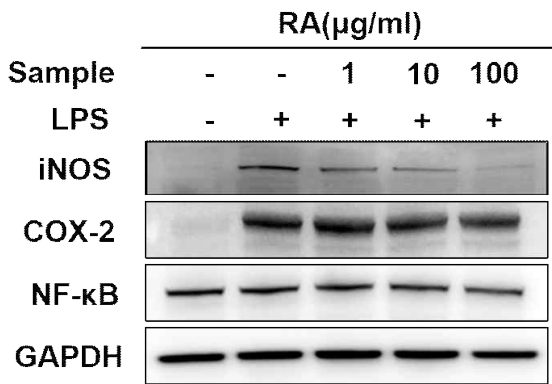
- 염증 유발 단백질인 inducible nitrous oxide (iNOS), cyclooxygenase (COX-2), NF-κB 단백질의 발현에 AG, RA, RAG의 영향을 확인하기 위해 western blot을 통해 각 단백질의 발현량을 측정하였다. (Fig. 22A)에서 AG는 iNOS와 COX-2 단백질 발현은 감소시켰지만 NF-κB 단백질 발현 억제에는 영향을 미치지 않았다. 정량적으로 분석한 결과, LPS 처리군은  $3.70 \pm 2.6$ , AG처리군 10, 100 µg/ml은  $2.08 \pm 1.1$ ,  $1.58 \pm 0.8$ 의 iNOS 단백질 발현을 나타냈으며, 농도별로 유의하게 감소시켰다. 또한 COX-2도 LPS 처리군에서  $4.38 \pm 1.6$ , AG처리군 100 µg/ml에서  $2.66 \pm 0.8$ 로 LPS 처리군과 비교하여 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 NF-κB 단백질 발현에는 영향을 미치지 않았다.
- RA와 RAG 처리에 의한 iNOS와 COX-2 단백질 발현량은 농도에 따라 소량 감소시켰지만 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 또한 NF-κB 단백질 발현 억제에도 영향을 미치지 않았다. (Fig. 22B, 22C). 따라서 AG와 RA에 의한 NO 생성 억제는 iNOS와 COX-2 단백질 발현의 감소를 통해 나타나며 특히 iNOS에 의한 효과가 큰 것으로 판단된다. 그러나 두 성분의 혼합효과는 다소 낮은 것으로 판단된다.



(A)



(B)



(C)

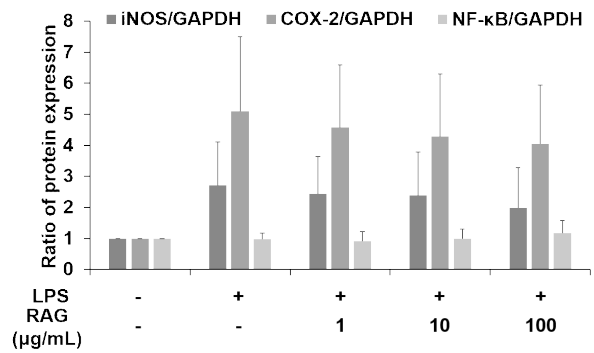
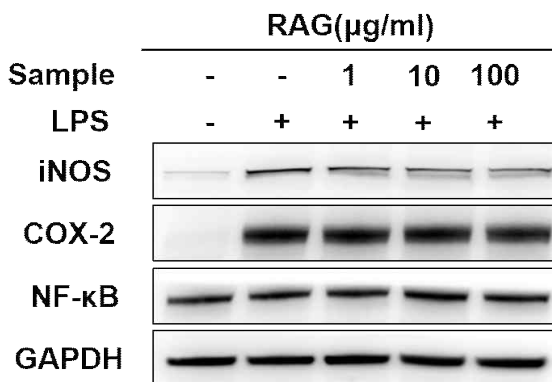


Fig. 22. AG, RA, RAG의 농도에 따른 염증관련 분자지표 단백질의 발현량 비교

**d. PGE2 생성 억제 활성**

LPS에 의해 생성되는 PGE2 생성량을 확인한 결과, LPS 단독 처리군과 비교했을 때, AG는 2%, 8% 9%, RA는 7%, 11%, 13%의 PGE2의 생성을 억제하는 것을 확인하였다.

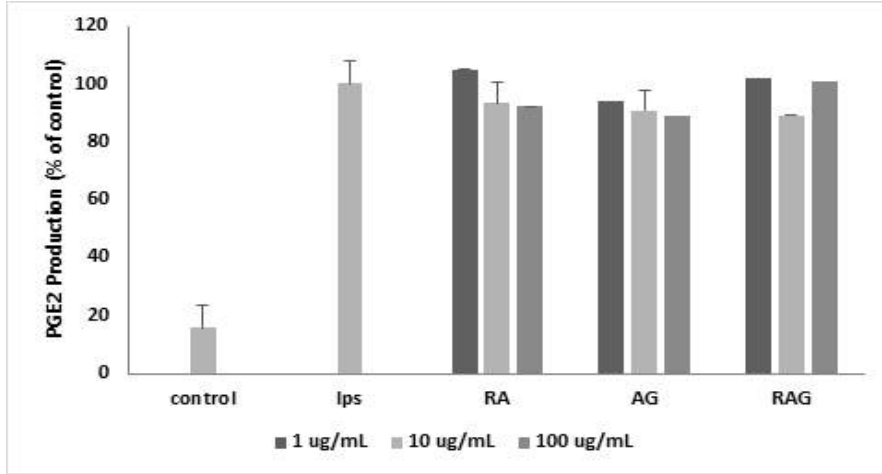


Figure 23. RA, AG, RAG의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성 평가

**마. in vitro HMG-CoA reductase inhibition activity 실험결과**

HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성 과정에 중요하게 작용하는 효소이다. HMG-CoA reductase의 저해 활성을 통해 콜레스테롤 생합성 저해능의 가능성을 확인하기 위해 AG, RA, RAG 처리에 의한 HMG-CoA reductase 활성을 확인하였다. 양성대조군 pravastatin은 83.3%의 저해활성을 보였다. RA, AG, RAG 10 ug/mL 처리에 의해 각각 94.1%, 16.6%, 90.7%의 저해활성을 나타내었다. 즉 RA의 강력한 HMG-CoA reductase 저해 활성을 확인할 수 있었으며, RA는 in vitro상에서 콜레스테롤 생합성을 억제하는 기능성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

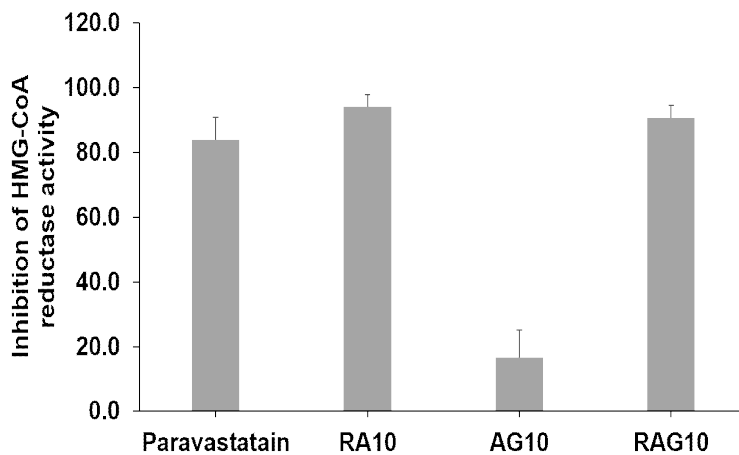


Fig. 24. RA, AG, RAG의 HMG-CoA reductase 저해 활성 평가

**바. 고지혈증 유발 동물모델을 이용한 혈중 지질 변화 실험 결과**

간과 신장은 천연물 추출물의 섭취에 따라 영향을 많이 받는 체내 장기로 간의 해독 기능, 신장의 노배출 기능과 깊은 연관성을 가진다. 따라서, 간기능의 일반적인 지표로서 잘 알려진 AST,

ALT의 혈중 수준 변화를 측정하여 Fig. 25에 나타내었다. AST, ALT는 모두 정상 범위에 속하고 군간 차이는 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다.

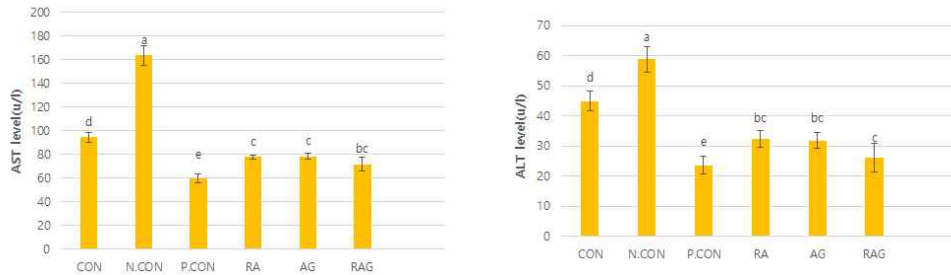


Fig. 25. Levels of AST and ALT after RA and AG administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, RA: Red-BCQ (0.83 mg/kg b.w.)+Triton WR-1339, AG: : Agnex (12.5 mg/kg b. w.) +Triton WR-1339, RAG: : Red-BCQ (0.83 mg/kg b.w.) + Agnex (12.5 mg/kg b. w.) +Triton WR-1339. All the values were expressed as means  $\pm$  SD.

Triton WR-1339에 의해 고지혈증을 유발한 NCON 군과 실험군들의 기초영양대사 물질의 변화를 측정하였고 결과를 Fig. 26에 나타내었다. 총콜레스테롤의 경우 RAG 군(81.75 mg/dl)이 가장 낮았으며, NCON 군(145.8 mg/dl)에 비해 약 44% 감소하였다. RA 군(91.5 mg/dl)과 AG 군(91.0 mg/dl)도 NCON군에 비해 약 37% 감소하였다. 반면, HDL 콜레스테롤 RA군 (92.0 mg/dl)과 AG 군(95.25 mg/dl)에서 NCON 군(56.8 mg/dl)보다 월등히 높아졌고, LDL 콜레스테롤은 NCON 군 (107.3 mg/dl)에 비해 모든 실험군들 (12.6~21.6 mg/dl)에서 현저히 낮아졌다. 중성지질 또한 NCON군과 비교하였을 때 모든 실험군에서 감소하였다. 이는 시험물질 투여에 의해 중성지질을 혈중으로 방출하는 양이 줄어들었거나 체내 중성지질 이용률이 증가한 것으로 생각된다. 고지혈증 동물 모델에서는 시험물질 투여에 의해 LDL 콜레스테롤의 현저한 저하와 HDL 콜레스테롤의 증가폭이 컸으며, 중성지질의 감소는 상대적으로 크지 않았다. 이를 토대로 동맥경화 지수를 계산해 보면 모든 실험군에서 동맥경화 지수기 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 27).

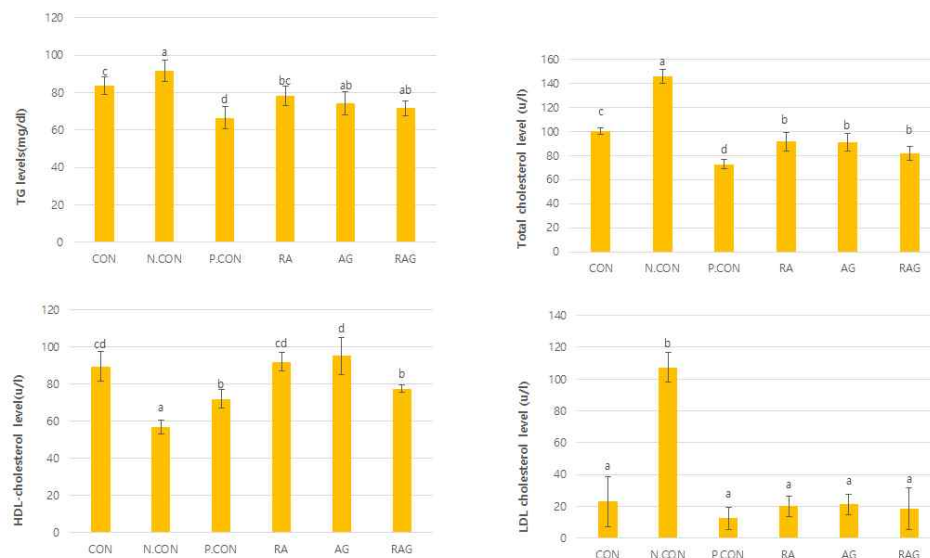


Fig. 26. Levels of triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol after RA and AG administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, RA: Red-BCQ (0.83 mg/kg b.w.)+Triton WR-1339, AG: : Agnex (12.5 mg/kg b. w.) +Triton WR-1339, RAG: : Red-BCQ (0.83 mg/kg b.w.) + Agnex (12.5 mg/kg b. w.) +Triton WR-1339. All the values were expressed as means  $\pm$  SD.

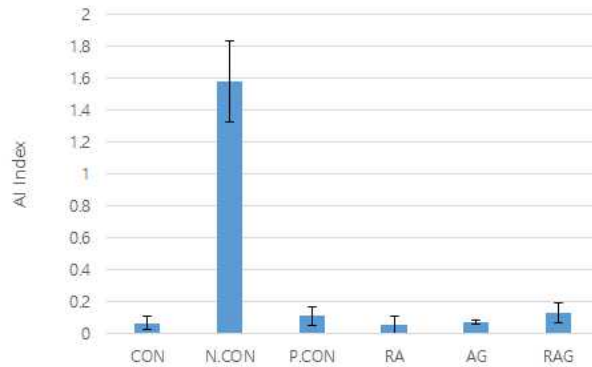


Fig. 27. AI index after RA and AG administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, RA: Red-BCQ (0.83 mg/kg b.w.)+Triton WR-1339, AG: : Agnex (12.5 mg/kg b. w.) +Triton WR-1339, RAG: : Red-BCQ (0.83 mg/kg b.w.) + Agnex (12.5 mg/kg b. w.) +Triton WR-1339. All the values were expressed as means  $\pm$  SD.

#### 사. 고지혈증 유발동물모델의 조직 중 항산화 효소 활성 변화 실험 결과

Malondealdehyde (MDA)는 산화스트레스 마커로서 유용하며, superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT)는 대표적인 항산화 효소이다. 활성산소종으로 인한 산화적 스트레스는 결국 세포막의 지방산을 산화시켜 지질과산화물인 MDA의 함량을 증가시키게 된다. 따라서 항산화 활성이 있는 물질을 섭취하거나, 체내 항산화 효소의 활성을 증가시키면 혈관확장 및 혈행개선에 도움이 된다. MDA 측정결과 PCON그룹(0.97 nmol/mg protein)은 NCON그룹(1.28 nmol/mg protein)에 비해 약 24%만큼 저하되었다. AG그룹과 RAG그룹은 CON그룹보다 낮은 값이었다(Fig. 28). SOD는 PCON 그룹(24.90 nmol/mg protein)이 NCON그룹(21.10 nmol/mg protein)에 비해 약 18% 증가했고, AG그룹(25.0 nmol/mg protein)과 RAG그룹(25.78 nmol/mg protein)은 NCON에 비해 각각 18.5%, 22.2% 증가했다(Fig. 28). CAT는 PCON 그룹(577.7 nmol/mg protein)이 NCON그룹(401.3 nmol/mg protein)에 비해 약 44% 증가했고, RA그룹(483.1 nmol/mg protein)과 RAG그룹(463.8 nmol/mg protein)은 NCON그룹에 비해 각각 20.4%, 15.6%만큼 증가했다(Fig. 28). 따라서 복합물 투여는 세포내 환원력을 유지하고 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 항산화 효능을 증가시켜 활성산소에 의한 혈관 세포를 보호할 것으로 생각된다.

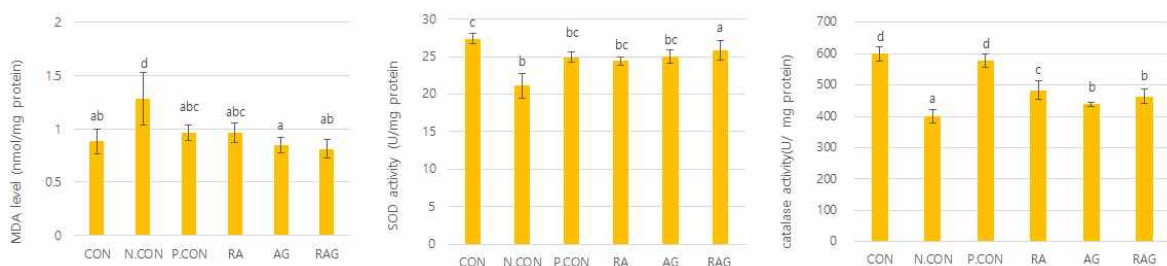


Fig. 28. Changes of malonedialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) after RA and AG administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, RA: Red-BCQ (0.83

mg/kg b.w.) + Triton WR-1339, AG: : Agnex (12.5 mg/kg b. w.) + Triton WR-1339, RAG: : Red-BCQ (0.83 mg/kg b.w.) + Agnex (12.5 mg/kg b. w.) + Triton WR-1339. All the values were expressed as means  $\pm$  SD.

## 제 4 절 발모효능실험

### 가. 실험동물 및 시료처리 후 육안적 평가에 의한 발모효과 분석 결과

모발연구에 주로 사용하는 C57BL/6 수컷 마우스는 검은색의 털을 가지고 있으며 모발 성장을 육안으로 관찰하기 쉽다는 장점을 가지고 있어서 모발연구에 주로 사용되고 있는 모델이다. 모발은 생장기(anagen), 퇴행기(catagen), 휴지기(telogen)를 거치면서 탈모와 발모가 반복 되는 것으로 알려져 있다. C57BL/6종은 약 6주령부터 모발주기가 휴지기로 들어가는 유전적 특징이 있으므로 이를 이용하여 연구를 시작하였다. 제 2 발모주기의 휴지기 상태인 7주령에 등 부위를 제모 하여 모든 실험동물이 동일한 발모주기를 가질 수 있도록 유도한 뒤 saline (CON), 5% 미녹시딜 (PCON), RA, AG, RAG 각각의 경구 투여 시에 나타나는 변화를 제모 후 2주 및 4주째에 사진촬영한 뒤 관찰하여 기록하였다(Fig. 29, Table 7). 시료 투여 후 1주차에 PCON그룹 중에 3개체, RA, AG, RAG그룹 중에서는 각각 1개체에서 발모가 시작되었으며, 2주차에 본격적으로 발모가 시작되는 개체와 그렇지 않은 개체가 육안으로도 뚜렷하게 관찰되었다. 3주차부터는 그룹 간 편차를 조금 더 확실하게 관찰할 수 있었고 PCON과 RAG그룹에서 발모가 많이 진행된 개체를 관찰할 수 있었다. 털이 자란 상태를 육안으로 관찰하여 점수화한 다음 비교한 결과 2주차부터 PCON그룹 (2.48점)과 RAG그룹(3.68점)은 다른 군에 비해 상대적으로 높은 점수를 나타내었다. 시간이 경과함에 따라 PCON그룹과 RAG그룹에서 hair re-growth가 급격하게 일어났고 4주차에는 CON그룹 (4.04점)과 비슷한 양상으로 hair re-growth가 일어났지만 모발의 건강상태와 윤기는 RAG그룹 (4.88점,  $p < 0.005$ )이 가장 뛰어났다.

Table 7. Comparison of hair re-growth after topical application of Red-BCQ, Agnex, and a mixture of these compounds for a period of 2 weeks and 4 weeks

	Hair re-growth score	
	2 weeks	4 weeks
CON	1.32 $\pm$ 0.47***	4.04 $\pm$ 0.64***
PCON	2.48 $\pm$ 1.09	4.44 $\pm$ 0.95
RA	1.98 $\pm$ 0.87***	4.30 $\pm$ 0.81*
AG	2.02 $\pm$ 0.74***	4.66 $\pm$ 0.56
RAG	3.68 $\pm$ 0.89***	4.88 $\pm$ 0.33***

Hair re-growth scoring index: 0-19% (1), 20-39% (2), 40-59% (3), 60-79% (4), 80-100% (5). Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG -administered group. All values were expressed as means  $\pm$  SD. Significance differences from positive control value are indicated by \* $p < 0.5$  and \*\*\* $p < 0.005$ .

### 나. 조직검사에 의한 발모효과 결과

피부 조직사진 분석결과 RAG그룹에서 모낭의 수가 많아졌고, 모낭의 크기가 크며, 모근의 길이가 길어진 것을 보면 발모효과가 있다고 판단할 수 있다. 조직절편상에서 모낭의 크기와 수는 모발 성장주기에서 모낭의 상태를 결정하는 중요한 척도로 다른 그룹들에 비해서 RAG그룹은 생장기로

의 전이가 빠르게 진행됨을 알 수 있다(Fig. 28). 이는 적양파의 혈행개선 작용, 참당귀의 혈행촉진 및 보혈작용, 그리고 이들 추출혼합물의 항산화 작용까지 더하여 모발에 충분한 영양분이 공급된 결과라 사료된다.

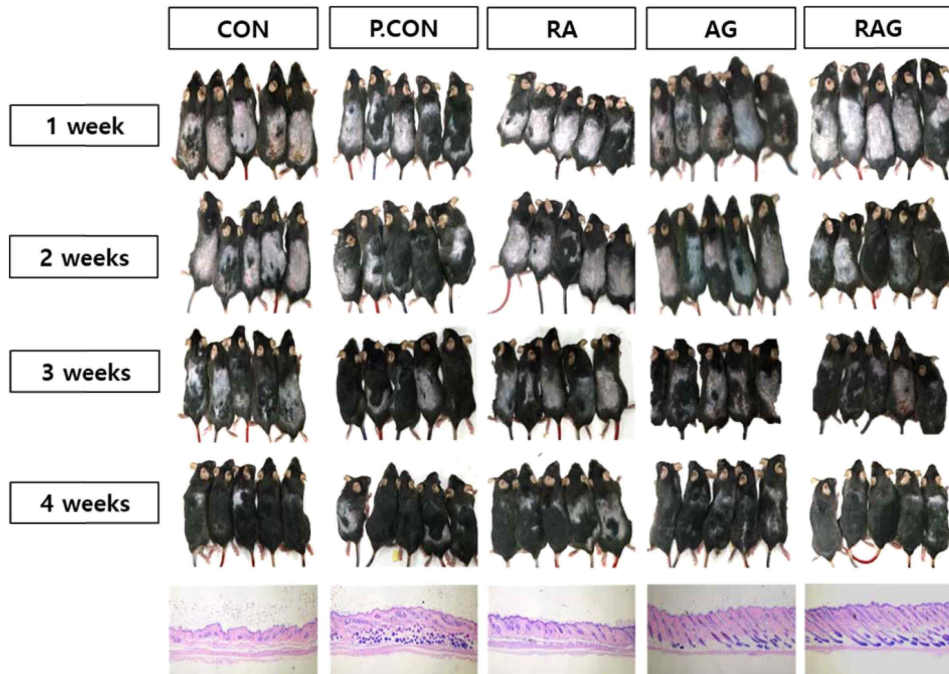


Fig. 29. Time dependent changes of hair re-growth in C57BL/6 treated with RA, AG, and a mixture of these compounds for a period of 4 weeks. Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG-administered group.

#### 다. 조직 중 항산화 효소 측정 결과

산화제와 항산화제 사이의 평형을 의미하는 산화적 밸런스(Oxidative balance)는 체내에서 매우 중요하며, 노화나 질병 등의 비정상적인 신체 상태일 때 이러한 균형은 깨어지고 이로 인해 많은 문제점들이 야기된다. Malonaldehyde (MDA)는 산화스트레스 마커로서 유용하며, superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT)는 대표적인 항산화 효소이다. MDA는 지질과산화물의 최종산물로 과잉의 활성산소는 DNA, 지질, 단백질 등의 변형 및 손상을 유발하고 결국 혈관을 오염시키고, 모근세포를 파괴하기 때문에 두피를 얇게 만들고 모발성장인자인 IGF-1을 저해하여 탈모를 가속화시킨다. 또한 활성산소종으로 인한 산화적 스트레스는 결국 세포막의 지방산을 산화시켜 지질과산화물인 MDA의 함량을 증가시키게 된다. 따라서 항산화 활성이 있는 물질을 섭취하거나, 체내 항산화 효소의 활성을 증가시키면 모세혈관 확장에 도움이 되고 모발의 성장을 촉진할 수 있다. 본 연구에서는 동물실험 후 간 조직을 채취하여 MDA와 항산화 효소의 변화를 확인해 보았다. MDA 측정결과 PCON그룹(20.7 nmol/mg protein)은 CON그룹(72.8 nmol/mg protein)에 비해 약 71.2%만큼 현저히 저하되었다. RA그룹과 AG그룹은 CON그룹에 비해 큰 차이는 없었으나, RAG그룹(61.90 nmol/mg protein)은 CON그룹에 비해 약 15%만큼 저하되었다(Fig. 30A). SOD는 PCON 그룹(27.3 nmol/mg protein)이 CON그룹(18.8 nmol/mg protein)에 비해 약 50.5% 증가했고, AG 그룹(24.5 nmol/mg protein)과 RAG그룹(40.1 nmol/mg protein)은 CON에 비해 각각 30.3%, 113.3% 증가했다(Fig. 30B). CAT는 PCON 그룹(8.96 nmol/mg protein)이 CON그룹(5.34 nmol/mg protein)에 비해 약 67.8% 증가했고, RA그룹(15.11 nmol/mg protein)과 RAG그룹(22.52 nmol/mg protein)은 CON그룹에 비해 각각 183%, 321.7%만큼 증가했다(Fig. 30C). 따라

서 복합물 투여는 세포내 환원력을 유지하고 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 항산화 효능을 증가시켜 활성산소에 의한 세포 손상을 막아서 탈모방지 또는 발모에 효과가 있을 것으로 생각된다.

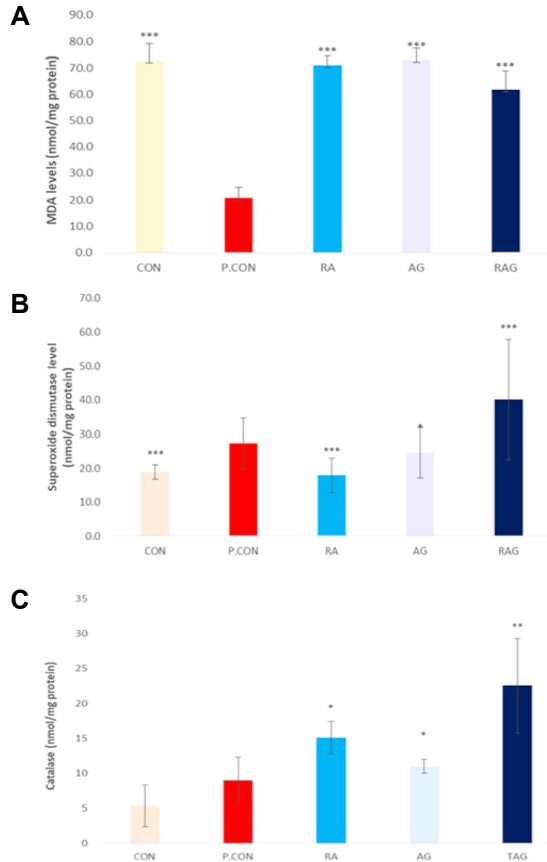


Fig. 30. Changes of malonedialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) in C57BL/6 treated with RA, AG, and a mixture of these compounds for a period of 4 weeks.

Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG -administered group. All values were expressed as means  $\pm$  SD. Significance differences from positive control value are indicated by \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , and \*\*\* $p < 0.005$ .

### 라. 모발성장인자, 탈모유발인자의 발현측정결과

모발성장인자인 IGF-1의 발현을 증가시키는지 확인하기 위해 동물실험 종료 시 채취한 조직을 이용하여 IGF-1의 발현을 확인하였다. IGF-1은 남성호르몬에 의해 생성이 촉진되고 모발성장을 조절하는 가장 중요한 성장인자 중 하나로 모낭세포의 세포사멸을 억제하고 모발성장을 촉진한다고 알려져 있다. IGF-1의 발현 양상을 관찰해 본 결과 RAG그룹에서 CON그룹에 비해 증가하였다. 5% 미녹시딜을 투여한 PCON그룹에서는 오히려 감소하였으나 유의적인 차이는 판단하기 어렵다 (Fig. 31). 또한 모발성장에 영향을 미치는 내분비계 물질인 TGF- $\beta$ 1의 발현량을 측정해 보았다. TGF- $\beta$ 1은 모발의 상피세포 증식을 억제하여 성장을 저해하고 퇴행기로 진입하게 함으로써 탈모를 유발하는 인자로 알려져 있다[35]. 따라서 TGF- $\beta$ 1의 발현량이 증가하면 털의 기질세포와 모근세포들의 세포사멸이 일어나 휴지기 모낭이 증가하게 되고 가늘고 짧은 모발로 전환된다. 본 연구에서는 TGF- $\beta$ 1의 발현이 AG그룹과 RAG그룹에서 비투여군에 비해 현저히 감소하였다(Fig. 31). 본 연구진의 다른 연구(현재 논문 투고 중)에서 적양파와 참당귀 추출복합물의 항혈전 및 혈소판 응집

억제 효과가 관찰되었는데 이러한 혈행개선 효과와 항산화 효과 등의 복합적인 메커니즘에 의해 모발성장인자인 IGF-1의 발현은 증가하고, 모발성장억제인자인 TGF- $\beta$ 1은 감소시켜 모낭의 성장을 촉진시키고 발모에 도움을 주는 것으로 생각된다.

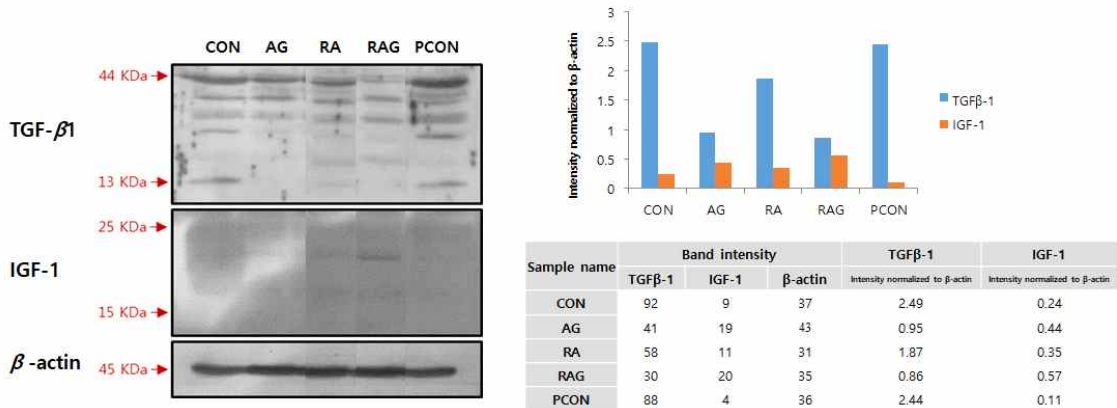


Fig. 31. Effects of RA, AG and a mixture of these compounds on expression of IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 by western blot.  $\beta$ -actin was used as a comparative control. Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG-administered group.

#### 마. 5- $\alpha$ Reductase의 정량 결과

피나스테라이드와 미녹시딜은 미국 FDA에서 공인받은 약물이지만, 중단 시 6개월 이내에 다시 숄로 바뀌게 되며, 장기간 사용시 가려움증, 피부염 등을 일으킬 수 있다고 보고되어 있다. 5 $\alpha$ -Reductase는 활성 남성호르몬인 dihydroxytestosterone (DHT)을 생성하는데 이러한 5 $\alpha$ -Reductase는 두 가지 형태로 알려져 있다. Type I은 모낭, 피부, 뇌, 간 등에 연관되어 작용하고, Type II는 전립선, 음낭 등에 존재하여 전립선비대증과 관련이 있다. 경구용 제제인 피나스테라이드는 5 $\alpha$ -Reductase Type II를 저해하여 전립선 비대증 치료제로 작용하기도 하지만, Type I을 저해하여 탈모치료제로 승인을 받은 약물이다. 따라서, 본 연구에서는 발모실험을 진행한 개체에서 혈액을 채취하여 serum 5 $\alpha$ -Reductase의 양을 측정하여 보았다. 5% 미녹시딜을 4주간 투여한 PCON그룹과 RAG그룹은 5 $\alpha$ -Reductase 양이 모두 1.08 ng/ml이었고, 이는 대조군(1.28 ng/ml)에 비해 약 16% 감소한 결과이다. RA와 AG 단독 투여시 5 $\alpha$ -Reductase 양은 각각 1.2 ng/ml, 1.15 ng/ml로 복합투여함으로써 약 7-10% 감소한 결과를 보였다(Fig. 32). 5 $\alpha$ -Reductase 양이 절대적인 발모 및 탈방지의 지표가 될 수는 없지만, RA와 AG 복합 투여시 5 $\alpha$ -Reductase 양이 줄어든 것은 결국 DHT level을 저하시켜 발모 및 탈방지의 가능성을 시사하고 심각한 부작용을 가진 화학탈방지제인 피나스테라이드를 대체할 수 있는 후보물질이 될 것이라 생각한다.



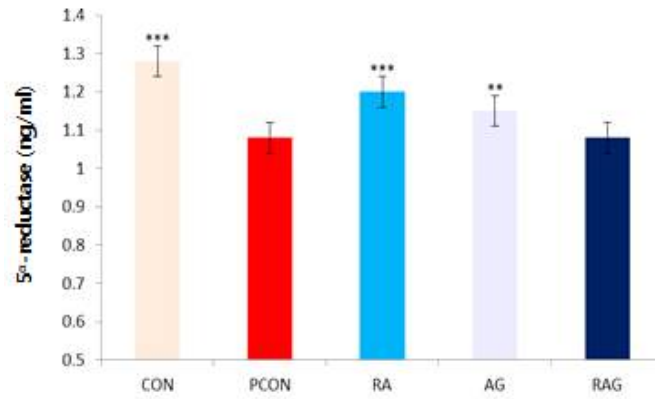


Fig. 32. Changes of 5α-reductase in the serum. Test compounds were administered for 4 weeks. Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG-administered group. All values were expressed as means ± SD. Significance differences from positive control value are indicated by \*\* $p < 0.05$ , and \*\*\* $p < 0.005$ .

#### 바. 피부조직 중 Alkaline phosphatase(ALP)와 γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT) 활성 측정 결과

lida 등에 따르면 피부 조직 내에서의 ALP는 모세혈관에 영양을 공급하고 혈관 신생작용에 관여하여 발모작용을 원활하게 해 준다고 하였다. 특히 ALP는 털이 다시 자라나기 시작하는 부위에서 활성이 증가하는 경향이 있다고 보고하였다. 본 연구에서 피부조직 내 ALP의 활성을 측정한 결과를 살펴보면 복합물을 투여한 RAG그룹(766.90 U/mg protein)은 PCON그룹(794.45 U/mg protein)과 유의한 수준으로 증가하였고, 이는 CON그룹(393.74 U/mg protein)에 비해 약 195~200% 증가한 값이다(Fig. 33). RA와 AG의 복합물에 의한 ALP의 현저한 증가는 발모에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 발모와 관련된 생화학적 효소로 모발 성장기 때 활성이 증가한다고 알려진 또 다른 발모지표로 γ-GT가 있다. 이는 세포막을 통한 아미노산과 펩타이드의 흡수 및 분비에 관여하는 효소로, glutathione의 체내 대사에 관여하여 cysteine을 공급함으로써 모발의 케라틴화에 도움을 준다. 본 연구에서는 CON그룹(153.4 U/mg protein)에 비해 PCON그룹(457.2 U/mg protein)과 RAG그룹(368.3 U/mg protein)은 각각 298%, 240% 증가하여 발모효과에 영향을 주었을 것으로 생각된다. RA그룹(275.5 U/mg protein)은 약 180%, AG그룹(278.5 U/mg protein)은 약 182% 증가하여 단독 투여 또한 발모효과에 긍정적인 영향을 주었을 것이라 생각된다(Fig. 33).

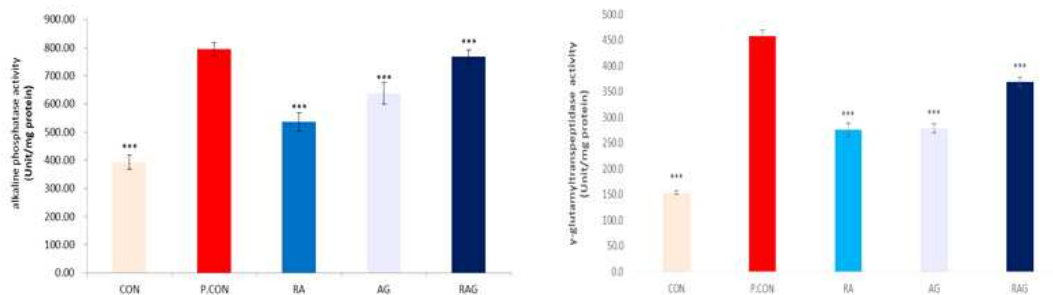


Fig. 33. Changes of ALP and γ-GT activity in the skin of mice. Test compounds were administered for 4 weeks. Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG-administered group. All values were expressed as means ± SD. Significance differences from positive control value are indicated by \*\* $p < 0.05$ , and \*\*\* $p < 0.005$ .





## 나. 시제품 포장

참당귀 적양파 추출물 임상제품은 1.5 g(4 mg quercetin/g 함량의 Red-BCQ 1g + 120 mg D/DA/g 함량의 Agnex 0.5 g)으로 비닐포장 한 후 20개씩 1박스에 담아 포장하여 임상시험 수행 기관(전북대학교병원)에 전달하였음.



Fig. 34. 임상시험용 시제품

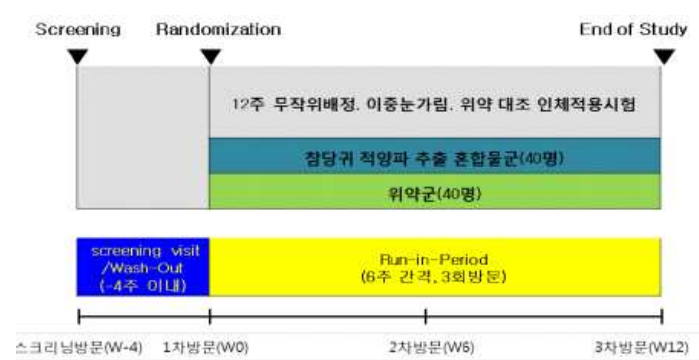
## 제 6 절 임상시험

### ▶ 인체적용시험 (전북대학교 의생명연구원)

○ 제목: 참당귀 적양파 추출 혼합물의 혈행 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험 (PRT: HJ-BF-AAM)

○ 요약

인체적용 시험용 제품	참당귀 적양파 추출 혼합물, 위약
시험목적	<p>참당귀 적양파 추출 혼합물의 12주 섭취가 혈행 개선 및 관련 지표에 미치는 영향을 위약 섭취와 비교하여 평가한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 1차 목적혈소판응집능(PFA), 혈액점도로 평가되는 혈행 개선에 대한 참당귀적양파 추출 혼합물의 유효성을 위약 섭취와 비교 평가한다.</li> <li>■ 2차 목적혈압, 맥박수, 혈액응고관련지표, 지질대사지표, 동맥경화 지수로 평가되는 혈행 개선에 대한 참당귀 적양파 추출 혼합물의 유효성 및 안전성을 위약 섭취와 비교 평가한다.</li> </ul>
연구대상자 상태	만 19 세 이상, 80 세 이하의 성인 남녀
선정기준	<p>1) 스크리닝 당시 연령이 만 19 세 이상, 80 세 이하의 성인 남녀</p> <p>2) 다음 내용 중 3 개 이상의 항목을 만족하는 자</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 현재 흡연하는 자</li> <li>☞ 공복 총콜레스테롤이 180~239 mg/dL 인 자</li> <li>☞ 공복 LDL-콜레스테롤이 130~159 mg/dL 인 자</li> <li>☞ 공복 혈당이 100~125 mg/dL 인 자</li> </ul> <p style="text-align: center;">CONFIDENTIAL APR 2021</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 수축기 혈압이 120~140 mmHg</li> <li>☞ BMI가 23~30 kg/m<sup>2</sup>인 자</li> <li>☞ 복부지방률(WHR)이 남성의 경우 0.9 이상, 여성의 경우 0.85 이상인 자</li> </ul> <p>3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후,자</p>

<p>제외기준</p>	<p>의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 혈소판 기능 및 혈소판 응고에 현저한 장애가 있는 자 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 혈소판 수가 10만/μL 이하이거나 50만/μL 이상</li> <li>☞ Hematocrit 수치가 25% 이하</li> </ul> </li> <li>2) 스크리닝 검사 전 4 주 이내에 항응고요법을 시행한 자</li> <li>3) 치료를 요하는 임상적으로 유의한 급성 또는 만성 심뇌혈관계, 내분비계, 면역계, 호흡기계, 간담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경정신계, 근골격계, 염증성 및 혈액·종양성, 위장관계 질환 등이 있는자</li> <li>4) 스크리닝 검사 당시 BMI 가 18.5 kg/m<sup>2</sup> 미만 또는 35 kg/m<sup>2</sup> 이상인 자</li> <li>5) 스크리닝 검사 전 4 주 이내에 혈소판 기능, 혈행 개선 및 고지혈증에 관련된 의약품 또는 건강기능식품을 복용한 자(병용금지약품 참고)</li> <li>6) 스크리닝 전 3 개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자</li> <li>7) 알코올 중독(21 unit/주) 또는 약물 남용이 있거나 의심되는 자</li> <li>8) 스크리닝 검사 전 3 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자</li> <li>9) 진단검사의학 검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ AST, ALT &gt; 참고범위 상한치의 3 배</li> <li>☞ Serum Creatinine &gt; 2.0 mg/dL</li> </ul> </li> <li>10) 임신 또는 수유 중인 여성</li> <li>11) 가임 여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않는 경우</li> <li>12) 진단검사의학검사 결과를 비롯한 기타 사유로 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자</li> </ol>
<p>시험방법</p>	<p>본 인체적용시험은 총 80 명의 연구대상자를 대상으로 하는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 연구이다. 시험자는 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터(이하 센터로 표기)에 방문하여서면동의를 작성한 연구자원자를 대상으로 스크리닝(선별) 검사를 실시하여 연구대상자를 선정하였다. 연구대상자는 스크리닝 방문일로부터 4 주 이내에 1 차 방문하여 선정 및 제외기준을 재검토 받고 인 HJ-BF-AAM CONFIDENTIAL APR 2021체적용시험에 등록되었으며 담당귀 적양과 추출 혼합물군과 위약군에 1:1 무작위배정 되어 1 차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료하였다. 시험용제품 섭취 기간은 12 주였으며 1 일 1 회, 1 회 1 포씩매일 복용하였다. 1 차 방문 이후 6 주마다 센터에 방문하여 유효성평가, 활력징후, 약물투여력 및 의학적 상태변화 조사, 이상반응 조사등을 수행하고 12 주차에 종료방문이 이루어졌다.</p>  <p style="text-align: center;">     Screening      Randomization      End of Study   </p> <p style="text-align: center;">     12주 무작위배정. 이중눈가림. 위약 대조 인체적용시험   </p> <p style="text-align: center;">     참당귀 적양과 추출 혼합물군(40명)      위약군(40명)   </p> <p style="text-align: center;">     screening visit /Wash-Out (-4주 이내)      Run-in-Period (6주 간격, 3회방문)   </p> <p style="text-align: center;">     스크리닝방문(W-4)    1차방문(W0)      2차방문(W6)      3차방문(W12)   </p>
<p>섭취제품, 섭취방법</p>	<p>연구대상자는 다음 두 군 중 한 군에 무작위배정 되어 12주 동안 인체적용시험용 제품을 1일 1회 경구 섭취하며, 일상생활을 수행하였다.</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 참당귀 적량파 추출 혼합물군: 1일 1회, 1회 1포, 아침 식후 경구 섭취(1.5 g/일, 참당귀 적량파 추출 혼합물로써 1.5 g/일)</li> <li>○ 위약군: 1일 1회, 1회 1포, 아침 식후 경구섭취HJ-BF-AAM CONFIDENTIAL APR 2021(1.5 g/일, 참당귀 적량파 추출 혼합물로써 0 g/일)</li> </ul>
평가기준	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 1차 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 혈소판 응집능(PFA)</li> <li>- 혈액점도</li> </ul> </li> <li>◆ 2차 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 혈압, 맥박수</li> <li>- 혈액응고관련지표: PAI-1, Serotonin, Thromboxane B2, aPTT</li> <li>- 지질대사지표: Total cholesterol, Triglyceride, LDL-C, HDL-C, Non HDL-C</li> <li>- 동맥경화지수: Total cholesterol/HDL-C, LDL-C/HDL-C, Triglyceride/HDL-C, (Total cholesterol-HDL-C)/HDL-C</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>○ 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자·타각 증상 등 이상반응 모니터링</li> <li>- 진단검사의학 검사</li> <li>- 활력징후, 신체검진, 심전도</li> </ul> </li> </ul>
통계방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 분석에 사용할 프로그램은 Window 용 SAS 9.4 를 이용하고, 통계학적 유의수준은 0.05 미만으로 설정하였다.</li> <li>• 집단 간 기저치 분포의 차이가 있는지를 확인하기 위한 검정은 Chi-Square test 또는 Fisher's exact test 와 Independent t-test 를 이용하였다.</li> <li>• 유효성 분석/안전성 분석</li> </ul> <p><u>1 차 유효성 평가 변수</u></p> <p>혈소판 응집능(PFA), 혈액점도 결과에 대하여 섭취군 별로 기술통계량을 제시하고, 섭취군 간 비교와 섭취군 내 비교를 실시하였다. 섭취군 간 비교의 경우, 변화량(섭취 12 주 후-섭취 전)에대해서 independent t-test 를 이용하여 분석하였다. 섭취군 내비교의 경우, 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화에 대하여 paired t-test 를 이용하여 분석하였다. 동질하지 않은 각 유효성 평가항목의 기저치 및 인구학적 정보 항목은 covariate 로 보정하여ANCOVA 를 실시하였다.</p> <p><u>2 차 유효성 평가 변수</u></p> <p>혈압, 맥박수, 혈액응고관련지표, 지질대사지표, 동맥경화지수 결과에 대하여 섭취군 별로 기술통계량을 제시하고, 섭취군 간 비교와 섭취군 내 비교를 실시하였다. 섭취군 간 비교의 경우, 변화량(섭취 12 주 후-섭취 전)에 대해서 independent t-test 를 이HJ-BF-AAM CONFIDENTIAL APR 2021용하여 분석하였다. 섭취군 내 비교의 경우, 섭취 전 대비 12 주시점의 변화에 대하여 paired t-test 를 이용하여 분석하였다. 혈압, 맥박수의 반복측정에 대해서 섭취군 간 비교와 섭취군 내 비교를 RM-ANOVA/Linear mixed model 등을 적용하여 분석하였다. 동질하지 않은 각 유효성 평가 항목의 기저치 및 인구학적 정보 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시하였다.</p> <p><u>안전성 평가 변수</u></p>

	<p>인체적용시험 기간 동안 발생한 모든 이상반응에 대하여 전체와 섭취군 별로 빈도, 퍼센트로 요약하였다. 섭취군 간 이상반응의 발생 양상을 chi-square test 또는 Fisher's exact test 를 이용하여 분석하였다. 진단검사의학 검사와 활력징후 결과에 대하여 섭취군 별로 기술통계량을 제시하고, 섭취군 간 비교와 섭취군 내 비교를 실시하였다. 섭취군 간 비교의 경우 변화량(섭취 12 주 후-섭취 전)에대해서 independent t-test 를 이용하여 분석하였다. 섭취군 내비교의 경우, 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화에 대하여 paired t test 를 이용하여 분석하였다. 또한 활력징후의 반복측정에 대해서 각 섭취군 간 비교와 섭취군 내 비교를 RM-ANOVA/Linear HJ-BF-AAM CONFIDENTIAL APR 2021mixed model 등을 적용하여 분석하였다</p>
<p>요약 · 결론</p>	<p>본 인체적용시험은 참당귀 적양파 추출 혼합물 섭취가 혈행 개선에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 연구이다. 본 인체적용시험의 등록목표 연구대상자수는 80 명, 중도탈락률30%를 고려한 종료목표 연구대상자 수는 56 명으로써, 총 107 명의자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝(선별) 검사를 받았고, 총 80 명이 적격 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 이중눈가림 방법을 통해 참당귀 적양파 추출 혼합물군과 위약군에 1:1 무작위배정 되어 본 인체적용시험에 참여하였다. 시험자는 모든 연구대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라, 혈소판 응집능(PFA), 혈액점도와 활력징후(혈압, 맥박수), 혈액응고관련지표(PAI-1, Serotonin, Thromboxane B2, aPTT), 지질대사지표(TC, TG, LDL-C, HDL-C, Non HDL-C), 동맥경화지수(TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, TG/HDL-C, Non HDL-C/HDL-C) 등 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다. 유효성 평가를 위한 주 분석군은 Full Analysis Set (FAS)HJ-BF-AAM CONFIDENTIAL APR 2021으로써, 중도탈락자 2 명이 분석에서 제외됨에 따라, 총 78 명(참당귀적양파 추출 혼합물군 38 명, 위약군 40 명)의 연구대상자를 대상으로 유효성 평가 분석을 시행하였다. 안전성 평가를 위한 주 분석군은 인체적용시험에 참여하여 최소 1 회 이상 시험용 제품을 복용한연구대상자군(Safety Set, 80 명)이었다. 1 차 유효성 평가 항목(혈소판 응집능, 혈액점도) 분석 결과, 혈소판응집능(PFA) 변화에 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(<math>P&gt;0.05</math>). 혈액점도 중 Shear rate 100 과 Shear rate 50, Shear rate 10 은 참당귀 적양파 추출 혼합물군과 위약군에서 각각 섭취 전에 비해 섭취 12 주 후 통계적으로 유의하게 증가하였으나(<math>P=0.046</math>, <math>P=0.016</math>, <math>P=0.021</math>)(<math>P=0.013</math>, <math>P=0.008</math>, <math>P=0.009</math>), 두 섭취군 간 비교 시통계적으로 유의한 차이는 없었다(<math>P&gt;0.05</math>). 2 차 유효성 평가 항목 (활력징후, 혈액응고관련 지표, 지질대사지표, 동맥경화지수) 분석 결과, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있는 항목은 없었다(<math>P&gt;0.05</math>). 인체적용시험 참여 기간에 연구대상자들의 생활습관을 평가하기 위해 식이섭취와 신체활동 조사를 하였으며, Full Analysis Set 78 명을 대상으로 분석 시, 참당귀 적양파 추출 혼합물군과 위약군의 열량, HJ-BF-AAM CONFIDENTIAL APR 2021거대영양소, 식이섬유섭취량 및 신체활동량(MET value)에서 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 없어, 연구대상자들이 인체적용시험에 참여하는 동안 일상생활을 일정하게 유지하였음을 알 수 있었고, 식이섭취와 신체활동도가 본 시험 결과에 미치는 영향이 거의 없을 것으로 판단하였다. 안전성 평가를 위해 최소 1 회 이상 시험용 제품을 복용한연구대상자 80 명</p>

(Safety Set)을 대상으로 이상반응, 진단검사의학검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 소변 검사), 신체계측 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 80 명의 연구대상자 중 8 명의 연구대상자에서 총 10 건의 이상반응이 발생하였다. 섭취군 간 이상반응 발생 건수에 차이가 없었으며( $P>0.05$ ), 인체적용시험용 제품 섭취와 인과관계가 없는 이상반응이었다. 진단검사의학 검사항목, 신체계측 결과에서도 두 섭취군 간에 임상적으로 의미 있는 변화가 없었다. 요약하면, 본 인체적용시험을 통해 참당귀 적양과 추출 혼합물 12주 섭취가 혈행 개선에 유효함을 증명할 수 없었으며 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 참당귀 적양과 추출 혼합물 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.

▶ 결론

1. 본 과제에서 수행한 인체적용시험을 통해서는 참당귀 적양과 추출 혼합물 12주 섭취가 혈행 개선에 유효함을 증명할 수는 없었다.
2. 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 참당귀 적양과 추출 혼합물 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.
3. 하지만 명확한 유효성을 평가하기 어려워 당초 계획이었던 건강기능식품 개별인정형 신청을 하기에는 다소 무리가 있다고 판단되어 향후 개선 및 추가 연구를 통하여 본 연구결과가 잘 활용될 수 있도록 하고자 한다.

제 7절 기능성 적색양파 육성 및 선발

가. 적색양파 기능성 성분함량 분석 및 품종선발

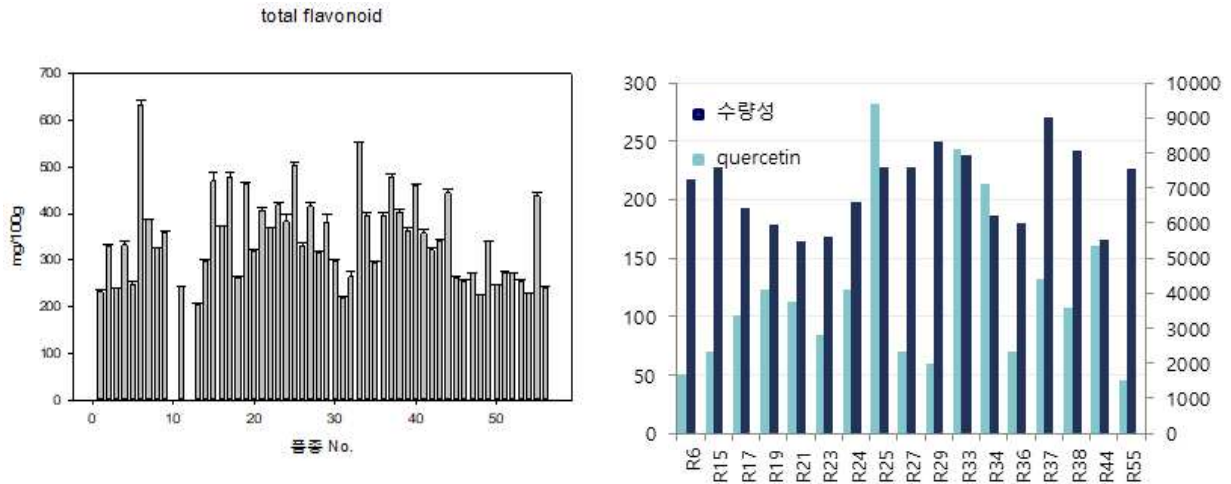
■ 적색양파 수확기 생육 특성 및 수량성을 조사하였음.

- 엽수 4.8~7.8매, 초장 43.1~76.6cm, 구형지수 0.73~1.24 및 상품수량 2,829~10,174kg10a의 분포를 보였다.

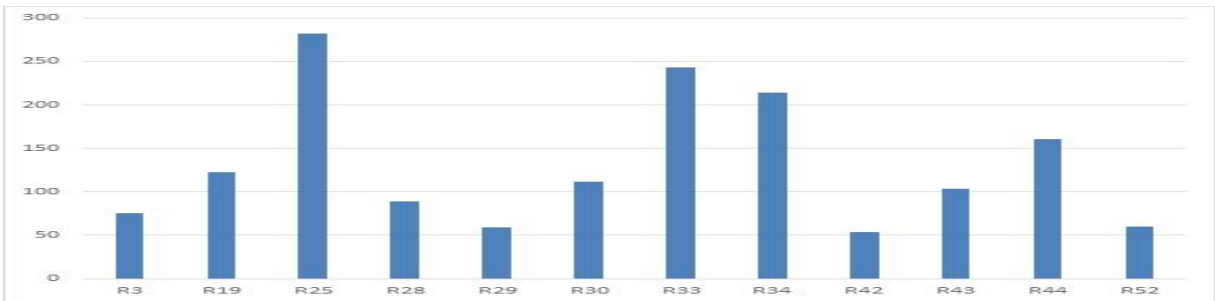
계통명	엽수 (매)	초장 (cm)	엽초경 (cm)	엽중경 (cm)	구경 (mm)	구고 (mm)	구중 (g)	구형 지수 <sup>1)</sup>	수량(kg/10a)		
									상품	비상품	총수량
R1	4.8	45.8	12.4	8.3	83.6	61.8	298.0	0.74	6046	1347	7393
R2	7.4	76.1	26.1	14.9	85.3	88.7	323.8	1.04	8181	425	8606
R3	7.4	76.6	19.7	15.5	88.5	82.4	350.9	0.93	6587	1314	7901
R4	5.8	61.0	20.3	10.3	96.0	71.4	381.8	0.74	10174	2491	12665
R5	7.4	59.3	22.8	12.0	85.4	79.1	219.3	0.93	7109.7	177.9	7288
R6	6.8	63.2	20.3	9.5	85.3	79.3	293.1	0.93	7248	773	8021
R7	6.0	58.0	20.0	8.5	84.3	104.5	362.2	1.24	8922	0	8922
R8	5.0	47.2	12.5	9.5	79.3	75.2	242.7	0.95	5825	523	6147
R9	5.8	63.0	23.9	8.8	83.3	90.6	295.9	1.09	6547	1173	7720
R11	5.4	59.9	19.6	7.5	82.4	78.2	296.1	0.95	6340	44	6384
R13	5.8	55.8	16.7	10.1	85.2	76.8	288.7	0.90	7208	595	7803
R14	6.8	61.0	21.9	12.1	91.1	81.7	370.7	0.90	8046	298	8344
R15	7.2	71.2	24.7	13.2	80.8	91.0	288.5	1.13	7854	258	8112
R16	4.8	61.5	14.0	7.9	81.8	69.8	246.3	0.85	5837	120	5657
R17	6.4	66.0	23.9	11.5	86.2	87.6	325.4	1.02	6412	465	6877
R18	5.4	64.1	19.2	8.9	96.1	81.5	448.8	0.85	9198	145	9343
R19	5.2	45.5	13.0	8.8	83.0	75.2	314.8	0.91	5933	403	6336
R20	6.6	58.2	18.3	11.3	85.0	70.4	268.4	0.83	6561	189	6750
R21	6.0	61.0	21.5	11.7	77.1	76.4	231.5	0.99	5465	334	5799
R22	5.4	47.2	12.2	10.6	88.4	60.9	223.6	0.73	4564	447	5011
R23	7.4	61.2	18.9	14.6	77.4	74.0	259.5	0.96	5810	1492	7102
R24	6.4	54.2	19.7	11.1	86.0	82.1	315.8	0.95	6616	639	7255
R25	5.8	55.6	17.9	6.6	94.6	71.7	336.1	0.76	7600	955	8555
R26	6.0	53.6	18.0	13.0	83.4	76.1	277.2	0.91	8329	346	7175
R27	6.6	57.6	18.4	12.8	83.7	73.4	275.1	0.88	7600	120	7720
R28	5.8	56.6	20.3	9.3	80.1	63.2	214.9	0.79	6307	1073	7382
R29	7.4	63.4	20.0	13.4	91.4	77.8	343.8	0.85	3308	1166	4473
R30	6.8	56.5	13.2	11.9	87.0	69.4	274.2	0.80	7532	614	8146
R31	5.2	49.2	16.2	10.9	85.3	77.3	284.4	0.90	7015	272	7288
R32	6.0	55.4	21.8	12.1	85.8	79.5	287.6	0.93	8522	0	8522
R33	6.4	55.8	18.9	12.6	92.7	78.4	284.5	0.85	7919	0	7919
R34	6.0	45.5	13.8	10.6	82.4	63.2	227.0	0.77	6213	423	6641
R35	6.0	47.0	19.3	9.2	79.6	76.5	239.9	0.96	4948	0	4948
R36	6.4	52.4	16.9	11.8	85.6	84.9	300.3	0.99	5980	65	6046



■ 적색양파 54종에 대해 총 플라보노이드를 분석하여 400mg/g 이상 함량을 가진 12품종에 대해 퀘르세틴을 분석함



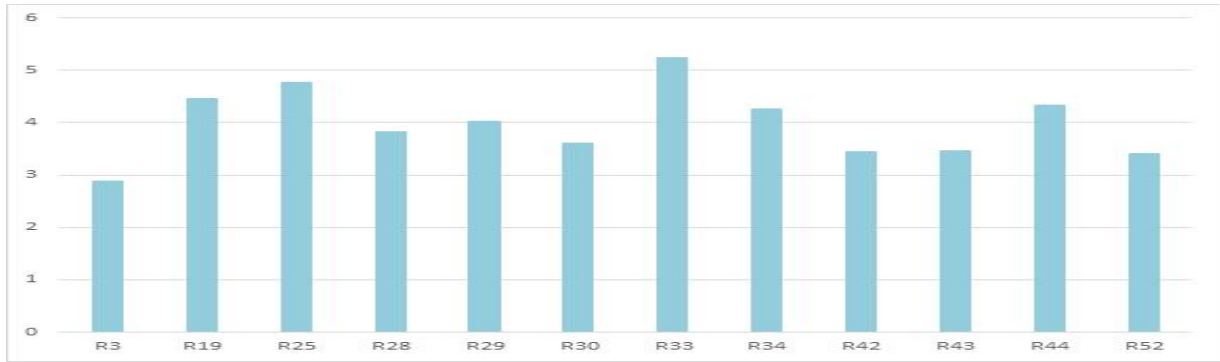
■ 퀘르세틴 함량 분석결과 R25 품종이 281.7 mg/g으로 가장 높았고 R33, R34 품종이 각각 242.7, 213.6 mg/g으로 높은 함량을 보였음.



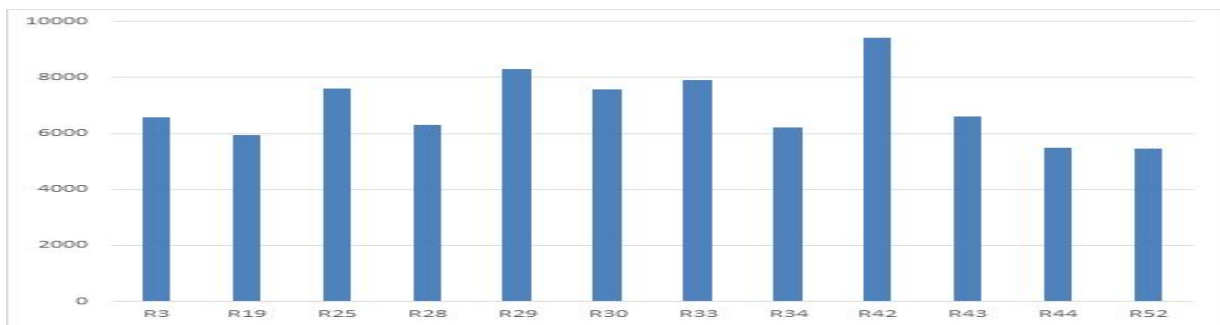
■ 총 플라보노이드 함량은 R33이 5.52 mg/g으로 가장 높았고 R25와 R44가 그 다음으로 높은 함량을 보였음.



■ 총 페놀 함량 또한 R33(5.24mg/g), R25(4.77mg/g)이 가장 높음 함량을 보였음.



■ 선발된 12종의 수확기 상품수량은 R42, R29, R33 품종이 각각 9,405, 8,307, 7,919 kg/10a 순으로 높게 나타났음.



■ 퀘르세틴 함량과 수량성을 함께 고려한 결과 기능성 소재 선발과제의 적정 품종으로 R25와 R33을 선발함.

#### 나. 선발된 품종의 안정적 생산 기술 구축

1차년도에 적색양파 54품종에 대한 생육, 수량 및 기능성분석(quercetin, total flavonoid, total phenol)을 수행하였고, 우수한 5품종을 선별하여 선발된 5품종에 대해 수확시기(도복100%, 황화 50%, 황화100%) 및 저장시기(수확직후, 저장 1개월, 저장 3개월)를 나누어 구 특성 및 이미지 정보를 구축함.

■ 선발 5품종의 중간생육 특성

계통명	결주율 (%)	엽수 (대)	초장 (cm)	엽초장 (cm)	엽초경 (mm)
슈퍼레드	4.1	6.7	71.0	19.5	15.3
사라다(적)	2.6	7.4	77.3	18.6	17.0
GS3180	0.7	6.6	67.7	22.1	13.6
GS3181	2.9	7.1	76.3	17.2	16.7
R44	1.1	7.0	62.4	21.9	16.6

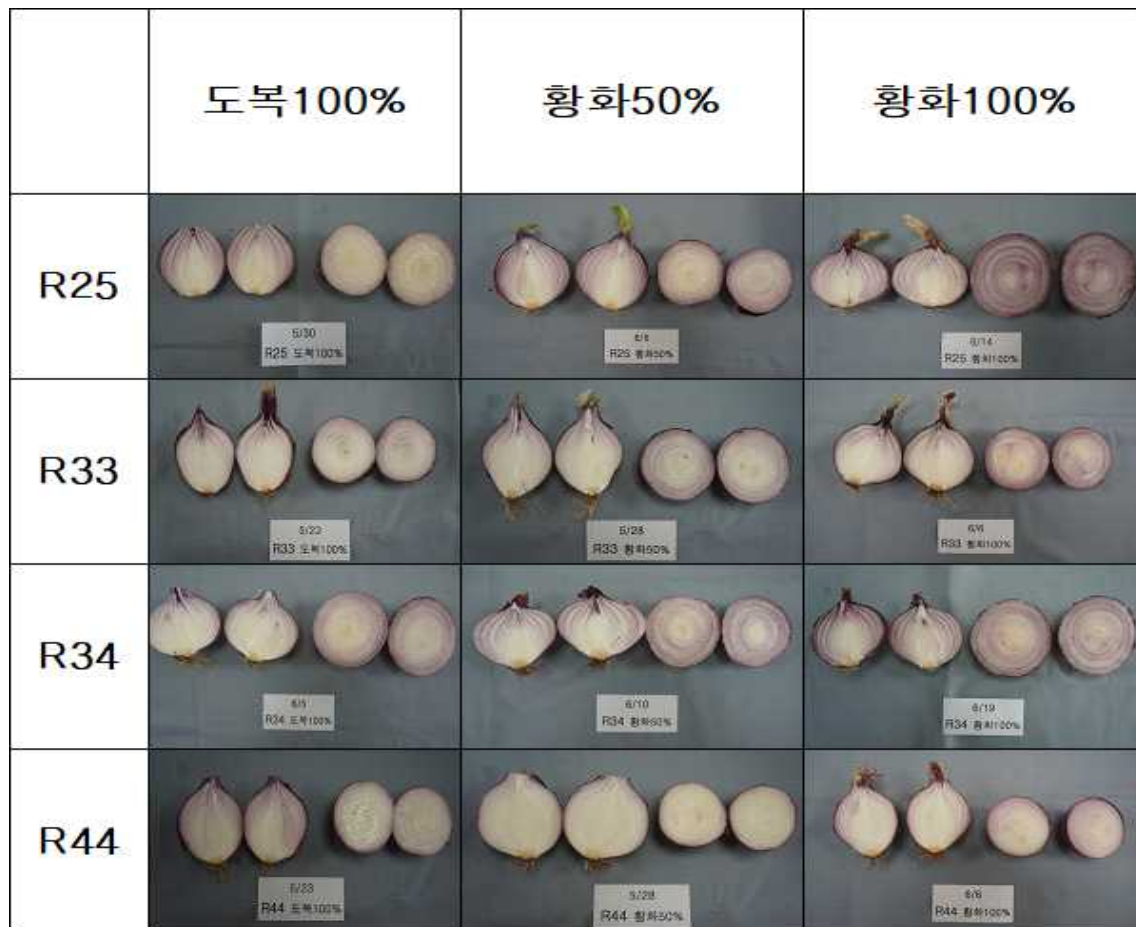
■ 선발 5품종의 수확기 구 특성

계통명	구경 (mm)	구고 (mm)	구중 (g)	구형 지수 <sup>1)</sup>	구입두께 (mm)	구적반크기 (mm)
슈퍼레드	79.48	65.47	219.9	0.82	0.10	11.40
사라다(적)	78.99	57.77	186.9	0.73	0.11	11.54
GS3180	74.80	71.32	205.2	0.95	0.11	11.91
GS3181	88.12	62.06	250.4	0.70	0.10	14.20
R44	71.05	75.03	199.1	1.06	0.11	14.74

■ 수확시기에 따른 수량성

품종	수확시기	구중	상품수량(kg/10a)				비상품수량(kg/10a)	총수량(kg/10a)
			대구	중구	소구	합계(지수)		
슈퍼레드	도복100%	172.1	936	1,473	2,143	4,552	238	4,790
	황화50%	192.2	1,227	2,842	1,465	5,534	181	5,714
	황화100%	214.5	1,435	2,000	2,105	5,540	1155	6,695
사라다 (적)	도복100%	170.7	797	1,700	2,338	4,835	199	5,034
	황화50%	175.8	817	1,857	2,157	4,841	230	5,072
	황화100%	197.0	827	1,932	1,808	4,567	959	5,526
GS3180	도복100%	210.3	1,474	4,027	1,079	6,580	430	7,009
	황화50%	182.6	596	2,301	2,729	5,626	107	5,733
	황화100%	200.9	1,691	2,812	1,624	6,127	853	6,979
GS3181	도복100%	182.6	708	2,616	1,735	5,059	277	5,336
	황화50%	198.9	1,484	2,101	1,830	5,415	644	6,060
	황화100%	210.5	1,440	2,489	1,802	5,731	913	6,645
R44	도복100%	137.5	108	1,988	2,054	4,150	185	4,336
	황화50%	131.0	20	185	3,731	3,936	135	4,071
	황화100%	136.7	0	636	3,001	3,637	884	4,521
F-test 수확시기(H)		-	-	-	-	ns	****	*

■ 수확시기에 따른 구 단면 이미지 정보



- 도복100%에서 황화100%로 갈수록 상품수량이 많아지고 안토시아닌 함량이 높아지면서 단면에 적색이 스며드는 것을 볼 수 있음. 따라서 도복100%보다는 황화100%에 수확하는 것이 좋음.

■ 수확시기에 따른 기능성 함량

품종	수확시기	폴리페놀 (mg/g)	플라보노이드 (mg/g)	퀘르세틴 (mg/g)	DPPH (%)
슈퍼레드	도복100%	29.83 ab	19.98 bc	8.10 bc	75.98 de
	황화 50%	22.61 d	9.25 f	5.57 c	73.15 fg
	황화100%	27.72 bc	19.10 bcd	6.41 c	91.14 b
사라다(적)	도복100%	31.70 a	23.77 a	10.44 ab	75.63 e
	황화 50%	27.56 bc	20.01 bc	6.99 bc	73.77 f
	황화100%	27.73 bc	19.57 bc	7.35 bc	91.32 b
GS3180	도복100%	24.28 cd	14.39 e	5.93 c	72.99 g
	황화 50%	23.20 d	15.46 de	6.23 c	71.29 h
	황화100%	30.28 a	16.30 cde	8.45 bc	91.88 c
GS3181	도복100%	23.87 cd	10.49 f	9.09 bc	71.35 h
	황화 50%	29.76 ab	21.71 ab	7.76 bc	76.63 d
	황화100%	23.16 d	15.21 e	6.42 c	89.10 c
R44	도복100%	26.1b cd	16.62 cde	7.16 bc	73.89 f
	황화 50%	25.25 bcd	17.24 cde	5.96 c	91.24 b
	황화100%	32.48 a	24.20 a	12.18 a	94.72 a
F-test					
품종(C)		*	****	ns	****
수확시기(H)		**	*	ns	****
C×H		****	****	*	****

\* :  $P \leq 0.05$ , \*\* :  $P \leq 0.01$ , ns : not significant

- 수확시기에 따른 기능성함량은, 수확시기가 늦어질수록 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 R44 황화100%, 사라다(적) 도복 100% 및 GS3181 황화50%에서 가장 높은 함량을 나타냈음.

- 상품수량과 수확시기 간의 유의성은 없었으며, GS3180 도복100%, GS3180 황화100%, GS3181 황화100%에서 각각 6,580kg/10h, 6,127kg/10h, 5,731kg/10h순으로 많았음

- 수확시기가 늦어질수록 총 수량성은 증가했으나, 이병구, 설구 등 비상품수량 또한 증가하였음

■ 저장시기에 따른 기능성 함량

- 저장시기가 늦어질수록 폴리페놀, 플라보노이드 및 퀘르세틴이 증가하였으며(<0.0001), R44 저장1개월, R44 저장 3개월, GS3181 저장 3개월 순으로 높았음

■ 9월 양파종자를 파종하여 채종용 모구를 생산·정식한 후 이듬해 2년 차에 대화시켜 종자를 채종함

■ 연구소 교배온실



■ 양파 종자 채종 단계

품종	저장시기	폴리페놀 mg/g	플라보노이드 mg/g	퀘르세틴 mg/g
슈퍼레드	수확직후	27.72 f	19.10 ef	6.41 h
	저장 1개월	38.97 bcd	25.30 bcd	8.37 fgh
	저장 3개월	36.57 cde	29.05 b	12.73 c
사라다(적)	수확직후	31.70 de	23.77 ef	10.44 def
	저장 1개월	37.79 cd	26.79 bc	8.31 fgh
	저장 3개월	35.61 cde	22.72 de	8.61 efg
GS3180	수확직후	30.28 def	16.30 fg	8.45 fgh
	저장 1개월	39.28 bcd	25.98 bcd	9.21 efg
	저장 3개월	38.68 cd	26.49 bc	11.07 cde
GS3181	수확직후	23.16 ef	15.21 g	6.42 gh
	저장 1개월	40.96 abc	27.12 bc	10.29 def
	저장 3개월	42.41 abc	33.39 a	15.61 b
R44	수확직후	32.48 de	24.20 cd	12.18 cd
	저장 1개월	48.23 a	36.86 a	18.31 a
	저장 3개월	44.21 ab	35.50 a	15.18 b
F-test				
품종(C)		*	****	****
저장시기(S)		****	****	****
C×S		ns	**	****

\* : P≤0.05, \*\* : P≤0.01, ns : not significant



■ 1차년도 선발 품종 외 F1 적색 양파 교배품종을 8품종을 육성하여 창녕, 대구 두 지역에서 지역적응성 검정을 실시함

- 창녕

	구경 (mm)	구고 (mm)	구중 (g)	상품수량 (kg/10a)	비상품수량 (kg/10a)	총수량
19C5	84.2	72.6	278.4	8702	202	8904
19C67	77.9	74.3	237.4	8949	481	9429
19C68	736	87.1	246.4	7817	0	7817
19C69	87.2	82	317.9	8987	199	9186
19C70	86.5	86.7	327.1	9625	615	10240
19C71	81.4	72.4	264.4	9564	494	10058
19C72	82.3	82.2	310.4	8301	569	9170
19C73	76.5	82.8	255.2	8029	224	8253
홍반장	83.3	89.1	308.9	10260	112	10372

- 대구

	구경 (mm)	구고 (mm)	구중 (g)	상품수량 (kg/10a)	비상품수량 (kg/10a)	총수량
19C5	80.8	63.7	223.2	7962	226	8188
19C67	81.9	73.8	263.6	7427	71	7499
19C68	75.7	79.1	228.8	6231	59	6290
19C69	80.5	75.7	260.2	7903	321	8223
19C70	86.5	80.6	328	7296	586	7883
19C71	92	68.1	331.6	6544	1125	7669
19C72	89.1	78.4	343.3	8616	349	8964
19C73	85.3	76.4	302.1	7467	214	7681
홍반장	88.8	84.6	346.7	7118	198	7316

■ 19C69, 19C70, 19C71, 19C72는 대비종인 홍반장보다 수량성이 우수하여 2차년도 지역적응성 검정을 실시할 계획임

## 제 8 절 제품의 제조공정 개선 및 신제품 개발

### 가. 기존 제품의 제조공정 개선

개선 전, 후의 제조공정과 제품의 사진은 다음과 같다.

원료 분말	원료 분말
초산 발효	에탄올 추출
반죽	발효
제한	반죽
건조	제한
커팅	건조
포장	커팅
	포장

기존 제조 공정

개선 후 제조공정



### 나. 신제품 개발

#### a. 기능별 과립 제품 개발

적양파, 늪은호박 등 주 원료에 혈행개선, 심혈관질환 개선에 효과가 있는 참당귀, 단삼 등을 부가하여 과립제품을 개발(양파를 발효하다 골드), 출시하였고, 향암, 면역작용에 효과가 있는 것으로 알려진 꽃송이버섯을 추가하여 과립제품을 개발하였다.(만나 꽃송이버섯 골드, 프리미엄-꽃송이버섯의 비율을 달리하여 2건을 개발)

#### b. 캔디 형태 제품 개발

적양파, 늪은호박, 누에, 여주 등 원료를 추출 발효공정을 통해 기능성을 높이고, 휴대와 섭취가 보다 간편한 캔디 형태의 제형으로 제품을 개발하여 출시하였음.(제품명-혈리모)



양파를 발효하다 골드  
(혈행개선, 심혈관질환 개선)



만나 꽃송이버섯 골드



만나 꽃송이버섯 프리미엄



혈리모

c. 샴푸, 헤어젤, 헤어에센스 용 추출액 개발

적양파 추출물, 참당귀 추출물, 늙은 호박 추출물이 동물실험에서 발모효과가 있는 것을 확인하였고, 식품소재의 활용도를 다양화 하기 위하여 위 혼합물들을 샴푸 등 화장품 원료로 개발하였고, 개발한 추출물을 화장품 회사에 납품 하여 OEM 방식으로 샴푸, 헤어젤, 헤어 에센스 등을 개발함.



흑모다 샴푸



흑모다 헤어젤



흑모다 헤어에센스

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

1) 정량적 연구개발성과표

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계 (2017~2021)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
	목표	실적				
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	논문	목표	8			
		실적	6			
	특허출원	목표	5			
		실적	3			
	특허등록	목표	3			
		실적	2			
	품종등록	목표	1			
		실적	0			
	학술발표	목표	6			
		실적	25			
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술이전	계획	2			
		실적	0			
	제품화	계획	4			
		실적	6			
	매출액	목표	250,000			
		실적	120,274			
	고용창출	목표	1			
		실적	0			
	기술인증	목표	1			
		실적	0			
	인력양성	목표	4			
		실적	9			
	홍보전시	목표	2			
		실적	3			
계						

2) 연구개발성과 성능지표

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2017~2021)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1 지표성분 quercetin 함량	mg/ g	20	한국	100	-	100		KP
2 지표성분 decursin, decursinol angelate 함량	mg/ g	20	한국	100	-	100		KP
3 제제의 안정성 (가속시험)	건	10	한국	적합여부	적합여부	100		식약처고시
4 발모촉진효과 (대조약물 대비 효과)	%	25	미국	100	-	80		양모제 효력평가시 험 가이드라인
5 고지혈증 개선효과 (대조약물 대비효과)	%	25	미국	100	-	80		혈행개선 효력평가시 험 가이드라인



(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Preventive effect of Angelica gigas Nakai extract oral administration on dry eye syndrome	Asian Pacific Journal of Tropical Medicine	Younje Lee	11(6)			SCI	2018.04.02	1995-7645	30
2	Bacillus polyfermenticus KJS-2와 참당귀 추출물의 triton WR-1339 유발 고지혈증에 대한 예방효과	생명과학회지	Kang Min Kim	28(6)	대한민국	한국생명과학회	비SCIE	2018.05.22	1225-9918	30
3	Bacillus Subtilis KJ-3를 이용한 생물전환물 및 그 혼합물의 생리활성	생명과학회지	이진영	29(10)	대한민국	한국생명과학회	비SCIE	2019.10.30	1225-9918	70
4	양과 추출물의 in vivo 생리활성에 관한 연구	생명과학회지	이진영	30(3)	대한민국	한국생명과학회	비SCIE	2020.03.31	1225-9918	100
5	C57BL/6 마우스에서 모발성장 촉진에 대한 Allium cepa (red)와 Angelica gigas Nakai의 효과	생명과학회지	이진영	30(11)	대한민국	한국생명과학회	비SCIE	2020.11.30	1225-9918	70
6	Triton WR-1339로 유도된 고지혈증에 대한 Bacillus polyfermenticus KJS-2와 Bacillus mojavensis KJS-3의 예방효과	생명과학회지	이진영	31(3)	대한민국	한국생명과학회	비SCIE	2021.03.31	1225-9918	50

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국원예학회 춘계학술발표회	문진성	2018.05.24.	대전컨벤션센터	대한민국
2	한국생명과학회	동재경, 양우진, 하배진	2018.08.10.	경주 더케이호텔	대한민국
3	한국생명과학회	이진영, 동재경, 양우진, 강재선, 하배진	2018.08.10.	경주 더케이호텔	대한민국
4	한국생명과학회	이진영, 강재선	2018.08.10.	경주 더케이호텔	대한민국
5	한국생명과학회	강현아, 강재선	2018.08.10.	경주 더케이호텔	대한민국
6	한국생명과학회	정유성, 강재선	2018.08.10.	경주 더케이호텔	대한민국
7	한국원예학회	백주희, 문진성, 권진혁	2019.05.23.	경주화백컨벤션센터	대한민국
8	춘계한국원예학회	문진성, 백주희, 이선영, 김희대, 김숙자, 이정미, 권진혁, 홍광표	2019.05.23.	경주화백컨벤션센터	대한민국
9	춘계한국원예학회	문진성, 백주희, 이선영, 김희대, 박귀옥, 박정숙, 권진혁	2019.05.24.	경주화백컨벤션센터	대한민국
10	2019 International Allium Conference	백주희, 문진성, 이종태, 권진혁	2019.07.24.	매디슨, 위스콘신	미국
11	한국생명과학회	정유성, 이진영, 강재선	2019.08.13.	백스코	대한민국
12	한국생명과학회	이진영, 동재경, 하배진	2019.08.13.	백스코	대한민국

13	한국생명과학회	이진영,이윤재,강재선	2019.08.13.	백스코	대한민국
14	한국생명과학회	강현아, 강재선	2019.08.13.	백스코	대한민국
15	한국생명과학회	정유성, 강재선	2019.08.13.	백스코	대한민국
16	한국생명과학회	김아름, 강재선	2019.08.13.	백스코	대한민국
17	한국식품영양과학회	황미선, 이주희, 이진영, 김강민	2019.10.23.	제주컨벤션센터	대한민국
18	한국식품영양과학회	이진영, 동재경, 김미령, 강재선	2019.10.23.	제주컨벤션센터	대한민국
19	한국식품영양과학회	김형수, 황미선, 이주희, 강재선, 이진영	2019.10.23.	제주컨벤션센터	대한민국
20	한국식품영양과학회	이지한, 박재구, 이정준, 김태희, 황병수, 황미선, 이진영, 김강민	2019.10.23.	제주컨벤션센터	대한민국
21	한국식품과학회	송지수, 임준형, 김미령	2020.07.01.	김대중컨벤션센터	대한민국
22	한국생명과학회	김아름, 최시훈, 이승재, 강재선	2020.08.06.	경주더케이호텔	대한민국
23	한국생명과학회	이진영, 강재선	2020.08.06.	경주더케이호텔	대한민국
24	한국생명과학회	정유성, 이승재, 김아름, 구지예, 서문섭, 이후영, 안수민, 강재선	2020.08.06.	경주더케이호텔	대한민국
25	한국식품영양과학회	송지수, 김미령	2020.10.22.	제주컨벤션센터	대한민국

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	유용 미생물을 이용한 적양파의 발효 방법	대한민국	(주)한지	2018.10.24	10-2018-0127743	(주)한지	2020.09.25	10-2160239-0000	100	여	
2	적양파 발효농축물, 호박 추출물 및 참당귀 추출물을 포함하는 탈모방지 또는 발모개선용 조성물 및 이의 제조방법	대한민국	(주)한지	2019.10.31	10-2019-0137134	(주)한지	2021.04.01	10-2237076-0000	100	여	
3	참당귀 추출 분말 및 적양파 발효농축 분말을 포함하는 혈행 개선용 기능성 식품 조성물 및 이의 제조방법	대한민국	(주)한지	2019.10.31	10-2019-0137129						

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									
2	√									
3	√									

## [경제적 성과]

### □ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	기존공정 개선	국내	추출 및 발효공정 응용 공정 개선	천연물로부터 유효물질을 추출하는 기술 및 발효기술을 습득하여 제품생산에 응용함.	(주)한지	30,768		2018	7
2	자기실시	신제품 출시	국내	추출 및 발효공정 응용 제품 개발	천연물의 유효물질 추출기술 응용 제품 개발	(주)한지	5,400		2018	7
3	자기실시	신제품 출시	국내	천연물의 유효물질 추출기술 응용 제품 개발	천연물의 유효물질을 추출하는 기술을 습득하여 양파, 늪은 호박 등 주원료에 기능별 단삼, 참당귀 등을 부가하여 제품 출시	(주)한지	2,938		2018	7
4	자기실시	기존공정 개선	국내	추출 및 발효공정 응용 공정 개선	천연물로부터 유효물질을 추출하는 기술 및 발효기술을 습득하여 제품생산에 응용함.-1차년도 사업화 제품 매출발생	(주)한지	7,513		2019	7
5	자기실시	신제품 출시	국내	천연물 추출 발효공정을 통한 캔디제품 출시	천연물로부터 유효물질을 추출하는 기술 및 발효기술을 습득하여 제품생산에 응용하고 타정공정을 통해 휴대성 편의성을 개선한 제품 개발 및 출시	(주)한지	29,537		2019	10
6	자기실시	신제품 출시	국내	천연물의 유효물질 추출기술 응용 제품 개발	천연물의 유효물질을 추출하는 기술을 습득하여 양파, 늪은 호박 등 주원료에 기능별 단삼, 참당귀 등을 부가하여 제품 출시-1차년도 사업화 매출발생	(주)한지	8,680		2019	7
7	자기실시	기존공정 개선	국내	추출 및 발효공정 응용 공정 개선	천연물로부터 유효물질을 추출하는 기술 및 발효기술을 습득하여 제품생산에 응용함.-1차년도 사업화 제품 매출발생	(주)한지	5,411		2020	7
8	자기실시	신제품 출시	국내	천연물 추출 발효공정을 통한 캔디제품 출시	천연물로부터 유효물질을 추출하는 기술 및 발효기술을 습득하여 제품생산에 응용하고 타정공정을 통해 휴대성 편의성을 개선한 제품 개발 및 출시-2차년도 사업화 제품 매출발생	(주)한지	8,547		2020	10
9	자기실시	신제품 출시	국내	천연물의 유효물질 추출기술 응용 제품 개발	천연물의 유효물질을 추출하는 기술을 습득하여 양파, 늪은 호박 등 주원료에 기능별 단삼, 참당귀 등을 부가하여 제품 출시-1차년도 사업화 매출발생	(주)한지	1,680		2020	7
10	자기실시	기존공정 개선	국내	탈모치료용 화장품용 추출물 소재 사업화	양파, 호박, 당귀 등 원료의 추출 발효물을 화장품 소재로 개발하여 OEM생산 완료.	(주)한지	19,800		2020	15

\* 1) 기술이전 또는 자기실시

\* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

\* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
추출 및 발효공정 응용	2018-2021	120,274		120,274	매출실적합산
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과		제품 출시 및 매출 발생				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3.5				
	소요예산(천원)	900,000				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후		
		120,274	250,000	700,000		
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후	
			국내	0	1.5	5
국외			0	0.5	1	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		본 과제를 통해 개발된 추출, 발효 기술을 응용하여, 탈모 치료에 효과가 있는 샴푸, 헤어젤, 헤어 에센스 등을 개발하였고, 마사지크림 및 입욕제를				
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후		
		0	100,000	300,000		
	수출	0	150,000	500,000		

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2018		2				2			2		
2		2019		1				1			1		
3		2020	1	3			2	2			4		
4		2021		1	1		2				2		

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	중앙일간지 보도	데일리한국	(주)한지, 천연 발모촉진 건강식품 '모왕수 with BIO' 제품화 성공	2019.01.09
2	전시회 참가	Vietfood & Beverage	전시회 참가	2018.08.08.~2018.08.11.
3	전시회 참가	Vietfood & Beverage	전시회 참가	2019.08.07.~2018.08.10.

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

영농활용 : 고기능성 적색양파 발효분말에 적합한 품종과 제조시기

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○적양파 품종선발 및 원료 표준화	○ 퀘세틴 함량과 수량성을 함께 고려하여 본 과제의 적정 품종으로 R25, R33 품종을 선발하였고, 선발된 품종에 대해 수확 시기 및 저장시기를 나누어 구 특성 및 이미지 정보를 구축함.	100
○ 미생물을 이용한 발효 적양파 (적양파 미생물 발효물)의 제조공정 개발	○ 3종의 균주를 적용하여 Quercetin 함량을 최대로 생산할 수 있는 균주를 선정하였고 에탄올 추출물의 발효전환 공정을 통해 quercetin 함량이 증가된 원료 생산	100
○호박 초산 발효물과 참당귀 에탄올 추출정제물(Agnex)의 제조공정 개발	○ 호박 초산발효물은 베타카로틴을 추출하기 위해 다양한 시도를 하였으나 그 함량이 너무 낮아 상품화하기에는 어려움이 있었음. ○ 참당귀 추출정제물은 decursin/decursinol angelate함량이 70%이상 되는 원료 생산 가능.	80
○발효 적양파 혼합물 제조공정 개발	○ in vitro 연구를 통해 유효농도 및 최적의 혼합비율을 설정하여 in vivo 연구 및 제품화에 활용하여 제조공정을 확립하였음.	100
○적양파 미생물 발효물 및 혼합천연물의 기능성 성분 분석	○ 공인시험법 및 validation을 통해 지표성분을 분석하였음	100
○적양파 미생물 발효물 및 혼합천연물의 in vitro 생리활성 검증	○ 혼합물의 세포독성, 항산화, 항염 등의 in vitro 연구 수행하였음.	100
○발효 적양파 혼합물의 최적 발효 조건 확립	○ 실험실 scale에서 pilot생산을 위해 용량을 단계적으로 늘여 가면서 미생물 배지의 혼합 비율, 시간, 온도, 기타 배양조건 등을 설정하여 조건 확립하였음.	100
○발효 적양파 혼합물의 in vitro 생리활성 검증	○각각의 원료와 혼합물의 세포독성, 항산화, 항염 등의 in vitro 연구 수행하였음.	100
○발효 적양파 혼합물의 탈모예방용 혈행개선 기능성, 안전성 검사	○ 혼합물의 혈행개선 기능성 연구 수행완료 하였음. (in vitro, ex vivo, in vivo) ○ 혼합물의 탈모예방 기능성 연구 수행완료 하였음. (in vitro, in vivo)	100
○ 발효 적양파 혼합물의 제형개발 및 일반 건강식품 시제품 개발	○ 기본적으로 분말, 과립제형을 개발하였고, 향후 다른 제품 개발을 위해 가용화제까지 수행하였음.	100
○ 발효 적양파 혼합물 활용한 증상별(항당뇨, 항산화, 여성갱년기증상완화) 제품개발	○ 발효 적양파 혼합물에 증상별 효능을 나타내는 원료를 추가하여(혈행개선, 심혈관질환 : 참당귀, 단삼), 항암, 면역 : 꽃송이버섯)다양한 과립 제품 개발 및 탈모치료용 화장품 소재 개발하여 사업화(샴푸, 헤어젤, 헤어에센스 제품화 완료)	100
○발효 적양파 혼합물의 탈모예방용 혈행개선 기능성 유효성분 분리 정제	○탈모예방용 유효성분 (Agnex) 분리 정제 생산 가능	100
○발효 적양파 혼합물의 탈모예방용 혈행개선 기능성 mechanism 구명	○다양한 탈모 mechanism 중 가장 핵심이 되는 5 $\alpha$ -reductase 활성 억제와 DHT 감소에 관한 mechanism 확인	100
○발효 적양파 혼합물 시제품의 안정성 시험	○가속시험을 통하여 기능성성분의 안정성 시험 완료	100
○발효 적양파 혼합물 시제품의 유효성분의 Method validation 확립	○ method validation을 하여 임상시험을 위한 IRB 승인자료에 첨부하여 승인 받음.	100
○발효 적양파 혼합물 시제품의 제품표준화	○ 제조공정 및 제품표준화를 확립하여 IRB 승인 자료에 사용하였고 임상제품 생산하였음.	100
○발효 적양파 혼합물 탈모예방용 혈행개선 기능성 건강기능식품 임상시험 신청	○ IRB승인을 받아서 임상시험 완료하였음.	100

○발효 적양파 혼합물의 혈행개선에 대한 건강기능식품 개별인정신청

○ 임상시험을 통해 임상시료의 안전성은 확보하였으나, 코로나로 인해 임상시험 참가자 모집의 어려움, 비용의 한계로 인해 충분한 개체 미확보, 시험기간 등으로 유효성을 입증하지 못하였음. 따라서 향후 개선 및 보완을 하여 개별인정신청 가능할 것으로 사료됨.

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 연구 진행과정에서 대부분의 연구는 성실히 수행하여 IRB 승인 후 임상시험까지 완료하였으나, 임상시험 참가자 모집 과정 및 시험 시작시점에서 ‘코로나’ 팬데믹으로 인해 참가자 모집에 어려움이 많았음.
- 시험기관이 코로나 관리 지정병원이 되기도 하였고, 참가자 중에 코로나로 인한 격리상황에 처하기도 하는 등 어려움 속에서도 임상시험을 완료하였음.
- 임상 제품의 안정성은 충분히 확인 되었으나 여러 가지 한계로 유효성을 입증하기는 어려운 것으로 판단 됨. 향후 개선 및 보완을 통해 추가 임상시험 진행하여 개별인정신청이 가능할 것으로 판단됨.

##### 2) 자체 보완활동

○ 임상결과 혈행개선 기능성에 대한 유효성을 입증하지는 못하였지만 본 과제를 통해 습득한 기술을 활용하여 기존 과립제품의 제조공정을 개선하고, 새로운 과립 제품 및 캔디 형태의 제품을 개발하였으며, 개발한 원료를 활용해 달모 치료에 효과가 있는 샴푸, 헤어젤, 헤어에센스 제품을 과제 3차년도 진행 중에 개발하여 판매를 시작하였음. 또한 위 원료를 활용해 마사지크림, 스팀사우나용 입욕제 등 제품을 개발하여 판매 중.



○ 본 과제에서 개발한 원료를 활용하여 향후 여건이 된다면 추가임상 시험을 진행하여 좋은 결과를 도출할 수 있도록 논의 중.

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

- 당초 계획하였던 연구에 대한 부분은 대부분 성실히 수행하였다고 판단됨.
  - 임상시험자 모집 및 임상 진행 시작단계에서 '코로나' 팬데믹으로 인해 임상시험자 모집에 어려움이 많았으며, 해당 임상기관이 코로나 관리 병원으로 지정되기도 하였고, 시험자 중에 코로나로 인한 격리상황에 처하는 등 변수가 많았음에도 불구하고 최선을 다하여 임상시험을 완료하였음.
  - 1차년도부터 CRO기관과 협업하여 과제를 진행하면서 연구결과 공유를 하여 최선의 결과를 도출하기 위해 노력하였고, 지리적인 한계(부산-전라도)에도 불구하고 주기적인 회의를 통해 여러 가지 부분을 논의하면서 진행하였음.
  - 코로나 상황에서도 주관기관, 참여기관 및 CRO기관이 Zoom을 활용한 비대면 회의를 주기적으로 진행하였음.
  - 참여기관 (신라대학교)의 경우 당초 연구책임자였던 하배진 교수님의 정년퇴임으로 연구책임자가 김미령 교수님으로 전환되는 상황이 있었지만 순조로운 인수인계를 통해 과제를 끝까지 잘 마무리 할 수 있었음.
- 

### 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 비록 임상시험에서 유의미한 결과를 얻지는 못 하였지만, 동물실험을 통해 유효성과 안정성을 충분히 확보하였으므로, 향후 개선 및 보완으로 기능성식품 허가를 받을 수 있을 것이라 생각되고 혈행개선으로 개선 내지 치료를 기대할 수 있는 다른 질병에 대한 식품 개발도 가능하므로 향후 건강식품산업의 발전에 이바지 할 수 있을 것이라 생각된다.
  - 발모 내지 탈모 치료는 건강기능식품 허가를 받을 수는 없지만, 본 과제를 통해 개발된 원료 및 기술을 활용하여 샴푸, 헤어젤, 헤어에센스 등 화장품류로 제품을 개발 하여 출시하였고, 이로써 본 과제에서 주 목표였던 식품 산업 이외에 화장품 산업의 발전에도 기여할 수 있을 것이라 생각된다.
  - 저장성이 낮은 양파 등 우리 농산물을 활용하여 고 기능성 식품, 화장품류의 소재 및 제품으로 개발함으로써 농가소득 증대와 관련 산업의 발전에 기여 할 수 있을 것이라 판단된다.
- 

### 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

#### 1. 제품화

- 객관적, 과학적 연구결과를 바탕으로 한 신뢰할 수 있는 혈행개선 제품 출시

현재 과대광고나 방문판매 등의 방식으로 진행되는 혈행개선과 관련된 식의약품은 넘쳐나고 있다. 이러한 방식의 문제점이 사회적으로 대두됨과 동시에 소비자들의 정보습득능력이 향상되면서 과학적 연구를 통해 객관적 사실을 근거로 한 효능을 가진 제품으로 소비자들에게 접근해야 한다. 따라서 본 과제를 통해 많은 연구를 진행하였고, 다양한 실험을 통해 그 유효성을 확인한 만큼, 그 결과물을 바탕으로 객관적이고 과학적인 혈행개선 식품을 제품화할 것이며, 다양한 제형으로 제품을 개발 할 것이다.

- 등록 특허를 바탕으로 기술우수성 홍보

본 연구로 도출된 특허가 2건(2018년-유용 미생물을 이용한 적양파의 발효 방법, 2021년-적양파 발효농축물, 호박추출물 및 참당귀 추출물을 포함하는 탈모방지 또는 발모개선용 조성물 및 이의 제조방법) 등록이 되었다. 등록된 특허는 향후 20년간 권리보호가 가능하며 실험을 통해 유효성을 충분히 확인하였으므로, 기술의 우수성을 적극적으로 홍보에 활용하여 판매를 촉진 할 수 있도록 할 것이다.

---

2. 혈행개선 건강기능식품 허가를 위한 추가연구

본 과제에서 수행한 혈행개선에 관한 임상시험에서는 여러 가지 한계로 유효성을 입증하기는 어려웠지만, 비임상시험에서는 그 유효성을 확인한 바 있으므로, 향후 임상시험에서 유효성의 입증에 어려웠던 원인을 심층적으로 분석하고 개선·보완을 통해 추가 임상시험을 수행하여 좋은 결과를 도출 할 수 있도록 할 것이다.

3. 관련연구활용

○ 기 연구결과물을 이용한 혈전, 당뇨 및 동맥경화 등 관련 분야로 연구영역 확대

혈행개선은 그 자체로도 중요한 효능이지만 혈전, 당뇨, 동맥경화 등 혈행개선과 연관된 다양한 질환이 있다. 따라서 혈행개선을 통한 이러한 질환의 개선 및 치료를 충분히 기대할 수 있으리라 판단되며, 향후 연구의 분야를 순환계질환으로 넓혀갈 계획이다.

○ 발모에 효과 적인 제품의 개발 및 판매 증대를 위한 성과의 활용 계획

동물 실험을 통해 발모에 효과가 있음을 확인하였고, 특허 등록도 완료되었으나, 식약처에 발모 효과와 관련하여서는 기능성식품 허가를 받는 것은 어려운 문제점이 있다. 이에 주관기관에서는 그 기술을 응용하여 다른 형태의 제품(샴푸, 헤어젤, 에센스)을 개발하여 출시하였고 이러한 파생 제품을 활용하여 향후 발모효과를 가지는 식품 제품의 개발 및 판매 촉진에 활용할 계획이다.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE		
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE	1	
	계	1	
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계	1	
인력양성	학사		
	석사	2	
	박사	1	
	계	3	
사업화	상품출시	2	
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			



## 붙임. 참고문헌

1. Ahn, .K.S., Sim, W.S. and Kim, I.H.. 1996. Decursin: a cytotoxic agent and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigas*. *Planta. Med.* 62, 7–9.
2. Ahn, M.J., Lee, M.K., Kim, Y.C. and Sung, S.H. 2008. The simultaneous determination of coumarines in *Angelica gigas* root by high performance liquid chromatography–diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 46, 258–266.
3. An, B.J., Lee, J.T., Kwak, J.H., Park, J.M., Lee, J.Y. and Park, T.S. 2004. Physiological activities of pumpkin(*Cucurbita moschata* Duch) extract. *Kor. J. Herbology.* 19, 1–7.
4. An, S.J. and Kim, M.K. 2001. Effect of dry powders, ethanol extracts and juices of radish and onion on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *J. Nutr. Health.* 50, 313–324.
5. Bae, E.A., Han, M.J., Kim, N.J. and Kim, D.H. 1998. Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 990–992.
6. Bakhsh, R. and Khan, S. 1990. Influence of onion (*Allium cepa*) and chaunga (*Caraluma tubercula*) on serum cholesterol, triglycerides, total lipids in human subject. *Sarhad. J. Agric.* 6, 425–428.
7. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 26, 1199–1200.
8. Chung, M.J., Walker, P.A., Brown, R.W. and Hogstrand, C. 2005. Zinc-mediated gene expression offers protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 225–236.
9. Davies, F. and Maloney, A.J. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 2, 1403.
10. Davis, W.B. 1947. Determination of flavonones in citrus fruits. *Anal. Chem.* 19, 476–478.
11. Folin, A.D. and Denis, W. 1915. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenolderivatives) in urine. *J Biol Chem.* 22, 305–308.
12. Granger, D.L., Taintor, R.R., Boockvar, K.S. and Hibbs, J.J. 1996. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods. Enzymol.* 268, 142–151.
13. Heo, J.S., Cha, J.Y., Kim, H.W., Ahn, H.Y., Eom, K.E., Heo, S.J. and Cho, Y.S. 2010. Bioactive materials and biological activity in the extracts of leaf, stem Mixture and root from *Angelica gigas* Nakai. *J. Life Sci.* 20, 750–759.
14. Hermann, K. 1976. Flavonoids and flavones in food plants: a review. *J. Food Tech.* 11, 433–488.
15. Ippouchi, K., Ito, H., Azuma, K. and Higashio, H. 2002. Effect of naturally occurring organosulfur compounds on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Life Sci.* 71, 411–419.
16. Kang, S.Y., Lee, K.Y., Sung, S.H., Park, M.J. and Kim, Y.C. 2001. Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase structure–activity relationships. *J. Nat. Prod.* 64, 683–685.
17. Kang, Y.H., Cha, H.S., Kim, H.M. and Park, Y.K. 1997. The nitrite scavenging and electron donating ability of pumpkin extract. *Kor. J. Food Nutr.* 10, 31–36.
18. Kendler, B.S. 1987. Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their

relationship to cardiovascular disease. *Prev. Med.* 16, 670–685.

19. Kim, K.M., Jung, J.Y., Hwang, S.W., Kim, M.J. and Kang, J.S. 2009. Isolation and Purification of decursin and decursinol Angelate in *Angelica gigas* Nakai. *J. Kor. Sci. Nutr.* 38, 653–656.

20. Kim, M.J., Hong, C.O., Nam, M.H. and Lee, K.W. 2011. Antioxidant effects and physiological activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) extract from different aerial parts. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 43, 195–199.

21. Kim, S.K. and Kim, M.K. 2004. Effect of dried powders or ethanol extracts of onion flesh and peel on lipid metabolism, antioxidative and antithrombogenic capacities in 16-month-old rats. *Kor. J. Nutr.* 37, 623–632.

22. Kim, S.O. and Lee, M.Y. 2001. Effects of ethylacetate fraction of onion on lipid metabolism in high cholesterol-fed rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 30, 673–678.

23. Marcocci, L., Maguire, J.J. and Packer, L. 1994. Nitecapone: a nitric oxide radical scavenger. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34, 531–541.

24. Lee, B., Jung, J.H. and Kim, H.S. 2012. Assessment of red onion on antioxidant activity in rat. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3912–3919.

25. Lee, B.K., Lee, D.S., Ha, S.Y., Park, S.W. and Jung, Y.S. 2014. Anti-platelet effects of mixtures of onion and aloe extract. *YakhakHoeji.* 58, 322–327.

26. Lee, H.J., Do, J.R., Kwon, J.H. and Kim, H.K. 2010. Physiological activities of *Cucurbita moschata* Duch. extracts with different extraction conditions. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39, 165–171.

27. Lee, H.J., Lee, K.H., Park, E.J. and Jung, H.K. 2010. Effect of onion extracts on serum cholesterol in borderline hypercholesterolemic participants. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39, 1783–1789.

28. Lee, L.S., Choi, E.J., Kim, C.H., Kim, Y.B., Kum, J.S. and Park, J.D. 2014. Quality characteristics and antioxidant properties of black and yellow soybeans. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 46, 757–761.

29. Lee, S.H., Lee, Y.S., Jung, S.H., Shin, K.H., Kim, B.K. and Kang, S.S. 2003. Anti-tumor activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas*. *Arch. Pharm. Res.* 26, 727–730.

30. Lee, S.H., Shin, D.S., Kim, J.S., Oh, K.B. and Kang, S.S. 2003. Antibacterial coumestrols from *Angelica gigas* roots. *Arch. Pharm. Res.* 26, 449–452.

31. Lee, Y.H. and Lim, E.M. 2013. Anti-inflammatory effect of *Ligustri lucidi fructus* water extract in RAW 264.7 cells by LPS. *J. Kor. Obstet. Gynecol.* 26, 66–81.

32. Lee, Y.R., Hwang, I.G., Woo, K.S., Kim, D.J., Hong, J.T. and Jeong, H.S. 2007. Antioxidative activities of the ethyl acetate fraction from heated onion (*Allium cepa*). *Food Sci. Biotechnol.* 16, 1041–1045.

33. Leighton, T., Ginther, C., Fluss, L., Harter, W.K., Cansado, J. and Nortario, V. 1991. Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in allium vegetables. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*. ACS, Washington, DC, USA. 220.

34. Li, L., Li, W., Jung, S.W., Lee, Y.W. and Kim, Y.H. 2011. Protective Effects of Decursin and Decursinol Angelate against Amyloid  $\beta$ -Protein-Induced Oxidative Stress in the PC12 Cell Line: The Role of Nrf2 and Antioxidant Enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 434–442.

35. Lu, X.L., Zhao, C.H., Yao, X.L. and Zhang, H. 2017. Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* 85, 658–671.
36. Moon, J.S., Kim, H.D., Ha, I.J., Lee, S.Y., Lee, J.T. and Lee, S.D. 2010. Chemical component of red onion (*Allium cepa* L.) according to cultivars and growing areas. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28, 921–927.
37. Park, G.Y., Li, H.S., Hwang, I.D. and Cheong, H.S. 2006. The functional effects of fermented pine needle extract. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 21, 378–383.
38. Park, Y.M., Wom, J.H., Yun, K.J., Ryu, J.H., Han, Y.N., Choi, S.K. and Lee, K.T. 2006. Preventive effect of *Gingko biloba* extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 985–990.
39. Rha, Y.A., Choi, M.S. and Park, S.J. 2014. Antioxidant and anti-adipogenic effects of fermented *Rhus verniciflua*. *Kor. J. Culinary. Res.* 20, 137–147.
40. Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152–159.
41. Ryu, K.S. and Yook, C.S. 1967. Studies on the coumarins of the root of *angelica gigas* Nakai. *Yakhakhoeji.* 11, 22–26.
42. Shon, M.Y., Choi, S.D., Kahng, G.G., Nam, S.H. and Sung, N.J. 2004. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food Chem. Toxicol.* 42, 659–666.
43. Yoon, S.B., Han, H.S. and Lee, Y.J. 2011. Effect of *Scutellariae radix* extract on the proinflammatory mediators in RAW 264.7 cells induced by LPS. *Kor. J. Herbol.* 26, 75–81.
44. Yim, D.S., Singh, R.P., Agarwal, C., Lee, S.Y. and Chi, H.J. 2005. A novel anticancer agent, decursin, induces G1 arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 65, 1035–1044.
45. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro methods. *Enzymology* 105, 121–126.
46. Dallob, A. L., Sadick, N. S., Unger, W., Lipert, S., Geissler, L. A., Gregoire, S. L., Nguyen, H. H., Moore, E. C. and Tanaka, W. K. 1994. The effect of finasteride, a 5 $\alpha$ -reductase, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 703–706.
47. Fridovich, I. 1986. Biologic effects of the superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 1–15.
49. Gloire, G., Legrand-Poles, S. and Piette, J. 2006. NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493–1505.
50. Hamada, K. and Suzuki, K. 1996. Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice. *Exp. Anim.* 45, 251–256.
51. Hamamoto, T. and Mori, Y. 1989. Sulfation of minoxidil in keratinocytes and hair follicles. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 66, 33–44.
52. Handjiski, B. K., Eichmüller, S., Hofmann, U., Czarnetzki, B. M. and Paus, R. 1994. Alkaline phosphatase activity and localization during the murine hair cycle. *By. J. Dermatol.* 131, 303–310.
53. Iida, M., Ihara, S. and Matsuzaki, T. 2007. Hair cycle-dependent changes of alkaline

phosphatase activity in the mesenchyme and epithelium in mouse vibrissal follicles. *Dev. Growth Differ.* 49, 185–195.

54. Jung, J. E. and Cho, E. J. 2014. Protective effects of *Zizyphus jujuba* and fermented *Zizyphus jujuba* from free radicals and hair loss. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 43, 1174–1180.

55. Kang, J. H. 2018. Characterization of *Bacillus subtilis* KJ-3 and bioconversion of ginseng saponin. Master's thesis, Kyungsung University, Busan, Korea.

56. Kaufman, K. D., Olsen, E. A., Whiting, D., Savin, R., DeVillez, R., Bergfeld, W., Prove, V. H., Neste, D. V., Robert, J. L., Hordinsky, M., Shapiro, J., Biokowitz, B. and Gormley, G. J. 1998. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. *J. Am. Acad. Dermatol.* 39, 578–589.

57. Kim, K. M., Jung, J. Y., Hwang, S. W., Kim, M. J. and Kang, J. S. 2009. Isolation and Purification of decursin and decursinol Angelate in *Angelica gigas* Nakai. *J. Kor. Sci. Nutr.* 38, 653–656.

58. Kim, S. K. and Kim, M. K. 2004. Effect of dried powders or ethanol extracts of onion flesh and peel on lipid metabolism, antioxidative and antithrombogenic capacities in 16-month-old rats. *Kor. J. Nutr.* 37, 623–632.

59. Lee, S. H., Lee, Y. S., Jung, S. H., Shin, K. H., Kim, B. K. and Kang, S. S. 2003. Anti-tumor activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas*. *Arch. Pharm. Res.* 26, 727–730.

60. Lee, S. H., Shin, D. S., Kim, J. S., Oh, K. B. and Kang, S. S. 2003. Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Arch. Pharm. Res.* 26, 449–452.

61. Lee, Y. J. and Lee, J. Y. 2007. Clinical analysis and treatments for androgenetic alopecia of men. *J. Kor. Soc. Cosm.* 13, 799–810.

62. Li, L., Li, W., Jung, S. W., Lee, Y. W. and Kim, Y. H. 2011. Protective effects of decursin and decursinol angelate against amyloid  $\beta$ -protein-induced oxidative stress in the PC12 cell line: The role of Nrf2 and antioxidant enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 434–442.

63. Liu, J., Kurashiki, K., Shimizu, K. and Kondo, R. 2006. 5 $\alpha$ -reductase inhibitory effect of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. *Biol. Pharma. Bull.* 29, 392–395.

64. Lowry, O.H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. S. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 256–261.

65. Lu, X. L., Zhao, C. H., Yao, X. L. and Zhang, H. 2017. Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* 85, 658–671.

66. Mitsui, S., Ohuchi, A., Hotta, M., Tsuboi, R. and Ogawa, H. 1997. Genes for a range of growth factors and cyclin-dependent kinase inhibitors are expressed by isolated human hair follicles. *British J. Dermatol.* 137, 693–698.

67. Moon, J. S., Kim, H. D., Ha, I. J., Lee, S. Y., Lee, J. T. and Lee, S. D. 2010. Chemical component of red onion (*Allium cepa* L.) according to cultivars and growing areas. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28, 921–927.

68. Moore, T., Carbajal, S. and Beltran, L., Perkins, S. N., Yakar, S., Leroith, D., Hursting, S. D. and Digiovanni, J. 2008. Reduced susceptibility to two-stage skin carcinogenesis in mice with low circulating insulin-like growth factor I levels. *Cancer Res.* 68, 3680–3688.

69. Nam, S. Y., Moon, J. H., Yun, Y. W., Baek, I. J., Yon, J. M., Ryu, K. C. and Lee, B. J.

2004. Effect of NDM hair tonic on hair growth promotion in C57BL/6 mice. *Yakhak Hoeji* 48, 122–129.
70. Paglia, E. D. and Valentine, W. N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
71. Paus, R. and Cotsarelis, G. 1999. The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* 341, 491–497.
72. Peters, K., Syuss, D. and Waddell, N. 1996. Hair loss prevention, pp. 1–3, 1st ed., Apple Tree Publishing Co. Ltd., Vancouver, Canada.
73. Perry, J. J., Shin, D. S., Getzoff, E. D. and Tainer, J. A. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1804, 245–262.
74. Ryu, E. M. and Shin, H. J. 2011. Hair growth effect of ethyl acetate and water fractions of *Sparassis crispa* extracts on hair-removed C57BL/6 mice. *Asian J. Beauty and Cosmetol.* 9, 295–304.
75. Ryu, K. S. and Yook, C. S. 1967. Studies on the coumarins of the root of *angelica gigas* Nakai. *Yakhakhoeji* 11, 22–26.
76. Segara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D. and Mahher, P. 1998. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1375–1389.
77. Shon, M. Y., Choi, S. D., Kahng, G. G., Nam, S. H. and Sung, N. J. 2004. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food Chem. Toxicol.* 42, 659–666.
78. Tang, L., Bernado, O., Bolduc, C., Lui, H. and Shapiro, J. 2003. The expression of insulin-like growth factor 1 in follicular dermal papillae correlates with therapeutic efficacy of finasteride in androgenetic alopecia. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, 229–233.
79. Tobin, D. J., Hagen, E., Botchkarev, V. A. and Paus, R. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J. Invest. Dermatol.* 111, 941–947.
80. Tsuji, Y., Denda, S., Soma, T., Raftery, L., Momoi, T. and Hibino, T. 2003. A potential suppressor of TGF- $\beta$  delays catagen progression in hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 8, 65–68.
81. Trüed, R. M. 2001. The value of hair cosmetics and pharmaceuticals. *Dermatol.* 202, 38–45.
82. Zappacosta, A. R. 1980. Reversal of boldness in patient receiving minoxidil for hypertension. *N. Eng. J. Med.* 303, 1480–1481.

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업 유용 미생물을 활용한 탈모치료용 혈행 개선식품 핵심소재 발굴 및 산업화 기술개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.