

발간등록번호

11-1543000-002753-01

국내산 두류를 이용한 노화성 근감소증 개선 건강기능식품 개발 최종보고서

2019.04.05

주관연구기관 / (주)뉴트리

협동연구기관 / 연세대학교 산학협력단

농림축산식품부

국내산 두류를 이용한 노화성 근감소증 개선
건강기능식품 개발 R&D Report

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 두류를 이용한 노화성 근감소증 개선 건강기능식품 개발”(개발기간 : 2016. 07. 07. ~ 2018. 12. 31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 04. 05.

주관연구기관명 : (주)뉴트리

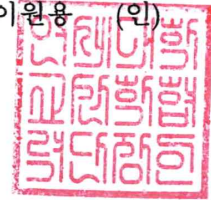
대표이사 김도언



협동연구기관명 : 연세대학교 산학협력단

대표자

이원용 (인)



주관연구책임자 : 김도언

협동연구책임자 : 황재관

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

| | | | | | |
|------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------|---|
| 과제고유번호 | 116202303 | 해 당 단 계 연 구 기 간 | 2016. 07. 07. ~ 2018. 12. 31. | 단 계 구 분 | 3차년도/2년 6개월 |
| 연구사업명 | 단 위 사 업 | 농식품기술개발사업 | | | |
| | 사 업 명 | 고부가가치식품기술개발사업 | | | |
| 연구과제명 | 대 과 제 명 | (해당 없음) | | | |
| | 세부 과제명 | 국내산 두류를 이용한 노화성 근감소증 개선 건강기능식품 개발 | | | |
| 연구책임자 | 김도언 | 해당단계 참여연구원 수 | 총: 16명 내부: 16명 외부: 명 | 해당단계 연구개발비 | 정부 : 190,000천원 민간 : 63,340천원 계 : 253,340천원 |
| | | 총 연구기간 참여연구원 수 | 총: 22명 내부: 22명 외부: 명 | 총 연구개발비 | 정부 : 500,000천원 민간 : 166,680천원 계 : 666,680천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | (주)뉴트리 연세대학교 산학협력단 | | | | |
| 국제공동연구 | - | | | | |
| 위탁연구 | - | | | | |

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

| | |
|--------------------------|--|
| 연구개발성과 의 보안등급 및 사유 | |
|--------------------------|--|

9대 성과 등록·기탁번호

| 구분 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구시설 ·장비 | 기술요약 정보 | 소프트 웨어 | 화합물 | 생명자원 | | 신품종 | |
|-------------|----|----|-----------|-------------|------------|-----------|-----|----------|----------|-----|----|
| | | | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | 정보 | 실물 |
| 등록·기탁 번호 | | | | | | | | | | | |

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

■ 연구의 목적 및 내용

- 목적 : 국내산 두류를 이용한 노화성 근감소증 개선 건강기능식품 개발
- 내용 :

- 1) 국내산 두류로부터 근기능 생리활성물질 및 펩타이드 소재 발굴
- 2) 국내산 두류의 근기능 생리활성물질 및 펩타이드 소재의 단계별 효능 규명
- 3) 국내산 두류 근기능 유용물질의 극대화 공정 및 산업화 적용기술 개발

■ 총 연구 개발 성과

- 1) 특허출원/등록 : 10/1건(PCT 출원 1건 포함)
- 2) 사업화 : 5건 (원료 : 1건, 건강기능식품 : 4건)
- 3) 학술발표 : 7건(국내 3건, 국제 4건)
- 4) 인력양성 : 7명(석사 7명), 고용창출 : 2명
- 5) 근기능 관련 인체적용시험 : 1건
- 6) 홍보전시 : 3건 (국내 1건, 해외 2건)
- 7) 기술이전 : 1건 (기술료 : 100,000천원)

보고서 면수
208

<요약문>

| | | | | | |
|------------------------------------|---|---------------------------|--------------|-------------------|-------------------------------|
| <p>연구의 목적 및 내용</p> | <ul style="list-style-type: none"> ■ 국내산 두류의 노화성 근감소증(sarcopenia) 개선 기능성 규명 및 근기능 강화 건강기능식품 개발 ■ 1차년도 : 국내산 두류로부터 근기능 생리활성물질과 펩타이드의 제조 공정 개발 및 근기능 생리활성물질의 <i>in vitro</i> 세포실험 검증 <ol style="list-style-type: none"> 1) 연구대상 국내산 두류 10종 수집 2) 추출 및 효소/아임계 공정을 이용 두류 생리활성물질 및 펩타이드 제조 3) 두류 생리활성물질과 펩타이드의 근기능 탐색 및 대표 두류 선정 4) 대표 두류의 세포 이용 근기능 분자기전 규명 ■ 2차년도: 국내산 두류의 근기능 생리활성물질과 펩타이드의 표준화 제조공정 확립 및 근기능 활성 <i>in vivo</i> 동물실험 검증 <ol style="list-style-type: none"> 1) 두류의 근기능 생리활성물질과 펩타이드의 유용성 극대화 기술 개발 2) 근기능 생리활성물질과 펩타이드의 표준화 공정 개발 3) 부동화(Immobilization) 및 노화동물 모델 기반의 근기능 개선 평가 ■ 3차년도 : 대표 생리활성물질과 펩타이드의 근기능 인체적용시험 검증 및 노화성 근감소증 타겟 건강기능식품 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) 근기능 생리활성물질과 펩타이드의 산업적 생산공정 개발 2) 근기능 생리활성물질과 펩타이드의 상품화 적용기술 개발 3) 근기능 생리활성물질과 펩타이드 복합소재의 인체적용시험 실시 | | | | |
| <p>연구개발성과</p> | <ul style="list-style-type: none"> ■ 총 연구 개발 성과 <ol style="list-style-type: none"> 1) 특허출원/등록 : 10건/1건(PCT 출원 1건 포함) 2) 사업화 : 5건 (원료 : 1건, 건강기능식품 4건) 3) 학술발표 : 7건(국내 3건, 국제 4건) 4) 인력양성 : 7명(석사 7명), 고용창출 : 2명 5) 근기능 관련 인체적용시험 : 1건 6) 홍보전시 : 3건(국내 1건, 해외 2건) 7) 기술이전 : 1건 (기술료 : 100,000천원) | | | | |
| <p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p> | <ul style="list-style-type: none"> ■ 국내산 두류의 근기능 생리활성물질 및 펩타이드의 최적 공정기술 확보 ■ 국내산 두류의 근기능 개선 및 근지구력 향상 과학적 근거 확보 ■ 국내산 두류를 이용한 단백질 보충제 및 건강기능식품 개발 ■ 국내산 두류의 고부가가치 창출 및 건강기능식품 신규 기능성 발굴 ■ 노령 인구의 근기능 강화를 통한 질병감소 및 국민 의료비 절감 | | | | |
| <p>국문핵심어 (5개 이내)</p> | <p>두류</p> | <p>생리활성물질</p> | <p>노화</p> | <p>근감소증</p> | <p>건강기능식품</p> |
| <p>영문핵심어 (5개 이내)</p> | <p>Legume</p> | <p>Bioactive compound</p> | <p>Aging</p> | <p>Sarcopenia</p> | <p>Health functional food</p> |

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

| | |
|-----------------------------|-----|
| 1. 연구개발과제의 개요 | 6 |
| 2. 연구수행 내용 및 결과 | 33 |
| 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 | 198 |
| 4. 연구결과의 활용 계획 등 | 205 |
| 붙임. 참고 문헌 | 207 |

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 국내 인구 고령화는 세계에서 유례를 찾을 수 없을 정도로 빠르게 진행되고 있다. 국내 통계청 자료에 따르면 2015년 65세 이상 인구는 662만 4천명으로 전체 인구의 13.1%를 차지하고 있으며 노인 진료비는 21조 9,300억 원으로 전체 진료비에 35.5%를 차지한다. 급속한 고령화에 따른 노인 인구의 증가는 의료비용 및 건강보험의 재정 부담을 증가시키는 주요 원인이다.
- 노화에 따른 생리학적 변화는 매우 다양하며 그 중에 하나가 골격근육량(skeletal muscle mass)의 감소로 인한 근감소증(sarcopenia)이다. 근감소증이 있으면 일상생활에서의 3가지 이상의 신체장애를 동반할 위험도가 4배 증가하며, 신체균형의 장애는 2~3배, 보행장애와 지팡이 등 보조기를 이용하게 되는 경우 및 낙상의 위험이 약 2배 높았다. 노인들의 근감소증으로 인한 낙상 및 골절 진료비가 연간 5조원으로 전체 노인진료비 중 32.6%를 차지하고 있다. 노인진료비는 2050년에 58조5,000억원으로 증가할 것이고, 이중 고위험군의 낙상으로 인한 진료비는 23조2,000억원까지 증가할 것으로 예측했다.
- 근감소증은 나이가 들어감에 따라 근육량이 점진적으로 감소하는 것으로 근육의 약화 및 퇴행을 말한다. 인체의 근육량은 정상적으로 단백질의 합성과 분해가 균형을 이루어 일정하게 유지되지만 단백질의 분해가 증가하거나 합성이 감소하는 상황이 발생하면 근기능이 저하된다. 노화에 따른 근기능의 저하는 근육량 및 근력손실에 의해 일상수행활동의 운동능력을 감소시킨다. 이에 따라 70~80세 노년남성 및 여성의 20~40%가 근육량 감소를 경험하고 있으며, 60세 이상 고령층의 약 30%는 근감소증 질환을 가지고 있어 고령화가 지속되면서 확대된다.
- 보건복지부 국가정보포털에 의하면 노인의 단백질 및 칼로리 섭취 감소, 단백질 합성의 변화, 신체활동 저하 역시 근감소증을 유발하는 요인들로 볼 수 있다. 특히, 건강한 상태라 하더라도 노인의 식후 단백질 합성 활성도는 청년에 비해 떨어지며 식이단백질의 체내 이용률이 저하된다. 따라서 노인들은 적절한 열량섭취와 함께 양질의 단백질 섭취와 운동이 필요하다. 우리나라 노인의 단백질 1일 권장섭취량은 남자는 50 g, 여자는 45 g이다. 이에 따라 노인성 근감소증을 억제하기 위한 방안으로 적절한 단백질 섭취가 근감소증 개선에 긍정적인 영향이 있다고 보고되고 있으며, 노인들은 소량의 식사로부터 흡수할 수 있는 단백질원이 제한될 수 있기 때문에 두류 등을 통한 식물성 단백질의 추가적인 섭취가 권장되고 있다.
- 단백질 섭취부족이 노인의 근육감소증을 일으키는 중요 요인으로 작용하는데 단백질 부족을 보충하는 수단으로는 동물성 단백질보다 대두 등과 같은 식물성 단백질의 섭취가 보다 바람직하다. 두류는 다른 식품보다 많은 단백질을 함유 하고 있으며, 예를 들면 대두(soybean)의 단백질 함량은 100 g 당 35.2 g으로 돼지고기와 소고기의 단백질 함량에 비해 높다. 따라서 높은 함량의 단백질을 함유하고 있는 대두는 근감소증을 갖고 있

는 노인들이 꼭 섭취해야하는 필수 식품으로 제안되고 있다.

- 노화로 인한 근감소증은 다양한 치료법이 실시되고 있지만 뛰어난 효과를 보이지는 못하고 있다. 여러 약물 중에서도 테스토스테론(testosterone)과 같은 동화 스테로이드(anabolic steroid)나 인슐린 유사 성장인자 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)과 같은 약물들이 주로 이용되고 있지만 안전성과 치료 효과는 미흡하다. 즉, 노화로 인한 근감소증을 개선하고 운동수행능력 향상시키는 새로운 기전연구가 필요하며, 이에 대한 안전하고 효과적인 식물성 생리활성물질 및 단백질 유래의 노화성 근기능 개선에 도움을 주는 건강기능식품의 개발이 요구된다.
- 노화에 의한 근감소증은 시급히 해결해야 할 건강문제인데, 이에 대한 해결책의 하나는 각종 두류(legumes)로부터 근기능을 향상시키는 건강기능식품 소재를 발굴하는 것이다. 따라서 본 연구에서는 두류 유래 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 및 운동수행능력 향상에 대한 세포, 동물 및 인체적용 시험 자료를 확보함으로써 근기능 건강기능식품을 개발하고자 한다.

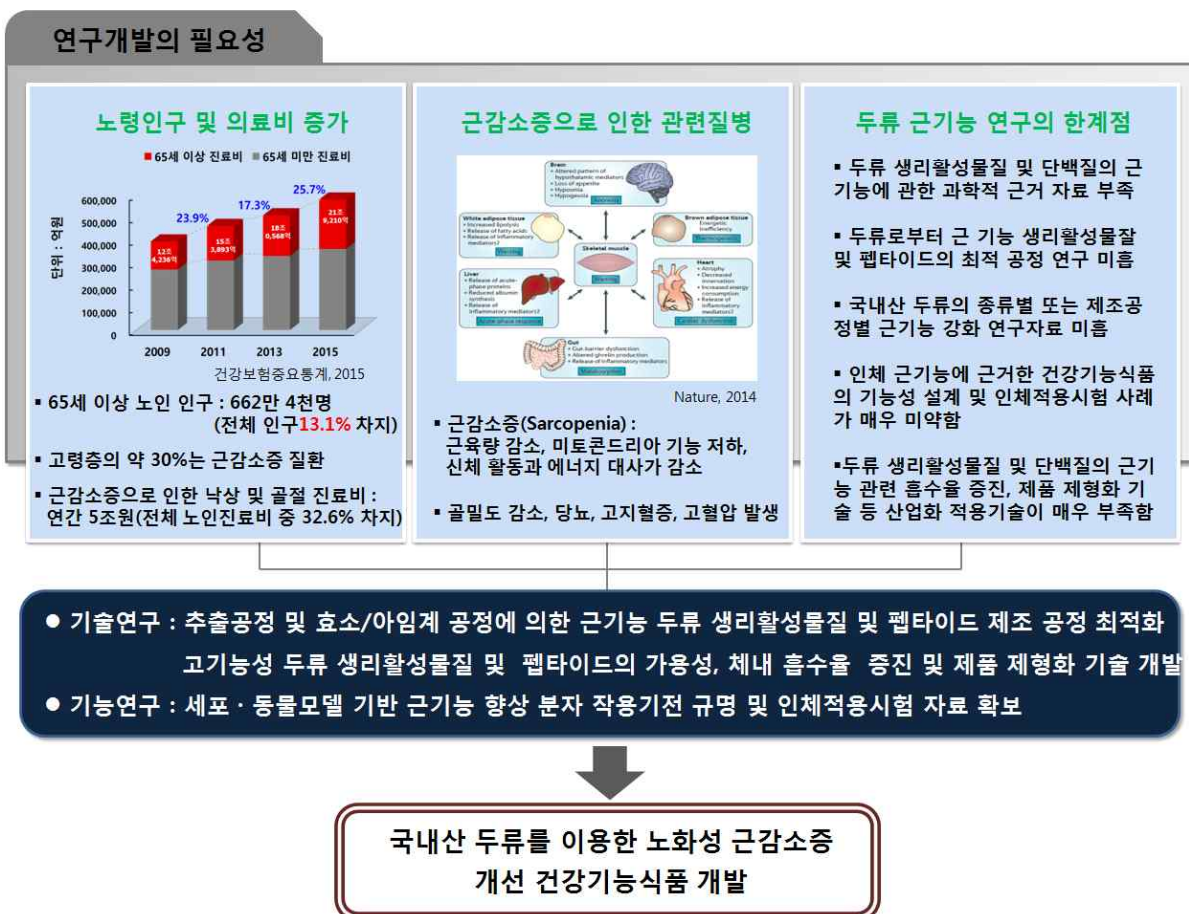


그림 1-1. 본 연구의 핵심내용 요약.

1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발 대상의 국내.외 현황

(1) 국내 기술 수준 및 시장현황

(가) 기술현황

① 기초연구 기술 현황

- 근기능에 관련되어 국내에서 다양한 기초연구가 진행 중이다. 한국생명공학연구원 (KRIBB) 연구팀은 노화로 인한 근감소증 기작에 대한 기초연구를 중점으로 활발하게 연구를 진행하고 있으며, 특히 노화성 근감소증에 대한 신규 표적 인자의 발굴 및 기능 검증에 초점을 맞추고 있다. 전남대학교 국현 교수 연구팀은 근육의 분화 조절 단백질에 대한 기초연구를 진행하고 있으며, 근육 단백질 분해에 중요한 polyubiquitin과 근육질환의 관계에 대한 기초 연구를 세부적으로 진행하고 있다. 이 외에도 분자 수준에서 임상수준까지 다양한 기관에서 근기능에 대한 분자수준의 기초 연구가 진행되고 있다.
- 근육 분화 촉진 효과를 지닌 물질 발굴을 위한 스크리닝 기술이 최근 들어 국내 두 연구팀(숙명여자대학교, 한국생명공학연구원)에 의해 진행되었다. 현재 근기능 물질 발굴을 위한 스크리닝 기술이 시작 단계에 머물러 있지만 앞으로 근육 분야에서 후보 물질 탐색 및 발굴에 대한 스크리닝 기술이 다양하게 개발될 것으로 예상된다.

표 1-1. 국내 근기능 기초 연구현황

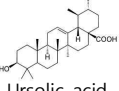
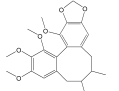
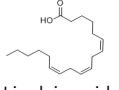
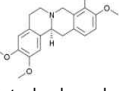
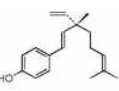
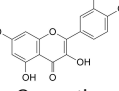
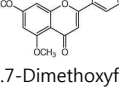

| 연구기관 | 책임자 | 연구내용 | 대표 논문 | 참고문헌 |
|------------------------|-----|--|--|--|
| 한국생명공학연구원 | 권기선 | 노화성 근감소증 마우스 모델 구축 완료 유전체, 단백질 데이터 베이스 분석 - 신규 분자 표적 발굴 및 기능 검증 성체줄기세포 근육 분화 유도 원천기술 개발 근육 분화 촉진 물질을 위한 스크리닝 기술 개발 | Efficient myogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by the transduction of engineered MyoD protein | Biochem. Biophys. Res. Commun 437: 156-161, 2013 |
| 전남대학교 의과대학 약리학교실 | 국 현 | 골격근육 후생성 분화조절 단백질에 대한 연구 근육질환과 polyubiquitination의 관계 연구 | Ret finger protein inhibits muscle differentiation by modulating serum response factor and enhancer of polycomb1 | Cell Death and Differentiation 19: 121-131, 2012 |
| 숙명여자대학교 약학대학교 세포치료학연구실 | 배운규 | 근육 분화 촉진 효과를 가진 천연물, 화합물, 약물에 대한 high throughput screening 기술 개발 | Tetrahydropalmatine promotes myoblast differentiation through activation of p38MAPK and MyoD | Biochem. Biophys. Res. Commun 455: 147-152, 2014 |
| 서울대학교 체육교육과 | 송욱 | Sarcopenic obesity의 역학 및 기전 연구 노화 모델에서 저항성 운동에 따른 myokine연구 | Relationships between sarcopenic obesity and insulin resistance, inflammation, and vitamin D status: the Korean Sarcopenic Obesity Study | Clin. Endocrinol 78(4): 525-532, 2013 |

② 소재 기술 현황

- 근육 단백질의 합성 촉진 및 분해 억제 활성을 지닌 천연물 유래 소재가 국내에서 발굴된 바 있다. 기초적인 수준에서 천연물 유래 소재를 통한 근육 단백질 합성 촉진 또는 근육 단백질 분해 억제의 기전 정도만 규명되었다. 근기능 관련 소재 발굴 및 개발 기술의 깊이는 아주 초보적인 단계에 있으며 원료 확보의 어려움 및 인체

적용시험 미흡 등으로 인해 산업화 단계에 이르지 못하고 있다. 특히, 현재까지 건강기능식품으로 노화성 근감소증 개선 대한 천연물 유래 소재는 단 한 건도 진행된 바 없다.

표 1-2. 국내 근기능 개선 천연 생리활성물질 개발 현황

| 원료 | 기능성분 | 연구기관 | 핵심 연구내용 | 참고문헌 |
|---|---|---|--|---|
| 비파나무 (<i>Eriobotrya japonica</i>) |  Ursolic acid | 향노화사업단 (김남득) | <ul style="list-style-type: none"> 노화에 의한 근감소증 동물 모델 개발 근력(Grip strength) 증가 넙치근(Soleus muscle) 증가 근 에너지 증가 : creatine kinase 활성 증가 근육 분화 촉진 : MyoD, myogenin 증가 | Inter. J. Mol. Sci. 36: 792-800, 2015 |
| 오미자 (<i>Schisandra fructus</i>) |  Schizandrin | 동의대학교 한의과대학 생화학교실 (최용현) | <ul style="list-style-type: none"> 근력(Grip strength) 증가 장딴지근(Gastrocnemius muscle) 증가 근육 단백질 분해 억제 : MuRF1 억제 근육 단백질 합성 촉진 : Akt 증가 근육 세포 사멸 억제 : caspase-3 억제 | Oxid. Med. Cell. Longev. 2015: ID 872428, 2015 |
| 달맞이꽃 (<i>Oenothera odorata</i>) |  Linoleic acid | 연세대학교 생명과학기술학부 분자약리 유전체학연구실 (김택중) | <ul style="list-style-type: none"> 불활동성 위축(Disuse atrophy) 동물 모델 개발 근육 볼륨(Muscle volume) 증가 근육 세포 사멸 억제 : HSP70 증가 | Evid Based Complement Alternat Med. 2015: ID 130513, 2015 |
| 현호색 (<i>Corydalis remota</i>) |  Tetrahydropalmatine | 숙명여자대학교 약학대학교 세포치료학연구실 (배규운) | <ul style="list-style-type: none"> 근육 분화 촉진 근육 분화 인자 증가 : MyoD 증가 근기능 활성 증가 : MHC 증가 전환분화(trans-Differentiation) 촉진 섬유아세포 → 근육세포 전환 | Biochem. Biophys. Res. Commun. 455: 147-152, 2014 |
| 파고지 (<i>Psoraleae corylifolia</i>) |  Bakuchiol | 숙명여자대학교 약학대학교 세포치료학연구실 (배규운) | <ul style="list-style-type: none"> 근육 분화 촉진 근육 분화 인자 증가 : MyoD, myogenin 증가 근육 분화 촉진 수용체 활성 : Cdo 증가 | Chem. Biol. Interact. 248: 60-67, 2016 |
| 양파 (<i>Allium cepa</i>) |  Quercetin | 울산대학교 식품영양학과 임상영양면역학 연구실 (유리나) | <ul style="list-style-type: none"> 비만 유도 근감소증 동물 모델 개발 염증과 근감소증 관계 규명 : TNFα 억제 장딴지근(Gastrocnemius muscle) 증가 근육 단백질 분해 억제 : MuRF1, Atrogin-1 억제 | Med. Inflamm. 2014: ID 834294, 2014 |
| 검은생강 (<i>Kaempferia parviflora</i>) |  5,7-Dimethoxyflavone | 연세대학교 생명공학과 바이오신소재연구실 (황재관) | <ul style="list-style-type: none"> 근육 생성에 관련된 분자적 기전 연구 근육 단백질 분해 억제 : MuRF1, Atrogin-1 억제 근육 단백질 합성 촉진 : PI3K, Akt, mTOR 증가 근육 분화 촉진 근육 분화 인자 증가 : MyoD, myogenin 증가 | 대한민국특허, 등록번호 : 10-1528023, 등록일자 : 2015년6월4일 |
| 제주진득찰 (<i>Siegesbeckia orientalis</i>) |  Kirenol | 연세대학교 생명공학과 바이오신소재연구실 (황재관) | <ul style="list-style-type: none"> 뒷다리 근육 무게 및 볼륨 증가 근육 단백질 분해 억제 : MuRF1, Atrogin-1 억제 근육 단백질 합성 촉진 : mTOR 증가 근육 분화 인자 증가 : MyoD, myogenin 증가 | 대한민국특허, 출원번호 : 10-2015-0092336 출원일자 : 2015년6월29일 |
| 두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>) | - | 동국대학교 한의학과 생리학교실 (신흥목) | <ul style="list-style-type: none"> 염증에 의한 근세포 사멸 억제 염증관련 인자 감소 : iNOS, COX-2 근육 성장 인자 촉진 : IGF-1 증가 | 대한민국특허, 출원번호 : 10-2014-0054193, 출원일자 : 2014년5월7일 |

(나) 시장현황

○ 현재 국내에서 근감소증의 치료는 주로 운동, 영양요법 그리고 약물 치료에 의존하고 있으며 대표적인 약제로는 테스토스테론, 성장호르몬, 선택적 안드로젠 수용체 조절제가 있다. 하지만 이러한 치료제들의 근감소증 개선효과에 대한 임상적 근거가 부족하고 호르몬약물의 부작용이라는 한계점이 있다¹⁾. 따라서 국내 근감소증 치료제 시장 개척이 시급하며 뚜렷한 작용기전을 가진 근감소증 개선제에 대한 연구 및 개발이 필요하다.

- 운동보조제는 단백질·아미노산과 같은 근기능 강화에 도움을 주는 영양성분을 식품 형태로 만든 것이다. 국내 운동보조제의 시장규모는 2008년에 200억원을 넘어섰으며 매년 20-30% 이상의 빠른 성장세를 보이며 2015년 800억에 달했다. 그 중 단백질 제품은 2013년 202억원의 수입실적을 보였으며 연평균 21.7%의 성장률을 보이고 있다²⁾. 이는 수요 대상의 범위가 전문 운동선수에서 일반인 및 노년층으로 확대되었기 때문이다.
- 현재 근육관련 건강기능식품으로 인정받은 원료는 운동수행능력 향상에 도움이 되는 마카 젤라틴화 분말, 크레아틴, 헛개나무과병추출물, 동충하초 발효추출물이 전부이다³⁾. 근기능 및 운동수행능력 관련 제품시장의 성장성과 신규성을 고려해볼 때 근육관련 운동보조제 및 건강기능식품의 시장전망은 2024년 각각 2618억원 1393억원의 규모를 형성할 것이다(그림 1-2)²⁾.

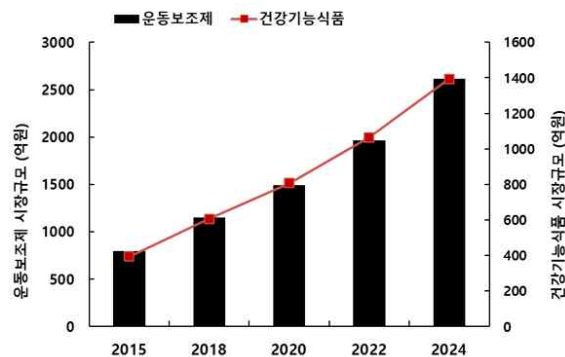


그림 1-2. 국내 근육관련 운동보조제 및 건강기능식품 시장전망³⁾.

- 근기능과 관련된 운동보조제 및 건강기능식품은 주로 크레아틴과 단백질을 주성분으로 하고 있다(표 1-3). 최근 통계에 따르면 소비자들이 구매하는 운동보조제의 유형은 단백질 제품이 68%로 가장 높았으며 크레아틴 제품이 14%로 두 번째를 차지하였다(그림 1-3)⁴⁾. 이는 크레아틴이 근육증강보다는 운동능력향상에 효과적인 반면 단백질 제품은 근육량 증가와 직접적으로 관련있기 때문에 선호도가 더 높은 것으로 분석된다.

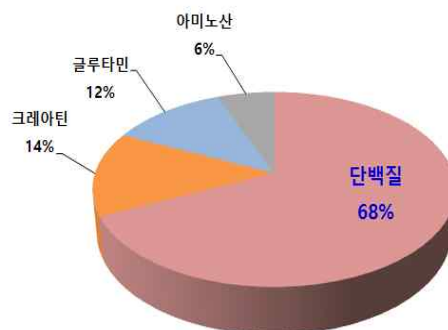


그림 1-3. 국내 근육관련 운동보조제 소재별 구매현황⁴⁾.

표 1-3. 국내 근기능 관련제품

| 주요성분 | | 제 품 | 특 징 | 개선점 |
|-------------------------------------|--|---|---|---|
| <chem>CN(C)CC(=O)O</chem> 크레아틴 | |  리얼크레아틴 (노바렉스) | - 근력운동시 운동수행능력 향상 - 지구력향상 - 개별인정형제품 건기식 인정 | - 구토·설사·복통 - 신장기능저하 - 탈수현상으로 인한 체수분 불균형 - 근육경련·근육강직 근육파열· 근육긴장 |
| | |  웨이더크레아틴 (노바렉스) | | |
| | |  다이나미스레아틴 (유유헬스케어) | | |
| | |  펌핑크레아틴 (스포츠바이오텍) | | |
| 유청단백질 (Whey protein) | 농축유청 단백질 (WPC) |  머슬킹콩 531 (킹콩팩토리) | - 고함량의 단백질 - 근육 합성 촉진 | - 과도한 단백질 섭취로 인한 간·신장 손상 - 칼슘손실로 인한 골다공증 - 위장 통증, 식욕감소, 메스꺼움, 두통, 피로감 |
| | 분리유청 단백질 (WPI) |  허벌라이프24 리빌드 스트렝스 (허벌라이프) | - 체내 필수 단백질 보충식품 - 근육보호 및 유지 - 단백질성분 건기식 인정 | |
| | 가수분해 유청단백질 (WPH) |  아폴로웨이 (일진바이오) | - 고함량의 아미노산 - 빠른 분해 및 흡수력 | |
| 카제인 |  카제인 웨이 (보령) | - 근육 분해 방지 - 뼈 건강 증진 | - 낮은 흡수력 - 소화 불량 | |
| BCAA (Branched Chain amino acid) |  아미노액티브 BCAA 100% (빅슬) | - 고함량 Valine 아미노산 제공 | - 제한적 섭취 대상 | |
| 계란 단백질 (Egg protein) |  에그프로틴 파워 (상아제약) | - 고른 아미노산 조성 - 유당 소화장애 대체품 | - 비린 향과 맛 - 낮은 분해 및 흡수 | |
| 발효 대두 단백질 (Soy proein) |  하루공력 (푸른친구들) | - 발효 대두 단백질 사용 - 흡수력 증진 | - | |

○ 2013년 기준 대두 이소플라본(soy isoflavone) 혹은 대두 단백질(soy protein)을 이용하여 제조한 건강기능식품수는 60건으로 전체 제조품목수의 0.4%에 해당한다. 또한, 대두 이소플라본 혹은 대두 단백질을 이용한 건강기능식품의 판매액은 2013년 기준 10억 2215만원으로 전체 판매액의 약 0.07%에 불과하였다. 2013년 개별인정형 원료건수는 37건수였으며, 이 중 식물추출물은 19건으로 절반이상을 차지하고 있었지만 두류 소재 중심의 개별인정형 원료는 전무한 실정이다⁵⁾.

○ 종합적으로, 국내 시장은 표 1-4에 나타난 바와 같다. 운동 및 근육과 관련되어 2017년 건강기능식품으로 출하된 금액은 약 366.3억원이며, 일반식품 중 스포츠뉴트리션

등으로 200억원이 출하된 것으로 추정하고 있다. 고령화사회로 인한 근감소증 환자 형성 및 운동과 근육에 대한 관심 등으로 인해 지속적으로 제조사출하액이 증가할 것으로 판단되며, 시장이 확장될 것으로 예상된다.

표 1-4. 근육 관련 식품 유형에 제조사출하액⁶⁻⁷⁾

| 구분 | | | | 제조사 출하액(억원) | 년도 |
|----------------|--------|--------------|-----------------------|----------------|------|
| 건강 기능 식품 | 고시형 | 단백질보충용 | | 68.6 | 2017 |
| | | 운동수행 | 육타코사놀 | 54.2 | 2017 |
| | 개별인정형 | 운동수행 | 헛개, 크레아틴, 마카, 동충하초 | 243.5 | 2017 |
| 일반 식품 | 특수용도식품 | 체중조절용식품 | | 404 | 2017 |
| | 기타 | 기타 스포츠뉴트리션 등 | | 200 | 추정 |
| 계 | | | | 970.3 | |

(다) 경쟁기관 현황

① 국내 근기능 관련 기술 연구기관

- 우리나라의 경우 근감소증 및 근세포 대사에 대한 기초 연구는 2000년대에 진입하면서 본격적으로 이루어지고 있으며, 근기능 개선 활성을 가진 천연물·화학물·약물 스크리닝 기술 개발 및 노화에 의한 근감소증 동물모델구축 등의 연구를 통하여 기능성 소재를 발굴하고 있다.
- 대표적으로 한국생명공학연구원에서 근기능 관련 기술 연구가 활발히 이루어지고 있다. 최근 논문을 통해 발표된 내용에 의하면, 형질전환 기술에 의하여 인간의 줄기세포를 이용해 근육세포로의 분화를 유도하는 기술을 개발하였다. 이 외에도 근육의 분화를 촉진하는 물질을 찾기 위한 스크리닝 기술을 개발하는 한편, 노화성 근감소증 마우스 모델을 구축해 노화성 근감소증에 대한 기초연구도 진행되고 있다.
- 전남대학교 국현 교수 연구팀, 이화여자대학교 황은숙 교수 연구팀을 포함해 많은 대학연구기관에서 근기능 관련 기술 연구가 이루어지고 있다. 근육세포 또는 동물 모델을 구축하여 분자적 기전에서 연구가 이루어지는 한편, 근육분화를 촉진하는 물질을 발굴하기 위한 스크리닝연구도 이루어지고 있다(표 1-5). 그러나 유통라인과 산업적 경험의 부족 및 인체시험적용 미흡으로 인해 제품으로의 출시는 이루어지지 않고 있다.

표 1-5. 국내 근기능 연구기관 및 연구내용

| 연구수행 기관 | 연구개발 내용 | 대표 논문 |
|-------------------|------------------------------|--|
| 한국생명공학연구원 (유권) | 마이크로 RNA를 통한 근육줄기세포 노화 원인 규명 | Nature Communications 6: 7693, 2015 |

| | | |
|----------------------|--|---|
| 한국체육대학교 (김창근 교수팀) | 고강도의 지구력운동 수행에 의한 근비대신호단백질 mTOR, p70S6K, 4E-BP1 및 AMPK의 발현변화 | J Exerc Nutrition Biochem. 19(1): 31-3, 2015 |
| 전남대학교 (국현 교수팀) | 위축이 일어난 골격근에서 Ret finger protein(RFP)의 새로운 E3 ligase로서의 활성화 연구 | Cellular Signalling 26: 2240-2248, 2014 |
| 이화여자대학교 (황은숙 교수팀) | 근육세포 분화 조절에 있어서 TAZ 단백질의 기능 네트워크 연구 | FEBS Letters 588: 79-85, 2014 |
| 서울대학교 (송욱 교수팀) | 포유류 모델을 이용한 다양한 근감소증 실험 기술 연구 | Endocrinol Metab. 31(1) :31-37, 2016 |

② 국내 근기능 관련 천연물 소재 연구기관

- 2000년 이후 설립한 근육분화 촉진물질 발굴 스크리닝 기술을 통해 천연물·화학물·약물 등의 분야에서 다양한 물질들이 발굴되어지고 있으며, 특히 근감소증에 대한 천연물의 효능 및 식품 연구는 최근 5년 전부터 이루어지고 있다.
- 주요 연구수행 기관인 부산대학교는 최근 항노화산업지원센터를 설립하고 7개 산업기관과 건강바이오 글로벌상용화 지원을 위한 협약을 맺는 등 항노화산업 연구 개발을 본격화하고 있다. 부산대학교 항노화기술개발 연구센터에서는 천연물을 이용하여 근감소증에 대한 기초 연구를 활발히 진행 중이나, 우리나라 농산품이나 두류를 이용한 건강기능식품의 산업화 연구는 아직 활발하게 진행되고 있지 않은 상태이다.
- 중앙연구소 한국야쿠르트에서도 동물모델을 통하여 사과 포메이스가 근력 및 근육을 증강시키는 활성을 가진다는 연구를 진행한 바 있다. 이외에도 연세대학교 김택중 교수 연구팀, 숙명여자대학교 배규운 교수 연구팀 등 많은 대학 연구기관에서 근기능과 관련된 다양한 천연물 유래 기능성 물질 발굴 및 분자적 기전에 대한 연구를 진행하고 있다(표 1-6). 그러나 현재까지 건강기능식품으로서 근기능을 향상시키는 천연물 유래 소재가 존재 하지 않으며, 우리나라 농산품이나 두류를 이용한 연구는 체계적으로 진행된 바 없다.

표 1-6. 국내 근기능 천연물 소재 연구기관 및 연구내용

| 연구수행 기관 | 주요 연구내용 | 대표 논문 |
|--------------------------|---|---|
| 항노화산업지원센터 (김남득) | 비파나무의 Ubiquitin-proteasome 시스템 억제에 의한 근육 감소 저해 효과 | Inter. J. Mol. Sci. 36: 792-800, 2015 |
| 중앙연구소 한국야쿠르트 (안영태) | 사과 포메이스(pomace)의 근력 및 근육 증강 효과 in vivo 연구 | J. Med. Food. 18(12): 1380-1386, 2015 |
| 연세대학교 (김택중 교수팀) | 불활동성 위축(Disuse atrophy) 동물 모델개발 및 달맞이꽃의 항산화 효능을 통한 근기능 개선 효과 | eCAM. 2015: ID 130513, 2015 |
| 부산대학교 (정해영 교수팀) | 비파추출물의 근감소증 억제 효과 in vivo 연구 | Mol. med. reports 12: 3607-3614, 2015 |
| 숙명여자대학교 (배규운 교수팀) | 파고지 기능성분인 bakuchiol의 근육세포 분화인자 활성화에 의한 근육세포성장 및 분화 조절 | Chem. Biol. Interact. 248: 60-67, 2016 |

| | | |
|-----------------------|--|--|
| 동의대학교 (최영현 교수팀) | 덱사메타손으로 유도된 근감소증 동물모델에서 Fructus Schisandrae의 효과 연구 | Int. J. Mol. Med. 36: 29-42, 2015 |
| 울산대학교 (유리나 교수팀) | 비만으로 유도된 골격근 염증 및 근감소증에 대한 quercetin 효과 연구 | Med. Inflamm. 2014: ID 834294 |
| 동국대학교 (송미영 교수팀) | 백출의 미토콘드리아 조절을 통한 C2C12 골격근 세포의 분화 조절 효능 | eCAM 2015: ID 643654, 2015 |
| 강원대학교 (이옥환 교수팀) | C2C12 근육세포의 산화적 손상에 대한 홍경천-홍삼 추출물 혼합액발효물의 보호효과 | J. Med. Food 19(1): 24-30, 2016 |
| 연세대학교 원주 (최인호 교수팀) | Akt1, ERK1/2 경로를 거치는 celastrol의 C2C12 근육세포 위축 억제효과 연구 | Archives of Biochemistry and Biophysics 537: 21-30, 2013 |

(라) 지식재산권현황

- ‘근육감소’, ‘근감소증’ 또는 ‘muscle atrophy’ 키워드로 국내 근기능 관련 특허 동향을 분석하였다. 국내 근감소증 예방 및 치료기술은 1994년 관련 특허가 처음 출원되었으며, 2016년까지 총 163건의 특허가 출원되었다. 매년 출원되는 특허 수는 증가하는 추세를 보이며, 2009년도에는 한해 5건의 특허가 출원되었는데 2014년도에는 540% 증가된 32건이 출원되어 근기능 관련 시장이 성장하고 있음을 알 수 있다. 총 누적특허 수는 2009년부터 186% 증가되어 2014년도에 143건으로 증가하였다.

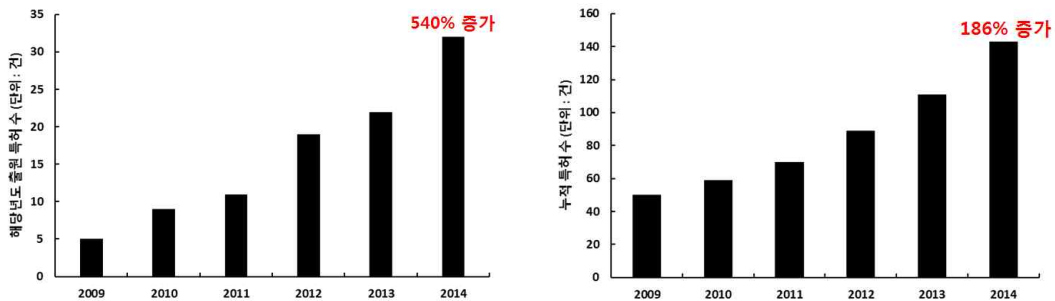


그림 1-4. 국내 근감소증 관련 특허 출원 수.

- 국내 출원된 근기능 관련 특허를 소재별로 분석한 결과, 163건 중, 61%에 해당하는 99건이 합성 화합물에 해당하였고, 30%인 51건이 단백질, 항체를 포함한 근기능 관련 치료 혹은 예방 기술에 해당하였다. 천연물을 이용한 특허기술은 전체의 9%인 14건에 해당하였다.

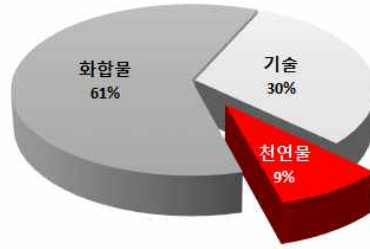


그림 1-5. 국내 근감소증 관련 특허 소재별 비율.

○ 천연물을 이용한 기술은 2010년부터 출원되고 있으며, 국내 출원인의 비율이 국외출원인보다 많아 천연물기술은 국내경쟁이 심화되고 있음을 보여준다. 대부분의 천연물 기반 특허는 일반적으로 흔히 사용되는 식품을 대상으로 하지 않고 일반적으로 생리활성이 높다고 밝혀진 식물들을 대상으로 하였다.

표 1-7. 국내 출원된 천연물 소재의 근기능 관련특허 목록

| 소재 | 특허명 | 출원인 | 효능 |
|-------------------------|---|--------------------------|---|
| 울금 외 8종 추출물 | 육체적 활동을 증진시키기 위한 상승적 식이 보조제 | 라일라 뉴트라슈티칼스 (고카라주 강가 라주) | <ul style="list-style-type: none"> 근세포 내 산화적 스트레스 억제 세포내 ATP 함량 증진 근세포에서 단백질 함량 증진 근육 강도 증진 근력측정 근육량 |
| 키레놀 희침 추출물 | 키레놀 또는 희침 추출물을 포함하는 근 기능 개선용 조성물 | 연세대학교 산학협력단 (황재관) | <ul style="list-style-type: none"> 근성장 단백질 발현증진(p-mTOR) 근세포 분화 증진 (myogenin, myoD) 동물모델 근육량 증가 |
| 가공인삼분말 가공인삼 추출물 | 진세노사이드 성분이 증가된 가공인삼분말 또는 가공인삼추출물을 함유하는 암 관련 피로의 예방 및 치료용 조성물 | (주)녹십자웰빙 (유영호) | <ul style="list-style-type: none"> 암으로 인한 근육 감소억제 효능 근육내 Glycogen 함량증가 근기능 증가 |
| 홍삼농축액 신선초 추출물 | 진공건조 홍삼농축액 및 신선초 추출물을 유효성분으로 함유하는 운동피로회복, 운동수행능력 증강용 또는 근감소증 예방 식품조성물 | (주)풀무원 (이명수) | <ul style="list-style-type: none"> 근세포 증식 근육량, 근섬유크기 증가 근감소증 예방 |
| 심비디움 추출물 | 심비디움 추출물을 유효성분으로 함유하는 근위축 예방 또는 치료용 약학 조성물 | 연세대학교 원주산학협력단 (김택중) | <ul style="list-style-type: none"> 항위축 효능 근세포 손상, 괴사 억제효능 근세포 아포토시스(apoptosis) 억제 |
| 두충 추출물 | 두충 추출물을 포함하는 근육 소모 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 | 동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단 (신홍목) | <ul style="list-style-type: none"> muscle creatine kinase 근세포 분화 증가 (myogenin, myoD) 근위축 억제 (Atrogin-1, MuRF1) 근세포 내 염증 억제 근기능 활성화 (creatine kinase) |
| 달맞이꽃 추출물 | 달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 함유하는 근위축 예방 또는 개선용 식품 및 약학조성물 | 연세대학교 원주산학협력단 (김택중) | <ul style="list-style-type: none"> 근세포 내 항산화 효능 근세포 손상, 괴사 억제효능 근세포 아포토시스(apoptosis) 억제 |
| 오미자 추출물 | 오미자 추출물을 포함하는 근위축 예방 및 개선용 조성물과 그 제조방법 | 동의대학교 산학협력단 (최영현) | <ul style="list-style-type: none"> 근섬유크기 증가 근위축 억제효능 (Atrogin-1, MuRF1) 근단백질 합성 증진 동물모델 근육량 증가 |
| 비파잎 추출물 | 비파잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 근육 감소증 예방 또는 치료용 조성물 | 부산대학교 산학협력단 (정해영) | <ul style="list-style-type: none"> 근육단백질 보호 (MyHC) 근육분해 억제 (FoxO1, MuRF1) 근기능 활성화 (creatine kinase) 근력측정 |
| 플라본계 화합물 캠페리아 파비플로라 추출물 | 캠페리아 파비플로라 추출물 또는 플라본계 화합물을 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물 | 연세대학교 산학협력단 (황재관) | <ul style="list-style-type: none"> 근성장 관여 주요단백질 발현증진 (PI3K, p-AKT, p-mTOR) 근세포 분화 증진 (myogenin, myoD) 근위축 억제 (Atrogin-1, MuRF1) |
| 홍경천 추출물 홍삼 추출물 | 홍삼을 이용한 홍경천 발효물의 제조방법 및 그 발효물을 포함하는 피로 회복 및 | 한국식품연구원 (홍희도) | <ul style="list-style-type: none"> 근세포내 산화적 스트레스 억제 근세포의 손상 억제 |

| 홍경천 발효물 | 운동능력 향상용 조성물 | | • 근세포 분화 증진 (myo D) |
|--|--|------------------------------------|---|
| 판두라틴 유도체 판두라타 추출물 | 판두라틴 유도체 또는 보에센베르기아 판두라타 추출물을 포함하는 근육 증가 촉진, 항-피로 및 운동수행능력 향상용 조성물 | (주)뉴트리, 연세대학교 산학협력단 (황재관) | • 비만유도모델에서의 근육량 증진 • 근세포 근육강화 단백질 발현 증진 • PPAR-δ 활성화 촉진 |
| 그린마테 외 9종 추출물 Eicosapentaenoic acid | 근육 타입 변화를 촉진하는 조성물 | (주)아모레퍼시픽 (조시영) | • 근육타입변화, 근육량 증가 • 근세포 근육강화 단백질 발현 증진 • PPAR-δ 활성화 촉진 • AMPK 활성화 촉진 • PGC1-α 활성화 촉진 |
| 은행나무 추출물 | 근육감소증 치료용 의약 제조를 위한 은행나무 추출물의용도 | 입센 파마 에스.에이.에스 (크리스탄) | • 장딴지 근육 질량 증가 • 근섬유크기 증가 |

○ 따라서 본 연구는 지속적으로 증가할 것으로 예상되는 근기능 관련 시장에서 국내 농산물인 두류를 활용한 안전하고 생리활성이 높은 효율적인 방안을 제시함으로써, 시장을 선도하고 국가의 기술경쟁력을 제고하는 의의가 있다.

(2) 국외 기술 수준 및 시장현황

(가) 기술현황

① 기초연구 기술 현황

○ 근기능 개선에 관련된 기초연구는 다양한 국가에서 이루어지고 있다. 질병 또는 노화로 인한 근감소와 근비대증에 대한 세포 및 분자적 수준에서의 기전 연구는 기존에 상당히 많은 부분 규명되었다. 최근에는 근육 내의 줄기세포 조절에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 근감소증 치료제 개발을 위한 근육줄기세포를 조절 인자에 연구의 중심이 관심을 모으고 있다.

표 1-8. 국외 근기능 기초연구 현황

| 연구기관 | 책임자 | 연구내용 | 대표 논문 | 참고문헌 |
|--|------------------------|--|--|--|
| Purdue University, Department of Animal Sciences | Shihuan Kuang | • 근육줄기세포의 분자적 기전 연구 • 근육 분화 및 재생관련 기초 연구 • 세포수준에서 근육세포의 비대 기전 연구 | Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation | Development 139: 2857-2865, 2012 |
| Ottawa Hospital Research Institute, Sprott Centre for Stem Cell Research | Michael A Rudnicki | • 근육 분화 관련되어 분자적 기전 연구 • 전환분화(trans-Differentiation)에 관한 연구 • 근육위성세포(Muscle satellite cell) 연구 • 단백질 수준에서 근육질량 치료제 개발 | Temporal activation of XRCC1-mediated DNA repair is essential for muscle differentiation | Cell Discovery 2: 15041, 2016 |
| Harvard Medical School | Alfred L. Goldberg | • 근육 단백질 분해관련 기전 연구 • 호르몬, 근육활동 등이 근감소에 미치는 영향연구 | Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies | Nat. Rev. Drug Discov. 14: 58-74, 2015 |
| Harvard Medical School | Bruce M. Spiegelman | • PGC-1α에 의해 매개되는 근육 현상 연구 - 근육 비대(Muscle hypertrophy) - 근육 타입 전환(Muscle remodeling) - Muscle cytokine (Myokine) 연관성 | A PGC-1α Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy | Cell., 151(6): 1319-1331, 2012 |
| Aston University | Michael J. Tisdal | • 근단백질 분해 기전 연구 • 근감소증과 대사성 질환 연관성 연구 • 약액질(Cachexia)에 대한 기초 연구 | Role of Ca ²⁺ in proteolysis-inducing factor (PIF)-induced atrophy of skeletal muscle | Cell Signal., 24(11): 2118-2122, 2012 |

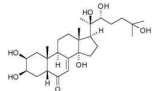
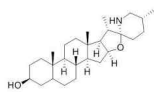
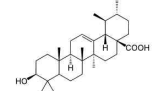
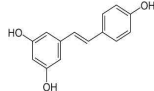
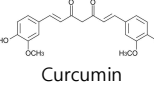
② 소재 기술 현황

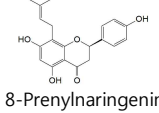
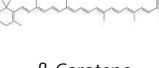
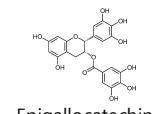
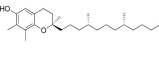
○ 근기능 개선 천연물 유래 소재에 대한 기술은 미국, 중국, 일본, 유럽 등에서 다양하

게 연구 및 개발되고 있다. 주로 근육 단백질 합성과 연관된 Akt 활성화 증가 또는 근육 단백질 분해 촉진 인자 MuRF1와 atrogen-1 억제 물질의 탐색 및 발굴에 초점이 맞춰져있다. 일반적으로 사과, 토마토, 녹차, 커피, 로얄 젤리 등 친숙하고 안전성이 검증된 천연물 및 식품에서 발굴된 것들이 다수를 이루고 있다.

- *Ajuga turkestanica* 추출물 속에는 steroid계통의 생리활성성분(phytochemical)이 다량 함유되어 있으며 추출물 및 기능성분은 Wnt 신호 전달 체계를 통해 근육의 분화 촉진 및 PI3K/Akt 활성을 통해 근육 단백질 합성을 증가시킨다. 이미 연구된 결과를 기반으로 추출물 및 compound이 함유된 근육량 및 근력 증가 제품이 이미 시장에 출시되고 있다.
- University of Iowa의 Adams 연구진은 사람의 근육세포 검사 및 connective map 기술을 이용하여 근감소증 억제 후보 물질 ursolic acid와 tomatidine을 발굴했으며 두 물질이 근기능 개선을 통해 지구력 및 근력 향상 및 지방을 시켰다고 발표한 바 있으며 제품이 이미 출시되었다.
- 최근 Italy 연구팀에서 발표한 논문에 의하면 세계적으로 약 57개의 식물 소재가 노화로 인한 근감소 억제 효과가 있다고 언급했다⁸⁾. 항염증으로 인한 근감소증 억제, 근육 손상 억제 효과, 근육의 분화 및 재생 능력 촉진 등이 대표 작용기전으로 검증되었다. 이렇게 활발한 연구에도 불구하고 아직까지도 근감소 억제를 가지는 소재에 대한 기술 개발 및 산업화는 부진한 상태에 머물러 있다.

표 1-9. 국외 근기능 개선 천연 생리활성물질 개발 현황

| 기능성 소재 | 기능성 성분 | 연구기관 | 연구논문 및 주요 연구내용 | 참고문헌 |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|---|---|
| <i>Ajuga turkestanica</i> |  20-Hydroxyecdysone | Rutgers University (USA) | <ul style="list-style-type: none"> • Steroid계통의 생리활성물질 함유 • 근력(Grip strength) 증가 • 근육 단백질 합성 증가 : PI3K/Akt신호 활성화 • 근육 분화 촉진 : Wnt신호 활성화 (J. Agric. Food Chem., 56(10):3532-3537, 2008) | J. Agric. Food Chem., 56(10): 3532-3537, 2008 |
| 토마토 |  Tomatidine | University of Iowa (USA) | <ul style="list-style-type: none"> • 뒷다리 근육 증가 - 장딴지근(Gastrocnemius muscle) 증가 - 넓적근(Soleus muscle) 증가 • 근기능 향상 - 지구력 향상 : PGC-1α 촉진 - 근육량 증가 : Akt 증가 - 근섬유 크기 증가 | J. Biol. Chem., 23; 14913-14924, 2014 |
| 사과껍질 |  Ursolic acid | University of Iowa (USA) | <ul style="list-style-type: none"> • 근육량 증가 - 근육 단백질 합성 촉진 : Akt 증가 - 근육 단백질 분해 억제 : atrogen-1, MuRF1 억제 - 근육 세포 성장 촉진 : IGF-1 증가 • 지구력 향상 | Cell Metab., 13(6): 627-38, 2011 |
| 포도 |  Resveratrol | Southern Medical University (USA) | <ul style="list-style-type: none"> • TNF-α로 유도된 근육 감소 억제 효과 - 근육 단백질 분해 억제 : atrogen-1, MuRF1 억제 - 근육 단백질 합성 촉진 : p70S6K, mTOR 증가 | Int. Immunopharmacol., 19(2): 206-213, 2014 |
| 강황 (<i>Curcuma longa</i>) |  Curcumin | Baylor College of Medicine (USA) | <ul style="list-style-type: none"> • 장딴지근(Gastrocnemius muscle) 감소 억제 - 장딴지근 내의 단백질량 증가 - 근육 단백질 분해 억제 : Atrogen-1 감소 | J. Cell Biochem., 100(4): 960-969, 2007 |
| 로얄젤리 | - | Tianjin Medical | <ul style="list-style-type: none"> • 노화에 의한 근감소증 동물 모델 개발 | J. Gerontol. A. |

| | | | | |
|------------------------|---|---|---|--|
| | | University (China) | <ul style="list-style-type: none"> 손상된 근육 회복 촉진 근육 성장 촉진 : IGF-1 증가 | Biol. Sci. Med. Sci., 68(12): 1482-1492, 2013 |
| 커피 | - | Tianjin Medical University (China) | <ul style="list-style-type: none"> 근력 및 근육 무게 증가 - 근육 단백질 합성 촉진 : Akt 증가 - 근육 감소 염증 인자 억제 : TNF-α, IL-6 억제 | Exp Gerontol. 50:1-8, 2014 |
| 홉 (Humulus lupulus) |  8-Prenylnaringenin | University of Tokushima Graduate School (Japan) | <ul style="list-style-type: none"> 장딴지근(Gastrocnemius muscle) 감소 억제 - 근육 단백질 합성 촉진 : Akt 증가 - 근육 단백질 분해 억제 : Atrogin-1 감소 - 근육 내 기능성 성분 축적 증가 | PLoS One. 7(9): e45048, 2012 |
| 당근 (Daucus carota) |  β -Carotene | Osaka Prefecture University (Japan) | <ul style="list-style-type: none"> 넙치근(Soleus muscle) 감소 억제 - 근육 단백질 분해 억제 : Atrogin-1, USP14, 19감소 - 산화 스트레스 감소 | Br. J. Nutr., 109(8): 1349-1358, 2013 |
| 녹차 (Camellia sinensis) |  Epigallocatechin-3-gallate | Aston University (UK) | <ul style="list-style-type: none"> 근육 단백질 합성 증가 - 근육 단백질 합성 촉진 : Akt 증가 - 근육 단백질 분해 억제 : FoxO 억제 | J. Cachexia Sarcopenia Muscle.5(4): 339-45, 2014 |
| 밤나무 (Castanea sativa) |  γ -Tocopherol | University of Florence (Italy) | <ul style="list-style-type: none"> 근육 단백질 합성 증가 - 근육 단백질 분해 억제 : Atrogin-1 억제 - 근육 지름 및 핵 수 증가 | Food Funct.2014, 5: 2870-2882, 2014 |

(나) 시장현황

- 현재 근감소증 치료제로는 Cytokinetics사의 Tirasemtiv와 미토콘드리아의 활성을 증가시킴으로써 근감소증을 개선하는 Stealth peptides사의 Bendavia가 개발되어 있다. 그러나 현재 근감소증 치료는 대부분 궁극적인 원인을 해결하는 것이 아니라 단순히 통증을 경감시키는 약이나 운동, 식이요법 등으로 이루어져있으며 FDA의 승인을 받은 근본적 치료법은 없는 실정이다.
- 전세계 운동보조식품의 시장규모는 2015년 기준 약 12조원이며 이 중 근기능 향상에 주요한 작용을 하는 단백질 제품군이 약 9조원을 차지하며 운동보조식품 시장의 대부분을 차지하고 있다²⁾.

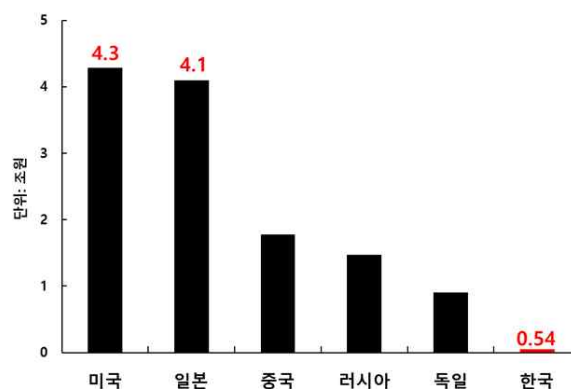


그림 1-6. 주요 국가의 근육관련 운동보조제 시장규모⁹⁾.

- 미국의 운동보조식품 시장은 세계 최대 규모를 형성하고 있으며 미국 내 건강기능식품 중 운동보조식품이 두 번째로 많이 판매되어 2013년 기준 약 4조 3천억원의 시장규모를 차지하고 있다. 이는 2013년 기준 약 540억 시장 규모를 가진 우리나라

의 약 80배에 달하는 규모이다. 미국을 비롯하여 일본, 중국 또한 근기능 향상에 대한 수요가 매우 높음을 알 수 있으며 세계 운동보조제 시장은 2018년까지 약 66조 원으로 성장할 것이다(그림 1-6)⁹⁾.

- 국외 근기능 관련 운동보조제 역시 크레아틴과 단백질을 주성분으로 하고 있으며 미국 내에서 유청단백질이 56%로 가장 높은 시장점유율을 차지하고 있다(표 1-10)¹⁰⁾. 해외 소비자들 역시 국내의 소비자들과 마찬가지로 근육량 증가에 대한 수요가 높은 것으로 분석된다.


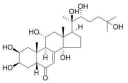

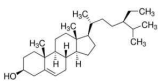

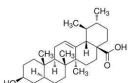

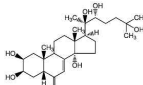

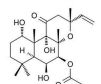
표 1-10. 국외 근기능 관련 산업체 및 제품

| 주요성분 | 제품 | 특징 | 문제점 |
|----------------------------------|--|---|--|
| <chem>CC(N)C(=O)O</chem> 크레아틴 |  Decacor (XPI) | - 에너지 증강 및 운동지구력증가 - 순간적 근력향상 및 운동수행능력향상 | - 근육손상 - 신장기능저하 - 체수분 불균형 - 탈수현상 - 구토·설사·복통 - 근육경련·근육강직·근육파열·근육긴장 |
| |  N.O.-XPLODE (BSN) | | |
| |  Micronized Creatine powder (Creapure) | | |
| |  Creatine (Dymatize) | | |
| 유청단백질 (Whey protein) | 농축유청 단백질 (WPC)  Myofusion (Gaspari Nutrition) | - 운동전후 강력한 근육 회복 및 성장 - 고품량의 아미노산 제공 - 빠른 흡수력 | - 과도한 단백질 섭취로 인한 간·신장 손상 - 칼슘손실로 인한 골다공증 - 위장 통증, 식욕감소, 메스꺼움, 두통, 피로감 |
| | 분리유청 단백질 (WPI)  100% Whey Gold Standard (Optimum Nutrition) | | |
| | 가수분해 유청단백질 (WPH)  100% Hydrolyzed protein (GNC) | | |
| 카제인 |  100% Casein Protein (Optimum Nutrition) | - 필수 아미노산 제공 - 근육합성 증가 | - 늦은 소화흡수 - 소화불량 |
| BCAA (Branched Chain amino acid) |  Branched Chain Amino Acid Powder (NOW sport nutrition) | - 근육 성장 및 재생 촉진 - 고품량의 Leucine 아미노산 제공 | - 제한적 섭취 대상 |
| 계란 단백질 (Egg protein) |  Gold standard 100% egg (Optimum Nutrition) | - 동물성 단백질 포함 - 유당소화장애 대체품 | - 제한적 섭취량 - 늦은 분해 및 흡수 |

- 천연물 유래 성분을 포함하는 근기능 관련 제품은 크레아틴이나 유청단백질을 주성분으로 하는 기존 제품과 차별성을 가질 수 있으며 천연물 유래 성분이라는 점에서


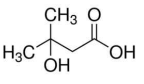

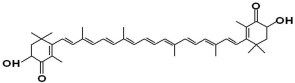

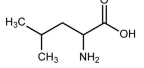
안전성을 확보하고 있다(표 1-11). 그러나 *Ajuga turkestanica*나 *Achyranthes aspera*은 국내에 식용여부가 등록되어 있지 않거나 식용불가인 원료로 국내 적용에는 한계점을 가지고 있다.


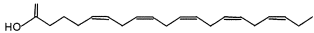

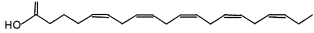

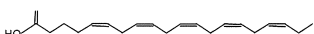

표 1-11. 천연물 유래 성분을 포함하는 근기능 관련 산업체 및 제품

| 기관 | 제품명 | 제품 | 주요성분 | 원료 |
|-------------------------------|---------------------------------------|---|---|--------------------------------------|
| Vitax | Probody Turkesterone Max Muscle |  | Turkesterone  | <i>Ajuga turkestanica</i> |
| Universal Nutrition | Natural Sterol Complex |  | Beta-sitosterol  | Brown rice, Brown algae (현미, 해조류) |
| Labrada | Labrada Ursolic Acid 120 capsules |  | Ursolic acid  | Apple peel (사과 껍질) |
| Natural Science Creation | Natural Strength Enhancement |  | 20-hydroxyecdysone  | <i>Achyranthes aspera</i> |
| Sunny Fox Natural Supplements | Forskolin Belly Buster |  | Forskolin  | <i>Coleus forskohlii</i> |

- 메디컬 푸드(Medical food)란 미국에서 특정한 영양성분이 필요한 환자를 대상으로 의사가 처방하는 환자용 식품이다. 현재 국내에는 정립되지 않은 개념이지만 미국에서는 노화나 암으로 인한 근기능 저하를 개선하기 위한 제품들이 시장에 출시되어 있다(표 1-12). 일반적으로 근육합성에 필요한 고함량의 단백질이나 아미노산과 항산화 기능성분을 포함하고 있다.

표 1-12. 근기능 관련 Medical Foods 현황

| 기관 | 제품명 | 제품 | 주요성분 | 특징 |
|-----------|--------------------|---|--|---|
| Abbott | Juven |  | β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB)  | - 대상질병: Sarcopenia - 근단백질 합성 증가 |
| AstaMed | AstaMed MYO |  | Astaxanthin  | - 대상질병: Sarcopenia - 항산화 효과 - 미토콘드리아 조절기작 |
| Nutri-Dyn | UltraMeal Advanced |  | Leucine  | - 대상질병: Sarcopenia - 필수 아미노산 제공 - 근육합성 증가 |

| | | | |
|----------|--|---|---|
| Abbott | Prosure  | Eicosapentaenoic acid (EPA)  | - 대상질병: Cachexia - 체중조절 및 근육합성 증가 |
| Nutrica | FortiCare  | Eicosapentaenoic acid (EPA)  | - 대상질병: Cachexia - 영양성분 보충 및 고함량 단백질 제공 |
| Novartis | Resource Support  | Eicosapentaenoic acid (EPA)  Docosahexaenoic acid (DHA)  | - 대상질병: Cachexia - 항산화 효과 - 약액질 개선 및 영양보충 |

- 2015년 일본의 야노경제연구소의 건강식품 관련 조사에 따르면 판매희망 기능성분 야에서 ‘근감소증 예방’이 35.6%로서 22항목 중에 1위를 차지하였다¹¹⁾. 현재 근감소증 예방에 대해 실제로 제품화가 되는 사례는 적으나 노화에 따른 근감소증을 뜻하는 ‘로커모티브 증후군’이 일본의 사회적 문제로 대두하며 그에 따른 수요가 증가하고 있는 것으로 분석된다.

(다) 경쟁기관 현황

① 국외 근기능 관련 기술 연구기관

- 국외에서는 미국 Louisville University의 Ashok Kumar 연구팀, 영국의 Cambridge University의 Julian L. Griffin 연구팀, 일본의 Kawasaki medical school의 Yoshigide Sunada 연구팀을 포함한 다양하고 우수한 연구기관에서 근감소와 근육 분화 및 운동수행능력에 관련된 깊은 기초 연구가 활발하게 이루어지고 있다.
- 국외의 경우, 근육세포 내 대사나 근감소증에 대한 연구는 우리나라보다 오래전부터 진행되어 왔으며 근감소와 근비대에 대한 분자적인 연구는 많은 부분 연구가 이루어졌다. 분자수준에서의 기전연구를 통하여, 근기능 관련 질병 또는 이상 등의 문제를 해결하기 위한 천연물·화학물·약물 등의 분야에서 다양한 물질들을 발굴할 수 있도록 촉진할 수 있을 것이다.

표 1-13. 국외 근기능 연구기관 및 연구내용

| 연구수행 기관 | 주요 연구내용 | 대표 논문 |
|---|---|--|
| University of Louisville School of Medicin (Ashok Kumar, USA) | 근육퇴행의 질병원인 및 분자적 메커니즘 연구 | The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 45: 2266-2279, 2013 |
| University of Cambridge (Julian L. Griffin, UK) | 식이유도비만과 노화관련비만 모델에서 Akt1 매개 근육증강의 대사적 분석 | J. Proteome Res. 14(1): 342-352, 2015 |
| Kawasaki Medical School (Yoshigide Sunada, Japan) | 카베올린 3가 결핍되어 생긴 근육퇴행 마우스모델을 통한 근위축증 완화 연구 | Laboratory Investigation 92: 1100-1114, 2012 |
| University of Thessaly (C. Karatzaferei, Greece) | 불활동성 위축 (disuse atrophy)로 인한 골격근 감소 메커니즘 연구 | J Muscle Res Cell Motil 36: 405-421, 2015 |
| University of Urbino Carlo Bo | 노화된 골격근에서의 미토콘드리아 | Oxid Med Cell Longev |

| | | |
|--|---|---|
| (Vilberto Stocchi, Italy) | 활성에 미치는 운동의 효과 | 2015: Article ID 917085, 15 pages, 2015 |
| Rappaport Faculty of Medicine (Oren Rom, Israel) | 골격근손실에서 E3 ubiquitin-ligases MuRF-1과 MAFbx의 역할 | Free Radical Biology and Medicine, 2015 |
| McGill University (Marco Sandri, Canada) | 근위축증에서 FoxO 전사 네트워크에 의한 자가소화 및 ubiquitin-proteasome 시스템의 조절 | Nature Communications 6, Article number: 6670 |

② 국외 근기능 관련 천연물 소재 연구기관

- 국외의 경우 이러한 기초연구를 바탕으로 근기능에 대한 천연물 및 식품원료의 효능에 대한 연구 또한 활발히 이루어지고 있다. 대표적으로 미국에서는 Iowa University의 Christopher M. Adams 연구팀 등이 중국에서는 Shanghai Jiaotong University의 Guo Cheng 연구팀, Southern Medical University의 Lian-Bo Wei 연구팀 외 다양한 국가 및 대학연구기관에서 근기능 개선 천연물 유래 소재를 개발하고 있다.
- 토마토, 사과, 양파, 포도씨앗, 커피 등의 천연물 및 천연물유래 기능성 물질들이 근감소증(sarcopenia) 또는 근위축증(muscle atrophy)에 미치는 효능이 검증되었으며, 분자적 기전 수준 및 동물모델 수준에서도 입증되고 있다. 그러나 이러한 연구에도 불구하고 아직 근기능 관련 천연물 소재에 대한 산업화는 이루어지지 않고 있다.

표 1-14. 국외 근기능 천연 생리활성물질 연구기관 및 연구내용

| 연구수행 기관 | 주요 연구내용 | 대표 논문 |
|---|--|---|
| University of Iowa (Christopher M. Adams, USA) | Tomatidine의 근위축증 억제 효과 연구 | J. Biol. Chem 23: 14913-14924, 2014 |
| | Ursolic acid의 근위축증 억제 효과 연구 | Cell Metab 13(6): 627-638, 2011 |
| Appalachian State University (David Nieman, USA) | 노화된 마우스 골격근에서 천연물 및 천연물유래 기능성 물질의 신호기전 연구 | Eur Rev Med Pharmacol Sci 18 (17): 2584-2592, 2014 |
| University of South Carolina (Ben Davis, USA) | 양파껍질 기능성분 Quercetin의 PGC-1 α 활성화에 의한 미토콘드리아 생합성 증가 및 운동수행능력향상 | Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 296(4): R1071-7, 2009 |
| Washington State University (Min Du, USA) | IL-10이 결핍된 마우스에서 포도씨앗추출물에 의한 골격근감소 예방 | BMC Complementary and Alternative Medicine 14: 162, 2014 |
| University of Tokushima (Junji Terao, Japan) | 근육 미사용으로 인한 근감소증 마우스모델에서 호프의 기능성물질 8-prenylaringenin의 근감소 예방 효과 연구 | PLoS One 7(9): e45048, 2012 |
| Shanghai Jiaotong University (Guo Cheng, China) | 약액질(cachexia) 동물모델에서 parthenolide의 약액질 개선 효과 연구 | Phytomedicine 20: 992-998, 2013 |
| Southern Medical University (Lian-Bo Wei, China) | Resveratrol 의 C2C12 세포에서 Akt-mTOR-FoxO1를 조절 통한 TNF- α 유도 근 위축 예방 효과 | Int.Immunopharmacol 19(2): 206-213, 2014 |
| Tianjin Medical University (Kaijun Niuk, China) | 근감소증이 유발된 노화마우스 모델을 이용한 로얄젤리 및 커피 등 천연물의 효능 검증 | J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci 68(12): 1482-1492, 2013 Exp Gerontol. 50:1-8, 2014 |
| University of Burgundy (Norbert Latruffe, France) | Resveratrol의 골격근 세포 분화촉진 효과 연구 | Biochemical Pharmacology 84: 1251-1259, 2012 |
| Fu Jen Catholic University (Jip Kuo, Taipei) | 가시오갈피의 최대산소섭취량(VO ₂ max) 증가에 의한 지구력 향상 효과 | Chinese Journal of Physiology 53(2): 105-111, 2010 |
| Aston University (Kamran A. Mirza, UK) | 녹차의 기능성분 epigallocatechin-3-gallate의 C2C12 근육세포에서 근육 쇠퇴 완화 연구 | J. Cachexia Sarcopenia Muscle 5(4): 339-45, 2014 |
| University of Burgundy (Norbert Latruffe, France) | Resveratrol의 C2C12 근육세포에서 골격근의 분화유도 효과 연구 | Biochemical Pharmacology 84: 251-1259, 2012 |

(라) 지식재산권현황

- 국외 근감소증 예방 및 치료기술 특허 동향을 분석하였을 때 총 3,182건으로 일본이 1,201건으로 가장 많은 특허를 출원하였으며, 미국이 862건으로 뒤를 이었다. 미국특허청, 일본특허청에 출원된 특허가 차지하는 비중이 각각 43%, 31%로 전체의 74%에 해당한다. 국외에서 출원된 특허를 통해 분석했을 때, 한국의 특허 수는 전체에서 6%에 해당하는 적은 수치이다. 이를 국내 출원인으로 한정시켰을 때는 전체에서 1.5%인 매우 적은 수준으로 현재의 국내 기술수준은 대외적인 경쟁력이 매우 낮은 상태라고 할 수 있다.

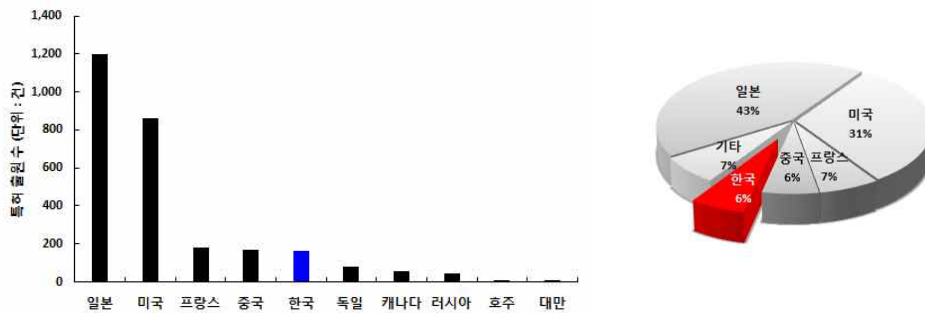


그림 1-7. 세계 근감소증 관련 특허 출원 수.

- 세계와 국내에서의 지식재산권 추이를 살펴본 결과, 국내의 근기능 관련시장에서의 기술경쟁력은 낮은 위치에 있어 세계적으로 증가하는 추세의 노령인구에 따라 커지는 근감소증 시장에 적절하게 대응하지 못할 수 있다. 하지만 본 과제의 목표인 농산물 추출물을 이용한 근기능 증진에 대한 기능성 특허는 많지 않고 관련 기작, 아임계 공정의 활용, 펩타이드와 생리활성물질의 복합 효능을 중점으로 연구한 기술은 거의 없기 때문에 건강기능식품 적용을 위한 본 평가대상기술의 경쟁력은 높다. 따라서 본 과제를 해결함으로써 부족한 국내 기술력을 보완발전하고 근기능 시장에서의 경쟁력 및 차별성을 제고 할 수 있다.

나. 연구개발의 중요성

(1) 기술적 측면

(가) 노화성 근감소증

- 근감소증(Sarcopenia)이란, 노화가 진행되면서 골격근량이 줄어들고, 기능이 떨어지면서 체지방 증가를 동반하는 현상을 말한다¹²⁾. 노화에 의해 근육량이 감소하고 미토콘드리아 기능이 저하되어 신체 활동과 에너지 대사가 감소된다. 그 결과 비만, 골밀도 감소, 당뇨, 고지혈증, 고혈압이 발생된다. 또한, 근감소증은 노인들의 독립적인 생활을 제한하고 일상생활 활동 및 보행장애를 유발한다¹³⁾.
- 2014년 Nature review에 따르면 근감소증은 뇌의 시상하부를 조절하여 식욕억제, 지

방조직에서 지방 합성증가, 알부민 생성 저하에 따른 간손상, 장 벽막의 기능장애로 인한 장 염증, 심근위축증 등을 유발한다고 보고 된 바 있다¹⁴⁾.

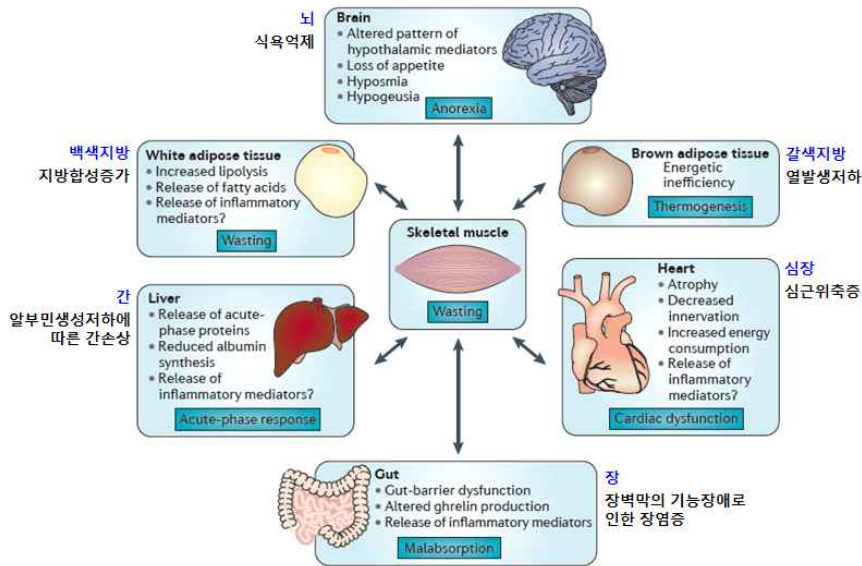


그림 1-8. 근감소증에 따른 다양한 기관 증후군 (Nature, 2014)¹⁴⁾.

- 근육은 노화에 따라 점진적으로 근섬유 크기와 근력이 감소되는 특징을 나타내며, 65세 이상 노인인구의 25-50%는 근감소증을 나타낸다. 30세 이후 근육량은 10년당 5%씩 급격히 감소하여 노인의 낙상과 골절을 일으키는 원인이 된다. 따라서 노인의 일상생활 유지 뿐 만 아니라 대사성 질환을 예방하기 위해 적정량의 근육량 확보가 요구된다¹⁵⁾.
- 근육감소증은 2016년 2월에 세계질병분류에 질병으로 신청이 된 상황이다. 근감소증은 아직까지 세계질병분류에 등록되어 있지 않고, 세계적으로 합의된 정의조차 없을 정도로 이에 대한 연구는 초기단계에 머물러 있다. 유럽의 경우 2010년에 EWGSOP (European working group on sarcopenia in older people)에서 근감소증의 정의와 진단에 관한 유럽만의 합의를 제시하면서 연구를 본격화하기 시작했다. 국내의 경우 2013년 대한근감소증연구회가 탄생하면서 본격 연구를 시작한 상태이다. 따라서 근감소증이 질병으로 등재된다면 이와 관련한 연구와 의약품 개발 등이 급격하게 늘어날 것으로 전망된다.
- 전세계 65세 이상인구는 2005년 4억 7천만 명에서 2010년 5억 3천만 명으로 증가했으며 이는 총인구의 13.1%에 달한다. 2030년에는 9억 7천만 명으로 전체인구의 19.3%를 차지하게 될 것이라고 예측하고 있다¹⁶⁾. 국내의 경우 2000년에 고령화 사회로 진입하였고, 2013년 노인인구가 613만 명으로 12.2%를 차지했으며, 2020년 20.8%까지 증가하여 한국이 2050년 일본에 이어 세계 2위의 고령화 국가가 될 것이라고 전망하고 있다¹⁷⁾.

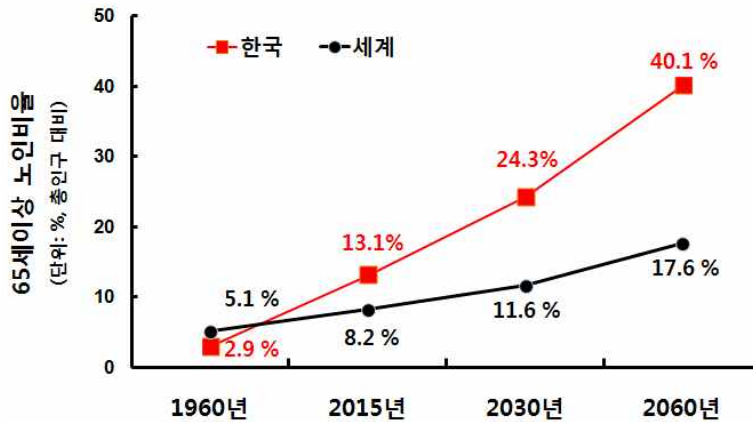


그림 1-9. 65세 이상 인구 고령화 비율 전망¹⁸⁾.

- 노화성 근감소증은 대부분의 노인들에게 있어서 피할 수 없는 질환임에도 불구하고, 치매, 심혈관질환 및 골다공증과 같은 다른 노인성 질환에 비해서 그 중요성이 간과되고 있다. 근감소증 개선용 건강기능식품개발을 통해서 노인들의 건강수명을 연장하고, 고령인구의 삶의 질 향상에 기여하고자 한다. 또한, 고령화 사회의 의료사회비용 문제를 절감 할 수 있을 것으로 전망된다.

(나) 노령기의 식이 단백질 중요성

- 노화에 의한 근감소증은 단백질 합성능력이 낮은 것 뿐 만 아니라 단백질 섭취 감소가 원인이다. 노인성 근감소증을 억제하기 위한 방안으로 식사와 더불어 추가적인 단백질 섭취가 근감소증에 긍정적인 영향이 있다고 보고되고 있다. 노인들은 음식의 소화 및 흡수력이 낮기 때문에 식사로부터 흡수할 수 있는 단백질 양이 제한적이다. 따라서 우유나 콩 등을 통한 정제된 단백질의 추가적인 섭취가 권장되고 있다. 특히 신체활동이 제한된 초고령자나 환자의 경우에 단백질의 추가적인 섭취는 비활동으로 인한 근육감소를 최소화할 수 있는 중요한 수단이 될 수 있다¹⁹⁾.

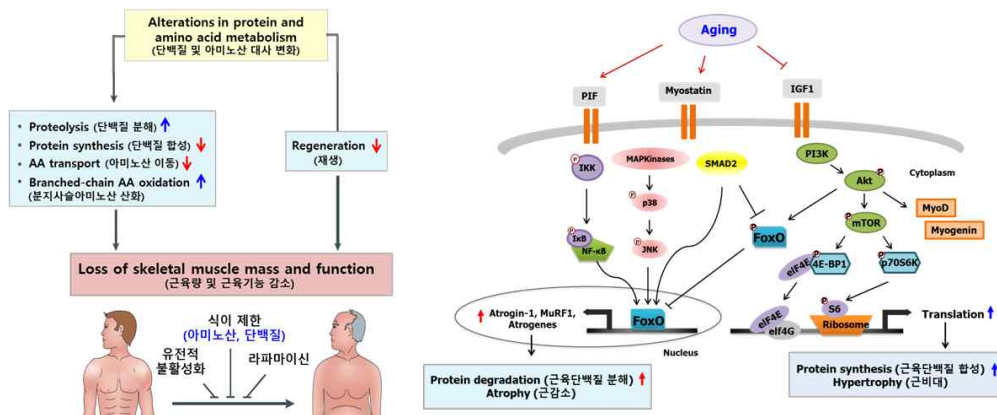


그림 1-10. 단백질 및 아미노산 섭취에 의한 근감소증 개선효과 (Nature, 2014)^{14,20)}.

- Nature 2014년 연구에 따르면, 노화가 진행됨에 따라 신체 내에 염증반응이 증가하여 대표적 염증인자 TNF- α (Tumor necrosis factor alpha)가 근육세포막에 작용하게 된다. 이로 인해 근육단백질합성 주요 조절경로인 PI3K/Akt 및 mTOR pathway가 억제되고 Ubiquitin-proteasome 시스템에 의해 근육단백질 분해가 촉진되어 근감소증(sarcopenia)이 발생한다. 한편, 단백질 및 아미노산의 섭취는 근육단백질 합성 촉진 및 분해 억제를 통하여 근감소증 개선에 효과가 있다고 보고되어 있다.
- 현재 단백질 섭취 기준은 0.8 g/kg/day이고, 70세 이상 노인의 40% 수준이 단백질 섭취 기준을 충족시키지 못하는 것으로 알려지고 있다²¹⁾. 뿐만 아니라 노인들을 대상으로 한 질소 균형 상태를 조사하였을 때, 노인의 단백질섭취기준을 1.14 g/kg/day 수준으로 높여야 한다는 연구결과가 있다²²⁾. 또한, 골격근의 유전자 발현 연구에 따르면, 노인들의 부족한 단백질 섭취는 골격근의 단백질 합성, 마이오신 형성, 위성 세포 증식 및 관련된 전사인자의 발현을 낮추는 것으로 나타났다²³⁾.

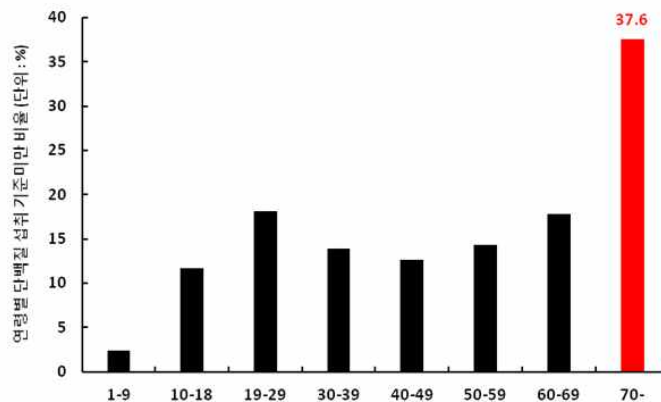











그림 1-11. 연령별 단백질 섭취 기준미만 비율²⁴⁾.

- 노인은 골격근 단백질 합성에 필수적인 아미노산을 이용하는 효율성이 낮다. 필수 아미노산 중에서도 루신의 섭취량은 하루에 최소한 2 g 정도이며, 가능한 6~8 g 정도 매일 섭취하는 것이 권고된다. 다만 섭취한 루신은 골격근의 단백질 합성에 이용된 후에는 그 양이 감소되기 때문에 우리 몸에 순환하는 루신의 양을 유지시켜 단백질 합성을 지속적으로 자극하는 것이 중요하다. 따라서 루신 함량이 풍부한 두류 식품의 섭취는 근육량과 근력 약화에 효과적인 전략이 될 수 있을 것이다²⁵⁾.

(다) 두류 단백질 및 필수 아미노산

- 농촌진흥청에 따르면 두류는 콩과식물(Leguminosae)의 종자로서 다른 작물에 비하여 높은 단백질을 함유하고 있으며 두류의 종류는 완두콩, 강낭콩, 녹두, 팥 등 50여 가지에 이른다. 두류의 영양성분 분석결과에 따르면 두류의 주성분은 탄수화물과 단백질이며 필수 아미노산 중에는 루신이 고농도로 함유되어 있다²⁶⁾. 루신이 가장 많이 들어있는 두류는 대두, 작두콩, 동부, 녹두, 팥이며 함량은 가식부의 1.4~2.4%정도를 차지하고 있다. 이는 대표적인 곡류의 보리나 현미의 약 2배에 해당하는 양이다.

표 1-15. 두류의 일반성분 및 필수 아미노산 함량²⁶⁾

| | 영양성분 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 대두 | 검은콩 | 녹두 | 완두 | 강낭콩 | 동부 | 팥 | 작두콩 | 쥐눈이콩 |
| 일반성분 (g/100g) | 탄수화물 | 30.7 | 30.5 | 62 | 67.1 | 63.9 | 60.3 | 68.4 | 57.4 | 41.2 |
| | 지질 | 17.8 | 18.1 | 1.5 | 1.3 | 1.1 | 2.1 | 0.1 | 1.0 | 6.9 |
| | 회분 | 5.6 | 5.4 | 3.3 | 2.8 | 3.4 | 3.9 | 3.3 | 3.3 | 5.2 |
| | 단백질 | 34.5 | 33.7 | 23.2 | 21.3 | 20.6 | 22.5 | 19.3 | 26.9 | 38.9 |
| 필수 아미노산 (mg/100g) | 루신 | 2,435 | 2,299 | 1,677 | 1615 | 1542 | 1,622 | 1,417 | 2,272 | 2,746 |
| | 이소루신 | 1,418 | 1,210 | 923 | 933 | 855 | 864 | 718 | 1,109 | 1,345 |
| | 라이신 | 1,975 | 1,889 | 1,741 | 1532 | 1293 | 1,375 | 1,316 | 1,523 | 2,157 |
| | 메티오닌 | 424 | 277 | 192 | 223 | 190 | 254 | 259 | 213 | 386 |
| | 페닐알라닌 | 1,443 | 1,441 | 1,314 | 1054 | 1008 | 1,097 | 932 | 1,173 | 1,729 |
| | 트레오닌 | 1,211 | 1,225 | 844 | 823 | 756 | 761 | 614 | 1,149 | 1,273 |
| | 트리토판 | - | 365 | 262 | 208 | 225 | - | - | 363 | 389 |
| | 발린 | 1,416 | 1,123 | 1,132 | 1034 | 983 | 976 | 838 | 1,219 | 1,353 |
| | 히스티딘 | 756 | 542 | 651 | 623 | 521 | 602 | 505 | 635 | 712 |
| 아르기닌 | 2,219 | 1,971 | 1,762 | 1915 | 1238 | 1,450 | 1,252 | 1,515 | 2,205 | |
| 분지사슬아미노산 (Branched-chain amino acid) | | 5,269 | 4,632 | 3,732 | 833 | 1,834 | 3,462 | 2,973 | 4,600 | 5,444 |

○ 필수 아미노산 중에서도 루신(leucine)은 단백질 분해를 억제시키는 대신 단백질 합성을 촉진시키는 역할을 한다. 루신은 mTOR 신호전달체계의 활성화를 통해 mTOR, p70S6K, eIF, 4EBP1, eIF4G의 인산화를 증가시켜 근육 단백질 합성을 증가시킨다. 또한, 골격근 특이성 E3 ligases에 해당하는 MuRF1 및 MAFbx/atrogen-1 유전자 발현을 최소화하여 근육 손실을 최소화시킨 것으로 밝혀졌다²⁷⁾.

○ 근육 단백질 합성에 대한 루신의 일회성 자극은 장시간 지속되지 않는데, 그 이유는 mTOR 신호전달체계의 활성화 및 단백질 합성으로 인해 혈중 아미노산 수준이 떨어지기 때문이다. 그러나 단백질 보충을 통하여 혈중 아미노산 수준을 일정하게 유지시키면 단백질 합성은 장시간 지속된다. 따라서 적정 단백질 및 루신-강화균형아미노산(leucine-enriched balanced amino acids)의 섭취는 단백질 합성의 증진을 통해 근육량과 근력 유지에 중요한 역할을 한다²⁸⁾.

○ 21세기에 접어들면서 현재 스포츠 영양 시장은 지속적 성장세에 있고, 단백질 보충제 중에서도 식물성 단백질 보충제의 수요대상들이 증가하고 있다. 이러한 시점에서 동물성 단백질 성분이 식물성 단백질을 활용한 근기능 개선 건강기능식품의 소재 개발은 산업적 경쟁력이 높을 것으로 전망된다.

(라) 두류의 근기능 선행연구

○ 강낭콩, 작두콩, 쥐눈이콩, 검정콩의 근기능 향상 효능은 특허와 논문으로 이미 검증된 바 있다. 1995년 British Journal of Nutrition지에 따르면 강낭콩의 장딴지근 증가에 대한 효능이 밝혀졌으며 작두콩, 쥐눈이콩, 검정콩에 대하여 각각 운동수행능력

증가, 근무력증 억제, 근골격 증가 효능에 대한 선행연구가 이루어졌다.

표 1-16. 두류의 근기능 선행 연구

| 두 류 | 연구기관 | 핵심 연구내용 | 참고문헌 |
|---|---------------------------|---|---|
|  강낭콩 | Rowett Research Institute | <ul style="list-style-type: none"> 장딴지근(Gastrocnemius) 증가 | British Journal of Nutrition, 13: 17-29, 1995 |
|  작두콩 | 전남대학교 산학협력단/농업회사법인 (주)산들촌 | <ul style="list-style-type: none"> 운동수행능력증가 - 수영시간 증가 - 혈중 젖산 감소 - 운동성 산화 스트레스 감소 | 대한민국특허 등록번호: 1016326980000 등록일자: 2016.06.16 |
|  쥐눈이콩 | 건국대학교 산학협력단 | <ul style="list-style-type: none"> 근무력증 억제 - Acetylcholine esterase 억제활성 | 대한민국특허 등록번호: 1005503580000 등록일자: 2006.02.02 |
|  검정콩(서리태) | 신규식 | <ul style="list-style-type: none"> 체지방 감소 근골격 증가 | 대한민국특허 공개번호: 1020140106274 공개일자: 2014.09.03 |





(마) 연구대상 최종 선정 두류

- 두류 선정을 위해 식용 가능한 원료를 바탕으로 식품공전 및 식품의약품안전처에 제시되어 있으며 근기능 관련하여 선행연구 사례가 없고 단백질 함량이 높은 국내산 두류 10종(녹두, 완두, 동부, 팥, 잠두, 제비콩, 붉은강낭콩, 그린콩, 덩굴강낭콩, 검은 팥)을 최종 선정하였다(표 1-17, 1-18).

표 1-17. 두류선정 기준

| No. | 기준 |
|-----|------------------------|
| 1 | 식용 가능한 원료 |
| 2 | 식품공전 및 식품의약품안전처 제시 |
| 3 | 근기능 선행연구(특허, 논문) 사례 전무 |
| 4 | 국내산 |
| 5 | 높은 단백질 함량 |

표 1-18. 두류별 식용가능 부위 및 단백질 함량

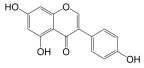
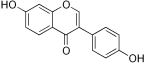
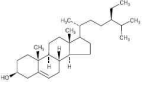
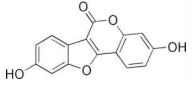
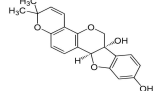
| 이름 | 이명 | Common name | 학명 | 식용 부위 ^{26,29)} | 단백질함량 (g/100g) |
|---|---------------------|-------------|---|-------------------------|---------------------|
| 검은팥  | 검정팥 | Adzuki Bean | <i>Vigna angularis var. angularis</i> | 씨앗 | 21.6 ²⁶⁾ |
| 그린콩  | 깍지콩 | Green Bean | <i>Phaseolus radiatus L. var. aurea</i> | 씨앗, 꼬투리 | 22.1 ³⁰⁾ |
| 녹두  | 안두, 길두 | Mung Bean | <i>Phaseolus radiatus L.</i> | 씨앗 | 23.2 ²⁶⁾ |
| 덩굴강낭콩  | 호랑이콩, 운편두, 강남채두, 돛부 | Black Bean | <i>Phaseolus vulgaris L.</i> | 씨앗, 꼬투리 | 23.8 ³¹⁾ |
| 동부  | 강두 | Cowpea | <i>Vigna unguiculata (L.) Walp.</i> | 씨앗, 꼬투리 | 22.5 ²⁶⁾ |

| | | | | | |
|---|----------|---------------|------------------------------------|------------|---------------------|
| 붉은강낭콩  | 올타리콩 | - | <i>Phaseolus multiflorus</i> Wild. | 씨앗 | 22.5 ²⁶⁾ |
| 완두  | 흰꽃완두 | Pea | <i>Pisum sativum</i> L. | 씨앗, 꼬투리 | 21.3 ²⁶⁾ |
| 잠두  | 누에콩, 마마콩 | Broad Bean | <i>Vicia faba</i> L. | 씨앗 | 26.1 ²⁶⁾ |
| 제비콩  | 백편두 | Hyacinth Bean | <i>Dolichos lablab</i> L. | 씨앗 | 22.4 ³²⁾ |
| 팥  | 소두, 적소두 | Red Bean | <i>Vigna angularis</i> W.F.Wight | 씨앗 | 19.3 ²⁶⁾ |

(바) 두류의 근기능 관련 생리활성물질

- 콩과식물은 1차 대사산물인 탄수화물, 단백질, 지방 외에도 다양한 향암, 혈중 콜레스테롤 저하, 항당뇨 등의 생리활성성분이 많이 함유되어 있어 건강기능성식품 개발 및 산업화로써 가치가 매우 높다. 최근 연구에 의하면, 콩과식물에 다량으로 함유되어 있는 아이소플라본은 근감소증을 예방한다는 연구결과가 보고된 바 있다(표 1-19).

표 1-19. 두류의 근기능 및 근지구력 개선 생리활성물질

| 성분명 | 구조 | 성분함량 (100 g 건물기준) | 효능 | 논문 |
|--------------|---|-------------------------|---|---|
| Genistein |  | 0.21 mg ³³⁾ | C2C12 세포모델에서 SIRT1 활성화를 통한 MuRF1 억제 근감소증 개선 효과 | J Nutr Sci Vitaminol., 59(4), 317-324, 2013 |
| Daidzein |  | 0.35 mg ³³⁾ | | |
| β-Sitosterol |  | 18.27 mg ³⁴⁾ | 동물모델에서 mTOR 활성화에 따른 근육 세포 증식 및 분화 | Trop J Pharm Res, 13(1), 9-16, 2014 |
| Coumestrol |  | 0.5 mg ³⁵⁾ | C2C12 근육 세포모델에서 SIRT1 활성화를 통한 mitochondrial biogenesis 효과 | J. Agric. Food Chem., 62: 4298-4305, 2014 |
| Glyceollin |  | - | L6 근육 세포에서 지구력 관련 생체지표 AMPK 증가 | J Nutr Biochem. 24(6): 1053-61, 2013 |

- 본 연구에서는 국내산 두류의 풍부한 식물성 단백질과 2차 대사산물을 용매별 추출, 표준화 기술 등을 이용하여 유용성물질을 극대화 하고자 한다. 이를 통해 개발된 근기능 개선 건강기능식품은 급증하는 고령 인구에 맞춘 두류 소재의 신규 기능성 식품 산업화 연구가 될 것이다.
- 노화성 근감소증 연구는 전 세계적으로 시작단계이기 때문에 본 연구진의 *in vitro*, *in vivo* 실험의 분자적 기전 규명을 통한 효능평가는 향후 신규기능성 건강기능식품 개발의 소재발굴에 중요한 정보를 제공할 것이며, 근감소증의 개선을 위한 기술 개발 또는 임상적용에 적용 될 것이다.

(2) 경제·산업적 측면

- 국내 노인인구는 2000년 전체인구의 7%를 돌파하여 고령화사회로 진입하였고, 2013년 613만 7702명으로 12.2%를 차지하였다. 고령인구는 젊은층의 5배에 해당하는 과도한 의료비용을 지출하여 사회 경제적인 문제로 대두되고 있다. 2011년 한국보건산업진흥원의 발표에 의하면 의료비 분포는 65~84세 노인층이 40%로 가장 많았고, 65세 이상 노인인구의 의료비는 2009년도 12조 4,236억원에서 2015년 21조 9,210억 원으로 2009년 대비 76% 증가하였다³⁶⁾. 노화성 근감소증 환자수를 10% 줄이면 연간 1조원의 의료비를 절감할 수 있다고 보고되고 있어 본 연구의 건강기능식품 개발로서 의료비 지출을 경감할 수 있을 것으로 전망된다¹⁹⁾.
- 국내 근 기능 관련 시장은 초기 단계로서 근기능 향상 건강기능식품은 없다. 하지만 노화와 근육의 밀접한 상관관계가 밝혀지면서 근기능과 관련된 항노화 산업 및 관련 제품 시장이 발전할 것으로 전망된다. 따라서 본 연구를 통해 운동수행능력 건강기능식품과 유사한 신규 기능성으로서 근기능 관련 시장 선점 우위성을 가질 것으로 전망된다.
- 국내 주관기업인 뉴트리가 본 연구를 통해 개발된 기술을 산업화할 것이며, 이미 보유하고 있는 다양한 유통라인을 통하여 시장에 진입할 예정으로 제품의 기능성이 검증된 건강기능식품은 높은 경쟁력으로 시장을 점유할 것으로 예상하고 있다. 본 연구의 노화성 근감소증 개선 건강기능식품 개발을 통해 고령화 사회의 의료사회비용을 절감할 수 있을 것이다.

(3) 사회·문화적 측면

- 2018년을 기점으로 전 연령대의 경제활동인구가 고령화로 인해서 감소할 것으로 전망된다. 2010년 기준으로 경제활동인구 중 25%를 차지하고 있는 50세 이상 고령자의 비중이 2020년 33%를 초과하여 노동력 부족 등의 사회적 문제가 대두될 것으로 예상된다³⁷⁾.

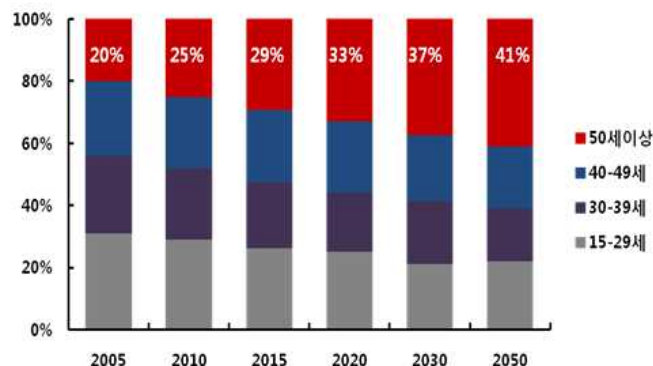


그림 1-12. 경제활동인구 고령화 전망³⁶⁾.

- 근기능개선 건강기능식품 개발 기술은 근기능 개선 뿐만 아니라 비만, 당뇨, 고혈압, 우울증 등과 같은 근기능 저하와 관련된 노인성 질환에 효과를 보이며 노년기 활동성 장애 극복과 건강수명 연장에 이바지할 것이다. 건강수명 5년 연장은 건강관리 비용 연간 17조원 절감 효과를 가지며 건강한 고령 인구는 경제 생산 활동에 참여함으로써 고령 사회의 경제 생산성 저하 문제를 해결할 수 있다³⁶⁾.

1-3. 연구개발 범위

- 두류는 원료 확보가 용이하고 다양한 생리활성물질을 갖고 있어 식품산업에서 다양하게 사용되는 원료이다. 그럼에도 불구하고 두류의 근기능, 특히 노화성 근감소증에 대한 연구는 매우 초보적인 수준이다. 본 연구진은 근육단백질합성에 주요 생체지표인 mTOR 활성 평가를 통한 스크리닝 시스템을 구축하고, 근육위성세포모델을 이용하여 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근육분화조절 평가를 진행할 것이다. 또한 부동화 및 노화 동물 모델을 이용하여 두류의 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 강화 효능을 평가할 것이다.
- 두류 유래 생리활성물질의 근기능 강화에 대한 연구는 isoflavones에만 한정되어 있다. 본 연구진은 기 구축된 스크리닝 시스템을 이용하여 isoflavones 이외에 새로운 근기능 강화 신소재 발굴할 것이다. 또한 새로운 생리활성물질의 표준화 및 물리화학적 특성을 규명하고 생리활성물질의 유용성 극대화를 위한 최적 추출공정을 개발하여 산업적 생산 및 상품화기술에 적용할 것이다.
- 본 연구진은 산업화 단계에 이르지 못한 임상시험을 식품의약품안전처 인체적용기준에 부합하도록 노인을 대상으로 두류 제품의 근기능 개선을 검증하고자 한다. 현재까지 시도되지 않은 근기능 인체적용시험을 시행하여 두류의 생리활성물질 및 펩타이드 근기능 강화 건강기능식품 소재를 개발하고자 한다. 체내 흡수율이 낮은 두류 단백질의 문제점은 본 연구진이 보유한 아임계공정 기반 펩타이드화 기술을 이용하여 단백질의 이용률, 기능성, 체내 흡수율을 극대화 할 것이다.

표 1-20. 본 연구의 연구 범위

| 구분 | | 기존 연구의 문제점 | 본 연구의 개선 방안 |
|-------|-------------------------------|--|--|
| 기능 연구 | 두류의 생리활성물질 및 펩타이드 근기능 강화 평가기술 | <ul style="list-style-type: none"> - 농산물 유래 근기능 강화 소재의 세포모델 기반 정량적 스크리닝 기술 적용 미흡 - 근육 위성세포 모델 기반의 농산물 유래 소재에 대한 근육 분화조절 평가기술 미흡 - 부동화 및 노령화 동물모델 기반의 농산물 유래 소재에 대한 근기능 강화 평가기술은 기초단계임 - 두류 유래 생리활성물질의 근기능 강화에 대한 연구는 isoflavones 소재에 한정되어 있음 | <ul style="list-style-type: none"> - 근육 단백질 합성의 주요 생체지표인 mTOR 활성 정량 평가를 통한 스크리닝 시스템 구축 - 근육 위성세포 모델 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근육 분화조절 기능 평가 - 부동화 및 노령화 동물 모델을 이용한 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 강화 효능 평가 - Isoflavones 이외에 두류 생리활성물질에 대한 근육단백질합성 평가를 통해 새로운 근기능 강화 신소재 발굴 |

| | | | |
|-------|-----------------------------------|--|--|
| 기술 연구 | <p>두류의 생리활성물질 및 펩타이드의 유용성 극대화</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 두류 유래 근기능 생리활성물질의 유용성 극대화를 위한 추출공정 및 물리화학적 연구가 미흡함 - 두류 단백질의 변성으로 인한 단백질의 이용률, 기능성, 체내 흡수율이 낮음 | <ul style="list-style-type: none"> - 새로운 근기능 강화 생리활성물질의 표준화 및 물리화학적 특성 규명 - 새로운 생리활성물질의 극대화를 위한 최적 추출공정 개발 - 아임계공정 기반 두류 단백질의 펩타이드화를 통한 단백질의 이용률, 기능성, 체내 흡수율 극대화 |
| 제품 연구 | <p>두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제품기술</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험 미흡 등으로 인해 산업화 단계에 이르지 못함 - 두류의 근기능 생리활성물질 및 펩타이드의 산업적 생산공정과 산업화 기술이 미흡함 - 건강기능식품으로 근기능 강화에 대한 농산물 유래 소재발굴은 체계적으로 시도된 바 없음 | <ul style="list-style-type: none"> - 식품의약품안전처 인체적용기준에 근거한 두류 제품의 근기능 개선 임상시험 설계 - 노화에 의한 근감소증 임상대상자 설정 - 임상시험을 통한 근기능 강화 두류 생리활성물질 및 펩타이드 소재 건강기능식품 개발 - 기 구축된 가용화, 복합 제제화, formulation 기술을 이용하여 근기능 두류 생리활성물질과 펩타이드의 산업적 생산 및 상품화 |

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발의 추진전략 방법 및 추진체계

가. 추진 전략 방법

(1) 추출공정을 이용한 두류 생리활성물질 제조

- 식품공전에 근거한 국내산 두류 10종을 확보
- 열수, 주정 등 식용가능 추출용매를 이용한 두류 생리활성물질 추출물 라이브러리 제조
- 아임계 공정 조건에 따른 두류 단백질 분해 및 펩타이드 라이브러리 확보

(2) 효소 및 아임계 공정을 이용한 두류 펩타이드 제조

- 상업용 proteases를 이용하여 두류 단백질 분해 펩타이드 라이브러리 제조
- 효소분해에 따른 단백질 수율, 분자량을 비교분석하여 최적화 공정 선정

(3) 대표 두류 펩타이드 제조공정 최적화

- GPC를 이용한 대표 두류 펩타이드의 분자량별 분획기술 개발
- pH 변성 및 열처리에 따른 안정성 평가

(4) 두류 생리활성물질 및 펩타이드 제조공정 표준화

- 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 표준화 제조공정 확립
- 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 분자량별 분획 scale-up 연구
- 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 산업적 대량 생산공정 설계

(5) 표준화 생리활성 추출물 및 펩타이드의 이화학적 특성 규명

- 표준화 생리활성 추출물의 주요 성분 분석 : 표준품 HPLC, LC-MS 등
- 표준화 펩타이드의 아미노산 조성 분석 : 아미노산 분석기
- 표준화 펩타이드의 평균 분자량 및 분자량 분포 : GPC
- 표준화 생리활성 추출물 및 펩타이드의 안정성 평가 : pH, 열, UV 등

(6) 세포모형을 이용한 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 개선 검증

- 근육 단백질 합성의 주요 조절인자인 mTOR 활성 평가
- Luciferase assay를 이용한 근지구력 주요 생체지표인 PGC-1 α 활성 평가
- 근기능 개선 지표의 종합평가를 통한 대표 두류 선정

(7) 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 분자기전 규명(*in vitro*)

- 근육 단백질 합성을 조절하는 주요인자 단백질 발현량 확인
- 근지구력을 조절하는 미토콘드리아 생합성의 주요인자 mRNA 발현량 확인
- 근육세포분화를 조절하는 주요인자(MyoD, myogenin) mRNA 발현량 확인

(8) 줄기세포 모델 근육위성세포(Satellite cell) 분화 활성검증

- 동물 근육조직을 이용하여 근육위성세포 분리 시스템 구축
- 근육세포 분화 주요인자(Pax7, MyoD, myogenin) mRNA 발현량 확인
- 근육세포의 type I, type II 핵심조절인자(MyHC I, MyHC II) 발현량 확인

(9) 대표 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 활성 검증 (*in vivo*)

- 부동 및 노화 동물모델 구축하고 생체지표를 선정
- 근육부위별 무게 및 근력 측정을 통한 근기능 개선 검증
- 트레이닝을 이용한 노화 동물모델의 근지구력 측정
- 근육 단백질합성 및 근육세포분화 조절 인자 확인
- 근지구력을 조절 미토콘드리아 생합성의 주요인자 확인

(10) 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 상품화 기술 개발

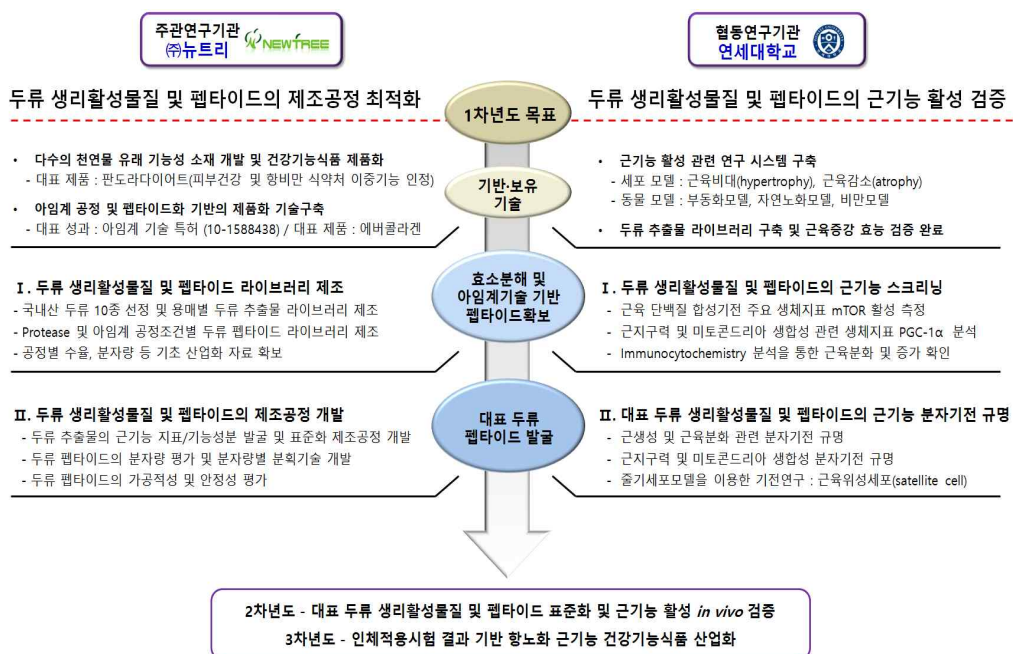
- 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 복합 제제화 기술 개발
- 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 가용성 증진 기술 개발
- 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 맛 조절 formulation 기술 개발

(11) 두류 생리활성물질 및 펩타이드 복합소재 근기능 인체 적용시험 근거 확보

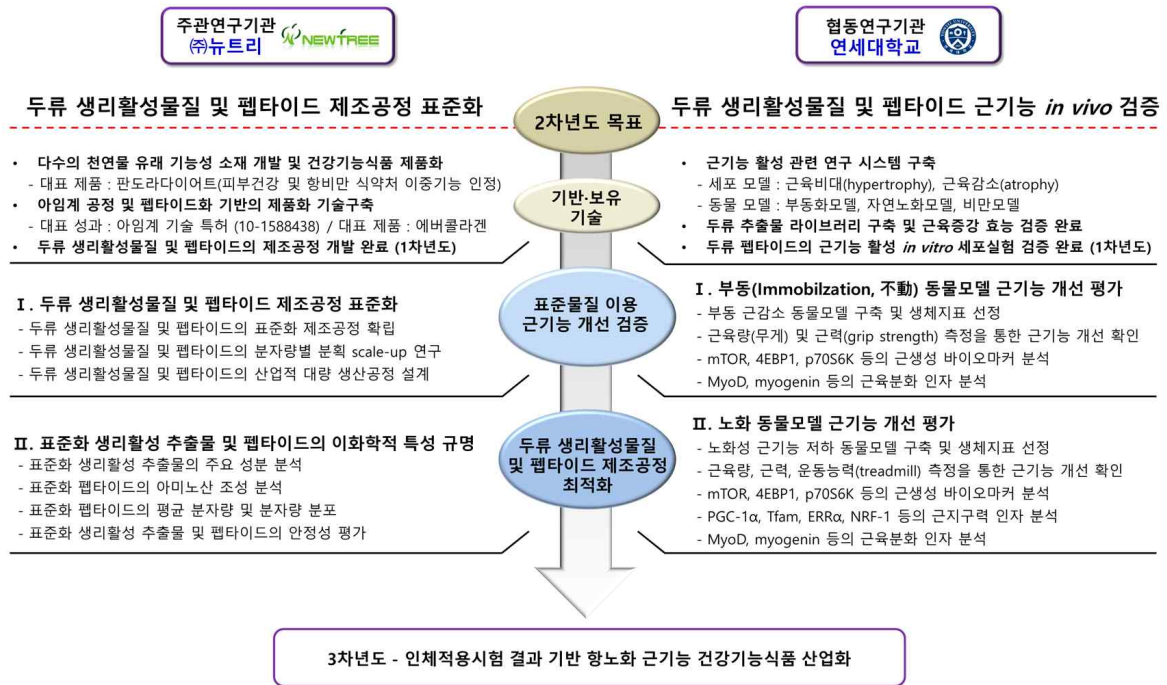
- 식품의약품안전처 인체적용기준에 근거한 두류 펩생리활성물질 및 펩타이드 복합소재의 근력 및 근지구력 인체적용시험설계
- 두류 펩타이드의 인체 적용시험 실시 등 IRB 승인 기관 활용

나. 추진체계

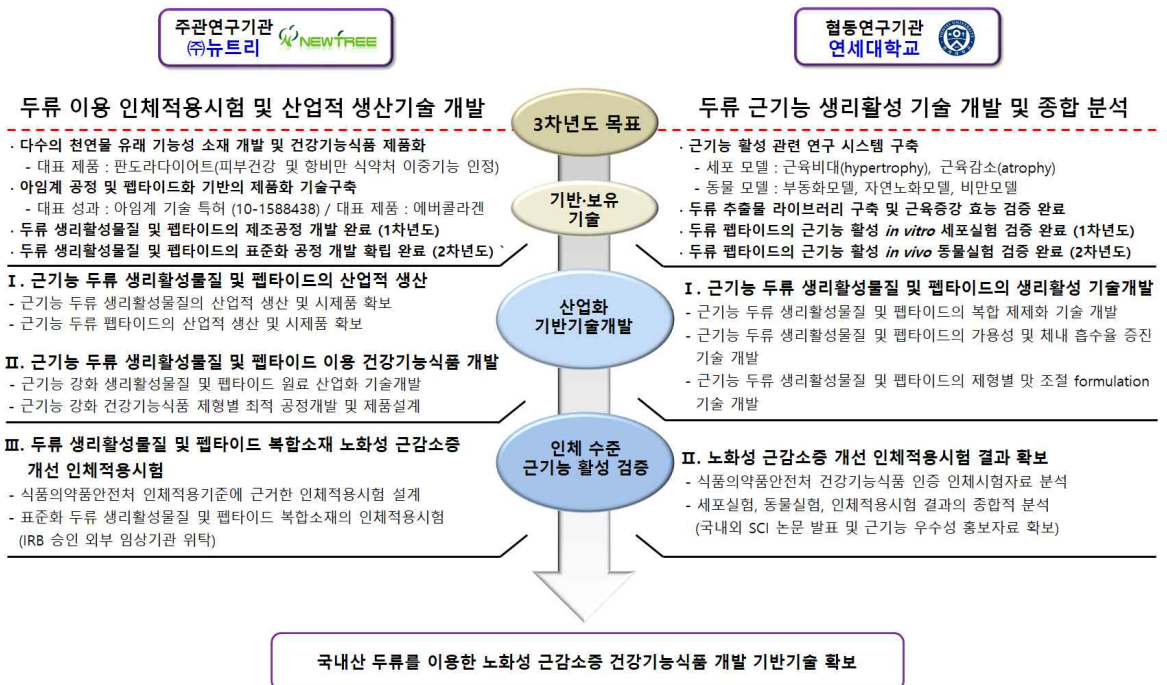
(1) 1차년도



(2) 2차년도



(3) 3차년도



2-2. 연구수행 내용 및 결과

가. 주관기관(뉴트리)

○ 연구개발목표 및 내용

| 차년도 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 |
|------|------|--|---|
| 1차년도 | 2016 | 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제조공정 개발 | (1) 두류 생리활성물질 탐색 및 펩타이드 제조 - 국내산 두류 원료 10종 시료수집 : 녹두, 완두, 동부, 팥, 잠두, 제비콩, 붉은강낭콩, 그린콩, 덩굴강낭콩, 검은팥 - 열수, 주정 등 용매별 두류 추출물 라이브러리 제조 - 아임계 공정조건 별 두류 펩타이드 라이브러리 제조 - Protease 별 대표 두류 펩타이드 라이브러리 제조 - 공정별 수율, 분자량 등 기초 산업화 자료 확보 (2) 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제조공정 개발 - 두류 추출물의 근기능 지표/기능 성분 발굴 - 두류 추출물의 지표/기능성분 표준화 제조공정 개발 - 두류 펩타이드의 분자량 평가 및 분자량별 분획기술 개발 - 두류 펩타이드의 가공적성 및 안정성 평가 |
| 2차년도 | 2017 | 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제조공정 표준화 | (1) 두류 생리활성물질 및 펩타이드 제조공정 표준화 - 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 표준화 제조공정 확립 - 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 분자량별 분획 scale-up 연구 - 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 산업적 대량 생산공정 설계 (2) 표준화 생리활성 추출물 및 펩타이드의 이화학적 특성 규명 - 표준화 생리활성 추출물의 주요 성분 분석 - 표준화 펩타이드의 아미노산 조성 분석 - 표준화 펩타이드의 평균 분자량 및 분자량 분포 - 표준화 생리활성 추출물 및 펩타이드의 안정성 평가 |
| 3차년도 | 2018 | 두류 생리활성물질 및 펩타이드를 이용한 노화성 근감소증 개선 건강기능식품 산업화 | (1) 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 산업적 생산 - 근기능 두류 생리활성물질의 산업적 생산 및 시제품 확보 - 근기능 두류 펩타이드의 산업적 생산 및 시제품 확보 (2) 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드 이용 건강기능식품 개발 - 근기능 강화 생리활성물질 및 펩타이드 원료 산업화 기술개발 - 근기능 강화 건강기능식품 제형별 최적 공정개발 및 제품설계 - 단백질 보충용 건강기능식품 시제품 생산 (3) 두류 생리활성물질 및 펩타이드 복합소재 노화성 근감소증 개선 인체적용시험 - 식품의약품안전처 인체적용기준에 근거한 인체적용시험 설계 - 표준화 두류 생리활성물질 및 펩타이드 복합소재의 근력 및 근지구력 인체적용시험(IRB 승인 외부 임상기관 위탁) |

(1) 1차년도 수행내용 및 결과

(가) 두류 생리활성물질 탐색 및 펩타이드 제조

① 국내산 두류 10종 구입

- 검은팥, 그린콩, 녹두, 동부, 붉은강낭콩, 완두, 잠두, 제비콩, 팥, 호랑이콩 등 총 국내산 두류 10종을 청옥산 농원, 채소박사, 인차 등에서 구입하여 실험에 사용하였다 (표 2-1-1).

표 2-1-1. 국내산 두류 10종 구매처 정보

| 국내산 두류 | 국내산 두류 |
|--|--|
|  <ul style="list-style-type: none"> 검은콩 <i>Vigna angularis</i> var. <i>angularis</i> 10,000원/kg (정육산농원) |  <ul style="list-style-type: none"> 완두 <i>Pisum sativum</i> L. 19,000원/kg (허풍이네밭) |
|  <ul style="list-style-type: none"> 그린콩 <i>Phaseolus radiatus</i> L. var. <i>aurea</i> 18,500원/kg (저스팍사) |  <ul style="list-style-type: none"> 장두 <i>Vicia faba</i> L. 30,000원 (동진농장) |
|  <ul style="list-style-type: none"> 녹두 <i>Phaseolus radiatus</i> L. 20,000원/kg (인차) |  <ul style="list-style-type: none"> 제비콩 <i>Dalchos lablab</i> L. 20,000원/kg (우리농사농업과학기술원) |
|  <ul style="list-style-type: none"> 동두 <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. 11,000원/kg (약초출삼사할) |  <ul style="list-style-type: none"> 팥 <i>Vigna angularis</i> W.F.Wight 5,000원/kg (약초출삼사할) |
|  <ul style="list-style-type: none"> 붉은강낭콩 <i>Phaseolus multiflorus</i> Wild. 9,500원/kg (인차) |  <ul style="list-style-type: none"> 포랑이콩(황유강낭콩) <i>Phaseolus vulgaris</i> L. 11,000원/kg (약초출삼사할) |

(나) 주정 추출물 제작

- 10종의 국내산 두류를 믹서기로 분쇄한 다음, 분쇄된 두류 10 g에 100 mL 주정을 넣고 water bath에서 180 rpm, 25°C, 4시간의 조건으로 skaking하여 주정 추출물을 제작하였다. 4시간이 지난 후, whatman 2번 filter paper를 이용하여 추출물을 분리한 후, evaporator (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG., Schwabach, Germany)를 이용하여 주정을 모두 제거한 뒤, 수율을 측정하였다.

(다) 열수 추출물 제작

- 10종의 국내산 두류를 믹서기로 분쇄한 다음, 분쇄된 두류 1 g에 10 mL 물을 넣고 water bath에서 180 rpm, 80°C, 4시간의 조건으로 shaking하여 열수 추출물을 제작하였다. 3,600 rpm, 30분의 조건으로 원심분리하여 residue를 가라앉힌 후, 상등액을 whatman 2번 filter paper를 이용하여 여과하였다. Evaporator(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG.)를 이용하여 물을 모두 제거한 뒤, 수율을 측정하였다.

(라) 아임계 추출물 제작

- 회분식 아임계수 장치(Biovan, Bucheon, Korea)를 이용하여 두류 아임계 추출물을 제작하였다. 믹서기로 분쇄한 두류 50g와 물 1 L를 고속 임펠러 균질기(HG-15A, Daihan Scientific, Wonju, Korea)를 사용하여 분산시켰다. 현탁액을 반응기에 넣고 밀폐한 후, 배기밸브를 열어놓은 상태에서 가열하여 현탁액의 온도가 80°C가 되었을 때, 질소가스의 주입을 약 1분간 퍼지하여 압력을 모두 떨어뜨린 후, 설정온도로 가열하였다. 이때, 반응기 내부 압력은 설정 온도에서 물의 포화증기압보다 약간 높은 압력을 유지하였다. 현탁액의 온도가 설정온도에 도달한 시점으로부터 20분간 반응시켰으며, 20분 후, 고압 및 고온의 두류 아임계 추출물이 재킷을 통해 냉매가 흐르는 상압의 저장용기로

배출되어 급속 냉각되게 하였다. 냉각된 두류 아임계 추출물을 원심분리하여 상등액을 회수한 뒤, 고형분 측정기기(IR-35, Denver Instrument, Bohemia, NY, USA)로 추출 수율을 측정하였다.

(마) 팥 펩타이드 제작

- 100 g 팥을 믹서기로 분쇄하여 가루로 만든 후, 1 L hexane (1:10, w/v)로 25°C, 4시간 추출하여 oil을 제거하였다. Filter paper 여과되어 남은 박을 완전히 건조시킨 후, 물을 넣고 3N NaOH로 pH를 9로 맞춘 후, 25°C에서 30분 간 물 추출을 하였다. 30분 뒤, 6,000 rpm, 30°C, 30분간 원심 분리하여 상등액만 취하였으며 상등액을 1N HCl로 pH를 4.5로 낮추어 팥 분리 단백을 얻었다. 침전된 단백질을 다시 물에 넣고, 3N NaOH로 pH를 8로 맞추어 충분히 녹였다. 0.5% Alcalase, flouvozyme, neutrase, protamex (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark)와 protease-NP (Bioland, Chaona, Korea)를 넣은 후, 50°C에서 6시간 동안 활성화하여 peptide를 만들었다. 6시간 후, 90°C, 20분의 조건에서 동안 효소를 불활성화하여 단백질의 가수분해 반응을 정지시켰다(그림 2-1-1). ortho-Phthalaldehyde (OPA, Sigma-aldrich, St Louis, MO, USA) 시약으로 340 nm에서 흡광도를 측정하여 가수분해 정도를 확인하였다.

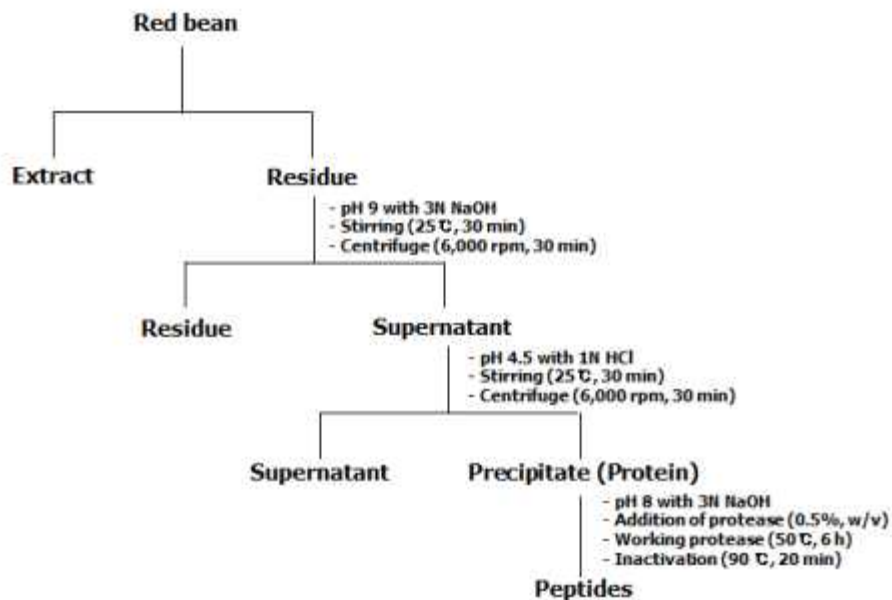


그림 2-1-1. 팥 펩타이드 제조 공정.







(사) 결과 및 고찰

① 아임계 추출물 조건 확립

- 아임계 추출 조건을 확립하기 위하여 1) 180°C, 13 bar, 2) 200°C 22 bar, 3) 220°C 33 bar의 조건으로 팥 아임계 추출을 제작하였다. 180°C, 13 bar의 조건에서 제작된 팥 아임계 추출물의 경우, 찌꺼기가 많이 나와 팥이 완전히 분해되지 않았음을 확인하였다. 반대로, 220°C 33 bar의 조건에서는 추출물에서 타는 냄새가 없으며 색깔이 갈색이 아닌 검은색을 띄어 상업성이 떨어진다고 판단하였다(표 2-1-2). 따라서 탄 냄새가

없고, 분해가 고르게 된 200℃의 조건으로 나머지 두류 9종을 추출하였다.










표 2-1-2. 아임계 추출물 조건 확립

| Temperature | 180℃ | 200℃ | 220℃ |
|------------------|---|---|--|
| Pressure | 13 bar | 22 bar | 33 bar |
| Time | 20 min | 20 min | 20 min |
| Extraction yield | 61.2% | 64.6% | 35.2% |
| Picture |  |  |  |
| |  |  |  |

② 두류 추출물 수율 측정

- 주정과 열수 추출물의 수율 측정 결과, 각각 평균 2.67%와 15.89%였다. 그린콩의 경우 다른 두류에 비해 주정과 열수 추출물 수율이 10.8%, 37.78%로 가장 높았으며, 이는 씨앗만이 아닌 씨앗과 꼬투리를 같이 추출한 결과라 사료된다. 아임계 추출의 경우, 호랑이콩이 54.8%로 가장 낮았고, 검은팥이 65.8%로 가장 높은 수율을 보였으나 크게 뚜렷한 수율 차이를 보이지 않았다. 아임계 추출물의 평균 수율은 62.10%였다 (표 2-1-3).

표 2-1-3. 두류 추출물 수율

| 추출 조건 | | 주정 추출물 | 열수 추출물 | 아임계 추출물 |
|---|--|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | | 온도 : 25도 압력 : 1 bar 시간 : 4시간 | 온도 : 80도 압력 : 1 bar 시간 : 4시간 | 온도 : 200도 압력 : 34 bar 시간 : 20분 |
|  | 검은팥 <i>Vigna angularis</i> var. <i>angularis</i> | 1.95% | 17.00% | 65.8% |
|  | 그린콩 <i>Phaseolus radiatus</i> L. var. <i>aurea</i> | 10.8% | 37.78% | 65% |
|  | 녹두 <i>Phaseolus radiatus</i> L. | 2.80% | 16.22% | 64.2% |
|  | 홍두 <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. | 3.10% | 16.23% | 58.6% |
|  | 붉은감남콩 <i>Phaseolus multiflorus</i> Willd. | 2.80% | 10.23% | 65.4% |
|  | 완두 <i>Pisum sativum</i> L. | 2.25% | 14.18% | 63.2% |
|  | 잠두 <i>Vicia faba</i> L. | 3.20% | 27.15% | 59.4% |
|  | 재비콩 <i>Dolichos labrad</i> L. | 3.15% | 9.27% | 60% |
|  | 팥 <i>Vigna angularis</i> W.F.Wight | 2.20% | 19.37% | 64.6% |
|  | 호랑이콩 <i>Phaseolus vulgaris</i> L. | 2.55% | 13.34% | 54.8% |

③ 팥 펩타이드 제작

- 팥 단백질로부터 pH 8, 50℃, 6시간의 조건에서 5종의 protease를 처리한 결과,

protease를 처리하지 않은 팔 분리 단백질에 비해, protease를 처리한 팔 분리 단백질에서 흡광도 값이 증가하였다(그림 2). 이는 protease가 pH 8, 50°C에서 활성을 나타내어 팔 분리 단백질을 가수분해했다는 것을 의미하며, 5종 중에서 flouvozyme에서 가장 높은 O.D.값을 나타내었기에 peptides가 가장 많이 형성되었음을 확인하였다.

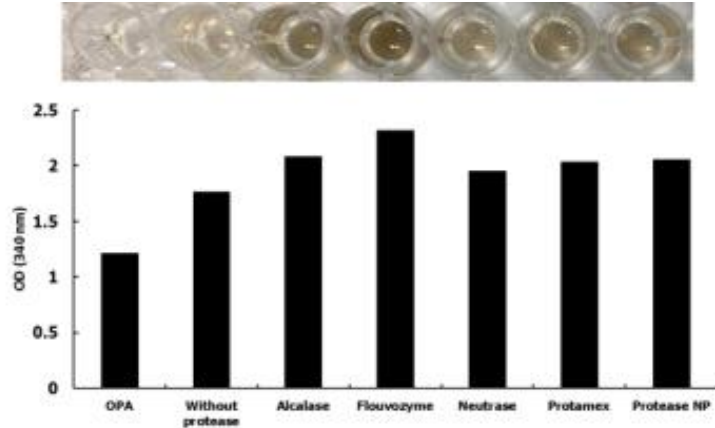


그림 2-1-2. 팔 분리 단백질로부터 protease 처리에 따른 peptide 형성.

(나) 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제조공정 개발

① 두류 추출물 제조 공정 개발

㉠ 지역별 국내산 팔 수집

- 경기 파주, 강원 정선, 충남 논산, 경북 예천, 전북 진안, 경남 함양에서 지역별 국내산 팔 6종을 수집 완료하였다.

㉡ 주정 추출물 제작

- 6종의 지역별 국내산 팔을 믹서기로 분쇄한 다음, 분쇄된 두류 10 g에 100 mL 주정을 넣고 water bath에서 180 rpm, 25°C, 4시간의 조건으로 shaking하여 주정 추출물을 제작하였다. 4시간이 지난 후, whatman 2번 filter paper를 이용하여 추출물을 분리한 후, evaporator (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG.)를 이용하여 주정을 모두 제거한 뒤, 수율을 측정하였다.
- 주정과 열수 추출물의 수율 측정 결과, 0.933% 였다. 경북 예천에서 재배된 팔의 수율이 1.23%로 가장 높았으며, 경남 함양에서 재배된 팔의 수율이 0.47%로 가장 낮았다(표 2-1-4).

표 2-1-4. 지역별 팔 에탄올 추출물 수율

| (Solvent: ethanol, %) | | | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 지역 | 경기 파주 | 충남 논산 | 전북 진안 | 강원 정선 | 경북 예천 | 경남 함양 |
| 수율 | 0.93 | 1.13 | 1.00 | 1.17 | 1.23 | 0.47 |

② 팔 추출물 시생산

- 열수추출물, 주정추출물, 단백질 효소처리물에서 활성이 모두 나타났기에 세 가지 방법을 혼용하여 팔 추출물을 제작하였다(표 2-1-5).

표 2-1-5. 팔 추출물 시생산 공정조건

| 제조 공정 | 공정 조건 |
|-------|-------------------------------|
| 원재료 | 팔(세척 후 이물 제거하여 건조) |
| ↓ | |
| 열수 추출 | 10배수, 80℃ 4 hour |
| ↓ | |
| 효소 반응 | protamex 0.1%, pH 6.5, 40℃ 6h |
| ↓ | |
| 효소 실활 | 90℃ 15min |
| ↓ | |
| 여과/농축 | |
| ↓ | |
| 주정 추출 | 70% 주정 9배수, 40~50℃ 12hour |
| ↓ | |
| 여과/농축 | |
| ↓ | |
| 건조 | 동결건조, 분무건조 |
| ↓ | |
| 포장 | |

③ 팔 추출물의 지표/기능 성분 발굴

㉠ 지표/기능 성분 발굴

- 학술 검색 홈페이지인 pubmed, google scholar, scopus를 통하여 팔에 함유되어 있는 지표/기능 성분을 탐색하였다.
- 문헌 조사를 통해 팔 에탄올 추출물 내의 생리활성을 탐색한 결과, β -sitosterol과 stigmasterol이 팔의 건물 기준으로 각각 0.738%, 0.576% 함유되어 있어 함량 분석

및 활성 연구를 통해 지표/기능 성분의 가능성이 있음을 확인하였다. 그 밖에 생리 활성물질로는 oleanolic acid, vitexin, oleanolic acid acetate, isovitex, catechin, ferulic acid 등이 팔 에탄올 추출물에 있음을 문헌 조사를 통해 확인하였다(표 2-1-6).

표 2-1-6. 팔 생리활성 물질

| Phytochemicals | 함량(mg/g)* | % |
|--------------------------------------|-----------|--------|
| β -Sitosterol ¹⁾ | 7.380 | 0.7380 |
| stigmasterol ¹⁾ | 5.760 | 0.5760 |
| Oleanolic acid ¹⁾ | 3.760 | 0.3760 |
| Vitexin ²⁾ | 1.260 | 0.1260 |
| Oleanolic acid acetate ¹⁾ | 0.720 | 0.0720 |
| Isovitexin ²⁾ | 0.397 | 0.0397 |
| Catechin ²⁾ | 0.370 | 0.0370 |
| Ferulic acid ³⁾ | 0.154 | 0.0154 |
| Sinapic acid ³⁾ | 0.068 | 0.0068 |
| Quercetin ²⁾ | 0.037 | 0.0037 |
| Coumaric acid ³⁾ | 0.027 | 0.0027 |
| Epicatechin ²⁾ | 0.016 | 0.0016 |
| Caffeic acid ³⁾ | 0.011 | 0.0011 |
| Genistin ⁴⁾ | 0.004 | 0.0004 |
| Chlorogenic acid ³⁾ | 0.002 | 0.0002 |

*건물기준

1) Molecules 19: 10309-10319, 2014
 2) Int. J. Food Sci. Nutr. 63(1): 117-124, 2012
 3) Int. J. Mol. Sci. 12: 7048-7058, 2011
 4) Kor. J. Pharmacogn. 46(1): 17-22, 2015

- 펩타이드 분석 - 분리대두단백에서 추출한 트리펩타이드인 Trp-Thy-Try를 표준품으로 팔추출물의 펩타이드를 분석하였다.

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 물을 이용하여 시료 중 트리펩타이드를 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 및 정량 분석을 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피플라스크(100 mL)
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 UV검출기(UV Detector) or PDA Detector(Photodiode Array)
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 Jupiter 4u proteo 90A, 4.6*250mm, phenomenex

2.3 이동상

- 2.3.1 이동상 A : 0.1% Trifluoroacetic acid Water
- 2.3.2 이동상 B : Acetonitrile

2.4 분석장비의 준비

이동상인 A와 B를 90:10의 비율로 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 트리펩타이드(Trp-Thy-Try)

3.2 일반시약

- 3.2.1 Water, Trifluoroacetic acid, Acetonitrile

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

- 4.1.1 표준품 2mg을 20 mL 부피플라스크에 넣고 물로 정용한다.
- 4.1.2 표준용액의 검량선

표 2-1-7. 표준용액의 검량표

| | std 1 | std 2 | std 3 | std 4 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| std 농도(ug/ml) | 25 | 50 | 75 | 100 |

- 4.1.3 0.45um syringe filter을 이용하여 필터한 후 분석한다.

4.2 시험용액의 조제

- 4.2.1 100ml의 부피플라스크에 시료 50~100mg을 취한 후 물을 이용하여 정용한다.
- 4.2.2 잘 섞은 후 0.45um syringe filter를 이용하여 필터한 후 분석한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석(HPLC)

5.1.1 column : Jupiter 4u proteo 90A, 4.6*250mm, phenomenex

5.1.2 이동상 : A = 0.1% TFA Water, B = Acetonitrile

표 2-1-8. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| Time (min) | A | B |
|------------|----|----|
| 0 | 90 | 10 |
| 5 | 90 | 10 |
| 45 | 50 | 50 |
| 50 | 50 | 50 |
| 55 | 90 | 10 |
| 60 | 90 | 10 |

5.1.3 column oven : 35°C

5.1.4 detector : UV 280nm, PDA 200~400nm

5.1.5 injection volumn : 10ul

5.1.6 Flow rate : 1mL/min

5.2 계산

5.2.1 트리펩타이드(Trp-Thy-Try)(mg/g) = $C \times (a / S)$

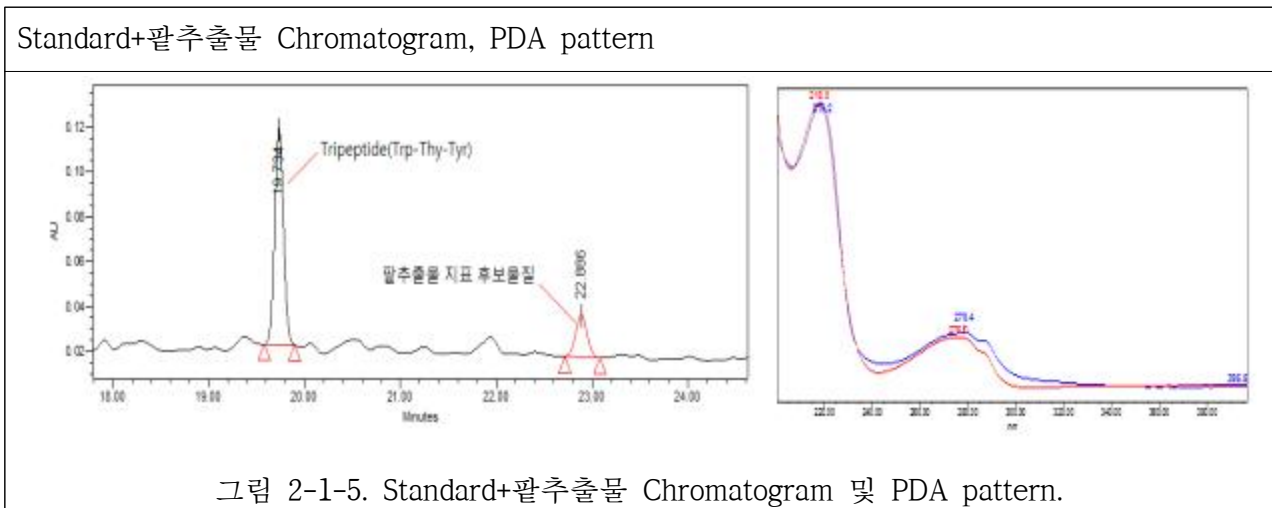
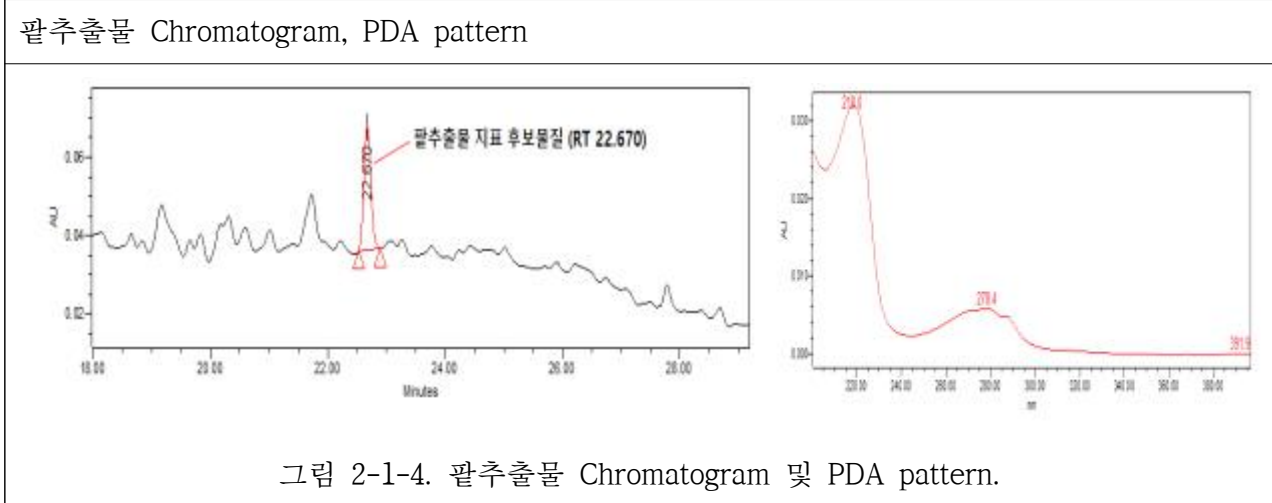
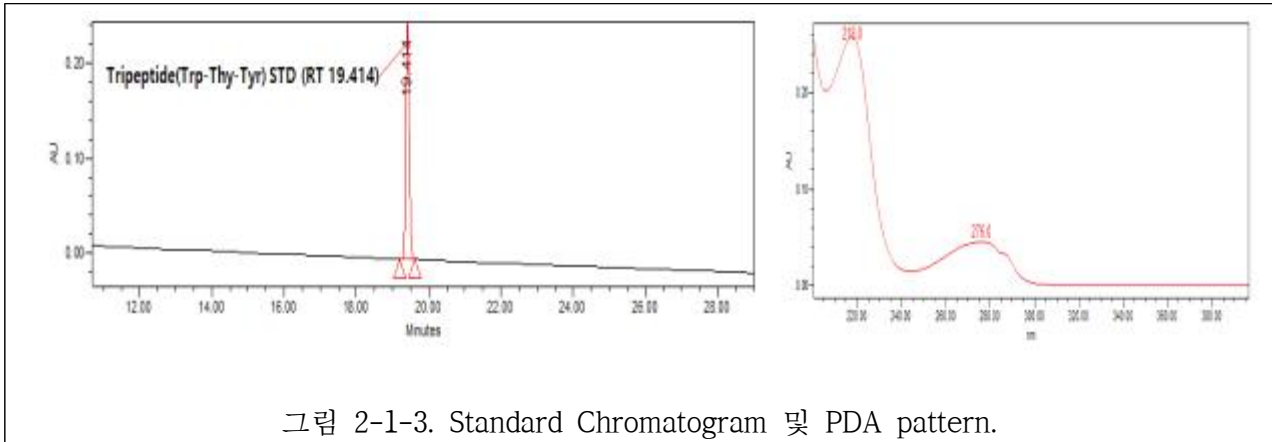
C : 시험용액 중의 트리펩타이드 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 최종희석액(mL)

S : 시료 채취량(mg)

- 펩타이드 분석결과 : 지표물질과 유사한 RT 값을 가지면서 동일한 PDA 패턴을 갖는 peak가 분석되었다. 아미노산 구성이 조금 다른 트리펩타이드로 추정하며, 이후 분리정제와 아미노산 조성 분석을 통해 지표물질로 활용 가능할 것으로 기대한다.

Standard Chromatogram, PDA pattern



- 이소플라본 분석 : 두류의 대표적인 이소플라본을 지표로 시생산한 팔 추출물의 이소플라본을 분석하였다.

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 메탄올을 이용하여 시료 중 이소플라본을 추출하여 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대 흡수파장인 260 nm에서 정량분석

한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 삼각플라스크(250 mL), 항온수조, 원심분리기, 멤브레인 필터, 부피플라스크(50 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 자외부흡광광도검출기

2.2.3 칼럼오븐

2.3 분석장비의 준비

이동상을 이용하여 용매를 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Genistein, Glycitein

3.2 일반시약

3.2.1 Methanol, Acetic acid, Distilled water, Sodium hydroxide

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 각 이소플라본(Daidzin, Genistin, Glycitin, Daidzein, Genistein, Glycitein) 표준물질 50mg을 정밀히 측정한다.

4.1.2 정밀히 측정한 표준물질을 50mL 부피플라스크에 넣는다.

4.1.3 배당체(Daidzin, Genistin, Glycitin) 표준품은 메탄올을 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준 원액으로 한다.

4.1.4 비배당체(Daidzein, Genistein, Glycitein) 표준품은 Dimethyl sulfoxide를 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준원액으로 한다.

4.1.5 위의 용액을 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 시료 1 ~ 10g을 정밀히 취한다.

4.2.2 위의 시료를 250mL 삼각플라스크에 넣는다.

4.2.3 여기에 80% 메탄올 40mL를 넣은 후 호일을 씌운다.

4.2.4 65°C 항온수조에서 2시간 추출한다.

4.2.5 냉각시킨 후 2M 수산화나트륨용액 3mL를 넣는다.

4.2.6 이를 상온에서 10분간 회전 교반한 후 초산 1mL를 넣는다.

4.2.7 80% 메탄올을 사용하여 50mL로 하여 하고 혼합한다.

4.2.8 여액 5mL에 증류수 4mL를 넣고 메탄올을 사용하여 10mL로 한다.

4.2.9 원심분리(5,000rpm, 5분)한 상등액을 0.45µm 멤브레인 필터로 여과한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석(HPLC)

5.1.1 column : Jupiter 4u proteo 90A, 4.6*250mm, phenomenex

5.1.2 이동상 : A = DW/MeOH/Formic acid(88:10:2), B = MeOH/Formic acid(98:2)

표 2-1-9. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| Time (min) | A | B |
|------------|----|----|
| 0 | 90 | 10 |
| 21 | 60 | 40 |
| 32 | 60 | 40 |
| 35 | 40 | 60 |
| 36 | 90 | 10 |

5.1.3 column oven : 40°C

5.1.4 detector : UV 260nm, PDA 200~400nm

5.1.5 injection volumn : 10ul

5.1.6 Flow rate : 1mL/min

5.2 계산

5.2.1 각 이소플라본(비배당체) 함량(mg/g)= $A \times (B/S) \times P \times (1/1,000)$

A : 시료의 농도($\mu\text{g/mL}$)

B : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료채취량(g)

P : 표준품의 순도

※ 이소플라본 배당체일 경우 1/1.6(0.625) 전환계수 적용함

- 이소플라본 분석 : 팥 추출물에서는 지표로 사용한 이소플라본이 분석되지 않았다.

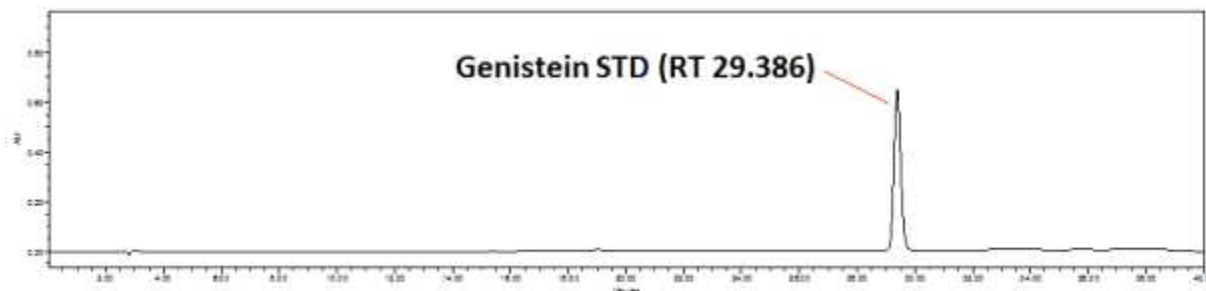


그림 2-1-6. Genistein standard chromatogram.

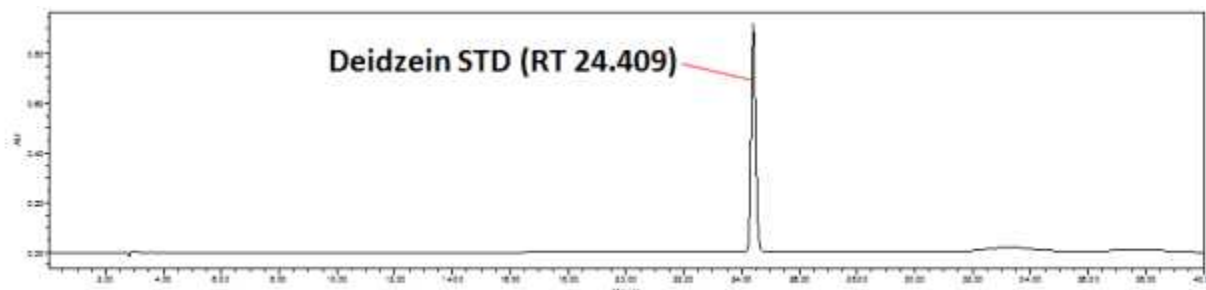


그림 2-1-7. Deidzein standard chromatogram.

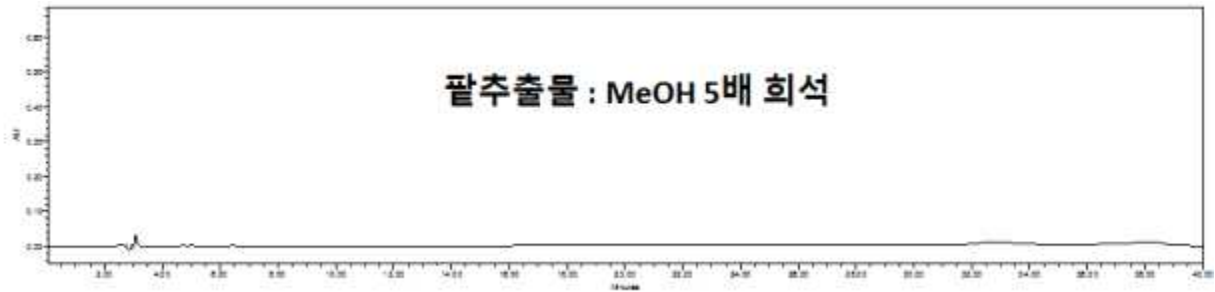


그림 2-1-8. 팔 추출물 chromatogram.

- 안토시아닌 분석 : 팔 추출물에 적색이 많이 포함되어 적색계열의 안토시아닌이 포함되어 있을 것이라 가정하여 4개 안토시아닌을 지표로 시생산 팔 추출물의 안토시아닌을 분석하였다.

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 0.1N HCl을 이용하여 시료 중 안토시아닌을 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 및 정량 분석을 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

- 2.1.1 부피플라스크(100 mL)
- 2.1.2 여과용 멤브레인 필터
- 2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.2 분석장비

- 2.2.1 고속액체크로마토그래프
- 2.2.2 UV검출기(UV Detector) or PDA Detector(Photodiode Array)
- 2.2.3 칼럼오븐
- 2.2.4 Jupiter 4u proteo 90A, 4.6*250mm, phenomenex

2.3 이동상

- 2.3.1 이동상 A : 5% Formic acid.
- 2.3.2 이동상 B : Acetonitrile

2.4 분석장비의 준비

이동상인 A와 B를 95:5의 비율로 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

- 3.1.1 delphinidin-3-rutinoside, delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-glucoside

3.2 일반시약

- 3.2.1 Water, Formic acid, Acetonitrile

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준품 2mg을 20 mL 부피플라스크에 넣고 0.1N HCl로 정용한다.

4.1.2 표준용액의 검량선

표 2-1-10. 표준용액의 검량표

| | std 1 | std 2 | std 3 | std 4 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| std 농도(ug/ml) | 25 | 50 | 75 | 100 |

4.1.3 0.45um syringe filter을 이용하여 필터한 후 분석한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 100ml의 부피플라스크에 시료 50~100mg을 취한 후 0.1N HCl을 이용하여 정용한다.

4.2.2 잘 섞은 후 0.45um syringe filter를 이용하여 필터한 후 분석한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석(HPLC)

5.1.1 column : Jupiter 4u proteo 90A, 4.6*250mm, phenomenex

5.1.2 이동상 : A = 5% Formic acid, B = Acetonitrile

표 2-1-11. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| Time (min) | A | B |
|------------|----|----|
| 0 | 95 | 5 |
| 5 | 95 | 5 |
| 25 | 85 | 15 |
| 30 | 20 | 80 |
| 35 | 20 | 80 |
| 36 | 95 | 5 |
| 50 | 95 | 5 |

5.1.3 column oven : 35°C

5.1.4 detector : UV 525nm, PDA 400~600nm

5.1.5 injection volumn : 10ul

5.1.6 Flow rate : 1mL/min

5.2 계산

5.2.1 안토시아닌(mg/g) = $C \times (a / S)$

C : 시험용액 중의 안토시아닌 농도(μ g/mL)

a : 최종희석액(mL)

S : 시료 채취량(mg)

- 안토시아닌 분석 결과 : 시생산 팔추출물의 안토시아닌을 분석 결과, 비교에 사용한 4개의 지표는 검출되지 않았다.

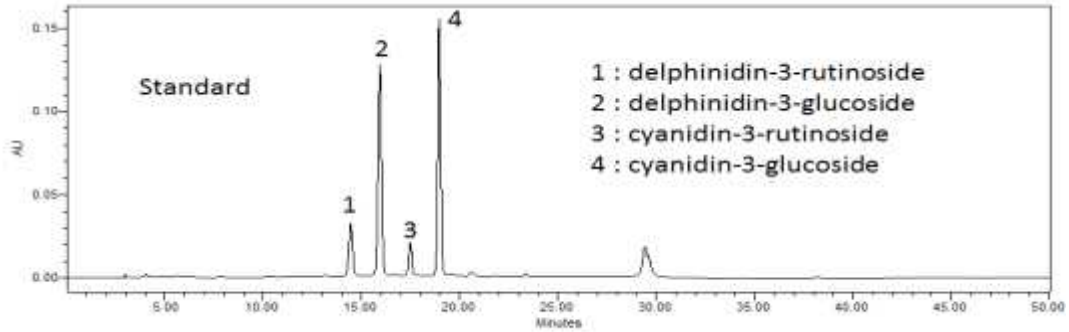


그림 2-1-9. Anthocyanin standard chromatogram.

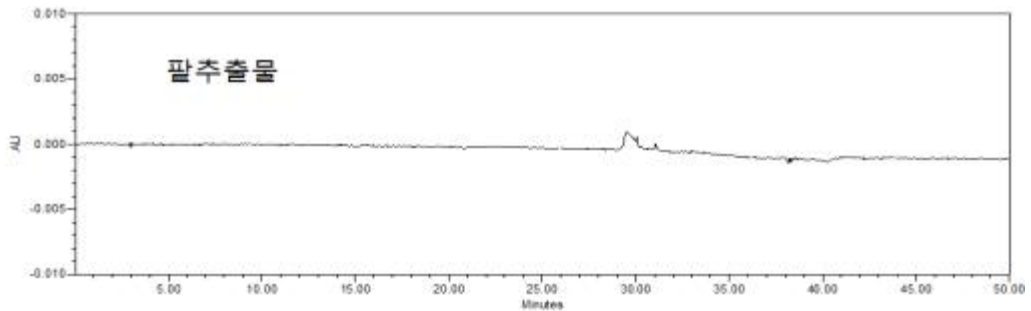


그림 2-1-10. 팔 추출물 chromatogram.

- 안토시아닌 : 시생산 팔추출물에서 단일 물질의 안토시아닌이 검출되지 않아, 안토시아닌을 분석하였다.

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료 중 안토시아노사이드를 염산을 이용하여 안토시아닌으로 분해한 후 분광광도기로 분석하는 방법으로 540 nm의 파장으로 흡광도를 구하여 정량 분석한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 용매용 일회용 실린지

2.1.2 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

2.1.3 부피플라스크

2.2 분석장비

2.2.1 자외분광광도계

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 안토시아닌의 함량이 알려진 바키늄미르틸루스엑스

3.2 일반시약

3.2.1 무수에탄올(Ethanol, anhydrous)

3.2.2 염산(Hydrochloric acid)

3.2.3 증류수(Distilled water)

4. 시험과정

4.1 표준용액 제조

4.1.1 안토시아니딘의 함량이 알려진 바키늄미르틸루스엑스 약 20 mg을 정밀히 칭량하여 시험 용액과 같이 조작하여 표준용액으로 한다.

4.2 시험용액 제조

4.2.1 시료 20 mg(안토시아니딘으로서)을 정밀히 칭량하여 무수에탄올 1.5 mol/L 염산혼합액(17:3)을 넣어 녹인 후 200 mL 부피플라스크에 정용한다.

4.2.2 이 액 5 mL를 취하여 무수에탄올 · 1.5 mol/L 염산혼합액(17:3)을 넣어 50 mL로 정용한 다음 여과하여 처음 여액 20 mL은 버리고 다음 여액을 시험용액으로 한다.

4.2.3 무수에탄올 · 1.5 mol/L 염산혼합액(17:3)을 대조액으로 하여 파장 540 nm에서 시험용액 및 표준용액의 흡광도 AT 및 AS를 측정한다.

5. 계산

5.1 계산

5.1.1. 총 안토시아니딘 함량(mg/g)

$$\text{표준품의 안토시아니딘 양(mg)} \times \frac{AT}{AS} \times \frac{1}{S} \times \frac{1}{1,000}$$

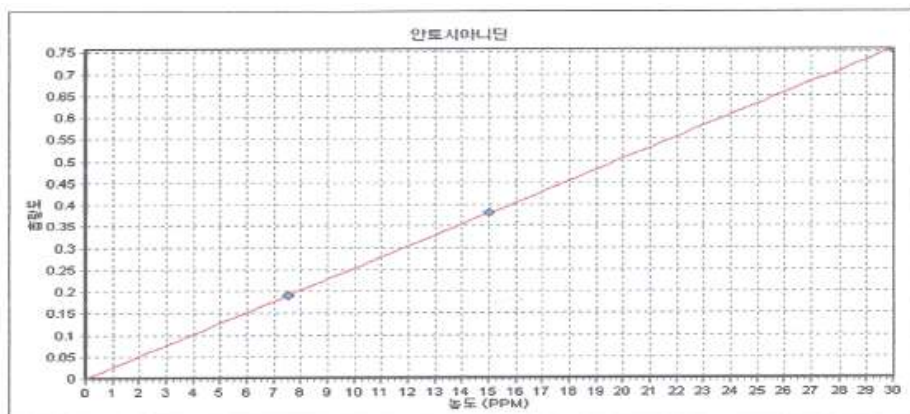
AT: 시험용액의 흡광도

AS: 표준용액의 흡광도

S : 시료 채취량(mg)

1/1,000 : 단위 환산 계수

• 안토시아니딘 분석결과

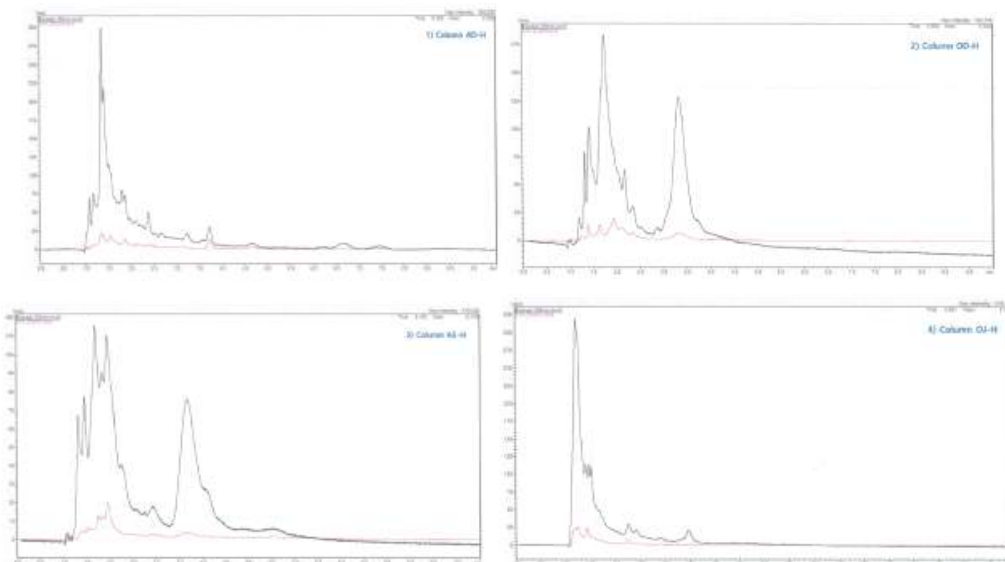


| 구분 | g/100ml | 희석배수 | ug/ml | abs | C | mg/g |
|--------------|---------|------|-------|-------|------|------|
| 동결건조 팔추출물 | 2.1072 | 3 | 7024 | 0.545 | 21.4 | 0.64 |
| 분무건조 팔추출물 | 2.034 | 3 | 6780 | 0.425 | 16.7 | 0.52 |

- SFC/MS 분석 - 팔추출물의 지표를 탐색하기 위해 SFC(Supercritical Fluid Chromatography)/MS 분석을 실행하였다.

1. 실험방법
 - 1.1 팔을 동결시킨 후 Ball-mill을 사용하여 분쇄한다.
 - 1.2 분쇄된 판 5g을 용매 methanol 500-에 넣고 40°C에서 5시간 sonication 한다.
 - 1.3 1시간 동안 방치 한뒤, 0.2 um syringe filter로 여과한다.
 - 1.4 여과된 용액을 rotatory evaporator를 이용하여 용매를 제거한다.
 - 1.5 methanol 2mL에 녹인후 syringe filter로 여과한후 분석 sample로 사용한다.
2. SFC Column을 이용한 Screening
 - 2.1 위에서 만든 sample을 SFC chamber에 넣고 methanol/CO₂ = 30:70의 비율로 유속 4mL/min으로 일정한 압력과 온도 조건에서 10개의 chiral columns을 사용하여 분석한다.
3. 분리가 잘되는 Column을 사용한 MS 분석
 - 3.1 위의 실험으로 가장 분리가 잘되는 Column을 사용하여 methanol/CO₂ = 10:90의 비율로 유속 4mL/min으로 일정한 압력과 온도 조건에서 SFC spectrum 과 MS spectra를 분석한다.

- SFC/MS 분석 결과
 - Column Screening



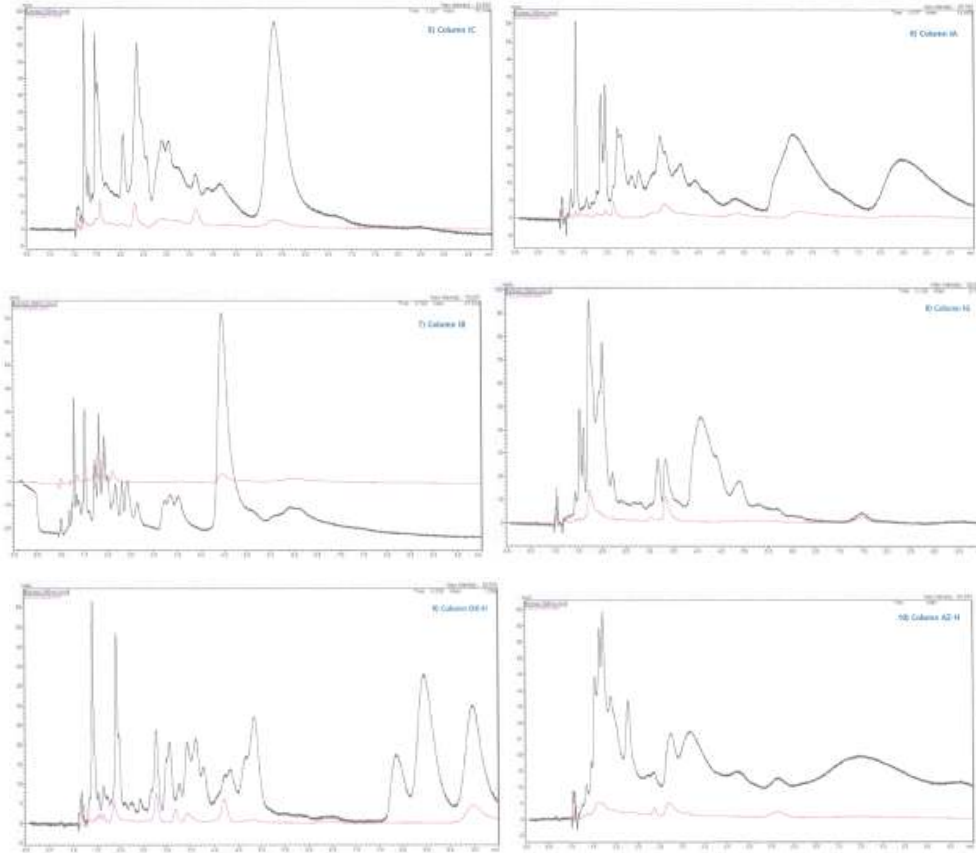
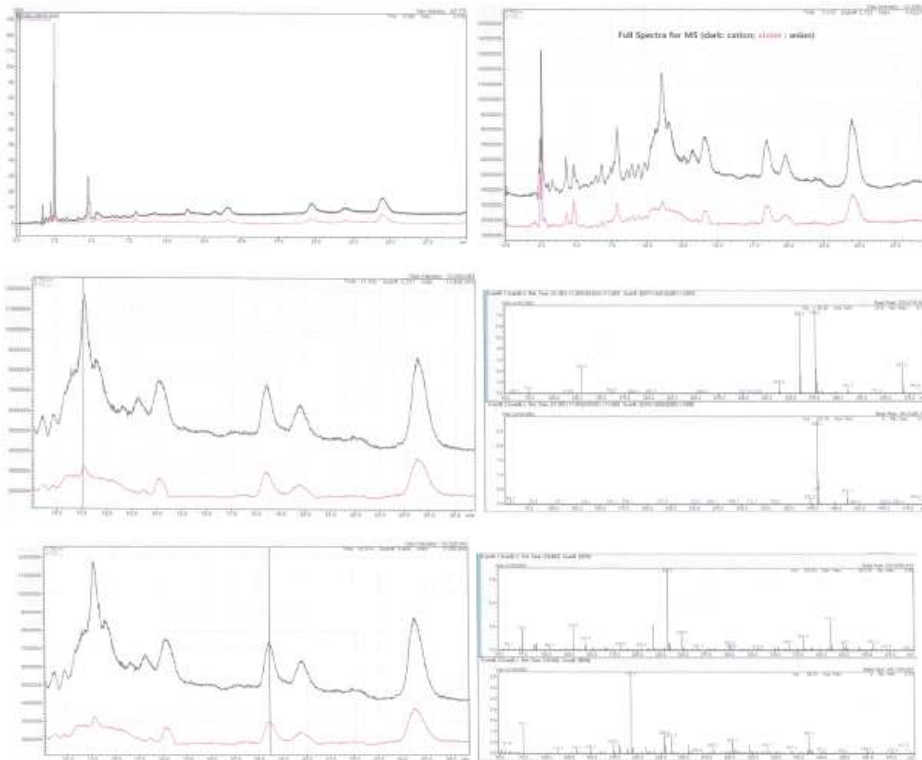


그림 2-1-11. 팔추출물의 SFC/MS 분석.

- Column IC를 사용한 SFC spectra / MS



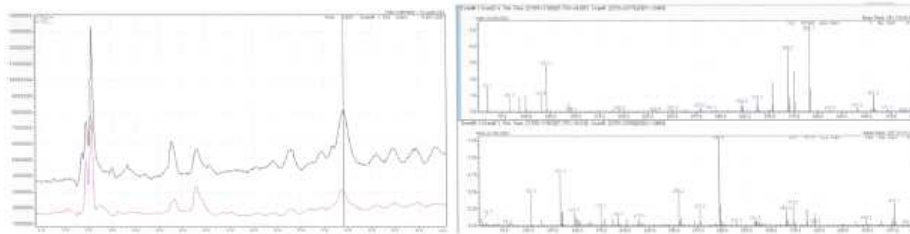


그림 2-1-12. Column IC를 사용한 팔추출물의 SFC/MS 분석.

- Column OX-H를 사용한 SFC spectra / MS

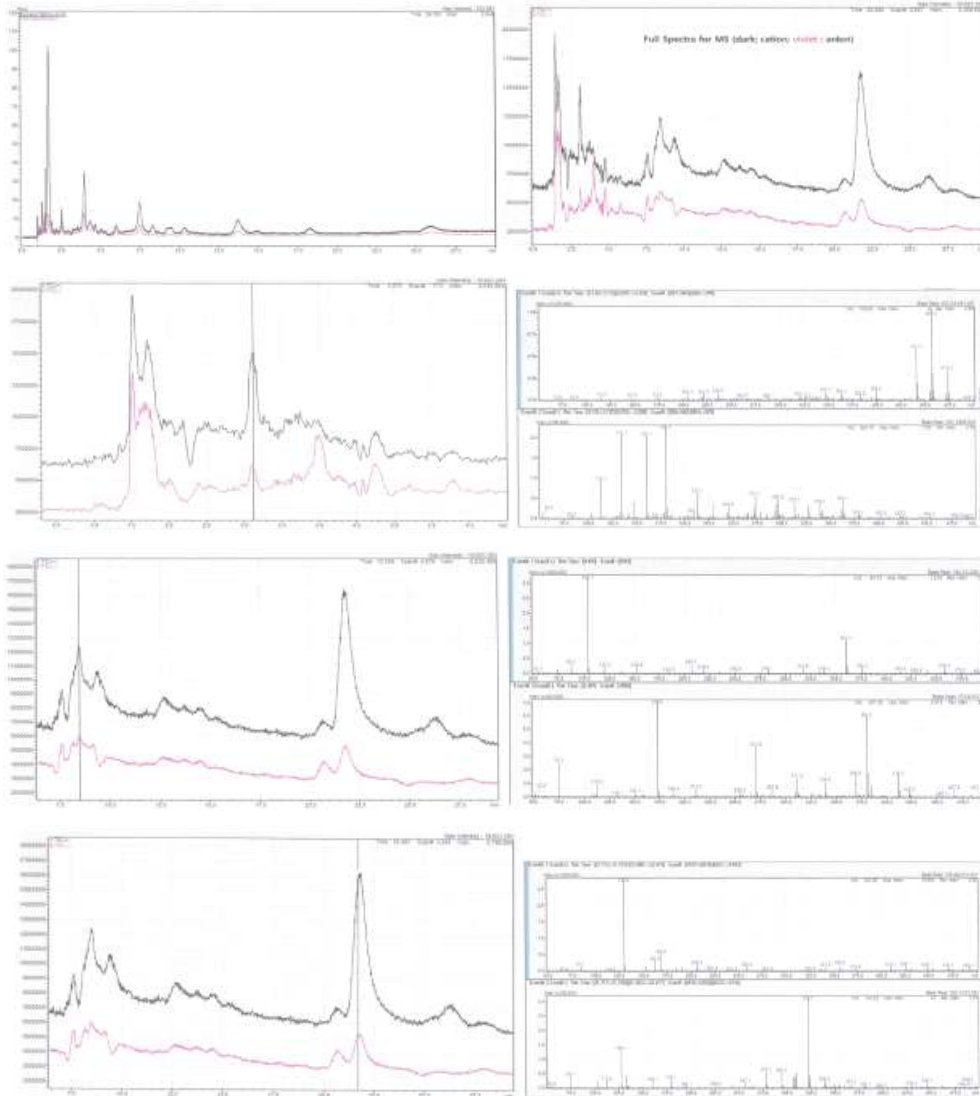


그림 2-1-13. Column OX-H를 사용한 팔추출물의 SFC/MS 분석.

④ 팔 추출물의 안정성 평가

- pH 안정성 : 물에 팔 추출물이 1%가 되도록 넣어주고 100mM HCl과 100mM NaOH를 이용하여 pH를 3, 5, 7, 9로 조정하였다. 1시간동안 sonication하고 상온에서 24시간 방치하였다.

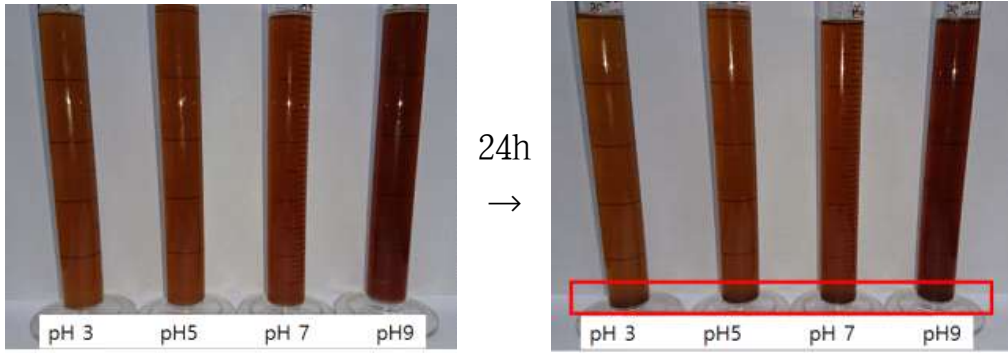


그림 2-1-14. pH에 따른 안정성 평가.

- 모든 조건에서 24시간이 지났을 경우 침전이 발생하였고, pH가 높을수록 침전된 양이 작았다. pH가 높을수록 용해도가 높아짐을 알 수 있다. 침전을 제외한 이상반응은 나타나지 않았다.
- 열 안정성 : 물에 팔추출물이 1%가 되도록 넣어주고 100mM HCl과 100mM NaOH를 이용하여 pH를 3, 5, 7, 9로 조정하였다. 95°C 에서 1시간동안 가열하고 상온에서 24시간 방치하였다.

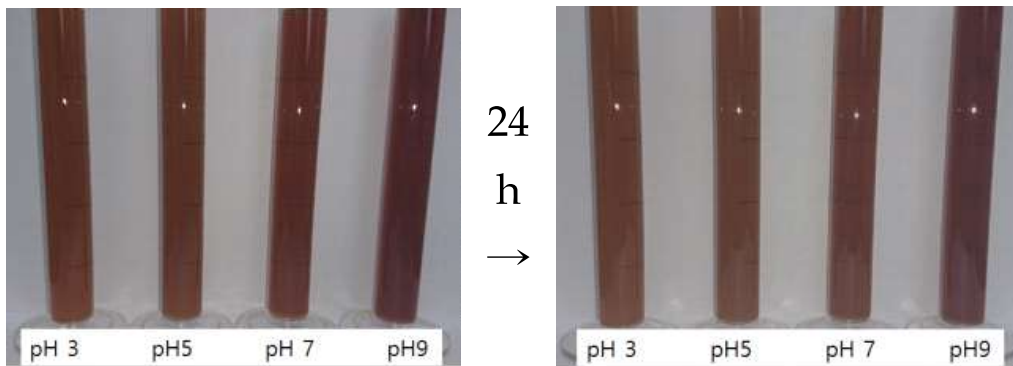


그림 2-1-15. 열처리에 따른 안정성 평가.

- 열처리하였을 때 용해도가 증가하였으며, pH에 따른 용해도의 차이는 없는 것으로 나타났다. 95°C 에서 한시간 가열하였을 경우 눈에 띄는 이상반응은 나타나지 않았다.

⑤ 팔 추출물의 유해물질 분석

- 팔추출물의 유해요소인 미생물과 중금속을 분석하였다.

표 2-1-12. 팔 추출물 내 미생물 및 중금속 함량

| 항목 | 대장균 | 납 | 카드뮴 | 수은 | 비소 |
|----|-----|----------|----------|-----|----------|
| 결과 | 음성 | 0.05 ppm | 0.02 ppm | 불검출 | 0.08 ppm |

(2) 2차년도 수행내용 및 결과

(가) 두류 생리활성물질 및 펩타이드 제조공정 표준화

① 두류 생리활성물질의 표준화 제조공정 확립

- 두류 10종 중 팔을 이용하여 추출물 확보

10종의 국내산 두류를 믹서기로 분쇄한 다음, water bath에서 열수, 주정 아임계 추출물을 제작한 후, 수율을 측정하였다. 수율 측정 결과 주정과 열수 추출물의 수율 측정 결과, 각각 평균 2.67%와 15.89%였다. 그린콩의 경우 다른 두류에 비해 주정과 열수 추출물 수율이 10.8%, 37.78%로 가장 높았으며, 이는 씨앗만이 아닌 씨앗과 꼬투리를 같이 추출한 결과라 사료된다. 아임계 추출의 경우, 호랑이콩이 54.8%로 가장 낮았고, 검은팥이 65.8%로 가장 높은 수율을 보였으나 크게 뚜렷한 수율 차이를 보이지 않았다. 아임계 추출물의 평균 수율은 62.10%였다. 10종 중 팔의 수율이 가장 높게 측정되어 팔을 이용한 추출물을 확보하였다.

- 팔 추출물 내 생리활성물질 선정 : 플라보노이드류에 속하는 후보 물질 선정(6종)

Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 6 (02), pp. 157-166, February, 2016
Available online at <http://www.japsonline.com>
DOI: 10.7324/JAPS.2016.60225
ISSN 2231-3354 

Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India

Tapan Seal*
Plant Chemistry Department, Botanical Survey of India, India.

ARTICLE INFO

Article history:
Received on: 24/11/2015
Revised on: 10/12/2015
Accepted on: 28/12/2015
Available online: 27/02/2016

Key words:
Phenolic compounds;
Ascorbic acid; Different
solvent extracts; *Sonchus arvensis*; *Oenanthe linearis*;
Gradient HPLC.

ABSTRACT

A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using photodiode array detector with gradient elution has been developed and validated for the simultaneous estimation of ascorbic acid, free phenolic acids and flavonoids (catechin, rutin, quercetin, myricetin, apigenin and Kaempferol) in four different solvent extracts of two wild edible leaves of viz. *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis*, collected from North-eastern region in India. The chromatographic separation was carried out on Acclaim C18 column (5 µm particle size, 250 x 4.6 mm). Diodes Ultimate 3000 liquid chromatograph and detection was carried out at three different wave lengths (272, 280 and 310 nm) using a mobile phase of acetonitrile and 1% aqueous acetic acid solution with gradient elution. The experimental results showed high amount of ascorbic acid in *S. arvensis* and *O. linearis* (1.2% and 2.3 % respectively) and gallic acid (0.02% and 0.06% respectively) in 1% aq. acetic acid extract of these two plants. The high percentage of recovery (96-103%), low coefficient of variation ($R^2 > 0.99$) and low limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) confirm the suitability of the method for simultaneous quantification of ascorbic acid and all phenolic compounds in the two plants under investigation.

그림 2-1-16. 플라보노이드 HPLC 분석 참고 논문.

그림 1. 의 논문을 참고하여 팔의 대표적으로 함유되어있는 카테킨, 루틴, 캄페롤, 아이소케르세틴, 아이소비텍신, 비텍신 등 6종의 플라보노이드 후보 물질을 선정하였다.

- Vitexin 분석

1. 개요

후보로 선정된 물질 중 vitexin에 대한 분석 논문(그림 2.)을 참고하여 분석을 진행하였다.

Contents of D-*chiro*-Inositol, Vitexin, and Isovitexin in Various Varieties of Mung Bean and Its Products

YAO Yang, CHENG Xu-zhen and REN Gui-xing

Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, P.R. China

Abstract

Mung bean (*Vigna radiata* L.) is rich in bioactive compounds including D-*chiro*-inositol (DCI), vitexin, and isovitexin, which have beneficial effects on patients with diabetes. To find a better source for these valuable chemicals, we have collected 110 varieties of mung bean seed samples and 8 mung bean products to determine the levels of these bioactive compounds. We also measured the DCI content in mung bean sprouts at different germination stages. Content of DCI, vitexin, and isovitexin in all mung bean varieties ranged from 0.43 to 5.79, 0.12 to 3.00, and 0.03 to 1.16 mg g⁻¹, respectively. The varieties of C0001321, C0003522, and C0004485 have the highest DCI, vitexin, and isovitexin contents, respectively. The mung bean products in the market contained relatively lower level of these bioactive components. Contents of DCI, vitexin, and isovitexin in all mung bean products ranged from 0.119 to 0.717, 0 to 0.547, and 0 to 0.923 mg g⁻¹, respectively. During the 112 h of germination test, DCI level steadily increased at first stage and reached the highest level at 80 h of germination (4.79 mg g⁻¹). These results provide useful information for the selection of suitable varieties and proper germination stages to obtain functional ingredients from mung beans.

Key words: D-*chiro*-inositol, vitexin, isovitexin, mung bean

그림 2-1-17. Vitexin 및 Isovitexin HPLC 분석 논문.

2. 시험방법의 요약

본 시험법은 그림 2.의 논문을 참고하여 70% 메탄올을 이용하여 시료 중 비텍신을 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 및 정량 분석을 한다.

3. 장비와 재료

3.1 실험실 장비 및 소모품

3.1.1 부피플라스크(20 mL)

3.1.2 여과용 멤브레인 필터

3.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

3.1.4 액체크로마토그래프용 바이알

3.2 분석 장비

3.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 UV검출기(UV Detector) 또는 PDA(Photodiode Array)

3.2.3 칼럼오븐

3.2.4 Luna 5u C18 4.6mm*250mm, phenomenex

3.3 이동상

3.3.1 이동상 A : 0.1 % 트리플루오로아세트산

3.3.2 이동상 B : 아세토나이트릴

4. 표준물질 및 일반시약

4.1 표준물질

4.1.1 Vitexin(비텍신)

Product number : 49513, (Lot# BCBR8611V, CAS NO. 3681-93-4, Sigma)

4.2 일반시약

4.2.1 물

- 4.2.2 메탄올
- 4.2.3 트리플루오로아세트산
- 4.2.4 아세트나이트릴

5. 시험과정

5.1 표준용액의 조제

5.1.1 표준품 약 10 mg을 10 mL 부피플라스크에 넣고 70% 메탄올을 이용하여 정용한다.
본 실험은 지표물질 탐색에서 정성과정이므로 검량선 작성은 하지 않았다.

5.2 시험용액의 조제

- 5.2.1 20 mL의 부피플라스크에 시료 약 1.5g을 취한 후 70% 메탄올을 이용하여 정용한다.
- 5.2.2 초음파추출기를 이용하여 초음파 추출을 한다.
- 5.2.3 잘 섞은 후 0.45um syringe filter를 이용하여 여과한 후 분석 한다.

6. 분석 및 계산

6.1 기기분석(HPLC)

6.1.1 칼럼

Luna 5u C18, 4.6mm*250mm, phenomenex

6.1.2 이동상

이동상 A : 0.1% 트리플루오로아세트산

이동상 B : 아세트나이트릴

표 2-1-13. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| 시간 | 이동상 A | 이동상 B | 유속(mL/min) |
|----|-------|-------|------------|
| 0 | 95 | 5 | 1 |
| 18 | 75 | 25 | 1 |
| 30 | 10 | 90 | 1 |
| 35 | 95 | 5 | 1 |
| 40 | 95 | 5 | 1 |

6.1.3 칼럼 오븐 : 30 °C

6.1.4 검출기 : UV 360 nm, PDA 190 ~ 600 nm

6.1.5 주입량 : 10 uL

6.2 계산

6.2.1 비텍신(Vitexin)(mg/g) = C × (a / S)

C : 시험용액 중의 비텍신 농도(μg/mL)

a : 최종회석액(mL)

S : 시료 채취량(mg)

- 비텍신 분석결과

팥 추출물의 크로마토그램과 비텍신의 크로마토그램을 비교하였을 때 비텍신의 RT와 일치하는 peak 를 확인할 수 없었으며 가까운 RT에 peak 하나가 확인되었지만 spectrum 확인 상 다른 물질임을 확인하였다.(그림 3.)

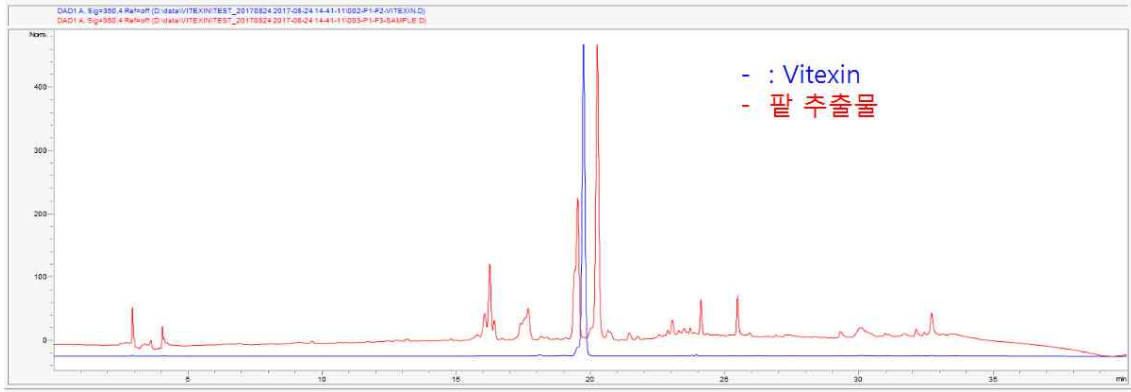


그림 2-1-18. 팥 추출물 및 비텍신의 크로마토그램 비교.

- 플라보노이드류에 속하는 카테킨, 루틴, 퀘르세틴, 아이소케르세틴, 아이소비텍신, 비텍신 분석

Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 6 (02), pp. 157-166, February, 2016
 Available online at <http://www.japsonline.com>
 DOI: 10.7324/JAPS.2016.60225
 ISSN 2231-3354

Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India

Tapan Seal*

Plant Chemistry Department, Botanical Survey of India, India.

ARTICLE INFO

Article history:
 Received on: 24/11/2015
 Revised on: 10/12/2015
 Accepted on: 28/12/2015
 Available online: 27/02/2016

Key words:
 Phenolic compounds ;
 Ascorbic acid; Different
 solvent extracts; *Sonchus
 arvensis*; *Oenanthe linearis*;
 Gradient HPLC.

ABSTRACT

A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using photodiode array detector with gradient elution has been developed and validated for the simultaneous estimation of ascorbic acid, free phenolic acids and flavonoids (catechin, rutin, quercetin, nyracetin, apigenin and Kaempferol) in four different solvent extracts of two wild edible leaves of viz. *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis*, collected from North-eastern region in India. The chromatographic separation was carried out on Acclaim C18 column (5 µm particle size, 250 x 4.6 mm), Dionex Ultimate 3000 liquid chromatograph and detection was carried out at three different wave lengths (272, 280 and 310 nm) using a mobile phase of acetonitrile and 1% aqueous acetic acid solution with gradient elution. The experimental results showed high amount of ascorbic acid in *S. arvensis* and *O. Linearis* (1.2% and 2.3 % respectively) and gallic acid (0.02% and 0.06% respectively) in 1% aq. acetic acid extract of these two plants. The high percentage of recovery (96-103%), low coefficient of variation ($R^2 > 0.99$) and low limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) confirm the suitability of the method for simultaneous quantification of ascorbic acid and all phenolic compounds in the two plants under investigation.

그림 2-1-19. 팥에 포함되어 있는 대표적인 플라보노이드의 HPLC 분석 논문.

플라보노이드가 다량 함유되어 있는 팥에 관한 논문 중 플라보노이드 동시분석을 진행한 논문을 참고하여 각 지표물질에 대한 정성분석을 진행하였다. 지표물질 분석법은 다음과 같다.

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 그림 2-1-19의 논문을 참고하여 70% 메탄올을 이용하여 시료 중 플라보노이드류에 속하는 카테킨, 루틴, 캄페롤, 아이소케르세틴, 아이소비텍신, 비텍신을 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 및 정량 분석을 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(20 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 액체크로마토그래프용 바이알

2.2 분석 장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 UV검출기(UV Detector) 또는 PDA(Photodiode Array)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 Luna 5u C18 4.6mm*250mm, phenomenex

2.3 이동상

2.3.1 이동상 A : 1 % 초산

2.3.2 이동상 B : 아세트나이트릴

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 카테킨((+)-Catechin hydrate)

Product number : C1251, (Lot# WXBC3261V, CAS NO. 225937-10-0, Sigma)

3.1.2 루틴(Rutin)

Product number : R5143, (Lot#BCRR8150, CAS NO. 207671-50-9, Sigma)

3.1.3 캄페롤(Kaempferol)

Product number : K0133, (Lot# BCBR9014, CAS NO. 520-18-3, Sigma)

3.1.4 아이소케르세틴(Isoquercetin)

Product number : 00140585, (Lot# BCBD3233V, CAS NO. 482-35-9, Sigma)

3.1.5 아이소비텍신(Isovitexin)

Product number : 17804, (Lot# BCBT5701, CAS NO. 38953-85-4, Sigma)

3.1.6 비텍신

Product number : 49513, (Lot# BCBR8611V, CAS NO. 3681-93-4, Sigma)

3.2 일반시약

3.2.1 물

3.2.2 메탄올

3.2.3 초산

3.2.4 아세트나이트릴

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준품 약 10mg을 10 mL 부피플라스크에 넣고 70% 메탄올을 이용하여 정용한다.
본 실험은 지표물질 탐색에서 정성과정이므로 검량선 작성은 하지 않았다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 20 mL의 부피플라스크에 시료 약 1.5g을 취한 후 70% 메탄올을 이용하여 정용한다.

4.2.2 초음파추출기를 이용하여 초음파 추출을 한다.

4.2.3 잘 섞은 후 0.45um syringe filter를 이용하여 여과한 후 분석 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석(HPLC)

5.1.1 칼럼

Luna 5u C18, 4.6mm*250mm, phenomenex

5.1.2 이동상

이동상 A : 1% 초산

이동상 B : 아세트나이트릴

표 2-1-14. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| 시간 | 이동상 A | 이동상 B | Flow rate (mL/min) |
|----|-------|-------|-----------------------|
| 0 | 90 | 10 | 1 |
| 28 | 60 | 40 | 1 |
| 39 | 40 | 60 | 1 |
| 50 | 10 | 90 | 1 |
| 55 | 90 | 10 | 1 |
| 60 | 90 | 10 | 1 |

5.1.3 칼럼 온도 : 28 °C

5.1.4 검출기 : UV 272, 280, 310 nm, PDA 190 ~ 600 nm

5.1.5 주입량 : 20 uL

- 카테킨, 루틴, 캄페롤, 아이소퀘르세틴, 아이소비텍신, 비텍신 분석 결과

1. 카테킨 분석

플라보노이드 동시분석법(그림 2-1-19)으로 팔 추출물과 6개의 플라보노이드 지표물질을 분석하였다. 각 지표물질과 팔 추출물의 크로마토그램과 스펙트럼은 다음과 같다. (그림 2-1-20-27.)

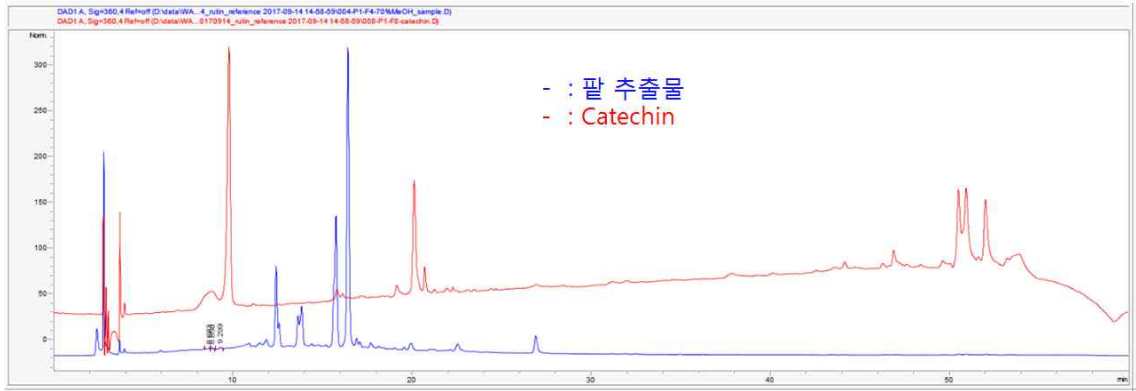


그림 2-1-20. 팔 추출물 및 카테킨의 크로마토그램 비교.

팔 추출물과 카테킨을 비교하기 위하여 분석 그림 4.의 방법으로 분석하였다. RT는 9.9분이 고 base line은 양호한 편이지만, 표준물질인 카테킨 peak 앞쪽에 간섭peak가 확인되며 팔 추출물에서도 동일한 RT에서 peak가 검출되지 않았다.

2. 루틴 분석

루틴 분석 시, 동일한 시간대인 15.8분에서 팔 추출물과 루틴 표준용액에서 peak가 검출되었다.(그림 6.) 또한 peak 분리도가 양호하지 않으며, 그림 7.의 spectrum에서와 같이 동일한 물질이 아님을 확인할 수 있다.

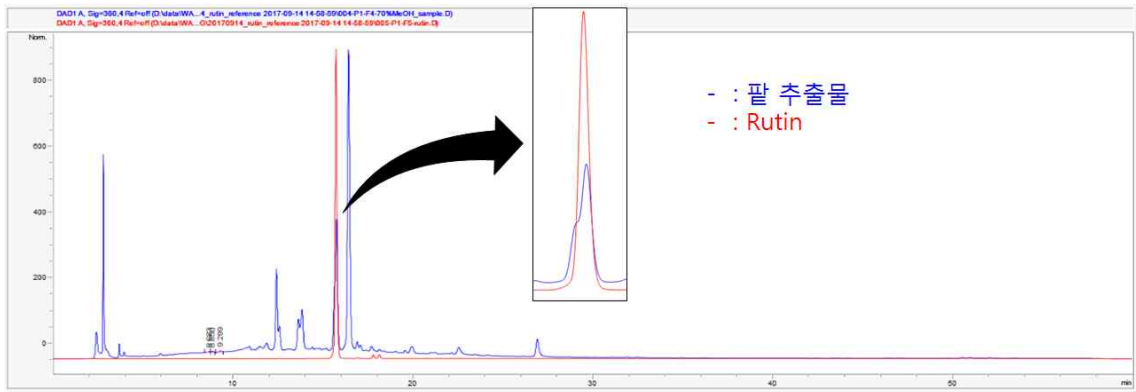


그림 2-1-21. 팔 추출물 및 루틴의 크로마토그램 비교.

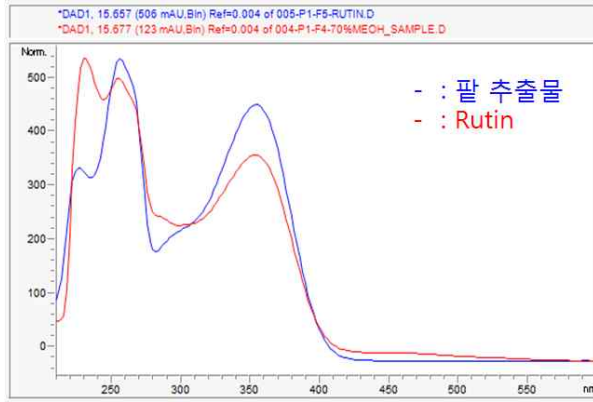


그림 2-1-22. 루틴과 동일한 RT를 갖는 peak와의 스펙트럼 비교.

3. 캠페롤 분석

캠페롤 분석 시, 캠페롤의 RT에 해당하는 peak는 검출되지 않았음을 확인할 수 있었다.(그림 8.)

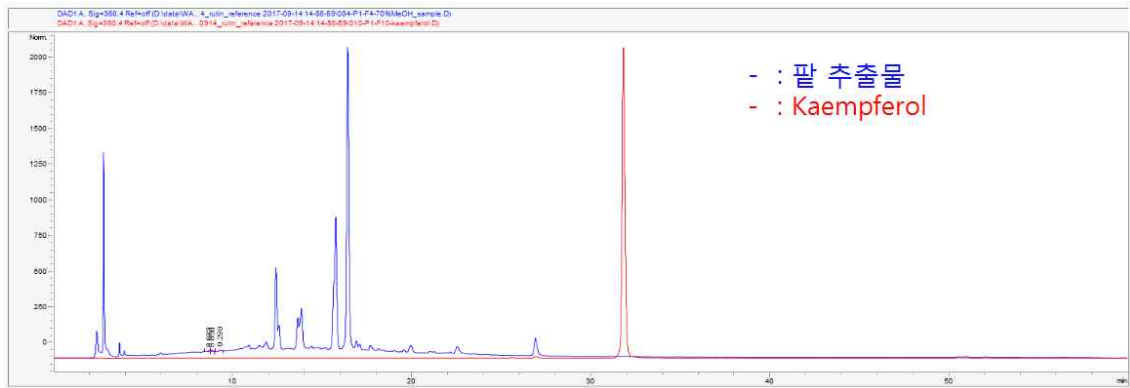


그림 2-1-23. 팔 추출물 및 캠페롤의 크로마토그램 비교.

4. 아이소퀘르세틴

아이소퀘르세틴 분석 시, 팔 추출물과 표준용액인 아이소퀘르세틴이 17.0분에서 peak가 검출되었지만 peak 분리도가 좋지 않으며(그림 9.), 아래의 스펙트럼(그림 10.)에서와 같이 동일한 물질이 아님을 확인할 수 있었다.

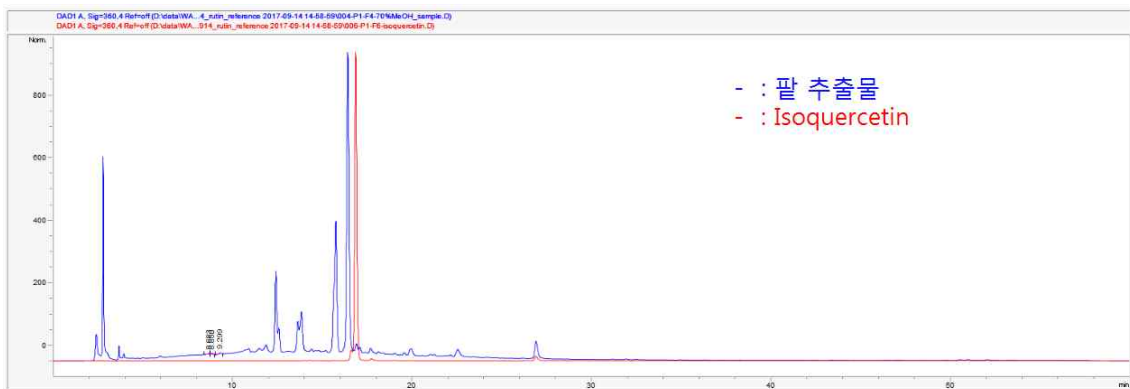


그림 2-1-24. 팔 추출물 및 아이소퀘르세틴의 크로마토그램 비교.

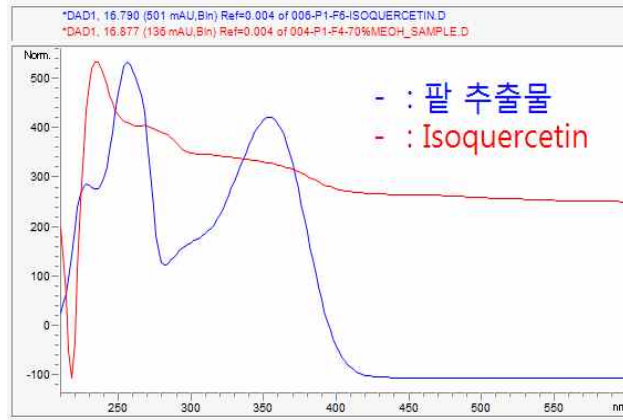


그림 2-1-25. 아이소퀘르세틴과 동일한 RT를 갖는 peak와의 스펙트럼 비교.

5. 아이소비텍신

아이소비텍신 분석 시, 아이소비텍신의 RT에 해당하는 peak는 검출되지 않았음을 확인할 수 있었다.

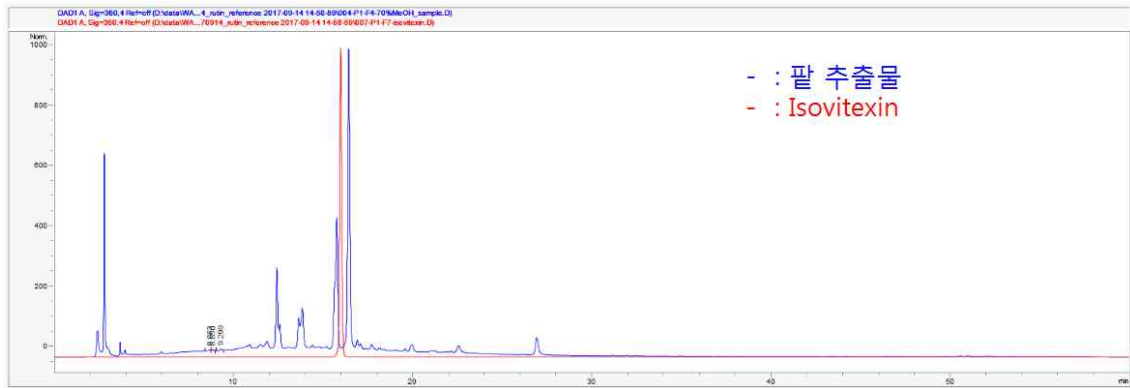


그림 2-1-26. 팔 추출물 및 아이소비텍신의 크로마토그램.

6. 비텍신

비텍신 분석 시, 비텍신의 RT에 해당하는 peak는 검출되지 않았음을 확인할 수 있었다.

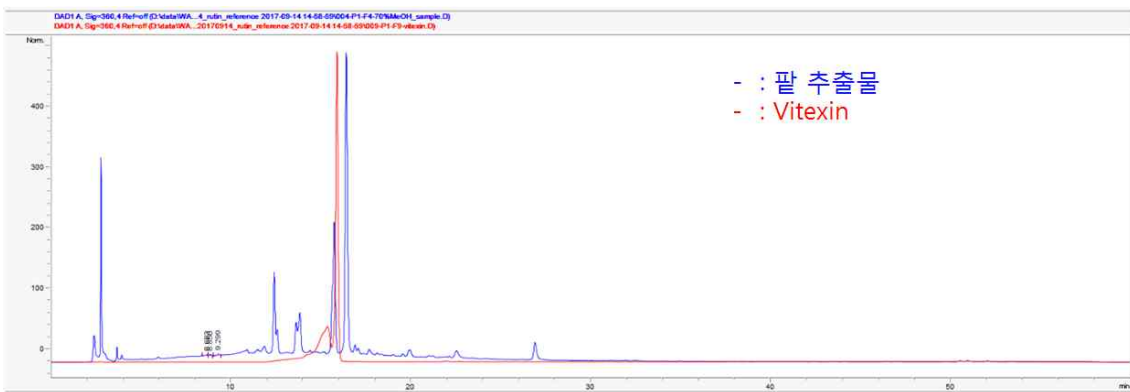


그림 2-1-27. 팔 추출물 및 비텍신 크로마토그램.

- 캄페롤, 캄페롤-3-O-β-루티노사이드, 루틴 분석

アズキ熱水抽出物 (アズキ煮汁) の成分とその抗酸化能

堀 由美子¹, 村 社 知 美¹, 福 村 基 徳¹,
鳥 居 塚 和 生¹, 伊 田 喜 光^{*1,2}

(2008年6月5日受付; 2008年9月2日受理)

要旨: 水腫, 脚気, 解毒の改善に用いられるアズキ(生薬名: 赤小豆, セキショウズ)煮汁の成分を明らかにする目的でアズキ熱水抽出物の成分研究を行った。その結果, フラボノイドならびにその配糖体13種を単離し, 構造を明らかにした。次いでアズキ熱水抽出物およびこれから得られたフラボノイド誘導体について DPPH 法によるラジカル消去活性を測定した。その結果, いずれも代表的な抗酸化物質である BHA に匹敵する強い抗酸化作用を示した。

キーワード: 赤小豆, アズキ熱水抽出物, アズキ煮汁, フラボノイド, 抗酸化能

그림 2-1-28. 팔에 함유되어있는 플라보노이드 배당체의 분석 논문.

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 그림1.의 논문을 참고하여 70% 메탄올을 이용하여 시료 중 캄페롤, 캄페롤-3-O-β-루티노사이드, 루틴을 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 및 정량 분석을 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(20 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 액체크로마토그래프용 바이알

2.2 분석 장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 UV검출기(UV Detector) 또는 PDA(Photodiode Array)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 Luna 5u C18 4.6mm*250mm, phenomenex

2.3 이동상

2.3.1 이동상 A : 0.1% 트리플루오로아세트산

2.3.2 이동상 B : 아세트나이트릴

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 캄페롤(Kaempferol)

Product number : K0133, (Lot# BCBR9014, CAS NO. 520-18-3, Sigma)

3.1.2 캄페롤-3-O-β-루티노사이드(Kaempferol 3-O-β-rutinoside)

Product number : 90242, (Lot# BCBT1584, CAS NO. 17650-84-9, Sigma)

3.1.2 루틴

Product number : R5143, (Lot#BCRR8150, CAS NO. 207671-50-9, Sigma)

3.2 일반시약

3.2.1 물

3.2.2 메탄올

3.2.3 트리플루오로아세트산

3.2.4 아세트나이트릴

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준품 약 10mg을 10 mL 부피플라스크에 넣고 70% 메탄올을 이용하여 정용한다.

본 실험은 지표물질 탐색에서 정성과정이므로 검량선 작성은 하지 않았다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 20 mL의 부피플라스크에 시료 약 1.5g을 취한 후 70% 메탄올을 이용하여 정용한다.

4.2.2 초음파추출기를 이용하여 초음파 추출을 한다.

4.2.3 잘 섞은 후 0.45um syringe filter를 이용하여 여과한 후 분석 한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석(HPLC)

5.1.1 칼럼

Luna 5u C18, 4.6mm*250mm, phenomenex

5.1.2 이동상

이동상 A : 0.1 % 트리플루오로아세트산

이동상 B : 아세트나이트릴

표 2-1-15. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| 시간 | 이동상 A | 이동상 B | Flow rate (mL/min) |
|----|-------|-------|-----------------------|
| 0 | 95 | 5 | 1 |
| 18 | 75 | 25 | 1 |
| 30 | 10 | 90 | 1 |
| 35 | 95 | 5 | 1 |
| 40 | 95 | 5 | 1 |

5.1.3 칼럼 온도 : 30 °C

5.1.4 검출기 : UV 360 nm, PDA 190 ~ 600 nm

5.1.5 주입량 : 10 uL

- 캠페롤, 캠페롤-3-O-β-루티노사이드, 루틴의 분석 결과

1. 캠페롤

팔 추출물과 캠페롤을 비교하기 위하여 분석 그림 13.의 방법으로 분석하였다. 동일한 RT인 26.7분에서 팔 추출물과 캠페롤 표준용액에서 peak가 검출되었다.(그림 14.) 스펙트럼을 확인한 결과 동일한 물질이 아님을 확인할 수 있었다(그림 15.).

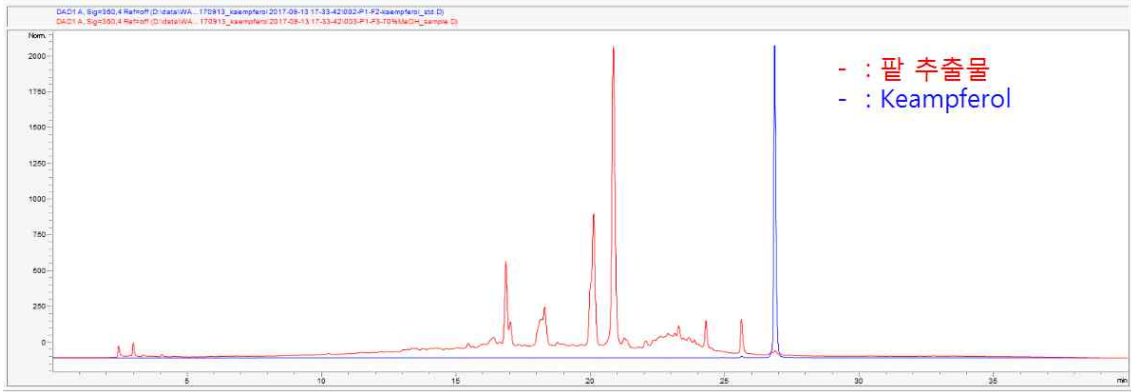


그림 2-1-29. 팔 추출물과 캠페롤의 크로마토그램 비교.

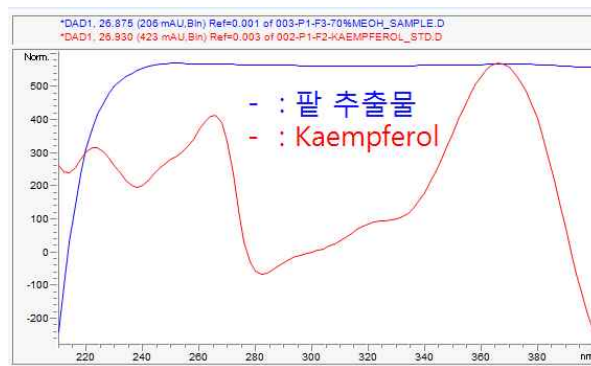


그림 2-1-30 캠페롤과 동일한 RT를 갖는 peak와의 스펙트럼 비교.

2. 캠페롤-3-O-β-루티노사이드

팔 추출물과 캠페롤-3-O-β루티노사이드를 비교하기 위하여 그림 13.의 방법으로 분석하였다. 캠페롤-3-O-β루티노사이드와 동일한 RT인 21.0분에서 peak가 검출되었다.(그림 16.) 스펙트럼을 확인한 결과 동일한 물질이 아닌 것을 확인할 수 있었다.(그림 17.)

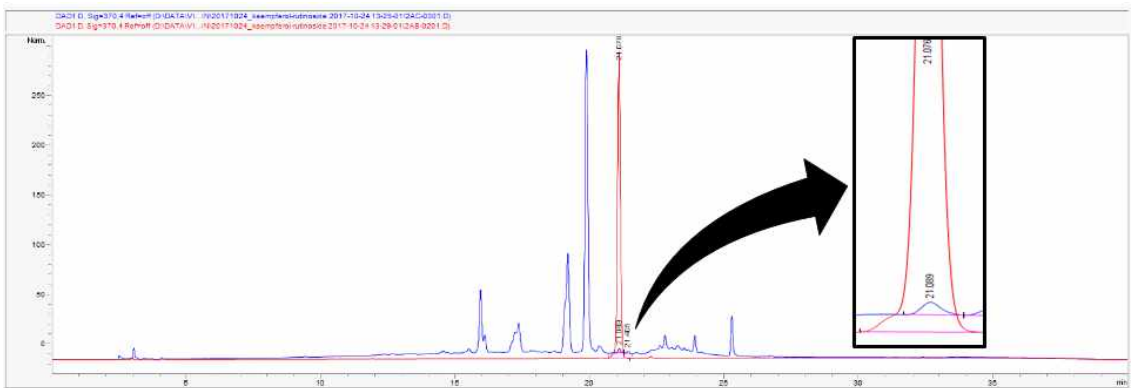


그림 2-1-31 팔 추출물과 캠페롤-3-O-β루티노사이드의 크로마토그램 비교.

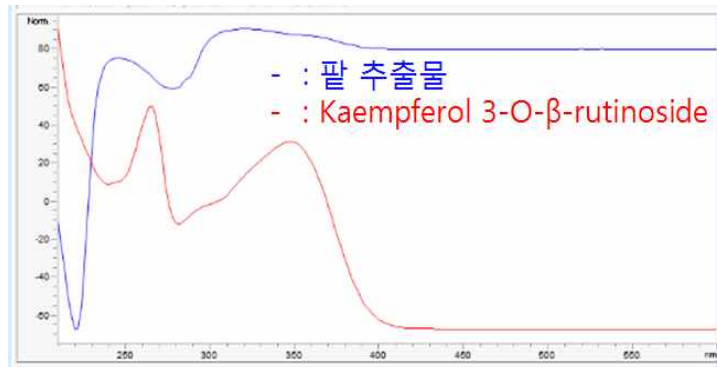


그림 2-1-32 캠페롤-3-O-β루티노사이드와 동일한 RT를 갖는 peak와의 스펙트럼 비교.

3. 루틴

팔 추출물과 루틴을 비교하기 위하여 분석 한 결과, 루틴의 RT와 겹치는 peak가 검출되지 않는 것으로 확인되었다.

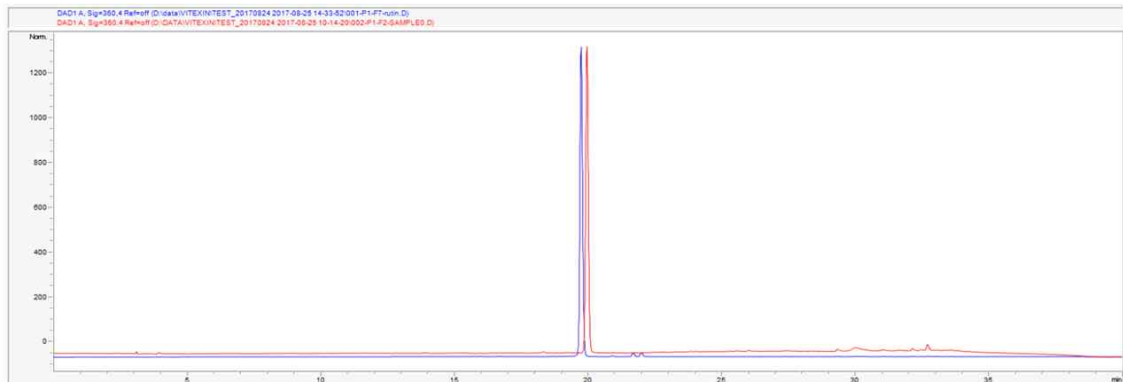


그림 2-1-33. 팔 추출물과 루틴의 크로마토그램 비교.

- 카테킨 최종 분석법 확립 : 최초 분석했던 플라보노이드 6종 중 카테킨의 분석이 가장 용이하여 생리활성물질로 선정하고 이에 대한 분석법을 확립하였다. 분석법과 분석 결과는 다음과 같다.

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 70% 메탄올을 이용하여 시료 중 카테킨을 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 및 정량 분석을 한다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 부피플라스크(20 mL)

2.1.2 여과용 멤브레인 필터

2.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

2.1.4 액체크로마토그래프용 바이알

2.2 분석 장비

2.2.1 고속액체크로마토그래프

2.2.2 UV검출기(UV Detector) 또는 PDA(Photodiode Array)

2.2.3 칼럼오븐

2.2.4 Luna 5u C18 4.6mm*250mm, phenomenex

2.3 이동상

2.3.1 이동상 A : 0.1% 초산

2.3.2 이동상 B : 아세트나이트릴

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

3.1.1 카테킨((+)-Catechin hydrate)

Product number : C1251, (Lot# WXBC3261V, CAS NO. 225937-10-0, Sigma)

3.2 일반시약

3.2.1 물

3.2.2 메탄올

3.2.3 초산

3.2.4 아세트나이트릴

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 표준품 약 10mg을 10 mL 부피플라스크에 넣고 70% 메탄올을 이용하여 정용한다.

4.1.2 표준용액의 검량선

표 2-1-16. 표준용액의 정량표

| | std1 | std2 | std3 | std4 | std5 |
|------------|------|------|------|------|------|
| STD(ug/mL) | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 20 mL의 부피플라스크에 시료 약 1.5g을 취한 후 70% 메탄올을 이용하여 정용한다.

4.2.2 초음파추출기를 이용하여 초음파 추출을 한다.

4.2.3 잘 섞은 후 0.45um syringe filter를 이용하여 여과한 후 분석한다

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석(HPLC)

5.1.1 칼럼

Luna 5u C18, 4.6mm*250mm, phenomenex

5.1.2 이동상

이동상 A : 0.1% 초산

이동상 B : 아세트나이트릴

표 2-1-17. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| 시간 | 이동상 A | 이동상 B | Flow rate (mL/min) |
|----|-------|-------|-----------------------|
| 0 | 95 | 5 | 1 |
| 18 | 75 | 25 | 1 |
| 30 | 10 | 90 | 1 |
| 35 | 95 | 5 | 1 |
| 40 | 95 | 5 | 1 |

5.1.3 칼럼 온도 : 30℃

5.1.4 검출기 : UV 280nm, PDA 200 ~ 400nm

5.1.5 주입량 : 10 uL

5.2 계산

5.2.1 카테킨 함량(mg/g) = $C \times (a / s) \times P$

C : 시험용액 중의 카테킨 농도 (ug/mL)

a : 최종희석액(mL)

S : 시료 채취량(mg)

P : 표준품 순도(%)

• 카테킨 분석의 최종 결과

• 고찰

생리활성물질로 결정된 카테킨의 최종분석법으로 분석한 결과, 14.3분에 카테킨 peak가 나타났고, 시험용액에서 카테킨은 14.3분에 peak가 검출되었다. 주어진 조건으로 분석하였을 때에 표준품 및 팔 추출물 중 카테킨 peak의 분리도는 다른 peak의 영향을 크게 받지 않았으며 base line 역시 문제없이 잘 나타났다. 카테킨 및 팔 추출물의 크로마토그램과 스펙트럼은 아래와 같다. (그림 2-1-34-37)

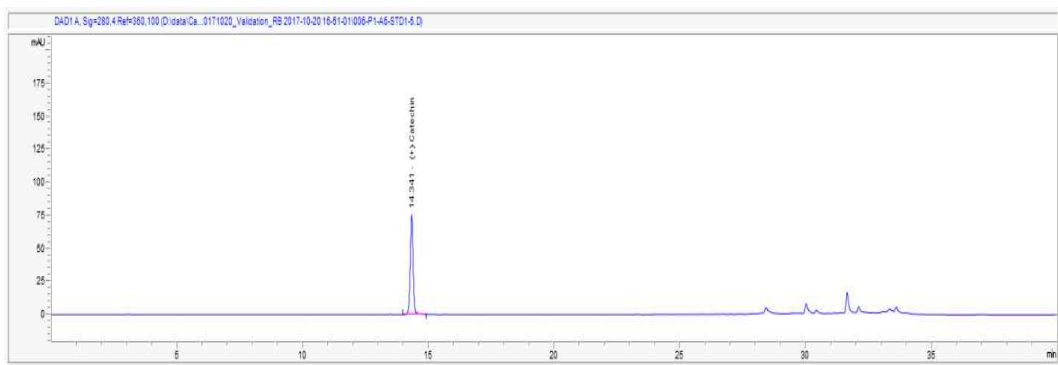


그림 2-1-34. 카테킨 크로마토그램.

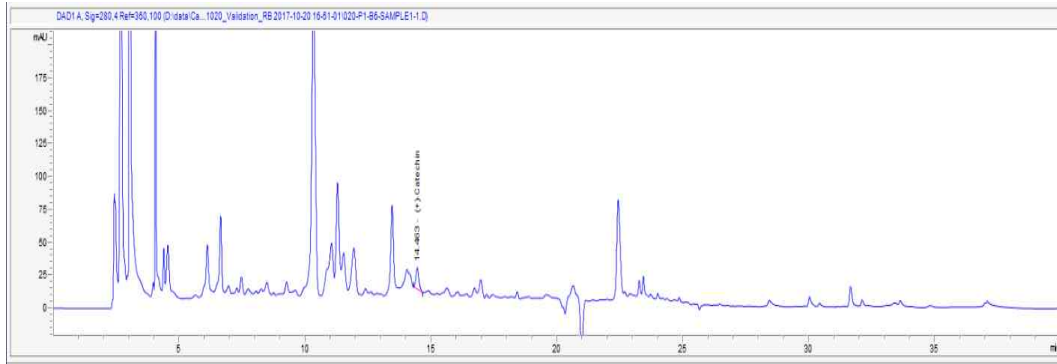


그림 2-1-35. 팔 추출물 내 카테킨의 크로마토그램.

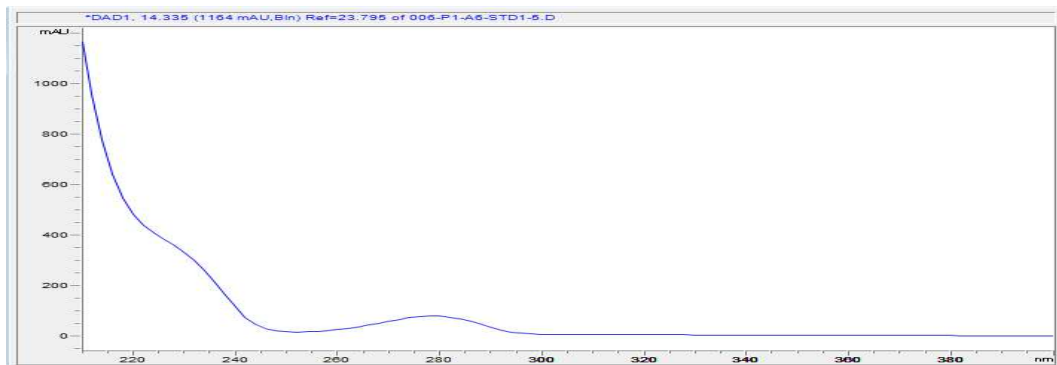


그림 2-1-36. 표준물질 카테킨의 스펙트럼.

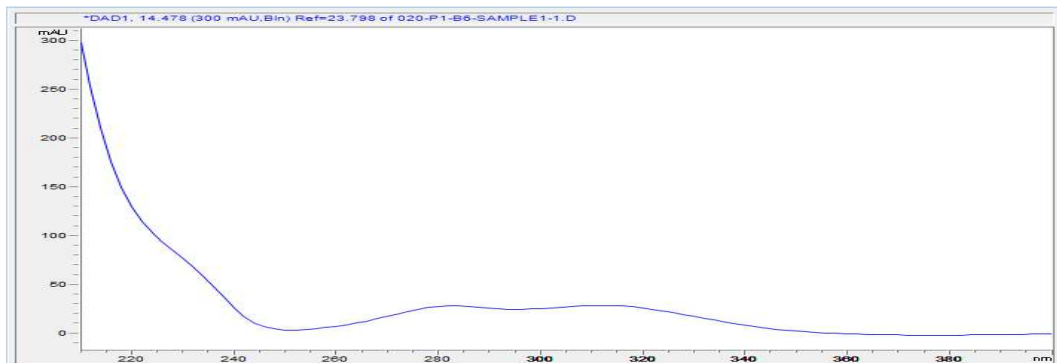


그림 2-1-37. 팔 추출물 내 카테킨의 스펙트럼.

팔 추출물 약 1,500mg을 취한 후 70% 메탄올로 추출하여 시료 중의 카테킨 함량을 분석한 결과, 카테킨의 함량은 55.07 ± 0.51 mg/g으로 나타났다.

② 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 분자량별 분획 scale-up 연구

- LC-MS/MS를 통한 펩타이드 분석 : LC-MS/MS로 펩타이드 프로파일을 분석하였다.

○ LC-MS/MS condition

1) LC condition

- HPLC : UltiMate 3000 system (Dionex, US)
- Column : ZORBAX 300SB-C18 (1.0 X 150mm, 3.5um, agilent)
- Mobile phase : A $H_2O/Formic\ acid(FA) = 100/0.2$ (v/v)
- B $Acetonitrile/FA = 100/0.2$ (v/v)

- gradient

표 2-1-17. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| Step | Time (min) | Flow rate(ug/ml) | A (%) | B(%) |
|------|------------|------------------|-------|------|
| 0 | 00.0 | 100.0 | 95.0 | 5.0 |
| 1 | 05.0 | 100.0 | 95.0 | 5.0 |
| 2 | 07.0 | 100.0 | 90.0 | 10.0 |
| 3 | 48.0 | 100.0 | 70.0 | 30.0 |
| 4 | 55.0 | 100.0 | 5.0 | 95.0 |
| 5 | 65.0 | 100.0 | 5.0 | 95.0 |
| 6 | 66.0 | 100.0 | 95.0 | 5.0 |
| 7 | 71.0 | 100.0 | 95.0 | 5.0 |

2) MS/MS condition

- MS 기기 : MicroQ-TOF III mass spectrometer (Bruker Daltonics, 255748 Germany)

- MS method : 20140110_low_AUTO_50_2000.m

- Mode : ESI+

- Flow rate : 100uL/min

- MS parameter

1. Source - Capillary Voltage : 4500, Nebulizer : 0.8, Dry Gas : 5.5, Dry Tem : 180°C

2. Transfer - Funnel 1RF : 400, Funnel 2RF : 400, ISCID energy : 0eV, Hexapole RF : 250

3. Quadruple - Ion Energy : 5.0eV, Low Mass : 300m/z

4. Collision Cell - Collision Energy : 7ev, Collision RF : 600, Transfer Time : 75us, Pre Puls Storage : 8us

- Scan range : m/z 50-2000

- Rolling Average spectra Rate : 2 X 2.0 Hz

- Source Temperature : 180 °C

- Auto MS/MS

1. Precursor ions - 4x

2. Threshold - Absolute : 5000cts, Relative 0%

3. Smart Exclusion - No check

4. Active Exclusion - Active check, Exclude after : 2 Spectra, Release after : 0.5min

- Collision Cell

1. Collision Sweeping - Active check

2. Collision RF - Start : 600Vpp, End : 100Vpp

3. Collision Energy - Start : 100Vpp, End : 130Vpp

○ 분석 결과

1) Prep 1 _ Peak 1

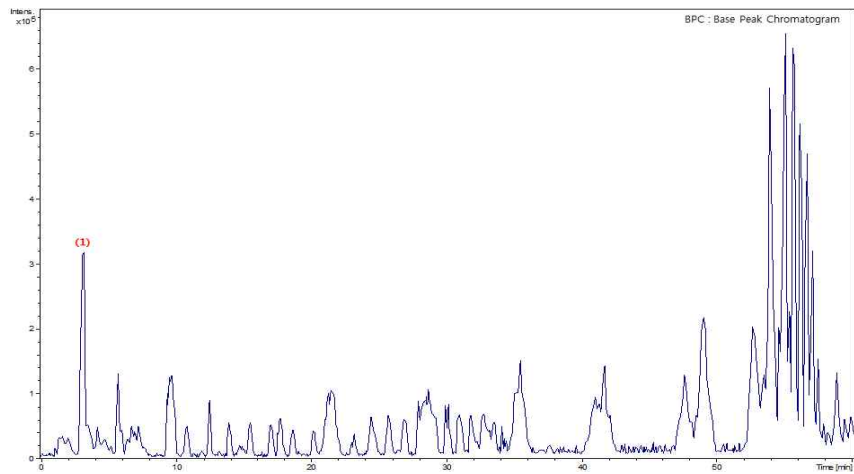


그림 2-1-38. Base Peak Chromatogram.

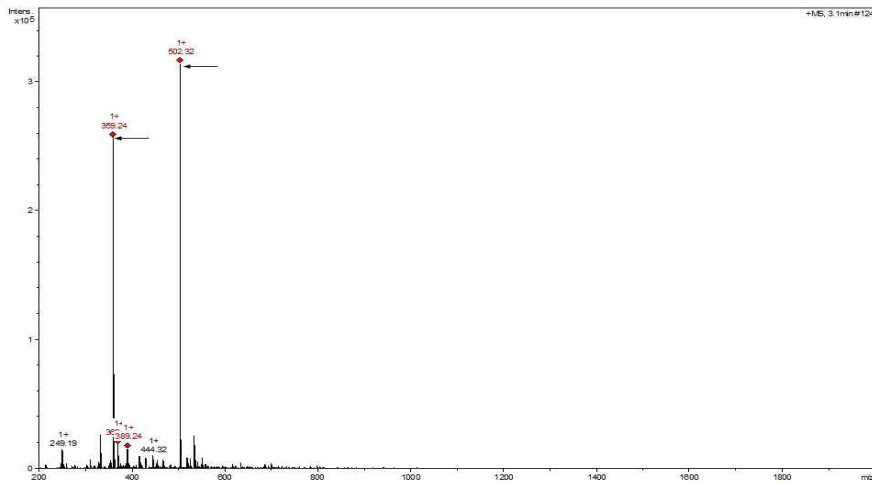


그림 2-1-39. MS spectrum.

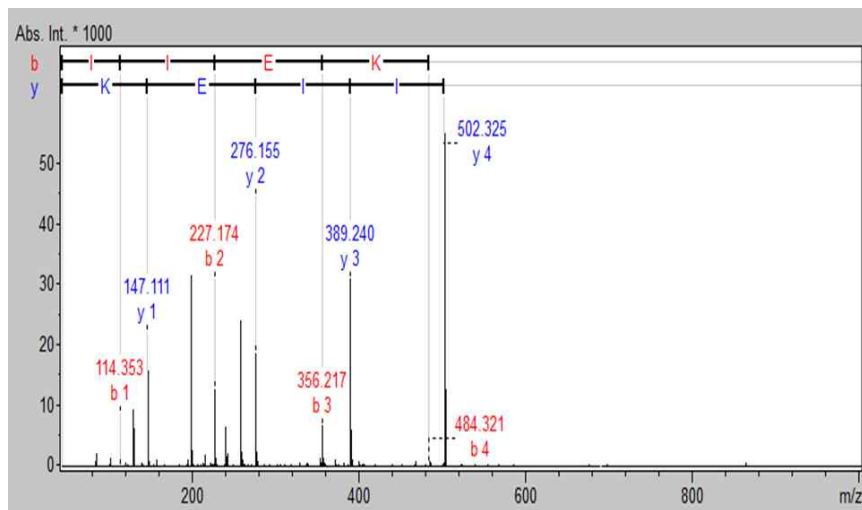


그림 2-1-40. MS/MS Sequencing (502.32[M+H] : IIEK).

2) Prep 4 _ Peak 5

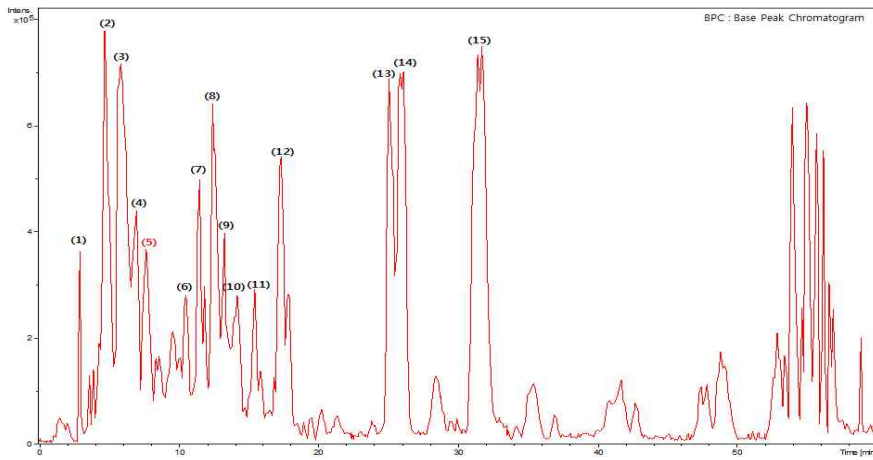


그림 2-1-41. Base Peak Chromatogram.

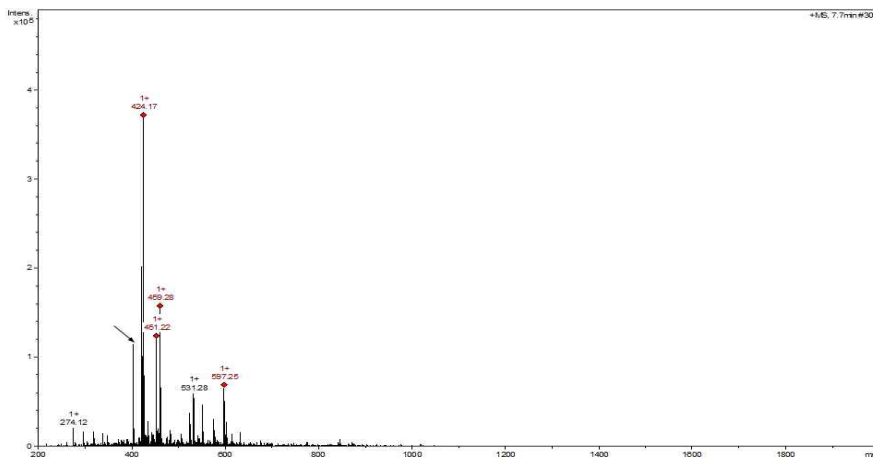


그림 2-1-42. MS spectrum.

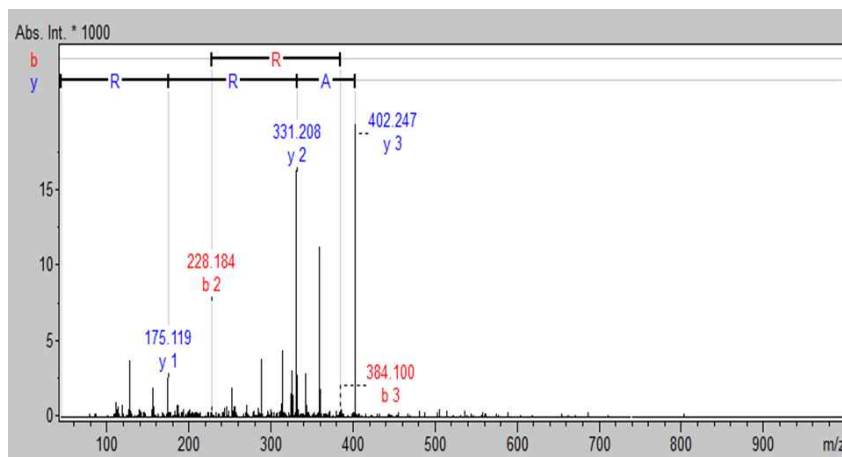


그림 2-1-43. MS/MS Sequencing (402.24[M+H] : ARR).

3) Prep 3 _ Peak 1, 3, 4, 5, 6

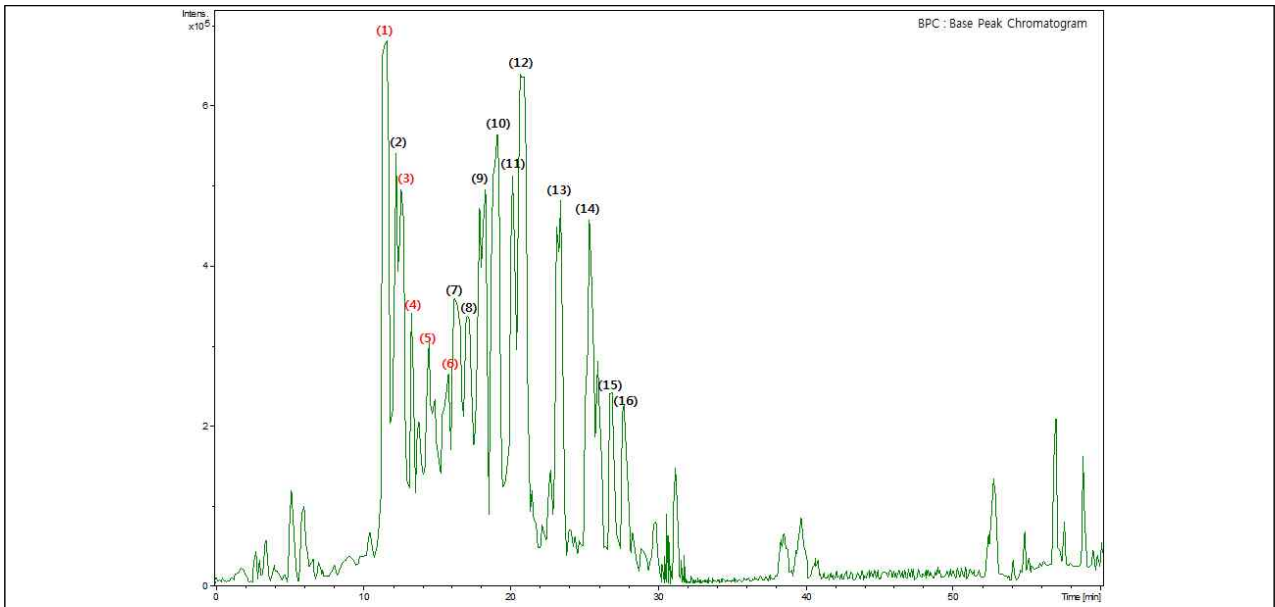


그림 2-1-44. Base Peak Chromatogram.

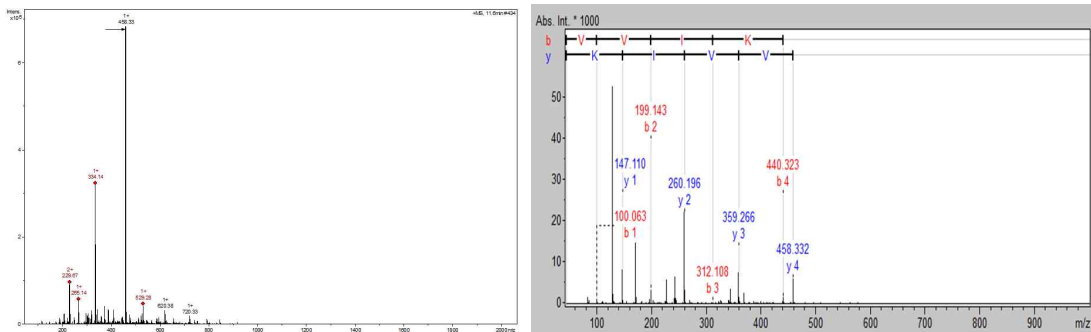


그림 2-1-45. peak 1: MS spectrum and MS/MS Sequencing (458.33[M+H] : VVIK).

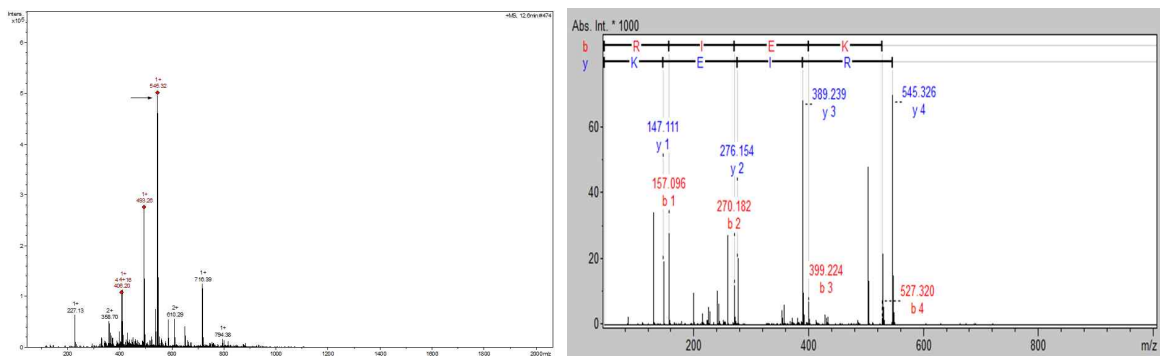


그림 2-1-46. peak 3: MS spectrum and MS/MS Sequencing (545.33[M+H] : RIEK).

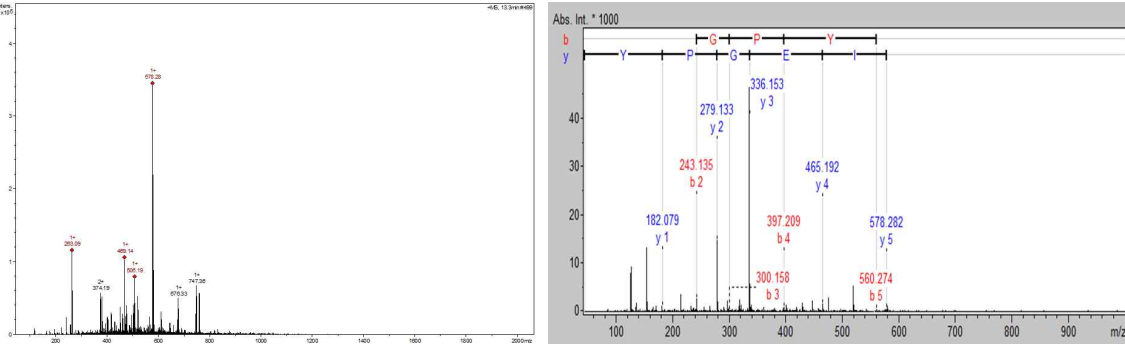


그림 2-1-47. peak 4: MS spectrum and MS/MS Sequencing (578.28[M+H] : IEGPY).

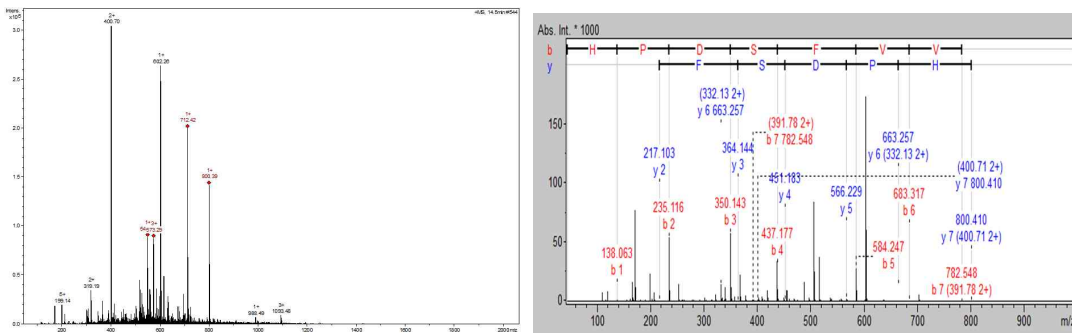


그림 2-1-48. peak 5: MS spectrum and MS/MS Sequencing (400.70[M+H] : HPDSFVV).

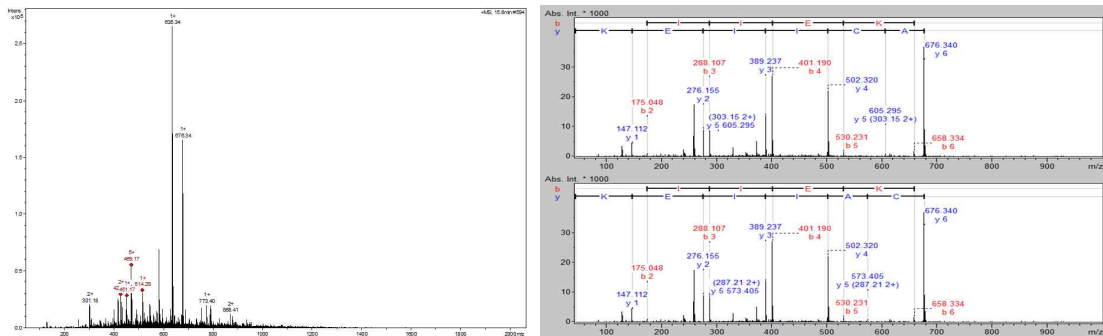


그림 2-1-49. peak 6: MS spectrum and MS/MS Sequencing (676.34[M+H] : ACIEEK or CAIEEK).

4) Prep 4 _ Peak 3, 4

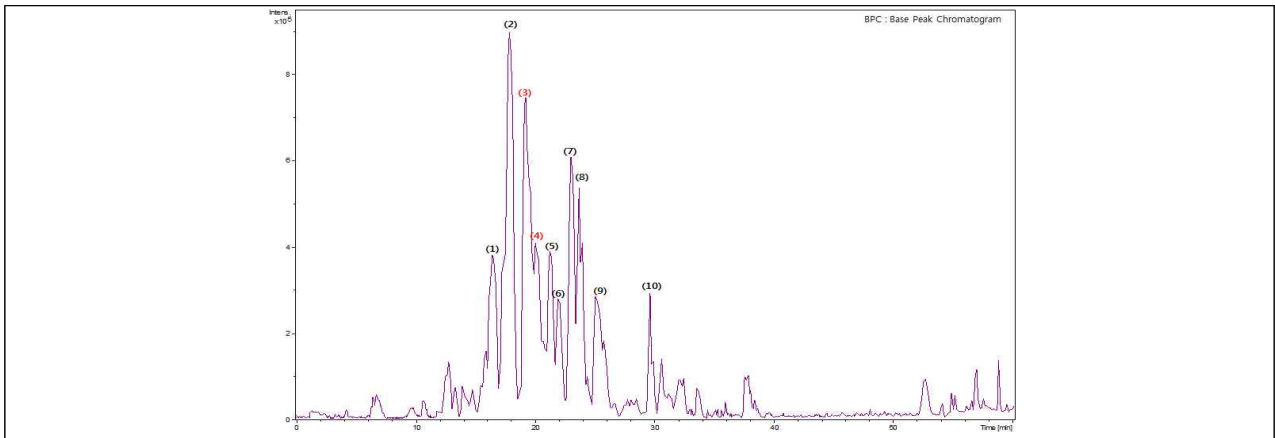


그림 2-1-50. Base Peak Chromatogram.

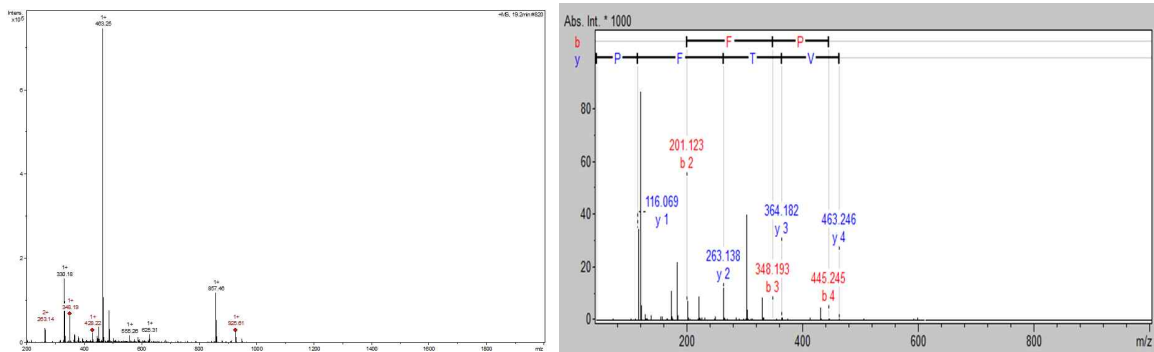


그림 2-1-51. peak 3: MS spectrum and MS/MS Sequencing (463.25[M+H] : VTFP).

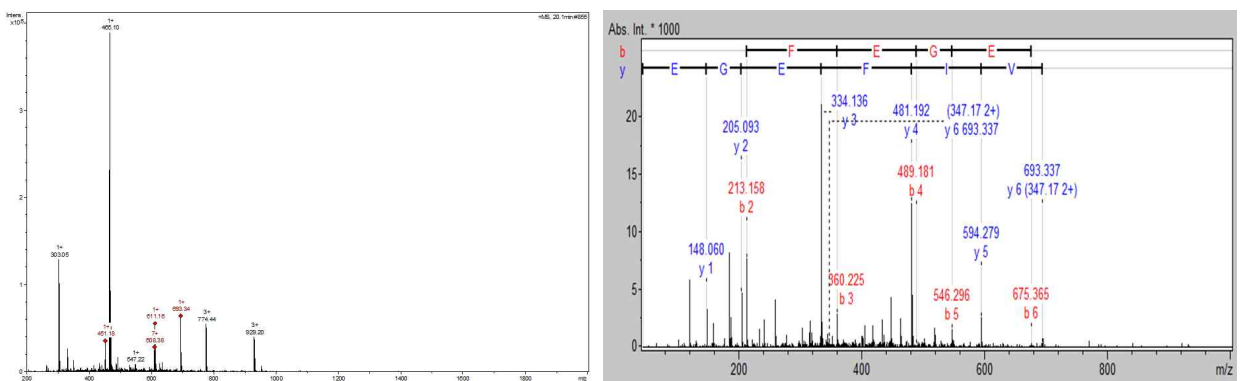


그림 2-1-52. peak 3: MS spectrum and MS/MS Sequencing (693.45[M+H] : VIFEGE).

5) Sequencing Table

표 2-1-18. 펩타이드 sequencing

| Prep No. | Peak No. | Charge | m/z | RT | Sequencing |
|----------|----------|--------|--------|------|------------------|
| 1 | 1 | 2 | 502.32 | 3.1 | IIEK |
| 2 | 5 | 1 | 402.24 | 7.7 | ARR |
| 3 | 1 | 1 | 458.33 | 11.6 | VVIK |
| | 3 | 1 | 545.33 | 12.6 | RIEK |
| | 4 | 1 | 578.28 | 13.3 | IEGPY |
| | 5 | 2 | 400.70 | 14.5 | HPDSFVV |
| | 6 | 1 | 676.34 | 15.8 | ACIIEK or CAIIEK |
| 4 | 3 | 1 | 463.25 | 19.2 | VTFP |
| | 4 | 1 | 693.45 | 20.1 | VIFEGE |

③ 팔 생리활성물질 및 펩타이드 제조공정 표준화 및 대량 생산 공정 설계

전 화 번 호 : 010 - 8582 - 9621

(주)뉴트리 귀하

| | | | |
|------|-------------------|-----|-----|
| 등록번호 | 480 - 14 - 00090 | | |
| 상 호 | 대찬농가 | 성 명 | 김형민 |
| 주 소 | 경남 함양군 함양읍 한들로 36 | | |
| 업 태 | 도소매 | 종 목 | 농산물 |

아래와 같이 견적합니다


| 합계금액: | | | | | | ₩13,000,000 | |
|-------|-------|-----|------|----|----------|--------------|----------|
| NO | 제품명 | 규 격 | 수 량 | 단위 | 단가 | 공급가 | 비고 |
| 1 | 국산 적두 | 1kg | 1000 | kg | ₩ 13,000 | ₩ 13,000,000 | 2016. 세척 |

표 2-1-19. 팔 추출물의 생산 공정 설계

| 제조 공정 | 공정 조건 | 수율(kg) | 카데킨 함량 (mg/g) | 펩타이드 함량 (mg/g) |
|-------|------------------------------------|--------|---------------|----------------|
| 원재료 | 팔 (세척 후 이물 제거하여 건조한 것) | 500 | | |
| ↓ | | | | |
| 열수 추출 | 4배수, 80℃ 4 hour | 46.5 | | 160 |
| ↓ | | | | |
| 효소 반응 | protamex 0.1%첨가, pH 6.5, 40℃ 6h | 46.5 | | 160 |
| ↓ | | | | |
| 효소 실활 | 90℃ 15min~20min | 46.5 | | 160 |

| | | | | |
|--------------|-----------------------------------|--|------|------|
| ↓ | | | | |
| 1차액 여과/농축 | 20~35 brix | | 46.5 | 160 |
| ↓ | | | | |
| 주정 추출 | 70% 주정 4배수, 실온 12hour | | 9 | 0.3 |
| ↓ | | | | |
| 2차액 여과/농축 | 20~35 brix | | 9 | 0.3 |
| ↓ | | | | |
| 살균 | 1차 농축액, 2차 농축액 혼합 살균 - 90℃ 30분 | | 55.5 | 0.25 |
| ↓ | | | | |
| 건조 | 분무건조 | | 50 | 0.2 |
| ↓ | | | | |
| 포장 | | | 50 | 0.2 |

※ 해당 공정에서 사용한 효소는 식품첨가물공전에 등재되어 있을 뿐 만 아니라, 두류 단백질 제조시에 가장 많이 사용되고 있는 효소로 안전성에 문제가 없는 것으로 확인하였다. 이에 효소의 안전성에 대한 정보를 아래와 같이 첨부하였다.



1 of 2
Valid from 2012-03-19

Protamex®

In this product the key enzyme activity is provided by
serine endoprotease that hydrolyzes internal peptide bonds:

PRODUCT CHARACTERISTICS/PROPERTIES

| | | | |
|--|-----------------------|--|--|
| Declared enzyme | Protease (Subtilisin) | | |
| Declared activity | 1.5 AU-N/g | | |
| Color | Light brown | | |
| Physical form | Granulate | | |
| Properties | Freeflowing | | |
| Approximate density (g/ml) | 1.10 | | |
| Color can vary from batch to batch. Color intensity is not an indication of enzyme activity. | | | |

PRODUCT SPECIFICATION

| | Lower Limit | Upper Limit | Unit |
|-----------------------|--------------|-------------|-------|
| Proteolytic unit AU-N | 1.5 | | /g |
| Total viable count | + | 50000 | /g |
| Coliform bacteria | - | 30 | /g |
| E. coli | Not Detected | | /25 g |
| Salmonella | Not Detected | | /25 g |
| Heavy metals: | | Max 30 | mg/kg |
| Lead | | Max 5 | mg/kg |
| Arsenic | | Max 3 | mg/kg |
| Cadmium | | Max 0.5 | mg/kg |
| Mercury | | Max 0.5 | mg/kg |

The enzyme analytical method is available from the Customer Center or sales representative.

COMPOSITION

| Ingredients | Appr. % (w/w) |
|---|---------------|
| Sodium chloride, CAS no. 7647-14-5 | 89 |
| Protease (neutral), CAS no. 9080-56-2* | 9 |
| Protease (Subtilisin), CAS no. 9014-01-1* | 1 |
| Water, CAS no. 7732-18-5 | 1 |

* Defined as enzyme conc. (dry matter basis)

ALLERGEN

| Allergen | Substance contained | Allergen | Substance contained |
|--|---------------------|--|---------------------|
| Beef | no | Lactose | no |
| Carrot | no | Legumes | no |
| Celery | no | Lupin | no |
| Cereals containing gluten ¹ | no | Milk | no |
| Chicken meat | no | Molluscs | no |
| Cocoa | no | Mustard | no |
| Coriander | no | Nuts ² | no |
| Corn/maize | no | Peanuts | no |
| Crustaceans | no | Pork | no |
| Egg | no | Sesame | no |
| Fish | no | Soy | no |
| Glutamate | no | Sulphur dioxide/sulphites, more than 10 mg per kg or l | no |

¹ Definition of substances according to LeDa/ALBA and EU Directives 2000/13/EC and 2007/68/EC, as amended
² i.e. wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut
i.e. almond, hazelnut, walnut, cashew, pecan nut, Brazil nut, pistachio nut, macadamia nut and Queensland nut

NUTRITIONAL VALUES

The product has a typical nutritional value of approximately 167 kJ/100 g enzyme product.

| | | |
|--------------------------|--|------------|
| • Protein | | 10 g/100 g |
| • Ash | | 90 g/100 g |
| • Sodium (34.94 g/100 g) | | |
| • Moisture | | 1 g/100 g |

PRODUCTION ORGANISM

Production organism: *Bacillus licheniformis*
Bacillus arylobacter

Produced by submerged fermentation of micro organisms. The enzyme protein is separated and purified from the production organisms.

STORAGE CONDITION

Recommended storage: 0-25 °C (32-77 °F)
Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to avoid the need for a higher dosage.
Best before: You will find the best before date in the certificate of analysis or on the product label.
The product gives optimal performance when stored as recommended and used within 24 months of the production date.
Novozymes guarantees delivery at least 6 months prior to the best-before date.

SAFETY AND HANDLING PRECAUTIONS




Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes, and mucous membranes upon prolonged contact. See the MSDS or Safety Manual for further information regarding safe handling of the product and spills.

COMPLIANCE

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).
Kosher and Halal certificates are available from the Customer Center or sales representative.

CERTIFICATIONS

Novozymes is a signatory to United Nations Global Compact, United Nations Convention on Biological Diversity and report on our sustainability performance through Global Reporting Initiative (GRI). See all our commitments under sustainability on www.novozymes.com.

FOOD SAFETY

Novozymes has carried out a hazard analysis and prepared an HACCP plan describing the critical control points (CCPs). The HACCP plan is supported by a comprehensive prerequisite program implemented in Novozymes' GMP practices. The product is produced according to Novozymes' HACCP plan, GMP practices, and additional requirements controlled by Novozymes' Quality Management System.
The product complies with FAO/WHO JECFA- and FCC-recommended purity requirements regarding mycotoxins. The product complies with EU legislation regarding pesticides.
The product is produced under FSSC 22000 certification.

PACKAGING

The product is available in different types of packaging. Please contact the sales representative for more information.

(나) 표준화 생리활성 추출물 및 펩타이드의 이화학적 특성 규명

① 표준화 생리활성 추출물의 주요 성분 분석

- HPLC를 이용한 주요 펩타이드 분리 : HPLC 펩타이드 컬럼을 이용하여 팔 추출물의 주요 펩타이드 분획을 정제하였다.

○ 분석 조건

- HPLC : Water 2690 system
- 컬럼 : Jupiter 4u proteo 90A, 4.6*250mm, phenomenex
- 컬럼 온도 : 35°C
- 이동상 : A = 0.1% TFA Water, B = Acetonitrile
- 검출기 및 측정파장 : 996 PDA, 280 nm
- 주입량 : 10 ul
- Flow rate : 1mL/min

표 2-1-20. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| Time (min) | A | B |
|------------|----|----|
| 0 | 90 | 10 |
| 5 | 90 | 10 |
| 20 | 50 | 50 |
| 25 | 10 | 90 |
| 30 | 90 | 10 |
| 35 | 90 | 10 |

○ 분석 결과

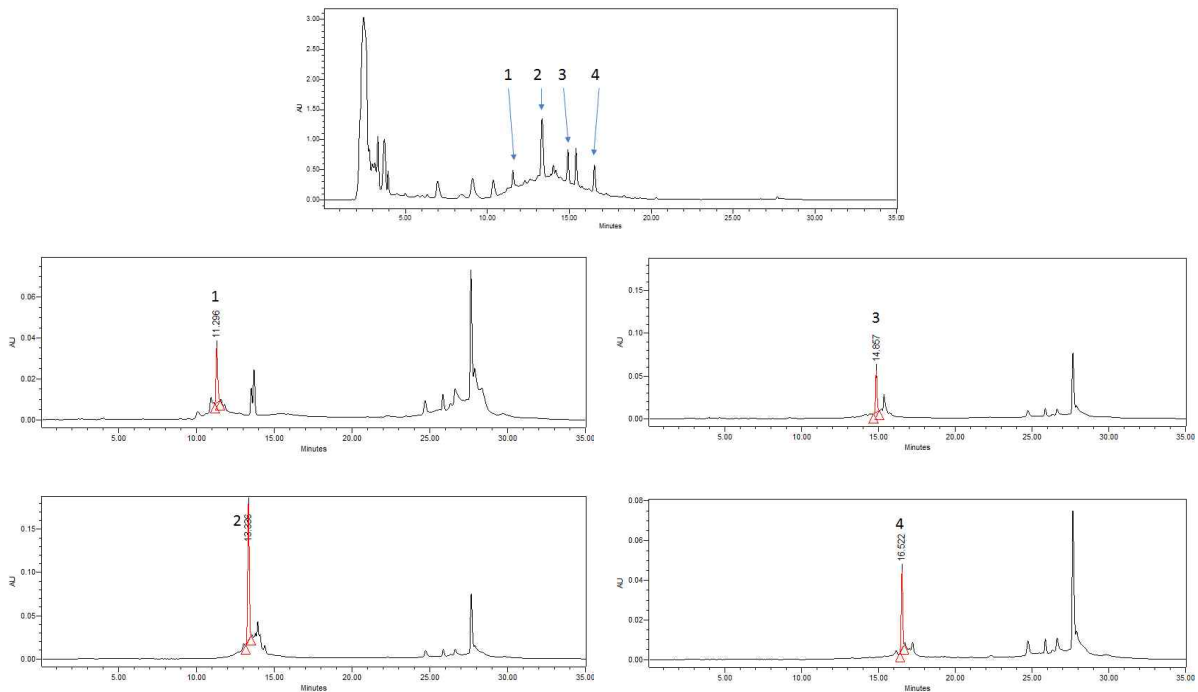


그림 2-1-53. 팔 추출물의 펩타이드 성분 분석.

② 팔 추출물의 아미노산 조성 (아미노산 분석기)

표 2-1-20. 팔 추출물 내의 아미노산 조성

| 아미노산 | 함량 (mg/100g) | 아미노산 | 함량 (mg/100g) |
|-------|--------------|--------|--------------|
| 트레오닌 | 41.00 | 로이신 | 14.07 |
| 시스틴 | - | 메티오닌 | 2.11 |
| 티로신 | 29.66 | 페닐알라닌 | 37.63 |
| 아르기닌 | 651.93 | 트립토판 | 88.64 |
| 알라닌 | 56.97 | 발린 | 33.48 |
| 프롤린 | 49.29 | 글루탐산 | 441.86 |
| 라이신 | 28.65 | 아스파라긴산 | 425.47 |
| 히스티딘 | 87.95 | 세린 | 25.36 |
| 이소로이신 | 14.68 | 글리신 | 29.50 |

③ 팔 추출물의 분자량 분포 : GPC

- GPC컬럼을 이용하여 팔 추출물의 분자량 분포를 측정하였다. 팔추출물 20mg을 취하여 0.01 mol/Tri-HCl buffer(pH 7.4)를 이용하여 20ml로 정용하였다. 이 용액을 0.45um 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다. UV 검출기를 이용한 고속액체크로마토그래프법으로 시험용액의 크로마토그램을 측정하였다.

1) 분석 조건

- HPLC : Water 2690 system
- 검출기 : 996 PDA
- 컬럼 : Superdex Peptide 10/300GL
- 컬럼 온도 : 30°C
- 이동상 : 0.01 mol/Tri-HCl buffer(pH 7.4)
- 유량 : 0.5 ml/min
- 측정파장 : 214 nm
- 주입량 : 20 uL

2) 분석 결과

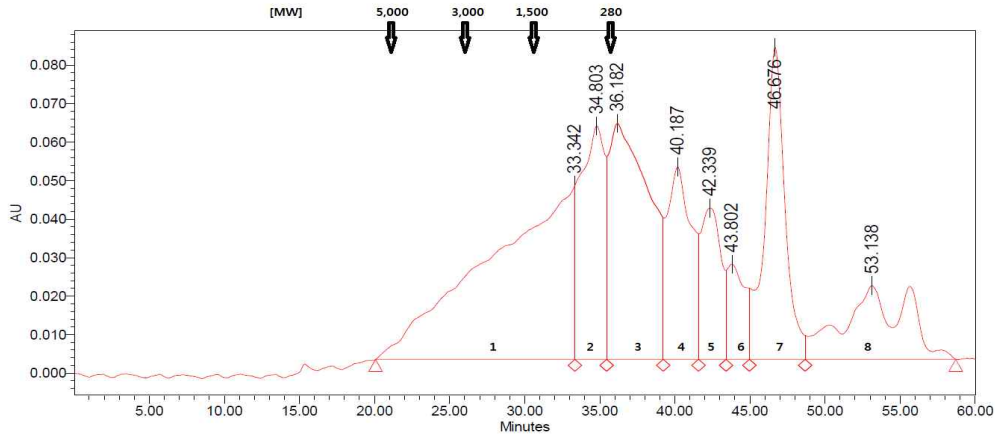


그림 2-1-53. GPC를 이용한 팔 추출물의 크로마토그램.

표 2-1-21. GPC 분석을 통한 각 시간대 별 면적값과 면적비

| | 유지시간(분) | 면적 | 면적비(%) |
|---|---------|----------|--------|
| 1 | 33.342 | 17886870 | 29.55 |
| 2 | 34.803 | 6744568 | 11.14 |
| 3 | 36.182 | 11389817 | 18.82 |
| 4 | 40.187 | 5670553 | 9.37 |
| 5 | 42.339 | 3690986 | 6.10 |
| 6 | 43.802 | 2014332 | 3.33 |
| 7 | 46.676 | 7592188 | 12.54 |
| 8 | 53.138 | 5538141 | 9.15 |

④ 표준화된 팔 추출물의 안정성 평가

1. pH 안정성

물에 팔 추출물이 7.5 %가 되도록 넣어주고 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 이용하여 pH를 3, 5, 7, 9로 조정하였다. 1시간동안 sonication하고 상온에서 24시간 방치하였다. 모든 조건에서 24시간이 지났을 경우 침전이 발생하였고, pH가 높을수록 침전된 양이 작았다. 따라서 pH가 높을수록 용해도가 높아짐을 알 수 있으며 침전을 제외한 이상반응은 나타나지 않았다.

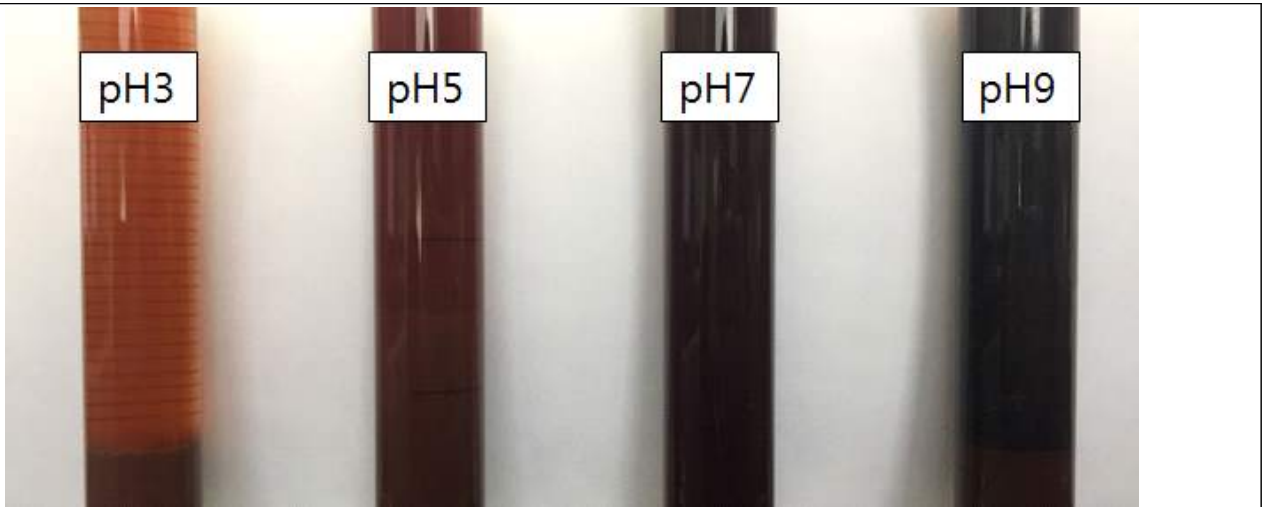


그림 2-1-54. pH에 따른 팔 추출물의 용해도 변화.

2. 열 안정성

물에 팔 추출물이 7.5 %가 되도록 넣어주고 0.1 M HCl과 0.1 M NaOH를 이용하여 pH를 3, 5, 7, 9로 조정하였다. 95°C 에서 30분 동안 가열하고 상온에서 24시간 방치하였다. 열처리하였을 때 용해도가 증가하였으며, 95°C 에서 30분 동안 가열하였을 경우 눈에 띄는 이상반응은 나타나지 않았다.

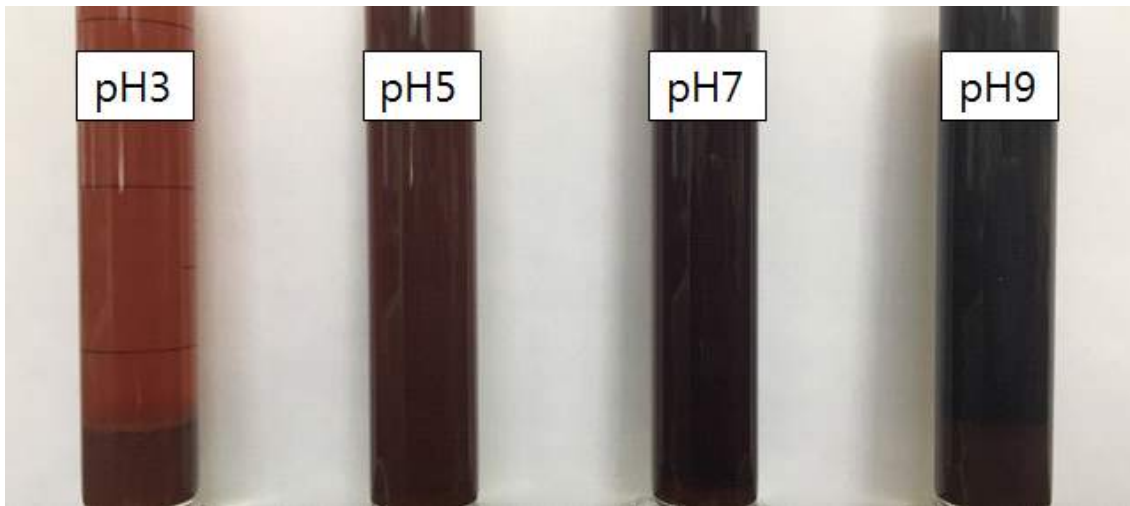


그림 2-1-55. pH를 조절한 팔 추출물에 95°C 가온설정 후의 용해도 변화.

3. 색도, 색차계 측정 결과

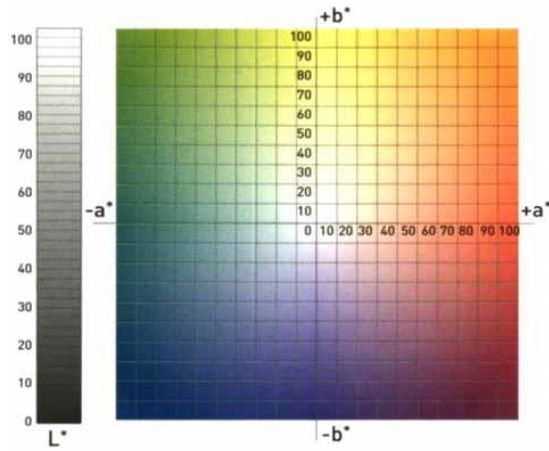


그림 2-1-56. 표색계.

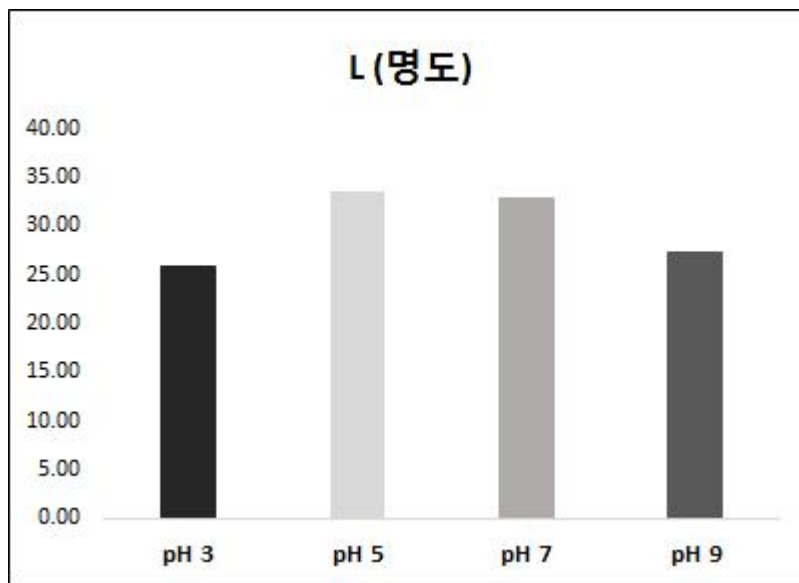


그림 2-1-57. pH에 따른 팔 추출물의 L값.

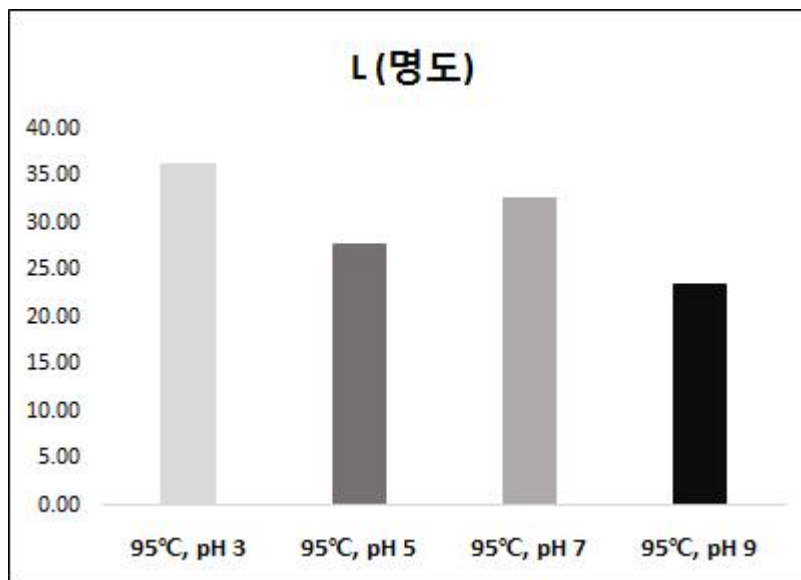


그림 2-1-58. pH설정 후 95°C로 가온한 팔 추출물 별 L값.

명도를 나타내는 L값은 열처리하였음에도 불구하고 그에 따른 유의차는 확인되지 않았다.

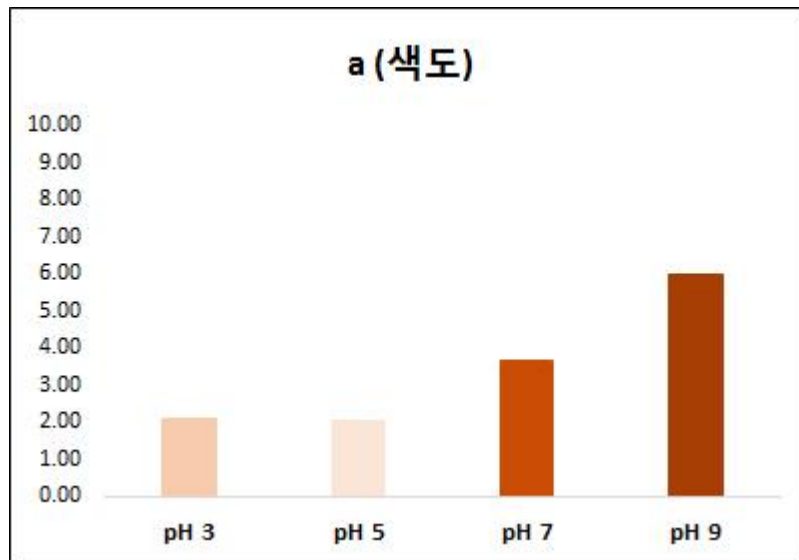


그림 2-1-59. pH에 따른 팔 추출물의 a값.

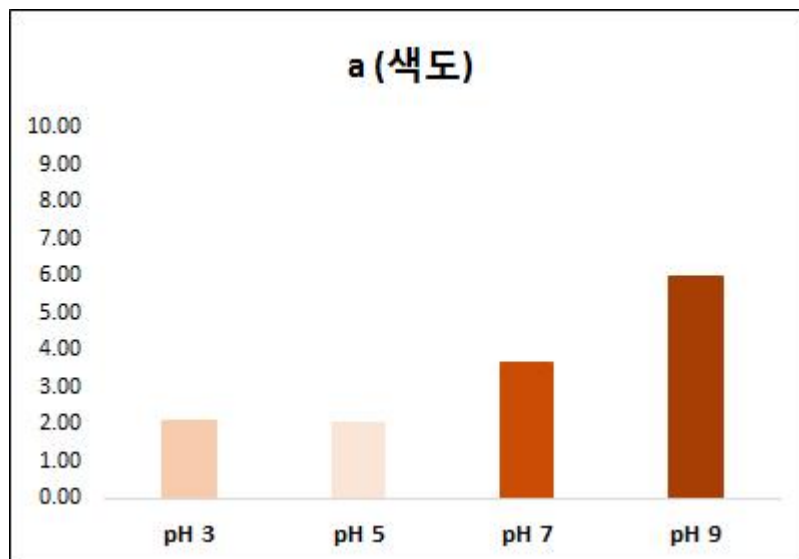


그림 2-1-60. pH설정 후 95°C로 가온한 팔 추출물 별 a값.

a(색도)값은 -a로 증가할수록 녹색 값 방향을, +a로 증가할 경우 빨간색 값을 나타낸다. 온도와 상관없이 pH가 증가할수록 팔 추출물의 색도는 적색을 나타냄을 알 수 있다.

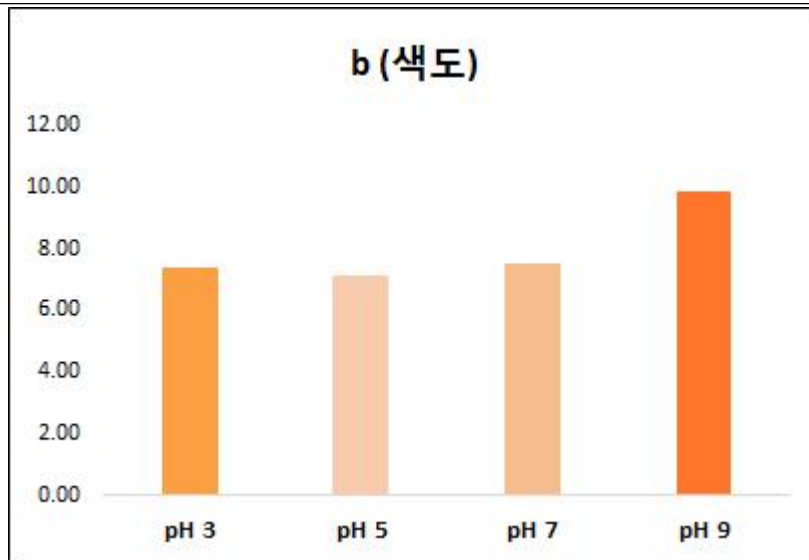


그림 2-1-61. pH에 따른 팔 추출물의 b값.

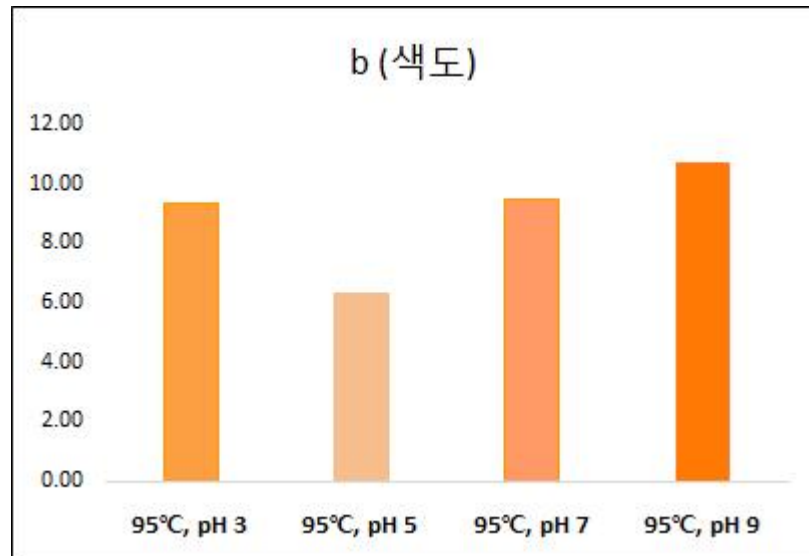


그림 2-1-62. pH설정 후 95°C로 가온한 팔 추출물 별 b값.

또한 b(색도)값은 -b로 증가할수록 파란색 값을, +b로 증가할 경우 노란색 값을 나타낸다. pH가 증가할수록 적색 부근으로 진행되는 것으로 보인다.

(3) 3차년도 수행내용 및 결과

(가) 근기능 두류 생리활성물질의 산업적 생산

① 근기능 두류 생리활성물질의 산업적 생산 및 시제품 확보

㉠ 팔 추출물의 생리활성 물질(Peonidin-3-rutinoside) 규명(HPLC)

- 본 시험법은 5% formic acid Water을 이용하여 시료 중 Peonidin-3-rutinoside을 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 분석을 한다.

1. 장비와 재료
 - 1.1 실험실 장비 및 소모품
 - 1.1.1 부피플라스크(20 mL)
 - 1.1.2 여과용 멤브레인 필터
 - 1.1.3 액체크로마토그래프용 유리병
 - 1.2 분석장비
 - 1.2.1 고속액체크로마토그래프
 - 1.2.2 UV검출기(UV Detector) or PDA Detector(Photodiode Array)
 - 1.2.3 칼럼오븐
 - 1.2.4 YMC-Pack Pro C18, 250*4.6 mmI.D, s-5um, 12nm
 - 1.3 이동상
 - 1.3.1 이동상 A :5% Formic acid Water
 - 1.3.2 이동상 B : 5% Formic acid Acetonitrile
 - 1.4 분석장비의 준비 : 이동상인 A와 B를 95:5의 비율로 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

2. 일반시약
 - 2.1 일반시약
 - 2.1.1 Water, Formic acid, Acetonitrile

3. 시험과정
 - 3.1 시험용액의 조제
 - 3.1.1 10ml의 부피플라스크에 시료 1mg을 취한다.
 - 3.1.2 A용매를 이용해 정용하고, 적정 농도로 희석한다.
 - 3.1.4 위 용액을 0.45um syringe filter를 이용하여 여과한 후 분석한다.

4. 분석
 - 4.1 기기분석(HPLC)
 - 4.1.1 column : YMC-Pack Pro C18, 250*4.6 mmI.D, s-5um, 12nm
 - 4.1.2 이동상 : A = 5% Formic acid Water , B = 5% Formic acid Acetonitrile

표 2-1-21. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| Time (min) | A | B |
|------------|----|----|
| 0 | 95 | 5 |
| 20 | 70 | 30 |
| 25 | 70 | 30 |
| 35 | 95 | 5 |

- 4.1.3 column oven : 30°C
- 4.1.4 detector : UV 310nm, PDA 200~400nm
- 4.1.5 injection volumn : 10ul

4.1.6 Flow rate : 1mL/min

5. 결과

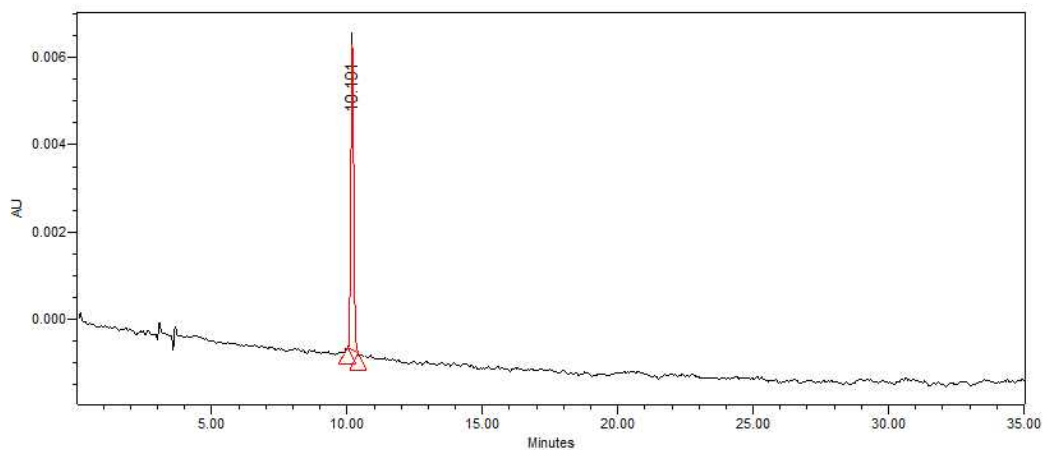


그림 2-1-63. Peonidin-3-rutinoside의 크로마토그램.

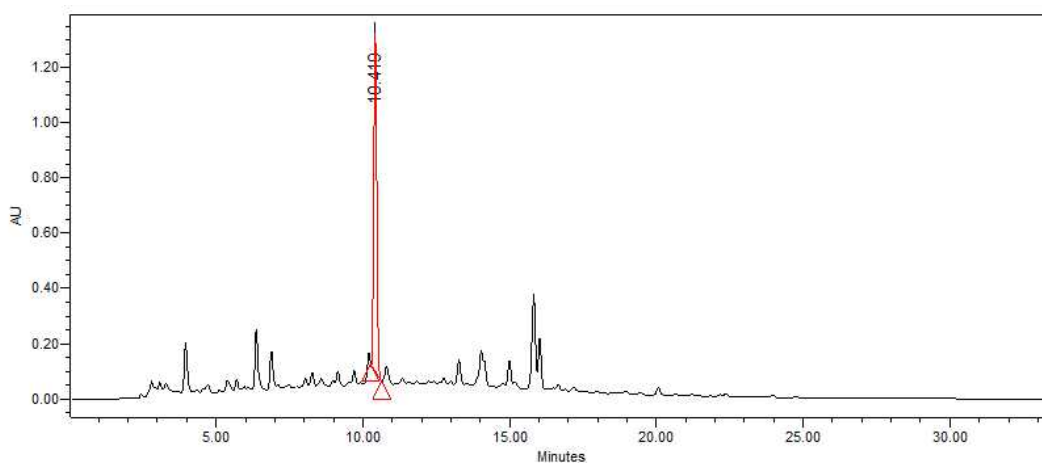


그림 2-1-64. 팔추출물의 크로마토그램.

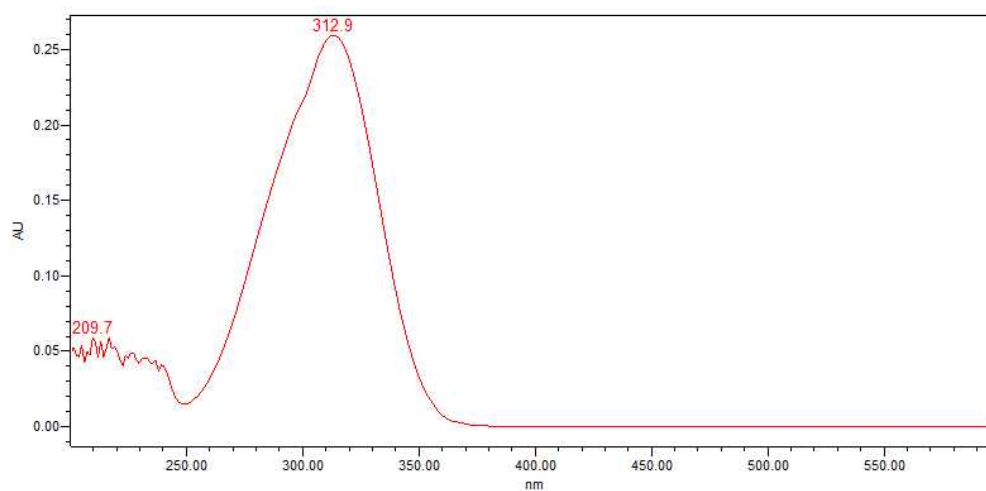


그림 2-1-65. Peonidin-3-rutinoside의 spectrum.

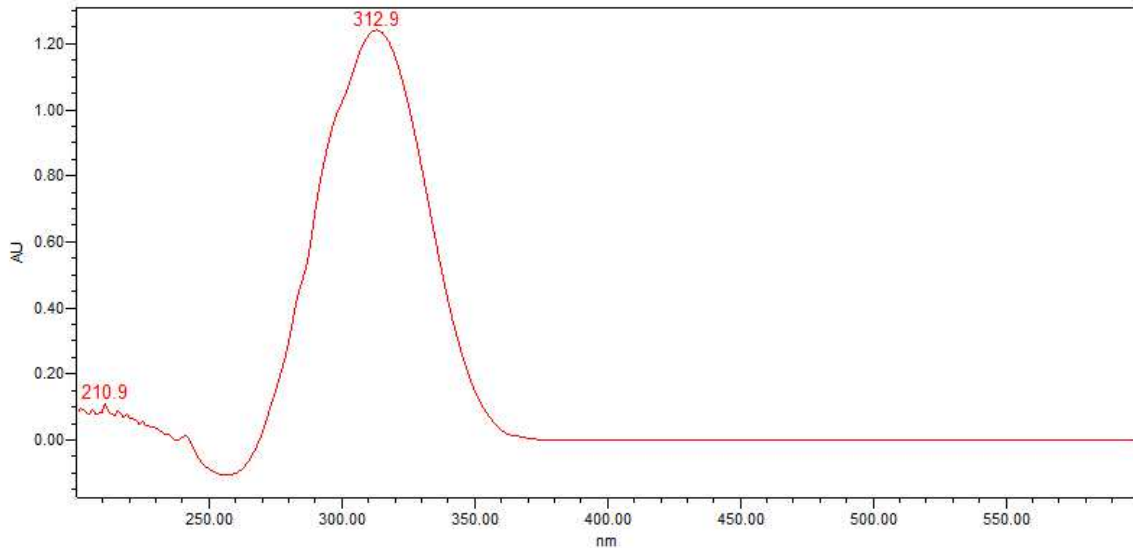


그림 2-1-66. 꾀추출물의 spectrum.

㉞ HPLC를 이용한 Vitexin 및 isovitexin 정성분석

- 본 시험법은 MeOH을 이용하여 시료 중 vitexin 및 isovitexin을 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 분석을 한다.

1. 장비와 재료

1.1 실험실 장비 및 소모품

- 1.1.1 부피플라스크(20 mL)
- 1.1.2 여과용 멤브레인 필터
- 1.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

1.2 분석장비

- 1.2.1 고속액체크로마토그래프
- 1.2.2 UV검출기(UV Detector) or PDA Detector(Photodiode Array)
- 1.2.3 칼럼오븐
- 1.2.4 Jupiter 4u proteo 90A, 4.6*250mm, phenomenex

1.3 이동상

- 1.3.1 THF : ACN : 0.05% Phosphoric acid

- 1.4 분석장비의 준비 : 이동상을 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

- 2.1.1 Vitexin, Isovitexin

2.2 일반시약

- 2.2.1 Water, Phosphoric acid, THF

3. 시험과정

3.1 표준용액의 조제

- 3.1.1 표준품 5mg을 10 mL 부피플라스크에 넣고 MeOH로 정용한다.
- 3.2 시험용액의 조제
 - 3.2.1 100ml의 부피플라스크에 시료 1,000mg을 취한다.
 - 3.2.2 10분간 sonicator를 이용하여 초음파 추출한 후 상온에서 방냉한다.
 - 3.2.3 방냉 후 MeOH을 이용하여 정용한다.
 - 3.2.4 위 용액을 0.45um syringe filter를 이용하여 여과한 후 분석한다.

4. 분석

4.1 기기분석(HPLC)

- 4.1.1 column : Jupiter 4u proteo 90A, 4.6*250mm, phenomenex
- 4.1.2 이동상 : THF : ACN : 0.05% Phosphoric acid(20 : 3 : 77)
- 4.1.3 column oven : 30°C
- 4.1.4 detector : UV 360nm, PDA 200~400nm
- 4.1.5 injection volumn : 10ul
- 4.1.6 Flow rate : 1mL/min

5. 결과

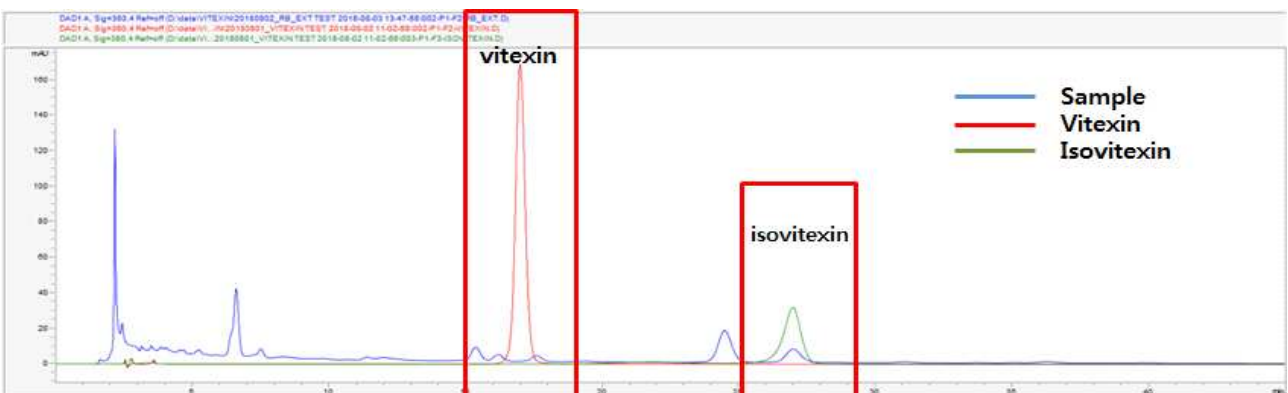


그림 2-1-67. Vitexin과 Isovitexin의 크로마토그램.³⁸⁾

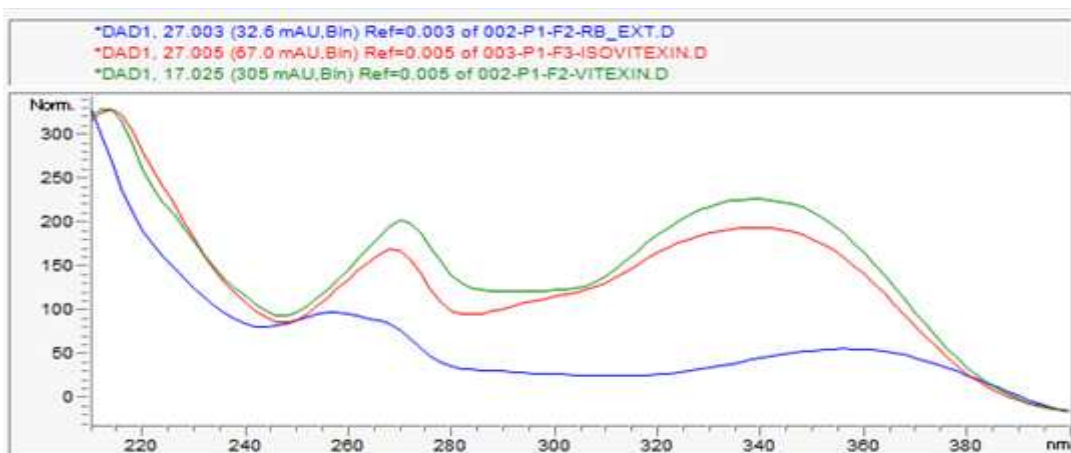


그림 2-1-68. 팔 추출물과 vitexin과 isovitexin의 스펙트럼 비교.

- HPLC를 이용하여 vitexin 과 isovitexin의 정성분석을 통해 존재여부를 확인하였다. isovitexin의 경우, RT가 27분대에 겹쳐서 나오지만 스펙트럼을 확인했을 때 동일 물질이 아닌 것을 확인하였다.

② 근기능 두류 펩타이드의 산업적 생산 및 시제품 확보

㉠ 팔 추출물의 펩타이드 물질 규명(LC/MS)

- 팔 추출물로부터 얻어진 Unknown-peak의 물질 규명 : 경기도경제과학진흥원

1) Material & Method

- Solvent : DW, Acetonitrile
- Reagent : Formic acid

2) Instrument Condition

- LC Method

| | | |
|---|-------------------|------------------------------------|
| 1 | Chromatography | Thermo(Dionex) UHPLC Ultimate 3000 |
| 2 | Mass spectrometry | ABscix Q-TOF |
| 3 | Column | Acquity UPLC BEH C18, 1.7um |
| 4 | Solvent | A : DW(0.1% FOA), B : ACN(0.1%FOA) |
| 5 | Flow rate | 400 ul/min |
| 6 | Injection | 2 uL |

- MS Method

| | | |
|---|--------------------|---|
| 1 | Detection ion mode | Positive([M+H] ⁺) |
| 2 | Scan range | PDA : 200~500nm MS : <i>m/z</i> 150~1500 |
| 3 | Spray voltage | 3.5 kV |
| 4 | Capillary voltage | 20 V |
| 5 | Capillary Temp. | 350 °C |
| 6 | Software | Xcalibur |

3) Result

- PDA & MS spectrum

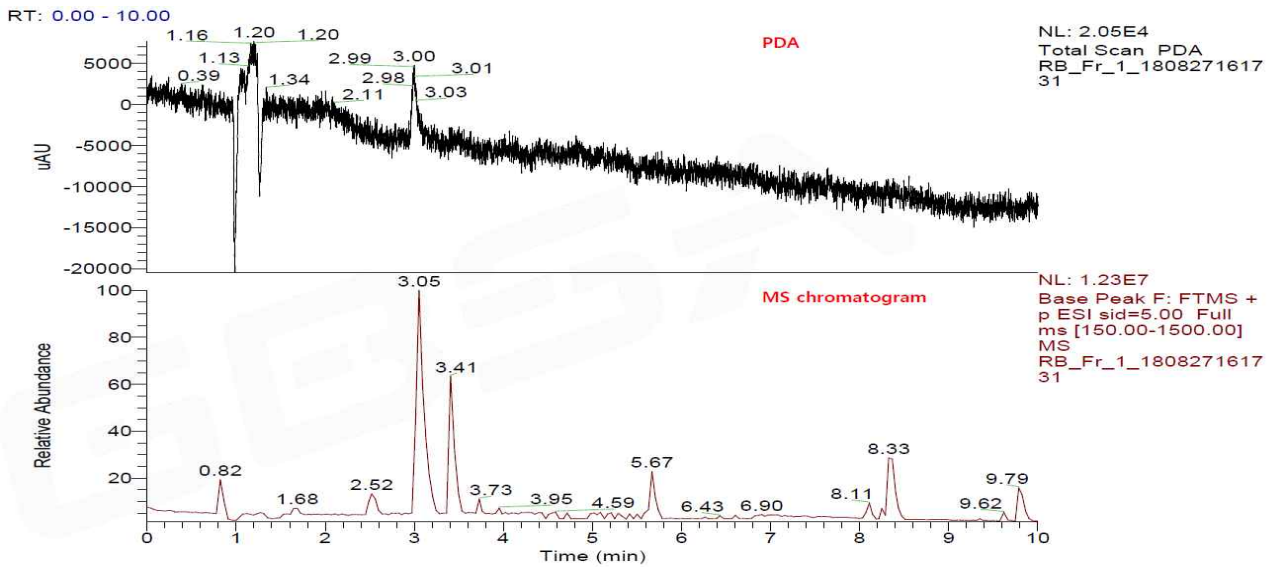
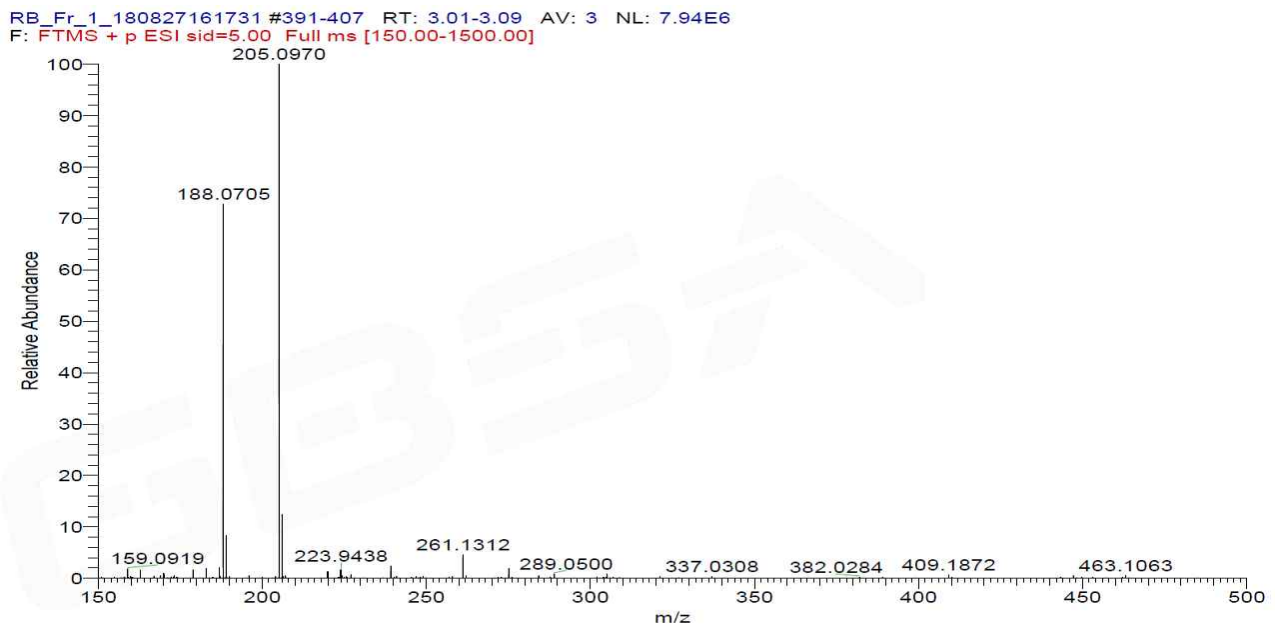


그림 2-1-69. LC/MS PDA와 크로마토그램.

3-1) MS spectrum (RT : 3.0min)



Elemental composition search on mass 205.10

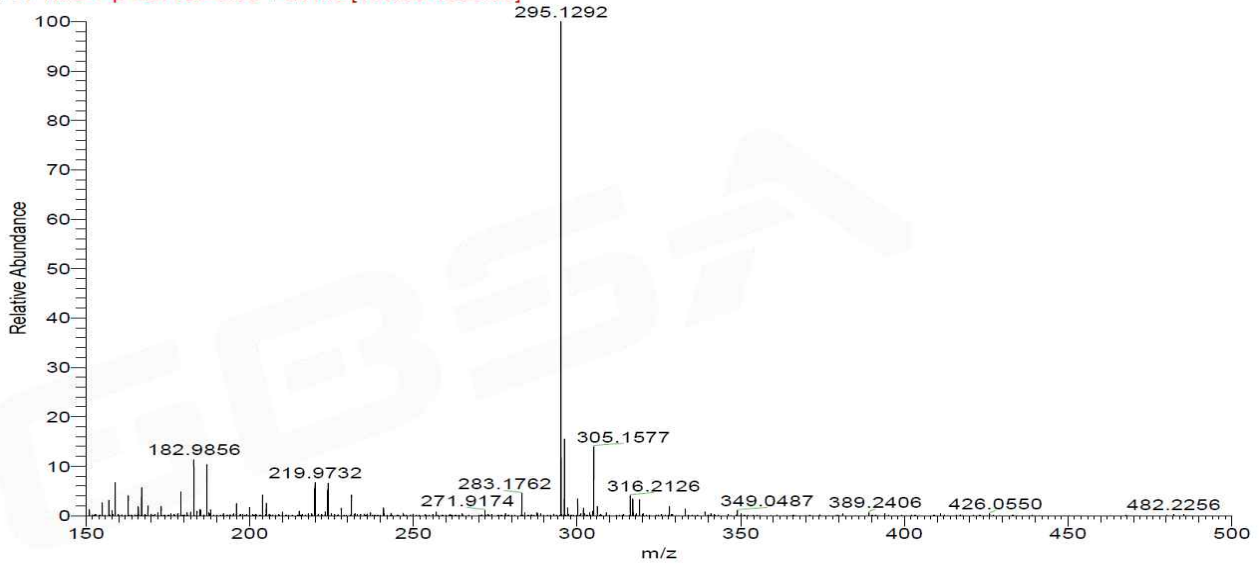
m/z= 200.10-210.10

| m/z | Theo. Mass | Delta (ppm) | RDB equiv. | Composition |
|----------|------------|-------------|------------|---|
| 205.0970 | 205.0972 | -0.85 | 6.5 | C ₁₁ H ₁₃ O ₂ N ₂ |
| | 205.0958 | 5.70 | 7.0 | C ₉ H ₁₁ ON ₅ |

- MS data로부터 얻어진 L-tryptophan(RT : 3.0min)의 정량분석

3-2) MS spectrum (RT : 3.4min)

RB_Fr_1_180827161731 #438-457 RT: 3.36-3.50 AV: 4 NL: 3.32E6
 F: FTMS + p ESI sid=5.00 Full ms [150.00-1500.00]



Elemental composition search on mass 295.13

m/z= 290.13-300.13

| m/z | Theo. Mass | Delta (ppm) | RDB equiv. | Composition |
|----------|------------|-------------|------------|--|
| 295.1292 | 295.1288 | 1.12 | 6.5 | C ₁₄ H ₁₉ O ₅ N ₂ |
| | 295.1288 | 1.14 | 12.0 | C ₁₃ H ₁₃ N ₉ |
| | 295.1302 | -3.41 | 11.5 | C ₁₅ H ₁₅ O ₂ N ₆ |
| | 295.1307 | -5.11 | 4.5 | H ₁₁ O ₂ N ₁₈ |
| | 295.1307 | -5.13 | -1.0 | C ₁₇ H ₁₇ O ₇ N ₁₁ |
| | 295.1275 | 5.67 | 7.0 | C ₁₂ H ₁₇ O ₄ N ₅ |
| | 295.1315 | -7.96 | 11.0 | C ₁₇ H ₁₇ O ₂ N ₃ |
| | 295.1320 | -9.66 | 4.0 | C ₂ H ₁₃ O ₃ N ₁₅ |

㉞ LC/MS로부터 규명한 L-tryptophan 정성분석

- 본 시험법은 MeOH을 이용하여 시료 중 L-tryptophan을 추출하여 액체크로마토그래프를 통해 분석하는 방법으로 UV검출기를 이용하여 정성 분석을 한다.

1. 장비와 재료

1.1 실험실 장비 및 소모품

1.1.1 부피플라스크(20 mL)

1.1.2 여과용 멤브레인 필터

1.1.3 액체크로마토그래프용 유리병

1.2 분석장비

1.2.1 고속액체크로마토그래프

1.2.2 UV검출기(UV Detector) or PDA Detector(Photodiode Array)

1.2.3 칼럼오븐

1.2.4 Luna 5um, 4.6*250mm, phenomenex

1.3 이동상

1.3.1 이동상 A : 0.1% Trifluoroacetic acid

1.3.2 이동상 B : Acetonitrile

1.4 분석장비의 준비 : 이동상인 A와 B를 90:10의 비율로 분당 1.0 mL로 충분한 시간 동안 흘려 안정화 시킨다.

2. 일반시약

2.1 일반시약

2.1.1 Water, Methanol, Trifluoroacetic acid, Acetonitrile

3. 시험과정

3.1 시험용액의 조제

3.1.1 100ml의 부피플라스크에 시료 1,000mg을 취한다.

3.1.2 10분간 sonicator를 이용하여 초음파 추출한 후 상온에서 방냉한다.

3.1.3 방냉 후 MeOH을 이용하여 정용한다.

3.1.4 위 용액을 0.45um syringe filter를 이용하여 여과한 후 분석한다.

4. 분석

4.1 기기분석(HPLC)

4.1.1 column : Luna 5um, 4.6*250mm, phenomenex

4.1.2 이동상 : A = 0.1% Trifluoroacetic acid, B = Acetonitrile

표 2-1-22. 시간에 따른 이동상 용매 비율

| Time (min) | A | B |
|------------|----|----|
| 0 | 90 | 10 |
| 5 | 90 | 10 |
| 20 | 70 | 30 |
| 28 | 10 | 90 |
| 32 | 90 | 10 |
| 40 | 90 | 10 |

4.1.3 column oven : 35°C

4.1.4 detector : UV 360nm, PDA 200~400nm

4.1.5 injection volumn : 10ul

4.1.6 Flow rate : 1mL/min

5. 결과

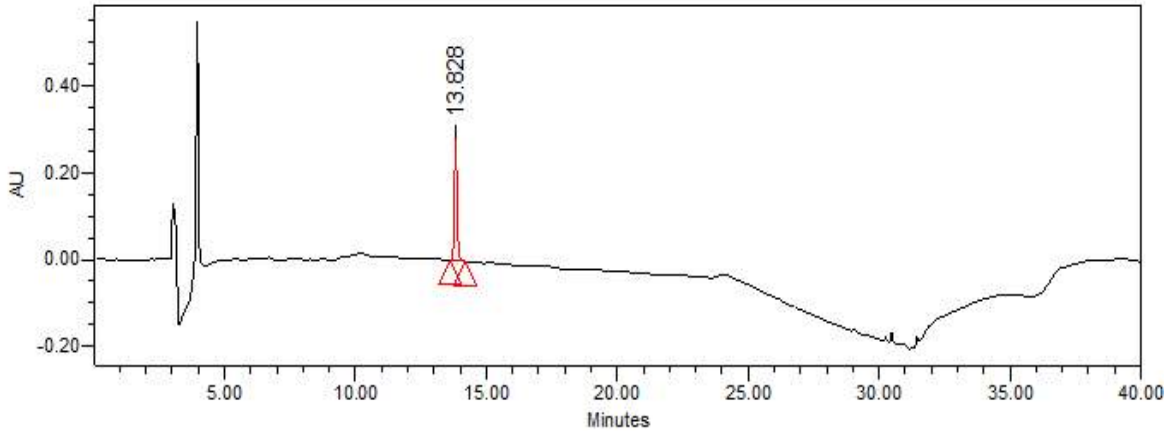


그림 2-1-70. L-tryptophan의 크로마토그램.³⁹⁾

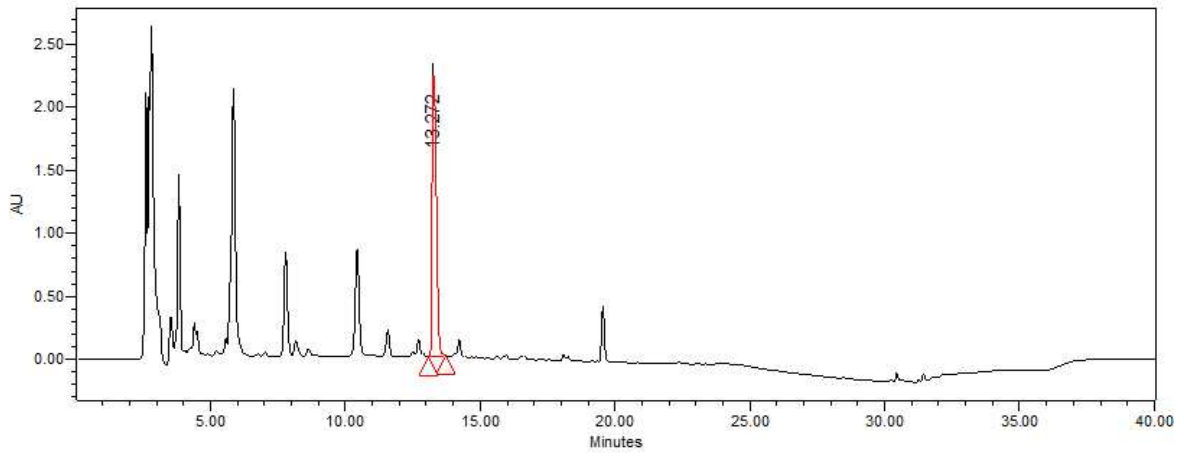


그림 2-1-71. 팔 추출물의 크로마토그램.

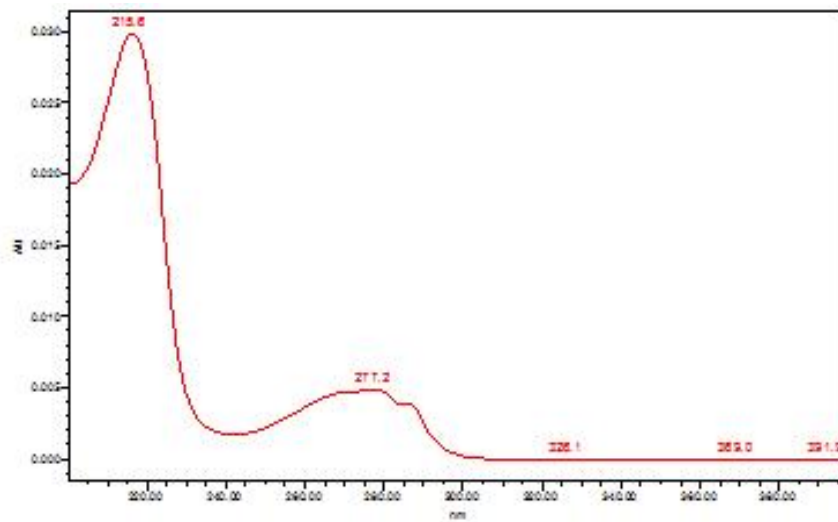


그림 2-1-72. L-tryptophan의 spectrum.

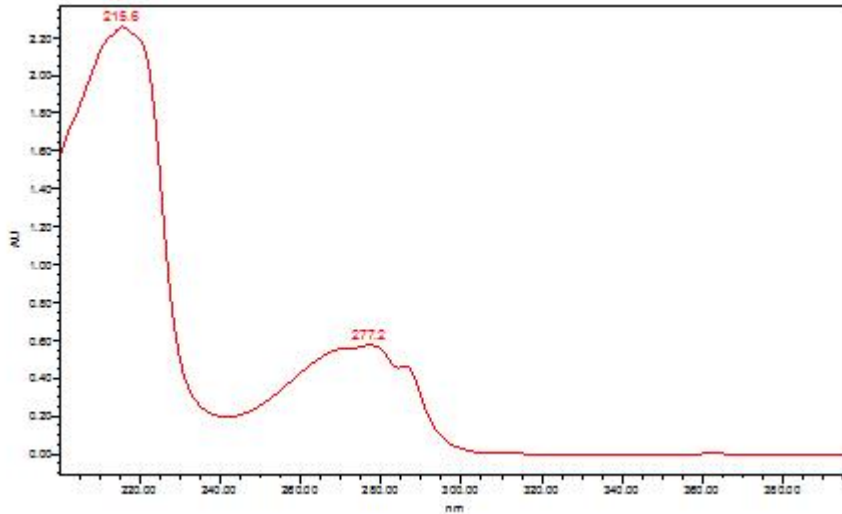


그림 2-1-73. 팔 추출물의 spectrum.

- HPLC를 통해 정성분석을 진행한 결과, L-tryptophan은 팔 추출물에서도 동일한 RT를 나타내며 spectrum 또한 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

(나) 두류 생리활성물질 및 펩타이드 복합소재 노화성 근감소증 개선 인체적용 시험

① 팔 추출물을 이용한 근기능 개선 인체적용 시험 설계

| | | |
|----------|---|--|
| 인체적용시험제목 | 팔추출물 섭취가 운동수행능력 및 근기능 개선에 미치는 영향을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험 | |
| 실시기관 | 동아대학교 가정의학과 | |
| 시험대상자수 | 총 80명 (시험군 40명, 대조군 40명) | |
| 시험기간 | IRB 승인일로부터 1년 | |
| 유효성 평가변수 | 1차 | <ul style="list-style-type: none"> · 신체능력 및 근지구력 측정치의 변화량 - 6min walk (6분 동안의 걸음거리, 심폐지구력) |
| | 2차 | <ul style="list-style-type: none"> · 근력 측정치의 변화량 - Biodex로 측정한 하지근의 근력, 악력(peak torque), Chair stand · 근육량 측정치의 변화량 - DEXA로 측정한 근육량, BIA로 측정한 하지 근육량 · 근피로도 측정치의 변화량 - 혈청 pyruvate, lactate · 에너지 대사 측정치의 변화량 - 혈청 glucose, ceratinine, CK |
| 안전성 평가변수 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 이상반응 2. 생체징후 및 문진에 의한 이상 소견 | |

| | |
|-------|--|
| | 3. 혈액학적/혈액화학적 검사치의 비정상적 변화 |
| 선정기준 | 1. 만 50세 이상의 건강한 자 2. 체질량지수가 18.5~30인 자 3. BIA로 측정된 골격근량이 표준의 110% 미만인 자 |
| 제외기준 | 1. 최근 1년 이내 골절의 병력이 있는 경우 2. 신장 질환이 있거나 혈청 creatinine 1.4mg/dL 초과인 경우 3. 2+ 이상의 단백뇨가 있는 경우 4. 조절되지 않는 간 질환이 있거나 AST 또는 ALT가 80 IU/L 초과인 경우 5. 조절되지 않는 당뇨병력이 있거나 공복혈당이 126mg/dL이상인 경우 6. 조절되지 않는 고혈압 환자나 협심증, 심근경색증 등의 심장질환이 있는 경우 7. 정신과 질환으로 약물을 복용하고 있는 자. 단, 수면장애로 인해 간헐적 투약을 하는 경우는 제외한다. 8. 지난 2개월간 한약이나 조약 복용력이 있는 자 9. 지난 4주 이내에 다른 연구용 약물을 투여 받은 자 10. 인체시험 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단하는 약물을 계속 복용해야 하는 자 11. 위장관 절제술을 받은 경력이 있는 자 (맹장 제외) 12. 임산부 또는 수유부 13. 시험식품이나 그 성분에 대한 과민증이 있는 자 |
| 시험방법 | <p>인체적용시험대상자는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정기준/제외기준 적합 여부를 판정받는다. 이후 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정된다. 배정된 시험대상자는 12주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취한다.</p> |
| 통계 분석 | 1. 유효성 1) 평가대상 - 평가 대상군은 무작위 배정 및 유효성 평가변수 결과 확보 여부에 따 |

| | |
|--|--|
| | <p>라 ITT또는 PP군으로 분류함</p> <p>2) 평가기준 및 방법</p> <ul style="list-style-type: none"> - 두 군간 범주형 변수의 차이를 검정하기 위해 카이제곱 검정 또는 피셔의 정확검정을 실시함. - 두 군간 연속형 변수의 차이를 검정하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 독립 t검정을, 그렇지 않을 경우 맨-휘트니 U 검정을 수행함. - 군 내 시점에 따른 차이 검정을 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 대응 t 검정을, 그렇지 않을 경우 윌콕슨의 부호순의 검정을 수행함. - 연속형 변수의 정규성 검정은 샤피로-윌크 검정을 이용함. - 인체시험에 대한 유효성 분석은 ITT분석과 PP분석을 동시에 실시함. <p>2. 안전성</p> <p>1) 평가대상</p> <ul style="list-style-type: none"> - 무작위 배정된 모든 대상자 <p>2) 평가기준 및 방법</p> <ul style="list-style-type: none"> - 이상반응의 심각성은 경증, 중등증, 중증의 3단계로 평가 - 시험용식품과의 인과관계는 6단계로 평가 - 임상검사치 및 생체징후의 비정상적인 변화 발견 시 구체적인 증상등을 파악하고 부정적인 임상적 의미가 있는 지를 평가 |
|--|--|

② 건강기능식품 인체적용시험의 원활한 수행 도모

○ 1차 유효성 평가 지표 측정 방법 - 6분 보행 검사 (6 minute Walk Test)

㉠ 목적

- 이 검사는 6분 동안 걸을 수 있는 최대거리(6-minute walk distance) 를 측정함으로써 피검자의 운동능력을 객관적으로 평가하기 위한 검사이다.

㉡ 검사 중 유의사항

- 검사 시작 전 최소한 10분간은 의자에 앉아 휴식을 취하는 것이 좋다.
- 6분 동안 가능한 한 많은 거리를 걷도록 한다.
- 검사 도중 피검자의 상태에 따라 휴식이나 멈추는 것을 허용한다.

㉢ 장소

- 인적이 드물고 바닥이 딱딱한 30m 길이의 복도가 적당하며, 3m 마다 바닥에 표시를 한다.
- 출발점과 반환점을 알 수 있도록 가설물(예 ; traffic cone) 을 세워 놓는다.

㉣ 준비물

- Oxy meter
- 스톱워치
- 주회표시기(lap counter)
- 반환점에 세울 가설물
- 검사 기록지
- 혈압계
- 산소
- 제세동기

㉞ 금기

- 절대금기 - 지난 한 달간 불안정 협심증이나 심근경색의 병력이 있는 경우.
- 상대금기 - 안정시 맥박120/회 이상이거나 수축기/확장기 혈압이 180/100 이상인 경우
- 안정 상태의 협심증은 금기는 아니지만 복용 중이던 항 협심증 약물을 평소대로 복용한 후 검사해야 한다.
- 검사 전 6개월 내에 시행된 심전도를 반드시 확인하여야 한다.

㉟ 검사 방법

- 검사시작 전 - 혈압과 맥박, 산소 포화도, 호흡곤란의 정도를 Borg scale을 이용하여 체크한다.
- 검사시작 - Oxy meter 를 착용하고 6분 동안 걷는다. 산소 포화도, 맥박을 30초마다 체크하고 총 걸은 거리와 최저 산소 포화도를 측정한다.
- 걷기 종료 후 - 혈압과 맥박, 산소 포화도, 호흡곤란 척도를 Borg scale을 이용하여 체크한다.

㊱ Borg scale

- 0 : 전혀 숨차지 않다.
- 0.5 : 아주 아주 약간 숨차다고 느껴진다.
- 1 : 아주 약간 숨차다.
- 2 : 약간 숨차다.
- 3 : 중간 정도로 숨차다.
- 4 : 약간 심하게 숨찬다.
- 5 : 심하게 숨찬다.
- 7 : 매우 심하게 숨찬다.
- 10 : 매우매우 심하게 숨찬다. (참을 수 없이)

㊲ 피검자 교육

- 출발선으로 이동하여 다음과 같이 설명한다.
- “이 검사의 목적은 6분 동안에 걸으실 수 있는 최대 거리를 측정하는 것입니다. 이 복도를 6분간 왕복하시면 되겠습니다. 6분은 긴 시간이므로 힘이 드실 수도 있습니다. 힘이 드시면 속도를 줄이거나, 멈추어 서실 수 있습니다. 멈추어서 쉬실 때는 벽에 기대셔도 좋습니다. 하지만 다시 걸을 수 있게 되면 즉시 다시 출발하셔야 합니다.”
- “앞에 보이는 두 원뿔 사이를 왕복하시고, 원뿔 주위로 도실 때는 민첩하게 도신 후 즉시 반대편으로 향하세요. 제가 시범을 보일 테니 잘 보세요.”
- 한 번 왕복하는 시범을 보인다.
- “준비되었나요? 저는 이것을 이용하여(lap counter) 왕복 횟수를 재겠습니다. 한 번 왕복하실 때마다 제가 이것을 한 번씩 누르겠습니다. 6분 동안에 가능한 많이 걸으셔야 한다는 점을 기억하세요. 하지만 뛰시면 안 됩니다.”
- “준비되었으면 출발하세요.”
- 설명의 내용은 위에서 크게 벗어나지 않게 합니다.

㊳ 임상적 시행

- 6분 보행 검사는 중등도, 고도의 기능적 장애를 가진 피검자의 운동능력을 측정하

- 는 데에 유용하다.
- 피검자의 수술 전, 후를 평가하기 위해서 검사한다.
 - 폐, 심장 질환을 가진 피검자의 치료요법의 반응을 보기 위하여 검사한다.

㉠ 그 외 고려할 점

- 연습은 대부분 필요없으나 고려해 볼 수 있다.
- 만약 연습을 한 경우 다음 검사까지 최소한 한 시간 휴식한다.
- 검사자는 표준지침으로 교육 받고, 수차례 견학 후 검사를 실시하는 것을 원칙으로 한다.

표 2-1-24. 인체시험 진행 일정표(Study Flow-Chart)

| 항목 | 방문 1 (screening) | 방문 2 (기초방문) | 방문 3 (시험 중) | 방문 4 (시험 종료) |
|------------------|---------------------|----------------|----------------|-----------------|
| | (-1일 ~-3주) | (0일) | (6주 ± 7일) | (12주 ± 7일) |
| 대상자 서면동의서 획득 | √ | | | |
| 대상자 선정/제외기준 평가 | √ | | | |
| 대상자 기초 정보 | √ | | | |
| 과거 병력 | √ | | | |
| 신체검사 | √ | √ | √ | √ |
| 생체징후 | √ | √ | √ | √ |
| 임상실험실검사(혈액, 뇨 등) | √ | | √ | √ |
| 심전도 검사 | √ | | | |
| 시험/대조식품 배분 | | √ | √ | |
| 유효성평가변수 측정 | | | √ | √ |
| 이상반응 체크 | | | √ | √ |
| 병용약물 체크 | | | √ | √ |
| 순응도 체크 | | | √ | √ |

(다) 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드 이용 건강기능식품 개발

① 근기능 강화 생리활성물질 및 펩타이드의 원료 산업화 기술 개발

- 선행연구 결과로 아래와 같이 품목 제조 신고를 완료하였으며, 팻 추출물을 생산하였다. 카테킨, L-tryptophan, Peonidin-3-rutinoside로 표준화하였다.

| 구분 | 추출기 (h) | 농축기 (h) | 분무건조기 (/batch) | 기타 | 품질관리비 | 유지관리비 | 원물가 | Batch당 원물투입 량 (kg) |
|------|------------|------------|-------------------|-----------|---------|-----------|--------|-----------------------------|
| 생산단가 | 2,059,200 | 2,029,200 | 2,100,000 | 1,680,000 | 150,000 | 1,603,680 | 10,000 | 800 |

| Batch당 부원료 | 수율(%) | 주정 사용량 (1750원/ L) | 주정회 수율 | Kg당 원재료 비 | Kg당 가공비 | Batch당 생산량 | Kg당 제조원 가 | P/D balance | |
|---------------|-------|----------------------------|-----------|-----------------|------------|---------------|-----------------|--------------------|--------------|
| | | | | | | | | Dosage (mg/day) | Cost /day |
| 320,000 | 9.9 | 2,240 | 0.5 | 129,798 | 133,640 | 79.2 | 263,438 | 1,500 | 395 |

발급번호 : 11SN-9FWW-L14U-N47V-U96C



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

| | | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------------------|--------|---------------|
| 보고인 | 성명 황재연 | 생년월일 [] | | |
| | 주소 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5(동수동) | 전화번호 [] | | |
| | | 휴대전화 [] | | |
| 영업소 | 명칭(상호) (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터 | 영업등록번호 20070512043 | | |
| | 소재지 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5(동수동) | | | |
| 제품정보 | 식품의 유형 | 두유가공품 | 영업신고번호 | 2007051204377 |
| | 제품명 | 팥추출물 | | |
| | 유통기한 | 제조일로부터 24개월까지 | | |
| | 품질유지기한 | 해당사항없음 | | |
| | 원재료 또는 성분명, 배합비율 | 팥창에 기재 | | |
| | 용도 용법 | 팥창에 기재 | | |
| | 보관방법 및 포장재질 | 팥창에 기재 | | |
| | 포장방법 및 포장단위 | 1, 5kg, 10kg, 20kg 그밖의 포장단위 | | |
| | 성상 | 분말로서 팥 고유의 색과 향을 가지고 있어야 한다 | | |
| 품목의 특성 <input checked="" type="checkbox"/> 고열량·저영양 식품 해당 여부 []에 []아니오 []해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 할랄인증 식품 해당 여부 []에 []아니오 | | | | |

기타 「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2018년 02월 09일
보고인 황재연

전라남도 나주시장 귀하

| | | | | | |
|-------|----------------|-------|-----|------|--------------|
| 품목보고필 | 20070512043-77 | | | | |
| 처리부서 | 복지보건국 보건위생과 | 처리자성명 | 나광필 | 처리일자 | 2018년 2월 09일 |



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

② 근기능 강화 건강기능식품 제형별 최적 공정개발 및 제품설계

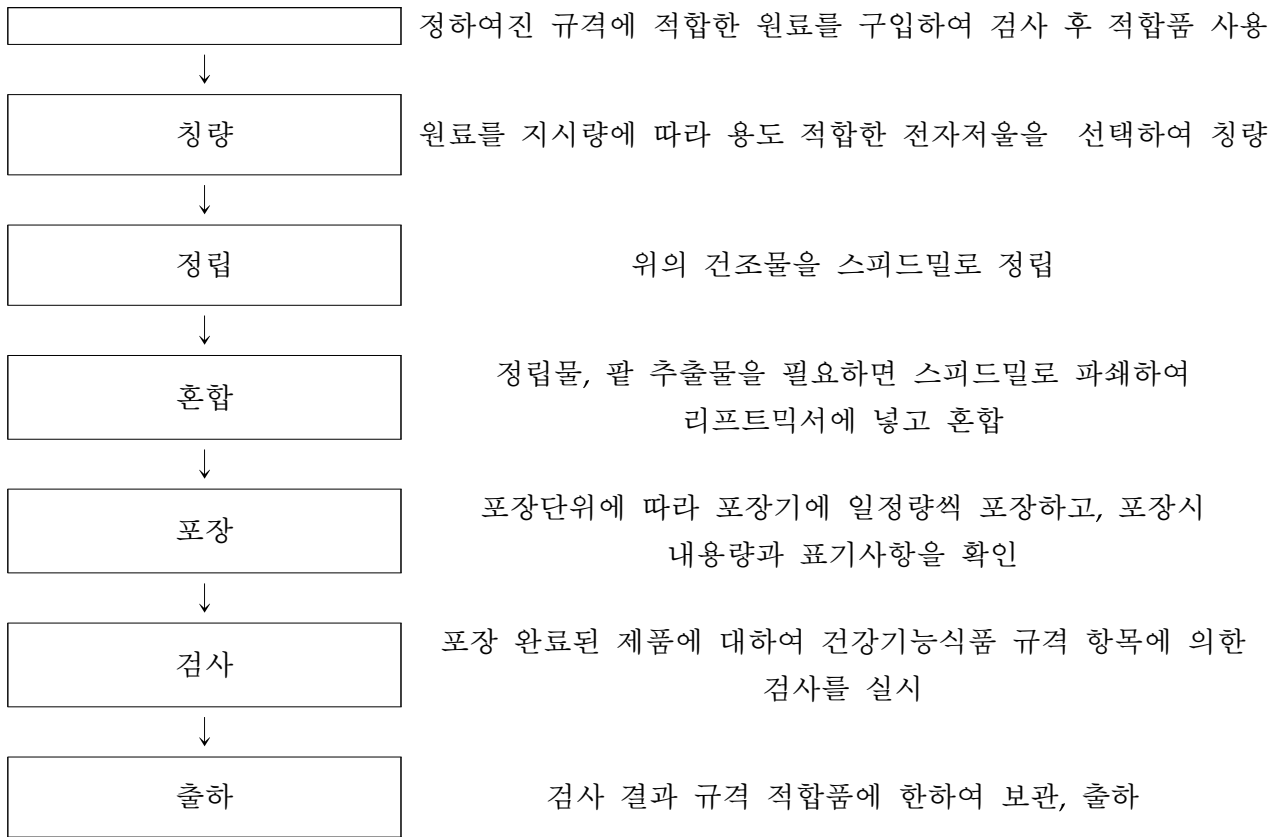
- 뷰티보이티
 - 성상 : 흰색 점박이가 있는 갈색의 분말
 - Gallic acid : 표시량 (35mg/1,050mg)의 80~120%
 - 납(mg/kg) : 1.0 이하
 - 비소(mg/kg) : 1.0 이하
 - 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하
 - 총수은(mg/kg) : 0.5 이하

- 대장균군 : 음성
- 카페인(mg/kg) : 80,000 이하

| 공정 | 설명 |
|-------------|---|
| 원료구입 및 선별방법 | 원료는 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물공전에서 정하여진 규격에 적합한 원료를 구입하여 검사 후 적합품 사용 |
| ↓ | |
| 칭량 | 원료를 지시량에 따라 용도 적합한 전자저울을 선택하여 칭량 |
| ↓ | |
| 정립 | 위의 건조물을 스피드밀로 정립 |
| ↓ | |
| 혼합 | 정립물, 팔 추출물을 필요하면 스피드밀로 파쇄하여 리프트믹서에 넣고 혼합 |
| ↓ | |
| 포장 | 포장단위에 따라 포장기에 일정량씩 포장하고, 포장시 내용량과 표기사항을 확인 |
| ↓ | |
| 검사 | 포장 완료된 제품에 대하여 건강기능식품 규격 항목에 의한 검사를 실시 |
| ↓ | |
| 출하 | 검사 결과 규격 적합품에 한하여 보관, 출하 |

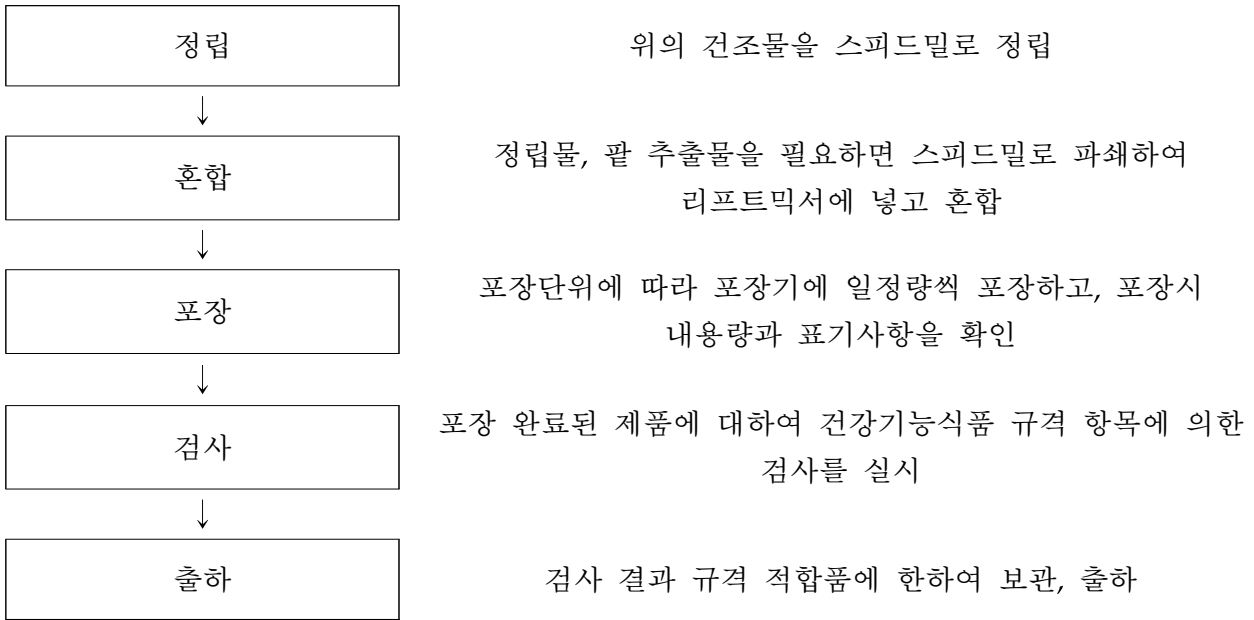
- 뉴피니션 포물라 5 헬시 다이어터리 서포터 슬림보이
 - 성상 : 흰색 점박이가 있는 갈색의 분말
 - Gallic acid : 표시량 (35mg/1,070mg)의 80~120%
 - 납(mg/kg) : 1.0 이하
 - 비소(mg/kg) : 1.0 이하
 - 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하
 - 총수은(mg/kg) : 0.5 이하
 - 대장균군 : 음성
 - 카페인(mg/kg) : 80,000 이하

| 공정 | 설명 |
|-------------|-------------------------------|
| 원료구입 및 선별방법 | 원료는 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물공전에서 |



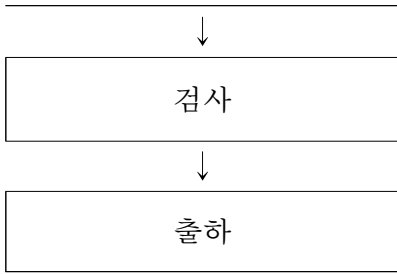
- 판도라 슬립보이티
 - 성상 : 흰색 점박이가 있는 갈색의 분말
 - Gallic acid : 표시량 (35mg/1,050mg)의 80~120%
 - 납(mg/kg) : 1.0 이하
 - 비소(mg/kg) : 1.0 이하
 - 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하
 - 총수은(mg/kg) : 0.5 이하
 - 대장균군 : 음성
 - 카페인(mg/kg) : 80,000 이하

| 공정 | 설명 |
|-------------|---|
| 원료구입 및 선별방법 | 원료는 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물공전에서 정하여진 규격에 적합한 원료를 구입하여 검사 후 적합품 사용 |
| ↓ | |
| 칭량 | 원료를 지시량에 따라 용도 적합한 전자저울을 선택하여 칭량 |
| ↓ | |
| 과립 및 건조 | 보이차추출물(기능성원료 인정 제 2014-7호)을 유동층과립건조기로 과립, 건조 |
| ↓ | |



- 뉴피니션 포물라4 헬시밸런스 젤리스트틱
 - 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.
 - 총 HCA : 표시량 (750mg/20g)의 80~120%
 - 납(mg/kg) : 1.0 이하
 - 비소(mg/kg) : 1.0 이하
 - 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하
 - 총수은(mg/kg) : 0.4 이하
 - 대장균군 : 음성

| 공정 | 설명 |
|-------------|---|
| 원료구입 및 선별방법 | 원료는 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물공전에서 정하여진 규격에 적합한 원료를 구입하여 검사 후 적합품 사용 |
| ↓ | |
| 소독 및 건조 | 칭량 전 사용하는 모든 기계 기구 및 설비를 식품용 증정 에탄올 용액으로 소독하여 건조 후 사용 |
| ↓ | |
| 내용물 조제 | 로커스트콩 검분말, 프락토올리고당을 교반하여 검 용액 제조 정제수 투입하여 교반 후 정제수로 배합비를 맞추어 80℃에서 30분간 가열하고 수율 및 브릭스를 점검 |
| ↓ | |
| 포장 | 포장단위에 따라 포장기에 일정량씩 포장하고, 포장시 내용량과 표기사항을 확인 |



포장 완료된 제품에 대하여 건강기능식품 규격 항목에 의한 검사를 실시

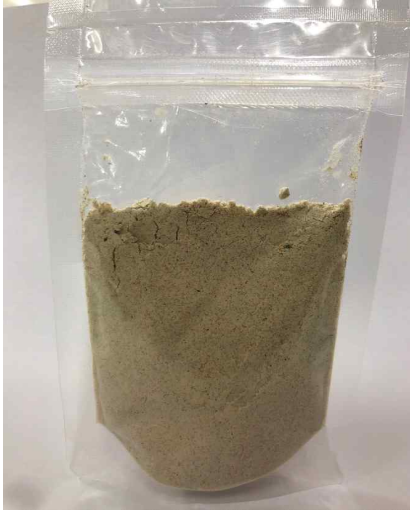
검사 결과 규격 적합품에 한하여 보관, 출하

팔 추출물 원료를 이용한 건강기능식품

| | |
|---|--|
|  |  |
| 에버스프링 뷰티보이티 | 헬시다이어터리 서포터 슬림보이 |
|  |  |
| 판도라 슬림보이티 | 헬시밸런스 젤리스트릭 |

③ 단백질 보충용 건강기능식품 시제품 생산

- 표준화된 원료를 이용하여 단백질 보충용 건강기능식품 시제품을 생산하였다.



- 당사 근기능 개선 식품/건강기능식품으로 개발 및 상용화
 - 팔 추출물을 이용한 근기능 강화 기능성 소재를 당사 브랜드로 완제품화하여 국내외 기업에 직접 공급할 예정이다.(무역상사 등 일본, 중국, 미국 등의 연계를 통한 해외진출 모색)
 - 팔 추출물을 이용하여 품목제조신고를 마친 4건의 제품을 당사 온라인몰과 홈쇼핑 및 오프라인몰을 통해 유통할 것이다.

나. 협동기관(연세대학교)

○ 연구개발목표 및 내용

| 차년도 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 |
|------|------|---|--|
| 1차년도 | 2016 | 두류 펩타이드의 근기능 활성 <i>in vitro</i> 세포실험 검증 | (1) 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 스크리닝 <ul style="list-style-type: none"> 근생성 관련 생체지표 mTOR 활성 측정 : mTOR 활성 kit 근지구력 및 미토콘드리아 생합성 증가 측정 : Luciferase assay를 통한 PGC-1α 활성 측정 근육분화 및 근육증가 현상학적 분석 : Immunocytochemistry assay를 통한 세포형태 측정 (2) 대표 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 분자기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> 근생성 관련 분자기전 : mTOR, 4EBP1, p70S6K 등 근지구력 및 미토콘드리아 생합성 분자기전 : PGC-1α, Tfam, ERRα, NRF-1 등 근육분화 및 근육증가 분자기전 : MyoD, myogenin 등 (3) 줄기세포 모델 근육위성세포(satellite cell) 분화 활성검증 <ul style="list-style-type: none"> 동물 근육조직을 이용한 근육위성세포 분리 시스템 구축 근육분화 촉진인자 발현 측정 : Pax7, MyoD, myogenin 근육타입별 조절인자 발현 측정 : MyHC I, MyHC II 근육분화 및 근육증가 현상학적 분석 : Immunocytochemistry assay를 통한 세포형태 측정 |
| 2차년도 | 2017 | 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 활성 <i>in</i> | (1) 부동(Immobilization, 不動) 동물모델 근기능 개선 평가 <ul style="list-style-type: none"> 부동 근감소 동물모델 구축 및 생체지표 선정 근기능 개선 : 근육량(무게) & 근력(grip strength) 측정 |

| | | | |
|------|------|-------------------------------|---|
| | | <i>vivo</i> 동물실험 검증 | <ul style="list-style-type: none"> - 근생성 인자 : mTOR, 4EBP1, p70S6K 등 - 근육분화 인자 : MyoD, myogenin 등 <p>(2) 노화 동물모델 근기능 개선 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 노화성 근기능 저하 동물모델 구축 및 생체지표 선정 - 근기능 개선 : 근육량, 근력, 운동능력(treadmill) 측정 - 근생성 인자 : mTOR, 4EBP1, p70S6K 등 - 근지구력 인자 : PGC-1α, Tfam, ERRα, NRF-1 등 - 근육분화 인자 : MyoD, myogenin 등 |
| 3차년도 | 2018 | 두류 단백질/펩타이드의 근기능 활성 인체적용시험 검증 | <p>(1) 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 생리활성 기술개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 복합 제제화 기술 개발 - 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 가용성 및 체내 흡수율 증진 기술 개발 - 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제형별 맛 조절 formulation 기술 개발 <p>(2) 노화성 근감소증 개선 개선 인체적용시험 결과 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식품의약품안전처 건강기능식품 인증 인체시험자료 분석 - 세포실험, 동물실험, 인체적용시험 결과의 종합적 분석 (국내외 SCI 논문 발표 및 근기능 우수성 홍보자료 확보) |

(1) 1차년도 수행내용 및 결과

(가) 두류 추출물의 근기능 스크리닝

① 실험 재료 및 방법

㉠ 세포 배양

- L6 근육세포와 COS-7 원숭이 신장세포를 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)와 Korea Cell Line Bank (KCLB; Seoul, Korea)에서 각각 분양 받아 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT, USA) 및 1% penicillin-streptomycin 항생제(100 units/mL penicillin A, 100 μ g/mL streptomycin)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HyClone)을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 배양 조건 하에서 배양하였다. L6 근육세포는 80% confluence가 되었을 때, 2% horse serum (HS; HyClone)가 함유된 DMEM (HyClone)로 바꾸어 L6 근육세포의 분화를 유도하였다. 분화배지는 2일 간격으로 교환하면서 6일간 분화시켰다.

㉡ 세포 독성 평가

- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약을 통해 각 시료에 대한 세포 독성 평가를 하였다. L6와 COS-7세포에 0.1% 0.1% FBS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)에 녹인 주정, 열수, 아임계 추출물을 처리하여, 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후, dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)로 씻은 다음 MTT 용액(0.5 mg/mL)을 300 μ L씩 넣어준 뒤, 37°C에서 3 시간 동안 배양하여 MTT-formazan이 형성되게 하였다. MTT 용액을 제거한 후, dimethyl sulfoxide (DMSO)로 MTT-formazan을 녹인 다음, VERSAmax tunable microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

㉔ mTOR 활성 측정

- mTOR Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 이용하여 두류 추출물의 mTOR 활성을 스크리닝 하였다. DMEM (Hyclone)에 녹인 두류 10종의 주정, 아임계, 초임계 추출물을 6 wells plate에서 총 6일 동안 분화시킨 L6 세포에 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 12시간 후, cell lysis buffer를 처리하여 세포를 용해시켰다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)법을 이용하여 단백질을 1 mg/ml로 정량한 뒤, mTOR antibody가 붙어 있는 microwell에 50 μ L씩 분주하여 37°C에서 2시간 incubation 하였다. Washing buffer로 총 4회 씻은 후, detection antibody를 37°C에서 1시간 incubation 했으며, 다시 washing buffer로 총 4회 씻은 후, HRP-linked secondary antibody를 넣고 37°C에서 30분 incubation 했다. 마지막으로 washing buffer로 총 4회 씻은 후, TMB substrate를 각 well에 넣고 37°C에서 10분 간, incubation하고 stop solution 넣어 TMB의 반응을 멈추었다. 2분 뒤, 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 mTOR 활성을 측정하였다.

㉕ PGC-1 α 활성 측정

- COS-7 cell line을 1.5×10^5 cells/well 농도로 24 wells plate에 24 시간 배양 후, pFR-PGC-1 α (Addgene, Cambridge, MA, USA)를 lipofector (Aptabio, Yongin, Korea)을 이용하여 형질주입하였다. 4시간 형질주입 후, 24시간 더 배양시켜 세포를 안정화시켰다. 두류 주정, 열수, 아임계 추출물이 함유되어 있는 DMEM (Hyclone)과 resveratrol (Res: Sigma-aldrich, St Louis, MO, USA)를 세포에 처리하여 24시간 배양하였다. 최종 24시간 후, phosphate buffer solution (PBS)로 세포들을 세척한 다음 NP-40 lysis buffer (Elpis, Daejeon, Korea)를 이용하여 세포들을 용해하였고, luciferase assay substrate (Promega, Madison, WI, USA)를 첨가하여, MicroLumat Plus LB 96V luminometer (Berthold, Wildbad, Germany)을 이용하여 PGC-1 α 의 luciferase 활성을 측정하였다.

㉖ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 23.0 통계 패키지(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통해 분석하였다. 유의성 조사는 unpaired *t*-test로 하였으며, *P* 값이 5% 및 1% 미만일 경우 통계적으로 유의성이 있다고 표기하였다(대조군이 대비 * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01).

② 결과 및 고찰

㉑ 두류 추출물의 세포 독성 평가

- 두류 10종의 각 에탄올, 열수, 아임계 추출물에 대한 독성 평가를 실시한 결과, 40 μ g/ml 에탄두류 주정 추출물, 40 μ g/ml 열수 주정 추출물, 5 μ g/ml 두류 아임계 추출물은 L6와 COS-7 세포에서 뚜렷한 독성을 나타내지 않았다(그림 2-2-1-6). 따라

서 에탄올과 열수 40 $\mu\text{g/ml}$ 과 아임계 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 두류 10종에 대한 근기능 스크리닝을 진행하였다.

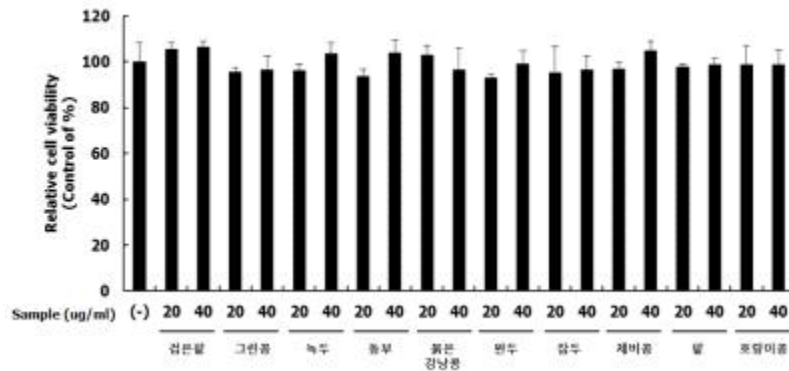


그림 2-2-1. 두류 주정 추출물에 대한 COS-7에서의 독성 평가.

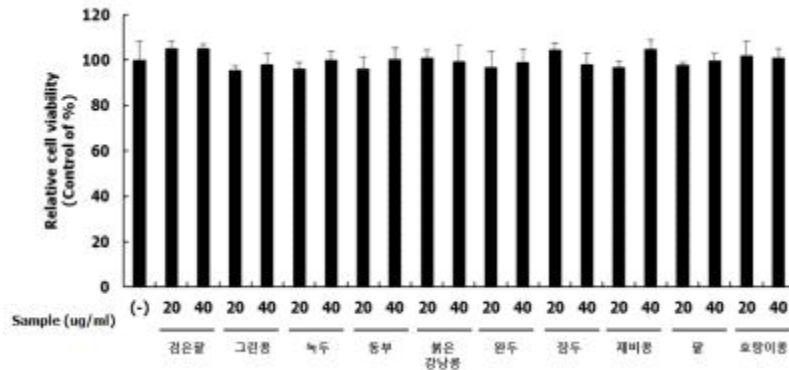


그림 2-2-2. 두류 열수 추출물에 대한 COS-7에서의 독성 평가.

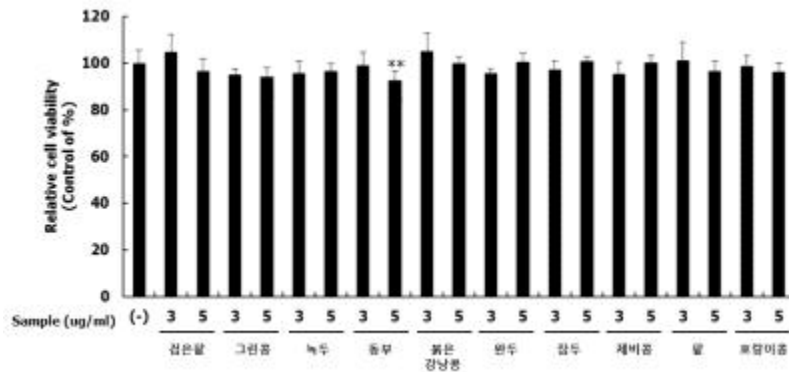


그림 2-2-3. 두류 아임계 추출물에 대한 COS-7에서의 독성 평가.

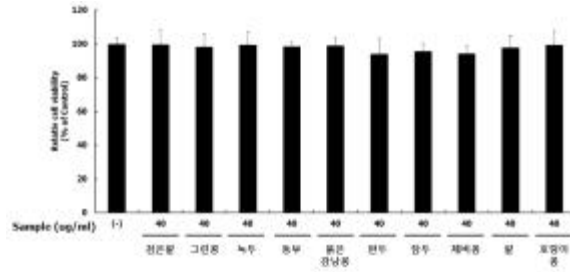


그림 2-2-4. 두류 주정 추출물에 대한 L6에서의 독성 평가.

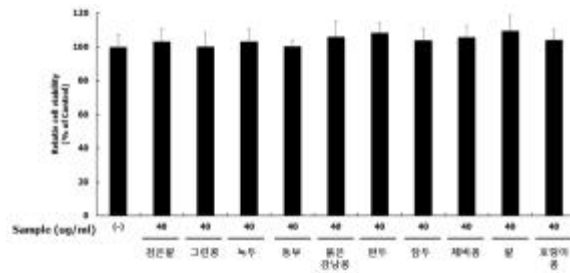


그림 2-2-5. 두류 열수 추출물에 대한 L6에서의 독성 평가.

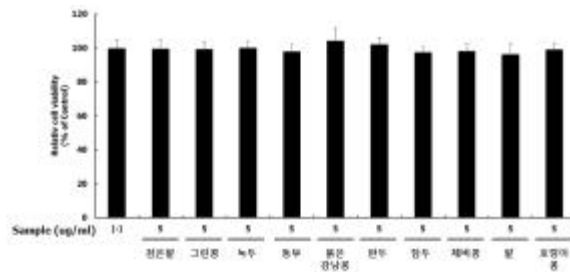


그림 2-2-6. 두류 아임계 추출물에 대한 L6에서의 독성 평가.

㉠ mTOR 스크리닝 결과

- 국내산 두류 10종의 주정 추출물을 L6 세포에 처리하여 mTOR 증가 효과를 검증한 결과, 총 9종 검은콩, 녹두, 동부, 붉은강낭콩, 완두, 참두, 제비콩, 팥, 호랑이콩에서 mTOR 증가 효과를 보였다. 이 중에서 팥과 호랑이 콩에서 높은 활성을 나타내었다 (그림 2-2-7).

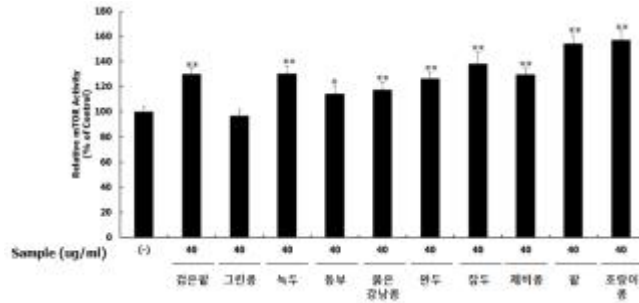


그림 2-2-7. 두류 주정 추출물에 대한 mTOR 활성 평가.

- 국내산 두류 10종의 열수 추출물을 L6 세포에 처리하여 mTOR 증가 효과를 검증한 결과, 검은팥을 제외한 총 9종 그린콩, 녹두, 동부, 붉은강낭콩, 완두, 잣두, 제비콩, 팥, 호랑이콩에서 mTOR 증가 효과를 보였으며 이 중, 팥의 활성이 가장 좋았다(그림 2-2-8).

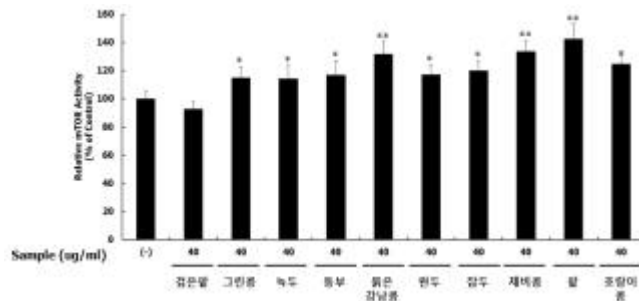


그림 2-2-8. 두류 열수 추출물에 대한 mTOR 활성 평가.

- 국내산 두류 10종의 아임계 추출물을 L6 세포에 처리하여 mTOR 증가 효과를 검증한 결과, 검은팥, 동부, 완두를 제외한 7종 그린콩, 녹두, 붉은강낭콩, 잣두, 제비콩, 팥, 호랑이콩에서 mTOR 증가 효과를 보였다. 이 중, 잣두의 활성이 가장 좋았다(그림 2-2-9).

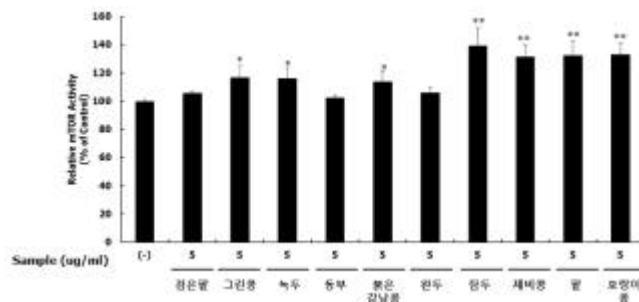


그림 2-2-9. 두류 아임계 추출물에 대한 mTOR 활성 평가.

- 종합적으로, 모든 추출물에서 mTOR 활성이 있던 두류는 녹두, 붉은강낭콩, 잣두, 제비콩, 팥, 호랑이콩이며, 검은팥의 경우 주정 추출물을 제외한 열수와 아임계 추출물에서는 mTOR 활성을 나타내지 않았다. 검은팥을 제외한 대부분의 두류에서 mTOR 활성이 있는 것으로 보아 두류 추출물은 근기능에 효과가 있는 것으로 사료된다.

㉔ PGC-1 α 스크리닝 결과

- 두류 에탄올 추출물에 대해서 PGC-1 α 활성을 확인한 결과, 10종 모두 증가 활성을 보였으며, 붉은 강낭콩이 가장 높은 활성을 나타내었고, 검은팥이 가장 낮은 활성을 나타내었다 (그림 2-2-10).

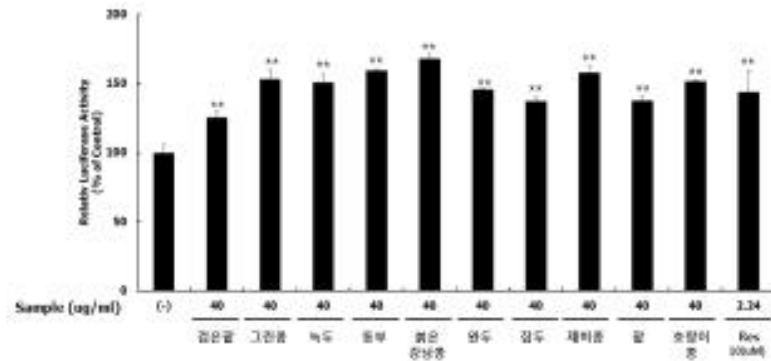


그림 2-2-10. 두류 주정 추출물에 대한 PGC-1 α 활성 평가.

- 두류 열수 추출물의 PGC-1 α 활성 평가에서 녹두와 잠두에서 활성을 나타내었으나 그 효과가 미비하며, 그린콩, 동부, 붉은강낭콩, 제비콩, 팥은 효과가 없었다. 이와는 반대로 검은팥, 완두 호랑이콩은 PGC-1 α 의 활성을 오히려 감소시켰다 (그림 2-2-11).

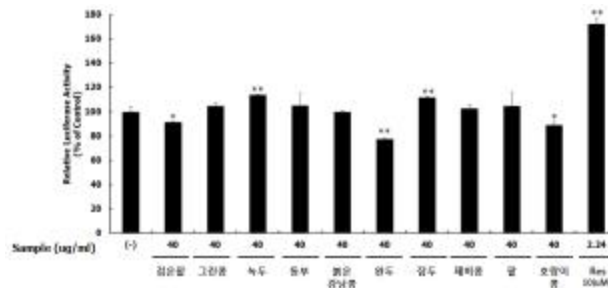


그림 2-2-11. 두류 열수 추출물에 대한 PGC-1 α 활성 평가.

- 두류 아임계 추출물로 PGC-1 α 활성 스크리닝 실험한 결과, 검은팥, 그린콩, 녹두, 제비콩, 호랑이콩에서 통계적으로 유의한 증가활성을 보였으나 그 효과가 미비하여, 우위를 판별하기 힘들었다. 그 외에 팥을 제외한 나머지 두류는 PGC-1 α 활성 효과를 나타내지 않았다(그림 2-2-12).

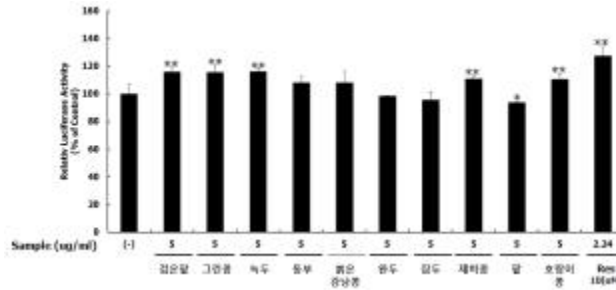


그림 2-2-12. 두류 아임계 추출물에 대한 PGC-1 α 활성 평가.

- 종합적으로, 두류 주정추출물에 대한 PGC-1 α 활성이 증가함에 따라, 두류 주정추출물에서 운동능력향상효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 열수와 아임계 추출물에서는 선택적으로만 사용이 가능할 것으로 판단되며, 녹두의 경우 모든 추출물에서 PGC-1 α 의 활성이 증가한 것을 확인하였다.

㉔ 최종 대표 두류 선정

- 산업적으로나 활성 측면에 있어서 mTOR활성이 가장 좋은 팔이 대표 두류로 선정되었으며, 비록 열수나 아임계 추출에서 PGC-1 α 의 활성이 없으나, 에탄올 추출물에서 PGC-1 α 활성이 있으므로 운동수행능력 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

(나) 팔 펩타이드 및 생리활성물질의 근기능 스크리닝

① 실험 재료 및 방법

㉔ 세포 배양

- L6 근육세포와 COS-7 원숭이 신장세포를 ATCC (Manassas, VA, USA)와 KCLB (Seou, Korea)에서 각각 분양 받아 사용하였다. 세포배양은 10% FBS (HyClone) 및 1% penicillin-streptomycin 항생제(100 units/mL penicillin A, 100 μ g/mL streptomycin)가 함유된 DMEM (HyClone)을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 배양 조건 하에서 배양하였다. L6 근육세포는 80% confluence가 되었을 때, 2% HS (HyClone)가 함유된 DMEM (HyClone)로 바꾸어 L6 근육세포의 분화를 유도하였다. 분화배지는 2일 간격으로 교환하면서 6일간 분화시켰다.

㉔ 세포 독성 평가

- MTT (Sigma-Aldrich) 시약을 통해 각 시료에 대한 세포 독성 평가를 하였다. L6와 COS-7세포에 0.1% FBS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)에 녹인 5종의 peptide와 분리 팔 단백질과 β -sitosterol, stigmasterol, oleanolic acid를 처리하여, 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후, DPBS로 씻은 다음 MTT 용액(0.5 mg/mL)을 300 μ L씩 넣어 준 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 3 시간 동안 배양하여 MTT-formazan이 형성되게 하였다. MTT 용액을 제거한 후, DMSO로 MTT-formazan을 녹인 다음, VERSAmax tunable microplate reader (Molecular Devices)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

㉔ mTOR 활성 측정

- mTOR Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology)를 이용하여 두류 추출물의 mTOR 활성을 스크리닝 하였다. DMEM (Hyclone)에 녹인 5종의 peptide와 분리 팔 단백질과 β -sitosterol, stigmasterol, oleanolic acid를 처리하여 6 wells plate에서 총 6일 동안 분화시킨 L6 세포에 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 12시간 후, cell lysis buffer를 처리하여 세포를 용해시켰다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.)법을 이용하여 단백질을 1 mg/ml로 정량한 뒤, mTOR antibody가 붙어 있는 microwell에 50 μ L씩 분주하여 37°C에서 2시간 incubation 하였다. Washing buffer로 총 4회 씻은 후, detection antibody를 37°C에서 1시간 incubation 했으며, 다시 washing buffer로 총 4회 씻은 후, HRP-linked secondary antibody를 넣고 37°C에서 30분 incubation 했다. 마지막으로 washing buffer로 총 4회 씻은 후, TMB substrate를 각 well에 넣고 37°C에서 10분 간, incubation하고 stop solution 넣어 TBM의 반응을 멈추었다. 2분 뒤, 450nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 mTOR 활성을 측정하였다.

㉕ PGC-1 α 활성 측정

- COS-7 cell line을 1.5×10^5 cells/well 농도로 24 wells plate에 24 시간 배양 후, pFR-PGC-1 α (Addgene)를 lipofector (Aptabio)을 이용하여 형질주입하였다. 4시간 형질주입 후, 24시간 더 배양시켜 세포를 안정화시켰다. 5종의 peptide와 분리 팔 단백질과 β -sitosterol, stigmasterol, oleanolic acid를 처리하여 이 함유되어 있는 DMEM (Hyclone)과 resveratrol (Res: Sigma-aldrich)를 세포에 처리하여 24시간 배양하였다. 최종 24시간 후, phosphate buffer solution (PBS)로 세포들을 세척한 다음 NP-40 lysis buffer (Elpis, Daejeon, Korea)를 이용하여 세포들을 용해하였고, luciferase assay substrate (Promega)를 첨가하여, MicroLumat Plus LB 96V luminometer (Berthold)을 이용하여 PGC-1 α 의 luciferase 활성을 측정하였다.

㉖ 근육세포 분화조절 형태학적 분석

- 근육세포를 0.5×10^5 cells/well 농도로 6 wells plate에 24 시간 배양 후, 5종의 peptide와 분리 팔 단백질과 2% HS (hyclone)이 함유되어 있는 DMEM (Hyclone)을 세포에 처리하여 3일간 분화를 유도하였다. 유도 후, 4% formalin으로 15분 세포를 고정하였다. 0.1% Triton-X 100으로 10분간 반응 시킨 후, 1% bovine serum albumin (BSA; Bioworld, Dublin, OH, USA) 용액으로 상온에서 1시간 blocking 하였다. MF-20-FITC mouse monoclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 1% BSA (BIOworld)에 1:50으로 희석시킨 후 세포에 1시간 반응시킨 후, donkey anti-mouse NL557 secondary antibody (R&D Systems)와 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich)를 1% BSA (BIOworld)에 각각 1:50과 1:3000으로 희석시켜 1시간 반응시켰다. 반응이 완료되면 confocal microscope (LSM 700; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)로 세포 형태를 확인하였다.

㉞ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 23.0 통계 패키지(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통해 분석하였다. 유의성 조사는 unpaired *t*-test로 하였으며, *P* 값이 5% 및 1% 미만일 경우 통계적으로 유의성이 있다고 표기하였다(대조군이 대비 * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01).

② 결과 및 고찰

㉟ 팔 펩타이드의 세포 독성 평가

- 5종의 peptide와 분리 팔 단백질에 대한 독성 평가를 실시한 결과, 40 μg/ml 5종의 peptide와 분리 팔 단백질은 L6와 COS-7 세포에서 뚜렷한 독성을 나타내지 않았다(그림 2-2-13,14). 따라서 5종의 peptide와 분리 팔 단백질 40 μg/ml 에서 근기능 스크리닝을 진행하였다.

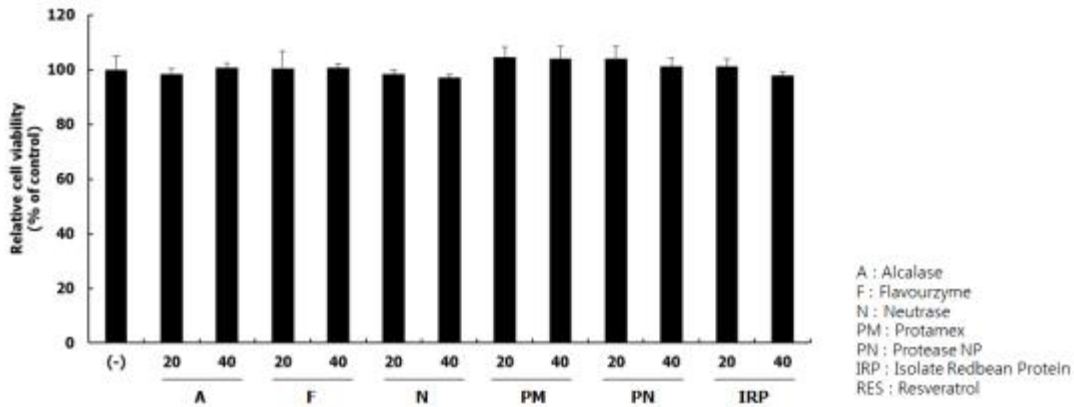


그림 2-2-13. 5종의 peptide와 분리 팔 단백질에 대한 L6에서의 독성 평가.

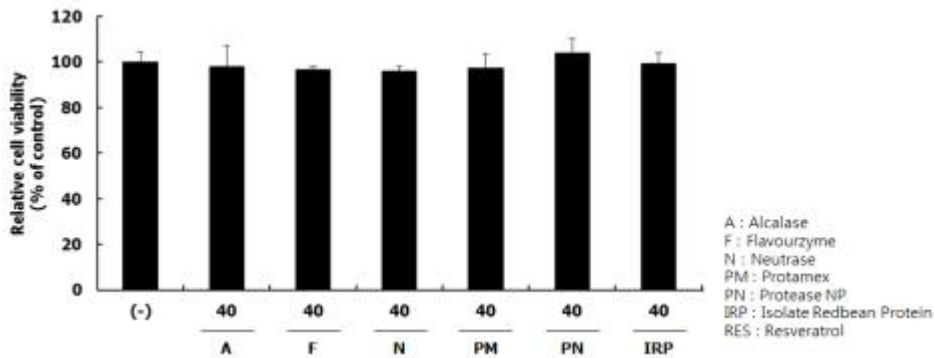


그림 2-2-14. 5종의 peptide와 분리 팔 단백질에 대한 COS-7에서의 독성 평가.

㊱ 팔 펩타이드의 mTOR 스크리닝 결과

- 5종의 peptide와 분리 팔 단백질을 L6 세포에 처리하여 mTOR 증가 효과를 검증한 결과, neutrase, protamex, protease NP 효소에 의해 가수분해된 peptides가 mTOR를

활성을 나타내었으며, 이중 protamex 효소에 의해 가수분해된 peptides에서 mTOR의 활성이 가장 높았다(그림 2-2-15).

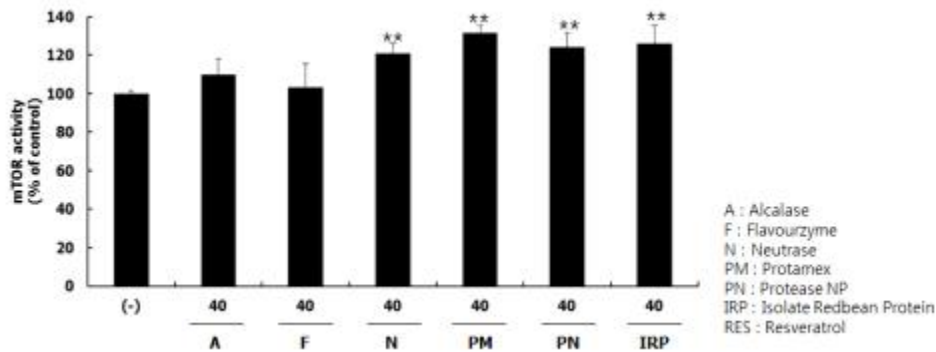


그림 2-2-15. 5종의 peptide와 분리 팔 단백질에 대한 mTOR 활성 평가.

㉔ 팔 펩타이드의 PGC-1 α 스크리닝 결과

- 5종의 peptide와 분리 팔 단백질에 대해서 PGC-1 α 활성을 확인한 결과, 모든 샘플에서 활성을 나타내었다. 이 중, alcalse와 protamex에 의해 생성된 peptides가 가장 좋은 활성을 나타내었다(그림 2-2-16).

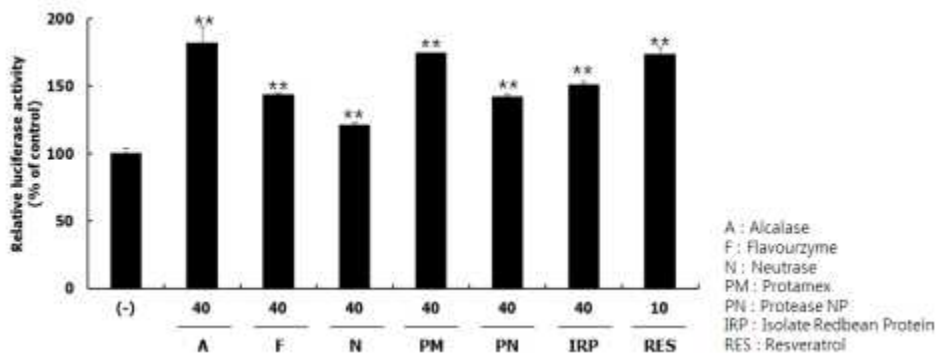


그림 2-2-16. 5종의 peptide와 분리 팔 단백질에 대한 PGC-1 α 활성 평가.

㉕ 근육분화 조절 형태학적 분석 결과

- 5종의 peptide와 분리 팔 단백질에 대해서 immunocytochemistry를 통해 근육세포의 형태를 분석하였다. 분석 결과 모든 샘플에서 대조군에 비해 근육세포의 분화를 촉진하는 것을 확인하였다(그림 2-2-17).

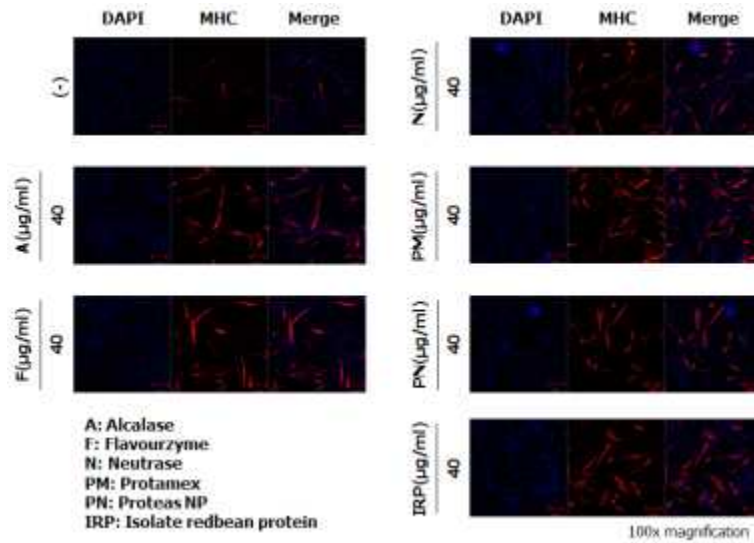


그림 2-2-17. 5종의 peptide와 분리 팔 단백질에 대한 근육 분화 활성.

㉞ 팔 생리활성물질의 세포 독성 평가

- 3종의 생리활성물질, β -sitosterol, stigmasterol, oleanolic acid에 대한 독성 평가를 실시한 결과, stigmasterol은 1 μ M에서 oleanolic acid와 β -sitosterol은 0.1 μ M에서 뚜렷한 독성을 나타내지 않았다.(그림 2-2-18-20). 따라서 3종의 팔 생리활성물질은 0.1 μ M 에서 근기능 스크리닝을 진행하였다.

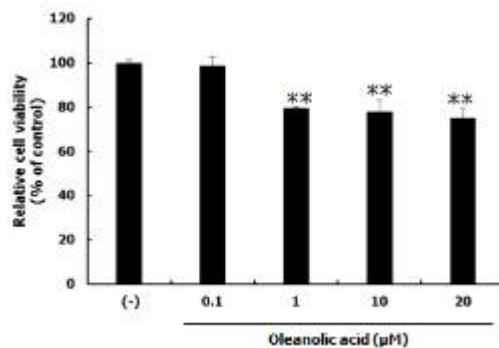


그림 2-2-18. Oleanolic acid에 대한 L6에서의 독성 평가.

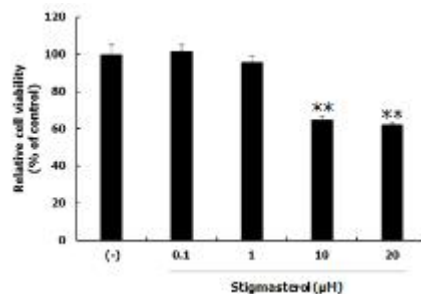


그림 2-2-19. Stigmasterol에 대한 L6에서의 독성 평가.

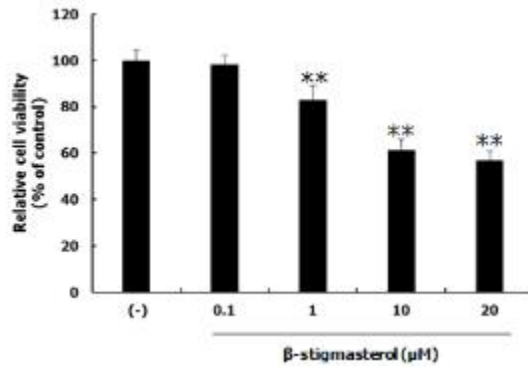


그림 2-2-20. β-Sitosterol에 대한 L6에서의 독성 평가.

㉞ 팔 생리활성물질의 mTOR 스크리닝 결과

- 종의 팔 생리활성물질을 L6 세포에 처리하여 mTOR 증가 효과를 검증한 결과, stigmasterol이 가장 높은 활성을 나타내었다(그림 2-2-21).

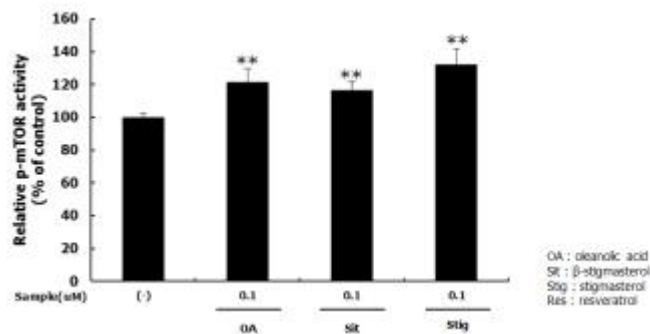


그림 2-2-21. 팔 생리활성물질에 대한 mTOR 활성 평가.

㉟ 팔 생리활성물질의 PGC-1α 스크리닝 결과

- 3종의 팔 생리활성물질을 COS-7 세포에 처리하여 mTOR 증가 효과를 검증한 결과, stigmasterol이 가장 높은 활성을 나타내었다(그림 22).

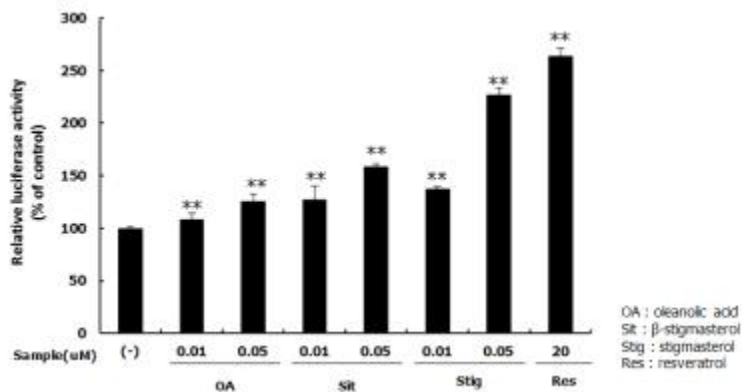


그림 2-2-22. 팔 생리활성물질에 대한 PGC-1α 활성 평가.

- 종합적으로, protamex를 처리하여 만들어진 팔 펩타이드와 stigmasterol이 가장 높은 활성을 나타냄에 따라 근기능 향상 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

(다) 팔 펩타이드와 생리활성물질의 근 기능 분자기전 규명

① 실험 재료 및 방법

㉠ 세포 배양

- L6 근육세포(ATCC,)를 분양 받아 10% FBS (HyClone) 및 1% penicillin-streptomycin 항생제(100 units/mL penicillin A, 100 μ g/mL streptomycin)가 함유된 DMEM (HyClone)을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 배양 조건 하에서 배양하였다. L6 근육세포는 80% confluence가 되었을 때, 2% HS (HyClone)가 함유된 DMEM (HyClone)로 바꾸어 L6 근육세포의 분화를 유도하였다. 분화배지는 2일 간격으로 교환하면서 6일간 분화시켰다

㉡ Satellite cell 배양

- 5 주령의 C57BL/6J (Daehan-Biolink Co., Chungbuk, Korea)을 분양 받아 희생 후 뒷다리 근육을 분리하였다. 뒷다리 근육을 해부용 가위로 잘게 다진 후, 2.5 U/mL dispase II (Roche, Mannheim, Germany)와 2.5 U/mL collagenase D (Roche)를 근육 조직과 함께 shaker에서 1시간 반응시켰다. 70 μ m nylon cell strainer (BD Falcon, San Jose, CA, USA)와 40 μ m nylon cell strainer (BD Falcon)에 여과 후 3.5 g, 5분간 두 번 원심분리하였다. 세포를 20% 우태아 혈청과 bFGF (Promega)와 20% FBS (Hyclone)가 함유한 Ham' s F-10 (Gibco, Carlsbad, CA) 배지와 함께 37°C, 5%, CO₂ 조건에서 24~72시간 배양하였다. 상층액을 분리하여 콜라겐이 코팅된 배양 접시에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 5% HS (Hyclone)이 함유된 DMEM (Hyclone)으로 배지를 변경하여 6일간 분화를 유도하였다.

㉢ 세포독성평가

- MTT (Sigma-Aldrich) 시약을 통해 세포 독성을 평가 하였다. L6 세포에 펩타이드 또는 stigmasterol을 24시간 처리하였다. 24 시간 후, DPBS로 씻은 다음 MTT 용액(0.5 mg/mL)을 300 μ L씩 넣어준 뒤, 37°C에서 3 시간 동안 배양하여 MTT-formazan이 형성되게 하였다. MTT 용액을 제거한 후, DMSO로 MTT-formazan을 녹인 다음, VERSAmax tunable microplate reader (Molecular Devices)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

㉣ RT-PCR

- TRIzol시약(Takara, Shiga, Japan)을 분화된 세포에 처리하여 세포를 깨트린 후, chloroform 200 μ L을 넣고 4°C, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 무색의 상층액과 isopropanol을 1:1로 혼합하여 다시 4°C, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후 상층액을 버리고 에탄올 2회 washing 한 후, 건조된 RNA를 DEPC water에 녹이고 Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 정량하였

다. 총 RNA를 수확한 다음 Reverse transcriptase premix (Elpis)를 이용하여 mRNA를 42°C 55분, 70°C 15분의 조건에서 cDNA로 역전사 시켰다. 합성된 cDNA를 그 다음은 아래와 같은 특정 프라이머(Bioneer, Deajeon, Korea)로 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems, MA, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다(표 2-2-1). PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다.

표 2-2-1. 프라이머 서열

| Cell | Biomarker | Sequence |
|----------------|------------------------|---------------------------|
| L6 | MyoD forward | GGATGGTGCCCTGGGTCCT |
| | MyoD reverse | TGGCCTTCGCTGTGAGTCGC |
| | Myogenin forward | TGGGCTGCCACAAGCCAGAC |
| | Myogenin reverse | CAGCCCAGCCACTGGCATCA |
| | PGC-1 α forward | ATGTGTCGCCTTCTTGCTCT |
| | PGC-1 α reverse | ATCTACTGCCTGGGGACCTT |
| | ERR α forward | AAGGGGATGGAGACCACAGT |
| | ERR α reverse | TGAGGTGGGAGCTGATAGGG |
| | NRF-1 forward | TGGACCCAAGCATTACGGAC |
| | NRF-1 reverse | GGTCATTTCCACGCCCTGTA |
| | Tfam forward | GCTTCCAGGAGGCTAAGGAT |
| | Tfam reverse | CCCAATCCCAATGACAACTC |
| | β -Actin forward | CTGTGTGGATTGGTGGCTCTAT |
| | β -Actin reverse | GTGTAACACGCAGCTCAGTAACA |
| Satellite cell | Pax7 forward | ACTAGAATGGCTGTATCTGTGGTT |
| | Pax7 reverse | TTGAAGTTCCTGCTCCTAAAGTGTA |
| | MyoD forward | CAAGACCACCAACGCTGAT |
| | MyoD reverse | CATCTGAGTCGCCACTGTAG |
| | Myogenin forward | ACCTTCCTGTCCACCTTCAG |
| | Myogenin reverse | CAGACTTCCTCTTACACACC |
| | MHC1 forward | CTCAAGCTGCTCAGCAATCTATTT |
| | MHC1 reverse | GGAGCGCAAGTTTGTATAAGT |
| | MHC2b forward | CACCTGGACGATGCTCTCAGA |
| | MHC2b reverse | GCTCTTGCTCGGCCACTCT |
| | β -Actin forward | ACTGTTACTGAGCTGCGTTTTACAC |
| | β -Actin reverse | GAGGGACTTCCTGTAACCACTTATT |

㉓ Western blotting

- Proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)이 포함된 NP-40 완충용액(Elpis)으로 세

포를 용해시켰다. 완충용액에 용해된 세포를 1.5 mL 튜브(tube)로 옮겨 13,000 rpm 으로 10분간 원심분리하여 상등액만을 취하였다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)법을 이용하여 정량된 단백질을 5분간 끓인 후 SDS-PAGE로 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 전달하였다. 1차 항체를 2.5% bovine serum albumin (BSA)에 1:1000의 비율로 희석하여 니트로셀룰로스 막에 전달된 단백질과 20시간 동안 상온에서 반응시켰다(표 2-2-2). 1차 항체를 반응시킨 다음 Tris-buffer Saline Tween 20 (TBST)을 이용하여 니트로셀룰로스 막을 10분간 3회 세척하였다. 세척 후, 1차 항체를 인지하는 horseradish peroxidase 가 접합된 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체항체(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TA, USA)를 2.5% BSA에 1:5000이 되도록 희석하여 니트로셀룰로스 막과 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, TBST를 이용하여 다시 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. Protein band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham, Tokyo, Japan)를 사용하여 발색하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene) 을 이용하여 발색된 protein band를 확인하였다.

표 2-2-2. 항체(Antibody) 정보

| 1차 antibody | 2차 antibody | Marker size(kDa) |
|-------------------|-------------|------------------|
| p-mTOR | Rabbit | 289 |
| t-mTOR | Rabbit | 289 |
| p-p70S6K | Mouse | 70 |
| t-t70S6K | Rabbit | 70 |
| p-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| t-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| α -Tubulin | Rabbit | 52 |

② 결과 및 고찰

㉠ 팔 펩타이드의 세포 독성 평가

- 근육세포에 Protamex에 의해 제조된 팔 펩타이드를 25, 50, 75, 100 μ g/ml을 처리하여 독성을 평가하였다. 그 결과, 모든 농도에서 독성을 보이지 않다(그림 2-2-23). 따라서, 팔 펩타이드의 근기능 향상에 대한 분자적 규명을 50, 100 μ g/ml 농도에서 진행하고자 한다.

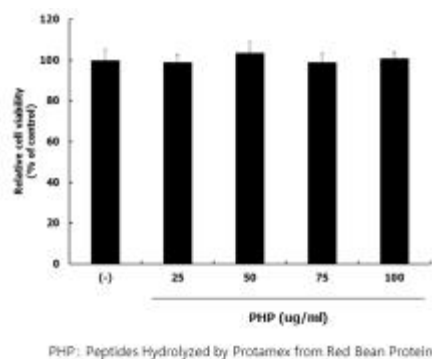


그림 2-2-23. 팔 펩타이드의 세포 독성 평가.

㉔ 팔 펩타이드의 근육세포 분화 촉진 효과

- 근육분화에 관여하는 인자인 myoD와 myogenin은 myoblast가 myotube로 분화하는 과정에 관여하는 주요 단백질이다. L6 근육세포에서 myoD와 myogenin을 RT-PCR을 통해 mRNA 발현량을 확인하였다(그림 2-2-24). 그 결과 myoD와 myogenin의 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 증가하였다. 따라서 팔에 protamex를 처리하여 제조한 펩타이드는 근육세포의 분화를 촉진할 것으로 사료된다.

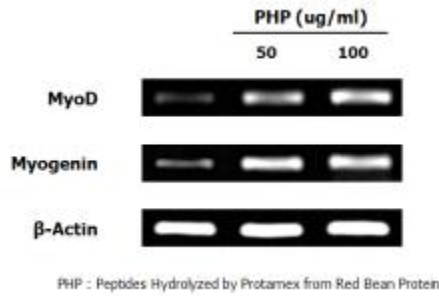


그림 2-2-24. 팔 펩타이드의 근육분화 촉진 활성.

㉕ 팔 펩타이드의 근육 생성 촉진 효과

- mTOR는 4E-binding protein (4EBP1)과 phosphorylated 70-kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K)를 활성화시킴으로써 근 단백질 합성을 유도하여 근육량 증가에 기여한다. mTOR 및 하위 마커인 4EBP1과 p70S6K 단백질의 발현량을 확인한 결과, 팔 펩타이드에 의해서 각각의 단백질이 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다(그림 2-2-25). 따라서 팔 펩타이드는 mTOR/4EBP1/p70S6K pathway를 증가시켜 단백질의 합성을 촉진시킬 것으로 사료된다.

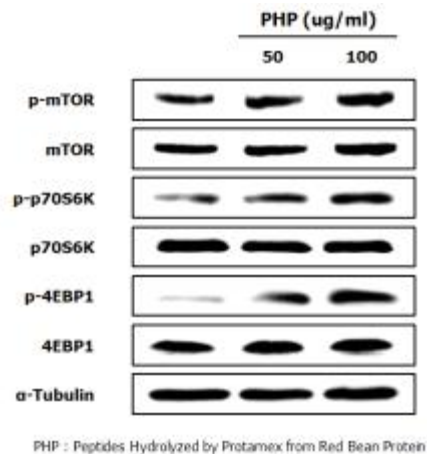


그림 2-2-25. 팔 펩타이드의 mTOR 신호전달경로 활성화 효과.

- 또한, stigmasterol에 의한 mTOR pathway 촉진을 확인한 결과, stigmasterol에 의해서 각각의 단백질이 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다(그림 2-2-26). 따라서 stigmasterol도 mTOR/4EBP1/p70S6K pathway를 증가시켜 단백질의 합성을 촉진시

킬 것으로 사료된다.

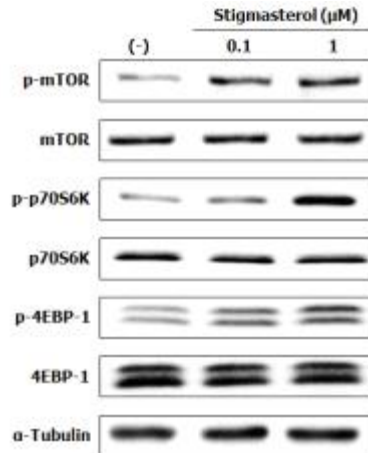


그림 2-2-26. Stigmasterol의 mTOR 신호전달경로 활성화 효과.

㉠ 팔 펩타이드의 운동수행능력 촉진 효과

- PGC-1 α 는 미토콘드리아 생합성에 관여하여 운동능력을 촉진시키는 주요 생체지표다. 팔 펩타이드를 L6 근육세포에 처리하여 PGC-1 α 및 하위마커 ERR α , NRF-1, Tfam의 발현량을 확인한 결과, 대조군에 비하여 농도의존적으로 증가하였다(그림 2-2-27). 따라서 팔 펩타이드는 근육 세포 내에 미토콘드리아의 생합성을 촉진시켜 운동수행능력을 향상시킬 것으로 사료된다.

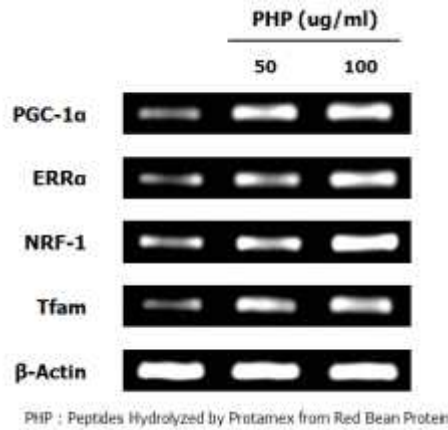


그림 2-2-27. 팔 펩타이드의 미토콘드리아 생합성 촉진 효과.

㉡ 팔 펩타이드의 satellite cell 활성화 촉진 효과

- Satellite cell은 손상된 근육을 회복시켜주거나 근육의 발달(development)에 관여하는 근육 특이적 세포이다. Pax7은 satellite cell의 기능에 가장 중요한 바이오마커로써 일반적인 세포에서는 확인할 수 없다. 따라서 본 연구진은 쥐의 뒷다리에서 분리한 satellite cell을 배양하였으며, 이를 이용하여 팔 펩타이드에 의한 satellite cell의 활성화에 기반이 되는 pax7 및 하위 생체지표, MyoD, myogenin, MHC1, MHC2b를 확인하였다(그림 2-2-28). 대조군과 비교하여 펩타이드를 처리함에 따라 농도의존적으로

pax7, MyoD, myogenin, MHC1, MHC2b를 증가시켰으며, 이는 팔 펩타이드가 손상된 근육의 회복을 촉진하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

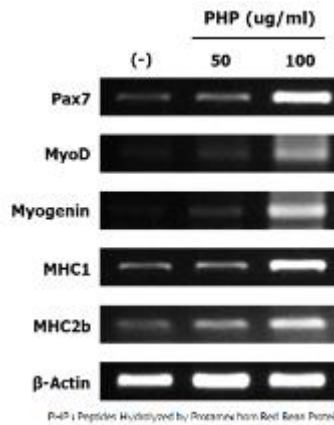


그림 2-2-28. 팔 펩타이드의 satellite cell의 활성화 효과.

(라) 팔 에탄올 추출물의 근감소증 억제활성 평가

① 실험 재료 및 방법

㉠ 세포 배양

- L6 근육세포를 ATC에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 10% FBS (HyClone) 및 1% penicillin-streptomycin 항생제(100 units/mL penicillin A, 100 μ g/mL streptomycin)가 함유된 DMEM (HyClone)을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 배양 조건 하에서 배양하였다. L6 근육세포는 80% confluence가 되었을 때, 2% HS (HyClone)가 함유된 DMEM (HyClone)로 바꾸어 L6 근육세포의 분화를 유도하였다. 분화배지는 2일 간격으로 교환하면서 6일간 분화시켰다.

㉡ 세포독성평가

- MTT (Sigma-Aldrich) 시약을 통해 각 시료에 대한 세포 독성 평가를 하였다. L6세포에 팔 에탄올 추출물 20 μ g/mL와 40 μ g/mL을 TNF- α 50 ng/mL에 각각 혼합하여 세포에 24시간 처리하였다. 24 시간 후, DPBS로 씻은 다음 MTT 용액(0.5 mg/mL)을 300 μ L씩 넣어준 뒤, 37°C에서 3 시간 동안 배양하여 MTT-formazan이 형성되게 하였다. MTT 용액을 제거한 후, DMSO로 MTT-formazan을 녹인 다음, VERSAmax tunable microplate reader (Molecular Devices)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

㉢ 활성산소종 측정

- L6 세포를 black 96-웰 평판배양기에 분주하였다. 24시간 배양 후 팔 에탄올 추출물 20 μ g/mL와 40 μ g/mL을 TNF- α 50 ng/mL에 각각 혼합하여 세포에 2시간 처리하였다. 2시간 후, 40 nm 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich)가 함유된 DMEM을 처리하여 30분간 배양하였다. 30분 후, 485 nm 흡

수 파장과 538 nm 방출 파장에서 fluorescence microplate reader (SpectraMax Gemini XS model; Molecular Devices)형광을 측정하였다.

㉔ RT-PCR

- TRIzol시약(Takara)을 분화된 세포에 처리하여 세포를 깨트린 후, chloroform 200 μ L을 넣고 4°C, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 무색의 상층액과 isopropanol을 1:1로 혼합하여 다시 4°C, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후 상층액을 버리고 에탄올 2회 washing 한 후, 건조된 RNA를 DEPC water에 녹이고 Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific)를 이용하여 정량하였다. 총 RNA를 수확한 다음 Reverse transcriptase premix (Elpis)를 이용하여 mRNA를 42°C 55분, 70°C 15분의 조건에서 cDNA로 역전사 시켰다. 합성된 cDNA를 그 다음은 아래와 같은 특정 프라이머 (Bioneer, Deajeon, Korea)로 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems)를 이용하여 PCR을 수행하였다(표 2-2-3). PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다.

표 2-2-3. 프라이머 서열

| Biomarker | Sequence |
|------------------------|-------------------------|
| MyoD forward | GGATGGTGCCCTGGGTCCT |
| MyoD reverse | TGGCCTTCGCTGTGAGTCGC |
| Myogenin forward | TGGGCTGCCACAAGCCAGAC |
| Myogenin reverse | CAGCCCAGCCACTGGCATCA |
| MuRF-1 forward | TCTACTCGGCCACAGGCGCT |
| MuRF-1 reverse | CTTGACAGTCCCGCCGCAA |
| Atrogin-1 forward | GTCCAGAGAGTCGGCAAGTC |
| Atrogin-1 reverse | GTCGGTGATCGTGAGACCTT |
| Catalase forward | TGAGCCAGCCCGGACAAGA |
| Catalase reverse | ACGCGAGCACGGTAGGGACA |
| β -Actin forward | CTGTGTGGATTGGTGGCTCTAT |
| β -Actin reverse | GTGTAAAACGCAGCTCAGTAACA |

㉕ Western blotting

- Proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)이 포함된 NP-40 완충용액(Elpis)으로 세포를 용해시켰다. 완충용액에 용해된 세포를 1.5 mL 튜브(tube)로 옮겨 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액만을 취하였다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.)법을 이용하여 정량된 단백질을 5분간 끓인 후 SDS-PAGE로 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 전달하였다. 1차 항체를 2.5% BSA (BIOworld)에 1:1000의 비율로 희석하여 니트로셀룰로스 막에 전달된 단백질과

20시간 동안 상온에서 반응시켰다(표 2-2-4). 1차 항체를 반응시킨 다음 TBST을 이용하여 니트로셀룰로스 막을 10분간 3회 세척하였다. 세척 후, 1차 항체를 인지하는 horseradish peroxidase가 접합된 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체항체(Bethyl Laboratories, Inc.)를 2.5% BSA에 1:5000이 되도록 희석하여 니트로셀룰로스 막과 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, TBST를 이용하여 다시 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. Protein band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 발색하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene) 을 이용하여 발색된 protein band를 확인하였다.

표 2-2-4. 항체(Antibody) 정보

| 1차 antibody | 2차 antibody | Marker size(kDa) |
|-------------------|-------------|------------------|
| p-PI3K | Rabbit | 85 |
| t-PI3K | Rabbit | 85 |
| p-Akt | Rabbit | 60 |
| t-Akt | Rabbit | 60 |
| p-mTOR | Rabbit | 289 |
| t-mTOR | Rabbit | 289 |
| p-p70S6K | Mouse | 70 |
| t-t70S6K | Rabbit | 70 |
| p-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| t-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| p-FoxO3 | Rabbit | 97 |
| t-FoxO3 | Rabbit | 97 |
| α -Tubulin | Rabbit | 52 |

㉞ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 23.0 통계 패키지(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통해 분석하였다. 유의성 조사는 unpaired *t*-test로 하였으며, *P* 값이 5% 및 1% 미만일 경우 통계적으로 유의성이 있다고 표기하였다(대조군이 대비 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

② 결과 및 고찰

㉠ 세포 독성 평가

- 팔 에탄올 추출물의 독성 평가를 위해 MTT assay 실험을 하였다. 근육에 염증을 유발시키는 TNF- α 와 함께 팔 에탄올 추출물 20, 40 μ g/ml을 처리하였다. 그 결과, 40 μ g/ml 농도에서 오히려 세포 농도가 증가하면서 독성을 보이지 않음을 확인하였다(그림 2-2-29). 따라서, TNF- α 와 함께 팔 추출물을 20, 40 μ g/ml 농도로 세포에 처리하여 실험을 진행하였다.

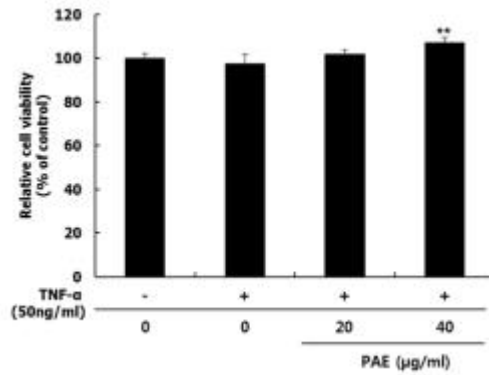


그림 2-2-29. 팔 에탄올 추출물의 세포 독성 평가.

㉔ 활성산소종 억제 활성

- TNF- α 에 의해 증가된 활성산소종을 팔 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 감소시켰다. 이는 팔 에탄올 추출물의 항산화 효과를 의미하며, TNF- α 에 의해 촉진된 근감소에 활성산소종이 매개를 하며 활성산소종을 억제시킴으로 팔 에탄올이 근감소를 억제시키는 것으로 사료된다(그림 2-2-30).

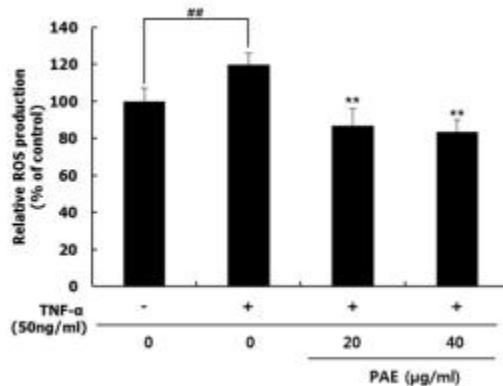


그림 2-2-30. 팔 에탄올 추출물의 활성산소종 억제 활성.

㉕ 근육세포분화 촉진 효과

- 근육분화에 관여하는 인자인 myoD와 myogenin은 myoblast가 myotube로 분화하는 과정에 관여하는 주요 단백질이다. RT-PCR을 통해 myoD와 myogenin의 mRNA 발현량을 확인한 결과, TNF- α 를 처리한 군에 비하여 농도 의존적으로 증가하였다(그림 2-2-31). 따라서 TNF- α 에 의해 저해되었던 근육세포의 분화과정이 팔 추출물에 의해 다시 회복될 수 있을 것으로 예상된다.

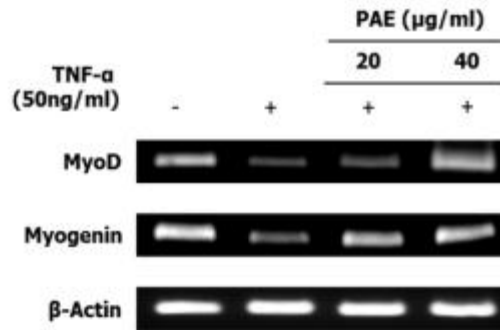


그림 2-2-31. 팔 에탄올 추출물의 근육분화 촉진 활성.

㉔ 근육단백질분해 억제 활성

- MuRF-1와 Atrogin-1은 근육세포 내에서 단백질 분해에 관여하는 핵심 과정인 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 활성화하여 근육단백질을 분해하여 근감소증을 유발시킨다. 이 두 인자를 RT-PCR로 mRNA 발현량을 확인하였을 때 TNF- α 에 의해 증가하였다가 팔 에탄올 추출물에 의해 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(그림 2-2-32). 따라서 팔 추출물은 근육단백질의 분해에 관여하는 인자의 발현량을 감소 시킴으로써 근감소증 예방에 효능이 있는 것으로 판단된다.

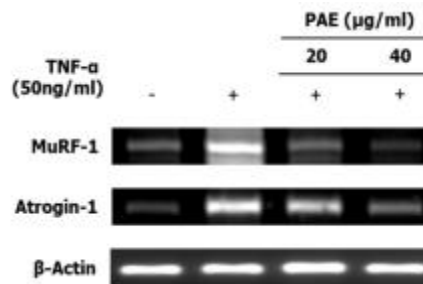


그림 2-2-32. 팔 에탄올 추출물의 근단백질분해 억제 효과.

㉕ 항산화 효소 카탈라아제 활성 증가 효과

- Catalase는 세포내에서 생성된 항산화 작용을 하는 주요 인자이다. 팔 추출물의 항산화 기능을 분자 수준에서 검증하기 위하여 catalase의 mRNA 발현량을 확인하였다. 그 결과, TNF- α 에 의해 발현이 억제되었던 catalase의 발현량이 팔 추출물에 의해 회복됨을 확인하였다(그림 2-2-33). 이로써 팔 에탄올 추출물은 항산화 효소인 catalase의 발현량을 증가시킴으로써 산화 스트레스를 감소시키는 것으로 사료된다.

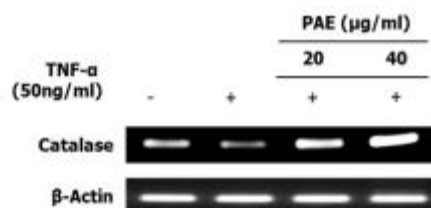


그림 2-2-33. 팔 에탄올 추출물의 catalase 발현 효과.

㉞ 근육 생성에 관여하는 주요 단백질 증가 효과

- 근 세포 내에서 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway의 자극을 기점으로 다운스트림 단백질(downstream proteins)을 인산화시킴으로써 단백질 합성을 유도한다. PI3K/Akt 신호전달에 의한 mTOR의 활성화는 세포 내에서 다양한 성장 신호를 통합하는 중심 성장 신호전달 인자로 인정되고 있다. TNF- α 에 의한 바이오 마커의 감소로 L6 세포 내에서 muscle atrophy가 일어났으나 팔 에탄올 추출물에 의해서 각각의 단백질이 회복되는 경향을 확인하였다(그림 2-2-34).

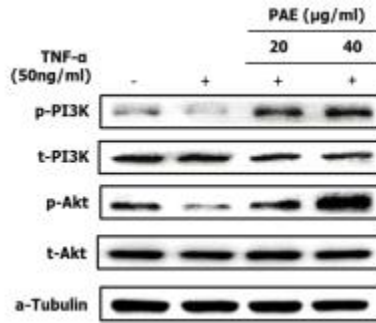


그림 2-2-34. 팔 에탄올 추출물의 PI3K/Akt 경로 활성화 효과.

- mTOR는 4E-binding protein (4EBP1)과 phosphorylated 70-kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K)를 활성화시킴으로써 근 단백질 합성을 유도하여 근육량 증가에 기여한다. 웨스턴블랏(western blot)을 통해 mTOR 및 하위 마커인 4EBP1과 p70S6K 단백질의 발현량을 확인하였다(그림 2-2-35). TNF- α 에 따른 바이오 마커의 감소로 L6 세포 내에서 근감소증이 일어났으나 팔 에탄올 추출물에 의해서 각각의 단백질이 회복되는 경향을 확인하였다. 따라서 팔 추출물은 TNF- α 에 의해 촉진된 muscle atrophy를 억제시켰으며, 이때 PI3K/Akt pathway를 거쳐 단백질 합성에 관여하는 mTOR/4EBP1/p70S6K pathway를 증가시켜 줄어든 단백질의 합성을 증가시키는 것으로 사료된다.

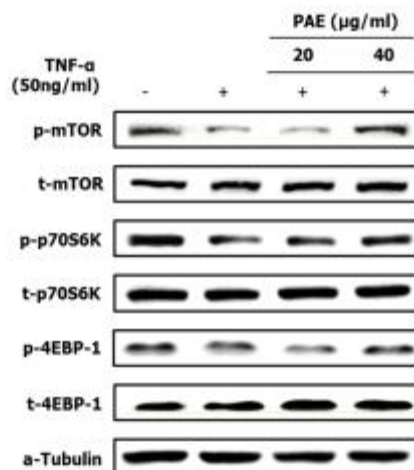


그림 2-2-35. 팔 에탄올 추출물의 mTOR 신호전달경로 활성화 효과.

- Forhead box (FoxO)가 세포질에서 핵 내로 이동하면 단백질 분해에 관여하는 atrogin-1과 MuRF-1의 발현을 증가고 이로 인해 근육 내의 단백질 분해가 촉진되어 근육량이 줄어들게 된다. 웨스턴블랏(western blot)을 통해 p-FoxO3단백질의 발현을 확인하였다(그림 2-2-36). TNF- α 에 따른 바이오 마커의 감소로 L6 세포 내에서 muscle atrophy가 일어났으나 팔 추출물에 의해서 단백질이 회복되는 경향을 확인하였다. 따라서 팔 추출물은 TNF- α 에 의해 촉진된 muscle atrophy를 억제시켰으며, 이때 PI3K와 Akt pathway를 거쳐 단백질 분해 억제에 관여하는 p-FoxO3a 생체지표를 증가시켜 줄어드는 단백질의 합성을 증가시키는 것으로 판단된다.

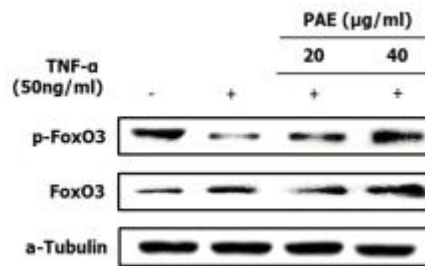


그림 2-2-36. 팔 에탄올 추출물의 단백질분해인자 저해 효과.

(마) 팔 에탄올 추출물의 근육 증대 및 운동수행능력 촉진 활성 평가

① 실험 재료 및 방법

㉠ 세포 배양

- L6 근육세포를 ATC에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 10% FBS (HyClone) 및 1% penicillin-streptomycin 항생제(100 units/mL penicillin A, 100 μ g/mL streptomycin)가 함유된 DMEM (HyClone)을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 배양 조건 하에서 배양하였다. L6 근육세포는 80% confluence가 되었을 때, 2% HS (HyClone)가 함유된 DMEM (HyClone)로 바꾸어 L6 근육세포의 분화를 유도하였다. 분화배지는 2일 간격으로 교환하면서 6일간 분화시켰다.

㉡ 세포독성평가

- MTT (Sigma-Aldrich) 시약을 통해 각 시료에 대한 세포 독성 평가를 하였다. 팔 에탄올 추출물이 25, 50, 70, 100 μ g/mL 되도록 DMEM (Hyclone)에 녹인 후 24시간 처리하였다. 24 시간 후, DPBS로 씻은 다음 MTT 용액(0.5 mg/mL)을 300 μ L씩 넣어준 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 3 시간 동안 배양하여 MTT-formazan이 형성되게 하였다. MTT 용액을 제거한 후, DMSO로 MTT-formazan을 녹인 다음, VERSAmix tunable microplate reader (Molecular Devices)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

㉢ 세포증식 활성

- L6 세포를 24웰 평판배양기에 분주 후, 24 시간 배양하였다. 2% HS (Hyclone)이 함유된 DMEM (Hyclone)에 팔 에탄올 추출물을 녹인 후 72시간 배양하였다. DPBS로 씻은 다음 MTT 용액(0.5 mg/mL)을 300 μ L씩 넣어준 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 배

양하여 MTT-formazan이 형성되게 하였다. MTT 용액을 제거한 후, DMSO로 MTT-formazan을 녹인 다음, VERSAmax tunable microplate reader (Molecular Devices)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

㉔ mTOR 활성 측정

- mTOR Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology)를 이용하여 두류 추출물의 mTOR 활성을 스크리닝 하였다. DMEM (Hyclone)에 녹인 팔 에탄올 추출물을 6 wells plate에서 총 6일 동안 분화시킨 L6 세포에 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 12시간 후, cell lysis buffer를 처리하여 세포를 용해시켰다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.)법을 이용하여 단백질을 1 mg/ml로 정량한 뒤, mTOR antibody가 붙어 있는 microwell에 50 μ L씩 분주하여 37°C에서 2시간 incubation 하였다. Washing buffer로 총 4회 씻은 후, detection antibody를 37°C에서 1시간 incubation 했으며, 다시 washing buffer로 총 4회 씻은 후, HRP-linked secondary antibody를 넣고 37°C에서 30분 incubation 했다. 마지막으로 washing buffer로 총 4회 씻은 후, TMB substrate를 각 well에 넣고 37°C에서 10분 간, incubation하고 stop solution 넣어 TMB의 반응을 멈추었다. 2분 뒤, 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 mTOR 활성을 측정하였다.

㉕ 미토콘드리아 생합성 측정

- 분화가 완료된 L6 세포에 100 nM mitotracker를 처리하여 30분간 배양하였다. 1 mL Methanol을 처리 후, 490 nm 흡수 파장과 516 nm 방출 파장에서 fluorescence microplate reader (SpectraMax Gemini XS model; Molecular Devices)형광을 측정하였다. Confocal microscope (LSM 700; Carl Zeiss)를 통해 세포 내의 미토콘드리아를 확인하였다.

㉖ RT-PCR

- TRIzol시약(Takara)을 분화된 세포에 처리하여 세포를 깨트린 후, chloroform 200 μ L을 넣고 4°C, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 무색의 상층액과 isopropanol을 1:1로 혼합하여 다시 4°C, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후 상층액을 버리고 에탄올 2회 washing 한 후, 건조된 RNA를 DEPC water에 녹이고 Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific)를 이용하여 정량하였다. 총 RNA를 수확한 다음 Reverse transcriptase premix (Elpis)를 이용하여 mRNA를 42°C 55분, 70°C 15분의 조건에서 cDNA로 역전사 시켰다. 합성된 cDNA를 그 다음은 아래와 같은 특정 프라이머 (Bioneer, Deajeon, Korea)로 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems)를 이용하여 PCR을 수행하였다(표 2-2-5). PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다.

표 2-2-5. 프라이머 서열

| Biomarker | Sequence |
|------------------------|------------------------|
| MyoD forward | GGATGGTGCCCCTGGGTCCT |
| MyoD reverse | TGGCCTTCGCTGTGAGTCGC |
| Myogenin forward | TGGGCTGCCACAAGCCAGAC |
| Myogenin reverse | CAGCCCAGCCACTGGCATCA |
| PGC-1 α forward | ATGTGTCGCCTTCTTGCTCT |
| PGC-1 α reverse | ATCTACTGCCTGGGGACCTT |
| ERR α forward | AAGGGGATGGAGACCACAGT |
| ERR α reverse | TGAGGTGGGAGCTGATAGGG |
| NRF-1 forward | TGGACCCAAGCATTACGGAC |
| NRF-1 reverse | GGTCATTTACCCGCCCTGTA |
| Tfam forward | GCTTCCAGGAGGCTAAGGAT |
| Tfam reverse | CCCAATCCAATGACAACCTC |
| PPAR δ forward | TGAGGACAAACCCACGGTAA |
| PPAR δ reverse | CACTTCTGGAAGCGGCAGTA |
| β -Actin forward | CTGTGTGGATTGGTGGCTCTAT |
| β -Actin reverse | GTGAAAACGCAGCTCAGTAACA |

㉔ Western blotting

- Proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)이 포함된 NP-40 완충용액(Elpis)으로 세포를 용해시켰다. 완충용액에 용해된 세포를 1.5 mL 튜브(tube)로 옮겨 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액만을 취하였다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.)법을 이용하여 정량된 단백질을 5분간 끓인 후 SDS-PAGE로 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 전달하였다. 1차 항체를 2.5% BSA (BIOworld)에 1:1000의 비율로 희석하여 니트로셀룰로스 막에 전달된 단백질과 20시간 동안 상온에서 반응시켰다(표 2-2-6). 1차 항체를 반응시킨 다음 TBST을 이용하여 니트로셀룰로스 막을 10분간 3회 세척하였다. 세척 후, 1차 항체를 인지하는 horseradish peroxidase가 접합된 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체항체(Bethyl Laboratories, Inc.)를 2.5% BSA에 1:5000이 되도록 희석하여 니트로셀룰로스 막과 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, TBST를 이용하여 다시 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. Protein band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 발색하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene) 을 이용하여 발색된 protein band를 확인하였다.

표 2-2-6. 항체(Antibody) 정보

| 1차 antibody | 2차 antibody | Marker size(kDa) |
|-------------------|-------------|------------------|
| p-mTOR | Rabbit | 289 |
| t-mTOR | Rabbit | 289 |
| p-p70S6K | Mouse | 70 |
| t-t70S6K | Rabbit | 70 |
| p-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| t-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| α -Tubulin | Rabbit | 52 |

㉕ ATP 함량 측정

- 분화가 완료된 세포에서 파이렛으로 배지를 수거한 뒤, 0.3% trichloroacetic acid를

처리하여 냉장고에서 30분간 방치하였다. 13,000 rpm, 4도의 조건에서 5분간 원심 분리 후, 상등액에 250 mM Tris-acetate를 처리하였다. Luciferin을 처리하여 MicroLumat Plus LB 96V luminometer (Berthold)로 luminescence를 측정하였다.

㉔ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 23.0 통계 패키지(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통해 분석하였다. 유의성 조사는 unpaired *t*-test로 하였으며, *P* 값이 5% 및 1% 미만일 경우 통계적으로 유의성이 있다고 표기하였다(대조군이 대비 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

② 결과 및 고찰

㉓ 세포 독성 평가

- 팔 에탄올 추출물의 독성 평가를 위해 MTT assay 실험을 하였다. 그 결과, 100 μ g/ml 농도에서 오히려 독성이 있음을 확인하였다(그림 2-2-37). 따라서, 팔 에탄올 추출물을 25, 50, 75 μ g/ml 농도로 세포에 처리하여 실험을 진행하였다.

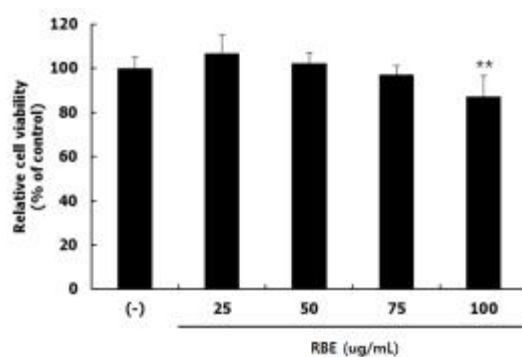


그림 2-2-37. 팔 에탄올 추출물의 세포 독성 평가.

㉒ 세포 증식 활성

- 팔 에탄올 추출물의 세포 증식 활성을 평가한 결과, 농도 의존적으로 세포가 증식함을 확인하였다 (그림 2-2-38).

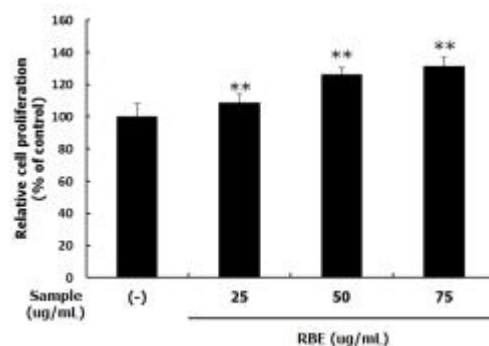


그림 2-2-38. 팔 에탄올 추출물의 세포 증식 활성.

㉔ 세포 분화 촉진 활성

- 근육분화에 관여하는 인자인 myoD와 myogenin은 myoblast가 myotube로 분화하는 과정에 관여하는 주요 단백질이다. L6 근육세포에서 myoD와 myogenin을 RT-PCR을 통해 mRNA 발현량을 확인하였다(그림 2-2-39). 그 결과 myoD와 myogenin의 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 증가하였다. 따라서 팔 에탄올 추출물은 근육세포의 분화를 촉진할 것으로 사료된다.

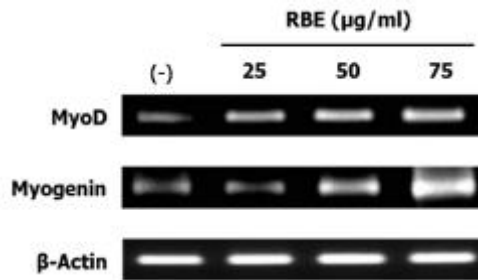


그림 2-2-39. 팔 에탄올 추출물의 근육분화 촉진 활성.

㉕ 세포 분화 촉진 활성

- mTOR는 4E-binding protein (4EBP1)과 phosphorylated 70-kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K)를 활성화시킴으로써 근 단백질 합성을 유도하여 근육량 증가에 기여한다. 웨스턴블랏(western blot)을 통해 mTOR 및 하위 마커인 4EBP1과 p70S6K 단백질의 발현량을 확인하였다(그림 2-2-40). 또한 mTOR kit를 이용하여 mTOR의 활성을 측정하였다(그림 41). 두 번의 실험 모두에서 팔 에탄올 추출물이 mTOR pathway를 증가시켰다. 따라서, 팔 에탄올 추출물은 mTOR/4EBP1/p70S6K pathway를 증가시켜 정상세포에서 단백질의 합성을 증가시킬 것으로 사료된다.

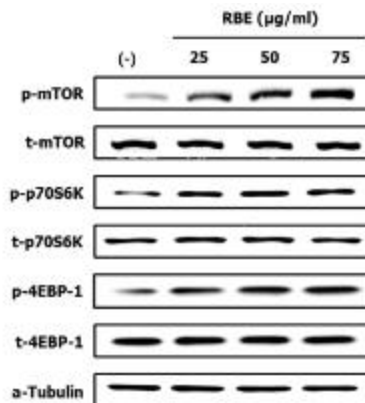


그림 2-2-40. 팔 에탄올 추출물의 mTOR 신호전달 체계 활성.

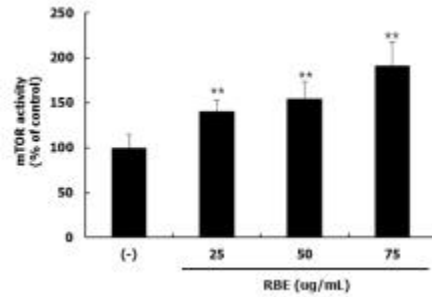


그림 2-2-41 팔 에탄올 추출물의 mTOR 촉진 활성.

㉓ 미토콘드리아 생합성 촉진 효과 효과

- PGC-1 α 는 미토콘드리아 생합성에 관여하여 운동능력을 촉진시키는 주요 생체지표다. 팔 에탄올 추출물을 L6 근육세포에 처리하여 PGC-1 α 및 하위마커 ERR α , NRF-1, Tfam의 발현량을 확인한 결과, 대조군에 비하여 농도의존적으로 증가하였다(그림 2-2-42).

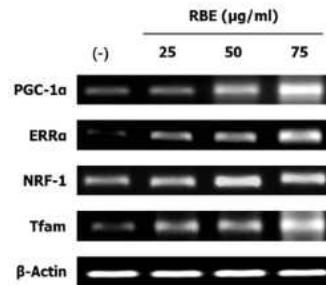


그림 42. 팔 에탄올 추출물의 미토콘드리아 생합성 관련 생체지표 증가 활성.

- 팔 에탄올 추출물에 의해 미토콘드리아 생합성 관련 생체지표가 증가함에 따라, Mitotracker를 이용하여 mitochondria의 함량을 측정하였다. 그 결과, 팔 에탄올 추출물을 처리함에 따라 농도의존적으로 미토콘드리아의 양이 증가하였다(그림 2-2-43).

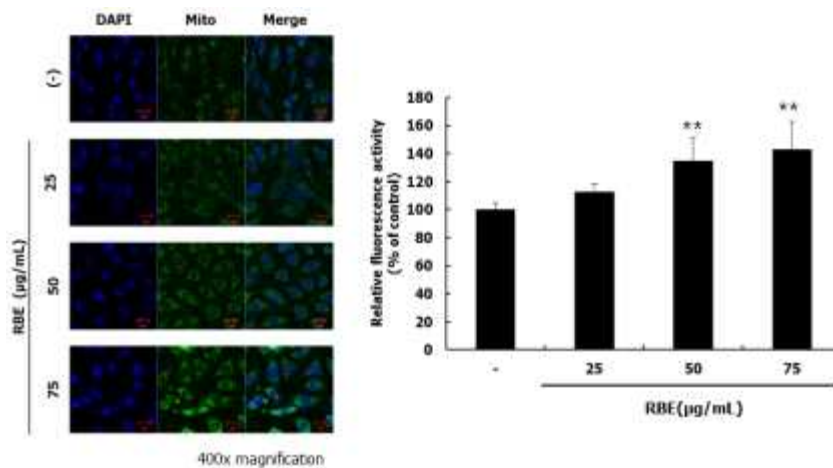


그림 2-2-43. 팔 에탄올 추출물의 미토콘드리아 증가 활성.

- 미토콘드리아는 에너지인 ATP를 생산하는 organelle이다. 팔 에탄올 추출물에 의해 미토콘드리아의 함량이 증가함에 따라 ATP의 양도 증가할 것으로 사료되어 ATP 량

을 측정하였다. 팔 에탄올 추출물을 처리함에 따라 ATP의 양이 증가됨을 확인하였다(그림 2-2-44)

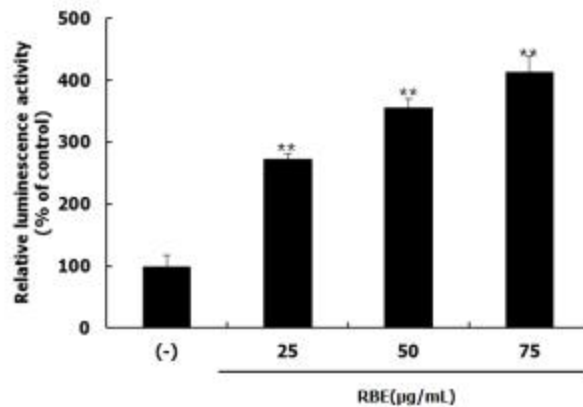


그림 2-2-44. 팔 에탄올 추출물의 ATP 증가 활성.

(2) 2차년도 수행내용 및 결과

(가) 두류 추출물의 부동(Immobilization, 不動) 동물모델 근기능 개선 평가

① 실험 재료 및 방법

㉠ 동물 사육

- 실험동물로 생후 7주된 C57BL/6J 수컷 쥐를 Young Bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 실험을 진행하였다. 모든 동물의 사육은 연세실험동물연구센터(Yonsei Laboratory Animal Research Center; YLARC, Seoul, Korea)에서 진행되었으며, 사육실 환경은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$ 로 유지시켰다. 실험 시작 전, 총 24마리의 쥐를 무작위로 1군당 6마리씩, 총 4군으로 나누었다. 1주일간 적응시킨 후, 대조군(control; CON)을 제외한 나머지 군의 쥐 복강에 325 mg/kg의 tribromoethanol (Sigma-aldrich, St Louis, MO, USA)을 주사하여 마취를 유도하였다. 마취 후, 쥐의 오른쪽 뒷다리(hindlimb) 장딴지근육(gastrocnemius muscle; GA)과 오른쪽 발바닥을 skin stapler (Unidus, Chungcheongbuk-do, Korea)를 사용하여 스테이플러 심으로 근육을 손상시키고 오른쪽 뒷다리가 움직이지 못하게 하였으며 이 상태를 1주일 간 유지시켰다. 1주일 뒤에 장딴지근과 발바닥에 고정되어 있던 스테이플러 심을 제거하고 다시 1주일 간 팔 50% 에탄올 추출물(*Vigna angularis* extract: VAE)을 300 mg/kg 또는 600 mg/kg의 농도로 매일 경구 투여하여 회복을 유도하였다. 이 때, 대조군과 근감소증 유도군(immobilization-induced muscle atrophy group; IM)은 식염수로 경구투여를 실시하였다. 경구투여 기간이 끝난 후, 근력과 지구력을 측정하였다. 실험동물을 325 mg/kg의 tribromoethanol (Sigma-aldrich)을 다시 복강 주사하여 마취하고 심채혈을 통해 희생을 하였다. 심장박동이 멈춘 것을 확인한 뒤, 오른쪽 뒷다리에서 장딴지근, 가자미근(soleus muscle: SOL), 전경골근(tibialis anterior muscle: TA), 조적근(extensor digitorum longus muscle: EDL)을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 근육은 다음 실험 진행을 위해 -70°C 에서 보관하였다.

㉠ 근력 측정

- 경구 투여 기간이 끝나고, 근력측정기(Chatillon force measurement system; Columbus Instrument, Columbus, OH, USA)를 이용하여 쥐의 근력을 측정하였다. 쥐가 근력측정기의 막대를 놓을 때까지 일정한 힘으로 쥐의 꼬리를 당겼으며, 한 마리당 총 5회 연속 테스트를 실시하였다

㉡ 지구력 측정

- 경구 투여 기간이 끝나고, 트레드밀 기기(LE8710MTS; Panlab, Barcelona, Spain)를 이용하여 실험동물의 운동수행능력을 평가하였다. 최초 8 m/min의 속도로 시작하여, 1 분마다 1 m/min씩 속도를 높였다. 쥐가 shock grid에 닿았을 때 0.2 mA의 전기를 주도록 설정하였으며, 쥐가 전기충격을 10초간 받아도 더 이상 달리지 않는 시점에서 실험을 멈추고 시간과 거리를 측정하였다.

㉢ 근육 부피 측정

- 희생하기 전, 쥐를 isoflurane으로 호흡 마취하고 microPET/CT/SPECT (positron emission tomography/computed tomography/single photon emission tomography, INVEON, Siemens, DC, USA)를 이용하여 오른쪽 뒷다리 근육의 부피를 측정하였다.

㉣ 조직학적 분석

- 적출한 오른쪽 장딴지근과 전경골근의 조직 일부를 떼어 10%포르말린(formalin)으로 고정시키고 파라핀 블록을 만들었다. 조직학적인 측면에서 근육의 단면적을 측정하기 위해 hematoxylin & eosin으로 조직을 염색하였으며, 염색된 조직은 eXcope T500 카메라(DIXI Science, Daejeon, Korea)가 장착된 광화학현미경(CK40; Olymupus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 근섬유를 촬영하여 image J 프로그램(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)으로 단면적을 측정하였다.

㉤ RT-PCR

- 총 RNA를 얻기 위해, TRIzol시약(Takara, Shiga, Japan)을 전경골근에 처리하여 근육 세포를 깨뜨리고, chloroform 200 μ L을 넣었으며, 이를 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 무색의 상층액과 isopropanol을 1:1로 혼합하여 다시 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후 상층액을 버리고 에탄올 2회 washing 한 후, 건조된 RNA를 DEPC water에 녹이고 Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 정량하였다. 총 RNA를 수확한 다음 Reverse transcriptase premix (Elpis, Daejeon, Korea)를 이용하여 mRNA를 42 $^{\circ}$ C 55분, 70 $^{\circ}$ C 15분의 조건에서 cDNA로 역전사 시켰다. 합성된 cDNA를 그 다음은 아래와 같은 특정 프라이머(Bioneer, Deajeon, Korea)로 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다(표 2-2-8). PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G;BOX EF

imaging system (Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다.

표 2-2-8. 프라이머 서열

| 생체지표 | 염기서열(5'-3') |
|------------------------|----------------------------|
| MuRF1 forward | TCTGCACTTAGAACACATAGCAGAG |
| MuRF1 reverse | TCTCCTTCTTCATTGGTGTCTTCT |
| Atrogin-1 forward | CAGTGATCCATTCTGTTTCATCCTTG |
| Atrogin-1 reverse | TTATTTCCAGCCAAATGGAGAGAGA |
| MyoD forward | CAAGACCACCAACGCTGAT |
| MyoD reverse | CATCTGAGTCGCCACTGTAG |
| Myogenin forward | ACCTTCCTGTCCACCTTCAG |
| Myogenin reverse | CAGACTTCCTTTACACACC |
| β -Actin forward | CAGCTCAGTAACAGTCCGCC |
| β -Actin reverse | TCACTATTGGCAACGAGCGG |

㉔ Western blotting

- Proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)이 포함된 NP-40 완충용액(Elpis)으로 전 경골근을 용해시켰다. 완충용액에 용해된 세포를 1.5 mL 튜브(tube)로 옮겨 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)법을 이용하여 정량된 단백질을 5분간 끓인 후 SDS-PAGE 로 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 전달하였다. 1차 항체를 2.5% bovine serum albumin (BSA)에 1:1000의 비율로 희석하여 니트로셀룰로스 막에 전달된 단백질과 20시간 동안 상온에서 반응시켰다(표 2-2-9). 1차 항체를 반응시킨 다음 Tris-buffer Saline Tween 20 (TBST)을 이용하여 니트로셀룰로스 막을 10분간 3회 세척하였다. 세척 후, 1차 항체(표 2)를 인지하는 horseradish peroxidase가 접합된 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TA, USA)를 2.5% BSA에 1:5000이 되도록 희석하여 니트로셀룰로스 막과 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, TBST를 이용하여 다시 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. Protein band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham, Tokyo, Japan)를 사용하여 발색하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene) 을 이용하여 발색된 protein band를 확인하였다.

표 2-2-9. 항체(Antibody) 정보

| 1차 antibody | 2차 antibody | Marker size(kDa) |
|-------------|-------------|------------------|
| p-PI3K | Rabbit | 85 |
| PI3K | Rabbit | 85 |
| p-Akt | Rabbit | 60 |
| Akt | Rabbit | 60 |
| p-FoxO3 | Rabbit | 82~97 |

| | | |
|-------------------|--------|-------|
| FoxO3 | Rabbit | 82~97 |
| p-mTOR | Rabbit | 289 |
| mTOR | Rabbit | 289 |
| p-p70S6K | Rabbit | 70 |
| p70S6K | Rabbit | 70 |
| p-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| 4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| α -Tubulin | Rabbit | 52 |

㉠ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 23.0 통계 패키지(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통해 분석하였다. 유의성 조사는 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)으로 비교한 후, 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan 다중범위 분석에 의해 검정하였다.

② 결과 및 고찰

㉠ 근력 향상 효과

- 1주일의 경구투여 후, 희생하기 전에 근력을 측정하였다. 앞/뒤 다리 측정시, 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 근력이 감소하였으나, 시료를 처리함에 따라 근력이 다시 회복되는 것을 확인하였다. 이러한 경향과는 다르게 앞다리만 측정할 경우, 모든 군에서 변화가 없었다(그림 2-2-45).

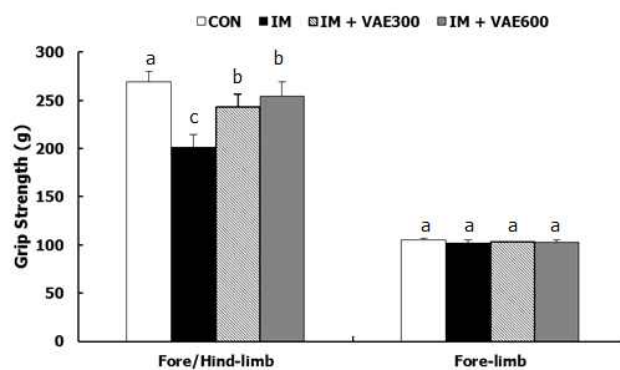


그림 2-2-45. 팔 에탄올 추출물의 근력 향상 효과.

㉡ 지구력 향상 효과

- Treadmill을 이용하여 실험 동물의 지구력을 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 운동 거리 및 시간이 감소하였으나, 시료를 처리함에 따라 근육이 회복되어 근운동 거리 및 시간이 증가하였다(그림 2-2-46).

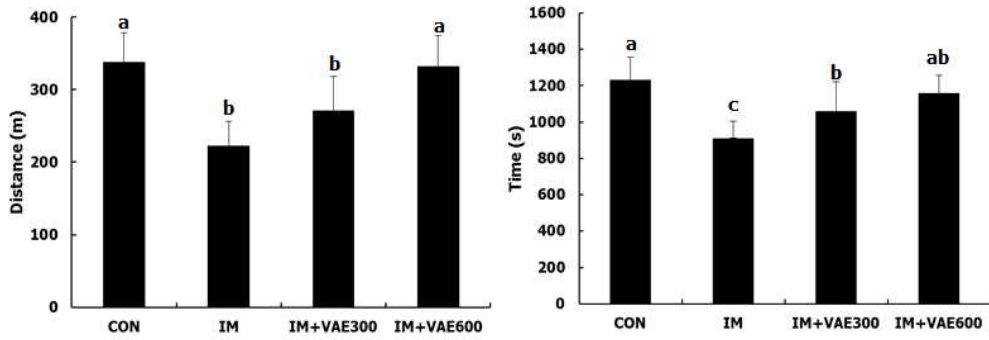


그림 2-2-46. 팔 에탄올 추출물의 지구력 향상 효과.

㉔ 근육 부피 증가 효과

- 근감소증을 일으킨 오른쪽 다리의 부피를 실험동물을 마취시킨 뒤, micro-CT를 통해 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증을 유도한 군에서 근육 부피가 감소하였으며 시료를 처리함에 따라 다시 회복되는 경향을 확인하였다(그림 2-2-47).

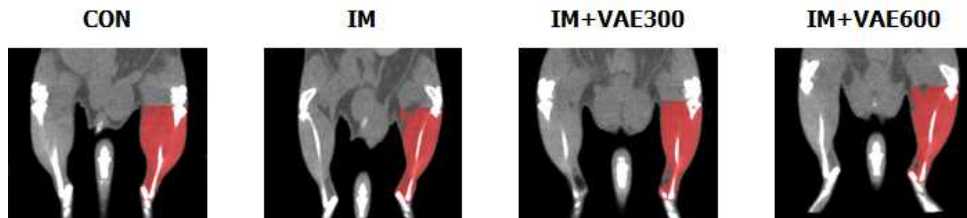


그림 2-2-47. 팔 에탄올 추출물의 근육 부피 증가 효과.

㉕ 근육 무게 증가 효과

- 실험동물을 희생한 뒤, 오른쪽 뒷다리의 장딴지근, 가자미근, 전경골근, 조적근을 적출하여 근육량을 측정하였다. 모든 근육 조직에서 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 무게가 감소하였다. 조적근을 제외한 다른 근에서 시료를 처리함에 따라 증가하였다(그림 2-2-48).

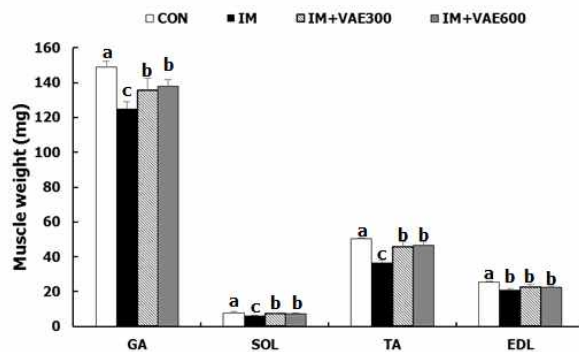


그림 2-2-48. 팔 에탄올 추출물의 근육량 증상 효과.

㉖ 근섬유 단면적 증가 효과

- 실험동물을 희생하고 장딴지근과 전경골근을 4% 포르말린으로 고정 한 뒤, 염색하여

그 단면적을 측정하였다. 전경골근에서 근감소증으로 인해 단면적이 현저하게 줄어들었으며, 시료에 따라서 농도의존적으로 증가하였다(그림 2-2-49). 장딴지근의 경우, 물리적으로 손상이 있었기 때문에 위성세포의 핵이 근단면적의 안으로 들어와 회복을 진행시킴을 관찰하였으며 이러한 현상이 시료를 처리함에 따라 개선되었음을 관찰하였다. 장딴지근도 전경골근과 마찬가지로 근섬유의 단면적이 감소하였다가 시료에 의해 농도의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다(그림 2-2-50).

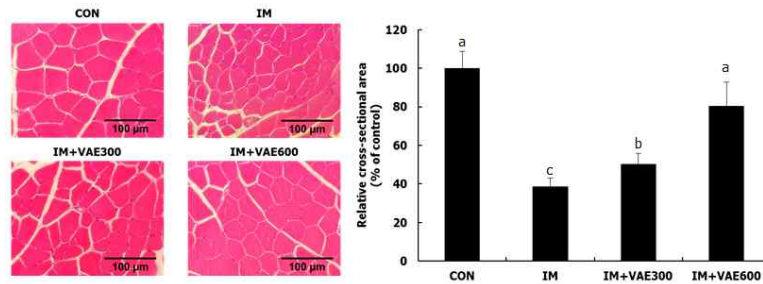


그림 2-2-49. 팔 에탄올 추출물의 전경골근 단면적 회복 촉진 효과.

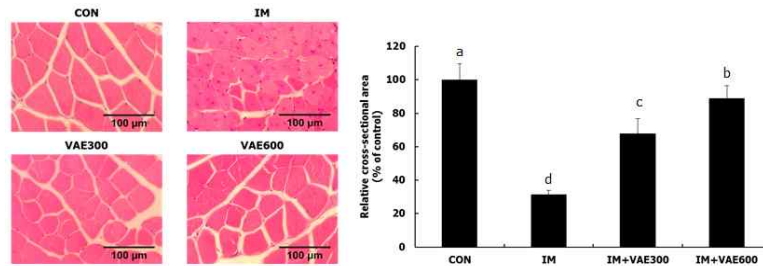


그림 2-2-50. 팔 에탄올 추출물의 장딴지근 단면적 회복 촉진 효과.

㉞ 근 단백질 분해 억제 활성

- 적출한 전경골근에서 mRNA를 분리하여 근 단백질 분해와 가장 밀접한 관련이 있는 생체지표 MuRF1과 atrogen-1의 발현량을 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 발현량이 현저하게 증가하였으나, 시료를 처리함에 따라 농도의존적으로 줄어드는 것을 확인하였다(그림 2-2-51). MuRF1과 atrogen-1을 조절하는 전사 조절인자인 p-FoxO3의 발현량을 관찰하였다. 그 결과, p-FoxO3의 발현량이 근감소증에서 가장 적게 발현되었음을 확인하였다(그림 2-2-52). 이는 MuRF1과 atrogen-1을 조절하는 FoxO3에 인산화가 붙으면서 핵으로 들어가지 못하게 되어 판단되며, 이에 따라 MuRF1과 atrogen-1의 발현량이 현저하게 감소한 것으로 해석된다.

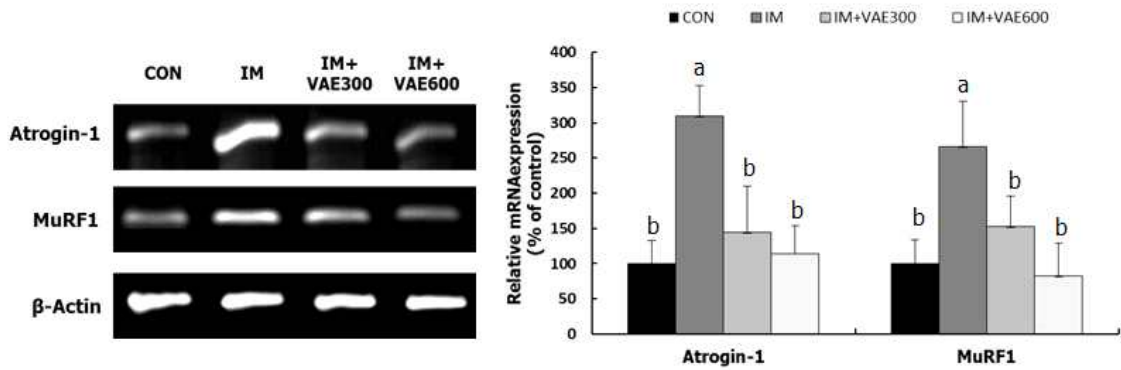


그림 2-2-51. 팔 에탄올 추출물이 MuRF1, atrogin-1의 변화량에 미치는 효과.

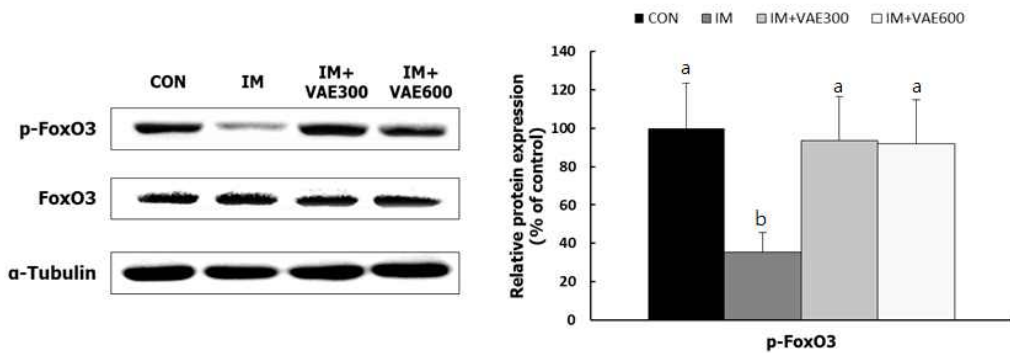


그림 2-2-52. 팔 에탄올 추출물이 FoxO3의 변화량에 미치는 효과.

㉔ 근 단백질 합성 촉진 활성

- 적출한 전경골근에서 단백질을 분리하여 근 단백질 합성과 가장 밀접한 관련이 있는 mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway의 변화를 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 발현량이 현저하게 감소하였으며, 시료를 처리함에 따라 농도 의존적으로 대조군만큼 회복되는 것을 확인하였다(그림 2-2-53). 또한, mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway를 조절하는 PI3K/Akt pathway의 변화량을 관찰한 결과, mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway와 비슷한 경향이 관찰되었다(그림 2-2-54). 이러한 결과는, 근 단백질의 합성에 있어서 일련의 신호전달 체계의 조절에 따른 것으로 해석된다.

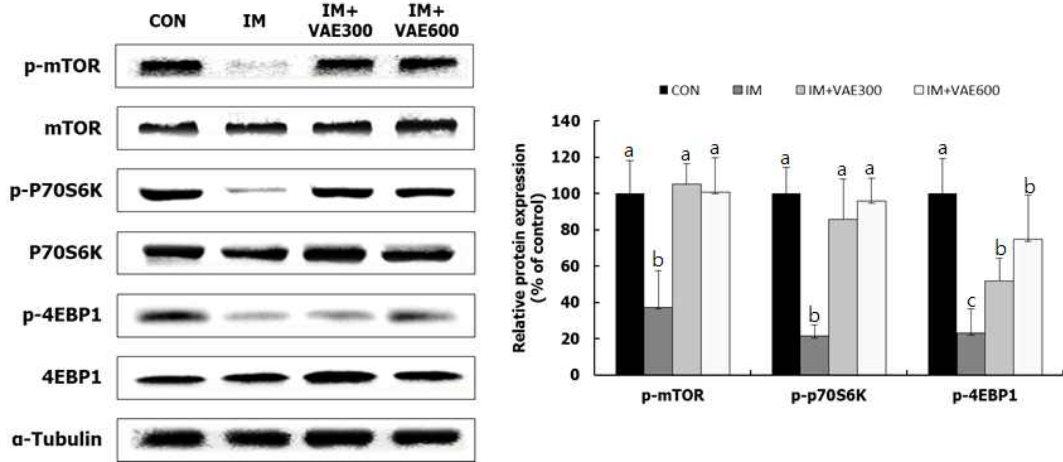


그림 2-2-53. 팔 에탄올 추출물이 mTOR/p70S6K/4EBP-1 세포신호 전달에 미치는 효과.

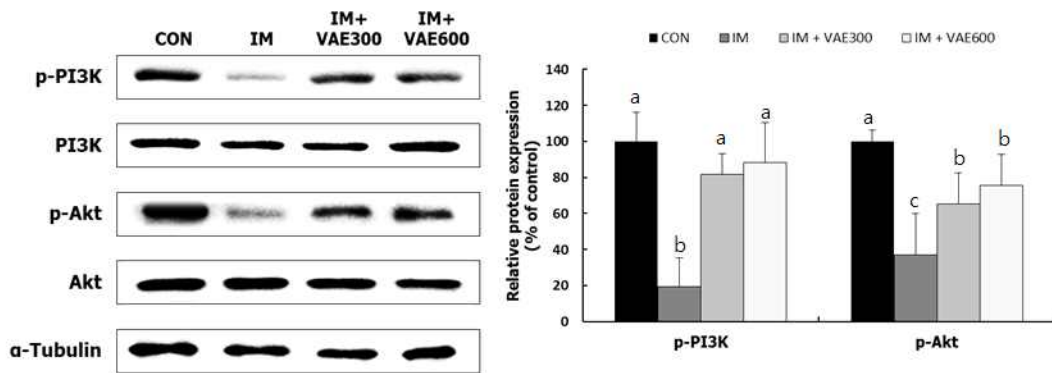


그림 2-2-54. 팔 에탄올 추출물이 PI3K/Akt 세포신호 전달에 미치는 효과.

㉠ 근육 분화 촉진 활성

- 적출한 장딴지근에서 mRNA를 분리하여 myoblast로부터 myotube로의 분화와 가장 관련이 있는 MyoD와 myogenin의 변화를 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 발현량이 현저하게 감소하였으며, 시료를 처리함에 따라 농도 의존적으로 대조군만큼 회복되는 것을 확인하였다(그림 2-2-55). 이러한 결과는, 손상된 근육이 팔 에탄올 추출물에 의해 빠르게 회복되는 것으로 해석될 수 있다.

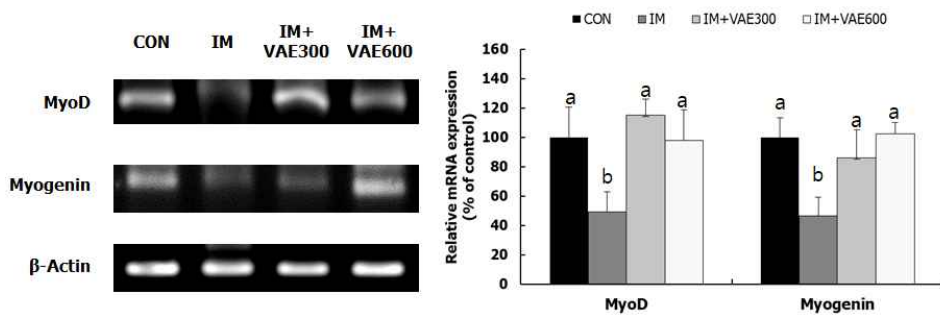


그림 2-2-55 팔 에탄올 추출물이 MyoD와 myogenin mRNA 발현에 미치는 효과.

(나) 프로테아제가 처리된 두류 추출물의 부동(Immobilization, 不動) 동물모델
근기능 개선 평가

① 실험 재료 및 방법

㉠ 동물 사육

- 실험동물로 생후 7주된 C57BL/6J 수컷 쥐를 Young Bio에서 구입하여 실험을 진행하였다. 모든 동물의 사육은 연세실험동물연구센터(Yonsei Laboratory Animal Research Center; YLARC)에서 진행되었으며, 사육실 환경은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$ 로 유지시켰다. 실험 시작 전, 총 18마리의 쥐를 무작위로 1군당 6마리씩, 총 4군으로 나누었다. 1주일간 적응시킨 후, 대조군(control; CON)을 제외한 나머지 군의 쥐 복강에 325 mg/kg의 tribromoethanol (Sigma-aldrich)을 주사하여 마취를 유도하였다. 마취 후, 쥐의 오른쪽 뒷다리(hindlimb) 장딴지근육(GA)과 오른쪽 발바닥을 skin stapler (Unidus)를 사용하여 스테이플러 심으로 근육을 손상시키고 오른쪽 뒷다리가 움직이지 못하게 하였으며 이 상태를 1주일 간 유지시켰다. 1주일 뒤에 장딴지근과 발바닥에 고정되어 있던 스테이플러 심을 제거하고 다시 1주일 간 프로제아제를 처리한 팔 추출물(Newtree Co. Ltd., Gyeonggi, Seoul)을 300 mg/kg 또는 600 mg/kg의 농도로 매일 경구 투여하여 회복을 유도하였다. 이 때, 대조군과 근감소증 유도군(immobilization-induced muscle atrophy group; IM)은 식염수로 경구투여를 실시하였다. 경구투여 기간이 끝난 후, 근력과 지구력을 측정하였다. 실험동물을 325 mg/kg의 tribromoethanol (Sigma-aldrich)을 다시 복강 주사하여 마취하고 심체혈을 통해 희생을 하였다. 심장박동이 멈춘 것을 확인한 뒤, 오른쪽 뒷다리에서 장딴지근, 가자미근(SOL), 전경골근(TA), 조적근(EDL)을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 근육은 다음 실험 진행을 위해 -70°C 에서 보관하였다.

㉡ 근력 측정

- 경구 투여 기간이 끝나고, 근력측정기(Chatillon force measurement system)를 이용하여 쥐의 근력을 측정하였다. 쥐가 근력측정기의 막대를 놓을 때까지 일정한 힘으로 쥐의 꼬리를 당겼으며, 한 마리당 총 5회 연속 테스트를 실시하였다

㉢ 지구력 측정

- 경구 투여 기간이 끝나고, 트레드밀 기기(LE8710MTS; Panlab)를 이용하여 실험동물의 운동수행능력을 평가하였다. 최초 8 m/min의 속도로 시작하여, 1분마다 1 m/min씩 속도를 높였다. 쥐가 shock grid에 닿았을 때 0.2 mA의 전기를 주도록 설정하였으며, 쥐가 전기충격을 10초간 받아도 더 이상 달리지 않는 시점에서 실험을 멈추고 시간과 거리를 측정하였다.

㉣ 근육 밀도 측정

- 희생하기 전, 쥐를 isoflurane으로 호흡 마취하고 microPET/CT/SPECT (positron emission tomography/computed tomography/single photon emission tomography,

INVEON)를 이용하여 오른쪽 뒷다리 근육의 부피 및 밀도를 측정하였다.

㉓ 조직학적 분석

- 적출한 오른쪽 장딴지근과 전경골근의 조직 일부를 떼어 10%포르말린(formalin)으로 고정시키고 파라핀 블록을 만들었다. 조직학적인 측면에서 근육의 단면적을 측정하기 위해 hematoxylin & eosin으로 조직을 염색하였으며, 염색된 조직은 eXcope T500 카메라(DIXI Science)가 장착된 광화학현미경(CK40; Olymupus)으로 관찰하였다. 근섬유를 촬영하여 image J 프로그램(National Institutes of Health)으로 단면적을 측정하였다.

㉔ RT-PCR

- 총 RNA를 얻기 위해, TRIzol시약(Takara)을 전경골근에 처리하여 근육세포를 깨뜨리고, chloroform 200 μ L을 넣었으며, 이를 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 무색의 상층액과 isopropanol을 1:1로 혼합하여 다시 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후 상층액을 버리고 에탄올 2회 washing 한 후, 건조된 RNA를 DEPC water에 녹이고 Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific)를 이용하여 정량하였다. 총 RNA를 수확한 다음 Reverse transcriptase premix (Elpis)를 이용하여 mRNA를 42 $^{\circ}$ C 55분, 70 $^{\circ}$ C 15분의 조건에서 cDNA로 역전사 시켰다. 합성된 cDNA를 그 다음은 아래와 같은 특정 프라이머(Bioneer, Deajeon, Korea)로 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems)를 이용하여 PCR을 수행하였다(표 2-2-10). PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다.

표 2-2-10. 프라이머 서열

| 생체지표 | 염기서열(5'-3') |
|------------------------|---------------------------|
| MuRF1 forward | TCTGCACTTAGAACACATAGCAGAG |
| MuRF1 reverse | TCTCCTTCTTCATTGGTGTCTTCT |
| Atrogin-1 forward | CAGTGATCCATTCTGTTCATCCTTG |
| Atrogin-1 reverse | TTATTTCCAGCCAAATGGAGAGAGA |
| IL-6 forward | CCGGAGAGGAGACTTCACAG |
| IL-6 reverse | TCCACGATTTCCCAGAGAAC |
| TNF- α forward | GCGGAGTCCGGGCAGGTCTA |
| TNF- α reverse | GGGGGCTGGCTCTGTGAGGA |
| MyoD forward | CAAGACCACCAACGCTGAT |
| MyoD reverse | CATCTGAGTCGCCACTGTAG |
| Myogenin forward | ACCTTCCTGTCCACCTTCAG |
| Myogenin reverse | CAGACTTCTCTTACACACC |
| β -Actin forward | CAGCTCAGTAACAGTCCGCC |
| β -Actin reverse | TCACTATTGGCAACGAGCGG |

㉕ Western blotting

- Proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)이 포함된 NP-40 완충용액(Elpis)으로 전경골근을 용해시켰다. 완충용액에 용해된 세포를 1.5 mL 튜브(tube)로 옮겨 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액만을 취하였다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.)법을 이용하여 정량된 단백질을 5분간 끓인 후 SDS-PAGE로 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 전달하였다. 1차 항체를 2.5% bovine serum albumin (BSA)에 1:1000의 비율로 희석하여 니트로셀룰로스 막에 전달된 단백질과 20시간 동안 상온에서 반응시켰다(표 2-2-11). 1차 항체를 반응시킨 다음 Tris-buffer Saline Tween 20 (TBST)을 이용하여 니트로셀룰로스 막을 10분간 3회 세척하였다. 세척 후, 1차 항체를 인지하는 horseradish peroxidase가 접합된 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체(Bethyl Laboratories, Inc.)를 2.5% BSA에 1:5000이 되도록 희석하여 니트로셀룰로스 막과 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, TBST를 이용하여 다시 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. Protein band는 ECL western blotting detection reagents (Amershamn)를 사용하여 발색하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene) 을 이용하여 발색된 protein band를 확인하였다.

표 2-2-11. 항체(Antibody) 정보

| 1차 antibody | 2차 antibody | Marker size(kDa) |
|-------------------|-------------|------------------|
| p-PI3K | Rabbit | 85 |
| PI3K | Rabbit | 85 |
| p-Akt | Rabbit | 60 |
| Akt | Rabbit | 60 |
| p-FoxO3 | Rabbit | 82~97 |
| FoxO3 | Rabbit | 82~97 |
| p-mTOR | Rabbit | 289 |
| mTOR | Rabbit | 289 |
| p-p70S6K | Rabbit | 70 |
| 70S6K | Rabbit | 70 |
| p-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| 4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| α -Tubulin | Rabbit | 52 |

㉠ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 23.0 통계 패키지(SPSS Inc.)를 통해 분석하였다. 유의성 조사는 분산분석(ANOVA)으로 비교한 후, 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan 다중범위 분석에 의해 검정하였다.

㉡ 결과 및 고찰

㉢ 근력 향상 효과

- 1주일의 경구투여 후, 희생하기 전에 근력을 측정하였다. 앞/뒤 다리 측정시, 정상군

에 비해 근감소증 유도군에서 근력이 감소하였으나, 시료를 처리함에 따라 근력이 다시 회복되는 것을 확인하였다. 이러한 경향과는 다르게 앞다리만 측정할 경우, 모든 군에서 변화가 없었다(그림 2-2-56).

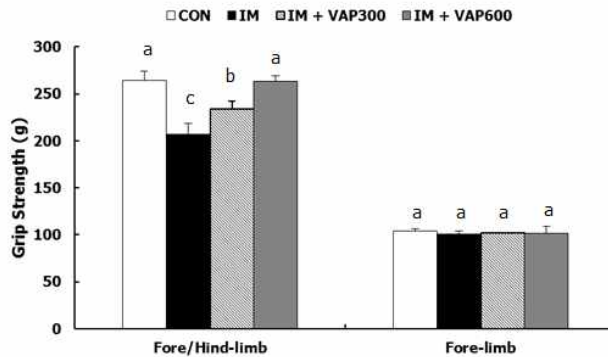


그림 2-2-56. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 근력 향상 효과.

㉠ 지구력 향상 효과

- Treadmill을 이용하여 실험 동물의 지구력을 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 운동 거리 및 시간이 감소하였으나, 시료를 처리함에 따라 근육이 회복되어 근운동 거리 및 시간이 증가하였다(그림 2-2-57).

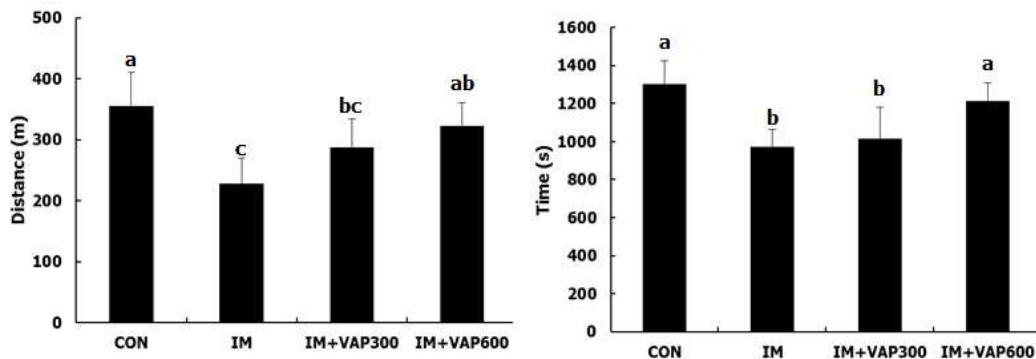


그림 2-2-57. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 지구력 향상 효과.

㉡ 근육 부피 증가 효과

- 근감소증을 일으킨 오른쪽 다리의 부피를 실험동물을 마취시킨 뒤, micro-CT를 통해 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증을 유도한 군에서 근육 부피가 감소하였으며 시료를 처리함에 따라 다시 회복되는 경향을 확인하였다(그림 2-2-58).



그림 2-2-58. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 근육 부피 증가 효과.

㉔ 근육 무게 증가 효과

- 실험동물을 희생한 뒤, 오른쪽 뒷다리의 장딴지근, 가자미근, 전경골근, 조적근을 적출하여 근육량을 측정하였다. 모든 근육 조직에서 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 무게가 감소하였다. 조적근을 제외한 다른 근에서 시료를 처리함에 따라 증가하였다(그림 2-2-59).

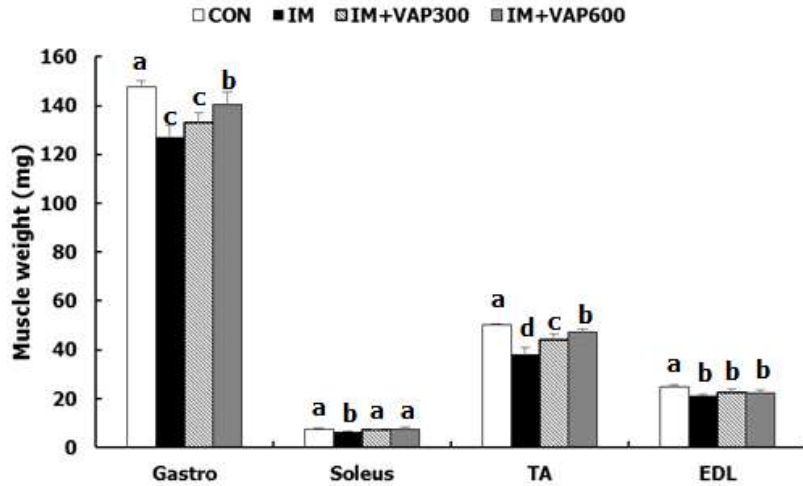


그림 2-2-59. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 근육량 증상 효과.

㉕ 근섬유 단면적 증가 효과

- 실험동물을 희생하고 장딴지근과 전경골근을 4% 포르말린으로 고정한 뒤, 염색하여 그 단면적을 측정하였다. 전경골근에서 근감소증으로 인해 단면적이 현저하게 줄어들었으며, 시료에 따라서 농도의존적으로 증가하였다(그림 2-2-60). 장딴지 근의 경우, 물리적으로 손상이 있었기 때문에 위성세포의 핵이 근단면적의 안으로 들어와 회복을 촉진하는 모습을 관찰할 수 있었으며, 이러한 현상이 시료를 처리함에 따라 개선되었음을 관찰하였다. 장딴지근도 전경골근과 마찬가지로 근섬유의 단면적이 감소하였다가 시료에 의해 농도의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다(그림 2-2-61).

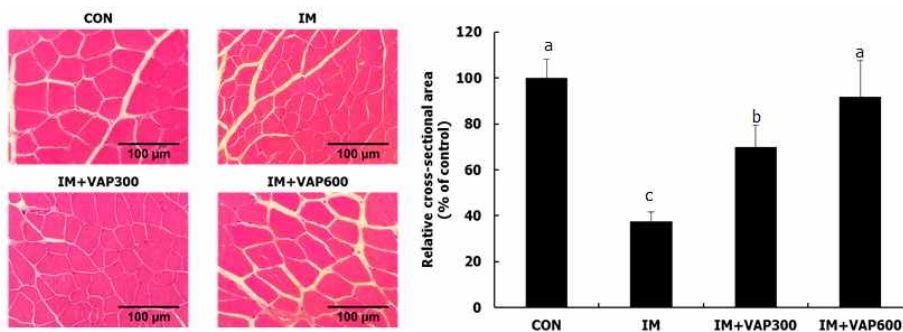


그림 2-2-60. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 전경골근 단면적 회복 촉진 효과.

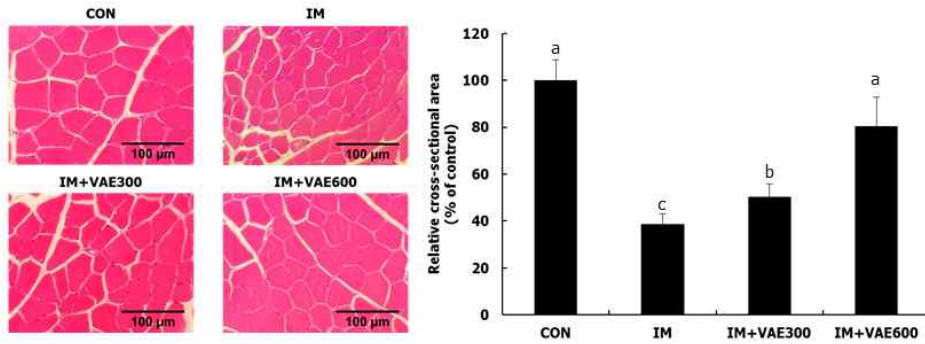


그림 2-2-61. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 장딴지근 단면적 회복 촉진 효과.

㉞ 근 단백질 분해 억제 활성

- 적출한 전경골근에서 mRNA를 분리하여 근 단백질 분해와 가장 밀접한 관련이 있는 생체지표 MuRF1과 atrogen-1의 발현량을 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 발현량이 현저하게 증가하였으나, 시료를 처리함에 따라 농도의존적으로 줄어드는 것을 확인하였다(그림 2-2-62). MuRF1과 atrogen-1을 조절하는 전사 조절인자인 p-FoxO3의 발현량을 관찰하였다. 그 결과, p-FoxO3의 발현량이 근감소증에서 가장 적게 발현되었음을 확인하였다(그림 2-2-63). 이는 MuRF1과 atrogen-1을 조절하는 FoxO3에 인산화가 붙으면서 핵으로 들어가지 못한 것으로 판단되며, 이에 따라 MuRF1과 atrogen-1의 발현량이 현저하게 감소한 것으로 해석된다.

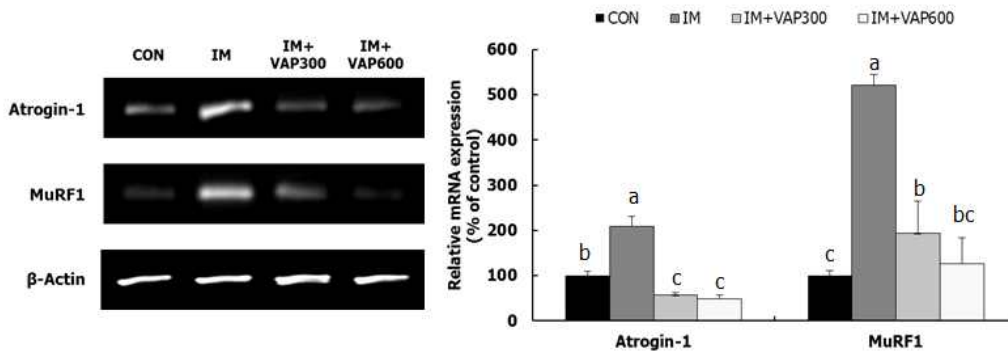


그림 2-2-62. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 MuRF1, atrogen-1의 변화량에 미치는 효과.

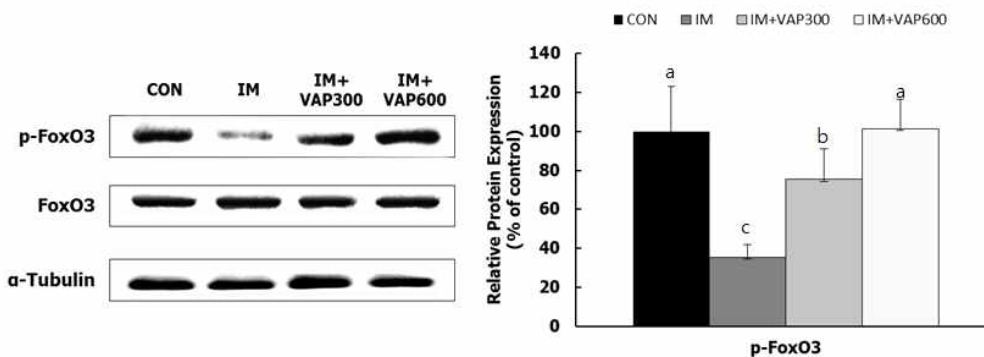


그림 2-2-63. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 FoxO3의 변화량에 미치는 효과.

㉔ 근 단백질 합성 촉진 활성

- 적출한 전경골근에서 단백질을 분리하여 근 단백질 합성과 가장 밀접한 관련이 있는 mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway의 변화를 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 발현량이 현저하게 감소하였으며, 시료를 처리함에 따라 농도 의존적으로 정상수치만큼 회복되는 것을 확인하였다(그림 2-2-64). 또한, mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway를 조절하는 PI3K/Akt pathway의 변화량을 관찰한 결과, mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway와 비슷한 경향이 관찰되었다(그림 2-2-65). 이러한 결과는, 근 단백질의 합성에 있어서 일련의 신호전달 체계의 조절에 따른 것으로 해석된다.

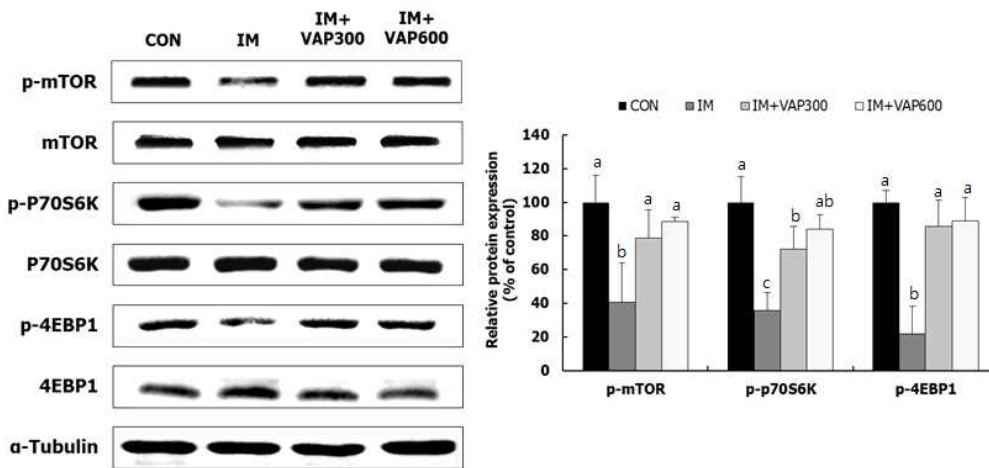


그림 2-2-64. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 mTOR/p70S6K/4EBP-1 세포신호 전달에 미치는 효과.

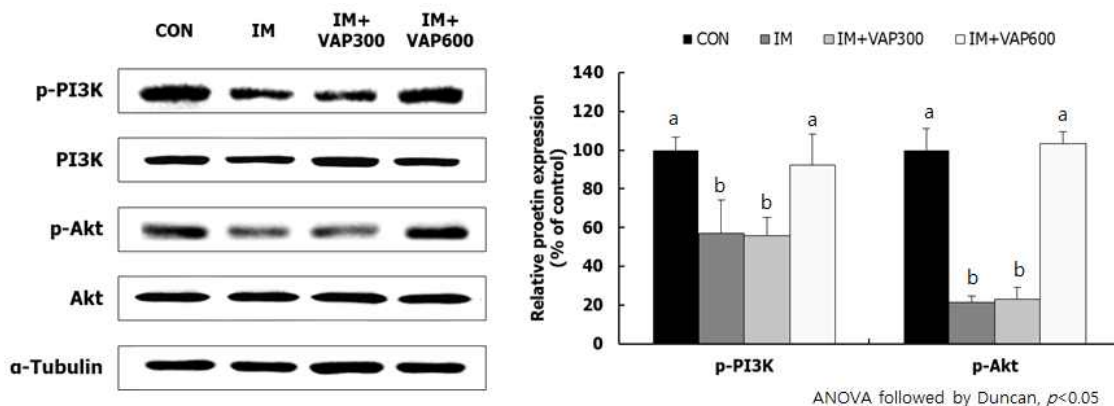


그림 2-2-65. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 PI3K/Akt 세포신호 전달에 미치는 효과.

㉕ 염증성 사이토카인 억제 활성

- 근감소증을 유발하는데 있어서, 염증성 사이토카인은 유발을 개시하거나 촉진하는 역할을 한다. 적출한 전경골근에서 mRNA를 분리하여, 대표적인 염증성 사이토카인, TNF- α 와 IL-6의 변화량을 측정한 결과, 근감소증이 유발된 군에서는 발현량이 정

산균에 비해 크게 증가한 반면, 시료를 처리함에 따라 발현량이 감소하는 것을 확인하였다(그림 2-2-66).

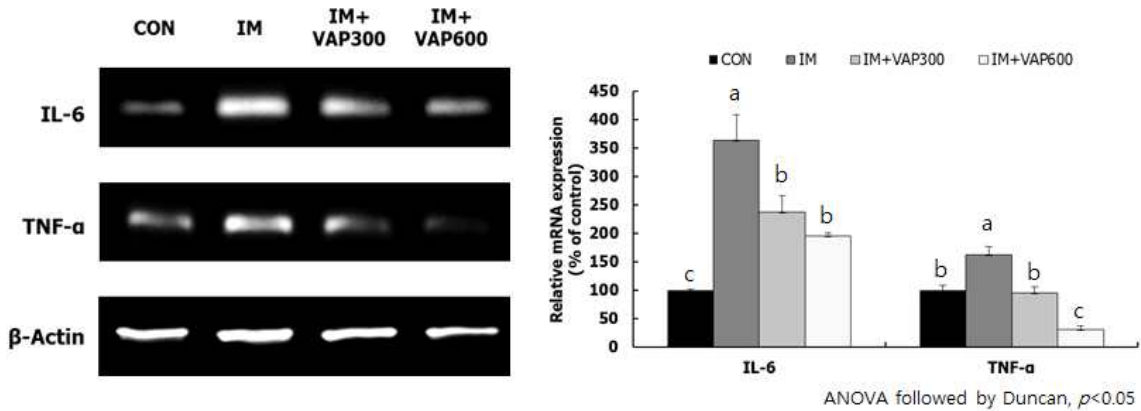


그림 2-2-66. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 TNF- α , IL-6의 변화량에 미치는 효과.

㉔ 근육 분화 촉진 활성

- 적출한 장딴지근에서 mRNA를 분리하여 myoblast로부터 myotube로의 분화와 가장 관련이 있는 MyoD와 myogenin의 변화를 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증 유도군에서 발현량이 현저하게 감소하였으며, 시료를 처리함에 따라 농도 의존적으로 대조군만큼 회복되는 것을 확인하였다(그림 2-2-67). 이러한 결과는, 손상된 근육이 시료에 의해 빠르게 회복되는 것으로 해석될 수 있다.

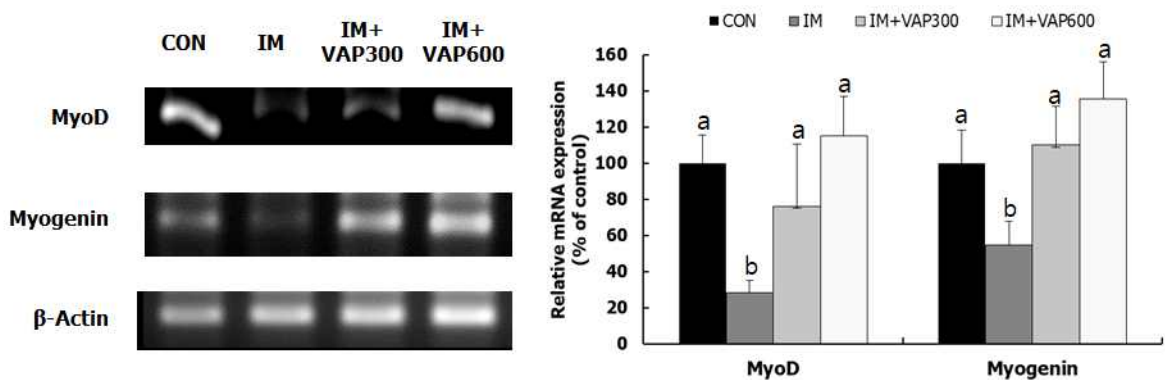


그림 2-2-67. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 MyoD와 myogenin mRNA 발현에 미치는 효과.

(다) 프로테아제가 처리된 두류 추출물의 노화 동물모델 근기능 개선 평가

① 실험 재료 및 방법

㉔ 동물 사육

- 실험동물로 생후 18개월 및 8주령된 C57BL/6J 수컷 쥐를 한국기초과학지원연구원 (Korea Basic Science Institute, Seongnam, Gwangju, Korea)에서 구입하여 실험을 진행하였다. 모든 동물의 사육은 연세실험동물연구센터(Yonsei Laboratory Animal

Reaserch Center)에서 진행되었으며, 사육실 환경은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$ 로 유지시켰다. 실험 시작 전, 8주령 쥐를 젊은 쥐(Young)으로 지정하였으면, 총 45마리의 노화쥐를 무작위로 1군당 15마리씩, 총 3군으로 노화쥐(Old), 노화쥐에 200 mg/kg/day 프로테아제가 처리된 팔 추출물 처리군(Old+VAP200), 노화쥐에 400 mg/kg/day 프로테아제가 처리된 팔 추출물 처리군(Old+VAP400)으로 나누었다. 1주일 간 적응시킨 후, Old+VAP200과 Old+VAP400에 속한 쥐에게 프로테아제가 처리된 팔 추출물(VAP; Newtree Co. Ltd.)을 200 mg/kg/day, 400 mg/kg/day로 경구투여를 2달간 진행하였다. 이 때, Young군과 Old군에 속한 쥐에게는 샘플 대신 생리식염수로 경구투여를 하였다. 2달 동안, 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 경구투여 기간이 끝난 후, 근력과 지구력, 근육 부피를 측정하였다. 실험동물을 325 mg/kg의 tribromoethanol (Sigma-aldrich)을 복강 주사하여 마취하고 심채혈을 통해 희생을 하였다. 심장박동이 멈춘 것을 확인한 뒤, 오른쪽 뒷다리에서 장딴지근(GA), 가자미근(SOL), 전경골근(TA), 조적근(EDL), 피하지방(subcutaneous fat), 신지방(perirenal fat), 부고환지방(epididymal fat), 간, 비장을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 조직 및 혈액은 다음 실험 진행을 위해 -70°C 에서 보관하였다.

㉠ 근력 측정

- 경구 투여 기간이 끝나고, 근력측정기(BioSeb, Chaville, France)를 이용하여 쥐의 근력을 측정하였다. 쥐가 근력측정기의 막대를 놓을 때까지 일정한 힘으로 쥐의 꼬리를 당겼으며, 한 마리당 총 5회 연속 테스트를 실시하였다

㉡ 지구력 측정

- 경구 투여 기간이 끝나고, 트레드밀 기기(LE8710MTS; Panlab)를 이용하여 실험동물의 운동수행능력을 평가하였다. 최초 10 m/s의 속도로 시작하여, 1 분마다 1 m/s씩 속도를 높였으며 41 m/s가 되었을 때 속도를 높이지 않고 계속 뛰게 하였다. 쥐가 shock grid에 닿았을 때 0.2 mA의 전기를 주도록 설정하였으며, 쥐가 전기충격을 100번 받아도 더 이상 달리지 않는 시점에서 실험을 멈추고 시간과 거리를 측정하였다.

㉢ 근육 밀도 측정

- 희생하기 전, 쥐를 isoflurane으로 호흡 마취하고 microPET/CT/SPECT (positron emission tomography/computed tomography/single photon emission tomography, INVEON)를 이용하여 오른쪽 뒷다리 근육의 부피 및 밀도를 측정하였다.

㉣ 간독성 평가

- 심채혈을 통해 채취한 혈액을 15분 간 상온에 방치하였다. 6,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 혈액 내 간독성 지표 aspartate transaminase (AST)과 alanine transaminase (ALT) 함량을 (주)녹십자랩셀(Gyeong-gi, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

㉞ 혈액 내 콜레스테롤 함량 측정

- 심채혈을 통해 채취한 혈액을 15분 간 상온에 방치하였다. 6,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 혈액 내 total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol 함량을 (주)녹십자랩셀(Gyeong-gi, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

㉟ 조직학적 분석

- 적출한 오른쪽 장딴지근의 조직 일부를 떼어 10%포르말린(formalin)으로 고정시키고 파라핀 블록을 만들었다. 조직학적인 측면에서 근육의 단면적을 측정하기 위해 hematoxylin & eosin으로 조직을 염색하였으며, 염색된 조직은 eXcope T500 카메라(DIXI Science)가 장착된 광화현미경(CK40; Olymupus)으로 관찰하였다. 근섬유를 촬영하여 image J 프로그램(National Institutes of Health)으로 단면적을 측정하였다.

㊱ RT-PCR

- 총 RNA를 얻기 위해, TRIzol시약(Takara)을 장딴지근과 가자미근에 처리하여 근육세포를 깨뜨리고, chloroform 200 μ L을 넣었으며, 이를 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 무색의 상층액과 isopropanol을 1:1로 혼합하여 다시 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후 상층액을 버리고 에탄올 2회 washing 한 후, 건조된 RNA를 DEPC water에 녹이고 Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific)를 이용하여 정량하였다. 총 RNA를 수확한 다음 Reverse transcriptase premix (Elpis)를 이용하여 mRNA를 42 $^{\circ}$ C 55분, 70 $^{\circ}$ C 15분의 조건에서 cDNA로 역전사 시켰다. 합성된 cDNA를 그 다음은 아래와 같은 특정 프라이머(Bioneer, Deajeon, Korea)로 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems)를 이용하여 PCR을 수행하였다(표 2-2-12). PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다.

표 2-2-12. 프라이머 서열

| 생체지표 | 염기서열(5'-3') |
|------------------------|----------------------------|
| MuRF1 forward | TCTGCACTTAGAACACATAGCAGAG |
| MuRF1 reverse | TCTCCTTCTCATTGGTGTCTTCT |
| Atrogin-1 forward | CAGTGATCCATTCTGTTTCATCCTTG |
| Atrogin-1 reverse | TTATTTCCAGCCAAATGGAGAGAGA |
| MyoD forward | CAAGACCACCAACGCTGAT |
| MyoD reverse | CATCTGAGTCGCCACTGTAG |
| Myogenin forward | ACCTTCCTGTCCACCTTCAG |
| Myogenin reverse | CAGACTTCCTTTACACACC |
| PGC-1 α forward | GTCCTTCCTCCATGCCTGAC |
| PGC-1 α reverse | GACTGCGGTTGTGTATGGGA |

| | |
|------------------------|----------------------|
| ERR α forward | AGTGTGAGATCACCAAGCGG |
| ERR α reverse | GGCGTACAGCTTCTCAGGTT |
| NRF-1 forward | CTTCATGGAGGAGCACGGAG |
| NRF-1 reverse | ATGAGGCCGTTTCCGTTTCT |
| Tfam forward | GAGCGTGCTAAAAGCACTGG |
| Tfam reverse | CCACAGGGCTGCAATTTTCC |
| β -Actin forward | CAGCTCAGTAACAGTCCGCC |
| β -Actin reverse | TCACTATTGGCAACGAGCGG |

㉔ Western blotting

- Proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)이 포함된 NP-40 완충용액(Elpis)으로 장판지근을 용해시켰다. 완충용액에 용해된 세포를 1.5 mL 튜브(tube)로 옮겨 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액만을 취하였다. Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.)법을 이용하여 정량된 단백질을 5분간 끓인 후 SDS-PAGE로 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 전달하였다. 1차 항체를 2.5% bovine serum albumin (BSA)에 1:1000의 비율로 희석하여 니트로셀룰로스 막에 전달된 단백질과 20시간 동안 상온에서 반응시켰다(표 2-2-13). 1차 항체를 반응시킨 다음 Tris-buffer Saline Tween 20 (TBST)을 이용하여 니트로셀룰로스 막을 10분간 3회 세척하였다. 세척 후, 1차 항체를 인지하는 horseradish peroxidase가 접합된 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체(Bethyl Laboratories, Inc.)를 2.5% BSA에 1:5000이 되도록 희석하여 니트로셀룰로스 막과 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, TBST를 이용하여 다시 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. Protein band는 ECL western blotting detection reagents (Amershamn)를 사용하여 발색하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene)을 이용하여 발색된 protein band를 확인하였다.

표 2-2-13. 항체(Antibody) 정보

| 1차 antibody | 2차 antibody | Marker size(kDa) |
|-------------|-------------|------------------|
| p-PI3K | Rabbit | 85 |
| PI3K | Rabbit | 85 |
| p-Akt | Rabbit | 60 |
| Akt | Rabbit | 60 |
| p-FoxO3 | Rabbit | 82~97 |
| FoxO3 | Rabbit | 82~97 |
| p-mTOR | Rabbit | 289 |
| mTOR | Rabbit | 289 |
| p-p70S6K | Rabbit | 70 |
| 70S6K | Rabbit | 70 |
| p-4EBP1 | Rabbit | 15~20 |
| 4EBP1 | Rabbit | 15~20 |

㉞ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 23.0 통계 패키지(SPSS Inc.)를 통해 분석하였다. 유의성 조사는 분산분석(ANOVA)으로 비교한 후, 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan 다중범위 분석에 의해 검정하였다.

② 실험 결과

㉟ 체중 및 식이섭취 변화량

- 실험 동물 사육 기간 동안 체중 및 식이량을 주 1회 측정하였다. Young군과 비교하여 Old군, Old+VAP200군, Old+VAP400군과 유의한 차이를 보였으나, Young군을 제외한 나머지 군간에는 서로 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Young군은 1주일 이 지남에 따라 체중이 증가하여 약 4 g이 증가하였으나, 나머지 군에서 약 1 g 정도 감소하였다(그림 2-2-68). 식이 섭취량은 실험 동물 사육 기간 동안 군 간의 유의한 차이가 없었다(그림 2-2-69).

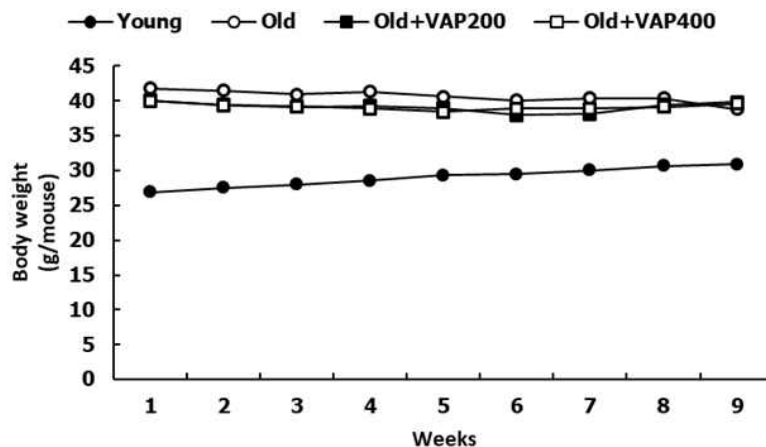


그림 2-2-68. 체중 변화량.

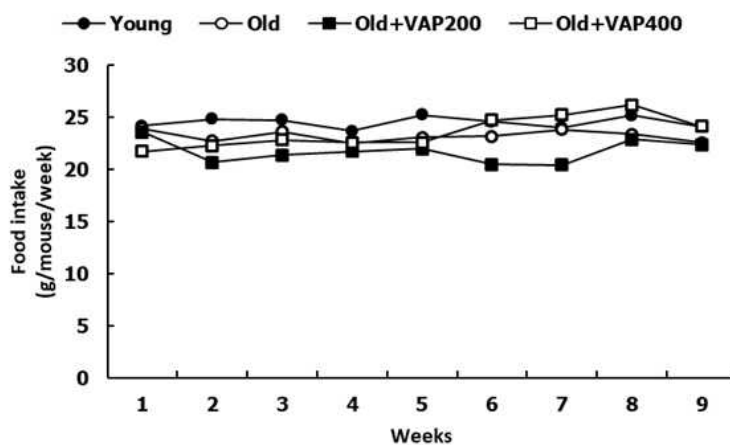


그림 2-2-69. 식이 섭취량.

㉠ 근육 향상 효과

- 2달 동안의 경구투여가 끝난 후, 근육을 측정하였다. Young군에 비해 Old군에서 근육이 감소하였으나, 시료를 처리하였을 때, 앞/뒤 다리 측정 및 앞 다리 측정 모두 근육이 증가하는 것을 확인하였다. 근육을 무게로 보정하였을 때, 동일한 경향을 나타내었다(그림 2-2-70)

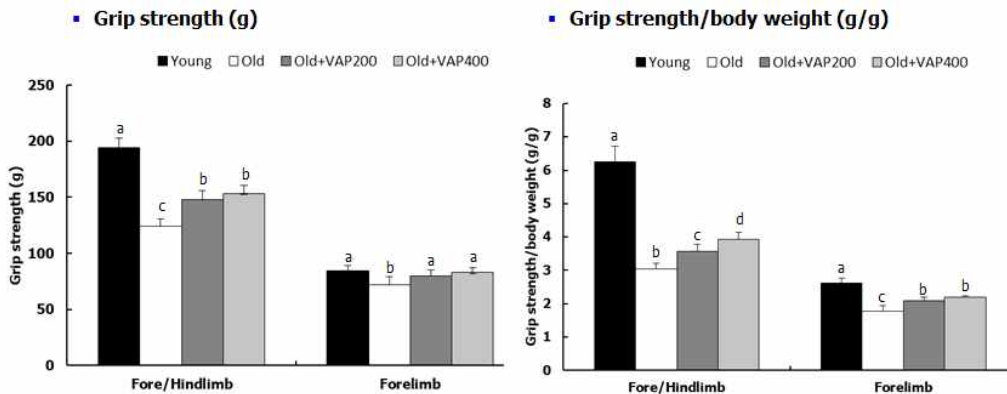


그림 2-2-70. 펩타이드가 처리된 팔 추출물의 근육 향상 효과.

㉠ 지구력 향상 효과

- Treadmill을 이용하여 실험 동물의 지구력을 측정하였다. Young군에 비해 Old군에서 달리는 시간과 거리가 유의적으로 감소하였으나, 시료를 처리하였을 때, 시간과 거리도 Young과 비슷한 수준으로 증가하였다. 특히, 200 mg/kg의 VAP를 처리한 군(Old+VAP200)에서 평균적으로 400 mg/kg/day의 VAP를 처리한 군(Old+VAP400)보다 더 많이 지구력이 향상되었으나, 군간의 유의차는 없었다(그림 2-2-71).

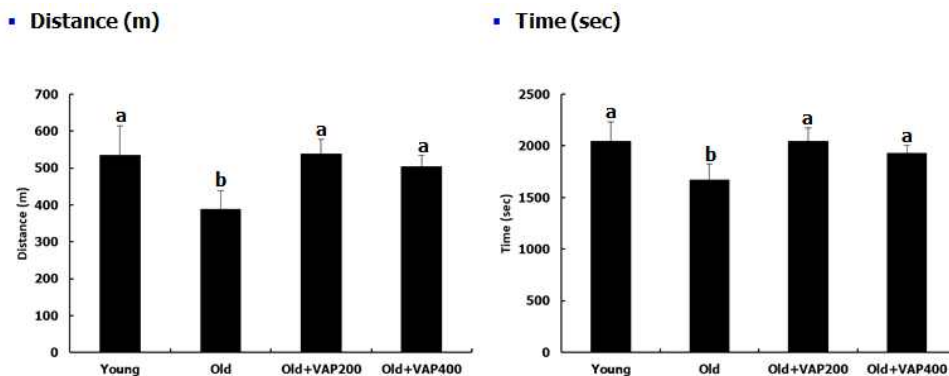


그림 2-2-71. 펩타이드가 처리된 팔 추출물의 지구력 향상 효과.

㉠ 근육 무게 증가 효과

- 근감소증을 일으킨 오른쪽 다리의 부피를 실험동물을 마취시킨 뒤, micro-CT를 통해 측정하였다. 정상군에 비해 근감소증을 유도한 군에서 근육 부피가 감소하였으며 시료를 처리함에 따라 다시 회복되는 경향을 확인하였다(그림 2-2-72).

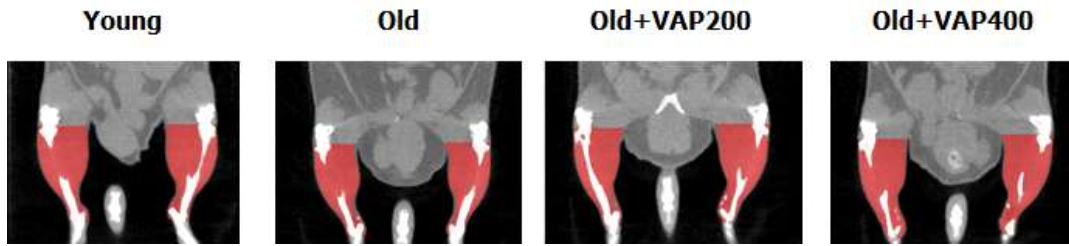


그림 2-2-72. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 근육 부피 증가 효과.

㉞ 근육 무게 증가 효과

- 노화로 인한 근감소증을 평가하기 위해서, 쥐를 희생하고 근육을 적출하여 근육량을 측정하였다. 가자미근을 제외한 다른 모든 근육 조직에서 Young군에 비해 Old 군에서 무게가 감소하였다. 시료에 의해 전경골근과 장딴지근의 무게가 농도 의존적으로 증가하였으나, 장지신근에서는 변화가 없었다. 가자미근의 경우, 400 mg/kg/day의 VAP을 처리했을 때만 유의적으로 증가하였다. 근육 무게를 체중으로 보정하였을 때, 동일한 경향을 나타내었다(그림 2-2-73).

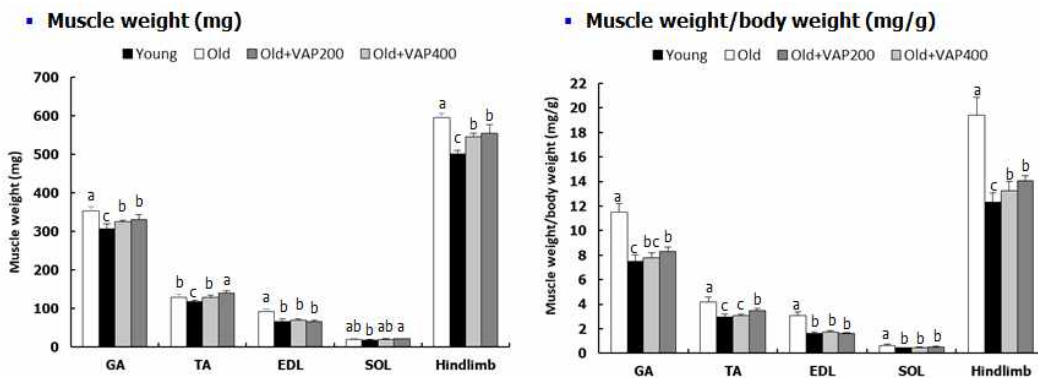
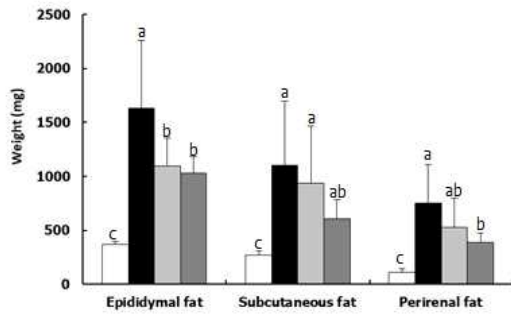


그림 2-2-73. 펩타이드가 처리된 팔 추출물의 근육량 증상 효과.

㉞ 지방 무게 감소 효과

- 경구투여가 끝난 후, 피하지방(subcutaneous fat), 신지방(perirenal fat), 부고환지방(epididymal fat)을 적출하여 무게를 측정하였다. 모든 지방 조직에서 Young군에 비해, Old군에서 지방 함량이 증가하였으나, 시료를 처리하였을 때 유의적으로 함량이 감소하는 것을 확인하였다. 몸무게가 젊은 쥐와 노화쥐가 다르므로 지방 무게를 체중으로 보정하였으며, 이 때도 동일한 결과를 확인하였다(그림 2-2-74).

▪ Tissue weight (mg)



▪ Tissue weight/body weight (mg/g)

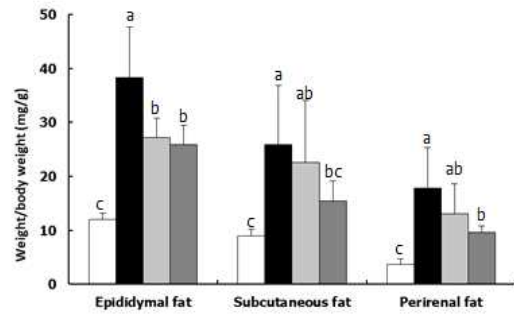
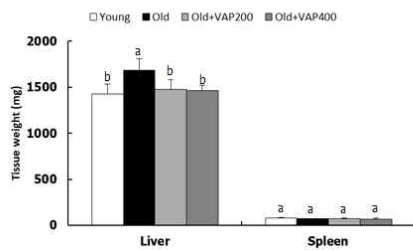


그림 2-2-74. 펩타이드가 처리된 팔 추출물의 지방 감소 효과.

㉔ 간과 비장 무게 변화

- 간과 비장의 무게를 적출하여 무게를 측정하였다. 간의 경우, Old군이 나머지 3군에 비해 유의적으로 증가하였으며, Old를 제외한 모든 군 간에는 유의적인 차이가 없었다. 무게로 보정했을 때, 시료를 처리한 군에서 간의 무게가 Old군과 Young군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 이는 Old군에 지방으로 인한 지방간에 의한 것으로 그 무게가 Young군만큼 증가한 것으로 사료되나, 추가적인 연구가 필요하다. 비장의 경우, 모든 군에서 그 무게가 동일하였으며, 체중으로 보정하였을 때, 노화쥐가 젊은쥐에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(그림 2-2-75).

▪ Tissue weight (mg)



▪ Tissue weight/body weight (mg/g)

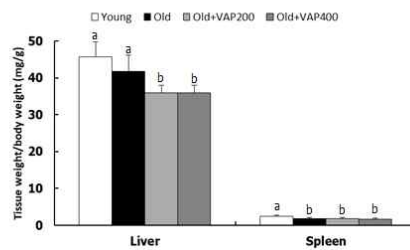


그림 2-2-75. 펩타이드가 처리된 팔 추출물이 간과 비장에 미치는 영향.

㉕ 간독성 지표 변화

- 모든 군에서 간에 손상이 있을 때 혈액 내로 분출되는 지표인 AST와 ALT의 변화가 없었다. 이는 본 실험에 사용된 펩타이드가 처리된 팔 추출물이 2달 동안 경구투여를 하였음에도 불구하고, 어떠한 독성이 나타나지 않았음을 의미한다. 이는 본 실험에 사용된 시료가 안전하게 사용될 수 있음을 제시한다(그림 2-2-76).

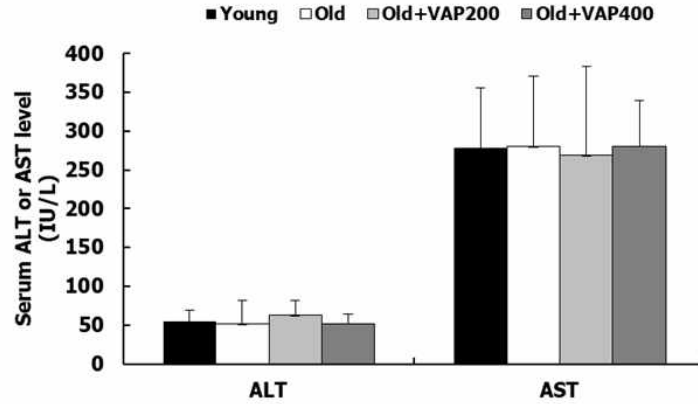


그림 2-2-76. 펩타이드가 처리된 팔 추출물의 안전성 평가.

㉔ 혈중 내 콜레스테롤 변화

- 모든 군에서 total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol의 변화가 없었다(그림 2-2-77). 항비만 실험에서 지방의 감소에 따른 혈중 지질 profile도 개선될 것으로 예측했으나, 예상과 달리 변화가 없었다.

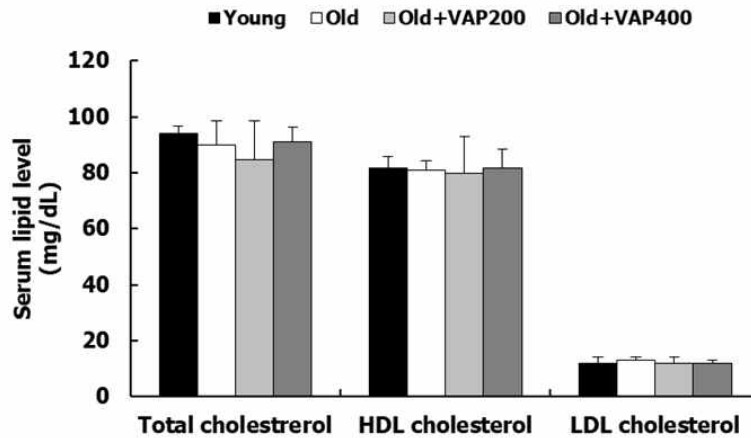


그림 2-2-77. 펩타이드가 처리된 팔 추출물에 의한 콜레스테롤 함량 변화.

㉔ 근섬유 단면적 증가 효과

- 실험동물을 희생하고 장딴지근을 4% 포르말린으로 고정한 뒤, 염색하여 그 단면적을 측정하였다. 장딴지근에서 노화로 인한 근감소증으로 인해 단면적이 현저하게 줄어들었으며, 시료에 따라서 농도의존적으로 증가하였다(그림 2-2-78).

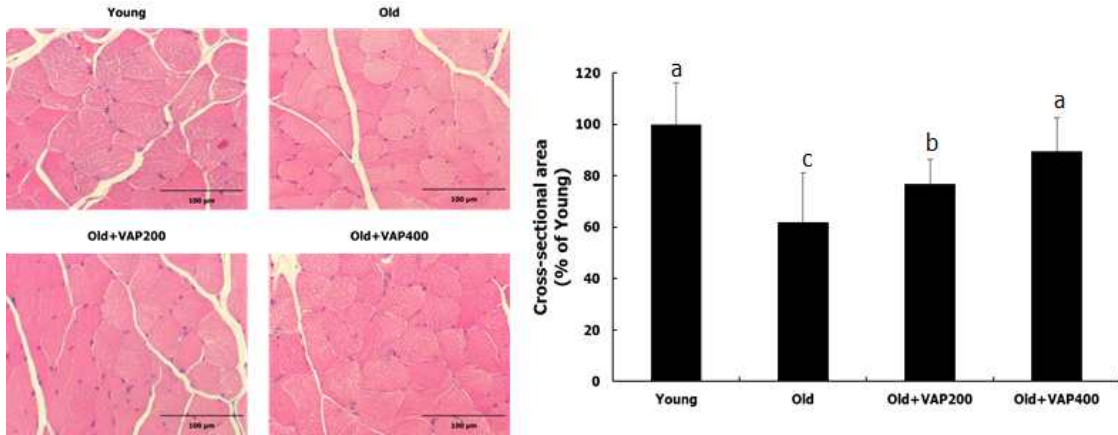


그림 2-2-78. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 장딴지근 단면적 증가 효과.

㉑ 미토콘드리아 생합성 촉진 활성

- 적출한 가자미근에서 mRNA를 분리하여 미토콘드리아 생합성과 가장 밀접한 관련이 있는 생체지표 PGC-1 α , ERR α , NRF-1, Tfam의 발현을 측정하였다. 젊은 쥐에 비해 노화쥐에서 발현량이 현저하게 유의적으로 감소하였으나, 시료를 처리함에 따라 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(그림 2-2-79).

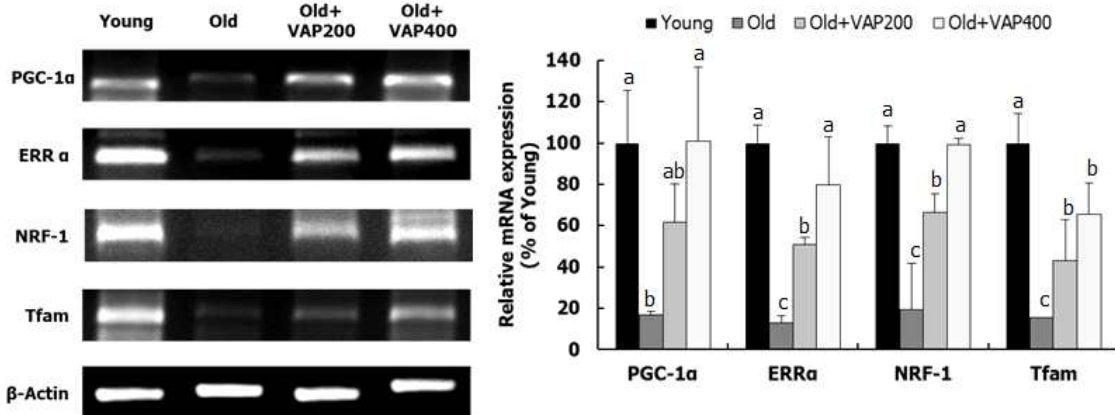


그림 2-2-79. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 미토콘드리아 생합성 촉진 효과.

㉒ 근 단백질 분해 억제 활성

- 적출한 장딴지근에서 mRNA를 분리하여 근 단백질 분해와 가장 밀접한 관련이 있는 생체지표 MuRF1과 atrogen-1의 발현량을 측정하였다. 젊은쥐에 비해 노화쥐에서 발현량이 현저하게 증가하였으나, 시료를 처리함에 따라 농도의존적으로 줄어드는 것을 확인하였다(그림 2-2-80). MuRF1과 atrogen-1을 조절하는 전사 조절인자인 p-FoxO3의 발현량을 관찰하였다. 그 결과, p-FoxO3의 발현량이 근감소증에서 가장 적게 발현되었음을 확인하였다(그림 2-2-81). 이는 MuRF1과 atrogen-1을 조절하는 FoxO3에 인산화가 붙으면서 핵으로 들어가지 못한 것으로 판단되며, 이에 따라 MuRF1과 atrogen-1의 발현량이 현저하게 감소한 것으로 해석된다.

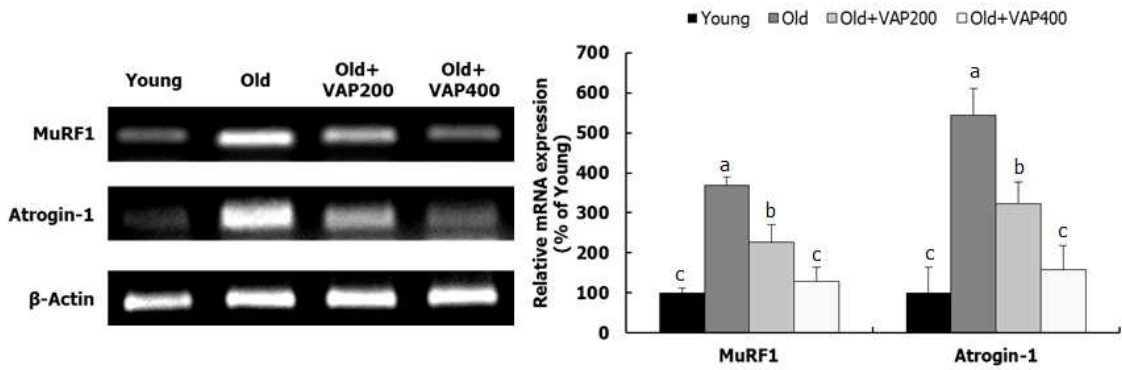


그림 2-2-80. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 MuRF1, atrogin-1의 변화량에 미치는 효과.

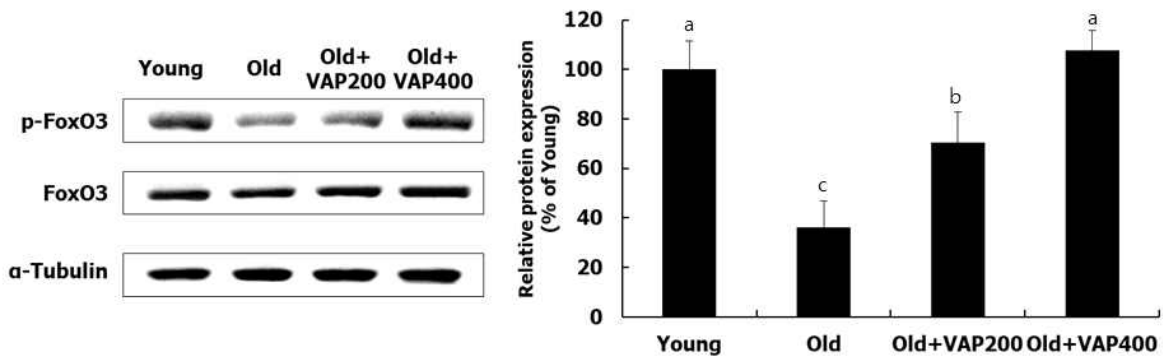


그림 2-2-81. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 FoxO3의 변화량에 미치는 효과.

㉠ 근 단백질 합성 촉진 활성

- 적출한 장딴지근에서 단백질을 분리하여 근 단백질 합성과 가장 밀접한 관련이 있는 mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway를 조절하는 PI3K/Akt pathway의 변화를 측정하였다. 젊은쥐에 비해 노화쥐에서 근감소증 유도군에서 발현량이 PI3K와 Akt 단백질이 현저하게 감소하였으며, 시료를 처리함에 따라 농도 의존적으로 정상수치만큼 회복되는 것을 확인하였다(그림 2-2-82).

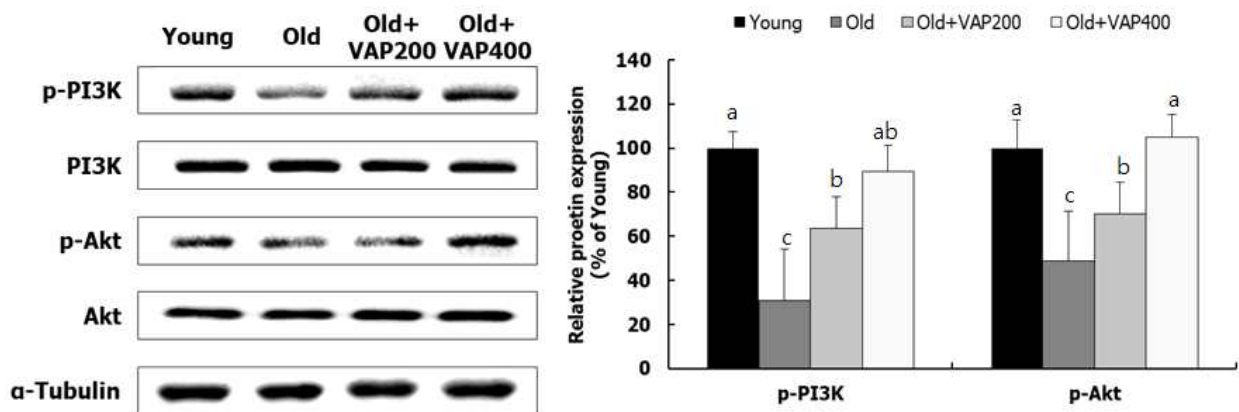


그림 2-2-82. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 PI3K/Akt 세포신호 전달에 미치는 효과.

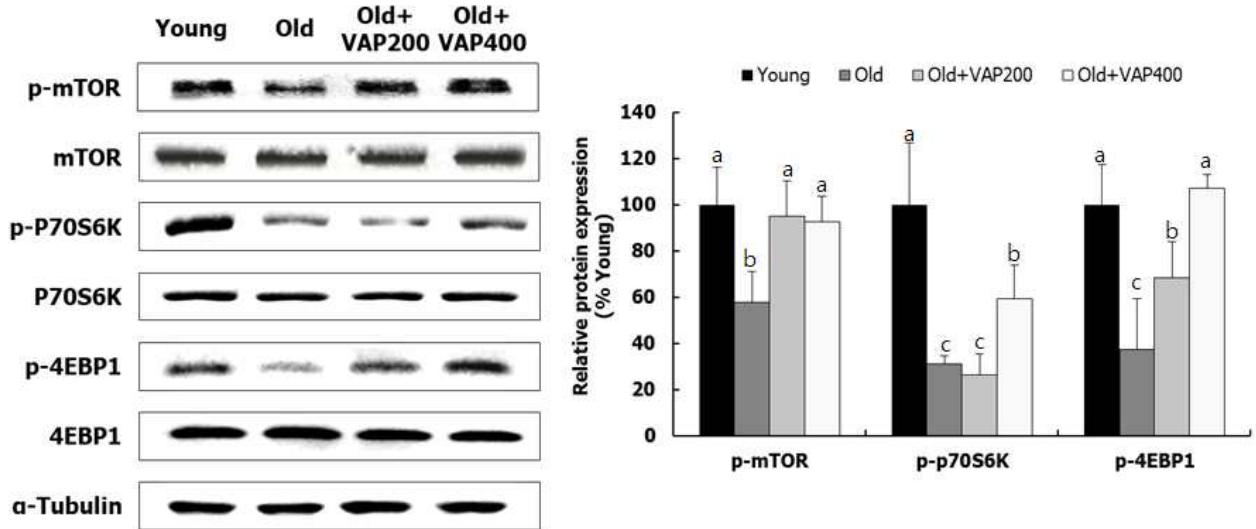


그림 2-2-83. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 mTOR/p70S6K/4EPB-1 세포신호 전달에 미치는 효과.

㉠ 근육 분화 촉진 활성

- 적출한 장딴지근에서 mRNA를 분리하여 myoblast로부터 myotube로의 분화와 가장 관련이 있는 MyoD와 myogenin의 변화를 측정하였다. Young군에 비해 Old군에서 발현량이 현저하게 감소하였으며, 시료를 처리함에 따라 농도 의존적으로 Young만큼 회복되는 것을 확인하였다(그림 2-2-84).

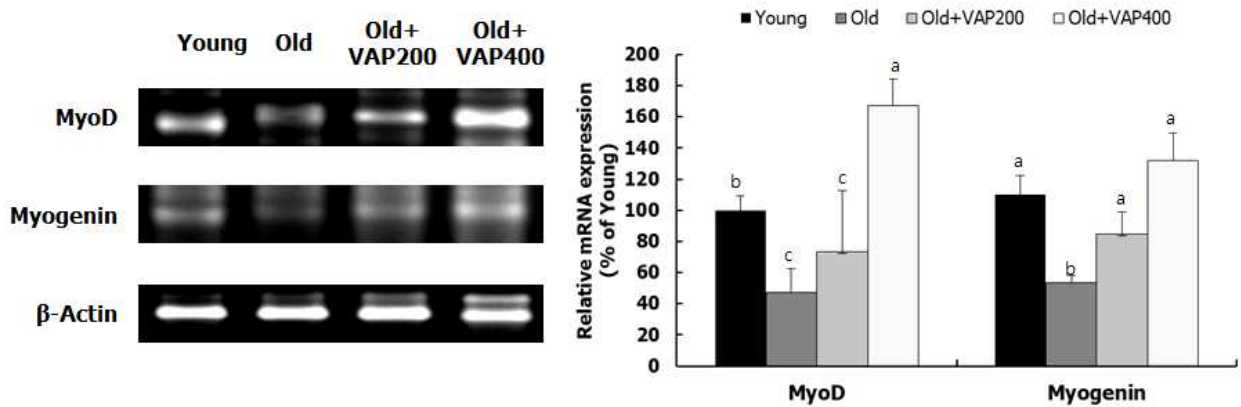


그림 2-2-84. 프로테아제가 처리된 팔 추출물이 MyoD와 myogenin mRNA 발현에 미치는 효과.

(3) 3차년도 수행내용 및 결과

(가) 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 복합 제제화 기술 개발

① 실험 재료 및 방법

㉠ 시료제작

- 주관기관에서 임상시험에 사용한 팔 추출물과 동일한 공정으로 실험실에서 추출물을 제작하였다. 팔을 80℃에서 4시간 열수 추출을 진행하였으며, 상온에 방치하여

온도를 낮췄다. 0.1% Protamex (Novozyme)을 처리하여 pH 6.5, 40°C의 조건에서 6시간 동안 효소작용을 진행하였다. 와트만(Whatman) 2번 여과지에 감압 여과하여 박을 수득하였으며, 여과로 얻은 추출액을 진공 회전 농축기(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany)로 농축하여 프로테아제가 처리된 팥 추출물(Protease treated-red bean extract; PRBE)을 수득하였다. 수득한 박을 건조시킨 후, 70% 에탄올로 45°C의 조건에서 6시간 추출을 진행하였다. 와트만(Whatman) 2번 여과지에 감압 여과하여 추출액을 수득한 뒤, 진공 회전 농축기(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)로 농축하여 70% 에탄올을 완전히 제거하고, 팥 에탄올 추출물(Red bean ethanol extract; RBEE)을 수득하였다.

㉠ 세포 배양

- COS-7 원숭이 신장세포를 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)와 Korea Cell Line Bank (KCLB; Seoul, Korea)에서 각각 분양 받아 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT, USA) 및 1% penicillin-streptomycin 항생제(100 units/mL penicillin A, 100 μ g/mL streptomycin)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HyClone)을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 배양 조건 하에서 배양하였다.

㉡ 세포 독성 평가

- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약을 통해 각 시료에 대한 세포 독성 평가를 하였다. COS-7 세포에 0.1% 0.1% FBS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)에 프로테아제가 처리된 팥 추출물과 에탄올 추출물을 처리하여, 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후, dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)로 씻은 다음 MTT 용액(0.5 mg/mL)을 300 μ L씩 넣어준 뒤, 37°C에서 3 시간 동안 배양하여 MTT-formazan이 형성되게 하였다. MTT 용액을 제거한 후, dimethyl sulfoxide (DMSO)로 MTT-formazan을 녹인 다음, VERSAmax tunable microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

㉢ PGC-1 α 활성 측정

- COS-7 cell line을 1.5×10^5 cells/well 농도로 24 wells plate에 24 시간 배양 후, pFR-PGC-1 α (Addgene, Cambridge, MA, USA)를 lipofector (Aptabio, Yongin, Korea)을 이용하여 형질주입하였다. 4시간 형질주입 후, 24시간 더 배양시켜 세포를 안정화시켰다. 두류 주정, 열수, 아임계 추출물이 함유되어 있는 DMEM (Hyclone)과 resveratrol (Res: Sigma-aldrich, St Louis, MO, USA)를 세포에 처리하여 24시간 배양하였다. 최종 24시간 후, phosphate buffer solution (PBS)로 세포들을 세척한 다음 NP-40 lysis buffer (Elpis, Daejeon, Korea)를 이용하여 세포들을 용해하였고, luciferase assay substrate (Promega, Madison, WI, USA)를 첨가하여, MicroLumat Plus LB 96V luminometer (Berthold, Wildbad, Germany)을 이용하여 PGC-1 α 의

luciferase 활성을 측정하였다.

㉓ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 23.0 통계 패키지(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통해 분석하였다. 유의성 조사는 unpaired *t*-test 로 하였으며, *P* 값이 5% 및 1% 미만일 경우 통계적으로 유의성이 있다고 표기하였다(대조군이 대비 * *P* < 0.05, ***P* < 0.01).

① 결과 및 고찰

㉑ 시료 제작

- 팔 20 g을 시료를 제작하는데 사용하였다. 시료 제작은 그림 2-2-85에 나타난 바와 같이 순차적으로 제작하였다. PRBE의 무게는 2.68 g으로 원물 대비 약 13.4%의 수율을 나타내었다. 프로테아제 처리 후, 여과액을 추출하고 남은 박에 70% 에탄올을 처리하여, RBEE를 0.4 g을 수득하였다. 팔 원물로부터 약 2%의 추출 수율을 나타냈으며, 박으로부터 약 2.58%의 수율을 나타내었다. 본 시료를 세포 실험에 사용하였다.

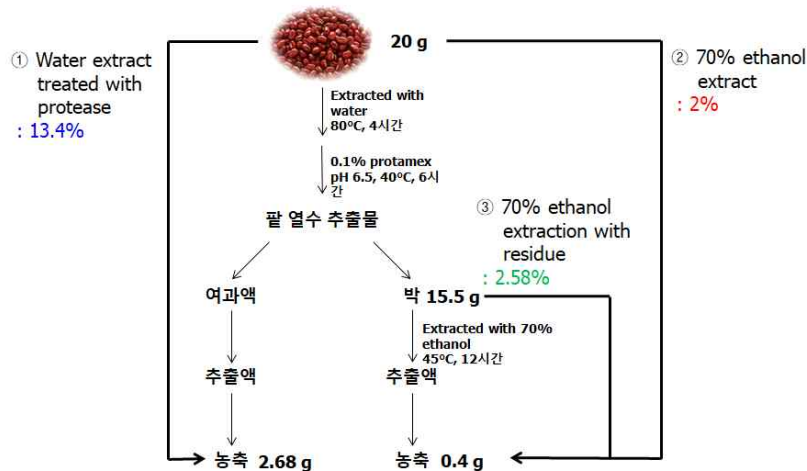


그림 2-2-85. 팔 추출물 제작 모식도.

㉒ 팔 추출물의 세포 독성 평가

- 위에서 제작한 PRBE와 RBEE의 COS-7 세포 독성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT를 진행하였다. 농도는 두 시료 모두 20, 40, 80, 160, 320 µg/mL 하여 세포에 처리하였다. 실험결과 PRBE에서 40 µg/mL까지 독성이 나타나지 않았으나, 80 µg/mL 이상의 농도에서는 세포 독성을 나타내었다(그림 2-2-86). RBEE에서는 160 µg/mL의 고농도까지 안전하게 세포에 처리할 수 있음을 확인하였다(그림 2-2-87).

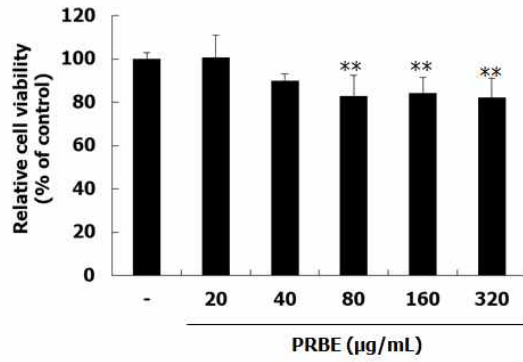


그림 2-2-86. 프로테아제가 처리된 팔 추출물의 COS-7에 대한 독성 평가.

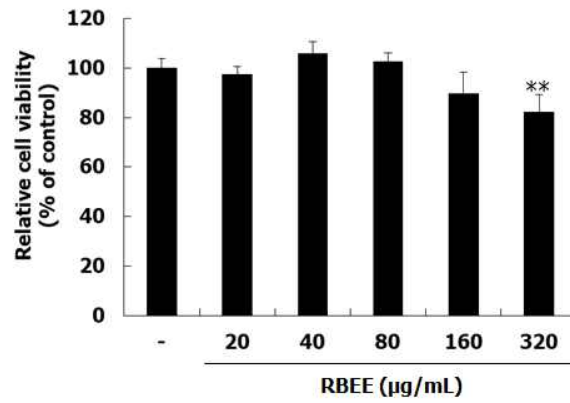


그림 2-2-87. 팔 에탄올 추출물의 COS-7에 대한 독성 평가.

㉔ 비율에 따른 PGC-1 α 활성 변화

- 위에서 만든 제작한 PRBE와 RBEE의 비율에 따라서 세포에 처리하여 PGC-1 α 의 전사 활성을 평가하였다.
- 1:1로 PRBE와 RBEE의 비율로 처리하였을 때, 20 ug/mL + 20 ug/mL부터 유의한 수준으로 PGC-1 α 전사 활성이 증가하였으며 40 ug/mL + 40 ug/mL로 처리하였을 때, 약 47% 증가하였다(그림 2-2-88).

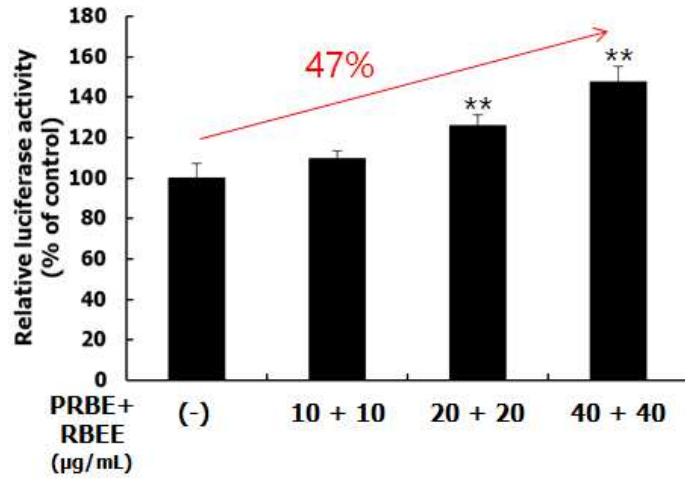


그림 2-2-88. 프로테아제가 처리된 팔 추출물과 팔 에탄올 추출물의 1:1 비율 처리에 따른 PGC-1 α 전사 활성.

- 1:2로 PRBE와 RBEE의 비율로 처리하였을 때, 모든 군에서 유의하게 증가하였다. 10 ug/mL + 20 ug/mL 처리군과 20 ug/mL + 40 ug/mL 처리군에서 뚜렷한 차이로 증가하지 않았으나 40 ug/mL + 80 ug/mL로 처리하였을 때, 약 75% 증가하였다(그림 2-2-89).

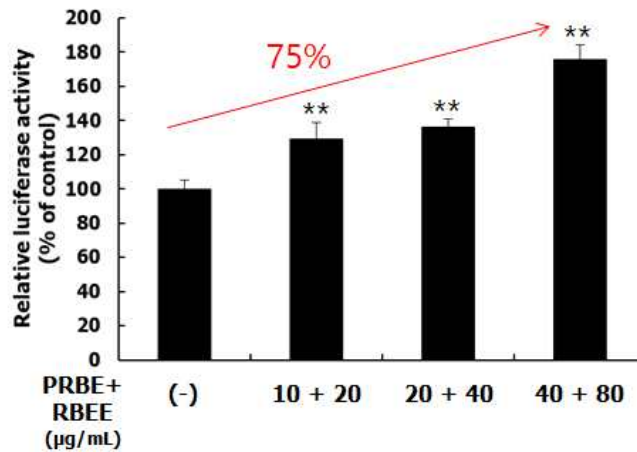


그림 2-2-89. 프로테아제가 처리된 팔 추출물과 팔 에탄올 추출물의 1:2 비율 처리에 따른 PGC-1 α 전사 활성.

- 1:3로 PRBE와 RBEE의 비율로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 유의하게 증가함을 확인하였다. 최고 농도에서 대조군과 비교하여 약 65% 증가하였다(그림 2-2-90).

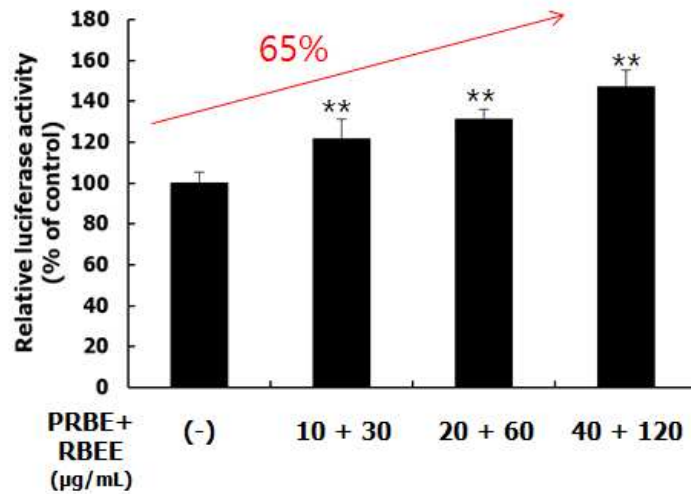


그림 2-2-90. 프로테아제가 처리된 팔 추출물과 팔 에탄올 추출물의 1:3 비율 처리에 따른 PGC-1 α 전사 활성화.

- 2:1로 PRBE와 RBEE의 비율로 처리하였을 때, 모든 군에서 농도 의존적으로 유의하게 증가했으며, 최고 농도에서 약 53% 증가하였다(그림 2-2-91).

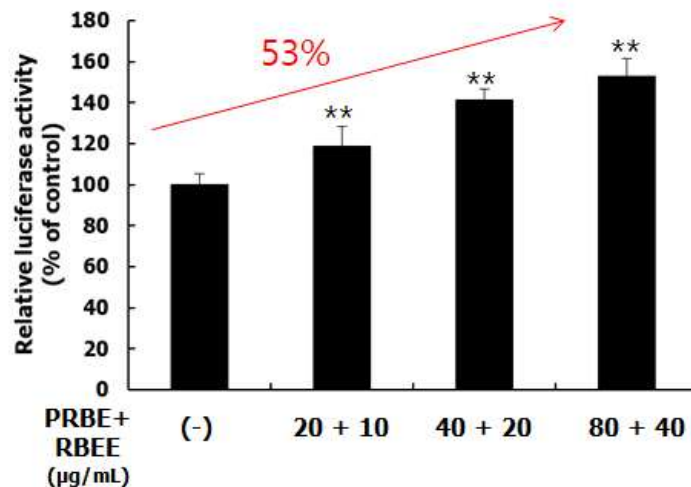


그림 2-2-91. 프로테아제가 처리된 팔 추출물과 팔 에탄올 추출물의 2:1 비율 처리에 따른 PGC-1 α 전사 활성화.

- 3:1로 PRBE와 RBEE의 비율로 처리하였을 때, 20 ug/mL + 6.67 ug/mL부터 유의한 수준으로 PGC-1 α 전사 활성이 증가하였으며, 40 ug/mL + 10.67 ug/mL로 처리하였을 때, 약 24% 증가하였다(그림 2-2-92).

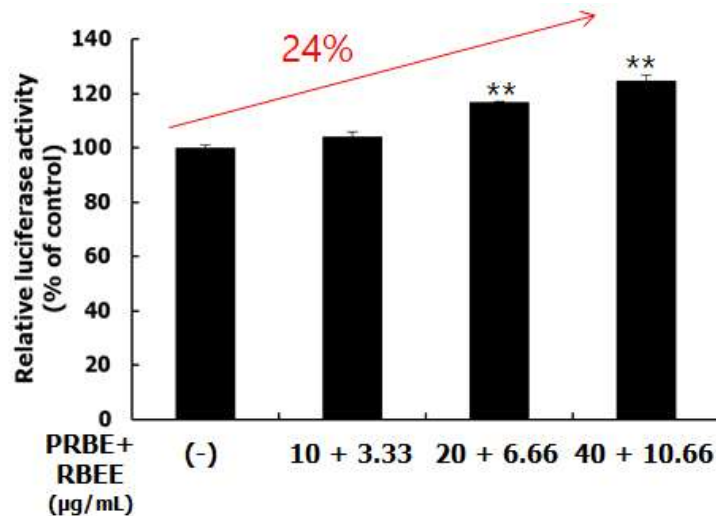


그림 2-2-92. 프로테아제가 처리된 팔 추출물과 팔 에탄올 추출물의 3:1 비율 처리에 따른 PGC-1 α 전사 활성.

- 종합적으로, PRBE보다 RBEE의 비율이 높을 때, PGC-1 α 의 활성이 뛰어남을 알 수 있었다. 특이한 것은 PRBE와 RBEE의 비율이 1:3에 비해, 1:2에서 더 높게 활성이 나타났다는 것이다. 따라서, 제품 개발 시, 프로테아제가 처리된 팔 추출물과 팔 에탄올 추출물의 비율을 1:2로 하여 단일 소재를 만들어 제품의 원료로 사용하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

(나) 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 가용성 및 체내 흡수율 증진 기술 개발

① 실험 재료 및 방법

㉠ pH 변화에 따른 용해도 평가

- 뉴트리에서 수령한 팔 추출물 파우더 1 g과 함께 증류수 10 ml을 15 mL conical tube (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA)에 넣었다. pH 조절을 위해 1 M NaOH와 1 M HCl을 이용하여 10% (w/v) 팔 추출물 용액을 각각 pH 3(산성), pH 7(중성), pH 11(염기성)로 조절하였다. 각각의 샘플을 상온에서 1시간 방치하였다. 1시간 후, 3600 rpm에서 10분간에서 원심분리하였으며, 침전된 추출물을 관찰하였다.

㉡ 온도 변화에 따른 용해도 평가

- 뉴트리에서 수령한 팔 추출물 파우더 1 g과 함께 증류수 10 ml을 15 mL conical tube (Falcon)에 넣었다. 3 개의 팔 추출물 용액을 각각 4~6°C(저온), 20~25°C(상온), 65~70°C(고온)에 1시간 방치하였다. 1시간 후, 3600 rpm에서 10분간에서 원심분리하였으며, 침전된 추출물을 관찰하였다.

㉢ 용매 변화에 따른 용해도 평가

- 뉴트리에서 수령한 팔 추출물 파우더 1 g을 15 mL conical tube (Falcon)에 넣었다.

그 후, 증류수, 50% 에탄올, 100% 에탄올을 10 mL 처리하였다. 그 후, 상온에서 1간 방치하였다. 1시간 후, 3600 rpm에서 10분간에서 원심분리하였으며, 침전된 추출물을 관찰하였다.

㉔ 유화제 처리에 따른 용해도 평가

- 뉴트리에서 수령한 팔 추출물 파우더 1 g과 함께 증류수 10 ml을 15 mL conical tube (Falcon)에 넣었다. 그 후, 유화제 Tween 20, 40, 80, Span 40, 60, 80이 2% (w/v)가 되도록 처리하였다. 30분간 60°C의 조건에서 초음파분산기에 넣고 분산시켰으며, 상온에서 30분간 방치하였다. 1시간 후, 3600 rpm에서 10분간에서 원심분리하였으며, 침전된 추출물을 관찰하였다.

② 실험 결과 및 고찰

㉑ pH 변화에 따른 용해도 변화

- 단백질은 pH에 따라 녹는점이 다르다. 따라서, pH에 따른 팔 추출물의 용해도 변화를 관찰하였다. 실험 결과, pH가 높을수록 침전물의 양이 감소함을 확인하였다. 또한, pH가 높을수록 용매의 색이 짙은 고동색으로 변하는 것을 확인하였으나, pH가 낮을수록 용매가 투명하고 색이 주황색인 것으로 확인하였다(그림 2-2-93). 이러한 결과는, pH가 높을수록 팔 추출물이 잘 녹는 것을 의미한다.

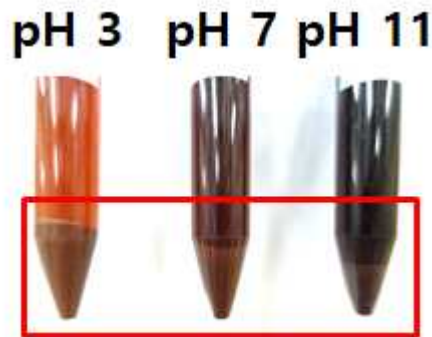


그림 2-2-93. pH에 따른 팔 추출물 침전 정도.

㉒ 온도 변화에 따른 용해도 변화

- 용질은 용매의 온도가 높을수록 잘 녹게 된다. 따라서, 온도 변화에 따른 용해도 변화를 확인하였다. 실험 결과, 온도가 높을수록 침전물의 양이 감소함을 확인하였다. 추가적으로, 온도가 높을수록 용매의 색이 짙은 고동색으로 변하는 것을 확인하였으나, 온도가 낮을수록 용매의 색이 옅은 갈색으로 확인하였다(그림 2-2-94). 이러한 결과는, 온도가 높을수록 팔 추출물이 잘 녹는 것을 의미한다.

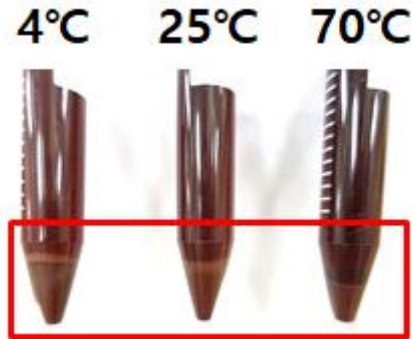


그림 2-2-94. 온도에 따른 팔 추출물 침전 정도.

㉔ 용매 변화에 따른 용해도 변화

- 본 팔 추출물 중에 70% 에탄올 추출물이 섞여있었기 때문에, 에탄올 비율에 따른 팔 추출물의 용해도 정도를 확인하였다. 에탄올 비율이 증가할수록 침전물의 양이 많은 것을 확인하였다. 특히, 100% 에탄올에는 거의 녹지 않음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는, 본 실험의 팔 추출물이 에탄올이 비율이 증가할수록 용해도 정도가 감소함을 확인하였다(그림 2-2-95). 따라서, 에탄올은 팔 추출물을 가용화하는데 사용하지는 안 된다.

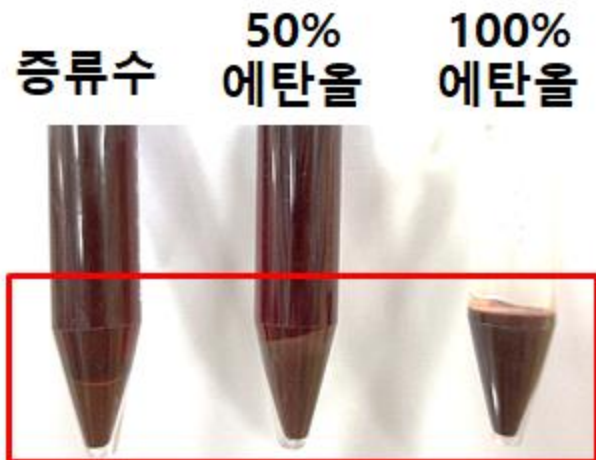


그림 2-2-95. 온도에 따른 팔 추출물 침전 정도.

㉕ 유화제에 따른 용해도 변화

- 팔 추출물과 유화제를 혼합하여 용해도 정도를 확인하였다. 실험 결과, 유화제에 따른 용해도 변화에 차이가 없었다(그림 2-2-96). 따라서, 유화제는 팔 추출물 분말의 가용화에는 도움이 안될 것으로 판단된다.

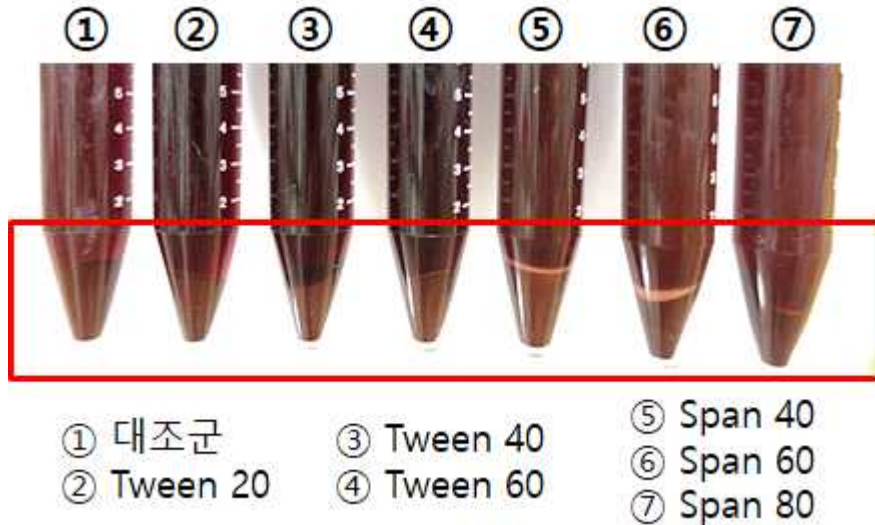


그림 2-2-96. 온도에 따른 팥 추출물 침전 정도.

㉞ 종합적 결과

- 총 4가지 변화(pH, 온도, 용매, 유화제)에 따른 팥 추출물의 가용화 정도를 확인하였다. 그 결과, pH와 온도가 높을수록 팥 추출물의 용해 정도가 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 팥 추출물을 가용화하기 위해서는 온도와 pH를 조절하는 것이 중요하다고 판단된다.

(다) 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제형별 맛 조절 formulation 기술 개발

① 실험 재료 및 방법

㉠ 시료의 준비

- 총 4종의 시제품을 주관기관으로부터 수령 받았다. 총 4종의 시제품은 다음과 같다. 팥 분말 차(Redbean powder tea-1; RPT-1), 팥 분말이 함유된 단백질 보충제(redbean protein supplement-1, RPS-1), 공정을 바꿔 생산한 팥 분말 차(Redbean powder tea-2, RPT-2), 공정을 바꿔 생산한 팥 분말이 함유된 단백질 보충제(redbean protein supplement-2, RPS-2).

㉡ 시험 대상

- 총 시험 대상은 성인 남녀 총 4종의 시제품을 주관기관으로부터 수령 받았다. 총 4종의 시제품은 다음과 같다. 팥 분말 차(Redbean powder tea-1; RPT-1), 팥 분말이 함유된 단백질 보충제(redbean protein supplement-1, RPS-1), 공정을 바꿔 생산한 팥 분말 차(Redbean powder tea-2, RPT-2), 공정을 바꿔 생산한 팥 분말이 함유된 단백질 보충제(redbean protein supplement-2, RPS-2).

㉢ 관능평가지

- 관능평가지는 세계김치연구소, 김치 관능검사 매뉴얼(reference)과 7점 척도법에 따라 제작하였다(그림 2-2-97). 총 6개의 항목으로 구분하여 검사를 진행하였다. 미각에 대하여 단맛, 쓴맛, 신맛 총 3가지 맛에 대해서 평가하였다. 촉각으로는 씹음과 식감에 2가지에 대해서 평가하였으며, 마지막으로 후각과 관련 있는 향에 대해서 평가를 진행하였다. 모든 항목에 대해 평균값을 관능평가지에 표시하여 나타내었다.

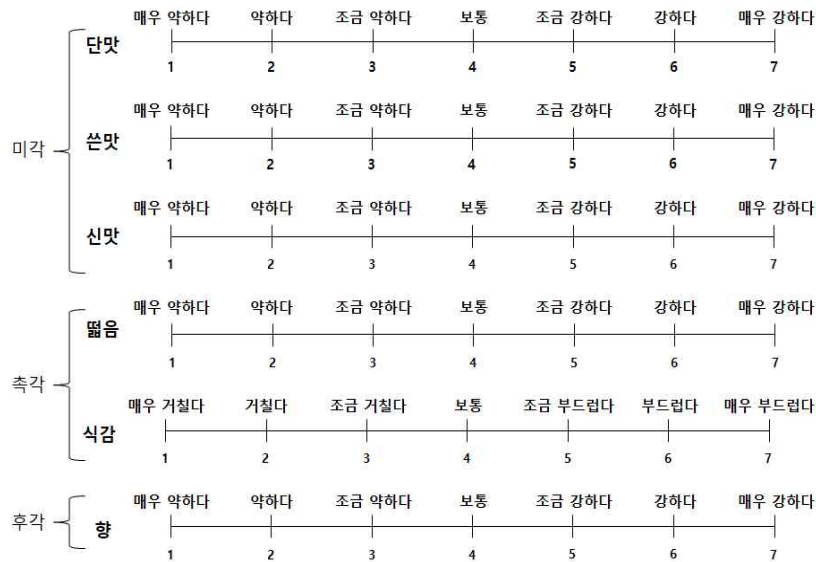


그림 2-2-97. 관능평가지.

② 결과 및 고찰

㉠ 팔 분말 차의 관능평가 결과

- RPT-1의 관능평가 결과, 단맛, 쓴맛, 신맛에 있어서 약하거나 조금 약한 수준을 나타내었다. 향에 있어서도 약함을 나타내었다. 촉각에 있어서 씹음은 강하거나 약하지도 않은 보통의 수준이었으며, 시제품이 “팔 분말 차”이기 때문에 부드럽다고 응답한 사람이 대다수였다(그림 2-2-98).



그림 2-2-98. RPT-1의 관능평가.

- RPT-1과 다르게 공정을 바꿔 제작한 RPT-2에 대하여 관능평가를 실시하였다. 공정을 바꿔 RPT-2를 제작하여 관능평가를 진행한 결과, 쓴맛, 신맛, 단맛, 향에 약한 것으로 나타났으며 떫음 또한 약한 것으로 확인되었다. 관능평가 결과, 단맛, 쓴맛, 신맛에 있어서 약하거나 조금 약한 수준을 나타내었다. 향에 있어서도 약함을 나타내었다. 촉각에 있어서 떫음은 보통의 수준이었으며, 시제품이 “팥 분말 차” 이기 때문에 부드럽다고 응답한 사람이 대다수였다(그림 2-2-99). RPT-1과 비교하여, 쓴맛, 신맛, 떫음, 향이 더 약해진 것을 확인하였다.



그림 2-2-99. RPT-2의 관능평가.

- 종합적으로 볼 때, RPT-1, RPT-2의 차이는 거의 없었다. 단맛, 쓴맛, 신맛이 약한 수준이었다. 미각에 있어서의 전반적인 약함은 제품의 대상의 기호에 따라 조절이 가능할 것으로 판단된다.

㉠ 팥 분말이 함유된 단백질 보충제의 관능평가

- RPS-1에 대하여 관능평가를 실시하였다. 단백질 보충제에서 신맛과 쓴맛을 거의 없었으나 단맛은 보통에 가까웠다. 차와 다르게 식감이 조금 거칠고, 떫음은 약하게 있음을 확인하였다. 후각에 대한 향도 보통에 가까운 평가를 받았다(그림 2-2-100).



그림 2-2-100. RPS-1의 관능평가.

- RPS-1과 다르게 공정을 바꿔 제작한 RPS-2에 대하여 관능평가를 실시하였다. 단맛은 RPS-1과 비교하여 강해진 반면, 쓴맛, 신맛, 짭썩음은 전반적으로 더 약해졌다. 단백질 보충제에서 신맛과 쓴맛을 거의 없었으나 단맛은 보통에 가까웠다. 식감에 있어 조금 거칠지만 향은 더 향상된 것을 확인하였다(그림 2-2-101).



그림 2-2-101. RPS-2의 관능평가.

- 종합적으로, 쓴맛과 신맛은 약하고, 단맛은 조금 약한 것으로 나타났다. 또한 식감은 조금 거칠었으며 향은 보통의 수준으로 확인되었다. 단백질 보충제의 특징상 물 또는 우유의 양에 따라서 맛과 짭썩음과 향이 달라질 것으로 판단된다. 제품 생산 시,

추가적으로 가미가 이뤄진다면 기호도를 높일 수 있을 것으로 판단된다.

㉔ 종합적 결론

- 본 연구의 결과를 기반으로 제품 생산 시 타겟 대상에 따라 맛을 조절할 수 있을 것으로 판단된다. 다만, 제형에 따라서 고려하는 정도가 달라질 수 있다. 가령, 타블렛이나 캡슐의 경우, 실제 미각을 느끼거나 후각을 고려하지 않아도 되므로 본 연구 결과는 의미가 없지만, 차, 분말 등으로 제품을 생산 시 고려해야할 것으로 판단된다.

(라) 식품의약품안전처 건강기능식품 인증 인체시험자료 분석

① 인체적용시험 계획

㉕ Tablet 준비

- 팔 추출물이 500 mg, 부형제가 200 mg이 함유된 시험 tablet을 뉴트리에서 제작하였다. 대조군은 전분 500 mg, 부형제가 200 mg이 함유된 tablet을 섭취하였다(표 2-2-14). 시험 tablet과 대조군으로 사용된 tablet으로 생산되는 품목은 각각 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않고, 중량 차이도 크지 않도록 하였다. 또한 동일한 라벨을 부착함으로써 연구 참여자 및 연구자에 대하여 눈가림(blind)이 유지되도록 하였다.

표 2-2-14. Tablet 정보

| 일반명 | 시험군 | 대조군 |
|---------|---------------------------------------|----------------|
| | 팔 추출물 | 전분 |
| 성분 및 함량 | 팔 추출물 2,100 mg/일 (*팔 추출물 1,500 mg) | 전분 2,100 mg /일 |
| 제형 | 700mg 정제 | |
| 성상 | 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 보라색의 정제 | 좌동 |

㉖ 1일 투여량의 산정 근거

- 동물실험 결과 200 mg/kgBW/day, 400 mg/kgBW/day를 8주간 투여 후 안전성과 유효성을 관찰한 결과, 유의한 독성 작용이 나타나지 않았고, 두 군 모두 대조군에 비해 유의한 근력향상와 지구력 향상 효과를 보였다. 또한, 두 군 모두 근육 무게가 증가하였고 지방무게가 감소하였다. 따라서, 이와 같은 결과를 바탕으로 인체에서의 섭취량으로 환산하고자 하였다. 실험결과 용량 의존적인 결과를 나타내었으므로 그 중간 값인 300 mg/kgBW/day을 유효한 복용량으로 산정하였다. Reagan-Shaw S. 등 (2008)⁴⁰⁾이 제시한 공식에 따라 임상용량을 계산하였다. 쥐의 300 mg/kgBW/day에 대비되는 60 kg 성인 섭취용량은 약 1500 mg/day 이다. 따라서, 1일 1회 3정을 섭취하도록 하였다.

㉗ 투여방법 및 투여기간

- 시험에 참가한 모든 대상자는 인체적용시험에 사용되는 tablet을 1일 1회, 1회 3정 복용하였다. 참여자는 인체시험에 사용되는 건강기능식품을 1일 1회 식후 30분에 물과 함께 복용하였다. 각 참여자당 tablet의 총 투여기간은 12주로 하였다.

㉔ 시험대상자 선정 및 선정 기준

- 만 50세 이상의 건강한 성인으로서 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당하지 않는 지원자를 대상으로 시험에 대한 충분한 설명 후 ‘대상자 동의서’에 자필 서명한 자에 대하여 다음 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자를 대상으로 선정하였다(표 2-2-15).

표 2-2-15. 적합 및 부적합 정기준

| 적합 기준 | 부적합 기준 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 만50세 이상의 건강한 자 • 체질량지수가 18.5-30.0인 자 • 골격근량이 표준의 110% 미만인 자 • 정상적인 신체활동이 가능한 자 • 시험동의서에 서면 동의한 자 | <ul style="list-style-type: none"> • 최근 1년 이내 골절의 병력이 있는 경우 • 신장 질환이 있는 경우 • 혈청 creatinine 1.4mg/dL 이상인 경우 • 2+ 이상의 단백뇨가 있는 경우 • 조절되지 않는 간 질환이 있는 경우 • AST 또는 ALT가 80IU/L 초과인 경우 • 공복혈당이 126mg/dL 이상인 경우 • 고혈압 환자나 심장질환이 있는 자 • 정신과 질환으로 약물을 복용하고 있는 자 • 지난 2개월간 한약이나 조약 복용력이 있는 자 • 지난 4주 이내에 연구용 약물을 투여받은 자 • 결과에 영향을 미칠 수 있는 약물 복용한 자 • 위장관 절제술을 받은 병력이 있는 자 • 임신부 또는 수유부 • 시험식품 및 성분에 대한 과민증이 있는 자 |

㉕ 인체시험 방법

- 이중눈가림 유지를 위하여, 본 인체시험에서는 tablet은 외형상으로는 구분이 불가능하도록 하였고, 대상자 코드의 할당 내역은 시험책임자가 봉인된 상태로 관리하여 인체시험 종료 시까지 공개하지 않았다. 중대한 이상약물반응 발생으로 부득이하게 해당 코드의 열람이 필요한 경우에도 해당 대상자의 무작위 배정 내역만을 열람할 수 있도록 대상자별 별도의 눈가림봉투의 형식으로 관리하였다.

- 본 인체시험을 과학적이고 객관적으로 시행하기 위하여 최종 선정된 대상자들을 블록 무작위 배정 방법을 이용하여 시험군 및 대조군에 1:1로 배정하였다. 이 때 블록의 크기에 따라 무작위배정에 대한 추측이 가능할 수 있으므로 그 크기는 통계전문가가 임의로 또는 무작위로 설정하였다. 따라서 무작위배정을 위한 블록의 크기와 수는 알 수 없다. 총 무작위배정 수는 목표 모집인원의 약 120% 규모로 생성하였다. 무작위배정 내역에 따라 모집된 대상자 순으로 3자리 숫자의 식별코드를 부여하고, 해당 코드에 따라 포장된 시험 tablet 또는 대조 tablet을 해당 대상자에게 배부하였다. 시험대상자로 등록되어 무작위배정번호가 부여되었다면 해당 대상자가 중도 탈

락하더라도 사용된 무작위배정번호는 다시 사용하지 않았다. 무작위배정내역은 통계 전문가가 nQuery Advisor 7.0(또는 SAS 9.0 또는 SPSS 21.0)을 이용하여 생성하여 이를 의뢰자에게 전달하였고, 의뢰자는 각 대상자별 무작위 배정내역을 각각의 비투과 용 봉투에 담아 밀봉하여 실시기관에 공급하였다.

- 자원자에 한하여 스크리닝(방문 1)을 시행하여 선정/제외기준 평가를 통해 본 인체 시험에 적합하다고 판단되는 대상자를 선정하였다. 방문 2에서는 선정된 대상자에 대하여 무작위배정에 따라 복용할 식품을 배정하고 안전성 및 유효성 평가 항목을 검사/측정하였다. 이 후 대상자들은 방문 2 이후 6주간 시험용 식품을 복용한 후 방문 3 일정을 수행하였고, 방문 3 이후 6주간 tablet을 복용한 후 방문4 일정을 수행하였다. 구체적으로 실시한 관찰 및 검사항목의 일정을 표 2-2-16에 요약하였다.

표 2-2-16. 인체시험 진행 일정표

| 항 목 | 방문 1 (screening) | 방문 2 (기초방문) | 방문 3 (시험 중) | 방문 4 (시험 종료) |
|---------------------------------|---------------------|----------------|----------------|-----------------|
| | (-1일~-3주) | (0일) | (6주±4일) | (12주±6일) |
| 대상자 서면동의서 취득 | √ | | | |
| 대상자 선정 / 제외기준 평가 | √ | | | |
| 대상자 기초 정보 ¹⁾ | √ | | | |
| 과거병력 | √ | | | |
| 신체검사 ²⁾ | √ | √ | √ | √ |
| 생체징후 ³⁾ | √ | √ | √ | √ |
| 임상실험실 검사(혈액, 뇨 등) ⁴⁾ | √ | | √ | √ |
| 심전도 검사 ⁵⁾ | √ | | | |
| 시험/대조식품 배분 | | √ | √ | |
| 유효성평가변수 측정 ⁶⁾ | | √ | √ | √ |
| 이상반응 체크 | | | √ | √ |
| 병용약물 체크 | | √ | √ | √ |

1) 연령, 성별, 생년월일, 음주량, 흡연량, 체중, 신장 등 기록

2) 양상태, 피부/점막, 이비인후계, 심혈관계, 신장/비뇨생식기계, 호흡기계, 대사/내분비계, 소화기계, 근골격계, 신경/정신계 등 검진을 실시하여 정상 여부를 기록

3) 혈압, 체온, 맥박을 측정 기록

4) 약 12cc를 채혈하여 방문 1과 방문 4에는 ①, ②을, 방문 3에는 ①의 검사를 실시하였다.

① CBC, BUN, GFR, Uric acid, Total Cholesterol, AST, ALT, ALP, Total Bilirubin, GGT, LDH, Pyruvate, lactate, Glucose, Creatinine, CK

② Na, K, Cl, HDL, LDL, Triglyceride, hsCRP

* 단, 방문 1에서 HbsAg, anti-HCV 검사와 뇨검사(7종)를 추가 실시하였다.

5) 부정맥, 심근경색 등 심장질환 확인

6) 6 분 걷기, 악력(좌, 우), 대퇴사두근력(좌, 우), 하지근육량, 사지근육비율, pyruvate, lactate, glucose, creatinine, CK

㉞ 시험 중 금지 및 주의 사항

- 시험 참가 당시 이미 받고 있던 치료나 복용하는 건강기능식품 및 시험기간 중 추가되는 치료는 병용요법으로 간주하며, 병용 투여할 필요가 있는 경우에는 투여 내역을 증례기록서와 대상자 진료차트에 기록하고 가능한 한 시험기간 중에는 병용요법을 변경하지 않도록 하였다. 시험기간 중 병용약물의 투여는 최소화하고 대상자의 복지를 위해 필요하고 또 시험에 영향을 주지 않는다고 판단될 경우에만 시험자의 판단에 따라 투여하도록 하였다. 또한, 시험 중 본 시험의 목적에 위배되지 않는 외

과적 수술을 시행하는 경우에도 이를 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록하였다.

㉠ 통계분석

- 본 연구의 분석결과는 평균 ± 표준편차로 요약하였다. 두 군간 범주형 변수의 차이를 검정하기 위해 chi-square test 또는 Fisher's exact test를 실시하였다. 두 군간 연속형 변수의 차이를 검정하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 독립 t 검정 (independent t test)을, 그렇지 않을 경우 Mann-Whitney's U test를 수행하였다. 또, 군 내 시점에 따른 차이 검정을 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 paired-t test를, 그렇지 않을 경우, Wilcoxon 's signed rank test를 수행하였다. 연속형 변수의 정규성 검정은 Shapiro-Wilk's test를 이용하였다. 본 인체시험에 대한 유효성 분석은 ITT분석과 PP분석도 동시에 실시하였다. ITT 분석을 실시할 때의 결측치 처리 기준은 Last Observation Carried Forward 방법을 사용하였다. 모든 통계분석은 SPSS 22버전(SPSS Statistics for Windows Version 22.0, IBM Corp. Armonk, NY, USA)을 사용하였고, 유의수준 0.05 하에서 양측검정하였다. 사전 동질성이 입증되지 않은 일부 변수(ESR, 적혈구, 맥박, ALT)에 대하여는 공분산분석(ANalysis of COVariance)을 시행하고자 하였으나 분석 전제조건을 만족하지 않아 시행하지 않았다.

㉡ 인체적용시험 결과

㉢ 시험 대상자

- 본 인체시험의 모집공고에 의하여 91명이 지원 및 스크리닝을 실시하였고 이 중 80명(시험군 40명, 대조군 40명)이 본 인체시험에 등록되었다. 시험 중 시험군 1명, 대조군 6명이 중도탈락 하였다. 이에 따라 총 73명이 시험에 순응하여 종료하였다(그림 2-2-102). 따라서, 총 80명(시험군 40명, 대조군 40명)이 ITT 분석군으로 구성되었으며, 탈락을 제외한 73명(시험군 39명, 대조군 34명)이 PP 분석군으로 구성되었다.

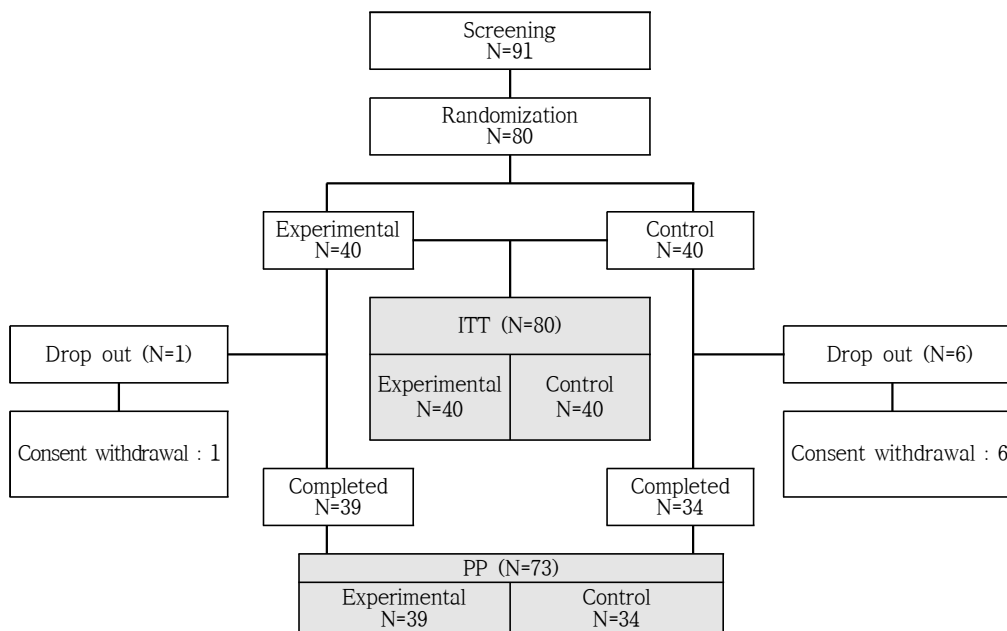


그림 2-2-102. 투여군별 대상자 분포

㉔ 인구 통계학적 및 기저 특성

- 본 인체시험 대상자에 대해 시험용 식품 투여 전의 기저 특성에 군 간 차이가 있는지 검정하였다(표 2-2-17). 그 결과 ITT군 및 PP군 모두 성별, 나이, 체중, 신장 등에 통계적으로 유의한 차이는 관측되지 않아 두 군의 사전 동질성이 인정된다고 볼 수 있고, 무작위배정은 통계학적으로 적절하다고 판단된다.

표 2-2-17. 인체적용시험 대상자 기저 특성

| Variable | ITT population | | | PP population | | |
|-------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------|---------------------|--------------------|
| | Control (n=40) | Experimental (n=40) | p value | Control (n=34) | Experimental (n=39) | p value |
| Sex (male) | 3 (7.5%) | 2 (5.0%) | .644 ¹⁾ | 3 (8.2%) | 2 (5.1%) | .533 ¹⁾ |
| Age (years) | 66.03±6.69 | 66.83±5.96 | .574 ²⁾ | 66.62±6.42 | 66.97±5.96 | .806 ²⁾ |
| Height (cm) | 155.08±5.82 | 154.43±4.81 | .588 ²⁾ | 155.19±5.96 | 154.49±4.86 | .580 ²⁾ |
| Weight (kg) | 57.93±6.99 | 56.66±5.48 | .371 ²⁾ | 58.11±6.73 | 56.62±5.55 | .303 ²⁾ |
| 음주 (yes) | 1 (2.5%) | 5 (12.5%) | .090 ¹⁾ | 1 (2.9%) | 5 (12.8%) | .125 ¹⁾ |
| 흡연 (yes) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | - | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | - |

1) P values were derived from Chi-square test.

2) P values were derived from independent t test.

(Shapiro-Wilk' s test was employed for test of normality assumption.)

㉕ 유효성 평가(ITT군)

- 총 80명(ITT군)을 대상으로 유효성 평가를 위해 평가 항목을 tablet 투여 전(방문2, week0)과 투여 후인 방문3(week6) 및 방문4(week12)에서 측정하였고, 각 측정값과 baseline(방문2) 대비 변화정도에 대하여 군 간 및 군 내(방문시기별) 비교하였다.
- 분석 결과, 측정값에 대한 군 간 비교에서는 유의성이 나타나지 않았지만, 군 내 비교에서는 시험군이 유의하게 증가하였다. 군 내에서 시험군의 변화량은 20.11이며, 대조군의 변화량은 13.34를 보였다. 이는 시험 tablet을 섭취한 사람들에서 운동수행 능력이 향상되었고, 도움이 되는 것으로 판단된다. 대퇴사두근력(좌, 우), glucose, creatinine에 대한 비교 시 군 간 유의한 차이는 없었다. 측정값에 대한 군 내 비교에서 대조군, 시험군은 유의하게 증가하였으나 군 간 유의한 차이가 없으므로 유효성에 대한 평가를 내릴 수는 없다. 그 외에, 악력(좌, 우), 하지근육량, 사지근육비율, 체지방비, pyruvate, lactate, CK에 대해서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(표 2-2-18).

표 2-2-18. 군간 또는 군내 비교(ITT 군)

| Variable | Observed value | | | Change from baseline | | | | |
|-------------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|
| | Control (n=40) | Experimental (n=40) | p value** | Control (n=40) | p value* | Experimental (n=40) | p value* | p value** |
| 6 min walk | | | | | | | | |
| visit 2 | 515.83±75.24 | 502.62±56.01 | .376 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 520.19±72.60 | 513.04±54.03 | .619 ³⁾ | 4.36±40.93 | .505 ¹⁾ | 10.42±36.95 | .082 ¹⁾ | .292 ⁴⁾ |
| visit 4 | 529.17±69.96 | 522.73±66.40 | .693 ⁴⁾ | 13.34±50.94 | .148 ²⁾ | 20.11±43.32 | .006¹⁾ | .299 ⁴⁾ |

악력(좌)

| | | | | | | | | |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------------|-------------|------------------------------|-------------|------------------------------|--------------------|
| visit 2 | 23.65±4.83 | 23.59±4.15 | .954 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 22.75±4.51 | 23.46±4.07 | .275 ⁴⁾ | -0.90±2.29 | .040²⁾ | -0.12±2.73 | .774 ¹⁾ | .230 ⁴⁾ |
| visit 4 | 23.45±4.50 | 23.30±4.77 | .747 ⁴⁾ | -0.20±2.59 | .944²⁾ | -0.29±2.85 | .520 ¹⁾ | .878 ³⁾ |
| 약력(우) | | | | | | | | |
| visit 2 | 23.76±5.58 | 29.56±31.88 | .430 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 23.74±5.37 | 24.54±4.47 | .268 ⁴⁾ | -0.01±1.92 | .945²⁾ | -5.02±32.04 | .739 ²⁾ | .773 ⁴⁾ |
| visit 4 | 24.33±4.57 | 25.13±4.54 | .439 ³⁾ | 0.58±3.30 | .275¹⁾ | -4.44±31.72 | .104²⁾ | .485 ⁴⁾ |
| 대퇴사두 근력(좌) | | | | | | | | |
| visit 2 | 74.50±24.62 | 70.91±22.31 | .874 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 87.50±28.03 | 79.94±23.24 | .193 ³⁾ | 13.01±19.37 | <.001²⁾ | 9.03±15.35 | .001^{D)} | .567 ⁴⁾ |
| visit 4 | 89.02±24.21 | 84.53±21.31 | .381 ³⁾ | 14.53±17.08 | <.001²⁾ | 13.62±12.48 | <.001^{D)} | .786 ³⁾ |
| 대퇴사두 근력(우) | | | | | | | | |
| visit 2 | 33.43±12.81 | 33.97±13.43 | .747 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 43.02±14.68 | 42.04±13.16 | .754 ³⁾ | 9.59±11.59 | <.001²⁾ | 8.07±13.71 | .001^{D)} | .467 ⁴⁾ |
| visit 4 | 46.23±15.56 | 43.19±10.45 | .308 ³⁾ | 12.81±14.35 | <.001²⁾ | 9.22±11.35 | <.001^{D)} | .219 ³⁾ |
| 하지근육량 | | | | | | | | |
| visit 2 | 5.78±0.95 | 5.57±0.68 | .535 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 5.75±0.90 | 5.63±0.73 | .889 ⁴⁾ | -0.03±0.35 | .893²⁾ | 0.05±0.21 | .107 ¹⁾ | .252 ⁴⁾ |
| visit 4 | 5.75±0.98 | 5.63±0.71 | .747 ⁴⁾ | -0.03±0.35 | .162²⁾ | 0.05±0.17 | .050 ¹⁾ | .127 ⁴⁾ |
| AMS / weight x 100 | | | | | | | | |
| visit 2 | 6.11±0.63 | 5.99±0.62 | .690 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 6.08±0.60 | 6.01±0.62 | .844 ⁴⁾ | -0.02±0.21 | .898²⁾ | 0.02±0.20 | .519 ¹⁾ | .700 ⁴⁾ |
| visit 4 | 6.07±0.62 | 6.00±0.60 | .973 ⁴⁾ | -0.04±0.21 | .216²⁾ | 0.01±0.20 | .686 ¹⁾ | .280 ³⁾ |
| 체지방비 | | | | | | | | |
| visit 2 | 1.75±0.49 | 1.74±0.47 | .806 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 1.74±0.54 | 1.73±0.46 | .704 ⁴⁾ | 0.00±0.14 | .263²⁾ | -0.01±0.12 | .561 ²⁾ | .931 ⁴⁾ |
| visit 4 | 1.71±0.46 | 1.76±0.50 | .381 ⁴⁾ | -0.03±0.10 | .070²⁾ | 0.01±0.12 | .679 ²⁾ | .073 ³⁾ |
| pyruvate | | | | | | | | |
| visit 1 | 0.79±0.24 | 3.91±19.96 | .935 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 0.74±0.19 | 0.75±0.25 | .722 ⁴⁾ | -0.05±0.21 | .208²⁾ | -3.15±19.98 | .696 ²⁾ | .866 ⁴⁾ |
| visit 4 | 0.71±0.18 | 0.78±0.36 | .874 ⁴⁾ | -0.09±0.23 | .024²⁾ | -3.13±20.02 | .690 ²⁾ | .264 ⁴⁾ |
| lactate | | | | | | | | |
| visit 1 | 8.76±3.59 | 8.79±3.95 | .946 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 7.80±1.97 | 8.72±3.63 | .733 ⁴⁾ | -0.96±3.05 | .088²⁾ | -0.07±4.75 | .896 ²⁾ | .218 ⁴⁾ |
| visit 4 | 7.71±2.18 | 9.61±4.67 | .077 ⁴⁾ | -1.06±3.58 | .091²⁾ | 0.82±5.65 | .197 ²⁾ | .071 ⁴⁾ |
| glucose | | | | | | | | |
| visit 1 | 93.25±9.32 | 93.50±8.24 | .580 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 96.50±10.23 | 96.05±11.60 | .900 ⁴⁾ | 3.25±8.83 | .044²⁾ | 2.55±12.35 | .199 ¹⁾ | .569 ⁴⁾ |
| visit 4 | 100.13±14.43 | 100.83±13.40 | .479 ⁴⁾ | 6.88±14.73 | <.001²⁾ | 7.33±13.81 | .003²⁾ | .923 ⁴⁾ |
| creatinine | | | | | | | | |
| visit 1 | 0.69±0.11 | 0.67±0.11 | .309 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 0.69±0.10 | 0.70±0.10 | .927 ⁴⁾ | 0.01±0.06 | .379²⁾ | 0.03±0.05 | .003²⁾ | .077 ³⁾ |
| visit 4 | 0.71±0.12 | 0.69±0.11 | .435 ⁴⁾ | 0.02±0.07 | .032²⁾ | 0.03±0.07 | .023²⁾ | .791 ³⁾ |
| CK | | | | | | | | |
| visit 1 | 108.30±72.76 | 107.60±73.21 | .908 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 106.23±51.70 | 109.18±55.17 | .889 ⁴⁾ | -2.08±52.67 | .376²⁾ | 1.58±67.99 | .274 ²⁾ | .696 ⁴⁾ |
| visit 4 | 106.78±64.68 | 104.28±42.95 | .462 ⁴⁾ | -1.53±64.12 | .850²⁾ | -3.33±64.17 | .387 ²⁾ | .740 ⁴⁾ |

* P values were compared within each group from baseline.

** P values were compared between groups.

¹⁾ P values were derived from paired t test.

²⁾ P values were derived from Wilcoxon' s signed rank test.

³⁾ P values were derived from independent t test.

⁴⁾ P values were derived from Mann-Whitney's U test.

(Shapiro-Wilk' s test was employed for test of normality assumption.)

라) 유효성 평가(PP군)

- 총 73명(PP군)을 대상으로 유효성 평가를 위해 평가 항목을 tablet 투여 전(방문2, week0)과 투여 후인 방문3(week6) 및 방문4(week12)에서 측정하였고, 각 측정값과 baseline(방문2) 대비 변화정도에 대하여 군 간 및 군 내(방문시기별) 비교하였다.

- 분석 결과, 측정값에 대한 군 간 비교에서는 유의성이 나타나지 않았지만, 군 내 비교에서는 시험군이 유의하게 증가하였다. 군 내에서 시험군의 변화량은 20.63이며, 대조군의 변화량은 9.46을 보였다. 이는 tablet을 섭취한 사람들에서 운동수행능력이 향상되었고, 도움이 되는 것으로 판단된다. 대퇴사두근력(좌, 우), glucose, creatinine에 대한 비교 시 군 간 유의한 차이는 없었다. 측정값에 대한 군 내 비교에서 대조군, 시험군은 유의하게 증가하였으나 군 간 유의한 차이가 없으므로 유효성에 대한 평가를 내릴 수는 없다. 그 외에, 악력(좌, 우), 하지근육량, 사지근육비율, 체지방비, pyruvate, lactate, CK에 대해서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(표 2-2-19).

표 2-2-19. 군간 또는 군내 비교(pp 군)

| Variable | Observed value | | | Change from baseline | | | | |
|---------------------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | Control (n=34) | Experimental (n=39) | p value** | Control (n=34) | p value* | Experimental (n=39) | p value* | p value** |
| 6 min walk | | | | | | | | |
| visit 2 | 518.28±76.23 | 502.58±56.74 | .318 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 523.40±72.95 | 513.26±54.72 | .500 ³⁾ | 5.12±44.45 | .506 ¹⁾ | 10.68±37.39 | .082 ¹⁾ | .489 ⁴⁾ |
| visit 4 | 527.74±73.64 | 523.20±67.20 | .784 ³⁾ | 9.46±42.80 | .206 ¹⁾ | 20.63±43.76 | .006 ²⁾ | .276 ³⁾ |
| 악력(좌) | | | | | | | | |
| visit 2 | 23.94±4.63 | 23.66±4.18 | .792 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 22.88±4.29 | 23.54±4.10 | .506 ³⁾ | -1.06±2.46 | .017 ²⁾ | -0.13±2.77 | .775 ¹⁾ | .179 ⁴⁾ |
| visit 4 | 23.70±4.58 | 23.36±4.82 | .825 ⁴⁾ | -0.24±2.57 | .966 ²⁾ | -0.30±2.89 | .520 ¹⁾ | .926 ³⁾ |
| 악력(우) | | | | | | | | |
| visit 2 | 23.83±5.42 | 29.78±32.27 | .373 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 23.81±5.16 | 24.63±4.49 | .230 ⁴⁾ | -0.01±2.08 | .945 ²⁾ | -5.15±32.45 | .739 ²⁾ | .690 ⁴⁾ |
| visit 4 | 24.27±4.69 | 25.23±4.55 | .157 ⁴⁾ | 0.45±2.61 | .596 ²⁾ | -4.55±32.12 | .104 ²⁾ | .510 ⁴⁾ |
| 대퇴사두근력(좌) | | | | | | | | |
| visit 2 | 75.83±24.59 | 70.91±22.60 | .630 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 91.13±27.18 | 80.16±23.49 | .069 ³⁾ | 15.30±20.18 | <.001 ²⁾ | 9.26±15.48 | .001 ²⁾ | .271 ⁴⁾ |
| visit 4 | 92.32±23.11 | 84.87±21.47 | .158 ³⁾ | 16.50±17.55 | <.001 ²⁾ | 13.97±12.44 | .000 ²⁾ | .486 ³⁾ |
| 대퇴사두근력(우) | | | | | | | | |
| visit 2 | 34.02±12.72 | 33.60±13.40 | .996 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 45.30±13.75 | 41.88±13.30 | .284 ³⁾ | 11.29±11.79 | <.001 ²⁾ | 8.28±13.82 | .001 ²⁾ | .324 ³⁾ |
| visit 4 | 48.41±15.21 | 43.06±10.56 | .082 ³⁾ | 14.39±14.59 | <.001 ²⁾ | 9.46±11.40 | .000 ²⁾ | .110 ³⁾ |
| 하지근육량 | | | | | | | | |
| visit 2 | 5.82±0.94 | 5.58±0.69 | .455 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 5.78±0.90 | 5.63±0.73 | .799 ⁴⁾ | -0.04±0.38 | .893 ²⁾ | 0.06±0.21 | .107 ¹⁾ | .226 ⁴⁾ |
| visit 4 | 5.81±0.93 | 5.63±0.72 | .623 ⁴⁾ | -0.01±0.35 | .071 ²⁾ | 0.05±0.17 | .050 ¹⁾ | .311 ⁴⁾ |
| AMS / weight x 100 | | | | | | | | |
| visit 2 | 6.16±0.62 | 6.01±0.62 | .584 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 6.14±0.58 | 6.03±0.62 | .757 ⁴⁾ | -0.03±0.22 | .898 ²⁾ | 0.02±0.20 | .520 ¹⁾ | .674 ⁴⁾ |
| visit 4 | 6.11±0.61 | 6.02±0.60 | .951 ⁴⁾ | -0.06±0.22 | .093 ²⁾ | 0.01±0.20 | .686 ¹⁾ | .161 ³⁾ |
| 체지방비 | | | | | | | | |
| visit 2 | 1.77±0.53 | 1.75±0.47 | .658 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 1.76±0.58 | 1.74±0.47 | .528 ⁴⁾ | 0.00±0.16 | .263 ²⁾ | -0.01±0.12 | .561 ²⁾ | .864 ⁴⁾ |
| visit 4 | 1.73±0.49 | 1.77±0.50 | .347 ⁴⁾ | -0.03±0.11 | .116 ²⁾ | 0.01±0.13 | .679 ²⁾ | .090 ³⁾ |
| pyruvate | | | | | | | | |
| visit 2 | 0.78±0.25 | 3.99±20.22 | .736 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 0.72±0.19 | 0.75±0.25 | .956 ⁴⁾ | -0.06±0.23 | .208 ²⁾ | -3.23±20.23 | .696 ²⁾ | .666 ⁴⁾ |
| visit 4 | 0.67±0.17 | 0.78±0.36 | .510 ⁴⁾ | -0.11±0.24 | .015 ²⁾ | -3.21±20.27 | .690 ²⁾ | .183 ⁴⁾ |
| lactate | | | | | | | | |
| visit 2 | 8.81±3.83 | 8.77±4.00 | .908 ⁴⁾ | | | | | |

| | | | | | | | | |
|-------------------|--------------|--------------|--------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|--------------------|
| visit 3 | 7.67±1.98 | 8.70±3.67 | .694 ⁴⁾ | -1.13±3.29 | .088 ²⁾ | -0.07±4.81 | .896 ²⁾ | .194 ⁴⁾ |
| visit 4 | 7.63±2.23 | 9.61±4.73 | .080 ⁴⁾ | -1.18±3.85 | .120 ²⁾ | 0.84±5.72 | .197 ²⁾ | .077 ⁴⁾ |
| glucose | | | | | | | | |
| visit 2 | 92.88±7.99 | 93.15±8.04 | .886 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 96.71±9.25 | 95.77±11.62 | .561 ⁴⁾ | 3.82±9.48 | .044 ²⁾ | 2.62±12.51 | .342 ²⁾ | .500 ⁴⁾ |
| visit 4 | 100.35±13.86 | 100.67±13.54 | .799 ⁴⁾ | 7.47±15.74 | .001²⁾ | 7.51±13.93 | .003²⁾ | .947 ⁴⁾ |
| creatinine | | | | | | | | |
| visit 2 | 0.70±0.11 | 0.67±0.11 | .120 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 0.71±0.10 | 0.70±0.11 | .458 ⁴⁾ | 0.01±0.06 | .379 ³⁾ | 0.03±0.05 | .003²⁾ | .112 ³⁾ |
| visit 4 | 0.73±0.12 | 0.70±0.11 | .152 ⁴⁾ | 0.02±0.07 | .033²⁾ | 0.03±0.07 | .023²⁾ | .891 ³⁾ |
| CK | | | | | | | | |
| visit 2 | 107.59±73.24 | 109.59±73.06 | .719 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 105.15±47.55 | 111.21±54.35 | .740 ⁴⁾ | -2.44±57.25 | .376 ²⁾ | 1.62±68.87 | .274 ²⁾ | .912 ⁴⁾ |
| visit 4 | 109.03±68.43 | 106.18±41.77 | .426 ⁴⁾ | 1.44±67.63 | .549 ³⁾ | -3.41±65.00 | .387 ²⁾ | .969 ⁴⁾ |

* P values were compared within each group from baseline.

** P values were compared between groups.

¹⁾ P values were derived from paired t test.

²⁾ P values were derived from Wilcoxon' s signed rank test.

³⁾ P values were derived from independent t test.

⁴⁾ P values were derived from Mann-Whitney's U test.

(Shapiro-Wilk' s test was employed for test of normality assumption.)

㉠ 안전성 평가

- 시험기간 동안의 이상반응 및 실험실 검사 등을 변수로 하여 ITT군을 대상으로 안전성을 평가하였다. 실험결과 총 5명의 대상자에서 5건의 이상반응이 보고되었으나, 이상반응으로 중도 탈락 및 눈가림 해제 사례는 없었으며, 시험 tablet과 인과관계가 없는 사례들로 판단되었다. 그 외, 중대한 이상반응은 보고되지 않았다. 추가적으로, 생체징후 및 신체검사 등 대상자에 대한 문진 및 진료에서도 특이적인 이상반응은 발견되지 않았다.
- 혈액 검사를 통해 안전성 평가를 진행한 결과, 안전성 검사에서 변화량에 대한 구간 유의차는 없었고, 개별 대상자의 결과치에 대해서도 이상소견은 없었다(표 2-2-20).

표 2-2-20. 혈액학적 검사

| Variable | Observed value | | | Change from baseline | | | | |
|--------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|------------------------------|--------------------|
| | Control (n=40) | Experimental (n=40) | p value** | Control (n=40) | p value* | Experimental (n=40) | p value* | p value** |
| 백혈구수 | | | | | | | | |
| visit 1 | 5.78±1.68 | 5.63±1.51 | .658 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 5.47±1.39 | 5.39±1.42 | .851 ⁴⁾ | -0.31±1.28 | .126 ²⁾ | -0.24±1.11 | .153 ²⁾ | .988 ⁴⁾ |
| visit 4 | 5.36±1.24 | 5.47±1.63 | .900 ⁴⁾ | -0.42±1.15 | .014²⁾ | -0.16±1.42 | .289 ²⁾ | .613 ⁴⁾ |
| 적혈구수 | | | | | | | | |
| visit 1 | 4.31±0.39 | 4.24±0.39 | .440 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 4.27±0.39 | 4.14±0.31 | .132 ³⁾ | -0.04±0.19 | .175 ¹⁾ | -0.10±0.19 | .004¹⁾ | .216 ³⁾ |
| visit 4 | 4.22±0.38 | 4.11±0.36 | .188 ³⁾ | -0.09±0.19 | .005¹⁾ | -0.13±0.23 | .001¹⁾ | .379 ³⁾ |
| 헤모글로빈 | | | | | | | | |
| visit 1 | 12.99±1.15 | 12.87±1.24 | .655 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 12.87±1.16 | 12.50±0.99 | .126 ³⁾ | -0.13±0.56 | .167 ¹⁾ | -0.38±0.54 | <.001¹⁾ | .043 ³⁾ |
| visit 4 | 12.68±1.10 | 12.37±1.16 | .220 ³⁾ | -0.32±0.55 | .001¹⁾ | -0.51±0.65 | <.001¹⁾ | .154 ³⁾ |
| 헤마토크릿 | | | | | | | | |
| visit 1 | 37.91±3.54 | 37.59±3.30 | .675 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 37.62±3.39 | 36.64±2.68 | .156 ³⁾ | -0.30±2.33 | .428 ¹⁾ | -0.95±1.76 | .001¹⁾ | .328 ⁴⁾ |
| visit 4 | 37.12±3.21 | 44.74±55.1 | .222 ⁴⁾ | -0.79±2.29 | .035¹⁾ | 7.15±54.94 | <.001²⁾ | .363 ⁴⁾ |

| | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------|---------------|--------------------|--------------|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------------|
| 혈소관수 | | | | | | | | |
| visit 1 | 240.63±46.37 | 262.58±72.04 | .110 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 236.60±51.26 | 255.80±68.99 | .126 ⁴⁾ | -4.03±24.17 | .255 ²⁾ | -6.78±26.67 | .116 ¹⁾ | .630 ³⁾ |
| visit 4 | 232.30±51.52 | 236.91±79.92 | .538 ⁴⁾ | -8.33±21.52 | .019^{D)} | -25.67±69.35 | .005²⁾ | .519 ⁴⁾ |
| Na | | | | | | | | |
| visit 1 | 135.57±19.82 | 135.68±19.79 | .996 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 4 | 138.35±5.38 | 139.10±1.61 | .695 ⁴⁾ | 2.78±20.46 | .144 ²⁾ | 3.43±20.12 | .164 ²⁾ | .695 ⁴⁾ |
| K | | | | | | | | |
| visit 1 | 4.02±0.28 | 4.06±0.28 | .401 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 4 | 3.99±0.26 | 4.03±0.27 | .334 ⁴⁾ | -0.03±0.32 | .612 ²⁾ | -0.03±0.31 | .485 ²⁾ | .981 ⁴⁾ |
| Cl | | | | | | | | |
| visit 1 | 104.08±1.72 | 104.60±1.72 | .176 ³⁾ | | | | | |
| visit 4 | 106.05±2.42 | 106.55±2.18 | .344 ⁴⁾ | 1.98±2.30 | <.001^{D)} | 1.95±1.74 | <.001²⁾ | .981 ⁴⁾ |
| HDL | | | | | | | | |
| visit 1 | 57.33±12.61 | 55.35±10.92 | .326 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 4 | 54.90±10.94 | 53.73±10.61 | .627 ⁴⁾ | -2.43±6.50 | .023^{D)} | -1.63±8.99 | .082 ²⁾ | .908 ⁴⁾ |
| LDL | | | | | | | | |
| visit 1 | 120.13±28.99 | 119.93±28.52 | .975 ³⁾ | | | | | |
| visit 4 | 106.28±19.82 | 115.93±30.11 | .095 ³⁾ | -13.85±21.58 | <.001^{D)} | -4.00±29.82 | .401 ¹⁾ | .137 ⁴⁾ |
| Triglyceride | | | | | | | | |
| visit 1 | 128.60±49.93 | 123.18±65.04 | .312 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 4 | 200.20±474.74 | 145.83±77.63 | .405 ⁴⁾ | 71.60±479.31 | .728 ²⁾ | 22.65±72.03 | .017²⁾ | .079 ⁴⁾ |
| AST | | | | | | | | |
| visit 1 | 24.58±6.27 | 26.83±9.60 | .743 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 24.13±5.84 | 26.95±11.81 | .335 ⁴⁾ | -0.45±5.32 | .910 ²⁾ | 0.13±9.28 | .857 ²⁾ | .713 ⁴⁾ |
| visit 4 | 23.68±7.30 | 24.73±8.11 | .475 ⁴⁾ | -0.90±3.34 | .041²⁾ | -2.10±7.34 | .193 ²⁾ | .981 ⁴⁾ |
| ALT | | | | | | | | |
| visit 1 | 18.10±5.40 | 20.10±9.42 | .721 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 18.78±6.78 | 20.48±13.81 | .855 ⁴⁾ | 0.68±5.27 | .651 ²⁾ | 0.38±9.92 | .869 ²⁾ | .900 ⁴⁾ |
| visit 4 | 16.73±5.45 | 18.38±10.54 | .728 ⁴⁾ | -1.38±4.12 | .036²⁾ | -1.73±8.47 | .224 ²⁾ | .843 ⁴⁾ |
| ALP | | | | | | | | |
| visit 1 | 76.78±21.76 | 74.80±22.32 | .788 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 76.18±24.45 | 76.38±22.05 | .866 ⁴⁾ | -0.60±7.48 | .530 ²⁾ | 1.58±11.96 | .489 ²⁾ | .300 ⁴⁾ |
| visit 4 | 75.35±22.98 | 77.45±23.02 | .593 ⁴⁾ | -1.43±7.96 | .284 ²⁾ | 2.65±14.75 | .503 ²⁾ | .230 ⁴⁾ |
| GGT | | | | | | | | |
| visit 1 | 20.65±15.55 | 21.45±23.40 | .772 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 19.55±10.46 | 20.88±22.41 | .765 ⁴⁾ | -1.10±8.71 | .308 ²⁾ | -0.58±4.81 | .768 ²⁾ | .846 ⁴⁾ |
| visit 4 | 21.65±18.95 | 21.23±21.03 | .750 ⁴⁾ | 1.00±18.15 | .190 ²⁾ | -0.23±3.77 | .964 ²⁾ | .222 ⁴⁾ |
| Total bilirubin | | | | | | | | |
| visit 1 | 0.62±0.18 | 0.60±0.17 | .638 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 0.66±0.26 | 0.60±0.18 | .594 ⁴⁾ | 0.04±0.17 | .183 ²⁾ | 0.01±0.17 | .882 ²⁾ | .689 ⁴⁾ |
| visit 4 | 0.63±0.22 | 0.67±0.22 | .310 ⁴⁾ | 0.01±0.17 | .647 ²⁾ | 0.08±0.17 | .758 ²⁾ | .632 ⁴⁾ |
| LDH | | | | | | | | |
| visit 1 | 407.33±77.28 | 431.18±103.33 | .453 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 405.05±61.32 | 427.95±86.50 | .176 ³⁾ | -2.28±47.09 | .762 ¹⁾ | -3.23±86.88 | .380 ²⁾ | .476 ⁴⁾ |
| visit 4 | 395.80±97.55 | 406.00±72.54 | .590 ⁴⁾ | -11.53±81.85 | .353 ²⁾ | -25.18±84.42 | .197 ²⁾ | .942 ⁴⁾ |
| Total cholestreol | | | | | | | | |
| visit 1 | 189.78±37.37 | 188.23±34.43 | .848 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 186.73±36.20 | 192.90±37.89 | .458 ³⁾ | -3.05±26.18 | .466 ¹⁾ | 4.68±26.58 | .273 ¹⁾ | .491 ⁴⁾ |
| visit 4 | 179.60±27.42 | 190.60±39.53 | .152 ³⁾ | -10.18±24.70 | .013^{D)} | 2.38±37.59 | .692 ¹⁾ | .281 ⁴⁾ |
| BUN | | | | | | | | |
| visit 1 | 15.60±3.77 | 15.05±3.45 | .498 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 16.00±3.44 | 16.30±4.22 | .728 ³⁾ | 0.40±3.38 | .459 ¹⁾ | 1.25±3.08 | .014^{D)} | .245 ⁴⁾ |
| visit 4 | 16.43±5.41 | 16.35±3.85 | .536 ⁴⁾ | 0.83±5.43 | .483 ²⁾ | 1.30±3.05 | .010^{D)} | .631 ³⁾ |
| GFR | | | | | | | | |
| visit 1 | 95.53±15.77 | 97.76±15.23 | .520 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 92.87±17.22 | 92.86±13.29 | .998 ³⁾ | -2.66±11.94 | .168 ¹⁾ | -4.90±8.73 | .001^{D)} | .153 ⁴⁾ |
| visit 4 | 92.69±17.95 | 93.30±13.50 | .864 ³⁾ | -2.83±9.48 | .066 ¹⁾ | -4.46±11.36 | .017^{D)} | .489 ³⁾ |
| Uric acid | | | | | | | | |
| visit 1 | 4.77±1.24 | 4.52±1.19 | .361 ³⁾ | | | | | |
| visit 3 | 4.65±1.34 | 4.52±1.10 | .977 ⁴⁾ | -0.13±0.55 | .161 ¹⁾ | -0.01±0.42 | .803 ²⁾ | .228 ⁴⁾ |

| | | | | | | | | |
|-------------------|--------------|--------------|--------------------|-------------|------------------------------|-------------|--------------------------|--------------------|
| visit 4 | 4.76±1.30 | 4.53±1.09 | .398 ³⁾ | -0.02±0.57 | .846 ¹⁾ | 0.00±0.56 | .955 ¹⁾ | .859 ³⁾ |
| pyruvate | | | | | | | | |
| visit 1 | 0.79±0.24 | 3.91±19.96 | .935 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 0.74±0.19 | 0.75±0.25 | .722 ⁴⁾ | -0.05±0.21 | .208 ²⁾ | -3.15±19.98 | .696 ²⁾ | .866 ⁴⁾ |
| visit 4 | 0.71±0.18 | 0.78±0.36 | .874 ⁴⁾ | -0.09±0.23 | .024²⁾ | -3.13±20.02 | .690 ²⁾ | .264 ⁴⁾ |
| lactate | | | | | | | | |
| visit 1 | 8.76±3.59 | 8.79±3.95 | .946 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 7.80±1.97 | 8.72±3.63 | .733 ⁴⁾ | -0.96±3.05 | .088 ²⁾ | -0.07±4.75 | .896 ²⁾ | .218 ⁴⁾ |
| visit 4 | 7.71±2.18 | 9.61±4.67 | .077 ⁴⁾ | -1.06±3.58 | .091 ²⁾ | 0.82±5.65 | .197 ²⁾ | .071 ⁴⁾ |
| glucose | | | | | | | | |
| visit 1 | 93.25±9.32 | 93.50±8.24 | .580 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 96.50±10.23 | 96.05±11.60 | .900 ⁴⁾ | 3.25±8.83 | .044²⁾ | 2.55±12.35 | .199 ¹⁾ | .569 ⁴⁾ |
| visit 4 | 100.13±14.43 | 100.83±13.40 | .479 ⁴⁾ | 6.88±14.73 | <.001²⁾ | 7.33±13.81 | .003²⁾ | .923 ⁴⁾ |
| creatinine | | | | | | | | |
| visit 1 | 0.69±0.11 | 0.67±0.11 | .309 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 0.69±0.10 | 0.70±0.10 | .927 ⁴⁾ | 0.01±0.06 | .379 ²⁾ | 0.03±0.05 | .003²⁾ | .077 ³⁾ |
| visit 4 | 0.71±0.12 | 0.69±0.11 | .435 ⁴⁾ | 0.02±0.07 | .032²⁾ | 0.03±0.07 | .023²⁾ | .791 ³⁾ |
| CK | | | | | | | | |
| visit 1 | 108.30±72.76 | 107.60±73.21 | .908 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 3 | 106.23±51.70 | 109.18±55.17 | .889 ⁴⁾ | -2.08±52.67 | .376 ²⁾ | 1.58±67.99 | .274 ²⁾ | .696 ⁴⁾ |
| visit 4 | 106.78±64.68 | 104.28±42.95 | .462 ⁴⁾ | -1.53±64.12 | .850 ²⁾ | -3.33±64.17 | .387 ²⁾ | .740 ⁴⁾ |
| hsCRP | | | | | | | | |
| visit 1 | 0.16±0.34 | 0.15±0.27 | .973 ⁴⁾ | | | | | |
| visit 4 | 0.10±0.15 | 0.12±0.16 | .636 ⁴⁾ | -0.06±0.22 | .047²⁾ | -0.03±0.30 | .420 ²⁾ | .572 ⁴⁾ |

* P values were compared within each group from baseline.

** P values were compared between groups.

¹⁾ P values were derived from paired t test.

²⁾ P values were derived from Wilcoxon' s signed rank test.

³⁾ P values were derived from independent t test.

⁴⁾ P values were derived from Mann-Whitney' s U test.

(Shapiro-Wilk' s test was employed for test of normality assumption.)

- Tablet을 1회 이상 복용한 시험군 40명과 대조군 40명의 대상자에 대해 시험 기간 중에 생체징후 평가, 임상실험실검사 등으로 안전성을 평가하였다. 시험 기간 중 이상반응이 발생한 사례가 있으나 시험 tablet과의 연관성은 없을 것으로 판단되며, 임상실험실 검사치 및 신체검사 등을 통한 안전성 평가결과 임상적으로 위해하다고 판단할 근거는 없었다. 안전성 평가는 시험에 참여한 임상 의사가 시행하였다. 따라서, 본 팔 추출물을 성인 기준 2,100 mg/day을 중·장기간 동안 섭취하여도 안전하다고 판단된다.

ⓑ) 종합적 분석

- 본 인체시험은 팔 추출물 섭취 시 운동수행능력 개선 기능성 및 안전성을 검증하기 위하여 실시하였다. 이를 위해서 준건강인(성인) 80명을 대상으로 본 인체시험용 식품 투여 전/후의 유효성 및 안전성 평가변수를 측정하여 비교하였다. 본 시험 대상 품목인 팔은 이미 일반식품으로도 널리 섭취되고 있으므로 그 안전성은 경험적으로 입증되어 있다고 볼 수 있으며, 따라서 본 시험에서 안전성 위해요소가 발견되지 않은 것은 당연한 것으로서 긍정적으로 판단된다. 6 min walk에서 시험군만 군 내에서 유의하게 증가하였으므로 꾸준히 복용하면 운동수행능력에 도움이 될 것으로 기대된다.

(마) 연령 및 BMI에 따른 인체시험자료 분석

① 실험 재료 및 방법

㉠ 분석 대상 및 항목설정

- 인체적용시험 데이터를 기반으로 연령별(50, 60, 70대), 65세 이상의 고령화, 정상(BMI 25미만)과 비만(BMI 25이상)으로 구분하여 분석을 진행하였다. Parameter로는 6분 걷기, 악력(좌, 우), 대퇴사두근력(좌, 우), 하지근육량, 사지근육비율을 선택하여 분석하였다.

㉡ 통계처리

- 모든 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 25.0 통계 패키지(SPSS Inc.)를 통해 분석하였다. 군 내에서 시간에 따른 parameter의 변화량에 대한 유의차는 독립 t 검정을 수행하였다. 군 내에서 시간에 따른 parameter의 값에 대한 유의차는 분산분석(ANOVA)으로 비교한 후, 유의성을 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 수준에서 Duncan 다중범위 분석에 의해 검정하였다.

② 결과 및 고찰

㉠ 팔 추출물 섭취 50대 성인의 근육 변화

- 팔 추출물을 섭취한 50대 성인의 근육 관련 지표를 측정하였다. 섭취 기간이 끝난 후, 6분 걷기, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근력(우)의 평균이 증가하였다(표 2-2-21). 악력, 하지근육량, 사지근육비율의 경우, 큰 변화가 없었다.

표 2-2-21. 팔 추출물 섭취 50대 성인의 섭취 기간에 따른 근육 관련 지표 측정

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지근육량 | 사지근육비율 |
|-----|--------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| 0주 | 512.68 \pm 73.21 | 22.06 \pm 6.13 | 23.08 \pm 4.61 | 87.20 \pm 24.20 | 35.38 \pm 14.75 | 5.53 \pm 0.48 | 6.02 \pm 0.42 |
| 6주 | 532.48 \pm 60.60 | 25.24 \pm 3.77 | 25.66 \pm 3.79 | 102.18 \pm 34.90 | 46.68 \pm 18.36 | 5.67 \pm 0.67 | 5.93 \pm 0.53 |
| 12주 | 541.02 \pm 58.03 | 22.92 \pm 6.25 | 24.72 \pm 4.13 | 102.18 \pm 18.83 | 44.54 \pm 9.27 | 5.56 \pm 0.49 | 5.99 \pm 0.43 |

- 팔 추출물을 섭취한 50대 성인에서 0주를 기준으로 6주와 12주의 변화량을 확인하였다. 그 결과, 시간에 따라 6분 걷기, 대퇴사두근력(좌) 지표의 평균이 큰 폭으로 증가하였다(표 2-2-22). 반면, 악력, 하지근육량은 큰 변화가 없었으며, 사지근육비율은 소폭으로 감소함을 확인하였다.

표 2-2-22. 팔 추출물 섭취 50대 성인의 시간 변화에 따른 근육 관련 지표 변화량

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지근육량 | 사지근육비율 |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------------|-------------|-----------|------------|
| 6주-0주 | 19.80±39.57 | 3.18±3.32 | 2.58±2.57 | 14.98±29.51 | 11.30±19.05 | 0.14±0.32 | -0.10±0.20 |
| 12주-0주 | 28.34±26.66 | 0.86±3.01 | 1.64±1.99 | 14.98±24.80 | 9.16±12.55 | 0.04±0.18 | -0.03±0.20 |

㉠ 팔 추출물 섭취 60대 성인의 근육 변화

- 60대 성인에게 팔 추출물을 섭취시켰을 때, 0주와 비교하여, 6주와 12주에 6분 걷기, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근력(우), 하지 근육량이 모두 증가하였다(표 2-2-23). 반면, 악력(좌)와 악력(우)는 0주와 비교하여 12주에 감소함을 확인하였다.

표 2-2-23. 팔 추출물 섭취 60대 성인의 섭취 기간에 따른 근육 관련 지표 측정

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지근육량 | 사지근육비율 |
|-----|--------------|------------|------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 0주 | 513.47±49.90 | 23.93±3.26 | 26.03±5.63 | 71.21±22.54 | 36.31±15.62 | 5.57±0.74 | 6.01±0.68 |
| 6주 | 521.46±43.81 | 23.31±3.53 | 25.16±4.42 | 78.73±20.16 | 43.08±10.94 | 5.61±0.72 | 6.07±0.65 |
| 12주 | 527.38±62.93 | 22.87±4.23 | 25.44±4.52 | 84.94±18.69 | 44.30±10.00 | 5.65±0.74 | 6.07±0.65 |

- 팔 추출물 섭취 60대 성인에게 근기능 지표의 시간에 따른 변화량은, 6분 걷기, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근력(우), 하지근육량, 사지근육량에서 모두 증가하였으며, 특히, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근력(우), 하지근육량은 유의한 수준을 나타내었다(표 2-2-24).

표 2-2-24. 팔 추출물 섭취 60대 성인의 시간 변화에 따른 근육 관련 지표 변화량

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지근육량 | 사지근육비율 |
|--------|-------------|------------|------------|---------------|-------------|-------------|-----------|
| 6주-0주 | 7.98±33.06 | -0.48±2.54 | -0.87±5.08 | 7.83±16.20 | 6.50±15.74 | 0.05±0.12 | 0.07±0.18 |
| 12주-0주 | 13.91±52.04 | -0.93±3.13 | -0.59±5.37 | 14.62±10.82** | 8.47±13.28* | 0.10±0.13** | 0.08±0.18 |

㉡ 팔 추출물 섭취 70대 노인의 근육 변화

- 분석결과, 팔 추출물을 섭취한 70대 노인에서 0주와 비교하여 12주에, 사지근육비율을 제외하고, 다른 모든 지표의 평균값이 증가하였다(표 2-2-25).

표 2-2-25. 팔 추출물 섭취 70대 성인의 섭취 기간에 따른 근육 관련 지표 측정

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지근육량 | 사지근육비율 |
|-----|--------------|------------|------------|-------------|--------------|-----------|-----------|
| 0주 | 485.40±59.09 | 23.86±4.67 | 23.42±3.26 | 65.09±20.84 | 29.58±9.12 | 5.60±0.72 | 5.99±0.64 |
| 6주 | 496.46±63.91 | 23.25±4.92 | 23.60±4.86 | 74.64±20.46 | 38.76±14.46* | 5.64±0.81 | 6.00±0.64 |
| 12주 | 511.40±76.65 | 24.12±5.26 | 24.96±4.88 | 79.01±23.59 | 41.00±11.9* | 5.62±0.80 | 5.96±0.61 |

- 시간 변화에 따른 지표의 변화량은 사지근육비율을 제외하고 모든 군에서 0주에 비해 12주에 증가하였음을 확인하였다. 특히, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근력(우)의 변화량은 0.01 수준에서 유의한 차이를 보였으며, 6분 걷기는 12주-0주의 변화량에서 0.05 수준에서 유의한 차이를 보였다. 하지만 악력(좌), 하지근육량, 사지근육비율 지표는 팔 추출물 섭취에 따른 변화를 보이지 않았다(표 2-2-26).

표 2-2-26. 팔 추출물 섭취 70대 성인의 시간 변화에 따른 근육 관련 지표 변화량

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지근육량 | 사지근육비율 |
|--------|--------------|------------|-----------|--------------|--------------|------------|-------------|
| 6주-0주 | 11.06±43.61 | -0.60±2.20 | 0.18±2.68 | 9.55±8.03** | 9.17±10.24** | 0.043±0.26 | 0.012±0.22 |
| 12주-0주 | 26.00±37.03* | 0.26±2.37 | 1.54±2.79 | 13.92±9.10** | 11.41±9.00** | 0.021±0.20 | -0.029±0.21 |

㉔ 팔 추출물 섭취 65세 이상 노인의 근육 변화

- 현재 한국에서는 고령시대 분류를 위한 나이를 65세로 하고 있다. 따라서, 65세 이상의 고령인에 대해서 분석을 진행하였다. 팔 추출물을 섭취한 65세 이상 노인에서 시간에 따라 6분 걷기, 악력(우), 대퇴사두근력(좌,우)의 지표가 증가하였다(표 2-2-27). 특히, 대퇴사두근력(좌)에서 0주와 비교하여 6주 때, 0.01에서 유의한 차이를 나타냈으며, 대퇴사두근력(우)에서 0주와 비교하여 12주 때, 0.05에서 유의한 차이를 나타냈다.

표 2-2-27. 팔 추출물 섭취 65세 이상 성인의 섭취 기간에 따른 근육 관련 지표 측정

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지근육량 | 사지근육비율 |
|-----|--------------|------------|------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| 0주 | 491.24±57.13 | 23.76±3.98 | 24.06±3.14 | 65.36±18.54 | 31.46±12.28 | 5.51±0.62 | 5.98±0.66 |
| 6주 | 502.31±56.46 | 23.48±4.28 | 24.44±4.54 | 74.40±20.66 | 39.92±13.13* | 5.57±0.68 | 6.01±0.61 |
| 12주 | 511.83±76.54 | 23.48±4.98 | 25.38±4.81 | 81.61±20.70** | 41.55±10.97** | 5.56±0.65 | 5.99±0.62 |

- 시간 변화에 따른 근기능 지표 변화량의 경우, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근력(우)에서 6주-0주, 12주-0주 변화량 모두 0.01수준에서 유의한 차이를 보였다. 또한 악력(우)의 경우, 12주-0주의 변화량에서 0.05수준의 유의한 차이를 보였다. 6분 걷기의 경우 섭취 기간에 따라 걷는 시간이 증가하지만 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면, 악력(좌) 지표의 변화량은 감소하는 결과를 보였다(표 2-2-28).

표 2-2-28. 팔 추출물 섭취 65세 이상 성인의 시간 변화에 따른 근육 관련 지표 변화량

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지 근육량 | 사지근육비율 |
|--------|-------------|------------|------------|--------------|---------------|------------|------------|
| 6주-0주 | 11.07±37.53 | -0.27±2.35 | 0.37±2.57 | 9.03±11.29** | 8.46±12.98** | 0.058±0.21 | 0.284±0.20 |
| 12주-0주 | 20.59±50.89 | -0.28±2.95 | 1.32±2.93* | 16.24±9.52** | 10.09±10.97** | 0.046±0.18 | 0.008±0.20 |

㉓ 팔 추출물 섭취 정상인의 근육 변화

- BMI이 값이 25미만이 사람을 기준으로 분석을 진행하였다. 분석결과, 팔 추출물을 섭취한 정상인에서 시간에 따라 6분 걷기, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근(우)의 지표가 증가하였다. 그러나 악력(좌), 하지근육량과 사지근육 비율은 뚜렷한 증가를 관찰할 수 없었다(표 2-2-29).

표 2-2-29. 팔 추출물 섭취 정상인의 섭취 기간에 따른 근육 관련 지표 측정

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지 근육량 | 사지근육비율 |
|-----|--------------|------------|------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 0주 | 513.70±47.60 | 24.5±4.00 | 25.32±4.34 | 74.12±24.37 | 35.14±10.10 | 5.60±0.75 | 5.90±0.67 |
| 6주 | 520.89±44.86 | 24.09±4.30 | 24.90±4.66 | 85.23±23.53 | 42.68±12.23 | 5.63±0.79 | 5.90±0.66 |
| 12주 | 537.45±56.42 | 24.11±4.58 | 25.53±4.35 | 87.98±23.13 | 43.7±10.64 | 5.62±0.79 | 5.89±0.63 |

- 섭취 시간에 따른 근육 관련 지표의 변화량에서 6분 걷기, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근력(우)가 0.01에서 유의한 수준으로 증가함을 확인하였다. 하지 근육량의 경우, 평균값이 증가는 하였으나 유의한 수준은 아니었으며, 사지근육비율과 악력(좌)의 경우 평균값이 오히려 감소하였다(표 2-2-30).

표 2-2-30. 팔 추출물 섭취 정상인의 시간 변화에 따른 근육 관련 지표 변화량

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지 근육량 | 사지근육비율 |
|--------|-----------------|------------|------------|---------------|--------------|------------|-------------|
| 6주-0주 | 7.19 ± 42.16 | -0.41±2.57 | -0.41±4.59 | 11.10±15.81** | 7.54±13.04** | 0.037±0.23 | -0.001±0.18 |
| 12주-0주 | 23.75 ± 40.99** | -0.39±2.80 | 0.21±4.77 | 13.86±12.78** | 8.55±12.54** | 0.026±0.18 | -0.001±0.19 |

㉔ 팔 추출물 섭취 비만인의 근육 변화

- BMI가 25 이상인 사람을 기준으로 분석을 진행하였다. 분석결과, 팔 추출물을 섭취한 비만인에서 0주와 비교하여 12주에서 6분 걷기, 악력(우), 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근(우), 하지근육량, 사지근육비율이 증가하였으나, 유의한 차이를 나타내지 않았다. 악력(좌)의 경우 큰 변화가 없었다(표 2-2-31).

표 2-2-31. 팔 추출물 섭취 비만인의 섭취 기간에 따른 근육 관련 지표 측정

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지 근육량 | 사지근육비율 |
|-----|----------------|------------|------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 0주 | 477.56 ± 69.13 | 21.78±4.08 | 23.14±3.17 | 63.68±16.68 | 30.15±11.75 | 5.53±0.58 | 6.24±0.46 |
| 6주 | 496.10± 71.52 | 22.30±3.43 | 24.01±4.22 | 68.78±19.83 | 40.08±15.89 | 5.64±0.63 | 6.32±0.42 |
| 12주 | 490.45 ± 79.72 | 21.66±5.08 | 24.33±4.96 | 77.88±5.73 | 41.65±10.7 | 5.65±0.58 | 6.31±0.42 |

- 팔 추출물 섭취 비만인의 시간 변화에 따른 근육 관련 지표 변화량을 분석하였다. 분석 결과, 대퇴사두근력(좌)와 하지근육량에서 유의한 0주와 비교하여 12주의 변화량이 유의한 수준으로 증가한 것을 확인하였다. 6분 걷기와 대퇴사두근력(우)의 경우 변화량이 증가는 하였으나 유의한 차이를 보이지 않았다(표 2-2-32).

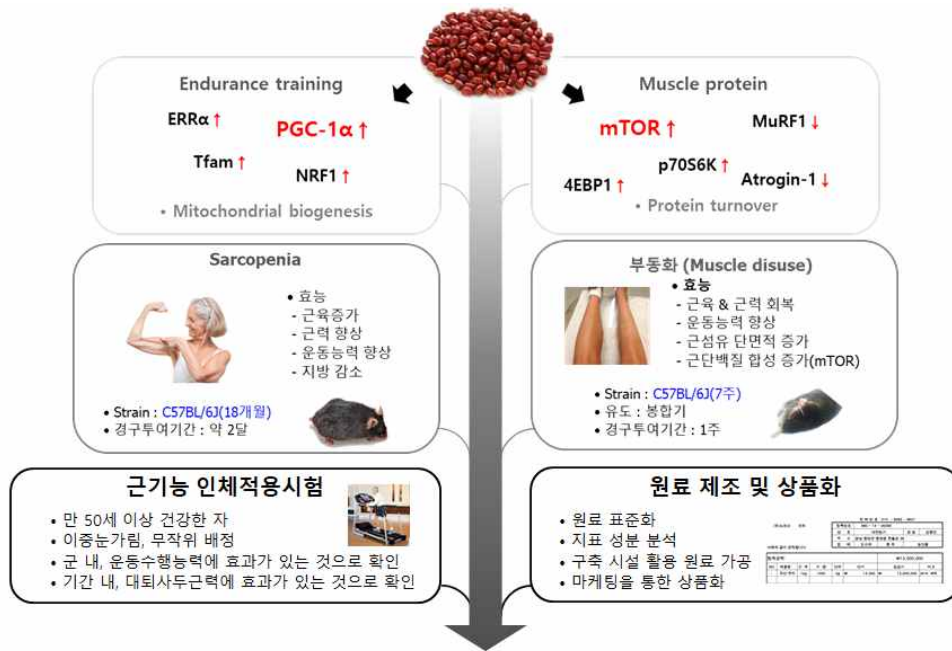
표 2-2-32. 팔 추출물 섭취 비만인의 시간 변화에 따른 근육 관련 지표 변화량

| 기간 | 6분 걷기 | 악력(좌) | 악력(우) | 대퇴사두근력(좌) | 대퇴사두근력(우) | 하지 근육량 | 사지 근육비율 |
|--------|-----------------|------------|-----------|-------------|------------|---------------|-----------|
| 6주-0주 | 18.54 ± 23.05** | 0.52±3.21 | 0.87±2.69 | 5.1±14.48 | 9.93±15.92 | 0.1250±0.14** | 0.07±0.25 |
| 12주-0주 | 12.89 ± 50.70 | -0.12±3.11 | 1.19±2.83 | 14.2±12.2** | 11.5±8.39 | 0.14±0.14** | 0.06±0.23 |

㉠ 종합결과

- 종합적으로, 팔 추출물을 섭취함에 따라, 6분 걷기, 대퇴사두근력(좌), 대퇴사두근력(우)가 증가함을 확인하였다. 특히, 대퇴사두근력(좌)와 대퇴사두근력(우)에서는 유의한 차를 보이는 연령대도 있었다. 사지근육비율과 하지 근육량에는 큰 변화가 없었으며, 악력의 경우 감소하는 연령대도 있었다. 따라서, 팔 추출물의 섭취는 시간에 따라 근력을 향상시키는 효과와 운동수행능력을 증가시키는 효과가 있음을 기대할 수 있다.

(바) 세포실험, 동물실험, 인체적용시험 결과의 종합적 분석



국내산 팥의 노화성 근감소증 개선 기능성 소재 개발을 위한 기반 기술개발

- 본 연구에서 산업적 가치가 있는 국내산 두류 10종을 선정하여 세포실험, 동물실험, 인체적용시험을 진행하였다.
- 1차년도에 10종에 대하여 아임계 추출물, 에탄올 추출물, 열수 추출물을 제작하였으며, 이에 대해 근육과 관련있는 mTOR와 운동수행능력과 관련 있는 PGC-1 α 을 측정하였다. 이를 토대로 최종 팥을 선정하였다. 팥의 생리활성물질 및 최적 프로테아제를 선정하기 위하여, 문헌 조사 및 실험을 진행하였다. 팥에서 단백질을 분리한 다음, 프로테아제 5종을 처리하여 실험 결과를 확인하였다. 그 결과, Protamex가 가장 효과가 좋은 것으로 확인 되었다.
- 2차년도에 선정된 팥을 이용하여 팥 추출 복합물을 제조하였다. 팥 추출 복합물의 효능을 동물실험에서 검증하기 위하여, 부동화 모델과 노화 모델을 사용하였다. 부동화 모델에서 근육의 회복, 운동능력 향상, 근섬유 단면적의 증가를 확인하였으며, 분자기전을 규명하였다. 노화 모델에서도 근육의 향상 및 근력의 증가, 근육 무게 증가를 확인하였으며, 이의 분자기전과 항산화, 항염증 효과도 확인하였다.
- 3차년도 임상시험을 통해 군 내에서 운동수행능력이 향상되었음을 확인하였다. 또한, 연령대에 따라, 정상과 비만에 따라 나눠서 분석한 결과 대퇴사두근력에서 군 내 간에 대부분 유의한 수준으로 증가한 것을 확인하였다. 실험 과정동안 어떠한 이상 징후도 관찰할 수 없었다.
- 결론적으로, 본 과제를 통해 개발한 팥 추출물은 근육 강화 및 근기능 향상을 위한 항노화 맞춤 기능성 식품에 활용 및 주원료로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

2-3. 연구개발성과

가. 지적재산권 출원/등록(출원 10건, 등록 1건)

| No | 특허명 | 출원 번호 | 출원일 | 등록 번호 | 등록일 | 발명자 | 국가 |
|----|---|-------------------|-------------|------------|-------------|-----------------------------------|------|
| 1 | 팔을 포함하는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물 | 10-2017-0056162 | 2017.05.02. | 10-1882006 | 2018.07.19. | 황재관, 이세인, 김창희, 김미보, 김도언, 정희철, 김형민 | 대한민국 |
| 2 | 팔 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육 손상 예방, 개선 또는 치료용 조성물 | 10-2018-0122603 | 2018.10.15. | | | 황재관, 김창희, 권도완, 김도언, 정희철, 김형민 | 대한민국 |
| 3 | 동부, 잠두 또는 제비콩을 함유하는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물 | 10-2018-0132585 | 2018.10.31. | | | 황재관, 김창희, 김도언, 정희철, 김형민 | 대한민국 |
| 4 | 동부, 잠두 또는 제비콩을 함유하는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물 | 10-2019-0008616 | 2019.01.23. | | | 황재관, 김창희, 김도언, 정희철, 김형민 | 대한민국 |
| 5 | 동부, 잠두 또는 제비콩을 함유하는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물 | 10-2019-0008622 | 2019.01.23. | | | 황재관, 김창희, 김도언, 정희철, 김형민 | 대한민국 |
| 6 | Composition for improving muscular function or for enhancing exercise performance comprising <i>Vigna angularis</i> var. <i>Angularis</i> | PCK/KR2017/004701 | 2017.05.02 | | | 황재관, 이세인, 김창희, 김미보, 김도언, 정희철, 김형민 | PCT |
| 7 | Composition for improving muscular function or for enhancing exercise performance comprising <i>Vigna angularis</i> var. <i>Angularis</i> | 16/098/416 | 2018.11.01 | | | 황재관, 이세인, 김창희, 김미보, 김도언, 정희철, 김형민 | 미국 |
| 8 | Composition for improving muscular function or for enhancing exercise performance comprising <i>Vigna angularis</i> var. <i>Angularis</i> | 2018-558236 | 2018.11.02 | | | 황재관, 이세인, 김창희, 김미보, 김도언, 정희철, 김형민 | 일본 |
| 9 | Composition for improving muscular function or for enhancing exercise performance comprising <i>Vigna angularis</i> var. <i>Angularis</i> | 17792915.5. | 2018.11.30 | | | 황재관, 이세인, 김창희, 김미보, 김도언, 정희철, 김형민 | 유럽 |
| 10 | Composition for improving muscular function or for enhancing exercise performance comprising <i>Vigna angularis</i> var. <i>Angularis</i> | 201780041210.7 | 2018.12.29 | | | 황재관, 이세인, 김창희, 김미보, 김도언, 정희철, 김형민 | 중국 |

나. 국내 및 국제 학술회의 발표(국내 3편, 국제 4편)

| No | 회의명칭 | 발표제목 | 발표일시 | 장소 | 국가 |
|----|---|---|-------------|----------|-------|
| 1 | 2016 KFN International Symposium and Annual Meeting | Inhibitory effect of red bean extract on TNF- α induced muscle atrophy | 2016.10.31. | ICC Jeju | Korea |
| 2 | 2017 KoSFoST | Preventive effect of red bean extract | 2017. | ICC | Korea |

| | | | | | |
|---|--|--|--------------|------------------------------|----------|
| | International Symposium and Annual Meeting | on immobilization-induced muscle atrophy in C57BL/6N mice | 06.21. | Jeju | |
| 3 | 2018 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting | Inhibitory effect of red bean extract on sarcopenia in middle-aged mice | 2018. 06.27. | BEXCO Busan | Korea |
| 4 | 20 th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN) | Simulatory effect of red bean extract on muscle function by increasing mitochondrial biogenesis and muscle protein synthesis | 2016. 12.14. | Rama garden hotel Bangkok | Thailand |
| 5 | 20 th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN) | Screening for muscle function of various extracts of legumes by regulating PGC-1 α and mTOR activities | 2016. 12.14. | Rama garden hote Bangkok | Thailand |
| 6 | The 15 th ASEAN Food Conference | Inhibitory effect of red bean on immobilization-induced muscle atrophy | 2017. 11.14. | Sheraton hotel Ho Chi Minh | Vietnam |
| 7 | 3 rd International Symposium on Phytochemicals in medicine and Food | Stimulatory effect of vitexin on mitochondrial biogenesis by activating AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway | 2018. 08.25. | Lishui Yunquan Hotel Kunming | China |

다. 전문 연구 인력 양성

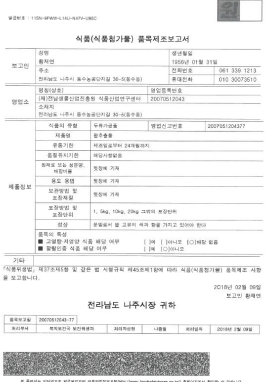
| No | 분류 | 기준 년도 | 현황 | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------|----------|-----|----|----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|--|
| | | | 학위별 | | | | 성별 | | 지역별 | | | | | |
| | | | 박사 | 석사 | 학사 | 기타 | 남 | 여 | 수도권 | 충청권 | 영남권 | 호남권 | 기타 | |
| 1 | 생물 소재공학 협동과정 | 2016 | | 1 | | | | 1 | 1 | | | | | |
| 2 | 생명공학 | 2017 | | 3 | | | 1 | 2 | 3 | | | | | |
| 3 | 생명공학 | 2018 | | 3 | | | 2 | 1 | 2 | | 1 | | | |

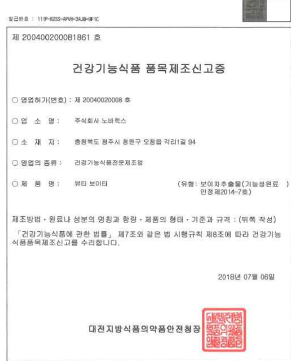
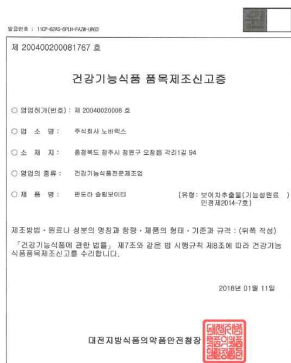

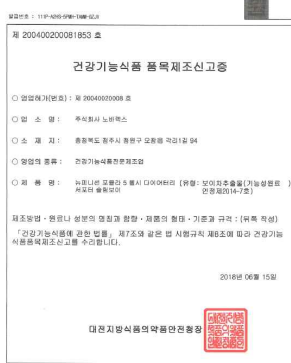
라. 홍보 전시(국내 1건, 해외 2건)

| No | 사진 | 전시회명 | 날짜 | 장소 | 국가 |
|----|---|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----|
| 1 |  | Supply Side West 2017 | 17.09.27~ 17.09.28 | 라스베가스 만달레이베이 컨벤션센터 | 미국 |

| | | | | | |
|---|--|---------------------|-----------------------|------------------|------|
| 2 |  | Vita Food Asia 2017 | 17.09.05~ 17.09.06 | 마리나베이샌즈 컨벤션센터 | 싱가포르 |
| 3 |  | 한국 식품 과학회 | 18.06.27~ 18.06.29 | 부산 BEXCO | 한국 |

마. 사업화 아이템(원료 1건, 건강기능식품 4건)

| No | 사진 | 아이템 명 | 특징 |
|----|---|--|--|
| 1 |  | <p>팜 추출물 식품(식품첨가물) 품목제조신고서</p> | <p>분말로서 팜 고유의 색과향을 가지고 있어야 한다. (두류가공품)</p> |

| | | | |
|----------|---|--|---|
| <p>2</p> |  <p>보건번호 : 117-4020-0001-0004-0001 제 200400200081981 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 영입허가(번호) : 제 20040020008 호 ○ 업 소 명 : 주식회사 노바팍스 ○ 소 재 지 : 충청북도 청주시 흥덕구 오성읍 각리1길 54 ○ 영입의 종류 : 건강기능식품제조업종 ○ 제 품 명 : 뷰티 보이티 (유형: 보이기추출물(기능성원료) 안정제(47.7%) 제조방법·유통이나 성분의 안정과 함양·제품의 형태·기준과 규격 : (유형: 액상) 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고증 수령합니다.</p> <p>2019년 07월 06일</p> <p>대전지방식품의약품안전청장</p> | <p>뷰티 보이티 건강기능식품 품목제조신고증 (유형 : 보이차추출물)</p> | <p>체지방감소에 도움을 줄 수 있음 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음</p> |
| <p>3</p> |  <p>보건번호 : 117-4020-0001-0004-0002 제 200400200081767 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 영입허가(번호) : 제 20040020008 호 ○ 업 소 명 : 주식회사 노바팍스 ○ 소 재 지 : 충청북도 청주시 흥덕구 오성읍 각리1길 54 ○ 영입의 종류 : 건강기능식품제조업종 ○ 제 품 명 : 판도라 슬립보이티 (유형: 보이기추출물(기능성원료) 안정제(47.7%) 제조방법·유통이나 성분의 안정과 함양·제품의 형태·기준과 규격 : (유형: 액상) 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고증 수령합니다.</p> <p>2019년 01월 11일</p> <p>대전지방식품의약품안전청장</p> | <p>판도라 슬립보이티 건강기능식품 품목제조신고증 (유형 : 보이차추출물)</p> | <p>체지방 감소에 도움을 줄 수 있음 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음</p> |
| <p>4</p> |  <p>보건번호 : 1129-4020-0001-0002-0002 제 200400200021902 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 영입허가(번호) : 제 20040020002 호 ○ 업 소 명 : 주식회사 뉴비전 ○ 소 재 지 : 충청북도 제천시 방위마을로2길 30 ○ 영입의 종류 : 건강기능식품제조업종 ○ 제 품 명 : 뉴피니션 포플라4 (유형: 가르시아니아검토지아 추출물) 제조방법·유통이나 성분의 안정과 함양·제품의 형태·기준과 규격 : (유형: 액상) 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고증 수령합니다.</p> <p>2019년 03월 15일</p> <p>대전지방식품의약품안전청장</p> | <p>뉴피니션 포플라4 헬시밸런스젤리스트틱 건강기능식품 품목제조신고증 (유형 : 가르시아니아검토지아 추출물)</p> | <p>탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방 감소에 도움을 줌</p> |
| <p>5</p> |  <p>보건번호 : 117-4020-0001-0004-0003 제 200400200081853 호</p> <p>건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 영입허가(번호) : 제 20040020008 호 ○ 업 소 명 : 주식회사 노바팍스 ○ 소 재 지 : 충청북도 청주시 흥덕구 오성읍 각리1길 54 ○ 영입의 종류 : 건강기능식품제조업종 ○ 제 품 명 : 뉴피니션 포플라5 헬시 다이어티 (유형: 보이기추출물(기능성원료) 안정제(47.7%) 제조방법·유통이나 성분의 안정과 함양·제품의 형태·기준과 규격 : (유형: 액상) 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고증 수령합니다.</p> <p>2019년 06월 15일</p> <p>대전지방식품의약품안전청장</p> | <p>뉴피니션 포플라5 헬시 다이어티 건강기능식품 품목제조신고증 (유형 : 보이차추출물)</p> | <p>체지방 감소에 도움을 줄 수 있음 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음</p> |

바. 기술이전(1건)

양도설정계약서


■ 계약명 : 팔을 포함하는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물

2017년 9월 1일

계약당사자

'갑'

주소 : 서울특별시 서대문구 연세로 50

기관 : 연세대학교 

대표 : 최문근 (인)

'을'

주소 : 경기도 성남시 중원구 상대원동 190-1

SK n 테크노파크 테크센터 1109호

상호 : (주)뉴트리

대표 : 김도연 

사. 인체적용시험(1건)

- 인체적용시험의 IRB 승인 심의결과 통지서 및 종료 심의결과 통지서(동아대학교)



심의결과 통지서

우 49201 부산광역시 서구 대신공원로 26 ☎051-240-2572,2577 전송 : 051-231-2140

| | | | | | |
|--|--|--|----------|---------------|---------|
| 수신 | 의뢰기관 | (주)뉴트리 | | | |
| | 연구책임자 | 소속 | 가정의학과 | 성명·직위 | 한성호·부교수 |
| 과제번호(IRB No.) | DAUHIRB-17-231 | | | | |
| 연구 과제명 | 국문 | 팥 추출물의 경구 섭취가 운동수행능력 개선에 미치는 영향 분석을 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험 | | | |
| | 영문 | Clinical study to analyze effects of adzuki beans extract on exercise performance : double-blind, randomized, placebo controlled trial | | | |
| 연구예정기간 | IRB 승인일로부터 ~ 2018년 12월 31일 | | 연구승인유효기간 | 2018년 12월 26일 | |
| 심의 구분 | ●신속심의 ○정규심의 | | 심의 일자 | 2017년 12월 27일 | |
| 지속심의주기 | ○3개월 ○6개월 ●1년 ○기타 | | | | |
| 심의결과 | ●승인 ○시정승인 ○보완 후 신속심의 ○보완 후 정기심의 ○반려 ○승인된 임상시험의 중지 또는 보류 | | | | |
| 심의 의견 | | | | | |
| 수정내용을 확인 후 승인합니다. | | | | | |
| 제출서류 목록 | | | | | |
| <p>연구계획서요약</p> <p>연구계획서 Version : 1.1 (인체적용시험계획서_팥 추출물_운동수행능력_ver.1.1_20171226.pdf)</p> <p>연구계획서 체크리스트</p> <p>연구대상자 설명문 및 동의서 Version : 1.1 (연구참여자 설명문 및 동의서_팥 추출물_운동수행능력_ver.1.1_20171226.pdf)</p> <p>연구자용 연구대상자 동의서 체크리스트</p> <p>중례기록서 Version : 1.0 (중례기록서_팥 추출물_운동수행_ver.1.0_20171106.pdf)</p> <p>연구대상자 보상 규약 및 보상에 관한 사항 Version : 1.0 (피해자보상에대한규약.pdf)</p> <p>연구비 실행예산서</p> <p>안전성 정보 및 임상시험자 자료집 Version : 1.0 (임상시험자 자료집_팥_v1.0.pdf)</p> | | | | | |



심의결과 통지서

우 49201 부산광역시 서구 대신공원로 26 ☎051-240-2572,2577 전송 : 051-231-2140

| | | | | | |
|--------------------|--|--|-------|---------------|-----------|
| 수신 | 의뢰기관 | (주)뉴트리 | | | |
| | 연구책임자 | 소속 | 가정의학과 | 성명·직위 | 한성호 · 부교수 |
| 과제번호(IRB No.) | DAUHIRB-17-231 | | | | |
| 연구 과제명 | 국문 | 팥 추출물의 경구 섭취가 운동수행능력 개선에 미치는 영향 분석을 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험 | | | |
| | 영문 | Clinical study to analyze effects of adzuki beans extract on exercise performance : double-blind, randomized, placebo controlled trial | | | |
| 연구기간 | 2017년 12월 27일 ~ 2018년 09월 14일 | 연구승인유효기간 | 년 월 일 | | |
| 심의 구분 | ●신속심의 ○정규심의 | | 심의 일자 | 2018년 10월 12일 | |
| 지속심의주기 | ○3개월 ○6개월 ●1년 ○기타 | | | | |
| 심의결과 | ●승인 ○시정승인 ○보완 후 신속심의 ○보완 후 정기심의 ○반려 ○승인된 임상시험의 중지 또는 보류 | | | | |
| 심의 의견 | | | | | |
| 중료보고서를 검토 후 승인합니다. | | | | | |
| 제출서류 목록 | | | | | |
| 연구종료보고서 - 종료보고 | | | | | |

* 본 임상연구심의위원회는 국제표준화추진위원회(ICH), 약사법, 의료기기법, 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련 법류를 준수합니다.

* 본 연구과 이해상충관계가 있는 위원이 있을 경우 해당 위원은 연구의 심의에서 배제하였습니다.

* 심의결과가 시정승인, 보완(신속심의,보완(정기심의)인 경우 보완심의신청서를 제출하시면 신속 또는 정기심의를 거쳐 최종승인을 받을 수 있습니다.

* 심의결과에 이의가 있을 경우 이의신청서를 작성하여 제출하여 주시기 바랍니다.

2018년 10월 12일

동아대학교병원 임상연구심의위원회 위원장



3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 총괄목표

| 구분 | 내용 |
|------|--|
| 최종목표 | 국내산 두류의 노화성 근감소증(sarcopenia) 개선 기능성 규명 및 근기능 강화 건강기능식품 개발 |
| 세부목표 | <p>1) 국내산 두류로부터 근기능 생리활성물질 및 펩타이드 소재 발굴</p> <ul style="list-style-type: none"> - 국내산 대표 두류 원료 10종 선정 및 선행자료 분석 - 국내산 두류로부터 근기능 강화 생리활성물질 및 펩타이드 제조공정 확립 <p>2) 국내산 두류의 근기능 생리활성물질 및 펩타이드 소재의 단계별 효능 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> 세포실험을 이용한 근생성 증가 및 근손실 억제 기전 규명 - <i>In vivo</i> 동물모델을 이용한 근기능 개선 생체지표 확인 - 인체적용시험을 통한 근기능 개선 인체지표 확인 <p>3) 국내산 두류의 근기능 유용물질 극대화 공정 및 산업화 적용기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제조공정 최적화 및 제조시스템 구축 - 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 표준화 지표 및 기준규격 설정 - 근기능 강화 두류 생리활성물질 및 펩타이드 제형화 기술개발 <p>4) 국내산 두류를 이용한 노화성 근감소증 타겟 건강기능식품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 근기능 및 근지구력 제품 용도별 formulation 및 시제품 개발 - 근기능 및 근지구력 관련 건강기능식품 인증을 위한 자료 확보 - 국내외 근기능 강화 건강기능식품 시장 진입 전략 수립 및 제품 출시 |

나. 세부기관별 목표

(1) 주관기관(뉴트리)

| 구분 년도 | 세부연구목표 | 가중치 | 평가의 착안점 및 기준 | |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|---|
| 1차 년도 (2016) | 두류 생리활성물질 탐색 및 펩타이드 제조 | 국내산 두류 원료 시료수집 | 20% | • 국내산 두류 10종 시료 수집 |
| | | 열수, 주정 등 용매별 두류 추출물 라이브러리 제조 | 10% | • 주정 추출물 제작 : 25도, 4시간 |
| | | | 10% | • 열수 추출물 제작 : 80도, 4시간 |
| | | 아임계 공정조건 별 두류 펩타이드 라이브러리 제조 | 20% | • 아임계 공정 최적 조건 확립 • 아임계 추출물 제작 : 200도, 20분, 34 bar |
| | | protease 별 팔 펩타이드 라이브러리 제조 | 20% | • 팔 protein 분리 공정 확보 및 단백질 확인 • Protease 별 팔 펩타이드 제조공정 확보 • ortho-Phthalaldehyde (OPA) reaction 통한 protein의 hydrolysis확인 |
| 공정별 수율, 분자량 등 기초 산업화 자료 확보 | 20% | • 추출물 별 수율 확보 | | |
| 2차 년도 (2017) | 두류 생리활성물질 및 펩타이드 제조공정 표준화 | 두류 생리활성물질의 표준화 제조공정 확립 | 10% | • 두류 10종 중 팔을 이용하여 추출물 확보 • 팔 추출물 내 생리활성 최종물질로 카테킨 확정 • 카테킨의 표준화 공정 확립 |

| | | | | |
|--|--|------------------------------------|---|--|
| | 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 분자량별 분획 scale-up 연구 | 6% | <ul style="list-style-type: none"> • GPC, HPLC, LC/MS를 이용한 분자량 분석 • 펩타이드 프로파일링 및 prep-LC를 통해 얻은 분획별 펩타이드의 분자량 분석 | |
| | | 두류 생리활성물질 및 산업적 대량 생산공정 설계 | 9% | <ul style="list-style-type: none"> • 열수추출과 효소반응을 거쳐 효소반응을 활성화 • 여과, 농축, 살균을 통한 공정 표준화 확립 |
| | 표준화 생리활성(팥) 추출물 및 펩타이드의 이화학적 특성 규명 | 표준화 생리활성 추출물(팥)의 주요 성분 분석 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 7종의 후보물질의 분석을 통한 최종지표 확립 • 최종지표 카테킨 선정 및 분석법 확립 |
| | | 표준화 펩타이드의 아미노산 조성 분석 | 5% | <ul style="list-style-type: none"> • 아미노산 분석기를 이용한 유리 아미노산의 조성 및 정량 분석 |
| | | 표준화 펩타이드의 평균 분자량 및 분자량 분포 | 5% | <ul style="list-style-type: none"> • GPC컬럼을 이용하여 분석-분자량의 분포를 확인 |
| | | 표준화 생리활성 추출물 및 펩타이드의 안정성 평가 | 5% | <ul style="list-style-type: none"> • pH, 열의 안정성 평가 • 지표성분은 pH와 열에 안정성을 띄지 못함 |
| | 팥 추출물의 생리활성 물질 선정 | 국내산 팥 추출물을 이용한 지표물질 탐색 | 7% | <ul style="list-style-type: none"> • 문헌과 논문 등을 통해 팥의 대표적 생리활성 성분 탐색 |
| | | | 7% | <ul style="list-style-type: none"> • vitexin, catechin, isovitexin, kaempferol, rutin, isoquercetin의 후보물질 선정 후 각 분석법 탐색 |
| | | | 7% | <ul style="list-style-type: none"> • 최종 catechin을 지표물질로 선정 및 분석법 확립 |
| | | 국내산 팥 추출물의 안정성 (pH, 열) 검토 | 4% | <ul style="list-style-type: none"> • 지표물질의 안정성 확인 : pH 3, 5, 7, 9와 각 pH조건에서의 95°C 가열한 조건에서의 추출물 내 지표성분 패턴분석 및 색도 등 확인 |
| | 팥 추출물 및 펩타이드의 이화학적 특성 규명 | 팥 추출물의 펩타이드 제조공정 표준화 및 대량 생산 공정 확립 | 5% | <ul style="list-style-type: none"> • 열수추출과 효소반응을 거쳐 효소반응을 활성화시키고 여과 및 농축 후 살균을 통한 제조 공정 표준화 확립 |
| | | 팥 추출물의 아미노산 조성 분석 | 5% | <ul style="list-style-type: none"> • 아미노산 분석기를 이용한 유리 아미노산의 조성 및 정량 분석 |
| | | 팥 추출물의 분자량 분포 확인 | 5% | <ul style="list-style-type: none"> • GPC를 이용하여 분자량 조성 및 분자량별 분포도를 확인 |
| | | 팥 추출물 중 펩타이드 주요 성분 분석 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • HPLC 이용 주요 펩타이드 분획 분리 및 정제 • LC/MS를 이용 펩타이드 프로파일링 진행 |
| | 3차년도 (2018) | 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 산업적 생산 | 근기능 두류 생리활성물질의 산업적 생산 및 시제품 확보 | 10% |
| 근기능 두류 펩타이드의 산업적 생산 및 시제품 확보 | | | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 근기능 두류 펩타이드 추출물의 공정 최적화 및 시제품 생산 |
| 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드 이용 건강기능식품 개발 | | 근기능 강화 생리활성물질 및 펩타이드 원료 산업화 기술개발 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 근기능 강화 생리활성 추출물의 제조공정 표준화 확립 |
| | | 근기능 강화 건강기능식품 제형별 최적 공정개발 및 제품설계 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 열수추출과 효소반응을 거쳐 효소반응을 활성화시키고 여과 및 농축, 살균을 통한 제조공정 표준화 확립 |
| | | 단백질 보충용 건강기능식품 시제품 생산 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 표준화된 근기능 생리활성 추출물질을 이용한 단백질 보충용 시제품 생산 |
| 두류 생리활성물질 및 펩타이드 복합소재 노화성 근감소증 개선 인체적용시험 | 식품의약품안전처 인체적용기준에 근거한 인체적용시험 설계 | 20% | <ul style="list-style-type: none"> • 식품의약품안전처 건강기능식품 인증 인체시험 자료 분석 • 세포실험, 동물실험, 인체적용시험 결과의 종합적 분석을 위한 시험 설계 | |
| | 표준화 두류 생리활성물질 및 펩타이드 복합소재의 근력 및 근지구력 인체적용시험(IRB 승인 외부 임상기관 위탁) | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 동아대학교 가정의학과를 통하여 IRB 승인 후 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용 시험 • 인체적용시험의 유효성 평가변수 및 안정성 평가변수의 통계적 유의차 확인 | |
| | 근지구력 인체적용시험(IRB 승인 외부 임상기관 위탁) | 20% | <ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험의 통계분석(유효성, 안전성) | |

(2) 협동기관(연세대학교)

| 구분 년도 | 세부연구목표 | | 가중치 | 평가의 착안점 및 기준 |
|--------------------|---------------------------------------|--|-----|---|
| 1차 년도 (2016) | 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 스크리닝 | 근생성 생체지표 mTOR 활성 측정 | 20% | <ul style="list-style-type: none"> • 두류 10종 주정 추출물 mTOR 활성 측정 • 두류 10종 열수 추출물 mTOR 활성 측정 • 두류 10종 아임계 추출물 mTOR 활성 측정 • Protease 따른 팔 펩타이드 mTOR 활성 측정 |
| | | 근지구력 및 미토콘드리아 생합성 증가 측정 | 20% | <ul style="list-style-type: none"> • 두류 10종 주정 추출물 PGC-1α 활성 측정 • 두류 10종 열수 추출물 PGC-1α 활성 측정 • 두류 10종 아임계 추출물 PGC-1α 활성 측정 • Protease 별 팔 펩타이드 PGC-1α 활성 측정 |
| | 대표 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 분자기전 규명 | 근생성 관련 분자기전 확인 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 생체지표 확인 - mTOR/4EBP1/p70S6K pathway |
| | 줄기세포 모델 근육위성세포분화 활성검증 | 동물 근육조직을 이용한 근육위성 세포 분리 시스템 구축 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 근육위성세포 분리 조건 확립 • 근육위성세포 배양 및 분화 • 근육위성세포 특이적 생체지표 Pax7 확인 |
| 2차 년도 (2017) | 부동(Immobilization, 不動) 동물모델 근기능 개선 평가 | 부동 근감소 동물모델 구축 | 5% | • 문헌조사 및 적용을 통한 모델 구축 |
| | | 근육 무게 변화량 측정 | 13% | • 4개 muscle 적출 및 측정 |
| | | 근육 밀도 증가 효과 검증 | 12% | • 오른쪽 Hindlimb muscle 측정 |
| | | 운동수행능력 측정 | 10% | • 시간(Time) 및 거리(distance) 측정 |
| | | 근력 증가 효과 측정 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 2다리(forelimb) 근력 측정 • 4다리(fore/hindlimb) 근력 측정 |
| | | 근섬유 단면적 측정 | 10% | • 장딴지근과 전정골근 단면적 측정 |
| | | 근단백질 생성 인자 확인 | 5% | <ul style="list-style-type: none"> • PI3K/Akt pathway 확인 • mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway 확인 |
| | | 근단백질 분해 인자 확인 | 5% | <ul style="list-style-type: none"> • FoxO3 translocation 확인 • MuRF1, atrogin-1 변화량 확인 |
| | | 근육 합성 및 분화 인자 확인 | 5% | • MyoD, myogenin 확인 |
| | 노화 동물모델 근기능 개선 평가 | 노화 동물모델 구축 | 5% | • 문헌조사 및 적용을 통한 모델 구축 |
| | | 근육 무게 변화량 측정 | 15% | • 4개 muscle 적출 및 측정 |
| | | 근육 밀도 증가 효과 검증 | 15% | • Hindlimb muscle 측정 |
| | | 운동수행능력 측정 | 15% | • 시간(Time) 및 거리(distance) 측정 |
| | | 근력 증가 효과 측정 | 15% | <ul style="list-style-type: none"> • 2다리(forelimb) 근력 측정 • 4다리(fore/hindlimb) 근력 측정 |
| | | 근섬유 단면적 측정 | 15% | • 장딴지근의 단면적 측정 |
| | | 미토콘드리아 생합성 인자 확인 | 10% | • PGC-1 α , Tfam, ERR α , NRF-1 확인 |
| | | 근단백질 분해 인자 확인 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • FoxO3 translocation 확인 • MuRF1, atrogin-1 변화량 확인 |
| | | 근단백질 생성 인자 확인 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • PI3K/Akt pathway 확인 • mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway 확인 |
| 3차 년도 (2018) | 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 생리활성 기술개발 | 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 복합 제제화 기술 개발 | 5% | • 펩타이드 처리 팔 추출물 및 에탄올 추출물의 비율 제시 |
| | | 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 가용성 및 체내 흡수율 증진 기술 개발 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 가용화 조건 제시 - 열, pH, 유화제, 용매별 |
| | | 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제형별 맛 조절 formulation 기술 개발 | 10% | • 관능평가 실시(미각, 후각, 촉각) |
| | 노화성 근감소증 개선 인체적용시험 결과 확보 | 식품의약품안전처 건강기능식품 인증 인체시험자료 분석 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 조건별 인체적용시험의 유효성 평가변수 확인 - 연령별, 고령화 기준, BMI 구분 |
| | | 세포 & 동물실험, 인체적용시험 결과 종합적 분석 | 10% | • 효능 평가에 대한 총괄 결과 제시 |

3-2. 목표 달성여부

가. 총괄목표달성

| 연구목표 | 비중 (%) | 달성도 (%) | 자체평가 |
|---|--------|---------|--|
| 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제조공정 개발 | 20 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> • 두류 생리활성물질 탐색 및 펩타이드 제조 • 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제조공정 개발 |
| 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제조공정 표준화 | 10 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> • 두류 생리활성물질 및 펩타이드 제조공정 표준화 • 두류 추출물 및 펩타이드의 이화학적 특성 규명 |
| 두류 펩타이드의 근기능 활성 <i>in vitro</i> 세포실험 검증 | 20 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> • 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 스크리닝 • 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 기전 규명 • 줄기세포 모델 근육위성세포 분화 활성검증 |
| 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 활성 <i>in vivo</i> 동물실험 검증 | 20 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> • 부동(Immobilization) 동물모델 근기능 개선 평가 • 노화 동물모델 근기능 개선 평가 및 분자기전 규명 |
| 두류 단백질/펩타이드의 근기능 활성 인체적용시험 검증 | 10 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> • 노화성 근감소증 개선 인체적용시험 결과 확보 |
| 두류 생리활성물질 및 펩타이드를 이용한 노화성 근감소증 개선 건강기능식품 산업화 | 20 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> • 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 산업적 생산 • 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드 기능 식품 개발 • 두류의 노화성 근감소증 개선 인체적용시험 완료 |
| 합계 | 100 | | |

나. 세부기관별 목표달성

(1) 주관기관(뉴트리)

| 구분 년도 | 세부연구목표 | 가중치 | 평가의 착안점 및 기준 | 달성도 | |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------|--|------|
| 1차 년도 (20 16) | 두류 생리활성물질 탐색 및 펩타이드 제조 | 국내산 두류 원료 10종 시료수집 | 20% | • 국내산 두류 10종 시료 수집 | 100% |
| | | 열수, 주정 등 용매별 두류 추출물 라이브러리 제조 | 10% | • 주정 추출물 제작 : 25도, 4시간 | 100% |
| | | | 10% | • 열수 추출물 제작 : 80도, 4시간 | 100% |
| | | 아임계 공정조건 별 두류 펩타이드 라이브러리 제조 | 20% | <ul style="list-style-type: none"> • 아임계 공정 최적 조건 확립 • 아임계 추출물 제작 : 200도, 20분, 34 bar | 100% |
| | | protease 별 팔 펩타이드 라이브러리 제조 | 20% | <ul style="list-style-type: none"> • 팔 protein 분리 공정 확보 및 단백질 확인 • Protease 별 팔 펩타이드 제조공정 확보 • ortho-Phthalaldehyde (OPA) reaction 통한 protein의 hydrolysis확인 | 100% |
| 공정별 수율, 분자량 등 기초 산업화 자료 확보 | 20% | • 추출물 별 수율 확보 | 100% | | |
| 2차 년도 (20 17) | 두류 생리활성물질 및 펩타이드 제조공정 표준화 | 두류 생리활성물질의 표준화 제조공정 확립 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 두류 10종 중 팔을 이용하여 추출물 확보 • 팔 추출물 내 생리활성 최종물질로 카테킨 확정 • 카테킨의 표준화 공정 확립 | 100% |
| | | 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 분자량별 분획 scale-up 연구 | 6% | <ul style="list-style-type: none"> • GPC, HPLC, LC/MS를 이용한 분자량 분석 • 펩타이드 프로파일링 및 prep-LC를 통해 얻은 분획별 펩타이드의 분자량 분석 | 100% |
| | | 두류 생리활성물질 및 산업적 대량 생산공정 설계 | 9% | <ul style="list-style-type: none"> • 열수추출과 효소반응을 거쳐 효소반응을 활성화 • 여과, 농축, 살균을 통한 공정 표준화 확립 | 100% |
| | 표준화 생리활성(팔) | 표준화 생리활성 추출물(팔)의 주요 성분 분석 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 7종의 후보물질의 분석을 통한 최종지표 확립 • 최종지표 카테킨 선정 및 분석법 확립 | 100% |

| | | | | | |
|--|--------------------------|--|--------------------------------|--|------------------------------------|
| | 추출물 및 펩타이드의 이화학적 특성 규명 | 표준화 펩타이드의 아미노산 조성 분석 | 5% | • 아미노산 분석기를 이용한 유리 아미노산의 조성 및 정량 분석 | 100% |
| | | 표준화 펩타이드의 평균 분자량 및 분자량 분포 | 5% | • GPC컬럼을 이용하여 분석-분자량의 분포를 확인 | 100% |
| | | 표준화 생리활성 추출물 및 펩타이드의 안정성 평가 | 5% | • pH, 열의 안정성 평가 • 지표성분은 pH와 열에 안정성을 띄지 못함 | 100% |
| | 팥 추출물의 생리활성 물질 선정 | 국내산 팥 추출물을 이용한 지표물질 탐색 | 7% | • 문헌과 논문 등을 통해 팥의 대표적 생리활성 성분 탐색 | 100% |
| | | | 7% | • vitexin, catechin, isovitexin, kaempferol, rutin, isoquercetin의 후보물질 선정 후 각 분석법 탐색 | 100% |
| | | | 7% | • 최종 catechin을 지표물질로 선정 및 분석법 확립 | 100% |
| | | 국내산 팥 추출물의 안정성(pH, 열) 검토 | 4% | • 지표물질의 안정성 확인 : pH 3, 5, 7, 9와 각 pH 조건에서의 95°C 가열한 조건에서의 추출물 내 지표성분 패턴분석 및 색도 등 확인 | 100% |
| | 팥 추출물 및 펩타이드의 이화학적 특성 규명 | 팥 추출물의 펩타이드 제조공정 표준화 및 대량 생산 공정 확립 | 5% | • 열수추출과 효소반응을 거쳐 효소반응을 활성화시키고 여과 및 농축 후 살균을 통한 제조 공정 표준화 확립 | 100% |
| | | 팥 추출물의 아미노산 조성 분석 | 5% | • 아미노산 분석기를 이용한 유리 아미노산의 조성 및 정량 분석 | 100% |
| | | 팥 추출물의 분자량 분포 확인 | 5% | • GPC를 이용하여 분자량 조성 및 분자량별 분포도를 확인 | 100% |
| | | 팥 추출물 중 펩타이드 주요 성분 분석 | 10% | • HPLC 이용 주요 펩타이드 분획 분리 및 정제 • LC/MS를 이용 펩타이드 프로파일링 진행 | 100% |
| | 3차년도 (2018) | 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 산업적 생산 | 근기능 두류 생리활성물질의 산업적 생산 및 시제품 확보 | 10% | • 근기능 두류 생리활성 추출물의 공정 최적화 및 시제품 생산 |
| 근기능 두류 펩타이드의 산업적 생산 및 시제품 확보 | | | 10% | • 근기능 두류 펩타이드 추출물의 공정 최적화 및 시제품 생산 | 100% |
| 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드 이용 건강기능식품 개발 | | 근기능 강화 생리활성물질 및 펩타이드 원료 산업화 기술개발 | 10% | • 근기능 강화 생리활성 추출물의 제조공정 표준화 확립 | 100% |
| | | 근기능 강화 건강기능식품 제형별 최적 공정개발 및 제품설계 | 10% | • 열수추출과 효소반응을 거쳐 효소반응을 활성화시키고 여과 및 농축, 살균을 통한 제조공정 표준화 확립 | 100% |
| | | 단백질 보충용 건강기능식품 시제품 생산 | 10% | • 표준화된 근기능 생리활성 추출물질을 이용한 단백질 보충용 시제품 생산 | 100% |
| 두류 생리활성물질 및 펩타이드 복합소재 노화성 근감소증 개선 인체적용시험 | | 식품의약품안전처 인체적용기준에 근거한 인체적용시험 설계 | 20% | • 식품의약품안전처 건강기능식품 인증 인체시험자료 분석 • 세포실험, 동물실험, 인체적용시험 결과의 종합적 분석을 위한 시험 설계 | 100% |
| | | 표준화 두류 생리활성물질 및 펩타이드 복합소재의 근력 및 근지구력 인체적용시험(IRB 승인 외부 임상기관 위탁) | 10% | • 동아대학교 가정의학과를 통하여 IRB 승인 후 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험 • 인체적용시험의 유효성 평가변수 및 안정성 평가변수의 통계적 유의차 확인 | 100% |
| | | 근지구력 인체적용시험(IRB 승인 외부 임상기관 위탁) | 20% | • 인체적용시험의 통계분석(유효성, 안전성) | 100% |

(2) 협동기관(연세대학교)

| 구분 년도 | 세부연구목표 | 가중치 | 평가의 착안점 및 기준 | 달성도 |
|--------------------|----------------------------|-----|--|------|
| 1차 년도 (2016) | 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 스크리닝 | 20% | • 두류 10종 주정 추출물 mTOR 활성 측정 • 두류 10종 열수 추출물 mTOR 활성 측정 • 두류 10종 아미계 추출물 mTOR 활성 측정 • Protease 따른 팥 펩타이드 mTOR 활성 측정 | 100% |
| | 근지구력 및 미토콘드리아 생합성 증가 측정 | 20% | • 두류 10종 주정 추출물 PGC-1 α 활성 측정 • 두류 10종 열수 추출물 PGC-1 α 활성 측정 | 100% |

| | | | | | | |
|--|---------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|
| | | | | <ul style="list-style-type: none"> • 두류 10종 아입계 추출물 PGC-1α 활성 측정 • Protease 별 팔 펩타이드 PGC-1α 활성 측정 | | |
| | 대표 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 분자기전 규명 | 근생성 관련 분자기전 확인 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 생체지표 확인 - mTOR/4EBP1/p70S6K pathway | 100% | |
| | 줄기세포 모델 근육위성 세포분화 활성검증 | 동물 근육조직을 이용한 근육위성 세포 분리 시스템 구축 | 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 근육위성세포 분리 조건 확립 • 근육위성세포 배양 및 분화 • 근육위성세포 특이적 생체지표 Pax7 확인 | 100% | |
| 2차년도 (2017) | 부동(Immobilization, 不動) 동물모델 근기능 개선 평가 | 부동 근감소 동물모델 구축 | 5% | • 문헌조사 및 적용을 통한 모델 구축 | 100% | |
| | | 근육 무게 변화량 측정 | 13% | • 4개 muscle 적출 및 측정 | 100% | |
| | | 근육 밀도 증가 효과 검증 | 12% | • 오른쪽 Hindlimb muscle 측정 | 100% | |
| | | 운동수행능력 측정 | 10% | • 시간(Time) 및 거리(distance) 측정 | 100% | |
| | | 근력 증가 효과 측정 | 10% | • 2다리(forelimb) 근력 측정 | • 4다리(fore/hindlimb) 근력 측정 | 100% |
| | | 근섬유 단면적 측정 | 10% | • 장판지근과 전경골근 단면적 측정 | 100% | |
| | | 근단백질 생성 인자 확인 | 5% | • PI3K/Akt pathway 확인 | • mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway 확인 | 100% |
| | | 근단백질 분해 인자 확인 | 5% | • FoxO3 translocation 확인 | • MuRF1, atrogin-1 변화량 확인 | 100% |
| | 노화 동물모델 근기능 개선 평가 | 근육 합성 및 분화 인자 확인 | 5% | • MyoD, myogenin 확인 | 100% | |
| | | 노화 동물모델 구축 | 5% | • 문헌조사 및 적용을 통한 모델 구축 | 100% | |
| | | 근육 무게 변화량 측정 | 15% | • 4개 muscle 적출 및 측정 | 100% | |
| | | 근육 밀도 증가 효과 검증 | 15% | • Hindlimb muscle 측정 | 100% | |
| | | 운동수행능력 측정 | 15% | • 시간(Time) 및 거리(distance) 측정 | 100% | |
| | | 근력 증가 효과 측정 | 15% | • 2다리(forelimb) 근력 측정 | • 4다리(fore/hindlimb) 근력 측정 | 100% |
| | | 근섬유 단면적 측정 | 15% | • 장판지근의 단면적 측정 | 100% | |
| | | 미토콘드리아 생합성 인자 확인 | 10% | • PGC-1 α , Tfam, ERR α , NRF-1 확인 | 100% | |
| | | 근단백질 분해 인자 확인 | 10% | • FoxO3 translocation 확인 | • MuRF1, atrogin-1 변화량 확인 | 100% |
| | | 근단백질 생성 인자 확인 | 10% | • PI3K/Akt pathway 확인 | • mTOR/p70S6K/4EBP1 pathway 확인 | 100% |
| | | 근육 합성 및 분화 인자 확인 | 10% | • MyoD, myogenin 확인 | 100% | |
| | | 3차년도 (2018) | 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 생리활성 기술개발 | 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 복합 제제화 기술 개발 | 5% | • 펩타이드 처리 팔 추출물 및 에탄올 추출물의 비율 제시 |
| 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 가용성 및 체내 흡수율 증진 기술 개발 | 10% | | | • 가용화 조건 제시 | - 열, pH, 유화제, 용매별 | 100% |
| 근기능 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 제형별 맛 조절 formulation 기술 개발 | 10% | | | • 관능평가 실시(미각, 후각, 촉각) | 100% | |
| 노화성 근감소증 개선 인체적용시험 결과 확보 | 식품의약품안전처 건강기능식품 인증 인체시험자료 분석 | | 10% | • 조건별 인체적용시험의 유효성 평가변수 확인 | - 연령별, 고령화 기준, BMI 구분 | 100% |
| | 세포실험, 동물실험, 인체적용시험 결과의 종합적 분석 | | 10% | • 효능 평가에 대한 총괄 결과 제시 | 100% | |

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

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 적용분야 및 기대효과

가. 적용분야

- (1) 본 연구과제 수행을 통해 얻어진 팔 추출물의 노화성 근감소 개선 효능을 이용하여 도래하는 고령화시대에 맞춰 근감소 개선 건강기능식품에 적용이 가능함
- (2) 고령자의 근감소 개선 및 근기능 저하의 치료제로서 확대적용이 가능함

나. 기대효과

(1) 기술적 측면

- 국내산 두류의 노화형 근기능 개선 기능에 대한 과학적 근거자료 확보(인체시험 포함)
- 국내산 두류 유래 생리활성물질 및 펩타이드의 근기능 식약처 건강기능식품 인증
- 국내산 두류를 이용한 항노화 근기능 생리활성물질 및 펩타이드 최적 제조공정 확립
- 국내산 두류 생리활성물질 및 펩타이드의 체내 흡수율 증진, 제형화 기술 등 핵심 산업기술 확보
- 국내 근기능 개선 건강기능식품 가이드라인 제공에 의한 근기능 관련 산업 활성화

(2) 경제적·사회적 측면

- 국내산 두류 이용 항노화 근기능 강화제품 개발을 통한 국내외 시장 점유
- 근기능 강화 신규 용도 개발을 통한 국내산 두류 활용성 제고 및 해외 단백질 시장 개척
- 국내산 두류의 고부가가치 창출로 인한 농업 또는 식품분야 산업체의 경제 활성화 기여
- 생산농가-제조-유통-소비자의 전주기 연계전략을 발굴하여 각 분야별 일자리 생성
- 근기능 강화 소재 개발 및 제품화를 통한 근감소증 관련 국민건강증진 및 의료비 감소
- 고령화로 인한 경제 생산성 저하 문제, 노동력 부족, 건강 관리 비용 등의 사회적 문제 완화

4-2. 사업화 전략

1) 일반 식품 및 건강기능식품 소재로 활용

- 특용 두류 유래의 근 기능 강화 기능성 소재를 개발한 후, 기능성 음료, 분말, 바, 과자, 스무지, 웨이크 등 일반 식품에 적용하여 일상생활에서 쉽게 섭취가 가능한 제형의 식품에 적용할 예정이며, 더 나아가 인체적용시험 등을 거쳐 건강기능식품 기능성 원료 인정 취득을 통해 국내외 건강 기능식품 소재로 활용할 계획이다. 일차적으로 중장년층의 근 기능 강화 제품을 컨셉으로 이후 젊은 층을 위한 다이어트 및 근육 강화 제품으로 확대해 나갈 계획이다.

2) 제품의 브랜드 및 디자인 연구

- 현재 건강기능식품 소재는 단순 기능성으로 approach 하는 시대가 아닌 브랜드 및 타겟팅을 설정해 놓고 마케팅을 하는 경우가 많다. 아울러, 최종제품의 경우 제품 디자인에 따라 제품의 quality가 매우 다르며 뿐만 아니라 전시회 참가 시 포스터, 카탈로그등

홍보 자료 역시 매우 중요한 역할을 한다. 따라서, 당사는 완성도 높은 제품개발에 주력할 것이다.

3) 마케팅 계획 총괄

- 마케팅 타겟 : 당사 직접 판매 또는 당사 국내외 거래처
 해외 식품전문 전시회 참가(신규 거래처 확보)
- 상용화 형태 : 기능성 소재, 건강기능식품 개별인정 소재, 일반 식품, 건강기능식품
- 수요처
 - 내수: 당사 자체물, 건강기능식품 회사(B to B), 홈쇼핑 판매(B to C)
 - 수출: 뉴트리 중국 법인인 뉴트리 상해를 통해 중국내 마케팅 및 유통
 일본, 미국 등 일반 식품 및 건강기능식품 소재/완제품 판매

4) 국내 마케팅계획 및 판매전략

- 중국 법인을 통한 광고, 홍보 작업
- 당사가 거래하는 거래처에 PT발표, 관심을 갖은 회사에는 샘플 및 자료 제공
- 거래처 유통 특성에 맞는 시제품 제작
- 개별인정형 취득 후, 국내 홈쇼핑 론칭 및 오프라인 제품 론칭
- 당사 자체 브랜드사이트이자 쇼핑몰인 판도라뷰티닷컴(www.newtreemall.co.kr) 및 판도라뷰티 케이알(www.pandorabeauty.kr) 등에서 마케팅 홍보 및 판매

5) 국외 마케팅계획 및 판매전략

- 제품의 연구 자료 데이터화 : 유효성 임상자료, 독성자료, 작용기전 등
- 전시회 참가 및 신규 거래처 확보

6) 당사 매출 및 마케팅 역량

- 당사의 총 매출액 중 완제품을 제외한, 원료 비즈니스 매출 중, 개별인정형 원료가 차지하는 비중과 천연물 추출물(식물 추출물 포함)이 차지하는 비중은 각각 약 45%와 69%이며, 매년 그 매출액과 비중이 상승세에 있다. 더욱이 천연물을 이용한 다양한 생리활성 소재를 직접 개발 및 상품화한 다수의 실적을 보유하고 있으며, 대표적인 원료로는 개별인정형 원료로 개발한 핑거루트추출분말, 구아바인 추출물, 콜라겐펩타이드 등이 있으며 기능성 화장품 소재로서 육두구 추출물(기능성분 메이스리그난) 등이 있다.

붙임. 참고 문헌

- 1) 2015년 대한근감소증학회 창립 심포지엄, 대한근감소증학회, 2015
- 2) 검은생강 특허기술가치평가서, 한국발명진흥회, 2016
- 3) 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황 2015, 식품의약품안전처, 2015
- 4) 단백질 보충제 섭취 실태와 구매행동에 관한 연구, 중앙대학교 의약식품대학원, 김윤지, 2016
- 5) 2014 식품의약품통계연보 제16호, 식품의약품안전처, 2014
- 6) 건강기능식품 생산실적, 식품의약품안전처, 2018
- 7) 특수용도식품 품목별 국내판매액 변동현황, 통계청
- 8) Evid. Based. Complement. Alternat. Med., e5970367, 2016
- 9) 스포츠 뉴트리션, 유정우의 현장분석, 한국경제, 2015.02.24.
- 10) 근육처럼 부풀어오르는 근육시장, 한국무역협회, 2015.5.14.
- 11) 2015년 일본 건강식품시장의 효능별 소비추이, 오사카지사 자체기획단신44호, 2015
- 12) J Am Med Dir Assoc. 12(4):249-56, 2011
- 13) The Korean Association of Internal Medicine, 83(4):444-454, 2012
- 14) Nature, 14, 754-762, 2014
- 15) Korean Journal of Sports Science 21(5), 983-995, 2012
- 16) 유엔사무국 경제 사회부 인구 분과 위원회, 세계인구전망, 2010
- 17) 통계청, 고령자통계, 2013
- 18) UN, World population prospects: The 2012 Revision, 2013
- 19) U.S Dairy Export Council, 근육감소증, 2013
- 20) Nature reviews molecular cell biology 12: 21-35, 2011
- 21) 보건복지부, 2014 국민건강통계, 2016
- 22) J Nutr Biochem 21: 1-13, 2010
- 23) Am J clin Nutr 85:1344-1352, 2007
- 24) 보건복지부, 2014 국민건강통계, 2016
- 25) Korean J Obes 22(2), 77-82, 2013
- 26) 2011 기능성 성분표 아미노산, 농촌진흥청 국립농업과학원, 2011
- 27) Korean J Obes 22(2), 77-82, 2013
- 28) 노인의 근감소성 비만 예방 및 치료를 위한 단백질 섭취 전략, 대한비만학회지, 22: 77-82, 2013
- 29) 식품의약품안전처, 식품원재료데이터베이스
- 30) J Agric Food Chem. 50:2454-8, 2002
- 31) Arch Latinoam Nutr. 42:201-9, 1992
- 32) Food Chemistry, 38:239-246, 1990
- 33) 식품의약품안전처, 식품영양성분데이터베이스
- 34) 대한화학회지, 49, 349-354, 2005
- 35) 한국식품영양과학회지, 42, 1255-1262, 2013
- 36) 건강보험주요통계, 2015

- 37) 한국직업능력개발원, 고령화 시대의 이슈와 정책 과제, 2011
- 38) J Ap Pharm Sci 6(02), 157-166, 2016
- 39) Int J Food Sci Nut 63(1), 117-124, 2012
- 40) FASEB J 22, 659-661, 2008