

발간등록번호

11-1543000-001280-01

사과 가공 부산물을 활용한 근력강화
기능성 소재 및 산업화 기술 개발

(Development of industrial availability of functional muscle
strength materials from apple pomace waste)

(주)한국야쿠르트

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “사과 가공 부산물을 활용한 근력강화 기능성 소재 및 산업화 기술 개발”
과제의 보고서로 제출합니다.

2016 년 1 월 15 일

주관연구기관명 : (주)한국야쿠르트

주관연구책임자 : 이 정 희

세부연구책임자 : 이 정 희

연 구 원 : 안 영 태

연 구 원 : 김 현 미

연 구 원 : 최 일 동

연 구 원 : 이 응 석

연 구 원 : 정 지 용

요 약 문

I. 제 목

사과 가공 부산물을 활용한 근력강화 기능성 소재 및 산업화 기술 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

| 구분 | | 특허 | | 논문 | | 기타 |
|-------|----|----|----|-----|------|---------------------|
| | | 출원 | 등록 | SCI | 비SCI | |
| 1차 년도 | 목표 | 1 | | 1 | | |
| | 달성 | 1 | | 0 | | 1 (학술대회-포스터) |
| 2차 년도 | 목표 | 1 | | 1 | 1 | 인체적용시험 종료 후, 개별인정신정 |
| | 달성 | 2 | | 1 | | 2 (학술대회-포스터) |
| 계 | 목표 | 2 | | 2 | 1 | |
| | 달성 | 3 | | 1 | | 3 (학술대회-포스터) |

III. 연구개발의 목적 및 필요성

골격근 소실은 노화 및 기아에 기인한 일반적인 현상이다. 또한 당뇨, 암, 만성적인 신부전증, 심혈관계 질환, 만성적인 호흡기 질환, HIV/AIDS등과 같은 감염, 척추 손상 등과 같은 심각한 광범위한 인간 질병에 의한 근육 퇴화 등에 의해 나타나고 있으며, 현재까지 이러한 근육소실에 대한 치료 혹은 예방법은 알려진 바가 없다. 최근까지 근육 소실에 대한 연구는 골격근 관련 유전자의 발현 조절에 대한 것만 소개 되어있다. 2011년 6월에 사과 껍질에 다량 존재하는 pentacyclic triterpenoid(ursolic acid)에 의한 근육량의 증가 및 체중 감소, 혈당 강화 효과에 대한 연구결과가 2011년 생명과학 전문 저널인 cell metabolism 에 발표 된 바 있으며, 본 연구팀의 선행 연구 결과 및 문헌 검색을 통하여 ursolic acid는 사과껍질과 로즈마리 등의 허브식물에서 주로 존재하고 있는 것으로 확인 하였고, 사과껍질의 ursolic acid 함량은 1.2% 정도 함유하고 있는 것으로 확인하였다. 현재 사과껍질은 사과 가공공정에서 부산물로 분류되어 사료첨가제 혹은 폐기물로 이용하고 있으며 이를 활용한 고부가가치 식의약품 원료 소재 개발이 절실한 실정이며, 제품 개발에 성공할 경우 과수 농가 및 가공 업체의 소득 향상에 큰 역할을 할 것으로 보여진다. 본 연구는 이와 같은 결과를 근거로 사과박에 다량 존재 하는 pentacyclic triterpenoid(ursolic acid)를 이용한 근력 강화 효과 소재 개발 및 제품 개발을 목표로 한다. 본 과제의 최종 목표는 사과 가공 부산물의 활용을 통한 근력강화 기능성 고부가가치 식품 소재 개발이다. 사과 가공 부산물에서 유용 물질의 근력 강화 기능성 관련 기전

을 규명하고, 신규 추출/농축 기술 개발을 통한 기능성 소재의 추출 효율을 극대화하고자 한다. 또한 개발된 소재를 활용한 근력강화 기능성 식품을 개발 및 산업화 기반을 구축하고, 물성 개선을 통한 근력강화 식품 및 스포츠 음료 등의 시장 영역을 확장하고자 한다. 최종적으로 개별 인정형 기능성 원료 신청 및 획득을 통한 기능성 공인을 추진하고자 한다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에의 연구 개발의 내용 및 범위는 다음과 같이 구성되어 있다.

- 사과 가공 부산물을 활용한 근력강화 시제품 개발 및 관련 품질확보
 - 사과 가공 부산물 기능성 소재의 제조공정도 개발 및 시제품 생산
 - 근력강화 기능성 성분의 분석법 개발
 - 제품 안전성 및 안정성 검사(잔류농약, 미생물, 독소 검사)
 - 시제품의 품질특성 검사
- 근력강화 소재 및 개발제품의 제조 표준화 및 영양학적 우수성 규명
 - 사과 가공 부산물의 식품 위생기준에 적합한 표준화 제법개발
 - 근력강화 소재의 영양적우수성 규명: 당, 기능성 성분, 식이섬유, 폴리페놀 함량
 - 개발된 근력강화 제품의 기호도 위치 분석
- 근력강화 소재의 기능성 분석법 확립 및 인체 적용 시험을 통한 기능성 규명
 - 사과 가공 부산물의 근력강화 기능성 성분의 추출물 제조법 확립과 분획
 - 사과 가공 부산물의 기능성 분석: 근육량 증가, 근력강화, 체중감소, 갈색지방 증가
 - 근력강화 기능성 성분의 관련 기전 연구

V. 연구개발결과

본 과제의 수행을 통해 사과 가공 부산물에서 근력강화/운동수행능력 강화 개선 기능성 소재를 성공적으로 분리하였으며, 동물효능평가 및 인체 적용시험을 통한 효능을 검정하였다. 현재 인체 적용시험의 피 시험자의 모든 섭취가 종료되어 최종 통계 처리 작업을 진행 중이다. 위와 같은 사과 가공 부산물 기능성 식품 원료의 지표물질을 확인하였고, 해당 지표물질이 기능성을 나타내는 작용기작을 밝혀, 이를 국제 우수 저널에 보고하고, 특허 출원을 하였다. 국내에서 폐기물로 처리되는 사과 가공 부산물의 기능성 원료 사용 가능성을 제시하고, 과수 농가 및 가공 업체의 발전에 기여하였다고 판단된다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제에서 얻어진 사과 가공 부산물에서 추출한 근력 강화 및 운동 수행능력 향상 기능성 소재 개발 및 제품 개발로 이른 시일 내에 상품화를 목표로 하고 있다. 이는 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 판매 규모가 더욱 확대될 것으로 생각되며, 본 과제를 통해 축적된 기능성 제품 개발 노하우는 추후 개발될 기능성 소재 및 제품의 개발 기간을 단축시킬 것으로 생각된다. 소재 개발 중에 출판된 국제 SCI 논문 및 특허를 통해 국내 농업 경쟁력을 제고하고, 기능

성 식품 산업을 더욱 발전시킬 수 있을 것으로 생각된다.

SUMMARY

I. Title

Development of industrial availability of functional muscle strength materials from apple pomace waste

II. Research target and accomplishment

| | | Patent | | Article | | Etc |
|--------------|----------------|-------------|--------------|---------|---------|----------------------|
| | | Application | Registration | SCI | non-SCI | |
| Primary year | target | 1 | | 1 | | |
| | accomplishment | 1 | | 0 | | 1(Conference-poster) |
| Second year | target | 1 | | 1 | 1 | |
| | accomplishment | 2 | | 1 | | 2(Conference-poster) |
| Total | target | 2 | | 2 | 1 | |
| | accomplishment | 3 | | 1 | | 2(Conference-poster) |

III. Objectives

Loss of skeletal muscle is a generally caused by aging or famine, but many diseases such as diabetes, cancer, chronic kidney disease, cardiovascular diseases, chronic respiratory disease, HIV infections are also factors of skeletal muscle disorder. However, there are no effective cure or preventive measure against such phenomenon at the moment; only studies of skeletal muscle at gene level are in process. On 2011, the journal 'Cell Metabolism' published an article proving that the pentacyclic triterpenoid (ursolic acid) in apple peel can increase muscle mass and decrease body weight and blood sugar. It is well known that ursolic acid is abundant in herbs and especially apple, which contains almost 1.2% of ursolic acid in the peel. Categorized as by-product, apple peel is currently used as feed additives or being thrown out, revealing the potential of high value product that can be used as food or medicine material and improve the income-situation of the agricultural industries. The target of the present study is to develop an effective muscle-strengthening natural product using the rich pentacyclic triterpenoid(ursolic acid) in apple peel. By elucidating the muscle-strengthening mechanism of apple peel, the study ultimately aims to develop a high value product. Development of extraction and concentration

technique is also necessary for maximizing the yield. We plan to receive the certification from the Ministry of Food and Drug Safety, so the function of the product can be officially approved and applied to many functional foods related to muscle-strengthening function, constructing the base for industrialization.

IV. Research contents

The present study contains the contents below.

- Development of muscle-strengthening sample using apple by-products and securing quality
 - Developing the making process of functional material using apple by-product and sample production
 - Developing the analysis method of muscle-strengthening components
 - Stability and safety test
 - Examination of quality characteristics of samples
- Manufacturing standardization and establishment of nutritional excellence
 - Development of standard method reaching the food sanitation criteria
 - Establishment of nutritional excellence: sugar, functional component, fiber, polyphenol
 - Analysis of preference of product
- Establishment of functional analysis method and investigation of functionality by clinical demonstration
 - Establishment of extraction and manufacturing method of functional component from apple by-product
 - Examination of functionality: muscle mass increase, muscle strengthening, weight loss, brown fat increase
 - Study of mechanism

V. Conclusion

The current study successfully separated the muscle-strengthening components from apple by-product, and the functions were proved by animal test and clinical trial. The final statistic process for the clinical trial is currently being analyzed. We found the index material and elucidated the mechanism of the muscle-strengthening function, published an article in a leading journal, and applied for a patent. We proposed the potential of the use of by-product as a high-value functional product, and we believe our results will contribute to the agricultural and manufacturing industry.

VI. Applications

We aim to commercialize our muscle-strengthening functional material by applying it to functional foods and sports drink as soon as possible. As the interest in health is increasing, we expect that the sales will escalate, leading to a rapid development of other functional foods using this material. The article and patent will improve and develop the agricultural and functional food industry.

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표
 - 제 2 장 국내외 기술개발 현황
 - 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
 - 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
 - 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
 - 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
 - 제 7 장 연구시설·장비 현황
 - 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적
 - 제 9 장 참고문헌
- <첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development

Chapter 3. Contents and result of study

Chapter 4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study

Chapter 5. Achievement of the study and application plan of the results

Chapter 6. Collected foreign scientific technology information for studying

Chapter 7. Current status of research installation

Chapter 8. Laboratory safety management

Chapter 9. References

<Attachment> Patents, articles and market analysis reports

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 목적

1. 연구 최종 목표

사과 가공 부산물을 활용한 근력강화 기능성 소재를 개발함으로써 고령화 사회를 대비한 노화 관련 시장 확대 및 관련 식품산업의 국제경쟁력 제고하고자 한다. 또한 근력강화 기능성 소재를 이용한 기능성 식품을 다양화함으로써 근기능성 관련 소재 시장의 홍보 및 수요창출을 모색하고 관련 식품산업의 성장을 도모한다. 최종적으로 개별인정형 기능성 원료 신청을 통한 공인기능성 확보하도록 한다.

2. 연구 내용

가. 사과 가공 부산물을 활용한 근력강화 시제품 개발 및 관련 품질확보

- (1) 사과 가공 부산물 기능성 소재의 제조공정도 개발 및 시제품 생산
- (2) 근력강화 기능성 성분의 분석법 개발
- (3) 제품 안전성 및 안정성 검사(잔류농약, 미생물, 독소 검사)
- (4) 시제품의 품질특성 검사

나. 근력강화 소재 및 개발제품의 제조 표준화 및 영양학적 우수성 규명

- (1) 사과 가공 부산물의 식품 위생기준에 적합한 표준화 제법개발
- (2) 근력강화 소재의 영양적우수성 규명: 당, 기능성 성분, 식이섬유, 폴리페놀 함량
- (3) 개발된 근력강화 제품의 기호도 위치 분석

다. 근력강화 소재 및 개발제품의 기능성 분석방법 확립 및 인체 적용 시험을 통한 기능성 규명

- (1) 사과 가공 부산물의 근력강화 기능성 성분의 추출물 제조법 확립과 분획
- (2) 사과 가공 부산물의 기능성 분석 : 근육량 증가, 근력강화, 체중감소, 갈색지방 증가
- (3) 근력강화 기능성 성분의 관련 기전 연구: mTOR pathway 관련 유전자와의 상호 관계 규명(IGF-1, Akt, S6K, MuRF1, Atrogin-1등)

라. 사과 가공 부산물의 추출/농축 기술 개발을 통한 소재 활용성 다양화

3. 세부 과제별 연구 목표 및 내용

가. 사과 가공 부산물을 활용한 근력강화 phytochemical의 기능성 및 기전 연구

(1) 연구개발 목표

- (가) 사과껍질에서 근력강화 기능성 terpenoid 성분(ursolic acid)의 분리 및 기능성 확인
- (나) 근육관련 세포주에서 세포 독성 및 관련 단백질의 발현 확인
- (다) 실험 동물을 활용한 근력 강화 기능성 확인
- (라) 인체 적용 시험을 통한 인체 적용 기능성 확인 및 제품 안전성 확인
- (마) 개별인정형 기능성 원료 인정 신청

(2) 연구개발 내용

(가) 사과껍질에서 유용 성분 추출 방법 개발

- ① 열수 추출법에 의한 유용성분의 추출 효율 확인
- ② 용매 추출조건에 의한 유용성분의 추출 효율 확인
- ③ 최적 추출 조건의 확인 및 추출물의 농축방법 개발

(나) pentacyclic terpenoids(ursolic acid)에 의한 근력강화 관련 in-vitro 효능 확인

- ① Human Skeletal Myotube 및 myoblast cell line을 이용한 사과껍질 추출물의 기능성 확인
- ② mTOR signaling pathway에 관여하는 Akt, IGF-1, S6K의 phosphorylation rate 확인
- ③ 유용 성분 처리에 의한 IGF-1 signaling 관련 유전자의 발현 상태 확인

(다) pentacyclic terpenoids(Ursolic acid)에 의한 근력강화 관련 in-vivo 효능 확인

- ① 6-8주령, male mouse C57BL/6 이용
- ② 대조군으로 일반 식이, 고지방 식이 섭취군 이용-섭취량 조절 실시
- ③ 유용성분 처리에 의한 Body weight 측정, 지방 weight 측정, plasma leptin level 측정, plasma cholesterol 측정
- ④ Blood glucose level, brown fat 측정
- ⑤ 실험 동물에서 mTOR signaling pathway에 관여하는 Akt, IGF-1, S6K의 phosphorylation rate 확인
- ⑥ 유용 성분 처리에 의한 IGF-1 signaling 관련 유전자의 발현 상태 확인
- ⑦ 근육량 측정 무게 측정
- ⑧ Grip strength 측정
- ⑨ Tread mill과 forced swim test를 이용한 근 지구력 측정

(라) 인체 적용시험을 통한 근력강화 기능성 효능 확인

- ① 건강인을 대상으로 사과껍질 추출 근력강화 기능성 물질의 효능 확인
- ② 무산소 운동 능력 지표 활용-혈중 젖산 농도, 피로지수, 체중대비 최대/최고 파워 측정

③ 통계 처리 시스템을 활용한 인체 적용시험 결과 분석

나. 사과 가공 부산물을 활용한 근력강화 phytochemical 소재 규격화 및 응용 제품 개발

(1) 연구개발 목표

(가) 고농도의 기능성분을 함유한 추출물/분말 생산 공정 개발

(나) 사과껍질 추출 기능성물질의 품질 규격화

(다) 실용화를 위한 포장원료, 포장방법 및 포장용기 확정

(라) 기능성 및 관능성이 우수한 근력강화 시제품 생산

(마) 시제품의 품질특성 검사를 통한 제품 최적화

(2) 연구개발 내용

(가) 사과껍질 추출물 생산 공정 최적 표준화 및 제품 적용성 연구

① 원재료 표준화

㉠ 지역 단위 농협(충북원예농협, 대구경북원예농협 등) 및 소규모 1차 가공업체와의 협력 관계 구축을 통한 전국적 사과껍질 수급처 탐색

㉡ 품종, 부위, 원산지, 채취시기별 지표성분 분포도 연구를 통한 원재료 표준화

㉢ 원활한 원재료 공급 방법 설정

② 제조공정 표준화

㉠ 수율 향상을 위한 추출용매 조건 설정 : 최적 용매종류, 용매비, 온도, 횟수 등

㉡ 다양한 추출 방법 적용성 연구 : 초임계추출, 초음파추출 등

㉢ 기능성분 함량 향상을 위한 정제공정 적용성 검토 : 기능성분 특이적 레진 도입 등

㉣ 최적 추출물 건조 방법 설정 : 동결건조, 분무건조, 진공건조 등

③ 기준 규격 설정

㉠ 색상, 이물, 수분, 지표성분함량 설정

㉡ 화학적·미생물 규격 및 중점관리 위해요소 설정 : 잔류농약, 중금속, 파툴린, 곰팡이/효모, 대장균, 병원성 미생물 등

④ 시제품 제조

㉠ OEM 업체 선정 및 시생산

㉡ 기준 규격에 따른 제품 적합성 검토

⑤ 안전성 및 안정성 점검

㉠ 기준 규격 및 위해요소 점검

㉡ 저장안전성 시험 : 유통기한 설정 실험

제 2 절 연구개발의 배경 및 필요성

1. 근육소실의 연구동향

가. 노년기에 접어들어서도 건강하고 활력 있는 생활을 지속적으로 유지하기 위해서는 생활 습관의 관리가 무엇보다 중요하겠지만, 그것만으로는 한계가 있다. 질병에 걸리지 않더라도 노화가 진행되면 시력이나 청력이 감퇴되는 것은 물론이고 운동신경 등 기본적인 체력의 저하가 서서히 일어나기 마련이다. 따라서 이와 같은 현상을 방지하고 신체의 각 기능이 꾸준히 그 역할을 수행할 수 있게 하는, 이른바 기초 체력 강화와 관련된 제품에 대한 수요 또한 매우 높을 것으로 보인다. 좀 더 넓게 해석했을 때, 최근 우후죽순으로 개발되고 있는 성기능 개선제 등이 이 분야의 범위에 들어간다고 볼 수 있다. 혹은 지엽적이지만 시력이나 청력의 감퇴를 막는 건강보조식품이라든가 보조 기구 등의 제품들도 여기에 속한다. 그러나 운동신경 강화라든가 피로의 회복을 돕는 역할을 하는 제품들은 아직 그 메커니즘이 제대로 알려지지 않아 연구개발이 매우 미진한 분야이다. 따라서 향후 보다 실질적인 효과를 가진 ‘체력 증강’ 관련 제품이 등장할 것으로 예상되고 있다.

나. 청년기 때부터 꾸준한 운동 등을 통하여 근(골격근, 평활근, 심근)의 기능을 향상 시킨 사람들의 경우 노년기에서도 건강한 삶을 유지할 뿐 아니라 평균 기대수명도 증가됨을 제시하고 있다. 골격근 수축력은 인체의 운동 및 안정성 유지에 필수적이며, 골격근 조직은 사람 몸무게의 절반을 차지하고 있으며 힘을 나타내는 역할과 항상성을 유지하기 위한 주요한 요인으로 알려져 있다. 따라서 골격근의 대사적 특성, 수축력 등은 인간의 건강을 유지하는데 있어 가장 중요한 요인으로 자리 잡고 있다.

다. 노화는 이러한 골격 근육의 양, 질, 힘의 지속적인 퇴화와 관련되어 있으며, 신경 퇴화, 미토콘드리아의 기능 저하, 염증, 호르몬 변화 등의 세포대사과정과 근력, 운동기능 감소 등이 복합적으로 이루어져 발생한다. 노화가 진행되면 피로도 증가, 골절 위험성 증가, 에너지 소비의 감소등과 근육량 감소 및 각종 질병 발생후에 생존율의 감소등이 동반 하게 되며, 골격근 소실은 노화 및 기아에 기인한 일반적인 현상이다. 또한 당뇨, 암, 만성적인 신부전증, 심혈관계 질환, 만성적인 호흡기 질환, HIV/AIDS등과 같은 감염, 척추 손상 등과 같은 심각하고 광범위한 인간 질병에 의한 근육 퇴화 등에 의해 나타난다. 60세 이상 성인 남녀의 13%~24% 정도는 이러한 근육 소실이 이루어지고 있고, 80세 이상에서는 50%이상 근육소실 위험성이 급격하게 증가하게 된다.

라. 미국의 경우 근육소실과 관련하여 약 180억 5천만 달러의 비용을 지출하였고 이는 전체 헬스케어관련 시장(식품/의약품 포함)의 1.5%에 해당된다. 따라서 노화에 의한 근육기능의 상실 및 근육양 감소는 현재 뿐만 아니라 미래의 주요한 건강 이슈로 나타날 수 있다. 노화와 관련된 몇가지 가능성 있는 기작이 알려져 있으나 확실한 예방, 치료방법은 알려져 있지 않다.

마. 최근까지 근육 소실에 대한 연구는 골격근 관련 유전자의 발현 조절에 대한 것만 소개 되

어있다. 국내의 경우 학계와 산업계에 근 기능개선 관련 의약품에 대한 연구는 아직 미약한 상태이지만 최근 경북대학교 박용복 교수팀, LG화학 중앙연구소, 제일제당 중앙연구소가 연구 초기단계에 있다. 한국생명공학연구원 김영국 연구팀은 근 기능개선 연구와 관련하여 다양한 관련 효소를 통한 질환 탐색법으로 섬광근접분석법을 사용하여 다른 기존의 탐색법에 비하여 많은 시료를 짧은 시간에 한꺼번에 처리할 수 있는 기술로 개선하였다. 국내외 모두 천연물을 통한 근 기능개선 활성 성분의 개발 및 상품화에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

2. 근력강화 기능성 물질의 물리화학적 특성

가. 사과껍질에는 ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid 등의 terpenoids 계열 물질을 다량 함유하고 있다. 특히 2011년 6월에 사과 껍질에 다량 존재하는 pentacyclic triterpenoid(ursolic acid)에 의한 근육량의 증가 및 체중 감소, 혈당 강하 효과에 대한 연구결과가 2011년 생명과학 전문 저널인 cell metabolism 에 발표 된 바 있다.

나. 본 연구팀의 선행 연구 결과 및 문헌 검색을 통하여 ursolic acid는 사과껍질과 로즈마리 등의 허브식물에서 주로 존재하고 있는 것으로 확인 하였고, 사과껍질의 ursolic acid 함량은 1.2% 정도 함유하고 있는 것으로 확인하였다.

다. Triterpenoid는 탄소수가 30개인 squalene으로부터 생합성되는 물질로서 현재까지 4,000종 이상의 화합물이 발견되었다. Triterpenoid는 환의 수에 따라 acyclic, bicyclic, tricyclic, tetracyclic, pentacyclic triterpenoid로 분류되며, 이 중 tetracyclic과 pentacyclic, triterpenoid가 주로 발견되었다. Ursolic acid는 항산화, 항염증, 항균, 항암등의 다양한 생물학적 기능을 가지는 기능성 물질로, 물에서는 거의 녹지 않으며, 에탄올, DMSO등의 유기용매에서만 수용성을 나타내는 특징을 가지고 있다.

3. 사과 가공 부산물 발생 현황 및 활용 방안

가. 국민의 식생활 수준이 향상됨에 따라 농산물 및 과일의 섭취 형태가 변화되어 많은 가공식품을 섭취하고 있다. 과일의 경우, 압착하여 주스의 형태로 많은 양을 섭취하고 있는데 과일 주스를 만드는 공정에서 상당히 많은 양의 부산물이 생산된다. 제조 공정에서 발생하는 사과껍질(사과박)은 특별한 수요가 없고 주로 사료 첨가제용으로 사용 되거나 방치 되고 있다. 특히 사과박의 방치 시, 환경오염의 원인이 되므로 많은 비용을 부담하면서 특수처리업체를 통하여 처리하고 있는 실정이다. 사과박의 성분은 탄수화물, 조단백, 조지방 및 섬유소이며 특히 펙틴과 같은 폴리 페놀류와 식이섬유를 상당 부분 함유하고 있다.

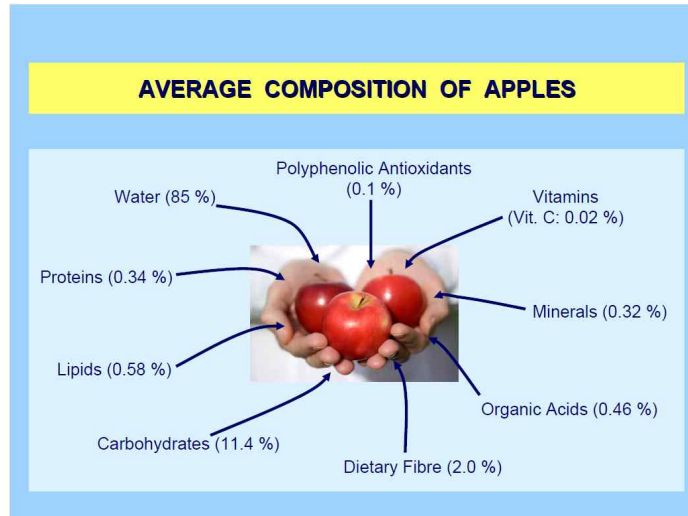


그림 1 사과의 일반적인 성분 및 함량

나. 2008년 국내 사과 총생산량은 223만톤으로 과일 생산량의 약 21%를 차지하고 있으며, 국내 사과가공 공장에서 사과주스 생산을 위해 년 16,000톤의 사과를 착즙하며 가공 시 발생하는 사과부산물은 연간 6,000톤 이상으로 폐기물 처리에 어려움이 있다. 부산물의 특징은 ① 수분이 많고, ② 물리적 크기가 비교적 작으며, ③ 단백질 함량이 높고, ④ 섬유소가 비교적 많으며, ⑤ 기호성이 양호하다는 특징을 갖는다. 부산물 사용을 제한하는 주요 원인으로서는 수분과다에 의한 빠른 부패와 부피가 커서 운반하는데 어려움이 있고, 지역별, 계절별로 생산처 및 생산량에 대한 정확한 자료가 부족하여 장기적으로 이용하는데 어려움이 있다. 현재 일부는 축산농가에서 사료로 이용하거나 과수원, 온실 등에서 유기질 비료로 이용하고 있으나 대부분은 폐기물 처리업자에 의해 폐기 처분되고 있다. 부산물의 폐기 처분은 처리비용이 소요되며 환경오염의 원인이 되기도 한다.

다. 사과주스나 오렌지 주스를 제조할 때 남는 사과 찌꺼기와 껍질에는 잼, 젤리의 겔상태를 형성하는 pectin이라는 물질이 건물량으로 20%내외 함유되어 있어 이를 추출하여 gelling agent로 생산하는 것은 식품폐기물 활용에 가장 성공적인 예라 할 수 있다.

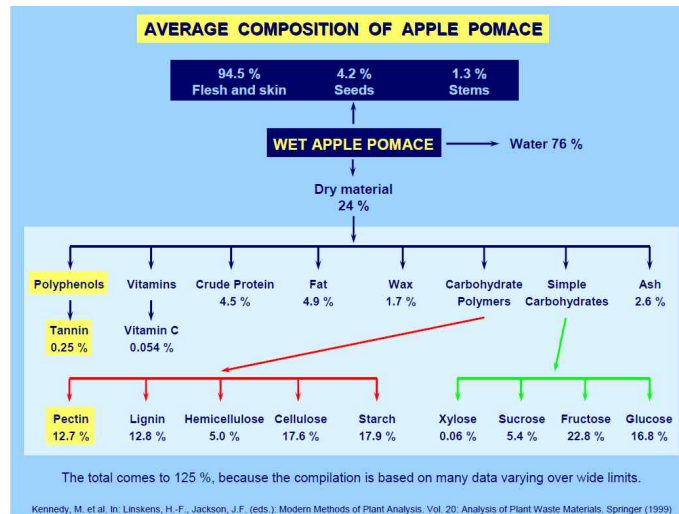


그림 2 사과박의 펙틴 함량 및 주요 구성 성분

4. 연구개발 필요성

가. 골격근 소실은 노화 및 기아에 기인한 일반 적인 현상이다. 또한 당뇨, 암, 만성적인 신부전증, 심혈관계 질환, 만성적인 호흡기 질환, HIV/AIDS 등과 같은 감염, 척추 손상 등과 같은 심각하고 광범위한 인간 질병에 의한 근육 퇴화 등에 의해 나타나지만, 현재까지 이러한 근육 소실에 대한 치료 혹은 예방법은 알려진 바가 없다. 최근까지 근육 소실에 대한 연구는 골격근 관련 유전자의 발현 조절에 대한 것만 소개 되어있다.

나. 2011년 6월에 사과 껍질에 다량 존재하는 pentacyclic triterpenoid(ursolic acid)에 의한 근육량의 증가 및 체중 감소, 혈당 강하 효과에 대한 연구결과가 2011년 생명과학 전문 저널인 cell metabolism 에 발표 된 바 있다. 또한 본 연구팀의 선행 연구 결과 및 문헌 검색을 통하여 ursolic acid는 사과껍질과 로즈마리 등의 허브식물에서 주로 존재하고 있는 것으로 확인 하였고, 사과껍질의 Ursolic acid 함량은 1.2% 정도 함유하고 있는 것으로 확인하였다.

다. 현재 사과껍질은 사과 가공공정에서 부산물로 분류되어 사료첨가제 혹은 폐기물로 이용하고 있으며, 이를 활용한 고부가가치 식의약품 원료 소재 개발이 절실한 실정이며, 상용화 시, 과수 농가 및 가공 업체의 소득 향상에 큰 역할을 할 것으로 보인다. 본 연구는 이와 같은 결과를 근거로 사과박에 다량 존재 하는 pentacyclic triterpenoid(ursolic acid)를 이용한 근력 강화 효과 소재 개발 및 제품 개발을 진행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 본 연구관련 국내외 기술 수준 비교

1. 국내외 기술 수준 비교

| 개발기술명 | 관련기술 최고보유국 | 현재 기술 수준 | | 기술개발 목표수준 | 비고 |
|------------|---------------|----------|-------|--------------|----|
| | | 우리나라 | 본 연구팀 | | |
| 근육강화 제품 개발 | 미국 | 20 | 70 | 95 | |
| 근육강화 제품 제조 | 미국 | 20 | 70 | 95 | |

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후, 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

제 2 절 제품 및 시장 분석

1. 생산 및 시장 현황

근육 기능 관련 시장은 크게 노화에 의한 근육 소실 예방 및 질병에 의한 근육 소실 이외에 헬스 등의 목적을 위한 근육 강화 일반 식품으로 크게 나누어질 수 있다. 이 중 가장 큰 규모는 노화에 의한 근육 소실 예방이 가장 크다고 할 수 있다. 따라서 본 과제의 근육 강화 소재 개발의 시장 규모는 노화에 의한 근육 소실예방을 주요 기능성으로 시장 규모를 예측 하고자 한다.

2. 국내 제품 생산 및 시장 현황

국내 건강기능식품 시장은 2005년 판매액은 6,825억원, 2006년 7,008억원, 2007년 7,234억 원으로 나타났으며, 특히 2007년 판매액은 2006년 대비 약 3.2% 증가한 것으로 보고되었다(식품의약품안전처, 2008). 농산물 건강기능식품 중 홍삼제품, 인삼제품, 개별인정형제품 등이 지속적으로 성장하고 있으며, 개별인정형 건강기능식품 시장은 2005년 82억5000만원, 2006년 89억원, 2007년 264억 1000만원 규모로 나타났으며, 특히 2007년은 전년 대비 약 297% 증가한 것으로 나타났다(식품의약품안전처, 2008). 현재 국내 근 기능 기능성 식품은 칼슘, 마그네슘, 단백질이 신경과 근육 유지에 도움을 주는 것을 기능성으로 제시한 다양한 제품이 출시되고 있다.

옥타코사놀은 근지구력 개선을 기능성으로 제시한 고시형 원료로 승인되어 있고 다양한 건

강기능식품으로 판매되고 있다. 또한 크레아틴의 경우 근력 운동 시, 운동기능 향상에 도움을 줄 수 있다는 기능을 인정받았으며, 최근 동충하초 추출물이 지구력 증진에 관한 기능을 인정 받은 바 있다. 이들 제품의 제형은 캡슐 형태가 주된 형태이며 액상, 타블렛, 환의 형태로도 시판되고 있다.

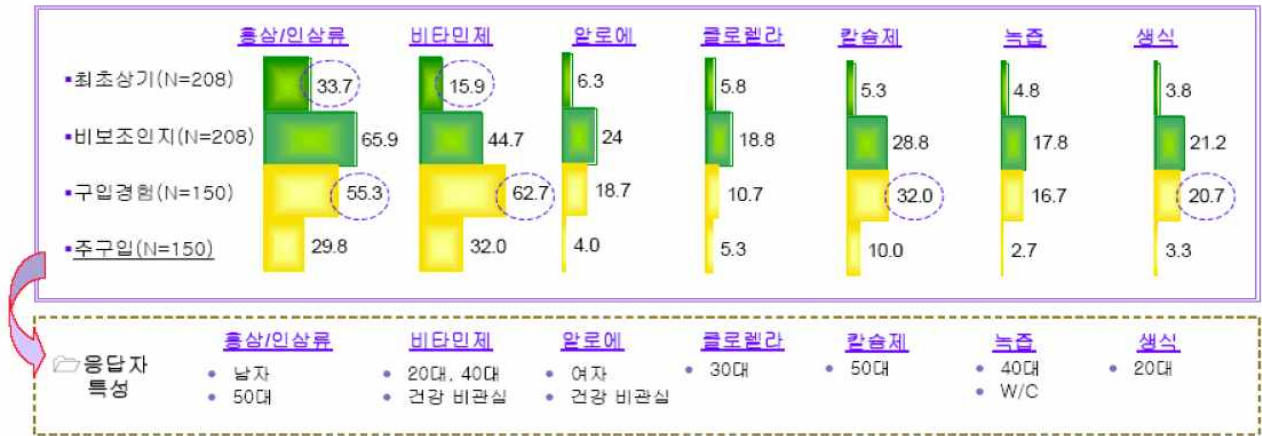


그림 1 국내 바이오 식품 산업의 수요도 조사(출처: 바이오푸드 네트워크 사업단)

2008년 대한 임상건강증진학회 추계학술대회에서 서강대 최대혁 교수의 연구 결과에 의하면 아미노산과 크레아틴의 경우 근육 강화 기능이 매우 미약하다고 보고하였다. 따라서 현재까지 근육 강화에 의한 근지구력 향상에 관한 건강 기능성 식품은 거의 전무 하다고 할 수 있다. 또한 최근 식품의약품안전처에서는 해외 인터넷 등을 통해 판매되는 근육강화를 표방하는 제품에 대하여 집중 검사한 결과, 19개 제품에서 식품에 사용이 금지된 ‘실테나필류’, ‘요힘빈’, ‘이카린’, ‘시부트라민’ 등이 검출되었다고 밝혔다.

| 기능성표방 | 유해물질 <실테나필류, 요힘빈, 이카린, 시부트라민> 검출현황 |
|-----------|---|
| 근육강화 표방제품 | ‘5-Tetra’ 등 3개 제품 중 2개 제품에서 이카린이 1캡슐(정) 당 0.3mg 씩 검출되었고, 1개 제품에서 요힘빈이 1정 당 0.9mg 검출 |

칼슘 보충용 시장의 경우 소비자에게 높은 인지도를 바탕으로 대부분의 업체에서 출시하는 품목으로써 칼슘제의 시장 규모는 2007년 150억원 규모로 매년 약 10%의 성장을 달성하고 있다. 옥타코사놀의 경우 2006년에 CJ제일제당을 비롯한 15개의 업체에서 품목제조 신고를 획득하였다. 크레아틴의 경우 주로 스포츠 음료의 형태로 스포츠용 보조식품으로 소비되며 2009년 약 20조의 시장 규모에 육박하면서 국내에서도 기대를 모으고 있다.

3. 국외 제품 생산 및 시장 현황

2005년 기준, 미국 기능성 식품 시장규모는 약 41억 달러로써 2000년에 비해 약 80% 이상의 성장을 보였으며 작년에 비해 8% 증가했음. 최근 시장조사 전문 기업인 Freedonia Group에 의하면, 미국 시장의 경우 노화방지 제품 및 서비스 시장은 2004년 이미 455억 달러 규모에 이르고 있으며, 향후 연평균 9.5%씩 성장하여 2009년에는 720억 달러로 확대될 전망이다.(LG 경제연구소)

품목군별 미국의 건강기능식품시장 매출현황

(단위: 백만불)

| | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009e | 2010e |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Supplements | 9,366 | 10,078 | 11,214 | 11,640 | 11,185 | 10,778 | 10,423 | 10,645 | 10,889 |
| Natural& Organic Foods | 2,328 | 2,607 | 2,946 | 3,300 | 3,795 | 4,478 | 5,598 | 7,277 | 9,460 |
| Functional Food | 14,790 | 16,417 | 16,417 | 17,895 | 19,058 | 18,724 | 18,911 | 18,343 | 17,977 |
| N&OPC& Household Products | 2,340 | 2,422 | 2,543 | 2,695 | 2,884 | 3,086 | 3,333 | 3,599 | 3,887 |
| 합계 | 28,824 | 31,525 | 34,598 | 36,694 | 37,303 | 37,066 | 38,264 | 39,343 | 42,213 |

자료: NBJ(Nutrition Business Journal), 2010

제 3 절 개발 기술의 산업화 방향 및 기대 효과

1. 산업화 방향

개발 대상 소재 및 이를 기반하고 있는 제품은 근육 소실의 억제 및 근육 강화의 기능성을 특징으로 한다. 또한 인공적 합성 원료가 아니라 천연물, 특히 일상적으로 널리 섭취되어 온 사과를 그 기원으로 하기에 소재에 대한 거부감이 매우 낮다. 그리고 폐기되던 원료의 재활용 이기에 자원 활용 측면에서도 매우 긍정적이다.

이와 같은 특징을 기초로 하여 다음과 같은 산업화의 방향을 생각해 볼 수 있다. 먼저 소재의 가장 중요한 특징인 근육 관련 기능성의 활용에 있어서 다양한 기능성 음료, 건강 기능성 식품의 개발을 목표로 한다. 그리고 이러한 점은 기존 유사 기능성 소재들과의 복합을 통한 시너지 효과를 지닌 제품과 나아가서는 노년기 건강 보조식, 해당 질병 환자 특수식으로 확장될 수 있다. 또 본 소재의 특징을 활용하여 다이어트식에 있어서도 활용이 가능한데, 다이어트에 있어서 체지방 감소를 목표로 하지만 근육 소실이 함께 나타나는 부작용이 있는데 본 소재는 이러한 경우에도 매우 효과적인 보완제가 될 것으로 사료된다. 둘째로 천연 원료라는 점을 바탕으로 합성품에 대한 반감을 가진 소비자층과 고급화된 기능성 소재를 구매하는 계층에게 어울리는 차별화된 제품군을 개발할 수 있으리라 여겨진다. 여기에는 사과박 추출물이 가지는 부가적 건강 기능성 성분들의 존재와 이들의 기능성에 대한 연구가 수반되어야 할 것이다. 셋째

로 국내 사과 부산물의 자원 활용 효과 뿐 아니라, 기술을 현지화하여 사과를 다량으로 재배하고 그래서 부산물이 매우 다량 생성되는 미국이나 중국 등 다량의 과수 폐기물이 생성되는 국가에 소재 개발 기술의 수출 또한 중장기적 산업화의 한 축이 될 수 있다. 소재 자체의 개발과 수출 뿐만 아니라 합작 기업 설립, 기술 수출 등 다양한 시도가 가능하며 이를 통한 국의선양의 효과 또한 기대된다.

이상과 같은 산업화는 식품 전반에 대한 이해와 해당 소재 개발 노하우 및 이를 활용한 시장 마케팅 역량 등 다양한 기업 역량을 요구한다. 본 연구진은 이와 같은 분야에 대한 기반 역량을 지니고 있으며, 이의 확대 적용을 위한 네트워크를 보유하고 있어 이 같은 산업화에 매우 유리한 위치를 점하고 있다.

2. 산업화를 통한 기대 효과

(단위 : 백만원)

| 항 목 \ 산업화 기준 | 1차년도 | 2차년도 | 계 |
|--------------|-------|-------|-------|
| 직접 경제효과 | 500 | 1,000 | 1,500 |
| 경제적 파급효과 | 1,000 | 1,000 | 2,000 |
| 부가가치 창출액 | 2,000 | 4,000 | 6,000 |
| 합 계 | 3,500 | 6,000 | 9,500 |

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 4 절 3P(특허, 논문, 제품) 분석을 통한 연구

1. 특허 분석 측면

기존 특허는 사과껍질의 phenolic compound를 활용한 항암 등의 의약품 치료제, 화장품 조성물, pectin,식이섬유 추출 분야에 집중되어 있으며, 사과껍질 내의 기능성 성분에 관한 내용은 주로 추출 방법 등의 제조/가공분야에 국한되고 있었으나 최근 저산패라면 개발 등과 같은 다양한 식품 첨가물 응용 분야로 확대되고 있다. 그러나 아직 유효 사과껍질 추출물에 대한 건강 기능성 식품으로서의 가능성과 제품생산에 대한 내용을 포괄적으로 포함하고 있는 특허물

은 부족하다고 보여지므로 이러한 방향으로 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원 하였다. 본 연구에서 실시한 근력강화 활성 물질을 함유한 기능성 식품 개발 연구와 이의 임상 적용은 현재 관련성이 높게 확인되는 특허가 없어 발명 시에 특허성 확보(등록)가 용이할 것으로 예측된다.

2. 논문 분석 측면

최근 phytochemical 관련 논문의 경향성을 보면 phytochemical의 면역 활성화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다양한 부위에서 유발되는 종양의 빈도를 감소시킨다는 연구 결과를 보고하고 있다. 그러나 대부분 약용식물에 존재하는 phytochemical에 관련된 내용이 대부분으로 herb 및 과수작물에 관련된 연구의 내용은 미비하며 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히, 논문의 검색 결과 사과껍질내의 phytochemical에 의한 함암, 항염증, 피부보습기능향상 등에서의 역할이나 효능에 관련된 정보들에 대한 내용은 있지만 본 연구와 직접적으로 연결되는 논문은 적게 발견이 되는 것으로 보아 이 분야와 관련되어 좀 더 깊고 포괄적인 연구가 요구되었다. 본 연구는 기존 논문들을 바탕으로 좀 더 다양한 연구를 수행함으로써 현재 발견된 사과껍질의 phytochemical에 의한 항염증 등의 면역반응과는 다른 근력강화 기능성을 제시함으로써 노화 혹은 질병 등으로 인한 근육감소 및 근육소실등에 대한 도움이 될 수 있는 방향으로의 타겟의 확립과 임상에 적용이 가능한 물질의 발견을 위한 방향으로 연구를 추진하였고, 관련 결과 등을 SCI급 학술지 등에 게재하였다.

3. 제품 및 시장 분석 측면

국내 및 국외시장 분석 결과, 근력강화 관련 제품은 주로 운동기능 향상 및 근지구력 강화를 목적으로 섭취와 보관이 쉬운 음료나 분말 등과 같은 형태로 건강 식품 보조제품 품목으로의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 대부분 효과 면에서 큰 효과를 나타내지 못하고 있고 현재 대부분의 원료물질을 수입에 의존하고 있으며, 대표적인 운동기능 향상 기능성 원료인 creatine의 합성에 의해 생산되는 등 천연물을 이용한 근력강화 제품은 현재 전무한 상태라 볼 수 있다. 더불어 최근 많은 연구자와 관련 업체들은 근육 강화 등의 근육자체를 키우는 제품을 목적으로 한 연구를 진행하고 있지만 국내 개발 원료 및 제품은 동충하초 발효 추출물이 유일하나 인체 적용시험결과가 매우 미흡한 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구 개발 사업에 의해 사과 가공 부산물의 phytochemical(ursolic acid)을 활용한 근력강화 원료 소재 확보 및 제품 개발이 성공 할 경우 원료 및 제품 국산화 및 수출 등에 의한 상당한 부가가치를 발생 할수 있을 것으로 판단되었다. 그러므로 브랜드 밸류를 갖춘 당사 및 지역 농협 과채가공공장의 협업을 통하여 본 연구에서 지향하고자 하는 사과가공 부산물을 활용한 근력강화 기능성 식품 소재 개발 및 응용제품 개발이 성공적 수행 및 상용화로 지역농협 조합원 및 과수 재배 농가의 소득 창출과 근력강화 제품의 신시장 창출이 가능하리라 생각된다.

3. 표준물질

기능 및 지표성분인 UA의 표준물질은 Fluka社($\geq 98.5\%$ 순도)에서 구입(Sigma-Aldrich)하여 사용하였다.

4. 소재화

가. 추출조건 설정

(1) 추출용매 농도 및 시간

사과박을 사용하여 주정 농도에 따른 추출율을 비교하였다. 용매비는 1:10으로 하였으며 각 용매 농도 조건별로 2, 4, 6, 8, 12, 24시간 동안 50°C 에서 교반 추출하였다. 각 시간대별 추출율은 그림 1-2와 같다. 95% 주정을 사용한 경우, 시간대별 UA의 추출량이 서서히 증가하는 현상을 볼 수 있었으며, 2시간 추출한 시료 대비 24시간 추출한 시료에서의 UA양이 약 10% 증가한 것으로 나타났다. 70% 주정을 사용하여 추출한 경우는 95% 주정을 사용한 경우에 비하여 전체적으로 평균 30.4% 수준의 UA가 추출되었다. 추출 효율 측면에서 보았을 때, 70% 주정보다는 95% 주정을 사용하여 추출하는 것이 주정 투입량 대비 유리할 것으로 판단된다. 또한 95% 주정으로 추출 할 경우 추출 시간에 비례하여 추출량이 증가하는 현상을 보이고 있으나, 추출액의 포화도나 효율성 등을 고려하였을 때, 짧은 시간 여러 번 추출함으로써 최종 제품의 추출율을 높일 수 있는 가능성도 추가로 검토해 볼 필요가 있다.

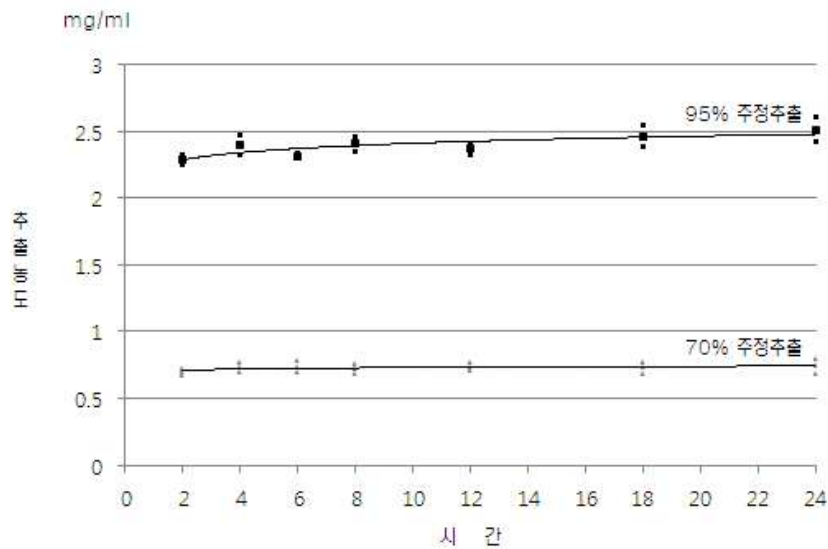


Figure 1-2. Extraction rates of UA with alcohol concentrations

(2) 용매비

용질(사과껍질)과 용매(70% 주정, 95% 주정)간의 배합 비율에 따른 추출 효율을 비교하였다 ($50^{\circ}\text{C}/6$ 시간 추출). 70% 주정을 사용하였을 때는 용질-용매간 비율에 상관없이 약 0.25 mg/ml 농도로 추출 되었으며, 95% 주정을 사용한 경우 용매의 양이 적을수록 높은 농도로 UA가 추

출되었다(그림 1-3). UA는 물에 대한 용해도가 매우 낮다는 사실에 근거하여 볼 때, 금번 실험 결과는 70% 주정으로의 최대 추출율에 도달하였기 때문에 용매비에 상관없이 거의 일정한 농도로 추출된 것으로 판단된다.

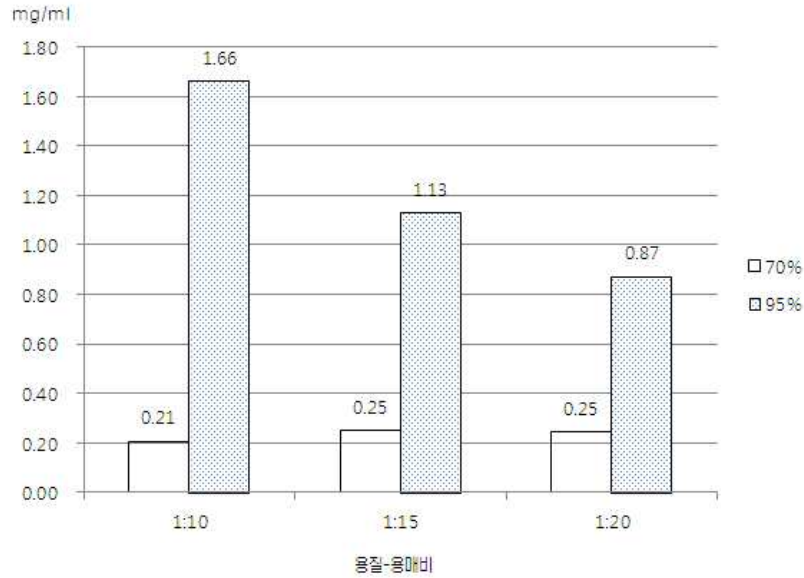


Figure 1-3. Extraction rates of UA with solute-solvent rate

(3) 추출반복횟수에 따른 추출율

추출 횟수에 따른 UA의 추출율을 비교하였다. 용매비는 1:10로 고정하였으며 50℃에서 추출하였고 2시간마다 추출액을 회수하고 용매를 다시 채우는 방식으로 3회 추출하였다. 95% 주정을 사용한 경우 1차 추출에서 1.69 mg/ml의 농도로 추출되었고 2차, 3차 추출 시에는 현격히 추출 농도가 저하하였다(그림 1-4). 70% 주정을 사용한 경우에는 추출 반복수에 상관없이 약 0.22 mg/ml의 농도로 추출되었다. 이는 용매비 설정 실험에서와 마찬가지로, 70% 주정으로 추출할 수 있는 양이 포화되었기 때문인 것으로 판단된다.

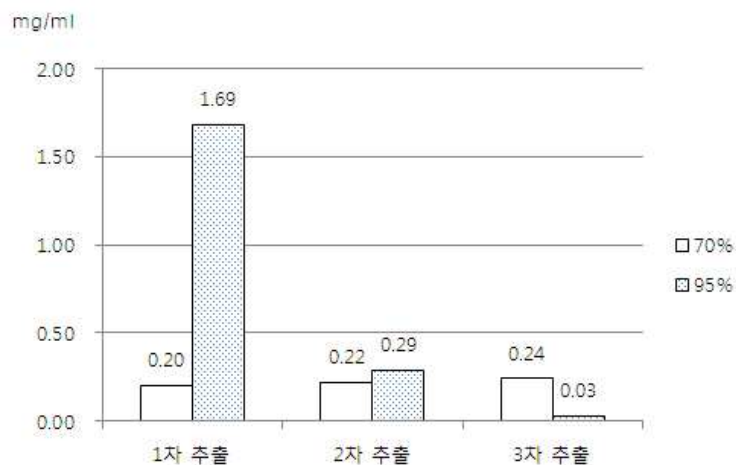


Figure 1-4. Extraction rates of UA with extraction times

(4) 추출온도에 따른 기능성분 추출율

70% 주정처리 조건에서 50℃, 65℃, 80℃로 온도조건을 달리하여 추출하였을 때 각 온도 조건에 따른 기능성분의 추출율의 차이는 없었다. 95% 주정처리 조건은 50℃와 상온(25℃)으로 온도조건을 달리하여 실험하였는데, 역시 온도조건에 따른 추출율의 변화는 없었다.

(5) 최적 추출조건 설정

상기 실험 결과를 종합하여 보았을 때, 추출용매는 95% 주정 사용, 용매비는 1:10 또는 그 이상이어도 생산에는 무관한 것으로 판단되었다. 95% 주정을 사용하기 위해서는 공정 중 안전성을 고려하여 상온(25℃)으로 온도 조건을 설정하였다. 추출 횟수는 경제성을 고려하여 1회로 정하였다.

나. 기능성분 수율향상

(1) 전처리 공정 도입을 통한 기능성분 수율 향상

본 과제에서 타겟으로 하는 UA는 불용성질의 물질이므로, 사과박/껍질에 존재하는 수용성 물질을 제거함으로써 추출 효율을 높일 수 있을 것이라는 전제하에 원물(사과박)에 대한 전처리 공정 도입 가능성을 확인하였다. 포괄적 수용성 물질을 제거하기 위하여 사과박을 열수처리(85℃/overnight) 한 후 95% 주정으로 4회 반복 추출하여 분말화하였으며, 다른 실험군으로서는 펙틴을 선별적으로 제거하기 위하여 열수처리 후 pectinase(Novozyme® 33095)를 추가로 처리(0.1%, 50℃/4시간)한 후 주정으로 4회 반복 추출하여 분말화하였다. 분말화는 고품분:부형제 비율 5:5와 7:3으로 각각 정하였으며 동결건조 하였다. 해당 분말에 대한 HPLC를 통한 분석 결과는 그림 1-5와 같다.

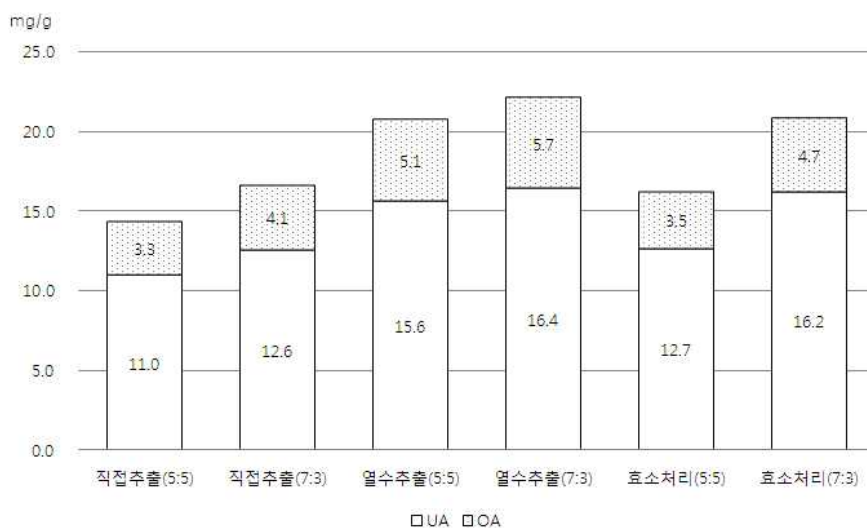


Figure 1-5. Effect of hot-water as pre-extraction treatment on yield of UA

실험 결과, 전처리를 하지 않고 원물 그대로에서 추출하여 분말화한 실험군에 비하여 전처리 공정을 추가한 경우 UA의 함량이 더 높은 것으로 나타났으며, 효소처리를 통한 펙틴의 제거는 효과가 없는 것으로 나타났다. 따라서 열수처리라는 전처리 조건을 설정함으로써 수율의 향상을 도모할 수 있을 것이라는 결론을 얻었다.

(2) 여과 공정 도입을 통한 기능성분 수율 향상

사과박 추출물 상태에서 관찰되는 침전물질을 제거함으로써 수율을 향상시킬 수 있는 방안으로 표준체망을 사용하는 방법을 검토하였다. 열수처리한 사과박을 95% 주정으로 4회 추출한 추출물을 400 mesh 표준체망을 사용하여 거른 후 동결건조(부형제 7:3 조건)한 결과 약 1mg 향상된 17.5 mg/g으로 정량되었다. 고형분의 제거를 통해 주정에 용해된 UA의 농도를 일부 높였지만, 가시적인 수율 향상에는 부족하였으므로 여과보조제를 통한 수율 향상 방법을 추가로 검토하였고, 여과 보조제인 펄라이트를 적용하였다. 추출액량 대비 약 1%(g/ml)의 농도로 펄라이트를 첨가하여 혼합한 뒤, 필터페이퍼를 사용하여 혼합액을 2회 여과한 결과, 침전물이 생기지 않는 것을 발견하였다. 또한 여과 전 후 샘플을 취하여 HPLC로 분석한 결과, 여과 과정에서 UA의 함량이 감소하지 않는 것이 확인되어, 공정에 적용하기로 하였다.

추출액에 펄라이트를 여과 보조제로서 첨가하여 여과하였을 때 여과과정에서 UA의 소실이 발생하지 않았으므로, 이 외의 고형분이 제거됨으로써 분말화 하였을 때 기능성분의 함량이 향상될 것이라는 전제로 실험하였다. 사과박을 열수처리(85°C/16시간)한 후 95% 주정으로 4회 반복 추출한 후 여과하여 분말화하였다. 펄라이트를 처리한 실험군과 처리하지 않은 실험군을 비교하였으며 그 결과는 그림 1-6과 같다.

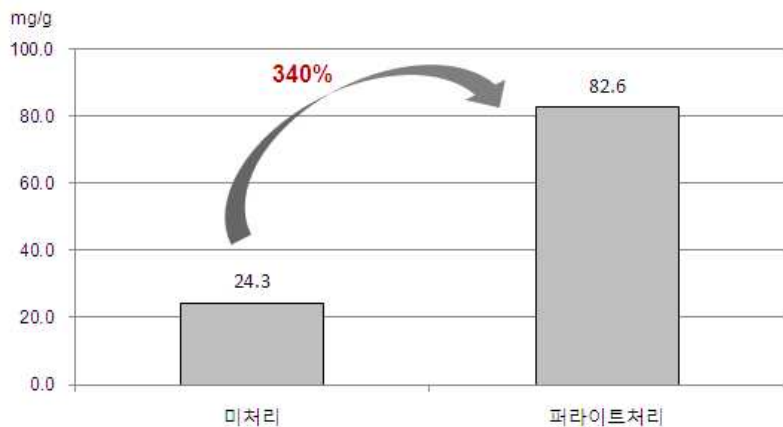


Figure 1-6. Effect of perlite as filtering assistant on yield of UA

여과 조건을 제외한 다른 공정 조건을 동일하게 하였을 때, 펄라이트를 처리하지 않은 실험군에 비하여 펄라이트를 여과보조제로 사용한 실험군 분말 중 기능성분 함량이 약 3.4배 증가되었다. 펄라이트가 추출액 상의 고형분을 제거함으로써 함량을 개선하고자 하는 UA의 함량이

상대적으로 높아질 것이라는 전제와 일치하였다.

다. 분말화조건 설정

사과박추출물의 분말화는 동결건조법으로 시행하였다. 부형제로서는 Maltodextrin (DE value 5이하)을 사용하였다. 감압농축한 농축액의 고형분을 측정하고 고형분:부형제 비율 8:2로 혼합하여 급속동결하였으며 24시간 이상 냉동 후 건조하였다. 열수 전처리 및 퍼라이트 처리를 통해 당 성분이 상당부분 제거되어 분말의 성상이 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다.

라. 시제품 내 UA 분석을 위한 시료 전처리 개선

사과박 추출물 분말 중의 UA의 함량을 분석하는데 있어 중요한 점은 고 농축된 UA를 보다 효과적으로 액상으로 다시 추출되는지의 여부이다. 따라서 용매에 따른 추출율을 검토하고, 동시에 sonication이 용출에 도움이 되는지 검토해보았다. 유기용매로서 100% Methanol과 70% Methanol, ACN, DMSO, 100% Ethanol을 각각 동일한 추출물 분말에 1:10 비율로 첨가하여 vortexing 하였다. 그 후 30분간 상온 정치하였고, 그와 동일한 샘플을 30분간 sonication 한 후 모든 샘플을 원심분리하여 상등액을 HPLC로 검사하였다. 여러 조건 중 DMSO를 사용하여 sonication을 한 실험군이 가장 높은 수치로 정량되었다(그림 1-7).

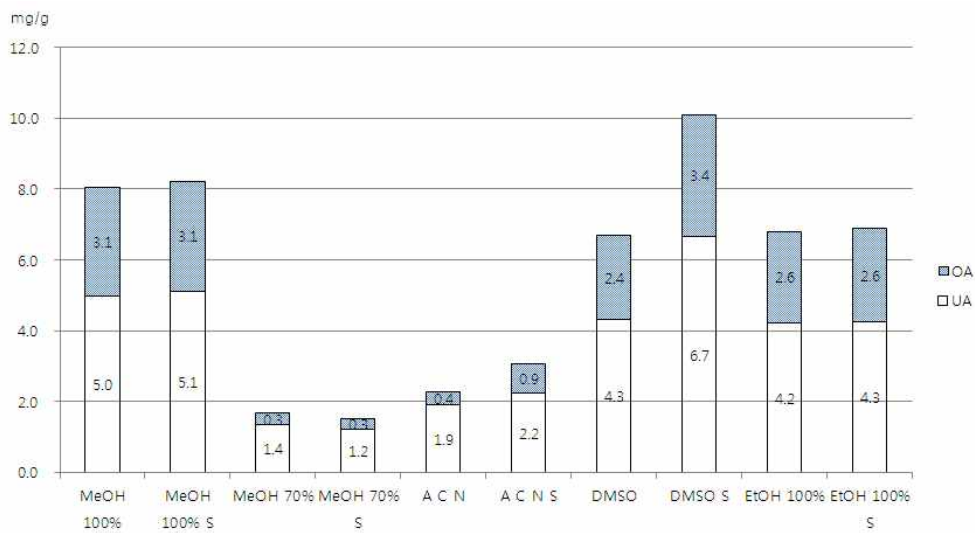


Figure 1-7. Relative solubility of extract powder depending on solvent and method

본 결과를 바탕으로, 부형제 함유량을 달리하여 제조한 사과박 추출물 분말을 분석하였다. 아래 결과로 보았을 때, 100% Methanol을 사용하여 시료를 녹인 경우 약 17.5 mg/g 수준에서 UA가 포화된 것으로 판단되었다. 정상면에서 제품화 가능성이 있는 분말 시료는 부형제 성분이 8:2 비율로 사용된 시료까지라고 보았을 때, DMSO를 이용한 전처리로 분석한 결과는 UA 함량 24.3 mg/g이었다(그림 1-8).

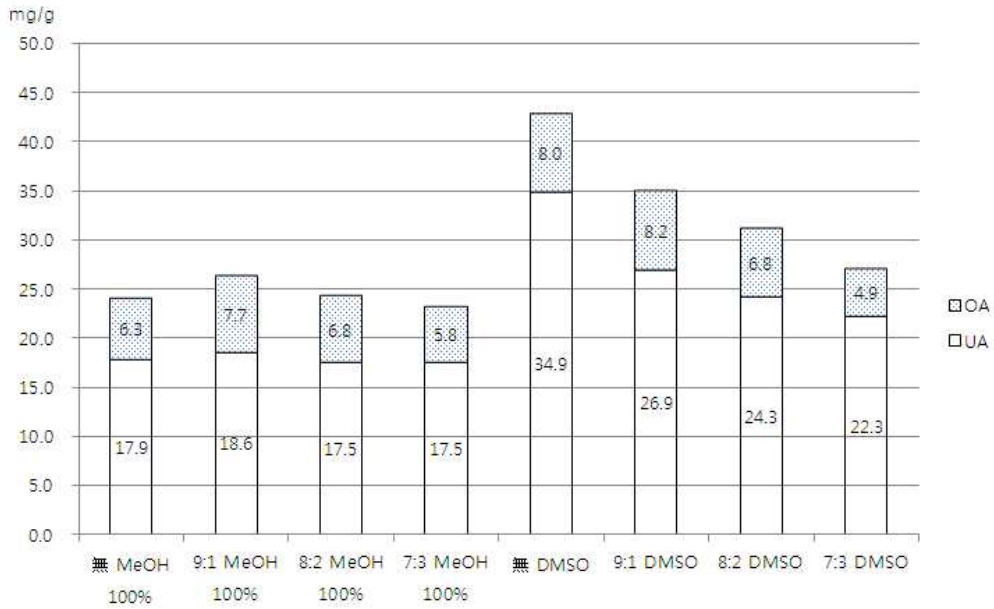


Figure 1-8. Relative solubility between 100% MeOH and DMSO

분말시료의 경우 DMSO에 용해시킨 후 부형제 성분 등을 제거하기 위하여 원심분리를 사용했는데, 이 경우 HPLC 분석 결과의 편차가 커서 정확한 정량을 하는데 한계가 있었다. 또한 이렇게 1차로 용해한 시료를 표준 물질 정량 범위에 들어오게 하기 위하여 희석을 할 때 DMSO를 사용할 경우, HPLC 결과상 Baseline에서 뜬 상태로 Peak가 형성되므로 실험자에 따라 정량 오차의 범위가 크게 나타날 수 밖에 없었다. 따라서 이러한 분석 시료 내 성분 편차를 저감하기 위해 원심분리 단계를 삭제하였으며, 분석수치 객관화를 위해 희석 용매를 DMSO에서 100% MeOH로 변경하여 실험하였다.

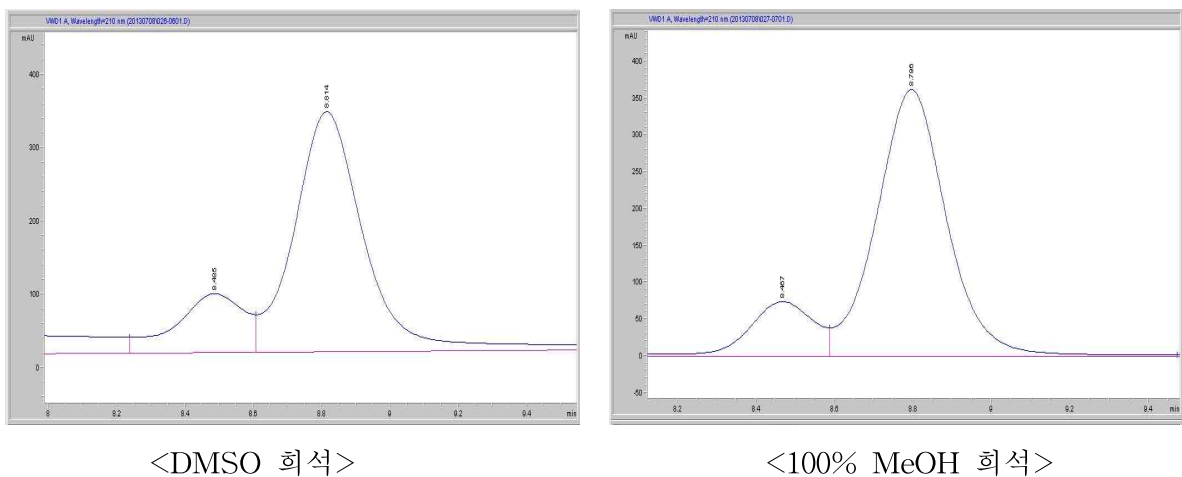


Figure 1-9. Peaks of UA depending on dilution solvents

그림 1-9는 희석액으로서 DMSO를 사용하였을 때(파란선)와 MeOH를 사용하였을 때(빨간선)의 HPLC 결과를 동시에 보여주고 있다(용매 이외의 실험처리는 동일함). 또한, 두 개의 그

림을 통해서도 동일한 시료가 다른 형태의 peak로 나타나는 것을 볼 수 있다. 희석 용매에 따른 분석 결과의 표준 편차는 DMSO가 MeOH에 비하여 약 20% 큰 것으로 나타났다. 따라서 결과를 판정할 때, 인위적으로 peak를 잘라 peak 면적을 구하는 과정을 없앴으로서 분석자에 따라 결과가 다르게 나타날 수 있는 여지를 제거하기 위해서는 100% MeOH를 이용하여 희석한 후 정량하는 것으로 결론 내렸다. 원심분리 여부에 따른 분석 결과간의 차이는 없었으며, 따라서 가능한 분말/농축액을 용해한 시료를 균질화하여 분석하는 것이 시료 내 편차 저감화에 도움이 될 것으로 판단하였다.

사과주정추출분말의 분석 방법을 정리하면 그림 1-10과 같다.

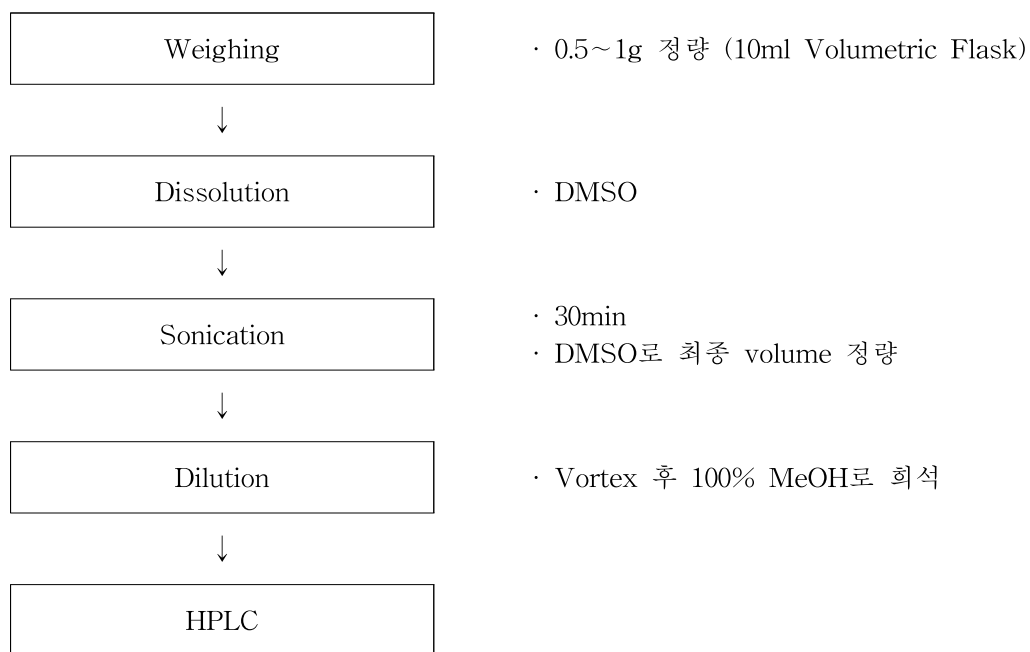


Figure 1-10. Flow of analysis of apple peel extract powder containing UA

최종 UA 함량은 반복수를 두어, 평균치±표본집단의 표준편차(mg/g)로 표현하는 것이 바람직할 것이라 판단된다.

마. 사과 산지별 UA 추출 함량 비교 분석

충북 원예 협동조합과 경북 능금 협동의 2012년 생산 사과박을 이용하여 주정 추출을 통한 유효성분(UA)의 추출을 실시하였다. 충북 원예협동조합의 사과주스 추출 공정은 경북 능금 협동조합과 달리 중간에 열처리를 통한 사과 주스 착즙 수율 향상 과정이 있어 사과박 자체의 수분 함량이 경북 능금에 비해 약 10%이상 수분을 포함하고 있는 상태이다.

Table 1-1. Characteristic comparison of apple pomace by regional differences.

| | 충북 원예협동조합 | 경북농금협동조합 |
|-------------|-----------|------------|
| 사과 주스 착즙 과정 | 압착식 | 압착식 |
| 중간 열처리 | 있음 | 없음 |
| 수분 함량 | 80~85% | 70~75% |
| 사과 처리량 | 4,000ton | 300,000ton |
| 사과박 생산량 | 1,000ton | 6,000ton |
| 사과 품종 | 홍로 외 | 부사 외 |

충주원예협동조합과 대구농금협동조합의 사과박 원물과 건조 및 파쇄 분말을 이용하여 사과박 내의 UA 함량을 측정하였다. 사과박 원물의 경우 사과주스 착즙 후 배출된 사과박을 그대로 이용하였고, 건조는 당사의 Dry Oven을 이용하여 70℃에서 3일간 열풍 건조를 실시한 후, mixer를 이용하여 분쇄하였다. 이후 분쇄한 사과박 분말의 수분 함량은 2.5%이하임을 확인 하였다. 앞서 확보한 충주와 대구의 사과박 원물 및 건조분말을 이용하여 UA의 함량 변화 여부를 HPLC를 이용하여 측정 하였다. 측정 결과는 아래에 나타내었다 (표 1-2).

Table 1-2. Comparison of UA contents by regional and extraction differences

| 사과박 원물 | 추출법 | UA함량(mg/ml) |
|---------------|------------------|-------------|
| 충주 10% | 70% 주정, 50℃, 8시간 | 0.193 |
| 10% | 95% 주정, 50℃, 8시간 | 0.281 |
| 대구 10% | 70% 주정, 50℃, 8시간 | 0.245 |
| 10% | 95% 주정, 50℃, 8시간 | 0.346 |
| 사과박 건조분말 | | |
| 충주 10% | 70% 주정, 50℃, 8시간 | 0.312 |
| 10% | 95% 주정, 50℃, 8시간 | 0.656 |
| 대구 10% | 70% 주정, 50℃, 8시간 | 0.369 |
| 10% | 95% 주정, 50℃, 8시간 | 0.668 |
| 충주 20% | 95% 주정, 50℃, 8시간 | 1.103 |
| 30% | 95% 주정, 50℃, 8시간 | 1.208 |
| 대구 20% | 95% 주정, 50℃, 8시간 | 1.583 |
| 30% | 95% 주정, 50℃, 8시간 | 1.873 |
| UA 1 mg(DMSO) | | 1 |

측정 결과 수분을 다량 함유한 사과박 원물의 경우 건조분말에 비해 추출된 UA의 양이 약 50% ~ 60% 정도 낮은 것을 확인 하였다. 또한 70% 주정을 이용할 경우는 95%에 비해 61.8%~ 66.3%의 UA 추출량을 나타내었다. 이는 물에 대한 UA의 낮은 용해도에 의한 것으로

이후 95% 주정을 이용하여 UA의 추출을 실시하였다. 충주와 대구의 건조 사과박 분말에서 UA 함량을 조사한 결과, 대구능금 협동조합의 사과박 분말이 충주에 비해 약 43% 정도 높은 사과박 함량을 나타냄을 확인 하였다. 이는 사과 품종의 차이 및 사과 주스 착즙시 처리과정중에 수분의 포함여부에 의해 달라지는 것으로 판단된다. 추출 결과, 20 g의 사과박 건조분말을 이용할 경우, 추출 수율 30%, 추출물 내의 UA 함량은 18.3%임을 확인하였다.

바. 1차 추출 및 2차 추출(임상시험용)분말 내 UA 함량 측정

시험 결과 1차 추출의 사과박 추출물 분말 내의 UA의 함량은 180 mg/g으로 확인되었으며, 2차 추출의 사과박 추출물 분말 내의 UA의 함량은 200 mg/g으로 확인되어 자체 규격인 150 mg/g 이상으로 확인되어 공정 내에 문제가 없음을 확인하였다.

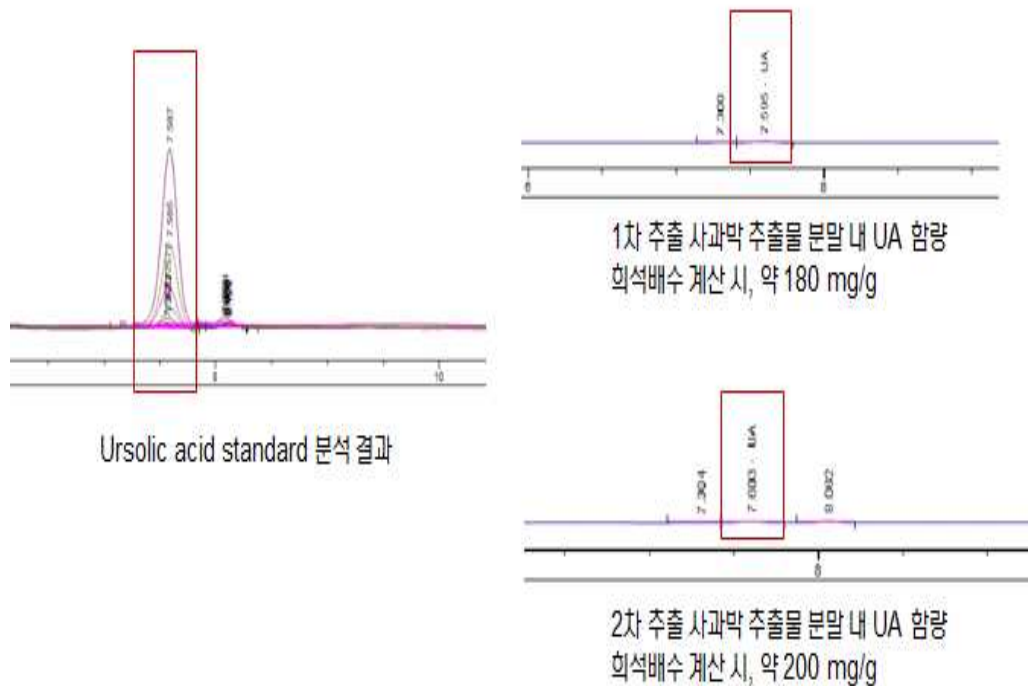


Figure 1-11 Peaks of standard UA and apple pomace extracts

사. 임상시험용 시험 캡슐 내 ursolic acid 및 oleanolic acid 함량 측정

사과박 주정 추출물 분말을 함유한 임상시험용 식품 및 대조 시험군 식품에서의 유효성분인 ursolic acid 및 그의 이성질체인 oleanolic acid의 함량을 측정하였다. 각 캡슐을 3반복하여 측정한 결과, 대조시험군 식품에서는 ursolic acid 및 oleanolic acid가 모두 불검출 되었으며, 임상시험용 식품에서는 각각 ursolic acid로써 44.20/500, 40.92/500, 40.99/500(각각 mg/mg)이 검출되었으며, oleanolic acid로써 7.43/500, 6.93/500, 6.82/500(각각 mg/mg)이 검출되었다. Ursolic acid로써 예상되는 측정치는 200 mg의 20%인 40±8 mg 이었으므로, 유효성분 및 지표 성분으로 ursolic acid가 적합하게 확인되었다.

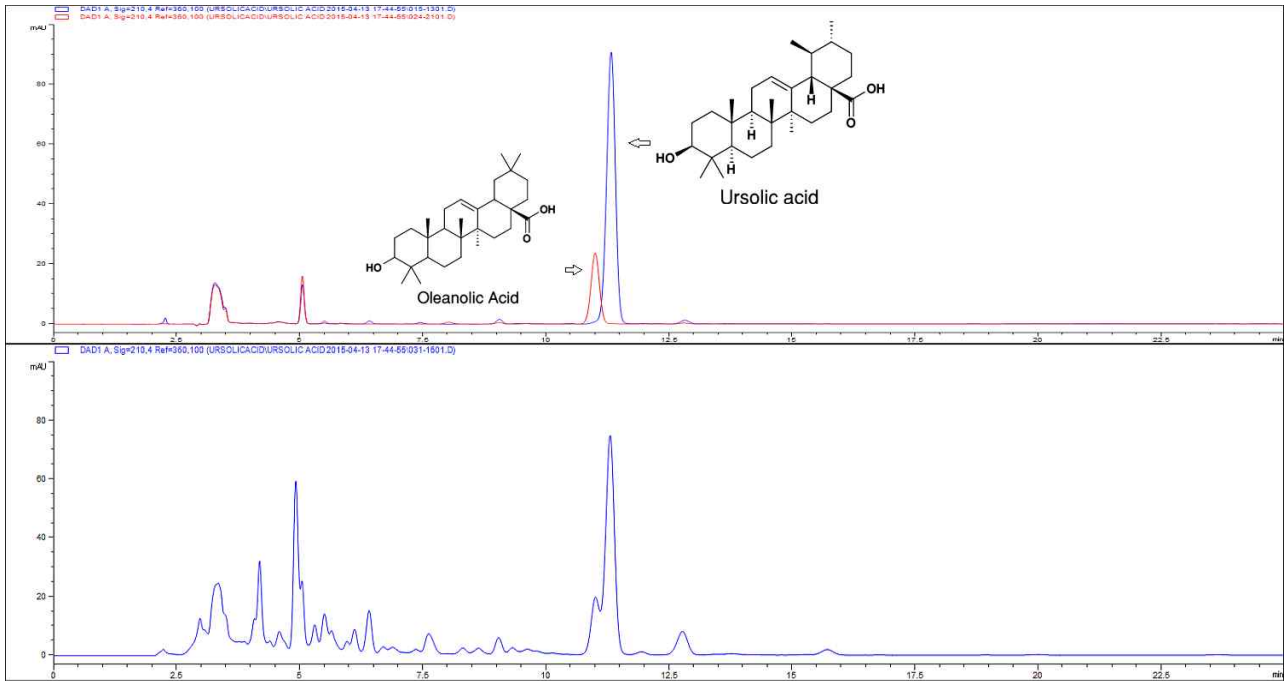


Figure 1-12 Peaks of UA depending on dilution solvents

제 2 절 in vitro 실험을 통한 근력강화 물질의 기능성 규명

본 연구는 사과박에 포함된 근육강화 기능성분인 UA를 포함하는 추출물 및 추출분말에 대한 시험관 실험을 통해 근력 강화 기능성을 규명하는 것을 목표로 한다. 마우스 근육세포주인 C2C12를 사용하여, 근육강화 및 근육 손실에 대한 유전자 발현분석, 근육 세포주에서의 세포 독성 탐색 및 AMPK를 기반으로 하는 미토콘드리아 활성 분석, IGF-1/AKT/Mtor 기전을 유전자 수준에서 탐색하고자 하였다. 본 결과를 바탕으로 사과박 추출물의 근력 강화 기능성을 확인하고, 동물 시험에서의 효능을 확인하는 것을 목표로 한다.

1. 재료 및 방법

가. 소재 확보

본 실험에서 사용한 사과박 추출 분말은 충주원예농협으로부터 확보한 사과박 원물을 통해 확보하였으며, 본 시료는 in vitro 시험 및 in vivo 시험에 동일하게 사용하였다. 상기(1.사과가공 부산물의 근력강화 기능성 물질 추출물 제조 및 기능성 분석 방법 확립)에서 서술된 바와 같이 확립된 조건으로 시험관 평가 및 동물 실험에 사용할 사과박 추출 분말을 획득하였으며, 같은 조건으로 분말의 시생산까지 진행하였다. 실험에서 사용한 사과박 추출물 분말 내 유효성분인 UA의 함량은 185 mg/g으로 확인되었다. 시험관 시험에 사용하기 위해 각 추출 분말을 DMSO에 용해하여 사용하였다.

나. 세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 ATCC에서 구입한 C2C12 mouse myoblast 세포주이다. C2C12는 C3H mouse의 thigh muscle로부터 분리된 세포주로 moutube로 분화 후에 사용하였다. 세포는 95% air, 5% CO₂ humidified atmosphere에서 37°C의 조건에서 배양하였다. Growth media 조성은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) high glucose(Gibco)에 10 % fetal bovine serum(FBS, Gibco)와 1 % Antibiotic-Antimycotic(Gibco)을 넣어서 사용하였으며, 90 %이상 배양이 된 세포는 분화용 media로 교체 후, 4~5일간 분화하여 사용하였다. 분화용 media는 D-MEM에 2 % horse serum(Gibco)과 1 % Antibiotic-Antimycotic을 넣어서 사용하였다. 분화 과정 중, 형태학적으로 길게 뻗으며 자라는 것을 확인할 수 있으며, 세포 condition 을 조절하고 계대수가 6이 넘지 않도록 일정하게 유지하여 실험하였다.

다. In vitro cytotoxicity assay

추출물의 cytotoxicity는 MTT assay를 통해 확인하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 배양세포인 C2C12 세포를 준비하여 96 well plate에 3×10⁴ cells/ml로 분주하여 배양시킨다. 24시간 이후에 사과박 추출물을 농도별로 단계 희석하여 처리하였으며, 단계 희석은 serum free DMEM을 사용하였다. 음성대조군으로는 Distilled water와 DMSO를 사용하였다. 이후에 Tetrazolium salt 를 넣어주고 4시간을 다시 배양시킨다. 배양된 배지를 제거한 뒤, DMSO를 첨가한 뒤에 그에 따른 540 nm에서의 흡광도를 spectrophotometer(Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek)를 이용하여 측정하고, Gen5 Data Analysis Software로 통계처리 및 분석하였다.

라. 근육 세포주 내 단백질 발현 확인(Western blot)

사과박 추출물 분말시료를 24시간 처리하고 6-well plate에서 배양한 세포를 RIPA lysis buffer에서 sonication하여 soluble protein을 획득하였다. 약 30 µg으로 정량한 각 sample을 90°C에서 5분간 denaturation시켰다. 전기영동장치에 loading buffer를 채우고 준비된 sample을 각 well에 loading한 후 전압을 걸어주었다. 전기영동이 끝난 분리된 gel상의 단백질을 nitrocellulose film으로 transfer하였다. Transfer가 끝난 후 TBST로 10분간 3회 세척 후, primary antibody를 4°C에서 overnight 처리하였다. TBST로 10분간 3회 washing 한 후 horseradish peroxidase가 부착된 secondary antibody를 상온에서 1시간 처리하였다. Enhanced chemiluminescence(GE healthcare#RPN2109)로 film을 감광시켜서 예상되는 size의 band가 나타나는지 확인하였다.

마. Real-time quantitative PCR

C2C12 세포를 6 well plate에 5×10^5 cells/well로 각 well에 분주하고, 18시간 배양한 후, 세포가 부착되는 것을 확인하였다. 매일 배양액을 교체하며 세포가 80~90 % 정도 배양이 된 이후에, 분화용 media로 교체하고, 4~5일간 분화하도록 하였다. 분화 이후에, serum free DMEM으로 교체한 후, 각기 다른 농도의 시료를 처리하고, 12시간 이후, total RNA를 추출하였다. Total RNA는 RNeasy Mini kit (Qiagen Hidlen, Germany)을 사용하여 추출하였으며, reverse transcription은 QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen)를 사용하였다. Taqman PCR reaction은 QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System(Applied Biosystems)을 사용하였으며, complementary DNA(cDNA) sample을 Taqman Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 각 target 유전자들은 Applied biosystems에서 상업적으로 제작된 것을 구매하여 사용하였다. TaqMan(R) Gene Expression Assays(Applied Biosystems)는 본 매뉴얼에 서술된 방법대로 수행하였다. Target mRNA는 GAPDH와의 comparative cycle threshold 상대적인 정량 값으로 표현하였다. 모든 sample은 이중 반복하여 평균값으로 표현하였다.

바. 효소 인산화 분석

사과박 주정 추출 분말의 세포 내 신호 전달 과정을 분석하기 위해, AMPK와 LKB1 효소의 인산화 정도를 분석하였다. AMPK는 cell signaling社의 pathscan Phospho-AMPK α (Thr172) Sandwich ELISA kit를 사용하여 매뉴얼대로 수행하였고, LKB1은 LSBio社의 Mouse/Human Phospho-STK11/LKB1 cell based phosphorylation ELISA kit를 사용하여 매뉴얼대로 수행하였다. 세포주는 mouse의 근육 세포주인 C2C12를 사용하였으며, passage 수가 10을 넘지 않도록 정도관리 하여 사용하였다.

2. 세포 독성 실험 결과

가. 사과박 추출물의 근육세포에서의 억제농도 확인(MTT assay)

마우스 근육세포에서의 UA 처리농도를 결정하기 위하여 사과박 에탄올 추출물을 감압농축하여 에탄올을 증류한 후, 이를 DMSO를 이용하여 현탁한 후, 각 농도별로 mouse myoblast cell line(C2C12)에 처리하고 MTT assay를 통해 각 군의 생존율을 확인하였다(그림 2-1). 또한 이것을 통해 향후 in vitro test 및 동물실험에 사용될 주요한 독성 실험의 기초 자료로 활용 가능하다. 100 mg의 고농도에서도 인간, 쥐의 근육세포에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 더불어 향후 동물실험 등에 적정량 투여 시, 독성 문제를 유발 하지 않는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 향후 동물실험의 기준은 MTT assay 결과를 이용하여 200 mg/kg으로 결정 하였고, 이러한 농도에서 각 세포에 대한 독성은 없는 것으로 확인하였다.

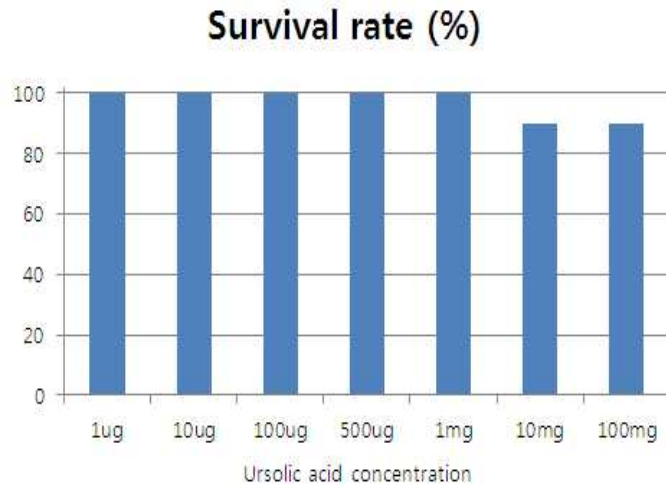


Figure 2-1. Apple pomace showed no visible manifestation of toxicity

3 시험관 내 근육강화 효능 평가 결과

가. 근육 세포주(C2C12 myotubes) 내 단백질 발현 확인

6 well plate에 각 4×10^5 의 근육세포를 배양한 후, 각각의 well에 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 사과박 추출물을 투여하였고, 이를 24 시간동안 배양하였다. 배양한 각 well을 PBS 1 ml을 이용하여 2회 세척한 후, RIPA lysis buffer를 첨가하여 cell의 파쇄를 실시하였고, 이를 향후 mTOR pathway의 단백질 분석에 이용하였다. 사과박 추출물을 myotube cell line에 투여 후, Total AKT와 IGF-1 단백질의 활성을 western blot을 통하여 분석한 결과, 사과박 처리군에서 약 2~3배의 단백질 발현 증가를 확인하였다(그림 2-2). 특히 AKT는 근육 생성 시, 발현이 증가하는 것으로 보고되어 있는 만큼 사과박 추출물의 근육 강화 관련 기능성에 대한 증거로서 활용 가능성을 확인하였다.



Figure 2-2. Apple pomace extract promote muscle related molecular marker

나. 근육 세포주(C2C12 myotubes) 내 유전자 발현 분석

(1) 미토콘드리아 활성화 기전 (AMPK pathway) 관련 유전자 발현 분석

Creatine 및 사과박 추출물을 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 근육세포주인 C2C12에 처리하였을 때, 미토콘드리아 활성화와 관련한 AMPK, PGC-1a, SIRT1 유전자 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(그림 2-3). 특히 근육 활성화와 관련이 있는 SIRT1의 유전자 발현은 큰 폭으로

증가하는 것을 확인할 수 있었다. (미처리 대비 2.5~4배 발현 증가) 본 결과를 바탕으로 하여 사과박 추출물 내의 UA의 활성의 단독 활성인지 사과박 내의 또 다른 활성 성분이 존재하는지 확인하기 위해 사과박 추출물 내의 UA 함량에 맞추어 UA 단독 효과를 측정해야 할 것으로 사료된다.

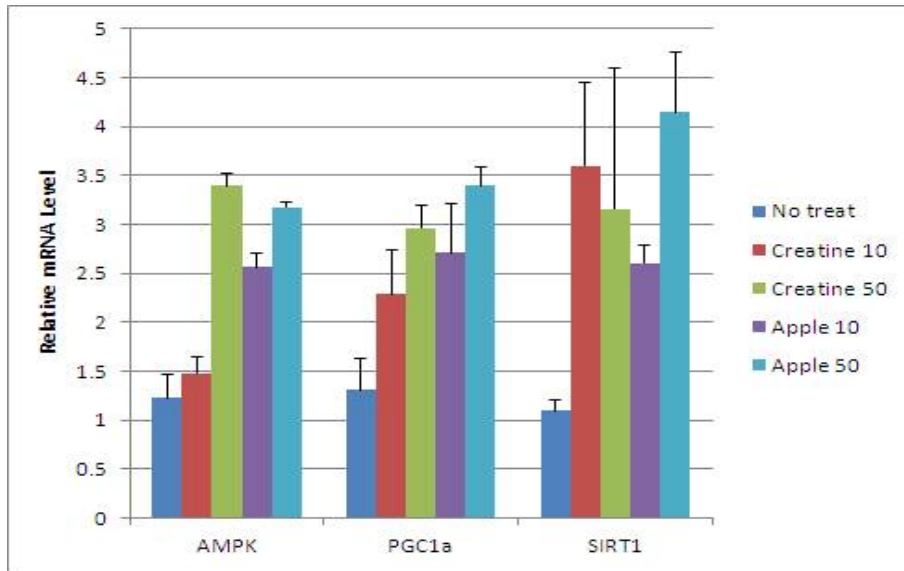


Figure 2-3. Gene expression level of apple pomace extract treated group

(2) IGF-1/AKT/Mtor 기전 관련 유전자 발현 분석

Creatine 및 사과박 추출물을 10, 50 µg/ml의 농도로 각각 근육세포주인 C2C12에 처리하였을 때, 유전자 발현 분석 결과 IGF-1을 통한 AKT, Mtor 유전자의 신호전달과 관련된 유전자 발현이 증가하는 경향을 관찰할 수 있으며, 농도 의존적 증가도 확인할 수 있었다(그림 2-4). 앞서 실험한 AKT는 근육 생성 시, 발현이 증가하는 것으로 이미 보고된 바 있었으며, 단백질 효소 발현 및 유전자 발현이 큰 폭으로 증가하는 것을 확인할 수 있어, 사과박에 의한 근육 강화 효과를 확인할 수 있었다. 본 결과를 바탕으로 하여 사과박 추출물 내의 UA의 활성의 단독 활성인지 사과박 내의 또 다른 활성 성분이 존재하는지 확인하기 위해 사과박 추출물 내의 UA 함량에 맞추어 UA 단독 효과를 측정해야 할 것으로 사료된다.

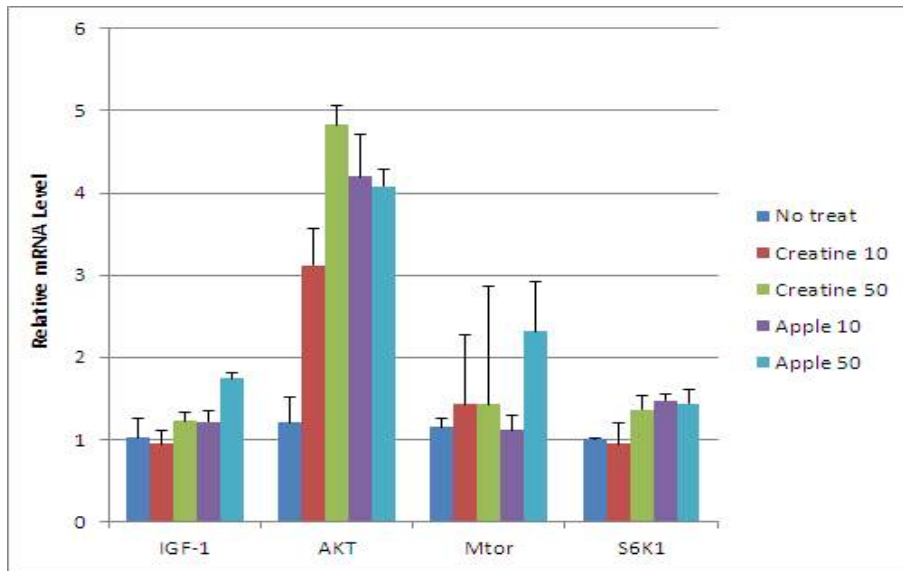


Figure 2-4. Gene expression level of apple pomace extract treated group

(3) 근육 소실 및 IGF-1 유도 및 억제관련 유전자 발현 분석

Creatine 및 사과박 추출물을 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 근육세포주인 C2C12에 처리하였을 때, 유전자 발현 분석 결과, 근육 소실과 관련된 유전자인 MuRF1 및 Atrogin-1의 유전자 발현은 감소하는 것으로 나타났다. MuRF1 유전자는 농도 의존적으로 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 (사과박 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리시) Atrogin-1 유전자는 유의적이지는 않지만, 감소하는 경향을 확인할 수 있었다(그림 2-5).

IGF-1 유전자에 대해 의존적으로 억제하는 유전자인 ADPRHL1, DDIT4L의 유전자 발현 분석은 유의적이지는 않지만 IGF-1의 결과와 비교하였을 때, 다른 연구 그룹에서 보고된 바와 같이 억제하는 것으로 나타났으며, IGF-1을 유도하여 근육 강화 효과를 나타내는 SMOX 유전자의 경우 사과박 추출물 고농도 처리군(50 $\mu\text{g/ml}$)에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 결과를 바탕으로 하여 사과박 추출물 내의 UA의 활성의 단독 활성인지 사과박 내의 또 다른 활성 성분이 존재하는지 확인하기 위해 사과박 추출물 내의 UA 함량에 맞추어 UA 단독 효과를 측정해야 할 것으로 사료된다.

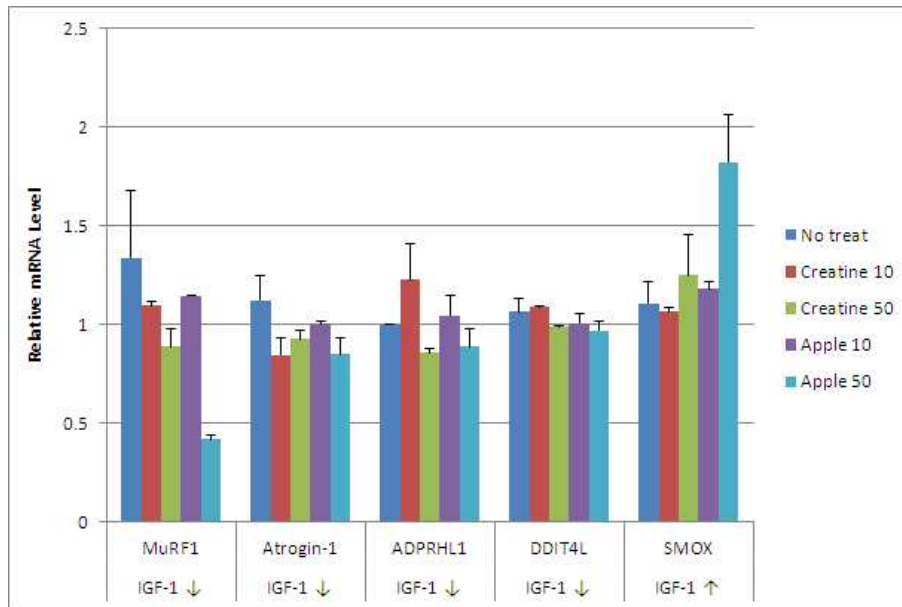


Figure 2-5. Gene expression level of apple pomace extract treated group

다. 근육 세포주(C2C12 myotubes) 내 사과박 주정 추출물의 효소 인산화 분석

살아있는 세포의 대사과정은 ATP와 ADP를 에너지원으로 사용하고 AMP를 생성하게 된다. AMP-activated protein kinase(AMPK)는 serine/threonine kinase로서 지질과 포도당 대사의 조절인자로 알려져 있으며, 당뇨와 비만에 중요한 조절작용을 한다. AMPK는 세포 내 에너지 소모 시 증가되는 AMP에 의해 활성화되어 ATP 사용을 억제시키며, 이화작용(catabolism)을 유도하여 에너지 항상성(homeostasis)을 유지하는데 핵심적인 역할을 한다. AMPK는 172번 threonine이 인산화 되는 것이 활성화 되는 것이며, 따라서 AMPK 활성화를 측정하는 많은 실험은 Thr-172에 대한 인산화 항체를 이용한 실험이 주로 이루어지므로 본 실험에서도 172번의 Thr의 인산화 정도를 측정하였다.

지방대사 측면에서 AMPK 활성화는 지방산 합성을 유도하는 효소인 FAS(fatty acid synthase)와 ACC(acetyl CoA carboxylase)를 억제하며, 콜레스테롤 생합성의 제한효소(rate-limiting enzyme)인 HMG-CoA reductase를 억제하므로 체내 지질 생성 조절에 영향을 미친다. 포도당의 생성과정에는 gluconeogenesis를 억제하는 작용을 하며, 근육세포의 GLUT4 양을 증가시켜 근육으로 포도당 이동을 증가시키는 작용을 한다. 따라서 당뇨병 환자에서 AMPK 활성화를 유도하면 다양한 치료기전을 가지게 된다. 이밖에도 AMPK는 혈관내피세포의 보호 작용에 대해서도 중요한 관점을 가지며, AMPK-eNOS-NO 신호전달경로를 통해 그 효과를 가진다. 또한 AMPK는 다양한 생체변화를 유도하는데 SIRT1 신호전달을 통한 항노화 작용, NF- κ B 억제에 의한 항염증작용, myosin light chain kinase 발현 억제와 인산화 myosin light chain 감소를 통한 혈관이완작용 등이 있다.

본 실험에서 확인한 AMPK의 인산화 정도는 사과박 추출물의 처리 농도에 따라 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 사과박 추출물 분말에서

AMPK의 활성화 즉, 인산화가 농도별로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 사과박 추출물 분말 50 $\mu\text{g/ml}$ 에 포함되어 있을 것이라고 추정되는 ursolic acid 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도보다 증가하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 2). 이것은 사과박 주정 추출물 분말 내에 단지 ursolic acid 이외에 oleanolic acid와 같은 다른 triterpene계열의 물질이 기여하는 것으로 판단되지만 다른 분석이 더 필요할 것으로 보인다.

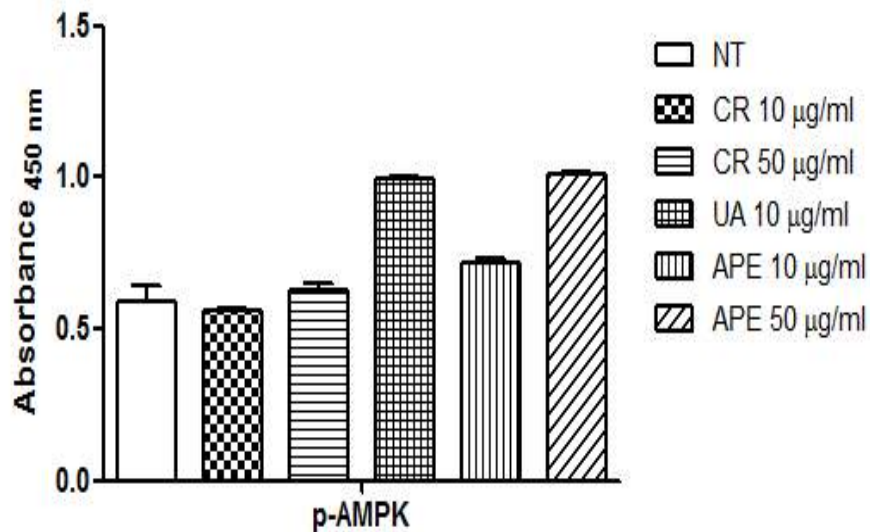


Figure 2-6. AMPK phosphorylation through apple pomace extract

또한, AMPK 활성화 과정에는 세포내부에서 증가된 AMP/ATP 비율을 γ 소단위에서 인식하여 AMPK가 활성화되는 기전과 AMPK 상위 인산화효소(upstream kinase)에 의하여 AMPK가 활성화 되는 기전이 있다. 세포의 에너지 소모에 의해 증가된 AMP는 α 소단위 Thr-172에 인산화를 유도하거나 구조적인 변동을 통해 AMPK 활성화 작용을 나타내지만, 이와 다르게 α 소단위에 존재하는 Thr-172를 직접적으로 인산화시키는 효소인 AMPK 상위 인산화효소(upstream kinase) 몇 종류가 알려졌다. 증가된 AMP를 감지하여 AMPK가 활성화되는 기전은 운동 등 육체적 활동에서 나타나는 일반적인 생리반응의 일종이며, AMPK 상위 인산화효소에 의해 AMPK α 소단위 Thr-172를 인산화하기 위한 상위 인산화효소의 종류는 liver kinase B1(LKB1), Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMKK β), TGF β -activated kinase(TAK-1) 등이 알려져 있다.

LKB1은 serine/threonine protein kinase이며, lkb1 유전자에서 발현되는 효소 단백질이다. LKB1은 STRAD나 MO25와 같은 보조 단백질들과 결합하고 있으며, 이들 단백질이 LKB1의 활성을 증가시킨다는 보고가 있으며, LKB1은 AMP가 γ 소단위에 부착하는 것을 강화시킨다는 보고도 있다. Statin계 약물, metformin 등 다수의 약물의 경우 AMP-dependent AMPK kinase인 LKB1의 428번 serine을 인산화시켜 AMPK 활성화 작용을 나타낸다고 알려졌지만, sirt1은 LKB1을 탈아세틸화시켜 활성화 시킨다는 보고도 있었다.

따라서 AMPK 활성화에 대한 기전을 확인하기 위해 AMPK의 상위 인산화효소인 LKB1의 인산화 정도를 확인하였다. 그림 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, LKB1 효소도 AMPK와 마찬가지로 사과박 주정 추출 분말을 농도별로 처리한 경우에, 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. AMPK의 인산화와 마찬가지로 ursolic acid 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 증가하는 것을 확인할 수 있었지만, 사과박 주정 추출분말 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

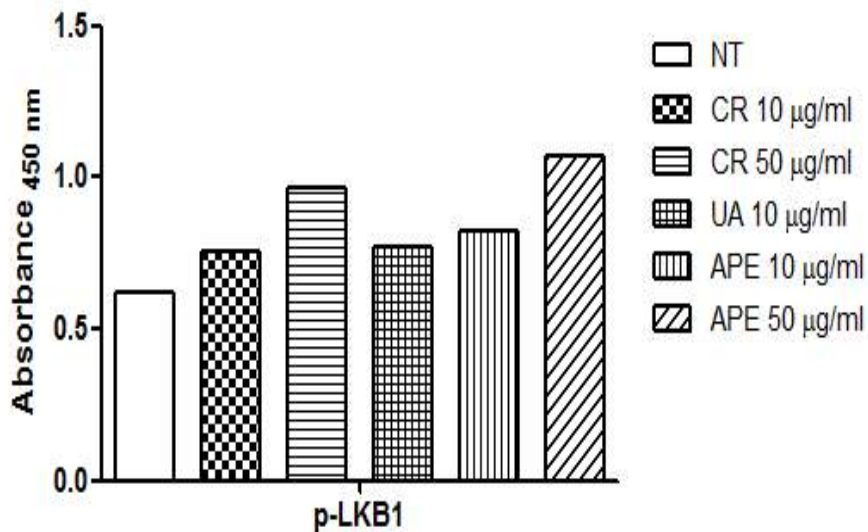


Figure 2-7. LKB1 phosphorylation through apple pomace extract

제 3 절 in vivo 실험을 통한 근력강화 물질의 기능성 규명

본 연구는 사과박에 포함된 근육강화 기능성분인 UA를 포함하는 추출물 및 추출분말에 대한 마우스 실험을 통해 근력 강화 기능성을 규명하는 것을 목표로 한다. 본 결과를 바탕으로 사과박 추출물의 근력 강화 기능성을 확증하고, 인체적용 시험에서의 효능을 확인하는 것을 최종 목표로 한다.

1. 예비 실험

가. 근력 강화 효능 예비 평가 ① - 강제수영법

동물실험을 위한 최적 투여 농도의 결정을 위한 예비 실험으로 6주령 mouse를 대상으로 사과박 추출물을 경구투여한 뒤 4주 동안 관찰 하였다. 이때 사용된 실험군은 control, 크레아틴 50 mg/kg, 사과박 sample 20, 50, 100, 200 mg/kg으로 각각의 농도를 가진 사과박 추출물을 C57BL/6 mouse에 4주 동안 경구 투여 한 후, 강제 수영법을 통하여 근지구력 향상 효과를 확인하였다. 적정 투여 농도를 결정하기 위한 예비동물 실험으로 control 2마리, creatine 2마리, 사과박 추출물 샘플군 16마리를 대상으로 예비 동물 실험을 실시하였다. Control 군은 PBS를 투여 하였다. 실험 결과, control 군에서 4주 후에 약 10%의 몸무게 증가를 나타내었으나, creatine과 사과박 추출물의 경우 몸무게 변화가 없거나 체중 감소의 효과를 나타내고 있음을

확인 하였다(그림 3-1). 양성대조군으로 이용된 creatine은 근지구력 강화 기능성 성분으로 2007년 식약청으로부터 기능성에 대한 개별인정을 획득한 원료로 본 실험에서는 고순도의 시약용 creatine을 사용하였다.

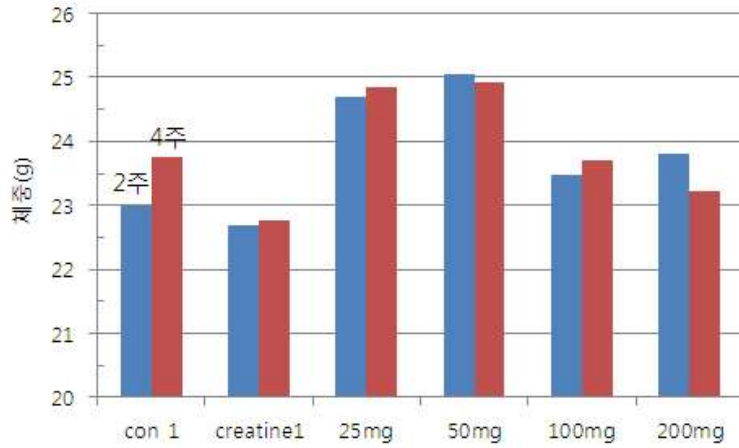


Figure 3-1. Total body weights before and after 4 weeks of the indicated concentration of dietary apple pomace

강제수영 부하실험은 실험동물을 강제로 수영 부하할 경우, 물에서 호흡을 유지하며 유지된 시간을 측정하여 비교하는 실험이다. 실험동물을 이용한 생체 내 실험으로 체력 혹은 인내력 증강에 의한 효과를 검증해볼 수 있고, 피로관련 물질 등 여러 체액 성분들의 변화 관찰에 의한 실제적 체력 증진 효과를 파악해 볼 수 있는 좋은 모델로 활용되고 있다.

본 연구에 이용된 사과박 추출물의 예비 동물 실험 결과 100, 200 mg/kg 두 그룹에서 강제수영부하 시, 가장 탁월한 효과를 나타내는 것을 확인 하였고, 향후 이를 본 동물 실험을 위한 투여량으로 결정하였다. 또한 사과박 추출물을 투여 시 대조군에 비해 약 3배의 근지구력 향상 효과가 있음을 확인하였다(그림 3-2)

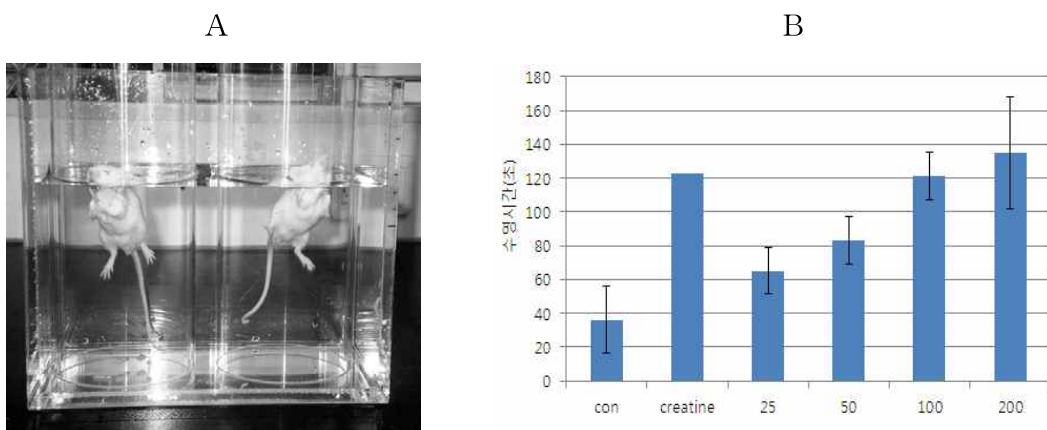


Figure 3-2. Effect of apple pomace extract on average forced swim time. A, example of forced swim test; B, average forced swim time

나. 근력 강화 효능 예비 평가 ② - 강제수영법

2차 예비 평가를 위하여 6주령의 C57/BL6 mouse를 이용하였고, 호르몬 등의 효과를 제거하기 위하여 옹성 마우스를 사용하였다. 이와 함께 사과박 추출물은 경구 투여를 통하여 섭취 시켰으며, 12주 동안 진행 하였다(표 3-1). 약 12주 간의 사과박 추출물을 경구 투여 한 결과, 대조군에 비해 양성대조군인 creatine은 약 2.4% 정도의 몸무게가 증가함을 나타내었고, 100 mg UA를 가진 사과박 추출물을 투여 할 경우 약 2.4% 정도 감소함을 확인 하였다(그림 3-3, 3-4). 수치상으로는 사과박 투여 실험군의 체중 감소가 나타나는 것으로 보이나, 통계적으로 큰 의미를 가지지는 않는 것으로 확인 되었다.

Table 3-1. Design of in-vivo experiment for muscle strength effect by apple pomace extract

| 투여 물질 | 투여 농도 | 개체수 | 비고 |
|-----------|-----------|-----|--------|
| PBS | | 10 | 대조군 |
| Creatine | 50 mg/kg | 10 | 양성 대조군 |
| 사과박 추출물 1 | 100 mg/kg | 10 | |
| 사과박 추출물 2 | 200 mg/kg | 10 | |

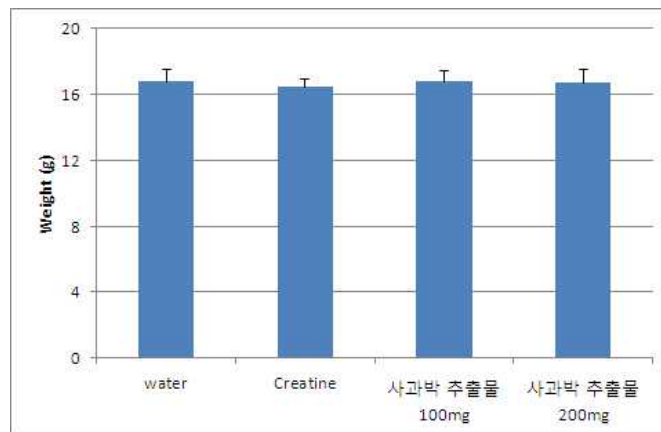


Figure 3-3. Initial weight measurement of experimental mouse

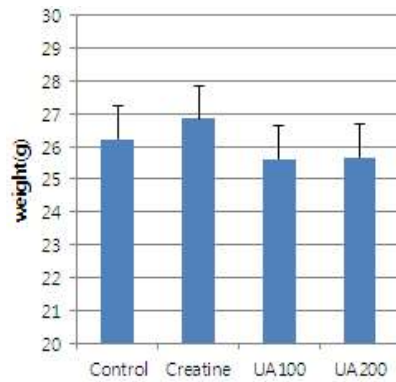


Figure 3-4. Measurement of average weight of experimental mouse after 12 weeks

강제 수영 방법을 이용 하여 실험 개체군의 수영 시간을 측정하여 각 개체군의 운동능력을 확인 하였다. 사과박 추출물 투여 개체군(200 mg/kg)에서 43%의 운동 능력이 증가함을 확인 하였고, 이는 통계적으로 유의함을 확인하였다(그림 3-5). 또한 양성 대조군으로 사용된 creatine의 경우보다도 약 14% 정도 향상된 운동 능력을 나타내었다.

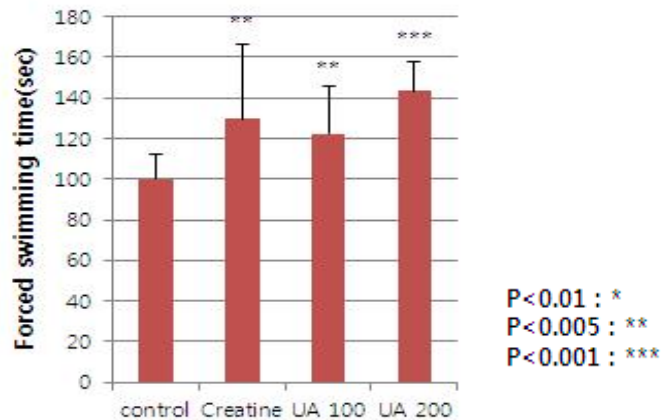


Figure 3-5. Apple pomace showed relatively long swimming time than control

12주간 경구 투여를 통해 사과박 추출물과 creatine을 경구 투여 한 뒤, 각 개체의 뒷다리 근육 무게를 측정 하였다. 사과박 추출물을 투여한 개체군에서 UA 100 mg/kg 투여군의 경우 5.8%, UA 200 mg/kg 투여군의 경우 8.2%의 근육 무게의 증가를 나타내었고 양성 대조군인 creatine의 경우 1.3%의 근육무게 감소를 나타내었다(그림 3-6). 사과박 추출물 투여 개체군의 경우 신뢰구간 내에서 차이를 나타내어 통계적으로 유의함을 확인 하였다.

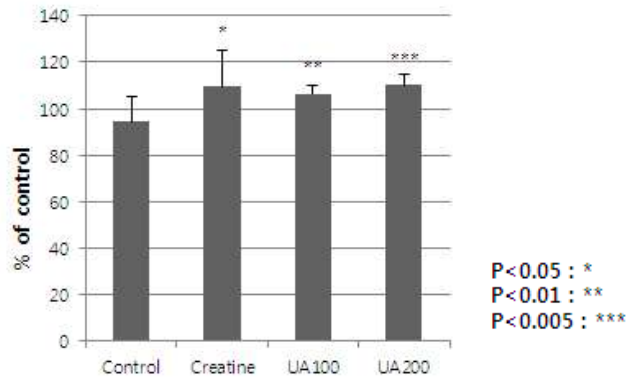


Figure 3-6. Apple pomace increase muscle mass

2. 본 실험

가. 본 실험동물 효능 평가 군 설정

근육강화 소재 개발을 위해 사과박 소재를 조제 사료로 제작하여 1주일간 순치 후, 각 군당 10마리는 treadmill을 통해 running test를 진행하였고, 각 군당 5마리는 grip strength test를 통해 무산소 근력 test를 진행하였다. 실험동물은 22g 내외의 3주령 C57BL/6NHsd 웅성 마우스를 Harlan laboratories로부터 분양받았다. 사육조건은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 50 %, 명암주기 12시간 이었으며, 실험기간 중 음수 및 사료는 자유로이 섭취하였고 체중은 1주일마다 측정하였다. 식이 투여는 총 12주간 진행하였으며, 훈련 및 학습을 통해 운동의 의지가 없는 개체는 배제하고 체중에 의한 무작위 법에 의해 grouping을 진행하였다(표 3-2, 3-3). 예비 실험에서 도출된 200 mg/kg의 유효농도를 중간값으로 하고, 추후 진행될 인체적용시험에서의 적정 농도를 확인하기 위해 좀 더 세밀한 단계를 두어 75, 150, 300 mg/kg의 세 농도구간에 대해 실험을 진행하였다. 각 군당 개체의 사료 섭취량은 3 g/day로 일정 수준에서 예상한 적정 농도의 사과박 추출물을 섭취하는 것으로 확인되었다.

나. Treadmill running test

(1) 시험군

사과박 추출물에서 근육 강화 효능 평가로 treadmill (유산소 운동 능력 증가 평가) test를 실시하였다. 체중 증가 및 체중 증가율(0주차 대비)은 각 군당 유의성 없는 차이에서 normal 식이와 비슷하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-7, 3-8).

Table 3-2. Group of Treadmill test

| Group (n=10) | 비고 |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| 미운동 대조군 (N) | Normal condition, AIN-93G diet |
| 운동 대조군 (C) | 운동, AIN-93G diet |
| Creatine (P75) 75 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + CRT 75 mg/kg |
| Apple pomace extract (A75) 75 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + AP 75 mg/kg |
| Apple pomace extract (A150) 150 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + AP 150 mg/kg |
| Apple pomace extract (A300) 300 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + AP 300 mg/kg |

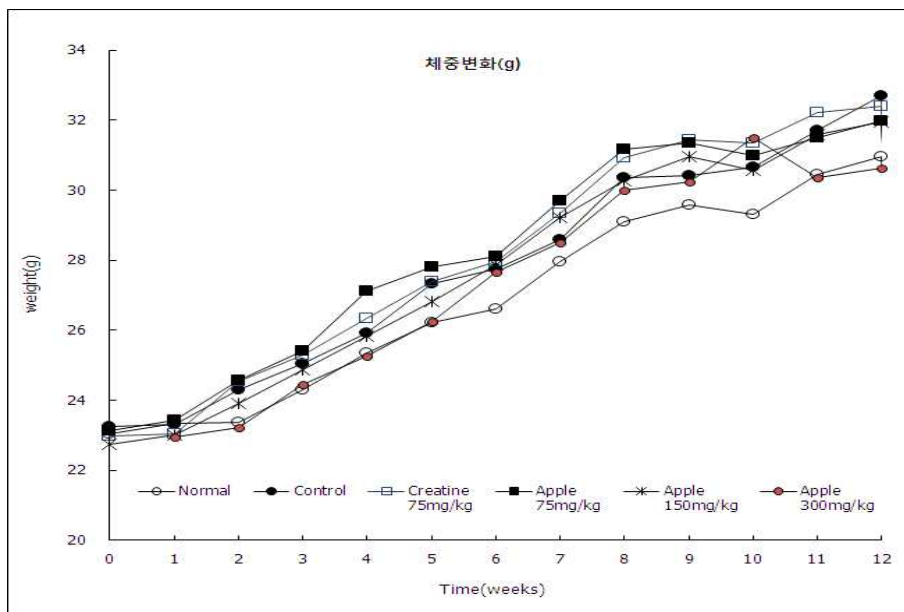


Figure 3-7. Weight(g) profile of treadmill test group

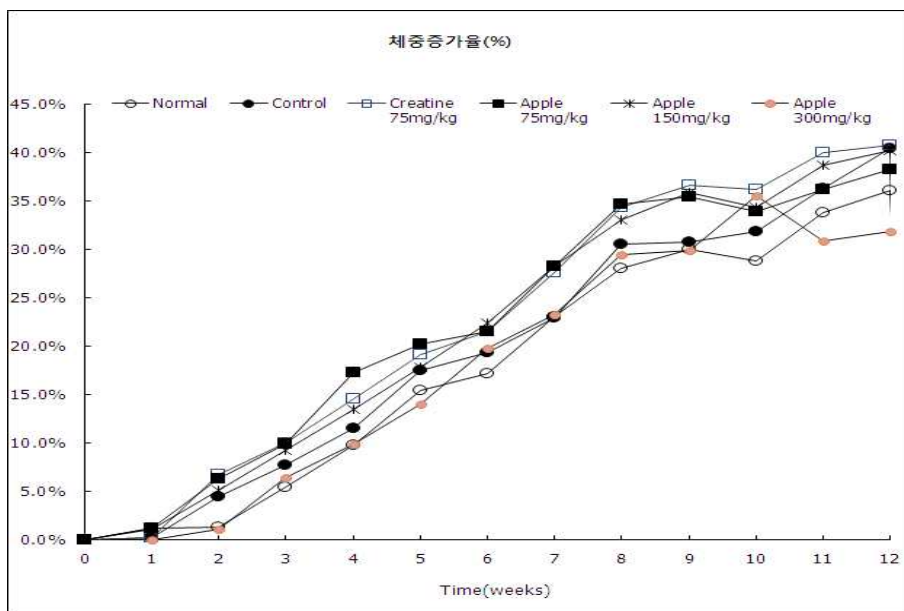


Figure 3-8. Weight gain rate(%) profile of treadmill test group

(2) 운동시험

Treadmill(정도비엔피)을 이용하여 유산소성 운동부하 실험을 실시하였다. 운동시험에 적응을 위한 예비운동 시험으로 희생 1주 전 1일차 5 m/분의 속도로 5분간, 2일차 10 m/분의 속도로 10분간, 3일차 15 m/분의 속도로 15분간, 4~5일차 20 m/분의 속도로 20분간 운동을 시켰다. 각 군을 나누기 전에 같은 방식으로 예비 운동을 하였기 때문에 운동 능력이 현저히 떨어지는 개체는 발생하지 않았다. Normal control 군은 운동을 수행하지 않았으며, 운동 당일 기울기 5°에서 10 m/분으로 10분간, 15 m/분으로 10분간, 17.5 m/분으로 10분간 운동을 실시하고, 이후에 20 m/분의 속도로 강제달리기 운동을 수행하였다. 전기자극은 2mA 이하로 유지하였으며, 전기 자극 지역에서 10초 이상 운동의 시도가 없을 시에는 탈락시키고 CO₂ 흡입에 의해 희생하였다.

(3) 혈액 채취 및 조직 적출

탈진 판정으로 희생된 마우스는 총 운동시간을 측정하고, 희생을 실시하였다. 희생 직후, 개복하여, 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액을 채취한 후, 양쪽 뒷다리의 근육 조직을 적출하고, 중량을 측정하였다. 중량을 측정한 근육 조직은 급속 동결하고 초저온고에서 보관하였으며, 또 다른 근육 조직은 RNA later solution(Ambion)에 보관하여 유전자 발현 분석용으로 사용하였다. 채취한 혈액은 13,000 RPM에서 10분간 원심분리하여 혈장 및 혈청으로 분리하였고, 혈청을 따로 취하여 초저온고에서 실험 진행시까지 보관하였다.

(4) Treadmill을 통한 최대 운동시간 및 거리에 대한 효과

소재투여 후, 12주차에 최대 운동거리 및 시간을 측정한 결과, 대조군은 34±5.88 분을 운동한 데 비해, 양성대조군인 creatine 섭취군은 45±6.27 분을 운동하는 것으로 확인되었다. 사과박 추출물 분말 섭취군은 농도별로 각각 49.63±8.228, 49±9.39, 54.5±9.36 분을 운동하는 것으로 확인되어 대조군 및 양성대조군에 비해 유의성 있는 증가가 나타났다(P<0.05, 그림 3-9). 각 시간에 따른 운동거리를 환산하여 조사한 결과 또한 사과박 추출물 분말 섭취군이 대조군 및 양성대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(P<0.05, 그림 3-10).

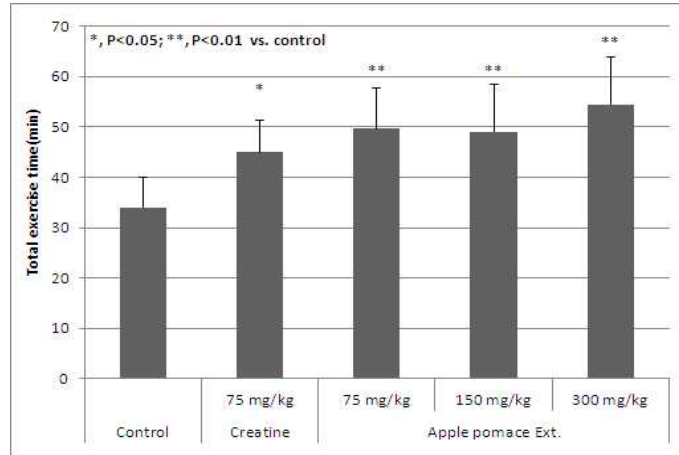


Figure 3-9. Total running time in mice treated with apple pomace extract

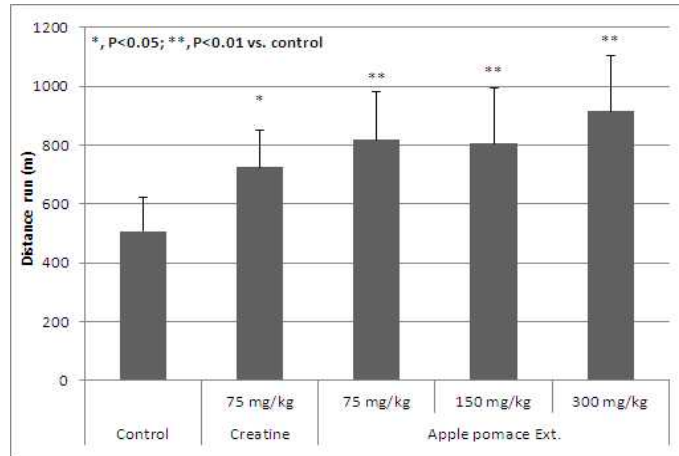


Figure 3-10. Total running distance in mice treated with apple pomace extract

(5) 근육량 증가 효과

소재투여 후, 12주차에 최대 운동거리 및 시간을 측정하고 희생하여 lower hindlimb soleus muscle을 채취하여 근육량을 조사하였다. 비운동 대조군에 비해 운동대조군은 운동의 효과로 근육이 조금 증가하였지만, 유의적이지는 않았다. 운동대조군에 비해 양성대조군인 creatine, 사과박 추출물은 모든 농도에서 유의적으로 근육량이 증가하는 것으로 조사되었다. ($P < 0.05$, 그림 3-11)

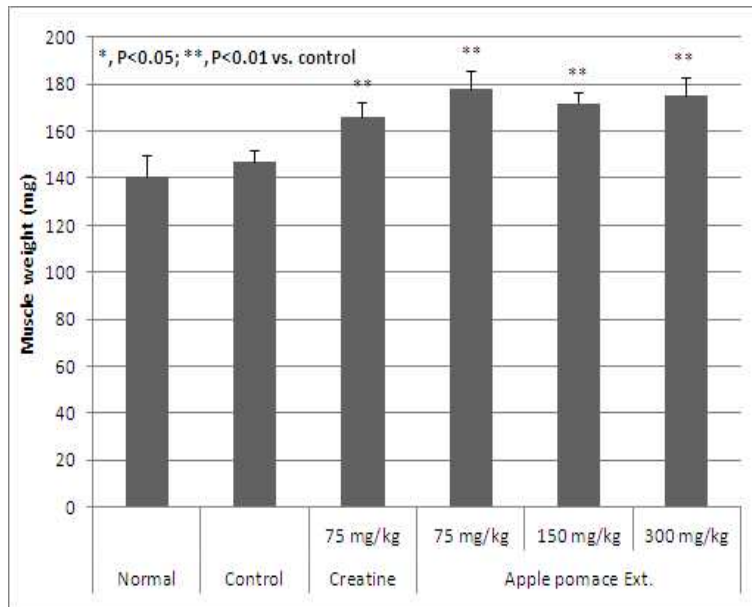


Figure 3-11. Effect of apple pomace extract on lower hindlimb soleus muscle weight

(6) Treadmill 운동에서의 혈중 바이오마커 분석

운동 이후, 희생하여 혈장을 분리하고 측정된 혈중 바이오마커는 운동 이후, 각 바이오마커가 증가하였으며, 소재 투여군에서 모두 감소하는 것으로 조사되었다.

(가) Lactate

세포에 산소가 충분히 공급되는 상황에서는 TCA 회로가 원활히 진행되므로 혈중 젖산농도가 0.56~2.00 mmol/L의 범위로 유지되고(human기준), 그 이상으로 축적되지 않는다. 그러나 해당작용과 TCA 회로의 대사적 연계가 당량비로 진행되지 못하고 해당 작용이 상대적으로 활발한 상황, 또는 세포에서 요구되는 산소량보다 산소공급이 부족한 상황에서 근육 내에 젖산이 생성된다고 알려져 있다. 고강도 운동 시 산소공급량이 근육의 산소소모량에 미치지 못하는 경우 근육조직의 젖산농도가 증가하게 되고, 이때 생성된 젖산은 혈액으로 확산되어 심장 및 간에서 처리되는데, 운동으로 인해 젖산이 축적되면 체내 산성화가 초래되어 운동 중 당질대사에 관여하는 phosphorylase 활성이 저해되고, 결과적으로 무산소 상태에서 운동에너지의 급원이 되는 glucose 신생이 억제된다. 따라서 혈중 젖산의 감소는 근육 내 피로도를 경감시키는 주요 바이오마커로 인지되고 있다.

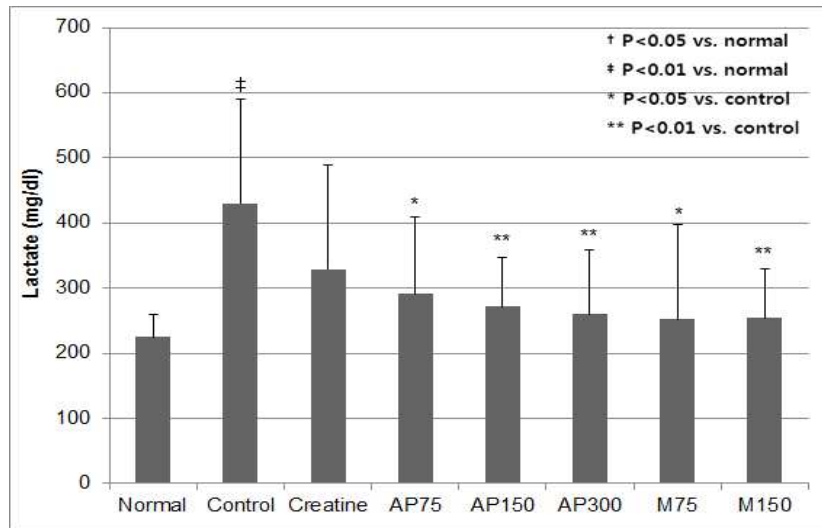


Figure 3-12. Serum lactate levels in treadmill tested groups

(나) Lactate dehydrogenase

Lactate dehydrogenase(LDH)는 무산소 상태에서 pyruvate로부터 lactate 형성을 촉매하는 효소로서, 고강도 운동 시 그 활성이 증가되며, 근육 피로에 있어서 중요한 인자로 알려져 있다. 과격한 운동을 할 경우 과량의 pyruvate가 생성되어 젖산 형성이 촉진되고, pyruvate를 젖산으로 전환시키는 과정을 촉매하는 LDH 활성이 증가하게 된다. 또한 혈중 LDH는 근육 손상의 정확한 지표로 확인되고 있다.

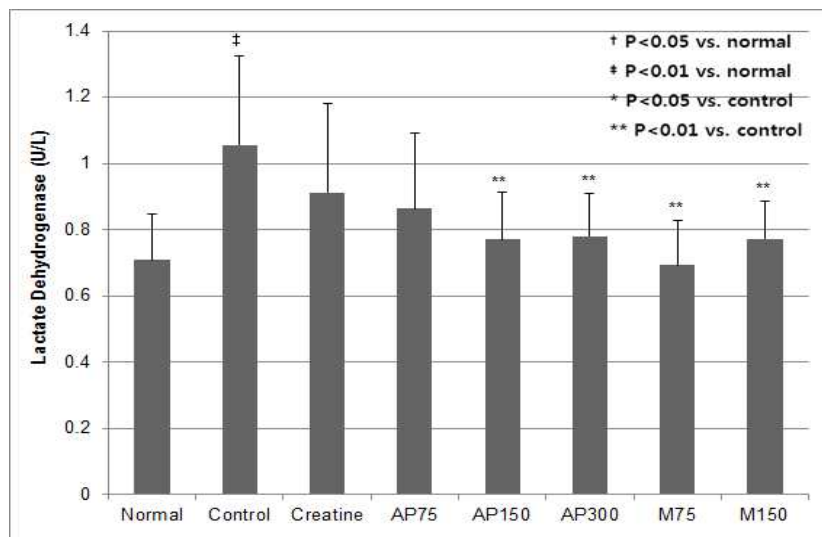


Figure 3-13. Serum lactate dehydrogenase activities in treadmill running tested group

(다) Glucose

혈중 glucose 농도가 감소하면 피로감을 느끼게 되고, 지구력 운동 수행능력을 저해하는 결과가 초래된다. 즉, 운동 후반부에 근육의 글리코겐 함량이 감소하면 혈중 glucose가 근육으로

유입되는 양이 증가하는데, 이로 인해 결과적으로 혈중 glucose가 고갈된다.

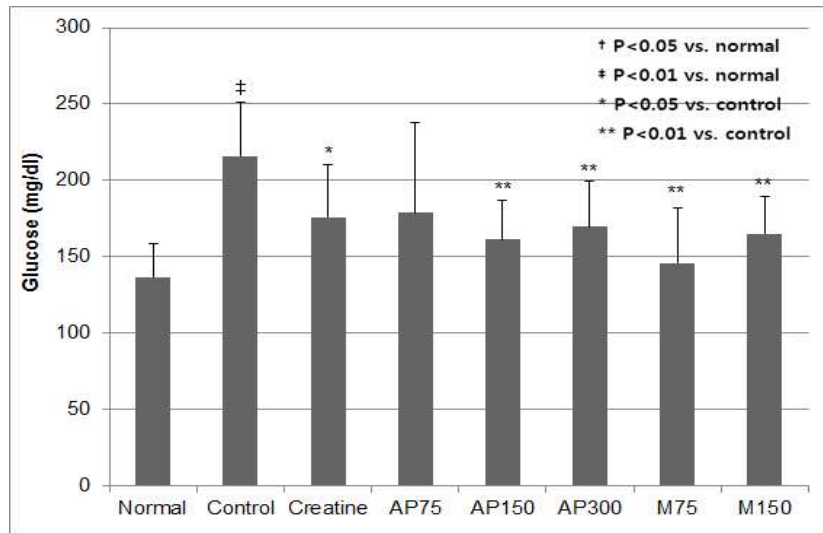


Figure 3-14. Serum glucose levels in treadmill tested groups

(라) Creatinine

Creatinine은 골격근의 수축에 사용되는 creatine phosphate의 분해산물이다. 보통 뇨의 형태로 배설되므로 신장의 손상 척도로 활용되지만, creatinine이 증가 원인 중 무리한 운동에 의한 단백질 손상도 있기 때문에 피로의 척도로 사용하였다.

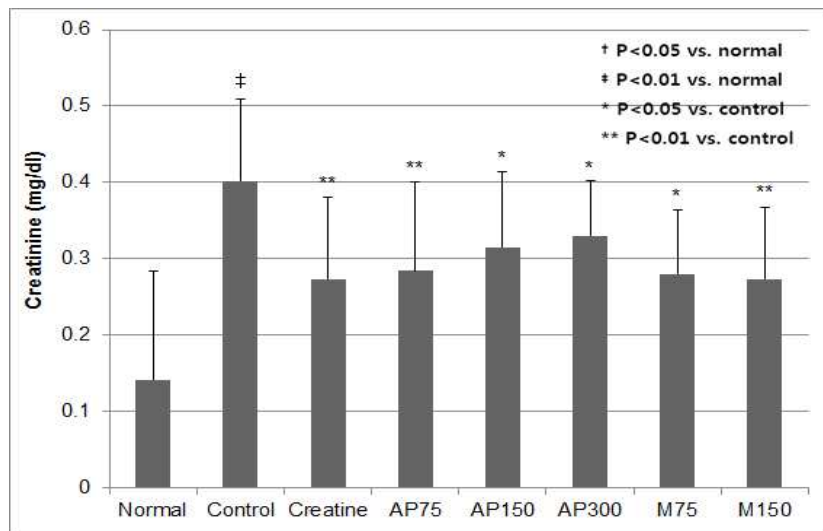


Figure 3-15. Serum creatinine levels in treadmill tested groups

(마) AST, ALT 및 ALP

강제운동으로 산화적 스트레스 발생 시 사과박 및 명월초의 급이가 마우스의 혈중 AST, ALT 및 ALP 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 강제 운동이후 피로도가 증가하여 AST, ALT 및

ALP의 활성이 증가될 수 있다는 보고도 있으며, 산화적 스트레스 유발 시 혈중 AST, ALT의 활성이 정상군에 비해 상당히 증가된다는 보고도 있다.

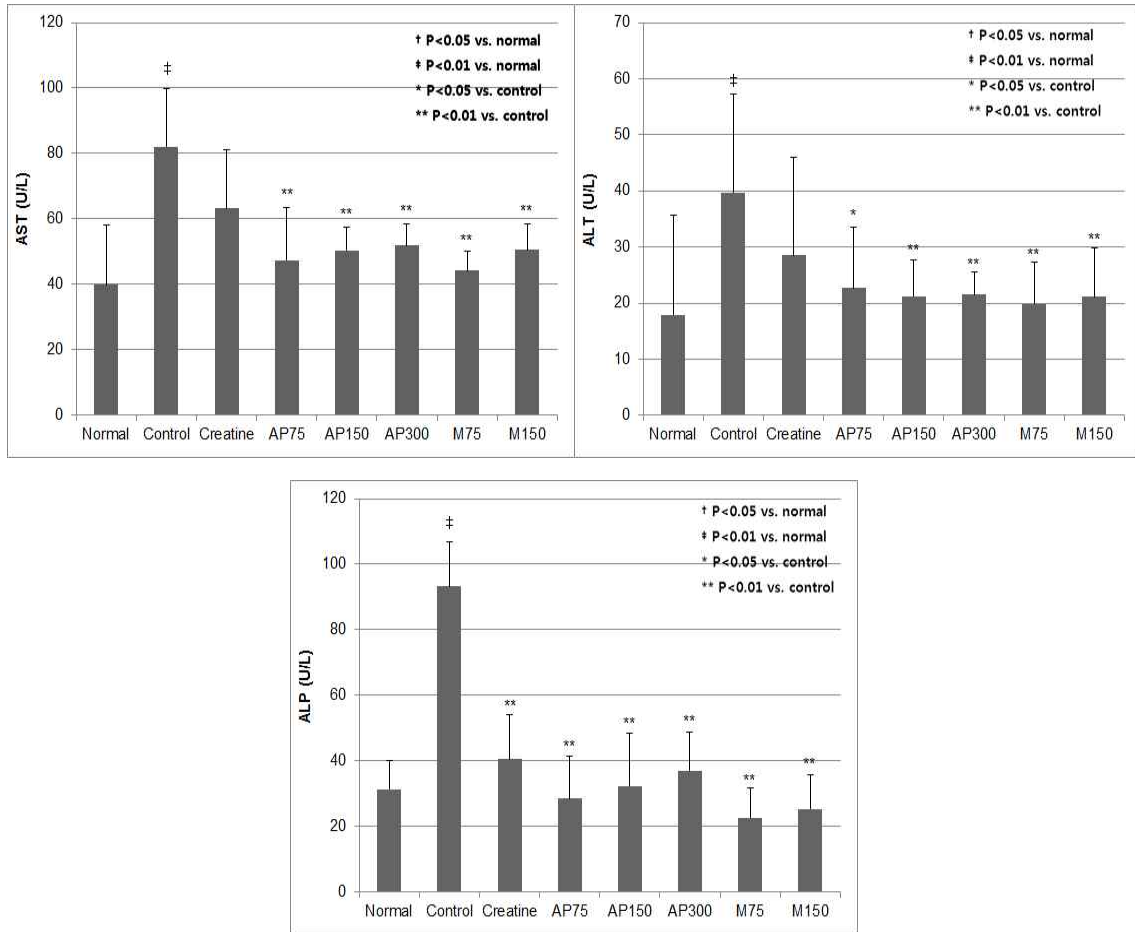


Figure 3-16. Serum AST, ALT and ALP levels in treadmill tested groups

(7) Treadmill 운동에서의 근육 조직 내 유전자 발현 분석

사과박 주정 추출물의 섭취는 근육 조직 내에서 IGF-1/AKT/mTOR 경로를 따라 유전자 발현 활성이 증가하여 근육량이 증가될 수 있음을 확인하였으며, 단백질 분해에 따른 근 위축 및 손상과 관련된 유전자인 Atrogin-1과 MuRF1의 유전자 발현을 유의적으로 억제하여 근육량 증가에 기여하는 것으로 판단된다. Mitochondria 활성화와 관련된 AMPK의 활성도 농도별로 증가하는 것으로 확인하였지만, AMPK의 활성 증가는 단백질 성장신호를 억제할 수 있다고 제안된 보고도 존재한다. 하지만 저항성 운동 이후에는 AMPK의 활성이 증가한다는 보고는 매우 많이 있다. 또한 AMPK의 발현 증가가 mTOR 단백질의 발현에 변화가 없다는 보고 또한 존재한다. (Inoki et al., Cheng et al.) 만일 AMPK가 활성화되면서 mTOR에 의한 단백질 합성이 억제된다면, AKT/mTOR 경로를 통해 p70S6K1 단백질을 활성화시킬 수 있다면, 근 단백질 합성을 증가시키는 방향으로 진행될 것이라 사료된다.

종합하자면, AMPK의 활성은 저항성 운동의 부하에 영향을 받고, mTOR의 인산화 상태에 영향을 줌으로써 mTOR의 활성 조절을 negative regulate 하는 것으로 보고되었지만, AMPK의

활성이 mTOR 신호전달을 억제하는지, ubiquitin-proteasome 체계에 영향을 미치는지에 대한 연구는 계속 진행 중인 것으로 확인되고 있으며, 또한 근육 내 glucose의 증가가 AMPK의 단백질 합성 저해 기능을 방해하여 세포 내 단백질 합성을 증가 시키는 것으로도 생각할 수 있다. 따라서 사과박 및 명월초의 섭취는 IGF-1/AKT/mTOR 경로를 통한 유전자 발현 증가, Atrogin-1, MuRF1의 근 위축과 관련된 유전자 발현을 억제하여 근육량을 증가시키며, AMPK/PGC-1a와 같은 mitochondria 활성을 증가시키고, 근육 내 glucose를 증가시킴으로 에너지 대사를 효율적으로 사용하게 하며, 혈중 피로물질을 감소시키는 것이라 사료된다.

(가) 미토콘드리아 활성 기전(AMPK pathway) 관련 유전자 발현 분석

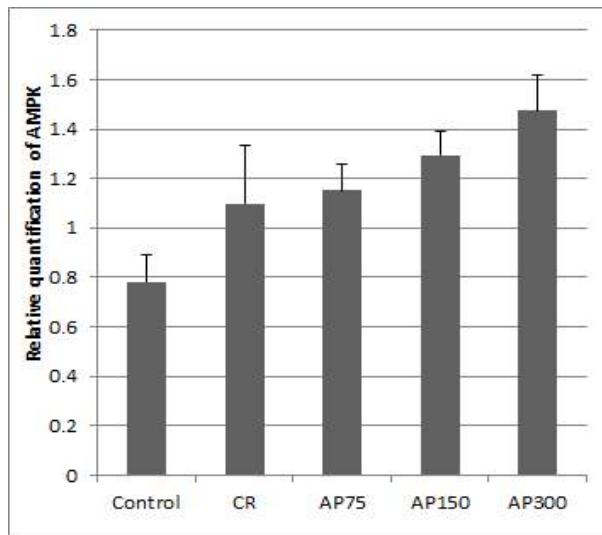
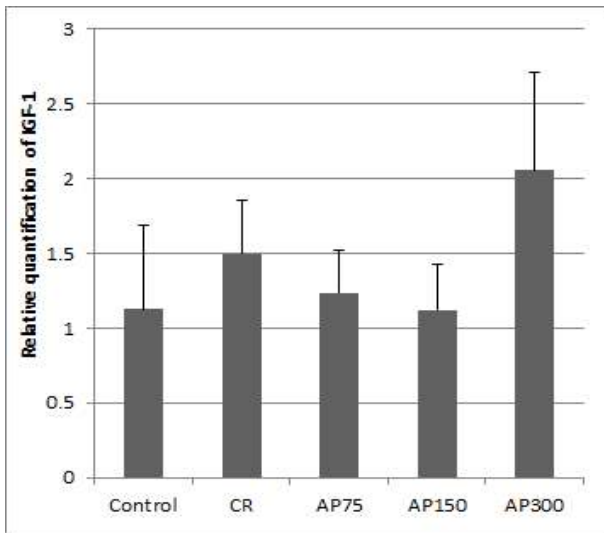


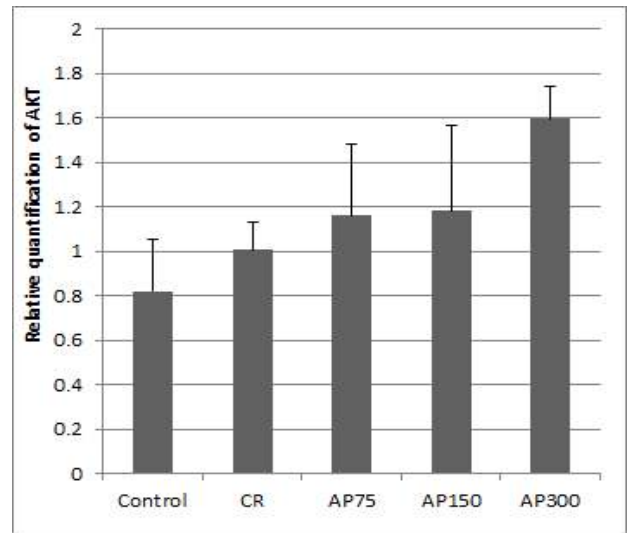
Figure 3-17. AMPK gene expression levels of treadmill test groups in skeletal muscle tissue

(나) IGF-1/AKT/Mtor 기전 관련 유전자 발현 분석

① IGF-1



② AKT



③ mTOR

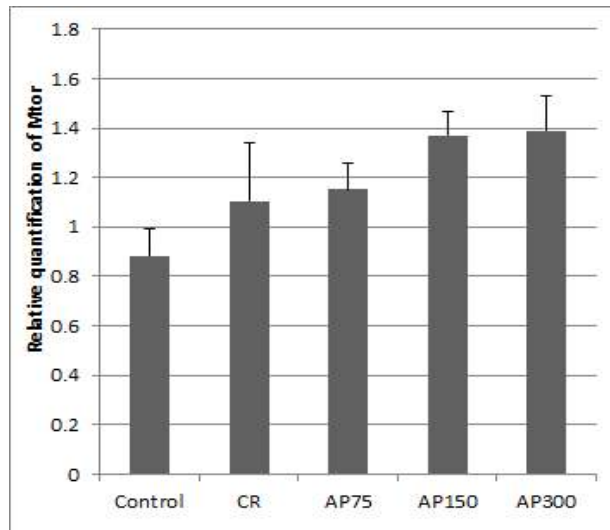
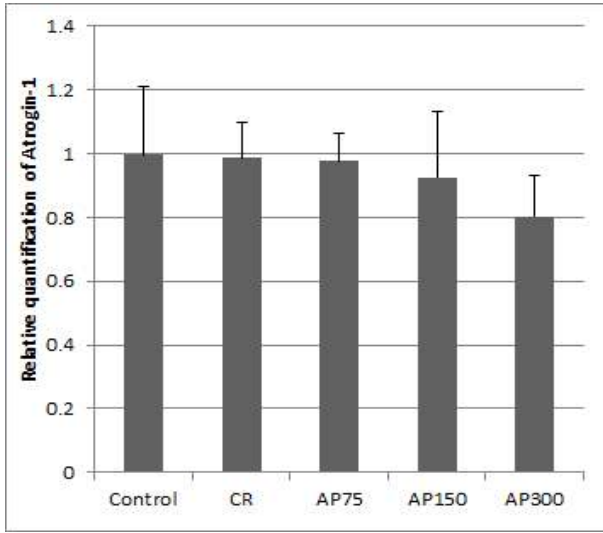


Figure 3-18. ①IGF-1, ②AKT, ③mTOR gene expression levels of treadmill test groups in skeletal muscle tissue

(다) 근육 소실 관련 유전자 발현 분석

① Atrogin-1



② MurF1

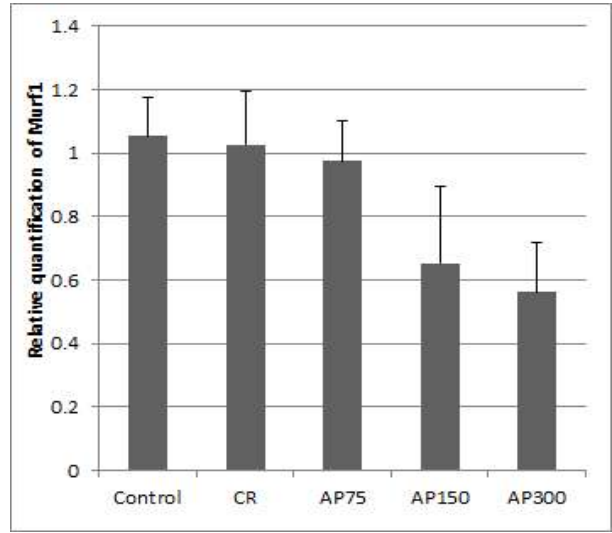


Figure 3-20. ①Atrogin-1, ②MurF1 gene expression levels of treadmill test groups in skeletal muscle tissue

다. Grip strength test

(1) 시험군

사과박 추출물에서 근육 강화 효능 평가로 grip strength 무산소 운동 능력 증가 평가를 실시하였다. 체중 증가 및 체중 증가율(0주차 대비)은 각 군당 유의성 없는 차이에서 normal 식이와 비슷하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-21, 3-22).

Table 3-3. Group of grip strength test

| Group (n=5) | 비교 |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| 미운동 대조군 (N) | Normal condition, AIN-93G diet |
| 운동 대조군 (C) | 운동, AIN-93G diet |
| Creatine (P75) 75 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + CRT 75 mg/kg |
| Apple pomace extract (A75) 75 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + AP 75 mg/kg |
| Apple pomace extract (A150) 150 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + AP 150 mg/kg |
| Apple pomace extract (A300) 300 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + AP 300 mg/kg |

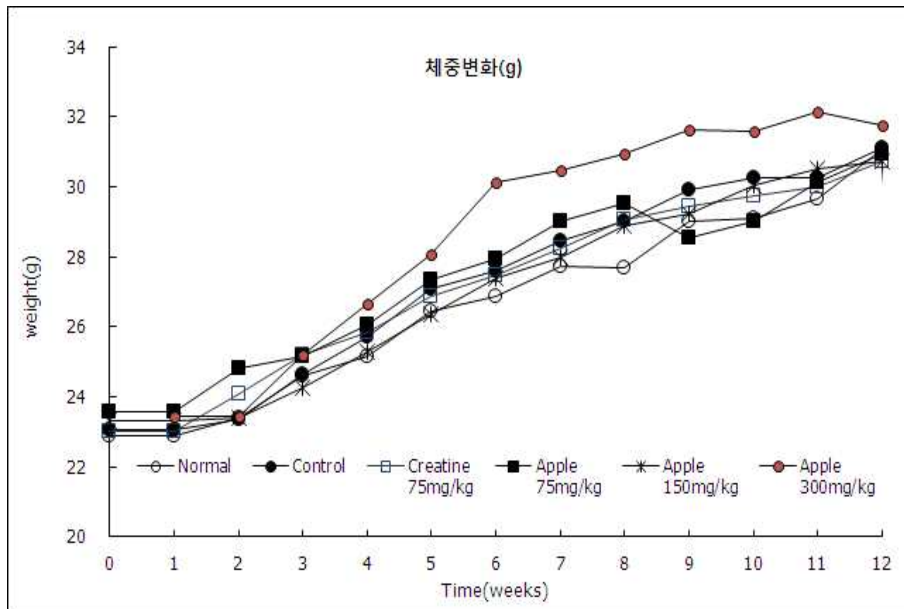


Figure 3-21. Weight(g) profile of grip strength test group

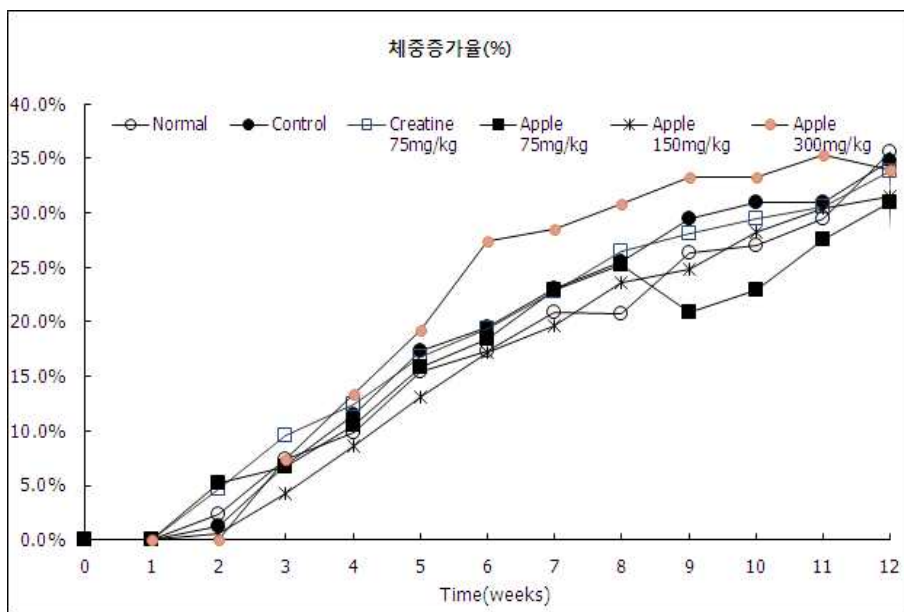


Figure 3-22. Weight gain rate(%) profile of grip strength test group

(2) 시험법

12주간 소재를 섭취한 각 군의 마우스의 근력을 측정하기 위해 grip strength meter(Columbus instruments)를 사용하였다. 각 마우스의 앞다리를 삼각형 대를 붙잡게 한 뒤, 당겨지는 힘을 5회 측정하였고, 가장 큰 최대값을 활용하였다(S. D. Kunkel et. al. Cell Metab. 13, 627-38. 2011). 근력시험을 마친 개체는 CO₂ 흡입에 의해 희생하고 혈액 및 조직을 적출하였다.

(3) Grip strength test 결과

식이 섭취 후 12주차에 grip strength를 측정하였다. 각 군당 5마리의 마우스를 5회 측정하여 최대값을 산출하여, 각 군의 평균값을 계산하였으며, 체중 값으로 나누어 체중 대비 grip strength를 산출한 결과를 나타내었다. 체중 값에 대비한 grip strength는 양성대조군인 creatine과 사과박 추출물 투여군에서 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, 사과박 추출물의 무산소 운동 중 근력 강화 효과를 확인할 수 있었다(그림 3-23). 또한 소재투여 후, 12주차에 grip strength를 측정하고 희생하여 lower hindlimb soleus muscle을 채취하여 근육량을 조사하였다. 대조군에 비해 양성대조군인 creatine은 증가하였지만, 유의적이지는 않았다. Treadmill의 경우 운동 학습 및 운동의 효과로 근육량이 증가하는 것으로 확인되었지만, grip strength test의 경우 단회 측정이므로 근육량 증가가 유의적으로 나타나지는 않았다. 하지만 사과박 추출물은 유의적으로 근육량이 증가하는 것으로 조사되었다(그림 3-24).

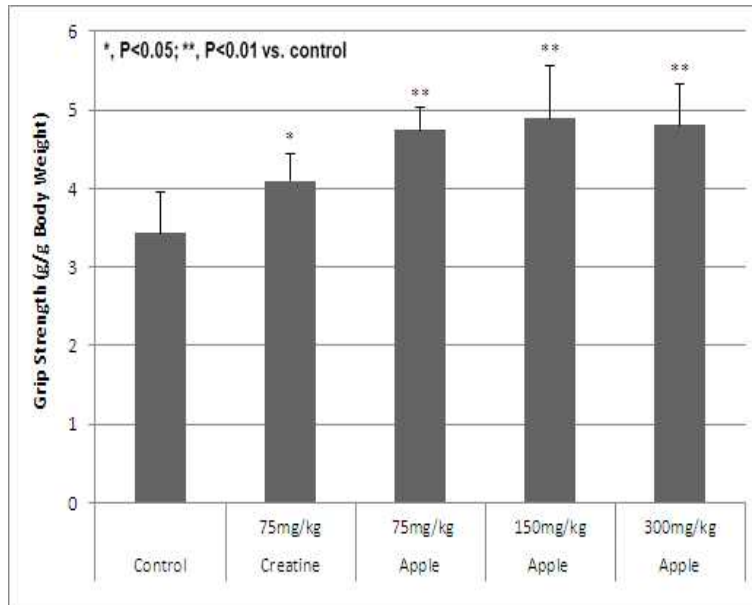


Figure 3-23. Effect of APE on peak grip strength, normalized to body weight

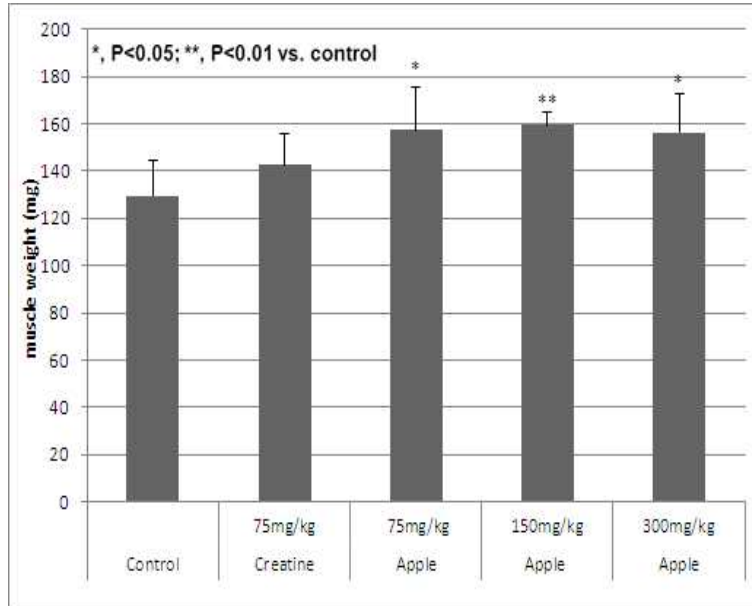


Figure 3-24. Effect of apple pomace extract on lower hindlimb soleus muscle weight

라. 강제 수영 운동 시험

(1) 시험군

사과박 추출물을 대상으로 강제수영 효능평가를 실시하였다. 체중 증가 및 체중 증가율(0주차 대비)은 각 군당 유의성 없는 차이에서 대조군 식이와 비슷하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 양성대조군으로는 현재 운동수행능력 증가에 도움을 줄 수 있으므로 개별인정형 식품 소재인 크레아틴을 사용하였다(표 3-4). 12주 기간 이후의 최종 체중은 그림 3-25와 같다. 각 군에서 크게 체중이 변화한 개체는 확인되지 않았으나, 사과박 주정 추출물 300 mg/kg에서 체중이 일부 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 S. D. Kundel 등이 발표한 Plos one journal의 “Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease”라는 제목의 논문에서 고지방 식이만을 섭취한 개체와 비교하였을 때, 고지방 식이와 ursolic acid를 같이 섭취한 군에서 근육량 및 에너지 기초 대사량이 증가하고, 갈색 지방이 증가하여 체중이 감소하는 것으로 나타난 바, 이와 동일한 효과가 나타난 것으로 사료된다. 반면에 일반 사료 및 사과박 추출물, 크레아틴이 함유된 사료를 총 12주간 섭취한 사료 섭취량은 유의적 변화가 관찰되지 않았다(그림 3-25, 3-26). 12주 기간 중에 체중 변화 추이를 확인하면, 식이 섭취 이후 4주 이후부터 체중이 감소하는 것으로 보이며(그림 3-27), 체중 증가율은 8주차에 가장 체중 증가율이 낮은 것으로 확인되었다(그림 3-27, 3-28).

Table 3-4. Groups of forced swimming test

| Group (n=8) | 비교 |
|--------------------------------|----------------------------------|
| 운동 대조군 (C) | 운동, AIN-93G diet |
| Creatine 75 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + CR 75 mg/kg |
| Apple pomace extract 75 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + APE 75 mg/kg |
| Apple pomace extract 150 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + APE 150 mg/kg |
| Apple pomace extract 300 mg/kg | 운동, AIN-93G diet + APE 300 mg/kg |

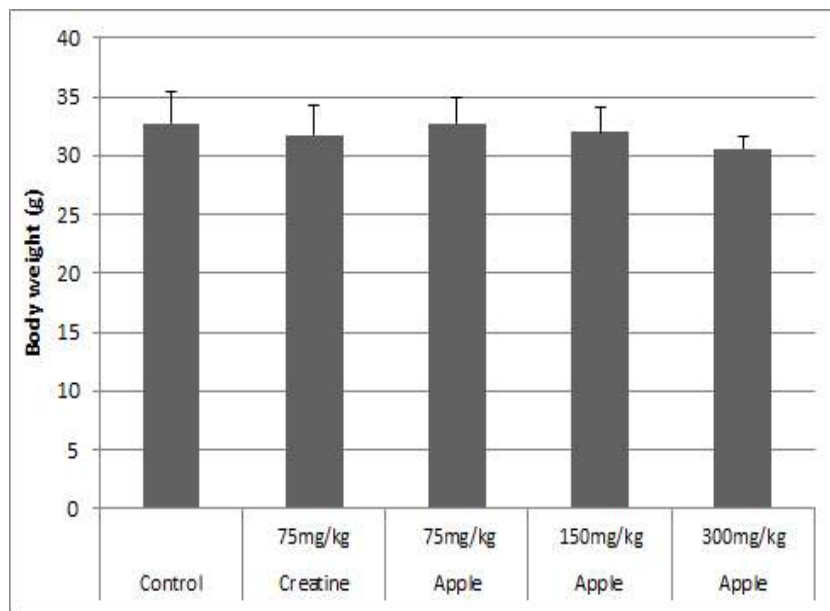


Figure 3-25. Body weight(g) of forced swim test groups

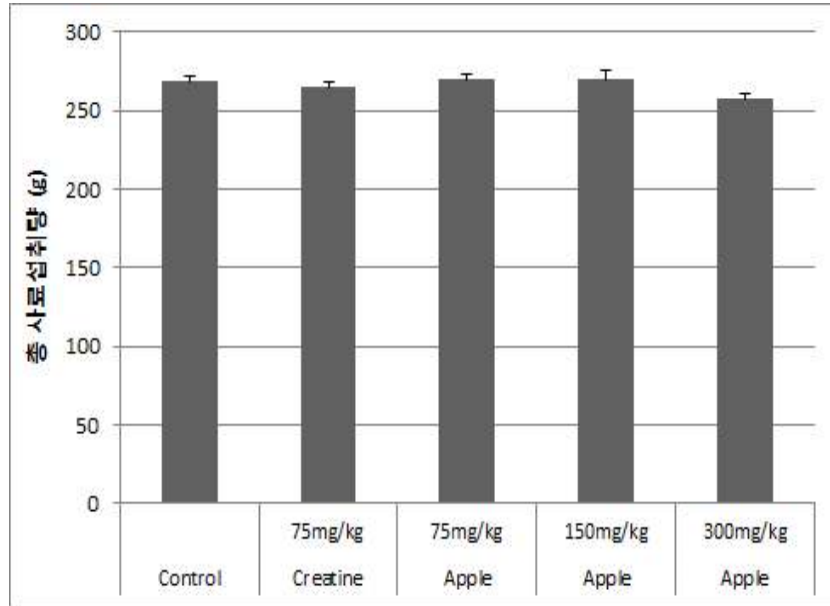


Figure 3-26. Total food consumption(g) of forced swim test groups

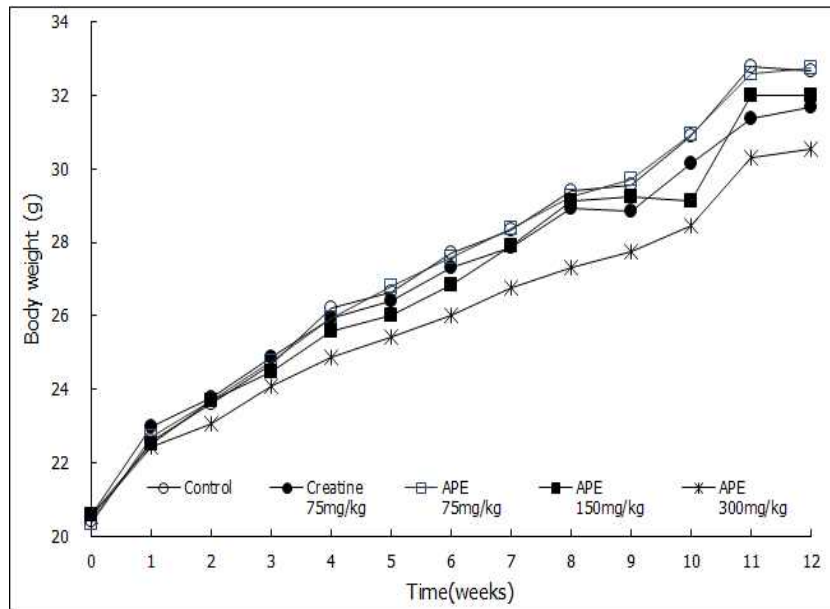


Figure 3-27. Body weight(g) of forced swim test groups

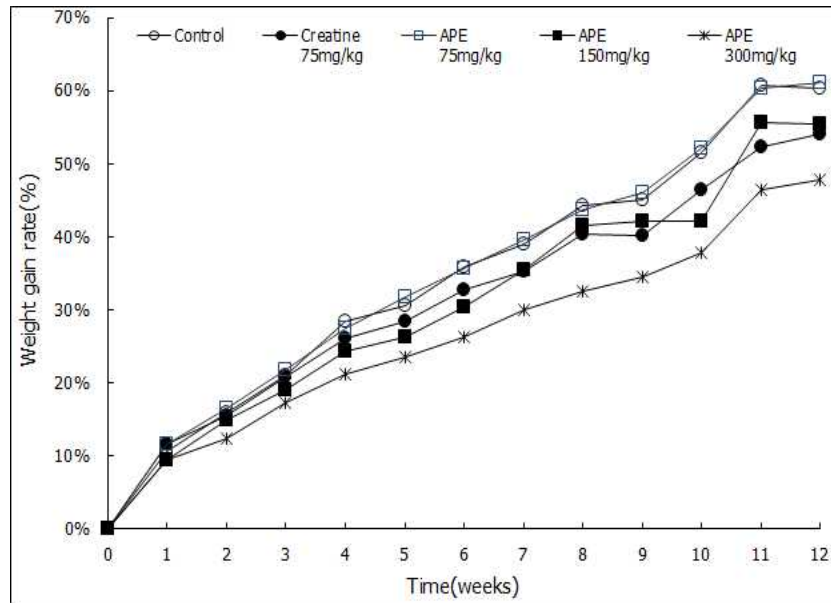


Figure 3-28. Weight gain rate(%) of forced swim test groups

(2) 시험법

강제 수영 운동시험법은 식품의약품안전처의 건강기능식품 기능성 시험 가이드에 따라 수행하였다. 실험동물은 각 군당 8마리를 수행하였으며, 시험군은 상기에 서술하였다. 수심을 일정하게 유지시킬 수 있는 투명한 항온 수조를 아크릴로 제작하여 사용하였으며, 운동 부하량을 증가시키기 위해 무게 추를 사용하였다. 운동 부하는 개체별 꼬리에 체중의 약 5~7 %에 해당하는 무게에 해당하는 중량을 실로 매달아 항온 수조에 입수시켜 진행하였다. 이때 사지가 모두 움직이도록 막대를 이용하여 자극을 주었으며, 탈진 판정(7초간 수면위로 떠오르지 못하는 상태) 직후, 총 수영시간을 기록하였다. 탈진 직후, 근육의 사후 경직이 일어나기 때문에 CO₂ 흡입 방법으로 곧바로 희생하였다.

(3) 혈액 채취 및 조직 적출

탈진 판정으로 희생된 마우스는 총 운동시간을 측정하고, 희생하였다. 희생된 각 개체에서 혈액을 복대정맥을 통해 채혈하고, 채취한 혈액은 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장 및 혈청으로 분리하였고, 혈청을 따로 취하여 초저온고에서 실험 진행시까지 보관하였다. 조직으로는 간과 근육(hindlimb skeletal muscle)을 채취하고, 근육의 무게를 측정하였다. 왼 다리 근육 조직은 유전자 측정을 위해 RNA later solution(Ambion)에 보관하였으며, 오른 다리 근육 조직은 단백질 분석을 위해 급속 냉동 이후 초저온고에서 실험 시까지 보관하였다. 간 조직 또한, 급속 냉동 이후 초저온고에서 실험 시까지 보관하였다.

(4) Multiplex cell signaling 분석법

탈진 판정으로 희생된 마우스의 오른 다리 근육 조직은 효소 인산화 분석을 위해 사용하였다.

초저온고에서 보관하던 마우스의 근육 조직을 lysis buffer를 사용해 균질화하여, 근육 조직액을 획득하였다. 획득된 근육 조직액에서 multiplex cell signalling 분석 kit를 사용해 분석을 진행하였다. 근육 조직액을 분주하기 전에 96 well plate 타입의 Filter plate를 wash buffer로 세척 후, 특정 항체가 결합되어 있는 beads를 분주 후 다시 한번 wash buffer로 세척한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 준비된 근육 조직액과 표준물질(standard antibody)을 각 well에 50 μ l씩 분주한다. 분주가 끝나면 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 혼합된 Detection Antibody를 각 well에 25 μ l씩 분주하고 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 잘 섞인 Streptavidin-PE를 각 well에 50 μ l씩 분주하고 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 각 well에 Reading buffer를 120 μ l씩 분주하고 실온에서 5분간 500rpm의 속도로 shaking한 후 Bioplex-200을 이용, 각 target 물질들의 발현량을 측정, 비교한다.

(5) 강제수영 시험 결과

사과박 주정 추출물의 섭취가 생쥐의 운동 지구력에 미치는 영향을 평가하기 위하여 강제수영 시험을 실시하였으며, 강제수영 시험은 통상적으로 논문에서 제시된 방법으로 실시하였다. 강제수영을 위한 아크릴 수조에 멸균수를 약 35 cm 높이까지 채우고 수온은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지시켰다. 수영 적응 훈련은 강제수영 실시 1주 전에 마우스 체중의 5%에 해당하는 무게를 마우스 꼬리에 부착하고 10분간 강제수영을 실시하여 유영운동 적응 훈련을 실시하였다. 최대 수영능력(exhaustive swimming) 측정은 유영 적응 훈련과 같은 방법으로 사료 섭취 12주 이후 각 동물에 대하여 생쥐의 꼬가 수면 아래로 7초 이상 가라앉을 시점(탈진)까지 강제수영운동을 실시하였다.

근육의 에너지 대사는 신체적 피로 정도를 결정하며, 지구력 운동(exercise endurance)은 항 피로를 평가하는 데 중요한 변수이다. 사과박 주정 추출물의 지구력 운동에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 사과박 주정 추출물을 마우스 kg당 75 mg과 150 mg, 300 mg을 12주간 사료와 같이 섭취하게 한 후, 탈진 때까지 수영하는 강제수영 능력을 평가하였다. 12주간 사과박 주정 추출물을 투여하였을 때, 일반 사료를 섭취한 대조군은 8.44 ± 3.88 분을 운동하였으나, 사과박 주정 추출물을 섭취한 군은 75, 150, 300 mg/kg에서 각각 23.08 ± 8.4 , 24.63 ± 9.31 , 22.67 ± 7.06 분을 운동하였다(그림 3-29). 이러한 각 군의 수영시간은 12주간 사과박 주정 추출물 섭취에 의해 수영시간이 2.7~2.9배 증가된 것이고, 이것은 사과박 주정 추출물의 섭취로 생쥐의 지구력이 유의적으로 증가되었음을 나타낸 것이다.

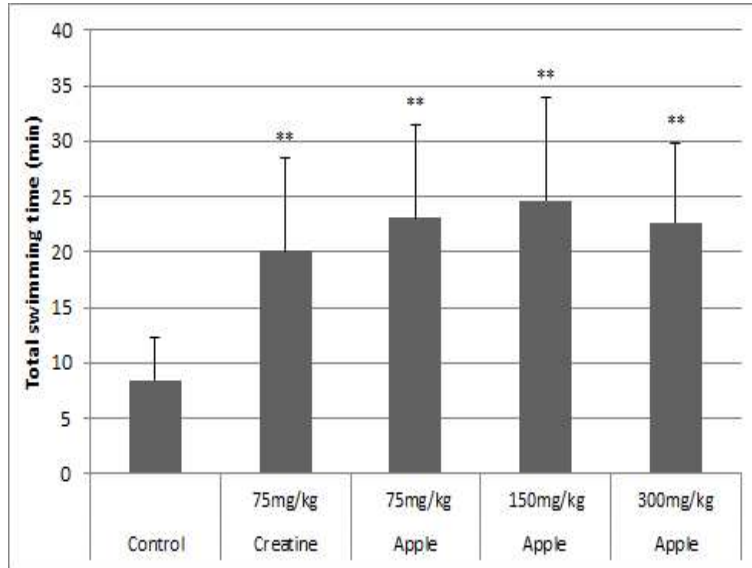


Figure 3-29. Total swimming time(min) of test groups(**, P<0.01)

근지구력의 증가는 근육 내 에너지 대사량 및 근육량과 연관이 있다. 따라서 최대 수영 시간을 측정이후에 생쥐를 희생하여 lower hindlimb soleus muscle을 채취하여 근육량을 조사하였다 (그림 3-30). 12주간 사과박 주정 추출물을 섭취한 생쥐는 일반 사료를 섭취하거나, 양성대조군인 크레아틴을 섭취한 쥐에 비해 근육량이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다 (P<0.05). 이러한 근육량의 증가는 근 지구력의 증가로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 한 가지 흥미로운 것은 사과박 주정 추출물을 300 mg/kg을 섭취한 군은 체중이 대조군에 비해 감소되었으나, 근육량은 증가 되었다는 사실이다. 이것은 체내 지방량은 감소하고 근육량의 증가로 체내 근육 에너지 이용률이 높아져 지구력 증가 효과가 나타난 것으로 사료된다.

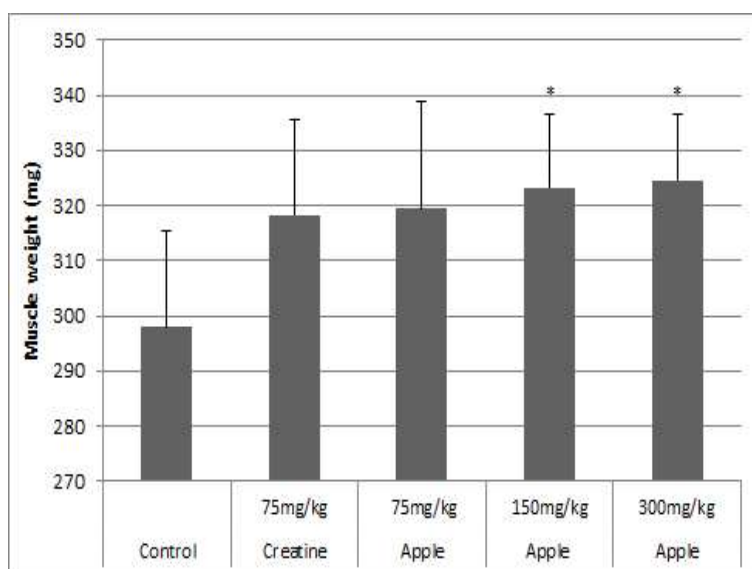


Figure 3-30. Muscle weight(mg) of forced swim test groups(*, P<0.05)

(6) 강제 수영 운동에서의 혈중 바이오마커 분석

강제 수영 운동 이후, 희생하여 혈장을 분리하고 측정된 혈중 바이오마커는 운동 이후, 각 바이오마커가 증가하였으며, 소재(사과박, 크레아틴)투여군에서 일부 감소하는 것으로 조사되었다.

(가)Lactate

세포에 산소가 충분히 공급되는 상황에서는 TCA 회로가 원활히 진행되므로 혈중 젖산농도가 0.56~2.00 mmol/L의 범위로 유지되고(human기준), 그 이상으로 축적되지 않는다. 그러나 해당 작용과 TCA 회로의 대사적 연계가 당량비로 진행되지 못하고 해당 작용이 상대적으로 활발한 상황, 또는 세포에서 요구되는 산소량보다 산소공급이 부족한 상황에서 근육 내에 젖산이 생성된다고 알려져 있다. 고강도 운동 시 산소공급량이 근육의 산소소모량에 미치지 못하는 경우 근육조직의 젖산농도가 증가하게 되고, 이때 생성된 젖산은 혈액으로 확산되어 심장 및 간에서 처리되는데, 운동으로 인해 젖산이 축적되면 체내 산성화가 초래되어 운동 중 당질대사에 관여하는 phosphorylase 활성이 저해되고, 결과적으로 무산소 상태에서 운동에너지의 급원이 되는 glucose 신생이 억제된다. 따라서 혈중 젖산의 감소는 근육 내 피로도를 경감시키는 주요 바이오마커로 인지되고 있다. 그림 3-31에서 보는 바와 같이 혈중 젖산 농도는 미운동 대조군에 비해 운동 시, 유의적으로 증가하는 것을 확인하였으며($P<0.01$), 운동 대조군에 비해 크레아틴 및 사과박의 각 농도별 섭취군에서 유의적으로 감소($P<0.01$)하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 직접적으로 근육 혹은 전신의 피로도를 경감시킴으로 강제 수영을 통해 알아본, 지구력 향상 효과를 나타낸 것으로 확인되며, 특히 사과박 투여 군은 혈중 내 피로 물질인 젖산의 감소로 지구력 향상 효과를 나타낸 것이라 추정된다.

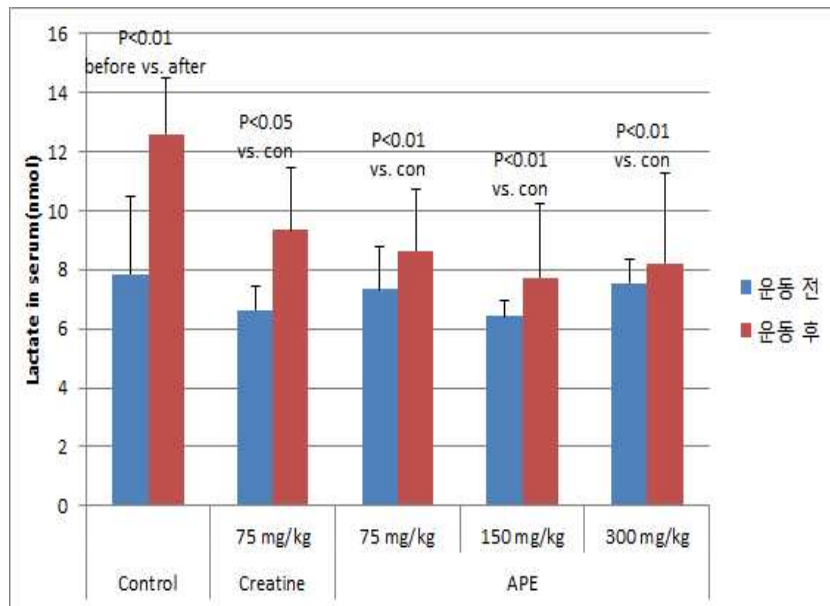


Figure 3-31. Serum lactate levels in forced swim tested groups

(나)Ammonia

아스파르트산은 근육 내에서 purine nucleotide 회로의 주요 구성분으로 극심한 고강도 운동 중에 ATP 풀을 재생시켜 근육에 에너지를 제공하고, 이 과정에서 유리 암모니아를 형성하게 된다. 운동 시 아미노산의 분해 결과, 생성된 암모니아는 근육으로부터 혈액으로 방출되고, 혈중 암모니아는 뇌에 전달되어 중추피로를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 한편 근육세포 내에 축적된 암모니아는 근육의 통증감지와 관련이 있는 구심성 신경을 자극하고, TCA cycle 및 당 신생 작용을 저해하며, 젖산 생성을 초래함으로써 근육의 피로를 유발하게 된다. 그림 3-32에서 보는 바와 같이 측정된 혈중 암모니아 농도는 운동 시에 증가하는 것으로 확인되었으며, 사과박 투여군에서 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였다 ($P<0.05$). Aspartic acid의 대사 과정에서 발생하는 암모니아의 증가는 단백질을 에너지원으로 사용하는 중요한 지표 중에 하나이기 때문에, 사과박 추출물 투여군의 혈중 암모니아의 감소는 근육 운동의 결과로 인한 근육의 피로도를 개선시키고, 근육의 수축운동을 지속시키고, 지구력을 향상시킬 수 있었다고 사료된다.

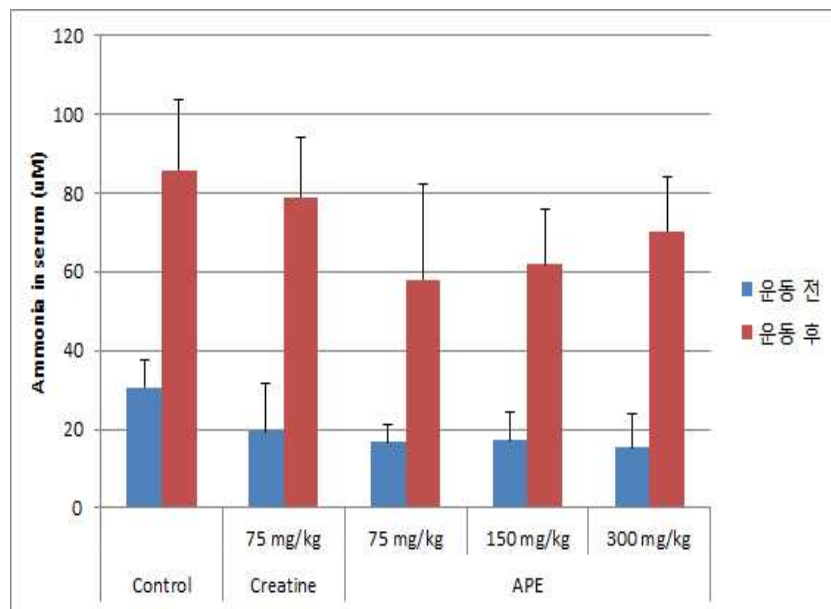


Figure 3-32. Serum ammonia levels in forced swim tested groups

(다)Lactate dehydrogenase

Lactate dehydrogenase(LDH)는 무산소 상태에서 pyruvate로부터 lactate 형성을 촉매하는 효소로서, 고강도 운동 시 그 활성이 증가되며, 근육 피로에 있어서 중요한 인자로 알려져 있다. 과격한 운동을 할 경우 과량의 pyruvate가 생성되어 젖산 형성이 촉진되고, pyruvate를 젖산으로 전환시키는 과정을 촉매하는 LDH 활성이 증가하게 된다. 또한 혈중 LDH는 근육 손상의 정확한 지표로 확인되고 있다. 그림 3-33에서 보는 바와 같이 운동 전에는 비슷한 활성을 유지하는 LDH의 활성은 운동 이후 유의적으로 증가하는 것으로 확인할 수 있었으며, 무산소 근력

운동으로 인해 증가된 혈중 LDH의 농도를 사과박 추출물에서 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 creatine을 섭취한 군에서는 운동 전과 후가 큰 차이가 없는 것을 또한 확인할 수 있었다. 근지구력 증가 효과가 입증된 creatine에서는 LDH에 의한 효과가 있을 것으로 또한 사료된다. 사과박 추출물 75 mg/kg의 농도에서 일부 많이 증가되기는 하였지만, 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 확인할 수 있었다.

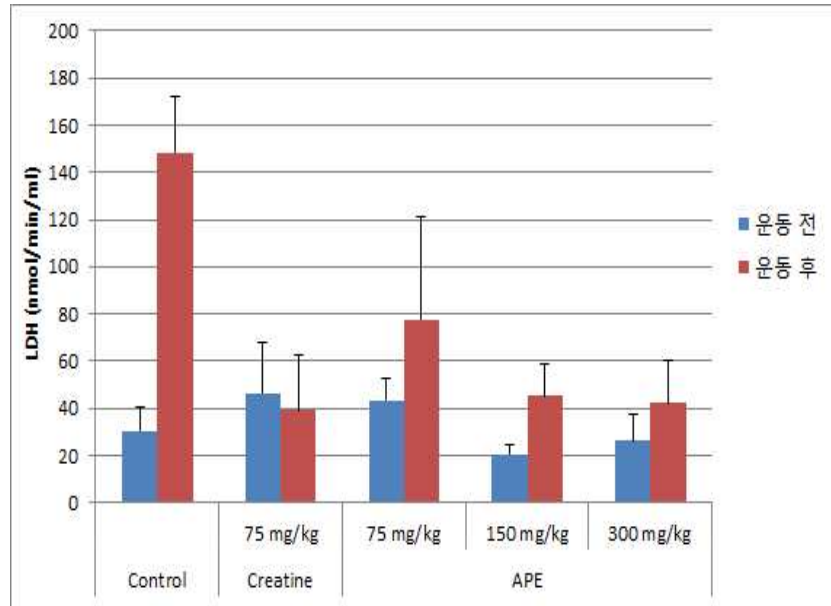


Figure 3-33. Serum LDH levels in forced swim tested groups

(라) Inorganic phosphate

운동 중인 근육에서는 반복되는 근육수축에 의해 myosin과 actin의 친화력을 높이는 단계에서 ATP가 가수분해되고, 이로 인해 혈중 무기인산농도가 급격히 증가하게 된다. 아울러, 일반적으로 운동 중에 혈청 무기인산농도가 급격히 증가하면 근섬유의 cross-bridge가 약화되면서 힘 생성이 저하되는 것으로 알려져 있다.

그림 3-34에서 보는 바와 같이 운동 후, 혈중 무기인산염의 농도를 사과박 주정 추출물에서 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 사과박 주정 추출물 투여군에서 운동 전의 혈중 무기인산염의 농도 높은 것으로 확인되었다. 정상 범주에는 들어가지만, 미운동군보다 높은 것으로 관찰되었다. 1~2 개체에 따라 증가한 것으로 확인되며, 그들 개체는 유영 적응 훈련 시, 높아진 무기인산염의 분해가 늦어진 것으로 생각되지만, 다른 실험결과들을 참고해서 확인해 보아야 할 것이다. 운동 이후의 사과박 주정 추출물에서의 혈중 무기인산염의 감소는 근 지구력 향상에 도움을 준 것으로 사료된다.

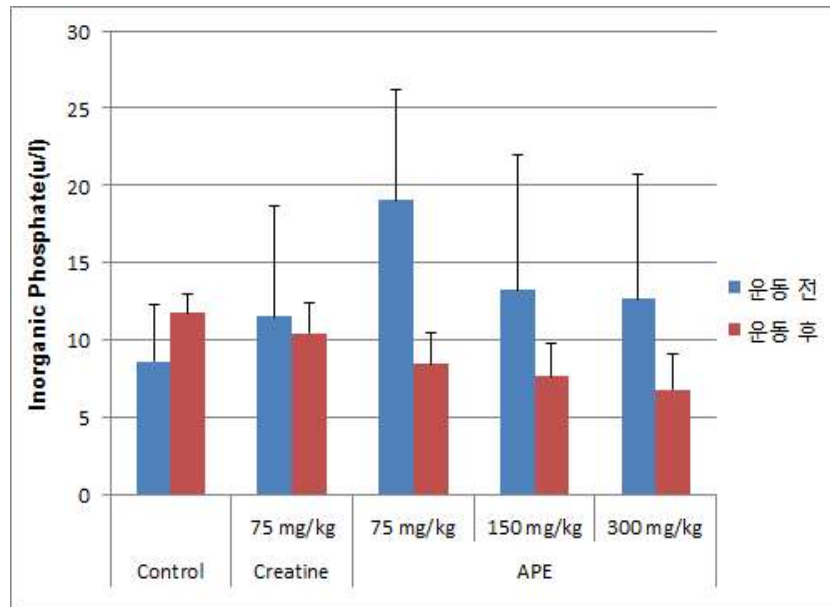


Figure 3-34. Serum inorganic phosphate levels in forced swim tested groups

(마)Creatine kinase

Creatine Kinase(CK)는 운동 중인 근육세포에서 무산소 시 ATP 재합성(ADP와 phosphocreatine으로부터 ATP를 합성하는 과정)에 필요한 creatine phosphate의 합성을 촉매하는 효소이다. 따라서 운동 시 산소 공급이 원활하지 않으면 혈중 CK의 활성이 증가된다.

Fig. 14에서 확인할 수 있는 바와 같이 혈중 CK는 운동 시 유의적으로 그 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 사과박 주정 추출물 투여군에서 감소하는 것으로 확인되어 ATP가 효율적으로 이용 혹은 근육 내 ATP의 합성이 충분히 이용되어, 근지구력 향상에 도움을 준 것이라 사료된다. 특히 사과박 주정 추출물 150, 300 mg/kg 투여군에서는 운동 전과 후가 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

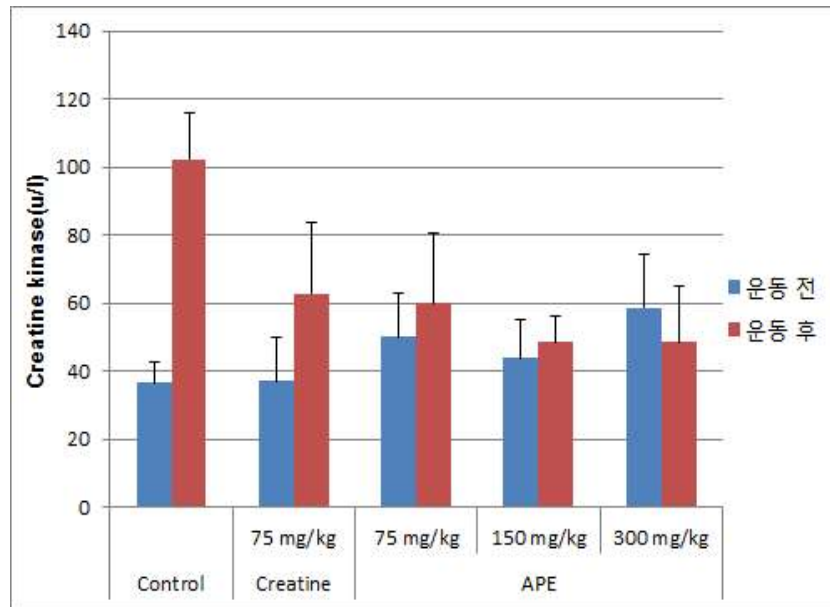


Figure 3-35. Serum CK levels in forced swim tested groups

(바)AST, ALT

강제운동으로 산화적 스트레스 발생 시, 사과박 주정 추출물의 급이가 마우스의 혈중 AST, ALT 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 강제 수영 운동 이후, 피로도가 증가하여 AST, ALT의 활성이 증가될 수 있다는 보고가 있으며, 산화적 스트레스 유발 시 혈중 AST, ALT의 활성이 정상군에 비해 상당히 증가한다는 보고도 있다.

그림 3-36에서 확인할 수 있는 바와 같이 운동 이후에, 간 기능의 직접적 수치인 AST, ALT의 수치가 증가하는 것으로 확인되었다. 사과박 주정 추출물의 경우에는 증가가 둔화되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 AST의 경우에는 유의적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 사과박 주정 추출물을 150 mg/kg으로 섭취한 경우에는, 운동 전에도 간 기능 수치가 감소되어 있는 것을 확인한 바, 사과박 주정 추출물의 섭취가 간 내에서 분해되는데 큰 문제점이 없는 것으로 동시에 확인할 수 있었다.

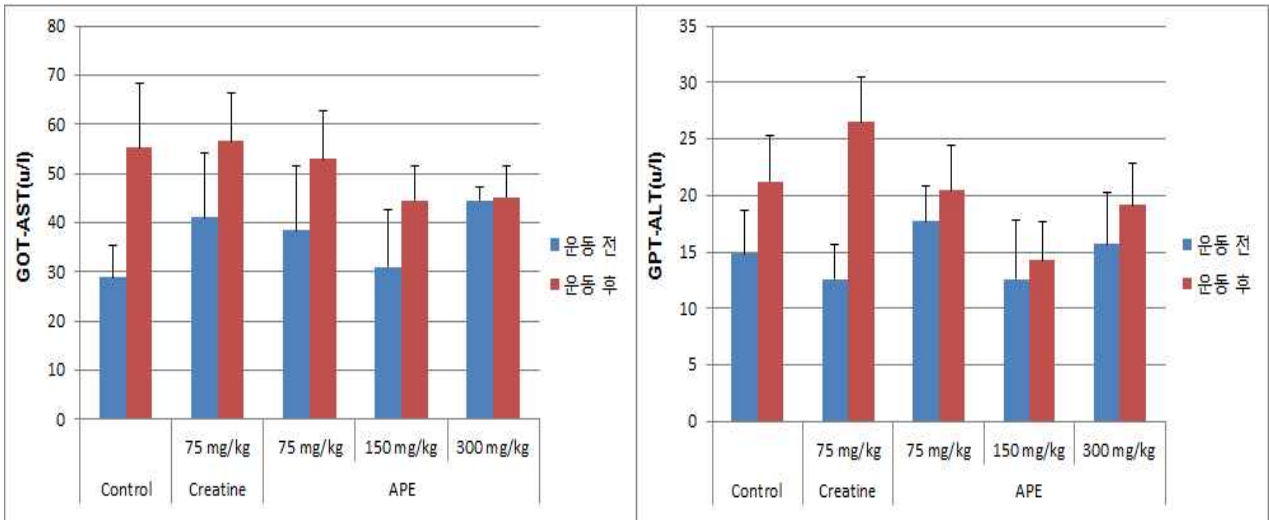


Figure 3-36. Serum AST, ALT levels in forced swim tested groups

(7) 강제 수영 운동에서의 근육 조직 내 바이오마커 분석

(가) 근육 생성 기전 관련 유전자 발현 분석

근육 생성과 관련이 있는 IGF-1, AKT, mTOR 유전자를 각 마우스의 근육 조직에서 분석하였다. 유전자 발현 분석 결과 IGF-1을 통한 AKT, mTOR 유전자의 신호전달과 관련된 유전자 발현이 유의적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 농도 의존적 증가도 확인할 수 있었다 (그림 3-37). Treadmill test에서 진행하였을 때, IGF-1, AKT는 근육 생성 시, 발현이 증가하는 것으로 확인하였으며, 단백질 효소 발현 및 유전자 발현이 큰 폭으로 증가하는 것을 확인할 수 있어, 사과박 주정 추출물 섭취에 의한 근육 강화 관련 유전자 발현 증가 효과를 다시 한번 확인할 수 있었다.

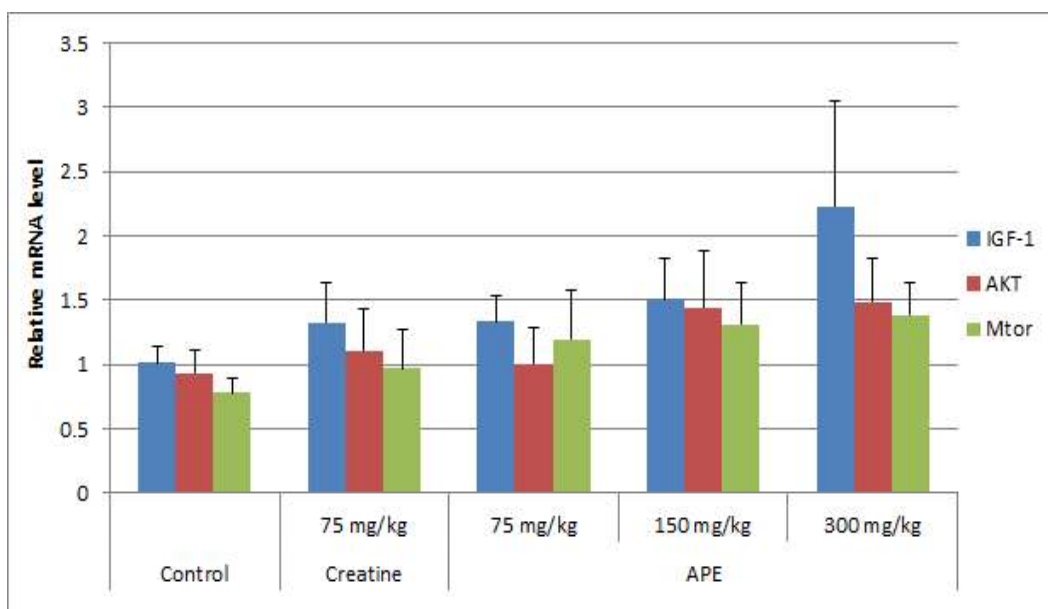


Figure 3-37. Gene expression levels of forced swim test groups in skeletal muscle tissue

(나) 근육 소실 기전 관련 유전자 발현 분석

Creatine 및 사과박 추출물을 섭취한 마우스의 근육조직에서의 근육 소실과 관련한 유전자 발현 분석 결과, 근육 소실과 관련된 유전자인 Atrogin-1 및 MuRF1의 유전자 발현이 사과박 주정추출을 섭취에 의해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. Creatine 섭취군에서는 유의적이지는 않지만 감소하는 경향을 확인할 수 있었다(그림 3-38).

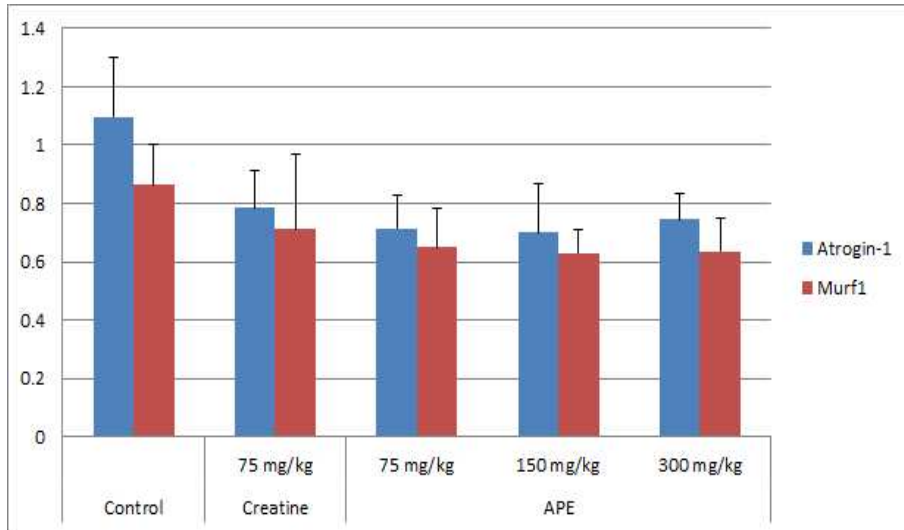


Figure 3-38. Gene expression levels of forced swim test groups in skeletal muscle tissue

(8) 강제 수영 운동에서의 간 조직 내 바이오마커 분석

운동 중 혈중 포도당 농도가 감소되면, 간 또는 근육에 저장되어있는 glycogen이 곧바로 에너지원으로 사용되게 되는데 이로 인해 저장된 glycogen의 고갈은 감소된 glycogen양을 보충시켜줄 수 없기 때문에 피로를 유발하게 된다. 그러므로 운동 후, 사과박 주정 추출물의 섭취로 인한 근육 피로 회복을 알아보기 위해 간 조직 내 glycogen의 함량을 확인하였다(그림 3-39). 간 조직 내 glycogen 함량은 대조군에 비해 사과박 주정 추출물을 섭취한 군에서 비슷하거나(75 mg/kg) 혹은 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 운동 이후에 감소되었을 것이라 추측되는 대조군에 비해 간 조직 중의 glycogen 함량의 증가는 근육 피로도를 감소시키는 에너지원이 될 것이라 사료된다.

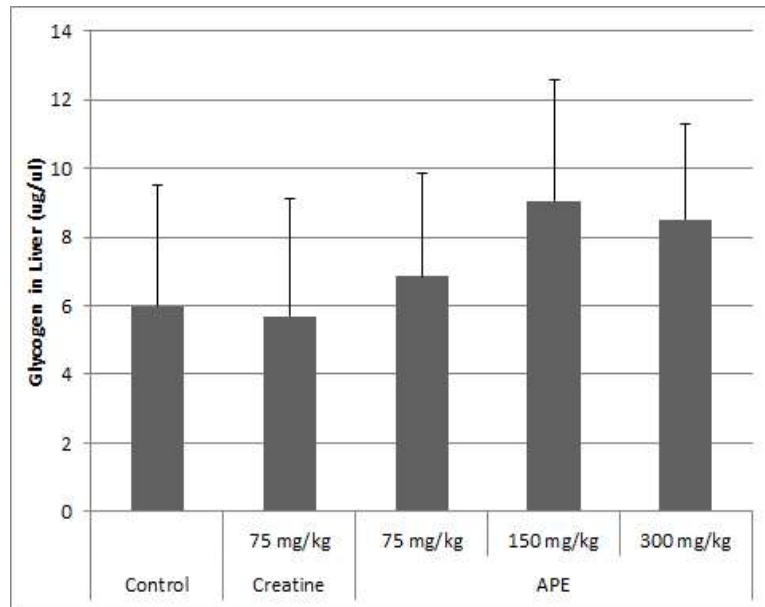


Figure 3-39. Glycogen levels in liver tissue

(9) 강제 수영 운동에서의 운동수행능력 강화 기전 연구

근육 크기(muscle size)는 근육 내에서 일어나는 동화작용(anabolism)이나 이화작용(catabolism)을 유도하는 세포 내 신호전달 과정(signalling pathways)에 의해 조절되며 근육 단백질의 분해보다 합성을 유도하는 신호전달 반응이 많이 일어날 경우, 근육 단백질 합성이 증가 되는데, 이는 근육 단백질 증가에 따른 근육 크기 증가(hypertrophy, 근비대)나 근섬유 수 증가(hyperplasia)로 나타난다. 그림 3-40에서 확인할 수 있는 바와 같이, 운동 자극에 의해 발현 되는 근 비대 유도 인자들은 근 세포 내에서 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway의 자극을 기점으로 downstream proteins를 인산화 시킴으로써 단백질 합성을 유도한다. 이 중 PI3K/Akt 신호전달에 의한 Mammalian Target of Rapamycin(mTOR)의 활성화는 세포 내에서 다양한 성장 신호를 통합하는 중심 성장 신호전달기전으로 인정되고 있다. mTOR는 PIKK족(phosphatidylinositol 3-kinase related kinase family)의 한 종류이며 Serine/Threonine protein kinase의 일종으로써 세포의 대사 작용, 세포의 성장 및 생존에 중요한 역할을 담당한다. mTOR는 두개의 서로 다른 단백질 복합체(complex)인 mTORC1과 mTORC2로 나뉠 수 있는데 이들은 세포 내에서 각각 서로 다른 기능을 수행하고 있다. 이 중 골격근의 세포성장과 관련된 복합체는 mTORC1이다. mTORC1은 mTOR, raptor, GβL(mLST8/G-protein β-subunit-like protein) 단백질로 구성되어 있는데 두 개의 major downstream targets인 4E-BP1과 p70S6K를 활성화시킴으로써 단백질 전사를 개시(protein translation initiation) 함으로써 단백질 합성을 유도하는데 기여한다. mTORC1의 활성화는 eIF4E의 활동을 억제하는 4E-BP1을 eIF4E에서 분리시킨 후 eIF4E와 eIF4G가 결합하게 함으로써 eIF4F 복합물을 형성해 단백질 합성을 개시(initiation)하는 한편, p70S6를 활성화시키는 경우에는 ribosomal protein S6 translation(rpS6)을 증가시키기도 한다. 따라서 4E-BP1과 p70S6K의 인산화 정도가 mTOR

활성을 평가하는 근 단백질 합성 지표(marker)로 사용되고 있다. 이 연구는 고강도의 유산소성 운동 수행에 의한 근단백질 합성 반응 및 사과박 주정 추출물의 근육 강화 및 운동수행능력 증강 기전을 알아보기 위해 수행 되었다. 연구를 위해 강제수영을 통한 고강도의 지구성 운동 수행 후 근단백질 합성 신호 경로 단백질인 IRS-1, Akt, mTOR, p70S6K, S6RP의 인산화 변화를 분석하였다.

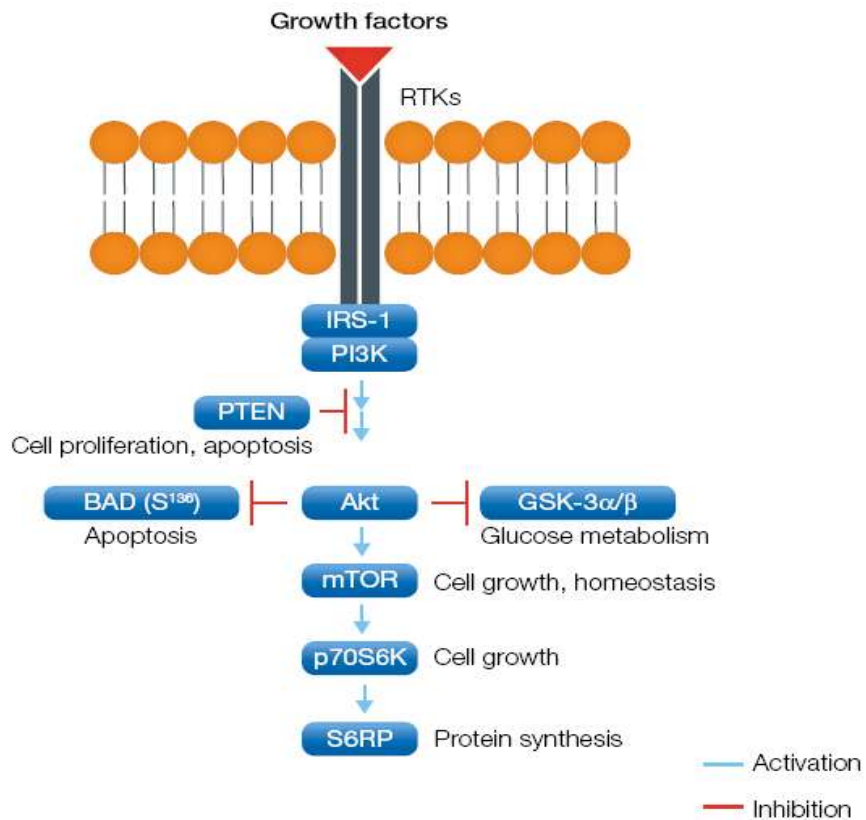


Figure 3-40. Schematic representation of the Akt signaling pathway

그림 3-41에서 확인할 수 있는 바와 같이, 사과박 주정 추출물의 섭취 군에서 IRS-1, Akt, mTOR, p70S6K a 및 S6RP의 인산화가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 단백질 합성에 주요한 역할을 하는 마지막 효소인 S6RP 효소의 인산화 증가는 근육 증가에 역할이 있음을 확인할 수 있었다. Akt로의 신호전달을 억제하는 PTEN효소의 경우, 군별 차이가 유의적으로 나타나지 않았으며, Akt의 증가가 많이 이루어지지 않음에 따라 Apoptosis 신호전달로 진행되는 BAD효소는 억제되지 못하였다. 또한 glucose 대사에 관여되는 GSK-3α/β 또한, 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 에너지 대사에 사과박 주정 추출물이 관여될 수 있음을 시사하였다. 본 실험을 통해 사과박 주정 추출물은 근육 증강에 필요한 단백질 합성, 에너지 대사에 중요한 glucose 대사에 영향을 미쳐, 근육 증강 및 운동 수행능력 증가에 기여하는 것으로 보이며, 이에 대한 분자생물학적 기전을 확보할 수 있었다.

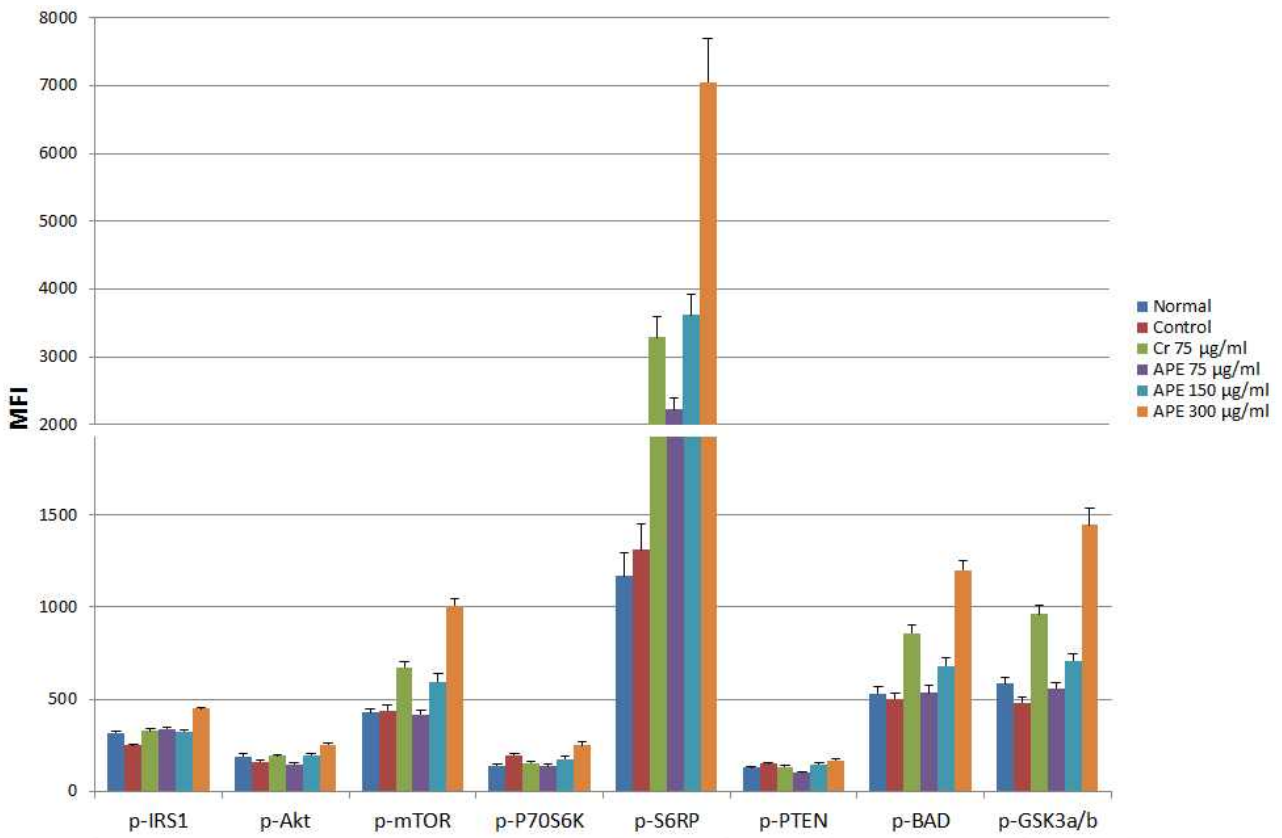


Figure 3-41. Detection of protein phosphorylation using the Bio-Plex Pro cell signalling panel on mouse skeletal muscle tissue

제 4 절 사과박 추출물 생산 공정 최적 표준화

1. 시생산을 통한 시제품 생산 및 지표물질 함량, 미생물, 위해요소 등 기준 규격 설정
가. 추출 횟수에 따른 경제성 점검

Scale-up된 사과박 추출물 제조시 경제성을 검토하기 위하여 추출 횟수별 완제품의 수율 및 기능성분 함량을 조사하였다. 총 3회를 95% 주정으로 추출한 추출액의 UA의 양(27.7 mg/g)을 100%로 가정하였을 때, 1차 추출에서 68.9%, 2회 추출에서 26.5%, 3회 추출에서 4.6%의 UA가 추출되었다.

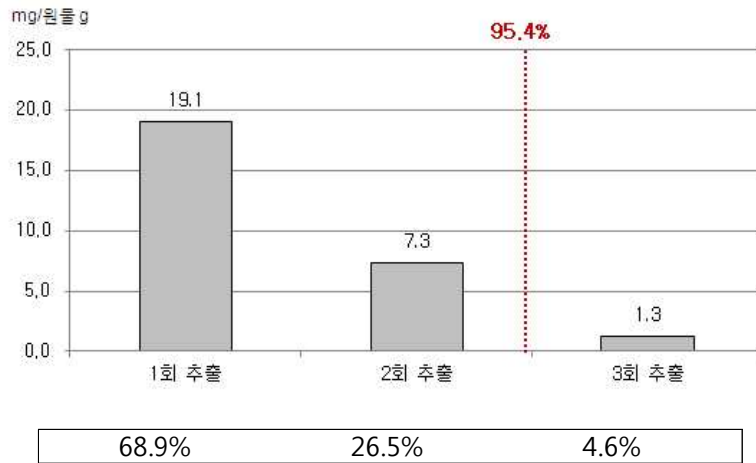


Figure 4-1. Yield of UA depending of extraction times

2회 추출 시까지 원물이 함유하고 있는 UA 중, 약 95.4%가 추출되어, 3차 추출을 제외하는 것을 잠정적으로 결정하였으며, 1회 추출 시와 2회 추출 시에 대하여 가공 공정에 소요되는 주정의 비용 및 수율 등을 대입하여 예상 납품 단가를 예측하였다.

Table 4-1. Price and yield of apple peel extract powder depending on extraction times

| 추출횟수 | 기능성분 함량 (분말/1g) | 원물 대비 수율 | 예상납품단가 (원/kg, 2ton Batch) |
|------|-----------------|----------|---------------------------|
| 1회 | 185 mg/g | 7.8% | 181,678.3 |
| 2회 | 161 mg/g | 12.0% | 194.370 |

위 표와 같이 추출 횟수를 1회로 하는 것이 예상 납품단가가 상대적으로 적은 것으로 나타났으며, 분말 1 g 중 기능성분의 함량도 높았다. 따라서 금번 추진 예정인 사과박 추출물 시생산에서는 95% 추정 추출을 1회로 한정하는 것으로 결정하였다.

나. 품질규격(안) 및 제조공정도 작성

Table 4-2. Specification of apple peel extract powder

| 검사 항목 | 기준 및 규격 | 검사 방법 |
|------------|--------------------------------|--|
| 1. 성 상 | 고유의 색택과 풍미를 가지며, 이미, 이취가 없어야 함 | 육안검사, 관능 |
| 2. 기능 성분 | Ursolic acid 150 mg/g 이상 | HPLC |
| 3. 수 분 | 10.0% 이하 | 105도 상압건조법 |
| 4. 일반세균수 | 100 CFU/g 이하 | 평판 배지법 |
| 5. 효모·곰팡이 | 100 CFU/g 이하 | PDA 배지법 |
| 6. 대장균군 | 음 성 | BGLB 배지법 |
| 7. 대장균 | 음 성 | EC 배지법 |
| 8. 납 | 0.2ppm 이하 | ICP법 |
| 9. 카드뮴 | 0.1ppm 이하 | ICP법 |
| 10. 과툴린 | 50ppb 이하 (농축배수로 환산 要) | 식품공전 제 10-6. 식품 중 자연독소 시험법 6.13 과툴린 |
| 11. 오크라톡신A | 10ppm 이하 | 식품공전 제 10-6. 식품 중 자연독소 시험법 6.15 오크라톡신 |
| 12. 잔류농약 | 적합하여야 함 | 식품공전 中 사과 |

| 공 정 도 | 공정 내용 |
|----------|---|
| 원 료 검 사 | 사과박 세척 및 건조 후, 원재료 품질규격 적합 여부 판정, 냉동보관 |
| 건조사과박 투입 | 건조사과박:95%주정 = 1:10~15 비율로 투입 |
| 추 출 | 25℃/10~20시간 추출, 간헐적 교반 |
| 액 분 리 | 25℃이하 유지하여 액 분리 |
| 여 과 | 퍼라이트 여과, 순환시 액 온도 25℃ 이하 유지 |
| 농 축 | 약 10~15 Brix로 농축, 연속농축/진공농축 |
| 부형제 혼합 | 고형분 함량:부형제 = 8:2 비율로 혼합 |
| 동결건조 | 동결시간 24시간 이상, 건조 48시간 이상 |
| 분쇄 및 선별 | 분쇄 및 진동분체선별(80 mesh/마그네틱바 10,000 Gaus 통과) |
| 포 장 | 자가품질검사 결과 적합제품에 한하여 상온보관(실리카겔 포함) |

Figure 4-2. Production flow of apple peel extract powder

다. 시생산

충주원예농협으로부터 확보한 사과박 원물은 냉동 상태로 보관하였고 공정 투입 전 3일 전부터 냉장 상태에서 해동하였다. 세척 공정은 용매비 1:20(원물 1, 정수 20)으로 진행하였고, 교반은 하지 않았다. 교반을 할 경우 원물이 풀어져 죽과 같은 형태로 되는 것을 LAB Test를 통해 확인하였다. 금번 시생산에서는 세척을 끝낸 사과박을 진동분체(50 mesh)하여 액을 분리하였으며 추가로 유압 프레스를 사용하여 수분을 제거하였다. 수분제거 공정은 원물 양이 많아질 경우 벨트 프레스를 사용하여 연속적으로 수행하는 것이 공정 편의성을 높일 수 있다는 현장의 의견이 있었다. 세척 및 수분제거 공정의 수율은 약 67%였으며 압착을 끝낸 원물의 수분함량은 약 88%였다. 압착을 끝낸 사과박은 진공건조 전까지 밀봉하여 냉장 상태로 보관하였다.



<세척>



<액분리-진동분체>



<액분리 원물>



<액분리 원물-6드럼>



<유압 프레스>



<액분리 원물>

Figure 4-3. Pre-treatment step in production of apple peel extract powder

전처리된 사과박을 팬에 각각 약 8~10 kg씩 나누어 담고 진공건조를 하였으며 수율은 약 18%였다. 냉동된 원물로부터 진공 건조된 사과박이 생산되기까지의 전체 수율은 약 13%였다. 건조공정은 MSC((주)엠에스씨)에 열풍건조 시설이 없어 진공건조 방식으로 진행하였다. 향후 사과박을 양산하는 상황에서는 공정 편의성 및 생산원가를 고려하였을 때, 위생적인 처리 시설을 갖춘 타 업체에 임가공 형태로 위탁 생산 하는 안을 검토할 필요가 있다.



Figure 4-4. Vacuum Drying of pre-treated apple peel

건조 사과박은 용매비 1:10(원물 1, 95% 주정 10)으로 진행하였으며, 1시간에 1~2회전씩 교반하여 추출하였다. 열수처리 때와는 달리 건조된 사과박은 교반을 해도 풀어지지 않았으며 추출과정 동안 지속적으로 교반하여도 문제가 없을 것으로 판단되었다. 금번 시생산에서는 추출기 내에 타공망이 설치되지 않은 설비에서 추출 공정이 진행되었으므로 액 분리 시, 작업상의 어려움과 액 손실분의 발생(추정)이 있었다. 소재 특성상 주정 추출물(액)은 쉽게 증발되며 이때 하얀 색의 추출물이 남게 된다. 추출탱크에서 액을 분리하여 이송한 후 이송관 내부에 하얀 고형분이 잔류하는 것이 관찰되었다. 수율 확보를 위해서는 추출물 이송 후 추가적으로 주정을 이송관을 통과시켜 내부에 잔류하는 고형분을 회수하는 과정이 필요할 것이라 판단된다.



<주정 추출>

<액 이송>

Figure 4-5. Extraction process with 95% EtOH

여과공정은 펄라이트를 여과 보조제로 사용하여 진행하였다. 별도의 가열 없이 현장 온도(약 35℃)로 여과하였는데, 순환 중인 여과 액이 맑아지는 것을 육안으로 확인한 뒤 여과를 종료하였는데, 채취한 공정품 시료에서 시간이 지남에 따라 미세 고형분이 나타나는 현상이 관찰되었으며 이는 온도가 낮아짐에 따라 용해도 차이에 의해 고형분이 다시 생겨나는 현상으로 확인되었다(온도를 높이면 다시 고형분이 없어짐). 따라서 여과 효율을 높이기 위해서는 온도를 가능한 낮추어(약 25℃) 여과를 진행하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 추출과정 후 액이송 때와 마찬가지로 추출액의 LOSS를 줄이기 위해서는 여과 후 라인에 주정을 통과시켜 여과기 및

배관 내부의 추출액을 밀어내어 회수하는 과정이 필요하다고 판단하였다.



<퍼라이트 여과>



<여과액 포장>

Figure 4-6. Filtering in assistance with perlite

이 시생산에서의 농축 공정은 batch 방식으로만 진행하였다(액량이 연속농축기를 사용하기에 부족함). 농축 후 농축액 회수 과정에서 탱크 내부 벽면에 하얀 추출물이 고형분으로 잔류하는 것이 관찰되어 스크래퍼로 긁어서 별도로 회수하였다. 회수된 분말은 다시 정제수로 용해(분산)시켜 분말화 공정에 사용하였다. 시생산에서의 고형분 측정은 중간 채취한 농축액 샘플을 기준으로 1차 측정하였으며 벽면에 붙은 고형분을 정제수에 현탁한 후 농축액과 혼합한 후 재측정하였다. 향후 고형분 측정은 농축이 끝난 후 액을 받기 전에 탱크 내에서 샘플링하여 고형분을 측정하고, 벽면에 묻은 추출분말은 이외 농축액의 고형분과 동일한 고형분 비율로 현탁하여 추가 투입하는 것으로 협의하였다. 고형분을 측정 후 농축액의 고형분 대비 8:2의 비율로 부형제인 말토텍스트린을 혼합한 후 동결건조를 실시하였다. 동결건조 후 탈패한 원물을 조분쇄 후 진동분체 선별하였다. 건조물의 경도가 높지 않아 작은 물리적 충격에 쉽게 분쇄되었기 때문에 분쇄 공정은 큰 의미가 없었다고 판단된다. 분말 성상 자체가 가벼운 편이라 쉽게 날리는 편이므로 LOSS 및 교차오염 가능성 등을 고려할 때 분쇄 공정은 생략하는 것이 가능하다고 생각된다. 진동분체 선별 시, 80 mesh 체망을 사용하여 선별하였다. 흡습성은 없으나 분말이 약간 진득한 느낌이 있는 특성이 있어 mesh에 끼이는 현상이 관찰되었으며 일부 체망을 통과하지 못하는 부분이 있었다. 기존 발효홍삼 분말 제품에 대한 80 mesh 적용 요구 이력이 있어 금번 시생산은 80 mesh 적용성을 테스트하였으며, 작업 효율성 및 LOSS 저감을 위해서 60 mesh를 적용하는 부분에 대한 검토가 필요할 것으로 생각된다.



<분쇄기 투입>



<날림 현상>



<공정 중 손실분>

Figure 4-7. Grinding of apple peel extract powder

라. 시생산 결과

(1) 투입량 및 비용 내역

(가) 사과박 건조물

Table 4-3. Details of input and price for producing pre-treated apple peels

| 항 목 | 배합비(%) | 배합량(kg) | 원료비 | 단가(원/kg) | 비 고 |
|-----------|--------|---------|-----|----------|------------|
| 사과박 | 4.76 | 800 | ₩0 | - | 직접 확보 |
| 정제수 | 95.24 | 16,000 | - | - | |
| 원재료비 소계 | 100.00 | 16,800 | ₩0 | - | |
| 가공비(진공건조) | - | - | - | ₩2,000 | |
| 합 계 | - | - | - | ₩216,000 | 건조물 108 kg |

(나) 사과박 건조물 주정 추출 및 분말화

Table 4-4. Details of input and price for final products

| 항 목 | 배합비(%) | 배합량(kg) | 원료비 | 비 고 |
|---------|--------|---------|------------|----------------------------------|
| 사과박 건조물 | 9.08 | 108.0 | ₩200,000 | 100 kg 초과분 금액 절사 |
| 발효주정 | 90.79 | 1080.0 | ₩775,000 | 회수율 50% 적용 1,000 kg 초과분 금액 절사 |
| 말토덱스트린 | 0.13 | 1.60 | ₩0 | 무상 |
| 원재료비 소계 | 100.00 | 1189.6 | ₩975,000 | |
| 부재료비 | - | - | ₩0 | 무상 |
| 가공비 | - | - | ₩1,800,000 | 추출, 농축, 건조 |
| 합 계 | - | - | ₩2,775,000 | |

(2) 시생산 내역

Table 4-5. Details of trial manufacturing apple peel extract powder

| 내역 | 용량 | 비고 |
|----------|----------|---|
| 투입량 | 1,160 kg | 10배수 추정 투입 - 사과박 건조물 108kg+ 추정 1,080 kg |
| 추출액량 | 961 kg | 수율 82.8% (이론치 적용) |
| 추출액 로스 | 199 kg | 건조물 자체 흡수(건조물 양의 약 1.1배), 액 이송시 손실 |
| 여과액량 | 738 kg | 실측치 |
| 여과 로스 | 223 kg | 고형분 제거, 액 이송시 손실 |
| 농축액량 | 168 kg | 실측치 |
| 동결건조량 | 9.6 kg | 실측치 (부형제 1.6 kg 포함) |
| 분쇄량 | 9.3 kg | 실측치 |
| 분쇄 로스 | 0.3 kg | 공정 중 비산 |
| 진동분체선별량 | 8.18 kg | 실측치 |
| 진동분체선별로스 | 1.12 kg | 체망 미통과 공정품, 진동분체선별 체망 조건 LAB 테스트 |
| 포장량 | 8.18 kg | 1 kg × 8포 포장. 잔량 별도 포장 |

(3) 품목제조보고

아래와 같이 사과박주정추출분말에 대한 기타가공품 유형으로 식품 품목제조 신고를 2013년 9월 2일에 완료하였다.

식품 품목제조보고서

| | | | | |
|------|---------------------------------|-------------------------|---------|--------------------|
| 보고인 | 성명 : 김 | 생년월일 | | |
| | 주소 : | 전화번호 | | |
| | | 휴대전화 : 010- | | |
| 영업소 | 명칭(상호) : (주)엠에스씨 | | | |
| | 소재지 : 경남 양산시 소주회야로 45-73, (소주동) | | | |
| 제품정보 | 식품의 유형 | 기타가공품 | 영업신고 번호 | 경남 양산 제 14-0-506 호 |
| | 제품명 | 사과박주정추출분말 | | |
| | 유통기한 품질유지기한 | 제조일부터 24개월까지 해당사항 없음 | | |
| | 원재료명 또는 성분명 및 배합비율 | (별첨) | | |
| | 용도 용법 | (별첨) | | |
| | 보관방법 및 포장재질 | (별첨) | | |
| | 포장방법 및 포장단위 | (별첨) | | |
| | 성상 | (별첨) | | |
| | 고열량·저영양 식품 해당 여부 | []에 []아니오 [0]해당 없음 | | |
| 기타 | | | | |

식품위생법 제37조제5항 및 식품규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고함
 식품위생법 제45조, 제46조에 의거 보고하였음을
 확인합니다. (보고일: 2013.09.02)
 양산시 응상보건지소 조 현 석 (인)

2013년 09월 02일

보고인

양 산 시 장 귀하

| | |
|------|--|
| 첨부서류 | 1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부 |
|------|--|

유의사항

1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.

210mm×297mm[일반용지 60g/m² (재활용품)]

Figure 4-8. Product manufacturing report

마. 저장 안정성 실험

시생산된 사과박 주정추출분말에 대한 저장성 실험은 12주간에 걸쳐 진행하였다. 저장성 실험은 시료를 약 20 g씩 파우치에 넣고 sealing한 후 25, 35, 45℃ 저장고에 저장하는 방식으로 하여 2주에 1회 성상의 육안 확인 및 기능성분인 UA를 정량하였다. 12주 저장기간 중 성상을 육안 확인하였을 때, 가시적인 색상의 변화나 흡습, 뭉침 현상 등 초기의 성상이 변화하는 양상은 관찰되지 아니하였으며 저장 온도별 특이적 차이는 발견되지 아니하였다. 12주차까지의 실험 결과는 그림 18과 같다.

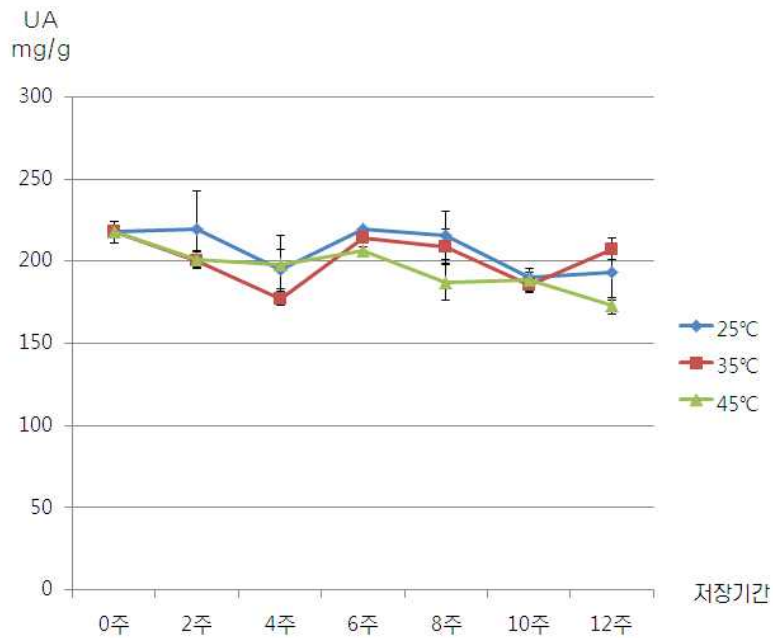


Figure 4-9. Analysis of apple peel extract for preservability

바. 제형 적용성 실험

(1) 타정형

사과박 추출물을 제품화하기 위해 타정 시제를 제작하였다. 실험은 (주)서흥캡셀과 협업으로 진행되었다. 800mg 경질캡슐에 사과박추출물 분말을 70%(시생산품 중 기능성분을 200 mg/g으로 가정했을 때 약 110mg 함유), 유당 20%, 결정셀룰로오스 7%, 스테아린산마그네슘 2%, HPMC 1%의 배합비로 제작하였다. 타정 시제가 제작되었으나, 봉해 실험 결과 2시간이 넘도록 봉해가 일어나지 않아 제품화하기에는 어려운 것으로 판단되었다. 그림 10은 봉해를 2시간 동안 시킨 제품의 사진으로서 모서리 부분에 약간의 크랙이 갈 뿐 수분이 거의 침투되지 않고 형태를 그대로 유지하고 있음을 보여준다.



Figure 4-10. Prototype sample of tablet

(2) 츠어블형

사과박 주정추출물 분말을 사용하여 chewable 정제 시제를 제작하였다. 시제 제작은 (주)서흥캡셀에 의뢰하여 시행하였다. 이번 시제 생산에 사용된 배합비는 아래와 같다.

Table 4-6. List of ingredients used for chewable tablet

| | 원 료 명 | 배합비율(%) |
|----|-----------------------|---------|
| 1 | 사과박주정추출분말 | 20.0 |
| 2 | 유당혼합(유당 95%, 텍스트린 5%) | 15.0 |
| 3 | 레몬농축과즙분말(SR20687) | 13.0 |
| 4 | 사과과즙분말 | 5.0 |
| 5 | 자일리톨 | 7.0 |
| 6 | 에리스리톨 | 7.0 |
| 7 | 결정과당 | 22.2 |
| 8 | 구연산 | 2.5 |
| 9 | 레몬향혼합제제(7510) | 1.5 |
| 10 | 효소처리스테비아 | 2.5 |
| 11 | 텍스트린혼합제제 | 0.3 |
| 12 | 3.0 | |
| 13 | 스테아린산마그네슘 | 1.0 |
| | 합계 | 100.0 |

시제는 1,500 mg chewable 제형의 시제이며 사과박 주정추출물분말을 20% 함유하여 산술적인 기능성분인 UA 함유량은 1정 당 120 mg이다. 시제의 외관은 약간의 녹색을 띄며 조금 진한 초록색 반점 형태가 한쪽 표면에 나타나는 모습이다. 식감은 다소 딱딱한 편이며 레몬농축과즙 분말과 사과과즙분말 등을 사용함으로써 사과박 주정추출물 분말의 컨셉을 살리고자 하였다. 전반적인 향이나 맛은 나쁘지 않으나 식감에 있어서 씹은 후 입 안에 약간 깔깔한 느낌이 남는 점이 개선이 필요한 점으로 도출되었다. 이는 사과박 주정추출물분말을 그대로 섭취하였을 때 나타났던 현상으로 chewable제에서도 없어지지 않고 남아있는 단점이었다. 금번 시제의 외형은 그림 11과 같다.

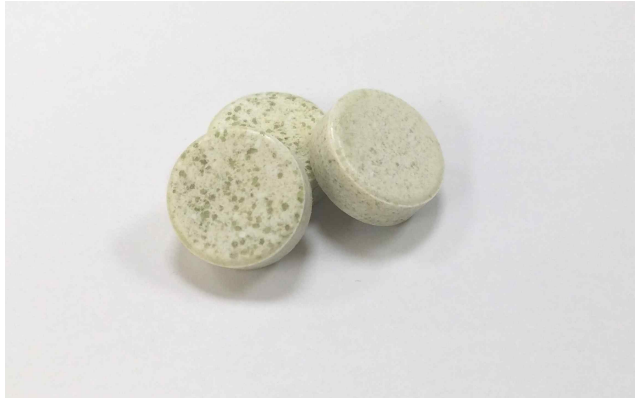


Figure 4-11. Prototype sample of chewable tablet

(3) 분말스틱형

사과박 추출물 분말을 활용하여 스틱포 형태의 시제를 제작하였다. 개략적인 제조공정은 계량 → 배합 → 유동층조립 → 향배합 → 포장 단계로 진행하였다. 먼저 계량 및 배합 단계에서 결합제로는 아라비아검, 효소처리스테비아, Vitamin E 혼합제제를 사용하였으며, 그 외 분말원료(유당, 식물성크림, 말티톨, 자일리톨, 딸기과즙분말, 프락토올리고당, 무수구연산, 사과박주정추출물분말)을 배합하여 Top-spray방식의 유동층조립을 실시하였다. 조립이 종료된 후 향을 추가적으로 투입하여 공정을 완료하였다. 유동층 조립 중 시간 조절을 통해 작은 과립과 큰 과립, 두 가지 형태로 제작하였는데, 제품 간 색상의 차이는 일부 존재하였다. (작은 과립: 밝은 베이지색, 큰 과립: 어두운 베이지색) 성상과 식감은 기호도에 따라 차이는 있겠으나 특이적 이미, 이취는 없고 사과박 특유의 오일향과 유사한 향은 느껴지지 않았다. 시제로 생산된 제품의 UA 함량을 조사하였다. 2 g의 스틱포를 기준으로 이론적인 UA 함량 수치는 46.8 mg이다 (11.7% 배합비, 20% 기능성분함량 기준) 작은 과립의 경우 18.3 ± 0.618 mg/g으로 정량되어 포당 약 36 mg의 함량을 보였고, 20.1 ± 0.646 mg/g으로 정량되어 포당 약 40 mg의 함량을 보였다. 이론치에 비하여 적게 정량된 원인은 미분이라는 성상 특성에 따른 공정 중 로스, 결합제와의 결합 특성에 따른 것일 것으로 추정된다.

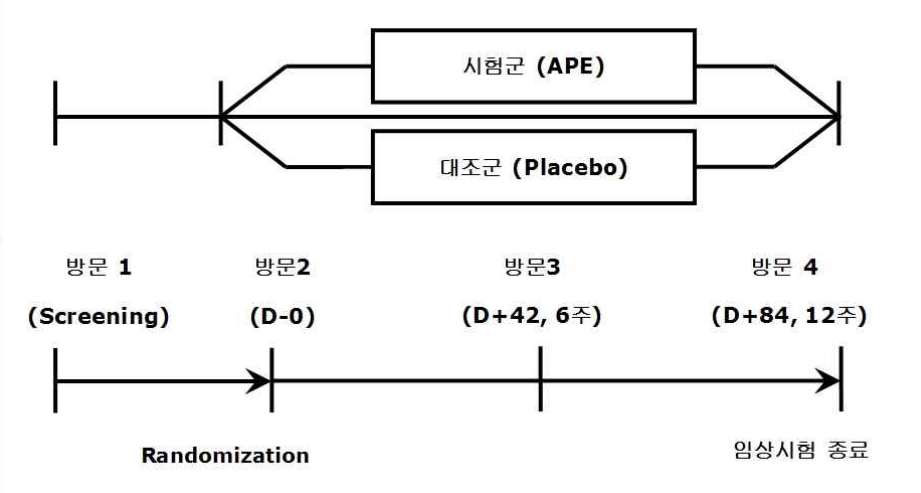
사. 기타/추출 조건별 확립 시험

기존 확립된 추출방법인 주정을 이용한 추출법과 비교하여 기능성분(Ursolic acid) 함량 증진 및 시제품에서 기능성 성분인 UA의 회수율 향상을 목적으로 초음파, 초임계 추출방법을 활용한 추출 조건 수립 및 기능성분에 대한 분석을 현재 진행 중이다. 또한 보통 농가에서 활용하지 못하는 열매 또는 흠집 열매들은 착즙용으로 활용되고 있지만, 사과 수확 시기에 맞추어 착즙 후 남은 사과박과 더불어 낙과 및 흠집열매까지도 활용할 수 있는 방안을 고려하여 농가 소득 증진에 도움이 될 수 있도록 할 계획이다.

제 5 절 사과박 추출물의 인체 적용 시험

1. 임상시험 요약

| | |
|------------|---|
| 임상시험 제목 | 지구력 운동 수행능력, 근력 및 혈중 근육피로요소에 미치는 사과박주정추출물(APE)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험 |
| 임상시험 계획서번호 | Protocol No.: KY_APE Version No.: 1.1 |
| 임상시험 실시기관 | 한국체육대학교 (서울특별시 송파구 양재대로 1239) |
| 임상시험 의뢰자 | (주)한국야쿠르트 대표이사 고** 서울시 서초구 강남대로 577 |
| 임상시험 책임자 | 오** (한국체육대학교 운동건강관리학과 교수) |
| 임상시험 공동연구자 | 김** (한국체육대학교 체육학과 교수) |
| 시험기간 | <ul style="list-style-type: none"> • 임상시험 시작일: 2015.03.11 (첫 시험대상자 스크리닝 일) • 임상시험 종료일: 2015.12.03 (마지막 시험대상자 마지막 방문일) |
| 단계 및 디자인 | <ul style="list-style-type: none"> • 단계: 기타 (건강기능식품) • 디자인: 12주간, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 |
| 시험식품 | 사과박주정추출물 (APE) |
| 대조식품 | Placebo |
| 용법, 용량 | <ul style="list-style-type: none"> • 시험군(APE): 1일 2회, 1회 2캡슐을 물과 함께 섭취 (사과박주정추출물로서 800mg/day) • 대조군(Placebo): 1일 2회, 1회 2캡슐을 물과 함께 섭취 |
| 임상시험 대상 | 정기적으로 운동을 하는 만 19세 이상의 건강한 성인 남녀 |
| 임상시험 목적 | 본 임상시험은 정기적으로 운동을 하는 건강한 성인을 대상으로 사과박주정추출물(APE)을 섭취하였을 때 지구력 운동 수행 능력 및 근력, 혈중 근육피로 요소의 농도 변화를 대조군(Placebo)과 비교하여 유의한 차이를 보이는지 검증하기 위하여 계획되었다. |

| <p>시험방법</p> |  <p>본 임상시험은 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험으로 디자인하였다. 자의(또는 법정대리인)에 의해 임상시험 동의서에 서명한 시험대상자가 본 임상시험에 등록되면 방문 평가를 통해 선정기준/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 시험대상자에 한하여 시험군 및 대조군 중 한 군으로 무작위 배정하였다. 배정된 시험대상자는 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하였다.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----------------|----|----|----|---------------------|----|----|----|--|-----|-----|-----|------------|----|----|----|--------|----|----|----|--------|----|----|----|
| <p>대상자 수</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 계획된 대상자 수: <table border="1" data-bbox="478 1142 1404 1299"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>합 계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종평가례수 (PP Set)</td> <td>36</td> <td>36</td> <td>72</td> </tr> <tr> <td>Drop-out (20%) 고려예수</td> <td>45</td> <td>45</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> • 결과분석에 포함된 대상자 수: <table border="1" data-bbox="478 1366 1404 1590"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>합 계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Safety Set</td> <td>45</td> <td>45</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>FA Set</td> <td>37</td> <td>38</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>PP Set</td> <td>27</td> <td>23</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | | 시험군 | 대조군 | 합 계 | 최종평가례수 (PP Set) | 36 | 36 | 72 | Drop-out (20%) 고려예수 | 45 | 45 | 90 | | 시험군 | 대조군 | 합 계 | Safety Set | 45 | 45 | 90 | FA Set | 37 | 38 | 75 | PP Set | 27 | 23 | 50 |
| | 시험군 | 대조군 | 합 계 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 최종평가례수 (PP Set) | 36 | 36 | 72 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Drop-out (20%) 고려예수 | 45 | 45 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 시험군 | 대조군 | 합 계 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Safety Set | 45 | 45 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FA Set | 37 | 38 | 75 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PP Set | 27 | 23 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>선정기준</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 정기적으로 운동을 하는 만 19세 이상의 건강한 성인 남녀 • 임상병리검사(Laboratory Test) 결과가 정상인 자 (비정상일 경우, 연구자의 판단에 의해 참여 가능) • 본 시험에 참여할 것을 동의하고 서면 동의서에 시험대상자 (또는 법정 대리인)가 자의로 서명한 자 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>제외기준</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 현재 중대한 질병 상태이거나, 심각한 정신 질환을 앓고 있는 사람 • 조절되지 않는 고혈압 환자(170/100 mmHg 이상) • 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 시 혈당 180 mg/dl 이상) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | |
|---------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> • 신장 또는 간장 관련 질환을 앓고 있는 사람 • 현재 근육피로 개선제, 피로회복제 (비타민 포함), 근육통 개선을 목적으로 하는 소염제, 근력 및 근육량 개선제, 항우울제 등의 약물을 복용하고 있는 사람 • 본 임상시험 기간 중에 다른 임상시험에 참가할 계획이 있는 사람 • 본 임상시험 전 3개월 이내 다른 임상시험에 참여했던 사람 • 임신 중이거나 3개월 이내에 임신 예정인 사람 • 시험자가 본 임상시험에 부적절하다고 판단하는 사람 |
| <p>유효성 평가</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 1차 유효성 평가변수 운동지속시간 최대산소섭취량(VO2max), 산소섭취량(VO2) 근력, 근육량 혈중 Lactate • 2차 유효성 평가변수 자각적 피로도, 심박수, 혈중 LDH, Ammonia, Phosphorus, Glucose, Creatinine, Creatine Kinase, BUN |
| <p>안전성 평가</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 이상반응 • 임상병리검사(혈액학적 검사/혈액화학적 검사/뇨 검사) • 신체계측(체중, BMI, 체지방량, 체지방량) |
| <p>통계분석방법</p> | <p>통계분석은 SAS®(Version9.3,SASInstitute,Cary,NorthCarolina,USA)를 이용하여 분석하였다.</p> <p>1. 유효성 분석방법</p> <ul style="list-style-type: none"> • 유효성 평가분석의 주 분석 대상은 PP Set으로 하고, FA Set을 추가적으로 실시하였다. • 유효성 평가변수의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 섭취 군간의 차이는 Two-sample t-test와 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. <p>2. 안전성 분석방법</p> <ul style="list-style-type: none"> • 안전성 평가분석의 주 분석 대상은 Safety Set을 대상으로 하였다. • 이상반응 <p>시험기간 동안 보고된 모든 이상반응에 대한 평가는 시험대상자의 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하였다. 각 군간 이상반응이 발생한 시험대상자의 비율을 계산하고 Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 비교 분석하였다.</p> |

| | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> • 임상병리검사 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하였고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다. 뇨 검사 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다. • 신체계측(체중, BMI, 체지방량, 제지방량) 신체계측(체중, BMI, 체지방량, 제지방량) 검사치에 대하여 해당 방문시 검사하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하였고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다. |
|--|---|

2. 윤리적 고려에 대한 기술

가. 임상시험 관리기준

시험자는 계획서에 서명함으로써, 본 임상시험 계획서와 일반적으로 인정되는 KGCP 규정, 국내의 모든 관련법규와 임상시험 수행에 관련된 규칙 및 규정에 따라서 효과적이고 성실하게 연구를 수행할 것을 동의하였다. 이와 관련된 구체적인 사항을 보면, 시험자는 KGCP와 국내의 모든 관련법규, 규정, 규칙에 따라 임상시험 관련 문서를 정확히 준비, 관리, 완성해야 하였다. 또한 임상시험에 참여하는 각 시험대상자에 대하여 임상시험 연구가 종료되거나 이를 중단하는 경우, 또는 (주)한국야쿠르트의 계약에 의거하여 요구되는 경우에 모든 작업일지 원본과 그 이외에 본 임상시험 계획서에서 요구되는 자료들을 (주)한국야쿠르트에게 즉시 제출하도록 하였다. 또한 실시기관에서는 본 임상시험과 관련된 문서를 항상 가용한 상태로 보관하도록 하였다.

나. 임상시험계획서의 승인

본 임상시험은 실시 전, 임상시험계획서 및 동의서에 대하여 임상시험 실시기관의 독립된 생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받았으며, 임상시험 실시기관의 생명윤리위원회(IRB)의 검토와 승인하에 수행되었다. 한국체육대학교에서 2015년 03월 11일에 최초 대상자의 스크리닝 방문이 시행되었으며, 2015년 03월 13일에 첫 대상자가 등록되었다. 실시기관의 생명윤리위원회 승인일 및 개시모임일과 첫 대상자 스크리닝일 및 등록일을 Table 1에 제시하였다.

Table 1. 임상시험승인 및 개시

| 실시기관명 | 승인일 | 최초 승인된 protocol version | 첫 대상자 스크리닝 | 첫 대상자 등록일 |
|---------|------------|----------------------------|---------------|--------------|
| 한국체육대학교 | 2015.01.09 | Ver. 1.1 | 2015.02.03 | 2015.03.11 |

다. 대상자 동의

시험책임자 혹은 시험담당자는 임상시험에 참여하는 시험대상자에게 사전에 시험의 성격, 범위, 예상되는 결과 등에 대해 쉽게 이해할 수 있도록 설명한 후 서면으로 참가동의를 획득하였다. 시험대상자에 대한 설명은 서면 및 구두로 하였으며, 시험대상자 동의는 시험자 및 시험대상자의 서명 및 날씨가 함께 기재되었다. 시험책임자 혹은 시험담당자는 시험대상자로부터 동의를 얻기 이전에는 임상시험을 목적으로 한 특정한 검사를 하지 않도록 하였다. 또한 시험대상자 및 시험자의 서명을 받은 시험대상자 동의서의 사본은 시험대상자에게 제공하였으며, 원본은 시험책임자가 보관하도록 하였다.

시험대상자 동의서에 포함된 내용은 다음과 같다.

- 연구 목적
- 연구 방법 및 예측 효능, 효과
- 시험식품에 대한 정보 및 시험군 또는 대조군에 무작위로 배정될 확률
- 시험대상자가 받게 되는 검사 및 절차
- 시험대상자 준수 사항
- 시험대상자가 선택할 수 있는 다른 치료방법 및 그에 따른 잠재적 위험과 이익
- 본 임상시험의 검증되지 않은 실험적인 측면
- 예견되는 위험(부작용)이나 불편사항
- 시험참여로 발생하는 비용에 대한 내용
- 참여함으로써 기대되는 이익
- 동의 후 철회
- 임상시험 도중 임상시험 참여가 중지 또는 탈락되는 사유
- 피해발생 시 보상 및 치료대책
- 비밀보장 및 허용 범위
- 서명
- 임상시험 예상 시험대상자 수 및 참여기간
- 임상시험 관련/책임자

시험대상자 동의서는 임상시험 실시기관의 생명윤리위원회로부터 사전 승인을 받았다. 시험대상자 동의서 양식은 시험의뢰자가 시험담당자에게 공급하였으며, 의뢰자로부터 위임 받은 모니

터 요원은 임상시험의 모든 절차를 시작하기 전에 시험대상자가 동의서에 서명하였음을 확인하였다.

라. 비밀보장

모든 시험대상자명은 비밀로 하고 시험 도중 부여한 번호로 기록 및 평가 시 확인하도록 하였다. 시험대상자에게 모든 시험 자료가 컴퓨터에 저장되고 엄격히 비밀 사항으로 다루어진다는 것을 알려주었다.

3. 시험식품 정보 및 기원

최근 수명의 연장과 함께 삶의 여유를 즐기고 각종 성인병의 예방과 치료를 위하여 운동의 중요성이 부각되고 있으며 이에 따라 노화에 따른 운동신경 감퇴를 방지하고 신체의 각 기능이 꾸준히 그 역할을 수행할 수 있게 하는 기초 체력 강화와 관련된 제품에 대한 수요 또한 매우 높아질 것으로 보여진다. 그러나 현재 시판중인 운동신경 강화와 근육피로 개선제 및 스포츠 드링크의 경우, 특정 성분 과다사용 등으로 인한 부작용의 위험을 안고 있으며 아직 그 메커니즘이 제대로 알려지지 않아 연구개발이 매우 미진한 분야이다. 한편 근지구력 향상 및 근육 피로 개선제 수요가 증가함에 따라 근육생성활성화에 관여하는 기전 및 근육피로물질 형성의 근본적인 원인을 찾아 이를 조절함으로써 운동수행능력 향상에 도움을 줄 수 있는 직접적인 근육 피로 개선제의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 안전성이 확보된 천연추출물을 이용하여 보다 근본적으로 지구력 운동 수행능력 향상 및 근육피로 개선효과를 낼 수 있는 기능성식품을 개발하고자 하였다.

APE(Apple Pomace Extract)는 사과박건조분말에서 추출한 Ursolic acid이 주성분인 사과박주정추출물로, Ursolic acid에 의한 근육량의 증가 및 체중 감소, 혈당 강하 효과에 대한 연구결과가 2011년 6월 'cell metabolism' 에 발표 된바 있으며, 최근 질병과 노화로 인한 근위축을 유발하는 유전자발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 사과껍질 섭취의 중요성이 대두되고 있다. 현재 APE는 in vitro 실험을 통해 근육량과 악력, 트레이드밀 운동시간이 증가 하였음을 확인하였으며, 근육피로 물질인 혈액 내 젖산, 탈수소 젖산효소, 무기인산염, 크레아티닌 수치감소와 간효소 수치인 ASP, AST, ALT 감소로 운동으로 유도된 피로물질이 억제되었음을 확인하였다. 또한 근육 세포주내 근력강화 관련 신호전달물질인 IGF-1, AKT, Mtor 발현이 증가하는 반면 근력 약화 및 근육 소실과 관련된 유전자인 MuRF1, Atrogin-1의 단백질 발현이 억제되었음을 확인하였다.

특히 사과박 주정 추출물 분말을 세 농도구간(75mg/kg, 150mg/kg, 300mg/kg)으로 섭취시켰을 때 150 mg/kg 농도이상에서 운동시간 및 근육량 그리고 바이오마커에 대한 효능이 관찰되었으므로, 인체시험에서는 동물 유효농도에 따라 미국 FDA에서 제안한 체적 농도 계산법으로

변환하여 60kg 성인 기준 사과박 주정 추출물 분말로써 729mg이 섭취 권장되어, 최종적으로 유효 성분인 ursolic acid는 131 mg 이 섭취될 것으로 결정하였다.

따라서 본 연구에서는 정기적으로 운동을 하는 사람을 대상으로 APE의 12주간의 섭취가 근육량 증가로 인한 운동수행능력, 근력 및 혈중 근육피로물질 감소에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

4. 임상시험용 식품의 개요

가. 시험식품(APE)

(1) 주성분명: 사과박주정추출물 (APE)

(2) 성상 및 제형 : 연한 노란 연두색의 내용물을 함유한 녹색의 경질캡슐제(480mg/capsule)

(3) 섭취량 및 섭취방법: 1일 2회, 1회 2캡슐을 물과 함께 섭취(사과박주정추출물로써 800mg/day)

(4) 함량 및 배합비 (480mg/캡슐 중)

| 원료명 | 함량(mg) | 처방비율(%) | 1일 섭취량 | 사용목적 |
|----------------------|---------|---------|-----------|------|
| 사과박주정추출분말 | 200.002 | 41.667 | 800.006 | 효능물질 |
| 폴리덱스트로스 | 205.598 | 42.833 | 822.394 | |
| 유당혼합(유당95%, 덱스트린 5%) | 48.0 | 10.0 | 192.0 | |
| 카르복시메틸스타치나트륨 | 14.4 | 3.0 | 57.6 | 붕해제 |
| 이산화규소 | 4.8 | 1.0 | 19.2 | |
| 스테아린산마그네슘 | 4.8 | 1.0 | 19.2 | |
| 히드록시프로필메틸셀룰로오스 | 2.4 | 0.5 | 9.6 | |
| 합계 | 480 mg | 100 % | 1,920.0 | |

(5) 지표성분: Ursolic acid 150mg/g APE 이상

(6) 유통기간: 제조일로부터 12개월

(7) 섭취량 근거: 사과박 주정 추출물 분말을 세 농도구간(75mg/kg, 150mg/kg, 300mg/kg)으로 섭취시켰을 때 150 mg/kg 농도이상에서 운동시간 및 근육량 그리고 바이오마커에 대한 효능이 관찰되었으므로, 인체시험에서는 동물 유효농도에 따라 미국 FDA에서 제안한 체적 농도 계산법으로 변환하여 60kg 성인 기준 사과박 주정 추출물 분말로써 729mg이 섭취 권장되어, 최종적으로 유효 성분인 ursolic acid는 131 mg 이 섭취될 것으로 결정하였다.

나. 대조식품(Placebo)

- (1) 주성분명: 폴리텍스트로스 (식이섬유)
- (2) 성상 및 제형: 시험식품과 동일
- (3) 섭취량 및 섭취방법: 1일 2회, 1회 2캡슐을 물과 함께 섭취

(4) 함량 및 배합비 (480mg/캡슐 중)

| 원료명 | 함량(mg) | 처방비율(%) | 1일 섭취량 | 사용목적 |
|-----------------------|---------|---------|-----------|------|
| 폴리텍스트로스 | 400.800 | 83.5 | 1,603.2 | |
| 유당혼합(유당 95%, 덱스트린 5%) | 48.0 | 10.0 | 192.0 | |
| 카르복시메틸스타치나트륨 | 14.4 | 3.0 | 57.6 | 붕해제 |
| 이산화규소 | 4.8 | 1.0 | 19.2 | |
| 스테아린산마그네슘 | 4.8 | 1.0 | 19.2 | |
| 스카이치자황색소 | 2.4 | 0.5 | 9.6 | 발색제 |
| 맥류약염염록소 분말 | 2.4 | 0.5 | 9.6 | 발색제 |
| 히드록시프로필메틸셀룰로오스 | 2.4 | 0.5 | 9.6 | |
| 합계 | 480 mg | 100 % | 1,920.0 | |

(5) 유통기간: 제조일로부터 12개월

5. 배정방법

본 임상시험은 시험군 또는 대조군을 무작위배정하여 병행시험으로 진행하였으며, 필요한 시험 대상자 수는 탈락율(20%)을 고려하여 각 군당 45명씩 총 90명이었다. 방문 2(Randomization Visit, Week 0)에서 선정, 제외기준에 적합한 모든 시험대상자에 대하여 실시기관에 따라 블록화 무작위배정법의 할당코드에 의하여 각 군으로 배정하였다. 섭취군 간의 균형 있는 무작위 배정을 위하여 동일한 블록의 크기를 적용하였고, 각 군의 시험대상자 수의 비는 1:1로 동일하게 하였다. 무작위배정표는 SAS® system의 Randomization program으로 발생된 난수(A, B의 Random number)의 순열을 시험대상자 번호 1번부터 순차적으로 적용시킨 것으로 SAS®를 통해 임상시험 전에 미리 고안하여 생성하였다. 의뢰자는 임상시험용 식품 포장 시 무작위 배정표에 따라 임상시험용 식품 라벨을 부착한 후, 임상시험 시작 전에 시험기관에 공급하였다. 이후, 방문 2에서 해당 시험대상자가 본 임상시험의 대상자로 적합한 경우에 다음의 시험 대상자번호를 순서대로 부여하고, 이때 일련번호와 같은 번호의 시험/대조식품을 섭취하도록 하였다.

AA-R ZZZ {AA: 기관코드, R: Randomization의 첫글자, ZZZ: 일련번호(001, 002~)}

시험기관 기관코드는 다음과 같다.

한국체육대학교: 01

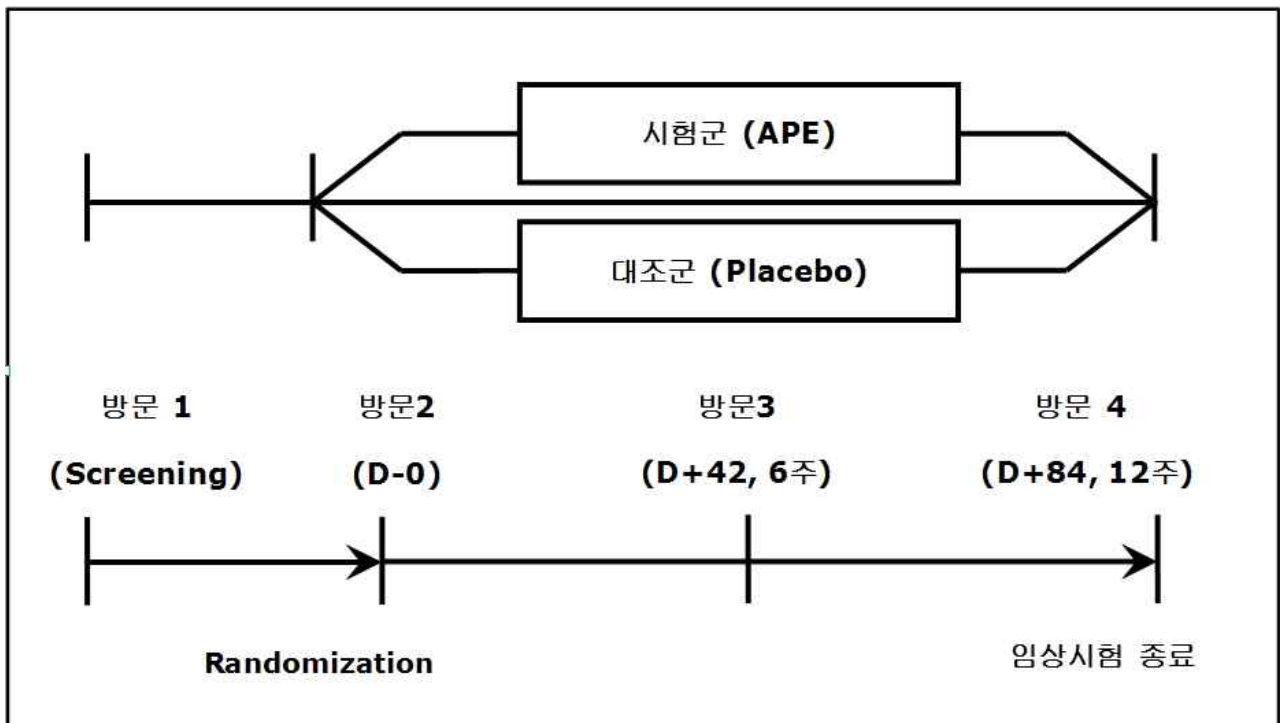
6. 이중눈가림

이중눈가림 유지를 위하여 본 임상시험에 사용되는 제품의 생산/포장 및 라벨링에서 언급된 내용 이외에, 각 군별로 고유코드의 할당 내역은 임상시험 시험자가 봉인된 상태로 관리하였으며, 중대한 약물유해반응 발생으로 부득이하게 해당 코드 열람이 필요한 경우를 제외하고는 임상시험 종료시까지 공개하지 않았다. 임상시험 시험자는 선정된 시험대상자의 섭취 배정번호와 일치하는 고유코드 식품을 시험대상자에게 공급하였으며, 임상시험용 식품의 결손 및 파손 시에는 여분(고유코드별)을 사용함으로써 눈가림을 유지하였다.

7. 임상시험 계획

가. 임상시험의 설계

본 임상시험은 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험으로 디자인되었으며, 자의에 의해 임상시험 동의서에 서명한 사람이 본 임상시험에 참가하면 인구학적조사, 병력/약물투여력 조사, 이학적 검사, 혈압, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당)를 실시하여 선정, 제외기준에 적합하면 무작위배정을 통한 임상시험대상자 등록이 이루어졌다. 시험군 또는 대조군으로 배정된 임상시험대상자는 총 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하였다. 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 하였다.



방문 2(Baseline visit, week 0), 방문 3(Interim visit, week 6), 방문 4(Closing visit, week 12)

에는 안정 시 심박수와 유효성 평가를 위한 혈액채취를 한다. 운동부하검사(지구력테스트)를 실시하여, 매 운동단계 시(7단계) 자각적 피로도와 심박수를 측정하며, 운동종료 시와 회복 15분/30분/60분 에 혈액채취 및 심박수를 측정하였다.

방문1(Screening visit, week -2)

스크리닝 검사/시험대상자 선정

- 서면 동의서 작성
- 인구학적 조사, 병력 및 약물투여력, 이학적 조사
- 신체계측 : 신장, 체중, BMI, 체지방량, 제지방량
- 임상병리검사 (여성의 경우, 임신반응검사)



방문2(Baseline visit, week 0)

1차 운동 테스트

- 운동부하검사 (측정항목: 최대산소섭취량(VO2max), 산소섭취량(VO2), 운동지속시간, 자각적 피로도, 심박수)
- 근력 측정, 근육량 측정
- 혈액채취: 각 시기별 5회
(안정 시, 운동종료 시, 회복 15분/30분/60분 시)



방문3(Interim visit, week 6)

2차 운동 테스트

- 운동부하검사 (측정항목: 최대산소섭취량(VO2max), 산소섭취량(VO2), 운동지속시간, 자각적 피로도, 심박수)
- 근력 측정, 근육량 측정
- 혈액채취: 각 시기별 5회
(안정 시, 운동종료 시, 회복 15분/30분/60분 시)



방문4(Closing visit, week 12)

3차 운동 테스트

- 운동부하검사 (측정항목: 최대산소섭취량(VO2max), 산소섭취량(VO2), 운동지속시간, 자각적 피로도, 심박수)
- 근력 측정, 근육량 측정
- 혈액채취: 각 시기별 5회
(안정 시, 운동종료 시, 회복 15분/30분/60분 시)
- 신체계측: 신장, 체중, BMI, 체지방량, 제지방량
- 임상병리검사

나. 임상시험기간

본 임상시험은 방문 2를 시작으로 임상시험에 참여하는 기간은 총 12주(84일)이다. 시험기간은 임상시험 승인일로부터 12개월로 계획되었으며, 2015년 03월 11일에 첫 시험대상자

가 스크리닝 되었고, 2015년 03월 13일 첫 시험대상자가 등록되었다. 마지막 시험대상자의 방문은 2015년 12월 03일에 이루어져서 총 9개월 동안 시험이 진행되었다.

다. 관찰항목

(1) 시험대상자 동의 및 인구학적 조사

임상시험에 들어가기 전, 본 임상시험의 목적과 내용에 대하여 시험대상자에게 상세히 설명하고, 문서 동의를 받고 인구학적 정보를 조사하였다. 기록사항은 서면 동의 여부 및 동의 일자와 임상시험대상자 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 연락처, 신체활동 조사(정기적 운동여부, 운동종류)였다.

(2) 병력 및 약물 투여력 조사

문진과 과거 진료 기록 점검 및 면담 등을 통하여 조사하였다. 외과적 수술력을 포함한 병력은 스크리닝 시점을 기준으로 3개월 이내 병력을 상세히 조사하여 기록하였다. 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기(발생년도 또는 발생년월), 치료기간, 지속여부, 연구자의 의견 등을 기재하였다. 약물투여력은 스크리닝 시점을 기준으로 2주 이내에 선행약물을 모두 확인하였다.

(3) 이학적 검사

방문 1, 3, 4에 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 시험대상자의 임상적 상태를 근거로 이학적 검사를 실시하였다.

(4) 신체 측정

방문 1, 4에서 신장(cm), 체중(kg), BMI(kg/m²), 체지방량(kg), 체지방량(kg)을 생체 전기저항 측정기(Inbody)를 사용하여 측정하였다. 정확한 측정을 위해 측정 8시간 전까지 식사나 운동을 금하였으며, 측정 시 가벼운 옷차림으로 측정하였고, 시계나 반지, 목걸이 착용을 금하였으며, 대상자가 움직이지 않는 상태에서 측정하였다. 신장은 0.1 cm, 체중은 0.1kg 단위까지 반올림하여 측정하였다.

(5) 임상병리검사

임상병리검사를 실시하여 시험대상자의 전신적인 건강상태를 평가하였다. 시험자는 시험대상자로 하여금 검사당일 8시간 공복상태로 내원하도록 지시하였다. 검사 항목에는 다음이 포함되었다.

- 혈액학적 검사: RBC, WBC, Hct, Hb, Platelet, Seg. Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil
- 혈액화학적 검사: Glucose, Total Protein, Albumin, Total bilirubin, AST(GOT),

ALT(GPT), BUN, Creatinine, Uric acid, Triglyceride, Total HCG (※ 가임기 여성만 해당)

- 소변검사: Nitrite, WBC, pH, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Blood, Color

본 연구의 특성 상 운동테스트와 채혈이 함께 진행되기 때문에 병원 및 보건소와 같은 의료기관에서 채혈할 수 없었으나 의사 또는 간호사가 위생적이고 안전하게 채혈을 실시하였다. 주목할만한 임상병리학적 비정상치 기준을 벗어나는 임상병리검사 결과는 임상시험대상자의 증례기록서(CRF) 연구자 의견(Comments)란에 평가를 기재하고, 시험자가 적절하다고 판단하는 경우 추가 평가를 실시하였다. 임상병리학적 비정상치로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 시험대상자의 증례기록서(CRF)의 '이상반응' 페이지에 진단 또는 의학적 상태를 입력하였다.

(6) 운동부하검사

운동부하검사는 트레드밀(Medtrack ST 55, Quinton Instrument Co., U.S.A)을 이용하여 Table 2와 같이 Bruce Protocol에 따라 운동부하검사(GXT: graded exercise testing)를 시행하였다. 가스분석은 Quinton metabolic cart(QMC; Quinton Instrument Co., U.S.A)를 이용하였고, mixing chamber mode 15초 간격으로 시행하여 최대산소섭취량(VO_{2max})을 측정하였다. 운동부하검사 중 연구대상자가 최대 운동량에 도달하거나, 지속적인 격려에도 운동 중단을 원할 때, 또는 검사 중 연구대상자의 흉통, 어지러움, 심한 호흡곤란 같은 자각증상 등의 이상 소견이 발견될 시 검사를 종료하는 점진적 증상제한 운동부하검사(symptom limited GXT)를 시행할 것이며, 세부적인 운동중단지침은 ACSM(2006)의 지침에 따라 시행하였다. 방문 2, 3, 4 에서 운동부하검사 중 측정된 최대산소섭취량(VO_{2max} :ml/min/kg), 산소섭취량(VO_2 :ml/min), 운동 지속시간(min, sec)을 측정하여 지구력 운동수행능력의 지표로 사용하였다.

Table 2. Bruce Protocol

| 운동단계(3분 간격) | 속도(Km/h) | 경사도(% grade) |
|-------------|----------|--------------|
| 1단계 | 2.7 | 10 |
| 2단계 | 4.0 | 12 |
| 3단계 | 5.5 | 14 |
| 4단계 | 6.8 | 16 |
| 5단계 | 8.0 | 18 |
| 6단계 | 8.9 | 20 |
| 7단계 | 9.6 | 22 |

(7) 근력(슬관절의 등속성 근력 측정)

슬관절의 등속성 근력측정을 위해 등속성 장비 CSMI를 이용하여 측정하였다. 시험대상자는 측정대 위에 앉은 자세에서 대퇴를 고정시키고 슬관절을 다이내모미터(dynamometer) 회전축에 일치시킨 후 신전 및 굴곡 운동 시의 외력의 힘이 작용하지 않도록 고정띠를 이용하여 가슴, 대퇴, 복부 부위를 고정시켰다. 힘 점인 레버 암(lever arm)은 발목 관절의 외과 부위에서 2-3cm 정도 위인 지점에 묶어 신전 및 굴곡운동을 하도록 하였으며, 가동범위(ROM)는 신전 0°에서 굴곡 90°까지 움직이도록 하였다. 양측 모두를 측정하였으며, 각 속도 60°/sec에서 3회, 180°/sec에서 10회, 300°/sec에서 15회를 시작 신호와 함께 최대한 굴곡과 신전운동을 하였다. 분석 변인은 peak torque %body weight, total work done %body weight를 수치화하였다.

(8) 근육량 측정

방문 2, 3, 4에 근위 둘레로 근육량을 측정하였으며, 근위 둘레는 줄자를 이용하여 ACSM(2006) 지침에 따라 측정하였다.

(가) 상완위

대상자는 직립 자세를 취한 후 팔은 자연스럽게 옆에 두고 손은 대퇴 측면에 닿게 하였다. 견봉과 팔꿈치 사이의 중앙 부위를 수평으로 하여 둘레를 측정하였다.

(나) 대퇴 중앙

대상자는 직립 자세를 취한 후 한쪽 다리를 지지대에 올려놓았다. 무릎이 90° 정도 굴곡된 상태에서 서혜부 주름과 슬개골 내측 경계 사이의 중앙 부위를 장축에 수직으로 하여 둘레를 측정하였다.

(9) 심박수

방문 2, 3, 4에 폴라(Polar, USA)를 사용하여 심박수를 측정하였으며, 안정 시, 매 운동단계 시(7단계), 회복 15분 시, 회복 30분 시, 회복 60분 시까지 측정하여 기록하였다.

(10) 자각적 피로도(Borg's RPE-Scale)

방문 2, 3, 4에 운동이 진행되는 동안 시험대상자 스스로 자각하는 피로의 정도를 Borg의 15 RPE scale을 사용하여 매 운동단계 시(7단계)에 측정하였다. RPE(Ratings of perceived exertion)는 자신의 운동부하가 어느 정도 힘든가를 주관적으로 평가해서 언어적으로 표현할 수 있도록 척도화한 것으로 6-20까지 15단계로 구성되어 있다.

(11) 혈중 Lactate, LDH(Lactate Dehydrogenase), Ammonia, Phosphorus, Glucose, Creatine Kinase(CK-MM), BUN, Creatinine

혈액 채취는 방문 2, 3, 4에 실시하였으며, 방문 시 시험대상자는 시기별(안정 시, 운동종료 시, 회복 15분/30분/60분 시)로 총 5회 채혈을 실시하였다. 본 연구의 특성 상 운동테스트와 채혈이 함께 진행되기 때문에 병원 및 보건소와 같은 의료기관에서 채혈할 수 없으나 의사 또는

간호사가 위생적이고 안전하게 채혈을 실시하도록 하였다. 채혈방법은 전완정맥(Antecubital vein)에서 각 시기별 5회, 1회당 약 10cc의 혈액을 채혈하였고, 채혈된 혈액은 원심분리기를 이용하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 냉장 또는 냉동보관 하였다가 분석에 이용하였다.

(12) 식사지도 및 식이조사

임상시험대상자로 적합하다고 판정될 경우, 임상시험기간 동안 시험대상자에게 평소 섭취하던 일반적인 식사형태, 신체활동량, 식이섭취량을 유지하고, 사과박 관련 식품을 정기적으로 먹거나 마시지 않도록 권고하였다. 사과박 관련 식품에 대한 지난 2주일 간의 섭취여부를 방문 2에 조사하였다. 시험대상자에게 시험기간 동안 자신의 식이조사지에 자신이 섭취한 사과박 관련 식품의 빈도수를 매주 1회 기록하도록 교육하였다. 방문 2에서는 시험대상자의 평상시 식이조사를 위해 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 연구담당자가 기록하였다. 임상시험기간 동안 시험대상자의 평상시 식이를 조사하기 위해 방문 2, 방문 3에 시험대상자에게 식이조사지를 배부하였다. 시험대상자가 식이조사지에 다음 방문일 전 최근 일주일 중 3일 동안(가능하면 주말 1일 포함) 평소의 식사와 유사한 날의 식사를 기록하였다. 방문 3, 방문 4에 임상시험 담당자는 작성된 시험대상자의 식이조사지를 확인하였다. 임상시험기간 동안 작성된 식이조사지는 한국영양학회의 Can pro program을 이용하여 식품 및 영양소 섭취량을 분석하였다.

(13) 선정기준/제외기준 확인(시험대상자 적합성 평가)

방문 1에 이루어진 시험대상자 동의여부와 인구학적 조사, 병력조사, 약물 투여력조사, 이학적 검사, 신체계측, 활력징후, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당) 결과를 종합하여 8.3.1.1항 및 8.3.1.2항의 선정기준/제외기준에 적합한 시험대상자인지를 방문 1, 2에 평가하여 기록하였다.

(14) 이상반응 점검

이상반응에 대한 정보는 무작위배정 방문 이후부터 시험대상자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색하였다. 또한 방문 시 또는 방문 기간 사이에 시험대상자가 자발적으로 보고하거나 이학적 검사, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인하도록 하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 임상시험용 식품과 관련하여 취해진 조치 및 임상시험용 식품과의 인과관계, 임상시험용 식품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함되었다. 이를 방문 3, 4에 평가하여 기록하였다.

(15) 무작위배정 및 섭취

방문 2에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 시험대상자를 대상으로 시험군 또는 대조군으로 무작위배정하고, 무작위배정 번호에 따라 섭취하도록 하였다. 섭취방법은

임상시험용 식품을 받은 날부터 섭취하도록 하며, 다음 방문일 전날까지 섭취하도록 지도하였다.

(16) 순응도 확인

시험/대조식품의 섭취상황에 대하여 방문 2, 3에 시험/대조식품 처방 후 연구담당자 또는 관리약사가 기록하고, 방문 3, 4에 시험대상자가 지참하고 온 시험/대조식품의 잔량을 확인하여 연구담당자가 점검하였다. 순응도 확인시 섭취율(%)은 반올림하여 소수점 1자리까지 표기하였다.

- 섭취 순응도(%) = 실제 섭취한 식품 수 / 섭취해야 하는 식품 수 X 100

(17) 관찰 검사 방법(방문별)

(가) 1차 방문 (Screening Visit, Week - 2)

본 임상시험에 참가를 원하는 시험대상자는 임상시험에 대한 설명을 듣고 다음 순서에 따라 평가하였다.

- ① 시험대상자를 시험에 참여시키기 전에 시험 과정을 설명하고, 시험대상자에게 서면 동의서를 받았다.
- ② 시험대상자는 순서대로 연구 스크리닝 번호를 지정 받았다.
- ③ 시험대상자의 인구학적, 병력 및 약물투여력의 조사를 시행하였다.
- ④ 이학적검사를 시행하고, 결과를 기록하였다.
- ⑤ 활력징후(혈압)을 측정한다.
- ⑥ 신체계측(신장, 체중, BMI, 체지방량, 체지방량)을 실시하였다.
- ⑦ 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당)를 실시하였다.
- ⑧ 1차 시험대상자 적합성 평가 후 시험대상자의 다음 방문 일을 지정하였다.

(나) 2차 방문 (Randomization Visit, Week 0)

이 방문은 최초 방문일 이후 14일 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 병력 및 약물투여력 변화를 조사하여 기록하였다.
- ② 근력 및 근육량을 측정하였다.
- ③ 안정 시 심박수를 측정하였으며, 혈액채취를 실시하였다.
- ④ 운동부하검사를 실시하여 최대산소섭취량, 산소섭취량, 운동지속시간을 측정하였다.
- ⑤ 운동 시 매 운동 단계별로 자각적 피로도, 심박수 측정을 실시하였다.
- ⑥ 회복 15분 시, 회복 30분 시, 회복 60분 시 심박수 측정을 실시하였다.
- ⑦ 운동종료 시, 회복 15분 시, 회복 30분 시, 회복 60분 시 혈액채취를 실시하였다.

- ⑧ 1, 2차 방문 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준의 적합성을 평가하였다.
- ⑨ 무작위배정 하였다.
- ⑩ 시험식품/대조식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육하였다.
- ⑪ 식사지도 및 식이조사를 시행하였다.
- ⑫ 다음 방문일을 지정하였다.

(다) 3차 방문 (Interim Visit, Week 6)

이 방문은 2차 방문일 이후 42일(±7일) 이후에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 이상반응 유무를 확인하였다.
- ② 병용약물 및 병용요법 변화를 확인하였다.
- ③ 이학적검사를 시행하고, 결과를 기록하였다.
- ④ 근력 및 근육량을 측정하였다.
- ⑤ 안정 시 심박수를 측정하였으며, 혈액채취를 실시하였다.
- ⑥ 운동부하검사를 실시하여 최대산소섭취량, 산소섭취량, 운동지속시간을 측정하였다.
- ⑦ 운동 시 매 운동 단계별로 자각적 피로도, 심박수 측정을 실시하였다.
- ⑧ 회복 15분 시, 회복 30분 시, 회복 60분 시 심박수 측정을 실시하였다.
- ⑨ 운동종료 시, 회복 15분 시, 회복 30분 시, 회복 60분 시 혈액채취를 실시하였다.
- ⑩ 식사지도 및 식이조사를 시행하였다.
- ⑪ 섭취 순응도를 확인하였다.
- ⑫ 시험식품 또는 대조식품을 처방하고, 섭취방법을 다시 한 번 설명하였다.
- ⑬ 시험대상자의 다음 방문일을 지정하였다.

(라) 4차 방문 (Closing Visit, Week 12)

4차 방문은 시험종료일로서 2차 방문일 이후 84일(±5일) 이후에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 이상반응 유무를 확인하였다.
- ② 병용약물 및 병용요법 변화를 확인하였다.
- ③ 이학적검사를 시행하고, 결과를 기록하였다.
- ④ 신체계측(신장, 체중, BMI, 체지방량, 체지방량)을 실시하였다.
- ⑤ 임상병리검사를 시행하였다.
- ⑥ 근력 및 근육량을 측정하였다.
- ⑦ 안정 시 심박수를 측정하며, 혈액채취를 실시하였다.

- ⑧ 운동부하검사를 실시하여 최대산소섭취량, 산소섭취량, 운동지속시간을 측정하였다.
- ⑨ 운동 시 매 운동 단계별로 자각적 피로도, 심박수 측정을 실시하였다.
- ⑩ 회복 15분 시, 회복 30분 시, 회복 60분 시 심박수 측정을 실시하였다.
- ⑪ 운동종료 시, 회복 15분 시, 회복 30분 시, 회복 60분 시 혈액채취를 실시하였다.
- ⑫ 식이조사를 시행하였다.
- ⑬ 섭취 순응도를 확인하였다.

(마) 추가방문(필요 시)

추가방문은 예정된 방문 외에 시험대상자 요청 또는 연구자가 필요하다고 판단할 때 수시로 이루어지도록 하였다.

라. 시험 대상자의 선정

(1) 대상자

정기적으로 운동을 하는 만 19세 이상의 건강한 성인 남녀

(2) 선정기준

다음 기술된 조건에 부합되는 사람을 시험대상자로 선정하였다.

(가) 정기적으로 운동을 하는 만 19세 이상의 건강한 성인 남녀

(나) 임상병리검사(Laboratory Test) 결과가 정상인 자 (비정상일 경우, 연구자의 판단에 의해 참여 가능)

(다) 본 시험에 참여할 것을 동의하고, 서면 동의서에 시험대상자 또는 법정 대리인이 자의로 서명한 자

(3) 제외기준

다음 기술된 조건에 해당되는 사람은 시험대상자에서 제외하였다.

(가) 현재 중대한 질병 상태이거나, 심각한 정신 질환을 앓고 있는 사람

(나) 조절되지 않는 고혈압 환자(170/100 mmHg 이상)

(다) 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 시 혈당 180 mg/dl 이상)

(라) 신장 또는 간장 관련 질환을 앓고 있는 사람

(마) 현재 근육피로 개선제, 피로회복제 (비타민 포함), 근육통 개선을 목적으로 하는 소염제, 근력 및 근육량 개선제, 항우울제 등의 약물을 복용하고 있는 사람

(바) 본 임상시험 기간 중에 다른 임상시험에 참가할 계획이 있는 사람

(사) 본 임상시험 전 3개월 이내 다른 임상시험에 참여했던 사람

(아) 임신 중이거나 3개월 이내에 임신 예정인 사람

(자) 시험자가 본 임상시험에 부적절하다고 판단하는 사람

8. 시험대상자

가. 시험대상자의 임상시험 참여상태

본 임상시험은 2015년 03월 11일 첫 시험대상자가 스크리닝 되었고 2015년 12월 03일 마지막 시험대상자의 마지막 방문이 진행되었다.

본 임상시험에서는 적합한 시험대상자를 선정하기 위해 총 103명의 시험대상자에 대해서 Screening 평가를 실시하였다. 시험군 45명, 대조군 45명으로 총 90명이 무작위배정되었고, 이 중 추적실패로 시험군에서 9명, 대조군에서 8명이 중도탈락하여 임상시험을 완료한 시험대상자는 총 73명이었다(시험군 36명, 대조군 37명).

나. 무작위배정후 탈락된 시험대상자

| Group | Randomization No. | Date of Termination | Category of Reason |
|-------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 시험군 | 01-R012 | 2015-03-30 | 추적실패 |
| | 01-R024 | 2015-03-31 | 추적실패 |
| | 01-R053 | 2015-09-24 | 추적실패 |
| | 01-R056 | 2015-09-24 | 추적실패 |
| | 01-R058 | 2015-09-24 | 추적실패 |
| | 01-R071 | 2015-09-25 | 추적실패 |
| | 01-R074 | 2015-09-22 | 추적실패 |
| | 01-R085 | 2015-11-02 | 추적실패 |
| | 01-R090 | 2015-09-28 | 추적실패 |
| 대조군 | 01-R023 | 2015-03-27 | 추적실패 |
| | 01-R034 | 2015-03-31 | 추적실패 |
| | 01-R054 | 2015-09-22 | 추적실패 |
| | 01-R055 | 2015-09-24 | 추적실패 |
| | 01-R063 | 2015-11-03 | 추적실패 |
| | 01-R068 | 2015-09-25 | 추적실패 |
| | 01-R073 | 2015-09-25 | 추적실패 |
| | 01-R075 | 2015-09-28 | 추적실패 |

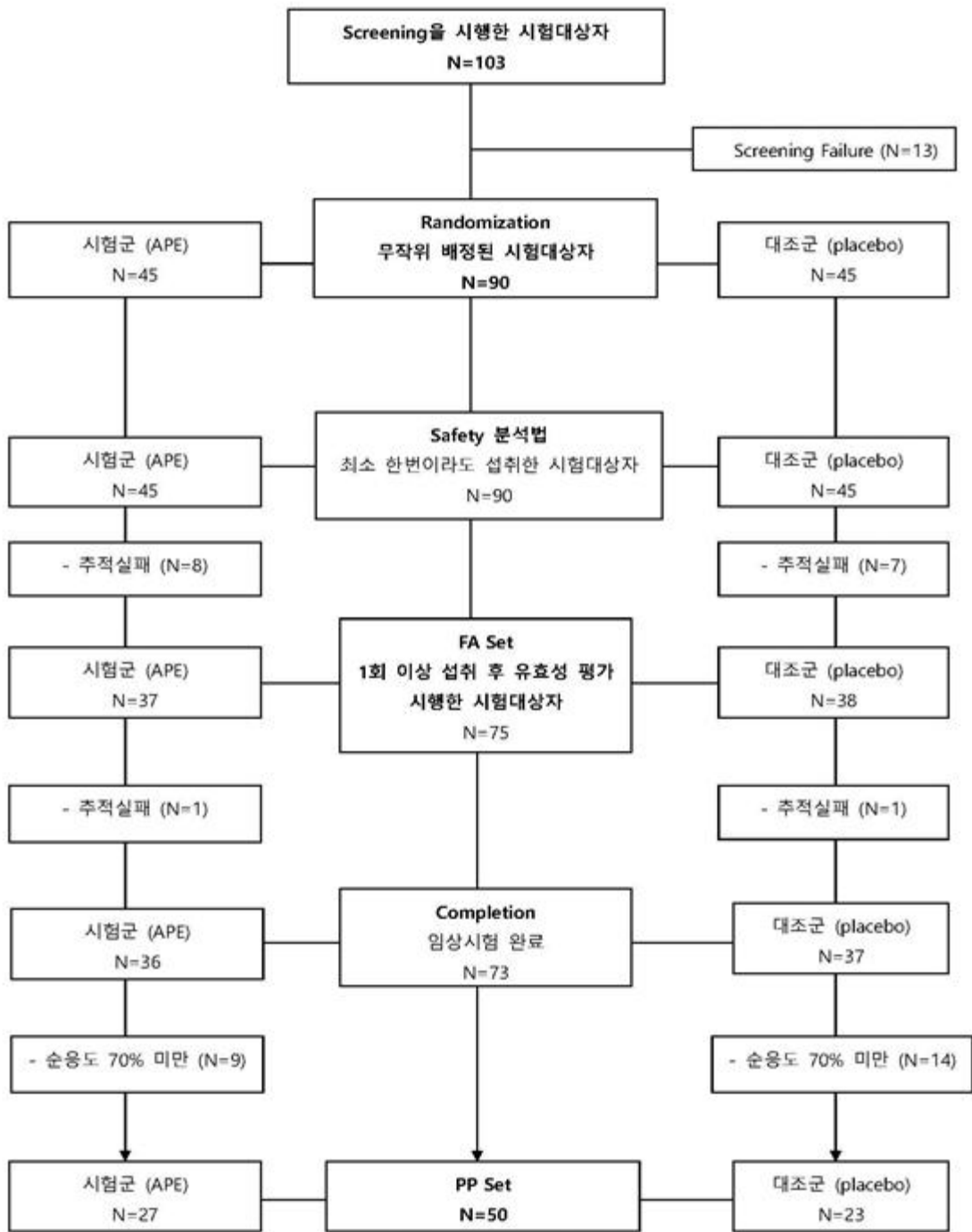
9. 유효성 평가 결과

가. 분석에 포함할 시험대상군의 선정

본 임상시험의 유효성은 PP Set을 주 분석으로 하고, FA Set을 추가적으로 분석하는 것으로 계획되었다. 무작위배정된 시험대상자 90명(시험군 45명, 대조군 45명) 중, FA Set 은 계획서에 기술하였던대로 임상시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행하고 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 집단을 대상으로 이루어졌다. 따라서 중도탈락하여 유효

성 평가를 실시하지 않는 15명(시험군 8명, 대조군 7명)이 제외되어 총 75명(시험군 37명, 대조군 38명)이 FA Set에 포함되었다.

PP Set은 FA Set 분석에 포함된 시험대상자 중에서 임상시험을 종료하고, 임상시험결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항이 없는 시험대상자로서, 분석군 판정을 통해 시험군에서는 섭취기간 동안의 전체 섭취순응도 70% 미만 9명, 추적실패로 인한 중도탈락 1명이 제외되었으며, 대조군에서는 전체 섭취순응도 70% 미만 14명, 추적실패로 인한 중도탈락 1명이 제외되어 50명(시험군 27명, 대조군 23명)이 분석에 포함되었다.



나. 시험대상자의 인구학적 정보 및 기타 섭취 전 특성에 대한 비교

본 임상시험에 참여한 시험대상자의 인구학적 정보를 포함한 섭취 전의 모든 특성을 섭취 군 별로 비교하여 차이가 있는 요인을 확인하고자 하였다.

섭취 전 시험대상자들의 인구학적 정보와 특성에 대하여 조사한 결과, 성별에서는 시험군의 경우 남성이 25명(55.56%), 여성이 20명(44.44%)이 포함되었고, 대조군의 경우 남성이 24명(53.33%), 여성이 21명(46.67%) 포함되어 군간 차이가 없었다($p=0.8324$). 연령에서도 시험군의 경우 평균 22.13 ± 3.97 세, 대조군의 경우 평균 22.13 ± 3.12 세로 섭취 군간 유의한 차이가 나타나지 않았다($p=1.0000$). 그 밖에 정기적 운동여부 및 운동종류에서는 섭취 군간의 통계적 유의한 차이는 나타나지 않아 섭취 군간 비교성(comparability)를 가정할 수 있었다.

| | | 시험군 N=45 | 대조군 N=45 | p-value |
|-------------------------|----------|--------------|--------------|---------|
| 성별 n(%) | 남성 | 25 (55.56) | 24 (53.33) | 0.8324† |
| | 여성 | 20 (44.44) | 21 (46.67) | |
| 연령 (세) | Mean±SD | 22.13±3.97 | 22.13±3.12 | 1.0000* |
| | Min, Max | 19.00, 40.00 | 19.00, 36.00 | |
| 정기적 운동 여부 n(%) | 아니오 | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 0.7824‡ |
| | 1회~2회/주 | 16 (35.56) | 15 (33.33) | |
| | 3회/주 | 22 (48.89) | 19 (42.22) | |
| | 4~5회/주 | 6 (13.33) | 9 (20.00) | |
| | 매일 | 1 (2.22) | 2 (4.44) | |
| 걷기(조깅) | 예 | 5 (11.11) | 7 (15.56) | 0.5351† |
| | 아니오 | 40 (88.89) | 38 (84.44) | |
| 등산 | 예 | 0 (0.00) | 1 (2.22) | 1.0000‡ |
| | 아니오 | 45 (100.00) | 44 (97.78) | |
| 요가/ 필라테스 | 예 | 2 (4.44) | 2 (4.44) | 1.0000‡ |
| | 아니오 | 43 (95.56) | 43 (95.56) | |
| 운동 종류 n(%) | 수영 | 6 (13.33) | 6 (13.33) | 1.0000† |
| | 아니오 | 39 (86.67) | 39 (86.67) | |
| 에어로빅 (댄스) | 예 | 1 (2.22) | 0 (0.00) | 1.0000‡ |
| | 아니오 | 44 (97.78) | 45 (100.00) | |
| 자전거 | 예 | 6 (13.33) | 4 (8.89) | 0.5023† |
| | 아니오 | 39 (86.67) | 41 (91.11) | |
| 테니스 | 예 | 2 (4.44) | 2 (4.44) | 1.0000‡ |
| | 아니오 | 43 (95.56) | 43 (95.56) | |
| 웨이트 트레이닝 | 예 | 13 (28.89) | 19 (42.22) | 0.1864† |
| | 아니오 | 32 (71.11) | 26 (57.78) | |

| | | | | |
|----|-----|------------|------------|---------|
| 기타 | 예 | 13 (28.89) | 13 (28.89) | 1.0000† |
| | 아니오 | 32 (71.11) | 32 (71.11) | |

*: p-value by Two sample t-test

† : p value by Chi-square test

‡ : p-value by Fisher's exact test

임상시험에 참여한 시험대상자의 이학적 검사는 신체기관별로 '정상', '비정상'으로 분류하여 비교하였으며, 두 군 모두 정상으로 확인되었다.

다. 유효성 평가 결과의 제시 및 분석

현재 유효성 평가 결과에 대한 각종 지표에 대해 통계 처리 중이며, 결과가 나오는대로 추가로 보고할 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표의 달성도

1. 1차년도

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|------------|--|---------------------------------------|------------|---|
| 1차 년도 | 사과 가공 부산물의 근력강화 기능성 확인 사과 가공 부산물의 근력강화 기능성 확인 | 사과 가공 부산물의 근력강화 기능성 물질 추출물 제조 | 100 | 95%주정 추출을 통한 추출물 제조 |
| | | in vitro 실험을 통한 근력강화 물질의 기능성 규명 | 100 | 1. C2C12 mouse myotube cell 을 사용한 유전자 발현분석 1) 근육 강화 및 소실 관련 2) IGF-1/AKT 기전 내 관련 3) 미토콘드리아 활성 관련 2. 세포 독성 실험 |
| | | in vivo 실험을 통한 근력강화 물질의 기능성 규명 | 100 | 1. 동물실험 모델을 이용한 근 력강화 예비 효능 평가 1) 강제수영법 평가 2. 동물실험 모델을 이용한 근 력강화 및 근지구력 강화 효능 평가 1) Treadmill 근지구력 평가 2) Grip strength 근력 평가 |
| | | 근력강화 성분의 기능성 강화 조건 탐색 | 100 | 추출 조건에 따른 기능성분 함 량 확인 |
| | | 원재료 표준화 | 100 | 품종, 채취시기 고려 원재료 지 표물질 모니터링 및 원재료 공 급 방법 설정 |
| | | 제조공정 표준화 | 100 | 용매비, 추출온도, 추출횟수, 분 물화 방법, 최종 수율 고려 제 조 공정 표준화 |
| | | 기준 규격 설정 | 100 | 성상, 수분, 지표성분 함량, 미 생물, 위해요소 (중금속, 잔류농 약 등) 및 부재료 규격 설정 |
| | | 대량생산공정 및 제조 공정도 개발 | 100 | 시생산을 통한 시제품 생산 및 안전성 점검 |

2. 2차년도

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|------------|--|--|---------------|---|
| 2차 년도 | 사과가공 부산물 을 활용한 근력 강화 phytochemical의 기능성 확인 및 소재 규격화 및 응용 제품 개발 | 사과 껍질 추출 phytochemical의 인체 적용시험 실시 | 100 | 인체적용시험 협의체 구성 CRO: (주)네오뉴트라 |
| | | | 100 | 인체적용시험 실험법 구성 식약처 모듬토의 실시 일시: 2014. 9. 22 식약처 건강기능식품기준과 김용무, 강윤정, 김민식 주무관 |
| | | | 100 | 실시기관 선정 및 모집자 기준 설정 실시기관: 한국체육대학교 연구자: 오재근 교수 |
| | | | 100 | 사과껍질 phytochemical의 인체 적용시험 평가 지표 분석 임상시험 시작: 2015. 03. 11 임상시험 종료: 2015. 12. 03 |
| | | 90 | 통계처리 및 유효성 분석 | |
| | | 사과박 추출물의 제품 적용성 연구 | 100 | 사과박 추출물의 안전성 및 품 질규격 적합성 여부 |
| | | | 100 | 제품 적용성 검토 |
| | | | 100 | 시제품 적용 |

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 국민의 식생활 수준이 향상됨에 따라 농산물 및 과일의 섭취 형태가 변화되어 많은 가공식품을 섭취하고 있다. 과일의 경우, 압착하여 주스의 형태로 많은 양을 섭취하고 있는데 과일 주스를 만드는 공정에서 상당히 많은 양의 부산물이 생산되고 있다.
2. 제조 공정에서 발생하는 사과껍질(사과박)은 특별한 수요가 없고 주로 사료 첨가제용으로 사용 되거나 방치되고 있다.
3. 특히 사과박의 방치 시에는 환경오염의 원인이 되므로 많은 비용을 부담하면서 특수처리 업체를 통해 처리하는 실정이다.

4. 사과박의 성분은 탄수화물, 조단백, 조지방 및 섬유소이며 특히 펙틴과 같은 폴리페놀류와 식이 섬유를 상당 부분 함유하고 있다.
5. 2011년 6월에 사과 껍질에 다량 존재하는 pentacyclic triterpenoid(ursolic acid)에 의한 근육량의 증가 및 체중 감소, 혈당 강하 효과에 대한 연구가 2011년 생명과학 전문 저널인 cell metabolism에 발표된 바 있다.
6. 현재 사과 껍질은 사과 가공과정에서 부산물로 분류되어 사료 첨가제, 폐기물로 이용하고 있기 때문에 이를 활용한 고부가가치 식의약품 원료 소재 개발 및 제품 개발에 성공할 경우 과수 농가 및 가공 업체의 소득 향상에 큰 역할을 할 것으로 사료된다.
7. 현재 국내 근 기능 기능성 식품은 칼슘, 마그네슘, 단백질이 신경과 근육 유지에 도움을 주는 것을 기능성으로 제시한 다양한 제품이 출시되고 있다. 옥타코사놀은 근지구력 개선을 기능성으로 제시한 고시형 원료로 승인되어 있고, 다양한 건강기능식품으로 판매되고 있다. 또한 크레아틴의 경우 근력운동 시 운동 기능 향상에 도움을 줄 수 있다는 기능성을 인정받았으며, 최근 동충하초 추출물이 지구력 증진에 관한 기능성을 인정받은 바 있다. 이들 제품의 제형은 캡슐 형태가 주된 형태이며, 액상, 타블렛, 환의 형태로도 시판되고 있다.
8. 2008년 대한 임상건강증진학회 추계학술대회에서 서강대 최대혁 교수의 연구 결과에 의하면 아미노산과 크레아틴의 경우 근육 강화 기능이 미약하다고 보고하였다. 따라서 현재까지 근육 강화에 의한 근지구력 향상에 대한 건강 기능성 식품은 거의 전무하다고 보여진다.
9. 현재까지도 근력강화 관련 제품은 주로 운동기능 향상 및 근지구력 강화를 목적으로 섭취와 보관이 쉬운 음료나 분말 등과 같은 형태로 건강식품보조제품 품목으로의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 대부분 효과 면에서 큰 효과를 나타내지 못하고 있다.
10. 또한 대부분의 원료물질을 수입에 의존하고 있으며, 대표적인 운동 기능 향상 기능성 원료인 Creatine의 합성에 의해 생산되는 등 천연물을 이용한 근력강화 제품은 없는 것으로 파악되고 있다.
11. 따라서 본 연구개발 사업에 의해 사과 가공 부산물의 phytochemical(ursolic acid)을 활용한 근력강화 원료 소재 확보 및 인체적용시험을 통한 효능 평가, 제품 개발이 성공할 경우 원료 및 제품 국산화 및 수출 등에 의한 부가가치를 기대할 수 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구개발 성과

| 구분 | 특허 | | 논문 | | 기타 |
|-------|----|----|-----|------|---------------------|
| | 출원 | 등록 | SCI | 비SCI | |
| 1차 년도 | 목표 | 1 | | 1 | |
| | 달성 | 1 | | 0 | 1 (학술대회-포스터) |
| 2차 년도 | 목표 | 1 | | 1 | 인체적용시험 종료 후, 개별인정신청 |
| | 달성 | 2 | | 1 | 2 (학술대회-포스터) |
| 계 | 목표 | 2 | | 2 | |
| | 달성 | 3 | | 1 | 3 (학술대회-포스터) |

2. 연구개발 성과 개요

가. 특허

(1) 사과박(apple pomace)으로부터 우르솔릭산을 고효율로 추출하는 방법 및 그 방법에 의해 추출된 우르솔릭산을 유효성분으로 함유하는 식품조성물 (10-2014-0057314, 2014-05-13)

(2) 명월초 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 운동능력 증강 및 피로회복용 조성물 (10-2014-0155959, 2014-11-11)

(3) 사과박 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물 (10-2015-0132869, 2015-09-21)

나. 논문

(1) 당초 목표는 SCI 2편, 비SCI 1편이었으며, 과제 기간중 SCI 1편의 논문을 게재하였으며 현재 1편의 논문을 추가로 투고하여 게재여부를 검토받고 있으며, 당초 예상보다 논문 게재시기가 다소 늦어졌지만 곧 게재 여부가 결정될 것으로 보이며, 논문 게재가 완료되면 소기의 목표를 달성할 수 있을 것이라 판단됨.

(2) 논문 목록

- Apple Pomace Extract Improves Endurance in Exercise Performance by Increasing Strength and Weight of Skeletal Muscle, J. Med. Food. 18(12), 2015, 1380-86.
- 국내산 사과 가공 부산물의 근력 강화 기능성 성분 비교 분석
- Anti-fatigue Effect of a Ursolic Acid-rich Extract from Apple Pomace. In submission.

다. 기타

(1) 학회발표목록

- 2014 Annual meeting of KSBMB. Apple Pomace Extract Improves Muscle Strength and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle.
- 2014 14th International nutrition & diagnostics conference. Apple pomace extract improves muscle strength and mitochondrial function in skeletal muscle.
- 2015 The Korean Society of Food Science and Nutrition. Anti-fatigue Effect of a Ursolic Acid-rich Extract from Apple Pomace.

제 2 절 연구개발 성과 활용 계획

1. 사과박은 현재 폐기물로 지정되어 있기 때문에 사과박을 수거하여 식품 원료로 가공하기에는 지방산단체의 협조가 필요하다. 따라서 관련 지자체와의 협의를 지속적으로 실시하여 식품원료로서 가공이 원활히 이루어 질수 있도록 할 계획이다
2. 또한 사과박은 취급할 수 있는 업체가 많지 않고 원물 수급이 용이하지 않다는 단점이 존재하기 때문에, ursolic acid를 고함유하는 다른 종에서의 추출을 고려하여 ursolic acid를 다량 함유하는 피로 회복 또는 운동수행능력 증강에 대한 제품 출시를 고려하겠음.
3. 해외 연구의 사례에서도 로즈마리 등의 잎에서 ursolic acid를 다량 함유한 추출물의 보고가 확인되고 있기 때문에 국내산 식물 내에서 ursolic acid를 다량 함유한 추출물을 지속적으로 독자적인 추출법 및 분석방법을 활용해 연구하도록 할 계획임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 사과 가공 업체

업체 : AppleActiv Inc

www.appleactiv.com

제품 : Dried organic apple peels

- 효과 :
- Provides antioxidant support
 - Helps maintain inflammation within the normal range
 - Supports healthy joints
 - Promotes joint comfort and mobility
 - Helps manage oxidative stress
 - Promotes healthy aging
 - Helps maintain cell integrity

- 특징 :
- **100% organic**
 - USDA Organic and EcoCert Organic certifications.
 - 제조방법관련 특허 보유



(12) **United States Patent**
Liu (10) **Patent No.:** **US 8,551,554 B2**
(45) **Date of Patent:** **Oct. 8, 2013**

(54) **APPLE PEEI POWDER, METHODS OF MARKING, AND USES THEREOF**
(75) **Inventor:** **Rui Hai Liu, Ithaca, NY (US)**
(73) **Assignor:** **Cornell Research Foundation, Inc., Ithaca, NY (US)**

(*) **Notice:** Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 1047 days.

(21) **App. No.:** **11/018,833**
(22) **Filed:** **Dec. 29, 2004**
(55) **Prior Publication Data**
US 2005/014723 A1 Jul. 7, 2005

Arad et al., "Flavonoid and Chlorogenic Acid Levels in Apple Fruit: Characterization of Varieties," *Sci. Hort.* 83:249-253 (2006).
Arad et al., "Effects of Light on Flavonoid and Chlorogenic Acid Levels in the Skin of 'Jonagold' Apples," *Sci. Hort.* 88:280-298 (2001).
Boschen et al., "Converting an Unconventional By-product into a Useful Product," *Food Technol.* 25:1108-1117 (1971).
Boyles et al., "Anthocyanin Composition of Red Raspberry Juice: Influence of Cultivar, Processing, and Environmental Factors," *J. Food Sci.* 76:1133-1141 (1995).
Bonds et al., "Phenolic Compounds and Their Changes in Apples During Maturation and Cold Storage," *J. Agric. Food Chem.* 38:945-948 (1990).
Delgado-Vargas et al., "Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40:173-209 (2000).
Demayo et al., "Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity," *J. Agric. Food Chem.* 59:3010-3014 (2002).

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 사항 없음.

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

제 1 절 연구실 안전관리 주요 현황

1. 연구실 안전관리 점검

| 번호 | 일정 | 항목 | 기관 |
|----|------------------|------------|-----------|
| 1 | 2015. 2. 24 ~ 25 | 상반기 작업환경측정 | 한국안전환경연구원 |
| 2 | 2015. 12. 10 | 하반기 작업환경측정 | 한국안전환경연구원 |
| 3 | 2015. 5. 22 | 상반기 특수건강검진 | 화****병원 |
| 4 | 2015. 12. 18 | 하반기 특수건강검진 | 화****병원 |
| 5 | 2015. 1 ~ 9 | 일반 건강검진 | 비*****무병원 |
| 6 | 2015. 5. 28 | 연구소 안전점검 | 미래창조과학부 |
| 7 | 2015. 5. 11 | 정밀안전진단 | 대한산업안전협회 |
| 8 | 2015. 9. 3 ~ 4 | 정기 점검 | 대한산업안전협회 |

제 2 절 연구실 안전관리 결과

1. 연구실 안전관리 현황

- 연구활동종사자 수 : 75명(상시 연구활동종사자 65명)
- 연구실 수 : 31실
- 안전관리 전담부서 : 연구기획팀
 - 산업안전보건법에 의한 안전관리 전문기관 위탁
 - 안전관리 담당자 : 조**
- 정기점검 및 정밀안전진단 실시 현황
 - 정기점검 : 미실시
 - 정밀안전진단 : 미실시

- 등급현황

| 구 분 | 2013년 | | | | | | 2014년 | | | | | |
|--------|-------|---|---|---|---|-----|-------|---|---|---|---|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 합 계 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 합 계 |
| 정기점검 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 정밀안전진단 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

○ 안전관리위원회 운영 횟수 : 미 실시

○ 연구실 안전교육(2014년 기준)

| 구 분 | 정기교육 | 신규교육 |
|------|---------------------|-------------------|
| 교육형태 | 집합교육 | 집합교육 |
| 교육시간 | 12시간 | 8시간 |
| 교육참여 | 78명 / 78명, 참여율 100% | 4명 / 4명, 참여율 100% |

○ 연구실 안전관리 예산 현황(단위 : 백만원)

| 2013년 | | | | 2014년 | | | |
|-------|--------|-------|----|-------|--------|-------|----|
| 기관자체 | 외부 연구비 | | | 기관자체 | 외부 연구비 | | |
| 안전관리비 | 인건비 | 안전관리비 | 비율 | 안전관리비 | 인건비 | 안전관리비 | 비율 |
| 204 | - | - | - | 72 | - | - | - |

○ 연구활동종사자 보험 가입 현황

- 산업재해보상보험법에 따른 보험가입

○ 연구활동종사자 건강검진('14년 기준)

- 일반건강검진 : 미 실시

- 특수건강검진 : 미 실시

○ 연구실 사고 현황(2014~현재)

- 없음

2. 상반기 작업환경 측정 실시

■ 산업안전보건법 시행규칙 [별지 제21호서식] <개정 2011.3.3>

작업환경측정 결과표(2015년도 상반기)

1. 사업장 개요

| | | | |
|------|--|--------|----------|
| 사업장명 | (주)한국아쿠르트중앙연구소 | 대표자 | 김혁수 |
| 소재지 | (446 - 901) 경기 용인시 기흥구 기흥단지24번길 22 (고매동) | | |
| 전화번호 | | 모사전송번호 | |
| 근로자수 | 82 | 업종 | 농학 연구개발업 |
| 주생산품 | 유제품연구 | | |

2. 작업환경측정 일시

가. 측정 기간 : 2015년 02월 24일 ~ 2015년 02월 25일 (2일간)

나. 측정 시간 : 08:37 ~ 16:19 (7 시간 42 분)

3. 작업환경측정자(분석자포함)

| 성명 | 자격종목 및 등급 | 자격등록번호 | 비고 |
|----|------------|--------|-----|
| 박 | 산업위생관리기사 | | 측정자 |
| 임 | 산업위생관리산업기사 | | 측정자 |
| 이 | 산업위생관리기사 | | 분석자 |
| 박 | 산업위생관리기사 | | 분석자 |

4. 지정한계 및 측정실적

| 지정측정기관명 | 지정한계 | 측정실시 사업장 일련번호(반기 기준) (총누적 / 5명이상 누적) |
|--------------|------|---|
| (주)한국안전환경연구원 | 380 | (26 / 26) |

5. 작업환경측정 결과 및 종합의견 : 불임

「산업안전보건법」 제42조제1항에 따라 작업환경을 측정하고 그 결과를 통지합니다.

2015년 03월 16일

(주)한국안전환경연구원



3. 상반기 특수 건강검진 실시 - 개인정보보호에 따라 첨부파일 미포함



병 원

문서번호 : 특검 제15- 416호

시행일자 : 2015. 09.30

수 신 : ㈜한국야쿠르트중앙연구소

참 조 : 건강검진 담당자님

| | | | |
|-----|------|---------------|--|
| 선 결 | | 지시 | |
| 접수 | 일자시간 | 결재 · 공람 | |
| | 번호 | | |
| 처리과 | | | |
| 담당자 | | | |

제 목 : 2015년도 특수 건강검진 결과표 및 사후관리 소견서

1. 귀 사(업체)의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 산업안전보건법 제43조에 의거 실시한 귀사 근로자의 건강진단 실시결과를 붙임과 같이 송부하오니 업무에 참고하시기 바랍니다.
3. 사업주보관용 결과는 산업안전보건법에 의거 05년간 보관하시기 바랍니다.
(발암성물질은 30년 보관)

※붙임:

1. 특수 건강검진 결과표 (1부)
2. 특수 건강검진 사후관리 소견서 (1부)끝.

화



병 원

4. 일반 건강검진 수검 - 개인정보보호에 따라 첨부파일 미포함

비 의



비에비스나무(기)제 15 - 120 호

2015. 09. 30

수 신 : 한국아쿠르트 중앙연구소

참 조 : 연구기획팀 조용민님

제 목 : 한국아쿠르트 중앙연구소 임직원 건강검진 수검 확인 및 수검 예정 일자 확인요청에 대한 회신

1. 귀 사의 무궁한 발전과 건승을 기원합니다.
2. 한국아쿠르트 중앙연구소 임직원 건강검진 수검 확인 및 수검 예정 일자 확인 요청에 대한 회신을

아래와 같이 통보 합니다.

3. 소화기전문 비에비스 나무병원은 향후에도 보다 나은 진료서비스를 제공하고자 노력해 나가겠습니다.

- 아 래 -

가. 검진일시 : 2015. 01. 01 ~ 2015. 09. 30

나. 검진인원 : 총 75 명

다. 검진내역 : 73명 수검 완료, 2명 수검 예정



5. 작업장 정밀 안전진단 및 정기점검 실시

"안전문화를 선도하는 최고의 종합안전컨설팅기관"



대한산업안전협회



수신자 (주)한국야쿠르트 대표이사

(경유) 안전업무담당자

제 목 (주)한국야쿠르트 연구실 정밀진단 및 정기점검 실시 확인

1. 귀 연구소의 무궁한 발전과 무재해를 기원합니다.

2. 연구실 정밀안전진단과 정기안전점검을 우리 협회에서 아래와 같이 실시하였음을 확인합니다.

| 구분 | 실시기관 | 일자 | 진단참여자 |
|--------|-------------|--------------------|-------|
| 정밀안전진단 | (사)대한산업안전협회 | 2015. 5. 11 (1일간) | |
| 정기안전점검 | (사)대한산업안전협회 | 2015. 9. 3-4 (2일간) | |

끝.

대한산업안전협회장



수신자

기안자 이주영 부장 배치우 본부장 김석진

협조자

시행 15-안전진단1부-0580(시행일자:2015.09.24)

접수

우 152-838 서울특별시 구로구 공원로 70 (대한산업안전협회 발당)

/ <http://www.safety.or.kr>

전화 02-860-7000

전송 02-859-4195

/ ijhjukki@safety.or.kr

/

10001004 / 152, 168, 1, 28 / 2018-01-22

6. 하반기 작업환경 측정 실시

■ 산업안전보건법 시행규칙 [별지 제21호서식] <개정 2011.3.3>

작업환경측정결과 결과표(2015년도 하반기)

1. 사업장 개요

| | | | |
|------|---|--------|---------------|
| 사업장명 | (주)한국아쿠르트중앙연구소 | 대표자 | 김혁수 |
| 소재지 | (446 - 901) 경기 용인시 기흥구 기흥단지로24번길 22 (고매동) | | |
| 전화번호 | 070-7835-5988 | 모사전송번호 | 031-8005-7831 |
| 근로자수 | 77 | 업종 | 농학 연구개발업 |
| 주생산품 | 유제품연구 | | |

2. 작업환경측정 일시

- 가. 측정 기간 : 2015년 12월 10일 ~ 2015년 12월 10일 (1일간)
- 나. 측정 시간 : 08:40 ~ 16:45 (8 시간 5 분)

3. 작업환경측정자(분석자포함)

| 성명 | 자격종목 및 등급 | 자격등록번호 | 비고 |
|----|-----------|--------|-----|
| 박 | 산업위생관리기사 | | 측정자 |
| 이 | 산업위생관리기사 | | 측정자 |
| 이 | 산업위생관리기사 | | 분석자 |
| 박 | 산업위생관리기사 | | 분석자 |

4. 지정한계 및 측정실적

| 지정측정기관명 | 지정한계 | 측정실시 사업장 일련번호(반기 기준) (총누적 / 5명이상 누적) |
|--------------|------|---|
| (주)한국안전환경연구원 | 380 | (71 / 69) |

5. 작업환경측정 결과 및 종합의견 : 불임

「산업안전보건법」 제42조제1항에 따라 작업환경을 측정하고 그 결과를 통지합니다.

2016년 01월 05일

(주)한국안전환경연구원



(사업주) (주)한국아쿠르트중앙연구소 귀하

7. 하반기 특수 건강검진 실시 - 개인정보보호에 따라 첨부파일 미포함

2015년 건강진단 실시 안내

♣ 검진일정 및 장소: (주)한국야쿠르트중앙연구소

| 건강검진 일자 | 검진장소 | 검진시간 |
|------------|------|----------|
| 2015.12.18 | 사내 | 08:30 시작 |

♣ 검진 대상 및 검진항목

- ◆ 일반건강진단 : 검진대상자에 대하여 기초검사,고혈압,고지혈증,간장질환
신장질환, 당뇨, 빈혈, 폐결핵, 기타 흉부질환등 22개항목 실시(전임직원)
- ◆ 특수건강진단 : 해당부서별 유해인자(소음,분진,중금속,유기용제등) - 작업환경측정결과서 참조.
- ◆ 생애전환기 : 만40세(1975년생), 만66세(1949년생)의 주민등록상 출생자
- ◆ 특정암검사 : 직장, 지역건강보험 가입자로 만40세 이상(단 동지역제외)
- ◆ 2차검진 : 1차검사결과 질환의심자 (질환별 정밀2차)재검사 실시

♣ 추가선택검사(본인부담)

| 추가검사항목 | 관 련 질 환 |
|--------|----------------------------------|
| 위 암 | 위, 식도, 십이지장의 종양(암),역류성 식도염 등 |
| 유방암 | 유방암, 낭종(물혹)등 |
| 혈액종합검사 | 혈액및 암,약성종양,갑상선,심근경색,통풍등 80여가지 항목 |

1. 위암(만 40세이상2년) 2.대장암(만 50세이상 1년)1차분변검사.3.유방암 (만 40세이상 여성)
4. 혈액종합검사 : 10만원 본인부담. 5.암검사(희망자),본인부담.

♣ 검진시 주의사항

1. 검사 3일 전 부터는 금주, 검진 전날오후 9시이후 부터는 음식을 삼가시기 바랍니다.

2. 검사 당일엔 절대 식사를 하지 마시고, 껌, 커피, 음료수등 검사에 영향을 미치는 음식은 정확한 검사를 위해서 절대 삼가 하십시오.(음식을 섭취시 검진 불가)

3. 평소 혈압 약을 드시던 분은 최소량의 물로 복용 하시면 됩니다.

4.임신 또는 임신의심되시는 분은 검진전 미리 말씀해 주시기 바랍니다.

문의사항 :

병원 종합검진센터

제 9 장 참고문헌

1. Bossy-Wefzel E. et. al. 2003. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:706-716.
2. Zong H, Ren JM, Young LH et al. 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in response to chronic energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25, 15983 - 15987.
3. Charles T. Putman et. al. 2003. AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fiber type transitions. *J. Physiol.* 551, 169-178.
4. Puigserver P. et. al. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 24(1):78-90.
5. Anil Kumar et al. 2011. Nitric oxide modulation in protective role of antidepressants against chronic fatigue syndrome in mice. *Indian J Pharmacol.* 43(4): 324-329
6. Niloofer Afari and Dedra Buchwald 2003. Chronic fatigue syndrome: a review. *Am. J. Psychiatry* 160: 221-236
7. Vanphawng Lalremruta and Gurunath S. Prassanna 2012. Evaluation of protective effect of *Aegle marmelos* Corr. in an animal model of chronic fatigue syndrome. *Indian J. Pharmacol.* 44(3): 351-356
8. Anil Kumar, Aditi Vashist and Puneet Kumar. 2010. Potential role of pioglitazone, caffeic acid and their combination against fatigue syndrome-induced behavioural, biochemical and mitochondrial alterations in mice *Inflam. pharmacol.* 18: 241-251
9. Joon-Young Park et al. 2009. p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content *Circ. Res.* 105: 705-712
10. Shuzhe Ding et al. 2012. Mild stress of caffeine increased mtDNA content in skeletal muscle cells: the interplay between Ca²⁺ transients and nitric oxide. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 33: 327-337
11. Carles Canto. et. al. 2010. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metabol.* 11, 213-219.
12. C. S. Na. et. al. 2013. The effects of *Hovenia dulcis* fruit hot water extracts on anti-fatigue and improvement of the exercise performance in SD rats. *J. Pharm. Soc. Korea.* 57(5). 348-356.
13. Richard C. Scarpulla. 2011. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1813. 1236-1278

14. H. C. Lee and Y. H. Wei. 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int. J. Biochem. and Cell Biol.* 37: 822-834.
15. Jackman RW, Kandarian SC. 2004. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol Cell Ph.* 287: C834-843.
16. Liu J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49: 57-68.
17. Liu J. 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J. Ethnopharmacol.* 10:92-94.
18. Jager S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. 2009. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules.* 14:2016-2031.
19. Frighetto RTS, Welendorf RM, Nigro EN, Frighetto N, Siani AC. 2008. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chem.* 106:767-771.
20. Wilkinson K, Boyd JD, Glicksman M, Moore KJ, El Khoury J. 2011. A high content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid beta protein interactions with its receptor CD36. *J. Biol. Chem.* 286:34914-34922.
21. De Angel RE, Smith SM, Glickman RD, Perkins SN, Hursting SD. 2010. Antitumor effects of ursolic acid in a mouse model of postmenopausal breast cancer. *Nutr. Cancer* 62:1074-1086.
22. Kim DK, Baek JH, Kang CM, et al. 2000. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int. J. Cancer.* 87:629-636.
23. Pinon A, Limami Y, Micallef L, et al. 2011. A novel form of melanoma apoptosis resistance: melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death. *Exp. Cell Res.* 317:1669-1676.
24. Jayaprakasam B, Olson LK, Schutzki RE, Tai MH, Nair MG. 2006. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *J. Agr. Food Chem.* 54:243-248.
25. Zhang W, Hong D, Zhou Y, et al. 2006. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochim. Biophys. Acta.* 1760:1505-1512.
26. Kunkel SD, Suneja M, Ebert SM, et al. 2011. mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell Metab.* 13:627-638.

27. Wolfe KL, Liu RH. 2003. Apple peels as a value-added food ingredient. *J. Agr. Food Chem.* 51:1676-1683.
28. Gorinstein S, Martin-Belloso O, Lojek A, et al. 2002. Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. *J. Sci. Food Agr.* 82:1166-1170.
29. Schieber A, Hilt P, Streker P, Endreß H-U, Rentschler C, Carle R. 2003. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innov. Food Sci. Emerg.* 4:99-107.
30. Belding RD, Blankenship SM, Young E, Leidy RB. 1998. Composition and Variability of Epicuticular Waxes in Apple Cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123:348-356.
31. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 alpha. *Cell.* 127:1109-1122.
32. Narkar VA, Downes M, Yu RT, et al. 2008. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell.* 134:405-415.
33. Pette D, Staron RS. 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Techniq.* 50:500-509.
34. Baar K, Wende AR, Jones TE, et al. 2002. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB. J.* 16:1879-1886.
35. Irrcher I, Adhietty PJ, Sheehan T, Joseph AM, Hood DA. 2003. PPARgamma coactivator-1 alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am. J. Physiol-Cell Ph.* 284:C1669-1677.
36. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. 2003. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 546:851-858.
37. Musaro A, McCullagh K, Paul A, et al. 2001. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* 27:195-200.
38. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, et al. 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* 3:1009-1013.
39. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, et al. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 3:1014-1019.
40. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:14440-14445.

41. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 294:1704–1708.
42. Kunkel SD, Elmore CJ, Bongers KS, et al. 2012. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLOS One*. 7:e39332.
43. Kimura Y, Sumiyoshi M. 2004. Effects of various *Eleutherococcus senticosus* cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice. *J. Ethnopharmacol*. 95:447–453.
44. Calders P, Matthys D, Derave W, Pannier JL. 1999. Effect of branched-chain amino acids (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. *Med. Sci. Sport Exer*. 31:583–587.
45. Cairns SP. 2006. Lactic acid and exercise performance : culprit or friend? *Sports Med*. 36:279–291.
46. Anderson FH, Zeng L, Rock NR, Yoshida EM. 2000. An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. *Hepatol. Res*. 18:63–71.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

첨부: 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

1. 본 연구와 관련된 기술의 국내외 수준 비교

| 기술명 | 관련기술 최고보유국 | 현재 기술수준 | | 기술개발 목표수준 | 비고 |
|------------|---------------|----------------|-----------------|--------------|----|
| | | 우리나라 관련기술수준 | 연구사업단 보유기술수준 | | |
| 근육강화 제품 개발 | 미국 | 20 | 70 | 95 | |
| 근육강화 제품 제조 | 미국 | 20 | 75 | 95 | |

- 1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
- 2) 현재 기술수준은 세계최고수준을 100%으로 할 때 우리나라 및 신청한 연구사업단의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 연구사업단 종료시의 기술수준을 세계최고수준(100%) 대비 목표로 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허조사분석

가. 특허조사분석 범위

| | |
|------|---------------------------------------|
| 대상국가 | 국내, 국외(미국, 일본, 유럽) |
| 특허DB | 특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB |
| 검색기간 | 최근 5년간 |
| 검색범위 | 제목 및 초록 |

※ 특허조사 분석시 활용하였던 특허정보이용과 관련된 내용을 기재

나. 특허 조사 분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

| 기술명 | 사과껍질 활용 | phytochemical 추출 | 근력강화 기능성 식품 제조 |
|---------------|--------------------------|---|--|
| Keyword | apple peel, apple pomace | ursolic acid | muscle power |
| 검색건수 | 362 | 256 | 130 |
| 유효특허건수 | 86 | 129 | 18 |
| 핵심특허 및 관련성 | 특허명 | 사과찌꺼기로부터 폴리페놀 함유 추출물을 제조하는 방법 | ursolic acid와 oleanolic acid 배합비율 |
| | 보유국 | 대한민국 | 네덜란드 |
| | 등록년도 | 2010 | 2006 |
| | 관련성(%) | 30 | 40 |
| | 유사점 | 없음 | 없음 |
| | 차이점 | <ul style="list-style-type: none"> • 사과찌꺼기를 열처리 후, 효소 처리, 용매 추출 공정을 통해 사과찌꺼기로부터 폴리페놀 함유 추출물을 제조하는 방법에 관한 특허로 본 과제에서 수행하는 추출 방법과 큰 차이가 있음 • 본과제의 추출방법은 이보다 더욱 단순하고 빠르게 고효율로 추출하는 방법을 사용할 예정임 | 카카오 버터로부터 ursolic acid 및 oleanolic acid를 추출하여 이를 체중감소용 식품조성물로 만드는 방법에 관한 특허임 |

1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재

- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 연구사업단 관련기술과 관련성이 높은 특허를 의미
- 3) 기존특허는 검색된 특허중 연구사업단 관련기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 상위 3개 특허를 기준으로 작성

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

| | |
|-------|--|
| 대상국가 | 미국, 일본, 유럽 |
| 논문 DB | Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr) |
| 검색기간 | 최근 5년간 |
| 검색범위 | 제목, 초록 및 키워드 |

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

| 기술명 | | 사과껍질 활용 | phytochemical 추출 | 근력강화 기능성 식품 제조 |
|---------------|--------|--|---|---|
| Keyword | | apple peel | apple peel phytochemical | muscle power |
| 검색건수 | | 294 | 3 | 1293 |
| 유효논문건수 | | 15 | 1 | 30 |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | Influence of triterpenoids present in apple peel on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel disease (IBD). | Apple peels as a value-added food ingredient. | Novel intriguing strategies attenuating to sarcopenia. |
| | 학술지명 | Food Chemistry | J Agric Food Chem. | J Aging Res |
| | 저자 | Mueller D, Triebel S, Rudakovski O, Richling E. | Wolfe KL, Liu RH. | Sakuma K, Yamaguchi A |
| | 게재년도 | 2013 | 2003 | 2012 |
| | 관련성(%) | 30 | 80 | 80 |
| | 유사점 | 사과껍질에 존재하는 triterpenoid의 활용 | 식품 첨가물로 사과껍질의 유용성에 관한 리뷰논문 | 노화에 의한 근육감소증을 지연시키기 위한 새로운 방법 제시 |
| | 차이점 | 사과껍질에 존재하는 triterpenoid에 의한 염증성 장질환 관련 유전자 발현 분석에 관한 논문으로 본 과제의 근력강화 기작과 연관 관계가 없음 | phenolic compound 의한 항산화 효과로 암, 심혈관계질환 등의 만성질환에 효과적인 식품 첨가제로 사과껍질이 이용 가능함을 확인 시켜줌. 리뷰논문으로 사과껍질의 유용성에 초점 | 근육감소증을 예방하기 위한 새로운 방법중의 하나로 본 과제에서 목표로 하는 phytochemical의 효과에 대해 일부 기술하고 있는 리뷰 논문임 |

- 1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 연구사업단 관련기술과 관련성이 높은 논문을 의미
- 3) 기존논문은 검색된 논문 중 연구사업단 관련기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 상위 3개 논문을 기준으로 작

4. 제품 및 시장 분석 ※ 최근의 자료를 기초로 작성하되, 각 내용별로 반드시 출처 명시

가. 생산 및 시장현황

- 근육 기능 관련 시장은 크게 노화에 의한 근육 소실 예방 및 질병에 의한 근육 소실 이외에 헬스등의 목적을 위한 근육 강화 일반 식품으로 크게 나누어 질수 있다. 이중 가장 큰 규모는 노화에 의한 근육 소실 예방이 가장 크다고 할 수 있음.
- 따라서 본 과제의 근육 강화 소재 개발의 시장 규모는 노화에 의한 근육 소실예방을 주요 기능성으로 시장 규모를 예측 하고자 함

1) 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 국내 건강기능식품 시장은 2005년 판매액은 6,825억원, 2006년 7,008억원, 2007년 7,234억 원으로 나타났으며 특히 2007년 판매액은 2006년 대비 약 3.2% 증가한 것으로 보고되었음(식품의약품안전청, 2008)
- 농산물 건강기능식품 중 홍삼제품, 인삼제품, 개별인정형제품 등이 지속적으로 성장하고 있음. 개별인정형 건강기능식품 시장은 2005년 82억5000만원, 2006년 89억원, 2007년 264억 1000만원 규모로 나타났으며 특히 2007년은 전년 대비 약 297% 증가한 것으로 나타났음(식품의약품안전청, 2008)
- 현재 국내 근 기능 기능성 식품은 칼슘, 마그네슘, 단백질이 신경과 근육 유지에 도움을 주는 것을 기능성으로 제시한 다양한 제품이 출시 되고 있다. 옥타코사놀은 근지구력 개선을 기능성으로 제시한 고시형 원료로 승인되어 있고 다양한 건강기능식품으로 판매되고 있다. 또한 크레아틴의 경우 근력운동시 운동기능 향상에 도움을 줄수 있다는 기능성을 인정 받았으며, 최근 동충하초 추출물이 지구력 증진에 관한 기능성을 인정 받은바 있다. 이들 제품의 제형은 캡셀 형태가 주된 형태이며 액상, 타블렛, 환의 형태로도 시판되고 있음.



국내 바이오 식품 산업의 수요도 조사(출처: 바이오푸드 네트워크 사업단)

- 2008년 대한 임상건강증진학회 추계학술대회에서 서강대 최대혁 교수의 연구 결과에 의하면 아미노산과 크레아틴의 경우 근육 강화 기능성이 매우 미약하다고 보고하였다. 따라서 현재까지 근육 강화에 의한 근지구력 향상에 관한 건강 기능성 식품은 거의 전무 하다고 할 수 있다.
- 또한 최근 식품의약품안전청은 해외 인터넷 등을 통해 판매되는 근육강화를 표방하는 제품에 대하여 지난 3월부터 4월까지 집중 검사한 결과, 19개 제품에서 식품에 사용이 금지된 '실데나필류', '요힘빈', '이카린', '시부트라민' 등이 검출되었다고 밝혔다.

| 기능성표방 | 유해물질 <실데나필류, 요힘빈, 이카린, 시부트라민> 검출현황 |
|-----------|---|
| 근육강화 표방제품 | '5-Tetra' 등 3개 제품 중 2개 제품에서 이카린이 1캡슐(정) 당 0.3mg 씩 검출되었고, 1개 제품에서 요힘빈이 1정 당 0.9mg 검출 |

- 칼슘 보충용 시장의 경우 소비자에게 높은 인지도를 바탕으로 대부분의 업체에서 출시하는 품목으로써 칼슘제의 시장 규모는 2007년 150억원 규모로 매년 약 10%의 성장을 달성하고 있다. 옥타코사놀의 경우 2006년에 CJ제일제당을 비롯한 15개의 업체에서 품목제조 신고를 획득하였다. 크레아틴의 경우 주로 스포츠 음료의 형태로 스포츠용 보조식품으로 소비되며 200년 약 20조의 시장 규모에 육박하면서 국내에서도 기대를 모으고 있는 것으로 알려짐.

2) 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

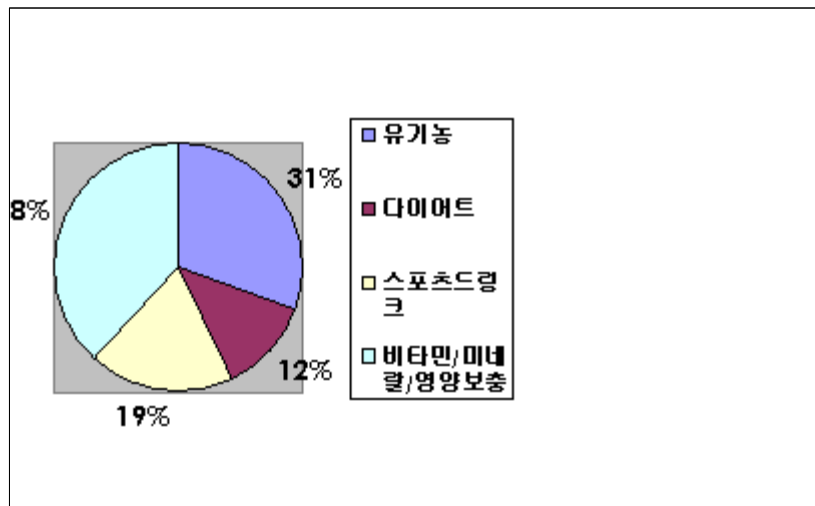
- 2005년 기준, 미국 기능성 식품 시장규모는 약 41억 달러로써 2000년에 비해 약 80% 이상의 성장을 보였으며 작년(2004)에 비해 8% 증가했음.
- 최근 시장조사 전문 기업인 Freedonia Group에 의하면, 미국 시장의 경우 노화방지 제품 및 서비스 시장은 2004년 이미 455억 달러 규모에 이르고 있으며, 향후 연평균 9.5%씩 성장하여 2009년에는 720억 달러로 확대될 전망이다.(LG 경제연구소)

품목군별 미국의 건강기능식품시장 매출현황

(단위: 백만불)

| | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009e | 2010e |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Supplements | 9,366 | 10,078 | 11,214 | 11,640 | 11,185 | 10,778 | 10,423 | 10,645 | 10,889 |
| Natural& Organic Foods | 2,328 | 2,607 | 2,946 | 3,300 | 3,795 | 4,478 | 5,598 | 7,277 | 9,460 |
| Functional Food | 14,790 | 16,417 | 16,417 | 17,895 | 19,058 | 18,724 | 18,911 | 18,343 | 17,977 |
| N&OPC& Household Products | 2,340 | 2,422 | 2,543 | 2,695 | 2,884 | 3,086 | 3,333 | 3,599 | 3,887 |
| 합계 | 28,824 | 31,525 | 34,598 | 36,694 | 37,303 | 37,066 | 38,264 | 39,343 | 42,213 |

자료: NBJ(Nutrition Business Journal), 2010



(출처: KOTRA 미국 건강 기능성 식품 분석 보고서, EUROMONITOR)

나. 연구사업단 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과

1) 산업화.제품화 계획(제품의 특징, 대상 등)

- 개발 대상 소재 및 이를 기반한 제품은 근육 소실의 억제 및 근육 강화의 기능성을 특징으로 한다. 또한 인공적 합성 원료가 아니라 천연물, 특히 일상적으로 널리 섭취되어 온 사과를 그 기원으로 하기에 소재에 대한 거부감이 매우 낮다. 그리고 폐기되던 원료의 재활용이기에 자원 활용 측면에서도 매우 긍정적이다.
- 위와 같은 특징을 기초로 하여 다음과 같은 산업화의 방향을 생각해 볼 수 있다. 먼저 소재의 가장 중요한 특징인 근육 관련 기능성의 활용에 있어서 다양한 기능성 음료, 건강 기능성 식품의 개발을 목표로 한다. 그리고 이러한 점은 기존 유사 기능성 소재들과의 복합을 통한 시너지 효과를 지닌 제품과 나아가서는 노년기 건강 보조식, 해당 질병 환자 특수식으로 확장될 수 있다. 또 본 소재의 특징을 활용하여 다이어트식에 있어서도 활용이 가능한데, 다이어트에 있어서 체지방 감소를 목표로 하지만 근육 소실이 함께 나타나는 부작용이 있는데 본 소재는 이러한 경우에도 매우 효과적인 보완제가 될 것으로 사료된다. 둘째로 천연원료라는 점을 바탕으로 합성품에 대한 반감을 가진 소비자층과 고급화된 기능성

소재를 구매하는 계층에게 어필하는 차별화된 제품군을 개발할 수 있으리라 여겨진다. 여기에는 사과박 추출물이 가지는 부가적 건강 기능성 성분들의 존재와 이들의 기능성에 대한 연구가 수반되어야 할 것이다. 셋째로 국내 사과 부산물의 자원 활용 효과 뿐 아니라, 기술을 현지화하여 사과를 다량으로 재배하고 그래서 부산물이 매우 다량 생성되는 미국이나 중국 등 다량의 과수 폐기물이 생성되는 국가에 소재 개발 기술의 수출 또한 중장기적 산업화의 한 축이 될 수 있다. 소재 자체의 개발과 수출 뿐만 아니라 합작 기업 설립, 기술 수출 등 다양한 시도가 가능하며 이를 통한 국의선양의 효과 또한 기대된다.

- 이상과 같은 산업화는 식품 전반에 대한 이해와 해당 소재 개발 노하우 및 이를 활용한 시장 마케팅 역량 등 다양한 기업 역량을 요구한다. 당사 및 당사의 중앙연구소는 이와 같은 분야에 대한 기반 역량을 지니고 있으며, 이의 확대 적용을 위한 네트워크를 보유하고 있어 이 같은 산업화에 매우 유리한 위치를 점하고 있다.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

| 항 목 \ 산업화 기준 | 1차년도 | 2차년도 | 3차년도 | 4차년도 | 5차년도 | 계 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 직접 경제효과 | 500 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 4,500 |
| 경제적 파급효과 | 1,000 | 1,000 | 1,500 | 1,500 | 1,500 | 6,500 |
| 부가가치 창출액 | 2,000 | 4,000 | 4,000 | 4,000 | 4,000 | 18,000 |
| 합계 | 3,500 | 6,000 | 6,500 | 6,500 | 6,500 | 29,000 |

- * 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- * 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- * 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석결과 및 연구사업단 사업내에서의 활용

가. 특허분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 기존 특허는 사과껍질의 phenolic compound를 활용한 항암등의 의약품 치료제, 화장품 조성물, pectin, 식이섬유 추출 분야에 집중되어 있으며, 사과껍질내의 기능성 성분에 관한 내용은 주로 추출 방법등의 제조/가공분야에 국한되고 있었으나 최근 저산패라면 개발 등과 같은 다양한 식품 첨가물 응용 분야로 확대되고 있다. 그러나 아직 유효 사과껍질 추출물에 대한 건강기능성 식품으로서의 가능성과 제품생산에 대한 내용을 포괄적으로 포함하고 있는 특허물은 부족하다고 보여지므로 이러한 방향으로 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임.
- 본 연구에서 제시한 근력강화 활성 물질을 함유한 기능성 식품 개발과 이의 임상 적용은 현재 관련성이 높게 확인되는 특허가 없어 발명 시에 특허성 확보가 가능할 것으로 생각됨.

나. 논문분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 최근 phytochemical 관련 논문의 경향성을 보면 phytochemical의 면역활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다양한 부위에서 유발되는 종양의 빈도를 감소시킨다는 연구 결과를 내보이고 있다. 그러나 대부분 약용식물에 존재하는 phytochemical dp 관련된 내용이 대부분으로 herb 및 과수작물에 관련된 연구의 내용은 미비하며 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히, 논문의 검색 결과 사과껍질내의 phytochemical에 의한 함암, 항염증, 피부보습기능향상 등에서의 역할이나 효능에 관련된 정보들에 대한 내용은 있지만 본 연구와 직접적으로 연결되는 논문은 적게 발견이 되는 것으로 보아 이 분야와 관련되어 좀 더 깊고 포괄적인 연구가 요구됨.
- 본 연구는 기존 논문들을 바탕으로 좀 더 다양한 연구를 수행함으로써 현재 발견된 사과껍질의 phytochemical에 의한 항염증등의 면역반응 과는 다른 근력강화 기능성을 제시함으로써 노화 혹은 질병등으로 인한 근육감소 및 근육소실등에 대한 도움이 될 수 있는 방향으로의 타겟의 확립과 임상 적용이 가능한 물질의 발견을 위한 방향으로 연구를 추진하여 관련논문 등을 SCI급 학술지 등에 게재할 계획임.

다. 제품.시장분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 국내 및 국외시장 분석결과 근력강화 관련 제품은 주로 운동기능 향상 및 근지구력 강화를 목적으로 섭취와 보관이 쉬운 음료나 분말 등과 같은 형태로 건강식품보조제품 품목으로의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 대부분 효과면에서 큰 효과를 나타내지 못하고 있고 현재 대부분의 원료물질을 수입에 의존하고 있으며, 대표적인 운동기능 향상 기능성 원료인 Creatine의 합성에 의해 생산되는 등 천연물을 이용한 근력강화 제품은 현재 전무한 상태라 볼수 있다. 더불어 최근 많은 연구자와 관련 업체들은 근육강화등의 근육자체를 키우는 제품을 목적으로 한 연구를 진행하고 있지만 국내 개발 원료 및 제품은 동충하초 발효 추출물이 유일하나 인체 적용시험결과가 매우 미흡한 것으로 알려져있다. 따라서 본 연구개발사업에 의해 사과가공부산물의 phytochemical(Ursolic acid)을 활용한 근력강화 원료 소재 확보 및 제품 개발이 성공 할 경우 원료 및 제품 국산화 및 수출등에 의한 상당한 부가가치를 발생 할수 있을것으로 판단됨.
- 그러므로 브랜드 밸류를 갖춘 본 기업과 지역농협 과채가공공장의 협업을 통하여 본 연구에서 지향하고자 하는 사과가공 부산물을 활용한 근력강화 기능성 식품 소재 개발 및 응용제품 개발이 성공적으로 수행하여 이의 상용화가 이루어진다면 지역농협 조합원 및 과수 재배 농가의 소득 창출과 근력강화 제품의 신시장 창출이 가능하리라 생각됨.