

발간등록번호

11-1543000-000579-01

한국산 겨우살이의 근 기능 저하 억제 효과 규명 및
근 위축 방지 효능 기능성 식품 개발

(Development of Functional Foods for Inhibition of
Muscle Atrophy with Korean Mistletoe)

한 동 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한국산 겨우살이의 근 기능 저하 억제 효과 규명 및 근 위축 방지 효능 기능성 식품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 09 월 07 일

주관연구기관명 : 한 동 대 학 교

주관연구책임자 : 김 종 배

세부연구책임자 : 김 종 배

연 구 원 : 서 병 선

연 구 원 : 정 주 성

연 구 원 : 지 광 일

연 구 원 : 김 지 환

연 구 원 : 이 교 석

연 구 원 : 신 은 총

연 구 원 : 배 태 근

연 구 원 : 윤 종 욱

연 구 원 : 김 예 은

연 구 원 : 배 태 근

연 구 원 : 송 준 현

연 구 원 : 이 겨 래

협동연구기관명 : 삼양제넥스 식품연구소

협동연구책임자 : 김 광 수

요 약 문

I. 제 목

한국산 겨우살이의 근 기능 저하 억제 효과 규명 및 근 위축 방지 효능 기능성 식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구의 목표

한국산 겨우살이 추출물의 근기능 저하 억제 효능을 다각적으로 조사하고 그 기전을 규명하여 과학적인 근거를 확립하여 임상시험을 할 수 있는 기반을 확립하고 수행함에 있어서 그 세부적인 목표를 요약하면 ;

가. 한국산 겨우살이 추출물과 단일성분인 BA(Betulinic acid)의 근기능저하 억제 효능 조사를 통한 과학적 근거확립

나. 효능의 기전 규명 : 근기능 관련 유전자발현과 여러 생리활성에 미치는 영향

다. 임상시험을 위한 기반확립

- 모듬토의를 통한 근기능 관련 효능 개별인증 항목 추가
- 임상시험을 위한 전임상시험 자료확보
- 원료 제조공 확립과 안정성 시험 등을 통한 유통기한 결정과 지표물질 결정

라. 임상시험 수행

- 인체적용시험 Protocol 작성(바이오 마커 및 측정 항목 선정).
- 인체 적용시험을 위한 시제품 제작 및 제형 결정
- 인체적용시험 실시기관 선정하여 IRB 통과

마 겨우살이 추출물을 이용한 가공 기술 및 제형 연구로 제품생산을 위한 기반확립.

바. 기술 특허권 확보

- 국내외 특허출원으로 기술력 확보
- 논문발표로 효능과 기전에 과관 연구결과 인정을 받도록 한다.

2. 연구의 필요성

가. 근기능 저하는 질병 및 노화로 야기되는 사회적인 문제다 : 삶의 질을 높여 건강한 삶의 구현에 있어서 필수적이며 이와 관련된 사업은 고부가가치를 창출하는 융합산업임.

- 노년층 부상의 가장 큰 원인은 노화성 근 위축에 의한 낙상임. 이로 인한 활동의 제약이 노령층 사망의 주요한 원인 중 하나임.
- 노화성 근 기능 저하는 곧 '운동력(체력) 저하'며 '생명연장' 단축과도 직접적 관련
- 근기능 저하는 질병(암 등)으로 인한 전형적인 현상임. 이의 해결은 의학적 및 산업적인 파급효과가 지대함.

나. 경제적인 파급효과가 지대하다

- 아직 근기능 촉진을 위한 제약 또는 기능성 식품이 미미하다. 따라서 개발될 경우 경제적인 파급효과가 매우 크다

다. 천연물질을 이용한 근기능 저하 억제 소재개발은 세계적인 추세다.

- 근 기능 증진(운동력 증진) 및 항노화 효능을 가진 소재 개발은 무한한 잠재력을 가짐.
- 포도 껍질 속의 레스베라트롤 (Resveratrol, RSV)은 가장 성공적인 예다.
- 사과껍질 속의 UA(ursolic acid)이 근기능강화효과가 있음이 밝혀져 상당한 주목을 받음. 새로운 소재 개발이 필요하다.

라. 본 연구를 성공적으로 수행할 수 있는 기반이 확립 : 풍부한 선행연구결과 확보

- 한국산 겨우살이의 항암효과, 면역력 증진 효과 등을 과학적으로 입증, 국내외 특허획득.
- 근기능과 직접적으로 연계된 한국산 겨우살이의 효능 입증 : 항당뇨, 항비만, 운동력 증진, 생명연장등
- 트리테르페노이드 성분(예;BA)의 다양한 생리활성 효능 입증
- 안전성 시험 완료 : 2011년 한국식품연구원의 지원을 받아 한국건설생활환경시험연구원(KCL)에서 겨우살이 추출물의 안전성평가를 완료하였음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

년차별 및 세부과제별로 요약하면 다음과 같다

1. 1차년도

가. 제1세부과제

- (1) 한국산 겨우살이 및 자생식물 추출법 개발
 - (가) 냉수 및 열수 추출법의 사용
 - (나) 각 방법으로 만든 추출물의 활성 비교
- (2) in-vitro 연구 : 근육세포에서의 작용 확인
 - (가) Cell metabolism: AMPK activation, mitochondrial activity
 - (나) Protein synthesis: Akt pathway
 - (다) protein degradation: ubiquitin ligase (Atrogin-1, Murf1)
- (3) muscle atrophy의 내분비학적 접근
 - (가) 겨우살이 추출물, 트리테르페노이드 계열 물질 처리에 따른 atrogin-1, murf1의 발현량 확인
 - (나) Testosterone 분비에 미치는 영향조사
- (4) in-vivo 연구 : 실험 동물에서 fasting, denervation에 따른 muscle atrophy에 미치는

영향 조사

- (가) 식이 제한 & 신경 손상후 겨우살이 추출물 투여
- (나) 조사항목 : 근육 무게 변화, gene expression 변화 확인, grip strength 측정
- (5) 실험동물에서 겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분 식이에 따른 muscle hypertrophy(근비대)에 미치는 영향조사
- (가) 4주간 일반 식이와 함께 겨우살이 추출물 투여
- (나) 조사항목 : 근육 무게 변화, gene expression 변화 측정, fiber type 확인
- (6) 주성분의 기전 연구: IGF-1 pathway 규명
serum free starvation condition의 C2C12 사용: insulin 첨가 유무에 따라 biomarker의 activation 정도 측정
- (7) 트리테르페노이드(BA) 식이에 의한 지방산 산화
겨우살이 추출물 군 이외에 usrolic acid 투여 군을 실험: 대조군으로 썸과 동시에 트리테르페노이드 계열 물질 식이에 따른 변화량 관찰
- (8) 시료 식이에 의한 유전자 발현 변화
- (가) 일반 식이 사료에 겨우살이 추출물을 첨가 하여 식이 사료로 만들
- (나) 5주간 자유 식이 후 유전자 발현 변화 확인

나. 제1협동과제

- (1) 겨우살이 관련 조사/ 인체적용시험 기반 구축
- (가) 근기능 저하 억제 관련 제품 수집 및 분석
- (나) 근기능 관련 자료 및 문헌 조사
- (다) 기능성 인정을 위한 건강기능성 모뎀토의 신청
- (라) 개별인정 가능성 타진 및 추가필요 자료 준비
- (2) 겨우살이 추출물을 이용한 제형연구
- (가) 제형 및 type 결정, 부원료 적합성 연구 : 쌀국수, 캔디, 과립형 분말, 음료, 정제, 앰플, 스틱 젤리
- (3) 인체 적용시험 Protocol 작성
- (가) 노인성 근 감소에 대한 개별인정 항목이 없음
- (나) 바이오 마커 및 측정 항목 선정
- (4) 인체적용시험용 시제품 제작
- (가) placebo 및 실험군에 대한 배합 설계 및 배합 실험
- (5) 겨우살이 추출물의 인체적용시험(1단계)
- (가) 인체적용시험 CRO 기관 선정 : 바이오푸드 CRO
- (나) 인체적용시험을 위한 1차 및 2차 유효성 평가 변수 협의
- (다) 인체적용시험 수행 연구 기관 탐색

2. 2차년도

가. 제1세부과제

- (1) 겨우살이 추출물 및 자생식물 추출물과 트리테르페노이드 성분의 식이에 의한 혈중 성분 변화 연구
 - 혈액 내 성분 분석 (adiponectin, T3, testosterone, insulin, cholesterol, c-reactive protein)
- (2) 주성분 물질의 노화 연구
 - (가) 노화 관련 유전자(SMP30) 발현으로 세포 보호 및 항산화 효과 확인
 - (나) 미토콘드리아 내 HSP10의 발현으로 근육 보호 확인
- (3) 지표물질 설정에 관한 연구
 - 지표물질 설정과 정량법 확립
- (4) BA의 여러 생리활성 조사
 - (가) 항염증 효능 조사 : NF-kB, TNF- α , IL-6, IL-1 β 발현량 확인
 - (나) 해당작용에 미치는 영향: G6P, PEPCK 발현량 확인
 - (다) 근기능 관련 nucleic acid 수용체 발현에 미치는 영향 조사 : PPAR- α , PPAR- γ , PPAR- δ , LXR- α , LXR- β , FXR- α

나. 제1협동과제

- (1) 인체 적용시험 Protocol 작성
 - (가) 노인성 근 감소에 대한 개별인정 항목이 없음. 이를 위한 기반호확립
 - (나) 대상자, 피험자수, 섭취기간, 바이오 마커 및 측정 항목 선정, 통계 방법 등에 대한 항목 작성
- (2) 겨우살이 추출물의 인체적용시험(1단계)
 - (가) 인체적용시험기관 선정 (피험자수, 평가항목 등에 대한 협의 필요)
 - (나) 식약처 인체적용시험에 대한 모뎀토의 (인체시험적용시험의 피험자 수, 바이오마커, 섭취 기간 및 용량 등에 대한 자문)
 - (다) 인체 적용 시험 계약 체결
 - (라) IRB 심사 완료
- (3) 겨우살이 추출물의 인체 적용 시험(2단계)
 - (가) 피험자 모집
 - (나) 인체적용시험 진행 사항 점검 및 진행
 - (다) 결과 입수 및 유효성 평가
- (4) 겨우살이 추출물 제품 응용 개발 및 용도 확대
 - (가) 시생산 제품의 안정성 및 지표성분 함량 시험
 - (나) 가속 실험을 통한 유통기간 결정
- (6) 겨우살이 소재의 사업기반 조성
 - (가) 대량 생산을 위한 원료 확보 방안 구축
 - (나) 관능평가를 통한 소비자 조사
 - (다) 제품 방향 결정: 대상 소비자 중심 시장 고려 제품 컨셉 및 홍보방안 구축

IV. 연구개발결과 (성과)

1. 연구성과

가. 특허출원

- (1) 근 위축 억제 및 근 비대 활성을 갖는 한국산 겨우살이 추출물
 - (가) 특허사무소와 특허 출원 작업 중임.
 - (나) 대상국: 대한민국
 - (다) 제목: 근 위축 억제 및 근 비대 활성을 갖는 한국산 겨우살이 추출물
 - (라) 내용: 겨우살이 추출물의 투여가 신경절단 마우스 모델에서 근육의 소실을 억제하고 근 위축 유전자 atrogen-1의 발현을 억제하여 근 위축 억제 효과를 입증하였으며 PGC-1 α /Sirt1의 발현을 촉진하여 근 비대를 유도함을 확인함. 또한 그와 관련된 PI3K/Akt pathway의 마커들을 인산화시켜 근 비대 효과를 일으킴을 확인함. 겨우살이의 근 위축 억제 및 근 비대 효과를 가진 원료로서 활용가치를 강조한 것으로 겨우살이의 근기능 위축억제 및 근비대 촉진효능에 대해선 세계 최초임.
- (2) 트리테르페노이드계의 베틀린산(BA;betulinic acid)의 근기능에 대한 특허
 - (가) 현재 진행 중 (2014년 10월 중 출원 완료 가능)
 - (나) 대상국: 일차 국내 출원하고 이어 국외출원 할 계획임.
 - (다) 제목: 베틀린산의 근위축 억제 효과
 - (라) 내용: 베틀린산의 근위축 억제 및 근비대촉진 효과를 기전까지 포함한 다양한 측면에서 입증함. BA가 이런 효능을 갖고 있음을 증명한 것은 세계에서 최초임.
 - (마) 의미 : 현재 BA는 항암제로 임상시험을 하고 있는 물질로 학계에 상당한 주목을 받고 있음. 그러나 근기능과 관련한 효능을 입증한 것은 본 연구가 최초임. 아직 세계적으로 근기능과 관련한 제약 또는 기능성 식품이 매우 미미한 것을 감안할 때 기대가 됨.

나. 최종 결과들을 토대로 발표할 주요 논문 및 학회발표 실적

- (1) 논문 실적 및 계획
 - (가) The Korean Mistletoe (*Viscum album coloratum*) Extract Has an Antiobesity Effect and Protects against Hepatic Steatosis in Mice with High-Fat Diet-Induced Obesity
 - ① 2013년 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 게재
 - (나) 겨우살이 추출물의 근위축 억제 및 근비대 효능에 대한 논문
 - ① 영문제목 : Effects of Korean mistletoe extract on the inhibition of skeletal muscle atrophy and the promotion of hypertrophy
 - ② 2014년 10월 중 투고 예정 : 본 연구에 참여한 정주성 연구원의 한동대학교 생명과학부 석사학위 논문으로 제출하고 국제학회지에 발표할 계획임.
 - (다) 베틀린산의 근위축 억제 및 근비대 효과에 대한 논문
 - ① 영문제목 : Effects of betulinic acid on the inhibition of skeletal muscle atrophy and hypertrophy of muscle.

② 2014년 11월 중 투고 예정 : 특허출원 후 발표 예정임.

(2) 학회발표실적 및 계획

(가) 국내학회발표

① 겨우살이의 근 위축 관련 바이오마커 발현 변화 연구

㉠ 2013년 생화학분자생물학회 연례국제학술대회 참석

㉡ 제목: Korean Mistletoe Extract (KME) affect the expression of biomarkers associated with muscle atrophy

㉢ 일시: 2013. 05. 14 - 16

㉣ 장소: 코엑스(서울)

② 신경절단 및 금식 마우스 모델에서의 겨우살이 추출물의 근 위축 저하 및 근 강화 연구

㉠ 2014년 생화학분자생물학회 연례국제학술대회 참석(2014. 05. 14 - 16)

㉡ 제목: Korean mistletoe extract prevents muscle atrophy and promotes muscle hypertrophy in denervation and fasting mouse models

㉢ 일시: 2014. 05. 14 - 16

㉣ 장소: 코엑스(서울)

(나) 국외학회발표

① 겨우살이 추출물의 미토콘드리아 활성의 자극에 의한 운동력 증가

㉠ 2013년 World Federation of Chinese Medicine Societies 참석

㉡ 제목: Korean Mistletoe (*Viscum album coloratum*) Extracts Improves Endurance Capacity in Mice by Stimulating Mitochondrial Acitivity

㉢ 일시: 2013. 11. 8 - 10

㉣ 장소: CLIFFORD HOTEL(광저우, 중국)

② 베틀린산의 근 위축 억제 효과 연구

㉠ 2015년 내에 국외 학회 발표 예정.

다. 서적 출판

(1) 과학으로 밝혀진 겨우살이의 신비 (김종배 저)

(가) 출판일: 2014. 07. 02

(나) 출판사 : 중앙미디어 북스, ISBN 979-11-950134-2-5 93470

본 과제에서 지원받아 수행한 근 위축 억제 기능과 근 비대 촉진 효능 외에 겨우살이에 대한 다양한 생리활성에 관한 연구결과들을 수록함.

라. 임상시험 실시

(1) 식약처에 근기능관련 개별인증을 위한 모뎀토의를 신청하여 인정을 받음.

(2) 이 결과에 따라 현재 임상시험을 이화여자대학 목동병원에서 실시 중임.

(3) 근 위축 억제 기능으로는 국내외적으로 최초임.

V. 연구성과활용 계획

1. 산업화 계획

가. 기능성 및 일반 식품 개발

(1) 일반 식품 원료 활용 확대

일반식품에 적용하여 다양한 제품 개발과 이의 사업화 : 특히 노인을 위한 식품을 중심으로 다양한 형태의 제품 개발

(2) 개별인증 및 기능성 식품 개발

(가) 식약처에 개별인증을 위한 신청 : 임상시험 후 이를 바탕으로 2015년 내에 신청하여 추진

(나) 상기 결과를 바탕으로 다양한 기능성 식품 개발과 이의 산업화

- ① 노인성 근위축 환자 대상 기능성 식품 개발
- ② 장기 입원환자 대상 기능성 식품 개발
- ③ 암환자 기력회복용 기능성 식품 개발

나. 제약화를 위한 활용

아직 근기능 관련 제약은 매우 미미한 실정임을 감안하여 겨우살이 추출물이나 BA를 이용한 제약화까지 개발할 수 있도록 계속 사업을 추진할 계획임.

연구성과 요약

1. 한국산 겨우살이 추출물이 근육유이축을 억제하고 나아가 근육비대를 촉진하는 효과가 있음을 과학적으로 처음으로 입증하였음
2. 단일성분인 트리테르페노이드계, BA(betulinic acid)와 합성 유도체도 같은 효과가 있음을 입증하여 제약의 기초도 확립하였음.
3. 효능입증뿐만 아니라 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하여 기전까지 규명하였고 그 외 다양한 생리활성에 미치는 영향도 함께 조사하여 좋은 결과를 얻었음
4. 원료제조공정을 확립 과 지표물질 결정으로 생산기반 확립
5. 임상시험 수행으로 개별인증 획득을 위한 기반 확립 : 현재 진행 중 : 세계 최초의 근기능 관련 개별인증이 됨
6. 다양한 기능성 식품 개발 : 일반식품은 하더라도 생산가능. 개별인증이 될 경우 2015년 내에 기능성 식품 최초 생산과 사업화 가능

SUMMARY

1. **Title of project:** Development of Functional Foods for Inhibition of Muscle Atrophy with Korean Mistletoe
2. **Key words:** anti-aging, sarcopenia, mistletoe, muscle atrophy, hypertrophy, Atrogin-1, MuRF1, betulinic acid, triterphenoids
3. **Institute:** School of Life Science, Handong Global University
4. **Principle Investigator:** Prof. Jong Bae Kim
5. **Associated Company:** Samyang Genex R&D Center
6. **Project Period:** 2012.08.08.~2014.08.07

Korean mistletoe is a semi-parasitic plant that is known to possess numerous beneficial properties such as anti-cancer and anti-diabetic. In this relatively unexplored field, we aimed to describe the effect of the Korean mistletoe and triterphenoid(Betulinic acid) on denervation- and fasting-induced skeletal muscle atrophy. Both *in vitro* and *in vivo* experiments have been implemented, where the results of the *in vitro* experiments indicated not only of the inhibitory activity of Korean mistletoe on muscle atrophy, but also of hypertrophic effect. More specifically, E3 ubiquitin ligases, Atrogin-1 and MURF1, that are upregulated during muscle atrophy were found to be downregulated by the treatment of Korean mistletoe and BA. At the same time, the Akt-mTOR pathway was found to be upregulated and thus promoted muscle hypertrophy, enhancing muscle strength and exercise capacity. A similar pattern was observed in the *in vivo* experiment when mice were either fed chow supplemented with Korean mistletoe extract at 0.3% and 1.5% of their total diet, or administered 200mg/kg or 500mg/kg of Korean mistletoe extract by oral gavage. In conclusion, the present study shows that Korean mistletoe extract and BA effectively reverses skeletal muscle atrophy induced by fasting and denervation. Our purpose is to prove the health benefit of Korean mistletoe extract, and to obtain

an approval of "Functional Ingredient for Health Functional Food". Manufacturing process and process controls of mistletoe extract powder were established and the finished product specification is satisfactory. Chlorogenic acid was selected as a marker compound of mistletoe extract powder. Functionality content and consumption amount were studied. Clinical protocol were reviewed and passed IRB. For the purpose of commercialization of mistletoe extract powder, we studied various types products- tablets, rice noodles, candies, beverages, drinks, shake, stick jelly etc.

CONTENTS

Chapter 1: Summary of Project.....17

1. Purpose.....17

(1) Yearly planning : aims and research contents.....17

(2) Necessity of Project.....20

Chapter 2: State-of-the-art researches.....23

1. State and problems associated related techniques.....23

(1) Technology level and trends in domestic and foreign countries.....23

Chapter 3: Research Contets and Results.....31

1. 1st project.....31

(1) Aim, content and criteria of researches.....31

(2) Methods.....33

(3) Results.....41

① 1st year.....41

② 2nd year.....82

2. 2nd project.....100

(1) Aim, content and criteria of researches.....100

| | |
|--------------------|-----|
| (2) Necessary..... | 101 |
| (3) Results..... | 102 |
| ① 1st year..... | 102 |
| ② 2nd year..... | 141 |

Chapter 4: Rating and Achievement and Contribution to The Related Fields.....185

| | |
|--|-----|
| 1. Achievement based on the original aims of research and points of evaluation..... | 185 |
| (1) 1st year..... | 185 |
| (2) 2nd year..... | 187 |
| 2. Contribution to the related fields..... | 188 |
| (1) Oriental plants research and development activation..... | 188 |
| (2) Foundation of new indivisual acknowledgement..... | 188 |
| (3) Standardization of raw material extraction and settlement of index material..... | 189 |
| (4) Development of new material for muscle function..... | 189 |
| (5) Investigation of pathway of muscle atrophy inhibition..... | 189 |
| (6) Investigation of effecto of betulinic acid to inhibit muscle atrophy..... | 190 |
| (7) Preparation of basis for pharmaceuticals..... | 190 |

Chapter 5: What to do with results obtained through carrying out the project : Planing of application for the industrilization.....192

| | |
|---|-----|
| 1. Plans of industrialization..... | 192 |
| 2. Plans of technological diffusion..... | 194 |
| 3. Plans of intellectual property right securation..... | 199 |
| 4. Plans of Further Study..... | 200 |

Chapter 6: Technical information corrected from abroad during carrying out the project.....204

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 1. Study of muscle atrophy..... | 204 |
| 2. Study of biomarker in muscle..... | 206 |
| 3. Study of betulinic acid..... | 208 |

Chapter 7: List of experimental equipments and facilities.....210

Chapter 8: Reference.....211

목 차

| | |
|---------------------------|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요..... | 17 |
| 제 1 절 연구 목적..... | 17 |
| 1. 연차별 연구개발 목표와 내용..... | 17 |
| 2. 연구개발의 필요성..... | 20 |
| 제 2 장 국내.외 기술개발 현황..... | 23 |
| 제 1 절 국내.외 관련기술의 현황..... | 23 |
| 1. 국내외 기술동향 및 수준..... | 23 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과..... | 31 |
| 제 1 절 제 1 세부과제..... | 31 |
| 1. 세부과제 목표 및 내용..... | 31 |
| 2. 연차개발 방법..... | 33 |
| 3. 연구개발 내용 및 결과..... | 41 |
| 가. 1차년도..... | 41 |
| 나. 2차년도..... | 82 |
| 제 2 절 제 1 협동과제..... | 100 |
| 1. 협동과제 목표 및 내용..... | 100 |
| 2. 연구개발의 필요성..... | 101 |

| | |
|--|------------|
| 3. 연구개발 내용 및 결과..... | 102 |
| 가. 1차년도..... | 102 |
| 나. 2차년도..... | 141 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도..... | 185 |
| 제 1 절 연도별 연구 목표 및 달성도..... | 185 |
| 1. 1차년도..... | 185 |
| 2. 2차년도..... | 187 |
| 제 2 절 관련분야 기술 발전에의 기여도..... | 188 |
| 1. 국산 자생식물 연구 개발 촉진..... | 188 |
| 2. 근 위축 개별인정 항목 신설..... | 188 |
| 3. 원료생산을 위한 추출공정및 지표물질 설정으로 규격화 확립..... | 189 |
| 4. 새로운 근기능관련 소재 개발..... | 189 |
| 5. 근기능 위축 억제효과에 대한 기전 규명..... | 190 |
| 6. 트리테르페노이드계의 BA성분의 근기능 위축 억제효과 처음으로 규명..... | 190 |
| 7. 제약화를 위한 근거마련..... | 190 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획..... | 192 |
| 제 1 절. 실용화 계획..... | 192 |
| 1. 산업화 계획..... | 192 |
| 제 2 절. 기술확산 계획..... | 194 |

| | |
|---|------------|
| 1. 겨우살이 인공재배..... | 195 |
| 2. 외국산 겨우살이의 이용 계획..... | 197 |
| 제 3 절. 지적재산권 확보계획..... | 199 |
| 1. 겨우살이를 이용한 근위축 억제 조성물 특허..... | 199 |
| 2. 베틀린산을 이용한 근위축 억제 조성물 특허..... | 199 |
| 제 4 절. 추가연구 계획..... | 200 |
| 1. 겨우살이 내 근위축 기능성 지표물질 연구..... | 200 |
| 2. 겨우살이 외 근위축 억제 기능을 나타내는 소재 개발 연구..... | 200 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보..... | 204 |
| 제 1 절 근위축 관련 자료..... | 204 |
| 제 2 절 근육 세포 내 지표성분 관련 자료..... | 206 |
| 제 3 절 베틀린산 관련 자료..... | 208 |
| 제 7 장 연구시설·장비 현황..... | 210 |
| 제 8 장 참고문헌..... | 211 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 목적

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 |
|------|------|---|--|
| 1차년도 | 2012 | 겨우살이를 중심으로 한 여러 자생식물 추출물의 근기능 저하 억제 효능 조사 | <ul style="list-style-type: none"> - 운동력 /지구력 증진 효능 조사 - AMPK 활성화 확인 |
| | | 근육세포에서의 작용 확인 | <ul style="list-style-type: none"> - 미토콘드리아 활성화와 관련하는 PGC-1β, SIRT1, Tfam mRNA 발현 정도 확인 - 발열반응(thermogenesis)와 관련하는 UCP-1 mRNA 발현 정도 확인 |
| | | muscle atrophy의 내분비학적 접근 | <ul style="list-style-type: none"> - Glucocorticoid에 의한 atrogen-1/MuRF-1 변화 확인 |
| | | 실험동물에서 Fasting에 따른 muscle atrophy | <ul style="list-style-type: none"> - 근기능 관련 유전자 변화 관찰 (microarray, PCR array) - 혈당치(blood glucose) 변화 측정 - 근육 무게(muscle weight) 변화 측정 - Atrogen-1/MuRF-1 mRNA level 측정 - 근 기능과 밀접한 관련이 있는 SIRT3 발현량 확인 |
| | | 실험동물에서 겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분 식이에 따른 muscle hypertrophy | <ul style="list-style-type: none"> - 근육 무게 변화 측정 - 근육 fiber diameter 측정 - grip strength test - treadmill test - swimming pool test - UA, AICAR 및 metformin과 비교 연구 |
| | | 시료 식이에 의한 유전자 발현 변화 조사 | <ul style="list-style-type: none"> - 트리테르페노이드 식이에 의한 근기능 관련 유전자 변화 관찰(microarray, PCR array) - Atrogen-1/MuRF-1/IGF-1 mRNA level 측정 - muscle mass 변화와 관련하여 myostatin/follistatin 발현량 확인 - 혈액 내 성장 조사(Plasma IGF-1) - SIRT3 발현량 확인 |
| | | 주성분의 기전 연구 : IGF-1 | - 동물 모델에서 트리테르페노이드 식이에 의한 Akt |

| | | |
|--|---|--|
| | | <p>pathway 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 활성화 확인(W/B) - 근육세포에서 insulin/IGF-1 유무에 따른 Akt, S6K, ERK, FoxO 활성화 확인(W/B) - 근육세포에서 insulin/IGF-1 유무에 따른 p-IGF-1 receptor 변화 측정(W/B) - Wortmannin 혹은 LY-294002(IGF-1 inhibitor)에 의한 영향 확인 - CR에 의한 mTOR pathway와의 비교 |
| | <p>트리테르페노이드 식이에 의한 지방산 산화</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 식이에 따른 fiber proportion 변화 확인 - 지방산 산화 관련 유전자 변화 확인 (UCP3, mCPT1, PDK4) - 지방산 저장 관련 유전자 변화 확인 (SCD1, FAS, SREBP1c) - 지방산 흡수 관련 유전자 변화 확인 (FAT/CD36, LPL) - 지방량과 근육량 변화 비교 |
| | <p>겨우살이 관련 조사/ 인체 적용 실험 기반 구축</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 근 기능 저하 억제 관련 제품 수집 및 분석 - 근 기능 관련 자료 및 문헌 조사 - 기능성 인정을 위한 건강기능성 모듬토의 신청 - 개별인정 가능성 타진 및 추가필요 자료 준비 |
| | <p>겨우살이 추출물을 이용한 제형연구</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 제형 및 type 결정(연질캡슐, 음료 형태 등) - 노인용, 스포츠용 제형 선정 - 부원료 적합성 연구 - 공업화를 위한 제조 공정 확립 |
| | <p>인체 적용시험 Protocol 작성</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 현재 근위축 억제에 대한 개별인정 항목이 없음. - 바이오 마커 및 측정 항목 선정 |
| | <p>인체적용시험용 시제품 제작</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 지표 물질 함유량 선택 - 시제품 가공 처리법에 따른 활성화도 조사 - 시제품 제작(인체적용시험용) 후 관련 실험 진행 |
| | <p>겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분의 인체 적용 시험(1단계)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - CRO/ 임상시험기관 선정(피험자수, 평가항목 등) - 인체 적용시험을 위한 제형 및 유효성분 함유량 결정 - 인체 적용 시험 계약 체결 |

| | | | |
|------|------|--|--|
| 2차년도 | 2013 | 겨우살이 추출물 및 자생식물 추출물과 트리테르페노이드 성분의 식이에 의한 혈중 성분 변화 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 혈액 내 성분 분석 (adiponectin, T3, testosterone, insulin, cholesterol, c-reactive protein) - Cortisol, Testosterone, DHEA, Thyroxine의 DELFIA법 개발 |
| | | 주성분 물질의 노화 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 노화 관련 유전자(SMP30) 발현으로 세포 보호 및 항산화 효과 확인 - 미토콘드리아 내 HSP10의 발현으로 근육 보호 확인 |
| | | 트리테르페노이드 성분의 Notch signaling에 미치는 영향 조사 | <ul style="list-style-type: none"> - CD34 발현을 통해 조혈세포의 생성 확인 - 기질인 Delta-1 및 저해제인 Numb의 발현량을 통해 Notch-1 발현 확인 - Notch signaling을 통한 노화근육 재생 정도 확인 |
| | | 주성분의 기타 효능 조사 | <ul style="list-style-type: none"> -항염증 효능 조사 : NF-kB, TNF-α, IL-6, IL-1β 발현량 확인 -해당작용에 미치는 영향:G6P, PEPCK 발현량 확인 -근기능 관련 nucleic acid 수용체 발현에 미치는 영향 조사 : PPAR-α, PPAR-γ, PPAR-δ, LXR-α, LXR-β, FXR-α |
| | | 겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분의 인체 적용 시험(2단계) | <ul style="list-style-type: none"> - 인체적용 시험 진행 사항 점검 - 결과 입수 및 유효성 평가 |
| | | 개별 인정형 인증 추진 검토 | <ul style="list-style-type: none"> - 식약청에 신규 기능성 항목 추가 신청 검토 (근 기능 저하 억제 및 근육 손실 방지 효과) - 개별인정형 인증 신청 준비 |
| | | 겨우살이 추출물 제품 응용 개발 및 용도 확대 | <ul style="list-style-type: none"> - 과립화 및 초미세 분말화, 유화 분산제 개발 - 시생산 제품의 안정성 및 지표성분 함량 시험 - 가속 실험을 통한 유통기간 산정 |
| | | 겨우살이 소재의 사업기반 조성 | <ul style="list-style-type: none"> - 대량 생산을 위한 원료 확보 방안 구축 - 관능평가를 통한 소비자 조사 - 제품 방향 결정: 대상 소비자 중심 시장 고려 제품 컨셉 및 홍보방안 구축 |

2. 연구개발의 필요성

가. 근기능 저하는 질병 및 노화로 야기되는 사회적인 문제다 : 삶의 질을 높여 건강한 삶 구현과 관련된 사업은 고부가가치 융합산업임.

- (1) 낙상(落傷)은 노인 사망 원인 중 5위로 65세 이상 노인의 약 13% 정도가 낙상으로 사망함(그림 1 참조). 낙상의 주요 원인으로서는 골밀도의 저하와 함께 근 위축에 의한 것으로 알려짐. 이로 인한 활동의 제약이 노령층의 사회적 참여도를 감소시킴.



그림 1. 노인 사망원인 5위 낙상

- (2) 노화성 근 기능 저하는 곧 ‘운동력(체력) 저하’며 ‘생명연장’ 단축과도 직접적 관련 있음.
- (3) 근기능 저하는 질병(암 등)으로 인한 전형적인 현상임. 이의 해결은 의학적 및 산업적인 파급효과가 지대하다.
- (4) 근 기능 증진(운동력 증진) 및 항노화 효능을 가진 소재 개발은 무한한 잠재력을 가짐.

나. 천연물질을 이용한 근기능 저하 억제 소재개발은 세계적인 추세다. * 포도의 레스베라트롤(Resveratrol, RSV)은 가장 성공적인 예다.

- (1) 하버드 의대 싱클레어 교수팀이 레스베라트롤의 생명 연장 효과를 밝힘.
- (2) 이 연구 결과를 세계적 제약회사인 GlaxoSmithKline(GSK)社에서 7억2천만달러(한화 약 1조원)에 구입함(그림 2 참조).

레드와인의 놀라운 힘...'GSK' 7억2000만 달러 인수
 NEWSis() | 기사입력 2008-07-04 11:07

【서울=메디컬투데이/뉴시스】

포도와 레드와인속에 풍부히 함유된 '레스베라트롤(resveratrol)'이라는 성분이 노화를 막고 심장병을 예방하는 물론 뼈를 튼튼히 하고 백내장 또한 예방하는 효고가 있는 것으로 나타났다.

4일 하버드의대 연구팀이 '세포대사학저널'에 밝힌 쥐를 대상으로 한 연구결과에 의하면 중년성인에서 이 같은 성분 보충이 전체적인 건강을 크게 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다.

이번 연구에서 레스베라트롤과 병행 고칼로리 식사를 한 쥐들이 레스베라트롤이 함유되지 않은 고칼로리 식사를 한 쥐들에 비해 수명이 훨씬 긴 것으로 나타났다.

그림 2. 레스베라트롤의 효능 및 GSK사의 인수

- (3) 이후 생명연장 및 항노화 분야가 급속도로 성장함.
=> 이를 대체할 수 있는 국내 연구가 필요함.

다. '식이제한(Calorie Restriction, CR)'에 의한 항노화 연구가 주목받음.

- (1) 식이제한이 근기능은 물론 생명연장의 효과가 있음이 밝혀짐(그림 3 참조).

“적게 먹으면 장수” 쥐 실험서 입증
 경향신문 | 기사입력 2004-03-23 19:15 | 최종수정 2004-03-23 19:15

엄격한 저(低)칼로리 식이요법으로 늙은 생쥐의 수명을 40% 이상 연장할 수 있다는 연구결과가 나와 '적게 먹으면 오래 산다'는 속설을 다시 한번 입증했다고 미국의 일간 USA투데이가 22일 보도했다.

리버사이드 캘리포니아대학의 스티븐 R 스피들러 박사 연구팀은 늙은 생쥐를 대상으로 한 실험에서 칼로리 섭취량을 제한한 늙은 생쥐가 평균적인 식사를 했지만 같은 배에서 난 다른 생쥐에 비해 최고 6개월 이상 더 오래 산다는 사실을 발견했다.

스피들러 박사에 따르면 이같은 다이어트 방식의 변화로 칼로리 제한 생쥐의 잔여 수명이 42%나 증가했다.

그림 3. 동물 실험을 통한 식이 제한의 수명 연장 효과 연구

- (2) '식이제한 대체 효능 물질(CR mimetics)'의 탐색과 식의약품 소재 개발에 많은 관심.
- (3) 현재 뚜렷하게 밝혀진 소재들이 없으며 대부분 극히 제한적 활용 가능.
=> 본 연구의 잠재성이 매우 큼.

라. 본 연구를 성공적으로 수행할 수 있는 기반이 확립되어 있다. * 풍부한 선행연구결과 확보

- (1) 한국산 겨우살이의 항암효과, 면역력 증진 효과 등을 과학적으로 입증, 국내외 특허획득.
- (2) 근기능과 직접적으로 연계된 한국산 겨우살이의 효능
- (3) 항당뇨 및 항비만 효과 입증.
- (4) 한국산 겨우살이의 체력 증진 및 생명연장 효능 입증 : 현재까지 보고된 결과 중 가장 탁월한 효능을 나타냄.
- (5) 단일성분 규명과 효능 입증 : 트리테르페노이드 성분이 있음을 규명함
- (6) 이를 토대로 근 기능 저하 방지 관련 기존 연구와 비교시 겨우살이 추출물과 트리테르페노이드 성분 및 이를 함유하는 자생식물이 근기능 저하억제 효과를 보일 것으로 확신함.

마. 겨우살이 추출물에 대한 안전성 시험 결과 확보

- (1) 겨우살이의 경우 이미 안전성 시험을 한국식품연구원의 지원을 받아 2011년도에 수행하여 완료하였음(그림 4 참조).

| 요 약 문 | | | | | | | |
|---|--|---|--------------------|---|------------------|---------|--|
| 관리번호 | | | 보안등급 분류 | <input type="checkbox"/> 보안과제 <input type="checkbox"/> 일반과제 | | 공개가능여부 | <input type="checkbox"/> 가 <input checked="" type="checkbox"/> 부 |
| 연구과제명 | (국문) 한국산 겨우살이의 안전성 평가 | | | | | | |
| | (영문) The safety evaluation of Korean Mistletoe Extract | | | | | | |
| 연구개발비 (2011. 1~ 2011. 12) | 정부출연 연구개발비 | 기업체부담금 | | | 정부 외 출연금 | 합계 | 참 여 연구원수 |
| | 74,000 | 현금 16,000 | 현물 16,000 | 소계 32,000 | (-) | 106,000 | 4 |
| 연구내용 | 제품명 | 미슬로 C | | | | | |
| | 평가항목 | <input type="checkbox"/> 기능성평가 () | | | | | <input checked="" type="checkbox"/> 안전성평가 |
| | 단계 및 디자인 | 인체적용전시험 (유전독성시험, 단회경구독성시험, 13주 반복경구투여독성시험) | | | | | |
| 수행기관 연구책임자 | 성명 | 소속기관 | 한국건설생활환경 경시험연구원 | 직위 | 선임연구원 | 전공 | 보건학 |
| | 김진식 | 전화 | 032-858-0011 | E-mail | bioman@kcl.re.kr | | |
| <p><유전독성> 시험물질인 미슬로C에 대한 유전독성을 확인하기 위해 시험관 내(In vitro) 시험인 미생물 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험을 수행하였다. 결과 직접법과 대사활성계를 적용한 대사활성법에 있어서 복귀된 돌연변이의 집락수와 이상중기상의 빈도는 음성대조군과 비교해 유의한 증가를 보이지 않았다. 생체 내(In vivo) 시험인 수컷시험을 수행한 결과, 미</p> | | | | | | | |

그림 4. 안전성 평가 최종 보고서 요약본

제 2 장 국내.외 기술개발 현황

제 1 절 국내.외 관련기술의 현황

1. 국내외 기술동향 및 수준

국내.외 모두 근기능과 관련된 health claim 인정 사례는 없음.

그러나, 근기능과 관련되어 유사 항목 및 중요성은 인지하고 있음

가. 세계적 수준

| | | | | | |
|---------|--|--------|---|-----------|--|
| 개념정립 단계 | | 기업화 단계 | V | 기술 안정화 단계 | |
|---------|--|--------|---|-----------|--|

(1) 외국에서의 사례

외국에서의 경우 유럽 식품안전청나 미국 식품의약국에서 직접적으로 근기능과 관련된 health claim은 없으나, 이와 유사한 사항으로 sarcopenia에 대한 언급한 내용과 운동 수행능력과 관련된 내용들이 있음.

(가) 유럽 식품안전청 - EFSA (European Food Safety Authority)

EFSA에서는 muscle function을 언급하며 이에 대한 정의와 측정 방법 등이 제시되어 있으며, health claim을 받기 위해 고려하여야 할 사항 등이 있음.

2.2.3. Claims on muscle function

Comments received

- Claims related to sarcopenia as stopping or decreasing muscle strength decline in the elderly were proposed.
- There was a request to consider health claims on recovery (e.g. from stiffness, muscle fatigue, muscle ache, mobility and general fatigue) after the exercise phase, claims on rehydration, and claims on muscle metabolism as beneficial physiological effects *per se*.

Panel consideration of comments received

The improvement, maintenance or reduced loss of muscle function (e.g. muscle strength) is considered to be a beneficial physiological effect. Outcome measures of muscle function which may be appropriate for the assessment of the claimed effect in humans in the context of a particular type of exercise or physical activity should be indicated (e.g. one repetition maximum weight lifting, isokinetic knee extension torque and isometric handgrip strength). Also changes in muscle structure (e.g. muscle mass, muscle shape, number and type of muscle fibres, muscle damage and muscle tissue repair) contributing to the improvement, maintenance or reduced loss of muscle function (e.g. muscle strength) can be considered beneficial physiological effects. Evidence on whether (and the extent to which) specific changes in muscle structure may lead to changes in muscle function should be provided, and will be considered on a case-by-case basis.

Faster recovery from water loss, muscle fatigue, muscle soreness or muscle damage after exercise, contributing to the restoration of muscle function (e.g. muscle strength) can be considered beneficial physiological effects. Subjective measures of muscle fatigue or muscle soreness may be used as supportive evidence in this context.

A new section specifically addressing claims on muscle function has been added to the guidance document (Section 5).

○ 근육 기능(muscle function)

- Sarcopenia와의 관련된 것으로 노화로 인해 근력 감소나 소실이 나타나는 것임
- 운동 후, 회복(강도, 근 피로, 근육통, 이동성, 일반적인 피로), 재수화(dehydration)에서, 유익한 생리적인 영향으로 근육 대사에서 health claim이 고려되어야 함.
- 근 기능(예) 근력의 개선, 유지, 손실 감소 등과 같은 유익한 생리적인 영향을 위해 고려되어야 한다.

: 최대근력(1RM) 무게 (one repetition maximum weight lifting), isokinetic knee extension torque, isometric handgrip strength 등

근 구조의 변화

예) 근육 양, 근육 모양, 근섬유의 수와 종류, 근 위험, 근 손상, 근조직 회복
운동 후, 수분 손실, 근 피로, 근 통증, 근 손실로부터 빠른 회복 등도 근 손실에 대한 유익한 생리학적 영향이라고 할 수 있음.

Ref. Outcome of a public consultation on the Draft Opinion of the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) on a draft guidance on the scientific requirements for health claims related to physical performance, Supporting Publications 2012:315 [1]

① 정상 근육 기능에 기여(muscle function)

㉔ 적용된 예) Astaxanthin의 근기능에 대한 영향 ⇒ health claim으로 사용하기에는 명확하지 않다고 판단함.

2.4. Contribution to normal muscle function (ID 1685)

The claimed effect is “muscle function”. The Panel assumes that the target population is the general population.

The references provided in relation to this claim included human intervention studies on the effects of astaxanthin on endurance capacity, endurance performance, muscle strength, and muscle fatigue during exercise, and animal studies on the effects of astaxanthin on exercise-induced skeletal and cardiac muscle damage, and skeletal muscle fatigue. The Panel notes that from the information provided the aspect of muscle function which is the subject of the health claim is unclear.

Astaxanthin의 경우, 인체에서 지구력, 지구성 운동훈련, 근력, 운동 중 근 피로, 동물시험에서는 운동으로 인해 발생된 골격근과 심근의 위험, 골격근 피로 등에 영향을 확인함.

Ref. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to astaxanthin and protection of the skin from UV-induced damage (ID 1687, 1979), defence against *Helicobacter pylori* (ID 1686), contribution to normal spermatogenesis (ID 1688), contribution to normal muscle function (ID 1685), and “immune system”(ID 1689, 1919, 1980) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 [2]

(나) 미국 식품의약국 - FDA(Food and Drug Administration)에서 언급한 sarcopenia

① sarcopenia와 관련된 직접적인 기능성 문구는 없었으나, 노인에서 일반적으로 쉽게 발생할 수 있는 것으로 이에 관련된 언급은 있었음

Q5: Are there concerns related to the data specific to the geriatric population that could be considered in the planning of the clinical studies?

A5: Depending on the mechanism of action of the drug and/or the characteristics of the disease, certain specific adverse events and age-related efficacy endpoints should be actively sought in the geriatric population, e.g., effects on cognitive function, balance and falls, urinary incontinence or retention, weight loss, and sarcopenia. This may require specific testing, e.g., for cognitive function. Applicants should also refer to disease specific guidances for specific recommendations concerning the evaluation of both efficacy and safety in geriatric patients.

E7 studies in support of special populations: Geriatrics(노인병)

임상시험 계획에서 노인성 질환을 위한 연구 시 고려해야 하는 것은?

시험약의 메커니즘이나 질병의 특성, 특정 이상반응, 노화와 관련된 효능에 따라 노인성 피험자를 찾는다.

예) 인지능력, 균형과 낙상, 요실금이나 요폐색, 체중 감소, sarcopenia 등

Ref. Guidance for Industry: E7 Studies in Support of Special Populations: Geriatrics, Questions and Answers, FDA [3]

(2) 근육의 기능과 관련된 내용은 크게 6가지로 분류함

(가) 근기능 저하(loss of muscle function)

① 정의

- ㉠ 근육이 정상적으로 움직이지 않을 때 근육 기능의 손실을 의미함
- ㉡ 근육 기능의 완전한 손실에 대한 의학 용어는 ‘마비(paralysis)’가 있음
- ㉢ 근기능 손실로 인해 저하가 발생 (Ref. U.S. National Library of Medicine; NIH)
- ㉣ 국내에서는 근력과 혼재되어 사용됨

② 원인

- ㉠ 영양 결핍
- ㉡ 근 자체의 질환 및 알코올과 관련된 근육병 (myopathy)
- ㉢ 선천성 근질환 (유전적 장애)
- ㉣ 약물 유도에 의한 근육병(스타틴, 스테로이드 등)
- ㉤ 신경계의 질환인 신경 손상, 척추나 신경 부상 또는 뇌 손상

(나) 근 비대(muscle hypertrophy)와 근 증식(hyperplasia)

① 정의

- ㉠ 근비대 또는 근 성장(muscle growth): 근육의 양이나 섬유 크기 증가 또는 횡단면적의 증가 → 미토콘드리아와 세포막 질량의 증가와 섬유 내 근 미세섬유의 증가 결과
- ㉡ 근육 증식: 근육 섬유수가 증가
- ㉢ IGF-1은 mTOR의 활성을 자극하고, PI3k-Akt를 통해 근육을 증가시킴(그림 5 참조).

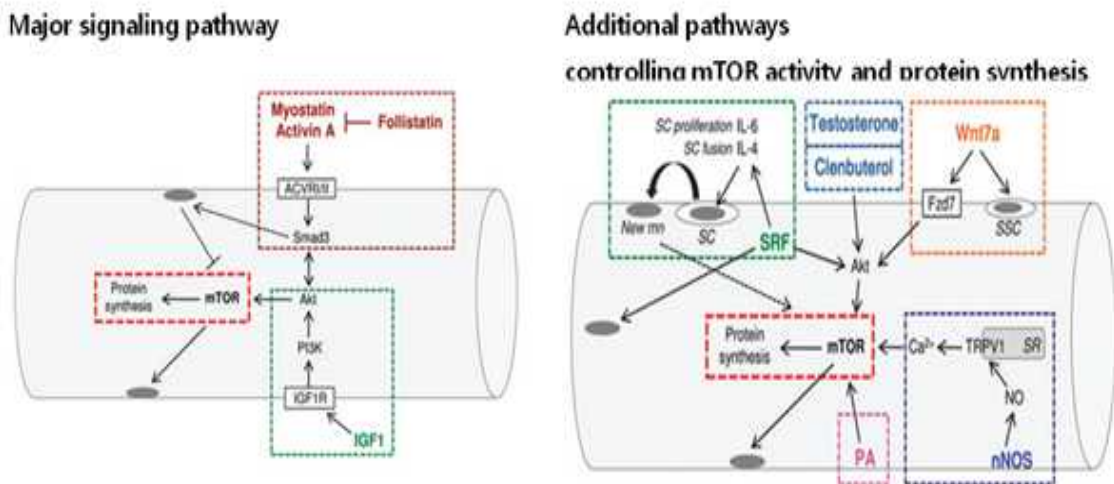


그림 5. 주요 신호전달 체계

② 근 비대 관련 바이오마커

- ㉠ 체성분 분석, 체지방 변화량: DEXA, MRI, CT, BIA
- ㉡ 근섬유 단면둘레(muscle fiber cross-sectional areas), 팔 둘레(limb circumferences)

- ㉔ 근섬유 사이즈(type I , type II)
- ㉕ 최대근력 (muscle strength)
- ㉖ 근단백질 합성률(muscle protein synthesis rate) 부족, 신체적 활동의 감소

(Ref. 운동생리학, 대경북스(2011) [4], 운동생리학의 기초, 라이프사이언스(2006) [5], FEBS J. 280(17):4294-4314 [6], Int J Biochem Cell Biol 37(10):1974-84 [7])

(다) 근 위축(muscle atrophy)

- ① 정의
 - ㉔ 세포소기관, 세포질, 단백질의 손실에 의해서 세포 크기가 줄어드는 것을 의미함
 - ㉕ 근육의 부피가 줄어들어 결국에는 근육을 약화시킴
- ② 증상
 - ㉔ 영양 부족, 신체적 활동의 감소
 - ㉕ 암, AIDS, 심장질환, 신장질환, 간질환 등 만성 질병에 의한 2차 증상으로 나타나기도 함
- ③ 바이오마커
 - ㉔ 체성분 분석, 체지방 변화량: DEXA, MRI, CT, BIA
 - ㉕ 최대근력(muscle strength)
 - ㉖ 근섬유 단면둘레(muscle fiber cross-sectional areas), 팔 둘레(limb circumferences)
 - ㉗ 혈액 검사: 인슐린, HbA1c, TGs, free T4, TSH, CRP, TNF-a, 혈당 등 소변 중 요소(질소 함량단백질 함량근육 손실 환산)
 - ㉘ 근섬유 사이즈(type I , type II)
 - ㉙ 근단백질 합성률(muscle protein synthesis rate)

(Ref. 운동생리학, 대경북스(2011) [4], 운동생리학의 기초, 라이프사이언스(2006) [5], Cell Metab 8;13(6):627-38 [8], FEBS J. 280(17):4294-4314 [6], Int J Biochem Cell Biol 37(10):1974-84 [7])

(라) 근력(muscle strength) 강화

- ① 근력의 정의
 - ㉔ 넓은 의미로 지구력에 포함됨
 - ㉕ 근력: 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한으로 수축력을 발휘할 수 있는 능력
 - ㉖ 근지구력: 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는 지에 대한 것

⇒ 근력과 근지구력은 밀접한 관련이 있음
- ② 근력 관련 바이오마커
 - ㉔ 1RM testing(single repetition maximal strength)
 - ㉕ 프리 웨이트
 - ㉖ 저항성 기계를 이용한 반복 횟수(10회)
 - ㉗ 힘 측정계(dynamometer)

⇒ 근력 강화는 기존에 건강기능식품 개별인정을 받은 이력이 있으므로 용어 자체에 대한 문제는 없음

(Ref. 운동생리학, 대경북스(2011) [4], 운동생리학의 기초, 라이프사이언스(2006) [5])

(마) 비활동성 근소실(Disuse atrophy)

① 정의

㉠ 중추신경 또는 운동신경의 손상에 의해 흥분의 전달이 차단되어 일어나는 근육마비나 석고고정에 의해 관절을 장기간 고정할 때 근육의 불사용으로 인해 발생하는 것으로 수축성 단백질의 함량이 심하게 감소하고, 근육 섬유 내 지방 함량이 증가함

㉡ 근육 불사용의 원인: 신체 비활동, 노화, 각종 질병 등으로 인해 근육 소실과 근육 기능의 감소

② 근소실 관련 바이오마커

㉠ 근섬유의 종류 비율 (type I, type II)

㉡ 근육 단면 측정법, area fractions, immuno-staining(active caspase-3, procaspase-3)

㉢ 유전자 발현(atrogin-1, MuRF-1, MyoD, myogenin, Myf5, MRF4)

㉣ 단면 둘레

㉤ 하지 최대 확장력

㉥ 근섬유 지름

(Ref. N Engl J Med 358:1327-35 [9], J Physiol 536: 625-33 [10], FASEB J 16(6):529-38. [11])

⇒ ‘비활동성’이라는 용어의 정의가 명확하지 않고 모호하며, 대상자의 연령 및 나이가 다양하며, 일반적으로 김스를 하거나 비활동성일 경우에는 염증 지표의 수치가 증가하며, 치료약과 시험물질간의 충돌도 고려하여야 하므로 여러 가지 노이즈의 변수가 많으므로 건강기능식품의 기능성에 대한 용어로는 부적합할 것으로 보임.

(바) 노인성 근 감소증 (Sarcopenia)

① 어원

㉠ 그리스어 “근육의 부족(poverty of flesh)”에서 유래됨

② 증상

㉠ 근육 내에서 노화로 인해 근 섬유 수가 감소하여 근육의 양과 질 모두 감소하는 현상임.

㉡ Type II fiber 밀도의 감소와 Type I fiber 밀도의 증가로 인해 발생

㉢ 단백질 합성을 감소 & 분해를 증가 (합성과 분해의 불균형)

③ 원인

㉠ 질병, 영양 불균형, 활동 감소 등 (확실한 기전은 밝혀지지 않음)

④ 문제점

- ㉠ 근 경련(muscle soreness), 근 부종(edema), 근 부기(swelling), 근 섬유 파괴(strain), 관절염, 골다공증, 요통

⑤ 바이오마커

- ㉠ 체성분 분석, 체지방 변화량: DEXA, MRI, CT, BIA
- ㉡ 간이 신체능력 배터리(Short Physical Performance Battery)
- ㉢ 근섬유 단면둘레(muscle fiber cross-sectional areas), 팔 둘레(limb circumferences)
- ㉣ 걷는 속도(walking speed), 400m 보행 검사, 6분 보행 검사
- ㉤ TNF-a, IL-6 농도

(Ref. J Nutr Health Aging 13(8):724-8 [12], J Nutr Health Aging 13(8): 708-712 [13], J Nutr Health Aging 15(10): 834-846 [14], J Am Geriatr Soc 60(1):16-23 [15], Clin Interv Aging 7:225-34 [16], Am J Clin Nutr 93(2):402-12 [17])

- 독일의 경우 Iscardor, Helixor 등과 같이 겨우살이를 첨가한 항암보조제 시장이 활성화 되어 있음. 본 연구팀의 사전 연구 결과 유럽산 겨우살이에 비해 국내산 겨우살이가 월등히 좋은 활성도를 갖고 있음. 해당 업체의 실무진과 미팅을 통해 국내산 겨우살이의 사업화에 대한 자문을 구함. 원료 수급 방법, 첨가물의 제조 공정 등에 대해 자문을 구함.



그림 6. 겨우살이 첨가 제품 HELIXOR(항암 보조제) 사진

나. 국내수준

(1) 국내에서의 사례

국내에서는 근육의 기능과 관련된 기능성 인정 원료는 없음. 그러나 이와 유사한 사례로 근력의 향상으로 인한 운동수행능력의 향상이 있으며, 현재 주관기관인 한동대학교에서 겨우살이 추출물의 지구력 향상으로 인한 운동수행능력 향상과 관련된 인체적용시험이 진행 중임.

The image shows a screenshot of a website page for '건강기능식품' (Health Functional Food) with a sub-header 'OX퀴즈' (OX Quiz). The page features a navigation menu with categories like '건강기능식품', '안전정보', '구매정보', '대상별 정보', '기능별 정보', '원료별 정보', and '자료실'. The main content area is titled '건강기능성 내용! 보다 알기 쉽게!' (Health Functional Content! Know it more easily!) and includes a quiz section titled '운동수행 능력을 개선시켜주는 것' (What improves exercise performance?). The quiz questions are: 01. 근력과 운동수행능력이란 무엇일까요? (What are muscle strength and exercise performance?), 02. 운동수행능력의 향상은 왜 중요할까요? (Why is improvement in exercise performance important?), and 03. 운동수행능력이 저하되는 원인은 무엇일까요? (What causes a decrease in exercise performance?).

그림 7. 개별인정 항목 중 운동수행 능력 관련 내용

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 제 1 세부과제

1. 세부과제 목표 및 내용

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 |
|-----------------------------|--|--|---|
| 1차 년도 (2012 ~2013) | 한국산 겨우살이 추출물의 근기능 저하 억제 효능에 관한 연구 | 한국산 겨우살이 및 자생식 물 추출법 개발 | - 냉수 및 열수 추출법의 사용 - 각 방법으로 만든 추출물의 활성 비교 |
| | | 근육세포에서의 작용 확인 | -Cell metabolism: AMPK activation, mitochondrial activity -Protein synthesis: Akt pathway -protein degradation: ubiquitin ligase (Atrogin-1, Murf1) |
| | | muscle atrophy의 내분비학 적 접근 | - 겨우살이 추출물, 트리테르페노이드 계열 물질 처리에 따른 atrogin-1, murf1의 발현량 확인 - Glucocorticoid 처리시의 변화와 대조 를 통해 효과를 확인 |
| | | 실험 동물에서 fasting, denervation에 따른 muscle atrophy | - 식이 제한 & 신경 손상 - 겨우살이 추출물 투여 - 근육 무게 변화, gene expression 변화 확인, grip strength 측정 |
| | | 실험동물에서 겨우살이 추출 물 및 트리테르페노이드 성 분 식이에 따른 muscle hypertrophy | - 4주간 일반 식이와 함께 겨우살이 추 출물 투여 - 근육 무게 변화, gene expression 변화 측정 - fiber type 확인 |
| | | 주성분의 기전 연구: IGF-1 pathway 규명 | - serum free starvation condition의 C2C12 사용: insulin 첨가 유무에 따라 biomarker의 activation 정도 측정 |
| | | 트리테르페노이드 식이에 의 한 지방산 산화 | - 겨우살이 추출물 군 이외에 usrolic acid 투여 군을 실험: 대조군으로 썸과 동시에 트리테르페노이드 계열 물질 식에 따른 변화량 관찰 |
| | | 시료 식이에 의한 유전자 발 현 변화 | - 일반 식이 사료에 겨우살이 추출물을 첨가 하여 식이 사료로 만들 - 5주간 자유 식이 후 유전자 발현 변화 확인 |

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 |
|-----------------------------|--|--|---|
| 2차 년도 (2013 ~2014) | 한국산 겨우살이의 근 기능 저하 억제 효과 규명 및 근 위축 방지 효능 기능성 식품개발 | 겨우살이 추출물 및 자생식 물 추출물과 트리테르페노이 드 성분의 식이에 의한 혈중 성분 변화 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 혈액 내 성분 분석 (adiponectin, T3, testosterone, insulin, cholesterol, c-reactive protein) - Cortisol, Testosterone, DHEA, Thyroxine의 DELFIA법 개발 |
| | | 주성분 물질의 노화 연구 주성분 탐색을 통한 지표물 질 설정에 관한 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 노화 관련 유전자(SMP30) 발현으로 세포 보호 및 항산화 효과 확인 - 미토콘드리아 내 HSP10의 발현으로 근육 보호 확인 - 미슬로-C(heating)내 정도관리를 위한 지표물질 설정 - 기능성 지표물질설정과 정량법 확립 |
| | | 트리테르페노이드 성분의 Notch signaling에 미치는 영향 조사 및 새롭게 설정된 지표물질의 효능 기전연구 | <ul style="list-style-type: none"> - CD34 발현을 통해 조혈세포의 생성 확인 - 기질인 Delta-1 및 저해제인 Numb의 발현량을 통해 Notch-1 발현 확인 - Notch signaling을 통한 노화근육 재생 정도 확인 - 상기연구에서 새롭게 설정된 지표물질을 갖고 기능기전 연구 : 근기능과 관련된 주요 biomarker 발현에 미치는 영향조사(예;Atrogin-1, MurF1등) |
| | | 주성분의 기타 효능 조사 추가동물실험 : 새로운 공정 에 의해 생산된 원료의 동물 실험 | <ul style="list-style-type: none"> -항염증 효능 조사 : NF-kB, TNF-α, IL-6, IL-1β 발현량 확인 -해당작용에 미치는 영향: G6P, PEPCK 발현량 확인 -근기능 관련 nucleic acid 수용체 발현에 미치는 영향 조사 : PPAR-α, PPAR-γ, PPAR-δ, LXR-α, LXR-β, FXR-α -Fasting과 신경절단 기법을 이용한 동물실험 수행 : 근기능 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 조사 |

2. 연차개발 방법

가. 1차년도 (2012~2013)

(1) 목표

한국산 겨우살이 및 자생식물 추출법을 개발하여 근육세포 및 실험동물에서의 muscle atrophy의 내분비학적 접근하여 작용 확인할 것.

(2) 자생식물 추출법 개발

(가) 냉수 추출법 개발

자생식물 원물을 깨끗이 세척하여 말린 후 잘게 세절하여 냉수로 밤새 추출한다. 원심분리를 통하여 상등액만을 수집한 후 필터를 통해 불순물을 제거하였다. 동결건조를 통해 분말을 획득하여 실험에 사용하였다.

(나) 열수 추출법 개발

자생식물 원물을 깨끗이 세척하여 말린 후 잘게 세절하여 열수로 추출한다. 원심분리를 통하여 상등액만을 수집한 후 필터를 통해 불순물을 제거하였다. 분무건조를 통해 분말을 획득하여 실험에 사용하였다.

(3) 근육세포에서의 단백질 발현 조사

(가) C2C12 세포 배양

마우스 근아세포인 C2C12 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에 배양시킨다. 세포가 플레이트에 90% 이상 차면 2% Horse Serum, 1% Penicillin/Streptomycin이 함유된 DMEM 배지로 바꾸어 주고 분화가 완료되면 실험에 사용한다.

(나) 샘플 처리 및 세포 용해

각 농도별 샘플을 준비하여 준비된 세포에 처리하고 시간별로 세포를 회수하여 사용시까지 -20°C에 보관한다.

(다) 단백질 정량

Bichinchomonic acid (BCA) assay를 이용하여 샘플 내 단백질을 정량한다. 2가의 구리이온이 단백질의 펩티드 결합과 접하게 되면 1가의 이온으로 환원되는데 이를 biuret reaction이라고 한다. 뷰렛 반응에 의해 구리이온의 환원은 단백질의 양과 비교적 정량성을 보이는데, 이렇게 형성된 구리 이온이 다시 BCA와 정량적으로 결합하여 BCA-Cu⁺ complex를 형성한다. 이 복합체는 562 nm에서 강한 흡광을 나타내며 시료의 색은 보라색을 나타낸다. 이 때 562 nm에서의 흡광도를 측정하여 standard curve와 비교함으로써 시료 단백질의 농도를 계산할 수 있다(그림 8 참조). Standard로는 Bovine Serum Albumin (BSA)을 사용하며 BSA의 standard curve와 비교하여 시료 내 단백질 양을 정량함으로써 전기영동시 같은 양의 단백질끼리 비교할 수 있게 한다.

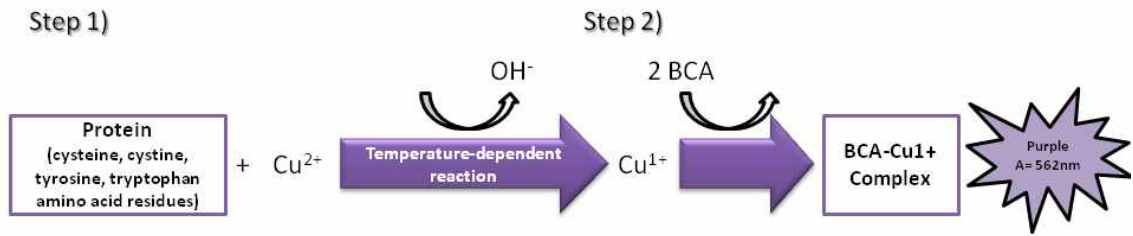


그림 8. BCA 반응 모식도

(라) SDS-PAGE

단백질의 전기 영동 이동성(polypeptide chain의 길이, 분자량, Protein folding, posttranslational modification)을 이용하여 단백질들 간의 분리에 사용하는 기술이다. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)는 변성할 때 주로 사용하는 물질로 보통 단백질을 분리할 때 사용하지만 높은 resolution power와 균일성으로 다양한 크기의 분자에도 사용한다. Acrylamide와 N, N'-methylene bisacrylamide의 2개의 기능기와 연쇄적으로 비가역적인 중합하여 polymer 형식, Ammonium sulfate (APS)를 가교제로 Tetramethylethylenediamine (TEMED)를 촉매제로 사용한다(그림 9 참조).

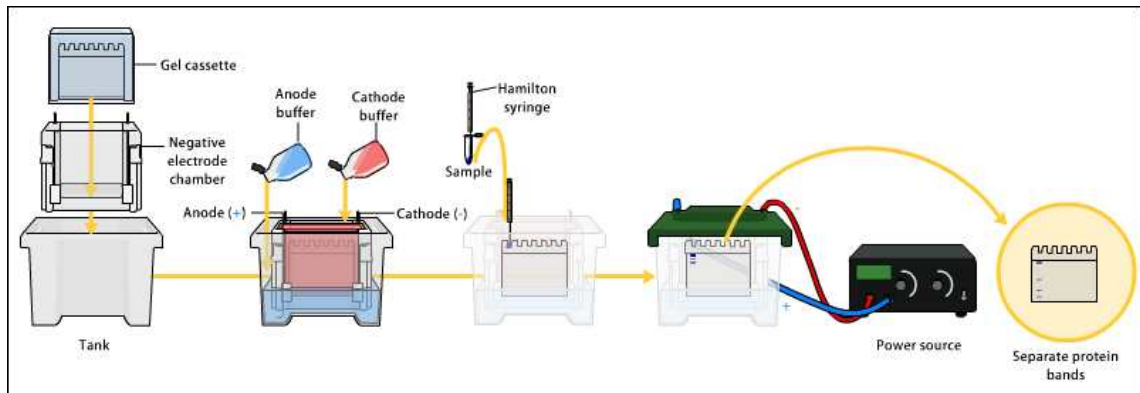


그림 9. 전기영동 방법

샘플버퍼에 희석한 시료 단백질 샘플을 각 well당 20 uL씩 넣고 145V에서 1시간 30분간 걸어준다.

(마) Western blot

SDS-PAGE를 통해 분리된 샘플이 든 젤을 4°C에서 200 mA의 전류로 2시간 동안 transfer 과정을 통해 membrane에 옮겨준다. membrane에 skim milk로 다른 단백질이 붙지 않도록 coating 한 후 원하는 단백질에 대한 항체를 이용하여 특정 단백질만 선택되게 한다. universal 항체를 이용하여 원하는 단백질만 선택될 수 있게 하여 그 단백질의 정도에 따라 밴드의 굵기로 그 발현 정도를 확인한다(그림 10 참조).

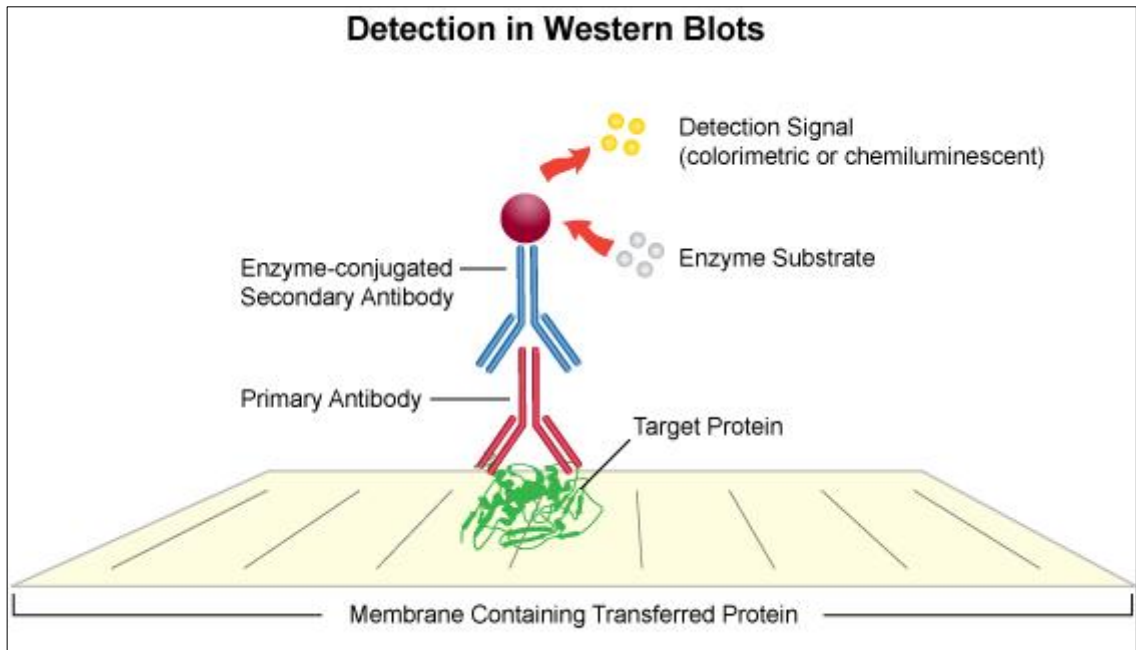


그림 10. 웨스턴 블랏 모식도

(4) 근육 세포에서의 RNA 발현 정도 측정

(가) C2C12 세포 배양

마우스 근아세포인 C2C12 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에 배양시킨다. 세포가 플레이트에 90% 이상 차면 2% Horse Serum, 1% Penicillin/Streptomycin이 함유된 DMEM 배지로 바꾸어 주고 분화가 완료되면 실험에 사용한다.

(나) 샘플 처리 및 세포 용해

각 농도별 샘플을 준비하여 준비된 세포에 처리하고 시간별로 세포를 회수하여 사용시까지 -20°C에 보관한다.

(다) RNA 추출

RNA 추출에는 iNtRON사의 easy-spin™ Total RNA Extraction Kit를 이용하여 매뉴얼 대로 실시하였다.

(라) RNA 정량

추출한 RNA는 정량 과정을 통해 각각의 농도와 순도 등을 확인하여 실험에 사용하였다.

(마) RT-PCR

정량된 단일가닥의 RNA는 이중가닥의 DNA보다 불안정한 물질이고 또한 in vivo에서 RNA 자체를 증폭할 수 없기 때문에 보다 안정적인 DNA로 역전환하는 과정이 필요한데 이를 역전사(Reverse transcription, RT)라고 한다. 역전사를 통해 만들어진 DNA는 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)라고 부르고 그 cDNA를 template로 PCR을 하는 것을 RT-PCR이라고 한다. RT-PCR 과정을 통해 정량된 RNA를 DNA로 변환하여 보다 안정적이게 만들어서 보관하였다(그림 11 참조).

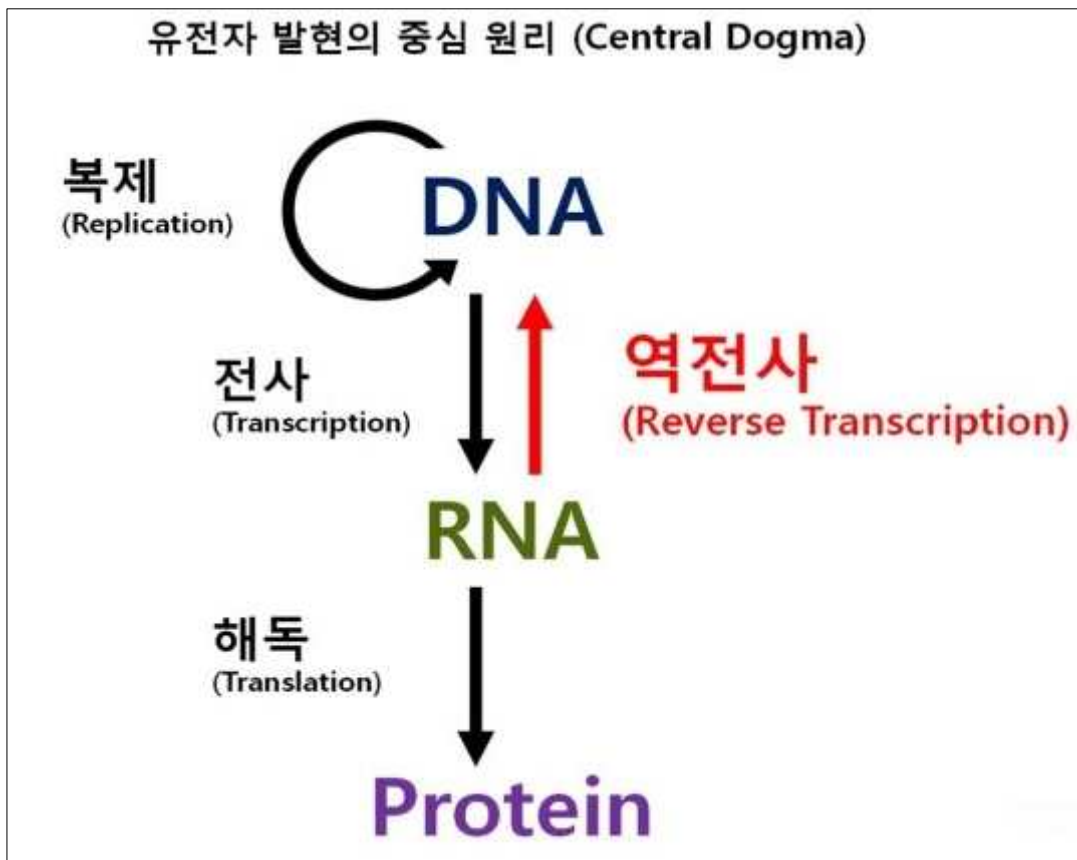


그림 11. 역전사의 원리

(바) Real-time PCR

일반적인 PCR은 증폭 이후 전기영동법으로 결과를 분석하게 되는데, 전기영동법은 민감도나 해상도가 가 낮기 때문에 정량적인 분석이 어렵다. 무엇보다도 PCR 반응 후 end-point에서 분석되기 때문에 초기에 투입된 template DNA의 양을 확인할 수 없다. 이런 전기영동법의 단점을 극복하기 위해 개발된 것이 Real-time PCR 이다. 말 그대로 증폭 과정을 실시간으로 모니터링하여 증폭되는 양을 정량할 수 있기 때문에 정량 PCR (quantitative PCR, qPCR)이라고도 불린다.

Real-Time PCR을 통해 원하는 RNA의 발현량을 각각 확인하였다.

(5) 동물 모델 근 위축 실험

(가) 실험동물 사육

5주령의 ICR male 마우스 모델을 코아텍에서 주문하여 사용하였다. 사육 조건은 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도와 50%의 습도를 유지하였고 12시간 간격으로 조명의 on/off를 조절하여 낮과 밤의 환경을 유지시켰다. 사료나 식수는 절식실험이나 특별한 조건의 식이 조건 외에는 자유롭게 식이할 수 있도록 준비하였다.

(나) 실험동물에 대한 샘플 투여

겨우살이 추출물 및 기타 샘플을 PBS에 녹여 실험에 필요한 농도를 만들고 실험에 따라 적절한 방법으로 투여하였다. 일반적으로 경구투여(oral gavage)를 통하여

투여하였다.

(다) 혈당치의 변화

실험 동물의 꼬리 끝부분을 절단하여 모인 혈액(tai vein blood)을 혈당측정기에 묻혀 혈당의 변화를 확인하였다.

(라) 신경 절단

실험 동물을 avertin을 이용하여 마취시킨 후 알코올로 잘 소독한 한 쪽 다리의 신경만을 절단하고 수술용 실로 봉합하여 상처가 덧나지 않게 하였다. 이를 통해 신경 절단되어 생긴 근 수축과 정상적인 다리의 근육 차이를 동일한 실험동물 개체에서 비교할 수 있게 하였다.

(마) 근육 적출

실험동물에서의 근육 조사는 뒷다리에 있는 대퇴사두근(Quadricep) 혹은 비복근(Gastrocnemius)을 이용한다. Sacrifice한 마우스의 뒷다리 피부를 벗기고 대퇴사두근 혹은 비복근을 적출 한 뒤 lysis buffer 속에서 균질기(homogenizer)를 이용하여 잘게 갈아준다.

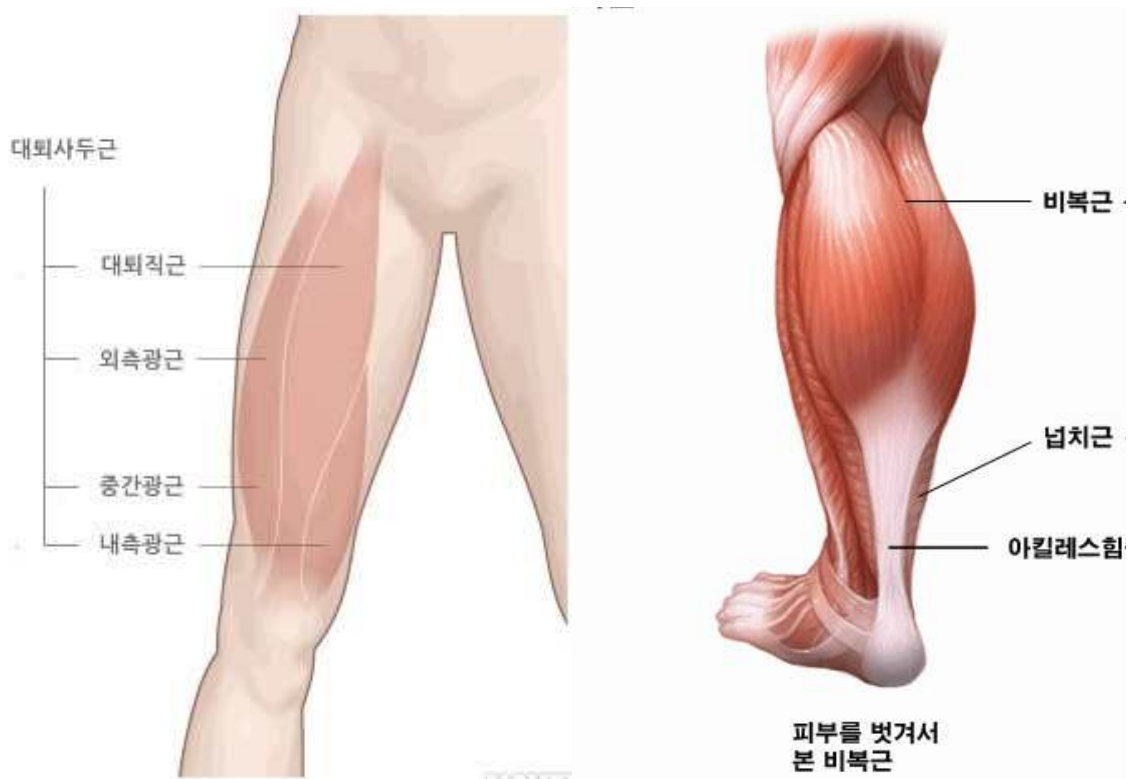


그림 12. 대퇴사두근(좌) 및 비복근(우)

나. 2차년도 (2013~2014)

(1) 목표

트리테르페노이드 성분이 muscle atrophy에 미치는 효과 규명.

(2) 근육세포에서의 단백질 발현 조사

(가) C2C12 세포 배양

마우스 근아세포인 C2C12 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에 배양시킨다. 세포가 플레이트에 90% 이상 차면 2% Horse Serum, 1% Penicillin/Streptomycin이 함유된 DMEM 배지로 바꾸어 주고 분화가 완료되면 실험에 사용한다.

(나) 샘플 처리 및 세포 용해

각 농도별 샘플을 준비하여 준비된 세포에 처리하고 시간별로 세포를 회수하여 사용시까지 -20°C에 보관한다.

(다) 단백질 정량

Bichinchomonic acid (BCA) assay를 이용하여 샘플 내 단백질을 정량한다. 2가의 구리이온이 단백질의 펩티드 결합과 접하게 되면 1가의 이온으로 환원되는데 이를 biuret reaction이라고 한다. 뷰렛 반응에 의해 구리이온의 환원은 단백질의 양과 비교적 정량성을 보이는데, 이렇게 형성된 구리 이온이 다시 BCA와 정량적으로 결합하여 BCA-Cu⁺ complex를 형성한다. 이 복합체는 562 nm에서 강한 흡광을 나타내며 시료의 색은 보라색을 나타낸다. 이 때 562 nm에서의 흡광도를 측정하여 standard curve와 비교함으로써 시료 단백질의 농도를 계산할 수 있다. Standard로는 Bovine Serum Albumin (BSA)을 사용하며 BSA의 standard curve와 비교하여 시료 내 단백질 양을 정량함으로써 전기영동시 같은 양의 단백질끼리 비교할 수 있게 한다.

(라) SDS-PAGE

단백질의 전기 영동 이동성(polypeptide chain의 길이, 분자량, Protein folding, posttranslational modification)을 이용하여 단백질들 간의 분리에 사용하는 기술이다. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)는 변성할 때 주로 사용하는 물질로 보통 단백질을 분리할 때 사용하지만 높은 resolution power와 균일성으로 다양한 크기의 분자에도 사용한다. Acrylamide와 N, N'-methylene bisacrylamide의 2개의 기능기와 연쇄적으로 비가역적인 중합하여 polymer 형식, Ammonium sulfate (APS)을 가교제로 Tetramethylethylenediamine (TEMED)를 촉매제로 사용한다.

샘플버퍼에 희석한 시료 단백질 샘플을 각 well당 20 uL씩 넣고 145V에서 1시간 30분간 걸어준다.

(마) Western blot

SDS-PAGE를 통해 분리된 샘플이 든 젤을 4°C에서 200 mA의 전류로 2시간 동안 transfer 과정을 통해 membrane에 옮겨준다. membrane에 skim milk로 다른 단백질이 붙지 않도록 coating 한 후 원하는 단백질에 대한 항체를 이용하여 특정 단백질만 선택되게 한다. universal 항체를 이용하여 원하는 단백질만 선택될 수 있게 하여 그

단백질의 정도에 따라 밴드의 굵기로 그 발현 정도를 확인한다.

(3) 근육 세포에서의 RNA 발현 정도 측정

(가) C2C12 세포 배양

마우스 근아세포인 C2C12 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에 배양시킨다. 세포가 플레이트에 90% 이상 차면 2% Horse Serum, 1% Penicillin/Streptomycin이 함유된 DMEM 배지로 바꾸어 주고 분화가 완료되면 실험에 사용한다.

(나) 샘플 처리 및 세포 용해

각 농도별 샘플을 준비하여 준비된 세포에 처리하고 시간별로 세포를 회수하여 사용시까지 -20°C에 보관한다.

(다) RNA 추출

RNA 추출에는 iNtRON사의 easy-spin™ Total RNA Extraction Kit를 이용하여 매뉴얼 대로 실시하였다.

(라) RNA 정량

추출한 RNA는 정량 과정을 통해 각각의 농도와 순도 등을 확인하여 실험에 사용하였다.

(마) RT-PCR

정량된 단일가닥의 RNA는 이중가닥의 DNA보다 불안정한 물질이고 또한 *in vivo*에서 RNA 자체를 증폭할 수 없기 때문에 보다 안정적인 DNA로 역전환하는 과정이 필요한데 이를 역전사(Reverse transcription, RT)라고한다. 역전사를 통해 만들어진 DNA는 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)라고 부르고 그 cDNA를 template로 PCR을 하는 것을 RT-PCR이라고 한다. RT-PCR 과정을 통해 정량된 RNA를 DNA로 변환하여 보다 안정적이게 만들어서 보관하였다.

(바) Real-time PCR

일반적인 PCR은 증폭 이후 전기영동법으로 결과를 분석하게 되는데, 전기영동법은 민감도나 해상도가 낮기 때문에 정량적인 분석이 어렵다. 무엇보다도 PCR 반응 후 end-point에서 분석되기 때문에 초기에 투입된 template DNA의 양을 확인할 수 없다. 이런 전기영동법의 단점을 극복하기 위해 개발된 것이 Real-time PCR 이다. 말 그대로 증폭 과정을 실시간으로 모니터링하여 증폭되는 양을 정량할 수 있기 때문에 정량 PCR (quantitative PCR, qPCR)이라고도 불린다.

Real-Time PCR을 통해 원하는 RNA의 발현량을 각각 확인하였다.

(4) 동물 모델 근 위축 실험

(가) 실험동물 사육

5주령의 ICR male 마우스 모델을 코아텍에서 주문하여 사용하였다. 사육 조건은 23 ± 2°C의 온도와 50%의 습도를 유지하였고 12시간 간격으로 조명의 on/off를 조절하여 낮과 밤의 환경을 유지시켰다. 사료나 식수는 절식실험이나 특별한 조건의 식이 조건 외에는 자유롭게 식이할 수 있도록 준비하였다.

(나) 실험동물에 대한 샘플 투여

겨우살이 추출물 및 기타 샘플을 PBS에 녹여 실험에 필요한 농도를 만들고 실험에 따라 적절한 방법으로 투여하였다. 일반적으로 경구투여(oral gavage)를 통하여 투여하였다.

(다) 혈당치의 변화

실험 동물의 꼬리 끝부분을 절단하여 모인 혈액(tai vein blood)을 혈당측정기에 묻혀 혈당의 변화를 확인하였다.

(라) 신경 절단

실험 동물을 avertin을 이용하여 마취시킨 후 알코올로 잘 소독한 한 쪽 다리의 신경만을 절단하고 수술용 실로 봉합하여 상처가 덧나지 않게 하였다. 이를 통해 신경 절단되어 생긴 근 수축과 정상적인 다리의 근육 차이를 동일한 실험동물 개체에서 비교할 수 있게 하였다.

(마) 근육 적출

실험동물에서의 근육 조사는 뒷다리에 있는 대퇴사두근(Quadricep) 혹은 비복근(Gastrocnemius)을 이용한다. Sacrifice한 마우스의 뒷다리 피부를 벗기고 대퇴사두근 혹은 비복근을 적출 한 뒤 lysis buffer 속에서 균질기(homogenizer)를 이용하여 잘게 갈아준다.

3. 연구개발 내용 및 결과

가. 1차년도 (2012~2013)

(1) 겨우살이의 활성 효과 확인

(가) *in vitro* 실험: 마우스 근아세포 내에서 겨우살이 추출물의 효과 확인

① AMPK (AMP activated protein kinase)의 기능

AMPK의 생리적인 기능은 그림 13에 나타난 바와 같이 각종 생리적인 활성을 나타내는 일종의 sensor의 역할을 담당한다. 심장, 근육, 지방세포, 췌장 및 간에 다양한 영향을 미친다. 특히 근육에는 지방산과 포도당 흡수를 촉진하고 또한 미토콘드리아 biogenesis도 관여를 하기 때문에 매우 중요한 바이오 마커다.

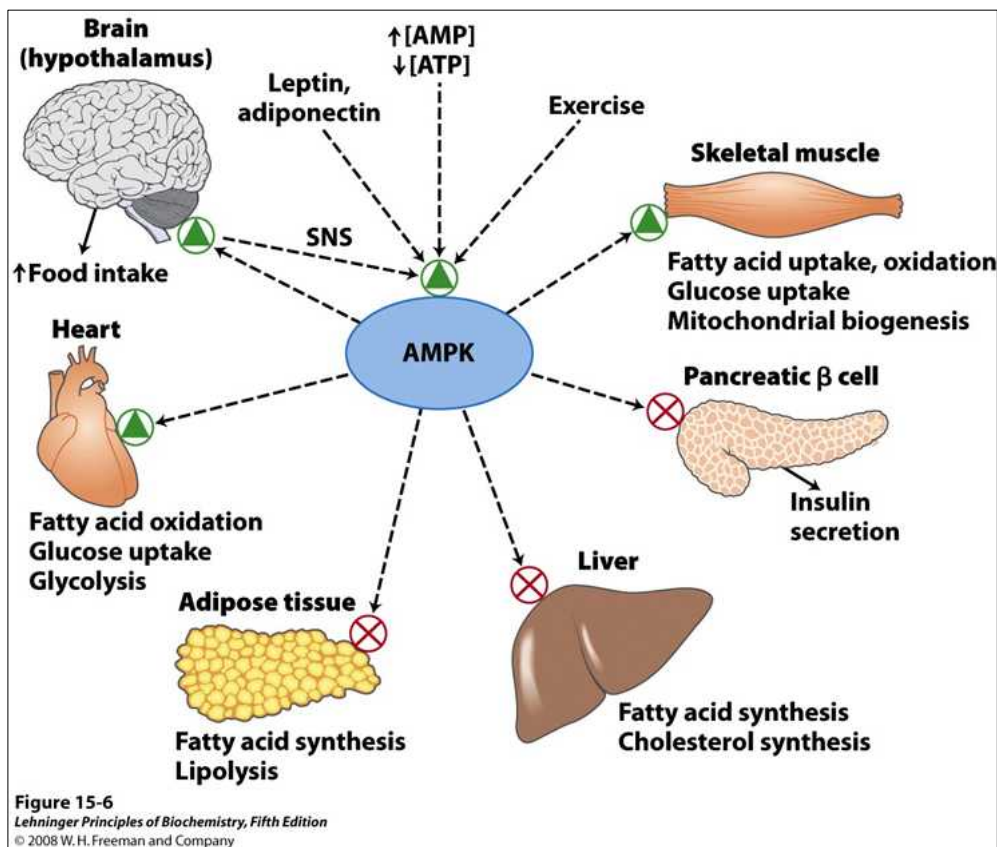


그림 13. AMPK의 작용 모식도

② AMPK의 기본 배경

㉞ AMPK (AMP activated protein kinase)는 exercise, low glucose, heat shock 등에 반응, activation되어 glucose transport를 조절하는 protein임.

㉟ 특히 근육 내에서는 GLUT1, GLUT4에 영향을 미쳐 translocation이 일어나게 하여 glucose uptake를 증가시키는 것으로 알려져 있음.

㉔ 이 외에도 mitochondrial activity 를 증가시키는 인자로도 알려져 있음.

③ AMPK phosphorylation를 위한 실험 조건 및 결과

- ㉔ 마우스 근아세포 C2C12에 겨우살이 추출물(KME)을 100ug/ml 농도로 처리
- ㉔ protein extraction 후 anti-AMPK (Cell signaling) 항체를 사용하여 Western blotting 실시
- ㉔ 겨우살이 추출물에 의해 AMPK의 phosphorylation을 통한 activation 정도를 조사 하였을 시 **그림 14**와 같은 결과를 얻었다. **그림 14**에 나타난 바와 같이 비처리 군에서는 AMPK의 활성이 전혀 나타나지 않은 반면 처리군 에서는 확연히 증가 함을 보임.

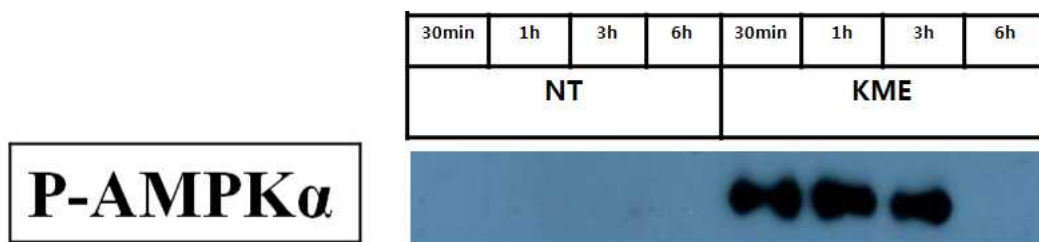


그림 14. 겨우살이 추출물이 AMPK인산화(phosphorylation)에 미치는 영향

(나) 근육 세포 내 muscle atrophy, hypertrophy 관련 pathway에서 겨우살이 추출 물의 효과 확인

① muscle atrophy 관련 biomarker(그림 15)

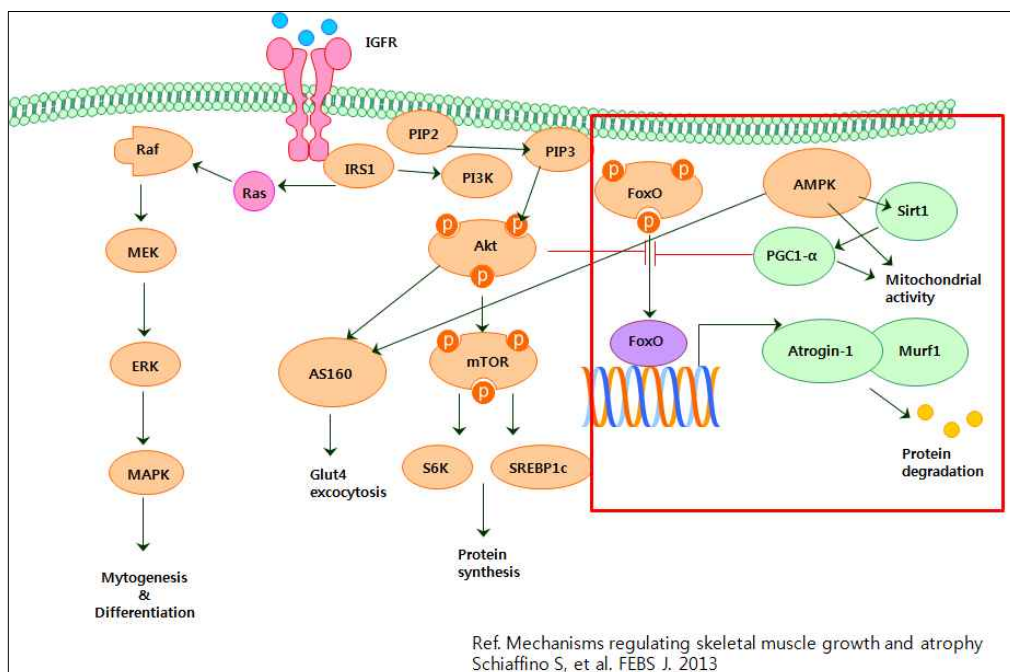


그림 15. 근육 위축(atrophy) 기전에 관여하는 주요 Biomarker와 경로

② Muscle atrophy의 기전 기본 배경

㉠ Muscle atrophy, hypertrophy와 관련된 main pathway는 PI3K를 통한 Akt pathway로 알려져 있음

㉡ 이 중 muscle atrophy와 관련된 pathway는 아래에 사각형으로 표시한 부분임.

- Muscle atrophy를 일으키는 biomarker는 단백질 분해를 촉진하는 Atrogin-1과 Murf1(muscle ring finger protein-1)으로 알려져 있음.
- 이들은 ubiquitin ligase의 일종으로 protein degradation을 일으켜 근육의 양적 감소를 일으키는 muscle atrophy를 초래하게 됨.
- 이 두 biomarker는 FoxO(forkhead box class O)에 의해 발현이 조절되는데 이 FoxO의 발현을 조절 하는 상위 biomarker가 mTOR와 PGC1- α 로 알려져 있음
- 즉, mTOR와 PGC1- α 에 의해 FoxO의 발현이 억제되면, 이로 인해 Atrogin-1과 Murf1의 발현량이 감소하게 되고, 결과적으로 protein degradation 또한 억제되게 되어 muscle atrophy가 감소하게 됨

③ FoxO 실험 조건 및 결과

㉠ 마우스 근아세포 C2C12에 겨우살이 추출물을 100ug/ml의 농도로 처리

㉡ anti-FoxO(Cell signaling) 항체를 사용하여 Western blotting을 실시

㉢ 결과: **그림 16**에 나타난 바와 같이 겨우살이 추출물에 의해 FoxO의 phosphorylation이 증가함을 확인

- FoxO의 경우 phosphorylation 되면 inactivation(불활성화) 되며 이는 Akt의 발현량 증가로 FoxO가 탈인산화(dephosphorylation)되어 activation되는 것을 억제하기 때문임.
- 이 결과를 통해 겨우살이 추출물이 기존에 알려진 PI3K/Akt pathway를 통해 FoxO의 활성을 조절 한다는 것을 확인함.
- 매우 흥미로운 결과는 겨우살이 추출물(KME)과 함께 조사한 triterphenoid acids인 BA, OA, UA 그리고 여주 추출물(YJ)도 비슷한 결과를 나타낸 것은 본 연구의 결과 이용에 중요한 의미가 있다. 즉 :

▶ UA는 근기능 위축 억제효과로 가장 잘 알려진 물질이고 이를 대조구로 항상 함께 조사하였다. 항상 같은 결과를 나타내어 겨우살이 추출물의 효과를 분명히 입증됨.

▶ BA는 자작나무 등에 많이 함유되어 있는 사포닌의 트리테르페노이드계의 비당부분으로서 겨우살이 추출물에도 함유되어 있다. 특히 항암활성을 비롯하여 여러 생리활성이 있음이 밝혀져 있지만 아직 근기능 관련에 대한 보고는 없어 본 결과는 또 다른 의미가 있다고 사료됨.

▶ 여주 추출물(YJ)이 좋은 활성을 나타낸 것은 추후 제품 개발시 부영제 등으로 활용 가능성이 있어 매우 주요한 결과라 평가됨.

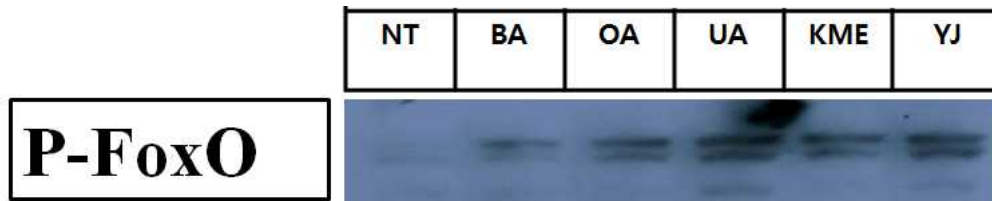


그림 16. 겨우살이 추출물이 FoxO 발현에 미치는 영향

④ PGC1- α , Sirt1, Atrogin-1, Murf1 발현에 미치는 영향조사를 위한 실험 조건 및 결과

㉞ PGC1- α 과 Sirt 발현에 미치는 영향 (그림 17 참고)

- 겨우살이 추출물이 Sirt1과 PGC1- α 의 발현량을 증가시킴을 확인
- 대조군으로 사용한 UA보다도 더 좋은 활성을 보였음.
- Sirt1과 PGC1- α 은 bioenergenesis와 관련이 있는 인자로 muscle hypertrophy에도 영향을 미치는 것으로 알려짐.

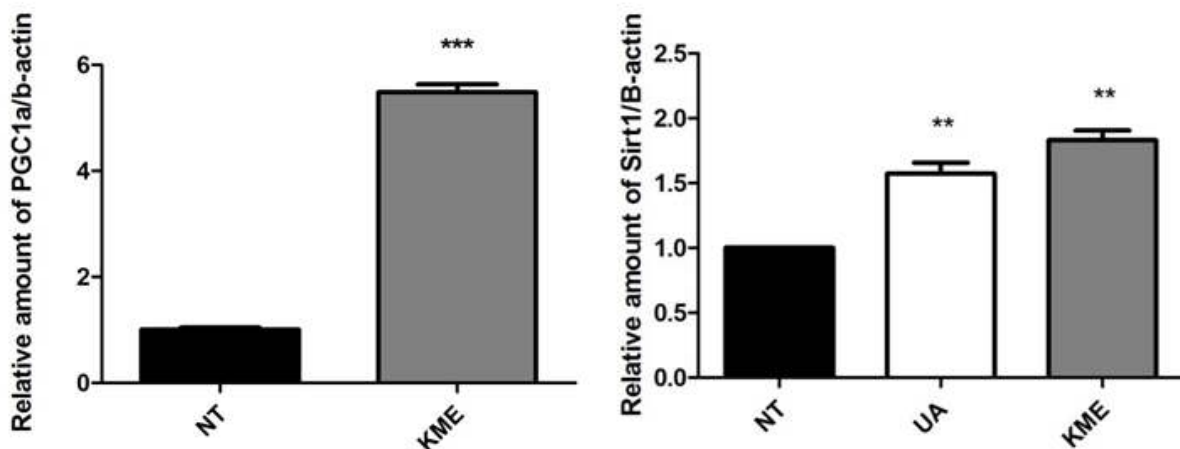


그림 17. 겨우살이 추출물과 UA가 PGC1- α , Sirt1 발현에 미치는 영향

㉞ Atrogin-1과 Murf1의 발현량에 미치는 영향 조사(그림 18 참고)

- Atrogin-1과 Murf1은 단백질의 degradation을 촉진시키는 단백질로서 근위축을 억제시키는 효과를 갖기 위해선 이 두 단백질은 감소현상이 일어나야 한다. 가장 직접적인 효과를 알 수 있는 biomarker다
- 그림 18에 나타난 바와 같이 대조군으로 사용한 가장 활성이 높은 것으로 알려진 UA보다 KME가 더 좋은 효과를 나타난 것은 본 연구의 가능성을 더욱 높여 주는 결과로 판단된다.

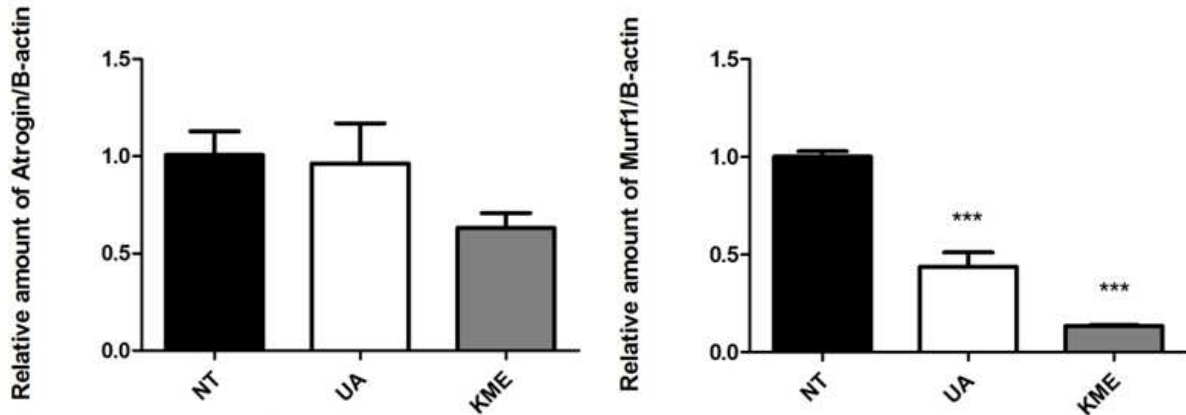


그림 18. 겨우살이 추출물과 UA가 Atrogin-1, Murf1 발현에 미치는 영향

㉔ 결론 : 이 결과를 통해 앞서 언급하였던 AMPK의 활성을 통한 Sirt1, PGC1- α 의 발현량 증가와 최종적으로 muscle atrophy를 직접 일으키는 Atrogin-1, Murf1의 발현 감소가 나타남을 확인할 수 있게 되어 본 연구의 이론적인 근거를 구축할 수 있는 좋은 결과로 평가됨.

(다) muscle hypertrophy 관련 biomarker

① Muscle hypertrophy(근비대)의 기본 배경

- ㉑ Muscle hypertrophy는 protein synthesis, cell differentiation, myogenesis, mitochondrial activity등의 증가를 통해 이루어짐(그림 19)
- ㉒ 특히 skeletal muscle에서는 PI3K/Akt pathway가 muscle hypertrophy에 주된 영향을 끼치고 있음이 많은 사전 연구 결과를 통해 알려짐
- ㉓ 외부에서 insulin 혹은 insulin like growth factor들이 insulin receptor와 반응하면 PI3K (phosphoinositide 3-kinase)에 의해 Akt가 phosphorylation 되면서 activation 됨
- ㉔ Activated Akt는 downstream의 mTOR(mammalian target of rapamycin)을 activation 시킴
- ㉕ mTOR는 S6K(S6 kinase)와 SREBP1-c(sterol regulatory element binding protein1)를 activation 시키며, 이들은 결과적으로 protein synthesis를 촉진하게 되어 근육을 비대시킴
- ㉖ insulin receptor에서 자극이 전해지는 MAP kinase pathway의 경우 myogenesis와 cell differentiation을 촉진하는 것으로 알려져 있는 주요 pathway 중 하나임.
- ㉗ Akt의 경우 AMPK와 함께 AS160의 발현을 증가시켜 GLUT4(glucose transporter 4)의 translocation을 일으켜 glucose uptake를 촉진시키는 역할을 수행함. 이 경로는 특히 항당뇨 효능을 나타내는 기전과도 깊은 관련이 있다.

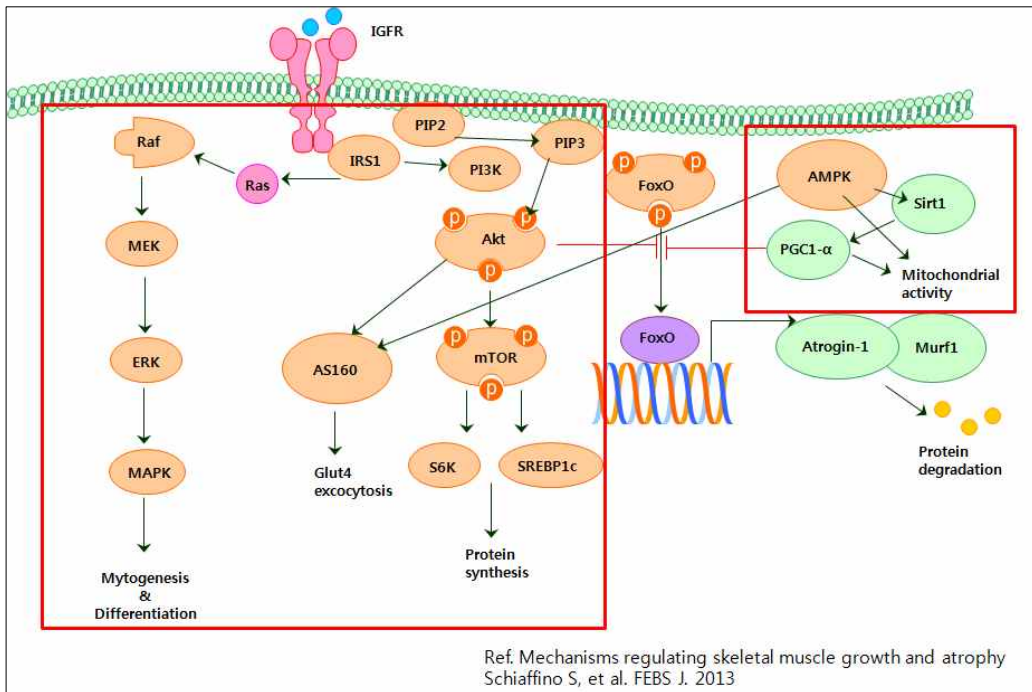


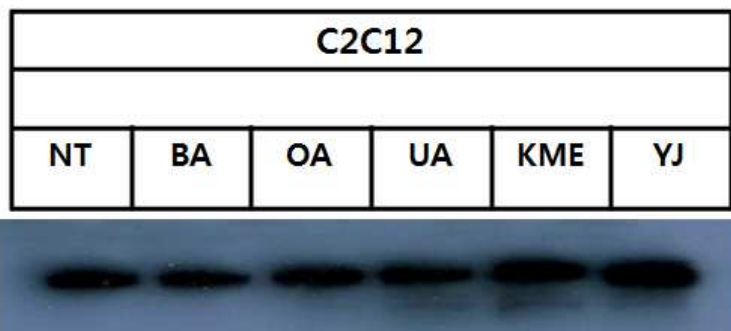
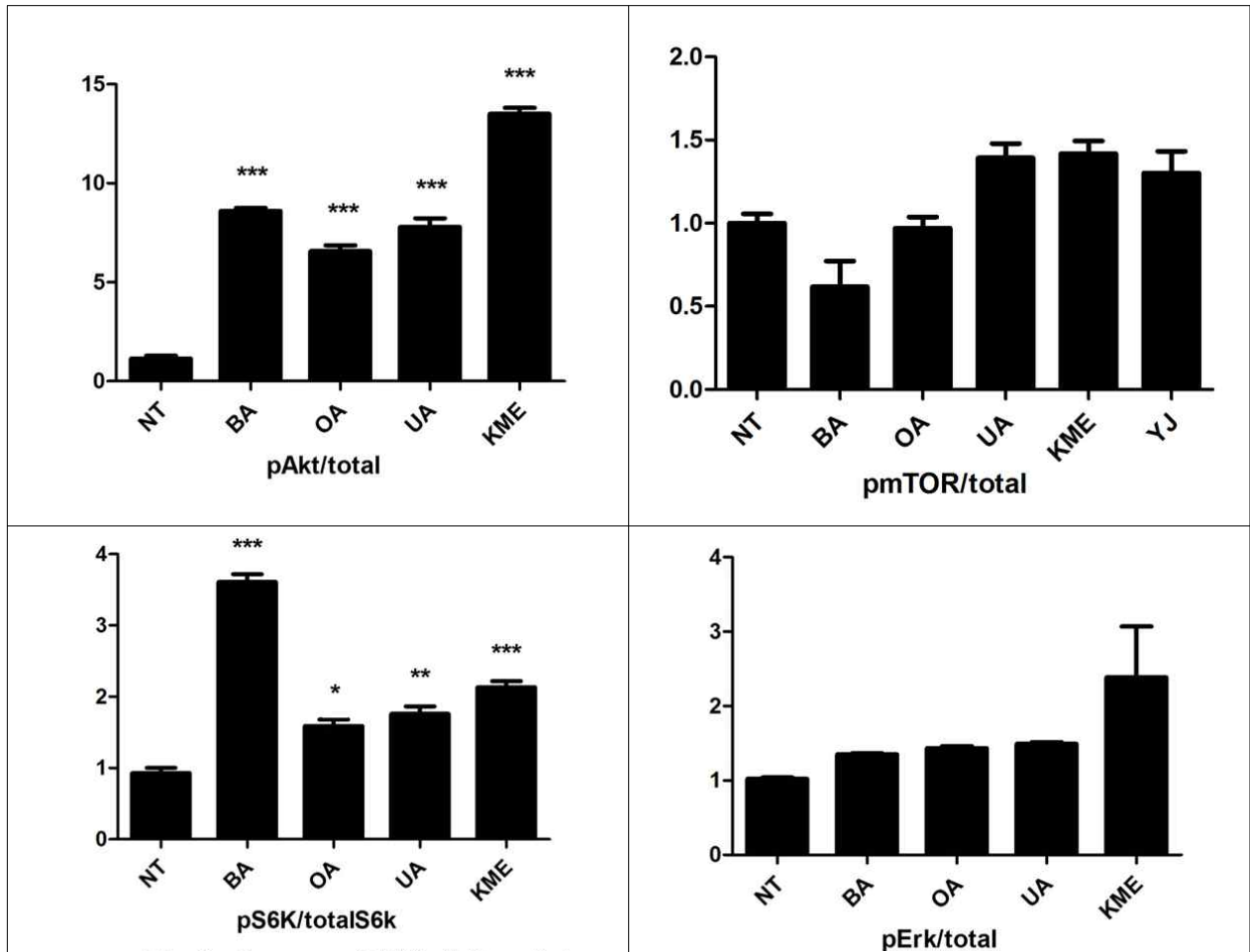
그림 19, 근육 증강(hypertrophy) 기전에 관여하는 주요 biomarker와 경로

② Akt/S6k/mTOR/Erk 실험 조건 및 결과

- ㉠ 마우스 근아세포 C2C12에 겨우살이 추출물을 100ug/ml의 농도로 처리
- ㉡ protein extraction 후 anti-Akt, anti-S6k, anti-mTOR, anti-Erk(Cell signaling) 항체를 사용하여 Western blotting을 실시하여 조사함.

㉢ 결과 (그림 20 참고)

- 겨우살이 추출물(KME)가 Akt pathway를 매우 강하게 활성화(activation) 시키는 것을 확인함.
- mTOR의 결과는 Fig4의 결과를 densitometer로 처리한 결과로서 대조군에 비해 증가함을 나타냄.
- S6K의 경우 미처리군에 비해 처리군에서 공히 높은 활성을 나타내었다. 특히 BA가 높은 활성을 나타낸 것은 매우 흥미로운 결과다. 제품 제조시 BA가 많이 함유된 것으로 알려진 소재(예; 자작나무)를 활용할 수 있는 좋은 근거가 된다고 판단됨. 또한 겨우살이를 풀이 아닌 지용성 용매(예; 주정 등)를 사용할 시 더욱 활성이 높은 결과를 얻을 것으로 예상된다.
- Erk 활성화에도 대체로 모두 영향을 나타내었고 특히 겨우살이 추출물이 가장 좋은 효과를 나타내었다.



P-mTOR

그림 20. 겨우살이 추출물이 Akt/S6k/mTOR/Erk 발현에 미치는 영향

③ SREBP1-c/GLUT1/GLUT4/UCP3/PDK4 발현에 미치는 영향

- ㉠ 마우스 근아세포 C2C12에 겨우살이 추출물을 100ug/ml 농도로 처리함.
- ㉡ RNA extraction kit(INTRON)를 사용하여 total RNA 추출 후, cDNA를 합성
- ㉢ SREBP1-c, GLUT1, GLUT4의 primer와 함께 realtime PCR 실험을 실시하여 조사함.
- ㉣ SREBP1-c, GLUT1, GLUT4 모두 겨우살이 추출물 처리군에서 발현량이 증가하는 것을 확인 할 수 있음(그림 21 참고)
- ㉤ SREBP1-c의 발현 증가를 통해 protein synthesis가 촉진되며, GLUT1, GLUT4를 통해 glucose uptake가 촉진 된다고 판단. 본 결과는 근육 hypertrophy 효능을 갖

는 물질들의 공통적인 효과임.

- ㉞ PDK4(pyruvate dehydrogenase kinase 4)와 UCP3(uncoupling protein3)의 발현 증가를 통해 mitochondrial activity가 증가함. 본 결과는 근육 hypertrophy 효능을 갖는 물질들의 효과임.

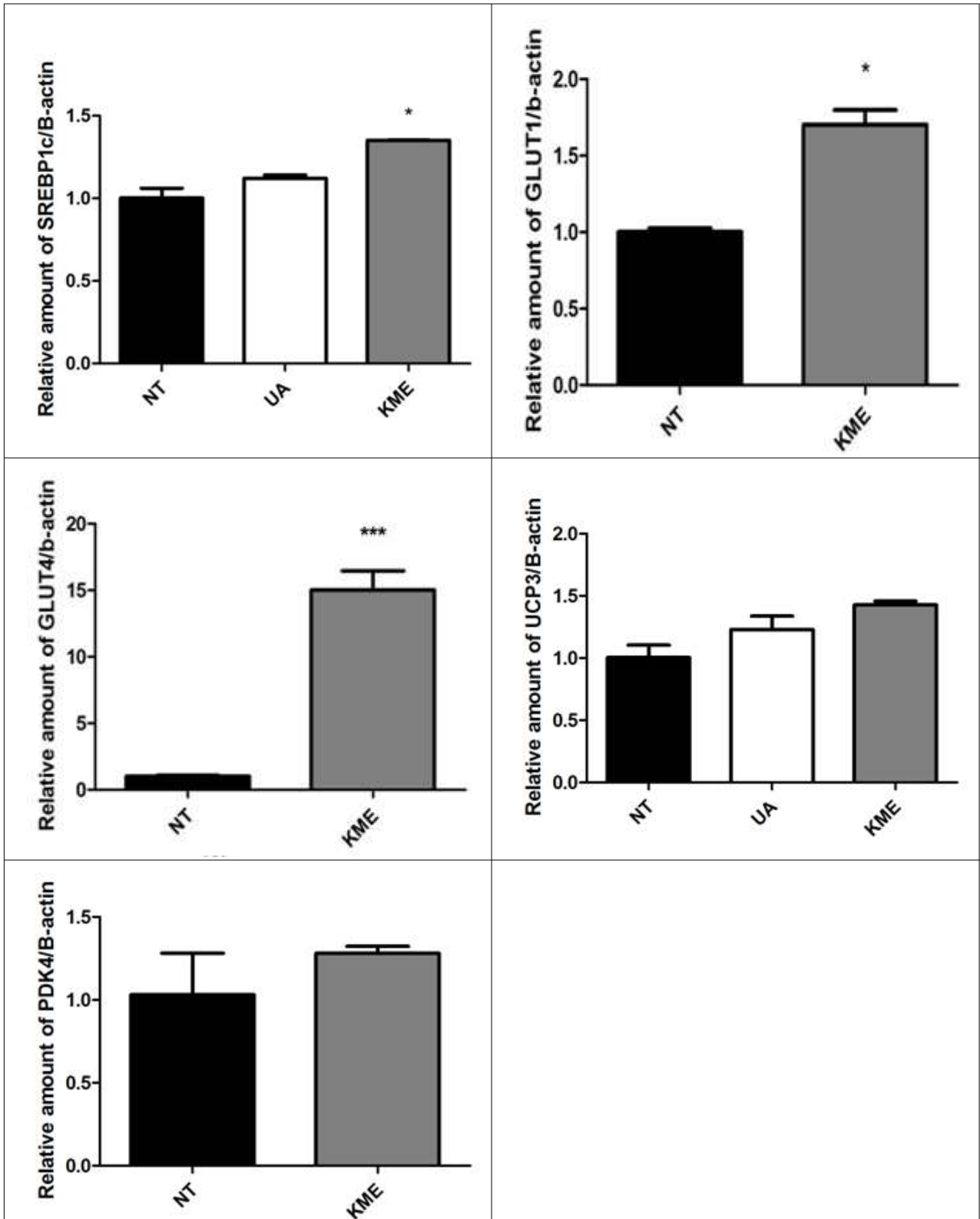


그림 21. 겨우살이 추출물이 근육비대 관련 유전자 발현에 미치는 영향

④ Insulin dependent/independent 판별 실험 조건 및 결과

- ㉠ PI3K/Akt pathway에서의 겨우살이 추출물 활성화와 insulin의 연관성을 확인하는 실험임.
- ㉡ 본 연구 이전에 다른 물질들을 이용하여 연구한 결과들은 PI3K/Akt pathway를 통해 muscle hypertrophy를 일으키는 기작은 insulin dependent 하다고 알려져 있음.
- ㉢ C2C12 myotube를 16시간 serum free media를 이용하여 starvation 시킨 후 실험을 진행함.
- ㉣ 마우스 근아세포 C2C12에 겨우살이 추출물을 100 ug/ml의 농도로 처리
- ㉤ 동일 물질 처리군을 2개 만드는데, 하나에는 insulin을 10 nM의 농도로 처리함.
- ㉥ 동일 물질 처리군 내의 insulin 유무 차이에 따른 biomarker 발현량 차이 조사함.
- ㉦ 결과 (그림 22 참고)
 - PI3K/Akt pathway 중 upstream에 해당하는 Akt에서 확실한 insulin dependent 결과 확인
 - Downstream의 경우 Akt에 비해 명확하지는 않으나 insulin dependent의 경향성 확인



그림 22. Akt와 Erk 발현에 있어서 Insulin이 미치는 영향

(라) 트리테르페노이드 계열 합성 물질과 겨우살이 추출물 간의 활성화 비교

- ① 트리테르페노이드 계열 BA유도체가 muscle atrophy, hypertrophy에 끼치는 영향
- ② 트리테르페노이드는 주로 식물 계통에서 발견, 추출된 물질로 다양한 생리 활성이 있음이 밝혀짐. 사포닌 계열의 비당부분으로(aglycon) 다양한 생리활성이 보고되

고 있다. 가장 대표적인 물질의 하나로서 주로, 자작나무에서 발견된 betulinic acid(BA), 올리브에서 발견된 oleanolic acid(OA), 사과 껍질에서 발견된 ursolic acid(UA) 등이 대표적인 물질임.

- ㉔ 이들 트리테르페노이드 계열 물질들은 항암, 생리활성, 항산화, 항염증에 효과가 있음이 밝혀져 있음. 특히 BA는 AMPK activation에 의한 생명 연장 효과, UA는 PI3K/Akt pathway activation에 의한 skeletal muscle hypertrophy 촉진과 atrophy 억제에 효과가 있음이 밝혀짐.
- ㉕ 본 연구에서 보고자 하는 muscle hypertrophy, atrophy와 관련하여 Betulinic acid, 그리고 합성한 BA의 유도체들인 compound 26과 compound 27(그림 23 참조)의 영향을 함께 확인하였음.

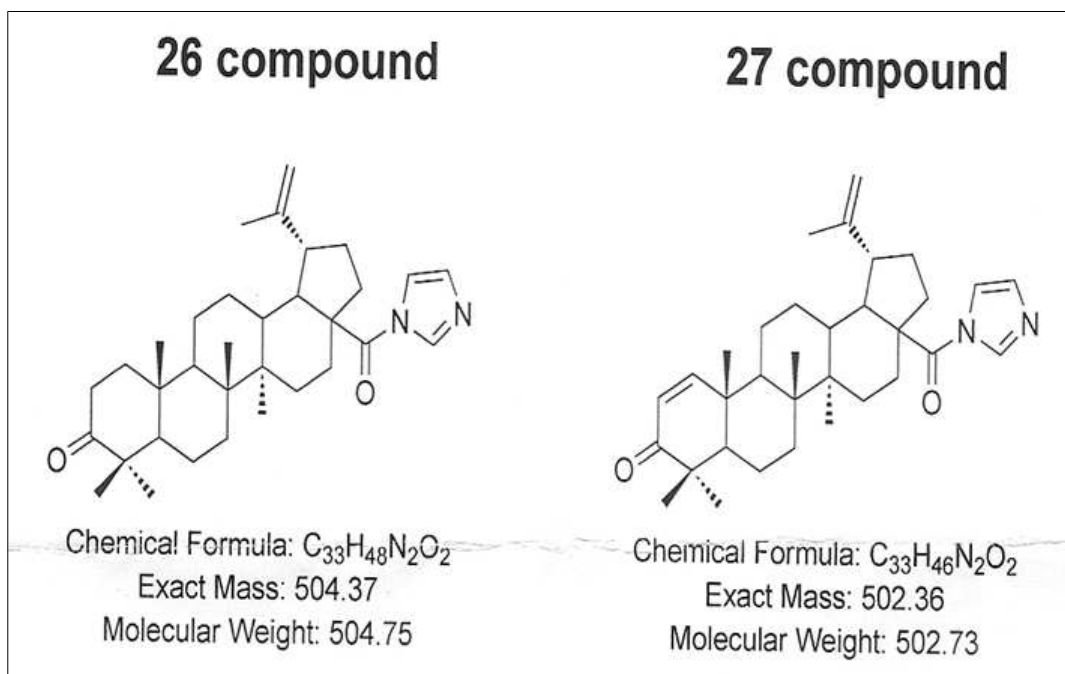
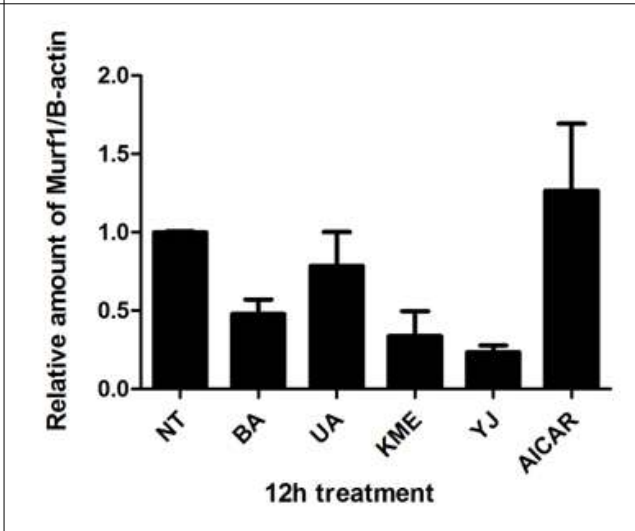
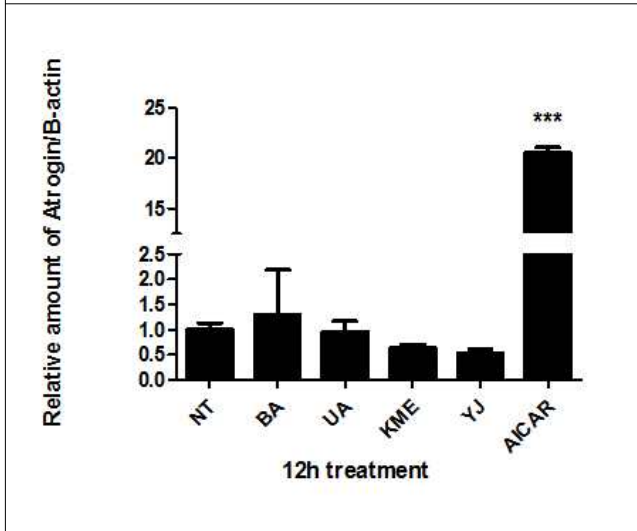
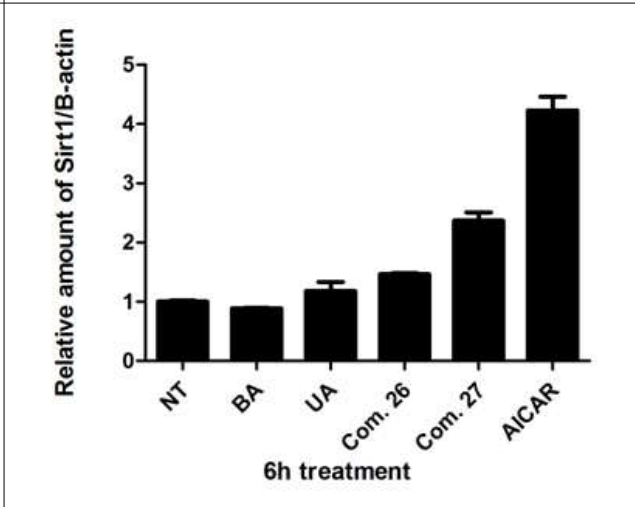
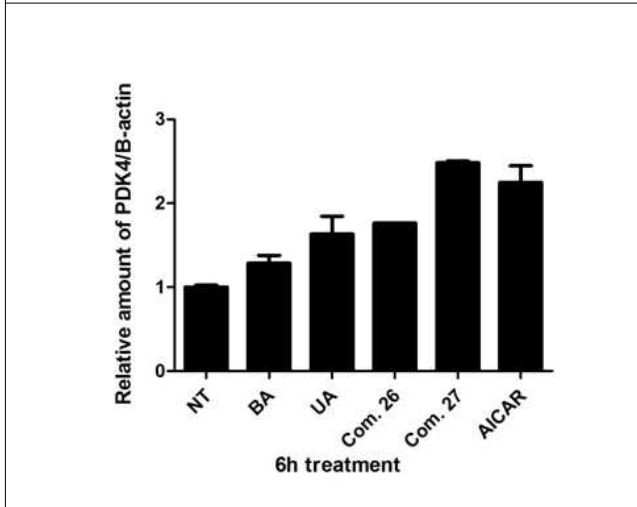
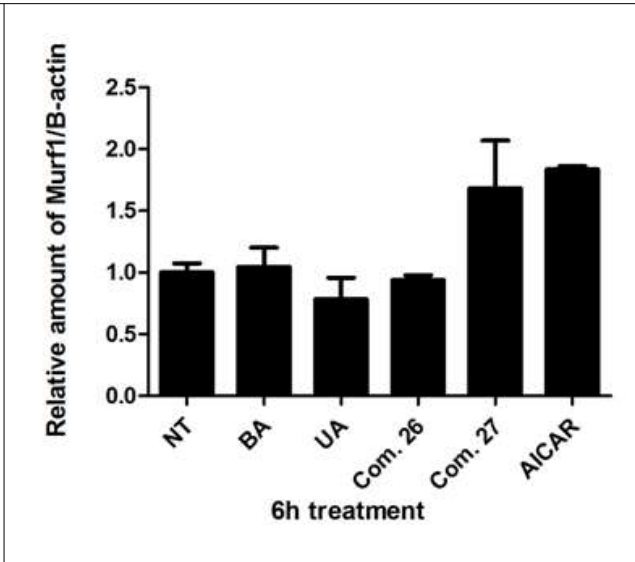
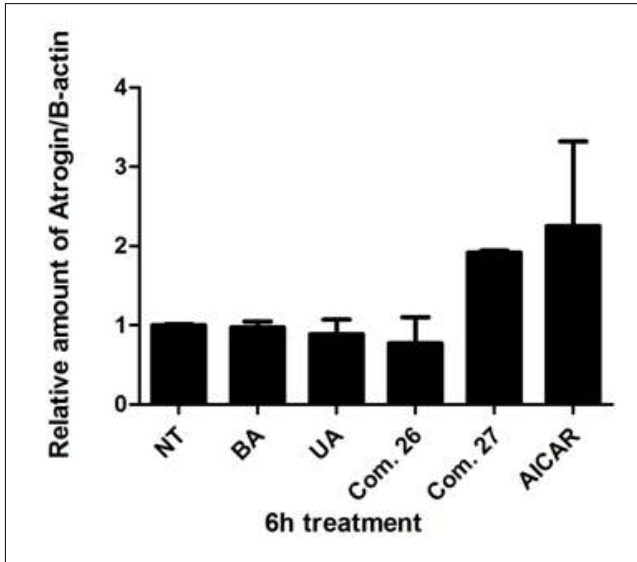


그림 23. BA의 유도체 Com.26과 Com.27의 구조

- ㉖ 트리테르페노이드 계열 물질과 겨우살이 추출물의 연관성
 - ㉗ 트리테르페노이드 계열 물질들의 muscle atrophy, hypertrophy에 관련된 효과와 겨우살이 추출물이 보이는 효과의 정도를 비교함으로써 겨우살이 추출물의 효과를 재확인 함.



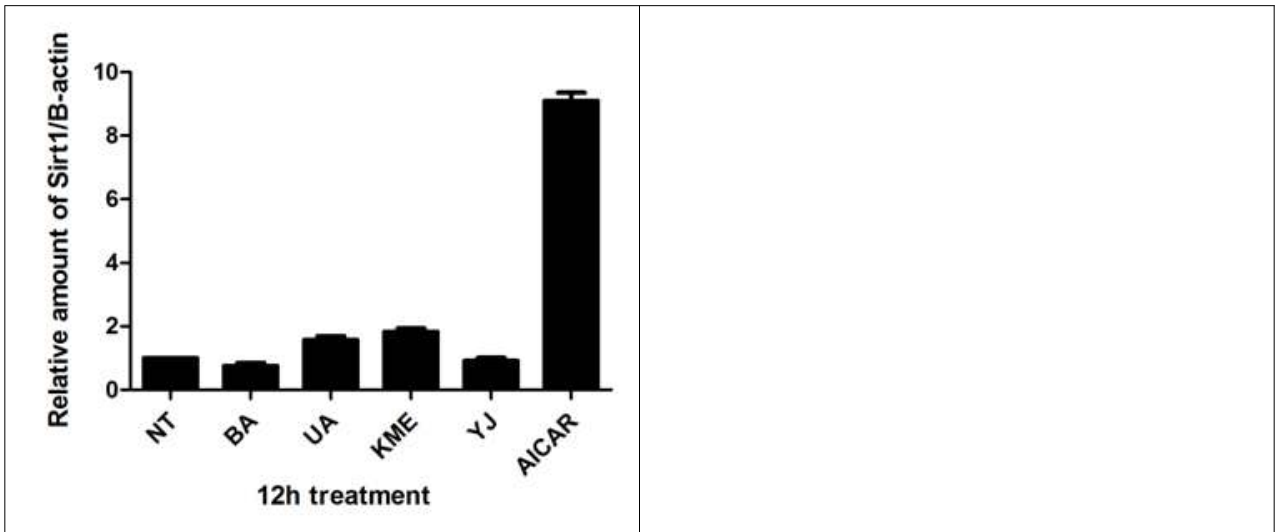


그림 24. 트리테르페노이드 계열 물질들과 겨우살이, 여주 추출물이 관련 유전자의 발현에 미치는 영향

㉞ 결과요약 (그림 24 참고)

- C2C12 마우스 근아세포에 트리테르페노이드 계열의 물질을 처리 할 경우, 6시간까지는 두드러지는 atrophy 억제 효과가 나타나지 않음. 12시간 처리 시 BA와 UA에서 atrogen-1과 murf1의 발현을 억제하는 효과가 나타남.
- **BA의 유도체인** Com.26과 Com.27의 경우 Com.27에 비해 Com.26에서 atrophy 억제 효과가 더 강하게 나타남을 확인하였음. Muscle hypertrophy 측면에서는 흥미롭게도 Com.27이 Com.26보다 더 좋은 효과를 나타내었음.
- **본 결과는 세계에서 처음으로 입증한 결과로서** 특히 아직 근기능 관련 제약이 없는 점을 감안할 때 근위축 억제 또는 근육비대 효과를 나타내는 약을 개발할 경우 그 기초자료로 활용할 수 있는 근거를 제공한다는 측면에서 매우 중요한 결과라 생각된다. 특히 BA는 현재 항암제로 임상시험을 하고 있는 물질이며 본 연구진이 항당뇨, 항비만 및 생명연장, 기력증진을 증가시키는 효과도 입증한 물질이라 앞으로 이의 이용가치는 무한하다.

㉞ **종합결론** : BA와 UA 그리고 겨우살이 추출물을 비교하였을 때, 겨우살이 추출물이 muscle atrophy 관련 biomarker인 atrogen-1과 murf1의 발현량 억제 효과가 더 큰 것을 확인함. 또한 muscle hypertrophy 관련 biomarker인 Sirt1의 발현량 증가도 겨우살이 추출물에서 더 큰 것을 확인함.

㉞ 겨우살이 이외의 국내 자생식물 추출물로 함께 실험한 여주(YJ)의 경우 muscle atrophy 관련 biomarker인 atrogen-1과 murf1의 발현 억제 효과가 매우 높은 것을 확인. 반면에 hypertrophy를 촉진 시키는 효과는 미비한 것으로 확인되어 향후 제품개발과 새로운 소재개발에 중요한 자료로 활용할 수 있게 하는 결과다.

(마) 세포 실험(in-vitro)에서의 연구 결과 발표

① 2013 생화학분자생물학회(KSBMB)에 본 연구의 세포 수준에서의 연구 결과를 바탕으로 포스터 발표

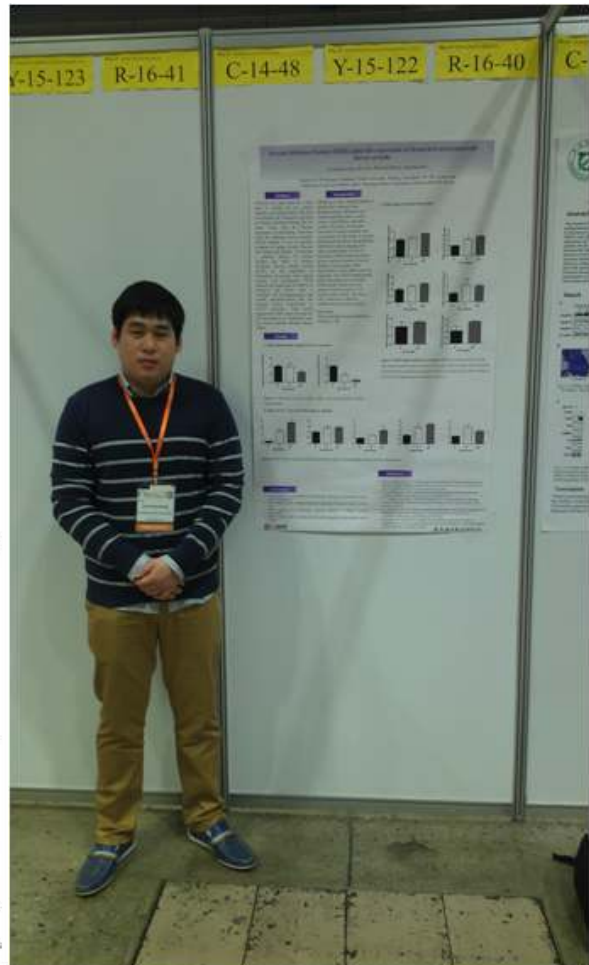
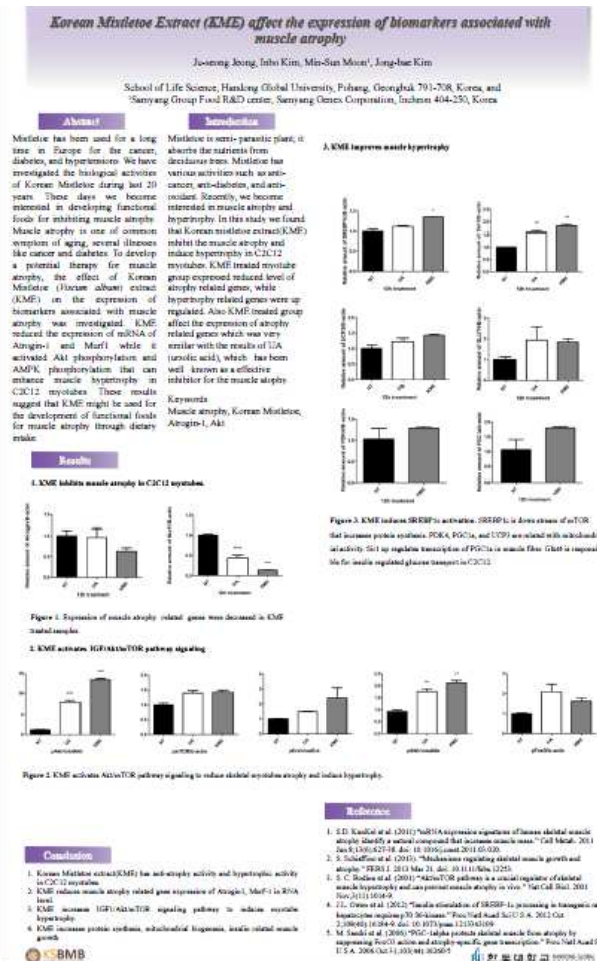


그림 25. in-vitro 결과의 학회지 포스터 발표

<Abstract> Korean mistletoe is a semi-parasitic plant that is known to possess numerous beneficial properties such as anti-cancer and anti-diabetic. Previously, it was shown that Korean mistletoe extract (KMH) is capable of inhibiting biomarkers related to muscle atrophy in murine muscle cells, while simultaneously increasing the activation of biomarkers related to muscle hypertrophy. These properties were investigated in two in vivo models, fasting and denervation, which are known to cause muscle atrophy. Mice were either fasted for 24 hours before orally administrating KMH, or had sciatic nerves of their right-hind leg cut before being fed KMH incorporated chow. Results of the present study suggest enhanced muscle activity and mass in KMH treated mice as demonstrated through treadmill and swimming tests. In addition, KMH inclusive diet reduced biomarkers of atrophy (Atrogin-1 and MURF1) while increasing

biomarkers of hypertrophy (e.g. Akt, AMPK and mTOR). In conclusion, the current study indicates that dietary intake of KMH shows beneficial effects against muscle atrophy.

- ② 겨우살이 추출물의 muscle atrophy, hypertrophy에서의 효과에 대해 독일 생약학회 국제 심포지움에 포스터 발표 준비중

(바) In-vivo 결과 : 마우스 단기간 식이 제한 모델에서의 겨우살이 추출물의 효과 확인

① 단기간 식이 제한의 기본 배경

- ㉠ 식이 제한을 통해 insulin dependent인 PI3K/Akt pathway를 억제함
- ㉡ FoxO의 de-phosphorylation 통한 Atrogin-1, Murf1 발현량 증가
- ㉢ protein degradation 증가를 통해 근육량 감소(muscle atrophy)
- ㉣ 식이 제한시 mTOR의 발현량 억제 효과가 있음이 밝혀짐
- ㉤ 식이 제한시 일어나는 mTOR의 발현 억제에 대한 겨우살이의 효과에 대해 보다 심층 있는 결과를 얻고자 더욱 심화 연구를 수행하고 있음. 이 결과에 따라 생명 연장과 근육량과의 관련성을 규명할 수 있는 새로운 경로를 제시할 수 있음.

② 단기간 식이 제한 모델의 실험 조건 및 결과

- ㉠ 5주령의 ICR male 마우스 모델을 사용
- ㉡ 사료 식이를 완전히 제한하며 겨우살이 추출물을 12시간 간격으로 2번 투여. 투여 하는 농도는 200mpk, 500mpk의 2개, Negative control로 겨우살이 추출물을 녹였던 PBS를 투여한 그룹을 사용하며, positive control로 이전에 연구가 진행 되어 논문이 발표된 ursolic acid(UA)를 대조군으로 사용하여 비교하였음.
- ㉢ 혈당치의 변화량 확인
- ㉣ sacrifice 후 근육을 떼어 내어 weight의 변화 측정
- ㉤ 근육에서 RNA를 추출: 30mg의 muscle을 total RNA extraction kit (INTRON) 이용하여 bead-bitter로 갈아 RNA 추출하여 realtime PCR 수행

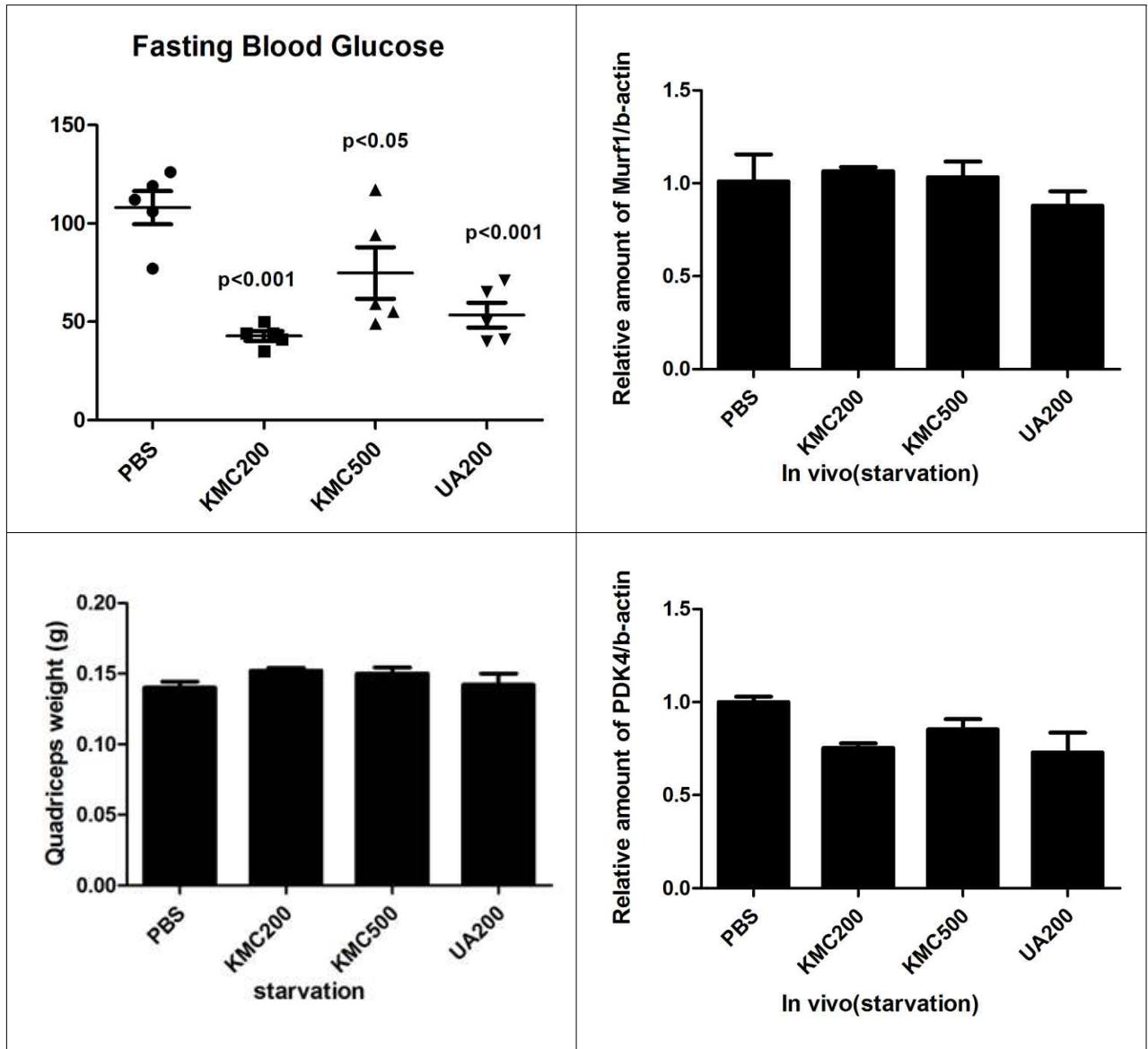


그림 26. In-vivo 실험 결과

㉮ 결과 (그림 26 참고)

- 혈당량에 미치는 영향 : 예상대로 혈당량을 감소시키는 영향을 나타내었음. 이는 겨우살이 추출물이 항당뇨 효능을 나타내는 기존 결과와 일치하는 결과임. 항당뇨 효능과 근육기능과도 밀접한 관계가 있음을 보여주는 결과다.
- RNA를 이용한 realtime PCR의 경우 Murf-1의 경우에선 유의성 있는 결과가 나타나지 않았다. 그러나 positive control로 사용한 UA의 결과 값도 경향을 보이지 않아 실험상의 오류일 수도 있다는 판단 아래 재실험을 진행하고 있음.
- 근육 무게의 변화는 두드러지지 않았음.

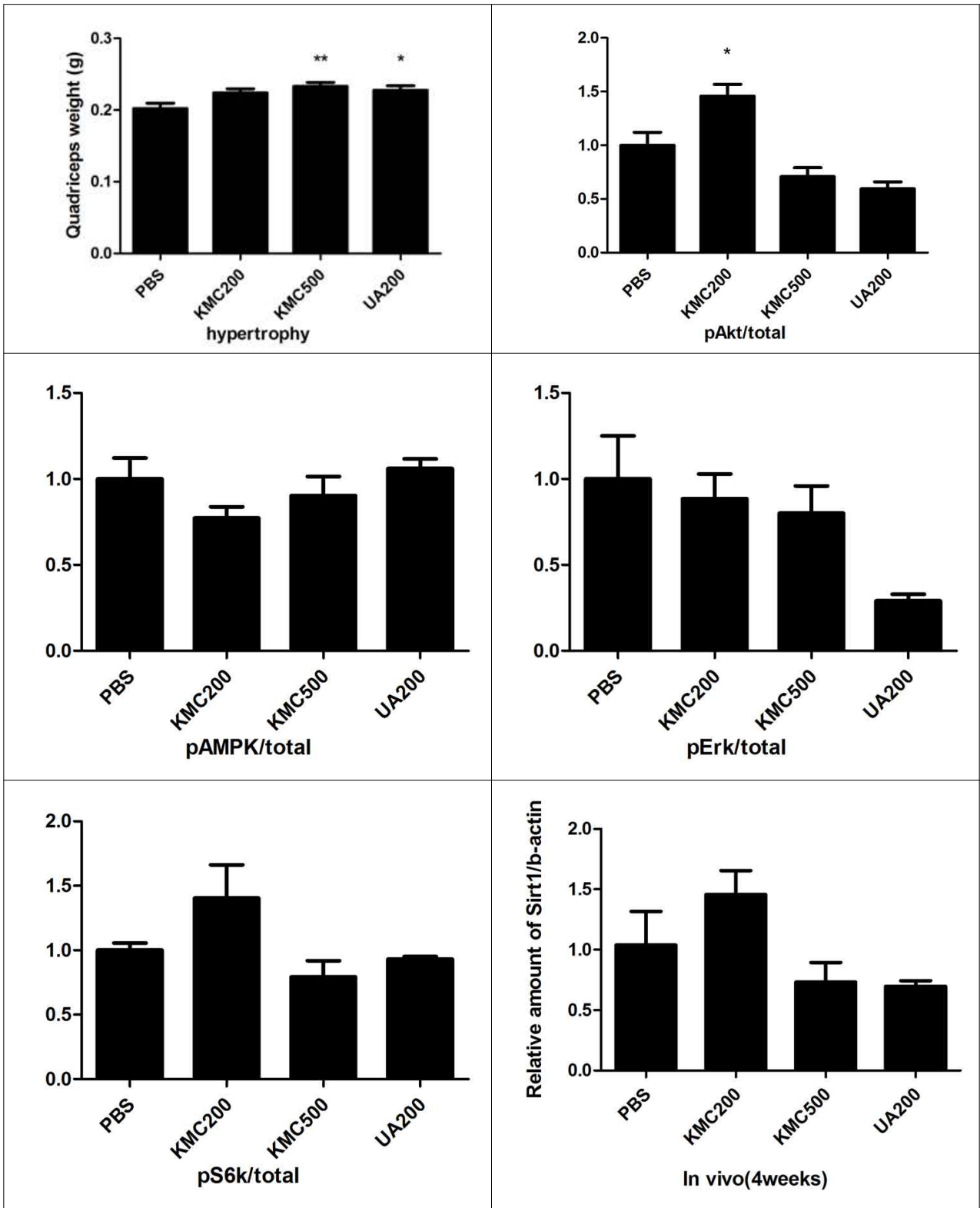
(사) In-vivo 결과 : 마우스 장기간 경구투여 모델 모델에서의 겨우살이 추출물의 효과 확인

① 장기간 경구투여의 기본 배경

- ㉠ 기본 식이 사료 이외에 겨우살이 추출물을 추가로 경구투여하여 근육기능에 미치는 영향을 조사하였음.
- ㉡ 일반적인 상황에서 겨우살이에 의한 근육량의 증가(muscle hypertrophy)가 이루어지는가를 확인함.
- ㉢ Muscle atrophy, hypertrophy를 연구함에 있어 atrophy에 대한 억제, 회복력에 대한 평가와 함께 근육량의 증가에 대한 평가가 매우 중요한 지표가 되어 이를 조사함.
- ㉣ Skeletal muscle에서는 Akt/mTOR/S6K/Erk의 activation을 통해 muscle hypertrophy가 일어남.
- ㉤ in vitro 실험 결과를 통해 겨우살이 추출물이 앞서 언급한 PI3K/Akt pathway를 통해 작용 할 때 insulin dependent임을 밝혔기 때문에 기존의 다른 연구 결과들과 마찬가지로 실험 방법을 적용 할 수 있음. 그 이유는 in vivo condition에서는 insulin이 항상 작용을 하고 있기 때문임.

② 장기간 경구투여 모델의 실험 조건 및 결과

- ㉠ 5주령의 ICR male 마우스 모델을 사용하여 실험
- ㉡ 기초 사료 식이를 제한하지 않은 상태에서 1일 1회 겨우살이 추출물을 경구투여함. 200mpk와 500mpk의 농도로 200ul씩 경구투여 하였으며 negative control로 PBS 투여군을, positive control로 기존의 연구 결과가 발표 되어 있는 ursolic acid 투여군을 사용함.
- ㉢ 4주간 투여 후 sacrifice 하여 muscle sample을 추출, 무게의 변화량을 측정
- ㉣ muscle sample을 이용하여 protein을 추출: 30mg의 muscle을 protein extraction solution(INTRON) 700ul에 homogenizer를 이용하여 갈아서 추출.
- ㉤ 위의 방법을 통해 얻은 protein sample을 30ug씩 loading하여 western blotting 실험 수행.
- ㉥ muscle sample을 이용하여 RNA 추출: 30mg의 muscle을 RNA extraction kit(INTRON)과 bead bitter를 이용, total RNA를 추출하여 cDNA를 합성함.
- ㉦ 합성한 cDNA를 atrogen-1, murf1, Sirt1, PDK4, GLUT4의 primer와 함께 realtime PCR 방법으로 발현량을 조사함.



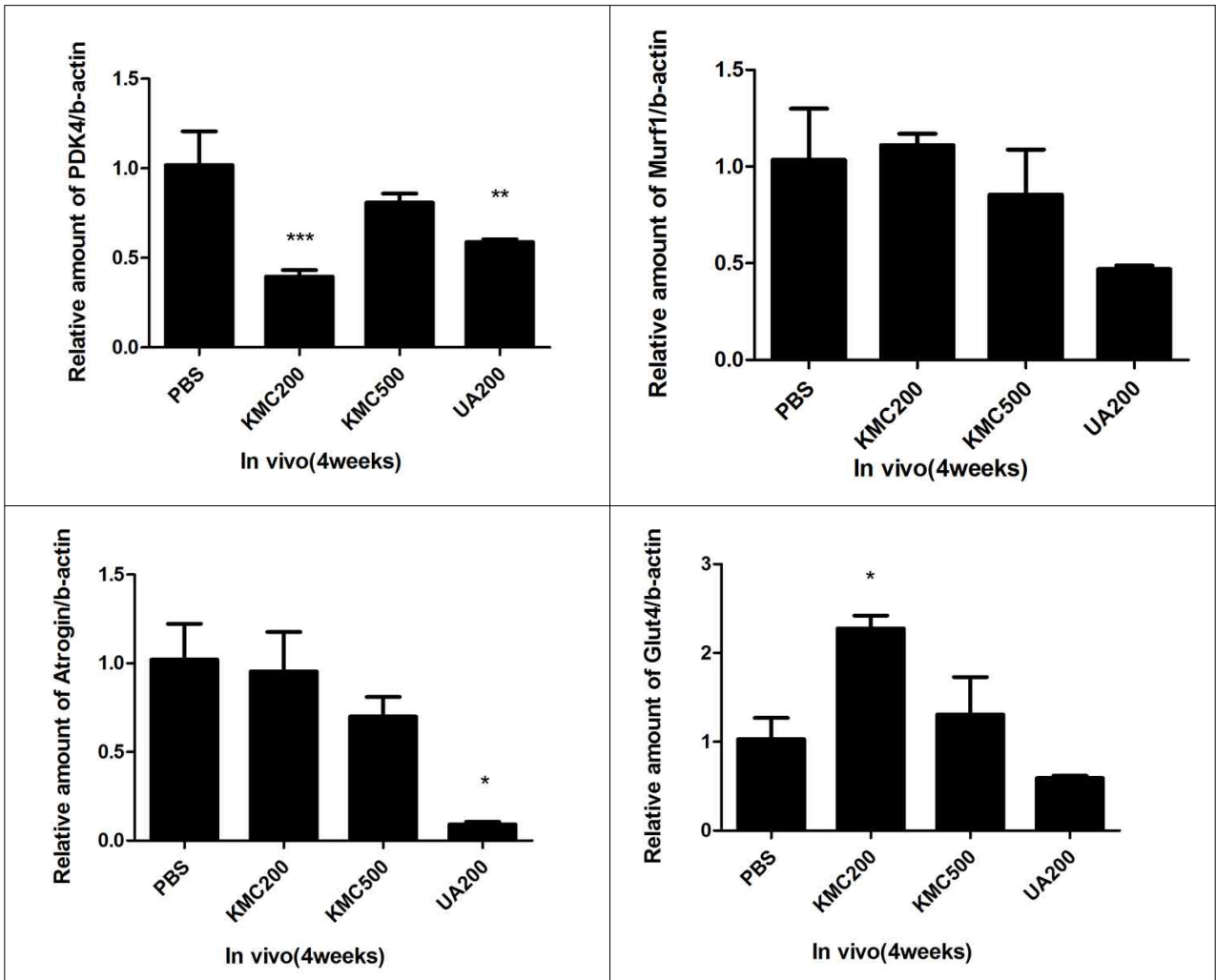


그림 27. in-vivo 실험에서 겨우살이 추출물 급여가 근육기능 관련 biomarker에 미치는 영향

㉠ 결과 (그림 27 참조)

- 근육 무게량 측정 실험을 통해 겨우살이 추출물과 트리테르페노이드 계열 UA가 PBS group에 비해 무게량이 증가한 것을 확인.
- 근육 샘플에서 추출한 RNA와 protein을 이용하여 western blotting과 realtime PCR을 수행함.
- Akt, S6k, 의 경우 겨우살이 추출물 200mpk 투여군에서 다른 투여군들에 비해 높은 phosphorylation 정도를 보여줌. Glut4와 Sirt1의 발현량 증가 역시 겨우살이 추출물 200mpk 투여군에서 가장 높음.
- Muscle atrophy와 관련된 atrogen-1과 murf1의 발현 억제 효과는 ursolic acid 투여군에서 가장 높으며, 겨우살이 500mpk 추출물 투여군이 200mpk 추출물 투여군보다 muscle atrophy 억제 효과가 높았음.
- 농도별 겨우살이 추출물 투여군 사이의 관계가 약간 불명확함. 200 mpk와 500 mpk에서 각각 200 mpk는 hypertrophy 증가 효과를 보였으며, 500 mpk는 atrophy 감소 효과를 보임.

(아) In-vivo 결과 : 마우스 비활동성 muscle atrophy 모델 모델에서의 겨우살이 추출물의 효과 확인

① 비활동성 muscle atrophy의 기본 배경

- ㉠ 근육 소실(muscle atrophy)가 일어나는 원인: 노화, 암, 활동 억제, 질병 등이 있음. 그 중 활동 억제에 의한 muscle atrophy와 그 상황에서의 회복, 혹은 예방에 대한 연구가 많이 이루어짐 [6, 7, 9].
- ㉡ 마우스 모델에서 sciatic nerve를 손상시켜 다리를 움직이지 못하게 하여 비활동성 상태를 만들고 실험을 진행함.
- ㉢ sciatic nerve는 뒷다리 뒤쪽에 위치하는 신경으로 이 신경이 손상을 입을 경우 손상 입은 다리를 제대로 사용하지 못하게 됨. 이 신경을 손상시키는 것을 denervation이라 함. 지금까지 denervation 경우 근육위축(muscle atrophy)현상이 일어나며 현재 이 방법을 근육기능 연구에 실험모델로 많이 사용하고 있음.
- ㉣ 사람이 깁스를 해서 신체 특정 부위를 움직이지 못하게 되었을 때 그 부분의 근육이 손실되는 것과 같은 현상. 근육을 움직이지 못해 해당 부위에서 mitochondrial activity, 세포 내 대사 활성 정도가 떨어지게 됨.
- ㉤ 본 연구의 모델로 삼은 논문들에서는 denervation 후 1주일동안 주사 혹은 경구투여의 방법으로 실험물질을 투여 하여 변화를 관찰하거나, denervation 전에 2주일동안 미리 투여한 후 denervation 후 1주일동안 추가로 투여하여 변화를 관찰하는 실험을 통해 결과를 확인함. 전자의 경우 denervation 후 atrophy로부터 회복하는 능력에 초점을 맞추었으며, 후자의 경우 denervation에 대한 prevention의 효과가 있는지에 초점을 맞추었음.
- ㉥ muscle atrophy와 관련된 atrogen-1, murf1이 주요 biomarker이며, hypertrophy 관련 biomarker들을 추가적으로 확인하였음.

② 비활동성 muscle atrophy 모델의 실험 조건 및 결과

- ㉠ 5주령의 ICR male 마우스를 사용하여 실험
- ㉡ Avertin을 마취제로 사용, IP로 주사하여 마취시킨 후 뒷다리의 외피와 내피를 수술용 가위로 찢고 근육 부분을 약 1cm 정도 절단함.
- ㉢ 그 사이로 sciatic nerve를 찾아 수술용 가위를 이용하여 절단한 후, 수술용 바늘과 실로 찢었던 외피와 내피를 봉합 해 줌. (Fig 15 참고)
- ㉣ denervation 후 하루를 경과를 본 후, 1주일간 겨우살이 추출물을 경구투여함. 농도는 200mpk, 500mpk의 두 그룹, negative control로 PBS 투여 그룹을, positive control로 기존의 denervation에서의 회복에 초점을 맞춘 실험을 통해 결과를 발표한 ursolic acid를 사용. 추가로 denervation이 제대로 이루어졌는가를 확인하기 위해 외과적 수술을 진행하지 않은 상태의 마우스에 PBS만을 투여한 그룹을 함께 조사함.

- ㉞ 1주일간 경구투여 한 후, grip strength test를 진행하고, sacrifice 후 muscle sample을 추출하여 weight의 변화량을 측정.

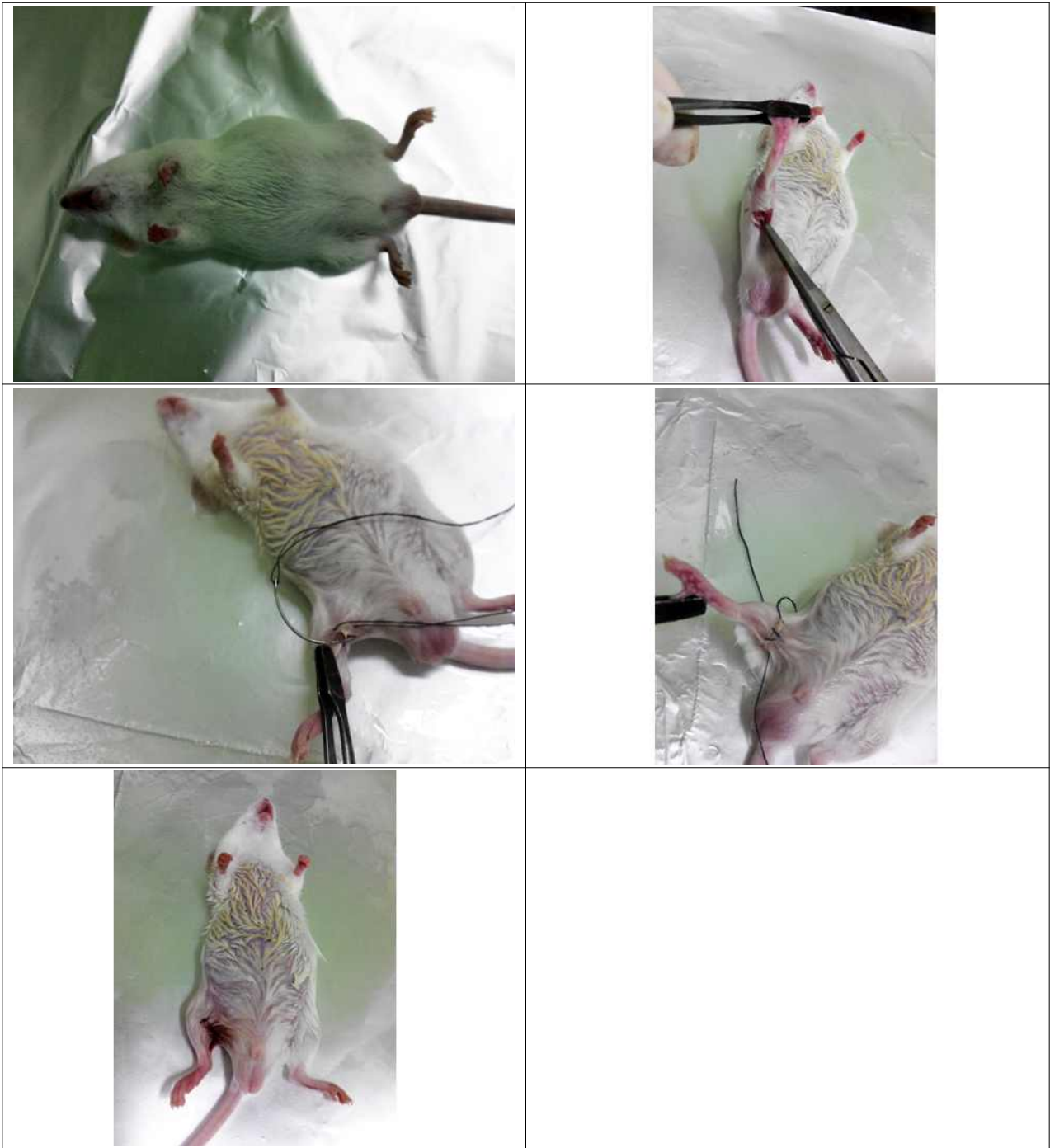


그림 28. Denervation 과정

- ㉞ muscle sample 30mg을 이용, RNA extraction kit(INTRON)를 사용하여 total RNA를 추출한 후, cDNA를 합성하여 atrogen-1, murf1, PGC1- α , Sirt1의 primer와 함께 realtime PCR 수행

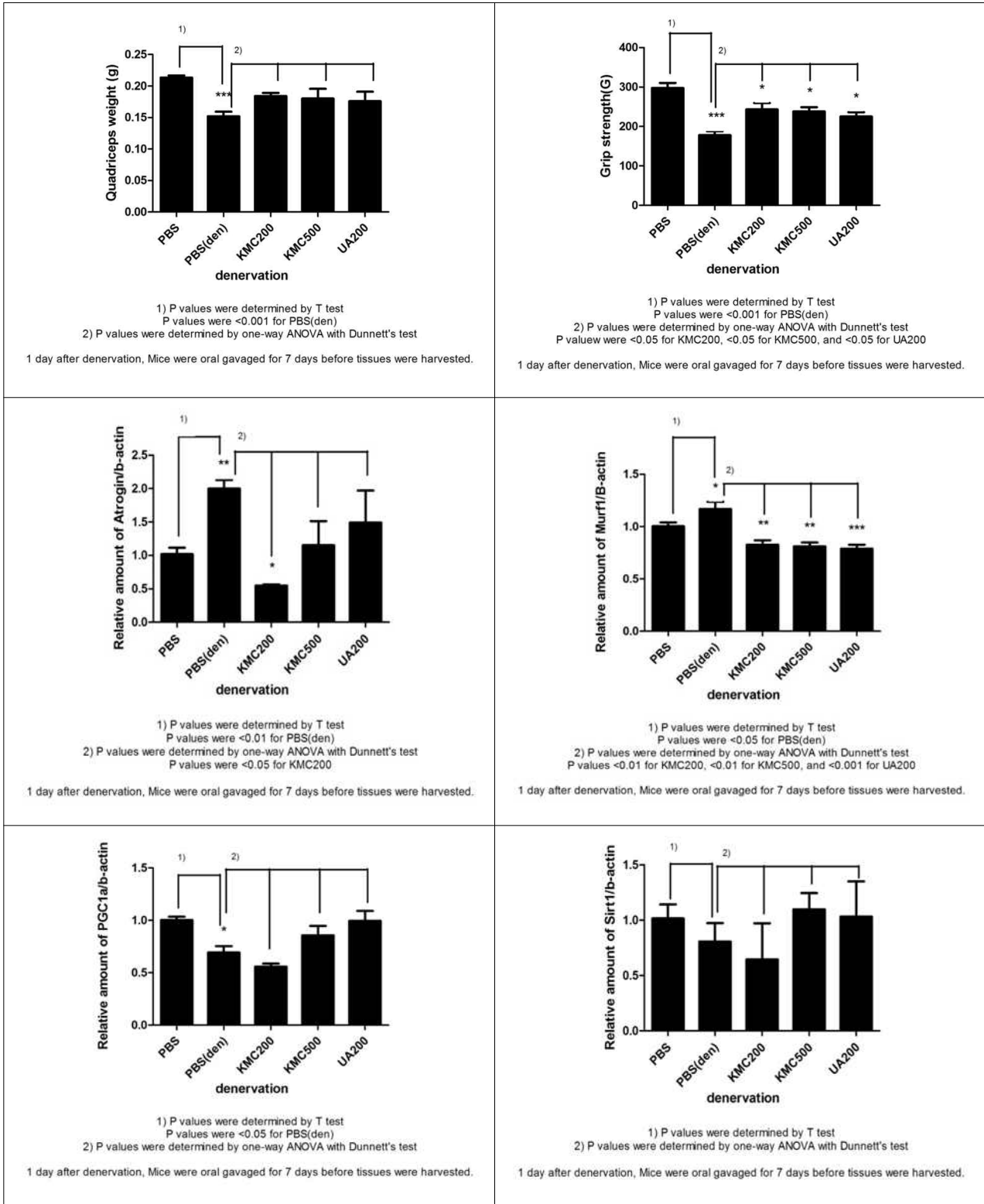


그림 29. in-vivo denervation 실험에서 겨우살이 추출물 급여가 근육기능 관련 biomarker에 미치는 영향

㉔ muscle weight 측정 결과, denervation을 시키지 않은 실험군에 비해 denervation을 시킨 실험군에서 무게량의 감소가 관찰되었음. 또한 denervation 후 PBS 투여 실험군에 비해 겨우살이 추출물과 ursolic acid 투여 실험군에서 근육 무게량

의 감소 정도가 줄었음을 확인.

- ㉠ grip strength 측정 실험의 결과, 근육 무게량 측정 실험과 유사한 경향성의 결과를 확인. denervation 시킨 경우 일반 denervation을 시키지 않은 대조군에 비해 grip strength 값이 떨어지는 결과를 확인, 겨우살이 추출물과 ursolic acid를 투여한 실험군에서 denervation 후 PBS를 투여한 실험군에 비해 grip strength 값이 높은 것을 확인.
- ㉡ muscle sample에서 추출한 RNA를 이용한 realtime PCR 실험의 결과, atrophy 관련 유전자인 atrogen-1과 murf1의 발현량이 일반 PBS 대조군에 비해 denervation 후 PBS 투여 실험군에서 증가함을 확인. 반면 denervation 후 겨우살이 추출물과 ursolic acid를 투여한 실험군에서 Atrogen-1과 murf1의 발현량이 감소하는 것을 확인함. realtime PCR과 muscle weight 측정, grip strength 실험의 결과를 종합할 때 겨우살이 추출물과 ursolic acid가 비활동성 muscle atrophy 상태에서 근육량 감소를 억제하는 효과가 있음을 확인하였음.
- ㉢ muscle hypertrophy 관련 유전자인 PGC1- α 와 Sirt1에서 겨우살이 500mpk 투여 실험군과 ursolic acid 200mpk 투여 실험군에서 유전자 발현량의 증가를 확인 할 수 있었음.

(2) 겨우살이 추출물의 사업화를 위한 연구

(가) 겨우살이 추출물의 지표 물질 설정

① 지표 물질 설정의 필요성

- ㉔ 겨우살이 추출물을 이용하여 협동기관인 삼양 제넥스와 함께 제품화, 사업화를 하는 과정에서 원료의 품질 표준화의 지표로 삼기 위함.
- ㉕ 겨우살이 추출물이 in vitro와 in vivo에서 효과를 나타내는데, 그 효과를 내는 성분이 어떤 성분인지를 밝히는데 도움이 됨.

② 지표 물질의 설정

경북대학교 약학대학 천연물약품학 송경식 교수 연구팀에게 의뢰함(그림 30 참조).

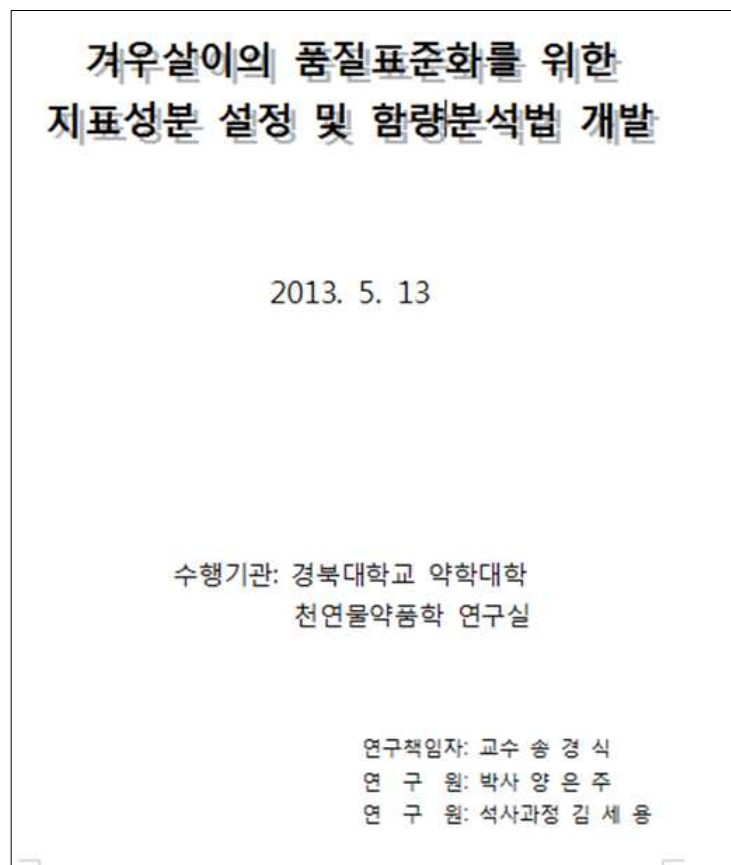


그림 30. 겨우살이 지표성분 설정 실험

(나) 지표성분의 설정 : 추출 및 정제

① 재료 및 시약

미슬토 추출분말 약 2 kg을 사용하였다. TLC는 precoated silica gel plate (Kieselgel 60F₂₅₄, Merck, NJ, USA)를, silica gel column chromatography는 Kieselgel 60 (Art. 7734, 70-230 mesh, Merck, NJ, USA)을 사용하였다. 기타 시약은 Sigma

사(MO, USA)로부터 구입하였다.

② 추출

겨우살이 분말 1.9 kg을 100% methanol (MeOH) 로 수욕 상에서 4시간 2회 환류 추출하여 여과한 후 감압 농축하여 MeOH extract 433.23 g을 얻었다. 지표성분의 설정을 위하여 MeOH 추출물을 HPLC로 분석한 결과 **그림 31a**와 같은 결과를 얻었으며, 이 중 가장 함량이 높을 것으로 예상되는 Rt 32분 대의 피크(화살표) 를 지표성분으로 설정하는 것이 가장 바람직할 것으로 판단되었다.

지표성분의 분리를 위하여 MeOH extract를 물에 분산시킨 후 methylene chloride (CH₂Cl₂) 0.5 L로 3회 분배 추출하여 CH₂Cl₂ 분획 3.66 g을 얻고, 남은 물층에 대하여 ethyl acetate (EtOAc) 0.5 L로 3회 분배 추출하여 EtOAc 분획 9.01 g을 얻었다. 이 분획들을 HPLC로 분석해 보았을 때 EtOAc 분획에서 Rt 32분대에 목적하는 화합물의 피크가 검출되어 이 분획을 대상으로 지표성분을 정제하고자 하였다 (**그림 31b**). 이 때 사용한 HPLC 조건은 **Table 1**과 같다.

Table 1. HPLC conditions for *Viscum album* var. *coloratum* fractions

| | | | | |
|------------------|--|----------|------------------------------|------------------|
| HPLC pump | Binary Waters 1525 (Waters 1525) | | | |
| Detector | Dual λ Absorbance Detector (Waters 2487) | | | |
| Wavelength | 254 nm | | | |
| Column | Thermo Hypersil-keystone (250 X 4.6 mm) | | | |
| Flow rate | 0.8 ml/min | | | |
| Injection volume | 10 μl | | | |
| | Time | Flow | Solvent A (%) | Solvent B (%) |
| | (min) | (mL/min) | (H ₂ O-1% HOAc) | (MeOH-1% HOAc) |
| Mobile phase | 0 | | 80 | 20 |
| | 5 | | 80 | 20 |
| | 45 | 0.8 | 0 | 100 |
| | 50 | | 0 | 100 |
| | 60 | | 80 | 20 |

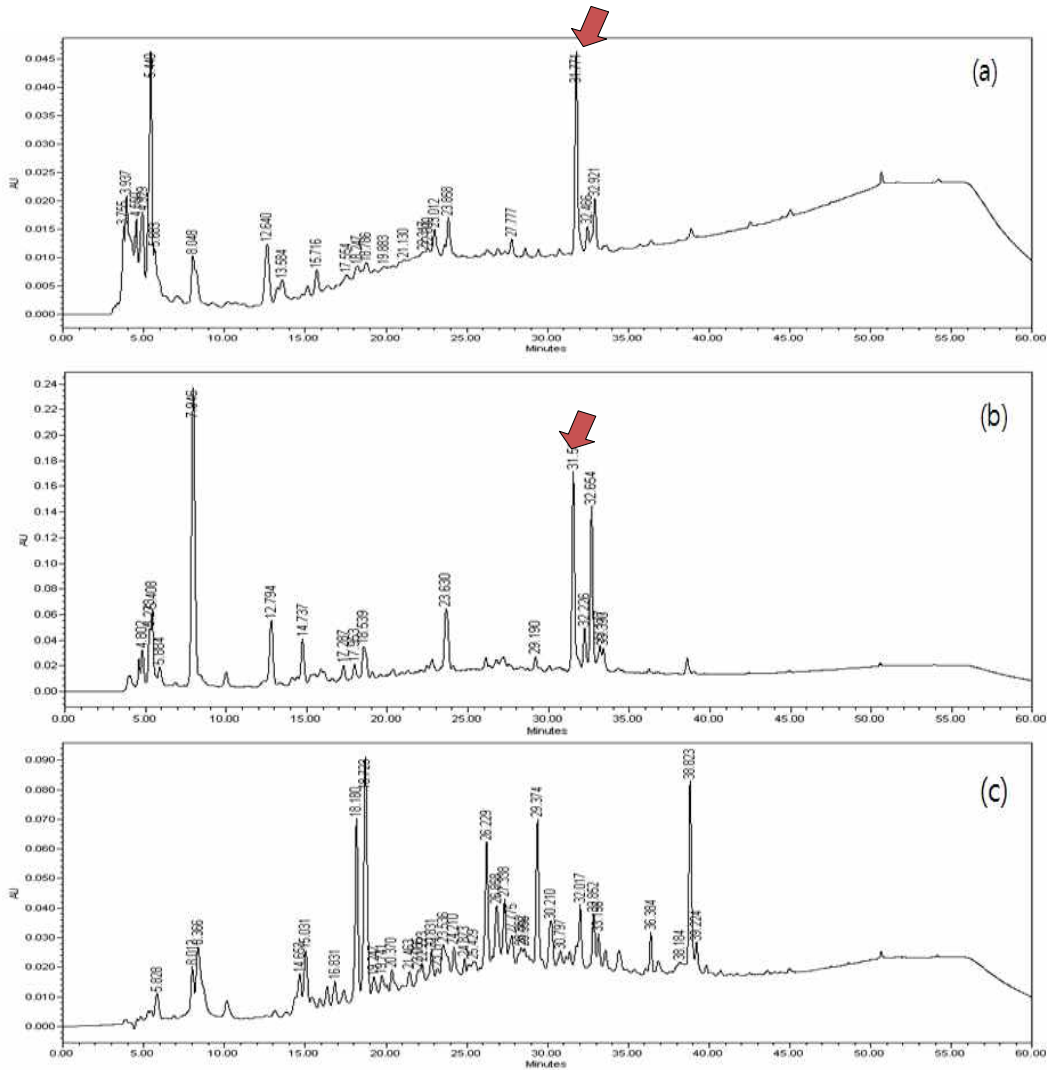


그림 31. HPLC chromatogram of *Viscum album* var. *coloratum*.

(a) HPLC chromatogram of MeOH extract

(b) HPLC chromatogram of EtOAc fraction.

(c) HPLC chromatogram of CH₂Cl₂ fraction.

③ 지표성분의 정제

EtOAc 분획 9.01 g을 silica gel column chromatography [10×60 cm, CH₂Cl₂-MeOH (100:1-5:1)]하여 fr. 1~8의 8개의 분획으로 나누었다. TLC 등의 확인을 통하여 지표 성분으로 설정한 화합물이 fr. 8에 있다는 것을 확인한 다음 fr. 8 2.8 g을 H₂O-MeOH 5:5의 혼합 용매로 RP column chromatography (10×60 cm)를 실시하여 fr. 8-1 ~ fr. 8-3의 3개 fraction으로 나누었다. 이 중 fr. 8-3 250 mg을 다시 silica gel column chromatography [CH₂Cl₂-MeOH = (10:1-5:1), 10×60 cm]하여 43 mg의 미황색 침전(Compound 1)을 얻었다. 이와 같은 분리 과정은 그림 32에 정리하였다.

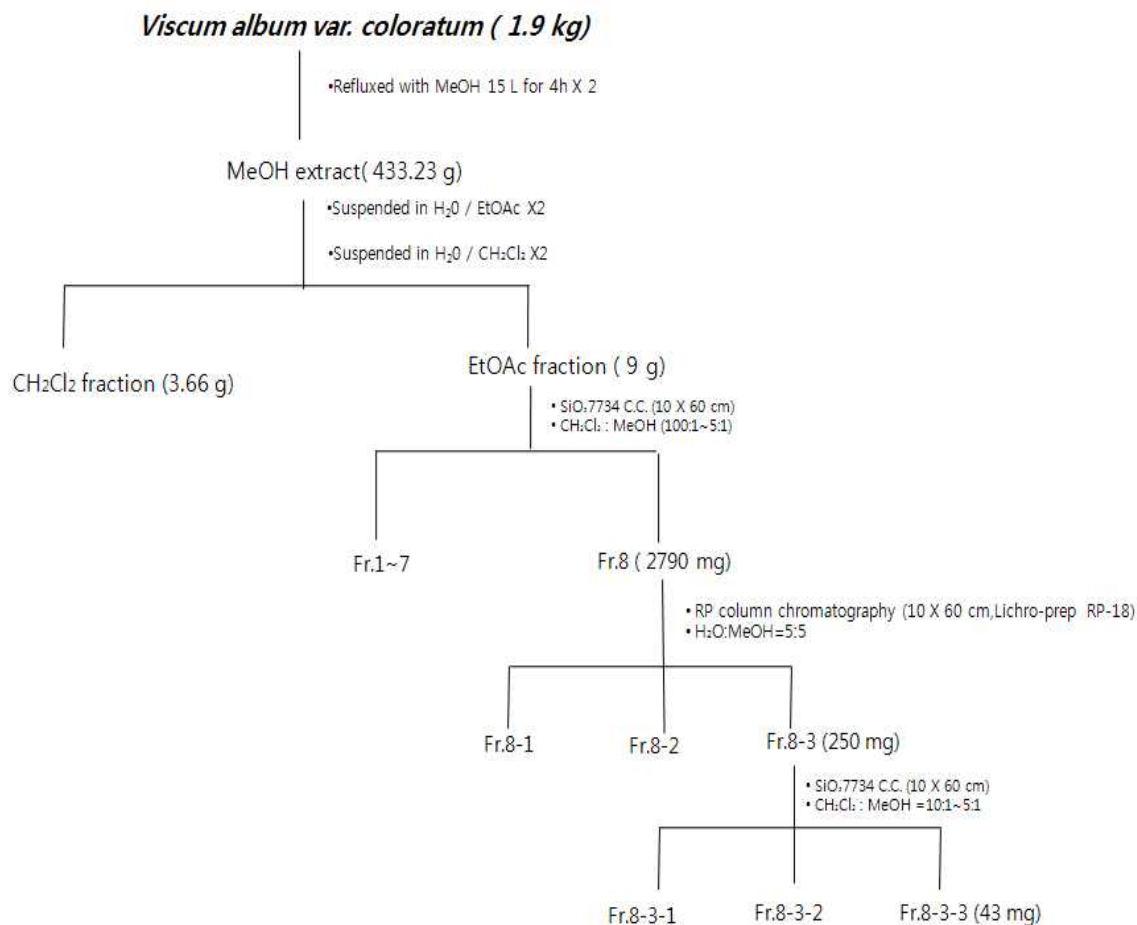


그림 32. Isolation procedures of Compound 1 from the MeOH extract of *V. album var. coloratum*.

(다) 지표성분의 설정 : 구조 동정

① 정색반응 및 MS 분석

Compound 1은 FeCl₃에 양성반응을 나타내어 구조 중 phenolic OH group을 함유하고 있는 것으로 판단되었다. FAB-MS 분석 결과, m/z 609에서 [M+1]⁺ peak가 관측되었으며, m/z 315의 peak로 미루어 pentose와 hexose가 각각 한 분자씩 결합되어 있는 배당체의 일종으로 생각되었다.

② NMR 분석

¹H- 및 ¹³C-NMR spectra는 Bruker Avance Digital 400 spectrometer (Karlsruhe, Germany)로 400과 100MHz에서 각각 측정하였다. Chemical shift는 TMS를 표준물질로 하여 δ (ppm)로 나타내었다.

¹H- 및 ¹³C-NMR의 결과와 FAB-MS에서의 결과로 미루어 compound 1은 C₂₈H₃₂O₁₅의 분자식을 가질 것으로 예측되었다. ¹H-NMR에서 δ 6.38 및 6.83 (각각 1H, d, $J=2.2$ Hz)의 signal로부터 *meta*-coupling proton의 존재가 확인되었으며, δ

7.63 (1H, d, $J=2.1$ Hz), 7.23(1H, d, $J=8.7$ Hz) 및 7.67 (1H, dd, $J=2.1, 8.7$ Hz)에서 전형적인 1,3,4-tri-substituted benzene ring의 resonance가 관측되었다.

이상의 결과와 δ 7.04(1H)에 나타난 singlet, δ 12.9(1H)에서 나타난 intramolecular hydrogen bonded hydroxyl proton 등으로 미루어 compound 1은 5위에 hydroxyl기가 치환된 flavone 계통의 화합물일 것으로 판단되었다. 그 이외에도 δ 3.88과 3.91 (각 3H, s)에서 두 개의 methoxyl signal이 관측되었으며, δ 5.31 (1H, d, $J=5.5$ Hz)와 5.44 (1H, s)에서 당의 anomeric proton이 관측되었다.

또한 ^{13}C -NMR에서는 모두 28개의 carbon signal이 관측되었으며 δ 181.9에서 α, β -unsaturated ketone 및 δ 163.3, 161.0, 165.1, 149.5, 149.0에서 oxygenated aromatic sp^2 탄소가 관측되었다. 또한 δ 97.8과 108.2에서는 당의 anomeric proton으로 생각되어지는 resonance가 관측되었다. 이상의 기기분석 data를 종합하여 볼 때 compound 1은 flavone의 골격을 가지며 7, 3', 4' 위 중 두 곳에 methoxyl 치환기를 가지고 나머지 한 곳에 pentose와 hexose가 glycoside결합을 하고 있는 화합물로 판단되었다.

이와 유사한 화합물들의 NMR data를 문헌에서 검색해 본 결과 compound 1은 homoflavoyadorinin B (3',7-dimethoxyluteolin-4'-O-[apiosyl (1 \rightarrow 2) glucoside])와 그 기기분석 data가 정확히 일치하였다 (Seo et al., 2004) [18].

이 화합물의 구조는 그림 33에, NMR spectra는 그림 34에, NMR data는 Table 2에 각각 나타내었다.

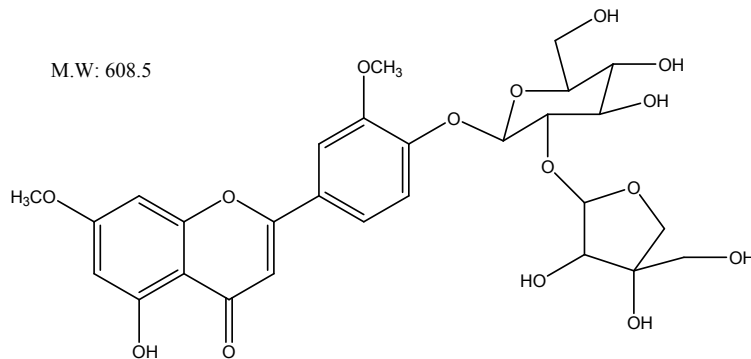


그림 33. Chemical structure of homoflavoyadorinin B

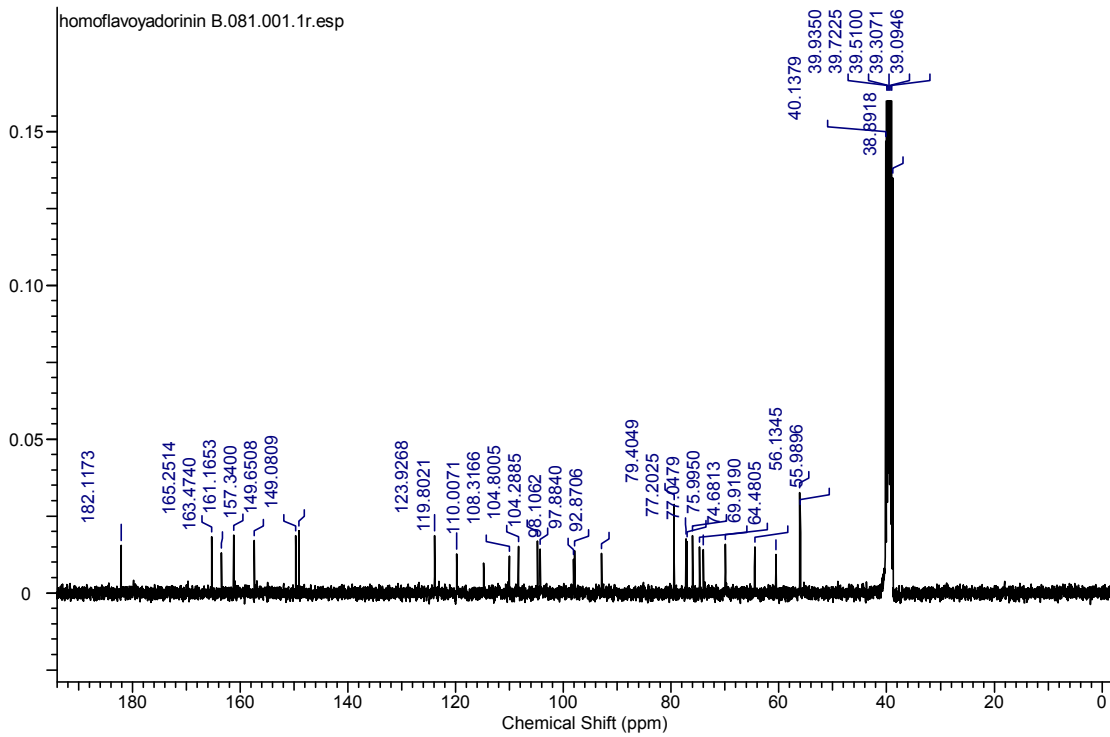
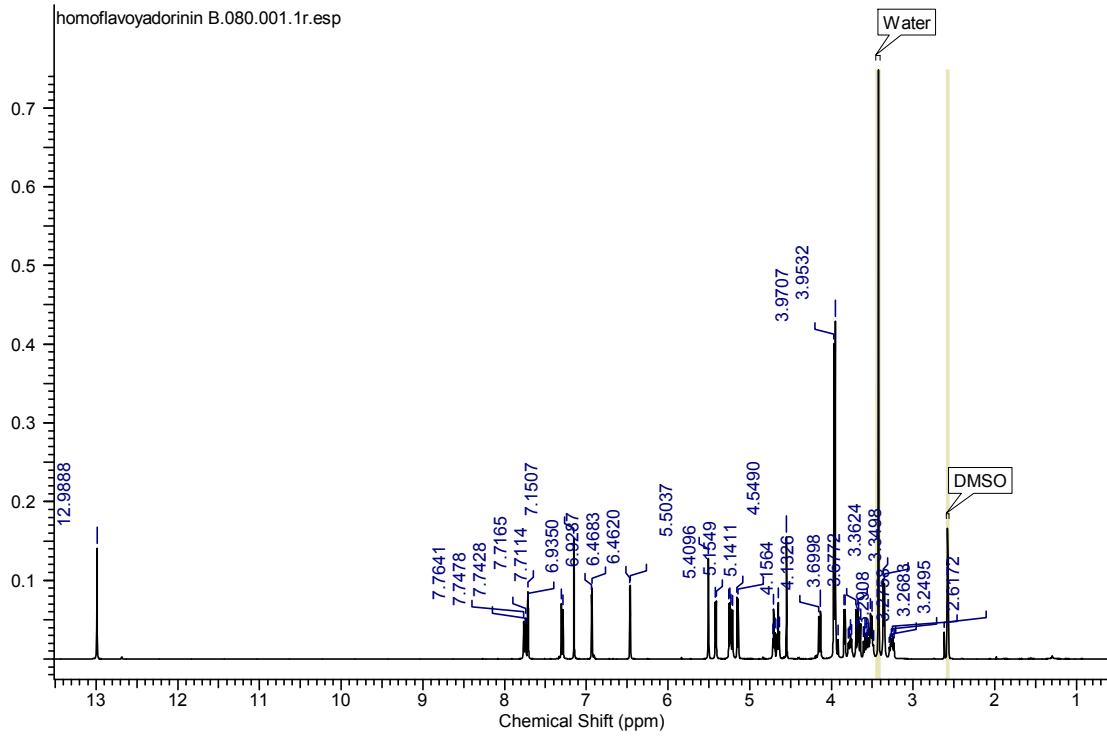


그림 34. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of compound 1 isolated from *V. album* var. *coloratum*

Table 2. NMR data of compound 1

| NO. | ¹ H | ¹³ C |
|---------------------|-----------------------------|-----------------|
| 2 | | 163.3 |
| 3 | 7.04(1H, s) | 104.2 |
| 4 | | 181.9 |
| 5 | | 161.0 |
| 6 | 6.38(1H, d, J=2.2 Hz) | 98.0 |
| 7 | | 165.1 |
| 8 | 6.83(1H, d, J=2.2 Hz) | 92.7 |
| 9 | | 157.2 |
| 10 | | 104.7 |
| 1' | | 123.8 |
| 2' | 7.63(1H, d, J=2.1 Hz) | 109.9 |
| 3' | | 149.5 |
| 4' | | 149.0 |
| 5' | 7.23(1H, d, J=8.7 Hz) | 114.7 |
| 6' | 7.67(1H, dd, J=2.1, 8.7 Hz) | 119.7 |
| 7-OCH ₃ | 3.88(3H, s) | 55.9 |
| 3'-OCH ₃ | 3.91(3H, s) | 56.0 |
| Glucose | | |
| 1 | 5.31(1H, d, J=5.5 Hz) | 97.8 |
| 2 | | 76.9 |
| 3 | | 74.6 |
| 4 | | 69.8 |
| 5 | | 77.6 |
| 6 | | 60.4 |
| Apiose | | |
| 1 | 5.44(1H, s) | 108.2 |
| 2 | | 75.9 |
| 3 | | 79.2 |
| 4 | | 73.8 |
| 5 | | 64.3 |

(라) 지표성분의 설정 : 지표성분의 분석법 개발

① 최적 분석조건 설정

각종 이동상과 고정상을 사용하여 최적 분석 조건을 검토한 결과는 다음과 같다.

즉 고정상은 Thermo Hypersil-keystone (250×4.6 mm)를 사용하였으며, 컬럼 온도는 실온, 유속은 0.8 mL/min, 10 μ l를 injection volume으로 설정하였다. 또한 이동상으로는 1% acetic acid가 포함된 H₂O (A)와 MeCN (B)를 사용하여 최초 95 (A) : 5 (B) v/v %로 시작하여 5분 후 65 (A) : 35 (B) v/v %로 gradient를 준 후, 18분까지 유지시킨 후, 20분에 다시 95 (A) : 5 (B) v/v%가 되도록 설정하였다.

Homoflavoyadorinin B의 최대 흡수 파장이 336 nm임을 감안하여 검출파장은 336 nm로 설정하였다. 이 때 homoflavoyadorinin B의 Rt는 약 14분 이었으며 **그림 35**에 나타낸 바와 같이 이 조건에서 다른 성분의 방해 없이 20분 이내에 겨우살이 내에 함유되어 있는 지표성분 homoflavoyadorinin B를 분석할 수 있었다.

이러한 최적 HPLC 조건은 아래 **Table 3**에 요약하였다.

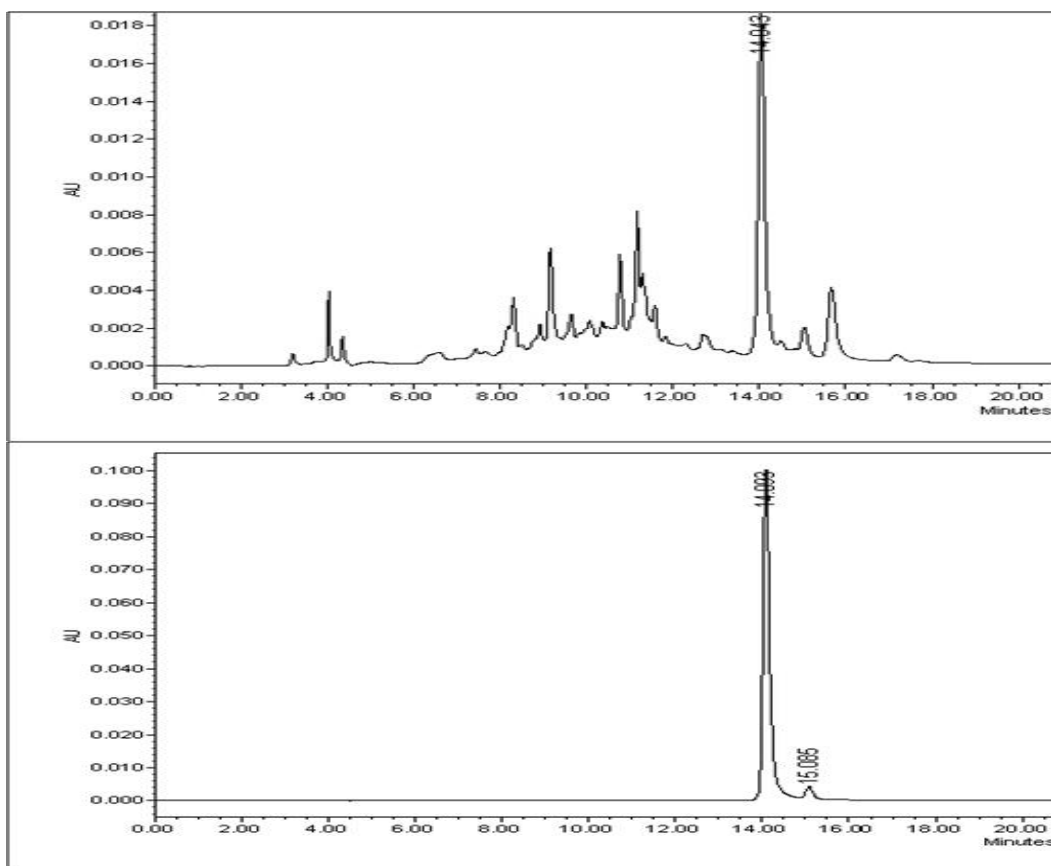


그림 35. HPLC profile of *V. album var. coloratum* (upper) and homoflavoyadorinin B (lower) under optimal condition established

Table 3. Optimal HPLC condition for homoflavoyadorinin B quantification in *V. album var. coloratum*

| | | | | |
|------------------|--|----------|------------------------------|------------------|
| HPLC pump | Binary Waters 1525 (Waters 1525) | | | |
| Detector | Dual λ Absorbance Detector (Waters 2487) | | | |
| Wavelength | 336 nm | | | |
| Column | Thermo Hypersil-keystone (250 X 4.6 mm) | | | |
| Flow rate | 0.8 ml/min | | | |
| Injection volume | 10 μ l | | | |
| | Time | Flow | Solvent A (%) | Solvent B (%) |
| | (min) | (mL/min) | (H ₂ O-1% HOAc) | (MeCN-1% HOAc) |
| Mobile phase | 0 | 0.8 | 95 | 5 |
| | 5 | | 65 | 35 |
| | 18 | | 65 | 35 |
| | 20 | | 95 | 5 |

② 겨우살이 추출물 중의 homoflavoyadorinin B의 확인

- LC-UV 분석

겨우살이 추출물을 분석한 Rt 14.04분의 major peak는 표준품이 나타내는 Rt 14.09 분과 머무름 시간이 거의 동일하였으며, data를 제시하지 않았으나 co-injection에 의하여 그 Rt 값이 동일하다는 사실을 증명하였다. 아울러 PDA를 이용한 UV pattern 분석 결과 흡수극대 파장의 패턴이 거의 동일한 것으로 미루어 이 peak가 homoflavoyadorinin B임을 알 수 있었다 (그림 36).

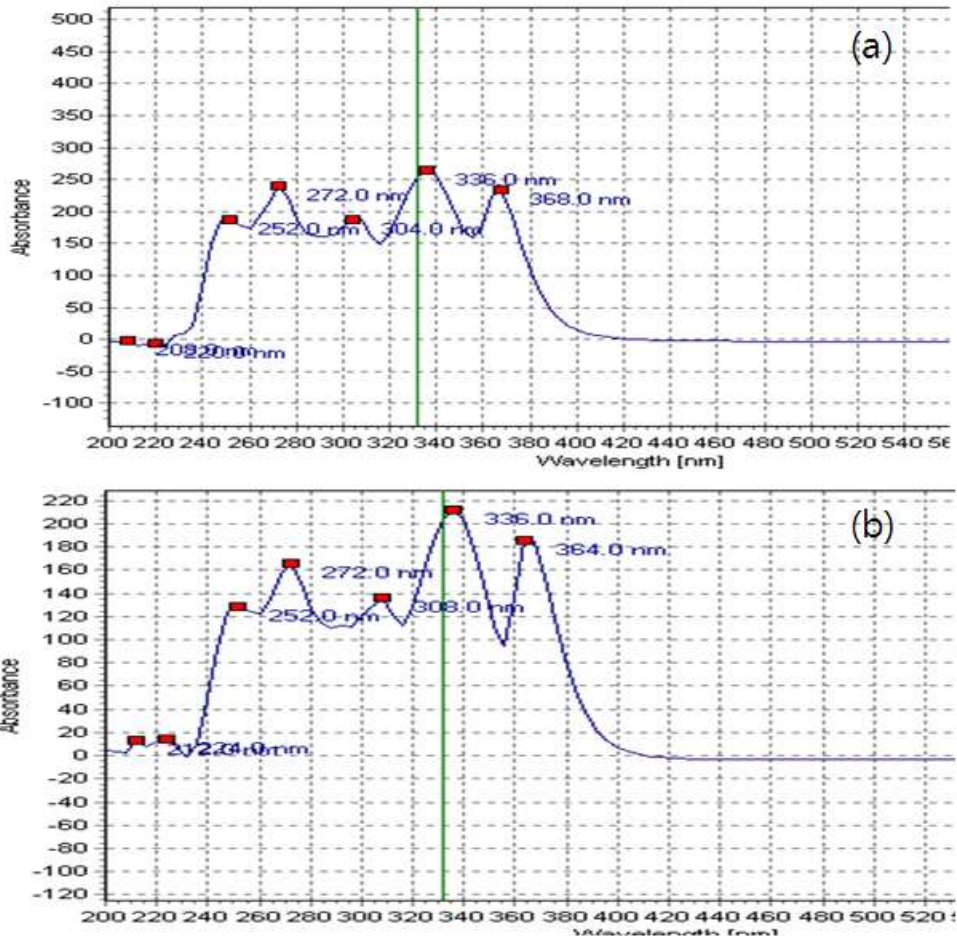


그림 36. Comparison of UV pattern at Rt 14.09 peak (upper) and homoflavoyadorinin B

- LC-MS 분석

보다 확실한 검증을 위해 LC-MS/MS를 이용해 homoflavoyadorinin B를 겨우살이 MeOH extract 와 함께 분석해보았다. 분석 조건은 **Table 4**와 같다.

Table 4. LC-MS/MS conditions for homoflavoyadorinin B

| | |
|--------------------|---|
| Instrument | LC-MS/MS (TSQ Vantage, Thermo) |
| Column | Luna-phenyl-hexyl (100 X 2 mm, 5 μm) |
| Mobile phase | MeCN with 1% formic acid/water with 1% formic acid (85:15, v/v) |
| Column temperature | 40°C |
| Ionization mode | ESI negative ion mode |
| Injection volume | 3 μL |
| Flow rate | 0.25 mL/min |
| Full scan | mass 200-650 |

Single Extracted Ion Monitoring 및 SRM (Selected Reaction Monitoring) LC-MS/MS 분석을 통해 겨우살이 추출물과 homoflavoyadorinin B를 분석한 결과, **그림 37 및 38**에 나타낸 것과 같이 겨우살이 추출물 중 homoflavoyadorinin B의 존재를 확인할 수 있었으며 예상되는 fragmentation pattern과 잘 일치하였다(**그림 39**).

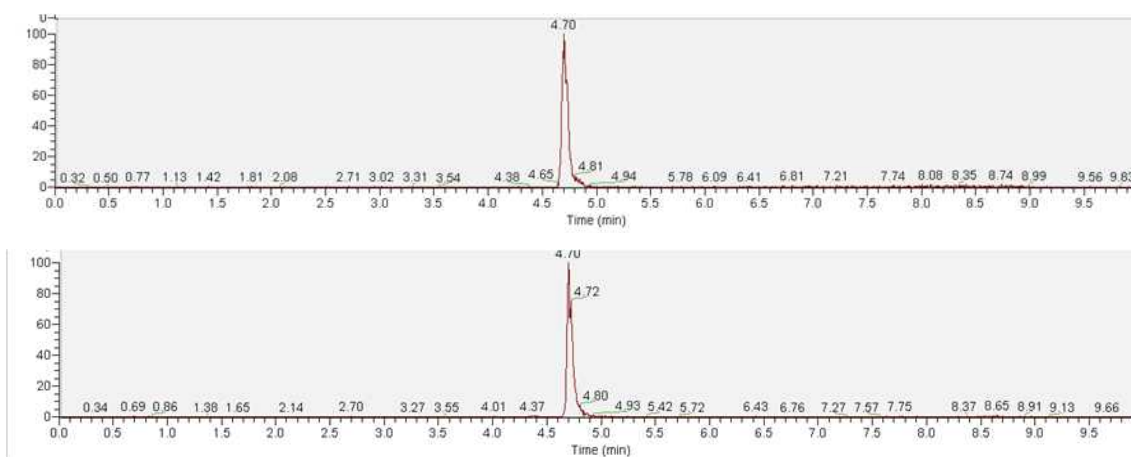


그림 37. SIM of homoflavoyadorin B (upper) and *V. album* var. *coloratum* MeOH extract (lower)

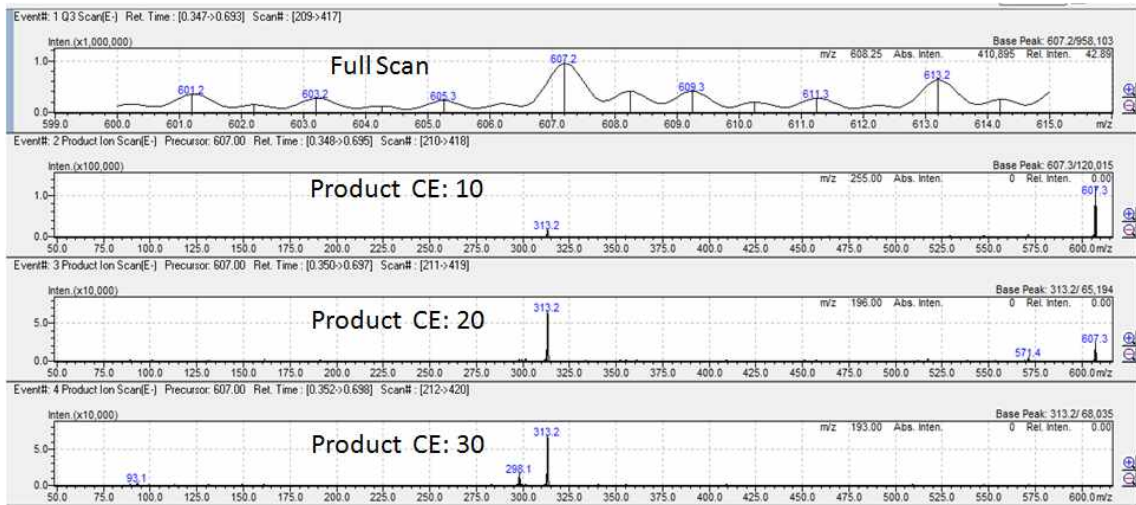
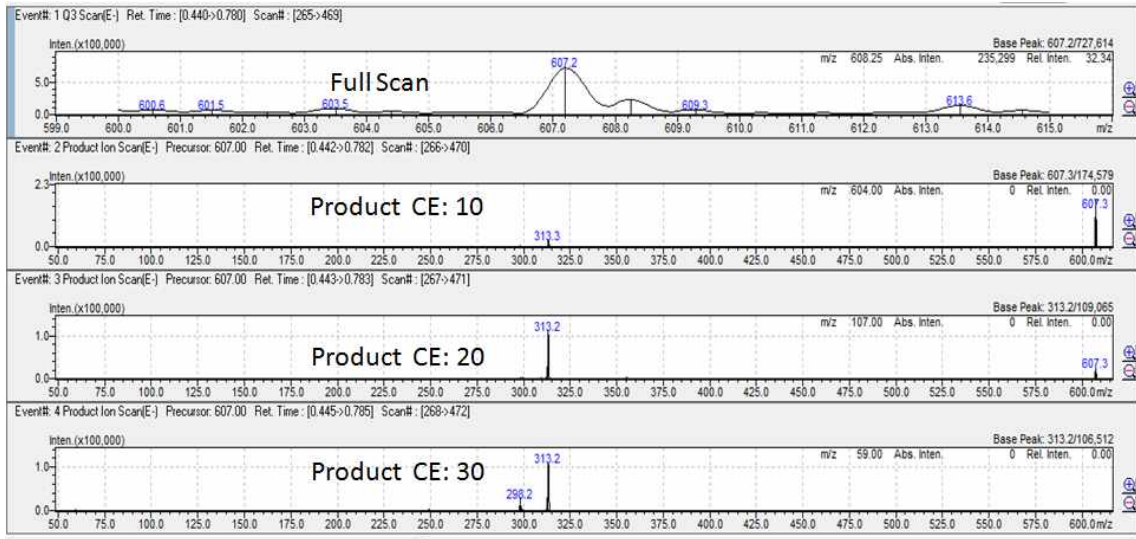


그림 38. SRM of homflavoyadorin B (upper) and *V. album* var. *coloratum* MeOH extract (lower)

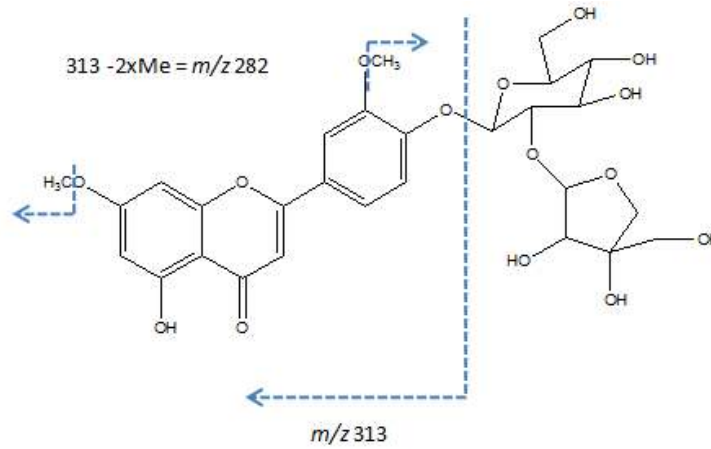


그림 39. Expected fragmentation pattern of homflavoyadorin B

(마) 지표성분의 설정 : Homoflavoyadorinin B의 검량선 작성

① 순도 검정

겨우살이 추출물로부터 가장 함량이 많고, 비교적 이 식물에 특이한 화합물로서 얻어진 homoflavoyadorinin B를 겨우살이의 품질평가를 위한 지표성분으로 설정하였다. Table 3에 나타난 조건으로 HPLC를 수행하여 순도를 검정한 결과 사용된 분석 조건에서 분리한 homoflavoyadorinin B는 96.0%의 순도를 나타내었다 (그림 40).

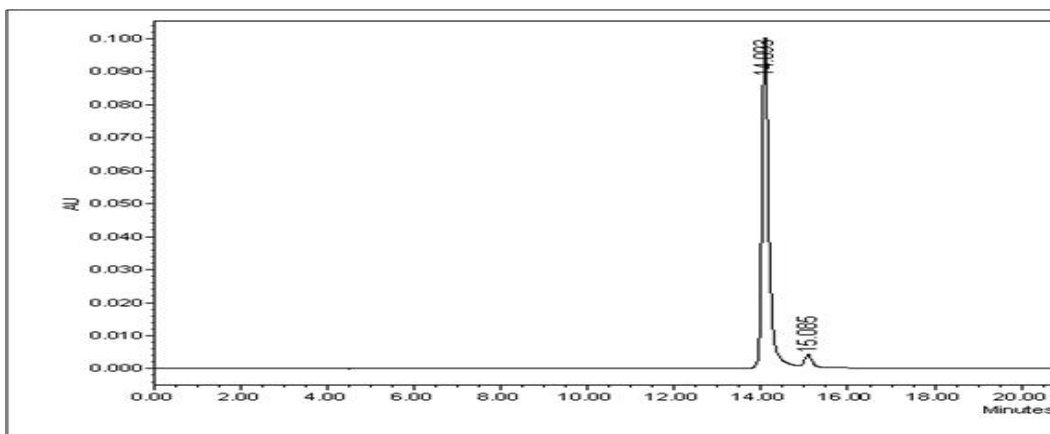


그림 40. HPLC chromatogram of Homoflavoyadorinin B isolated from *V. album* var. *coloratum*

② 검량선 작성 및 간이 validation

지표성분을 MeOH에 용해하여 1 mg/ml으로 조제하고 이를 stock solution으로 하였다. 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 5, 7.5, 10, 15, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 총 6개의 구간을 설정하였으며 각 표준 용액은 0.45 μm membrane filter로 여과하여

HPLC 분석하였으며, peak area와 농도간의 상관관계를 이용하여 검량선을 작성하였다 (그림 41). 그 결과 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9990의 직선성을 보였으며, LOD는 0.05 $\mu\text{g/ml}$, LOQ는 0.165 $\mu\text{g/ml}$ 의 수준으로 나타났다. 이 때 분석기기의 LOD (limit of detection) 는 signal 대 noise의 비가 3으로 설정하였으며, LOQ (limit of quantification) 는 LOD x 3.3일 때의 농도로 구하였다. 또한 peak area에 대한 RSD는 1.34%, retention time에 대한 RSD는 0.21%로 매우 양호한 재현성을 나타내었다 (Table 5 및 6).

Table 5. Range, linearity, purity, content, LOD and LOQ

| Linear range(μg) | LOD ($\mu\text{g/ml}$) | LOQ ($\mu\text{g/ml}$) | Correlation coefficient |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 5~30 | 0.05 | 0.165 | 0.999 |

Table 6. Reproducibility on peak area and retention time

| Compound | Injection amount(μg) | Peak area | | | Retention time (min) | | |
|----------------------|-----------------------------------|-----------|---------|---------|----------------------|------|---------|
| | | Average | SD | RSD (%) | Average | SD | RSD (%) |
| Homoflavoyadorinin B | 10 | 326725.7 | 4380.95 | 1.34 | 14.08 | 0.03 | 0.21 |

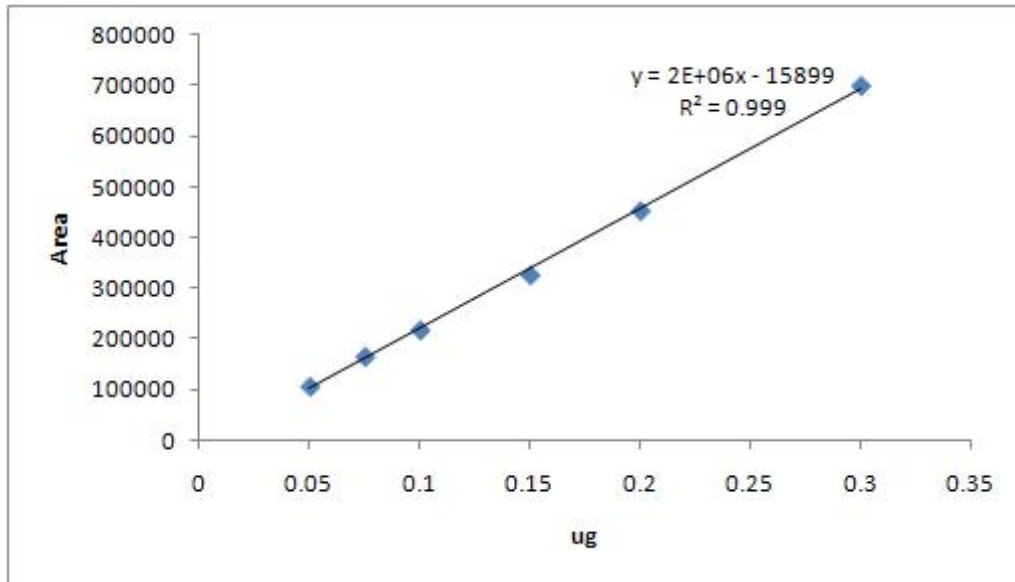


그림 41. Calibration curves of homoflavoyadorinin B

③ 겨우살이 중 homoflavoyadorinin B 함량 분석

겨우살이 중 지표 성분의 함량을 측정하기 위해 겨우살이 분말 100 mg을 초음파 세척기를 이용하여 EtOH 20 ml로 30분 간 3번 반복 추출하였다. 이렇게 얻은 추출액을 여과지로 여과 후, 여액을 합한 다음 회전농축기로 농축하여 33.2 mg의 EtOH extract 를 얻었다. 이를 10 ml EtOH에 녹인 후 이 중 1 ml를 취하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 다음 HPLC 로 분석하였으며 HPLC의 주입량은 10 µl 이었다.

순도를 확인한 결과 96.5 ± 0.35 %를 나타냈으며 제공된 겨우살이 분말 중 지표성분으로 설정한 homoflavoyadorinin B의 함량을 구한 결과 건조 분말 g 당 836.6 ± 17.6 µg/g으로 나타났다.

(바) 지표성분의 설정 : 요약 및 결론

비교적 겨우살이에 특이하고 major 화합물로 존재하는 물질을 설정하여 각종 크로마토그래피를 이용하여 분리한 다음 NMR 등을 이용하여 구조를 동정한 결과 homoflavoyadorinin B를 지표성분으로 설정할 수 있었다. 겨우살이 중의 homoflavoyadorinin B를 정량하기 위한 최적 HPLC 분석 조건을 검토한 결과, 고정상은 Thermo Hypersil-keystone (250×4.6 mm), 유속은 0.8 mL/min, 이동상으로는 1% acetic acid가 포함된 H₂O (A)와 MeCN (B)를 사용하여 최초 95 (A) : 5 (B) v/v %로 시작하여 5분 후 65 (A) : 35 (B) v/v %로 gradient를 준 후, 18분까지 유지시킨 후, 20분에 다시 95 (A) : 5 (B) v/v%로 용출하는 조건을 확립하였으며, 이 때 검출기로서는 UV 336 nm를 이용하였다. 이 조건에서 다른 성분의 방해 없이 20분 이내에 겨우살이 내에 함유되어 있는 지표성분 homoflavoyadorinin B를 분석할 수 있었다. 이 분석 조건에서 homoflavoyadorinin의 Rt는 약 14분 이었으며 분리한 지표성분의 순도는

96%이었다.

겨우살이 추출물 중의 homoflavoyadorinin B의 존재를 확인하기 위하여 표준품과의 co-injection, LC-UV, LC-MS/MS를 비교분석한 결과, Rt 14분경에 나타나는 peak가 homoflavoyadorinin B인 것을 확인할 수 있었다.

분리한 지표성분 homoyadorinin B를 이용하여 검량선을 작성한 결과 검량선의 상관 계수(R2)는 0.9990의 직선성을 보였으며, LOD는 0.05 $\mu\text{g/ml}$, LOQ는 0.165 $\mu\text{g/ml}$ 의 수준으로 나타났다.

이상 확립된 분석방법을 이용하여 겨우살이 중의 homoflavoyadorinin B의 함량을 분석한 결과 836.6 \pm 17.6 $\mu\text{g/g}$ 이었으므로 겨우살이 분말제품의 품질 평가를 위한 기준함량으로서 이의 약 $\pm 20\%$ 범위인 670 ~ 1000 μg 을 설정하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

(사) 지표성분의 설정 : 참고 문헌

Seo, J. H., Choi, Y.H., Kim, K.S. (2004) Active Principles of the Methanol Extract of Korean Mistletoe Responsible for the Inhibitory Effect on the Proliferation of Human Tumor Cell Lines. Kor. J. Pharmacogn. 35(2): 134~138

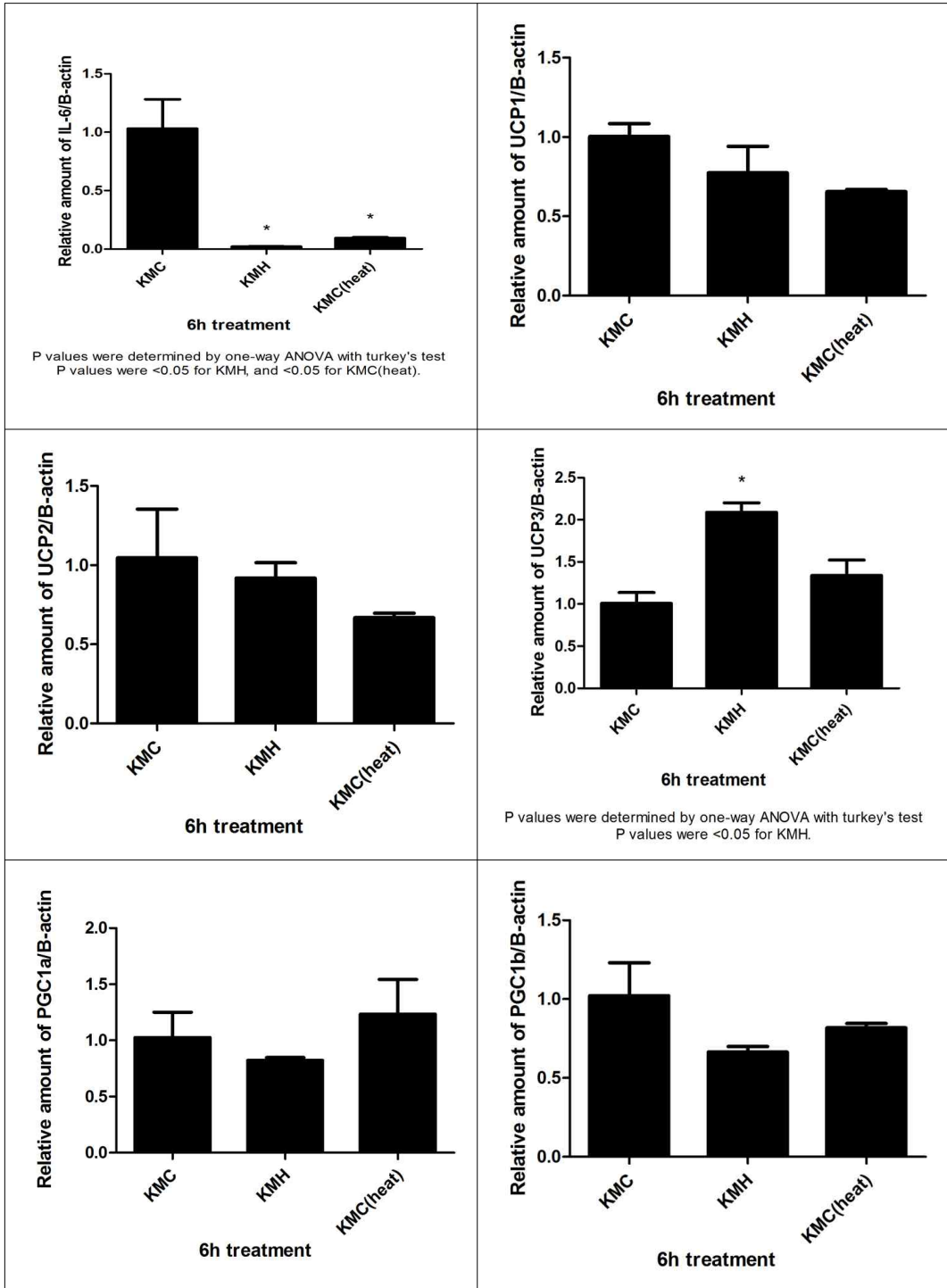
(3) 겨우살이 추출물 타입에 따른 활성 변화 측정

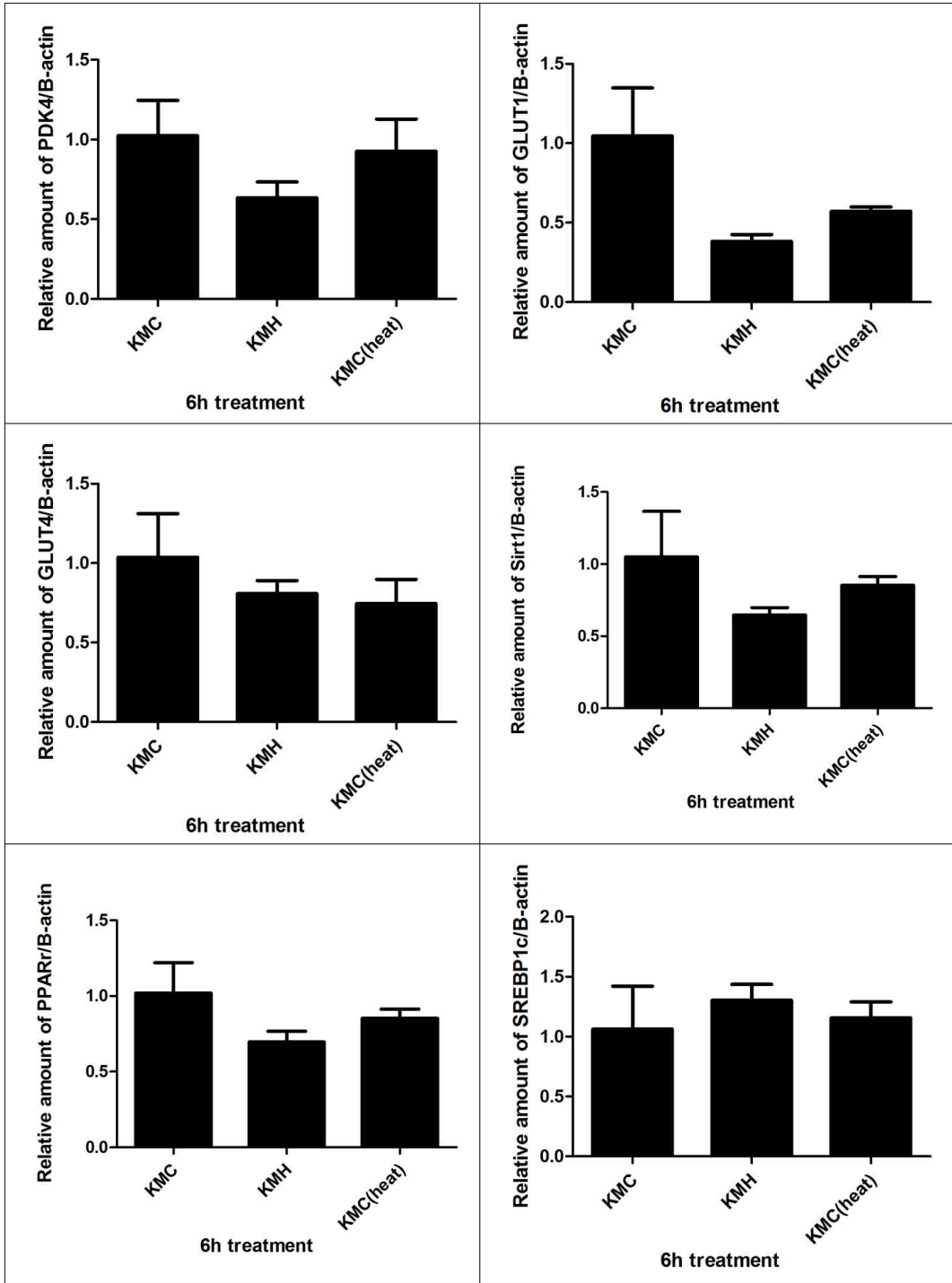
(가) 추출물 타입의 종류, 추출물 타입별 활성 변화 측정의 필요성

① 추출물 타입의 종류

- ㉠ 겨우살이 추출물은 기본적으로 물을 이용하여 추출함
- ㉡ 추출 방법에 따라 냉수 추출과 열수 추출로 구분 할 수 있음. 본 과제에서 기본적인 실험은 모두 냉수 추출물을 이용하여 진행 하였음.
- ㉢ 냉수 추출물과 열수 추출물의 가장 큰 차이는 열수를 이용하여 추출을 하는 과정에서 단백질 성분이 변성이 일어난다는 점임. 냉수 추출물은 제작하는 과정에서 열의 발생을 최소화하기 때문에 단백질 성분의 변성이 일어나지 않음.
- ㉣ 사업화, 제품화 과정에서 멸균, 가공 공정을 거치려면 열을 가하는 작업은 피할 수 없는 상황. 이 때 겨우살이 냉수 추출물 속의 성분 물질의 변성이 일어날 수 있음. 이에 대한 사전 연구와 확인이 요구됨.
- ㉤ 기존의 냉수 추출물과 열수 추출물 간의 활성 비교와 함께, 냉수 추출물에 열을 가해준 상태도 함께 실험에 추가하여야 함. 냉수 추출물에 열을 가하는 조건은 기존의 삼양사의 제품화 과정에 포함되는 열처리 과정을 그대로 사용함

② 추출물 타입 간의 활성 정도 차이 확인





| C2C12 | | | | | | | | | | | |
|--------------|----|----|----|--------------|----|----|----|----------------------|----|----|----|
| 1h | 2h | 3h | 4h | 1h | 2h | 3h | 4h | 1h | 2h | 3h | 4h |
| KMC(10ug/ml) | | | | KMH(10ug/ml) | | | | KMC(10ug/ml,heating) | | | |

P-AMPK α



그림 42. 겨우살이 추출 조건이 근기능 관련 biomarker에 미치는 영향

- 위의 그림 42에서 확인 할 수 있듯 겨우살이 냉수 추출물 KMC와 겨우살이 열수 추출물 KMH, 냉수 추출물에 열을 가한 추출물 간의 in vitro에서 유의성 있는 차이는 나타나지 않은 것을 확인 함.
- IL-6의 경우 겨우살이 추출물 속 단백질 성분인 lectin에 의해 활성이 증가하는 물질로, 열수 추출물과 냉수 추출물에 열을 가하는 경우 단백질 성분의 변성이 일어나기 때문에 lectin이 IL-6의 활성을 자극하지 못한 것으로 볼 수 있음. 열수 추출물과 냉수 추출물에 열을 가한 것이 실험의 목적에 맞게끔 준비 되었는가를 확인하는 biomarker로 사용하였음.
- 결과의 의미 : 제품화를 위한 원료 가공면에서 냉수추출의 경우 가공비용이 매우 높다. 이는 멸균과정에서 세밀한 여과과정과 동결건조 과정이 필수적이며 이에 따른 비용이 높기 때문이다. 따라서 열수추출의 경우 멸균과정을 쉽게 해결할 수 있고 분말처리가 용이하여 생산 단가를 절감시킬 수가 있어 매우 중요한 연구다. 2차년도에서 동물실험까지 냉수추출과 같은 결과를 얻을 경우 제품화를 위한 기반구축에 지대한 기여를 할 수 있음은 물론 제반여건을 다 확립할 수가 있어 본 연구의 상업화를 위한 가능성을 더욱 제고시켜주는 결과라 사료된다.

(나) 겨우살이 추출물의 사업화를 위한 특허 출원

- ① 겨우살이 추출물의 근 위축 억제 효과에 관한 특허 출원 준비 중
 - ㉠ 겨우살이 추출물의 in-vitro와 in-vivo에서의 muscle atrophy 억제 효과를 중심으로 하여 “근 위축 억제 효과를 갖는 겨우살이 추출물”로 특허 출원 준비.
 - ㉡ 트리테르페노이드 계열 물질 BA, UA 가 in-vitro에서 나타내는 muscle atrophy 억제, hypertrophy 촉진 효과를 중심으로 하여 in-vivo의 추가적인 실험 후 결과에 따라 트리테르페노이드 계열 물질의 근 위축 억제와 근육량 증가에 관련하여 특허 출원.

나. 2차년도 (2013~2014)

(1) 겨우살이의 활성 효과 확인

(가) In vivo 실험: 마우스 비활동성 muscle atrophy 모델에서의 장기간 겨우살이 추출물 함유 사료의 효과 확인

① 비활동성 muscle atrophy의 기본 배경

- ㉠ 근육 소실(muscle atrophy)가 일어나는 원인: 노화, 암, 활동 억제, 질병 등이 있음. 그 중 활동 억제에 의한 muscle atrophy와 그 상황에서의 회복, 혹은 예방에 대한 연구가 많이 이루어짐 [6, 7, 9].
- ㉡ 마우스 모델에서 sciatic nerve를 손상시켜 다리를 움직이지 못하게 하여 비활동성 상태를 만들고 실험을 진행함.
- ㉢ Sciatic nerve는 뒷다리 뒤쪽에 위치하는 신경으로 이 신경이 손상을 입을 경우 손상 입은 다리를 제대로 사용하지 못하게 됨. 이 신경을 손상시키는 것을 denervation이라 함. 지금까지 denervation 경우 근육위축(muscle atrophy)현상이 일어나며 현재 이 방법을 근육기능 연구에 실험모델로 많이 사용하고 있음.
- ㉣ 사람이 깁스를 해서 신체 특정 부위를 움직이지 못하게 되었을 때 그 부분의 근육이 손실되는 것과 같은 현상. 근육을 움직이지 못해 해당 부위에서 mitochondrial activity, 세포 내 대사 활성 정도가 떨어지게 됨.
- ㉤ 본 연구의 모델로 삼은 논문에서는 denervation 후 5주간동안 실험물질을 전체사료에 0.27%의 양을 맞춰 섞은후 먹이는 방법으로 변화를 관찰함. Denervation 후 atrophy의 억제 효과, atrophy로부터 회복하는 능력과 hypertrophy를 유발할 수 있는 능력에 초점을 맞추었음.
- ㉥ Muscle atrophy와 관련된 atrogen-1, murf1이 주요 biomarker이며, hypertrophy 관련 biomarker들을 추가적으로 확인하였음.

② 비활동성 muscle atrophy 모델의 실험 조건

- ㉠ 5주령의 ICR male 마우스를 사용하여 실험
- ㉡ Avertin을 마취제로 사용, IP로 주사하여 마취시킨 후 뒷다리의 외피와 내피를 수술용 가위로 찢고 근육 부분을 약 1cm 정도 절단함.
- ㉢ 그 사이로 sciatic nerve를 찾아 수술용 가위를 이용하여 절단한 후, 수술용 바늘과 실로 찢었던 외피와 내피를 봉합 해 줌.
- ㉣ Denervation 후 하루를 경과를 본 후, 5주일간 겨우살이 추출물 포함한 사료를 먹임. 겨우살이의 농도는 전체 사료에 0.3%와 1.5%의 두 그룹, negative control로 일반사료 그룹을, positive control로 기존의 denervation에서의 회복에 초점을 맞춘 실험을 통해 결과를 발표한 0.27% ursolic acid를 사용. 추가로 denervation이

제대로 이루어졌는가를 확인하기 위해 외과적 수술을 진행하지 않은 상태의 마우스에 일반사료 먹인 그룹을 함께 조사함.

③ 비활동성 muscle atrophy 모델의 외형적 변화 결과(그림 43)

- ㉠ muscle weight 측정 결과, denervation을 시키지 않은 실험군에 비해 denervation을 시킨 실험군에서 무게량의 감소가 관찰되었음. 또한 denervation 후 일반사료 실험군에 비해 겨우살이 추출물과 ursolic acid 투여 실험군에서 근육 무게량의 감소 정도가 줄었음을 확인.
- ㉡ Grip strength 측정 실험의 결과, 근육 무게량 측정 실험과 유사한 경향성의 결과를 확인. denervation 시킨 경우 일반 denervation을 시키지 않은 대조군에 비해 grip strength 값이 떨어지는 결과를 확인, 겨우살이 추출물과 ursolic acid를 먹인 실험군에서 denervation 후 일반사료 먹인 실험군에 비해 grip strength 값이 높은 것을 확인.
- ㉢ 트레이드밀 테스트의 결과, 겨우살이 추출물 0.3% 함유 사료를 먹인 실험군에서 운동수행 시간이 대조군에 비해 약 2배의 증가효과를 보임을 관찰하였음. 이는 외과적 수술을 진행하지 않은 ND-control 그룹에 비해서도 약 30% 이상 증가한 운동시간을 보이며 양성대조군인 UA 0.3% 함유 사료를 먹인 그룹에 비해서도 현저한 증가양상을 보임으로 겨우살이의 운동수행능력 증가 효과를 확인함.
- ㉣ 트레이드밀 테스트와 유사하게 현수실험(swimming pool test)에서는 겨우살이 추출물 1.5% 함유 사료를 먹인 그룹에서 가장 오랜 시간 수영시간을 기록함. 이는 대조군에 비해 약 70% 가량 증가한 수치이며 양성대조군 및 ND-control 그룹에 비해서도 증가한 결과로 겨우살이 추출물 자체의 운동수행능력 증가를 나타내는 결과임.

④ 비활동성 muscle atrophy 모델의 근육 내 유전자 변화(그림 44)

- ㉠ muscle sample 30mg을 이용, RNA extraction kit(INTRON)를 사용하여 total RNA를 추출한 후, cDNA를 합성하여 atrogen-1, murf1, PGC1- α , Sirt1, GLUT4, SREBP-1c, PDK4의 primer와 함께 realtime PCR 수행함.
- ㉡ Muscle sample에서 추출한 RNA를 이용한 realtime PCR 실험의 결과, atrophy 관련 유전자인 atrogen-1과 murf1의 발현량이 일반사료 대조군에 비해 denervation 후 일반사료 실험군에서 증가함을 확인. 반면 denervation 후 겨우살이 추출물과 ursolic acid를 먹인 실험군에서 Atrogen-1과 murf1의 발현량이 감소하는 것을 확인함. realtime PCR과 muscle weight 측정, grip strength 실험의 결과를 종합할 때 겨우살이 추출물과 ursolic acid가 비활동성 muscle atrophy 상태에서 근육량 감소를 억제하는 효과가 있음을 확인하였음.
- ㉢ Muscle hypertrophy 관련 유전자인 PGC1- α 와 Sirt1에서 겨우살이 사료 실험군과 ursolic acid 사료 실험군에서 유전자 발현량의 증가를 확인 할 수 있었음.

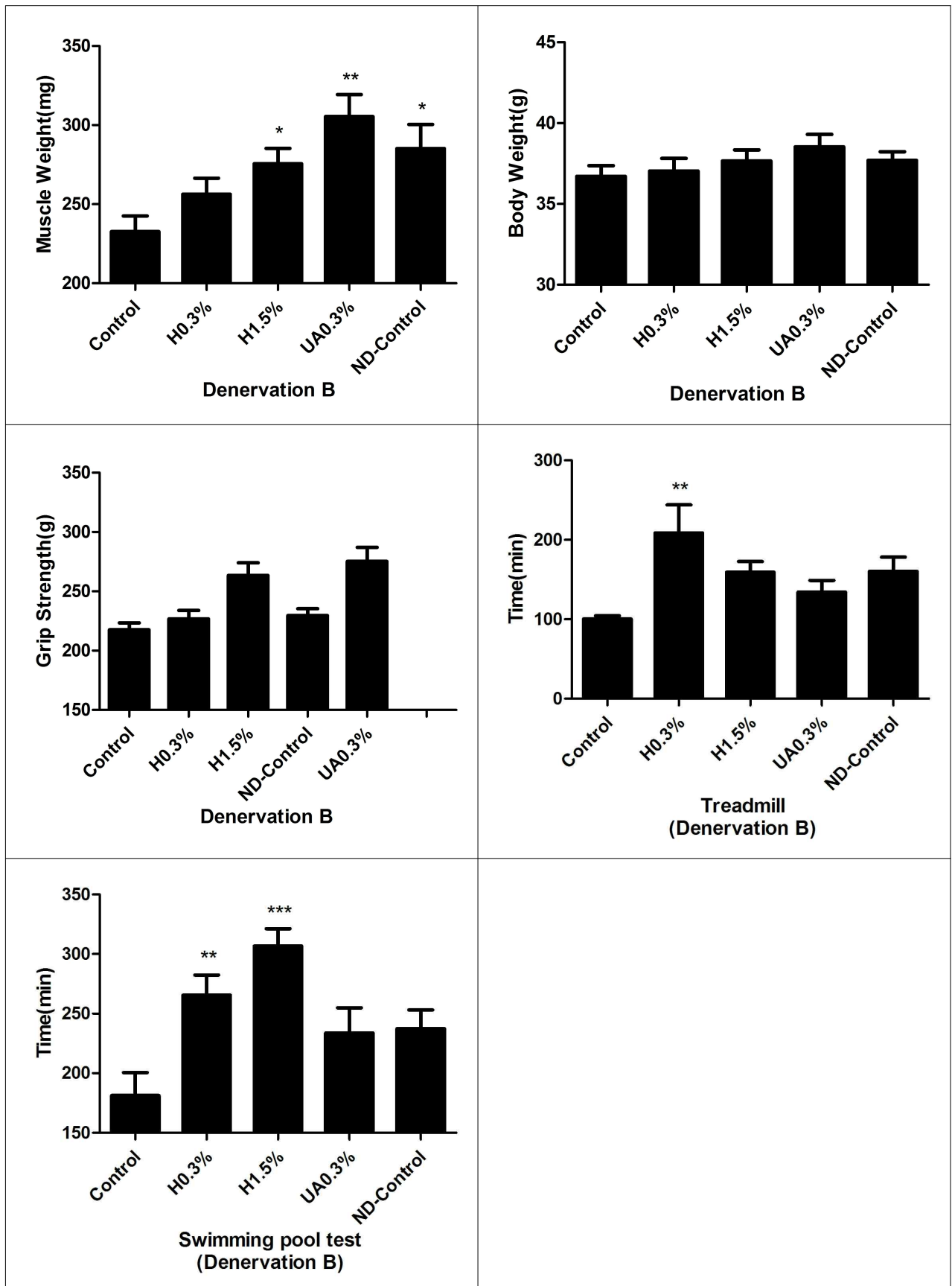


그림 43. 겨우살이 추출물 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 외형적 변화

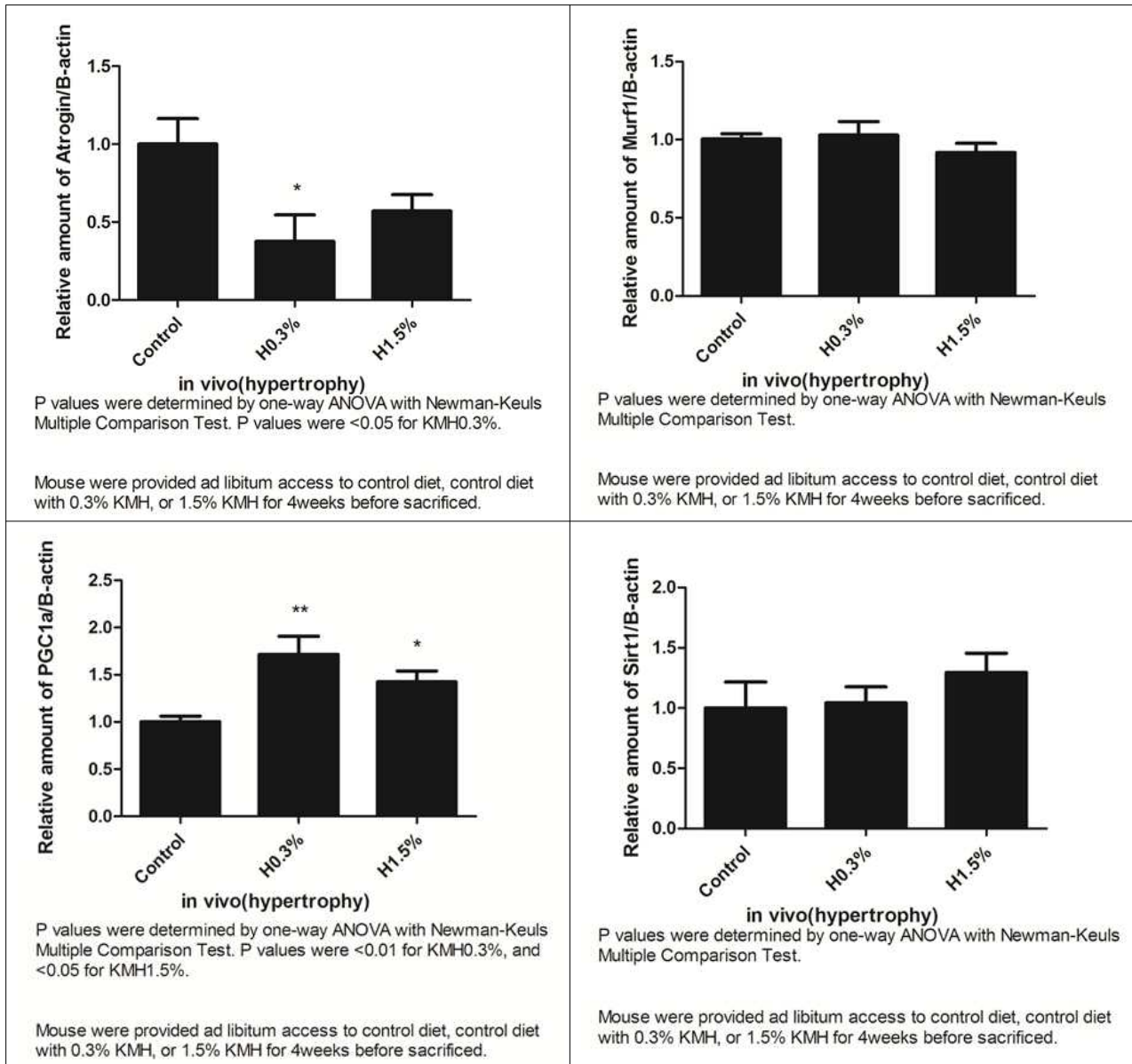


그림 44. 겨우살이 추출물 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 운동 관련 유전자 변화

⑤ 비활동성 muscle atrophy 모델의 근육 내 유전자 변화(그림 45)

- ㉠ muscle sample 30mg을 이용, RNA extraction kit(INTRON)를 사용하여 total RNA를 추출한 후, cDNA를 합성하여 SREBP-1c, PDK4, GLUT4의 primer와 함께 realtime PCR 수행함.
- ㉡ Muscle sample에서 추출한 RNA를 이용한 realtime PCR 실험의 결과, 지방산 산화 관련 유전자인 SREBP-1c 및 PDK4의 발현량이 대조군에 비해 현저하게 증가한 것을 확인하였음. 또한 GLUT4의 발현 역시 증가함으로 인해 겨우살이 추출물이 에너지 대사를 활발히 하여 운동력을 증가시킴을 확인함.

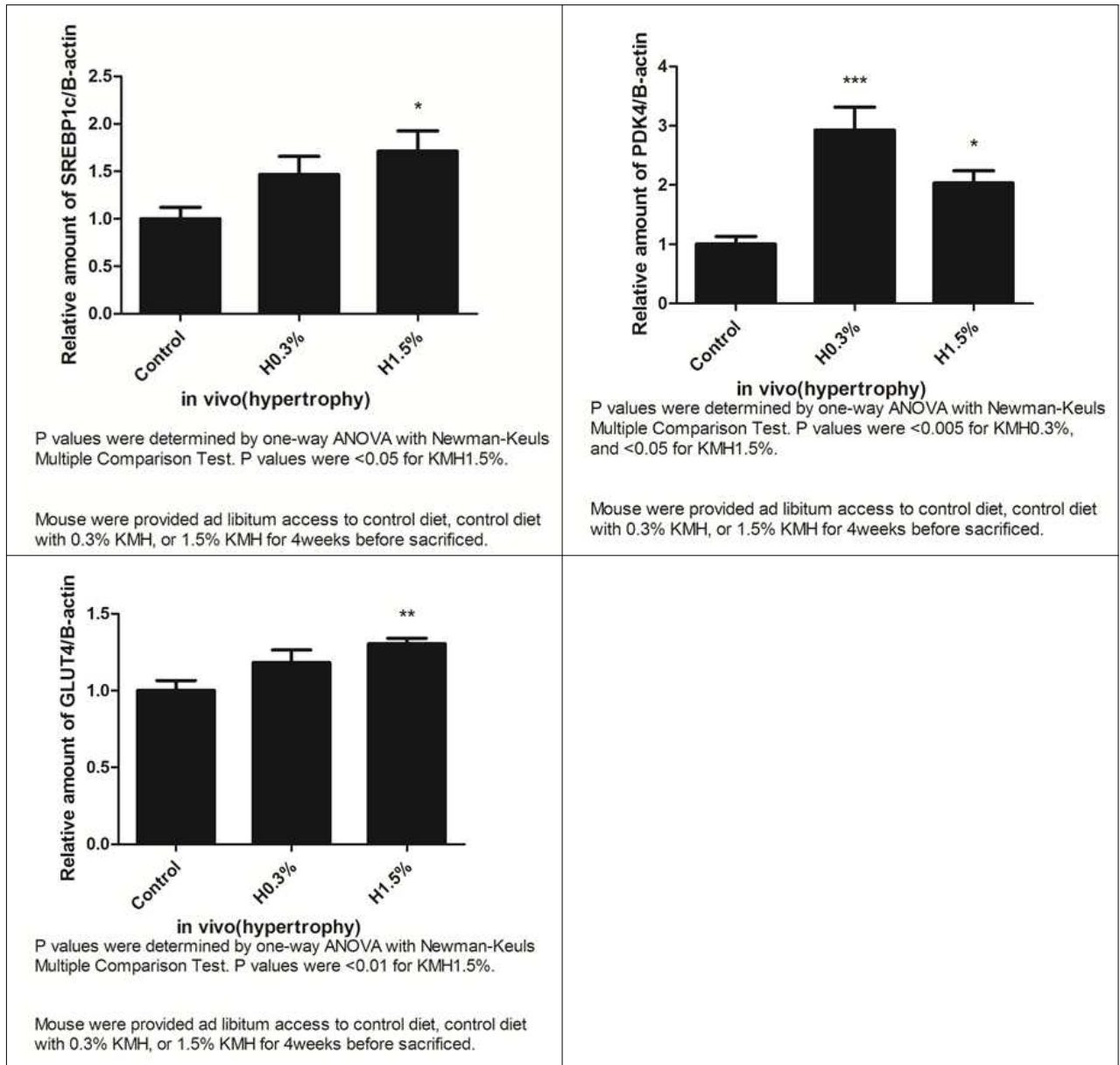
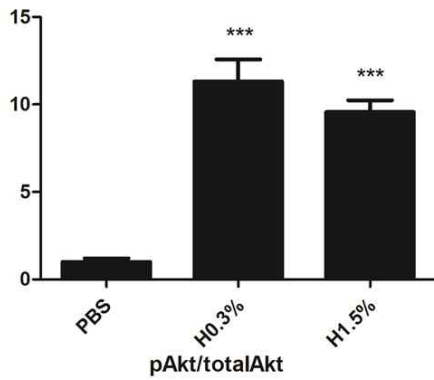


그림 45. 겨우살이 추출물 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 기타 유전자 변화

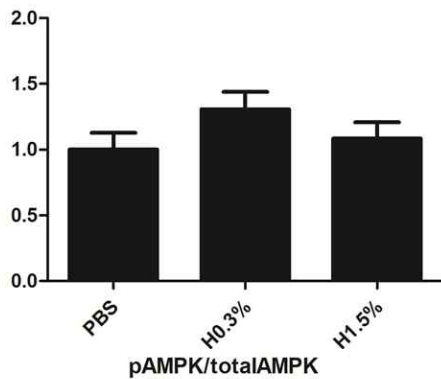
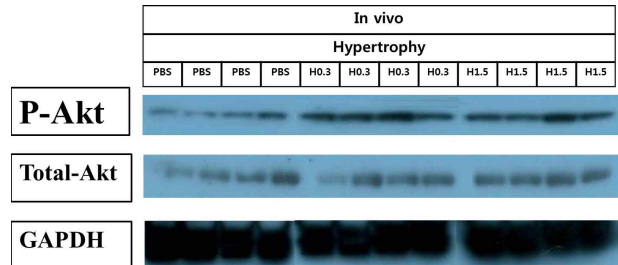
⑥ 비활동성 muscle atrophy 모델의 근육 내 단백질 변화(그림 46)

- ㉔ Muscle sample을 protein lysis buffer(INTRON)를 이용, protein 추출 후 western blotting을 이용하여 단백질 수준에서도 조사함.
- ㉕ Muscle hypertrophy 관련 biomarker들을 (Akt, Erk, mTOR, S6K) 확인한 결과 Akt-mTOR pathway에 activation 정도의 증가를 확인할 수 있었음.



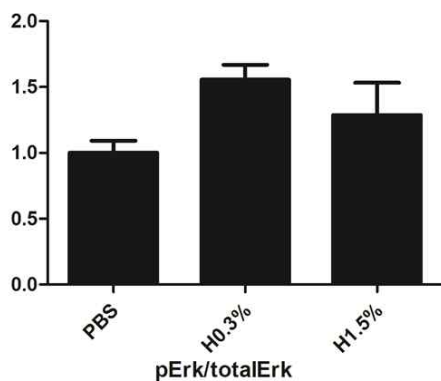
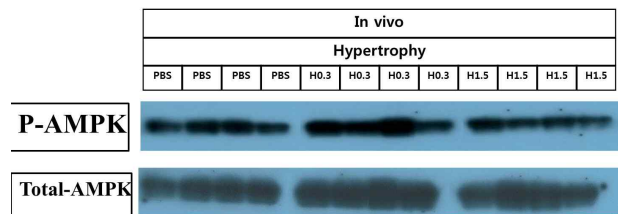
P values were determined by one-way ANOVA with Newman-Keuls Multiple Comparison Test. P values were <0.005 for KMH0.3%, and <0.005 for KMH1.5%.

Mouse were provided ad libitum access to control diet, control diet with 0.3% KMH, or 1.5% KMH for 4weeks before sacrificed.



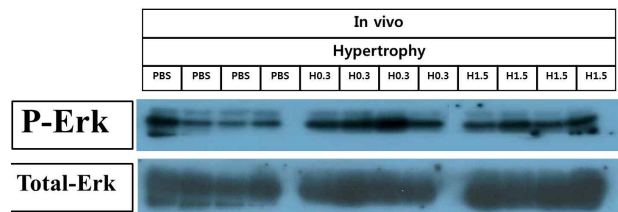
P values were determined by one-way ANOVA with Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Mouse were provided ad libitum access to control diet, control diet with 0.3% KMH, or 1.5% KMH for 4weeks before sacrificed.



P values were determined by one-way ANOVA with Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Mouse were provided ad libitum access to control diet, control diet with 0.3% KMH, or 1.5% KMH for 4weeks before sacrificed.



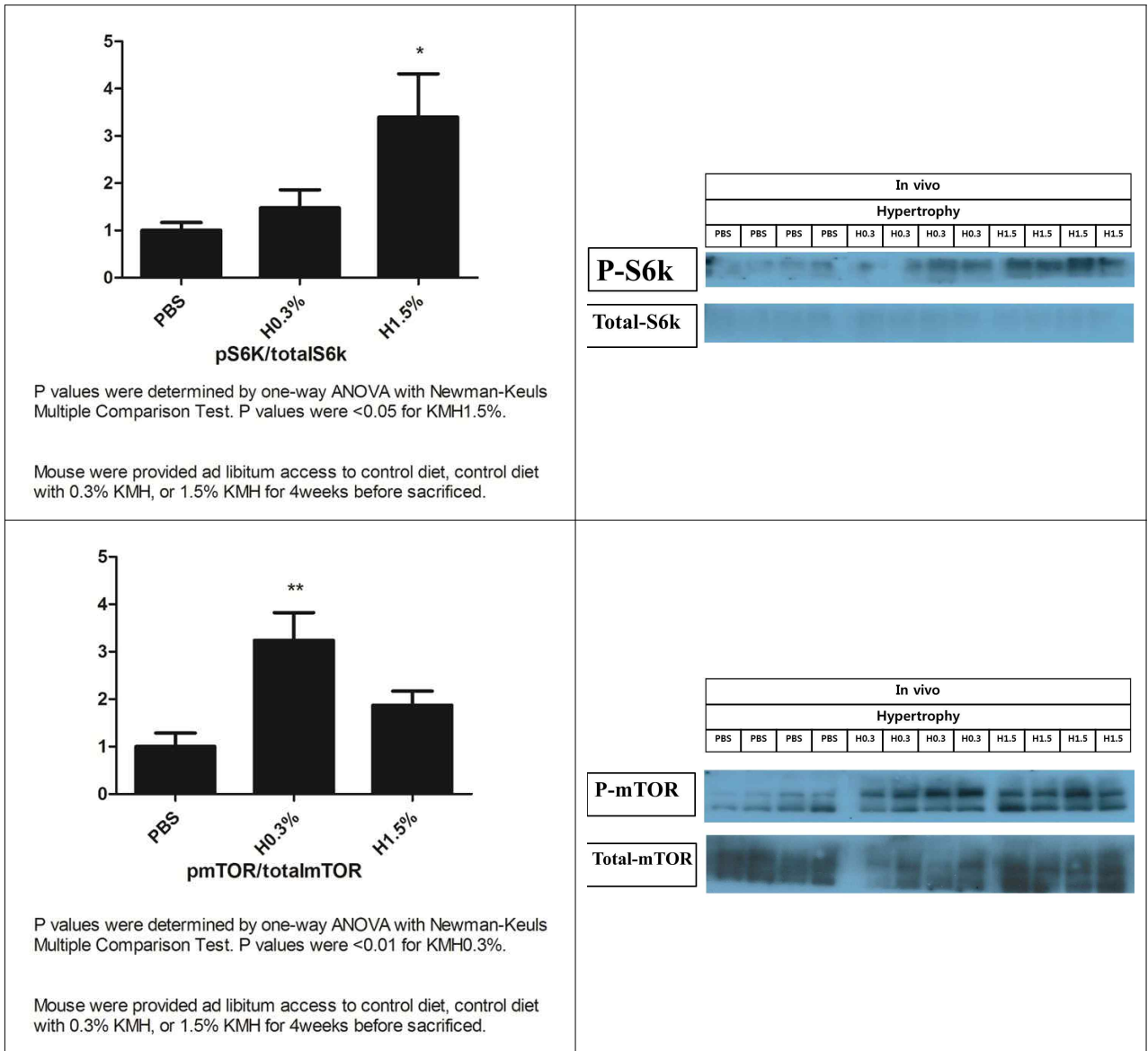


그림 46. 겨우살이 추출물 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 단백질 변화

(나) 동물실험 (*in vivo*)에서의 연구 결과 발표

① 2014 생화학분자생물학회 (KSBMB)에 본 연구의 *in vivo* 수준의 연구 결과를 바탕으로 포스터 발표

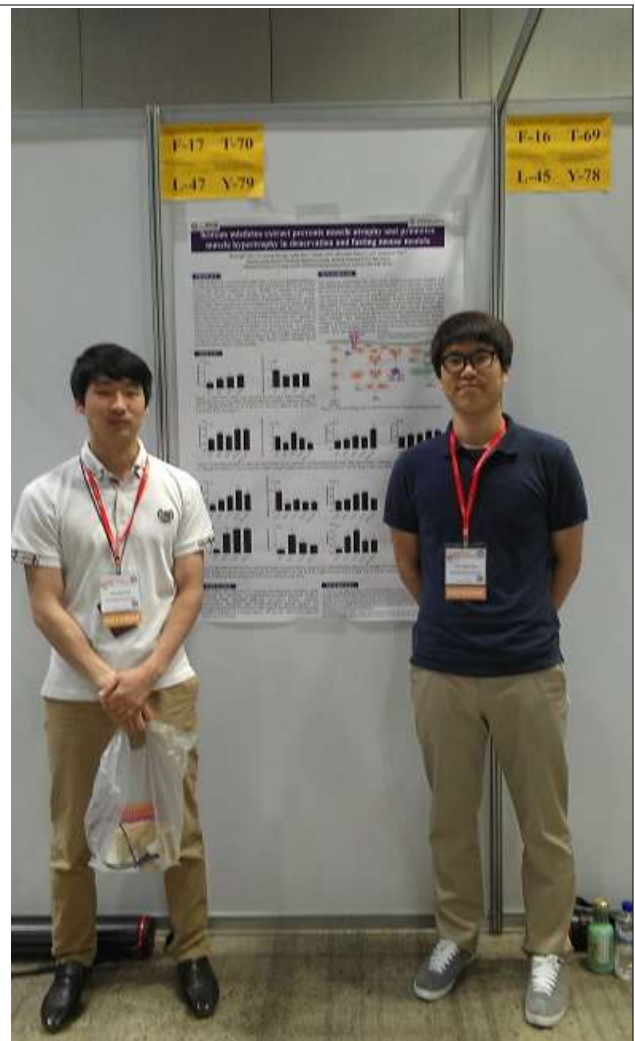
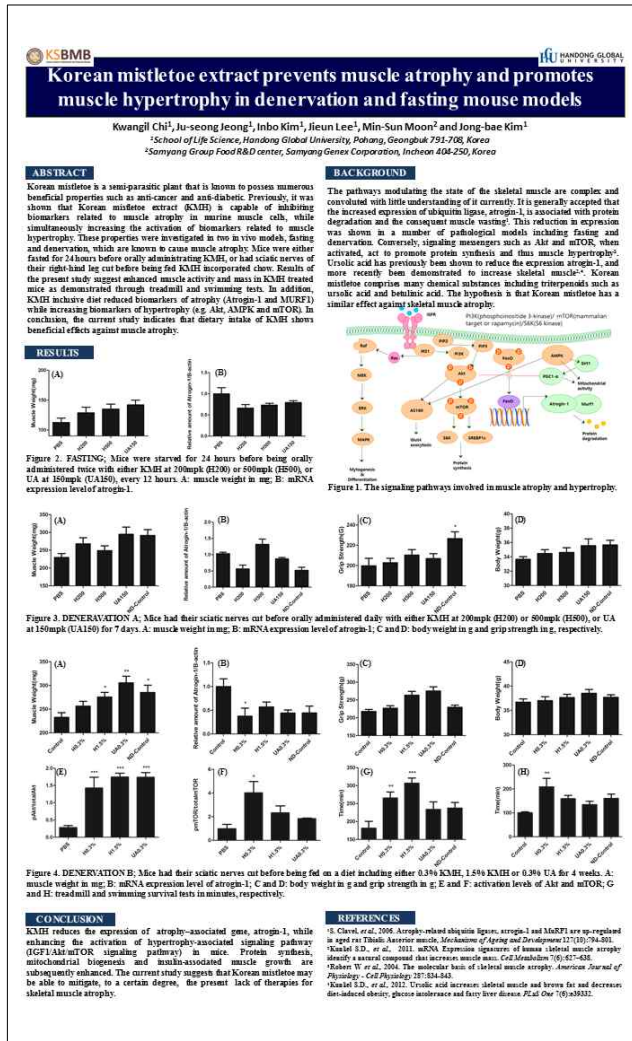


그림 47. *in vivo* 결과의 학회지 포스터 발표

<Abstract> Korean mistletoe is a semi-parasitic plant that is known to possess numerous beneficial properties such as anti-cancer and anti-diabetic. Previously, it was shown that Korean mistletoe extract (KMH) is capable of inhibiting biomarkers related to muscle atrophy in murine muscle cells, while simultaneously increasing the activation of biomarkers related to muscle hypertrophy. These properties were investigated in two *in vivo* models, fasting and denervation, which are known to cause muscle atrophy. Mice were either fasted for 24 hours before orally administering KMH, or had sciatic nerves of their right-hind leg cut before being fed KMH incorporated chow. Results of the present study suggest enhanced muscle activity and mass in KMH treated mice as demonstrated through treadmill and

swimming tests. In addition, KMH inclusive diet reduced biomarkers of atrophy (Atrogin-1 and MURF1) while increasing biomarkers of hypertrophy (e.g. Akt, AMPK and mTOR). In conclusion, the current study indicates that dietary intake of KMH shows beneficial effects against muscle atrophy.

(2) 트리테르페노이드 성분의 활성 효과 확인

(가) In vivo 실험: 마우스 비활동성 muscle atrophy 모델에서의 장기간 베타테인산 함유 사료의 효과 확인

① 비활동성 muscle atrophy의 기본 배경

- ㉠ 근육 소실(muscle atrophy)가 일어나는 원인: 노화, 암, 활동 억제, 질병 등이 있음. 그 중 활동 억제에 의한 muscle atrophy와 그 상황에서의 회복, 혹은 예방에 대한 연구가 많이 이루어짐 [6, 7, 9].
- ㉡ 마우스 모델에서 sciatic nerve를 손상시켜 다리를 움직이지 못하게 하여 비활동성 상태를 만들고 실험을 진행함.
- ㉢ Sciatic nerve는 뒷다리 뒤쪽에 위치하는 신경으로 이 신경이 손상을 입을 경우 손상 입은 다리를 제대로 사용하지 못하게 됨. 이 신경을 손상시키는 것을 denervation이라 함. 지금까지 denervation 경우 근육위축(muscle atrophy)현상이 일어나며 현재 이 방법을 근육기능 연구에 실험모델로 많이 사용하고 있음.
- ㉣ 사람이 깁스를 해서 신체 특정 부위를 움직이지 못하게 되었을 때 그 부분의 근육이 손실되는 것과 같은 현상. 근육을 움직이지 못해 해당 부위에서 mitochondrial activity, 세포 내 대사 활성 정도가 떨어지게 됨.
- ㉤ 본 연구의 모델로 삼은 논문에서는 denervation 후 5주간동안 실험물질을 전체사료에 0.27%의 양을 맞춰 섞은 후 먹이는 방법으로 변화를 관찰함. Denervation 후 atrophy의 억제 효과, atrophy로부터 회복하는 능력과 hypertrophy를 유발할 수 있는 능력에 초점을 맞추었음.
- ㉥ Muscle atrophy와 관련된 atrogin-1, murf1이 주요 biomarker이며, hypertrophy 관련 biomarker들을 추가적으로 확인하였음.

② 비활동성 muscle atrophy 모델의 실험 조건

- ㉠ 5주령의 ICR male 마우스를 사용하여 실험
- ㉡ Avertin을 마취제로 사용, IP로 주사하여 마취시킨 후 뒷다리의 외피와 내피를 수술용 가위로 찢고 근육 부분을 약 1cm 정도 절단함.
- ㉢ 그 사이로 sciatic nerve를 찾아 수술용 가위를 이용하여 절단한 후, 수술용 바늘과 실로 찢었던 외피와 내피를 봉합 해 줌.
- ㉣ Denervation 후 하루를 경과를 본 후, 5주일간 겨우살이 추출물 포함한 사료를 먹

임. 베틀린산의 농도는 전체 사료에 0.27% 한 그룹, negative control로 일반사료 그룹을, positive control로 기존의 denervation에서의 회복에 초점을 맞춘 실험을 통해 결과를 발표한 0.27% ursolic acid를 사용. 추가로 denervation이 제대로 이루어졌는가를 확인하기 위해 외과적 수술을 진행하지 않은 상태의 마우스에 일반사료 먹인 그룹을 함께 조사함.

③ 비활동성 muscle atrophy 모델의 외형적 변화 결과(그림 48)

- ㉠ muscle weight 측정 결과, denervation을 시키지 않은 실험군에 비해 denervation을 시킨 실험군에서 무게량의 감소가 관찰되었음. 또한 denervation 후 일반사료 실험군에 비해 betulinic acid와 ursolic acid 투여 실험군에서 근육 무게량의 감소 정도가 줄었음을 확인.
- ㉡ Grip strength 측정 실험의 결과, 근육 무게량 측정 실험과 유사한 경향성의 결과를 확인. denervation 시킨 경우 일반 denervation을 시키지 않은 대조군에 비해 grip strength 값이 떨어지는 결과를 확인, betulinic acid와 ursolic acid를 먹인 실험군에서 denervation 후 일반사료 먹인 실험군에 비해 grip strength 값이 높은 것을 확인.
- ㉢ 트레이드밀 실험 결과, BA 투여 그룹이 대조군에 비해 약 2배의 오랜 운동수행시간을 나타냈으며, 이는 양성대조군인 UA 투여그룹이나 외과적 수술을 시행하지 않은 ND-control 그룹과 유사한 운동수행시간을 확인하였음. 이는 BA의 투여로 정상적인 운동수행능력 증가효과까지 회복이 가능함을 보여주는 자료가 됨.
- ㉣ 현수실험 결과는 BA 처리 그룹이 대조군에 비해 약 3배의 오랜 수영시간을 기록하였고 이는 양성대조군인 UA 처리 그룹과 외과적 수술을 하지 않은 ND-control 그룹보다 더 뛰어난 결과로 BA의 운동수행능력 증가 효능을 여실히 보여주는 결과임.

④ 비활동성 muscle atrophy 모델의 근육 내 운동 관련 유전자 변화(그림 49)

- ㉠ muscle sample 30mg을 이용, RNA extraction kit(INTRON)를 사용하여 total RNA를 추출한 후, cDNA를 합성하여 atrogen-1, murf1, PGC1- α , Sirt1의 primer와 함께 realtime PCR 수행
- ㉡ Muscle sample에서 추출한 RNA를 이용한 realtime PCR 실험의 결과, atrophy 관련 유전자인 atrogen-1과 murf1의 발현량이 일반사료 대조군에 비해 denervation 후 일반사료 실험군에서 증가함을 확인. 반면 denervation 후 betulinic acid와 ursolic acid를 먹인 실험군에서 atrogen-1과 murf1의 발현량이 감소하는 것을 확인함. Realtime PCR과 muscle weight 측정, grip strength 실험의 결과를 종합할 때 betulinic acid과 ursolic acid가 비활동성 muscle atrophy 상태에서 근육량 감소를 억제하는 효과가 있음을 확인하였음.
- ㉢ Muscle hypertrophy 관련 유전자인 SREBP1c, PGC1- α 와 Sirt1에서 betulinic acid 실험군과 ursolic acid 사료 실험군에서 유전자 발현량의 증가를 확인 할 수 있었음.

㉔ PPAR δ 와 PPAR γ 의 발현량을 확인했을 때 일반사료 실험군에 비해 betulinic acid 및 ursolic acid 사료 실험군과 일반사료 대조군에서 감소함을 확인했음. PPAR δ 같은 경우엔 betulinic acid 사료 그룹 외에는 큰 차이가 없음을 확인함.

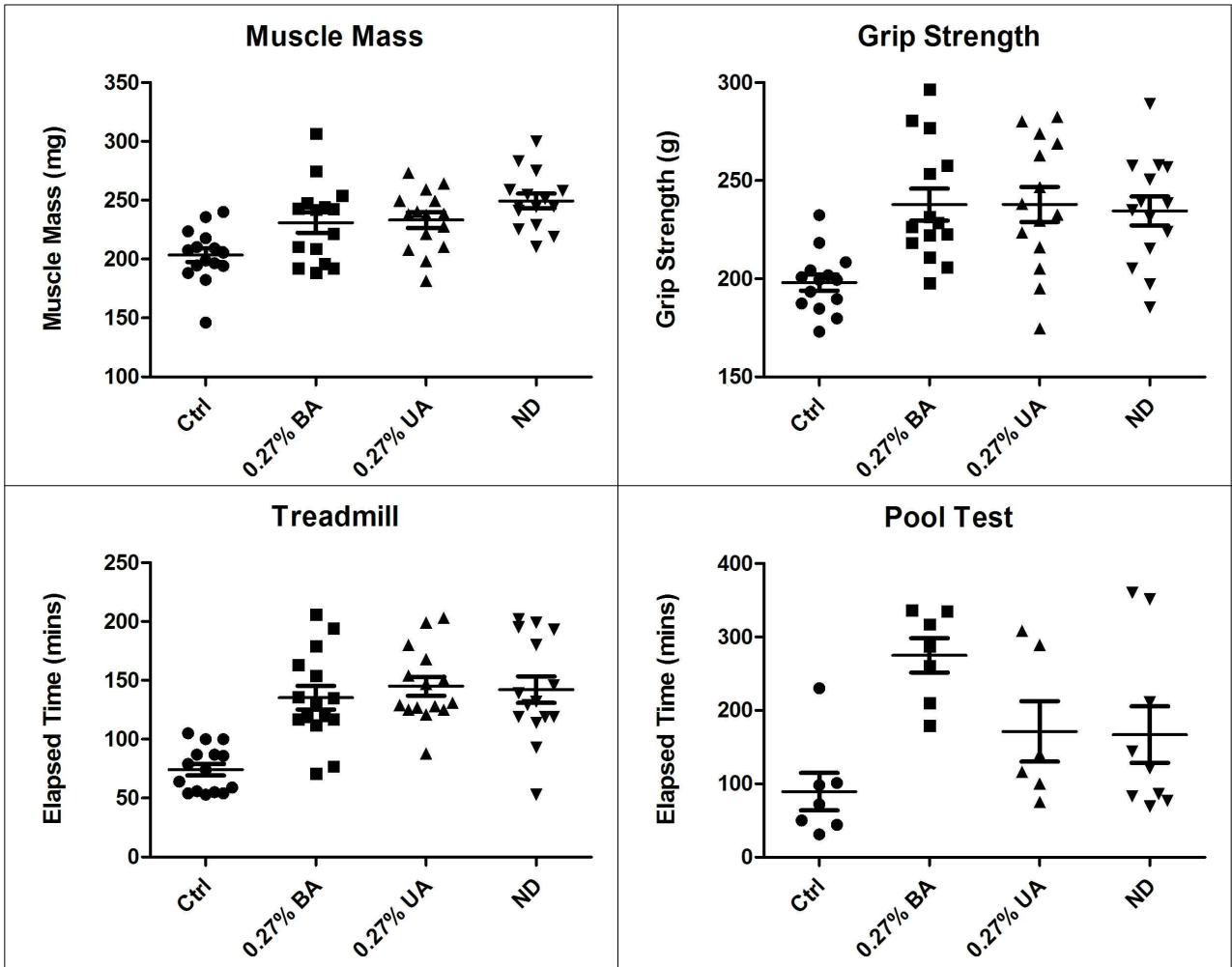


그림 48. 베틀린산 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 외형적 변화

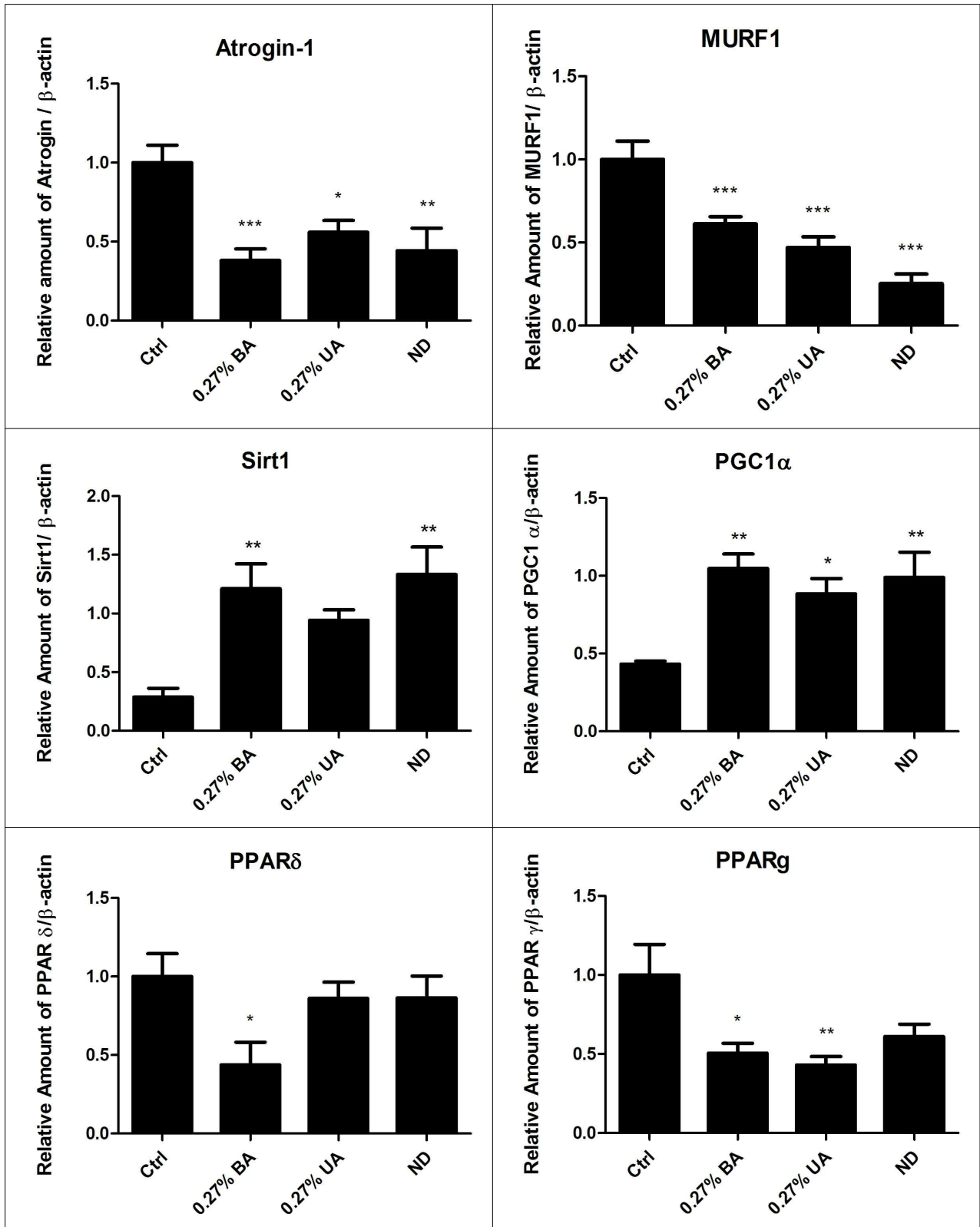


그림 49. 베틀린산 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 운동 관련 유전자 변화

⑤ 비활동성 muscle atrophy 모델의 근육 내 항염증 및 기타유전자 변화(그림 50)

㉞ 항염증 효능을 조사하기 위해 NF κ B, TNF- α , IL-1 β 와 IL-6의 발현량을 qPCR로 확인

했을 때 일반사료 실험군에 비해 나머지 3 그룹에서 축소함을 확인하였음.

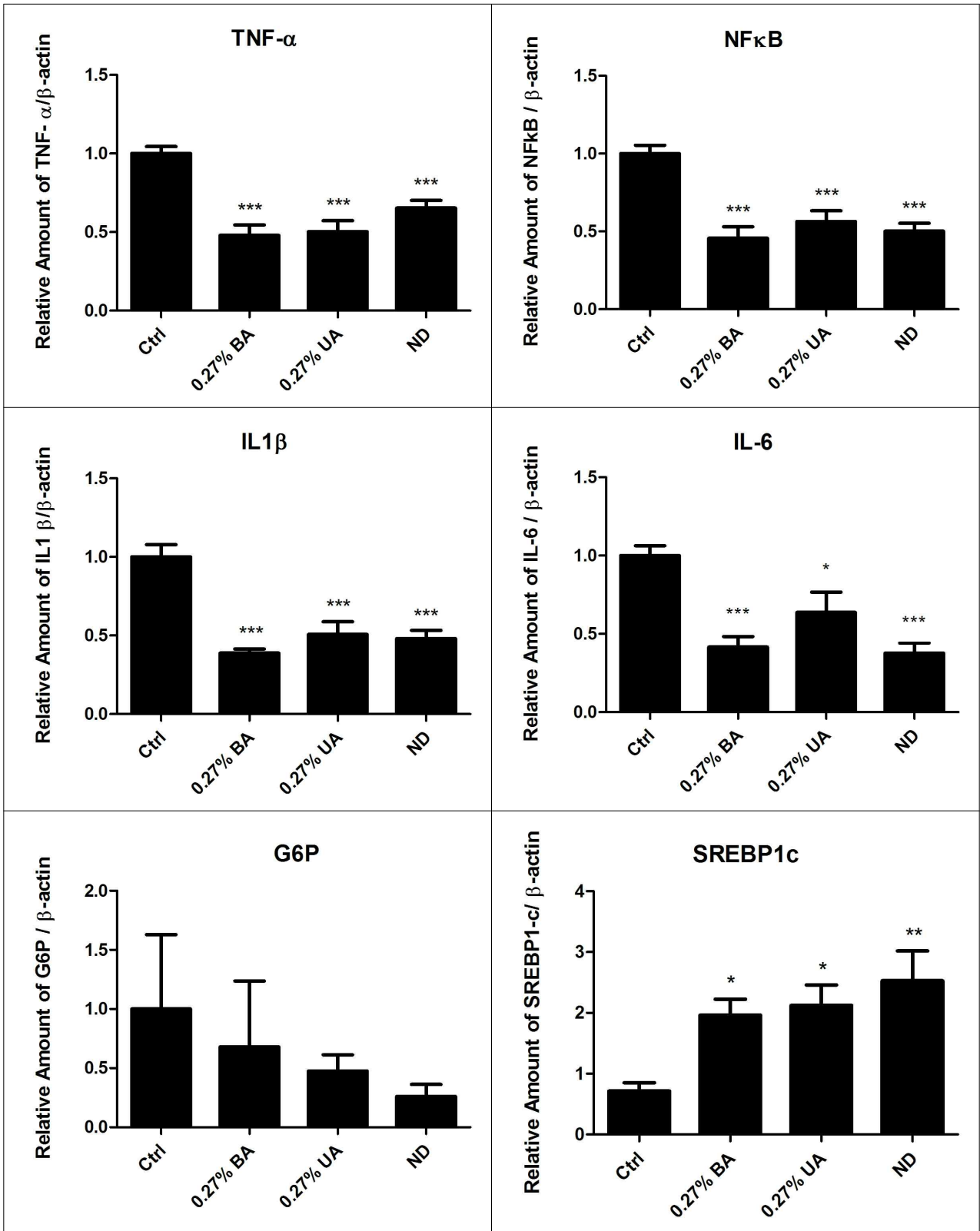


그림 50. 베틀린산 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 기타 유전자 변화

⑥ 비활동성 muscle atrophy 모델의 간 내 유전자 변화(그림 51)

㉔ 간 내에 mRNA 발현량 확인 결과 FXR 과 PEPCK의 발현량이 증가함을 확인했고, LXR α 와 LXR β 의 발현량은 각 ursolic acid 사료 먹인 그룹에서만 증가한 것을 확인 함. 추가적인 biomarker로써 CD34와 HSP10을 확인하였으나 별 차이점이 없어 보임.

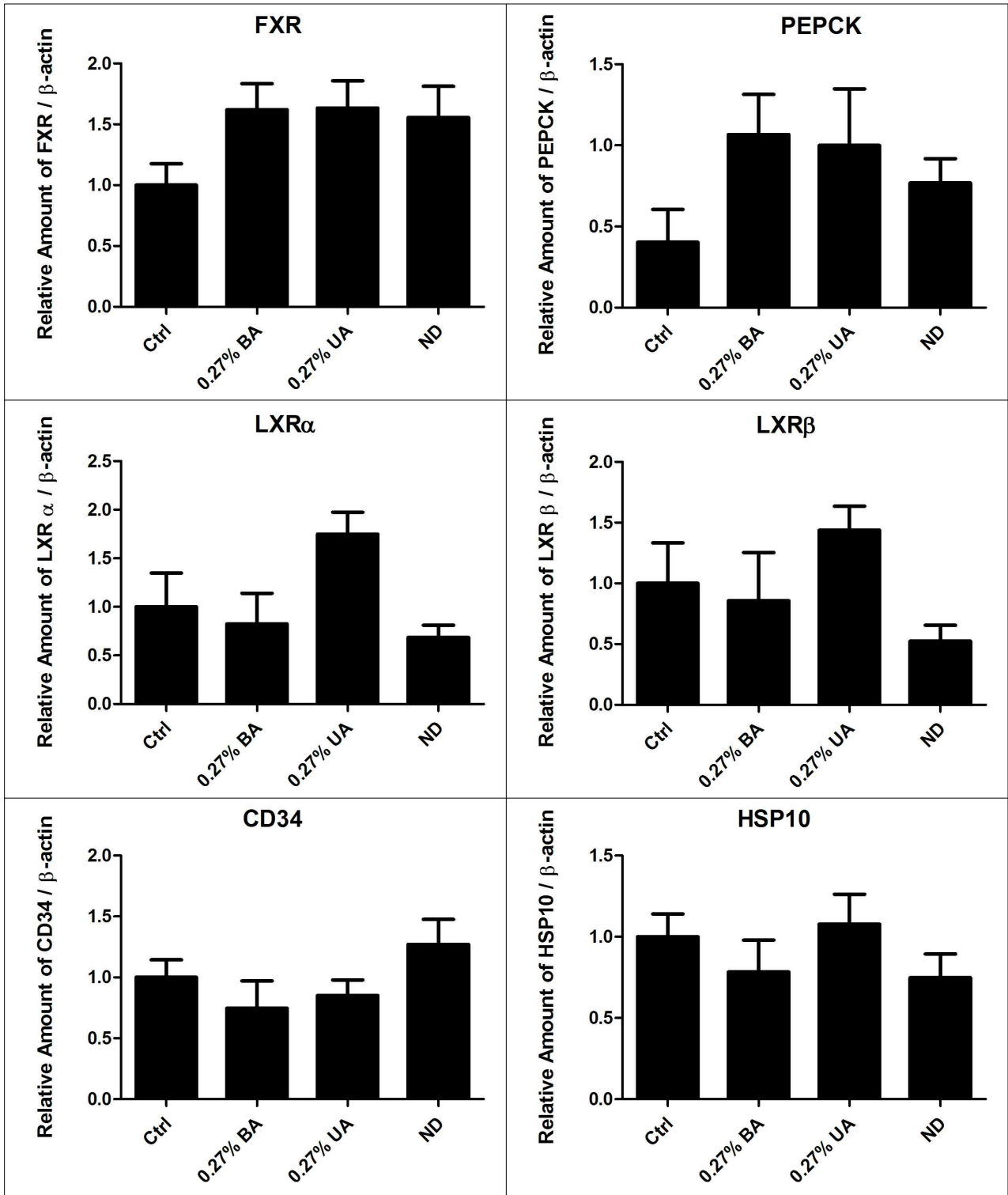
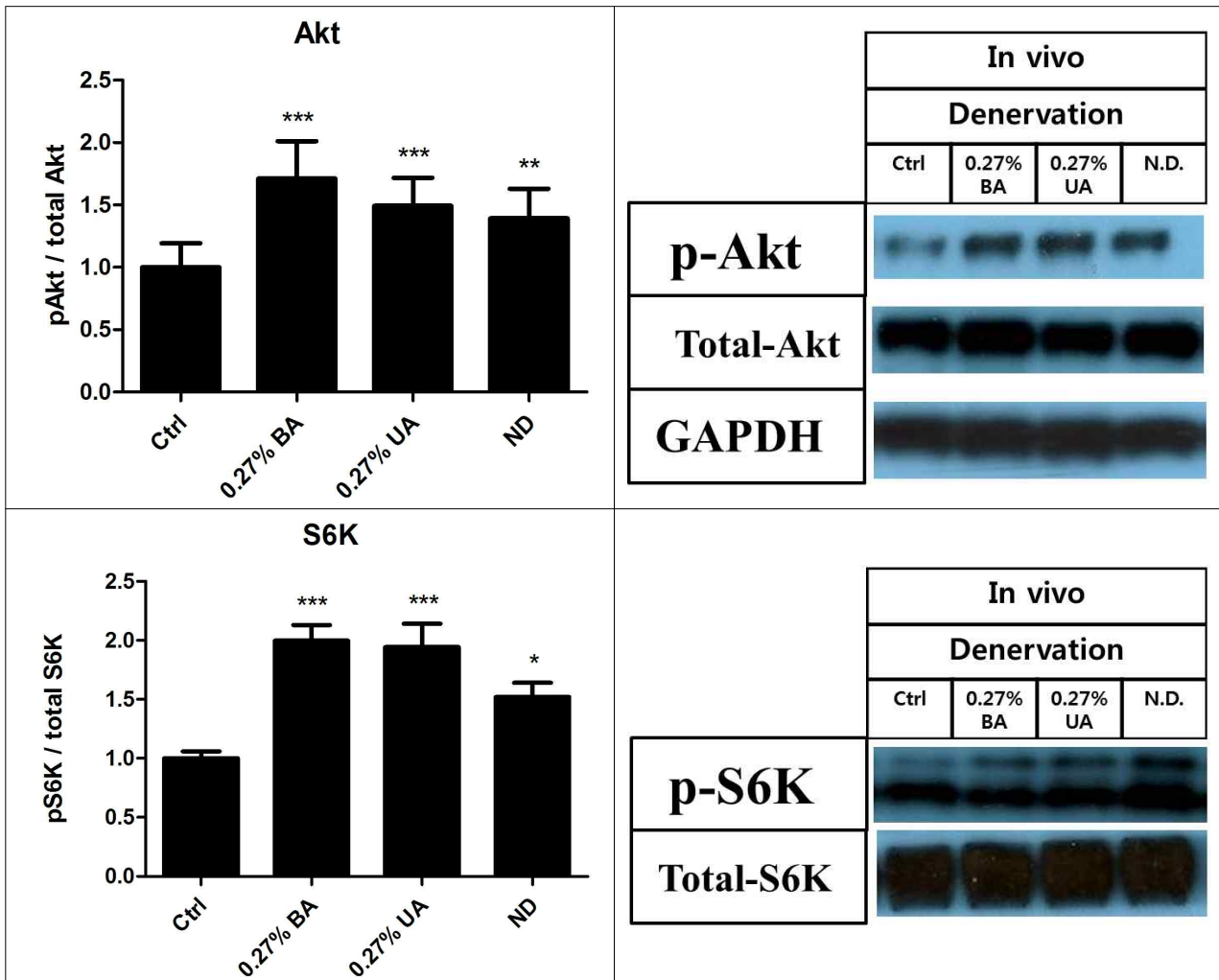
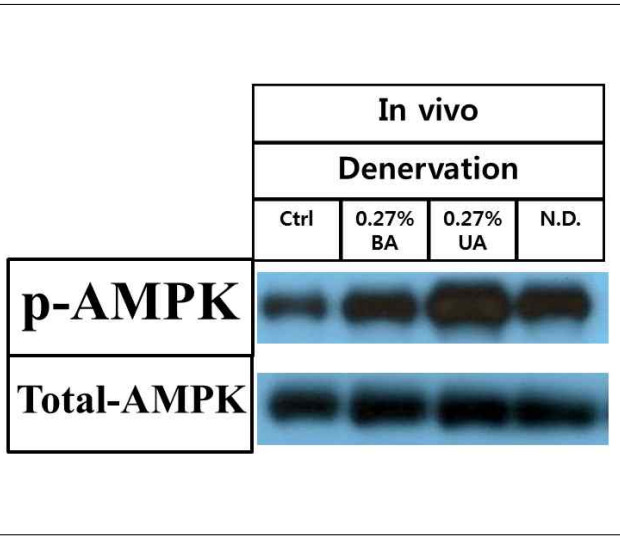
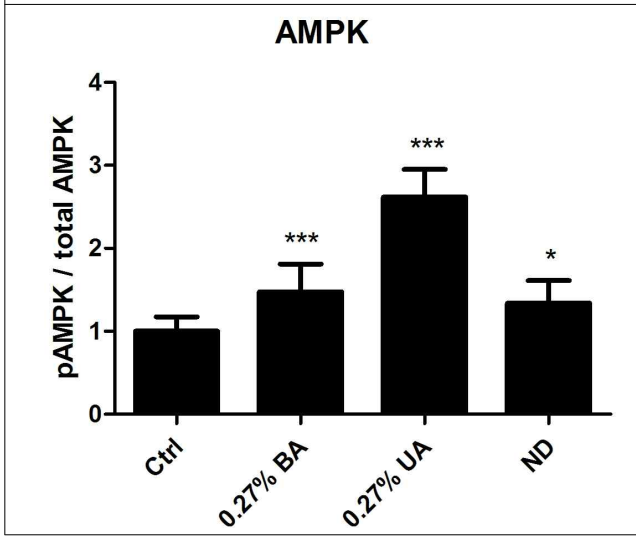
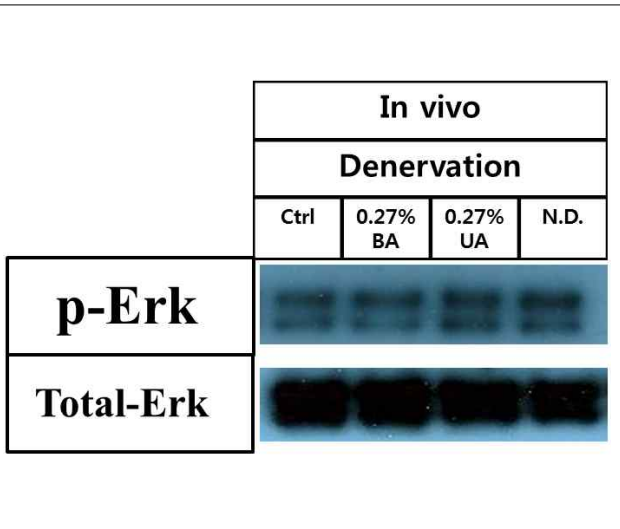
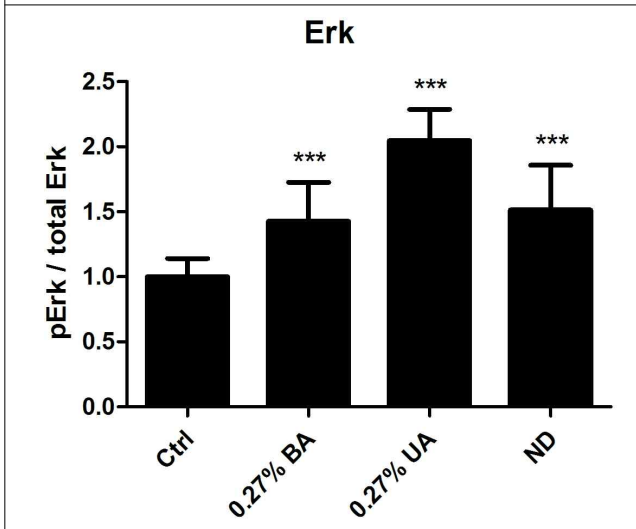
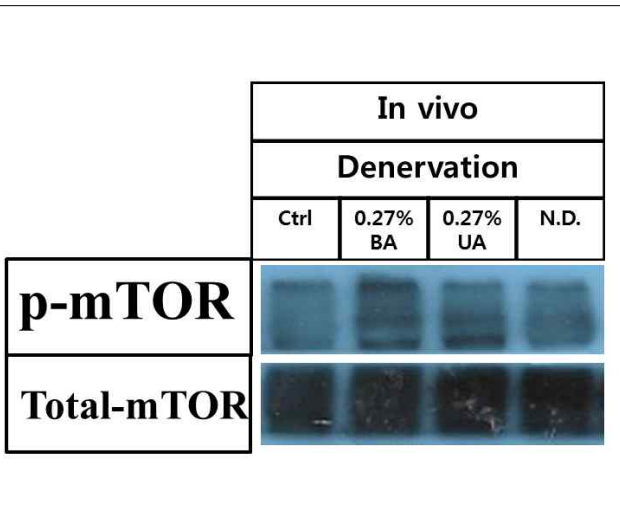
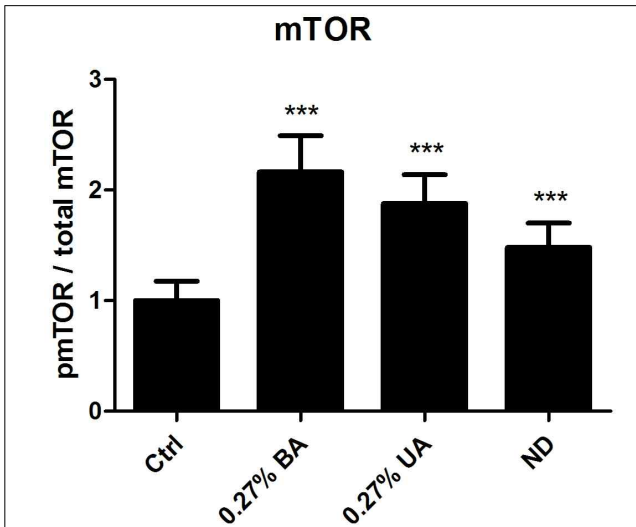


그림 51. 베틀린산 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 간 내 유전자 변화

⑦ 비활동성 muscle atrophy 모델의 근육 내 단백질 변화(그림 52)

㉔ Muscle sample을 protein lysis buffer(INTRON)를 이용, protein 추출 후 western blotting 방법을 이용하여 단백질 수준에서도 조사 한 결과 Muscle hypertrophy 관련 biomarker들을 (Akt, Erk, mTOR, S6K) 확인한 결과 Akt-mTOR pathway 에 activation 정도의 증가를 확인할 수 있었음.





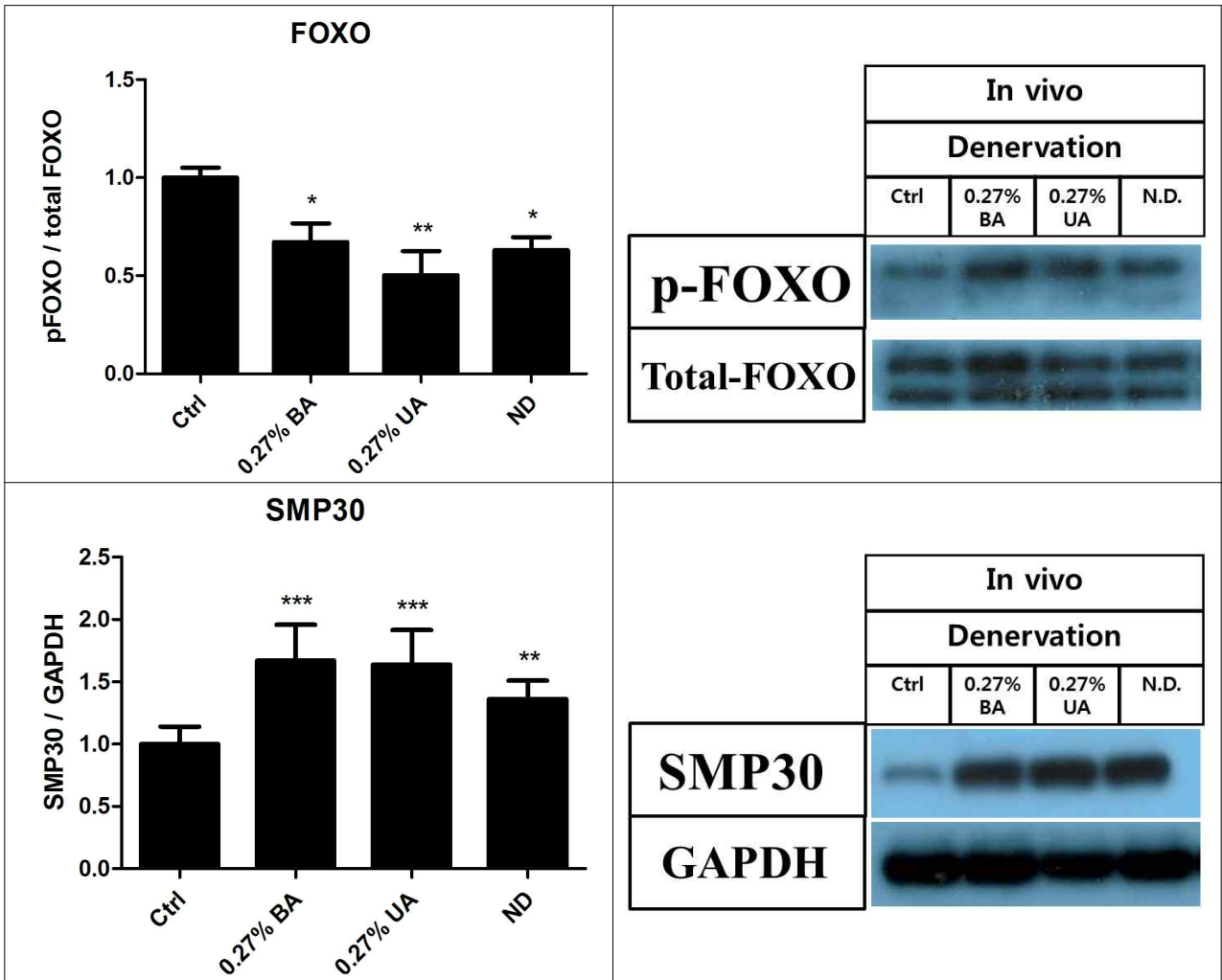


그림 52. 베틀린산 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 단백질 변화

⑧ 비활동성 muscle atrophy 모델의 근육 내 단백질 변화(그림 53)

- ㉠ 혈액 내 성분 분석 결과 adiponectin (결과 미포함)은 그룹별 차이가 없음을 확인함. 혈액 내 testosterone level은 일반사료 실험군에 비해 나머지 3 그룹이 더 높음을 확인 하였으며 cholesterol level은 그 반대의 결과를 확인할 수 있었다.

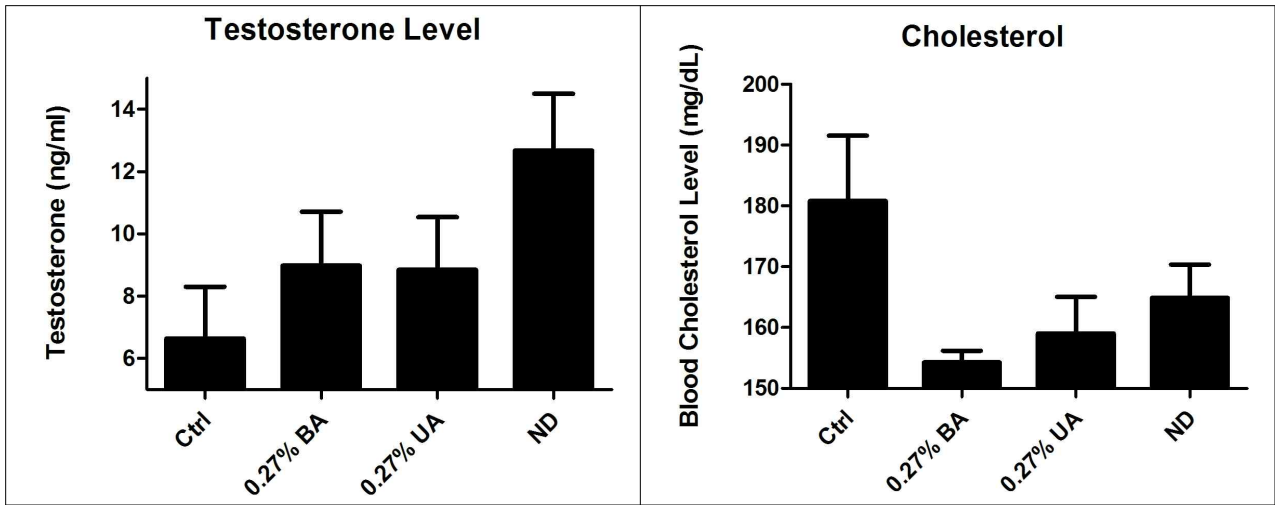


그림 53. 베틀린산 투여에 따른 신경절단 마우스 모델의 혈액 정상치 변화

제 2 절 제 1 협동과제

1. 협동과제 목표 및 내용 (책임자: 김광수)

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 |
|------|------|---------------------------------------|--|
| 1차년도 | 2012 | 겨우살이 관련 조사/ 인체 적용 실험 기반 구축 | <ul style="list-style-type: none"> - 근 기능 저하 억제 관련 제품 수집 및 분석 - 근 기능 관련 자료 및 문헌 조사 - 기능성 인정을 위한 건강기능성 모듬토의 신청 - 개별인정 가능성 타진 및 추가필요 자료 준비 |
| | | 겨우살이 추출물을 이용한 제형연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 제형 및 type 결정(연질캡슐, 음료 형태 등) - 노인용, 스포츠용 제형 선정 - 부원료 적합성 연구 - 공업화를 위한 제조 공정 확립 |
| | | 인체 적용시험 Protocol 작성 | <ul style="list-style-type: none"> - 현재 근위축 억제에 대한 개별인정 항목이 없음. - 바이오 마커 및 측정 항목 선정 |
| | | 인체적용시험용 시제품 제작 | <ul style="list-style-type: none"> - 지표 물질 함유량 선택 - 시제품 가공 처리법에 따른 활성화도 조사 - 시제품 제작(인체적용시험용) 후 관련 실험 진행 |
| | | 겨우살이 추출물의 인체 적용 시험(1단계) | <ul style="list-style-type: none"> - CRO/ 임상시험기관 선정(피험자수, 평가항목 등) - 인체 적용시험을 위한 제형 및 유효성분 함유량 결정 - 인체 적용 시험 계약 체결 - IRB 심사 완료 |
| 2차년도 | 2013 | 겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분의 인체 적용 시험(2단계) | <ul style="list-style-type: none"> - 피험자 모집 - 인체적용 시험 진행 사항 점검 - 결과 입수 및 유효성 평가 |
| | | 개별 인정형 추진 검토 | <ul style="list-style-type: none"> - 식약청에 신규 기능성 항목 추가 신청 검토 (노인성 근 기능 손실/저하 방지 효과) - 개별인정형 인증 신청 준비 |
| | | 겨우살이 추출물 제품 응용 개발 및 용도 확대 | <ul style="list-style-type: none"> - 시생산 제품의 안정성 및 지표성분 함량 시험 - 가속 실험을 통한 유통기간 산정 |
| | | 겨우살이 소재의 사업기반 조성 | <ul style="list-style-type: none"> - 대량 생산을 위한 원료 확보 방안 구축 - 관능평가를 통한 소비자 조사 - 제품 방향 결정: 대상 소비자 중심 시장 고려 제품 컨셉 및 홍보방안 구축 |

2. 연구개발의 필요성

가. 근기능 저하방지 효능을 갖는 제품 개발이 필요함

- 노년층이 증가함에 따라 근 기능 감소의 문제가 대두되고 있으며, 노년층의 근력 회복은 사회적으로 노년층 인구의 경제활동 참여 재고로 인한 삶의 질 개선과 미래산업으로 인정받는 실버산업과 연계한 사업을 활성화 할 수 있다.
- 근기능 향상 기능성을 지닌 원료를 통해 다양한 스포츠 관련 식품의 개발이 가능하고 경제적, 산업적 잠재성이 큼.

나. 겨우살이 추출물의 선행 연구 결과 근 기능 저하 방지의 효능이 기대됨

- 근육의 감소는 억제하고 단백질 합성은 촉진하며 근육의 형성을 활성화하는 기작이 밝혀져 근 기능 저하 방지 효능을 가지는 기능성 원료로써의 연구가 필요.
- 신규 기능성 물질의 원천 기술 확보가 기대 됨.

다. 건강기능성을 허가받기 위해 인체적용 시험을 통한 과학적 기능성 입증 필요 함

- 겨우살이 추출물은 In vitro, In vivo적으로 기능성 메커니즘이 연구됨.
- 국내 전문 CRO(예; Health Care, Bio Food등)를 통한 전문 병원에서의 임상이 필요.
- 국내/외적으로 근기능 저하 방지, 근육량 향상 관련 임상 실험은 본 연구가 선도적인 연구가 될 것임
- 선행 연구가 부족한 근기능 관련 기능성 지표 임상 실험 프로토콜의 개발이 필요

라. 인체적용 시험 결과를 활용하여 건강기능식품 개별인정이 필요

- 과학적 증거에 입각한 데이터를 구축하여 식약처의 건강기능식품 개별인정형 원료로 신청 할 수 있음.

마. 겨우살이 원료 관련 연구 필요

- 원료 표준화, 지표물질 선정, 제조 공정 확립, 원료 안전성 확보 등의 연구가 필요 함.

바. 소비자 요구(니즈)에 맞는 경쟁력을 갖춘 제품 개발이 필요

- 실버 및 스포츠 산업에 맞춘 다양한 제형의 개발이 필요
- 흡수 위치 및 소화력을 고려한 제형 결정 : 웨이크, 스틱젤리, 면, 캔디, 음료, 정제 등

3. 연구개발 내용 및 결과

가. 1차년도 (2012~2013)

(1) 겨우살이 관련 조사/ 인체 적용 실험 기반 구축

(가) 근 기능 저하 억제 및 겨우살이 관련 제품 수집 및 분석

① 근 기능 및 근육 관련 제품 조사

㉠ 근육, 근기능 관련 제품 현황 검색 결과

검색 결과 대부분 중복되는 제품이 많았고, 검색된 제품도 근육 생성을 위한 단백질 파우더에 한정되어 다양한 제형 및 제품이 없는 것으로 조사됨

| | | |
|-----------------------------------|--------------------|------------------------|
| 홍삼/건강/다 이 어 트 식 품 (160,935) | 헬스보충제(15,060) | 헬스보충제기타 (9,607) |
| | | 근육발달 (4,068) |
| | | 체중근육복합기능 (800) |
| | | 체중증가 (773) |
| | 칼슘/철분/엽산/미네랄 (413) | 칼슘 (338) |
| | | 마그네슘 (57) |
| | | 아연 (11) |
| | | 철분 (4) |
| | | 엽산 (2) |
| | | 기타미네랄 (1) |
| | 다이어트 보조식품 (205) | 기타다이어트 보조식 (127) |
| | | 허벌라이프 (42) |
| | | CLA (14) |
| | | 가르시니아 (10) 씨리얼/오트밀 (6) |
| | | 식이섬유 (3) |
| | | 다이어트바/바란스 (2) |
| | | 유산균 (1) |
| | 비타민 (63) | 기타비타민 (40) |
| | | 멀티비타민 (13) |
| | | 비타민B (6) |
| 비타민C (3) | | |
| 비타민A (1) | | |




| | | |
|-----------------|------------------|----------------|
| | 기타건강식품 (62) | 기타건강보조식품 (59) |
| | | 초유 (3) |
| | 다이어트음료 (40) | 다이어트차/마테차 (40) |
| | 글루코사민/관절영양 (16) | 글루코사민 (14) |
| | | 초록입홍합/관절영양 (2) |
| | 오메가3/감마리놀렌산 (10) | 정제어유 (10) |
| | 꿀/로얄제리/프로폴리스 (5) | 프로폴리스 (5) |
| | 알로에/코큐텐/콜라겐 (5) | 콜라겐 (4) |
| | | 코큐텐/토코페롤 (1) |
| | 건강환 (3) | 기타건강환/분말 (3) |
| | 생식/선식 (3) | 선식 (3) |
| 건강즙/과일즙 (2) | 기타즙/농축액 (1) | |
| | 호박즙 (1) | |
| 홍삼/인삼 (2) | 기타홍삼제품 (1) | |
| | 어린이/성장기홍삼(1) | |
| 음료/과자/가공식품 (27) | 통조림/캔 (16) | 기타통조림 (16) |
| | 냉동/간편조리식 (3) | 어묵/오뎅 (2) |
| | | 기타 즉석식품 (1) |
| | 녹차/전통차 (2) | 허브차 (2) |
| | 식용유/오일 (2) | 기타기름 (2) |
| | 건강음료 (1) | 기타전통음료 (1) |
| | 분말 (1) | 기타분말 (1) |
| | 주스/과즙음료 (1) | 기타과즙음료 (1) |
| 초콜릿/사탕/껌 (1) | 초콜릿 (1) | |

㉔ 제품 분석 결과




- 근기능 관련 제품 시장 조사 결과 대부분 운동 능력이나 근육 형성에 기능이 집중적이었고, **근기능 억제 저하 제품은 거의 없었음.**
- 대상 고객은 근육 형성 및 체형 관리 필요성이 있는 남성 소비자를 타겟으로 하여 한정적인 소비자층을 겨냥한 제품이 대부분이었음.
- 관련 제품은 단백질 파우더 비중이 높았고 그 외에 미네랄, 비타민 등 영양소 첨가 제품으로 한정되어 있음.
- 겨우살이 적용 제품 개발 시 다양한 소비자를 타겟으로 할 수 있을 것으로 기대되며, 근기능 저하 억제 기능성을 요구하는 건강 지향적 제품이 될 것으로 판단됨.
- 겨우살이 적용 제품을 다양한 제형으로 개발하여 소비자에게 만족을 주고 관심을 받을 수 있을 것으로 보임.

| 제품명 | 업체명 | 제품 사진 | 특징 및 성분 |
|-----------------------|--------------|---|--|
| 프로84락 (Pro84RACC) | 바이오 하우스 |  | 근육량 현저히 증가 체지방 감소도움, 피로억제, 면역력강화, 대장 종양 발생에 대한 억제력 분리유청단백, 세븐베리농축액, 비타민스함유 |
| 슈퍼 | 메이지 주식회사 |  | 17 종류의 아미노산 소재 VAAM 3,000 mg 코엔자임Q10,L-카르니틴을 플러스한 시리즈 |
| 바무 | 메이지 주식회사 |  | 17 종류의 아미노산 소재 VAAM 3,000 mg 15 년의 실적을 자랑하는 시리즈의 스테디셀러 제품 |
| 위다 인 젤리 단백질 인 | 모리나가 주식회사 |  | 일반인의 단백질 필요량은 체중 1kg당 1g, 선수는 2배 시간과 장소를 가리지 않고 간편하게 단백질 공급 유청 펩타이드 5,000mg함유, EMR 14mg 배합 열매 요구르트 맛 90kcal |
| 위다 인 젤리멀티 비타민 인 | 모리나가 주식회사 |  | 튼튼한 근육을 만들어 충분한 에너지를 축적해도 비타민과 미네랄이 부족하고, 몸은 제대로 작동하지 않음 11가지 비타민 배합 |




| 제품명 | 업체명 | 제품 사진 | 특징 및 성분 |
|----------------------------|------------------------|---|--|
| 위다 인 젤리멀티 미네랄 인 | 모리나가 주식회사 |  | 튼튼한 근육을 만들어 충분한 에너지를 축적해도 비타민과 미네랄이 부족하고, 몸은 제대로 작동하지 않음 5종류의 미네랄 (철분, 칼슘, 아연, 구리, 마그네슘) 배합 포도맛 90kcal |
| Ensure Plus | Abbott사 |  | 체중을 유지하는데 도움을 줌 237ml에 단백질 13g 함유 |
| Ensure Muscle Health | Abbott사 |  | 근육을 정진시키고나 근력을 증진시키는데 도움을 줌 237ml에 단백질 13g 함유 |
| Recovery bar | Maxim |  | 운동 후 섭취 근육의 회복과 피로회복 (고탄수화물, 고단백) |
| Muscle bar | ASD Sports |  | 근육 성장 단백질과 탄수화물의 양이 많아야 함 |
| Ganomax | Norrmejerie r forum |  | 근육 회복 단백질과 탄수화물의 빠른 공급이 중요 |
| Zone | Abbott |  | 유산소 운동용 경기 3일 전 부터는 장시간 경기에 대비하여야 함 (탄수화물 위주의 식사를 하여 근육의 글리코겐의 양을 늘림) |
| Titan | Premier nutrition |  | 무산소 운동용 훈련 기간 중 근육 강화를 위한 단백질이 필요함 (근육이나 인대의 강화를 위해 비타민 필요) |
| Big100 | Met Rx |  | 복합형 운동용 글리코겐과 지방을 동시에 태워 나가면서 에너지를 운용함 (두 에너지 모두 충분한 섭취가 필요함) |
| 머슬샷웨이 트게이너 | 미국플로리 던트힐마 |  | 유청단백질, BCA 등 함유 포화지방, 트랜스지방 0%, 근육발달+체중증가 비타민, 타우린 등 약 13종 이상의 고급 영양성분 함유 |

| 제품명 | 업체명 | 제품 사진 | 특징 및 성분 |
|-------------------------|---------------------------|---|--|
| 퍼펙트바디 W/W/M | 휠마사 |  | <p>W(웨이트)-탄수화물:단백질=9:1 체중증가, 근육성장</p> <p>WM(웨이트머슬)-탄수화물:단백질=7:3</p> <p>MW(머슬웨이트)-탄수화물:단백질=6:4 근육 벌크 및 근 매스 빠른 성장</p> <p>HW(하이드로웨이)-단백질90%이상, 지방의 증가 없이 순수 근육 증가 도움</p> <p>EW(에그화이트)-단백질 90%이상, 지방의 증가 없이 순수 근육 증가 도움</p> |
| 맥스익스트림 립웨이트게이너 프로 | MB |  | <p>소화흡수력이 뛰어난 탄수화물 61.2%, 양질단백질 (탈지대두/농축유청단백) 21%</p> <p>체중 증가, 근육 증가 도움</p> |
| 빅 매스 게이너 | 미국 Nucare Nutrition |  | <p>MCT오일(중쇄지방산)이 함유되어 운동 중 에너지 공급을 도와 하트트레이닝, 체지방 증가 없이 근매스 증가, 체격 향상에 도움</p> <p>-MCT(MediumChainTriglycerides)</p> <p>MCT oil은 사슬 구조를 띄기 때문에 소화 흡수가 빨라 근육을 발달시키는데 있어 이상적인 기능, 운동을 하면서 섭취를 하게 되면, 인슐린 분비 촉진과 근육의 아나볼릭 상태를 유도하여 근사이즈 증가에 도움</p> <p>비타민, 칼슘, 철분 등의 영양소를 추가 공급</p> <p>Cold-Processed 단백질과 탄수화물이 1:2의 이상적인 비율로 만들어진 제품</p> <p>근육 발달 보충제로서 프로틴(단백질)을 집중적으로 공급해 주는 건강기능식품</p> |




· 운동 시기에 따른 분류

| 컨셉 | 특징 | 제품 사진 |
|---------|------------------------------|---|
| 운동 전 섭취 | 충분한 열량을 내어 식사대용 |  (VPX, 2,800원/EA) |
| 운동 중 섭취 | 빠르게 흡수 (단당류, 무기질) |  (EAS, 3,100원/EA) |
| 운동 후 섭취 | 근육의 회복과, 피로회복 (고 탄수화물, 고 단백) |  (MAXIM, 3,900원/EA) |

· 용도에 따른 분류

| 컨셉 | 특징 | 제품 사진 |
|--------|---------------------------|--|
| 근육 성장 | 단백질과 탄수화물의 양이 많아야 함 |  (ASD sports, 2,600원/EA) |
| 에너지 보충 | 빠른 흡수가 가능한 저분자 아미노산과 탄수화물 |  (MAXIM, 3,900원/EA) |
| 근육 회복 | 단백질과 탄수화물의 빠른 공급이 중요 |  (NORRMEJERIER FORUM, 3,000원/EA) |

· 운동 종류에 따른 분류

| 컨셉 | 특징 | 제품 사진 |
|--------|--|--|
| 유산소 운동 | 경기 3일 전 부터는 장시간 경기에 대비하여야 (탄수화물 위주의 식사를 하여 근육의 글리코겐의 양을 늘림) |  (ABBOTT, 1,400원/EA) |
| 무산소 운동 | 훈련기간 중 근육강화를 위한 단백질이 필요함 (근육이나 인대의 강화를 위해 비타민 역시 필요) |  (PREMIER NUTRITION) |
| 복합형 운동 | 글리코겐과 지방을 동시에 태워나가면서 에너지를 이용함 (두 에너지 모두 충분한 섭취가 필요함) |  (MET-RX, 1,800원/EA) |

② 겨우살이 관련 제품 조사

- 조사된 겨우살이 제품은 기타가공품 또는 액상, 다류 등 다양한 식품 형태로서 제조되고 있음을 확인 할 수 있음.
- 일반 식품 형태의 제품의 경우 겨우살이 추출분말의 함량 및 지표성분에 대한 기준 규격 등이 없어서 제품별 겨우살이 함량에 차이를 보이고 있음.
- 환 제품의 경우 1회 섭취량을 보면 10~50환으로 다소 많은 양을 섭취하도록 되어있어 섭취에 불편함이 예상됨.

㉠ 환 제형

| 제품명 | 업체명 | 제품 사진 | 특징 및 성분 |
|---------------------|------------------|---|--|
| 지리산 겨우살이 골드 환 | 홍화인 |  | 지리산 겨우살이 원료 사용 국내산 겨우살이(잎/줄기) 48%, 구운 발마늘, 산사(열매) 등 원료 함유 1일 2~3회 1회 20~30환씩 섭취 중량 180g, 소비자가 26,000원 |
| 상기생 (겨우살이) 환 | 초원 한방 플러스 |  | 상기생(겨우살이) 80%, 참쌀 20% 원료 함유 1일 20~30환씩 섭취 중량 220g, 소비자가 11,000원 |
| 자연산 겨우살이환 | 한농 마을 |  | 겨우살이엑기스 50%, 겨우살이분말 50%, 참쌀가루 등 원료 함유 1일 1~2회 1회 10~15환씩 섭취 중량 160g, 소비자가 60,000원 |
| 제천 겨우살이환 | 충북 약초 영농조합 |  | 겨우살이 100% 원료 함유 1일 3~4회, 1회 20~30환씩 섭취 중량 250g, 소비자가 15,000원 |
| 갑당 겨우살이환 | 갑당 약초 |  | 겨우살이 48%, 마늘30%, 솔잎 11%, 뽕잎 11% 등 원료 함유 1일 3~4회, 1회 30~50환씩 섭취 중량 600g, 소비자가 19,900원 |

㉔ 액상 및 차류

| 제품명 | 업체명 | 제품 사진 | 특징 및 성분 |
|-----------------------------|----------------------------------|---|--|
| 김정환홍삼과 겨우살이 이야기 | 홍화인 |  | 엄선된 6년근 홍삼과 겨우살이를 36시간 추출 6년근 홍삼 추출액(국산)94%, (고형분2%이상), 겨우살이추출분말(국산6%) 등 함유 식품 유형: 홍삼 음료 80ml*30포, 소비자가 106,500원 |
| 겨우살이 액 | 신수동 식품 |  | 강원도 겨우살이 원료 사용 겨우살이 100%원료를 사용하여 발효 효소 처리하여 제조한 기타 발효 음료 80ml*30팩, 소비자가 120,000원 |
| 미슬토 프리미엄 | (주)한미 양행 |  | 겨우살이 유효성분 함량이 20ml 한 포에 1,600mg이상 함유되도록 겨우살이의 모든 성분을 추출하여 고농축한 진액 겨우살이 99.95% 함유 액상차 20ml*60포, 소비자가 160,000원 |
| Mistletoe fluid | ESPARA US |  | 겨우살이 100% 증류액 미국에서 판매되는 제품 30ml, 소비자가 150,000원 |
| Nerve and Sleep Tonic | KLAMAT H BLUE GREEN INC |  | 신경조직의 안정과 조화에 도움이 되며 스트레스를 저해하고 깊고 편안한 잠에 들 수 있도록 도와주는 제품으로 미국에서 판매 취오줌풀, 시계꽃, 라벤더꽃, 겨우살이 등 함유 소비자가 17,000원 |
| 지리산 참나무 겨우살이 차 | 쌍계제다 |  | 지리산 참나무 기생 겨우살이 원료 함유 겨우살이 100% 침출차 중량 60g, 소비자가 66,000원 |
| 지리산 야생 겨우살이 차 | 다향제다 |  | 지리산 야생 참나무 기생 겨우살이, 찌고 볶는 과정 거친 법제된 겨우살이 차 겨우살이 100% 다류 중량 100g, 소비자가 25,000원 |
| 지리산구례 명차 (겨우살이차) | 지리산 구례차 영농조합 법인 |  | 겨우살이는 항암식물, 근육과 신장 강화시켜 쥐 신경통에 좋고 콜레스테롤 제거하며 인슐린 분비 원활하게 하는 차류로 겨우살이 100% 함유 중량 22.5g, 소비자가 5,700원 |
| 겨우살이 액 | 조태연가 | | 겨우살이 100% 함유 침출차 |

| 제품명 | 업체명 | 제품 사진 | 특징 및 성분 |
|----------------|-------------|---|---|
| | |  | 중량 100g, 소비자가 45,070원 |
| 제주 겨우살이 차 | 효월 |  | 제주산 참나무 기생 겨우살이 원료 함유 중량 140g, 소비자가 70,000원 |
| 플로라 디스 미슬토 허브티 | SALUS-H AUS |  | 미슬토(겨우살이) 정제원료 100% 함유 침출차로서 하루 3회 티백 1개를 5-10분간 우려내어 음용 |

㉔ 생식, 파우더/과립 류

| 제품명 | 업체명 | 제품 사진 | 특징 및 성분 |
|---------------|-----------|---|--|
| 한농마을 365골드 | 한농마을 |  | 유기농재료사용 자연산 미슬토(겨우살이)0.5%함유 물 200ml에 파우치40g 한봉지 혼합하여 섭취 40g*31포, 소비자가 88,000원 |
| 상기생 (겨우살이) 분말 | 초원 한방 플러스 |  | 겨우살이 100% 분말 건강죽, 차, 야쿠르트, 우유, 된장국, 비빔밥 등에 겨우살이 분말을 응용하여 섭취 중량 300g, 소비자가 11,000원 |
| 성광수 MST 과립 | 수신 오가피 |  | 장에서 흡수되는 먹는 미슬토 과립 1일 2~4회, 1회에 미슬토 한 봉지씩 씹지 말고 복용 오가피 분말 60%, 겨우살이분말 30%, 쥐눈이콩 분말 10% 등 원료 함유 3.5g*30포, 소비자가 200,000원 |

라 정제

| 제품명 | 업체명 | 제품 사진 | 특징 및 성분 |
|--------------------|-----------------------|--|--|
| 뉴트라자임 미슬 | (주)엔지 뱅크 |  | 마늘분말 23%, 솔잎추출물분말 19%, 겨우살이(국산)17%, 산사자분말 17%, 누에가루, 비타민C, 효소혼합물 등 함유 제품 350mg*90캡슐, 소비자가 55,000원 |
| NOBLIN KMW | MEDICOM PHARMA |  | 심혈관계에 도움을 주는 제품으로 독일에서 판매 마늘, 겨우살이, 산사자 등 원료 함유제품 소비자가 11,000원 |
| Relax-Eze | DR CHRISTO PHER |  | 편안함, 안정감을 주며 효과적인 제품으로 미국에서 판매 승마뿌리, 호프플라워, 로벨리아허브, 쥐오줌풀 뿌리, 베토니허브, 겨우살이 잎 등 함유 소비자가 9,000원 |
| Cardiovasc ular | DHERBS |  | 적절한 심장박동 기능, 혈행, 콜레스테롤 수치 등 심장과 심혈관계 강화에 도움을 주는 제품 마늘, 고추, 산사나무베리, 겨우살이, 은행 잎, 산초나무 등 원료 함유 소비자가 23,000원 |

- 겨우살이를 함유하는 제품 조사 결과, 각각의 제품에 다양한 함량의 겨우살이 추출물이 주원료 또는 부원료로서 사용되어 일반식품으로 출시됨을 확인함.
- 항암, 근기능 개선, 혈행개선 등 다양한 겨우살이의 기능성에도 불구하고, 기능성을 효과적으로 나타내는 겨우살이의 원료 표준화 및 기준 규격이 설정되지 않아 소비자 측면에서 다양한 함량과 가격대의 제품을 접하게 되어 제품에 대한 신뢰도가 저하되는 단점을 가짐.
- 이에 건강기능식품으로서 겨우살이 원료의 표준화 및 기준 규격을 설정함으로써 소비자가 쉽고 효과적이고 합리적으로 제품을 선택 및 섭취할 수 있으며 더불어 겨우살이 제품 시장이 확대될 것으로 예상됨.

(나) 근기능 관련 자료 및 문헌 조사

① 근육의 생성 및 분해와 관련된 기전은 다음과 같음

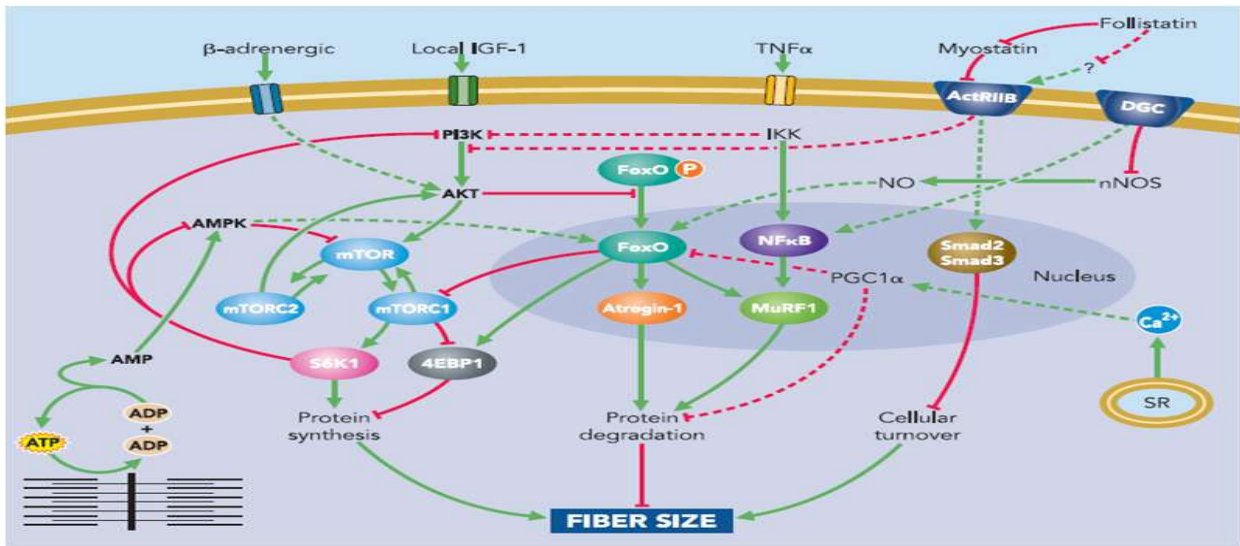


그림 54. 근육 생성 기전 모식도

Ref. Physiology (Bethesda) 23:160-70, 2008 [19]

위의 그림 54은 근 위축 및 비대에 대한 경로임. 근 기능과 관련된 기전은 크게 단백질 합성, 단백질 분해, 세포의 턴오버(cellular turnover)와 같이 3가지로 분류할 수 있는데, 이 기전에 의해서 근육 비대 혹은 근 위축 등과 같은 반응들이 나타남.

근 위축을 저해하고 근육의 활성을 증가시키기 위한 메커니즘을 보면, 근육을 반복해서 사용하게 되면 IGF-1을 자극하게 되고 이는 PI3K와 AKT kinases의 활성을 통해 근섬유 비대와 단백질 생성을 자극하게 됨 [19].

AKT는 atrogene 발현 및 단백질 분해를 저해하는 인산화된 FoxO의 핵막이동을 저해함 [7]. PGC-1a는 atrogene의 발현과 단백질 저하를 억제함으로써, FoxO3의 전사적인 활성을 저해함. 또한 PGC-1a는 미토콘드리아와 슬로우 트위치 머슬(slow twitch muscle : 약하지만 장기간 지구력 있는 힘을 낼 때 사용하는 근육섬유질)의 생성 증가를 유도함.

단백질 분해 증가 메커니즘은 염증 유발 사이토카인인 TNF-a에 노출되면 NF-kB를 활성화하게 되고, MuRF1을 증가를 촉진하여 단백질의 분해를 촉진시키게 됨.

- 근육 비대: 근섬유의 크기 증가 or 횡단면적의 증가→미토콘드리아와 세포막 질량의 증가와 섬유 내 근 미세섬유의 증가 결과) / 근육 증식: 근육 섬유수가 증가.
- 근 위축: 세포소기관, 세포질, 단백질의 손실에 의해서 세포 크기가 줄어드는 것 (원인을 영양부족이나, 노화, 비활동성 등으로 보고 있음).
- 근력강화: 주어진 근력속도에 대해 근수축이 이루어지는 동안 적용될 수 있는 가장 큰 파워임.

(2) 겨우살이 추출물을 이용한 제형연구

(가) 겨우살이추출물을 첨가한 쌀국수 개발



① 개발 목적: 근기능 저하 개선 효과가 있는 겨우살이추출물을 쌀국수의 면 또는 스프에 적용하여 건강기능식품을 따로 섭취하지 않아도 간편하게 식사를 하면서 근기능 강화 기능성을 높일 수 있는 “겨우살이추출물을 첨가한 쌀국수”를 개발하고자 함.

② 면에서의 최적 겨우살이추출물 함량 선정

| | | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|--------------------|---------|------|------|------|------|
| 구 성 비 (%) | 쌀가루 | 45.0 | 45.0 | 45.0 | 45.0 |
| | 중력분 | 33.7 | 33.2 | 32.7 | 32.2 |
| | 전분 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| | 정제염 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| | 겨우살이추출물 | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 |

- 관능 평가 결과, 겨우살이추출물 함량이 높을수록 색상이 어두워지고, 면대 형성이 잘 되지 않으며, 툭툭 끊기는 듯한 식감이 형성됨.
- 겨우살이추출물 함량이 1.5%를 초과하는 경우, 면대가 끊기고 식감이 좋지 않음
- 이에, 겨우살이추출물 1.5%를 최대 함량으로 설정하고, 식감 개선을 위한 실험을 추가함

③ 겨우살이추출물이 들어간 쌀면 개발

| | | 시료1 | 시료2 | 시료3 |
|--------------------|----------------------|---|--|---|
| 구 성 비 (%) | 쌀가루 | 45.5 | 44.5 | 45.0 |
| | 중력분 | 32.0 | 32.0 | 32.0 |
| | 소맥전분 | 10.0 | 8.0 | 8.0 |
| | 변성전분 | 10.0 | 12.0 | 12.0 |
| | 정제염 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| | 겨우살이추출물 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| | L-카르니틴 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| | ISP | | 1.0 | 0.5 |
| | 뜨거운물 5분 후 면 상태 |  |  |  |

- 골격근을 구성하는 L-카르니틴을 첨가하여 근기능 저하 개선의 효과를 더욱 증진시킴
- 소맥전분보다 변성전분의 함량이 약간 높은 배합의 경우가, 쫄깃한 식감을 구현함
- 골격형성에 도움을 주는 단백질이 90%함유된 분리대두단백분말(ISP)을 첨가하여 근기능 개선의 효과도 더욱 증진시키고, 글루텐형성을 통한 단단한 식감을 부여하여 퍼지는 현상을 방지함
- 1% 이상 사용하는 경우, 단단한 식감 때문에 툭툭 끊기는 듯한 식감이 구현되므로 사용량을 1% 미만으로 함

④ 겨우살이 쌀면 물성 측정

- Texture Analyzer를 이용하여 쌀면의 물성(Hardness, Adhesiveness, Tensilestrength) 측정
- Hardness, Adhesiveness 측정조건은 PastaFirmness/stickiness rig(HDP/PFS), pretestspeed 2.0mm/sec, testspeed 0.5mm/sec, posttestspeed 0.5mm/sec, time 2sec, distance 75%(% strain)로 하였음
- Tensilestrength 측정조건은 pretestspeed3.0mm/sec, testspeed 3.0mm/sec, posttestspeed 5.0mm/sec, distance100mm로 하였음

| 구분 | 시료 1 | 시료 2 | 시료 3 |
|--------------------|---------|--------|--------|
| Hardness(g) | 2,215 | 4,521 | 3,801 |
| Adhesiveness | -113.00 | -45.35 | -53.01 |
| Tensilestrength(g) | 10.06 | 16.22 | 18.07 |

- 시료1의 경우, ISP가 포함되지 않고 소맥전분과 변성전분의 함량이 동일한 배합으로 부드러우면서도 달라붙는 식감이 형성되었는데, 물성 측정에서도 Hardness와 Tensilestrength의 경우 낮게 측정되었으며, 부착성은 타시료 보다 높은 편임
- 시료2는 Hardness가 다소 높은 편으로, 이러한 물성이 툭툭 끊기는 듯한 식감을 형성시키는 것으로 보여짐
- 시료3의 경우, 시료1과 시료2의 중간정도의 Hardness와 약간 높은 Tensilestrength를 나타내며 쫄깃한 식감을 구현하는 것으로 보여짐

⑤ 겨우살이 쌀면 관능평가

- 평가대상 연구소 패널 21명 대상 비교 관능평가 진행
- 평가 결과표(5점 척도)

| 구분 | 시료 1 | 시료 2 | 시료 3 |
|----------|------|------|------|
| 외관 기호도 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| 식감 기호도 | 3.7 | 3.9 | 4.0 |
| 이미 이취 강도 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 전반적인 선호도 | 3.7 | 4.0 | 4.2 |

⑥ 스프에서의 최적 겨우살이추출물 함량 선정

| | | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|--------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| 구 성 비 (%) | 쌀국수 스프 (멸치맛) | 99 | 97 | 95 | 93 |
| | 겨우살이추출물 | 1 | 3 | 5 | 7 |

| | | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|--------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| 구 성 비 (%) | 쌀국수 스프 (해물맛) | 99 | 97 | 95 | 93 |
| | 겨우살이추출물 | 1 | 3 | 5 | 7 |

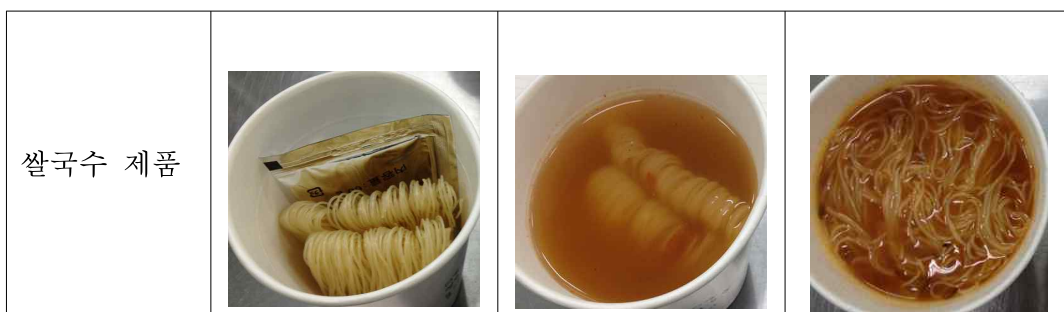
| | | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|--------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| 구 성 비 (%) | 쌀국수 스프 (매운맛) | 99 | 97 | 95 | 93 |
| | 겨우살이추출물 | 1 | 3 | 5 | 7 |

* 홈플러스 PB제품 쌀국수 스프 사용(스프 중량 12g)

- 관능 평가 결과, 겨우살이추출물 함량이 높을수록 색상이 어두워지고, 겨우살이 특유의 맛이 발현됨.
- 겨우살이추출물 함량이 5%를 초과하는 경우, 겨우살이 특유의 맛에 의해 쌀국수 본연의 맛(멸치맛, 해물맛 등)이 저하되고, 이미처럼 느껴지기도 함.
- 이에, 겨우살이추출물 5%를 최대 함량으로 설정하고, 겨우살이추출물 특유의 맛이 잘 마스킹 되는 매운맛 쌀국수 스프 개발을 진행함.

⑦ 겨우살이추출물이 들어간 쌀국수 스프 개발

| 원료명 | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 | 시료5 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 정제수 | 32.57 | 32.07 | 30.57 | 29.77 | 29.07 |
| 비프엑기스 | 20.00 | 18.00 | 17.00 | 16.00 | 16.00 |
| 매콤한 맛 베이스 | 20.00 | 18.00 | 17.00 | 16.00 | 16.00 |
| 정제염 | 7.30 | 7.30 | 7.30 | 7.30 | 7.30 |
| 고춧가루 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| 겨우살이추출물 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| 사골엑기스 | - | 4.50 | 4.50 | 4.50 | 4.50 |
| 다시마엑기스 | - | - | 3.50 | 3.50 | 3.50 |
| 맛 사랑 | 3.50 | 3.50 | 3.50 | 3.50 | 3.50 |
| 지미인헨서 | 2.80 | 2.80 | 2.80 | 2.80 | 2.80 |
| 쇠고기육수분말 | - | - | - | 2.80 | 2.80 |
| 건과 | 0.80 | 0.80 | 0.80 | 0.80 | 0.80 |
| 생강엑기스 | - | - | - | - | 0.70 |
| 청양고추분말 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.70 |
| 김 분태 | 0.60 | 0.60 | 0.60 | 0.60 | 0.60 |
| 마늘혼합양념 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| 올레오레진캡시컴 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| 폴리펜톡스 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| 소 계 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |



⑧ 겨우살이 쌀국수 관능 평가

- 앞서 실험한 면 시료3을 공통으로 사용, 스프 시료 5가지를 다르게 하여 평가진행
- 평가대상 연구소 패널 21명 대상 비교 관능평가 진행
- 평가 결과표(5점 척도)

| 구분 | 시료 1 | 시료 2 | 시료 3 | 시료 4 | 시료 5 |
|-----------|------|------|------|------|------|
| 외관 기호도 | 3.8 | 3.6 | 3.7 | 3.7 | 3.7 |
| 전반맛 기호도 | 3.0 | 3.2 | 3.5 | 3.7 | 3.8 |
| 매운맛 기호도 | 3.5 | 3.7 | 3.9 | 3.9 | 4.0 |
| 이미 이취 강도 | 2.0 | 2.0 | 1.5 | 1.3 | 1.0 |
| 전반 적인 선호도 | 3.1 | 3.2 | 3.6 | 3.7 | 3.9 |

⑨ 결론 및 향후 계획

- 겨우살이추출물을 1.5% 이내에서 사용하는 것이 면대 형성을 방해 하지 않으며, 좋은 식감을 구현할 수 있는 것으로 나타남.
- ISP를 첨가하지 않고, 소맥전분과 변성전분을 동일양 사용한 시료의 경우 질척거리고 달라붙는 식감이 다소 느껴진다는 의견들이 있음.
- ISP을 1% 미만으로 사용하여 약간의 단단함을 부여함으로써, 질척거리고 달라붙는 현상을 해소하며, 변성전분의 함량을 소맥전분의 함량보다 다소 높여 쫄깃한 식감을 구현하는 것으로 나타남.(시료3의 식감 및 전반 선호도가 가장 높음)
- 겨우살이추출물을 5% 미만으로 사용하는 것이 스프 자체의 관능을 방해 하지 않고, 매운맛의 스프가 겨우살이추출물 자체 특유의 관능을 부각시키지 않는 데 도움이 됨
- 사골엑기스를 첨가한 것이 풍미를 증가시키고, 묵직한 맛을 주어 선호도가 좋았음.
- 다시마엑기스를 첨가한 것이 깔끔한 맛을 부여하여 선호도가 좋았음.
- 생강엑기스를 첨가한 것이 이미, 이취(겨우살이추출물 자체의 맛 포함)를 마스킹하여 선호도가 가장 좋았음(스프 시료5의 전반 맛 및 전반 선호도가 가장 높음)
- 근기능 저하 개선 효과 여부 평가 진행(관능을 저해하지 않으면서 사용할 수 있는 겨우살이추출물 함량 한계치 : 약 2%- 전체중량 대비)
- 소비자 조사 진행을 통하여 근기능 저하 개선 기능성 쌀국수 제품의 시장 가능성 평가 진행
- 시장 평가 결과에 따른 출시 가능성 검토

(나) 겨우살이를 첨가한 건강지향캔디 개발

- ① 개발 목적: 건강지향캔디의 제품화를 통하여 겨우살이의 섭취를 용이하게 하고, 겨우살이 시장의 확대를 목적으로 함

| 구분 | 배합1 | 배합2 | 배합3 | 배합4 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 백설탕 | 350 | 350 | 350 | 350 |
| 말티톨시럽 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| 정제수 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 겨우살이 추출분말 | 3 | 10 | 20 | 50 |
| 정제수 | 5 | 5 | 5 | 5 |

② 겨우살이 캔디 배합표

- 모든 시료에서 겨우살이 특유의 맛과 향은 느낄 수 없음
- 겨우살이의 함량이 높아지면 캔디의 색에서 겨우살이의 색이 발현이 됨
- 겨우살이 추출분말이 50이상에서는 겨우살이 분말이 눈에 보임
- 연구소 내부 관능평가 결과 겨우살이 추출분말의 농도 10 이하가 외관이 적절하다고 판단

③ 색소 및 향 배합

| | | |
|------|---------------------|------|
| 시료 1 | 식용색소 청색 1호 | |
| | Passionfruit flavor | 0.02 |
| | Mixfruit flavor | 0.02 |
| 시료 2 | 식용색소 청색 1호 | |
| | Passionfruit flavor | 0.01 |
| 시료 3 | 식용색소 청색 1호 | |
| | Citrus Mix flavor | 0.04 |

- 겨우살이의 생리활성 성분이 근기능 향상이라는 점을 고려할 때, 청색이 적절하다고 판단
- 연구소 내부 관능평가 결과 청색과 가장 어울리는 향은 Citrus mix flavor로 판단
- 시료 3의 배합을 이용하여 배합 1과 배합 2에 적용토록 함

④ 겨우살이 캔디의 제조

| 구분 | 캔디1 | 캔디2 |
|-------------------|------|------|
| 백설탕 | 350 | 350 |
| 말티톨시럽 | 250 | 250 |
| 정제수 | 100 | 100 |
| 겨우살이 추출분말 | 3 | 10 |
| 정제수 | 5 | 5 |
| 식용색소 청색 1호 | | |
| Citrus Mix flavor | 0.04 | 0.04 |



캔디 1



캔디 2

그림 55. 겨우살이 캔디 시제품

⑤ 겨우살이 캔디의 관능평가

- 평가대상 연구소 및 당사 임직원 20명 대상 비교 관능평가 진행
- 평가 결과표(5점 척도)

| 구분 | 캔디 1 | 캔디 2 |
|-------------|------|------|
| 컨셉 기호도 | 4.0 | 4.0 |
| 외관 기호도 | 3.3 | 2.5 |
| 단맛 기호도 | 2.3 | 2.0 |
| 이미 이취의 강도 | 2 | 2.7 |
| 전반적인 맛의 기호도 | 3.0 | 2.4 |

⑥ 결론

- 관능 평가결과 겨우살이 컨셉의 기호도가 높아 시장 가능성 확인
- 외관에 있어서는 불투명한 캔디 2보다는 투명한 캔디 1을 더 선호하는 것으로 나타남
- 캔디 1, 2와 같이 prototype의 제작에는 성공하였으나 전반적인 맛의 기호도를 더 높이기 위하여 개선이 필요함

(다) 겨우살이를 첨가한 과립제품 개발

- ① 개발 목적 : 겨우살이 과립의 제품화를 통하여 겨우살이의 섭취를 용이하게 하고, 겨우살이 시장의 확대를 목적으로 함
- ② 국내 유통되는 근기능 향상 관련 분말제품 조사

| 구분 | A사 | B사 |
|-----------|--|----------------------------------|
| 분말의 상태 | 과립 | 일반파우더 |
| 주요 기능성 성분 | BCAA (Branched Chain Amino Acid) | L-아르기닌 |
| 효능 | 근육의 성장 및 회복 보조 | 일산화질소 생성, 혈액순환개선 |
| 관능특성 | 용해성이 높아 외관이 좋다. 레몬맛이 상큼하지만, 뒷맛이 쓰다. | 분말이 뭉쳐져서 잘 녹지 않는다. 레몬맛이 상큼하다. |

- A사 제품은 용해도가 높은 장점은 있으나, 쓴맛 때문에 맛 선호도는 낮았음
- B사 제품은 맛 선호도는 좋았으나, 분말이 뭉쳐서 녹지 않는다.
- 이에, 과립을 하여 A사 제품의 용해성을 목표 품질로 하여, 맛 선호도를 높일 수 있는 최적 배합 선정

③ 겨우살이 과립의 배합표

| 구분 | 배합 1 | 배합 2 | 배합 3 | 배합 4 | 배합 5 |
|-----------|------|------|------|------|------|
| 말토덱스트린 | 38.5 | 36.5 | 33.5 | 30.5 | 28.5 |
| 무수결정포도당 | 22.5 | 19.5 | 17.5 | 15.5 | 12.5 |
| 비타민 C | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| 무수구연산 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| 효소처리 스테비아 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 |
| 에리스리톨 | 10.3 | 10.3 | 10.3 | 10.3 | 10.3 |
| 아라비아검 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 복숭아과즙분말 | 9.5 | 9.5 | 9.5 | 9.5 | 9.5 |
| 복분자 과즙분말 | 7.0 | 7 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| 겨우살이 추출분말 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |

- 겨우살이 함량이 20이상인 배합 4, 5에서는 겨우살이의 맛이 복숭아과즙분말과 이질적으로 느껴짐.
- 겨우살이의 농도는 15 이하가 적절한 것으로 판단하고, 배합 1, 2, 3을 선정하여 과립을 진행

④ 과립조건 설정

| 구분 | 조건 1 | 조건 2 | 조건 3 | 조건 4 |
|----------|------|------|------|------|
| 결합액 분사시간 | 10분 | 20분 | 30분 | 40분 |
| 온도 조건 | 50℃ | 50℃ | 50℃ | 50℃ |
| 시간 | 50분 | 50분 | 50분 | 50분 |

* 결합액: 정제수와 백설탕을 1.43 : 3.57의 비율로 섞어 용해하여 제조

- 조건 1, 2의 경우 결합액의 양이 부족하여 부분적으로는 과립이 형성되었으나 완벽하지 않음.
- 조건 3, 4의 경우 과립이 완전히 형성되어 용해도 및 외관이 좋음.
- 조건 3을 최적 조건으로 설정

| 구분 | 섞기 전 | 섞은 후 |
|------|---|---|
| 과립 전 |  |  |
| 과립 후 |  |  |

⑤ 겨우살이 과립제품의 관능평가

- 평가대상 연구소 및 당사 임직원 20명 대상 비교 관능평가 진행
- 평가 결과표(5점 척도)

| 구분 | 배합 1 | 배합 2 | 배합 3 |
|------------------|------|------|------|
| 컨셉 기호도 | 4.5 | 4.5 | 4.5 |
| 외관 기호도 | 4.0 | 3.8 | 3.5 |
| 단맛 강도 (5가 가장 강함) | 4.2 | 4.0 | 3.7 |
| 단맛의 기호도 | 3 | 3.2 | 4.0 |
| 이미 이취 강도 | 1 | 1 | 1 |
| 전반 적인 선호도 | 3.5 | 3.7 | 3.8 |

⑥ 결론

- 외관에 있어서 겨우살이의 함량이 높아지면 색이 짙은 색이 강해짐.
- 배합 1, 2는 단맛이 강하다고 판단
- 외관 및 관능특성을 고려 할 때, 배합 3이 최적의 배합으로 판단하여 prototype 제작



그림 56. 겨우살이 과립 시제품

(라) 겨우살이를 첨가한 건강지향음료 개발

① 개발 목적 : 겨우살이 적용 음료 제품화를 통해 겨우살이의 섭취를 용이하게 하고, 겨우살이 소재 시장의 확대를 목적으로 함. 남녀노소 누구나 즐길 수 있는 기호도 높은 음료 제품화함.

② 음료에서의 최적 겨우살이추출물 함량 선정

| 구분 | 배합1 | 배합2 | 배합3 | 배합4 | 배합5 | 배합6 |
|---------|-------|---------|------|-------|-------|-----------|
| 겨우살이 함량 | 0.1% | 0.25% | 0.5% | 1% | 2% | 3% |
| 용해 정도 | 양호 | 양호 | 양호 | 양호 | 양호 | 약간의 침전 가능 |
| 가열 실험 | 양호 | 양호 | 양호 | 양호 | 양호 | 양호 |
| 관능 | 거의 무미 | 약간 차 느낌 | 차 느낌 | 약간 쓴맛 | 다소 쓴맛 | 쓴맛 강함 |

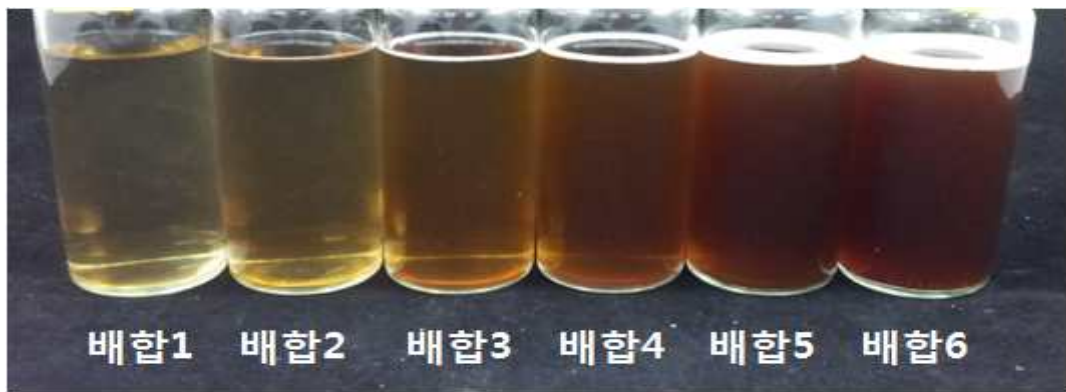


그림 57. 겨우살이 건강음료 배합비에 따른 샘플

- 용해도 실험: 2%까지 용해 양호하였으나 3% 첨가 시 침전 발생 가능성이 있었고, 색상이 너무 짙어져 한약과 같은 색이 나 외관의 기호도가 나쁨.
- 음료 제조 공정 과정의 가열에 대한 안정성 테스트를 실시한 결과 3%까지 양호
- 관능 0.1% 첨가 시 거의 무미에 가까웠고, 0.25% 첨가부터 차 느낌과 구수한 맛이 났으며, 1% 첨가 시부터 쓴맛이 강해지며 2% 첨가 시 쓴맛이 강해 2% 이상 첨가가 어려울 것으로 보임.
- 색상: 음료의 색차를 균질액 색차측정용 색차계(Spectrophotometer SA2000, Nippon Denshoku)를 이용하여 온도 35℃, 습도 75%의 가혹조건에서 0, 2주, 4주, 6주 저장하며 보관 기간에 따른 색차를 확인하였음
- 색도는 상기 색차계를 사용하여 Hunter 색차계의 L, a, b 값을 측정하여 나타냄. L은 명도, a는 적색도, b는 황색도를 나타내며, 구체적으로 L 값은 0(검정)~100(흰색), a 값은 -80(녹색)~100(적색), b 값은 -80(청색)~70(황색)을 나타냄.

| 구분 | 배합1 | 배합2 | 배합3 | 배합4 | 배합5 | 배합6 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 겨우살이 함량 | 0.1% | 0.25% | 0.5% | 1% | 2% | 3% |
| L (Lightness) | 95.05 | 91.75 | 82.21 | 70.02 | 48.88 | 32.42 |

| | | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| a (Redness) | -1.93 | -2.51 | -1.98 | 1.63 | 10.25 | 15.8 |
| b (Yellowness) | 11.23 | 17.47 | 32.79 | 45.78 | 53.87 | 47.63 |

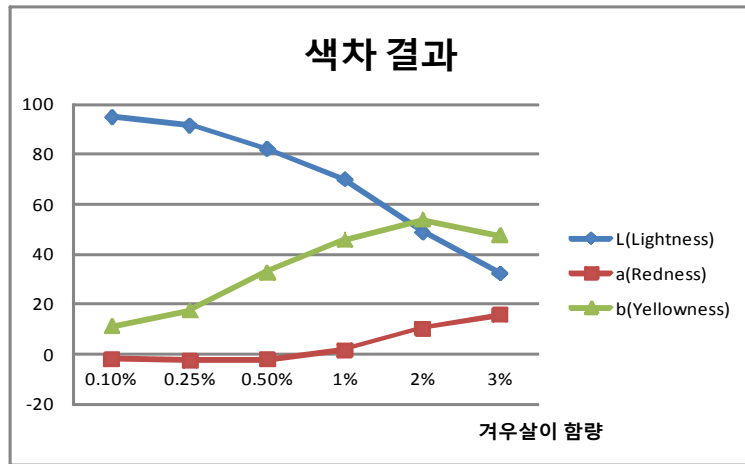


그림 58. 겨우살이 함량에 따른 색차 결과

- 겨우살이 추출물을 넣을수록 L값은 감소하여 명도가 진해지는 것으로 나타났고, b값은 상승하여 yellowness가 증가함. a값 역시 상승하여 붉은 색이 증가하다 3% 첨가 시 감소하는 경향을 보임
- 2%이상 첨가 시 색상이 너무 강해 외관 기호도가 좋지 않음

③ 겨우살이 음료 제품 개발

㉠ 청색의 겨우살이 음료

| | | |
|------|---------------------|------|
| 시료 1 | 식용색소 청색 1호 | 0.04 |
| | Passionfruit flavor | 0.02 |
| | Mixfruit flavor | 0.02 |
| 시료 2 | 식용색소 청색 1호 | 0.04 |
| | Passionfruit flavor | 0.01 |
| 시료 3 | 식용색소 청색 1호 | 0.04 |
| | Citrus Mix flavor | 0.04 |

- 겨우살이 기호도 높은 색상 및 향 검토
- 겨우살이의 근기능 향상 생리활성 성분을 착안해 이를 더 부각시킬 수 있는 색상이므로 청색이 적절 하다고 판단함.
- 연구소 내부 관능평가 결과 청색과 가장 어울리는 향은 Citrus mix flavor로 판단함.

- 시료 3의 배합을 이용하여 음료배합에 적용토록 함.

㉠ 겨우살이 음료의 제조

| 구분 | 음료1-1 | 음료1-2 | 음료1-3 |
|-------------------|------------|------------|----------|
| 겨우살이 추출분말 | 0.5 | 0.8 | 1 |
| 포도당 | 2 | 2 | 2 |
| 결정과당 | 1.75 | 1.75 | 1.75 |
| 함수구연산 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 정제염 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| 구연산나트륨 | 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| 염화칼륨 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 수크랄로스 | 0.008 | 0.008 | 0.008 |
| 아세실팜칼륨 | 0.003 | 0.003 | 0.003 |
| 염화마그네슘 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| 정제수 | 95.638 | 95.338 | 94.838 |
| 식용색소 청색 1호 | 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| Citrus Mix flavor | 0.04 | 0.04 | 0.04 |

겨우살이 추출분말의 함량을 달리하여 겨우살이 음료 제조함.



음료 1-1

음료1-2
그림 59. 겨우살이 함량에 따른 음료 조합

음료1-3

㉠ 겨우살이 음료의 관능평가

- 평가대상 연구소 및 당사 임직원 20명 대상 비교 관능평가 진행
- 평가 결과표(5점 척도)

| 구분 | 음료1-1 | 음료1-2 | 음료1-3 |
|-------------|-------|-------|-------|
| 컨셉 기호도 | 3.8 | 4.4 | 4.7 |
| 외관 기호도 | 3.6 | 3.7 | 3.7 |
| 단맛 기호도 | 3.8 | 3.8 | 3.8 |
| 이미 이취의 강도 | 3.8 | 3.6 | 3.5 |
| 전반적인 맛의 기호도 | 3.9 | 3.8 | 3.6 |

④ 결론

- 관능 평가 결과 겨우살이 컨셉의 기호도가 높아 시장 가능성 확인
- 겨우살이를 0.5% 첨가하여 실험한 결과, 관능 특성이 가장 우수한 것으로 나타남
- 소비자 조사 진행을 통하여 겨우살이 함량에 따라, 색상 및 관능평가 통한 겨우살이 적용 제품 시장 가능성 평가 진행
- 시장 평가 결과에 따른 출시 가능성 검토

(마) 겨우살이 차 컨셉의 음료 개발

- 앞서 개발한 청색 음료의 경우 근기능의 컨셉이 부각되어 여성 및 노인, 어린이 등 더 많은 소비자에게 부각되지 않을 것으로 사료됨
- 남녀노소 누구나 편하게 즐길 수 있는 음료 형태 개발 필요성 논의
- 차와 과일의 향이 나는 산뜻한 타입의 음료 개발 검토

① 겨우살이 차 컨셉 부합하는 부원료 및 향 검토

| | | |
|------|-------|------|
| 시료 1 | 캐모마일 | 0.05 |
| | 허브향 | 0.04 |
| 시료 2 | 캐모마일 | 0.05 |
| | 과일향 | 0.04 |
| 시료 3 | 히비스커스 | 0.05 |
| | 허브향 | 0.04 |
| 시료 4 | 히비스커스 | 0.05 |
| | 과일향 | 0.04 |
| 시료 5 | 로즈힙 | 0.05 |
| | 허브향 | 0.04 |
| 시료 6 | 로즈힙 | 0.05 |
| | 과일향 | 0.04 |

② 음료의 제조

허브 및 향을 달리하여 겨우살이 음료 제조

| 구분 | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 | 시료5 | 시료6 |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 정제수 | 96.637 | 96.637 | 96.637 | 96.637 | 96.637 | 96.637 |
| 과당 55 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| 하얀설탕 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 겨우살이추출물 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 리치주스농축액 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 함수구연산 | 0.168 | 0.168 | 0.168 | 0.168 | 0.168 | 0.168 |
| 캐모마일추출물분말 | 0.05 | 0.05 | | | | |
| 히비스커스추출물분말 | | | 0.05 | 0.05 | | |
| 로즈힙추출물분말 | | | | | 0.05 | 0.05 |
| 허브향 | 0.04 | | 0.04 | | 0.04 | |
| 과일향 | | 0.04 | | 0.04 | | 0.04 |
| 수크랄로스 DFF-1 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.005 |

③ 겨우살이 음료의 관능평가

- 평가대상 연구소 및 당사 임직원 20명 대상 비교 관능평가 진행
- 평가 결과표(5점 척도)

| 구분 | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 | 시료5 | 시료6 |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 컨셉 기호도 | 4.2 | 4.2 | 4.3 | 4.3 | 4.2 | 4.2 |
| 외관 기호도 | 3.8 | 3.8 | 3.8 | 3.7 | 3.8 | 3.8 |
| 단맛 기호도 | 3.4 | 3.5 | 3.6 | 3.7 | 3.5 | 3.5 |
| 목넘김 기호도 | 3.2 | 3.5 | 3.6 | 3.9 | 3.6 | 3.6 |
| 전반적인 맛 기호도 | 3.1 | 3.6 | 3.7 | 3.9 | 3.2 | 3.5 |

- 겨우살이와 히비스커스 혼합하여 사용 시 소비자의 기호도 가장 높은 것으로 나타남
- 허브향보다 산뜻한 과일 향이 목 넘김 및 어울림이 좋아 선호하는 것으로 나타남
- 차와 과일의 향이 나는 산뜻한 타입의 음료 개발 검토

④ 히비스커스 첨가 겨우살이 음료 개발

겨우살이 추출분말과 히비스커스를 첨가하여 음료 개발

| 구분 | 음료2-1 | 음료2-2 | 음료2-3 |
|-------------|--------|--------|--------|
| 정제수 | 96.017 | 96.487 | 96.667 |
| 과당 55 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| 하얀설탕 | 1 | 1 | 1 |
| 겨우살이추출물 | 1 | 0.5 | 0.3 |
| 리치주스농축액 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 함수구연산 | 0.168 | 0.168 | 0.168 |
| 펙틴 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 히비스커스추출물분말 | 0.02 | 0.05 | 0.07 |
| 리치향 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| 라임향 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 수크랄로스 DFF-1 | 0.005 | 0.005 | 0.005 |



그림 60. 히비스커스 첨가 겨우살이 음료 샘플

⑤ 겨우살이 음료의 관능평가

- 평가대상 연구소 및 당사 임직원 20명 대상 비교 관능평가 진행
- 평가 결과표 (5점 척도)

| 구분 | 음료2-1 | 음료2-2 | 음료2-3 |
|-------------|-------|-------|-------|
| 컨셉 기호도 | 4.4 | 4.2 | 3.9 |
| 외관 기호도 | 3.5 | 3.8 | 3.9 |
| 단맛 기호도 | 3.7 | 3.6 | 3.6 |
| 목넘김 기호도 | 3.8 | 3.9 | 3.9 |
| 전반적인 맛의 기호도 | 3.8 | 4.1 | 3.9 |

⑥ 결론

- 소비자 조사 진행을 통하여 겨우살이 함량에 따라, 색상 및 관능평가 통한 겨우살이 적용 제품 시장 가능성 평가 진행
- 관능 평가결과 겨우살이와 차 혼합 컨셉의 기호도가 높아 시장 가능성 확인함
- 외관의 경우, 겨우살이를 넣을수록 황색화 되고, 히비스커스추출물을 넣을수록 붉은 색이 증가하여 겨우살이를 적게 넣고 히비스커스를 많이 넣을수록 외관 기호도 높아짐
- 겨우살이를 0.1% 0.05% 및 히비스커스추출물을 0.05% 첨가하여 실험한 결과, 관능 특성이 가장 우수한 것으로 나타남
- 겨우살이의 기능성과 차 컨셉이 잘 어울리며 마시기에 부담이 없어 만족감이 높은 것으로 나타남
- 시장 평가 결과에 따른 출시 가능성 검토

(바) 겨우살이추출물 건강기능식품 정제 제형 개발

- ① 개발 목적: 근기능 저하 개선 효과가 있는 겨우살이추출물을 건강기능식품 정제 제형 제품으로 개발함으로써, 근력 증진 및 근육 감소/손실을 예방하는데 도움을 주는 건강기능식품을 개발하고자함.

건강기능식품은 제품의 형태, 섭취량 및 섭취 방법, 영양 기능정보 및 표시 성분의 함량을 제품에 표시하고, 식약처의 허가를 받아서 판매되기 때문에 소비자들이 제품에 대한 정확한 정보를 얻을 수 있고, 믿고 섭취할 수 있는 특징이 있음.

② 정제 제품의 기준 규격 설정

- 겨우살이 추출물을 개별인정형 기능성 원료로 1일 1,000mg 또는 1,500mg 섭취하는 경우를 가정함.
- 삼키는 정제 제형의 경우 타원형(또는 장방형)이 섭취가 용이하며, 정제의 크기가 작을수록, 섭취 정수가 적을수록 섭취가 용이한 점 고려하여 정제 크기, 섭취량 및 섭취 방법 결정함.
- 겨우살이의 기능성을 근력 및 근육 손실 방지로 가정하고, 보완적인 영양 보충 성분으로 비타민 B군(단백질 합성 및 대사 관련)과 아연을 추가함.
- 근육 합성에 필요한 아미노산을 프리믹스 형태로 추가함.

표 7. 정제 제품 주요 컨셉

| | | 1안 | 2안 | 3안 |
|-----------------|---------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 겨우살이 추출물 1일 섭취량 | | 1,000mg | 1,000 mg | 1,500 mg |
| 제품의 형태 | | 600mg 타원형 정제 | 500mg 타원형 정제 | 500mg 타원형 정제 |
| 섭취량 및 섭취방법 | | 1일 3정 1일 3회, 1회 1정 | 1일 4정, 1일 2회, 1회 2정 | 1일 6정, 1일 3회, 1회 2정 |
| 표시 성분 함량 | 겨우살이추출물 | 1,000 mg | 1,000 mg | 1,000 mg |
| | 비타민 B1 | 2.0mg (200%) | 2.0mg (200%) | 2.0mg (200%) |
| | 비타민 B2 | 2.4mg (200%) | 2.4mg (200%) | 2.4mg (200%) |
| | 나이아신 | 26 mg (200%) | 26 mg (200%) | 26mg (200%) |
| | 판토텐산칼슘 | 10 mg (200%) | 10 mg (200%) | 10mg (200%) |
| | 비타민 B6 | 3 mg (200%) | 3 mg (200%) | 3mg (200%) |
| | 엽산 | 250ug (100%) | 250ug (100%) | 250ug (100%) |
| | 비오틴 | 60ug (200%) | 60ug (200%) | 60ug (200%) |
| | 비타민 B12 | 2ug (200%) | 2ug (200%) | 2ug (200%) |
| | 아연 | 12mg (100%) | 12mg (100%) | 12mg (100%) |

③ 정제 제품 배합비 개발

- 겨우살이 추출물, 비타민, 아미노산 등을 정제 제형화 시 수분이 들어가는 일반적인 습식과립법(Wet Granulation)으로 하면 성분의 안정성이 떨어질 수 있으므로, 수분이나 주정 등을 전혀 사용하지 않고, 각 원료 등을 단순 혼합하여 타정하는 직타법 (Direct Compression)에 의한 정제타정 배합비를 개발함
- 정제 타정 적합성을 보기 위하여, 타정 시의 캡핑 여부, 정제의 Hardness 및 마손도를 측정하여 타정에 문제가 없는 배합비 개발을 완료함

표 8. 개발 정제제형 배합비

(단위 : %)

| | | 1안 | 2안 | 3안 |
|--------------------|-----------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 겨우살이 추출물 | | 1,000mg | 1,000 mg | 1,500 mg |
| 제품의 형태 | | 600mg 타원형 정제 | 500mg 타원형 정제 | 500mg 타원형 정제 |
| 섭취량 및 섭취방법 | | 1일 3정 1일 3회, 1회 1정 | 1일 4정, 1일 2회, 1회 2정 | 1일 6정, 1일 3회, 1회 2정 |
| 배 합 비 (%) | 겨우살이추출물 | 55.6000 | 50.0000 | 50.0000 |
| | 비타민 B1질산염 | 0.1524 | 0.1372 | 0.0914 |
| | 비타민 B2 | 0.1481 | 0.1333 | 0.0889 |
| | 나이아신 | 1.6049 | 1.4444 | 0.9630 |
| | 판토텐산칼슘 | 0.6710 | 0.6039 | 0.4026 |
| | 비타민 B6염산염 | 0.2258 | 0.2033 | 0.1355 |
| | 엽산 | 0.0174 | 0.0156 | 0.0104 |
| | 비오틴 | 0.0037 | 0.0033 | 0.0022 |
| | 비타민 B12 | 0.1235 | 0.1111 | 0.0741 |
| | 산화아연 | 0.9260 | 0.8340 | 0.5560 |
| | 솔비톨 | 15.0000 | 18.0000 | 20.0000 |
| | 결정셀룰로오스 | 12.9072 | 17.0139 | 19.5059 |
| | 아미노산 믹스 | 11.1200 | 10.0000 | 6.6700 |
| | 스테아린산마그네슘 | 1.5000 | 1.5000 | 1.5000 |
| 합계 | | 100.0000 | 100.0000 | 100.0000 |

- 아미노산 믹스는 페닐알라닌 13.12%, 로이신 13.12%, 메티오닌 12.6%, 라이신 염산염 1.55%, 팔라티노스 12.28%, 이소로이신 9.45%, 발린 9.45%, 히스티딘, 9.45%, 트레오닌 6.83%, 트립토판 3.15%의 배합비로 혼합한 아미노산으로, 1일 200mg 섭취를 기준으로 배합함.

④ 정제 제형 타정 물성 검사

- 경도계 및 마손도 측정기를 이용하여 정제의 경도 및 마손도를 측정함.
- 경도값이 다른 3가지 샘플의 정제를 만들어 경도 및 마손도를 측정하므로써, 해당 배합비가 타정 적성이 나오는 지 평가하였으며, 제시된 배합비는 모두 적합하였음.
- 제품의 적정 경도는 8~15 kPa 바람직하기로는 10~12 kPa이 적합함.
- 마손도는 정제의 후속 작업 시에 파손되는 정도를 보는 것으로 그 값이 낮을수록 후속 공정(예, 탈분, 포장 공정)에서의 파손이 적음.
- 개발 배합비는 직타법에 의한 타정이 가능하고, 타정 물성이 적합함.

표 9. 1안 정제 타정 적합성







| | 샘플 A | 샘플 B | 샘플 C |
|-----------------------|---|--|---|
| 정제 경도 (Hardness, kPa) | 6.88 | 11.96 | 15.98 |
| 마손도 1차 (4분, 1회) | 1.25 % | 0.41 % | 0.39 % |
| 마손도 2차 (4분, 2회) | 1.98 % | 0.79 % | 0.77 % |
| 마손도 3차 (4분, 3회) | 2.77 % | 1.03 % | 1.06 % |
| 캡핑 현상 | 없음 | 없음 | 없음 |
| 종합 평가 | 경도 약한 편 | 타정 적합 | 경도 조금 강한 편 |
| 정제 사진 |  |  |  |

표 10. 2안 정제 타정 적합성

| | 샘플 D | 샘플 E | 샘플 F |
|-----------------------|---|--|---|
| 정제 경도 (Hardness, kPa) | 8.19 | 14.84 | 17.02 |
| 마손도 1차 (4분, 1회) | 0.45 % | 0.20 % | 0.22 % |
| 마손도 2차 (4분, 2회) | 0.78 % | 0.39 % | 0.43 % |
| 마손도 3차 (4분, 3회) | 0.98 % | 0.58 % | 0.60 % |
| 캡핑 현상 | 없음 | 없음 | 없음 |
| 종합 평가 | 타정 적합 | 타정 적합 | 경도 조금 강한 편 |
| 정제 사진 |  |  |  |

⑤ 결론

- 겨우살이 추출물을 개별인정형 기능소재로 하고, 비타민 B군, 아연, 아미노산 복합 등을 근육 손실 방지 영양 성분으로 한 건강기능식품 정제 제형 가능성 확인
- 습식 과립하지 않고, 각 원료 등을 직접 혼합하여 타정하는 직타법 배합비를 개발 완료함.

(사) 겨우살이 추출물 건강기능식품 앰플 제형 개발

① 개발 목적: 근 기능 저하 개선에 효과가 있는 겨우살이추출물을 50ml 앰플 제품에 적용하여 건강기능식품으로써 근 기능을 강화하고 근력 증강에 도움이 되는 차별화된 앰플 제형의 건강기능식품 제품을 개발 하고자 함.

② 건강기능식품으로써 겨우살이 앰플 배합

(총 부피: 50ml)

| | | 시료 1 | 시료 2 | 시료 3 | 시료 4 |
|---------------|----------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 겨우살이추출물(mg)/병 | | 200mg | 500mg | 1,000mg | 1,500mg |
| 섭취량 및 섭취방법 | | 1일 3회, 1회 1병 600mg/일 | 1일 2회, 1회 1병 1,000mg/일 | 1일 1회, 1회 1병 1,000mg/일 | 1일 1회, 1회 1병 1,500mg/일 |
| 배합비 (%) | 겨우살이추출물 | 0.40 | 1.00 | 2.00 | 3.00 |
| | 말티톨시럽 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| | 자일리톨 | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.00 |
| | 배농축액 | 3.60 | 3.60 | 3.60 | 3.60 |
| | 복숭아농축액 | 1.60 | 1.60 | 1.60 | 1.60 |
| | 타우린 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| | 리치농축액 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| | 구연산 | 0.23 | 0.23 | 0.23 | 0.23 |
| | 복합황금추출물 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| | 효소처리스테비아 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| | 사과산 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| | L-카르니틴 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 정제수 | 81.82 | 81.22 | 80.22 | 79.22 | |
| 합계 | | 100 | 100 | 100 | 100 |

- 겨우살이 앰플 당 겨우살이추출물 함량은 국내 문헌을 참고하여 선정 1g 추출물/day(겨우살이 원물 약 10g)를 기준규격으로 가정 함.

** 동의보감 : 상기생으로 생 30~40g을 차로 음용

임상 한방본초학: 9~15g

약효의 성분과 이용: 겨우살이를 하루 10~15g을 물에 달여 마심

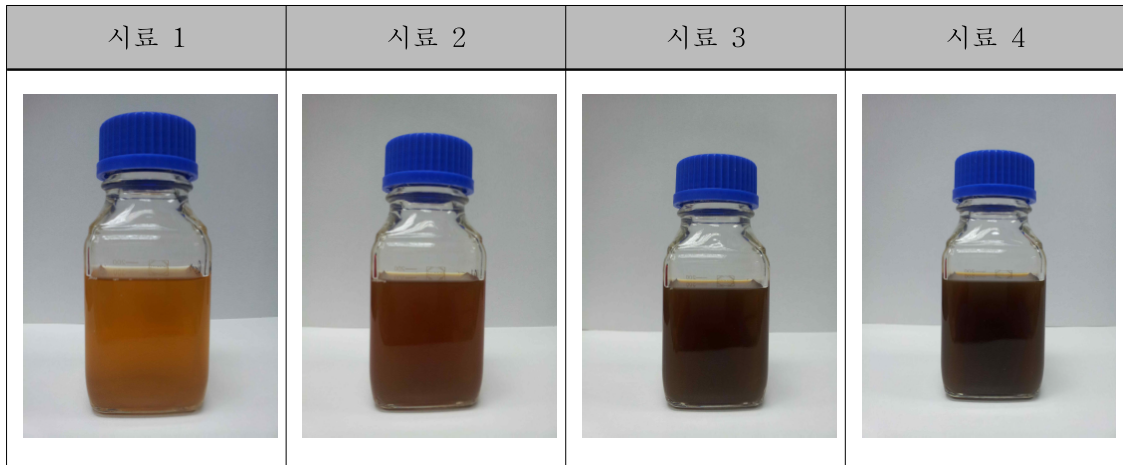


그림 61. 겨우살이 추출물 배합물 사진

③ 겨우살이 앰플 특성

<용해도>

| 용해도 | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|-----|-----|-----|--------|--------|
| | 양호 | 양호 | 침전 가능성 | 침전 가능성 |

- 겨우살이추출물 함량 200mg~500mg 까지는 용해도가 양호하나 1,000mg 이상부터 시간이 경과할수록 침전형성 가능성이 있음.
- 앰플 제품화 시 겨우살이추출물 함량에 따라 검류 등을 통한 분산의 안정화가 필요할 것으로 판단됨.

<pH>

| pH | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|----|------|------|------|------|
| | 3.07 | 3.20 | 3.39 | 3.52 |

- 겨우살이 함량이 증가 할수록 pH가 증가하는 경향을 보임.
- 4가지 시료 모두 pH 4.00 이하로 pH상으로 음료의 미생물적 안전성을 고려할 때 적당한 수준이라 판단됨.

<Brix>

| Brix | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|------|-------|-------|-------|-------|
| | 15.16 | 15.74 | 16.54 | 17.42 |

- 겨우살이추출물의 함량이 증가 할 수 록 Brix의 함량이 증가함

④ 겨우살이추출물 앰플 관능평가

- 평가대상은 연구소 패널 13명으로 관능평가 진행

| 구 분 | 시료 1 | 시료 2 | 시료 3 | 시료 4 |
|----------|------|------|------|------|
| 색상 기호도 | 3.85 | 4.23 | 3.68 | 2.69 |
| 향 기호도 | 3.69 | 3.85 | 3.38 | 2.85 |
| 맛 기호도 | 4.15 | 4.31 | 3.08 | 2.38 |
| 목넘김성 | 4.00 | 4.31 | 3.00 | 2.77 |
| 전반적인 선호도 | 4.00 | 4.46 | 3.08 | 2.62 |

- 평가 결과표(5점 척도)

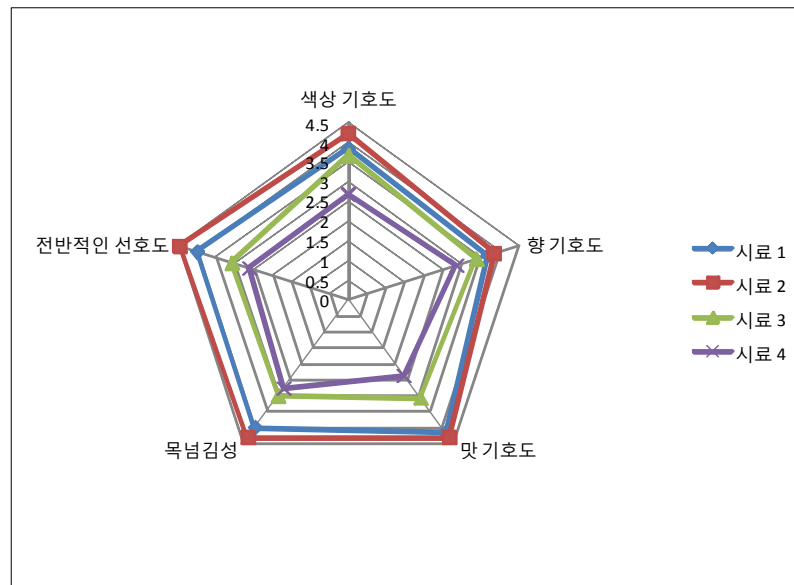


그림 62. 겨우살이 앰플 시료별 색상기호도



그림 63. 겨우살이 50mL 앰플

- 겨우살이추출물 함량에 따른 앰플 색상의 기호도는 시료 2인 500mg 정도가 적당함 500mg 함량 이상에서는 색상이 너무 짙어져 한약재와 같은 짙은 갈색을 띄어 기호도를 저해함.
- 향이나 맛의 경우 시료 1은 다소 묽었고, 시료 2는 약간의 차 느낌이 있어 기호도가 가장 높게 평가 됨. 시료 3, 4는 겨우살이추출물 특유의 향과 쓴맛으로 인해 기호도가 감소함.
- 목넘김성의 경우 역시 시료 2인 500mg의 겨우살이추출물 함량이 적당 하였고 1,000mg 함량 이상부터는 기호도가 급격히 감소함.
- 색상, 향, 맛, 목넘김성 등의 기호도와 전반적인 선호도를 고려했을 때 앰플 제형화에 있어서 겨우살이추출물의 함량은 500mg 정도가 적당하다 판단됨.

⑤ 겨우살이추출물 음료 컨셉 평가

- 평가대상은 연구소 패널 13명으로 컨셉 평가 진행
- 평가 결과표(5점 척도)

| 구 분 | 겨우살이추출물 앰플 |
|------------------------------|------------|
| 근기능 저하 방지/근력 강화에 도움이 될 것 같다 | 3.77 |
| 믿을 수 있는 좋은 성분/ 원료를 사용 할 것 같다 | 4.69 |
| 합성착향료 무첨가 제품이라 마음에 든다 | 4.46 |
| 건강에 좋을 것 같다 | 4.31 |
| 먹기 간편할 것 같다 | 4.46 |
| 기존 제품 대비 차별화된 제품이다 | 4.23 |
| 나에게 필요한 제품이다 | 4.23 |

- 컨셉 평가 결과 대부분의 항목에 있어서 소비자 평가가 4.0 이상으로 겨우살이추출물을 이용한 앰플 제형 음료의 시장 가능성을 확인함

(아) 겨우살이추출물 건강기능식품 스틱 젤리 제형 개발

① 개발 목적: 겨우살이추출물을 이용하여 차별화된 스틱 젤리 제형을 개발함으로써, 겨우살이의 섭취를 보다 용이하게 하고 소비의 대상층을 넓혀 겨우살이 시장을 확대하고자 함.

② 건강기능식품으로써 겨우살이 스틱 젤리 배합

(총 중량 : 15g)

| 배합비(%) | | 시료 1 | 시료 2 | 시료 3 | 시료 4 |
|----------------|----------|---------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| 겨우살이추출물(mg) /포 | | 100 | 300 | 500 | 1,000 |
| 섭취량 및 섭취방법 | | 섭취량 설정 어려움 | 1일 3회, 1회 1~2포 | 1일 2회, 1회 1포 | 1일 1회, 1회 1포 |
| 배합비 (%) | 겨우살이추출물 | 0.66 | 1.98 | 3.30 | 6.60 |
| | 유기농아가베시럽 | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.00 |
| | 이소말토올리고당 | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.00 |
| | 결정과당 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| | 복숭아농축액 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| | 시클로덱스트린 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| | 레몬 농축액 | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.00 |
| | 자일리톨 | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.00 |
| | 폴리글리시톨 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| | 복숭아과즙분말 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| | 잔탄검 | 0.60 | 0.60 | 0.60 | 0.60 |
| | 로커스트빈검 | 0.60 | 0.60 | 0.60 | 0.60 |
| | 카라기난 | 0.60 | 0.60 | 0.60 | 0.60 |
| | 구연산 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| | 복합황금추출물 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| | 효소처리스테비아 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 정제수 | 53.99 | 52.67 | 51.35 | 48.05 | |
| 합계 | | 100 | 100 | 100 | 100 |

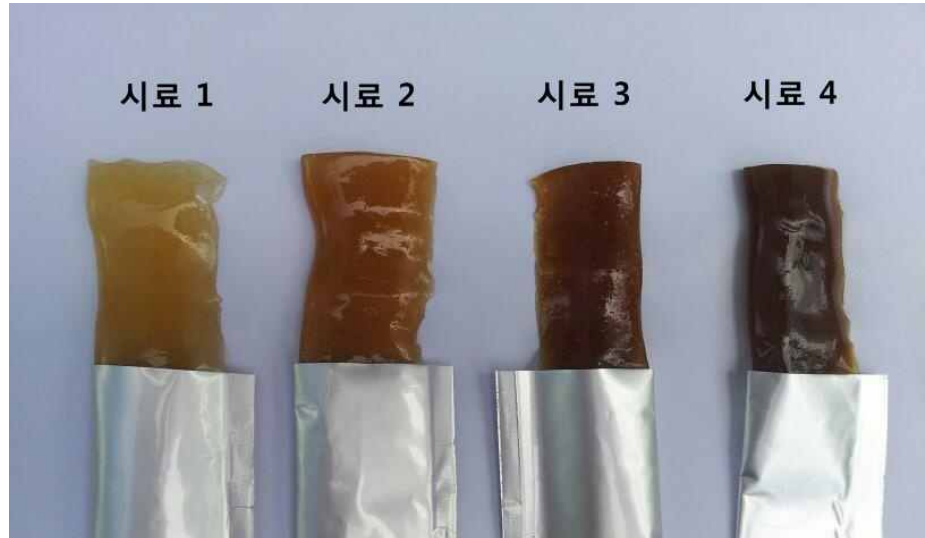


그림 64. 겨우살이 스틱젤리 사진

- 겨우살이 스틱 젤리 제품화에 있어서 겨우살이추출물의 함량은 색상, 맛, 관능 등을 고려했을 때 300mg 함량인 시료 2가 가장 적당함.
- 겨우살이추출물 함량 500mg 이상에서 색상이 매우 진해지고 쓴 맛이 나며 식감이 다소 단단함.

③ 겨우살이 스틱젤리 특성

<pH>

| pH | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|----|------|------|------|------|
| | 3.00 | 3.13 | 3.23 | 3.41 |

- 겨우살이추출물의 함량이 증가함에 따라 pH가 증가하는 경향을 보임.
- 스틱 젤리의 미생물적 안전성을 고려시 4가지 시료 모두 pH 4.0이하로 적당함

<조직감>

| 조직감 | 시료1 | 시료2 | 시료3 | 시료4 |
|-----|-----|-----|------|------|
| | +++ | +++ | ++++ | ++++ |

- 견고성은 (+++) : 적당함을 기준으로, (+) : 매우 약함, (+++++) : 매우 강함으로 표시함.
- 시료 1, 2 (겨우살이추출물 함량 100~300mg)의 경우 겔의 강도가 가장 적당하였고 시료 3, 4의 경우는 다소 겔의 강도가 강함.
- 스틱 젤리의 식감을 고려했을 시 겨우살이추출물 함량은 100~300mg 수준이 적당함.
- ** 이수 현상이 없는 젤리 제품화를 위해 겔의 배합을 잔탄검, 로커스트빈, 카라기난 3종을 각각 0.6% 수준으로 고정 하였을 때를 기준.

(3) 인체 적용시험 Protocol 작성 (2차년도 보고 참조)

(가) 현재 근위축 억제에 대한 개별인정 항목이 없음

- ① 식약처 모뎀토의 시, 총 5가지의 기능성을 제안함.
 - ㉠ 근육량 증가(muscle hypertrophy)에 도움을 줄 수 있습니다.
 - ㉡ 근력(muscle strength) 강화에 도움을 줄 수 있습니다.
 - ㉢ 노인성 근육 감소/손실(sarcopenia)을 예방하는데 도움을 줄 수 있습니다.
 - ㉣ 비활동성 근소실(disuse atrophy)을 예방하는데 도움을 줄 수 있습니다.
 - ㉤ 근 기능 저하 억제에 도움을 줍니다.

- ② 가능한 문구 선정함
 - ㉠ '노인성 근육 감소/손실(sarcopenia) 예방하는데 도움을 줄 수 있습니다.'
→ 보건 용도로 가장 적합할 것으로 보임
 - ㉡ '근력(muscle strength) 강화에 도움을 줄 수 있습니다.'
→ 기존에 받은 이력이 있으므로 기능성 문구 자체에는 문제가 없음

(나) 바이오마커 및 측정 항목 선정 (가안)

- ① 실험 방법: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled
- ② 대상자: 50~70세
- ③ 섭취 방법: supplement
- ④ 시험 기간: 12주 (총 4회 방문: screening, 0, 6, 12주)
- ⑤ IRB 승인
- ⑥ 통계: ANOVA, Duncun's multiple range test (SAS program)
- ⑦ 바이오마커
 - ㉠ 1차 기능성 평가 변수
: 체성분 분석- Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) [0, 12주]
 - ㉡ 2차 기능성 평가 변수
 - 근육 대사 지표: 크레아티닌(creatinine) [0, 6, 12주]
 - 근 기능 지표: 손 근력 측정(hand held dynamometer), 400m 걷기 [0, 6, 12주]
 - 염증지표: TNF-a, IL-6 [0, 6, 12주]
 - 유전자 발현(피험자 동의 시): muscle mTOR, p70s6k, atrogen, Murf-1 [0, 12주]
- ⑧ 안전성 평가 징후
 - ㉠ 자· 타각 증상 등 이상반응 모니터링
 - ㉡ 활력징후(혈압, 맥박), 신체 검진, 심전도
 - ㉢ 임상병리검사(일반혈액검사 및 뇨 검사)
- ⑨ 선정기준
 - ㉠ 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자
 - ㉡ 만 60세 이상으로 근 감소증을 가진 자
 - ㉢ 제 2형 당뇨, 신장 및 간기능에 정상인 자

⑩ 제외 기준

- ㉔ 첫번째 방문 전 4주 이내에 근육 대사에 영향을 미치는 의약품, 한약제나 건강 기능식품을 섭취한 경우
- ㉕ 첫번째 방문 전 6개월 이내에 임상시험에 참여한 자
- ㉖ 다음의 질환이 있는 경우:
 - 미세알부민뇨증
 - 당뇨병을 진단받았거나, 스크리닝 검사에서 공복혈당 126 mg/dL 이상일 경우
 - 간기능 장애(AST, ALT 정상 상한치의 2.5배 이상 상승)
 - 신기능 장애(Creatinine 정상수치 (1.2mg/dL) 초과)
 - 갑상선 기능 항진증 및 기능 저하증
 - 악성종양
- ㉗ 약물 또는 알코올 중독자
- ㉘ 연구자가 본 시험에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 기타 질환
- ㉙ 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자

(Ref. J Nutr Health Aging 13(8):724-8 [12], J Nutr Health Aging 13(8): 708-712 [13], J Nutr Health Aging 15(10): 834-846 [14], J Am Geriatr Soc 60(1):16-23 [15], Clin Interv Aging 7:225-34 [16], Am J Clin Nutr 93(2):402-12 [17])

(4) 인체적용시험용 시제품 제작 (2차년도 보고 참조)

건강기능식품 제조업체인 네추럴웨이에서 배합 설계 및 배합 실험

(5) 겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분의 인체 적용 시험(1단계, 2차년도 참조)

(가) 인체적용시험 CRO 업체 선정: 바이오푸드 CRO

(나) 인체적용시험을 위한 1차 유효성 평가 변수, 2차 유효성 평가 변수 등에 관해 협의 실시

(다) 인체적용시험 수행 연구 기관 탐색 (2차년도에 결정)

⇒ 동물실험이 1차년도 6월에 종료되어, 동물 실험 종료 후, 1일 섭취량 설정 및 인체적용시험을 실시함

나. 2차년도 (2013~2014)

(1) 겨우살이 소재의 사업기반 조성

(가) 지표물질 선정 및 분석방법

① 지표물질 선정

- ㉠ 겨우살이추출물분말의 지표물질로 Chlorogenic acid를 최종 선정함.
- ㉡ 1차년도에서 지표 물질 후보군으로 선정하였던 homoflavoyadorinin B는 상업적으로 표준물질을 구하기 어렵고, 추출물 분말 중 함유량이 낮아서 원료의 품질 표준화 지표물질로 삼기에 적합하지 않은 면이 있었음.
- ㉢ 여러 자료를 검색 중 식약처에서 2008년 발간한 "건강기능식품 개발자를 위한 기능성 원료 표준화 지침서"에서 Chlorogenic acid를 겨우살이 추출물의 지표물질로 추천한 사례가 있으며, 한국기능식품연구원에서 Chlogenic acid 분석법이 확립되어 공인 규격 검사가 가능한 것이 확인되어 별도의 분석법 개발이 필요치 않으며, 시그마 등을 통하여 상업적 표준물질의 구입도 용이한 장점 등이 있어, Chlorogenic acid를 지표물질 후보로서 검토함.
- ㉣ 자체 분석 및 한국기능식품연구원에 규격 검사를 의뢰하여 분석을 실시한 결과 추출분말 Lot 별로 Chlorogenic 함량이 일정하였으며, 분석의 재현성도 높고, 추출물 중 Chlorogenic acid 함량도 homoflavoyadorinin보다 높아 원료의 품질 표준화 및 기능성 원료의 지표물질로 Chlorogenic acid를 최종 선정함.

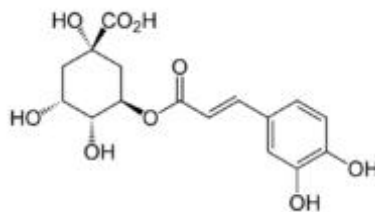


그림 65. Chlorogenic acid 구조도

IUPAC 명칭 : (1S,3R,4R,5R)-3-[[{(2Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) prop-2-enoyl]oxy}-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid

② 지표물질 분석 방법

- ㉠ Chlorogenic acid는 HPLC(Agilent Technologies, Agilent 1260 infinity, Singapore)를 이용하여 분석함. 분석법은 유럽 약전 아티초크 분석 항목의 Chlorogenic acid 분석법과 동일함.
- ㉡ 재료 및 시약
 - 겨우살이추출분말 : 확립된 생산공정에 따라 대호양행을 통해 생산한 원료 사용
 - Chlorogenic acid 표준물질 : HWI ANALYTIK GmbH(Germany), Product No : 0050-05-90, purity : 94.69%

㉔ HPLC 분석 표준 용액 및 시험용액 준비

- 표준용액 : Chlorogenic acid 약 3.5mg 칭량 후 50ml 메스플라스크에 넣고 30% 메탄올을 이용하여 용해 후, 적정 농도로 희석하여 사용
- 시험 용액 준비
 - * 시료 약 120mg를 100ml 메스 플라스크에 넣는다
 - * 30% 메탄올 30ml을 가하여 20분간 35℃에서 진탕 혼합한다
 - * 30% 메탄올로 부피를 100ml로 맞춘 후 10분간 초음파 처리
 - * 멤브레인 필터(0.45um hydrophilic PTEE)로 여과 후 검액으로 한다

㉕ HPLC 분석 조건

- 컬럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5um)
- 컬럼 온도 : 40℃
- 주입량 : 5 μ l
- 이동상 용매 A : Phosphoric acid : Water = 0.5 : 99.5(v/v)
이동상 용매 B : Phosphoric acid : Acetonitrile = 0.5 : 99.5(v/v)
- Gradient 조건 :

| Time(min) | % Solvent A | % Solvent B | Flow(ml/min) |
|-----------|-------------|-------------|--------------|
| 0 | 92 | 8 | 1.2 |
| 1 | 92 | 8 | 1.2 |
| 20 | 75 | 25 | 1.2 |
| 33 | 75 | 25 | 1.2 |
| 35 | 0 | 100 | 1.2 |
| 36 | 92 | 8 | 1.2 |
| 40 | 92 | 8 | 1.2 |

- 유속 : 1.2ml/min
- 검출기 : DAD detector (330nm)

㉖ 계산식

$$Chlorogenicacid(mg/g) = \frac{\text{시험용액농도}(ug/mL) \times \text{희석용량}(mL) \times \text{표준품 순도} \times \text{희석배수}}{\text{시료양}(g) \times 1000}$$

㉗ 표준물질 및 겨우살이추출분말 HPLC 데이터 비교

표준물질 및 겨우살이추출분말의 HPLC 분석 데이터에 Chlorogenic acid 피크를 화살표로 표시한 바와 같이, 이 분석 조건에서 다른 성분의 방해 없이 겨우살이추출분말에 함유되어 있는 지표성분 Chlorogenic acid를 분석 할 수 있었다.

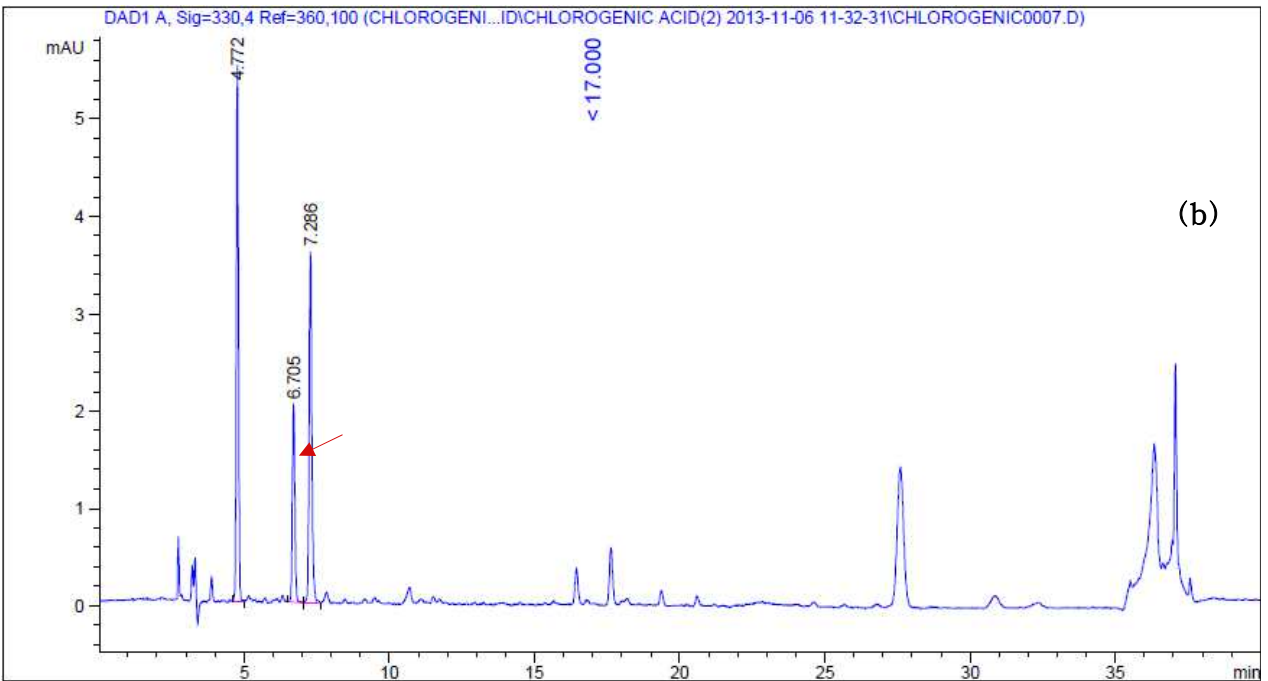
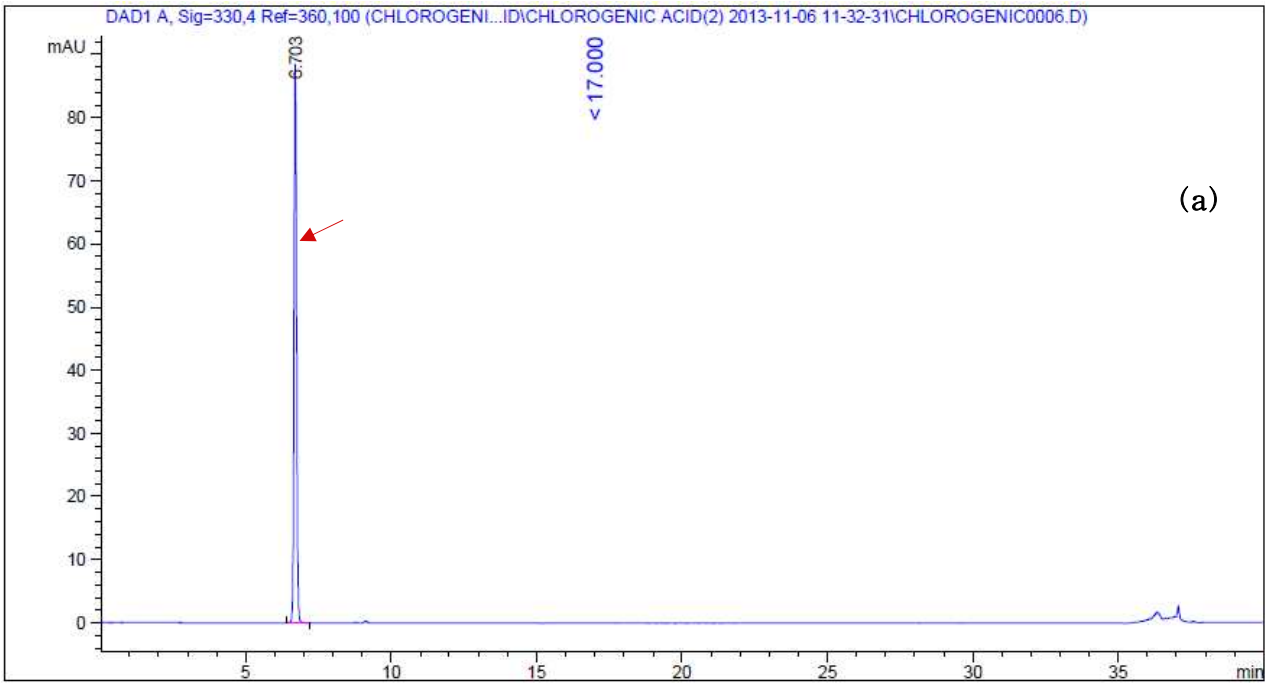


그림 66. HPLC 크로마토그래피에 의한 (a) Chlorogenic acid 표준용액 및 (b) 겨우살이 추출분말

㉔ 검량선 작성

지표성분을 30% 메탄올에 용해하여 약 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 조제하고 이를 stock solution으로 하였다. 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 약 1, 2, 4, 17, 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 총 5개의 구간을 설정하였으며 각 표준 용액은 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석하고, peak area와 농도간의 상관관계를 이용하여 검량선을 작성하였다 (그림 67). 그 결과 검량선의 상관계수(R^2)는 1의 직선성을 보였으며, LOD는 0.011 $\mu\text{g}/\text{ml}$, LOQ는 0.042 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 수준으로 나타났다. 이 때 분석기기의 LOD (limit of detection) 는 signal 대 noise의 비가 3 이상으로 설정하였으며, LOQ (limit of quantification) 는 signal 대 noise의 비가 10 이상일 때의 농도로 구하였다.

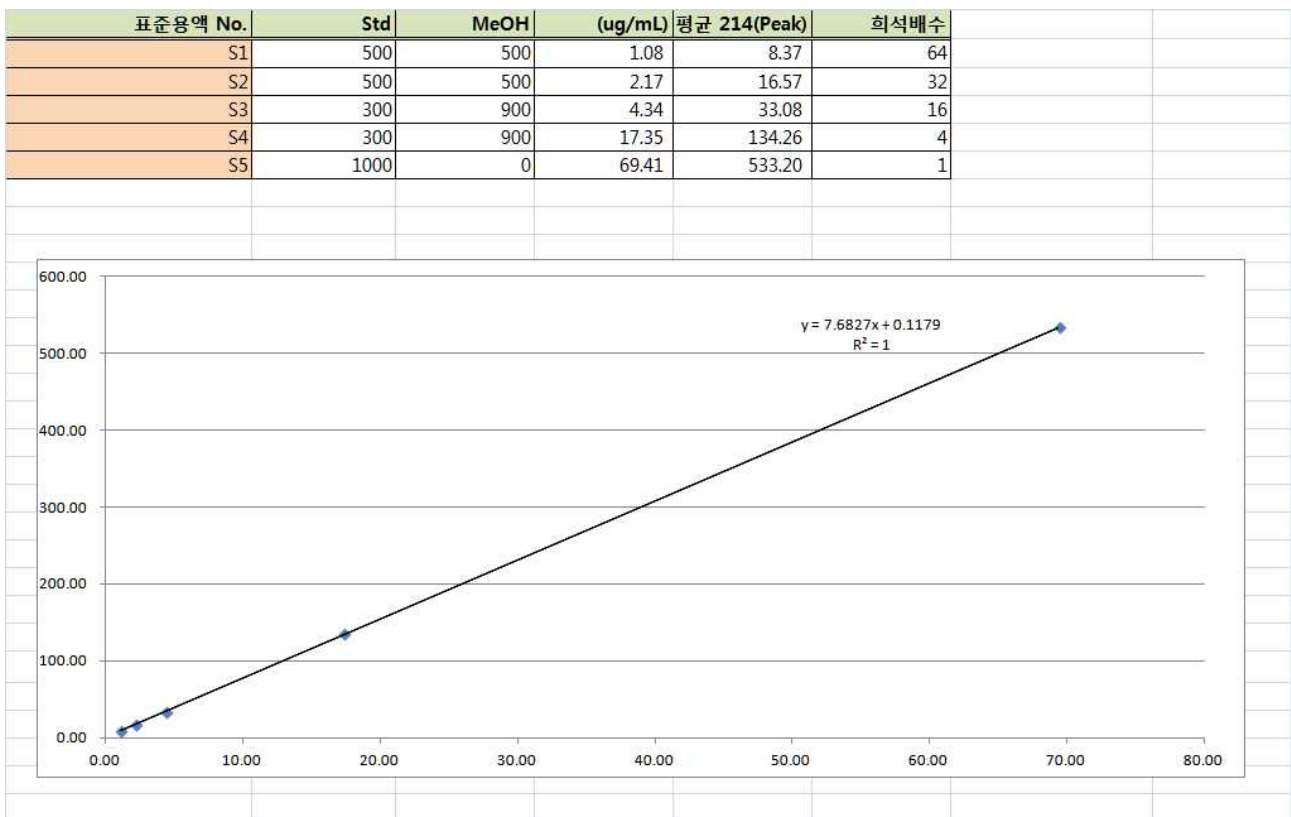


그림 67. Chlorogenic acid 검량선 그래프

③ 지표물질 Chlorogenic acid 분석 결과 및 규격 제안

이상의 분석 방법으로 생산 스케일로 제조된 겨우살이추출분말 중의 지표성분 Chlorogenic acid를 자체 및 공인기관을 통해 분석한 결과, 1.34 ~ 1.87 mg/g의 결과치를 보였으며, 이 결과들을 바탕으로 겨우살이추출분말의 Chlorogenic acid 규격은 1.2 ~ 2.0 mg/g으로 제안함.

| Lot No. | SMT130909 | SMT130910 | SMT130911 | SMT140226 |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Chlorogenic acid (mg/g) 공인기관 분석 결과 | 1.34 | 1.81 | 1.81 | 1.62 |
| Chlorogenic acid (mg/g) 자체 분석 결과 | 1.34 | 1.86 | 1.87 | 1.44 |

| 샘플명 | HPLC Area | 시료 농도 (ug/ml) | 희석 배수 | 시료 희석부피 (ml) | 시료채취량 (g) | Chlorogenic acid 함량 (ug/g) | 표준편차 |
|-------------|---------------|---------------|-------|--------------|-----------|----------------------------|-------|
| SMT130909-1 | 12.17 | 1.57 | 1 | 100 | 0.1201 | 1306.38 | 31.50 |
| SMT130909-2 | 12.09 | 1.64 | 1 | 100 | 0.1204 | 1360.40 | |
| SMT130909-3 | 12.09 | 1.64 | 1 | 100 | 0.1203 | 1361.45 | |
| 평균 | 12.12 | 1.61 | | | | 1342.74 | |
| 샘플명 | HPLC Area | 시료 농도 (ug/ml) | 희석 배수 | 시료 희석부피 (ml) | 시료채취량 (g) | Chlorogenic acid 함량 (ug/g) | 표준편차 |
| SMT130910-1 | 16.91 | 2.24 | 1 | 100 | 0.1204 | 1862.03 | 6.06 |
| SMT130910-2 | 16.84 | 2.23 | 1 | 100 | 0.1206 | 1851.52 | |
| SMT130910-3 | 16.91 | 2.24 | 1 | 100 | 0.1204 | 1862.00 | |
| 평균 | 16.89 | 2.24 | | | | 1858.52 | |
| 샘플명 | HPLC Area | 시료 농도 (ug/ml) | 희석 배수 | 시료 희석부피 (ml) | 시료채취량 (g) | Chlorogenic acid 함량 (ug/g) | 표준편차 |
| SMT130911-1 | 16.95 | 2.25 | 1 | 100 | 0.1203 | 1867.43 | 12.90 |
| SMT130911-2 | 16.89 | 2.24 | 1 | 100 | 0.1203 | 1860.98 | |
| SMT130911-3 | 17.10 | 2.26 | 1 | 100 | 0.1201 | 1885.84 | |
| 평균 | 16.98 | 2.25 | | | | 1871.42 | |
| 샘플명 | HPLC Area | 시료 농도 (ug/ml) | 희석 배수 | 시료 희석부피 (ml) | 시료채취량 (g) | Chlorogenic acid 함량 (ug/g) | 표준편차 |
| SMT140228-1 | 117.14 | 15.11 | 1 | 100 | 1.0640 | 1419.93 | 15.26 |
| SMT140228-2 | 117.22 | 15.12 | 1 | 100 | 1.0424 | 1450.43 | |
| SMT140228-3 | 117.37 | 15.14 | 1 | 100 | 1.0543 | 1435.84 | |
| 평균 | 117.24 | 15.12 | | | | 1435.40 | |

그림 68. Lot별 Chlorogenic acid 함량 측정 결과

제 D2013100655 호

검 사 성 적 서

| | | | | |
|--------|----------|-----------------------|-------------|-----|
| 검체명 | 겨우살이추출분말 | 제조일자 (유통기한) | 2013-09-11 | |
| 의뢰인 | 업체명 | 한동대학교산학협력단 | 성명 | 이재영 |
| | 주소 | 경북 포항시 북구 흥해읍 한동로 558 | | |
| 제조번호 | | 접수년월일 | 2013-10-16 | |
| 검사의뢰목적 | 제출용 | 검체접수번호 | D2013100655 | |

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

| 시험항목 | 결과 | 검사담당자 |
|------------------------|-----------------------|-------|
| chlorogenic acid(mg/g) | 1.81mg/g | 유재명 |
| 납(mg/kg) | 0.4135mg/kg | 홍영철 |
| 총비소(mg/kg) | 0.2185mg/kg | 홍영철 |
| 카드뮴(mg/kg) | 0.0311mg/kg | 홍영철 |
| 총수은(mg/kg) | 불검출 | 엄유리 |
| 대장균군 | 음성 | 허태영 |
| 열량(Kcal/100g) | 360.44Kcal/100g | 김수희 |
| 탄수화물(%) | 77.15%(식이섬유 0.19% 함유) | 김수희 |
| 조단백질(%) | 10.94% | 이경민 |
| 조지방(%) | 0.94% | 주은선 |
| 수분(%) | 5.45% | 이현아 |
| 회분(%) | 5.52% | 이현아 |
| 나트륨(mg/100g) | 60.20mg/100g | 이현아 |
| 식이섬유(%) | 0.19% | 이경민 |
| 비에치씨(mg/kg) | 불검출 | 이선미 |
| 디디티(mg/kg) | 불검출 | 이선미 |
| 알드린(mg/kg) | 불검출 | 이선미 |
| 디엘드린(mg/kg) | 불검출 | 이선미 |
| 엔드린(mg/kg) | 불검출 | 이선미 |

[chlorogenic acid]분석법-업체제공
[식이섬유]분석법-건강기능식품공전/3-26-1식이섬유(제1법)

2013 년 10 월 29 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

그림 69. 겨우살이 추출분말에 대한 한국기능식품연구원 검사성적서

(나) 대량 생산을 위한 원료 확보 방안 구축

① 겨우살이추출분말 생산 제조 공정 확립

겨우살이추출분말 대량 생산 제조 공정을 우수건강기능식품제조기준 GMP 업체인 (주)대호양행과 협력하여 아래와 같이 확립함.

| 공정명 | 공정 | 검사 항목 |
|---------|--|-----------------|
| 원료 투입 | 겨우살이 원료(200~300kg)를 추출탱크에 넣고 7배수의 정제수를 가한다. - 추출기: 스테인레스 재질, 2000리터 | - 원료 수분함량 12%이하 |
| 1차 추출 | 100℃에서 8시간 이상 추출 후 이송 - 저장탱크: 스테인레스 재질, 4000리터 | - 고형분(Brix) 측정 |
| 여과/이송 | 1um 카트리지 여과기로 추출액 여과 | - 고형분(Brix) 측정 |
| 2차 추출 | 4배의 정제수를 가하고 100℃에서 2차 추출하여 저장탱크로 이송한다. | |
| 여과/이송 | 1um 카트리지 여과기로 추출액 여과 | - 고형분(Brix) 측정 |
| 농축 | 여액을 25~30Brix로 저온 감압 농축 | - 고형분(Brix) 측정 |
| 혼합 및 살균 | 배합비율에 의하여 텍스트린을 혼합하고 65~80℃에서 30~40분간 살균 - 비율: 추출고형분 70%, 텍스트린30% - 혼합기: 스테인레스 재질, 500리터 | - 고형분(Brix) 측정 |
| 여과 | 100메쉬 스테인레스 여과망으로 이물을 제거한다 | |
| 분무 건조 | inlet temp 175℃, outlet temp 80℃ - 분무건조기: 스테인레스재질 - 증발량: 80kg/Hr | |
| 검사 및 포장 | 수분함량, 이물 등을 검사하고 포장 | -제품 규격 검사 |

그림 70. 겨우살이 추출분말 생산제조공정 모식도

② 3 Lot 겨우살이추출분말 제품 생산 및 규격 항목 분석

겨우살이 원료 약 100kg을 투입하여 설정된 제조 공정으로 겨우살이 추출분말 3 Lot 제품 생산을 실시하여, 생산 공정을 검증하여 확립하고, 생산된 제품의 규격검사를 공인 기관인 한국기능식품연구원을 통하여 분석함.

㉞ 공정 수율 및 회수율 예 : Lot No. SMT130910

| 공정명 | 중량 | 함량 | 비고 |
|-----------|--------------|-----------------|--------|
| 겨우살이 원료 | 100kg | - | 100% |
| 1차 추출 여과액 | 정제수 700kg 추출 | 5 brix | |
| 2차 추출 여과액 | 정제수 400kg 추출 | 1 brix | |
| 농축액 | 107kg | 29 brix | 31.03% |
| 텍스트린 투입량 | 13.3kg | 농축고형분의 30/70 투입 | |
| 배합액 살균 후 | 120.3kg | 36 brix | 44.33% |
| 분무건조 | 39.5 kg | 수분함량 9.3% | 39.5% |

㉞ 지표물질 Chlorogenic acid 분석 결과 및 규격 제안

지표물질인 Chlorogenic acid의 함량은 1.44 ~ 1.87 mg/g의 분석 결과치를 보였으며, 이 결과들을 바탕으로 겨우살이추출분말의 Chlorogenic acid 규격은 1.2 ~ 2.0 mg/g으로 제안함.

| Lot No. | SMT130910 | SMT130911 | SMT140226 |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Chlorogenic acid (mg/g) 공인기관 분석 결과 | 1.81 | 1.81 | 1.62 |
| Chlorogenic acid (mg/g) 자체 분석 결과 | 1.86 | 1.87 | 1.44 |

㉞ 중금속, 대장균균, 잔류농약 등의 시험 항목 분석 결과

- 중금속은 납, 총비소, 카드뮴, 총수은 등을 시험 분석 하였으며, 분석 결과치와 고시형 건강기능식품 기능성 원료인 바나바잎 추출물, 밀크씨슬추출물, 달맞이꽃 추출물 등의 규격을 참고하여 동일 규격인 납과 총비소는 1.0 mg/kg 이하를 카드뮴과 총수은은 0.5 mg/kg 이하를 규격으로 제안함.
- 대장균균은 음성 규격을 제안하며, 잔류농약 규격은 별도로 두지 않는 것을 제안함.

| 시험항목 \ Lot No. | SMT130910 | SMT130911 | SMT140226 | 비고 (규격 제안) |
|----------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 납(mg/kg) | 0.3987 | 0.4135 | - | 1.0 이하 |
| 총비소(mg/kg) | 0.1985 | 0.2185 | - | 1.0 이하 |
| 카드뮴(mg/kg) | 0.0288 | 0.0311 | - | 0.5 이하 |
| 총수은(mg/kg) | 불검출 | 불검출 | - | 0.5 이하 |
| 대장균군 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 |
| 열량(Kcal/100g) | - | 360.44 | - | - |
| 탄수화물(%) | - | 77.15 | - | - |
| 조단백질(%) | - | 10.94 | - | - |
| 조지방(%) | - | 0.94 | - | - |
| 수분(%) | - | 5.45 | - | - |
| 회분(%) | - | 5.52 | - | - |
| 나트륨(mg/100g) | - | 60.2 | - | - |
| 식이섬유(%) | - | 0.19 | - | - |
| 비에이치씨(mg/kg) | - | 불검출 | 불검출 | - |
| 디디티(mg/kg) | - | 불검출 | 불검출 | - |
| 알드린(mg/kg) | - | 불검출 | 불검출 | - |
| 디엘드린(mg/kg) | - | 불검출 | 불검출 | - |
| 엔드린(mg/kg) | - | 불검출 | 불검출 | - |

(다) 제품 방향 결정

① 건강기능식품 개발 설문 조사 -가이드라인

㉠ 조사목적

- 기능성을 포함한 식품개발을 위한 소비자 Needs 확인
- 목표기능성의 시장성 검증을 위한 기초자료 확보
- 신제품개발 아이템 선정에 위한 아이디어 수집

㉡ 조사대상

- 1차. 20세 이상의 성인 남녀
- 2차. 60 ~ 75세 남녀

㉢ 조사일시

- 2014. 04. 14 (월) ~ 04. 25 (금)

㉣ 진행 Process

- 1단계: 건강 기능성을 포함하는 일반식품에 대한 선호도
- 2단계: 근육량 유지 및 근력 증가에 대한 제품 가능성 확인
- 3단계: 근육량 유지 및 근력 증가에 대한 가능성 확인

㉤ 세부 진행 방법

- 1차. 20세 이상 45세 이하 성인 (남,여) 식품연구소 연구원 지인
 - * Warming-up
 - * 조사목적 소개
 - * 진행방법 소개
 - * 자유토론 형태

- * 정답/오답 없음, 솔직한 자신의 의견 발표/타인 의견 경청
- 2차. 60세 이상 75세 이하 노인 (남, 여) 식품연구소 연구원 지인
- * 조사목적 소개
- * 진행방법 소개
- * 정답/오답 없음, 솔직한 자신의 의견 기재 등

㉮ 세부 진행사항

<1단계> 건강 기능성을 포함하는 일반식품에 대한 선호도

- 건기식 섭취빈도 및 인식
 - * 먹고 있는 건기식은 어떤 것이 있는지?
 - * 어떤 건기식이 있었으면 좋을 것 같은지?
- 건기식과 다른 일반식품 형태의 건강지향 식품에 대한 의견
- 일반식품(밥, 과자 등)으로 만들어지는 건강기능 포함 식품이 있으면 사먹을지?
- 편하게 섭취하기 쉬운 식품 제형은 무엇인지?

<2단계> 근육량 유지 및 근력 증가 제품 가능성 확인

- 근육량 유지 및 근력 증가에 대한 인지
 - * 근육량 유지 및 근력 증가가 있다고 생각하는지?
 - * 있다면 이로 인해 발생하는 증상은 어떤 것인지?
- 근육량 유지 및 근력 증가에 대한 대책
 - * 있다면 관리는 어떤 식으로 하는지?
 - * 특별히 운동 및 치료하는 경우는 있는지?
- 근육량 유지 및 근력 증가 기호식품에 대한 의견
 - * 기호식품 형태의 근육량 유지 및 근력 증가 개선제품에 대한 호/불호
 - * 원하는 기호식품의 형태는? (타정, 스틱, 구미젤리, 츄어블 정, 웨이크 등 제안)

<3단계> 근육량 유지 및 근력 증가에 대한 가능성 확인

- 근육량 유지 및 근력 감소의 인지 수준
 - * 평상시 근육량 및 근력에 대해 관심이 많은 편인지?
 - * 관심이 있다면 본인의 근육량 및 근력에 대해 어떤 식으로 인지하는지?
(몸에 끼는 옷을 입었을 때, 빠른 걸음을 걷거나 숨이 찬 운동을 할 때 등)
- 근육량 유지 및 근력 증가에 대한 대책
 - * 일상 생활에서 하고 있는 노력은?
- 근육량 유지 및 근력 증가를 위한 기호식품에 대한 의견
 - * 좋은 식품을 알고 있는지?
 - * 좋다는 식품이 실제 효과가 있다고 느끼는지? (섭취 경험 고려)
 - * 기호식품 형태의 기능성 제품에 대한 호/불호
 - * 원하는 기호식품의 형태는? (타정, 스틱, 구미젤리, 츄어블 정, 웨이크 등 제안)

근육량 유지 및 근력 강화 제품 소비자 인식 조사

안녕하십니까?

삼양사 식품연구소입니다.

이번에 삼양사에서 연구 및 개발되고 있는 새로운 건강기능식품에 대하여 소비자 여러분의 의견을 듣고자 합니다.

참고로 질문에는 맞거나 틀리는 답이 없으며 단지 소비자 여러분의 의견은 통계를 내는 데만 이용 됩니다.

보다 나은 제품 개발을 위해 성실히 응답해 주시기 바랍니다.

2014. 04. 28.

담당 : 문민선 책임 연구원 (Tel : 032-570-8068)

• 겨우살이란?

- 참나무, 팽나무, 밤나무 및 자작나무 등에 기생하며, 스스로 광합성 하여 엽록소를 만드는 반기생 식물로, 사계절 푸른 잎을 지니는 상록 활엽 관목입니다.

• 겨우살이 적용 제품

- 독일, 스웨덴 등 유럽 등지에서는 항암제, 면역력 증강 제품, 콜레스테롤 개선제로 섭취하며, 우리나라의 경우에도 동의보감 등을 보면 예로부터 차로 마시기도 하였다고 기록되어 있습니다.



SQ 1. 성별

- 1) 남성 2) 여성

SQ 2. 귀하의 연령은 어떻게 되십니까? 만 _____ 세

- 1) 20 세 ~ 29 세 2) 30 세 ~ 39 세 3) 40 세 ~ 49 세
4) 50 세 ~ 59 세 5) 60 세 ~ 69 세 6) 70 세 이상

SQ 3. 결혼 유무

- 1) 미혼 2) 기혼

[지금부터는 근육량 유지 및 근력 강화 제품 타입별 선호도에 대해 조사 하겠습니다.]

A1. 다음의 3 가지 제품 컨셉에 대한 선호도를 평가해주세요.

| 구분 | 전혀 호감이 가지 않는다. | 별로 호감이 가지 않는다. | 보통 이다. | 약간 호감이 간다. | 매우 호감이 간다. | 순위 |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|------------------|------------------|----|
| (1) A제품 (정제/겉술엿티켓) | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | |
| (2) B제품 (털어 먹는 분말) | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | |
| (3) C제품 (씹어 먹는 과립) | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | |

A2. 상기 3 가지 제품 컨셉 중 새롭고 차별화된 컨셉이라고 생각되는 제품에 대해서 선택해주세요.

- 1) A 제품 2) B 제품 3) C 제품

A3. 상기 3 가지 컨셉의 제품이 출시되었을 때 구매 의향이 있는 제품에 대해서 선택해주세요.

- 1) A 제품 2) B 제품 3) C 제품

A3-1. A3 처럼 생각하신 이유는 무엇인가요?

[→아래 설문 내용 중 본인이 생각할 때 선호도가 가장 높은 것 하나를 선택해 주세요.]

B1. 근육량 유지 및 근력 강화 제품 건강기능식품이면, 난 이런 제형이 좋다. (복수 선택 불가).

- 1) 물과 함께 섭취하는 정제나 캡슐 제품.
- 2) 물에 타서 자 또는 물처럼 섭취하는 분말 제품.
- 3) 입에 털어서 녹여먹는 분말 제품.
- 4) 오독오독 씹어서 먹는 과립 제품.
- 5) 맛있게 씹어서 먹는 추어블 정제 제품.

B2. 근육량 유지 및 근력 강화 제품 건강기능식품이 정제나 캡슐 제품이면, 난 이런 포장형태가 좋다. (복수 선택 불가).

- 1) 멀티팩 포장
- 2) 병 포장
- 3) PTP 포장
- 4) 지퍼백.



B3. 근육량 유지 및 근력 강화 제품 건강기능식품이면, 난 이렇게 섭취하는 것이 좋다. (복수 선택 불가).

- 1) 하루 한 번 아무 때나.
- 2) 하루 두 번 아침 저녁으로.
- 3) 하루 한 번 식사 후에.
- 4) 하루 한 번 자기 전에.
- 5) 과식이나 회식 후 비 정기적으로 섭취.

B4. 근육량 유지 및 근력 강화 건강기능식품 중 들어보거나 평소 관심 있는 소재를 선택해 주세요. (복수 선택 불가).

- 1) 단백질 또는 펩타이드 아미노산.
- 2) 크레아틴.
- 3) 마그네슘.
- 4) 마카추출물.
- 5) 옥타코사놀.
- 6) 1)~5) 소재에 대해 들은 바가 없거나 잘 모르겠다.

B5. 근육량 유지 및 근력 강화 건강기능식품이면, 난 이런 소재가 사용된 제품이 좋다. (복수 선택 불가).

- 1) 단백질 또는 펩타이드 아미노산.
- 2) 크레아틴.
- 3) 마그네슘.
- 4) 마카추출물.
- 5) 옥타코사놀.
- 6) 1)~5) 소재에 대해 들은 바가 없거나 잘 모르겠다.

[> 근육량 유지 근력 향상 제품에 대한 본인의 생각을 바탕으로, 아래 설문 내용에 답해주세요.]

C1. 근육 관련된 건강기능식품을 섭취한 적이 _____.

- 1) 있다 (C1-1 이동).
- 2) 없다.

C1-1. 섭취한 경험이 있다면, 제형의 종류는 어떤 것인지요?

- 1) 정제.
- 2) 캡슐.
- 3) 입에서 녹여 먹는 분말.
- 4) 물에 타 먹는 분말.

C2. 근육과 관련된 건강기능식품이 _____.

- 1) 필요하다 (C3 이동).
- 2) 필요없다 (응답 끝).

C2처럼 생각하신 이유는 무엇인가요?

C3. 근육량 유지 및 근력 강화 제품 건강기능식품을 구매한다면, 한달 기준으로 지불 가능한 금액은?

- 1) 1만원.
- 2) 3만원.
- 3) 5만원.
- 4) 7만원 이상.

C4. 근육량 유지 및 근력 강화 제품 건강기능식품 구매 시, 고려하는 사항은?

- 1) 구매 비용.
- 2) 다이어트 효과.
- 3) 섭취 편리성.
- 4) 제품 브랜드.
- 5) 기타 의견 (.....).

그림 71. 근육량 유지 및 근력 강화 제품 소비자 인식 조사 설문지

② 소비자인식조사결과 report

- ㉠ 일시: 2014. 05. 01 ~09
- ㉡ 담당자: 문민선 책임연구원
- ㉢ 소속: 소비재개발Program
- ㉣ 조사 배경: 근육량 유지 및 근력 강화 제품 개발
- ㉤ 조사 방법: 컨셉평가 (사내 식품 연구소 연구원 및 가족, 친지분)
- ㉥ 결과

[20 ~ 45세 성인대상]

i) 조사대상

- 성별

| 남 | 여 |
|---|---|
| 4 | 6 |

- 조사 연령

| 20세 ~ 29세 | 30세 ~ 39세 |
|-----------|-----------|
| 1 | 9 |

- 결혼 유무

| 미혼 | 기혼 |
|----|----|
| 2 | 8 |

ii) 제품 컨셉에 따른 선호도

- 컨셉 중 새롭고 차별화된 컨셉이라고 생각되는 제품

| 멀티팩 | 분말 | 과립 |
|-----|----|----|
| 2 | 1 | 7 |

- 제품 출시 후, 구매 의향이 있는 제품

| 멀티팩 | 분말 | 과립 |
|-----|----|----|
| 7 | 0 | 3 |

iii) 제품에 따른 선호도

- 제형에 대한 선호도

| 정제나 캡셀 | 차 또는 음료로 섭취하는 분말 | 털어먹는 분말 | 씹어먹는 과립 | 츄어블 정제 |
|--------|------------------|---------|---------|--------|
| 6 | 0 | 0 | 1 | 3 |

- 정제나 캡셀 제품에 대한 포장 형태

| 멀티팩 포장 | 병 포장 | PTP 포장 | 지퍼백 포장 |
|--------|------|--------|--------|
| 2 | 4 | 3 | 1 |

- 섭취 방법에 대한 선호도

| 1일 1회, 아무때나 | 1일 2회, 아침,저녁 | 1일 1회, 식사 후 | 1일 1회, 자기 전 | 비정기적 |
|----------------|-----------------|----------------|----------------|------|
| 9 | 0 | 1 | 0 | 0 |

- 소재에 대한 친근성

| 단백질, 펩타이드, 아미노산 | 크레아틴 | 마그네슘 | 마키추출물 | 옥타코사놀 | 잘 모르겠다 |
|-----------------|------|------|-------|-------|--------|
| 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

- 소재에 대한 선호도

| 단백질, 펩타이드, 아미노산 | 크레아틴 | 마그네슘 | 마키추출물 | 옥타코사놀 | 잘 모르겠다 |
|-----------------|------|------|-------|-------|--------|
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

iv) 제품에 대한 친숙도

- 본 기능성과 관련된 건강기능식품 섭취 경험

| 있다 | 없다 |
|----|----|
| 1 | 9 |

- 섭취한 제형

| 정제 | 캡슐 | 입에서 녹여먹는 분말 | 물에 타 먹는 분말 |
|----|----|-------------|------------|
| 0 | 0 | 0 | 1 |

- 본 기능성과 관련된 건강기능식품의 필요여부

| 필요하다 | 필요없다 |
|------|------|
| 7 | 3 |

- 본 기능성 관련 한달 지불 가능한 금액은

| 1만원 | 3만원 | 5만원 | 7만원 이상 |
|-----|-----|-----|--------|
| 1 | 7 | 2 | 0 |

- 본 기능성 관련 건강기능식품 구매시 고려하는 사항?

| 구매 비용 | 다이어트 효과 | 섭취 편리성 | 제품 브랜드 | 기타 |
|-------|---------|--------|--------|----|
| 2 | 1 | 3 | 1 | 3 |

[60세 이상 노인 대상]

i) 조사대상

- 성별

| 남 | 여 |
|---|---|
| 6 | 4 |

- 조사 연령

| 60세 ~ 69세 | 70세 이상 |
|-----------|--------|
| 8 | 2 |

- 결혼 유무

| 미혼 | 기혼 |
|----|----|
| 0 | 10 |

ii) 제품 컨셉에 따른 선호도

- 컨셉 중 새롭고 차별화된 컨셉이라고 생각되는 제품

| 멀티팩 | 분말 | 과립 |
|-----|----|----|
| 3 | 2 | 5 |

- 제품 출시 후, 구매 의향이 있는 제품

| 멀티팩 | 분말 | 과립 |
|-----|----|----|
| 7 | 0 | 3 |

iii) 제품에 따른 선호도

- 제형에 대한 선호도

| 정제나 캡셀 | 차 또는 음료로 섭취하는 분말 | 털어먹는 분말 | 씹어먹는 과립 | 츄어블 정제 |
|--------|------------------|---------|---------|--------|
| 6 | 1 | 1 | 2 | 0 |

- 정제나 캡셀 제품에 대한 포장 형태

| 멀티팩 포장 | 병 포장 | PTP 포장 | 지퍼백 포장 |
|--------|------|--------|--------|
| 0 | 3 | 5 | 2 |

- 섭취 방법에 대한 선호도

| 1일 1회, 아무때나 | 1일 2회, 아침, 저녁 | 1일 1회, 식사 후 | 1일 1회, 자기 전 | 비정기적 |
|-------------|---------------|-------------|-------------|------|
| 8 | 0 | 2 | 0 | 0 |

- 소재에 대한 친근성

| 단백질, 펩타이드, 아미노산 | 크레아틴 | 마그네슘 | 마카추출물 | 옥타코사놀 | 잘 모르겠다 |
|-----------------|------|------|-------|-------|--------|
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |

- 소재에 대한 선호도

| | | | | | |
|-----------------|------|------|-------|-------|--------|
| 단백질, 펩타이드, 아미노산 | 크레아틴 | 마그네슘 | 미카추출물 | 옥타코사놀 | 잘 모르겠다 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |

iv) 제품에 대한 친숙도

- 근육 관련 건강기능식품을 섭취한 경험

| | |
|----|----|
| 있다 | 없다 |
| 1 | 9 |

- 섭취한 제형

| | | | |
|----|----|-------------|------------|
| 정제 | 캡슐 | 입에서 녹여먹는 분말 | 물에 타 먹는 분말 |
| 0 | 1 | 0 | 1 |

- 본 기능성과 관련된 건강기능식품의 필요 여부

| | |
|------|-------|
| 필요하다 | 필요 없다 |
| 7 | 3 |

- 구매한다면 한달 기준으로 지불 가능한 금액

| | | | |
|-----|-----|-----|--------|
| 1만원 | 3만원 | 5만원 | 7만원 이상 |
| 0 | 7 | 3 | 0 |

- 근육량 유지 및 근력 강화 제품 건강기능식품 구매 시 고려하는 사항?

| | | | | |
|-------|---------|--------|--------|----|
| 구매 비용 | 다이어트 효과 | 섭취 편리성 | 제품 브랜드 | 기타 |
| 3 | 3 | 2 | 1 | 1 |

㉔ 결론

i) 20, 30대 성인 남녀 대상으로 조사한 결과

- 컨셉은 과립의 멀티팩 제품이 가장 선호도가 높은 것으로 나타남.
- 제형은 정제나 캡슐로 포장형태는 병 포장일 때, 섭취방법은 1일 1회 아무때나 섭취하는 것을 가장 선호하는 것으로 나타남.
- 소재는 건강기능식품 소재 중 단백질, 펩타이드, 아미노산 등에 대한 소재에 대해서 들어본 것도 가장 많고, 선호도도 뛰어난 것을 확인하였음.
- 대부분 근육 관련 제품을 섭취한 경험은 없으나, 필요성에 대해서는 인지를 하고 있으며 월 3만 원 정도 지불 가능한 금액으로 예상하고 있었음.

ii) 60세 이상 노년 남녀 대상으로 조사한 결과

- 컨셉은 과립의 멀티팩 제품이 가장 선호도가 높은 것으로 나타남.
- 제형은 정제나 캡슐로 포장형태는 PTP 포장일 때, 섭취방법은 1일 1회 아무때나 섭취하는 것을 가장 선호하는 것으로 나타남.
- 소재는 건강기능식품 소재 중 단백질, 펩타이드, 아미노산 등에 대한 소재에 대해서 들어본 것도 가장 많고, 선호도도 뛰어난 것을 확인하였음.
- 대부분 근육 관련 제품을 섭취한 경험은 없으나, 필요성에 대해서는 인지를 하고 있으며 월 3만 원 정도 지불 가능한 금액으로 예상하고 있었음.

(2) 인체적용시험 Protocol 작성

(가) 인체적용시험 계획서 요약

| | |
|------------|---|
| 제목 | 겨우살이추출물분말이 근육량 유지 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험 |
| 의뢰사 | 삼양제넥스 |
| 연구책임자 | 이화여대목동병원 재활의학과 한수정 교수 |
| 공동연구자 | 이화여자대학교 식품영양학과 권오란 교수 (전체 PI) 이화여자대학교 바이오푸드 네트워크 김주희 연구교수 서울과학기술대학교 식품공학과 김지연 교수 이화여대목동병원 재활의학과 신준호 전공의 |
| 연구기관 | 이화여대목동병원 (서울시 양천구 안양천로 1071) |
| 시험기간 | IRB 승인일 ~ 2014년 12월 31일 |
| 시험대상 | 60세 이상 75세 이하, BMI 18 이상 30 이하인 남녀 |
| 목적 | 노화로 인한 근육량 감소에 있어 겨우살이추출물분말이 근육량 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가함 |
| 디자인 | 12주간, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 실험 |
| 시험식품 | 겨우살이추출물분말 1g, 2g /d |
| 대조식품 | Placebo |
| 섭취방법 | 1일 2회, 1회 4정을 물과 함께 섭취 |
| 시험방법 | 방문 1에 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자는 연구대상자 선정 및 제외 기준에 의해 적합여부를 판정 받는다. 선정된 연구대상자는 방문 2(0주)에 등록된 순서에 따라 대조군 또는 시험군으로 무작위 배정되어 12주간 대조식품 또는 시험식품을 섭취한다. 방문 2(0주)와 방문 5(12주)에는 공복상태에서 1일 단백질 권장섭취량의 1/3을 함유하는 식사를 섭취한 후, 대조식품 또는 시험식품 1회 섭취량(4정)을 섭취하며, 섭취 2시간 후 기능성 및 안전성 바이오마커를 측정한다. 방문 3(4주), 방문 4(8주)에는 식사섭취 없이 계획된 항목을 평가한다. |
| 연구대상자 수 | 대조군, 저용량시험군, 고용량시험군은 각 군당 17명씩, 총 51명이 목표이고, 탈락률(15%)을 고려하여 선정기준에 적합한 대상자는 군당 21명씩, 총 63명을 등록하기로 한다. |
| 연구대상자 포함기준 | 다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정한다. 1) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 2) 60세 이상 75세 이하의 남녀 3) BMI 18이상 30이하인 자 |

| | |
|------------|--|
| | 4) 저항성 운동프로그램에 참여할 수 있는 자 |
| 연구대상자 제외기준 | 1) 첫번째 방문 3개월 이내에 다음의 의약품 또는 건강기능식품을 지속적으로 복용한 자: 호르몬제, 근육강화제, 단백질 보충용 건강기능식품 2) 저항성 운동 프로그램에 참여하기 어려운 자 3) 다음의 질환이 있는 자: 당뇨, 간질환, 신장질환, 갑상선질환, 악성종양, 치매, 우울증 4) 첫번째 방문 전 6개월 이내에 지속적으로 에어로빅이나 저항성 운동에 참여했던 자 5) 평상시 단백질 섭취량이 한국인의 권장섭취량보다 월등히 많은 자 6) 흡연자 7) 시험기간 중 식이지침을 따르기 어려운 자 (건강기능식품 복용금지, 한약 복용금지) 8) 평소에 알코올을 140g/주 (소주로 약 2.5병/주, 약 2.5잔/일) 이상 섭취하는 자 9) 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자 10) 첫 번째 방문 전 4주 이내에 임상시험에 참여한 자 11) 연구자가 본 시험에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 기타 질환 |
| 기능성 평가 | 1) 신체계측 - 근육면적 [초음파 측정] - 근육량, 지방량, BMI 등 [Inbody 측정] - 팔둘레, 다리둘레 등 2) 신체기능평가 - 근전도 [EMG 측정] - Muscle manual testing (MMT) - Short physical performance battery: 보행속도, 의자에서 일어서기, 균형 검사 [posturography 측정] - Knee extensor strength [Cybex 측정], hand grip strength 등 3) 근육조직 분석 - 근육합성 및 분해 대사경로 관련 단백질 및 유전자발현 관련 바이오마커 등 4) 혈액/뇨 분석 - 근육대사·항산화 관련 바이오마커 등 |
| 안전성 평가 | 1) 이상반응 2) 활력징후 3) 임상병리검사 (일반혈액검사 및 뇨 검사) |
| 운동 및 식이지침 | 1) 저항성 운동교육 실시 (1주일에 3회 실시, 운동간 1일 이상 간격을 둠) : 운동 전 스트레칭→10 RM 1 set로 무릎 강화 운동 → 운동 후 스트레칭 2) 식이지침 : 평상시 식습관 유지 |

(나) 인체적용시험 진행 일정표

| Visit | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---|---|--------|--------|--------|
| Week | | - | 0 | 4 | 8 | 12 |
| Window period | | | 0 | 28d±5d | 56d±5d | 84d±5d |
| 서면동의서 | | ✓ | | | | |
| 인구학적 조사(성별, 생년월일, 연령) | | ✓ | | | | |
| 병력 조사 | | ✓ | | | | |
| 음주력 및 흡연력 조사 | | ✓ | | | | |
| 의약품/건강기능식품 복용력 조사 | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 활력징후(맥박, 혈압, 체온) | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 임상병리검사(혈액, 뇨 검사) ^{1),2)} | | ✓ | ✓ | | | ✓ |
| 기능성 평가 | Inbody 측정(체중, 키, BMI, 근육량, 지방량 등) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | 근육면적, 팔둘레 · 다리둘레 등 | | ✓ | | | ✓ |
| | 혈액/뇨 분석 ^{1),3)} | | ✓ | | | ✓ |
| | 근육조직 분석 ^{1),4)} | | ✓ | | | ✓ |
| | 신체기능평가/근력평가 ⁵⁾ | | ✓ | | | ✓ |
| 신체활동량 설문조사 ⁶⁾ | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 저항성운동 교육 및 수행여부 확인 ⁷⁾ | | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 식습관 조사·식사교육 | 식습관 설문조사 ⁸⁾ | ✓ | | | | |
| | 식사교육 및 식사지침 준수여부 확인 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 적합성 평가 | | ✓ | | | | |
| 무작위배정 | | | ✓ | | | |
| 시험식품 및 대조식품 배부 | | | ✓ | ✓ | ✓ | |
| 반납식품 회수/순응도 확인 | | | | ✓ | ✓ | ✓ |
| 이상반응 확인 | | | | ✓ | ✓ | ✓ |

- 1) 전날 12시간 금식상태로 내원하여 검사한다.
- 2) 다음의 항목을 검사한다. 단, 스크리닝 방문 4주 이내에 건강검진 결과가 있는 피험자에 한하여 스크리닝 방문 시 임상병리검사(혈액, 뇨 검사)를 생략할 수 있다.
 - 혈액학적 검사: CBC(WBC, RBC, Hb, Hct, PLT), differential count(neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes)
 - 혈액화학적 검사: AST, ALT, BUN, creatinine, glucose, total protein, albumin, TSH, MDA (TSH와 MDA는 방문 1에만 측정함)
 - 뇨 검사: pH, color, specific gravity, protein, glucose, ketone, blood
- 3) 혈액/뇨 분석: 근육대사 · 항산화 관련 바이오마커 등
- 4) 근육조직 분석: 근육 합성 및 분해 대사경로 관련 단백질 및 유전자 발현 관련 바이오마커 등
- 5) 신체기능평가: 근전도 [EMG 측정], muscle manual testing (MMT), Short physical performance battery (보행속도, 의자에서 일어서기, 균형검사 [posturography 측정]), knee extensor strength [Cybex 측정] · hand grip strength 등
- 6) 한국형 노인신체 활동 측정도구(K-PAQE)를 이용하여 신체활동량 조사
- 7) 저항성운동은 시험기간(12주) 동안 매주 3회 실시한다.
- 8) 평상시 단백질 섭취량 조사, Recommended Food Score 조사 등

(3) 인체적용시험용 시제품 제작

(가) 지표물질 함유량 선택

- ① 겨우살이추출물분말을 이용한 근육량 유지 및 근육 기능을 평가한 동물실험 결과를 기준으로 체표면적을 활용한 용량 산정(약 1,460mg/day), Gut volume을 활용한 용량산정(1,540 ~ 3,850 mg/d), Gut surface area를 활용한 용량 산정(1,960 ~ 4,900 mg/d) 결과를 검토하여, 인체적용시험 샘플은 저용량 시험식품 (겨우살이추출물 분말 1g/day), 고용량 시험식품 (겨우살이추출물 분말 1g/day)으로 정하였음.
- ② 생산 스케일로 생산한 지표물질 Chlorogenic acid 함량은 각각 1.34 mg/g, 1.81mg/g, 1.81mg/g, 1.62mg/g과 같이 나왔으며, 이상의 결과를 바탕으로 겨우살이추출물분말의 품질 평가를 위한 기준함량으로서 1.2 ~ 2.0 mg/g 으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 따라서, 저함량식품군은 1.2~2.0mg/d, 고함량식품군은 2.4~4.0mg/d의 Chlorogenic acid를 섭취하는 것을 기준으로 삼고자 함.

(나) 인체적용 시험용 시제품 제작

① 제형 및 성분함량

- 제형 및 중량: 정제, 500 mg/정
- 1일 섭취량: 8 정/day
 - * 겨우살이추출분말 1일 섭취량: 1 g (저용량군), 2 g (고용량군)
- 섭취방법: 1일 2회, 1회 4정을 물과 함께 섭취하십시오.
- 보관방법: 제품은 직사광선을 받지않는 곳에 보관하시고, 제품 개봉 후에는 인습되지 않게 밀봉하여 보관하십시오.
- 성분함량

(500 mg/정)

| 구분 | 대조식품 | 저용량시험식품 | 고용량시험식품 |
|----------------|------------|------------|------------|
| 겨우살이추출분말 | 0 | 125 | 250 |
| 카라멜색소분말 | 250 | 125 | 0 |
| 결정셀룰로오스 | 214 | 214 | 214 |
| 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘 | 10 | 10 | 10 |
| 스테아린산마그네슘 | 6 | 6 | 6 |
| 코팅제+코팅색소 | 20 | 20 | 20 |
| 합계 | 500 | 500 | 500 |

② 겨우살이추출분말 인체시험용시제품 정제 사진

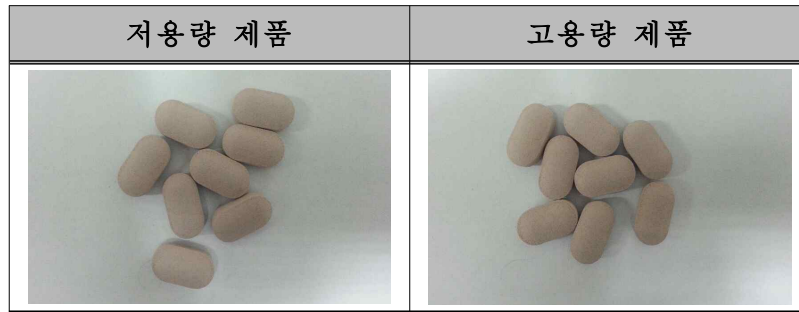


그림 72. 겨우살이 추출물 분말 인체적용시험 시제품

(4) 겨우살이 추출물의 인체적용시험(1단계)

(가) 인체적용시험 기관 선정

- ① 연구기관: 이화여자대학교 산학협력단
- ② 연구 책임자: 이화여대목동병원 재활의학과 한수정 교수
- ③ 공동 연구자 (과제 전체 PI): 이화여대 식품영양학과 권오란 교수
- ④ 섭취량 및 피험자 수 산정

㉠ 섭취량 및 섭취방법

- 1일 섭취량: 8 정/day
- * 겨우살이추출물분말 1일 섭취량: 1 g (저용량군), 2 g (고용량군)
- 섭취방법: 1일 2회, 1회 4정을 물과 함께 섭취

㉡ 섭취기간

- 12주

㉢ 설정사유

- 겨우살이 추출물의 근육량 유지 및 근육기능을 평가한 동물시험에서는 5 주령의 ICR mice 에게 겨우살이 추출물 400, 1,000 mg/kg BW (체중 35 g을 적용하여 일일섭취량 환산시 14~35 mg/d)을 단회 또는 15 일간 경구투여시 관련 바이오마커가 개선됨을 확인할 수 있었다.

- 체표면적을 활용한 용량 산정

: $400 \sim 1,000 \text{ mg/kg BW} \times 0.081 \text{ (conversion factor)} \times 60 \text{ kg} \times \sim 1 \text{ (safety factor)} = \sim 1,460 \text{ mg/d}$

(Ref: FDA Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. USDHHS & FDA, 2005 [20])

- Gut volume을 활용한 용량 산정

: $14 \sim 35 \text{ mg/d} \times 110 \text{ (conversion factor)} = 1,540 \sim 3,850 \text{ mg /d}$

(Ref: C. Casteleyn, A. Rekecki, A. Van der Aa, P. Simoens, W. Van den Broeck (2010) Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral

dose translation from mouse to man. Lab Anim 44: 176-183 [21], C. Schiller, C. P. Fröhlich, T. Giessmann, W. Siegmund, H. Mönnikes, N. Hosten, W. Weitschies (2005) Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. 22(10):971-9 [22])

- Gut surface area를 활용한 용량 산정

: 14 ~ 35 mg x 140 (conversion factor) = 1,960 ~ 4,900 mg/d

(Ref: J. M. DeSesso, C. F. Jacobson (2001) Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. 39(3):209-28 [23], C. Casteleyn, A. Rekecki, A. Van der Aa, P. Simoens, W. Van den Broeck (2010) Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. Lab Anim 44: 176-183 [21])

㉔ 목표한 연구대상자의 수 및 설정근거

| | 대조군 | 저용량시험군 | 고용량시험군 | 합계 |
|----------------------------|-----|--------|--------|----|
| 최종 평가 연구대상자수 | 17 | 17 | 17 | 51 |
| Drop-out(15%) 고려 연구대상자수 | 21 | 21 | 21 | 63 |

연구대상자 선정, 제외기준에 적합한 63명(drop-out 15% 고려)을 확보하도록 하고, 인체적용시험 계획서의 위반 없이 시험을 종료한 피험자 55명 이상 (군당 17명 이상)을 통계분석하기로 계획한다.

본 연구의 목적은 노화로 인한 근육량 감소에 있어 겨우살이추출물 분말이 근육량 및 근육기능에 미치는 영향을 평가하기 위함으로 연구대상자 산정을 위한 가설은 아래와 같다.

$$H_0 : \mu_c = \mu_{t1} = \mu_{t2}$$

$$H_1 : \mu_c \neq \mu_{t1} \text{ or } \mu_{t1} \neq \mu_{t2} \text{ or } \mu_{t2} \neq \mu_c$$

where, μ : Lean body mass, c: 대조군, t1: 저용량군, t2: 고용량군

- 유의수준(α) 5%

- 제 2 종 오류(β) 0.2 (power 80%)

- 대조군: 저용량시험군: 고용량시험군 피험자수 비율 = 1 : 1 : 1

연구대상자수 산정을 위해 아미노산 보충제를 섭취한 후 lean body mass 를 측정 한 인체적용시험 자료를 참고하였다. 해당연구에서는 아미노산 보충제를 섭취한 후 3 개월 쯤 lean body mass의 변화값이 아래와 같이 대조군은 0.3 kg, 시험군은 1.7 kg 이었다.

TABLE 1. Subject characteristics

| | Placebo (n = 7) | | SUP (n = 7) | |
|--------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | Month 0 | Month 3 | Month 0 | Month 3 |
| Age (yr) | 69 ± 3 | | 67 ± 1 | |
| Height (cm) | 163 ± 2 | | 165 ± 3 | |
| Weight (kg) | 71 ± 4 | 72 ± 5 | 73 ± 6 | 74 ± 5 |
| LBM (kg) | 40.7 ± 2.4 | 41.0 ± 2.8 | 43.5 ± 2.8 | 45.2 ± 3.0* |
| Fat (%) | 40 ± 1 | 40 ± 1 | 38 ± 2 | 38 ± 2 |
| Serum creatinine (mg/dl) | 0.81 ± 0.06 | 0.83 ± 0.04 | 0.76 ± 0.03 | 0.74 ± 0.04 |

* Significantly different from 0 months (P < 0.05)

J Clin Endocrinol Meta, 2009; 94(5):1630-1637

본 연구에서는 12 주간 시험제품 섭취 후 lean body mass 의 차이 값이 대조군은 0.3, 저용량시험군과 고용량시험군은 각각 1.7 인 것으로 가정한다. 이에 따라 연구대상자수는 아래와 같이 군당 17 명이며, 탈락율(15%)를 고려하여 군당 등록할 연구대상자수는 21 명으로, 총 등록 연구대상자수는 63 명으로 한다.

$$\Delta = \frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^3 (\mu_i - \bar{\mu})^2 = \frac{1}{1.5^2} ((-0.93)^2 + (0.47)^2 + (0.47)^2) = 0.58$$

$$n = \lambda / \Delta = 9.64 / 0.58 = 16.6 \approx 17$$

(나) 식약처 인체적용시험에 대한 모뎀토의

▶ 상담내역

| 민원인 이름 | 문헌선 | 확정상담장소 | 모용청사-민원실 |
|----------|------------------|----------|------------------|
| • 예약등록일 | 2014-03-03 11:33 | • 희망상담일시 | 2014-03-13 02:00 |
| • 확정상담일시 | 2014-03-13 02:00 | • 확정상담부서 | 건강기능식품기준과 |
| • 확정담당자 | 김종두 | • 상담구분 | 발문상담 |

○건강기능식품 개별인정형용을 위한 절차 및 구체적인 사항 1. 기능성 원료명: 겨우살이 추출물 분말 2. 기능성 내용: 근육량 유지 및 근육기능 향상 3. 요청 상담 내용 :기능성-적합한 바이오마커 및 사용 가능한 기능성 내용 등

[목록보기](#)

식품의약품안전처

(우)1063-700 충청북도 청주시 광역의정부 오송생명2동 167 (연락처 643) 오송보건과학진흥센터
 종합상담센터 : 1577-1255

그림 73. 모뎀토의 민원내역


| | | |
|---|--|--------------|
|  겨우살이 과제 회의록 | | 작성일 |
| | | 2014. 03. 14 |
| 주 제 | 인체적용시험 계획 | |
| 목 적 | 인체적용시험 protocol 진행 관련 건 | |
| 회의 일시 및 장소 | 식약처 (2014. 03. 13 11:00~12:00) | |
| 주요 내용 | <p>1) 원료 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> - chlorogenic acid의 분석 방법은 현재 유럽 약전(European Pharmacopoeia)의 아티초크 분석 방법으로 진행하였는데, 문제 없음 <p>2) 인체적용시험 디자인 관련 논의</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전체적인 방향 및 실험 디자인, biomarker 등은 매우 잘 설정되어 있음 - 추가적으로 활동량에 대해 검토할 경우 도움이 될 것으로 보임 - 중간확인을 통해 통계적으로 확인 후, 실험의 방향을 재설정하는 것도 하나의 방법임 (3/14 BFN에 확인 결과, 중간확인 후에는 실험 기간을 늘리는 등의 방법을 취해야 하나, 시험 기간 및 비용이 증가하므로 현재 상황에서는 적용이 불가할 것으로 보임) - Gene expression 확인 시, 동물실험에서 진행한 gene과 동일한 gene으로 사용하는 것이 바람직 할 것으로 보임 <p>3) 기능성 문구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험 자체가 노인을 대상으로 진행하지만, 실험의 특성상 노인을 선정한 것이며 동물 실험에서는 어린 쥐를 대상으로 진행하였으므로, 기능성 문구에는 '노인성'이란 문구 삭제도 가능 할 것으로 보임 - 근육량 유지 사용 가능한 문구: 근육량 증가는 기능성으로 나타나기도 어렵고, 보건증진에 기여한다고 표현하기 어려우므로 사용 불가 - 근력강화에 도움, 근력 증가, 근력감소 억제 등을 모두 사용 가능 - 근 기능 저하 억제: 불가능한 문구는 아니지만, 광범위하므로 의견이 분분할 여지가 있음 | |
| 향후 계획 | <p>1) '수입 등의 검사에 관한 규정' 확인 후, 겨우살이 추출물 분말의 유해물질 분석 항목 확인 후, 우려사에 알려 주기로 함</p> <p>2) 추가적인 모듬토의는 진행하지 않아도 될 것으로 보이며, 문의사항이 있을 경우에만 진행하면 될 것으로 보임</p> | |
| 참석자 | 김용우 | 김광수 |
| | | 문민선 |

그림 74. 모듬토의 회의록

(다) 인체적용시험 계약 체결

- ① 연구 기관: 이화여대 산학협력단
- ② 연구 기간: 2014. 04. 01 ~ 2015. 02. 27
 - * 1차년도 계획이었던 인체적용시험 protocol 작성은 진행 중이며, 인체적용시험 1 단계 마무리 후, 2차년도 계획이었던 인체적용시험 2단계, 개별인정형 추진 검토를 2차년도에 수행하게 됨에 따라, 본 연구기간 종료 후에도 진행하여 완성도 높은 연구로 마무리 하고자 함
- ③ 연구비: 90,000,000 (부가세 별도)

연구용역계약서

□ 연구과제명 : 겨우살이추출물분말이 근육량 유지 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험

□ 연구기간 : 2014년 4월 1일 ~ 2015년 2월 27일

□ 연구비 : 금 구천만원정 (₩90,000,000) (※ 부가가치세 별도)

□ 계약당사자

“삼양” : 주식회사 삼양제넥스

“이화여대” : 이화여자대학교 산학협력단

위 연구용역 수행과 관련하여 “삼양” 과 “이화여대” 는 다음과 같이 계약을 체결한다.

제 1조(연구의 목적)

“이화여대” 는 “삼양” 으로부터 용역을 받아 “겨우살이추출물분말이 근육량 유지 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험” 을 수행한다. 본 계약은 이에 대한 쌍방간의 권리와 의무 및 조건을 명시하기 위한 것이다.

제 2조(연구의 범위)

본 연구의 내용 및 범위는 “이화여대” 가 작성한 연구계획서에 의한다.

제 3조(연구기간)

① 연구기간은 2014년 4월 1일 부터 2015년 2월 27일까지로 한다.

② “삼양” 과 “이화여대” 는 본 계약기간 만기일 전 기간 연장이 필요한 경우 기간연장에 따른 사유를 서면으로 통보하여 상호합의에 의해 계약기간을 재조정할 수 있다.

제 4조(연구비 및 지급조건)

“삼양” 은 “이화여대” 에게 본 연구용역계약상의 연구개발비 금 구천만원 (₩90,000,000, 부가가치세 별도)을 “이화여대” 의 지정된 입금 계좌로 지급하도록 한다.

- 계약일로부터 14일 이내 금 사천오백만원정 (₩45,000,000, 부가가치세 별도)

- 1차 보고서 제출 후 14일 이내에 금 사천오백만원정 (₩45,000,000, 부가가치세 별도)

제 5조(신의성실 및 상호협조)

① (신의성실) “삼양” 과 “이화여대” 는 신의를 가지고 본 계약의 각 조항을 성실히

그림 75. 인체적용시험 연구용역계약서

(라) IRB 심사 완료

심의결과 통보서

(회의) 14-11B 자

1. 일 시 : 2014.04.09, 수, 13:00-14:00
2. 장 소 : 의학관 A 동 937 호 회의실
3. 참석자(심사위원) : Panel C
4. (정원: 2 명, 참석: 2 명)
5. 회의내용(신속심사)

| | | | | | | | |
|------|---|--|--------------------------|--|---------------------------------|---------------------|------------|
| 수 신 | 책임연구자 | 성 명 | 한수정 | 소 속 | 재활의학과 | 직 위 | 교수 |
| | 지원기관 | 주식회사 삼양제넥스 | | | | | |
| 연구제목 | 겨우살이추출물분말이 근육량 유지 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험(Human study for evaluating the safety and the effect of mistletoe on maintenance of muscle mass and muscle function) | | | | | | |
| 연구내용 | <input type="checkbox"/> 임상연구 (<input type="checkbox"/> 의약품 일반명: , <input type="checkbox"/> 상품명:) <input type="checkbox"/> 의료기기 <input type="checkbox"/> 의료행위(시술, 치료법 등) <input type="checkbox"/> 조직 및 혈액 <input type="checkbox"/> 생물학제재 <input type="checkbox"/> Stored Sample <input type="checkbox"/> 관찰연구(<input type="checkbox"/> 임상정보 <input type="checkbox"/> 임상시료 <input type="checkbox"/> 설문조사) <input checked="" type="checkbox"/> 기타(건강기능식품) | | | | | | |
| 심의종류 | <input type="checkbox"/> 정규심의 <input checked="" type="checkbox"/> 신속심의 | | | 심의일 | 2014.04.09 | 승인일자 | 2014.04.09 |
| 전수번호 | 14-11B-25 | 최초접수번호 | 14-05-05 (2014.02.18) | 최초승인번호 | EOT 14-09-01 (2014.03.18) | 중간보고 에 경 알 | 2014.04.09 |
| 제출서류 | <input type="checkbox"/> 임상시험심사위원회 (Ver no.:) | | | <input type="checkbox"/> 임상시험 시험자 자료리(대상자의약품의 개요, 안전성 정보 포함) (Ver no.:) | | | |
| | <input type="checkbox"/> 임상시험 연구계획서 요약 (Ver no.:) | | | <input type="checkbox"/> 식약청 또는 주관연구기관 승인서 | | | |
| | <input type="checkbox"/> 연구계획서 (Ver no.:) | | | <input type="checkbox"/> 피험자 모집관련 서류 (Ver no.:) | | | |
| | <input type="checkbox"/> 중재기록지 (Ver no.:) | | | <input type="checkbox"/> 피험보상규약 | | | |
| | <input type="checkbox"/> 피험자에게 제공되는 서류 : 피험자 설문지, 피험자 알지 등 (Ver no.:) | | | <input type="checkbox"/> 피험보험증 사본 | | | |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 피험자 서면 동의서 및 설명문 (Ver no.: 1.2) | | | <input type="checkbox"/> 제조(수입)품목 허가증 사본 | | | |
| | <input type="checkbox"/> 연구자 최근 이력 또는 기타 경력에 관한 문서 () | | | <input type="checkbox"/> 이해상충 서약서 | | | |
| | <input type="checkbox"/> 연구비 산정내역서 (필수, 연구비 없는 경우제외) | | | <input type="checkbox"/> 서면동의를 불필요한 경우 사유서 첨부 | | | |
| | <input type="checkbox"/> 임상시험이상반응보고서 (Ver no.:) | | | <input type="checkbox"/> 중간/ 지속심사 보고 (Ver no.:) | | | |
| | <input type="checkbox"/> 임상시험계획변경신청 (Ver no.:) | | | <input type="checkbox"/> 조거종료 (Ver no.:) | | | |
| | <input type="checkbox"/> 종료보고 (Ver no.:) | | | | | | |
| | <input type="checkbox"/> 결과보고 (Ver no.:) | | | <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (심사자의사항에 대한 답변 보고) | | | |
| | 심의결과 | <input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 재심사(보완) <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 승인원 임상시험의 중지/보류 | | | | | |

| | |
|-------------|---|
| 심사내용 | 심사지적사항에 대한 답변 보고 (IRB 접수일 : 2014.04.04) * 2014.03.18 재심사(정규)_시정승인 <시정답변> 근역 채취 시의 위험성에 대한 내용 대상자 설명문에 추가 기술함 |
| | 제출하신 연구계획서 및 그 외 서류들을 검토한 결과, 본 위원회의 시정사항에 대해 모두 적절히 답변된 것으로 확인합니다. 이에, 만장일치로 연구의 진행을 1년간 승인합니다. |

- 주) 1. 본 기관생명윤리심의위원회는 임상시험관리기준(KGCP) 및 국제임상시험통일안(ICH-GCP), 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련 법규를 준수 합니다.
2. 본위원회의 심의결정에 재평가 또는 변경이나 보연을 요청할 수 있습니다.
3. 본 위원회에서 지정한 중간보고시기에 중간보고서를, 연구종료시에는 종료 및 결과 보고서를 작성하여 지정일까지 제출하여 주시기 바랍니다.
4. 연구중에 중대한 유해사건(Serious Adverse Event) 발생시 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.
5. 본 통지서는 KGCP 제 13 조 제헌항에 따른 심사통보서로 사용할 수 있으며, 기관생명윤리심의위원회에 기록된 내용과 동일 합니다.
6. 시정승인은 심사지적사항에 대한 답변서를 제출하여 승인 후 연구를 진행하여야 합니다.
 (매주 목요일까지 제출, 신속심사 진행 : 원본 1부, 사본 2부)
7. 재심사는 심사지적사항에 대한 답변서를 보완하시어 자료를 제출하시기 바랍니다.
 (정규 재심사 진행 : 수정된 자료 원본 1부, 사본 14부 제출, 단, 의료기기 : 원본 1부, 사본 11부 제출)
8. 직인(서명)이 기재되지 않은 통지서는 무효입니다.
 (위원회가 연구계획서를 승인하지 않은 경우 즉, 반려, 중지/보류의 결정을 통보 받은 경우 4주 이내에 최초심의회 동일한 방법으로 이의신청을 할 수 있습니다. 단, 동일연구에 대한 이의신청은 2번까지 가능)
9. 헬싱키선언(제 19 조)에 따라 모든 임상시험은 첫 피험자 모집하기 전 공개적으로 접근이 가능한 임상연구등록시스템(primary registry)에 등록하여 이를 공개하여야 하며, 예를 들어, 질병관리본부에서 운영하는 임상연구정보서비스(CRIS, <http://cris.cdc.go.kr>)를 이용하실 수 있습니다.
- * 관련서식은 본원 홈페이지(<http://ewhactc.eumc.ac.kr>)를 참조하시기 바랍니다.

이화여자대학교 의과대학부속 목동병원 기관생명윤리심의위원장 임 기 환



그림 76. 생명윤리심의위원회 심의결과통보서

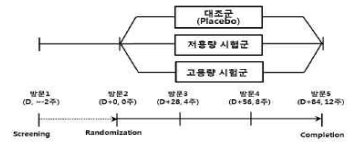
(5) 겨우살이 추출물의 인체적용시험(2단계)

(가) 피험자 모집

- 대조군, 저용량시험군, 고용량 시험군 군당 21명 총 63명 목표로 모집 진행 중임.
- 9월말까지 30명, 11월 말까지 63명 누적 등록 계획임.

(나) 인체적용시험 진행 사항 점검 및 진행

① 1차 중간보고서 (2014년 6월 16일)

| | |
|--|---|
| <p>인체적용시험 1차 중간보고서</p> <p>겨우살이추출물분말이 근육량 유지 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험</p> <p>2014. 6. 16.</p> <p>이화여자대학교 식품영양학과 기능성소재 평가 연구실</p> | <p>1. 연구 개요</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 연구제목: 겨우살이추출물분말이 근육량 유지 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험 ■ 연구책임자: 이화여자대학교 식품영양학과 권오한 교수 ■ 연구기관: 이화여자대학교 식품영양학과, 이화여대목동병원 재활의학과 ■ 연구목적: 노화로 인한 근육량 감소에 있어 겨우살이추출물분말이 근육량 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가함 ■ 디자인: 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 실험 ■ 연구대상: 60세 이상 75세 이하, BMI 18 이상 30 이하인 남녀 ■ 연구대상자수: 총 63명 (군당 21명) ■ 연구방법  <p>방문 1 (D=1, 2주) 방문 2 (D=1, 2주) 방문 3 (D=3, 4주) 방문 4 (D=5, 8주) 방문 5 (D=14, 12주)</p> <p>Screening Randomization Completion</p> <p>방문 1에 자외에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 자원은 연구대상자 선정 및 제외 기준에 의해 적절여부를 판정 받음. 선정된 연구대상자는 방문 2(0주)에 등록된 순서에 따라 대조군 또는 시험군으로 무작위 배정되어 12주간 대조식품 또는 시험식품을 섭취함. 방문 2(0주), 3(4주), 4(8주), 5(12주)에 방문 별로 계획된 바이오 마커를 측정함.</p> <p style="text-align: center;">1</p> |
|--|---|

- 바이오마커
 - 기능성평가
 - 신체계측: 근육면적 [초음파 측정], 근육량, 지방량, BMI 등 [Inbody 측정], 팔둘레, 다리둘레
 - 신체기능평가: 근전도 [EMG 측정], muscle manual testing (MMT), short physical performance battery (보행속도, 의자에서 일어서기, 균형검사 [posturography 측정]), knee extensor strength [Cybex 측정], hand grip strength
 - 근육조직 분석: 근육 합성 및 분해 대사경로 관련 바이오마커
 - 혈액/노 분석: 근육대사 · 항산화 관련 바이오마커 등
 - 안전성평가
 - 이상반응
 - 활력징후
 - 임상병리검사: 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사

2

- 인체적용시험 진행 일정표

| Visit | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------|-----------------------------------|---|--------|--------|--------|
| Week | - | 0 | 4 | 8 | 12 |
| Window period | | 0 | 28d±5d | 56d±5d | 84d±5d |
| 서면동의서 | ✓ | | | | |
| 인구학적 조사(성별, 생년월일, 연령) | ✓ | | | | |
| 병력 조사 | ✓ | | | | |
| 음주력 및 흡연력 조사 | ✓ | | | | |
| 의약품/건강기능식품 복용력 조사 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 활력징후(맥박, 혈압, 체온) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 임상병리검사(혈액, 뇨 검사) | ✓ | ✓ | | | ✓ |
| 기능성평가 | Inbody 측정(체중, 키, BMI, 근육량, 지방량 등) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | 근육면적, 팔둘레 · 다리둘레 등 | | ✓ | | ✓ |
| | 혈액/노 분석 | | ✓ | | ✓ |
| | 근육조직 분석 | | ✓ | | ✓ |
| | 신체기능평가/근력평가 | | ✓ | | ✓ |
| 신체활동량 설문조사 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 적합성운동 교육 및 수행여부 확인 | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 식습관조사 | ✓ | | | | |
| 식사교육 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 적합성 평가 | ✓ | | | | |
| 무작위배정 | | ✓ | | | |
| 시험식품 및 대조식품 배부 | | ✓ | ✓ | ✓ | |
| 반납식품 회수/순응도 확인 | | | ✓ | ✓ | ✓ |
| 이상반응 확인 | | | ✓ | ✓ | ✓ |

3

2. 진행경과

1) 개시모임 진행

- 일자: 2014.5.7(수) 오전 11시~12시
- 장소: 이대목동병원 2층 소회의실
- 참석자
 - 삼양제넥스: 이강표 소장, 김광수 팀장, 문민선 과장
 - 이화여대 식품영양학과/바이오푸드 네트워크
 - 김오한 교수, 김주희 연구교수, 김상미 CRC, 옥향옥 연구원
 - 이대 목동병원 재활의학과: 한수정 교수, 신준호 전공의, 박가희 전공의
 - 이화여대 체육학과: 김혜진 연구원
- 내용
 - 연구 개요 공유
 - 기반연구 결과
 - 인체적용시험 진행계획
 - 논의사항
 - 연구대상자의 평상시 운동수행 여부(종류 및 운동시간) 등을 확인하기 위한 조사 필요 → 설문조사 추가
 - 근육조직 생검 시점 등 논의
 - 근육조직 생검은 시험식품과 근육단백질 합성을 위한 기질 섭취 후 측정

2) 연구계획 변경사항 IRB제출

- 제출일자: 2014.6.2(월) 이대목동병원 임상시험심사위원회(IRB)
- 주요 변경내용
 - 연구대상자의 평상시 운동수행 여부(종류 및 운동시간) 확인을 위한 설문조사 추가: Korean Physical Activity Questionnaire for Elderly (PAQE) 사용
 - 안전성평가 측정시점 추가: 겨우살이추출물분말 섭취에 따른 안전성 평가를 위해 방문 2(0주)에 혈액검사와 뇨검사 추가
 - 바이오마커 측정은 시험식품과 근육단백질 합성을 위한 기질 섭취 후 측정
 - 방문 2(0주)와 방문 5(12주)에 공복상태에서 1일 단백질 권장섭취량의 1/3을 제공하는 식사를 섭취한 후, 대조식품 또는 시험식품 1회 섭취량(4정)을 섭취하며, 섭취 2시간 후 바이오마커를 측정함.

4

3) 연구대상자 모집 개시

- 연구대상자 모집 방법
 - 연구대상자 모집광고 포스터 약 30부 부착 완료
 - 이대목동병원 게시판, 병원 인근 상점, 노인복지센터 등

- 이화여대 바이오푸드 네트워크 인체적용시험 연구대상자 pool D8에 등록된 사람 중 선정기준에 적합한 연구대상자를 대상으로 홍보전화 발송 완료
- 연구대상자 모집광고 포스터 추가부착 예정
 - 목동 1~16 단지 아파트 게시판 (350 부)
 - 목동 주민센터 (6 부)
 - 당산 및 선유도 지하철역 근처 아파트 게시판 (100 부)
- 연구대상자 등록 목표 일정
 - 현재~7월 말까지 15명, 8월 말까지 30명, 9월 중순까지 18명 등록 계획 (총 63명)

5

② 2차 중간 보고서 (2014년 8월 22일)

인체적용시험 2차 중간보고서

**겨우살이추출물분말이 근육량 유지 및
근육기능에 미치는 영향과 안전성을
평가하기 위한 인체적용시험**

2014. 8. 22

**이화여자대학교 식품영양학과
기능성소재 평가 연구실**

1. 연구 개요

- 연구제목: 겨우살이추출물분말이 근육량 유지 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험
- 연구책임자: 이화여자대학교 식품영양학과 권오연 교수
- 연구기관: 이화여자대학교 식품영양학과, 이화대목동병원 재활의학과
- 연구목적: 노화로 인한 근육량 감소에 있어 겨우살이추출물분말이 근육량 및 근육기능에 미치는 영향과 안전성을 평가함
- 디자인: 무작위배정, 이중맹검, 평형설계, 대조식품 비교 실험
- 연구대상: 60세 이상 75세 이하, BMI 18 이상 30 이하인 남녀
- 연구대상자수: 총 63명 (군당 21명)
- 연구방법

- 연구방법

방문 1에 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자는 연구대상자 선정 및 제외 기준에 의해 적합여부를 판정 받음. 선정된 연구대상자는 방문 2(0주)에 등 록된 순서에 따라 대조군 또는 시험군으로 무작위 배정되어 12주간 대조식품 또는 시험식품을 섭취함. 방문 2(0주), 3(4주), 4(8주), 5(12주)에 방문 별로 계획된 바이오 마커를 측정함.

- 바이오마커
 - 기능성평가
 - 신체계측: 근육면적 [조용파 측정], 근육량, 지방량, BMI 등 [Inbody 측정], 팔둘레, 다리둘레
 - 신체기능평가: 근전도 [EMG 측정], muscle manual testing (MMT), short physical performance battery (보행속도, 의자에서 일어시기, 균형검사 [posturography 측정]), knee extensor strength [Cybex 측정], hand grip strength
 - 근육조직 분석: 근육 합성 및 분해 대사경로 관련 바이오마커
 - 혈액/노 분석: 근육대사·항산화 관련 바이오마커 등
 - 안전성평가
 - 이상반응
 - 활력징후
 - 임상병리검사: 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사

- 인체적용시험 진행 일정표

| Visit | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------|-----------------------------------|---|---|--------|--------|--------|
| Week | | - | 0 | 4 | 8 | 12 |
| Window period | | | 0 | 28d±5d | 56d±5d | 84d±5d |
| 서면동의서 | | ✓ | | | | |
| 연구학적 조사(성별, 생년월일, 연령) | | ✓ | | | | |
| 병력 조사 | | ✓ | | | | |
| 음주력 및 흡연력 조사 | | ✓ | | | | |
| 의약품/건강기능식품 복용력 조사 | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 발작징후(め박, 할압, 저온) | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 임상병리검사(혈액, 뇨 검사) | | ✓ | ✓ | | | ✓ |
| 기능성평가 | Inbody 측정(체중, 키, BMI, 근육량, 지방량 등) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | 근육면적, 팔둘레·다리둘레 등 | | ✓ | | | ✓ |
| | 혈액/노 분석 | | ✓ | | | ✓ |
| | 근육조직 분석 | | ✓ | | | ✓ |
| | 신체기능평가/근력평가 | | ✓ | | | ✓ |
| 신체활동량 설문조사 | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 저항성운동 교육 및 수행여부 확인 | | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 식습관조사 | 식습관 설문조사 | | ✓ | | | |
| | 식사교육 및 식사지침 준수여부 확인 | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 적합성 평가 | | ✓ | | | | |
| 무작위배정 | | | ✓ | | | |
| 시험식품 및 대조식품 배부 | | | ✓ | ✓ | ✓ | |
| 반납식품 회수/순응도 확인 | | | | ✓ | ✓ | ✓ |
| 이상반응 확인 | | | | ✓ | ✓ | ✓ |

2. 진행경과

■ **피험자 모집 현황 (2014.8.21 기준)**

| 목표 피험자수 | Screening | Screening failure * | Run-in | Random | Ongoing | Drop-out | Comple- tion |
|------------|-----------|------------------------|--------|--------|---------|----------|-----------------|
| 63 | 8 | 2 | 0 | 6 | 6 | 0 | 0 |

* AST, ALT 선정제외기준 부적합

■ **연구계획 변경사항 IRB제출**

- 제출일자: 2014.7.15(화) 이대목동병원 임상시험심사위원회(IRB)
- 주요 변경내용 (Protocol version 1.4)
: 공동연구자 (이화여대목동병원 재활의학과 박가희 전공의) 추가함
- 승인일자: 2014.8.5 (수)

■ **연구대상자 모집건**

- 피험자모집 포스터 추가 부착 완료
 - 1차 중간보고 후 연구대상자 모집공고 포스터 약 20부
 - 마포 노인복지센터 (포스터 2부, 전단지 50부)
 - 서울서남병원 게시판 (10부)
- 피험자모집 포스터 추가 부착 계획
 - 양천구민체육센터 (2부)
 - 신월문화체육센터 (2부)
 - 독동문화체육센터(2부),
 - 계남다목적체육관(2부)

■ **연구대상자 등록 목표 일정**

- 9월 말까지 누적 30명, 11월 말까지 누적 63명 등록 계획 (총 63명)

(다) 결과 입수 및 유효성 평가

- 인체적용시험이 완료되면 인체적용시험 결과 보고서를 입수하여 그 유효성을 평가 후 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청 여부를 결정할 예정임.

(6) 개별인정형 추진 검토

(가) 식약처에 신규 기능성 항목 추가 신청 검토

- ① 인체적용시험 결과 효능 검증 시 개별인정 대행 업체 선정하여 허가 진행
- ② 기능성 원료 신청 및 제품 허가 신청 동시 추진

(나) 개별인정형 인증 신청 준비 : 제조 기준 규격안 설정

① 제조 기준 설정

- ㉠ 원재료 : 겨우살이
- ㉡ 제조방법 : 상기 원재료를 열수 추출하고 여과, 농축하여 제조하여야 함
- ㉢ 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : Chlorogenic acid로서 1.2 ~ 2.0 mg/g 함유되어 있어야 함

② 겨우살이추출물분말 규격

- ㉠ 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미, 이취가 없어야 함
- ㉡ Chlorogenic acid
 - 원료성 제품 : 표시량 이상
 - 최종제품 : 표시량의 80 ~ 120%
- ㉢ 중금속
 - 납(mg/kg) : 1.0 이하

- 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하
- 총수은(mg/kg) : 0.5 이하
- 총비소(mg/kg) : 1.0 이하

㉠ 대장균균 : 음성

③ 최종제품의 요건

㉠ 기능성 내용

- 노인성 근육 감소/손실(sarcopenia)을 예방하는데 도움을 줄 수 있음.
- 근력(muscle strength) 강화에 도움을 줄 수 있음.

㉡ 일일섭취량 : 겨우살이추출물분말 또는 지표물질 Chlorogenic acid 기준 섭취량 설정

- 저용량 효능 시: 겨우살이추출물분말로서 1g (Chlorogenic acid로서 1.2 ~ 2.0 mg)
- 고용량 효능 시: 겨우살이추출물분말로서 2g (Chlorogenic acid로서 2.4 ~ 4.0 mg)

(7) 겨우살이추출물분말 제품 응용 개발 및 용도 확대

(가) 시생산 제품의 안정성 및 지표성분 함량 시험

① 정제 제품의 안정성 및 지표성분 함량 실험

㉠ 목적 : 겨우살이추출물분말 정제 제품의 시생산을 통해 겨우살이추출물분말이 정제 제형에 있어서 물리적, 화학적 안정성 및 지표성분인 Chlorogenic acid의 함량 변화 정도를 확인 하고자 함.

㉔ 정제 제품 배합비

[정제 1개 중량 : 500mg]

| | | 저용량 제품 | 고용량 제품 |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 겨우살이추출물 1일 섭취량(mg) | | 1,000 | 2,000 |
| 섭취량 및 섭취방법 | | 1일 2회, 1회 4정 | 1일 2회, 1회 4정 |
| 배합비 (%) | 겨우살이추출물 | 25.00 | 50.00 |
| | 카라멜색소분말 | 25.00 | - |
| | 결정셀룰로오스 | 42.80 | 42.80 |
| | 카르복시메틸셀룰로오스 | 2.00 | 2.00 |
| | 스테아린산마그네슘 | 1.20 | 1.20 |
| | 코팅제(*OPADRY) | 3.70 | 3.70 |
| | 코팅색소(갈색) | 0.30 | 0.30 |
| | 합계 | 100.00 | 100.00 |

*OPADRY(1050180000) : Polyvinyl alcohol(40%), Calcium carbonate(17.5%), Titanium dioxide(25%), Triethyl citrate(7.5%), HPMC 15CPS(10%)

㉕ 시생산 제품 공정도

원료 칭량 → 혼합 → 타정 → 코팅 → 선별 → 검사 → 포장

㉖ 겨우살이 정제 특성

- 붕해도

| 용해도 | 저용량 제품 | 고용량 제품 |
|-----|--------|--------|
| | 적합 | 적합 |

* 60min 붕해도 테스트 시 저용량, 고용량 제품 모두 붕해도가 적합함.

* 테스트 조건 : 37±2℃ 온도에서 1시간 내에 완전 붕해

- 색상

| 성상 | 저용량 제품 | 고용량 제품 |
|----|------------------|------------------|
| | 연한 자주빛이 도는 회색 | 연한 자주빛이 도는 회색 |

* 저용량, 고용량 두 제품 모두 동일한 성상을 나타내었다.

- 미생물

| 미생물 (cfu/g) | 저용량 제품 | 고용량 제품 |
|-------------|--------|--------|
| 대장균군 | 음성 | 음성 |
| 일반세균 | 음성 | 음성 |
| 진균 | 음성 | 음성 |

* 겨우살이 저용량, 고용량 정제 제품의 미생물(대장균군, 일반세균, 진균)적 안정성을 확인 하였다.

- 중금속

| 중금속 | 저용량 제품 | 고용량 제품 |
|------------|--------|--------|
| 납(mg/kg) | 0.1447 | 0.2680 |
| 총비소(mg/kg) | 0.0849 | 0.1716 |
| 카드뮴(mg/kg) | 0.0108 | 0.0223 |
| 총수은(mg/kg) | 불검출 | 불검출 |

- 저용량, 고용량 제품의 중금속 분석을 실시 하였으며, 규격 내에 적합한 수준을 확인 하였다.

- 지표성분 함량

| Chlorogenic acid (ug/g) | 저용량 제품 | 고용량 제품 |
|-------------------------|--------|--------|
| | 490.00 | 950.00 |


* 겨우살이추출분말 원료의 지표성분인 Chlorogenic acid 함량이 1,810ug/g 임.

* 저용량 제품의 겨우살이추출분말 함량은 25% → Chlorogenic 452.5ug/g(이론치)

* 고용량 제품의 겨우살이 분말 함량은 50% → 905ug/g(이론치)

* 이론치와 비슷한 지표성분 함량을 확인 하였다.

- 겨우살이 정제 제품(저용량, 고용량)의 한국기능식품 연구원 검사 성적서

| | | | |
|---|-------------------------------------|-------------------|-------------|
| 제 D2014040228 호 검사 성적서 | | | |
| 검체명 | 겨우살이(저) | 제조일자 (유통기한) | 2014-03-26 |
| 의뢰인 | 업체명 | (주)네추럴웨이 | 성명 |
| | 주소 | 경기 포천시 설운동 584-13 | |
| 제조번호 | | 접수년월일 | 2014-04-04 |
| 검사의뢰목적 | 참고용 | 검체접수번호 | D2014040228 |
| 귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 희 | | | |
| 시험항목 | 결과 | 검사담당자 | |
| 성상 | 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 희분홍색의 제외정제 | 김수희 | |
| 대장균군 | 음성 | 허태영 | |
| chlorogenic acid(mg/g) | 0.49mg/g | 유제명 | |
| 납(mg/kg) | 0.1447mg/kg | 엄유리 | |
| 총비소(mg/kg) | 0.0849mg/kg | 엄유리 | |
| 카드뮴(mg/kg) | 0.0108mg/kg | 엄유리 | |
| 중수은(mg/kg) | 불검출 | 박재롬이 | |
| 분석법-업체제공 | | | |
| 2014년 4월 15일 한국기능식품연구원 | | | |
|  | | | |
| (사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 031)628-2400 FAX(031)628-0400-1 | | | |

제 D2014040229 호

검 사 성 적 서

| | | | | |
|--------|---------|-------------------|-------------|-----|
| 검체명 | 겨우살이(고) | 제조일자 (유통기한) | 2014-03-26 | |
| 의뢰인 | 업체명 | (주)네추럴웨이 | 성명 | 최종현 |
| | 주소 | 경기 포천시 설운동 584-13 | | |
| 제조번호 | | 접수년월일 | 2014-04-04 | |
| 검사의뢰목적 | 참고용 | 검체접수번호 | D2014040229 | |

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 희

| 시험항목 | 결과 | 검사담당자 |
|------------------------|-------------------------------------|-------|
| 성상 | 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 회분홍색의 제과정제 | 김수희 |
| 대장균군 | 음성 | 허태영 |
| chlorogenic acid(mg/g) | 0.95mg/g | 유재명 |
| 납(mg/kg) | 0.2680mg/kg | 엄유리 |
| 중비소(mg/kg) | 0.1710mg/kg | 엄유리 |
| 카드뮴(mg/kg) | 0.0223mg/kg | 엄유리 |
| 중수은(mg/kg) | 불검출 | 박세류이 |

분석법-업체제공

2014 년 4 월 15 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khni.re.kr> 전화번호 051-628-2100 FAX(031)628-0400-1

그림 77. 한국기능식품연구원 검사성적서

② 겨우살이추출분말을 첨가한 셰이크 개발

㉠ 개발 목적

- 겨우살이추출분말을 적용한 소비자 중심, 시장성 있는 제품 개발
- 남녀노소 누구나 섭취가 용이한 기호성 높은 겨우살이 셰이크 제품화를 통해 겨우살이의 섭취를 용이하게 함
- 겨우살이 소재 시장의 확대를 목적으로 함

㉡ 겨우살이 첨가 셰이크 개발

- 맛 타입 개발
 - * 관능 및 기호성 높음 셰이크 개발을 위한 다양한 맛의 셰이크 프로토타입 개발
 - * 커피, 바나나, 딸기, 녹차, 곡물, 호두, 고구마 등 다양한 맛 타입 검토한 결과, 고구마 맛의 셰이크 타입이 건강 컨셉과 잘 맞고 기호성이 높음.
- 최종 배합 개발

| 번호 | 원료명 | 원산지 | 배합비 (%) |
|-----------|----------------------|------------|-------------|
| 1 | supro661(ISP:분리대두단백) | 미국산 | 21.40 |
| 2 | 뉴트리오스(밀식이섭유) | 프랑스산 | 14.00 |
| 3 | 고구마분말 | 국내산 | 11.20 |
| 4 | 프루타피트오에프 | 네덜란드산 | 10.24 |
| 5 | 혼합탈지분유 | 호주산 | 10.23 |
| 6 | 제네텍스 | 국내산 | 8.38 |
| 7 | 썬믹스 알파전분 | 국내산 | 7.50 |
| 8 | 정백당 | 국내산 | 6.73 |
| 9 | 썬프리젤 | 국내산 | 4.00 |
| 10 | 폴리텍스트로스-P | 국내산 | 2.20 |
| 11 | 겨우살이 분말 | 국내산 | 1.00 |
| 12 | 미네랄프리믹스-큐 | 국내산 | 1.26 |
| 13 | 가르시니아감보지아(HCA60) | 인도산 | 1.25 |
| 14 | 비타민프리믹스-와이 | 국내산 | 0.31 |
| 15 | 고구마 향 | 국내산 | 0.30 |
| 소계 | | | 100.00 |

㉢ 셰이크 제조공정 설계

- 과립 및 공정 설계
 - * 셰이크의 용해성 향상 및 뭉침 현상 억제를 위해 과립 및 살균 공정 설계

| 공정 | 공정 내용 | 공정 관리 |
|----|--|------------|
| 과립 | 1.과립액분사150~200rpm15~20분간과립진행(15~20min) | 수분함량(6~8%) |
| 살균 | 1.과립기의온도를105℃로증가 2.중심온도가73℃가되는시점부터살균진행35min 3.중심온도는30min동안은80℃내외로유지 4.이후5min동안73℃이상으로유지 | 유동층과립장치 |

- 최종 공정 설계

| 구분 | 구분 | Fan (Hz) | Inlet air(℃) | Material(℃) | 수분함량(%) | 시간(분) | 비고 |
|----|---------------|----------|--------------|-------------|---------|-------|-----------------|
| 1 | Premix | 25 | 40이하 | - | 3~5% | 15 | - |
| 2 | Granule1 | 25 -> 31 | 40이하 | - | | 8~10 | 과립액분사 200RPM |
| 3 | Granule2 | 31 -> 40 | 40이하 | - | 6~8% | 8~10 | 과립액분사 200RPM |
| 4 | Comeup1 | 40 -> 32 | 105 | -> 73 | - | 25~30 | |
| 5 | Main heating1 | 32 | 105 | 73 -> 80 | | 10 | |
| 5 | Main heating2 | 32 | 105 | 80 | | 20 | |
| 6 | Main heating3 | 32 -> 30 | 70 | 73 | | 5~10 | |
| 7 | Cooling | 30 | 20 | 45 | 2%미만 | 10 | |
| 9 | After mixing | 25 | 20 | - | | 5 | 분말 향 첨가 |

- 용해성 관련 패널 관능 평가

* 기존과 개선(과립형) 믹스의 용해 정도 확인(육안)

* 750um pore size 체에 동일양(100ml) 걸러 걸러짐 정도 확인

목적: 기존 시판 제품과 과립을 적용한 개선 제품간의 관능 특성 차이 파악

방법: 분말의 분산 정도를 파악하기 위하여 동일하게 제조 (30회 흔들어 혼합)

대상: 전문패널(n=17)

시료: 기존(과립 전) / 개선(과립 후)

결과(5점 척도)

ㄱ. 관능 기호도

| | 외관 기호도 | 식감 기호도 | 맛 기호도 | 전반적인 기호도 | 비고 |
|----|--------|--------|-------|----------|------|
| 기존 | 2.05 | 3.36 | 3.36 | 3.00 | 시판제품 |
| 개선 | 3.13 | 3.72 | 3.48 | 3.50 | 과립적용 |

** 기호도 : 2점(싫다) ~ 3점(보통이다) ~ 4점(좋다)

- 외관 기호도는 기존 제품에 비해 개선 제품이 상대적으로 우수함

- 식감 및 맛 기호도는 개선 제품이 우수

- 전반적인 기호도는 기존 제품에 비해 개선 제품이 우수
- 나. 관능 특성

| | 덩어리 진 정도 (적다-많다) | 목넘김성 (부드러운 정도) |
|----|---------------------|-------------------|
| 기존 | 4.32 | 3.25 |
| 개선 | 1.94 | 3.72 |

** 덩어리 진 정도 : 1점(적다) ~ 3점(보통이다) ~ 5점(많다)

** 목 넘김성 : 1점(전혀 부드러움 없다) ~ 3점(보통이다) ~ 5점(매우 부드럽다)

- 과립을 한 개선 제품에 비해 기존 제품은 잘 풀리지 않음
(분말이 잘 풀리지 않고 작은 알갱이로 뭉쳐 있음)
- 기존 제품에 비해 개선 제품이 목넘김성이 더 부드럽다고 평가
(5점에 가까울수록 부드럽다고 평가 / 기호도 아님)

결론

- 과립 전 보다 과립 후의 분산성이 유의적으로 우수한 것으로 나타남

㉠ 겨우살이 컨셉의 웨이크 대량 생산화

- 겨우살이 웨이크 제조 배합비 및 수율

| 번호 | 원료명 | 원산지 | 배합비 (%) | 소요량 | | |
|-----------|--------------------------|------------|---------------|---------------|--------------|-------------------|
| | | | | g/EA | kg /140kg | 1batch /수율 95% |
| 1 | supro661 (ISP:분리대두단백) | 미국산 | 21.4000 | 8.5600 | 29.960 | 31.537 |
| 2 | 뉴트리오스(밀식이첨유) | 프랑스산 | 14.0000 | 5.6000 | 19.600 | 20.632 |
| 3 | 고구마분말 | 국내산 | 11.2000 | 4.4800 | 15.680 | 16.505 |
| 4 | 프루타피트오에프 | 네덜란드산 | 10.2400 | 4.0960 | 14.336 | 15.091 |
| 5 | 혼합탈지분유 | 호주산 | 10.2300 | 4.0920 | 14.322 | 15.076 |
| 6 | 제네틱스 | 국내산 | 8.3800 | 3.3520 | 11.732 | 12.349 |
| 7 | 썬믹스 알파전분 | 국내산 | 7.5000 | 3.0000 | 10.500 | 11.053 |
| 8 | 정백당 | 국내산 | 6.7300 | 2.6920 | 9.422 | 9.918 |
| 9 | 썬프리젤 | 국내산 | 4.0000 | 1.6000 | 5.600 | 5.895 |
| 10 | 폴리텍스트로스-P | 국내산 | 2.2000 | 0.8800 | 3.080 | 3.242 |
| 11 | 겨우살이 분말 | 국내산 | 1.0000 | 0.4000 | 1.400 | 1.474 |
| 12 | 미네랄프리믹스-큐 | 국내산 | 1.2600 | 0.5040 | 1.764 | 1.857 |
| 13 | 가르시니아카보지아 (HCA60) | 인도산 | 1.2500 | 0.5000 | 1.750 | 1.842 |
| 14 | 비타민프리믹스-와이 | 국내산 | 0.3100 | 0.1240 | 0.434 | 0.457 |
| 15 | 고구마 향 | 국내산 | 0.3000 | 0.1200 | 0.420 | 0.442 |
| | 소계 | | 100.0000 | 40.000 | 140.00 | 147.37 |

(나) 가속실험을 통한 유통기간 산정

① 정제 제형 가속실험 결과

- 목적 : 유통기간 내에 겨우살이 정제 제품(저용량, 고용량)의 미생물적 안정성과 지표 물질의 함량 변화를 알아보고자 함

㉠ 미생물

| | 0주차 | | 4주차 | | 8주차 | | 12주차 | | 14주차 | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 |
| 대장균군 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 |
| 일반세균 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 |
| 진균 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 | 음성 |

※ 위 데이터의 결과는 가혹 조건인 45℃ 보관 온도를 기준으로 하였으며, 동일한 실험을 25℃, 35℃에서도 수행 함.

- 주차별 대장균, 일반세균, 진균이 모두 음성으로 나왔으며, 이를 통해 미생물적 안정성을 확인하였다.

㉡ 관능 변화

| | 0주차 | | 4주차 | | 8주차 | | 12주차 | | 14주차 | |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 |
| 시각(성상, 색, 외관) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 미각(맛) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 후각(향, 냄새) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

※ 0주차 제품을 표본(5점 기준*)으로 하여 주차별 관능의 변화 정도를 확인함.

* 5점 : 매우양호, 4점 : 양호, 3점 : 보통, 2점 : 양호하지 못함, 1점 : 매우 양호하지 못함

- 그 결과 14주차가 지난 시점에서 시각, 미각, 후각의 변화가 0주차와 비교했을 시 변화가 없음을 확인 하였다.

㉢ 지표성분

| | | 0주차 | | 4주차 | | 8주차 | | 12주차 | | 14주차 | |
|-------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 | 저용량 | 고용량 |
| 보관 온도 | 25℃ | 490.00 | 950.00 | 410.97 | 860.90 | 476.77 | 913.88 | 481.14 | 981.16 | 478.24 | 941.70 |
| | 35℃ | 490.00 | 950.00 | 410.81 | 829.24 | 475.34 | 913.91 | 486.77 | 983.66 | 469.76 | 936.70 |
| | 45℃ | 490.00 | 950.00 | 429.63 | 822.75 | 473.72 | 905.57 | 486.56 | 996.34 | 474.61 | 955.04 |

※ 0주차 데이터는 정제 제품 시 생산 직후 한국기능식품연구원에 의뢰한 결과 데이터를 기준으로 하였음.(25℃ 온도 기준)

- 보관온도별, 겨우살이추출물 함량별(저용량, 고용량) 지표성분인 Chlorogenic acid의 함량 변화가 크지 않으며, 이를 통해 주차별 지표성분의 안정성을 확

인 하였다.

② 겨우살이추출분말을 첨가한 셰이크의 유통기한 테스트

㉠ 목적 : 가속실험을 통한 유통기한 설정

㉡ 실험 방법 : 25℃, 35℃, 45℃ 항온항습기에 저장 후 각각 7일 간격으로 측정

㉢ 분석 내용

- 색상, 맛, 냄새: 9점 척도 관능 측정 (냉장 보관 제품 Reference로 함)

- 미생물: 대장균군, 일반세균, 바실러스 cfu 분석

㉣ 결과

ㄱ. 25℃ 저장 테스트

| 저장일 | 색상 | 맛 | 냄새 | 대장균군 | 일반세균 | 바실러스 |
|-------|----|---|----|------|--------|------|
| 1일 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 123.33 | 음성 |
| 7일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 140.00 | 음성 |
| 14일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 150.00 | 음성 |
| 21일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 150.00 | 음성 |
| 28일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 196.67 | 음성 |
| 35일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 183.33 | 음성 |
| 42일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 193.33 | 음성 |
| 49일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 183.33 | 음성 |
| 56일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 176.67 | 음성 |
| 63일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 160.00 | 음성 |
| 70일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 196.67 | 음성 |
| 77일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 186.67 | 음성 |
| 84일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 173.33 | 음성 |

ㄴ. 35℃ 저장 테스트

| 저장일 | 색상 | 맛 | 냄새 | 대장균군 | 일반세균 | 바실러스 |
|-------|----|---|----|------|--------|------|
| 1일 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 150.00 | 음성 |
| 7일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 140.00 | 음성 |
| 14일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 166.67 | 음성 |
| 21일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 163.33 | 음성 |
| 28일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 196.67 | 음성 |
| 35일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 163.33 | 음성 |
| 42일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 136.67 | 음성 |
| 49일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 150.00 | 음성 |
| 56일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 143.33 | 음성 |
| 63일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 160.00 | 음성 |
| 70일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 163.33 | 음성 |
| 77일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 160.00 | 음성 |
| 84일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 153.33 | 음성 |

ㄷ. 45℃ 저장 테스트

| 저장일 | 색상 | 맛 | 냄새 | 대장균군 | 일반세균 | 바실러스 |
|-------|----|---|----|------|--------|------|
| 1일 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 143.33 | 음성 |
| 7일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 156.67 | 음성 |
| 14일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 176.67 | 음성 |
| 21일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 173.33 | 음성 |
| 28일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 153.33 | 음성 |
| 35일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 126.67 | 음성 |
| 42일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 106.67 | 음성 |
| 49일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 136.67 | 음성 |
| 56일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 116.67 | 음성 |
| 63일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 186.67 | 음성 |
| 70일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 143.33 | 음성 |
| 77일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 113.33 | 음성 |
| 84일경과 | 9 | 9 | 9 | 음성 | 116.67 | 음성 |

㉑ 결론

- 유통기한 테스트 분석 결과를 토대로 12개월의 유통기한 설정함.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구 목표 및 달성도

1. 1차년도

| 목표 | 내용 및 범위 | 달성도 (%) |
|---|---|---------|
| 한국산 겨우살이 및 자생식물 추출법 개발 | - 냉수 및 열수 추출법의 사용 - 각 방법으로 만든 추출물의 활성 비교 | 100 |
| 근육세포에서의 작용 확인 | - 미토콘드리아 활성과 관련하는 PGC-1 β , SIRT1, Tfam mRNA 발현 정도 확인 - 발열반응(thermogenesis)와 관련하는 UCP-1 mRNA 발현 정도 확인 | 100 |
| muscle atrophy의 내분비학적 접근 | - Glucocorticoid에 의한 atrogen-1/MuRF-1 변화 확인 | 100 |
| 실험동물에서 Fasting에 따른 muscle atrophy | - 근기능 관련 유전자 변화 관찰 (microarray, PCR array) - 혈당치(blood glucose) 변화 측정 - 근육 무게(muscle weight) 변화 측정 - Atrogen-1/MuRF-1 mRNA level 측정 - 근 기능과 밀접한 관련이 있는 SIRT3 발현량 확인 | 100 |
| 실험동물에서 겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분 식이에 따른 muscle hypertrophy | - 근육 무게 변화 측정 - 근육 fiber diameter 측정 - grip strength test - treadmill test - swimming pool test - UA, AICAR 및 metformin과 비교 연구 | 100 |
| 시료 식이에 의한 유전자 발현 변화 조사 | - 트리테르페노이드 식이에 의한 근기능 관련 유전자 변화 관찰(microarray, PCR array) - Atrogen-1/MuRF-1/IGF-1 mRNA level 측정 - muscle mass 변화와 관련하여 myostatin/follistatin 발현량 확인 - 혈액 내 성장 조사(Plasma IGF-1) - SIRT3 발현량 확인 | 100 |
| 주성분의 기전 연구 : IGF-1 pathway 규명 | - 동물 모델에서 트리테르페노이드 식이에 의한 Akt 활성 확인(W/B) - 근육세포에서 insulin/IGF-1 유무에 따른 Akt, S6K, ERK, FoxO 활성 확인(W/B) - 근육세포에서 insulin/IGF-1 유무에 따른 p-IGF-1 receptor 변화 측정(W/B) - Wortmannin 혹은 LY-294002(IGF-1 inhibitor)에 의한 영향 확인 - CR에 의한 mTOR pathway와의 비교 | 100 |

| | | |
|---|---|------------|
| <p>트리테르페노이드 식이에 의한 지방산 산화</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 식이에 따른 fiber proportion 변화 확인 - 지방산 산화 관련 유전자 변화 확인 (UCP3, mCPT1, PDK4) - 지방산 저장 관련 유전자 변화 확인 (SCD1, FAS, SREBP1c) - 지방산 흡수 관련 유전자 변화 확인 (FAT/CD36, LPL) - 지방량과 근육량 변화 비교 | <p>100</p> |
| <p>겨우살이 관련 조사/ 인체 적용 실험 기반 구축</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 근 기능 저하 억제 관련 제품 수집 및 분석 - 근 기능 관련 자료 및 문헌 조사 - 기능성 인정을 위한 건강기능성 모듬토의 신청 - 개별인정 가능성 타진 및 추가필요 자료 준비 | <p>100</p> |
| <p>겨우살이 추출물을 이용한 제형연구</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 제형 및 type 결정(연질캡슐, 음료 형태 등) - 노인용, 스포츠용 제형 선정 - 부원료 적합성 연구 - 공업화를 위한 제조 공정 확립 | <p>100</p> |
| <p>인체 적용시험 Protocol 작성</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 현재 근위축 억제에 대한 개별인정 항목이 없음. - 바이오 마커 및 측정 항목 선정 | <p>100</p> |
| <p>인체적용시험용 시제품 제작</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 지표 물질 함유량 선택 - 시제품 가공 처리법에 따른 활성도 조사 - 시제품 제작(인체적용시험용) 후 관련 실험 진행 | <p>100</p> |
| <p>겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분의 인체 적용 시험(1단계)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - CRO/ 임상시험기관 선정(피험자수, 평가항목 등) - 인체 적용시험을 위한 제형 및 유효성분 함유량 결정 - 인체 적용 시험 계약 체결 | <p>100</p> |

2. 2차년도

| 목표 | 내용 및 범위 | 달성도 (%) |
|--|--|---------|
| 겨우살이 추출물 및 자생식물 추출물과 트리테르페노이드 성분의 식이에 의한 혈중 성분 변화 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 혈액 내 성분 분석 (adiponectin, T3, testosterone, insulin, cholesterol, c-reactive protein) - Cortisol, Testosterone, DHEA, Thyroxine의 DELFIA법 개발 | 70 |
| 주성분 물질의 노화 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 노화 관련 유전자(SMP30) 발현으로 세포 보호 및 항산화 효과 확인 - 미토콘드리아 내 HSP10의 발현으로 근육 보호 확인 | 100 |
| 트리테르페노이드 성분의 Notch signaling에 미치는 영향 조사 | <ul style="list-style-type: none"> - CD34 발현을 통해 조혈세포의 생성 확인 - 기질인 Delta-1 및 저해제인 Numb의 발현량을 통해 Notch-1 발현 확인 - Notch signaling을 통한 노화근육 재생 정도 확인 | 100 |
| 주성분의 기타 효능 조사 | <ul style="list-style-type: none"> -항염증 효능 조사 : NF-kB, TNF-α, IL-6, IL-1β 발현량 확인 -해당작용에 미치는 영향:G6P, PEPCK 발현량 확인 -근기능 관련 nucleic acid 수용체 발현에 미치는 영향 조사 : PPAR-α, PPAR-γ, PPAR-δ, LXR-α, LXR-β, FXR-α | 100 |
| 겨우살이 추출물 및 트리테르페노이드 성분의 인체 적용 시험(2단계) | <ul style="list-style-type: none"> - 인체적용 시험 진행 사항 점검 - 결과 입수 및 유효성 평가 | 50 |
| 개별 인정형 인증 추진 검토 | <ul style="list-style-type: none"> - 식약청에 신규 기능성 항목 추가 신청 검토 (근 기능 저하 억제 및 근육 손실 방지 효과) - 개별인정형 인증 신청 준비 | 50 |
| 겨우살이 추출물 제품 응용 개발 및 용도 확대 | <ul style="list-style-type: none"> - 과립화 및 초미세 분말화, 유화 분산제 개발 - 시생산 제품의 안정성 및 지표성분 함량 시험 - 가속 실험을 통한 유통기간 산정 | 100 |
| 겨우살이 소재의 사업기반 조성 | <ul style="list-style-type: none"> - 대량 생산을 위한 원료 확보 방안 구축 - 관능평가를 통한 소비자 조사 - 제품 방향 결정: 대상 소비자 중심 시장 고려 제품 컨셉 및 홍보방안 구축 | 100 |

제 2 절 관련분야 기술 발전에의 기여도

1. 국산 자생식물 연구 개발 촉진

기존에 자생식물 연구는 인삼과 홍삼을 제외하곤 체계적인 연구가 진행되지 못하였고 현재 사용되고 있는 원료들도 동의보감 등의 한방지식에 의거하거나 구전 효능에 의해 사용되는 경우가 많았다. 정관장으로 대표되는 홍삼 제품은 이미 오랜동안 연구하여 현재의 건강기능식품 원료의 대표주자로 여겨지고 있다. 이는 건강기능식품 판매의 50%를 여전히 홍삼 제품이 차지하고 있는 것을 근거로 들 수 있다.

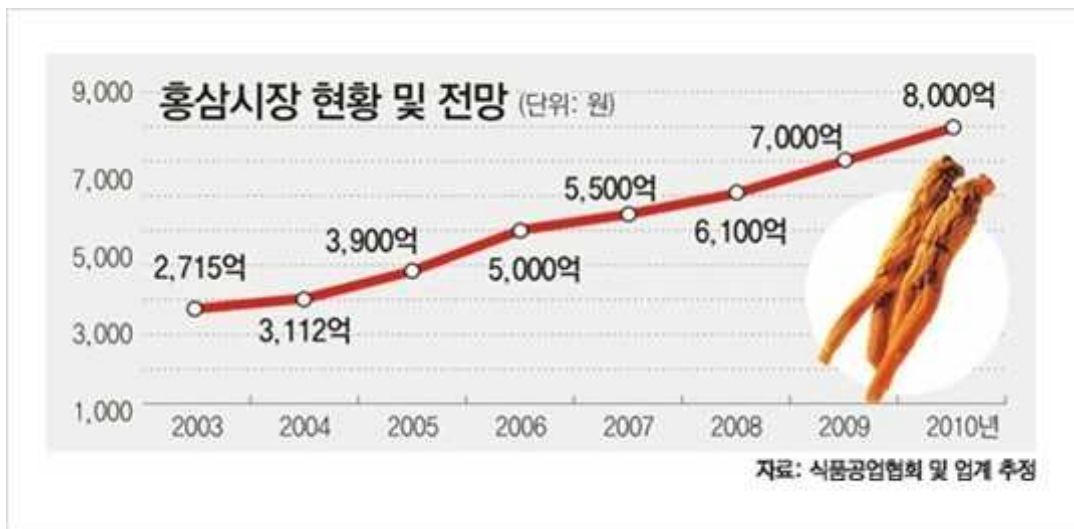


그림 78. 홍삼시장 현황 및 전망

본 연구팀은 겨우살이라는 자생식물을 이미 20년 가까이 연구해오면서 본 과제와 관련한 근 위축 연구뿐만이 아니라 항암, 면역, 항비만, 항당뇨, 생명연장 등 다양한 분야에서 연구를 진행해 왔다. 이를 통해 겨우살이라는 새로운 자생식물의 활용이 가능해졌으며 다양한 분야에서의 활용 가능성을 나타내어 앞으로가 더욱 기대가 된다.

2. 근 위축 개별인정 항목 신설

본 과제를 통해 진행하는 인체적용시험의 적용 분야가 근 위축의 억제 및 근육량 증가이며 이와 관련한 개별인정 항목은 현재 존재하지 않는다(그림 79 참고). 본 과제를 성공적으로 완료하여 개별인정 항목을 신청하게 획득까지 이어진다면 기존에 없던 새로운 개별인정 항목이 신설되고 되고 이를 통해 근위축 증상 효과 개선에 도움을 줄 수 있는 다양한 원료의 개발을 촉진할 수 있다. 이를 위해 개별인정 항목 신설을 위한 모둠 토의를 진행하였으며 회의 결과 새로운 항목 신설에 긍정적인 결론을 도출하여 임상시험까지 실시하게 되었다.

2) 생리활성기능

인체의 구조 및 기능에 대하여 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과로서, 31개의 기능성(아래 표 참조)이 있습니다. 예를 들어 '기억력 개선'에 해당된다면, '기억력 개선에 도움을 줌 (줄 수 있음, 줄 수 있으나 관련 인체적용 시험이 미흡)'으로 인정됩니다.

[2014.8.31. 현재]

| 번호 | 기능성 분야 | 번호 | 기능성 분야 | 번호 | 기능성 분야 |
|----|---------------------------|----|------------------------|----|-------------------------|
| 1 | 기억력개선 | 9 | 관절/뼈건강 | 17 | 칼슘흡수 도움 |
| 2 | 혈행개선 | 10 | 전립선건강 | 18 | 요로건강 |
| 3 | 간건강 | 11 | 피로개선 | 19 | 소화기능 |
| 4 | 체지방감소 | 12 | 피부건강 | 20 | 항산화 |
| 5 | 갱년기여성 건강 | 13 | 콜레스테롤 개선 | 21 | 혈중중성지방개선 |
| 6 | 혈당조절 | 14 | 혈압조절 | 22 | 인지능력 |
| 7 | 눈건강 | 15 | 긴장완화 | 23 | 운동수행능력향상 /지구력 향상 |
| 8 | 면역기능 | 16 | 장건강 | 24 | 치아건강 |
| 25 | 배뇨기능 개선 | 26 | 면역과민반응에 의한 피 부상태 개선 | 27 | 갱년기 남성건강 |
| 28 | 월경 전 변화에 의한 불편 한 상태 개선 | 29 | 정자 운동성 개선 | 30 | 유산균 증식을 통한 여성 의 질 건강 |
| 31 | 머린이 키성장 | | | | |

그림 79. 건강기능식품 개별인정 항목(2014. 08. 31 현재)

3. 원료생산을 위한 추출공정 및 지표물질 설정으로 규격화 확립

대부분의 기능성식품이 갖는 약점의 하나는 명확한 지표물질이 설정되어 있지 않고 원료생산을 위한 공정이 규격화되어 있지 않은 점이다. 겨우살이의 경우 본 연구를 통해 추출공정을 확립(그림 70 참조)하였다는 점과 정도관리를 위한 지표물질이 설정된 것은 그 의의가 크다고 사료된다. 현재 기능성 지표물질 탐색도 진행 중에 있어 이것까지 완성되면 근기능과 관련 연구에 높은 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 새로운 근기능관련 소재 개발

현재까지 근기능 관련 치료약 및 기능성 식품은 매우 제한되어 있다. 본 과제를 통해 겨우살이가 근기능을 강화 또는 근육 위축을 억제하는 효과를 가지고 있음을 밝힌 것은 관련 분야에 새로운 계기를 마련할 수 있는 매우 귀중한 결과라 평가한다.

5. 근기능 위축 억제효과에 대한 기전 규명

겨우살이 추출물과 베틀린산 성분이 단순히 근기능 위축을 억제하는 효과를 가지고 있다는 현상만을 확인한 것이 아니라 그 기전까지 밝힌 것은 기능성 식품 개발에 있어서 명확한 과학적인 근거로 뒷받침한다는 측면에서 관련 연구에 기여도가 크다고 생각한다.

6. 트리테르페노이드계의 BA(Betulinic acid)성분의 근기능 위축 억제효과 처음으로 규명

Ursolic acid(UA)와 같은 트리테르페노이드 성분이 근기능 위축을 억제한다는 사실을 Kunkel 등(그림 80 참고)이 보고하고 미국특허까지 등록하였으나 베틀린산(BA)에 대한 사실은 아직 보고된 바가 없다. 본 연구에서 BA가 근기능 위축을 억제한다는 사실을 그 기전까지 밝힌 것은 세계에서 처음이다. 이를 근거로 제약까지 개발할 수 있는 근거를 마련하게 된 것도 큰 효과다.

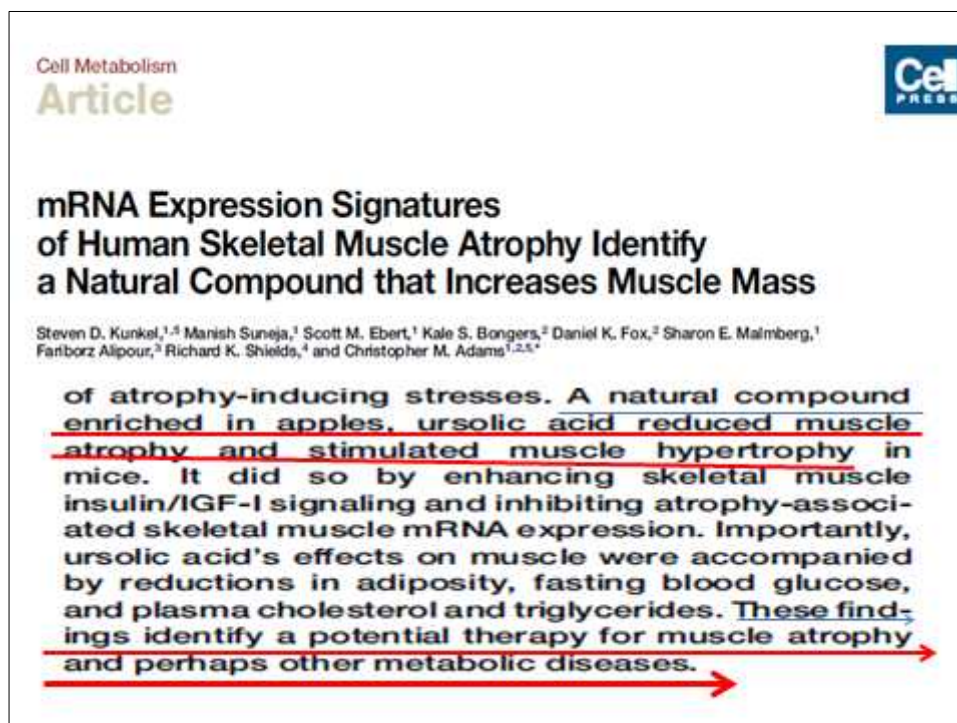


그림 80. UA가 근기능 위축을 억제한다는 것을 최초로 밝힌 논문

7. 제약화를 위한 근거마련

본 연구를 통한 또 하나의 기대효과는 근기능 관련 약이나 항암제등 여러 가지의 제약을 개발할 수 있다는 점이다.

가. 다기능성 항암제 개발을 위한 자료로 활용

- (1) 겨우살이는 항암효과 뿐만 아니라 항당뇨, 고혈압, 기력증진, 생명연장, 항비만 등 다양한 효과가 있다. 겨우살이의 이런 다양한 효능도 함께 갖는 말 그대로 '다기능성 항암제'를 개발함에 있어 본 과제의 결과는 암환자가 갖는 근기능 위축을 감소시킬 수 있는 제약으로도 발전시킬 수 있을 것으로 기대된다.
- (2) 현재 수입되어 사용되고 있는 겨우살이 항암제(그림 81 참고)의 홍보물을 보면 겨우살이는 삶의 질(quality of life)를 증진시킨다고 광고하고 있다. 식욕증진, 통증완화, 숙

면, 면역증진 등 다양한 효과를 말하지만 근기능에 대한 부분은 언급이 없다. 따라서 본 연구결과는 이런 측면에서 매우 큰 의미가 있다고 판단된다.

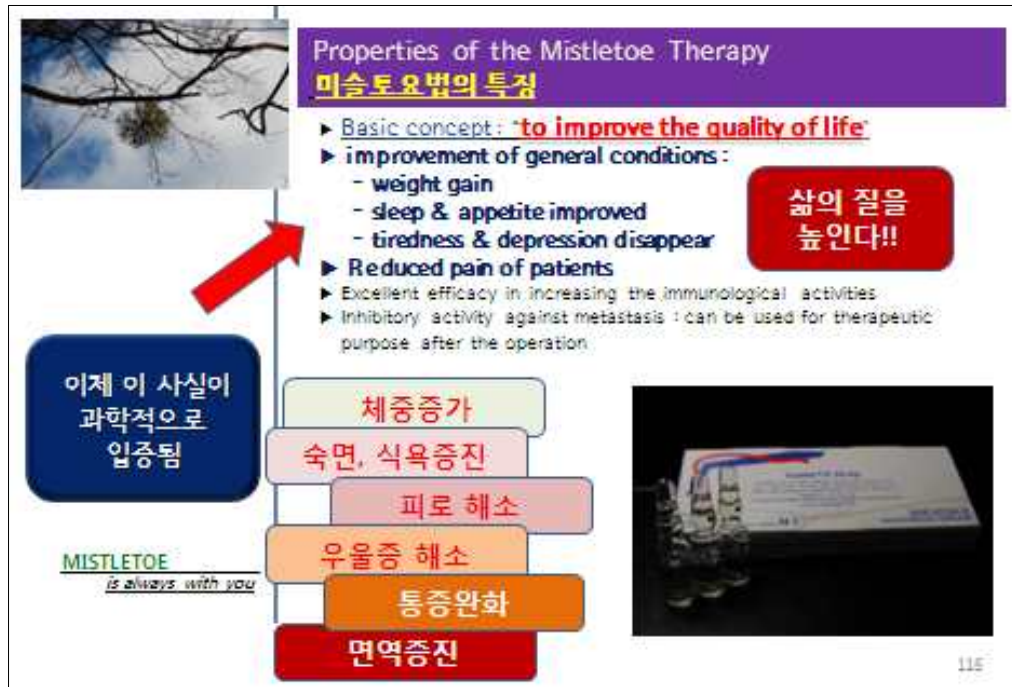


그림 81. 겨우살이 항암제의 다양한 효능

나. 베타린산(BA)의 응용

- (1) BA는 현재 새로운 항암제로서 임상시험 중에 있다. 이외에 본 연구실에서는 BA가 항비만, 항당뇨 그리고 생명을 연장한다는 결과도 가지고 있다. 여기에 본 연구에서 근기능 위축 억제 효과와 근 비대 효능까지 더하면 BA의 다기능성 항암제는 물론 항당뇨약까지 개발할 수 있게 되어 새로운 영역을 구축할 수가 있다.
- (2) BA유도체(그림 23 참고)가 다양한 대사 기능의 센서 역할을 하는 AMPK를 증가시킨다는 결과도 갖고 있어 향후 본 연구 결과를 토대로 근기능 관련도 함께 연구할 수 있는 기초를 확립하였다는 측면에서도 본 연구의 의미가 매우 크다고 사료됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 실용화 계획

1. 산업화 계획

가. 일반식품 개발

(1) 일반 식품 원료로 활용

(가) 겨우살이는 식규 65421-11013에 의거하여 식품 부원료로 사용이 가능함.


식품의약품안전청

우 122-704 서울특별시 은평구 녹번동 5번지 / 전화 (02) 380-1665-8 / 직송 (02) 382-4892
식품규격과 과 장 김희원 연구관 김동승 담당자 장길진

문서번호 식규 65421-11013
시행일자 2001. 8. 22
수신 김종배, 이관희
경북 포항시 북구 흥해읍 남송리
3번지,
한동대학교 생물식품공학부

제목 식품원료 사용 가능 여부에 대한 검토 의견

1. 민원서류1807호(2001. 8. 7)와 관련입니다.
2. 위 대호로 귀하께서 문의하신 내용에 대하여 검토한 결과, 겨우살이(Mistletoe : *Viscum album coloratum*)는 여러가지 나무류 속주로 하여 성장하는 반기생식물로서 오래 전 부터 약용 및 식품으로 사용된 예가 있고 약리작용 등이 보고되고 있는 바, 겨우살이 (Mistletoe : *Viscum album coloratum*)는 식품의 부원료로서 사용가능함을 알려드리니 업무에 참고하시기 바랍니다.
3. 참고로, 식품의 부원료는 식품공전 제3. 2. 1) (7) ㉔ ㉕에 의하면 a)원료 배합시의 기준으로 50% 미만(배합수는 제외)사용하여야 하며, b)부원료에 해당하는 원료를 혼합할 경우 5종류 이하만 혼합가능하며 혼합성분의 총량이 제품의 50% 미만(배합수 제외)이어야 한다. 다만, 다류, 음료류, 주류 및 향신료 제조시에는 제품의 구성원료중 식품의 부원료에 속하는 식품성 원료가 1가지인 경우에는 주원료로 사용가능함을 알려드립니다. 끝.



식품의약품안전청장

그림 82. 겨우살이 원료의 식품원료 사용가능여부에 대한 식약처 의견

(나) 엄선된 겨우살이 원료를 활용하여 확립된 공정과 지표물질을 근거로 신뢰할 수 있는 식품 원료로 공급가능

(2) 겨우살이를 기반으로 한 음료등 다양한 제품 개발

삼양사에서 이미 시제품까지 개발한 상태인 바 개별인증과 관계없이 다양한 일반식품을 생산하여 사업화 할 수 있다고 판단됨.

나. 개별인증 및 기능성 식품 개발

(1) 노인성 근위축 환자 대상 식품 개발

연령에 따른 노화에 직접적인 영향을 받는 장기 중 하나가 근육이다. 나이가 들어 노화가 진행됨에 따라 일반적으로 근육이 줄어들어 신체를 지탱하기 어려워지게 되고 이로 인해 허리가 굽고 체격이 왜소해지게 된다. 줄어든 근육량으로 인한 운동력 저하는 노인 사고 중 낙상으로 인한 비율이 크게 증가하는 것으로도 확인할 수 있다. 이를 해결하기 위해선 적절한 운동으로 인해 근육의 소실을 막는 것이지만 그러한 이것만으로는 해결할 수가 없는 경우가 있다. 특히 운동을 할 수 없는 환자나 노인의 경우 한계가 있다. 이를 보완하기 위한 방법으로 근 소실 억제 및 근육량 증가의 효과를 가진 겨우살이 원료를 이용한 건강기능식품을 개발한다면 노년층의 근 위축으로 인한 사회적 비용 및 노년층의 건강에 이바지함은 물론 암환자나 운동을 할 수 없는 사람들에게 유용하게 활용될 수 있다고 평가된다.

(2) 장기 입원환자 대상 식품 개발

현재 병원 구내매점 등에서 병문환용으로 시판되는 다양한 음료 및 식품 시장은 일반식품 위주로 편성되어 있으며 환자의 기력 회복이나 근기능을 회복시킬 수 있는 기능은 없다. 일반적으로 장기 입원환자들은 오래 침상에 누워 있는 경우가 많으며 그 결과 사용하지 못하는 근육들의 부피가 줄어드는 위축이 자연적으로 일어나게 된다. 운동을 하지 못하는 장기입원 환자의 몸무게가 주는 것도 이 때문이다. 이를 대상으로 금번 진행 중인 근 위축 억제 효과의 겨우살이 인체적용시험이 성공적으로 완료되고 근 위축 억제에 도움을 줄 수 있다는 개별인정을 획득한다면 장기 입원환자들을 대상으로 하는 회복 음료 혹은 식품 등의 새로운 마켓을 개척할 수 있다고 믿는다. 이는 현재까지 시도되지 않은 새로운 시장으로 블루오션의 가능성을 기대할 수 있다.

(3) 암환자 기력회복용 식품 개발

국내 성인 사망률의 높은 비중을 차지하고 있는 질환인 암은 다양한 종류만큼이나 많은 환자들을 만들어내고 있다. 암으로 인한 통증만큼이나 암환자들을 고통스럽게 하는 것은 없다. 화학요법으로 인한 부작용인 식욕 저하 및 근 소실로 인한 기력 감소는 암환자들이

겪어야 하는 더 큰 고통이다. 화학요법으로 인해 음식을 먹어도 그 맛을 느끼지 못하게 되고 또 통증과 약물 주사의 부작용으로 식이량이 줄 수밖에 없다. 이러한 식이 감소에 의한 기력 감퇴를 해결하기 위해 근 위축 억제 방지 및 근육량 증가 효과를 가진 기력회복용 식품 개발 시 암환자들의 QOL(Quality of Life)에 큰 도움을 줄 수 있고 이런 기능을 가진 소재로서 겨우살이는 최고의 선택일 될 것으로 생각한다.

제 2 절. 기술확산 계획

1. 겨우살이 인공재배

겨우살이의 사용을 위한 보편화에 있어서 가장 걸림돌의 하나는 원료확보에 제한성이다. 장기적으로 볼 때 이 문제를 해결할 수 있는 가장 현실적인 방법은 인공재배다.

가. 기존 겨우살이 인공재배 현황

현재 겨우살이는 정부과제를 통해 이미 2000년도에 농림부 작물시험장에서 인공재배를 시도한 바 있다. 또한, 최근에는 민간에서도 겨우살이의 인공재배에 성공하여 겨우살이의 인공재배의 길이 많이 열려있다. 본격적인 겨우살이 인공재배가 시작되면 우수한 한국산 겨우살이를 대량으로 생산하게 되면 식품 및 제약 사업에 원료를 충분히 공급할 수 있을 것으로 기대된다.

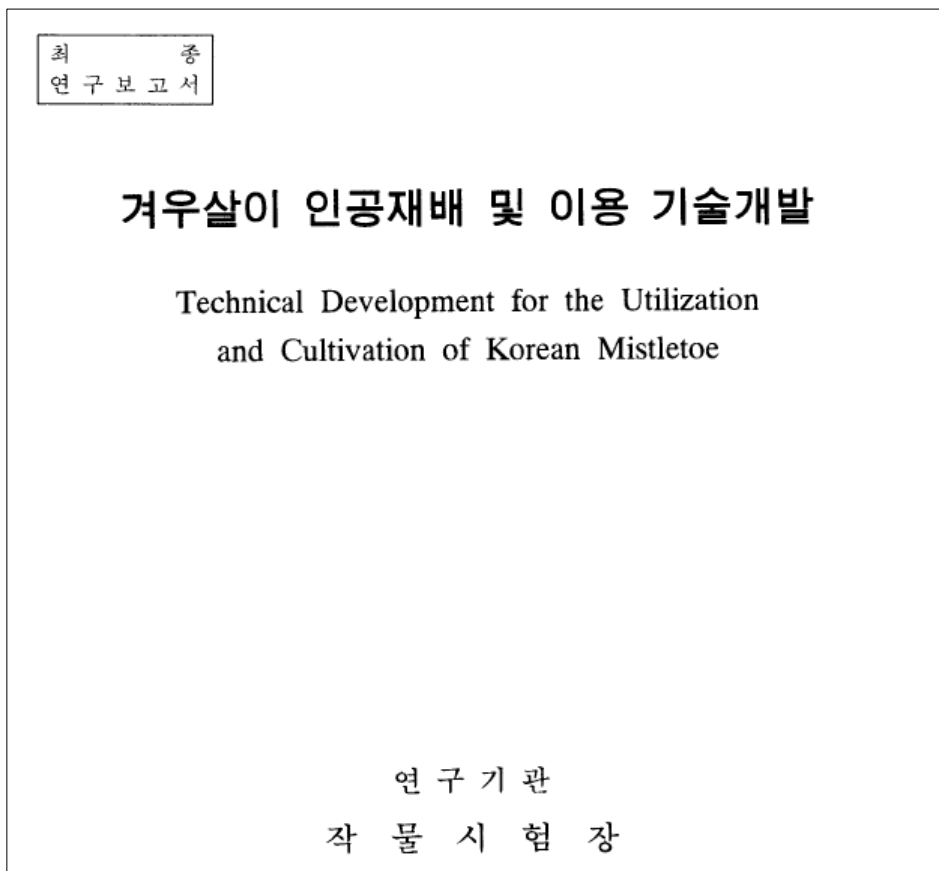


그림 83. 농림부 작물시험장에서 작성한 겨우살이 인공재배 및 이용 기술개발 보고서

[이사람]겨우살이 인공재배 성공한 변양모 대표<전남 광양>

숙성시킨 종자, 나무에 붙여 발아

매실 등 30여종 나무에 파종
80% 싹터...숙주나무도 튼튼



변양모 광양매실농원 대표가 인공파종 후 3년이 지난 겨우살이를 보여주고 있다.

체내 암세포를 죽이는 '비스코톡신'

과 '렉틴' 성분 등을 함유하고 있어 항암효과가 높다고 알려진 약용식물 겨우살이, 야생에서만 자라던 겨우살이의 인공재배에 성공한 농업인이 있어 화제다.

그림 84. 겨우살이 민간 인공재배 성공

나. 추후 겨우살이 인공재배 예상 및 추진계획

아직은 야생 겨우살이로 수요를 충족시킬 수 있으나(그림 85 전국 생산지 참조) 향후 10년 후를 생각하면 인공재배가 필요하다고 생각한다. 이를 위해 다각적으로 연구가 전문적으로 시도되어야 할 것이다.



그림 85. 겨우살이 산지 전국 분포도

2. 외국산 겨우살이의 이용 계획

가. 지금까지의 연구결과

- (1) 지역별(나라별)에 따라 성분의 차이가 심하다. 특히 렉틴 성분은 확연히 다르다. 유럽산과는 당특이성이 다르지만 미국산의 경우 렉틴성분이 거의 없다.
- (2) 잎의 모양은 비슷하나 크기 등은 확연히 구분이 된다.
- (3) 숙주나무의 종류가 국내보다 더 다양하다.
- (4) 렉틴이 아닌 성분 특히 저분자물질들은 AMPK등을 활성화 시키는 효능이 확인되었다.

나. 활용계획

- (1) 그림 86에서 보는 바와 같이 외국에서는 겨우살이를 이용한 제품이 다양하게 존재한다. 화장품, 샴푸, 크림, 관절 환자를 위한 마사지용 크림 등 그 용도도 다양하다. 이를 바탕으로 한국산을 이용하여 다양한 제품을 개발 활용코자 한다.
- (2) 미국에는 고혈압을 위한 제품(그림 86 좌하)과 장의 곰팡이 *Candida albican*에 효과적인 기능성 식품(그림 86 우하)으로도 활용하고 있을 정도다. 국내와는 달리 과학적인 근거만 있으면 개별인증 없이 생산으로 하고 광고, 홍보를 할 수 있어 유통이 더 손쉽다.
- (3) 이 점을 최대한 활용하여 수출까지 할 수 있도록 발전시켜 나가코자 한다.



고혈압효능 제품

장내 곰팡이로 인한 질병에 유효한 제품

그림 86. 외국의 여러가지 겨우살이 제품들

제 3 절. 지적재산권 확보계획

1. 겨우살이를 이용한 근위축 억제 조성물 특허

가. 기존 특허 검색

- (1) 겨우살이에 대한 특허 조사
- (2) 겨우살이의 근위축 관련 특허 확인
 - (가) 근위축에 관한 특허 없음.
 - (나) 기존 등록 특허 없으므로 신규 특허로서의 가능성 높음.
 - (다) 2014년 10월 중으로 국내 특허 출원

나. 논문 제출

- (1) 석사학위 논문 제출
한동대학교 생명과학부 정주성 석사학위 논문으로 2014년 10월 중 제출
- (2) SCI급 논문 제출
상기 학위 논문을 바탕으로 10월 중에 SCI급에 논문 제출하여 발표 계획

2. 베틀린산(BA)을 이용한 근위축 억제 조성물 특허

(1) 베틀린산에 대한 특허 조사

- (가) 근위축에 관한 특허 없음.
- (나) 기존 등록 특허 없으므로 신규 특허로서의 가능성 높음.
- (다) 2014년 11월 중으로 국내외 특허출원

(2) 논문 제출

단일물질로서 근기능 위축억제 효과를 보고한 논문은 전무함. 따라서 이를 근거로 2014년 11월 중으로 국외 SCI 급 회지에 논문 제출하여 발표할 계획임

제 4 절. 추가연구 계획

1. 겨우살이 내 근위축 기능성 지표물질 연구

가. 현재 순천대와 협력하여 겨우살이 내 다양한 지표물질 검색 중인 바 금년 내에 확인가능
나. 기능성 지표물질이 새롭게 탐색이 될 경우 새로운 연구의 장을 열 수 있음

현재 수용성 물질 중에서 기능을 갖는 물질 탐색은 전무함. BA는 지용성이고 사용한 추출법은 물로 추출하였기 때문에 지표물질로 사용할 수가 없음. 따라서 수용성에서 기능성 지표물질을 찾을 경우 의미하는 바가 매우 큼.

2. 겨우살이 외 근위축 억제 기능을 나타내는 소재 개발 연구

겨우살이 외에 또 다른 소재를 탐색하는 것은 추후 기능성 식품을 개발할 경우 함께 사용할 수 있는 부영제로서 그 의미가 크다.

가. 여주(Bitter Melon) 의 근기능위축 억제 효능에 관한 연구

여주(그림 87 참조)는 ‘식물 인슐린’으로 불릴 정도로 당뇨에 탁월한 효과가 있음은 널리 알려진 사실이다. 그리고 장수 식품으로도 잘 알려져 있다.



그림 87. 여주 사진

(1) 근위축 억제 효과 MuRF-1의 감소효과 확인

여주 추출물이 단백질 분해에 관여하는 ‘MuRF-1’감소를 나타내어 근위축 억제 효과를 가질 수 있음을 확인하였다(그림 87 참조). 이를 바탕으로 추후 계속하여 여주를 이용하여 연구를 계속 할 것이다. 여주에 대한 연구는 아직 세계에서 전무한 상황이라 새로운 연구 분야를 개척할 수 있을 것으로 기대된다.

(2) 겨우살이와 병용 사용할 시 근위축 억제효과 상승효과 기대

근기능 위축에 관여하는 대표적인 효소는 현재 두 가지로 알려져 있다. 그 하나가

Atrogin-1이고 또 하나가 바로 MuRF-1이다. 흥미롭게도 겨우살이에 비해 여주추출물이 MuRF-1감소효과는 더욱 큰 것으로 나타났다. 이 결과는 매우 흥미로운 결과로서 추후 더욱 상호 관련성 연구가 되어야할 부분이지만 새로운 소재 개발에 중요한 근거를 제시해 주는 결과라 평가된다.

(가) 여주 추출물의 FoxO 인산화



그림 88. 여주 추출물이 FoxO 인산화에 미치는 영향

마우스 근아세포 C2C12세포에 여주 추출물을 처리한 후 western blotting을 통해 FoxO 단백질의 활성을 확인한 결과 인산화된 FoxO 단백질의 발현이 대조군에 비해 확연히 증가함을 확인하였다. FoxO가 인산화되면 비활성 상태가 되며 이는 Akt의 발현량 증가가 FoxO가 탈인산화되어 활성이 되는 것을 억제하기 때문이다. 본 연구에서 확인한 겨우살이의 결과와 여주가 비슷한 경향을 보이는 것으로 보아 유사한 성질을 보일 수 있을 것으로 기대되는 후보물질이다.

(나) 여주 추출물의 mTOR 인산화



그림 89. 여주 추출물이 mTOR 인산화에 미치는 영향

마우스 근아세포 C2C12 세포에 여주 추출물을 처리한 후 western blotting을 통해 mTOR 단백질의 활성을 확인한 결과 인산화된 mTOR의 발현이 대조군에 비해 확연히 증가함을 확인하였다. mTOR 역시 Akt pathway를 거치기 때문에 앞의 FoxO의 결과를 보충하는 자료가 된다.

(다) 여주 추출물의 Akt 인산화

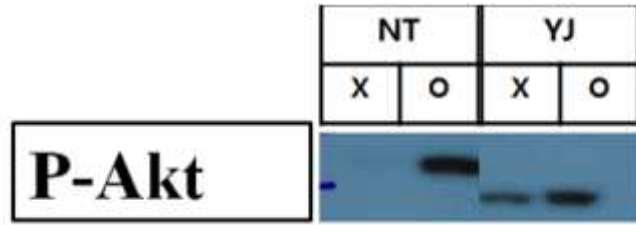


그림 90. 여주 추출물이 Akt 인산화에 미치는 영향

마우스 근아세포 C2C12세포에 여주 추출물을 처리한 후 western blotting을 통해 Akt 단백질의 활성을 확인한 결과 인산화된 FoxO 단백질의 발현이 대조군에 비해 확연히 증가함을 확인하였다. 여주 추출물의 근육세포에서의 FoxO, mTOR, Akt의 인산화를 통해 PI3K/Akt pathway 와 연관이 있음을 시사하고 있다.

(라) 여주 추출물의 Atrogin-1 감소 효과

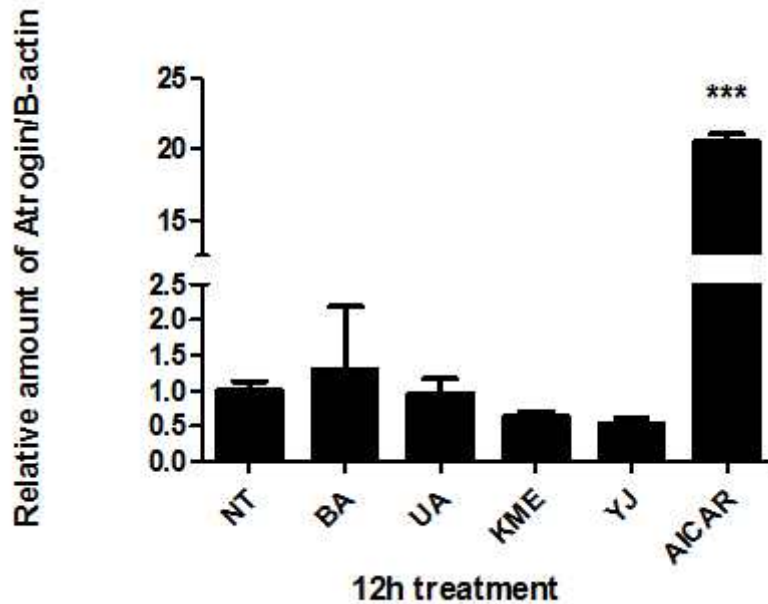


그림 91. 여주 추출물이 Atrogin-1 발현에 미치는 영향

마우스 근아세포 C2C12 세포에 여주 추출물을 처리한 후 real-time PCR을 통해 Atrogin-1 gene의 발현을 확인한 결과 atrogin-1의 발현이 대조군에 비해 확연히 감소함을 확인하였다. Atrogin-1은 근육을 분해하는 인자로 여주 추출물 처리에 따른 atrogin-1의 감소는 근 위축을 억제하는데 유효한 효과가 있음을 알 수 있다.

(마) 여주 추출물의 MuRF-1 감소 효과

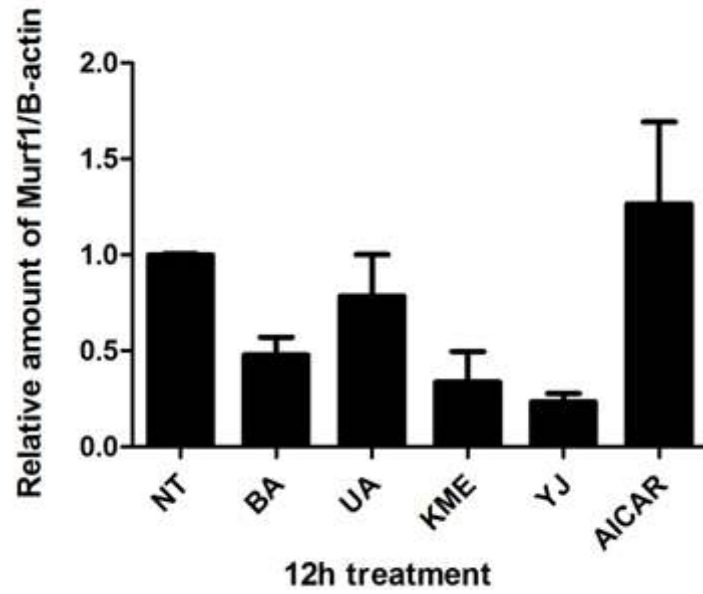


그림 92. 여주 추출물이 MuRF-1 발현에 미치는 영향

마우스 근아세포 C2C12 세포에 여주 추출물을 처리한 후 real-time PCR을 통해 MuRF-1 gene의 발현을 확인한 결과 MuRF-1의 발현이 대조군에 비해 확연히 감소함을 확인하였다. MuRF-1은 근육을 분해하는 인자로 여주 추출물 처리에 따른 MuRF-1의 감소는 근 위축을 억제하는데 유효한 효과가 있음을 알 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 근위축 관련 자료

Cell Metabolism
Article

Cell
PRESS

mRNA Expression Signatures of Human Skeletal Muscle Atrophy Identify a Natural Compound that Increases Muscle Mass

Steven D. Kunkel,^{1,5} Manish Suneja,¹ Scott M. Ebert,¹ Kale S. Bongers,² Daniel K. Fox,² Sharon E. Malmberg,¹ Fariborz Alipour,³ Richard K. Shields,⁴ and Christopher M. Adams^{1,2,5,*}

¹Department of Internal Medicine
²Department of Molecular Physiology and Biophysics
³Department of Speech Pathology and Audiology
⁴Graduate Program in Physical Therapy and Rehabilitation Science
Roy J. and Lucille A. Carver College of Medicine, The University of Iowa, Iowa City, IA 52242, USA
⁵Department of Veterans Affairs Medical Center, Iowa City, IA 52246, USA
*Correspondence: christopher-adams@uiowa.edu
DOI 10.1016/j.cmet.2011.03.020

SUMMARY

Skeletal muscle atrophy is a common and debilitating condition that lacks a pharmacologic therapy. To develop a potential therapy, we identified 63 mRNAs that were regulated by fasting in both human and mouse muscle, and 29 mRNAs that were regulated by both fasting and spinal cord injury in human muscle. We used these two unbiased mRNA expression signatures of muscle atrophy to query the Connectivity Map, which singled out ursolic acid as a compound whose signature was opposite to those

Previous studies demonstrated that skeletal muscle atrophy is driven by conserved changes in skeletal muscle gene expression (Bodine et al., 2001a; Sandri et al., 2004). We therefore hypothesized that pharmacologic compounds with opposite effects on gene expression might inhibit skeletal muscle atrophy. To test this, we first determined an mRNA expression signature of one atrophy-inducing stress (fasting) in human and mouse skeletal muscle. We then used these unbiased data in conjunction with the Connectivity Map (Lamb et al., 2006) to identify candidate small molecule inhibitors of muscle atrophy. This approach identified a natural compound that may have applications in the treatment of human skeletal muscle atrophy.

2011년 발표된 UA의 근위축 억제에 대한 논문으로 이 연구의 시발점이 되었다. 트리테르페노이드계 물질인 우르솔릭산이 근위축을 억제한다는 연구 결과에서 겨우살이 추출물 내에 같은 트리테르페노이드계 물질인 베툴린산이 존재하며 이와 유사한 결과를 낼 것으로 추측하였다.

Disease Models & Mechanisms 6, 25-39 (2013) doi:10.1242/dmm.010389

REVIEW

Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy

Paolo Bonaldo¹ and Marco Sandri^{1,2}

Skeletal muscle is a plastic organ that is maintained by multiple pathways regulating cell and protein turnover. During muscle atrophy, proteolytic systems are activated, and contractile proteins and organelles are removed, resulting in the shrinkage of muscle fibers. Excessive loss of muscle mass is associated with poor prognosis in several diseases, including myopathies and muscular dystrophies, as well as in systemic disorders such as cancer, diabetes, sepsis and heart failure. Muscle loss also occurs during aging. In this paper, we review the key mechanisms that regulate the turnover of contractile proteins and organelles in muscle tissue, and discuss how impairments in these mechanisms can contribute to muscle atrophy. We also discuss how protein synthesis and degradation are coordinately regulated by signaling pathways that are influenced by mechanical stress, physical activity, and the availability of nutrients and growth factors. Understanding how these pathways regulate muscle mass will provide new therapeutic targets for the prevention and treatment of muscle atrophy in metabolic and neuromuscular diseases.

Introduction

Muscles are the largest protein reservoir in the body. Muscles serve as a source of amino acids that can be used for energy production by various organs (including the heart, liver and brain) during catabolic periods, such as in cancer, sepsis, burn injury, heart failure and AIDS. However, excessive protein degradation in skeletal muscle, and the ensuing muscle loss (cachexia), is highly detrimental for the economy of the human body and can lead to death. Moreover, excessive loss of muscle mass is a poor prognostic indicator and can impair the efficacy of many different therapeutic treatments. Thus, cachexia ultimately aggravates diseases, and increases morbidity and mortality. The maintenance of healthy

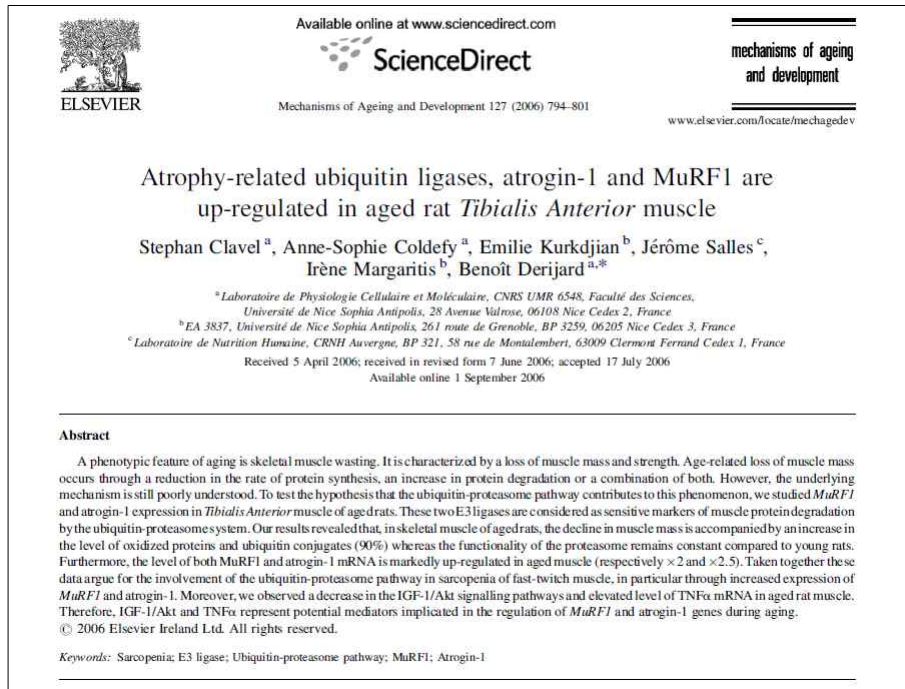
adulthood (Amthor et al., 2009; Blaauw et al., 2009; McCarthy et al., 2011; Raffaello et al., 2010; Sartori et al., 2009).

Atrophy is defined as a decrease in the size of a tissue or organ due to cellular shrinkage; the decrease in cell size is caused by the loss of organelles, cytoplasm and proteins. This Review discusses the latest findings and emerging concepts related to pathways controlling muscle atrophy in physiological and pathological conditions. In particular, we focus on the ubiquitin-proteasome machinery and the autophagy-lysosome machinery, the two most important cell proteolytic systems that control protein turnover in muscle. The involvement of these systems in muscle physiopathology, as well as the signaling pathways controlling their

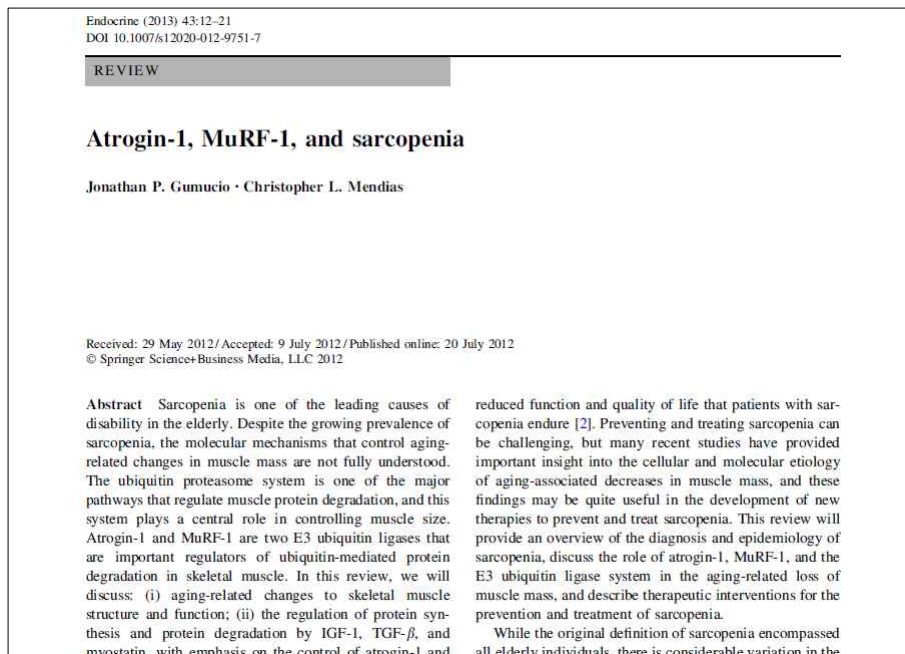
e-Models & Mechanisms • DMM

근육 위축의 세포분자생물학적 기전에 대하여 밝힌 리뷰 논문으로 근 위축과 관련한 단백질

및 유전자 마커들을 검색하는데 활용하였다.



근 위축과 관련한 atrogin-1, MuRF1에 대한 기초를 제공한 논문으로 랫 실험모델을 마우스 실험모델로 적용하는데 참고한 논문이다.



Sarcopenia와 atrogin-1, MuRF-1의 관계에 대하여 정리한 리뷰 논문으로 근육 세포에서 확인할 마커들을 찾는 자료로 활용하였다.

The American Journal of Clinical Nutrition

Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity¹⁻³

William J Evans

ABSTRACT
 Loss of skeletal muscle mass occurs during aging (sarcopenia), disease (cachexia), or inactivity (atrophy). This article contrasts and compares the metabolic causes of loss of muscle resulting from these conditions. An understanding of the underlying causes of muscle loss is critical for the development of strategies and therapies to preserve muscle mass and function. Loss of skeletal muscle protein results from an imbalance between the rate of muscle protein synthesis and degradation. Cachexia, sarcopenia, and atrophy due to inactivity are characterized by a loss of muscle mass. Each of these conditions results in a metabolic adaptation of increased protein degradation (cachexia), decreased rate of muscle protein synthesis (inactivity), or an alteration in both (sarcopenia). The clinical consequences of bedrest may mimic those of cachexia, including rapid loss of muscle, insulin resistance, and weakness. Prophylaxis against bedrest-induced atrophy includes nutritional support with an emphasis on high-quality protein. Nutritional supplementation alone may not prevent muscle loss secondary to cachexia, but, in combination with the use of an anabolic agent, it may slow or prevent muscle loss. *Am J Clin Nutr* 2010;91 (suppl):1123S-7S.

INTRODUCTION
 Cachexia is a metabolic condition that is always associated with an underlying illness and inflammation. It is characterized by loss of skeletal muscle and body weight. Nutritional interventions have shown limited success in preserving fat but not muscle mass. Sarcopenia is the age-associated loss of skeletal muscle and function. Sarcopenia is a life-long process with a complex and multifactorial etiology. The effects of inactivity, and in particular bedrest, may mimic those of cachexia. However, there are important metabolic distinctions with significant nutritional implications. Cachexia has long been recognized as a condition associated

associated with malignant cancers (3), chronic heart failure (4), or chronic kidney disease (5). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with inflammation and muscle wasting (6). Clinical studies have shown that the preservation of body fatness and skeletal muscle in cachectic patients can decrease mortality risk (2, 7, 8). However, important questions remain in the treatment of cachexia. If the metabolic consequence of cachexia is loss of skeletal muscle, will strategies to conserve muscle in cachectic conditions improve mortality and morbidity? Weight loss and extreme loss of body fat are the most obvious clinical manifestation of cachexia. Do strategies designed to maintain body weight, irrespective of composition of the weight, have a positive influence on outcomes? In addition, as cachexia is associated with an underlying disease, patients are often hospitalized or become extremely inactive as a result of the manifestations of the disease. Is it, therefore, possible to separate the effects of immobilization and inactivity from the metabolic effects of cachexia?

SKELETAL MUSCLE AND CACHEXIA
 As noted, muscle wasting is important in the pathophysiology of cachexia and a major cause of fatigue (9) in patients. Accelerated or exaggerated loss of skeletal muscle mass distinguishes cachexia from weight loss that is due solely to reduced energy intake. Several groups of investigators have suggested that actomyosin, actin, and myosin are selectively targeted for degradation in clinical conditions associated with cachexia (10-12). Acharyya et al (10) wrote that "cachectic factors are remarkably selective in targeting myosin heavy chain." In mice with colon-26 tumors, they found that 2 markers of inflammation that are typically elevated with cachexia, tumor necrosis factor- α and interferon- γ , reduce the expression of myosin. They also reported that loss of myosin protein was associated with the ubiquitin-dependent proteasome pathway. These data suggest

Downloaded from ajcn.nutrition.org by guest on July 13, 2014

근육의 손실에 의한 전신쇠약증, 근육 감소, 활성 저하에 대한 전반적인 증상들에 서술한 논문으로 인체적용시험에 대한 자료 구축에 도움이 되었다.

Am J Physiol Cell Physiol 287: C834-C843, 2004; 10.1152/ajpcell.00579.2003.

Invited Review

The molecular basis of skeletal muscle atrophy

Robert W. Jackman and Susan C. Kandarian
Boston University, Department of Health Sciences, Boston, Massachusetts 02215

Jackman, Robert W., and Susan C. Kandarian. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C834-C843, 2004; 10.1152/ajpcell.00579.2003.—Skeletal muscle atrophy attributable to muscular inactivity has significant adverse functional consequences. While the initiating physiological event leading to atrophy seems to be the loss of muscle tension and a good deal of the physiology of muscle atrophy has been characterized, little is known about the triggers or the molecular signaling events underlying this process. Decreases in protein synthesis and increases in protein degradation both have been shown to contribute to muscle protein loss due to disuse, and recent work has delineated elements of both synthetic and proteolytic processes underlying muscle atrophy. It is also becoming evident that interactions among known proteolytic pathways (ubiquitin-proteasome, lysosomal, and calpain) are involved in muscle proteolysis during atrophy. Factors such as TNF- α , glucocorticoids, myostatin, and reactive oxygen species can induce muscle protein loss under specified conditions. Also, it is now apparent that the transcription factor NF- κ B is a key intracellular signal transducer in disuse atrophy. Transcriptional profiles of atrophying muscle show both up- and downregulation of various genes over time, thus providing further evidence that there are multiple concurrent processes involved in muscle atrophy. The purpose of this review is to synthesize our current understanding of the molecular regulation of muscle atrophy. We also discuss how ongoing work should uncover more about the molecular underpinnings of muscle wasting, particularly that due to disuse.

protein synthesis; protein degradation; nuclear factor- κ B; disuse; unloading; cachexia

OVERVIEW
 Skeletal muscle atrophy is a change that occurs in muscles of adult animals as a result of the conditions of disuse (e.g., immobilization, denervation, muscle unloading), aging, starvation, and a number of disease states (i.e., cachexia). Regardless

After the initial physiological stimulus, in which the skeletal muscle no longer bears weight or contracts with tension, molecules involved with disuse atrophy, such as initiating triggers, signaling proteins, and affected targets, carry out the process of muscle protein loss. While it has been well established that muscle disuse due to the removal of weight bearing

근 위축의 분자적 기초에 대한 리뷰논문으로 근 위축의 마커 설정에 도움을 받은 논문이다.

제 2 절 근육 세포 내 지표성분 관련 자료

IL-1 β stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF- κ B

Guangjo Luo,^{1*} Dan D. Hershko,^{1,6} Bruce W. Robb,¹ Curtis J. Wray,¹ and Per-Olof Hasselgren²

¹Department of Surgery, University of Cincinnati, Cincinnati, and Shriners Hospitals for Children, Cincinnati, Ohio 45267; and ²Department of Surgery, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215

Submitted 16 August 2002; accepted in final form 23 January 2003

Luo, Guangjo, Dan D. Hershko, Bruce W. Robb, Curtis J. Wray, and Per-Olof Hasselgren. IL-1 β stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF- κ B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1249–R1254, 2003; 10.1152/ajpregu.00490.2002.—Recent studies suggest that the skeletal muscle may be a significant site of IL-6 production in various conditions, including exercise, inflammation, hypoperfusion, denervation, and local muscle injury. The mediators and molecular mechanisms regulating muscle IL-6 production are poorly understood. We tested the hypothesis that IL-6 production in muscle cells is regulated by IL-1 β and that mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling and NF- κ B activation are involved in IL-1 β -induced IL-6 production. Cultured C2C12 cells, a mouse skeletal muscle cell line, were treated with different concentrations (0.1–2 ng/ml) of IL-1 β in the absence or presence of the p38 MAP kinase inhibitor SB-208350 or the p42/44 inhibitor PD-98059. Protein and gene expression of IL-6 were determined by ELISA and real-time PCR, respectively. NF- κ B DNA binding activity was determined by electrophoretic mobility shift assay and by transfecting myocytes with a luciferase reporter plasmid containing a promoter construct with multiple repeats of NF- κ B binding site. Treatment of myotubes with IL-1 β resulted in a dose- and time-dependent increase of IL-6 production accompanied by an ~25-fold increase in IL-6 mRNA levels. IL-1 β stimulated NF- κ B DNA binding activity

in muscle tissues, such as the liver and spleen, there is growing evidence that other tissues as well may be an important source of IL-6. In particular, recent studies suggest that skeletal muscle may be a significant site of IL-6 production in various conditions. Thus increased gene expression and production of IL-6 in skeletal muscle were reported during exercise (14, 21), muscle inflammation (2), hypoperfusion (31), and after denervation (16) or local muscle injury (1).

IL-6 produced in skeletal muscle may have both local and systemic biological effects. For example, previous studies suggest that IL-6 released from muscle during exercise can stimulate lipolysis in adipose tissue and glycogenolysis in liver (22). IL-6 is a major regulator of acute-phase protein synthesis in the liver, and although the Kupffer cells are probably the most important source of IL-6 regulating hepatocyte protein synthesis, it is possible that IL-6 from muscle may contribute to the regulation of acute-phase protein production during inflammation. Locally, IL-6 has trophic effects and may participate in tissue repair after injury and in regeneration of muscle tissue in dystrophy and after denervation (12, 16, 17). There is also evidence that IL-6 may regulate muscle protein degra-

근육 세포내 IL-1 β 및 IL-6의 생산과 MAPK kinase 신호전달 기전의 관계에 대하여 공부한 논문이다.

Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles

MARK A. FEBBRAIO^{*,†} AND BENTE KLARLUND PEDERSEN^{*,†,‡}

^{*}The Copenhagen Muscle Research Centre and [†]The Department of Infectious Diseases, Rigshospitalet, The University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; and [‡]The Department of Physiology, The University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia

ABSTRACT It has recently been demonstrated that the marked increase in the systemic concentration of cytokine interleukin-6 (IL-6) seen with exercise originates from the contracting limb and that skeletal muscle cells per se are the likely source of the production. This review summarizes the possible mechanisms for activation and biological consequences of muscle-derived IL-6. It appears that intramuscular IL-6 is stimulated by complex signaling cascades initiated by both calcium (Ca²⁺)-dependent and -independent stimuli. It also seems likely that skeletal muscle produces IL-6 to aid in maintaining metabolic homeostasis during periods of altered metabolic demand such as muscular exercise or insulin stimulation. It may do so via local and/or systemic effects. This review also explores the efficacy that IL-6 may be used as a therapeutic drug in treating metabolic disorders such as obesity, type 2 diabetes, and atherosclerosis.—Febbraio, M. A., Pedersen, B. K. Muscle-derived interleukin 6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J*, 16, 1335–1347 (2002)

Key Words: cytokines · lipolysis · intracellular signaling · metabolism · calcium · glycogen · metabolic syndrome

IT HAS BEEN well demonstrated that the plasma concentration of interleukin-6 (IL-6) increases up to

structure and a shared receptor subunit (the transmembrane glycoprotein 130) (12, 13). IL-6 is a variably glycosylated protein with a molecular mass of 22–27 kDa depending on the cellular source and amount of post-translational modification. It is synthesized as a precursor protein of 212 amino acids (aa), with a 28 aa signal sequence and a 184 aa mature segment (13). IL-6 is produced by many different cells, but the main sources in vivo are stimulated monocytes/macrophages, fibroblasts, and vascular endothelial cells (14), indicative of its role in the modulation of the immune system. Other cells known to express IL-6 include keratinocytes, osteoblasts, T cells, B cells, neutrophils, eosinophils, mast cells, smooth muscle cells (14), and skeletal muscle cells (15). Typical stimuli for IL-6 production are IL-1, TNF- α , and bacterial endotoxin (14). Hypoxia induces IL-6 in cultured endothelial cells (16) and hypoxia in vivo elevates plasma IL-6 (17, 18). Therefore, like many cytokines, IL-6 is a ubiquitous protein, stimulated by many physiological and pathological stressors (for review, see ref 2). Recently, however, the observation that 10–35% of the body's basal circulating IL-6 is derived from adipose tissue (19) has stimulated interest in this cytokine as a possible mediator of metabolic processes.

THE IL-6 RESPONSE TO EXERCISE

근육에서 유래한 IL-6의 활성 기전과 생리학적 역할에 대한 기초를 공부한 논문입니다.

Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction

Simon Schenk,^{1,2} Carrie E. McCurdy,³ Andrew Philp,⁴ Mark Z. Chen,¹ Michael J. Holliday,³ Gautam K. Bandyopadhyay,¹ Olivia Osborn,¹ Keith Baar,⁴ and Jerrold M. Olefsky¹

¹Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, and ²Department of Orthopaedic Surgery, UCSD, La Jolla, California, USA. ³Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Colorado Denver, Aurora, Colorado, USA. ⁴Department of Neurobiology, Physiology, and Behavior, UCD, Davis, California, USA.

Skeletal muscle insulin resistance is a key component of the etiology of type 2 diabetes. Caloric restriction (CR) enhances the sensitivity of skeletal muscle to insulin. However, the molecular signals within skeletal muscle linking CR to improved insulin action remain largely unknown. Recently, the mammalian ortholog of *Sir2*, sirtuin 1 (Sirt1), has been identified as a potential transducer of perturbations in cellular energy flux into subsequent metabolic adaptations, including modulation of skeletal muscle insulin action. Here, we have demonstrated that CR increases Sirt1 deacetylase activity in skeletal muscle in mice, in parallel with enhanced insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling and glucose uptake. These adaptations in skeletal muscle insulin action were completely abrogated in mice lacking Sirt1 deacetylase activity. Mechanistically, Sirt1 was found to be required for the deacetylation and inactivation of the transcription factor Stat3 during CR, which resulted in decreased gene and protein expression of the p55 α /p50 α subunits of PI3K, thereby promoting more efficient PI3K signaling during insulin stimulation. Thus, these data demonstrate that Sirt1 is an integral signaling node in skeletal muscle linking CR to improved insulin action, primarily via modulation of PI3K signaling.

Introduction

Skeletal muscle insulin resistance is a common metabolic disorder in obese and aged individuals and a key contributor to the etiology of type 2 diabetes (1). Moderate caloric restriction (CR; a 10%–40% reduction below ad libitum [AL] intake) enhances skeletal muscle insulin sensitivity and reverses insulin resistance in aged and obese skeletal muscle (2–8). However, the molecular signals within skeletal muscle linking CR to improved insulin action are incompletely defined. CR-induced improvements in insulin-stimulated glucose uptake by skeletal muscle in response

Sirt1 demonstrate a metabolic profile resembling that of CR (15). Considering that Sirt1 is sensitive to changes in NAD⁺ and the NAD⁺/NADH ratio and activation of Sirt1 can enhance skeletal muscle insulin sensitivity, the objective of this study was to investigate whether Sirt1 is the putative signaling node linking CR to enhanced skeletal muscle insulin signaling and sensitivity.

Results

Mouse model. To address the role of Sirt1 deacetylase activity in the enhancement of skeletal muscle insulin sensitivity with CR,

Sirt1이 마우스 근육세포의 인슐린 민감성을 증가시킨다는 논문으로 Sirt1과 PGC-1을 주요한 마커로 잡는 근거가 된 논문이다.

제 3 절 베틀린산 관련 자료

Int. J. Mol. Sci. 2008, 9, 1096-1107; DOI: 10.3390/ijms9061096

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences
ISSN 1422-0067
www.mdpi.org/ijms

Review

Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention

Simone Fulda

University Children's Hospital, Eythstr. 24, 89075 Ulm, Germany
Tel.: +49-731 500 57034; Fax: +49-731 500 57042; E-mail: simone.fulda@uniklinik-ulm.de

Received: 13 May 2008; in revised form: 3 June 2008 / Accepted: 4 June 2008 / Published: 27 June 2008

Abstract: Betulinic acid is a natural product with a range of biological effects, for example potent antitumor activity. This anticancer property is linked to its ability to induce apoptotic cell death in cancer cells by triggering the mitochondrial pathway of apoptosis. In contrast to the cytotoxicity of betulinic acid against a variety of cancer types, normal cells and tissue are relatively resistant to betulinic acid, pointing to a therapeutic window. Compounds that exert a direct action on mitochondria present promising experimental cancer therapeutics, since they may trigger cell death under circumstances in which standard chemotherapeutics fail. Thus, mitochondrion-targeted agents such as betulinic acid hold great promise as a novel therapeutic strategy in the treatment of human cancers.

겨우살이 내 트리테르페노이드 물질인 겨우살이의 항암 활성에 대한 연구 결과로 베틀린산이란 물질의 기초 특성을 이해하는데 사용되었다.



Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals

Christopher Aiken¹ and Chin Ho Chen²

¹Department of Microbiology and Immunology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN 37232, USA
²Department of Surgery, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA

Betulinic acid (BA) derivatives are low molecular weight organic compounds synthesized from a plant-derived natural product. Several BA derivatives are potent and highly selective inhibitors of HIV-1. Depending on the specific side-chain modification, these compounds function by inhibiting HIV fusion or, as recently demonstrated, by interfering with a specific step in HIV-1 maturation. BA derivatives have potential as novel HIV-1 therapies, and additional studies of their mechanisms of action are likely to further define the novel targets of these compounds and elucidate the basic biology of HIV-1 fusion and maturation. In this review, recent studies of the novel mechanisms of action of this interesting class of antiviral compounds are discussed.

The need for new HIV antivirals

The therapeutic management of HIV infection depends on the availability of potent and specific chemical inhibitors of virus replication. Currently, the majority of clinically available anti-HIV drugs target reverse transcriptase (RT) or protease (PR), the two key viral enzymes. RT inhibitors include both nucleoside analogs and non-

Discovery of betulinic acid derivatives as inhibitors of HIV replication

BA (Figure 1) is a natural product that is present in a variety of plants. The molecule is a member of the triterpene family of compounds that is moderately water soluble and relatively nontoxic. In the 1980s, researchers identified triterpenes as potential anti-cancer agents [1-3]. Subsequently, several triterpenes were found to be inhibitors of HIV-1 replication [4,5]. In an independent line of investigation, Lee, Fujioka and colleagues [6] identified BA and dihydrobetulinic acid as antiviral compounds present in extracts of leaves of the clove-like plant *Syzygium claviflorum*. This group of medicinal chemists later synthesized a panel of BA derivatives containing side-chain modifications at C3 and C28 positions of the BA scaffold [7,8]. Several of the modifications resulted in enhanced antiviral potency, resulting in the effective inhibition of HIV-1 replication at nanomolar concentrations. Studies in cell culture revealed two potential mechanisms of action. First, the BA derivatives containing modifications to the carboxylic acid group at position C28 appeared to inhibit HIV-1 entry into cells [4,9,10]. By contrast, compounds containing alterations to

베틀린산의 AIDS 치료에 대한 리뷰 논문으로 베틀린산의 특성을 이해하는데 활용하였다.

Biological Activity of Betulinic Acid: A Review

Mansour Ghaffari Moghaddam¹, Faujan Bin H. Ahmad^{2*}, Alireza Samzadeh-Kermani¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran; ²Department of Chemistry, Faculty of Science, Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia
Email: faujan@science.upm.edu.my

Received January 15th, 2012; revised February 18th, 2012; accepted March 6th, 2012

ABSTRACT

Betulinic acid is a known natural product which has gained a lot of attention in the recent years since it exhibits a variety of biological and medicinal properties. This review provides the most important biological properties of betulinic acid.

Keywords: Betulinic Acid; Betulin; Triterpene; Natural Product; Medicinal Properties

1. Introduction

Betulinic acid, (3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid) (Figure 1) is a naturally occurring pentacyclic lupane-type triterpenoid which exhibits a variety of biological and medicinal properties such as inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) [1,2], anti-bacterial [2,3], anti-malarial [4], anti-inflammatory [5-8], anthelmintic [9], antinociceptive [10], anti-HSV-1 [11,12], and anti-cancer activities [13-16]. Betulinic acid is widely distributed throughout the plant kingdom [17]. The birch tree (*Betula* spp., Betulaceae) is one of the most widely reported sources of betulinic acid and betulin which can be obtained in considerable quantities [18-20]. Betulinic acid

Betulinic acid was isolated from the MeOH extract of the aerial part of Vietnamese *Orthosiphon stamineus* and tested for its cytotoxicity towards highly liver metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cells [30]. It was found that betulinic acid shows the cytotoxicity with an ED₅₀ value of 75.4 μ g/ml.

Betulinic acid was obtained from the ethanol extract of *Engelhardtia serrata* Bl. by bioassay-guided isolation and was tested for its cytotoxic and apoptosis-inducing activities against the K562 cell line [31]. Betulinic acid showed an inhibitory activity on the growth of K562 tumor cell line with IC₅₀ value of 6.25 μ g/ml and also induced 35% apoptosis at 25 μ g/ml.

Betulinic acid was isolated from the CHCl₃ extract of

베틀린산의 생리학적 활성에 대한 전반적인 리뷰로 베틀린산의 근육 및 대사작용에 대한 지식을 얻는데 활용하였다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당없음.

제 8 장 참고문헌

1. Outcome of a public consultation on the Draft Opinion of the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) on a draft guidance on the scientific requirements for health claims related to physical performance, Supporting Publications 2012:315
2. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to astaxanthin and protection of the skin from UV-induced damage (ID 1687, 1979), defence against *Helicobacter pylori* (ID 1686), contribution to normal spermatogenesis (ID 1688), contribution to normal muscle function (ID 1685), and “immune system”(ID 1689, 1919, 1980) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006
3. Guidance for Industry: E7 Studies in Support of Special Populations: Geriatrics, Questions and Answers, FDA
4. 운동생리학, 대경북스(2011)
5. 운동생리학의 기초, 라이프사이언스(2006)
6. S. Schiaffino, K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw and M. Sandri (2013) Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. FEBS J. 280 (17):4294-4314

7. D. J. Glass (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37(10):1974–84
8. S. D. Kunkel, M. Suneja, S. M. Ebert, K. S. Bongers, D. K. Fox, S. E. Malmberg, F. Alipour, R. K. Shields, C. M. Adams (2011) mRNA Expression Signatures of Human Skeletal Muscle Atrophy Identify a Natural Compound that Increases Muscle Mass. *Cell Metab* 13(6):627–38
9. S. Levine, T. Nguyen, N. Taylor, M. E. Friscia, M. T. Budak, P. Rothenberg, J. Zhu, R. Sachdeva, S. Sonnad, L. R. Kaiser, N. A. Rubinstein, S. K. Powers and J. B. Shrager (2008) Rapid Disuse Atrophy of Diaphragm Fibers in Mechanically Ventilated Humans. *N Engl J Med* 358:1327–35
10. P. Hespel, B. O. Eijnde, M. Van Leemputte, B. Ursø, P. L. Greenhaff, V. Labarque, S. Dymarkowski, P. Van Hecke and E. A. Richter (2001) Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J Physiol* 536(2): 625–33
11. R. B. HUNTER, E. J. STEVENSON, A. KONCAREVIC, H. MITCHELL-FELTON, D. A. ESSIG and S. C. KANDARIAN (2002) Activation of an alternative NF- κ B pathway

in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J* 16(6):529–38

12. M. Pahor, T. Manini, M. Cesari (2009) Sarcopenia: Clinical evaluation, biological markers and other evaluation tools. *J Nutr Health Aging* 13(8):724–8
13. G. Abellan Van Kan (2009) Epidemiology and consequences of sarcopenia. *J Nutr Health Aging* 13(8): 708–712
14. G. A. Van Kan, J. M. Cedarbaum, M. Cesari, P. Dahinden, R. G. Fariello, R. A. Fielding, B. H. Goodpaster, S. Hettwer, M. Isaac, D. Laurent, J. E. Morley, M. Pahor, D. Rooks, R. Roubenoff, S. B. Rutkove, A. Shaheen, S. Vamvakas, J. W. Vrijbloed, B. Vellas (2011) Sarcopenia: Biomarkers and imaging (International Conference on Sarcopenia research). *J Nutr Health Aging* 15(10): 834–846
15. H. K. Kim, T. Suzuki, K. Saito, H. Yoshida, H. Kobayashi, H. Kato and M. Katayama (2012) Effects of Exercise and Amino Acid Supplementation on Body Composition and Physical Function in Community-Dwelling Elderly Japanese Sarcopenic Women: A Randomized Controlled Trial. *J Am Geriatr Soc* 60(1):16–23
16. H. Alemán-Mateo, L. Macías, J. Esparza-Romero, H. Astiazaran-García, A. L. Blancas (2012) Physiological effects beyond the significant gain in muscle mass in sarcopenic

elderly men: evidence from a randomized clinical trial using a protein-rich food. *Clin Interv Aging* 7:225-34,

17. G. I. Smith, P. Atherton, D. N. Reeds, B. S. Mohammed, D. Rankin, M. J. Rennie and B. Mittendorfer (2011) Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 93(2):402-12
18. J. H. Seo, Y.H. Choi, K.S. Kim (2004) Active Principles of the Methanol Extract of Korean Mistletoe Responsible for the Inhibitory Effect on the Proliferation of Human Tumor Cell Lines. *Kor. J. Pharmacogn.* 35(2): 134~138
19. *Physiology* (Bethesda) 23:160-70, 2008
20. FDA Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. USDHHS & FDA, 2005
21. C. Casteleyn, A. Rekecki, A. Van der Aa, P. Simoens, W. Van den Broeck (2010) Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Lab Anim* 44: 176-183

22. C. Schiller, C. P. Fröhlich, T. Giessmann, W. Siegmund, H. Mönnikes, N. Hosten, W. Weitschies (2005) Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. 22(10):971-9

23. J. M. DeSesso, C. F. Jacobson (2001) Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. 39(3):209-28