121016
-03

질환·대상별 맞춤형 기능성 소재 발굴 및 대량 생산기술개발

2023

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( )발간등록번호(O)

고부가가치식품기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-004452-01

질환·대상별 맞춤형 기능성 소재 발굴 및 대량생산기술 개발

2023. 11. 08.

주관연구기관 / 숙명여자대학교

협동연구기관 / ㈜ 휴온스

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

■ 농림축산식품연구개발사업 관리기준 [별지 제17호 서식] <제23조제3호 관련>

최종보고서

보안등급: 일반[√], 보안[ ]

중앙행정기관명	농림축산식품부	사업명	사업명	고부가가치식품기술개발사업	
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)	미래대응식품 [메디푸드 분야]	
공고번호	제 농축 2021-19호	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
		연구개발과제번호		121016031HD030	

기술분류								
국가과학기술 표준분류	LA0906	50 %	LB1801	30 %	LA0404	20 %		
농림식품과학기술분류	PA0201	50 %	PA0204	30 %	RA0203	20 %		

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문				
	영문				
연구개발과제명	국문	근력개선 기능성 소재 발굴 및 대량생산기술 개발			
	영문	Development of functional food for alleviating muscle atrophy			
주연구개발기관	기관명	숙명여자대학교 산학협력단	사업자등록번호	106-82-12227	
	주소	(04310)서울 용산구 청파로 47길 100	법인등록번호	274371-0009396	
연구책임자	성명	류 재 하	직위	교수	
	연락처 직장전화		휴대전화		
	연락처 전자우편		국가연구자번호		
연구개발기간	전체	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2 년 9 개월)			
	단계 (해당 시 작성) 1단계	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1 년 9 개월)			
	단계 (해당 시 작성) 2단계	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1 년 개월)			

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		550,000	9,890	80,100					559,890	80,100	639,990	
1단계	1년차	150,000	1,110	7,460					151,110	7,460	158,570	
	2년차	200,000	2,780	18,640					202,780	18,640	221,420	
2단계	1년차	200,000	6,000	54,000					206,000	54,000	260,000	

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
						역할	기관유형
공동연구개발기관	㈜ 휴온스	연 성 흠	연구위원			수요	중견기업
위탁연구개발기관							
연구개발기관 외 기관							

연구개발담당자 실무담당자	성명	이 혜 진	직위	연구교수	
	연락처 직장전화		휴대전화		
	연락처 전자우편		국가연구자번호		

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

2023 년 9 월 8 일

연구책임자: 류 재 하 (인)

주관연구개발기관의 장: 오 중 산 (직인)
공동연구개발기관의 장: 송 수 영 (직인)
위탁연구개발기관의 장: (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “근력개선 기능성 소재 발굴 및 대량생산기술 개발”(개발기간 : 2021. 04. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023. 09. 08.

주관연구기관명 : (대표자) 오 중 산 (인)
협동연구기관명 : (대표자) 송 수 영 (인)
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 류 재 하
협동연구책임자 : 연 성 흠
참여기관책임자 :

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

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="2">고부가가치식품 기술개발사업</td><td colspan="2">총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="2">미래대응식품 [메디푸드 분야]</td><td colspan="2">연구개발과제번호</td><td colspan="2">121016031HD030</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술 표준분류</td><td>LA0906</td><td>50%</td><td>LB1801</td><td>30%</td><td>LA0404</td><td>20%</td></tr>
<tr><td>농림식품 과학기술분류</td><td>PA0201</td><td>50%</td><td>PA0204</td><td>30%</td><td>RA0203</td><td>20%</td></tr>
<tr><td colspan="2">총괄연구개발명
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="6">질환·대상별 맞춤형 기능성 소재 발굴 및 대량생산기술 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="6">2021. 04. 01 ~ 2023. 12. 31</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="6">총 639,990 천원
(정부지원연구개발비: 550,000 천원, 기관부담연구개발비 : 89,990 천원
지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="2">기초[ ] 응용[ ] 개발[√]
기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]</td><td colspan="2">기술성숙도
(해당 시 기재)</td><td colspan="2">착수시점 기준( )
종료시점 목표( )</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 특성
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td rowspan="4">연구개발
목표 및 내용</td><td colspan="2">최종 목표</td><td colspan="5">▪ 본 연구는 다양한 천연물 자원으로부터 근력개선에 효능을 나타내는 오리나무추출물을 도출하였으며, 이를 재료로 근력개선에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정형 소재를 개발하기 위한 것임.
▪ 본 수행기관은 선행연구로부터 오리나무추출물을 유망소재로 도출하였고 이를 토대로 근력개선 유효성 연구 결과와 지식재산권을 확보한 바, 본 사업이 추구하는 취지에 부합하게 인체적용시험을 통해 사람을 대상으로 복용 시 부작용이 없으며 우수한 기능성을 갖는 제품을 개발하여 최종 식약처의 개별인정원료로써 “근력개선에 도움”을 주는 건강기능식품 원료를 신청하고자 함.</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 내용</td><td colspan="5">▪ 선행연구로부터 확보된 근육강화 활성소재인 오리나무추출물의 원료 규격화, 제조공정 표준화, 대량생산 표준화 및 공정최적화 시스템을 구축하여 경쟁제품보다 더 우수하고, 가격경쟁력을 갖는 생산 시스템의 구축과 제형연구, 시제품 제작, 인체적용시험 CRO 선정 및 protocol 확립 등을 통한 인체적용시험을 완료하여 최종 개별인정자료를 신청 완료하고자 함.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">1단계
(해당 시 작성)</td><td>목표</td><td colspan="5">▪ 오리나무 추출물의 in vitro 효능 평가와 기전 연구
▪ 동물 모델에서 추출물의 in vivo 효능 평가와 기전 연구
▪ 오리나무 원재료 및 제조공정 표준화
▪ 오리나무추출물 대량생산 표준화
▪ 근력개선 건강기능식품 인체적용시험 진입</td></tr>
<tr><td>내용</td><td colspan="5">▪ 오리나무 추출물의 in vitro 효능 평가와 기전 연구
- 근육 근원세포에서 근관 세포로의 분화 촉진 효능 평가
- 근관세포 손상 모델에서 근섬유 손실 억제 효능과 기전평가
▪ 동물 모델에서 추출물의 in vivo 효능 평가와 기전 연구
- 노인성 근육 감소 동물 모델에서 운동성 개선평가
- 실험동물 근육의 형태학적, 병리학적 분석
- 근육 손실 억제 기전 연구
- 근개선 관련 개별 인정을 획득한 오미자 추출물 대비 효능의 우월성 확인
▪ 오리나무 원재료 및 제조공정 표준화 연구</td></tr>
</table>

			- 산지별, 채취시기별, 부위별 추출물 규격화 연구 - 추출물제조 최적화 및 제조공정 표준화 연구 - 지표(유효) 성분 선정 및 분석법 확립 - Scale-up 공정규격 parameter 설정 ▪ 오리나무추출물 대량생산 표준화 - 상업화 scale-up 대량생산 연구 및 원료 GMP 생산 - 기준 및 시험법 설정 및 분석법 validation 확립/검증 - 안정성 연구 진행 (원료, 임상약) ▪ 인체적용시험 - 임상약 시제품 연구 및 제조 (GMP) - CRO 및 임상기관 선정 및 프로토콜 설정 - 피험자 모집 준비 (IB자료집, IRB 신청 등)
	2단계 (해당 시 작성)	목표	▪ 근력개선 기능성 인체적용시험 완료 ▪ 식약처 개별인정원료 신청서 제출 ▪ 지재권 확보 및 평가 지표 추가 제안
		내용	▪ 근력개선 기능성 인체적용시험 완료 - 인체적용시험 피험자 모집, 진행 및 완료 - 통계분석 및 결과보고서 확보 (IRB 승인) ▪ 식약처 개별인정원료 신청 - 개별인정원료 신청을 위한 기반자료 수집 및 신청서 제출 - 제품 제형 연구 및 시제품 개발 - 근력개선 건강기능식품 마케팅 계획 수립 ▪ 지재권 확보 및 평가 지표 제안 - 추가 바이오마커 발굴 및 기전연구 - 지적 재산권 확보와 논문 발표

연구개발성과	▪ 오리나무 추출물의 *in vitro* 효능 평가 i) 근육 근원세포에서 근관 세포 (근섬유)로의 분화 촉진 효능 평가 - 분화 인자들(MHC, myogenin)의 발현 증가와 p38 MAPK 활성화 기전 확인 ii) 덱사메타손을 처리한 근섬유 손상 *in vitro* 모델 확립 - 덱사메타손에 의해 감소된 MHC 발현 및 다핵성 MHC(+) 근섬유의 회복 - 근단백질 분해 효소 억제 (MuRF1, MAFbx) 효능 확인 ▪ 활성 물질 (리그난, 오레고닌)의 *in vitro* 효능 평가 i) 근섬유로의 분화 촉진 효능 평가 - 분화 인자들 (MHC, myogenin)의 발현증가와 다핵성 MHC(+) 근섬유의 증가 - p38 MAPK 활성화 기전 규명 ii) 덱사메타손으로 유도된 근섬유 손상의 개선 효능 확인 - MHC 발현 또는 다핵성 MHC(+) 근섬유의 회복 - 근단백질 합성 기전 (mTOR)의 활성화 - 근단백질 분해 기전 (NF-κB, FOXO3a) 또는 분해 인자들(MuRF1, MAFbx, Myostatin)등의 발현 억제 활성 iii) 리그난과 오레고닌은 근단백질 합성을 증가시키고, 분해 기전을 억제하는 dual-effect를 갖음을 확인함 ▪ 활성 물질 (오레고닌)의 미토콘드리아 생합성 촉진 및 항노화 효능 평가 (*in vitro*) i) 오레고닌에 의한 근관세포 미토콘드리아 생합성 촉진 효능 확인 - 인산화형-AMPK, SIRT-1, 6 타입과 PGC1α의 단백질 발현 증가 - 미토콘드리아 생합성에 관련된 NRF-1, TFAM, PGC1α의 mRNA 발현 증가 - 근관세포에서 근육의 에너지원인 ATP 생산 증가 ii) C_2-세라마이드로 유도된 세포 노화 억제 효능 (항노화 효능) - C_2-세라마이드로 유도된 세포 증식 억제를 회복하며, 관련하여 p53, p21의 발현을 억제하거나 cyclin B1, E1 발현을 증가시킴 - 노화된 세포 특이적인 노화성 β-galactosidase가 발현이 억제됨 - 노화된 근원세포에서 나타나는 지질 축적 현상이 억제됨 ▪ 동물 모델에서 추출물의 *in vivo* 효능 평가와 기전 연구 i) 덱사메타손으로 유도된 노인성 근위축 (sarcopenia) 동물 모델 구축 - 악력 및 rota-rod 테스트에서 운동성 개선 - 가자미근과 장딴지 근육의 무게 증가함 - 근육 피로도 마커인 크레아티닌 (creatinine)의 혈중 농도 감소

	- 근육 에너지원 물질인 젖산 (lactate)의 혈중 농도 증가 - 가자미근과 장딴지 근육에서, 근단백질 분해 관련 바이오 마커들의 (*murf1, mafbx, myostatin, foxo3a*)의 mRNA 발현 감소 ii) 자연 노화 (16개월령 마우스 사용)로 유도된 sarcopenia 동물 모델 구축 - 악력 테스트에서 운동 능력 증가 - 부고환 지방, 간의 무게와, 가자미근, 그리고 장딴지근의 무게 변화 없음 - 혈중 젖산, 피루브산, TNFα 농도 변화 없음 - 가자미근에서 *mhc, myogenin, myoD*의 발현이 증가하는 경향성을 보임 - 장딴지근에서 foxo3a 발현이 유의적으로 감소함 iii) 개선된 운동성 평가를 위해, 자연 노화 (16개월령) 마우스를 수영으로 트레이닝시킨 새로운 sarcopenia 동물 모델 구축 - 악력 테스트와 Treadmill 테스트에서 추출물에 의한 그룹 간 변화 없음 - 부고환 지방, 간의 무게와, 가자미근, 그리고 장딴지근의 무게 변화 없음 - 장딴지근에서 *myogenin, myoD*의 발현이 증가하며, *mhc, mTOR, Akt*는 증가 경향성을 보임 ▪ 오리나무 원재료 및 제조공정 표준화 연구 - 산지별, 채취시기별, 원재료 부위별 규격화 연구 - 추출물 제조공정의 최적화 및 제조공정 표준화 연구 - 지표(유효) 성분 선정 및 분석법 확립 - Scale-up 공정규격 parameter 설정 ▪ 제조공정 표준화 연구 - 원료 추출 용매, 온도, 시간 설정을 통한 원료 표준화 확립 - Scale-up 및 대량생산에 적용 할 수 있는 조건 확립 ▪ Scale-up 및 공정 규격 연구 - 대량생산 공정 수립을 위한 공정 진행 및 단위 규격 확립 - 원료 성상 및 안정성을 고려한 부형제 검토 ▪ 오리나무 대량생산 표준화 연구 - 상업화 scale-up 대량생산연구 및 원료 GMP생산 - 제조공정 단계별 parameter, 수율 모니터링 및 경제성 분석 - 제조공정 단계별 지표(유효)성분 함량 모니터링 - 최종원료에 대한 지표(유효)성분 분석 - 최종원료에 대한 공인시험분석기관 결과 확보 (성상 및 대장균, 영양성분, 중금속, 잔류농약) ▪ 지표성분 선정 - 오리나무 유래 성분들 검토 진행 후 특이적이며, 함량이 비교적 많은 성분인 Oregonin을 지표성분으로 설정 ▪ 분석법 Validation - 대량생산원료에서 지표성분 분석 및 validation 확립 - 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 범위 설정 - 지표성분 Validation 자료 확보 및 시험법 설정 최적화 - 지표성분 함량 공인분석기관 결과 확보 ▪ 안정성 연구 - 원료 안정성 연구(가속 및 장기보존) - 6개월 동안 수분함량 및 지표성분 함량 모니터링 실시 - 원료 유통기한 설정 ▪ 인체적용시험 진입 - IB 자료집 작성 - CRO 섭외 - 인체적용시험계획서 확립
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	▪ 활용계획 - 근력개선 기능성 신규소재 개발 및 원천기술 확보 - 선정 원료인 오리나무를 이용한 다양한 제형의 식품 개발에 활용 가능함 - *in vivo* 데이터를 기반으로 glucocorticoid 장기 복용에 따른 근육 손상 개선이 가능할 것으로 기대됨. - 선정 원료에 원·부재료를 첨가하여 다양한 제형의 최적 조건 확립 및 근력개선을 위한 고부가가치 제품개발에 활용 가능함.

<table>
<tr><td></td><td>- 연구를 통해 구축된 인적, 물적 연구 인프라를 기반으로 관련 분야 연구를 위한 산학·연구협의체 구성을 통한 효율적 사업화 전략 확립
▪ 기대효과
- 기술적 측면
오리나무를 이용한 새로운 근력개선 효능 입증을 통한 기능성 소재 발굴
오리나무 수피를 활용한 개별인정형 원료 개발 시 필요한 공정개발을 완료
과학적 기반의 식품산업 발전과 국내기술 선진화에 이바지
근위축과 관련한 다양한 적응증 개발에 대한 기초 기술자료 근거 자료 확보
- 경제적・산업적 측면
근력개선을 통한 건강관리에 대한 수요 급증으로 새로운 시장창출 기대
기존의 근력 개선 효능 물질과의 혼합으로 더 효과적이고 경쟁력 높은 식품 개발 가능성 기대
천연물을 활용한 고부가가치의 건강기능식품 산업 선도 기대
- 사회적 측면
국민 건강 예방, 관리의 측면에서 사회적 경제적 부담 경감 가능
근소실과 관련된 질환들의 발병 위험을 감소시키고, 초기 단계의 근력 개선 관련 제품의 국내 시장 활성화 기대
과학적으로 효능이 입증된 소재 개발로 단백질 위주의 근력 개선 제품 시장의 다양화 기대</td></tr>
<tr><td>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</td><td></td></tr>
</table>

<table>
<tr><td rowspan="3">연구개발성과의 등록・기탁 건수</td><td rowspan="2">논문</td><td rowspan="2">특허</td><td rowspan="2">보고서 원문</td><td rowspan="2">연구 시설 ・장비</td><td rowspan="2">기술 요약 정보</td><td rowspan="2">소프트 웨어</td><td rowspan="2">표준</td><td colspan="2">생명자원</td><td rowspan="2">화합물</td><td colspan="2">신품종</td></tr>
<tr><td>생명 정보</td><td>생물 자원</td><td>정보</td><td>실물</td></tr>
<tr><td>SCI 논문 2건

학술발표 4건</td><td>등록 4건

국내 출원 1건

국외 출원 2건</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">연구시설・장비 종합정보시스템 등록 현황</td><td>구입 기관</td><td>연구시설 ・장비명</td><td>규격 (모델명)</td><td>수량</td><td>구입 연월일</td><td>구입가격 (천원)</td><td>구입처 (전화)</td><td>비고 (설치장소)</td><td>ZEUS 등록번호</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>국문핵심어 (5개 이내)</td><td colspan="2">근감소증</td><td colspan="2">근위축증</td><td colspan="2">건강기능식품</td><td colspan="2">오리나무</td><td colspan="2">대량생산</td></tr>
<tr><td>영문핵심어 (5개 이내)</td><td colspan="2">Sarcopenia</td><td colspan="2">Muscle atrophy</td><td colspan="2">Functional food</td><td colspan="2">Alnus japonica</td><td colspan="2">Mass production</td></tr>
</table>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ---------- 8

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 ---------- 13

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 ---------- 52

4. 목표 미달 시 원인분석 ---------- 64

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 ---------- 68

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ---------- 69

별첨 1: 자체평가의견서 ---------- 70

별첨 2: 연구성과 활용계획서 ---------- 77

별첨 3: 세부 정량적 연구개발성과 증빙자료 ---------- 81

1. 연구개발과제의 개요

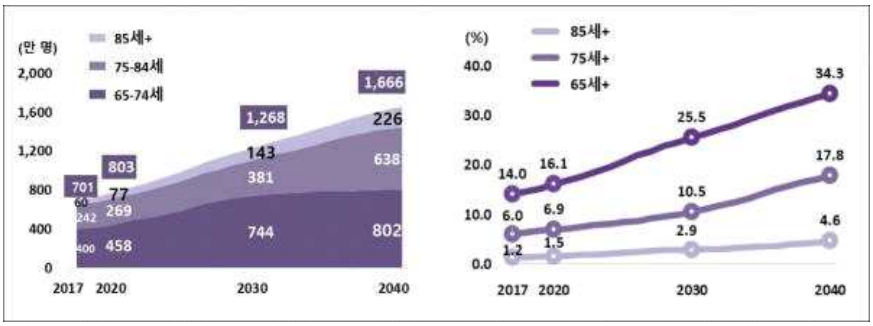
1) 연구개발의 목적

본 연구는 오리나무 추출물을 이용하여 근력개선 유효성 연구를 기반으로 인체적용시험을 통해 효능을 입증하여 식품의약품안전처에 “근력개선에 도움”을 주는 개별인정형 원료로 신청하고자 함.

2) 연구개발의 필요성

(1) 고령화에 따라 수요층 확대

- 통계청은 오는 2025년 고령인구가 전체인구의 20%인 1000만 명을 넘어 본격 초고령화 사회에 진입하고 2036년 1500만명(30%)을 초과할 것이라고 발표함(통계청, 2020년).
- 최근 출산율의 감소, 수명 연장 등으로 인한 고령화 속도가 빨라지면서 우리나라 전체 인구의 14% 이상이 노인 인구임. **40세가 넘어가면 매년 1% 정도의 근육이 소실됨.**
- 노인 인구의 증가로 고혈압, 당뇨, 심혈관 질환 등과 같은 만성 질환이 증가하고 있으며, 이와 함께 단순 노화로 인한 **골격근의 양과 질의 기능이 저하되는 근육 위축증 (muscle atrophy) 환자의 증가 현상**이 뚜렷함.
- 백세시대에 건강에 대한 관심이 높아지면서 ‘근육’의 중요성이 커지고 있음. 고령인구의 근육약화로 근감소증에 대한 경각심이 높아지고 동시에 건강한 노화에 대한 관심이 높아짐에 따라 고령친화제품의 수요층은 점차 확대되고 있음.
- 한국인은 대개 65세 이상에서 20%, 80세 이상에서 50%가 근감소증을 보이며, 30세 이후 10년마다 3~8% 근육량이 감소하고 60세 이상에서는 30%, 80세 이상에서는 50% 근육이 감소함.
- 근육은 생명유지를 위한 작용뿐만 아니라 해마조직을 통한 기억력 증진 작용에도 관여하여. 근육이 줄면 당뇨병, 고지혈증, 심혈관 질환 등 대사증후군 및 만성질환이 악화됨.
- 노인성 질환 예방 및 치료 기술 개발 분야에 필요한 R&D 설문 조사 결과, 근감소증의 진단 및 치료 기술 개발에 대한 필요성이 매우 높게 조사됨(미래창조과학부, 2015년).
- 정부에서 고령친화식품을 미래 먹거리로 선정하였으며, 고령친화 사업에서 필요한 기술조사 결과 근감소증이 치매에 이어 2위로 조사됨.
- 초고령화사회를 대비하여 노령화 산업의 중심이 될 근감소증을 예방 치료할 수 있는 소재발굴을 선점함이 긴급한 상황임.



[내국인 고령인구 추이; 통계청]

(2) 근감소 개선 및 근력강화를 위한 건강기능식품 산업의 시장성

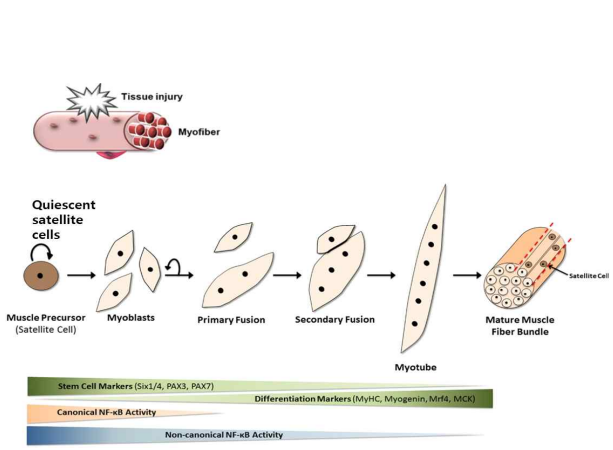
- 인구 고령화로 인해 관련 시장도 빠르게 성장하고 있으며, 농식품부에 따르면 국내 실버푸드 시장 규모는 지난 2015년 7천 903억원에서 6년 사이 2배 가까이 성장함 (한국농수산식품유통공사, 2020년).
- **근감소증 치료제는 아직 개발되지 않았으므로, 근감소를 예방하고 근육건강 유지를 위한 단백질 제품시장이 세계적으로 증가하는 추세**임.
- 노년층에게는 더 높은 단백질 섭취가 필요하지만 식풍의 저작과 연하 작용이 힘들어 영양섭취가 어려운 이유로 고령친화제품 시장은 지속 성장하는 중임.
- 세계 고령친화식품 시장규모는 2020년 147억 6,786만 달러에 달할 것으로 예상되며, 이는 2012년 53억 5923만 달러와 비교했을 때 8년간 연평균 13.5% 성장함.
- 전 세계적인 고령화와 더불어 고령자의 생활수준 향상으로 고령친화식품은 2025년까지 180억 달러에 달할 것으로 전망됨.

- **노인층의 웰빙, 건강한 생활에 대한 관심도**가 높아짐에 따라, 건강기능식품에 대한 세분화된 다양한 니즈가 생겨남. 또한 **젊은 층에서는 다이어트와 체형 관리** 등, 근육 생성과 유지에 대한 사회적 요구가 커지고 있음.

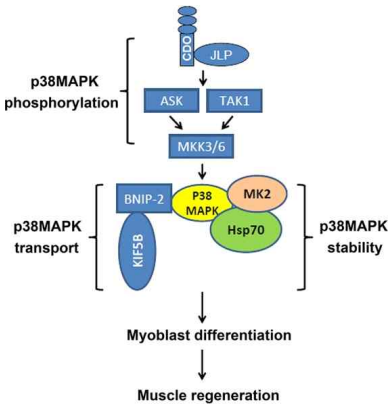
(3) 근감소증 개선 물질 발굴의 배경

가) 근육 줄기 세포 (근원세포)분화 촉진 물질 발굴

- 근육 위성세포 (satellite cell)는 줄기세포로서 근육 손상 시 성장, 분화를 통해 근육 재생에 기여함. 근감소증에서 이러한 근원세포 분화 촉진은 근육 재생을 위해 중요하며 본 연구 소재에 의해 근원세포 분화가 촉진됨을 확인함.
- 근원세포에서 근관세포로의 분화 시 발현되는 **분화 인자들 (myosin heavy chain (MHC), myogenin, myoD)의 단백질 발현을 촉진하는 물질을 근감소증 개선 물질**로 이용 가능함.
- 근관세포는 실린더형 다핵성의 특징을 가지므로, 면역 형광 염색을 통해 MHC 발현형 다핵성 근관세포들의 (MHC(+)-multinucleated myotubes) 수를 측정하여 오리나무 추출물 또는 활성 물질에 의해 증가되는지 확인함.
- p38 MAPK 신호전달계는 근원세포 분화에 매우 중요한 기전으로 알려져 있으므로, 본 연구 소재에 의한 p38 MAPK 신호전달계 활성을 확인함.



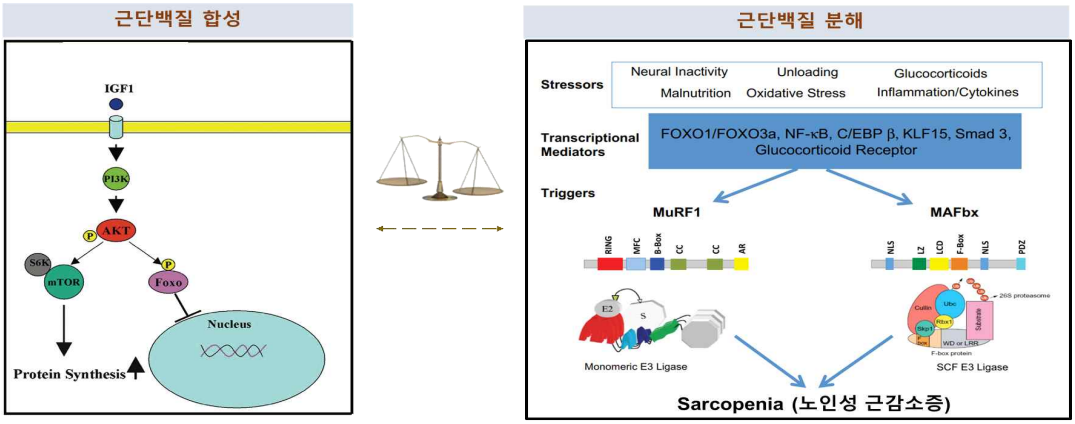
Sartori *et al.* Nat. Commun. 2021. 12: 330



Fan *et al.* Mol. Cell. Biol. 2018. 38:e00211

[근육줄기세포 분화/재생 과정과 관련 인자들]

- 근감소증 억제 물질의 효능을 세포 모델에서 평가하기 위해 근관세포(myotubes) 손상 조건에서 근관세포 손상보호 활성과 근단백질 합성 기전 촉진 및 분해 기전 억제 활성을 평가함.
  - dexamethasone으로 유도된 근관 세포 손상이 억제되는지 평가하고, 근관세포 단백질 합성 기전인 mTOR 신호전달계의 활성을 확인함.
  - 근관세포 단백질 분해 효소 MuRF1 (muscle ring finger-1)와 MAFbx (muscle atrophy F-box, atrogin-1)와 상위 조절 인자들 (FOXO3a, NF-κB 등)의 발현이 본 연구 소재에 의해 감소되는지 확인함.
  - **근감소증 억제를 위해서는 근단백질의 합성/분해의 균형이 요구되므로, 근단백질 합성과 분해 기전을 조절하는 물질의 발굴이 매우 중요함.**

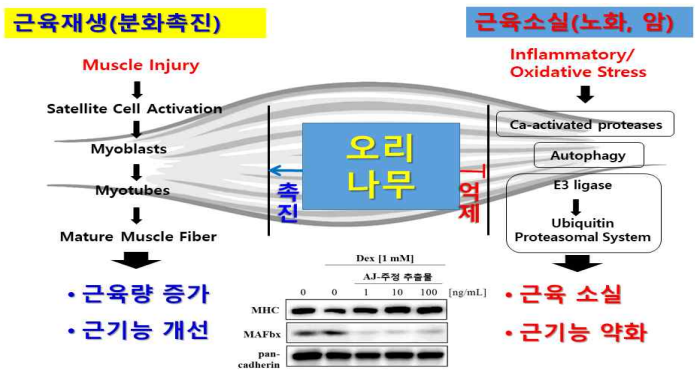


Bodine *et al.* Am J Physiol. Endocrinol. Metab. 2014. 307: e469

[근단백질 합성/분해 조절]

(4) 본 연구의 독창성과 차별성

- 본 숙명여자대학교 산학협력단 (개발자; 류재하 교수)은 **근육 손상 예방 및 치료, 개선을 위한 천연물 추출물 원료 및 효능 물질과 관련된 11건의 특허를 보유**하고 있음.
- 근 강화 관련 제품의 대부분은 운동 능력이나 근육 형성 증진 효능을 갖는 단백질 보충제를 위주로 개발되었고, 현재 **근력개선을 용도로 기능성을 인정받은 개별인정형 원료는 오미자 추출물이 유일함**.
- **노인성 근감소증(sarcopenia)은 2016년 WHO에서 새로운 질병으로 분류**하여 코드 (ICD-10-CM)을 부여하였으며, FDA로부터 허가된 **치료제는 전무**한 상태임. 세계 빅파마들이 치료제 개발에 열중하고 있는 상황에서 **국내 자생 천연자원으로부터 유용한 소재발굴을 선점하는 것이 중요함.** 우리나라는 2021년 질병코드 부여함(한국표준질병사인분류 KCD 8차 개정).
- 건강한 근육에서는 근단백질의 합성과 분해가 균형있게 이루어지나, 노화로 인해 항상성의 불균형으로 인해 근위축이 발생하게 됨. 그러므로 **근단백질 합성과 분해를 균형있게 조절할 수 있는 천연물질의 발굴이 매우 중요함**.
- 본 연구의 소재는 천연물로서, 기존의 의약품 및 단백질 보충제들과 비교하여 안전하고, 기능성식품으로 개발하기에 적합한 소재이며, **근육감소를 차단하는 작용기전 뿐 아니라, 근육줄기세포의 분화를 촉진하여 근육재생을 촉진하는 2중적인 기능을 동시에 가지는 특징**을 확인함.



[본 기술의 특장점: 새로운 근육의 재생 촉진 및 근육소실의 억제

(5) 본 기술 원료 범위 및 중요성

가) 오리나무 효능과 이용 현황

- 오리나무(*Alnus japonica* Steud)는 자작나무과(Betulaceae)에 속하는 낙엽활엽교목으로서, 한방에서 수피(樹皮) 또는 눈지(嫩枝)를 약재로 이용해왔으며, 약성은 양(凉)하고 고삽(苦澁)하며, 해열·지혈·수렴의 효능이 있는 것으로 알려져 있음. 민간에서는 숙취 해소, 장염, 설사, 외상출혈, 천식, 위장병 및 만성기관지염에 효과가 있다고 알려짐 (정보섭외, 도해향약대사전, 영림사, p802, 1990년).
- 충청남도를 제외한 한국 전지역에 분포하고, tannin, flavonoids, diarylheptanoid 등의 성분이 알려졌

으며, 항암효과, 항산화효과, 항염효과 등 효능이 보고되었으며, acetaminophen에 의한 간손상 모델에서 간보호 효과와 알콜 분해촉진에 대한 연구가 보고됨.

- 다양한 효능을 가지고 있어 가지, 줄기, 그리고 열매를 달여서 차로 먹기도 하고, 근래에는 분말이나 엑기스 형태로도 판매되고 있음.
- **항바이러스, 항암, 뇌질환 예방 및 치료, 기억력 감퇴 예방 및 치료, 당뇨 예방 및 치료제로서 국내 특허가 등록되어 있으며, 오리나무를 원료로 포함한 다양한 제품이 출시**되어 있음.

제 품 명	효 능	제 조 사
여명 1004	오리나무, 마가목의 잎, 줄기, 뿌리의 추출물을 주원료로 한 숙취제거 음료	그래미
출근환	오리나무 수피, 헛개나무 열매, 귤나무 껍질 등을 다려 만든 환약 형태의 숙취제거제	선경 바이오
골든벨	가시오가피, 헛개나무, 오리나무 추출물 혼합액의 숙취제거 음료	다인스팜
푸르모	오리나무 추출 물질 오레고닌과 느릅나무 추출 물질 카테킨등을 원료로 한 두피, 모발 영양제	퓨리샘
해피코	유근피, 오리나무, 청이자 등의 추출물 혼합물로 된 엑기스 형태의 비염, 축농증 저해제	해피바디

[오리나무 추출물을 원료로 한 제품들]

나) 근육 강화 소재로서의 오리나무 효능

- 본 연구의 주요 소재로써 **오리나무 추출물**은 근육줄기세포의 분화를 촉진함으로써 **근육재생의 기능**과, 근육소실을 유도한 실험 모델에서 **근육소실을 억제**하는 활성을 발휘함. **노인성근위축증을 예방 또는 치료**할 수 있는 가능성이 충분한 소재로 평가됨.
- 오리나무 추출물을 활용하여, 고부가 가치 식의약품 소재로의 개발을 통해 농가의 소득 향상을 기대할 수 있으며, 근감소증 개선을 위한 건강기능식품 및 고령친화식품으로 개발할 가능성이 충분함.

다) 원료 수급 및 제품화 전략

(가) 원료 수급 및 표준화 전략

- 오리나무 사용 부위 선정 및 선정된 부위의 안정적인 원료 수급 및 표준화 방안 모색
  - 기원, 품종, 지표성분 함량 및 in vitro/vivo 효능평가를 통한 재배지역/사용부위/채취시기 등 확립
  - 추출, 여과, 농축 제조 공정상의 scale up 시 생약의 절도, 추출방법, 추출용매량, 추출온도, 시간, 여과 방법, 농축조건, 건조조건 및 수율에 대한 영향 평가
  - 한약재 전문 유통 업체를 통한 오리나무 선정 부위의 대량 수급 방안 모색
  - 농가 계약 재배를 통한 원료 원가 절감, 안정적 수급 및 표준화 용이 방안 모색

(나) Scale-up 및 대량생산 공정적용 원료 표준화 추진전략

- 추출 횟수, 온도, 용매 비율, 분쇄 정도에 따른 추출기준 설정
  - 성분패턴, 수율-지표성분 상관성 및 함량, 고형분 등
- 제조공정도 확립을 위한 감압농축 조건에 따른 기준 설정
  - 최종 농축 Brix 설정 및 고형분 및 지표성분 함량, 수율 등
- 원료 안정성을 고려한 제형연구
  - 상업화 용이 분무건조 조건에 따른 최종 소율 및 지표성분 함량, 안정성 고려 등
- 대량생산 공정 적용에 따른 제조공정도 및 기준 및 시험법 설정
  - 파일럿 단위 추출물 제조에 따른 성분패턴 분석
  - 제조공정 단계별 수율, 지표성분 함량 모니터링 및 공정규격 설정
  - 대량생산 원료에 대한 기준 및 시험법 설정 (성상, 지표성분 함량, 중금속, 미생물, 잔류용매 등)

(다) 기술 정보 수집

- 식품의약품안전처 근력개선 건강기능식품 개발 가이드라인 및 자료
- 공인 국제 논문 및 관련 문헌 조사
- 관련 학회 참석을 통한 정보수집

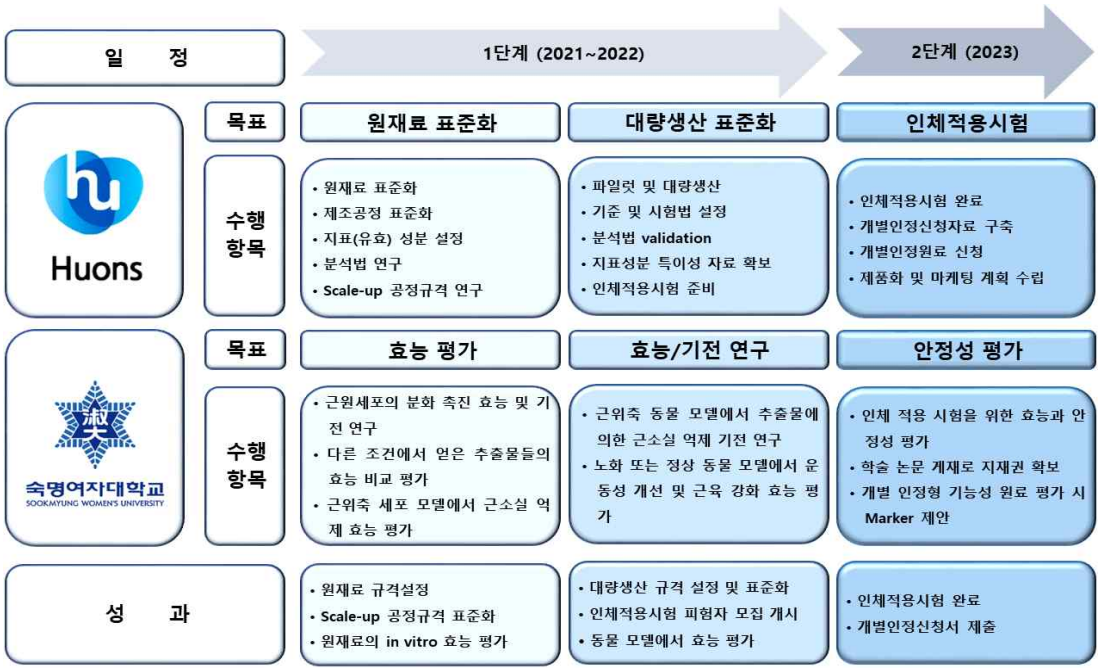
(라) 다른 기관과의 협조 방안

● 동물시험 및 인체적용시험: 연구기관 (OO병원 임상시험센터) & CRO (위탁기관)
● 전문 기관 활용 1
- 원료 대량생산 시설 용역위탁 제조
- 실제 제품생산 관련된 규정 및 조건 검토
● 전문 기관 활용 2
- 원료 제제 및 제형 등 시제품 제조 관련 시험 용역위탁 제조
- 실제 제품화를 위한 제제 및 제형 최적화 검토
● 전문 기관 활용 3
- 유효성의 객관적 평가를 위한 외부기관 평가 의뢰

(마) 연구개발 방법론
● 연구 설계: 건강기능식품 기능성 원료 식품의약품안전처 허가를 위한 연구 방향 설계
● 근력개선 시험 모델의 확립: 식품의약품안전처 효력시험 평가지침서 기준으로 확립
● 객관적 평가 자료 획득: 자/타기관의 객관적 실험 결과를 근거로 한 유효성 평가
● 원료 및 시제품의 실제 생산 공정에 근접하도록 scale-up 설정에 초점을 둔 설계

(바) 원료 및 시제품의 안정성 평가
● 제품화 (상업화) 고려 원료 및 시제품 안정성 연구 (가속시험, 장기보존시험)를 통한 유통기한 설정
- 가속 안정성 시험 (3개온도): 단기간의 가속 조건에서 물리·화학적 시험, 미생물학적 시험 및 내용물과 용기와의 적합성에 대하여 제형에 따른 적절한 기준 및 시험방법과 온도 조건에서 시험
- 장기보존시험 (실온): 온도, 광선, 습도 등 가혹 조건에서 안정성을 예측하기 위한 시험
- 원료 및 시제품 경시변화에 따른 품질 안정성 평가 진행

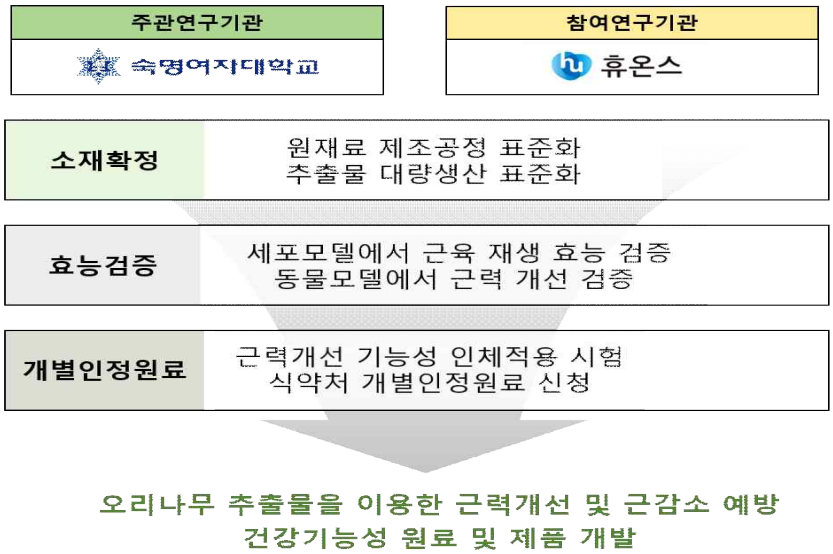
(6) 연구개발과제의 추진 체계



2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 연구 개발 목표 및 범위

	목 표
단계	오리나무 추출물을 이용한 개별 인정형 기능성 원료 신청
1 단계 (1,2차년)	- 오리나무 추출물 원재료의 표준화 - 대량 생산 규격 설정 및 표준화 - 기준 및 시험법 설정 및 분석법 validation - 오리나무 추출물의 *in vitro* 효능 평가와 기전 연구 - 동물 모델에서 오리나무 추출물의 *in vivo* 효능 평가와 기전 연구 - 인체 적용 시험 진입
2 단계 (3차년)	- 인체 적용 시험 완료 - 개별 인정 원료 신청 - 지재권 확보 및 평가 지표 제안



2) 연구 개발 수행 내용

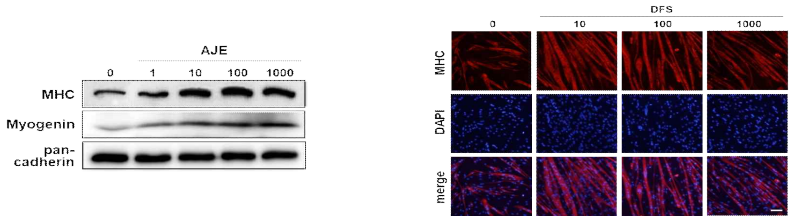
(1) 주관 기관 (숙명여자대학교)

가) *in vitro* 효능 검증

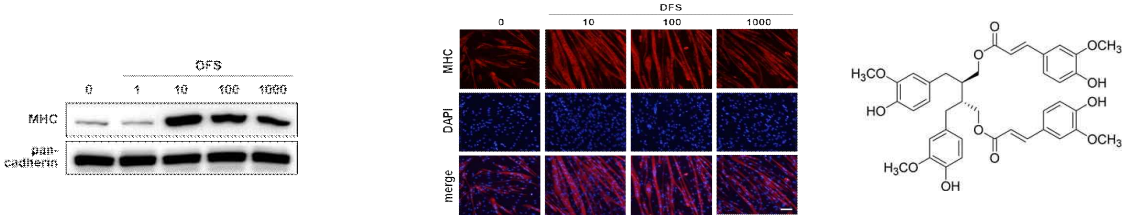
(가) 근원 세포의 근관 세포로의 분화 촉진 효능과 기전 규명

- ✓ 근원세포의 근관세포로의 분화 촉진 (MHC, myogenin 발현증가)
- ✓ 다핵성 MHC(+) 근섬유 증가
- ✓ p38 MAPK 활성화 기전에 의한 근원세포 분화 촉진

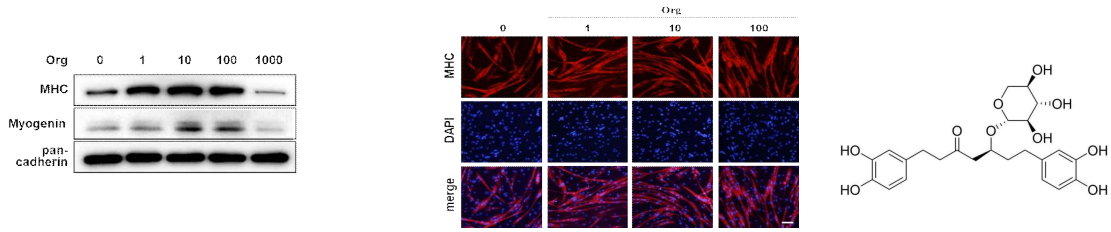
- 오리나무 추출물 (extreact of *A. japaonica*, AJE)과 추출물에서 분리, 정제한 리그난 (DFS: 2*R*,3*R*-1,4-O-diferuloylsecoisolarciresinol)과 오레고닌 (Oregonin, Org)의 근육 근원 세포(myoblast)에서 근관 세포 (근섬유, myotube)로의 분화 촉진 효능 평가.
- 분화 과정 중 발현되는 분화 인자들 [myosin heavy chain (MHC), myogenine]의 단백질 발현이 추출물 또는 활성 물질들에 의해 증가됨을 확인함.
- 근섬유는 다핵성이며, MHC 발현이 증가되는 특징을 갖고 있음. 그러므로 DAPI (blue, 핵 염색)와 항-MHC (red, MHC 염색)로 면역염색 실험에서 추출물 또는 물질들에 의해 다핵성 MHC(+) 근관 세포들이 증가함을 확인함.



[오리나무 추출물에 의한 근원세포 분화 촉진]

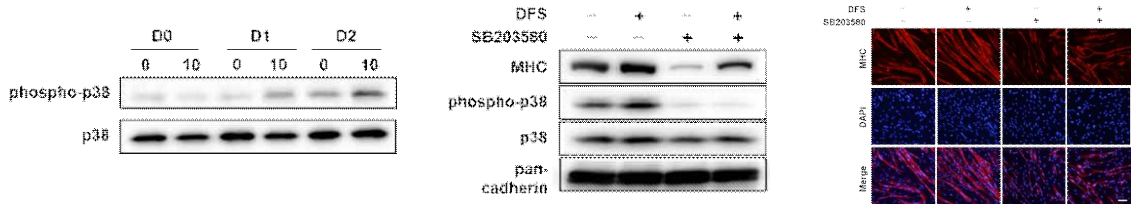


[리그난에 의한 근원세포 분화 촉진]

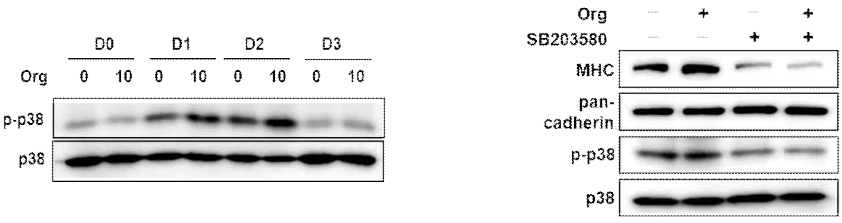


[오레고닌에 의한 근원세포 분화 촉진]

- p38 MAPK 활성화를 통한 리그난과 오레고닌의 근원세포 분화 효능을 확인하고, p38 MAPK 저해제 (SB203580) 처리 시, p38 MAPK가 불활성화되고 활성 물질들의 처리에 의해 근섬유의 손상이 복구되지 않음을 통해 활성 물질들의 주요 활성 기전임을 확인함.



[리그난에 의한 p38 MAPK의 활성화]



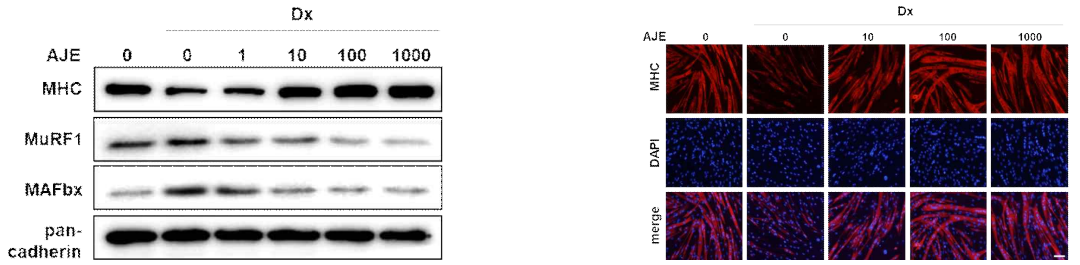
[오레고닌에 의한 p38 MAPK의 활성화]

(나) 근관 세포 손상 억제 효능과 기전 규명

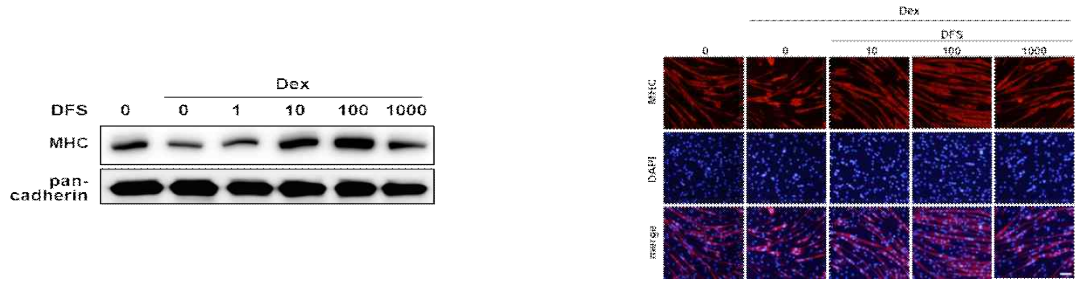
✓ 덱사메타손 유도 근섬유의 손상 억제
✓ 덱사메타손에 의해 감소된 MHC와 mTOR의 발현 증가
✓ 덱사메타손에 의해 증가된 NF-κB, FOXO3a, MuRF1, MAFbx, Myostatin의 발현 감소

- 합성 글루코코르티코이드인 덱사메타손 (Dexamethasone, Dx)으로 유도된 *in vitro* 근섬유 손상모델에서, 덱사메타손에 의해 감소된 MHC 발현 또는 다핵성 MHC(+) 근섬유가 추출물과 활성 물질들에

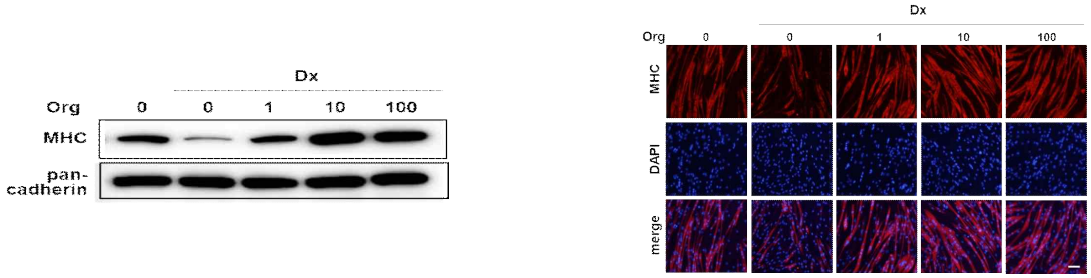
의해 회복됨을 확인함.



[근섬유 소실 모델에서 추출물에 의한 근섬유 보호 효능]

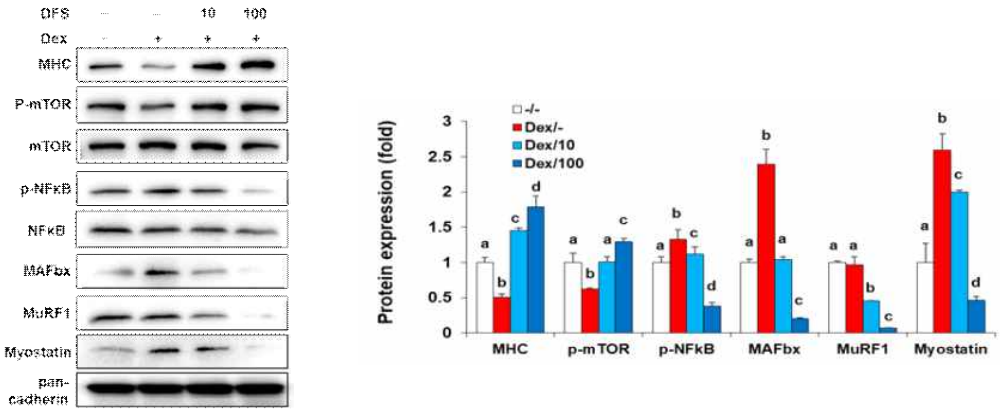


[근섬유 소실 모델에서 리그난에 의한 근섬유 보호 효능]

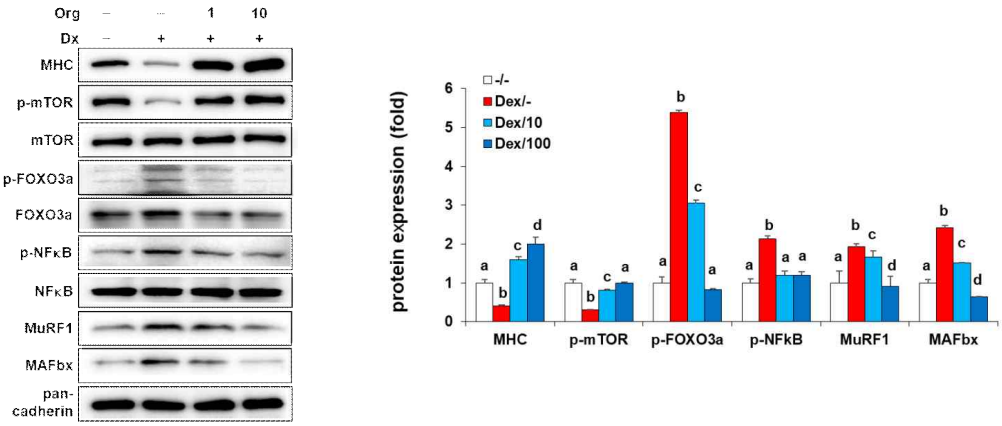


[근섬유 소실 모델에서 오레고닌에 의한 근섬유 보호 효능]

- 덱사메타손으로 유도된 *in vitro* 근섬유 손상 모델에서, 감소된 MHC와 mTOR의 단백질 발현이 활성 물질들에 의해 증가함을 확인함. 반대로 덱사메타손에 의해 증가된 근단백질 분해 기전과 관련된 NF-κB, FOXO3a, MuRF1, MAFbx, 그리고 Myostatin의 발현이 활성 물질들에 의해 감소됨을 확인함.



[근섬유 손상 모델에서 리그난에 의한 근단백질 합성/분해 인자들의 발현 변화]

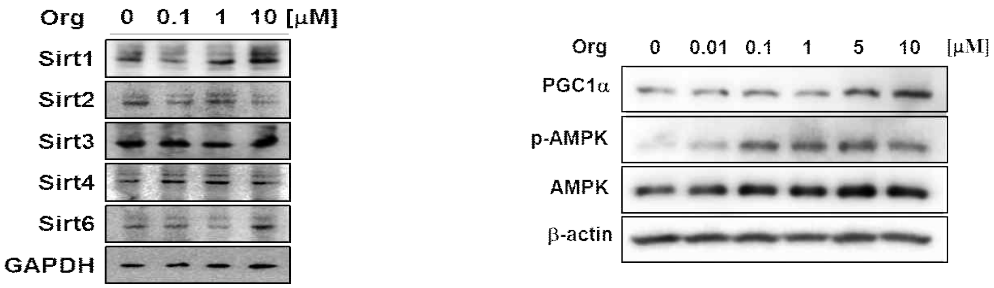


[근섬유 손상 모델에서 오레고닌에 의한 근단백질 합성/분해 인자들의 발현 변화]

(다) 오레고닌에 의한 근관세포의 미토콘드리아 생합성 증가

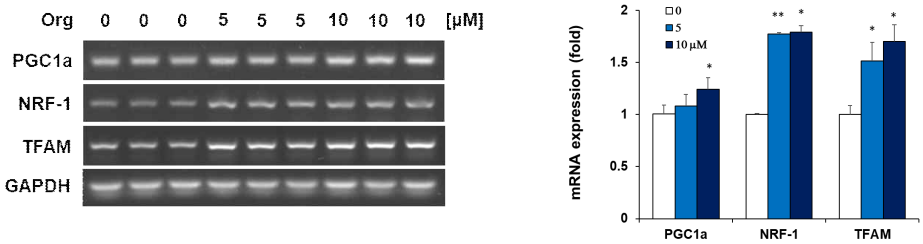
- ✓ SIRT 1, 6 발현 증가
- ✓ PGC1α 및 하위 유전자 발현 증가 (NRF-1, TFAM)
- ✓ AMPK활성화 및 ATP 생성 증가

- 근관세포 내 미토콘드리아 생합성(biogenesis)의 증가는 근육 기능을 유지하는데 매우 중요하며, 운동 능력을 증가시키고, 근육 피로도를 완화시킴
- 지방 조직, 심장 및 근육에서 미토콘드리아 생합성의 주요 조절 인자는 peroxisome prolifertor-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC1α)로서 AMP-activated protein kinase (AMPK)에 의해 인산화되거나, SIRT 1에 의해 탈아세틸화되어 활성형이 됨
- PGC1α의 활성화는 하위 유전자인 nuclear respiratory factor 1 (NRF)-1, NRF-2 그리고, mitochondrial transcription factor A (TFAM) 등을 발현시킴으로써 미토콘드리아 생합성을 증가시킴
- 오레고닌에 의한 근관세포 미토콘드리아 생합성 증가를 확인하기 위해, 분화된 근관세포에 오레고닌을 처리한 결과, 인산화형-AMPK 및 SIRT 1, 6 타입과 PGC1α의 단백질 발현이 증가함



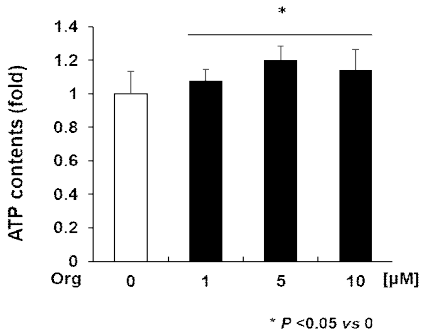
[근관세포에서 오레고닌에 의한 미토콘드리아 생합성 관련 인자들의 단백질 발현 변화]

- 오레고닌에 의해 미토콘드리아의 NRF-1, TFAM, PGC1α 등의 mRNA 발현이 증가함
- 오레고닌에 의해 AMPK, SIRT, PGC1α 단백질과 NRF-1, TFAM, PGC1α의 mRNA 발현 증가를 통해 근육 세포의 미토콘드리아 생합성을 증가시켜 근육 기능을 향상시킬 수 있음을 확인함.



[근관세포에서 오레고닌에 의한 미토콘드리아 생합성 관련 인자들의 mRNA 발현 변화]

- 오레고닌에 의한 미토콘드리아 생합성 증가의 결과로 근육의 에너지원인 ATP 생산이 증가함

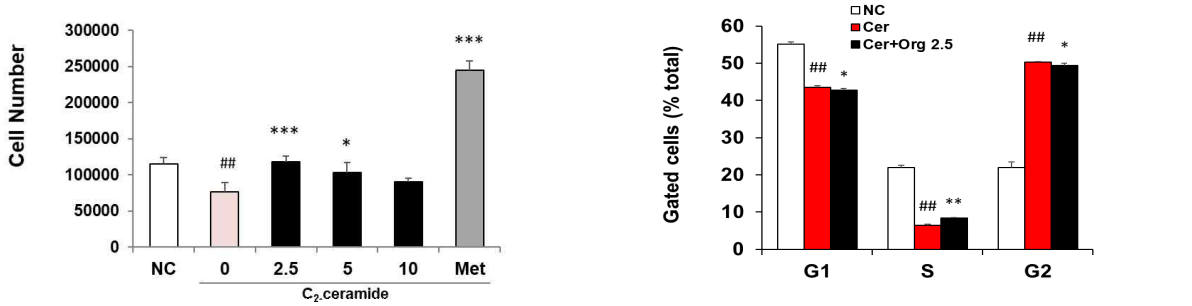


[근관세포에서 오레고닌에 의한 ATP 합성 증가]

(라) 근육 세포에서의 항노화 효능

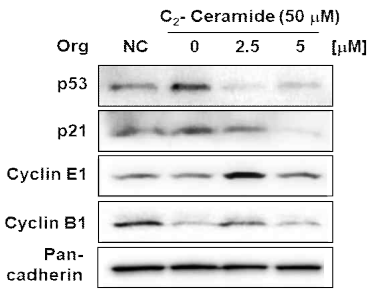
✓ C_2-세라마이드 유도 노화 모델에서 세포수 회복 및 세포주기 회복
✓ 지질 축적 억제 및 β-galactosidase 활성 억제

- C_2-세라마이드, 싸이토카인 등의 세포 자극제를 근원세포에 처리하면 세포 노화가 진행되어 세포 성장이 느려짐.
- C_2-세라마이드로 유도된 노화 세포 모델에서는 세포 주기가 G2-phase에서 정지(cell cycle arrest)하여 세포 수가 감소하며, 이때 세포 주기를 작동시키는 cyclin B1, E1의 발현이 감소됨
- 살아있는 세포의 수를 카운팅하고, 세포 주기 분석 (flow cytometry)을 실시한 결과, C_2-세라마이드 유도 노화 세포 모델에서는 예상대로 G2-phase에서 세포 주기 정지가 일어나 세포 수가 감소하며, 세라마이드과 오레고닌을 함께 처리하면 세포 주기 정지가 억제됨을 확인함
- 이때 오레고닌에 의해 세포 주기를 저해하는 단백질인 p53과 p21은 감소하며, cyclin B1, E1의 발현은 증가함을 분석함.



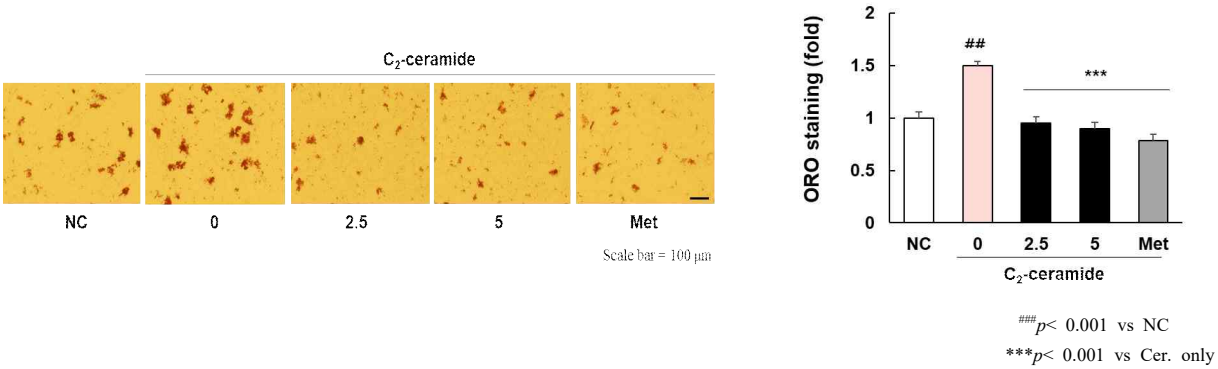
##p< 0.001 vs NC
*p< 0.005 vs Cer. only
**p< 0.001 vs Cer. only
***p< 0.0001 vs Cer. only

[C_2-세라마이드 유래 노화 세포 모델에서 오레고닌에 의한 세포 주기 정지 (cell cycle arrest)의 억제]



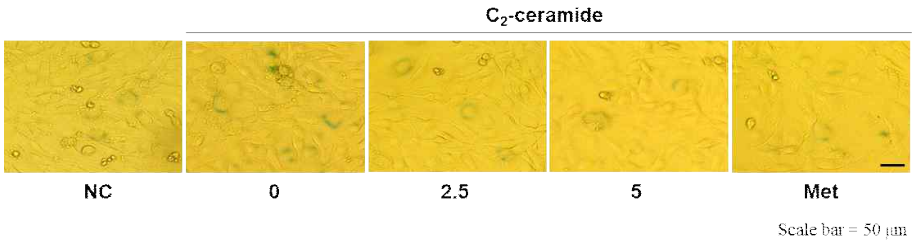
[오레고닌에 의한 세포 주기 조절 인자들의 발현 변화]

- C_2-세라마이드가 처리된 C2C12 근원세포에는 인지질 축적이 나타나며, 노화된 세포에서 특이적으로 발현되는 노화성 β-galactosidase가 발현됨
- Oil-Red O 염색을 통해 노화된 근원세포에서 오레고닌에 의해 지질 축적이 억제됨을 확인함. 양성대조군으로 metformin (2 mM)을 사용함



[노화된 근원세포에서 오레고닌에 의한 지질 축적 억제]

- 노화성 β-galactosidase 분석법을 통해, 노화된 근원세포에서 오레고닌에 의해 노화성 β-galactosidase 활성이 감소함을 확인함



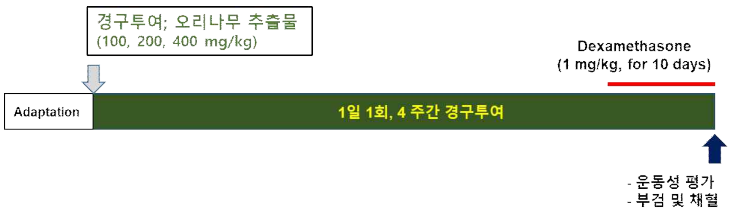
[노화된 근원세포에서 오레고닌에 의한 노화성 β-galactosidase 활성 감소]

나) 시험용 추출물의 *in vivo* 효능 검증

- (주)휴온스에서 대량으로 생산한 오리나무 추출 분말 (고형분 무게 대비 1:1 덱스트린 첨가)을 *in vivo* 연구를 위한 시험용 추출물로 사용함
- 동물실험과 관련한 지표는 식약처에서 제시한 근력관련 기능성 바이오 마커를 참조하여 측정함.

항 목	지 표
운동능력	악력 테스트, Treadmill 테스트, Rota rod 테스트
근육, 장기 무게	Gastrocnemius(장딴지근), Soleus(가자미근) 간, 부고환지방
근육단백질 대사 인자 (mRNA)	MHC, myogenin, myoD, mTOR, Akt murf1, mafbx, myostatin, foxo3a
혈청학적 지표	크레아티닌, 크레아틴 인산화효소, TNFα, Lactate, Pyruvate

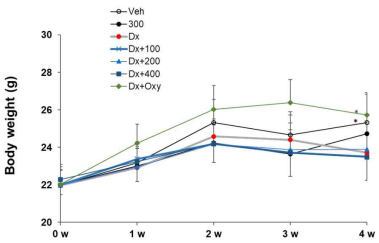
(가) 덱사메타손으로 유도된 노인성 근육 감소 동물 모델에서 효능 평가



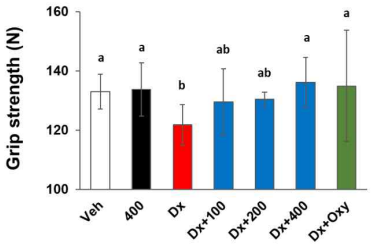
[덱사메타손 유래 근손실 동물에서의 효능 평가]

✓ 운동능력 개선됨 (악력테스트, Rota rod 테스트)
✓ 가자미근과 장딴지 근육의 무게 개선됨
✓ 근단백질 분해 관련 바이오 마커들 (*murf1, mafbx, myostatin, foxo3a*)의 mRNA 발현 감소됨

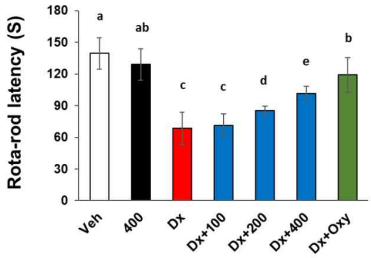
- 시험용 추출물을 100, 200, 400 mg/kg로 4 주간 경구 투여한 마우스에, 덱사메타손 (1 mg/kg)을 10일 동안 피하주사하여 근소실 동물 모델을 구축함.
- 시험용 추출물의 효능에 대한 양성 대조군으로는 oxymetholone (50 mg/kg)를 경구 투여함.
- 시험용 추출물에 의한 체중 변화와 악력 테스트 (Grip strength test), Rota-rod 테스트를 이용한 근력 (Muscle strength) 개선 효능 평가 결과, 덱사메타손에 의해 감소된 근력이 시험용 추출물에 의해 증가함을 확인함. 이때 그룹 간 체중 변화는 관찰되지 않았음.



[체중 변화]

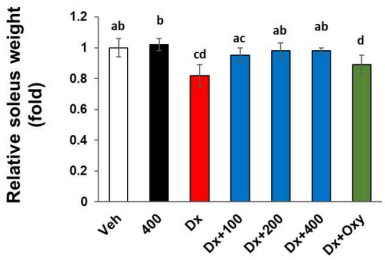


[악력 테스트]

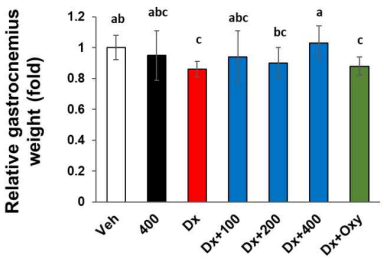


[Rota-rod 운동 테스트]

- 실험 동물 조직의 형태학적, 병리학적 분석
  - 가자미근(soleus), 장딴지근(gastrocnemius) 중량 변화는 각 개체의 체중 대비 상대 무게로 평가함.
  - 덱사메타손에 의해 감소된 가자미근, 장딴지근의 상대 무게가 각각 시험용 추출물 (유효 농도; 200, 400 mg/kg 또는 400 mg/kg)에 의해 증가되었음.

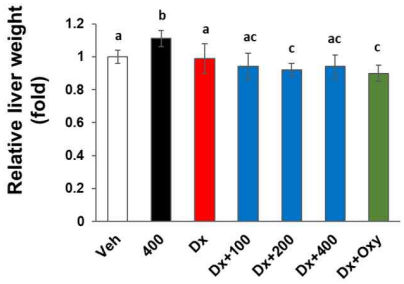


[가자미근의 무게]

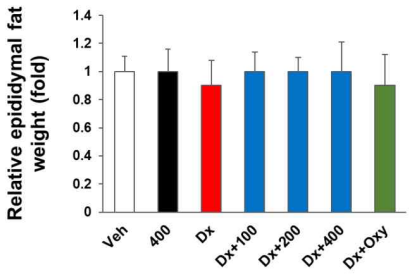


[장딴지근의 무게]

  - 시험용 추출물에 의한 간과 부고환 지방 중량 변화는 각 개체의 체중 대비 상대 무게로 평가함.
  - 덱사메타손 처리군과 비교 시, 시험용 추출물 (유효 농도; 200 mg/kg)에 의해 간의 상대 무게가 감소되었음.

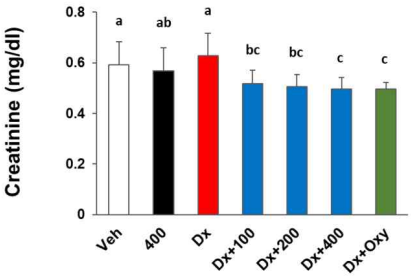


[간의 무게]

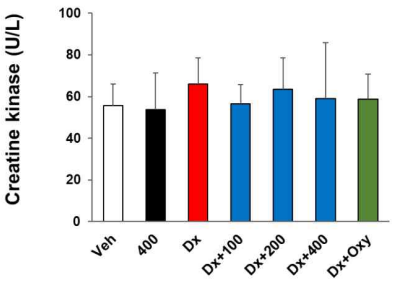


[부고환 지방의 무게]

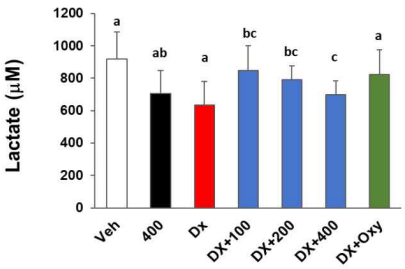
- 근육 피로도의 마커인 크레아티닌 (creatinine)의 혈중농도와 크레아틴 인산화효소 (creatine phosphokinase)의 활성 측정 결과, 크레아틴 인산화효소 농도는 그룹 간 변화가 없었고, 시험용 추출물 투여군 (유효 농도; 100, 200, 400 mg/kg)에서 크레아티닌의 농도가 감소함. 즉, 추출물에 의한 근피로도가 감소함.
- 근육 에너지원인 젖산 (lactate)과 피루브산 (pyruvate)의 혈중 농도 측정 결과, 피루브산 농도는 Dx와 Dx+추출물 그룹들 간 변화 없었고, 시험용 추출물 투여군 (유효 농도; 100, 200, 400 mg/kg)에서 Dx 그룹 대비 젖산의 농도가 증가함. 즉 시험용 추출물에 의한 근육 에너지원인 젖산의 생산이 증가함.



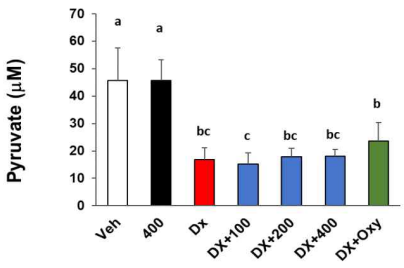
[혈중 크레아티닌 농도]



[혈중 크레아틴인산화효소 활성]



[혈중 젖산 농도]

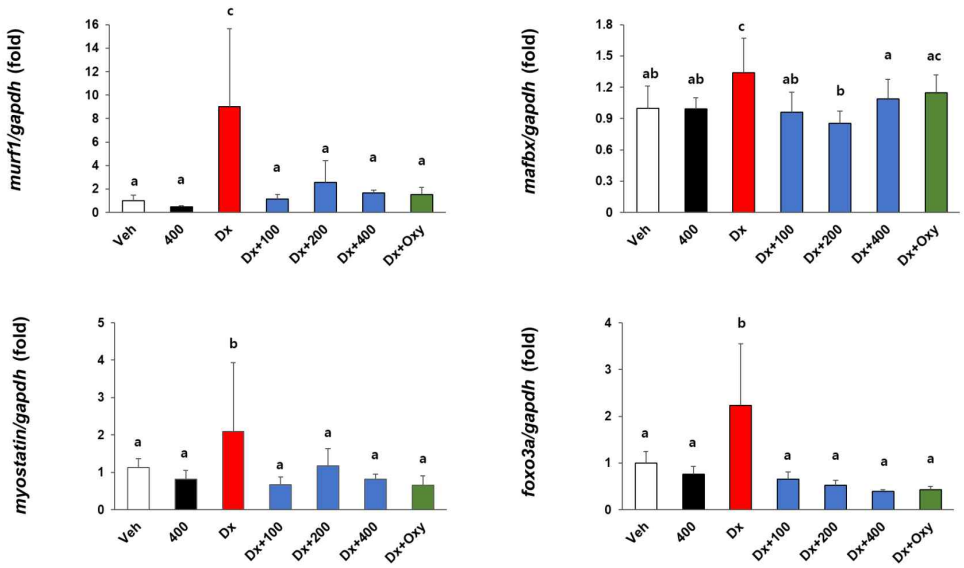


[혈중 피루브산 농도]

● 시험용 추출물의 근육 손실 억제 효능과 관련된 기전 연구

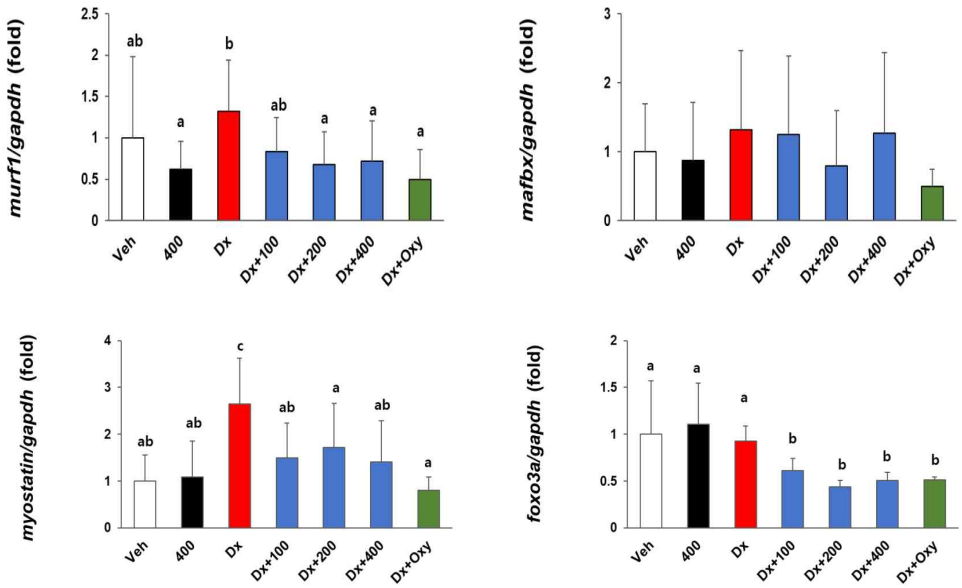
- 동물로부터 분리된 가자미근과 장딴지 근육에서, 근육 단백질 분해에 관여하는 바이오 마커들의 (*murf1, mafbx, myostatin, foxo3a*) mRNA 발현을 측정하여 시험용 추출물의 효능과 관련된 기전을 규명함.

i) 가자미근에서의 마커 변화; 덱사메타손에 의해 손상된 동물에서 근단백질 분해 인자들의 mRNA 발현이 증가하였고, 시험용 추출물에 의해 감소되었음.



[가자미근의 단백질 분해 관련 바이오 마커들의 mRNA 발현 변화]

ii) 장딴지근에서의 마커 변화; 덱사메타손에 의해 손상된 동물에서 *murf1, myostatin, foxo3a*의 mRNA 발현이 증가하였고, 시험용 추출물에 의해 감소되었음.



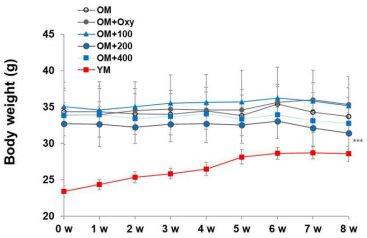
[장딴지근의 근단백질 분해 관련 바이오 마커들의 mRNA 발현 변화]

(나) 자연 노화로 유도된 노인성 근감소 동물 모델에서 효능 평가

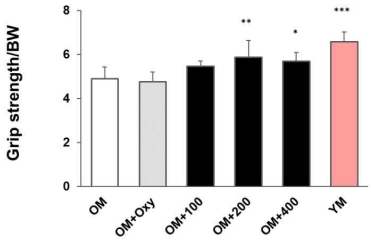
[자연 노화 유래 근손실 동물에서의 효능 평가]

✓ **운동능력 개선됨 (악력테스트)**
✓ **가자미근: 근단백질 합성인자(*mhc, myogenin, myoD*)의 발현 증가 경향성 (유의성 없음)**
✓ **장딴지근: 근단백질 분해인자인 *foxo3a* 발현은 감소함**

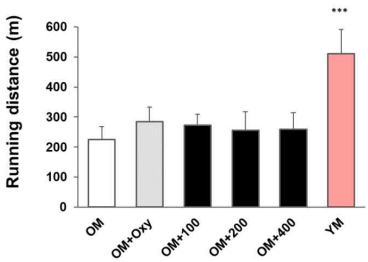
- 16 개월령의 노화 마우스 (old mice, OM)에 2 달 동안 시험용 추출물 (100, 200, 400 mg/kg)을 경구 투여함.
- 노인성 근감소 마우스의 대조군은 3 개월령의 마우스 (young mice, YM)를 사용함.
- 시험용 추출물 효능을 위한 양성 대조군으로 oxymetholone (50 mg/kg)을 경구 투여함.
- 시험용 추출물에 의한 체중 변화와 , Treadmill 테스트를 이용한 근력 (Muscle strength)을 평가하여, 노화된 동물에서 저하된 운동 능력이 시험용 추출물에 (유효 농도, 200, 400 mg/kg) 의해 개선됨을 확인함



[체중 변화]



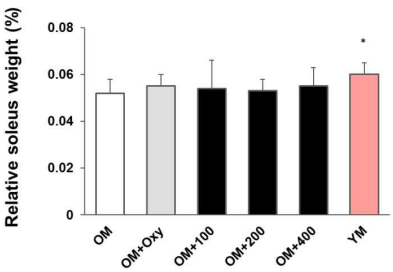
[악력 테스트]



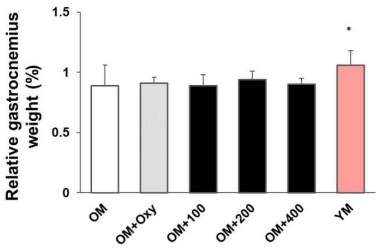
[Treadmill 운동 능력 평가]

$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs* OM

- 노화로 인한 근소실 동물 조직의 형태학적, 병리학적 분석
  - 가자미근, 장딴지근 무게 변화를 각 개체의 체중 대비 근육의 상대 무게로 평가한 결과, OM과 OM+추출물 그룹 간 변화 없음.



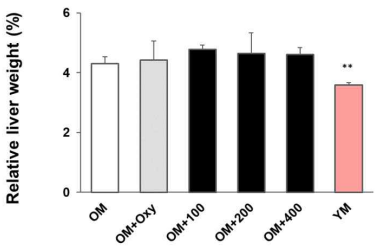
[가자미근의 무게]



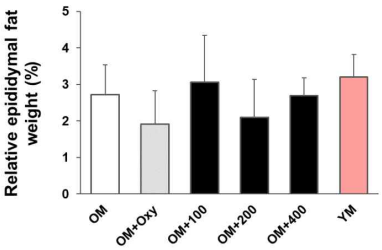
[장딴지근의 무게]

$^{*}p<0.05$ *vs* OM

  - 간과 부고환 지방의 무게 변화를 각 개체의 체중 대비 상대 무게로 평가한 결과, OM과 OM+추출물 그룹 간 변화 없음.



[간의 무게]

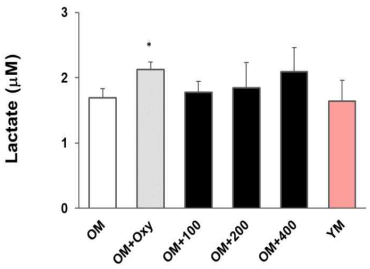


[부고환 지방의 무게]

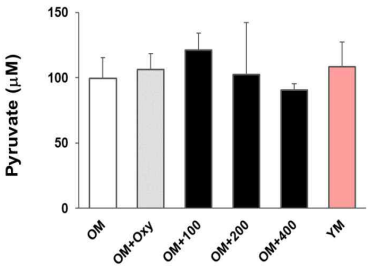
$^{**}p<0.01$ *vs* OM

  - 근육 에너지원인 젖산(lactate)과 피루브산(pyruvate)의 혈중 농도 측정 결과, 그룹 간 변화 없음.

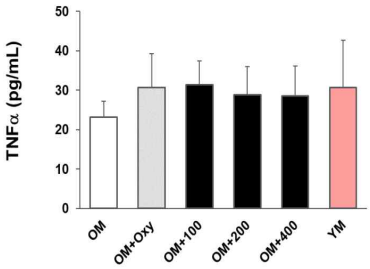
- 노화로 인한 염증성 마커인 TNFα의 혈중 농도 측정 결과, 그룹 간 변화 없음.



[혈중 젖산의 농도]



[혈중 피루브산의 농도]



[혈중 TNFα의 농도]

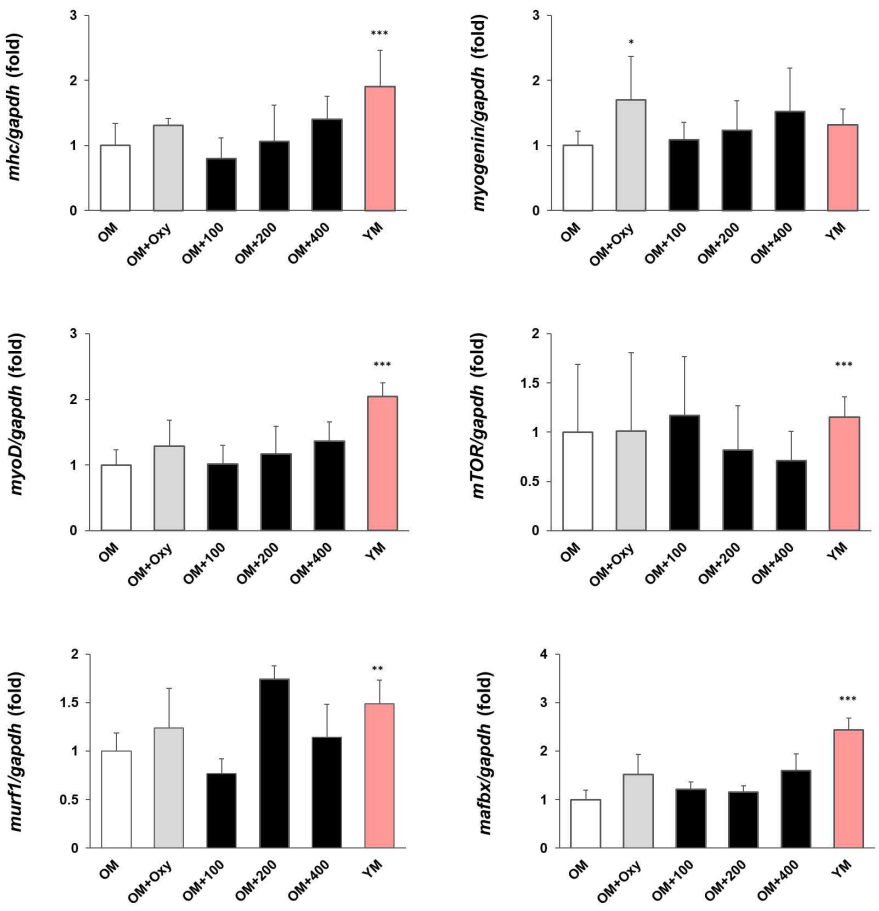
*$p<0.05$ *vs* OM

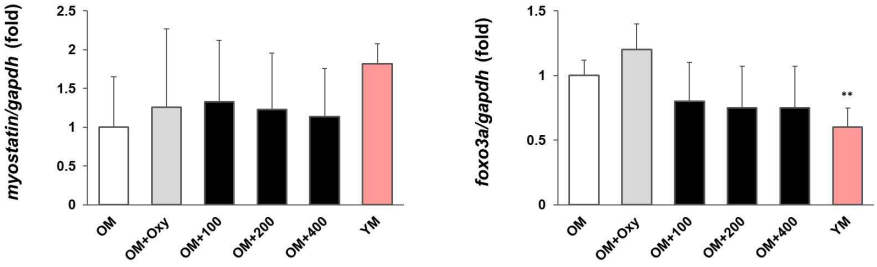
● 자연노화로 인한 근손실 동물 모델에서 시험용 추출물의 근감소 억제 효능과 관련된 기전 연구

- 노화동물로부터 가자미근과 장딴지 근육을 분리하여, 근육 단백질 합성/분해에 관여하는 바이오 마커들 (*mhc, myogenin, myoD, mTOR, murf1, mafbx, myostatin, foxo3a*)의 mRNA 발현을 측정하여, 시험용 추출물의 효능과 관련된 기전 연구
- **가자미근**에서의 마커 변화;

i) 근단백질 합성 인자 (*mhc, myogenin, myoD, mTOR*); YM에 비해 OM에서 발현이 감소하였으나, OM과 OM+추출물 그룹 간의 유의적인 변화는 관찰되지 않았으나, *mhc, myogenin, myoD*의 경우 시험용 추출물 농도에 따른 **증가 경향성을 보임**

ii) 근단백질 분해에 관련된 인자 (*murf1, mafbx, myostatin*); YM에 비해 OM에서 발현이 증가함을 예상하였으나 오리혀 감소하였고, 추출물의 개선 효능은 나타나지 않음.
foxo3a 발현은 OM에서 증가하였으나, OM과 OM+추출물 그룹 간의 유의적 변화는 없음.





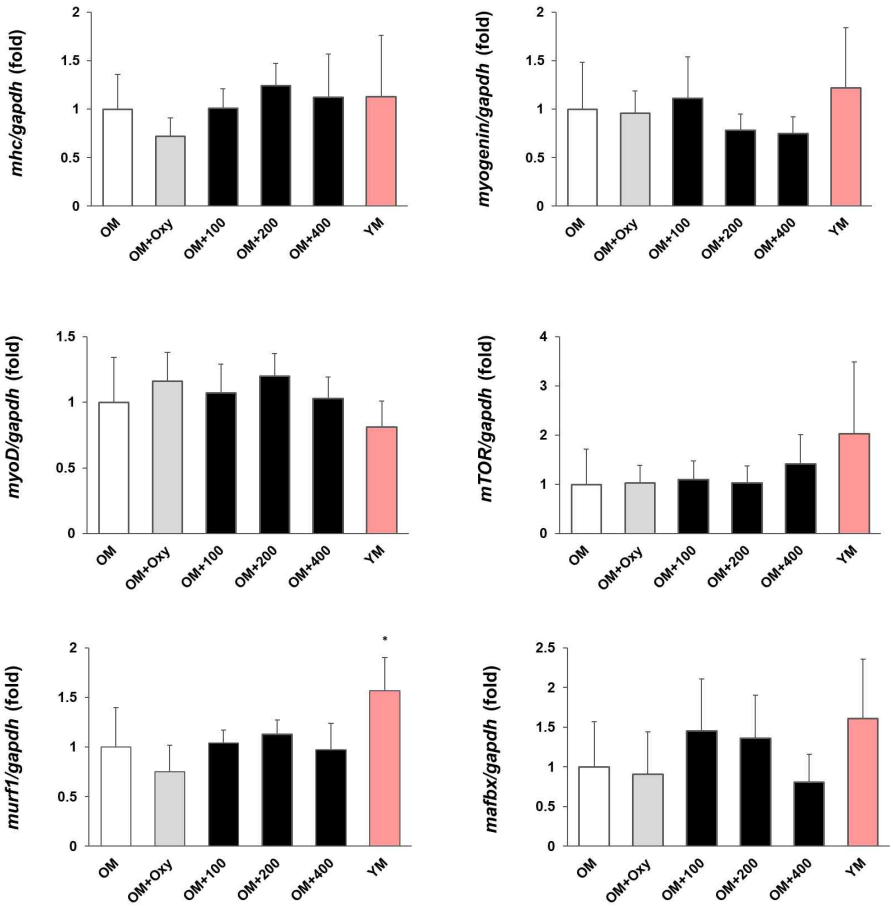
[가자미근 단백질 분해 관련 바이오 마커들의 mRNA 발현 변화]

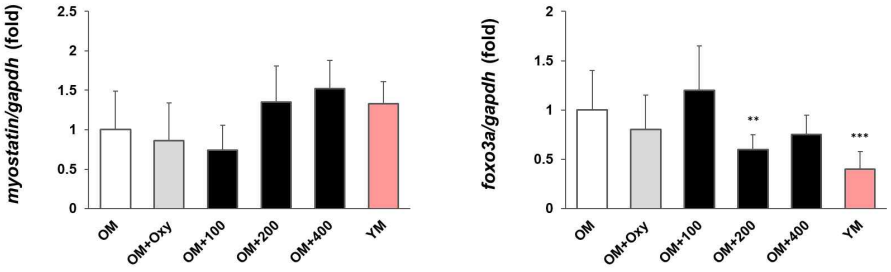
$^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs* OM

- **장딴지근**에서의 마커 변화;

  i) 근단백질 합성에 관련된 인자 (*mhc, myogenin, myoD, mTOR*); 그룹 간 변화 없음

  ii) 근단백질 분해에 관련된 인자 (*murf1, mafbx, myostatin, foxo3a*); *murf1*은 YM에 비해 OM에서 발현이 증가할 것으로 예상했으나 유의적으로 감소하였고, 추출물에 의한 개선 효능은 나타나지 않음. *mafbx, myostatin* 발현은 그룹 간 변화없음. *foxo3a* 발현은, YM에 비해 OM에서 발현이 증가하였고, OM와 비교하여 OM+추출물 (200 mg/kg)그룹에서 유의적으로 감소함.

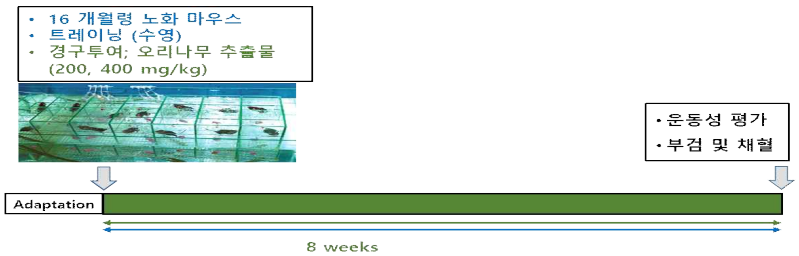




[장딴지 근단백질 합성/분해 관련 바이오 마커들의 mRNA 발현 변화]

$^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs* OM

(다) 트레이닝된 자연 노화 마우스에서 효능 평가



Kim *et al.* J Ethnopharm. 2018 212:175

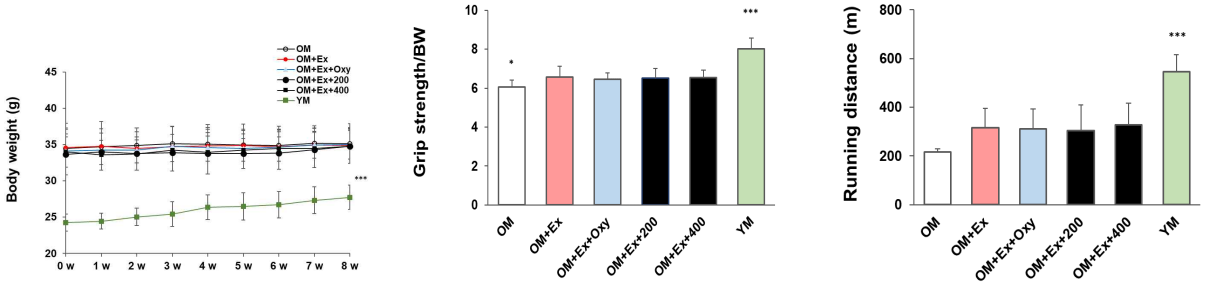
[트레이닝시킨 노화 동물에서의 효능 평가]

✓ **장딴지근: 근단백질 합성인자 중 *myogenin, myoD, mTOR*의 발현 증가**
✓ **운동성, 근육무게 등 기타 요소들의 변화 없음**

- 16 개월령의 노화 마우스 (old mice, OM) 그룹과 노화 마우스를 8 주간 수영으로 트레이닝 시킨 그룹 (OM+Ex), 트레이닝된 마우스에 추출물을 투여한 그룹 (OM+Ex+200 또는 400)에서 효능 평가

  트레이닝 조건; 8 주간, 수영으로 운동시킴
  - 물의 온도 : 30℃ ± 5℃
  - 물의 깊이 : 약 15 cm
  - 수조깊이 : 약 30 cm
  - 운동수행시간 : 1~5주 → 1 min/day, 6~8주, 2 min/day

  8 주동안 시험용 추출물 (200, 400 mg/kg)을 경구 투여함.
- 노인성 근감소 마우스의 대조군은 3 개월령의 마우스 (young mice, YM)를 사용함.
- 양성 대조군으로 oxymetholone (50 mg/kg, OM+Ex+Oxy)을 경구 투여함.
- 시험용 추출물에 의한 체중 변화와 악력 테스트, Treadmill 테스트를 이용한 근력 (Muscle strength)을 평가한 결과, 시험용 추출물이 트레이닝 시킨 노화 동물의 운동 능력을 증가시키지 못함을 확인함.



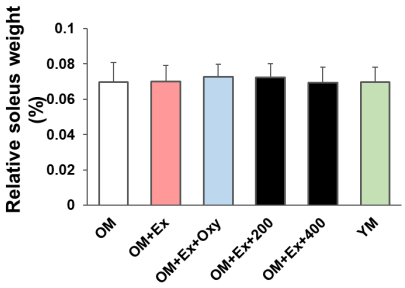
$^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ *vs* OM+Ex

$^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ *vs* OM+Ex

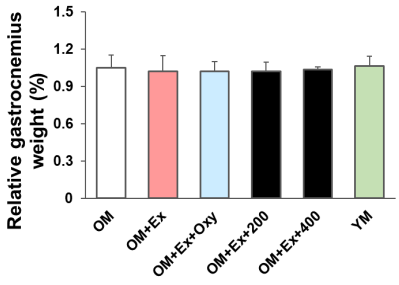
[체중 변화] [악력 테스트] [Treadmill 운동 능력 평가]

● 트레이닝된 노화 마우스의 근소실 동물 조직의 형태학적, 병리학적 분석

- 가자미근, 장딴지근 무게 변화를 각 개체의 체중 대비 근육의 상대 무게로 평가한 결과, OM, OM+Ex와 OM+Ex+추출물 투여 그룹 간 변화 없음.

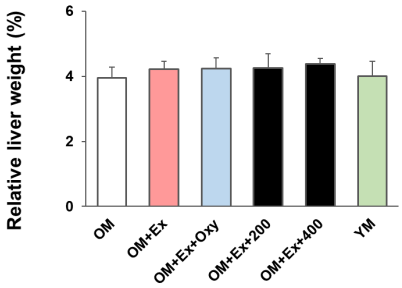


[가자미근의 무게]

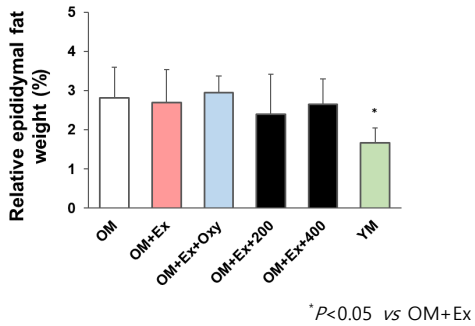


[장딴지근의 무게]

- 간과 부고환 지방의 무게 변화를 각 개체의 체중 대비 상대 무게로 평가한 결과, OM, OM+Ex와 OM+Ex+추출물 투여 그룹 간 변화 없음.



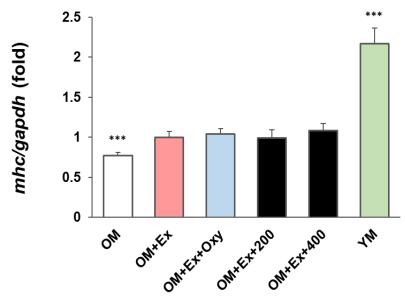
[간의 무게]

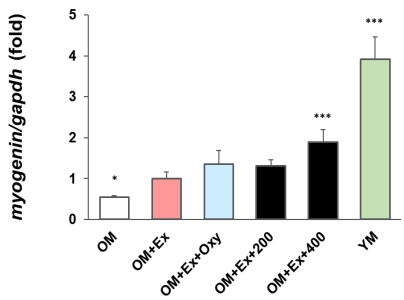


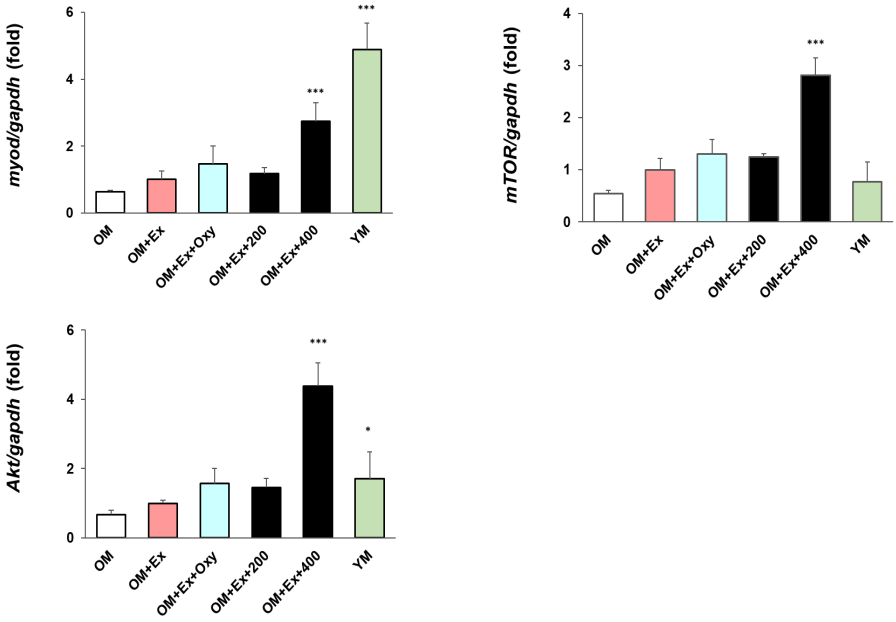
[부고환 지방의 무게]

- 장딴지근에서의 마커 변화;

i) 근단백질 합성 인자 (*mhc, myogenin, myoD, mTOR, Akt*); 장딴지 근육에서 근단백질 합성에 관련된 인자들의 유전자 발현을 측정한 결과, 트레이닝과 함께 추출물 (유효 농도 400 mg/kg)을 섭취한 노화 마우스에서 OM+Ex에 비해 ***myogenin, myoD, mTOR*의 발현이 더 증가**하였음.







[장딴지근 단백질 합성 관련 바이오 마커들의 mRNA 발현 변화]

$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ $^{***}p<0.001$ *vs* OM+Ex

(2) 공동연구 기관 ((주)휴온스)

가) 원료의 산지별, 부위별 효능 비교

국내에 유통되고있는 오리나무 수급 가능 부위를 파악하였으며, 산지별로 목질 및 수피 샘플을 확보하여 추출물을 제조하고 각 추출물에 대하여 Myogenic effect, Anti-myopathy effect를 평가함. 수율 및 식품가능성 여부 확인 후 산지 및 부위 선정함.

(가) 오리나무 목질 및 수피 정보

- 오리나무 목질

① 경북 영천	② 강원도
수율: 6.26%	수율: 7.25%
단가: 5,833원/kg	단가: 10,200원/kg

- 오리나무 수피

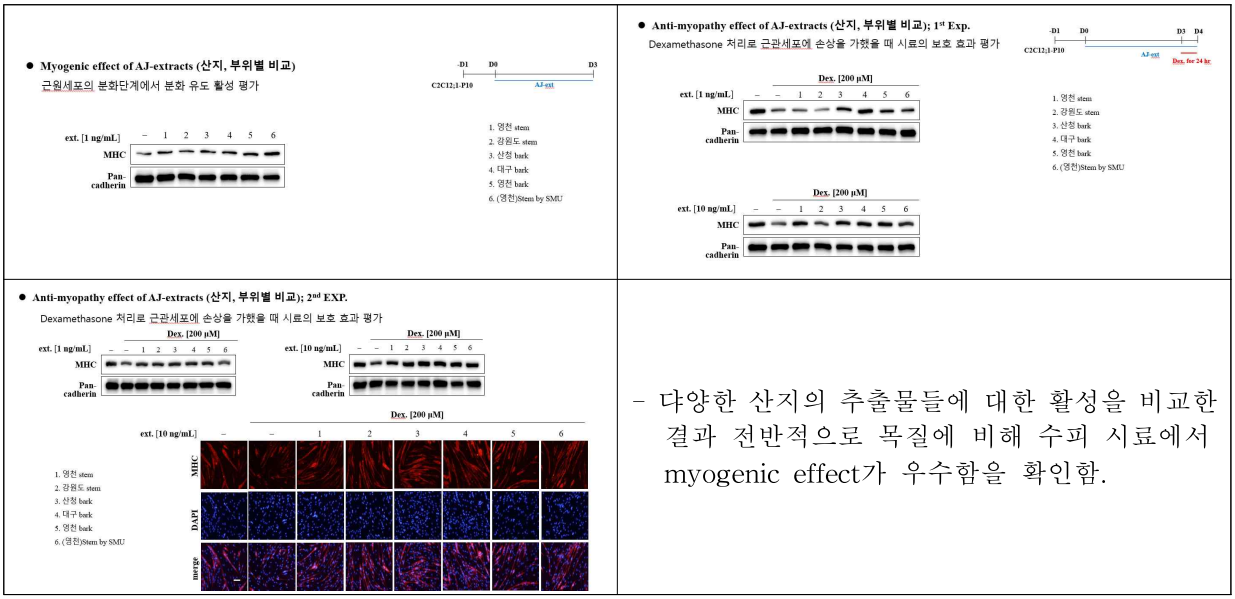
③ 경남 산청	④ 대구	⑤ 경북 영천
수율: 12.66%	수율: 20.81%	수율: 15.20%
단가: 42,000원/kg	단가: 28,000원/kg	단가: 28,000원/kg

(나) 추출 및 검증

오리나무 원생약 50 g을 분쇄 후 50% 에탄올로 80℃에서 4시간 환류 추출하여 추출물을 획득함.

용매	50% 에탄올
시료량	50 g (분쇄)
용매량	500 mL
추출 시간	4시간 (2회)
추출 온도	80℃

- 오리나무 산지, 부위별 활성 비교



- 다양한 산지의 추출물들에 대한 활성을 비교한 결과 전반적으로 목질에 비해 수피 시료에서 myogenic effect가 우수함을 확인함.

- 오리나무에서 식품사용 가능 부위

[별표 2] "식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료"의 목록

1. 식물성

고유번호	명칭	기타명칭 또는 시장명칭	학명 또는 특성	사용부위 (생약명)	사용조건
B가008500	오리나무	오리목, Japanese alder	Alnus japonica (Thunberg) Steudel	수피, 잎	-

<식품의약품안전처, 식품공전>

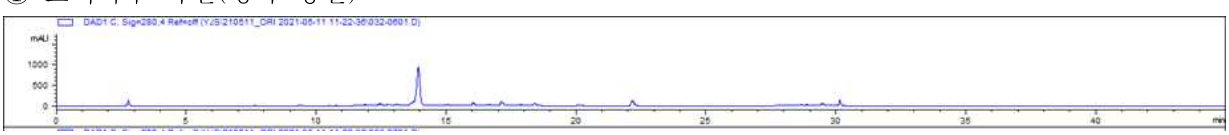
다) HPLC 분석법

	Time (min)	0.1% TFA(%)	ACN (%)
Mobile phase	0	90	10
	12	75	25
	24	60	40
	30	0	100
	35	0	100
	38	90	10
	45	90	10
Detector	UV 280 nm		
Column	Agilent Eclipse plus C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 ㎛)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 uL		
Temperature	30℃		
Instrument	Agilent 1260 Infinity		

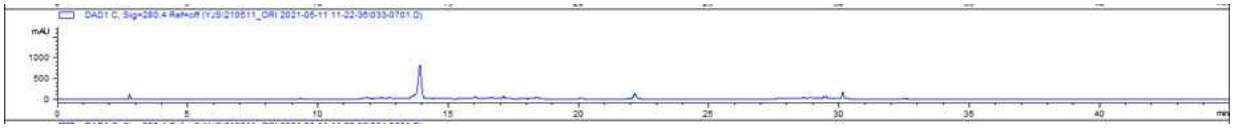
$$함량(mg/g) = (검량선농도(ug/mL) \times 희석용량(mL) \times 표준품순도))/시료량(mg)$$

(라) 산지별 부위별 추출물의 HPLC 분석 결과

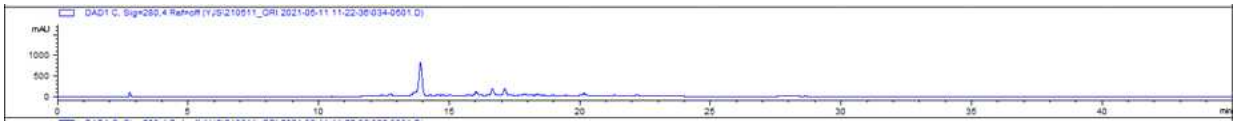
① 오리나무 목질(경북 영천)



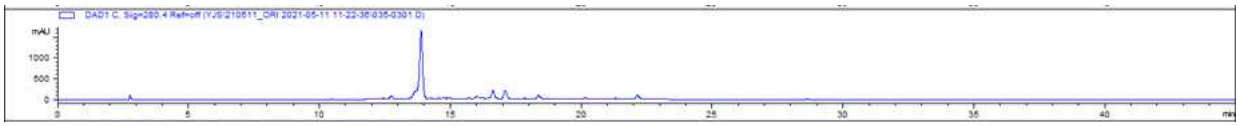
② 오리나무 목질(강원도)



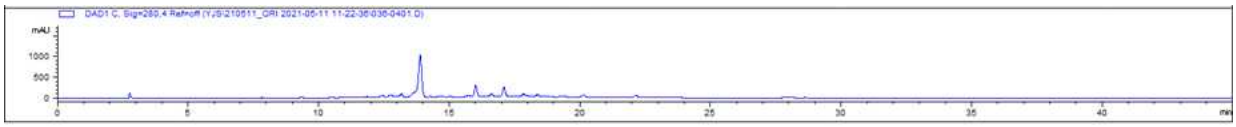
③ 오리나무 수피(경남 산청)



④ 오리나무 수피(대구)



⑤ 오리나무 수피(경북 영천)



(마) 결론

번호	산지	부위	Oregonin 면적	수율
①	경북 영천	목질	8865.3	6.26%
②	강원도	목질	7979.2	7.25%
③	경남 산청	수피	8074.9	12.66%
④	대구	수피	15913.2	20.81%
⑤	경북 영천	수피	10217.6	15.20%

- 목질 수율은 6.26~7.25%로 확인하였으며, 수피 수율은 12.66~20.81%로 확인
- 효능 및 식품사용 가능성 측면을 고려하여, 가장 적합한 원생약을 대구산 수피로 확정함.

나) 원재료 표준화 연구

(가) HPLC 분석법

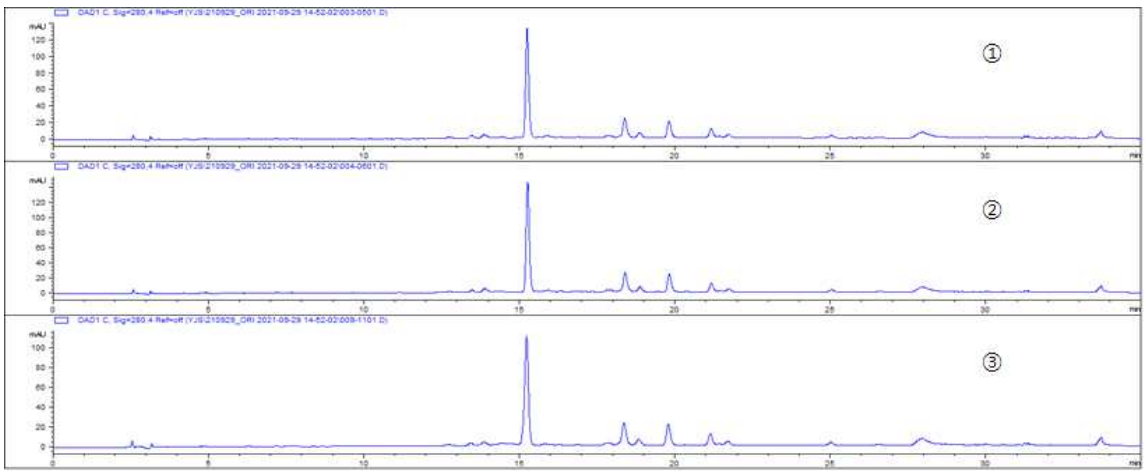
Mobile phase	Time (min)	0.1% TFA(%)	ACN (%)
	0	90	10
	12	78	22
	24	70	30
	28	0	100
	30	0	100
	32	90	10
	35	90	10
Detector	UV 280 nm		
Column	Agilent Eclipse plus C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 ㎛)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 uL		
Temperature	30℃		
Instrument	Agilent 1260 Infinity		

$$함량(mg/g) = (검량선농도(ug/mL) \times 희석용량(mL) \times 표준품순도))/시료량(mg)$$

(나) 추출 용매 설정

원재료 정보	오리나무 수피
용매	MeOH
시료량	1 g
용매량	200 mL
추출시간	60분
추출온도	25℃

- 추출용매에 따른 추출물의 HPLC 결과 (Oregonin peak : 15.3 min)



- 추출 용매에 따른 함량값

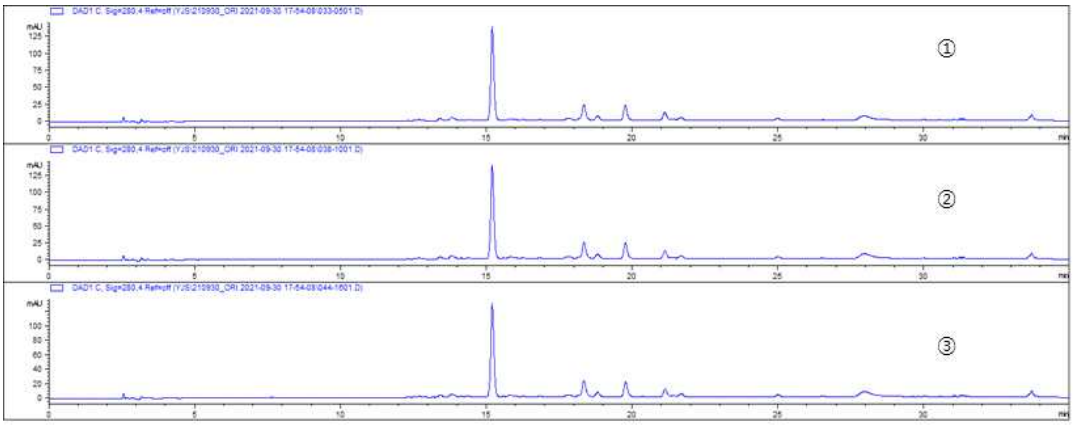
번호	추출 용매	Oregonin 함량값
①	50% MeOH	19.10 mg/g
②	80% MeOH	20.76 mg/g
③	100% MeOH	20.10 mg/g

- Oregonin함량 범위는 19.10~20.76 mg/g으로 나타남
- 80% MeOH>100% MeOH>50% MeOH 순서로 Oregonin 함령이 높은 것을 확인함.

(다) 추출 온도 설정

원재료 정보	오리나무 수피
용매	80% MeOH
시료량	1 g
용매량	200 mL
추출시간	60분
추출온도	30~70℃

- 추출온도에 따른 추출물의 HPLC 결과 (Oregonin peak : 15.3 min)



- 추출 온도에 따른 함량값

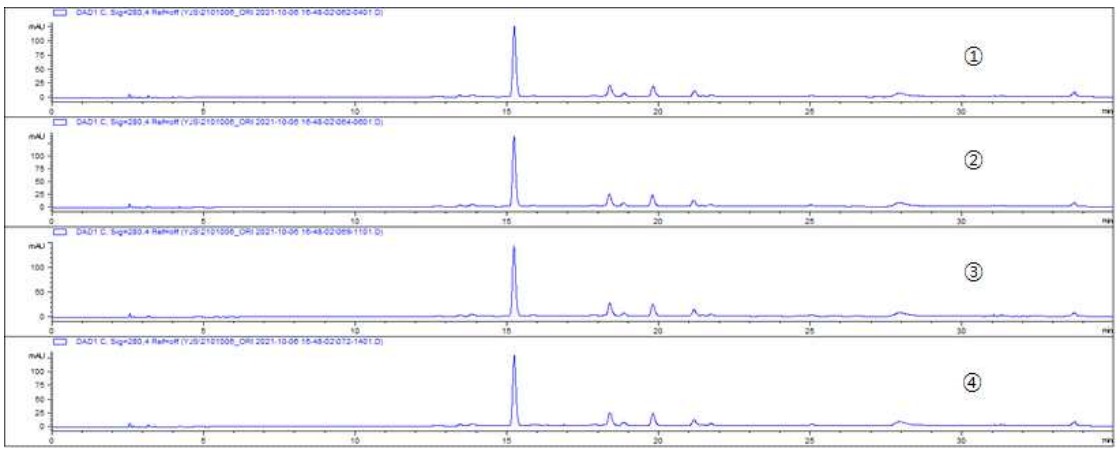
번호	추출 온도	Oregonin 함량값
①	30℃	20.94 mg/g
②	50℃	21.77 mg/g
③	70℃	20.72 mg/g

- 80% MeOH로 추출 용매 설정되고, 추출 온도 다르게 하여 초음파 추출을 진행함.
- Oregonin함량 범위는 20.72~21.77 mg/g으로 나타남.
- 50℃>30℃>70℃ 순서로 Oregonin 높은 함량 확인.

(라) 추출 시간 설정

원재료 정보	오리나무 수피
용매	80% MeOH
시료량	1 g
용매량	200 mL
추출시간	30분,60분,90분,120분
추출온도	50℃

- 추출시간에 따른 추출물의 HPLC 결과 (Oregonin peak : 15.3 min)



- 추출 시간별 함량값

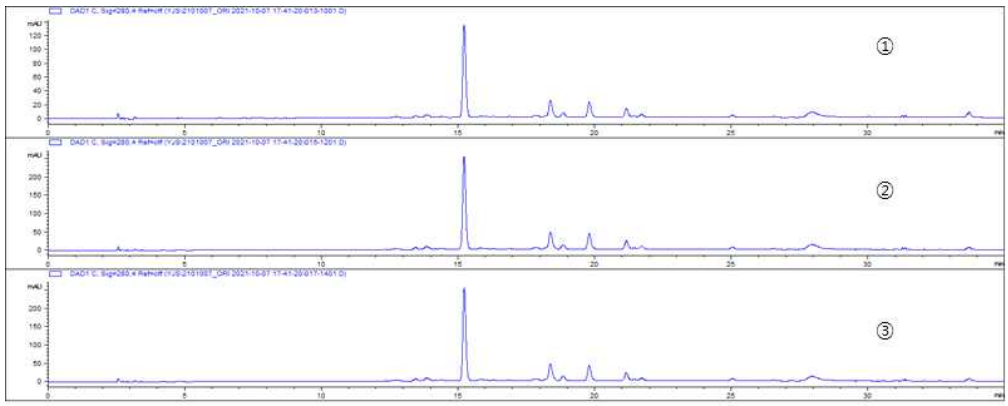
번호	추출 시간	Oregonin 함량값
①	30분	19.06 mg/g
②	60분	21.69 mg/g
③	90분	21.36 mg/g
④	120분	21.41 mg/g

- 80% MeOH, 50℃ 추출 조건 설정되고, 추출 시간을 다르게 하여 초음파 추출 진행
- Oregonin함량 범위는 19.06~21.69 mg/g으로 나타남
- 60분 >120분 >90분 >30분 순서로 Oregonin 높은 함량 확인

(마) 추출 용매량 설정

원재료 정보	오리나무 수피
용매	80% MeOH
시료량	1 g, 2 g
용매량	200 mL, 500 mL
추출시간	60분
추출온도	50℃

- 추출 용매량에 따른 HPLC 결과 (Oregonin peak : 15.3 min)



- 추출 용매량별 함량값

번호	추출 농도	Oregonin 함량값
①	1g/200 mL	21.74 mg/g
②	2g/200 mL	23.25 mg/g
③	5g/500 mL	23.77 mg/g

- 80% MeOH, 50℃, 60분 추출 조건이 설정되고, 추출 농도를 다르게 하여 초음파 추출을 진행함.
- Oregonin함량 범위는 21.74~23.77 mg/g으로 나타남.
- 5 g/500 mL > 2 g/200 mL > 1 g/200 mL 순서로 Oregonin 높은 함량을 확인함.

(바) 결론

- 오리나무 수급 시 원재료 적합 유무를 판단할 수 있는 품질관리 기준을 설정함.
- 원생약의 주요 성분의 함량 확인시험 조건은 원생약 5 g을 500 mL의 80% 메탄올에 가하여 초음파 추출법으로 50℃에서 60분 동안 추출하고, HPLC를 이용한 함량확인 시험법을 정립하였음.

- 원재료 지표성분 제안규격 함량은 평균 함량인 23.77 mg/g의 ±10%으로 설정하였음

다) 제조공정 표준화 연구

(가) 추출 용매 설정

- *in vitro* 효능 결과
  - MHC expression level로 Anti-myopathy effect 평가 시 에타놀 30, 50% 추출물에서 효과가 우수함을 확인함.
- 추출 용매별 수율 및 함량값 비교

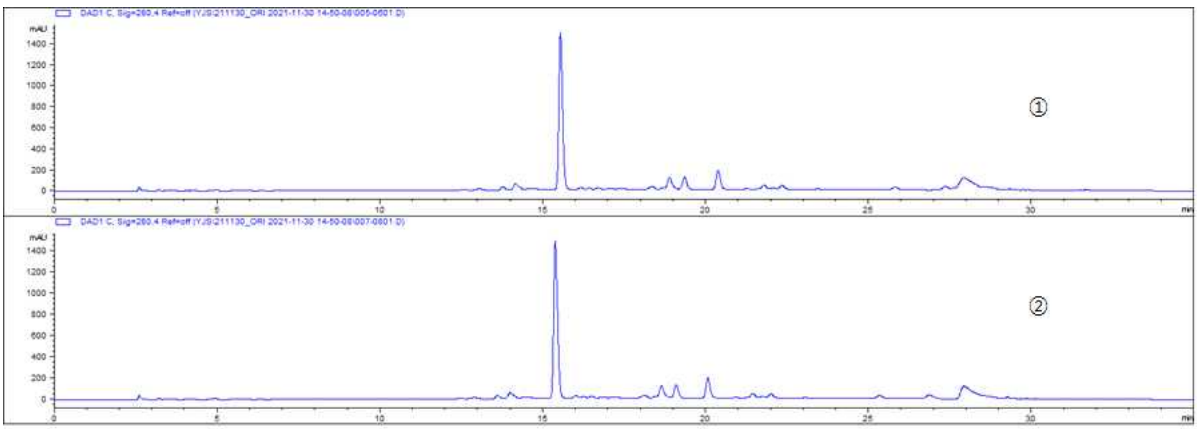
구분	추출용매			
	물	30% EtOH	50% EtOH	70% EtOH
지표성분 함량(mg/g)	148.46	155.13	161.47	149.52
추출 수율	9.18	10.30	11.778	11.20

- 물, 30%, 50%, 70% EtOH 4가지 용매로 환류 추출을 진행 (조건: 50 g, 500 mL, 8시간, 80℃)
- 지표성분 함량 결과는 50% EtOH>30% EtOH> 70% EtOH> 물 경향성으로 확인함..
- 수율 결과는 50% EtOH>70% EtOH> 30% EtOH> 물 경향성으로 확인함.
- *in vitro* 효능 결과 및 추출 수율 결과를 바탕으로 추출 용매는 50% EtOH로 설정함.

(나) 추출 온도 설정

원재료 정보	오리나무 수피
용매	50% EtOH
시료량	50 g
용매량	500 mL
추출시간	2시간
추출온도	60℃, 80℃

- 추출온도에 따른 HPLC 결과 (Oregonin peak : 15.3 min)
  - 원재료 표준화 연구 [2)-가] 분석법으로 진행



- 추출 온도별 함량값

번호	추출 온도	Oregonin 함량값	수율
①	60℃	186.80 mg/g	4.38%
②	80℃	204.25 mg/g	4.54%

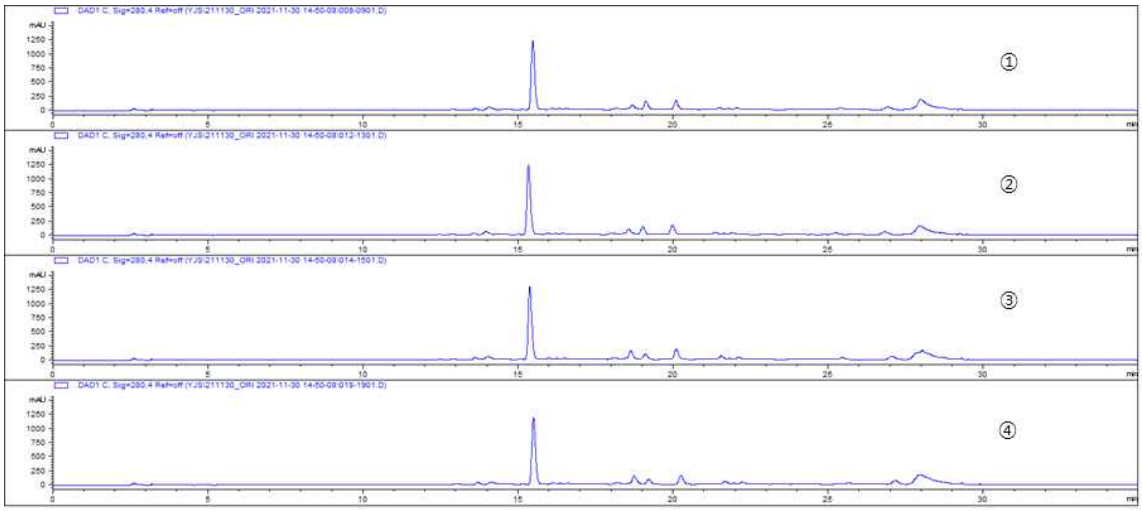
- 50% EtOH로 추출 용매가 설정되고, 추출 온도를 다르게 하여 환류 추출 진행함.
- Oregonin함량 범위는 186.80～204.251 mg/g으로 확인함.
- 80℃>60℃ 순서로 Oregonin 높은 함량 확인함.

(다) 추출 시간 설정

원재료 정보	오리나무 수피
용매	50% EtOH
시료량	50 g
용매량	500 mL
추출시간	4, 6, 8, 10시간
추출온도	80℃

- 추출시간에 따른 HPLC 결과

- 원재료 표준화 연구 [2)-가] 분석법으로 진행



- 추출 시간별 함량

번호	추출 시간	1차추출물 고형분	2차추출물 고형분	Oregonin 면적값	Oregonin 함량값	수율
①	4시간	0.88%	0.17%	9652.4 mg/g	163.33 mg/g	10.15%
②	6시간	1.16%	0.28%	9777.2 mg/g	165.32 mg/g	10.80%
③	8시간	1.38%	0.27%	10356.4 mg/g	174.57 mg/g	11.48%
④	10시간	1.34%	0.26%	9465.5 mg/g	160.23 mg/g	10.48%

- 50% EtOH, 80℃로 추출 조건 설정되고, 추출 시간 다르게 하여 환류 추출 진행함.
- Oregonin함량 범위는 160.23～174.57 mg/g으로 확인함.
- 80℃>60℃ 순서로 Oregonin 높은 함량 확인함.

(라) 결론

- 오리나무 추출물의 대량생산 공정적용을 위한 원재료 표준화 확립함. 대구산 오리나무 수피를 대상으로 추출 온도조건, 추출용매 에탄올 함량에 따른 (0-100% 에탄올) 추출물의 *in vitro* 효능 비교 결과, 50% 에탄올이 추출 용매로 설정됨.

- 온도조건 (60℃, 80℃, 10배수)에 따라 2회 반복 추출 시의 수율 결과는 온도가 높아질수록 수율이 높았음 (수율, 60℃: 4.38%, 80℃: 4.54%).
- 시간조건 (4, 6, 8, 10시간)에 따라 2회 반복 추출 시의 수율 결과는 8시간에서 가장 수율이 높았음 (11.48%). 그러나, 8시간 추출부터 불용성 물질 많이 생성되어 대량생산 공정적용에는 적합하지 않을것으로 사료됨. 오리나무 추출물 제조에 적합한 추출 시간은 6±1시간으로 설정함.

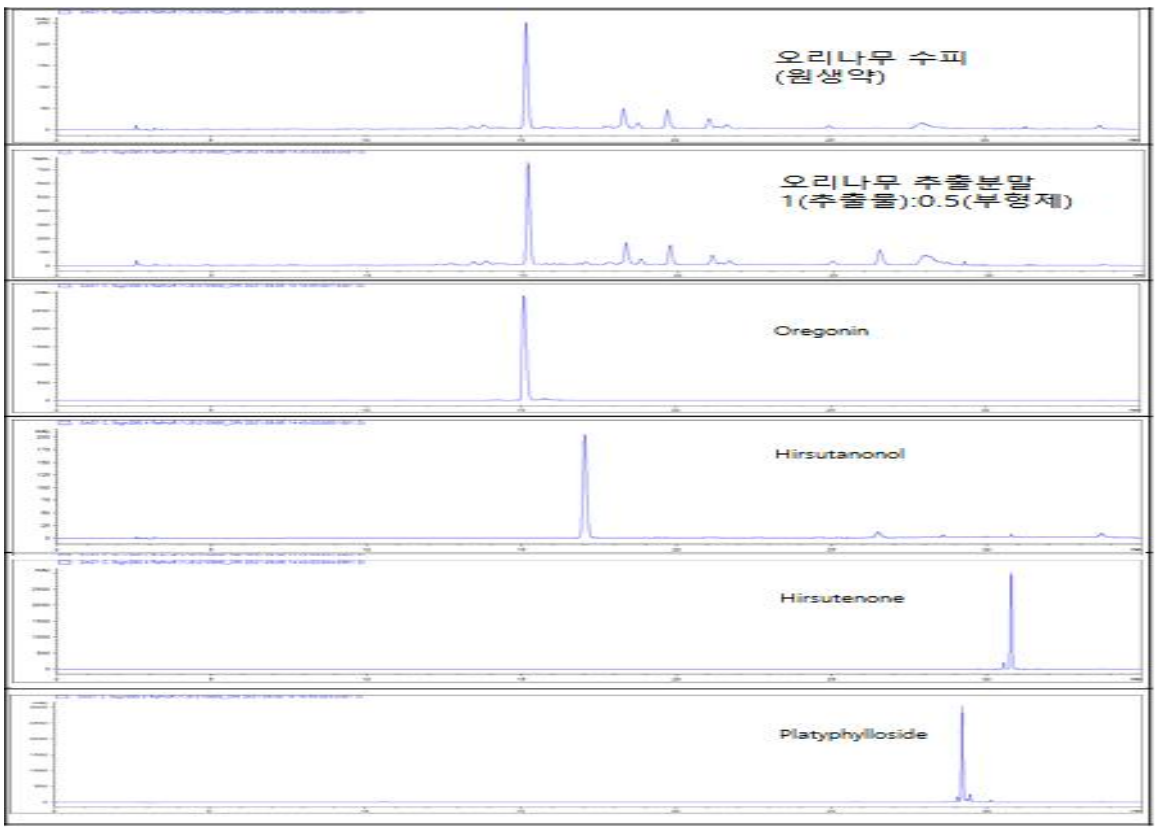
라) 지표(유효) 성분 설정 및 분석법 연구

(가) HPLC 분석법

	Time (min)	0.1% TFA(%)	ACN (%)
Mobile phase	0	90	10
	12	78	22
	24	70	30
	28	0	100
	30	0	100
	32	90	10
	35	90	10
Detector	UV 280 nm		
Column	Agilent Eclipse plus C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 ㎛)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 uL		
Temperature	30℃		
Instrument	Agilent 1260 Infinity		

$$함량(mg/g) = (검량선농도(ug/mL) \times 희석용량(mL) \times 표준품순도))/시료량(mg)$$

(나) 오리나무 추출물 성분 분석 (Oregonin peak : 15.3 min)



(다) 결론

- 오리나무 유래 성분으로 알려진, Oregonin, Hirsutanonol, Hirsutenone, Platyphylloside 4종을 분석하였을 때, 오리나무 추출에서 Oregonin 표준품과 추출물 상 retention time이 동일하였으며, 오리나무 추출물에서 다른 성분에 비해 Oregonin의 분리능이 뛰어남을 확인하였음.
- Diarylheptanoid 배당체인 Oregonin은 Alnus속 식물에서 발견되는 대표성분이므로, 지표성분으로 Oregonin을 설정하는 것이 바람직하다고 판단됨.

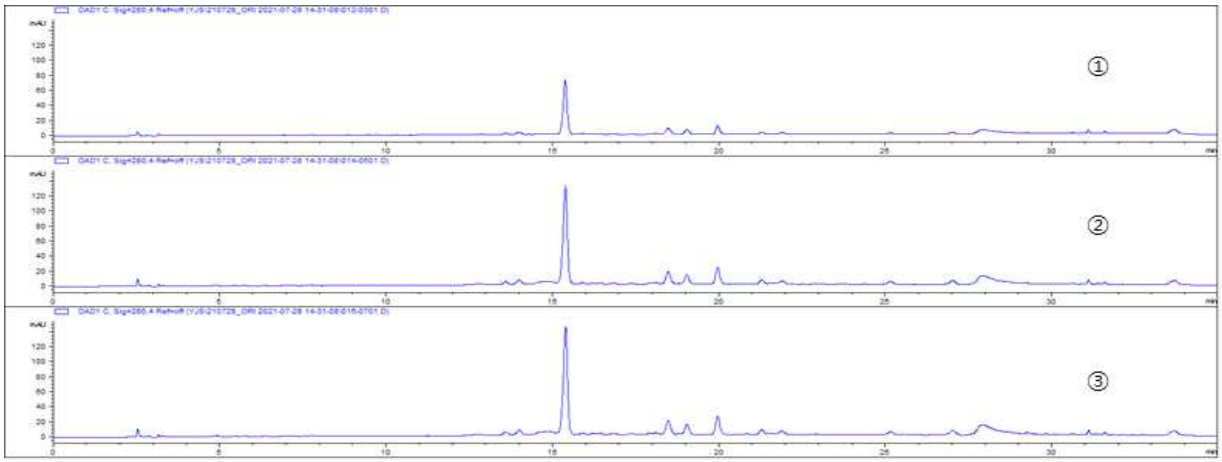
마) Scale-up 공정규격 연구 (시생산 진행 (lab) 및 단위 규격 확립)

(가) 제조공정표 (2kg 원생약 추출 진행)

제조공정	식품, 식품첨가물 조건	
원재료	오리나무(*Alnus japonica* (Thunb.) Steud. (1840))	
↓		
1차 추출 및 여과	50% 주정 (원재료 중량의 10배)	80±5℃, 7±1시간
↓		
2차 추출 및 여과	50% 주정 (원재료 중량의 10배)	80±℃, 7±1시간
↓		
농축		고형분 15% 이상 60℃/40cmhg~Full Vacuum
↓		
배합		고형분 대비 1:0.5, 1:1 부형제 첨가
↓		
분무건조		송풍 150±5℃, 배풍 85±5℃
↓		
포장	오리나무 추출 분말	

(나) 추출 시간 설정

- HPLC 결과



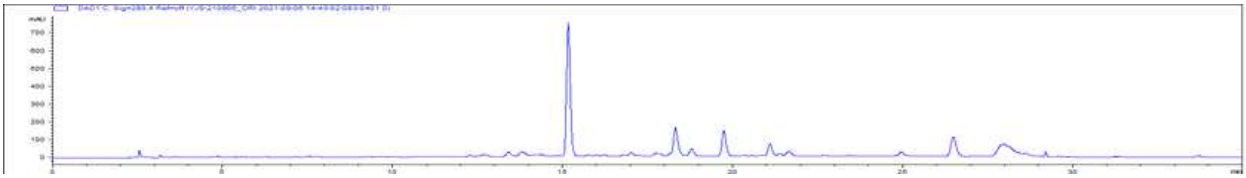
- 추출 시간별 Oregonin 면적 비교

번호	Scale up 추출 시간	Oregonin 피크 면적 (1차 추출)	Oregonin 피크 면적 (2차 추출)
①	6시간	607.3	265.0
②	7시간	1182.6	225.0
③	8시간	1302.3	226.4

(다) 부형제에 따른 분무건조물 비교

번호	추출물 brix	부형제	세부공정조건	성상사진
①	14.6 brix	덱스트린 (DE20) 분무건조	고형분:부형제=1:1	
②			고형분:부형제=1:0.5	
③		덱스트린 (DE12) 분무건조	고형분:부형제=1:1	
④			고형분:부형제=1:0.5	
⑤	19.6 brix	덱스트린 (DE20) 분무건조	고형분:부형제=1:1	
⑥			고형분:부형제=1:0.5	
⑦		덱스트린 (DE20) 동결건조	고형분:부형제=1:1	

(라) HPLC 분석결과



- 부형제 종류 및 부형제 비율에 따른 HPLC 패턴 차이 없음

(마) 최종 결과

- 추출물 brix, 분무건조 방식, 부형제 배합비에 따른 함량 비교

번호	추출물 brix	부형제	건조 방식	세부공정조건	함량	수율
①	14.6 brix	DE20	분무건조	고형분 부형제=1:1	86.42 mg/g	86.6%
②				고형분 부형제=1:0.5	114.10 mg/g	81.0%
③		DE12		고형분 부형제=1:1	83.924 mg/g	65.7%
④				고형분 부형제=1:0.5	97.69 mg/g	78.9%
⑤	19.6 brix	DE20		고형분 부형제=1:1	86.38 mg/g	84.7%
⑥				고형분 부형제=1:0.5	114.20 mg/g	77.3%
⑦			동결건조	고형분부형제=1:1(동결건조)	99.99 mg/g	98.8%

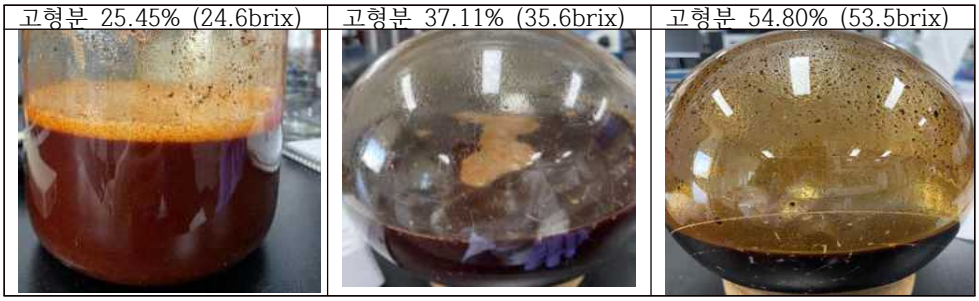
(바) 결론

- 제조공정 표준화 연구에서 설정된 규격방식이 Scale-up 연구에도 적용되는 것을 확인하였음. Lab scale에서는 추출시간을 6±1시간으로 설정 하였으나, Scale-up경우에는 Lab scale 대비 추출시간을 길게 해야 할 것으로 사료됨 (추출시간별 샘플링 후 Oregonin 면적 값으로 확인하였음). 2 kg 추출 후 농축 진행할 때, 고형분 20% 이상 제조 시 불용성 물질 많이 생성됨이 확인되었음. 따라서, Scale-up 추출시간은 7±1시간으로 설정하였음.
- 추출물 제조는 원생약 2 kg에 20L 50% 에탄올을 넣고 80℃에서 7±1시간 추출하는 조건으로 설정하였음.
- 추출분말 성상이 가장 우수한 조건은 DE20, 1:1 (고형분:부형제) 조건으로 확인됨. 파일럿 및 대량생산에도 DE20, 1:1 (고형분:부형제) 조건이 적용될 예정.
- 추출물 brix, 분무건조 방식, 부형제 배합비에 따른 함량을 비교함.
- 추출물 brix 차이에 따른 분무건조물 함량값 및 LC 패턴 차이 없음 (①,⑤/②,⑥).
- 부형제에 따른 함량값 다름 관찰됨 (①,③).
- 건조 방식에 따른 함량값 다름을 확인함 (⑤,⑦).

바) 파일럿 및 대량생산 진행

(가) 원료 규격연구 개선 내용

개선 전	- 8시간 추출시, 수율이 가장 높게 확인되었으나, 8시간 추출시부터 불용성 물질 많이 생성됨. 이에 따라 scale up 공정 연구시 추출시간을 7±1시간로 설정하였음. - 추출물 농축 시 불용성 물질 발생으로 고형분 20% 이상 농축하기 어려움이 확인 됨
개선 방법	덱스트린 혼합 시 불용성 물질 감소하는 경향이 관찰됨. 1) 1차 추출 후 농축 시 원재료의 10%에 해당 하는 양의 덱스트린을 혼합함. 2) 이후 1차 농축액과 2차 추출물 혼합한 뒤 농축 진행함.
개선 후	- 덱스트린을 혼합하여 농축 할 경우, 불용성 물질이 감소함을 확인함. - 농축 공정 중 필터 과정에서 걸러지는 불용성 물질 감소함에 따라 1.57%로 수율이 증가함. - 고형분 35%이상 농축 가능함을 확인함.

	- 추출시간 8시간 가능함을 확인함. - 고형분 30±5%로 규격 설정 및 8시간을 추출 시간으로 설정을 완료함.
참고 사진	고형분 25.45% (24.6brix) / 고형분 37.11% (35.6brix) / 고형분 54.80% (53.5brix)  <추출물의 고형분 범위에 따른 성상 사진>

- 샘플별 추출 조건

샘플	추출 조건	조건
①	분쇄 X, 추출포X	2 kg, 기존 Lab scale 공정법
②	분쇄 X, 추출포X	2 kg, 1차 추출물에 덱스트린 혼합 뒤 농축 진행

- 추출 조건 별 파라미터 비교

실험단계	①	②
원재료	오리나무(*Alnus japonica* Steud)	
↓		
1차 추출 및 여과	고형분, 지표성분 함량 1.33%, 2.78 mg/g	고형분, 지표성분 함량 1.37%, 2.83 mg/g
↓		
2차 추출 및 여과	고형분, 지표성분 함량 0.36%, 0.64mg/g	고형분, 지표성분 함량 0.31%, 0.45mg/g
↓		
추출물	수율: 12.93%	수율: 14.50%

- 분쇄 없이, 추출포 사용하지 않고 ①, ②번 공정 진행함.
- ①, ②번 샘플은 농축공정만 상이함.
- 1차 추출물 농축 시 덱스트린 혼합한 ②번 공정으로 진행 할 경우 불용성 물질 감소함.
- 농축 후 필터 진행 시 손실되는 불용성 물질 감소로 추출물 수율이 1.57% 증가하는 것을 확인함.
- 원료 표준화 개선 내용을 적용하여 대량생산을 진행함.

(나) 대량생산 공정 규격 설정

- 제조공정도

: 아래와 같은 제조 공정도를 확립한 뒤 GMP 시설을 이용하여 대량생산 원료를 생산하였으며, 공인시험기관인 (사)한국건강기능식품협회로부터 대량생산 원료에 대한 시험성적서를 확보하였음.

제조공정	식품, 식품첨가물	조건	고형분 (%)	지표성분 함량 (mg/g)	수율 (kg)
원재료	오리나무 수피	100 kg			100.0
↓					
1) 1차 추출	50% 주정 (원재료 중량의 10배)	80±5℃, 8시간	1.38±0.20%	**2.49**	

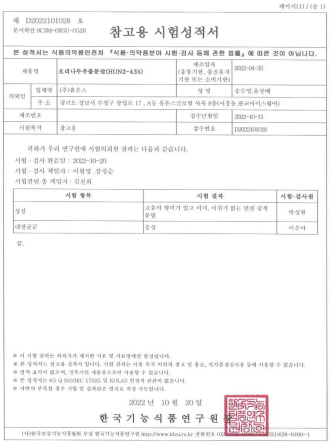
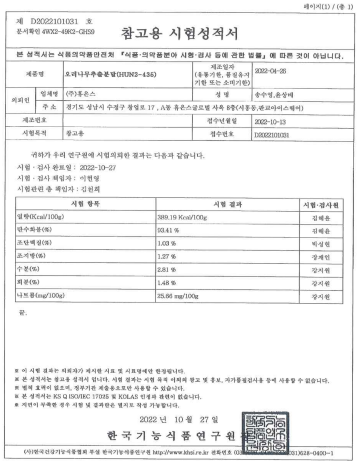
2) 여과		5 ㎛ catridge filter			
3) 2차 추출	50% 주정 (원재료 중량의 10배)	80±5℃, 8시간	0.2±0.20%	**0.42**	
4) 여과		5 ㎛ catridge filter			
*5) 농축		고형분 20±5% 25±2 Brix	25% 25 Brix	**29.51**	73.75
6) 여과		80 mesh			
**7) 배합		고형분 무게 대비 1:1 덱스트린 첨가	30~35 Brix		
살균					
8) 분무건조		송풍 180±5℃, 배풍 95±5℃			
9) 여과		60 mesh			
10) 포장				**85.28**	20.00

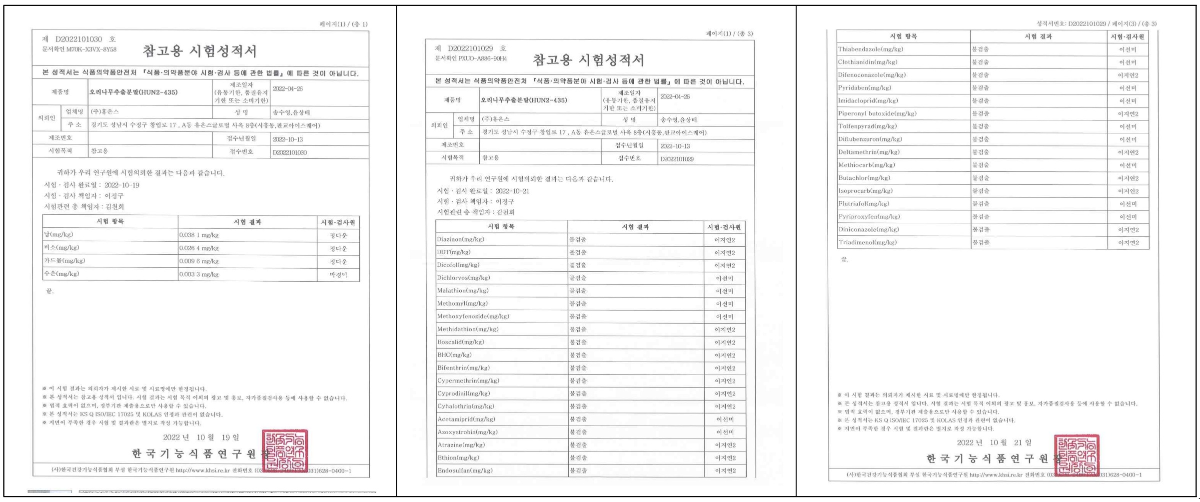
<오리나무추출분말 제조공정도>

* 1차추출물에 원생약 무게의 10% (w/w)에 해당되는 덱스트린 혼합 뒤 농축함.

** 농축 및 여과 단계에서 투입했던 덱스트린 이외의 덱스트린 투입함.
(고형분 무게 대비 최종 1:1 덱스트린 첨가)

- 공인시험 성적서

성상 및 대장균	영양성분
	
중금속	잔류농약



페이지(1) / (총 1)

제 D2022101030 호
문서확인 M70K-X3VX-8Y58

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 『식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률』에 따른 것이 아닙니다.

제품명	오리나무추출분말(HUN2-435)	제조일자 (유통기한, 품질유지기한 또는 소비기한)	2022-04-26
의뢰인 업체명	(주)휴온스	성 명	송수영,윤상배
의뢰인 주 소	경기도 성남시 수정구 창업로 17 , A동 휴온스글로벌 사옥 8층(시흥동,판교아이스퀘어)		
제조번호		접수년월일	2022-10-13
시험목적	참고용	접수번호	D2022101030

귀하가 우리 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험 · 검사 완료일 : 2022-10-19
시험 · 검사 책임자 : 이정구
시험관련 총 책임자 : 김천희

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.038 1 mg/kg	정다운
비소(mg/kg)	0.026 4 mg/kg	정다운
카드뮴(mg/kg)	0.009 6 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	0.003 3 mg/kg	박경덕

끝.

※ 이 시험 결과는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에만 한정됩니다.
※ 본 성적서는 참고용 성적서 입니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 광고 및 홍보, 자가품질검사용 등에 사용할 수 없습니다.
※ 법적 효력이 없으며, 정부기관 제출용으로만 사용할 수 있습니다.
※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2022 년 10 월 19 일
한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr

페이지(1) / (총 3)

제 D2022101029 호
문서확인 PXUO-A886-90H4

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 『식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률』에 따른 것이 아닙니다.

제품명	오리나무추출분말(HUN2-435)	제조일자 (유통기한, 품질유지기한 또는 소비기한)	2022-04-26
의뢰인 업체명	(주)휴온스	성 명	송수영,윤상배
의뢰인 주 소	경기도 성남시 수정구 창업로 17 , A동 휴온스글로벌 사옥 8층(시흥동,판교아이스퀘어)		
제조번호		접수년월일	2022-10-13
시험목적	참고용	접수번호	D2022101029

귀하가 우리 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험 · 검사 완료일 : 2022-10-21
시험 · 검사 책임자 : 이정구
시험관련 총 책임자 : 김천희

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
Diazinon(mg/kg)	불검출	이지연2
DDT(mg/kg)	불검출	이지연2
Dicofol(mg/kg)	불검출	이지연2
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	이선미
Malathion(mg/kg)	불검출	이선미
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	이지연2
Boscalid(mg/kg)	불검출	이지연2
BHC(mg/kg)	불검출	이지연2
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	이지연2
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	이지연2
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	이지연2
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	이지연2
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출	이지연2
Ethion(mg/kg)	불검출	이지연2
Endosulfan(mg/kg)	불검출	이지연2

성적서번호: D2022101029 / 페이지(3) / (총 3)

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
Thiabendazole(mg/kg)	불검출	이선미
Clothianidin(mg/kg)	불검출	이선미
Difenoconazole(mg/kg)	불검출	이지연2
Pyridaben(mg/kg)	불검출	이선미
Imidacloprid(mg/kg)	불검출	이선미
Piperonyl butoxide(mg/kg)	불검출	이지연2
Tolfenpyrad(mg/kg)	불검출	이선미
Diflubenzuron(mg/kg)	불검출	이선미
Deltamethrin(mg/kg)	불검출	이지연2
Methiocarb(mg/kg)	불검출	이선미
Butachlor(mg/kg)	불검출	이지연2
Isoprocarb(mg/kg)	불검출	이지연2
Flutriafol(mg/kg)	불검출	이선미
Pyriproxyfen(mg/kg)	불검출	이선미
Diniconazole(mg/kg)	불검출	이지연2
Triadimenol(mg/kg)	불검출	이지연2

끝.

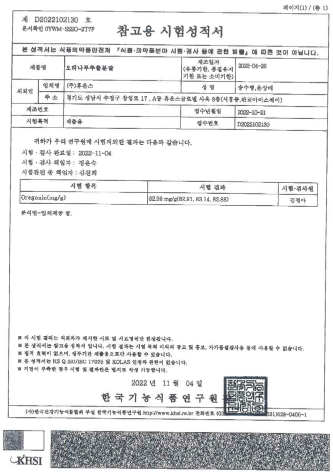
※ 이 시험 결과는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에만 한정됩니다.
※ 본 성적서는 참고용 성적서 입니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 광고 및 홍보, 자가품질검사용 등에 사용할 수 없습니다.
※ 법적 효력이 없으며, 정부기관 제출용으로만 사용할 수 있습니다.
※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2022 년 10 월 21 일
한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr

- 오리나무 추출분말의 중금속 실험을 진행한 결과, 납 최대 0.0381 mg/kg, 카드뮴 최대 0.0096 mg/kg, 총비소 최대 0.0264 mg/kg, 총 수은은 0.0033 mg/kg으로 검출되었으나 기준치에는 미달임. 또한 대장균군은 실험결과 원료에서 음성임이 확인되었고, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 따라 대장균군의 규격을 음성으로 설정하였음.

(다) 제조 원료에 대한 함량 분석 결과



페이지(1) / (총 1)

제 D2022102130 호
문서확인 0YWM-SSSO-2T7F

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 『식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률』에 따른 것이 아닙니다.

제품명	오리나무추출분말	제조일자 (유통기한, 품질유지기한 또는 소비기한)	2022-04-26
의뢰인 업체명	(주)휴온스	성 명	송수영,윤상배
의뢰인 주 소	경기도 성남시 수정구 창업로 17 , A동 휴온스글로벌 사옥 8층(시흥동,판교아이스퀘어)		
제조번호		접수년월일	2022-10-21
시험목적	제출용	접수번호	D2022102130

귀하가 우리 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험 · 검사 완료일 : 2022-11-04
시험 · 검사 책임자 : 정은숙
시험관련 총 책임자 : 김천희

시험 항목	시험 결과	시험·검사원
Oregonin(mg/g)	82.98 mg/g(82.91, 83.14, 82.88)	김경아

분석법-업체제공 끝.

※ 이 시험 결과는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에만 한정됩니다.
※ 본 성적서는 참고용 성적서 입니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 광고 및 홍보, 자가품질검사용 등에 사용할 수 없습니다.
※ 법적 효력이 없으며, 정부기관 제출용으로만 사용할 수 있습니다.
※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2022 년 11 월 04 일
한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr

KHSI

- 공인시험기관인 한국기능식품연구원에 의뢰하여 원료에 대한 지표성분 시험성적서를 확보 하였음.
- 3반복 분석 결과 지표성분 함량은 82.98 mg/g 으로 확인함.

(라) 기준 규격 설정

본 연구 결과 오리나무 추출분말의 기준 규격은 다음과 같음

시험항목		실측값	제안규격
성상		고유의 향미가 있고 이미, 이취가 없는 연한갈색 분말	고유의 향미가 있고 이미, 이취가 없는 연한갈색 분말
Oregonin 함량		82.98 mg/g	83.0 mg/g 의 80～120 %
중금속	납	0.0381 mg/kg	1.0 mg/kg 이하
	카드뮴	0.0096 mg/kg	1.0 mg/kg 이하
	총비소	0.0264 mg/kg	1.0 mg/kg 이하
	총수은	0.0033 mg/kg	1.0 mg/kg 이하
미생물	대장균	음성	음성

사) 오리나무추출분말 시험법 밸리데이션

(가) 요약

: 오리나무추출분말 중 Oregonin을 정해진 방법으로 처리하여 분리, 정량하는 분석법의 유효성을

검토함. 분석법의 유효성을 검토하기 위해서 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision) 항목 검토를 진행함.

항목		평가방법	설정값
특이성 (Specificity)		○ HPLC 분석 시 머무름 시간(Retention time)과 λ_{max} 및 Peak의 간섭현상 유무 확인으로 검토	○ 약 16 분대에 peak 검출 ○ λ_{max}: 280 nm (reference wavelength: off) ○ Peak 간섭현상 발생 없음
직선성 (Linearity)	표준 용액	○ 표준용액 6개 농도로 3반복 ○ 직선성 확인, $R^2 \geq 0.990$	○ 표준용액 400 ug/mL을 기준으로 25 ~ 800%, R^2 평균값 $\geq$ 0.999
	시료	○ 시료 5개 농도로 3반복 ○ 직선성 확인, $R^2 \geq 0.990$	○ 시험용액 10 mg/mL을 기준으로 25 ~ 400%, R^2 평균값 $\geq$ 0.999
정확성 (Accuracy)		○ 표준용액 3개 농도로 3반복, 회수율 검토 ○ 회수율 범위가 90~108% 이내에 들어와야 함	○ 추가 표준용액 농도 25~75 ug/mL 범위 회수율(%): 98.15~101.05%
정밀성 (Precision)		○ 반복성의 경우 3개 이상의 함량에 대해 5회 이상 반복 측정하고, 측정값들 사이의 근접한 정도 확인	○ 분석 결과 - 함량평균: 83.508 mg/g - SD: 0.198 mg/g - %RSD: 0.11~0.38%

(나) 표준 및 시험용액 제조 방법

- 표준용액제조
  - Oregonin 표준품 약 50 mg을 25 mL 정용플라스크에 정밀히 달아 80% MeOH 을 일정량 넣고 10분간 초음파 추출을 한 뒤, PVDF syringe filter (0.45 um)로 여과한 것을 표준용액으로 사용함.
  - 방냉 후 80% MeOH로 정용하여 stock solution으로 하고 적절히 희석하여 표준용액으로 사용함.
- 시험용액제조
  - 시료 2 g을 200 mL 정용플라스크에 정밀히 달아 80% MeOH 를 넣고 50℃에서 60분 동안 초음파 추출함.
  - 방냉하여 80% MeOH 로 정용한 뒤 PVDF syringe filter (0.45 um)로 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용함.

(다) HPLC 분석 조건

Instrument	Agilent 1260 Infinity
Detector	UV detector (DAD)
Wavelength	λ_{max} 280 nm (reference off)
Column	Agilent Eclipse Plus C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 um) 혹은 이와 동등한 것
Mobile phase	A: 0.1% Trifluoroacetic acid water B: Acetonitrile

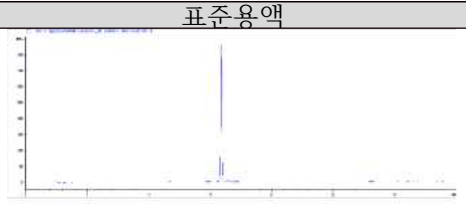
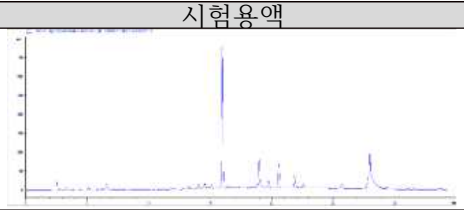
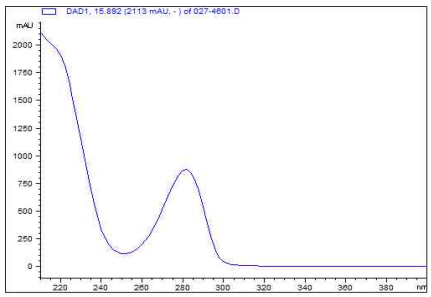
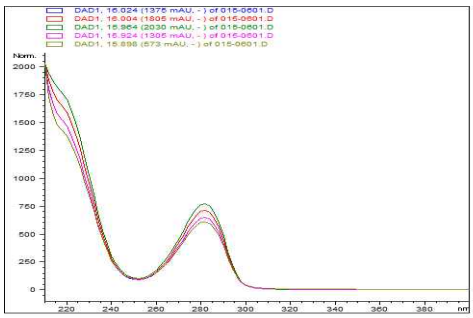
Time (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
12	78	22
24	70	30
28	0	100
30	0	100
32	90	10
35	90	10

Post time: 3 min

Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	10 ㎕
Oven temperature	30℃

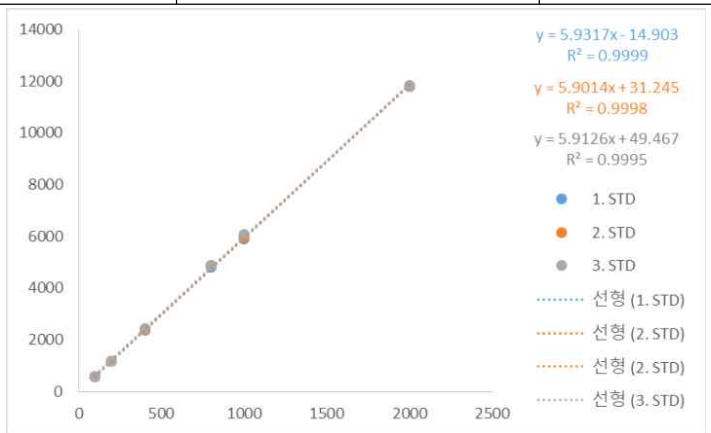
(라) 시험 결과

- 특이성(Specificity)
  - 표준용액과 시험용액의 크로마토그램을 통해 간섭물질에 대한 영향이 없음을 확인함.
  - 표준용액과 시험용액에서 해당 성분에 대한 머무름 시간(약 16분대) 및 스펙트럼의 패턴이 일치함.

	표준용액	시험용액
크로마토그램		
스펙트럼		

< 표준용액과 시험용액의 UV 스펙트럼>

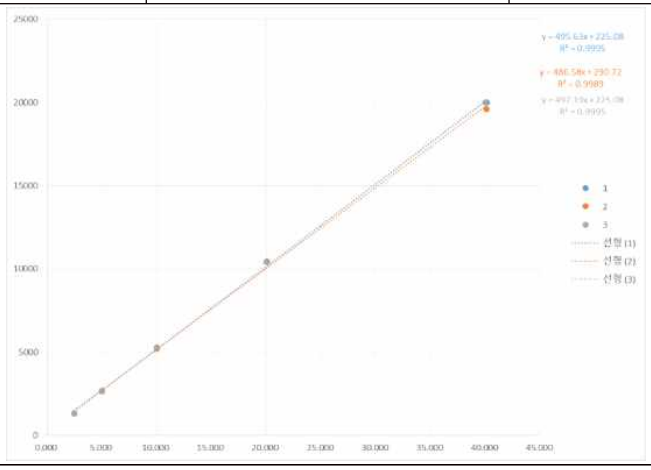
- 표준용액의 직선성 (Linearity)
  - Oregonin 농도를 5개 이상으로 하여 3반복 분석한 결과, 범위는 정확도와 정밀도를 확인할 수 있는 범위이고, 결정계수(R^2)는 0.99이상으로 확인함.

반복수	1		2		3	
	실농도(ug/mL)	면적(Area)	실농도(ug/mL)	면적(Area)	실농도(ug/mL)	면적(Area)
1	104.563	560.6	102.058	579.9	101.162	573.7
2	209.125	1153.0	204.115	1166.8	202.324	1156.8
3	418.251	2350.9	408.531	2394.9	404.648	2437.1
4	836.502	4811.1	816.461	4860.9	809.295	4885.0
5	1045.63	5897.9	1020.58	5956.8	1011.619	6062.2
6	2091.25	11829.9	2041.15	11784.5	2023.238	11788.9
기울기	5.9317		5.9014		5.9126	
y절편	-14.903		31.245		49.467	
R^2	1		1.		1	
검량선						

<Oregonin 표준용액을 이용한 검량선 작성>

- 시료의 직선성 (Linearity)

- 시료의 농도를 5개 이상으로 하여 3반복 분석한 결과, 범위는 정확도와 정밀도를 확인 할 수 있는 범위이고, 결정계수(R^2)는 0.99이상으로 확인함.

반복수	1		2		3	
	실농도(mg/mL)	면적(Area)	실농도(mg/mL)	면적(Area)	실농도(mg/mL)	면적(Area)
1	2.509	1322.2	2.505	1307.9	2.501	1322.2
2	5.018	2659.9	5.011	2663.6	5.002	2659.9
3	10.035	5281.2	10.021	5225.5	10.003	5281.2
4	20.070	10414.0	20.042	10447.3	20.007	10140.0
5	40.140	19993.9	40.084	19598.9	40.014	19993.9
기울기	495.63		486.58		497.19	
y절편	225.08		290.72		225.08	
R^2	1		0.999		1	
검량선						

<시료중 Oregonin 검량선 작성>

- 정확성-회수율 (Accuracy)
  - 회수율을 구한 결과, 전체 평균 회수율은 99.785%로 확인함.
  - 오리나무추출분말 2 g에 첨가한 Oregonin는 4876.48~14991.40 ug이므로, 기준에 따른 범위는 ≥ 0.1%(1 mg/g)이며 회수율은 90~108%이내여야 함.
  - 분석 결과, 회수율 구간은 98.150~101.045%인 것으로 확인되어 기준에 적합함을 확인함.

	함량(μg)		
	4876.48	10042.80	14991.40
1	100.668	97.338	100.421
2	100.228	98.552	101.890
3	99.587	98.559	100.825
함량별 평균회수율(%)	100.161	98.150	101.045
전체 평균회수율(%)	99.785		
회수율 구간(%)	98.150~101.045		

< 오리나무추출분말의 Oregonin 함량분석의 정확성>

- 정밀도 (Precision)
  - 재현성 확인 실험을 진행하고자, 단일 실험실에서 시험일 간, 시험자 간, 시험장비 간 비교를 통해 값을 확보함.
  - 분석 결과, RSD (%)측정값이 0.25% 로 확인되어 기준에 적합함을 확인함.

	다른 시험일	
	2022.08.18	2022.08.31
1	83.610	83.428
2	84.017	83.159
3	84.031	83.495

4	83.721	83.448
5	83.475	86.428
분석값 (mg/g)	83.771	83.294
RSD (%) [검체 측정값에 대한 RSD]	0.29	0.23

<재현성: 다른시험일>

	다른 시험자	
	시험자 A	시험자 B
1	83.428	83.566
2	83.159	83.560
3	83.495	83.407
4	83.448	83.461
5	86.428	83.347
분석값 (mg/g)	83.294	83.511
RSD (%) [검체 측정값에 대한 RSD]	0.23	0.11

<재현성: 다른 시험자>

	다른 시험장비	
	Agilent 1260	Agilent 1260 II
1	83.610	83.239
2	84.017	83.115
3	84.031	83.894
4	83.721	83.384
5	83.475	83.638
분석값 (mg/g)	83.771	83.454
RSD (%) [검체 측정값에 대한 RSD]	0.29	0.38

<재현성: 다른 시험장비>

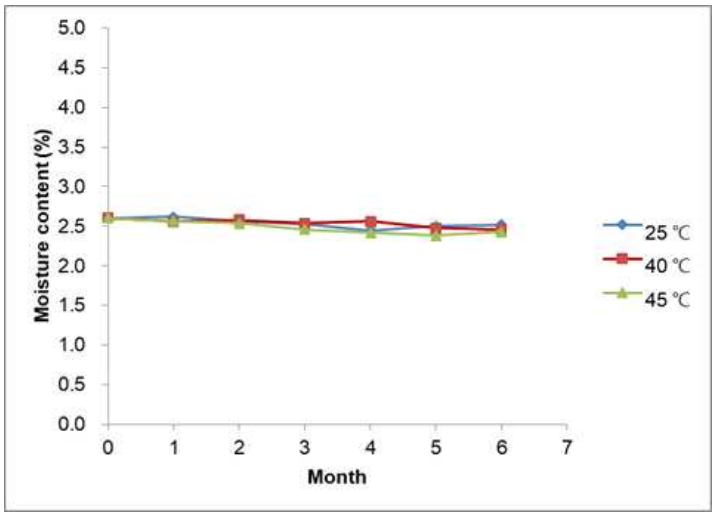
(마) 결론

- 오리나무추출분말의 지표성분으로 설정된 Oregoin의 특이성 시험결과, 표준용액과 시험용액의 Oregonin 스펙트럼이 일치하며 검출시간도 16분대에 동일하게 검출 되었음. 표준용액의 농도별 스펙트럼과 시험용액 중 Oregonin 피크내의 스펙트럼이 일치함.
- 표준용액은 100~2000 ug/mL 범위에서 R^2=0.999이상, 시료는 목적농도 25~800% 범위 내에서 $R^2 \geq$ 0.990 로 확인되어 직선성을 확인함.
- 시험용액에 표준물질(25, 50, 75 ug/mL)을 첨가하여 회수율을 검토한 결과, 전체 회수율 평균은 99.784%, 회수율 구간은 98.150~101.045%으로 정확성을 확인함.
- 단일 실험실에서 시험일 간, 시험자 간, 시험 장비간 재현성 실험을 통해 83.294~83.771 mg/g 분석값 범위에서 RSD 0.25%로 평가기준인 RSD 4.0%이하에 적합하여 정밀성을 확인함.
- 본 시험법으로 오리나무추출분말 중 Oregonin의 특이성, 직선성, 정확성, 정밀도를 검토한 결과, 오리나무추출분말 중 Oregonin를 분석하기에 적합한 시험법으로 확인함.

아) 안정성 연구

(가) 수분함량 결과

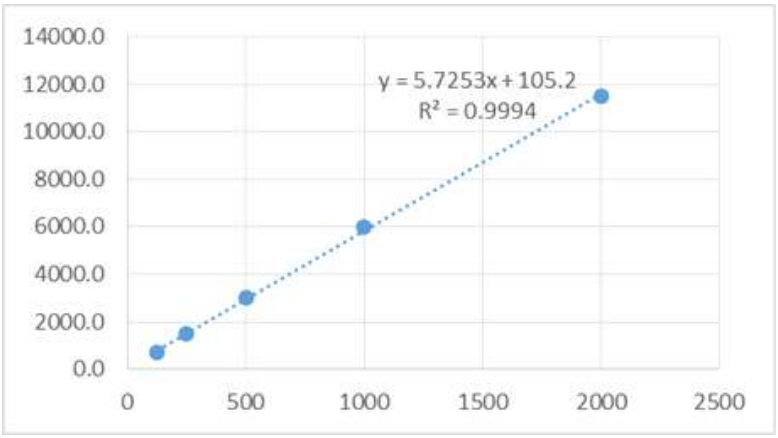
- 수분



- 6개월까지 가속시험 결과, 수분함량 5% 내외로 저장기간 중 수분에 의한 품질 변화는 없을 것으로 확인됨.

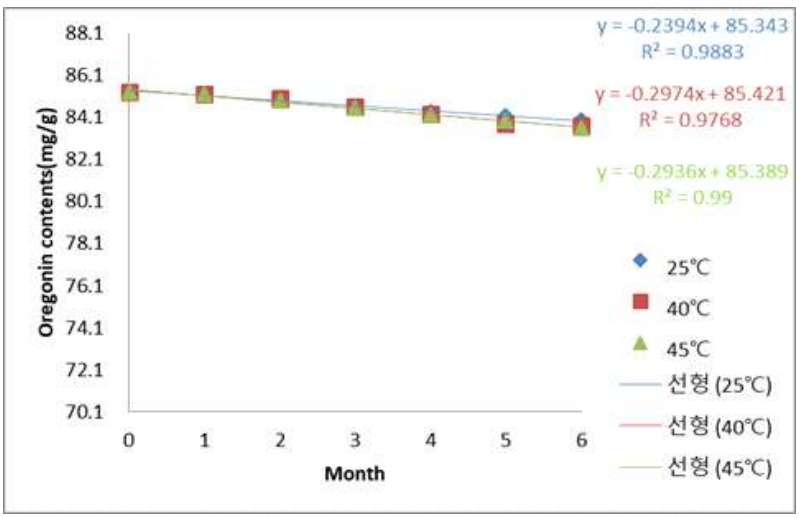
(나) 지표성분(Oregonin)에 따른 유통기한 산출

- 표준곡선
  - 매 실험별 표준곡선을 작성하여 사용함.

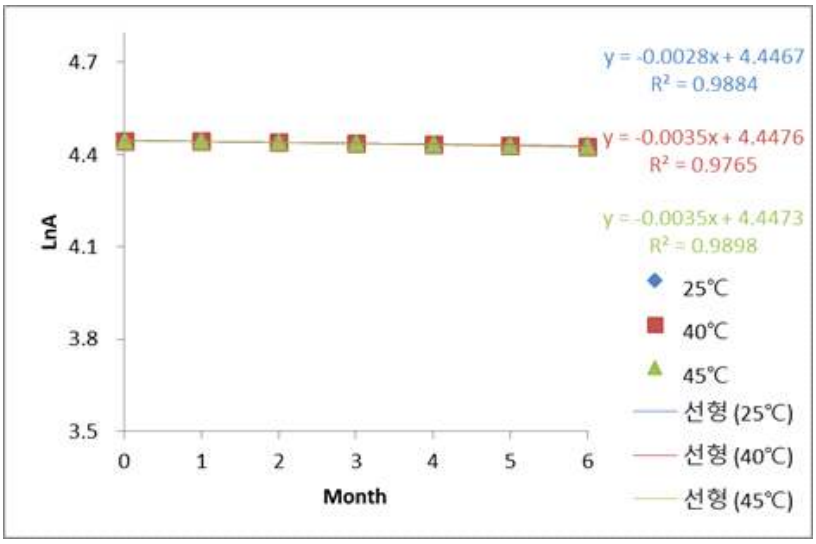


- 시험용액의 분석

① Oregonin 함량(mg/g) 변화



② Oregonin 함량 변화의 지수 값



- 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출

반응차	온도(℃)	회귀방정식	결정계수
0차[1)]	25	Y = -0.2394X + 85.343	0.9883
	40	Y = -0.2974X + 85.421	0.9763
	45	Y = -0.2936X + 85.389	**0.9900**
1차[2)]	25	Y = -0.0028X + 4.4467	0.9884
	40	Y = -0.0035X + 4.4476	0.9765
	45	Y = -0.0035X + 4.4473	0.9898

<저장온도별 품질지표 반응속도 상수>

[1)]Y=KX+B(X:저장기간, Y:저장기간중 X중의 시험항목의 결과값, K:반응속도상수)
[2)]Y=KX+B(X:저장기간, Y: LnA, B: LnA_0,K:반응속도상수)

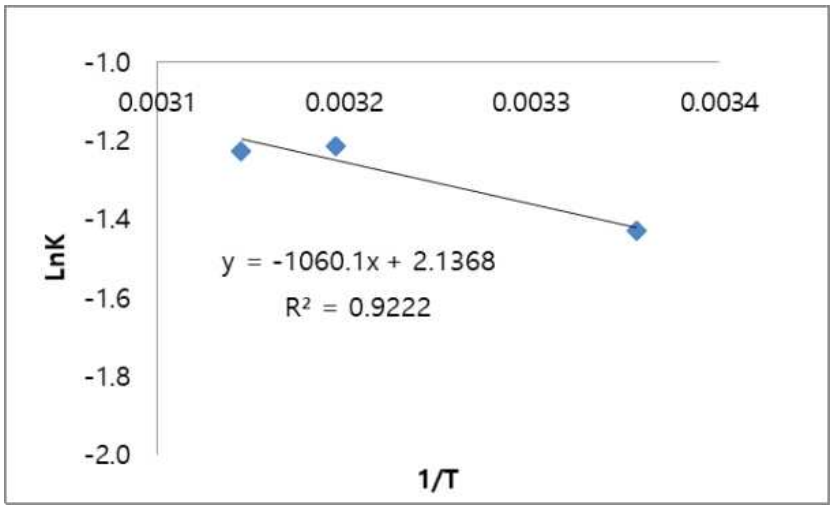
- 0차 및 1차 반응식의 결정계수 분석 결과, 결정계수가 높은 0차 반응식을 따르는 것으로 나타났으며, 0차 반응식의 반응속도상수인 $K_{25℃}$=0.2394,$K_{40℃}$=0.2974,$K_{45℃}$=0.2936을 이용하여 품질지표별 활성화에너지를 산출함.

- 온도에 따른 품질지표의 활성화에너지(Ea) 산출

온도(℃)	온도(T)	1/T	K	LnK
25	298	0.003356	0.2394	-1.4296
40	313	0.003195	0.2974	-1.2127
45	318	0.003145	0.2936	-1.2255

<활성화에너지 산출(0차 반응식)>

① 활성화 에너지 산출 그래프



LnK = -(Ea/R)(1/T)+LnA = -1060.1X+2.1368
(R^2=0.9222)
-Ea/R = -1060.1 → Ea/1.987(기체상수) = 1060.1
Ea = 2,106.42 kcal/mol

- 유통기간 산출
  실험하지 않은 구간의 반응속도상수(K), 연간변화 반응속도 상수(K′)으로부터 유통기간을 산출함.

온도(℃)	T	1/T=X	LnK	K	유통개월수	K'
10	283	0.003534	-1.609136	0.200060	5	1.000302
15	288	0.003472	-1.544103	0.213503	1	0.213503
20	293	0.003413	-1.481289	0.227345	2	0.454689
25	298	0.003356	-1.420583	0.241573	2	0.483146
30	303	0.003300	-1.361880	0.256179	2	0.512357
누계					12	2.663998

<0차 반응식을 이용한 반응속도상수 산출>

LnK = -1060.1X+2.1368
$K=e^{LnK}$

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	K'	유통기간
85.281	68.225	17.056	2.664	61.46개월 (1869.52일)

<0차 반응식을 이용한 유통기간 산출>

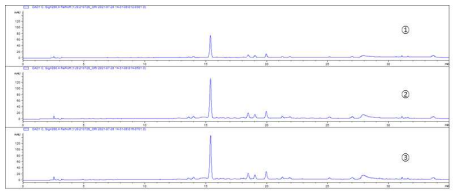
유통기간 = (A-B)/K′ ×12달 = (A-B)/K′ ×365일

(다) 결론

최소인 76.83 개월에 안전계수 0.8을 곱하고 자체 유통기한 관리방안 및 수용도에 따라 최종 24개월로 오리나무추출분말의 유통기한을 설정하였음.

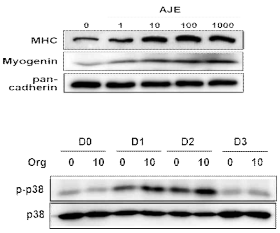
(3) 연구개발 수행 내용 요점 정리

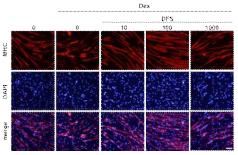
가) 원료대량 생산 및 표준화 연구

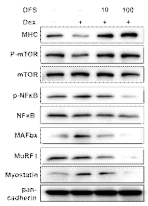


- 원료대량생산 공정 표준화
- 기준시험법 설정
- 분석법 validation
- 원료 안정성 평가
- 소재연구 활용 가능

나) 원재료의 *in vitro* 효능

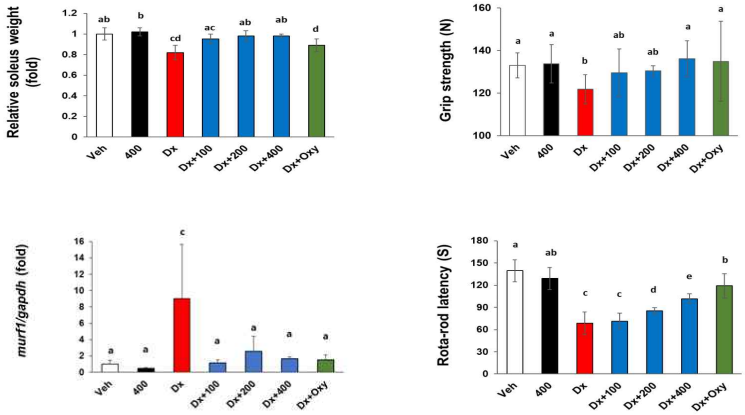






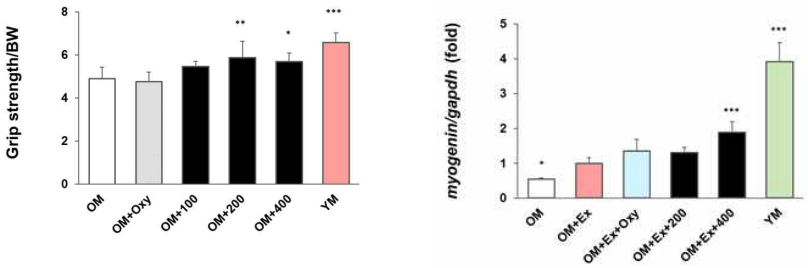
- 근원세포 분화 촉진효능
- 손상된 근관세포 보호효능
- 근육분해 인자 발현 억제
- 근육합성 인자 발현 촉진
- 특허 및 논문 발표 (Planta Medica)

다) 원재료의 덱사메타손 동물 모델에서의 효능



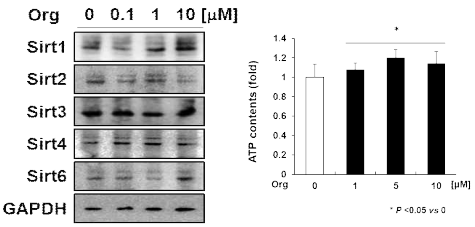
- 근육무게 개선
- 근육분해 인자 발현 억제
- 악력테스트 개선 효능
- Rota rod테스트 개선 효능 논문발표 (J. Func. Foods)

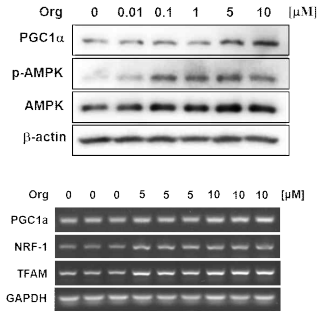
라) 원재료의 노화 동물 모델에서의 효능 (자연 노화, 자연 노화+운동 모델)



- 악력테스트 개선 효능 (자연노화)
- 근육합성 인자 발현 촉진 (자연노화+운동)

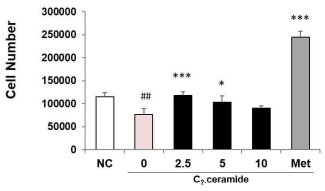
마) 오레고닌에 의한 미토콘드리아 생합성 효능

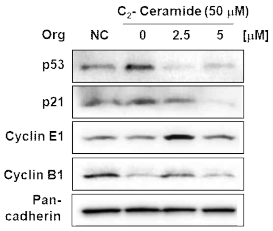


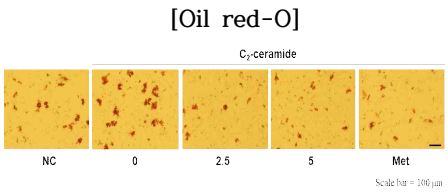


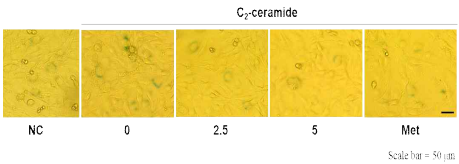
- SIRT-1, 6 발현증가
- PGC1a 발현증가 및 하위 유전자 발현증가 (NRF-1, TFAM)
- AMPK 활성화
- ATP 생성 증가

바) 오레고닌에 의한 노화 억제 효능









- C_2-세라마이드 유도 노화 억제 효능
- 생존 세포수 개선
- 세포주기 정지 억제
- 지질 축적 및 β-galactosidase 활성억제

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

1단계 1차년도														
번호	구분 / 개발내용	연구개발기간												진도율 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	원재료 표준화 연구				■	■	■	■	■	■	■	■	■	100
2	제조공정 표준화 연구						■	■	■	■	■	■	■	100
3	지표(유효)성분 분석법 연구							■	■	■	■	■	■	100
4	Scale-up 공정 규격 연구										■	■	■	100
5	추출물들의 효능 평가			■	■	■								100
6	근원세포 분화 촉진 효능 분석 (*in vitro*)			■	■	■	■	■	■	■				100
7	근위축 모델에서 효능 평가 (*in vivo*)					■	■	■	■	■	■	■	■	100
1단계 2차년도														
번호	연구내용	연구개발기간												진도율 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	파일럿 및 대량생산 진행	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			100
2	기준 및 시험법설정 및 분석법 validation	■	■	■	■	■								100
3	안정성 연구				■	■	■	■	■	■	■	■	■	100
4	인체적용시험 진입							■	■	■	■	■	■	50
5	근위축 억제 기전 연구	■	■	■	■									100
6	노화 모델에서 효능 평가 (*in vivo*)			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	100
	총 진도율													92
2단계 1차년도														
번호	연구내용	연구개발기간												진도율 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	미토콘드리아 생합성 증가 (*in vitro*) 및 근 개선 평가 지표 제안	■	■	■	■	■	■							100
2	근육 세포에서의 항노화 효능	■	■	■	■	■	■							100

	(*in vitro*)													
3	트레이닝시킨 노화 마우스에서 효능 평가 (*in vivo*)													100
	총 진도율													100

가) 주관 기관 (숙명여자대학교)

(가) 추출물들의 효능 평가

- 산지, 부위별 추출물의 선정
- 추출 조건별 추출물의 근원세포 분화 효능 평가
- 가장 효능이 우수한 조건의 추출 용매 조건 확립

(나) 근원세포 분화 촉진 효능 분석(*in vitro*)

- 추출물과 그로부터 분리된 리그난과 오레고닌의 근원세포 분화 촉진 효능 확인함.
- 분화 관련 인자들(MHC, Myogenin)의 발현 증가 확인함.
- 효능 물질들의 작용 기전으로 p38 MAPK 활성화를 확인함.

(다) 근관 세포 손상 모델에서 추출물과 그로부터 분리된 리그난과 오레고닌에 의한 근섬유 손실 억제 효능과 기전 평가 (*in vitro*)

- 근육 단백질 분해 효소 (MAFbx, MuRF1)의 발현 감소 확인함.
- 덱사메타손로 인한 근섬유 손실로 비활성화된 근육 단백질 합성 기전 (mTOR) 및 활성화된 분해 기전 (NF-κB, FOXO3a, MuRF1, MAFbx, Myostatin) 인자들에 대한 추출물과 효능 물질들에 의한 발현 변화 검증함.

(라) 근관 세포의 미토콘드리아 활성 평가 (*in vitro*)

- 오레고닌에 의한 근관세포 미토콘드리아 생합성 증가를 확인하기 위해, 분화된 근관세포에 오레고닌을 처리하여 AMPK, SIRT와 PGC1α의 단백질 발현과 하위 유전자들의 발현을 분석함.
- 분화된 근관세포에서 오레고닌에 의한 AMPK 및 SIRT 1, 6 타입과 PGC1α의 단백질 발현이 증가됨을 확인함.
- 오레고닌에 의해 미토콘드리아의 NRF-1, TFAM, PGC1α 유전자 발현이 증가함.
- 오레고닌에 의한 미토콘드리아 생합성 증가의 결과로 근육의 에너지원인 ATP 생산이 높아짐을 측정함.
- 오레고닌에 의해 AMPK, SIRT, PGC1α 단백질과 NRF-1, TFAM, PGC1α의 mRNA 발현 증가를 통해 근육 세포의 미토콘드리아 생합성을 증가시켜 근육 기능을 향상시킬 수 있음을 확인함.

(마) 근육 세포에서의 항노화 효능 평가 (*in vitro*)

- C_2-세라마이드 처리에 의한 노화 세포 모델에서 일어나는 세포 주기 정지와 이와 관련된 단백질 발현이 오레고닌에 의해 회복됨을 확인함.
- 노화된 근육 세포에서 나타나는 인지질 축적, 노화성 β-galactosidase가 발현 증가가 오레고닌에 의해 저해됨.
- 오레고닌의 근육 세포 노화 억제 효능을 규명함 (*in vitro*)

(바) 노인성 근육 감소 동물 모델에서 효능 검증

- **덱사메타손**으로 유도된 근소실 동물 모델
  - 휴온스에서 대량 생산한 오리나무 추출 분말 (고형분 무게 대비 1:1 덱스트린 첨가)을 시험용 추출물로 사용함.
  - 시험용 추출물을 100, 200, 400 mg/kg로 4 주간 경구 투여한 마우스에, 덱사메타손 (1 mg/kg)을 10일간 피하주사하여 근소실 동물 모델을 구축함.
  - 악력 테스트, Rota-rod테스트를 이용한 운동 능력 평가 (Behavioral pharmacology) 결과, 덱사메타손에 의해 저하된 운동 능력이 추출물에 (유효 농도, 200, 400 mg/kg) 의해 개선됨.
  - 덱사메타손에 의해 감소한 장딴지, 가자미근 중량이 추출물에(유효 농도, 가자미근; 200, 400 mg/kg, 장딴지근; 400 mg/kg) 의해 증가함 (근육량 증가 효능 확인).
  - 덱사메타손에 의해 유도된 근육 피로 마커인 크레아티닌 (creatinine)의 혈중 농도가 추출물에 (유

효 농도, 100, 200, 400 mg/kg) 의해 감소됨.
- 근육 에너지원 물질인 젖산 (lactate) 농도가 추출물에 (유효 농도, 100, 200, 400 mg/kg) 의해 증가함.
- 적출된 동물의 가자미근과 장딴지 근육에서, 덱사메타손에 의해 증가된 근단백질 분해 관련 바이오마커들 (*murf1, mafbx, myostatin, foxo3a)*의 mRNA 발현이 시험용 추출물에 의해 감소함 (근단백질 분해 억제 작용 기전을 밝힘).
- **덱사메타손 유래 근손실 모델에서 시험용 추출물이 운동성을 개선시키고, 근육량과 근육 대사를 증가시키며, 이는 근백질 분해 기전 억제를 통한 효과임을 입증함.**

• **자연 노화**로 인한 근소실 동물 모델
- 자연 노화로 인한 근소실 동물 모델에서 추출물의 근소실 억제 효능을 평가하기 위해 16 개월령 마우스에 추출물을 각각 100, 200, 400 mg/kg로 2달 동안 경구 투여함.
- 악력 평가 결과, 노화된 동물에서 저하된 운동 능력이 시험용 추출물에 (유효 농도, 200, 400 mg/kg) 의해 개선됨.
- 노화 동물과 추출물을 투여한 동물 그룹들 간의 체중, 조직, 근육 무게의 유의적 변화 없음.
- 노화 동물과 추출물을 투여한 동물 그룹들 간의 혈중 젖산 (lactate), 피브르산 (pyruvate), TNFα 농도 변화 없음.
- 가자미근육에서 **근육생성 인자 *mhc, myogenin, myoD*의 발현이 증가하는 경향성을 보임.**
- 장딴지근육에서 **근단백질 분해 인자인 *foxo3a* 발현이 시험용 추출물에 (유효 농도, 200 mg/kg) 의해 유의적으로 감소함.**
- **자연 노화로 인한 동물모델에서, OM(old mouse)과 YM(young mouse)의 평가지표 일부가 예상과 다르게 관찰되는 등 실험모델운영에 문제가 있는 것으로 평가되어, 노화된 마우스를 트레이닝 시킨 새로운 모델을 이용하여 시험용 추출물의 운동 능력 개선에 대한 재평가를 수행함.**

• **트레이닝된 자연 노화** 근소실 동물 모델
- **노화 마우스를 8 주간 수영으로 트레이닝** 시키며, 추출물 (200, 400 mg/kg) 을 경구 투여하여 추출물에 의한 근소실 억제 및 운동 수행 능력을 평가함.
- 트레이닝된 노화 마우스의 운동 능력은 시험용 추출물에 따른 변화 없음.
- 가자미근육과 장딴지근육의 상대 무게는 트레이닝 시킨 동물군과 시험용 추출물 투여군들 간 변화 없음.
- 간과 부고환 지방의 상대 무게는 트레이닝 시킨 동물군과 시험용 추출물 투여군들 간 변화 없음
- 장딴지근에서 **근단백질 합성에 관련된 인자 *myogenin, myoD, mTOR*의 발현이 시험용 추출물 투여에 의해 유의적으로 증가함.**
- **자연 노화된 마우스를 8 주간 매일 수영으로 트레이닝시키며 추출물을 투여하고 운동 능력 개선 효능을 평가한 결과, 장딴지근의 근단백질 합성 관련 유전자들의 발현은 증가하였으나 운동성 및 근육 무게의 그룹 간 변화가 없었음.**

나) 공동 기관 ((주)휴온스)

(가) 원재료 표준화 연구

• 원재료 수급 지역 및 부위 선정
- 오리나무 목질과 수피를 각 지역별로 확보 한 뒤, 수율과 단가 검토함.
- 수율, 단가, 식품가능성 여부 확인 후 산지 및 부위 최종 선정함.
- 원재료 대량공급 가능한 수급처 섭외함.
- 안정적인 수급방안 도출 후, 원재료 품질 관리 기준 설정 진행함.
- 지표성분인 Oregonin 용해도가 높은 메탄올을 원재료 추출용매로 설정한 뒤 메탄올 농도에 따른 지표성분 함량 비교함(용매조건 : 50%, 80%, 100% MeOH).
- 원재료 추출 온도에 따른 지표성분 함량값 비교함 (온도조건: 30℃, 50℃, 70℃).
- 원재료 추출 시간에 따른 지표성분 함량값 비교함 (시간조건: 30분, 60분, 90분, 120분).
- 원재료 추출 용매량에 따른 지표성분 함량값 비교함 (1 g/200 mL, 2 g/200 mL, 5 g/500 mL).
- 최종결과: 80% MeOH, 50℃, 60분, 5 g/500 mL 조건으로 설정됨.

(나) 제조공정 표준화 연구

• 추출 용매 설정
- 물, 30%, 50%, 70% EtOH 추출 진행 뒤 지표성분 함량 및 수율 검토함.
- 수율, 지표성분 함량값, *in vitro* 효능결과 추출 용매는 50% EtOH로 설정함.
• 추출 온도 설정
- 50% EtOH을 이용하여 60℃, 80℃ 추출을 진행 한뒤 수율 및 지표성분 함량 검토함.
- 온도가 높을수록 수율 및 지표성분 함량값 높게 관찰됨.
- 최종 추출 온도는 80℃로 설정 함.
• 추출 시간 설정
- 50% EtOH, 80℃ 조건을 이용하여 추출 시간 설정 실험을 진행함.
- 4시간, 6시간, 8시간, 10시간 추출 진행 시 고형분 및 지표성분 함량값 검토함.
- 시간조건에 따라 2회 반복 추출시 수율 결과는 8시간에서 가장 높게 관찰됨.
- Scale up 및 대량생산에 적용할 수 있는 조건을 확인함.

(다) 지표(유효)성분 설정 및 분석법 연구

• 지표성분 설정
- 오리나무 추출물에서 Oregonin 표준품과 Retention time 동일한 피크를 관찰함.
- 오리나무 추출물에서 다른 성분에 비해 Oregonin이 뛰어난 분리능을 나타냄을 확인함.
- 4종의 화합물 분석 완료 및 품질관리를 위한 지표성분 설정함.
- 지표성분 분석에 용이한 HPLC 분석법을 설정함.

(라) Scale-up 및 공정 규격 연구

• 제조공정 표준화 개선
- 제조공정 표준화 연구 시 8시간 추출할 때 수율이 가장 높게 관찰 되었으나, 8시간 추출 경과 시 불용성 물질 많이 생성됨. 불용성 물질을 저감하고자 하는 연구 진행함.
- 1차 추출물에 덱스트린을 혼합 시 불용성 물질 감소하는 경향이 관찰됨.
- 대량생산 공정 수립을 위한 Pilot 공정 진행 및 단위 규격을 확립함. (추출시간 8시간 설정)
- 원료 성상 및 안정성을 고려한 부형제 종류 및 비율을 검토함.
- 농축물 Brix에 따른 부형제 종류 및 추출물과 부형제 비율 검토를 진행함.
- 각각의 조건에 따라 소형 분무건조를 진행 한 뒤, 지표성분 함량과 수율을 비교함.
- 추출분말 성상이 가장 우수한 조건을 도출함.

(마) 파일럿 및 대량생산 진행

• 대량생산 공정 진행
- GMP시설을 이용하여 대량생산 진행 하였음.
- 고형분, 지표성분함량, 수율 파라미터 설정 완료 함. (제조공정도 완료)
- 원료에대한 공인시험성적서 수령함. (성상 및 대장균, 잔류농약, 중금속, 영양성분)
- 오리나무 추출분말의 기준 규격 설정 완료 함.
- 최종원료를 이용하여 분석법 밸리데이션 완료 함.

(바) 기준 및 시험법 설정 및 분석법 validation

• 대량생산원료를 이용하여 최종 지표성분 함량 분석 및 validation 완료
- 오리나무 추출분말 중 Oregonin을 분리, 정량하는 분석법의 유효성을 검토함.
- 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 범위를 확인함.
- 기준 및 시험법 설정 최적화를 확립함.

(사) 안정성 연구

• 가속 안정성 연구
- 원료 가속 안정성 연구를 통하여 유통기한 설정을 완료함.
- 6개월간 수분 및 지표성분함량 변화를 모니터링 하면서, 원료 유통기한 설정을 완료함.
- 최종 유통기한 24개월로 설정함.

(아) 인체적용시험 진입

• 인체적용시험 준비
- IB 자료집 작성 완료함.
- CRO 섭외 완료함.
- 인체적용시험계획서 확립함.

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

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명 \ 연도			1단계 (2021~2022)	2단계 (2023~2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표[1]		목표(단계별)	SCI 논문 1건 학술 발표 2건	SCI 논문 1건 학술 발표 2건	SIC 논문 2건 학술발표 4건	- 10
		실적(누적)	SCI 논문 1건 학술 발표 2건	SCI 논문 1건 학술 발표 2건	SCI 논문 2건 학술발표 4건	- 10
		목표(단계별)	특허출원 1건	특허출원 1건 특허등록 1건	특허출원 2건 특허등록 1건	10 10
		실적(누적)	PCT 특허출원 1건 국내 특허출원 1건 국내 특허등록 4건	미국 특허출원 1건	미국 특허출원 1건 PCT 특허출원 1건 국내 특허출원 1건 국내 특허등록 4건	10 10
연구개발과제 특성 반영 지표[2]		목표(단계별)	고용창출 1건	고용창출 1건	고용창출 2건	10
		실적(누적)	고용창출 1건	고용창출 1건	고용창출 2건	10
		목표(단계별)	인력양성 1건	인력양성 1건	인력양성 2건	10
		실적(누적)		인력양성 1건	인력양성 1건	10
계						

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능[1])		단위	전체 항목에서 차지하는 비중[2] (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
				보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1									
2									

* 1」 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.
* 2」 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과 (별첨 3)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	A Lignan from *Alnus japonica* Activates Myogenesis and Alleviates Dexamethasone-induced muscle atrophy	Planta Medica	Hyejin Lee, Jae-Ha Ryu	89 DOI: 10.1055/a-1891-3366	독일	Thieme	SCIE	2022.07.04	0032-0943	70%
2	Extract of *Alnus japonica* prevents dexamethasone-induced muscle atrophy in mice	Journal of Functional Foods	Hyejin Lee, Jae-Ha Ryu	101	영국	ELSEVIER	SCIE	2023.01.17	2214-9414	70%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2023년 춘계 대한약학회	이 혜 진	2023. 04. 20	라한 셀렉트 경주	대한민국
2	2023년 춘계 대한응용약물학회	이 혜 진	2023. 04. 06	여수 베네치아 호텔	대한민국
3	IUBMB	류 재 하	2022. 07. 09	Lisbon	Portugal
4	2021년 추계 대한약학회	이 혜 진	2021. 12. 21	전북대학교	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 3-5를 함유하는 골격근 근육 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	숙명여자대학교 산학협력단	2022.07.06.	10-2022-0083247		숙명여자대학교 산학협력단	2022.08.10.	10-2432797	100%	
2	오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 2를 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	숙명여자대학교 산학협력단	2022.07.06.	10-2022-0083246		숙명여자대학교 산학협력단	2022.08.10.	10-2432796	100%	
3	오리나무 추출물을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	숙명여자대학교 산학협력단	2020.08.11.	10-2020-0100747		숙명여자대학교 산학협력단	2022.07.20.	10-2424758	100%	
4	오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 1을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	숙명여자대학교 산학협력단	2022.004.26.	10-2022-0051499		숙명여자대학교 산학협력단	2022.06.14.	10-2410619	100%	
5	양강 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	숙명여자대학교 산학협력단	2021.09.29	10-2021-0129274					50%	

6	오리나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용조성물 및 이의 용도	국제출원(PCT)	숙명여자대학교 산학협력단	2021.08.03	PCT/KR2021/010158					100%	
7	A composition comprising an extract of alder tree or the isolated compounds therefrom for treating and preventing muscle-related disorder and the use thereof	미국	숙명여자대학교 산학협력단	2023.01.27	18/018473					100%	

ㅇ 지식재산권 활용 유형

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

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분[1」]	인증여부[2」]	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류[3」]	제안/인증일자

* 1」 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분[1」]	표준명	표준기구명[2」]	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식[3」]	제안자	표준화 번호	제안일자

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식[1」]	사업화 형태[2」]	지역[3」]	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1」 기술이전 또는 자기실시
* 2」 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
* 3」 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021-2022년	2023년	
1	김채진	(주)휴온스	1		1
2	정혜리	(주)휴온스		1	1
합계			1	1	2

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	이경선	2023년		1				1	1				

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	㈜휴온스 주췌한 심포지엄에서 연구개발성과 홍보	한국식품영양과학회	Discovery of food ingredients for attenuating muscle atrophy	2022. 10. 20.

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

[인프라 성과]

□ 연구시설・장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설・장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

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

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

2) 목표 달성 수준

추진목표	달성 내용	달성도 (%)
○ 오리나무 추출물의 *in vitro* 효능 평가와 기전 연구	○ 근원 세포에서 근관 세포로의 분화 효능 - 바이오 마커들 (MHC, Myogenin)의 단백질 발현과 면역 형광법을 이용한 근관 세포 수 증가 확인 - 근관 세포로의 분화에 중요한 p38 MAPK 신호 전달계 활성화 확인	100
	○ 덱사메타손 근관 세포 손상 모델에서 효능과 기전 - 추출물에 의한 근육 단백질 분해 효소 (MAFbx, MuRF1)의 발현 감소 - 손상에 의해 비활성화된 근육 단백질 합성 기전 (mTOR) 및 p38 MAPK 신호 전달계 관련 인자들의 발현 증가	100
○ 동물 모델에서 추출물의 *in vivo* 효능 평가와 기전 연구	○ 덱사메타손으로 유도된 근소실 동물 모델 - 악력테스트, Rota-rod 테스트에서 개선 효능확인 - 장딴지근과 가자미근육양의 증가 - 근육분해관련 지표의(*murf1, mafbx, myostatin, foxo3a*)의 mRNA)의 감소	100
	○ 자연노화로 유도된 근소실 동물모델 - 가자미근: 근단백질 합성인자(*mhc, myogenin, myoD*)의 발현 증가 경향성 (유의성 없음) - 장딴지근: 근단백질 분해인자인 *foxo3a* 발현 감소함	50
	○ 자연노화로 유도된 근소실 동물모델(운동 추가) - 장딴지근: 근단백질 합성인자 중 *myogenin, myoD, mTOR*의 발현 증가 - 운동성, 근육무게 등 기타 요소들의 변화 없음	50
○ 오리나무 원재료 및 제조공정 표준화	- 산지별, 채취시기별, 부위별 오리나무 규격화 연구	100
	- 오리나무추출물 최적화 및 제조공정 표준화 연구	100
	- 지표(유효) 성분 선정 및 분석법 확립	100
○ 오리나무추출물 대량생산 표준화	- 상업화 scale-up 대량생산 연구 및 원료 GMP 생산	100
	- 안정성 연구 진행 (원료)	100
○ 기준 및 시험법 설정 및 분석법 Validation 검증	- 기준 및 시험법 설정 및 분석법 validation 확립/검증	100
○ 근력개선 건강기능식품 인체적용시험 진입	- CRO 및 임상기관 선정 및 프로토콜 설정 - 피험자 모집 준비 (IB자료집, IRB 신청 등) - 인체적용시험계획서 확립	50

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

(1) 주관기관 수행 사항

- 연구계획에 따라 오리나무 추출물 및 구성성분에 대해 근위축 개선 효능연구를 수행함.
- *in vitro* 세포실험과 덱사메타손 유도 근손실 동물모델에서 성공적으로 근손실 개선 효능을 확인하고 그 기전을 규명함.
- 자연노화 모델에서 악력의 개선과 일부 지표의 개선 경향성은 관찰되었으나 대조군 대비 유의성을 확인하지 못함. 또한 일부 대조군 간의 평가 지표가 예상과 다르게 관찰되는 등의 이유로 새로운 노화모델로 재실험을 계획함.
- 새로운 노화 모델에서는 운동성 향상 효능을 평가하기 위해 문헌을 참고하여, 자연 노화로 인한 근소실된 마우스에 운동을 추가하여 추출물에 의한 운동 수행 개선평가를 용이하게 디자인하였음.
- **회사 자체 예산을 투입하여, 모델을 수정하면서(노화+운동) 2번에 걸친 노화 동물 실험을 진행하는 등 최선을 다하였으나, 효능 평가에서 유의적인 결과를 얻지 못하여 인체적용시험에 진입하지 못함.**

- 연구 결과에 대한 고찰
- 덱사메타손 처리와 자연 노화에 의한 근감소 동물 모델에서, 부**분적인 활성과 개선 경향성은 확인**하였기에 실험 결과가 매우 아쉬운 점이 있음.
- 특히 노화 동물 모델에서의 결과 도출 실패는, 노화 동물의 청년기 마우스에 비해 낮은 bioavailability에 있으리라 예상되므로 **투여 용량 조절 및 흡수율을 증가**시키는 방안의 강구가 필요함.
- 하기 참고 문헌들에 따르면, 16개월령 이상의 마우스에서 악력과 근육 위성 세포 수의 감소가 나타났음. 이를 토대로 본 연구의 동물 실험에서는 16개월령 마우스에 2달 동안 시험용 추출물을 투여하였으며, 이는 18개월령에 부합하는 마우스로 사료됨.

model	strain	mouse age	주요 결과	참고 문헌
Natural ageing	C57BL/6J	2, 12, 16 22 month	• 16개월령 이상부터 GST 감소 • 11개월령 이상부터 rotarod test 감소 • 18개월령 이상부터 T-maze 빈도 감소 (시험 시작 8주 후)	1
	C57BL/6J	10, 16, 21, 25 month	• 16, 21, 25개월령 간의 근육량에 유의성이 없으나 10개월령과 비교시 유의적 차이 확인	2
	C57Bl/6	4, 16 month	• 대조군 4개월령 대비 16개월령 마우스 myofibre 내 satellite cell 감소 확인 (대조군 : 8.6 satellite cell/myofibre, 실험군 :5.0 satellite cell/myofibre)	3

참고문헌

1. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2019; 39:100-118.
2. Sarcopenia in older mice is characterized by a decreased anabolic response to a protein meal. *Arch Gerontol Geriatr*. 2017; 69:134-143.
3. Moderate-intensity treadmill running promotes expansion of the satellite cell pool in young and old mice. *FEBS J*. 2013; 280:4063-4073.

- 노령동물 사용에 따른 문제점 분석
- 식약처 건강기능식품 기능성 평가 가이드에 따르면 노인성 근감소증에 대한 인체 적용 시험 연령은 50세 이상 85세 이하의 성인임.
- 이를 참고하여, 근손상 동물 모델 실험에서는 **인간의 수명 50-60세에 해당하는 최저 월령인 16월령 마우스** 사용함.
- 그러나 노령 마우스의 기본 운동 능력이 10 또는 12개월령 마우스에 비해 현저히 떨어져 음성/양성 대조군의 효과도 유의적 차별성이 없었음.
- 16개월령 마우스를 운동시켜 이러한 노화 마우스의 기본 운동력을 올려 재실험하였으나, 유의적 결과를

얻지 못함.

- 최근 근력개선을 위한 개별인정형 원료로 선정된 강황 추출물(커큐민)은 10개월령 마우스를 사용하였고, 운동수행능력 향상을 위한 개별인정형 원료인 유산균 TWK10 프로바이오틱스의 경우 10주령 마우스를 이용하여 동물 실험을 수행한 바, 식약처 가이드에 **노인성 근력 개선 활성 평가를 위한 다양한 동물 모델 제안이 필요함.**
- 연령과 무관하게 운동 개선을 목표로 연구 개발을 시도할 필요도 있음.

(2) 공동연구기관 수행 사항

- 공동연구기관인 ㈜휴온스에서는 인체적용시험을 위하여 일정에 맞춰 연구개발를 진행함.

원재료 표준화 : 원재료 산지별, 부위별 추출물 분석 및 분석법 확립, 원재료 기준규격 설정 완료

지표물질 분석 : 추출조건별 지표물질 (Oregonin) 함량 비교 및 분석법 확립

공정 연구-1 : Lab-scale 공정연구 진행 및 추출 조건 확립, 부형제 선정

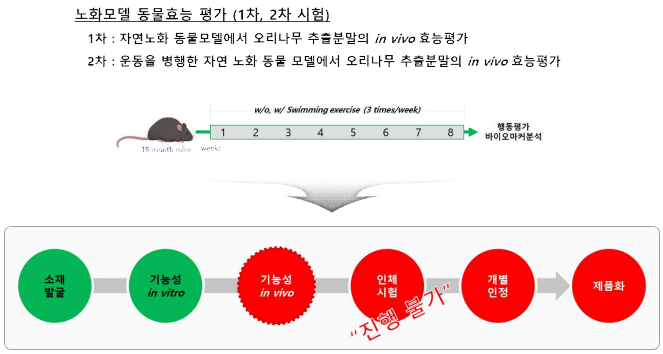
공정 연구-2 : 식품 GMP 시설 사용한 대량생산 공정 규격 설정, 원재료 기준규격 설정 완료

시험법 벨리데이션 : 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 결과 확보

유통기간설정 : 지표물질 함량 분석을 통한 유통기한 설정 완료 (24개월)

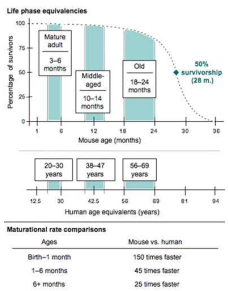
[공동연구기관 연구 내용]

- 주관기관의 연구개발 목표인 노화모델 효능평가에서 유의성을 확인하지 못하여 ㈜휴온스에서는 2단계 목표인 인체적용시험을 진행하지 못하였음.



[2단계 연구개발 모식도]

- 기허가 자료에서는 사람의 36-47 연령에 해당하는 10-14개월 마우스를 사용하였음.
- 오리나무 추출분말을 사용한 노화모델에서의 운동성개선 효능의 차별성을 확보하고자 아래와 같이 문헌을 참고하여 16개월 이상 마우스로 선정하였음. 이는 노화가 급격히 시작되는 50대 초반을 고려한 것이며, 최근 sarcopenia 개선 연구 논문에서 16개월령 이상의 마우스를 사용함.



모델	처리물질	마우스 연령	참고 문헌
Natural ageing	DMF (dimethoxyflavone)	18 m	*Nutrients* 2020;12:1079
	ALA (aminolevulinic acid)	25 m	*Sci Rep* 2017;7:4013
	Coffee extract	27 m	*Exp Gerontol* 2014;50:1–8
	Anti-myostain antibody	22 m	*Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:2212–2217
	Testosterone	22 m	*Endocrinology* 2010;151:628–638
	Uphill treadmill HIIT exercise	24 m	*J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2018;73:429–437
	Olive leaf extract	24 m	*Antioxidants* 2021;10:737
	Loquat leaf extract	18-19 m	*Int J Mol Med* 2015;36:792–800
	L. plantarum HY7715	20 m	*Int J Mol Sci* 2021;22:10023

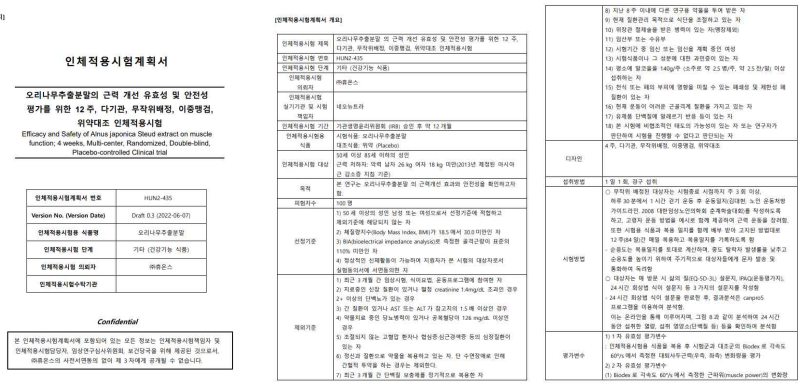
[mouse와 human 연령 비교 (좌, Jackson Lab 제공), Sarcopenia 개선 물질 논문 (우)]

- 고찰

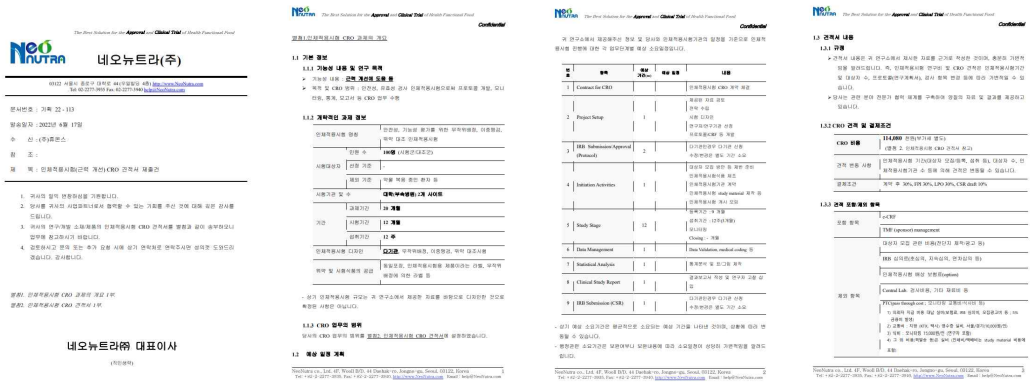
- **1, 2차에 걸친 노화 동물 효능평가에서 행동평가 및 근육합성, 근육감소 등 바이오마커에서 대조군**

대비 유의적인 차이를 확인하지 못하여 인체적용시험 진입을 하지 못하였음.

- 공동연구기관 ㈜휴온스에서는 1, 2차의 동물효능평가로 **지체된 인체적용시험 일정을 맞추고자 CRO 기관 섭외, 견적 진행 및 시험계획서 확보함.**



[인체적용시험 계획서]



[CRO 견적서]

2) 자체 보완활동

- 16개월령 자연노화동물모델에서 오리나무 추출분말의 *in vivo* 효능평가 분석 결과 유의성을 확보하지 못함에 따라 **자연노화동물모델에 운동을 병행한 2차 동물효능평가 진행함.**
- 과제일정을 준수하고자 2차 효능평가와 병행으로 공동연구기관에서는 **IRB 자료 준비, CRO 기관 확보 등 인체적용시험을 위한 사전 준비를 진행함.**
- 23년 1Q에 인체적용시험을 진입을 위해 CRO 기관에 협조를 확인함.

3) 연구개발 과정의 성실성

(1) 오리나무 추출물의 근기능 개선 효능 검증

- **오리나무 추출물의 *in vitro* 효능 검증**
  - 추출물과 그로부터 분리된 활성 물질들 (리그난과 오레고닌)의 근원세포 분화 촉진 효능과 관련 기전 (p38 MAPK)을 확인함.
  - 추출물과 활성 물질들은 덱사메타손로 유도한 근관세포 근섬유 손실을 억제하는 효능을 확인함.
- **노인성 근육 감소 동물 모델에서 효능 검증**
  - 덱사메타손 유도 근손실(식약처 가이드 참조) 동물 모델에서 추출물이 운동성을 개선하고, 근육량과 근육 대사를 개선하며, 이는 근단백질 분해 기전 억제를 통한 효과임을 입증함.
- **자연 노화 동물 모델에서 효능 검증**

- 자연 노화로 인한 근소실 동물모델에서, 추출물에 의한 악력 증가를 확인하였고, 일부 지표의 개선 경향성은 있으나 대조군 대비 유의성을 확인하지 못함. 또한 일부 대조군 간의 평가 지표가 예상과 다르게 관찰되는 등의 이유로 새로운 노화모델로 재실험을 계획함.

- 수정한 노화 동물모델에서는 문헌을 참고하여 수영을 추가하여 자연 노화로 인한 근소실 개선 효능을 평가하였음. 근육단백질 합성 마커들의 개선은 관찰되었으나 근육량의 증가와 운동능력의 개선은 관찰되지 않았음.

- **연구 성과의 확보**

  노화 동물 모델에서 효능 확인은 못하였으나, *in vitro* 세포모델에서 **오리나무 활성성분의 근위축 개선 작용기전과 덱사메다손 근손실유도 동물 모델에서의 효능을 2편의 국제 학술지에 게제 완료하고(J. Functional Foods. Planta Medica), 특허 등록 4건, 특허 출원 3건 (미국특허 1건 포함)의 연구성과를 확보함.**

- **3 차년도 추가 연구 내용**

  - 3차년도 이지바로 등록과 연구비 지급/집행 없었음.

  - 오리나무 주성분인 오레고닌이 근육 세포에서 AMPK, PGC1α를 활성화하여 미토콘드리아 생합성을 촉진하는 추가 *in vitro* 연구 자료를 확보함.

    i) 미토콘드리아 생합성에 관련된 AMPK, SIRT-1과 6 타입, 그리고 PGC1α의 단백질 발현을 증가시킴

    ii) 하위 인자들, NRF-1, TFAM, PGC1α의 mRNA 발현을 증가시킴

    iii) 근관세포에서 근육의 에너지원인 ATP 생산 증가

  - C_2-세라마이드로 유도된 근육 세포 노화 모델에서 항노화 효능이 있음을 규명함.

    i) 관련 단백질들의 발현을 증가시켜 세포 증식을 활성화함.

    ii) 노화된 세포 특이적인 노화성 β-galactosidase가 발현과 지질 축적이 억제됨.

(2) 오리나무 공정 표준화 완료

- 본 과제의 결과로 오리나무의 원재료 표준화, 원료 표준화, 지표성분 설정 및 분석법 밸리데이션, 대량생산 표준화 구축 완료, 원료 안정성 검토 완료.

- 원재료 표준화 연구

- 국내산 오리나무 산지별, 부위별 샘플 확보 및 추출물 제조 후 사용 지역 및 부위 선정.
- 원재료 추출 용매, 온도, 시간, 용매량 설정을 통한 원재료 표준화 확립.

- 제조공정 표준화 연구

- 원료 추출 용매, 온도, 시간 설정을 통한 원료 표준화 확립.
- Scale-up 및 대량생산에 적용 할 수 있는 조건 확립.

- Scale-up 및 공정 규격 연구

- Scale-up 공정 규격 연구.
- 대량생산 공정 수립을 위한 공정 진행 및 단위 규격 확립.
- 원료 성상 및 안정성을 고려한 부형제 검토.

- 파일럿 및 대량생산 진행

- 대량생산에 적용 가능한 추출공정 개선, 파라미터 수립, 수율 모니터링.
- 대량생산 원료에 관련한 공인시험 성적서 확보 (성상 및 대장균, 잔류농약, 중금속, 영양성분).
- 대량생산 원료를 이용하여 지표성분 분석법 밸리데이션 완료.

- 지표성분 선정

- 오리나무 유래 성분들 검토 진행 후 생약에 특이적이며, 함량이 비교적 많은 성분인 Oregonin을 지표성분으로 설정.

- 기준 및 시험법 설정 및 분석법 validation

- 대량생산 원료를 이용하여 최종 지표성분 함량 분석 및 validation 완료.
- 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 범위 확인.
- 기준 및 시험법 설정 최적화 확립.

- 안정성 연구

- 원료 가속 안정성 연구 완료.
- 6개월 동안 수분함량 및 지표성분 함량 모니터링 실시.
- 최종 유통기한을 24개월로 설정 완료.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

1) 기술력 측면

(1) 오리나무를 이용한 새로운 근력개선 효능 입증을 통한 기능성 소재 발굴

- 세계적인 근감소 치료제개발 타겟은 마이오스타틴 또는 activin 수용체이며, 최근 예방 및 치료를 위한 **식물성 기능성 소재에 대한 수요도 증가**하고 있음.
- 근원세포배양모델에서 오리나무 추출물과 주요 성분들은 **분화를 촉진**하여 근섬유 생성을 강화하고, 덱사메타손으로 유도된 **근단백질 분해에 관여하는 각종 지표들의 발현을 억제**함으로써 손상된 근섬유를 보호함.
- 덱사메타손유도 근손상 동물 모델에서 오리나무추출물은 운동능력을 개선하고, 근육량의 증가 및 근육분해에 관여하는 각종 지표들의 발현을 억제함으로써 **근력개선 효능이 입증됨.**
- 오리나무 추출물을 활용한 근력개선 관련 **연구성과 (논문 2건, 특허 등록 4건)를 통하여 근력과 관련한 연구에 학문적·기술적 이바지를 기대함.**

(2) 오리나무 수피를 활용한 개별인정형 원료 개발 시 필요한 공정개발을 완료

- 국내산 오리나무 수피의 원활한 수급 방안 도출 및 원재료 수급 시 원재료 적합 유무를 판단할 수 있는 품질관리 기준 제시함.
- 오리나무 수피의 최적 수율 조건, 일정한 함량을 확인할 수 있는 원료의 최적 추출 조건 확립함.
- 부형제 첨가 비율에 따른 함량 변화 및 성상 변화 관찰함으로써, 안정한 원료를 획득할 수 있는 최적의 분무건조 조건 확립함.
- 원료 표준화, 대량생산 표준화, 원료 안정성 확인을 통해 오리나무의 시제품 개발 가능성 확인함.
- 지표성분 분석법 validation 확립을 통해, 오리나무의 시제품의 품질을 지속적으로 검토 할 수 있는 방안 도출함.

(3) 새로운 근력개선식품 개발을 통한 과학적 기반의 식품산업 발전과 국내기술 선진화 이바지

- 수입의존도가 높은 시장에서 자생식물의 활용 및 국내기술에 의한 자생력 구축에 이바지할 것으로 기대함.
- 신규소재 획득 및 제제화 기술개발에 따른 실용화 기술 획득을 기대함.

(4) 다양한 적응증 개발에 대한 기초 기술자료 근거 자료 확보

- 근력개선과 연관된 위험군 질병으로의 적응증 확대를 통하여 천연물 소재의 활용범위를 확대하고, 본 연구에서 작용기전이 밝혀진 오리나무의 주요성분을 의약품으로 개발할 수 있는 근거를 마련함.
- 본 연구에서 제안한 오리나무 및 주요 구성 성분과 유사한 소재를 활용한 기능성 연구를 통하여 안전하고 유용한 식품을 개발할 수 있는 연구자료를 제공함.

2) 경제·산업적 측면

- 오리나무 추출물은 덱사메타손 근육손상 동물모델에서 운동능력개선, 근육양의 개선 및 근육분해관련 마커들의 발현을 억제함으로써 **glucocorticoid 장기 복용에 따른 근육손상을 치료할 수 있을 것으로 기대**되며 근력개선 산업 시장에 크게 이바지라 것으로 기대됨.
- 오리나무 추출물을 근력개선 기능을 가진 것으로 알려진 크레아틴, 아르기닌 등과 혼합하여 경쟁력있는 식품을 개발할 수 있을 것으로 기대됨.

3) 사회적 측면

- 국민 건강의 예방·관리적인 측면에서 근력개선 관련한 다양한 제품은 사화 경제적 부담을 경감시킬 수 있을 것으로 기대됨.
- 제품 개발 후 근력개선을 통해 근력과 관련한 질환의 발병 위험을 감소시켜 사회적 비용의 감소 및 아직 초기 단계인 국내 근력개선 시장을 활성화할 것으로 기대됨.
- 근력개선 및 운동수행능력 개선을 위해 주로 단백질 제품이 주를 이루는 상황에서, 과학적으로 기능성이 입증된 소재의 식품에 대한 사회적 욕구를 충족하는 제품 개발이 가능함.

6. 연구 개발 성과의 관리 및 활용 계획

- 본 과제로 다양한 시험법을 활용한 근력개선 유효성/작용기전의 과학적 근거 및 **우수한 소재 도출에 활용**하며, 선정 원료인 오리나무의 이화학적 특성 분석을 통한 최적 수율 조건, 일정한 함량 및 용량을 얻을 수 있는 원료 생산조건 확립과 원료의 성상 및 물성 확인시험을 통해 **다양한 제형의 식품 개발에 활용** 가능함.
- *in vitro*에서 근육분화촉진 및 근단백분해 억제 작용기전을 확인하였고, 덱사메타손 근육손상 동물모델에서 운동능력개선, 근육양의 개선 및 근육분해기전을 억제함으로써 **glucocorticoid 장기 복용에 따른 근육손상을 개선**할 수 있을 것으로 기대됨.
- 선정 원료의 응용 기술개발을 위한 제형화 연구를 통해 응용 기술제품 규격 설정 및 표준화와 안정성 확인을 통해 원·부재료의 첨가에 따른 제형의 최적 조건 확립 및 근력개선을 위한 고부가가치 제품개발에 활용함.

< 연구개발성과 활용계획표>

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

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 세부 정량적 연구개발성과 증빙자료
2.	1)
	2)

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호			121016031HD030	
사업구분	농림축산식품연구개발사업				
연구분야	미래대응식품 (메디푸드 분야)			과제구분	단위
사 업 명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	질환·대상별 맞춤형 기능성소재 발굴 및 대량생산기술 개발			과제유형	개발
연구개발기관	숙명여자대학교 산학협력단			연구책임자	류 재 하
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021.04.01 -2021.12.31	150,000	8,570	158,570
	2차년도	2022.01.01 -2022.12.31	200,000	21,420	221,420
	3차년도	2023.01.01 -2023.12.31	200,000	60,000	260,000
	계	2021.04.01 -2023.12.31	550,000	89,990	639,990
참여기업	㈜휴온스				
상 대 국		상대국연구개발기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
숙명여자대학교 약학대학	교 수	류 재 하

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	

I. 연구 개발 실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구 개발 결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 노령화에 따른 근력개선 소재 발굴이 긴급한 상황에서 자생식물 오리나무를 유용 소재로 발굴함.
- *In vitro* 세포 모델에서 소재의 효능 물질에 대해, 근원세포 분화 촉진 및 근단백 분해 마커 발현 억제를 작용기전으로 규명하고, 재료의 대량 생산 및 표준화를 완료함.
- 덱사메타손 근손상 동물 모델에서 운동 능력 개선, 근육량 개선 및 근단백 분해마커 발현 억제를 확인함.

2. 연구 개발 결과의 파급 효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 2건의 오리나무의 근기능 개선 효능을 밝힌 논문으로써 유사한 목적의 연구 및 개발을 위한 아이디어를 제공함.
- *In vitro* 및 동물 모델에서의 결과를 활용하여 제품을 개발하게 되면 농가 소득에 이바지할 것으로 기대됨.
- 치료제가 전무한 상황에서 식물 추출물을 소재로 노인성 근위축증에 대한 예방 및 치료를 위한 적극적인 개발의 동기를 제공하며, 식약처 가이드에 근력 개선 활성 평가를 위한 다양한 동물 모델 제안의 필요성을 제기함.

3. 연구 개발 결과에 대한 활용 가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- *In vitro*에서 분화 촉진 및 근단백 분해 억제 작용 기전과, 덱사메타손 근육 손상 동물 모델에서 운동능력 개선, 근육양의 개선 및 근육 분해 기전을 억제함으로써 glucocorticoid 장기 복용에 따른 근육손상은 개선할 수 있을 것으로 기대됨.
- 오리나무 추출물과 기능성이 알려진 다른 소재 (예, 크레아틴, 아르기닌)와의 적절한 배합으로 새로운 상품을 개발할 수 있는 소재로 제안함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 연구계획서상의 일정에 따라 소재확정, 대량생산, *in vitro* 및 동물 모델에서 효능 검증 등의 과정을 성실하게 수행함.
- 자연 노령화 동물 모델에서 기허가 제품과 (12개월령) 차별화된 16개월령 동물을 사용하였으며, 회사 자체 예산을 추가 투입하여 자연 노화+운동 동물 모델에서 활성을 재검증하며 연구를 성공적으로 마감하기 위해 최대한 노력함. 부분적인 활성 확인 및 유의성을 확보하지 못한 아쉬운 점이 있으나, 용량 조절, 실험 모델수정 등으로 개선이 가능할 것으로 기대됨

5. 공개 발표된 연구 개발 성과 (논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 국제 학술지에 2건 (J. Functional Foods, Planta Medica)의 논문 출판을 완료하였으며, 특허 등록 4건, 특허 출원 3건 (미국특허 1건포함)을 완료함
- 국내외 학술대회 4회 발표함.
- 홍보 활동 (본 연구에서 개발하고자 하는 제품의 연구진행 상황) 1회 실시함

Ⅱ. 연구목표 달성도

1. 주관 기관 (숙명여자대학교)

구분	세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1단계	원재료의 근원세포 분화 촉진 효능 검증 (*in vitro*)	20	100	- 산지별, 시기별 재료의 효능비교 완료하여 원재료 확정 - 원재료의 근원세포 분화 촉진 효능과 기전 규명함
	근위축 세포 모델에서 효능 검증 및 기전 연구 (*in vitro*)	20	100	- 덱사메타손으로 유도된 근소실 모델에서 원재료에 의한 근관세포 보호 효능 및 기전 규명함
	동물 모델에서 효능 검증 (*in vivo*)	25	100	- 덱사메타손 유래 노인성 근감소 동물에서의 운동 수행 능력 증가, 근육양개선 및 근단백질 합성/분해 기전을 조절함을 규명함
		25	50	- 자연 노화 마우스의 운동 수행 능력 증가 및 근단백질 분해 기전을 억제함을 일부 확인함 - 트레이닝된 자연 노화 마우스의 근단백질 합성 기전 촉진을 확인함 - 노화 동물 모델에서 효능이 충분히 입증되지 않아 인체적용 시험에 진입하지 못함
2단계	근개선 관련 평가 지표 제안 지적재산권 확보	10	100	- 특허 4건 등록 및 3건 출원 완료함 - 오레고닌에 의한 미토콘드리아 생합성 촉진 평가 - 근개선 관련 개별 인정형 원료 효능 평가 지표로 PGC1α를 제안함
	근육 세포에서 항노화 효능 평가 (*in vitro*)		100	- C_2-세라마이드로 유도된 근세포 노화 억제 효능 규명 - 노화 세포 특이적인 노화성 β-galactosidase 발현 및 지질 축적 억제
합계		100	87.5	

2. 공동연구 기관 ((주) 휴온스)

구분	세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1단계	원료 및 제조공정 표준화	10	100	- 원재료, 원료 제조공정 표준화 완료
	대량생산 공정 표준화	20	100	- Scale-up 공정 규격 연구, 대량생산 표준화 완료
	기준 및 시험법 설정 및 분석법 Validation 검증	15	100	- 지표성분 선정 및 분석법 Validation 완료
	인체적용시험 IP 제조 및 시제품 제작	10	0	- 1차 노화모델 평가에서 유의미한 결과 확인하지 못하여 IP 제조 및 시제품 제작 진입 불가 - 2차 노화모델 재평가 결과 확인 후 IP 및 시제품 제작하고자 하였으나, 진행 불가

	원료 및 시제품 안정성 평가	5	100	- 원료 가속 안정성 평가 진행 - 유통기한 설정 완료
2단계	인체적용시험 완료	20	35	- IB 자료집 작성, CRO 섭외 및 시험 계획서 확립
	개별인정원료 신청	20	0	
합계		100	57	

Ⅲ. 종합 의견

1. 연구 개발 결과에 대한 종합의견

- 노령화에 따른 근력 개선 소재 개발이 **긴급한 상황에서 자생식물을 활용한 유용소재를 발굴함**.
- 오리나무 추출물에서 효능 성분을 확인하고 작용 기전을 규명하였으며, **재료의 대량 생산 및 표준화**를 완료함.
- 식약처에서 권고하는 **덱사메타손 근육 손상 동물 모델에서** 운동 능력 개선, 근육양의 개선 및 근육 분해기전을 억제함으로써 glucocorticoid 장기 복용에 따른 **근육 손상은 개선**할 수 있을 것으로 기대됨.
- 자연 노령화 동물 모델에서 부분적인 활성 확인 및 유의성을 확보하지 못해 인체 적용 시험을 못한 아쉬운 점이 있으나, 용량 조절 및 실험 모델 수정 등으로 개선의 가능성을 제기함.
- 제품 개발 목표는 달성하지 못했으나, **국제 학술지 논문 2편, 국내 특허등록 4건, 국내외 특허출원 3건의 성과**를 달성함.

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

- 2차에 걸친 자연 노화 동물 모델에서의 효능 검증의 노력에도 불구하고, 그 결과를 바탕으로 부득이하게 인체 시험에 진입은 못했으나, **㈜휴온스의 자체 예산을 투입하는 등 최선의 노력을 다했음을 고려해 줄 것을 요청드림.**
- 최선을 다했음에도 최종 목표에 이르지 못하고, **제품화를 실천하지 못함으로써 사업화 지표가 부족하나, 성실하게 연구를 수행하였고, 지재권 확보 및 연구 기반 지표의 성과를 확보한 점**을 고려해 주실 것을 요청 드림.
- 현재 노인성 근위축증 치료제가 세계적으로 전무하며, 근력 개선에 도움이 되는 **국내 허가된 기능성 소재는 오미자 추출물이 유일함**. 특히 노화 모델에서 효능 확보가 쉽지 않으나, 지속적인 소재 발굴 시도에 대한 적극적인 지원이 필요할 것으로 사료됨.
- **2단계 연구비가 지급되지 않았음에도 성실하게 연구를 수행하여, 효능 평가 지표로 미토콘드리아 생합성 개선 및 근세포 노화 억제 효능 데이터를 추가로 확보하였음.**

3. 연구 결과의 활용 방안 및 향후 조치에 대한 의견

- 오리나무 추출물은 덱사메타손 근육 손상 동물 모델에서 운동 능력 개선, 근육양의 개선 및 근육 분해 관련 마커들의 발현을 억제함으로써 glucocorticoid 장기 복용에 따른 근육 손상을 개선할 수 있을 것으로 기대됨.
- 오리나무 추출물을 근력 개선 기능을 가진 것으로 알려진 크레아틴, 아르기닌 등과 혼합하여 경쟁력있은 식품을 개발할 수 있을 것으로 기대됨.
- 오리나무 성분 2종에 대한 근기능 개선 효능을 밝힌 논문은 유사한 목적의 연구 및 개발을 위해 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

Ⅳ. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	√ 자유응모과제 □지정공모과제	분 야	미래대응식품 [메디푸드 분야]
연 구 과 제 명	질환·대상별 맞춤형 기능성 소재 발굴 및 대량생산기술 개발		
주관연구개발기관	숙명여자대학교 산학협력단	주관연구책임자	류 재 하
연 구 개 발 비	정부지원 연구개발비 / 기관부담연구개발비 / 기타 / 총연구개발비		
	550,000,000 원 / 89,990,000 원 / / 639,990,000 원		
연구개발기간	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2 년 9 개월)		
주요활용유형	□산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)		

2. 연구 목표 대비 결과

1) 주관 기관 (숙명여자대학교)

당초 목표	당초 연구 목표 대비 연구 결과
① 오리나무 추출물들의 효능 평가	- 추출물들의 근육 근원세포에서 근관 세포로의 분화 촉진 효능과 산지별, 채취시기별 원재료의 효능 검증
② 근원세포 분화 촉진 효능 평가 (*in vitro*)	- 원재료에 의한 근원세포 분화 관련 단백질들의 발현 증가 확인과 p38 MAPK 신호 전달계 활성화 확인
③ 근위축 세포 모델에서 효능 검증 및 기전 연구 (*in vitro*)	- 덱사메타손으로 유도된 근소실 세포 모델에서 원재료에 의한 근육 보호 및 기전 연구 완료
④ 노화 동물 모델에서 근력 개선 효능 검증 (*in vivo*)	- 덱사메타손 유래 노인성 근감소 동물과 자연 노화 동물에서의 운동 수행 능력 증가 및 근단백질 합성/분해 기전을 조절함을 규명 - 트레이닝된 자연 노화 마우스의 근단백질 합성 기전 촉진 효능 확인 - 자연 노화 동물 모델에서 부분적인 활성을 확인함
⑤ 근개선 관련 평가 지표 제안	- 활성 물질인 오레고닌에 의한 미토콘드리아 생합성 촉진 확인 - 근개선 관련 개별 인정형 원료 효능 평가 지표로써 PGC1α를 제안함
⑥ 활성 물질의 항노화 효능 평가 (*in vitro*)	- 노화 세포에서 오레고닌에 의한 세포 주기 활성화, 노화성 β-galactosidase 발현 및 지질 축적 억제 확인함
⑦ 지적재산권 확보	- 특허 등록 4건 및 국내외 특허 출원 3건 완료함

2. 공동연구 기관 ((주) 휴온스)

당초 목표	당초 연구 목표 대비 연구 결과
① 원료 및 제조공정 표준화	- 제조 공정 표준화 확립
② 대량 생산 공정 표준화	- 대량 생산 공정 확립
③ 기준 및 시험법 설정 및 분석법 Validation 검증	- 지표 성분 설정 및 분석법 Validation 완료
④ 인체 적용 시험용 IP 제조 및 시제품 제작	- 22년 11월 노화모델 재평가 진행하면서, - 22년에 IP 및 시제품 제작 불가하였음
⑤ 원료 및 시제품 안정성 평가	- 가속 시험 안정성 평가 완료 및 유통 기한 설정 완료
⑥ 인체 적용 시험 완료	- IB 자료 준비, CRO 기관확보 등 인체 적용 시험을 위한 사전 준비 진행 (2단계 '23년도) 진행 사항 - 노령화 모델에서 효력을 입증하지 못하여 인체 적용 시험 진입하지 못함
⑦ 개별 인정 원료 신청	- 2단계 ('23년도) 진행 사항 - 개별 인정 원료 신청이 어려움

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표		사업화지표												연구기반지표								
		지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
														논문								
		특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건	평균등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		10	10			10		10			10		10			20	10		10			
최종목표		2	2		B	1		1	8200		2		1	3		3.3	4		2		4	
당해년도	목표	1	1		B	1		1			1		1	1		3	2		1		1	
	실적	1									1			1		5.23	2		1			
달성률(%)		100	0			0		0			100		0	100		174	100		100		0	

** 3년차 연구비가 투여되지 않은 상황에서 과제가 중단됨. 3년차의 목표였던 사업화지표의 성과를 거둘 수 없었으며, 학술성과는 최선으로 달성함. 특허등록은 2년차에 앞당겨 초과 달성함.

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	오리나무의 대량추출, 규격 설정 및 표준화 기술
②	오리나무 추출물 및 구성 성분의 근원세포분화 효능 및 덱사메타손에 의한 근섬유손상 보호 효능 검증
③	덱사메타손 근손상 유도 동물 모델에서의 오리나무 추출물의 근기능개선 효능 검증
④	자연 노화 동물 모델에서의 오리나무 추출물의 근기능개선 효능 검증

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v						v		
②의 기술		v				v				
③의 기술		v								v
④의 기술		v								v

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구 결과별 구체적 활용 계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	오리나무 추출 분말을 이용한 제품 개발 시 대량 생산 및 표준화 기술로 활용 가능하며 농가 소득에 기여할 것으로 기대됨
②의 기술	특허 기술로써 오리나무 추출물 및 구성 성분의 근원세포 분화 촉진 활성과 덱사메타손에 의한 근섬유 손상 보호 효능을 활용하여 근육 개선 효능이 알려진 다른 소재(예, 크레아틴, 아르기닌)와 적절하게 배합한 식품 개발이 가능할 것으로 기대됨
③의 기술	덱사메타손 근손상 유도 동물 모델에서 오리나무 추출물이 운동 능력 개선, 근육양의 개선 및 근육 분해 관련 마커들의 발현을 억제함으로써 glucocorticoid 장기 복용에 따른 근육 손상을 개선할 수 있을 것으로 기대됨
④의 기술	자연 노화 동물 모델에서 오리나무 추출물의 근기능개선 효능이 입증되지 않아 인체 적용 시험에 진입하지 못하여 과제가 중단됨. 투여 용량과 동물 월령 조절 또는 다른 동물 모델에서 재검토의 여지가 있음.

7. 연구 종료 후 성과 창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표												연구기반지표								
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	평균등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	10	10			10		10			10		10			20	10		10			
최종목표	2	2		B			1	8200		2		1	3		3.3	4		2		4	
연구기간내 달성실적	2	4		C						2			2		4.15	4		1		1	
연구종료후 성과창출 계획		1		B									1		2					2	

** 2단계에서 과제가 중단되어 사업화는 달성하지 못하였으나, 지식재산권과 연구기반 지표는 최선으로 달성함.

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]			
이전형태	□무상 □유상	기술료 예정액	천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기[3]	
기술이전시 선행조건[4]			

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

별첨 3. 연구성과 실적 증빙 자료

〈 목 차 〉

1. 논문 게재 ---------- 82

2. 국내 및 국제 학술회의 발표 ---------- 84

3. 기술적 성과-지식재산권 ---------- 86

4. 고용창출 ---------- 93

5. 인력양성 ---------- 94

6. 홍보실적 ---------- 95

1. 논문 게재

1) 논문명; A Lignan from *Alnus japonica* Activates Myogenesis and Alleviates Dexamethasone-induced muscle atrophy (*Planta Medica* **2022**. 89: DOI: 10.1055/a-1891-3366)

Original Papers

Thieme

A Lignan from *Alnus japonica* Activates Myogenesis and Alleviates Dexamethasone-induced Myotube Atrophy

저자

Authors

Hyejin Lee[1], Ji Hye Jeong[1], Seung Hwan Hwang[2], Sung Hum Yeon[2], Jae-Ha Ryu[1]

Affiliations

1 Research Institute of Pharmaceutical Sciences and College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea

2 R&D Center, Huons Co., Ltd., Gyeonggi-Do, Korea

Key words

Alnus japonica, Betulaceae, myogenesis, muscle atrophy, muscle fiber, C2C12

received January 27, 2022

accepted after revision July 4, 2022

published online December 5, 2022

Bibliography

Planta Med 2023; 89: 484–492

DOI 10.1055/a-1891-3366

ISSN 0032-0943

© 2022. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14, 70469 Stuttgart, Germany

Correspondence

Prof. Jae-Ha Ryu

초록

ABSTRACT

To find inhibitors against skeletal muscle loss, we isolated a lignan compound ((−)-(2*R*,3*R*-1,4-O-diferuloylsecoisolarciresinol, DFS) from the stem of *Alnus japonica*. C2C12 myoblasts were treated with DFS during differentiation. To induce an *in vitro* atrophic condition, differentiated myotubes were treated with dexamethasone (a synthetic glucocorticoid). DFS (10 nM) increased expression levels of myogenic factors and the number of multi-nucleated myotubes expressing myosin heavy chain (MHC). The myogenic potential of DFS could be attributed to p38 MAPK activation. DFS also protected against dexamethasone-induced damage, showing increased expression of MHC and mammalian target of rapamycin (mTOR), a major anabolic factor. Under atrophic condition, the anti-myopathy effect of DFS was associated with inactivation of NF-κB signaling pathway and the subsequent suppression of muscle degradative E3 ligases and myostatin. DFS treatment also restored fast muscle fiber (type IIa, IIb, and IIx), known to be susceptible to dexamethasone. These results indicate that DFS isolated from *A. japonica* can stimulate myogenesis via p38 MAPK activation and alleviate muscle atrophy by modulating the expression of genes associated with muscle protein anabolism/catabolism. Thus, we propose that DFS can be used as a pharmacological and nutraceutical agent for increasing muscle strength or protecting muscle loss.

Downloaded by: Sookmyoung Womens University. Copyrighted material.

Introduction

In elderly people, several diseases such as arthritis, neuralgia, sciatica, osteoporosis, and fatigue can decrease quality of life. Especially, fatigue is a typical marker of decreased physical strength and mobility of older people. As life expectancy increases, sarcopenia – defined as age-related loss of skeletal muscle mass and strength – has been recognized as a clinical disease by International Classification of Disease, 10th revision, Clinical Modification code (M62.84) [1]. Recently, there is a social demand for the development of medicines or functional foods to improve muscle strength [2].

To overcome muscle loss, muscle can be regenerated through the processes of satellite cell activation and myogenesis [3]. Quiescent satellite cells located beneath the basal lamina can be activated by physical injury or growth stimuli to regenerate muscles [3]. Activated muscle satellite cells can proliferate. Proliferating satellite cells (myoblasts) can then express various myogenic factors to initiate myoblast differentiation (myogenesis). Differentiated myoblasts (i.e., myotubes) then fuse together to form muscle bundles. Therefore, activators of quiescent satellite cells have attracted attention as candidates for developing muscle strengthening drugs or supplements [4].

Skeletal muscle is composed of various muscle fibers that determine metabolic characteristics and plasticity of muscles [5]. According to their myosin adenosine triphosphatase histochemistry, myosin heavy chain isoforms, and histochemistry for enzymes in energy metabolism, muscle fibers can be classified into type I and type II based on the presence of specific myosin heavy chain (MHC). Each has specific contraction characteristics and energy

▶ **Table 1** Oligonucleotide primer sequences used for the RT-PCR analysis

Gene Name	Forward Primer	Reverse Primer
MHC I	CCAAGGGCCTGAATGAGGAG	GCAAAGGCTCCAGGTCTGAG
MHC IIa	AAGCGAAGAGTAAGGCTGTC	TGATTGCTTGCAAAGGAAC
MHC IIb	CCGAGCAAGAGCTACTGGA	TGTTGATGAGGCTGGTGTTC
MHC IIx	AGGCCAGGGTCCGTGAA	CCACGTTGCGCTTCTGTTC
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

사사표기

munofluorescence staining for MHC (red) and nuclei (blue) were captured using a fluorescence microscope (Olympus).

Western blot analysis

To evaluate expression levels of myogenic and myopathy markers, cells were lysed with cell lysis buffer. Prepared cell lysates were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred into polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Transferred protein blots were incubated with primary antibodies against myosin heavy chain (MHC) (1:1000), MyoD (1:1000), myogenin (1:1000), myostatin (1:1000), MAFbx (1:1000), MuRF1 (1:1000) (all Santa Cruz Biotechnology), p38 MAPK (1:1000), phospho-p38 MAPK (1:1000), mTOR (1:1000), phospho-mTOR (1:1000), NF-κB (1:1000), phospho-NF-κB (1:1000) (all Cell Signaling Technology), and pan-cadherin (1:2000) (Sigma-Aldrich). Protein levels were quantified using a Fusion Solo system (Vilber Lourmat).

RNA extraction and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Differentiated myotubes were lysed with TriZol reagent (Molecular Research Center) to purify total RNA, which was then used for cDNA synthesis with a Labopass cDNA synthesis kit (Cosmogenetech). The cDNA was then used to evaluate mRNA levels of each muscle fiber type by RT-PCR using LaboPass IP-Taq DNA Polymerase (Cosmogenetech). Primers used for PCR amplifications are listed in ▶ **Table 1**.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. Differences between values of group were assessed using Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Dunnett's test with statistical package for social sciences (SPSS) software version 25. The criterion of significance was set at $p < 0.05$.

Contributors' Statement

Conception and design of the work: H. Lee, J. H. Ryu; data collection: H. Lee, J. H. Jeong, H. S. Hwang; analysis and interpretation of the data: H. Lee, J. H. Jeong, H. S. Hwang, S. H. Yeon; drafting the manuscript: H. Lee, J. H. Ryu; critical revision of the manuscript: H. Lee, J. H. Ryu.

Acknowledgements

This research was supported by Korean Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through High Value-added Food Technology Development Program funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (IPET-121016031580l0), and the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (NRF-2021R1I1A1A01052160).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

[1] Cao L, Morley JE. Sarcopenia is recognized as an independent condition by an international classification of disease, tenth revision, clinical modification (ICD-10-CM) code. J Am Med Dir Assoc 2016; 17: 675e7

[2] Robinson S, Granic A, Sayer AA. Nutrition and muscle strength, as the key component of sarcopenia: An overview of current evidence. Nutrients 2019; 12: 2942–2959

[3] Wang YX, Rudnicki MA. Satellite cells, the engines of muscle repair. Nature reviews. Mol Cell Biol 2012; 13: 127–133

[4] Motohashi N, Shimizu-Motohashi Y, Roberts TC, Aoki Y. Potential therapies using myogenic stem cells combined with bio-engineering approaches for treatment of muscular dystrophies. Cells 2019; 8: 1066–1084

[5] Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. Phys Ther 2001; 81: 1810–1816

[6] Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. Int J Biochem Cell Biol 2013; 45: 2191–2199

[7] Chen X, Liang D, Huang Z, Jia G, Zhao H, Liu G. Quercetin regulates skeletal muscle fiber type switching via adiponectin signaling. Food Funct 2021; 12: 2693–2702

[8] Wu L, Ran L, Lang H, Zhou M, Yu L, Yi L, Zhu J, Liu L, Mi M. Myricetin improves endurance capacity by inducing muscle fiber type conversion via miR-499. Nutr Metab (Lond) 2019; 16: 27–39

[9] Wen W, Chen X, Huang Z, Chen D, Chen H, Luo Y, He J, Zheng P, Yu J, Yu B. Resveratrol regulates muscle fiber type conversion via miR-3p and AMPK/SIRT1/PGC-1α pathway. J Nutr Biochem 202; 77: 108297–108308

[10] Xue Y, Huang Z, Chen X, Jia G, Zhao H, Liu G. Naringin induces skeletal muscle fiber type transformation via AMPK/PGC-1α signaling pathway in mice and C2C12 myotubes. Nutr Res 2021; 92: 99–108

[11] McCarthy JJ, Esser KA. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2010; 13: 230–235

Downloaded by: Sookmyoung Womens University. Copyrighted material.

2) 논문명; Extract of *Alnus japonica* prevents dexamethasone-induced muscle atrophy in mice (*J. Func. Foods* **2023**. 101:DOI:doi.org/10.1013 / j.jff.2023.105419)

Journal of Functional Foods 101 (2023) 105419

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Extract of *Alnus japonica* prevents dexamethasone-induced muscle atrophy in mice

Hyejin Lee[a], Kyeong Seon Lee[a], Ji Hye Jeong[a], Ji Soo Yoon[b], Seung Hwan Hwang[b], Sang-Yoon Kim[b], Sung Hum Yeon[b], Jae-Ha Ryu[a,*]

저자

[a] Research Institute of Pharmaceutical Sciences and College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Republic of Korea
[b] R&D Center, Huons Co., Ltd., 55 Hanyangdaehak-ro, Ansan 15588, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:
Alnus japonica
Oregonin
Sarcopenia
Dexamethasone
Muscle atrophy
C2C12

초록

ABSTRACT

As part of our effort to search for food ingredients with ability to inhibit muscle wasting, we found that extract of *Alnus japonica* (AJE) and its main constituent, oregonin, could prevent muscle atrophy from *in vitro* and *in vivo* studies. Oregonin rich extract of AJ improved muscle strengths of dexamethasone-induced atrophied mice as evidenced by decreased expression of muscle protein-degradative factors and increased muscle mass. In C2C12 myoblasts, oregonin stimulated myogenesis, showing increased expression of MHC and myogenin via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. In differentiated myotubes, AJE and oregonin protected against dexamethasone-induced loss of myotubes by suppressing expressions of MAFbx and MuRF1, while increasing MHC expression and mTOR phosphorylation. These dual effects of oregonin might have contributed to its ability to protect against loss of myotubes. Taken together, our results suggest that AJE has a favorable alleviating effect on sarcopenia via regulation of muscle protein synthesis and degradation.

1. Introduction

Sarcopenia is defined as age-related progressive loss of muscle mass, strength, and function. Recently, the percentage of seniors aged over 65 is expected to reach 16% by 2050 worldwide (Wu et al., 2022). In elderly populations, various musculoskeletal diseases such as arthritis, neuralgia, back pain, sciatica, and osteoporosis occur due to age-related degeneration of the skeletal muscle system. It is known that muscle degeneration is associated with cancer, diabetes, and osteoporosis. Given the increase in life expectancy, increase in age-related muscle atrophy is expected to increase social and economic costs (Dao et al., 2020). Sarcopenia was recognized as a clinical disease in 2016 by International Classification of Disease. However, it has no approved therapeutic drug yet. Therefore, there is an increasing social demand for developing preventive and therapeutic agents for age-related muscle wasting.

Under the current situation of no approved drug for sarcopenia, to protect and alleviate muscle-atrophy, exercise and nutritional supplementation have been considered (Lo, 2020). Considering the proven stability and reliability of medicinal plants, plant extracts and/or natural compounds might be feasible alternatives for treating sarcopenia as functional foods.

Alnus japonica (Betulaceae) (AJ) has been used to treat expectorant, asthma, hepatitis, and rheumatism in Asian countries (Ren et al., 2017; Sati, Sati, & Sati, 2011). In Korea, various drinks based on AJ extract have been used as hangover relievers. We have previously reported that diarylheptanoids and lignan are anti-cancer and anti-obesity components of AJ (Dong et al., 2017a, 2017b; Lee, Jeong, & Ryu, 2020; Shim et al., 2022). Recently, we have reported that a lignan from the stem of AJ can improve dexamethasone-induced myotube loss in an *in vitro* study (Lee, Jeong, Hwang, Yeon, & Ryu, 2022). AJ contains diverse compounds such as diarylheptanoids, triterpenoids, and flavonoids known to possess anti-cancer, anti-bacterial, anti-viral, anti-inflammatory, and hepatoprotective activities (Ren et al., 2017; Sati et al., 2011). We have identified oregonin as a major component of AJ bark that can alleviate age-associated muscle atrophic conditions. Oregonin as a well-known diarylheptanoid has been reported to have anti-inflammatory, anti-obesity, and anti-oxidative activities both *in vitro* and *in vivo* (Abadjieva et al., 2020). It is also reported to be a modulator of the DNA methylation process and sperm quality of rams (Abadjieva et al., 2020). Thus, the objective of this study was to evaluate the anti-myopathy activity of AJ extract (AJE) in an animal model and disclose the action

* Corresponding author at: 52 Hyochangwongil, Yongsan-gu, Seoul 140–742, Republic of Korea.
(J.-H. Ryu).

https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105419
Received 23 November 2022; Received in revised form 6 January 2023; Accepted 17 January 2023
Available online 23 January 2023
1756-4646/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

expression as compared to dexamethasone control (Fig. 5B).

These results imply that oregonin can protect against dexamethasone-induced myotube atrophy by exhibiting dual roles in catabolism and anabolism of muscles.

4. Discussion

Sarcopenia, a muscle atrophy caused by normal aging, is characterized by degenerative loss of muscle mass, quality, and strength. Patients with sarcopenia are at increased risk of falls, fractures, and physical disabilities known to be associated with an impaired quality of life. In 2016, sarcopenia was assigned a code M62.84 in the International Classification of Disease (Dao et al., 2020). Despite many efforts, no drug was approved for the treatment for sarcopenia. To prevent sarcopenia development, nutritional supplements focusing on the amount and quality of protein intake have been used. However, several side effects associated with protein overconsumption have been reported (Delimaris, 2013). In recent nutraceutical treatment against sarcopenia, natural compounds are considered to be effective strategy as they are safer, cheaper, and less toxic. Wang *et al.* have reported that supplementation with dietary nutrients can protect aging-induced skeletal muscle atrophy in several *in vitro* and *in vivo* studies (Wang et al., 2021). We have previously reported that a lignan from *Alnus japonica* (AJ) can protect against muscle loss *in vitro* (Lee et al., 2022). In this study, we further investigated anti-myopathy activities of extract of AJ (AJE) and oregonin, the main component of AJ, in *in vivo* and *in vitro* experimental models.

Oregonin rich AJE was administered to mice at a dose of 200 or 400 mg/kg for 28 days. We used oxymetholone (17α-alkylated anabolic–androgenic steroid), a positive control known to improve muscle mass and strength (Pavlatos, Fultz, Monberg, & Vootkur, 2001). In the present study, AJE improved muscle strength in grip and rota-rod tests and increased muscle mass in dexamethasone-damaged mice.

Creatinine is generated from a non-enzymatic conversion of creatine and creatine phosphate with roles in muscular energy metabolism. High level of creatinine in serum has been considered an indirect marker of muscle damage (Jordan et al., 2021; Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). Lactate production in muscle provides energy source to continued exercise (Brooks, 2020; Flis et al., 2022). As atrophied skeletal muscle maintains lower energy state, dexamethasone-administered mice show decreased lactate levels (Baker, McCormick, & Robergs, 2010; Shirai, Uemichi, Hidaka, Kitaoka, & Takemasa, 2021). AJE administration effectively decreased creatinine and increased lactate levels in serum samples, suggesting that AJE could improve muscle function in damaged conditions.

Results of the present study showed that AJE might prevent muscle atrophy by inhibiting the catabolic pathway in skeletal muscles by down-regulating myostatin and FOXO3a signaling pathways, thereby suppressing muscle-specific E3 ligases (Sandri et al., 2004; Schiaffino, Dyar, Ciciliot, Blaauw, & Sandri, 2013).

Mouse myoblasts C2C12 cell line is regarded as a quiescent muscle satellite cell that can proliferate and differentiate to form myotubes (myogenesis) followed by muscle regeneration (Zheng, Hemker, Xie, Soukup, & Diel, 2018). Therefore, activators of myoblasts differentiation have attracted attention as candidates for developing muscle strengthening supplements or drugs. As shown in Figs. 3 and 4, AJE and oregonin stimulated myogenesis, increasing expression levels of myogenic factors and MHC-expressing multinucleated myotubes *in vitro*.

The p38 MAPK has been reported to play a critical role in regulating transcription of myogenic regulatory factors at the early stage of myogenesis to promote the formation of multinucleated myotubes (Brennan, Emerson, Owens, & Christoforou, 2021). As shown in Fig. 4C and 4D, activation of p38 MAPK pathway was required for the action of oregonin.

Dexamethasone-damaged myotubes has been considered to be a cellular model to mimic pathophysiology of sarcopenia (Mankhong et al., 2020). Under muscle atrophic conditions, activation of NF-κB pathway can induce subsequent expression of muscle specific E3 ligases (MuRF1 and MAFbx) to degrade muscle proteins (Cai et al., 2004). The expression of muscle E3 ligases could also be induced by FOXO3a activation in muscle atrophy environment (Sandri et al., 2004). In our study, differentiated myotubes were treated with dexamethasone to examine protective roles of AJE and oregonin. As shown in Fig. 3B and 5, dexamethasone induced MHC degradation, whereas pre-treatment with AJE and oregonin treatment protected against MHC loss. Dexamethasone increased expression levels of E3 ligases following activation of NF-κB and FOXO3a pathways (Cai et al., 2004; Kang et al., 2017). However, oregonin inhibited the expression of these catabolic factors, resulting in suppression of MHC degradation.

Contrary to catabolic mechanism, anabolic mechanism was inhibited by dexamethasone in myotubes. The anabolic mTOR pathway is a key mechanism not only in muscle protein synthesis, but also in cell survival during myogenesis (Lee et al., 2022). Dexamethasone is known to decrease the level of phospho-mTOR. However, pre-treatment with oregonin could protect against dexamethasone-induced mTOR inactivation, contributing to MHC expression (Fig. 5B).

Accordingly, our results suggest that oregonin is a representative compound of AJE responsible for attenuating dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. Oregonin has various pharmacological effects, including anti-adipogenic, anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer activities (Abadjieva et al., 2020; Ren et al., 2017). These beneficial activities of oregonin may additionally contribute to its ability to protect muscle atrophy.

In conclusion, oregonin rich extract of *Alnus japonica* can be developed as a functional food to prevent and alleviate sarcopenia.

Ethics statement

All experimental procedures, which included minimizing the number of animals and their suffering, were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (approval number: CE21281-1).

CRediT authorship contribution statement

Hyejin Lee: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Kyeong Seon Lee:** Investigation. **Ji Hye Jeong:** Investigation. **Ji Soo Yoon:** Investigation, Validation. **Seung Hwan Hwang:** Investigation, Methodology. **Sang Yoon Kim:** Investigation, Methodology. **Sung Hum Yeon:** Writing – review & editing. **Jae-Ha Ryu:** Writing – review & editing, Funding acquisition, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

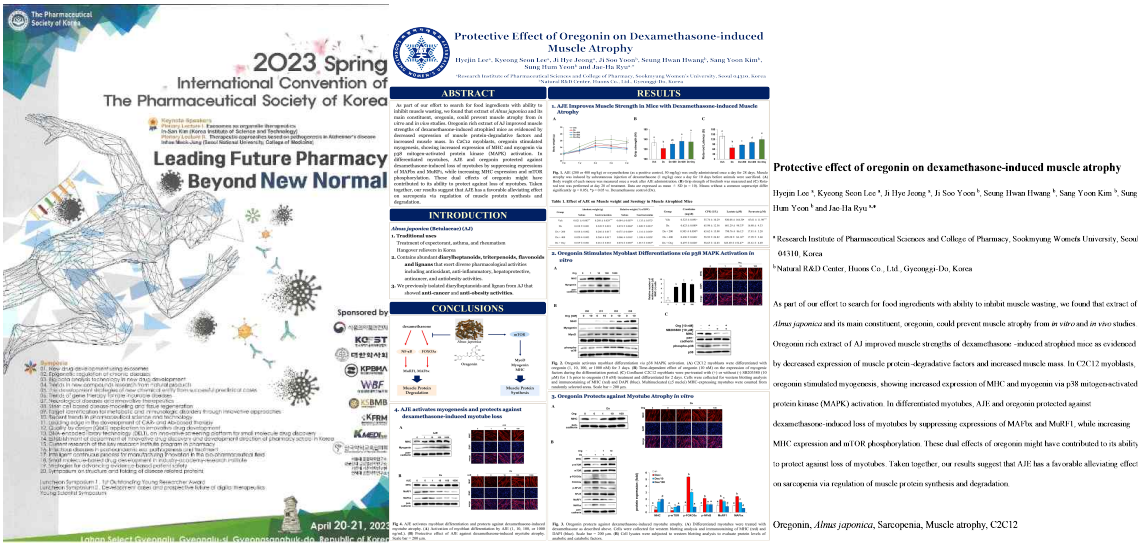
사사표기

Acknowledgements

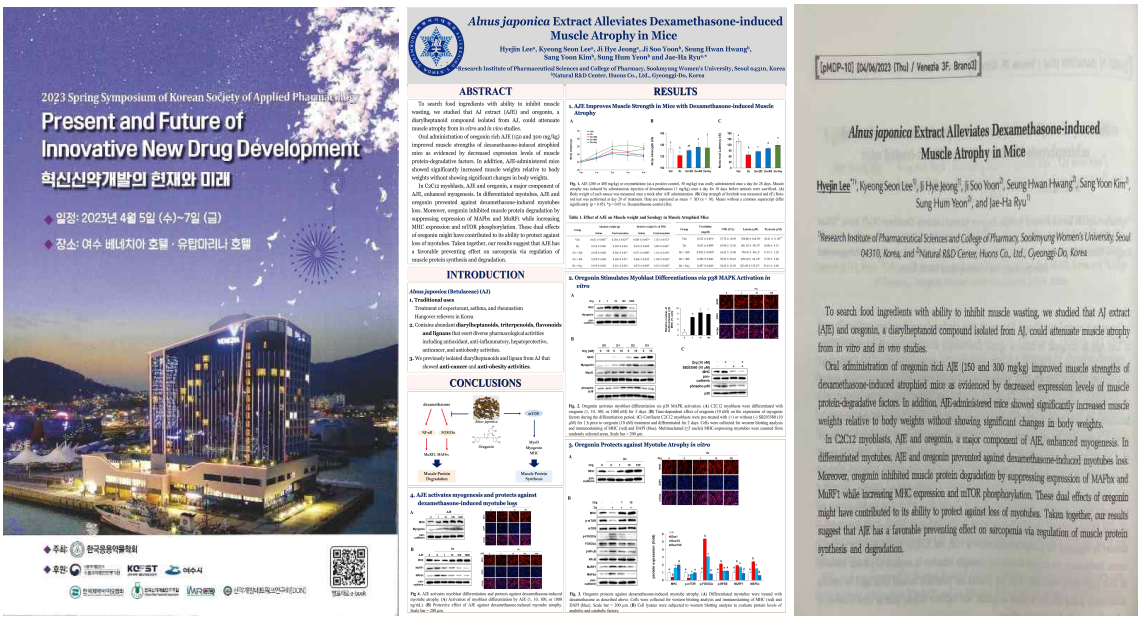
This research was supported by Korean Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through High Value-added Food Technology Development Program funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (IP-ET-121016031SB010), and the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (NRF-2021R1I1A1A01052160).

2. 국내 및 국제 학술회의 발표

1) 2023년 춘계 대한 약학회; Protective effect of Oregonin on Dexamethasone -induced Muscle Atrophy



2) 2023년 춘계 한국응용약물학회; Alnus japonica Extract Alleviates Dexameth -asone induced Muscle Atrophy in Mice



3) 2022년 IUBMB; A lignan from *Alnus japonica* activates myogenesis and alleviates dexamethasone-incued myotube atrophy

IUBMB FEBS PABMB 2022 9-14 JULY LISBON, PORTUGAL

2022.6.7

THE BIOCHEMISTRY GLOBAL SUMMIT LISBON

Dear JAE-HA RYU

Abstract ID: 46783

Title: A lignan from Alnus japonica activates myogenesis and alleviates dexamethasone-indu myotube atrophy

Topic: Ageing

Thank you for submitting a late-breaking abstract to the to the IUBMB–FEBS–PABMB Congress be held 9-14 July, 2022 in Lisbon.

On behalf of the Congress Organizing Committee, we are pleased to inform you that your abs has been accepted for a POSTER PRESENTATION.

Posters will be hung for the whole event. Presenting authors should be Attended poster sessions the different abstract topics are listed on the Congress website at https://2022congress.febs-iub pabmb.org/poster-guidelines; please be available at your poster at this time to discuss your work interested delegates. You will also find guidelines for the preparation of your poster on this webpa

We look forward to welcoming you to Lisbon!

Kind regards,

Alive Travel (Congress Secretariat), on behalf of the IUBMB–FEBS–PABMB Congress Organi Committee

IUBMB FEBS PABMB 2022 9-14 JULY LISBON, PORTUGAL

THE BIOCHEMISTRY GLOBAL SUMMIT LISBON

REGISTER / LOG IN

THE BIOCHEMISTRY GLOBAL SUMMIT

A lignan from Alnus japonica activates myogenesis and alleviates dexamethasone-induced myotube atrophy

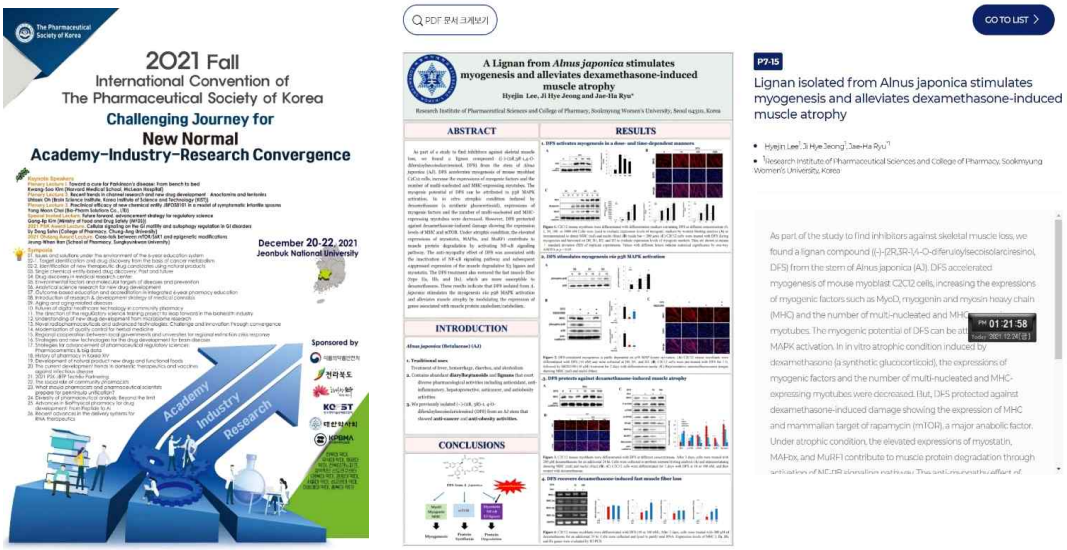
LB-01.5-02

J. RYU[1], H. Lee[1], J.H. Jeong[1]

[1]Sookmyung Women's University, Seoul, South Korea

As life expectancy increased, sarcopenia, age-related loss in skeletal muscle mass and strength, was recognized as a clinical disease To find inhibitors against skeletal muscle loss, we isolated a lignan compound ((+)-(2R,3R-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol, DFS) from the stem of Alnus japonica. C2C12 myoblasts were treated with DFS during differentiation period. To induce the in vitro atrophic condition, fully differentiated myotubes were treated with dexamethasone (a synthetic glucocorticoid). DFS (10 nM) increased expression levels of myogenic factors, and increased the number of multi-nucleated and myosin heavy chain (MHC)-expressing myotubes. The myogenic potential of DFS could be attributed to p38 MAPK activation. DFS also protected against dexamethasone-induced damage showing increased expression of MHC and mammalian target of rapamycin (mTOR), a major anabolic factor. Under atrophic condition, the anti-myopathy effect of DFS was associated with inactivation of NF-κB signaling pathway and the subsequent suppression of muscle degradative E3 ligases and myostatin. The DFS treatment also restored the fast muscle fiber (type IIa, IIb, and IIx), which are more susceptible to dexamethasone. These results indicate that DFS isolated from A. japonica can stimulate myogenesis via p38 MAPK activation and alleviate muscle atrophy by modulating the expression of genes associated with muscle protein anabolism/catabolism. Thus, we propose that DFS can be used as a pharmacological and nutraceutical agent for the treatment of age-related muscle loss (sarcopenia).

4) 2021년 추계 대한 약학회; Lignan isolated from *Alnus japonica* stimulates myogenesis and alleviates dexamethasone-incued myotube atrophy



The Pharmaceutical Society of Korea

2021 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea

Challenging Journey for New Normal Academy-Industry-Research Convergence

December 20-22, 2021 Jeonbuk National University

Sponsored by

Academy Industry Research

PDF 문서 크게보기

A Lignan from *Alnus japonica* stimulates myogenesis and alleviates dexamethasone-induced muscle atrophy

Hyejin Lee, Ji Hye Jeong, Jae-Ha Ryu*

Research Institute of Pharmaceutical Sciences and College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea

ABSTRACT

RESULTS

INTRODUCTION

CONCLUSIONS

GO TO LIST

P7-15

Lignan isolated from Alnus japonica stimulates myogenesis and alleviates dexamethasone-induced muscle atrophy

Hyejin Lee[1], Ji Hye Jeong[1], Jae-Ha Ryu[1]*

[1]Research Institute of Pharmaceutical Sciences and College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Korea

As part of the study to find inhibitors against skeletal muscle loss, we found a lignan compound ((-)-(2R,3R-1,4-O-diferuloylsecoisolariciresinol, DFS) from the stem of Alnus japonica (AJ). DFS accelerated myogenesis of mouse myoblast C2C12 cells, increasing the expressions of myogenic factors such as MyoD, myogenin and myosin heavy chain (MHC) and the number of multi-nucleated and MHC myotubes. The myogenic potential of DFS can be at MAPK activation. In in vitro atrophic condition induced by dexamethasone (a synthetic glucocorticoid), the expressions of myogenic factors and the number of multi-nucleated and MHC-expressing myotubes were decreased. But, DFS protected against dexamethasone-induced damage showing the expression of MHC and mammalian target of rapamycin (mTOR), a major anabolic factor. Under atrophic condition, the elevated expressions of myostatin, MAFbx, and MuRF1 contribute to muscle protein degradation through

3. 기술적 성과-지식재산권

1) 오리나무 추출물을 함유하는 골격근 근육관련질환의 예방 및 치료용 조성물 (특허등록)

공개특허 10-2022-0020477

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0020477
(43) 공개일자 2022년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/12 (2006.01) *A61K 31/216* (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0100747
(22) 출원일자 2020년08월11일
심사청구일자 2020년08월11일

(71) 출원인
숙명여자대학교산학협력단

(72) 발명자
류제하
이혜진
최성희

(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **오리나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

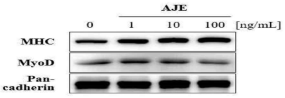
본 발명은 오리나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 오리나무 추출물/화합물 시료를 대상으로 오리나무 추출물 및 화합물들을 대상으로 (1) 근원세포 분화(myoblast differentiation) 에 미치는 영향실험 (실험예 1, 3 및 4)을 통하

(뒷면에 계속)

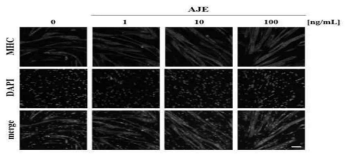
대 표 도 - 도1

본 발명의 오리나무 추출물이 근원 세포 분화에 미치는 영향

도 1A



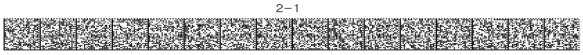
도 1B



보정서

【보정구분】 출원서 등 보정
【제출처】 특허청장
【제출인】
【명칭】 숙명여자대학교산학협력단
【특허고객번호】 2-2005-009297-7
【대리인】
【성명】 신동인
【대리인번호】 9-2000-000156-1
【사건의 표시】
【출원번호】 10-2020-0100747
【제출원인이 된 서류의 접수번호】 1-1-2020-0844932-73
【보정할 서류】 특허출원서
【보정할 사항】
【보정대상항목】 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
【보정방법】 정정
【보정내용】
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1545025145
【과제번호】 121016-03-1-SB010
【부처명】 농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원
【연구사업명】 고부가가치식품기술개발
【연구과제명】 근력개선 기능성소재 발굴 및 대량생산기술 개발
【기여율】 1/1

2-1



특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-2424758 호
Patent Number

출원번호 제 10-2020-0100747 호
Application Number
출원일 2020년 08월 11일
Filing Date
등록일 2022년 07월 20일
Registration Date

발명의명칭 Title of the Invention
오리나무 추출물을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물

특허권자 Patentee
숙명여자대학교산학협력단(274371-*******)
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2022년 07월 20일

특허청
Korean Intellectual Property Office

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
이 인 실

2) 오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 1을 함유하는 골격근 근육관련질환의 예방 및 치료용 조성물 (특허등록)

공개특허 10-2022-0061070

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0061070
(43) 공개일자 2022년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/216 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0051499(분할)
(22) 출원일자 2022년04월26일
심사청구일자 2022년04월26일
(62) 원출원 특허 10-2020-0100747
원출원일자 2020년08월11일
심사청구일자 2020년08월11일

(71) 출원인
숙명여자대학교산학협력단

(72) 발명자
류재하

이혜진

최성희

(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 1을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

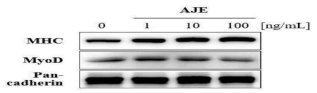
본 발명은 오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 1을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 오리나무 추출물/화합물 시료를 대상으로 오리나무 추출물 및 화합물들을 대상으로 (1) 근원세포 분화(myoblast differentiation) 에 미치는 영향실험 (실험예 1, 3 및 4)을 통하여 시료 처치에 의하

(첫면에 계속)

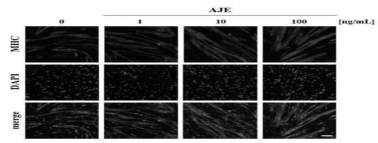
대 표 도 - 도1

본 발명의 오리나무 추출물이 근원 세포 분화에 미치는 영향

도 1A



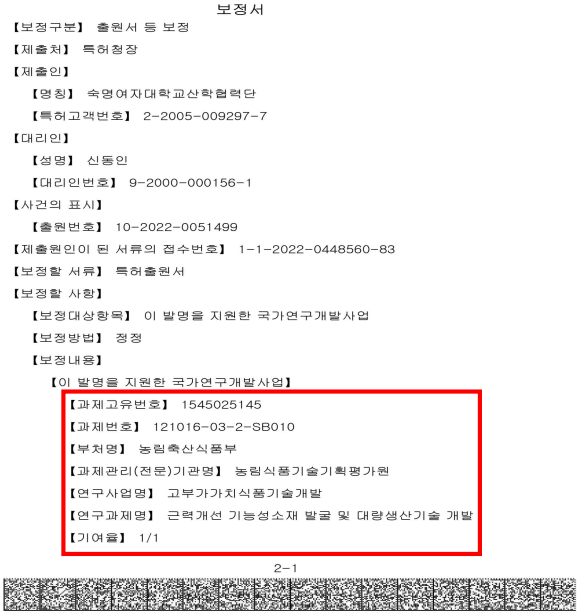
도 1B



보정서

【보정구분】 출원서 등 보정
【제출처】 특허청장
【제출인】
【명칭】 숙명여자대학교산학협력단
【특허고객번호】 2-2005-009297-7
【대리인】
【성명】 신동인
【대리인번호】 9-2000-000156-1
【사건의 표시】
【출원번호】 10-2022-0051499
【제출원인이 된 서류의 접수번호】 1-1-2022-0448560-83
【보정할 서류】 특허출원서
【보정할 사항】
【보정대상항목】 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
【보정방법】 정정
【보정내용】
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1545025145
【과제번호】 121016-03-2-SB010
【부처명】 농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원
【연구사업명】 고부가가치식품기술개발
【연구과제명】 근력개선 기능성소재 발굴 및 대량생산기술 개발
【기여율】 1/1

2-1



특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 Patent Number 제 10-2410619 호
출원번호 Application Number 제 10-2022-0051499 호
출원일 Filing Date 2022년 04월 26일
등록일 Registration Date 2022년 06월 14일

발명의명칭 Title of the Invention
오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 1을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물

특허권자 Patentee
숙명여자대학교산학협력단(274371-*******)
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2022년 06월 14일

특허청
Korean Intellectual Property Office

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
이 인 실

3) 오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 2를 함유하는 골격근 근육관련질환의 예방 및 치료용 조성물(특허등록)

공개특허 10-2022-0101588

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101588
(43) 공개일자 2022년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/12 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0083246(분할)
(22) 출원일자 2022년07월06일
심사청구일자 2022년07월06일
(62) 원출원 특허 10-2020-0100747
원출원일자 2020년08월11일
심사청구일자 2020년08월11일

(71) 출원인
숙명여자대학교산학협력단
(72) 발명자
류재하
이혜진
최성희
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 2를 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물**

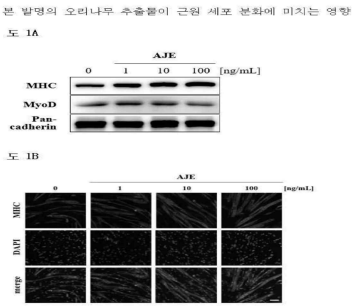
(57) 요 약

오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 2를 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물에 대한 것이다.

본 발명의 오리나무 추출물/화합물 시료를 대상으로 오리나무 추출물 및 화합물들을 대상으로 (1) 근원세포 분화

(첫면에 계속)

대 표 도 - 도1



보정서

【보정구분】 출원서 등 보정
【제출처】 특허청장
【제출인】
【명칭】 숙명여자대학교산학협력단
【특허고객번호】 2-2005-009297-7
【대리인】
【성명】 신동인
【대리인번호】 9-2000-000156-1
【사건의 표시】
【출원번호】 10-2022-0083246
【제출원인이 된 서류의 접수번호】 1-1-2022-0705718-17
【보정할 서류】 특허출원서
【보정할 사항】
【보정대상항목】 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
【보정방법】 정정
【보정내용】
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1545025145
【과제번호】 121016-03-2-SB010
【부처명】 농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원
【연구사업명】 고부가가치식품기술개발
【연구과제명】 근력개선 기능성소재 발굴 및 대량생산기술 개발
【기여율】 1/1

2-1

4) 오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 3-5를 함유하는 골격근 근육관련질환의 예방 및 치료용 조성물 (특허등록)

공개특허 10-2022-0102600

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0102600
(43) 공개일자 2022년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/12 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0083247(분할)
(22) 출원일자 2022년07월06일
심사청구일자 2022년07월06일
(62) 원출원 특허 10-2020-0100747
원출원일자 2020년08월11일
심사청구일자 2020년08월11일

(71) 출원인
숙명여자대학교산학협력단

(72) 발명자
류재하
이혜진
최성희

(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 3-5를 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물**

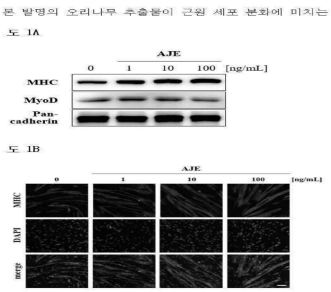
(57) 요 약

오리나무 추출물로부터 분리된 화합물 3-5를 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물에 대한 것이다.

본 발명의 오리나무 추출물/화합물 시료를 대상으로 오리나무 추출물 및 화합물들을 대상으로 (1) 근원세포 분화

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

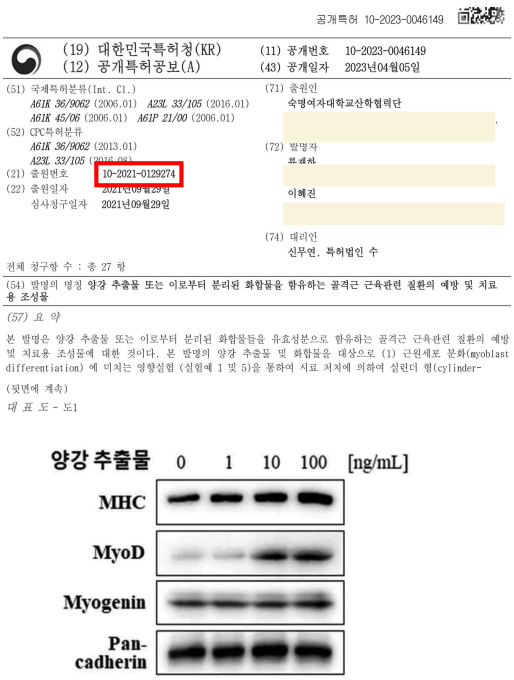


보정서

【보정구분】 출원서 등 보정
【제출처】 특허청장
【제출인】
【명칭】 숙명여자대학교산학협력단
【특허고객번호】 2-2005-009297-7
【대리인】
【성명】 신동인
【대리인번호】 9-2000-000156-1
【사건의 표시】
【출원번호】 10-2022-0083247
【제출원인이 된 서류의 접수번호】 1-1-2022-0705719-52
【보정할 서류】 특허출원서
【보정할 사항】
【보정대상항목】 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
【보정방법】 정정
【보정내용】
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1545025145
【과제번호】 121016-03-2-SB010
【부처명】 농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원
【연구사업명】 고부가가치식품기술개발
【연구과제명】 근력개선 기능성소재 발굴 및 대량생산기술 개발
【기여율】 1/1

2-1

5) 양강추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 골격근 근육관련질환의 예방 및 치료용 조성물 (특허출원)



공개특허 10-2023-0046149

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0046149
(43) 공개일자 2023년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/9062 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/9062 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0129274
(22) 출원일자 2021년09월29일
심사청구일자 2021년09월29일

(71) 출원인
숙명여자대학교산학협력단
(72) 발명자
[redacted]
이혜진
(74) 대리인
신무연, 특허법인 수

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **양강 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 양강 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물들을 유효성분으로 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 양강 추출물 및 화합물을 대상으로 (1) 근원세포 분화(myoblast differentiation) 에 미치는 영향실험 (실험예 1 및 5)을 통하여 시료 처치에 의하여 실린더 형(cylinder-

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

특허출원서

【출원구분】 특허출원
【출원인】
【명칭】 숙명여자대학교 산학협력단
【특허고객번호】 2-2005-009297-7
【대리인】
【성명】 신동인
【대리인번호】 9-2000-000156-1
【발명의 국문명칭】 양강 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물
【발명의 영문명칭】 A composition comprising an extract of Alpinia officinarum or the isolated compound therefrom for treating and preventing skeleton muscle-related disorder
【발명자】
【성명의 국문표기】 류재하
【성명의 영문표기】 Ryu, Jae-Ha
【발명자】
【성명의 국문표기】 이혜진

3-1

【주소】 서울특별시 노원구 중계로 233 청구3차아파트 105동 1307호
【출원언어】 국어
【심사청구】 청구
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1545022935
【과제번호】 121016031SB010
【부처명】 농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원
【연구사업명】 고부가가치식품기술개발(R&D)
【연구과제명】 근력개선 기능성소재 발굴 및 대량생산기술 개발
【기여율】 1/2
【과제수행기관명】 숙명여자대학교산학협력단
【연구기간】 2021.04.01 ~ 2021.12.31
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1345333090
【과제번호】 2021R1I1A1A01052160
【부처명】 교육부
【과제관리(전문)기관명】 한국연구재단
【연구사업명】 창의도전연구기반지원
【연구과제명】 근섬유 리모델링을 통한 근력 강화 및 근감소증 억제 천연 물질 발굴
【기여율】 1/2
【과제수행기관명】 숙명여자대학교
【연구기간】 2021.06.01 ~ 2024.05.31
위와 같이 특허청장에게 제출합니다.
대리인 신동인 (서명 또는 인)
【수수료】
【기본출원료】 0 면 46,000 원

3-2

6) 오리나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 골격근 근육관련질환의 예방 및 치료용조성물 및 이의 용도 (PCT출원)

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 2 월 17 일 (17.02.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/035115 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 36/185 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/010158

(22) 국제출원일: 2021 년 8 월 3 일 (03.08.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0100747 2020 년 8 월 11 일 (11.08.2020) KR

(71) 출원인: 숙명여자대학교 산학협력단 (SOOKMYUNG WOMEN'S UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 04310 서울시 용산구 청파로47길,100, Seoul (KR).

(72) 발명자: 류재하 (RYU, Jae-Ha); [redacted]. 이혜진 (LEE, Hye Jin); [redacted]
최성희 (CHOI, Sunghee) [redacted].

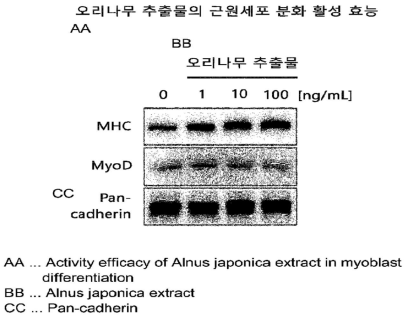
(74) 대리인: 신동인 (SHIN, Dong In): [redacted]

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

WO 2022/035115 A1

(54) **Title:** COMPOSITION FOR PREVENTION AND TREATMENT OF SKELETAL MUSCLE-RELATED DISEASES CONTAINING ALNUS JAPONICA EXTRACT OR COMPOUND ISOLATED THEREFROM AND USE THEREOF

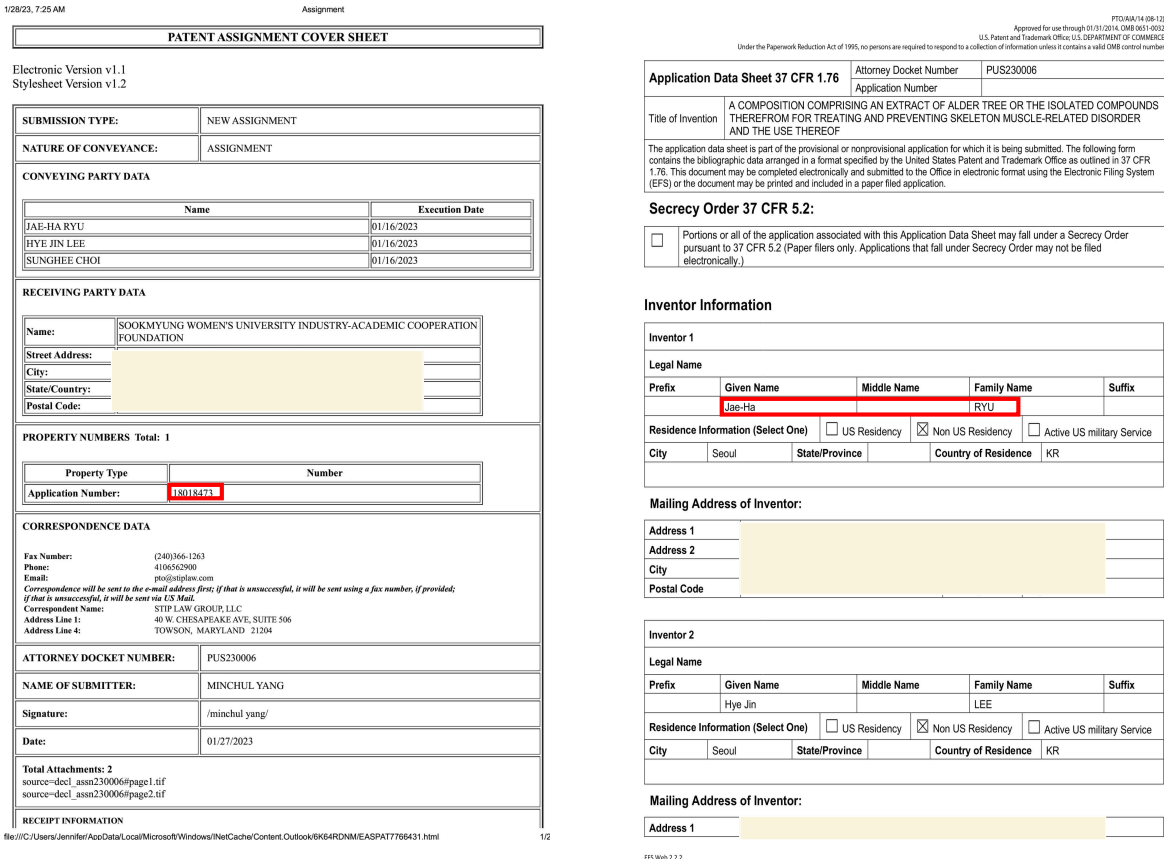
(54) **발명의 명칭:** 오리나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 골격근 근육관련 질환의 예방 및 치료용 조성물 및 이의 용도



AA ... Activity efficacy of Alnus japonica extract in myoblast differentiation
BB ... Alnus japonica extract
CC ... Pan-cadherin

(57) **Abstract:** The present invention relates to a composition for the prevention and treatment of skeletal muscle-related diseases, containing an Alnus japonica extract or a compound isolated therefrom as an active ingredient. With respect to Alnus japonica extract/compound samples of the present invention, it was confirmed that, through (1) experiments on the effects of Alnus japonica extracts and compounds on myoblast differentiation (experimental examples 1, 3, and 4), upon treatment with the samples, differentiation into cylinder-shaped multinucleated myotubes was induced in a concentration-dependent manner, and the number of multinucleated myotubes increased, and it was confirmed that, through: (2) experiments for mechanism research on the p38 MAPK signaling pathway

7) A composition comprising an extract of alder tree or the isolated compounds therefrom for treating and preventing muscle-related disorder and the use thereof (미국 특허출원)



1/28/23, 7:25 AM Assignment

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.2

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
JAE-HA RYU	01/16/2023
HYE JIN LEE	01/16/2023
SUNGHEE CHOI	01/16/2023

RECEIVING PARTY DATA

Name:	SOOKMYUNG WOMEN'S UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
Street Address:	
City:	
State/Country:	
Postal Code:	

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	18018473

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (240)366-1263
Phone: 4106562900
Email: pto@stiplaw.com
Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent using a fax number, if provided; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.
Correspondent Name: STIP LAW GROUP, LLC
Address Line 1: 40 W. CHESAPEAKE AVE, SUITE 506
Address Line 4: TOWSON, MARYLAND 21204

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PUS230006
NAME OF SUBMITTER:	MINCHUL YANG
Signature:	/minchul yang/
Date:	01/27/2023

Total Attachments: 2
source=decl_assn230006#page1.tif
source=decl_assn230006#page2.tif

RECEIPT INFORMATION

file:///C:/Users/Jennifer/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/Content.Outlook/6K64RDNM/EASPAT7766431.html 1/2

PTO/AIA/14 (08-12)
Approved for use through 01/31/2014. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number

Application Data Sheet 37 CFR 1.76	Attorney Docket Number	PUS230006
	Application Number	
Title of Invention	A COMPOSITION COMPRISING AN EXTRACT OF ALDER TREE OR THE ISOLATED COMPOUNDS THEREFROM FOR TREATING AND PREVENTING SKELETON MUSCLE-RELATED DISORDER AND THE USE THEREOF	

The application data sheet is part of the provisional or nonprovisional application for which it is being submitted. The following form contains the bibliographic data arranged in a format specified by the United States Patent and Trademark Office as outlined in 37 CFR 1.76. This document may be completed electronically and submitted to the Office in electronic format using the Electronic Filing System (EFS) or the document may be printed and included in a paper filed application.

Secrecy Order 37 CFR 5.2:

☐	Portions or all of the application associated with this Application Data Sheet may fall under a Secrecy Order pursuant to 37 CFR 5.2 (Paper filers only. Applications that fall under Secrecy Order may not be filed electronically.)

Inventor Information

Inventor 1				
Legal Name				
Prefix	**Given Name**	**Middle Name**	**Family Name**	**Suffix**
	Jae-Ha		RYU	

Residence Information (Select One)	☐ US Residency	☒ Non US Residency	☐ Active US military Service		
City	Seoul	**State/Province**		**Country of Residence**	KR

Mailing Address of Inventor:

Address 1	
Address 2	
City	
Postal Code	

Inventor 2				
Legal Name				
Prefix	**Given Name**	**Middle Name**	**Family Name**	**Suffix**
	Hye Jin		LEE	

Residence Information (Select One)	☐ US Residency	☒ Non US Residency	☐ Active US military Service		
City	Seoul	**State/Province**		**Country of Residence**	KR

Mailing Address of Inventor:

Address 1	

EFS Web 2.2.2

PTO/AIA/14 (08-12)
Approved for use through 01/31/2014. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number

Application Data Sheet 37 CFR 1.76	Attorney Docket Number	PUS230006
	Application Number	
Title of Invention	A COMPOSITION COMPRISING AN EXTRACT OF ALDER TREE OR THE ISOLATED COMPOUNDS THEREFROM FOR TREATING AND PREVENTING SKELETON MUSCLE-RELATED DISORDER AND THE USE THEREOF	

The application data sheet is part of the provisional or nonprovisional application for which it is being submitted. The following form contains the bibliographic data arranged in a format specified by the United States Patent and Trademark Office as outlined in 37 CFR 1.76. This document may be completed electronically and submitted to the Office in electronic format using the Electronic Filing System (EFS) or the document may be printed and included in a paper filed application.

Secrecy Order 37 CFR 5.2:

☐	Portions or all of the application associated with this Application Data Sheet may fall under a Secrecy Order pursuant to 37 CFR 5.2 (Paper filers only. Applications that fall under Secrecy Order may not be filed electronically.)

Inventor Information

Inventor 1				
Legal Name				
Prefix	**Given Name**	**Middle Name**	**Family Name**	**Suffix**
	Jae-Ha		RYU	

Residence Information (Select One)	☐ US Residency	☒ Non US Residency	☐ Active US military Service		
City	Seoul	**State/Province**		**Country of Residence**	KR

4. 고용창출

1) 김채진 ((주) 휴온스); 자격취득일 2022. 06. 27.

2) 정혜리 ((주) 휴온스); 자격취득일 2023. 01. 02.

사업장 가입자 명부

발급번호 : JGD03282023070329 Page : 1/1

※「건강보험 사업장 가입자명부」는 발급일 현재까지 가입 신고된 가입자 중 발급대상으로 요청한 가입자의 명부로 「공공기관의 정보공개에 관한 법률 제10조」에 의거 발급 관리 되고 있습니다.
※ 본「사업장 가입자명부」는 반드시 국민건강보험업무를 위해서만 사용하여야 하며 또한「사업장 가입자명부」는 개인정보이므로 외부로 유출되어 개인의 이익이 침해되는 경우 법적인 책임은 공단에 있지 않음을 알려드립니다.

사업장명	(주)휴온스	사업장관리번호 - 단위사업장기호
단위사업장명	NONE	86387002700 - 000

일련번호	가입자			자격취득일	자격상실일
	증번호	주민번호	성명		
1			김채진	2022.06.27	
2			정혜리	2023.01.02	

발급일 기준 사업장 가입자(상실자) 발급 건수 총 2 명

※ 주민등록번호중 일부는 개인정보보호를 위해 특수문자로 대체하였습니다.

2023.07.03

국민건강보험공단 이사장

5. 인력양성

1) 이경선 (숙명여자대학교, 2023년 석사학위 졸업 예정자)

문서확인번호 ▣ XD11-F3B6-326C-8B7D ▣ 제출처:농림식품기술기획평가원 용도:공공기관용

시점확인본 진본 2023/06/15 20:40 KST 한국무역정보통신

학위수여예정증명서

성 명 : 이경선

생 년 월 일 :

소 속 : 대학원 석사과정

학 과 (전 공) : 약학과 (제약학전공)

학위수여예정일 : 2023년 08월 25일

학 위 종 별 : 약학석사

학위 등록 번호 : ==========

위의 사실을 증명함.

2023년 6월 15일

숙 명 여 자 대 학 교 총 장

숙명여자대학교 총장인 제증명전용3

본 PDF증명서는 타임스탬프(시점확인도장)와 전자서명을 통해 원본 효력을 가지는 전자증명서로서, 출력물은 사본입니다.
www.webminwon.com에서 위변조 여부를 검증하시기 바랍니다.(유효기간은 발급일로부터 90일)(Adobe Acrobat Reader 권장)

6. 홍보실적

1) 2022년 한국식품영양과학회 ; Discovery of food ingredients for attenuating muscle atrophy

Program at a Glance

■ October 19, Wednesday

	Halla A	Halla B	Samda A	Samda B	301	302	303	401	402A	402B	3F Lobby
13:30-17:00	Registration (3F Lobby)										
14:30-15:30	**PL1.** Dr. Baraem Pam Ismail (Halla A)										Poster Session I & Exhibition
15:30-17:30	**IS I.** Prevention of Cancer	**Session 1** Smart-farm Technology	**Session 2** Sustainable Functional Food	**Session 3** Nutritional Safety Manage-ment Policy	**Special Senior Session**	**Division 1** Microbes & Fermented Foods	**Division 2** Affective/ Sensory Science	**Division 3** My Data-Driven Nutrition	**Division 4** Untact Nutrition Service	**Division 5** Green Materials & Packaging	
18:00-20:00	Board Meeting (5F Oceanview)										

■ October 20, Thursday

	Halla A	Halla B	Samda A	Samda B	301	302	303	401	402A	402B	3F Lobby
08:30-17:00	Registration (3F Lobby)										
09:00-09:30	Academic Award Lecture (Halla Hall)										Poster Session II & Exhibition
09:30-10:20	**PL2.** Dr. Mark J. Post (Halla Hall)										
10:30-11:20	**PL3.** Dr. GwangPyo Ko (Halla Hall)										
11:20-12:20	General Meeting (Halla Hall)										
12:20-13:45	Lunch										
13:45-15:45	**IS II.** Novel Biotech-nology	**Session 4** Hair Loss Treatment	**Session 5** Healthy Muscle	**Session 6** Functional Materials	**Session 7** Cancer & Nutrition	**Session 8** New Beauty & Nutrition Beauty	**Session 9** Red Ginseng	**Session 10** Omega-3	**Session 11** Individual-ized Func-tional Food Ingredients	**Session 12** Foods Reinspection Regulation	Poster Session III & Exhibition
15:45-16:00	Coffee Break										
16:00-18:00	**IS III.** Nutrition & Gut Microbiome	**Session 13** Probiotics	**Session 14** Kimchi Industry	**Session 15** Silver Care Project	**Session 16** Food for the Elderly	**Session 17** Alternative Food	**Session 18** Respiratory Health	**Session 19** Health Functional Ingredients	**Session 20** Agri-Food Upcycling	**Session 21** Regulatory Science Expert Training	

Session 15. Silver Care Project: Study of Functional Food Ingredients for Healthy Seniors

Sponsored by 휴온스

Chairperson: Jung-Mi Yun (Chonnam Natl Univ)

16:00~16:40 Establishment of a public probiotics bank and case studies for supporting industrialization: development of a obesity improvement probiotics
Doo-Sang Park (박두상, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)

16:40~17:20 Discovery of food ingredients for attenuating muscle atrophy
Jae-Ha Ryu (류재하, Sookmyung Women's University)

17:20~18:00 Sleep-promoting effect of fermented *Perilla frutescens* and underlying mechanism
Yi-Sook Jung (정이숙, Ajou University)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 질환·대상별 맞춤형 기능성 소재 발굴 및 대량생산기술개발과제 최종보고서이다.

2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.