

오가자 추출액을 활용한 가공식품 개발 및
오가자의 항암 활성 연구

(Food development using *Ogaza* extract and research for
anti-cancer activities from *Ogaza* extract)

오가자 추출/농축액의 제조 및 상품화

(Manufacturing of *Ogaza* extract/concentration liquid
and product development)

오가자 추출액의 적용 상품 개발

(Food development using *Ogaza* extract)

오가자의 항산화, 항염증 및 암예방/항암 활성 기작 규명

(Research for anti-oxidation, anti-inflammation
and anti-cancer activities from *Ogaza* extract)

(농)국순당정선명주(주)

농 립 식 품 수 산 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “오가자 추출액을 활용한 가공식품 개발 및 오가자의 항암 활성 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009년 5월 일

주관연구기관명: (농)국순당정선명주(주)

주관연구책임자: 김계원

연 구 원: 조계봉

연 구 원: 전인수

연 구 원: 유미숙

협동연구기관명: 정선군농업기술센터

협동연구책임자: 최대성

연 구 원: 전찬우

연 구 원: 김영수

연 구 원: 이종현

연 구 원: 이성규

협동연구기관명: 서울대학교

협동연구책임자: 이형주

연 구 원: 정성근

연 구 원: 김종은

연 구 원: 오미현

요 약 문

I. 제 목

오가자 추출액을 활용한 가공식품 개발 및 오가자의 항암 활성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서 개발하고자 하는 오가피 열매(오가자) 및 오가자 가공식품의 경우, 식품 소재로서의 활용 뿐 아니라 생리활성에 관한 연구도 거의 전무한 실정이어서 극히 일부만이 가정에서 식용으로 소비될 뿐 산업적 유통 및 이용이 전혀 이루어지지 않는 상황임.

근래에 오가자를 이용한 과실주를 개발/시판하여 오가자의 이용 범위가 다소 확대되기는 하였으나 아직도 오가피 수확량에 비하면 이용범위가 미미한 것으로 볼 수 있는 바, 본 연구에서는 오가자의 활용성을 증대시키기 위한 추출/농축 조건을 확립하고, 오가자 추출물을 이용한 가공 적성 시험 및 응용 상품을 개발하며, 오가자의 항산화, 항염증 및 암예방/항암활성과 그 기작을 규명함으로써 기능성 신소재로서 오가자의 개발 가능성을 고찰하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 오가자(오가피 열매)로부터 유용물질을 RSM을 적용하여 추출 조건을 설정하고, 추출액의 저장 안정성을 기하기 위한 분말화 조건을 확립하여, 오가자 추출물의 신소재 상품화를 위한 기반 기술을 확립함.
- 오가자 추출/농축액은 적용 식품 개발에 제공되어 발효식품 및 음료, 식초류 등의 다양한 식품에 이용하여 그 식품 본래의 식감 및 색감의 개선, 특유의 향미 및 오가자의 기능성 등을 부여한 차별화된 제품을 개발
- 오가자의 항산화 활성 및 항염증, 세포간 신호전달 조절 활성을 확인하고 이를 바탕으로 산화적 손상 및 암촉진제로 유발한 암세포 증식, 이동 및 전이 등 암예방/항암 활성의 기작을 규명

IV. 연구개발 결과

- 오가자 추출물의 LC/MS/MS 분석 결과 80% methanol 추출물에서 sesamin, hyperoside, isochiisanoside와 미동정 peak를 검출하였다. RSM(Response Surface Methodology)을 이용한 오가자의 최적 추출 조건은 추출온도 52℃, 추출시간 7.7시

간으로 설정하였으며(당도 및 고형분 함량 고려), 이 때의 오가자에 대한 추출용매의 비율은 7.5배였으며, 추출물의 분말화는 동결건조 및 분무건조 방식을 채택하여 저장 안정성 증대 및 포장/유통의 편의를 최대화 하였다.

- 오가자 간장은 30일간 발효/숙성시켜 염도 26~28에서 가장 우수한 색감과 식미를 보였으며, 물엿에 오가자 추출액 2% 농도로 첨가하여 제조한 물엿이 가장 우수한 상품성을 나타내었고, 오가자와 물을 1:20으로 혼합하고 20brix 농도로 가당 처리하여 25℃에서 5일 동안 알코올발효 후 멸균한 다음 27℃에서 10일 동안 초산발효를 진행하여 총산도 45의 오가자 식초를 개발하였으며, 오가자 초산발효 중에 산도 25 도달 시 멸균 처리하여 오가자 초산음료를 제조한 결과 가장 우수한 관능평가 결과를 나타내었다.
- 오가자의 항암활성 규명을 위해 오가자 추출물과 오가자 함유 폴리페놀 분석 성분 중 sesamin, hyperoside를 선정하여, 항산화, 항염증 및 세포간 신호 전달 조절 활성을 탐색하였다. 오가자 추출물의 총 페놀 함량은 1 g 당 18.3 mg에 해당하는 gallic acid와 동일한 페놀 함량을 나타내었고, 오가자 추출물 500, 1000, 2,000, 4,000 µg/ml 각각은 34.0, 73.0, 194.3, 339.7 µg/ml 에 해당하는 vitamin C와 동일한 항산화 효과를 나타내었다. Vitamin C와 비교 하였을 때, hyperoside는 0.73배의 항산화 능력이 있음을 확인하였으며, 오가자 추출물과 sesamin은 상대적으로 항산화능이 떨어짐을 확인하였다. 오가자 추출물, sesamin 및 hyperoside는 처리 농도 모두에서 LPS에 의해 생성된 NO를 억제하는 효과를 보이지 않았다. 오가자의 항염증 활성 탐색결과 오가자 추출물은 고농도에서 TNF-α의 생성을 약하게 억제하였다. 또한, 오가자 추출물, sesamin, hyperoside 모두 IL-6의 생성을 고농도에서 약 20-30% 가량 억제하는 효능을 나타내었다. 또한 오가자 추출물의 함유 성분인 hyperoside는 세포간 신호전달을 회복하는 효과를 나타내었다. 대표적인 염증관련 지표로 잘 알려진 cyclooxygenase-2의 promoter 활성 억제 효능을 측정한 결과, 오가자 추출물, sesamin, hyperoside 모두 농도 의존적으로 COX-2 promoter activity를 억제하는 효과를 나타내었다.
- 오가자 추출물의 MMP-2, 9의 활성화에 미치는 영향을 gelatin의 분해정도를 측정하는 gelatin zymography assay를 통해 확인하였다. Gelatin zymography 연구결과 오가자 추출물 10, 100, 1000 µg/ml 농도에서 MMP-2, 9의 활성을 억제하지 못하였다. 오가자의 활성성분 중 하나인 hyperoside가 자외선 조사에 의해 유도되는 신호전달 체계에 미치는 효능을 추가적으로 규명하였다. 자외선 조사에 의해 유도되는 AP-1 promoter 활성이 hyperoside 20, 40, 80 µM 에서 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. Western blot assay 결과 hyperoside가 CREB와 STAT3의 인산화를 20, 40, 80 µM에서 농도 의존적으로 억제하는 결과를 보였다. Hyperoside가 AP-1 활성의 상위 조절인자로 알려진 MAPKs의 인산화를 조절하는 효능을 보이는지 여부를 western blot assay를 통해 확인하였고, hyperoside가 ERK의 하위조절자인 p90^{RSK}의 인산화를 40, 80 µM에서 농도 의존적으로 억제하였으나, 다른 MAPK family인

JNK, p38과 Akt/p70S6K pathway는 억제하는 효과가 없었다. p90RSK의 인산화를 조절하는 상위 효소인 ERK의 활성화에 미치는 hyperoside의 효능을 ERK kinase assay를 통해 확인하였다. Hyperoside가 20, 40, 80 μ M에서 농도 의존적으로 ERK의 활성을 억제하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통하여 오가자 유용성분의 최적 추출 조건을 설정할 수 있었으며, 활용성 증대를 위한 분말 시제품을 제조하여 산업화를 위한 기반을 마련하였으며, 오가자 추출물을 활용한 다양한 시제품을 개발하였고, 개발된 오가자 식초 제조방법은 “두릅나무 관목의 과실 추출물을 원료로 제조된 발효식초”라는 제목의 국내 특허를 출원하였으며, 오가자의 항암활성 연구를 통하여 오가자 유효성분의 하나인 hyperoside는 암 예방 물질로써 이용될 수 있는 가능성을 밝혀내어 국내외학술지에 2편의 논문을 투고할 수 있게 되었다.

향후 본 연구과제에서 개발된 know-how 및 특허 기술은 참여기업인 국순당정선명주에 기술 이전하여 산업화 할 계획이며, 가정에서도 손쉽게 오가자 추출물을 이용할 수 있도록 각종 요리법에 적용하여 널리 홍보할 계획이며, 오가자 추출액을 함유한 간장, 물엿의 경우 육류의 양념용으로, 간장, 식초는 일반 음식점의 요리(예: 회 요리)에 곁들이는 간장소스용으로, 그 밖에 가정에서도 사용가능한 국간장용, 무침용 등으로 사용범위를 확대할 계획이며, 세계적으로 대규모 시장을 형성하고 있는 기능성 식품 및 의약품 산업의 발전에 우리나라의 전통 천연 식물 자원인 오가자가 일조할 수 있도록 심도 있는 연구 및 원천기술 개발에 노력할 것이며, 우수한 연구결과들을 국제 저명 저널에 투고하고, 학회 보고 및 언론보도를 통해 오가자의 기능성과 이를 이용한 제품의 우수성을 간접 홍보할 계획이다.

SUMMARY

1. Title

Food development using *Ogaza* extract and research for anti-cancer activities from *Ogaza* extract

2. Contents and extent

- Establishing the base technology for the new material commercialization of the *Ogaza* extract with from that the *Ogaza*(*Acanthopanax sessiliflorus*) will be established optimum extraction conditions of useful materials using RSM(response surface methodology) and be fixed up powder conditions for storing stabilization of the extract
- Search and choice of applicable *Ogaza* extracts's food through preliminary experiment, development of various food that has it's own functionality and taste, color, flavor through establishment of recipe
- Investigating mechanisms of anticancer activity and chemopreventive effect of *Ogaza* including carcinogen induced cancer cell proliferation, invasion, and migration based on the effect of antioxidant, anti-inflammation, and regulation of gap junctional communication

3. Results and discussion

- The *Ogaza*(*Acanthopanax sessiliflorus*) was extracted with 80% methanol, and we identified sesamin, hyperoside, isochiisanoside, unknown peak by LC/MS analysis from the extract. An optimal extract conditions of the *Ogaza* by RSM(response surface methodology) were established extract temperature 52°C, extract time 7.7 hour. And water volume for extract was fixed by 7.5 times of *Ogaza* weight. The *Ogaza* extract was powdered by freeze drying and spray drying process for increasement of storing stabilization and convenience in packaging/distribution of the *Ogaza* liquid.
- The result showed that color and taste of *Ogaza* soy sauce fermented and aged at salinity 26~28 during 30 days is the most excellent. And that the value of commodities is the most excellent when the *Ogaza* starch syrup is mixed with 2% *ogaza* extract. By mixing water and *Ogaza* extract(20:1), and sweetening with sucrose at 20 brix, and processing of alcoholic fermentation during 5 days at 25°C, prior to sterilization, and then processing of acetic acid fermentation during 10 days at 27°C until the total acidity 45, finally, *Ogaza* vinegar was developed. And the result showed that the sensory test of sterilized vinegar beverage processed acetic acid fermentation until the total acidity 25 is the most excellent.
- The total phelic content of *Acanthopanax sessiliflorus* is 18.3 mg gallic acid

equivalents/g GAE. The extract of *Acanthopanax sessiliflorus* at 500, 1000, 2,000, 4,000 $\mu\text{g/ml}$ has 34.0, 73.0, 194.3, 339.7 $\mu\text{g/ml}$ Vit. C equivalents, respectively. When we compared to hyperoside and sesamin with Vit. C, there isn't significant antioxidant effect. The result showed that *Acanthopanax sessiliflorus*, sesamin, and hyperoside didn't inhibit LPS-induced NO production. Hyperoside and sesamin at 80 μM inhibited IL-6 production by 20–30%. Although hyperoside exerted protective effect on H_2O_2 -induced inhibition of GJIC (gap-junction intercellular communication) in WB-F344 rat liver epithelial cells as determined by the scrape-loading/dye transfer assay, while *Acanthopanax sessiliflorus* and sesamin didn't affect inhibition of GJIC. Hyperoside also inhibited UVB-induced AP-1 promoter activity in JB6 P+ cells.

- The gelatin zymography result showed that hyperoside didn't exert inhibitory effect on MMP-2, 9 activity. Since multiple lines of study reported that MMP-2, 9 is critical marker of invasion and migration of cancer cells, we altered study plan toward examining the effect of hyperoside on UVB-induced signaling pathway related to carcinogenesis. AP-1 luciferase assay result showed that hyperoside (20, 40, and 80 μM) significantly inhibited UVB-induced AP-1 transactivation by 20 ± 4.1 , 23 ± 3.1 , and 39 ± 1.4 %, respectively ($p < 0.05$ and 0.01) compared with the UVB-only treated group in JB6 P+ cells. Hyperoside inhibits UVB-induced p90^{RSK} , but didn't affect phosphorylation of ERK, p38, JNK, and Akt. Hyperoside didn't affect UVB-induced phosphorylation of ERK. An *in vitro* ERK kinase data indicated that hyperoside (20, 40, and 80 μM) significantly inhibited ERK kinase activity by 26 ± 9.2 , 24 ± 12.9 , and 40 ± 13.9 , respectively ($p < 0.05$ and 0.01) compared with non-treated group in JB6 P+ cells. The western blot assay results showed that hyperoside inhibited UVB-induced phosphorylation of CREB and STAT3 in JB6P+ cells.

CONTENTS

Description for submission	1
Summary	2
Summary in English	5
Contents in English	7
Contents	8
Chapter 1. Introduction	9
Session 1. Purpose of research and development	9
Session 2. Necessity of research and development	10
Chapter 2. The status of technical development in domestic and foreign nation	12
Session 1. Trends of relation technology in domestic and foreign nation	12
Session 2. Technology level on the technology development trends	14
Chapter 3. Contents and results of research and development.....	15
Session 1. Particular research 1	15
Session 2. Collaboration research 1	25
Session 3. Collaboration research 2	37
Chapter 4. Degree of purpose achievement and contribution degree on relation field	49
Session 1. Viewpoint of annual research evaluation	49
Session 2. Degree of achievement on the research purpose	51
Session 3. Application of research results	52
Chapter 5. Application plan of the study results	53
Session 1. Necessity of additional study	53
Session 2. Application on other study	53
Session 3. Promotion plan of enterprise conversion	54
Chapter 6. Corrected foreign scientific technology information for studying	55
Chapter 7. References	56

목 차

제출문	1
요약문	2
영문요약문	5
영문목차	7
목차	8
제 1 장 연구개발과제의 개요	9
제 1 절 연구개발의 목적	9
제 2 절 연구개발의 필요성	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황	12
제 1 절 국내·외 관련기술의 현황	12
제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	15
제 1 절 세부연구과제	15
제 2 절 제1 협동연구과제	25
제 3 절 제2 협동연구과제	37
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	49
제 1 절 연도별 연구평가의 착안점	49
제 2 절 연구개발 목표에 대한 달성도	51
제 3 절 연구개발 결과의 대의적 활용 실적.....	52
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	53
제 1 절 추가 연구의 필요성	53
제 2 절 타 연구에의 응용	53
제 3 절 산업화 추진 방안	54
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	55
제 7 장 참고문헌	56

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- ◇ 근래에 기능성 식품에 대한 관심 증가로 유익한 식품들이 다양하게 등장하고 있으며, 오가피에 관한 연구는 식품학적 측면에서 보다는 약리학적 측면에서 먼저 시작되어 오가피 뿌리에서 분리된 lignin계 배당체의 생리활성 연구, 오가피의 항암 및 수명연장 효과 등에 관한 연구가 이루어진 바 있다. 또한, 지금까지의 오가피의 생리활성에 관한 연구는 오가피의 잎, 줄기, 뿌리를 주 원료로 하여 연구되어 왔으며, 식품으로의 가공도 주로 줄기를 활용하는 방향으로 이루어졌다. 반면, 본 연구에서 개발하고자 하는 오가피 열매(오가자) 및 가공식품의 경우, 식품소재로서의 활용 뿐 아니라 생리활성에 관한 연구도 거의 전무한 실정이어서 극히 일부만이 식용으로 소비될 뿐 산업적 이용이 전혀 이루어지지 않는 상황이다.

- ◇ 한편, 강원도 정선군에서는 농업기술센터가 주축이 되어 오가피를 정선군의 특화작목으로 선정하고, 오가피열매를 활용하기 위하여 오가피열매 수확 수율이 높은 품종의 육종 및 가공 식품의 개발 등에 대한 다양한 연구를 실시하여 그 결과로 오가피열매를 사용하여 과실주를 제조하는 기술을 확립하고, 기술내용에 대하여 국내 특허 (특허공고번호:1006437350000) 획득과 함께 PCT 출원 및 미국, 일본, 러시아, 중국, EU 출원을 통하여 오가피열매를 산업적으로 활용할 수 있는 기반 경쟁력을 확보하였다. 또한, 이러한 기반 기술을 실질적인 농가 소득 증대로 연계시키기 위하여 육종된 품종의 농가 보급 및 재배 기술 제공을 통한 오가피열매의 안정적 생산기반을 마련하고, 과실주 제조를 위한 가공시설을 구비하여 오가피열매를 활용한 과실주 제조의 산업화 기반을 구축하였다. 이후, 정선군과 국순당은 오가피열매 과실주 산업화를 위한 협약을 체결하고, 정선군내 오가피열매 생산 농민들과 국순당이 참여하여 오가피열매 과실주 제조 및 판매를 위한 농업회사법인국순당정선명주(주)를 설립하여 2006년 8월 1일 “오가명작” 브랜드로 오가피열매 과실주를 출시하였다.

- ◇ 즉, 지자체의 기반 기술 제공, 생산자 농민의 원료 제공 및 지역 주민의 고용 창출, 기업의 생산 기술과 영업, 마케팅 및 자본 제공 등이 결집함으로써 서로가 상생할 수 있는 새로운 농업 정책의 방향을 제시하는 효시가 되었으며, 시장 확대에 따라 실질적인 농가 소득 증대를 기대할 수 있을 것이다. 현재, 원료인 오가피 열매는 1kg에 2만원에 수매하고 있으며, 분석결과 농가에서는 평당 0.4kg이 생산되어 10a당 조수입 2,400천원, 소득 1,700천원 정도인 것으로 나타나 지역농업의 가능성을 제시한 좋은 예가 되고 있다.

- ◇ 이와 같은 일련의 긍정적 효과를 극대화하기 위하여는 프랑스의 와인 산업 정책에서와 같이 오가피열매 및 가공식품의 생리활성 규명이 필수적이라 판단하여

본 연구에서는 오가피열매를 활용한 새로운 식품의 개발 및 오가피열매와 가공 식품의 암예방 활성을 규명하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- ◆ 최근 고려대 의대 통합의학교실이 발표한 보고서에 따르면, 국내에서 사용되는 74개 건강기능식품 성분의 약효 569가지를 조사한 결과 의학적으로 근거가 있는 것은 15.5%에 불과한 것으로 나타났다. 569개 중 481개가 ‘사용해도 좋을지 아직까지 판단할 수 없다’라는 C등급으로 분류되었는데, 이는 우리나라 기능성식품 원료의 효능에 대한 국제적인 논문이 부족하고 과학적인 근거가 불충분하며 효과에 대한 논란도 많다는 것을 의미한다. 급성장하는 기능성식품 시장에서 국제적인 경쟁력을 확보하기 위해서는 과학적으로 인정받을 수 있는 기능성식품 원료에 대한 연구를 활성화할 필요가 있다. 보건산업진흥원이 발표한 보고서에 따르면, 우리나라 식품 유래 기능성소재 관련 기술은 선진국에 비해 약 2년 정도 뒤쳐져 있는 것으로 조사되었다. 특히, 유효소재의 효능 검정기술은 30 (선진국 70), 생리활성물질을 이용한 건강증진기술은 10 (선진국 40), 구조분석을 통한 신소재 물질 디자인 기술은 10 (선진국 60) 정도의 수준인 것으로 보고되었다. 따라서 천연물 유래 천연물의 기능성을 동정하고 이 물질의 기능성을 체계적으로 분석하는 데 있어 많은 투자가 이루어져야 하는 실정이다.

2. 경제·산업적 측면

- ◆ 강원도는 지역적 특성상 논농사 보다는 밭농사가 중심인 지역이었으나 근래에는 외래 저가 농산물의 유입 및 경작 비용의 증대로 농가 소득을 증대하기 위한 고부가가치 작물의 탐색이 다각도로 이루어지고 있는 바, 강원 산간지역의 특성 및 유희 농경지를 이용하기 위한 특화작물의 하나로 오가피 재배가 성행하기 시작하였으나, 오가피는 한약재로 인식되어 뿌리와 줄기만이 이용되는 한계를 지니고 있다(예, 약재 및 엑기스 등).
- ◆ 미국 국립암연구소는 1990년부터 5년 동안 항암 기능성 식물성분 연구를 수행하면서 마늘, 감초, 대추, 미나리과식품 등 거의 대부분의 식품에 포함된 식물성화합물의 생리활성평가를 실시했다. 그 후 1994년 Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA)가 제정됨에 따라 과학적 근거가 있는 제품에 대한 건강관련 효능을 표시할 수 있는 법적 근거가 마련되었으며 현재 모두 12건의 건강강조표시(health claim)가 가능하다. 이와 같이 미국, 일본, 유럽 등은 법적 체도가 정비되어감에 따라 활발하게 기능성 식품에 대한 기초연구와 산업체 연구가 진행되고 있다. 미국은 1960년대부터 국립암연구소(NCI)를 주축으로 천연물 유래 암치료제 개발을 위한 연구 사업을 본격 추진했으며, 천연물 항암 신약으로 연간 1조원 이상의 매출액을 보이는

Taxus속 식물로부터 개발된 항암제 ‘Taxol’을 대표적인 예로 들 수 있다. 하지만 우리나라의 경우 천연물 기능성 소재 개발에 필요한 원천기술 발굴에 대한 투자가 미흡한 실정이며, 이 분야 연구개발비는 정부 전체 연구개발비 중 0.07%에 불과했다(2001년 기준).

- ◆ 이에 본 연구에서는 국산농산자원의 고부가가치화 탐색 연구를 통한 오가자 식품 신소재화 기술 개발 가능성을 점검하여 식품 적용성을 증대시키고, 특히 출원을 통한 지역사회 저변 기술 확보를 꾀하며, 나아가 재배 농가의 소득 향상 및 지역 농업 발전에 기여하고, 기능성 식품소재의 수입 대체 및 수출 산업화에 기여하고자 하였다.

3. 사회·문화적 측면

- ◆ 식품 공전에 건강보조식품이 24개가 지정되어 운영되고 있으며 건강보조식품, 특수영양식품 및 인삼 제품류에 대하여 유용성 표시를 허용하고 있으나 표시의 내용과 범위가 불분명하며 식품의 종류와 특정 성분의 유용성에 대한 구체적인 표시 기준이 없다. 현재 이용되고 있는 의약식품들의 대부분은 항산화 및 항노화 효능을 갖는 것이 많으며, 이들을 구입하는 소비자의 상당수는 암예방 효능을 기대하는 것으로 추정된다. 이와 같이 국내외 암예방과 관련된 의약식품에 대한 객관적 평가나 안전성 확보에 대한 사회적 요구가 높아짐으로써 이에 관한 기술의 수요가 크게 증가할 것으로 판단된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황

1. 국외 기능성 식품 연구 현황

- ◆ 미국: 기능성식품과 관련하여 '89년부터 nutraceutical (nutrient + pharmaceutical) 이라는 용어가 사용되기 시작하였으며 '80년대 후반부터 국공립 연구소, 산업체, 대학 등에서 기능성식품에 관한 연구가 활발하게 이루어졌다. 국립암연구소(NCI)에서는 1990년부터 5년 과제인 “항암 기능성 식물성분(phytochemicals)” 연구를 수행하면서 암 예방 성분을 많이 함유한 식품 즉 "designer food"의 개발을 연구 목표의 하나로 포함하였다. 미국 보건원의 기능성식품 관련연구 예산은 94년까지도 없었으나 이후 98년까지 3,000만불 수준으로 증가하였으며, 관련 논문은 94년 약 200편에서 98년 약 3,000편으로 5년간 약 15배 급 신장하였다.

- ◆ 일본: 어느 나라보다 먼저 기능성식품 관련 연구가 국책 연구로 시작되고, 대학, 연구소, 산업체 등에서 연구가 활성화되어 이루어지고 있다. 기능성식품 관련 연구는 1984년부터 1994년까지 3단계에 걸쳐 문부성특정연구의 형태로 수행되었다. 제 1단계 연구가 진행되면서 식품의 제 3차 기능에 역점을 둔 “기능성 식품”이란 용어가 시작되었고, 1990년 “기능성 식품” 대신 “특정보건용 식품”이라는 용어가 제시되었다. 이 “특정보건용 식품”은 영양개선법 제 12조에 반영되어 1991년부터 시행되었는데 2001년에 특정보건용식품과 영양기능식품을 망라하는 보건 기능식품 제도로 통합되어 운영되고 있다. 특정보건용식품은 각각의 품목을 허가 받는 개별허가형 제품인데 2001년의 시장규모는 224개 품목에 2,000억엔 정도이다. 일본에서 상업화되고 있는 기능성식품 소재로서는 식이섬유, 올리고당, 당 알코올, 다가불포화지방산, 펩타이드 및 단백질, 배당체, 비타민류, 기타 식물성분, 미네랄류 등이 있다.

- ◆ 유럽: 각 나라마다 규정이 달라 EU 차원에서 통일된 기능성식품 규정은 없으나 많은 검토를 진행 중에 있다. 현재 EU에서 개발되어 제품화 된 기능성식품 소재로는 오메가-3 지방산/어유, 요구르트, 유산균, 올리고 과당, 식물성 스테롤, 식이섬유 등이 있다.

- ◆ 기능성식품의 특허출원 동향: 1980년 이후 2000년까지 미국, 일본, 유럽, 한국 지역에서 출원된 기능성식품 분야 특허출원은 5,469건으로 분석되었는데 (특허청 신기술동향보고서, 2000), 일본이 1984년부터 특허가 출원되어 시기적으로도 앞서 있고 출원건수도 2,256 건으로 가장 많다. 다음은 미국 1,218건, 유럽이 692 건 순이다. 또한 기능성식품 특허출원 상위 10대 출원인에는 P&G 등 미국 업체 6개, Ajinomoto 등 일본 업체 2개 등이 포함되어 있다.

2. 국내 기능성 식품 연구 현황

- ◆ 우리나라에서는 80년대 말부터 각 대학 및 연구소에서 건강기능성 식품소재 또는 식품에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재 식품 및 관련 산업에 설치된 부설 연구소는 2001년도 현재 57개로 집계되고 있으며 이들 업체 대부분은 기능성식품 관련 연구를 주요 연구과제로 수행하고 있다. 또한 전국 약 40여 개 4년제 대학에 식품관련 학과 또는 전공이 설치되어 있는데 이들 대부분의 대학 연구실에서는 기능성식품에 관한 연구를 수행하고 있다.

1980년 이후 2000년까지 우리나라에서 출원된 기능성식품 분야 특허출원은 1,303건으로 분석되었다(특허청 신기술동향보고서, 2000). 또한 한국, 미국, 일본, 유럽의 기능성식품 특허출원 상위 10대 출원인에는 우리나라의 제일제당과 롯데제과 등 2개 업체가 포함되어 우리나라도 기능성식품 분야의 기술개발이 활발히 이루어지고 있는 것으로 나타났다.

- ◆ 국내의 암 예방 식품소재에 관한 연구는 최근 들어서 활발하게 연구되고 있으며, 주로 학계를 중심으로 이루어지고 있다. 그러나 주로 약학, 생명공학, 의학과를 중심으로 제약회사가 참여하여 암을 억제하는 특정 물질의 분자생물학적 작용 기작에 관한 학문적인 연구가 이루어지고 있으며, 연구 투자도 암 예방 식품소재보다는 암 치료에 이용할 수 있는 약품 개발 및 작용 기작에 관한 분야에 우선되고 있다. 이에 따라 식품에 이용할 수 있을 만큼 안전성이 입증되고 또한 산업적으로 이용할 만한 암 예방 소재의 개발은 거의 이루어지지 않았다. 또한 실제 식품 산업에 응용할 때에는 특정 단일 성분보다는 여러 성분이 혼합되었을 때의 효과와, 기호도가 높을 것으로 예상되는 원료로부터 암 예방 효능 식품소재를 탐색하는 것이 필요하다. 특정한 물질의 암 억제 효능 탐색과는 달리 여러 성분이 포함되어 있는 암 예방 식품소재의 탐색을 위해서는 식품소재 전체의 효능을 측정할 수 있는 탐색법, 그리고 예상되는 물질의 구조적 특성 및 정량 분석이 요구되고, 이를 토대로 효율적인 분리, 정제, 생산을 위한 최적 생산 공정이 이루어져야 하는데, 현재까지 이러한 다단계 기술의 개발이 미진하여 산업현장에 응용되기 힘든 실정이다. 최근 일부 연구팀의 결과는 식품생명공학 관련 업계에 기술이 이전되어 암 예방 식품 및 식품소재로서 이용되기 시작하고 있다.

3. 오가자 연구현황

- ◆ 2007년 과제 시작시점에서의 오가피에 대한 연구결과는 약 10편으로 오가피나무의 정유성분 분석, 가시오가피에서 발생하는 주요 병해충 특성에 대한 연구이며, 주로 성분분석에 대한 연구가 이루어지고 있다. 오가피 활성성분의 항산화 항암 및 세포내 신호전달 체계 조절작용에 대한 연구는 보고된 바 없어 현재의 연구자료로는 오가자를 이용하기 위한 기초 정보가 매우 부족한 상태이므로 이에 대한 정보를 제공할 경우 농산물 이용뿐만 아니라 식·의약품 개발 전반에 걸쳐 활용 가능할 것이다.

제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- ◆ 본 연구과제는 오가자의 활성성분을 동정하고 다양한 생리활성을 갖는 오가자 소재로 하여 본 과제를 통해 확립된 방법을 통하여 제조한 추출물의 항산화·항염증 활성을 검색하여 추출물 및 활성성분의 암 예방 기능성 소재로서의 가능성을 제시하고, 이들의 자외선 조사에 의해 활성화되는 신호전달 체계에 있어서 조절작용을 밝히는 학문 및 산업적 활용기반을 한 단계 심화시키는 연구이다. 오가피는 이미 잎과 뿌리를 전통적으로 이용하고 있으며 본 연구를 통하여 항산화 항암 등의 기능이 증명된다면, 국내 작물이 고부가가치 소재로 발돋움 하여 농가 소득증대에 기여할 수 있으리라 예상된다. 또한 이는 본 과제를 통해 확립된 기술을 다른 작목 개발로의 활용을 유도하여 고령화/선진화/세계화에 들어서 있는 국내 시장에 수입의존도 탈피 및 미활용 식물자원 활용에 의한 고부가가치화 상품의 생산이라는 발전으로 이어질 수 있을 것으로 예상된다. 산업적으로는 웰빙 시대에 부합하는 건강 지향 nutraceutical 시장의 확대가 더욱 가속화될 것으로 예상된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절: (제1세부과제) 오가자 추출/농축액 제조 및 상품화

1. 오가자 추출 및 농축조건 설정

○ 오가자 추출액의 지표물질 선정

- 극성 및 비극성 생리활성 물질을 추출하기 위해 분쇄한 건조 오가자에 80% MeOH를 1 : 10 비율로 가 하고 상온에서 24시간 동안 추출하였다 (Fig. 1).

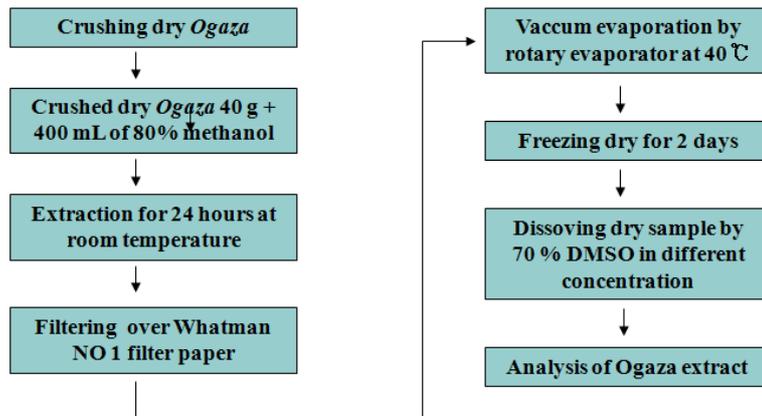


Fig. 1. Schematic of *Ogaza* extraction

- 오가자 추출물은 LC/MS/MS분석을 통해 정성 및 정량 분석하였다(Fig. 2). MeOH 추출물의 정량 분석 결과를 바탕으로 상위 4개 peak를 선정하여 동정하였다(Fig. 3).

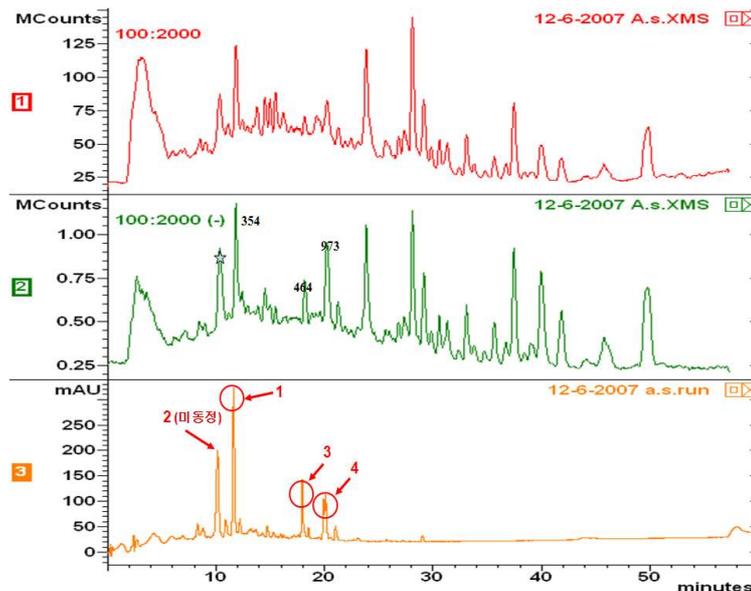


Fig. 2. Identification of *Ogaza* extract by LC/MS/MS analysis

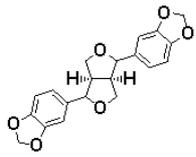
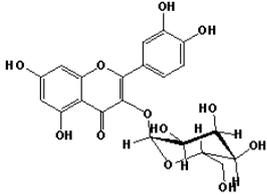
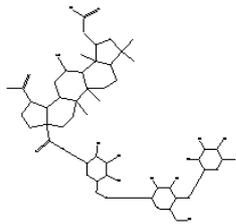
Retention Time	Ion	Molecular Weight	Molecular Formula	Synonym(s)	Structure
11.6	M - H, M + Na	354.11	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	Sesamin	
18.2	M - H, M + Na	464.1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Hyperin	
19.9	M - H	973.1	C ₄₈ H ₇₆ O ₂₀	Isochiisanoside	

Fig. 3. Identifical analysis of Ogaza extract by LC/MS/MS

○ 열매 상태(생,건)별, 부위별에 따른 추출 조건 설정

- 오가자는 수확 직후 오가자 고유의 색인 검붉은 적색이 발견되지 않아 가공원료로서의 이용가치가 현저히 저하되어 가공적성 구현이 매우 어려움.
- 생물을 수확 후 음건하거나 열풍건조(50°C 전후)하여 수분함량 15% 이하로 유지 시 24개월 이상 품질을 유지할 수 있는 특성을 보이는 바, 본 연구에서는 열풍건조 후 밀봉하여 냉장저장하면서 실험에 사용함.

○ RSM을 이용한 최적 추출/농축 조건 선정

- 오가자 최적 추출 조건을 설정하기 위하여 추출수율을 측정하기 위한 지표는 생산현장에서 간편하면서 신속하게 측정이 가능하도록 당도 및 탁도를 설정하였고 건조 및 농축 후 수율 측정을 위하여는 고형분 함량을 설정하였다.
- 추출 용매는 산업현장에서 안전하고 경제적이며 위생적으로 작업이 가능하도록 유기용매를 배제한 열수 추출 방식을 채택하였으며, 추출 효율성 및 향후 건조/농축 효율과 생산현장의 작업성을 고려하여 오가자에 대한 추출용매의 비율은 7.5배로 설정하여 진행하였다.
- 오가자 유효 성분의 최적 추출/농축 조건을 위한 실험은 중심합성계획에 의하여 설계하였고, 반응표면 회귀분석에는 SAS(statistics analysis system) 프로그램을 사용하였다. 추출 조건은 오가자 시료에 대한 추출시간 및 용매의 온도로 설정하고, 독립변수는 5단계로

부호화(-2, -1, 0, 1, 2)하였으며 추출 중의 품질열화를 최소화하기 위하여 실험구간은 예비실험을 통하여 추출 온도 및 추출 시간을 최대한 억제하도록 설계하였다.(Table 1)

Table 1. Coded levels for independent variables used in developing experimental data

Variables	Coded X_i	Coded level					$\Delta X^{1)}$
		-2	-1	0	1	2	
Extraction Time(hr)	X1	2	4	6	8	10	2
Extraction Temp.(°C)	X2	20	30	40	50	60	10

¹⁾The increment of the experimental factor values corresponding to one unit of the coded variable

- 중심합성 계획에 의한 반응표면 값으로 추출액의 당도(Brix), 탁도, 고형분함량 등을 종속변수로 설정한 후 각 실험구 마다 3회 반복한 결과를 평균하여 결과를 구하였다.(Table 2)

Table 2. Response of dependent variables to the extraction conditions by central composite design

Exp. No.	Coded variables ¹⁾		Process variables ²⁾		Brix (%)	Turbidity (NTU)	Insoluble Mat.(%)
	X_1	X_2	X_1	X_2			
1	1	1	8	50	5.3	41.5	6.84
2	1	-1	8	30	4.8	44.9	6.57
3	-1	1	4	50	5.1	44.0	6.78
4	-1	-1	4	30	4.2	56.5	5.68
5	0	0	6	40	4.7	35.3	6.87
6	0	0	6	40	4.8	35.1	6.87
7	2	0	10	40	5.1	46.8	7.60
8	-2	0	2	40	3.7	39.0	6.46
9	0	2	6	60	5.6	56.5	7.41
10	0	-2	6	20	4.6	44.7	6.37

^{1), 2)} : X_1 : Extraction Time(hr), X_2 : Extraction Temp.(°C)

- 중심합성계획법에 따라 도출된 결과(Table 2)를 SAS 프로그램으로 각각의 종속변수에 대하여 회귀분석을 실시하여 반응 모형의 적합성 및 유의성 분석을 실시하고 반응회귀식을 구하였다.(Table 3, 4, 5)

Table 3. Values of regression coefficients calculated for the brix

Independent variables ¹⁾	Coefficient	Standard error	t-value	Significance level (p)
Constant	4.80714	0.10112	47.539	< 0.001
X ₁	0.34641	0.05640	6.142	< 0.01
X ₁ ²	-0.12619	0.05539	-2.278	< 0.1
X ₂	0.32717	0.05640	5.801	< 0.01
X ₂ ²	0.10714	0.05539	1.934	
X ₁ X ₂	-0.13333	0.11280	-1.182	
R ²				0.9574
F-statistic				17.9800
P-value				0.0076

¹⁾ X₁ : Extraction Time(hr), X₂ : Extraction Temp.(°C)

Table 4. Values of regression coefficients calculated for the Turbidity

Independent variables ¹⁾	Coefficient	Standard error	t-value	Significance level (p)
Constant	38.3857	5.0303	7.651	< 0.01
X ₁	0.1443	2.8058	0.051	
X ₁ ²	2.0190	2.7552	0.733	
X ₂	0.7409	2.8058	0.264	
X ₂ ²	4.5857	2.7552	1.664	
X ₁ X ₂	3.0333	5.6116	0.541	
R ²				0.4398
F-statistic				0.6282
P-value				0.6920

¹⁾X₁ : Extraction Time(hr), X₂ : Extraction Temp.(°C)

Table 5. Values of regression coefficients calculated for the Insoluble materials

Independent variables ¹⁾	Coefficient	Standard error	t-value	Significance level (p)
Constant	6.61429	0.20743	31.887	< 0.001
X ₁	0.31081	0.11570	2.686	< 0.1
X ₁ ²	0.09595	0.11361	0.845	
X ₂	0.33198	0.11570	2.869	< 0.01
X ₂ ²	0.04929	0.11361	0.434	
X ₁ X ₂	-0.27667	0.23140	-1.196	
R ²				0.8148
F-statistic				3.5190
P-value				0.1233

¹⁾X₁ : Extraction Time(hr), X₂ : Extraction Temp.(°C)

- 당 함량에 대한 회귀식은

$$\text{Brix} = 4.80714 + 0.314641 \times \text{Time} - 0.12619 \times \text{Time}^2 + 0.32717 \times \text{Temp.},$$

으로 구하였으며, 이 때 R²=0.9574이고, 유의성은 0.0076으로 99% 수준에서 인정되었으며, 탁도의 회귀식은 R²=0.4398이고, 유의성은 0.692으로 반응모형의 적합성 및 유의성은 기준에 충족되지 못하여 기각하고 최적점을 구하지 않았다.

- 고형분 함량에 대한 회귀식은

$$\text{Insoluble material} = 6.61429 + 0.31081 \times \text{Time} + 0.33198 \times \text{Temp.}$$

으로 이 때 R²=0.8148이고, 유의성은 0.1233으로 일반적인 유의수준 5% 범위는 벗어나지만 식품공학적인 한계 수준인 10% 수준에서 크게 벗어나지 않는 것으로 판단하여 회귀식을 채택하였다.

- 개별 반응 변수의 최적점 탐색을 위하여 당함량 및 고형분함량에 대한 추출 시간과 추출온도와의 관계를 3차원 반응표면 그래프로 표현하였으며(Fig. 3, 4), 최적점 탐색 결과 추출 시간 및 추출 온도의 최대값 수준에서 최적점을 나타내고 있어 다중 반응 분석은 의미가 없어 개별 최적점을 구하였다. 오가자 추출물의 당함량 및 고형분 함량을 최대화 하기 위한 예상 최적점에서 실측치를 구한 결과 예상치와 비교한 결과 1% 미만의 실험오차 범위내에서 일치함을 나타내었다.(Table 6)

- 오가자 추출/농축 조건은 열수 추출 시 추출온도 52°C, 추출시간 7.7시간으로 설정하였으며(당도 및 고형분 함량 고려), 이 때의 오가자에 대한 추출용매의 비율은 중량비로 7.5배였다.

반응표면: Brix

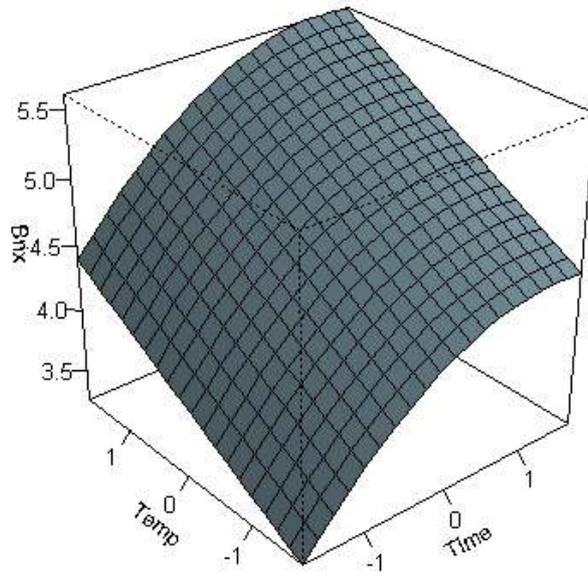


Fig. 4. Response surface on the brix of extraction time versus extraction temperature

반응표면: Insoluble

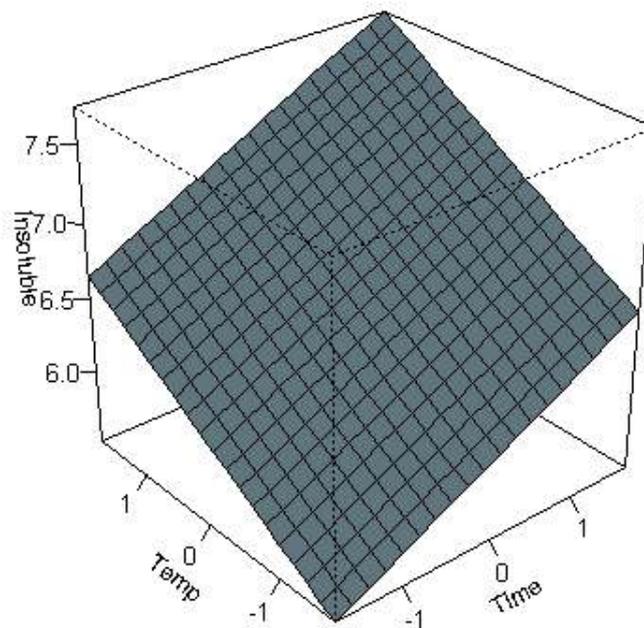


Fig. 5. Response surface on the insoluble materials of extraction time versus extraction temperature

Table 6. Critical values from the response surface based on the coded data

Variables ¹⁾	Independent variables		Dependent variable yields of Brix	
	coded	uncoded	predicted	result
X ₁	1.3725	6.86	5.61	5.65
X ₂	1.7321	51.96		

Variables ¹⁾	Independent variables		Dependent variable yields of insoluble materials	
	coded	uncoded	predicted	result
X ₁	1.7321	8.66	7.73	7.66
X ₂	1.7321	51.96		

¹⁾X₁ : Extraction Time(hr), X₂ : Extraction Temp.(°C)

2. 오가자 추출/농축액의 제조 표준화 조건 확립

○ 오가자 추출/농축액의 건조 방법 및 조건 선정

– 오가자 열수 추출액의 저장안정성 및 유통 편의성을 증대하고자 감압 농축을 실시한 결과 다른 제품과 비교하여 농축 효율이 저하되고 농축 후 포장 시 많은 loss가 발생되며 작업성 또한 매우 불편한 것으로 나타났으며, 농축방법보다 시간이 많이 소요되기는 하나 제품 loss율이 줄고 공정 작업성이 보다 나은 열풍건조를 실시하였다. 오가자 추출액의 열 변성을 최대한 억제하고자 추출 온도보다 높지 않은 조건에서 건조를 실시하여 건조 시간에 따른 수분함량의 변화를 측정하였다(Fig 6). 그림에서와 같이 일정 시간 경과 후에는 건조속도가 매우 저하됨을 알 수 있는 바, 이는 추출액의 주요 구성성분이 당류 성분으로서 건조 시 표면에 피막이 형성되어 내부 수분이 고르게 건조되지 못하여 시간이 경과하여도 요구하는 수준 이상으로 수분함량을 줄이기 어려웠다. 일정 시간 경과 후 수분 함량 변화가 없는 시간대에서 수분 함량을 측정한 Table 7의 결과에서 알 수 있듯이 요구 수준의 수분함량(10% 이하)을 초월하고, 60°C에서 30시간 건조한 오가자 추출액의 사진인 Fig 7에서 처럼 건조 후 엷처럼 영긴 상태가 되어 오가자 추출액의 열풍건조에 의한 건조 방법은 비효율적인 것으로 판단되었다.

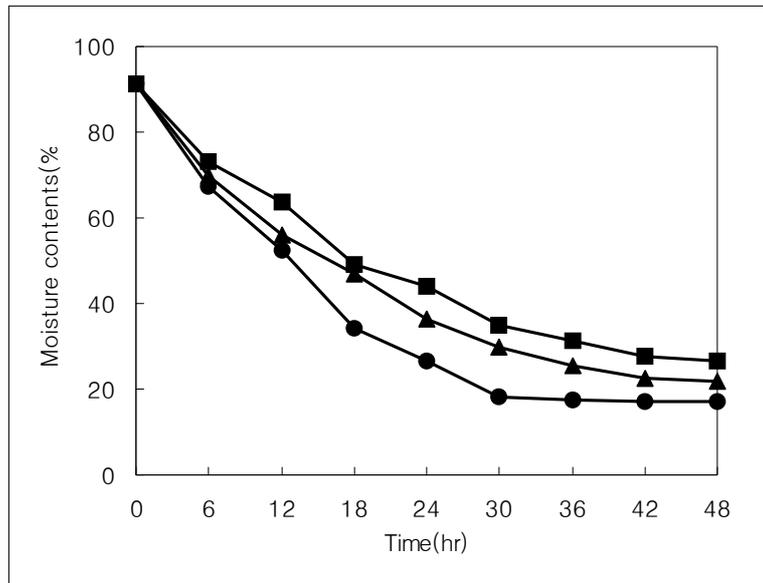


Fig. 6. Changes in moisture contents of the Ogaza extract during hot-air drying. ●: 60°C, ■: 50°C, ▲: 40°C.

Table 7. The final moisture contents of the Ogaza extract by hot-air drying conditions

Drying temp(°C)	40°C	50°C	60°C
Drying time(Hr)	48	42	30
Moisture content(%)	26.59	22.43	18.25



Fig. 7. A shape of the Ogaza extract after hot-air drying at 60°C for 30 hr

- 식품공학적으로 가장 우수한 건조 방법인 동결건조 방법을 적용하여 오가자 추출액을 건조하였다. 추출액을 -77°C의 deep freezer에서 1시간 동안 급속 동결하여 진공동결건조기에서 건조하였다. 이때의 시료 온도는 38°C, 건조기 chamber 조건은 -56°C, -760mmHg였으며, 건조 시간은 24시간이었다. 동결건조한 오가자 추출액은 성상이 매우 양호하였고

복원력 또한 매우 우수하였으나(Fig. 8), 건조 후 대기 중의 습도에 매우 취약한 특성을 나타내었으며, 추출액의 고형분 함량이 10% 미만인 시료를 동결 건조함으로써 비경제적인 건조 방식으로 판단되었다.



Fig. 8. A shape of the Ogaza extract after freeze drying process

- 가장 경제적이고 효율적인 건조 방법으로 분무건조 방식을 적용하여 오가자 추출액을 건조하였다. 오가자 추출액 자체를 분무 건조한 결과 건조 시 열풍건조 때와 유사하게 건조기 chamber 내에서 영겨 붙는 특성을 나타내는 바, 효율적인 건조를 위하여 부형제를 추출액에 혼합하여 분무건조하였다(Fig. 9). 부형제는 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 dextrin을 사용하였고, 사용 농도는 추출액중량비로 20%를 첨가하였을 때 가장 양호한 분말을 획득할 수 있었다. 그림 9에서와 같이 기존 오가자 추출액 건조 보다 색상이 다소 약하기는 하나 이는 부형제 혼합에 따른 특성으로 부형제인 dextrin의 특성상 다양한 제품에 적용할 수 있어 오가자 추출액의 적용성을 크게 확장할 수 있을 것이다. 또한 포장에 있어서 제품의 품질 열화를 최대한 억제하고 경제적이며 무게가 가벼우며 운반 및 적재가 용이한 사각형의 갈색 pet병을 사용하는 것이 가장 합리적일 것으로 판단하였다(Fig. 10.)



Fig. 9. A shape after spray drying process of the Ogaza extract



Fig. 10. A shape packed spray dried the Ogaza extract in pet bottle

○ 오가자 추출액의 분말화 조건 및 포장 가공 방법 확립

– 오가자 열수 추출액에 부형제로 dextrin을 20% 첨가하여 spray drying 방법을 적용하여 건조/분말화는 공법이 오가자의 품질 열화 억제 및 사용 편의성을 고려한 가장 경제적이며 합리적인 건조 방법으로 판되며, 이 때의 Spray drying 조건은 Table 8에 나타내었다.

Table 8. Spray drying conditions of the Ogaza extract

Air inlet temp.(°C)	Air outlet temp.(°C)	Chamber temp.(°C)	Feeding rate(mL/min)	Atomizer rotation speed (rpm)
180~185	85~88	110~115	100~150	18,00~20,000

제 2 절 (제1협동과제) : 오가자 추출액의 적용 상품 개발

1. 실험방법

가. 오가자 간장 제조

(1) 메주를 이용한 간장제조실험 : 물에 염도 15~30이 되도록 소금을 각각 혼합하여 소금물을 만든 후 소금물 10 중량부에 메주 1 중량부를 각각 넣고, 여기에 오가자 추출액 1 중량부를 투입한 후 30일간 숙성시킨 후 관능평가하였다(Fig. 1).

(2) 메주가루를 이용한 간장제조실험 : 물에 염도 15~30이 되도록 소금을 각각 혼합하여 소금물을 만든 후 소금물 10 중량부에 메주가루 1 중량부를 각각 넣고, 여기에 오가자 추출액 1 중량부를 투입한 후 30일간 숙성시킨 다음 관능 평가를 실시하였다(Fig. 2).



Fig. 1. Process for mixing soy sauce with *Ogaza* extract



Fig. 2. Aging process of soy sauce made from *Ogaza* extract

나. 오가자 물엿 제조

(1) 추출액 투입비율에 따른 물엿제조실험 : 물엿 100중량부에 오가자 추출액 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 중량부를 각각 투입하여 10분간 교반한 후 상온에서 30일간 보관하였다(Fig. 3, 4).



Fig. 3. Process for mixing starch syrup with *Ogaza* extract



Fig. 4. Aging process of starch syrup made from *Ogaza* extract

(2) 농축온도에 따른 물엿제조실험: 물엿 100중량부에 오가자 추출액 4중량부를 각각 넣고, 40, 50, 60, 80, 100, 120℃의 온도로 15분간 감압 또는 가압농축시켜 상온에서 30일간 보관하였다(Fig. 5, 6).



Fig. 5. Normal temperature storing process



Fig. 6. Vacuum evaporation of starch syrup made from *Ogaza* extract

다. 오가자 식초 제조

(1) 종초 선발 및 배양조건 규명시험

- 멸균수 1L에 yeast extract 5.0g, peptone 3.0g, mannitol 25g을 각각 넣고, pH 6.0으로 조정한다. 에틸알콜을 혼합하여 알코올농도(0, 1, 2, 3, 4, 5, 6%)를 조정하고, 가압멸균처리 후, 활성화시킨 초산균액(*acetobacter aceti*, (Pasteur) Beijerinck) 10ml를 접종하고 온도 26~28℃를 유지하면서 산소 공급 및 교반한다(Fig. 7, 8). 매일 종초액의 1ml씩을 취하여 현미경으로 검경하였다.



Fig. 7. Liquid badge vaccinated acetobater

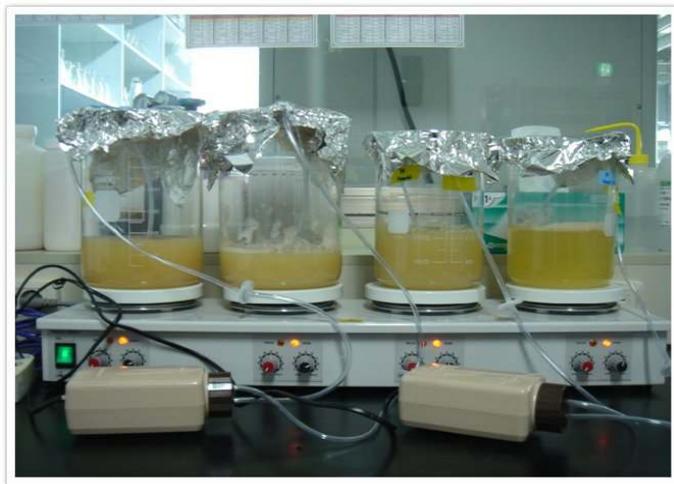


Fig. 8. Proliferation of acetobacter

(2) 오가자 추출액 및 발효주를 이용한 식초제조시험

- 오가자 발효주를 이용한 식초제조시험은 발효주를 알코올농도 5%가 되도록 물에 희석하고 yeast extract 0.01~0.1%씩 각각 투입한 후 초산균액을 접종하여 25~28℃로 30일간 초산발효를 진행하고 매일 pH와 총산도를 측정하였다.

그리고 오가자 추출액을 이용한 식초제조시험은 오가자 1중량부에 물 10~30중량부를 혼합, 15~25brix로 가당처리하여 활성화시킨 효모를 일정량 접종하여 28℃로 3~7일간 알코올발효를 진행한 후 알코올농도 3~6%에 도달하였을 때 멸균가열 및 여과를 통해 알코올발효를 정지하고, 준비한 초산균액을 접종하여 총산도 40~50에 도달할 때까지 25~28℃로 30일간 산소공급 및 교반을 통해 초산발효를 진행하고 매일 pH와 총산도를 측정하였다.

라. 오가자 추출액을 이용한 식초음료 제조시험

- 물 20~25중량부에 오가자 1중량부를 넣고 10~24시간 상온추출하고, 여과한 후

과실 찌꺼기를 버리고 남은 추출액에 당도 15~20brix가 되도록 가당처리한다. 여기에 활성화시킨 효모추출액 5ml를 접종한 후 온도 26~28℃를 유지하면서 알코올발효를 진행하다가 알코올농도가 3~6%에 도달하였을 때 멸균가열 및 여과를 통해 알코올발효를 정지하고, 준비한 초산균액을 일정량 접종 후 25~28℃로 30일간 초산발효를 진행하고 매일 pH와 총산도를 측정하였다(Fig. 9, 10).



Fig. 9. Acetic acid fermentation of *Ogaza* extract



Fig. 10. Acetic acid fermentation of *Ogaza* wine

2. 실험결과

가. 오가자 간장제조시험

– 메주를 원료로 한 간장제조시험에서 높은 소금물의 염도로 인해 메주에 있는 여러 가지 성분들이 삼투압 현상으로 쉽게 침출될 것으로 추측하였으나 1개월간 숙성처리기간 중에 투입된 오가자 추출액으로 인해 메주의 표면이 코팅처리 되어 메주의 성분들이 침출되지 못하는 결과를 나타내었다. 이는 오가자에 함유되어 있는 성분이 메주의 단백질과 반응하여 나타내는 현상이라 예측된다. 따라서 본 실험에서는

일반적으로 메주를 이용하는 재래식 방법에서 탈피하여 물에 염도 15~30이 되도록 소금을 각각 혼합하여 소금물을 만든 후 소금물 10중량부에 메주가루 1중량부를 각각 넣고, 여기에 오가자 추출액 1중량부를 투입한 후 30일간 숙성시켰다(Fig. 11, 12).
 - 30일간 숙성 후 여과하여 관능평가를 한 결과 염도 26~28에 메주가루와 오가자 추출액을 넣어 제조한 간장의 식미와 색이 가장 우수했으며, 오가자의 고유색에 가까운 색을 나타내어 상품성이 우수하다는 결과를 얻었다. 또한 제조한 간장을 30~60일간 상온 저장한 결과 잡균으로 인한 오염은 없었다.



Fig. 11. Soy sauce from *Ogaza* extract and fermented soybean powder



Fig. 12. Soy sauce from *Ogaza* extracts and fermented soybeans

나. 오가자 물엿제조시험

- 추출액 투입비율에 따른 물엿제조시험 결과 물엿 100중량부에 오가자추출액 3중량부를 혼합하여 10분간 교반한 시험구의 색깔이 가장 좋았으며, 농축온도별 물엿제조시험의 경우 물엿에 오가자추출액을 혼합 및 교반 후 60℃로 15분간 감압농축시킨 시험구가 가장 색깔과 향이 좋았다. 또한 40, 50℃로 감압농축한 시험구를 30일

간 상온 보관한 결과 잡균으로 인해 곰팡이가 발생하였다. 그 이유는 오가자물엿 제조과정에서 발생한 잡균이 40~50℃의 온도에 멸균되지 않고 생존했기 때문에 판단된다. 그리고 100~120℃로 농축시킨 시험구의 경우 농축하는 과정에서 물엿의 당 성분이 타서 물엿의 색이 검은 빛을 나타내었다. 따라서 오가자추출액을 이용한 물엿 제조는 60~80℃로 감압 농축시켰을 때 가장 멸균효과, 색, 향, 식미가 좋았다 (Fig. 13, 14).



Fig. 13. Color tone of starch syrup



Fig. 14. Starch syrup from *Ogaza* extracts

다. 오가자 식초제조시험

– 종초 선발 및 배양조건 규명시험에서는 멸균수 1L에 yeast extract 5.0g, peptone 3.0g, mannitol 25g을 각각 넣고, pH 6.0으로 조정된 후 에틸알콜을 혼합하여 알코올 농도(0, 1, 2, 3, 4, 5, 6%)를 조정하고, 가압멸균처리 후, 활성화시킨 초산균액 (*acetobacter aceti*, (Pasteur) Beijerinck) 10ml를 접종하고 온도 26~28℃를 유지하면서 산소 공급 및 교반했다(Table 1). 그 후 매일 종초액의 1ml씩을 취하여 현미경

으로 검정한 결과 멸균수 1L에 yeast extract, peptone, mannitol을 각각 넣고, pH 6.0, 알코올 농도 5~6%로 조정된 후 초산균액을 접종한 배양액의 균 활성도가 가장 우수했고, 증식속도도 빨랐고, 접종 후 2~3일차에 균의 수가 가장 많았으며, 시간이 경과할수록 균의 수는 일정하게 줄어들다가 7~10일이 지난 후에는 급격히 줄어드는 것으로 나타났다. 또한 교반 및 산소공급을 하지 않은 시험구에서는 균의 활성도 및 증식속도가 급격히 떨어지는 결과를 나타내었다.

Table. 1. Activities and proliferation speeds of acetobacters

알코올 농도(%)	알코올농도(%)								교반여부		산소공급여부	
	0	1	2	3	4	5	6	교반	미교반	공급	미공급	
활성도 및 증식속도 (상, 중, 하)	하	하	중	중	중	상	상	상	중	상	하	

- 오가자 발효주를 이용한 식초제조시험에서는 오가자를 원료로 하여 알코올 발효시킨 오가자 발효주(알코올농도 13~15%, 당도 7~9brix)를 물에 희석하여 알코올농도 5%로 조정 한 후 yeast extract를 일정비율로 각각 투입한 후 매일 pH 및 총산도를 측정하였다. 그 결과는 Table. 2. 에 기재하였다.

Table. 2. pH and total acidities of Acetic acid fermentation extracts

경과 일수	시험구명											
	A		B		C		D		E		F	
	pH	총 산도										
1일차	3.58	4.72	3.67	3.94	3.67	4.88	3.60	4.06	3.48	3.76	3.73	3.76
2일차	3.37	8.97	3.40	9.28	3.43	10.61	3.49	8.02	3.53	7.07	3.53	6.93
3일차	3.32	11.60	3.35	12.80	3.39	13.52	3.36	9.97	3.47	9.41	3.44	9.55
4일차	3.29	13.48	3.28	15.61	3.36	15.80	3.34	11.86	3.41	10.39	3.41	11.29
5일차	3.26	17.55	3.24	20.06	3.33	19.05	3.32	15.14	3.36	11.48	3.39	15.26
6일차	3.22	19.10	3.19	24.86	3.29	21.11	3.26	16.74	3.32	13.71	3.31	19.32
7일차	3.20	20.51	3.15	27.36	3.27	22.95	3.22	18.22	3.23	17.40	3.25	22.66
8일차	3.17	21.70	3.10	30.87	3.24	24.10	3.19	20.83	3.19	20.65	3.19	25.18
9일차	3.13	24.81	3.03	34.80	3.17	27.80	3.13	23.64	3.14	23.39	3.12	30.16
10일차	3.10	26.20	3.01	38.81	3.11	30.36	3.11	26.00	3.10	26.45	3.06	34.90
11일차	3.06	28.09	2.96	40.67	3.06	34.62	3.07	27.00	3.07	28.98	3.02	37.22
12일차	3.03	30.05	발효중지		3.03	36.74	3.04	28.11	3.05	32.66	3.01	38.05
13일차	3.02	31.12			3.00	38.54	3.02	30.63	3.03	35.41	2.99	39.87
14일차	3.01	32.44			2.98	40.46	3.00	31.97	3.01	37.35	2.97	41.69
15일차	3.00	33.96			발효중지		2.99	33.16	2.99	39.60	발효중지	
16일차	2.97	35.23					2.96	34.55	2.92	41.77		
17일차	2.95	36.79					2.93	35.69	발효중지			
18일차	2.91	38.86					2.90	39.65				
19일차	2.85	42.45					2.88	40.46				
20일차	발효중지						발효중지					

[시험구]

- A : 오가자발효주 + yeast extract(0.01%) + 종초액 5ml(dextrose 배지)
- B : 오가자발효주 + yeast extract(0.05%) + 종초액 5ml(dextrose 배지)
- C : 오가자발효주 + yeast extract(0.10%) + 종초액 5ml(dextrose 배지)
- D : 오가자발효주 + yeast extract(0.01%) + 종초액 5ml(탄산칼슘배지)
- E : 오가자발효주 + yeast extract(0.01%) + 종초액 5ml(탄산칼슘배지)
- F : 오가자발효주 + yeast extract(0.01%) + 종초액 5ml(탄산칼슘배지)

- Table. 2. 에서 알 수 있듯이 초산균을 증식하는 배지조건에 따른 발효효율은 크게 차이가 없었으며, 시험구 B의 경우 초산발효기간이 짧아 특유의 발효취 등 잡내가 거의 없는 것으로 나타났다.

그리고 완료된 오가자 식초의 관능검사는 10점 척도법을 사용하여 실시하였으며, 패널은 성인남녀 10명을 선정하여 오가피 식초의 신맛, 짠맛, 단맛에 대하여, 맛의 강도를 조사하고, 신향, 발효취, 빛깔 등을 조사하여 전체적인 기호도를 측정하여, 그 결과를 Table. 3 에 나타내었다.

Table. 3. Sensory test of vinegars made from *Ogaza* wine

맛	A	B	C	D	E	F
신맛	9	10	8	10	8	9
떫은맛	2	0	1	2	2	3
단맛	4	3	3	2	3	4
신향	8	8	7	9	8	8
발효취	7	0	1	6	5	4
빛깔	8	7	7	8	8	8
전체적인 기호도	7	10	9	9	7	8



Fig. 15. Color tone of vinegar made from *Ogaza* extracts



Fig. 16. Vinegar made from *Ogaza* extracts

라. 오가자 식초음료 제조시험

- 물 25중량부에 오가자 1중량부를 넣고 24시간 상온추출하고, 여과한 후 과실 찌꺼

기를 버리고 남은 추출액에 당도 13~18brix가 되도록 각각 가당처리 후 활성화시킨 효모추출액 5ml를 접종하고 온도 26~28℃를 유지하면서 알코올발효를 진행하다가 알코올농도가 5%에 도달하였을 때 멸균가열 및 여과를 통해 알코올발효를 중지하고, 준비한 초산균액을 투입하여 26~28℃로 10~15일간 초산발효를 진행하고 매일 pH와 총산도를 측정하였다. 단 최종적으로 희석하지 않고 음용할 수 있도록 총산도 30이하까지만 초산발효를 진행하였다. 아래 표는 알코올발효가 중지되고 초산균액을 투입한 시점부터 초산발효가 중지된 시점까지의 기간동안 pH와 총산도를 측정한 값을 Table. 4. 에 기재하였다.

Table. 4. pH and total acidities of vinegar beverages from acetic acid fermentation extracts

경과 일수	시험구명											
	13brix		14brix		15brix		16brix		17brix		18brix	
	pH	총산도	pH	총산도	pH	총산도	pH	총산도	pH	총산도	pH	총산도
1일차	3.71	4.32	3.67	4.54	3.58	4.77	3.71	4.72	3.67	4.72	3.58	4.86
3일차	3.58	7.97	3.60	6.28	3.52	7.87	3.67	7.97	3.51	8.97	3.53	11.77
5일차	3.46	15.66	3.55	11.43	3.48	11.60	3.56	10.67	3.46	14.60	3.6	18.50
7일차	3.41	21.70	3.46	15.54	3.45	13.48	3.45	13.21	3.32	20.48	3.21	24.81
9일차	3.31	24.81	3.38	18.06	3.42	17.55	3.33	20.55	3.22	29.31	3.21	30.43
11일차	3.30	26.21	3.32	21.86	3.38	19.10	3.26	28.98				
13일차	3.38	27.51	3.28	24.36	3.32	24.31						
15일차	3.35	28.23	3.26	28.30	3.25	29.30						
최종 당도	8.3brix		8.9brix		10.3brix		11.8brix		12.0brix		14.1brix	

- Table. 4. 에서 알 수 있듯이 알코올발효과정에서 효모는 5% 알코올농도가 될 때까지 약 5brix의 당을 분해하며 약 3~5일정도가 소요되며, 초산균은 초산발효과정을 통해 5%의 알코올을 분해하여 총산도 30에 도달하는데 평균 10~12일 정도 소요되었으며, 결론적으로 오가자 추출액을 원료로 하여 알코올발효 및 초산발효를 진행하여 오가자 식초음료를 제조하는데 소요되는 기간은 평균 15일정도 소요되는 것으로 나타났다.

그리고 완료된 오가자 식초음료의 관능검사는 10점 척도법을 사용하여 실시하였으며, 패널은 성인남녀 10명을 선정하여 오가자 식초의 신맛, 짠맛, 단맛에 대하여, 맛의 강도를 조사하고, 신향, 발효취, 빗깔 등을 조사하여 전체적인 기호도를 측정하여, 그 결과를 Table. 5. 에 기재하였다. Table 5에서 알 수 있듯이 알코올 발효 전 초기당도는 최소 18~20brix는 되어야 오가자 식초음료의 최종당도가 13이상에 도달하여, 일반적으로 단맛을 느껴 음료수로 가능하다는 결론에 도달하였다.

Table. 5. Sensory test of vinegar beverages from *Ogaza* extracts

맛	오가자 추출액 초기 당 농도(Brix)					
	13	14	15	16	17	18
신맛	9	8	9	10	10	10
떫은맛	2	1	2	2	1	1
단맛	5	6	5	7	8	9
신향	9	8	8	9	9	10
발효취	2	0	1	1	0	0
빛깔	8	9	9	9	8	9
전체 기호도	6	7	7	8	9	9

제 3 절 (제2협동과제) : 오가자의 항산화, 항염증/항암 기작 탐색

1. 오가자의 *in vitro* 항산화, 항염증 및 세포간 신호전달 조절 활성탐색

가. 실험방법

(1) 페놀함량 측정

Folin's method : 시료에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 첨가한 후 실온에서 3분간 반응시킨 후, 여기에 포화된 Na_2CO_3 용액을 첨가한 후 다시 37°C 에서 1시간 반응시키고, 반응액을 원심 분리한 후, 상층액을 취하여 725nm 에서의 흡광도를 측정하였으며, (+)-gallic acid를 표준물질로 하여 농도를 결정한 후 함량을 계산함.

(2) 항산화 활성 검색

- ABTS assay: ABTS에 대한 전자 공여능을 측정하는 Kim's method를 이용하는 것으로 ABTS 20 mg을 PBS에 녹여 만든 ABTS 용액에 여러 농도의 시료용액 1 ml을 넣고 5초간 진탕시킨 후 30분 동안 방치한 후 734 nm 에서 흡광도의 변화를 측정함.

- DPPH assay: DPPH에 대한 전자 공여능을 측정하는 Blis's method를 이용하는 것으로 DPPH 20 mg을 ehanol에 녹여 만든 DPPH 용액에 여러 농도의 시료용액 1 ml을 넣고 5초간 진탕시킨 후 30분 동안 방치한 후 517 nm 에서 흡광도의 변화를 측정함.

(3) 항염증 활성 검색

- NO assay: LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 nitric oxide(NO)에 대한 시료의 저해효과를 알아보는 것으로 Griess assay를 이용하여 측정함.

- 염증성 cytokine 발현 억제 측정: LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 염증성 cytokine인 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 등에 대한 저해효과를 ELISA 방법으로 측정함.

(4) 세포간 정보전달(Gap junctional intercellular communication, GJIC)의 저해를 회복하는 작용기작 연구

- GJIC assay: Scrape Loading/ Dye Transfer (SL/DT) assay가 이용되는데 정상 간 상피세포에 생체 내에서 중요한 암촉진 역할을 하는 과산화수소와 시료를 동시 처치한 후 세포가 90%이상 채워졌을 때 lucifer yellow 염색액을 이용하여 GJIC이 회복되는지를 형광으로 확인하는 Scrape Loading/ Dye Transfer (SL/DT) 방법을 이용함.

나. 실험결과

- 오가자 함유 폴리페놀 성분 동정 및 정량 분석결과 80% methanol 추출물에서 sesamin, hyperoside, isochiisanoside와 미동정 peak가 검출되었다. 이 후 연구에서는 sesamin과 hyperoside를 선정하여 오가자 추출물, sesamin, hyperoside의 항산화, 항염증 및 세포간 신호 전달 조절 활성을 탐색하였다.

(1) 항산화 활성측정

○ Total phenolic phytochemical contents assay

- 오가자 추출물의 총페놀 함량을 측정한 결과, 1g 당 18.3mg에 해당하는 gallic acid와 동일한 페놀 함량을 나타내었다.

○ ABTS radical scavenging activity

- 오가자 추출물, sesamin, hyperoside의 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)-radical 소거 활성을 측정하였다. *Ogaza* extract 500, 1000, 2,000, 4,000 $\mu\text{g/ml}$ 각각은 34.0, 73.0, 194.3, 339.7 $\mu\text{g/ml}$ 에 해당하는 vitamin C와 동일한 항산화 효과를 나타내었다 (Fig. 1). 또한, Hyperoside의 항산화 효능이 상대적으로 높게 나타났으며, sesamin과 hyperoside 각각은 100 μM 에서 4.30과 0.58 $\mu\text{g/ml}$ 에 해당하는 vitamin C와 동일한 항산화 효과를 나타내었다 (Fig. 2).

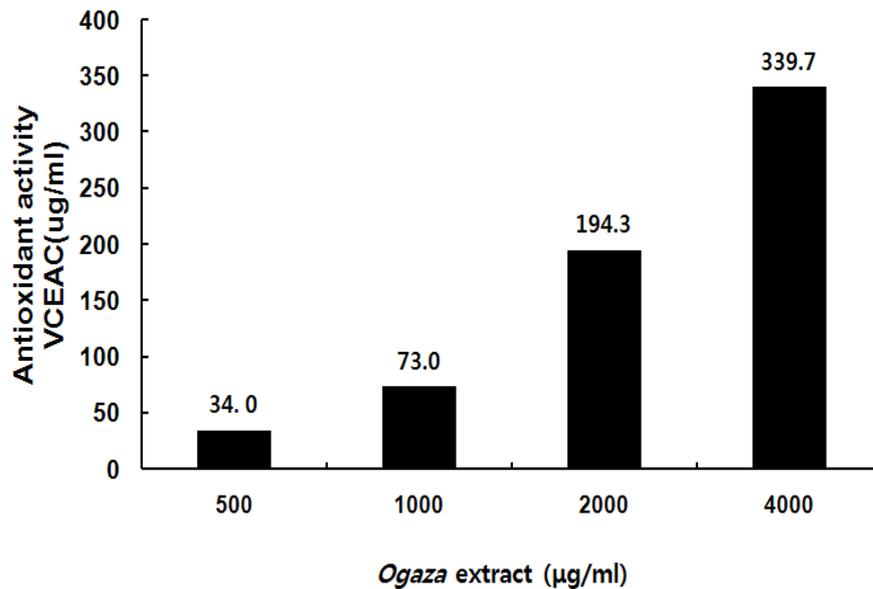


Fig. 1. Total antioxidant activity of *Ogaza* extract.

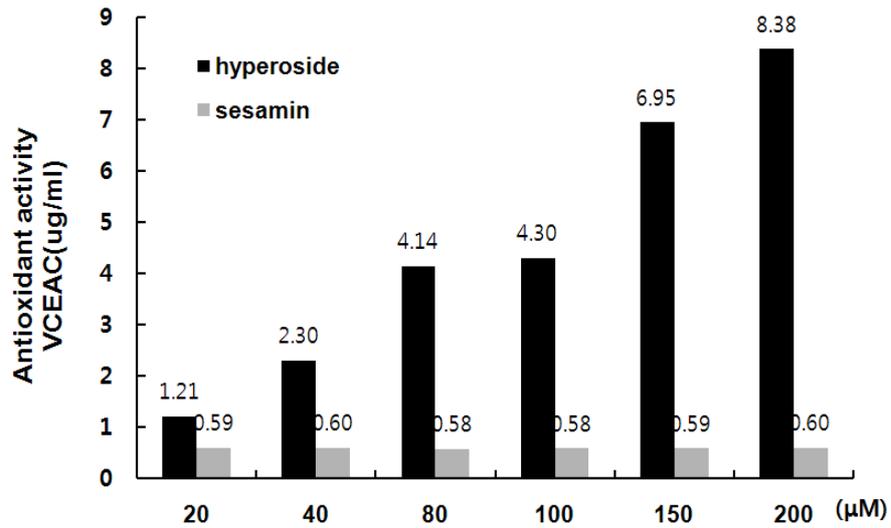


Fig. 2. Total antioxidant activities of sesamin and hyperoside.

○ DPPH radical scavenging activity

– 오가자 추출물, sesamin과 hyperoside의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)-radical 소거 활성을 측정하였다. Vitamin C와 비교 하였을 때, hyperoside는 0.73배의 항산화 능력이 있음을 확인 하였으며, 오가자 추출물과 sesamin은 상대적으로 항산화능이 떨어짐을 확인 하였다 (Fig. 3).

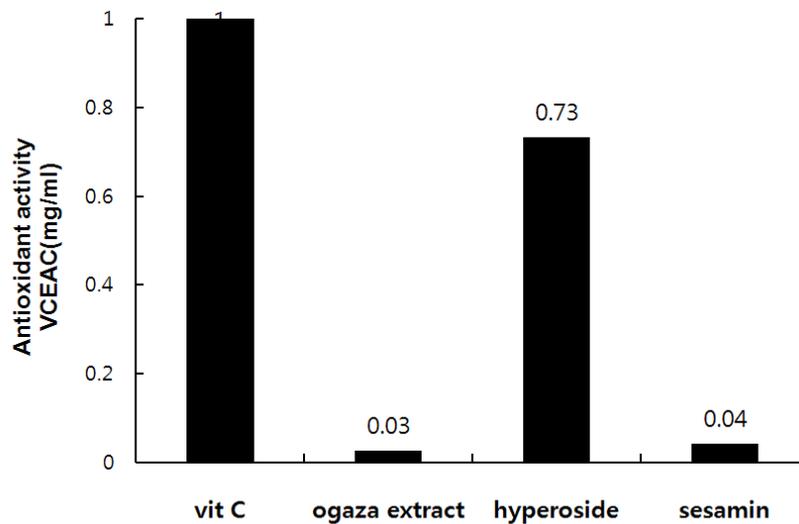


Fig. 3. Free-radical scavenging activities of *Ogaza* extract, hyperoside and sesamin.

(2) 항염증 활성 측정

○ Nitric oxide 억제 활성

- LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 nitric oxide (NO)에 대한 시료들의 저해효과를 Griess assay를 이용하여 측정하였다. 오가자 추출물, sesamin 및 hyperoside는 처리 농도 모두에서 LPS에 의해 생성된 NO를 억제하는 효과는 보이지 않았다 (Fig. 4).

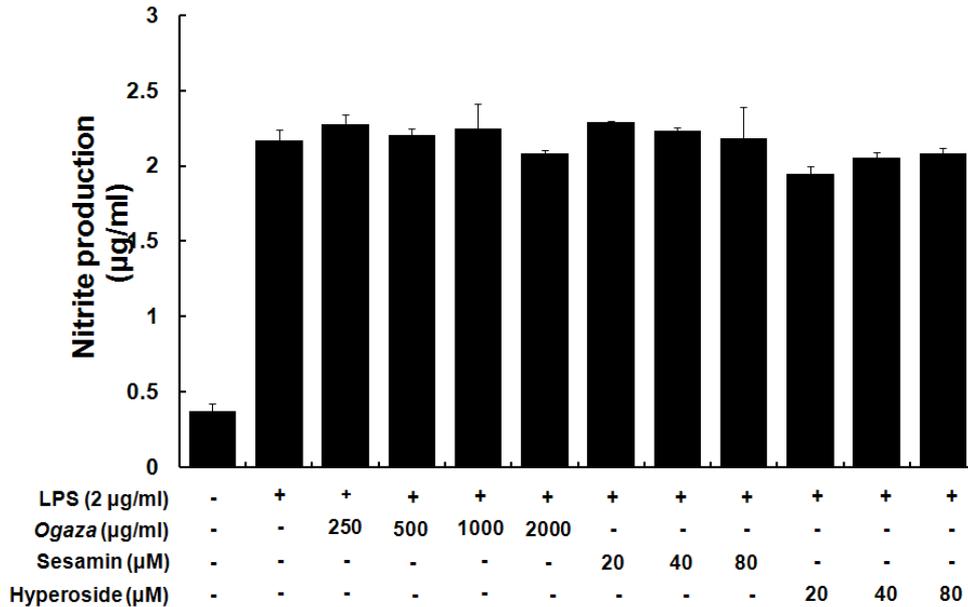


Fig. 4. Effects of phenolics in *Ogaza* extract, hyperoside and sesamin on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells

○ 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6) 억제 활성

- LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 생성하는 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6등에 대한 저해효과를 ELISA 방법으로 측정하였다. 오가자 추출물은 고농도에서 TNF- α 의 생성을 약하게 억제 하였지만, sesamin과 hyperoside 은 TNF- α 의 생성 억제 효과를 보이지 않았다 (Fig. 5). 또한, 오가자 추출물, sesamin, hyperoside 모두 IL-6의 생성을 고농도에서 약 20-30% 가량 억제 하는 효능을 나타내었다 (Fig. 6).

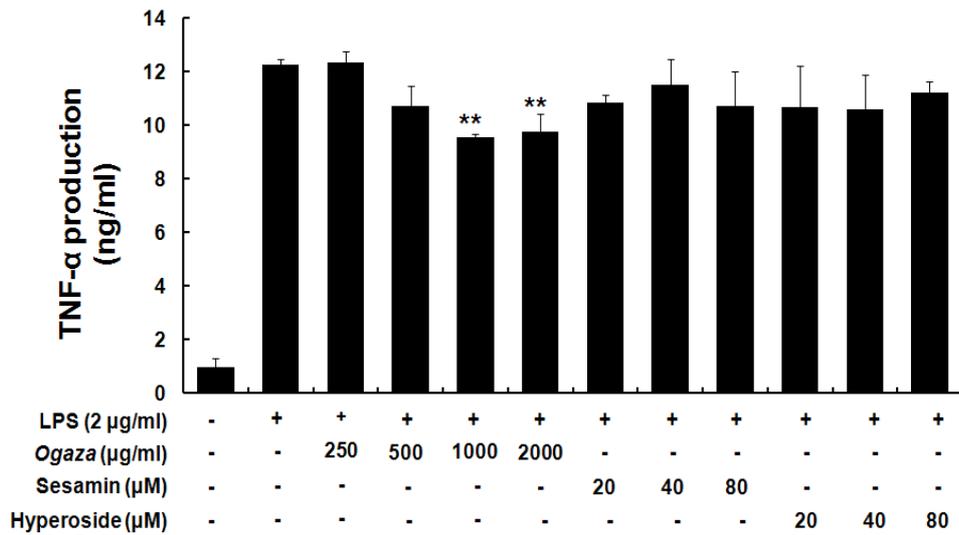


Fig. 5. Effects of phenolics in *Ogaza* extract, hyperoside and sesamin on LPS-induced TNF-α production in RAW264.7 cells

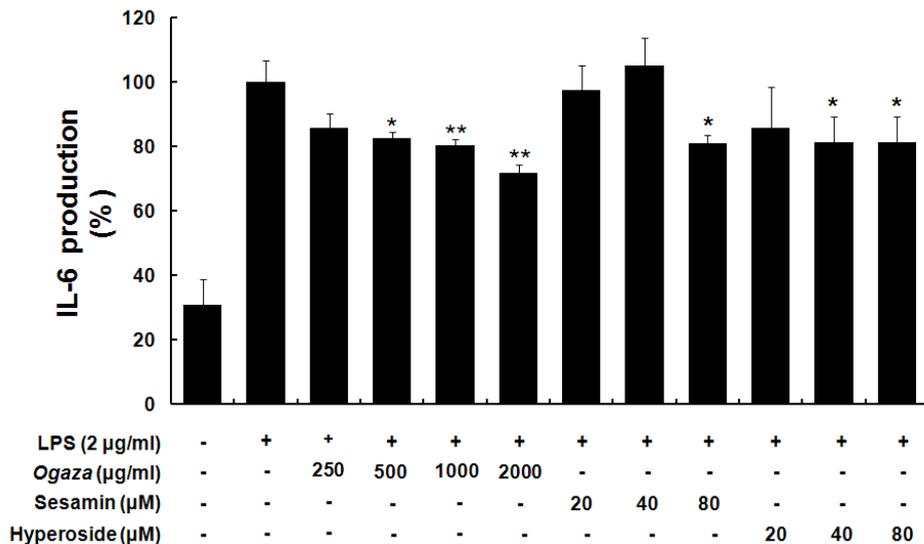


Fig. 6. Effects of phenolics in *Ogaza* extract, hyperoside and sesamin on LPS-induced IL-6 production in RAW264.7 cells

(3) 갭 정선을 통한 세포간 신호전달 증가 효과 평가

○ 세포간 신호전달 (Gap junctional intercellular communication, GJIC) 조절 활성 탐색

– 오가자 추출물, sesamin 및 hyperoside의 세포간 신호전달 회복 효과를 확인하였다. Hyperoside는 과산화수소에 의해 억제된 세포간 신호전달을 농도 의존적으로 회복하는 효과를 보였으나, 오가자 추출물 및 sesamin은 회복 효과를 보이지 않았다 (Fig. 7). 하단의 그래프는 오가자 추출물, sesamin, hyperoside의 갭정선 회복능을 정량한 결과이다.

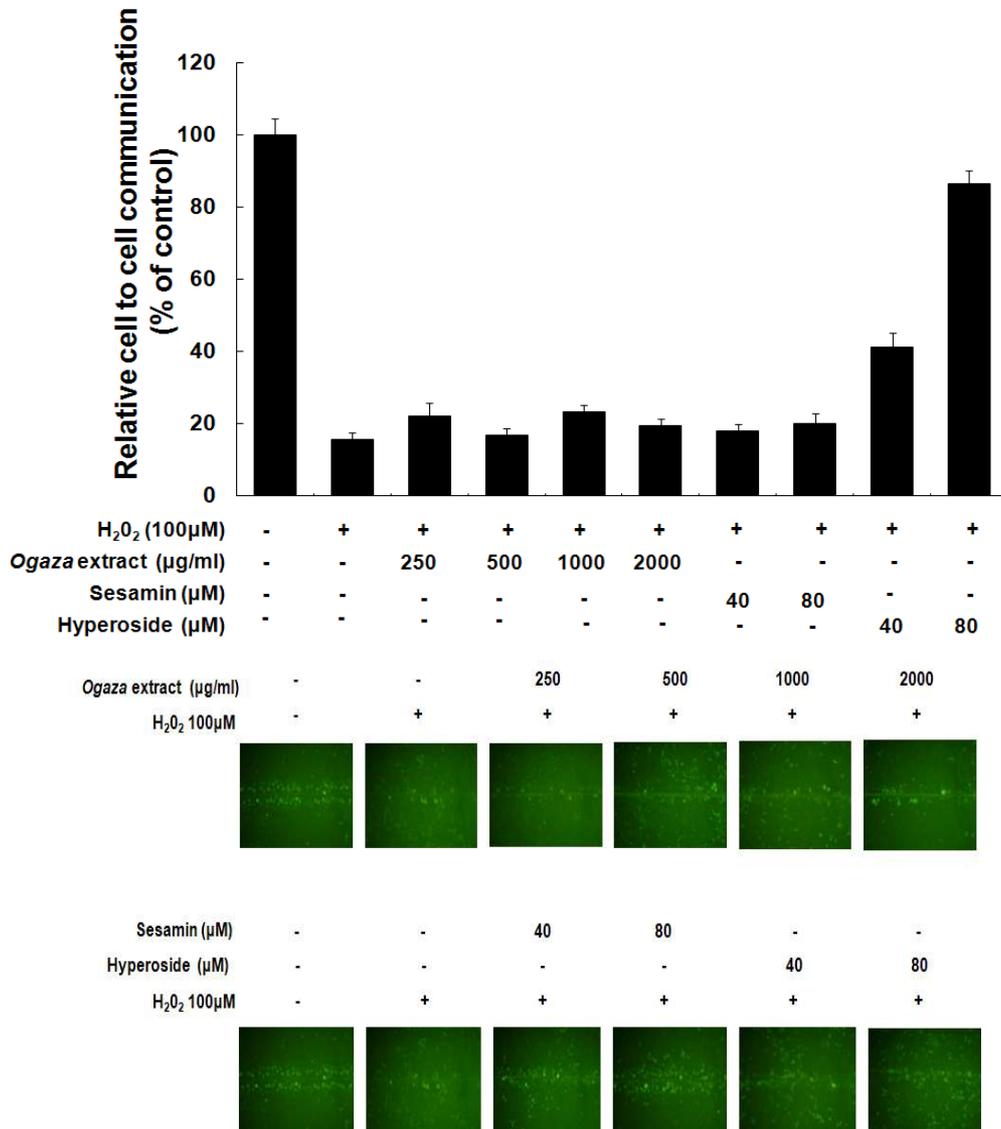


Fig. 7. Effects of *Ogaza* extract, hyperoside and sesamin on H₂O₂-induced GJIC inhibition

(4) 추가연구

○ COX-2 (cyclooxygenase-2) promoter activity

- 대표적인 염증관련 지표로 잘 알려진 cyclooxygenase-2의 promoter 활성 억제 효능을 측정하였다. 오가자 추출물, sesamin, hyperoside 모두 농도 의존적으로 COX-2 promoter activity를 억제하는 효과를 나타내었다(Fig. 8).

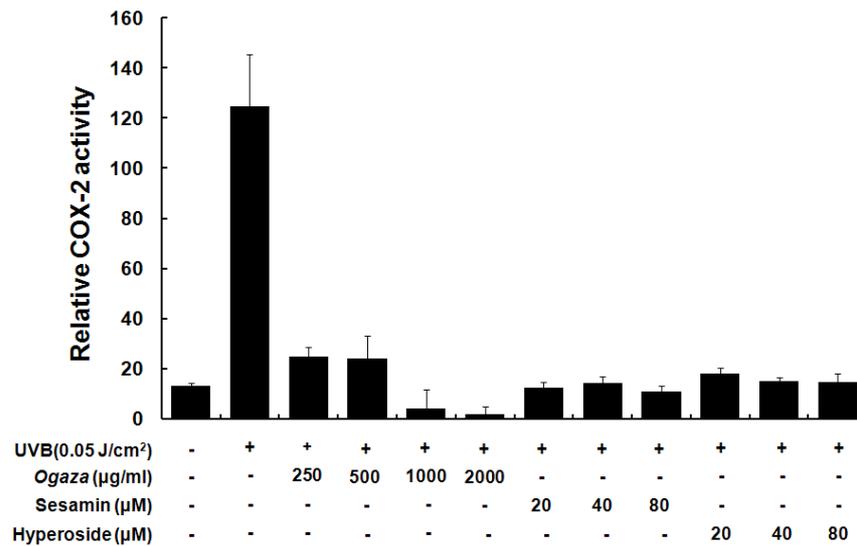


Fig. 8. Effect of Ogaza extract, hyperoside and sesamin on UVB-induced COX-2 transactivation

2. 오가자의 *in vitro* 항산화, 항염증 및 세포간 신호전달 조절 활성탐색

가. 실험방법

(1) MMPs 활성측정

Zymography를 이용한 MMP활성 측정 : 세포를 24 시간 배양한 후, PBS로 씻어내고 serum free media로 48 시간동안 배양하는데, 이때 효과를 보고자하는 시료를 함께 처리하여 배양함. 상층액을 모아서 원심분리(vision, DN-5500)하여 정량(Beckman, DU650)한 후 동량의 total protein을 0.1% gelatin이 포함된 10% SDS-PAGE gel에 전기영동함. gel은 2.5% triton X-100으로 세 번 씻어내고, 40 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 용액을 넣고 37°C에서 18 시간동안 배양한 후, 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하면 전체적인 배경은 푸른색이고 gelatin이 분해된 부분은 흰색 밴드로 나타남.

(2) Western blot assay

- 시약을 처리한 JB6 P+ cell을 RIPA bufer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail)로 0°C에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취함. 단백질 함량을 BCA reagent로 정량을 한 뒤, 30 µg을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동함. 전개시킨 gel을 PVDF membrane (Gelman Sciences)에 tranfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking 시킴. 3% fat-free dry milk-PBS에 anti-Poly(ADP-ribose) polymerase, caspase-3, Bcl2 primary antibody (Transduction Laboratories, KY)를 overnight으로 붙이고, PBST용액으로 5분간 3회 washing 한 후 horseradish peroxidase conjugated-secondary

antibody를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간동안 붙인 다음 PBST용액으로 5분간 3회 washing함. 이후enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Amersham Pharmacia Biotech., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 1분간 반응한 뒤 x-ray 필름에 노출시킴.

- Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) 활성화 측정: MCF10A-ras cell에 TPA를 처리한 4시간 후 단백질을 얻어낸 다음, p38 MAP Kinase, ERK1,2 그리고 JNK1,2에 대한 antibody와 활성화 형태에 선택적인 antibody를 이용하여 MAPK 활성화를 Western blot를 통해 확인함.

(3) AP-1 프로모터 결합활성 측정

AP-1 luciferase plasmid가 트랜스펙션된 JB6 P+ cell을 취한 후 5% FBS/MEM 배지에 8×10^3 의 셀통도가 되도록 하누 96 well plate에 배양한다. 세포가 80-90% 정도 자라면 0.1% FBS/MEM 배지로 24시간 동안 starvation 한다. 자외선 조사 1시간 전에 hyperoside를 농도별 (20, 40, 80 μ M)로 처리하고 6시간 동안 배양한 후 lysis buffer (0.1 M NaP (pH 7.8), 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM EDTA)로 lysis 한다음 luminometer(Luminoskan Ascent; Thermo Electron, Helsinki, Finland)로 luciferase의 활성을 측정한다.

나. 실험결과

암 전이의 주요 조절 효소로 알려진 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성에 미치는 오가자의 효능을 탐색하고 invasion assay와 migration assay를 통해 오가자의 침윤 및 이동에 미치는 효과를 탐색하였으나, gelatin zymography 연구 결과 오가자 추출물이 MMP-2, 9의 활성을 억제하지 못하는 결과를 얻었다. MMPs는 암세포의 침윤 및 이동과 관련된 중요한 효소로, 특정 성분이 암세포의 전이를 억제하는지 여부를 판단하기 위한 첫 번째 표적 단백질이라고 할 수 있다. 하지만 오가자 추출물이 MMP-2, 9의 활성을 억제하지 못했기 때문에, 오가자 추출물이 암세포의 전이를 억제하는 기작보다는 발암단계의 다른 과정을 억제함으로써 암예방 효능을 보이는지 탐색했다. 따라서, 암전이 이외의 다른 효능을 탐색하기 위해 본 과제 연구를 통해 동정한 바 있는 오가자의 활성성분 중 하나인 hyperoside가 자외선 조사에 의해 유도되는 신호전달 체계에 미치는 효능을 추가적으로 규명하였다.

(1) MMP-2, 9 활성 억제 효능 측정

○ Gelatin zymography

- MMP-2 9은 gelatinase로 암세포의 침윤과 전이에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, 오가자 추출물의 MMP-2, 9의 활성에 미치는 영

향을 gelatin의 분해정도를 측정하는 gelatin zymography assay를 통해 확인하였다. Gelatin zymography 연구결과 오가자 추출물 10, 100, 1000 µg/ml 농도에서 MMP-2, 9의 활성을 억제하지 못하였다.

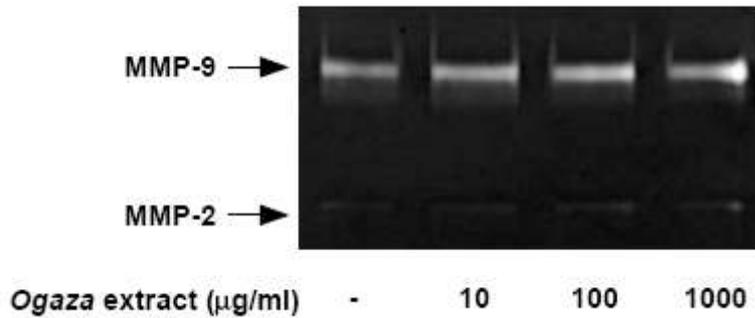


Fig. 9. The effect of *Ogaza* extract on MMP-2, 9 activity in CT-26 murine colorectal cancer cells

(2) 추가연구

- 오가자 추출물이 MMP-2, 9의 활성을 조절하지 못하는 결과를 토대로, 오가자 추출물이 암세포의 전이를 억제하는 기작을 통해 암예방에 관여하는 효과가 크지 않을 것으로 예상됐다. 선행연구를 통하여 오가자 추출물의 유효성분인 hyperoside가 발암 표적 단백질인 COX-2의 프로모터 활성을 효과적으로 저해함을 확인하였기 때문에, hyperoside (Fig. 10)가 자외선 조사에 의해 유도되는 피부암 관련 신호전달 체계를 조절하는 기작을 통해 암 예방 효능을 보이는지 탐색하였다.

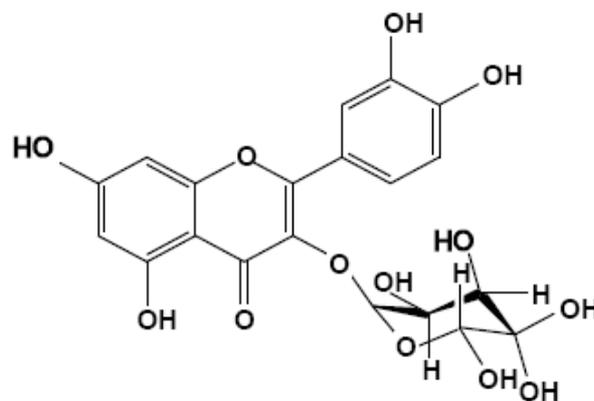


Fig. 10. The structure of hyperoside (quercetin-3-O-galactoside)

○ AP-1 프로모터 활성 억제 효능

- AP-1 luciferase 플라스미드가 삽입된 JB6 P+ mouse skin epithelial cell을 이용하여 자외선 조사에 의해 유도되는 AP-1의 프로모터 활성에

hyperoside가 미치는 영향을 luciferase assay를 통해 확인하였다. 자외선 조사에 의해 활성화된 AP-1의 프로모터 활성이 hyperoside 20, 40, 80 μM 에서 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다 (Fig. 11).

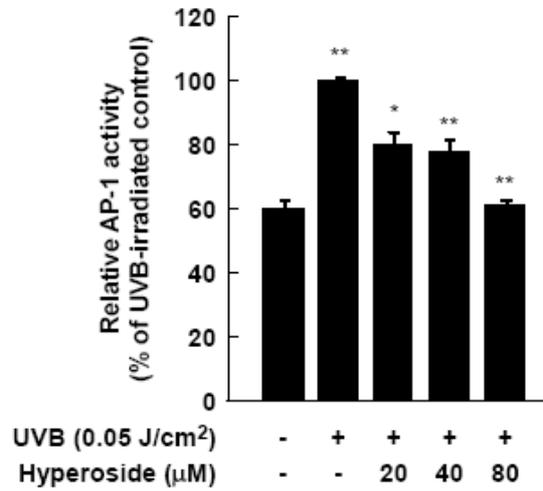


Fig. 11. Effects of hyperoside on UVB-induced AP-1 transactivation in JB6 P+ cells

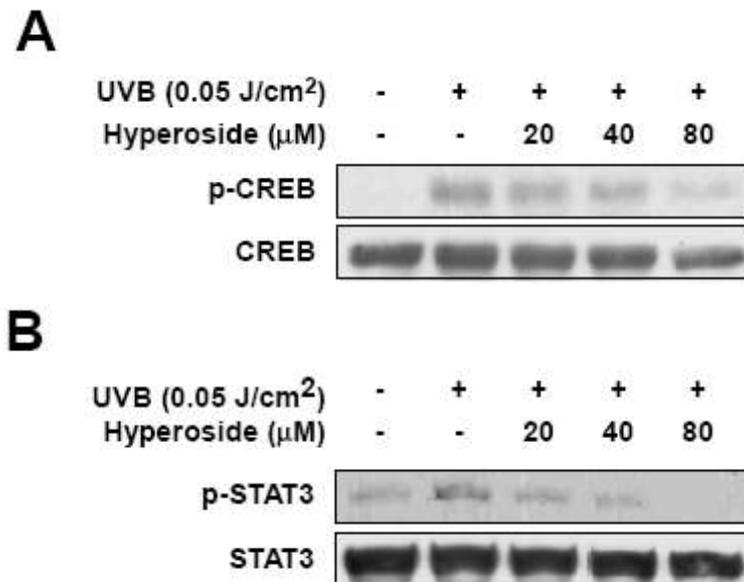
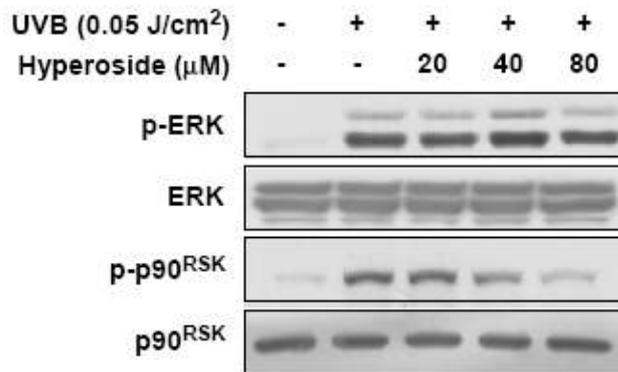


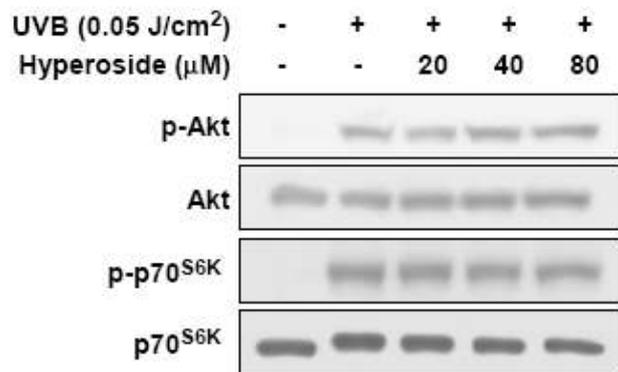
Fig. 12. Effects of hyperoside on UVB-induced phosphorylations of CREB and STAT3 in JB6 P+ cells

- 전사인자 CREB (cAMP response element binding) 와 STAT3 (signal transducer and activator of transcriptio 3) 의 인산화 억제 효능
 - Hyperoside가 전사인자인 CREB와 STAT3의 인산화에 미치는 효과를 western blot assay를 통해 확인하였다. Hyperoside가 CREB와 STAT3의 인산화를 20, 40, 80 μM 에서 농도 의존적으로 억제하였다 (Fig. 12).

A



B



C

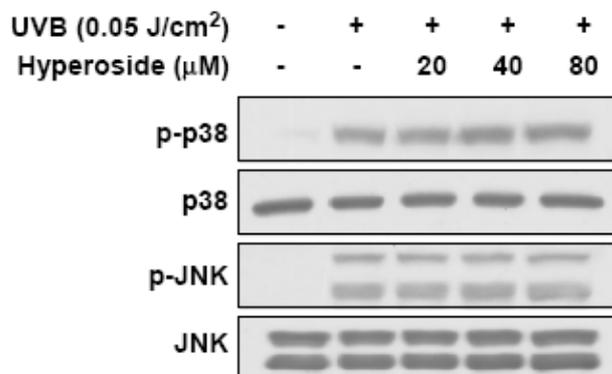


Fig. 13. Effects of hyperoside on UVB-induced activations of signal transduction pathways in JB6 P+ cells

- Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 인산화 억제 효능
 - Hyperoside가 AP-1 활성의 상위 조절인자로 알려진 MAPKs의 인산화를 조절하는 효능을 보이는지 여부를 western blot assay를 통해 확인하였다. Hyperoside가 ERK의 하위조절자인 p90^{RSK}의 인산화를 40, 80 μ M에서 농도 의존적으로 억제하였으나, 다른 MAPK family 인 JNK, p38 과 Akt/p70S6K pathway 는 억제하는 효과가 없었다. (Fig. 13).

- ERK(extracellular signal-regulated kinase) 활성 억제 효능
 - p90RSK의 인산화를 조절하는 상위 효소인 ERK의 활성화에 미치는 hyperoside의 효능을 ERK kinase assay를 통해 확인하였다. Hyperoside가 20, 40, 80 μ M에서 농도 의존적으로 ERK의 활성을 억제 하였다 (Fig. 14)

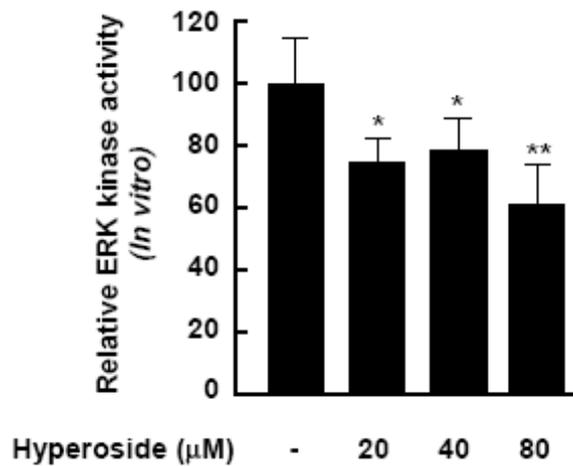


Fig. 14. Effect of hyperoside on ERK activity

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구평가의 착안점

1. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표

- 오가피열매 추출/농축액 제조 및 상품화
- 오가피열매 추출액을 적용한 식품의 시제품 개발 및 발명특허 출원 1건 이상
- 오가자의 항암활성 규명을 통한 SCI급 논문 2편 이상 발표

나. 연차별·과제별 연구개발의 목표 및 내용

구분	과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	(세부)	오가자 추출 및 농축 조건 설정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출액의 지표물질 선정 ○ 열매 상태(생,건)별, 부위별에 따른 추출 조건 설정 ○ RSM을 이용한 최적 추출/농축 조건 선정
	(협동1)	오가자 추출물을 이용한 적용 식품 탐색 및 선정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 적용 가능 식품 screening ○ 적용 식품 선정 및 recipe 선정 ○ 적용 제품의 관능평가 수행
	(협동2)	오가자의 <i>in vitro</i> 항산화, 항염증 및 세포간 신호 전달 조절 활성탐색	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자의 항산화 효능 규명 ○ 오가자의 항염증 효능 규명 ○ 오가자의 세포간 신호전달 조절 효능 규명
2차 년도	(주관)	오가자 추출/농축액의 제조 표준화 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 추출/농축액의 저장안정성 증대 방안 탐색 ○ 추출/농축액의 건조 방법 및 조건 선정 ○ 분말화 조건 및 포장 가공 방법 확립
	(협동1)	오가자 추출물을 적용한 시제품 제조	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시제품 제조 조건 확립 ○ 적용 제품의 저장안정성 조건 확립
	(협동2)	오가자의 암세포 증식, 이동, 및 전이 억제 활성 탐색 및 작용기작 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자의 암세포 증식억제 효능 규명 ○ 오가자의 암세포 이동성 억제 효능 규명 ○ 오가자의 암세포 전이 억제 효능 규명

2. 연구개발 평가의 착안점

년도	구 분	평가 착안점	척도 (점수)
1차 년도 (2007)	세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출 및 농축조건 설정 <ul style="list-style-type: none"> - LC/MS/MS에 의한 오가자의 생리활성 물질 분석 및 동정 - 오가자 추출조건 설정을 위한 실험 설계의 적절성 - 오가자 추출액의 최적 추출조건의 설정 여부 	30 (5) (5) (20)
	협동 1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출물을 이용한 적용 식품 탐색 및 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 적용 가능 식품 screening - 적용 식품의 가공적성 평가 및 recipe 선정 - 적용 제품의 관능평가 수행 	30 (5) (20) (5)
	협동 2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자의 항산화, 항염증/항암 기능성 활성 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> 항산화 활성 탐색 - 항염증 활성 탐색 - 세포간 신호전달 조절활성 탐색 	40 (10) (10) (20)
2차 년도 (2008)	세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출/농축액의 제조 표준화 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 추출/농축액의 저장안정성 증대 방안 탐색 - 추출/농축액의 건조 방법 및 조건 선정 - 분말화 조건 및 포장 가공 방법 확립 	30 (5) (20) (5)
	협동 1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출물을 적용한 시제품 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 시제품 제조 조건 확립 - 적용 제품의 식품가치 평가 및 사업성 평가 	30 (20) (10)
	협동 2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자의 자외선 조사에 의해 유도되는 신호전달 억제 효능규명 <ul style="list-style-type: none"> - 오가자의 AP-1과 NF-κB 억제 효능 규명 - 오가자의 MAPKs 인산화 억제 효능 규명 - 오가자의 ERK 활성 억제 효능 규명 	40 (10) (15) (15)
최종 평가	세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출/농축액의 제조 표준화 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 오가자 추출액의 분말 시제품 	30 (30)
	협동 1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출물을 적용한 시제품 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 오가자 적용 시제품 4종 - 오가자 적용 제품의 특허 출원 1건 	30 (15) (15)
	협동 2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자의 암 예방 및 항암 활성 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 논문 게재(SCI급 2편) 	40 (40)

제 2 절 연구개발 목표에 대한 달성도

년도	목 표	도출된 결과	달성도 (%)
1차 년도 (2007)	오가자 추출 및 농축 조건 설정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출액의 지표물질 선정 및 분석 ○ RSM을 이용한 최적 추출 조건 선정함. 	100
	오가자 추출물을 이용한 적용 식품 탐색 및 선정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 적용 가능 식품 screening 결과 간장, 물엿, 식초, 식초음료 선정. ○ 오가자 색소의 특징상 낮은 pH와 높은 당도에 안정하여 물엿, 식초, 식초음료의 가공적성이 우수하며, 관능평가에서 타 제품과 경쟁력이 있다는 결론에 도달함. 	100
	오가자의 항산화, 항염증/항암 기능성 탐색	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자의 추출 성분 중 hyperoside가 IL-16의 생성을 억제함 ○ 염증관련 대표적인 지표단백질인 COX-2 발현이 hyperoside에 의해 억제됨 	100
2차 년도 (2008)	오가자 추출/농축액의 제조 표준화 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자 추출액의 건조 방법 및 조건 선정 ○ 오가자 추출액의 분말화 방법 및 조건 확립 ○ 오가자 추출액의 분말 시제품 제조 	100
	오가자 추출물을 적용한 시제품 제조	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오가자를 이용하여 간장, 물엿, 식초, 식초음료의 제조조건을 확립하고 제조된 각 시제품의 관능평가 및 사업성을 평가한 결과 물엿과 식초음료의 경우 상품성 및 사업성이 우수하다는 결론에 도달함. 	100
	오가자의 자외선 조사에 의해 유도되는 신호전달 억제 효능규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hyperoside에 의해 자외선 조사로 증가한 AP-1 활성이 억제됨 ○ Hyperoside가 p90RSK의 인산화를 억제함 ○ Hyperoside가 CREB와 STAT3의 인산화를 억제함 ○ Hyperoside가 ERK의 활성을 억제함 	100

제 3 절 연구 결과의 대의적 활용 실적

1. 국내 특허 출원 1 건

○ “두릅나무 관목¹⁾의 과실 추출물을 원료로 제조된 발효식초” 특허 출원

관인생략

출원번호통지서

출원 일자 2009.03.11
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원 번호 10-2009-0020731 (접수번호 1-1-2009-0147608-10)
 출원인 명칭 정선군(2-1999-027158-5) 외 1명
 대리인 성명 김원준(9-1998-000674-0)
 발명자 성명 최대성 김영수
 발명의 명칭 두릅나무과 관목의 과실 추출물을 원료로 제조된 발효식초

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(온라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.(단 홈페이지 화면에 한하여 통지서비스 신청 가능)
 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 유별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
 ※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 2-라. 1차 심사결과통지(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 배론 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자의 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
 특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

¹⁾ : “두릅나무 관목”은 본 연구에서 사용된 오가피나무의 종명임.

2. 국외 학술지 논문 2건 게재 중

○ "Hyperoside, a phenolic compound from *Acanthopanax sessiliflorus* fruits, inhibits UVB-induced AP-1transactivation and ERK activation"을 Journal of Agricultural and Food Chemistry에 투고 중

○ “Cyanidin-3-O-galactoside, active anthocyanind from *Acanthopanax sessiliflorus* fruit, inhibits UVB-induced COX-2 expression”을 Journal of Agricultural and Food Chemistry에 투고 중

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

1. 연구범위의 확대

본 과제를 통해 전통적으로 사용해 오던 오갈피 잎, 뿌리뿐만 아니라 열매에 대한 건강기능성에 기초 결과를 확보함으로써 전통 식품의 건강기능성에 관한 과학적 근거를 마련하였다. 자외선 조사에 의해 조절되는 신호전달 체계는 암의 발생단계 뿐만 아니라 진행단계를 매개하기 때문에 항암 및 암예방뿐만 아니라 화장품으로의 응용을 위한 연구에도 그 효능을 기대할 수 있다.

2. 기능성 제품의 상품화 연구

본 연구를 통하여 *in vitro* 효능에 관련된 기초 결과는 확보 되었으나, 기능성 식품 신소재 개발을 위해서 동물 실험연구가 추가적으로 진행 된다면 제품의 상품화가 보다 용이할 것으로 생각되며 이로 인해 농민 소득 증대에 기여할 수 있으리라 판단된다.

3. 신소재의 대량 생산 연구

본 과제를 통하여 오가자 추출물 및 구성성분의 새로운 기능성 소재 성공 가능성을 제시하고 있으나, 이를 상업화하기 위해서는 추가적인 대량 생산 및 최적화 공정에 관한 연구가 진행 되어야 할 것으로 생각된다.

제 2 절 타 연구에의 응용

1. 핵심기술 활용분야

- 가. 오가자 성분의 분석 결과 데이터베이스화
- 나. 기능성 소재의 *in vitro* 기능성 screening 기술
- 다. 기능성 소재의 체내 대사 및 기작 연구기법 활용

2. 핵심기술 활용유형 및 산업

- 가. 개발 소재 조성물의 용도에 대한 특허화 및 소재화
- 나. Nutraceutical, Pharmaceutical, Cosmeceutical 소재 응용

3. 식품소재

- 가. 암 예방 식품 및 병원(치료)식의 원료로 사용
- 나. 건강보조식품의 원료 및 제품으로 사용
- 다. 가정식 요리 및 가공 식품의 원료로 사용

제 3 절 산업화 추진 방안

1. Scale-up 연구를 통한 상업화 추진

가. 대량 생산 설비 및 공장 적용 검토

나. 수율 증대를 통한 제조 비용의 절감 추진

다. 생산 경제성 평가 및 시장 조사 평가를 통한 상용화 시점 조절

2. 건강기능식품으로 적용 모색

가. 2004년부터 실시된, 건강기능식품법에 따라 소재의 기능성 홍보 및 표시를 위해서는 건강기능식품 인증 절차가 필요함.

나. 본과제의 소재는 건강기능식품 개별 인정형 제품으로 응용이 필요함.

다. 건강기능식품 개별인정을 위해서는 전임상이상의 기능성 평가 결과와 안전성(독성) 평가가 필요함.

3. 확보된 기술에 대한 기술이전 모색

가. 본 연구과제 참여 기관인 정선군농업기술센터에서 출원한 특허 기술을 참여 기업인 국순당정선명주에 기술 실시 이전하여 국순당정선명주의 발효기술과 지역 농가에 재배된 오가자 원료를 이용한 오가자 초산 발효 식품의 제품화를 위한 방안 검토 중.

나. 정선 지역의 발효식품 식품 업체(간장, 된장 생산 업체) 등에 기술이전하여 오가자를 첨가한 전통 발효 식품 생산에 이용되도록 기술이전 실시 예정

다. 국순당정선명주의 개발 기술인 오가자 추출물의 분말화 기술을 식품원료 생산업체에 기술 이전하여 새로운 식품원료의 소재로서 개발되도록 할 계획임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. *Acanthopanax sessiliflorus*로 검색 시 11 편의 연구 논문이 검색 됨. *Acanthopanax sessiliflorus* fruit에서 hyperoside에 관한 연구는 검색되지 않음.
2. Hyperoside와 암과 관련된 논문은 총 6편으로 EGFR의 저해제에 관한 연구와 뇌기능에 관한 연구가 선행됨.

제 7 장 참고문헌

1. 한용봉; 한국의 야생 식용식물자원 II, 고려대학교 출판부, 2003.
2. 유태종; 식품동의보감, 아카데미북, 1999.
3. 김광남, 백순엽; 제2의산삼 오가피, 건강신문사, 2006.
4. 육창수; 약용오가피, 경원미디어, 2001.
5. 천연물화학 교재편찬위원회; 천연물화학, 영림사, 2003.
6. 노봉수, 김석신, 장관식, 이현규, 김태집; 식품저장학, 수학사, 2008.
7. 조여원; 생약초 특화지역 조성사업 "황기·오가피를 이용한 체질별 건강 음식 개발 연구", 경희대임상의학연구소, 2007.
8. Hibasami, H.; Fujikawa, T.; Takeda, H.; Nishibe, S.; Satoh, T.; Fujisawa, T.; Nakashima, K., Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells. *OncolRep* **2000**, 7, (6), 1213-6.
9. Liu, Z.; Tao, X.; Zhang, C.; Lu, Y.; Wei, D., Protective effects of hyperoside (quercetin-3-o-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. *Biomed Pharmacother* **2005**, 59, (9), 481-90.
10. Ma, W. Y.; Huang, C.; Dong, Z., Inhibition of ultraviolet C irradiation-induced AP-1 activity by aspirin is through inhibition of JNKs but not erks or P38 MAP kinase. *Int J Oncol* **1998**, 12, (3), 565-8.
11. Afaq, F.; Ahmad, N.; Mukhtar, H., Suppression of UVB-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B by green tea polyphenol in SKH-1 hairless mice. *Oncogene* **2003**, 22, (58), 9254-64.
12. Karin, M.; Liu, Z.; Zandi, E., AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **1997**, 9, (2), 240-6.
13. Jung, S. K.; Lee, K. W.; Byun, S.; Kang, N. J.; Lim, S. H.; Heo, Y. S.; Bode, A. M.; Bowden, G. T.; Lee, H. J.; Dong, Z., Myricetin suppresses UVB-induced skin cancer by targeting Fyn. *Cancer Res* **2008**, 68, (14), 6021-9.
14. Prusty, B. K.; Das, B. C., Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer* **2005**, 113, (6), 951-60.
15. Zhang, Y.; Pu, X.; Shi, M.; Chen, L.; Song, Y.; Qian, L.; Yuan, G.; Zhang, H.; Yu, M.; Hu, M.; Shen, B.; Guo, N., Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model. *BMC Cancer* **2007**, 7, 145.
16. Young, M. R.; Li, J. J.; Rincon, M.; Flavell, R. A.; Sathyanarayana, B. K.; Hunziker, R.; Colburn, N., Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, 96, (17), 9827-32.
17. Jochum, W.; Passegue, E.; Wagner, E. F., AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **2001**, 20, (19), 2401-12.

18. Dong, Z.; Huang, C.; Brown, R. E.; Ma, W. Y., Inhibition of activator protein 1 activity and neoplastic transformation by aspirin. *J Biol Chem* **1997**, 272, (15), 9962–70.
19. Leaner, V. D.; Chick, J. F.; Donniger, H.; Linniola, I.; Mendoza, A.; Khanna, C.; Birrer, M. J., Inhibition of AP–1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *Am J Pathol* **2009**, 174, (1), 265–75.
20. Kang, N. J.; Lee, K. W.; Rogozin, E. A.; Cho, Y. Y.; Heo, Y. S.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z., Equol, a metabolite of the soybean isoflavone daidzein, inhibits neoplastic cell transformation by targeting the MEK/ERK/p90RSK/activator protein–1 pathway. *J Biol Chem* **2007**, 282, (45), 32856–66.
21. Kang, N. J.; Lee, K. W.; Shin, B. J.; Jung, S. K.; Hwang, M. K.; Bode, A. M.; Heo, Y. S.; Lee, H. J.; Dong, Z., Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB–induced COX–2 expression. *Carcinogenesis* **2009**, 30, (2), 321–30.
22. Chen, M.; Song, F.; Guo, M.; Liu, Z.; Liu, S., Analysis of flavonoid constituents from leaves of *Acanthopanax senticosus* harms by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2002**, 16, (4), 264–71.
23. Park, K, S.; Chang D, S.; Cho. H, R.; Park. U, Y., Investigation of Cultural Characteristics of High concentration Ethanol Resistans *Acetobacter* sp. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **1994**, 23(4), 666~670.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.