

최 중
연구보고서

농산자원 이용 미생물 복합발효
배양액의 oxidative stress억제관련 생리
활성적 특성규명과 산업화 이용 연구

Studies on the Industrial Utilization and
Physiological Characterization Searching
Involved Oxidative Stress Inhibition of
Complex Strains Culture broth Using the
Agricultural Resources

연 구 기 관
경 북 과 학 대 학

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농산자원 이용 미생물 복합발효 배양액의 oxidative stress억제 관련 생리 활성적 특성규명과 산업화이용 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 경북과학대학
총괄연구책임자 : 김 성 호
세부연구책임자 : 이 유 순
연 구 원 : 이 진 만
연 구 원 : 문 철 호
연 구 원 : 김 중 현
연 구 원 : 김 인 호
협동연구기관명 : 계명대학교
협동연구책임자 : 최 미 자
연 구 원 : 김 현 수
연 구 원 : 조 현 주

요 약 문

I. 제 목

농산자원 이용 미생물 복합발효 배양액의 oxidative stress억제관련 생리 활성적 특성규명과 산업화이용연구에 관한 연구

제 1 세부과제 : 미생물 복합발효에 의한 항산화성 생리활성물질의 생산 특성

제 2 세부과제 : 미생물 복합발효 배양물의 피부 적용성과 화장품 제품개발

협동 연구과제 : 미생물 복합발효 배양물의 항산화성 생리 활성적 특성 검증

II. 연구개발의 목적 및 필요성

생체 내에는 free radical과 유해활성산소를 제거할 수 있는 다양한 항산화제가 존재하여 항상성을 유지한다. 즉, catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathion peroxidase(GSH-Px), glutathione reductase, glutathione-s-transferase(GST)등이 생체내 항산화 효소계로 알려져 있다. 그러나 생체내 효소적 항산화제만으로는 생성되는 free radical을 효율적으로 소거하기 어려우므로 비효소적인 항산화제를 투여하여 free radical의 소거활성을 높일 필요가 있다.

합성 항산화제는 가격이 싸고 효과가 탁월하여 식품가공, 의약 및 화장품등에 널리 이용되고 있으나 안전성에 문제가 있고 소비자의 거부감도 함께 심해지고 있다. 천연물 항산화물질의 효능이 알려져 있어도 상업적 생산에 대한 연구가 수반되지 않는 경우가 많아 산업적으로 무의미 한 경우가 많다. 고추출 수율, 정제의 단순화 등에 대한 연구도 수행되어 원가절감으로 가격 경쟁력이 우선적으로 고려되어야 한다.

최근 만성질환과 성인병이 증가하면서 질병의 예방과 노화의 지연에 대한 관심이 고조되고 있다. 이미 질병을 앓고 있는 사람은 약물의 섭취는 부작용이 많고 또한 건강한 사람은 예방의 차원에서 기능성 식품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있

다. 발효식품은 발효과정 동안에 인체에 유익한 물질이 생성되기도 하는데 곡류나 야채의 미생물 발효 배양액은 여러 가지 비타민과 항산화물질이 있다고 알려져 있다. 그러나 이들을 복합적으로 배양할 경우 발효과정 중에 생성되는 물질이나 그 효과에 대하여 연구가 미진하며 특히 미생물 복합 발효배양 물질은 여러 가지 생리활성 물질이 상승하리라 유추되나 검증된 결과는 아직 없다. 따라서 항산화 기능을 가지고 있을 것으로 추정되는 미생물 복합발효 배양액이 생리적 활성에 미치는 영향과 또한 섭취 수준별 효과를 알아보는 것은 매우 의미가 있다고 사료된다.

본 연구에서는 무독성의 천연 농산물에 본 연구진들이 우리나라 전통 발효식품 등에서 분리한 다양한 미생물의 복합발효 배양으로 항산화성이 강한 대사성의 물질을 유도하고 원료의 수급이나 계절적 영향이 없이 발효에 의한 항산화물의 대량 생산화를 유도하고 그에 따른 제품화 및 산업화를 위한 기반구축 연구로서 무독성 소재 개발, 기능적 효능의 검정과 응용제품화를 시도하는 것을 최종 목표로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제 1 세부과제 : 미생물 복합발효에 의한 항산화성 생리활성물질의 생산 특성

- 각 단일균주 배양물의 항산화능 검정 비교
- 균주조합과 혼합균주 배양물의 항산화능 검정
- 농산물 부원료의 첨가 항산화 활성능 비교
- 항산화 물질분비 유전자선발을 위한 돌연변이선발
- 발효배양물의 항산화 활성물질 생산 최적발효조건 설정
- 순차별 용매 추출물의 분리
- 분획추출액의 항산화 활성 검증
- 항산화성 물질 분리 및 유효성 실증실험
- 항산화 물질분비 유전자(단일균주) 선발
- SRB assay에 의한 세포독성 측정
- Trypan blue exclusion assay에 의한 세포생육저해시험
- 항산화 물질분비 유전자 cloning 연구

제 2 세부과제 : 미생물 복합발효 배양물의 피부 적용성과 화장품 제품개발

- 인체평가 시험법 연구

- 피부에 대한 독성 및 자극성 연구
- 선택적 피부흡수 시스템에 의한 유용성분의 안정화 기술 연구 및 사용 편의성 제형 연구
- 보존시험에 의한 rheology 평가 연구
- 인체평가 시험법 연구
- in vitro 효능 평가
- in vivo 효능 평가
- 피부에 대한 독성 및 자극성 연구
- 선택적 피부흡수 시스템에 의한 유용성분의 안정화 기술 연구 및 사용 편의성 제형 연구
- 보존시험에 의한 rheology 평가 연구
- 인체평가를 통한 미백효과 평가 연구
- in vitro 및 in vivo 효능 평가
- 피부에 대한 독성 및 자극성 연구
- 선택적 피부흡수 시스템에 의한 유용성분의 안정화 기술 연구 및 사용 편의성 제형 연구
- 보존시험에 의한 rheology 평가 연구
- 제품화 연구(시제품제작)

협동 연구과제 : 미생물 복합발효 배양물의 항산화성 생리 활성적 특성 검증

- 혈장 및 간조직의 지질 함량 검사
- 혈액과 간의 지질과산화물 함량검사
- 간조직의 항산화계 효소활성 검사
- 당뇨 유발 흰쥐의 혈장 및 간조직의 지질함량 조사
- 당뇨 유발 흰쥐의 간의 유해활성산소제거 효소 측정
- 당뇨 유발 흰쥐의 혈장의 혈당 강하 효과
- 당뇨 유발 흰쥐의 혈 중 인슐린 함량 검사
- 당뇨 유발 흰쥐의 뇨 중 아미노산 함량 분석
- 당뇨 유발 흰쥐의 혈장 및 간조직의 지질측정
- 당뇨 유발 흰쥐의 혈액과 간조직의 항산화계 효소활성 검사
- 당뇨 유발 흰쥐의 혈장의 혈당 강하 효과

- 당뇨 유발 흰쥐의 혈장 인슐린 함량 검사
- 당뇨 유발 흰쥐의 뇨 중 아미노산 함량 분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1세부과제 : 미생물 복합발효에 의한 항산화성 생리활성물질의 생산 특성

미생물 복합발효에 의한 항산화성 물질의 생산 특성을 조사하기 위하여 발효식품 등에서 항산화 활성이 우수한 균주를 최종 4종을 분리하였다. 이들을 조합하여 발효특성에 따른 혼합균주를 *Bacillus* B6, *Acetobacter* A6 및 *Saccharomyces* S1의 3종을 혼합발효한 배양물이 높은 항산화 활성이 나타났다. 이들 균주를 이용한 배양물의 특성을 조사한 결과 당밀 2%, 쌀추출물 0.5 °brix 및 부원료로 미강추출물 5%를 첨가한 배양물이 우수한 항산화 활성이 나타났다.

항산화력이 높은 발효조건을 설정하기 위하여 발효액 및 배양조건별 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능에 대한 발효특성을 조사하고 이들 값의 반응표면을 superimposing하여 최적 발효액 조건 범위를 예측한 결과 발효액의 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능이 모두 만족하는 범위는 당밀 첨가량 1.8~2.2%, 미강 첨가량 2.1~2.4% 및 탈지대두박 첨가량 1.9~2.4%로 나타났고 최적 발효조건의 범위는 발효온도 25~35℃, 발효시간 10~14일, 발효초기 pH 5.5~7.5이었다. 그리하여 이로부터 최적점이라고 예상되는 발효온도 30℃, 발효시간 12일, 발효초기 pH 6.5를 최적의 발효조건으로 예측되었다.

배양액의 용매 분획물의 항산화적 특성을 조사한 결과 총 페놀 화합물 함량은 methanol/water 분획이 117.50 mg%으로서 가장 높은 함량이었다. 아질산염소거능 측정결과 methanol/water 분획과 n-butanol분획에서 각각 94.81%, 92.61%의 높은 활성을 나타내었다. DPPH법 및 DMPD법에 의한 배양액의 전자공여능 실험결과 methanol/water 분획에서 각각 96.53%, 및 73.07%으로 가장 높은 활성을 나타내었다.

발효액 추출물 및 중성 페놀물질과 산성 페놀물질을 분획하여 C₁₈ reverse phase HPLC 분석 및 TLC에서 분리를 행한 결과 발효액에서의 phenolic acid는 중성획분에서 추출되며, 주요 페놀 성분은 ferulic acid와 sinapic acid로 밝혀졌다.

발효액으로부터 추출한 추출물의 중성 획분과 산성 획분의 총 페놀성 화합물, 아질산염 소거능 및 전자공여능을 측정된 결과 아질산염 소거능은 각각 98.29%,

89.29%로 강한 활성을 나타내었고, 총 페놀성 화합물 함량은 중성 획분에서 월등히 높은 함량(141.75 mg%)을 보였다. 전자공여능은 DPPH법의 경우 중성획분에서 97.70%의 높은 활성을 나타냈으며, DMPD 법에서도 중성획분의 전자공여능 활성이 가장 좋았다. 발효액의 전자공여능은 중성획분이 산성획분 보다 항산화 효과가 훨씬 큰 것으로 나타났다.

발효배양액의 수용성 갈변물질 중 투석내액 물질 및 DEAE-cellulose 칼럼 분획들의 항산화력을 측정된 결과 투석 외액물질 및 DEAE-cellulose 칼럼 분획들의 항산화능은 투석 내액물질 보다 높은 활성을 보였으며, 투석 외액물질은 DPPH radical 소거능이 92.25%, 총 페놀성 화합물 함량 289.50 mg%로 상당히 높은 값을 보였다. DEAE-cellulose 칼럼 분획 중 0.01M 초산 완충액에서 전자공여능(DPPH radical 소거능)이 81.32%로 높은 활성을 나타내어 0.01M 초산완충 분획에서 항산화능을 가진 수용성 갈변물질이 분리되는 것으로 보였다.

수용성 갈변물질 구분의 투석 내액물질 구분과 투석 외액물질 구분을 DEAE-cellulose 칼럼으로 분획하고 각 분획분으로 박층 크로마토그래피를 실시한 결과 투석 내액물질 구분의 분리에서는 0.02 M HCl 분획분으로부터 Rf치 0.2와 0.35의 2개 구분으로 분리되었으며, 투석 외액물질 구분의 분리에서는 0.01 M AcOH용액 분획분으로부터 Rf치 0.28과 0.45의 2개의 구분이 각각 분리되었다.

최종 선별된 9종의 변이균주를 대상으로 한 항산화 활성을 비교한 결과 전자공여능(DPPH, DMPD, ABTS radical 소거능) 및 아질산염 소거능 활성에서 M1 변이주인 경우 모든 항산화 활성이 모균주보다 높은 것으로 나타나 모균주 및 변이주 M1을 대상으로 primer를 제작하고 항산화성 물질 합성에 관여하는 유전자 단편을 클로닝 하였다.

SRB assay를 통한 암세포 성장억제효과의 검사에서 6가지 시료추출물 중 ether fraction, chloroform fraction과 ethylacetate fraction은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 암세포 성장을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 3 시료 ether fraction, chloroform fraction과 ethylacetate fraction 3시료에 대하여 Trypan blue exclusion assay를 통한 암세포 성장 억제효과를 확인한 결과 시료의 농도가 증가 할수록 사멸한 세포의 수가 증가하였으며, 생존 세포의 수도 대조군에 비하여 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 시료 추출물 ether fraction, chloroform fraction과 ethylacetate fraction IC₅₀ 각각의 값은 0.84±0.079, 0.94±0.017, 0.8±0.03으로 나타났다.

제 2세부과제 : 미생물 복합발효 배양물의 피부 적용성과 화장품 제품개발

미생물 복합 발효 배양액의 인체에 대한 세포 독성 및 피부 1차 자극성 평가, 피부 감작성 평가를 관찰한 결과, 세포 독성은 SLS에 비하여 2,000배 이상 세포 독성이 낮은 것으로 관찰되었으며, 피부 감작성 평가에서는 증폭 정도(SI)가 3이하로서 알려지 유발 가능성이 없는 것으로 관찰되었다. 또한 CTFA 가이드라인에 따라 실시한 인체접촉 시험은 미생물 복합 발효 배양액 5%(v/v)의 인체 도포시 자극이 없는 안전한 원료인 것으로 관찰되었다.

미생물 복합 발효 배양액의 피부 각질제거 효과를 관찰한 결과, 약 32.1%의 각질제거 효과가 있는 것으로 관찰되었으며, 피부 보습력 평가에서는 화장품 제조시 보습제로 많이 사용되고 있는 glycerin, 1,3-butylene glycol, propylene glycol과 거의 유사한 보습력을 가지는 것으로 관찰되었다

미생물 복합 발효 배양액의 항산화 작용에 의한 피부 주름개선 효과 즉, 자유라디칼 소거 활성화 및 세포 활성화, 콜라겐 합성, 엘라스타제 활성 저해 효과, UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과에 대해 배양 전 시료와 비교 관찰해 본 결과, 자유라디칼 소거 활성화능은 약 9배 가량 우수한 것으로 관찰되었으며, 세포활성화능은 약 12배, 콜라겐 합성능은 약 6배 가량 우수한 것으로 관찰되었다.

미생물 복합 발효 배양액의 피부 미백 효과에 대해 관찰한 결과, 약 68%의 tyrosinase 활성 저해율이 관찰되었고 66.9%의 L-DOPA 자동산화억제 효과를 가지고 있는 것으로 관찰되었다. 그리고 69.3% 정도의 B-16 melanoma 내의 melanin 생성을 억제하는 것으로 나타났으며 인공 색소침착을 유도한 시험자들을 대상으로 관찰한 결과 통계학적으로 유의한($p < 0.05$) 미백효과를 가지는 것으로 관찰되었다.

1%의 미생물 복합 발효 배양액을 함유하는 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형을 제조하여 광학 현미경으로 관찰 한 결과, 제형이 완성된 것을 확인할 수 있었고 liquid crystal 제형의 물성은, 25°C 일 때 pH가 6.73 ± 0.08 이었고, 점도는 $7,530 \pm 460$ cP로 나타났으며, microcapsule 제형의 pH는 6.56 ± 0.12 이었고, 점도는 $19,650 \pm 500$ cP으로 관찰되었다. 이들 값은 일반적인 화장품의 물성과 유사한 수치를 가지는 것 수치이다. 온도 변화(0°C, 25°C, 40°C)에 따른 30일간의 물성 변화를 관찰한 결과, pH 및 점도가 크게 변화하지 않은 것으로 관찰되어 안정성 면에서 매우 우수한 것으로 판단되었다. 또한 일반시험 및 특수가속시험을 실시한 결과, 두 제형 모두 상의 분리 및 변색, 변취 등의 물성적 변화가 나타나지 않아 안정한 제형임을 확인할 수 있었다.

협동연구과제 : 미생물 복합발효 배양물의 항산화성 생리 활성적 특성 검증

미생물 복합 발효 배양액의 섭취 수준에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화 효소 및 지질과산화물 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대상으로 농도가 다른 미생물 복합발효 배양액 함유수(10 mg%, 20 mg%, 30 mg%, 50 mg%)를 6주간 공급한 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취수준이 6주간의 체중증가 패턴과 체중증가량 및 평균 식이섭취량과 식이효율에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

2. 혈청 중성지방의 수치는 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 10 mg%군과 20 mg%군이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다. 30 mg%군과 50 mg%군도 대조군에 비하여 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 혈청 총 콜레스테롤 수치는 대조군에 비하여 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 네 실험 군들에서 유의적으로 낮게 나타났으며, 미생물 복합발효 배양액의 희석 농도에 따른 실험 군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈청 HDL-콜레스테롤 수치는 총콜레스테롤 수준이 낮았던 복합 미생물 배양액을 섭취한 네 군이 대조군 보다 유의적으로 낮았으며, 배양액을 섭취한 실험 군 중에서도 50 mg%군이 나머지 세 군 보다 유의적으로 낮았다. 그러나 총 콜레스테롤 중 HDL 콜레스테롤이 차지하는 비율은 실험 군들 간에 유의적인 차이가 없었다. 혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 대조군에 비하여 총콜레스테롤 수준이 현저히 낮았던 실험 군들에서 유의적으로 낮은 경향을 나타내었으며, 50 mg%군은 대조군 보다 유의적으로 낮게 나타났으며, 동맥경화지수(atherogenic index)는 실험 군들 간에 유의적인 차이가 없었다.

3. 간 중성지방과 총콜레스테롤 농도는 대조군과 실험 군들 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

4. 간 조직의 SOD 활성도는 20%군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 나머지 실험 군들은 유의적인 차이가 없었다. 간 조직의 catalase 활성도는 30%군과 50%군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 간 조직의 GSH-Px 활성도는 10%군이 가장 높게 나타났으며, 희석농도가 진할수록 낮아지는 경향을 보여 50%군은 10%군에 비하여 유의적으로 감소하였다.

5. 혈액에서의 MDA 수준은 50%군에서 유의적으로 감소하였으며, 간 조직의 MDA 수준은 대조군과 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 실험군 간에도 미

생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

미생물 복합발효 배양액 섭취가 혈청 중성지질에 미치는 효과는 섭취 수준에 따라 그 효과가 다르게 나타났다. 배양액 희석 농도가 30%와 50%군 보다 10%, 20%군이 혈청 중성지질을 낮추는데 효과적이었으며, 혈청 총콜레스테롤 수치를 감소시키는데 있어서는 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 상관없이 모두 유효한 것으로 나타났다. 유의적인 차이는 없었으나 20%군과 50%군이 더 낮은 경향이였다.

당뇨쥐에서 미생물 복합 발효 배양액의 섭취 수준에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 활성 및 혈장 아미노산 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대상으로 농도가 다른 미생물 복합발효 배양액 함유수(20%, 30%)를 4주간 공급 한 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 당뇨 쥐에서는 식이섭취량 증가 현상과 함께 체중감소 현상이 나타나 정상군들에 비하여 당뇨군들에서 식이효율이 낮게 나타났다. 당뇨군 내에서는 30%군의 최종 체중이 가장 높게 나타났다.

2. 혈청 중성지방의 수치는 당뇨상태와 정상시 모두 미생물 복합발효 배양액을 섭취로 혈중 중성지방수치가 낮아졌으며, 20%군 보다 30%군에서 더욱 낮았다. 혈청 총 콜레스테롤 수치는 당뇨-대조군의 값이 가장 높았으며, 정상-30%군의 값이 가장 낮았다. 당뇨군내에서는 대조군에 비하여 20%군이 유의적으로 낮았으며, 20%군 보다 30%군이 유의적으로 낮아 당뇨시 30%섭취군의 혈중 콜레스테롤 강하효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 정상군들 내에서도 이와 같은 경향으로 나타났다. 같은 식이 섭취 조건에서 정상군과 당뇨군을 비교해 보면 당뇨군이 대조군에 비하여 혈 중 콜레스테롤 수치가 높은 것으로 나타났다. 혈청 HDL-콜레스테롤 수치는 당뇨와 정상 의 경우 모두에서 대조군에 비하여 30%군들의 HDL-콜레스테롤 수준이 유의적으로 높았다. 20%군들도 대조군 보다 높은 경향이였으나 유의적인 차이는 없었다. 혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 정상과 당뇨상태에서 각각 대조군, 20%군, 30%군의 순으로 낮게 나타났다. 정상-30%군이 가장 낮았으며, 당뇨-대조군이 가장 높았다. 대조식이, 미생물 복합발효 배양액 20% 섭취와 미생물 복합발효 배양액 30% 섭취에서 각각 정상시 보다 당뇨시에 혈청 혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 정상과 당뇨상태에서 각각 대조군, 20%군, 30%군의 순으로 낮게 나타났다. 정상-30%군이 가장 낮았으며, 당뇨 대조군이 가장 높았다. 대조식이, 미생물 복합발효 배양액 20% 섭취와 미생물 복합

발효 배양액 30% 섭취에서 각각 정상시 보다 당뇨시에 혈청 LDL-콜레스테롤 수치가 높아지는 것으로 나타났다. Atherogenic index를 보면, 당뇨-대조군의 값이 다른 5군들 보다 유의적으로 높았으며, 당뇨시 증가된 수치는 20%와 30% 미생물 배양액 섭취로 유의적으로 감소하였다. 정상 쥐들에서도 역시 미생물 배양액의 섭취로 atherogenic index 값을 낮출 수 있었고 6군들 중에서 정상-30%군의 Atherogenic index값이 유의적으로 가장 낮았다.

3. 간 중성지방은 당뇨 유무와 복합 미생물 배양액 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 간의 총콜레스테롤 농도는 당뇨와 정상 쥐에서 모두 복합 미생물 배양액 섭취군에서 낮게 나타났다.

4. 간 조직의 SOD 활성도는 정상군 중 발효액 30%섭취 군이 가장 높았으며, 당뇨군 중 발효액을 섭취하지 않은 군이 가장 활성이 낮은 것으로 나타났다. 정상군 내에서는 발효액 섭취량이 많을수록 간에서의 SOD 활성도가 높은 것으로 나타났다. 당뇨군에서도 이와 유사한 경향으로 나타났다. 간 조직의 catalase 활성도는 당뇨 유무와 복합 미생물 배양액 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 간 조직의 GSH-Px 활성은 정상쥐와 당뇨쥐에서 대조군 보다 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 20%와 30%군이 유의적으로 활성이 높게 나타났으며, 30%군이 20%군 보다 유의적으로 활성이 높게 나타났다.

5. 혈장 유리 아미노산 농도결과는, Taurine, Threonine, Glycine, Citrulline, Cystine, Methionine, Tyrosine, Ornithine, Lysine과 Histidine의 농도는 당뇨 발생 여부와 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취 수준에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. Glutamic acid와 Alanine 농도는 당뇨-30%군이 가장 높았으며, Valine, Leucine, Isoleucine과 Phenylalanine 농도는 당뇨-대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 유의적으로 낮았다. Arginine은 당뇨 대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 낮았으며, 당뇨-20%군이 당뇨-30%군 보다 낮은 값이었으나 유의적이지는 않았다.

미생물 복합발효 배양액 섭취로 당뇨시 증가한 혈 중 총 콜레스테롤을 감소시켰다. 이와 함께 혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 낮추고 HDL-콜레스테롤 수치는 높였으며 atherogenic index값을 낮추었으므로 미생물 복합발효 배양액의 섭취는 당뇨로 인한 심혈관계 질환에 대한 발병 위험을 낮추는데 유의할 것으로 사료되며, 그 효과는 30% 희석액 섭취 군에서 가장 높은 것으로 나타났다. 미생물 복합발효 배양액이 체내 항산화계에 미치는 효과는 1차 때와는 달리 정상상태와 당뇨상태의 경우 모두에서 20% 군과 30% 군에서 SOD와 GSH-Px의 활성도가 증가하였다.

당뇨쥐에서 미생물 복합 발효 배양물의 섭취 수준에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 활성 및 혈장 유리아미노산 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 당뇨 유발 수컷 쥐를 대상으로 미생물 복합발효배양물인 methanol 분획물 1%, 메탄올 분획물 3%, 순수분리물 0.2%를 4주간 공급하여 항산화성 생리활성적 특성을 검증하였다. 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 체중증가량은 정상군내에서는 유의적인 차이가 없었고 당뇨군의 체중증가량은 정상군보다 유의적으로 낮았다. 평균 식이 섭취량은 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 높았고 식이효율은 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 낮았다.

2. 4주간의 혈당수준은 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 높게 나타났다. 정상군에서는 4주간의 혈당 수준은 유의적인 차이가 없었고 당뇨군내에서는 순수분리물 0.2%군이 가장 높았고 메탄올 분획물 3%군이 낮은 경향을 보였다.

3. 공복시 혈당은 당뇨군이 정상군보다 전반적으로 높았으나 정상군과 당뇨군간에 유의적인 차이가 없었다. 정상군과 당뇨군내에서 각각 메탄올 분획물 3%군이 유의적인 차이는 아니지만 공복시 혈당이 가장 낮게 나타났다. 인슐린농도는 당뇨군내에서 메탄올 분획물 3%군이 유의적인 차이는 아니지만 가장 높게 나타났고 정상군내에서는 순수분리물 0.2%군이 유의적으로 인슐린 농도를 증가시켰다.

4. 혈중 총콜레스테롤 농도는 당뇨군내에서 메탄올 분획물 1%군보다 메탄올 분획물 3%군과 순수분리물 0.2%군이 유의적으로 낮게 나타났다. 혈중 중성지방 농도는 당뇨군내에서 메탄올 분획물 3%군과 순수분리물 0.2%군이 유의적으로 낮았다. 혈중 HDL-콜레스테롤 농도는 당뇨군내에서 실험식이에 따른 유의적인 차이가 없었으나 메탄올 분획물 3%군과 순수분리물 0.2%군이 대조군과 메탄올 분획물 1%군보다 높은 경향을 나타내었다. 혈중 LDL-콜레스테롤 농도는 정상군과 당뇨군 모두에서 메탄올 분획물 3%군과 순수분리물 0.2%군이 대조군과 메탄올 분획물 1%군보다 유의적으로 낮게 나타났고 당뇨군내에서는 순수분리물 0.2%군이 유의적으로 가장 낮았다. 동맥경화지수(athrogenic index)는 정상군과 당뇨군 모두에서 메탄올 분획물 3%군과 순수분리물 0.2%군이 대조군과 crude 1%군보다 유의적으로 낮게 나타났다.

5. 간의 총 콜레스테롤 농도는 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 당뇨군내에서는 각 군간에 간의 총콜레스테롤 농도가 유의적인 차이를 보여 순수분리물 0.2%군이 유의적으로 가장 낮았고 메탄올 분획물 3%군, 메탄올 분획물 1%군, 대조군의 순으로 유의적으로 낮았다. 간의 중성지방 농도는 당뇨군이 정상군에 비해

높은 경향을 보였다. 당뇨군내에서는 메탄올 분획물 1%군, 메탄올 분획물 3%군, 순수분리물 0.2 %군이 대조군보다 유의적으로 낮았다.

6. 간조직의 SOD 활성은 정상군보다 당뇨군이 낮았고 당뇨군내에서는 대조군과 메탄올 분획물 1%군보다 메탄올 분획물 3%군과 순수분리물 0.2%군이 유의적으로 높았다. Glutathione peroxidase는 당뇨군내에서 메탄올 분획물 3%군과 순수분리물 0.2%군이 대조군과 메탄올 분획물 1%군보다 유의적으로 높았다. Catalase 활성도는 정상군과 당뇨군 간에 유의적인 차이가 없었고 정상군과 당뇨군내에서도 식이에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

7. C-protein은 정상군보다 당뇨군이 유의적으로 높았고 당뇨군내에서도 대조군, 메탄올 분획물 1%군, 메탄올 분획물 3 %군, 순수분리물 0.2%군의 순으로 감소하여 유의적인 차이를 보였으며 순수분리물 0.2%군이 유의적으로 낮은 값을 보였다. M-protein은 당뇨군내에서 대조군, 메탄올 분획물 1%, 메탄올 분획물 3%, 순수분리물 0.2%순으로 증가하여 각 군간에 유의적인 차이를 보였고, 순수분리물 0.2%군이 가장 높게 나타났다.

8. 혈장 유리 아미노산 농도는 asprtic acid, taurine, threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, histidine, arginine의 농도는 정상쥐와 당뇨쥐간에 유의적인 차이가 없었고 미생물 복합발효 배양물의 섭취 정도에 따라서도 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서 glutamic acid, proline, glycine, methionine, ammonia 농도는 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서 alanine, tyrosine, lysine 농도는 crude 1%군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았고 메탄올 분획물 1%와 메탄올 분획물 3%군간에는 유의적인 차이가 없었다.

이상에서 당뇨유발 수컷 쥐를 대상으로 미생물 복합발효 배양물 메탄올 분획물 1%, 메탄올 분획물 3%, 순수분리물 0.2%를 4주간 공급한 결과, 당뇨군내에서 메탄올 분획물 3%와 0.2% 순수분리물이 공복시 혈당이 낮았다. 또한 당뇨쥐에서 메탄올 분획물 3%와 순수분리물 0.2%는 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방 및 LDL-콜레스테롤 농도를 유의적으로 낮추어 당뇨상태에서 혈중 지질농도를 개선하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 당뇨쥐의 간 조직 총콜레스테롤 농도는 순수분리물 0.2%가 유의적으로 가장 낮았고 간 조직의 중성지방 농도는 메탄올 분획물 1%, 메탄올 분획물 3%, 순수분리물 0.2 % 모두 대조군보다 유의적으로 낮추어 미생물 복합발효 배양물의 섭취가 효과가 있었다. 당뇨쥐의 항산화효소 활성을 분석한 결과, 간 조직

의 superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성은 메탄올 분획물 3%와 순수분리물 0.2%가 대조군 보다 유의적으로 높았다.

결론적으로 미생물 복합발효 배양물 메탄올 분획물 3%와 순수분리물 0.2% 첨가 식이는 당뇨쥐에서 혈중 지질농도 개선 효과와 항산화 효소의 활성을 증가시켜 항산화작용에 유리한 것으로 사료되어진다.

SUMMARY

(영문요약문)

On the 1st project : Production characteristics on antioxidative physiological-activated compound in complex strains culture broth

Human body has various anti-oxidant system helping remove free radicals and oxygen free radicals, which lead to homeostasis maintained. That is, catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathion peroxidase(GSH-Px), glutathione reductase, glutathione-s-transferase(GST) are known as antioxidative enzyme system within human body.

As enzymatic antioxidant is not enough to effectively prevent free radicals from being induced within human body, the giving of non enzymatic antioxidant should be involved to improve free radical scavenger activity.

Synthetic antioxidant is cheap and effective, so it has usually been used for the purpose of food processing, medicine and cosmetics. However, the problem of safety is sparking public rejection more and more over time.

Despite the well-known efficacy of natural antioxidant, most of them are meaningless because of the lack of necessary studies on its industrial applications. Cost competitiveness from cost reduction should be considered above all through conducting studies on high extraction yield and the simplification of purification.

These days, the recent rise in chronic and adult diseases is driving the disease prevention and the delay of aging to attraction more attention. While those who already have a disease suffer from side effects of drug consumption, healthy people have much attention on the studies of functional food to keep their health. Fermented process usually involves the production of healthy elements ; Microorganism fermentation cultures of grains or vegetable is known to have

various vitamins and antioxidant. But complex microorganism fermentation culture is assumed to show a rise in various biologically active materials, not yet demonstrated due to the lack of studies on the effect and produced materials from the complex fermentation culture. Therefore, it would be significantly meaningful to find out the effect on the biological activity or the consumption consequence by each level of complex microorganism fermentation culture broth that is presumed to have an antioxidative function.

This study aimed to produce metabolic materials with a strong level of antioxidant activity through complex fermentation culture of various microorganism isolated from Korean traditional fermented foods, make possible the mass production of antioxidants using a fermentation method less affected by raw material supply or weather, and then finally develop non-toxic material proved functionally effective with potential applications, which can be seen as a basic foundation for future product development and industrialization.

To study the production characteristics of antioxidant with the complex microorganism fermentation, Strain with excellent antioxidative activity in fermented food was isolated into the final four strains. Complex fermentation culture, a mixture of different types of mixed strains and *Bacillus* B6, *Acetobacter* A6, *Saccharomyces* S1 showed higher antioxidative activity. As a studying result of culture broth composition by these strains, the added culture of 2% in molasses, 0.5 °brix in rice extracts and 5% in rice bran extract was one of the most excellent antioxidative activity.

To set up an effective fermentation condition of antioxidative activity, the fermentation characteristics on total phenol content and electronic donating ability of each fermented broth and culture condition was researched. Then, the optimal condition of fermented broth was estimated through superimposing the response surface of each value. As a result, the most suitable range for the fermented both total phenol content and electronic donating ability was 1.8~2.2% in molasses added amount, 2.1~2.4% in rice extracts added amount and 1.9~2.4% in defatted soybean cake, and the optimum fermentation condition range was 25~35°C in fermentation temperature, 10~14 days in fermentation time, and pH 5.5~

7.5. In all, the most optimized fermentation condition is 30°C in fermentation temperature, 12 days in fermentation time, and pH 6.5.

The study on antioxidative features of solvent extracts from cultures indicated that methanol fraction was the highest as 117.50mg% in total phenol content. The nitrite-scavenging ability showed the highest in methanol fraction and n-butanol fraction as 94.81% and 92.61% respectively. The electronic donating ability of cultures by the DPPH and DMPD method showed the highest as 96.53%, and 73.07% respectively in methanol fraction. Fermented broth extract, neutral phenolic compound and acidic phenolic compound were fractionated and then, as a result of the analysis by C₁₈ reverse phase HPLC and TLC, phenolic acid was extracted from neutral fraction, and major phenolic compound was showed as ferulic acid and sinapic acid.

Total phenolic compound, nitrite scavenging ability and electronic donating ability of acidic fraction and neutral fraction extracted from culture broth was measured, Total phenolic compound was the highest with 141.75mg% in neutral fraction. Nitrite scavenging ability was 98.29% and 89.29% respectively. As for the DPPH method, electronic donating ability showed stronger activity of 97.70% in neutral fraction. At the same time, the DMPD method was the same. Electronic donating ability in neutral fraction of fermented broth was far more effective than acidic fraction in antioxidative activity.

The antioxidative activity result of fraction dialysate and DEAE-cellulose column fraction among water-soluble browning material from fermentation culture showed that antioxidative ability of fraction diffusate and DEAE-cellulose column fraction was more active than fraction dialysate. Fraction diffusate was significantly high with 92.25% of scavenging ability and 289.50mg% of total phenolic compound. In 0.01M acetate buffer of column fraction, electronic donating ability (DPPH radical scavenging ability) showed high activity of 81.32%. Also, from the 0.01M acetate buffer fraction, water-soluble browning material with antioxidative ability was shown to be separated.

Fraction dialysate and fraction diffusate of water-soluble browning material were fractionated by DEAE-cellulose column, and then each fractionates was

spotted on TLC. As the result, presented that the two parts of Rf 0.2 and 0.35 were separated from 0.02 M HCl fraction in fraction dialysates, and Rf 0.28 and 0.45 from 0.01M AcOH fluid fraction in fraction diffusates.

As a result of the antioxidative activity comparison among the final nine kinds of mutated strain, as for the M1 mutated strain in electronic donating ability (DPPH, DMPD and ABTS radical scavenging ability), all of the antioxidative activities was shown higher than parent strain. So, targeting parent strain and mutated strain of M1, primer was manufactured, and then cloning of gene was practiced that is used to synthesize antioxidative materials.

In the test of growth inhibition effect of cancer cell lines through SRB assay, ether fraction, chloroform fraction and ethylacetate fraction in the six kinds of fermentation broth extract were inhibited the cancer cell growth in the concentrate-dependent, as compared to the control group. The test of cancer cell growth inhibition effect among ether fraction, chloroform fraction and ethylacetate fraction through the trypan blue exclusion assay presented that higher concentration test solution means higher number of dead cells, and the number of remained cells was reduced compared with the control group. IC₅₀ value of test solution, ether fraction, chloroform fraction and ethylacetate fraction was 0.84±0.079, 0.94±0.017 and 0.8±0.03 respectively.

On the 2nd project : Skin acceptability and development of cosmetic product using the complex strain culture broth

The observation of cytotoxicity against human body, the first test of skin irritation and skin sensitizing test showed that cytotoxicity of complex fermentation culture of microorganism was 2000 times lower than SLS. In a skin sensitizing test, allergy response was almost impossible with the lower than 3 SI level. In addition, the human patch test conducted following the CTFA guideline indicated that complex fermentation culture of 5%(v/v) microorganism was safe for human body application.

The observed effect of dead skin removal showed that complex fermentation culture of microorganism was effective as much as 32.1%. In a skin moisture test, it showed as similar moisturizing power as glycerin, 1,3-butylene glycol, propylene glycol that is mostly used as a moisturizer for cosmetics.

As a comparison result with pre-culture test solution about the effect of skin lifting like free radical scavenging activity, cell activity, collagen synthesis, elastase activity inhibitory effect and MMP-1 expression inhibitory effect, the antioxidative process of complex fermentation culture of microorganism helped make the free radical scavenging activity almost nine times excellent, cell activity some twelve times, and collagen synthesis about six times.

From the result of tyrosinase activity inhibition, complex fermentation culture of microorganism reduced some 68% of tyrosinase activity and was effective as much as 66.9% of L-DOPA lipid autoxidation. Also, that was helpful to inhibit melanin production as much as 69.3% within B-16 melanoma. The result from test objects who were induced to have artificial pigmentation showed the meaningful effect in tyrosinase activity inhibition($p < 0.05$).

Through observing via optical microscope the liquid crystal structure and microcapsule structure manufactured with 1% complex culture broth, the structure was observed to be completed. In addition, as for the liquid crystal structure, physical properties were pH 6.73 ± 0.08 with the temperature of 25°C and viscosity was $7,530 \pm 460\text{cP}$, while microcapsule structure showed pH 6.56 ± 0.12 and

19,650±500cP in viscosity. These values are similar to physical properties of general cosmetics. The physical property change observed for 30 days showed that temperature (0°C, 25°C, 40°C) didn't play a role in changing pH and viscosity, which means its structural stability is excellent. In addition, both general test and intensive test presented its stability with the levels of formation separation, discoloration and smell change kept as before.

Collaboration project : The effect of complex strains culture broth or extract powder supplemented diet on anti-oxidative function in diabetic rats

A variety of bioactive compounds in foods contribute functionality to feedstuffs. In particular, antioxidants play an important role in reducing the risk of free-radical-related oxidative damage associated with aging and degenerative disease such as diabetes.

This study was performed to investigate the effect of complex strain culture broth supplemented diet on lipids and antioxidant enzyme activities in normal and diabetic rats. Eighty Sprague-Dawley male rats weighting 200 g were fed the control diet and experimental diets (10%, 20%, 30% and 50% of complex strain culture broth supplemented diet) in normal rats for 6 weeks, and fed 20%, 30% of complex strain culture broth supplemented diet in diabetic rats, and fed 1% methanol fractionate powder, 3% methanol fractionate powder, and 0.2% pure powder of complex strain culture broth extract supplemented diet for 4 weeks. Male Sprague-Dawley rats weighing about 160-170 g were obtained from the Biogenomics, Seoul Korea. When the animals attained a weight of from 190 to 210 grams, diabetes was induced in one-half of the animals by an intramuscular injection of streptozotocin (in 0.25 M citrate buffer pH 4.5, Sigma, U.S.A) at a dose of 50 mg/kg body weight. At the same time, 0.25 M citrate buffer, pH 4.5, was injected intramuscularly into the non-diabetic rats.

Three days after streptozotocin treatment, the appearance of glucose in the urine was used to confirm the diabetic state (Multistix, U.S.A). Blood sample were taken from the tail vein and animals were diagnosed as being diabetic if they had a non-fasting blood glucose concentration which was greater than 300 mg/dl. Rats were then randomly assigned to four or three experimental dietary groups of 10 rats each: those with a complex strain culture broth or extract powder diet supplemented group; 20%, 30% or 1% methanol fractionate powder, 3% methanol fractionate powder, and 0.2% pure powder) and those without supplementation (control). Rats were individually housed in stainless steel cages

in a room with controlled temperature (23°C) and humidity (55–60%) and were given free access to the experimental diets and water. Rats were maintained a 12h light (0700–1900h) and dark cycle. Plasma was separated from blood by centrifugation (1600 X g, 15 min 4 °C). Plasma lipids (total cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides) were determined by using commercial kits. LDL-cholesterol concentrations were estimated with the equation of Friedewald et al. About 1 g of liver were homogenized, and lipids were extracted with a chloroform: methanol mixture (2:1. v/v) as described by Folch et al. The concentration of liver cholesterol in the lipid extracts was measured enzymatically by using a kit. Plasma were deproteinized by using sulfosalicylic acid, and taurine concentrations in plasma were measured with an automatic amino acid analyzer based on ion-exchange chromatography (Biochrom 20, Pharmacia Biotech, Cambridge, England). The SAS statistical package (version 9.12; SAS Institute Inc, Cary, NC) was used for the data analysis. Results are expressed as means ± SDs. Values reported as significant have pvalues < 0.05.

No differences in effects on food intake and FER were found among the study groups within diabetic and nondiabetic groups, but 3% methanol fractionate powder group was lower in food intake within diabetic rats. Serum levels of fasting glucose were lower in 3% methanol fractionate powder group and 0.2% pure diet groups than in the control group both in diabetic and nondiabetic rats. No differences in effects on concentrations of insulin were found among the experimental diet groups in diabetic rats. The effects of 1 % methanol fractionate powder group diet was not significant in all groups but tended to be lower than the control diet in total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol in diabetic rats. Serum levels of total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol were lower in experimental diet (3% methanol fractionate powder group and 0.2% pure diet) groups than in control group in nondiabetic rats. No differences in effects on HDL-cholesterol were found among the diabetic rats. The activities of superoxide dismutase(SOD) in liver were significantly higher in methanol fractionate powder group 3% and pure 0.2% diet group in both diabetic and nondiabetic groups. The activities of glutathione peroxidase(GSH-Px) in liver were significantly higher in

methanol fractionate powder group 3% and pure 0.2% diet group in both diabetic and nondiabetic groups. The activities of catalase were not significantly different in both diabetic and nondiabetic groups. Within diabetic rats, fed the experimental diets for 4 weeks were characterized by high liver SOD and GSH-PX activities compared with control diet. It is suggested that multimicroorganism fermented solution (20%, 30%) and multimicroorganism fermented solution extracts powder(3% methanol fractionate powder group and 0.2% pure) supplementation diet decrease the serum lipids level and increases the activities of antioxidant enzymes(SOD, GSH-Px) in STZ-induced diabetic rats. Future research focus on mechanism by which multimicroorganism fermented substance may reduce the risk of oxidation-mediated disease.

CONTENTS (영 문 목 차)

Chapter I. Introduction	32
Chapter II. Current status of technology development in domestic and overseas.	36
Section 1. Current status of related technology in overseas	37
Section 2. Current status of related patent in domestic	37
Chapter III. Contents and result of research	40
Section 1. Antioxidative activity of cultures by isolated strains	40
1. Materials and method	40
가. Assay of antioxidative activity	40
나. Mutant selection	41
2. Contents and result of research	41
가. Isolation of strains with antioxidative activity	41
나. Antioxidative activity of cultures with selected strains	42
다. Antioxidative activity compare of single and complex strains cultures ...	45
라. Determination of carbon source and concentration	48
마. Antioxidative activity of cultures on concentration of rice extract	49
바. Antioxidative activity of cultures on sub-material addition	50
사. Mutant isolation for gene selection with antioxidants secretion	51
3. Results	52
Section 2. Solvent extraction of cultures, isolation and reliability test of antioxidation effectiveness	53
1. Materials and method	53
가. Establishment of fermentation condition	53
나. Assay of antioxidative characteristics	54

다. Selection of antioxidants	55
라. Mutation induction by UV irradiation and antioxidative characteristics of mutants	59
2. Contents and result of research	59
가. Establishment of fermentation condition	59
나. Antioxidative characteristics of classified solvent fractionates	79
다. Analysis of phenolic compound fractionates and antioxidative characteristics	80
라. Separate of antioxidative soluble browning pigment by TLC and dialysis.	83
마. Antioxidative characteristics of authentic commercial antioxidants	88
바. Mutation induction and antioxidative characteristics of mutants	89
3. Results	91
Section 3. Research on antitumor effectiveness and gene cloning of cultures	93
1. Materials and method	93
가. SRB assay cell culture	93
나. SRB assay	93
다. Trypan blue exclusion assay	93
라. Statistics analysis	94
2. Contents and result of research	95
가. Antitumor effectiveness	95
나. Gene cloning	99
Section 4. The study of skin effectiveness and stability of complex strains cultures	103
1. Materials and method	103
가. Measurement of skin stability	103
나. Measurement on remove of skin horny substance and moisture	104
다. Measurement of skin wrinkles by antioxidative reaction	105
라. Measurement of skin whitening	110
2. Contents and result of research	114
가. Measurement of skin stability	114
나. Measurement on remove of skin horny substance and moisture	115

다. Measurement of skin wrinkles by antioxidative reaction	107
라. Measurement of skin whitening	110
3. Results	114
Section 5. The study on formulation and safety of cosmetics using the complex strains cultures	130
1. Materials and method	130
가. Technology of cosmetic formulation	130
나. Measurement on safety of cosmetic formulation	131
2. Contents and result of research	132
가. Technology of cosmetic formulation	132
나. Measurement on safety of cosmetic formulation	135
다. Test cosmetic products	138
3. Results	139
Section 6. Effect concentration of complex strains cultures on lipid profile and antioxidative activity of rat	140
1. Purpose of the experiment	140
2. Materials and method	140
가. Rat and experimental diet	140
나. Analysis of sample	142
다. Statistics analysis	145
3. Contents and result of research	146
가. Measurement of food intake and weight	146
나. Determination on lipids in blood and liver	148
다. Anaysis of liver lipid	150
라. Antioxidative enzyme system of liver tissue	151
마. Determination on lipid peroxidation in blood and liver tissue	152
4. Results	154
Section 7. Examination on anti-diabetic activity and antioxidative enzyme of complex strains cultures	156
1. Purpose of the experiment	156
2. Materials and method	157

가. Rat and experimental diet	157
나. Analysis of sample	160
다. Statistics analysis	165
3. Contents and result of research	165
가. Food intake and weight gain	165
나. Effect on the blood glucose	168
다. Effect on the blood lipids	169
라. Liver lipids analysis	172
마. Antioxidative enzyme (CAT, GSH-Px, SOD) activity of liver tissue	173
바. Effect on insulin concentration in blood	176
사. Analysis of free amino acid concentration in blood	176
4. Results	178
Section 8. Examination on the antioxidation and anti-diabetic of separated compound of complex strains culture	181
1. Purpose of the experiment	181
2. Materials and method	181
가. Rat and experimental diet	181
나. Analysis of sample	185
다. Statistics analysis	190
3. Contents and result of research	190
가. Weight gain and liver weight	190
나. Food intake and FER (food efficiency ratio)	191
다. Effect on the blood glucose	192
라. Effect on blood glucose and insulin concentration at empty stomach	193
마. Blood lipid concentration	194
바. Liver lipid concentration	196
사. Antioxidative enzyme (CAT, GSH-Px, SOD) activity of liver tissue	197
아. C-protein과 M-protein concentration	199
자. Determination of free amino acids concentration in plasma	200
4. Results	202

Chapter IV. Achievements to the project targets and contributions to the related fields	205
Chapter V. Applications and utilixation of researched results	214
Chapter VI. Scientific and technological information from abroad	216
Chapter VII. References	217

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	32
제 2 장 국내외 기술개발 현황	36
제1절 국외 관련기술의 연구동향	37
제2절 국내의 특허현황	37
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	40
제1절 균주별 발효배양물의 향산화능 검정	40
1. 연구수행방법	40
가. 향산화능 측정	40
나. 돌연변이 선발	41
2. 연구수행 내용 및 결과	41
가. 향산화 활성물질 생성 균주 분리	41
나. 선별균주 배양액의 향산화 활성	42
다. 단일균주 및 혼합균주 배양액의 향산화 활성비교	45
라. 탄소원의 종류 및 농도 결정	48
마. 쌀추출물의 농도에 따른 발효액의 향산화 활성	49
바. 부원료 첨가에 따른 발효액의 향산화 활성	50
사. 향산화 물질분비 유전자선발을 위한 돌연변이 분리	51
3. 결론	52
제2절 발효배양액의 용매추출, 분리와 향산화 유효성 실증실험	53
1. 연구수행방법	53
가. 발효조건의 설정	53
나. 향산화적 특성 시험	54
다. 향산화 물질 분리	55
라. UV 조사에 의한 돌연변이 유발 및 돌연변이 균주의 향산화 특성	59

2. 연구수행내용 및 결과	59
가. 발효조건 설정	59
나. 용매 분획별 항산화적 특성	79
다. 폐놀물질 분획의 성분분석과 항산화 작용 특성	80
라. TLC 및 투석을 이용한 항산화성 수용성 갈변물질 분리	83
마. 기존의 상업용 항산화 물질의 항산화 특성	88
바. 돌연변이 및 돌연변이 균주의 항산화 특성	89
3. 결론	91
제3절 발효배양물의 항암 효과 및 유전자 cloning 연구	93
1. 연구수행방법	93
가. SRB assay 세포 배양	93
나. SRB assay	93
다. Trypan blue exclusion assay	93
라. 통계처리	94
2. 연구수행 내용 및 결과	95
가. 항암효과	95
나. 유전자 cloning	99
제4절 미생물 복합 발효 배양액의 피부 안전성 및 유효성에 대한 평가 연구	103
1. 연구수행방법	103
가. 피부에 대한 안전성 평가	103
나. 피부 각질제거 평가	104
다. 피부보습효과 평가	105
라. 항산화 작용에 의한 피부 주름개선 및 완화 평가	107
마. 피부 미백효과 평가	110
2. 연구수행 내용 및 결과	114
가. 피부에 대한 안전성 평가	114
나. 피부 각질제거 및 보습력 평가	115
다. 항산화 작용에 의한 피부 주름개선 및 완화 평가	120
라. 피부 미백효과 평가	125
3. 결론	128

제5절 복합발효배양액을 이용한 화장품의 제형화 및 안정성에 대한 평가 연구 ..	130
1. 연구수행방법	130
가. 화장품 제형화 기술	130
나. 제형의 안정성 평가	131
2. 연구수행 내용 및 결과	132
가. 화장품 제형화 기술	132
나. 제형의 안정성 평가	135
다. 시제품화	138
3. 결론	139
제6절 발효배양물 농도에 따른 흰쥐의 지방대사, 항산화능 활성검토	140
1. 실험목적	140
2. 연구수행방법	140
가. 실험동물 및 실험식이	140
나. 시료분석	142
다. 통계분석	145
3. 연구수행 내용 및 결과	146
가. 체중의 변화 및 식이섭취량 측정	146
나. 혈중 지질 분석 결과	148
다. 간 지질 분석 결과	150
라. 간 조직의 항산화 효소계의 활성도	151
마. 혈액과 간 조직의 지질과산화물	152
4. 결론	154
제7절 발효배양물의 항당뇨 활성 및 항산화 효소 검토	156
1. 실험 목적	156
2. 연구수행방법	157
가. 실험동물 및 실험식이	157
나. 시료분석	160
다. 통계분석	165
3. 연구수행내용 및 결과	165
가. 체중의 변화 및 식이섭취량 측정	165
나. 혈당 변화에 미치는 영향	168

다. 혈중 지질에 미치는 영향	169
라. 간 지질 분석 결과	172
마. 간 조직의 항산화 효소계의 활성화도	173
바. 혈중 인슐린 농도에 미치는 영향	176
사. 혈액 중 유리 아미노산 농도 분석	176
4. 결론	178
제8절 분리화합물의 항산화 및 항당뇨능의 검토	181
1. 실험 목적	181
2. 연구수행방법	181
가. 실험동물 및 실험식이	181
나. 시료분석	185
다. 통계분석	190
3. 연구수행 내용 및 결과	190
가. 체중 증가량 및 간무게	190
나. 식이섭취량과 식이효율	191
다. 혈당에 미치는 영향	192
라. 공복시 혈당과 인슐린 농도에 미치는 영향	193
마. 혈중 지질농도	194
바. 간지질 농도	196
사. 간 조직의 항산화 효소 활성화	197
아. C-protein과 M-protein 농도	199
자. 혈장 유리 아미노산 농도	200
4. 결론	202
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	205
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	214
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	216
제 7 장 참고문헌	217

제 1 장 연구개발과제의 개요

우리 농산물을 이용한 기능물질의 분리가 가능하고 대량생산이 가능하다면 대내외적으로 압박을 받고 있는 농업의 문제점을 다양하게 풀어 갈 수 있는 기반이 될 수 있다. 최근의 고령화시대, 웰빙 문화의 욕구 증대, 식생활의 변화, 건강한 삶 지향이라는 시대적, 사회적 요인들이 반영되어, 안전하면서 건강개념의 물질의 식이와 사용이 국내뿐만 아니라 국제적으로 형성되어 있어 천연물을 이용한 기능성 식품, 화장품등에 널리 이용되고 있어 이에 대한 기능물질의 분리가 다양한 형태로 이루어지고 있다. 이러한 수요는 전 세계적으로 더욱 수요가 증대될 것으로 예상된다.

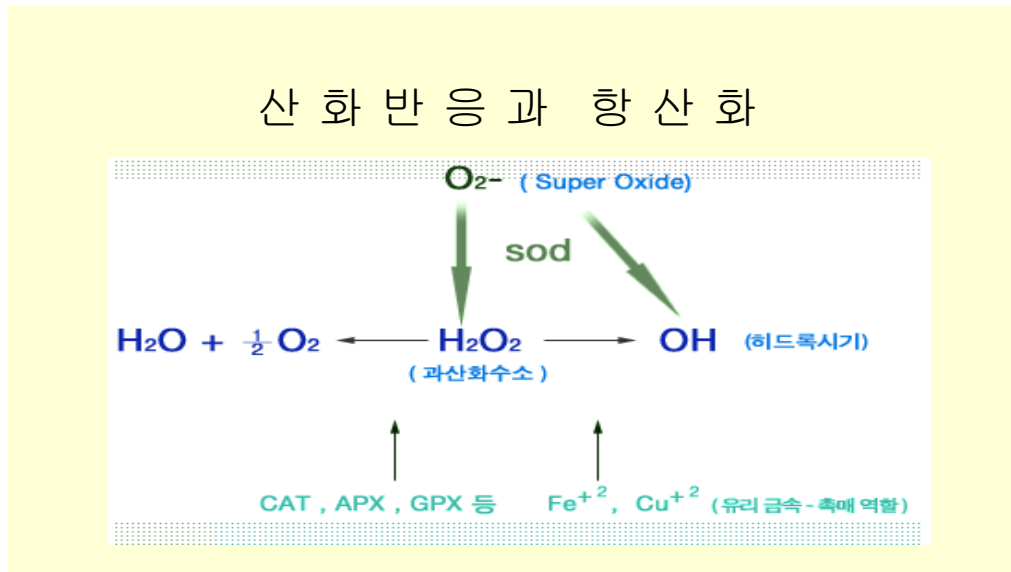
미생물의 이용은 농산물의 생산, 식품가공, 물질생산, 환경보전과 공해대책등 여러 분야에서 확대되고 있다. 자연계에는 수많은 미생물이 존재하여 다양한 형태로 공생 공존하며 물질의 생산에 관여하고 있다. 복합미생물을 이용한 대표적인 발효물은 우리나라의 김치나 된장 같은 전통발효식품 등에서 예를 찾을 수 있다.

일본에서는 1982년 Ryukyu대학의 Higa Teruo 교수에 의해 자연계에 존재하면서 사람에게 유익한 80여종의 미생물을 조합 배양하여 유용미생물군(Effective Microorganism, EM)이라는 복합 미생물 배양액으로 농업용 자재로 개발하여 농업용도, 환경정화, 공중위생, 각종 공업 등에 널리 사용하고 있다. EM은 효모, 유산균, 광합성세균, 방선균 등 80여종의 균주가 쌀겨와 당밀 같은 천연 유기물에서 공생공존으로 배양되어진 액으로서 자연 친화적이면서 다양한 생리활성 물질을 만들어서 유기질 비료, 음식물 쓰레기 분해, 축분과 오니 감소, 약취제거, 수질개선 등에 활용되고 있다.

최근 우리나라를 비롯한 세계 90여 개국에서 EM을 이용한 농작물의 관리, 농토개량, 재배, 수확, 어류 양식, 축사 관리 및 폐수처리 등 다양한 방면에 이용되고 있다. 그러나 EM은 주로 일본의 자연계에서 분리 되어져서 전 세계적으로 배양액이나 균체형태로 보급되고 있다. 우리나라는 예부터 된장, 간장, 김치, 젓갈 등 다양한 발효식품을 애용하여 왔다. 이는 대부분 목적에 맞는 미생물의 자연적인 혼합발효로서 천연의 다양한 생리활성 물질이 생산된다.

생명체에서 필수적인 산소는 부분적으로 환원되거나 전자 재배치 등으로 산화적 스트레스를 일으키게 된다. 이는 반응성이 큰 O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$ 와 같은 중간반응활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 NO , NO_2 , HNO_2 , $ONOO\cdot$ 등의 중간반응활성질소종(reactive nitrogen species: RNS)들을 생성하게 된다. 생체내에서 이

러한 중간반응활성산소종은 유해활성산소(free radical)가 대량 존재하고 반응성이 높아서 생체내 구성성분으로부터 전자를 뺏어와 상대 세포를 산화시킴으로서 기능저하와 피사를 일으킨다.



활성산소종이 세포내 생체막의 불포화지방산과 반응하여 lipid peroxidation을 일으키면 세포의 유동성 및 투과성의 변화로 세포내 소기관의 파괴에 의한 세포 사멸, 또는 세포내 소기관의 기능정지(예, 미토콘드리아에 의한 에너지 생산 중지)등이 나타난다.

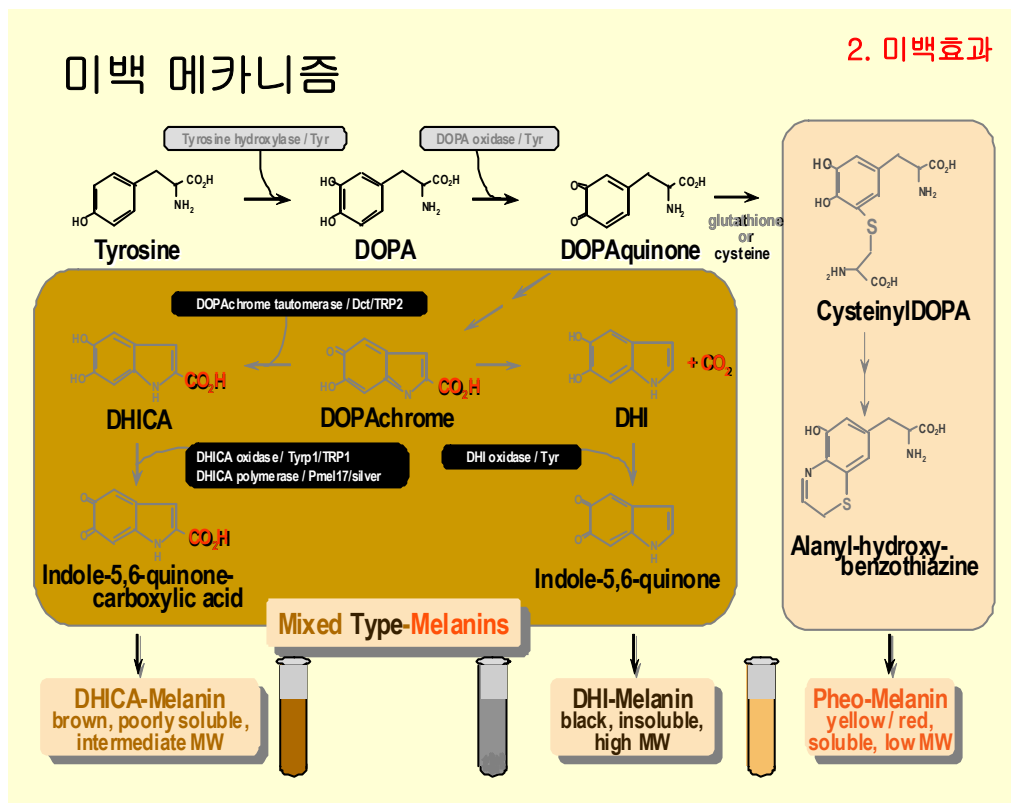
생체내 단백질 또한 산화적 스트레스를 받게 되면 carbonyl proteins의 sulfhydryl containing enzyme의 불활성화로 -SH기가 일차적으로 공격을 받게 되거나, integral protein의 cross linking 등으로 그 기능을 수행할 수 없게 되어, 결국 세포의 기능정지와 파괴를 나타내게 된다.

또한 생체내 유전자(DNA/RNA) 물질 또한 산화적 스트레스에 의해 변화, 절단 즉, base lesions, sugar lesions, single strand breaks, abasic sites, DNA-protein cross-link 등의 DNA damage가 일어나게 되어 유전자 파괴와 함께 돌연변이를 유발하며, 생체에 치명적인 손상을 나타낸다.

한편 환경독성물질, UV, ozone, 공기오염과 같은 외부자극에 의해서도 산화적 스트레스는 발생되며 또는 유기화합물의 산화환원 반응에 의해서도 나타난다. 결국 이러한 내인성, 외인성 산화적 스트레스는 만성기관지염, 천식 등의 기관지 질환, 위궤

양 등의 소화기 질환, 국소빈혈, 지질산화-혈행저해에 의한 동맥경화, 뇌졸중, 고혈압 등의 심장질환, 파킨슨씨병, 알츠하이머 병 등의 뇌 및 신경 질환, 빈혈 등의 혈액 질환, Fe^{2+} 이온, Cu^{2+} 이온의 축적(Fenton reaction)에 의한 간장질환, 신우염 등의 신장질환, 십이지장염, 당뇨병, 백내장, 아토피성 피부염, 노화, 발암, 돌연변이(DNA 손상), 당뇨, 피부 멜라닌 색소 침착, 암전이, 혈관 신생관련, 생체시계 파괴, 면역감소, 염증(관절염 등)등에 광범위하게 관련되어 있다고 보고되고 있다.

생체 내에는 이러한 free radical과 유해활성산소를 제거할 수 있는 다양한 항산화제가 존재하여 항상성을 유지한다. 즉, catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase, glutathione-s-transferase (GST)등이 생체내 항산화 효소계로 알려져 있다. 그러나 생체내 효소적 항산화제만으로는 생성되는 free radical을 효율적으로 소거하기 어려우므로 비효소적인 항산화제를 투여하여 free radical의 소거활성을 높일 필요가 있다.



합성 항산화제는 가격이 싸고 효과가 탁월하여 식품가공, 의약 및 화장품등에 널

리 이용되고 있으나 안정성에 문제가 있고 소비자의 거부감도 함께 심해지고 있다.

천연물 항산화물질의 효능이 알려져 있어도 상업적 생산에 대한 연구가 수반되지 않는 경우가 많아 산업적으로 무의미 한 경우가 많다. 고추출 수율, 정제의 단순화 등에 대한 연구도 수행되어 원가절감으로 가격 경쟁력이 우선적으로 고려되어야 한다.

최근 만성질환과 성인병이 증가하면서 질병의 예방과 노화의 지연에 대한 관심이 고조되고 있다. 이미 질병을 앓고 있는 사람은 약물의 섭취는 부작용이 많고 또한 건강한 사람은 예방의 차원에서 기능성 식품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 발효식품은 발효과정 동안에 인체에 유익한 물질이 생성되기도 하는데 곡류나 야채의 미생물 발효 배양액은 여러 가지 비타민과 항산화물질이 있다고 알려져 있다. 그러나 이들을 복합적으로 배양할 경우 발효과정 중에 생성되는 물질이나 그 효과에 대하여 연구가 미진하며 특히 미생물 복합 발효배양 물질은 여러 가지 생리활성 물질이 상승하리라 유추되나 검증된 결과는 아직 없다.

따라서 항산화 기능을 가지고 있을 것으로 추정되는 미생물 복합발효 배양액이 생리적 활성에 미치는 영향과 또한 섭취 수준별 효과를 알아보는 것은 매우 의미가 있다고 사료된다. 따라서 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대상으로 미생물 복합 발효 배양액을 농도가 다른 배양액 함유수를 섭취케 하여 미생물 복합 발효 배양액의 섭취 수준(10 mg%, 20 mg%, 30 mg%, 50 mg%)에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 및 지질과산화물 함량에 미치는 영향을 1차 연도에서 알아본 후, 2차 년도에서는 그 중 혈중 지질 개선 및 항산화 효과에 상대적으로 좋은 20 mg%와 30 mg% 배양액을 선정하였다. 당뇨병의 가장 흔한 합병증은 고지혈증과 항산화능 결핍이므로 이 물질을 STZ 유도-당뇨 흰쥐에서 4주간 섭취시켜 혈중 지질과 항산화능을 알아보았다. 그 결과 당뇨쥐에서 혈중지질 개선효과와 항산화효소 활성도의 증가를 확인하였다. 그리고 3차 년도에서는 이들 배양물을 추출하여 냉동건조시켜 분말을 만든후 추출상태에 따라 crude 1%, crude 3%와 pure 0.2% 첨가 식이를 제조하여 당뇨쥐에서 혈중 지질 개선 효과와 항산화능을 알아보았다.

본 연구에서는 우리 농산물과 전통 발효식품에 관여하는 미생물을 이용하여 혼합 발효 시키고 이를 통하여 생성되는 항산화적 효과가 있는 물질의 확인과 생리적인 효능 효과와 특징을 조사하였으며 이를 이용한 화장품 제품의 생산 및 활용에 대한 연구를 수행하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

지금까지의 항산화성 물질의 생산은 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxy anisole(BHA), propyl gallate(PG), tertiary butylated hydroxyquinone(TBHQ), exthoxyquin, santoquin와 같은 합성 항산화제와 α -tocopherol, ascorbic acid, glutathione, selenium, carotenoid, polyphenol등 과 같은 천연 항산화제 등이 사용되고 있다.

In vivo에서 항산화력이 강한 천연 항산화제는 in vitro에서 항산화성이 떨어지고 가격 또한 문제가 되고 있다. 따라서 가격이 저렴하면서 항산화력이 강한 천연물 유래 항산화 물질의 개발에 관한 연구가 활발하다.

항산화 효과에 대한 천연물에 대한 탐색은 100여 년 전부터 관련 연구가 수행되어 왔고 caraway, sage, cumin, rosemary, thyme, clove 등에서 항산화 효과를 확인된 바 있다.

그 외 항산화 연구에서 알려진 천연물로는 왕겨, 인삼, 참깨박, 고추과피 추출물, 갖과 겨자 추출물, 각종 해초류, 식용식물로서 오미자, 고구마, 더덕, 탈지미강, 양조 간장, 감초, 칩뿌리 등이 있다. 또한 한약재로 붉나무 추출물, 생강추출물, 오리가노, 야생포도, 보리 잎, 녹차, 목단피, 땅콩껍질, 완두 등의 추출물에서 항산화 효과가 보고되었다.

실제 식품에서 적용되어 상업적으로 생산되는 항산화성 물질은 rosemary추출물에서 rosemariquinone과 rosemariidiphenol 등이 알려져 있고 sage의 rosemary-9-ethylether와 붉나무 추출물이 가공식품의 산화안정에 효과가 있다. 또한 쌀겨의 색소로 anthocyanin는 cyanidin 3-O- β -D-glucopyranoside와 peonidin 3-O- β -D-glucopyranoside이 알려져 있고, 방아의 estragole도 항산화성이 확인 되었다.

그 외에도 포도씨 추출, 석류 추출물, 실크 펩타이드, 은행잎 추출물, 베타카로틴, 비타민류 등이 주를 이루고 있다. 따라서 보다 광범위한 농산자원 및 약용식물로 부터 신기능성의 항산화 물질 개발이 필요하다.

또한 약용식물의 경우 추출 효율, 분리 기술 및 생산 기술과 항산화능 안정화 기술 및 산업화에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다.

제1절 국외 관련기술의 연구동향

미국의 경우 항산화 기능성은 심장병 및 고콜레스테롤 환자의 혈행 개선에 많은 연구가 되어 있으며, 이 부분의 시장 규모만도 현재 130억불이 넘는 것으로 추정된다.[보건산업기술경향 통권 5호(2001년)].

최근 연구는 주로 기능성 식용식물 및 phytochemicals의 소재화를 목적으로 식용식물의 추출물 또는 해당 식물의 주 생리활성 phytochemicals의 항산화 식품으로의 소재화에 대한 연구개발이 활발히 이루어지고 있다. 특히 주로 주목받고 있는 신소재에는 해초에서 얻는 효소 소재, 마카, 노팔선인장, 톱야자, 산사나무 열매, 콩소재, 버섯 추출물 소재, 콜린 소재, 로즈메린산, 누룩효모나 전립 곡물, 브로콜리, 프룬, 버섯 등에 들어 있는 크롬 소재, 감자 소재 등이 있다.

또한 미국의 경우 항산화 제품 자체도 소비자 맞춤형제품(phytoestrogen이 함유된 케익, 에너지 바, 음료 등), 생활활력 증진 소재(인구의 고령화, 스트레스 등의 활력 증진제품) 연구개발에 대한 관심이 높다.

또한 2002년에 NIH 영양보조식품과 관련된 발표논문 350여종 중 식품 영양성분의 건강 효과에 관한 연구 논문들 가운데서 가장 중요하다고 생각되는 논문 25편중 항산화 관련 발표물이 6편으로 가장 많이 선정되어 기술 개발이 매우 활발한 상태이다.

제2절 국내의 특허현황

국내의 항산화 기능성에 관한 지적재산권중 2004년 12월 25일 현재 특허실용신안 553건 중 본 연구과제와 관련된 특허출원의 현황과 예는 다음과 같다.

항혈전성 항산화 기능성 물질 : 2 건, 항미백성 항산화 기능성 물질 : 73건

피부질환 관련 항산화 기능성 물질 : 29건, 항암 관련항산화 기능성 물질 : 52 건

항산화관련 화장품제조 및 조성 관련 특허

- [특허실용] 편축 추출물을 함유하는 항산화 화장료(공개)
- [특허실용] 상기생 추출물을 함유하는 항산화 화장료(공개)
- [특허실용] 루이보스로부터 항산화제를 추출, 정제하는 방법 및 루이보스 추출물을 이용한 화장료의 개발(공개)
- [특허실용] 항산화, 미백, 보습, 면역증강 및 항어드름 작용을 나타내는 목질 진

흡버섯 자실체 및 배양균사체 추출물(등록)

○[특허실용] 잎새버섯 균사체의 추출물을 함유하는 화장료 조성물(등록)

○[특허실용] 현미, 녹차, 포공영에 유효 미생물을 접종하여 발효시켜 얻은 항산화력이 증진된 화장료 조성물(공개)

○[특허실용] 상황버섯추출물과 포도발효액추출물을 함유하는 주름방지용 화장료 조성물(거절)

○[특허실용] 유산균 곡물발효액 및 이를 이용한 화장료 조성물(공개)

□ 항산화관련 식품 및 물질생산 관련 특허

○[특허실용] 항산화 활성을 갖는 카카오 콩깍질 발효물의 제조방법(등록)

○[특허실용] 항암요법에 따른 부작용 억제 효과를 갖는 항산화 음료 및 그 제조방법(등록)

○[특허실용] 항산화 식품 및 항산화 제제(등록)

○[특허실용] 항산화 물질의 제조 방법(공개)

○[특허실용] 항산화 효과를 증진시키는 상황버섯의 균사체 제조법(등록)

○[특허실용] 항산화효과가 증강된 발효식품 및 체내 항산화활성 검정법(공개)

○[특허실용] 파피아로도지마 균주를 이용한 항산화 활성향상과 진세노사이드의 생산방법(등록)

○[특허실용] 해양 미생물 유래 콜로이드달 키틴 자화 적색색소 생산 미생물 및 이를 이용한 적색 색소의 제조법(거절)

○[특허실용] 항암, 항산화 및 항노화 활성이 우수한 기능성 김치 및 그 제조 방법(등록)

○[특허실용] 맥문동을 주재로 한 한약재술 및 그 제조방법(거절)

○[특허실용] 우술을 주재로 한 한약재술 및 그 제조방법(거절)

○[특허실용] 항산화물질을 함유하는 맥주의 제조방법(공개)

○[특허실용] 모과를 이용한 생리기능성 발효주와 그 제조방법(등록)

라) 본 연구의 특허활용방안

□ 상기 출원된 특허의 경우에서 보다시피 기존의 다양한 질환 관련 항산화 기능성 물질은 대부분 식용이 불가능한 천연물에서 추출하여 그 상업화에 많은 어려움이 있으며, 추출물 형태로 그 활성물질이 분리 정제 되어 있지 않은 상태이다.

□ 본 연구에서는, 식용 가능한 농산식물의 복합균주의 발효배양물의 항산화 신기능성을 규명하여 특허출원과 함께 실질적 상업화를 유도할 수 있으며, 나아가 활성 물질의 분리, 정제 등의 연구로 부가적인 안전성 확보 및 대량생산 및 산업화의 기반을 구축한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 균주별 발효배양물의 항산화능 검정

1. 연구수행방법

가. 항산화능 측정

1) 전자공여능 측정

가) DMPD법

0.1M DMPD(N, N-dimethyl- p-phenylenediamine)용액 1 mL를 0.1 M acetate buffer 100 mL에 첨가하여 pH를 5.25로 조정하고, 여기에 0.05 M ferric chloride 용액 0.2 mL를 첨가하여 활성화되어 색을 띠는 라디칼 양이온을 얻는다. 이 용액 5 mL를 취하여 시료 용액 0.5 mL와 혼합한 후 25°C에서 10분간 반응 후 505 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하였다.

나) DPPH법

α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH)를 사용한 방법으로 측정하였다. 즉, DPPH 시약 12 mg을 absolute ethanol 100 mL에 용해한 후 증류수 100mL를 가하고 50% ethanol 용액을 blank로 하여 517 nm에서 DPPH용액의 흡광도를 약 1.0으로 조정한 후 이 용액 5 mL를 취하여 시료 용액 0.5 mL와 혼합한 후 상온에서 10 분간 방치시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자 공여능으로 하였다.

2) 아질산염 소거능 측정

1 mM NaNO_2 용액 1 mL에 소정 농도의 시료를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2)을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2로 조정하여 각 반응용액을 10 mL로 정용하였다. 각 반응용액은 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 1 mL를 취해 2% 초산 용액 5 mL를 첨가한 다음, Griess 시약(30% acetic acid로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1비로 혼합한 것, 사용직전 조제) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시켜 실온에서 15 분간 방치시킨 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 식에 의하여 아질산염 소거율을 구하였다.

나. 돌연변이 선발

1) UV 조사법, MNNG처리법

항산화 활성물질의 생산을 위한 돌연변이주를 분리하기 위하여 UV조사 및 화학 변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)처리를 행하여 변이주를 획득하였다. 즉, 배양 균체를 현탁하고 각각 UV 및 MNNG를 처리하여 고체배지에서 형태적으로 변화된 변이주를 1차선별하고 1차 선별된 변이주를 액체 배양하여 항산화 활성이 높은 변이주를 최종 선별하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 항산화 활성물질 생성 균주 분리

1) 1차 및 2차 균주분리

물, 토양, 과일, 식초박, 발효유제품, 장류 발효식품 및 자연계 등의 다양한 분리원으로 부터 채취된 시료에서 순수 분리된 200여 균주들 중 skim milk가 첨가된 각 배양 배지에서 배양하여 단백질 분해능이 우수한 균주를 1차 분리하였다(Fig. 1-1). 이 중 각 균주별로 분해환이 우수한 6종씩을 2차 선별하여 그 배양물의 항산화 활성을 측정하였다.

균주분리방법으로 단백질분해능을 측정한 것은 단백질분해능의 효소가 항산화활성과 직접적인 관련은 없으나, 식물이나 식품에 페놀성 화합물, 비타민 등의 항산화 활성을 가지는 각종 phytochemical이 다양하게 함유되어 있고 또한 식물계의 phenol화합물은 phenolic hydroxyl 그룹을 가지며 단백질 또는 효소단백질, 기타 2가 금속이온 및 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며 항산화 및 항미생물의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Kumar 등, 1984; Salunkhe, 1990). 또한 단백질 분해효소인 protease는 free radical에 의해서 손상된 단백질 분자를 분해시켜 superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxidase 등의 적절히 기능화된 효소단백질 또는 uric acid, glutathion(Langseth, 2000), 아미노산 및 peptide 등(Marcuse, 1961; Farag 등, 1978; Pokorny, 1987; Yamashoji, 1980; Chen, 1995)의 작은 분자로 변화시켜 항산화작용을 일으키는 물질로 전환 시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 이유로 균주의 선택적 분리를 위하여 단백질분해능을 1차 분리법으로 선택하였다.



Yeast group



Acetobacter sp.



Lactobacillus sp.



Bacillus sp.

Fig. 1-1. Clear zone of isolated strains on culture agar media added in skim milk

나. 선별균주 배양액의 항산화 활성

2차 선별된 각 균주를 각 균주의 배양배지에 배양하여 항산화 활성을 측정한 결과는 아래 표와 같다.

1) *Saccharomyces* 속

분리된 *Saccharomyces*속 효모의 경우 전자공여능은 26.50~46.35%를 나타내었으며, S1의 균주의 경우가 DMPD 46.35%, DPPH 36.63%, 총 페놀성 화합물 함량 19.06mg% 및 아질산염 소거능이 46.83%로 나타나 분리된 효모균주중 항산화 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다(Table 1-1).

Table 1-1. Antioxidant activities of cultures by isolated *Saccharomyces* sp. strains.

Strains No.	Electron donating ability (%)		Total phenolics content(mg%)	Nitrite-scavenging ability(%)
	DMPD*	DPPH**		
S1	46.35	36.63	19.06	46.83
S2	42.89	26.62	15.56	33.02
S3	42.83	30.37	14.74	37.23
S4	30.40	27.41	14.41	28.10
S5	45.85	28.44	13.97	31.85
S6	39.94	26.50	13.80	30.44

* DMPD : N, N-dimethyl-p-phenylenediamine(DMPD) method

** DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) method

2) *Acetobacter* 속

분리된 *Acetobacter*속중에서 전자공여능과 총 페놀성 화합물 함량에서는 A6의 균주가 가장 높은 값을 나타낸 반면, 아질산염 소거능의 경우 A4가 다른 균주들에 비해 높은 값이 나타났다(Table 1-2).

Table 1-2. Antioxidant activities of cultures by isolated *Acetobacter* sp. strains.

Strain sNo.	Electron donating ability (%)		Total phenolics content (mg%)	Nitrite-scavenging ability (%)
	DMPD*	DPPH**		
A1	37.23	30.43	19.25	25.29
A2	30.97	14.03	15.18	27.76
A3	31.22	13.91	13.64	26.94
A4	47.46	23.71	14.67	40.58
A5	3.27	12.32	11.80	23.41
A6	53.09	34.30	19.62	31.29

* DMPD : N, N-dimethyl-p-phenylenediamine(DMPD) method

** DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) method

3) *Lactobacillus* 속

전자공여능 측정에서 DMPD법과 DPPH법에서는 L4 균주가 가장 높은 값을 나타

내었으며, 총 페놀성 화합물의 경우는 L6 균주가 34.23mg%로서 가장 높은 함량을 나타내었다. 아질산염 소거능의 경우는 모두가 50% 이상의 활성을 나타내었다 (Table 1-3). *Lactobacillus* 속의 경우, 다른 4가지 속 균주들에 비해 항산화 활성이 월등히 우수한 것으로 나타났다.

Table 1-3. Antioxidant activities of cultures by isolated *Lactobacillus* sp. strains.

Strain No.	Electron donating ability(%)		Total phenolics content(mg%)	Nitrite-scavenging ability(%)
	DMPD*	DPPH**		
L1	48.95	58.17	30.21	53.79
L2	44.47	26.68	21.70	54.74
L3	46.90	47.32	32.36	54.98
L4	62.27	69.34	26.97	53.79
L5	47.03	56.96	31.70	53.55
L6	44.98	58.32	34.23	50.21

* DMPD : N, N-dimethyl-p-phenylenediamine(DMPD) method

** DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) method

4) *Bacillus* 속

분리된 *Bacillus* 속중 B6의 균주가 DMPD 32.33% , DPPH 48.41%, 총 페놀성 화합물 함량 35.09mg% 및 아질산염소거능 41.49%로 항산화 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다(Table 1-4).

Table 1-4. Antioxidant activities of cultures by isolated *Bacillus* sp. strains.

Strains No.	Electron donating ability(%)		Total phenolics content(mg%)	Nitrite-scavenging ability(%)
	DMPD*	DPPH**		
B1	31.32	40.90	32.45	32.98
B2	30.18	30.50	21.03	41.03
B3	31.95	39.32	21.41	38.73
B4	32.58	46.21	29.34	33.44
B5	33.97	49.37	31.20	38.27
B6	32.33	48.41	35.09	41.49

* DMPD : N, N-dimethyl-p-phenylenediamine(DMPD) method

** DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) method

5) 최종 균주의 선정

각각의 시료에서 분리된 균주를 항산화적 특성 즉, 전자공여능(DPPH법 및 DMPD법), 총 페놀성 화합물 함량 및 아질산염소거능에 의한 screening 과정을 통하여 항산화 활성이 가장 우수한 S1, A6, L4 및 B6 등 4가지 균주(Fig. 1-2)를 선별하여 이후 본 실험에 사용하였다.



Saccharomyces sp. Y1



Acetobacter sp. A6



Lactobacillus sp. L4



Bacillus sp. B6

Fig. 1-2. Final selected 4 strains implied high antioxidant capacity

다. 단일균주 및 혼합균주 배양액의 항산화 활성비교

1) 단일균주배양

앞서 분리된 항산화 활성이 우수한 최종 4가지 균주를 이용하여 쌀추출물과 당밀 등의 기본배지에서 배양한 배양액의 항산화 활성을 측정한 결과(Table 1-5), 모든

균주 배양액에서 pH는 3.50 이하로 발효가 완료되었음을 알 수 있었다. 각 배양액의 전자공여능은 DMPD법 32.62~57.84%와 DPPH법 68.82~80.86%의 값을 나타내었다. 또한 총 페놀성 화합물 함량은 모든 균주 배양액에서 유사한 값을 나타내어 차이를 보이지 않았다. 아질산염소거능의 경우는 40.00~57.69%의 값을 나타내었다. 4가지 균주 배양액 중 가장 항산화 활성이 높은 것은 DPPH법 80.86%, DMPD법 57.84% 및 아질산염소거능 57.69%인 효모인 S1균주로 나타났으며, *Bacillus* 속인 B6의 배양액이 전반적인 항산화 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다.

Table 1-5. Antioxidant activities of cultures by isolated various single strains.

Items Strains	pH	Electron donating ability(%)		Total phenolics content(mg%)	Nitrite scavenging ability (%)
		DMPD법	DPPH법		
B6	3.12	32.62	68.82	23.54	40.00
L4	3.40	52.45	80.18	23.90	55.64
A6	3.07	35.66	70.40	22.80	40.00
S1	3.37	57.84	80.86	22.82	57.69

2) 혼합균주배양

분리된 단일균주 4가지를 Table 1-6과 같이 혼합 배양한 혼합균주 배양액의 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 1-7과 같다. 배양액의 pH는 최저 3.16에서 최고 3.41로 나타났다. DMPD법에 의한 전자공여능은 1번 배양액인 *Bacillus* B6와 *Lactobacillus* L4 혼합균주 배양액이 56.16%를 9번 배양액인 *Bacillus* B6, *Acetobacter* A6 및 *Saccharomyces* S1 혼합 배양액이 52.45%로 나타나 다른 혼합균주 배양액에 비해 약 10% 정도 높은 값을 나타내었다. DPPH법에 의한 전자 공여능은 70.29~84.25%의 범위였으며 9번 조합의 혼합균주 배양액이 84.25%로 가장 높은 값을 나타내었으며, 6번 배양액인 *Acetobacter* A6와 *Saccharomyces* S1 혼합균주 배양액이 가장 낮은 값을 나타내었다. 또한 총 페놀성 화합물 함량은 22.17~26.06mg%로 모든 혼합균주 배양액에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 9번 배양액이 26.06mg%로 가장 많은 함량을 보였다. 아질산염소거능의 경우는 8번 배양액에서 가장 높은 값을 나타냈으나 전체적으로 다른 배양액과 큰 차이는 없었다.. 따라서 혼합균주 배양액의 항산화 활성은 1번 배양액인 *Bacillus* B6와 *Lactobacillus* L4 혼합균주 배양액과 *Bacillus* B6, *Acetobacter* A6 및 *Saccharomyces* S1 혼합배양액이 우수한 활성을 나타내었다 이는 비슷한 배양조건에서 항산화 활성에 대한 상승효과를 갖는 것

으로 추론된다. 따라서 이후의 실험은 *Bacillus* B6, *Acetobacter* A6 및 *Saccharomyces* S1 혼합균주를 사용하여 실험을 진행하였다.

Table 1-6. Mixing composition of isolated 4 strain for antioxidant assay of strains culture.

No.	Mixed strains	No.	Mixed strains
1	<i>Bacillus</i> B6 + <i>Lactobacillus</i> L4	7	<i>Bacillus</i> B6 + <i>Lactobacillus</i> L4 + <i>Acetobacter</i> A6
2	<i>Bacillus</i> B6 + <i>Acetobacter</i> A6	8	<i>Bacillus</i> B6 + <i>Lactobacillus</i> L4 + <i>Saccharomyces</i> S1
3	<i>Bacillus</i> + <i>Saccharomyces</i> S1	9	<i>Bacillus</i> B6 + <i>Acetobacter</i> A6 + <i>Saccharomyces</i> S1
4	<i>Lactobacillus</i> L4 + <i>Acetobacter</i> A6	10	<i>Lactobacillus</i> L4 + <i>Acetobacter</i> A6 + <i>Saccharomyces</i> S1
5	<i>Lactobacillus</i> L4 + <i>Saccharomyces</i> S1	11	<i>Bacillus</i> B6 + <i>Lactobacillus</i> L4 + <i>Acetobacter</i> A6 + <i>Saccharomyces</i> S1
6	<i>Acetobacter</i> A6 + <i>Saccharomyces</i> S1		

Table 1-7. Antioxidant activities of cultures by various mixed strains.

Items No.	pH	Electron donating ability(%)		Total phenolics content(mg%)	Nitrite-scavenging ability(%)
		DMPD법	DPPH법		
1	3.33	56.16	83.23	23.05	58.77
2	3.16	34.06	70.74	22.17	54.35
3	3.41	32.85	72.33	23.87	57.69
4	3.31	41.45	80.86	23.33	53.07
5	3.34	33.15	71.08	23.30	57.42
6	3.33	33.60	70.29	25.35	59.40
7	3.26	34.06	71.08	24.65	54.95
8	3.25	33.15	71.54	25.00	59.40
9	3.31	52.45	84.25	26.06	55.44
10	3.29	42.92	83.23	22.38	54.20
11	3.23	43.60	83.01	25.71	55.69

라. 탄소원의 종류 및 농도 결정

1) 탄소원 종류에 따른 항산화적 특성 비교

분리 선택된 3종류의 혼합균주의 항산화활성 배양배지의 특성을 조사하기 위하여 탄소원의 종류에 따른 항산화 활성을 측정하였다. 쌀추출물을 기본배지로 하여 각 탄소원의 종류에 따라 2%를 첨가 배양한 후 배양액의 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 1-8과 같다. DMPD 0~54.00%, DPPH 0~82.68%, 총 페놀성 화합물 함량 1.26~22.45mg% 및 아질산염소거능 2.55~47.75%의 범위였으며, 당밀 > 흑설탕 > 백설탕 > 포도당 > 과당 순으로 나타났다. 5가지 탄소원 중 당밀이 다른 탄소원에 비해 월등히 우수한 항산화 활성을 나타내었다.

Table 1-8. Effect of carbon sources on the antioxidant activities of cultures by mixed 3 strains.

Carbon source (2%)	Electron donating ability (%)		Total phenolics content(mg%)	Nitrite-scavenging ability(%)
	DMPD법	DPPH법		
Molasses	54.00	82.68	22.45	45.75
raw sugar	9.46	20.11	2.35	11.37
refined sugar	-	-	2.29	5.11
Glucose	-	-	1.83	5.11
Fructose	-	-	1.26	2.55

2) 탄소원의 농도에 따른 균주 배양액의 항산화 활성

탄소원 중에서 항산화 활성이 가장 우수한 당밀의 농도별 효과를 검토한 결과는 위의 Fig. 1-3.과 같이 당밀의 농도가 높아질수록 항산화 활성이 증가하였으나 4% 이상에서는 다시 감소하는 경향을 보여, 3% > 4% > 5% > 2% > 1% > 0% 순으로 나타났으며, 3% 이상의 농도에서는 큰 변화가 없이 유사한 값을 나타내었다. 반면에 3%의 당밀 첨가에서 항산화 활성이 가장 높게 나타났으나, 발효액에서 혼탁함이 나타났다. 따라서 당밀 2%의 농도를 첨가하여 이후 실험을 진행하였다.

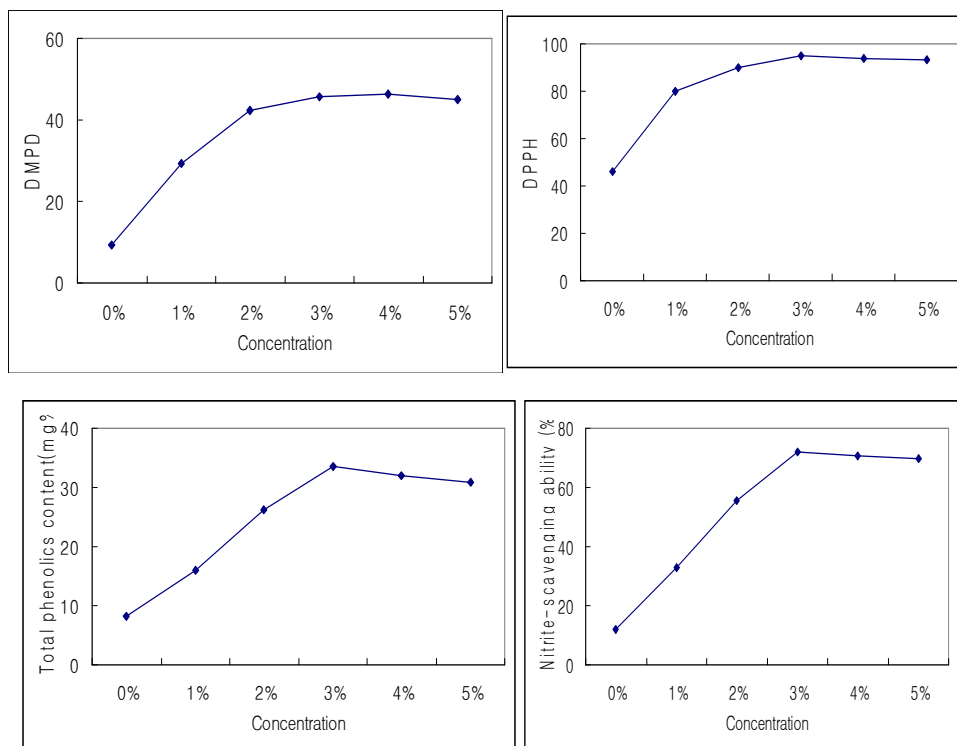


Fig. 1-3. Effect of molasses concentration on the antioxidant activities of cultures by mixed 3 strains.

마. 쌀추출물의 농도에 따른 발효액의 항산화 활성

쌀추출물의 농도에 따른 혼합균주의 배양액의 항산화 활성을 살펴보면(Table 1-9), DMPD법에 의한 전자공여능은 쌀뜨물 농도별로 10.71~12.39%가 증가하였다. 또한 총 페놀성 화합물 함량에 있어서도 6.54~7.23mg% 증가함을 나타내었다. DPPH법에 의한 전자공여능과 아질산염 소거능은 0.5brix가 가장 높게 나왔다. 따라서 균주 배양액에 있어 쌀추출물의 농도가 높을수록 항산화 활성이 우수한 배양액을 얻을 수 있으리라 생각된다.

Table. 1-9. Effect of rice extract concentration on the antioxidant activities of cultures by mixed 3 strains.

Items Conc. (brix)	Electron donating ability (%)		Total phenolics content(mg%)	Nitrite-scavenging ability(%)
	DMPD법	DPPH법		
0	25.48	33.89	14.25	22.11
0.1	40.80	80.75	23.22	53.19
0.2	39.31	89.69	24.02	53.23
0.4	39.42	82.29	25.76	55.32
0.5	45.48	83.36	26.90	57.92

바. 부원료 첨가에 따른 발효액의 항산화 활성

1) 부원료의 항산화 활성

발효액에 부원료의 첨가가 혼합균주 배양액의 항산화 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 부재료의 선택 전, 각 부재료의 항산화적 특성을 비교하기 위해 각 재료 10g을 100ml의 물에 첨가해 18시간 진탕하여 추출 후 여과하여 5%의 농도로 희석하여 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 1-10과 같다. 그 결과 녹차, 검은콩, 노란콩, 보리, 미강이 항산화 활성이 우수한 것으로 나타났다. 미강과 검은콩의 경우는 모든 면의 항산화 활성이 우수한 것으로 나타나 가장 적합한 부재료라 생각된다.

2) 부원료 첨가에 따른 혼합 균주 배양액의 항산화 활성

부원료 자체의 항산화 활성이 높은것을 나타난 5가지 부원료를 각각 5%를 첨가하여 혼합 균주 배양액의 항산화 활성을 살펴본 결과는 Table 1-11과 같다. 부원료를 첨가하지 않은 배양액보다 부원료를 첨가한 배양액에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 특히 미강과 검은콩 배양액이 다른 첨가구에 비하여 항산화 활성이 높은 것으로 나타났다.

Table. 1-10. Effect of sub-material sources on the antioxidant activities of cultures by mixed 3 strains.

Items Materials	Electron donating ability (%)		Total phenolics content (mg%)	Nitrite-scavenging ability (%)
	DMPD법	DPPH법		
Brown rice	38.59	47.29	7.90	47.06
Rice hull	10.59	25.19	4.57	8.82
Rice bran	66.97	78.29	91.92	75.59
Barley	61.78	36.43	28.48	89.41
Green tea	56.05	—	321.56	97.65
Black soybean	61.84	75.58	76.48	81.18
yellow soybean	48.97	77.97	38.98	49.12

Table 1-11. Effect of sub-material sources on the antioxidant activities of cultures by mixed 3 strains.

Items Materials	Electron donating ability (%)		Total phenolics content(mg%)	Nitrite-scavenging ability(%)
	DMPD법	DPPH법		
Control	34.97	63.74	29.19	37.65
Rice bran	49.58	92.55	55.48	77.52
Barley	46.46	91.84	35.97	76.89
Black soybean	49.31	90.30	64.35	86.74
Green tea	25.62	94.91	149.10	96.54
yellow soybean	44.76	88.41	47.58	71.18

사. 항산화 물질분비 유전자선발을 위한 돌연변이 분리

미생물에 의한 항산화성 물질의 생산 특성을 조사하기 위하여 발효식품등에서 항산화 활성이 우수한 균주를 최종 4종을 분리하였다. 이들 4종 균주를 대상으로 UV조사 및 MNNG처리를 통하여 항산화 활성이 뛰어난 변이주를 선별하였다.

3. 결론

미생물 복합발효에 의한 향산화성 물질의 생산 특성을 조사하기 위하여 발효식품 등에서 향산화 활성이 우수한 균주를 최종 4종을 분리하였다. 이들을 조합하여 발효특성에 따른 혼합균주를 *Bacillus* B6, *Acetobacter* A6 및 *Saccharomyces* S1의 3종을 혼합발효한 배양물이 높은 향산화 활성이 나타났다. 이들 균주를 이용한 배양물의 특성을 조사한 결과 당밀 2%, 쌀추출물 0.5brix 및 부원료로 미강추출물 5%를 첨가한 배양물이 우수한 향산화 활성이 나타났다.

제2절 발효배양액의 용매추출, 분리와 항산화 유효성 실증 실험

1. 연구수행방법

가. 발효조건의 설정

1) 사용균주

본 연구에 사용된 균주는 여러 가지 발효식품으로부터 분리하여 보관 중인 *Bacillus* sp., *Acetobacter* sp., *Lactobacillus* sp.와 *Saccharomyces* sp.를 계대배양하면서 공시균주로 사용하였다.

2) 배양방법

항산화물질 생산을 위한 배양에는 주원료인 쌀추출물에 부원료로서 당밀, 미강, 탈지대두박을 농도별로 첨가하여 살균 후 전배양된 균주를 3% 접종하여 각 조건에 따라 정치 배양하였다.

3) 배양조건 설정을 위한 실험계획

본 실험에서는 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 최적 추출조건의 예측과 발효조건에 따른 발효액의 이화학적 특성을 모니터링 하였다. 발효조건의 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법에 의하여 설계하였고, 반응표면분석을 위해서는 SAS(statistical analysis system) program을 사용하였다.

중심합성계획에 의한 독립변수(X_i)의 실험계획은 Table 2-1, 2-2와 같이 본 연구의 발효배양액에서 중요한 변수로 고려되는 인자, 즉 당밀 함량(X_1), 미강함량(X_2), 탈지대두박함량(X_3)과 발효조건 중 발효온도(X_4), 발효시간(X_5), 발효초기 pH(X_6)을 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 각각 부호화하였다.

이들 요인변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y_n)은 발효액의 품질인자로서 총 페놀성 화합물 함량(Y_1), 전자공여능(DPPH(Y_2), DMPD(Y_3), ABTS(Y_4)) 및 아질산염소거능(Y_5)로 하였으며, 이 값들을 회귀분석에 사용하였다. 변수들의 발효특성과 그에 상응하는 최적 발효조건은 Mathematica program을 이용하여 4차원반응표면으로 나타내었다.

Table 2-1. Experimental design of sub-material addition conditions for culture broth

Fermentation conditions		-2	-1	0	1	2
X ₁	Molasses(%)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
X ₂	Rice Bran(%)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
X ₃	Defatted soybean meal(%)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0

Table 2-2. Experimental design of fermentation conditions for culture

Fermentation conditions		-2	-1	0	1	2
X ₁	Temperature(°C)	20	25	30	35	40
X ₂	Time(day)	4	7	10	13	16
X ₃	pH	4	5	6	7	8

나. 항산화적 특성 시험

1) 총 페놀성 화합물 함량

총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis법에 따라 비색 정량하였다. 즉, 시료 1ml에 Folin-Ciocalteu 시약 1ml를 가하여 혼합하고 3분 후 10% Na₂CO₃ 1ml를 넣어 진탕한 다음 실온에서 1시간 방치하여 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수를 넣어 동일하게 처리하였으며, 이때 표준물질로는 tannic acid를 5~50 µg/ml의 농도로 조제하여 검량곡선의 작성에 사용하였다.

2) 전자공여능

가) DPPH법 : 전자공여능(electron donating ability, EDA)시험은 α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)를 사용하여 측정하였다. 즉, DPPH 시약 12mg을 absolute ethanol 100ml에 용해한 후 증류수 100ml를 가하고 50% ethanol 용액을 blank로 하여 517nm에서 DPPH 용액의 흡광도를 약 1.0으로 조정한 후 이 용액 5ml를 취하여 시료 용액 0.5ml와 혼합한 후 상온에서 10분간 방치시킨 다음 517nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 하였다.

나) DMPD법 : DMPD법에 의한 전자공여능은 100mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine(DMPD) 1ml에 0.1M acetate buffer 100ml를 첨가하여 pH를 5.25로 맞추고, 0.05M ferric chloride 용액 0.2ml를 첨가하여 활성화되어 색을 띠는 라디칼 양이온을 얻는다. 이 용액 5ml에 시료 0.5ml를 첨가하여 계속 교반시키면서 25°C에

서 10분간 반응 후 505nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 하였다.

다) ABTS법 : ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+· cation decolourisation assay방법에 의하여 시행하였다. 7mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+·을 형성시킨 후 732nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 용액 3ml에 10배 희석된 sample 0.1ml를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하였다.

$$EDA(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{공시험의 흡광도}}\right) \times 100$$

3) 아질산염 소거능

아질산염 소거능력은 Gray와 Dugan의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 1mM NaNO₂용액 1ml에 각각의 시료를 가하고 0.1M HCl(pH 1.2)을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조정된 다음 총량을 10ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1ml 씩 취하여 2% acetic acid 용액 5ml, Griess 시약(30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 하여 사용직전 혼합한 것) 0.4ml를 가하여 잘 혼합하였다. 이를 실온에서 15분간 방치한 후 520nm에서 흡광도를 측정하고 잔존하는 아질산량을 계산하였다. 아질산염 소거능력은 1-(시료첨가구의 흡광도 / 시료 무첨가구의 흡광도) × 100으로 나타내었다.

다. 항산화 물질 분리

1) 용매별 항산화 물질 분리 및 항산화능 측정

가) 용매분획물의 조제

발효액의 분획은 발효액과 동량의 용매를 이용하여 Fig. 2-1과 같은 방법으로 순차 분획하였다. 즉, 분획깔때기에서 동량의 diethyl ether를 가한 후 2회씩 추출, 농축하여 분획을 얻었고, 계속해서 같은 방법으로 물층을 chloroform, ethyl acetate, n-butanol 및 methanol/water로 순차적으로 추출하여 각각의 분획을 농축하여 본 실험

험에 사용하였다.

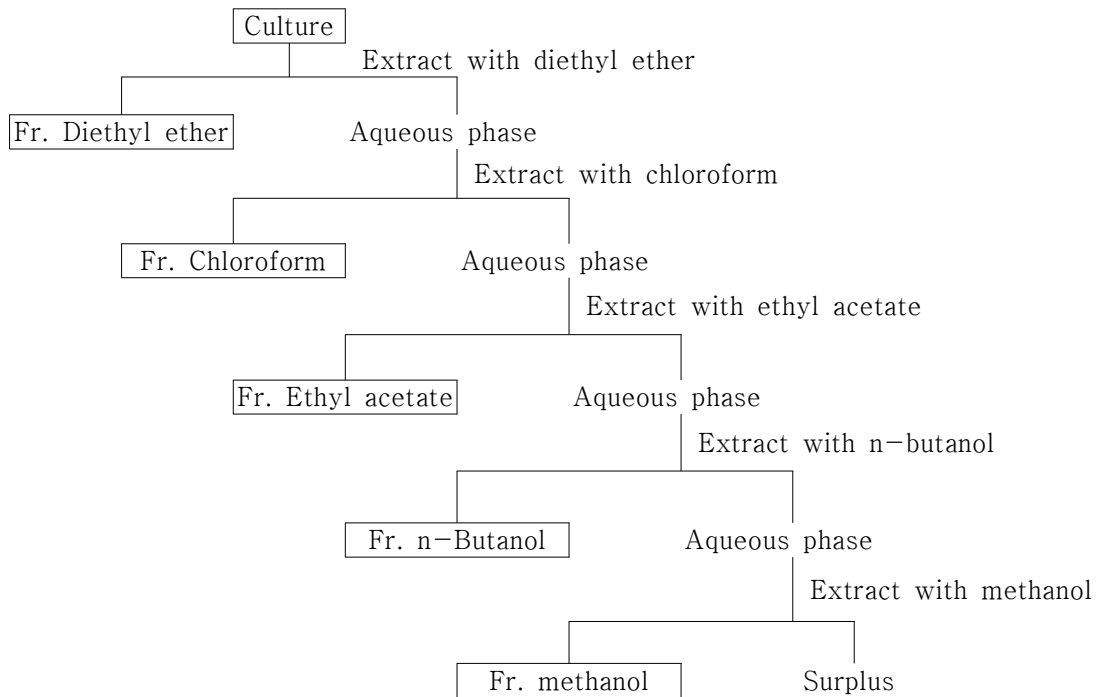


Fig. 2-1. Fractionation of culture broth

2) 페놀물질분획의 성분분석과 항산화 작용 특성

가) 페놀물질의 추출

페놀물질의 추출은 Seo와 Morr의 방법으로 Fig. 2-2와 같이 실시하였다. 먼저 배양액을 헥산으로 탈지한 다음 80% 에탄올 100ml로 2번 환류추출한 후 추출물은 20분 동안 8000rpm에서 원심분리를 행하여 상층액은 감압 하에서 회전식 진공농축기로 농축시켰다. 얻어진 농축물은 2N-NaOH 50ml을 가하여 실온에서 6시간 동안 가수분해를 행하였다. 가수분해물은 염산으로 pH 7로 조정하여 원심분리를 하였고 얻어진 상층액은 중성페놀물질을 흡착하기 위하여 메탄올과 증류수로 각각 5ml로 미리 조정된 C₁₈ Sep-Pak[®]에 통과시켰다. 중성 페놀물질이 흡착된 C₁₈ Sep-Pak[®]은 75% 메탄올 3ml로 용출시켜 중성 페놀물질을 분리하였다. C₁₈ Sep-Pak[®]을 통과한 액은 염산으로 pH 2.5로 조정하여 위와 동일한 조건에서 원심분리를 행하여 상층액

은 산성 페놀물질을 흡착하기 위해 메탄올, 증류수, 0.01N 염산(pH 2.5)으로 미리 조정된 C₁₈ Sep-Pak[®]에 통과시켰다. 산성 페놀물질이 흡착된 C₁₈ Sep-Pak[®]은 75% 메탄올 3ml로 용출하여 산성 페놀물질을 분리하였다.

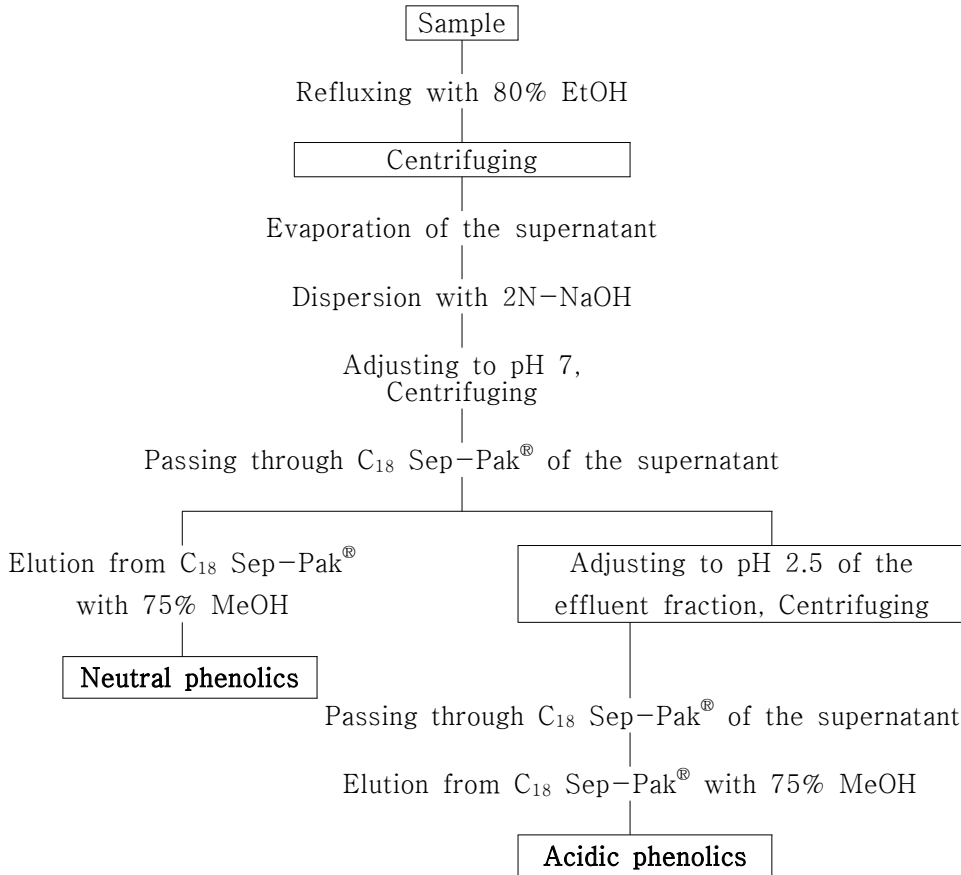


Fig 2-2. Isolation of the neutral phenolics and acidic phenolics from culture broth.

나) 페놀물질의 구성성분 분석

HPLC를 이용하여 그 유효성분을 분리 정량하였고 이때의 기기분석 조건은 Table 2-3과 같다.

Table 2-3. Instrumental conditions for HPLC analysis of phenolics acid

Specification	Condition
Instrument	Shimadzu LC 10A
Column	Symmetry [®] C18(4.6×150mm, 5 μ m, Waters Co.)
Mobile phase	A : 2% Acetic acid 80%, B : Methanol 20%
Flow rate	1.0 ml/min
Column Temp.	40 $^{\circ}$ C
Injection volume	20 μ L
Detector	UV 254nm

다) 페놀화합물의 TLC에 의한 분리

Fig. 2-2와 같이 추출한 페놀산 추출물을 Silica plate 상에서 benzene : ethanol : acetic acid (20:4:1)를 전개용매로 TLC(thin layer chromatography)하였다. Spot 위치는 UV hand lamp 및 20% 황산용액을 분무·건조하여 확인하고 구성페놀산은 ferulic와 sinapic acid 등의 표준품과 Rf 값을 비교하여 조사하였다.

라) TLC와 투석을 이용한 향산화성 갈변물질 분리

(1) 수용성 갈변물질의 추출 및 분획

Chloroform / Methanol = 2 : 1 용액으로 지용성 갈변물질 구분을 추출하고 남은 잔사에 methanol / water = 1 : 1 용액을 가하여 수용성 갈변물질 구분을 추출하고 sephadex G-50 칼럼을 통과시켜 정제한 후 10배량의 증류수에 12시간 간격으로 외액을 교체하며 48시간 투석하여 투석 내액물질 구분과 투석 외액물질 구분으로 분리하였다. 분리된 양 구분은 진공 증발기로써 농축하고 각각 DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피에 의하여 0.01M 초산완충액 \rightarrow 0.01M 염산 \rightarrow 0.02M 염산 \rightarrow 0.03M 염산용액 순으로 용출시켜 분획하였다.

(2) TLC에 의한 분리

수용성 갈변물질의 칼럼 크로마토그래피 분획분을 cellulose(sigma, cell type 100) TLC plate 상에서 n-butanol / acetic acid / water = 4 : 1 : 5 용액으로 전개하여 분리하고 UV 조사(365nm)와 ninhydrin 시약에 의한 발색으로 형광성과 ninhydrin

반응성을 각각 확인하였다.

(3) 갈변도 측정

DEAE-cellulose 칼럼에서 분획한 수용성 갈변물질의 각 분획을 400nm, 420nm 및 440nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) UV spectrum 측정

수용성 갈변물질의 각 분획을 UV spectrophotometer로써 흡수스펙트럼을 측정하였다.

라. UV 조사에 의한 돌연변이 유발 및 돌연변이 균주의 항산화 특성

1) UV 조사

돌연변이를 유발하기 위하여 분리된 야생 모균주들중 항산화 활성이 뛰어난 *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. 및 *Saccharomyces* sp. 균주를 각각의 완전배지인 TSB., MRS 및 YM액체에 접종하여 30°C에서 1일간 전배양하여 10^{-6} 배수로 희석하였고, 희석액 0.1ml 씩을 각각 고체 배지에 삼각유리봉으로 도말한 후 시간 간격을 두고 광활성화를 방지하기 위해 암실에서 UV를 조사하였다. UV box에서 UV lamp(파장, 254nm)와 빛을 받는 petri dish의 거리를 24 inch로 하였고, 배지상의 세포들에 UV가 골고루 조사되게 하기 위해 petri dish를 올려놓는 판은 적당한 속도로 회전하게끔 하였다. UV 조사 후 각각의 완전배지에 접종하고 30°C에서 2일간 배양하여 나타난 colony를 다시 완전배지와 최소배지에 각각 접종하여 돌연변이 균주를 선별하였다.

2. 연구수행내용 및 결과

가. 발효조건 설정

1) 부원료 첨가조건에 따른 발효액의 항산화적 특성 모니터링

중심합성계획에 의한 16구간의 발효조건에 따라 발효를 실시하고, 이때 얻어진 각각의 발효액에 대하여 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능(DPPH, DMPD, ABTS radical 소거능)을 측정한 결과는 Table 2-4에 나타내었다. 각각의 결과를 이용하여 부원료 첨가조건을 얻고자 반응표면 회귀분석을 실시하여 각 종속변수 즉, 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능에 대한 회귀식을 얻었다. 또한 변수별 최적 첨가조건

과 품질특성 값을 예측하여 Table 2-5에 나타내었으며, 각각의 종속변수에 대한 첨가조건의 영향을 Table 2-6에 나타내었다. 반응변수들의 4차원 반응표면은 Mathematica program으로 당밀, 미강 및 탈지대두박 첨가량을 독립변수로 하여 Fig. 2-3 ~ Fig. 2-6에 나타내었다.

가) 발효배양물별 총 페놀성 화합물 함량

각각의 배양물에 대한 총 페놀성 화합물 함량은 Table 2-4에 나타내었으며, 4차원 반응표면은 Fig. 2-3에 나타내었고, 결과에 대한 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{TPC} = 51.204375 - 10.061250X_1 - 7.681250X_2 - 9.253750X_3 - 0.020000X_1^2 + 4.085000X_1X_2 - 0.515000X_2^2 + 4.245000X_1X_3 + 4.175000X_2X_3 - 0.575000X_3^2$$

발효액의 총 페놀성 화합물 함량에 대한 회귀식의 R^2 는 0.9170이고, 5% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었다. 총 페놀성 화합물 함량의 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 실시하여 본 결과, 최대값은 47.36mg%로 나타났다. 이때의 추출조건은 당밀 첨가량 2.13%, 미강 첨가량 2.14% 및 탈지대두박 첨가량 2.42%이었다. 발효액의 총 페놀성 화합물 함량 변화는 Fig. 2-3에서 보는 바와 같이 미강 첨가량에 가장 큰 영향을 받고 있었으며, 그 함량이 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 총 페놀성 화합물 함량에 대한 부원료 첨가물의 영향은 Table 2-7에서와 같이 당밀 및 미강 첨가량에 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 설정된 범위 내에서 탈지대두박에 대한 영향은 거의 없는 것으로 나타났다.

Table 2–4. Experimental data on total phenolics content, electron donating ability and ABTS of culture broth under different sub–material addition conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No. ¹⁾	Fermentation conditions			Total phenolics content	Electron donating ability		
	Molasses (%)	Rice ran(%)	Defatted soybean meal(%)		DPPH	DMPD	ABTS
1	2.0	2.0	2.5	43.53	71.95	53.84	59.45
2	2.0	2.0	1.5	40.94	69.45	55.30	56.74
3	2.0	1.0	2.5	36.88	60.22	41.77	52.68
4	2.0	1.0	1.5	34.99	57.94	43.15	50.24
5	1.0	2.0	2.5	37.38	63.54	43.38	56.34
6	1.0	2.0	1.5	35.56	60.80	45.49	52.95
7	1.0	1.0	2.5	31.34	54.98	41.42	47.94
8	1.0	1.0	1.5	37.17	52.05	421.57	43.90
9	1.5	1.5	2.0	36.03	66.20	53.03	54.01
10	1.5	1.5	2.0	37.06	66.74	52.34	54.44
11	2.5	1.5	2.0	41.81	64.10	51.54	60.13
12	0.5	1.5	2.0	31.27	51.70	40.73	45.05
13	1.5	2.5	2.0	42.29	72.52	52.11	62.30
14	1.5	0.5	2.0	29.80	56.24	41.88	46.72
15	1.5	1.5	3.0	38.02	56.81	48.78	58.23
16	1.5	1.5	1.0	33.95	62.96	50.39	51.19

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

Table 2-5. Polynomial equations calculated by RSM program for fermentation extraction conditions of culture broth

Response	Second order Polynomials	R ²	Significance
Total phenolics content	$Y_{\text{TPC}} = 51.204375 - 10.061250X_1 - 7.681250X_2$	0.9170	0.0122
	$- 9.253750X_3 - 0.020000X_1^2 + 4.085000X_1X_2$		
	$- 0.515000X_2^2 + 4.245000X_1X_3 + 4.175000X_2X_3$		
	$- 0.575000X_3^2$		
DPPH	$Y_{\text{DPPH}} = - 1.936875 + 28.731250X_1 + 10.886250X_2$	0.9387	0.0052
	$+ 26.693750X_3 - 8.555000X_1^2 + 2.965000X_1X_2$		
	$- 2.75000X_2^2 - 0.445000X_1X_3 + 0.015000X_2X_3$		
	$- 6.570000X_3^2$		
DMPD	$Y_{\text{DMPD}} = 12.276250 + 11.952500X_1 + 11.675000X_2$	0.8929	0.0246
	$+ 13.325000X_3 - 6.550000X_1^2 + 9.170000X_1X_2$		
	$- 5.690000X_2^2 - 0.290000X_1X_3 - 1.020000X_2X_3$		
	$- 3.100000X_3^2$		
ABTS	$Y_{\text{ABTS}} = 46.401875 + 16.337500X_1 + 10.395000X_2$	0.9597	0.0016
	$+ 3.387500X_3 - 1.635000X_1^2 - 2.090000X_1X_2$		
	$+ 0.285000X_2^2 - 1.140000X_1X_3 - 0.190000X_2X_3$		
	$+ 0.458000X_3^2$		

나) DPPH radical 소거능

중심합성계획에 의한 각 발효액의 DPPH 라디칼 소거능은 Table 2-4에 나타내었으며 그 결과에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{\text{DPPH}} = - 1.936875 + 28.731250X_1 + 10.886250X_2 + 26.693750X_3 - 8.555000X_1^2 + 2.965000X_1X_2 - 2.75000X_2^2 - 0.445000X_1X_3 + 0.015000X_2X_3 - 6.570000X_3^2$$

발효액의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 발효액의 회귀식의 R²는 0.9387이고 유의성은 1% 이내의 수준에서 인정되었다. DPPH 라디칼 소거능의 예측된 정상점은 최대점이고, 최대값은 75.06%로 예측되었다(Fig. 2-4). 이때의 첨가량은 당밀 첨가량 1.88%, 미강 첨가량 2.42% 및 탈지대두박 첨가량 1.98%이었다(Table 2-6). 발효액의 전자공여능에 대한 4차원 반응표면을 분석하여 본 결과 미강 첨가량이 증가할수록 전자공여능의 활성이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 전자공여능에 대한 발효조건 영향은 Table 2-7과 같이 당밀과 미강 첨가량에 영향을 가장 크게 받으며, 탈

지대두박에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

다) DMPD radical 소거능

발효액 조건에 따른 DMPD radical 소거능의 변화는 Table 2-4에 나타내었으며, 결과에 대한 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{\text{DMPD}} = 12.276250 + 11.952500X_1 + 11.675000X_2 + 13.325000X_3 - 6.550000X_1^2 + 9.170000X_1X_2 - 5.690000X_2^2 - 0.2900005X_1X_3 - 1.020000X_2X_3 - 3.100000X_3^2$$

DMPD radical 소거능에 대한 발효액의 회귀식의 R^2 는 0.8929이고 유의성은 5% 이내의 수준에서 인정되었다. Table 2-6과 같이 발효액의 전자공여능의 최적 예측조건은 당밀 첨가량 2.15%, 미강 첨가량 2.23% 및 탈지대두박 첨가량 1.83%로 나타났으며, 최대값은 58.14%로 예측되었다. 발효액 조건에 따른 DMPD radical 소거능에 대한 발효특성은 Fig. 2-5에서와 같이 당밀 첨가량에 가장 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 전자공여능에 대한 발효액 조건의 영향은 Table 2-7과 같이 당밀 및 미강 첨가량에 영향을 받고 있었으며, 탈지대두박 첨가량에 대한 영향은 거의 나타나지 않았다.

라) ABTS radical 소거능

발효액 조건별 ABTS radical 소거능의 변화는 Table 2-4에 나타내었으며 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{\text{ABTS}} = 46.401875 + 16.337500X_1 + 10.395000X_2 + 3.387500X_3 - 1.635000X_1^2 - 2.090000X_1X_2 + 0.285000X_2^2 - 1.140000X_1X_3 - 0.190000X_2X_3 + 0.458000X_3^2$$

발효액 조건별 발효액의 ABTS radical 소거능에 대한 회귀식의 R^2 는 0.9597이고, 1% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었다. Table 2-6과 같이 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 실시한 결과 최적 발효액 조건은 당밀 첨가량 1.81%, 미강 첨가량 2.37% 및 탈지대두박 첨가량 2.36%로 나타났으며, 이때 최대값은 92.72%로 예측되었다. 발효액 조건에 따른 ABTS radical 소거능에 대한 발효특성은 Fig. 2-6과 같이 미강 첨가량이 증가할수록 활성이 높아지는 경향을 나타내었다. Table 2-7과 같

이 ABTS radical 소거능에 대한 발효액 조건의 영향은 당밀과 미강 첨가량에 영향을 크게 받으며, 다음으로 탈지대두박 첨가량에 영향을 받고 있는 것으로 나타났다.

Table 2-6. Predicted levels of Fermentation conditions of culture broth for the maximum responses of variables by the ridge analysis

Responses	R ²	Pro>F	X ₁ ¹⁾ (%)	X ₂ ²⁾ (%)	X ₃ ³⁾ (%)	Maximum (mg%)	Morphology
Total phenolics content	0.9170	0.0122	2.13	2.14	2.42	47.36	Saddle point
DPPH	0.9387	0.0052	1.88	2.42	1.98	75.06	Maximum
DMPD	0.8929	0.0246	2.15	2.23	1.83	58.14	Maximum
ABTS	0.9597	0.0016	1.81	2.37	2.36	92.72	Saddle point

¹⁾Molasses (%), ²⁾Rice Bran (%), ³⁾Defatted soybean meal (%)

Table 2-7. Regression analysis for regression model of variables in fermentation condition

Extraction condition	F-Ratio		
	Molasses (%)	Rice Bran(%)	Defatted soybean meal(%)
Total phenolics content	7.33**	9.52***	1.69
DPPH	9.57***	12.95***	1.64
DMPD	6.77**	7.75**	0.48
ABTS	12.28***	19.73***	3.70*

*Significant at 10% level; ** significant at 5% level; *** significant at 1% level.

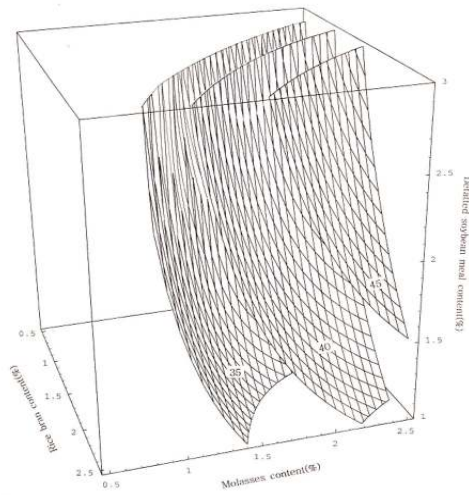


Fig. 2-3. Response surface for Total phenolics content at constant values (Total phenolics content : 35, 40, 45 mg%) as a function of molasses, rice bran and defatted soybean meal of culture broth.

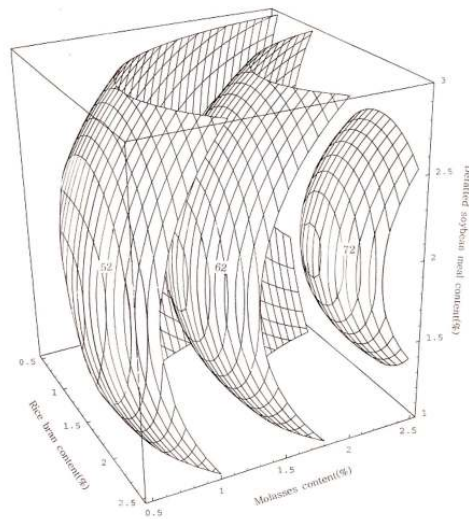


Fig. 2-4. Response surface for electron donating ability(DPPH) at constant values (DPPH : 52, 62, 72 %) as a function of molasses, rice bran and defatted soybean meal of culture broth.

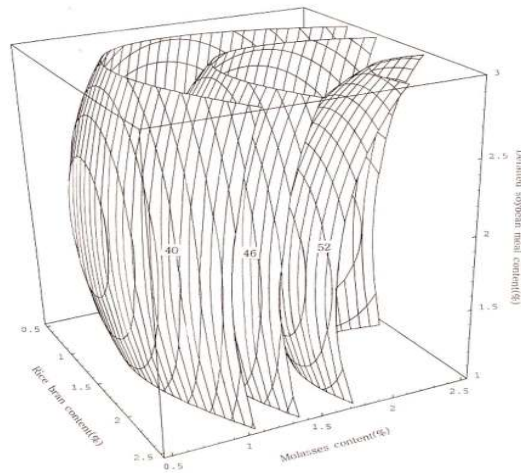


Fig. 2-5. Response surface for electron donating ability(DMPD) at constant values (DMPD : 40, 46, 50 %) as a function of molasses, rice bran and defatted soybean meal of culture broth.

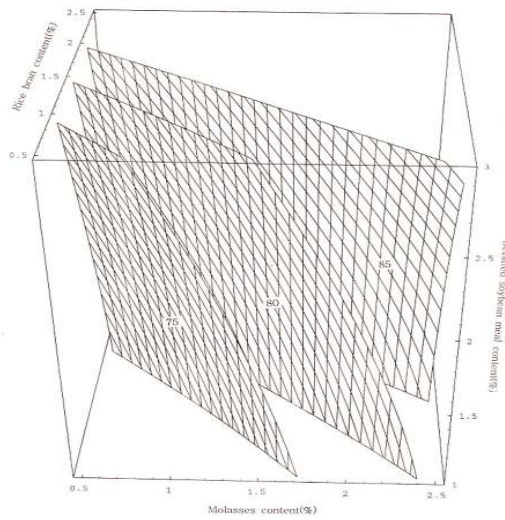


Fig. 2-6. Response surface for electron donating ability(ABTS) at constant values (ABTS : 75, 80, 85 %) as a function of molasses, rice bran and defatted soybean meal of culture broth.

마) 최적 발효액조건의 예측

항산화력이 높은 배양액의 조성을 설정하기 위하여 부원료 첨가 조건별 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능에 대한 발효특성을 조사하였다.

그 결과 총 페놀성 화합물 함량과 전자공여능의 반응표면을 superimposing하여 최적 발효액 조건 범위를 예측하였다(Fig. 2-7). 발효액은 Table 2-8과 같이 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능이 모두 만족하는 범위는 당밀 첨가량 1.8~2.2%, 미강 첨가량 2.1~2.4% 및 탈지대두박 첨가량 1.9~2.4%로 나타났다.

Table 2-8. The range of optimum fermentation condition for maximum response variables by superimposing response surface of variables yielding in the fermentation of culture broth

Fermentation Condition	Range of predicted condition (optional point)
Molasses(%)	1.8 ~ 2.2
Rice Bran(%)	2.1 ~ 2.4
Defatted soybean meal(%)	1.9 ~ 2.4

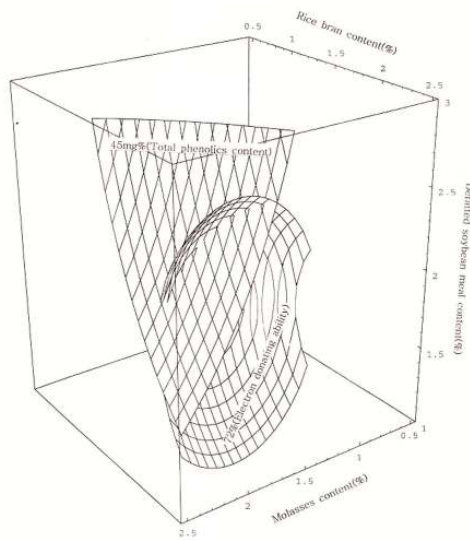


Fig. 2-7. Superimposed response surface for optimization of total phenolics acid and electron donating ability as function of molasses, rice bran and defatted soybean meal content of culture broth.

2) 발효조건에 따른 발효액의 항산화적 특성 모니터링

발효에 영향을 미치는 발효온도, 발효시간 및 발효초기 pH에 대하여 중심합성계획에 따라 16구간을 설정하여 발효하였다.

이때 얻어진 발효조건에 대하여 총 페놀성 화합물 함량, 전자공여능(DPPH, DMPD, ABTS radical 소거능) 및 아질산염 소거능을 측정된 결과는 Table 2-9에 나타내었다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면 회귀분석을 실시하고 각 종속(반응)변수 즉, 총 페놀성 화합물 함량, 전자공여능 및 아질산염 소거능에 대한 회귀식을 얻었다(Table 2-10). 또한 변수별 최적 발효조건과 항산화적 특성 값을 예측하여 Table 2-11에 나타내었으며, 이들의 4차원 반응표면은 발효온도, 발효시간 및 발효초기 pH를 독립변수로 하여 Fig. 2-8 ~ 2-12에 나타내었다. 뿐만 아니라 각 종속변수별 F-Ratio를 Table 2-12에 나타내었다.

Table 2-9. Experimental data on total phenolics content, electron donating ability, ABTS and nitrile scavenging ability of culture broth under different fermentation conditions based on central composite design by response surface analysis

Ex p. No. ¹⁾	Fermentation conditions			Total phenolics content (mg%)	Nitrile scavenging ability (%)	Electron donating ability (%)		
	Temp. (°C)	Time (day)	pH			DPPH method	DMPD method	ABTS method
1	35	13	7	45.63	63.28	59.95	62.24	76.66
2	35	13	5	38.51	52.08	59.02	60.61	94.19
3	35	7	7	36.71	60.41	60.82	58.66	80.583
4	35	7	5	35.38	59.11	66.24	57.99	92.58
5	25	13	7	49.09	49.21	66.24	64.68	85.37
6	25	13	5	40.26	49.73	52.84	61.62	78.60
7	25	7	7	35.13	54.68	63.14	57.55	81.61
8	25	7	5	32.95	57.29	57.47	57.41	76.02
9	30	10	6	45.88	53.64	62.89	65.11	93.45
10	30	10	6	45.23	54.01	62.11	64.98	92.74
11	40	10	6	32.51	57.03	58.51	64.53	76.99
12	20	10	6	29.39	44.42	54.38	65.26	76.22
13	30	16	6	35.62	54.68	56.96	66.83	80.21
14	30	4	6	27.85	55.72	56.19	56.71	70.46
15	30	10	8	38.56	60.15	62.88	57.84	88.17
16	30	10	4	32.69	57.55	52.84	54.65	79.78

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

가) 총 페놀성 화합물 함량 변화

각각의 발효물에 대한 총 페놀성 화합물 함량은 Table 2-9에 나타내었으며, 4차원 반응표면은 Fig. 2-8에 나타내었고, 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{\text{TPC}} = -239.267431 + 9.978333X_1 + 7.890694X_2 + 28.476667X_3 - 0.145050X_1^2 - 0.076833X_1X_2 - 0.383889X_2^2 - 0.064000X_1X_3 + 0.518333X_2X_3 - 2.482500X_3^2$$

총 페놀성 화합물 함량에 대한 발효액의 회귀식의 R^2 는 0.8810이고 5% 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점이고, 최대값은 48.62mg%로 예측되었고, 이때 발효조건은 발효온도 29.46°C, 발효시간 12.07일 및 발효초기 pH 6.71이었다. Table 2-13에서 보는 바와 같이 발효액의 총 페놀성 화합물 함량은 발효시간, 발효온도, 발효초기 pH 순으로 영향을 받는 것으로 나타났으며, 그 차이가 크지는 않아 전체 반응변수에 골고루 영향을 받는 것으로 확인할 수 있었다.

나) DPPH radical 소거능

항산화 물질을 지질의 산화 과정 중 생성되는 R·, ROO· 등의 유리 라디칼에 전자를 전해줌으로서 산화의 진행을 방지한다. 전자공여능은 유리 라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있다. Table 2-9는 발효조건에 따른 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{DPPH} = -143.037500 + 7.896167X_1 + 1.243333X_2 + 27.889583X_3 - 0.060550X_1^2 - 0.054667X_1X_2 - 0.164583X_2^2 - 0.589000X_1X_3 + 0.586667X_2X_3 - 1.160000X_3^2$$

발효액의 DPPH radical 소거능에 대한 발효조건 회귀식의 R^2 는 0.8796이고 5% 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점이고, 최대값은 77.89%로 예측되었고, 이때 발효조건은 발효온도 25.18°C, 발효시간 12.07일 및 발효초기 pH 7.61이었다. Table 2-12에서 보는 바와 같이 발효액의 DPPH radical 소거능은 발효온도, 발효시간 및 발효초기 pH의 3가지 변수 모두에서 비슷하게 영향을 받는 것으로 나타났다.

다) DMPD radical 소거능

발효조건에 따른 DMPD radical 소거능의 측정 결과는 Table 2-9에 나타내었고, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_{DMPD} = -34.854931 + 0.160583X_1 + 2.059028X_2 + 23.938333X_3 - 0.001500X_1^2 - 0.027833X_1X_2 - 0.090972X_2^2 + 0.032500X_1X_3 + 0.236667X_2X_3 - 2.200000X_3^2$$

DMPD radical 소거능 측정에 대한 발효조건 회귀식 R^2 는 0.9524이며, 1% 이내

에서 유의수준이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 능선분석을 실시하여 본 결과 최대값은 59.28%로 예측되었다. 이때의 발효조건은 발효온도 23.92℃, 발효시간 14.63일 및 발효초기 pH 6.36으로 나타났다. 발효조건별 DMPD radical 소거능 변화의 반응표면은 Fig. 2-10과 같이 발효시간이 길어질수록 DMPD radical 소거능이 증가하는 것으로 나타났으며, Table 2-12에서도 알 수 있듯이 발효 시간 및 발효초기 pH에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다.

라) ABTS radical 소거능

발효 조건별 ABTS radical 소거능은 Table 2-9에 나타내었고 결과에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{ABTS} = -420.947083 + 17.200417X_1 + 13.582917X_2 + 60.579167X_3 - 0.164900X_1^2 - 0.071667X_1X_2 - 0.493333X_2^2 - 1.048500X_1X_3 - 0.179167X_2X_3 - 2.280000X_3^2$$

ABTS radical 소거능 측정에 대한 발효조건의 회귀식 R²는 0.8504이고 10% 이내에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점이고, 최대값은 94.16%로 예측되었고 이때 발효조건은 발효온도 33.20℃, 발효시간 10.40일 및 발효초기 pH 5.24이었다.

발효조건별 ABTS radical 소거능 변화의 반응표면은 Fig. 2-11과 같이 나타났다. 또한 Table 2-12에서와 같이 발효시간 및 발효초기 pH에도 영향을 받지만 특히 발효온도에 영향을 많이 받는 것으로 나타났다.

마) 아질산염 소거능

중심합성계획에 의한 발효조건별 아질산염소거능은 Table 2-9에 나타내었으며, 그 결과에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_{NSA} = 178.095903 - 0.608792X_1 - 6.380347X_2 - 30.882708X_3 - 0.031000X_1^2 + 0.073917X_1X_2 + 0.038194X_2^2 + 0.390750X_1X_3 + 0.499583X_2X_3 + 1.256250X_3^2$$

발효액의 아질산염 소거능에 대한 발효조건의 회귀식의 R²는 0.9188이고, 유의성은 5% 이내의 수준에서 인정되었다. 발효액의 아질산염 소거능의 예측된 정상점은 안

장점이고, 최대값은 66.17%로 예측되었다. 이때의 발효조건은 발효온도 35.29%, 발효 시간 11.08일 및 발효초기 pH 7.60이었다. 아질산염 소거능에 대한 4차원 반응표면을 분석하여 본 결과 발효온도가 증가할수록 아질산염 소거능이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 발효액의 아질산염 소거능에 대한 발효조건에 대한 영향은 Table 2-12와 같이 발효온도에 영향을 가장 크게 받으며, 나머지 조건에 대한 영향은 작게 나타났다.

Table 2-10. Polynomial equations calculated by RSM program for fermentation extraction conditions of culture broth

Response	Second order Polynomials	R ²	Significance
Total phenolics content	$Y_{TPC} = -239.267431 + 9.978333X_1 + 7.890694X_2 + 28.476667X_3 - 0.145050X_1^2 - 0.076833X_1X_2 - 0.383889X_2^2 - 0.064000X_1X_3 + 0.518333X_2X_3 - 2.482500X_3^2$	0.8810	0.0327
DPPH	$Y_{DPPH} = -143.037500 + 7.896167X_1 + 1.243333X_2 + 27.889583X_3 - 0.060550X_1^2 - 0.054667X_1X_2 - 0.164583X_2^2 - 0.589000X_1X_3 + 0.586667X_2X_3 - 1.160000X_3^2$	0.8796	0.0337
DMPD	$Y_{DMPD} = -34.854931 + 0.160583X_1 + 2.059028X_2 + 23.938333X_3 - 0.001500X_1^2 - 0.027833X_1X_2 - 0.090972X_2^2 + 0.032500X_1X_3 + 0.236667X_2X_3 - 2.200000X_3^2$	0.9524	0.0025
ABTS	$Y_{ABTS} = -420.947083 + 17.200417X_1 + 13.582917X_2 + 60.579167X_3 - 0.164900X_1^2 - 0.071667X_1X_2 - 0.493333X_2^2 - 1.048500X_1X_3 - 0.179167X_2X_3 - 2.280000X_3^2$	0.8504	0.0594
Nitrile scavenging ability	$Y_{NSA} = 178.095903 - 0.608792X_1 - 6.380347X_2 - 30.882708X_3 - 0.031000X_1^2 + 0.073917X_1X_2 + 0.038194X_2^2 + 0.390750X_1X_3 + 0.499583X_2X_3 + 1.256250X_3^2$	0.9188	0.0115

Table 2–11. Predicted levels of fermentation conditions of culture broth for the maximum responses of variables by the ridge analysis

Responses	R ²	Pro>F	X ₁ ¹⁾ (°C)	X ₂ ²⁾ (day)	X ₃ ³⁾	Maximum	Morphology
Total phenolics content	0.8810	0.0327	29.46	12.07	6.71	48.62	Maximum
DPPH	0.8796	0.0337	25.18	12.07	7.61	77.89	Saddle point
DMPD	0.9524	0.0025	23.92	14.63	6.36	59.26	Saddle point
ABTS	0.8504	0.0594	33.20	10.40	5.24	94.16	Maximum
Nitrile scavenging ability	0.9188	0.0115	35.29	11.68	7.60	66.17	Saddle point

¹⁾Temperature (°C), ²⁾Time (day), ³⁾pH

Table 2–12. Regression analysis for regression model of variables in fermentation condition

Extraction condition	F-Ratio		
	Temp. (°C)	Time (day)	pH
Total phenolics content	4.90**	8.02**	3.89*
DPPH	5.69**	3.16*	8.69**
DMPD	0.23	15.73***	12.97***
ABTS	6.52**	4.39*	3.71*
Nitrile scavenging ability	10.87***	2.86	4.70**

*Significant at 10% level; ** significant at 5% level; ***significant at 1% level.

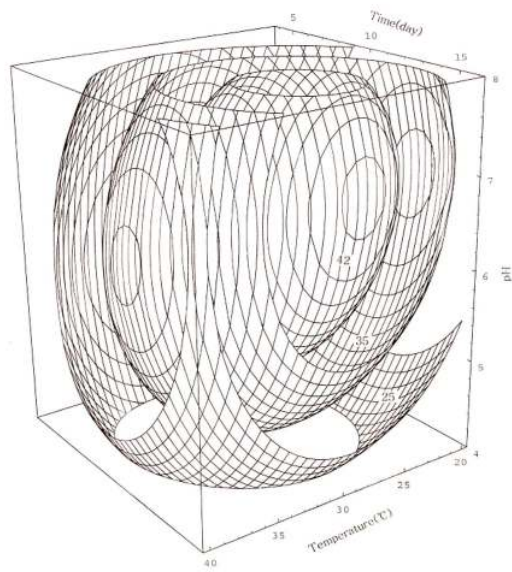


Fig. 2-8. Response surface for Total phenolics content at constant values (Total phenolics content : 25, 35, 42 mg%) as a function of fermentation temperature, time and pH of culture broth

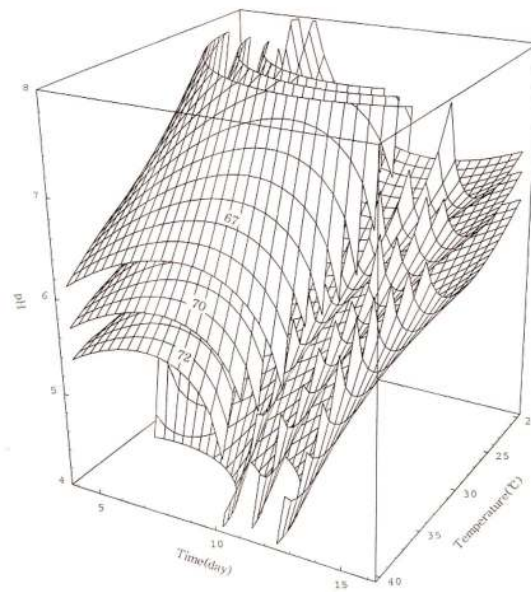


Fig. 2-9. Response surface for electron donating ability(DPPH) at constant values (DPPH : 67, 70, 72 %) as a function of fermentation temperature, time and pH of culture broth

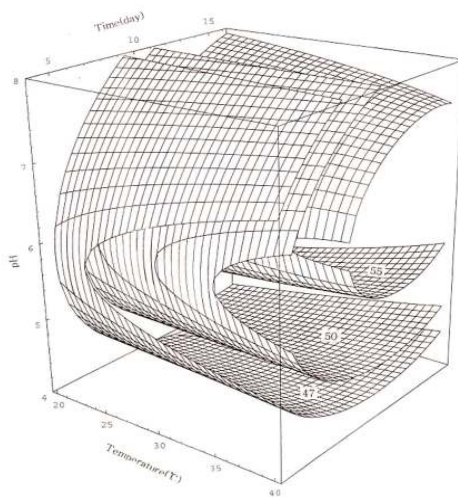


Fig. 2-10. Response surface for electron donating ability(DMPD) at constant values (DMPD : 47, 50, 55 %) as a function of fermentation temperature, time and pH of culture broth.

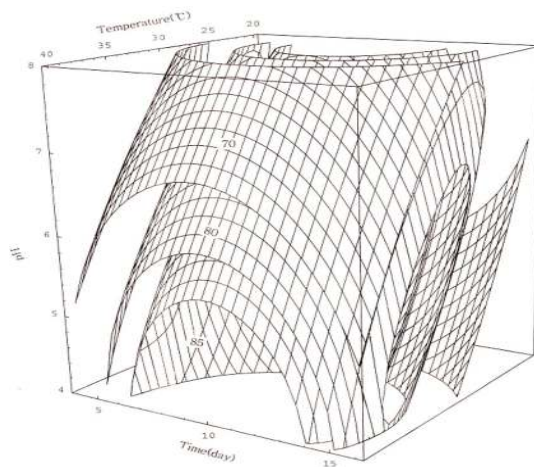


Fig. 2-11. Response surface for electron donating ability(ABTS) at constant values (ABTS : 70, 80, 85 %) as a function of fermentation temperature, time and pH of culture broth

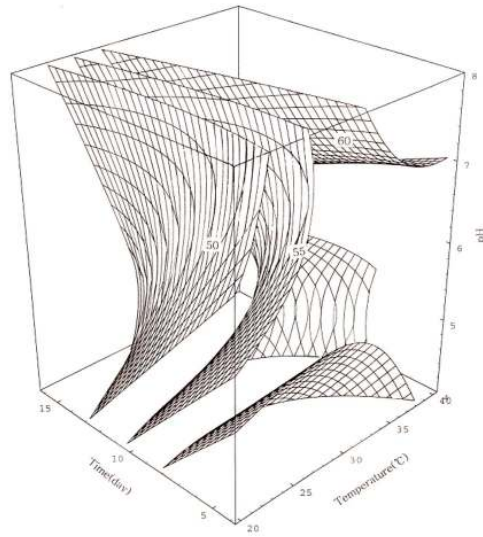


Fig. 2-12. Response surface for nitrile scavenging ability at constant values (nitrile scavenging ability : 50, 55, 60 %) as a function of fermentation temperature, time and pH of culture broth

바) 최적 발효조건의 예측

항산화 특성이 우수한 최적 발효조건을 설정하기 위하여 발효액의 총 페놀성 화합물 함량, 전자공여능 및 아질산염소거능에 대한 4차원 반응표면을 superimposing하였다(Fig. 2-13). 그 결과 최적 발효조건의 범위는 Table 2-13과 같이 발효온도 25~35°C, 발효시간 10~14일, 발효초기 pH 5.5~7.5이었다. 그리하여 이로부터 최적점이라고 예상되는 발효온도 30°C, 발효시간 12일, 발효초기 pH 6.5를 임의의 발효조건으로 예측하였다.

Table 2-13. The range of optimum fermentation condition for maximum response variables by superimposing response surface of variables yielding in the fermentation of culture broth

Fermentation Condition	Range of predicted condition
	(optional point)
Temperature(°C)	25 ~ 35
Time(day)	10 ~ 14
pH	5.5 ~ 7.5

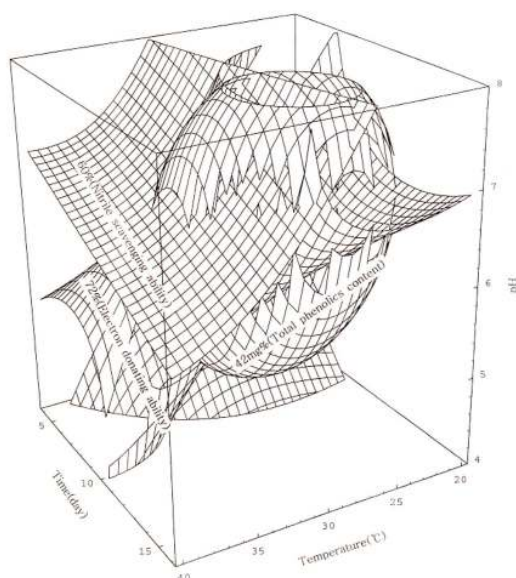


Fig. 2-13. Superimposed response surface for optimization of total phenolics acid, electron donating ability and nitrile scavenging ability as function of fermentation temperature, time and pH of culture broth.

나. 용매 분획별 항산화적 특성

각 분획물의 총 페놀 화합물 함량에 대한 결과는 Table 2-14와 같다. 총 페놀 화합물 함량은 methanol 분획에서 다른 분획물에 비해 월등히 많은 함량인 117.50mg%를 나타내었고, chloroform 분획에서는 다른 분획에 비해 다소 낮은 함량을 보였고, 나머지 분획에서는 26.01~46.58mg%의 함량이 측정되었다.

아질산염 소거능 측정결과 methanol 분획과 n-butanol분획에서 각각 94.81%, 92.61%의 높은 활성을 나타내었으며, 나머지 분획에서는 51.47~88.88%의 높은 소거능이 측정되었다. 아질산염은 그 자체가 지니는 특성 때문에 일정 농도 이상 섭취하게 되면 혈중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 methemoglobinemia 등과 같은 각종 중독증상을 일으키는 것으로 보고되어 있다. 그러므로 위의 결과로 미루어 볼 때 이 발효액이 각종 중독 증상을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 2-14. Total phenolics content and nitrile scavenging ability of various fractions obtained form culture broth

Fraction	Total phenolics content(mg%)	Nitrile scavenging ability(%)
BHT	2.97	53.98
Culture broth	48.62	66.17
Diethyl ether	46.58	88.88
Chloroform	6.54	51.47
Ethyl acetate	26.61	68.48
n-Butanol	37.75	92.61
Methanol	117.50	94.81

DPPH법 및 DMPD법에 의한 배양액의 전자공여능 실험결과는 Table 2-15과 같다. 배양액의 diethyl ether 분획, ethyl acetate 분획, methanol분획에서 88.59%, 64.42%, 96.53%로 강한 활성을 나타내었다. 각각 분획의 활성은 methanol> diethyl ether> ethyl acetate> butanol> chloroform 순으로 활성이 나타났으며, 전체적으로 비극성, 극성 모두에서 높은 활성을 나타내었다. DMPD법에 의한 배양액의 전자공여능 측정 결과 methanol 분획에서 73.07%의 강한 활성을 나타내었으며, 그 다음으로 butanol 분획, 43.97%, ethyl acetate 분획 26.10% 순으로 나타났다. 반면 diethyl ether과 chloroform 분획에서는 활성을 나타내지 않아 DPPH법에 의한 전자공여능과

상이한 결과를 보였다.

Table 2-15. Electron donating abilities of various fraction obtained from culture broth

Fraction	Electron donating ability	
	DPPH(%)	DMPD(%)
BHT	64.08	-
Culture broth	77.89	59.26
Diethyl ether	88.59	-
Chloroform	42.39	-
Ethyl acetate	64.42	26.10
n-Butanol	59.39	43.97
Methanol	96.53	73.07

다. 페놀물질 분획의 성분분석과 항산화 작용 특성

1) 페놀산 분석

발효액으로부터 추출한 추출물 및 중성 페놀물질과 산성 페놀물질을 분획하여 C₁₈ reverse phase HPLC 분석을 행한 결과는 Table 2-16과 Fig. 2-14에 나타나 있다.

발효액의 중성획분의 주요 phenolic acid는 ferulic acid와 sinapic acid로 각각 27.97, 27.77 μ g/g의 함량을 나타내었고, coumaric acid와 benzoic acid도 확인되었다. 산성 획분에서도 소량이지만은 coumaric, sinapic, benzoic와 ferulic acid 순으로 함량이 나타났으며, 에탄올 추출물에서는 phenolic acid는 검출되지 않았다. 이상의 결과로 보아 발효액에서의 phenolic acid는 중성획분에서 추출되며, 주요 페놀 성분은 ferulic acid와 sinapic acid로 밝혀졌다.

Table 2-16. Composition of phenolic acid of culture broth

Fraction	Phenolic acid concentration(μ g/g)			
	Benzoic acid	ρ -Coumaric acid	Ferulic acid	Sinapic acid
Extract solution(80% Et-OH)	-	-	-	-
Neutral fraction	5.47	16.27	29.97	27.77
Acid fraction	1.81	3.82	0.77	2.66

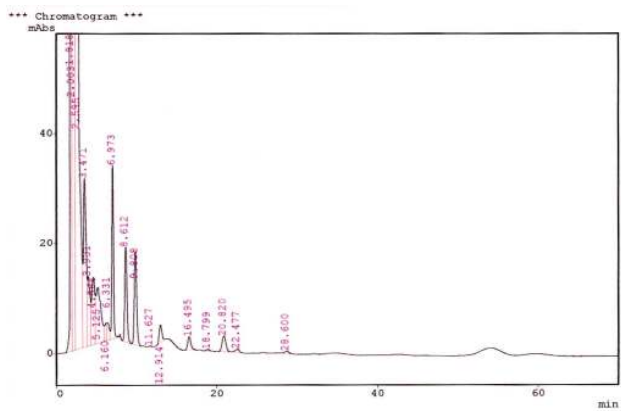
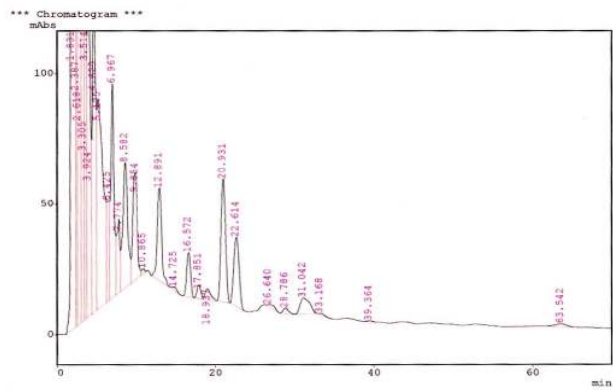
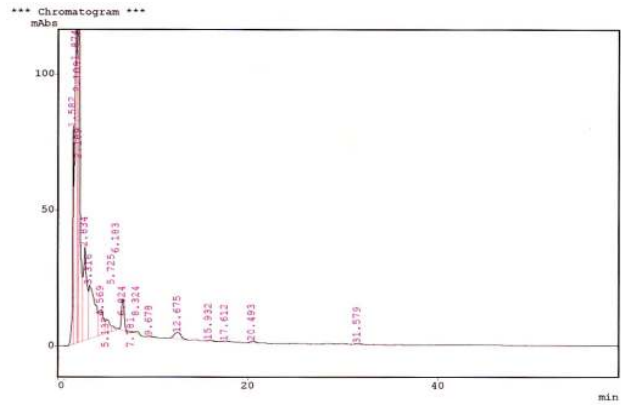


Fig. 14. High performance liquid chromatogram of phenolics from culture broth
 * RT 16.57 : Coumaric acid, 20.93 : Sinapic acid, 22.61 : Ferulic acid, 28.78 :
 Benzoic acid

2) TLC에 의한 페놀화합물의 구성성분

분획별 추출물로부터 각 페놀산을 TLC로 분석하여 Fig. 2-15에 나타내었다.

추출된 페놀 물질을 silica plate 상에 전개하여 분리한 결과에서 중성 용출 분획 Rf치 0.68의 ferulic acid와 Rf치 0.65의 coumaric과 sinapic acid의 표준품과 동일한 위치에서 검출되었으나 에탄올 추출물과 산성 용출 분획에서는 검출되지 않았다.

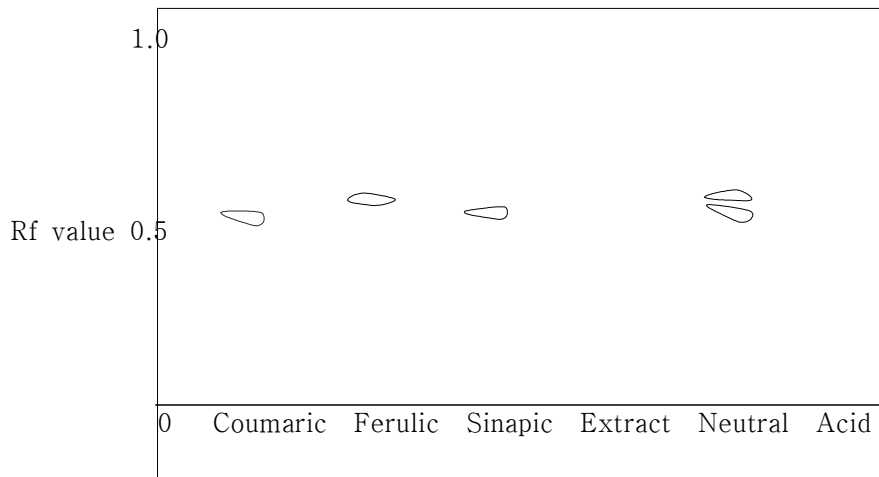


Fig. 2-15. Thin layer chromatogram of phenolic acid extract form culture broth fractions.

3) 항산화작용 특성

발효액으로부터 추출한 추출물과 추출물을 가수분해 후 Sep-Pak C₁₈[®]을 이용해 분획한 중성 획분과 산성 획분의 총 페놀성 화합물, 아질산염 소거능 및 함량전자공여능을 측정된 결과는 Table 2-17, 2-18과 같다. 아질산염 소거능은 각각 98.29%, 89.29%로 강한 활성을 나타내었고, 총 페놀성 화합물 함량은 중성획분에서 월등히 높은 함량(141.75mg%)을 보였다. 전자공여능은 DPPH법의 경우 중성획분 > 추출물 > 산성획분 순으로 활성이 나타나 중성획분에서 97.70%의 가장 높은 활성을 나타냈으며, DMPD 법에서도 중성획분의 전자공여능 활성이 가장 좋았다. 발효액의 전자공여능은 중성획분이 산성획분 보다 항산화 효과가 훨씬 컸다.

Table 2-17. Total phenolics content and nitrile scavenging ability of various fractions obtained from culture broth

Fraction	Total phenolics content(mg%)	Nitrile scavenging ability(%)
Extract solution (80% Et-OH)	35.46	85.88
Neutral fraction	141.75	98.29
Acid fraction	38.34	89.29

Table 2-18. Electron donating abilities of various fraction obtained from culture broth

Fraction	Electron donating ability	
	DPPH(%)	DMPD(%)
Extract solution (80% Et-OH)	88.43	34.14
Neutral fraction	97.90	59.96
Acid fraction	58.37	40.20

라. TLC 및 투석을 이용한 항산화성 수용성 갈변물질 분리

1) 갈변도

발효배양액의 수용성 갈변물질을 용매 추출 후 컬럼크로마토그래피를 통과한 후 투석막을 이용하여 투석하여 갈변물질을 분리하였다. 갈변물질을 각각 투석내외물질로 분리하여 각각에 대한 갈변도를 측정된 결과는 Table 2-19와 같다. 투석 내액물질 및 칼럼 분획분의 갈변도를 보면 초기 투석 내액물질보다 낮은 값을 보였으며, 0.01M 초산 완충용액 분획은 400nm, 420nm 및 440nm의 흡광도가 각각 0.171, 0.115 및 0.076이었으나 0.02M 염산용액의 분획분에서는 흡광도가 증가하여 각각 0.595, 0.464 및 0.350으로 높은 흡광도를 나타내어 갈변도가 증가하였음을 알 수 있었다. 투석 외액물질 구분의 칼럼 분획분의 갈변도를 보면 각 분획분은 투석 내액물질 구분에서 보다 더 낮은 값을 보였으며, 0.01M 초산완충용액 분획에서 다른 분획보다 높은 값을 나타내었다.

Table 2-19. Color intensity of DEAE-Cellulose column fraction of dialysate and diffusate from hydrophilic brown pigments in culture broth

Fraction	Absorbance		
	400nm	420nm	440nm
Dialysate	1.119	0.818	0.608
DEAE-cellulose	0.289	0.203	0.155
0.01M AcOH	0.171	0.115	0.076
0.01M HCl	0.180	0.167	0.138
0.02M HCl	0.595	0.464	0.350
0.03M HCl	0.058	0.050	0.042
Diffusate	0.791	0.564	0.424
DEAE-cellulose	0.055	0.042	0.026
0.01M AcOH	0.152	0.126	0.104
0.01M HCl	0.137	0.110	0.081
0.02M HCl	0.108	0.066	0.044
0.03M HCl	0.016	0.012	0.009

2) DEAE-cellulose 칼럼 분획분의 분광학적 특성

수용성 갈변물질의 각 분획들의 항산화성에 관계되는 구조적 특성을 알아보기 위하여 UV spectrum을 측정하였다. 투석 내액물질 구분의 DEAE-cellulose 칼럼 분획분들의 자외선 흡수 spectrum(Fig. 2-16)을 보면 0.02M HCl 분획분에서 260nm에서 280nm에 걸치는 흡수대를 형성하였으나 나머지 분획분에서는 특징적인 흡수를 나타내지 않았다. 한편 투석 외액물질 구분의 경우에는 0.01M 초산완충용액 분획에서 280nm 부근에 폭넓은 흡수를 나타내었고 나머지 분획은 뚜렷한 흡수곡선을 나타내지 않았다(Fig. 2-17).

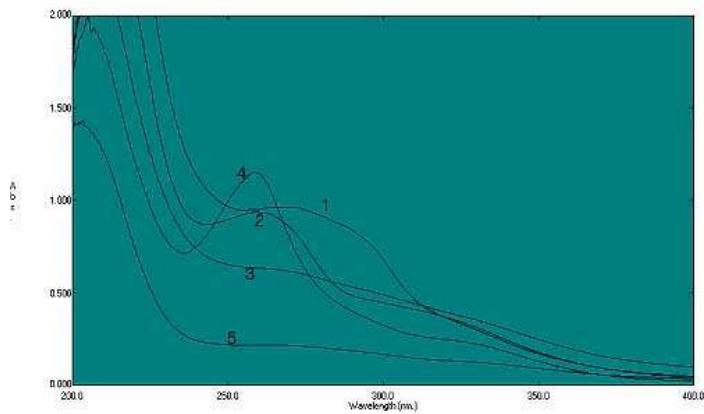


Fig. 2-16. UV-spectra of DEAE-cellulose column fraction of dialysate from hydrophilic brown pigment in culture broth

* 1: Dialysate, 2: 0.01M AcOH, 3: 0.01M HCl, 4: 0.02M HCl, 5: 0.03M HCl

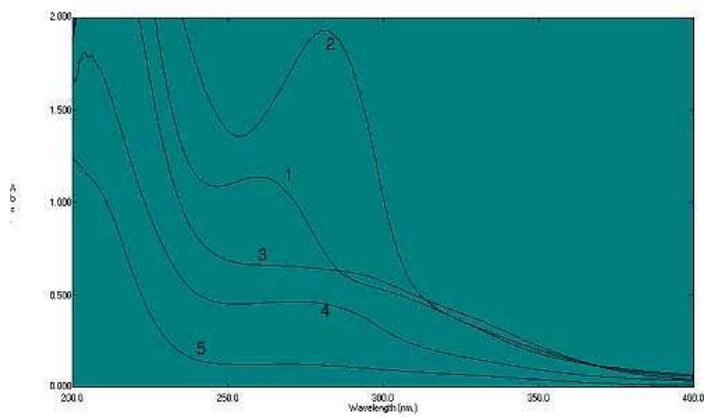


Fig. 2-17. UV-spectra of DEAE-cellulose column fraction of diffusate from hydrophilic brown pigment in culture broth

* 1: Dialysate, 2 : 0.01M AcOH, 3 : 0.01M HCl, 4 : 0.02M HCl, 5 : 0.03M HCl

3) 수용성 갈변물질의 항산화력

수용성 갈변물질 중 투석내액 물질 및 DEAE-cellulose 칼럼 분획들의 항산화력을 측정된 결과(Table 2-20) DEAE-cellulose 칼럼의 모든 분획은 DEAE-cellulose 분획 전인 투석 내액물질 보다 낮은 항산화력을 나타내었으며, 분획물들 중

DEAE-cellulose 칼럼 통과액에서 높은 항산화력을 보였으며, 나머지 분획에서는 낮은 활성을 나타내었다.

한편, 투석 외액물질 및 DEAE-cellulose 칼럼 분획들의 항산화능은 투석 내액물질보다 높은 활성을 보였으며, 투석 외액물질은 DPPH radical 소거능이 92.25%, 총 페놀성 화합물 함량 289.50mg%로 상당히 높은 값을 보였다(Table 2-22). DEAE-cellulose 칼럼 분획 중 0.01M 초산 완충액에서 전자공여능(DPPH radical 소거능)이 81.32%로 높은 활성을 나타내어 0.01M 초산완충 분획에서 항산화능을 가진 수용성 갈변물질이 분리되는 것으로 보이며, 나머지 분획에서는 낮은 항산화 활성을 보였다.

Table 2-20. Antioxidative characteristics of DEAE-Cellulose column fraction of dialysate from hydrophilic brown pigments in culture broth

Fraction	Total phenolics content(mg%)	Electron donating ability(%)		Nitrile scavenging ability(%)
		DPPH	DMPD	
Dialysate	187.40	82.11	59.12	28.94
DEAE-cellulose	123.90	74.94	44.67	22.58
0.01M AcOH	49.53	34.05	7.44	4.23
0.01M HCl	30.57	27.56	5.40	3.76
0.02M HCl	60.20	44.64	22.33	14.11
0.03M HCl	6.92	23.46	10.21	0.47

Table 2-21. Antioxidative characteristics of DEAE-Cellulose column fraction of diffusate from hydrophilic brown pigments in culture broth

Fraction	Total phenolics content(mg%)	Electron donating ability(%)		Nitrile scavenging ability(%)
		DPPH	DMPD	
Diffusate	289.50	92.25	61.89	43.29
DEAE-cellulose	25.20	14.57	1.60	1.88
0.01M AcOH	72.35	81.32	51.02	30.58
0.01M HCl	29.95	28.13	22.18	2.35
0.02M HCl	27.42	29.72	19.82	3.29
0.03M HCl	3.39	20.84	4.81	-

4) TLC에 의한 수용성갈변물질의 확인

수용성 갈변물질 구분의 투석 내액물질 구분과 투석 외액물질 구분을 DEAE-cellulose 칼럼으로 분획하고 각 분획분의 박층 크로마토그래피를 실시하여 Fig. 2-18 ~ 2-19에 나타내었다.

투석 내액물질 구분의 분리에서는 0.02M HCl 분획분으로부터 Rf치 0.2와 0.35의 2개 구분으로 분리되었으며, 투석 외액물질 구분의 분리에서는 0.01M AcOH용액 분획분으로부터 Rf치 0.28과 0.45의 2개의 구분이 각각 분리되었다.

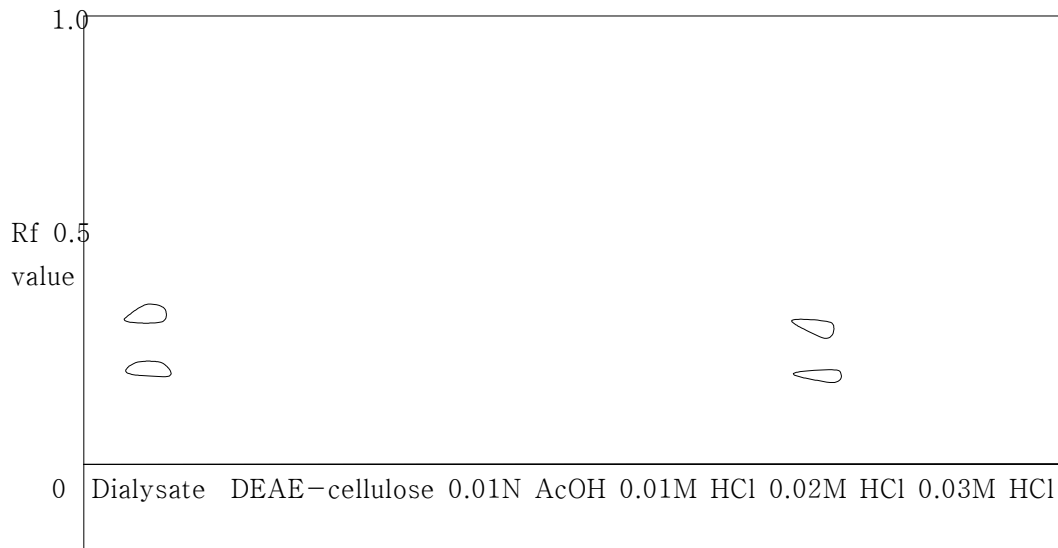


Fig. 2-18. Thin layer chromatogram of dialysate from hydrophilic brown pigments from culture broth fractions.

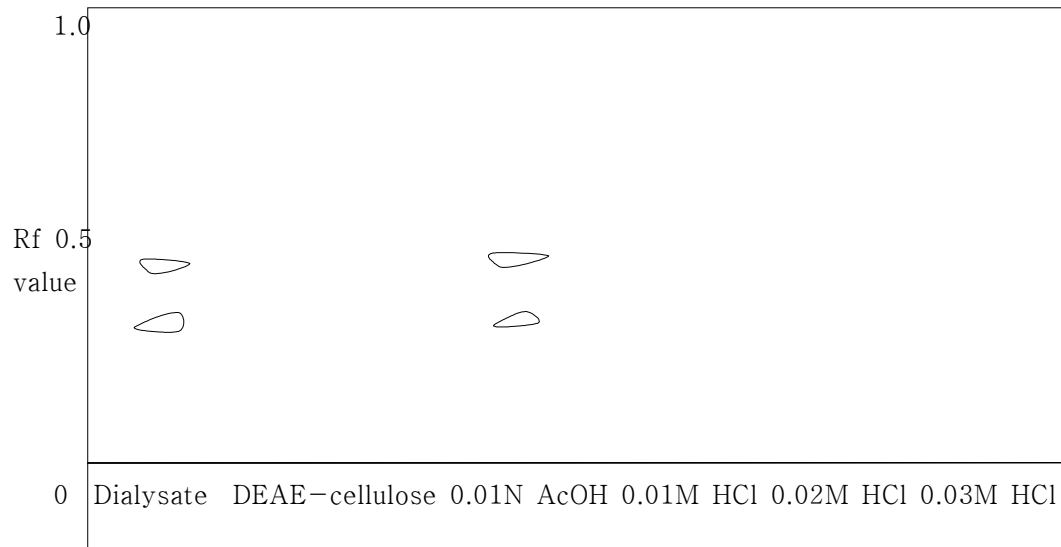


Fig. 2-19. Thin layer chromatogram of diffusate from hydrophilic brown pigments from culture broth fractions.

마. 기존의 상업용 항산화 물질의 항산화 특성

현재 식품 및 화장품 제품의 상업적으로 이용되고 있는 항산화물질로서 천연항산화제 및 합성 항산화제의 항산화적 특성을 조사한 결과는 Table 22와 같다. 이중 총페놀성화합물과 전자공여능의 DPPH 및 ABTS활성은 합성 항산화제인 PG가 가장 높게 나타났고 DMPD 활성은 TBHQ가 가장 높게 나타났다. 또한 아질산염소거능의 경우는 BHT가 활성이 높은 것으로 나타났다. 그러나 이들 합성 항산화제의 경우 인체에 미치는 영향이 강하기 때문에 최근 천연물질 유래의 항산화제에 대한 관심이 증가하고 있다. 따라서 본 연구의 발효에 의한 항산화성 물질이 이들 합성 항산화제에 비해 항산화능이 떨어지지 않기 때문에 이들을 대체 할 수 있는 천연항산화제를 기대할 수 있으리라 생각된다.

Table 2-22. Antioxidative characteristics of commercial authentic antioxidants

Number ¹⁾	Total phenolics content($\mu\text{g/g}$)	Electron donating ability(%)			Nitrile scavenging ability(%)
		DPPH	DMPD	ABTS	
Ascorbic acid	48.72	4.79	3.56	7.06	15.95
BHA	34.82	70.52	7.12	71.62	40.28
BHT	29.70	64.68	—	36.05	53.98
TBHQ	43.29	77.70	48.25	61.83	43.76
PG	90.41	77.81	24.40	98.30	42.74
α -Tocopherol	17.08	33.02	—	20.81	34.15
Vit. E(50%)	3.15	—	—	2.97	—

¹⁾ Concentration 0.01%

바. 돌연변이 및 돌연변이 균주의 항산화 특성

1) 항산화성 물질 합성용 유전자 클로닝을 위한 돌연변이 균주 선발

미생물에 의한 항산화성 물질의 생산 특성을 조사하기 위하여 발효식품 등에서 항산화 활성이 우수한 분리된 최종 4종의 균주중 항산화 활성이 가장 뛰어난 *Bacillus* B6를 변이대상 모균주로 하여 변이주를 분리하였다. 최종 선발된 변이주중 완전배지에서 생육하지만 최소배지에서 생육하지 못하는 균주 9종을 최종 선별하여 이들 변이주의 배양물에 대한 항산화 활성을 비교하여 최종선발 하였다.

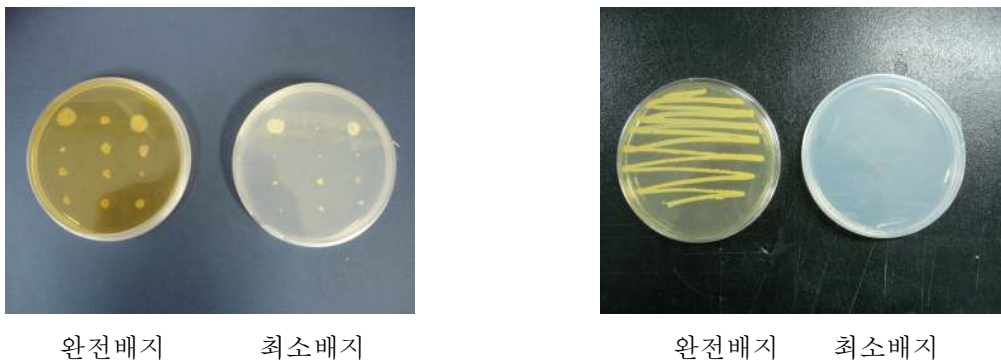


Fig 2-20. Isolated mutant strains from parent strain, *Bacillus* sp

2) 돌연변이 균주의 항산화적 특성 및 유전자 클로닝용 primer 제작

최종 선별된 9종의 변이균주를 대상으로 한 항산화 활성을 비교한 결과는 Table 2-23과 같다.

총 페놀성 화합물 함량에서는 모든 변이주들이 모균주보다 함량이 높게 나타났지만 그 차이는 크지 않았다. 전자공여능(DPPH, DMPD, ABTS radical 소거능) 및 아질산염 소거능은 전반적으로 모균주보다 활성이 낮은 변이주도 있었으나 M1 변이주의 경우 모든 항산화 활성이 모균주보다 높은 것으로 나타나 모균주 및 변이주 M1을 대상으로 항산화성 물질 합성에 관여하는 유전자 단편을 클로닝하기 위하여 primer를 제작하였다.

Table 2-23. Experimental data on total phenolics content, electron donating ability and ABTS of culture broth of mutant strains

Starains	Total phenolics content(mg%)	Electron donating ability(%)			Nitrile scavenging ability(%)	
		DPPH	DMPD	ABTS		
Parents strain	40.32	71.38	72.24	61.55	70.07	
Mutants	M1	41.14	80.28	79.26	69.10	77.37
	M2	44.13	75.80	74.80	66.60	72.50
	M3	46.27	66.57	74.00	61.55	70.07
	M4	42.26	65.11	73.68	65.26	69.83
	M5	47.82	78.00	73.52	61.79	83.21
	M6	44.21	68.22	75.75	62.15	72.73
	M7	45.61	71.33	74.32	63.59	66.59
	M8	45.09	76.88	75.43	63.35	70.98
	M9	46.20	65.33	72.56	61.79	64.19

3. 결론

1) 항산화력이 높은 발효조건을 설정하기 위하여 발효액 및 배양조건별 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능에 대한 발효특성을 조사하고 이들 값의 반응표면을 superimposing하여 최적 발효액 조건 범위를 예측한 결과 발효액의 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능이 모두 만족하는 범위는 당밀 첨가량 1.8~2.2%, 미강 첨가량 2.1~2.4% 및 탈지대두박 첨가량 1.9~2.4%로 나타났고 최적 발효조건의 범위는 발효온도 25~35℃, 발효시간 10~14일, 발효초기 pH 5.5~7.5이었다. 그리하여 이로부터 최적점이라고 예상되는 발효온도 30℃, 발효시간 12일, 발효초기 pH 6.5를 최적의 발효조건으로 예측되었다.

2) 배양액의 용매 분획물의 항산화적 특성을 조사한 결과 총 페놀 화합물 함량은 methanol/water 분획이 117.50mg%으로서 가장 높은 함량이었다. 아질산염소거능 측정결과 methanol/water 분획과 n-butanol분획에서 각각 94.81%, 92.61%의 높은 활성을 나타내었다. DPPH법 및 DMPD법에 의한 배양액의 전자공여능 실험결과 methanol/water 분획에서 각각 96.53%, 및 73.07%으로 가장 높은 활성을 나타내었다.

3) 발효액 추출물 및 중성 페놀물질과 산성 페놀물질을 분획하여 C₁₈ reverse phase HPLC 분석 및 TLC에서 분리를 행한 결과 발효액에서의 phenolic acid는 중성획분에서 추출되며, 주요 페놀 성분은 ferulic acid와 sinapic acid로 밝혀졌다.

4) 발효액으로부터 추출한 추출물의 중성 획분과 산성 획분의 총 페놀성 화합물, 아질산염 소거능 및 전자공여능을 측정된 결과 아질산염 소거능은 각각 98.29%, 89.29%로 강한 활성을 나타내었고, 총 페놀성 화합물 함량은 중성 획분에서 월등히 높은 함량(141.75mg%)을 보였다. 전자공여능은 DPPH법의 경우 중성획분에서 97.70%의 높은 활성을 나타냈으며, DMPD 법에서도 중성획분의 전자공여능 활성이 가장 좋았다. 발효액의 전자공여능은 중성획분이 산성획분 보다 항산화 효과가 훨씬 큰 것으로 나타났다.

5) 발효배양액의 수용성 갈변물질 중 투석내액 물질 및 DEAE-cellulose 칼럼 분획들의 항산화력을 측정된 결과 투석 외액물질 및 DEAE-cellulose 칼럼 분획들의

항산화능은 투석 내액물질 보다 높은 활성을 보였으며, 투석 외액물질은 DPPH radical 소거능이 92.25%, 총 페놀성 화합물 함량 289.50mg%로 상당히 높은 값을 보였다. DEAE-cellulose 칼럼 분획 중 0.01M 초산 완충액에서 전자공여능(DPPH radical 소거능)이 81.32%로 높은 활성을 나타내어 0.01M 초산완충 분획에서 항산화능을 가진 수용성 갈변물질이 분리되는 것으로 보였다.

6) 수용성 갈변물질 구분의 투석 내액물질 구분과 투석 외액물질 구분을 DEAE-cellulose 칼럼으로 분획하고 각 분획분으로 박층 크로마토그래피를 실시한 결과 투석 내액물질 구분의 분리에서는 0.02M HCl 분획분으로부터 Rf치 0.2와 0.35의 2개 구분으로 분리되었으며, 투석 외액물질 구분의 분리에서는 0.01M AcOH용액 분획분으로부터 Rf치 0.28과 0.45의 2개의 구분이 각각 분리되었다.

7) 최종 선별된 9종의 변이균주를 대상으로 한 항산화 활성을 비교한 결과 전자공여능(DPPH, DMPD, ABTS radical 소거능) 및 아질산염 소거능 활성에서 M1 변이주의 경우 모든 항산화 활성이 모균주보다 높은 것으로 나타나 모균주 및 변이주 M1을 대상으로 항산화성 물질 합성에 관여하는 유전자 단편을 클로닝하기 위하여 primer를 제작하였다.

제3절 발효배양물의 항암 효과 및 유전자 cloning 연구

1. 연구수행방법

가. SRB assay 세포 배양

인체 전립선암 세포주인 RC58T/h/SA#4는 Center for Prostate Disease Research (Department of Surgery, Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, MD20814, USA)로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, 100 units/ml의 Antibiotic Antimycotic 과 10 % FBS(Fetal Bovine Serum)이 첨가 된 DMEM 배지를 사용하였으며, 각 세포주는 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 주 2~3회 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 계대 배양하여 사용하였으며, passage number가 10회 이상 일 때는 폐기하고 새로운 세포를 다시 배양하여 실험하였다.

나. SRB assay

Monolayer로 배양한 각 세포주를 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10^5 cells/ml가 되도록 희석하여 24well plate에 seeding한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 preincubation 하였다. 24시간이 지난 후 각 well의 배양액을 제거한 후 다양한 농도로 준비한 시료가 포함 된 새 배양액을 well에 첨가하고 24시간 반응시켰다. 배양이 종료된 후 세포 배양액을 조심히 제거하고 각 well에 차가운 12% TCA(Trichloroacetic acid)를 500 μ l씩 첨가하고 4°C에서 1시간 배양하여 충분히 단백질을 고정시켰다. 1시간 후 plate는 증류수로 5회 세척하고 완전히 건조시켰다. 각 well에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB 용액을 250 μ l씩 가하여 상온에서 1시간 충분히 염색시킨 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 완전히 건조시켰다. 건조 후 각 well에 10mM Triss buffer를 100 μ l씩 가하여 SRB dye를 충분히 녹여내어 96-well plate용 microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하고 대조군에 대한 실험군의 흡광도를 비교하였다.

다. Trypan blue exclusion assay

Monolayer로 배양한 각 세포주를 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10^5 cells/ml가 되도록 희석하여 24well plate에 seeding한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 pre-incubation 하였다. 24시간 처리한 후 각 well의 배양액을 제거한 후 다양한 농도로 준비한 시료가 포함 된 새 배양액을

well에 첨가하고 24시간 반응시켰다. 반응이 종료된 well에서 배양액을 수거하고 부유하지 않은 세포는 0.25% Trypsin-EDTA용액을 처리하여 세포를 모두 회수하였다. 원심분리 (1200rpm, 5min, 4°C) 후 세포를 PBS에 부유시켜 세포 현탁액을 Trypan blue dye로 염색하고 hemocytometer로 염색이 된 세포와 염색이 되지 않은 세포를 모두 counting한 후 총 세포의 수에서 살아있는 세포의 비로 계산하였다.

라. 통계처리

모든 실험의 결과들은 mean±SD로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 유의성 여부를 판정하였다 (*p<0.05, **p<0.01).

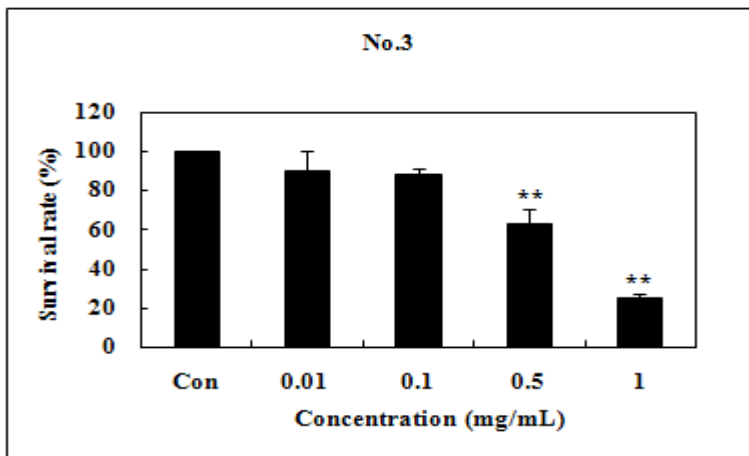
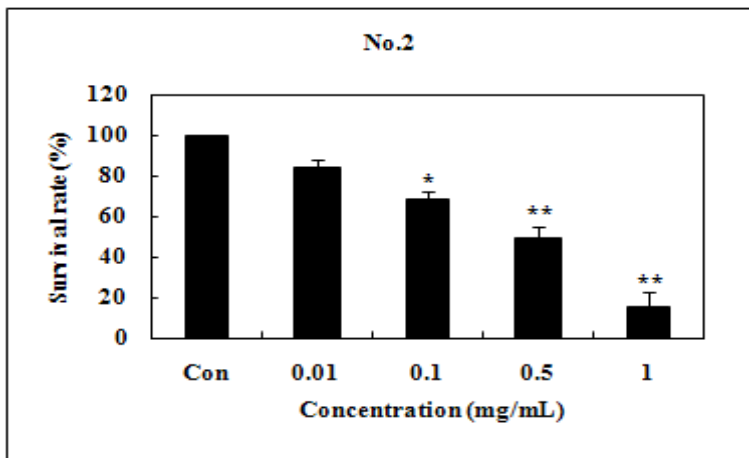
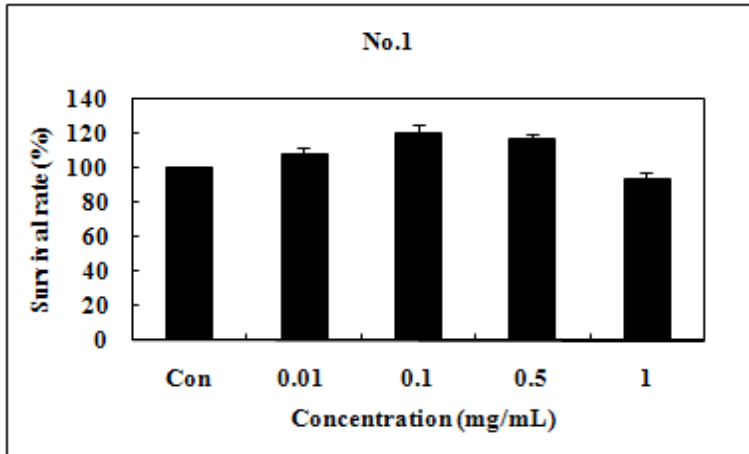
2. 연구수행 내용 및 결과

가. 항암효과

전립선암세포주인 RC58T/h/SA#4에 대한 발효배양물과 용매 분획시료의 억제효과를 확인하기 위하여 각 시료를 0.01, 0.1, 0.5 및 1 mg/mL 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 암세포의 성장억제효과를 SRB 방법으로 측정한 결과는 Fig. 3-1과 같다.

6가지 시료 중 발효배양물(No.1), buthanol 획분(No. 5) 및 methanol 획분(No. 6)은 대조군에 비하여 암세포 성장억제효과를 나타내지 않았으나, ether획분(No.2), chloroform획분(No. 3) 및 ethylacetate획분(No.4)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 암세포 성장을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다.

한편 SRB assay를 통해 암세포 성장억제효과를 확인한 ether획분(No.2), chloroform획분(No. 3) 및 ethylacetate획분(No.4)의 3가지 시료를 Trypan blue exclusion assay를 통한 암세포 성장 억제효과를 확인한 결과는 Fig 3-2와 같다. 즉 시료의 농도가 증가 할수록 사멸한 세포의 수가 증가하였으며, 생존 세포의 수도 대조군에 비하여 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 6개의 시료 중 암세포 성장 억제효과를 나타낸 3가지 시료 추출물 ether획분(No.2), chloroform획분(No. 3) 및 ethylacetate획분(No.4)을 24시간 처리 한 후 IC_{50} 을 측정한 결과는 Table 3-1과 같다. 즉 ether획분(No.2), chloroform획분(No.3) 및 ethylacetate획분(No.4)은 각각 0.84 ± 0.079 , 0.94 ± 0.017 , 0.8 ± 0.03 mg/mL의 IC_{50} 값을 나타내었다.



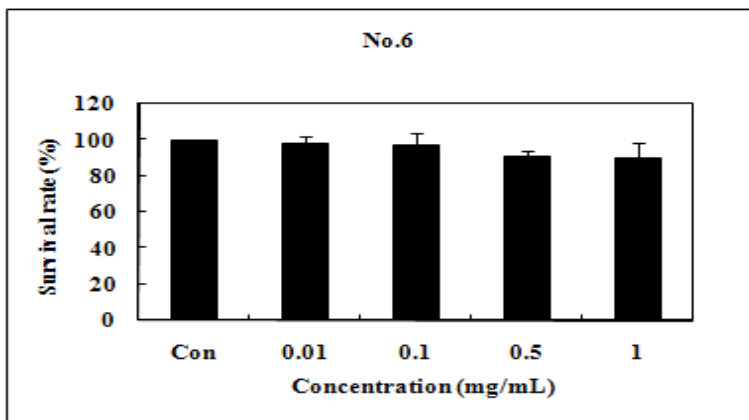
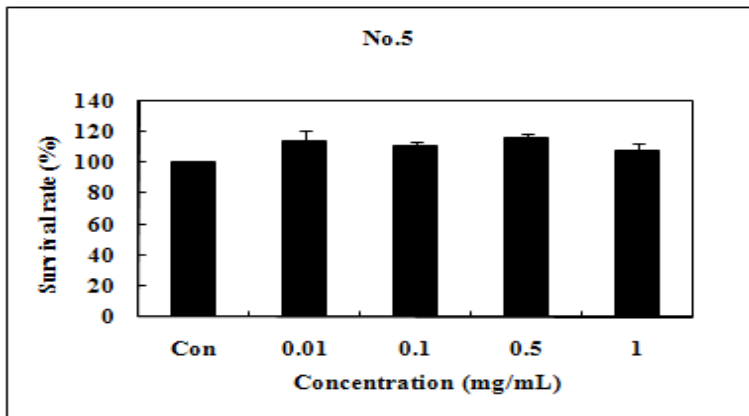
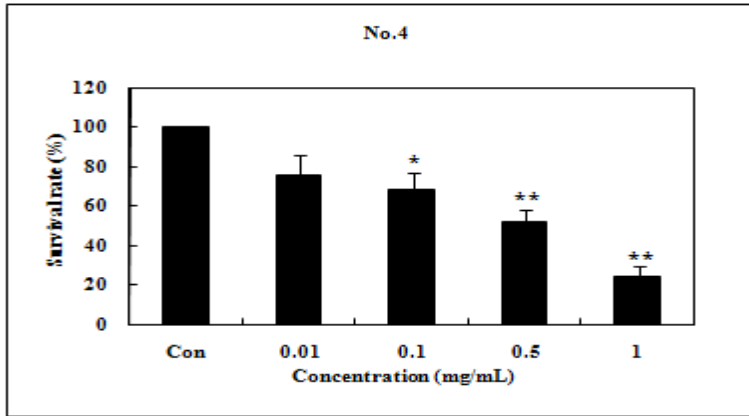


Fig. 3-1. Cell growth inhibition effects in RC58T/h/SA#4 treated with samples for 24 hours by SRB assay. Results were expressed as the percentage of control. Values are mean±SD and were obtained from three different experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

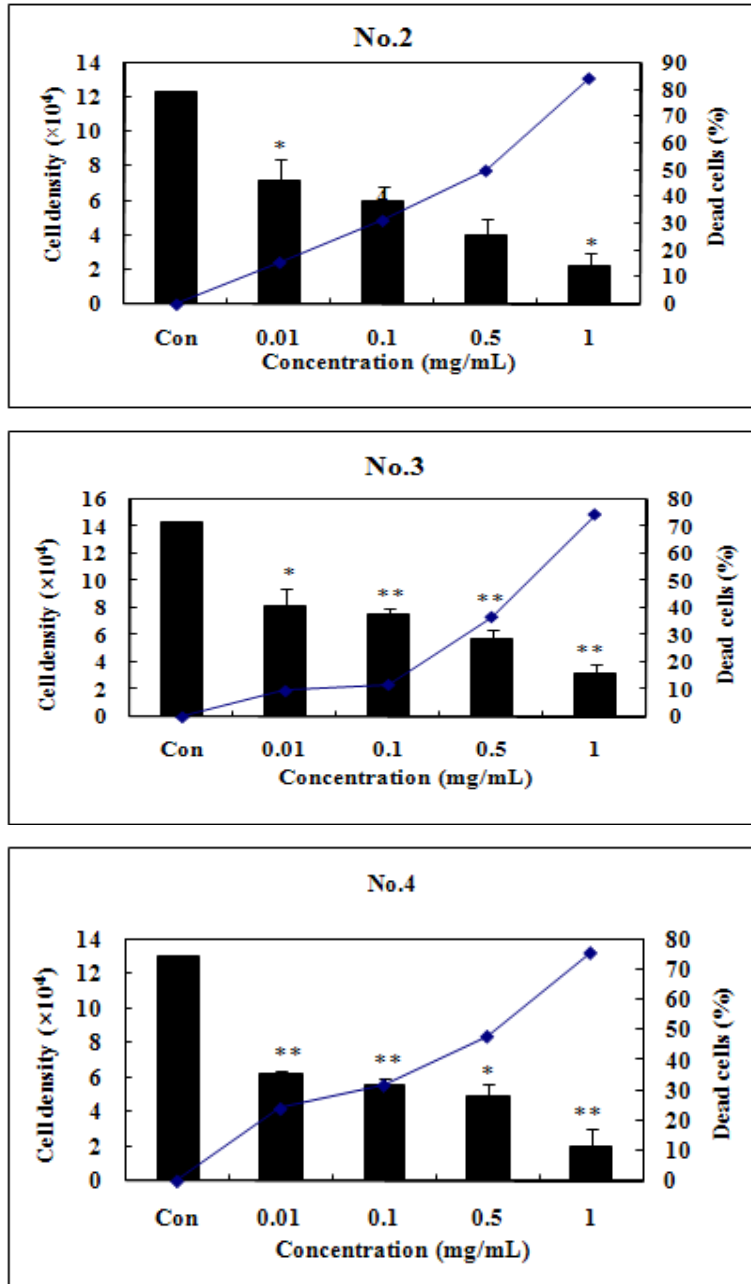


Fig. 3-2. Cell growth inhibition effects in RC58T/h/SA#4 cells treated with samples for 24 hours by typan blue dye. Results were expressed as the percentage of control. Values are mean \pm SD and were obtained from three different experiments(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Table 3-1. IC₅₀ value of sample on the prostate cancer cells by SRB

Cell	IC ₅₀ (mg/mL)		
	No.2	No.3	No.4
RC58T/h/SA#4	0.84±0.079	0.94±0.017	0.8±0.03

IC₅₀ is the concentration that inhibited 50% of the growth.

Data values are expressed as mean ±SD of triplicate determinations.

나. 유전자 cloning

1) Phenylalanine ammonia lyase 유전자의 클로닝

Phenylalanine으로부터 ferulic acid, sinapic acid 등의 생합성에 관련된 경로는 다음 Fig 3-3과 같다.

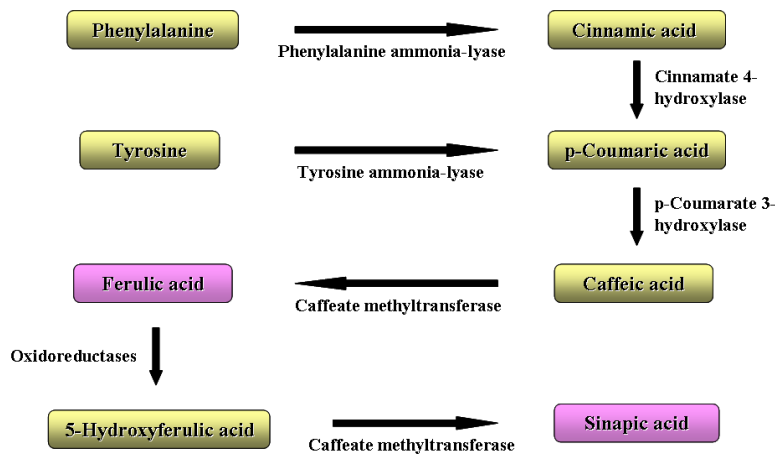


Fig. 3-3 Ferulic acid 와 Sinapic acid의 생합성 경로

이 반응경로에서 첫 번째 단계에 작용하는 효소인 phenylalanine ammonia lyase의 생합성하는데 관여하는 유전자를 클로닝하고자 계획을 수립하였다. 먼저 미생물이 생산하는 phenylalanine ammonia lyase의 단백질 구조로부터 클로닝의 정보를 얻고자 현재까지 연구되어 저장되어있는 data들을 이용하여, 다중 정렬을 수행한 결과 다음 Fig. 3-4 와 같은 결과를 얻었다.

```

(a) -----MSLLNGSVNGIPHSKPYN-----YSTLLSRFIESYNELQ
(b) MGLDNSKNTARFFDLKRAVHGMMGTTPVNGFRATALSFRASRTMTRTSALSQFLAYRELE
(c) MVLDELRLDSTLRRVNGD LLDPAVYPRRMGHMTDGE-----EDSMLTRFLQSEREVA
(d) SS-----MAPTADVLPVVEASTRPG-----LLVQPSDTRKRA
      * : :
(a) SY-----RSKRAVRVDGRTLSVAAVTAARYHASVELDDCPTARARLAKSRKVITDRV
(b) GY-----KNGRAIRVDGQTLSTAAVAAAARYNAAVELDESPLVKRVRKSQLAIANKV
(c) RFSLTVFNTRNGQPVVVDGHTLLTAGVVAARFHARIELEDDCHRVDRDRIARSRKVISDRV
(d) FRTEQVVIDGYNLKIQGLVASARYGHVPLVDPVSAETRKRIDD SVQSLIARKL
      . : : * * . . : * * * : * * . : * : * : * :
(a) ESGTSVYGLSTGFGGSADTRTDQPLLLGHALLQHQMGLVLP-----SSQALDVLPL
(b) STGASVYGLSTGFGGSADTRDRPMLLGFALLQHGHVGLPT-----STEPDVLPL
(c) DSGTSVYGLSTGFGGSADTRDRP LLLGHALLQHGHVGLPT-----SGRAPEGLPL
(d) DRGESIYGINTGFGGSADSRANTRALQLALLQMQQCGLVLPVPTFPTGEPSSAPFALPL
      . * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(a) LDPNSSTIMPE SWVRGAMLIRMS LIRGHS GVRWELIERINEVLSAN-VTPVPLRGSIS
(b) QDANN-TSMPEAWIRGAILIRMS LIRGHS GIRWELIERMRELAAN-VI PVVPLRGSIS
(c) LDPLSSTIMPE SWVR-----WELIERMKEVFMAN-ITPAVVPRTSIS
(d) TDTESSLIMPEAWVRGIVVRLSSLMRGHS GVRWEVLDRMQKFLQNNVT PVVPRSSIS
      * . . * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(a) ASGDLSPLSYIAGTLVNPAPVYHGPAAYGARQTS P SSDALTYQNIPLPLASKEHLGI
(b) SSGDLSPLSYIAGTIIGNPSIRVYHGPKS GIRQIGSKRDVLA LHMIEPFPLESREPLGI
(c) ASG-----VANPSIRVHFTPPSSDSRQLTSADALSQHGIEPISLASREHLGI
(d) ASGDLSPLSYVAGALAGQRGIYCFVTDGR-GQRVKVTADEACRMRHRTIPVQYEPREALGL
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(a) LNGTAFSASVVALALMDAVHLSLLAQVCTAMGTEALACTRGSYDPFIHATARPHPGQIE
(b) LNGTAFSASVVAALALMEAIHLVLLAQVCTAMGTEALICTRASHAPFIHATARPHPG-QVE
(c) LNGTAFSASVVAALVMHDAMQLALLSQVCTALGTEALRGNIGSYAPFIHATARPHPG-QVE
(d) LNGTAFSASVAGLATYE AENLASLTQLTTAMAVEALKGTAS FAPFIEIARPHPG-QIK
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(a) AAHNIPTLEE SKLARLHETE--VNIHDDQYSLRQDRYPLRTAPQFLGPQIEDILSALVA
(b) CAENIWNLLDGSKLAQLEEHE--VRLEDDRYTLRQDRYPLRTS PQFLGPQIEDIISAFTA
(c) TARNIWNLLQGSLLAQLHEEE--VGLSQDRYTLRQDRYPLRTS PQFLGPQVEDILAAALST
(d) SAKFIRALLSGSRLAEHLENERHVLFSEDNCTLRQDRYPLRTASQWVGPGLIEDIENAKRS
      * . * * * . * * * . * * * : : * : * * * * * * * * * * * * *

```



```

(a) ITQECN--STTDNPLVDGETG--EVHHGGNFQAMAVTNAMEKTR LALHHIGKLLFAQSTE
(b) VTQECNYLPATDNPLIDGETG--ESHHGGNFQAMAVTNAMEKTR LALHHVGRLLFSQSTE
(c) VQLECN--STTDNPLIDGETG--HVHGGNFQAMAVTNAMEKTR LALHHIGKLLMFAQSTE
(d) VDIEIN--STTDNPMIDPYDGDGRIHHGGNFQAMAMNAVEKIR LALCAMGRMTFQQMTE
      : * . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(a) LVNPTMNNGLPPS LAAT-DPSLNYHARGIDIATAAYVAELGYLATPVSTHIQSAEMHNQA
(b) LVNPAMNRLGPPSVAAT-DPSLNYHARGLDIATAAYVAEA----TPGPTHIQSAEMHNQA
(c) LSNPAMNNGLPNLAAS-DPSLNYHARGIDIATAAYVAELGHLAAPVSTHIQSAEMHNQA
(d) LVNPAMNRGLPANLASTPDLNLFHARGIDIALASVTSELMFLGNPVSTHVQSAEMANQA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(a) VN-----SLALISARATLNSLEVLSILMASYIYLICQALDLRALQSEFVSGLR
(b) VN-----SLALISARATLNSLEVLSILMASYIYLICQALDLRALQREFLPLGLD
(c) VNHLLDRWTRGTHSSSLALISARSTVNSVQVLSMLIASYLYLLCQAVDLRALQHEFEAGLR
(d) IN-----SLALISGRQTLQATECLSMIQAWSLYLLCQALDIRALQYKVAEQLP
      : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(a) NIINDELVSIFGSFSLASQEDTLKRLLTIMKSSLEKTTTMDGVDQMLATAASTTTAFVD
(b) IIREELRSSFGSFLSSEQMERLQQLNTSAFEDHLDKTTTMDNTDRMTTAAATSSSVLLQ
(c) DIIREELSSSFLSTEGDSQGLSSEIFHLMRQSLDKNTTMDNTDRMTTAAATSTSTL LLT
(d) TLILASLHSHFGWMDETRQQLAAQVLRSMKRLDETSSKDLRDLRVETYQDASSVLR
      : * . * * * . : : : : : : : : : * * * * * * * * * * * *
(a) FFGSSEFTDASL LGSVVALISHFRS QVASRAANLLDQLRRDFLS GERGLAPASSYMGKTR
(b) FFTDSGASVPPSSCDLLSVSSSQSVATRS SVLMDDLKREYIFGDRGPTPASQYIGKTR
(c) KVTSSSLDAAT-KGSALAHPEFQSRVATRAALQQQLRDEFLS GKRGPAPAAASLLGKTQ
(d) YFSELPSGGGA--DPLRNIVKWRATGVADTERIYRQVTIEFLDN-PYACHASHLLGKTR
      : : : : : : : : : : : : : : : * * * * * * * * * * *
(a) LLYEFVRVTLGVRMHGSENYARFVNGLGVEDVSIQNI SLIHEAIRDGRMQPIVASLFT-
(b) PVYQFIRTTIGVRKHGSENYNRFYNGLGVEDVTIGNI SRIYESIRDGRMQSIIIVSLFD-
(c) AVYRYVRTNLGIRMHGSENHGQFTINGIGHDEVTIGENI STIYEAIRDGHMSVWVSLFH-
(d) RAYEFVRRTLGVPMHGRENLNEFRGEFEQWN-TTGGYVSVIYASIRDGELYNNLSELERD
      * . : * * * . * * * . * . : : : * * * * * * * * * * * *

```



```

(a) -
(b) -
(c) -
(d) L

```

Fig. 3-4 Multiple alignment of amino acid sequence determined from phenylalanine ammonia lyase cDNA of several fungi
(a) *Tricoloma matsutake* (b) *Amanita muscaria* (c) *Coprinus cinerea* okayama 7#130 (d) *Ustilago maydis* 521.

이상의 다중정렬로부터 보존성이 우수한 붉은색으로 표시된 부분의 아미노산 배열을 참고로 하여, degenerate primer(Table 3-2)를 합성하여 polymerase chain reaction을 수행하였다. Phenylalanine ammonia lyase 유전자의 클로닝을 시도하였다.

Table 3-2. Primer synthesis for phenylalanine ammonia lyase gene cloning

Primer type	Sequence
Forward primer	5' AATGGNACNGCNTTYTC 3'
Reverse primer	5' GCCATNGCYTGRAARTT 3'

이때 사용된 polymerase chain reaction(PCR) 반응 조건은 Table 3-3과 같다.

Table 3-3. Polymerase chain reaction reaction condition

	Temperature	Time	
	95 °C	2 min	
denaturation	95 °C	30 sec	35 cycles
anealing	50°C	1 min	
polymerization	72°C	2 min	
extention	72 °C	7 min	

이상의 실험을 수행하였으나, 목적으로 하는 유전자가 클로닝되지 못하였다. 그래서 최근에 발표된 논문자료를 바탕으로 하여, Table 3-4와 같은 primer를 합성하여, phenylalanine ammonia lyase 유전자의 클로닝을 진행하였다.

Table 3-4. The 2nd primer synthesis for phenylalanine ammonia lyase gene cloning

primer type	Sequence
forward primer	5' CACTGTCATATGAATATAACATCTCTACAACAGAACAT 3'
reverse primer	5' GACAGTGGCGGCCGCTCACGTTGACTTTAAGCTCGAAAAAATATG 3'

2) 시료균주의 동정

시료균주의 동정을 위하여, 16S rRNA의 배열정보를 이용하여 Table 3-5와 같은 primer를 합성하였다.

Table 3-5. Primer synthesis for Bacteria strain identification

Primer name	Deoxyoligonucleotide sequence ^a (_{59 to 39})	Location on 16S rRNA ^b	Specificity
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	515-533	Universal
1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT	1492-1510	Universal
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	8-27	<i>Bacteria</i>

a M=A+C, and Y=C+T. b Escherichia coli numbering system

현재 균주동정을 위한 PCR반응을 수행하고 있으므로, 조만간 동정 결과가 성공적으로 도출될 것으로 생각된다.

제4절 미생물 복합 발효 배양액의 피부 안전성 및 유효성에 대한 평가 연구

1. 연구수행방법

가. 피부에 대한 안전성 평가

1) 실험 재료

피부에 대한 안전성을 평가하기 위하여 실험에 사용된 재료는, 본 연구과제중 1세 부과제 팀인 경북과학대학 실험실에서 제조한 미생물 복합 발효 배양액과 대조군으로 sodium lauryl sulfate (SLS, Sigma Co.)를 사용하였다.

2) 실험 방법

가) 세포 독성 평가

미생물 복합 발효 배양액의 1차 안전성을 검증하기 위하여 V79-4세포 (차이니스 햄스터, 폐조직 섬유아세포의 연속 세포주)를 배양하여 MTT 시험법으로 세포 독성 시험을 실시하였다. 96-well plate에 100 μ L씩 분주하여 12시간 동안 부착시키고 새로운 1 % FBS DMEM으로 교환한 다음 LPS를 1 μ g/mL이 되도록 가하였다. 시료는 최종농도 0.1 % DMSO 또는 0.1 % EtOH 용액이 되도록 LPS와 동시에 배양액에 가한 다음 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 배양액을 제거 후 PBS로 한 번 세척한 후 MTT의 농도가 0.5 mg/mL가 되도록 10 % FBS DMEM에 녹인 후 100 μ L씩을 가하였다. 이때 대사 활동을 하고 있는 세포의 경우 NADH와 NADPH의 작용으로 인한 환원반응으로 MTT (yellow tetrazolium salt)가 formazan crystal(purple)로 변하게 된다. 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 4시간 배양한 후 solubilization 용액 100 μ L씩을 가하고, 12시간 이상 실온에서 formazan crystal을 용해시켰다. 대조 파장을 650nm로 하고 측정 파장을 570nm로 하여 흡광도를 측정하고, 이를 통하여 세포에 대해 독성이 없는 농도에서 활성을 검정하였다.

나) 인체 첩포시험을 통한 피부 1차 자극 평가

미생물 복합 발효 배양액의 인체에 대한 안전성을 알아보기 위하여, 인체 첩포 시험 (Human patch test)을 통하여 인체에 대한 1차 자극시험을 행하였다. 건강한 성인 남녀 14명을 대상으로 CTFA 가이드라인에 따라 실시하였다. 핀 챔버 (Finn

chamber)에 미생물 복합 발효 배양액 15 μL를 적하시킨 후, 이것을 시험 부위인 인체의 전박에 얹어 테이프로 고정시켰다. 이어서 24시간 동안 첩포한 후, 첩포를 제거하고 다시 4시간 경과한 다음 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가기준은 international contact dermatitis research group (ICDRG)의 판정기준에 따랐으며, 피부 자극 유발 가능성의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다.

Grade	Score	
-	0	No reaction
+	1	Moderate positive reaction(erythema)
++	2	Strong positive reaction(erythema, edema)
+++	3	Severe positive reaction(erythema, edema, vesicle)

$$\text{Mean Score} = \frac{\text{Grade No. of responses} \times 100 \times (1/3)}{3(\text{Maximum grade}) \times 20(\text{Total subjects})}$$

다) 피부 감작성 평가

미생물 복합 발효 배양액의 알러지 유발 여부를 확인하기 위하여 피부 감작물질을 확인하는 대체시험법으로 이용되고 있는 국소림프절시험법 (Local Lymph Node Assay, LLNA)을 사용하였다. 미생물 복합 발효 배양액 시료를 20%, 40%, 60% 용액으로 제조하여, 마우스 (Balb/c)의 양쪽 귀에 25 μL씩 3일간 발라준 후 마우스로부터 이개림프절 (Auricular lymph node)을 분리하였다. 분리한 림프절을 분쇄하여 단일세포 상태로 만든 후 방사성 동위원소 [³H]-메칠티미딘 (methyl thymidine)를 첨가하여 24시간 배양한 다음, 세포 증식의 증폭도 [dpm]를 측정하였다.

나. 피부 각질제거 평가

1) 실험 재료

피부에 대한 각질제거 효과를 평가하기 위하여 실험에 사용된 재료는, 본 연구과제 중 1세부과제 팀인 경북과학대학 실험실에서 제조한 미생물 복합 발효 배양액과 피부 착색을 위해서 Dihydroxy acetone (DHA, Aldrich Co.)을 사용하였다.

2) 실험 방법

가) 각질 박리 효과 측정

미생물 복합 발효 배양액의 피부 각질제거 효과를 확인하기 위하여 10명의 피시험자를 대상으로 측정하였다. 측정 방법은 먼저 시료 도포 전 피시험자의 팔 상박 안쪽부위에 지름 2 cm의 시험부위를 선정한 후, 각각의 시험부위를 Chromameter CR-200 (Minolta, Japan)을 사용하여 색상을 측정한 다음 10% 농도의 Dihydroxy acetone(DHA) 용액을 Hill top chamber에 넣고 피시험자의 팔 상박부 안쪽 시험부위에 10시간 동안 부착하여 피부색을 갈색으로 착색시킨 다음, 24시간 경과 후 DHA에 의해 갈색으로 착색된 부위의 피부 색상을 측정하여 시료 도포 전과의 색상차이를 비교하였다. 24시간 후부터 미생물 복합 발효 배양액을 용매(중량기준 Ionized water : Ethyl alcohol : 1,3-butylene glycol = 85 : 15 : 5)에 용해시켜 각각 5%, 10%, 15%로 조절한 뒤, 이를 각각 1일 2회씩 도포하면서 25일간 피부의 탈색 정도를 측정하여 시료 적용에 따른 TT (Turnover Time)를 측정하였다. 각질 박리 촉진율은 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$\text{Exfoliation of Horny substance(\%)} = \frac{\text{TT of Blank} - \text{Sample of TT}}{\text{TT of Blank}} \times 100$$

나) 영상 분석을 통한 피부 각질 상태 측정

미생물 복합 발효 배양액에 대한 피부의 각질 상태를 확인하기 위하여 Visioscan VC 98 (Courage+Khazaka Electronic, Cologne, Germany)을 이용하여 피부상태를 관찰하였다.

다. 피부보습효과 평가

1) 실험 재료

실험에 사용한 미생물 복합 발효 배양액 3종은, 본 연구과제중 1세부과제 팀인 경북과학대학 실험실에서 제조한 시료를 제공 받아 사용하였다. 즉, 배양액의 부원료로서 당밀을 각각 1%(시료명 A), 3%(시료명 B), 5%(시료명 C)를 첨가하여 배양후 미생물을 제거하여 시료로 사용하였다. 대조군으로 사용된 시료는 증류수, 글리세린(glycerine) 및 1,3-부틸렌글라이콜 (1,3-butylene glycol), 프로필렌글라이콜(propylene glycol)로서 이들 시료 모두는 화장품 원료 등급을 사용하였다.

2) 실험 기기

피부표면의 수분함량을 측정하기 위하여 피부 정전부하용량 측정법 (skin capacitance measurement)으로 측정하는 피부수분량 측정기 (Corneometer CM 820[®], Courage+Khazaka Electronic, Cologne, Germany)를, 피부 수분 손실량 (trans-epidermal water loss, TEWL) 측정에는 피부 수분손실량 측정기 (Tewameter TM 300[®], Courage+Khazaka Electronic, Cologne, Germany)를 사용하였으며, 피부내 수분 침투력 측정에는 최첨단 광학분석기술인 OCT (optical coherence tomography)를 응용한 SkinDex 300 (ISIS Optronics GmbH, Germany)을 이용하여 측정하였다.

3) 실험 방법

가) 피부표면 수분함유량 측정

시험 시작 30분 전부터 항온항습조건 (20~22℃, 상대습도 40~60%)의 실내에서 대기한 피시험자의 상박부에 각각의 시료 2.0 mg/mL을 균일하게 도포하고, 시료를 도포하지 않은 좌측상박부를 대조군으로 도포직전 및 도포직후에 피부 수분 함량을 측정하였다. 도포 전, 1시간 후, 24시간 후, 48시간 후, 72시간 경과한 후, 피부 수분 함량을 측정하였다. 수분보유량에 대한 변화율은 다음 계산식으로 계산하였다.

$$\text{Skin Moisture Capacity}(\%) = \{(B-A)/A\} \times 100$$

A : Moisture capacitance before treated skin

B : Moisture Capacitance after treated skin

나) 피부 수분손실량 측정

시험 시작 30분 전부터 항온항습조건 (20~22℃, 상대습도 40~60%)의 실내에서 대기한 피시험자의 상박부에 각각의 시료 2.0 mg/mL을 균일하게 도포하고, 시료를 도포하지 않은 좌측상박부를 대조군으로 도포직전 및 도포직후에 피부 수분손실량을 측정하였다. 도포 전, 1시간 후, 24시간 후, 48시간 후, 72시간 경과한 후 피부 수분 손실량을 측정하였다. 측정된 TEWL은 g/h/m²로 표기하였다.

다) 피부내 수분 침투력 측정

시험 시작 30분 전부터 항온항습조건 (20~22℃, 상대습도 40~60%)의 실내에서

대기한 피시험자의 상박부에 직경 20 mm의 circle을 표시하고 0.15 g/circle 씩 각각의 시료를 적용한 후 SkinDex 300 기기를 이용하여 광학렌즈와 피부와의 거리를 100 μ m로 고정한 후 피부 표피층에 대하여 2차원 영상촬영을 하여 측정 표피층 두께의 평균 RI 값과 색상변화를 관찰하였다.

라. 항산화 작용에 의한 피부 주름개선 및 완화 평가

1) 실험 재료

실험에 사용한 미생물 복합 발효 배양액은, 본 연구과제중 1세부과제 팀에서 항산화특성이 우수한 최적조건으로 발효 배양후 처리한 시료를 제공받아 사용하였다 즉, 당밀 2%, 쌀 추출물 0.5 °brix 및 부원료로 미강추출물 5%를 배양 원료로서 발효온도 30℃, 발효시간 12일, 발효초기 pH 6.5를 최적의 발효조건으로 배양하여 균주를 제거 후 사용하였다. 항산화 측정에 사용한 시약은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (Sigma)와 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma)를 사용하였다.

2) 실험 방법

가) 자유라디칼 소거효과 측정

자유라디칼 소거활성 실험은, 안정한 자유라디칼인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH, Sigma)을 사용하는 방법으로 메탄올에 용해시킨 0.2 mL의 DPPH 용액 1 mL에 평가하고자 하는 시료를 다양한 농도로 제작하여, 이들 각각을 2 mL을 첨가하여 혼합하고 실온에서 10분간 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu)로 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 여러 농도의 미생물 복합 발효 배양액을 사용하였으며, 대조군으로는 정제수를 사용하였다. 상기 실험군과 대조군에 대한 흡광도를 측정한 후, 다음의 식을 이용하여 자유라디칼소거활성 효과를 계산하였다. 소거활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도 (free radical scavenging activity, SC₅₀, μ g/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{(\text{Experiment} - \text{Blank})}{\text{Control}} \times 100$$

나) 사람 섬유아세포 증식효과 측정

피부의 주름개선 효과를 검정하는 섬유아세포의 증식효과를 보기 위하여 사람 섬유아세포를 이용한 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma] 시험법을 수행하였다. 농도별로 시료를 희석하여 48시간 적용한 다음, 시료를 버리고 PBS buffer로 2회 washing 한 후 MTT로 3시간 처리하였다. 다시 MTT를 버린 후 PBS buffer로 2회 세척한 후 IPA (Isopropyl Alcohol)를 처리한 후 1시간 동안 shaking하고 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 희석한 vehicle (serum 1% 함유 DMEM)과 비교하여 세포 활성능을 평가하였다. 세포의 생존능력은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Growth-promoting activity(\%)} = 100 - \frac{(B - A)}{A} \times 100$$

A : Absorbance at 540 nm without test sample

B : Absorbance at 540 nm with test sample

다) 콜라겐 합성능 측정

피부의 주름개선 효과를 검정하는 콜라겐 합성효과를 보기 위하여 사람 섬유아세포 (human skin fibroblast cell)를 96 well-plate에 1×10^4 cells/well 씩 분주하여 10% FBS/DMEM 배지로 24시간 배양시킨 다음, 새로운 serum-free 배지와 적정 농도 범위에서 단계적으로 희석한 시료를 가하고, 다시 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 상등액을 취하여 상업적으로 판매되고 있는 PICP (Production of Procollagen Type C-peptide) EIA kit (Cat.# MK101, Takara Shuzo, Japan)를 이용하여 콜라겐양을 측정하였다. 모든 실험은 3회 실험하여 평균값으로 나타내었다.

라) 엘라스타제 활성 저해효과 측정

엘라스타제 (porcine pancreatic elastase, PPE, Sigma, Type IV)에 의해 합성 펩티드 기질 (*N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide, Sigma)의 가수분해에 근거한 실험법으로, 흡광도 450 nm에서의 *p*-nitroanilide의 방출량을 엘라스타제의 활성값으로 하였다. 먼저 0.2 M Tris-Cl (pH 8.0, Sigma), 농도별로 희석한 미생물 복합 발효 배양액, 8.8 mM 기질액을 넣고 25°C에서 10분간 전처리하였다. PPE (10 µg/mL)를 넣고 25°C 항온수조에서 20분간 반응시키고, 냉침법으로 반응을 정지시켰다. *p*-nitroanilide의 방출량을 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였

다. 미생물 복합 발효 배양액과 제니스테인, 우르소닉애씨드를 비교 시료로 실시하였다. 대조군은 시료를 처리하지 않고 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성저해효과는 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Inhibitory activities of elastase(\%)} = 100 - \frac{(B - A)}{A} \times 100$$

A : Absorbance at 405 nm without test sample

B : Absorbance at 405 nm with test sample

마) UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과

(1) UVA 조사 및 시료의 처리

HDF (human dermal fibroblast)를 1.5×10^5 cells/mL의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때 까지 배양한다. UVA 조사 전에 배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거 후 6.3 J/cm^2 UVA (UVA F15T8, BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사 후 배양배지는 FBSfmf 첨가하지 않은 DMEM/F13 (3:1) 배지에 미생물 복합 발효 배양액을 투여하여 24시간 배양하였다.

(2) MMP-1 발현저해 측정

HDF에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C 에서 overnight하여 counting하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 blocking buffer로 37°C , 1시간 동안 blocking한 후 monoclonal anti-MMP-1을 assay buffer에 희석하여 $150 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 37°C , 90분간 반응시킨 후 PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1mg/mL pNPP (*p*-nitrophenyl phosphate)를 포하판 기질용액 $150 \mu\text{L}$ 를 넣어 실온에서 30분간 반응시켰다. 3 N NaOH $50 \mu\text{L}$ 를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

바) *in vivo* 주름평가

미생물 복합 발효 배양액의 주름개선 효과를 측정하기 위하여 각각의 시료를 첨가한 제형을 제조하여 20명의 피시험자 얼굴의 왼쪽과 오른쪽 눈꼬리의 주름 부위를

매일 2회 (아침, 저녁) 반복하여 약 8주일간 사용하게 하였다. 사용 전, 사용 4주 후, 사용 8주 후 시점에서 피부 상태 변화를 조사하기 위하여 설문지를 배포하였으며 각 피시험자는 각 설문시점에서 현재의 피부 상태를 스스로 평가하고 설문지에 답하도록 하였다. 피부 상태 변화를 조사하기 위하여 피부 건조도, 피부 탄력 정도, 피부 주름량, 피부 윤기, 피부 거칠 이상 등 5개 항목의 질문을 하였다. 그리고 제품 사용에 따른 주름개선 효과를 Skin-Visiometer SV 600 (Courage_Khazaka Electronic, Germany)을 이용하여 분석하였다. 제품 사용 전 (D-0), 제품 사용 4주 후 (D-28), 제품 사용 8주일 (D-56) 후에 눈꼬리 주위 (Crow's feet)의 주름을 replica로 채취하였다. Replica의 제작은 항온항습조건 (20~22°C, 상대습도 40~60%)에서 제작하였으며, 피시험자는 측정 당시 피부에 어떠한 화장품도 바르지 말도록 하였다. 사용하기 전과 사용 후의 피부 표면상태와 주름의 변화를 피부영상 분석 장치인 Skin visiometer SV 600과 Visioscan (Courage+Khazaka Electronic, Germany)을 이용하여 측정하였다. 분석 결과는 circle line을 이용하여 R1~R5의 값을 계산하여 분석하였다. R1~R5의 값이 작아질수록 피부주름이 개선되어 주름의 깊이가 낮아짐을 의미하며 단위는 임의의 단위를 나타낸다.

R1: skin Roughness, 최고 주름의 포인트와 최저 주름의 포인트와의 거리

R2: Maximum Roughness, 주름을 자동적으로 5개로 분할하여 각각 R1을 구한 후 분할된 주름 중에서 가장 높은 R1 값

R3: Average Roughness, 5개로 분할하여 얻은 R1 값의 평균

R4: Smoothness Depth

R5: 산술적인 평균 거칠기

마. 피부 미백효과 평가

1) 실험 재료

실험에 사용한 미생물 복합 발효 배양액은, 본 연구과제중 1세부과제 팀인 경북과 학대학 실험실에서 발효 배양하여 제조한 시료를 제공 받아 사용하였다. 즉, 최적 발효조건으로 발효한 배양원료를 methanol 분획 후 농축 후 동결건조 하여 시료로 사용하였다.

2) 실험 방법

가) Tyrosinase 억제 활성

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물에 대하여 tyrosinase 억제 활성을 이용하여 미백효과를 측정하였다. Test tube에 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 2.2 mL와 1.5 mL tyrosine solution 400 μ L를 첨가한 후 농도별로 미생물 복합 발효 배양액을 20 μ L씩 넣고 여기에 2,000 U/ μ L mushroom tyrosinase 200 μ L를 첨가하였다. 37°C에서 20분간 incubation한 후 생성된 dopachrome의 양을 25°C, 490nm에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{(B-A)}{A} \times 100$$

A : Absorbance at 490 nm without test samples after incubation

B : Absorbance at 490 nm with test samples after incubation

나) 도파(L-DOPA) 산화 억제 활성

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물에 대하여 도파(L-DOPA) 산화 억제 활성을 이용하여 미백효과를 측정하였다. 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 분획건조물을 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.5%, 0.75%, 1.0% (w/w %) 농도로 희석하여 사용하였다. Test tube에 미생물 복합 발효 배양액을 900 μ L씩 첨가하고 여기에 2,000 U/mL mushroom tyrosinase (0.1 M phosphate buffer pH 6.5로 용해) 50 μ L를 넣고 반응액의 온도가 균일하도록 37°C에서 약 5분간 방치한다. 여기에 10 mM L-3,4-디하이드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine: L-DOPA, pH 7.0)액 50 μ L를 넣고 상온에서 1분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{(B-A)}{A} \times 100$$

A : Absorbance at 490 nm without test samples after incubation

B : Absorbance at 490 nm with test samples after incubation

다) B-16 melanoma내의 멜라닌 생성 억제 실험

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물에 대하여 B-16 melanoma를 이용하여 미백효과를 측정하였다. B-16 melanoma cells를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 6 well plate에 세포 수 2×10^4 cells/well로 2 mL씩 첨가하고 5% CO₂, 37°C 조건하에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 10% FBS, 0.2 mM α -MSH와 2 mM theophylline (Sigma)이 함유된 DMEM으로 교체한 후, 미생물 복합 발효 배양액을 각각 첨가하고 나서, 5% CO₂, 37°C 조건하에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거한 다음 PBS로 세척하고 이것을 trypsin-EDTA로 처리하여 세포 pellet를 회수하였다. 회수된 pellet을 eppendorf tube로 옮겨 5,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 pellet을 60°C 항온기에서 24시간 건조시킨 후 1N NaOH를 첨가하여 세포내의 melanin을 용해시켰다. 용해된 melanin을 PBS로 적당량 희석하여 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 melanin 저해율을 측정하였다. 그리고 사진촬영 후 미백 활성을 육안으로 확인하였다.

라) 인공 색소침착을 이용한 미백효과 평가

(1) 시료 도포방법

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물의 피부 미백 효과에 대한 효능을 평가하기 위하여 피시험자 20~40대 여성 25명을 선별하여 인위적으로 색소 침착된 팔 부위에 placebo와 sample(1.0% 분획건조물 함유)을 8주 동안 1일 2회 도포하였다.

(2) 연구자에 의한 육안평가

시험부위의 피부 색상은 2명의 시험자에 의해 주관적으로 모든 피시험자들을 4주경과 후, 6주 경과 후, 8주 경과 후의 피부 흑화도를 관찰하였으며 시료도포 전과 비교하여 8단계로 구분하여 평가하였다. 평가기준은 다음과 같다.

Rating	Description
0	None
1	None / mild pigmented
2	Mild pigmented
3	Mild / moderate pigmented
4	Moderate pigmented
5	Moderate / severe pigmented
6	Severe pigmented
7	Very severe pigmented

(3) 기기적 평가

Chromameter CR-400 (Minolta, Japan)에 의한 피부 밝기 측정은 색소 침착된 부위의 L^* , a^* , b^* value의 변화를 측정하여 평가하였다. 평가는 자외선을 3회 조사한 뒤 7일 경과 후(0 week), 시료 도포 4주 경과 후(4 week), 6주 경과 후(6 week), 8주 경과 후(8 week) 피시험자들을 대상으로 Chromameter CR-400의 L^* , a^* , b^* value를 측정하였다. Chromameter는 사람에 의해서 인지되는 색들을 세가지 인자로 구성된 디지털 코드로 전환하는 장비로 화장품 연구에 있어 피부색 측정을 위해 널리 사용되고 있다. L^* , a^* , b^* value는 각각 다음과 같은 parameter이다.

L^* : Lightness

a^* : green-to-red spectrum

b^* : blue-to-yellow spectrum

이때 a^* , b^* 는 chrominance parameters (색채인자)이고, L^* 는 luminance parameters (채도인자)이다.

(4) 통계분석 방법

시험자에 의한 육안평가와 Mexameter를 이용한 기기적 평가 둘 다 paired t -test를 통해 placebo와 sample간의 유의성 여부를 가설 평균차 5%로 확인하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 피부에 대한 안전성 평가

1) 세포 독성 평가

미생물 복합 발효 배양액의 1차 안전성을 검증하기 위하여 V79-4세포 (차이니스 햄스터, 폐조직 섬유아세포의 연속 세포주)를 배양하여 MTT 시험법으로 세포 독성 시험한 결과를 Table 4-1에 나타내었다. Table에서 보는 바와 같이 미생물 복합 발효 배양액의 IC₅₀ 값은 10%로 측정되었으며, SLS에 비하여 2,000배 이상 세포 독성이 낮게 나타난 것으로 안전성이 매우 우수함을 관찰할 수 있었다.

Table 4-1. Cell toxicity for culture broth

Sample	^a IC ₅₀ (% , w/v)
Culture broth	0.005
SLS	10

^aIC₅₀ : Inhibitory Concentration 50, 50%의 세포를 사멸시키는 농도

2) 피부 1차 자극 평가

나) 피부 1차 자극 평가

피시험자 14명에 대하여 실시한 미생물 복합 발효 배양액의 첩포시험의 검사 결과에 근거하여 계산된 피부 반응도를 Table 4-2에 나타내었다. 시험 결과, 5%(v/v)의 미생물 복합 발효 배양액은 반응도 0.06으로 피부 반응도 판정기준에 의하면 인체 도포시 자극이 없는 안전한 원료인 것으로 판정되었다.

Table 4-2. Skin irritation for culture broth

Sample	Treated Conc. (%)	Skin irritation
I.O. water	—	0.24
SLS	0.05	0.44
Culture broth	5	0.06

3) 피부 감작성 평가

미생물 복합 발효 배양액의 알러지에 대한 평가 결과를 Table 4-3에 나타내었다. 알러지 평가는 대조군에 대한 시료군의 임파구 증폭 정도로 나타내며, 한 농도에서라도 시료의 증폭 정도 (S.I.: Stimulation index)가 3 이상이고, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보일 경우 알러젠으로 간주하는데, 시험 결과 미생물 복합 발효 배양액은 증폭 정도 (S.I.)가 3 이하로서 알러지의 유발 가능성이 없는 것으로 나타났다.

Table 4-3. Skin sensitivity for culture broth

Sample	Treated Conc. (%)	lymph node number (Cell/mL $\times 10^7$)	^a dpm (Average)	^b S.I.
Ethanol	60	2.27	1895	-
	20	2.29	1241	0.7
Culture broth	40	2.32	1839	1.0
	60	3.20	1714	0.9

^adpm (disintegration per minute): [3H]-methyl thymidine이 세포내 삽입되는 양

^bS.I. (stimulation index): 시료의 평균 dpm을 대조군의 평균 dpm으로 나눈 값

나. 피부 각질제거 및 보습력 평가

1) 각질 박리 효과 측정

미생물 복합발효 배양액의 피부 각질제거 효과를 확인하기 위하여 각질제거 효과가 우수한 것으로 알려져 있는 glycolic acid와 비교하여 관찰한 결과를 Table 4-4에 나타내었다. 관찰 결과 5%의 미생물 복합 발효 배양액은 각질제거율이 24.9%, 10%인 경우 29.0%, 15%인 경우에는 32.1%의 각질제거율이 관찰되었다. 5%의 glycolic acid의 각질제거율 수치보다는 낮은 값을 보였지만 일반적으로 각질제거 효과가 있는 것으로 판단된다.

Table 4-4. Exfoliation of horny substance

Sample	TT(Turnover Time)	Exfoliation of Horny substance (%)
Blank	19.3±6.1	-
5% Glycolic acid	11.4±4.1	40.9
5% Culture broth	14.5±5.6	24.9
10% Culture broth	13.7±3.9	29.0
15% Culture broth	13.1±2.3	32.1

2) 영상 분석을 통한 피부 각질 상태 측정

미생물 복합 발효 배양액에 대한 피부의 각질 상태를 확인하기 위하여 Visioscan VC 98을 이용하여 피부상태를 관찰한 결과를 Fig. 4-1에 나타내었다. 각질상태 개선 및 미세주름 완화 효과가 있는 것으로 판단된다.

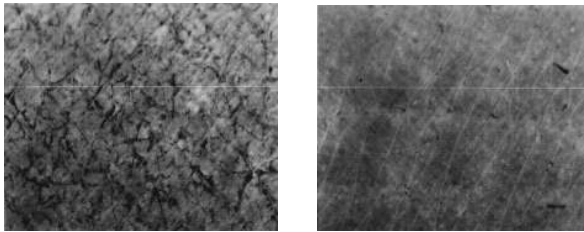


Fig. 4-1. Photograph of the skin horny substance

3) 피부 수분함유량 측정

7종의 시료(미생물 복합 발효 배양액 3종, 증류수, 글리세린, 1,3-부틸렌글라이콜, 프로필렌글라이콜)에 대해 위의 첩포시험에서와 동일한 방법으로 첩포를 행한 후 1시간 후와 그 후 24시간 간격으로 3일 동안 corneometer를 이용하여 피부 수분보유량을 측정된 결과를 Table 4-5에 나타내었다. 미생물 발효 배양액 A, B, C의 피부 수분보유량은 증류수보다는 모두 높게 측정되었으나 3종의 미생물 복합 발효 배양액 중 A와 B는 화장품의 보습제로 많이 사용되고 있는 글리세린보다는 수분보유력이 낮은 것

으로 관찰되었다. 그러나 미생물 복합 발효 배양액 C은 화장품 원료 중에서 보습효과가 뛰어난 글리세린과 비슷한 보습력을 가지고 있는 것으로 관찰되었다.

Table 4-5. The skin surface moisture quantity which it measures with the corneometer

Sample	before	1 h	24 h	48 h	72 h
Culture broth A	35.3	47.6	42.3	40.0	35.8
Culture broth B	35.3	48.2	44.0	42.2	39.0
Culture broth C	35.3	48.7	44.5	42.8	39.7
I.O.Water	35.3	46.5	43.1	38.2	34.2
Glycerine	35.3	48.8	45.8	43.1	40.0
1,3-butylene glycol	35.3	46.1	42.2	39.4	35.5
Propylene glycol	35.3	49.0	44.5	40.3	36.3

4) 피부 수분 손실량 측정

7종의 시료(미생물 복합 발효 배양액 3종, 증류수, 글리세린, 1,3-부틸렌글라이콜, 프로필렌글라이콜)에 대해 위의 첩포시험에서와 동일한 방법으로 첩포를 행한 후 1시간 후와 그 후 24시간 간격으로 3일 동안 TEWL을 측정한 결과를 Table 4-6에 나타내었다. 미생물 발효 배양액 A, B, C의 TEWL에 대한 평균값은 증류수 보다는 낮게 나타났으나 화장품 보습제로 많이 사용되는 글리세린, 1,3-부틸렌글라이콜, 프로필렌글라이콜 보다는 거의 같거나 조금 높게 나타난 것으로 측정되어 피부에 대한 보습효과가 있는 것으로 판단되었다.

Table 4-6. Measurement of TEWL

Sample	before	1 h	24 h	48 h	72 h
Culture broth A	32.9	42.7	40.4	38.3	34.0
Culture broth B	32.9	43.1	40.2	38.6	34.3
Culture broth C	32.9	43.4	40.6	38.5	34.6
I.O.Water	32.9	47.8	42.3	39.9	35.1
Glycerine	32.9	46.3	41.6	38.0	34.0
1,3-butylene glycol	32.9	46.6	41.2	37.5	34.1
Propylene glycol	32.9	45.5	40.7	38.0	34.3

5) 피부내 수분 침투력 측정

7종의 시료(미생물 복합 발효 배양액 3종, 증류수, 글리세린, 1,3-부틸렌글라이콜, 프로필렌글라이콜)에 대해 피부에 대한 침투력을 평가하기 위하여 피부 내부를 직접 관찰할 수 있는 OCT (Optical coherence tomography) 기기인 SkinDex 300을 이용하여 RI (Refractive Index)값 및 색상변화를 측정하여 피부 표피층의 보습상태 변화를 평가한 결과를 Table 4-7과 Fig. 4-2 및 4-3에 나타내었다. RI 값이 적은 것이 피부에 대한 수분의 침투가 좋은 것으로 알려져 있어, 평가 결과 도포 후 RI 값이 미생물 복합 발효 배양액 C가 가장 적고 증류수가 가장 높은 것으로 관찰되었다. 그리고 미생물 복합 발효 배양액 A, B와 글리세린, 1,3-부틸렌글라이콜, 프로필렌글라이콜은 비슷한 수치를 나타내는 것으로 관찰되었다. 또한, 색상 변화 관찰 결과 도포 전 보다는 도포 후의 피부 색상이 과관색으로 변화된 것을 확인할 수 있었다.

Table 4-7. Measurement of skin moisture by OCT method

Sample	Refractive Index	
	before	after
Culture broth A	1.401	1.390
Culture broth B	1.428	1.394
Culture broth C	1.428	1.389
I.O.Water	1.401	1.386
Glycerine	1.428	
1.3-butylene glycol	1.401	1.395
Propylene glycol	1.401	1.399

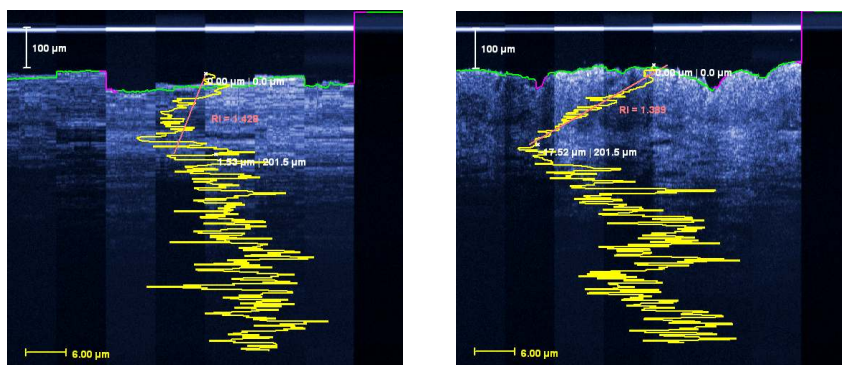


Fig. 4-2. Measurement of refractive index

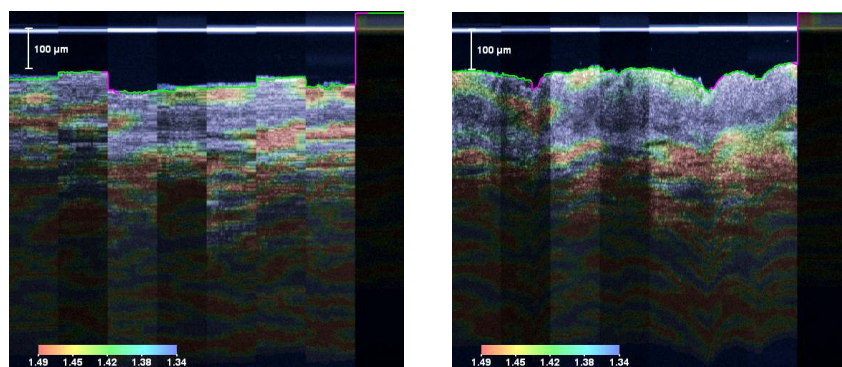


Fig. 4-3. Measurement of skin color

다. 항산화 작용에 의한 피부 주름개선 및 완화 평가

1) 자유라디칼 소거효과 측정

최적 발효조건으로 배양한 미생물 복합 발효 배양액의 항산화 효과와 그 정도를 알아보기 위하여 각각 3회씩 실험하여 평균 결과를 산출하였으며, 그 결과를 자유라디칼 소거율 50%를 달성하기 위해 소요되는 시료의 농도인 SC₅₀ 값으로 Table 8에 나타내었다. 실험 결과, 자유라디칼 소거율에서 미생물 복합 발효 배양액은 비교적 농도 의존적으로 자유라디칼을 소거하는 효과가 촉진됨을 보여주고 있다. SC₅₀은 자유라디칼 소거율 50%를 달성하기 위해 소요되는 시료의 농도로서 다른 물질과 상대적으로 비교할 때 사용하는 수치이다. 값이 작을수록 자유라디칼 소거율이 높음을 의미하는데, 미생물 복합 발효 배양액의 SC₅₀ 값은 0.34%로 자유라디칼 소거율이 높은 것으로 판단되었다. 일반적으로 식물 성분 중에서 작약추출물의 SC₅₀ 값은 15.51%, 하수오 추출물의 SC₅₀ 값은 4.21%, 황금 추출물의 SC₅₀ 값은 14.40%이다.

Table 4-8. Comparison of free radical scavenging activity

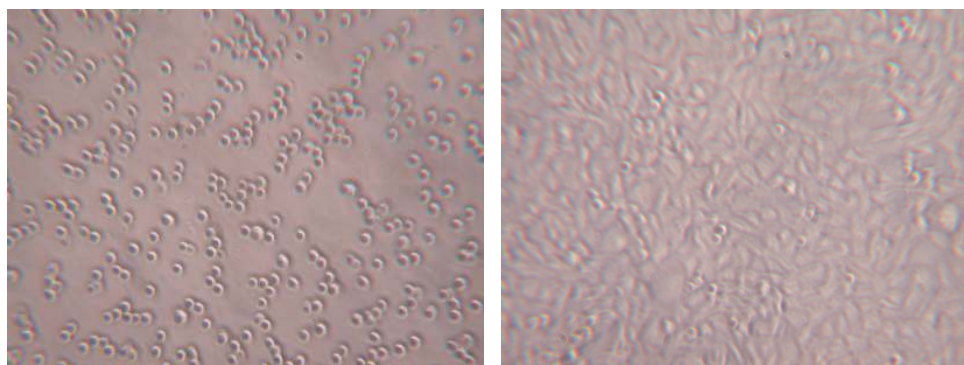
Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Free radical scavenging Activity(%)	SC ₅₀ (%)
0.1	2.7	
1	3.3	
10	15.9	
100	22.8	0.34
1,000	42.1	
10,000	65.6	

2) 사람 섬유아세포 증식효과 측정

미생물 복합 발효 배양액이 섬유아세포에 미치는 세포증식 촉진효과를 확인하기 위하여 사람 섬유아세포에서 MTT 시험법을 실시하여 그 결과를 Table 4-9와 Fig. 4-4에 나타내었다. Table 4-9의 실험자료는 대조군의 세포활성 촉진 효과를 100%로 한 결과이다. 결과에서 보듯이 미생물 복합 발효 배양액은 비교적 농도 의존적으로 세포증식이 촉진됨을 보여주고 있다.

Table 4-9. Comparison of growth-promoting activity for normal human fibroblast cell

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Growth-promoting activity(%)
	Culture broth
0	100
0.01	108.57
0.1	123.22
0.5	135.09
1	178.90



A

B

Fig. 4-4. Comparison of growth-promoting activity for normal human fibroblast cell (A : before culture, B : after culture)

3) 콜라겐 합성능 측정

Procollagen 합성에 미치는 미생물 복합 발효 배양액의 작용을 알아보기 위하여 콜라겐 생성촉진에 효과가 있는 것으로 알려진 레티놀 (Retinol) 및 제니스테인 (Genistein-90)을 양성 대조군으로 하여 사람 섬유아세포 (human skin fibroblast cell)에서 시험을 실시하였다. Table 4-10에서와 같이 미생물 복합 발효 배양액은 레티놀 및 제니스테인과 유사한 정도의 콜라겐 생성촉진 효과를 보였다.

Table 4-10. Comparison of procollagen synthesis effect

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Produced amount(%)		
	Culture broth	Retinol	Genistein-90
0	100	100	100
0.01	118.60	170.33	102.68
0.1	125.81	106.98	165.82
0.5	108.23	122.51	124.03
1	164.70	131.00	116.24

4) 엘라스타제 활성 저해효과 측정

미생물 복합 발효 배양액, 제니스테인 및 우르소닉에씨드에 대한 엘라스타제 효소의 활성을 저해하는 정도를 Table 4-11에 나타내었다. 미생물 복합 발효 배양액의 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 저해율은 52.16%, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 31.73%로 관찰되었다.

Table 4-11. Elastase activity inhibition effect

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Elastase Activity Inhibition(%)		
	Culture broth	Genistein-90	Ursolic acid
0.01	—	—	23.52
0.1	23.50	—	78.64
0.5	31.73	—	—
1	52.16	30.75	—

5) UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과

UVA에 의해서 발현이 증가되는 MMP-1에 미생물 복합 발효 배양액이 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF에 $6.3 \text{ J}/\text{cm}^2$ UVA를 조사하고 미생물 복합 발효 배양액을 첨가하여 24시간 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 ELISA를 통해 알아보았다. 그 결과 Table 12에 나타난 것과 같이 미생물 복합 발효 배양액을 0.01, 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 MMP-1 발현저해 효과는 2.7%, 16.2%, 22.0%, 31.5%로 나타났다.

Table 12. MMP-1 inhibition activity of culture broth

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MMP-1 inhibition activity(%)
0.01	2.7
0.1	16.2
0.5	22.0
1	31.5

6) *in vivo* 주름평가

미생물 복합 발효 배양액을 함유한 제품에서의 주름개선 효과를 측정하기 위하여 피시험자를 이용하여 제품 사용 전과 사용 4주 후, 8주 후의 피부결 개선 및 주름개선 효과를 설문 평가와 주름 측정기를 이용하여 평가하였다. Skin visiometer를 이용

한 replica 분석법을 사용하였으며, 영상 분석을 통한 통계분석 결과 Table 4-13 및 4-14에서 보듯이 각각의 매개변수($\Delta R1 \sim \Delta R5$) 평균값이 도포 전에 비해 실험제품에서 유의적인 주름 감소 효과를 나타내었다. 주름 측정 parameter $\Delta R1$, $\Delta R2$, $\Delta R3$, $\Delta R4$, $\Delta R5$ 측정 결과를 보면, 미생물 복합 발효 배양액을 함유한 제품을 도포한 부위는 무함유 제품을 도포한 부위에 비해 사용 4주 후부터 $\Delta R1$, $\Delta R2$ 의 측정값이 통계적으로 유의한 수준의($p < 0.05$) 차이를 가지는 것으로 나타났으나 $\Delta R3$, $\Delta R4$, $\Delta R5$ 는 유의적인 차이가 없었다. 하지만 제품 도포 8주일 경과 후에는 각 parameter를 측정한 결과, $\Delta R1$, $\Delta R2$, $\Delta R3$ 가 대조 부위에 비해 통계적으로 유의한 수준의 ($p < 0.05$) 차이를 가지는 것으로 나타났다. 미생물 복합 발효 배양액을 함유한 제품을 약 8주 간 도포했을 경우, 총 주름수의 감소효과를 관찰할 수 있었으며, 95% 신뢰구간에서 통계학 적으로 유의한 주름개선 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

Table 4-13. Comparison of the volunteer's eye area before and after the treatment of the containing optimal culture broth(4 week)

Sample	4 week				
	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
Control	-0.054 ± 0.02	-0.035 ± 0.02	-0.024 ± 0.01	-0.007 ± 0.01	-0.010 ± 0.01
1% Culture broth	-0.075 ± 0.04	-0.085 ± 0.03	-0.026 ± 0.01	-0.006 ± 0.01	-0.011 ± 0.01

Table 4-14. Comparison of the volunteer's eye area before and after the treatment of the containing optimal culture broth(8 week)

Sample	8 week				
	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
Control	-0.060 ± 0.03	-0.056 ± 0.02	-0.025 ± 0.01	-0.013 ± 0.01	-0.015 ± 0.01
1% Culture broth	-0.087 ± 0.03	-0.099 ± 0.04	-0.045 ± 0.02	-0.016 ± 0.01	-0.017 ± 0.01

라. 피부 미백효과 평가

1) Tyrosinase 활성 저해 효과

Tyrosinase는 멜라닌 합성 초기과정에서 tyrosine과 L-dopa의 산화를 도와주는 주요 효소로서, 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물이 tyrosinase 효소의 저해능을 확인하기 위하여 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정된 결과는 Table 15와 같다. 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물을 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.5%, 0.75%, 1.0%의 농도별로 측정된 결과, 농도가 증가할수록 tyrosinase의 억제 효과가 증가하는 것을 관찰하였다. 그러나 tyrosinase 억제 효과가 우수한 것으로 알려진 kojic acid에 비해서는 억제 효과가 미약한 것으로 관찰되었다.

Table 4-15. Inhibition of tyrosinase for methanol fractionates of culture broth

Sample	Treated Conc. (%)	Inhibition of tyrosinase (%)
Culture Broth	0.1	23.7
	0.2	39.6
	0.4	
	0.5	53.2
	0.75	
	1.0	68.0
	Kojic acid	0.1
	0.2	89.9

2) 도파(L-DOPA) 산화 억제 활성

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물에 대하여 다른 미백활성 기질이 있는지를 확인하기 위하여 도파(L-DOPA) 산화 억제 활성 실험을 실시하였다. 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물을 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.5%, 0.75%, 1.0% (w/w %) 농도로 처리하였으며 0.5%에서 52.5%의 억제 효과를 0.75%에서 58.3%의 억제 효과, 1.0%에서는 66.9%의 L-DOPA 자동산화억제 효과를 보여주었다.(Table 4-16).

Table 4-16. Inhibition of L-DOPA auto-oxidation for methanol fractionates of culture broth

Sample	Treated Conc. (%)	Inhibition of L-DOPA (%)
Culture Broth	0.1	20.2
	0.2	37.0
	0.4	45.2
	0.5	52.5
	0.75	58.3
	1.0	66.9

3) B-16 melanoma내의 멜라닌 생성 억제 실험

세포 독성이 없는 농도 범위 내에서 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물의 B-16 melanoma내의 melanin 생성 억제율을 측정한 결과 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물 0.1% 농도에서 50%의 melanin 생성 억제율을 나타냈으며 0.5% 농도에서는 62.5%, 1% 농도에서는 69.3%의 melanin 생성 억제율을 보여주었다(Table 4-17, Fig. 4-5).

Table 4-17. Inhibitory activity of melanin synthesis in B-16 melanoma for methanol fractionates of culture broth.

Sample	Treated Conc. (%)	Inhibition Activity of Melanin Synthesis (%)
Culture Broth	0.0001	10.3
	0.001	17.6
	0.01	43.5
	0.1	50.0
	0.5	62.5
	1.0	69.3

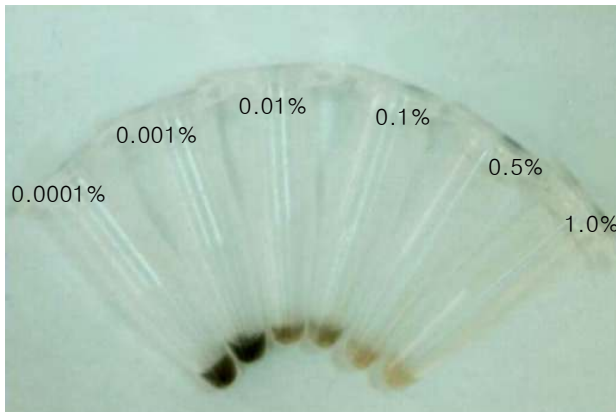


Fig. 4-5. Inhibitory activity of melanin synthesis in B-16 melanoma for methanol fractionates of culture broth

4) 인공 색소침착을 이용한 미백효과 평가

(1) 연구자에 의한 육안평가

연구자의 육안평가에 의한 분석 결과, 8주 경과 후 인공색소가 침착된 시험 부위에서 시료 사용에 따른 육안 평가 변화 결과 Table 18에서 알 수 있듯이 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물은 -3.6 ± 1.2 , placebo는 -2.3 ± 1.0 , ($p < 0.05$) 으로 미생물 복합 발효 배양액은 placebo에 비해 통계학적으로 유의한 미백 효과를

관찰 할 수 있었다.

Table 4-18. Results of visual assessment by research worker.

Sample	0 ~ 4 week	0 ~ 6 week	0 ~ 8 week
Control	-2.1±0.8	-2.1±1.0	-2.3±1.0
1% Culture broth	-2.7±1.1	-3.0±0.9	-3.6±1.2

(3) 기기적 평가

사용기간에 따른 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물의 기기적 평가를 통한 L* value(피부밝기변화)를 분석한 결과, Table 19에서 보듯이 8주경과 후 placebo와 미생물 복합 발효 배양액간의 L* value가 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물은 4.7 ± 1.7, placebo는 3.2 ± 1.4, ($p < 0.05$)으로 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 미백효과를 나타내고 있는 것으로 관찰되었다.

Table 4-19. Change in the L* value of spectrometer by chromameter CR-400.

Sample	0 ~ 4 week	0 ~ 6 week	0 ~ 8 week
Control	2.3±1.0	2.8±1.1	3.2±1.4
1% Culture broth	3.0±0.9	3.9±1.2	4.7±1.7

3. 결론

1) 미생물 복합 발효 배양액의 인체에 대한 세포 독성 및 피부 1차 자극성 평가, 피부 감작성 평가를 관찰한 결과, 세포 독성은 SLS에 비하여 2,000배 이상 세포 독성이 낮은 것으로 관찰되었으며, 피부 감작성 평가에서는 증폭 정도(SI)가 3이하로서 알러지 유발 가능성이 없는 것으로 관찰되었다. 또한 CTFA 가이드라인에 따라 실시한 인체접촉 시험은 미생물 복합 발효 배양액 5%(v/v)의 인체 도포시 자극이 없는 안전한 원료인 것으로 관찰되었다.

2) 미생물 복합 발효 배양액의 피부 각질제거 효과를 관찰한 결과, 약 32.1%의 각질제거 효과가 있는 것으로 관찰되었으며, 피부 보습력 평가에서는 화장품 제조시 보습제로 많이 사용되고 있는 glycerin, 1,3-butylene glycol, propylene glycol과 거의 유사한 보습력을 가지는 것으로 관찰되었다

3) 최적조건에서 발효한 미생물 복합 발효 배양액의 항산화 작용에 의한 피부 주름개선 효과 즉, 자유라디칼 소거 활성화 및 세포 활성화, 콜라겐 합성, 엘라스타제 활성 저해 효과, UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과에 대해 배양 전 시료와 비교 관찰해 본 결과, 자유라디칼 소거 활성화능은 약 9배 가량 우수한 것으로 관찰되었으며, 세포활성화능은 약 12배, 콜라겐 합성능은 약 6배 가량 우수한 것으로 관찰되었다.

4) 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 분획 건조물의 피부 미백 효과에 대해 관찰한 결과, 약 68%의 tyrosinase 활성 저해율이 관찰되었고 66.9%의 L-DOPA 자동산화억제 효과를 가지고 있는 것으로 관찰되었다. 그리고 69.3% 정도의 B-16 melanoma 내의 melanin 생성을 억제하는 것으로 나타났으며 인공 색소침착을 유도한 시험자들을 대상으로 관찰한 결과 통계학적으로 유의한($p < 0.05$) 미백효과를 가지는 것으로 관찰되었다.

제5절 미생물 복합발효 배양액을 이용한 화장품의 제형화 및 안정성에 대한 평가 연구

1. 연구수행방법

가. 화장품 제형화 기술

1) Liquid crystal 제형화 기술

가) 실험 재료

실험에 사용된 시약은 화장품용 등급의 원료를 사용하였고, liquid crystalline 제형을 제조하기 위하여 liquid crystalline 제형화제로 hydrogenated lecithine을 사용하였다. 을 사용하였다. 보습제로는 glycerine, 1,3-butylene glycol을 사용하였으며, 유연제로는 cyclomethicone, isononyl isonononate, capric/caprylic triglyceride, mine-ral oil, cetostearyl alcohol, tocopheryl acetate를 사용하였다. 그리고 본 연구의 활성물질인 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물도 사용하였다.

나) 실험 기기

유화 및 분산장치로 T.K Robomics (Tokushu Kika Kogyo, Co., Japan)를 사용하였고, 유화입자를 관찰하기 위하여 광학현미경을 사용하였다.

다) 실험 방법

Hydrogenated lecithin이 함유된 수상(water-phase)의 총량이 100 g이 되도록 정확하게 계량한 다음, 75~80℃까지 가온하여 완전히 용해시키고 별도로 보관하였다. 또한 오일상(oil-phase)을 정확하게 계량하여 75~80℃까지 가온하여 완전히 용해시킨 다음 별도로 보관하였다. 호모믹서를 사용하여 이미 만들어 놓은 수상에다 오일상을 천천히 투입하면서 3분간 3,000 rpm의 속도로 배합하였다. 그리고 50℃까지 아주 천천히 냉각시키면서 미생물 복합 발효 배양액이 함유되어 있는 상의 원료들을 첨가한 후 30℃까지 냉각시켜 liquid crystallin의 제조를 완료하였다. 그리고 난 후 액정이 형성되기까지 약 3일 동안 25℃ 이하의 온도에서 보관하여 숙성시켰다.

2) Microcapsule 제형화 기술

가) 실험 재료

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물을 함유시킨 microcapsule을 제조하기 위하여 particle size가 5~10 μm 정도의 다공성을 가지고 있는 PMMA (Methyl methacrylate cross polymer)를 사용하였으며, 화장품용 등급의 원료를 사용하였다.

나) 실험 기기

유화장치로 T.K Robomics (Tokushu Kika Kogyo, Co., Japan)를 사용하였고, microcapsule의 생성을 확인하기 위하여 광학 현미경을 사용하였다.

다) 실험 방법

70% 에탄올에 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물과 PMMA를 넣고 혼합한 후 압 농축하고 동결건조시켜 microcapsule을 제조하였다. 이 microcapsule 시료를 함유하는 에멀전의 제조는, 수상(water-phase) 및 유상(oil-phase)을 나누어 75~80 $^{\circ}\text{C}$ 까지 가온하여 완전히 용해시킨 다음 호모믹서를 사용하여 3분간 3,000 rpm의 속도로 유화하고, 다시 carboxyl polymer를 넣고 1분간 유화한 후 50 $^{\circ}\text{C}$ 까지 아주 천천히 냉각시킨다. Crystalsome을 혼합하고 10분간 유화한 뒤 microcapsule을 넣고 mixing한 후 탈포하였다.

나. 제형의 안정성 평가

1) pH 측정

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 함유된 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형에 대한 pH 측정은 Metrohm (Metrohm 691, Metrohm Ltd. Herisau., Swiss)사의 pH meter를 사용하여 30일 동안 25 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관시킨 미생물 복합 발효 배양액이 함유된 liquid crystal 및 microcapsule의 pH를 측정하였다.

2) 점도 측정

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 함유된 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형에 대한 점도측정은 Brookfield viscometer (Brookfield LVDV-II+, Brookfield Engineering Laboratories, Inc. Middleboro, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 스피들(spindle) No. 4를 선택하여 20 rpm에서 3분간 측정하였으며, 기포의 영향을 줄이기 위해 제조시 탈포를 하였고, 3회 반복하여 평균값을

얻었으며, 1회 측정 후 3시간 뒤에 다시 측정하여 30일 동안 측정한 값을 나타내었다.

3) 온도에 따른 경시변화 안정성 측정

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 함유된 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형 각각을 0℃, 25℃, 40℃의 온도조건에서 보관하여 경시적 변화에 따른 제형의 상태변화를 육안으로 평가하였다. 관찰은 제형을 보관한 후 1일, 3일, 5일, 7일, 15일 및 30일 경과 후에 제형의 분리 및 침전, 변색, 응집과 같은 현상들을 관찰하였다.

4) 온도순환(Cycle chamber)에 따른 특수·가혹 보존 시험 평가

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 함유된 liquid crystal 제형 및 microcapsule 제형에 대하여 -15℃, -10℃, -5℃, 0℃, 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 37.5℃ 및 40℃에서 각각 24시간 동안 보관한 후 이를 1 cycle로 하여 10회 반복 시행하여 온도 순환에 따른 제형의 안정성을 평가하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 화장품 제형화 기술

1) Liquid crystal 제형화 기술

위의 실험 방법 및 조건에 의해서 제조한 liquid crystal 제형의 조성비는 Table 5-20 과 같다. 조성비에 의해서 제조된 liquid crystal 제형의 입자 사진은 Fig. 5-6과 같다.

Table 5-20. Composition of liquid crystal with hydrogenated lecithin in O/W emulsion

	Ingredients	wt%
Water phase	Hydrogenated lecithin	4.00
	1,3-butylene glycol	2.80
	Glycerine	3.00
	EDTA-2Na	0.02
	Methyl paraben	0.20
	I.O.water	Q.S
Oil phase	Carpric/carprylic triglyceride	3.50
	Isononyl isononanoate	2.50
	Mineral oil	4.00
	Cyclomethicone	2.50
	Cetostearyl alcohol	4.00
	Propyl paraben	0.10
Additive	Tocopheryl acetate	0.50
	Culture broth	1.00
	Imidazolidinyl urea	0.20
	Total	100.00

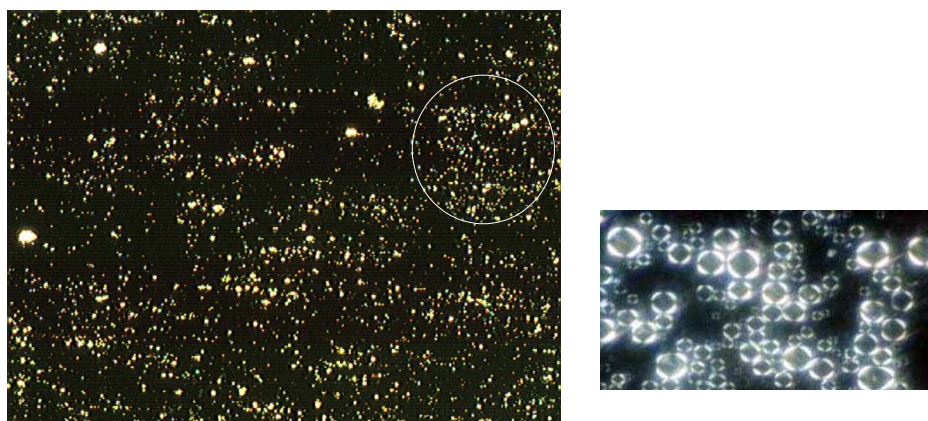


Fig. 5-6. Photograph of the polarized light for forming liquid crystal gel($\times 100$, $\times 400$)

2) Microcapsule 제형화 기술

위의 실험 방법 및 조건에 의해 제조한 microcapsule 제형의 조성비는 Table 5-21과 같다. 이 조성비에 의해서 제조된 microcapsule 제형의 입자 사진은 Fig. 5-7과 같다.

Table 5-21. Microcapsule composition of the emulsion containing methanol fractionates of culture broth

	Ingredients	wt%
Oil phase	Stearic acid	4.00
	Cetostearyl alcohol	8.00
	Glyceryl stearate	8.00
	Sorbitan monostearate	8.00
	Etc	Q.S
Water phase	Water	45.00
	Glycerin	8.00
	Triethanolamine	0.50
	Etc	Q.S
Additive	Microcapsule	3.00
	Vitamin E acetate	1.60

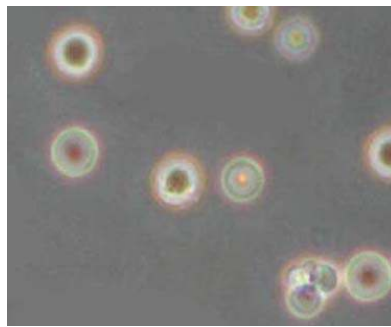


Fig. 5-7. Photograph of the microcapsule emulsion containing methanol fractionates of culture broth ($\times 400$)

나. 제형의 안정성 평가

1) pH 측정

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 함유된 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형에 대하여 pH를 측정한 결과, Fig 5-8과 같이 나타났다. 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 1%가 함유된 liquid crystal 제형의 pH는 6.73 ± 0.08 을 나타내었으며, microcapsule 제형의 pH는 6.56 ± 0.12 를 나타내었다. 30일 동안 두 제형에 대해 pH를 측정한 결과 뚜렷한 변화가 나타나지 않아 두 제형의 안정성은 매우 양호한 것으로 판단되었다.

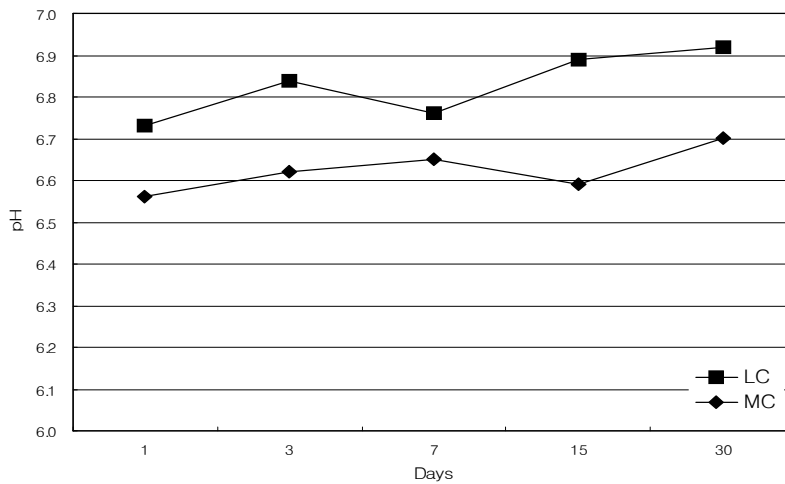


Fig. 5-8. pH measurement of the liquid crystal and microcapsule containing Culture broth.

2) 점도 측정

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 함유된 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형에 대하여 점도를 측정한 결과, Fig. 5-9와 같이 나타났다. 미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 1% 함유된 liquid crystal 제형의 점도는 $7,530 \pm 460$ cP를 나타내었으며, microcapsule 제형의 점도는 $19,650 \pm 500$ cP를 나타내었다. 30일 동안 보관하면서 두 제형에 대해 점도 변화를 측정한 결과 점도가 약간 감소하는 경향이 보였으나 안정성에 영향을 미치는 않은 것으로 판단되었다.

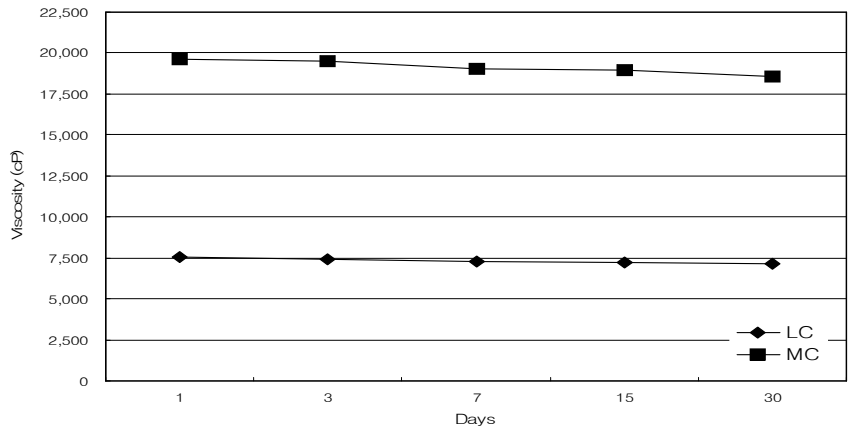


Fig. 5-9. Viscosity measurement of the liquid crystal and microcapsule containing methanol fractionates of culture broth.

3) 온도에 따른 경시변화 안정성 측정

미생물 복합 발효 배양액의 methanol 희분 건조물이 함유된 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형에 대하여 점도를 측정된 결과, Table 5-22와 같이 나타났다. 두 제형 모두 0°C, 25°C, 40°C의 온도조건에서 30일 동안 육안 관찰한 결과 제형의 분리 및 침전, 변색, 응집과 같은 현상들이 관찰되지 않아 안정함을 확인할 수 있었다.

Table 5-22. Result of stability test of the liquid crystal and microcapsule containing methanol fractionates of culture broth in constant temperature conditions(0, 25, 40°C)

Temp. \ Day	Liquid crystal			Microcapsule		
	0°C	25°C	40°C	0°C	25°C	40°C
1	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○
7	○	○	○	○	○	○
15	○	○	○	○	○	○
30	○	○	○	○	○	○

○ : Stable × : Unstable

4) 온도순환(Cycle chamber)에 따른 특수·가혹 보존 시험 평가

미생물 복합 발효 배양액이 함유된 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형에 대하여 온도순환 조건에 의한 특수·가혹 보존시험 결과, Table 5-23에 나타난 것과 같이 두 제형 모두 10 cycle 모두에서 상의 분리와 변색, 변취 등이 발견되지 않아 안정함을 확인할 수 있었다.

Table 5-23. Result of stability test of the liquid crystal and microcapsule containing methanol fractionates of culture broth in cycle chamber condition

Day	Temp.	Liquid crystal			Microcapsule		
		0℃	25℃	40℃	0℃	25℃	40℃
1		○	○	○	○	○	○
2		○	○	○	○	○	○
3		○	○	○	○	○	○
4		○	○	○	○	○	○
5		○	○	○	○	○	○
6		○	○	○	○	○	○
7		○	○	○	○	○	○
8		○	○	○	○	○	○
9		○	○	○	○	○	○
10		○	○	○	○	○	○

○ : Stable × : Unstable

다. 시제품화

- 제품 종류 : 총 8종
- 바디클렌저, 폼클렌징, 마사지젤, 필오프팩, 워시오프팩, 마스크팩, 에센스, 크림



3. 결론

1) 1%의 미생물 복합 발효 배양액을 함유하는 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형을 제조하여 광학 현미경으로 관찰 한 결과, 제형이 완성된 것을 확인할 수 있었다.

2) 1%의 미생물 복합 발효 배양액을 함유한 liquid crystal 제형의 물성은, 25℃ 일 때 pH가 6.73 ± 0.08 이었고, 점도는 $7,530 \pm 460$ cP로 나타났으며, microcapsule 제형의 pH는 6.56 ± 0.12 이었고, 점도는 $19,650 \pm 500$ cP로 관찰되었다. 이들 값은 일반적인 화장품의 물성과 유사한 수치를 가지는 것 수치이다.

3) 1%의 미생물 복합 발효 배양액을 함유한 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형에 대하여 온도 변화(0℃, 25℃, 40℃)에 따른 30일간의 물성 변화를 관찰한 결과, pH 및 점도가 크게 변화하지 않은 것으로 관찰되어 안정성 면에서 매우 우수한 것으로 판단되었다.

4) 1%의 미생물 복합 발효 배양액을 함유한 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형에 대하여 일반시험 및 특수·가혹시험을 실시한 결과, 두 제형 모두 상의 분리 및 변색, 변취 등의 물성적 변화가 나타나지 않아 안정한 제형임을 확인할 수 있었다.

5) 시제품화로서 8종의 제품(바디클렌저, 폼클렌징, 맛사지젤, 필오프팩, 워시오프팩, 마스크팩, 에센스, 크림)을 개발하였다

제6절 발효배양물 농도에 따른 흰쥐의 지방대사, 항산화능 활성검토

1. 실험목적

최근 만성질환과 성인병이 증가하면서 질병의 예방과 노화의 지연에 대한 관심이 고조되고 있다. 이미 질병을 앓고 있는 사람은 약물의 섭취는 부작용이 많고 또한 건강한 사람은 예방의 차원에서 기능성 식품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 발효식품은 발효과정 동안에 인체에 유익한 물질이 생성되기도 하는데 곡류나 야채의 미생물 발효 배양액은 여러 가지 비타민과 항산화물질이 있다고 알려져 있다. 그러나 이들을 복합적으로 배양할 경우 발효과정 중에 생성되는 물질이나 그 효과에 대하여 연구가 미진하며 특히 미생물 복합 발효배양 물질은 여러 가지 생리활성 물질이 상승하리라 유추되나 검증된 결과는 아직 없다.

따라서 항산화 기능을 가지고 있을 것으로 추정되는 미생물 복합발효 배양액이 생리적 활성에 미치는 영향과 또한 섭취 수준별 효과를 알아보는 것은 매우 의미가 있다고 사료된다. 따라서 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대상으로 미생물 복합 발효 배양액을 농도가 다른 배양액 함유수를 섭취케 하여 미생물 복합 발효 배양액의 섭취 수준(10%, 20%, 30%, 50%)에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 및 지질과산화물 함량에 미치는 영향을 알아보았다.

1차년도 본 연구의 구체적인 실험 목표는 다음과 같다.

- 1) 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따른 혈중 지질함량과 간조직의 지질함량의 차이를 알아보았다.
- 2) 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따른 혈액과 간의 지질과산화물 함량의 차이를 알아보았다.
- 3) 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따른 간조직의 항산화계 효소활성에 미치는 영향을 알아보았다.

2. 연구수행방법

가. 실험동물 및 실험식이

Sprague-Dawley 수컷 쥐(200 g \pm 10 g)를 대한 동물사육센터로부터 분양받아 1

주일간의 적응기간 동안 고품사료(rat chow, 삼양사)로 사육한 후 난괴법을 이용하여 각 군당 12마리씩 5군으로 나누어 6주간 실험식이를 공급하였다. 실험동물은 6주간 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실의 온도는 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $63\pm 5\%$ 로 유지하고 매일 광주기, 암주기를 12시간이 되도록 조절하였다.

실험 기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취케 하였으며 물은 2차 이온교환수로 자유섭취 하게하였다. 실험 군의 음용수는 2차 이온 교환수에 3% 당밀을 첨가하여 발효한 미생물 복합 발효 배양액을 농도별(10%, 20%, 30%, 50%)로 희석하여 4개의 실험 군에 공급하였다. 실험군의 분류는 섭취한 음용수의 종류에 따라 2차 이온수를 섭취한 대조군, 10%, 20%, 30% 및 50%을 각각 섭취한 group으로 나누었다.

실험식이는 AIN-93M 에 기준하여 조제하였으며, 대조군과 4개의 실험 군 모두 동일한 식이를 섭취케 하였다. 실험식이의 조성은 Table 6-1과 같다.

Table 6-1. Composition of experimental diets(g/kg of diet)

Ingredients	Control	10%	20%	30%	50%
Casein ¹⁾	531	531	531	531	531
Corn starch	100	100	100	100	100
Sucrose	200	200	200	200	200
Soybean oil	70	70	70	70	70
Cellulose	50	50	50	50	50
Min-mix ²⁾	35	35	35	35	35
Vit-mix ³⁾	10	10	10	10	10
L-cystine	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butyl hydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
복합물액체 배양액 ⁴⁾	-	10 mg % in water	20 mg% in water	30 mg% in water	50 mg% in water

¹⁾Casein high protein(total protein 85%), Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, US

²⁾AIN-93M-MX, Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, US

³⁾AIN-93M-VM, Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, US

⁴⁾복합물액체배양액 추출물 30% 원액을 이용하여

각각 %로 조정하여 식수에 첨가하였음.

*Calorie % of diet - carbohydrate : protein : fat = 64 : 19 : 17

나. 시료분석

1) 식이섭취량 및 체중 측정

실험기간 동안 식이 섭취량은 이틀에 한 번씩, 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다. 복합물액체배양액 원액을 이용하여 각각 10, 20, 30 및 50%로 동물의 섭취하는 물에 조정하여 섭취시켰다. 농도의 차이에 따른 효과를 정확하게 보기 위하여 농도가 다른 복합물액체배양액은 같은 식수의 양으로 동물에게 공급하여 섭취량을 동일하게 통제하였다.

$$\text{식이효율(FER)} = \{6\text{주간의 체중 증가량(g)} / 6\text{주간의 식이 섭취량(g)}\}$$

2) 시료수집 및 전처리

6주간 사육 후 12시간동안 절식시킨 후 에테르 마취 하에 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 간 문맥을 통하여 차가운 식염수 20 mL를 관류시킨 후 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액은 30분간 방치한 후 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 -70°C 에서 냉동 보관하였다. 적출한 간 조직은 액체질소로 급속 냉동시킨 후 분석 시까지 -70°C 에서 냉동 보관하였다.

채취 한 간 조직 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄 균질액을 만들었다. 이 균질액을 $600\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상층액을 $10,000\times\text{g}$ 에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻고 다시 이 상층액은 $105,000\times\text{g}$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻었다.

Mitochondria 분획은 catalase 활성도 측정, cytosol 분획은 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

3) 혈청 및 간 지질 분석

혈청 중성지질 분석은 TG kit(BC118, 영동제약)을 이용하였으며, 리파제를 이용하여 중성지질을 글리세롤로 분해한 후 다시 글리세롤-1-인산을 거쳐 디하이드록시포스페이트로 분해하는 과정 중에 생성되는 과산화수소를 아미노안티피린과 반응시켜 적색의 퀴논이 생성되면 이를 비색정량 하는 방법으로 분석하였다.

혈청 총 콜레스테롤은 콜레스테롤 E kit(BC108-E, 영동제약)을 이용하여 효소법으로 비색정량 하였다. 그 원리는 cholesterol ester hydrolase 효소로 에스터형의 콜레

스테롤을 유리형으로 분해한 후 다시 유리형 콜레스테롤에 콜레스테롤 산화효소를 반응시켜 과산화수소와 4- δ -cholestenone의 생성을 유도한다. 생성된 과산화수소에 과산화효소와 4-아미노안티피린 및 페놀을 동시에 반응시키면 산화적 축합반응으로 퀴논이 형성되므로 이를 비색정량하는 방법으로 효소용액 3 ml에 시료 20 μ l를 혼합하여 37°C 수조에서 15분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 비색정량하였다.

혈청 HDL 콜레스테롤은 dextran sulfate와 magnesium sulfate를 이용하여 LDL과 VLDL을 침전시킨 후 상층에 남아 있는 HDL 중의 콜레스테롤을 분석하는 방법으로 HDL 콜레스테롤 kit(BC 308-HDL, 영동제약)을 이용하여 분석하였다. 침전시약으로 LDL과 VLDL을 침전시킨 후 총 콜레스테롤 분석과 동일한 방법으로 분석하였다. Non-HDL 콜레스테롤의 농도는 총 콜레스테롤 농도에서 HDL 콜레스테롤 농도를 제한 값으로 구하였다. Atherogenic index는 동맥경화의 위험율을 예측할 수 있는 변인으로 산출방법은 다음과 같다.

$$\text{Atherogenic index} = \{(\text{total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}) / \text{HDL cholesterol}\}$$

간 조직의 중성지방과 콜레스테롤의 추출은 Folch법(165)을 응용하였다. 간 시료 1 g을 취해 6 ml의 chloroform : methanol (2:1, v/v) 혼합액과 2 ml의 증류수를 넣어 균질화시킨 후 원심분리 하였다. 윗층의 물-메탄올 혼합을 따라내고 간 고형물 아래의 콜레스테롤과 중성지방이 함유된 chloroform층을 분리해 낸 후, 500 μ l를 취하여 고속진공 농축기를 이용하여 휘발시켰다. 이를 50 μ l의 Triton X-100/chloroform 혼합액(1:1, v/v)과 450 μ l의 chloroform을 넣어 가볍게 흔들어 내용물을 용해시켰다. 이중 50 μ l를 취하여 chloroform을 다시 휘발시킨 후 ethanol로 용해시켜 분석에 사용하였다. 간 조직의 중성지방과 총 콜레스테롤 분석은 효소법을 이용한 영동제약 분석용 kit으로 혈액에서와 같은 방법으로 비색정량 하였다.

4) 혈액과 간 조직의 과산화 정도의 측정

간조직과 혈장 중 Malondialdehyde (MDA) 함량 측정은 Ohkawa, Ohishi, Yagi (1979)의 방법에 따라 측정하였다. 효소 시료 속의 과산화지질을 산성조건 하에서 2-thiobarbituric acid 용액과 가열 반응시켜 생긴 MDA의 흡광도를 532nm에서 측정하였다. MDA 함량은 조직 g당 nmole로 표시하였다.

(nmoles/g of tissue(liver))

5) 항산화 효소계의 활성 측정

가) Catalase (CAT) 활성도 측정

간조직 중 mitochondria 분획의 CAT 활성도는 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 기질로 하여 환원되는 정도를 240nm에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi (1974, 673-684)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 간조직의 효소액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분 동안에 반응하여 감소시킨 H_2O_2 양을 nmole로 표시하였다.

(Reduced H_2O_2 nmoles/min/mg protein)

나) Glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성도 측정

간 조직 중 GSH-Px 활성도는 Paglia, Valentine (1967)의 방법에 따라 측정하였다. Glutathione 기질과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 25°C에서 5분간 반응시켜 340nm에서 NADPH의 산화로 인한 흡광도 감소율을 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분간 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다.

(NADPH oxidized nmoles/min/mg protein)

다) Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

간조직 중 SOD 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 관찰하는 Martin, Dailey, Sugarman (1987)의 방법에 준해 0.1mM EDTA가 함유된 50mM 인산 완충액 (pH 7.5)에 10 μ M hematoxylin 및 효소액을 가해 25°C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560nm에서 측정하여 효소의 활성을 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 액 중의 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1unit로 나타내었다.

(Unit#/mg protein(#50% inhibition of autooxidation of hematoxylin))

6) 단백질 함량 측정

간조직 중 단백질 함량은 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

(mg/g of tissue(liver))

다. 통계분석

본 실험에서 얻은 결과의 통계 분석은 SAS package를 이용하였다. 각 실험군 당 평균과 표준편차를 구하였으며 각 군간의 통계적 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다. 변수들간의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient로 처리하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 체중의 변화 및 식이섭취량 측정

6주간의 주차별 체중 변화를 Table 6-2에 나타내었다. 실험 시작 시 실험군별 평균 체중은 241.3-243.4(g)으로 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 실험 6주간 동안 주차별 체중 증가 패턴 역시 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취 수준에 따른 차이는 나타나지 않았다.

6주간의 체중 증가량, 평균 식이 섭취량 및 식이효율을 Table 6-3에 나타내었다. 실험 기간 중 총 체중 증가량은 실험군들 간에 유의적인 차이는 없어 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취수준이 체중 증가에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

평균 식이섭취량도 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취수준에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 대조군과 실험군들 간에 유의적인 차이는 없었지만, 대조군의 평균 식이섭취량(27.6g)이 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 실험군들의 식이섭취량(20.36~21.29g) 보다 높은 경향을 나타내었다.

식이효율에서도 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취수준이 체중 증가에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 6-2. Changes of body weight during experimental period

Group	Control	10%	20%	30%	50%
0wk BW ³⁾ (g)	241.31±6.34 ^{1)a2)}	241.86±5.51 ^a	241.31±6.32 ^a	243.40±5.53 ^a	242.27±5.01 ^a
1wk BW(g)	280.31±11.96 ^a	279.36±12.90 ^a	278.40±7.25 ^a	280.90±11.56 ^a	280.09±5.28 ^a
2wk BW(g)	321.18±15.05 ^a	326.27±14.53 ^a	320.36±8.51 ^a	326.95±15.39 ^a	326.36±4.35 ^a
3wk BW(g)	343.81±19.20 ^a	350.63±13.20 ^a	348.36±11.23 ^a	353.63±14.31 ^a	346.36±9.89 ^a
4wk BW(g)	376.77±19.34 ^a	381.63±19.80 ^a	378.31±8.88 ^a	385.81±15.02 ^a	382.31±7.77 ^a
5wk BW(g)	394.72±18.59 ^a	395.09±31.63 ^a	393.63±12.91 ^a	394.50±17.50 ^a	386.27±8.36 ^a
6wk BW(g)	391.31±20.38 ^a	396.18±26.51 ^a	394.54±21.17 ^a	398.50±19.87 ^a	392.54±16.63 ^a

¹⁾Mean±SD.

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.¹⁾Mean±SD.

³⁾ BW : Body weight

Table 6-3. Effects of experimental diet on body weight gains, mean food intake and FER(Food intake efficiency ratio) during experimental period

Group	Control	10%	20%	30%	50%
Weight gains (g)	150.00±18.98 ^{1)a2)}	154.31±27.15 ^a	141.22±19.67 ^a	155.09±16.95 ^a	150.27±18.05 ^a
Mean food intake(g)	27.60±19.79 ^a	21.29±1.20 ^a	21.52±1.11 ^a	21.25±0.78 ^a	20.36±1.31 ^a
FER ³⁾	0.17±0.02 ^a	0.18±0.02 ^a	0.17±0.02 ^a	0.17±0.01 ^a	0.17±0.01 ^a

¹⁾Mean±SD.

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.¹⁾Mean±SD.

³⁾FER : Food intake efficiency ratio

나. 혈중 지질 분석 결과

혈청 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 atherogenic index에 대한 결과를 Table 6-4에 나타내었다. 혈청 중성지방의 수치는 미생물 복합 발효 배양액을 섭취한 10%군과 20%군이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았고, 30%군과 50%군도 대조군에 비하여 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 배양액 희석 농도가 높은 30%와 50%군 보다 희석 농도가 낮은 10%와 20%군이 혈청 중성 지질을 낮추는데 효과적 이었으며 특히 20%군의 효과가 가장 높았다.

혈청 총 콜레스테롤 수치는 대조군에 비하여 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 실험 군들에서 유의적으로 낮게 나타났으며, 미생물 복합발효 배양액의 희석 농도에 따른 실험 군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 미생물 복합발효 배양액의 섭취는 섭취 수준에 상관없이 모두 혈청 총콜레스테롤 수치를 감소시키는데 유효한 것으로 나타났으며, 유의적인 차이는 없었으나 20%군과 50%군이 10%와 30%군에 비하여 낮은 경향이였다.

혈청 HDL-콜레스테롤 수치는 대조군에 비하여 총콜레스테롤 수준이 현저히 낮았던 실험 군들에서 유의적으로 낮게 나타났으며, 실험 군 중에서도 50%군이 10%, 20%와 30%군 보다 유의적으로 낮았다. 총 콜레스테롤 중 HDL-콜레스테롤이 차지 하는 비율과 atherogenic index는 실험 군들 간에 유의적인 차이가 없었다.

혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 대조군에 비하여 10%군, 20%군과 30%군이 낮은 경향이였으며, 50%군은 유의적으로 낮았다. 혈중 총 콜레스테롤 농도가 심장질환의 주요 위험인자이긴 하나 최근에는, 혈중 콜레스테롤을 운반하는 HDL과 LDL의 비율이 더욱 민감한 진단 기준이 된다고 밝히고 있다. 그러므로 혈중 콜레스테롤 수준이 정상이라 하더라도 LDL-콜레스테롤 수준이 높을 경우 동맥경화증의 위험이 증가된다. 이러한 관점에서 미생물 복합발효 배양액의 섭취는 총콜레스테롤 감소와 함께 LDL-콜레스테롤 감소가 동반되어 나타난 것으로 보이며, 혈중 총 콜레스테롤 감소와 동반된 혈중 LDL 콜레스테롤 농도의 감소는 심혈관계 질환에 대한 예방인자로 알려지고 있다.

Table 6-4. Effects of experimental diet on serum triglyceride, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, HDL/total cholesterol and atherogenic index in male rats

Group	control	10%	20%	30%	50%
Triglyceride (mg/dl)	108.1±31.1 ^{1)a2)}	81.5±9.2 ^{bc}	69.4±14.4 ^c	90.7±18.7 ^{ab}	99.7±18.3 ^a
Total cholesterol (mg/dl)	105.4±54.8 ^a	70.9±17.7 ^b	59.6±14.4 ^b	66.3±19.5 ^b	52.0±9.9 ^b
HDL cholesterol (mg/dl)	49.6±16.3 ^a	30.6±10.8 ^b	25.4±4.2 ^{bc}	27.8±14.1 ^{bc}	20.2±4.5 ^c
LDL cholesterol (mg/dl)	34.1±23.7 ^a	24.7±12.1 ^{ab}	23.3±12.5 ^{ab}	19.5±14.5 ^{ab}	16.1±11.4 ^b
HDL/Total cholesterol	0.51± 0.14 ^a	0.44 ±0.13 ^a	0.44± 0.09 ^a	0.44± 0.14 ^a	0.40± 0.11 ^a
Athrogenic index	1.06±0.82 ^a	1.44±1.03 ^a	1.33±0.54 ^a	1.63±1.77 ^a	1.73±1.84 ^a

¹⁾Mean±SD.

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

다. 간 지질 분석 결과

간 중 중성지방과 총콜레스테롤에 대한 결과를 Table 6-5에 나타내었다. 간 중성 지방은 대조군과 실험군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따른 유의적인 차이는 없었다. 간 중 총콜레스테롤 농도는 20%군이 56.37(mg/dl), 10%군이 57.39(mg/dl), 대조군이 60.76(mg/dl), 30%군이 63.69(mg/dl), 50%군이 64.13(mg/dl)의 순으로 나타나 20%군이 가장 낮은 값을 나타내었으나 대조군과 실험군들 간에 유의적인 차이는 없었다. 식이섭취의 효과는 생리적 상태 또는 식이섭취 수준에 의존적이므로 병리적 상태 또는 보다 장기간의 섭취 시에 미생물 복합발효 배양액이 간 중 총 콜레스테롤 농도에 미치는 효과를 후속연구에서 다루어 볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

Table 6-5. Effects of experimental diet on hepatic triglyceride and total cholesterol in male rats

Group	control	10%	20%	30%	50%
Triglyceride (mg/g liver)	37.80±7.27 ¹⁾²⁾	38.07±9.31 ^a	43.34±6.98 ^a	38.34±7.23 ^a	36.85±7.65 ^a
Total cholesterol (mg/g liver)	60.76±8.65 ^a	57.39±14.85 ^a	56.37±12.72 ^a	63.69±24.36 ^a	64.13±13.84 ^a

¹⁾Mean±SD.

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.¹⁾Mean±SD.

라. 간 조직의 항산화 효소계의 활성화도

간 조직 내 항산화계 효소의 활성도를 알아보기 위하여 SOD, GSH-Px와 catalase 활성을 측정된 결과를 Table 6-6에 나타내었다.

Catalase와 SOD는 자유기에 대해 초기 보호작용을 하는 효소로서 $O_2^{\cdot-}$ 는 SOD에 의해 보다 반응성이 약한 H_2O_2 로 전환된 다음 catalase에 의해 H_2O 와 OH^- 로 무독화 되어 배설된다. 간 조직의 SOD 활성도는 20% 희석 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 20%군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 나머지 실험 군들은 유의적인 차이가 없었다.

간 조직의 catalase 활성도에 대한 결과를 보면, 10%군과 20%군은 대조군과 유의적인 차이가 없었으며, 30%군과 50%군은 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다.

Glutathion peroxidase는 catalase와 마찬가지로 H_2O_2 를 H_2O 로 전환시켜주는 기능을 하는 동시에 lipid hydroperoxide 및 다른 organic hydroperoxide에 대해서도 자체적인 방어 작용을 하는 필수적인 항산화 효소 중의 하나이다. 간 조직의 GSH-Px 활성도 측정 결과는 10%군이 가장 높게 나타났으며, 희석농도가 진할수록 낮아지는 경향을 보여 50%군은 10%군에 비하여 유의적으로 감소하였다.

이와 같은 결과들은 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따라 간의 항산화계 효소 활성화에 미치는 영향이 다르게 나타남을 시사한 것이라 사료되나, 항산화 효소의 활성만으로는 어떤 물질의 체내 산화적 방어 능력을 단정 지을 수 없다. 항산화 효소의 절대적인 양에 따라 활성이 되먹임 조절될 가능성도 배제할 수 없으므로 이에 대한 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

인체는 정상적인 생리 상태에서는 자유라디칼의 생성과 항산화 방어체계의 활성이 균형을 이루고 있다. 이 균형이 깨어진 상태를 산화적 스트레스라고 한다. 자유라디칼에 의한 지질과산화 반응은 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathion peroxidase(GSH-Px) 등의 항산화 효소와 항산화 영양소들로 이루어진 체내 항산화 방어체계에 의하여 억제된다. 따라서 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 자유라디칼이 과다 생성되거나 혹은 항산화 방어체계의 기능이 감소되어 일어난다. 이러한 점을 감안하여 볼 때, 미생물 복합발효 배양액이 체내 항산화계에 미치는 효과는 동물의 생리적 조건과 조직에 따라 다르게 나타날 수 있으므로 산화적 스트레스가 증가하는 병리적 상태 또는 노화 등의 생리적 상태에서는 본 연구와는 다르게 나타날 수 있으므로 이에 대한 후속연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Table 6-6. Effects of experimental diet on SOD, GSH-Px and catalase activities in liver

Group	control	10%	20%	30%	50%
SOD ³⁾	6.18±1.57 ^{1)a2)}	5.77±0.97 ^{ab}	4.65±0.94 ^b	5.02±1.50 ^{ab}	4.85±1.99 ^{ab}
GSH-Px ⁴⁾	53.45±18.11 ^{ab}	55.64±11.54 ^a	48.24±5.14 ^{ab}	47.79±6.47 ^{ab}	44.24±3.86 ^b
Catalase ⁵⁾	183.58±80.9 ^a	183.58±89.7 ^a	120.40±82.1 ^{ab}	107.90±66.5 ^b	79.53±50.2 ^b

¹⁾Mean±SD.

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.³⁾Mean±SD.

³⁾(unite/mg protein (50% inhibition of autooxidation of hematoxylin))

⁴⁾(NADPH oxidized nmoles/min/mg protein)

⁵⁾(Reduced H₂O₂ nmoles/min/mg protein)

마. 혈액과 간 조직의 지질과산화물

혈액 간의 지질과산화 정도를 알아보기 위하여 혈청과 간조직의 MDA (malondialdehyde) 함량을 측정하여 Table 6-7에 그 결과를 나타내었다. 혈청의 지질 과산화물 농도는 50%군만이 대조군 보다 유의적으로 감소하였다. 간 조직의 지질과산화물 농도는 대조군과 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 실험 군 간에도 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 노화 및 기타 퇴행성 질환 유발의 요인이 되는 지질과산화 반응은 세포손상 기작의 하나로 생각되고 있다. 일반적으로 당뇨 등과 같은 질병 발생시 산화적 스트레스의 증가로 인하여 조직 내의 과산화물이 증가하며, 간 조직에서의 MDA 함량이 증가한다는 보고도 있다. 본 실험에서는 건강한 수컷 쥐를 대상으로 이상적인 조성의 AIN-93M에 기준하여 조제한 식이를 공급하였으므로 미생물 복합발효 배양액의 섭취로 인한 지질과산화물 생성에 미치는 효과를 관찰 할 수 없었던 것으로 사료된다.

Table 6-7. Effects of experimental diet on lipid peroxide contents in plasma and liver

Group	Control	10%	20%	30%	50%
MDA (nmol/ml serum)	0.709±0.120 ^{ab}	0.599±0.164 ^{bc}	0.704±0.057 ^{ab}	0.780±0.158 ^a	0.581±0.113 ^c
MDA (nmol/g liver)	3.467±1.126 ^a	3.027±1.172 ^a	3.516±1.640 ^a	3.612±1.306 ^a	3.358±1.124 ^a

¹⁾Mean±SD.

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.³⁾Mean±SD.

4. 결론

미생물 복합 발효 배양액의 섭취 수준에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 및 지질과산화물 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대상으로 농도가 다른 미생물 복합발효 배양액 함유수(10%, 20%, 30%, 50%)를 6주간 섭취케 하였다. 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취수준이 6주간의 체중증가 패턴과 체중증가량 및 평균 식이섭취량과 식이효율에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

2) 혈청 중성지방의 수치는 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 10%군과 20%군이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다. 30%군과 50%군도 대조군에 비하여 낮은 경향이 있었으나 유의적인 차이는 없었다.

혈청 총 콜레스테롤 수치는 대조군에 비하여 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 네 실험 군들에서 유의적으로 낮게 나타났으며, 미생물 복합발효 배양액의 희석 농도에 따른 실험 군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈청 HDL-콜레스테롤 수치는 총콜레스테롤 수준이 낮았던 복합 미생물 배양액을 섭취한 네 군이 대조군 보다 유의적으로 낮았으며, 배양액을 섭취한 실험 군 중에서도 50%군이 나머지 세 군 보다 유의적으로 낮았다. 그러나 총 콜레스테롤 중 HDL 콜레스테롤이 차지하는 비율은 실험 군들 간에 유의적인 차이가 없었다.

혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 대조군에 비하여 총콜레스테롤 수준이 현저히 낮았던 실험 군들에서 유의적으로 낮은 경향을 나타내었으며, 50%군은 대조군 보다 유의적으로 낮게 나타났으며, Atherogenic index는 실험 군들 간에 유의적인 차이가 없었다.

3) 간 중성지방과 총콜레스테롤 농도는 대조군과 실험 군들 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

4) 간 조직의 SOD 활성도는 20%군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 나머지 실험 군들은 유의적인 차이가 없었다. 간 조직의 catalase 활성도는 30%군과 50%군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 간 조직의 GSH-Px 활성도는 10%군이 가장 높게 나타났으며, 희석농도가 진할수록 낮아지는 경향을 보여 50%군

은 10%군에 비하여 유의적으로 감소하였다.

5) 혈액에서의 MDA 수준은 50%군에서 유의적으로 감소하였으며, 간 조직의 MDA 수준은 대조군과 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 실험군 간에도 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

미생물 복합발효 배양액 섭취가 혈청 중성지방에 미치는 효과는 섭취 수준에 따라 그 효과가 다르게 나타났다. 배양액 희석 농도가 30%와 50%군 보다 10%, 20%군이 혈청 중성지방을 낮추는데 효과적이었으며, 혈청 총콜레스테롤 수치를 감소시키는데 있어서는 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 상관없이 모두 유효한 것으로 나타났다. 유의적인 차이는 없었으나 20%군과 50%군이 더 낮은 경향이었다.

간의 항산화계 효소 활성화에 미치는 효과는 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따라 효과 다르게 나타남을 시사한 것이라 사료되나, 항산화 효소의 활성화만으로는 어떤 물질의 체내 산화적 방어 능력을 단정 지을 수 없다. 항산화 효소의 절대적인 양에 따라 활성이 되먹임 조절될 가능성도 배제할 수 없으므로 이에 대한 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한, 미생물 복합발효 배양액이 체내 항산화계에 미치는 효과는 동물의 생리적 조건과 조직에 따라 다르게 나타날 수 있으므로 산화적 스트레스가 증가하는 병리적 상태 또는 노화 등의 생리적 상태에서는 본 연구와는 다르게 나타날 수 있으므로 이에 대한 후속연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

제 7절 발효배양물의 항당뇨 활성 및 항산화 효소 검토

1. 실험 목적

항산화 기능을 가지고 있을 것으로 추정되는 미생물 복합발효 배양액이 생리적 활성을 나타내는데 필요한 섭취 수준을 알아보기 위하여 실시되었던 1차년도 보고에 기초하여 생리적 활성이 높은 것으로 판단되는 최적배양조건에서 발효된 배양액 20%와 30% 수준의 미생물 배양액 함유수를 당뇨유발 흰쥐에게 공급하여 당뇨상태에서의 미생물 발효액의 생리적 효능과 최적 수준을 알아보고자 하였다.

제 1형 당뇨병은 췌장에서 분비되는 혈당조절 호르몬인 인슐린의 양이나 기능이 부족하여 고혈당과 당뇨 증세가 나타나는 대사 이상 질환으로 신장 및 심장 등의 여러기관에 영향을 주어 심각한 당뇨합병증이나 동맥경화, 고혈압, 말초 신경장애, 고지혈증, 심혈관계 질환 등을 야기 시킨다. Wada 등은 당뇨쥐에서 과산화적 손상에 의해 지질과산화물의 축적이 증가되고 혈청 중성지질 수준이 증가한다고 보고하였으며, 산화적 스트레스가 당뇨병에 관여한다는 보고도 있다. 당뇨병의 합병증을 예방하기 위하여 산화적 스트레스의 억제, 제거 및 지질대사의 개선이 필요하다고 주장되어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 Sprague-Dawley 암컷 쥐를 대상으로 당뇨 유발군과 정상군으로 나눈 뒤 4주간 20%와 30% 미생물 배양액 함유수를 섭취케 하여 미생물 복합 발효 배양액의 섭취(20%, 30%)가 당뇨상태에서 혈액 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 활성 및 혈중 유리 아미노산 농도에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

본 연구의 구체적인 실험 목표는 다음과 같다.

- 1) 당뇨 유발쥐에서 20%와 30% 미생물 복합발효 배양액의 섭취가 혈중 지질함량과 간조직의 지질 함량의 차이를 알아보았다.
- 2) 당뇨 유발쥐에서 20%와 30% 미생물 복합발효 배양액의 섭취가 간조직의 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 알아보았다.
- 3) 당뇨 유발쥐에서 20%와 30% 미생물 복합발효 배양액의 섭취가 혈중 유리 아미노산 농도에 미치는 영향을 알아보았다.

2. 연구수행방법

가. 실험동물 및 실험식이

Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐(평균 체중 190 ± 5 g)를 대한 동물사육센터로부터 분양받아 일주일간의 적응 기간 동안 고품사료(rat chow, 삼양사)로 사육한 후 난괴법을 이용하여 실험 군당 10마리씩 6군으로 분류하였다. 3군은 당뇨유발군이며, 3군은 정상군으로 당뇨유발군과 정상군은 각각 희석한 복합 발효 배양액의 섭취 수준(0%, 20%, 30%)에 따라 다시 3군씩으로 나누어 4주간 실험식이를 공급하였다.

따라서 실험군은

- 1) 정상-대조식이 군(Normal)
- 2) 정상-미생물 복합 발효액 20% 희석액 섭취 군(Normal 20%)
- 3) 정상-미생물 복합 발효액 30% 희석액 섭취 군(Normal 30%)
- 4) 당뇨-대조식이 섭취 군(DM)
- 5) 당뇨-미생물 복합 발효액 20% 희석액 섭취 군(DM 20%)
- 6) 당뇨-미생물 복합 발효액 30% 희석액 섭취 군(DM 30%)

으로 분류하여 당뇨상태에서 미생물 복합 발효액의 섭취가 지질대사, 간의 항산화 효소 활성과 혈중 아미노산 대사에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 실험 디자인은 Fig. 7-1에 나타내었다.

실험동물은 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육기간 동안 사육실의 온도는 25 ± 2 °C, 습도는 $63 \pm 5\%$ 를 유지하고 광주기와 암주기를 12시간(light 6:00~18:00) 자동조절 장치를 이용하여 조절하였다. 실험 기간 동안 실험 식이와 물은 자유롭게 섭취하게 하였으며, 이때 사용된 물은 모두 2차 이온 교환수를 사용하였다.

실험 군의 음용수는 2차 이온 교환수에 미생물 복합 발효 배양액(30mg% 원액)을 농도별(20%, 30%)로 희석하여 매일 20 mL씩 정상군과 당뇨군에 각각 공급하였다.

당뇨 군의 당뇨 유발은 실험동물의 평균 체중이 약 200 g 되었을 때 streptozotocin (Sigma S0130) 50 mg/kg body weight을 신선한 0.25 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해하여 대퇴부 근육에 1회 주사하여 유발 시켰으며, 정상군은 동량의 citrate buffer용액을 주사하였다. 당뇨유발의 확인은 streptozotocin 주사 4일 후 꼬리정맥에서 채혈하여 간이혈당계로(precision Q.I.D) 혈당을 측정하여 혈당량이 300 mg/dl 이상인 동물을 당뇨가 유발된 것으로 간주하여 실험식이를 시작하였다.

실험식은 AIN-93M 에 기준하여 조제하였으며, 대조군과 5개의 실험군 모두 동일한 식이를 섭취케 하였다. 실험식의 조성은 Table 7-1과 같다.

Table 7-1. Composition of control and experimental diets(g/kg of diet)

Ingredients	Dietary group		
	Control	발효액 20%	발효액 30%
Casein ¹⁾	200	200	200
Corn-starch	531	531	531
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	70	70	70
Cellulose ²⁾	50	50	50
Mineral Mix ³⁾	35	35	35
Vitamin Mix ⁴⁾	10	10	10
L-cystein ⁵⁾	1.8	1.8	1.8
Choline bitartate ⁶⁾	2.5	2.5	2.5
TBHQ ⁷⁾	0.008	0.008	0.008
복합물 액체배양액 (30mg%) ⁸⁾	—	4ml in 20ml water	6ml in 20ml water

¹⁾Casein, Maeil Dairy Indstry CO. Korea

²⁾α-Cellulose, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

³⁾AIN-93M-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

⁴⁾AIN-93M-VM, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

⁵⁾L-Cystine, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

⁶⁾Choline bitartate, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

⁷⁾Tert-bulyl hydroquione, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

⁸⁾복합물액체배양액 30mg% 원액을 이용(증류수로 희석하여 20ml로 만들어 먹임)

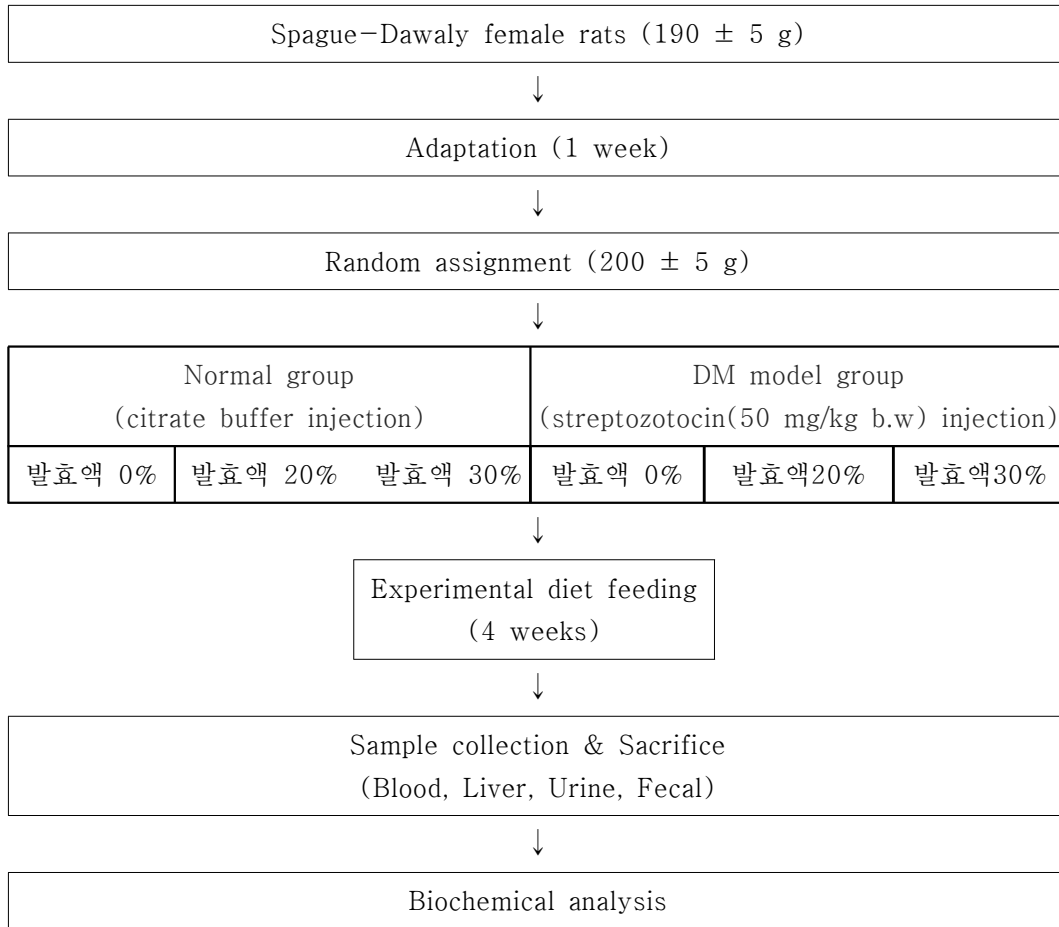


Fig 7-1. Experimental design

나. 시료분석

1) 식이섭취량 및 체중 측정

실험 식이를 시작한 날을 기준으로, 실험기간 동안 식이 섭취량은 이틀에 한 번씩, 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

$$\text{식이효율(FER)} = \{4\text{주간의 체중 증가량(g)} / 4\text{주간의 식이 섭취량(g)}\}$$

2) 시료수집 및 전처리

4주간 사육 후 12시간동안 절식시킨 후 에테르 마취 하에 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 간 문맥을 통하여 차가운 식염수 20 ml를 관류시킨 후 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액 중 일부는 EDTA 처리된 시험관에 분주하여 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 채취한 혈액의 나머지는 상온에서 30분간 방치한 후 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 -70°C 에서 냉동 보관하였다. 적출한 간 조직은 액체질소로 급속 냉동시킨 후 분석 시까지 -70°C 에서 냉동 보관하였다.

채취 한 간 조직 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄 균질액을 만들었다. 이 균질액을 $600\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상층액을 $10,000\times\text{g}$ 에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻고 다시 이 상층액은 $105,000\times\text{g}$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻었다.

Mitochondria 분획은 catalase 활성도 측정, cytosol 분획은 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

3) 혈청 및 간 지질 분석

가) 혈청 지질 분석

혈청 콜레스테롤 농도는 혈청 콜레스테롤 분석용 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. 즉 혈청 중 에스테르형의 콜레스테롤을 cholesterol esterase에 의해 유리형 콜레스테롤로 만든 다음 이에 cholesterol oxidase를 반응시켜 생성된 Δ^4 -cholesterol을 peroxidase와 Δ^4 -aminoantipyrine과 반응시킴으로써 형성된 퀴논형 적색색소를 spectrophotometer(Uvikon 930, Switzerland)를 이용하여 흡광도 500 nm에서 측정하여 비색정량 하였다. 혈청 중성지방 농도는 혈청 중성지방 분석용 효소 kit(아산제

약)를 사용하여 측정하였다.

Triglyceride와 lipoprotein lipase가 반응해서 유리된 글리세롤을 glycerol kinase와 반응시켜 생성된 L- γ -glycerophosphoric acid를 L- γ -glycerophosphooxidase, amino antipyrine과 반응시켜 얻은 퀴논형 색소를 spectrophotometer(Uvikon 930, Switzerland)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 비색정량 하였다.

혈청 HDL-콜레스테롤은 혈청 HDL-콜레스테롤 분석용 효소 kit(영동제약)를 사용하여 측정하였다. Dextran-sulfate-Mg(II)을 혈청과 반응시켜 혈청내 LDL, VLDL을 침전시킨 후 상층액인 HDL fraction을 검체로 사용하여 혈청 콜레스테롤과 같은 방법으로 spectrophotometer(Uvikon 930, Switzerland)를 이용하여 흡광도 580 nm에서 측정하였다.

혈청 LDL-콜레스테롤은 Friedwald 등의 방법을 이용하여 산출하였으며, 그 산출식은 다음과 같다.

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{Total cholesterol} - (\text{HDL-cholesterol} + \text{TG}/5)$$

동맥경화지수(atherogenic index)는 동맥경화의 위험률을 예측할 수 있는 변인으로 산출방법은 아래와 같다

$$\text{Atherogenic index} = \{(\text{total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}) / \text{HDL cholesterol}\}$$

나) 간지질 분석

간 조직의 중성지방과 콜레스테롤의 추출은 Folch법(165)을 응용하였다. 간 시료 1 g을 취해 6 ml의 chloroform : methanol (2:1, v/v) 혼합액과 2 ml의 증류수를 넣어 균질화시킨 후 원심분리 하였다. 윗층의 물-메탄올 혼합을 따라내고 간 고형물 아래의 콜레스테롤과 중성지방이 함유된 chloroform층을 분리해 낸 후, 500 μ l를 취하여 고속진공 농축기를 이용하여 휘발시켰다. 이를 50 μ l의 Triton X-100/chloroform 혼합액(1:1, v/v)과 450 μ l의 chloroform을 넣어 가볍게 흔들어 내용물을 용해시켰다. 이중 50 μ l를 취하여 chloroform을 다시 휘발시킨 후 ethanol로 용해시켜 분석에 사용하였다.

간 조직의 중성지질과 총 콜레스테롤 분석은 효소법을 이용한 영동제약 분석용 kit으로 혈액에서와 같은 방법으로 비색정량 하였다.

간 시료 0.5 g을 취해 10ml의 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 혼합액을 첨가하

여 균질화 시킨 후, 균질액을 여과하여 여액을 테스트 튜브에 담아 질소 건조기 (OTU-2C, TAITEC, Japan)로 건조 하였다. 여기에 chloroform : metanol(2 : 1, v/v) 1 ml 가하여 혼합하여 녹인 후 100 μ l 씩 테스트 튜브에 옮겨 질소 건조기로 건조하였다. 그 후 에탄올 5 mL를 가하여 지질을 녹인 후 분석에 사용하였다. 간 조직의 중성지질과 총 콜레스테롤 분석은 효소법을 이용한 아산제약 분석용 kit으로 혈액에서와 동일한 방법으로 비색정량 하였다.

다) 혈당 분석

혈당은 매주 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 상업용 kit로 분석하였다.

4) 항산화 효소계의 활성 측정

가) Catalase (CAT) 활성도 측정

간조직 중 mitochondria 분획의 CAT 활성도는 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 기질로 하여 환원되는 정도를 240nm에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi (1974, 673-684)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 간조직의 효소액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분 동안에 반응하여 감소시킨 H_2O_2 양을 nmole로 표시하였다.

(Reduced H_2O_2 nmoles/min/mg protein)

나) Glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성도 측정

간 조직 중 GSH-Px 활성도는 Paglia, Valentine (1967)의 방법에 따라 측정하였다. Glutathione 기질과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 25°C에서 5분간 반응시켜 340nm에서 NADPH의 산화로 인한 흡광도 감소율을 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분간 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다.

(NADPH oxidized nmoles/min/mg protein)

다) Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

간조직 중 SOD 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 관찰하는 Martin, Dailey, Sugarman (1987)의 방법에 준해 0.1mM EDTA가 함유된 50mM 인산 완충

액 (pH 7.5)에 10 μ M hematoxylin 및 효소액을 가해 25 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560nm에서 측정하여 효소의 활성을 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 액 중의 hematoxylin의 자동산화율 50% 억제하는 정도를 1unit로 나타내었다.

(Unit*/min/mg protein (*50% inhibition of autooxidation of hematoxylin))

라) 단백질 함량 측정

간조직 중 단백질 함량은 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

(mg/g of tissue(liver))

5) 혈장 인슐린 분석

검체의 항원과 표지항원이 특정항체에 대해 경쟁적으로 반응하는 원리를 이용한 insulin RIA kit(DPC, USA)를 이용하여 gamma counter로 분석하였다.

6) 혈중 유리아미노산 농도 측정

가) 전처리

혈장에서 유리아미노산 농도를 측정하기 위해 시료 1ml를 취하고 동량의 10% sulfosalicylic acid 용액을 가하여 세계 혼합한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 단백질을 제거시킨 후 상층액을 깨끗한 tube에 옮겨 놓고, 아미노산 농도를 분석하기 직전에 0.2 μ m filter(Gelman aerodisc LC PVDF)로 여과하였다.

나) 아미노산의 측정방법

시료의 아미노산 농도는 ion-exchange chromatography에 입각한 아미노산 전용분석기(Biochrom 20, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)를 사용하여 측정하였다. Lithium high performance column으로부터 혈장에 함유된 각 생체 유리아미노산을 성공적으로 분리시키기 위해서 이동상으로 pH와 이온 농도를 단계적으로 증가시킨 lithium citrate buffer를 25.0ml/h의 유속에서 사용하였다.

유리아미노산 분리는 14단계의 mobile phase를 단계적으로 거치는데, 각 단계에서 사용되는 buffer와 반응온도 및 시간은 다음과 같다.

- Ⓐ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 35°C, 4mins
- Ⓑ buffer 2: lithium citrate buffer pH 3.00 0.30M, 35°C, 32mins
- Ⓒ buffer 3: lithium citrate buffer pH 3.15 0.50M, 35°C, 7.5mins
- Ⓓ buffer 3: lithium citrate buffer pH 3.15 0.50M, 81°C, 6.5mins
- Ⓔ buffer 4: lithium citrate buffer pH 3.50 0.90M, 81°C, 16mins
- Ⓕ buffer 4: lithium citrate buffer pH 3.50 0.90M, 86°C, 7mins
- Ⓖ buffer 5: lithium citrate buffer pH 3.55 1.65M, 86°C, 27mins
- Ⓗ buffer 5: lithium citrate buffer pH 3.55 1.65M, 93°C, 6.5mins
- Ⓘ buffer 6: lithium hydroxide solution 0.30M, 93°C, 5mins
- Ⓙ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 93°C, 1mins
- Ⓚ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 38°C, 25mins
- Ⓛ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 38°C, 5mins
- Ⓜ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 38°C, 0mins
- Ⓝ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 38°C, 1mins

Table 7-2. Instrument and operating conditions of amino acid analyzer.

Instrument	Biochem 20 Amino Acid Analyzer
Integrator	Biochem 20 programmer
Analytical column	Pre-wash and high performance PEEK lithium column with Peltier heating/ cooling system (200×4.6mm+Resin pot)
Detector	Ninhydrin (Pharmacia Biotech. Ltd, England)
Carrier gas	Oxygen free nitrogen gas regulated to 5.5bar
Flow rates	Buffer 25ml/hr, Ninhydrin 20ml/hr
Temperature	Column 37°C, Reaction coil 135°C
Operating pressure	Buffer 57bar, Ninhydrin 7bar, Coil 2-12bar
Photometer	Single flow cell with optical beam splitter to provide detection at 440nm and 570nm
Sample injection volume	40µl

다. 통계분석

본 실험에서 얻은 결과의 통계 분석은 SAS package를 이용하였다. 각 실험군 당 평균과 표준편차를 구하였으며 각 군간의 통계적 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

3. 연구수행내용 및 결과

가. 체중의 변화 및 식이섭취량 측정

4주간의 체중 변화를 Table 7-2에 나타내었다. 실험 시작 시 실험 군별 평균 체중은 약 221-229(g)으로 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 실험 4주 후 희생 전체중은 정상군들과 당뇨군들 간에 유의적으로 차이가 나타났으며, 당뇨가 유발된 세군의 체중이 정상군들 보다 낮아 당뇨 모델에서 볼 수 있는 전형적인 체중증가량 감소 현상을 나타내었다. 당뇨군 내에서는 30%군의 최종 체중이 유의적으로 높았으며, 20%군의 최종 체중은 대조군과 차이가 없었다. 따라서 당뇨군에서는 30%군만이 미생물 복합발효 배양액의 섭취로 인한 체중 감소 현상을 다소 감소시켰다. 정상군들 내에서는 대조군 보다 20%와 30%군의 체중증가량이 많았으며, 20%군과 30%군 간의 유의적인 차이는 없었다. 정상군에서는 당뇨군과 달리 20%군에서도 체중 증가량이 대조군 보다 높은 경향이였다. 하지만 체중 증가량의 차이가 유의적이지는 않았다.

실험기간동안 실험동물들의 평균 식이 섭취량과 식이효율을 Table 7-3에 나타내었다. 평균식이 섭취량은 당뇨가 유발된 세 군의 섭취량이 정상상태의 세 군의 섭취량 보다 유의적으로 높았다. 당뇨군 내에서의 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취수준에 따른 유의적인 차이는 없었으며, 정상군 내에서도 이와 같은 결과를 나타내었다.

식이효율은 평균 식이섭취량은 많으나 체중 증가량은 적어 전형적인 당뇨에서의 특징을 나타내었던 당뇨 세 군이 정상 세 군 보다 유의적으로 낮았다. 당뇨군내에서는 유의적인 차이는 없었으나, 체중 증가량이 유의적으로 많았던 30%군이 가장 높은 값을 나타내었다. 정상군들 내에서는 체중 증가량이 많았던 20%군과 30%군이 높은 경향을 나타내었다.

Table 7-2. Effects of experimental diet on body weight and weight gain in female rats.

	Normal			Diabetes		
	Control	20% ³⁾	30% ³⁾	Control	20% ³⁾	30% ³⁾
Initial						
weight (g)	221.1±6.9 ^{1)a}	221.6±6.9 ^a	221.7±7.1 ^a	226.9±10.2 ^a	229.3±11.2 ^a	228.9±9.0 ^a
Final						
weight (g)	343.5±99.9 ^{ab}	377.0±29.2 ^a	373.9±18.4 ^a	282.0±34.3 ^{cd}	274.4±42.8 ^{cd}	304.2±27.0 ^{bc}
Weight gain(g)	122.4±96.1 ^a	155.4±28.8 ^a	152.2±15.2 ^a	55.1±41.6 ^{bc}	45.1±40.4 ^{bc}	75.2±32.3 ^b

1)Mean ± SD

2)Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) Complex microorganism fermentation cultures

Table 7-3. The effect of diets on food intake and food intake efficiency ratio(FER) in female rats during experimental period.

	Normal			Diabetes		
	Control	발효액20%	발효액30%	Control	발효액20%	발효액30%
Mean food intake (g/d)	21.12±3.06 ^{1)a}	22.42±1.05 ^a	22.02±2.06 ^a	33.04±3.20 ^b	33.42±2.33 ^b	34.26±2.56 ^b
FER ³⁾	0.23±0.18 ^a	0.28±0.04 ^a	0.28±0.03 ^a	0.07±0.06 ^b	0.05±0.04 ^b	0.09±0.04 ^b

1)Mean ± SD

2)Values with different superscript within a column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾FER : Food intake efficiency ratio

나. 혈당 변화에 미치는 영향

당뇨 유발 후 미생물 복합발효 배양액 섭취가 혈당 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 4주간의 혈당 변화를 측정하였다. 혈당 측정 결과는 Table 7-4에 나타내었다.

정상군들 보다 당뇨군들의 혈당 수준이 4주간 동안 유의적으로 높게 나타났다. 정상군들과 당뇨군들 내에서 미생물 복합발효 배양액의 섭취에 따른 유의적인 혈당 변화는 나타나지 않았다. 암컷 흰쥐를 대상으로 4주간 미생물 복합발효 배양액을 섭취케 한 결과, 혈당조절에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 7-4. The effect of diets on blood glucose in female rats during experimental period.

	Normal			Diabetes		
	Control	발효액20%	발효액30%	Control	발효액20%	발효액30%
1th blood						
glucose (mg/dl)	111.8±10.1 ^{1)a}	118.1±7.3 ^a	110.1±15.9 ^a	432.6±53.4 ^b	446.7±74.0 ^b	400.6±69.2 ^b
2th blood						
glucose (mg/dl)	115.4±6.7 ^a	111.3±10.8 ^a	108.4±9.9 ^a	363.3±37.5 ^b	385.0±46.5 ^b	390.0±69.0 ^b
3th blood						
glucose (mg/dl)	103.3±9.8 ^a	106.1±7.3 ^a	104.7±3.6 ^a	419.4±70.5 ^b	424.6±38.5 ^b	427.6±60.7 ^b
4th blood						
glucose (mg/dl)	113.6±4.9 ^a	109.0±8.3 ^a	104.9±5.6 ^a	411.6±19.7 ^b	395.4±22.4 ^b	405.7±40.4 ^b

1) Mean ± SD

2) Values with different superscript within a column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

다. 혈중 지질에 미치는 영향

당뇨 유발 상태에서 4주간의 미생물 복합배양액의 섭취가 혈청 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 atherogenic index에 미치는 효과에 대한 결과를 Table 7-5에 나타내었다.

혈청 중성지방의 수치는 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 20%군과 30%군이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다. 당뇨상태와 정상시 모두 미생물 복합발효 배양액을 섭취로 혈중 중성지방수치가 낮아졌으며, 20%군 보다 30%군에서 더욱 낮았다. 미생물 복합발효 배양액 섭취가 혈청 중성지질에 미치는 효과는 섭취 수준에 따라 그 효과가 다르게 나타났다.

혈청 총 콜레스테롤 수치는 당뇨 대조군이 88.4 당뇨-20%군이 83.1(mg/dl), 정상-대조군이 82.0(mg/dl), 정상-20%군이 77.5(mg/dl), 당뇨-30%군이 74.5(mg/dl), 정상-30%군이 68.4(mg/dl)로 나타나 당뇨-대조군의 값이 가장 높았으며, 정상-30%군의 값이 가장 낮았다. 당뇨군내에서는 대조군에 비하여 20%군이 유의적으로 낮았으며, 20%군 보다 30%군이 유의적으로 낮아 당뇨시 30%섭취군의 혈중 콜레스테롤 강하 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 정상군들 내에서도 이와 같은 경향으로 나타나 미생물 복합발효 배양액 섭취가 혈 중 총콜레스테롤을 낮추는 것으로 나타났다. 식이 섭취 조건에서 정상군과 당뇨군을 비교해 보면 같은 식이섭취 조건이라고 하더라도 당뇨군이 대조군에 비하여 혈 중 콜레스테롤 수치가 높은 것으로 나타났다.

혈청 HDL-콜레스테롤 수치는 당뇨와 정상외의 경우 모두에서 대조군에 비하여 30%군들의 HDL-콜레스테롤 수준이 유의적으로 높았다. 20%군들도 대조군 보다 높은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 일정 수준 이상의 미생물 복합발효 배양액 섭취는 총콜레스테롤 수치가 감소하였음에도 불구하고 혈청 HDL-콜레스테롤 수치를 증가시킨 것으로 보아 당뇨시 혈중 지질 패턴을 양호하게 개선시키는데 유효할 것으로 사료된다.

반면, 혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 정상과 당뇨상태에서 각각 대조군, 20%군, 30%군의 순으로 낮게 나타났다. 정상-30%군이 가장 낮았으며, 당뇨-대조군이 가장 높았다. 대조식이, 미생물 복합발효 배양액 20% 섭취와 미생물 복합발효 배양액 30% 섭취에서 각각 정상시 보다 당뇨시에 혈청 LDL-콜레스테롤 수치가 높아지는 것으로 나타났다. 혈중 총 콜레스테롤 농도가 심장질환의 주요 위험인자이긴 하나 최근에는, 혈중 콜레스테롤을 운반하는 HDL과 LDL의 비율이 더욱 민감한 진단 기준이 된다고 밝히고 있다. 그러므로 혈중 콜레스테롤 수준이 정상이라 하더라도

LDL-콜레스테롤 수준이 높을 경우 동맥경화증의 위험이 증가된다. 혈중 총 콜레스테롤 감소와 동반된 혈중 LDL 콜레스테롤 농도의 감소는 심혈관계 질환에 대한 예방인자로 알려지고 있다.

이러한 관점에서 미생물 복합발효 배양액의 섭취는 총콜레스테롤 감소와 함께 LDL 콜레스테롤 감소가 동반되어 나타난 것으로 보이며, HDL 콜레스테롤은 증가시켰으므로 미생물 복합발효 배양액의 섭취는 혈중 지질개선에 유의한 것으로 사료되어지며, 그 효과는 20%군 보다 30%군의 효과가 큰 것으로 나타났다.

Atherogenic index를 보면, 당뇨-대조군의 값이 2.29로 다른 5군들 보다 유의적으로 높아 당뇨시 심혈관계 질환에 대한 위험율이 증가한다는 여러 보고의 결과를 확인할 수 있었으며, 당뇨시 증가된 수치는 20%와 30% 미생물 배양액 섭취로 유의적으로 감소하였다. 정상-대조군은 당뇨-대조군 보다 유의적으로 낮았으며, 정상 쥐들에서도 역시 미생물 배양액의 섭취로 atherogenic index 값을 낮출 수 있었고 6군 들 중에서 정상-30%군의 Atherogenic index값이 유의적으로 가장 낮았다.

Table 7-5. Effects of experimental diet on serum triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index in female rats

	Normal			Diabetes		
	Control	발효액20%	발효액30%	Control	발효액20%	발효액30%
Triglyceride (mg/dl)	89.0±4.0 ^{1)a}	79.5±8.3 ^b	65.0±5.7 ^c	92.4±4.2 ^a	80.62±4.6 ^b	69.0±6.9 ^c
Total cholesterol (mg/dl)	82.0±4.0 ^{1)ab}	77.5±9.1 ^{bc}	68.4±6.6 ^{1)d}	88.4±7.0 ^{1)a}	83.1±4.0 ^a ^b	74.5±6.7 ^{cd}
HDL - cholesterol (mg/dl)	30.64±1.8 ^{bc}	32.2±3.6 ^{bc}	35.1±1.5 ^a	27.0±1.7 ^{cd}	30.0±2.1 ^c	32.9±2.4 ^{ab}
LDL - cholesterol (mg/dl)	33.7±4.9 ^{bc}	29.4±11.0 ^c	20.4±6.2 ^d	43.0±7.2 ^a	37.1±4.7 ^{ab}	27.8±6.1 ^c
Athrogenic index	1.68±0.19 ^b	1.46±0.6 ^{bc}	0.95±0.21 ^d	2.29±0.29 ^a	1.79±0.22 ^b	1.27±0.26 ^{cd}

1)Mean ± SD

2)Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

라. 간 지질 분석 결과

간 중 중성지방과 총콜레스테롤에 대한 결과를 Table 6에 나타내었다. 간 중성지방의 분석결과를 보면, 암컷 흰쥐에서 당뇨에 의한 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한, 4주간의 미생물 복합배양액의 섭취 여부와 섭취 수준에 따른 유의적인 차이도 나타나지 않았다.

간의 총콜레스테롤 수준은 정상상태와 당뇨상태 모두에서 미생물 복합배양액의 섭취 여부와 섭취 수준에 따른 차이가 나타났다. 당뇨군의 경우, 대조군이 59.3(mg/dl), 20%군이 47.8(mg/dl), 30%군이 45.0(mg/dl)의 순으로 유의적으로 낮았으며 정상군에서도 이와 같은 경향으로 나타났다. 수컷 흰쥐를 대상으로 6주간 공급한 경우에는 20%군의 값이 가장 낮은 값을 나타냈었다. 식이섭취의 효과는 성별, 생리적 상태 또는 식이섭취 수준에 의존적이므로 암컷 쥐를 대상으로 하였으며, 당뇨라는 병리적 조건 그리고, 4주간의 섭취에 따른 결과로 사료되므로 미생물 복합배양액이 간 중 총 콜레스테롤 농도에 미치는 효과를 후속연구에서도 지속적으로 다루어볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

Table 7-6. Effects of experimental diet on hepatic triglyceride and total cholesterol in female rats

	Normal			Diabetes		
	Control	발효액20%	발효액30%	Control	발효액20%	발효액30%
Triglyceride (mg/g)	47.2±14.1 ^{1)a}	45.7±10.9 ^a	43.3±12.7 ^a	54.7±18.0 ^a	49.7±10.9 ^a	46.5±16.5 ^a
Total cholesterol (mg/g)	56.1±8.2 ^{1)ab}	48.4±11.8 ^{abc}	41.6±16.3 ^c	59.3±9.0 ^a	47.8±11.5 ^{abc}	45.0±11.2 ^c

1)Mean ± SD

2)Values with different superscript within a column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

마. 간 조직의 항산화 효소계의 활성화도

간 조직 내 항산화계 효소의 활성도를 알아보기 위하여 SOD, GSH-Px와 catalase 활성을 측정한 결과를 Table 7-7에 나타내었다.

인체는 정상적인 생리 상태에서는 자유라디칼의 생성과 항산화 방어체계의 활성이 균형을 이루고 있다. 이 균형이 깨어진 상태를 산화적 스트레스라고 한다. 자유 라디칼에 의한 지질과산화 반응은 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathion peroxidase(GSH-Px) 등의 항산화 효소와 항산화 영양소들로 이루어진 체내 항산화 방어체계에 의하여 억제된다. 따라서 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 자유 라디칼이 과다 생성되거나 혹은 항산화 방어체계의 기능이 감소되어 일어난다.

catalase와 SOD는 자유기에 대해 초기 보호 작용을 하는 효소로서 $O_2^{\cdot-}$ 는 SOD에 의해 보다 반응성이 약한 H_2O_2 로 전환된 다음 catalase에 의해 H_2O 와 OH^{\cdot} 로 무독화 되어 배설된다.

간 조직의 SOD 활성도는 정상군 중 발효액 30%섭취 군이 가장 높았으며, 당뇨군 중 발효액을 섭취하지 않은 군이 가장 활성이 낮은 것으로 나타났다. 정상군 내에서는 대조군 보다 발효액 20% 섭취군이 유의적으로 활성이 높았으며, 발효액 30%군이 대조군과 20%섭취군 보다 유의적으로 높아 발효액 섭취량이 많을수록 간에서의 SOD 활성도가 높은 것으로 나타났다. 당뇨군에서도 이와 유사한 경향으로 나타났다. 유의적이지는 않았으나, 당뇨 대조군 보다 발효액 20%군이 높은 경향이었으며, 대조군과 20%섭취군 보다 30%군이 유의적으로 높게 나타나 당뇨 상태에서도 정상 상태에서와 마찬가지로 발효액 섭취량이 많을수록 간에서의 SOD 활성도가 높은 것으로 나타났다.

Glutathion peroxidase는 catalase와 마찬가지로 H_2O_2 를 H_2O 로 전환시켜주는 기능을 하는 동시에 lipid hydroperoxide 및 다른 organic hydroperoxide에 대해서도 자체적인 방어 작용을 하는 필수적인 항산화 효소 중의 하나이다.

간 조직의 GSH-Px 활성도 측정 결과를 살펴보면, 정상군내에서는 대조군 보다 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 20%와 30%군이 유의적으로 활성이 높게 나타났으며, 30%군이 20%군 보다 유의적으로 활성이 높게 나타났다. 당뇨군내에서도 이와 같이 대조군 보다 20% 섭취군이 유의적으로 활성이 높게 나타났으며, 대조군과 20%군 보다 30%군이 유의적으로 활성이 높게 나타났다. 또한 미생물 배양액을 섭취하지 않은 군들과 20% 희석액을 섭취한 군들에서는 정상 상태 보다 당뇨상태에서 GSH-Px의 활성이 유의적으로 낮게 나타났다. 그러나 30% 희석 배양액을 섭취한

군들에서는 정상상태와 당뇨상태에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이것은 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따라 효소 활성화에 미치는 영향이 다를 수 있다는 것을 시사하는 것으로 사료된다.

간 조직의 catalase 활성도에 대한 결과를 보면, 정상상태와 당뇨상태 모두에서 미생물 복합발효 배양액의 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 당뇨군의 경우 30%군이 대조군 보다 낮은 경향이였으나 유의적인 차이는 없었다. 또한 정상군과 당뇨군 간의 유의적인 차이도 나타나지 않아 당뇨상태에서의 간의 catalase 활성도 변화를 확인 할 수 없었다.

미생물 복합발효 배양액이 체내 항산화계에 미치는 효과는 1차 때와는 달리 정상상태와 당뇨상태의 경우 모두에서 20% 군과 30% 군에서 SOD와 GSH-Px의 활성도가 증가하였다. 이는 당뇨라는 병리적 상태에서의 산화스트레스의 증가와 관련이 있는 것으로 사료되며, 이번 실험에서는 지난 실험과 달리 암컷 흰쥐를 대상으로 하였으며 섭취기간도 지난 번 6주와 달리 4주로 보다 단기간의 섭취효과를 반영한 것으로 실험 대상과 생리적 상태, 섭취 기간에 따라 다른 결과가 나타날 수 있음을 시사한 것으로 보여 지므로 다양한 조건에서의 연구가 보다 더 구체적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

또한, 항산화 효소의 활성만으로는 어떤 물질의 체내 산화적 방어 능력을 단정 지을 수 없다. 항산화 효소의 절대적인 양에 따라 활성이 되먹임 조절될 가능성도 배제할 수 없으므로 이에 대한 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 7-7. Effects of experimental diet on SOD, GSH-Px and catalase activities in liver

	Normal			Diabetes		
	Control	발효액20%	발효액30%	Control	발효액20%	발효액30%
SOD	1.33±0.28 ^{1)c}	1.57±0.61 ^{bc}	2.37±0.91 ^a	0.84±0.27 ^c	0.23±0.60 ^c	2.08±0.97 ^{ab}
GPX	10.0±1.42 ^c	12.9±2.74 ^b	15.3±1.06 ^a	7.31±0.66 ^d	9.62±1.35 ^c	14.8±1.42 ^a
Catalase	159.0±19.9 ^a	152.8±24.1 ^a	150.3±17.7 ^a	159.0±24.6 ^a	148.1±38.4 ^a	140.1±10.2 ^a

1)Mean ± SD

2)Values with different superscript within a column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

³⁾(unite/mg protein (50% inhibition of autooxidation of hematoxylin))

⁴⁾(NADPH oxidized nmoles/min/mg protein)

⁵⁾(Reduced H₂O₂ nmoles/min/mg protein)

바. 혈중 인슐린 농도에 미치는 영향

혈중 plasma insulin 농도는 대조군과 당뇨군 사이에 유의적인 차이는 없었고 (Table 7-8) 당뇨군에서 낮은 경향을 보였다. 그리고 각 대조군과 당뇨군 내에서 식이에 의한 차이는 없었다.

Table 7-8. Effects of experimental diet on plasma insulin

	Normal			Diabetes		
	Control	발효액20%	발효액30%	Control	발효액20%	발효액30%
Insulin (unit/ml)	11.3±1.28	12.25±1.32	12.02±1.51	8.33±1.22	7.23±1.62	7.66±1.33

1)Mean ± SD

사. 혈액 중 유리 아미노산 농도 분석

혈장 유리 아미노산을 측정된 분석결과를 Table 7-9에 나타내었다. 정상과 당뇨상태에서 미생물 복합발효 배양액의 섭취에 따른 혈장 유리아미노산의 변화를 살펴보면, 아미노산 중 taurine, threonine, glycine, citrulline, cystine, methionine, tyrosine, ornithine, lysine과 histidine의 농도는 당뇨 발생 여부와 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취 수준에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

Glutamic acid 농도는 당뇨-30%군이 가장 높았으며, 정상-대조군 보다 유의적으로 높았다. Serine과 proline의 농도는 정상군들에서 대조군이 30%군 보다 유의적으로 높았다. Alanine 농도는 당뇨-30%이 가장 높았으며, 당뇨-대조군 보다 유의적으로 높았다. Valine 농도는 당뇨-대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 유의적으로 낮았다. 정상군들에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. Leucine과 isoleucine 농도도 valine과 같이 당뇨-대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 유의적으로 낮았다. 정상군들에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. Phenylalanine 농도도 당뇨-대조군이 당뇨-30%군 보다 유의적으로 낮았다. 정상군들에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. Arginine은 당뇨 대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 낮았으며, 당뇨-20%군이 당뇨-30%군 보다 낮은 값이었으나 유의적이지는 않았다.

Table 7-9. Comparison of plasma free amino acids in the experimental group.

	Normal			Diabetes		
	Control	발효액20%	발효액30%	Control	발효액20%	발효액30%
Taurine	5.67±2.07 ^a	4.71±1.75 ^a	5.18±2.17 ^a	4.17±1.24 ^a	5.52±1.21 ^a	6.33±2.18 ^a
Threonine	5.39±2.80 ^a	3.84±1.40 ^a	1.48±1.86 ^a	2.59±0.92 ^a	4.72±0.91 ^a	2.32±4.01 ^a
Serine	5.30±3.09 ^a	3.96±1.24 ^{ab}	1.63±2.04 ^{bc}	3.20±1.33 ^{ab}	4.77±0.73 ^a	0.00±0.00 ^c
Glutamic acid	2.44±1.24 ^b	1.93±0.78 ^b	2.77±2.0 ^{ab}	1.47±0.13 ^b	3.34±1.04 ^{ab}	4.67±1.95 ^a
Proline	2.87±1.36 ^a	1.95±0.78 ^{ab}	0.35±0.61 ^{cd}	1.55±0.45 ^{bc}	3.17±1.08 ^a	0.00±0.00 ^d
Glycine	5.44±2.46 ^a	4.47±1.27 ^a	4.48±0.48 ^a	3.57±1.96 ^a	3.5±0.63 ^a	5.23±2.70 ^a
Alanine	9.48±4.03 ^{ab}	7.05±1.56 ^b	7.30±1.36 ^{ab}	6.87±0.63 ^b	10.49±1.65 ^{ab}	10.94±3.83 ^a
Citrulline	1.54±0.79 ^a	1.32±0.30 ^a	1.18±0.22 ^a	1.18±0.18 ^a	1.67±0.37 ^a	1.49±0.49 ^a
Valine	2.79±1.29 ^{ab}	2.40±0.75 ^{ab}	2.70±0.62 ^{ab}	1.61±0.11 ^b	3.45±0.83 ^a	3.31±1.30 ^a
Cystine	0.11±0.08 ^a	0.09±0.06 ^a	0.04±0.04 ^a	0.09±0.03 ^a	0.09±0.07 ^a	0.09±0.08 ^a
Methionine	0.99±0.47 ^a	0.80±0.32 ^a	0.78±0.37 ^a	0.51±0.13 ^a	0.97±0.09 ^a	1.07±0.64 ^a
Isoleucine	1.67±0.77 ^{ab}	1.37±0.45 ^{ab}	1.64±0.42 ^{ab}	0.90±0.03 ^b	1.86±0.39 ^a	1.78±0.76 ^a
Leucine	2.20±1.11 ^{ab}	1.90±0.65 ^{ab}	2.20±0.51 ^{ab}	1.26±0.13 ^b	2.65±0.56 ^a	2.66±1.15 ^a
Tyrosine	1.64±0.75 ^a	1.16±0.50 ^a	1.13±0.19 ^a	0.98±0.09 ^a	1.59±0.37 ^a	1.81±1.00 ^a
Phenylalanine	1.09±0.54 ^{ab}	0.88±0.35 ^{ab}	0.99±0.22 ^{ab}	0.62±0.16 ^b	1.10±0.19 ^{ab}	1.20±0.52 ^a
Ornithine	2.14±1.65 ^a	1.69±1.53 ^a	1.58±0.51 ^a	1.07±0.55 ^a	0.92±0.55 ^a	1.83±0.15 ^a
Lysine	8.42±3.20 ^a	7.33±1.95 ^a	7.61±1.57 ^a	6.33±2.23 ^a	9.23±1.43 ^a	9.75±3.46 ^a
Histidine	0.49±0.42 ^a	0.42±0.20 ^a	0.18±0.28 ^a	0.22±0.38 ^a	0.44±0.31 ^a	0.67±0.54 ^a
Arginine	0.96±0.94 ^{ab}	1.79±1.19 ^a	0.68±0.46 ^{ab}	0.07±0.12 ^b	0.66±0.29 ^{ab}	1.21±0.72 ^{ab}

4. 결론

당뇨쥐에서 미생물 복합 발효 배양액의 섭취 수준에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 활성 및 혈장 아미노산 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Sprague-Dawley 암컷 쥐를 대상으로 농도가 다른 미생물 복합발효 배양액 함유수(20%, 30%)를 4주간 섭취케 하였다. 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 당뇨 쥐에서는 식이섭취량 증가 현상과 함께 체중감소 현상이 나타나 정상군들에 비하여 당뇨군들에서 식이효율이 낮게 나타났다. 당뇨군 내에서는 30%군의 최종 체중이 가장 높게 나타났다.

2) 혈청 중성지방의 수치는 당뇨상태와 정상시 모두 미생물 복합발효 배양액을 섭취로 혈중 중성지방수치가 낮아졌으며, 20%군 보다 30%군에서 더욱 낮았다.

혈청 총 콜레스테롤 수치는 당뇨-대조군의 값이 가장 높았으며, 정상-30%군의 값이 가장 낮았다. 당뇨군내에서는 대조군에 비하여 20%군이 유의적으로 낮았으며, 20%군 보다 30%군이 유의적으로 낮아 당뇨시 30%섭취군의 혈중 콜레스테롤 강화 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 정상군들 내에서도 이와 같은 경향으로 나타났다. 같은 식이섭취 조건에서 정상군과 당뇨군을 비교해 보면 당뇨군이 대조군에 비하여 혈중 콜레스테롤 수치가 높은 것으로 나타났다.

혈청 HDL-콜레스테롤 수치는 당뇨와 정상시 모두에서 대조군에 비하여 30%군들의 HDL-콜레스테롤 수준이 유의적으로 높았다. 20%군들도 대조군 보다 높은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다.

혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 정상과 당뇨상태에서 각각 대조군, 20%군, 30%군의 순으로 낮게 나타났다. 정상-30%군이 가장 낮았으며, 당뇨-대조군이 가장 높았다. 대조식이, 미생물 복합발효 배양액 20% 섭취와 미생물 복합발효 배양액 30% 섭취에서 각각 정상시 보다 당뇨시에 혈청 혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 정상과 당뇨상태에서 각각 대조군, 20%군, 30%군의 순으로 낮게 나타났다. 정상-30%군이 가장 낮았으며, 당뇨-대조군이 가장 높았다. 대조식이, 미생물 복합발효 배양액 20% 섭취와 미생물 복합발효 배양액 30% 섭취에서 각각 정상시 보다 당뇨시에 혈청 LDL-콜레스테롤 수치가 높아지는 것으로 나타났다.

Atherogenic index를 보면, 당뇨-대조군의 값이 다른 5군들 보다 유의적으로 높았으며, 당뇨시 증가된 수치는 20%와 30% 미생물 배양액 섭취로 유의적으로 감소하였다.

정상 쥐들에서도 역시 미생물 배양액의 섭취로 atherogenic index 값을 낮출 수 있었고 6군 들 중에서 정상-30%군의 Atherogenic index값이 유의적으로 가장 낮았다.

3) 간 중성지방은 당뇨 유무와 복합 미생물 배양액 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 간의 총콜레스테롤 농도는 당뇨와 정상 쥐에서 모두 복합 미생물 배양액 섭취군에서 낮게 나타났다.

4) 간 조직의 SOD 활성도는 정상군 중 발효액 30%섭취 군이 가장 높았으며, 당뇨군 중 발효액을 섭취하지 않은 군이 가장 활성이 낮은 것으로 나타났다. 정상군 내에서는 발효액 섭취량이 많을수록 간에서의 SOD 활성도가 높은 것으로 나타났다. 당뇨군에서도 이와 유사한 경향으로 나타났다. 간 조직의 catalase 활성도는 당뇨 유무와 복합 미생물 배양액 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 간 조직의 GSH-Px 활성은 정상쥐와 당뇨쥐에서 대조군 보다 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 20%와 30%군이 유의적으로 활성이 높게 나타났으며, 30%군이 20%군 보다 유의적으로 활성이 높게 나타났다.

5) 혈장 유리 아미노산 농도결과는, taurine, threonine, glycine, citrulline, cystine, methionine, tyrosine, ornithine, lysine과 histidine의 농도는 당뇨 발생 여부와 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취 수준에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. Glutamic acid와 alanine 농도는 당뇨-30%군이 가장 높았으며, valine, leucine, isoleucine과 phenylalanine 농도는 당뇨-대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 유의적으로 낮았다. Arginine은 당뇨 대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 낮았으며, 당뇨-20%군이 당뇨-30%군 보다 낮은 값이었으나 유의적이지는 않았다

미생물 복합발효 배양액 섭취로 당뇨 시 증가한 혈 중 총 콜레스테롤을 감소시켰다. 이와 함께 혈청 LDL-콜레스테롤 수치는 낮추고 HDL-콜레스테롤 수치는 높였으며 Atherogenic index값을 낮추었으므로 미생물 복합발효 배양액의 섭취는 당뇨로 인한 심혈관계 질환에 대한 발병 위험을 낮추는데 유의할 것으로 사료되며, 그 효과는 30% 희석액 섭취 군에서 가장 높은 것으로 나타났다.

미생물 복합발효 배양액이 체내 항산화계에 미치는 효과는 1차 때와는 달리 정상 상태와 당뇨상태의 경우 모두에서 20% 군과 30% 군에서 SOD와 GSH-Px의 활성도

가 증가하였다. 이는 당뇨라는 병리적 상태에서의 산화스트레스의 증가와 관련이 있는 것으로 사료되며, 이번 실험에서는 지난 실험과 달리 암컷 흰쥐를 대상으로 하였으며 섭취기간도 지난 번 6주와 달리 4주로 보다 단기간의 섭취효과를 반영한 것으로 실험 대상과 생리적 상태, 섭취 기간에 따라 다른 결과가 나타날 수 있음을 시사하는 것으로 보여지므로 다양한 조건에서의 연구가 보다 더 구체적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한, 항산화 효소의 활성화만으로는 어떤 물질의 체내 산화적 방어 능력을 단정 지을 수 없다. 항산화 효소의 절대적인 양에 따라 활성이 되먹임 조절될 가능성도 배제할 수 없으므로 이에 대한 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

제 8절 분리화합물의 항산화 및 항당뇨능의 검토

1. 실험 목적

당뇨쥐에서 미생물 복합 발효 배양물의 섭취 수준에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 활성 및 혈장 유리아미노산 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 당뇨 유발 수컷 쥐를 대상으로 미생물 복합발효배양물의 methanol 분획물 1%, methanol 분획물 3%, 순수분리물 0.2%를 4주간 공급하여 항산화성 생리활성적 특성을 검증하였다.

2. 연구수행방법

가. 실험동물 및 실험식이

Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(평균 체중 190 ± 5 g)를 Biogenomics사로부터(서울) 분양받아 일주일간의 적응 기간 동안 고휘사료(rat chow, 삼양사)로 사육한 후 약 220g의 체중이 되었을 때 당뇨군은 당뇨를 유발시켰다.

당뇨 유발은 streptozotocin (Sigma S0130) 50 mg/kg body weight을 신선한 0.25 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해하여 대퇴부 근육에 1회 주사하여 유발 시켰으며, 정상군은 동량의 citrate buffer용액을 주사하였다. 당뇨유발의 확인은 streptozotocin 주사 4일 후 꼬리정맥에서 채혈하여 간이혈당계로(precision Q.I.D) 혈당을 측정하여 혈당량이 300 mg/dl 이상인 동물을 당뇨가 유발된 것으로 간주하여 실험식이를 시작하였다. 그리고 당뇨군과 비당뇨군은 임의로 군당 10마리씩 각각 식이에 따라 4군으로 분류하여 총 8군으로 분류하였다.

실험식이는 미생물복합발효배양물을 methanol로 분획(methanol fractionation, MF)하여 동결건조시켜 분말형태로 만들어 1%, 3% 및 methanol 분획물을 정제처리하여 순수분리물 형태로 만든 순수분리물(pure) 0.2%로 각각 정상군과 당뇨군에 4주간 실험식이를 공급하였다.

따라서, 실험군은

- 1) 정상-대조식이 군(Normal)
- 2) 정상-미생물 복합 발효배양물 methanol fractinates(MF). 1% 섭취 군(Normal FR 1%)
- 3) 정상-미생물 복합 발효배양물 FR. 3% 섭취 군(Normal MF 3%)
- 4) 정상-미생물 복합 발효배양물 pure 0.2% 섭취 군(Normal pure 0.2%)

- 5) 당뇨-대조식이 섭취 군(DM)
- 6) 당뇨-미생물 복합 발효배양물 FR 1% 섭취 군(DM MF 1%)
- 7) 당뇨-미생물 복합 발효배양물 FR 3% 섭취 군(DM MF 3%)
- 8) 당뇨-미생물 복합 발효배양물 pure 0.2% 섭취 군(DM pure 0.2%)

으로 분류하여 당뇨상태에서 미생물 복합 발효배양물의 섭취가 지질대사, 간의 항산화 효소 활성과 혈중 아미노산 대사에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 실험 디자인은 Fig. 8-1에 나타내었다.

실험동물은 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육기간 동안 사육실의 온도는 23 ± 2 °C, 습도는 $55 \pm 5\%$ 를 유지하고 광주기와 암주기를 12시간(light 6:00~18:00) 자동조절 장치를 이용하여 조절하였다. 실험 기간 동안 실험 식이와 물은 자유롭게 섭취하게 하였으며, 이때 사용된 물은 모두 2차 이온 교환수를 사용하였다.

실험식은 AIN-93M 에 기준하여 조제하였으며 실험식의 조성은 Table 8-1과 같다.

Table 8-1. Composition of experimental diets (g/ kg diet)

Ingredients	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%
Casein ¹⁾	200	200	200	200
Corn starch	529.486	529.486	529.486	529.486
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70
α-Cellulos ²⁾	50	50	50	50
Min-mixture ³⁾	35	35	35	35
Vit-mixture ⁴⁾	10	10	10	10
L-cystin ⁵⁾	3	3	3	3
Choline ⁶⁾	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butyhyl droquinonec ⁷⁾	0.014	0.014	0.014	0.014
Methanol fractionates ⁸⁾	—	10	30	—
Pure ⁹⁾	—	—	—	2

¹⁾Casein, Maeil Dairy Indstry CO. Korea

²⁾α-Cellulose, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

³⁾AIN-93M-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

⁴⁾AIN-93M-VM, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

⁵⁾L-Cystine, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

⁶⁾Choline bitartate, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

⁷⁾Tert-bultyl hydroquione, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

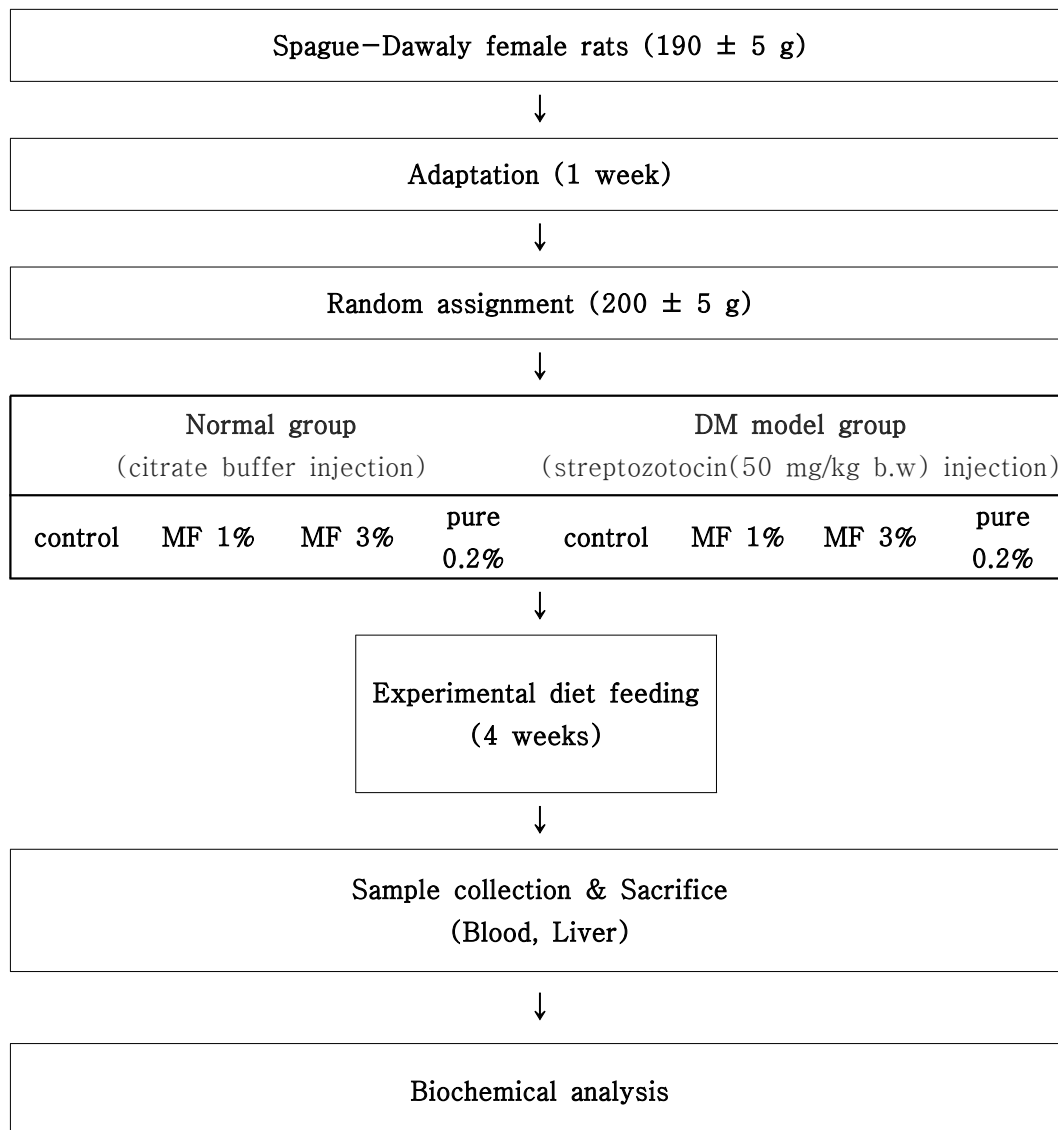


Fig. 8-1. Experimental design

나. 시료분석

1) 식이섭취량 및 체중 측정

실험 식이를 시작한 날을 기준으로, 실험기간 동안 식이 섭취량은 이틀에 한 번씩, 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

$$\text{식이효율(FER)} = \{4\text{주간의 체중 증가량(g)} / 4\text{주간의 식이 섭취량(g)}\}$$

2) 시료수집 및 전처리

4주간 사육 후 12시간동안 절식시킨 후 에테르 마취하에 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 간 문맥을 통하여 차가운 식염수 20 ml를 관류시킨 후 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액 중 일부는 EDTA 처리된 시험관에 분주하여 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 채취한 혈액의 나머지는 상온에서 30분간 방치한 후 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 -70°C 에서 냉동 보관하였다. 적출한 간 조직은 액체질소로 급속 냉동시킨 후 분석 시까지 -70°C 에서 냉동 보관하였다.

채취 한 간 조직 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄 균질액을 만들었다. 이 균질액을 $600\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상층액을 $10,000\times\text{g}$ 에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻고 다시 이 상층액은 $105,000\times\text{g}$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻었다. Mitochondria 분획은 catalase 활성도 측정, cytosol 분획은 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

3) 혈청 및 간 지질 분석

가) 혈청 지질 분석

혈청 콜레스테롤 농도는 혈청 콜레스테롤 분석용 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. 즉 혈청 중 에스테르형의 콜레스테롤을 cholesterol esterase에 의해 유리형 콜레스테롤로 만든 다음 이에 cholesterol oxidase를 반응시켜 생성된 Δ^4 -cholesterol을 peroxidase와 Δ^4 -aminoantipyrine과 반응시킴으로써 형성된 퀴논형 적색색소를 spectrophotometer(Uvikon 930, Switzerland)를 이용하여 흡광도 500 nm에서 측정하

여 비색정량 하였다. 혈청 중성지방 농도는 혈청 중성지방 분석용 효소 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. Triglyceride와 lipoprotein lipase가 반응해서 유리된 글리세롤을 glycerol kinase와 반응시켜 생성된 L- γ -glycerophosphoric acid를 L- γ -glycerophosphooxidase, amino antipyrine과 반응시켜 얻은 퀴논형 색소를 spectrophotometer(Uvikon 930, Switzerland)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 비색정량 하였다.

혈청 HDL-콜레스테롤은 혈청 HDL-콜레스테롤 분석용 효소 kit(영동제약)를 사용하여 측정하였다. Dextran-sulfate-Mg(II)을 혈청과 반응시켜 혈청내 LDL, VLDL을 침전시킨 후 상층액인 HDL fraction을 검체로 사용하여 혈청 콜레스테롤과 같은 방법으로 spectrophotometer(Uvikon 930, Switzerland)를 이용하여 흡광도 580 nm에서 측정하였다. 혈청 LDL-콜레스테롤은 Friedwald 등의 방법을 이용하여 산출하였으며, 그 산출식은 다음과 같다.

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{Total cholesterol} - (\text{HDL-cholesterol} + \text{TG}/5)$$

동맥경화지수(atherogenic index)는 동맥경화의 위험률을 예측할 수 있는 변인으로 산출방법은 아래와 같다.

$$\text{Atherogenic index} = \{(\text{total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}) / \text{HDL cholesterol}\}$$

나) 간지질 분석

간 조직의 중성지방과 콜레스테롤의 추출은 Folch법(1965)을 응용하였다. 간 시료 1 g을 취해 6 ml의 chloroform : methanol (2:1, v/v) 혼합액과 2 ml의 증류수를 넣어 균질화시킨 후 원심분리 하였다. 윗층의 물-메탄올 혼합을 따라내고 간 고형물 아래의 콜레스테롤과 중성지방이 함유된 chloroform층을 분리해 낸 후, 500 μ l를 취하여 고속진공농축기를 이용하여 휘발시켰다. 이를 50 μ l의 Triton X-100/chloroform 혼합액(1:1, v/v)과 450 μ l의 chloroform을 넣어 가볍게 흔들어서 용해시켰다. 이 중 50 μ l를 취하여 chloroform을 다시 휘발시킨 후 ethanol로 용해시켜 분석에 사용하였다. 간 조직의 중성지방과 총 콜레스테롤 분석은 효소법을 이용한 영동제약 분석용 kit으로 혈액에서와 같은 방법으로 비색정량 하였다.

간 시료 0.5 g을 취해 10ml의 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 혼합액을 첨가하여 균질화 시킨 후, 균질액을 여과하여 여액을 테스트 튜브에 담아 질소 건조기 (OTU-2C, TAITEC, Japan)로 건조 하였다. 여기에 chloroform : metanol(2 : 1, v/v) 1 ml 가하여 혼합하여 녹인 후 100 ul 씩 테스트 튜브에 옮겨 질소 건조기로 건조하였다. 그 후 에탄올 5 mL를 가하여 지질을 녹인 후 분석에 사용하였다. 간 조직의 중성지질과 총 콜레스테롤 분석은 효소법을 이용한 아산제약 분석용 kit으로 혈액에서와 동일한 방법으로 비색정량 하였다.

4) 혈당 분석

혈당은 매주 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 상업용 kit로 분석하였다.

5) 항산화 효소계의 활성 측정

가) Catalase (CAT) 활성도 측정

간조직 중 mitochondria 분획의 CAT 활성도는 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 기질로 하여 환원되는 정도를 240nm에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi (1974, 673-684)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 간조직의 효소액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분 동안에 반응하여 감소시킨 H_2O_2 양을 nmole로 표시하였다.

(Reduced H_2O_2 nmole/min/mg protein)

나) Glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성도 측정

간 조직 중 GSH-Px 활성도는 Paglia, Valentine (1967)의 방법에 따라 측정하였다. Glutathione 기질과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 25°C에서 5분간 반응시켜 340nm에서 NADPH의 산화로 인한 흡광도 감소율을 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분간 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다.

(NADPH oxidized nmole/min/mg protein)

다) Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

간조직 중 SOD 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 관찰하는 Martin,

Dailey, Sugarman (1987)의 방법에 준해 0.1mM EDTA가 함유된 50mM 인산 완충액 (pH 7.5)에 10 μ M hematoxylin 및 효소액을 가해 25 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560nm에서 측정하여 효소의 활성을 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 액 중의 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1unit로 나타내었다.

(Unit*/min/mg protein (*50% inhibition of autooxidation of hematoxylin))

라) 단백질 함량 측정

간조직 중 단백질 함량은 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

(mg/g of tissue(liver))

6) 혈장 인슐린 분석

검체의 항원과 표지항원이 특정항체에 대해 경쟁적으로 반응하는 원리를 이용한 insulin RIA kit(DPC, USA)를 이용하여 gamma counter로 분석하였다.

7) 혈중 유리아미노산 농도 측정

가) 전처리

혈장에서 유리아미노산 농도를 측정하기 위해 시료 1ml를 취하고 동량의 10% sulfosalicylic acid 용액을 가하여 세계 혼합한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 단백질을 제거시킨 후 상층액을 깨끗한 tube에 옮겨 놓고, 아미노산 농도를 분석하기 직전에 0.2 μ m filter(Gelman aerodisc LC PVDF)로 여과하였다.

나) 아미노산의 측정방법

시료의 아미노산 농도는 ion-exchange chromatography에 입각한 아미노산 전용분석기(Biochrom 20, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)를 사용하여 측정하였다. Lithium high performance column으로부터 혈장에 함유된 각 생체 유리아미노산을 성공적으로 분리시키기 위해서 이동상으로 pH와 이온 농도를 단계적으로 증가시킨

lithium citrate buffer를 25.0 mL/h의 유속에서 사용하였다.

유리아미노산 분리는 14단계의 mobile phase를 단계적으로 거치는데, 각 단계에서 사용되는 buffer와 반응온도 및 시간은 다음과 같다.

- Ⓐ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 35°C, 4mins
- Ⓑ buffer 2: lithium citrate buffer pH 3.00 0.30M, 35°C, 32mins
- Ⓒ buffer 3: lithium citrate buffer pH 3.15 0.50M, 35°C, 7.5mins
- Ⓓ buffer 3: lithium citrate buffer pH 3.15 0.50M, 81°C, 6.5mins
- Ⓔ buffer 4: lithium citrate buffer pH 3.50 0.90M, 81°C, 16mins
- Ⓕ buffer 4: lithium citrate buffer pH 3.50 0.90M, 86°C, 7mins
- Ⓖ buffer 5: lithium citrate buffer pH 3.55 1.65M, 86°C, 27mins
- Ⓗ buffer 5: lithium citrate buffer pH 3.55 1.65M, 93°C, 6.5mins
- Ⓘ buffer 6: lithium hydroxide solution 0.30M, 93°C, 5mins
- Ⓙ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 93°C, 1mins
- Ⓚ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 38°C, 25mins
- Ⓛ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 38°C, 5mins
- Ⓜ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 38°C, 0mins
- Ⓝ buffer 1: lithium citrate buffer pH 2.80 0.20M, 38°C, 1mins

Table 8-2. Instrument and operating conditions of amino acid analyzer.

Instrument	Biochem 20 Amino Acid Analyzer
Integrator	Biochem 20 programmer
Analytical column	Pre-wash and high performance PEEK lithium column with Peltier heating/ cooling system (200×4.6mm+Resin pot)
Detector	Ninhydrin (Pharmacia Biotech. Ltd, England)
Carrier gas	Oxygen free nitrogen gas regulated to 5.5bar
Flow rates	Buffer 25ml/hr, Ninhydrin 20ml/hr
Temperature	Column 37°C, Reaction coil 135°C
Operating pressure	Buffer 57bar, Ninhydrin 7bar, Coil 2-12bar
Photometer	Single flow cell with optical beam splitter to provide detection at 440nm and 570nm
Sample injection volume	40µl

다. 통계분석

본 실험에서 얻은 결과의 통계 분석은 SAS package를 이용하였다. 각 실험군 당 평균과 표준편차를 구하였으며 각 군간의 통계적 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 체중 증가량 및 간 무게

Table 8-3에 체중증가량과 간 무게를 나타내었다. 실험 시작시 평균체중은 234.0 ~ 244.2 g으로 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 4주간 실험 종료시 정상군내에서 평균 체중은 유의적인 차이가 없었고, 당뇨군내에서 대조군과 pure 0.2%군이 MF 1%군, MF 3%군에 비해 유의적으로 높았다. 실험 4주간 체중증가량은 정상군내에서는 유의적인 차이가 없었고 당뇨군의 체중증가량은 정상군보다 유의적으로 낮았는데 이는 당뇨가 유발된 쥐에서 체중이 유의적으로 감소하는 것과 일치하였다. 이러한 체중 감소 증상은 crude 1%군과 crude 3%군이 유의적으로 가장 현저하게 나타났고 당뇨군내에서 pure 0.2%군의 체중증가량이 가장 높았다.

실험군의 간 무게는 당뇨군이 정상군보다 낮은 경향이였다. 정상군내에서 대조군 14.8 ± 3.6 g, crude 1%군 12.8 ± 1.5 g, crude 3%군 11.6 ± 2.1 g, pure 0.2%군 21.1 ± 2.9 g이었으며 pure 0.2%군이 다른 실험군보다 유의적으로 높았다. 당뇨군내에서 대조군 12.2 ± 2.7 g, crude 1%군 8.6 ± 0.8 g, crude 3%군 8.2 ± 1.3 g, pure 0.2%군 17.4 ± 1.9 g이었으며 pure 0.2%군이 다른 실험군보다 유의적으로 높았다.

Table 8-3. The effect of experimental diets on body weight and weight gain in diabetic rats.

	Normal rats				Diabetic rats			
	Control	MF ³⁾ 1%	MF 3%	pure 0.2%	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%
Initial weight(g)	243.0 ±8.1 ^{1)a2)}	241.2 ±6.1 ^{ab}	244.2 ±6.8 ^a	244.2 ±6.8 ^a	236.0 ±4.4 ^{ab}	237.0 ±5.0 ^{ab}	236.1 ±4.3 ^{ab}	234.3 ±3.3 ^{ab}
Final weight(g)	378.9 ±23.2 ^a	395.5 ±14.7 ^a	384.4 ±32.1 ^a	377.4 ±26.7 ^a	243.0 ±39.8 ^b	219.8 ±20.9 ^c	220.0 ±18.0 ^c	272.0 ±18.8 ^b
Weight gain(g)	135.9 ±21.6 ^a	154.3 ±23.1 ^a	140.2 ±28.3 ^a	133.2 ±23.5 ^a	7.1 ±38.1 ^{bc}	-17.2 ±16.7 ^c	-16.1 ±14.5 ^c	37.6 ±17.8 ^b
Liver wt(g)	14.8± 3.6 ^{bc}	12.8± 1.5 ^d	11.6± 2.1 ^c	21.1± 2.9 ^a	12.2 ±2.7 ^c	8.6± 0.8 ^d	8.2 ±1.3 ^d	17.4± 1.9 ^b

1)Mean ± SD

2)Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) MF : Methanol fractionates of complex microorganism fermentation cultures

나. 식이섭취량과 식이효율

Table 8-4에 4주간의 평균 식이섭취량과 식이효율을 나타내었다. 평균 식이 섭취량은 정상군은 20.59-22.09g, 당뇨군은 27.28-30.42g으로 정상군보다 당뇨군이 유의적으로 높았다. 당뇨가 유발된 쥐의 경우 정상쥐에 비해 식이섭취량이 유의적으로 높다는 보고와 일치하였다. 정상군내에서 평균 식이섭취량은 대조군보다 MF 1%군, MF 3%군이 유의적으로 높았고 당뇨군내에서는 MF 3%군이 다른 군에 비해 유의적으로 낮은 식이섭취량을 나타내었다.

식이효율은 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 낮았고 정상군내에서 식이효율은 유의적인 차이가 없었으나 당뇨군내에서는 MF 1%군이 가장 낮았고 pure 0.2%군이 가장 높게 나타났다. 당뇨군의 경우 정상군보다 식이섭취량은 높았고 체중증가량은 낮아서 식이효율이 정상군에 비해 유의적으로 감소하였다. 이는 당뇨의 전형적인 증상 중 하나로 당뇨에 의한 체내 대사의 퇴행적 변화 때문으로 보여진다.

Table 8-4. The effect of experimental diets on food intake and food efficiency ratio(FER) in daibetic rats

	Normal rats				Diabetic rats			
	control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%	control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%
Food intake(g)	20.59 ±0.92 ^d	22.09 ±1.09 ^c	22.02 ±1.07 ^c	21.28 ±1.10 ^{cd}	30.42 ±1.06 ^a	29.45 ±0.73 ^a	27.28 ±0.45 ^b	30.24 ±0.71 ^a
FER	0.24 ±0.04 ^a	0.25 ±0.04 ^a	0.23 ±0.04 ^a	0.22 ±0.03 ^a	0.02 ±0.06 ^{bc}	-0.02 ±0.02 ^c	0.01 ±0.04 ^{bc}	0.04 ±0.02 ^b

1)Mean ± SD

2)Values with different superscript within a column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

3) MF : Methanol fractionates of complex microorganism fermentation cultures

다. 혈당에 미치는 영향

당뇨쥐에서 실험식이 혈당에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 시작부터 4주간의 혈당을 측정하여 Table 8-5에 나타내었다. 4주간의 혈당수준은 정상군보다 당뇨군이 유의적으로 높게 나타났다. 정상군내 각 실험군에서 4주간의 혈당 수준은 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서는 pure 0.2%군이 가장 높았고 crude 3%군이 낮은 경향을 보였다.

Table 8-5. The effect of experimental diets on nonfasting blood glucose in diabetic rats.

	Normal rats				Diabetic rats			
	control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%	control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%
Initial	110.0	109.6	106.6	112.4	329.1	309.0	334.0	332.7
BG	±10.2 ^b	±13.4 ^b	±16.3 ^b	±12.6 ^b	±62.4 ^a	±26.1 ^a	±20.6 ^a	±56.7 ^a
1 week	103.8 ±4.3 ^b	103.2 ±11.4 ^b	111.0 ±9.5 ^b	105.0 ±7.6 ^b	421.3 ±55.9 ^a	424.0 ±42.5 ^a	421.3 ±97.9 ^a	374.7 ±51.1 ^a
2 week	103.0 ±9.6 ^c	102.8 ±13.1 ^c	106.0 ±13.9 ^c	109.0 ±10.0 ^c	430.8 ±46.7 ^{ab}	421.6 ±46.2 ^{ab}	373.0 ±70.3 ^b	465.2 ±124.2 ^a
3 week	107.6 ±7.6 ^c	106.2 ±14.0 ^c	103.0 ±13.1 ^c	112.2 ±5.8 ^c	408.5 ±54.4 ^b	380.0 ±43.0 ^b	382.3 ±49.5 ^b	498.0 ±107.0 ^a
4 week	110.4 ±19.4 ^c	101.8 ±9.1 ^c	112.2 ±5.16 ^c	115.2 ±10.4 ^c	421.0 ±35.0 ^{ab}	388.4 ±17.2 ^{ab}	375.6 ±27.5 ^b	433.5 ±116.8 ^a

1) Mean ± SD

2) Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) MF : Methanol fractionates of complex microorganism fermentation cultures

라. 공복시 혈당과 인슐린 농도에 미치는 영향

당뇨 쥐에서 실험식이가 공복시 혈당과 인슐린 농도에 미치는 영향을 Table 8-6에 나타내었다. 공복시 혈당은 당뇨군이 정상군보다 전반적으로 높았으나 정상군과 당뇨군간에 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군에서 공복시 혈당은 대조군 177.6 ± 84.6 mg/dl, 3) MF 1%군 192.2 ± 50.8 mg/dl, MF 3%군 130.0 ± 55.6 mg/dl, pure 0.1%군 155.2 ± 46.0 mg/dl으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 정상군과 당뇨군내에서 각각 crude 3%이 유의적인 차이는 아니지만 공복시 혈당이 가장 낮게 나타났다. 공복시 혈당이 1mmol/L 낮아짐에 따라 발작 위험율은 21% 감소되었고 허혈성 심장질환의 위험률은 23% 감소되어 당뇨병의 혈당관리에 대한 중요성이 제시되고 있다. 당뇨쥐의 혈당은 실험식이 중 MF 3%와 pure 0.2%군이 대조군에 비해 혈당을 감소시키는

경향을 보였다.

인슐린농도는 정상군내에서 pure 0.2%군이 5.30 ± 2.7 uIU/ml로 대조군 1.40 ± 0.3 uIU/ml, MF 1%군 1.74 ± 0.6 uIU/ml, MF 3%군 2.36 ± 1.2 uIU/ml보다 유의적으로 높게 나타났다.

Streptozotocin은 췌장의 랑게르한스섬의 β -cell을 파괴하여 인슐린 결핍을 초래하고 포도당에 대한 β -cell 예민도를 저하시키는 역할을 한다. 당뇨병의 경우 MF 3%군이 유의적인 차이는 아니지만 가장 높게 나타났고 정상군내에서는 pure 0.2%군이 유의적으로 인슐린 농도를 증가시켰다.

Table 8-6. The effect of experimental diets on fasting blood glucose and insulin concentration in diabetic rats.

	Normal rats				Diabetic rats			
	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%
Blood glucose (mg/dl)	125.8 $\pm 37.3^{abc}$	135.8 $\pm 25.8^{abc}$	106.4 $\pm 11.4^b$	115.2 $\pm 10.5^{bc}$	177.6 $\pm 84.6^{ab}$	192.2 $\pm 50.8^a$	130.0 $\pm 55.6^{abc}$	155.2 $\pm 46.0^{abc}$
Insulin (uIU/ml)	1.40 $\pm 0.35^b$	1.74 $\pm 0.69^b$	2.36 $\pm 1.21^b$	5.30 $\pm 2.76^a$	2.73 $\pm 1.86^b$	2.62 $\pm 1.28^{bc}$	3.60 $\pm 2.47^{ab}$	1.15 $\pm 0.12^b$

마. 혈중 지질농도

Table 8-7에는 6주간 실험식이 공급 후 혈중 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 atherogenic index 결과를 나타내었다. 제 2형 당뇨병은 인슐린 민감도가 낮아져 식후 혈당이 조절되지 않아 고혈당인 유발되며 이로 인해 혈 중 지질 농도가 증가한다. 혈 중 중성지방 농도의 증가는 HDL-콜레스테롤의 농도를 낮추고 카이로마이크론 잔유물의 함량을 높여주어 관상동맥질환의 주요 원인이 된다고 한다.

혈중 총콜레스테롤 농도는 정상군내에서 대조군 97.58 ± 1.08 mg/dl, MF 1%군

96.08±2.90 mg/dl, MF 3%군 92.20±2.35 mg/dl, pure 0.2%군 88.22±1.99 mg/dl로 MF 3%와 pure 0.2%군이 다른 군보다 유의적으로 낮았고 pure 0.2%군의 총콜레스테롤 농도가 유의적으로 가장 낮았다. 당뇨군내에서는 대조군 96.1±2.76 mg/dl, MF 1%군 93.2±3.02 mg/dl, MF 3%군 85.5±3.70 mg/dl, pure 0.2%군 79.0±3.78 mg/dl로 대조군과 MF 1%군보다 MF 3%군과 pure 0.2%군이 유의적으로 낮게 나타났으며 정상군과 같이 pure 0.2%군이 가장 낮은 값을 나타내어 정상군과 당뇨군 모두 pure 0.2%군이 혈 중 총콜레스테롤 농도를 낮추는데 가장 효과적인 것으로 보인다.

혈중 중성지방 농도는 정상군은 crude 3%군과 pure 0.2%군이 각각 72.96±1.15 mg/dl, 71.90±1.15 mg/dl로 유의적으로 낮았고 당뇨군에서도 crude 3%군과 pure 0.2%군이 각각 74.86±1.76 mg/dl, 76.57±3.47 mg/dl로 유의적으로 낮은 결과를 나타내었다. 이는 crude 3%와 pure 0.2% 두군 모두 혈중 중성지방 농도를 유의적으로 낮추는데 효과적인 것으로 보인다.

혈중 HDL-콜레스테롤 농도는 정상군내에서는 MF 3%군, pure 0.2%군이 21.24±1.49 mg/dl, 20.94±0.98 mg/dl로 다른 군보다 유의적으로 높게 나타났고 MF 3%와 pure 0.2%군 간에는 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서 혈중 HDL-콜레스테롤 농도는 실험식이에 따른 유의적인 차이가 없었으나 MF 3%군과 pure 0.2%군이 각각 19.10 ± 0.93 mg/dl, 19.05 ± 0.78 mg/dl로 대조군과 MF 1%군보다 높은 경향을 나타내었다.

당뇨쥐는 인슐린 결핍에 의한 LDL 수용체 활성도가 감소되고 고혈당에 의해 LDL apoprotein B가 당화되어 LDL 수용체로의 이동이 이루어지지 않아 혈중 LDL-콜레스테롤의 제거가 감소된다고 한다. 혈중 LDL-콜레스테롤 농도는 정상군과 당뇨군 모두에서 MF 3%군과 pure 0.2%군이 대조군과 MF 1%군보다 유의적으로 낮게 나타났고 당뇨군내에서는 pure 0.2%군이 44.69±4.40 mg/dl로 유의적으로 가장 낮았다.

Athrogenic index는 정상군과 당뇨군 모두에서 MF 3%군과 pure 0.2%군이 대조군과 MF 1%군보다 유의적으로 낮게 나타났다.

혈중 지질 농도 분석결과, MF 3%군과 pure 0.2%군은 대조군과 MF 1%군보다 총콜레스테롤, 중성지방, LDL-콜레스테롤 및 athrogenic index를 유의적으로 낮추고 HDL-콜레스테롤은 유의적으로 증가시켜 혈중 지질 농도 개선에 유익한 것으로 사료되어지며 특히 pure 0.2%군은 다른 군보다 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤을 유의적으로 낮추어 가장 효과적인 것으로 보여진다.

Table 8-7. The effect of experimental diets on serum lipid concentrations in diabetic rats.

	Normal rats				Diabetic rats			
	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%
Total cholesterol (mg/dl)	97.58 ±1.08 ^a	96.08 ±2.90 ^{ab}	92.20 ±2.35 ^c	88.22 ±1.99 ^d	96.1 ±2.76 ^{ab}	93.2 ±3.02 ^{bc}	85.5 ±3.70 ^d	79.0 ±3.78 ^e
Triglyceride (mg/dl)	78.68 ±1.62 ^{bc}	76.52 ±3.25 ^{cd}	72.96 ±2.69 ^e	71.90 ±1.15 ^e	82.71 ±3.21 ^a	80.56 ±2.37 ^{ab}	74.86 ±1.76 ^{de}	76.57 ±3.47 ^{cd}
HDL - cholesterol (mg/dl)	18.04 ±0.55 ^b	18.00 ±0.90 ^b	21.24 ±1.49 ^a	20.94 ±0.98 ^a	18.18 ±1.06 ^b	18.16 ±1.65 ^b	19.10 ±0.93 ^b	19.05 ±0.78 ^b
LDL - cholesterol (mg/dl)	63.80 ±1.48 ^a	62.77 ±4.12 ^{ab}	56.37 ±2.91 ^{cd}	52.90 ±2.29 ^{de}	61.44 ±2.14 ^{ab}	58.92 ±3.35 ^{bc}	51.51 ±4.03 ^e	44.68 ±4.40 ^f
Athrogenic index	4.41 ±0.19 ^a	4.35 ±0.40 ^a	3.36 ±0.30 ^b	3.22 ±0.22 ^b	4.30 ±0.26 ^a	4.17 ±0.48 ^a	3.49 ±0.29 ^b	3.16 ±0.29 ^b

1) Mean ± SD

2) Values with different superscript within a column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

바. 간지질 농도

Table 8-8에 간 조직 중의 총 콜레스테롤과 중성지방 농도를 나타내었다. 간의 총 콜레스테롤 농도는 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 당뇨쥐의 간 콜레스테롤 함량 증가는 streptozotocin의 투여로 인해 인슐린 분비가 저하되면서 정상적인 당대사가 원활하게 일어나지 않아 acetyl CoA 축적으로 지방합성이 증가하여 간 내 지질이 축적되고 심심한 변성이 일어나기 때문이다.

정상군내에서 간의 총 콜레스테롤 함량은 pure 0.2%군이 37.62±1.49 mg/dl로 대조군, MF 1%군, MF 3%군에 비해 유의적으로 낮았고 MF 1%군과 MF 3%군은 대조군보다 유의적으로 낮았다. 당뇨군내에서는 각 군간에 간의 총콜레스테롤 농도가 유의적인 차이를 보였으며 pure 0.2%군이 47.97±1.29 mg/dl로 유의적으로 가장 낮았고 MF 3%군, MF 1%군, 대조군의 순으로 유의적으로 낮았다.

간의 중성지방 농도는 당뇨군이 정상군에 비해 높은 경향을 보였다. 당뇨쥐의 간

중성지방 함량이 높은 것은 당뇨로 인한 인슐린 기능 저하로 세포내로 운반되어 오는 포도당의 양 감소와 세포내 당신생 증가로 간에서 지방합성이 감소하고 이미 생성된 지방마저 에너지원으로 이용되었기 때문이라고 한다. 간의 중성지방 농도는 정상군내에 MF 3%군, pure 0.2%군이 각각 28.14 ± 2.19 mg/dl, 25.70 ± 2.85 mg/dl로 대조군과 MF 1%군보다 유의적으로 낮았고 pure 0.2%군이 유의적인 차이는 아니지만 낮은 경향을 보였다. 당뇨군내에서는 MF 1%군 33.72 ± 2.64 mg/dl, MF 3%군 31.81 ± 4.83 mg/dl, pure 0.2%군 30.95 ± 2.16 mg/dl로 대조군보다 유의적으로 낮았고 pure 0.2%군이 유의적인 차이는 아니지만 낮게 나타났다.

간 지질 분석 결과, 정상군과 당뇨군에서 모두 pure 0.2%군이 총 콜레스테롤 농도를 유의적으로 낮추는데 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 당뇨쥐의 경우 MF 1%군, MF 3%군, pure 0.2%군이 대조군보다 간의 중성지방 농도를 유의적으로 낮추어 모두 간 조직 중성지방 농도에 유리한 것으로 보여진다.

Table 8-8. The effect of experimental diets on liver lipid concentrations in diabetic rats.

	Normal rats				Diabetic rats			
	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%
Total cholesterol (mg/g)	45.04 $\pm 2.65^e$	42.56 $\pm 1.71^f$	40.42 $\pm 1.02^f$	37.62 $\pm 1.49^g$	58.01 $\pm 1.87^a$	54.90 $\pm 1.17^b$	51.48 $\pm 1.67^c$	47.97 $\pm 1.29^d$
Triglyceride (mg/g)	31.36 $\pm 1.59^{bc}$	33.06 $\pm 3.77^b$	28.14 $\pm 2.19^{cd}$	25.70 $\pm 2.85^d$	37.65 $\pm 1.76^a$	33.72 $\pm 2.64^b$	31.81 $\pm 4.83^{bc}$	30.95 $\pm 2.16^{bc}$

1) Mean \pm SD

2) Values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

사. 간 조직의 항산화 효소 활성

간 조직의 항산화 효소 활성을 알아보기 위하여 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), catalase 활성을 분석한 결과를 Table 8-9에 나타내었다. 체내에서 과산화물에 대한 항산화 작용을 하는 방어 기전 시스템으로 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPH-Px),

glutathione S-transferase(GST)와 같은 효소적 항산화계가 있다. 항산화 효소는 세포막의 지질 과산화 손상, sulfhydryl-함유 효소의 불활성화 및 구성 단백질의 교차결합 등을 일으키는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)를 불활성화 시키거나 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다. catalase와 SOD는 자유기에 대해 초기 보호 작용을 하는 효소로서 $O_2^{\cdot-}$ 는 SOD에 의해 보다 반응성이 약한 H_2O_2 로 전환된 다음 catalase에 의해 H_2O 와 OH^- 로 무독화 되어 배설된다. 특히 SOD는 세포내 호흡작용의 부산물로서 생성되는 superoxide anion에 작용하는 첫 번째 효소로서 과산화수소로 전환시켜 superoxide anion의 농도를 감소시킨다. Glutathion peroxidase는 catalase와 마찬가지로 H_2O_2 를 H_2O 로 전환시켜주는 기능을 하는 동시에 lipid hydroperoxide 및 다른 organic hydroperoxide에 대해서도 자체적인 방어 작용을 하는 필수적인 항산화 효소 중의 하나이다.

간조직의 SOD 활성은 정상군보다 당뇨군이 낮았고 정상군내에서 대조군 1.16 ± 0.09 , MF 1%군 1.32 ± 0.07 , MF 3%군 1.58 ± 0.08 , pure 0.2%군 1.80 ± 0.09 으로 모든 실험군이 유의적인 차이를 나타내었으며, pure 0.2%군이 유의적으로 가장 높았고 MF 3%군, MF 1%군, 대조군 순으로 나타났다. 당뇨군내에서는 대조군 0.77 ± 0.04 , MF 1%군 0.85 ± 0.13 , MF 3%군 1.41 ± 0.10 , pure 0.2%군이 1.72 ± 0.14 으로 대조군과 MF 1%군보다 MF 3%군과 pure 0.2%군이 유의적으로 높았으며 정상군과 마찬가지로 pure 0.2%군이 유의적으로 가장 높았다. 당뇨 쥐의 경우 간 조직의 SOD 활성은 MF 3%와 pure 0.2% 섭취시 유의적으로 증가하였고 특히 pure 0.2% 섭취시 SOD 활성도가 가장 높은 것으로 나타났다.

Glutathione peroxidase는 정상군내에서 MF 3%군이 13.20 ± 0.94 , pure 0.2%군이 14.79 ± 0.99 로 대조군보다 유의적으로 높았고 pure 0.2%군이 MF 3%군보다 유의적인 차이는 아니지만 높은 경향을 보였다. 당뇨군내에서도 MF 3%군이 13.96 ± 3.99 , pure 0.2%군이 15.07 ± 0.30 로 대조군과 MF 1%군보다 유의적으로 높았고 정상군과 마찬가지로 pure 0.2%군이 MF 3%군 보다 유의적인 차이는 아니지만 높은 경향을 보였다.

간 조직의 catalase 활성도는 정상군과 당뇨군 간에 유의적인 차이가 없었고 정상군과 당뇨군내에서도 식이에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

당뇨병 환자의 합병증 발생을 과거에는 흡연, 고혈압, 고지혈증과 같은 요인들로 설명하려 하였으나, 현재는 당뇨병 환자가 고혈당 상태에서 포도당이 비효소적으로 단백질에 결합하는 당화과정이 진행되는 대사이상 일어나며, 이 과정에서 많은 free radical이 형성되어 자유기의 생성량과 체내 항산화 방어력 사이의 불균형상태

인 산화스트레스가 증가되면서 여러 조직의 손상을 일으킴이 알려졌다. 당뇨쥐에서 실험식이에 따른 간조직에서 항산화 효소의 활성을 분석한 결과, SOD와 glutathione peroxidase는 MF 3%군과 pure 0.2%군이 다른 군보다 유의적으로 높았고 catalase는 실험식이에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 특히 SOD의 경우 pure 0.2%군이 다른 군에 비해 유의적으로 활성을 높였고 glutathione peroxidase는 유의적인 차이는 아니지만 pure 0.2%군이 다른 군보다 높은 활성을 나타내어 당뇨쥐의 경우 항산화 효소 활성에 pure 0.2%군이 가장 유리한 것으로 보여진다.

Table 8-9. The effect of experimental diet on SOD, GSH-Px and catalase in liver .

	Normal rats				Diabetic rats			
	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%	Control	MF 1%	MF 3%	pure 0.2%
SOD (unit/mg protien/min)	1.16 ±0.09 ^d	1.32 ±0.07 ^c	1.58 ±0.08 ^b	1.80 ±0.09 ^a	0.77 ±0.04 ^e	0.85 ±0.13 ^e	1.41 ±0.10 ^c	1.72 ±0.14 ^a
GPX (nmol NADPH/mg protein/min)	9.45 ±0.56 ^{cd}	11.41 ±0.82 ^{bc}	13.20 ±0.94 ^{ab}	14.79 ±0.99 ^a	7.32 ±0.58 ^d	9.19 ±0.58 ^{cd}	13.96 ±3.99 ^a	15.07 ±0.30 ^a
Catalase	134.2 ±16.76 ^b	140.2 ±3.58 ^{ab}	132.6 ±8.98 ^b	138.5 ±5.23 ^{ab}	149.2 ±16.15 ^a	136.7 ±7.08 ^{ab}	140.1 ±8.12 ^{ab}	140.8 ±3.36 ^{ab}

아. C-protein과 M-protein 농도

Table 8에 C-protein과 M-protein 농도를 나타내었다. C-protein은 정상군보다 당뇨군이 유의적으로 높았고 정상군내에서는 대조군, MF 1%군, MF 3%군, pure 0.2%군의 순으로 감소하여 각 실험군간에 유의적인 차이를 보였다. 당뇨군내에서도 대조군, MF 1%군, MF 3%군, pure 0.2%군의 순으로 감소하였고 정상군과 마찬가지로 각군 간에 유의적인 차이를 보였으며 pure 0.2%군이 유의적으로 낮은 값을 보였다.

M-protein은 정상군내에서 대조군보다 MF 1%, MF 3%, pure 0.2%군이 유의적으로 높았고 MF 1%군과 MF 3%군간에는 유의적인 차이가 없었고 pure 0.2%군이 유의적으로 가장 높았다. 당뇨군내에서 M-protein 농도는 대조군, MF 1%, MF 3%, pure 0.2%순으로 증가하여 각 군간에 유의적인 차이를 보였고, pure 0.2%군이 가장 높게 나타났다.

Table 8-10. The effect of experimental diet on C-protein and M-protein in liver

	Normal rats				Diabetic rats			
	Control	crude 1%	crude 3%	pure 0.2%	Control	crude 1%	crude 3%	pure 0.2%
C-protein	761.4 ±20.9 ^c	714.0 ±20.1 ^d	660.1 ±22.1 ^e	591.7 ±28.0 ^f	1004.7 ±46.3 ^a	914.2 ±26.2 ^b	721.7 ±37.3 ^d	614.6 ±16.3 ^f
M-protein	830.8 ±63.8 ^e	1184.6 ±61.8 ^d	1264.2 ±74.2 ^d	1573.9 ±35.7 ^b	885.7 ±59.0 ^e	1246.2 ±32.0 ^d	1437.0 ±55.5 ^c	1674.1 ±102.0 ^a

자. 혈장 유리 아미노산 농도

Table 9에 혈장 유리 아미노산을 분석한 결과를 나타내었다. 미생물 복합발효배양물의 섭취에 따라 정상쥐와 당뇨쥐에서 혈장 유리 아미노산 농도 변화에 미치는 영향을 살펴보면 asprtic acid, taurine, threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, histidine, arginine의 농도는 정상쥐와 당뇨쥐간에 유의적인 차이가 없었고 미생물 복합발효 배양물의 섭취 정도에 따라서도 유의적인 차이가 없었다.

Serine은 당뇨군의 대조군이 정상군의 대조군에 비해 유의적으로 높았고, MF 1%군과 MF 3%군간에는 유의적인 차이가 없었으나 당뇨군이 정상군보다 낮은 경향을 보였다. 당뇨군내에서 glutamic acid, proline, glycine, methionine, ammonia 농도는 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서 alanine, tyrosine, lysine 농도는 crude 1%군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았고 MF 1%와 MF 3%군간에는 유의적인 차이가 없었다.

Table 8-11. Comparison of plasma free amino acids in the experimental group.
(mol/L)

	Normal rats			Diabetic rats		
	Control	MF 1%	MF 3%	Control	MF 1%	MF 3%
Aspartic acid	14.5±12.7 ^a	5.24±3.77 ^a	6.95±7.40 ^a	22.18±29.9 ^a	6.28±4.25 ^a	22.55±30.35 ^a
Taurine	5.67±2.07 ^a	4.71±1.75 ^a	5.18±2.17 ^a	4.17±1.24 ^a	5.52±1.21 ^a	6.33±2.18 ^a
Threonine	342.5 ±168.6 ^a	553.9 ±18.8 ^a	496.7 ±58.6 ^a	183.0 ±81.86 ^b	96.0 ±42.95 ^b	141.4 ±76.5 ^b
Serine	220.1 ±98.46 ^c	549.47 ±274.95 ^{bc}	486.61 ±243.22 ^{bc}	431.88 ±152.09 ^a	305.29 ±100.18 ^{abc}	337.60 ±176.23 ^{ab}
Glutamic acid	250.80 ±106.17 ^{ab}	193.55 ±56.86 ^{ab}	157.32 ±12.50 ^b	277.28 ±91.39 ^a	204.06 ±30.13 ^{ab}	237.86 ±86.72 ^{ab}
Proline	104.66 ±62.61 ^a	75.47 ±17.97 ^{ab}	52.63 ±9.47 ^b	117.68±42 ^{ab}	59.86 ±11.21 ^{ab}	81.23 ±32.52 ^{ab}
Glycine	185.37 ±140.61 ^{ab}	131.53 ±28.58 ^b	128.20 ±12.71 ^b	220.74 ±34.92 ^a	178.81 ±21.64 ^{ab}	209.59 ±50.74 ^a
Alanine	407.38 ±106.97 ^a	398.75 ±82.6 ^a	308.44 ±36.87 ^{ab}	420.71 ±119.07 ^a	259.77 ±46.69 ^b	299.67 ±57.56 ^{ab}
Valine	169.85 ±110.80 ^a	109.28 ±14.95 ^a	118.86 ±18.15 ^a	158.47 ±68.22 ^a	107.47 ±21.35 ^a	146.25 ±52.88 ^a
Methionine	63.26 ±29.34 ^a	43.60 ±6.91 ^{ab}	41.59 ±8.80 ^{ab}	50.58 ±8.30 ^{ab}	36.88 ±5.73 ^b	41.76 ±13.57 ^{ab}
Isoleucine	50.06 ±22.50 ^a	57.62 ±8.43 ^a	50.46 ±16.84 ^a	64.65 ±23.26 ^a	45.45 ±9.14 ^a	62.55 ±20.92 ^a
Leucine	210.59 ±152.49 ^a	133.20 ±19.06 ^a	142.27 ±38.25 ^a	168.69 ±47.42 ^a	111.89 ±23.68 ^a	140.31 ±53.66 ^a
Tyrosine	64.38 ±30.47 ^a	49.39 ±13.13 ^{ab}	43.58 ±9.45 ^{ab}	61.19 ±9.67 ^a	36.07 ±6.73 ^b	45.20 ±15.06 ^{ab}
Phenyl alanine	83.77 ±64.43 ^a	43.03 ±11.02 ^a	52.20 ±27.15 ^a	69.64 ±11.88 ^a	47.34 ±8.98 ^a	60.59 ±21.29 ^a
Ammonia	351.19 ±39.75 ^a	539.26 ±463.95 ^{ab}	327.49 ±50.83 ^b	351.04 ±44.23 ^{ab}	305.93 ±44.98 ^b	842.70 ±677.82 ^{ab}
Lysine	610.69 ±405.66 ^a	350.60 ±38.53 ^{ab}	344.77 ±67.72 ^{ab}	431.57 ±38.30 ^a	324.33 ±37.51 ^b	348.48 ±76.81 ^{ab}
Histidine	92.35 ±73.32 ^a	43.98 ±4.42 ^a	44.03 ±5.99 ^a	60.42 ±21.07 ^a	32.09 ±12.77 ^a	62.58 ±33.68 ^a
Arginine	30.39 ±27.52 ^a	72.29 ±42.10 ^a	73.52 ±43.70 ^a	53.61 ±25.22 ^a	41.52 ±4.14 ^a	69.92 ±49.42 ^a

4. 결론

당뇨쥐에서 미생물 복합 발효 배양물의 섭취 수준에 따라 혈중 및 간의 지질함량과 간의 항산화효소 활성 및 혈장 유리아미노산 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 당뇨 유발 수컷 쥐를 대상으로 미생물 복합발효배양물의 methanol 분획물(MF) 1%, 3% 및 , 순수분리물(pure) 0.2%를 4주간 공급하여 항산화성 생리활성적 특성을 검증하였다. 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 체중증가량은 정상군내에서는 유의적인 차이가 없었고 당뇨군의 체중증가량은 정상군보다 유의적으로 낮았다. 평균 식이 섭취량은 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 높았고 식이효율은 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 낮았다.

2) 4주간의 혈당수준은 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 높게 나타났다. 정상군에서는 4주간의 혈당 수준은 유의적인 차이가 없었고 당뇨군내에서는 pure 0.2%군이 가장 높았고 MF 3%군이 낮은 경향을 보였다.

3) 공복시 혈당은 당뇨군이 정상군보다 전반적으로 높았으나 정상군과 당뇨군간에 유의적인 차이가 없었다. 정상군과 당뇨군내에서 각각 MF 3%군이 유의적인 차이는 아니지만 공복시 혈당이 가장 낮게 나타났다. 인슐린농도는 당뇨군내에서 MF 3%군이 유의적인 차이는 아니지만 가장 높게 나타났고 정상군내에서는 pure 0.2%군이 유의적으로 인슐린 농도를 증가시켰다.

4) 혈중 총콜레스테롤 농도는 당뇨군내에서 대조군과 MF 1%군보다 MF 3%군과 pure 0.2%군이 유의적으로 낮게 나타났다. 혈중 중성지방 농도는 당뇨군내에서 MF 3%군과 pure 0.2%군이 유의적으로 낮았다. 혈중 HDL- 콜레스테롤 농도는 당뇨군내에서 실험식이에 따른 유의적인 차이가 없었으나 MF 3%군과 pure 0.2%군이 대조군과 MF 1%군보다 높은 경향을 나타내었다. 혈중 LDL-콜레스테롤 농도는 정상군과 당뇨군 모두에서 MF 3%군과 pure 0.2%군이 대조군과 MF 1%군보다 유의적으로 낮게 나타났고 당뇨군내에서는 pure 0.2%군이 유의적으로 가장 낮았다. 동맥경화 지수(athrogenic index)는 정상군과 당뇨군 모두에서 MF 3%군과 pure 0.2%군이 대조군과 MF 1%군보다 유의적으로 낮게 나타났다.

5) 간의 총 콜레스테롤 농도는 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 당뇨군내에서는 각 군간에 간의 총콜레스테롤 농도가 유의적인 차이를 보여 pure 0.2%군이 유의적으로 가장 낮았고 MF 3%군, MF 1%군, 대조군의 순으로 유의적으로 낮았다. 간의 중성지방 농도는 당뇨군이 정상군에 비해 높은 경향을 보였다. 당뇨군내에서는 MF 1%군, MF 3%군, pure 0.2 %군이 대조군보다 유의적으로 낮았다.

6) 간조직의 SOD 활성은 정상군보다 당뇨군이 낮았고 당뇨군내에서는 대조군과 MF 1%군보다 MF 3%군과 pure 0.2%군이 유의적으로 높았다. Glutathione peroxidase는 당뇨군내에서 MF 3%군과 pure 0.2%군이 대조군과 MF 1%군보다 유의적으로 높았다. Catalase 활성도는 정상군과 당뇨군 간에 유의적인 차이가 없었고 정상군과 당뇨군내에서도 식이에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

7) C-protein은 정상군보다 당뇨군이 유의적으로 높았고 당뇨군내에서도 대조군, MF 1%군, MF 3 %군, pure 0.2%군의 순으로 감소하여 유의적인 차이를 보였으며 pure 0.2%군이 유의적으로 낮은 값을 보였다. M-protein은 당뇨군내에서 대조군, MF 1%, MF 3%, pure 0.2%순으로 증가하여 각 군간에 유의적인 차이를 보였고, pure 0.2%군이 가장 높게 나타났다.

8) 혈장 유리 아미노산 농도는 asprtic acid, taurine, threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, histidine, arginine의 농도는 정상쥐와 당뇨쥐간에 유의적인 차이가 없었고 미생물 복합발효 배양물의 섭취 정도에 따라서도 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서 glutamic acid, proline, glycine, methionine, ammonia 농도는 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서 alanine, tyrosine, lysine 농도는 crude 1%군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았고 MF 1%와 MF 3%군간에는 유의적인 차이가 없었다.

이상에서 당뇨유발 수컷 쥐를 대상으로 MF 1%, MF 3% 및 pure 0.2%를 4주간 공급한 결과, 당뇨군내에서 MF 3%와 0.2% pure 군이 공복시 혈당이 낮았다. 또한 당뇨쥐에서 MF 3%와 pure 0.2%는 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방 및 LDL-콜레스테롤 농도를 유의적으로 낮추어 당뇨상태에서 혈중 지질농도를 개선하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 당뇨쥐의 간 조직 총콜레스테롤 농도는 pure 0.2%가 유

의적으로 가장 낮았고 간 조직의 중성지방 농도는 MF 1%, MF 3%, pure 0.2 % 모두 대조군보다 유의적으로 낮추어 미생물 복합발효배양물의 섭취가 효과가 있었다. 당뇨쥐의 항산화효소 활성을 분석한 결과, 간 조직의 superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성은 crude 3%와 pure 0.2%가 대조군 보다 유의적으로 높았다. 결론적으로 미생물복합발효배양물 분말 crude 3%와 pure 0.2% 첨가 식이는 당뇨쥐에서 혈중 지질농도 개선 효과와 항산화 효소의 활성을 증가시켜 항산화작용에 유리한 것으로 사료되어진다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1세부과제 : 미생물 발효 배양에 의한 향산화성 생리활성물질의 생산 특성

□ 각 단일균주 배양물의 향산화능 검정 비교

각각의 시료에서 분리된 균주를 향산화적 특성의 측정에 의한 screening 과정을 통하여 향산화 활성이 가장 우수한 S1, A6, L4 및 B6 등 4가지 균주를 선별하여 이후 본 실험에 사용하였다.(목표치 : 100% 달성)

□ 균주조합과 혼합균주 배양물의 향산화능 검정

혼합균주 배양액의 향산화 활성은 *Bacillus* B6와 *Lactobacillus* L4 혼합균주 배양액과 *Bacillus* B6, *Acetobacter* A6 및 *Saccharomyces* S1 혼합배양액이 우수한 활성을 나타내었다.(목표치 : 100% 달성)

□ 농산물 부원료의 첨가 향산화 활성능 비교

부원료를 첨가하지 않은 배양액보다 부원료를 첨가한 배양액에서 높은 향산화 활성을 나타내었다. 특히 미강과 검은콩 배양액이 다른 첨가구에 비하여 향산화 활성이 높은 것으로 나타났다.(목표치 : 100% 달성)

□ 향산화 물질분비 유전자 선발을 위한 돌연변이선발

향산화 활성이 우수한 균주를 최종 4종을 분리하였고 이들 4종 균주를 대상으로 UV조사 및 MNNG처리를 통하여 향산화 활성이 뛰어난 변이주를 선별하였다.(목표치 : 100% 달성)

□ 발효배양물의 향산화 활성물질 생산 최적발효조건 설정

발효액 및 배양조건별 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능에 대한 발효특성 값의 반응표면을 superimposing하여 최적 발효액 조건 범위를 예측한 결과 발효액의 총 페놀성 화합물 함량 및 전자공여능이 모두 만족하는 범위는 당밀 첨가량 1.8~2.2%, 미강 첨가량 2.1~2.4% 및 탈지대두박 첨가량 1.9~2.4%로 나타났고 최적 발효조건의 범위는 발효온도 25~35℃, 발효시간 10~14일, 발효초기 pH 5.5~7.5이었다. 이로부터 최적점이라고 예상되는 발효온도 30℃, 발효시간 12일, 발효초기 pH 6.5를 최적의 발효조건으로 예측되었다.(목표치 : 100% 달성)

□ 순차별 용매 추출물의 분리

발효배양액의 용매 분획물의 총 페놀 화합물 함량은 methanol/water 분획이 117.50mg%으로서 가장 높았다. 아질산염소거능은 methanol/water 분획과 n-butanol분획에서 각각 94.81%, 92.61%의 높은 활성이었다. DPPH법 및 DMPD 법에 의한 전자공여능 실험결과 methanol/water 분획에서 각각 96.53%, 및 73.07%으로 가장 높은 활성이었다. 발효배양액의 수용성 갈변물질 중 투석내액 물질 및 DEAE-cellulose 칼럼 분획들의 항산화력 측정 결과 투석 외액물질의 DPPH radical 소거능이 92.25%, 총 페놀성 화합물 함량 289.50mg%로 가장 높았다. DEAE-cellulose 칼럼 분획 중 0.01M 초산 완충액에서 전자공여능(DPPH radical 소거능)이 81.32%로 높은 활성을 나타내어 0.01M 초산완충 분획에서 항산화능을 가진 수용성 갈변물질이 분리되는 것으로 보였다.(목표치 : 100% 달성)

□ 분획추출액의 항산화 활성 검증 - in vitro 검증

발효배양액으로부터 추출한 추출물의 중성 획분과 산성 획분의 총 페놀성 화합물, 아질산염 소거능 및 전자공여능을 측정한 결과 아질산염 소거능은 각각 98.29%, 89.29%로 강한 활성을 나타내었고, 총 페놀성 화합물 함량은 중성 획분에서 월등히 높은 함량(141.75mg%)을 보였다. 전자공여능은 DPPH법의 경우 중성획분에서 97.70%의 높은 활성을 나타냈으며, DMPD 법에서도 중성획분의 전자공여능 활성이 가장 좋았다. 발효액의 전자공여능은 중성획분이 산성획분 보다 항산화 효과가 훨씬 큰 것으로 나타났다.(목표치 : 100% 달성)

□ 항산화성 물질 분리 및 유효성 실증실험

발효배양액 추출물 및 중성 페놀물질과 산성 페놀물질을 분획하여 C₁₈ reverse phase HPLC 분석 및 TLC에서 분리를 행한 결과 발효액에서의 phenolic acid는 중성획분에서 추출되며, 주요 페놀 성분은 ferulic acid와 sinapic acid로 밝혀졌다. 수용성 갈변물질 구분의 투석 내액물질 구분과 투석 외액물질 구분을 DEAE-cellulose 칼럼으로 분획하고 각 분획분으로 박층 크로마토그래피를 실시한 결과 투석 내액물질 구분의 분리에서는 0.02M HCl 분획분으로부터 R_f치 0.2와 0.35의 2개 구분으로 분리되었으며, 투석 외액물질 구분의 분리에서는 0.01M AcOH용액 분획분으로부터 R_f치 0.28과 0.45의 2개의 구분이 각각 분리되었다.(목표치 : 100% 달성)

□ 항산화 물질분비 유전자(단일군주) 선발

최종 선별된 9종의 변이군주를 대상으로 한 항산화 활성을 비교한 결과 전자공여능(DPPH, DMPD, ABTS radical 소거능) 및 아질산염 소거능 활성에서 M1 변이주의 경우 모든 항산화 활성이 모균주보다 높은 것으로 나타나 모균주 및 변이주 M1을 대상으로 항산화성 물질 합성에 관여하는 유전자 단편을 클로닝하기 위하여 primer를 제작하였다.(진행율 100%)

□ SRB assay에 의한 세포독성 측정

SRB assay를 통한 암세포 성장억제효과의 검사에서 6가지 시료추출물 중 ether fraction, chloroform fraction과 ethylacetate fraction은 대조군에 비하여 농도의존적으로 암세포 성장을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. (진행율 100%)

□ Trypan blue exclusion assay에 의한 세포생육저해시험

발효배양액 시료의 ether fraction, chloroform fraction과 ethylacetate fraction의 3시료에 대하여 Trypan blue exclusion assay를 통한 암세포 성장 억제효과를 확인한 결과 시료의 농도가 증가 할수록 사멸한 세포의 수가 증가하였으며, 생존 세포의 수도 대조군에 비하여 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 시료 추출물 ether fraction, chloroform fraction과 ethylacetate fraction IC₅₀ 각각의 값은 0.84±0.079, 0.94±0.017, 0.8±0.03으로 나타났다.(진행율 100%)

□ 항산화 물질분비 유전자 cloning 연구

진균류의 다중정렬로부터 보존성이 우수한 아미노산 배열을 참고로 하여, degenerate primer를 합성하여 polymerase chain reaction을 수행하고 ferulic acid와 sinapic acid의 합성에 관여하는 phenylalanine ammonia lyase 유전자의 클로닝을 시도하였다. (진행율 100%)

제 2세부과제 : 미생물 발효 배양물의 피부 적용성과 화장품 제품개발

□ 피부에 대한 독성 및 자극성 연구

인체에 대한 세포 독성 및 피부 1차 자극성 평가, 피부 감작성 평가를 관찰한 결과, 세포 독성은 SLS에 비하여 2,000배 이상 세포 독성이 낮은 것으로 관찰되었으며, 피부 감작성 평가에서는 증폭 정도(SI)가 3이하로서 알러지 유발 가능성이 없는 것으로 관찰되었다. 또한 CTFA 가이드라인에 따라 실시한 인체접촉 시험은 미생물 복합 발효 배양액 5%(v/v)의 인체 도포시 자극이 없는 안전한 원료인 것으로 관찰되었다.(목표치 : 100% 달성)

□ 선택적 피부흡수 시스템에 의한 유용성분의 안정화 기술 연구 및 사용 편의성 제형 연구

1%의 미생물 복합 발효 배양액을 함유하는 liquid crystal 제형과 microcapsule 제형을 제조하여 광학 현미경으로 관찰 한 결과, 제형이 완성된 것을 확인하였다.(목표치 : 100% 달성)

□ 피부에 대한 각질제거 및 보습 효과에 대한 평가 연구

피부 각질제거 효과를 관찰한 결과, 약 32.1%의 각질제거 효과가 있는 것으로 관찰되었으며, 피부 보습력 평가에서는 화장품 제조시 보습제로 많이 사용되고 있는 glycerin, 1,3-butylene glycol, propylene glycol과 거의 유사한 보습력을 가지는 것으로 관찰되었다.(목표치 : 100% 달성)

□ 피부 주름 개선 및 완화 등의 항산화 효과에 대한 평가 연구

피부 주름개선 효과 즉, 자유라디칼 소거 활성화 및 세포 활성화, 콜라겐 합성, 엘라스타제 활성 저해 효과, UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과에 대해 배양 전 시료와 비교 관찰해 본 결과, 자유라디칼 소거 활성화능은 약 9배 가량 우수한 것으로 관찰되었으며, 세포활성화능은 약 12배, 콜라겐 합성능은 약 6배 가량 우수한 것으로 관찰되었다.(목표치 : 100% 달성)

□ 피부에 대한 미백 효과 검증

피부 미백 효과에 대해 관찰한 결과, 약 68%의 tyrosinase 활성 저해율이 관찰되었고 66.9%의 L-DOPA 자동산화억제 효과를 가지고 있는 것으로 관찰되었다. 그

리고 69.3% 정도의 B-16 melanoma 내의 melanin 생성을 억제하는 것으로 나타났으며 인공 색소침착을 유도한 시험자들을 대상으로 관찰한 결과 통계학적으로 유의한($p < 0.05$) 미백효과를 가지는 것으로 관찰되었다.(목표치 : 100% 달성)

□ 보존시험에 의한 rheology 평가 연구

개발한 두 제형에 대해 일반 보존시험 및 특수·가혹 보존 시험을 통해 pH 및 점도변화와 상 분리, 변색, 변취 등의 rheology 변화를 관찰하였으며 뚜렷한 변화가 나타나지 않아 두 제형 모두 안정성 면에서 우수한 제형임을 관찰하였다.(목표치 : 100% 달성)

□ 제품화 연구(시제품 제작)

기초화장품 8종 개발 : 바디클렌저, 폼클렌징, 맛사지젤, 필오프팩, 워시오프팩, 마스크팩, 에센스, 크림 (목표치 : 100% 달성)

협동연구과제 : 미생물 발효 배양물의 항산화성 생리 활성적 특성 검증

□ 혈중 지질함량과 간조직의 지질 함량 검사

미생물 복합발효 배양액이 생리활성을 나타내는데 필요한 양을 알아보기 위하여 Sprague-Dawley 쥐를 대상으로 대조군과 실험군 4그룹으로 농도별(10%, 20%, 30%, 50%) 섭취량에 따라 혈중 및 간의 지질함량을 분석한 결과 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 10%군과 20%군이 혈 중 중성지방 농도가 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다. 혈청 총 콜레스테롤 농도는 대조군에 비하여 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 네 실험 군들에서 유의적으로 낮게 나타났으며 혈청 LDL-콜레스테롤 농도는 50%군은 대조군 보다 유의적으로 낮게 나타나 효과가 있었다. 간 중성지방과 총콜레스테롤 농도는 대조군과 실험 군들 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 혈중 총콜레스테롤과 중성지방, LDL-콜레스테롤을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 확인되었다. (목표치 : 100% 달성)

□ 혈액과 간의 지질과산화물 함량검사

혈액과 간의 지질과산화물 분석은 malondialdehyde(MDA)를 측정된 결과 혈액에서의 malondialdehyde(MDA) 수준은 50%군에서 유의적으로 감소하였으며, 간 조직의 MDA 수준은 대조군과 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 실험군 간에도 미생물 복합발효 배양액의 섭취 수준에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 혈액의 지질과산화물 함량을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 확인 되었다. (목표치 : 100% 달성)

□ 간조직의 항산화계 효소활성 검사

간 조직의 SOD 활성도는 20%군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 나머지 실험 군들은 유의적인 차이가 없었다. 간 조직의 catalase 활성도는 30%군과 50%군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 간 조직의 GSH-Px 활성도는 10%군이 가장 높게 나타났으며, 희석농도가 진할수록 낮아지는 경향을 보여 50%군은 10%군에 비하여 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 간조직의 항산화 효소 활성(GSH-Px 활성)을 증가시키는 것으로 확인되었다. (목표치 : 100% 달성)

□ 당뇨 유발 흰쥐의 혈장 및 간의 지질함량 검사

최적조건에서 발효된 미생물 복합발효 배양액의 가장 생리적 활성이 우수한 농도를 찾아 그 농도의 미생물 복합발효 배양액의 섭취가 당뇨쥐에서 혈중 및 간의 지질함량을 분석한 결과 혈청 중성지방의 농도는 당뇨상태와 정상시 모두 미생물 복합발효 배양액 섭취로 낮아졌다. 혈청 총 콜레스테롤 농도는 당뇨시 30% 섭취군의 혈중 콜레스테롤 강하효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 당뇨와 정상 모두에서 대조군에 비하여 30%군들의 HDL-콜레스테롤 수준이 유의적으로 높았다. Atherogenic index는 당뇨-대조군의 값이 미생물 복합발효 배양액 섭취군들 보다 유의적으로 높았으며, 당뇨시 증가된 수치는 20%와 30% 미생물 배양액 섭취로 유의적으로 감소하였다. 간 중성지방은 당뇨 유무와 복합 미생물 배양액 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 간의 총콜레스테롤 농도는 당뇨와 정상 쥐에서 모두 복합 미생물 배양액 섭취군에서 낮게 나타났다. 따라서 혈중과 간의 중성지방과 총콜레스테롤을 감소시키고 HDL-콜레스테롤을 증가시켜 당뇨쥐의 지질개선효과를 확인하였다. (목표치 : 100% 달성)

□ 당뇨 유발 흰쥐의 간과 혈액의 유해활성산소제거 효소 측정

당뇨 유발 흰쥐에서 유해활성 산소 제거 효소인 항산화 효소를 분석한 결과 간 조직의 SOD 활성도는 정상군 중 발효액 30%섭취 군이 가장 높았으며, 당뇨군 중 발효액을 섭취하지 않은 군이 가장 활성이 낮은 것으로 나타났다. 당뇨군 내에서는 발효액 섭취량이 많을수록 간에서의 SOD 활성도가 높은 것으로 나타났다. 간 조직의 catalase 활성도는 당뇨 유무와 복합 미생물 배양액 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 간 조직의 GSH-Px 활성은 정상쥐와 당뇨쥐에서 대조군 보다 미생물 복합발효 배양액을 섭취한 20%와 30%군이 유의적으로 활성이 높게 나타났으며, 30%군이 20%군 보다 유의적으로 활성이 높게 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

□ 혈장의 혈당강하 효과

당뇨 유발 후 미생물 복합발효 배양액 섭취가 혈당 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 4주간의 혈당 변화를 측정한 결과 정상군들 보다 당뇨군들의 혈당 수준이 4주간 동안 유의적으로 높게 나타났다. 정상군들과 당뇨군들 내에서 4주간 미생물 복합발효 배양액의 섭취에 따른 유의적인 혈당 변화는 나타나지 않았다. (목표치 : 100% 달성)

□ 혈장의 인슐린 함량 검사

Plasma insulin 농도는 대조군과 당뇨군 사이에 유의적인 차이는 없었고 당뇨군에서 낮은 경향을 보였다. (목표치 : 100% 달성)

□ 당뇨 유발 흰쥐의 혈중 아미노산 함량 분석

혈장 유리 아미노산 농도결과는 taurine, threonine, glycine, citrulline, cystine, methionine, tyrosine, ornithine, lysine과 histidine의 농도는 당뇨 발생 여부와 미생물 복합발효 배양액의 섭취 유무와 섭취 수준에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. Glutamic acid와 alanine의 농도는 당뇨-30%군이 가장 높았으며, valine, leucine, isoleucine과 phenylalanine 농도는 당뇨-대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 유의적으로 낮았다. Arginine은 당뇨 대조군이 당뇨-20%와 30%군 보다 낮았으며, 당뇨-20%군이 당뇨-30%군 보다 낮은 값이었으나 유의적이지는 않았다.(목표치 : 100% 달성)

□ 미생물 복합발효 배양물의 methanol 희분 및 순수 분리물 분말 식이가 당뇨 유발 흰쥐의 혈장 및 간의 지질에 미치는 영향

개발한미생물 복합발효 배양물의 methanol 희분 분말 식이의 섭취가 당뇨쥐에서 혈 중 및 간의 지질에 미치는 효과를 분석한 결과 당뇨쥐에서 메탄올 희분 3%와 순수분리물 0.2%는 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방 및 LDL-콜레스테롤 농도를 유의적으로 낮추어 당뇨상태에서 혈중 지질농도를 개선하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 당뇨쥐의 간 조직 총콜레스테롤 농도는 순수분리물 0.2%가 유의적으로 가장 낮았고 간 조직의 중성지방 농도는 메탄올 희분 1%, 메탄올 희분 3%, 순수분리물 0.2 % 모두 대조군보다 유의적으로 낮추어 미생물 복합발효 배양물의 methanol 희분 및 순수 분리물 섭취가 효과가 있는 것으로 확인되었다. (목표치 : 100% 달성)

□ 미생물 복합발효 배양물의 methanol 희분 및 순수 분리물 식이가 당뇨 유발흰 쥐의 간의 항산화효소에 미치는 영향

간조직의 SOD 활성은 정상군보다 당뇨군이 낮았고 당뇨군내에서는 대조군과 메탄올 희분 1%군보다 메탄올 희분 3%군과 순수 분리물 0.2%군이 유의적으로 높았다. Glutathione peroxidase는 당뇨군내에서 메탄올 희분 3%군과 순수 분리물 0.2%군이 대조군과 메탄올 희분 1%군보다 유의적으로 높았다. Catalase 활성도는

정상군과 당뇨군 간에 유의적인 차이가 없었고 정상군과 당뇨군내에서도 식이에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 간조직 항산화 효소의 활성을 증가시키는 것으로 확인되었다. (목표치 : 100% 달성)

□ 미생물 복합발효 배양물의 methanol 희분 및 순수 분리물 식이가 당뇨 유발흰쥐의 혈장의 혈당강하 효과

4주간의 혈당수준은 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 높게 나타났다. 정상군에서는 4주간의 혈당 수준은 유의적인 차이가 없었고 당뇨군내에서는 순수 분리물 0.2%군이 가장 높았고 메탄올 희분 3%군이 낮은 경향을 보였다. 공복시 혈당은 당뇨군이 정상군보다 전반적으로 높았으나 정상군과 당뇨군간에 유의적인 차이가 없었다. 정상군과 당뇨군내에서 각각 메탄올 희분 3%군이 유의적인 차이는 아니지만 공복시 혈당이 가장 낮게 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

□ 미생물 복합발효 배양물의 methanol 희분 및 순수 분리물 식이가 당뇨 유발흰쥐의 혈장의 인슐린 함량 검사

인슐린농도는 당뇨군내에서 methanol 희분 3%군이 유의적인 차이는 아니지만 가장 높게 나타났고 정상군내에서는 순수 분리물 0.2%군이 유의적으로 인슐린 농도를 증가시키는 것으로 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

□ 미생물 복합발효 배양물의 methanol 희분 및 순수 분리물 식이가 당뇨 유발흰쥐의 혈 중 아미노산 함량 분석

혈장 유리 아미노산 농도는 aspartic acid, taurine, threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, histidine, arginine의 농도는 정상쥐와 당뇨쥐간에 유의적인 차이가 없었고 미생물 복합발효 배양물의 methanol 희분 및 순수 분리물의 섭취 정도에 따라서도 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서 glutamic acid, proline, glycine, methionine, ammonia 농도는 유의적인 차이가 없었다. 당뇨군내에서 alanine, tyrosine, lysine 농도는 methanol 희분 1%군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았고 methanol 희분 1%와 methanol 희분 3%군간에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

□ 특허

1. 복합발효 균주 중 항산화 활성물질 분비가 확인된 균주를 대상으로 한 균주기탁과 특허 준비중.
2. 배양물 및 배양방법의 특허 준비중
3. 배양물에 의한 항산화 물질생산 특허
4. 복합발효배양물을 중심으로 한 화장품제조방법 특허
5. 배양물을 조성으로하는 화장품 조성 특허 등

□ 논문 투고 및 투고준비중

1. Cloning and expression of antioxidants(ferulic acid or sinapic acid) production gene from bacteria or yeast. J. Microbiol. Biotechnol.(투고준비중)
2. 복합균주에 의한 발효배양물의 항산화적 특성. (투고준비중)
3. Identification of stain with antioxidant product. (투고준비중)
4. 복합발효배양액으로부터 항산화물질의 분리(투고준비중)
5. 복합발효배양액의 피부안정성 및 적용성(투고 준비중)

□ 학회발표

1. 최미자, 김성호, 정윤정, 정소형, 조현주 (2007. 6. 21) 당노취에서 미생물 복합 발효 배양물이 골밀도에 미치는 영향, 한국식품과학회 2007년도 정기학술발표회, 부산 Bexco.
2. 최미자, 김성호, 이유순 (2007. 6. 21) 당노취에서 미생물 복합발효 배양액이 당노취에서 혈당 및 혈중과 간지질에 미치는 영향, 한국식품과학회 2007년도 정기학술발표회, 부산 Bexco.
3. 최미자, 김성호, 이유순 (2007. 6. 21) 당노취에서 미생물 복합발효 배양액이 항산화효소에 미치는 영향, 한국식품과학회 2007년도 정기학술발표회, 부산 Bexco.
4. 최미자, 김성호, 이유순 (2007. 6. 21) 당노 취에서 미생물 복합발효 배양액이 혈중 인슐린 및 아미노산 농도에 미치는 영향, 한국식품과학회 2007년도 정기학술발표회, 부산 Bexco.

□ 추가연구의 필요성

복합미생물발효추출물이 당뇨쥐의 혈중지질 개선과 항산화능감소의 개선에 가능성을 보였으나 그 기전과 기능에 대한 추후 연구가 필요하다.

□ 타연구에 응용

본 연구 결과는 당뇨병성 고지혈증과 항산화능감소에 적용될 뿐 만 아니라 노화로 인한 고지혈증과 여성호르몬 결핍으로 인한 고지혈증과 항산화능감소의 개선에 적용이 가능하다고 판단되므로 노화연구에 응용할 수 있으리라 사료된다.

□ 산업화를 위한 조치(기술이전)

- 산업화 대상 시제품 제조
 - 피부 미백용 기초화장품
 - 피부 항산화용 기초화장품
 - 고보습용 기초화장품
 - 각질제거용 기초화장품
- 소비자 반응조사
 - 참여업체 이용 대상 소비자 반응조사
 - 대상제품 선정과 보완
- 참여업체에 대상제품 기술이전
- 상품화 및 판매

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 외국에는 약물로 인한 부작용이 없는 식물로부터 기능성 물질이나 성분을 추출하여 항산화를 지연시키거나 만성퇴행성 질환을 예방 및 치료하는 것에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 항산화능의 강화를 위하여 복합 발효미생물 배양액 추출시 일부 기능성 물질을 첨가하여 그 기능을 상승시킬 수 있다고 사료된다. 카테킨, 폴리페놀, 플라보노이드 등은 이미 항산화능이 보고되었으므로 이들의 물질을 가미하여 복합미생물배양을 하여 이용하면 그 기능이 강화되어 대체약물로서의 기능이 있으리라 사료되나 추후 연구가 요망된다.

제 7 장 참고문헌

제 1세부과제

1. Akaike, T., Sato, K., Ijiri, S., Miyamoto, Y., Kondo, M., Ando, M. and Maeda, H. (1992) Bactericidal activity of alkyl peroxy radicals generated by hemeiron-catalyzed decomposition of organic peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 55-63.
2. Amanatidou, A. E., Smid, J., Bennid, M. H. J. and Gorris, L. G. M. (2001) Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations. *FFMS Microl. Lett.* **203**, 87-94.
3. Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31, 347-364.
4. Aubourg, S. P. (1993) Review : Interaction of malondialdehyde with biological molecules—new trend about reactivity and significance. *Int. J. Food Technol.* **28**, 323-335.
5. Bai, J., Rodriguez, A. M., Melendez, J. A. and Cederbaum, A. I. (1999) Over expression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J. Bio. Chem.* **274**, 26127-26224.
6. Baker, M. A. and He, S. Q. (1991) Elaboration cellular DNA break by hydroperoxides. *Free Radic. Bio. Med.* **11**, 563-572.
7. Bertelsen, G., Christophersen, C., Nielsen, P. H., Madsen, H. L. and Stadel, P. (1995) Chromatographic isolation of antioxidants guided by a methyl linoleate assay. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1272-1275.

8. Boveris, A. and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide : General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707–716.
9. Buettner, G. R. (1993) The packing order of free radicals and antioxidants : Lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 535–544.
10. Commoner, B., Townsend, J. and Pake, G. E. (1954) Free radicals in biological materials. *Nature* **174**, 689–691.
11. Cutrin, J. F., Donovan, M. and Cotter, T. G. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. of Immunol. Methods* **265**, 49–72.
12. Dahiya, R. S. and Speck, M. L. (1968) Hydrogen peroxide formation by *lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* **51**, 1568–1572.
13. Fahey, R. C., Brown, W. C., Adams, W. B. and Worsham, M. B. (1978) Occurrence of glutathione in bacteria. *F. Bacteriol.* **133**, 1126–1129.
14. Farr, S. B. and Kogoma, T. (1991) Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**, 561–585.
15. Floyd, R. A. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 1447–1450.
16. Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **264**, 7761–7764.
17. Gille, J. J., Van Berkel, C. G. and Joenje, H. (1994) Mutagenicity of metabolic

- oxygen radicals in mammalian cell cultures. *Carcinogenesis* **15**, 2695–2699.
18. Halliweel, B. (1987) Oxidant and human disease : Some new concepts. *FASEB J.* **1**, 358–364.
 19. Halliweel, B. (1999) Oxygen and nitrogen are procarcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen. chlorine and nitrogen species : measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res.* **443**, 37–52.
 20. Halliwell, H. S., Murica, S., Chrigo, S. and Aruoma, O. I. (1995) Free radical and antioxidants in foods : what do they and how do they work. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**, 7–20.
 21. Ingold, K. U., Webb, A. C., Witter D., Burton, G. W., Metcalfe, T. A. and Muller, D. P. R. (1987) Vitamin E remain the major lipid-soluble, chain breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering vitamin E deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 224–225.
 22. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173–215.
 23. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. and Remacle, J. (1994) Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase and CU/ZN SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Bio. Med.* **17**, 235–248.
 24. Mruk, D. D., Silvestrini, B., Mo, M. Y. and Cheng, C. Y. (2002) Antioxidant superoxide dismutase a review : its function, regulation in the testis and role in male fertility. *Contraception* **65**, 305–311.
 25. Reed, D. J. (1990) Glutathione : Toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 603–631.

26. Stadtman, E. R. and Berlett, B. S. (1991) Fenton chemistry, Amino acid oxidation. *J. Bio. Chem.* **266**, 17201–17211.
27. Wanasundara, U., Amarowicz, R. and Shahidi, F. (1994) Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *J. Agric. Food. Chem.* **42**, 1285–1290.

제 2세부과제

1. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199.
2. Chun, J. H., Kang, S. W., Varani, J., Lin, J., Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. (2000) Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 177.
3. Cotellessa, C., Peris, K., Onorati, M. T., Fargnoli, M. C. and Chimenti, S. (1999) The use of chemical peelings in the treatment of different cutaneous hyperpigmentation, *Dermatol. Surg.*, **25**, 450.
4. Fugita, Y., Urea, I., Morimoto, Y., Nakajima, M., Hatano, C. and Okuda, T. (1988) Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. II. Inhibition mechanism of caffeetannins isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation, *Yakugaku Zasshi*, **108**, 129–135.
5. Fukushima, S., Yamaguchi, M. and Harusawa, F. (1977) Effect of cetostearyl alcohol on stabilization of oil-in-water emulsion, *J. Colloid and Interface Science*, **59**, 159 .
6. Garcia, A. and Fulton, J. E. (1996) The combination of glycolic acid and

- hydroquinone or kojic acid for the treatment of melanoma and related conditions, *Dermatol. Surg.*, **22**, 443.
7. Gorden, P. R., Mansur, C. P. and Gilchrest, B. A. (1986) Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factors, *J Invest. Dermatol.*, **92**, 565.
 8. Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomita, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Niyaki, T., Koni, and Oki, T. (1991) Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity, *J. Antibiotics*, **44**, 25.
 9. James, A. E. K., Timothy, D. W. and Gorden, L. (1996) Inhibition of human leucocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic truosin inhibitors, *Biochemistry*, **35**, 9090–9096.
 10. Mason, H. S. and Peterson, E. W. (1965) Melanoproteins reactions between enzyme generated quinones and amino acids. *Biochem Biophys. Acta*, **111**, 134.
 11. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assat for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity, *J. Immunol, Methods*, **65**, 55–63.
 12. Muizzudin, N., Marenus, K., Maes, D. and Smith, W. P. (1990) Use of a chromameter in assessing the effcacy of anti-irritants and tanning accelerators, *J. Soc. Cos. Chem.*, **41**, 369.
 13. Noro, T., Yasuhi, O., Toshio, M., Akira, U. and Fukushima, S. (1983) Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984–3987.
 14. Serup, J. and Agner, T. (1990) Colorimetric quantification of erythema: a

comparison of two colorimeters with a clinical scoring scheme and laser-dopper flowmetry, *Clin. Exp. Dermatol.*, **15**, 267.

15. Suzuki, T., Nakamura, M., Sumida, H. and Shigeta, A. (1992) Secondary droplet emulsion-contribution of liquid crystal formation to physicochemical properties and skin moisturizing effect of cosmetic emulsion, *JSCC*, **43**, 21.

협동연구과제

1. 김혜정, 김영철. (2006) Streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐에서 청국장 분말의 항당뇨 및 항산화 효과. 한국환경독성학회지 21, 139-146.
2. 신순현. (1977) 한국인 당뇨환자의 혈청지질에 관한연구 당뇨병 4, 1-20.
3. 윤연희 (1994) 한국산 녹차, 우롱차 및 홍차가 카드뮴에 중독된 흰쥐 간조직의 항산화적 해독 작용에 미치는 영향. 효성여자대학교 식품영양학과 석사학위 논문 20-22.
4. 이주원, 신효선 (1993) 녹차 추출물의 항산화 효과. 한국영양학회지 25, 759-763.
5. 임애경 (2006) Streptozotocin으로 유발된 당뇨병에서 빙청국장 분말의 항당뇨 및 항산화 효과 계명대학교 석사학위논문
6. 최원경 (1994) Streptozotocin 유발 당뇨쥐에 있어서 항산화적 방어기구 및 Metallothionein합성에 미치는 비타민 E의 영향. 효성여자대학교. 식품영양학과. 박사학위논문 62-70.
7. Abrams, J. J., Ginsberg, H., Grundy, S. M. (1982) Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in non-ketotic diabetes mellitus. *Diabetes* 31, 903-910.
8. Aebi, H. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 2, *Catalase*. New York: Academic Press.

9. Baum J. A., Teng, H., Erdman, J. W. Jr. (1998) Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low density lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68, 545–551.
10. Balin, A. K. Testing the free radical theory of aging. In: R.C. Adelman and G.S. Roth, eds., *Testing the theories of Aging*. CRC Press, Boca Raton, Fla p37.
11. Baynes, J. W. (1991) Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 40, 405–421.
12. Bergmeyer, H. U., Wahlefeld, A. W. (1974) *Methods of enzymatic analysis*. 2nd English ed. Academic Press, New York, NY. p 1831.
13. Davie, S. J., Gould, B. J., Yudkin, J. S. (1992) Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes*. 41, 167–173.
14. Eastman, R. C., Keen, H. (1997) The impact of cardiovascular disease on people with diabetes: The potential for prevention. *Lancet*, 350, 29–32.
15. Fava, S, Azuilina, O, Azzopardi, J, Muscat, H. A., Fenech, F. F. (1996) The prognostic value of blood glucose in diabetic patients with acute myocardial infarction. *Diabetic Medicine*. 13, 80–83.
16. Folch, J, Lees, M, Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226, 497–509.
17. Fujita, Y., Yamane, T., Tanaka, M., Kuwata, K., Okuzumi, J., Takehashi, T., Fujiki, H., Okuda, T. (1989) Inhibitory effect of (–)epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum.

Jap J Cancer Res 80, 503.

18. Gonuth, S. M. (1973) Plasma insulin and glucose profiles in normal, obese and diabetic persons. *Ann. Intern. Med* 79, 812–817.
19. Goodman, G. D., Kritz, S. D. (2001) Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr* 131, 1202–1206.
20. Haglund, O., Loustarinen, R., Wallin, R., Wibell, I., Saldeen, T. (1991) The effect of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin. *Eur J Nutr* 121, 165–172.
21. Halliwell, Barry. (1991) Reactive oxygen species in living system, *Am J Medicine* 91, 14–23.
22. Harman D. A. (1956) theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11, 298–307.
23. Harris E. D. (1992) Regulation of antioxidant enzyme. *J Nutr* 122, 625–626.
24. Hsu, C. S., Chiu, W. C., Yeh, S. L. (2003) Effects of soy isoflavone supplementation on plasma glucose, lipids and antioxidant enzyme activities in streptocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research* 23: 67–75.
25. Hyon S. H., Kim, D. H. 2001. Long-term preservation of rat pancreatic islets under physiological conditions. *J Biotechnol* 85: 241–6.
26. Ikeda, I., Masato, Y., Nakayama, M., Takeo, T., Yayabbe, F., Sugano, M. (1991) Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. International symposium on tea science(shizuoka) Abstr 11–A–3.

27. Kada, T., Kaneko, K., Matsuzki, S., Matsuzaki, T., Hara, Y. (1985) Detection and chemical identification of natural bioantimutagens. *Mutation Research* 150, 127.
28. Kahn, C. R. (1985) The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med* 36, 429–433.
29. Khokhar, S., Magnúsdóttir, S. G. (2002) Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J Agric Food Chem* 50, 565–570.
30. Kim, J. S., Kim, Y. J., Park, S. I. (1993) Mean fasting blood glucose level and an estimated prevalence of diabetes mellitus among a representative adult Korean population. *Korean J of Preventive Medicine* 26, 311–320.
31. Laakso, M. (1996) Glycemic control and the risk for coronary heart disease in patient with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the Finnish studies. *Annals of Internal Medicine* 124, 127–130.
32. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
33. Martin, J. P. Jr., Dailey, M. and Sugarman, E. (1987) Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 255, 329–336.
34. Mates J. M., Perezgomez, C., Castro, I. (1999) Antioxidant enzyme and human diseases. *Clinical biochemistry* 32, 595–603.
35. McCord J. M. (1983) The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology *surgery* 94, 412–4.

36. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358.
37. Paglia, D. E. and Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70, 158–169.
38. Park, H. S., Jang, Y. J., Choi, D. S., Namgung, M. A., Lee, Y. J., Kang, S. A. (1995) Increased oxydative stress in sciatic nerves of streptozotocin–induced diabetic Rats: lack of Vitamin C Effect. *J Kor Diabetes Asso* 19, 279–286.
39. Park, H. S., Lee, Y. M. (2003) Effect of vitamin C supplementation on blood sugar and antioxdative ststus in types II diabetes mellitus patients. *J Korean Acad Nurs* 33, 170–178.
40. Reaven, G. M. (1987) Abnormal lipoprotein metabolism on non–insulindependent diabetes mellitus. Pathogenesis and treatment. *Am J Med* 83, 31–40.
41. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C. (1993) AIN–93 purified diets for laboratory rodents. *J Nutr* 123, 1939–1951.
42. Rhee, S. J., Park, G. Y. (1997) Effects of green tea catechin on liver 3–hydroxy–3–methylglutaryl co enzyme a reductase activity and serum lipid levels in streptozotocin–induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26, 1187–1193.
43. Richmond, W. (1973) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 19, 1350–1356.

44. Sin, M. K., Han, S. H., Han, G. J. (1997) The effects of green tea on the serum lipid and liver tissue of cholesterol fed rats. *Korean J Food SCI Technol* 29, 1255–1263.
45. Sohal R. S., Allen, R. G. (1980) Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: A unifying hypothesis *Exper. Gerontol* 25, 499–522.
46. Steinberg, D., Parthasarathys, Carew, T. E., Khoo, J. C., Witztum, J. L. (1991) Modification of low-density-lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Eng. J. Med.* 320, 915–924.
47. Tavia, G., William. B. K. (1978) Menopause and coronary heart disease: Framingham study. *Ann Intern Med* 89, 157–161.
48. Tomita, I., Nakamura, Y., Sano, M., Watanabe, J., Miura, S., Suzuki, N., Yoshino, K. (1993) Preventive effects of green tea against oxidastive damage and mutagenesis. *Proceedings of the 2nd International symposium on green tea* September 1, 69–73.
49. Toyoshima, Y., Okubos, S., Toda, M., Hara, Y. (1986) Effect of green tea catechins on plasma cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 32. 613.
50. Urano, S, Midori, H. H., Tochihi, N., Matsuo, M., Ito, H. (1991) Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26(1): 58–61.
51. Yukiko, M., Tsuyoshi, C., Isao, T., Haruko, K., Shinji, M., Keizo, U., Yukihiko, H., Masahiko, I., Takako, T. (2001) Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 131:27–32.

52. Wada, K., Miki, H., Etoh, M., Okuda, T., Kusukawa, R. (1983) The Inhibitory effect of lipid peroxides on activity of the membrane bound and the solubilized lipoproteinlipase. *Jan Clin J* 47, 837–842.
53. Warnick, G. R., Nguyen, T., Albers, A. A. (1985) Comparison of improved precipitation methods for quantification of high density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 31, 217–222.
54. Wolff, S. P., Jiang, Z. Y., Hunt, J. V. (1988) Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus. *FreeRadical Biology Med* 10, 339–352.
55. West I. C. (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17, 171–180.
56. Yeh, S. L., Hsu, C. Y., Shieh, M. J. (1998) Effect of dietary casein and soy protein on plasma lipids in a streptozotocin-induced diabetes model in hamsters. *Nutrition Research* 18, 1757–1768.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.