

전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리 기능활성 탐색
연구 및 이를 이용한 웰빙 식품 개발

(Research for physiological activities of microorganisms from Korean traditional
Nuruk and traditional wines and development of well-being foods)

심혈관계 활성 탐색 연구 및 웰빙식품개발

(The study on cardiovascular activity and development of well-being foods)

항암·혈관생성억제 및 면역증진 효능 및 작용기전 연구

(The study of action mechanism on anti-cancer and anti-inflammation)

생리 기능활성 유효성분 분획·분리 연구

(The study on isolation and purification of active components)

(주)국순당

농림수산식품자료실



0017678

농 립 식 품 수 산 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리 기능활성 탐색 연구 및 이를 이용한 웰빙 식품 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 일

주관연구기관명 : (주)국순당

주관연구책임자 : 김 계 원

세부연구책임자 : 김 계 원

연 구 원 : 이 상 진

연 구 원 : 권 희 숙

연 구 원 : 김 지 윤

위탁연구기관명 : (주)캠온

위탁연구책임자 : 박 찬 구

협동연구기관명 : 성균관대학교

협동연구책임자 : 홍 성 렬

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 백 남 인

요 약 문

I. 제 목

전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리 기능활성 탐색 연구 및 이를 이용한 웰빙 식품 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

웰빙 추세에 맞추어 변화되는 식품산업계에서 단순한 우리 농산물을 활용한 제품은 경쟁력이 없는 한계를 극복하기 위한 차별화 요소를 발굴할 필요성이 있으며 잉여 농산물을 활용한 직접적인 농가 소득 증대를 위한 제품개발이 필요하다. 본 연구팀은 선행연구로 전통누룩 유래 미생물과 그를 이용한 전통주의 심혈관계 활성 (지질대사와 혈전생성억제)과 항암 효과 (전이·신생혈관과 염증 억제)를 도출하였다. 이런 생리 기능활성을 차별화 요소로 판단하여, 본 연구 과제에서 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리 기능활성 유효성분의 분리·동정 시스템을 확립하고 체계인 생리 기능활성 기전을 규명하고자 하였다. 또한 다양한 웰빙 전통식품 개발과 상품화 기술에 필요한 기초 자료를 제공하여 제품 경쟁력과 직접적인 농가 소득 증대를 도모하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815 (KFCC-11279)과 전통주의 생리 기능활성 유효 성분을 다양한 용매를 활용하여 추출·분리 및 column chromatography 방법을 활용한 활성성분 정제, 그리고 활성성분의 물리·화학적 특성을 규명하며 화학 구조를 결정하였다. 분획 및 유효성분의 생리 기능활성 탐색은 선행연구에서 확인된 활성에 근거하여 심혈관계 활성, 항암 활성 (세포사 유도, 신생혈관 생성 및 전이 억제) 그리고 항염증 활성에 대한 작용 기전 연구를 각각 수행하였다. 또한 전통누룩 유래 미생물을 이용하여 우리 농산물을 활용한 웰빙식품의 컨셉 발굴과 시제품을 개발하였다. 개발된 웰빙식품의 유효성분 분리 및 기능활성 검증 체계를 확립하여 전통식품개발과 상품화 기술에 필요한 기반 연구를 제공하였다.

IV. 연구개발결과

전통누룩 유래 미생물인 *Rhizopus oryzae* KSD-815 배양액의 methanol 수용액을 이용한 용매 추출물 및 전통주 농축물을 조제하였다. 추출물에 대한 용매 극성을 이용한 분획물을 조제하였으며 활성분획에 대하여 TLC (thin layer chromatography)로 함유 성분을 분석하였고 분획물의 소분획화를 통하여 hexane, ethylacetate, butanol 분획에서 총 45개의 소분획을 확보하였다. 생리 기능활성 평가 결과에 근거로 각 분획에서 silica gel, ODS 및 column chromatography를 이용하여 활성성분을 분리·정제하였다. 또한 활성성분의 화학구조 결정과

물리·화학적 특성을 규명하였다. 그 결과, 활성성분으로부터 column chromatography를 이용하여 15종의 물질을 순수하게 분리·정제하였으며, NMR, MS, IR 데이터 해석을 통하여 fatty acids, sterols 등으로 정확하게 구조 결정하였다. 또한 기능활성이 있는 6종의 지방산에 대하여 gas chromatography를 이용한 분석 방법을 확립하고 분석하였다.

분획별·유효성분별 심혈관계 효능 연구를 수행한 결과, 전통누룩 유래 미생물 분획과 전통주 농축물에서 angiotensin converting enzyme 저해활성을 확인하였다. Rat platelet rich plasma를 이용한 혈전생성억제 활성 평가 결과, 전통누룩 유래 미생물 추출물과 전통주 농축물의 각 분획은 ADP 또는 collagen으로 유도한 혈전생성 모델에서 양성대조물질로 사용한 aspirin과 동등 또는 유사한 혈전 생성 억제 효과를 확인하였다. 또한 고지방식이 동물모델을 이용한 고지혈 개선 평가 결과, 전통누룩 유래 미생물 추출물에서 total-cholesterol과 LDL-cholesterol 저하 효과를 확인하였다. 이 효과는 hexane 분획 유래 fatty acids에 의한 PPAR- α /- γ 의 전사활성과 HDL-cholesterol 혈성에 관여하는 Apoprotein A1 발현 증가에 의한 작용으로 규명하였으며 이 fatty acids는 약물 대사 효소 저해활성에 대한 저항성을 나타내었으나 전지방 세포 분화 억제 활성은 없는 것으로 분석하였다. 하지만, 전통누룩 유래 미생물의 hexane 분획 유래 sterols에서는 PPAR- α /- γ 전사활성 등 심혈관계 개선 활성이 없는 것으로 확인하였다. 이상의 결과를 종합하면, 전통누룩 유래 미생물의 hexane 분획에서 분리한 fatty acids는 PPAR- α agonist 활성 (PPAR- α /- γ dual agonist)을 가지고 있으며 약효 및 약물상호작용 측면에서 장점을 가지는 것으로 판단되며 이를 근거로 임상 적응증을 고려할 때, 고지혈증 치료제의 접근 가능성이 있다고 사료된다.

전통누룩 유래 미생물 분획과 전통주 농축물의 항암활성 평가 결과, 분획별로 다양한 항암 활성 (암세포사/apoptosis 유도, 전이·신생혈관 생성 억제 및 항염증)을 확인하였다. 특히, 전통누룩 유래 미생물의 H₂O 분획에서 신생혈관 생성 및 내피세포의 혈관 관상구조 형성을 억제하였으며 다양한 혈관생성인자 (ex. bFGF, HIF-1 α 등)의 mRNA 수준의 발현을 억제하는 기전으로 규명하였다. 분획의 항암효과에 근거하여, 분리·동정된 유효 물질에 대한 항암 활성 기전을 규명하였으며, 전통누룩 유래 미생물의 지방산에서 높은 항암 활성을 확인하였다. Methyl ester 형태의 γ -linolenate는 암세포의 apoptosis를 유도하였는데, 이는 p38 MAPK의 phosphorylation과 activation을 조절하는 기전으로 규명되었다. 구체적으로 methyl γ -linolenate는 p38 MPAK의 활성화를 유도하고, 이를 통해 mTOR pathway를 저해함과 동시에 AMPK pathway의 activation시키는 작용 기전으로 전립선암의 세포주기 변화와 apoptosis를 유도하였다. 또한 methyl γ -linolenate 및 methyl linoleic acid와의 혼합물은 AMPK activation을 유도하여 암 세포에서 비정상적으로 발현이 높은 acetyl-CoA carboxylase α 와 fatty acid synthase를 저해하는 작용 기전으로 *de novo* fatty acid synthesis를 억제하였다. 이외 분리·동정된 지방산과 sterols의 apoptosis 유도 및 전이 억제 기전도 확인하였다. 뿐만 아니라, 분리·동정된 지방산 중 linoleic acid는 LPS에 의해 유도된 염증 모델에서 inducible nitric oxide synthase의 mRNA 수준의 발현을 조절하여 NO의 생성 억제하는 항염증 기전도 규명하였다.

전통누룩 유래 미생물인 *Rhizopus oryzae* KSD-815를 이용하여 웰빙식품 3가지를 개발하였다. 우리 농산물을 *Rhizopus oryzae* KSD-815과 함께 발효한 식초음료, 쌀음료, 그리고 막걸리의 최적 recipe, 발효조건 및 방식을 확립하였고 시제품을 생산하였다. 이 웰빙식품의 시제품에서 유효성분 분리·동정 체계를 확립하였으며 생리 기능활성 탐색 체계를 확립하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통하여 “리조푸스 속 균주를 함유하는 혈관신생 억제용 조성물“에 대한 국내 특허를 출원하였다. 국내학회지에 논문게재와 국제학술잡지에 투고를 위한 논문을 작성 중에 있다. 해외학술대회 발표와 국내학술대회에서 초청연사 및 포스터 발표 등 본 연구성과를 다양한 채널을 통해 발표하였다. 또한 ”서울시 산학연협력사업단-반가사업단“에서 주최한 한국 전통식품 및 반가식품의 우수성 심포지엄을 통해 본 연구 수행 결과를 발표하였다. 주관연구기관이며 동시에 참여기업인 국순당에서 주관하는 우리술 강좌에서 본 연구성과의 일부를 교육자료로 활용하고 있으며 1명의 박사과 7명의 석사의 인력양성을 하였다.

본 연구에서 개발한 3가지 웰빙식품은 실용화·사업화를 추진할 예정이다. Recipe 및 제조방법 등 특허출원을 진행하고 기술의 실시 및 이전을 농민법인인 국순당정선명주(주)을 대상으로 협의를 통하여 제품 생산을 단계적으로 추진할 계획이다. 그리고 전통누룩 유래 미생물의 생리활성물질에 대한 보완/추가 연구로 건강기능식품을 위한 특허 출원 및 시제품 개발로 실용화·사업화를 추진할 계획이다.

SUMMARY

(영문요약문)

1. Title

Research for physiological activities of microorganisms from Korean traditional Nuruk and traditional wines and development of well-being foods

2. Background and purpose

To increase the income of farmers and find the factors of product differentiation, it is necessary to develop the new agricultural-product based beverages. We have previously observed that extracts of Korean traditional nuruk and its alcohol beverage improved cardiovascular disorders (hyperlipidemia and anti-coagulation) and diminished the angiogenesis and metastasis. Regarding physiological activities as differentiative factors, we aimed to establish the system of purification and elucidation for physiological components isolated from Korean traditional nuruk and beverages and to investigate the action mechanisms of physiological functionalities. And then, based on physiological research, we tried to develop the new well-being products with Korean traditional nuruk and our agricultural products.

3. Results and discussion

Nuruk has been used to make traditional fermented foods because it contains many microorganisms. Previously *Rhizopus oryzae* KSD-815 (KFCC-11279) was isolated from traditional nuruk and its physiological activities have not yet been reported. Firstly dried and powdered nuruk was extracted with methanol and the removal of solvent under vacuum afforded methanol extracts. The extracts were partitioned with hexane, ethylacetate, butanol and H₂O, and then each fraction was fractionated using solvent polarity, respectively, obtaining total 45 subfractions. Similar to nuruk, traditional wine was concentrated and fractionated. Based on the results of physiological screening, effective compounds were purified and elucidated from each subfractions using silica gel, ODS and column chromatography. Through these processes, 15 pure compounds were obtained and chemical structures of these compounds was determined on the basis of the interpretation from NMR and GC/MS and confirmed by comparing the molecular ion peak [M]⁺ and fragmentation ion peak with those of the Wiley Library in the GC/MS experiment and literature data.

To investigate whether extract of *Rhizopus oryzae* KSD-815 has the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity and inhibits blood clotting, ACE inhibitory assay and platelet aggregation assay were performed. This extract have the inhibitory activity on ACE and inhibited ADP- or collagen-induced platelet aggregation in a

dose-dependent manner. Especially, butanol fraction dose-dependently inhibited platelet aggregation induced by both antagonists and had similar potency with positive control, aspirin. In concentrates of traditional wine, we confirmed the similar activity of ACE inhibitory and anti-coagulation with extracts. And the *in vivo* effect of hexane fraction on hypercholesterolemia was estimated high cholesterol diet-fed rat model. Hexane fraction reduced LDL- and total cholesterol levels and has a similar potency as compared with gemfibrozil. Fatty acids from hexane fraction activated PPAR- α / γ in a dose-dependent manner and significantly increased the amount of human ApoA1 secretion. Also these fatty acids had resistance to drug metabolism concerned enzymes and no ability to attenuate the differentiation of pre-adipocyte. Taken together, fatty acids from *Rhizopus oryzae* KSD-815 is a well-balanced dual agonist of PPAR- α / γ , and suggest that these have excellent hypolipidemic activities and potential to develop the therapeutic agent against cardiovascular disorders.

In respect of anti-cancer activities, each fraction has various anti-cancer effects. Especially, the anti-angiogenic effect of aqueous fraction from *Rhizopus oryzae* KSD-815 was examined in the CAM and tube formation assay. The aqueous fraction substantially inhibited new blood vessel growth in the CAM and led to a complete suppression of bFGF-induced tube formation in HUVEC cells. Despite the inhibitory activities of aqueous fraction on neovascularization and tube-like structure formation, aqueous fraction did not affect the VEGF expression level but decreased the mRNA expression of important regulators of tumor angiogenesis such as bFGF, HIF-1 α .

Methyl ester form of γ -linolenate from hexane fraction of *Rhizopus oryzae* KSD-815 was purified and whether this compound has anti-cancer effects was determined. Actually, this compound activated and phosphorylated p38 MAPK down-regulated mTOR pathway and activated AMPK pathway, resulting in the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. And methyl γ -linolenate and mixture with methyl linoleic acid activated AMPK and then regulated acetyl-CoA carboxylase α and fatty acid synthase to inhibit the de novo fatty acid synthesis that is high expressed in cancer cells. Moreover, purified other fatty acids and sterols induced apoptosis and inhibited metastatic potential in human breast cancer cells. In addition, linoleic acid suppressed LPS-induced expression of inducible nitric oxide synthase and production of NO in macrophage like RAW264.7 cells.

Using *Rhizopus oryzae* KSD-815 and Korean agricultural products, we developed the well-being beverages including vinegar drink, rice drink and Korean traditional alcohol beverage and established the optimization of recipe, fermenting condition and process, producing the prototypes. Finally, we put system of purification and screening on a firm footing.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Description for submission	1
Summary	2
Summary in English	5
Contents in English	7
Contents	8
Part 1. Introduction	9
1. Backgrounds	9
2. Purpose	10
Part 2. Present status of the techniques	12
1. Domestic and foreign trends in research field	12
2. Expectation effects of technical development	13
Part 3. Methods and Results	15
1. Research section 1	15
2. Research section 2	35
3. Research section 3	43
4. Research section 4	95
Part 4. Evaluation	118
1. Annual evaluation	118
2. Achievement	122
Part 5. Practical use and application	123
1. Plan of practical use and industrialization	123
2. Plan of technical proliferation	124
3. Plan of intellectual property	124
Part 6. Foreign technical information	128
Part 7. References	130

목 차

제출문	1
요약문	2
영문요약문	5
영문목차	7
목차	8
제 1 장 연구개발과제의 개요	9
제 1 절 연구개발의 필요성	9
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황	12
제 1 절 연구개발 대상의 국내·외 기술 현황	12
제 2 절 기술개발의 기대 효과	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	15
제 1 절 세부연구과제	15
제 2 절 위탁연구과제	35
제 3 절 제1협동연구과제	43
제 4 절 제2협동연구과제	95
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	118
제 1 절 연구개발 목표 및 평가 착안점	118
제 2 절 연구개발 목표 달성도	122
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	123
제 1 절 실용화·산업화 계획	123
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획	124
제 3 절 특허·논문 등 지적재산권 확보 계획	124
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	128
제 7 장 참고문헌	130

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 경제적·산업적 중요성

- ◇ 최근 웰빙이 문화적 큰 주류를 형성하는 가운데, 건강 기능성 식품 산업이 폭발적으로 증가하고 있다. 2001년 기준으로 세계 기능성 식품 시장 규모는 62,360 백만 달러로 추정되며 식사보충제까지 포함하면 112,280 백만 달러에 달한다. 국내의 경우 2000년부터 꾸준하게 시장이 증가하고 있으며 2002년 매출은 1조 5천억 정도로 추정하고 있으며 많은 대기업이 생산·판매에 참여하고 있다. 또한 웰빙식품을 상징하는 건강 기능성 식품에 대해 식품의약품안전청 (KFDA)에서 원료성분인정 등 제도적 장치도 마련하였다. 하지만 이런 건강 기능성 식품에서 전통식품을 소재로 활용한 제품은 거의 찾아 볼 수 없다.
- ◇ 국내 농업분야의 연구개발은 농산물 생산성 증대에 중점을 두고 진행되어 왔으며, 최근 자유무역협정 (FTA)으로 농업분야의 전면적인 개방을 앞둔 시기에 직면하였다. 이런 환경적 요인으로 인해 우리 농가는 잉여 농산물의 판로와 농가 소득 불안정을 해결할 방안을 강구해야 할 시점이다.
- ◇ 선진국은 식품산업 및 주류산업과 연계한 농업정책을 추진하여 농민 소득 증대 및 국가 경제를 향상시키고 있다. 유럽의 와인산업 정책, 독일의 증류주 정책으로 전통식품을 소중하게 육성하고 주요한 무역물자로 적극적인 수출도 하고 있다. 또한 미국과 브라질의 동결농축 오렌지 주스의 경우처럼, 농산물을 가공하여 부가가치를 높이는 방법을 활용하여 국가 경제 향상과 농민 소득을 증대하고 있다.
- ◇ 우리나라에서 재배하고 생산한 농산물을 활용한 전통주·전통식품의 복원·개발로 전통식품 산업의 부흥·발전을 꾀할 수 있다. 즉, 우리 땅에서 재배한 농산물을 활용할 수 있는 기술 개발은 직접적인 농가 소득 증대 및 농민의 신규 사업 창출의 가능성을 제시하는 중요성이 있다. 또한 전통주를 비롯한 전통식품의 생리 기능성에 대한 연구 기술은 전통식품의 가치와 우수성을 향상시켜 전통식품 산업의 부흥·발전에 기여하는 의미도 있다. 더불어 우리 땅에서 재배한 농산물의 소비 촉진 및 판로 확보할 수 있는 중요성도 있다.

2. 연구개발의 필요성

- ◇ 현재 소비자들의 주류·식품 기호도가 양보다는 질 중심 문화로의 변화는 식품 산업 변화를 요구하며 연구개발의 강화를 통한 질 좋은·새로운 주류·식품의 생산이 요구되는 시기이다. 이런 사회적·문화적 분위기 속에 단순한 우리 농산물 및 그의 잉여 농산물을 활용한 제품 개발은 경쟁력을 가질 수 없는 한계가 있다. 기능성 연구 개발로 이런 한계를 극복하기 위

한 차별화된 요소를 발굴할 필요성이 있다.

- ◇ 먼저 전통 누룩 유래 미생물 및 전통주를 이용하여 생리 기능활성을 가지는 유효 성분의 분획·분리 방법과 생리 기능활성 검증 방법을 체계화하여 우리 전통식품의 우수성을 규명할 기술 개발이 필요하다. 이 기술을 활용·응용하여 우리 농산물을 활용한 전통 건강 기능성 식품 개발을 통하여 차별화 요소를 구축할 수 있으며 각 제품에서 생리 기능활성 유효성분을 확인하고 그 기능성을 규명함으로써 경쟁력을 강화시킬 수 있다. 또한 직접적인 농가 소득 증대를 위한 농업정책의 새로운 방향성을 제시할 수 있는 전통주를 포함한 기능성 전통 식품의 개발기술이 절실히 요구된다.

제 2절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표

가. 연구개발의 최종목표

- ◇ 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리 기능활성 유효 성분의 분획·동정 및 시스템 확립
- ◇ 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 유효성분에 대한 심혈관계 활성 효과 및 항암·혈관 신생 억제 및 면역 활성 향진 효능을 입증하고, 작용 기작을 규명
- ◇ 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리기능성 유효성분 및 기능활성 기전 확립 등 동정·확인된 기능성물질을 최대한 활용한 웰빙 전통식품 개발 및 상품화 기술에 필요한 기초 자료를 제공

나. 연구개발의 성격

- ◇ 전통누룩 유래 미생물 및 전통주에서 생리 기능성 유효 성분을 분리·동정하고 이의 생리 기능 활성 기전을 규명
- ◇ 이를 바탕으로 우리 농산물을 활용하며 최적의 기능성물질을 함유한 웰빙 식품 (주류·식품) 시제품을 개발하는 실용화 연구개발

2. 연구개발의 목표 및 내용

우리 농산물 활용·개발한 제품의 차별화 요소를 발굴하여 시장 경쟁력을 창출해야 한다. 본 연구과제의 선행연구를 통하여 전통누룩 유래 미생물의 심혈관계 활성 (혈전생성 억제·지질대사 개선)과 항암 활성 (암 세포死 유도·전이 억제), 그리고 항염증 활성을 확인하였다. 선행연구 결과는 우리 농산물을 활용한 제품의 건강 기능성 차별화 요소를 부여할 수 있는 가능성을 확인하였다.

본 연구는 전통누룩 유래 미생물과 전통주의 생리 기능활성 유효 성분을 다양한 용매를 활

용하여 추출·분리 및 column chromatography 방법을 활용한 활성성분 정제, 그리고 활성성분의 물리·화학적 특성을 규명하며 화학 구조를 결정할 것이다. 우리 농산물을 활용한 웰빙식품에서 유효성분 분리·동정 체계를 확립할 예정이다.

전통누룩 유래 미생물과 전통주의 유효성분의 생리 기능활성 탐색은 선행연구에서 확인된 활성에 대한 심화 연구를 수행할 예정이다. 심혈관계 활성, 항암 활성 (암 세포사 유도, 신생혈관 생성 및 전이 억제) 그리고 면역 활성 증진 중 항염증 활성에 대한 작용 기전 연구를 각각 수행할 것이다. 전통누룩을 이용하여 제조한 웰빙식품에서 동일한 생리 기능활성 탐색 및 동정 체계도 확립할 것이다.

본 연구과제의 성과를 활용·응용하여 우리 농산물을 활용한 전통 건강 기능성 식품 개발을 위한 컨셉 제공, 시제품 제조 및 대량 생산에 대한 가능성을 모색함으로써 우리 농산물을 활용한 전통 웰빙 식품 개발 및 그로 인한 직접적인 농가 소득 증대를 도모하고자 한다.

본 연구과제의 각 년차별 목표는 다음과 같다.

◆ 1차년도 (2006년)

- 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 분획 방법 확립
- 전통누룩 유래 미생물 및 전통주 분획의 심혈관계 활성 탐색 (동물 실험 포함)
- 전통누룩 유래 미생물 및 전통주 분획의 항암·혈관 생성 억제 및 면역 활성 증진 효과 탐색

◆ 2차년도 (2007년)

- 생리활성별 유효 성분 분리 방법 확립 및 structure elucidation 분석
- 전통누룩 유래 미생물·전통주 유효 성분의 심혈관계 활성 탐색 및 기전 연구 (동물실험 포함)
- 전통누룩 유래 미생물·전통주 유효 성분의 항암·혈관 생성 억제 및 면역 활성 증진 효과 기전 연구
- 이를 응용하여 우리 농산물을 활용한 기능활성 최적 recipe/발효방식의 웰빙 식품 (주류) 개발

◆ 3차년도 (2008년)

- Structure elucidation 및 우리 농산물을 활용한 웰빙 식품에서 유효성분 검증·동정 시스템 확립
- 우리 농산물을 활용한 웰빙 식품에서 생리 기능활성 연구 및 검증 시스템 확립 (동물실험 포함)
- 우리 농산물을 활용한 웰빙 식품의 대량생산체계 확립 및 개발 컨셉 확립(음료, 장류 등)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 연구개발 대상의 국내·외 기술 현황

1. 서양의 기술개발 현황

- ◇ 서양의 와인은 90년대 초반, French paradox라는 현상 규명을 위해 생리 기능활성에 대한 연구가 시작되어 현재, 심도 깊은 연구가 전 세계적으로 수행 중
 - 와인의 생리 기능활성 물질인 폴리페놀성 화합물에 대한 유효 성분을 분리·동정
 - 폴리페놀 화합물 중 flavonol, anthocyanine hydroxybenzoic acid 등에서 라디칼 스캐빈저, NO 억제 등 항산화 활성 작용 기전 규명
 - 레드 와인의 폴리페놀성 화합물의 LDL 산화방지, 활성산소 스트레스 제거, 지방 및 지질 단백질 생합성 조절 등 관상 동맥성 질환 개선 효과 및 그 작용 기전 확립
 - 레드 와인의 폴리페놀성 화합물이 혈전 생성 억제 효과에 대한 작용 기작 규명
 - 와인·포도즙의 혈관 생성 억제 활성 등 항암에 대한 효과 규명
 - 항염증 활성에 대한 연구도 진행되어 페놀성 화합물이 COX-2 억제, T- & B-림프구 조절 및 기타 면역세포 활성 조절에 관여함을 확인
- ◇ 와인에 대한 생리 기능활성 연구 성과로 인하여 전세계적 와인의 매출이 폭발적으로 증대되었고 와인의 원료인 포도에 대한 많은 연구로 국가 정책적으로 포도 및 와인 산업을 육성하여 많은 경제적 이익을 창출
- ◇ 맥주에서도 생리 기능성에 대한 연구가 진행되고 있으며 맥주의 주원료인 홉의 주성분인 xanthohumole의 항암효과에 대한 연구사례 보고

2. 일본의 기술개발 현황

- ◇ 일본주 (청주, Sake), 국균 (Koji) 및 술지게미의 생리 기능활성에 대한 다양한 연구 진행 중
 - 청주에서 항산화 작용이 높은 ferulic acid을 동정하였으며 이는 와인의 hydroxycinnamic acid와 유사한 작용기전 확인
 - 청주의 고지에서 저분자 물질이 암 세포독성 효과 및 NK 세포의 활성 증가를 규명하였으며 임상 연구 결과, 청주 섭취 시 통계학적으로 암 발생률을 낮추는 효능 확인
 - 일본주 농축액은 방광·전립선·자궁암 조직에서 암 조직 괴사 및 응축 활성을 확인
 - 일본주 및 술지게미에서 펩타이드를 분리하여 안지오텐신 전환 효소 저해 활성 및 유로키나제 활성 증가에 관여해 혈전 생성 억제 효과를 확인하여 관상 동맥성 질환 억제 활성 규명
 - 일본주 펩타이드 성분이 혈전 용해 활성·HDL 생성 증가 및 LDL 산화 방지 효과도 확인
 - 청주의 succinic acid가 mast 세포에 의한 과민성 면역반응 억제 활성도 확인
 - 청주의 α -ethylglucoside와 kojic acid의 미용·미백효과 작용 기전도 규명

- ◇ 일본주를 섭취하는 지역에서 낮은 간 질환 발병률을 역학조사로 확인하였음.
- ◇ 이런 일본주 연구로 유효 생리 기능활성 물질을 대량으로 생산 가능한 방법이 확립되어 다수의 특허출원이 되었으며 일부 펩타이드는 치료제로써의 효과를 검증하고 있음.

3. 국내 기술개발 현황

- ◇ 건강기능성 식품 소재에 대한 연구·개발이 진행 중
- ◇ 전통주를 포함한 전통식품을 활용한 건강기능성 소재 및 식품에 대한 연구·개발은 미진
 - 전통식품과 관련된 건강 기능성 식품 개발은 기능성 주류 개발로 한정되어 있으나 기능활성에 대한 연구는 초보적 수준이며 특정 소재의 기능성을 활용·홍보하는 현실
 - 웰빙 또는 기능성 식품과 연계된 연구는 미진
 - 전통누룩 유래 미생물 및 전통주와 관련된 연구는 특정 소재를 이용한 기능성 주류 개발, 발효기술을 활용한 기능성 식품 개발, 또는 전통명주의 품질개선 연구가 중심으로 수행
- ◇ 생리 기능활성이 있는 소재 (주로 한약재)를 활용한 전통주에서 생리 기능활성 연구가 진행되나 항산화·혈전용해·미백활성 등에 국한된 기초 수준의 탐색 연구만 수행되고 있음
 - 전통누룩 유래 미생물의 생리 기능활성 연구는 고지방 섭취 마우스 모델에서 콜레스테롤·LDL 감소와 HDL 증가 효과를 확인
 - 본 연구팀은 전통누룩 유래 미생물의 생리 기능활성 선행연구 결과, 위보호 효과 및 심혈관계 질환의 일종인 지질대사에 관여하는 PPAR- α 의 효과를 확인하였고 혈관생성 억제 및 암 세포 전이 억제 활성화도 확인
- ◇ 하지만 이외 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 주요 생리 기능활성 성분에 대한 동정·분리 및 그의 기능활성에 대한 연구는 미비한 상황
- ◇ 국산 농산물을 활용한 제품 개발을 통한 직접적인 농가 소득 증대는 크지 않은 실정임

제 2 절 기술 개발의 기대 효과

1. 기술적 측면

본 연구과제 수행으로 유효 물질의 분리·동정 및 기능활성 효과 입증으로 세계학술잡지 투고/게재로 전통누룩과 전통주의 국내·외 연구 저변 확대가 가능하며 우리나라 전통누룩 및 전통주의 우수성을 인정받고 세계적인 명주로 인식될 수 있는 기반 구축도 가능할 것이다.

또한 우리 농산물을 활용한 농민 소득 증대를 위한 제품 개발 기술 확립이 될 것이며 전통누룩 및 전통주에서 분리·동정된 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리 기능활성 유효성분에 대한 유효성 및 안전성 실험을 통하여 신약개발에 대한 기본 자료를 제공할 수도 있을 것으로 기대된다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	성과 활용현황
토론토 대학 (캐나다) 카톨릭 대학 (이탈리아) 등	○생리 기능활성물질인 폴리페놀성 화합물의 유효 성분 분리·동정 ○와인·포도의 관상 동맥성 질환 억제 효과 ○와인·포도즙의 혈관생성 억제활성 등 연구 ○와인·포도즙의 항산화 및 항염증 효과	폴리페놀성 화합물 규명 논문게재 및 특허출원 등
(주)월계관, 교토대학 등	○일본주의 생리 기능활성 유효 분리·동정 ○일본주의 항산화·노화 방지 효과 연구 ○일본주·고지의 항암 효과 연구 ○일본주·술지게미의 펩타이드 분리 및 관상 동맥성 질환 억제 효과 ○일본주의 면역반응 억제활성 및 미백 효과	각 생리 활성별 유효성분의 특허·치료제 개발 중
배재대학교	○다양한 소재를 활용한 민속주 제조 및 생리기능성 ○전통주의 생리 기능성	소재를 활용한 민속주 개발
연세대학교	○전통약주의 세포성장 억제 효과	논문 게재
(주)국순당	○암세포에 대한 전통약주의 세포독성 효과 ○전통누룩 유래 미생물·전통약주의 위보호 효과	논문 게재

2. 경제적·산업적 측면

본 연구과제로 확립된 생리 기능활성별 유효성분의 분획·분리 체계와 생리 기능활성에 대한 특허출원이 가능하다. 또한 건강기능성·웰빙식품 산업에 활용으로 사장되어 가는 전통발효 식품의 위상을 재정립하며, 현대에 맞게 재가공하고 대량생산체계 확립하여 현대 식품 산업의 한 축으로 성장할 수 있다.

또한 웰빙주류 및 웰빙식품 개발 컨셉을 제공하여 우리 땅에서 재배한 농산물을 활용한 농민주 (전통주 기반) 및 전통발효 식품에 대한 전국민적 관심 증대와 전통누룩 유래 미생물 및 전통주를 소재·기반으로 한 신규 산업분야를 창출할 수 있으며 기능성 제품의 가치 향상으로 농민의 소득 증대와 신사업을 창출하는데 큰 기여를 할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절

세부과제: 전통누룩 유래 미생물·전통주의 심혈관계 활성 탐색 연구
및 웰빙식품 개발 -(주)국순당 김계원

1. ACE 저해 활성 탐색

가. 연구 수행 방법

Angiotensin-converting enzyme (ACE) 저해 활성은 50 μ l의 전통누룩 유래 미생물인 *Rhizopus oryzae* KSD-815 (이하 KSD-815) 및 전통주의 추출물을 rabbit lung acetone powder에서 추출한 ACE 용액 150 μ l와 기질 용매 (12.5 mM Hip-His-Leu) 50 μ l를 섞은 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 1 N HCl로 반응을 정지시켰다. 이 반응액에 유리되어 나온 hippuric acid의 양을 분광분석기로 228 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 후 이들 추출물을 첨가하지 않은 대조군에서 생성되는 hippuric acid양과 비교하여 저해활성을 계산하였다 [1]. 여기서 ACE 효소 활성의 1 unit는 37°C에서 1분 동안 1 μ M의 hippuric acid를 Hip-His-Leu로부터 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다.

나. *Rhizopus oryzae* KSD-815의 ACE 저해 활성

KSD-815의 4가지 추출물인 hexane (TAHe), ethylacetate (TAE), butanol (TAB), H₂O (TAH)에 대한 ACE 저해 활성을 평가한 결과, TAE 추출물에서 ACE 저해 활성 (77.7 \pm 9.34%)이 가장 높았으며 TAB, TAH 순으로 ACE 저해 활성을 나타내었다 (Fig. 1). TAHe는 저해활성이 없었다.

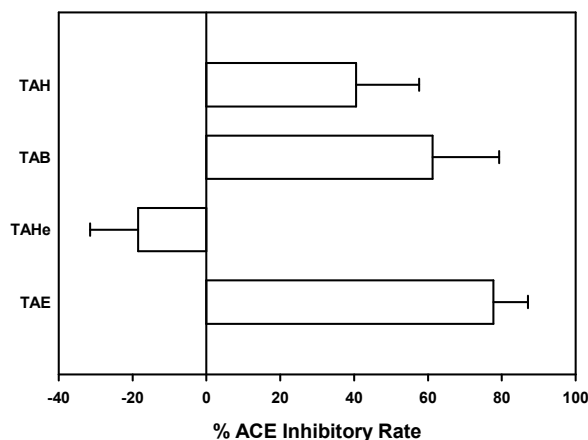


Fig. 1. ACE inhibitory activities of the extracts of *Rhizopus oryzae* KSD-815

TAE의 2차 분획에 대한 ACE 저해 활성을 측정한 결과, TAE subfractions은 전반적으로

높은 ACE 저해 활성을 나타내었으며 그 중 TAE#15에서 가장 높은 ACE 저해활성을 확인하였으며 TAE#12와 TAE#13도 TAE 분획물보다 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

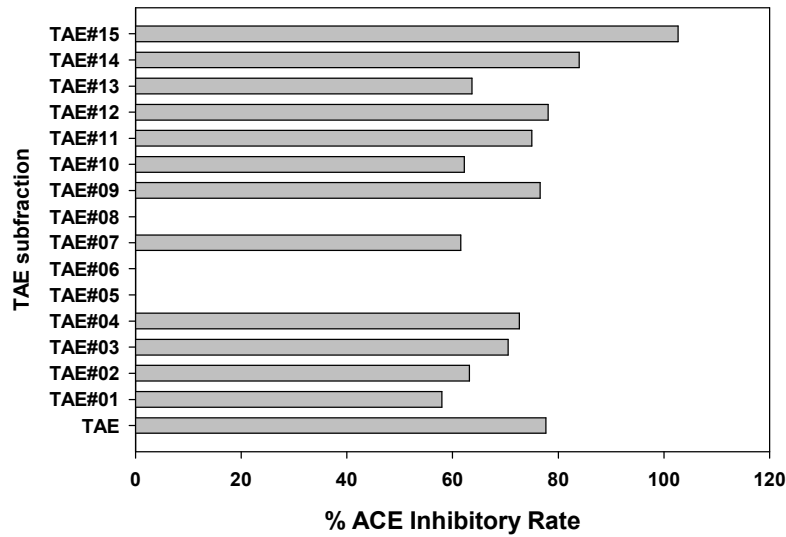


Fig. 2. ACE inhibitory activities of TAE subfractions

다. 전통주의 ACE 저해 활성

KSD-815을 이용하여 제조한 전통주의 3가지 분획물인 ethylacetate (BE), buthanol (BB), H₂O (BH)에 대한 ACE 저해 활성을 평가한 결과, 50 µg/ml 전통주 농축액 (B)에서 ACE 저해 활성 (95.833%)이 가장 높았으며 BE, BB, BH에서는 농축액 (B)보다 낮은 ACE 저해 활성을 나타내었다 (Fig. 3). 이는 전통주 BE 분획과 BB 분획의 시너지즘으로 농축액에서 높은 활성을 유도하는 것으로 사료된다.

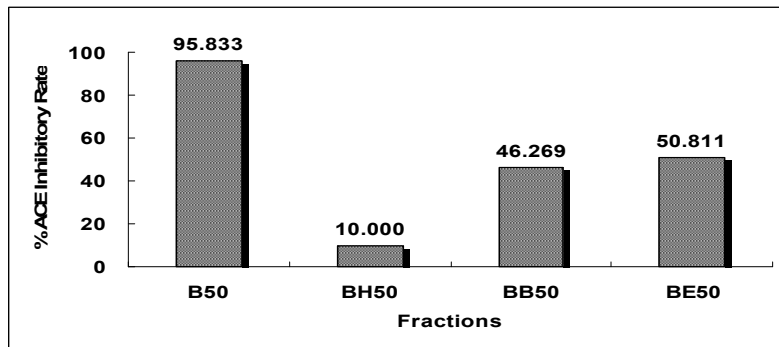


Fig. 3. ACE inhibitory effects of traditional wine fractions

이상의 ACE 저해 활성 결과, KSD-815의 TAE#12, TAE#13, TAE#15번에서 TAE 분획물보다 ACE에 대한 specific activity가 증가하는 경향을 확인하였다. 또한 전통주 농축물도 ACE 저해 활성을 확인하였다. KSD-815와 전통주 추출물 (분획)에서 ACE 저해 활성은 향후 여러 작용기전에 대한 규명을 통해 천연물 유래 고혈압 치료제로 개발 가능성을 시사한다.

2. *In vivo* 고지혈 개선 시험

가. 연구 수행 방법

High cholesterol diet (HC, 1.25% cholesterol + 0.5% cholic acid)를 1주일간 feeding하고 HC 사료를 유지하면서 KSD-815 분획을 4일간 투약하였다. 4일째, 투약한 1 시간 후 동물을 에테르 마취 후 복대 정맥을 통하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 7,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 serum에서 혈액생화학적 검사 (HDL, LDL & total cholesterol, TGs, glucose)를 수행하였다 [2].

나. *Rhizopus oryzae* KSD-815 분획의 고지혈 개선 활성

KSD-815의 ethylacetate 분획의 고지혈 개선 약효 평가를 HD 동물모델에서 수행하였다 (Fig. 4). 그 결과, HD에 의해 LDL 및 total cholesterol이 유의적으로 증가하였으며 실험군간 체중은 비슷한 수준으로 다소 증가하였다. 고지혈치료제로 사용되는 양성대조물질인 Gemfibrozil [3]에 의해 LDL 및 total cholesterol이 각각 39%, 28% 감소하였다. KSD-815의 ethylacetate 분획에 의해 LDL 및 total cholesterol이 각각 38%, 35% 저해되었다. 즉 KSD-815의 ethylacetate 분획은 Gemfibrozil과 고지혈 개선에서 동등한 *in vivo* potency를 나타냄을 확인하였다.

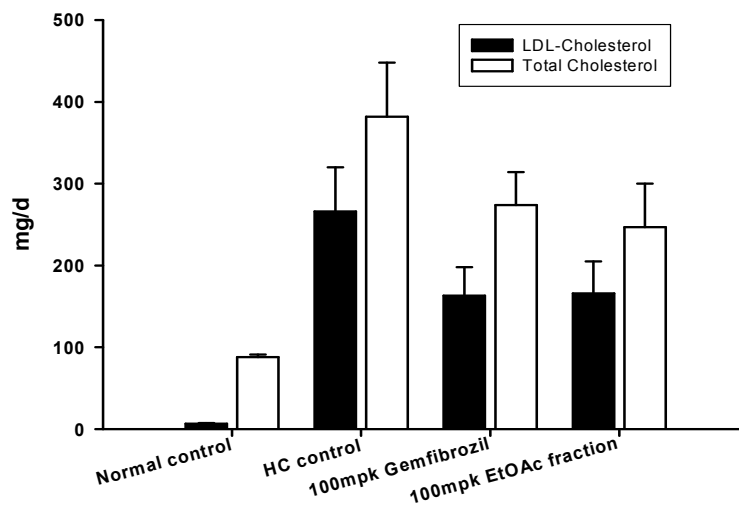


Figure 4. Effects of EtOAc fraction on LDL- and total-cholesterol

3. Human PPAR α / γ gene reporter assay

가. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)

PPAR은 핵 내 존재하는 수용체이면서 ligand와 결합함으로써 단백질구조가 변화하여 특정 유전자의 promoter region에 있는 PPAR response element (PPRE)에 결합하여 특정 유전자의 발현을 조절하는 transcription factor로서 작용한다. PPAR은 α , δ (β), γ 의 세 종류의 subtype이 존재하며 PPAR- γ 작용약은 당뇨치료제로서, PPAR- α 작용약은 지질대사 개선제로서 시판되고 있다. PPAR- α 에 의한 지질대사 개선은 LDL-cholesterol, triglyceride를 낮추는 것이 주 작용이다 [3, 4].

나. 연구 수행 방법

Monkey kidney cell인 CV-1을 seeding 후 24 시간 배양하였다. Human PPAR- α 또는 - γ 의 ligand binding domain (LBD)을 발현하는 expression vector와 reporter vector, transfection 보정을 위한 control vector 각 3종의 plasmid DNA를 Lipofectamine reagent를 이용하여 37°C 배양기에서 3 시간 동안 처리하여 세포 내로 삽입하였다. 상등액을 제거하고 약물을 포함하는 새 배지로 교체하고 24 시간 동안 37°C 배양기에서 KSD-815과 전통주 추출물(분획)을 처리하였다. 24 시간 후 Dual luciferase reagent를 이용하여 각각 추출물(분획)이 PPAR에 작용한 후 일련의 작용으로 증가하는 reporter vector에서 발현 유도된 Firefly luciferase 활성[A]을 측정하였다. Cotransfection된 control vector에서 발현된 Renilla luciferase 활성[B]을 측정하여 well간 transfection 효율의 차이를 보정하였다. 각 반응의 Firefly luciferase 활성을 Renilla luciferase 활성으로 나눈 값을 이용하여 양성대조물질인 GW409544 (PPAR- α /- γ dual, full agonist)처리군 반응성에 대한 백분율 (Relative Response %)로 나타내었다.

다. *Rhizopus oryzae* KSD-815 및 전통주의 human PPAR- α /- γ 전사활성

KSD-815의 MeOH 추출물과 전통주 농축물 (B)에 대한 human PPAR α / γ 에 대한 전사활성을 평가한 결과, KSD-815의 MeOH 추출물만 human PPAR α 에 대한 선택적으로 농도의존적인 증가를 확인하였다 (Table 1).

Table 1. Effects of extract and concentrate on human PPAR- α /- γ

	hPPAR α (RR%)	hPPAR γ (RR%)
누룩 유래 미생물의 MeOH 추출물	67.3%	5.5% (NS)
전통주 농축물 (B)	0.0%	1.0% (NS)

§ NS : Not significant

라. KSD-815 분획별 human PPAR- α /- γ 활성

(1) 1차분획의 human PPAR- α /- γ 활성

KSD-815의 EtOAc, BuOH, H₂O 분획에 대한 hPPAR α 전사활성을 측정한 결과, EtOAc 분획에서 높은 hPPAR- α 전사활성을 확인하였으며 BuOH과 H₂O에서는 300 μ g/ml 농도까지 유의적 활성이 나타나지 않았다 (Fig. 5). EtOAc 분획과 MeOH 추출물은 full agonism을 나타내었으며 EC₅₀ (최대반응의 50% 활성을 나타내는 농도)을 산출한 결과 10-50 μ g/ml 수준의 potency를 나타냄을 확인하였다. 이런 EtOAc의 PPAR에 대한 효과는 고지혈 개선 활성과 연관있는 것으로 사료된다 [5].

(2) EtOAc 2차분획의 human PPAR- α /- γ 활성

활성이 가장 우수한 EtOAc 분획을 hexane과 ethylacetate을 이용한 2차 분획 (TAHe와 TAE)의 PPAR- α 전사활성을 측정한 결과, EtOAc 분획과 TAHe, TAE의 활성차이를 비교하여 산출된 EC₅₀은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났으나, 최대반응에서 EtOAc 분획 = TAHe > TAE의 순으로 TAHe에서 확실한 전사활성 증가한 경향을 확인하였다 (Fig. 6).

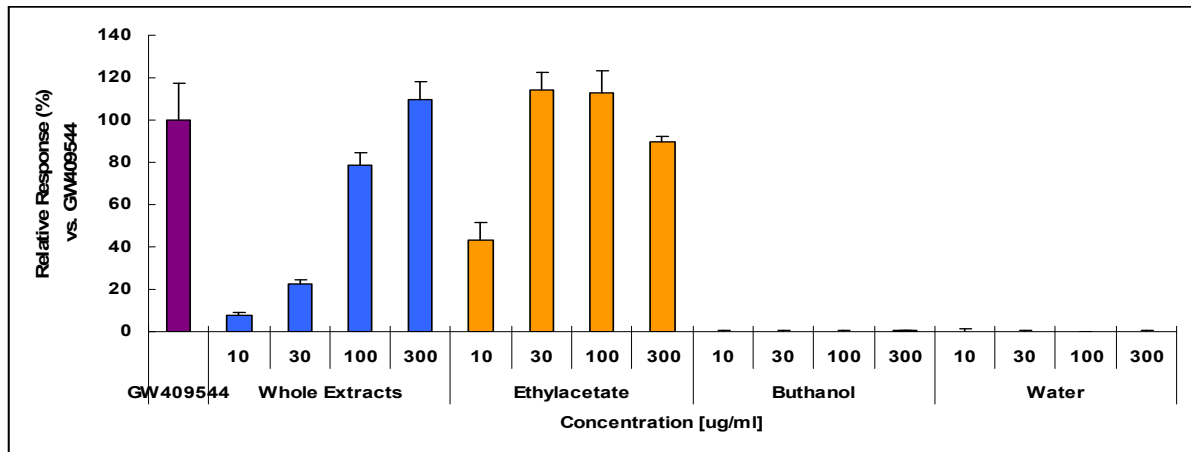


Figure 5. Effects on the PPAR- α transactivation activity. Among 4 extracts, only ethylacetate extracts significantly and selectively induced the human PPAR- α transactivation in reporter gene assay.

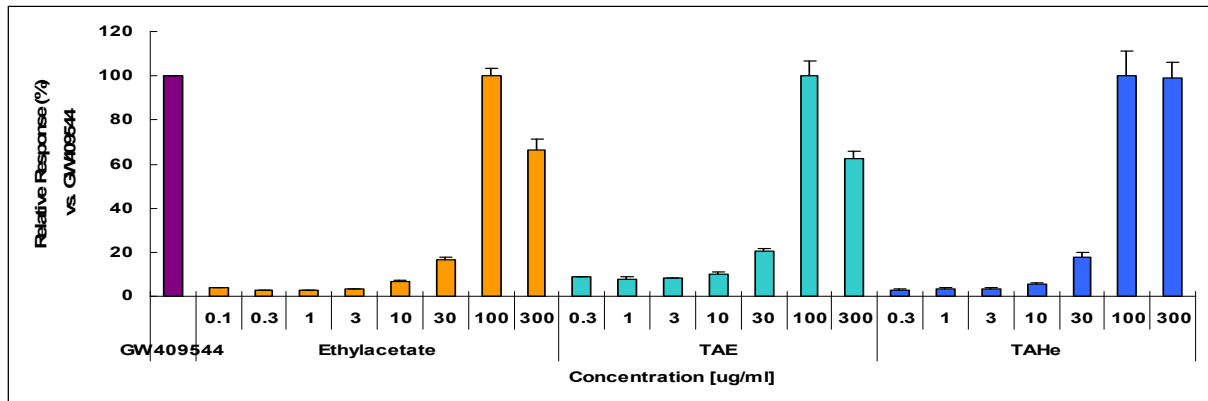


Figure 6. Effects of ethylacetate, TAE, and TAHe on the PPAR α transactivation activity.

(3) TAHe 분획별의 human PPAR- α / γ 활성

TAHe 분획의 15개 subfractions에 대한 PPAR- α 전사활성을 평가하였다 (Fig. 7). TAHe#04와 TAHe#05는 TAHe 동등 수준의 potency를 가지면서 hPPAR- α full agonism을 나타내었다. TAHe#01과 TAHe#03은 약 58 $\mu\text{g/ml}$ 의 EC50을 가지면서 각각 24%, 62%의 maximum response를 나타내었으나 고농도에서 반응의 plateau를 나타내어 partial agonism의 경향을 확인하였다. TAHe#09~15 중 TAHe#11만 제외하고 25~45 $\mu\text{g/ml}$ 수준의 EC50값을 나타내면서 hPPAR- α 에 대한 full agonism으로 확인되었다.

Human PPAR- α 에서 활성이 증가한 경향을 확인함에 따라 이들이 초회 분획에서 PPAR- γ 활성이 나타나지 않았더라도 분획과정에서 함량이 증가한 성분에 의한 PPAR- γ 활성 증가가 나타날 가능성이 있으므로 이를 확인하고자 human PPAR 전사활성을 평가하였다 (Table 2). TAHe 에서 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 15% 수준의 미미한 활성을 나타내던 결과와 달리, PPAR- γ 에 대한 전사활성이 전반적으로 상승한 경향을 확인하였다. TAHe#12의 PPAR- γ 전사활성이 가장 높았으며 70% 수준의 최대반응으로 partial/full agonist 분류의 경계수준의 반응성을 보였다 [6]. 따라서 TAHe#12는 human PPAR- α / γ dual agonism을 나타내는 것으로 사료된다. 또한

TAHe#13, 14, 15는 human PPAR- α 에 대한 full agonist이면서 human PPAR- γ 에 대한 partial agonism을 나타내는 것으로 확인하였다.

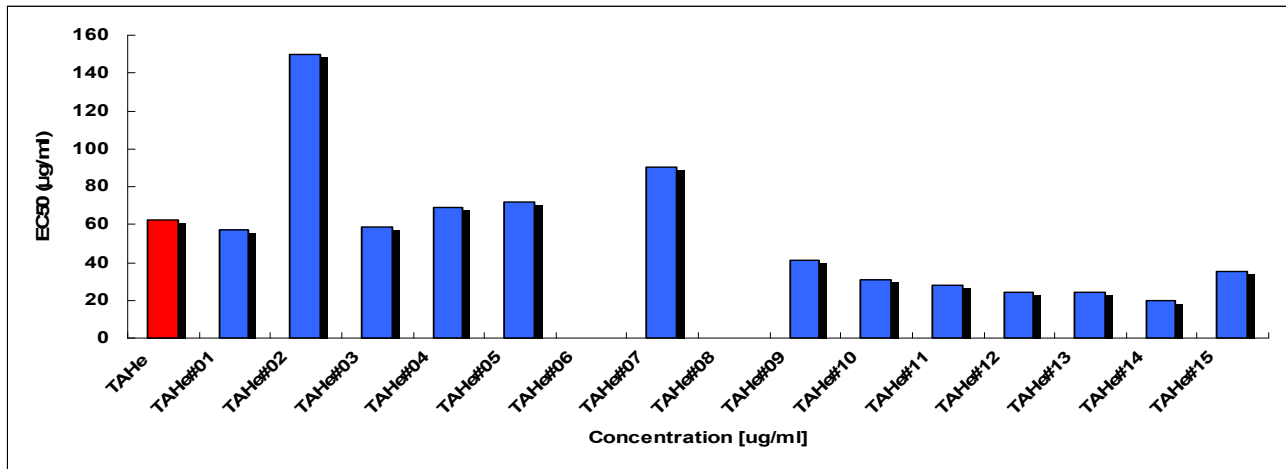


Figure 7. EC50 value of TAHe subfractions on the PPAR- α transactivation activity.

Table 2. Effects of TAHe subfractions on the human PPAR α / γ transactivation activity.

	TAHe#09		TAHe#10		TAHe#11		TAHe#12		TAHe#13		TAHe#14		TAHe#15	
	μ g/ml	EC ₅₀	Max%	EC ₅₀	Max%	EC ₅₀	Max%	EC ₅₀	Max%	EC ₅₀	Max%	EC ₅₀	Max%	EC ₅₀
hPPAR α	41.1	98%	31.0	74%	28	54%	23.9	105%	24.2	87%	19.7	99%	35.3	150%
hPPAR γ	29.1	15%	48.9	39%	ND	15%	27.8	68%	19.8	16%	24.1	31%	25.4	33%

4. Hexane 유래 지방산의 지질대사 개선 활성

가. *Rhizopus oryzae* KSD-815에서 분리한 지방산의 PPAR 전사활성

KSD-815의 hexane 분획에서 분리·정제한 지방산 (fatty acid) 6종에 대한 PPAR- α / γ 에 대한 전사활성을 기반으로 한 지질대사 개선 활성을 평가하였다 (Table 3).

Table 3. Fatty acids purified from the hexane fraction of *Rhizopus oryzae* KSD-815

Code명	Structure name	Molecular weight	Remarks
TAHe#2-4	9,12,15-octadecatrienoic acid	292.46	Single compound
TAHe#2-7	γ -linolenic acids, methyl ester & linoleic acid, methyl ester		mixture
TAHe#2-8	not identified		mixture
TAHe#2-11	methyl palmitate	270.45	Single compound
TAHe#4-2	5,8,11-heptadecatrienoic acid	278.43	Single compound
TAHe#4-6	linoleic acid	280.46	Single compound
TAHe#4-10	palmitic acid	256.43	Single compound

지방산에 대한 PPAR- α 전사활성은 TAHe#2-7 > TAHe#2-8 > TAHe#4-10의 순으로 활성을 증가시켰다 (Fig. 8). 각 지방산의 EC50 값은 TAHe#2-7은 10 μ g/ml보다 작은 것으로 추정되며 TAHe#2-8이 15.2 μ g/ml, TAHe#4-2가 8.34 μ g/ml, TAHe#4-6이 9.75 μ g/ml로 측정

되었다. 또한 동일한 지방산이 허용하는 최대농도를 포함하는 구간에서 PPAR- γ 에 대한 활성을 검색한 결과, TAHe#2-7은 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 평가에서 반응이 plateau에 도달하였고, 78%의 최대반응을 나타내어 full agonist에 가까운 PPAR- γ 전사활성을 확인하였다. TAHe#2-4, TAHe#2-8, TAHe#4-2, TAHe#4-6은 20~50 $\mu\text{g/ml}$ 사이에서 40~50% 수준의 반응성을 나타내었으며, 농도구간의 한계로 반응의 saturation 여부를 확인할 수 없어 full 또는 partial agonist 여부에 대한 판정이 불가능하였다. 그리고 TAHe#2-11과 TAHe#4-10은 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 최대 검색농도에서 유의적인 전사활성 증가를 나타내지 않았다 (Fig. 9).

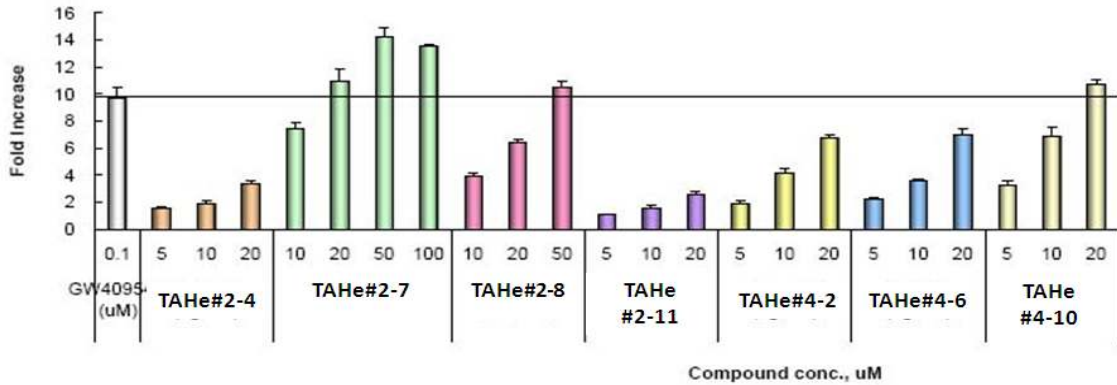


Figure 8. The effects of fatty acids on PPAR- α transactivation activity.

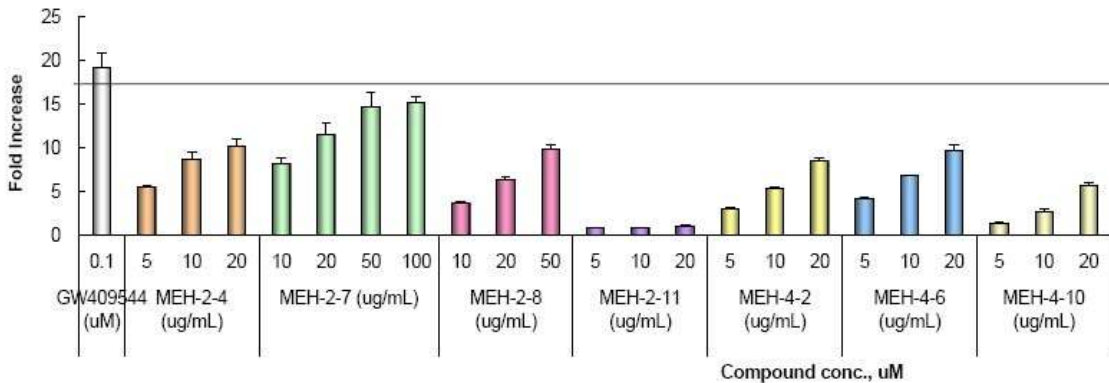


Figure 9. The effects of fatty acids on PPAR- γ transactivation activity

이상의 결과를 종합하면, 아래 table 4과 같다.

Table 4. Summary of the effects of fatty acids on PPAR- α / γ activities

	TAHe-2-4		TAHe-2-7		TAHe-2-8		TAHe-4-2		TAHe-4-6		TAHe-4-10	
	EC ₅₀	Max	EC ₅₀	Max	EC ₅₀	Max	EC ₅₀	Max	EC ₅₀	Max	EC ₅₀	Max
hPa	ND	27	<10	152	15.2	109	8.34	66	9.75	69	8.14	112
hPg	<10	50	<10	78	15	49	7.64	41	6.38	48	ND	25

TAHe#2-7 > TAHe#2-8 > TAHe#4-6 > TAHe#4-2 > TAHe#2-4 (PPAR- α 활성 順)는 PPAR- α - γ dual agonism의 특징을 가지며 TAHe#4-10은 PPAR- α dominant agonism을 확인하였다.

나. Hexane 분획에서 분리한 지방산의 ApoA1 발현 영향 평가

PPAR 전사활성 결과를 바탕으로 5가지 지방산 (TAHe#2-7, TAHe#2-8, TAHe#4-2, TAHe#4-6, TAHe#4-10)이 high density lipoprotein (HDL)을 구성하는 아포단백의 발현에 미치는 영향 평가를 수행하였다. 인간 간암세포주인 HepG2에 각 지방산을 72시간 동안 처리하고 마지막 48시간 동안 배지 중으로 유리된 ApoA1을 ELISA 방법 [7]을 사용하여 정량하였다 (Fig. 10).

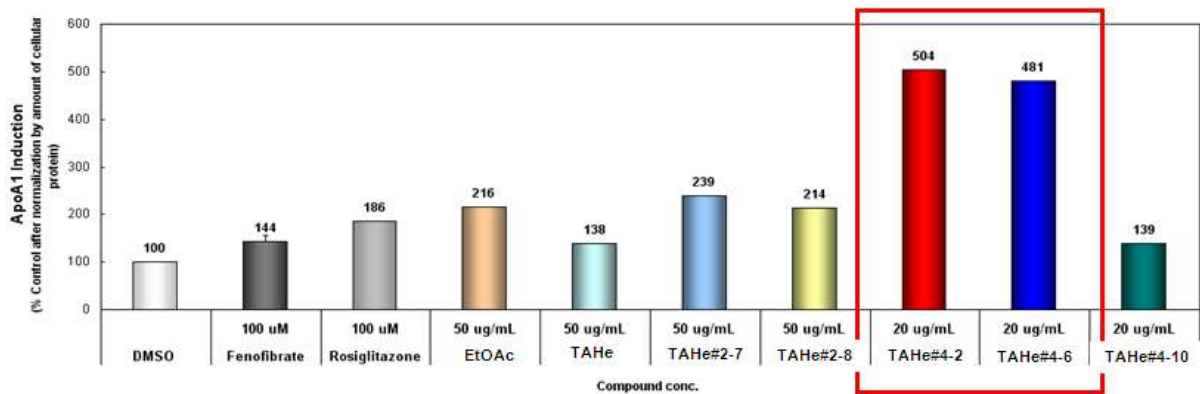


Figure 10. The effects of fatty acids on the induction of ApoA1

평가한 지방산 모두 고지혈 치료제인 fenofibrate와 PPAR- γ agonist로 사용되는 rosiglitazone과 비교하였을 때 [8], 동등 이상 수준의 ApoA1 유도활성을 확인하였다. ApoA1 유도 활성은 TAHe#4-2 > TAHe#4-6 > TAHe#2-7 > TAHe#2-8 > TAHe#4-10의 순으로 확인하였다. 특히, TAHe#4-2와 TAHe#4-6은 fenofibrate 대비 탁월한 효과를 확인하여 추가 농도 의존성 평가를 수행하였다.

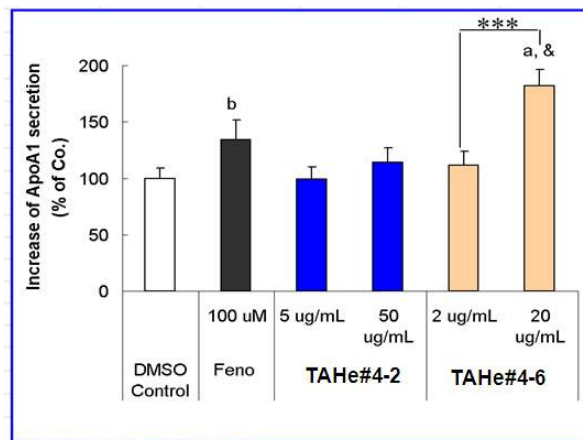


Figure 11. The effects of TAHe#4-2 &4-6 on the induction of ApoA1

TAHe#4-2와 TAHe#4-6은 농도의존적이며 fenofibrate [9] 동등 이상의 ApoA1 유도 활성을 확인하였다 (Fig. 11). 특히 TAHe#4-6이 명확한 농도의존적 유도 활성이 유의적 수준에 있음을 확인하였다.

다. Hexane 분획에서 분리한 지방산의 CYP 저해활성 평가

TAHe#4-2와 TAHe#4-6에 대한 주요 약물대사 효소 5종에 대한 저해활성 평가를 통해 임상에서 약물상호작용을 나타낼 가능성을 평가하였다. 실험방법으로 *in vitro* enzyme inhibition assay를 수행하여 fluorometry로 측정하였다 (Fig. 12).

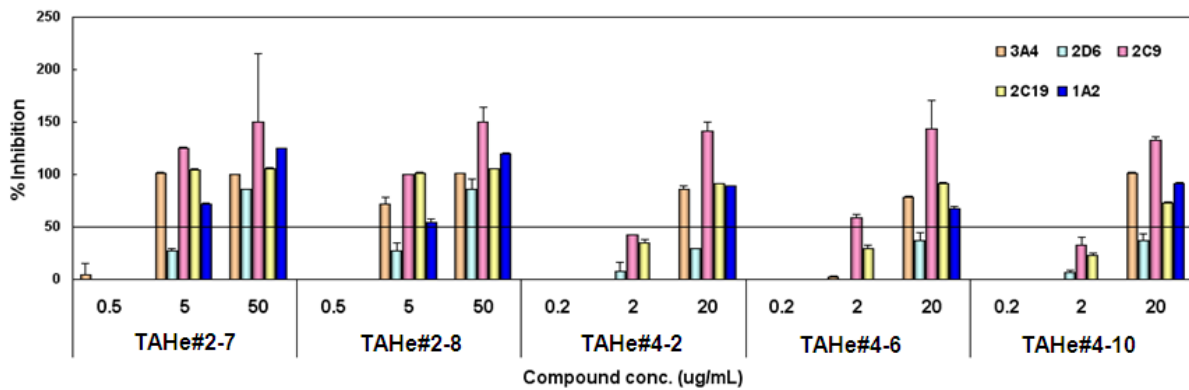


Figure 12. The effects of fatty acids on CYP inhibition

평가한 지방산 모두 농도의존적인 CYP 저해 활성을 나타내었다. 하지만 ApoA1 유도활성이 높은 TAHe#4-2와 TAHe#4-6은 약물대사 효소인 주요 CYP 5종에 대한 저해활성이 TAHe#2-7, TAHe#2-8에 비해 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 종합하면 (Table 5), TAHe#4-2와 TAHe#4-6은 PPAR- α agonist 활성을 가지고 있으며 (PPAR- α - γ dual agonist) 타 분획 및 물질에 비해 약효 및 약물상호작용 측면에서 장점을 가지는 것으로 판단된다 [10]. 이를 근거로 임상 적응증을 고려할 때, 고지혈증 치료제의 접근 가능성이 있다고 사료된다.

Table 5. Summary of the effects of TAHe#4-2 and TAHe#4-6 on hyperlipidemia

	hP α		hP γ		hApoA1	hCYPs inhibition (EC ₅₀ μ g/ml)				
	EC ₅₀	MAX%	EC ₅₀	MAX%		3A4	2D6	2C9	2C19	1A2
TAHe #04-2	8.34	66	7.64	41	504	8.2 (34 μ M)	> 20 (83 μ M)	2.4 (9.9 μ M)	3.8 (15.8 μ M)	8.0 (33.2 μ M)
TAHe #04-6	9.75	69	6.38	48	481	8.5 (30.4 μ M)	> 20 (71.4 μ M)	< 2.0 (7.1 μ M)	4.3 (15.4 μ M)	12.1 (43.2 μ M)

5. 전지방 세포 분화 억제 활성

가. 연구 수행 방법

마우스 전지방세포주인 3T3-L1은 10% FBS, 3.7 g/L NaHCO₃, 3.6 g/L 15 mM HEPES,

100 U/mL penicillin G, 100 ug/mL streptomycin을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다 (GM). 3T3-L1을 48-multiwell plate에 4×10^4 cells/well/1ml로 seeding한 후 48 시간 동안 37°C, 10% CO₂ humidified 배양기에서 배양하였다. 4×DM을 조제한 후, 1.5 ml microtube에 1.0 ml씩 분주하였다. 대조약물인 Rosiglitazone 또는 KSD-815 분획의 1000× DMSO stock을 조제하여 4×DM에 4 µl씩 가하여 4×약물용액을 조제하였다. Plate에서 배지를 제거한 후, 신속하게 GM 750 µl를 각 well에 첨가하였다. 4×DM과 약물을 각 250 µl씩 가하였다. 2일과 5일째에 배지를 4×PM으로 교체하였다. 7일째에 배지를 모두 제거하고 Oil-Red O 염색을 통하여 전지방세포의 분화를 형광분광계를 활용하여 측정하였다.

나. 전지방 세포 분화 탐색

전지방 세포 분화 억제제 활성은 human PPAR α 전사활성과 큰 상관성이 있어 hPPAR α 의 활성이 가장 우수한 TAE 분획물에 대한 농도의존적인 전지방 세포 분화 억제 활성을 평가하였다 (Fig. 13). Differentiation medium으로 전지방 세포에 분화를 유도한 조건에서 *Rhizopus oryzae* KSD-815의 EtOAc 분획물은 전지방 세포 분화 억제에 영향을 주지 못하였다. 또한 Human PPAR γ agonist인 Rosiglitazone을 처리한 조건에서 전지방 세포 분화는 EtOAc 분획물의 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 이 결과는 EtOAc 분획물은 증가된 hPPAR α 전사활성으로 AMP-activated protein kinase (AMPK)와 같은 다른 작용기전을 통해 작용한다는 것을 의미한다.

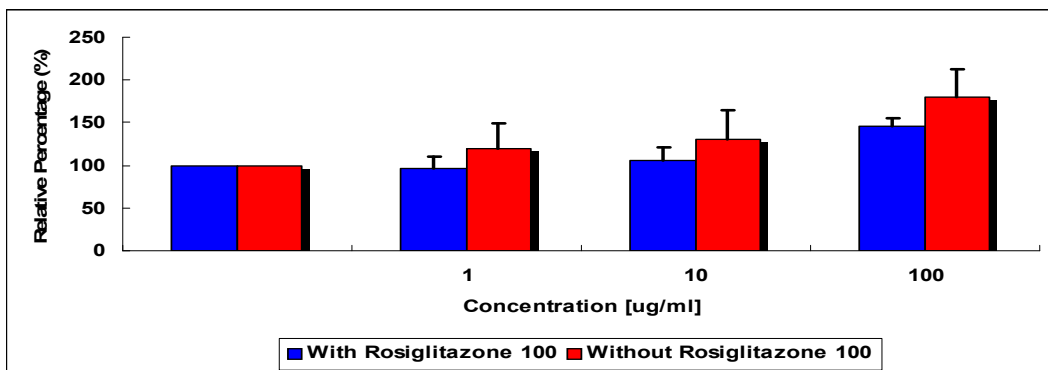


Figure 13. The effects of TAE fraction on the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte.

KSD-815의 EtOAc 분획에서 전지방세포 분화 억제 활성이 나타나지 않았더라도 분획과정에서 함량이 증가한 성분에 의한 억제 활성 증가할 가능성이 있으므로 hPPAR α 전사활성이 높은 TAHe subfractions에 대한 전지방 세포 분화 억제 활성을 탐색하였다 (Fig. 14). TAHe에 대한 subfractions도 전지방 세포 분화 억제 활성은 나타나지 않았다.

전통주 추출물 (B) 및 3가지 분획 (BE, BB, BH)에 대한 전지방 세포 분화 억제 활성을 평가하였다 (Fig. 15). Human PPAR γ agonist인 Rosiglitazone을 differentiation medium과 같이 처리한 조건하에서 전통주 추출물 및 그의 3가지 분획은 50 µg/ml의 최고 농도에서 전지방 세포의 분화 억제 활성을 나타내지 않았다.

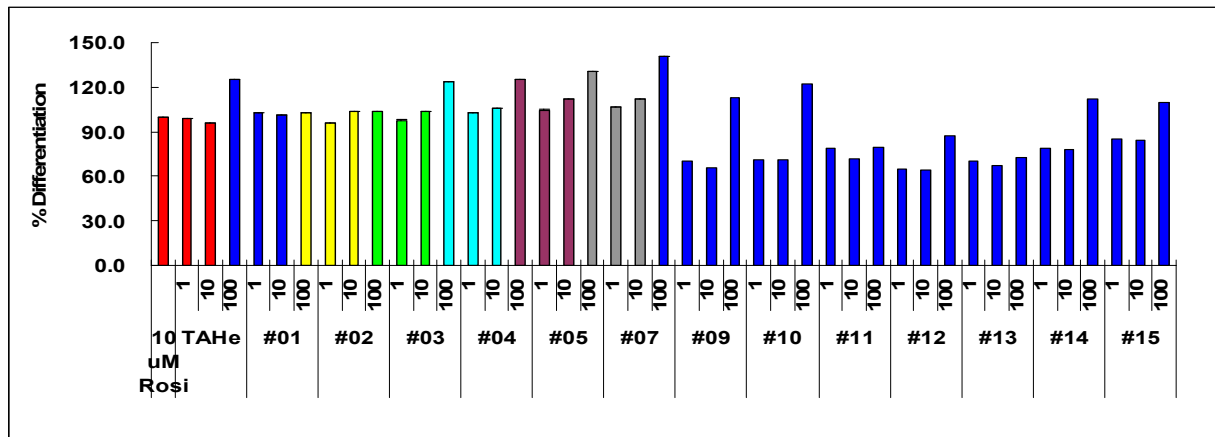


Figure 14. The effects of TAHe subfractions on the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte.

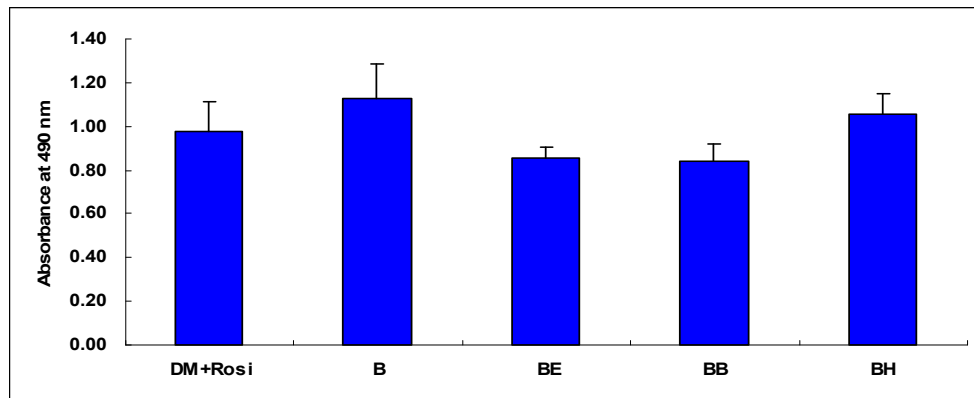


Figure 15. The effects of the fractions of traditional wine on the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte.

6. *Rhizopus oryzae* KSD-815로부터 분리·동정한 sterol 및 sphingolipid류의 심혈관계 개선 활성 평가

가. Sterol과 sphingolipid의 PPAR 전사활성 영향 평가

KSD-815의 hexane과 butanol 분획으로부터 다음과 같은 물질을 분리·정제하고 구조를 동정하였다. Hexane 분획에서 TAHe#11-4-6 (5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol)을 분리하였으며 butanol 분획에서 TAB#2-5 (The mixture of daucosterol & ergosta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β , 9 α -tetraol), TAB#4-7-3 (glycosphingolipid), 그리고 TAB#4-8 (monoglycosyl monoglyceride)를 동정하였다.

TAHe#11-4-6 (5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol), TAB#2-5 (The mixture of daucosterol & ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β ,9 α -tetraol), 그리고 TAB#4-7-3 (glycosphingolipid)에 대한 PPAR 전사활성 평가를 수행하였다 (Fig. 16).

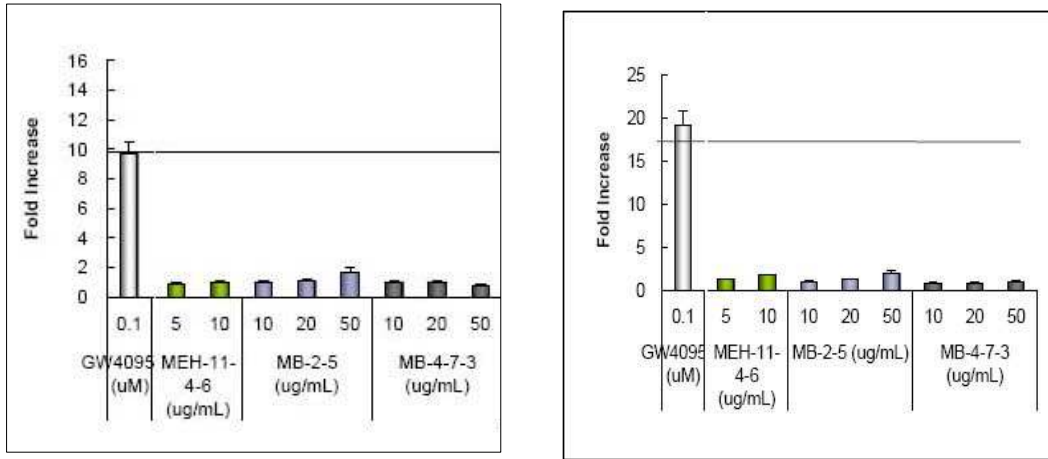


Figure 16. The effects of sterols on PPAR- α /- γ transactivation

Fig. 16과 같이, 평가한 3종의 sterol은 PPAR- α 또는 PPAR- γ 에 대한 어떤 전사활성에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 즉, 이 sterol은 모두 고지혈증 개선 활성이나 당뇨병치료에 효과가 없는 것으로 사료된다.

나. Sterol과 sphingolipid류의 전지방세포 분화 억제 평가

TAB#4-8 series와 TAB#4-7-3, 그리고 TAB#2-5-4에 대한 전지방 세포 분화 억제를 Oil Red O 염색을 이용하여 측정한 결과, TAB#4-5가 20 μ M의 농도에서 약 40% 정도 분화억제를 유도하였으나 나머지 물질은 효과가 없는 것으로 확인하였다 (Fig. 17). 또한 Oil Red-O로 염색하여 분화된 3T3-L1 세포를 관찰한 결과, TAB#4-5를 처리한 군에서 현격하게 lipid droplet형성이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 18). 이는 TAB#4-5가 전지방 세포 분화를 억제시키는 활성을 가지고 있으며 비만 치료 또는 예방에 대한 접근성을 가지고 있다고 사료된다.

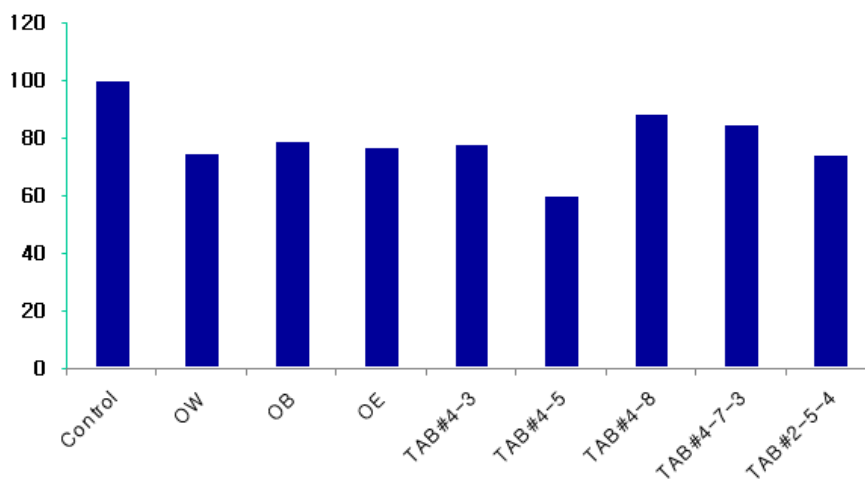


Figure 17. Inhibitory effects of compounds from butanol fraction on differentiation of 3T3-L1

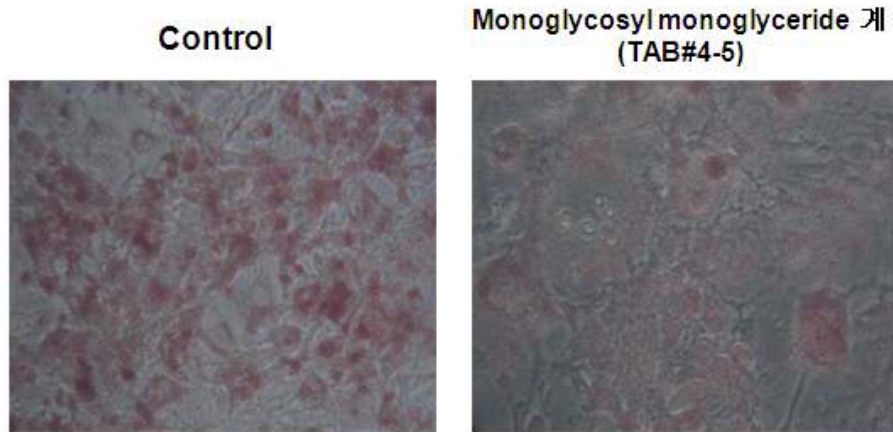


Figure 18. The effect of TAB#4-5 on differentiation of 3T3-L1 stained by Oil Red O.

7. 식초음료 개발을 위한 발효 조건 확립

식초음료 개발을 위해 *Rhizopus oryzae* KSD-815를 이용하여 발효 조건 및 기법을 확립하였으며 이 시제품을 이용하여 심혈관계 활성 중 혈전생성억제 활성 (위탁연구과제)을 평가하였다.

가. Seed 배양

- (1) 배지 : yeast extracts 1%, glucose 5%, ethanol 3%
- (2) 배양조건 : 37°C, 170 rpm, 48시간 배양

나. 초산발효 액체 배양

- (1) 배지 : yeast extracts 1%, (NH₄)₂PO₄ 0.06%, glucose 5%, ethanol 3%
- (2) 배양 조건 : 37°C, 170 rpm, 9일 배양

다. 식초 발효

(1) 국순당 술을 활용한 초산발효

(가) 배지: 알코올 농도가 최종 5%가 되도록 멸균된 증류수로 희석한 후, 포도당 5% 농도로 첨가하여 발효

(나) 조건: flask의 경우, 배지 150 ml (/250 ml baffled flask)에서 30°C, 170 rpm, 12 일 발효를 하였으며 5 L Jar fermentor의 경우, working volume 2.1 L, 30°C, 300 rpm, 0.5 vvm 조건으로 9일 발효

(2) 국순당 술 주박을 이용한 초산발효

(가) 배지: 알코올 5%, 포도당 5%에 주박 16.7%의 농도가 되도록 첨가한 후 발효 진행

(나) 조건: flask의 경우, 배지 150 ml (/250 ml baffled flask)에서 30°C, 170 rpm, 12 일 발효를 하였으며 5 L Jar fermentor의 경우, working volume 2.1 L, 30°C, 300 rpm, 0.5 vvm 조건으로 9일 발효

8. 쌀음료 개발을 위한 조건 확립

식초음료 개발을 위해 *Rhizopus oryzae* KSD-815를 이용하여 발효 조건 및 기법을 확립하였으며 이 시제품을 이용하여 심혈관계 활성 증 혈전생성억제 활성 (위탁연구과제)을 평가하였다.

가. 실험군

- (1) 전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815
- (2) 전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815 : 10배 강화 첨가군

나. 제조방법 및 recipe

(1) 제조방법

일반미를 세척하여 실온(25℃)의 물에 2시간 불린 후, 1시간 탈수하여 증기로 쌀을 찌서 쌀음료 원료로 사용하였다. 5% *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물을 제조하여 이용하였다. 분량의 재료를 고루 섞어 40℃에서 24시간 동안 당화시켰다. 분석은 3시간마다 실시하였으며, 당화 후 간단한 소비자 기호도 검사를 통해 두 시료를 비교하였다.

(2) Recipe

재료	추출물 첨가군	10배 강화 첨가군
일반미	1000g	1000g
5% KSD-815 추출물	133.3ml	1333.3ml
DW	2866.7ml	1666.7ml

다. 결과

(1) 발효 profile

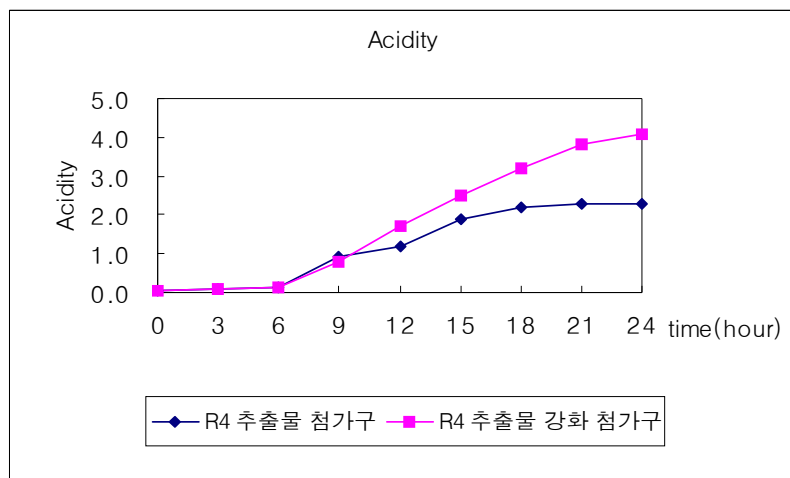
(가) *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물 첨가군

시간	산도	RS	Lac	Dex	Brix
0	0.04	0.7	0.00	0.8	0
3	0.07	30	0.00	25.3	3.6
6	0.13	68	0.08	65.6	10
9	0.9	92	0.06	88.2	12.1
12	1.2	114	0.03	116.0	13.8
15	1.9	148	0.42	147.0	17.9
18	2.2	164	0.54	162.0	18.1
21	2.3	164	0.83	163.0	18.8
24	2.3	169	0.85	166.0	18.9

(나) *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물 10배 강화 첨가군

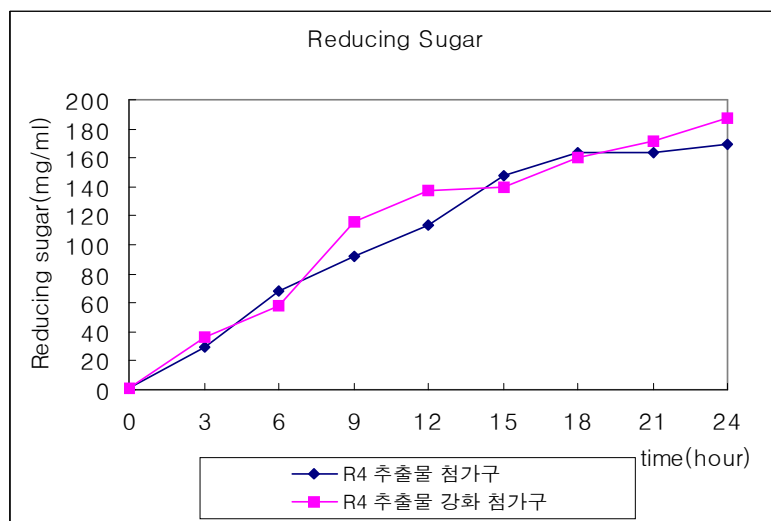
시간	산도	RS	Lac	Dex	Brix
0	0.04	0.7	0.00	0.8	0
3	0.08	36.8	0.01	26.2	4
6	0.13	58	0.02	32.6	6
9	0.8	116	0.14	93.1	13
12	1.7	138	0.63	120.0	15
15	2.5	140	1.12	135.0	16.5
18	3.2	160	1.37	154.0	18
21	3.8	172	1.68	168.0	19
24	4.1	188	1.87	172.0	19

(다) 산도 변화



산도는 *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물 첨가군 및 추출물 강화 첨가군 모두 0.04로 나왔으며, 당화 9시간 이후부터는 점차 차이를 보여 24시간 당화 완료 후에는 *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물 첨가군은 2.3 그리고 추출물 강화 첨가군은 4.1로 큰 차이를 보였다.

(라) 환원당 변화



환원당은 *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물 첨가구 및 추출물 강화 첨가구 모두 0.7 mg/ml로 나왔으며, 당화 9시간 이후부터는 점차 차이를 보여 24시간 당화 완료 후에는 *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물 첨가구는 169 mg/ml 그리고 추출물 강화 첨가구는 188 mg/ml로 큰 차이는 나타나지 않았다.

(마) 소비자 기호도 검사

본 소비가 기호도 검사는 국순당 직원 72명을 대상으로 실시하였으며, 기호도 및 활용방안을 조사하였다.

		A(R4 100%)	B(R4 1000%)	차 이 (A 평균 - B 평균)
전 체	전 체 (72명)	4.68	4.07	0.61
	남 (55명)	4.67	4.16	0.51
	여 (16명)	4.63	3.75	0.88

○ 전체적으로 봤을 때에는 A와 B (10배 강화군) 모두 보통 수준으로 평가되었으며, B보다는 A의 기호도가 좀 더 높게 평가되었다.

○ A와 B 모두 여성 보다는 남성이 좀 더 좋아하는 것으로 나타났으며, 특히 여성은 B의 경우 보통 이하로 평가했다.

		A(R4 100%)	B(R4 1000%)	차 이 (A 평균 - B 평균)
20대	전 체 (18명)	4.74	3.89	0.85
	남 (6명)	5.00	4.17	0.83
	여 (12명)	4.50	3.75	0.75
30대	전 체 (45명)	4.67	4.13	0.54
	남 (41명)	4.63	4.17	0.46
	여 (4명)	5.00	3.75	1.25
40대	남 (7명)	4.29	4.14	0.15

○ 전반적으로 A가 B보다 높게 평가되었으며, 그 차이는 남성보다는 여성에게서 크게 나타남

○ 30대 여성이 A를 가장 좋아하는 것으로 나타났으며, B와의 차이도 가장 크게 나타남

○ 20대는 남성, 여성 모두 A와 B의 차이가 비교적 많이 나타남

○ 40대 남성은 A와 B의 차이가 거의 나타나지 않음

○ 연령에 따른 기호도 특성은 A와 B 모두 나타나지 않으며 남녀의 차이도 없음

○ 기타 의견

막걸리향이 나기도 하며, 요구르트 음료와 유사한 느낌

첫맛에 비해 마실수록 기호도 증가, 단맛이 강해 기호성이 떨어짐

(바) 활용 방안

○ 더 걸쭉하게 만들어서 아침대용식으로 활용하거나, 더 묽게 해서 쌀음료로 활용가능

○ 플레인과 과일맛 등 다양한 음료로 활용 가능

○ 소비자 기호도 조사 결과 도출된 단점을 보완/강화한다면, 좋은 음료로 개발 가능

나. 시제품 개발

시제품#1: 쌀음료, 시제품 #2: 10배 강화 쌀음료



9. 막걸리 개발을 위한 조건 확립

기능성주류 개발을 위해 *Rhizopus oryzae* KSD-815를 이용하여 발효 조건 및 공정을 확립 하였으며 이 시제품을 이용하여 심혈관계 활성 중 혈전생성억제 활성 (위탁연구과제)을 평가하였다.

가. 기능성주류 (막걸리) 개발을 위한 실험군

: 점진적 수요가 증가하고 있는 막걸리를 target 제품으로 개발하고자 여러 실험군을 설정하여 막걸리를 제조/분석하였으며, 생쌀을 그대로 사용하여 풍부한 영양분을 가진 막걸리를 개발하는데 중점을 두었다. 그 중 제품 완성도가 높고 생리 기능활성에 적용한 실험군은 다음과 같다.

- (1) 실험군 1: *Rhizopus oryzae* KSD-815, 25°C 발효
- (2) 실험군 2: *Rhizopus oryzae* KSD-815, 20°C 발효
- (3) 실험군 3: *Rhizopus oryzae* KSD-815 강화균 (3배), 25°C 발효

나. 제조방법 및 recipe

(1) 제조 방법

세척하여 물에서 불린 후, 탈수 과정을 거친 쌀을 *Rhizopus oryzae* KSD-815과 함께 발효를 진행하였다. 발효는 1단, 2단으로 나누어 진행하는 병행복발효 방식을 적용하였으며, 10일 이상의 발효 과정을 거치고 술덧 자체에서 원주의 숙성을 진행하였다. 발효가 종료된 술덧에서 체별기를 이용하여 술지게미를 제거하고 저온 (10°C 이하)에서 숙성을 하였다. 다양한 알코올분 에 맞도록 제성을 하여 소비자 평가를 수행하였다.

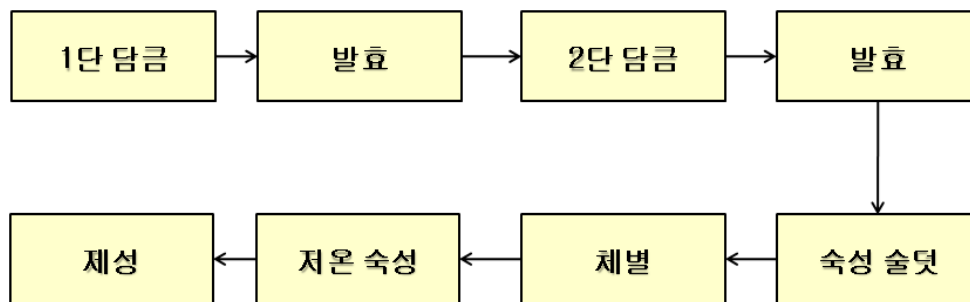


Figure. 기능성주류 (막걸리) 제조 공정도

(2) Recipe

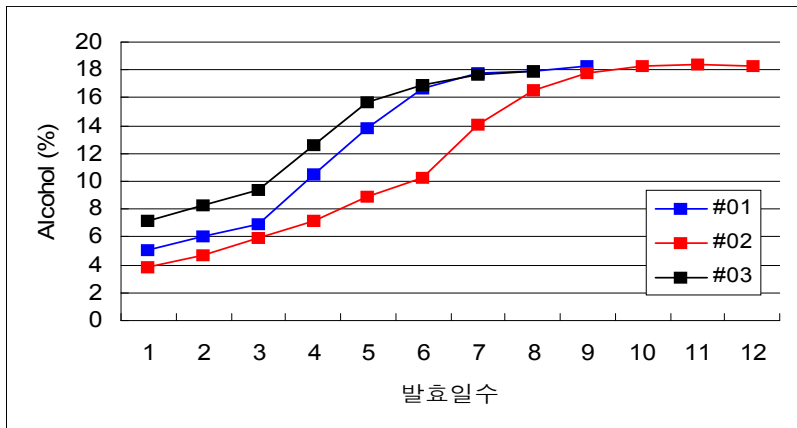
: *Rhizopus oryzae* KSD-815의 생리 기능활성을 극대화하기 위하여, 주원료는 쌀 100%를 사용하였으며, *Rhizopus oryzae* KSD-815의 첨가량과 발효 온도에 따른 recipe를 선정하였다.

시제품	원료량	급수	<i>R. oryzae</i> KSD-815	발효온도	비고
1	1000 g	10L	8%	25°C	
2	1000 g	10L	8%	25°C	
3	1000 g	10L	25%	25°C	

**Rhizopus oryzae* KSD-815의 첨가량은 원료량 대비 비율임.

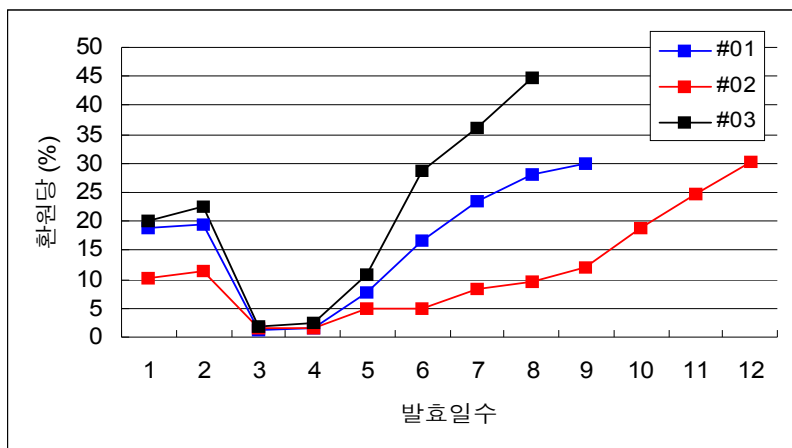
다. 실험결과

(1) Alcohol 생성 분석



시제품#1은 일반적인 알코올 발효 패턴을 보이나, 20℃ 저온에서 발효를 진행한 시제품#2는 발효일수가 약 3일 정도 더 소요되어 목표 알코올 18%를 생성하였다. 하지만, 막걸리 내 생리 기능활성을 증대하기 위한, *Rhizopus oryzae* KSD-815 3배 강화처리균은 유사한 수준의 18% 알코올을 확보하였으나 발효 초기 과정에서 급격한 알코올 상승을 확인하였다.

(2) 환원당 분석



시제품#1에서 약 30 mg/ml의 환원당을 확인하였으나, *Rhizopus oryzae* KSD-815 3배 강화 처리한 시제품#3에서는 약 45 mg/ml의 환원당이 생성되었다. 이는 *Rhizopus oryzae* KSD-815의 과량 첨가에 의한 현상으로 확인되며, 저온에서 발효를 진행한 시제품#2은 시제품 1과 유사한 수준의 환원당을 생성하였지만, 알코올 생성과 마찬가지로 3일 정도 늦은 패턴을 확인하였다.

(3) 기타 발효 패턴

Lactate, pH, 그리고 산도에서 3가지 실험군에서 차이는 나타나지 않았다. 발효 종료 시, 시제품 #1, #2, #3의 pH, Lactate, 산도의 값은 다음과 같다.

시제품	Lactate	pH	산도	발효일수
1	0.41	4.33±0.01	4.82±0.06	9일
2	0.39	4.34±0.02	4.78±0.03	12일
3	0.46	4.29±0.04	4.86±0.04	8일

라. 소비자 기호도 검사

(1) 본 소비가 기호도 검사는 국순당 직원 30명을 대상으로 실시하였으며, 기호도 및 활용방안을 조사하였다.

	#1	#2	#3
전체 (30명)	3.05±0.13	3.68±0.25	2.89±0.06
남 (20명)	3.14±0.29	3.85±0.07	2.93±0.02
여 (10명)	2.95±0.03	3.5±0.14	2.85±0.07

(2) 서술형 묘사

○ 시제품#1

- 전체적으로 과실취, 깔끔한 맛, 바디감 등이 양호하다.
- 뒷맛이 다소 밋밋하지만, 신선하고 바디감이 풍부하다.

○ 시제품#2

- 적당한 바디감과 감미와 산미의 밸런스가 좋다.
- 과실취가 나타나고 저온발효의 장점을 만끽할 수 있으며 고급스런 제품의 맛.

○ 시제품#3

- 단맛이 강하고 뒷맛이 깔끔하지 못하다. 또한 알코올취가 다소 강하다는 평

마. 활용방안

생리 기능활성을 위해 주원료로 쌀 100%를 사용하였으나, 지역별 농특산물을 활용할 수 있도록 주원료인 쌀 이외에 약재, 특산물 등을 활용하여 막걸리를 제조할 수 있을 것으로 생각된다. 다양한 제성방법과 조미를 통하여 신세대에 맞는 제품으로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

바. 시제품 현황

시제품 개발과 관련된 일부 사항은 (주)국순당의 기업자료/정보이므로 100% 공개를 하지는 못합니다. 시제품#1: *Rhizopus oryae* KSD-815, 25℃ 발효, 시제품#2: *Rhizopus oryae* KSD-815, 20℃ 발효, 시제품#3: *Rhizopus oryae* KSD-815 강화균 (3배), 25℃ 발효



제 2 절

위탁과제: 전통누룩 유래 미생물·전통주의 유효성분별 심혈관계 활성화 중 혈전생성억제 활성화 탐색 - (주)켄은 박찬구

1. 연구 수행 방법

가. Platelet Rich Plasma (PRP) 준비

랫드의 복대동맥으로부터 채혈한 혈액을 3.8% sodium citrate 용액과 혼합하여 혈액응고를 방지하였다 (3.8% sodium citrate 용액 : 혈액 = 1 : 9, v/v). 이 혈액을 1000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 PRP를 얻어 혈액검사로 혈소판을 계수하고 생리식염주사액으로 적절히 희석하여 혈소판 수를 3×10^8 cells/ml로 맞추어서 사용하였다. 혈액응고의 측정은 채혈로부터 3시간 이내에 실시하였으며 PRP는 실온에서 보관하였다.

나. 혈액응고 측정 방법

Aggregometer는 506-Ca whole Blood Lumi-aggregometer를 사용하였다. 온도 지시계 눈금이 37°C가 될 때까지 안정화시켰다. 450I 큐벳을 가운데에 꽂고 5분간 가온하였다. 큐벳에 400 μ l PRP를 넣고 micromagnetic bar를 넣어 교반을 시작하였다. 3분 후 각 농도의 시험물질 용액 50 μ l를 넣었다. 2분 뒤 20 μ g/ml의 ADP (Adenosine 5'-Diphosphate) 용액 50 μ l 또는 1 mg/ml의 collagen 용액을 10 μ l를 넣은 후 10분 이상 반응시켜 반응 정도를 aggregation %로 측정하였다. Inhibition % (X)는 각 trace에서 나타난 aggregation %에 대하여 다음과 같은 식에 의하여 각각을 산출하였다.

$$X = [(A - B)] / A \times 100$$

A : Aggregation % of the negative control (saline)

B : Aggregation % of the test items

다. 혈전생성 억제 판정 기준

응고 유도제인 ADP [11] 및 collagen [12]을 처리시, 두 물질 모두에서 혈전생성 억제 활성이 관찰될 경우를 “혈전 생성 억제 (항응고) 활성이 있다.”라고 판정한다.

2. *Rhizopus oryzae* KSD-815 및 전통주의 혈전생성 억제 평가

가. ADP로 유도한 혈장에서의 혈전 생성 억제 (항응고) 활성화 (Table 1)

양성대조군 Aspirin lysine의 inhibition %는 10, 1 mg/ml 및 100 ug/ml에서 각각 88.89, 35.56 및 8.89%였다. 부형제 대조군인 생리식염주사액과 멸균증류수의 Aggregation %는 각각 45 및 44%였으며 평균 45% 값으로 Inhibition %를 산출하였다. 다만 TAHe 및 TAB은 부형제 대조군으로 2% DMSO를 사용하였다. 2% DMSO Aggregation %은 37%이므로 이 두 물질의 Inhibition % 산출에 적용하였다.

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815의 각 분획에 대한 활성화는

- 1) TAHe 처리군의 Inhibition %는 10, 5 및 1 mg/ml에서 각각 13.51, 5.41 및 -24.32%였다.
- 2) TAE 처리군의 Inhibition %는 10, 5 및 1 mg/ml에서 각각 88.44, 13.3 및 -22.22%였다.
- 3) TAB 처리군의 Inhibition %는 10, 5 및 1 mg/ml에서 각각 82.22, 55.56 및 0%였다.
- 4) TAH 처리군의 Inhibition %는 10, 1 mg/ml alc 100 ug/ml에서 각각 75.66, 48.89 및 22.2%였다.

전통주 농축물의 각 분획에 대한 활성은

- 1) B 처리군의 Inhibition %는 10, 1 mg/ml 및 100 ug/ml에서 각각 91.11, 48.89 및 15.56 %였다.
- 2) BE 처리군의 Inhibition %는 500, 250 및 100 ug/ml에서 각각 75.68, 29.73 및 8.11 %였다.
- 3) BB 처리군의 Inhibition %는 500, 250 및 100 ug/ml에서 각각 88.89, 57.78 및 37.78 %였다.
- 4) BH 처리군의 Inhibition %는 10, 1 mg/ml 및 100 ug/ml에서 각각 82.22, 26.67 및 13.33 %였다.

나. Collagen으로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성 (Table 1)

Collagen로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성은 다음과 같다. 양성대조군(Aspirin lysine)의 Inhibition %는 약 10, 1 mg/ml 및 100 ug/ml에서 각각 100.00, 90.48 및 33.33 %였다. 부형제 대조군인 생리식염주사액과 멸균증류수의 Aggregation %는 각각 60 및 66 %였으며 평균 63 % 값으로 Inhibition %를 산출하였다. 다만 TAHe 및 BE는 부형제대조군으로 2 % DMSO를 사용하였다. 2 % DMSO Aggregation %은 57 %이므로 이 두 물질의 Inhibition % 산출에 적용하였다.

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815의 각 분획에 대한 활성 (Table 1)은

- 1) TAHe 처리군의 Inhibition%는 10, 5 및 1 mg/ml에서 각각 38.60, 26.32 및 -12.28 %였다.
- 2) TAE 처리군의 Inhibition %는 10, 5 및 1 mg/ml에서 각각 68.25, 15.87 및 -19.05 %였다.
- 3) TAB 처리군의 Inhibition %는 10, 5 및 1 mg/ml에서 각각 96.83, 80.95 및 -11.11 %였다.
- 4) TAH 처리군의 Inhibition %는 10, 1 mg/ml 및 100 ug/ml에서 각각 14.29, -9.52 및 -11.11 %였다.

전통주 농축물의 각 분획에 대한 활성 (Table 1)은

- 1) B 처리군의 Inhibition %는 10, 1 mg/ml 및 100 ug/ml에서 각각 77.78, 11.11 및 -4.76 %였다.
- 2) BE 처리군의 Inhibition %는 500, 250 및 100 ug/ml에서 각각 100.00, 26.32 및 -3.51 %였다.
- 3) BB 처리군의 Inhibition %는 500, 250 및 100 ug/ml에서 각각 28.57, 3.14 및 1.59 %였다.
- 4) BH 처리군의 Inhibition %는 10, 1 mg/ml 및 100 ug/ml에서 각각 14.29, -7.94 및 -6.35 %였다.

다. 전통누룩의 butanol 분획의 collagen으로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성

전통누룩의 butanol 분획에서 분리한 활성물질은 처리농도를 각각 500, 50 및 5 ug/ml로 설정하여 실험하였다. 그 결과,

- 1) TAB#4-7-3의 inhibition %는 500, 50 및 5 ug/ml에서 각각 11.34, -27.84, -34.02%였다.
- 2) TAB#4-8 inhibition %는 500, 50 및 5 ug/ml에서 각각 13.4, -29.90, -27.84%였다.

라. 고찰 및 결론

수컷 SD 랫드의 혈장에서 시험물질의 처리가 혈전생성 억제에 미치는 영향을 Aggregometer로 측정하였다. 응고 유도제인 ADP 및 Collagen을 처리한 경우 모든 분획에서 최고농도에서 혈전생성 억제 활성이 관찰되었다. TAHe, TAE, TAB는 10 및 5 mg/ml에서 항응고 활성이 관찰되었고, B는 10 및 1 mg/ml에서 항응고 활성이 관찰되었으며, TAH 및 BH는 1 mg/ml에서만 항응고 활성이 관찰되었다. 또한 BB는 500, 250 및 100 ug/ml에서 항응고 활성이 관찰되었고, BE는 500 및 250 ug/ml에서 항응고 활성이 관찰되었다. 시험물질 6종 중 TAB#4-7-3, #4-8은 응고 유도제인 collagen에 대하여 항응고 활성을 나타내지 않았다.

Table 1. Inhibition effects of fractions on rat platelet aggregation by ADP and Collagen

Agonist		ADP (2 ug/ml)		Collagen (22 ug/ml)	
Sample	Concentration	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
Saline	0	45	0	60	0
DW	0	44	0	66	0
DMSO	2%	37	0	57	0
Aspirin	10mg/ml	5	88.89	0	100.00
	1mg/ml	29	35.56	6	90.48
	100ug/ml	41	8.89	42	33.33
TAHe	10mg/ml	32	13.51	35	38.60
	5mg/ml	35	5.41	42	26.32
	1mg/ml	46	-24.32	64	-12.28
TAE	10mg/ml	7	84.44	20	68.25
	5mg/ml	39	13.33	53	15.87
	1mg/ml	55	-22.22	75	-19.05
TAB	10mg/ml	8	82.22	2	96.83
	5mg/ml	20	55.56	12	80.95
	1mg/ml	45	0.00	70	-11.11
TAH	10mg/ml	11	75.56	54	14.29
	1mg/ml	23	48.89	69	-9.52
	100ug/ml	35	22.22	70	-11.11
B	10mg/ml	4	91.11	14	77.78
	1mg/ml	23	48.89	56	11.11
	100ug/ml	38	15.56	66	-4.76
BE	500ug/ml	9	75.68	0	100.00
	250ug/ml	26	29.73	42	26.32
	100ug/ml	34	8.11	59	-3.51
BB	500ug/ml	5	88.89	45	28.57
	250ug/ml	19	57.78	61	3.17
	100ug/ml	28	37.78	62	1.59
BH	10mg/ml	8	82.22	54	14.29
	1mg/ml	33	26.67	68	-7.94
	100ug/ml	39	13.33	67	-6.35

3. *Rhizopus oryzae* KSD-815를 활용한 웰빙식품 (식초음료)의 혈전생성 억제 평가

가. Collagen으로 유도한 혈장에서의 식초음료의 혈전생성 억제 활성 (Table 2)

Collagen로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성은 다음과 같다. 양성대조군(Aspirin lysine)의 Inhibition %는 약 10, 1, 0.1 mg/ml에서 각각 83.17, 39.39 및 1.52% 였다. 부형제대조군인 멸균수사용수와 saline의 aggregation %는 각각 49.5 및 50였고 이를 기준으로 Inhibition %를 산출하였다.

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815을 이용한 식초음료 시제품의 활성은 다음과 같다. 시제품#01부터 시제품#04까지는 액상물질로 시험물질 자체를 최고농도로 하여 아래로 처리농도를 각각 10×, 100× 및 1000×로 설정하여 실험하였다. 실험결과 시험물질 각각의 농도에서

- 1) 시제품#01의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100, 67.68, -7.07%였다.
- 2) 시제품#02의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100, 61.62, 7.07%였다.
- 3) 시제품#03의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100, 55.56, 11.11%였다.
- 4) 시제품#04의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100, 61.62, 13.13%였다.

나. ADP으로 유도한 혈장에서의 식초음료의 혈전생성 억제 활성 (Table 2)

ADP로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성은 다음과 같다. 양성대조군(Aspirin lysine)의 Inhibition %는 약 10, 1, 0.1 mg/ml에서 각각 92.73, 38.18 및 10.91% 였다. 부형제대조군인 멸균수사용수와 saline의 aggregation %는 각각 55.0 및 63.0였고 이를 기준으로 Inhibition %를 산출하였다.

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815을 이용한 식초음료 시제품의 활성은 다음과 같다. 시제품#01부터 시제품#04까지는 액상물질로 시험물질 자체를 최고농도로 하여 아래로 처리농도를 각각 10×, 100× 및 1000×로 설정하여 실험하였다. 실험결과 시험물질 각각의 농도에서

- 1) 시제품#01의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 94.55, 89.09, 1.82%였다.
- 2) 시제품#02의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 90.91, 90.91, -21.82%였다.
- 3) 시제품#03의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 96.36, 83.64, -21.82%였다.
- 4) 시제품#04의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 94.55, 89.09 0%였다.

다. 고찰

식초음료 시제품#01, #02, #03, #04에서 응고 유도제 collagen 및 ADP (×10, and ×100)에 대하여 항응고 활성을 나타내었다. 결과를 종합하면, 식초음료 시제품은 혈전 생성 억제 활성이 있는 것으로 판단하였다.

Table 2. Inhibitory effects of 4 test articles on rat platelet aggregation by collagen & ADP

Agonist		Collagen (22 ug/ml)		ADP (2 ug/ml)	
Sample	Concentration	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
Saline	0	50	0	63	0
DW	0	49.5	0	55	0
Aspirin	10mg/ml	8.33	83.17	4	92.73
	1mg/ml	30.00	39.39	34	38.18
	0.1mg/ml	48.75	1.52	49	10.91
Product #01	10×	0	100.00	3	94.55
	100×	16	67.68	6	89.09
	1000×	53	-7.07	54	1.82
Product #02	10×	0	100.00	5	90.91
	100×	19	61.62	5	90.91
	1000×	46	7.07	67	-21.82
Product #03	10×	0	100.00	2	96.36
	100×	22	55.56	9	83.64
	1000×	44	11.11	67	-21.82
Product #04	10×	0	100.00	3	94.55
	100×	19	61.62	6	89.09
	1000×	50	13.13	55	0.00

4. *Rhizopus oryzae* KSD-815를 활용한 기능성음료 (쌀 음료)의 혈전생성 억제 평가

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815 첨가균 (시제품#01)과 10배 강화 첨가균 (시제품#02)에 대한 혈전 생성 억제 평가를 수행하였다.

가. Collagen으로 유도한 혈장에서의 기능성음료 (쌀 음료)의 혈전생성 억제 활성 (Table 3)

Collagen로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성은 다음과 같다. 양성대조군(Aspirin lysine)의 Inhibition %는 약 100, 10, 1 mg/ml에서 각각 96.88, 82.81 및 21.88% 였다. 부형제 대조군인 멸균수사용수와 saline의 aggregation %는 각각 64 및 67였고 이를 기준으로 Inhibition %를 산출하였다.

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815을 이용한 기능성음료 (쌀 음료)의 시제품의 활성은 다음과 같다. 시제품#01부터 시제품#02 (10배 강화첨가균)까지는 액상물질로 시험물질 자체를 최고농도로 하여 아래로 처리농도를 각각 10×, 100× 및 1000×로 설정하여 실험하였다. 실험결과 시험물질 각각의 농도에서

- 1) 시제품#01의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 84.38, 3.13, 및 -4.69%였다.
- 3) 시제품#02의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 98.44, 25.00, 및 -12.50%였다.

나. ADP으로 유도한 혈장에서의 기능성음료 (쌀 음료)의 혈전생성 억제 활성 (Table 3)

ADP로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성은 다음과 같다. 양성대조군(Aspirin lysine)의 Inhibition %는 약 100, 10, 1 mg/ml에서 각각 100, 88.57, 및 20.00% 였다. 부형제대조군인 멸균수사용수와 saline의 aggregation %는 각각 35 및 36였고 이를 기준으로 Inhibition %를 산출하였다.

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815을 이용한 기능성음료 (쌀 음료)의 시제품의 활성은 다음과 같다. 시제품#01과 시제품#02 (10배 강화첨가군)까지는 액상물질로 시험물질 자체를 최고농도로 하여 아래로 처리농도를 각각 10×, 100× 및 1000×로 설정하여 실험하였다. 실험결과 시험물질 각각의 농도에서

- 1) 시제품#01의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 97.14, 91.43, 및 34.29%였다.
- 3) 시제품#02의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100.00, 74.29, 및 -5.71%였다.

Table 3. Inhibitory effects of 3 test rice beverages on rat platelet aggregation by collagen & ADP

Agonist		Collagen (22 ug/ml)		ADP (2 ug/ml)	
Sample	Concentration	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
Saline	0	67	-4.69	36	-2.86
DW	0	64	0	35	0
Aspirin	100mg/ml	2	96.88	0	100.00
	10mg/ml	11	82.81	4	88.57
	1mg/ml	50	21.88	28	20.00
Product #01	10×	4	93.75	2	94.29
	100×	49	23.44	19	45.71
	1000×	66	-3.13	23	34.29
Product #02	10×	10	84.38	1	97.14
	100×	62	3.13	3	91.43
	1000×	67	-4.69	23	34.29
Product #03	10×	1	98.44	0	100
	100×	48	25.00	9	74.29
	1000×	72	-12.50	37	-5.71

다. 고찰

기능성음료 (쌀 음료)의 시제품#01과 #02에서 응고 유도제 collagen (×10) 및 ADP (×1, ×10, ×100)에 대하여 항응고 활성을 나타내었다. 특히, ADP 유도 모델에서 강력한 혈전 생성 억제 효과를 확인하였다. 결과를 종합하면, 기능성음료 시제품은 혈전 생성 억제 활성이 있는 것으로 판단하였다.

5. *Rhizopus oryzae* KSD-815를 활용한 기능성 주류 (막걸리)의 혈전생성 억제 평가

가. Collagen으로 유도한 혈장에서의 기능성 주류 (막걸리)의 혈전생성 억제 활성 (Table 4)

Collagen로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성은 다음과 같다. 양성대조군(Aspirin lysine)의 Inhibition %는 약 10, 1, 0.1 mg/ml에서 각각 96.88, 73.44, 및 35.94% 였다. 부형제대조군인 멸균수사용수와 saline의 aggregation %는 각각 68 및 64였고 이를 기준으로 Inhibition %를 산출하였다.

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815을 이용한 기능성 주류 (막걸리)의 시제품의 활성은 다음과 같다. 시제품#01부터 시제품#03까지는 액상물질로 시험물질 자체를 최고농도로 하여 아래로 처리농도를 각각 10×, 100× 및 1000×로 설정하여 실험하였다. 실험결과 시험물질 각각의 농도에서

- 1) 시제품#01의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 90.63, 45.31, 및 23.44%였다.
- 2) 시제품#02의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100.0, 89.06, 및 1.56%였다.
- 3) 시제품#03의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100.0, 85.94, 및 -4.94%였다.

나. ADP으로 유도한 혈장에서의 기능성 주류 (막걸리)의 혈전생성 억제 활성 (Table 4)

ADP로 유도한 혈장에서의 혈전생성 억제 활성은 다음과 같다. 양성대조군(Aspirin lysine)의 Inhibition %는 약 10, 1, 0.1 mg/ml에서 각각 100.0, 26.0 및 -14.0% 였다. 부형제대조군인 멸균수사용수와 saline의 aggregation %는 각각 51 및 50였고 이를 기준으로 Inhibition %를 산출하였다.

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815을 이용한 기능성 주류 (막걸리)의 시제품의 활성은 다음과 같다. 시제품#01부터 시제품#03까지는 액상물질로 시험물질 자체를 최고농도로 하여 아래로 처리농도를 각각 10×, 100× 및 1000×로 설정하여 실험하였다. 실험결과 시험물질 각각의 농도에서

- 1) 시제품#01의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100.0, 80.0, 및 16.0%였다.
- 2) 시제품#02의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100.0, 100.0, 및 82.0%였다.
- 3) 시제품#03의 Inhibition%는 10×, 100× 및 1000×에서 각각 100.00, 100.0, 및 34.0%였다.

다. 고찰

기능성 주류 (막걸리)의 시제품#01, #02, #03에서 응고 유도제 collagen 및 ADP에 의한 항응고 형성정도를 측정하였다. 시제품#01, #02, #03은 희석 농도 ×1000, ×100, ×10에서 ADP로 유도한 응고에 대하여 항응고활성을 확인하였다. 또한 시제품#01은 희석 농도 ×1000, ×100, ×10에서, 시제품#02, #03은 희석 농도 ×100, ×10에서 collagen으로 유도한 응고에 대하여 항응고활성을 확인하였다.

연구결과를 종합하면, 기능성 주류 (막걸리) 시제품#01은 ×1000 희석액, 시제품 #02, #03dms ×100 희석액 이상에서 항혈전효과를 가진다고 판단된다.

Table 4. Inhibitory effects of 3 test traditional wines on rat platelet aggregation by collagen & ADP

Agonist		Collagen (20 ug/ml)		ADP (22 uM)	
Sample	Concentration	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
Saline	0	64	0	50	0
DW	0	68	-6.25	51	-2.00
Aspirin	10mg/ml	2	96.88	0	100.00
	1mg/ml	17	73.44	37	26.00
	0.1mg/ml	41	35.94	57	-14.00
Product #01	10×	6	90.63	0	100.00
	100×	35	45.31	10	80.00
	1000×	49	23.44	42	16.00
Product #02	10×	0	100.00	0	100.00
	100×	7	89.06	0	100.00
	1000×	63	1.56	9	82.00
Product #03	10×	0	100.00	0	100.00
	100×	9	85.94	0	100.00
	1000×	67	-4.69	33	34.00

제 3 절

제1협동과제: 전통누룩 유래 미생물·전통주의 항암·혈관생성억제 및 면역증진 효능 및 작용기전 연구 -성균관대학교 홍성렬

1.연구 수행 방법

가. 항암작용 탐색

(1) 암세포에 대한 세포독성 (cytotoxicity) 효과

세포 독성은 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [13]를 사용하여 분석한다. 96-well cell culture plate에 5×10^4 의 세포를 plating하고 37°C에서 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한다. 96-well plate에 50 μ l MTT solution (stock concentration : 0.5 mg/ml)를 첨가하여 4시간동안 37°C에서 반응을 시킨다. 각 well에 100 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO)와 20 μ l Sorenson`s solution (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH 10.2)를 첨가하여 formazan crystal을 용해시킨다. 세포 내에서 MTT가 formazan으로 reduction된 양을 540 nm의 흡광도를 이용하여 측정한다. 생존율은 물질을 처리하지 않은 세포의 흡광도 값의 백분율로 계산을 하며 세포 독성은 대조군과 per cent survival의 차이로 나타내진다.

(2) 암세포의 apoptosis 유도 효과

암세포의 apoptosis 유도 효과는 FACS (fluorescent activating cell sorter) analysis를 이용하여 분석한다. 암세포에 전통누룩 유래 미생물·전통주의 분획 또는 유효 성분을 농도별로 처리한 후 24시간, 48시간 후에 1×10^6 의 세포를 trypsin/EDTA를 이용하여 분리한 후, 1000 \times g에서 5분 동안 원심분리하고 DPBS로 세척한다. 세포를 200 μ l의 DPBS로 현탁하여 70%의 차가운 에탄올을 첨가하여 한 시간 동안 얼음에 방치한다. 원심분리로 에탄올은 제거한 후 800 μ l의 DPBS로 현탁하여 26G1/2크기의 바늘로 주사기에 통과시켜 세포와 세포를 분리한다. 1 mg/ml의 RNaseA 100 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 propidium iodide (PI)를 40 μ g/ml의 농도로 첨가한다. 반응이 끝난 세포들을 FACSCalibur flow cytometer로 분석한다. 또한 처리한 암세포의 DNA fragmentation을 분석함으로써 DNA 수준에서 apoptosis 여부를 분석한다.

(3) 혈관 신생(angiogenesis) 억제 효과의 검색

수정된 유정란의 표면을 70% 에탄올로 닦아준 후 37°C에서 3.5일 동안 incubation한다. 3.5일 후 유정란의 알부민을 3 ml 추출한 후 window를 내고 4.5일이 되는 날 시료를 농도별로 chorioallantoic membrane (CAM)에 처리한다. 6.5일이 되는 날 유정란의 CAM에 intralipose를 채워 맥관 형성을 관찰함으로써 시료가 맥관 형성에 미치는 영향을 알아보려고 한다 [14].

(4) 암 전이 활성화 (invasion) 억제 효과 탐색

암 세포주를 24-well 세포배양 플레이트에 90% confluence하게 분주하고 배양을 한다. 24 시간 후에 yellow-tip을 사용하여 세포표면에 wound를 만들고 PBS로 2번 정도 씻어준다. FBS가 포함된 배지를 첨가하고 시험물질을 원하는 농도별로 처리한다. 그리고 시간 간격으로 암세포의 전이현상을 1% paraformaldehyde로 고정시킨 후 관찰한다 [15].

(5) Matrix metalloproteinase 억제 효과 탐색

암 세포주를 1×10^6 의 수로 세포배양 플레이트에 분주하고 24시간 배양한다. 그 후 배지를 FBS가 첨가되지 않은 배지로 바꾸고 시험물질을 처리한다. 48시간을 배양한 후 상등액을 취하여 centrifrep을 이용하여 농축을 한다. 이렇게 획득한 농축물을 젤라틴 (1.5 mg/ml)이 첨가하여 10% SDS-PAGE를 수행한다. 전기영동 후 젤을 37°C에서 12-18시간 반응시키고 Coomassie brilliant blue G250를 사용하여 염색을 30분 동안 수행한다. 그 후 탈색과정을 거쳐 MMP 억제 효과를 관찰한다.

(6) 혈관신생에 관여하는 인자의 발현 양상 분석

혈관신생에 관여하는 angiopoietin 1 및 angiopoietin 2 등 신생혈관형성에 관여하는 인자들의 유전자 발현 양상의 변화를 RNA 수준에서 RT-PCR 및 Northern blot등을 수행하여 확인한다.

나. 면역 활성 증진 탐색

(1) 세포배양

마우스 macrophage like cell line, RAW 264.7, 인간 monocyte cell line, U937, 마우스 splenocyte 및 CTLL-2 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양한다. 배지는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용한다.

(2) 세포 생존율 (cell viability) 시험

면역 활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, 전통누룩 유래 미생물·전통주의 분획 또는 유효 성분이 나타내는 세포생존에 미치는 효과를 MTT assay법 [13]을 이용하여 분석한다. 96-well plate에 5×10^5 의 세포를 plating하고 37°C에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한다. 이후 50 μ l MTT 용액 (stock concentration : 0.5 mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 추가반응을 유도한다. 반응 종료 및 formazan crystal 용해를 위해 각 well에 100 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO)와 20 μ l Sorenson`s solution (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH 10.2)을 추가적으로 첨가한다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 540 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출한다.

(3) 대식세포 유래 세포독성물질 (NO/ROS)의 정량

Murine 대식 세포주인 RAW264.7 세포를 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 μ g/ml)과 5%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절한 후, 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양한다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도로 조제된 시험물질 50 μ l와 450 μ l의 LPS (최종농도 1 μ g/ml) 혹은 IFN- γ (50 U/ml) 함유 배지를 동시에 처리하여 배양한다. 6시간 혹은 24시간 후 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3분간)하고, 상층액 일부를 정량 전까지 -20°C 이하에서 보관한다. NO 정량은

Griess 용액 (0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H₃PO₄) 을 이용하여 실시한다. 표준물질로 sodium nitrite (5 에서 50 μM) 를 사용하여 검량선을 작성한다. 유리된 ROS는 배양액에 DAF를 10 μM 농도로 첨가하여 일정시간 배양한 후 형광광도를 측정하여 정량한다.

(4) Western blot을 이용한 표적 단백질의 발현량 조사

분비된 사이토카인의 양 및 세포독성물질을 생성하는 효소들의 정성적 분석은 Western blot을 이용하여 실시하였다. 각 시료 처리 하에 일정시간 배양한 세포들을 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 tablet/50 ml solution protease inhibitor cocktail)로 용해시킨 후 세포질 단백질을 12,000 g에서 15분간 원심 분리한다. 얻어진 세포 lysates를 10% SDS-Polyacrylamide minigels에 loading 한 뒤, 전기영동을 하고 전개된 protein 들을 PVDF membranes으로 옮긴다. 이 membrane를 각 표적단백질의 항체를 함유한 blot buffer에 넣어 4°C에서 10시간 동안 반응시킨 뒤, HRP-conjugated secondary antibody로 detection하고 ECL법을 이용하여 발색시킨다.

2. 연구 결과

가. 1차분획

(1)항암활성

㉠ 세포독성 활성 및 증식 억제 효과 탐색

전통누룩 유래 미생물 *Rhizopus oryzae* KSD-815 (이하 *Rhizopus oryzae* KSD-815)의 4 가지 추출물 중 ethylacetate (TAE), hexane (TAHe), butanol (TAB) 분획물의 subfractions에 대한 세포독성 활성을 50 μg/ml의 농도를 적용하였다. Human breast cancer cell lines, MDA-MB-231, MCF-7, human liver cancer cell line, SK-HEP-1, human melanoma A2058, human colon cancer cell line, HT-29, human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y, mouse glioma, C6, mouse fibroblast cell line, NIH-3T3 및 ras-transformed NIH-3T3 등 총 9개 암 세포주의 세포독성 활성을 측정하였다

㉡ TAHe

세포독성 효과는 암 세포주별로 subfractions 마다 다양한 활성을 나타내었다. *Rhizopus oryzae* KSD-815의 TAHe subfractions은 인간 melanoma 세포인 A2058에서 가장 높은 세포독성 활성을 나타내었다. 50 μg/ml의 농도에서 TAHe#10, #11, #14, #15에서 84.0 ~ 86.0%의 높은 세포독성 활성을 확인하였다. 유방암 세포인 MDA-MB-231에서 TAHe#07가 66%, 대장암 세포인 HT-29에서 TAHe#11가 53%, 인간 뇌종양 세포인 SH-SY5Y에서는 TAHe#07과 TAHe#15가 51%와 56%의 세포독성 활성을 각각 나타내었다. TAHe#07, #11, #15는 2개 이상의 암 세포주에 대한 세포 독성 활성을 확인하였다. (Table 1-1).

Table 1-1. Cytotoxic effects of TAHe subfractions on various cancer cell lines

Cell lines		C6	SK- HEP-1	MDA- MB-231	MCF-7	A2058	HT-29	SH- SY5Y	NIH- 3T3	ras-NIH- 3T3
TAHe	#01	0	1.5	15.2	4.9	0	7.3	10.6	17.7	25.1
	#02	0	0	3.4	0	0	7.0	8.4	14.5	9.3
	#03	0	0	29.9	0	0	0	38.8	54.8	0
	#04	0	0	45.5	3.0	0	0	37.2	49.6	0
	#05	0	0	44.4	0	0	0	37.7	51.2	26.5
	#06	0	0	13.5	0	0	0	37.8	1.6	0
	#07	2.4	0	66.2	0	20.4	4.0	51.1	0	0
	#08	0	0	37.1	0	0	0	14.0	0	0
	#09	0	0	0	6.4	15.1	0	27.5	80.9	4.2
	#10	0	0	1.0	0	85.4	0	29.0	66.8	9.3
	#11	0	1.0	26.7	39.5	84.6	52.9	45.2	38.5	19.5
	#12	0	0	3.7	0	0	0	36.3	0	0
	#13	0	0	0	0	0	0	36.3	0	0
	#14	0	0	15.8	0	84.0	17.0	40.7	23.8	21.5
	#15	26.0	35.2	18.5	28.5	86.3	32.2	56.3	59.9	12.8

⊕ TAE

Rhizopus oryzae KSD-815의 TAE subfractions은 인간 대장암 세포인 HT-29에서 가장 높은 세포독성 subfractions을 확인하였다. 50 µg/ml의 subfractions을 24시간 처리한 조건에서는 별다른 세포독성 활성을 나타내지 못하였으나, 72시간 처리한 조건에서 높은 세포독성 활성을 확인하였다. TAE#02, #03, #04, #06, #07, #08, #12, #13에서 52 ~ 70%의 세포독성 활성을 나타내었다. 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231에서 TAE#01, TAE#02과 TAE#06에서 각각 77%, 66%와 64%, MCF-7에서 TAE#01, TAE#03과 TAE#06에서 각각 51%, 60%, 54%의 세포독성을 나타내었으며 특히 TAE#01과 TAE#06은 estrogen receptor와 metastatic potential에 따른 특성이 다른 유방암 세포에 공통적인 세포독성 활성을 나타내었다. 또한 마우스 뇌종양 세포인 C6에서 TAE#06가 57%의 세포독성 활성을 나타내었다. (Table 1-2).

Table 1-2. Cytotoxic effects of TAE subfractions on various cancer cell lines

Cell lines		C6	SK- HEP-1	MDA- MB-231	MCF-7	A2058	HT-29	SH- SY5Y	NIH- 3T3	ras-NIH-3 T3
TAE	#01	0	23.3	77.4	50.8	85.9	23.2	4.4	0	29.0
	#02	25.4	25.9	66.2	45.3	42.0	57.4	14.6	3.4	20.8
	#03	6.3	20.7	45.3	60.0	0	63.0	0	7.0	0
	#04	20.8	22.3	40.3	22.7	0	66.0	0	0	0
	#05	21.6	29.8	40.5	33.3	0	46.8	0	0	8.4
	#06	57.4	44.2	63.9	54.1	24.7	69.0	17.4	0	7.3
	#07	27.4	34.8	31.1	44.4	0	69.5	0	0	0
	#08	0	45.9	23.7	9.5	0	61.5	0.3	0	0
	#09		3.3	0	4.1	0	45.3	0	0	0
	#10		5.1	0	7.9	0	41.6	0	0	0
	#11		0	0	0	0	35.5	0	0	0
	#12			0	0	0	51.6	0	0	0
	#13			10.2	0	0.5	0	59.0	0	0
	#14			0	0	0	43.7	0	0	0
	#15			0	0	0	27.5	0	0	0

특히 이 중 TAE#1과 TAE#6 분획은 세포독성효과를 확인하기 위해 estrogen receptor와 metastatic potential이 다른 두 개의 유방암 세포 MDA-MB-231과 MCF-7 에서 공통적으로 농도 의존적으로 세포생존율이 감소함을 통해 높은 세포독성 효과를 확인하였다 (Fig. 1).

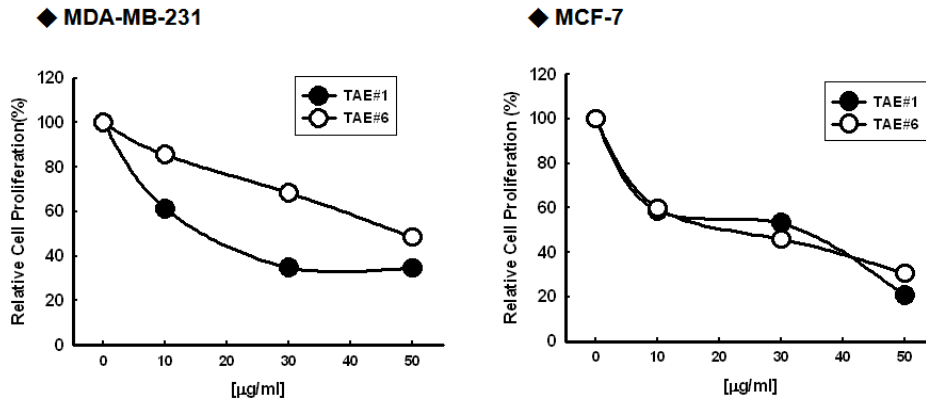


Figure 1. Cytotoxic activities of TAE#1 and TAE#6 on human breast cancer cells

⊕ TAB

TAHe과 TAE subfractions과 달리, TAB subfractions은 세포독성 활성이 높지 않았다 (Table 1-3). Melanoma 세포인 A2058에서 TAB#11C가 50.3%, 인간 대장암 세포인 HT-29에서 TAB#02가 52%의 세포독성 활성을 나타내었다.

Table 1-3. Cytotoxic effects of TAB subfractions on various cancer cell lines

Cell lines	C6	SK-HEP-1	MDA-MB-231	MCF-7	A2058	HT-29	SH-SY5Y	NIH-3T3	ras-NIH-3T3	
Subfractions	#01	32.6	15.0	10.4	5.6	17.1	7.3	47.5	34.1	39.4
	#02	36.3	4.2	44.3	0	0	51.6	49.8	0	29.4
	#03	1.5	37.4	0	0	0	0	28.7	0	32.1
	#04	7.4	0	0	0	0	9.2	30.9	0	34.8
	#04c	19.3	0	1.0	2.0	0	14.9	0	5.2	30.2
	#05	48.7	0	0	0	0	24.8	0	0	4.0
	#06	18.3	0	0	0	21.1	22.8	8.8	0	0
	#07	2.4	0	0	0	40.6	20.9	0	5.5	0
	#08	10.6	0	0	27.8	0	0	0	1.8	0
	#09	21.6	0	0	0	0	0	9.8	1.0	0
	#10	14.9	0	0	0	0	0	0	5.5	0
	#11	30.1	0	0	16.1	0	3.0	30.5	0	1.7
	#11c	44.6	0	0	0	50.3	4.12	20.1	4.1	0
#12	18.7	0	0	6.5	0	18.7	38.3	1.8	0	
#13	36.2	0	0	15.1	0	0	28.8	0	1.2	

⊕ 전통주 농축물

Rhizopus oryzae KSD-815을 이용하여 제조한 전통주 농축물 (B) 및 3가지 추출물인 ethylacetate (BE), buthanol (BB), H₂O (BH) 분획물에 대한 암 세포주에 대한 세포독성 활성을 탐색하였다. 마우스 유래 뇌종양 세포 C6, 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231과 MCF-7,

인간 폐암세포주인 293T, 그리고 인간 위암 세포주인 AGS에 대한 세포독성 활성을 탐색한 결과, 인간 위암 세포주인 AGS에서 buthanol 분획만 세포독성 활성을 나타내었다 (Fig. 2). BB 분획물에서 IC50 값은 8.97 $\mu\text{g/ml}$ 으로 확인하였다.

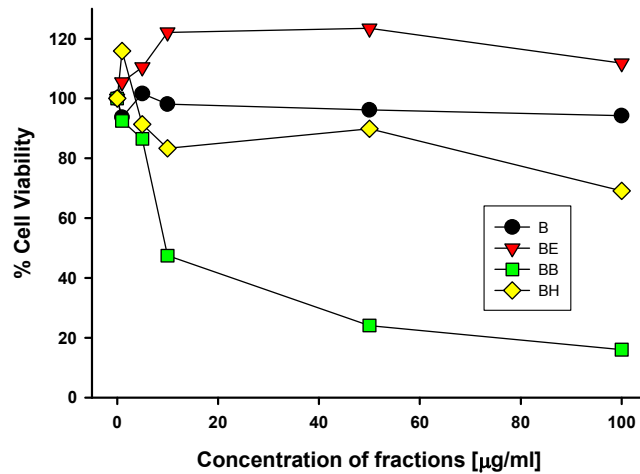


Figure 2. Cytotoxic effects of the fractions of traditional wine on AGS

② 암 전이 억제 활성 탐색

암에서 분리되어 나온 세포는 순환계 (림프관 및 혈관)를 타고 신체의 다른 부위로 이동하여 또 다른 새로운 종양을 형성한다. 이처럼 종양이 그 원발부위에서 여러 경로를 따라 다른 신체의 부위에 이식되어 그곳에서 정착, 증식하는 현상을 암의 전이 (metastasis)라 한다. 암의 침윤과 전이는 암세포와 세포외기질 (extracellular matrix)의 파괴 및 신혈관 생성을 포함하는 다단계 과정을 거친다. 세포외기질의 분해에 관여하는 metalloproteinase (MMP)는 암 전이와 침윤에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 이런 이유로 암 전이 억제 활성은 암의 이동성 (cell motility) 및 metalloproteinase의 저해 활성을 평가하였다.

마우스 유래 뇌종양 세포 C6, 인간 간암 세포주인 SK-HEP-1, 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231의 3종류의 암 세포를 사용하여 암 전이 억제활성을 평가하였다. 암 세포주 (2×10^5 cells/ml)를 24-well 세포배양 플레이트 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들을 yellow-tip을 사용하여 세포표면에 wound를 만들고 PBS로 2번, 무혈청 배지로 한번 세척하였다. FBS가 포함된 배지를 첨가하고 *Rhizopus oryzae* KSD-815 및 전통주의 추출물 (분획)을 원하는 농도별로 처리한다. 24시간 배양 후 현미경으로 각 세포들의 전이현상을 1% paraformaldehyde로 고정시킨 후 관찰하였다.

Rhizopus oryzae KSD-815 추출물 및 그 분획에 대한 1차 암 전이 억제활성을 평가하였다 (Fig. 3-1). 마우스 유래 뇌종양 세포주인 C6에서 각 분획물이 추출물보다 높은 암 전이 억제 활성을 나타내었으며 buthanol 분획과 ethylacetate 분획이 유사하게 높은 억제 활성을 확인하였다. 또한 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 C6와 유사한 결과를 나타냈다. 이 결과로 *Rhizopus oryzae* KSD-815의 TAB, TAE, 그리고 TAHe에서 암 전이 억제활성이 있음을 확인하였다.

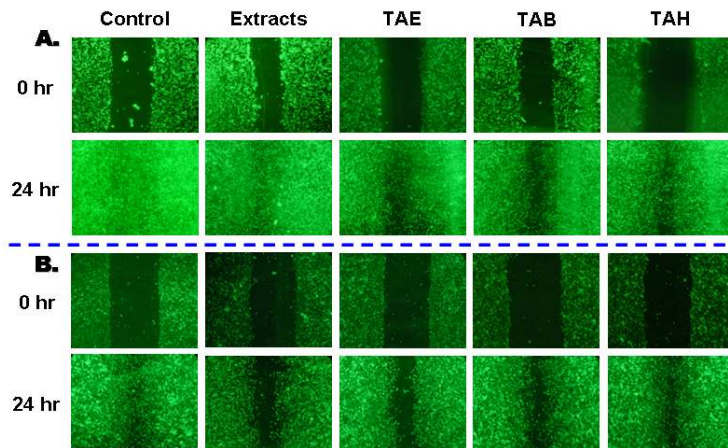


Figure 3-1. Anti-metastatic activities of the extracts of *Rhizopus oryzae* KSD-815 on mouse glioma C6 (A) and human breast cancer cell line, MDA-MB-231 (B).

㉞ TAE

Ethylacetate (TAE) 1차 분획에 대한 암전이 억제 활성을 cell motility assay를 통해 평가하였다 (Table 3). 마우스 유래 뇌종양 세포인 C6, 인간 간암세포주인 SK-HEP-1, 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231의 3가지 암세포주를 사용하여 암세포 이동 억제 활성을 평가하였다. 암세포주 (2×10^5 cells/ml)를 24-well plate에 12~18시간 배양하고, 세포들을 yellow tip을 이용하여 세포에 wound를 만들고 PBS로 2번, 무혈청 배지로 1번 세척하였다. FBS가 포함된 배지에 TAE 1차 분획을 원하는 농도로 처리한다. 24시간 배양 후 광학현미경으로 각 세포들의 전이 현상을 1% paraformaldehyde로 고정시킨 후 관찰하였다.

Table 2-1. Anti-migratory activities of TAE subfractions on various cancer cell lines

Cell lines		C6	SK-HEP-1	MDA-MB-231
Subfractions				
TAE	#01	×	×	×
	#02	○	×	×
	#03	○	○	×
	#04	×	○	×
	#05	×	○	×
	#06	○	×	×
	#07	○	○	×
	#08	×	×	×
	#09	×	×	×
	#10	○	×	×
	#11	×	×	×
	#12	○	○	×
	#13	×	○	×

물질처리농도 : 10 μ g/ml, 20 μ g/ml

○ : Inhibitory effect of cell motility

×

TAE 1차 분획에 대한 세포 이동억제 효과를 평가한 결과, C6의 경우 TAE#2, TAE#3, TAE#6, TAE#6, TAE#7, TAE#10, TAE#12 분획이 세포의 이동을 약하게 억제하는 것을 확인하였다 (data not shown). SK-HEP-1에서는 TAE#3, TAE#4, TAE#5, TAE#7, TAE#12, TAE#13에서 세포이동을 억제하는 효과를 확인하였고 암전이 억제활성이 있을 것으로 추정하고 있다(Fig. 3-2).

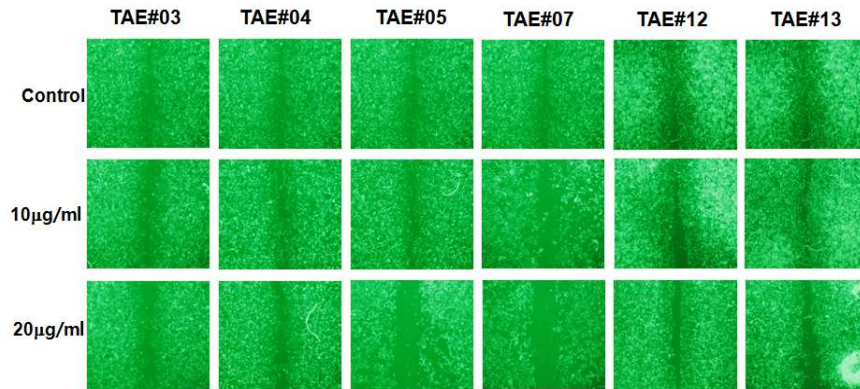


Figure 3-2. Anti-migratory activities of TAE 2nd subfractions on human liver adenocarcinoma SK-HEP-1

⊕ TAB

Rhizopus oryzae KSD-815의 TAB subfractions에 대한 암 전이 억제 활성을 wound-healing assay 방법으로 평가를 완료하였으며 (Table 2-2), TAE 분획물에 대한 암전이 억제 활성은 평가를 진행 중이다. 마우스 유래 뇌종양 세포주인 C6에서 TAB#01, #04C, 그리고 #07에서 농도의존적인 암 전이 억제 활성을 확인하였다 (Fig. 3-3). 인간 간암 세포주인 SK-HEP-1에서 TAB#04, #06, 그리고 #07에서 농도의존적인 암 전이 억제 활성을 확인하였으며 (Fig. 3-4) 유방암 세포주인 MDA-MB-231은 TAB#03에서 유사한 억제 활성을 확인하였다 (Fig. 3-5). 각 subfractions을 용매인 0.1% DMSO에 대한 암 전이 억제 활성은 없는 것으로 확인하였다 (data not shown).

Matrigel을 이용한 invasion assay 방법을 통해 TAB#07의 암 전이 억제 활성을 검증하였다. Matrigel 1 mg/ml의 농도로 0.8 µm Transwell에 코팅하였다. 각 암세포는 5×10^4 cells/transwell/ml 농도로 만들어 Transwell 내로 분주하였다. Attractant로 10% FBS 배지를 사용하였으며 TAB#07을 처리한 세포를 upper chamber에 분주하여 37°C 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 Matrigel을 통과하지 못한 세포들을 멸균된 면봉으로 제거하고 Hematoxyline과 eosin을 이용하여 염색을 하고 현미경으로 invasion된 세포들을 관찰하였다. TAB#07는 인간 간암 세포인 SK-HEP-1과 마우스 유래 뇌종양 세포인 C6의 invasion을 농도의존적으로 억제하였으며 100 µg/ml 농도에서 50%에 가까운 억제 활성을 확인하였다 (Fig. 3-6).

Table 2-2. Anti-metastatic activities of TAB subfractions on various cancer cell lines

Cell lines Subfractions		C6			SK-HEP-1			MDA-MB-231		
		1	10	100	1	10	100	1	10	100
TAB	#01	△	○	◎	×	×	×	×	×	×
	#02	×	△	○	×	△	○	×	△	△
	#03	△	○	○	×	△	◎	×	○	○
	#04	×	△	○	◎	◎	◎	△	△	
	#04c	△	○	◎	×	×	○	×	×	×
	#05	×	×	×	△	△	○	×	×	×
	#06	×	△	○	○	○	◎	×	×	×
	#07	△	○	◎	○	○	◎	×	×	×
	#08	△	△	○	×	△	○	△	△	△
	#09	×	△	○	×	×	×	×	△	○
	#10	×	△	○	×	×	×			
	#11	×	×	△	○	△	×			
	#11c	×	×	×	×	×	×			
	#12	×	×	×	○	×	×			
#13	×	×	×	×	△	○				

물질 농도 단위 : $\mu\text{g/ml}$

◎ : Very strong inhibition of cell motility

○ : Strong inhibition of cell motility

△ : Weak inhibition of cell motility

× : No inhibition of cell motility

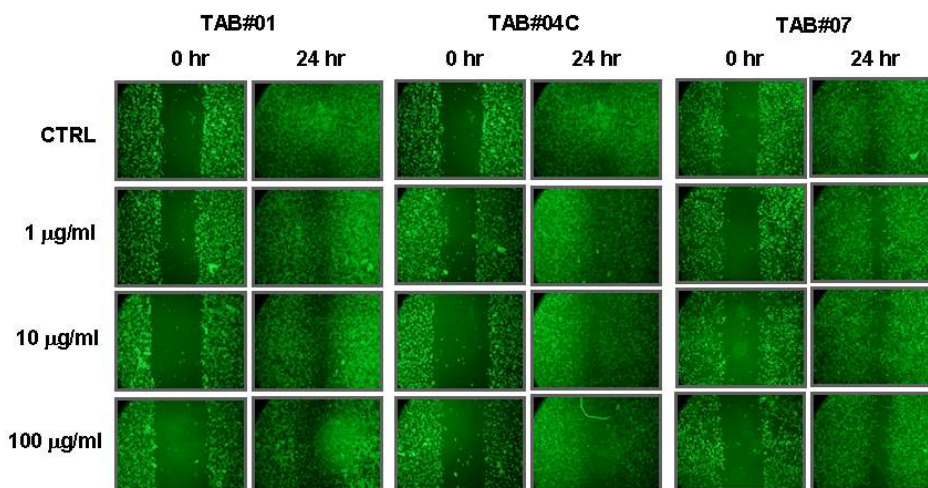


Figure 3-3. Anti-metastatic activities of TAB#01, #04C, and #07 on mouse glioma C6 in dose-dependent manner

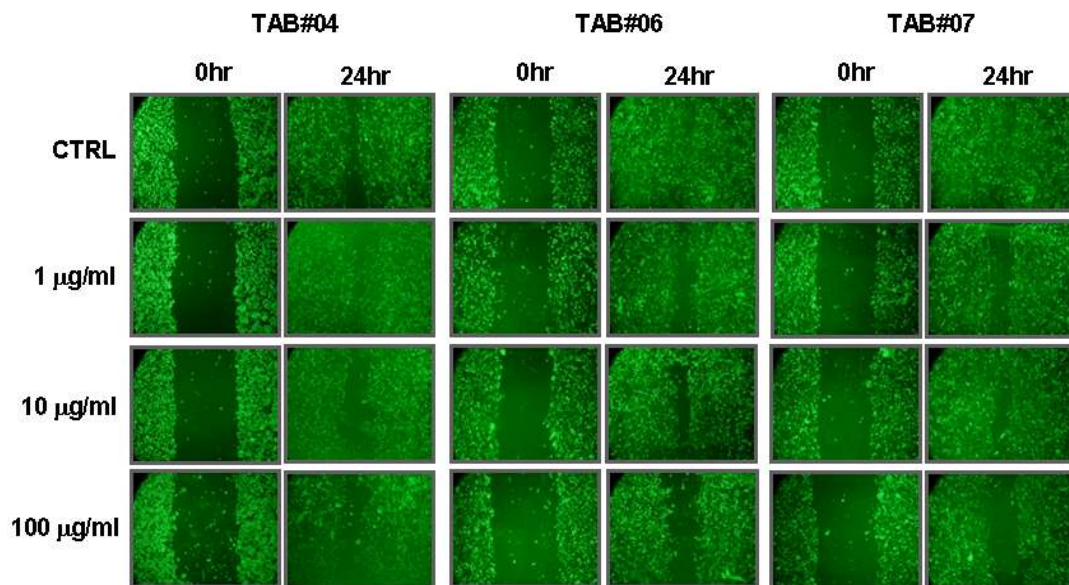


Figure 3-4. Anti-metastatic activities of TAB#04, #06 and #07 on human liver cancer cell line, SK-HEP-1

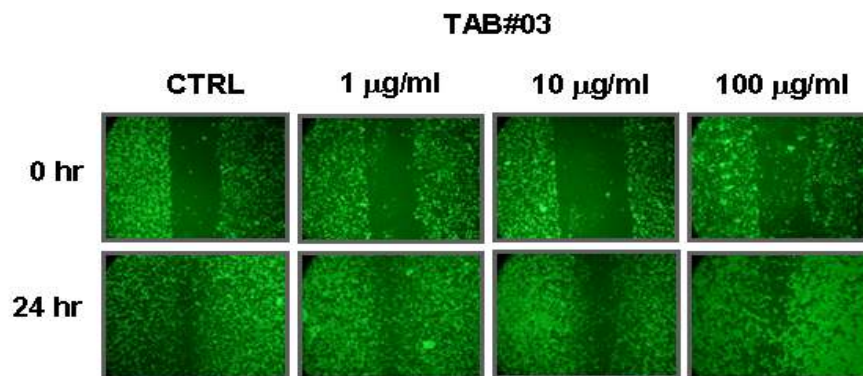
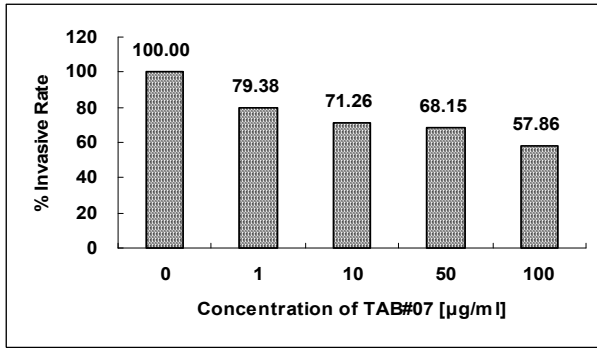


Figure 3-5. Anti-metastatic activities of TAB#03 on human breast cancer cell line, MDA-MB-231

A.



B.

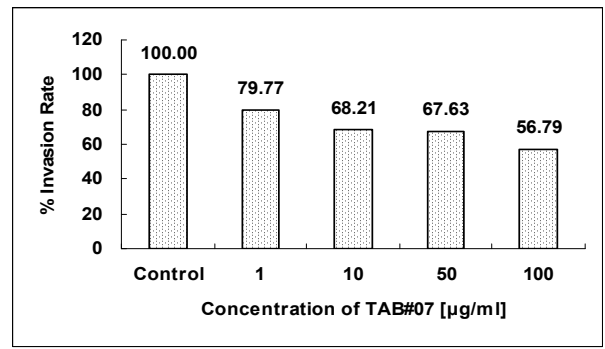


Figure 3-6. Anti-invasive activities of TAB#07 on human liver cancer cell line, SK-HEP-1 (A) and mouse glioma cells, C6 (B)

㊤ 전통주 농축물

Rhizopus oryzae KSD-815를 이용한 전통주 농축물과 그 분획에 대한 암 전이 억제 활성도 wound-healing assay 방법을 이용하여 평가하였다 (Fig. 3-7). *Rhizopus oryzae* KSD-815의 분획물과 유사하게 마우스 유래 뇌종양 세포주인 C6와 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 모두 BE 분획물과 BB 분획물에서 높은 암 전이 억제 활성을 나타내었다. 이는 *Rhizopus oryzae* KSD-815의 암 전이 억제 활성에 기인하는 것으로 사료된다.

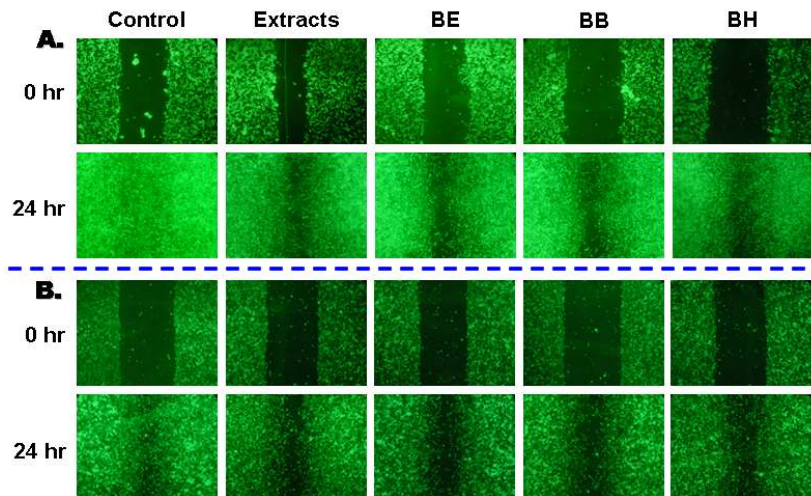


Figure 3-7. Anti-metastatic activities of the fractions of traditional wine on mouse glioma cell C6 (A) and human breast cancer cell line, MDA-MB-231

③ Matrix metalloproteinase 억제 효과 탐색

암 세포주를 1×10^6 수로 100 mm 세포배양 플레이트에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하고 무혈청 배지에 전통누룩 유래 미생물인 *Rhizopus oryzae* 분획을 원하는 농도로 처리하여 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 후, 배지

만 취하여 Vivaspin Centrifugal Concentrators를 이용하여 단백질을 농축하였다. 농축물을 젤라틴 (1.5 mg/ml)이 포함된 10% SDS-PAGE에서 전기영동 후, TritonX-100에 세척하고 zymogram development solution으로 옮겨 37°C에서 18시간 동안 반응시켰다. Coomassie brilliant blue G250을 사용하여 염색하였다. 그 후 탈색과정을 거쳐 MMP 억제 효과를 관찰하였다.

Rhizopus oryzae KSD-815 추출물과 그 분획물에 대한 gelatin을 이용한 zymogram을 C6와 MDA-MB-231에서 수행하였다 (Fig. 4-1). TAE와 TAB에서 MMP-9 저해 활성이 확인되었다. 이 분획물의 subfractions에 대한 zymogram을 C6, MDA-MB-231 그리고 SK-HEP-1에서 수행하였으나 MMP-9 또는 MMP-2에 대한 저해 활성은 확인하지 못하였다 (data not shown).

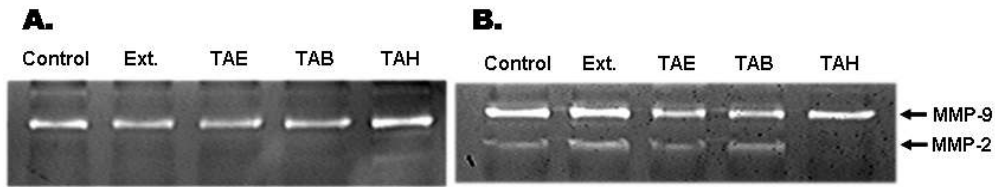
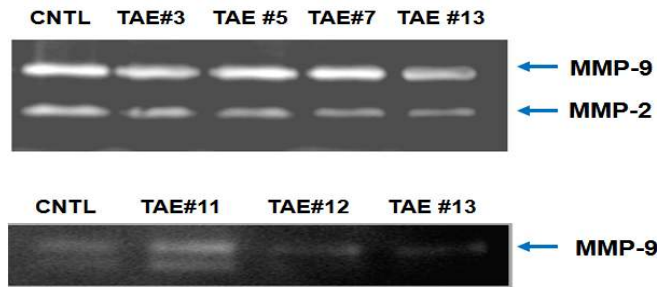


Figure 4-1. Gelatin zymographic analysis of extracts and fractions from *Rhizopus oryzae* KSD-815 on C6 (A) and MDA-MB-231 (B)

㉑ TAE

TAE 1차 분획 중 암세포의 이동 억제 효과를 보인 TAE#3, TAE#5, TAE#7, TAE#13을 SK-HEP-1에서 MMP 저해 활성을 평가하였다 (Fig. 4-2). TAE#3, TAE#12, TAE#13번은 MMP-9의 약한 저해활성을 보였고, TAE#3, TAE#5, TAE#7, TAE#13은 MMP-2의 대한 저해 활성을 나타내었다.



Final concentration : 20 µg/ml

Figure 4-2. Gelatin zymography of TAE#3, TAE#4, TAE#5, TAE#7, TAE#11, TAE#12, and TAE#13 on SK-HEP-1

④ 혈관 생성 억제 활성

인체조직을 구성하고 있는 모든 세포의 생존은 혈관에 의한 산소와 영양분의 공급 및 대사산물의 배출이 필수적으로 요구된다. 이런 혈관 생성 기전은 두 가지 생성기전으로 나뉘는데 하나는 혈관형성 (Vasculogenesis)으로써 혈관 전구세포인 angioblast의 분열과 분화에 의해

혈관과 혈구 세포들이 만들어지는 de novo 혈관생성 과정으로 초기 발생과정에서만 일어난다. 또 다른 과정은 혈관신생 (Angiogenesis)로 기존의 혈관이 자극에 의해 발아가 일어나 새로운 혈관이 생성되는 과정이다. 혈관신생의 과정은 세포외 기질의 proteolytic degradation, endothelial cell-matrix adhesion, migration, proliferation, differentiation 단계로 이루어진다 [16]. 이런 생물학적 반응은 암, 류마티스 관절염, 건선등과 같은 몇몇 질병과 연관되어 있다. 그리고 다양한 growth factor들이 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 angiogenesis를 유도할 수 있다고 알려져 있는데 그 중 대표적으로 Vascular endothelial cell growth factor(VEGF)와 basic Fibroblast Growth Factor(bFGF)가 주로 많이 발현된다 [17].

기존에 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관의 성장, 즉 신생혈관 생성은 목표로 하는 내피 세포에서 점착(adhesion), 이동(migration), 생존 기작(survival machinery) 등 등위적 신호에 의해 조절된다. 따라서 이러한 과정을 방해하는 물질들은 신생혈관 기작을 저해할 수 있다 [18]. 닭 배아의 융모막요막 (Chick embryonic chorioallantoic membrane, CAM)은 활성을 탐색하고자 하는 물질의 혈관내(intravascular) 뿐만 아니라 국소적(topical) 주입의 효과를 모두 관찰할 수 있고, 다른 실험에 비해 상대적으로 신속하며, 종양 성장과 같은 신생혈관 기작과 연관된 다른 연구에 쉽게 적용될 수 있다는 장점이 있다. 이처럼 CAM assay는 *in vivo*상에서 신생혈관 촉진 및 억제 물질의 상호작용에 대한 연구가 가능하도록 생리적인 환경을 제공해준다 [14].

수정된 유정란의 표면을 70% 에탄올로 닦아준 후 37°C에서 배양하였다. 3.5일 후 유정란의 알부민을 3 ml 추출한 후 window를 내고 4.5일이 되는 날 시료를 농도별로 chorioallantoic membrane (CAM)에 처리하였다. 6.5일째, 유정란의 CAM에 intralipose를 채워 맥관 형성을 관찰하였다.

Rhizopus oryzae KSD-815 추출물의 3가지 분획 (TAE, TAB, TAH)에 대한 혈관 생성억제 활성을 CAM assay 방법으로 측정하였다 (Table 3-1 & Fig. 5-1). H₂O 분획 (TAH)은 10 µg/ml의 농도에서 양성대조군으로 사용한 1 µg retinoic acid과 동등한 혈관 생성억제 활성을 나타내었다. TAE 분획도 retinoic acid와 유사한 수준의 억제 활성을 확인하였다.

Table 3-1. Anti-angiogenic effects of the fractions of *Rhizopus oryzae* KSD-815

Sample	Concentration	No. of survived eggs	No. of positive eggs	% Relative activity
0.1% DMSO	-	13	0	0
Retinoic acid	1 µg	13	9	69.9
TAE	10 µg/ml	15	9	60.0
TAB	10 µg/ml	16	8	50.0
TAH	10 µg/ml	13	9	69.2

※ 각 시료별로 20개의 유정란을 사용하였다.

※ % relative activity은 (number of positive eggs / number of survived eggs) × 100로 산출

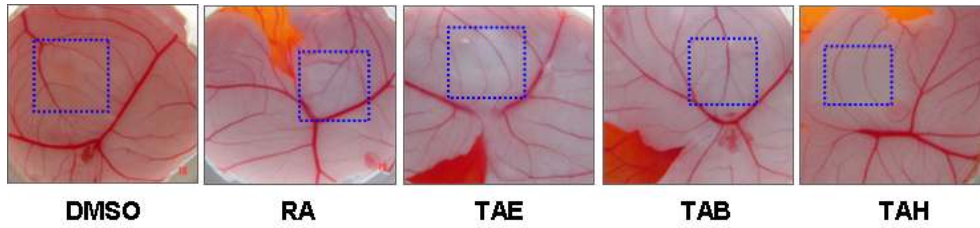


Figure 5-1. Effects of fractions of *Rhizopus oryzae* KSD-815 on angiogenesis in the CAM assay

㉞ TAHe

Negative control인 0.1% DMSO를 처리했을 때 신규 혈관 형성이 일어났지만, *Rhizopus oryzae* KSD-815의 TAH 분획을 10 $\mu\text{g/ml/egg}$ 에 처리했을 때, positive control인 retinoic acid (1 μg)와 동등한 억제 활성을 확인하였다 (Table 3-2). TAH은 1 $\mu\text{g/ml/egg}$ 에서 약 50% 이상의 antiangiogenic 효과를 보였다. 이 효과는 용량 의존적인 혈관 생성 억제 활성이 증가함을 보였다 (Fig. 5-2).

Table 3-2. Anti-angiogenic effects of TAH fraction

Sample	Concentration	No. of survived eggs	No. of positive eggs	% Relative activity
0.1% DMSO	-	13	1	7.69
Retinoic acid	1 μg	12	8	66.7
TAH	1 $\mu\text{g/ml}$	12	6	50.0
	10 $\mu\text{g/ml}$	13	9	69.2
	100 $\mu\text{g/ml}$	15	11	73.3

※ 각 시료별로 20개의 유정란을 사용하였다.

※ % relative activity은 (number of positive eggs / number of survived eggs) \times 100로 산출

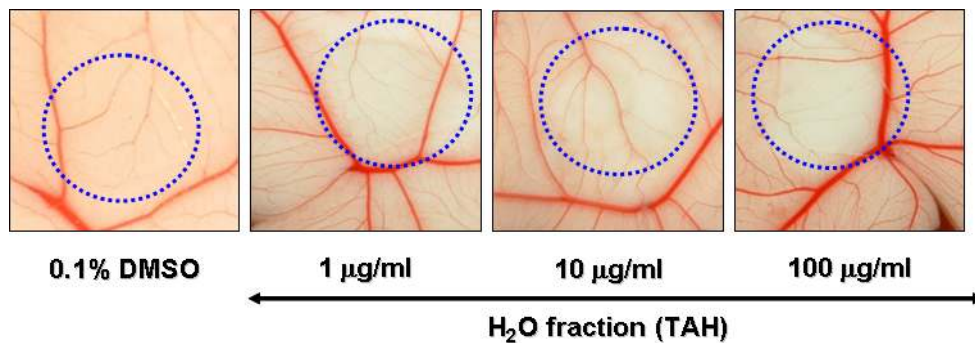


Figure 5-2. Effects of fractions of TAH on angiogenesis in the CAM assay

㉔ 전통주 농축물

Rhizopus oryzae KSD-815을 사용하여 제조한 전통주에서 *Rhizopus oryzae* KSD-815에서 확인한 혈관생성억제 활성 유무를 평가하기 위해 전통주 농축물 (B) 및 그 3가지 분획물 (BE, BB, BH)에 대한 혈관 생성억제 활성을 CAM assay 방법으로 측정하였다 (Table 3-3). 전통주 농축물 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 양성 대조물질로 사용한 1 μg retinoic acid과 동등한 혈관 생성억제 활성을 나타내었다. BE와 BB는 50% 수준의 억제 활성을 보였으나 BH는 80% 수준의 매우 높은 혈관생성억제 활성을 확인하였다. 이 BH 분획물은 1 $\mu\text{g/ml/egg}$ 에서 약 58% 이상의 antiangiogenic 효과를 보였으며 농도의존적인 혈관 생성 억제 활성을 확인하였다. 전통주 BH 분획물에서의 활성은 TAH 분획물의 영향으로 사료되며, TAH 분획물보다 증가된 혈관 생성억제 활성을 확인하였다 (Table 3-4).

Table 3-3. Anti-angiogenic effects of the concentrates of traditional wine

Sample	Concentration	No. of survived eggs	No. of positive eggs	% Relative activity
0.1% DMSO	-	13	0	0
Retinoic acid	1 μg	13	9	69.9
B (concentrates)	100 $\mu\text{g/ml}$	18	13	72.2
BE	100 $\mu\text{g/ml}$	16	9	56.3
BB	100 $\mu\text{g/ml}$	14	7	50.0
BH	100 $\mu\text{g/ml}$	16	13	81.2

* 각 시료별로 20개의 유정란을 사용하였다.

* % relative activity은 (number of positive eggs / number of survived eggs) \times 100로 산출

Table 3-4. Anti-angiogenic effects of H₂O fractions of traditional wine

Sample	Concentration	No. of survived eggs	No. of positive eggs	% Relative activity
0.1% DMSO	-	13	1	7.7
Retinoic acid	1 μg	12	8	66.7
BH	1 $\mu\text{g/ml}$	12	7	58.3
	10 $\mu\text{g/ml}$	15	11	73.3
	100 $\mu\text{g/ml}$	14	11	78.6

* 각 시료별로 20개의 유정란을 사용하였다.

* % relative activity은 (number of positive eggs / number of survived eggs) \times 100로 산출

㉕ HUVEC에서 Tube Formation 억제 활성 탐색

신생혈관과 관련된 현상을 연구하기 위한 가장 특징적인 실험 방법 중 내피세포가 3차원적인 구조 (tube)를 형성하는 능력을 측정하는 것이다. 어떠한 기원의 내피세포라도 자연적으로

관상의 구조(tubular structure)를 형성하게 되고, 이는 적당한 종류의 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)을 도말한 *in vitro* 상에서도 관찰된다. Extracellular matrix을 도말한 *in vitro* assay의 경우에서와 마찬가지로 *in vivo* 에서도 이러한 현상은 상당히 충실하게 지켜진다. 특히 Engelbreth Holm Swarm (EHS) 종양세포로부터 주로 laminin으로 구성된 Matrigel을 이용하여 *in vitro*에서 24시간 내에 tube formation을 유도할 수 있다.

10 mg/ml의 Matrigel을 12-well plate에 코팅하였다. HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)의 1.5×10^5 cells/ml의 농도로 Matrigel로 코팅된 plate에 seeding하고 37°C 배양기에서 60분 동안 배양하였다. *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물 및 분획물을 처리하고 추가 배양하였다. 24시간 후 현미경으로 tube 형성 여부를 측정하였다.

대조군에서는 뚜렷한 관상구조의 tube를 형성하였으나 50 μ g/ml의 TAH와 TAB를 처리한 HUVECs은 관상구조를 형성하지 못하였다 (Fig. 6). TAB는 불완전한 형태의 관상구조가 형성된 반면 TAH에서는 어떤 형태의 구조도 형성되지 못하였다. TAH는 내피세포의 자연적인 혈관 형성 능력을 저해시키는 활성을 가지고 있으며 이는 CAM assay를 통해 확인한 결과와 상관성이 매우 높다.



Figure 6. Inhibition of TAH and TAE on HUVEC tube formation on Matrigel

㉔ 혈관생성 인자의 mRNA 수준의 발현 억제 탐색

혈관내피성장인자 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)는 암의 혈관 신생에 관여하여 암의 성장, 진행 및 전이에 중요한 역할을 한다 [17]. VEGF의 발현을 유도하는 상위조절 핵심인자는 저산소증-유도전사인자 (hypoxia-inducible transcription factor, HIF)-1로 이는 HIF-1a, HIF-1b subunit으로 구성된 이질이량체 (heterodimer)이다 [19]. 종양의 빠른 성장과 진행에 따라 발생하는 종양 내 저산소증은 일부 고형 종양에서 HIF-1a 단백질의 지속적인 발현을 유도하여 VEGF 발현을 활성화시킴으로써 종양의 진행을 촉진한다.

㉕ TAE

암의 혈관생성에 영향을 주는 bFGF, TNF- α , 그리고 HIF-1a의 mRNA 발현 변화를 TAH 처리 후 역전사 중합효소연쇄반응으로 확인하였다. 유방암 세포주인 MDA-MB-468에 TAH 농도별로 처리한 결과, bFGF와 TNF- α 는 10~100 μ g/ml의 농도에서 감소하였다. TAH는 HIF-1a의 발현을 억제함으로써 종양의 빠른 성장과 진행에 따라 발생하는 종양 내 저산소증으로 인한 VEGF의 발현을 저해할 것으로 사료되며 혈관생성억제 및 내피세포의 관상 구조 생성 억제 활성에 대한 분자수준 작용기전을 설명한다. 현재 TAH를 처리한 다양한 암세포에서 VEGF를 포함한 혈관생성인자에 대한 mRNA 발현 변화를 탐색하고 있다.

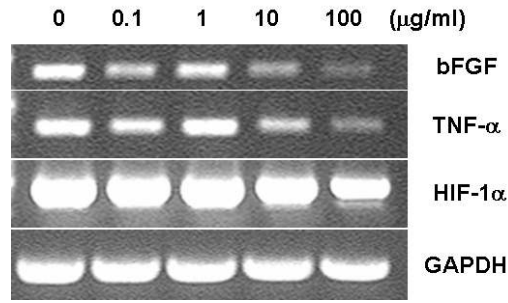


Figure 7. Effects of TAH on bFGF, TNF- α , and HIF-1 α in MDA-MB-468

(2) 암세포의 apoptosis 유도 효과

세포사멸(Apoptosis)은 다세포 생물에서 일어나는 programmed cell death의 한 형태이며 일련의 생화학적 반응에 의해 blebbing, 세포막의 변화, 세포의 수축(shrinkage), 크로마틴의 응축, DNA fragmentation을 포함하는 형태적 변화를 일으키게 된다 [20].

① DNA fragmentation

세포사멸 단계 중 하나인 DNA fragmentation 현상을 알아보기 위해, 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231과 MCF-7을 사용하여 DNA laddering 정도를 평가하였다. 암 세포주 (1×10^6 cells/ml)를 6-well plate에 세포배양하고 12~18시간 후 세포독성 활성을 나타낸 분획을 serum 무첨가 배지에 24시간 동안 처리하였다. 배지를 제거한 후 lysis buffer를 넣은 well에 cell scraper를 이용하여 세포들을 모은 후, proteinase K (100 μ g/ml)을 1~3시간 반응시킨다. 동일량 페놀 (pH 8.0)을 넣고 4 $^{\circ}$ C, 13,000rpm에서 15분간 원심분리를 하고 상층액을 취한다. 동량의 chloroform : isoamylalchol (24 : 1) 혼합액을 넣고 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리를 수행하고 상층액을 취한다. 상층액에 에탄올과 5 M NaCl을 넣어 -70 $^{\circ}$ C에 30분간 침전 반응시킨다. 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리를 하고 70%에탄올로 침전된 DNA를 닦아낸 후 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리를 한다. DNA를 건조시킨 다음, RNase를 포함한 TE buffer (20~50 μ l)에 녹이고 65 $^{\circ}$ C에 5분 동안 반응 후, 1.5% agarose gel에서 전기영동 하여 DNA fragmentation 정도를 관찰하였다.

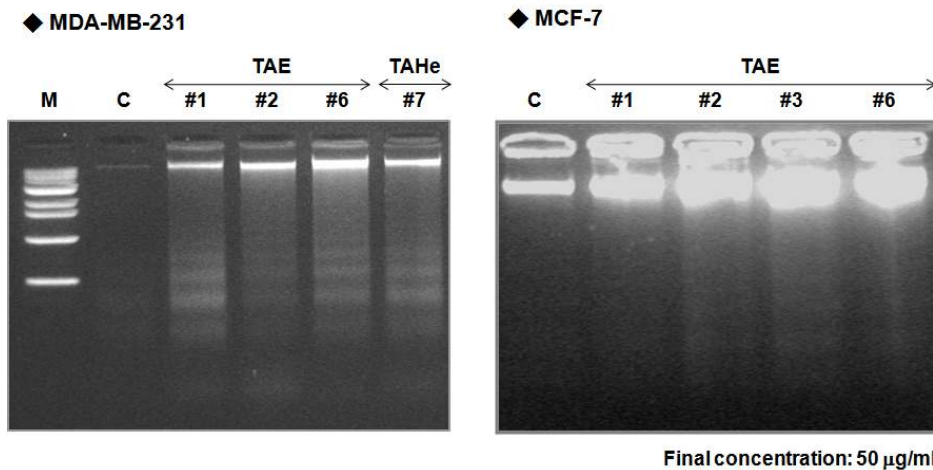


Figure 8. DNA fragmentation induced by extracts of *Rhizopus oryzae* KSD-815

인간 유방암 세포주인 MDA-MB231에서는 *Rhizopus oryzae* KSD-815의 ethylacetate subfraction인 TAE#1 TAE#2, TAE#6, TAE#7분획이 DNA fragmentation를 유도하는 것을 확인하였고, 인간 유방암 세포주인 MCF-7에서는 TAE#1, TAE#2, TAE#3, TAE#6분획이 DNA fragmentation에 의한 laddering 현상을 나타냄을 확인하였다. TAE#1과 TAE#6 분획은 두 세포주 모두, DNA fragmentation 현상을 관찰하였다 (Fig. 8).

② Hoechst33258 staining

세포 사멸 단계의 특징적인 현상 중 하나인 chromatin condensation 현상을 확인하기 위해 Hoechst33258 staining을 수행하였다. 세포사멸을 유도하는 물질에 반응하는 세포는 chromatin이 응축하게 되어 DNA에 흡착하는 형광염료인 Hoechst33258이 응축된 부위에 더 많이 흡착하게 된다. Chromatin이 응축된 정도는 형광현미경으로 관찰하여 대조군과 형광 밝기 정도를 비교하였다.

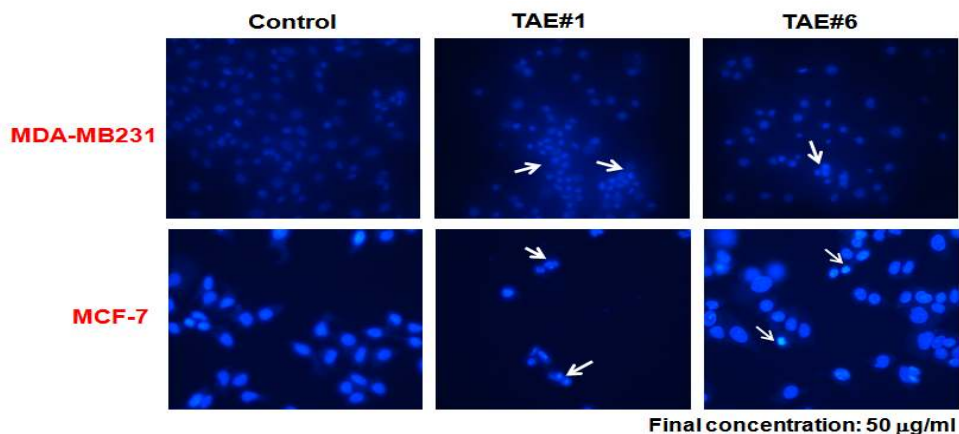


Figure 9. Chromatin condensation induced by TAE#1 and TAE#6 on human breast cancer cell lines.

TAE#1과 TAE#6이 MDA-MB-231, MCF-7에서 세포 사멸 효과가 나타나는 것을 확인하였다 (Fig. 9). 50 µg/ml에서 MDA-MB-231과 MCF-7의 세포 크기가 줄어든 것을 확인하였으며 chromatin condensation이 일어난 것을 관찰하였다.

(3)면역증강 활성

Nitric oxide (NO)는 면역·신경·심혈관계 조직을 포함한 많은 생물학적 시스템에서 중요한 신호전달 messenger인 동시에 effector molecule이다. NO는 신체 대부분의 세포에 존재하는 nitric oxide synthase에 의해 합성된다. NO localization은 다양한 범위의 생리학적 과정에 관여하지만 병리적인 과정에 관여하는 단백질과의 주된 반응 때문에 해로울 수 있다.

NO 생성을 알아보기 위한 방법은 NO에서 만들어지는 안정하고 비휘발성 산물인 nitrite를 측정하는 Griess reagent assay가 일반적이다. 이 assay는 산성 조건 하에서 sulfinilamide와 N-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED)에 의한 화학반응을 기반으로 하고 있다. 이 시스템은 plasma, serum, urine 과 tissue culture medium과 같은 생물학적 또는 실험적 liquid matrix들에서 nitrite를 측정할 수 있다.

대식세포인 RAW264.7에서 *Rhizopus oryzae* KSD-815의 분획의 각 subfractions에 대한 NO 억제 활성 및 세포독성 활성을 평가하였다. *Rhizopus oryzae* KSD-815 추출물 중 TAE, TAHe, TAB 분획물의 각 subfraction을 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 및 10 U/ml interferon- γ 로 활성화시킨 RAW264.7에 처리하고 37°C에서 배양하였다. 24시간 후 배지와 sulfinilamide와 N-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED)를 1:1의 비율로 반응시켜 발색된 정도를 비교하여 NO 생성 저하 활성을 평가하였으며 대식세포 생존율은 MTT assay 방법으로 확인하였다

㉞ TAHe

TAHe#05, #11, #13, #15에서는 NO 생성을 14.1~26.2%로 억제하고 세포 생존율은 84.0% 이상의 면역 증강 활성을 확인하였다 (Fig. 10-1).

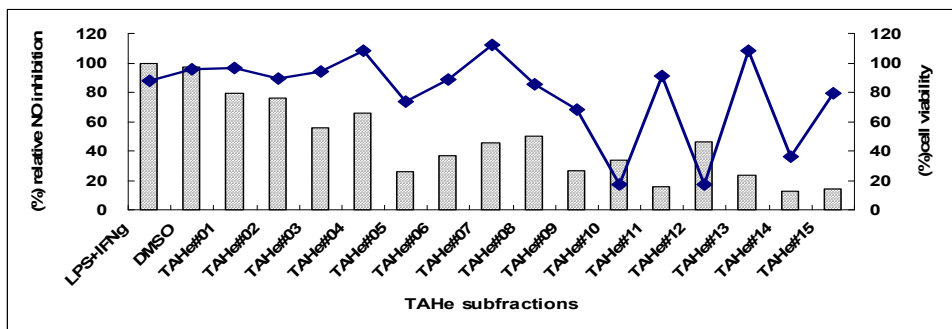


Figure 10-1. Effects of TAHe on inhibition of NO production and cell viability

TAHe#9과 TAHe#14는 세포독성을 나타내지 않으면서 농도의존적인 NO 생성억제 활성을 나타내었다. TAHe#11과 TAHe#15는 농도 의존적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으나 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포독성 효과를 나타내었다 (Fig. 10-2).

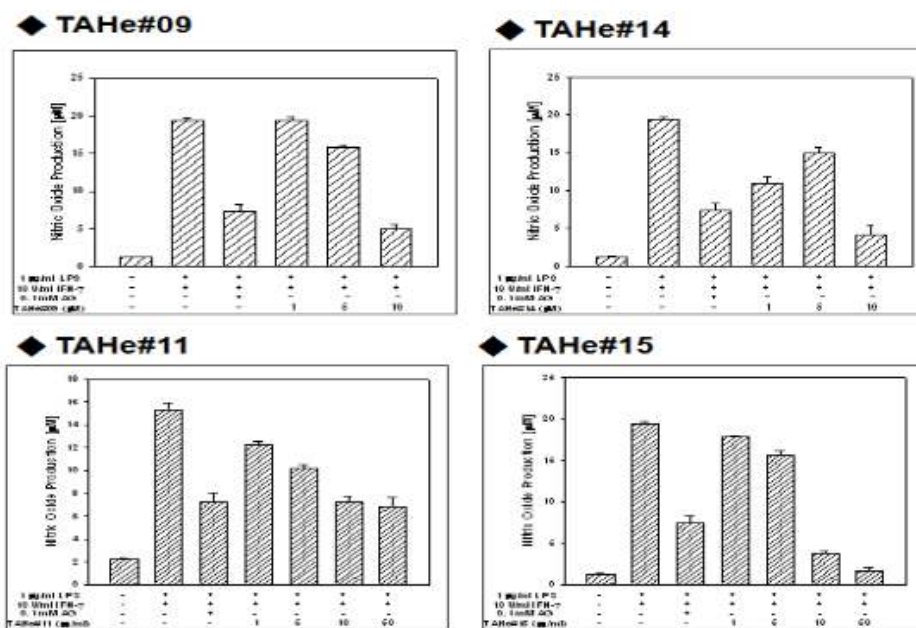


Figure 10-2. Effects of TAHe#9, TAHe#11, TAHe#14, and TAHe#15 on NO production

⊕ TAE

TAE 분획물의 subfractions은 TAE#03만 NO 생성을 22% 수준으로 저해하였으며 세포 생존율은 76.0%을 나타내었다 (Fig. 10-3).

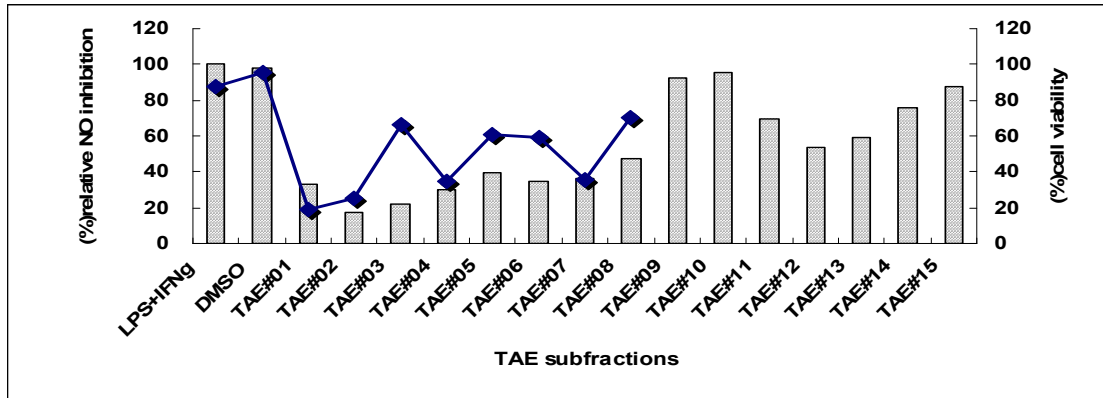


Figure 10-3. Effects of TAE on inhibition of NO production and cell viability

TAE 분획은 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 NO 생성 억제 활성을 확인해 본 결과, 높은 세포독성 때문에 NO 생성이 저하되는 것으로 확인 하였다 (Data not shown). 그래서 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 RAW264.7에 적용하여 높은 세포 생존율을 나타내면서 NO 생성을 저해하는 활성을 나타내는 TAE 분획을 선별하였다 (Fig. 10-4). TAE#1, TAE#2, TAE#6, TAE#7은 세포독성은 없으면서 농도 의존적인 NO 생성 저해 활성을 확인하였다 (Fig. 10-5).

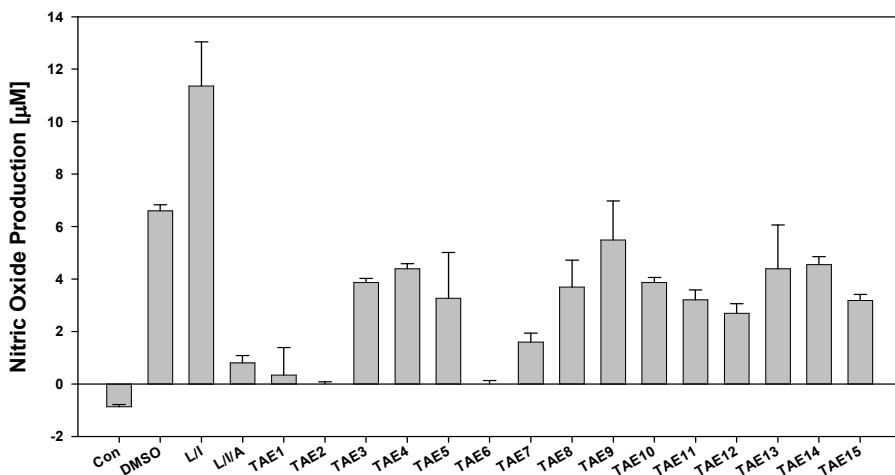


Figure 10-4. Effects of TAE on inhibition of NO production

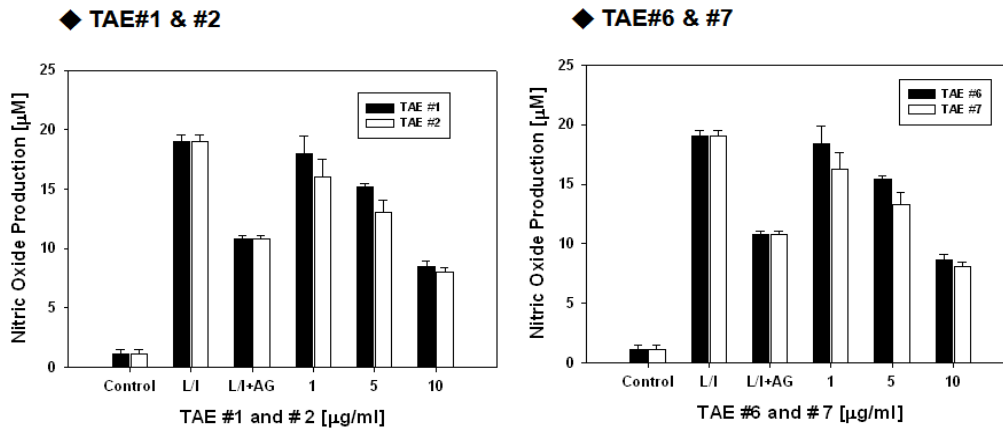


Figure 10-5. Effects of TAE#1, TAE#2, TAE#6, and TAE#7 on inhibition of NO production

㉔ TAB

TAB 분획물은 다른 분획물의 subfractions 보다 높은 NO 생성 억제 활성을 나타내었다. 그 중 TAB#01, #02, #03, #04, #04c, 그리고 #07은 NO 생성을 16.0~27.7% 수준으로 억제했으며 세포 생존율은 89.0% 이상이었다 (Fig. 10-6).

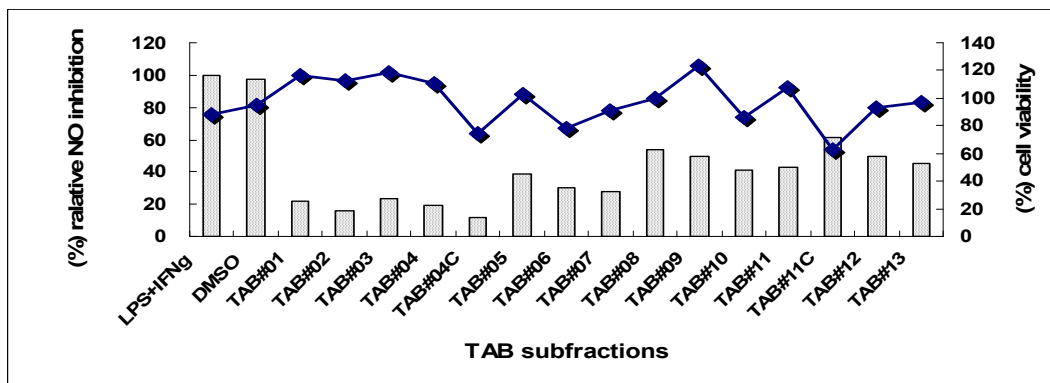


Figure 10-6. Effects of TAB on inhibition of NO production and cell viability

TAB#1과 TAB#2는 RAW264.7에서 세포독성을 나타내지 않았으며, 농도 의존적으로 NO 생성 억제를 확인하지 못했지만, 50 μ g/ml의 농도에서 높은 NO 생성 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 10-7).

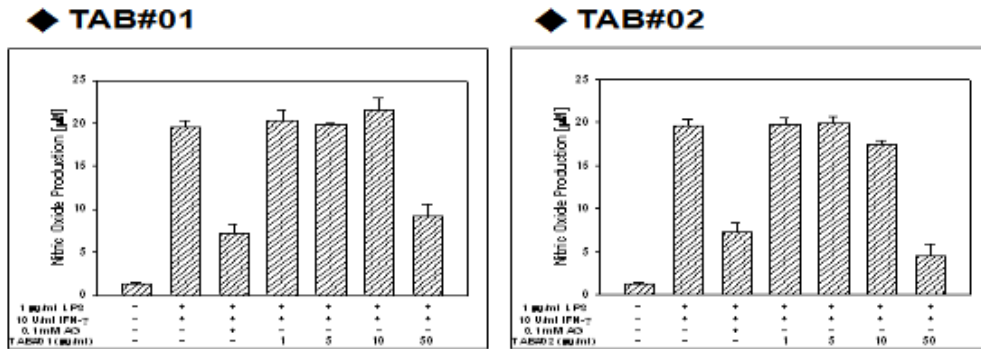


Figure 10-7. Effects of TAB#1, TAB#2, TAHe#9, TAHe#11, TAHe#14, and TAHe#15 on NO production

나. TAE #1, #6 번 분획

(1) 항암활성

① 세포독성 활성 및 증식 억제 효과 탐색

TAE#1과 TAE#6의 2차 분획의 세포독성 효과를 탐색하기 위해 MTT assay를 수행 하였다. TAE#1과 TAE#6의 2차 subfraction들의 세포독성 활성을 측정하기 위해, 50 µg/ml의 농도로 적용하였다. TAE#1은 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231과 MCF-7, Human melanoma cell line A2058을 이용하였고 TAE#6은 MDA-MB-231, MCF-7, 설치류 glioma cell line C6, 인간 뇌종양 세포주 SH-SY5Y 및 인간 간암 세포주 SK-HEP-1에서 세포독성 활성을 측정하였다(Table 4-1, 4-2).

Table 4-1. Cytotoxic effects of TAE#1 2nd subfractionson various cancer cell lines

Cell lines		MDA-MB-231	MCF-7	A2058
subfractions				
TAE	#1-1	41.31	32.08	51.79
	#1-2	63.03	71.63	76.82
	#1-3	17.39	0	15.32
	#1-4	0	0	0
	#1-5	58.69	55.31	54.77
	#1-6	35.15	56.08	54.47
	#1-7	31.83	10.62	23
	#1-8	47.96	33.13	51.88
	#1-9	26.55	35.18	34.61
	#1-M	20.65	20.13	0

TAE#1 2차 분획의 #1-2는 A2058과 MDA-MB-231, MCF-7에서 63.03-76.82%의 세포독성 활성을 나타내었고 #1-5는 54.77-58.69%의 세포독성 활성을 확인하였다 (Table 4-1). TAE#6

2차 분획의 #6-2는 MCF-7에서 61.54%을, MDA-MB-231과 C6, SH-SY5Y, SK-HEP-1에서는 84.41-88.24%의 세포독성 활성을 나타내었다. TAE#6-11은 MCF-7을 제외한 4개 암세포주에서 53.85-58.46%의 세포독성 활성을 확인하였다 (Table 4-2).

Table 4-2. Cytotoxic effects of TAE#6 2nd subfractions on various cancer cell lines

Cell lines		MDA-MB-231	MCF-7	C6	SH-SY5Y	SK-HEP-1
subfractions						
TAE	#6-1	0	6.46	0	0	0
	#6-2	84.74	61.54	88.24	84.03	84.41
	#6-3	67.02	28.63	48.11	50.82	30.78
	#6-4	43.2	4.17	32.03	41.18	28.95
	#6-5	38.21	6.29	23.36	42.25	12.51
	#6-6	47.23	0	34.98	31.07	25.52
	#6-7	51.11	0	41.12	38.99	31.29
	#6-8	38.73	3.67	21.45	11.1	28.75
	#6-9	44.07	0	27.82	26.93	28.13
	#6-10	49.93	7	53.65	41.07	38.58
	#6-11	58.46	25.17	56.35	55.26	53.85

TAE#6-2 분획은 MDA-MB-231에 50 µg/ml의 농도로 적용하였을 때, 84.74%의 세포독성 활성을 나타내었다. TAE#6-2를 최고 농도 50 µg/ml을 기준으로 농도별로 24 시간 처리한 조건에서는 농도 의존적인 세포독성 활성을 나타내었으며 IC₅₀값은 6.7 µg/ml로 확인하였다. 같은 세포에서 20 µg/ml을 최고 농도로 하여 48시간 처리한 조건에서도 농도 의존적인 세포독성 활성을 확인하였다 (Fig. 11-1).

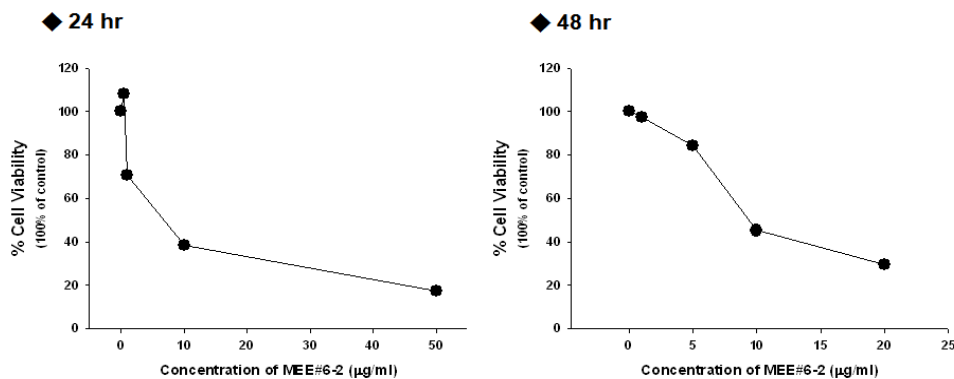


Figure 11-1. Cytotoxic activities of TAE#6-2 on MDA-MB-231 in a dose and time dependent manner

암 세포의 증식억제 효과를 탐색하기 위해 [³H]thymidine assay [21]를 수행하였다. 방사성 동위원소가 labeling된 thymidine은 DNA가 합성될 때 이용되어 세포의 증식이 활발한 세포에서는 더 많이 세포 내로 섭취되어 세포 증식의 정도를 확인 할 수 있다. 암 세포주를 24-well plate에 5×10^4 cells/well로 10% 18~24시간 배양한다. 10% FBS가 포함된 세포배양 배지를 제거 후, PBS로 세척하고, 무혈청 배지로 교체하여 원하는 농도로 *Rhizopus oryzae* KSD-815 분획을 처리한다. 18시간 배양 후 1 μ Ci/ml의 [³H]thymidine 1 μ l를 세포에 처리하고 6 시간 동안 배양한다. 처리한 세포를 Trypsin 처리하여 모으고 PBS로 2회 세척 후, 5% TCA를 이용하여 precipitation을 시킨다. 그 후 세포들을 10% SDS 와 1 M NaOH로 lysis시키고 scintillation cocktail에 섞어 scintillation counter로 세포 내로 흡수된 [³H]thymidine의 양을 cpm값을 측정하여 확인하였다.

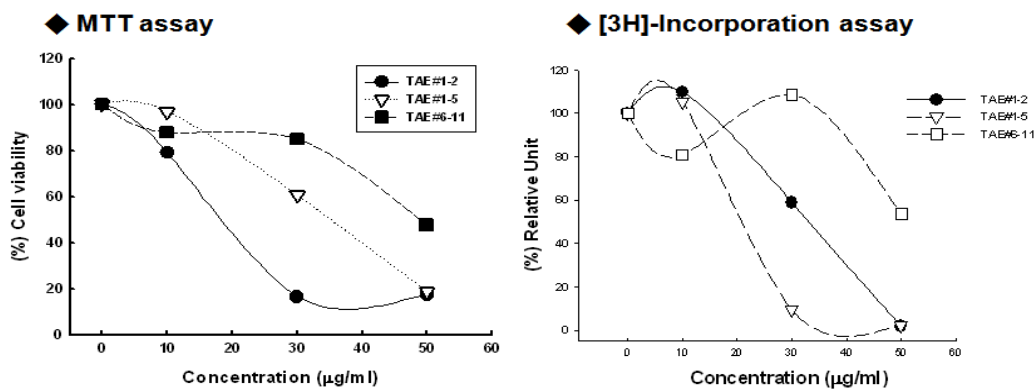


Figure 11-2. Cytotoxic and inhibitory activities of proliferation on MDA-MB-231

TAE#1-2, TAE#1-5, TAE#6-11에 대한 세포독성 활성과 세포증식 억제 활성을 검증하였다. MDA-MB-231에서 TAE#1-2, TAE#1-5, TAE#6-11은 농도의존적인 세포독성 활성을 나타내었으며 TAE#1-2의 IC₅₀값은 18.1 μ g/ml, TAE#1-5의 IC₅₀값은 35.0 μ g/ml, TAE#6-11의 IC₅₀값은 48.6 μ g/ml로 확인하였다 (Fig. 11-2; left panel). 또한 MDA-MB-231에 대해서 TAE#1-2, TAE#1-5, TAE#6-11은 농도의존적인 세포증식 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 11-2; right panel). 이는 TAE#1-2, TAE#1-5, TAE#6-11의 높은 세포독성 활성에 의한 세포사멸에 의한 것으로 사료된다.

(2) Cell cycle arrest 와 세포사멸(apoptosis) 유도

Propidium iodide (PI)는 nucleic acid에 삽입함으로써 DNA를 염색할 수 있다. PI는 죽은 세포의 세포막을 투과하여 DNA를 염색할 수 있지만 살아있는 세포의 세포막은 투과할 수 없다. 세포사멸의 특징적인 형태적 변화 현상 중 세포사멸 초기 단계에서는 membrane phospholipid phosphatidylserine (PS)가 막의 안쪽에서 바깥쪽으로 이동하여 PS와 강친화성을 갖는 Annexin V와의 결합이 쉽게 이루어진다. PS의 translocation은 세포외막의 손실, DNA fragmentation, chromatin condensation과 같은 다른 세포사멸 과정을 진행하게 해준다. 따라서 PI staining, PI/Annexin V staining을 통해 세포사멸 (apoptosis)를 일으킨 세포를 FACS를 이용하여 cell cycle arrest 또는 세포사멸 현상을 확인 할 수 있다.

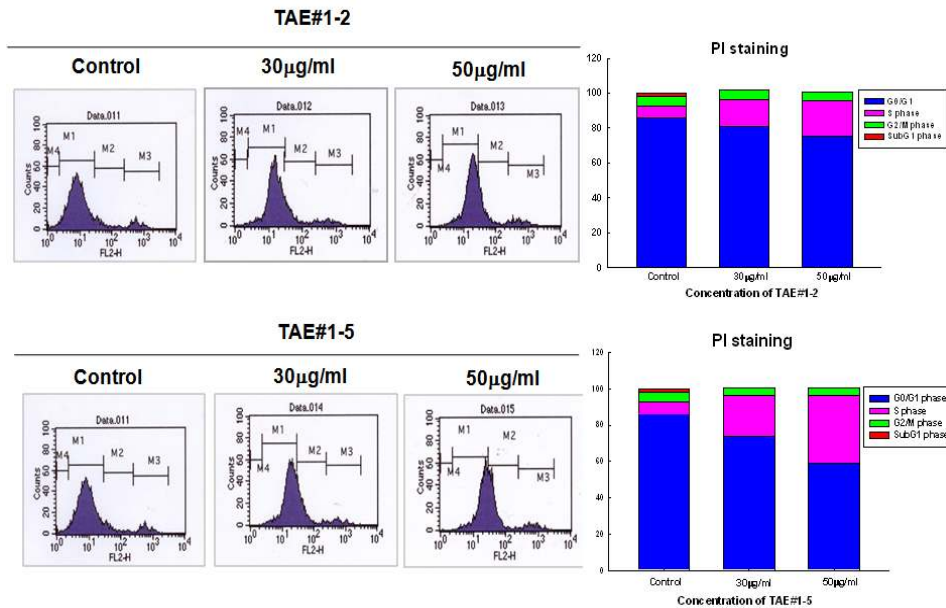


Figure 12. Cell cycle analysis by PI staining of TAE#1-2 and TAE#1-5 on MDA-MB-231

TAE#1-2과 TAE#1-5분획을 MDA-MB-231에 24시간 처리한 후, cell cycle arrest 효과를 평가하였다 (Fig. 12). TAE#1-2분획을 MDA-MB-231에 30 µg/ml을 처리한 결과, 대조군에 비해 S phase가 8.83% 증가하였고 50 µg/ml을 처리한 실험군은 대조군에 비해 S phase로 14.11% 증가하였다. TAE#1-5 분획을 MDA-MB-231에 30 µg/ml을 처리한 실험군은 S phase로 15.94% 증가하였고, 50 µg/ml을 처리한 실험군에서는 S phase로 30.53% 증가하는 것을 확인하였다. TAE#1-2 와 TAE#1-5는 세포주기 중 DNA 합성단계에서 arrest되는 것으로 예상된다.

(2) 면역 증강 활성

① NO 생성량 저해

TAE #1, #6의 subfraction을 20 µg/ml의 농도에서 NO 생성 억제 활성을 확인해 본 결과, #1-2, #1-5, #1-6, #1-8, #6-3, #6-5, #6-6, #6-7의 활성이 높은 것으로 확인되었다(Data not showed). 각 물질에 대해서 농도 별로 처리한 결과, 모두 처리농도가 높을수록 NO 생성이 저하되는 것으로 확인 하였다 (Fig. 13-1). 그리고 처리한 모든 농도에서 RAW264.7에 높은 세포 생존율을 나타내면서 NO 생성을 저해하는 활성을 나타내었다 (Data not shown).

② TAE #1-2-10의 iNOS 발현량 저해와, MAPK pathway에 미치는 영향

위의 활성 있는 fraction 중에 가장 활성이 좋은 #1-2를 제2협동기관으로부터 다시 7개의 fraction으로 나누어 NO 저해 활성을 살펴보니, #1-2-10이 가장 좋은 활성을 나타내었고, 처리 농도에 따라 NO의 생성도 줄어들었다(Fig. 13-2). #1-2-10이 RAW 264.7 cell 에 미치는 세포 독성을 보기 위해 MTT assay를 수행한 결과 20 µg/ml 농도에는 생존율이 거의 없었지만, 10 µg/ml에서는 70% 정도의 생존율을 보였다(Fig. 13-3). 따라서 앞으로의 실험에서는 농도를 1, 5, 10 µg/ml 로 cell에 처리하였다.

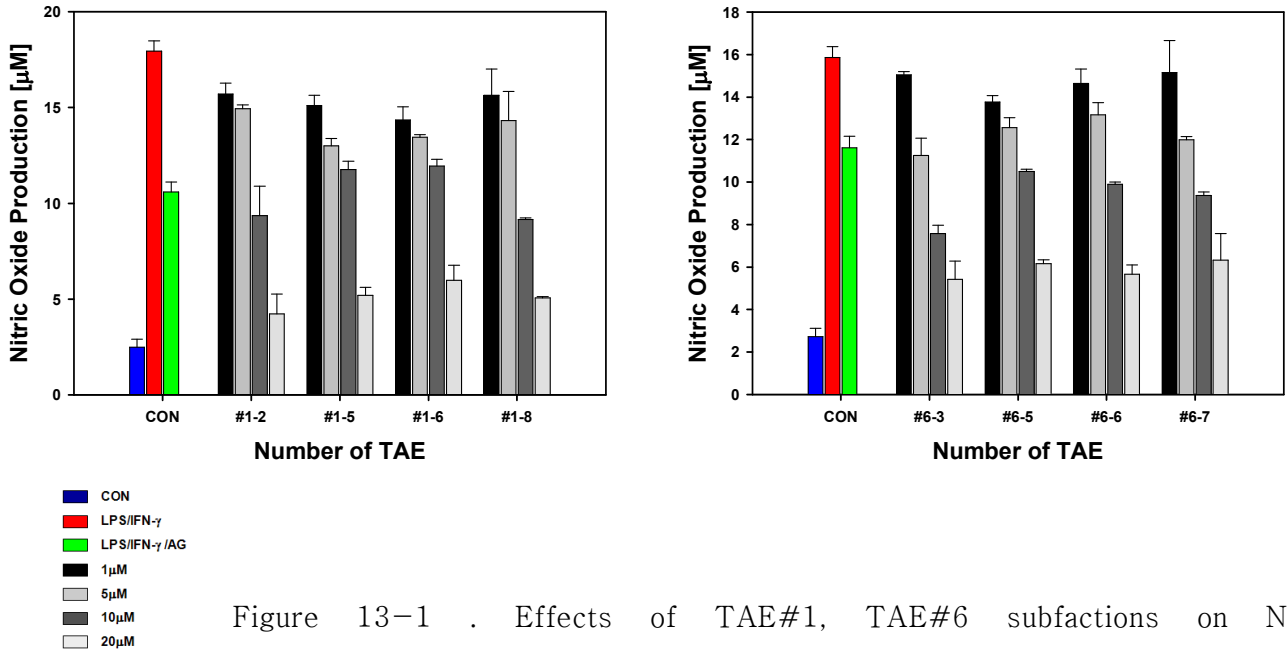


Figure 13-1 . Effects of TAE#1, TAE#6 subfactions on NO

production

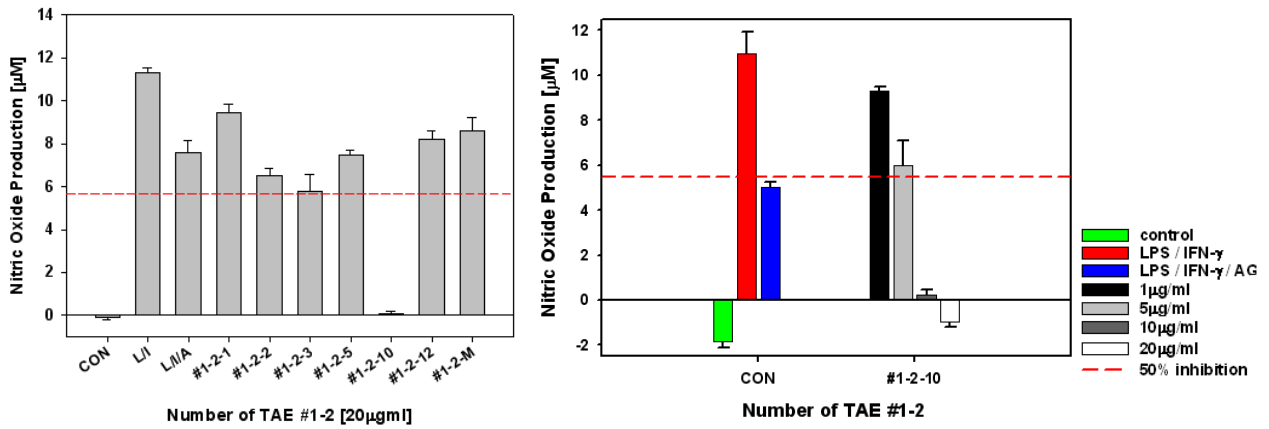


Fig 13-2. Effects of TAE#1-2 subfactions on NO production

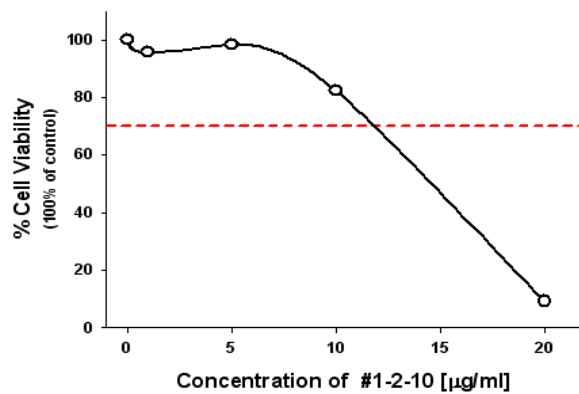


Fig 13-3. Effects of TAE#1-2-10 on NO production

다. Sterols에 대한 항암 활성 및 암 전이 억제 활성

- TAHe#11-4-6 : 5a,8a-epidioxyergosta-6,22-dien-3b-ol
- TAHe#14-3c : Stigmast-4-en-3,6-diol
- TAB#2-5-2 : Ergosta-7,22-diene-3b,5a,6b,9a-tetraol
- TAB#2-5-4 : Daucosterol

(1) TAB#2-5-4 (Daucosterol)에 대한 세포독성 활성

TAB#2-5-4 분획의 세포독성 활성을 인간의 대장암 세포인 HT-29에서 평가하였다 (Fig. 14-1). TAB#2-5-4는 HT-29에서 농도의존적인 세포독성 활성을 나타내었으며 IC₅₀ 값은 19.59 µg/ml로 확인하였다.

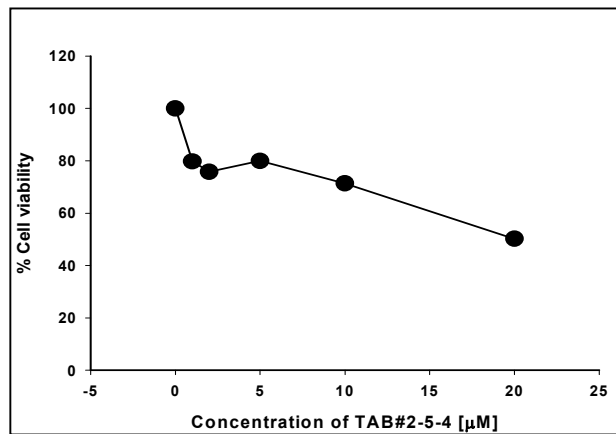


Figure 14-1. Cytotoxic activities of TAB#2-5-4 on human colon cancer cell HT-29.

(2) 스테롤 분획에 대한 암 전이 억제 활성 탐색

Sterols에 대한 암 전이 억제 효과 탐색을 cell motility assay를 수행하여 평가하였다 (Fig. 14-2). TAHe#11-4-6과 TAB#2-5-4는 농도 의존적으로 MDA-MB-231에서 세포이동 억제를 관찰하였다.

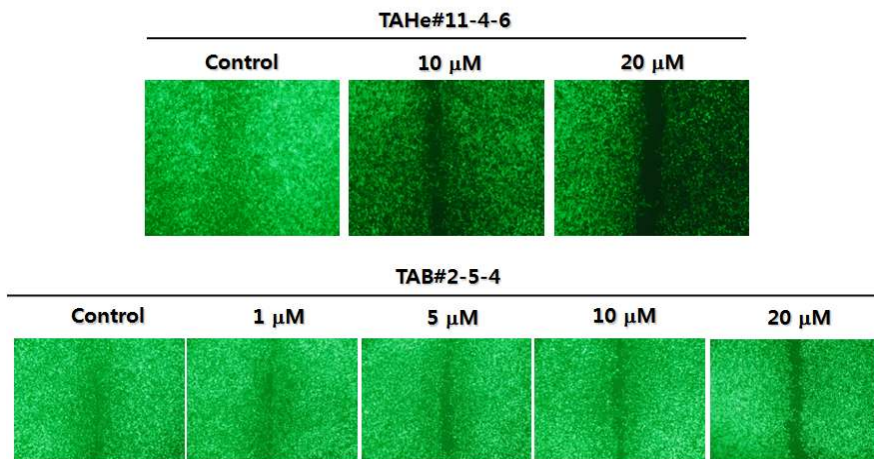


Figure 14-2. Anti-migratory activities of TAHe#11-4-6 and #2-5-4 on MDA-MB-231.

TAHe#11-4-6, TAHe#14-3c는 SK-HEP-1에서 약한 세포이동 억제 효과를 나타내었다. TAB#2-5-2와 TAB#2-5-4는 SK-HEP-1에서 세포이동 억제를 확인하지 못했다 (Fig. 14-3).

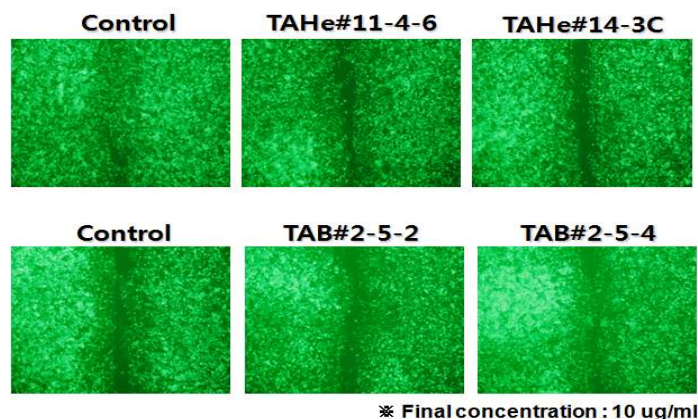


Figure 14-3. Anti-migratory activities of TAHe#11-4-6, TAHe#14-3c, TAB#2-5-2, and TAB#2-5-4 on human liver adenocarcinoma SK-HEP-1.

(3) 스테롤 분획에 대한 Matrix Metalloproteinase (MMP) 저해 활성 탐색

암 전이 억제 활성 중 Matrix metalloproteinase (MMP)의 저해 활성을 평가하기 위해 gelatin을 이용한 zymogram을 MDA-MB-231에서 수행 하였다. MDA-MB-231에서 MMP의 발현을 증가시켜주기 위해 모든 실험군에 LPS 1 µg/ml을 함께 처리하여 sterol의 억제 활성을 농도 의존적으로 비교하여 하였다.

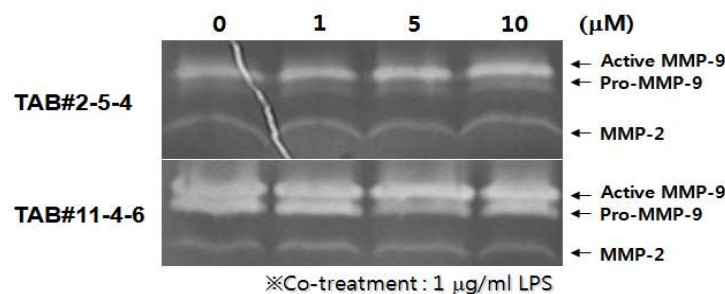


Figure 14-4. Gelatin zymographic analysis of sterols on MDA-MB-231.

TAB#2-5-4, TAB#11-4-6은 MDA-MB-231에서 MMP-2와 MMP-9의 저해 활성을 나타내지 못했다 (Fig. 14-4). MDA-MB-231에서 세포의 이동을 억제하는 효과를 보인 TAB#2-5-4, TAB#11-4-6은 MMP 저해활성을 보이지 않은 것으로 보아 MMP에 의한 암의 전이 억제활성 보다는 세포의 이동과 침윤에 관여하는 인자의 영향이 더 클 것으로 사료된다.

라. TAHe#4-2의 항암 활성 평가

제2 협동연구기관으로부터 제공받은 hexane #4-2 분획에 대한 항암 활성 평가를 수행하였다. Hexane#4-2 분획은 γ -linolenic acid인 것으로 동정되었다 [22].

(1) γ -linolenic acid의 세포독성 활성 및 증식 억제 효과 탐색

γ -linolenic acid를 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 24시간 동안 처리 후, 세포독성 및 세포 증식 억제 효과를 탐색하기 위해, colorimetric assay방법인 MTT assay와 [³H]-thymidine incorporation assay를 수행하였다. Fig. 15-1과 같이, γ -linolenic acid는 농도 의존적으로 MDA-MB-231에 cell viability를 감소시켰으며 proliferation도 저해하는 효과를 확인하였다. 이는 γ -linolenic acid가 유방암 세포의 성장과 증식에 저해 효과를 가지고 있는 것으로 사료된다.

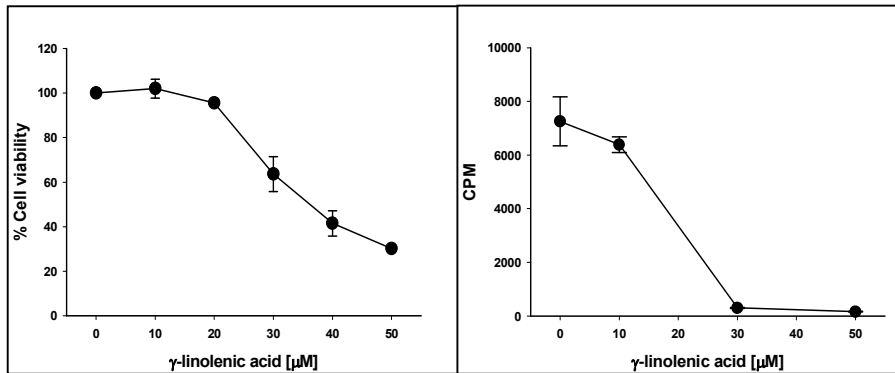


Figure 15-1. Effect of γ -linolenic acid on cell viability and proliferation in MDA-MB-231

(2) γ -linolenic acid의 암세포사 (apoptosis) 유도 탐색

γ -linolenic acid에 의한 암세포의 성장 및 증식 억제가 암 세포사를 유도하는지 확인하기 위하여 세포사 (programmed cell death)의 형태학적·생화학적 hallmark를 탐색하였다.

① Morphology 관찰

γ -linolenic acid를 24시간 동안 처리하고 light microscope를 이용하여 MDA-MB-231의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 농도 의존적인 세포 형태의 변화를 확인하였다 (Fig. 15-2 : A). γ -linolenic acid를 처리하지 않은 대조군과 비교 시, 10 μ M의 농도에서 둥근형태의 세포가 관

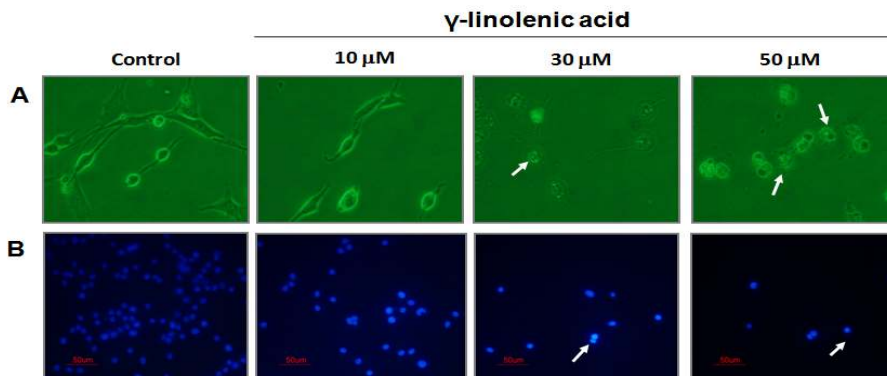


Figure 15-2. γ -linolenic acid induces morphological change and DNA condensation. A) Morphological change was measured by light microscope. B) DNA condensation was observed by fluorescence microscope after staining with DAPI.

찰되었으며 농도가 높아질수록 세포 형태가 파괴된 것을 관찰하였다. 또한 MDA-MB-231에 DAPI로 염색을 하고 형광현미경을 이용하여 DNA condensation과 apoptotic body의 형성을 관찰한 결과, γ -linolenic acid의 농도 의존적으로 DAPI staining의 intensity가 증가되는 현상을 통해 DNA condensation를 확인하였다 (Fig. 15-2 : B).

② DNA fragmentation

또한 γ -linolenic acid에 의한 DNA의 절편화 (DNA fragmentation) 유도 여부를 확인하기 위해 DNA fragmentation assay를 수행하였다. 그 결과, 농도 의존적인 DNA fragmentation이 확인되었으며 특히 50 μ M 농도에서 100 bp의 laddering 현상이 관찰되었다 (Fig. 15-3 ; left panel).

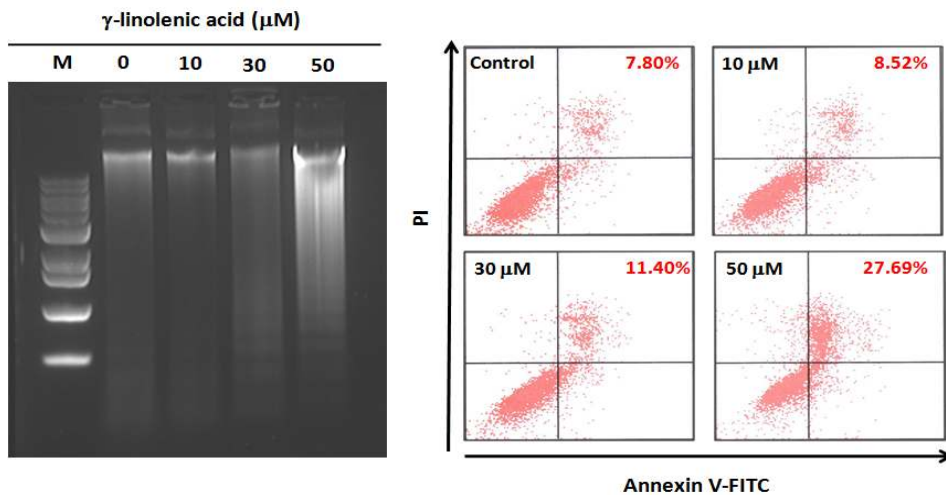


Figure 15-3. Effect of γ -linolenic acid on the induction of apoptosis. Left panel represented DNA fragmentation and right was a representative of flow cytometric analysis to conduct Annexin V/PI assay.

Inner plasma membrane의 phospholipid phosphatidylserine가 outer membrane으로 translocation되는 flip-flap 현상도 세포사의 주요 특징이다. Phospholipid-binding protein인 Annexin V를 활용하여 early/late stage 세포사를 규명하였다. Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI)로 염색을 하고 FACS를 이용하여 분석하였다. γ -linolenic acid 농도 의존적으로 dual positive population (PI+/Annexin V+)이 증가하는 경향을 확인하였다 (Fig. 15-3 ; right panel). 특히, 50 μ M γ -linolenic acid를 처리한 군에서 약 30% 정도의 dual positive population을 확인하였다. 이는 γ -linolenic acid가 MDA-MB-231의 plasma membrane polarity 변화를 유도하는 것을 의미한다.

(3) γ -linolenic acid에 의한 caspase signaling pathway 영향 평가

γ -linolenic acid에 의한 MDA-MB-231의 형태학적·생화학적 세포사 유도를 caspase signaling pathway [23]를 확인하기 위해 Western blot analysis를 수행하였다. γ -linolenic acid

를 MDA-MB-231에 24시간 동안 처리하고 total 단백질을 분리 후, 20~30 μg 의 단백질을 10% SDS-PAGE를 수행하고 PVDF membrane으로 transfer시켰다. Caspase 관련 antibody를 4°C에서 overnight하여 반응하였다. 그 후 HRP-conjugated된 2차 antibody로 반응을 시킨 후 developing과 fixation 과정을 수행하였다.

Caspase의 활성화된 형태인 cleaved caspase-3가 γ -linolenic acid 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며 cleaved caspase-7은 농도 의존적으로 증가하였다. Caspase-3의 substrate인 PARP의 cleaved 형태도 γ -linolenic acid 농도 의존적으로 증가하였다. 하지만 Cleaved caspase-9은 농도 의존적인 변화는 확인하지 못했다 (Fig. 15-4).

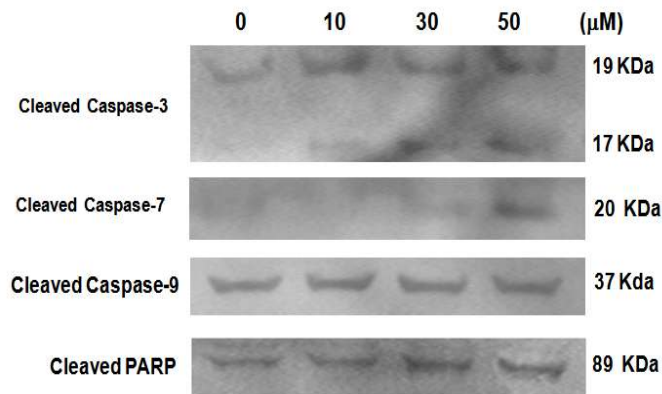


Figure 15-4. Western blot analysis for caspase-3,-7,-9 and PARP

이 Western blot analysis 결과, γ -linolenic acid에 의한 MDA-MB-231의 apoptosis는 apoptosis의 주요 executioner인 caspase-3의 활성화 기작에 의해 유도되며, caspase-7과 caspase-3의 타겟 단백질인 PARP의 cleavage를 유도하여 DNA degradation, nuclear breakdown을 유도하는 것으로 사료된다.

(4) γ -linolenic acid에 의한 AMPK 및 *de novo* fatty acid synthesis 영향 평가

γ -linolenic acid에 의한 MDA-MB-231의 cell growth & proliferation 저해 및 caspase-3에 의한 apoptosis가 AMPK 및 *de novo* fatty acid synthesis에 영향을 미치는 여부를 확인하기 위해, Western blot analysis를 수행하였다.

γ -linolenic acid는 phosphorylated AMPK가 농도 의존적으로 감소하였다. *De novo* fatty acid synthesis의 주요 효소인 ACC는 γ -linolenic acid에 의해 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인하였다 (Fig. 15-5).

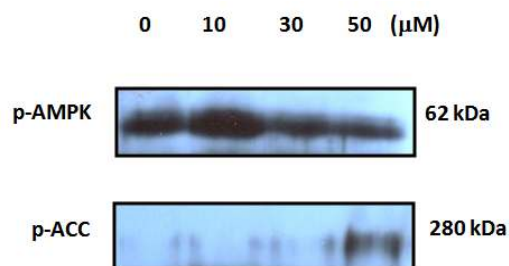


Figure 15-5. Western blot analysis for AMPK & ACC

(5) γ -linolenic acid에 의한 세포주기 (cell cycle) 영향 평가

① FACS analysis

γ -linolenic acid에 의한 MDA-MB-231의 apoptosis가 cell cycle과의 상관성이 있다는 것을 평가하기 위해, γ -linolenic acid를 농도별로 24시간 동안 처리하고 PI staining 및 FACS analysis를 수행하였다. γ -linolenic acid 처리 농도가 증가할수록, cell death region인 sub-G₁ phase가 다소 증가하였다. 전체적인 cell cycle 경향은 농도의존적으로 G₁/G₀ phase population이 감소하고 S-phase population이 증가하였다. 하지만 G₂/M phase의 population에는 영향이 없었다. 즉, γ -linolenic acid는 유방암세포인 MDA-MB-231의 cell cycle을 S phase로 arrest시키는 것을 확인하였다 (Fig. 15-6).

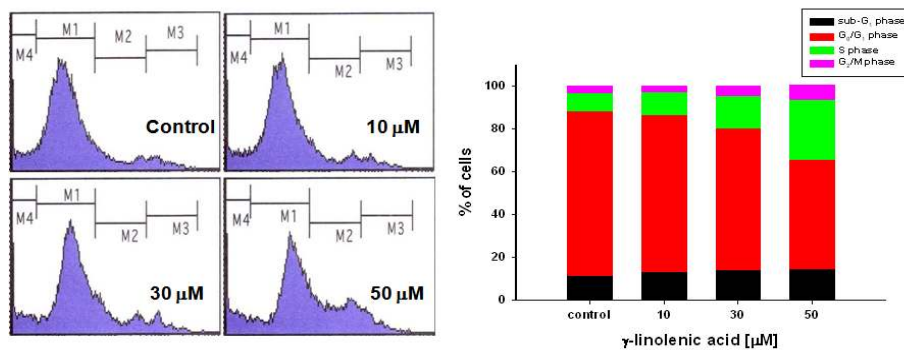


Figure 15-6. Cell cycle analysis by FACS analysis

② Cell cycle 관련 molecular RNA 발현량의 변화

이 γ -linolenic acid에 의한 S phase arrest 기전을 규명하기 위해 cell cycle과 관련된 인자, 특히 cell cycle inhibitor (CDKI)로 알려진 p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, Retinoblastoma protein (Rb), cell cycle check-point에 관여하는 cyclin A, cyclin D1, cyclin E에 대한 RT-PCR analysis를 수행하였다.

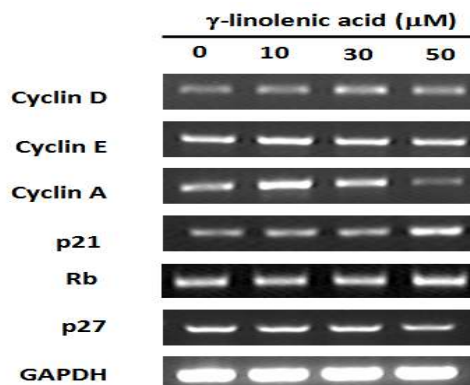


Figure 15-7. RT-PCR analysis for pro- and anti-apoptotic factors

p21^{Waf1/Cip1}는 γ -linolenic acid의 농도의존적으로 증가하였으나, p27^{Kip1}는 다소 감소하는 경향을 확인하였다. Rb는 큰 변화가 없었다. Cell cycle check-point인 cyclin A는 농도의존적으로

감소하였으나 cyclin D1, cyclin E는 영향이 없었다 (Fig. 15-7).

마. TAHe#2-7의 항암 활성 평가

제2 협동연구기관으로부터 제공받은 hexane #2-7 분획에 대한 항암 활성 평가를 수행하였다. Hexane#2-7 분획은 γ -linolenic acid, methyl ester와 linoleic acid, methyl ester의 mixture (이하 LAME로 명명)로 구성되어 있는 것으로 동정되었다.

(1) LAME의 세포독성 활성 및 증식 억제 효과 탐색

LAME를 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 24시간 동안 처리 후, 세포독성 및 세포 증식 억제 효과를 탐색하기 위해, colorimetric assay방법인 MTT assay와 [³H]-thymidine incorporation assay를 수행하였다. Fig. 23과 같이, LAME는 농도 의존적으로 MDA-MB-231에 cell viability를 감소시켰으며 proliferation도 저해하는 효과를 확인하였다. 이는 LAME가 유방암 세포의 성장과 증식에 저해 효과를 가지고 있는 것으로 사료된다. 또한 인간 간암 세포주인 SK-HEP-1에서도 유사한 암 세포 성장 및 증식 억제 활성을 확인하였다 (data not shown).

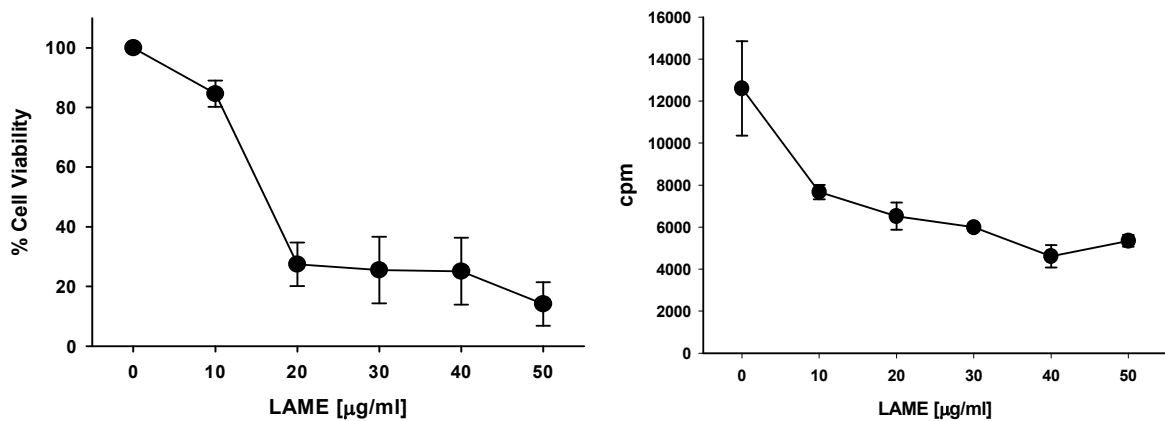


Figure 16-1. The effect of LAME on cell viability and proliferation in MDA-MB-231

(2) LAME의 암세포사 (apoptosis) 유도 탐색

LAME에 의한 암세포의 성장 및 증식 억제가 암 세포사를 유도하는지 확인하기 위하여 세포사 (programmed cell death)의 형태학적·생화학적 hallmark를 탐색하였다.

① Morphology 관찰

LAME를 24시간 동안 처리하고 light microscope를 이용하여 MDA-MB-231의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 농도 의존적인 세포 형태의 변화를 확인하였다 (Fig. 16-2: A). LAME를 처리하지 않은 대조군과 비교 시, 10 µg/ml의 농도에서 둥근형태의 세포가 관찰되었으며 농도가 높아질수록 세포 형태가 파괴된 것을 관찰하였다. 또한 MDA-MB-231에 DAPI로 염색을 하고 형광현미경을 이용하여 DNA condensation과 apoptotic body의 형성을 관찰한 결과, LAME의 농도 의존적으로 DAPI staining의 intensity가 증가되는 현상을 통해 DNA condensation를 확인하였다 (Fig. 16-2: B).

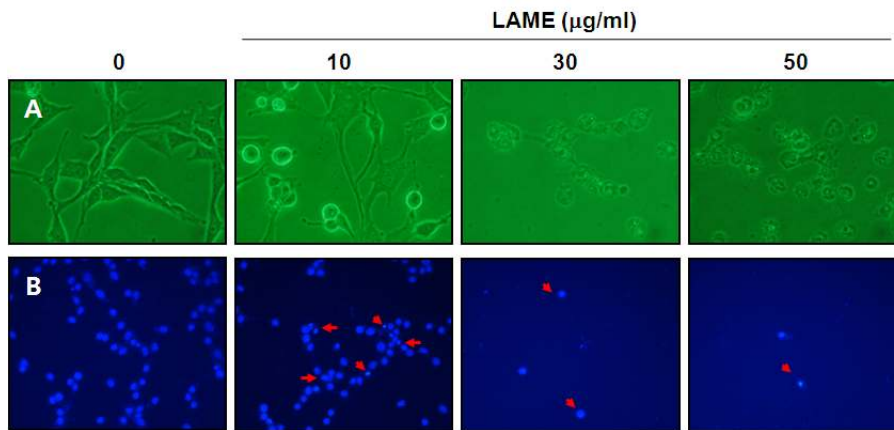


Figure 16-2. LAME induces morphological change and DNA condensation. A) Morphological change was measured by light microscope. B) DNA condensation was observed by fluorescence microscope after staining with DAPI.

② DNA fragmentation

또한 LAME는 DNA의 절편화 (DNA fragmentation)를 유도 여부를 확인하기 위해 DNA fragmentation assay를 수행하였다. 그 결과, 농도의존적인 DNA fragmentation이 확인되었으며 특히 20 µg/ml 이상의 농도에서 100 bp의 laddering 현상이 관찰되었다 (Fig. 16-3 ; left panel). Inner plasma membrane의 phospholipid phosphatidylserine가 outer membrane으로 translocation되는 flip-flap 현상도 세포사의 주요 특징이다. Phospholipid-binding protein인 Annexin V를 활용하여 early/late stage 세포사를 규명하였다. Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI)로 염색을 하고 FACS를 이용하여 분석하였다. LAME 농도 의존적으로 dual positive population (PI+/Annexin V+)이 증가하는 경향을 확인하였다 (Fig. 16-3 ; right panel). 특히, dual positive region은 30 µg/ml의 LAME를 처리한 군에서 70%가 넘는 population을 확인하였다. 이는 LAME가 MDA-MB-231의 plasma membrane polarity 변화를 유도하는 것을 의미한다.

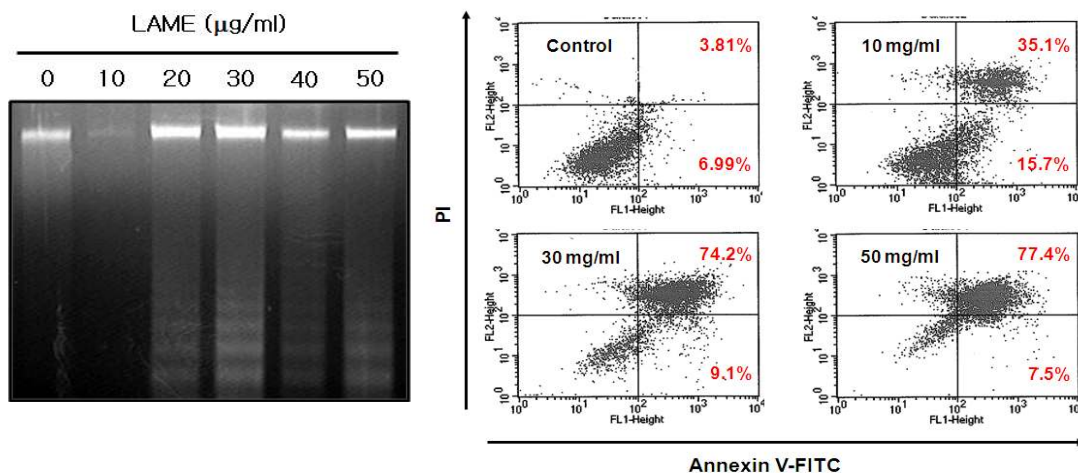


Figure 16-3. Effect of LAME on the induction of apoptosis. (Left) represented DNA fragmentation

and right was a representative of flow cytometric analysis to conduct Annexin V/PI assay.

(3) LAME에 의한 caspase signaling pathway 영향 평가

LAME에 의한 MDA-MB-231의 형태학적·생화학적 세포사 유도를 caspase signaling pathway를 확인하기 위해 Western blot analysis를 수행하였다. LAME를 MDA-MB-231에 24 시간 동안 처리하고 total 단백질을 분리 후, 20~30 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE를 수행하고 PVDF membrane으로 transfer시켰다. Caspase 관련 antibody를 4°C에서 overnight하여 반응하였다. 그 후 HRP-conjugated된 2차 antibody로 반응을 시킨 후 developing과 fixation 과정을 수행하였다.

Caspase의 활성화된 형태인 cleaved caspase-3가 LAME 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며 total caspase도 다소 감소하는 경향을 확인하였다. 또한 caspase-3의 substrate인 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 cleaved 형태도 LAME 농도 의존적으로 증가하였으며 total 형태는 변화가 없었다 (Fig. 16-4).

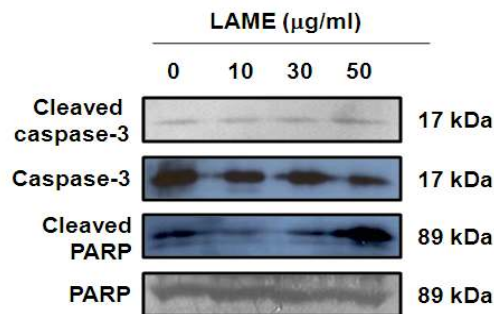


Figure 16-4. Western blot analysis for caspase-3 and PARP

이 Western blot analysis 결과, LAME에 의한 MDA-MB-231의 apoptosis는 apoptosis의 주요 executioner인 caspase-3의 활성화 기작에 의해 유도되며, caspase-3의 타겟 단백질인 PARP의 cleavage를 유도하여 DNA degradation, nuclear breakdown을 유도하는 것으로 사료된다.

(4) LAME에 의한 AMPK 및 *de novo* fatty acid synthesis 영향 평가

5'-AMP-activated protein kinase (AMPK)는 cellular & systemic energy homeostasis를 조절하는 단백질로 알려져 있으며 세포 내 AMP/ATP 비율에 의해 활성화되며 glucose & lipid metabolism, cell growth & proliferation 등 세포 내 다양한 생리적인 process에 관여한다. 또한 *de novo* fatty acid synthesis는 정상 세포와 달리 다양한 암세포에서 높은 비율로 발현되는 기작으로 알려져 있다 [24]. 이 *de novo* fatty acid synthesis에 관여하는 주요 효소는 fatty acid synthase (FAS)와 acetyl-CoA carboxylase (ACC)이며 이는 PI3K/AKT pathway에 의해 조절된다고 보고되고 있다 [25,26]. Kahn *et al.*는 AMPK가 암세포에서 ACC를 활성화시켜 *de novo* fatty acid synthesis를 저해하는 기작을 통해 암세포의 growth & proliferation을 억제한다고 보고하였다 [27].

이런 관점에 기반을 두고, LAME에 의한 MDA-MB-231의 cell growth & proliferation 저해 및 caspase-3에 의한 apoptosis가 AMPK 및 *de novo* fatty acid synthesis에 영향을 미치는 여부를 확인하기 위해, Western blot analysis를 수행하였다.

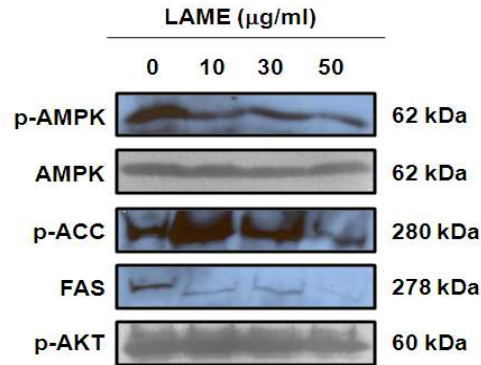


Figure 16-5. Western blot analysis for AMPK & *de novo* fatty acid synthesis

LAME는 phosphorylated AMPK가 농도의존적으로 감소하고 total AMPK에는 영향이 없는 것으로 확인되었다. *de novo* fatty acid synthesis의 주요 효소인 FAS와 ACC도 LAME에 의한 영향이 없으며 phosphorylated AKT는 농도의존적으로 감소하는 경향을 확인하였다 (Fig. 16-5).

(5) LAME에 의한 Cell motility 및 MMP-9 발현 영향 평가

최근 연구에 따르면, 암전이 (metastasis)를 조절하는 기전은 apoptosis에 대한 resistancy 증가와 상관있으며 apoptotic 또는 anti-apoptotic factor의 조절도 metastatic efficiency에 영향을 준다는 보고가 있다.

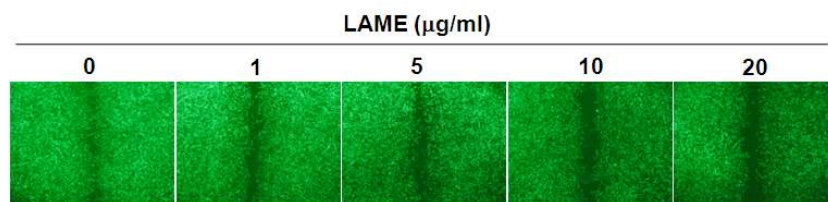


Figure 16-5. The effect of LAME on cell motility in MDA-MB-231

Cell proliferation에 영향을 미치지 않는 20 µg/ml 이하의 농도에서 LAME의 MDA-MB-231의 암 전이에 대한 영향을 wound-healing assay를 이용하여 평가하였다. LAME를 처리하고 24시간 후 세포 이동성을 inverted microscope으로 관찰한 결과, 대조군의 세포는 wound region으로 이동하여 빈 공간을 거의 채운 반면, LAME를 처리한 군은 농도의존적으로 억제하는 효과를 확인하였다 (Fig. 16-5). 이는 LAME가 암 전이, 특히 암 세포의 motility를 억제하는 활성을 가지고 있음을 시사한다.

암 세포 전이는 주변의 Extracellular matrix (ECM)를 invasion하는 과정을 통해 진행된다.

암 세포가 생성하는 Matrix Metalloproteinase (MMP)에 의해 이루어진다. LAME가 MMP 활성화에 미치는 영향을 ECM의 한 종류인 gelatin에 대한 proteolytic 활성을 zymography를 사용하여 평가하였다. 1 µg/ml LPS를 처리하여 MDA-MB-231 세포의 MMP 발현을 증가시켰다. Fig. 16-6 과 같이, LAME는 LPS-treated MDA-MB-231에 의해 생성된 MMP-9의 proteolytic 활성을 5 µg/ml 이상의 농도에서 저해하였으며, active MMP-9과 pro-MMP-9을 모두 억제하는 것을 확인하였다.

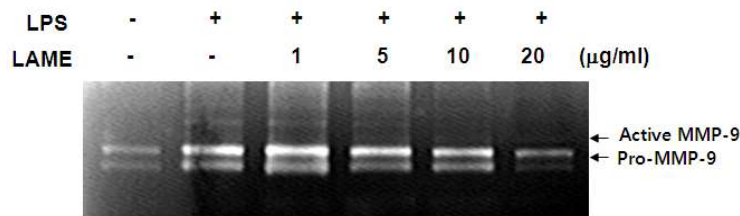


Figure 16-6. The effect of LAME on MMP-9 activity analyzed by zymography

γ-linolenic acid, methyl ester와 linoleic acid, methyl ester의 mixture로 구성된 hexane#2-7 분획의 항암활성 결과를 정리하면, 인간 유방암세포인 MDA-MB-231의 cell growth 및 proliferation를 저해하며 caspase-3 활성화를 통한 세포 형태 변화, DNA condensation 및 laddering을 수반한 apoptosis를 유도한다. AMPK와 FAS, ACC의 변화에 큰 영향은 없지만, Akt pathway를 농도의존적으로 억제한다. 또한 암세포의 motility 및 MMP-9을 억제한다. 즉, hexane#2-7 분획은 고농도에서 암세포 apoptosis를, 저농도 (20 µg/ml 이하)에서는 암 전이활성을 억제하는 multi-potent한 특징을 가지고 있음을 시사한다.

바. TAHe#2-7-2 (methyl γ-linolenic acid, methyl GLA)의 항암 활성 평가

Hexane#2-7 분획의 항암활성 결과를 바탕으로, 제2 협동연구기관 (경희대 백남인 교수팀)은 hexane#2-7 분획을 추가로 hexane#2-7-2와 hexane#2-7-4를 분리·정제하였다. 구조 동정 결과, hexane#2-7-2는 methyl γ-linolenic acid (methyl GLA)으로, hexane#2-7-4는 linoleic acid, methyl ester로 확인하였다. Hexane#2-7과 hexane#2-7-2, 그리고 hexane#2-7-4에 대한 암세포 독성을 평가한 결과, Hexane#2-7-2에서 가장 효율적인 세포독성 결과를 확인 (data not shown)하여 Hexane#2-7-2에 대한 항암 활성을 평가하였다.

(1) Methyl GLA 의 세포독성 활성 및 증식 억제 효과 탐색

Methyl GLA의 인간 전립선암세포주인 LNCaP과 Human breast cancer cell lines, MDA-MB-231, SK-Br3 에서 세포독성 및 증식 억제 효과를 평가하기 위해, MTT assay와 [³H]-thymidine incorporation assay를 수행하였다 (Fig. 17-1). Methyl GLA의 EC₅₀ 값은 LNCaP에서 22.9 µM 이었다. Methyl GLA의 세포독성을 확인하기 위해 시간, 농도 별로 처리했을 때, 50 µM, 100 µM에서 EC₅₀는 각각 15h, 8h 나타냈다 (Fig 17-2 : A). 또한 [³H]-thymidine incorporation assay 결과, methyl GLA는 세포독성 효과에 비해 완만한 세포 증식억제 활성을 나타내었다 (Fig 17-2 : B)

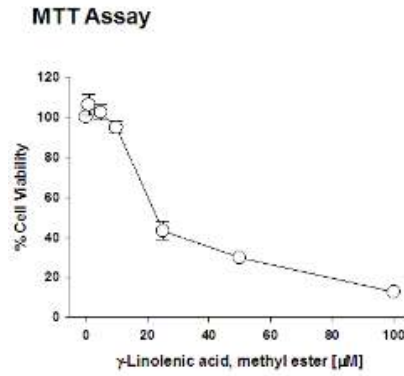


Figure 17-1. The effect of methyl GLA on cell viability

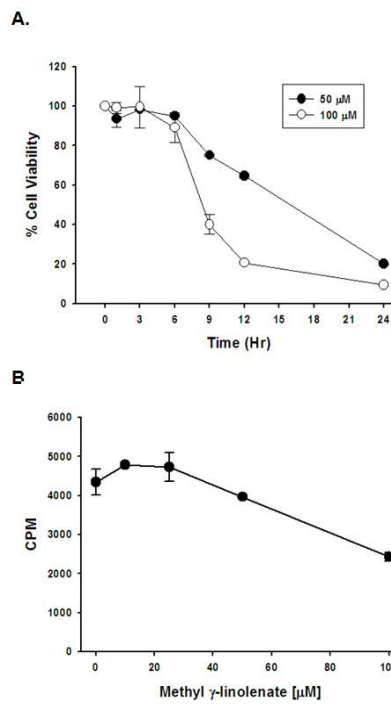


Figure 17-2. The effect of methyl GLA on cell viability and proliferation

(2) Methyl GLA의 전립선암 세포주기 (cell cycle) 영향 평가

Methyl GLA에 의한 LNCaP의 cell cycle과의 상관성을 평가하기 위해, Methyl GLA를 농도별로 24시간 동안 처리하고 PI staining 후 FACS analysis을 수행하였다. Methyl GLA농도가 증가할수록, cell death region인 sub-G₁ phase가 미약하게 증가하였다. 전체적인 cell cycle 경향은 농도의존적으로 G₁/G₀ phase population이 감소하고 S-phase population이 증가하였다. 하지만 G₂/M phase의 population에는 영향이 없었다. 즉, Methyl GLA는 전립선암세포인 LNCaP의 cell cycle을 S phase로 arrest시키는 것을 확인하였다 (Fig. 17-3).

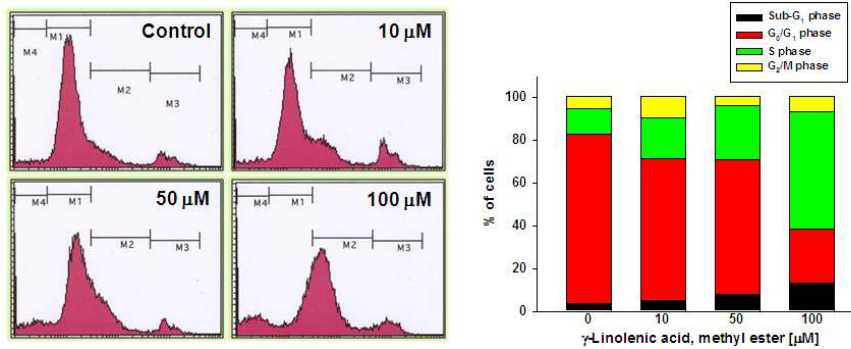


Figure 17-3. Cell cycle analysis by FACS analysis

이 methyl GLA에 의한 S phase arrest 기전을 규명하기 위해 cell cycle과 관련된 인자, 특히 Cell cycle inhibitor로 알려진 p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, Rb, cell cycle checkpoint에 관여하는 cyclin A, cyclin D1, cyclin E에 대한 RT-PCR analysis를 수행하였다. p21^{Waf1/Cip1}는 methyl GLA의 농도의존적으로 증가하였으나, p27^{Kip1}는 다소 감소하는 경향을 확인하였다. 또한 Rb는 큰 변화가 없었다.

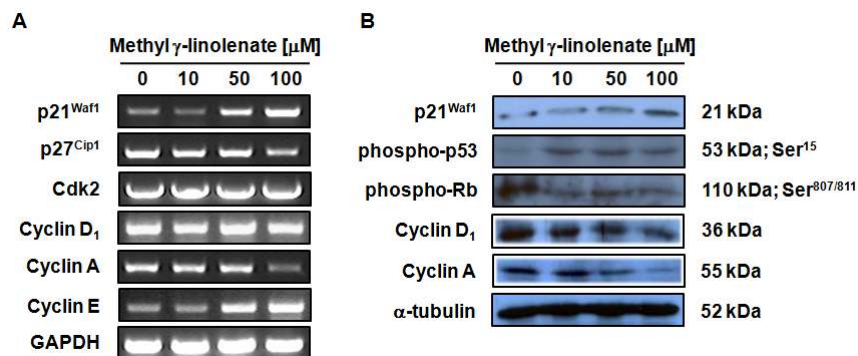


Figure 17-4. RT-PCR and Western blot analysis for the factors of cell cycle

G1 phase의 check point의 핵심 단백질인 cyclin E는 농도의존적으로 증가하였으며 G2 phase check point의 핵심 단백질인 cyclin A는 농도의존적으로 감소하였다. 전체 cell cycle을 regulation하는 cyclin D는 methyl GLA에 의한 영향이 없는 것으로 확인하였다 (Fig. 17-4 ; left panel). 이 RT-PCR 결과, methyl GLA는 p21^{Waf1/Cip1}의 활성화를 유도하여 cyclin D-CDK2에 의한 cell cycle regulation을 저해하며 cyclin A를 down-regulation하여 S phase로 arrest를 유도하는 것으로 사료된다.

Cyclin D1과 cyclin A에 대한 Western blot analysis 결과, 농도의존적으로 감소하는 경향을 확인하였다 (Fig. 17-4; right panel). mRNA 발현에는 큰 차이가 없었던 cyclin D1은 단백질 수준에서 저해되어 궁극적으로 methyl GLA가 cyclin D1의 저해와 p21^{Waf1/Cip1}의 활성화를 통해 cell cycle를 조절하는 것으로 판단된다 [28].

(3) Methyl GLA가 mTOR pathway에 미치는 영향 평가

세포의 proliferation을 조절하는데 있어서 PI3K/Akt 가 중요한 역할 [29]을 하기 때문에 methyl GLA가 PI3K/Akt pathway를 어떻게 조절하는지 알아보기 위해 western blot을 수행하

였다. Fig.17-5 : A, B에서 보듯이 methyl GLA를 처리한 농도 시간에 의존적으로 PI3K/Akt 활성이 저해되는 것을 관찰하였다. Akt는 또한 mTOR [30]을 TSC2의 저해를 통해 직접적으로 조절하므로 methyl GLA의 mTOR pathway의 영향을 살펴보았다. Methyl GLA가 농도, 시간이 늘어남에 따라 mTOR, p70S6K의 phosphorylation을 저해하는 것을 보았다 (Fig.17-5 : C, D).

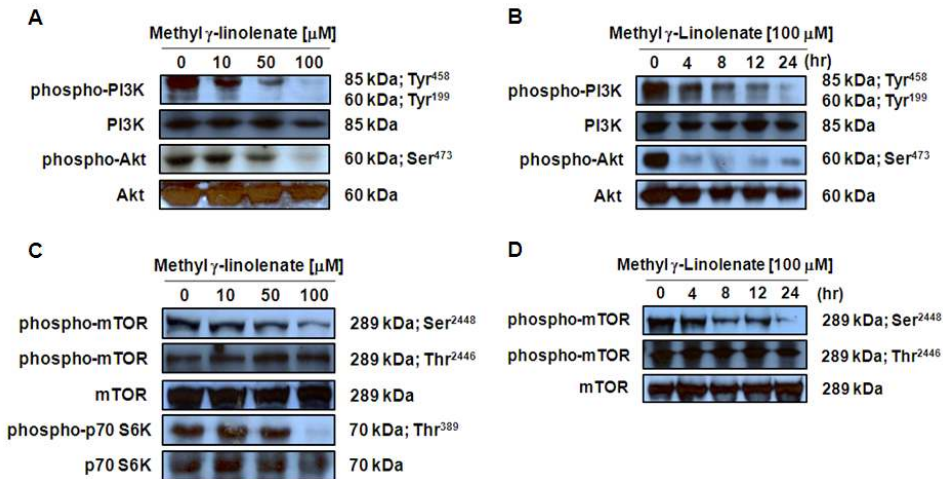


Figure 17-5. Methyl GLA down-regulates PI3K/Akt pathway and mTOR

① Methyl GLA가 caspase와 연관하여 Akt, mTOR에 미치는 영향

Caspase의 activities가 세포의 성장을 저해하는 동안 Akt의 mTOR의 inactivation를 유도하기 때문에 caspase의 inhibitor, Z-VAD-FMK를 사용하여 methyl GLA가 유도하는 Akt, mTOR의 저해에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. Z-VAD-FMK가 methyl GLA에 의해 일어나는 Akt, mTOR의 저해가 일어나지 않는 것을 알아낼 수 있었다 (Fig 17-6). 이 결과는 methyl GLA가 caspase와 연관하여 Akt, mTOR의 inactivation을 통해 cell proliferation을 간접적으로 조절한다는 것을 의미한다.

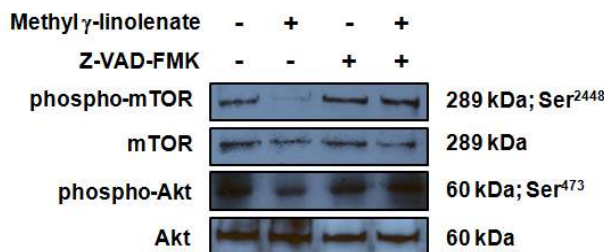


Figure 17-6. Methyl GLA-induced caspase-dependent inactivation of Akt and mTOR.

(4) 전립선암 세포에서 Methyl GLA의 AMPK 활성화 및 *de novo* fatty acid synthesis에 대한 영향 평가

Kahn et al.는 AMPK가 암세포에서 ACC를 활성화시켜 *de novo* fatty acid synthesis를 저해하는 기작을 통해 암세포의 growth & proliferation을 억제한다고 보고하였다 [27]. 이 *de novo* fatty acid synthesis의 핵심 효소인 FAS와 ACC는 PI3K/AKT pathway에 의해 조절된다고 보고되었다. [25,26]. 비록 hexane#2-7은 AMPK activation 및 FAS와 ACC를 저해하지 못하였지만, phosphorylated Akt를 저해하는 효과를 확인하였다. 이런 점에 착안하여 methyl GLA의 AMPK activation과 FAS / ACC 저해 활성을 Western blot analysis으로 평가하였다.

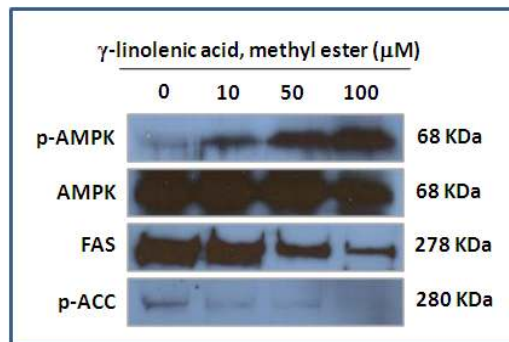


Figure 17-7. Western blot analysis for AMPK, FAS, and ACC

Hexane#2-7의 결과와 달리, methyl GLA는 농도의존적으로 phosphorylated AMPK가 증가되었으며 FAS의 활성은 감소시키는 것을 확인하였다. 하지만 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 전환시키는 ACC는 변화가 없었다 (Fig. 17-7). 즉, methyl GLA는 AMPK activation을 유도하고 그 일련의 작용으로 *de novo* fatty acid synthesis의 핵심 효소인 FAS를 저해시켜 암세포의 growth와 proliferation을 억제하는 것으로 판단된다.

PI3K/Akt signal pathway는 cell growth, proliferation, survival, motility 등 cancer의 progression을 유도하는 cascade를 총괄하는 pathway로 알려져 있다 [31]. 또한 SREBP-1을 경유하여 *de novo* fatty acid synthesis에도 관여하며 tuberlin-1/-2 (TSC-1/-2)를 저해하여 AMPK의 signal을 down-regulation한다고 보고되었다 [32].

PI3K와 Akt에 대한 western blot analysis 결과, methyl GLA는 phosphorylated PI3K와 Akt를 모두 농도의존적으로 저해하였다 (Fig. 17-8). 특히 phosphorylated PI3K는 100 μ M에서 거의 발현되지 않는 것을 확인하였다. 즉, methyl GLA는 PI3K/Akt pathway를 down-regulation하여 cell proliferation과 growth 그리고 cell cycle을 조절하며 fatty acid synthase를 저해하는 일련의 과정을 통해 전립선 암세포인 LNCaP을 apoptosis로 유도함을 시사한다.

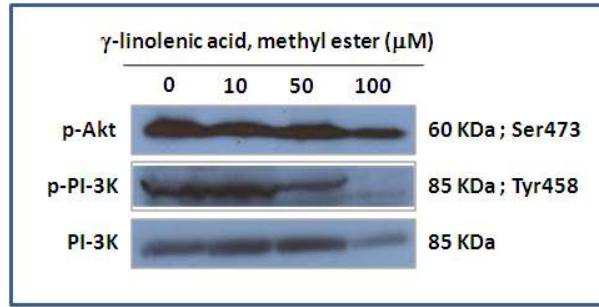


Figure 17-8. Western blot analysis for PI3K/Akt pathway

① 전립선암 세포에서 methyl GLA의 AMPK 및 PPAR- γ 활성화 영향 평가

AMPK activation과 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)와의 관계를 Western blot analysis로 평가하였다. AMPK activation과 비례하게 PPAR- γ activation도 농도의존적으로 증가하였으나 PPAR- α 는 변화 없었다 (Fig. 17-9). 특히, PPAR- γ subtype 2의 증가가 두드러졌으며 PPAR- γ subtype 1도 다소 증가하는 것을 확인하였다.

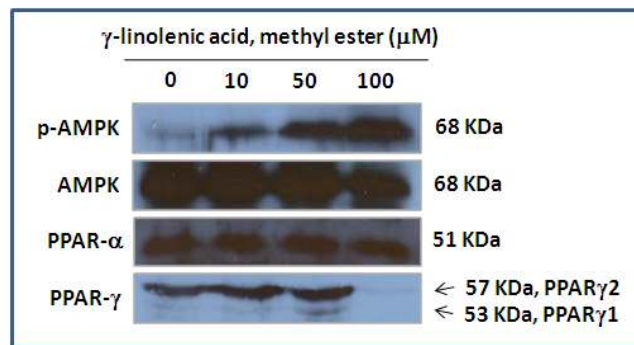


Figure 17-9. Western blot analysis for PPAR- α / γ

PPAR- γ agonist는 PPAR- γ 의존적 또는 비의존적인 방식을 통해 PTEN/AMPK를 up-regulation하고 Akt/mTOR/p70s6k signal을 down-regulation하여 cell proliferation 제어한다고 보고되었다 [33]. Methyl GLA는 PPAR- γ agonist로서의 역할하며 AMPK를 up-regulation하고 Akt를 down-regulation하여 cell proliferation을 저해하는 기전이라 사료된다.

(5) Methyl GLA의 전립선암 세포사의 형태학적 생화학적 규명

① Methyl GLA에 의한 morphology 변화 관찰

Methyl GLA의 전립선암 세포 증식 억제 및 세포독성효과로 인한 형태학적·생화학적 세포사 유도를 평가하였다 (Fig. 17-10). Methyl GLA를 24시간 동안 처리 후, 형태학적 변화를 light microscope을 이용하여 관찰하였다. Methyl GLA는 농도 의존적으로 LNCaP의 형태를 변화시켰다. 또한 DAPI 염색 후 형광현미경으로 관찰한 결과, 농도 의존적으로 DNA condensation을 확인하였으며 50 μ M 이상의 농도에서 apoptotic body도 관찰하였다.

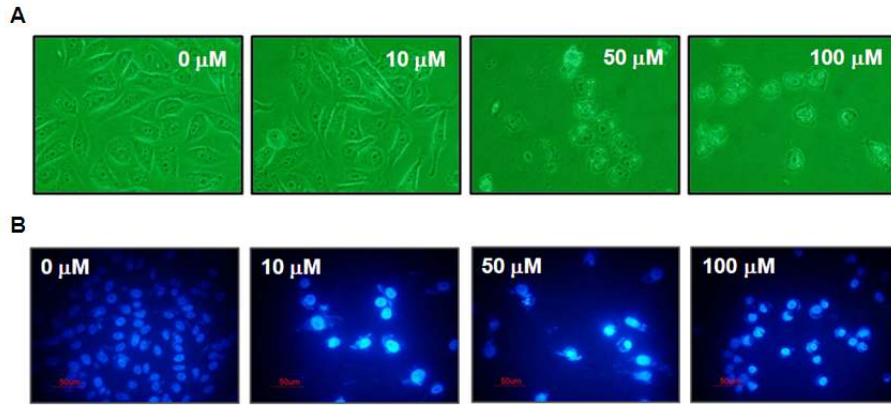


Figure 17-10. Methyl GLA induces morphological change and DNA condensation. A) Morphological change was measured by light microscope. B) DNA condensation was observed by fluorescence microscope after staining with DAPI.

② Methyl GLA가 caspase를 통해 apoptosis에 미치는 영향 고찰

Methyl GLA에 의한 LNCaP의 DNA fragmentation assay을 평가한 결과, 농도의존적인 DNA laddering현상을 확인하였다. 농도의존적인 DNA fragmentation이 확인되었으며 특히 50 μ M 이상의 농도에서 100 bp의 laddering현상이 관찰되었다 (Fig. 17-11 ; A).

또한 Phospholipid-binding protein인 Annexin V를 활용하여 early/late stage 세포사를 규명하였다. Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI)로 염색을 하고 FACS를 이용하여 분석하였다. Methyl GLA를 농도 의존적으로 dual positive population (PI+/Annexin V+)이 증가하는 경향을 확인하였다 (Fig. 17-11 ; B). 특히, 100 μ M의 methyl GLA를 처리한 군에서 40% 정도의 dual positive population을 확인하였다. 이는 methyl GLA가 LNCaP의 plasma membrane polarity 변화를 유도하는 것을 의미한다.

Methyl GLA가 apoptosis에 관여하는 주요인자에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해, reverse transcriptase-PCR을 수행하였다. Fig. 17-11 : C 와 같이, caspase-3와 PARP의 mRNA 발현은 methyl GLA의 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. Pro-apoptotic factor인 Bax는 농도의존적으로 증가하는 결과를 확인하여 methyl GLA에 의한 apoptosis는 일련의 caspase cascade에 의한 signaling과 Bax에 의한 영향으로 사료된다.

다음으로는 western blot analysis를 통해 methyl GLA를 처리한 LNCaP에서 caspase의 발현 양상을 관찰 하였다. 농도 의존적으로 cleaved caspase-3와 cleaved PARP가 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 17-11 : D). 이는 caspase-3 활성화를 통한 PARP의 cleavage현상으로 판단되며 methyl GLA에 의한 세포사는 일련의 caspase cascade에 의한 apoptosis라 사료된다.

③ Methyl GLA 유도 cell proliferation 저해에서 caspase inhibitor에 의한 변화 고찰

Methyl GLA가 cancer cells에서 caspase를 통한 apoptosis를 유도하는 것을 확실히 하고자 caspase inhibitor Z-VAD-FMK를 methyl GLA를 처리하기 1h 전에 30 μ M 처리한 뒤 12시간 incubation 시켰다. Z-VAD-FMK가 methyl GLA가 유도한 세포사멸을 저해하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 17-12 : A). 그리고 Annexin V/7-ADD staining assay를 통해 Z-VAD-FMK가 apoptotic cell population을 감소시키며 (Fig. 17-12: B), 이를 Fig 17-12: C에

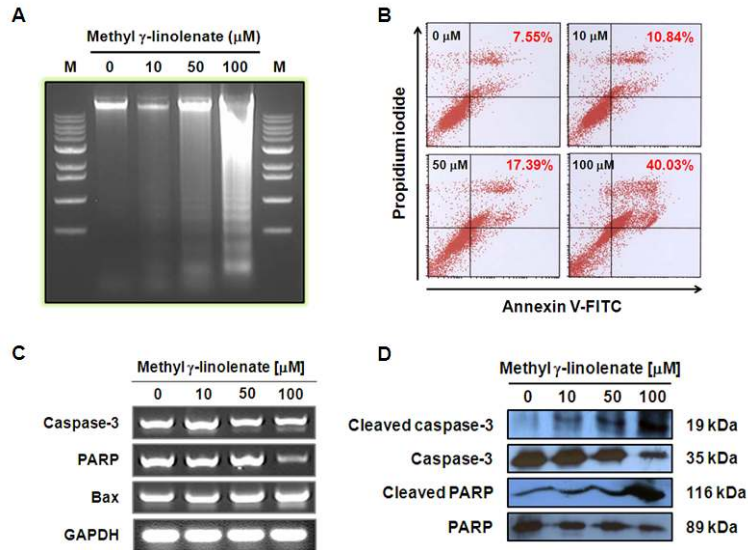


Figure 17-11. Methyl GLA induces caspase-3-mediated apoptosis. A) DNA fragmentation B) Flow cytometry analysis of LNCaP cells treated with methyl GLA and labeled with Annexin V. C) RT-PCR D) Western blot

도표로 나타내었다. Western blot을 통해 Z-VAD-FMK 처리로 methyl GLA에 의한 caspase-3, -8, -9가 저해되는 것을 확인 하였다 (Fig. 17-12 : D). 이 결과는 methyl GLA가 LNCaP cell에서 serial caspase activation [34]을 통한 apoptosis를 유도한다는 것으로 사료 된다.

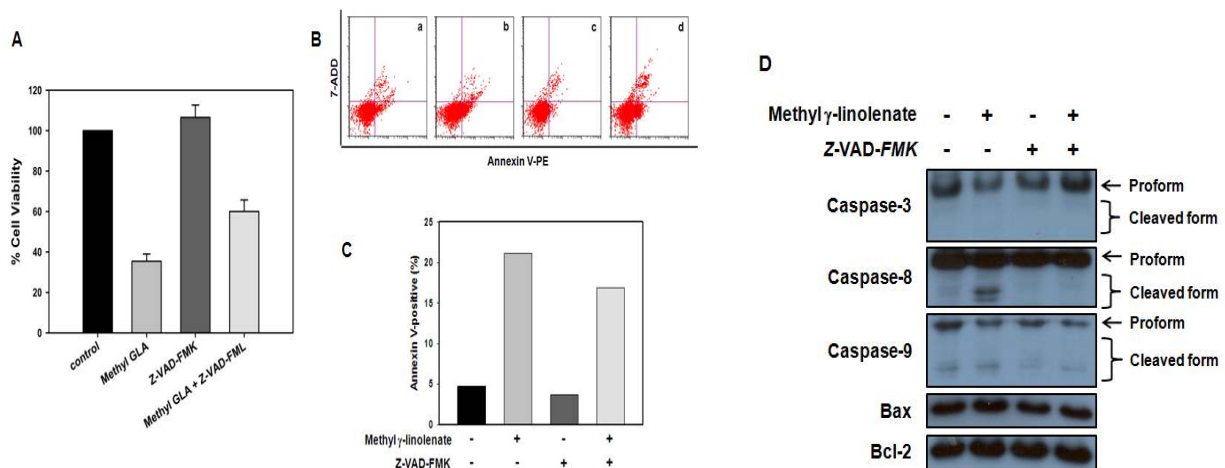


Figure 17-12. Caspase inhibitor inhibits the blockade of cell proliferation induced by methyl GLA. A) Cell viability was measured by MTT assay B) Flow cytometry analysis of LNCaP pre-treated with Z-VAD-FMK C) Quantitative analysis of effect of methyl GLA on cell population D) Western blot for caspase -3, -8, -9, Bax, or Bcl-2

④ Methyl GLA가 caspase-9, Bax와 독립적으로 caspase-8의 activation 유도에 대한 평가
Methyl GLA가 유도하는 apoptosis가 caspase-8에 의한 것인지를 알아보기 위해 caspase-8의 inhibitor인 Z-ITED-FMK를 사용하였다. Z-ITED-FMK를 처리한 결과 apoptosis가 회복되는 것을 관찰하였고 이를 정량적으로 도표로 나타내었다 (Fig 17-13 : A, B). 또한 western blot을 통해 Z-ITED-FMK가 caspase-8은 저해하지만, caspase-9의 활성화와 Bax의 translocation에는 관여하지 않은 것을 알 수 있었다 (Fig 17-13 : C). 따라서 methyl GLA Bax와 caspase-9과는 상관없이 caspase-8을 통한 apoptosis를 유도한다는 것을 알아내었다 [35].

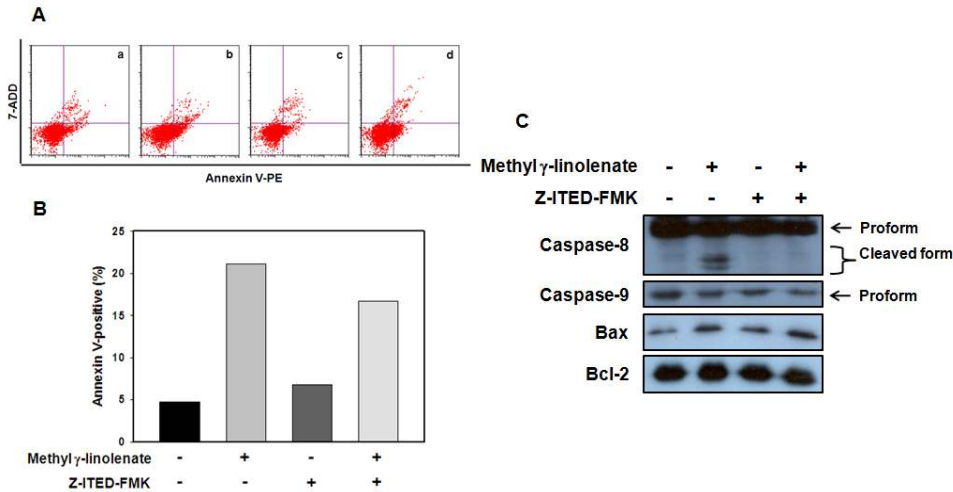


Fig 17-13. Methyl GLA induces caspase-8 independent caspase-9 activation and Bax translocation. A) Flow cytometry analysis of LNCaP pre-treated with Z-ITED-FMK B) Quantitative analysis of the effect of methyl GLA on cell population C) Western blot for caspase-8, -9, or Bax

(6) 전립선암 세포에서 Methyl GLA의 p38 MAPK 활성화 및 apoptosis에 대한 영향 평가

① Methyl GLA에 의한 apoptosis에서 p38 MAPK의 activation에 대한 고찰

Methyl GLA가 LNCaP에서 apoptosis를 유도하는 동안 p38 MAPK, JNK, ERK 1/2의 활성화 [36-38]를 western blot을 통해 확인하였다. Figure 17-14 : A에서 보듯이 methyl GLA를 30분 처리한 cell에서 phospho-p38 MAPK의 발현이 증가하는 것을 보았고 2시간 처리했을 때 가장 많은 것을 관찰하였다. Phospho-JNK는 2시간 후 부터 증가하였고 8시간 후에 가장 많이 발현하였다. 반면에 ERK의 발현은 변하지 않았다. mTOR pathway에서도 관찰한 결과 methyl GLA에 의해 mTOR의 dephosphorylation이 매우 빠르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 17-14: B). 따라서 methyl GLA에 의해 일어나는 mTOR의 inactivation과 p38 MAPK의 activation이 서로 연관이 있을 거라 사료된다.

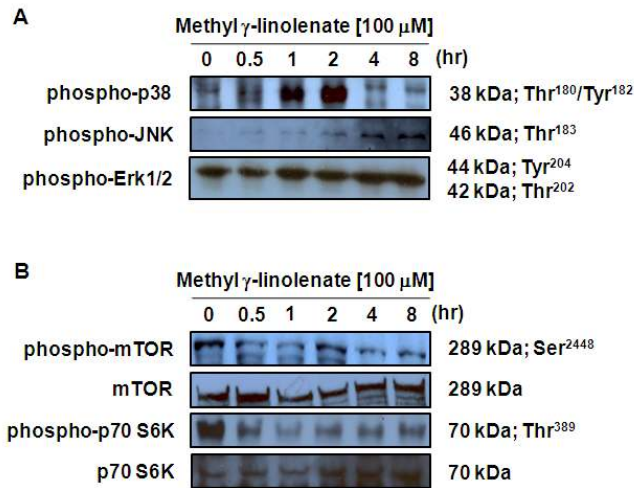


Figure 17-14. Methyl GLA selectively induces activation of p38 MAPK and JNK and time-dependently inhibits phosphorylation of mTOR and p70S6K. A) Western blot for p38MAPK, JNK, ERK B) Western blot for mTOR pathway

② Caspase 독립적으로 methyl GLA에 의해 일어나는 p38 MAPK activation에 대한 평가
Caspase의 활성이 methyl GLA-induced apoptosis에서 p38 MAPK의 activation을 요구하는지 알아보기 위해 caspase inhibitor, Z-VAD-FMK를 세포에 처리하여 western blot을 통해 p38 MAPK activation 정도를 살펴 보았다. 결과를 보면 methyl GLA-induced p38 activation이 Z-VAD-FMK를 처리해도 전혀 변화가 없었다 (Fig. 17-15). 이 결과는 methyl GLA에 의한 p38 MAPK 활성이 caspase activation과는 무관하게 일어난다는 것을 의미한다.

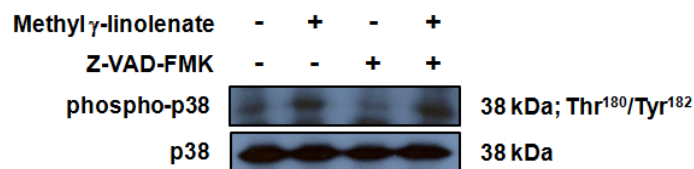


Figure 17-15. Methyl GLA-induced caspase-independent activation of p38 MAPK.

③ p38 MAPK inhibitor가 methyl GLA-induced apoptosis에 미치는 영향
p38 MAPK inhibitor, SB203580을 사용하여 p38 MAPK의 저해가 methyl GLA-induced apoptosis에 미치는 영향에 대해 알아보았다. SB203580를 LNCaP에 pre-treatment를 하여 apoptosis assay와 DNA fragmentation을 통해 apoptosis가 저해되는 현상을 관찰했다.

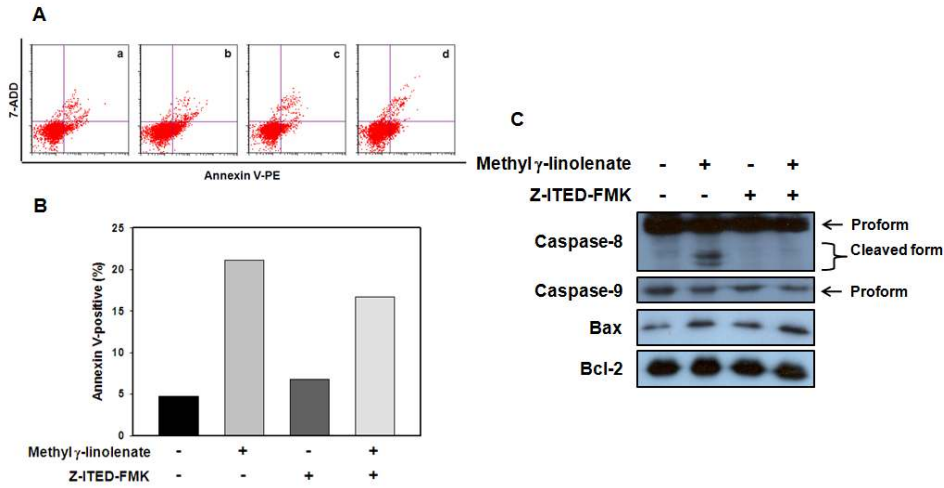


Figure 17-16. Inhibition of p38 MAPK suppresses methyl GLA-induced apoptosis. A) Cell viability measured by MTT assay. B) DNA fragmentation. C) Flow cytometry analysis of LNCaP pretreated with SB203580. D) Quantitative analysis on cell population

④ p38 MAPK의 activation가 methyl GLA-induced apoptosis에서의 역할

p38 MAPK inhibitor, SB203580를 세포에 pre-treatment하여 caspase-8 cleavage의 정도를 western blot을 통해 확인한 결과, 변화가 없었지만 caspase-9 activation은 완전히 저해되었다 (Fig 17-17). 이는 p38 MAPK가 caspase-8이 아니라 caspase-9 activation에 필수적이라고 사료되며 Bax protein의 변화를 살펴본 결과, methyl GLA에 의해 Bax protein 발현 양에 차이가 있었다. 하지만, SB203580를 처리했을 때는 methyl GLA에 의한 Bax protein의 발현 양이 감소하였다. 이는 p38 MAPK activation이 methyl GLA induced apoptosis동안 Bax protein이 cytosol에서 mitochondria로의 이동을 조절한다는 것을 말한다.

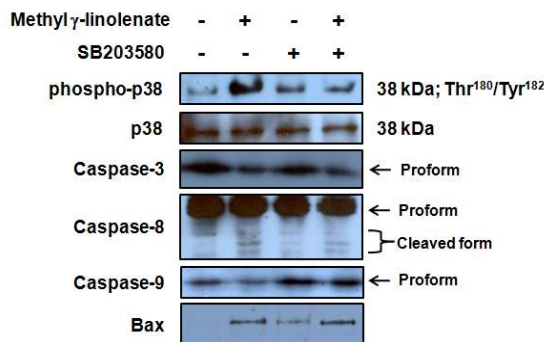


Figure 17-17 Inhibition of p38 MAPK blocks distribution of Bax and caspase-9 activation induced by methyl GLA

⑤ p38 MAPK pathway의 저해가 methyl GLA-induced apoptosis에서 mTOR, AMPK에 미치는 영향

우리는 methyl GLA가 mTOR pathway를 저해하고 AMPK를 activation 함으로써 cell proliferation을 저해 하는 것을 알아냈다. 여기서 mTOR 와 p38 MAPK와의 관계를 규명하기 위해 p39 MAPK inhibitor, SB203580를 사용하였다. Fig17-18 : A에서 보듯이 methyl GLA를 처리한 cell에서는 mTOR와 p70S6K가 감소하는 것을 알 수 있었다. p39 MAPK inhibitor, SB203580를 처리한 cell은 methyl GLA-induced apoptosis 동안 mTOR, p70S6K의 phosphorylation 저해가 일어나지 않았다. 하지만 p38 MAPK의 저해가 AMPK의 activation에는 아무런 영향을 끼치지 않았다 (Fig 17-18: B). 이 결과는 methyl GLA-induced apoptosis에서 p38 MAPK는 AMPK와는 상관없이 mTOR pathway를 조절함으로써 일어남을 말해준다.

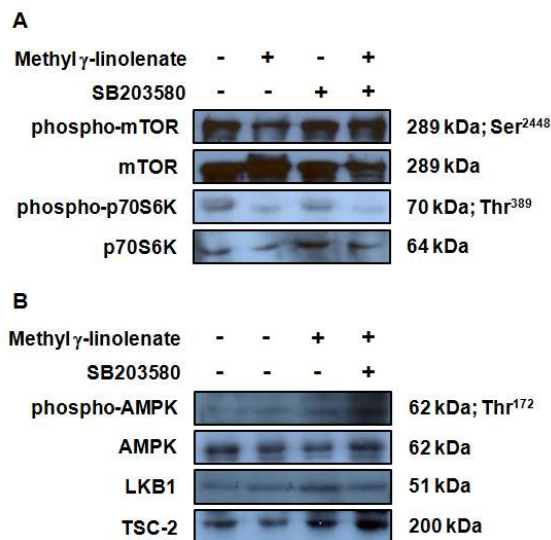


Figure 17-18 Inhibition of p38 MAPK attenuated inactivation of mTOR pathway but not up-regulation of AMPK pathway during methyl GLA-induced cell death.

A) Western blot for mTOR pathway B) Western blot for AMPK pathway

⑥ p38 MAPK가 methyl GLA에 의해 유도되는 p21 mRNA 발현양에 미치는 영향

Methyl GLA에 의해 일어나는 cell cycle arrest와 p38 MAPK와의 상관관계를 살펴보기 위해 p38 MAPK inhibitor, SB203580를 사용하였다. Methyl GLA는 p21^{waf1} mRNA의 level을 증가시켰다. SB203580를 pre-treated 한 cell에서는 p21^{waf1} mRNA의 level의 증가가 일어나지 않았다 (Fig 17-19 :A). 하지만, 다른 cell cycle arrest factor에는 영향을 미치지 않았다 (Fig 17-19 : B). 이는 p38 MAPK가 p21^{waf1} 발현을 통해서 methyl GLA가 cell cycle arrest가 일어나도록 유도하는 것을 생각된다.

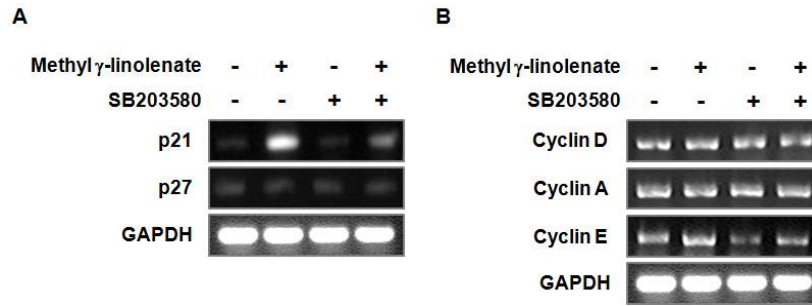


Figure 17-19. Inhibition of p38 MAPK reduces p21 mRNA level induced by methyl GLA.

(7) Methyl GLA의 유방암에서의 항암활성

① 세포독성 활성 및 증식 억제 효과 탐색

Fatty acid synthase와 HER2/Neu의 발현 정도의 차이가 있는 Breast cancer cell line의 두 세포주인 MDA-MB-231과 SK-Br3를 이용한 항암 활성 연구 모델로 사용하고 있다 [39]. 특히 FAS 발현에 따른 methyl GLA의 항암 효과를 탐색하기 위해, MTT assay와 [³H]-thymidine incorporation assay를 수행하였다 (Fig. 17-20). MTT assay 결과, methyl GLA는 MDA-MB-231과 SK-Br3에 농도의존적인 세포독성 효과를 확인하였다. 특히, methyl GLA 농도가 20~60 μ M 사이에서 FAS가 상대적으로 낮게 발현되는 MDA-MB-231에 비해, FAS가 과발현하는 SK-Br3는 methyl GLA에 대한 resistance를 가지고 있는 것으로 확인하였다. 80 μ M 이상의 농도에서, 두 세포주 모두에서 80% 이상의 세포독성을 효과를 확인하였다. 또한 [³H]-thymidine incorporation assay 결과, methyl GLA는 MDA-MB-231에 세포독성 효과와 동등한 세포 증식억제 활성을 나타내었다.

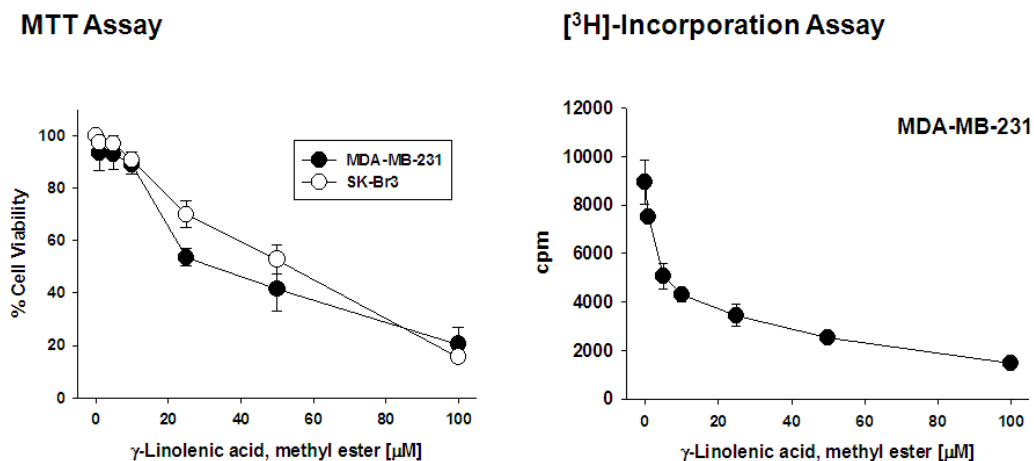


Figure 17-20. The effect of methyl GLA on cell viability and proliferation

② methyl GLA가 MDA-MB-231과 SK-Br3의 AMPK 및 *de novo* fatty acid synthesis에 미치는 영향 평가

Methyl GLA가 FAS 발현이 다른 두 유방암 세포에서 AMPK와 *de novo* fatty acid

synthesis의 핵심 효소인 FAS와 ACC에 미치는 영향을 평가하기 위해, Western blot analysis를 수행하였다. FAS가 낮게 발현되는 MDA-MB-231에서, methyl GLA는 AMPK activation을 미약하게 유도하였다. *de novo* fatty acid synthesis의 핵심 효소인 ACC 활성을 농도의존적으로 저해하였지만 FAS에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다. 이 FAS와 ACC를 regulation하는 phosphorylated Akt를 농도의존적으로 저해하는 것으로 나타내었다 (Fig. 17-21; left panel).

반면, FAS가 과발현되는 SK-Br3는 MDA-MB-231과 다른 경향의 결과를 확인하였다 (Fig. 17-21; right panel). AMPK의 activation과 ACC 억제에는 영향을 미치지 않았지만, FAS의 발현 저하를 농도의존적으로 유도하였다. 즉, FAS 과발현으로 FAS 저해를 통한 세포 생육/성장을 다른 기전을 활용하는 것으로 판단된다. 하지만 FAS가 저발현되는 MDA-MB-231은 ACC를 억제하고 Akt pathway를 조절하는 것으로 세포 생육/성장에 영향을 미친다. 같은 origin의 암세포라 할지라도, 그 특성에 따라 작용하는 것이 다르며, 이는 향후 건강기능식품 또는 의약품으로 활용할 때 좋은 적용 기준을 제시할 수 있다고 사료된다.

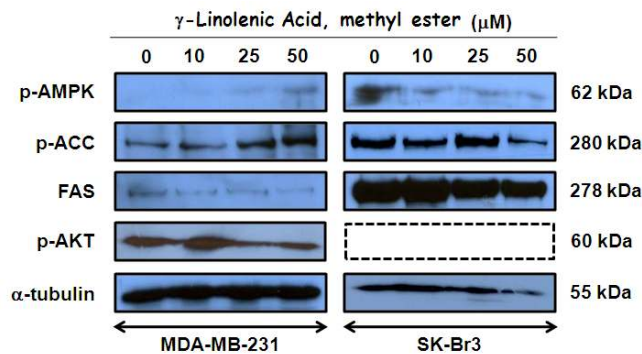


Figure 17-21. Western blot analysis for AMPK, ACC, & FAS in MDA-MB-231 and SK-Br3

(8) Methyl GLA의 항염증 억제 활성 탐색

암은 다단계로 진행되며 개시단계 (initiation), 촉진단계 (promotion) 그리고 진행단계 (progression)의 과정으로 구분된다. 이러한 일련의 다단계 발암과정 (multi-stage carcinogenesis) 중 어느 한과정을 억제하거나 그 진행을 지연시키면 암의 예방을 기대할 수 있다. 발암과정의 후 단계인 촉진의 경우 약 20~30년 동안 서서히 진행되는 가역적인 과정이므로, 이미 개시단계가 진행된 경우라도 촉진단계를 억제 또는 지연시키면 암의 예방효과를 볼 수 있다는 것이 암을 연구하는 학자들 사이에 널리 인식되고 있다. 다단계 발암 과정 중 암 촉진 단계는 조직의 염증 (inflammation)이나 산화적 손상 (oxidative stress)에 의해 유도될 수 있다.

AMPK와 PPAR- γ 활성화로 *de novo* fatty acid synthesis의 주요 효소 저해 기작을 통해 인간 전립선암세포에 apoptosis를 유도하는 methyl GLA의 암 예방 활성을 탐색하기 위해, murine macrophage cell line인 RAW264.7에 LPS와 IFN- γ 로 inflammation을 유도하고 그 저해활성을 탐색하였다.

Methyl GLA는 농도의존적인 염증 저해 효과를 확인하였다 (Fig. 17-22). 양성대조군으로 사용한 aminoguanidine (AG)와 비교하였을 때, 10 μ M 이상의 농도에서 동등 이상의 항염증 활성을 나타내었다. 하지만, linoleic acid, methyl ester가 혼합된 methyl GLA보다는 다소 낮은 항염증 활성을 가지고 있는 것으로 사료되며, methyl GLA는 항염활성 뿐만 아니라 암 예방 활성도 가지고 있음을 시사한다.

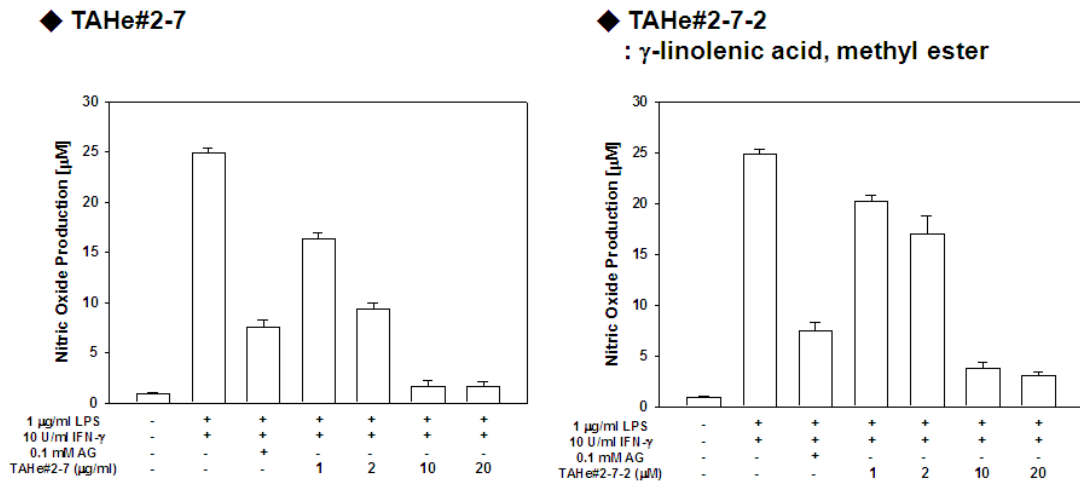


Figure 17-22. The inhibitory effect of methyl GLA on inflammation induced by LPS/IFN- γ

사. 식초음료의 항염활성 탐색

여러 농도로 희석된 식초음료의 시제품을 대식세포 세포주인 RAW264.7에 24시간 동안 처리한 후, NO의 생성량을 측정하였다 (Fig 18-1).

시제품 1은 처리 농도에 의존적으로 NO의 양이 줄어들었다. 특히, 2.5% 처리 했을 때 NO의 생성량이 50% 저해 되었으며 5% 처리 했을 때는 75% 저해 효과를 보였다. 반대로 시제품 2와 시제품 3에서는 저해 효과를 효과적으로 보이지 않았다.

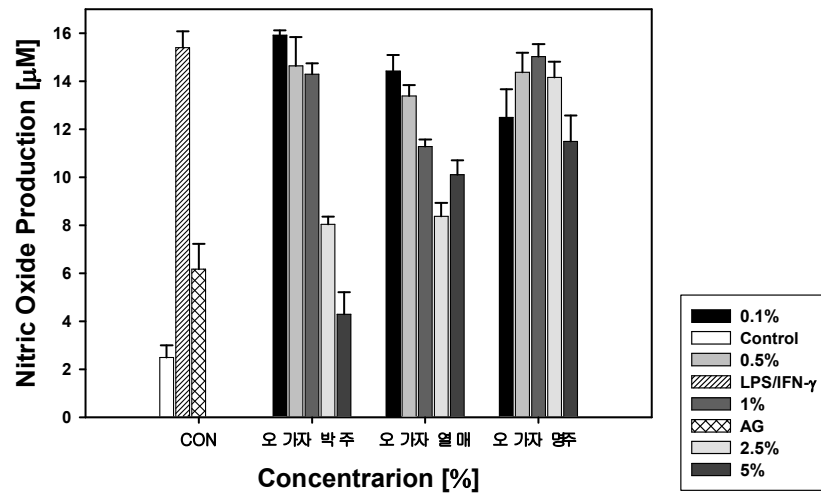


Figure 18-1. The inhibitory effect of 식초음료 on inflammation induced by LPS/IFN-γ

제 4 절

제2협동과제: 전통누룩 유래 미생물·전통주의 생리기능활성 유효성분 분획·분리 연구 - 경희대학교 백남인

1. 누룩으로부터 활성 추출물 및 분획물 제조

가. 누룩으로부터 추출물 및 용매분획물 제조

본 실험에서 사용한 누룩은 (주)국순당에서 제공한 것으로 표본시료(KHU-060425)는 경희대학교 생명공학원 천연물화학실험실에 보관되어 있다.

누룩 8 kg (건물 중 / 가루)을 추출 용기에 넣은 후, 80% MeOH 10 L를 가하고, 실온에서 24시간 추출하였다. 추출액을 여지로 여과하고 남은 잔사는 동일하게 반복 추출하였다. 얻어진 여액을 합한 후, 45°C 이하에서 회전농축기로 감압 하에서 농축하여, MeOH 추출물 1227 g을 얻었다

MeOH 추출물을 Separating funnel 에 H₂O와 EtOAc를 3000 mL씩을 사용하여 넣고, 가볍게 흔든 후, 정치하고, 두 개의 층으로 나뉘어 진후, 아래층의 H₂O층을 funnel 의 코크를 열고, beaker 에 받고, 위층의 EtOAc 층은 다른 beaker 에 받았다. 다시 H₂O층에 EtOAc를 3000 mL을 넣고, 가볍게 흔든 후, 정치하였다. 두 개의 층으로 맑게 나뉘어 진후, 아래층의 H₂O층을 funnel 의 코크를 열고, beaker 에 받고, 위층의 EtOAc 층은 다른 beaker에 합하였다. 얻어진 EtOAc 층을 합한 후, MgSO₄(삼천화학)를 가하여 탈수하였다. 탈수한 EtOAc 층을 여지로 여과한 후, 45 °C 이하에서 회전농축기로 감압 농축하여 EtOAc 추출물 231 g 을 얻었다. 얻어진 EtOAc 추출물을 다시 *n*-Hexane 과 80% MeOH를 각각 1000 mL씩 사용하여, 동일한 과정으로 *n*-Hexane (TAHe / 135 g) 과 EtOAc (TAE / 92 g) 분획물을 얻었다. 위에서 얻어진 수층을 다시 funnel 에 넣고, *n*-BuOH 2500 mL (x2) 를 사용하여 동일한 과정으로 *n*-BuOH추출물을 얻었고, 45°C 이하에서 회전농축기로 감압농축 하였다. (TAB / 114 g)

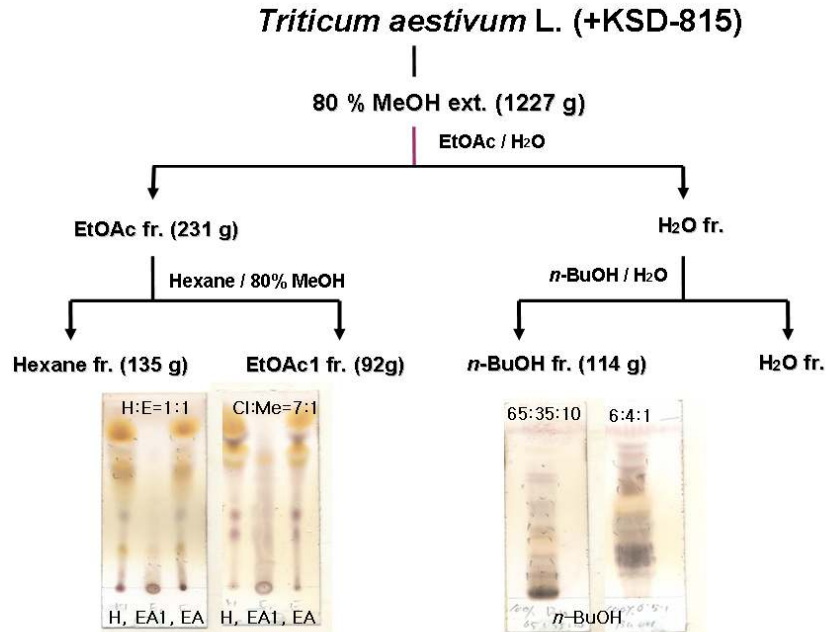


Fig. 1. Isolation procedure of compounds from the *Triticum aestivum* L.

나. 누룩 용매 분획물로부터 소분획물 제조

(1) *n*-BuOH 분획물로부터 column chromatography를 이용한 소분획물 제조

n-BuOH 분획(90 g)으로부터 silica gel column chromatography (Φ10×55 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O = 17:3:1→16:3:1→15:3:1→13:3:1)를 실시하여 각 200 ml 씩 분취 하였다. 각 분취액을 TLC를 이용하여, UV detection (254, 365 nm) 및 10% aq. H₂SO₄, Dragendorff, FeCl₃, Ninhydrin 시약등과 CHCl₃-MeOH-H₂O = 12:3:1, 65:35:10 의 전개용매를 이용하여 발색 시약 분무 시 나타나는 양상에 따라 유사한 부분들을 함께 모으고, 45 °C 이하에서 회전농축기로 감압 농축하여 13개의 분획물 (TAB1~13)을 얻었다.

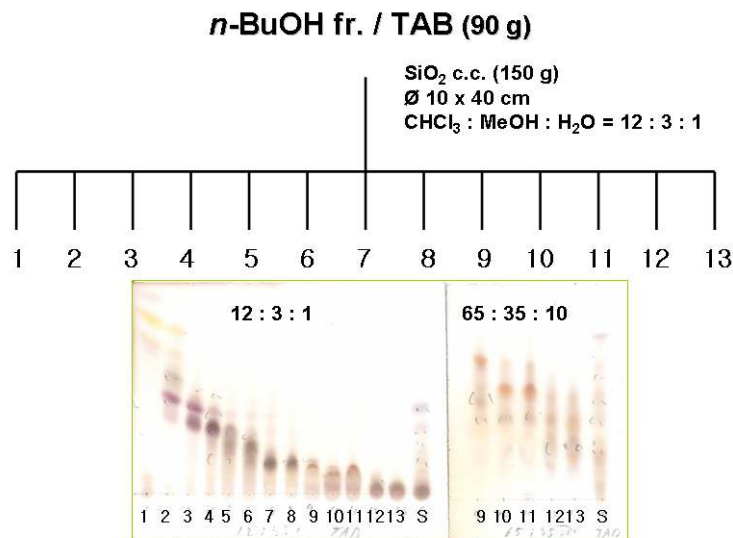
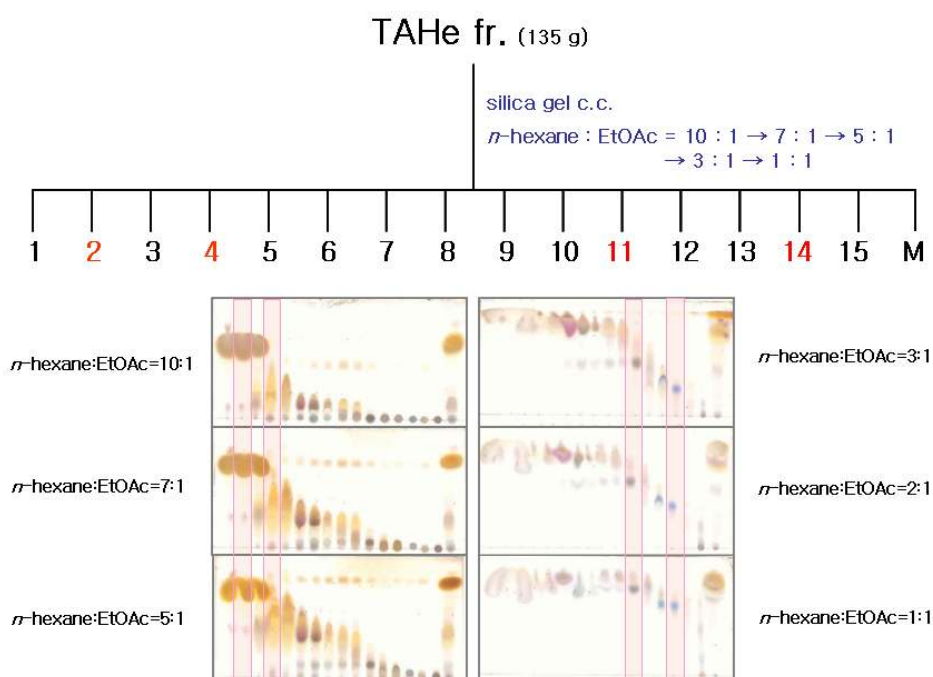


Fig. 2. Isolation procedure of compounds from the *Triticum aestivum* L.

(2) *n*-Hexane 분획으로부터 column chromatography를 이용한 소분획물 제조

n-Hexane 분획(231 g)으로부터 silica gel column chromatography (Φ 10 × 17 cm, *n*-hexane-EtOAc = 10:1→7:1→5:1→3:1→1:1) 를 실시하여 각 200 ml 씩 분취 하였다. 각 분취액을 TLC를 이용하여, UV detection (254, 365 nm) 및 10% aq. H₂SO₄ 시약등과 *n*-hexane-EtOAc = 3:1 의 전개용매를 이용하여 발색 시약 분무 시 나타나는 양상에 따라 유사한 부분들을 함께 모으고, 45 °C 이하에서 회전농축기로 감압 농축하여 16개의 분획물 (TAHe1~16)을 얻었다.



(3) EtOAc 분획으로부터 column chromatography를 이용한 소분획물 제조

EtOAc 분획(92 g)으로부터 silica gel column chromatography (Φ 10 × 15 cm, CHCl₃-MeOH = 30:1→25:1→20:1→15:1→7:1→5:1→3:1→2:1→1:1) 를 실시하여 각 200 ml 씩 분취 하였다. 각 분취액을 TLC를 이용하여, UV detection (254, 365 nm) 및 10% aq. H₂SO₄ 시약등과 CHCl₃-MeOH = 10:1 과 CHCl₃-MeOH = 5:1의 전개용매를 이용하여 발색 시약 분무 시 나타나는 양상에 따라 유사한 부분들을 함께 모으고, 45 °C 이하에서 회전농축기로 감압 농축하여 16개의 분획물 (TAE1~16)을 얻었다.

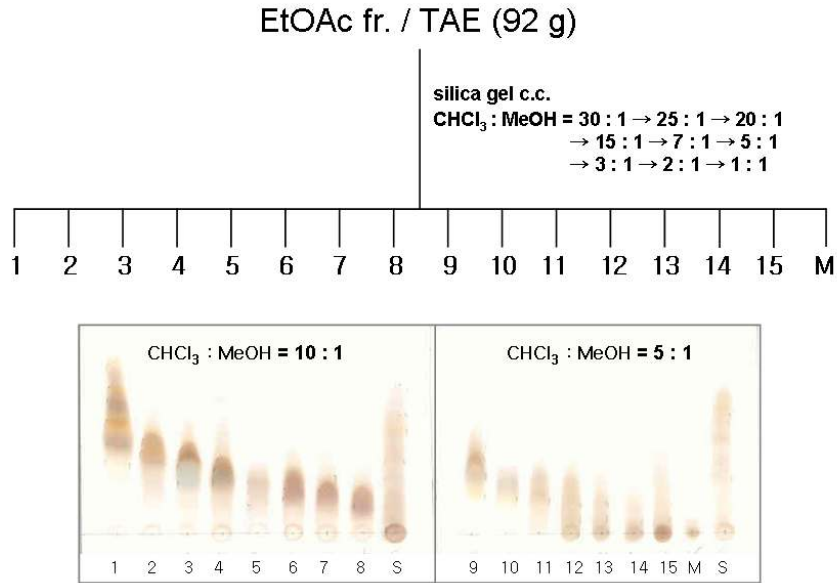


Fig. 4. Isolation procedure of compounds from the *Triticum aestivum* L.

2. 누룩제품으로부터 추출물 및 분획물 제조

가. 전통누룩으로 제조한 전통주의 농축물 및 용매 분획물 조제

전통주 5 L를 회전농축기로 감압 하에서 농축하였다. 농축물을 Separating funnel 에 H₂O 와 EtOAc를 3000 mL씩을 사용하여 넣고, 가볍게 흔든 후, 정치하고, 두 개의 층으로 나뉘어 진후, 아래층의 H₂O층을 funnel 의 코크를 열고, beaker 에 받고, 위층의 EtOAc 층은 다른 beaker 에 받았다. 다시 H₂O층에 EtOAc를 3000 mL을 넣고, 가볍게 흔든 후, 정치하였다. EtOAc를 회전농축기로 감압 하에서 농축하여 Hexane으로 녹여 다시 Separating funnel에 H₂O와 Hexane를 3000 mL씩을 사용하여 넣고, 동일한 방법으로 두 개의 층으로 나뉘어 진후, 아래층의 H₂O층을 funnel 의 코크를 열고, beaker 에 받고, 위층의 Hexane 층은 다른 beaker 에 받았다. 동일한 방법으로 Separating funnel에 H₂O와 EtOAc를 3000 mL씩을 사용하여 넣고, 가볍게 흔든 후, 정치하고, 두 개의 층으로 나뉘어 진후, 아래층의 H₂O층을 funnel 의 코크를 열고, beaker에 받고, 위층의 EtOAc 층은 다른 beaker 에 받았다. 다시 H₂O층에 EtOAc를 3000 mL을 넣고, 가볍게 흔든 후, 정치하여 분획물을 얻었다. Separating funnel에 H₂O와 BuOH를 3000 mL씩을 사용하여 넣고, 가볍게 흔든 후, 정치하고, 두 개의 층으로 나뉘어 진후, 아래층의 H₂O층을 funnel 의 코크를 열고, beaker 에 받고, 위층의 BuOH 층은 다른 beaker 에 받았다. 위와 같은 방법으로 BuOH 분획과 H₂O분획을 얻었다.

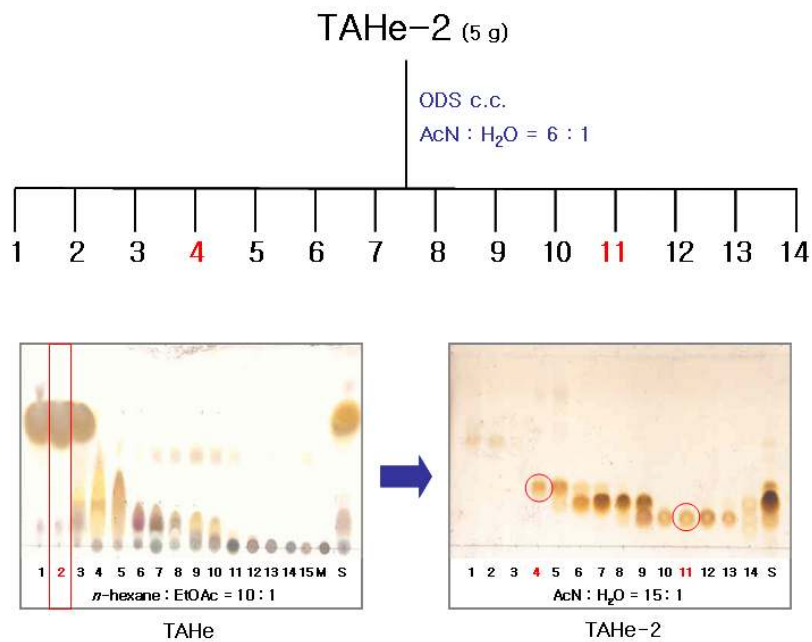
나. 전통누룩을 이용하여 제조한 쌀음료 (N10, N) 및 탁주의 농축물 및 용매 분획물 조제

쌀음료 N10, N, 및 탁주에 대하여 위와 동일한 방법으로 농축하고, 용매 분획하여 각각의 hexane 분획물, EtOAc 분획물, BuOH 분획물 및 물분획물을 조제하였다.

3. 누룩 비극성분획으로부터 지방산 화합물의 분리 동정

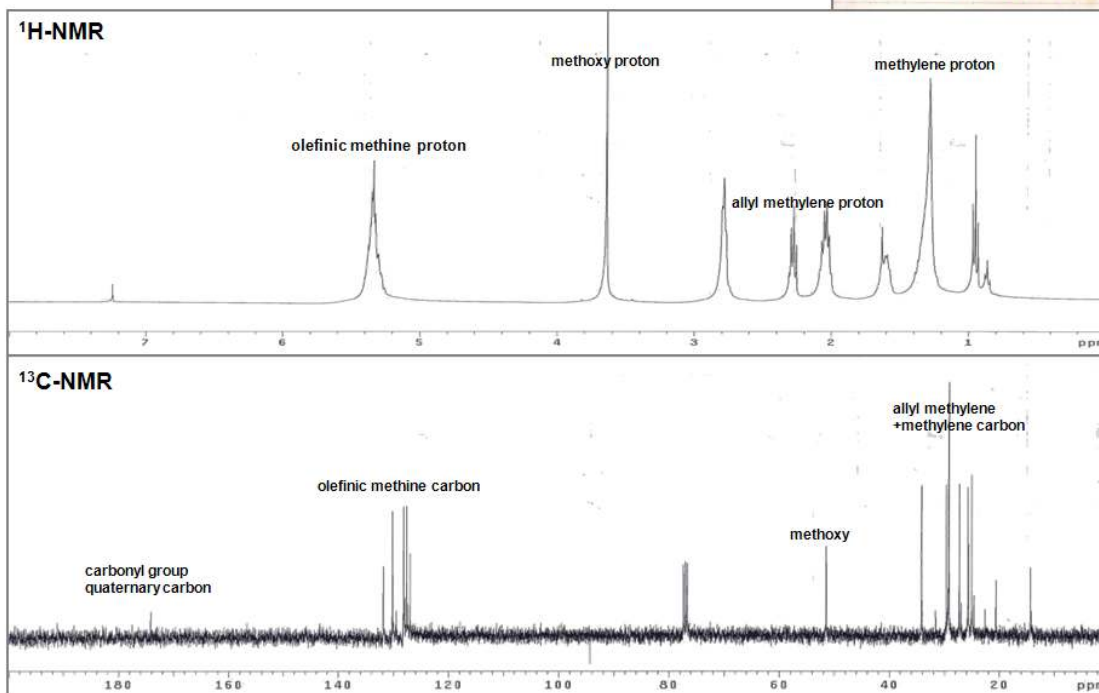
가. TAHe2 분획으로부터 지방산 화합물의 분리, 동정

TAHe2(5 g)를 ODS c.c.(acetonitrile : H₂O = 6 : 1) 를 실시하여 얻은 분취액을 TLC를 이용하여, UV detection (254, 365 nm) 및 10% aq. H₂SO₄ 시약등과 acetonitrile : H₂O = 15 : 1 의 전개용매를 이용하여 발색 시약 분무 시 나타나는 양상에 따라 유사한 부분들을 함께 모으고, 45°C 이하에서 회전농축기로 감압 농축하여 14개의 분획물(TAHe2-1~14)을 얻었다.

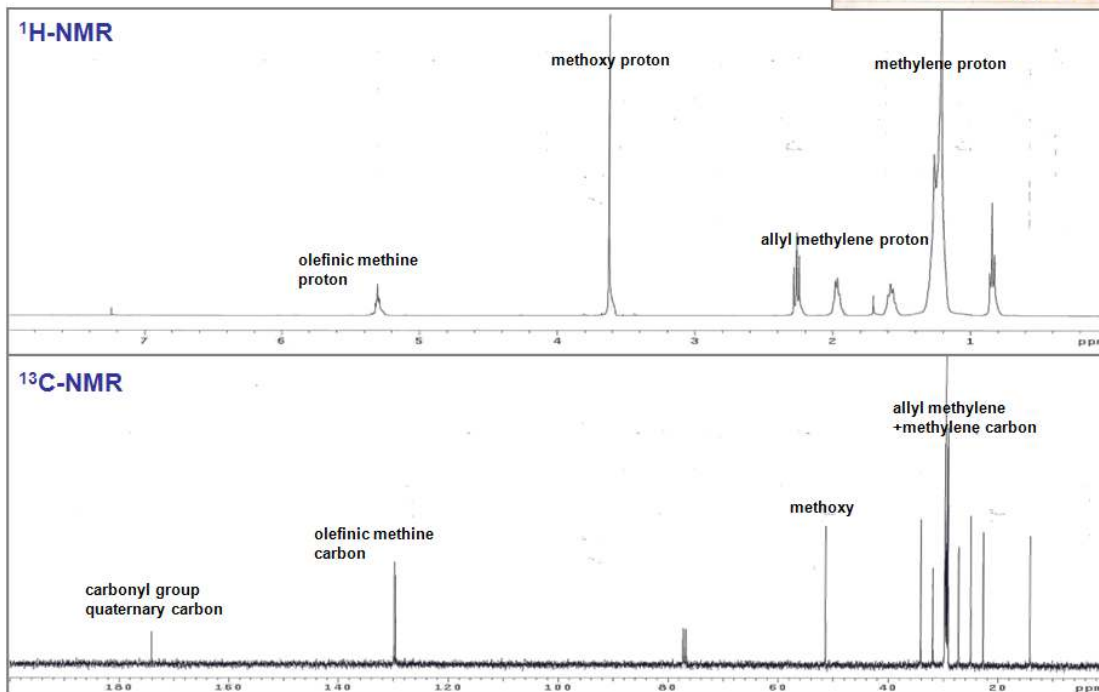


이 분획물중 단일화합물로 추정되는 분획물을 GC 측정결과 TAHe2-4는 linolenic acid, methyl ester 라는 화합물로 구조결정하였고, TAHe2-11는 palmitic acid, methyl ester가 major 화합물로 oleic acid, methyl ester가 minor 화합물로 이루어진 지질화합물로 구조 결정 하였다.

TAHe-2-4 NMR spectrum

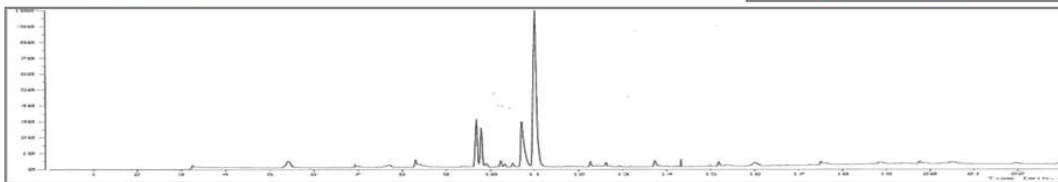
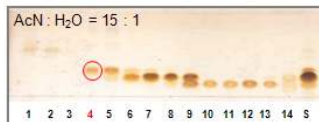
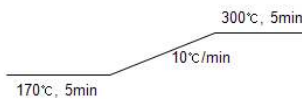


TAHe-2-11 NMR spectrum



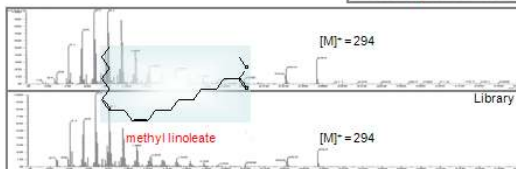
TAHe-2-4 GC chromatogram

- Gas Chromatography
 • GC : Agilent 6890N
 • Column : DB-5



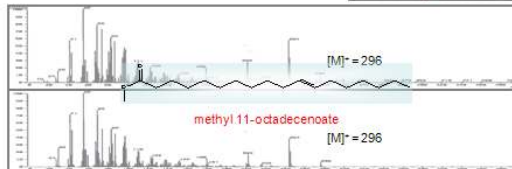
TAHe-2-4 MS spectrum

1. RT[min] = 9.69



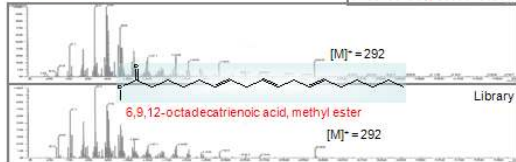
TAHe-2-4 MS spectrum

2. RT[min] = 9.79



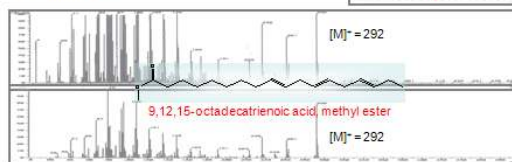
TAHe-2-4 MS spectrum

3. RT[min] = 10.71



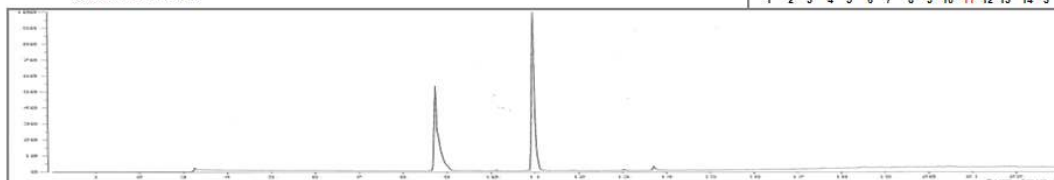
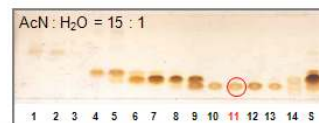
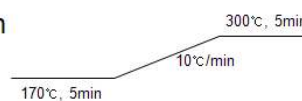
TAHe-2-4 MS spectrum

4. RT[min] = 11.04



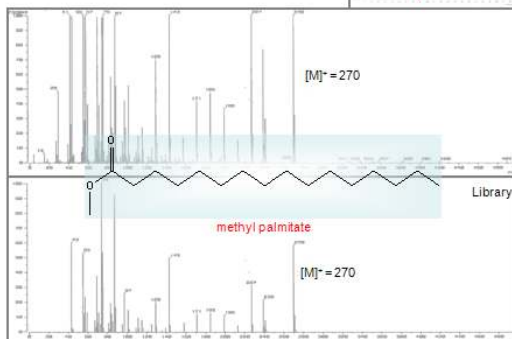
TAHe-2-11 GC chromatogram

- Gas Chromatography
 • GC : Agilent 6890N
 • Column : DB-5



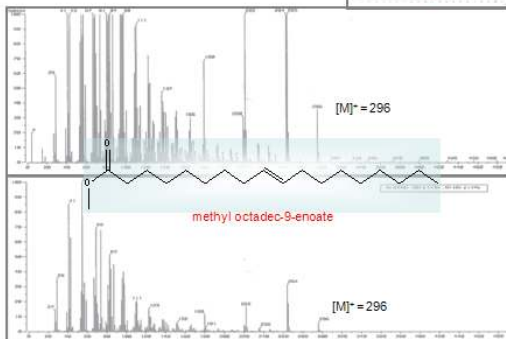
TAHe-2-11 MS spectrum

1. RT[min] = 8.74



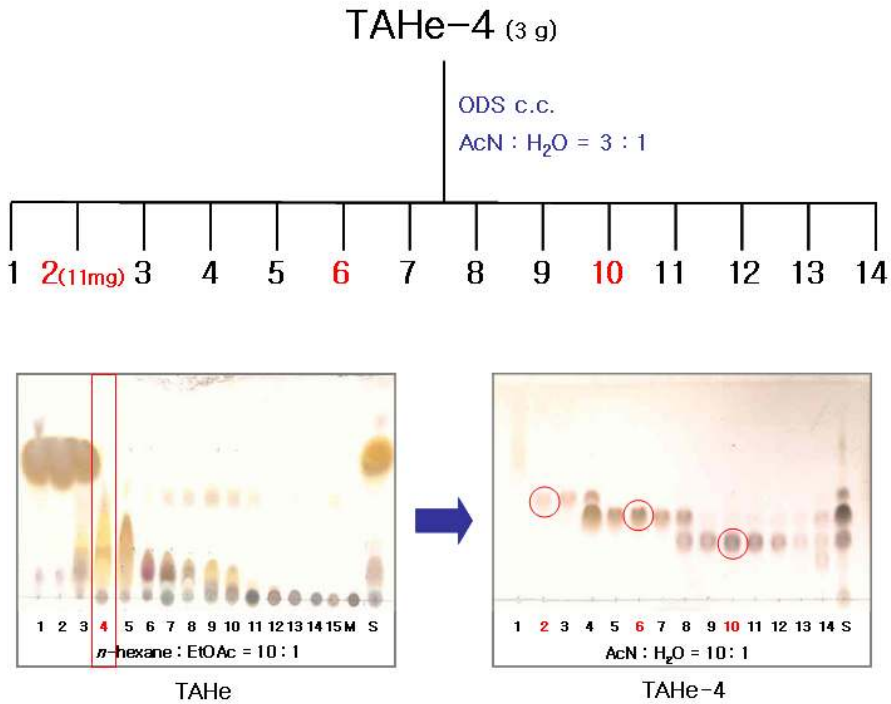
TAHe-2-11 MS spectrum

2. RT[min] = 10.98



나. TAHe4 분획으로부터 지방산 화합물의 분리, 동정

TAHe4(3 g)를 ODS c.c.(acetonitrile : H₂O = 3 : 1) 를 실시하여 얻은 분취액 TLC를 이용하여, UV detection (254, 365 nm) 및 10% aq. H₂SO₄ 시약등과 acetonitrile : H₂O = 10 : 1 의 전개용매를 이용하여 발색 시약 분무 시 나타나는 양상에 따라 유사한 부분 들을 함께 모으고, 45 °C 이하에서 회전농축기로 감압 농축하여 14개의 분획물(TAHe4-1~14) 을 얻었다.



이 분획물중 단일화합물로 추정되는 분획물을 GC 측정결과 TAHe4-2는 linolenic acid 와 gamma linolenic acid 로 이루어진 화합물로, TAHe4-6은 linoleic acid 라는 화합물로 구조 결정하였고, TAHe4-10은 palmitic acid가 major 화합물로 oleic acid가 minor 화합물로 이루어진 지질화합물로 구조결정하였다.

TAHe-4 GC chromatogram

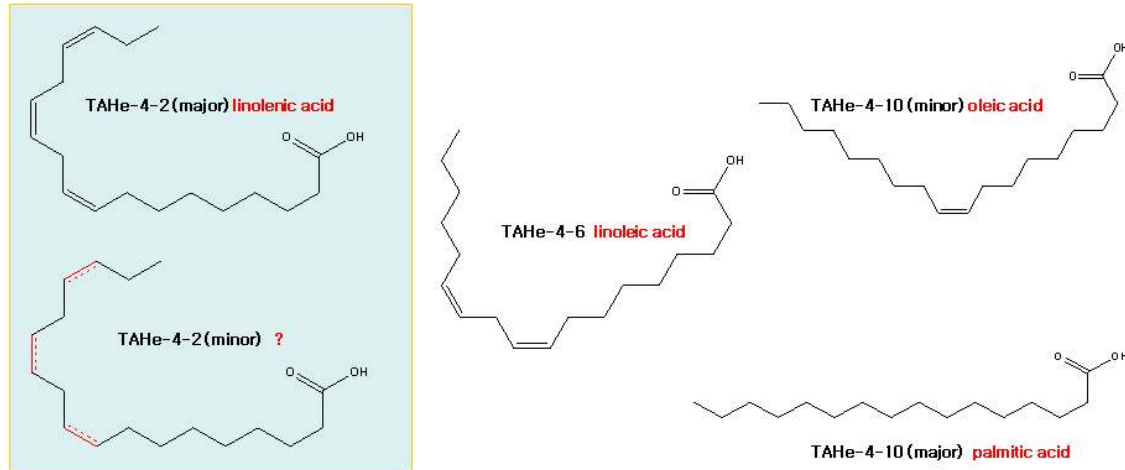
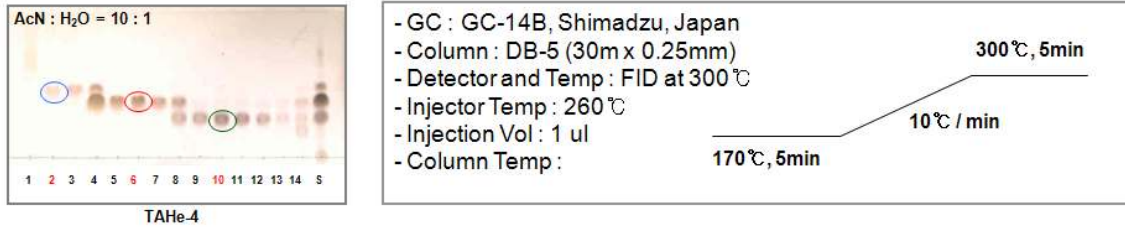
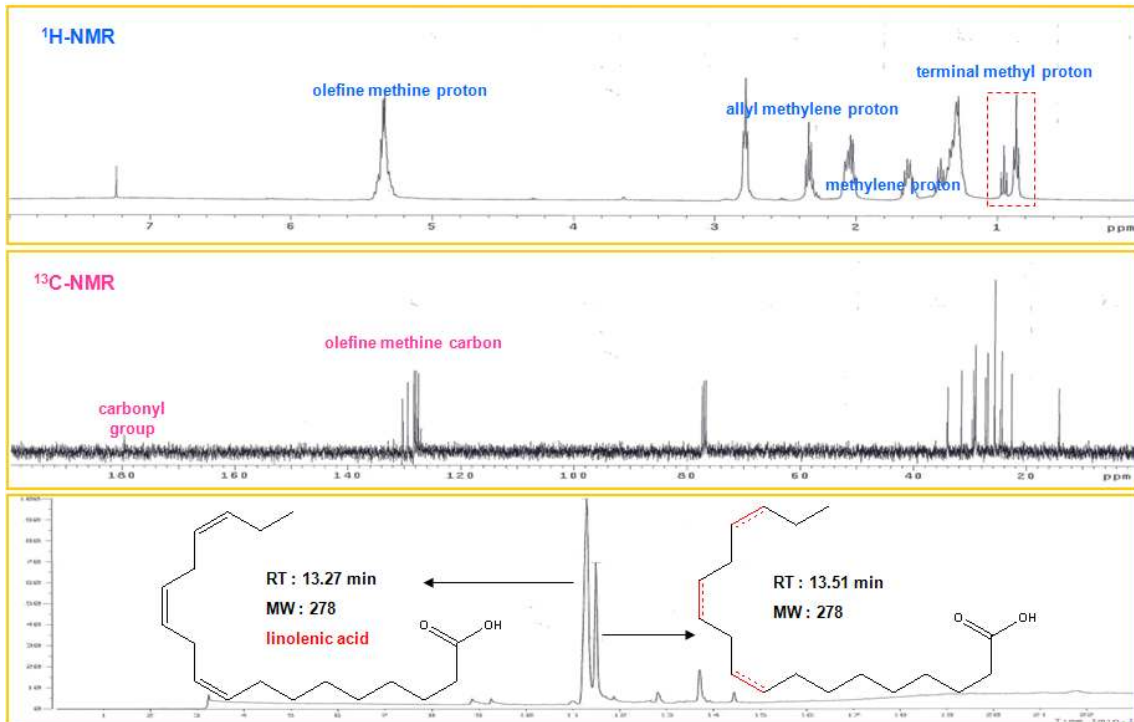


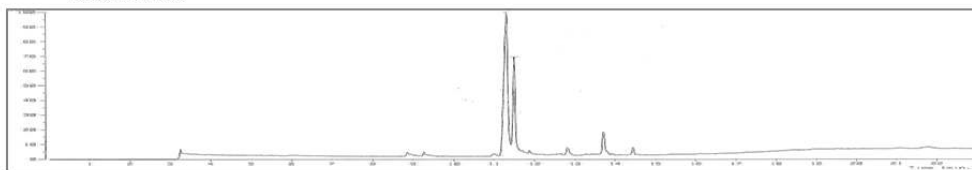
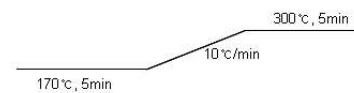
Fig. 3. Operation conditions of GC and GC-MS analysis and Identification of the peaks.

TAHe-4-2 NMR & GC Data



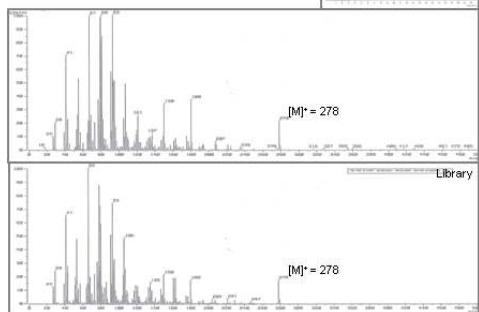
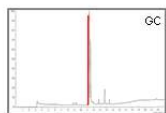
TAHe-4-2 GC chromatogram

- Gas Chromatography
- GC : Agilent 6890N
- Column : DB-5



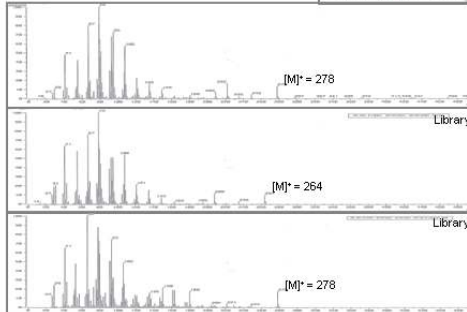
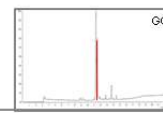
TAHe-4-2 MS spectrum

1. RT[min] = 11.33



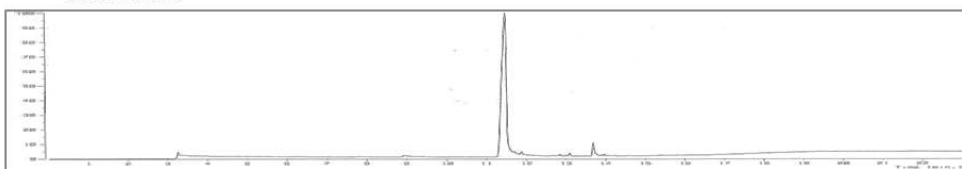
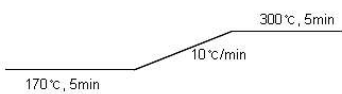
TAHe-4-2 MS spectrum

2. RT[min] = 11.51



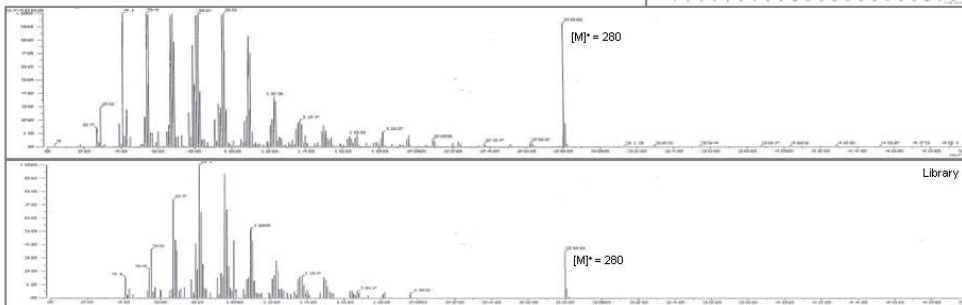
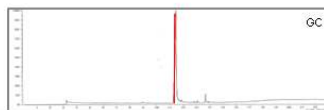
TAHe-4-6 GC chromatogram

- Gas Chromatography
- GC : Agilent 6890N
- Column : DB-5



TAHe-4-6 MS spectrum

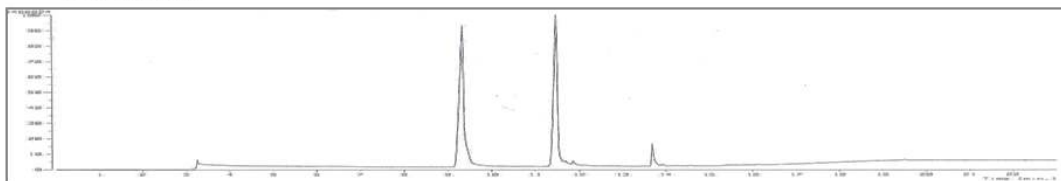
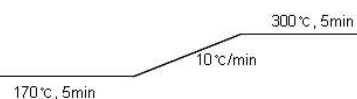
1. RT[min] = 11.49



TAHe-4-10 GC chromatogram

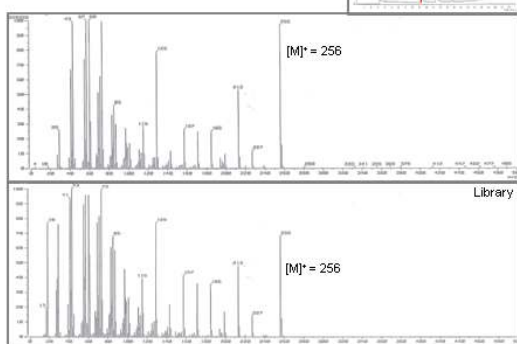
– Gas Chromatography

- GC : Agilent 6890N
- Column : DB-5



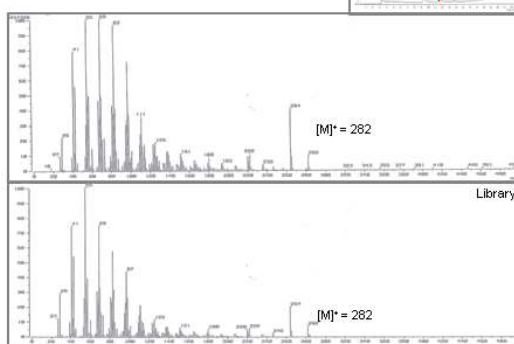
TAHe-4-10 MS spectrum

1. RT[min] = 9.34



TAHe-4-10 MS spectrum

2. RT[min] = 11.49



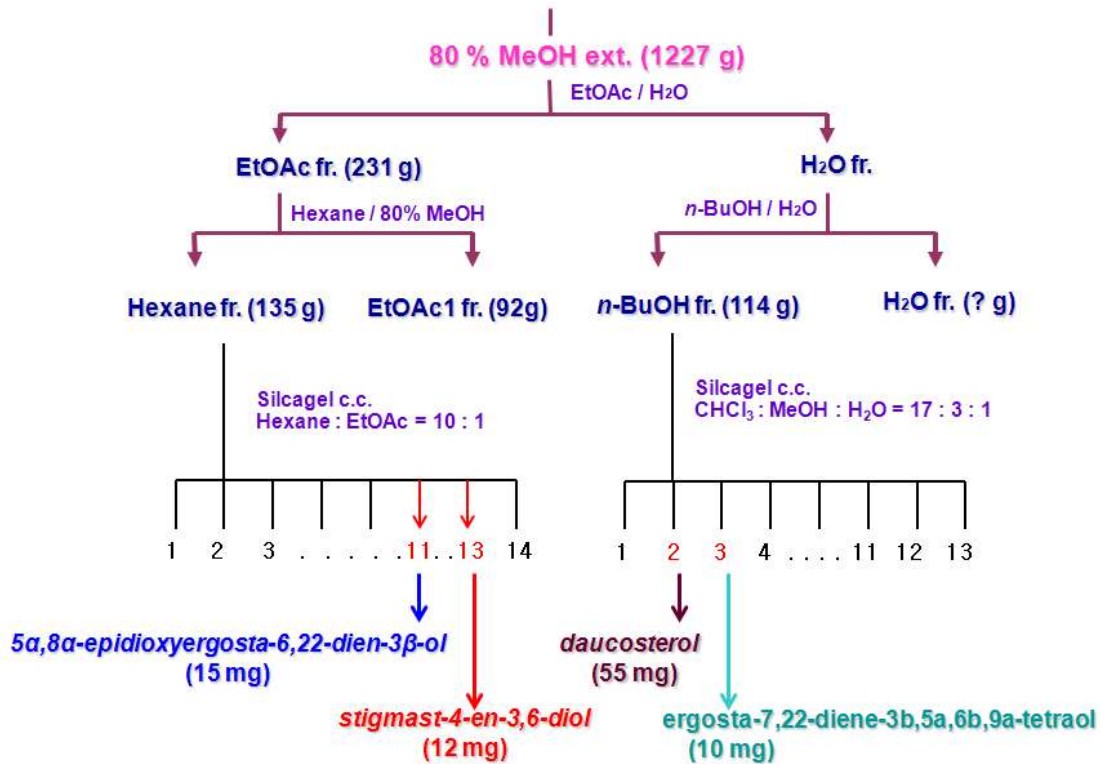
4. 누룩 중간극성 분획으로부터 스테롤 화합물의 분리 동정

가. TAHe11 분획으로부터 스테롤의 분리 및 구조동정

TAHe11(392 mg)을 ODS c.c.(acetonitrile : H₂O = 2 : 1 , Φ4.5 × 7 cm)를 실시하여 8개의 분획물 (TAHe11-1~8)을 얻었다. 그 중 TAHe11-4 (77 mg)를 다시 ODS c.c.(acetonitrile : H₂O = 2 : 1 , Φ2.5 × 7 cm)로 정제하여 TAHe11-4-6(18.9 mg)을 분리하였다.

Compound 1 (Ergosterol peroxide): colorless needles (CHCl₃); m.p. 181–183°C [α]_D²⁵ = –31.7° (c=0.4, CHCl₃) EIMS m/z 428 [M]⁺, 410 [M–H₂O]⁺, 396, 377, 363, 251, 107, 69; IR_ν (KBr, cm^{–1}) 3400, 1459 cm^{–1} ¹H–NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 6.48 (1H, d, J=8.8 Hz, H–7), 6.22 (1H, d, J=8.8 Hz, H–6), 5.20 (1H, dd, J=15.6, 8.0 Hz, H–22), 5.11 (1H, dd, J=15.6, 7.6 Hz, H–23), 3.95 (1H, m, H–3), 0.98 (3H, d, J=6.8 Hz, H–21), 0.88 (3H, d, J=6.8 Hz, H–28), 0.87 (3H, s, H–19), 0.81 (3H, d, J=6.8 Hz, H–26), 0.79 (3H, d, J=6.4 Hz, H–27), 0.79 (3H, s, H–18); ¹³C–NMR (100 MHz, CDCl₃, δ) see Table 1.

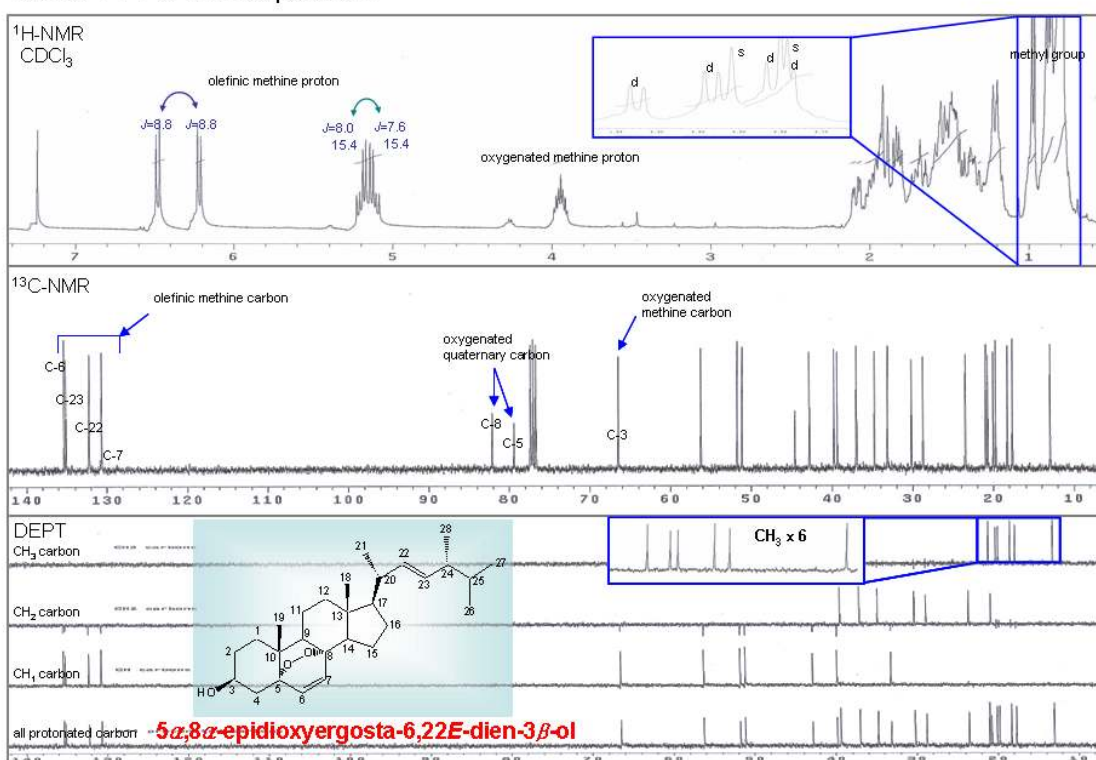
Nuruk (*Rhizopus pryzae* KSD-815 / 8 kg)



이 화합물을 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV흡수가 없고 10% aq. H₂SO₄로 분무 가열 하였을 때 진한 파랑색으로 발색되었다. 분자량은 EI-MS에서 m/z 428[M]⁺의 peak가 분자이온 peak 로 관찰되어 428로 결정되었다. IR 스펙트럼에서 수산기와 (3400 cm⁻¹) 이중결합 (1459 cm⁻¹)의 존재를 확인하였다. ¹H-NMR spectrum에서 δH 6.48(1H, d, J = 8.8 Hz), δH 6.22(1H, d, J = 8.8 Hz), δH 5.20(1H, dd, J = 15.6, 8.0 Hz), δH 5.11(1H, dd, J = 15.6, 7.6 Hz)의 signal로부터 총 4개의 olefinic methine proton이 관측되었고, δH 3.95(1H, m)의 signal에서 oxygenated methine proton 1개를 관측하였다. δH 2.2 미만의 고자장 영역에서 다수의 methylene과 methine signal을 비롯하여, singlet methyl signal 2개 (δH 0.87, 0.79)와 doublet methyl signal 4개 (δH 0.98, 0.88, 0.81, 0.79)가 관측되었다. 따라서 이 화합물은 2개의 이중결합과 1개의 oxygenated methine을 가진 sterol로 추측되었다. 특히 저자장 영역에서 두 개의 olefinic methine proton이 8.8 Hz로 coupling하고, 또 다른 두 개의 olefinic methine proton은 각각 15.6 Hz로 coupling 하는 것으로 보아 ring 안에 이중결합 한 쌍과 chain 상에 trans 구조를 갖는 이중결합 한 쌍이 있는 것으로 예상할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서 총 28개의 carbon이 관측되었고, δC 135.3, δC 135.1, δC 132.2, δC 130.6의 signal로부터 olefinic methine carbon 4개를 확인하였다. 또한 δC 82.1과 δC 79.4의 signal에서 oxygenated quaternary carbon 2개와 δC 66.4의 signal에서 oxygenated methine carbon이 관측되었다. δC 12.9~21.0 사이의 고자장 영역에서 6개의 methyl

carbon signal(δ_C 20.9, 20.0, 19.7, 18.2, 17.6, 12.9)이 관측되었다. 이러한 1H - 및 ^{13}C -NMR을 종합하여 분석하여 본 결과, trans 배향 ($J = 15.2, 8.0$ Hz)을 갖는 chain 상의 이중결합과 ring 안의 이중결합 ($J = 8.8$ Hz)을 비롯하여 산소가 결합한 3개의 탄소 및 methyl기 6개를 갖는 탄소수 28개의 ergosterol 화합물임을 추정할 수 있었다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과, 이 화합물은 ergosterol의 C-5와 C-8사이에 α 배향의 peroxide와 C-3에 β 배향의 수산기를 갖고, C-6(C-7) 및 C-22(C-23)에 2쌍의 이중결합을 가진 5 $\alpha,8\alpha$ -epidioxyergosta-6,22E-dien-3 β -ol로 동정하였다.

TAHe-11-4-6 NMR spectrum



나. TAHe14 분획으로부터 sterol의 분리 및 구조동정

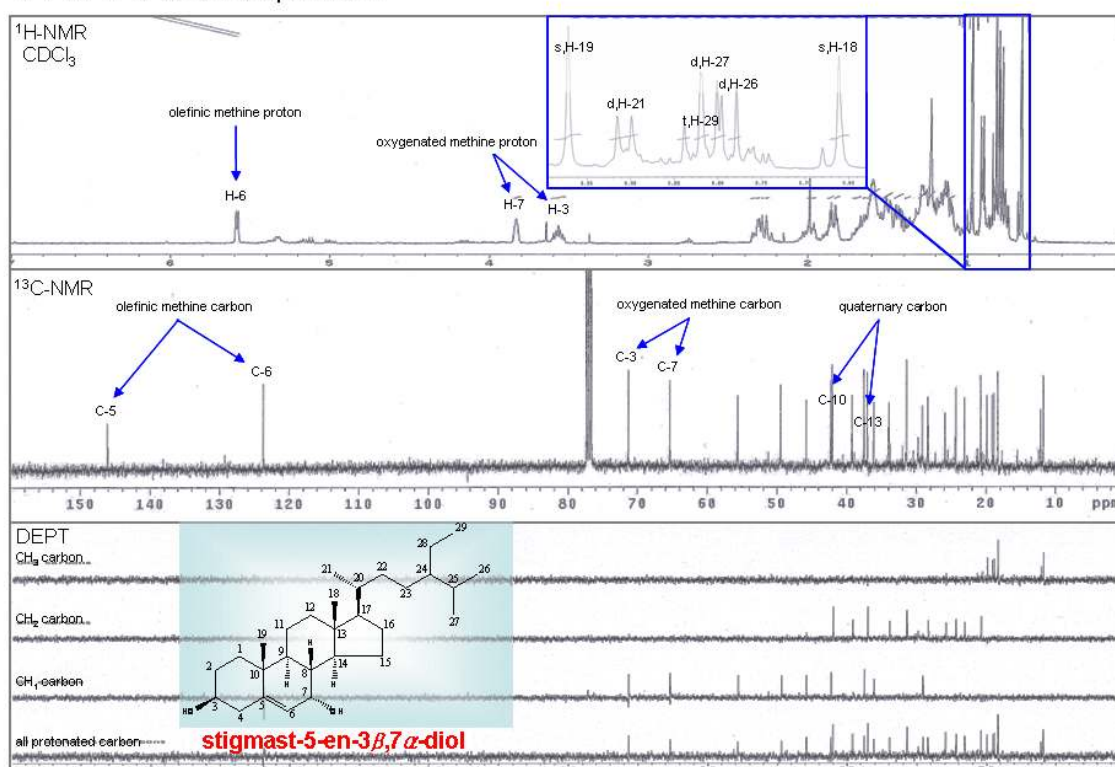
TAHe14(192 mg)를 silica gel c.c.($CHCl_3 : MeOH = 20 : 1, \Phi 4 \times 12$ cm)를 실시하여 11개의 분획물(TAHe14-1~11)을 얻었다. 그 중 TAHe14-3(27.7 mg) 분획을 MeOH를 사용하여 침전과 정과 여과과정을 반복하여 TAHe11-4-C(4 mg)를 분리하였다.

Compound 2 (Stigmast-5-en-3 $\beta,7\beta$ -diol): colorless needles ($CHCl_3$) m.p. 157–158°C [α]_D²⁵ = -15.8° (c=0.3, $CHCl_3$) EIMS m/z 430 [M]⁺, 412 [M-H₂O]⁺, 394 [M-2H₂O]⁺, 289, 271, 253; IR_v (KBr, cm^{-1}) 3420, 1660, 840 cm^{-1} 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ) 5.57 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-6), 3.83 (1H, br s, H-7), 3.55 (1H, br dd, $J=4.4, 11.6$ Hz, H-3), 0.97 (3H, s, H-19), 0.90 (3H,

d, J=6.4 Hz, H-21), 0.82 (3H, t, J=7.6 Hz, H-29), 0.81 (3H, d, J=7.6 Hz, H-27), 0.78 (3H d, J=7.6, H-26), 0.66 (3H, s, H-18) ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ) see Table 1.

이 화합물은 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 약한 UV흡수가 있었고 10% aq. H_2SO_4 로 분무 가열하였을 때 보라색으로 발색되었다. 분자량은 EI-MS에서 m/z 430[M] $^+$ 의 peak가 분자이온 peak 로 관찰되어 430으로 결정되었다. IR 스펙트럼에서 수산기와 (3420 cm^{-1}) 이중결합 (1660 cm^{-1})의 존재를 확인하였다. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ) spectrum의 olefine 영역에서 olefine methine proton signal { δH 5.57 (1H, d, J = 5.2 Hz)} 1개가 관측되었으며, oxygenated methine proton signal { δH 3.55 (1H, dd, J = 4.4, 11.6 Hz), δH 3.83 (1H, br. s)} 2개가 관측되었고, 고자장 영역에서 singlet methyl proton signal { δH 0.97 (H-19), δH 0.66 (H-18)} 2개와, doublet methyl proton signal { δH 0.90 (H-21), δH 0.81 (H-27), δH 0.78 (H-26)} 3개, triplet methyl proton signal { δH 0.82 (H-29)} 1개가 관측되어 steroid 구조의 화합물로 추정할 수 있었다. ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ) spectrum 및 DEPT에서 29개의 탄소가 관측되었으며, 1개의 olefine quaternary carbon signal { δC 146.1 (C-5)} 과 1개의 olefine methine carbon signal { δC 123.7 (C-6)} 을 olefine 영역에서 관측할 수 있었다. 그리고 oxygenated methine carbon signal { δC 71.3 (C-3), δC 65.3 (C-7)} 2개와 고자장 영역에서 sterol에서 비롯한 methine carbon signal, methylene carbon signal과 methyl carbon signal 6개 (δC 19.8, 19.1, 18.8, 18.3, 12.0, 11.7) 및 quaternary carbon signal 2개가 관측되었다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과 이 화합물은 탄소수 29개의 steroid 화합물에 C-3과 C-7에 수산기를 갖고, C-5(C-6)에 1쌍의 이중결합을 가진 stigmast-5-en-3 β ,7 α -diol로 구조 동정하였다.

TAHe-14-3-C NMR spectrum



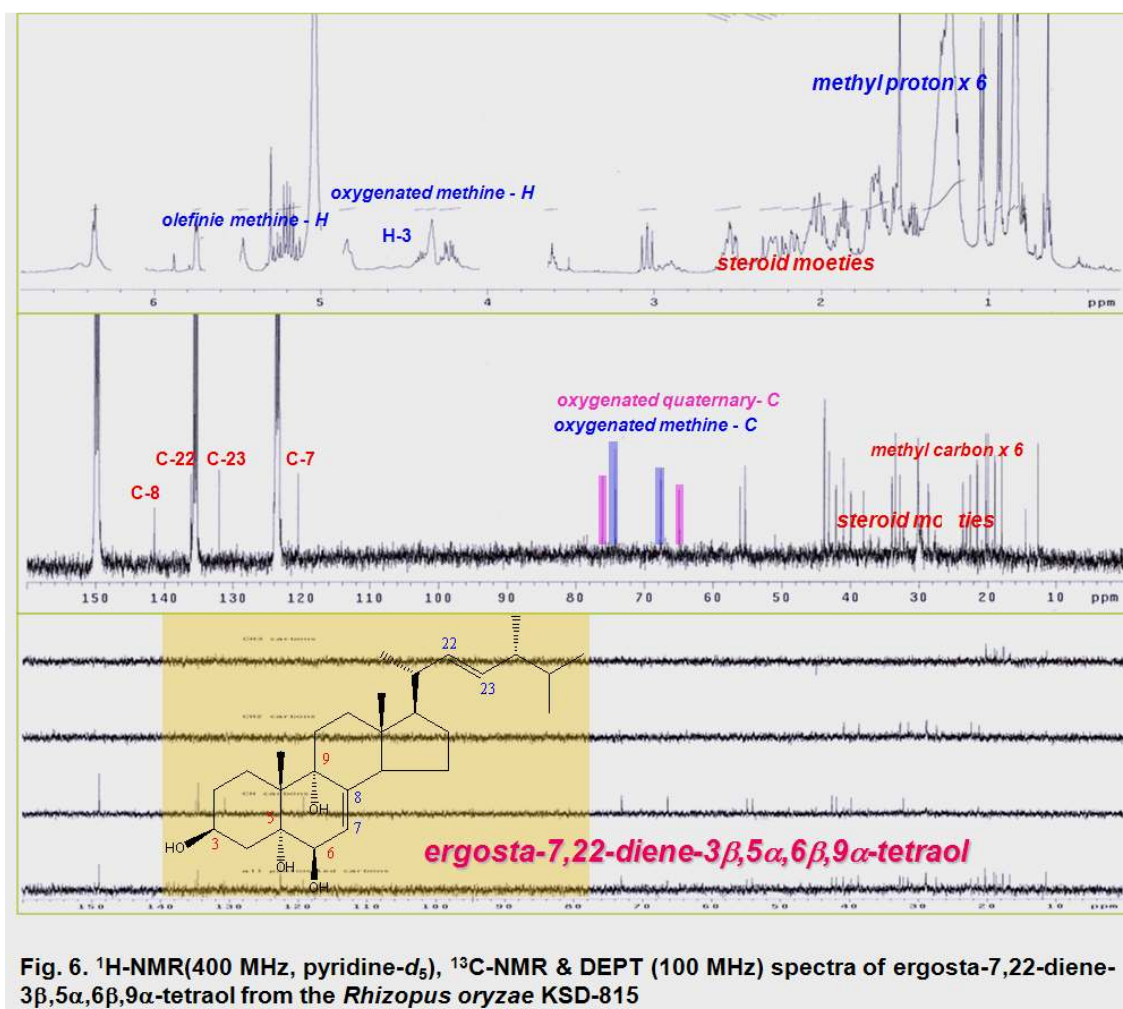
다. RoB2-5 분획으로부터 sterol의 분리 및 구조동정

분획 RoB2 (770 mg, Ve/Vt 0.15-0.40)을 SiO₂ column chromatography 하였다. 용출용매는 CHCl₃-MeOH-H₂O (16:3:1)을 사용하였으며, 9 개의 분획 (RoB2-1 ~ RoB2-9)을 얻었다. 분획 RoB-2-5 (20 mg, Ve/Vt 0.55-0.65)를 다시 Sephadex LH-20 column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, 70% MeOH, 500 ml) 하여 화합물 3 [8 mg, Ve/Vt 0.55-0.65, TLC (RP-18 F254) R_f 0.70 in MeOH-H₂O (1:1)]을 분리 정제하였다.

Compound 3 (Ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β ,9 α -tetraol): White powder (MeOH); m.p. 272°C [a]_D²⁵ = -33.7° (c=0.4, MeOH) EIMS m/z 446 [M]⁺, 428 [M-H₂O]⁺, 410 [M-2H₂O]⁺, 392 [M-3H₂O]⁺, 318, 300, 285; IR_ν (KBr, cm⁻¹) 3367, 1690, 1260, 835; ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N, δ) 5.74 (1H, d, J=5.0, H-7), 5.25 (1H, dd, J=16.4, 8.0 Hz, H-22), 5.18 (1H, dd, J=16.4, 7.6 Hz, H-23), 4.40 (1H, br dd, 5.6, 12.8, Hz, H-3), 4.35 (1H, d, J=5.0 Hz, H-6), 3.05 (1H, dd, J=12.8, 13.6Hz, H-4_{ax}), 2.50(1H, dd, 13.6, 5.6 Hz, H-4_{eq}), 1.53 (3H, s, H-19), 1.04 (3H, d, J=6.8 Hz, H-21), 0.93 (3H, d, J=6.8 Hz, H-28), 0.84 (3H, d, J=6.4 Hz, H-27), 0.83 (3H, d, J=6.8 Hz, H-26), 0.64 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N, δ) see Table 1.

화합물 3은 MeOH 재결정하여 백색분말을 얻었다. IR spectrum 은 화합물 1과 비슷하여 수산기(3367 cm⁻¹) 와 이중결합 (1690 cm⁻¹)의 흡수가 관측되었다. EI-MS 측정결과, 분자이온 peak ([M]⁺) 각 m/z 446에서 관측되어 분자량을 446으로 결정하였다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 6 개의 methyl 기가 δ 1.53 (s, H-19), 1.04 (d, J=6.8 Hz, H-29), 0.93 (d, J=6.8 Hz, H-28), 0.84 (d, J=6.4 Hz, H-27), 0.83 (d, J=6.8 Hz, H-26), and 0.64 (s, H-18)에서 관측되어 화합물 3이 ergostane sterol moiety를 갖고 있는 것으로 판명되었다. 또한 2개의 oxygenated methine proton signal [δ 4.40(1H, m, H-3), δ 4.35(1H, d, J=5.6 Hz, H-6)] 과 3개의 olefin methine proton signal [δ 5.74 (1H, d, J=5.0 Hz, H-7), δ 5.25 (1H, dd, J=16.4, 8.0 Hz, H-22), 5.18 (1H, dd, J=16.4, 7.6 Hz, H-23)] 이 각각 관측되었는데, 뒤의 2개 signal 은 coupling constant 값으로부터 trans-configuration을 갖는 aliphatic chain의 이중결합임을 알 수 있었다. The ¹³C-NMR spectrum에서는 모두 28 개의 carbon signal이 관측되었는데, DePT 실험을 통하여 각 탄소를 한 개의 olefin quaternary carbon (δ C 141.5), 3개의 olefin methine carbons (δ C 120.4, 132.0, 136.1), 2개의 oxygenated quaternary carbon (δ C 74.3, 76.1), 2 개의 oxygenated methine carbon (δ C 67.3, 73.8), 그리고 6 개의 methyl carbon (δ C 12.6, 17.9, 19.8, 20.1, 22.4, 21.4)으로 동정하였다. 각 관능기의 결합위치는 HSQC 와 HMBC와 같은 2-D NMR 실험을 통하여 결정하였다. 두 개의 oxygenated methine carbon signal (δ C67.3, 73.8) 은 HSQC 스펙트럼에서 δ 4.40 (H-3) 과 4.35 (H-6)의 proton signal 과 correlation을 보였다. 3개의 olefin methine carbon signal (120.4, 132.0, 136.1) 은 HSQC 스펙트럼에서 각각 δ 5.74 (H-7), 5.18 (H-23), 5.25 (H-22) 의 proton signal 과 J₁ correlation을 보였으므로, C-7, C-23 및 C-22로 결정하였다. 또한 δ C 74.3에서 관측

된 oxygenated quaternary carbon signal 은 HMBC 스펙트럼에서 (δ 4.35, H-6)의 oxygenated methine proton signal과 J2 correlation을 보였고, (δ 5.74, H-7) 의 olefin methine proton signal 및(δ 1.53, H-19) 의 methyl proton signal 과 J3 correlation을 보였으므로, C-5 로 동정하였다. δ C 76.1에서 관측된 또 다른 oxygenated quaternary carbon signal 은 HMBC 스펙트럼에서 H-19 및 H-7 과 J3 correlation을 보였으므로 C-9으로 동정하였다. δ C 141.5 의 olefin quaternary carbon signal은 H-6 (J3) 및 H-7 (J2) 과 correlation을 보여 C-8로 동정하였다. 최종적으로 화합물 3은 ergosta-7,22-dien-3,5,6,9-tetraol로 구조결정하였다. 입체구조는 스펙트럼 data 와 물리화학적 data를 문헌값과 비교하여 3 β ,5 α ,6 β ,9 α -tetraol 과 22-trans-ene 으로 결정하였다. 이 화합물처럼 수산기를 4개 가진 steroid 는 천연에서는 드물게 발견 된다.



라. RoB2-7 분획으로부터 sterol의 분리 및 구조동정

위에서 얻은 분획 RoB2-7 (181 mg, Ve/Vt 0.70-0.78)를 ODS를 이용하여 column chromatography 하였다. 용출용매는 MeOH-H₂O (2:1)을 사용하였으며, 모두 5 개의 분획 (RoB2-7-1~RoB2-7-5)을 얻었으며, 동시에 화합물 4 [63 mg, Ve/Vt 0.30-0.45, TLC (RP-18 F254) R_f 0.55 in MeOH-H₂O (4:1)]를 분리 정제 하였다.

Compound 4 (Daucosterol): colorless crystals (MeOH-H₂O); m.p. 285-288°C [α]_D²⁵ = -43.7° (c=0.3, pyridine) pos. FABMS m/z 577 [M+H]⁺ IR_v (KBr, cm⁻¹) 3320, 3030, 2937, 1640; ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N, δ) 5.34 (1H, br. d, J=4.8 Hz, H-6), 5.05 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1'), 3.59 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, d, J=6.8 Hz, H-21), 0.93 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, J=7.2 Hz, H-26), 0.88 (3H, d, J=7.6 Hz, H-27), 0.85 (3H, t, J=7.6 Hz, H-29), 0.66 (3H, s, H-18) ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N, δ) see Table 1.

화합물 4는 MeOH-H₂O 로 재결정하여 무색결정을 얻었다. Positive FAB-MS spectrum에서 pseudomolecular ion peak [M+H]⁺ 가 m/z 577에서 얻어져, 분자량을 576 으로 결정하였다. IR을 측정하였을 때, 수산기와 이중결합의 흡수가 각각 3320 와 1640 cm⁻¹에서 나타났다. NMR 스펙트럼은 잘 알려진 식물 스테롤 배당체인 daucosterol과 같게 나타났다. NMR data 와 IR, MS data를 문헌값과 비교하여 이 화합물의 구조를 확인하였다.

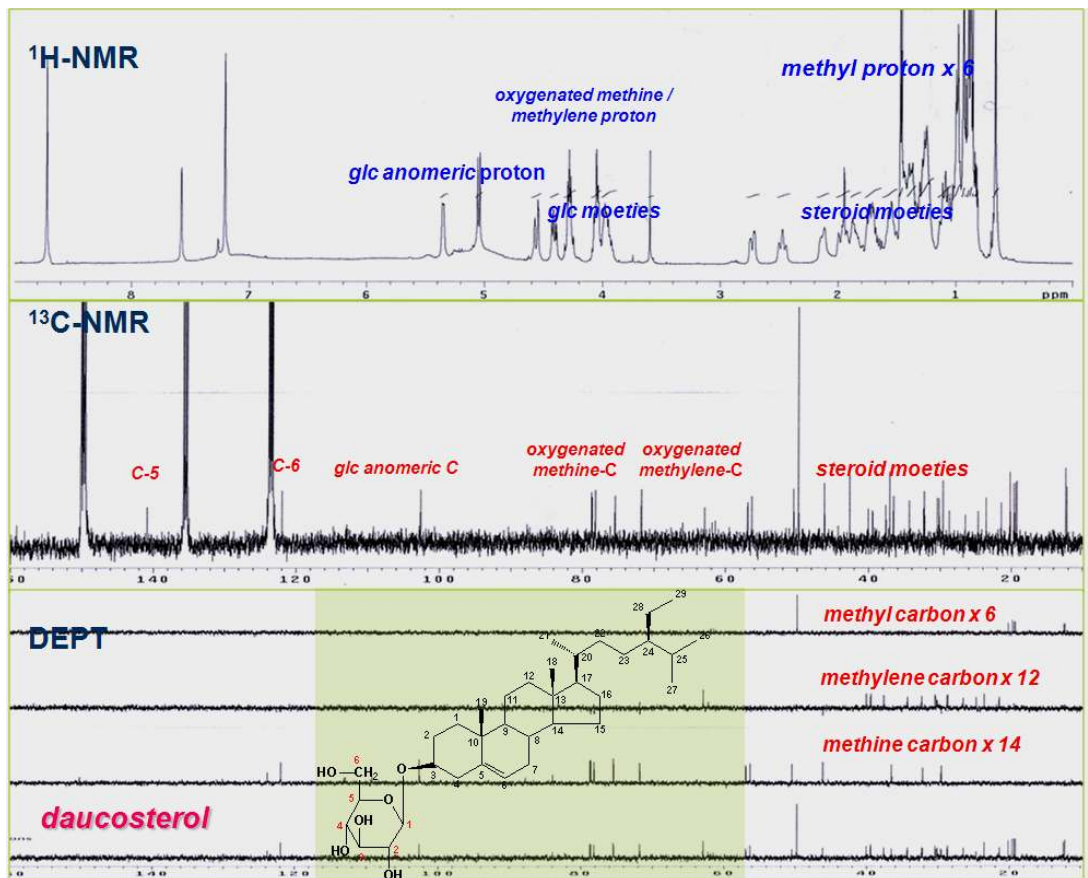
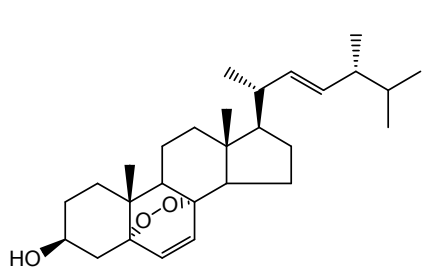


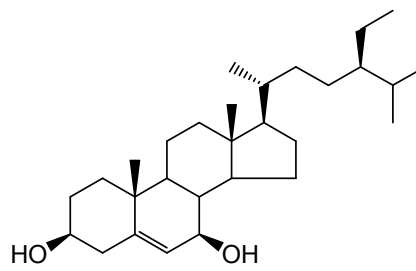
Fig. 5. ¹H-NMR(400 MHz, pyridine-d₅), ¹³C-NMR & DEPT (100 MHz) spectra of daucosterol from the *Rhizopus oryzae* KSD-815

Table 1. ^{13}C -NMR data of compounds **1**, **2** (in chloroform- d_1) and **3**, **4** (in pyridine- d_5)

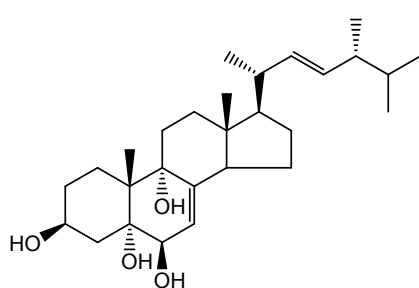
Carbon No.	Compound 1	Compound 2	Compound 3	Compound 4
1	37.0	37.1	29.1	37.5
2	30.2	31.4	32.4	30.3
3	66.4	71.3	67.3	78.1
4	34.7	42.2	42.1	40.0
5	79.4	146.1	74.3	140.8
6	135.3	123.7	73.8	121.9
7	130.6	65.3	120.4	32.2
8	82.1	37.0	141.5	32.1
9	51.1	42.0	76.1	50.4
10	37.0	37.5	41.3	37.0
11	20.7	20.7	28.5	21.4
12	39.4	39.2	36.0	39.4
13	44.6	42.1	44.4	42.5
14	51.7	49.4	51.3	56.9
15	28.7	23.1	23.5	24.6
16	23.5	28.3	28.7	28.6
17	56.2	55.6	56.3	56.3
18	12.9	12.0	12.6	12.1
19	18.2	18.3	22.4	19.5
20	39.8	36.0	40.7	36.5
21	20.9	18.8	21.4	19.1
22	132.2	34.0	136.1	34.3
23	135.1	26.1	132.0	26.4
24	42.8	45.8	43.1	46.1
25	33.1	29.2	33.3	30.1
26	20.0	19.8	19.8	19.3
27	19.7	19.1	20.1	20.1
28	17.6	23.1	17.9	23.5
29		11.7		12.3
1'				102.5
2'				75.4
3'				78.6
4'				71.7
5'				78.5
6'				62.9



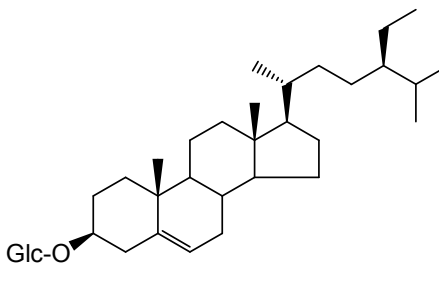
5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22E-dien-3 β -ol



stigmast-5-en-3 β ,7 α -diol



ergosta-7,22-dien-3,5,6,9-tetraol

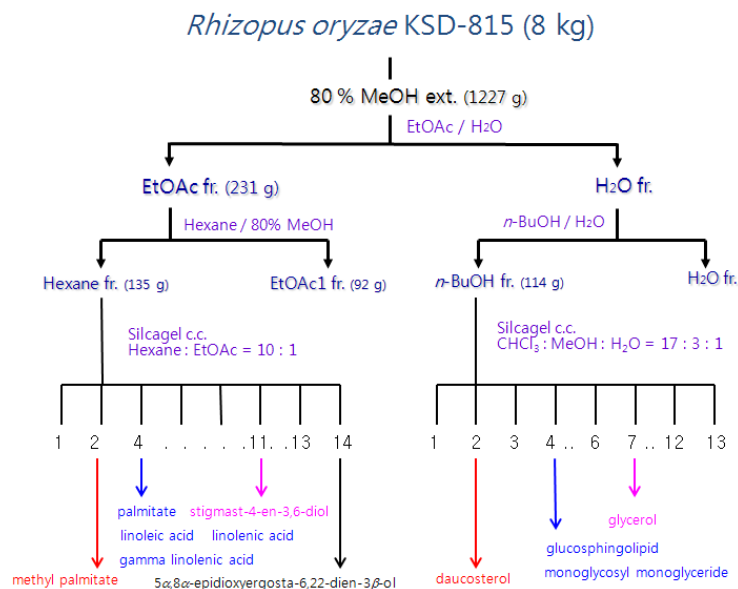


Daucosterol

5. Glycosylglyceride 및 핵산 화합물의 분리 동정

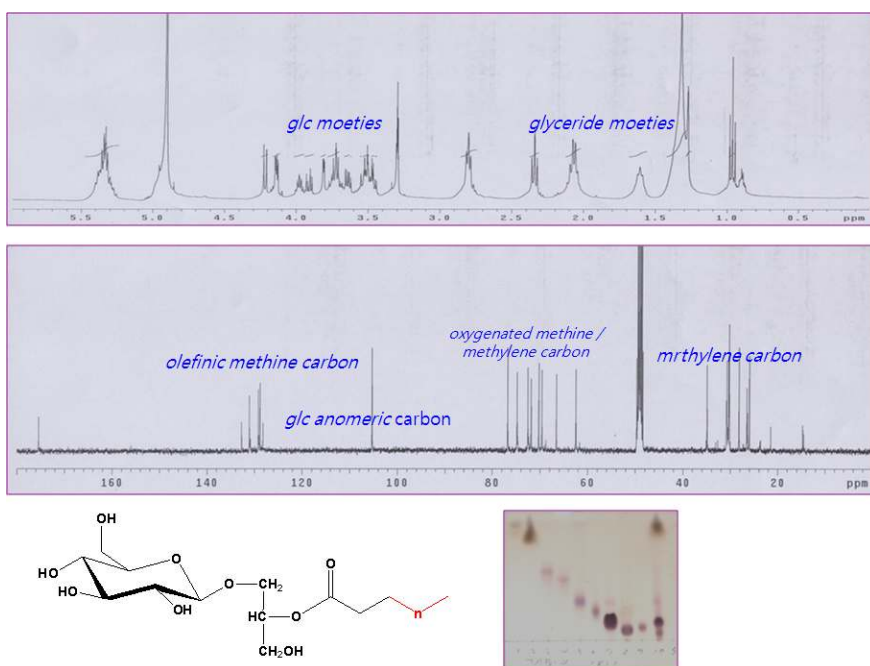
가. TAB-6 분획으로부터 glycosylglyceride 의 분리 및 구조동정

위에서 얻어진 분획 TAB-6 번 분획으로부터 silica gel column chromatography를 수행하여 8개의 분획을 얻었으며 그 중 순수하게 정제된 glycosylglyceride (TAB-6-3, 45 mg)을 분리하였다.

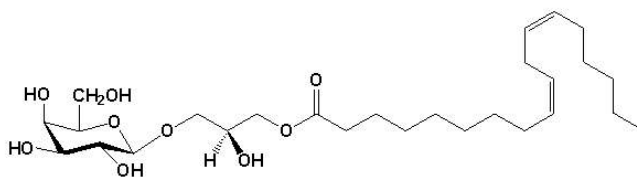
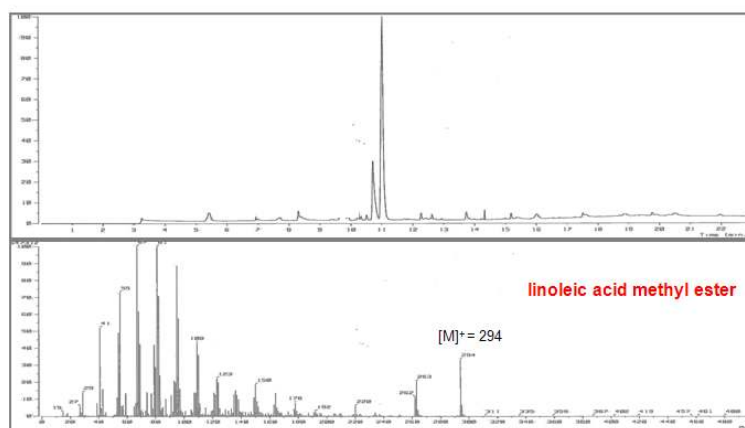


화합물 TAB-6-3 은 $^1\text{H-NMR}$ 에서 이중결합, 말단 메틸기, 3개의 allyl methylene 및 다수의 methylene signal 이 관측되어 불포화 지방산으로 추정되었다. 또한 anomer 수소 외에 다수의

oxygenated-methine 및 oxygenated-methylene 의 수소가 관측되어 당의 존재가 확인되어, glycosylglyceride 화합물로 판명되었다. ^{13}C -NMR 및 DEPT spectrum 에서도 carboxyl 기, 이중결합, 말단 메틸기와 다수의 methylene carbon signal 의 존재가 확인되었고, hemiacetal 탄소 및 oxygenated-methine 및 oxygenated-methylene 탄소 signal 이 관측되어 glycosylglyceride 화합물이 확인되었다. 결합한 당은 chemical shift로부터 D-glucose 로 판명되었다. 결합한 지방산을 규명하기 위하여 5% NaOH를 이용하여 알칼리 가수 분해한 후에 GC/MS 측정한 결과 linoleic acid 가 가장 주요한 지방산인 것으로 결정하였다. 따라서 화합물 3은 (2S)-1-O-linoleoyl-3-O- β -D-glucopyranosyl-sn-glycerol 로 구조 규명 하였다.



Alkaline hydrolysis of TAB-6-3

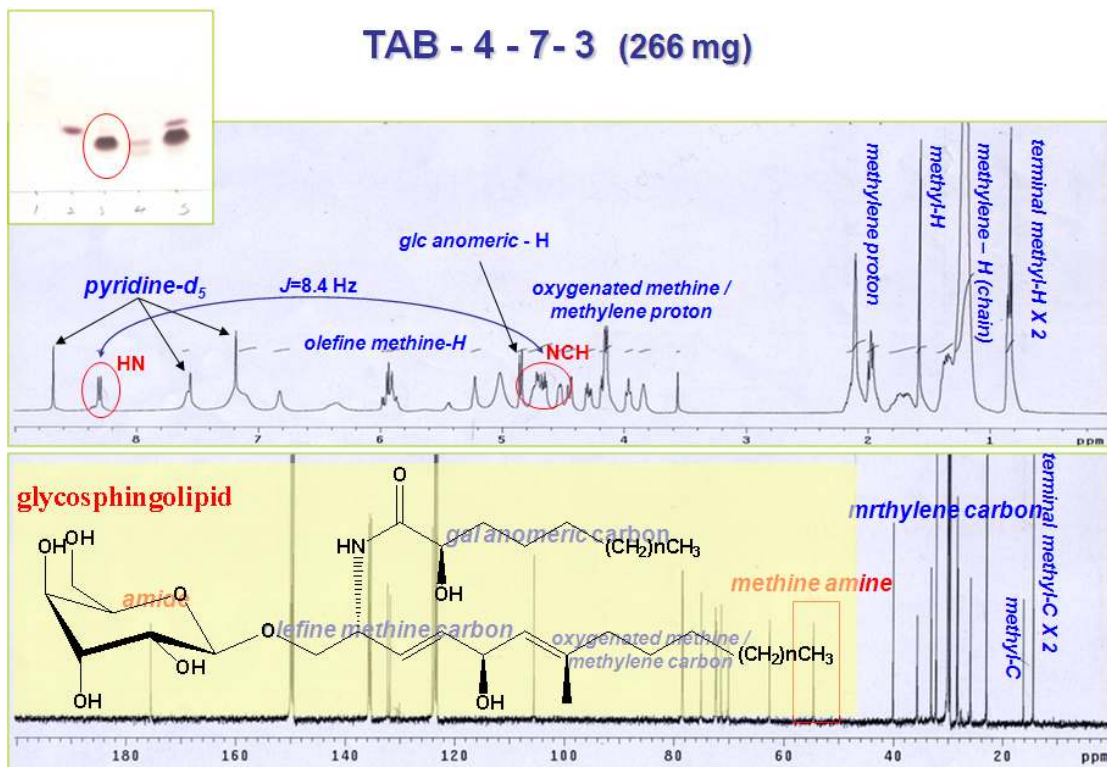


(2S)-1-O-linoleoyl-3-O- β -D-galactopyranosyl-sn-glycerol

나. TAB-4 분획으로부터 glycosphingolipid 의 분리 및 구조동정

위에서 얻어진 분획 TAB-4 번 분획으로부터 silica gel column chromatography를 수행하여 8개의 분획 (TAB-4-1 ~ TAB-4-8) 을 얻었다. 다시 TAB-4-6 분획에 대하여 ODS column chromatography 하여 6개의 분획을 얻었고, 그 중 순수하게 정제된 glycosphingolipid (TAB-4-6-3, 266 mg)을 분리하였다.

화합물 TAB-4-6-3 은 $^1\text{H-NMR}$ 에서 이중결합, 말단 메틸기, 다수의 methylene signal 이 관측되어 불포화 지방산으로 추정되었다. 또한 anomer 수소 외에 다수의 oxygenated-methine 및 oxygenated-methylene 의 수소가 관측되어 당의 존재가 확인되었으며, 아민기의 수소 signal 도 관측되어 glycosylsphingolipid 화합물로 판명되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 및 DEPT spectrum 에서도 amide 기, 이중결합, 말단 메틸기와 다수의 methylene carbon signal 의 존재가 확인되었고, hemiacetal 탄소 및 oxygenated-methine 및 oxygenated-methylene 탄소 signal 이 관측되어 glycosylsphingolipid 화합물이 확인되었다. 결합한 당은 chemical shift로부터 D-galactose 로 판명되었다. 따라서 화합물 TAB-4-6-3 은 아래 그림과 같은 구조로 판명되었다. 결합한 지방산 및 aliphatic chain 의 구조는 알칼리 가수 분해, 산 분해 등의 화학반응을 이용하거나 MS data를 측정하여 확인할 예정이다.

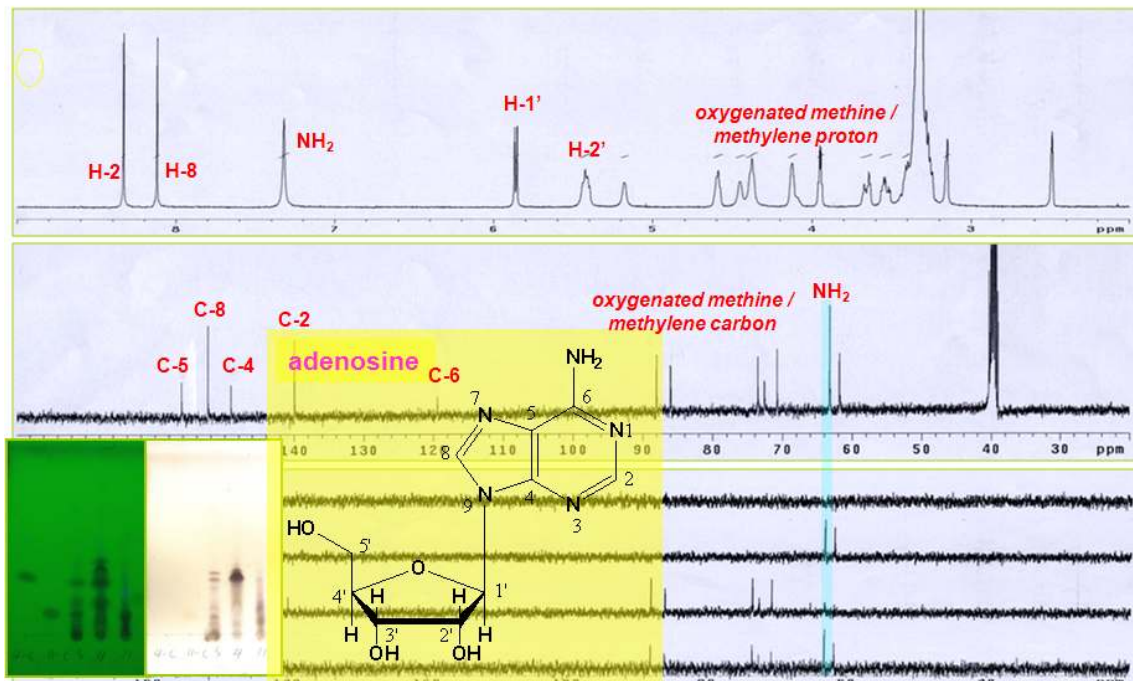


다. TAB-11 분획으로부터 핵산화합물의 분리 및 구조동정

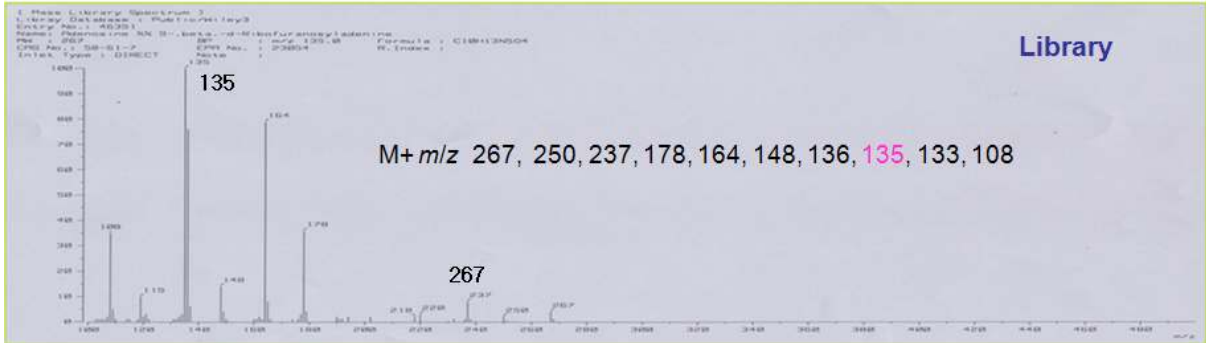
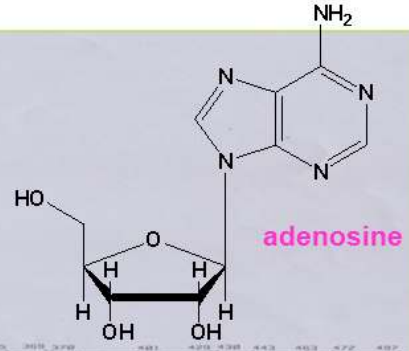
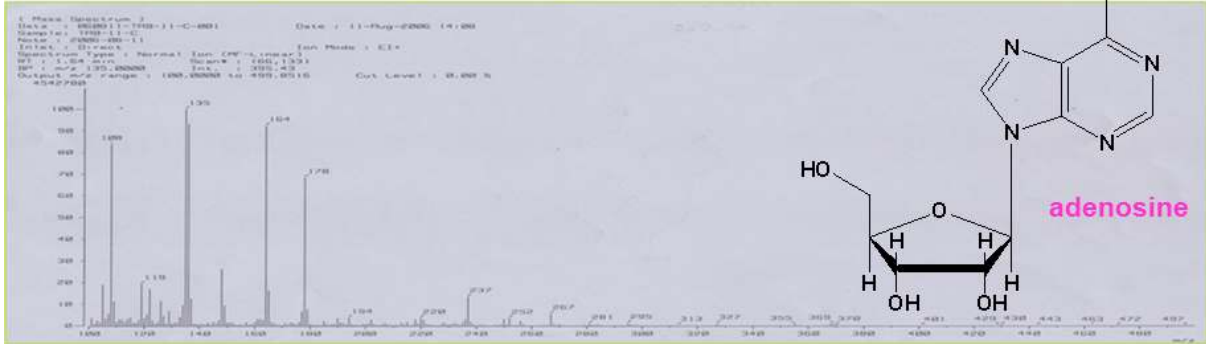
위에서 얻어진 분획 TAB-11 번 분획을 5 ml 의 MeOH 에 녹인 후, 저온에 보관하였다. 생성된 침전을 glass filter를 이용하여 여과하였다. 침전물을 찬 EtOH 로 세척한 후, 얻어진 결정을 건조하여 핵산화합물 TAB-11-C (88 mg)을 얻었다.

화합물 TAB-11-C는 4-6-3은 $^1\text{H-NMR}$ 에서 purine 염기의 hetero 불포화 고리의 수소, signal, amine 수소, anomer 수소 외에 다수의 oxygenated-methine 및 oxygenated-methylene 의 수소가 관측되어 핵산화합물로 추정되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 및 DEPT spectrum 에서도 adenine 유래의 탄소 및 hemiacetal 탄소 및 oxygenated-methine 및 oxygenated-methylene 탄소 signal 이 관측되었다. 결합한 당은 chemical shift로부터 D-ribose로 판명되었다. 따라서 화합물 TAB-11-C 는 adenine 에 ribose 가 결합한 핵산화합물 adenosine 으로 구조 동정하였다. EI/MS spectrum 에서도 분자이온 peak 가 m/z 267에서 나타났고, 그 외의 fragment ion peak 도 library 와 비교하였을 때 정확하게 일치하여 구조를 확인할 수 있었다.

Crystallization of TAB-11-C (88 mg)



TAB-11-C Mass Spectrum



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표 및 평가 착안점

1. 연구개발의 최종 목표

최종 목표	내용
<p>◆ 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리기능활성 유효성분 동정</p> <p>- 생리 기능활성 작용 기작 규명 (심혈관계·항암/혈관생성억제·면역증진)</p>	<p>◇ 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리 기능활성 유효 성분의 분획 동정 및 시스템 확립</p> <p>◇ 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 유효성분에 대한 심혈관계 활성 효과 및 항암·혈관 신생 억제 및 면역 활성 항진 효능을 입증하고, 작용 기작을 규명</p>
<p>◆ 웰빙 전통식품 개발과 상품화 기술 제공</p>	<p>◇ 전통누룩 유래 미생물 및 전통주의 생리기능성 유효성분 및 기능활성 기전 확립 등 동정·확인된 기능성물질을 최대한 활용한 웰빙 전통식품 개발 및 상품화 기술에 필요한 기초 자료를 제공</p>

2. 연구개발 목표, 개발 내용 및 범위

가. 1차년도

구분	연구개발의 목표	연구개발 내용 및 범위
<세부과제>	전통누룩 유래 미생물·전통주 분획별 심혈관계 활성 탐색	<p>○ACE 저해활성 탐색- ACE assay</p> <p>○혈전억제 활성 탐색</p> <p>○고지혈 및 당뇨 개선 탐색</p> <p>-Human PPAR assay</p> <p>-고지방식이 유도 비만 동물 모델</p> <p>○지방세포 분화억제 효과 탐색</p>
<제1협동과제>	전통누룩 유래 미생물·전통주 분획별 항암·혈관 생성 억제	<p>○암 세포 독성 효과 탐색</p> <p>-MTT assay & FACS analysis</p> <p>○암 전이 억제 효과 탐색</p> <p>-Cell motility assay & zymography</p> <p>○혈관생성 억제 효과 탐색</p> <p>-CAM & tube formation assay</p> <p>-Cell viability assay & RT-PCR</p>
	전통누룩 유래 미생물·전통주 분획별 면역 활성 증진 효과 검증	<p>○세포 생존율 검증</p> <p>-Cell viability assay</p> <p>○대식세포 유래 세포독성물질 생성능 측정</p> <p>-NO/ROS 정량 및 hemocytometer 측정</p>
<제2협동과제>	전통누룩 유래 미생물·전통주 제조 및 분획	<p>○전통누룩 유래 미생물 배양액의 MeOH 수용액을 이용한 용매 추출물 및 전통주 농축물 조제</p> <p>-용매 추출물 조제</p> <p>○ 추출물에 대한 용매 극성을 이용한 분획물 조제</p> <p>-추출물에 대한 분획물 조제</p> <p>-활성분획에 대하여 TLC 분석하여 함유 성분 추정</p> <p>○ 분획물의 활성 검색 의뢰</p>

나. 2차년도

구분	연구개발의 목표	연구개발 내용 및 범위
<p><세부과제></p>	<p>유효 성분별 심혈관계 효능 기전 연구</p>	<p>○ACE 저해 활성 기전연구 -ACE, Renin assay ○혈전용해 활성 기전연구 ○콜레스테롤·중성지방 조절 활성 및 기전 연구 -in vitro & in vivo experiments -고지방식이 유도 비만 동물 모델 ○지방세포 분화에 관여하는 인자의 발현 패턴 분석 -지방조직 분석 등 -aP2·adiponectin 등 발현 분석 -RT-PCR,northern·western blotting</p>
	<p>전통누룩 유래 미생물을 응용한 웰빙 식품(주류) 개발</p>	<p>○우리 농산물 분석 (오가자, 오미자 등) ○기능활성 최적 recipe 및 발효 방식 개발 -Recipe formulation & 발효공법 ○우리 농산물을 활용한 웰빙 식품 (주류) 개발 -웰빙 식품(주류) 시제품 제작</p>
<p><제1협동과제></p>	<p>유효 성분별 암 전이·혈관 생성 억제</p>	<p>○암 전이에 관여하는 인자의 발현 양상 분석 -MMP2/9, TIMP1/2 등 ○신생혈관형성에 관여하는 인자의 발현 양상 분석 -VEGF, bFGF, TNF, HIF-1a 등의 발현 분석 ○혈관 내피세포에 대한 유효성분의 작용 기전 연구 -RT-PCR 및 Tube formation assay</p>
	<p>유효 성분별 면역 활성 증진 효과의 작용기전 연구</p>	<p>○대식세포 면역 활성 향진 효과 관련 세포 내 신호 전달 과정 연구 -전사 수준에서 표적단백질의 발현양 조사 : RT-PCR -표적 단백질 발현량 조사 : western blot 분석</p>
<p><제2협동과제></p>	<p>생리 기능활성별 유효성분 분리·structure elucidation (I)</p>	<p>○활성성분의 분리, 정제 -Silica gel, ODS및 Sephadex column chromatography를 이용하여 활성성분의 추적 분리, 정제 -활성성분의 정제 (HPLC) ○활성성분의 화학구조 결정 및 구조 규명 -활성성분의 물리, 화학적 특성 규명 -스펙트럼 data를 이용한 화학구조 결정</p>

다. 3차년도

구분	연구개발의 목표	연구개발 내용 및 범위
<세부과제>	우리 농산물을 활용한 웰빙 식품의 -대량생산체계 확립 -웰빙 식품 개발 컨셉 확립	○우리 농산물을 활용한 웰빙 주류의 시제품 대량생산 체계 확립 -Pilot plant를 이용한 시제품 제조 ○우리 농산물을 활용한 웰빙 식품 (음료, 장류 등) 개발 가능성 탐색 및 시제품 제조 -음료, 장류 적용을 위한 시제품 제조
<제1협동과제>	우리 농산물을 활용한 웰빙 주류에서 생리 기능활성 연구 및 검증 시스템 확립	○우리 농산물을 활용한 웰빙 식품에서 생리 기능활성 검증 및 체계 확립 -심혈관계 활성 효과 검증 -항암·혈관 생성 억제 효능 검증 -면역 활성 증진 효과 검증
<제2협동과제>	Structure elucidation(Ⅱ)·우리 농산물을 활용한 웰빙 식품의 유효 성분 검증·동정 시스템 확립	○활성성분의 화학구조 확인 -[α]D,ORD, NOESY를 이용한 입체 구조 결정 -아세틸화 등 유도체화 반응을 이용하여 화학구조 확인 -HPLC, GC, 1H-NMR을 이용한 유효성분 정량분석 ○우리 농산물을 활용한 웰빙 주류에서 유효 성분 (지표성분) 분리·동정체계 확립

3. 연구평가의 착안점

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	2006	(세부과제) ◇심혈관계 효능 탐색	30 %	심혈관계 활성 확인
		(제1협동과제) ◇항암·혈관생성억제효과 탐색	20 %	혈관생성·암전이 억제 활성 확인
		◇면역 활성 증진 효과 탐색	20 %	대식세포 등 면역활성 증진 확인
		(제2협동과제) ◇전통누룩 유래 미생물/전통주 분획	30 %	활성 검정 분획의 조제 여부
2차 연도	2007	(세부과제) ◇심혈관계 효과 및 기전 연구	10 %	유효 성분별 심혈관계 기작 규명
		◇우리농산물 활용한 웰빙 주류 개발 (기능활성 최적 recipe/발효방식)	20 %	웰빙 주류 컨셉 및 시제품 제조
		(제1협동과제) ◇암전이·혈관 생성 억제 기전 연구	20 %	생리 기능활성의 유효 성분별 항암, 면 역활성 증진 등 기작 규명
		◇면역 활성 증진 효과 및 기전 연구	20 %	
		(제2협동과제) ◇생리 기능활성별 유효성분 분리 및 structure elucidation	30 %	활성성분의 분리 및 구조결정 여부
3차 연도	2008	(세부과제) ◇대량생산체계 확립 (주류)	20 %	pilot plant를 활용한 대량 제조 및 기 능활성 및 유효성분을 활용한 식품 개 발 컨셉 확립
		◇웰빙 식품 개발 컨셉 확립	20 %	
		(제1협동과제) ◇웰빙식품, 기능활성 검증체계 확립	30 %	개발 웰빙식품, 기능활성 검증/분석 체계 확립
		(제2협동과제) ◇웰빙 식품의 유효성분 동정·검증 체계 확립	30 %	활성성분의 미세구조 결정 및 유효성분 의 정량분석체계 확립
최종 평가		(세부과제) ◇심혈관계 효과 및 기전 연구	10 %	생리기능활성 확인 및 작용기전 규명 기능활성 활용한 제품 컨셉 개발 및 시 제품 제조
		◇웰빙 식품 (주류·식품) 개발 컨셉 확립	30 %	
		(제1협동과제) ◇항암·혈관생성억제효과/기전 연구 ◇면역활성 증진 효과 및 기전 연구	30 %	생리기능활성 확인 및 작용기전 규명
		(제2협동과제) ◇생리활성별 유효성분 분리 및 structure elucidation	30 %	활성성분 분리, 동정 및 정량분석법 확 립

제 2 절 연구개발 목표 달성도

1. 평가의 착안점에 따른 목표달성도

평가의 착안점	달성도	목표 달성도
◇ 세부과제		
▶ 심혈관계 활성 확인	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Hexane 유래 지방산의 지질대사 개선 활성 확인 <ul style="list-style-type: none"> -PPARα/g 전사 활성 확인 -ApoA1발현 및 약물대사 저해활성(CYP) 확인 ▷ Sterol 및 sphingolipid의 <ul style="list-style-type: none"> -지질대사 개선 활성 확인 -전지방세포 분화 억제 확인 ▷분획, 유효성분 및 시제품의 혈전 생성억제 활성 확인 ▷시제품 개발 (식초음료, 쌀음료, 쌀 막걸리)
◇ 제1협동과제		
※ 활성분획물 ▶ 항암·혈관생성억제효과 탐색 및 기전 연구 ▶ 면역증진 효과 탐색	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 분획별 세포독성, 세포주기, 전이억제 및 항염증 활성 탐색 ▷ 활성분획별, <ul style="list-style-type: none"> - 세포독성 및 증식억제 효과 및 작용 기전 규명 - 암 전이 및 MMP 활성 억제 효과 및 작용 기전 규명 - 혈관신생 억제 활성 및 작용 기전 규명 - 대식세포의 독성물질 (NO) 생성능 측정 및 발현 탐색
※ 활성물질(지방산·스테롤) ▶ 항암·혈관생성억제효과 탐색 및 기전 연구 ▶ 면역증진 효과 탐색	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 지방산 및 스테롤의 암세포사 유도 기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - p38 MAPK 활성화를 통한 mTOR pathway 억제 및 AMPK pathway 활성화 유도 - AMPK 활성화를 통한 암 세포의 지방산 합성 억제 기전 - Cell cycle 관련 인자 발현 조절을 통한 cell arrest 유도 - AMPK 활성화에 PPAR-γ 관여 확인 ▷ 지방산의 항염증 활성 기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - iNOS mRNA 발현 저해를 통한 NO 생성 억제 ▷ 시제품에서 생리기능활성 체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 항염증 활성 탐색 체계 확립
◇ 제2협동과제		
▶ 활성물질의 분리 정제 여부	100%	▷ 활성분획으로부터 column chromatography를 이용하여 15종의 물질을 순수하게 분리 정제하였음
▶ 분리한 물질의 구조 동정 여부	100%	▷ 15종 물질의 구조를 NMR, MS, IR 데이터를 해석하여 지방산, 스테롤 등으로 정확하게 구조 결정하였음
▶ 활성물질 분석 여부	100%	▷ 활성 지방산 6종에 대하여 GC를 이용하여 분석하는 방법을 확립하고 분석하였음.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 실용화·산업화 계획 (기술실시 등)

1. 웰빙 식품의 실용화·산업화 방안

가. 활용방안

- 실용화·산업화를 위한 웰빙 식품의 recipe, 제조방법 등 특허출원 : 2건 이상
- 웰빙 식품의 기술실시/이전을 통한 실용화·산업화 추진
 - 기술실시/이전 대상 : 농업법인 국순당 정선명주(주)
 - 단계적 기술실시/이전을 통한 실용화·산업화 추진
 - 2010년 기능성주류 (막걸리)를 1차적 기술실시/이전 진행

시제품명	2009	2010	2011
기능성주류 (막걸리)	기술이전 협의	기술이전 및 제품생산	
식초 음료	특허출원	기술이전 협의	기술이전 및 제품생산
쌀 음료	특허출원	기술이전 협의	기술이전 및 제품생산

특히 막걸리의 경우, 막걸리의 경우 국내 및 국외시장 분석결과 소재별, 지역별 특색을 갖는 무수히 많은 제품이 생산, 판매되고 있으나, 중견기업 일부 제품을 제외하고는 지역적 한계를 벗어나지 못하고 있으며, 최근 5년 동안 소비량이 30% 증대되었다고는 하나, 연간 순증가량은 답보상태에 있는 것으로 조사되었는 바, 본 연구과제에서는 개발한 기능성 막걸리를 농업법인인 국순당정선명주(주)을 통하여 제품 생산·판매를 추진하여 국내 시장 뿐만 아니라, 최근 젊은 세대를 중심으로 꾸준한 수요가 증가하고 있는 일본에 (주)국순당 일본 지사를 통한 수출/판매를 위한 기술실시/이전을 최우선적으로 추진할 예정임.

2. 생리 기능활성 물질의 실용화·산업화 방안

가. 활용방안

- 특허출원 중인 혈관생성 억제 조성물
 - 항암 활성 중 암전이 억제 기전에 대한 보완/추가 연구 진행
 - 건강기능식품 개발 가능성 모색
- 누룩 미생물에서 분리한 steroid, 지방산
 - 항암활성 및 심혈관계 개선 효과에 대한 보완/추가 연구 진행
 - 누룩 미생물을 활용한 제품의 첨가 및 성분 강화 연구로 시제품의 기능활성 강화
 - 신약 또는 건강기능식품으로 개발 가능성 모색
- 건강기능식품 개발을 위한 특허 출원 및 시제품 개발을 통하여 향후 3년 이내 실용화·산업화 추진

제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

1. 인력활용/양성성과

총 인원	학위별, 취득자			성별	
	박사	석사	학사	남	여
11	1	10	-	9	2

2. 연구 홍보 성과

가. 국순당 강원도 횡성공장 견학 프로그램 (주향로) 활용

- 일반인과 견학 신청자들을 대상으로 진행하고 있는 견학 프로그램으로
- 국순당 횡성공장 홍보 브로셔 제작·배포
- 국순당 견학 프로그램 중 본 연구 개발성과의 일부가 포함된 동영상 상영

나. (주)국순당의 대내외적 우리술 강좌의 교육 자료로 활용

- 2008년부터 국순당 직원 대상으로 하는 우리술 강좌를 개설하여 운영하고 있음
- 2009년부터 국순당 도매점 직원으로 대상으로 확대 운영 중
- 2009년 하반기부터 일반인을 대상으로 확대 운영 및 횡성공장 견학 프로그램과 연계할 계획임.
- 우리술 강좌 프로그램 중 “기능성 및 숙취” 주제로 약 4시간 분량의 교육 자료로 구성하여 강좌.

제 3 절 특허, 논문 등 지적재산권 확보 계획

1. 학술대회 발표

가. 국내 학술대회 초청 발표

Sang-Jin Lee, Gye-Won Kim (2007) In vitro activities against tumor and cardiovascular disorders by *Rhizopus oryzae* KSD-815 and Korean traditional wine extracts. 2007 International Symposium and Annual Meeting on "Strategy for Innovation of Korean Wine Industry"

Sang-Jin Lee and Gye-Won Kim (2008) Physiological functionalities of *Rhizopus oryzae* isolated from Nuruk. (사)한국균학회 춘계학술대회. Special Lecture II-2

김계원 (2008) 한국전통누룩에서 분리한 미생물의 생리기능활성, 2008년 대한민국주류박람회 세미나 (주류제조기술 및 주류산업활성화) (주관: 대한주류공업협회)

나. 국내 학술대회 발표

Sang-Jin Lee, Narkhyun Bae, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim, and Sungyoul Hong (2007) Evaluation of the effects of extracts isolated from *Rhizopus oryzae* KSD-815 on angiogenesis and cell motility. 19th FAOBMB Seoul Conference on "Science and Technology for the Integration of Life", 332, G-88.

Sang-Jin Lee, Narkhyun Bae, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim, and Sungyoul Hong (2007) Activities of extract isolated from *Rhizopus oryzae* KSD-815 on cytotoxicity and antihypertension. 19th FAOBMB Seoul Conference on "Science and Technology for the Integration of Life", 339, G-127.

Dae-Young Lee, Ho-Young Kawak, Sang-Jin Lee, Narkhyun Bae, Sungyoul Hong, Gye-Won Kim and Nam-In Baek, (2007) Isolation of Sterols from the *Rhizopus oryzae* KSD-815, 한국응용생명화학회 춘계학술대회, 경희대학교 수원캠퍼스

Dae-Young Lee, Ho-Young Kwak, Sang-Jin Lee, Narkhyun Bae, Sungyoul Hong, Gye-Won Kim and Nam-In Baek (2007) Isolation of Sterols from the *Rhizopus Oryzae* KSD-815 and their Anti-Migratory Activity, "1st International Symposium on Most Valuable Products of Korean Ginseng", 경희대학교 국제캠퍼스

Dae-Young Lee, Ho-Young Kwak, Sang-Jin Lee, Sungyoul Hong, Gye-Won Kim and Nam-In Baek (2007) Sterols from the *Rhizopus oryzae* KSD-815 inhibited migratory activity, 6th OSONG INTERNATIONAL BIO-SYMPOSIUM Symposium of The Korean Association of Societies for Plant Science, Nov. 1-2, Ramada Plaza Hotel, Cheong-ju.

Dae-Young Lee, Ho-Young Kwak, Sang-Jin Lee, Narkhyun Bae, Sungyoul Hong, Gye-Won Kim, Yeong-Deok Rho and Nam-In Baek (2007) Isolation of lipids from the *Rhizopus oryzae* KSD-815 and their anti-cancer and anti-inflammatory activities, 2007 International Symposium on Genetically Modified Organism, oct. 31, yongin, Kyung Hee University, korea

Dae-Young Lee, Ho-Young Kwak, Sang-Jin Lee, Narkhyun Bae, Sungyoul Hong, Gye-Won Kim, Yeong-Deok Rho and Nam-In Baek (2007) Isolation of sterols from the *Rhizopus oryzae* KSD-815 and their anti-migratory activity, 2007 International Symposium on Genetically Modified Organism, oct. 31, Yongin, Kyung Hee University, korea

Dae-Young Lee, Ho-Young Kwak, Sang-Jin Lee, Narkhyun Bae, Sungyoul Hong, Gye-Won Kim, Yeong-Deok Rho and Nam-In Baek (2007) Isolation of lipids from the *Rhizopus oryzae* KSD-815 and their anti-cancer and anti-inflammatory activities, 2007 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, oct. 11-13, Gyeongju, korea

Sang-Jin Lee, Ji-Yeon Ryu, Hoyoung Kwak, Daeyoun Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim, and Sungyoul Hong (2008) The Methyl gamma-Linolenate induces apoptosis and cell cycle arrest through the activation of AMP-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human prostate cancer cells, LNCaP. 6th KSBMB Annual Meeting and KSMBMB-KSBMB Joint Symposium on “Emerging trends in biomedical science and biotechnology”, 313, Q-103.

Ji-Yeon Ryu, Sang-Jin Lee, Hoyoung Kwak, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim and Sungyoul Hong (2008) Gamma-Linoleic acid from *Rhizopus oryzae* induces apoptosis via activation of AMP-activated protein kinase in human breast cancer cells, MDA-MB-231. 65th KSBMB Annual Meeting and KSMBMB-KSBMB Joint Symposium on “Emerging trends in biomedical science and biotechnology”, 313, Q-108.

다. 해외 학술대회 발표

Sang-Jin Lee, Narkhyun Bae, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Sungyoul Hong and Gye-Won Kim (2007) Effects of *Rhizopus oryzae* KSD-815 on apoptosis and metastasis in human breast cancer cells, MDA-MB-231. 32nd FEBS Congress on “Molecular Machines”, 184, C2-141.

Sang-Jin Lee, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim and Sungyoul Hong (2007) Studies of chemical constituents and their anti-cancer and anti-inflammatory activities from *Rhizopus oryzae* KSD-815. 32nd FEBS Congress on “Molecular Machines”, 184, C2-143.

Narkhyun Bae, Sang-Jin Lee, Hyun Woo Lee, Ji-Yeon Ryu, Hoyoung Kwak, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim, Jeung Whan Han, and Sungyoul Hong (2008) The Methyl gamma-linolenate induces apoptosis and cell cycle arrest through the activation of AMP-activated protein kinase in human prostate cancer cells, LNCaP. Joint Metastasis Research Society-AACR Conference on “Metastasis”, 106, C78

2. 논문 출판 및 투고 준비중

가. 게재 논문

Ho-Young Kwak, Sang-Jin Lee, Dae-Young Lee, Lakoon Jung, Nark-Hyun Bae, Sung-Youl Hong, Gye-Won Kim and Nam-In Baek (2008) Cytotoxic and Anti-inflammatory Activities of Lipids from the Nuruk (*Rhizopus oryzae* KSD-815), *Journal of the Korean Society for Applied Biotechnology Chemistry*, 51(2): 142-147

나. 투고 준비 중인 논문

Lee, Dae-Young, Sang-Jin Lee, Ho-Young Kwak, Lakoon-Jung, Jieun Heo, Sungyoul Hong, Gye-Won Kim, and Nam-In Baek (2009) Sterols isolated from *Nuruk* (*Rhizopus oryzae* KSD-815) inhibit the migration of cancer cells, *J. Microbiol. Biotechnol.*,

Submitted.

Sang-Jin Lee, Ji-Yeon Ryu, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim, Moosik Kwon, and Sungyoul Hong. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by methyl g-linolenate regulates cell proliferation and apoptosis in LNCaP cells (Target journal: Molecular Nutrition and Food Research) - 4월 투고 예정

Sang-Jin Lee, Hyun-Jin Bae, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim, and Sungyoul Hong. Culture of Rhizopus oryzae isolated from traditional Korean Nuruk has the potential to inhibit cardiovascular disease and cancer metastasis (Target journal: Food Science and Biotechnology) - 5월 투고 예정

Sang-Jin Lee, Ji-Yeon Ryu, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim, Moosik Kwon, and Sungyoul Hong. Polyunsaturated fatty acid from Rhizopus oryzae KSD-815 suppresses LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells (Journal of Microbiology and Biotechnology)

Sang-Jin Lee, Ji-Yeon Ryu, Daeyoung Lee, Nam-In Baek, Gye-Won Kim, Moosik Kwon, and Sungyoul Hong. Hexane fraction from Rhizopus oryzae KSD-815 regulates peroxisome-proliferator activated receptor (PPAR) (SCI journal)

3. 특허 출원 및 등록 현황

- 리조푸스 속 균주를 함유하는 혈관신생 억제용 조성물 (출원번호: 10-2007-0096979)

4. 기타 세미나 발표

- 가. 주관 : 서울형 미래도시산업 육성지원사업 “서울전통반가식의 과학화 및 산업화”
(서울시 산학연협력사업단-반가사업단)
- 나. 일시 및 장소 : 2008. 10. 31. 이화여자대학교
- 다. 세미나 주제 : 한국 전통식품 및 반가식품의 우수성 심포지엄
- 다. 발표주제 및 연사

	발표 주제	소속	연사	비고
1	Physiological Functionalities of Rhizopus oryzae KSD-815 isolated from Nuruk	(주)국순당	김 계 원	
2	Isolation and Identification of Lipids from 'Nuruk' Rhizopus oryzae KSD-815 on Triticum aestivum L. and Their Anticancer Activity	경희대학교	백 남 인	
3	Methyl γ -Linolenate Isolated from Rhizopus oryzae KSD-815 induces Apoptosis through the Regulation of mTOR pathway	성균관대학교	홍 성 렬	

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 국내외 탁주 (막걸리) 제조 판매 현황

국외에서 탁주를 제조, 판매하는 - 국외에서 탁주를 제조, 판매하는 곳은 없는 것으로 판단되며 탁주 수출 동향을 살펴보면 2003년 122만불에서 2007년 290만불로 약 137% 증대되었으며, 이는 국외 거주 한국인의 증대에 따른 소비증대와 부재료 첨가에 의한 다양한 맛과 색, 향을 부여한 탁주의 출시로 소비자의 기호에 부합된 제품 개발의 효과에서 기인하는 것으로 판단된다. 특히, 일본 시장에서의 탁주의 소비는 2008년 상반기에만 전년비 41.4% 증가하는 등 (2007년 133만불에서 2008년 188만불) 시장의 성장성이 비약적이라고 할 수 있다. (농수산물유통공사의 농수산물무역정보)

2. 기능성식품에 대한 외국 사례

가. 미국

일반식품 (conventional food) 이외 기능성식품 (functional food), 특별식이용도식품 (foods for special dietary use), 의료용 식품 (medical food), 식이보조제 (dietary supplement) 등이 인정되고 있다.

- (1) 기능성식품 : 일반식품에 영양소를 보충하거나 건강에 유익하도록 설계된 제품
- (2) 특별식이용도식품 : 영유아용, 임산부용, 수유부용 제품 등
- (3) 의료용식품 : 특정환자를 위해 조제된 제품
- (4) 식이보조제 : 우리나라 건강기능식품과 개념이 유사하며 정제, 캡슐, 분말, 액상 등의 형태로 존재하여 건강기능표시가 있는 것.

나. 일본

- (1) 기능성식품 : 식품성분이 갖는 생체방어, 생체리듬 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품
- (2) 보건기능식품은 특정보건용 식품과 영양기능식품으로 구분

다. EU

- (1) 기능성식품 : 적당한 영양학적인 효과 이상으로 다른 신체기능에 효과를 가진 식품
- (2) 보조식품 : 캡슐, 정제, 파우더 등의 형태로 일반적으로 팔리면서 특별한 효과를 가진 것으로 믿어지는 영양소나 다른 성분을 가진 식품
- (3) 강화식품 : 특별한 성분을 강화한 식품

3. 캐나다의 건강기능식품

Agriculture and Agri-Food Canada에서 캐나다의 건강기능식품 및 자연건강제품을 관리

운영하고 있다. 다양한 제품군을 구성하고 있으며, 특히 농업에 기반을 둔 여러 건강기능식품과 자연건강제품을 정책적으로 개발 육성하여 전세계 수출의 60% 이상을 차지하고 있다. 이런 제품군은 ① flax bioactives, ② Gamma-Linolenic acid, ③ milk bioactives, ④ oat and barley beta-glucans, ⑤ omega-3 fatty acids, ⑥ phytosterols and stanols, ⑦ polysaccharides (plant derived), ⑧ probiotics, ⑨ protein and peptides 등으로 종류가 다양하다. www.4agr.gc.ca에서 캐나다 정부의 건강기능식품 정책과 여러 제품에 대한 다양한 정보를 얻을 수 있다.

누룩 유래 미생물에서 분리·동정된 fatty acids, steroid 등을 활용한 다양한 건강기능식품을 개발하여 제품화에 성공하였다. wood 또는 식물(야채) 유래 sterol의 종류와 구성을 보면 다음과 같다.

sterol	relative content (% w/w of total sterols)	
	wood-derived	vegetable oil-derived
sttosterol	72	45
campesterol	8.2	26.8
sigmasterol	0.3	19.3
brassicasterol	0	1.6
sitostanol	15.3	2.1
campestanol	1.6	0.8
other minor sterols	2.6	4.4

이런 식물유래 sterol의 용도는 기존의 용도와 다른 혁신적인 용도를 개발하여 사용하고 있으며 국민의 건강증진 및 농민의 소득 증대와 연계하여 추진하고 있다. 이런 제품화를 위한 연구는 Canadian Centre for Agrifood Research in Health and Medicine (CCARM), Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF), Richardson Centre for Functional Foods and Nutraceuticals, University of British Columbia, University of Toronto 등 많은 연구기관이 독립적/협력적 관계를 형성하여 연구를 진행하고 있으며 제품개발 뿐만 아니라, 다양한 생리기능활성에 대한 연구를 병행하여 국민 건강 증진에 힘쓰고 있다.

제 7 장 참고문헌

- [1] Jae Ho Kim, Seung Chan Jeong, Na Mi Kim, and Jong Soo Lee (2003) Effect of Indian Millet Koji and Legumes on the Quality and Angiotensi I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Korean Traditional Rice Wine. *Korean J. Food Sci. Technol*, 35: 733-737
- [2] Krause, B.R. and Princen, H.M. (1998) Lack of predictability of classical animal models for hypolipidemic activity: a good time for mice. *Atherosclerosis* 140, 15-24
- [3] Rubins, H.B., Robins, S.J., Collins, D., Nelson, D.B., Elam, M.B., Schaefer, E.J., Faas, F.H. and Anderson, J.W. (2002) Diabetes, plasma insulin, and cardiovascular disease: subgroup analysis from the Department of Veterans Affairs high-density lipoprotein intervention trial (VA-HIT). *Arch. Intern. Med.* 162, 2597-2604
- [4] van Wijk, J.P., de Koning, E.J., Martens, E.P. and Rabelink, T.J. (2003) Thiazolidinediones and blood lipids in type 2 diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1744-1749
- [5] Huttunen, J.K., Manninen, V., Manttari, M., Koskinen, P., Romo, M., Tenkanen, L., Heinonen, O.P. and Frick, M.H. (1991) The Helsinki Heart Study: central findings and clinical implications. *Ann. Med.* 23, 155-159
- [6] Garvey, W.T., Kwon, S., Zheng, D., Shaughnessy, S., Wallace, P., Hutto, A., Pugh, K., Jenkins, A.J., Klein, R.L. and Liao, Y. (2003) Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes* 52, 453-462
- [7] Sakamoto, J., Kimura, H., Moriyama, S., Odaka, H., Monose, Y., Sugiyam, Y. and Sawada, H. (2000) Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by poglitazone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 704-711
- [8] Nissen, S.E. and Wolski, K. (2007) Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N. Engl. J. Med.* 356, 2457-2471
- [9] Bastow, M.D., Durrington, P.N. and Ishola, M. (1998) Hypertriglyceridemia and hyperuricemia: effects of two fibric acid derivates (bezafibrate and fenofibrate) in a double blind, placebo-controlled trial. *Metabolism* 37, 217-22004
- [10] Doebber, T.W., Kelly, L.J., Zhou, G., Meurer, R., Biswas, C., Li, Y., Wu, M.S., Ippolito,

- M.C., Chao, Y.S., Wang, P.R., Wright, S.D., Moller, D.E. and Berger, J.P. (2004) MK-0767, a novel dual PPAR α/γ agonist, displays robust antihyperglycemic and hypolipidemic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 323–328
- [11] Jackson, S.P., Nesbitt, W.S. and Kulkarni, S. (2003) Signaling events underlying thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* 1: 1602–1612
- [12] Sarratt, K.L., Che, H., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Hammer, D.A. and Kahn, M.L. (2005) GPVI and $\alpha 2b1$ play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood*, 106: 1268–1277
- [13] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferatin and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55–63,1983
- [14] Oikawa, T., Hirotani, K., Nakamura, O., Shudo, K., Hiragun, A. and Iwaguchi, T. (1989) A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. *Cancer Lett.* 48, 157–162
- [15] Albrecht–Buehler, G. (1977) The phagokinetic tracks of 3T3 cells. *Cell* 11, 395–40
- [16] Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmark of cancer. *Cell* 100, 57–70
- [17] Folkman, J. and Kalluri, R. (2004) Cancer without disease. *Nature* 427, 787
- [18] Carmeliet, P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932–936
- [19] Hellwig–Bürgel, T., Stiehl, D.P., Wagner, A.E., Metzen, E. and Jelkmann, W. (2005) Hypoxia–inducible factor–1 (HIF–1): a novel transcription factor in immune reactions. *J. Interferon Cytokine Res.* 25, 297–310
- [20] Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide–ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257
- [21] Cronkite, E.P., Fliedner, T.M., Bond, V.P. and Rubini, J.R. (1959) Dynamics of hemopoietic proliferation in man and mice studies by ^3H –thymidine incorporation into DNA. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 77, 803–82
- [22] Begin, M.E., Ells, G., Das, U.N. and Horrobin, D.F. (1986) Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n–3 and n–6 polyunsaturated fatty acids. *J. Natl. Cancer Inst.* 77, 1053–1062

- [23] Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 17
- [24] Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67, 821-855
- [25] Swinnen, J.V., Brusselmans, K., and Verhoeven, G. (2006) Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 6: 358-365
- [26] Menendez, J.A., and Clolmer, R., and Lupu, R. (2005) Why does ttor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? *Med hypotheses*, 64: 342-349
- [27] Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1: 15-25
- [28] Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A. and Makela, T.P. (2002) Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21 (WAF1/CIP1). *Hum. Mol. Genet.* 11, 1497-1504
- [29] Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101
- [30] Fingar, D.C. and Blenis, J. (2004) Target of rapamycin (TOR): An integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene.* 23, 3151-3171
- [31] Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2: 489-501
- [32] Luo, Z, Saha, A.K., Xiang, X., and Ruderman, N.B. (2005) AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends. Pharmacol. Sci.* 26: 69-76
- [33] Han, S. and Roman, J. (2006) Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways. *Mol. Cancer Ther.* 5: 430-437
- [34] Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl-2

interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481–490

- [35] Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* 274, 22532–22538
- [36] Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O. and Kolch, W. (2007) MAP kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–3290
- [37] Schaeffer, H.J. and Weber, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2435–2444
- [38] Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–183
- [39] Menendez, J.A., Mehmi, I., Atlas, E., Colomer, R. and Lupu, R. (2004) Novel signaling molecules implicated in tumor-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53-p21^{WAF1/CIP1}, ERK1/2 MAPK, p27^{KIP1}, BRCA1, and NF- κ B. *Int. J. Oncol.* 24, 591–60