

11-1543000-002864-01

황금찰수수
이용한
발모촉진제
원료소재
및
제품개발
최종보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

보안과제(), 일반과제() / 공개(), 비공개()

농식품연구성과후속지원사업 제2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002864-01

황금찰수수를 이용한 발모촉진제 원료 소재 및 제품 개발 최종보고서

2019.07.31.

주관연구기관 / 주식회사 두웰바이오
협동연구기관 / 제주대학교산학협력단

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “황금찰수수를 이용한 발모촉진제 원료 소재 및 제품 개발”(개발기간 : 2018. 4. 30 ~ 2019. 4. 29)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 04. 29.

주관연구기관명 : (주)두웰바이오

대표 최 송 암



협동연구기관명 : 제주대학교산학협력단

단장 도 양 회



주관연구책임자 : 최 송 암

협동연구책임자 : 이 영 재

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

〈보고서 요약서〉

보고서 요약서

과제고유번호	818007-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.30. ~ 2019.04.29	단 계 구 분	(1) / (1)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	2018년도 농식품연구성과후속지원사업 (벤처창업바우처지원)			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	황금찰수수를 이용한 발모촉진제 원료 소재 및 제품 개발			
연구책임자	최송암	해당단계 참여연구원 수	총: 9명 내부: 2명 외부: 7명	해당단계 연구개발비	정부: 95,000천원 민간: 32,000천원 계: 127,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 9명 내부: 2명 외부: 7명	총 연구개발비	정부: 95,000천원 민간: 32,000천원 계: 127,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)두웰바이오 천연의약연구소			참여기업명: 해당 없음	
국제공동연구	상대국명: 해당 없음			상대국 연구기관명: 해당 없음	
위탁연구	연구기관명: 제주대학교산학협력단			연구책임자: 이영재 교수	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제
----------------------	------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	투고중	특허출원 10-2018- 0082356 특허출원 10-2019- 0054152	등록								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(500자 이내)

식용 잡곡 작물인 황금찰수수는 다양한 항산화성 phenolic compound와 flavonoid 성분들을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 선행 연구를 통해서 모유두세포의 분화촉진 및 발모촉진 효과에 대한 가능성을 확인한 바 있음.

본 과제를 통해 황금찰수수를 이용한 본격적인 발모촉진제 원료 소재화 및 제품화를 위한 과학적인 근거자료를 확보하기 위하여 세포실험 및 동물모델 실험을 통해서 발모촉진 활성평가와 작용기전 연구, 발모촉진 활성성분의 분리동정 및 분석법 개발 연구를 진행하여 발모촉진제 제품화를 위한 기초 자료를 확보하였으며, 원료 소재의 추출조건 확립과 식품 및 화장품 시제품 제조 공정을 확립하고 시제품 제작을 완료하여 사업화의 기반을 마련하였음.

또한, 본 과제의 성공적인 수행을 통해 특허출원, 학회 발표와 문헌 투고 실적을 달성하였으며, 향후 본격적인 사업화를 통하여 매출 확보와 인재 채용 등의 가시적인 사업화 성과를 도출할 계획임.

보고서 면수: 55쪽

〈요약문〉

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 과제는 식용 잡곡 작물인 황금찰수수를 원료 소재로 활용하여 만성 난치성 탈모 증상의 개선을 위한 발모촉진용 원료 소재를 개발하고 이를 함유하는 안전성이 확보된 피부 외용 화장품 제형 개발을 목표로 하였다.</p> <p>황금찰수수는 다양한 항산화성 phenolic compounds와 flavonoids 성분들을 함유하고 있으며, 선행 연구를 통해 동물에서의 발모촉진효과, 모발성장인자인 KGF 발현양 증가 효과, 모유두세포 분화 촉진 효과 등을 확인한 바 있으며, 본 과제에서는 황금찰수수를 이용한 본격적인 원료 소재화를 위한 과학적인 근거자료를 확보하기 위하여 연구수행기관을 활용하여 세포실험 및 동물모델 실험을 통하여 발모촉진 활성 평가와 Wnt/β-catenin신호조절과 관련한 작용 기전 연구, 발모촉진 활성성분의 분리 동정 및 분석법 개발 연구를 진행하여 발모촉진제 제품화를 위한 기초 자료를 확보하였다.</p> <p>또한, 본 과제를 통해 추출공정 확립, 원료소재의 표준화 및 규격화, 추출조건 확립 및 추출물 대량 제조, 시제품 제조, 원료소재 및 완제품의 기준 규격 설정, 안정성평가를 통해서 피부 외용 화장품의 제품화를 완료하였다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>1) 학술발표 1건 2) 문헌투고 1건 3) 특허출원 2건 4) GLP기관((주)크로엔) 피부안정성시험 1건 완료 5) 시제품제작: 식품 1종 및 피부 외용제 4종 제조</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 난치성 질환인 탈모개선용 신규 발모촉진제 원료소재 및 발모촉진제 제품 개발 - 단순 식용 잡곡을 이용하여 발모 촉진에 효과적이며 합리적인 가격경쟁력을 가진 원료 소재 및 제품화를 통한 고부가가치 사업화 아이টে็ม으로 활용 - 장기적으로 임상시험 결과를 확보하여 탈모완화 기능성에 대한 식약처의 기능성화장품 인증을 획득하여 공신력을 확보하고 마케팅 효과를 극대화하며, 경구용 발모촉진제 기능성식품으로의 후속 개발을 추진하기 위한 근거자료로 활용 - 단순 식용 잡곡을 원료 소재로 활용하여 농가의 신규 소득자원화 및 부가가치 창출이 기대됨 - 만성 난치성 탈모 질환의 효과적인 개선을 통한 국민보건익으로 및 삶의 질 향상 효과 - 연구결과의 문헌발표 및 지적재산권 확보를 통해 발모촉진제 및 탈모개선제 개발을 위한 이론적 근거 제시를 통한 효율적인 치료기술 확산 - 연구과제 수행을 위한 연구개발 인력, 제품화에 필요한 생산인력, 사업화에 필요한 영업/마케팅 인력의 신규채용을 통한 고용창출 효과 기대 - 향후 NET 등 신기술 인증을 통한 공신력 확보 및 식약처 기능성화장품 등록 등으로 후속 연구개발 추진 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>황금찰수수</p>	<p>모발</p>	<p>발모</p>	<p>원료</p>	<p>제형</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Hwanghumchal sorghum</p>	<p>hair</p>	<p>hair growth</p>	<p>raw material</p>	<p>formulation</p>

〈본문목차〉

목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	13
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	48
4. 연구결과의 활용 계획 등	50
붙임. 참고 문헌	51

〈별첨〉 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 탈모란 생리적으로 털이 빠지는 것으로, 일반적으로 모발은 성장기(3년)-퇴행기(3주)-휴지기(3개월)의 성장주기를 가지는데, 휴지기의 털이 자연스럽게 탈락되는 자연탈모와 발열성 질병, 임신, 정신적 스트레스 등의 원인에 의해서 성장기의 털이 갑자기 휴지기에 들어가 많이 빠지는 비정상적인 탈모로 구분됨.
- 모발의 성장은 보통 15-30세 사이에 가장 활발하여 40-50세에 점진적으로 퇴보되며, 50세 이상이 되면 노화에 의한 자연스런 탈모가 일어나기 시작하여 70세 이후부터는 탈모가 빨라짐. 하루에 보통 50-100개 정도의 정상적인 퇴행기 탈모가 일어나는데 이를 초과하여 빠질 경우에는 원인과 증상에 따른 탈모를 의심할 필요가 있음.



- 모발과 두피를 관리하고 보호를 해 준다는 것은 결국 모발을 지속적으로 건강한 상태로 유지시켜 주는 것이 핵심임. 손상된 모발은 영양 공급을 통해 건강하게 복구시켜 주고, 자라나는 모발에 대해서는 튼튼하게 성장하면서 잘 빠지지 않게 하는 것임. 탈모 관리가 곧 헤어 케어의 궁극적인 목표임. 따라서 탈모방지나 개선을 위한 헤어 제품은 모발 관리, 두피 관리, 탈모 관리까지 포함하는 개념으로 볼 수 있음.
- 최근에는 산업화로 인한 각종 스트레스로 인해 탈모를 겪는 경우가 부쩍 늘어났는데, 이에 따라 기능성을 강조하는 헤어 제품의 추세에 따라 탈모 방지 제품이 조명을 받고 있음. 주로 홈케어 제품으로 만들어지고 있으며 제품의 특징에 따른 마케팅적인 요소가 매출의 많은 부분을 차지하고 있음.
- 현재 FDA 승인을 받고 시판되는 발모촉진제 의약품은 Minoxidil과 Finasteride 성분의 제품 이외에는 전무함. Minoxidil의 경우 당초 고혈압치료제로 개발된 성분으로 아직 정확한 발모촉진 기전에 대한 설명은 미흡한 실정이며 혈관확장 및 칼륨통로를 통한 혈류촉진이 주요한 작용기전으로 이해되고 있으며, 보통 6개월~12개월 이후에 모발성장효과가 나타나기 시작하지만 사용자의 약 4.4%에서 성욕감퇴, 발기부전, 정액량 감소 등의 부작용이 발생하는 것으로 보고됨.



Finasteride의 경우는 전립선비대증치료제로 개발된 약품으로서 5α -reductase 효소를 억제함으로써 남성 호르몬인 testosterone이 불활성형인 DHT로 전환되는 것을 억제함으로써 2년간 투여하면 약 80%에서 모발성장 효과가 발휘되지만, 두피가려움증, 홍반, 표피 건성화, 피부염, 체중증가, 부종, 심박수증가, 협심증 등의 부작용 발생이 보고되고 있음.

*주요 시판 제품의 부작용 발생 현황

Minoxidil	Finasteride
-입술, 혀, 안면, 목 부종 (swelling of the lips, tongue, throat)	-알리지 증상: 입술, 혀, 안면, 목 부종 (swelling of the lips, tongue, face, throat),
-두드러기 (hives), 가려움증 (itching)	-두드러기 (hives)
-호흡곤란 (difficulty breathing)	-남성 유방암 증상: 유방 종괴 (breast lumps), 통증 (pain), 유두분비물 (nipple discharge)
-머리가 어찢한 증상 (lightheadedness)	-발기부전 (Impotence), 성욕감퇴 (loss of interest in sex)
-불규칙한 심박동 (irregular heartbeat)	-어지러움 (dizziness), 두통 (headache), 콧물 (runny nose), 피부발진 (skin rash)
-어지러움 (dizziness), 가슴통증 (chest pain), 두통 (headache)	
-홍반 (redness), 건조 (dryness)	
-두피박편 (flaking of the scalp)	

- 이들 기존 발모촉진제들이 모발 성장 효과를 유지하기 위해서는 평생 동안 지속적으로 복용이 요구되고 있으며, 중단하면 4~6개월 후에는 치료 이전의 상태로 복귀하며 남성의 성기능 장애, 가임 여성의 기형아 출산 등은 매우 중대한 부작용으로 알려짐.
- 이러한 배경 위에서 다양한 천연물 소재로부터 발모촉진제를 개발하기 위한 시도들이 많이 진행되었으나, 하수오, 사삼, 산삼배양근, 꽃송이버섯, 골쇄보, 상황버섯 등의 소재들에서 발모촉진 효과가 발휘됨이 문헌으로 발표된바 있으나, 기존 minoxidil 대비 유사하거나 다소 낮은 수준의 발모 효과를 보이며 근원적인 발모 촉진 작용 기전에 대한 설명이 부족한 현실임. 따라서 장기간 투여에도 부작용의 우려가 없는 안전한 발모촉진용 소재 개발에 대한 needs는 매우 높은 상황임.

식물 추출물	효능 효과	참고문헌
하수오	모발성장, 진피 두께, 모낭 수, 모낭 길이 증가, ALP, γ -GT 활성, IGF-1, mRNA, SCF발현	이경미등, 2010
사삼	발모현상, 모낭수 증가, 모발 수 및 굵기 증가, 분포 조밀	이연미, 2008
산삼배양근	모발성장, VEGF, IGF-1 높은 발현, 비듬균(Malassezia furfur)에 항균 효과	안규성, 2010
꽃송이버섯(물분획물)	발모, 모낭 수, 모낭길이 증가	류은지와 신현재, 2011
DCS-HT* (상백피: 하수오: β -sitosterol)	ALP, γ -GT 활성, IGF-1, TGF- β 의 높은 발현	이혜숙과 황석연, 2009
골쇄보	발모 효과, 피하층에 모낭 관찰	정석영, 2007
상황버섯	모발성장 및 혈중 testosterone, DHT 감소	김유나, 2012

- 최근의 연구에서 JAK/STAT signaling을 억제하면 발모가 촉진된다는 문헌 발표가 늘어나고 있으며, 많은 개발자들이 이 기전을 통한 발모촉진제 개발에 몰두하고 있음.

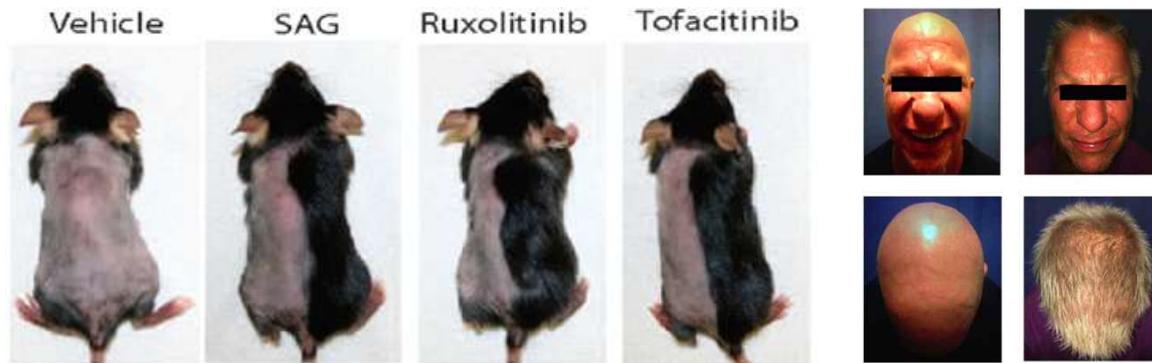
JAK-STAT Signaling Jump Starts the Hair Cycle



Etienne Wang¹, Sivan Harel¹ and Angela M. Christiano²

Legrand et al show that JAK/STAT5 signaling in the dermal papilla is required for anagen onset in the murine hair cycle. Interestingly, others have shown that JAK-inhibition is able to induce telogen-to-anagen transition in wild-type mice. This apparent contradiction highlights the complexity of interactions within the hair follicle, and encourages further discussion on the role of JAK-STAT signaling in the various stem cell niches of the hair follicle.

Journal of Investigative Dermatology (2016) 136, 2131–2132. doi:10.1016/j.jid.2016.07.031



RESEARCH ARTICLE

CLINICAL MEDICINE

Pharmacologic inhibition of JAK-STAT signaling promotes hair growth

Sivan Harel,¹ Claire A. Higgins,^{1*} Jane E. Cerise,¹ Zhenpeng Dai,¹ James C. Chen,^{1,2} Raphael Clynes,¹ Angela M. Christiano^{1,3†}

Several forms of hair loss in humans are characterized by the inability of hair follicles to enter the growth phase (anagen) of the hair cycle after being arrested in the resting phase (telogen). Current pharmacologic therapies have been largely unsuccessful in targeting pathways that can be selectively modulated to induce entry into anagen. We show that topical treatment of mouse and human skin with small-molecule inhibitors of the Janus kinase (JAK)–signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway results in rapid onset of anagen and subsequent hair growth. We show that JAK inhibition regulates the activation of key hair follicle populations such as the hair germ and improves the inductivity of cultured human dermal papilla cells by controlling a molecular signature enriched in intact, fully inductive dermal papillae. Our findings open new avenues for exploration of JAK-STAT inhibition for promotion of hair growth and highlight the role of this pathway in regulating the activation of hair follicle stem cells.

2015 © The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. Distributed under a Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC). 10.1126/sciadv.1500973

- 당사의 선행 연구에서 ‘황금찰수수’ 추출물은 JAK/STAT 신호전달을 유의적으로 억제함이 확인되었으며, 동물모델을 이용한 예비실험에서 발모촉진 효과를 발휘함을 확인하여 발모촉진제 개발의 유용한 소재로서의 가능성을 확인하였음.
- 본 과제에서는 최신의 발모촉진 기전인 JAK/STAT 신호전달 억제를 통한 발모촉진용 소재로서 식용 곡물 자원인 ‘황금찰수수’를 이용하여 신규의 발모촉진제 원료 소재화와 제품 개발을 수행하고자 함.
- 발모 관련 많은 연구에서 Wnt/ β -catenin 경로의 활성화가 모발 성장을 촉진 시킬 수 있음이 확인되어있으므로, 동물 및 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호전달 경로에의 황금찰수수 추출물의 촉진 효과를 연구하고자 함

1-2. 연구개발의 필요성

○ 황금찰수수 (Hwanggeumchal sorghum / Sorghum bicolor L. cv. Hwangeumchalsusu)

황금찰수수 (Hwanggeumchal sorghum / Sorghum bicolor L. cv. Hwanggeumchalsusu)는 잡곡으로 식용하고 있는 수수 (Sorghum bicolor)를 기본으로 2004년 강원도 농업기술원에서 순계분리 육종방법으로 육성된 품종으로 강원도 전역에서 많이 재배되고 있으며 충청북도와 경상북도 지역에서도 최근 재배가 확산되고 있는 단자엽 벼과식물 Sorghum속 식물이다. 황금찰수수는 수확시기가 빠른 조숙 품종이고 수량이 많은 다수성 찰수수로서 불포화지방산 함량이 많은 것이 특징이고 Gallic acid를 포함한 폴리페놀 화합물들이 다른 수수 품종들에 비하여 다량 함유되어 있어서 높은 항산화 효과를 가지고 있으므로 식품이나 사료 등의 새로운 기능성 소재로서의 가능성이 높은 작물로 알려져 있다. (농촌진흥청)

○ 황금찰수수의 성분 및 약리활성

황금찰수수에는 Gallic acid, Protocatechuic acid, p-hydrobenzoic acid, vanillic acid, Caffeic acid 등의 항산화 phenolic 화합물들이 다른 수수 종에 비하여 다량 함유되어 있는 것으로 보고되어 있으며, Luteolinidin, Apigeninidin, Luteolin 등의 플라보노이드 화합물도 다량 함유되어 있음 (Journal of Life Science, 2015).

황금찰수수의 약리활성으로는 항산화 효과 및 항염증효과, 조골세포에서의 분화촉진효과, 유방암 세포에서의 종양 억제효과, 항당뇨 효과 등이 보고된 바 있으나, 현재까지 발모 또는 양모 효과에 대한 보고는 없다.



○ 탈모 관련 시장

국내 탈모 관련 시장 규모는 2012년 약 3조원 대를 형성하고 있고 향후 지속적으로 성장하여 2018년에는 4조 원대까지 증가하여 약 30%의 성장을 이룰 것으로 예측됨 (아시아경제)

국내 탈모 환자수는 누적 기준으로 약 1000만명이며, ‘탈모질환’ 진료 환자수는 2009년 기준으로 18만 1천명으로 집계 (국민건강보험공단)

글로벌 탈모 시장 규모는 2010년 676억 달러로 추산되며, 2015년도에는 843억 달러에 달할 것으로 추산됨 (Dow Corning, Hair care market)

○ 신규 탈모 개선제의 필요성

현재 FDA의 허가를 받은 탈모치료제는 Minoxidil과 Finasteride 뿐이며, Minoxidil은 고혈압 치료제로 개발되어 후에 발모효과가 발견된 경우로 혈관확장 이외의 정확한 발모 기전은 알려지지 않았으며, Finasteride 역시 남성호르몬에 의한 탈모를 막는 약으로 여성에게는 효과가 없으며 오히려 기형아 출산 등의 부작용으로 사용이 어려운 실정임.

국내에서는 5 α -reductase 억제 평가, 동물실험에 의한 양모효과 평가, 모유두세포의 신호전달계 조절 평가 등에 의해 소재 연구가 이루어지고 있으며, 대부분 천연물로부터 활성물질을 탐색하고 있는 수준임.

따라서 신규의 탈모 개선제에 대한 소비자 needs가 높은 현실에서 작용 기전이 명확하고 과학적인 근거자료가 충분히 확보된 신규의 발모촉진제 개발에 대한 필요성은 매우 높음.

○ 황금찰수수의 발모촉진효과 선행 연구결과

선행 연구를 통하여 황금찰수수 추출물은 발모촉진 관련한 세포실험 및 동물실험에서 유의적인 발모촉진 효과를 발휘함을 확인할 수 있었으며, 본 과제를 통하여 다양한 실험모델에서의 효능평가와 활성성분의 규명, 원료 소재의 표준화 및 규격화, 제형개발 및 안정화 연구 등을 수행하여 발모촉진제 사업화의 기반을 마련하고자 함.

○ 황금찰수수 고부가가치화

황금찰수수는 현재 식용 잡곡으로만 섭취되고 있는 실정이며, 여타의 가공식품이나 고부가가치 기능성 제품의 형태로 제품화된 사례는 전혀 없음.

본 과제를 통한 신규의 발모촉진제 개발을 통해 잡곡으로 식용에 그치고 있는 황금찰수수의 활용 범위를 확대하고 부가가치를 창출하며, 농가의 신규 소득자원화가 가능할 것으로 판단됨.

1-3. 연구개발 범위

○ 황금찰수수의 추출조건 확립

황금찰수수에 함유된 발모 활성 성분의 추출수율이 가장 높은 추출 방법을 결정하기 위하여 물과 주정, 보조용매 등을 이용하여 추출 용매의 조성, 용매량, 추출온도 및 시간 등을 변화시키면서 최적의 추출 조건을 확립

○ 황금찰수수 추출물의 기능성 소재 표준화 및 규격화

발모촉진용 기능성 소재의 표준화를 위하여 활성 성분 함량을 비교하여 황금찰수수 재배 지역을 결정하고 위에서 확정된 추출조건에 따라 제조한 소재에 대하여 성상, 고형분량, 활성성분 함량, pH, 부형제 및 보존제, 미생물, 중금속 등의 항목에 대한 화장품 및 식품 원료로서의 기준규격을 설정하고 외부 시험분석기관의 시험성적서를 확보함

○ 제형 개발 및 시제품 제조

최종적으로 기준규격이 설정된 황금찰수수 추출물 원료 소재를 이용하여 헤어샴푸, 헤어크림, 헤어에센스, 헤어토닉 등의 제형을 개발하기 위하여 이들 제형에서 일반적으로 사용되는 안전성이 확보된 보조성분, 부형제, 보존제, 윤활제, 증점제, 보존제, 착향제 등의 처방량을 결정하고 제형을 개발하여 점성, 바름성, 물리화학적 안정성, 관능적 평가 등으로 최종 제제 처방을 확립하고 시제품을 제조함.

○ 원료 소재 안전성 평가

황금찰수수 추출농축액에 대하여 식약처 인증 공인시험분석기관인 (주)크로엔을 통해서 토끼를 이용하여 피부자극시험을 진행하고 피부 안전성에 대한 시험결과보고서를 확보함.

○ 황금찰수수 추출물의 원료소재 및 제품의 안정성(stability) 평가

식품의약품안전처의 안정성시험 가이드라인에 따라 최종적으로 확립된 제조공정에 따라 제조한 황금찰수수 추출농축액 및 추출분말에 대하여 안정성을 평가하였다. 보관조건을 온도 40°C, 상대습도 75%의 가속시험 조건과 실온 조건에 보관하면서 2개월 간격으로 성장, pH, 미생물, 기능성분 함량 변화 등의 항목을 관찰하여 가속시험과 장기보존시험을 통한 안정성을 평가하며, 24개월 이상의 안정성을 확보하도록 처방을 설정함.

○ 황금찰수수 추출물의 발모촉진 활성평가 및 작용기전 연구

식약처의 발모제 임상시험 가이드라인 및 문헌 등에서 발모제 효능평가를 위해 공통적으로 활용되는 평가항목 및 방법에 따라서 모유두세포 (dermal papilla cell)을 이용한 분화촉진효과 및 동물모델시험을 통한 생체에서의 발모촉진효과를 검증하였으며, Wnt/ β -catenin 신호 유도 촉진 활성과 더불어 발모촉진에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 KGF, VEGF 등 성장인자 촉진 활성을 확인하여 황금찰수수 추출물이 발모촉진활성이 있음을 확인하였으며, 황금찰수수에서 분리한 기능성분으로서 Naringenin에 대하여 세포실험과 동물모델시험 및 각종 성장인자들에 대하여 발모촉진 활성을 검증하였고, 발모촉진 활성에 대한 작용기전을 밝힐 수 있었음.

○ 황금찰수수에 함유된 발모촉진용 활성성분 분리동정

황금찰수수에는 다양한 항산화성 phenolic compounds와 flavonoids 성분들이 함유되어 있음이 보고되어 있으며, 발모 촉진 효과를 발휘하는 성분을 규명하기 위하여 용매 분획물을 제조한 다음 Silica gel 및 ODS column chromatography 및 Preparative MPLC를 이용하여 activity-guided separation 방법으로 10여 종의 활성성분 [Apigenin, Luteolin, Ferulic acid, Naringenin, Kaempferol, Coumaric acid, Caffeic acid, Hesperidine, Chlorogenic acid, Catechin]을 분리하였고, 그 중에서 활성이 우수한 발모촉진 기능성분으로 Naringenin을 선정하여 활성평가와 기전 연구를 수행하였음.

2. 연구수행 내용 및 결과

○ 황금찰수수 원재료 수급방안

-본 과제 of 사업화 원료 소재인 황금찰수수는 2004년도에 강원도 농업기술원에서 식용 잡곡 작물인 수수의 품종 개량을 통해서 보급된 것으로 기존 수수에 비하여 항산화 페놀성 화합물과 플라보노이드 및 불포화지방산의 함량이 훨씬 높은 것으로 보고됨.

-강원도 영월 지역에서 대량으로 재배되고 있으며, 도정을 통하여 알곡을 식용으로 섭취하고 있으나 다량의 생리활성 성분을 함유하고 있는 도정 부산물인 수수겨는 사료용, 비료용 등의 목적 이외에는 소재화된 사례가 전무함.

-황금찰수수의 알곡은 Kg 당 6,000~10,000원 사이에서 판매가 되고 있으나, 수수겨의 경우에는 생리활성 성분도 다량 함유하고 있으며 또한, Kg 당 400원 정도에서 판매 되고 있어서 원재료의 가격 경쟁력 확보 측면에서도 매우 유리함.



-본 과제 수행과 향후 본격적인 사업화를 위한 안정적 원료 수급을 위하여 시장 조사를 거쳐 국내 최대 황금찰수수 재배 지역인 강원도 영월의 승당영농조합을 통해 원재료인 황금찰수수의 안정적인 수급 방안을 마련함.



○ 황금찰수수의 추출조건 확립

-황금찰수수는 강원도 농업기술원에서 잡곡 식물인 수수를 개량하여 보급된 품종으로 영월 지역에서 가장 많이 재배되고 있음.

-황금찰수수의 알곡과 수수겨에 대하여 비교해본 바, 생리활성 성분의 대부분은 알곡 보다는 수수겨 부분에 더 많이 함유되어 있는 것으로 확인되었음.

Table 1. Extraction yields and antioxidant compounds of the methanolic extracts from the milling fractions of sorghum

Milling fractions of sorghum	Yield (%)	Antioxidant compounds				
		Polyphenol ¹⁾	Flavonoid ²⁾	Tannin ³⁾	Anthocyanin ⁴⁾	Proanthocyanidin ⁵⁾
Hull	9.95	30.57±0.40 ^{b6)}	14.47±0.55 ^b	13.37±1.03 ^b	11.93±0.28 ^b	0.519±0.021 ^a
Bran	19.05	61.47±0.45 ^a	15.71±0.52 ^a	47.25±0.66 ^a	13.60±1.95 ^a	0.530±0.013 ^a
Grain	2.94	3.40±0.27 ^c	4.61±0.47 ^c	2.22±0.33 ^c	6.44±1.72 ^c	0.045±0.005 ^b

-황금찰수수에 함유된 다양한 생리활성 물질인 phenolic compounds 및 flavonoids 성분들을 효율적으로 분리하기 위한 최적의 추출조건 확립을 위하여 물과 주정의 비율을 달리하여 최적의 추출 조건을 확립하고자 하였음.

-추출을 위한 용매로 화장품 원료와 식품 원료로 동시에 사업화를 추진하는 것을 전제로 하였을 때, 추출용매로서 식용으로 사용가능한 발효에탄올을 사용하는 것으로 결정하였으며, 발효에탄올(주정)의 비율을 0%, 30%, 50%, 70% 및 100%로 5가지의 추출 용매를 제조하여 건조한 황금찰수수 수수겨분말을 추출하여 추출 수율과 기능성분의 함량을 비교 분석하였음.

-원료 분말의 용매 흡수량이 많아 추출용매의 양은 원료 분말당 10배의 용매량을 사용하여 추출함.

-최대 추출 효율을 얻기 위하여 총 3회의 추출을 반복함.

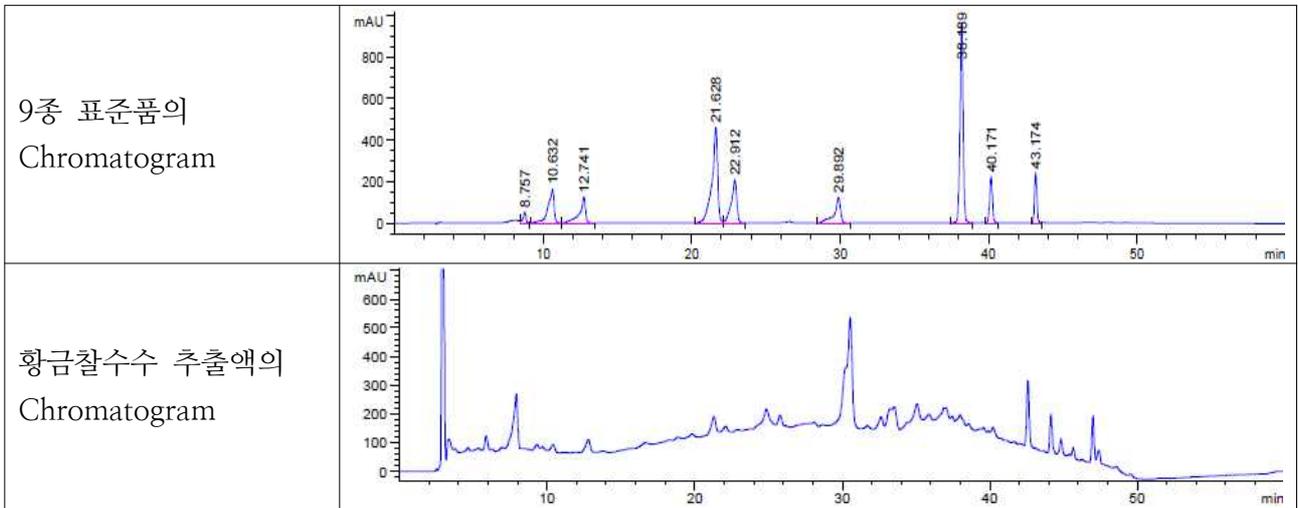


-각 추출 용매로 3회 추출한 다음 감압여과(Whatman No 2 여과지)한 여액을 모아 회전감압농축기를 사용하여 충분히 농축한 다음 MeOH을 가하여 100ml로 한 다음 HPLC를 이용하여 활성 성분을 분석함.

-HPLC분석조건



기기: Agilent 1200 HPLC System
 컬럼: YMC Triart 5C18, 4.6X250mm
 검출기: Agilent DAD (UV 280nm)
 주입량: 20uL
 유속: 1ml/min
 이동상: MeOH(A) + 0.5% FA in H2O(B) gradient (0분: 15% A, 10분: 20% A, 30분: 40% A, 45분: 70% A, 60분: 15% A)



표준품 \ 주정 (%)	100%	70%	50%	30%	0%	
Catechin	8.757분	1202	1387	1735	1317	1110
Chlorogenic acid	10.632분	392	314	348	161	53
Caffeic acid	12.741분	160	194	838	1906	39
Ferulic acid	21.628분	1906	2207	2079	1346	598
3-Coumaric acid	22.912분	361	1521	2458	759	116
Hesperidine	29.892분	1523	2412	2358	2279	1083
Naringenin	38.189분	686	1472	1116	739	558
Luteolin	40.171분	741	829	1130	1084	347
Apigenin	43.174분	707	1581	1311	430	59
Peak area 합계		7681	11923	13377	10025	3963
추출수율(%)		10.8	13.5	17.4	18.8	22.5

-상기 실험결과에서 보듯이 황금찰수수는 추출 용매를 50% 주정으로 사용하였을 때에 각종 phenolic 화합물과 Flavonoid 화합물의 추출율이 가장 높게 나타났음.

-50% 이하의 주정을 사용하였을 경우, 다량의 수분으로 인하여 원료에 함유된 전분질 및 당질의 추출이 많아지면서 고형분 함량은 증가하지만, 침전물에 의한 여과 공정의 어려움이 발생함. 하지만 약 리활성 성분들의 추출 수율은 더 낮게 나타남.

-따라서 추출 효율이 가장 높고 추출 공정의 편의성 등을 고려하여 최종적으로 추출 용매는 원재료 중량 대비 10배량의 50% 발효에탄올(주정)을 사용하는 것으로 결정함.

-추출 효율이 가장 좋은 적정 온도를 결정하기 위하여 추출 용매로서 10배량의 50% 주정을 가하고 실온, 30°C, 50°C, 70°C 및 100°C의 조건에서 7시간 동안 추출을 진행한 후 방냉 후 여과하고 농축한 다음 고형분량 및 상기의 활성 성분을 HPLC로 분석하여 총 피크면적의 합을 계산하여 보았다.

추출온도	수율 (고형분량 g)	총 피크면적
실온	13.2g	7289
30°C	14.8g	11788
50°C	18.8g	15173
70°C	13.2g	14382
100°C	10.8g	16638

-이상의 결과로부터 여과, 농축 등의 제조공정과 시간, 경제성(단가) 등을 함께 고려하였을 때, 50°C의 추출조건이 원료의 추출 조건으로 가장 적절한 것으로 평가됨.

-황금찰수수 분말의 추출 공정을 확립하기 위한 용매 조성, 용매 량, 추출 시간, 추출 온도에 대한 검토를 위한 실험 결과, 50%의 발효에탄올(주정)을 원료 분말 대비 10배량 이상을 가하고, 50°C의 온도에서 7시간 정도 추출하는 것이 가장 효율적인 것으로 평가됨.

○ 황금찰수수의 대량 추출 공정 연구

-강원도 영월에서 구입한 건조된 황금찰수수 수수겨 10Kg을 가지고 앞에서 실험실적으로 확인한 추출 조건으로 100L 규모의 중형 추출 농축기를 활용하여 대량 추출 공정을 확립하고자 하였음.

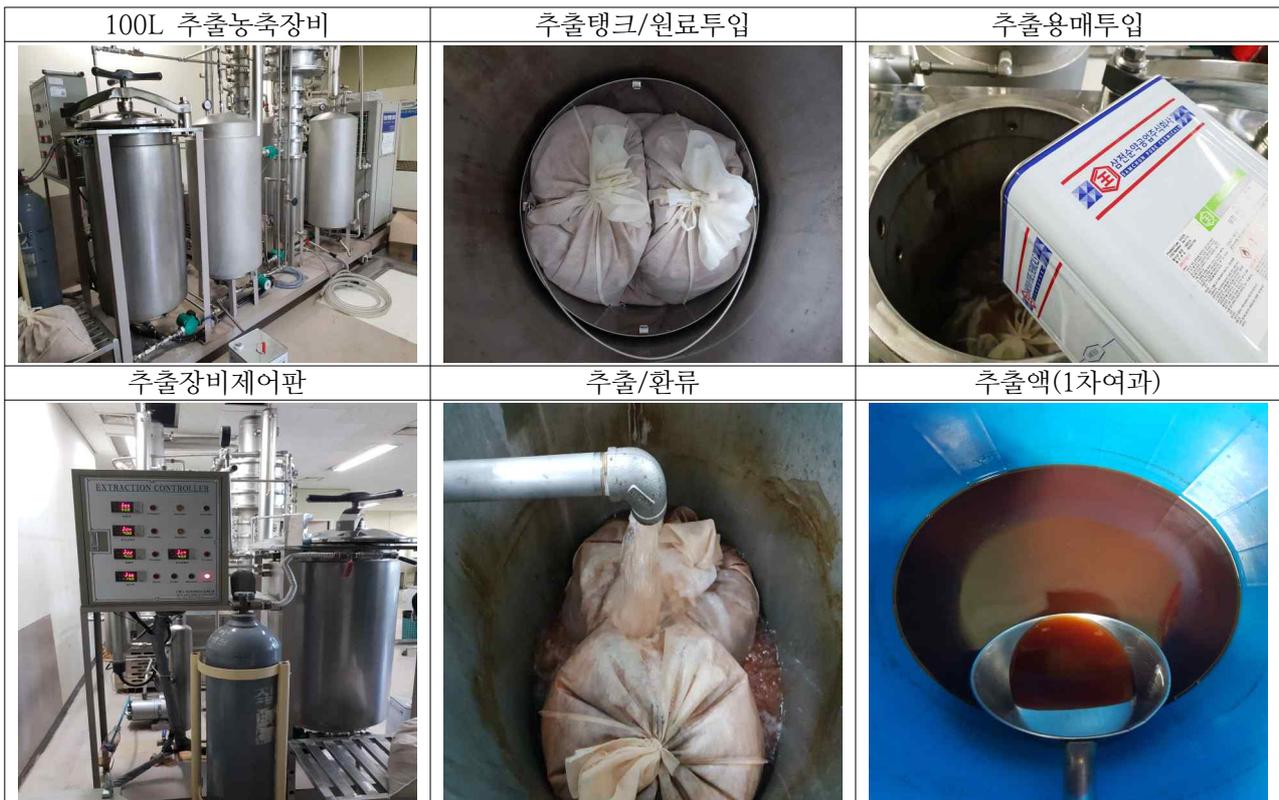
-분말 원료를 약 10Kg씩 부직포 망에 담에 총 10Kg의 분말 원료를 추출 tank에 넣은 후 50% 발효에탄올 (주정)을 10배량 (100L)를 첨가함.

-추출기의 온도를 50°C로 설정하고 7시간 동안 추출기 내부의 용매를 환류시키면서 효율적으로 추출될 수 있는 조건을 설정함.

-7시간간 후 추출된 용매를 내려 받아서 1차 여과를 진행하고, 저장탱크에 담아서 방냉한 다음 1μm 필터로 2차 여과를 진행한 다음 농축과정을 진행함.

-농축탱크에 추출액을 모두 넣은 다음 탱크 온도는 45°C, 진공감압 -70mmHg 조건에서 농축을 진행하였음.

-30Brix 수준까지 농축하여 액상 황금찰수수 추출농축액을 얻었으며, 일부분을 취하여 부형제로서 MCC (미결정 셀룰로오스)를 고품분량 대비 1:1 비율로 첨가하여 계속 농축을 진행하여 분말화 공정을 수행함.



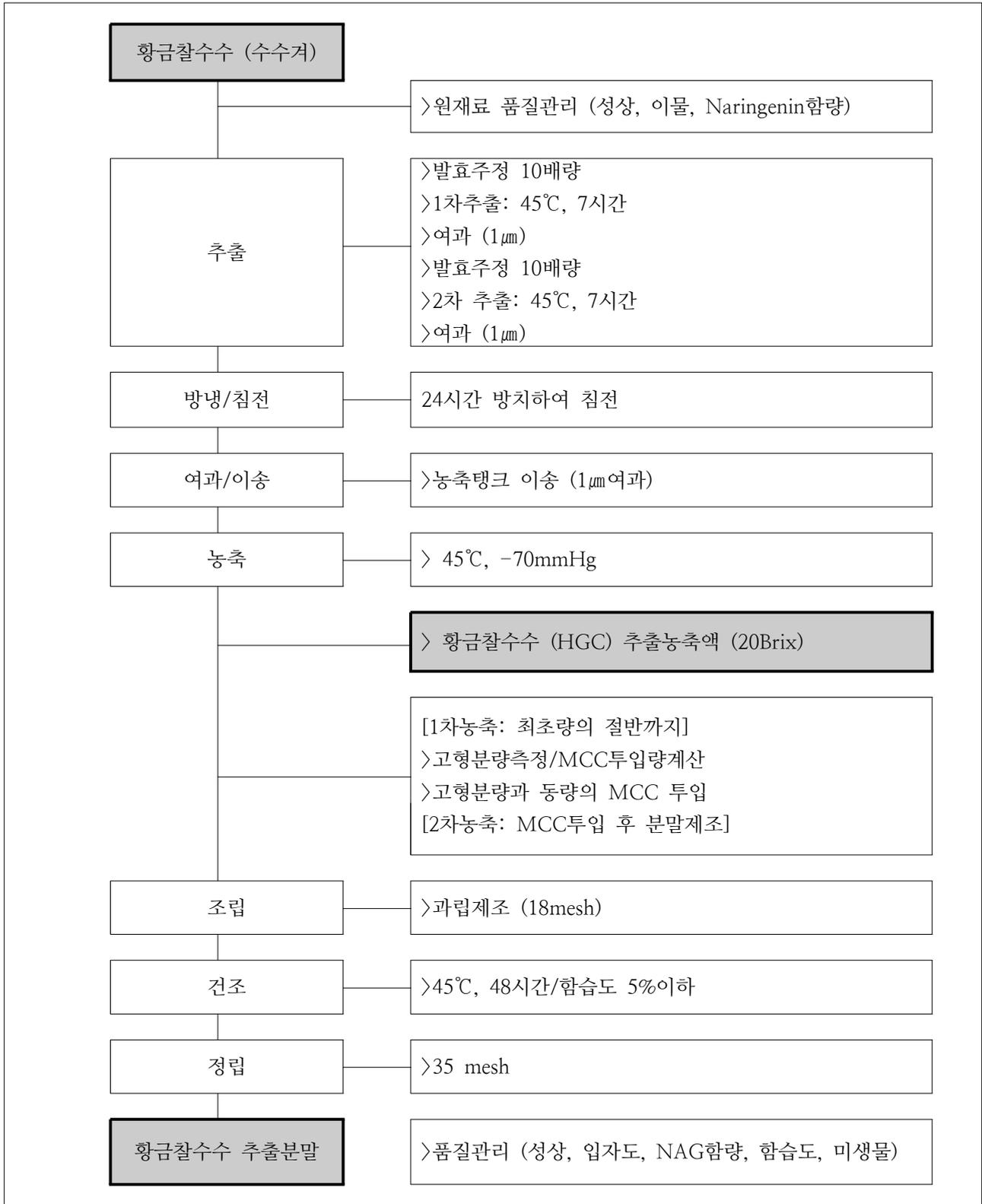


-상기의 대량 추출 공정 연구를 통하여 아래와 같이 100L 이상의 대형 추출기를 이용한 추출, 농축 및 분말화의 모든 공정이 수월하게 진행되어 대량 추출을 위한 제반 공정별 Parameter를 최종 결정 함.

공정별	세부 항목	Parameter 결정
추출공정	탱크온도	50℃
	용매조성	50% 발효에탄올(주정) 20배량
	추출시간	7시간
	교반속도	30rpm
농축공정	탱크온도	50℃
	진공압력	-70mmHg
	교반속도	30rpm
	농축시간	8시간
	고형분량	30Brix
분말공정	부형제 투입량	고형분량과 동량 (1:1)
	탱크온도	50℃
	진공압력	-70mmHg
	교반속도	30rpm
	분말화시간	8시간

○ 황금찰수수 추출농축 및 분말화 생산공정 확립

-상기의 실험실적 연구와 대량 추출공정 연구를 통해 아래와 같이 황금찰수수 추출물 및 분말 원료의 제조공정을 확립함.



○ 황금찰수수에 함유된 발모촉진용 활성성분 분리동정

실험재료

본 연구에 사용된 황금찰수수의(*Sorghum bicolor* L. Moench : SB) 표본시료는 대구한의대학교 천연소재분석실험실에 보관되어 있다.

시약 및 기기

Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, Merk, Darmstadt, Germany)을 사용하였고, Sephadex LH-20(GE Healthcare, SWEDEN)을 사용하였다. Thin Layer Chromatography (TLC)는 Kieselgel 60 F₂₅₄와 DC Kieselgel 60 RP-18 F_{254S}를 사용하였고, 실험에 사용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. Preparative MPLC는 YMC사의 Forte/R 기기를 사용하였으며, NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400 (Varian, USA)으로 측정하였다.

추출 및 분획

건조하고 분쇄한 황금찰수수 2.0kg에 70% ethanol (EtOH, 18L)을 첨가하여 실온에서 24시간 추출하였다. 추출물을 여과하고 남은 잔여물에 추출용매(70% EtOH)를 첨가하여 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압농축하여 EtOH 추출물을 얻었다. 얻어진 EtOH 추출물에 H₂O를 2L 가한 후 ethyl acetate (EtOAc, 2L×3)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O 층을 *n*-butanol (2L×3)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압농축하여 ethylacetate 분획물 (47.2g), *n*-butanol (28.2g) 및 H₂O분획 (63.6g)을 얻었다.

EtOAc 분획물로부터 화합물의 분리.

EtOAc 분획(45g)으로부터 silica gel column chromatography (c.c.) (ϕ 10×25cm, CHCl₃-MeOH=20:1→10:1→5:1→3:1→MeOH)를 실시하여 16개의 분획물(SBE-1~SBE-16)을 얻었다. 이 중에서 강한 UV흡수 및 10% H₂SO₄에서 발색되는 SBE-6 (3.14g) 분획물에 대하여 SiO₂ c.c. (ϕ 10×30cm, CHCl₃-MeOH=20:1)를 실시하여 SBE-6-8 (33.8 mg) 화합물(1)을 분리하였다. SBE-7 (2.15 g)분획물에 대하여 Sephadex LH 20 c.c.(ϕ 3×60cm, *n*-hexane-CHCl₃-MeOH=1:3:1)를 실시하여 7의 분획물 (SBE-7-1~SBE-7-7)을 얻었고, 그 중 SBE-7-2 (13mg, 2) 및 SBE-7-5 (82mg, 3)을 분리하였다. SBE-12 (222mg) 에 대하여 다시 silica gel c.c.(ϕ 5×12cm, CHCl₃-MeOH=15:1)를 실시하여 SBE 12-2 (20mg, 4)를 분리하였다. SBE-13 (159mg)을 Sephadex LH-20 (ϕ 3×60, *n*-hexane-CHCl₃-MeOH=1:3:1)를 실시하여 SBE-13-3 (35mg, 5)를 분리하였다.

NMR을 통한 화합물의 구조분석

화합물 1 (luteolin) ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ _H): 7.43 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 7.41 (1H, dd, J = 8.1, 2.1 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-8), 6.18(1H, d, J = 1.5 Hz, H-6). ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD, δ _C): 182.1 (C-4), 164.6 (C-7), 164.3 (C-2), 161.9 (C-5), 157.7 (C-9), 150.1 (C-4'), 146.1 (C-3'), 121.9 (C-1'), 119.4 (C-6'), 116.4 (C-5'), 113.8 (C-2'), 104.1 (C-10), 103.3 (C-3), 99.2 (C-6), 94.2 (C-8).

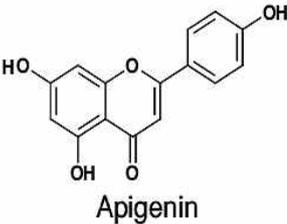
화합물 2 (apigenin) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ_{H}): 7.87 (2H, d, $J = 14.9$ Hz, H-2' , H-6'), 6.95 (2H, d, $J = 14.9$ Hz, H-3' , H-5'), 6.61 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ_{C}): 184.2 (C-4), 166.7 (C-5), 163.6 (C-2), 159.8 (C-4'), 151.4 (C-9), 147.4 (C-7), 124.1 (C-1'), 120.7 (C-2' , C-6'), 117.2 (C-3' , C-5'), 114.5 (C-10), 104.2 (C-3), 100.5 (C-6), 95.4 (C-8).

화합물 3 (ferulic acid) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ_{H}): 7.48 (1H, d, $J=15.2$ Hz, H1'), 7.28 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-3), 7.08 (1H, dd, $J=8, 2.1$ Hz, H-5), 6.89 (1H, d, $J=9$ Hz, H-6), 6.36 (1H, d, $J=15.2$ Hz, H-2'). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ_{C}): 168.44 (C-3'), 149.54 (C-1), 148.37 (C-6), 144.96 (C-1'), 126.24 (C-4), 123.26(C-3), 116.10 (C-2'),115.98 (C-2), 111.63 (C-5), 56.15 (OCH_3).

화합물 4 (naringenin) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ_{H}): 7.31 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2' , 6'), 6.79 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3' , 5'), 5.89 (2H, s, H-6, 8), 5.43 (1H, dd, $J=13.1, 3.1$ Hz, H-2), 3.26 (1H, dd, $J=17.2, 13.0$ Hz, H-3b), 2.51 (1H, dd, $J=17.2, 3.0$ Hz, H-3a). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ_{C}): 196.80 (C-4), 167.12 (C-7), 163, 96 (C-5), 163.40 (C-8a), 158.19 (C-4'), 129.33 (C-1'), 128.77 (C-2' , 6'), 115.63 (C-3' , 5'), 102.23 (C-4a), 96.27 (C-8), 95.44 (C-6), 78.89 (C-2), 42.45 (C-3).

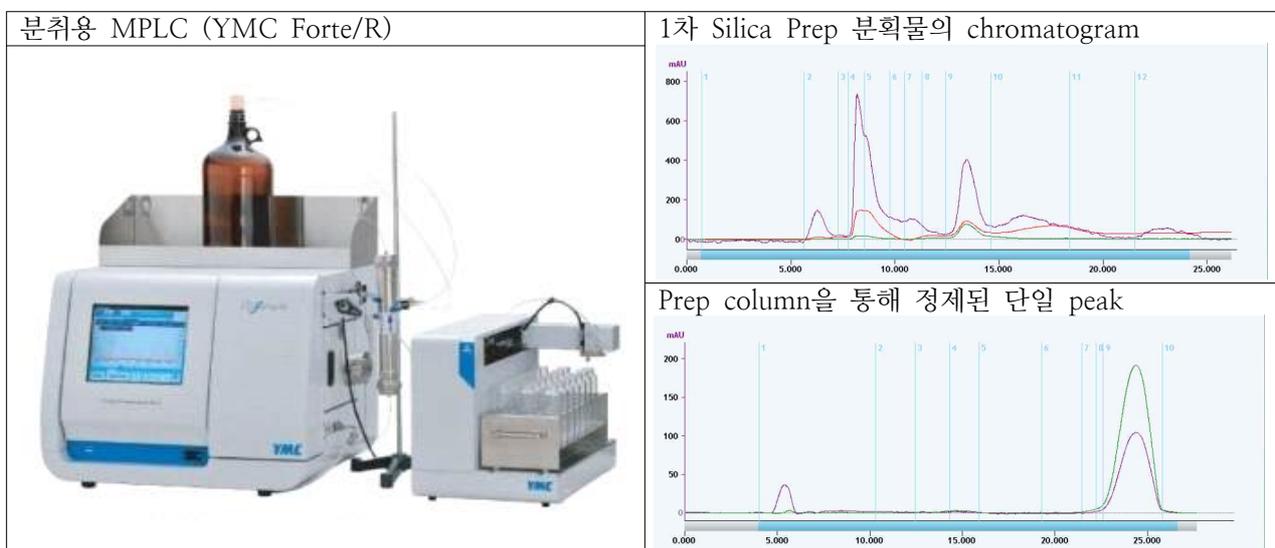
화합물 5 (kaempferol) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ_{H}): 8.01 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-2' , 6'), 6.92 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-3' , 5'), 6.43 (1Hm d, $J = 1.5$ Hz, H-8), 6.24 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ_{C}): 159.51 (C-2), 135.62 (C-3), 176.51 (C-4), 146.81 (C-2), 136.61 (C-3), 162.33 (C-5), 99.27 (C-6), 164.93 (C-7), 94.45 (C-8), 157.75 (C-9), 104.12 (C-10), 123.35 (C-1'), 125.95 (C-2' , 6'), 116.3 (C-3' , 5'), 160.34 (C-4').

황금찰수수로부터 분리한 5종 화합물의 화학구조 동정

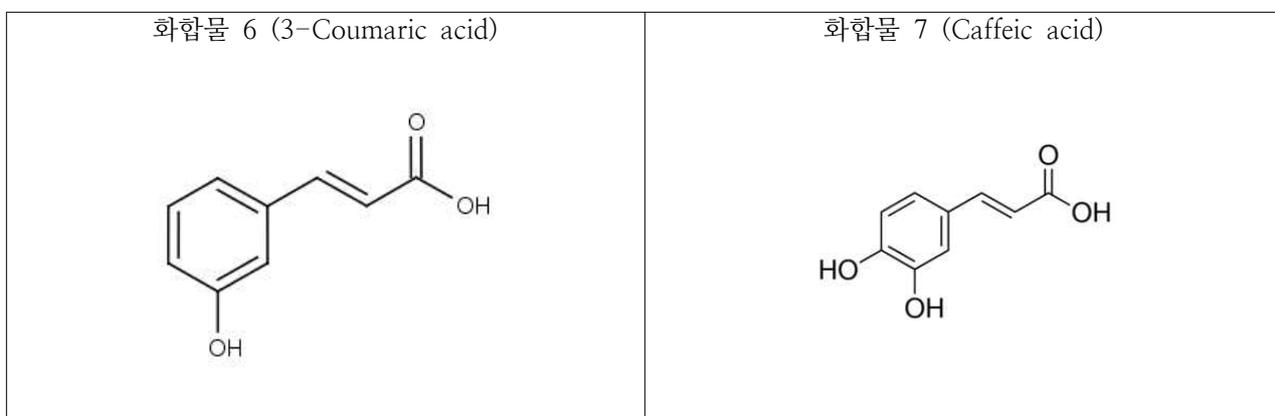
화합물 1 (Luteolin)	화합물 2 (Apigenin)
	 <p style="text-align: center;">Apigenin</p>

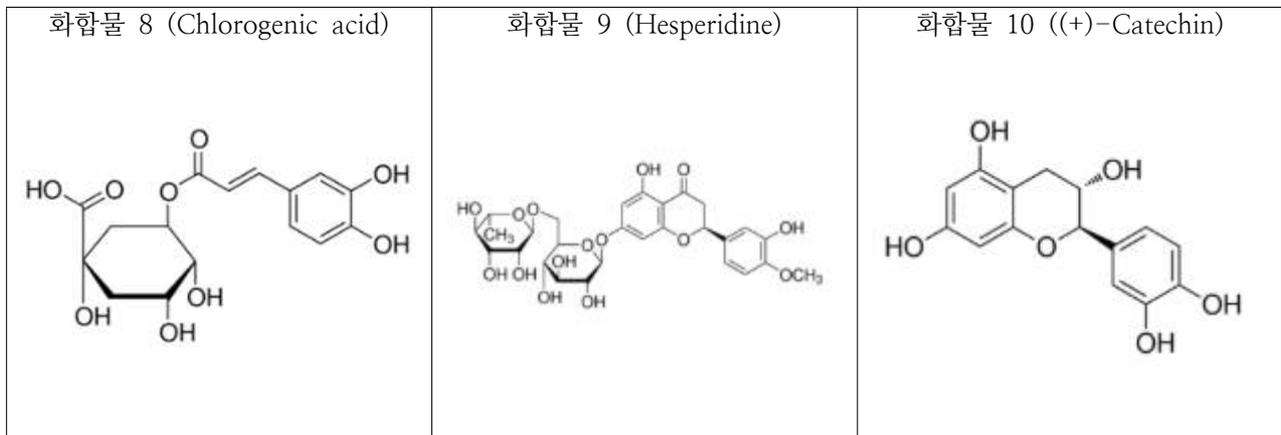
화합물 3 (Ferulic acid)	화합물 4 (Naringenin)	화합물 5 (Kaempferol)
----------------------	--------------------	--------------------

또한, 황금찰수수에 함유된 활성성분의 효율적인 분리동정을 위하여 Preparative MPLC를 이용하여 일부 성분을 분리하였다. 사용한 성분 분리용 MPLC는 YMC Forte/R을 사용하였으며, 1차로 극성의 실리카 카트리지 (25 μ m, 40g)를 사용하여 분획을 얻었으며, 이 분획물에 대하여 2차로 YMC Triart 5C18, 10X250mm ODS 분취용 컬럼을 사용하여 정제를 진행하였다.



이러한 과정을 반복하여 황금찰수수의 에틸아세테이트 용매분획물로부터 아래와 같이 5종의 화합물을 순수하게 분리/정제할 수 있었다. 얻어진 화합물은 시판 Reference STD와 HPLC 및 UV spectrum을 비교하여 동일한 화합물임을 확인하였다.





○ 황금찰수수 추출물의 기능성 소재 표준화 및 규격화

-황금찰수수 추출물을 화장품 및 식품 소재로 활용하기 위하여 상기와 같이 확립된 공정을 통하여 제조된 추출농축액 및 추출분말에 대하여 원료 소재로서의 표준화 및 규격화가 필요함.

-황금찰수수의 건조 수수겨를 50% 발효에탄올(주정) 10배량으로 50°C에서 7시간 추출하는 경우의 고형분 수율은 약 17.8%로 나타났음.

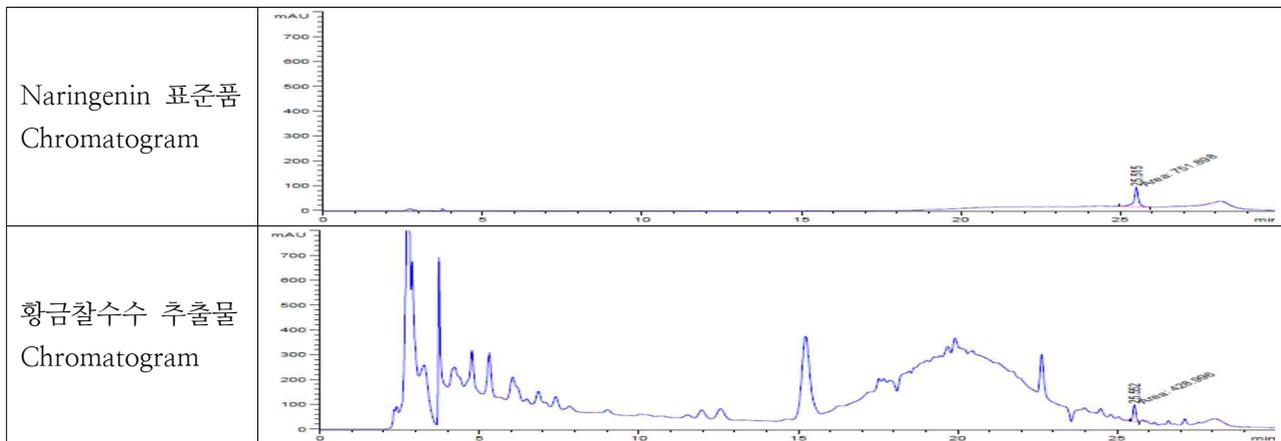
-황금찰수수 추출물로부터 분리된 9종의 활성 성분들에 대하여 Dermal papilla cell 분화 촉진 효과와 동물모델시험을 통해서 flavonoid 화합물인 Kaempferol과 Naringenin에서 유의적인 모유두 세포 분화 촉진 활성을 확인하였으며, Kaempferol은 일부 세포독성이 관찰됨으로 인하여 Naringenin을 황금찰수수에 함유된 발모촉진 기능성분으로 설정함.

-황금찰수수 추출물에 함유된 기능성분인 Naringenin의 HPLC분석조건 확립을 위하여 선행 연구 및 문헌 조사를 통해 최적의 분석조건을 확립하였음.

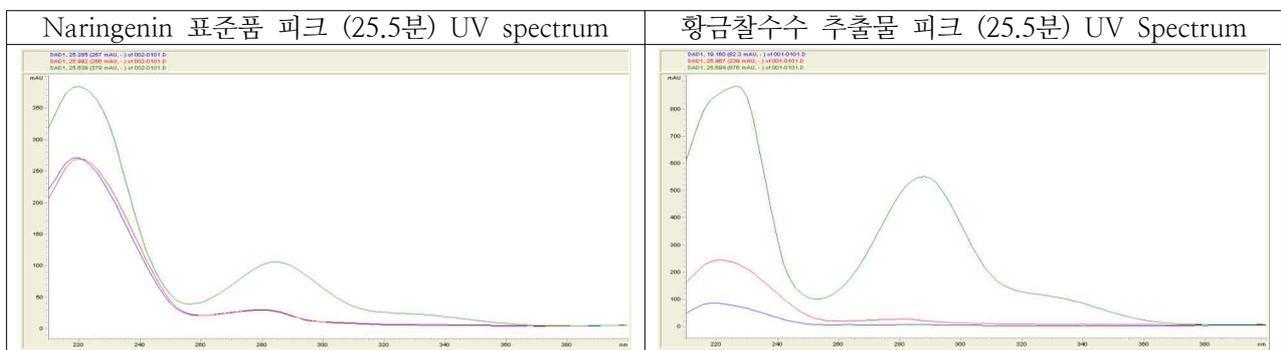
-황금찰수수 추출물 중 Naringenin 함량 분석을 위한 HPLC 분석조건 설정

분석기기	컬럼	YMC Triart 5C18, 4.6X250mm	
Agilent HPLC 1200 system	검출기	UV 280nm	
	이동상 Gradient	AcCN (0.1% formic acid) : H2O (0.1% formic acid)	
		0~10분	20% AcCN
		10~20분	20→40% AcCN
		20~25분	40→70% AcCN
		25~28분	70→20% AcCN
28~30분	20% AcCN		
	유속	1.0ml/min	

-상기의 조건으로 Naringenin 표준품과 황금찰수수 추출물 시료에 대하여 HPLC 분석을 수행함.



- 피크유지시간 25.5분에서 Naringenin의 단일 피크가 나타남을 확인하였으며, PDA검출기를 통해서 25.5분에 나타나는 피크의 흡광도를 비교 분석하여 동일한 물질임을 확인하였음.



○ 기준규격 설정 및 시험성적서

- 황금찰수수 추출물에 함유된 기능성분 Naringenin의 함량은 HPLC분석 결과 0.2%로 확인되었음.
- 상기 추출액의 농축은 20Brix 수준까지 제조하는 것으로 결정하였음.
- 제조한 최종 황금찰수수 (HGC) 추출농축액에 대하여 아래와 같이 기준 및 규격을 설정하였음.

시험항목	시험기준
성상	적갈색의 약간의 점성이 있는 농축액
고형분량	15.0% 이상
pH	5.0±0.5
Naringenin함량	0.2% 이상
미생물(대장균)	불검출(음성)

- 건강기능식품 등의 소재로 활용하기 위한 원료 분말의 소재화에 필요한 표준화 연구
- 황금찰수수 추출액에 함유된 고형분량과 동일한 량의 부형제 (MCC; 미결정셀룰로오스)를 가하여 분말 원료를 제조함 (향후 캡슐제, 정제, 과립제 등의 고형제제의 원료로 활용)
- 제조한 분말 원료에 대하여 표준화를 위한 기준 및 규격을 설정함.

시험항목	시험기준
성상	적갈색의 분말
입자도	35mesh (500µm) 이하 95% 이상
건조감량	5% 미만 (1g, 105°C, 30분)

Naringenin함량	0.6% 이상
미생물(대장균군)	불검출

-제조한 HGC 추출농축액 및 분말에 대하여 상기와 같이 기준 규격을 설정하고, 대량 제조처인 GMP인증 생산업체인 (주)메디언스와 외부기관(경희대학교 피부생명공학센터)를 통하여 객관적인 외부기관 시험성적서를 확보함.

HGC 추출농축액 및 분말 시험성적서

(주)메디언스

경기도 용인시 수지구장 호신동 301호 TEL: 031-208-6256 FAX: 031-208-6259

완제품 시험성적서 Certificate of Analysis				
제품명	수수열추출물	시험번호		
Lot No.	-	제조일자	2019. 01. 25	
Quantity	40 L	유통기한	2020. 01. 24	
포장단위				
시험결과				
시험항목	시험기준	시험결과	시험자	비고
염산	이온, 이취가 없고 고유의 색채를 띠어야 하는 액상	적합	유호희	
일반 세균	100 cfu/g 이하	적합	유호희	
대장균군	불검출	적합	유호희	
시험책임자 경희대학교 피부생명공학센터 연구교수 방 현 호				

경희대학교 피부생명공학센터

시험성적서

135-02-102호
경희대학교 산학협력단
피부생명공학센터(관) 연구교수 방 현 호

2019년 01월 22일

시험물질	HGC (황금찰수수) 추출농축액		
시험항목	시험기준	시험방법	시험결과
염산	적갈색 액체	육안 관찰	적갈색 액체
pH	5.5	pH meter	5.6
고형분량	Min 2.0%	회전검정농축	2.20%
Naringenin 함량	Min. 0.2%	HPLC	0.21%
중금속	Max 0.2ppm	비색법	적합
미생물(세균)	Max. 100cfu/ml	방관배지법	적합
미생물(진균)	Max. 10cfu/ml	방관배지법	적합
미생물(대장균)	불검출	방관배지법	적합

시험물질에 대하여 의뢰인이 요청한 방법에 따라 시험하여
 위의 같은 시험성적을 양att출을 확인합니다.
 시험책임자 경희대학교 피부생명공학센터 연구교수 방 현 호

경희대학교 피부생명공학센터

시험성적서

135-02-102호
경희대학교 산학협력단
피부생명공학센터(관) 연구교수 방 현 호

2019년 01월 22일

시험물질	HGC (황금찰수수) 추출분말		
시험항목	시험기준	시험방법	시험결과
염산	적갈색 분말	육안 관찰	적갈색 분말
건조감량	Max. 5.0%	수분측정기	2.80%
입자도	24mesh	체망	95% 이상
Naringenin 함량	Min. 0.6%	HPLC	0.65%
중금속	Max 0.2ppm	비색법	적합
미생물(세균)	Max. 100cfu/g	방관배지법	적합
미생물(진균)	Max. 10cfu/g	방관배지법	적합
미생물(대장균)	불검출	방관배지법	적합

시험물질에 대하여 의뢰인이 요청한 방법에 따라 시험하여
 위의 같은 시험성적을 양att출을 확인합니다.
 시험책임자 경희대학교 피부생명공학센터 연구교수 방 현 호

○ 제형 개발 및 시제품 제조

-본 과제 의 최종 목표인 황금찰수수 추출물을 함유하는 발모촉진제 제품화를 위하여 경구용 식품 제형과 경피용 화장품 제형 개발에 대한 검토를 진행한 바, 편의성, 용량설정 용이, 제조공정 단순화 및 제조단가 등 제형이 갖추어야 할 제반 요인들 측면에서 경질캡슐 제형이 가장 적합할 것으로 판단하고 제조공정을 설정하기 위한 연구를 수행함.

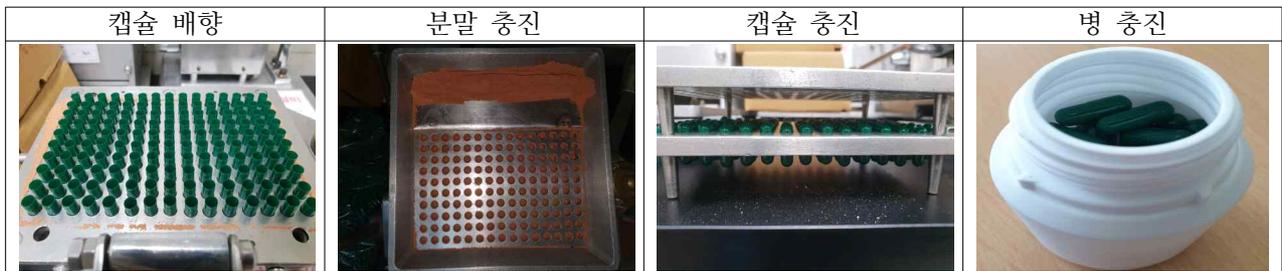
-앞서 제조한 황금찰수수 추출농축액을 가지고 분말화를 위한 부형제로서 MCC (미결정셀룰로오스) 를 추출액에 함유된 고형분량 대비 1:1의 중량으로 첨가하여 용액을 모두 증발시키고 체망을 이용하여 과립을 제조하고 건조 및 정립 과정을 거쳐 황금찰수수 추출분말을 제조함.



-제조한 황금찰수수 추출분말은 흐름성 및 캡슐 충전성, 함습도 등의 제반 물성이 양호한 것으로 평가되었음.

-식품(캡슐) 제형 개발을 위한 캡슐 충전 공정은 다음과 같이 수행함.

- ①반자동 캡슐충진기(1호)의 배향기에 공캡슐을 넣고 Cap과 Body를 분리함
- ②캡슐충진판 (1판 150홀)에 Body를 넣고 캡슐충진기에 장착함
- ③캡슐충진판 위에 300mg X 150홀 = 45,000mg의 황금찰수수 추출 분말을 넣고 중량편차가 발생하지 않도록 전체적으로 고르게 분말을 충전함 (충진이 불충분하여 분말이 남은 경우 압력판을 사용하여 가볍게 눌러주면서 계량된 분말 총량을 완전히 충전함)
- ④Cap을 덮고 실링판으로 가볍게 눌러서 캡슐을 실링함
- ⑤제조가 완료된 캡슐을 캡슐충진기에서 꺼내어 표면의 분말을 제거함
- ⑥100ml 플라스틱 용기에 60캡슐씩 넣어 포장을 완료함



-제조한 황금찰수수 추출분말을 함유한 캡슐 제형에 대하여 식품공전에서 정한 기준규격에 따라 자체 품질관리 시험을 수행함.

시험항목	시험기준	시험결과	판정
성상	적갈색의 분말이 충전된 녹색의 경질캡슐	적갈색의 분말이 충전된 녹색의 경질캡슐	적합
NAG함량	0.20% 이상	0.22%	적합
질량편차	15% 이내	8% 이내	적합
붕해시험	20분 이내	8분 이내	적합

-두피용 헤어샴푸, 헤어크림, 헤어로션, 헤어에센스 제품 개발을 위하여 빈번하게 사용되는 성분들을 이용하여 시제품을 제조함

-헤어샴푸 처방설계 및 제조공정

	INCI Name	처방량	제조공정
A상	Water	적량	80°C 첨가제 혼합 Agitation 25 rpm 완전용해
	PEG-150 Distearate	적량	
	Allantoin	적량	
	Niacinamide	적량	
	Caprylyl glycerol	적량	
	Glycerin	적량	
	Polyquaterium-10	적량	

B상	Cocamidopropyl Betaine	적량	첨가제 혼합 20분간 36rpm Agitation 냉각 (40℃ 이하)
	Disodium Cocoamphodiacetate	적량	
	Sodium chloride	적량	
	Hexylene glycol	적량	
	Behentrimonium chloride	적량	
	TEA-Cocoyl glutamate	적량	
C상	Decylene glycol	적량	10분간 26rpm Agitation 균질 혼합 QC/충전
	Ethyhexyl glycerin	적량	
	Butylene glycol	적량	
	Totarol	적량	
	HGC 추출액	1.0%	
	Fragrance	적량	

시제품



-헤어에센스 처방설계 및 제조공정

	INCI Name	처방량	제조공정
A상	Cyclopentasiloxane	적량	첨가제 혼합 Agitation 25rpm, 10min QC/충전
	Dimethicone	적량	
	Disiloxane	적량	
	HGC 추출액	0.001%	
	Fragrance	적량	

시제품



-헤어크림 처방설계 및 제조공정

	INCI Name	처방량	제조공정
A상	Water	적량	80°C 첨가제 혼합 Agitation 25 rpm 완전용해
	Hydrolysed silk	적량	
	Carbomer	적량	
	Dipropylene glycol	적량	
	Polyquaterium-10	적량	
B상	Cyclopeta siloxane	적량	80°C 첨가제 혼합 36rpm Agitation, Homogenize 3600rpm, 5분 유화
	Cetearyl alcohol	적량	
	Butyrospermum Parkii butter	적량	
	Glyceryl stearate	적량	
	Glyceryl stearate SE	적량	
	Cetearyl glucoside	적량	
C상	Arginine	적량	36rpm Agitation Homogenize 3600rpm, 1분 중화, 냉각(40°C 이하)
D상	Decylene glycol	적량	첨가제 혼합 15~20rpm Agitation 균질 혼합 QC/충전
	Ethylhexylglycerin	적량	
	Hexylene glycol	적량	
	Butylene glycol	적량	
	Totarol	적량	
	Cyclomethicone	적량	
	Dimethiconol	적량	
	Caprylyl glycol	적량	
	HGC 추출액	1%	
	Fragrance	적량	



-두피 토너 처방설계 및 제조공정

	INCI Name	처방량	제조공정
A상	Water	적량	첨가제 혼합 Agitation 25 rpm 완전용해
	Panthenol	적량	
	Disodium EDTA	적량	
	Niacinamide	적량	
	Ethoxydiglycol	적량	
	Betaine	적량	
	Allantoin	적량	
	Butylene glycol	적량	
	HGC 추출액	1.0%	
B상	Alcohol	적량	40°C 첨가제 혼합 25rpm Agitation 가용화
	Menthyl lactate	적량	
	Butylene glycol	적량	
	Hydroxyacetophenone	적량	

	1,2-Hexanediol	적량	QC/충전
	PEG-60 Hydrogenated castor oil	적량	
	Mentha piperita (peppermint) oil	적량	



-제조한 각 시제품에 대하여 향취, 색상, 흡수성, 점성, 바름성 등의 기본 물성을 포함하여 상 안정성 등을 평가해본 바, 각 시료에 있어서 물성이 양호한 것으로 확인되었으며, 전반적인 사용자 만족성이 양호한 것으로 평가됨

○ 원료 소재 안전성 평가

-본 원료는 식용 잡곡 식물인 황금찰수수 추출물로서 안전성 측면에서 크게 우려할만한 소재는 아닐 것으로 판단되며, 또한 이미 화장품의 원료로 등재되어 있는 원료임.

-대한화장품협회의 화장품성분사전: 수수겨추출물 원료 등재

총 5건의 자료가 조회되었습니다.		표준화명칭목록 다운로드	명칭변경목록 다운로드	
성분코드	성분명	영문명	CAS No	구명칭
10209	아스퍼질러스/수수잎/줄기추출발효여과물	Aspergillus/Sorghum Bicolor Leaf/Stem Extract Ferment Filtrate		
10157	수수겨추출물	Sorghum Bicolor Bran Extract		
9759	수수잎/줄기추출물	Sorghum Bicolor Leaf/Stem Extract		
6189	수수줄기즙	Sorghum Bicolor Stalk Juice		
3043	수단그래스씨/껍질/줄기추출물	Sorghum Vulgare Seed/Skin/Stalk Extract		단수수씨/껍질/줄기추출물

-황금찰수수 추출물의 발생 가능한 부작용이나 독성에 대한 예측을 위하여 식품의약품안전처의 GLP 인증기관인 (주)크로엔에서 토끼를 이용한 피부자극시험을 수행하였음.

<p>최종보고서</p> <p>HGC(황금찰수수) 추출농축액의 New Zealand White 토끼를 이용한 피부자극 시험</p> <p>C19BL-037N</p> <p> 경기도 수원시 권선구 서호로 89</p>	<p>Final Report Study No.: C19BL-037N</p> <p>승인</p> <p>시험제목: HGC(황금찰수수) 추출농축액의 New Zealand White 토끼를 이용한 피부 자극 시험</p> <p>시험번호: C19BL-037N</p> <p>시험책임자  2019. 03. 26 김 주 홍 날 짜</p> <p>운영책임자  2019. 03. 26 백 성 진 날 짜</p> <p style="text-align: center;">i / v </p>
---	--

피부자극 시험

황금찰수수 추출물의 피부 안전성을 평가하기 위하여 New Zealand white 토끼를 이용하여 피부 자극시험을 수행하였다. 시험은 식품의약품안전처의 GLP 인증기관인 (주)크로엔에서 수행하였으며, “OECD guideline for testing of chemicals No.404, Acute dermal irritation/Corrosion” (Adopted: Jul. 28, 2015)와 “의약품등의 독성시험기준” 식품의약품안전처 고시 제2017-71호 (2017년 08월 30일)의 시험기준을 준수하여 진행되었으며, “동물보호법 (제15502호, 2018년 09월 21일 일부개정)”에 따라 동물실험운영윤리위원회의 승인 하에 수행되었다.

시험물질은 앞에서 제조한 황금찰수수 추출액을 50Brix로 고농축한 것을 사용하였으며, 적용 전날에 등 부위의 털을 상처가 생기지 않도록 동물용 전기제모기를 이용해 제모하였다. 시험물질 적용일에 제모된 피부를 좌우로 나누어 좌를 대조구획으로 우를 시험물질 적용구획으로 하고, 적용구획과 대조구획의 비찰과부위 또는 찰과부위가 서로 대각선으로 분포하도록 구분하였고, 적용구획에 시험물질을 적용하였다. 시험물질 적용 후 일반증상, 체중 및 피부 자극성을 관찰하였다.

피부자극시험 결과 요약

본 시험은 시험물질 HGC(황금찰수수) 추출농축액의 피부자극을 조사하기 위하여, 시험물질을 New Zealand White 토끼의 피부에 적용한 후 평가하였다.

시험물질 적용 전날에 등 부위의 털을 상처가 생기지 않도록 동물용 전기제모기를 이용해 제모하였다. 시험물질 적용일에 제모된 피부를 좌우로 나누어 좌를 대조구획으로 우를 시험물질 적용구획으로 하고, 적용구획과 대조구획의 비찰과부위 또는 찰과부위가 서로 대각선으로 분포하도록 구분하였고, 적용구획에 시험물질을 적용하였다. 시험물질 적용 후 일반증상, 체중 및 피부 자극성을

관찰하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 동안 사망개체는 관찰되지 않았다.
- 2) 시험기간 동안 이상증상은 관찰되지 않았다.
- 3) 시험물질 투여에 의한 체중의 이상변화는 관찰되지 않았다.
- 4) 적용구획의 피부반응 관찰결과, 모든 개체의 찰과부위에서 홍반이 시험물질 제거 후 1 시간부터 5일까지 산발적으로 관찰되었고, 부종이 1 마리에서 시험물질 제거 후 1 시간부터 24시간 까지 관찰되었다. 비찰과 부위에서는 홍반이 시험물질 제거 후 1 시간부터 6일까지 모든 개체에서 산발적으로 관찰되었고, 부종이 시험물질 제거 후 1 시간부터 48 시간까지 모든 개체에서 산발적으로 관찰되었다. 시험물질 제거 후 48 시간부터 13일까지(투여 후 14일, 관찰종료일) 모든 시험물질 적용구획에서 인설(scaling)이 관찰되었다. 대조구획에서 피부이상 변화는 관찰되지 않았다.
- 5) 피부반응 평가기준에 따라 작성된 일차자극지수는 1.7로 평가되었고, 찰과부위 및 비찰과 부위는 각각 1.3 및 2.0 으로 평가되었다.

이상의 결과로, 시험물질 HGC(황금찰수수) 추출농축액의 토끼를 이용한 피부자극시험 결과, 약한 자극성으로 판단하였다.

-본 시험에 사용한 시험물질은 황금찰수수 (HGC)를 추출한 다음 50Brix 이상으로 고농축한 시료이므로 임상적인 사용 용량에 비하여 매우 고농도로 제조한 시료라는 점에서 본 황금찰수수 추출물은 임상용량에서는 거의 피부자극이 없는 무자극성 원료일 것으로 판단됨.

○ 황금찰수수 추출물의 원료소재 및 제품의 안정성(stability) 평가

-HGC(황금찰수수) 추출농축액 및 분말에 대하여 실온 및 가속조건에서의 안정성을 평가하기 위하여 제조한 각 시료를 실온(25℃, 60% RH)과 항온항습기(40℃, 75% RH)에 보관하면서 매 2개월 마다 시료를 취하여 설정한 시험기준 및 시험방법에 따라 시험하여 안정성(stability)을 평가하였음.

-안정성시험의 구체적인 내용은 다음과 같음.

시험제목	[HGC 추출농축액 및 분말]의 실온 및 가속조건에서 안정성시험		
시험목적	(주)두웰바이오에서 발모촉진 및 탈모예방 신소재로 개발중인 [HGC (황금찰수수)]의 원료소재(50%주정 추출농축액 및 분말)의 안정성(stability)를 평가하기 위하여 실온 및 가속조건에 보관하면서 시간별로 아래 각 시험항목에 대하여 시험하여 품질의 변화를 관찰하고 유통기한 설정의 근거자료를 확보하고자 함.		
시험기간	(1) 가속시험: 2019.03.10.~2019.09.10. (6개월) (2) 장기보존시험: 2019.03.10.~2020.03.10. (12개월)		
시험기관	(주)두웰바이오 천연의약연구소 [단, 미생물시험의 경우 외부시험기관 의뢰]		
시험담당자	(주)두웰바이오 천연의약연구소 전임연구원 전윤아		
시험규정	건강기능식품공전		
시험항목	(1) 액제: 성장, 함량, pH, 중금속, 미생물 (2) 분말: 성장, 함량, 건조감량, 중금속, 미생물		
시험기준	시험항목	시험기준: HGC 추출 농축액	시험기준: HGC 추출 분말
	성장	적갈색의 약간 점성이 있는 액체	적갈색의 분말
	기능성분함량	Naringenin으로서 0.2% 이상	Naringenin으로서 0.6% 이상
	개별시험	pH: 5.0±0.5	건조감량: 5% 미만

시험방법	중금속	납, 카드뮴: 0.2mg/L 이하	납, 카드뮴: 0.2mg/kg 이하
	미생물	일반세균수: 100cfu이하	대장균군: 불검출
	성상	이 제품을 가지고 직접 육안으로 관찰한다.	
	기능성분함량	Naringenin 표준품 및 검액을 가지고 다음 기능성분 함량시험법에 따라 HPLC법으로 시험한다.	
	pH	HGC 추출농축액 10ml를 취하여 pH meter로 측정한다.	
	건조감량	건조감량 시험법에 따라 건조감량측정기를 이용하여 시험한다.	
평가방법	중금속	HGC (황금찰수수) 추출농축액 및 분말을 가지고 화장품의 중금속 시험법(납, 카드뮴)에 따라 시험한다.	
	미생물	HGC (황금찰수수) 추출농축액 및 분말을 가지고 화장품의 미생물 시험법에 따라 시험한다.	
평가방법	상기 개별 항목별 시험기준 및 화장품 공통 기준 및 규격에 적합하여야 한다.		

-확립된 제조공정에 따라 식약처의 GMP 인증기관인 (주)메디언스에서 대량으로 제조한 HGC (황금찰수수) 추출농축액 및 분말 시료를 각 보관 조건에 저장하면서 설정한 시험 기준 및 방법에 따라 안정성시험을 수행함.

-안정성시험 종합결론: HGC (황금찰수수) 추출농축액 및 분말에 대한 소재 안정성 (stability)를 평가하기 위하여 가속시험 (40°C, 75%RH)와 장기보존시험 (25°C, 60%RH)을 수행한 결과, 가속 조건과 장기보존 조건에서 HGC (황금찰수수) 추출농축액 및 분말은 성상, 기능성분함량, 건조감량, 중금속 및 미생물 시험의 모든 항목에서 시험개시일의 시험결과 비교하여 큰 변화가 없는 것으로 확인되었음. 따라서 본 시험제제는 안정성이 확보된 것으로 판단됨.

-현재 안정성시험 개시 후 3개월 경과 중이며 지속적으로 매 2개월 간격으로 보관 중인 시료를 취하여 각 항목별 시험을 거쳐 안정성을 평가할 계획임.

안정성시험결과 - 시험개시일				
시험항목	HGC 추출농축액		HGC 추출분말	
	가속시험	장기보존	가속시험	장기보존
성상	1회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	2회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	3회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	평균	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	판정	적합	적합	적합
NAG 함량	1회	0.216	0.214	0.603
	2회	0.221	0.219	0.620
	3회	0.210	0.212	0.619
	평균	0.216	0.215	0.620
	판정	적합	적합	적합
pH	1회	5.05	5.06	
	2회	5.05	5.05	
	3회	5.06	5.05	
	평균	5.05	5.05	
	판정	적합	적합	
건조감량	1회		3.97	3.01
	2회		3.19	3.21
	3회		3.08	3.97
	평균		3.06	3.06
	판정		적합	적합
중금속	1회	적합	적합	적합
	2회	적합	적합	적합
	3회	적합	적합	적합
	평균	적합	적합	적합
	판정	적합	적합	적합
미생물	1회	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출
	2회	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출
	3회	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출
	평균	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출
	판정	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출

안정성시험결과 - 2개월				
시험항목	HGC 추출농축액		HGC 추출분말	
	가속시험	장기보존	가속시험	장기보존
성상	1회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	2회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	3회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	평균	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	판정	적합	적합	적합
NAG 함량	1회	0.211	0.213	0.621
	2회	0.215	0.219	0.622
	3회	0.214	0.219	0.619
	평균	0.214	0.216	0.620
	판정	적합	적합	적합
pH	1회	5.05	5.05	
	2회	5.05	5.06	
	3회	5.06	5.07	
	평균	5.05	5.06	
	판정	적합	적합	
건조감량	1회		3.13	3.18
	2회		3.10	3.14
	3회		2.97	3.08
	평균		3.07	3.14
	판정		적합	적합
중금속	1회	적합	적합	적합
	2회	적합	적합	적합
	3회	적합	적합	적합
	평균	적합	적합	적합
	판정	적합	적합	적합
미생물	1회	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출
	2회	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출
	3회	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출
	평균	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출
	판정	적합 / 불검출	적합 / 불검출	적합 / 불검출

안정성시험결과 - 4개월

안정성시험결과 - 6개월



4. 시험결과종합표

(1) Stability - Initial (0개월: 2019년 3월 10일)

이승환

시험항목	HGCC 추출농축액		HGCC 추출분말	
	가속시험	장기보존	가속시험	장기보존시험
상상	1회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	2회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	3회	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	평균	적갈색 액체	적갈색 액체	적갈색 분말
	판정	적합	적합	적합
NAG 함량	1회	0.216	0.214	0.603
	2회	0.221	0.219	0.619
	3회	0.210	0.212	0.619
	평균	0.216	0.214	0.600
	판정	적합	적합	적합
pH	1회	5.05	5.06	
	2회	5.05	5.05	
	3회	5.06	5.05	
	평균	5.05	5.05	
	판정	적합	적합	
건조감량	1회			3.97
	2회			3.19
	3회			3.08
	평균			3.06
	판정			적합
중금속	1회	적합	적합	적합
	2회	적합	적합	적합
	3회	적합	적합	적합
	평균	적합	적합	적합
	판정	적합	적합	적합
미생물	1회	적합 / 불감균	적합 / 불감균	적합 / 불감균
	2회	적합 / 불감균	적합 / 불감균	적합 / 불감균
	3회	적합 / 불감균	적합 / 불감균	적합 / 불감균
	평균	적합 / 불감균	적합 / 불감균	적합 / 불감균
	판정	적합 / 불감균	적합 / 불감균	적합 / 불감균

(주)두웰바이오

2019년 9월 10일 시험 예정

○ 황금찰수수 추출물의 발모촉진 활성평가 및 작용기전 연구

1) 실험재료

-황금찰수수는 강원도 영월 승당영농조합으로부터 구입하였으며, 건조 수수겨에 70% 발효에탄올 20배량을 가하고 50°C에서 12시간 동안 추출한 후 여과하였다. 같은 방법으로 3회 반복 추출한 여과액을 모두 합하여 회전감압농축기로 농축하여 용매를 제거한 다음 동결건조하여 최종적으로 13.7%의 수율로 황금찰수수 추출물을 얻었다.

-황금찰수수로부터 활성 성분을 분리하기 위하여, 위에서 얻어진 추출물을 정제수에 현탁시킨 다음 용매의 극성도에 따라 n-hexane, ethylacetate, 및 n-butanol을 사용하여 용매계통분획을 실시하여 분획물을 조제하였다. 용매 분획물에 대하여 silica gel과 ODS(Octadecylsilane)로 충전된 open column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 5종의 대표적인 활성 성분을 분리하였으며 LC/MS와 NMR을 사용해서 구조를 동정하여 Ferulic acid, Apigenin, 3',4',5,7-tetrahydroxy flavone, Kaempferol, Naringenin임을 확인하여 이후의 실험에 사용하였다.

2) 세포배양

Rat vibrissa immortalized dermal papilla cell (DPC) 은 제주대학교 강희경 교수로부터 세포와 장소를 제공받아 배양하였다. 모유두 세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco Inc, NY, USA)와 1%의 penicillin streptomycin (Gibco Inc, NY, USA)이 포함된 DMEM (Gibco Inc, NY, USA) 배지를 이용하여, 37 °C, 5% CO₂의 항온기에서 배양하였다.

세포 독성 유무 및 증식 촉진 효과를 알아보기 위해 96-well cell culture plate에 2.5x10⁴cells/ml의 세포를 분주하고 다양한 농도의 황금찰수수 추출물 및 활성성분을 처리 한 후 24, 48 시간 후 세포 생존률을 측정하였다. 간략히, 2mg/ml의 MTT용액을 배지 부피의 1/10 처리 후 4시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 well 당 DMSO 200ul를 넣고 상온에서 교반하며 1시간동안 녹여낸 후 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

모성장 관련 단백질의 발현을 알아보기 위해 세포를 6-well cell culture plate에 1x10⁵cells/ml의 밀도로 분주하고 다양한 농도의 황금찰수수 추출물과 활성성분을 24시간 혹은 48시간동안 처리 하였다. 이후 PBS하에서 prep한 세포액을 4°C에서 13000rpm으로 2분간 원심분리 하여 상등액을 제거해 세포 pellet을 얻었다. 세포 pellet에 lysis buffer (PRO-PREPTMProtein Extraction Solution; iNtRON biotechnology, Korea)를 넣어 lysis 시켰다. Cell lysate를 4°C에서 15000rpm으로 15분간 원심분리 후 상등액을 얻었고, western blotting 수행 시까지 -20°C에 보관하였다.

3) 실험동물

본 연구는 “동물보호법 (제15502호, 2018년 09월 21일 일부개정)”에 따라 제주대학교 동물실험 윤리위원회(IACUC)의 승인을 받아 수행되었다 (승인번호 2018-0036). 모든 동물은 제주대학교 실험동물 센터에서 사육되었으며, 동물 사육실은 온도 22±5°C 상대습도 50±10%, 12시간씩 밤낮을 유지하였다. 생후 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 대한바이오링크사에서 구입, 7일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 식이와 음수는 자율적으로 급여 하였고, 케이지는 주 1-2회 교체하였다. 실험 시작 전 마우스의 등 피부를 1x4cm의 면적으로 두 부위로 나누어 동물 용 클리퍼로 털을 제거하였다. 시료는 매일 100ul씩 제모부위 중 오른쪽 면에만 도포하였고, 육안으로 모성장

상태를 확인하기 위해 실험 기간 중 isopropanol로 가볍게 마취 후 사진 촬영 하였다. 사진은 image J (ImageJ 1.51k, NIH, USA) 프로그램을 이용, 1x4cm 면적 대비 검은 부분의 면적(털이 자란 면적)의 비율을 계산하여 평균으로 나타내었다.

실험군은 대조군(acetone oliveoil, 4:1), 양성대조군(MynoxilTM, 현대약품, minoxidil 5%), 황금찰수수 추출물 처리군(HGC: 100, 200mg/ml)으로 나누었고, 군당 7-9마리로 하였다. 또한 황금찰수수 추출물로부터 분리한 활성성분 중 naringenin의 동물에서의 발모 촉진 효능을 확인하고자 대조군(acetone oliveoil, 4:1, n=3)과 naringenin처리군(60mM, n=4)을 별도의 실험군으로 설정하였다. 각 물질 처리 후 육안 상 털이 90% 이상 자랐을 때 실험을 종료하여 CO₂가스로 마우스를 희생시키고 1x4cm 면적의 약물 도포 및 미 도포 부위의 피부를 수거하였다. 이후 조직을 10배 부피의 lysis buffer (PRO-PREPTM)에 넣어 TissueLyser II (Qiagen, Germany)를 이용해 homogenize하였다. 이후 13,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 얻어 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다

4) Western blotting

세포와 동물의 피부로부터 얻은 단백질을 이용하여 Bradford solution (Bio-Rad, USA)을 사용하여 정량 후 BSA(bovine serum albumin)으로 농도를 표준화하였다. 전기영동은 8-12% mini gel SDS-PAGE로 실시하였으며 종료 후 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(Bio-Rad, USA)에 200mA로 2시간 동안 transfer하였다. Transfer 후 membrane을 blocking buffer (5% skim milk, TTBS(0.1% Tween 20, TBS))에 넣어 1시간 동안 blocking 하였다. 이후 primary antibody를 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 교반 하였다.

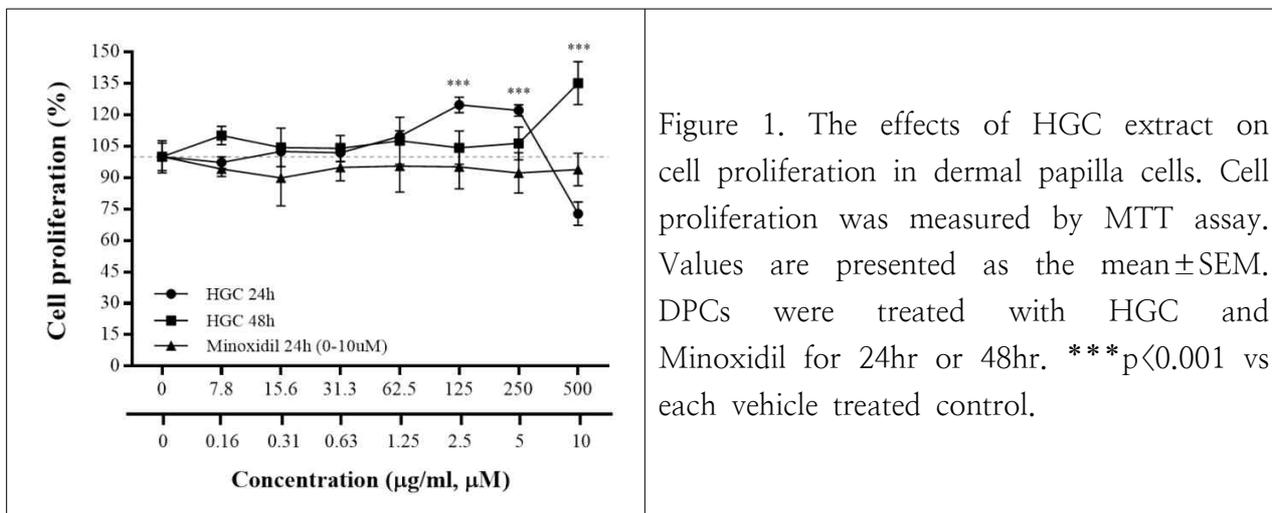
Primary antibody는 anti-mouse vascular endothelial growth factor (VEGF), β -catenin, p- β -catenin, β -actin (1:1,000), anti-rabbit keratinocyte growth factor (KGF) antibody를 사용하였다. Secondary antibody는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse와 anti-rabbit IgG(Amersham Pharmacia Biotech, United Kingdom)를 1:2000으로 희석하여 상온에서 45분간 부착 시켰다. TTBS로 세척 후, ECL (Electrochemiluminescence) (Amersham Biosciences, United Kingdom)에 1-3분간 반응시킨 후 Chemidoc(Fusion solo, Germany)을 이용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

5) 통계처리

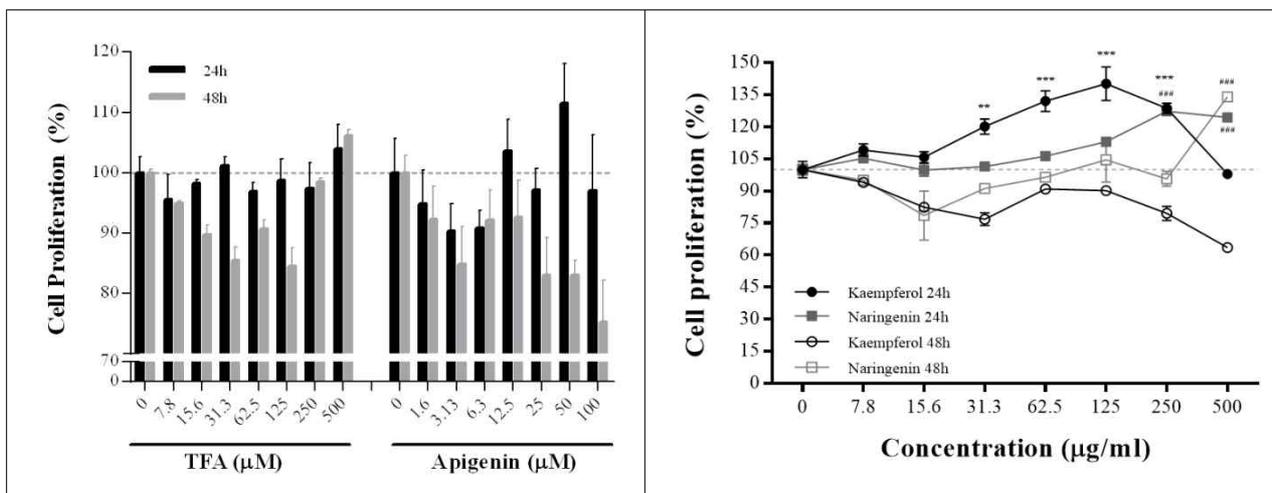
통계처리는 GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) 프로그램을 이용하여 one-way 혹은 two-way ANOVA 분석을 실시하였다. 검증은 P-value가 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

6) 시험결과

Rat vibrissa immortalized dermal papilla cell (DPC)에서의 황금찰수수 추출물의 모성장 촉진 기능을 조사하였다. DPC의 세포 증식에 미치는 영향을 알아본 결과는 다음과 같았다 (Fig. 1.). 황금찰수수 추출물을 0-500ug/ml의 다양한 농도로 처리하고 24시간과 48시간 후 세포 증식률을 알아본 결과, 24시간 처리시 125-250 ug/ml 사이의 농도에서 유의한 수준의 세포 증식이 나타났다. 반면 처리 48시간 이후에는 500ug/ml의 농도에서 증식이 나타났다. 반면 Minoxidil 0-10uM 처리시 유의한 세포 증식 효과는 나타나지 않았다.



황금찰수수 추출물에서 얻은 활성성분인 Trans-ferulic acid, Apigenin을 DPC에 처리하여 24시간과 48시간 경과 후 세포 증식률을 알아본 결과, 유의한 증가는 나타나지 않았고 Apigenin 100 μ M 48시간 처리시 유의한 독성이 나타났(P <0.05) (Fig. 2. A). 반면 Kaempferol, Naringenin의 경우 24시간 처리시 유의한 세포 증식 효과가 나타났 (Fig. 2. B). Kaempferol은 24시간 처리시 31.3–250 μ M의 농도에서 DPC의 증식이 유의하게 증가되었으나 48시간 처리시 유의한 독성이 나타났(p <0.01). 그러나 Naringenin은 500 μ M 처리시 24시간과 48시간 처리 모두에서 유의한 세포 증식 효과를 나타내었다.



황금찰수수 추출물이 DPC에서 Wnt/ β -catenin signaling pathway 및 growth factor 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 단백질을 추출해 western blotting으로 target 단백질의 발현을 조사하였다 (Fig. 3). 0-250 μ g/ml의 다양한 농도로 황금찰수수 추출물을 처리, 24시간 후 β -catenin과 모성장 관련 growth factor인 VEGF (vascular endothelial growth factor), KGF (keratinocyte growth factor) 단백질의 발현을 조사한 결과는 다음과 같았다. β -catenin의 경우 농도에 따른 발현량의 유의한 변화는 나타나지 않았다. VEGF 또한 농도에 따라 증가하는 경향이 나타났으나 유의한 차이는 없었다. 반면 KGF의 경우 125, 250 μ g/ml의 농도에서 유의한 수준으로 발현량이 증가하였다.

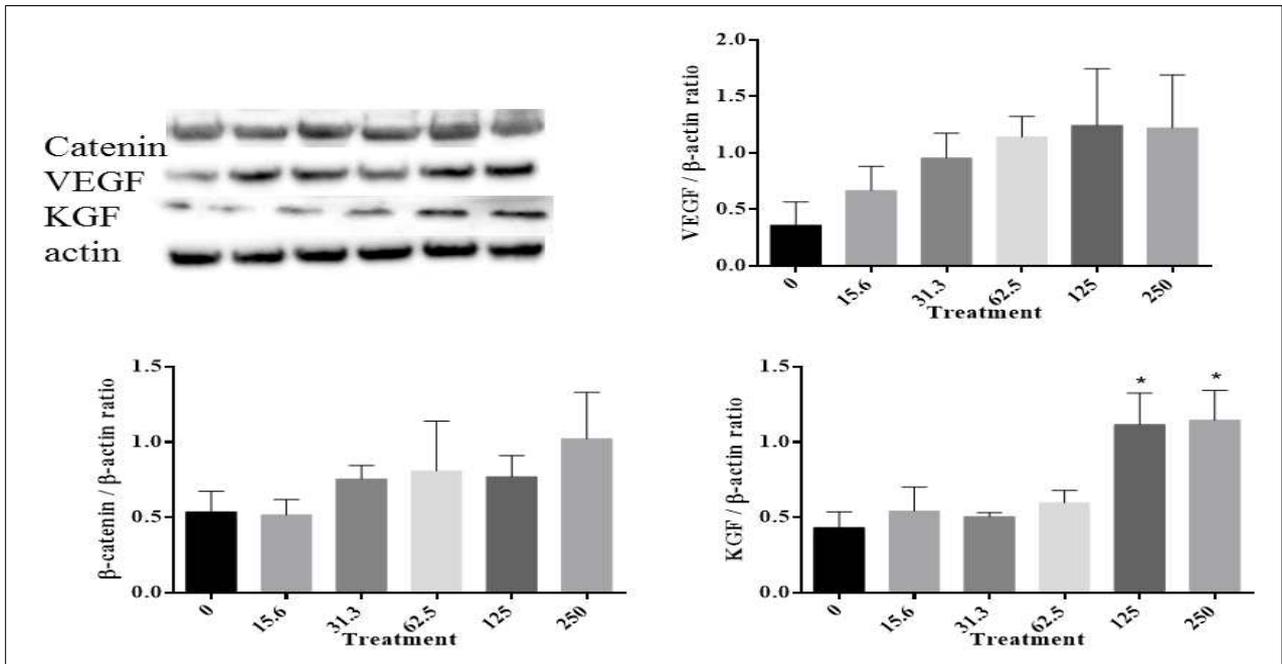


Figure 3. The effects of HGC extract on the level of growth factor and Wnt/ β -catenin signaling proteins in dermal papilla cells. DPCs were treated with HGC (0~250 μ g/ml) for 24hr. The levels of growth factor protein KGF and VEGF, Wnt/ β -catenin signaling protein β -catenin were analysed by western blot. * p <0.05 vs vehicle treated control. Values are presented as the mean \pm SEM.

황금찰수수에서 분리한 활성성분의 모성장 관련 growth factor 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, DPC 증식 효과가 나타났던 Kaempferol, Naringenin을 24시간 및 48시간 처리 후 단백질 발현을 조사하였다 (Fig. 4. A). KGF 단백질의 경우 minoxidil 10 μ M과 naringenin 50 μ M를 48시간 처리시 무 처리군에 비해 유의하게 발현이 증가되었다. VEGF의 경우 naringenin 250 μ M를 24시간 처리했을 때 유의하게 증가되었다. 반면 Wnt/ β -catenin signaling pathway의 활성화를 알아보기 위하여 β -catenin과 p- β -catenin(ser33)의 발현량의 변화를 살펴본 결과 황금찰수수 추출물(50, 250mg/ml)과 Minoxidil, Kaempferol 처리에 따른 대조군과의 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4. B). Naringenin 24시간 처리시 p- β -catenin의 발현량이 유의하게 증가되었으나 β -catenin/p- β -catenin ratio는 유의한 변화가 나타나지 않았다

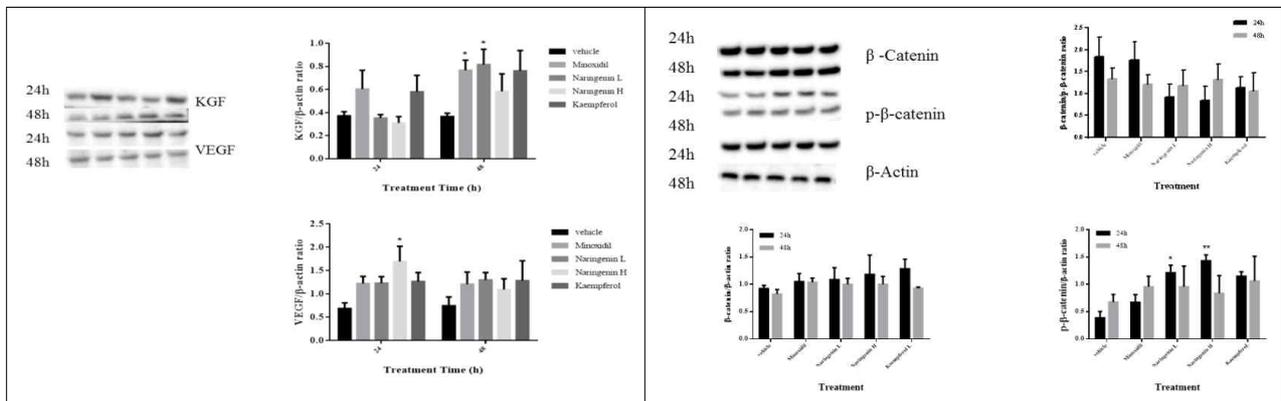


Figure 4. The effects of active component of HGC on the level of growth factor and Wnt/ β -catenin signaling proteins in dermal papilla cells. DPCs were treated with HGC(L: 50, H:250ug/ml), Minoxidil (10uM), Naringenin (L: 50, H: 250uM) and Kaempferol (50uM) for 24 h and 48h. Proteins were analyzed by western blot. Values are presented as the mean \pm S.E.M.

(A) The levels of growth factor protein KGF and VEGF were measured. * $p < 0.05$ vs vehicle treated control.
 (B) The levels of Wnt/ β -catenin signaling protein β -catenin and p- β -catenin, β -catenin/ p- β -catenin ratio were measured.

황금찰수수 추출물이 동물의 발모에 미치는 영향을 알아보기 위하여 등 피부를 제모하여 약물을 도포하며 털이 자라는 수준 및 관련 단백질의 발현을 조사하였다. 용매를 Acetone:olive oil(4:1)로, 황금찰수수 추출물의 농도를 100mg/ml과 200mg/ml로 하여 매일 100ul씩 도포 한 후의 모발 성장 결과는 다음과 같았다 (Fig. 5.). 실험 종료일인 도포 15일차의 HGC를 처리한 피부에서 모발이 자란 면적은 대조군에 비해 황금찰수수 추출물 100mg/ml를 도포한 군에서 유의하게 증가하였다 (Fig. 5. B.). 반면 200mg/ml 처리군은 대조군에 미흡한 수준을 보였다. 도포한 부위와 도포하지 않은 부위의 털이 자란 총 면적을 누적 도표로 확인한 결과 마찬가지로 도포 15일차 황금찰수수 추출물 100mg/ml 처리군에서 유의하게 높은 수치를 나타내었다 (Fig. 5. C.).

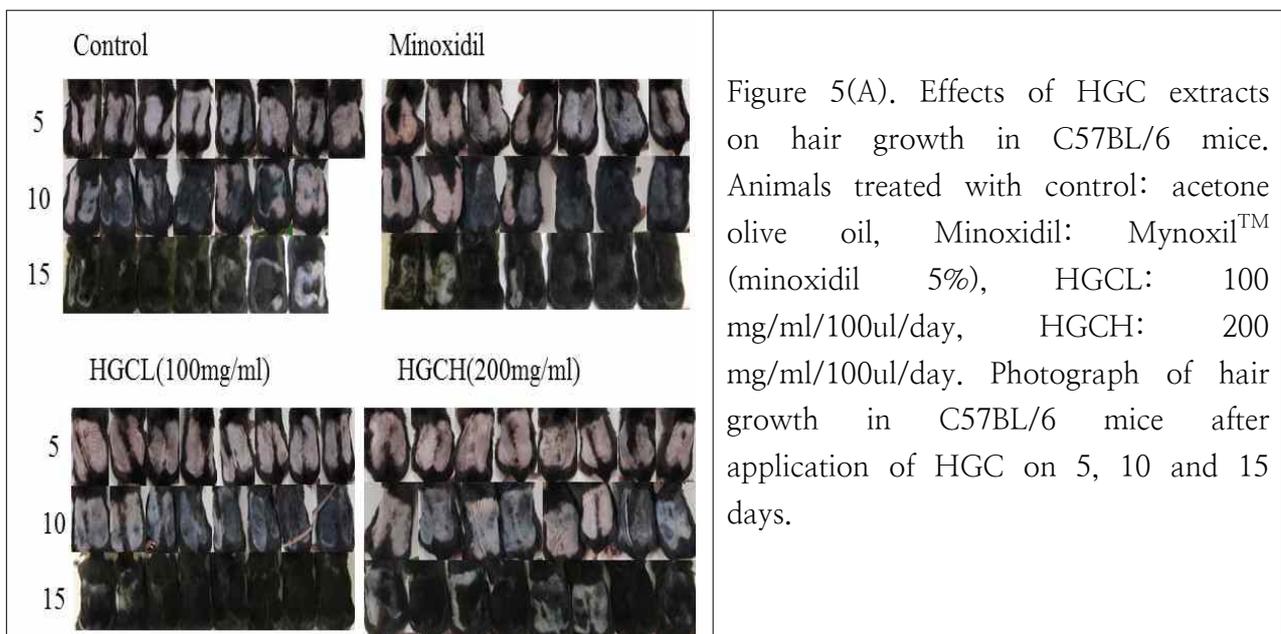


Figure 5(A). Effects of HGC extracts on hair growth in C57BL/6 mice. Animals treated with control: acetone olive oil, Minoxidil: MynoxilTM (minoxidil 5%), HGCL: 100 mg/ml/100ul/day, HGCH: 200 mg/ml/100ul/day. Photograph of hair growth in C57BL/6 mice after application of HGC on 5, 10 and 15 days.

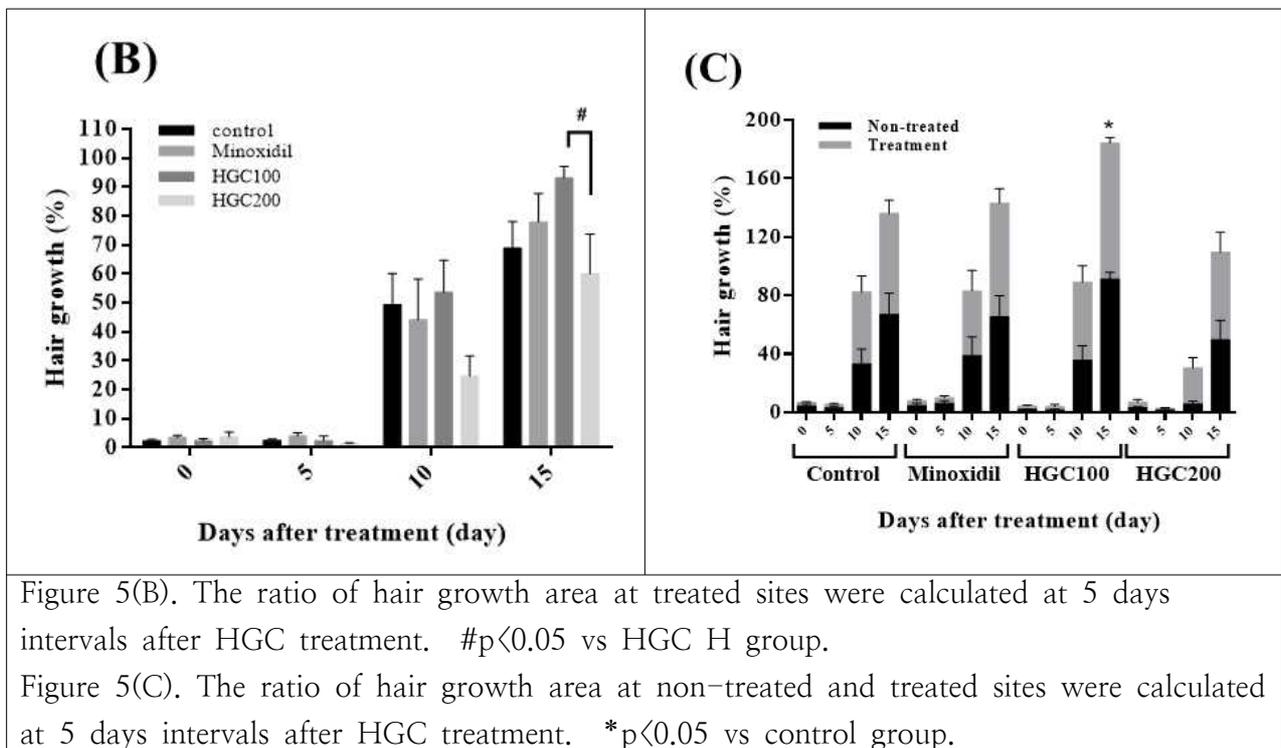


Figure 5(B). The ratio of hair growth area at treated sites were calculated at 5 days intervals after HGC treatment. # $p < 0.05$ vs HGC H group.

Figure 5(C). The ratio of hair growth area at non-treated and treated sites were calculated at 5 days intervals after HGC treatment. * $p < 0.05$ vs control group.

황금찰수수 추출물에서 얻은 활성성분 중 DPC에서 세포증식 및 모성장 관련 growth factor 단백질 발현의 증가를 보였던 naringenin을 이용하여 동물의 피부에 도포한 결과는 다음과 같았다 (Fig. 6). 2x4cm의 면적으로 등 피부를 제모 후 매일 200ul의 60mM naringenin을 도포한 후 8일 차에 대조군에 비해 유의하게 높은 값이 나타났다.

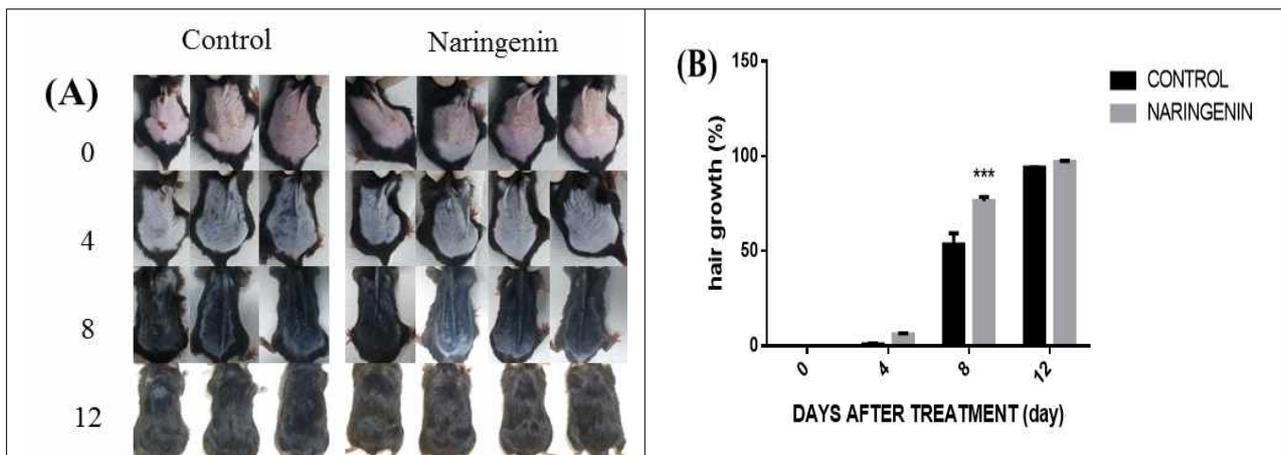


Figure 6. Effects of naringenin on hair growth in C57BL/6 mice. Animals treated with control: acetone olive oil, naringenin 60uM/200ul/day.

(A) Photograph of hair growth in C57BL/6 mice after application of naringenin on 0, 4, 8 and 12 days.

(B) The ratio of hair growth area at treated sites were calculated at 4 days intervals after naringenin treatment. *** $p < 0.001$ vs control group.

마지막으로 HGC를 도포한 동물의 피부에서 Wnt/ β -catenin signaling pathway 및 growth factor 단백질의 발현을 분석한 결과는 다음과 같았다 (Fig. 7). β -catenin의 경우 HGC 100mg/ml 처리군에서 발현이 증가하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었으며, VEGF와 KGF 모두 황금찰수수 추출물 100mg/ml 처리군의 도포 부위에서 대조군에 비해 유의하게 높은 수준으로 나타났다.

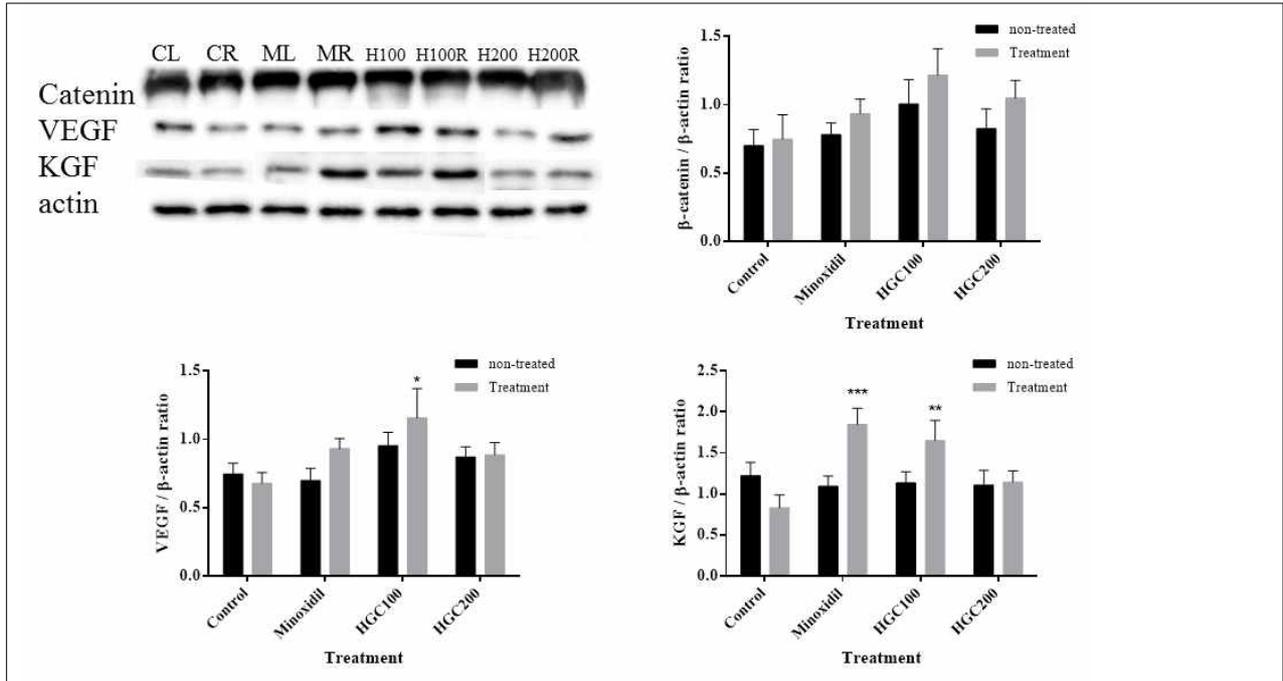


Fig. 7. The effects of HGC on the level of growth factor and Wnt/ β -catenin signaling proteins in dorsal skin of treated C57BL/6 mice. Animals treated with control: acetone olive oil, Minoxidil: MynoxilTM (minoxidil 5%), HGCL: 100 mg/ml/100ul/day, HGCH: 200 mg/ml/100ul/day for 15 days. The levels of growth factor protein KGF and VEGF, Wnt/ β -catenin signaling protein β -catenin were analyzed by western blot. Values are presented as the mean \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ vs control group; ** $p < 0.01$ vs control group; *** $p < 0.001$ vs control group

한편 황금찰수수 추출물의 피부 안전성을 평가하기 위하여 50Brix로 고농축한 추출물에 대하여 New Zealand white 토끼를 이용한 피부자극시험의 결과는 다음과 같았다. 1) 시험기간 동안 사망 개체는 관찰되지 않았으며, 2) 시험기간 동안 이상증상은 관찰되지 않았고, 3) 시험물질 투여에 의한 체중의 이상 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 4) 적용구획의 피부반응 관찰결과, 모든 개체의 찰과부위에서 홍반이 시험물질 제거 후 1시간부터 5일까지 산발적으로 관찰되었고, 부종이 실험동물 1 마리에서 시험물질 제거 후 1 시간부터 24시간 까지 관찰되었다. 5) 비찰과 부위에서는 홍반이 시험물질 제거 후 1 시간부터 6일까지 모든 개체에서 산발적으로 관찰되었고, 부종이 시험물질 제거 후 1 시간부터 48 시간까지 모든 개체에서 산발적으로 관찰되었다. 시험물질 제거 후 48 시간부터 13일까지(투여 후 14일, 관찰종료일) 모든 시험물질 적용구획에서 인설(scaling)이 관찰되었다. 대조구획에서 피부 이상 변화는 관찰되지 않았다. 6) 피부반응 평가기준에 따라 작성된 일차자극지수는 1.7로 평가되었고, 찰과부위 및 비찰과 부위는 각각 1.3 및 2.0으로 평가되었다. 이상의 결과로, 시험물질인 HGC(황금찰수수) 추출농축액의 토끼를 이용한 피부자극시험 결과, 약한 자극성으로 평가되었다.

본 피부자극시험에 사용한 시험물질은 식용 잡곡으로 오랫동안 섭취되어 온 안전성이 확보된 원재료인 찰수수로부터 추출된 물질이라는 점과 임상적 사용 용량에 비하여 50brix 이상으로 고농축된 시료라는 점, 찰과부위의 일차자극지수가 1.3임에 비하여 비찰과부위의 일차자극지수가 2.0으로 더 높게 나타났다는 점 등의 측면에서 황금찰수수 추출물은 임상 용량에서는 피부자극이 거의 없는 안전한 소재일 것으로 사료된다.

7) 고찰

모유두 세포(dermal papilla cell, DPC)는 여러 signaling pathway를 통해 모성장 관련 growth factor를 발현하고, 이 factor들은 모낭상피(follicular epithelium)의 증식 및 모낭의 발달을 조절하는 cytokine들의 신호 전달을 조절한다.²⁷⁾ 즉, 모유두 세포의 증식과 생존은 모성장 조절에 중요한 역할을 하므로, 본 연구에서는 황금찰수수의 모성장 효능을 평가하기 위해 모유두 세포의 증식률을 측정하였다. 실험결과, 황금찰수수 추출물 31-500ug/ml의 농도에서 모유두 세포의 증식이 증대되었다. 또한 황금찰수수에서 얻은 활성성분인 Kaempferol과 Naringenin을 처리한 경우에도 유의한 증식 효과가 나타남으로써 모성장에 긍정적 영향을 가질 것으로 판단되었다.

황금찰수수 추출물 및 활성성분이 growth factor 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 모유두세포에서 VEGF(vascular endothelial growth factor)와 KGF(keratinocyte growth factor)의 단백질 발현이 증가되었고, 황금찰수수 추출물을 도포한 C57BL/6 mouse의 피부에서도 발현이 증가되었다. VEGF는 Minoxidil의 작용 기전 중 하나로, 세포의 분열과 이동을 돕고, 결과적으로 신생혈관의 생성을 촉진하여 모유두 및 모모세포로의 양분 공급을 증가, anagen기의 유지 및 모성장을 촉진 시키는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾ 또한 KGF는 모섬유(hair fiber)의 신장을 자극하고 모낭의 발달에 직접적으로 관여한다.³¹⁾ 즉, 황금찰수수 추출물과 활성성분의 모유두세포 및 동물에서의 VEGF 및 KGF 단백질 발현 증가 효과는 모성장 촉진 및 성장기를 유지시키는 기능이 있음을 시사한다.

Wnt/ β -catenin 신호전달 경로는 세포의 생존에 관여하는 여러 growth factor 유전자의 발현을 조절하며, 모유두 세포에서 모발의 성장 및 성장기 유지 기능을 할 수 있는 것으로 알려져, 많은 연구들이 탈모 치료를 위한 표적으로 하고있다.¹³⁻¹⁵⁾ 그러나 본 연구에서는 모유두세포와 동물의 피부에 황금찰수수 추출물을 처리하였을 때 β -catenin의 발현이 증가하는 경향은 보였으나 유의성있는 증감은 나타나지 않았다.

Wnt리간드가 수용체에 결합되면 세포질 내의 β -catenin 분해가 억제되며, 누적된 β -catenin은 핵으로 이동하여 표적 유전자의 발현을 조절한다. 그러나 Wnt 신호가 없는 경우 Axin/APC/GSK3/CK1으로 구성된 complex에 의해 β -catenin의 T41, S37, S33이 인산화되며, 이후 ubiquitination 되어 proteasome에 의해 분해된다.^{29,34)} 반면 AKT의 활성화는 Wnt 신호에 의해 안정화된 β -catenin의 ser552를, PKA는 ser552 및 ser675의 인산화시켜 β -catenin의 세포핵으로의 이동을 촉진시킨다.³⁶⁾

황금찰수수 추출물 및 활성성분이 β -catenin의 분해를 억제하는 형태로 작용하는지를 알아보기로 모유두세포의 β -catenin과 p- β -catenin(S33)의 발현량의 변화를 살펴본 결과, 황금찰수수 추출물 처리에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이로 미루어 볼 때, 황금찰수수 추출물은 Wnt/ β -catenin 신호전달경로의 하위경로 산물로도 알려진 VEGF와 KGF의 발현은 증가시키지만 Wnt/ β -catenin 경로와는 별개의 작용기전을 갖는 것으로 판단된다.

Naringenin은 감귤류의 식물에 많이 함유되어있는 항산화, 항암 및 지질혈중 개선 등의 효능이 보

고된 식물의 flavonoid 중 하나이다. ^{32,33)}이전 연구에 따르면 나린제닌은 3T3-L1 preadipocytes 및 tsNRK에서 PI3K활성을 억제하며, Akt의 인산화와 GSK-3의 활성화 및 인산화를 억제하여 glucose uptake를 저해하는 것으로 보고되었다. ^{35,37)}반면 rat의 해마(hippocampus)에서는 PI3K/Akt 신호전달 경로의 인산화 및 활성화를 일으켜 세포사를 막는다는 연구결과도 있다. ³⁸⁾그러나 상기에 언급한 바와 같이, β -catenin의 세포핵으로의 이동은 AKT의 활성화에 의해 촉진되는 것으로 알려져 있다. 즉, 실험결과 모유두 세포에서 p- β -catenin(S33)의 증가가 나타난 것은 naringenin이 AKT의 인산화를 저하시킨 결과물이라 생각된다. 한편, 인간 모유두세포와 Keratinocyte에서 naringenin이 산화 스트레스에의 보호 및 VEGF의 발현을 증가시킨다는 본 연구의 결과가 알려진바 있다. ³⁹⁾즉, naringenin은 Wnt/ β -catenin 경로와는 별개로 VEGF와 KGF의 발현을 증가시켜 모성장을 촉진하는 것으로 판단된다.

황금찰수수 추출물이 동물의 발모에 미치는 영향을 알아보기 위하여 피부를 제모하여 약물을 도포하며 털이 자라는 수준 및 모성장 속도를 비교한 결과, 추출물 100ug/ml 및 naringenin 60uM을 매일 도포한 경우 10일 이내로 피부색이 회색을 띄기 시작하고 곧 빠른 속도로 털이 자라는 것을 확인할 수 있었다.

결과적으로, 황금찰수수 추출물 및 활성성분인 naringenin의 모발 성장 촉진 효과는 모유두세포의 증식 증가와 성장 인자로서의 KGF 및 VEGF의 발현 증가의 결과로 생각된다. 이러한 결과는 탈모 치료에의 새로운 치료 적 원천이 될 수 있음을 시사한다.

○ 사업화 성과 및 매출실적

1) 연구결과 특허출원 2건

특허출원 1	특허출원2
<p>출원일자: 2018.07.16. 출원번호: 10-2018-0082356 특허명칭: 황금찰수수 추출물 또는 그 분획물을 유효성분으로 함유하는 탈모방지 또는 발모촉진용 조성물</p>	<p>출원일자: 2019.05.09. 출원번호: 10-2019-0054152 특허명칭: 베르가모틴 또는 이의 유도체를 포함하는 탈모예방 또는 치료용, 또는 발모 또는 육모 촉진용 조성물</p>
<p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.07.16 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2018-0082356 (접수번호 1-1-2018-0698843-12) 출원인명칭 주식회사두벨바이오(1-2016-077564-8) 대리인성명 안창우(9-2009-001021-2) 발명자성명 최승람 이영재 전원아 발명의명칭 황금찰수수 추출물 또는 그 분획물을 유효성분으로 함유하는 탈모방지 또는 발모촉진용 조성물</p> <p style="text-align: center;">특 허 청 장</p> <p style="text-align: center;"><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ol style="list-style-type: none"> 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호-0131(가관코드)-접수번호 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 - 민원서비스다문로드 - 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허 실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허 실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원권 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 (전자적교번가서(PTO/SB-39))를 제출하여야 합니다. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다. ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000 중업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허가결결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다. </div>	<p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;">출원번호통지서</p> <p>출원일자 2019.05.09 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2019-0054152 (접수번호 1-1-2019-0472951-46) 출원인명칭 주식회사두벨바이오(1-2016-077564-8) 대리인성명 안창우(9-2009-001021-2) 발명자성명 최승람 이영재 전원아 발명의명칭 베르가모틴 또는 이의 유도체를 포함하는 탈모 예방 또는 치료용, 또는 발모 또는 육모 촉진용 조성물</p> <p style="text-align: center;">특 허 청 장</p> <p style="text-align: center;"><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <ol style="list-style-type: none"> 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호-0131(가관코드)-접수번호 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 - 민원서비스다문로드 - 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허 실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허 실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원권 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 (전자적교번가서(PTO/SB-39))를 제출하여야 합니다. </div>

2) 연구결과의 학술발표

학술회의: 대한수의학회 2018년 추계국제학술대회 (2018년 10월 25일~27일)

회의장소: 텔피노골프앤리조트

발표제목: Hairgrowth promoting effect of Hwanggeumchal Sorghum in C57BL/6 mouse and dermal papilla cells

발표저자: 전윤아, 박지영, 박정민, 신정협, 고봉현, 최송암, 이영재

2018년도 대한수의학회 국제학술대회 초록집

제58권 3호 부록 2018년 10월

(사)대한수의학회 2018년 추계국제학술대회
동물과 인간의 공존에 있어서 수의학의 역할
Veterinary Medicine for Coexistence Between Humans and Animals

- 일 시 : 2018년 10월 25일(목) ~ 27일(토)
- 장 소 : 텔피노골프앤리조트
- 주 최 : (사)대한수의학회, 대한수의연학·경제학연구회, 반려동물연구사망단, 수의학의학회, 한국육성병리학회, 한국동물매개감염체학회, 한국수의과대학협회, 한국수의교육학회, 한국심혈관동물수업학회, 한국어병학회, 한국해마수의학학회
- 후 원 : 한국과학기술단체총연합회, 한국미사학회, ㈜카카오에그리나유리나, 배령가인켐(라임동물약품), ㈜중앙병신연구소
- 협 찬 : ㈜백스파트, ㈜비이오노트, 한국회화연구원부생안전생물기연구소, ㈜세온바이오, ㈜오리엔트바이오, 한국심혈병리학회, ㈜인투메, 반려동물사랑재단, ㈜바이오독스텍, 빙그레, ㈜엑스파바이오

사단법인 대한수의학회
The Korean Society of Veterinary Science

이 발표논문집은 정부재원(과학기술진흥기금 및 복권기금)으로 한국과학기술단체총연합회의 지원을 받아 발간되었습니다

P-277

Hairgrowth promoting effect of Hwanggeumchal Sorghum in C57BL/6 mouse and dermal papilla cells.

Yoon A Jeon^{1,2}, Ji Young Park¹, Jeong Min Park¹, Jeong Hyup Shin¹, Byong Hyeon Go¹, Song Am Choi¹, Young Ja Lee¹

¹College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Korea, ²Dowellbio Inc., Suwon 16229, Korea

Present study was carried out to investigate the effect of Hwanggeumchal sorghum (Sorghum bicolor M.) extract on hair growth, cell viability promotion and growth factor protein expression at dermal papilla cell (DPC) and C57BL/6 mice. Male C57BL/6 mice were treated on the depilated dorsal skin with Hwanggeumchal sorghum extract. Mice were divided into 4 groups including normal (vehicle), Hwanggeumchal sorghum extract (1 low, 1 high and 5% aminoxidil treated group. DPCs were cultured with the presence of 0.500µg/ml concentration of Hwanggeumchal sorghum extract during overnight. Then, cell viabilities were measured by MTT assay. The expression level of growth factor proteins related to hair growth was measured by western blotting using skin and DPCs. In vivo, hair growth effect was shown in C57BL/6 mice by Hwanggeumchal sorghum extract. Moreover, treatment of extract on DPCs induced effects of cell viability promotion compared to control treated group. Protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), keratinocyte growth factor (KGF) and β-catenin in the skin and DPCs were significantly increased in all of the Hwanggeumchal sorghum extract treatment groups compared to the control group. These results indicate that Hwanggeumchal sorghum extracts effectively promoted hair growth and protein expression suggesting that this could be a new therapeutic source for the treatments of hair loss.

P-278

A study on policy issue for classroom with animals of the United States

Jihyun Yoo¹, Hyunjoon Jin, Hyeon-gu Oh

¹Technology Service Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju-gun, Korea

In this study, it was surveyed some of education policy issue of U.S. to make it simpler to incorporate animals in education settings for animal assisted intervention(AAI) research and support. As a result, it showed legitimately incorporating animals into schools require not only scientific support but also a shift in public policy promoting a more positive awareness of AAI. Legislators and administrators need to recognize that the value of animals in schools far surpasses any potential risks. Educators must be trained to learn how animals in the classroom can be integrated, including understanding appropriate husbandry and guidelines for proper hygiene. The US Centers for Disease Control and prevention(CDC) has published guidelines for animals in school settings, which include basic recommendations on handling. Some states have announced guidelines or have policies regarding the keeping of certain animals such as wild animals based on health and safety concerns, and have made guideline including recommendations that relate to the health and proper restraint of animals. This study could be used as a basic data for developing the policy of the animal assisted education in Korea.

P-279

Development of specific monoclonal antibody against CD4-1 in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Jae Wook Jung, Tae Sung Jung

Despite increasing studies regarding immune defense in fish, several difficulties have emerged in identifying the immune system of fish due to numerous species in fish, genetic diversity and especially shortage of monoclonal antibodies, as a tool for recognizing target cells. Most cell markers developed for fish aimed at B cells, granulocytes and macrophages. On the other hand, few mAbs were developed for T cells. To obtain a better understanding of the immune system related to CD4-1, we produced anti-CD4-1 mAb (1F8-3) using olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Here using 1F8-3 we showed, we found that there is a relation between the CD4-1 population and the immune system. This finding is important in further elucidating the immune system of teleost. Expression of cells recognized by 1F8-3 was examined through FITC observation, which appear green under fluorescence microscope. In the negative control, leukocytes treated with only FITC did not show fluorescence in lymphocytes outside in other cells such as neutrophils and macrophages. In 1F8-3 positive group, however, many lymphocytes were positively stained with FITC as shown by the green fluorescence, whereas FITC staining was not expressed in other leukocytes. The proportion of 1F8-3 positive lymphocytes from gill, liver, spleen, kidney, intestine and peripheral blood was indicated. Relatively higher percentages of 1F8-3 positive lymphocytes were shown in spleen, head and trunk/kidney 4 (1st), 20%, 5.76%, 0.9%, 0.77%, 0.65%, respectively. While, low percentages of positive cells were represented in gill, 2.56%, 41%, liver, 0.64%, 12%, intestine, 2.11%, 0.9% and in peripheral blood, 2.56%, 27%, in kidney. CD4-1 transcripts was detected in only 1F8-3 positive lymphocytes, CD4-1, CD4 and 1F8-3 transcripts were detected both 1F8-3 positive and negative lymphocytes, whereas CD8α, CD8β, IgM, and IgM transcripts were expressed in only 1F8-3 negative lymphocytes. Once a mAb has been produced, it could be used to detect the presence of a substance specific to it. The results from this study revealed that 1F8-3 produced heterooid detect CD4-1 in olive flounder. The use of this mAb may lead to a better understanding of the role of cell markers associated with T cell differentiation.

P-280

Developments of Point-of-care test for dogs' allergy

Youngja Ha, Yeonhik Choi

Dept. of Bio-medical Analysis, Bio Campus, Korea Polytechnic

It is important to know allergen, the cause of allergy, to effectively treat skin diseases caused by allergens in domestic dogs. At present, allergen tests of dogs are carried out using ELISA or microchip array method in laboratories. However, they are time consuming and costly. The purpose of this study is to develop POCT (Point-of-care test) that can rapidly diagnose allergen, the cause of skin diseases in dogs, by using serum samples. For this purpose, 10 respiratory, contact allergen and 10 food allergens were selected from the common allergens of domestic dogs. The selected allergen was partially purified and the IgG of allergen present in the serum of the dog was confirmed by western blotting method.



Hair growth promoting effect of *Hwanggeomchal* Sorghum in C57BL/6 mice.

Yoon A Jeon^{1,2}, Ji Yong Park¹, Jeong Min Park¹, Jeong Hyup Shin¹, Bong Hyeon Go¹, Song Am Choi², Young Jae Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Korea, ²Dowellbio Inc., Suwon 16229, Korea

Introduction

Mammalian hair follicles regulate a cycle of growth, regression and rest (anagen, catagen and telogen). Hair loss is usually the result of early entry into catagen.

It is known that Wnt / β -catenin signaling plays an important role in hair growth and regeneration process. When the Wnt ligand binds to its receptor, β -catenin degradation in the cytoplasm is prevented while β -catenin migration into the nucleus increases, which up regulates the expression of target genes such as VEGF, IGF-1 and KGF.

Sorghum is well known for its various affects on human health (antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer effects), but its effects on hair growth are unknown.

Objective

The purpose of this study was to investigate the effect of *Hwanggeomchal* sorghum (*Sorghum bicolor* M.) extract on hair growth, cell viability promotion and growth factor protein expression at dermal papilla cell (DPC) and C57BL/6 mice.

Materials & Methods

DPCs(dermal papilla cell) were cultured with the presence of 0-500ug/ml concentration of *Hwanggeomchal* sorghum extract. Then, cell viabilities were measured by MTT assay.

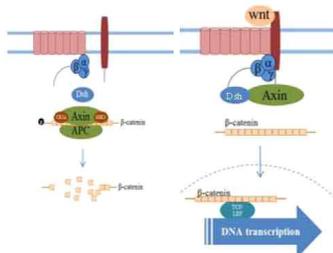
Depilated dorsal skin of male C57BL/6 mice were treated with *Hwanggeomchal* sorghum extract.

Mouse were divided into 4 groups including normal, *Hwanggeomchal* sorghum extract and minoxidil-treated group.

The expression level of growth factor proteins related to hair growth was measured by western blotting using skin and DPCs.

Conclusions

The Wnt/ β -catenin pathway



References

- HSub Shin, KJ Lee, TH Yi. Effect of *Vitex rotundifolia* on Hair Regeneration: *in vitro* and *in vivo* Study. J. Beauty & Trichology 5(1), 27-31(2009)
 Ji Kang, SC Kim, YJ Jeon, YS Koh, ES Yoo, HK Kang. Hair-growth Promoting Effect of Grateloupia elliptica Via the Activation of Wnt Pathway. Kor. J. Pharmacogn. 47(2) : 143 ~ 149 (2016)

Results

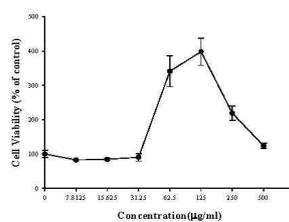


Fig. 1. Cell viability effects of Hwanggeomchal sorghum extract on the dermal papilla cells (DPCs) by MTT assay. The cells were treated with various concentrations of Hwanggeomchal sorghum extracts for overnight.

Treatment of extract on DPCs induced effects of cell viability promotion compared to non-treated group.

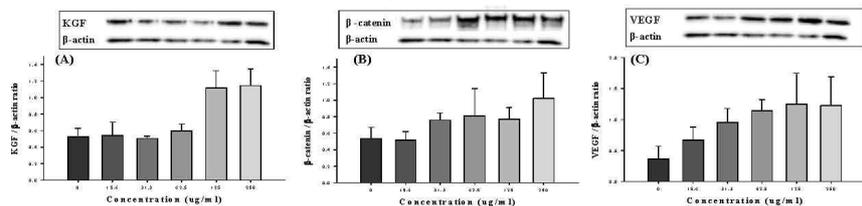


Fig.3. Protein expression on Hwanggeomchal sorghum extract treated-DPCs. The cells were treated with various concentrations of Hwanggeomchal sorghum extracts for 24h. A: keratinocyte growth factor (KGF); B: β -catenin; C: vascular endothelial growth factor (VEGF)

Following extract treatment on DPC, protein expression was increased depending on HGC concentration.

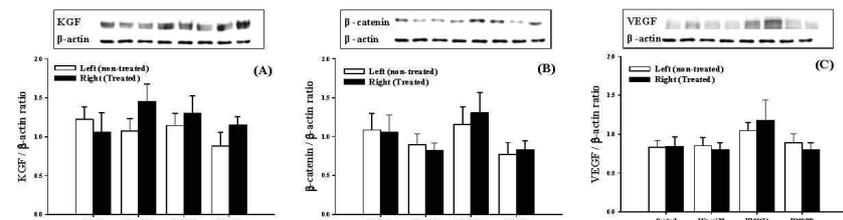


Fig.4. Protein expression on treated-skin on 15th day after application. A: keratinocyte growth factor (KGF); B: β -catenin; C: vascular endothelial growth factor (VEGF).

Protein expression of KGF, β -catenin and VEGF in the skin was increased in HGC1 (Hwanggeomchal sorghum extract, 100mg/ml/100ul/day) treatment groups compared to the control group.

In this study, the hair growth effect of the extract was confirmed using *in vitro* and *in vivo* models.

As a result, it was found that the extract promotes DPC proliferation, which plays an important role in hair growth, and promotes the rate of hair growth in hair removal model animals. In addition, it was confirmed that on both of animal skin and DPCs, *Hwanggeomchal* sorghum extracts positively influenced the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway through the increase of β -catenin protein expression. KGF is a factor stimulating hair growth, and VEGF is known to act as a factor promoting neovascularization, leading to the growth of hair.

Therefore, the hair growth promoting effect of the extract is thought to be the result of activation of the Wnt / β -catenin signaling pathway and increased expression of KGF and VEGF as growth factors.

These results indicate *Hwanggeomchal* sorghum extracts effectively promoted hair growth and protein expression suggesting that this could be a new therapeutic source for the alopecia treatment.

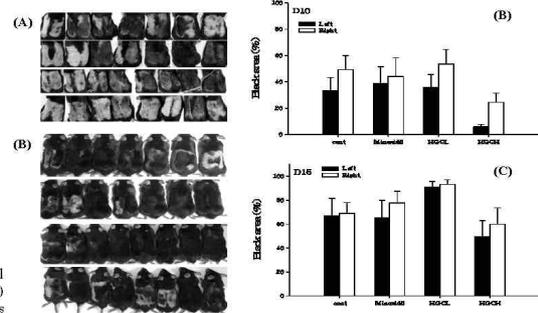


Fig. 2. Effect of Hwanggeomchal sorghum extracts on C57BL/6 male mouse hair growth. After shaving, 2 part of dorsal skins were treated topically with the minoxidil (5%), HGC (L:100, H:200 mg/ml/100ul/day), and vehicle for 15 days. A, B: The skins were photographed on 10th and 15th day after application; C, D: Percentage of black area on dorsal skin on 10th and 15th day after application.

Following 15th day of treatment, the HGC1 groups showed higher percentage than the other groups.

3) 연구결과 문헌발표 (투고 중)

학술지명: 한국 식품저장 유통학회지 (IF 1.21)

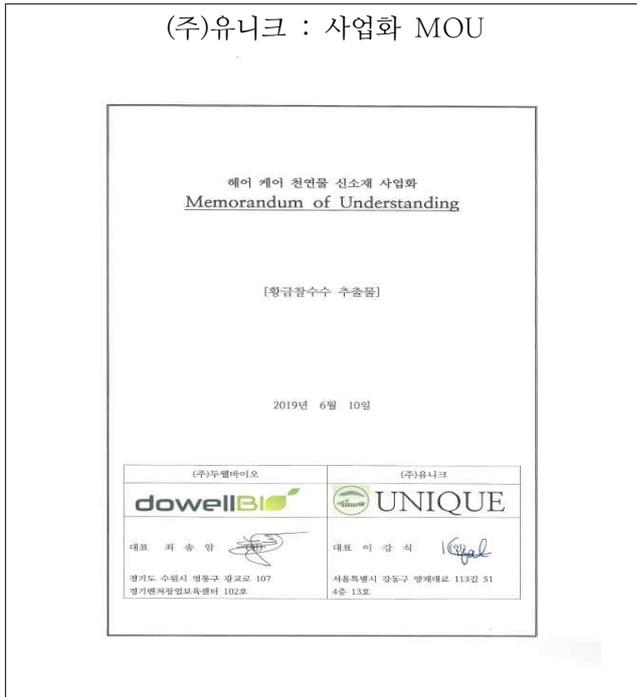
논문초록

Present study was carried out to investigate the effect of Hwanggeumchal sorghum (*Sorghum bicolor* M.) extract and its active component (TFA(trans-ferulic acid), apigenin, Kaempferol and Naringenin) on hair growth promotion effects at dermal papilla cell (DPC) and C57BL/6 mice. Male C57BL/6 mice were treated on the depilated dorsal skin with Hwanggeumchal sorghum extract. Mice were divided into 4 groups including normal (vehicle, N), Hwanggeumchal sorghum extract (L low, H high), 5% minoxidil (M) and Naringenin treated group. DPCs were cultured with the presence of Hwanggeumchal sorghum extract and its active component. Then, cell viabilities were measured by MTT assay. The expression level of growth factor proteins(KGF, VEGF and β -catenin) related to hair growth was measured by western blotting using skin and DPCs. In vivo, hair growth effect was shown in C57BL/6 mice by Hwanggeumchal sorghum extract. Moreover, treatment of extract and its active component (Kaempferol and Naringenin) on DPCs induced effects of cell proliferation compared to control treated group. Protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), keratinocyte growth factor (KGF) and β -catenin in the skin and DPCs was significantly increased in all of the Hwanggeumchal sorghum extract treatment groups compared to the control group. These results indicate that Hwanggeumchal sorghum extracts and its active component (Kaempferol and Naringenin) effectively promoted hair growth and protein expression suggesting that this could be a new therapeutic source for the treatments of hair loss.

4) 사업화실적 : MOU 체결 1건 및 특허기술실시계약 1건

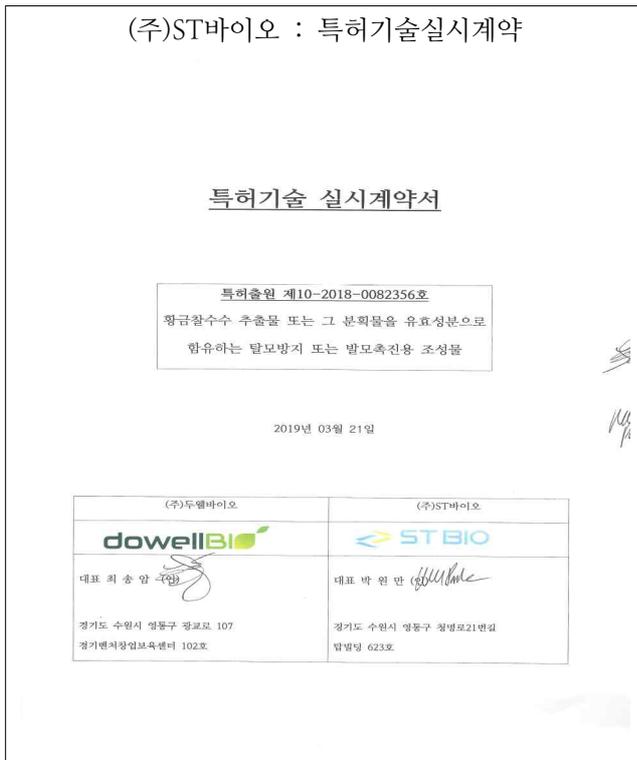
MOU 내용: 황금찰수수 추출물을 이용한 헤어케어용 화장품 사업화 MOU

거래처: (주)유니크



특허기술실시계약: 특허출원 제10-2018-0082356호 특허기술 통상실시계약

거래처: (주)ST바이오



5) 사업화실적 : 매출 달성 5건 (₩22,000천원)

매출품목: 황금찰수수 추출농축액 및 추출분말
 거래처: 글로디스, 삼경화성, ST바이오, 유니크 등

전자세금계산서		승인번호		20190417-1000000-92926314	
등록번호	879-87-00649	중사업장번호		등록번호	204-21-34830
상호(법인명)	주식회사두월바이오	성명	최승압	상호(법인명)	글로디스
사업장	경기도 수원시 영통구 광교로 107, 부록동 102호(이외동, 경기도중소기업지원센터)	사업장	서울특별시 영등포구 63로 40, 342(여의도동, 라이프오피스텔)	사업장	서울특별시 영등포구 63로 40, 342(여의도동, 라이프오피스텔)
업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매
이메일	dowell@dowellbio.com	이메일	alanjo@naver.com	이메일	
작성일자	2019/04/17	공급가액	7,500,000	세액	750,000
비고					
월	일	품목	규격	수량	단가
04	15	HGC 황금찰수수추출농축액	Kg	30	250,000
합계금액					
8,250,000		현금	수표	어음	외상미수금

전자세금계산서		승인번호		20190501-1000000-10186767	
등록번호	879-87-00649	중사업장번호		등록번호	135-04-54019
상호(법인명)	주식회사두월바이오	성명	최승압	상호(법인명)	삼경화성
사업장	경기도 수원시 영통구 광교로 107, 부록동 102호(이외동, 경기도중소기업지원센터)	사업장	경기도 수원시 영통구 신원로 88(산동, 디지털라이더2) 103동 111호	사업장	경기도 수원시 영통구 신원로 88(산동, 디지털라이더2) 103동 111호
업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도매채소
이메일	dowellbio@gmail.com	이메일	sam7546@naver.com	이메일	
작성일자	2019/05/01	공급가액	226,800	세액	22,680
비고					
월	일	품목	규격	수량	단가
05	01	HGC 황금찰수수추출분말	Kg	1	226,800
합계금액					
249,480		현금	수표	어음	외상미수금

전자세금계산서		승인번호		20190607-1000000-38947663	
등록번호	879-87-00649	중사업장번호		등록번호	130-73-00232
상호(법인명)	주식회사두월바이오	성명	최승압	상호(법인명)	에스티바이오
사업장	경기도 수원시 영통구 광교로 107, 부록동 102호(이외동, 경기도중소기업지원센터)	사업장	경기도 수원시 영통구 청명로21번길 19, 623호	사업장	경기도 수원시 영통구 청명로21번길 19, 623호
업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	제조도소매
이메일	dowellbio@gmail.com	이메일	wommpark@naver.com	이메일	
작성일자	2019/06/07	공급가액	5,000,000	세액	500,000
비고					
월	일	품목	규격	수량	단가
06	07	HGC 황금찰수수추출농축액	Kg	20	250,000
합계금액					
5,500,000		현금	수표	어음	외상미수금

전자세금계산서		승인번호		20190617-1000000-46130927	
등록번호	879-87-00649	중사업장번호		등록번호	661-25-00303
상호(법인명)	주식회사두월바이오	성명	최승압	상호(법인명)	유니크
사업장	경기도 수원시 영통구 광교로 107, 부록동 102호(이외동, 경기도중소기업지원센터)	사업장	경기도 양주시 고하길 282-36, 609동 502호	사업장	경기도 양주시 고하길 282-36, 609동 502호
업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	제조도소매
이메일	dowellbio@gmail.com	이메일	hangjo@gmail.com	이메일	
작성일자	2019-06-17	공급가액	500,000	세액	50,000
비고					
월	일	품목	규격	수량	단가
06	17	HGC 황금찰수수추출농축액	Kg	5	100,000
합계금액					
550,000		현금	수표	어음	외상미수금

전자세금계산서		승인번호		20190708-1000000-62236294	
등록번호	879-87-00649	중사업장번호		등록번호	204-21-34830
상호(법인명)	주식회사두월바이오	성명	최승압	상호(법인명)	글로디스
사업장	경기도 수원시 영통구 광교로 107, 부록동 102호(이외동, 경기도중소기업지원센터)	사업장	서울특별시 영등포구 63로 40, 342(여의도동, 라이프오피스텔)	사업장	서울특별시 영등포구 63로 40, 342(여의도동, 라이프오피스텔)
업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매
이메일	dowellbio@gmail.com	이메일	alanjo@naver.com	이메일	
작성일자	2019/07/08	공급가액	8,750,000	세액	875,000
비고					
월	일	품목	규격	수량	단가
07	02	황금찰수수추출분말	Kg	25	350,000
합계금액					
9,625,000		현금	수표	어음	외상미수금

전자세금계산서		승인번호		20190708-1000000-62236294	
등록번호	879-87-00649	중사업장번호		등록번호	204-21-34830
상호(법인명)	주식회사두월바이오	성명	최승압	상호(법인명)	글로디스
사업장	경기도 수원시 영통구 광교로 107, 부록동 102호(이외동, 경기도중소기업지원센터)	사업장	서울특별시 영등포구 63로 40, 342(여의도동, 라이프오피스텔)	사업장	서울특별시 영등포구 63로 40, 342(여의도동, 라이프오피스텔)
업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매
이메일	dowellbio@gmail.com	이메일	alanjo@naver.com	이메일	
작성일자	2019/07/08	공급가액	8,750,000	세액	875,000
비고					
월	일	품목	규격	수량	단가
07	02	황금찰수수추출분말	Kg	25	350,000
합계금액					
9,625,000		현금	수표	어음	외상미수금

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.2억원
			향후 3년간 매출	5억원
		관련제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	3억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 1%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 3% 국외 : 1%
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 1%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		100위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		50위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1		
	소요예산(백만원)		200		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0.2	5	20
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.2	5	7
국외		0	1	1	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		-본 연구 결과로 확보한 신규 특허출원 소재를 활용한 발 모촉진용 원료 및 신제품 개발을 통해 국내 및 해외에서 사업화 추진 예정			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	5	30	
	수 출	0	5	30	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

구분	내용
최종목표	연구를 통해 확인한 식용 잡곡 황금찰수수의 발모촉진 효과를 입증하기 위하여 다양한 실험모델에서의 발모촉진 효과를 평가하고, 활성성분의 규명, 원료 소재의 표준화 및 규격화, 제형개발 및 안정화 연구 등을 수행하여 발모촉진제 제품화 및 사업화의 기반을 마련하고자 함.
세부목표	(1) 표준화된 발모촉진용 황금찰수수 추출물 원료 소재 개발 (1종) (2) 발모촉진 활성성분 분리 동정 (1종) (3) 황금찰수수 추출물을 함유한 발모촉진제 제품 개발 (2종) (4) 원료 소재 및 제품의 기준규격 설정 (각 1건) (5) 발모촉진 원료소재 GLP기관 안전성 평가 (1건) (6) 원료 소재 및 제품의 외부공인기관 시험성적서 (2건) (7) 시제품 안정성 평가 (가속 및 장기보존시험 6개월 이상) (8) 특허출원 1건 (9) 문헌발표 1건

3-2. 목표 달성여부

연구개발 목표 및 내용	달성 내용
표준화된 발모촉진용 황금찰수수 추출물 원료 소재 개발 (1종)	황금찰수수 추출농축액 및 추출분말 소재 개발 (2종)
발모촉진 활성성분 분리 동정 (1종)	5종 이상의 화합물을 분리하였으며, 최종적으로 기능성분인 Naringenin의 발모촉진효과를 확인함
황금찰수수 추출물을 함유한 발모촉진제 제품 개발 (2종)	연구개발을 통하여 화장품 완제품 4종과 경구용 식품 제형으로서 캡슐 시제품 개발을 완료함 (5종)
원료 소재 및 제품의 기준규격 설정 (각 1건)	황금찰수수 추출농축액과 추출분말에 대한 기준규격 설정을 완료함 (2건)
발모촉진 원료소재 GLP기관 안전성 평가 (1건)	GLP기관인 (주)크로엔을 통하여 피부자극시험 수행 (1건)
원료 소재 및 제품의 외부공인기관 시험성적서 (2건)	설정된 기준규격에 따른 외부기관 시험성적서 확보 (2건)
시제품 안정성 평가 (가속 및 장기보존시험 6개월 이상)	개발한 황금찰수수 추출농축액 및 추출분말에 대하여 안정성 시험 2개월 완료
특허출원 1건	특허출원 완료 (2건)
문헌발표 1건	학술발표 1건 완료 문헌발표 1건 예정 (투고중)

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

(1)인체 임상평가

- 화장품 분야에 있어서 보다 공격적인 마케팅을 위해서는 탈모예방 기능성화장품으로 식약처의 인증을 획득하는 것이 필요함.
- 탈모 증상의 완화와 관련된 제품이 '의약품'에서 '기능성화장품'으로 전환됨에 따라, 인체에서의 임상평가를 통한 객관적인 근거자료의 확보가 필요함.
- 본 과제는 1년간 1억원의 연구비를 지원하는 사업으로서 각종 표준화연구 및 효능평가, 시제품개발 등의 내용으로 연구가 수행되었으며, 연구계획서에서도 언급하였듯이 인체 임상평가 연구까지 수행하는 것은 불가능하므로 추가 후속 연구를 통하여 탈모증상 완화에 대한 임상평가를 수행할 예정임.
- 소자본의 소규모 창업기업에서 인체에서의 임상평가를 자체적으로 수행하는 부분에 어려움이 많으며, in-vitro 및 in-vivo 실험에서 탁월한 발모촉진 효과가 입증된 황금찰수수를 이용한 발모촉진제의 사업화를 위한 임상시험 연구에 대한 후속 지원 프로그램이 절실함.

(2) 안정성시험

- 제조한 원료 소재 및 시제품의 안정성을 평가하기 위하여 가속조건과 실온에서의 장기보존시험을 2019년 3월 10일부터 진행하고 있으며, 가속시험의 경우 최소 6개월간 진행하고자 계획하여 2019년 9월 10일 완료할 예정이며, 장기보존시험의 경우 12개월간 진행할 계획이므로 2020년 3월 10일 완료할 예정임.
- 추출 및 제조공정 연구, 기능성분 분리동정 및 표준화와 규격화 등에 소요되는 시간과 GMP 인증업체에서의 대량 제조공정 검토를 위한 비용, 공정 검토 및 일정 조정 등에 필요한 시간, 그리고 시제품 제조를 위한 화장품 GMP인증 제조업체에서의 시제품 제작 등의 연구 내용에 있어서 일정의 지연이 발생하였음.

(3)문헌발표

- 연구결과의 학술발표는 2018년 10월에 대한수의학회를 통해 완료하였으나 문헌발표에 있어서는 문헌의 완성도를 높이기 위한 추가 연구와 기능성분 (Naringenin)에 대한 내용의 추가 연구 및 작용기전 규명을 위한 근거자료 확보에 필요한 추가 연구를 수행하였으며, 그 결과를 정리하여 현재 논문 투고를 진행 중임 (식품저장유통학회지 투고 중).

(4)사업화

- 현재 황금찰수수 추출농축액 원료 소재에 대하여 화장품 원료로서 일부 매출이 발생하고 있으며, 아모레퍼시픽, LG생활건강 등의 중견기업을 포함한 다양한 업체들과의 제휴를 통해 사업을 확대할 계획임.
- 사업화 관련 MOU 및 특허기술실시계약이 체결되어 본격적인 사업화를 추진할 계획임
- 건설업체들과의 협력을 통한 발모촉진용 건강기능식품 개별원료인정 추진을 통한 시장 확대
- 장기적으로 발모촉진용 천연물신약으로의 개발 가능성 검토를 통한 의약품 사업화 추진 예정

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 개발한 원료 소재 (황금찰수수 추출농축액 및 분말)을 이용하여 두피용 발모촉진용 화장품 및 식품 제형으로 개발하여 사업화에 활용하고 있음. (매출 발생)
- 인체에서의 발모촉진 임상시험 결과 확보를 위한 추가 연구를 통해 기능성화장품 인증을 획득하여 보다 적극적인 마케팅 전개 예정
- 본 연구를 통해 신규의 발모촉진용 기능성분 Bergamottin을 발굴하였으며, 향후 추가 연구를 통해 신규 발모촉진용 제품 개발에 활용할 계획임. (특허출원 완료)
- 본 과제를 통해 확립된 스크리닝 및 효능평가 기술, 활성성분 분리동정 기술 등을 이용하여 천연물 소재를 이용한 신규의 화장품 또는 식품 소재 발굴에 활용함.
- 발모촉진 또는 탈모예방용 천연물 원료 소재 판매와 더불어 화장품 제조업체 및 건강기능식품 업체와의 전략적 제휴를 통한 특허기술이전 등의 사업화를 동시에 추진할 계획임.
- 해당 기술의 특허출원 및 문헌발표를 통해 인력 양성, 사업화에 필요한 인재의 고용 확대 등의 경제적 성과가 기대됨,

<제품화전략>

	제품화 소재	단계	제품화	제품화
1	황금찰수수	1단계	원료화	황금찰수수추출농축액/분말
		2단계	제품화	헤어샴푸, 헤어크림 등 두피용 제품
2	Bergamottin	3단계	원료화	Bergamottin함유 추출농축액
		4단계	제품화	탈모예방용 기능성화장품 인증
3	복합소재	5단계	제품화	황금찰수수+Bergamottin 복합제품

붙임. 참고문헌

1. Alonso, L. and Fuchs, E. (2006) The hair cycle. *J Cell Sci.* 119(Pt 3):391-3.
2. Stenn, K. S., Paus, R. (2001) Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 81: 449-494.
3. Ellis, J. A., Sinclair, R. and Harrap, S. B. (2002) Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. *Expert. Rev. Mol. Med.* 4: 1-11.
4. Zong, Z.P., Matsui, S., Li, A. L., Katsuda, S., Yamaguchi, N. (2003) Autoimmune hair loss induced by alloantigen in C57BL/6 mice. *Cell Struct Funct* 28(1) : 97-104.
5. Trueb, R.M. (2002) Molecular mechanisms of androgenic alopecia. *Exp. Gerontol.* 37: 981-990.
6. Peters, E. M. J., Arck, P. C., Paus, R. (2006) Hair growth inhibition by psychoemotional stress: A mouse model for neural mechanisms in hairgrowth control. *Exp. Dermatol.* 15: 1-13.
7. Ozeki, M., Tabata, Y. (2003) In vivo promoted growth of mice hair follicles by the controlled release of growth factors. *Biomaterials* 24: 2387-2394.
8. Danilenko, D. M., Ring, B. D., Pierce, G. F. (1996) Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Mol Med Today.* 2:460-467.
9. Callahan, C. A., Ofstad, T., Horng, L., Wang, J. K., Zhen, H. H., Coulombe, P. A., Oro, A. E. (2004) MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes Dev.* 18, 2724-2729.
10. Lowry, W. E., Blanpain, C., Nowak, J. A., Guasch, G., Lewis, L. and Fuchs, E. (2005) Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* 19, 1596-1611.
11. L. Xing, Z. Dai, A. Jabbari, J. E. Cerise, C. A. Higgins, W. Gong, A. de Jong, S. Harel, G. M. DeStefano, L. Rothman, P. Singh, L. Petukhova, J. Mackay-Wiggan, A. M. Christiano, R. Clynes (2014) Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat. Med.* 20, 1043-1049.
12. Greco, V., Chen, T., Rendl, M., Schober, M., Pasolli, H. A., Stokes, N., Dela Cruz-Racelis, J., Fuchs, E. (2009) A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell*, 4, 155-169.
13. Kishimoto, J., Burgeson, R. E., Morgan, B. A. (2000) Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev.* 15;14(10):1181-5.

14. Shin, E. Y., Park, E. C., Hong, Y. H., Kim, G. H. (2013) Protein kinases involved in the regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *J. Life Sci.*, 23(7); 947–954
15. Tsai, S.Y., Sennett, R., Rezza, A. (2014) Wnt/beta-catenin signaling in dermal condensates is required for hair follicle formation. *Dev Biol.* 385: 179–188.
16. Dallob, A. L., Sadick, N. S., Unger, W., Lipert, S. Geissler, L.A., Gregoire, S. L. (1994) The effect of finasteride, a 5 α -reductase, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *J Clin Endocrinol Metab.* 79 : 703–706.
17. Han, J. H., Kwon, O. S., Chung, J. H., Cho, K. H., Eun, H. C., Kim, K. H. (2004) Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. *J Dermatol Sci.* 34(2):91–8.
18. Meisheri, K. D., Cipkus, L. A., Taylor, C. J. (1988) Mechanism of action of minoxidil sulfate-induced vasodilation: a role for increased K⁺ permeability. *J Pharmacol.* 245(3);751–60.
19. Kwack, M. H., Kang, B. M., Kim, M. K., Kim, J. C. and Sung, Y. K. (2011) Minoxidil activates beta-catenin pathway in human dermal papilla cells: A possible explanation for its anagen prolongation effect. *J. Dermatol. Sci.* 62: 154–159.
20. Melcangi RC, Caruso D, Abbiati F, Giatti S, Calabrese D, Piazza F, Cavaletti G. (2013) Neuroactive Steroid Levels are Modified in Cerebrospinal Fluid and Plasma of Post- Finasteride Patients Showing Persistent Sexual Side Effects and Anxious/Depressive Symptomatology. *J Sexual Medicine.* 10(10):2598–603. 20.
21. McClellan, K. J., Markhan, A. (1999) Finasteride: a review of its use in male pattern hair loss. *Drugs* 57(1): 111–126.
22. Mackay, A., Isles, C., Henderson, I., Fife, R., Kennedy, A. C. (1981) Minoxidil in the management of intractable hypertension. *Quarterly Journal of Medicine* 50(198): 175–190.
23. Woo, K. S., Lee, J. S., Kang, J. R., Ko, J. Y., Song, S. B., Oh, B. G., Seo, M. C., Kwak, D. Y., Nam, M. H. (2011) Effects of cultivated area on antioxidant compounds and antioxidant activities of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(11): 1512–1517.
24. Kim, M. S., I. T. Oh, D. Y. Jun, J. Y. Lee, H. Y. Sohn, D. Y. Kwak, M. C. Seo, K. S. Woo, J. Y. Ko, T. W. Jung, M. H. Nam, M. H. Woo, and Y. H. Kim. 2013. Anticoagulant and fibrinolytic activities of Hwanggeumchal sorghum in vitro. *J. Life Science.* 23(12) : 1460–1470.
25. Wolfender, J. L., W. P, Ndjoko, K., Hobby, K. R. and Major, H. J. (2000) Evaluation of

Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MS for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis* 28, 895–906.

26. Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J. L. and Hartle, D. K. (2008) Inhibition of hyaluronidase activity by select sorghum brans. *J. Med. Food* 11, 307–312.

27. Rushan, X, Fei, H, Zhirong, M, Yu-zhang, W. (2007) Identification of proteins involved in aggregation of human dermal papilla cells by proteomics. *J Dermatol Sci* 48: 189–197.

28. Wangefjord, S., Brändstedt, J., Ericson Lindquist, K., Nodin, B., Jirström, K. and Eberhard, J. (2013) Associations of betacatenin alterations and MSI screening status with expression of key cell cycle regulating proteins and survival from colorectal cancer. *Diagn. Pathol.* 8: 10.

29. MacDonald, B. T., Tamai, K. and He, X. (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9–26.

30. Witner AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. (2003) Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 22: 1–29.

31. Braun S, Krampert M, Bodo E, et al. (2006) Keratinocyte growth factor protects epidermis and hair follicles from cell death induced by UV irradiation, chemotherapeutic or cytotoxic agents. *J Cell Sci* 119(23): 4841–4849.

32. F.A. van Acker, O. Schouten, G.R. Haenen, W.J. van der Vijgh, A. Bast. (2000) Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett*, 473: 145–148

33. A.W. Harmon, Y.M. Patel. (2004) Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.* 85: 103–110

34. Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. and He, X. (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837–847.

35. Kwon, O. S., Kim, B. Y., Kim, K. A., Kim, M. S., Oh, H., Kim, B. S., Kim, Y. H., Ahn, J. S.(2004) Effect of the hesperetin and naringenin on pp60 v-src -induced NF- κ B activation. *Korean J.Pharm.* 35: 244–249.

36. Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T. and Lu, Z. (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282, 11221–11229.

37. Harmon, A. W., Patel, Y. M. (2003) Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:

38. Hua, F. Z., Ying, J. 1., Zhang, J. 1., Wang, X. F., Hu, Y. H., Liang, Y. P., Liu, Q., Xu, G. H. (2016) Naringenin pre-treatment inhibits neuroapoptosis and ameliorates cognitive impairment in rats exposed to isoflurane anesthesia by regulating the PI3/Akt/PTEN signalling pathway and suppressing NF- κ B-mediated inflammation. *Int J Mol Med.* 38(4):1271–80
39. Madaan, A., Joshi V., Kishore, A, Verma, R., Singh, A. T., Jaggi, M., Sung, Y. K. (2017) In vitro Hair Growth Promoting Effects of Naringenin and Hesperetin on Human Dermal Papilla Cells and Keratinocytes. *Amer J Derm Venereology.* 6(3): 51–57

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 연구성과후속지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 연구성과후속지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.