

일반과제(V)

과제번호 2006-0056

Conjugated Linoleic Acid (CLA)가 풍부한 우육생산을  
위한 CLA PEGylation의 개발

Simple PEGylation of Conjugated Linoleic Acid for  
CLA-Enriched Beef Production

서울대학교

농림수산식품자료실



0017699

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Conjugated Linoleic Acid (CLA)가 풍부한 우육생산을 위한 CLA PEGylation의 개발”의 최종 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 21 일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 조 종 수

세부연구책임자 : 조 종 수

협동연구기관명 : 부산대학교

협동연구책임자 : 이 홍 구

# 요 약 문

## I. 제 목

Conjugated Linoleic Acid (CLA)가 풍부한 우육생산을 위한 CLA PEGylation의 개발

## II. 연구 개발의 목적 및 필요성

항암, 항산화, 동맥경화억제, 면역성증가, 콜레스테롤저하, 체지방감소, 항균 및 당뇨병 예방 등의 여러 생리활성 효과를 갖는 CLA가 물에 녹지 않아 생체 흡수율이 낮고 반추위내에서 미생물에 의하여 환원되기 쉽기 때문에 쇠고기내의 CLA함량이 매우 낮고 Oil 상으로 취급하기 어려운 문제점 등을 해결하기 위하여 생체적합성이 우수하고 가격이 저렴하고 안전성에 문제가 없는 폴리에틸렌글리콜을 간단하게 CLA에 화학적으로 결합시켜 반추위는 물론 하부소화기관에서의 CLA의 안정성 확보는 물론 장내 흡수율을 증가시킬 수 있는 제제를 개발하고 이에 대한 *in vitro* 및 *in vivo*를 통하여 확인하고자한다.

## III. 연구 개발 내용 및 범위

### 1. 제 1 세부과제

#### 가. PEG에 CLA를 결합시킨다

반응온도 및 반응시간에 따라서 PEG를 CLA에 결합시켰다.

#### 나. PEGylated CLA의 확인 및 정량

CLA가 PEG에 결합된 것을 UV와 NMR로 확인하고 결합된 량을 계산하였다.

#### 다. PEGylated CLA 나노입자의 제조

PEGylated CLA를 물에 녹여 나노입자를 제조하였다.

#### 라. 나노입자의 크기 확인

제조된 나노입자의 크기를 DLS로 확인하였다.

#### 마. 제조된 나노입자의 형태 관찰

제조된 나노입자의 형태를 SEM과 TEM으로 관찰하였다.

#### 바. PEGylated CLA의 반감기 측정

PEGylated CLA의 반감기를 가수분해 방법에 의하여 측정하였다.

#### 사. PEGylated CLA의 산화안정성 측정

시간에 따른 PCLA의 산화안정성을 GC를 이용하여 측정하였다.

#### 아. PEGylated CLA의 독성 조사

세포에 미치는 PEGylated CLA의 독성을 MTT, DAPI 염색 및 FACS로 측정하였다.

자. PEGylated CLA의 지방 세포의 분화 억제 능력 측정

PEGylated CLA의 지방 세포 분화 억제 능력을 중성 지방 합성 방법으로 측정하였다.

차. PEGylated CLA가 지방세포 transcription factor에 미치는 영향 조사

지방세포 분화와 관계하는 PPAR $\gamma$ <sup>2</sup>, C/EBP $\alpha$  및 aP2의 expression에 PEGylated CLA가 미치는 영향을 Western blot으로 조사하였다.

타. PEGylated CLA가 비만 쥐에서 비만억제효과 측정

PEGylated CLA가 비만 쥐에서 실제 비만억제 효과가 있는 가를 모델 비만 쥐에서 확인하였다.

파. PEGylated CLA가 지방세포의 지방분해에 미치는 생물화학적인 신호 체계의 연구

PEGylated CLA가 지방세포의 지방분해에 미치는 생화학적인 신호 체계를 Western blot과 면역형광 방법으로 확인하였다.

## 2. 제 1 협동과제

가. PEGylated CLA의 분석 방법 확립 및 소화에 의한 PEGylated CLA의 안정성 검사

인공위액에서 PEGylated CLA의 안정성 조사 배양조건, 시간대별 CLA함량 변화를 대조구와 비교 pH, 암모니아농도, VFA의 농도를 조사하였다.

나. 흰쥐에 있어서 PEGylated CLA의 혈액 및 조직 중 CLA이행 효율 조사

흰쥐를 이용하여 혈중 흡수율과 복강지방 및 유선중 CLA의 함량을 조사하였다.

다. PEGylated CLA의 유산양에 투여시 유중 CLA 전이 정도 평가

비유중 젖산양이용, 4일간 PEG-CLA투여하여 유중의 CLA함량을 조사하였다.

라. 한우거세우육 중 CLA 침착정도 및 육성상에 미치는 영향 조사

거세한우를 이용하여 시험기간 (1개월)동안 도체 조직의 CLA 함량을 측정하고 육성상을 조사하였다.

## IV. 연구 개발 결과

### 1. 제 1 세부과제

가. PEG에 CLA의 결합 여부를 NMR로 확인결과 PEG의 메틸렌 수소의 3.4-3.6의 peak과 CLA의 이중결합의 수소의 5.2-6.2 ppm의 peak이 나오고 있는 결과로 확인되었다. FT-IR에서도 ester 결합으로 인한 카르보닐 피크가 1737.81cm<sup>-1</sup>가 나타났다.

나. PCLA의 나노입자를 만들어 TEM으로 관찰한 결과 원형이었고 DLS로 크기를 측정된 결과 조건에 따라서 10-100nm이었다.

다. PCLA의 반감기를 UV로 측정된 결과 55시간이었고 HPLC로 확인결과 끊어진 CLA가 75시간에 90%가 방출되었다.

라. PCLA의 산화 안정성을 headspace air를 주입하여 측정된 결과 CLA는 산화 안정성이 급격히 감소하나 PCLA는 완만히 감소하였다.

마. PCLA의 독성조사를 MTT 방법으로 지방전구세포로 확인한 결과 CLA 단독은 세포 생존율이 농도증가에 따라서 급격하게 감소하였지만 PCLA는 완만히 감소하였다.

바. PCLA의 지방세포 축적 조사를 FACS를 통해서 조사하였더니 CLA와 비슷하게 지방 입자 축적 억제 능력을 나타냈다.

사. PCLA의 지방세포분화에 관련된 전사인자를 Western blotting 방법으로 확인한 결과 PPAR $\alpha$ 의 억제효과가 탁월하였다.

아. PCLA의 지방분해에 의한 glycerol 방출 거동을 GPO-trinader kit로 확인한 결과 CLA와 비슷하게 대조구에 비하여 증가하였다.

자. In vivo에서의 PCLA의 항비만 효과를 비만쥐에 투여후 조가 결과, 몸무게, 복부지방, 간, 몸통의 lipid, LDLC, TC, GPDH, C/EBP $\alpha$  및 PPAR $\alpha$  수치가 대조구보다 낮았다.

차. PCLA의 지방세포분화에 대한 메카니즘 구명에서 ADRP, oleic acid, IL-6, IL-8의 분비량이 증가하였고 ERK는 활성화되었고 MEK/ERK MARK 신호전달의 기구에 의존하였다.

## 2. 제 1 협동과제

가. 다양한 형태의 PEGylated CLA의 CLA함량을 정확하게 분석할 수 있는 분석방법이 구축되었으며 적정 pegylation 방법(130°C에서 50mmol%CLA)을 구축하였다. 이렇게 제조된 PEG-CLA는 24시간동안 *in vitro* 반추위 발효실험을 통하여 free CLA에 비하여 뛰어난 안정성이 확인되었다. 또한 pH=2 인공위액에서 free CLA는 2, 4, 8, 12, 24hr 에 40%이상이나 분해되었으나 PEGylated CLA에서는 30%이내의 분해정도를 보였다.

나. 흰쥐에 PEG-CLA와 free CLA를 구강투여 4시간후 혈중에 CLA함량을 조사한 결과 혈중에 *cis*-9, *trans*-11 CLA함량 및 *trans*-10, *cis*-12 CLA모두가 free CLA처리구보다 유의한 증가를 보였다 ( $P < 0.05$ ). 아울러 흰쥐에서 사료내 PEG-CLA와 free CLA첨가한 사료를 급여한 후 복강 지방조직 및 유선 조직 CLA 전이 정도를 측정된 결과 유선조직에서 PEG-CLA처리구가 free CLA처리구에 비하여 2.5배 이상 검출되었고 지방조직 역시 PEG-CLA구에서 가장 높은 CLA함량이 확인되었다.

다. Sannen 유산양에 순 CLA기준으로 사료중 3.4%를 첨가한 CLA 및 PEG-CLA 구에 있어서 유 산양 유중 CLA함량을 측정된 결과 free CLA의 처리는 대조구에 비하여 유중 CLA함량의 변화를 보이지 않았으나 PEG-CLA처리구의 경우 대조구와 CLA의 0.8 mg/milk fat 100g에 비하여 PEG-CLA구에서 1.3 mg/milk fat 100g 수준으로 PEG-CLA처리구가 대조구 및 순 CLA 처리구에 비하여 1.5배 이상 높게 검출되었다.

라. 현재 사양시험은 시험 축 선정에 있어서 출하전 1개월 거세한우 확보에 있어서 많은 문제점이 발생 대상농가의 비협조로 조기 출하등 문제가 발생하여 2009년 3월에야 실험을 실시하게 되었다. 따라서 본 보고서에서는 등심 조직내 CLA함량에 대한 자료는 제공되지 못하였으나 한우 비육 말기 펠렛 사료 내 첨가 시 발생하는 CLA의 파괴를 최소화하기 위하여 여러 가지 방법 시험하여 효과적인 첨가방법을 구축하였고, 사양시험에 대한 육성상에 대한 결과는 5월중 분석이 완료될 것으로 사료되며 연구 1, 2, 3의 결과를 비취어 볼 때 긍정적인 결과가 기대되어진다.

## V. 연구 성과 및 성과활용 계획

1. 참여기업에 기술 이전 - 고 기능성 축산물 사료 개발에 활용  
(현재 국제 특허 준비중)
2. PEG-CLA의 물에 용해성을 이용한 CLA첨가 음료제로 개발 (음료회사와 공동 개발 타진중)
3. 한우 고급브랜드에 활용 (광역 및 지역 브랜드연계를 통한 고품질 기능성 한우 브랜드 탄생)
4. 사양시험 결과를 특허출원

# SUMMARY

## I . Title

Simple PEGylation of Conjugated Linoleic Acid for CLA-Enriched Beef Production

## II. The Purpose of the Research

The purpose of this research is to prepare pegylation of conjugated linoleic acid (PCLA), to characterize PCLA, to check half-life and oxidative stability of PCLA, to check attenuation of lipid accumulation in vitro and in vivo for application for CLA-enriched beef production.

## III. Methods

### 1. The First Subject

#### 1) Coupling of PEG with CLA

PCLA was prepared by coupling of PEG with CLA at melting state of PEG.

#### 2) Confirmation of PCLA

NMR and FT-IR were measured to confirm PCLA.

#### 3) Preparation of PCLA nanoparticles (NPs)

PCLA NP was prepared by dissolving in MeOH and dialysis in water.

#### 4) Particle size of PCLA NPs

DLS was used to measure particle size of PCLA NP.

#### 5) Observation of PCLA NPs

TEM was used to observe PCLA NPs.

#### 6) Measurement of half-life of PCLA

Half-life of PCLA was measured by hydrolysis.

#### 7) Measurement of oxidative stability of PCLA

Oxidative stability of PCLA was measured by GC.

#### 8) Checking of cell viability of PCLA

Cell viability of PCLA was checked by MTT.

#### 9) Checking of anti-adipogenic effect of PCLA

Anti-adipogenic activity was checked by western blot.

10) Checking of transcription factor of PCLA

Transcription factor of PCLA was checked by western blot.

11) Checking of anti-obesity effect of PCLA

Anti-obesity of PCLA was checked in the obese C57BL/6J(ob/ob) mice.

12) Checking of lipolysis mechanism of PCLA

Lipolysis mechanism of PCLA was checked in 3T3-L1 cells.

## 2. The First-Joint Subject

1) Effect of pegylation of CLA on the stability in rumen and stomach

We determined the method to analysis of CLA concentration in PEG-CLA and the optimal condition for pegylation of CLA(130°C, 50mmol%CLA).

2) Effect of the administration of PEGylated CLA on the CLA concentration in blood, mammary gland and visceral adipose tissues of SD rats.

In present study, the CLA concentrations in blood and visceral adipose tissue were increased at 4 hr after oral administration of PEG-CLA (P<0.05).

3) Effect of the supplementation of PEGylated CLA in feed on the concentration of CLA in the milk of lactating goats.

In *in vivo* trial for 4 days in lactating goat, the highest concentration of CLA in milk was observed in PEG-CLA group, followed by control and CLA group.

4) Effect of the supplementation of PEGylated CLA on the concentration of CLA in the sirloin meat of Hanwoo steers.

Thirty Hanwoo steers (30months, 582.5kg) were randomly divided into three groups ((1) Control , (2) PEG-CLA, (3) Ca-CLA) of teen animals based on their body weights. The trial was conducted in a completely randomized design with three dietary treatments for 30 days.

## IV. Results and discussions

1) From results of NMR measurement of PCLA, methylene peaks of PEG and double bond peaks of CLA appeared at 3.4~3.6 and 5.2~6.2 ppm, respectively. And from FT-IR result, the C=O stretching band of ester bond in PCLA appeared at 1737.81 cm<sup>-1</sup>.

2) PCLA NPs were prepared by dialysis after dissolving PCLA in methanol.

The sizes of the NPs were 10-100nm and the shapes of the them observed by TEM were spherical.

3) Half-life time of PCLA measured by UV was 55h. Also, CLA release from PCLA was almost 90% over the 75h.

4) Oxidative stability of PCLA after injection of headspace air was slowly decreased whereas that of CLA was rapidly decreased.

5) The cell viability of the 3T3-L1 cells reduced by PCLA was lower than that reduced by CLA it self.

6) From the western blotting assay, PCLA induced anti-adipogenic effect on 3T3-L1 cells similar to CLA itself.

7) From the western blotting assay, the expressions of PPAR $\alpha$  and C/EBP $\alpha$  were decreased by treatment of PCLA similar to CLA.

8) More oleic and glycerol were released after lipolysis of cultured 3T3-L1 cells with treatment of PCLA or CLA than control.

9) Body weight, addominal fat, liver, body lipid, LDLC, TC, GPDH, C/EBP $\alpha$  and PPAR $\alpha$  in high-fat-fed obese C57BL/6J (ob/ob) mice containing PCLA were lower than control.

10) Lipolysis of 3T3-L1 cells was stimulated by PCLA through the cyclic adenosine monophosphate-independent signaling pathway and activation of MEK/ERK MARK signaling pathway and hyper-secretion of IL-6 and IL-8.

## 2. The First-Joint Subject

1) Effect of pegylation of CLA on the stability in rumen and stomach

We determined the method to analysis of CLA concentration in PEG-CLA and the optimal condition for pegylation of CLA(130°C, 50mmol% CLA). In addition we found that the PEG-CLA showed the degradability below 30% for 24 hr in both ruminal fermentation and artificial gastric juice (pH 2).

2) Effect of the administration of PEGyated CLA on the CLA concentration in blood, mammary gland and visceral adipose tissues of SD rats.

In present study, the CLA concentrations in blood and visceral adipose tissue were increased at 4 hr after oral administration of PEG-CLA (P<0.05). In trial of lactating SD rat, the concentration of CLA in the mammary gland tissue of PEG-CLA group was two and half times higher than in control and free CLA groups.

3) Effect of the supplementation of PEGylated CLA in feed on the concentration of CLA in the milk of lactating goats.

In *in vivo* trial for 4 days in lactating goat, the highest concentration of CLA in milk ( $P < 0.05$ ) was observed in PEG-CLA group ( $1.3 \pm 0.19$  g/100g fat), followed by control ( $0.8 \pm 0.03$  g/100g fat) and CLA ( $0.8 \pm 0.15$  g/100g fat) group. Therefore, these results suggest that the PEGylation of CLA may be related to extent of protection from rumen bacteria as well as post-ruminal bioavailability.

4) Effect of the supplementation of PEGylated CLA on the concentration of CLA in the sirloin meat of Hanwoo steers.

Thirty Hanwoo steers (30 months, 582.5 kg) were randomly divided into three groups ((1) Control , (2) PEG-CLA, (3) Ca-CLA) of ten animals based on their body weights. The trial was conducted in a completely randomized design with three dietary treatments for 30 days.

# CONTENTS

Chapter 1. Summary of research project -----	12
1-1. Purpose of research project -----	12
1-2. Significance of research project -----	12
1-3. Scope of research project -----	13
Chapter 2. Status of research project in the domestic and foreign countries -----	16
2-1. Domestic country -----	16
2-2. Foreign country -----	16
2-3. Position of research project in the domestic and foreign countries--	16
Chapter 3. Methods and results of the research project -----	18
3-1. The First Project -----	18
3-1-1. Materials and methods -----	18
3-1-2. Results and discussion -----	19
3-2. The First Cooperative project -----	25
3-2-1. Materials and methods -----	25
3-2-2. Results and discussion -----	28
Chapter 4. Accomplishment to the gold and contribution to the related fields -----	75
Chapter 5. Research results and Performance plan -----	77
5-1. Research results -----	77
5-2. Performance plan of the research -----	80
Chapter 6. Information of foreign science and technology during performing research project -----	81
6-1. Information of polymeric nanoparticles to biotechnology -----	81
6-2. Information of preparation of the polymeric nanoparticles -----	81
6-3. Information of coupling of anticancer drugs to PEG -----	81
Chapter 7. References -----	82

# 목 차

제 1장 연구 개발 과제의 개요 -----	12
1절 연구 개발의 목적 -----	12
2절 연구 개발의 필요성 -----	12
3절 연구 개발의 범위 -----	13
제 2장 국내외 기술 개발 현황 -----	16
1절 국내 -----	16
2절 국외 -----	16
3절 국내외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치 -----	16
제 3장 연구 개발 수행 내용 및 결과 -----	18
1절 제 1 세부 과제 -----	18
1. 연구 방법 및 내용 -----	18
2. 연구 결과 및 고찰 -----	19
2절 제 1 협동 과제 -----	25
1. 연구 방법 및 내용 -----	25
2. 연구 결과 및 고찰 -----	28
제 4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 -----	75
제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	77
1절 연구 성과 -----	77
2절 연구 성과 활용 계획 -----	80
제 6장 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보 -----	81
1절 고분자 나노 입자의 생물 공학에의 응용 정보 -----	81
2절 고분자 나노 입자의 제조 방법에 대한 정보 -----	81
3절 항암제를 PEG에 결합시키는 방법에 대한 정보 -----	81
제 7장 참고 문헌 -----	82

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발의 목적

항암, 항산화, 동맥경화억제, 면역성증가, 콜레스테롤저하, 체지방감소, 항균 및 당뇨병 예방 등의 여러 생리활성 효과를 갖는 CLA가 물에 녹지 않아 생체 흡수율이 낮고 반추위내에서 미생물에 의하여 환원되기 쉽기 때문에 쇠고기내의 CLA 함량이 매우 낮고 Oil 상으로 취급하기 어려운 문제점 등을 해결하기 위하여 생체적합성이 우수하고 가격이 저렴하고 안전성에 문제가 없는 폴리에틸렌글리콜을 간단하게 CLA에 화학적으로 결합시켜 경제성이 있는 CLA가 많이 축적된 우육생산을 하고자 한다.

## 2절 연구 개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

가. CLA와 같은 대부분의 불포화지방산은 반추위내의 여러 미생물에 의하여 수소화가 되어 포화지방산이 되기 때문에 (Mansbridge 등, 1997) 건강에 좋지 않아 반추위내에서 CLA를 안정화시키는 방법이 필요하다.

나. 반추위내에서 CLA를 보호하기위하여 CLA의 칼슘화 (Chouinard 등, 1998), CLA의 아미드화 및 lipid 코팅 (Perfield 등, 2004), CLA의 포름알데이드화 (de Veth 등, 2005)등과 같은 연구가 되어 있지만 작업공정이 복잡해 경제성이 떨어지고 안전성이 확인이 아직 안된 단점이 있다.

다. CLA는 고급 지방산의 일종으로 물에 녹지 않기 때문에 생체 흡수율이 매우 낮은 문제가 있어 효율적인 소장 흡수율을 높이는 방법이 필요하다.

라. CLA는 oil 형태의 액체물질로 사료나 건강식품에 사용하기가 불편하다.

마. CLA는 항암 (Doyle 등, 1998), 항산화효과 (Park 등, 1998), 항동맥경화 (Nicolosi 등, 1997), 면역성증가 (Miller 등, 1994), 콜레스테롤저하 (Lee 등, 1994), 체지방 감소효과 (Thom 등, 1997), 항균효과 (Wang 등, 1992) 및 당뇨병의 예방 (Houseknecht 등, 1998) 등의 생리적인 기능이 있지만 과량 사용 시에는 세포독성이 있기 때문에 사용에 제한이 있어 세포독성을 줄일 필요성이 있다.

바. 육우의 경우 쇠고기 내 CLA 함량이 우유에 비해서 매우 낮기 때문에 쇠고기에 CLA를 많이 축적시킬 방법이 필요하다.

사. Linoleic acid가 다량 함유된 식물성 oil 에서 수소화 과정으로 CLA를 생산하는데 이러한 과정은 CLA의 생산효율이 매우 낮아 (Jung 등, 2001) 경제적이 못됨으로 생산효율을 높이는 방법이 필요하다.

아. 우육을 장기간 냉동상태에서 보관 할 경우 보습성이 떨어져 우육의 맛이 떨어지고 불포화 지방이 다량 함유시 산패의 우려가 있어 보관 중 산패 방지 및 보습성이 유지되어야 한다.

자. 식용유에서 수소화 과정으로 CLA를 생산하는데 CLA의 생산효율이 매우 낮아 (Jung 등, 2001) 경제성에 문제점이 생기어 생산효율을 높이는 방법이 필요하다.

차. CLA의 생리활성 기작에 대한 정확한 이해가 부족함으로 정확한 mechanism을 밝히는 연구가 필요하다.

## 2. 경제, 산업적 측면

가. WTO 가입이후 국내 쇠고기 시장의 개방시대에 외국산 쇠고기와의 품질의 차별화를 통한 경쟁력 확보 측면에서 고급우육의 생산이 필요하다.

나. 반추동물 유래의 지방의 기피현상을 막고 이들의 기능성 소재로 지방성분의 변화를 위해 반추위 지방 내 기능성 소재인 CLA의 효율적인 축적으로 반추류 생산물 소비 증대를 위해 필요하다.

다. 반추류 생산물 중 CLA는 반추동물의 소화 생리적으로 축적이 타 축종에 비하여 용이하여 반추동물에서의 연구의 장점이 있다.

라. 우유 중의 CLA의 함양효과 (Ha 등, 1987)가 알려지면서 우유 중 CLA 증가를 위한 연구가 활발히 진행되어 왔으므로 우육과 우유에 효과적으로 CLA가 축적된다면 우육과 우유의 소비증가를 가져오리라 생각된다.

마. CLA의 생리활성 효과를 극대화하여 국내의 축산농가의 농촌 경제력을 증대시키고 아울러 외국에 수출상품으로서의 개발이 필요하다.

바. CLA를 이용한 육제품 및 유제품의 개발연구가 더욱 진행이 되어 농촌 경제력을 증대시킬 필요가 있다.

## 3 사회, 문화적 측면

가. CLA는 항암, 항 당뇨, 항비만, 항고혈압과 같은 성인병 예방에 아주 탁월한 효과가 있는 것으로 이미 실험 동물 및 인체에서 밝혀져 건강식품의 수요가 증대하리라 생각된다.

나. 현대인들의 운동부족, 스트레스, 흡연, 음주 및 식생활의 서구화로 성인병이 큰 사회적인 문제로 대두되고 있기 때문에 건강식품을 개발하여 국민건강에 기여해야 한다.

## 3절 연구개발의 범위

### 1. 제 1 세부과제

가. 제 1차년도

CLA의 PEGylation과 그의 확인 및 물리화학적 성질을 조사한다.

- 1) PEG에 CLA의 결합
- 2) PEGylated CLA의 확인 및 정량
- 3) PEGylated CLA의 나노 입자제조
- 4) 나노입자 크기확인 및 형태관찰
- 5) PEGylated CLA의 반감기 측정
- 6) PEGylated CLA의 산화 안정성 측정

나. 제 2차년도

CLA-PEGylation 최적 조건을 확립한다.

- 1) PEG 분자량 영향
- 2) PEG 구조 영향
- 3) 결합 형태 영향
- 4) 산화 안정성 및 반감기 조사

다. 제 3차년도

PEGylated CLA 대량생산 시스템 구축과 지방세포 분화기작을 구명한다.

- 1) PEGylated CLA 대량 생산시스템 구축
- 2) PEGylated CLA의 독성조사
- 3) PEGylated CLA의 지방세포 분화 능력 측정
- 4) PEGylated CLA의 지방세포 분화 억제에서 PEG의 최적화
- 5) PEGylated CLA의 지방세포 transcription factor 영향 조사

2. 제 1협동 과제

가. 제 1차년도

PEGylated CLA의 ruminal protection 정도와 반추위의 발효특성을 조사한다.

- 1) *In vitro* 실험을 통하여 PEGylated CLA의 반추위 보호효율 조사
- 2) PEGylated CLA의 *in vitro* 발효성상 조사
- 3) 인공위액에서 PEGylated CLA의 안정성조사

나. 제 2차년도

PEGylated CLA의 *in vitro*에서의 흡수율과 *in vivo*에서의 근내 지방 대사를 측정한다.

- 1) *in vitro*에서의 흡수율 측정

2) in vivo에서의 흡수율 측정

다. 제 3차년도

PEGylated CLA의 근내 지방 대사, 거세한우 육성상 및 CLA 축적정도를 조사한다.

1) in vivo에서 근내 지방 대사 측정

2) 한우거세우육 중 CLA 침착정도 및 육성상에 미치는 영향 조사

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내

1. 경상대학교 (2001) : CLA를 돼지사료에 첨가하여 급여하면 일반성분 및 이화학적 성질에 영향을 주지 않고 CLA를 육내에 축적시키고 CLA가 축적된 돈육은 저장 중 산화를 억제하는 항산화 능력이 있다고 보고하였다.
2. 경상대학교 (2001) : CLA를 육계사료에 급여하여 생산된 계육이 이화학적, 관능적 및 조직적 특성에 차이가 없으면서 CLA를 계육 및 난황에 축적시키고 축적된 계육 및 계란은 저장 중 산화를 억제하는 항산화 능력과 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과가 있다고 보고하였다.
3. 충북대학교 (2002) : 10t-12c와 CLA mixture가 지방전구세포의 세포분화 억제 작용이 현저했고 분화 유도 후 CLA 처리가 분화를 더 억제했다고 보고하였다.
4. 경상대학교 (2003) : 유화형 sausage 제조 시 CLA 첨가는 이화학적 특성과 조직 감에 영향을 주지 않고 제품의 저장기간을 연장 및 CLA를 축적시키는 것이 가능하여 고급 sausage 생산이 가능하다고 보고하였다.

### 2절 국외

1. University of Laval (1998) : 칼슘 지방산을 사료로 주면 우유생산은 증가하고 우유 지방은 감소한다고 보고하였다.
2. Cornell University (2004) : 아마이드화 CLA는 21%, lipid 코팅 CLA는 22% 우유지방이 감소하였는데 이것은 CLA가 반추위내에서 보호되었기 때문이라고 보고하였다.
3. Cornell University (2005) : 칼슘화 CLA는 34%, 포름 알데하이드화 CLA는 44% 우유지방이 감소하였는데 이것은 CLA가 반추위내에서 보호되었기 때문이라고 보고하였다.
4. Strathclyde University (2004) : 가장 풍부한 cis9, trans11-CLA나 50:50 CLA mixture에 대한 세포수준이나 실험동물에 대한 생리활성에 대한 자료는 많지만 사람에게 적용했을 때의 자료는 별로 많지 않아 사람에게 있어 CLA 효과에 대한 임상연구가 진행돼야 하고 분자생물학적으로도 접근해야 한다고 보고하였다.

### 3절 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

1. 외국산 쇠고기와 품질의 차별화를 통한 기능성 우육생산이 기대되어 국내산 쇠고기의 경쟁력을 높일 수 있다.

2. 반추류 지방 내 기능성 소재인 CLA의 효율적인 축적으로 반추류 생산의 소비증대를 높일 수 있다.
3. 우유 소비 감소로 갈수록 어려워지고 있는 낙농업에 있어서 우육과 같이 우유에서도 CLA가 고효율로 전이된다면 고기능성 유제품 제조가 가능해져 우유의 소비증대를 유도 낙농가 수입증대 및 낙농업 발전에 기여될 것이다.
4. CLA의 생리활성을 극대화하여 국내의 축산농가의 농촌 경쟁력을 증대시키고 아울러 외국에 수출 상품으로서도 기대된다.
5. PEG는 생체적합성이 우수하고 인체에의 약품에도 인가가 나있고 가격이 저렴하여 상품화가 용이하다.
6. 콩이나 홍아씨에서 CLA 추출 과정 시 PEG를 첨가하여 PEGylated CLA를 얻을 수 있기 때문에 CLA의 추출효율을 높일 수 있다.
7. 식물성 oil로부터 CLA 추출 과정 시 PEG를 첨가하여 PEGylated CLA를 얻을 수 있기 때문에 PEGylation에 소요되는 비용을 절감할 수 있다.
8. 사료는 물론 항비만 등의 건강식품에의 개발에도 기여할 것이다.

## 제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

### 1절 제 1 세부과제

#### 1. 연구방법 및 내용

##### 가. PEG에 CLA를 결합시킨다

반응온도 및 반응시간에 따라서 PEG를 CLA에 결합시켰다.

##### 나. PEGylated CLA의 확인 및 정량

CLA가 PEG에 결합된 것을 UV와 NMR로 확인하고 결합된 양을 계산하였다.

##### 다. PEGylated CLA 나노입자의 제조

PEGylated CLA를 물에 녹여 나노입자를 제조하였다.

##### 라. 나노입자의 크기 확인

제조된 나노입자의 크기를 DLS로 확인하였다.

##### 마. 제조된 나노입자의 형태 관찰

제조된 나노입자의 형태를 SEM과 TEM으로 관찰하였다.

##### 바. PEGylated CLA의 반감기 측정

PEGylated CLA의 반감기를 가수분해 방법에 의하여 측정하였다.

##### 사. PEGylated CLA의 산화안정성 측정

시간에 따른 PCLA의 산화안정성을 GC를 이용하여 측정하였다.

##### 아. PEGylated CLA의 독성 조사

세포에 미치는 PEGylated CLA의 독성을 MTT, DAPI 염색 및 FACS로 측정하였다.

##### 자. PEGylated CLA의 지방세포의 분화억제능력 측정

PEGylated CLA의 지방세포 분화억제 능력을 중성지방 합성방법으로 측정하였다.

##### 차. PEGylated CLA가 지방세포 transcription factor에 미치는 영향 조사

지방세포 분화와 관계하는 PPAR $\gamma$ <sup>2</sup>, C/EBP $\alpha$  및 aP2의 expression에 PEGylated CLA가 미치는 영향을 Western blot으로 조사하였다.

##### 타. PEGylated CLA가 비만 쥐에서 비만억제효과 측정

PEGylated CLA가 비만 쥐에서 실제 비만억제 효과가 있는 가를 모델 비만 쥐에서 확인하였다.

##### 파. PEGylated CLA가 지방세포의 지방분해에 미치는 생물화학적 신호 체계의 연구

PEGylated CLA가 지방세포의 지방분해에 미치는 생화학적 신호 체계를 Western blot과 면역형광 방법으로 확인하였다.

## 2. 연구결과 및 고찰

### 가. PEG에 CLA를 결합

Hydroxyl기를 가지고 있는 PEG와 carboxylic기를 가지고 있는 CLA를 용매나 촉매제 없이 온도 반응으로만 ester 결합시켰다. PEG (MW 5,000 15 g, 0.003 mol)와 CLA (MW 280.45 30 g, 0.107 mol)를 질소상태에서 150°C 5시간 반응을 시키고 DMSO에 반응된 물질을 녹인다. 이후 미반응 CLA를 투석을 통해 제거하고 이어서 미반응 PEG는 NANOSEP<sup>®</sup> centrifugal devices를 통해 제거 시켰다. 미반응 CLA와 PEG가 제거된 산물을 -20°C에 얼린 후 동결 건조하여 최종 산물을 얻었다. 반응 scheme을 Fig.1에 나타냈다.

PEG 분자량이 500과 2000인 경우 양쪽에 -OH기가 있어서 CLA가 양쪽에 결합을 하고 있는 반응식을 Fig. 2에 나타냈다. 또한 PEG-PPG-PEG의 pluronic에 CLA를 150°C 5시간 결합시킨 반응식을 Fig. 3에 나타냈다.

### 나. PCLA의 확인 및 정량

합성된 PEGylated CLA를 *d*-chloroform에 녹인 후 <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) (Bruker, Avance 500)을 사용하여 합성된 정도가 확인되었다. 확인에 사용하였던 PEG와 CLA의 NMR spectra는 Fig. 4에 PCLA는 Fig.5에 나타냈다. PEG 분자량이 2000은 CLA가 약 81mol-%, pluronic은 약 53.7mol-%가 결합되었다.

반응온도와 반응시간에 따른 CLA의 mol-%를 나타낸 것이 Fig. 6로서 반응시간과 반응온도가 증가함에 따라서 CLA의 mol-%는 증가하였고 150°C 5시간에서 30 mo-%로서 프라토가 되었다. 또한 FT-IR spectra에서도 에스테르결합으로 인한 PCLA의 카르보닐 스트레칭 밴드가 Fig.7에 나타낸 바와 같이 1737.81 cm<sup>-1</sup>가 나타났다.

### 다. PCLA의 나노입자의 제조 및 특성

합성된 PEGylated CLA 형태를 DLS와 TEM으로 확인한 결과 평균 100nm 정도의 둥근 모양을 가진 나노입자가 형성됐음을 확인하였다.

분자량 5000 PEG로 만든 PCLA의 TEM 사진과 DLS 결과는 Fig. 8에, 분자량 2000 PEG는 Fig. 9에 Plu-CLA는 Fig. 10에 나타냈는데 원형으로서 크기는 대략 PEG 2000은 25nm, Plu-CLA는 약 14nm이었다.

### 라. PCLA의 반감기 측정

합성된 PEGylated CLA를 UV로 확인한 결과 55 시간의 반감기를 가지고 있음을 확인하였다. 또한, pro-drug으로서의 활동을 증명하기 위해 HPLC로 확인한 결

과 약 85시간에 걸쳐 90% 이상의 CLA가 PEGylated CLA로부터 방출됨을 확인하였다. 이 결과로 합성된 PEGylated CLA가 항비만 pro-drug으로서의 활동을 할 수 있을 것이라는 예상을 할 수 있었다. 이 결과는 Fig. 11에 나타냈다.

#### 마. PCLA의 산화 안정성 측정

각 준비된 sample을 stirrer를 이용해 교반시켰다. 실험은 temperature-controlled analytical room (25°C)에서 실시하였으며 각 sample에 100  $\mu$ l portion headspace air를 주입시켜 Hewlett-Packard 5890 series II plus gas chromatography에서 측정하였다. Carrier gas는 helium을 사용하였고 100 $\mu$ l headspace는 Hewlett-Packard 3365 integrator를 이용하여 그 측정된 량을 mmol O<sub>2</sub>/L headspace air로 변환시켰다.

이미 기존에 여러 논문들에서 보고된 CLA의 산화안정성 문제가 극복이 되었는지 확인하기 위해 GC로 CLA 단독과 PEGylated CLA의 산화안정성을 측정하였다. CLA 단독은 시간에 따른 산화 안정성이 급격히 떨어짐을 확인하였으나 PEGylated CLA는 산화 안정성의 수치가 CLA 단독보다 높고 안정적으로 보호되고 있음을 확인하였다.

#### 바. PCLA의 독성조사

PEG, CLA 그리고 PEGylated CLA가 3T3-L1 지방 전구 세포의 독성 및 apoptosis에 미치는 영향을 각 농도별로 FACS를 이용해 측정하였다.

CLA 단독은 농도가 증가함에 따라 지방세포의 apoptosis 정도가 크게 나타났으나 PEGylated CLA는 그 정도가 낮았고 고농도에서 나타나는 CLA의 지방세포에 대한 독성이 PEGylation에 의해 감소되고 있음을 확인하였다. 또한, PEG 단독은 지방세포에 전혀 독성이 없음을 확인하였다.

이들의 apoptosis 결과를 Fig. 12에 나타냈다. 또한 MTT 방법에 의한 세포생존율도 Fig. 13에 나타내는 바와 같이 CLA 단독은 농도 증가에 따라서 급격히 감소하는 반면 PCLA는 완만하였다. 반면에 PEG 2000의 경우 암세포에 대한 세포 생존율은 PCLA의 물의 용해성으로 인하여 Fig. 14, 15와 16에 나타낸 바와 같이 CLA에 비하여 현저히 감소하였다. Flu-CLA도 Fig. 17과 18에 나타낸 바와 같이 PEG 2000와 같은 경향을 나타냈다.

#### 사. PCLA의 지방세포 축적 조사

FACS 분석을 통해 얻어진 결과를 토대로 apoptosis 능력이 비슷했던 200 $\mu$ M을 선택하여 실험을 진행하였다. 이미 기존에 여러 논문들을 통해서 입증된 INS, Dex, 및 IBMX의 지방세포 축적증진효과에 PEG, CLA 그리고 PEGylated CLA가 negative하게 작용을 할 수 있는지 ORO 염색과 위상차 사진을 통해 관찰하였다.

지방세포 분화에 CLA 및 PEGylated CLA가 미치는 영향을 ORO 염색을 통해

확인한 결과 CLA와 유사한 지방입자 축적억제능력을 PEGylated CLA가 가지고 있음을 확인하였다. 또한, 중성지방 축적을 가속화 시키는 여러 호르몬들의 작용을 억제하여 지방입자 생성이 감소됐음을 위상차 사진을 통해 확인하였다.

이 결과를 Fig. 19에 나타냈다.

#### 아. PCLA의 지방세포 분화에 관련된 전사인자 조사

ORO 염색과 위상차 사진을 통해 입증된 CLA 및 PEGylated CLA의 지방세포 입자 축적억제 능력이 지방세포분화에 관계된 여러 전사인자들의 expression에 관여할 수 있는지 western blotting 방법을 통해 관찰하였다.

- 세포배양기간: 15일
- CLA 및 PEGylated CLA treatment 기간: 15일
- primary anti-body 반응시간: overnight
- secondary anti-body 반응시간: 2시간

지방세포 분화에 관련된 여러 transcription factor에 PEGylated CLA가 미치는 영향을 western blotting으로 확인한 결과 모든 단백질들의 expression에 관여하여 CLA 단독과 비슷한 경향을 나타냈으며 또한 key transcription factor PPAR $\gamma$ 2의 억제 효과가 탁월하여 지방세포 분화 억제에 관여하고 있음을 확인하였다.

Fig. 20에 그 결과를 나타냈고, Fig. 21에는 농도에 대한 영향을 나타냈다.

#### 자. PCLA의 지방 분해 측정

분화가 되고 있는 지방세포의 축적억제 능력이 입증된 PEGylated CLA가 이미 축적된 지방세포를 분해시킬 수 있는지 평가하기 위해 serum-starvation 방법을 통해 조사하였다.

- 세포배양기간: 15일
- serum-starvation 시간: 12시간
- CLA 및 PEGylated CLA treatment 시간: 12시간
- data: mean (n=3)  $\pm$  SEM
- \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

지방분해에 PEGylated CLA가 미치는 영향을 GPO-trinder kit으로 확인한 결과 isoproterenol이 없는 상태에서는 CLA와 유사한 glycerol 방출거동을 보이면서 지방분해에 관여하고 있음을 확인하였다. 그러나 isoproterenol이 있는 상태에서는 CLA 뿐만 아니라 PEG와 대조군과도 비슷한 glycerol 방출거동을 보였다. 이 결과로 인해 CLA 뿐만 아니라 PEGylated CLA 역시 호르몬들에 의해서 이루어지는 지

방분해 현상이 아닌 독자적으로 지방세포의 분해에 관여한다는 것을 알 수 있었다. 지방 분해 결과는 Fig. 22에 글리세롤 방출 결과는 Fig. 23에 나타냈다.

차. in vivo에서 PCLA의 항 비만 효과

5주 수컷 C57BL/6J (ob/ob) 비만 쥐에 먹인 사료의 배합 조성을 Table 1에 나타냈고 1%의 CLA를 사용하였다. 6주후에 몸무게를 보면 Table 2에 나타내는 바와 같이 비만 쥐는 CLA나 PCLA로 처리한 것보다 몸무게가 8.9g 증가하였다. CLA나 PCLA를 처리한 쥐의 복부지방과 간 무게는 Table 3에 나타내는 바와 같이 비만 쥐에 비하여 현저히 감소하였다.

Table 1  
Composition of experimental diets

Formula	AIG-93G	HF	HF-PEG (g%)	HF-CLA	HF-PCLA
Protein	20	20	20	20	20
Carbohydrate	64	46	46	46	46
Fat	7	24	24	24.2	24.2
Ingredient	g/kg				
Casein	200	200	200	200	200
L-Cystine	3	3	3	3	3
Corn starch	397	224	224	224	224
Sucrose	100	100	100	100	100
Dextrose	132	132	132	132	132
Cellulose	50	50	50	50	50
Soybean oil	70	70	70	70	70
Lard	0	173	173	173	173
TBHQ	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Mineral mix	35	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10	10
Choline bitartrate	3	3	3	3	3
PEG	—	—	28	—	—
CLA <sup>a</sup>	—	—	—	10	—
PCLA <sup>b</sup>	—	—	—	—	38

PEG, CLA and PEG-CLA (PCLA) were mixed to a basal AIN-93G diet enriched in fat (HF).

TBHQ, *t*-butylhydroquinone.

<sup>a</sup> CLA isomers (g/10g) containing: *trans*-10,*cis*-12 CLA 4, *cis*-9,*trans*-11 CLA 4, other isomers 2.

<sup>b</sup> CLA isomers in PCLA (g/38g) containing: *trans*-10,*cis*-12 CLA 4, *cis*-9,*trans*-11 CLA 4, other isomers 2, PEG 28.

몸통의 lipid량도 CLA나 PCLA 처리에 의하여 Table 4에 나타내는 바와 같이 비만 쥐에 비하여 감소하였다.

또한 CLA와 PCLA 처리한 쥐는 Table 5에서와 같이 비만 쥐에 비하여 LDLC와 TC가 현저히 낮았다. GPDH도 CLA와 PCLA 처리한 쥐에서 Table 6에서 나타낸 바와 같이 비만쥐에서 낮았다. PCLA로 처리한 쥐에서는 Fig. 24에 나타낸 바와 같이 비만 쥐보다 간에서의 MDA는 낮고 GSH값은 높은 결과를 가져왔다. Fig. 25에 나타낸 바와 같이 CLA와 PCLA도 처리한 쥐에서 비만 쥐보다 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2 수치가 낮은 결과를 나타냈다.

Table 2  
Body weight and food intake in mice fed HF diets containing CLA

	Normal	HF (added or not with PEG)	HF-CLA (added or not with PEG)
Body weight (g)			
Initial	20.7±0.4	20.3±0.8	20.1±0.3
Final	27.9±1.8 <sup>b,c</sup>	34.7±1.2 <sup>a</sup>	25.8±2.2 <sup>c</sup>
Food intake (g/day)	4.3±1.9	4.2±0.5	4.2±1.3
Feed efficiency	0.032±0.004	0.081±0.007 <sup>a</sup>	0.031±0.002 <sup>b</sup>
Weight gain (g/day)	0.17±0.08 <sup>b,c</sup>	0.34±0.05 <sup>a</sup>	0.13±0.04 <sup>c</sup>

Data were analyzed using one-way ANOVA followed by paired Student's *t* tests for multiple comparisons. Values (means±S.D.; *n*=10) not sharing a common superscript differ significantly (*P*<.05).

Table 3  
Organ weights in mice fed HF diets containing CLA

	Normal	HF (added or not with PEG)	HF-CLA (added or not with PEG)
Organ weight (g)			
Liver	1.403±0.321 <sup>a,b</sup>	1.643±0.312 <sup>a</sup>	1.210±0.320 <sup>b</sup>
Spleen	0.065±0.072	0.067±0.021	0.068±0.072
Kidney	0.065±0.013	0.061±0.019	0.060±0.017
Lung	0.109±0.044	0.109±0.097	0.110±0.017
AF	0.354±0.072 <sup>b,c</sup>	0.671±0.033 <sup>a</sup>	0.292±0.032 <sup>c</sup>

Data were analyzed using one-way ANOVA followed by paired Student's *t* tests for multiple comparisons. Values (means±S.D.; *n*=10) not sharing a common superscript differ significantly (*P*<.05).

Table 4  
Carcass composition in mice fed HF diets containing CLA

	Normal	HF (added or not with PEG)	HF-CLA (added or not with PEG)
Body composition (%)			
Lipid	28.17±6.74 <sup>a,b</sup>	31.57±1.70 <sup>a</sup>	25.32±3.29 <sup>b</sup>
Protein	17.02±0.80 <sup>a,b</sup>	15.28±0.44 <sup>b</sup>	18.79±0.32 <sup>a</sup>
Ash	3.48±0.91 <sup>a</sup>	2.79±0.12 <sup>a,b</sup>	3.55±0.18 <sup>a</sup>
Water	52.89±4.95 <sup>a</sup>	47.18±5.71 <sup>a,b</sup>	53.24±7.41 <sup>a</sup>

Data were analyzed using one-way ANOVA followed by paired Student's *t* tests for multiple comparisons. Values (means±S.D.; *n*=10) not sharing a common superscript differ significantly (*P*<.05).

Table 5  
Cholesterol levels and HOMA analysis of plasma in mice fed HF diets containing CLA

	Normal	HF (added or not with PEG)	HF-CLA (added or not with PEG)
Plasma			
HDLC (mg/dl)	51.7±3.2	50.2±8.4	49.4±6.3
LDLC (mg/dl) *	63.2±1.0 <sup>b,c</sup>	103.7±0.2 <sup>a</sup>	46.8±0.7 <sup>c</sup>
TC (mg/dl)	138.2±11.2 <sup>a,b</sup>	181.3±18.9 <sup>a</sup>	126.2±15.4 <sup>b</sup>
Insulin (μIU)	11.1±0.9 <sup>a,b</sup>	15.7±0.8 <sup>a</sup>	9.2±1.3 <sup>b</sup>
HOMA (μU/ml) **	2.6±0.1 <sup>b,c</sup>	5.4±0.4 <sup>a</sup>	1.7±0.3 <sup>c</sup>
Glucose (mM)	6.6±0.4 <sup>a,b</sup>	7.8±0.8 <sup>a</sup>	4.1±0.9 <sup>b</sup>

Data were analyzed using one-way ANOVA followed by paired Student's *t* tests for multiple comparisons. Values (means±S.D.; *n*=10) not sharing a common superscript differ significantly (*P*<.05).

Table 6  
GPDH and FAS activities of adipose tissue in mice fed HF diets containing CLA

	Normal	HF (added or not with PEG)	HF-CLA (added or not with PEG)
Enzyme activity			
GPDH in AF (U/mg of protein)	1373.3±29.4 <sup>a,b</sup>	1,534.7±39.5 <sup>a</sup>	916.3±53.1 <sup>b</sup>
FAS in AF (U/mg of protein)	1,710.7±63.3 <sup>a,b</sup>	993.4±81.7 <sup>c</sup>	1,959.9±83.1 <sup>a</sup>

Data were analyzed using one-way ANOVA followed by paired Student's *t* tests for multiple comparisons. Values (means±S.D.; *n*=9) not sharing a common superscript differ significantly (*P*<.05).

#### 카. PCLA의 지방세포 분화에 대한 기구 해명

PCLA를 지방 전구 세포에 처리하면 Fig. 26에 나타내는 바와 같이 CLA와 같은 경향으로 perilipin은 대조구보다 발현양이 감소하고 ADRP는 증가하였다.

PCLA를 지방 전구 세포에 처리하면 Fig. 27처럼 지방 분해에 의하여 oleic acid가 방출되고 시간이 증가하면 방출량이 증가하였다.

PCLA를 지방 전구 세포에 처리하면 Fig. 28처럼 adipo-cytokine인 IL-6과 IL-8이 시간에 따라 분비량이 증가하였다.

PCLA는 Fig. 29처럼 CLA와 같이 지방 전구 세포의 지방 분해에 있어서 시간에 따라 증가하면서 ERK를 활성화하였다. MEK/ERK MARK 신호전달은 Figs. 30과 31에서 나타내는 것처럼 UO126에 의하여 블록되었다. 반면에 Fig. 32에서 나타내는 것처럼 글리세롤의 방출량은 증가하나 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 는 UO126치리에 의하여 감소되었다.

PCLA는 Fig. 33에서 나타내는 바와 같이 CLA와 같은 경향으로 cAMP와 다른 신호전달체계를 나타냈다.

## 2절 제 1협동 과제

### 1. 연구방법 및 내용

가. 제조된 PEGylated CLA의 분석 방법 확립 및 소화에 의한 PEGylated CLA의 정성 검사

#### (1) PEGylated CLA의 분석 방법확립

CLA의 제조과정중 이성화 또는 산화로 인한 이성체생성 정도를 조사하기 위하여 GC를 이용하여 PEGylated CLA중 CLA함량을 분석하였다. 이과정중 PEG와 CLA의 안정적 분리가 요구되어 PEG-CLA중 CLA의 안정적 분리방법을 확립하였다. 이러한 방법을 토대로 여러 형태로 제조된 PEG-CLA중 CLA함량을 조사하여 제조품질을 검증하는데 이용하였다.

#### (2) 소화에 의한 PEGylated CLA의 안정성 검사

##### (가) 반추위 발효 안정성 검사

250ml 플라스크로 제작한 인공반추위에 반추위액과 McDougall's 인공 타액을 50: 50의 비례로 100ml과 무지 농후사료와 조사료(9:1)을 1g첨가하고 원제 CLA (40% c9t11CLA + 40% t11c12CLA)와 50mmol% PEG-CLA를 순CLA기준으로 사료의 1%수준으로 첨가한 뒤 shaking incubator에서 39℃, 120RPM으로 배양하면서 0, 2, 4, 8, 12, 24시간대별로 sample을 채취하여 분석을 실시하였다.

##### (나) 인공 위액(pH 2)내에서 안정성 검사

50ml 튜브에 인공 위액(pH2)에 원제 CLA (40% c9t11 CLA + 40% t11c12 CLA)와 50mmol% PEG-CLA를 순CLA기준으로 250mg의 수준으로 첨가한 뒤 shaking incubator에서 39℃, 120RPM으로 배양하면서 0, 2, 4, 8, 12, 24시간대별로 sample을 채취하여 CLA분석 실시하여 CLA분해 정도를 조사하였다.

나. 흰쥐(SD rat)에 있어서 PEGylated-CLA투여가 CLA의 혈중 흡수 및 유선/ 지방조직으로의 전이에 미치는 영향

#### (1) 혈중 흡수에 미치는 영향

○ 공시동물: 평균체중 350g Sprague-Dawley (SD) rat 수컷 12마리, 각 처리당 3마리

○ 시료준비: CLA(원제 80% 함유), PEG-CLA(원제 40%함유)

○ 처 리 구:

- CLA 처리구: 300mg 80%CLA(240mg CLA포함)을 oral injection.

- PEG-CLA 처리구: 600mg PEG-CLA(240mg CLA포함)을 oral injection.

○ 투여 및 sampling 방법:

- 6시간 절식후 oral injector를 이용하여 기도에 유입되지 않도록 조심스럽게

각 처리rats에 투여 후 0, 2, 4h 각 시간별로 blood채취 후 serum 분리하여-80℃에 저장.

○ 조사항목:

- Serum 중 cis-9,trans-11 CLA, trans-10,cis-12 CLA함량측정,  
(지방산 분석은 연구 1과 동일한 방법으로 추 GC분석 실시)

(2) 유선조직으로의 전이 연구

○ 공시동물: 비유중 흰쥐(SD) 15마리 (처리당 5마리)

○ 시료 준비: CLA , PEG, PEG-CLA

○ 처 리 구:

- 대조구: Normal diet (e-Joeun Pet Feed Co., Ltd, Seoul, Korea)
- CLA구: CLA 첨가된 사료 (사료중 1% 순 CLA첨가)
- PEG-CLA구: PEG-CLA 첨가된 사료(사료중 1% 순 CLA첨가)

○ 투여방법: 시험 전 7일간 normal사료를 비유 흰쥐에게 자유 급식시켜 사료섭취량을 측정하고 각 상태를 관찰한다. 시험 전 7일간 측정된 사료섭취량에 의하여 시험 시작할 때 적정 급여량 수준을 결정하여 사료와 물을 7일간 자유채식

○ 사료 준비 : 기초사료내 CLA, PEG 및 PEG-CLA를 잘 혼합한뒤 특수가공법을 이용하여 열처리 하지 않고 펠렛형태로 시험사료를 제조

○ 샘플링 항목 및 방법:

- 시험 시작 7일째 heparin포함된 DMEM buffer로 perfusion한 후 외과수술 방법으로 유선, 복강 지방을 채취

○ 조사항목

- 시험 개시 및 종료 시 체중을 측정

- 유선조직 중 지방산 함량(total fatty acid; cis9, trans11 CLA와 trans10, cis12 CLA; total CLA)

(3) 지방조직으로의 전이 연구

○ 공시동물: 8주령 Sprague-Dawley (SD) male rat (평균체중 250±10g)

○ 시험구 배치

- 대조구: Normal diet

- CLA 처리구: 80% CLA 4.5%첨가 (순 CLA 3.6%함유)

- PEG-CLA 처리구: PEG-CLA 9%첨가 (순 CLA 3.6%함유)

○ 공시동물 관리:

- 처리구: 무계에 의하여 처리구별 각 4마리씩 선발관리

- 사 육: 본 실험실시 전 Normal diet를 급이 실시 사료 섭취량 및 증체량 조사 (Previous test: 2-3 일간 실시)

○실험기간: 5 일간

○시료채취:

- 혈액: 실험후 6일째 심장을 통하여 헤파린 처리된 혈청채취 튜브에 채취하여

4℃ 3000 rpm, 15분간 원심분리 후 상층 액을 취한 뒤 지방산추출 전까지 -80℃에 보관

- 복부지방: 실험후 6일째 채혈과 함께 외과적 수술 방법으로 복강지방 샘플을 채취하여 무게를 측정하고 액체질소에 즉시 냉동시킨 후 지방산추출 전까지 -80℃에 보관.

○사료와 샘플에 지방산 추출 및 분석 : 연구1의 조건과 동일하게 실시

다. PEGylated CLA의 유산양에 투여시 유중 CLA 전이 정도 평가

(1) 공시동물: 유 산양(Saanen lactating goat) 6마리 (3처리 4반복)

(2) 사료 준비 : Normal diet내 CLA 및 PEG-CLA를 잘 혼합한 뒤 특수가공법을 이용하여 열처리 하지 않고 펠렛형태로 시험사료를 제조하였다.

(3) 처 리 구:

- 대조구: Normal diet (tallow포함)

- CLA구: CLA 첨가된 사료(사료중 3.4% CLA첨가)

- PEG-CLA구: PEG-CLA 첨가된 사료(사료중 3.4% CLA첨가)

(4) 사양 관리: 시험 전 8일간 비유량을 측정하고 NRC 사양표준에 의하여 사료를 급여하고 시험 개시전 8일간 사료와 물을 자유채식 시켰다.

(5) PEG-CLA 투여 방법: 시험 개시 후 4일 동안 아침, 저녁 착유 후에 각 사료를 처리구별로 급여 하였다.

(6) 산양유 샘플채취:

산양유: 착유기를 이용하여 일당 600-1,600g의 젖 샘플을 채취하고 지방산 추출 전까지 -80℃에 보관하였다.

(7) 조사항목

- 시험 개시 및 종료 시 체중을 측정

- 유성분 및 유중 CLA함량 분석

라. PEGylated CLA첨가사료 급여가 한우의 육성상 및 CLA 축적 정도조사

(1) 공시축 : 30개월령 출하 1개월 전 30두(평균체중 582.5 kg)

(2) 시험설계

- 대조구(10두), PEG-CLA구(PEGylated CLA, 10두), Ca-CLA구(Calcium Salt CLA, 10두)

- A, B처리구 각 10두씩 특별사료를 30일간 급여 후 도축

항목	대조구	PEG-CLA	Ca-CLA
사료구성	기초사료	가초사료+ 2% 피복복합제 (0.4% 순 CLA)	가초사료+ 1% 피복복합제 (0.4% 순 CLA)
시험두수	10	10	10

- (3) 시험기간 : 1개월(30일)간
- (4) 시험장소 : 강원도 평창 강 환덕농장
- (5) 샘플채취 : 도축후 채끝부위 등심 지육 1kg 샘플 채취
- (6) 조사항목
  - 개시체중, 종료체중, 사료섭취량, 일당증체, 초음파 측정
  - 출하등급 : 육질/육량 등급, 등심단면적, 근내지방도
  - CLA 함량 : 등심 중 CLA 함량

## 2. 연구결과 및 고찰

가. 제조된 PEGylated CLA의 분석 방법 확립 및 소화에 의한 PEGylated CLA의 정성 검사

### (1) PEGylated CLA의 분석 방법확립

- 다양한 형태의 PEGylated CLA의 함량 분석결과

80% CLA를 이용한 32mmol% 와 50mmol% CLA를 각각 130℃ 및 150℃제조조건으로 pegylation한뒤 CLA함량을 hexan또는 chloroform로 추출방법을 달리하여 분석한 결과는 아래 Table 7과 같다.

Table 7. CLA concentration on different condition for CLA analysis.

Sample	CLA c9,t11	CLA t10,c12	CLA t9,t11	CLA (isomer)	Total CLA
	----- % -----				
80% CLA hexane	30.91	30.65	7.58	5.50	72.47
80% CLA chloroform	38.05	38.87	1.38	0.00	81.91
32mmol% PEG-CLA hexane	28.46	25.92	13.06	5.01	71.24
32mmol% PEG-CLA chloroform	33.00	31.05	8.49	2.40	76.75
50mmol% PEG-CLA chloroform	33.23	38.29	1.87	2.32	76.56
150℃ PEG-CLA chloroform	29.15	31.89	4.86	1.45	69.49
130℃ PEG-CLA chloroform	30.61	31.35	5.15	5.34	71.22

PEG-CLA : PEGylated CLA

분석결과 PEG-CLA중 CLA추출에 있어서는 Chloroform을 이용하는 것이 Pegylation된 CLA를 추출함에 있어 보다 효율적임이 확인되었다. 아울러 CLA함량을 50mmol% 수준까지 증가시켜도 CLA의 함량은 32mmol%보다 크게 감소되지 않았음을 확인하였다. 제조온도조건에 있어서 150℃와 130℃사이 다르지 않음이 입증되어 이후 실험에는 가능한 한 다량의 CLA를 함유하고 낮은 온도에서 제조가

가능한 것이 제조 및 이용 시 유리한 점을 감안하여 볼 때 130°C에서 50mmol% CLA를 함유한 PEG-CLA제조가 유리할 것으로 사료된다.

(2) 소화에 의한 PEGylated CLA의 안정성 검사

(가) 반추위 발효 안정성 검사

사료 중 free CLA기준으로 1%를 첨가한 CLA 및 PEG-CLA구에 있어서 반추위 액중 CLA 분해율을 조사한 결과를 Table 8에 나타내었다.

Table 8. The percentage of CLA, derived from the experimental diet through the *in vitro* fermentation

Fatty acid	Fermentation time (hr)						SE
	0	2	4	8	12	24	
CLA(cis9, trans11)							
Control (%) <sup>1</sup>	100	113.9	84.8	ND	ND	ND	0.23
CLA (%) <sup>1</sup>	100	45.7	14.2	11.5	11.7	6.4	0.15
PEG-CLA (%) <sup>1</sup>	100	48.1	28.6	23.7	24.5	23.2	0.12
CLA(trans10, cis12)							
Control (%) <sup>1</sup>	100	201.1	326.4	ND	ND	ND	0.55
CLA (%) <sup>1</sup>	100	1.1	1.9	ND	ND	ND	0.17
PEG-CLA (%) <sup>1</sup>	100	25.5	10.0	7.2	7.1	4.3	0.15

<sup>1</sup> % is CLA concentration after fermentation / CLA concentration at 0hr X 100

표에서 보는 바와 같이 발효 2시간대에 t10c12 CLA의 분해율이 free CLA처리구에 비하여 PEG-CLA처리구가 24.4%의 분해가 덜 되는 것으로 나타났으며, 4시간대에서는 c9t11 CLA경우 14.4%, 8시간대에서 12.2%, 24시간대에 16.8%가 free CLA처리에 비하여 인공 반추위액에 의한 발효에 의해 PEG-CLA의 경우 반추위 보호효과가 있음이 확인되었다. 아울러 t10c12CLA의 경우 free CLA처리의 경우 발효 8시간에 모두 분해되는 반면에 PEG-CLA처리구의 경우 발효 8시간대에 92.8%의 분해율을 보여 PEG에 의해 free CLA보다 반추위 보호 효과가 더 있음이 확인되었다. 이는 PEG에 의한 반추위액에 용해성(유화현상)을 증가시켜 반추위 미생물에 의한 분해를 최소화했음으로 추측되어진다.

(나) 인공 위액(pH 2)내에서 안정성 검사

pH2 인공위액에서 free CLA는 2, 4, 8, 12, 24hr 에 40%이상이나 분해되었으나 PEGylated CLA에서는 분해율은 30%도 도달하지 않는다. 그러므로 PEG-CLA는 free CLA 보다는 위(胃)내에서 더 우수한 안정성을 갖고 있으며 상대적으로 같

은 양의 CLA보다 흡수율이 더 우수 할 것으로 기대된다. (Table 9)

Table 9. The percentage of CLA, derived from the experimental diet through the artificial gastric juice

Items	Time(h)	0	2	4	8	12	24
		CLA	Degradation(%) <sup>a</sup>	0	54.72	53.67	42.37
PEG-CLA	Degradation(%) <sup>b</sup>	0	10.17	12.38	25.70	10.79	11.42

<sup>a</sup>(첨가한 CLA시료량-각hr 의 CLA함량)/첨가한 시료량 x 100

<sup>b</sup> hr별로 PEG-CLA중 degradation된 CLA함량/첨가한 PEG-CLA중 CLA함량 x 100

<sup>\*</sup>(0hr 의 CLA함량-2, 4, 8, 12, 24hr CLA함량) /0hr 피복체 무게 x 100

나. 흰쥐(SD rat)에 있어서 PEGylated-CLA투여가 CLA의 혈중 흡수 및 유선/ 지방조직으로의 전이에 미치는 영향

#### (1) 혈중 흡수에 미치는 영향

Figure 34-36을 보면 일반 흰쥐에 액체형 PEG-CLA와 CLA을 투여하여 혈중에 CLA 흡수율을 조사한 결과 혈중에 cis-9, trans-11 CLA 함량은 PEG-CLA 처리구는 2h에서 4시간간격으로 증가하는 양상을 나타냈지만 CLA 처리구는 2h에서는 증가하다가 4시간에는 감소하는 양상을 나타냈다. 아울러 투여 2h, 4h모두에서 CLA처리구 보다 PEG-CLA구에서 증가하는 양상을 보였고 특히 4h에서 PEG-CLA 처리구는 CLA 처리구보다 유의한 증가를 보였다 (P<0.05). 혈중에 trans-10, cis-12 CLA의 함량도 마찬가지로 PEG-CLA 처리구는 2h에서 4시간사 의에도 증가하는 반면 free CLA 처리구는 감소하며 4시간에서 PEG-CAL처리구의 혈중에서 trans-10, cis-12 CLA함량이 free CLA처리구보다 유의성 차 있게 증가 하였다 (P<0.05). 이러한 이유로 혈중 Total CLA함량도 동일하게 PEG-CLA구가 free CLA구보다 혈중 CLA함량이 높게 나타났다. 이러한 결과는 CLA의 PEGylation은 CLA의 소장내 흡수효율 또는 흡수량을 증가시킬 수 있음을 입증하고 있다.

#### (2) 유선조직으로의 전이 연구

사료 중 free CLA기준으로 급여 사료중 1%를 첨가한 CLA 및 PEG-CLA구에 있어서 유선으로 CLA전이 정도를 조사한 결과 대조구에서는 CLA가 검출되지 않았으나 CLA 및 PEG-CLA구에서는 26.83, 71.89 mg/유선조직 100g 수준으로 PEG-CLA처리구가 free CLA 처리구에 비하여 2.5배 이상 검출되었다 (Table 10). 아울러 CLA 및 PEG-CLA급여 비유 흰쥐에 있어서 성장성적 및 새끼흰쥐의 체중을 측정한 결과 일당증체량은 비유중인관계로 뚜렷한 차이를 보이고 있지 않지만 새끼 생시체중에 있어서는 대조구에 비하여 유의한 증가를 보였다 (Table 11).

Table 10. Composition of CLA in mammary gland tissue of lactating SD rat fed PEGylated CLA

Fatty acids	Control	CLA	PEG-CLA
	----- mg/100g of Total tissue -----		
c9, t11-CLA	ND	13.62	34.46
t10, c12-CLA	ND	13.21	37.26

Number of animals per treatment = 5

ND : not detectable

Table 11. Effect of PEGylated CLA administration on the growth performance in lactating SD rat <sup>1)</sup>

Item	Control	CLA	PEG-CLA	SEM <sup>3)</sup>
Initial body weight (g/d) <sup>1)</sup> .	339.74	356.07	356.05	4.602
Final body weight (g/d) <sup>1)</sup> .	326.96 <sup>a</sup>	347.40 <sup>ab</sup>	362.37 <sup>b</sup>	5.055
Daily liveweight gain (g/d) <sup>1)</sup> .	-1.83	-1.24	0.9	0.505
Feed intake (g/d) <sup>1)</sup> .	44.73	47.75	51.26	1.364
Offspring liveweight gain (g/d) <sup>2)</sup> .	22.18 <sup>a</sup>	26.62 <sup>b</sup>	24.57 <sup>b</sup>	0.483

a,b, Means in the same row with different superscripts differ significantly(P < 0.05).

1) Number of animals per treatment = 5

2) Number of animals per treatment = 10

3) SEM : standard error of means.

이상의 결과는 PEG-CLA는 free CLA보다 소장에서의 흡수가 용이하며 조직 중으로 전이가 2.5배 이상 증가되는 것으로 확인 되었다.

### (3) 지방조직으로의 전이 연구

시험 결과 처리구별 사료섭취량은 free CLA구와 PEG-CLA구에서 동일한 사료 섭취량을 보였으며 시험 기간 동안 체중변화에서도 처리구간 유의성차가 나타나지 않았다 (Table 12, 13).

Table 12. Feed intake level during experiment period

	Food intake (g/d)	CLA intake (g/d)
Normal	25±1	0
CLA	25±1	1.125±0.023
PEG-CLA	25±1	1.125±0.023

Data are average±SE of 4 heads

Table 13. Changes in body weight (g) during experiment period in SD rat fed PEGylated CLA

	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day
Normal	280.3±2.56	285.8±5.08	286.9±5.85	289.6±3.28	296.9±4.4	309.7±5.3
CLA	279.8±3.99	280.4±5.44	283.1±5.51	288.3±8.75	297.5±9.91	302.4±9.56
PCLA	279.6±3.7	278.8±3.43	287.3±4.42	293.5±3.83	303.8±5.40	312.1±4.65

Data are average±SE of 4 heads

하지만 Table 14에서 보는 바와 같이 복강지방함량에서 대조구에 비하여 CLA구 및 PEG-CLA구가 유의성 있는 감소를 보였으나 (P<0.05), CLA구와 PEG-CLA구 사이에는 통계적 유의성차가 관찰되지 않았다.

Table 14. Change in the visceral adipose tissues in SD rat fed PEGylated CLA

	Normal	CLA	PEG-CLA
Fat mass(g)	5.0±0.17 <sup>a</sup>	3.2±0.76 <sup>b</sup>	4.1±0.57 <sup>b</sup>

Data are average±SE of 4 heads

a, b different letters denote a difference (p<0.05) in means

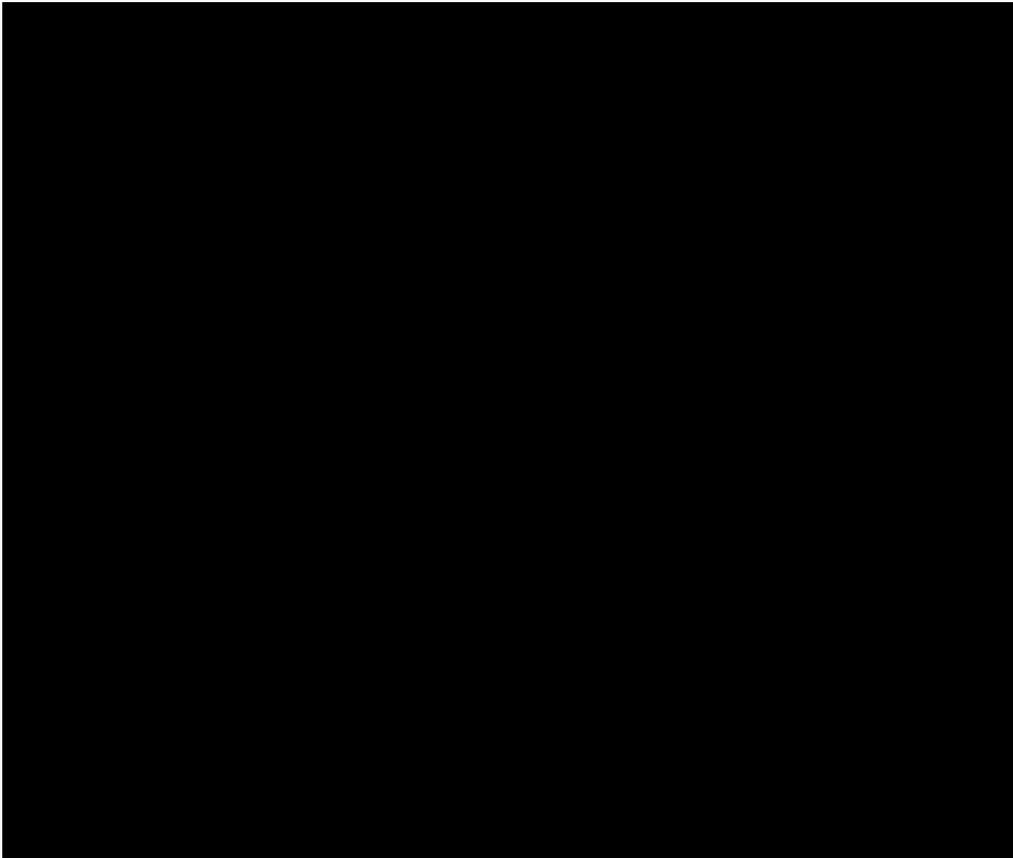
ND, not detected

최근 연구에 의하면 CLA의 주요한 생리활성 이성체는 cis-9, trans-11 CLA와 trans-10, cis-12 CLA이며 이들은 서로 다른 생리활성을 가지고 있다고 보고하고 있다. 이들 CLA 이성체중 cis-9, trans-11 CLA는 항암 작용이 있는 반면 trans-10, cis-12 CLA는 강력한 지방합성 억제 작용이 있다. 반추동물 유래 생산물에서 cis-9, trans-11 CLA의 함량은 각각 80-90%이나, trans-10, cis-12 CLA의 함량은 20-30%이다. 그렇지만 본 연구에서 사용된 CLA는 cis-9, trans-11 CLA : trans-10, cis-12 CLA가 1:1비율로 t10c12 CLA 함량이 c9t11 CLA와 동일한양을 투여하였다. 이와 같은 이유로 섭취된 trans-10, cis-12 CLA의 작용에 의하여 복강지방의 감소에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다. 이는 급여된 free CLA 및 PEG-CLA가 흰쥐 체내 흡수되었음을 간접적으로 증명하고 있다. 이러한 결과는 투여 6일째 채취한 복강 지방 중 CLA 함량을 조사한 결과 대조구에 비하여 CLA 및 PEG-CLA 처리구에 있어서 유의한 증가 (P<0.05)를 보여 이를 입증하고 있다. 특히 Figure 35에서 나타낸바와 같이 CLA구에 비하여 PEG-CLA처리구중 복강 지방 중 trans-10,cis-12 CLA 함량이 유의한 증가(P<0.05)가 확인 되었는데 이는 순수 CLA에 비하여 PEG-CLA의 사료 내 투여가 흰쥐의 지방 조직 내 전이를 증가시킴을 시사하고 있다.

다. PEGylated CLA의 유산양에 투여 시 유중 CLA 전이 정도 평가

사료 중 순 CLA기준으로 3.4%를 첨가한 CLA 및 PEG-CLA구에 있어서 유 산 양 성장성적 및 유중 성분을 측정한 결과 시험전과 후의 함량차이를 볼 때 대조구에 비하여 CLA 및 PEG-CLA구의 경우 감소하는 경향을 보였다 (Table 15).

Table 15. Effect of the supplementation of PEG-CLA in feed on milk composition in Saanen goats.



\* Increment = After experiment - before experiment

Number of animals per treatment = 4

특히 유단백, 유지방, 유당의 함량 중 유지방 함량의 감소가 크게 나타났다. 보고에 의하면 Dhiman(1999)등은 extruded soybean과 extruded cottonseed를 사료에 첨가한 식물성 지방함량이 4.8%인 TMR 사료를 비유중인 홀스타인 젖소에 각각 급여하였을 때 유지방의 함량이 감소되었다고 하였다. 아울러 Dhiman(1999)등의 연구에서는 유중의 C<sub>18:1</sub>의 증가시 유지방 함량이 감소되는 것으로 나타났다. Palmquist (1986)는 비유우에 100g의 지방을 급여하면 유단백질의 함량이 0.03% 감소를 확인하기도 하였는데, 이러한 결과는 Dhiman(1999)의 연구에서도 확인되었

다. 이들의 연구 결과를 보면 비유우에 100g의 유지방을 급여할 경우 유단백질 함량이 평균 0.045% 감소되었다. 특히 농후사료 위주의 급여는 유중 trans-10, cis-12 CLA의 함량을 증가 시켰으며 증가된 trans-10, cis-12 CLA는 유선에서 FAS의 발현을 유의성 있게 억제하였으며 LPL과 SCD의 발현도 억제하는 경향을 나타냈다고 했다. 또한 mouse를 이용한 많은 실험결과를 보면 CLA의 급여는 혈중 TG와 NEFA의 농도를 낮추는 작용이 있으며 간세포에서 TG의 합성과 분비를 억제한다고 하였다.

Table 16. Effect of the supplementation of PEG-CLA in feed on blood metabolites at day 2 in Saanen goats.

	Initial	Day 2		
		Control	CLA	PEG-CLA
HDL	166.3 ± 11.43	163.2 ± 17.14	155.5 ± 5.50	172.8 ± 12.26
LDL	39.3 ± 4.06	34.3 ± 4.61	33.0 ± 4.95	35.8 ± 5.28
T-Cho	135.7 ± 9.87	129.3 ± 15.12	120.5 ± 7.04	137.8 ± 12.59
TG	14.0 ± 0.82	13.8 ± 1.65	13.8 ± 3.64	14.3 ± 3.64
Glu	74.0 ± 2.27	71.8 ± 2.50	67.3 ± 1.49	71.3 ± 3.20
NEFA	86.0 ± 12.37	100.3 ± 13.29	95.8 ± 12.66	110.0 ± 18.51

Data are mean±SE

Table 16, 17에서 나타낸 것과 같이 지방대사 관련 혈중 대사산물 분석결과에서는 뚜렷한 통계적 유의차는 보이지 않지만 NEFA의 경우는 PEG-CLA의 경우 대조구(P=0.053) 및 CLA구(P=0.069)에 비하여 높은 결과를 보였다. 이는 CLA의 지방분해 효과에서 기인된 결과라 사료된다.

Table 17. Effect of the supplementation of PEG-CLA in feed on blood metabolites at day 4 in Saanen goats.

	Initial	Day 4		
		Control	CLA	PEG-CLA
HDL	166.3 ± 11.43	162.2 ± 17.72	154.3 ± 7.39	171.5 ± 13.11
LDL	39.3 ± 4.06	33.5 ± 5.17	30.5 ± 3.71	37.3 ± 4.75
T-Cho	135.7 ± 9.87	128.3 ± 16.14	118.3 ± 6.34	138.8 ± 11.82
TG	14.0 ± 0.82	13.5 ± 1.04	15.5 ± 0.65	15.5 ± 1.85
Glu	74.0 ± 2.27	67.5 ± 3.50	69.0 ± 1.22	65.0 ± 2.35
NEFA	86.0 ± 12.37	110.8 ± 12.50	109.5 ± 15.02	149.3 ± 9.94

Data are mean±SE

Table 15에서 유지방 감소결과는 그 결과를 뒷받침하는 결과라 사료된다. 물론 CLA구에서도 지방 감소가 더 크게 나타났지만 NEFA 농도는 대조구에 비하여 큰 변화를 보이지 않은 결과는 좀 더 확인되어야할 부분이기도 하다. 전반적인 수치에 있어서 대조구에 비하여 CLA 및 PEG구에서 본 연구에서 유중 CLA 함량 변화를 조사한 결과 순 CLA의 처리는 대조구에 비하여 유중 CLA 함량의 변화를 보이지 않았으나 PEG-CLA 처리구의 경우 대조구와 CLA의 0.8 mg/milk fat 100g에 비하여 PEG-CLA 구에서 1.3 mg/milk fat 100g 수준으로 PEG-CLA처리구가 대조구 및 free CLA 처리구에 비하여 1.5배 이상 높게 검출되었다 (Table 18). 이는 반추동물에 있어서 순 CLA처리는 반추위내에서 거의 대부분 분해가 이루어져 하부 소화기관에서의 흡수량이 적은 결과라 사료되며, 반면에 PEG-CLA의 경우 PEG결합에 의하여 반추위내 미생물 공격을 효과적으로 방어함은 물론 유화작용에 의한 소장에서의 소장 점막상피세포로의 흡수를 촉진시키는 기능을 함께 발휘함으로써 free CLA 처리구에 비하여 유중 CLA함량을 증가시켰을 것으로 사료된다.

Table 18. CLA composition in goat milk<sup>1</sup> (g/100g fat)

Days (dose of CLA g /d)	Fatty acid	Control	Treatment	
			CLA diet	PEG-CLA diet
Day 0(0g)	CLA cis9, trans11	0.7±0.15	0.7±0.12	0.7±0.17
	CLA trans10, cis12	ND <sup>3</sup>	ND	ND
	total CLA	0.7±0.15	0.7±0.12	0.7±0.17
Day 2(12.5g)	CLA cis9, trans11	0.8±0.12	0.8±0.14	1±0.2
	CLA trans10, cis12	ND	ND	0.2±0.04
	total CLA	0.8±0.12 <sup>b</sup>	0.8±0.14 <sup>b</sup>	1.1±0.13 <sup>a</sup>
Day 4(12.5g)	CLA cis9, trans11	0.8±0.03 <sup>b</sup>	0.8±0.15 <sup>b</sup>	1.1±0.17 <sup>a</sup>
	CLA trans10, cis12	ND	ND	0.3±0.08
	total CLA	0.8±0.03 <sup>b</sup>	0.8±0.15 <sup>b</sup>	1.3±0.19 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> values are the mean ± SE for 4 goats.

<sup>a, b</sup>different letters denote a difference (p<0.05)in means between diets within a row.

ND, not detected.

결론적으로 PEG-CLA는 순 CLA보다 반추위내 CLA 분해율이 12%를 감소되고 유선으로 전이를 용이하게 하여 유중 CLA 함량이 1.5배 이상 증가되는 것으로 입증되었다.

라. PEGylated CLA첨가사료 급여가 한우의 육성장 및 CLA 축적 정도조사

Table 19. Formulation (% As Fed) and chemical composition (% DM) of compound feed<sup>1)</sup> in *in vivo* trial.

	Control	PEG-CLA	Ca-CLA
<i>Formulation</i>			
Barley	5.0	5.0	5.0
Wheat	10.0	10.0	10.0
Wheat mill run	8.5	8.5	8.5
Soy hulls	12.0	12.0	12.0
Salt	0.66	0.66	0.66
Molasses	4.0	4.0	4.0
Whole cottonseed	3.3	3.3	3.3
Corn	4.7	4.7	4.7
MgO (50%)	0.2	0.2	0.2
Soy oil	1.0	-	-
CLA-Ca Salt	-	-	1.0
CLA-PEG	-	2.0	-
Flaked corn	25.0	25.0	25.0
Palm kernel meal	7.0	7.0	7.0
Condensed molasses solubles	0.4	0.4	0.4
Glycerin	2.0	1.0	2.0
Corn gluten feed	12.0	12.0	12.0
Limestone	0.43	0.43	0.43
Corn gluten	0.14	0.14	0.14
Soy bean meal	3.5	3.5	3.5
Mineral premix	0.13	0.13	0.13
Vitamin premix	0.04	0.04	0.04
Total	100	100	100
<i>Chemical composition</i>			
DM	87.32	87.29	87.32
Ash	5.08	5.09	5.10
Crude protein	13.7	13.7	13.7
NDF	27.49	27.49	27.49
Ether extract	5.08	5.11	5.05
Calcium	.66	.66	0.67
Magnesium	.39	.39	.39
Phosphorus	.46	.46	.46
Vitamin A, IU/g	3.9	3.9	3.9
Vitamin D, IU/g	1.43	1.43	1.43
Vitamin E, IU/kg	127.7	127.7	127.7

<sup>1)</sup> Compound feed was provided ad libitum and average dry matter intake was 9.02kg/day/head.

In addition, 1kg of rice straw was provided to each animal daily.

The Ca-CLA (no brand name) was produced and purchased from Humass Ltd. Seoul, Korea.

Table 20. Fatty acid composition in experimental feed

Fatty acid	Fatty acid composition (%)		
	Control	PEG-CLA	Ca-CLA
Caprylic acid(8:0)	0.74	0.05	0.09
Capric acid(10:0)	0.68	0.22	0.23
Lauric acid(C12:0)	8.67	5.15	5.36
Myristic acid(14:0)	3.10	4.76	4.13
Palmitic acid (16:0)	13.12	12.68	12.51
Palmitoleic acid (16:1)	0.35	0.32	0.27
Stearic acid (18:0)	4.19	3.81	3.65
Elaidic acid(18:1,trans-9)	21.98	21.77	21.73
Linolelaidic acid (18:2,trans-9,12)	35.33	31.63	31.93
Linoleic acid (18:2,cis-9,12)	0.32	0.22	0.22
Arachidic acid(C20:0)	11.51	9.14	9.36
CLA (c9,t11) (18:2)	ND	4.64	4.76
CLA (t10,c12) (18:2)	ND	5.60	5.76
Total CLA	ND	10.24	10.52

ND : not detectable

Table 21. Effect of a supplementation of PEG-CLA in feed on the carcass characteristics in Hanwoo steers.

Items	Experimental period					
	Initial (ultra sound)			Final (slaughter)		
	Control	PEG-CLA	Ca-CLA	Control	PEG-CLA	Ca-CLA
Body weight(kg)	582±4	583±4	582±3			
Marbling score	3	3	3			
Back fat thickness(mm)	8±1	8±1	9±1			

Data are mean±SE

본 연구에서는 PEG-CLA 형태로 사료중 첨가된 CLA가 거세한우 등심 조직내 이행정도를 측정하여 CLA 고함유 우육생산 여부를 시험하기 위하여 26개월령 출하 거세한우 30두 (평균체중 582.5 kg)를 이용하여 1개월간 사양시험을 실시하였다. 현재 사양시험은 시험축 선정에 있어서 출하전 1개월 거세한우 확보에 있어서 많은 문제점이 발생 대상농가의 비협조로 조기 출하등 문제가 발생하여 2009년 3월에야 실험을 실시하게 되었다. 따라서 본 보고서에서는 등심 조직내 CLA함량에 대한 자료는 제공되지 못하였으나 한우 비육 말기 펠렛 사료 내 첨가시 발생하는

CLA의 파괴를 최소화하기 위하여 여러 가지 방법 시험하여 효과적인 첨가방법을 구축하였고, 사양시험에 대한 육성상에 대한 결과는 5월중 분석이 완료될 것으로 사료되며 그 동안의 결과를 비취어 볼 때 긍정적인 결과가 기대되어진다.

이상의 연구를 통하여 40%의 순 CLA함유 80% CLA를 PEG와 함께 130℃에서 PEGylation을 통하여 제조된 PEG-CLA는 반추위 및 4위내 분해 안정성이 free CLA보다 뛰어난 것은 물론 혈중흡수 정도도 우수한 것으로 판명되었다. 아울러 이러한 물성이 유산양유 및 흰쥐의 지방조직으로 전이량을 증가시킨 것을 볼 때 반추동물의 유, 육은 물론 단위동물의 CLA 고함유 축산물 생산을 위한 첨가제로의 활용이 기대되어진다.

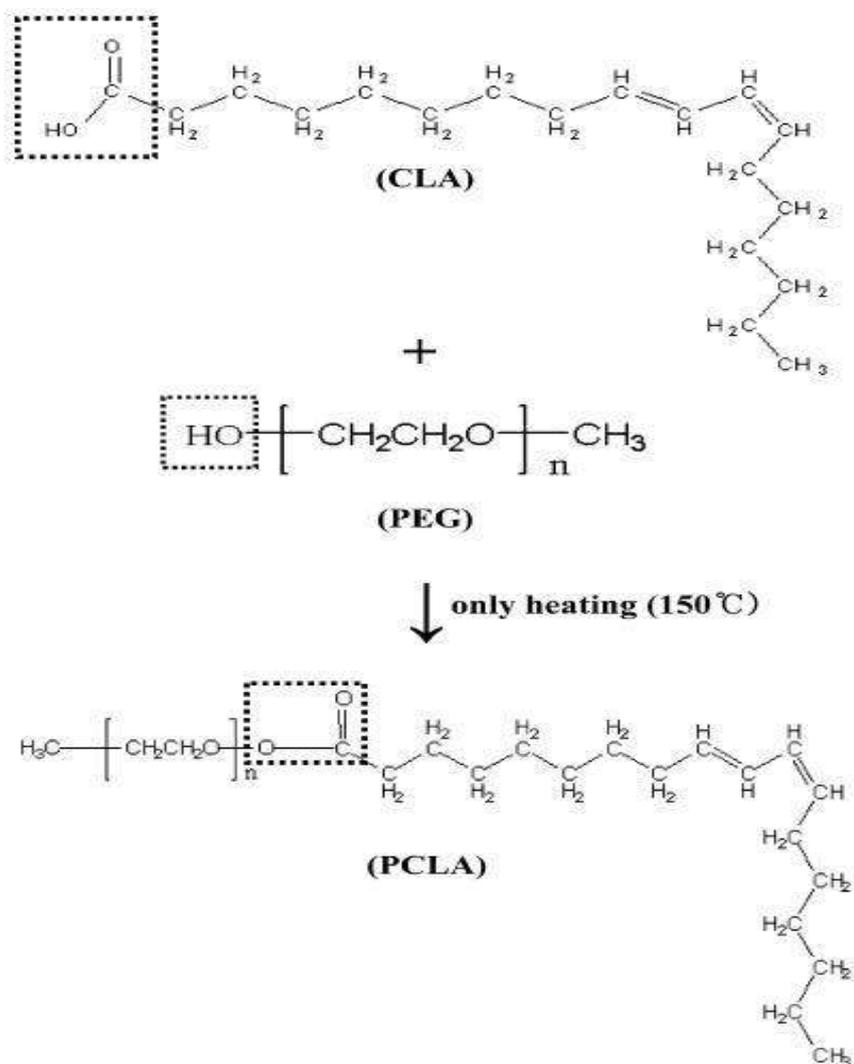


Fig 1. The reaction scheme of PCLA. The CLA was simply coupled to PEG at the melting state without solvents or catalysts through ester linkage between the carboxylic group of CLA and the hydroxyl group of PEG.

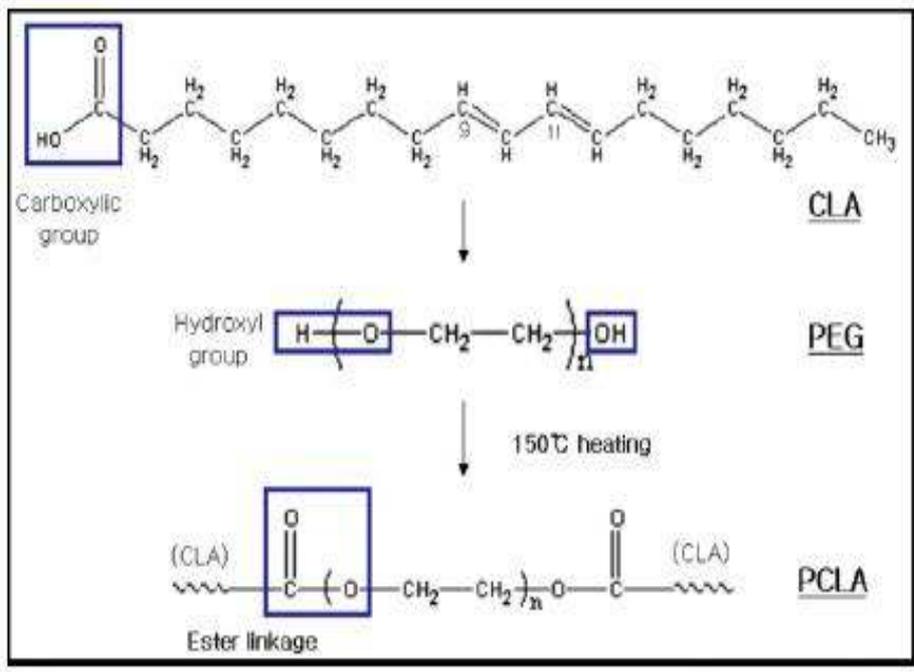


Fig 2. The reaction scheme of PCLA. The CLA was simply coupled to PEG at the melting state without a solvent or a catalyst and handled under a dry nitrogen condition.

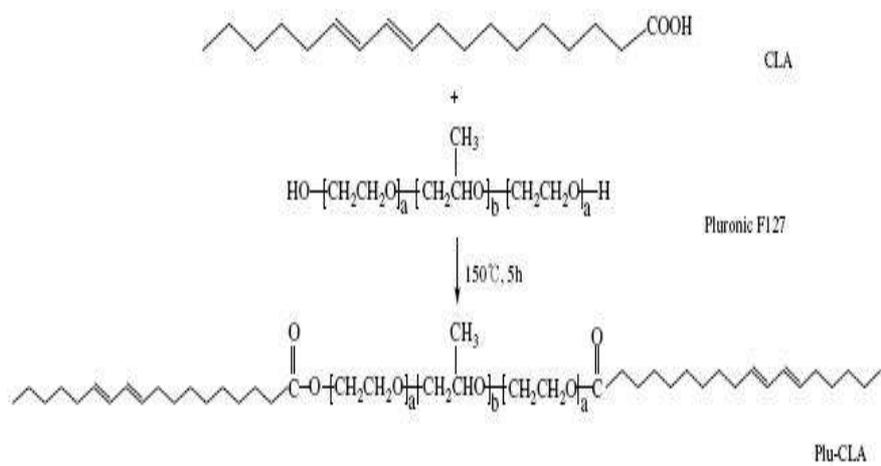


Fig 3. Synthesis scheme of Plu-CLA.

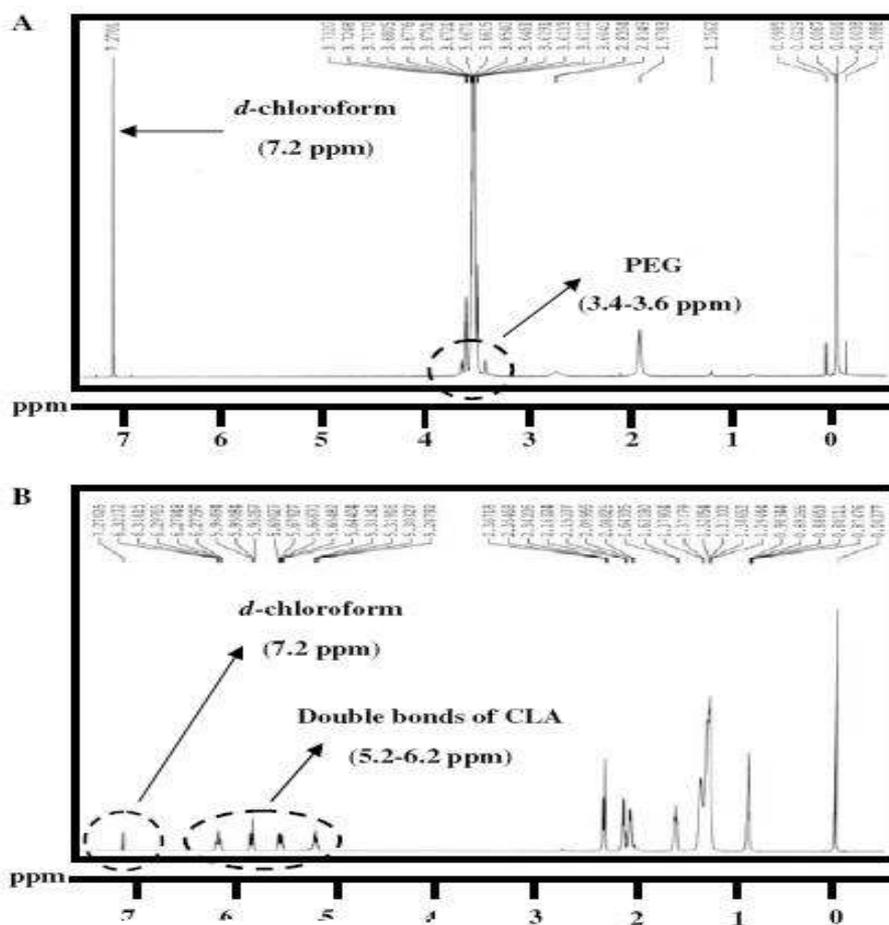


Fig 4. Representative  $^1\text{H}$  NMR spectra of PEG (A) and CLA (B). The peaks at 3.4–3.6 ppm in Fig. 4-A were assigned to the protons of PEG and the peaks at 5.2–6.2 ppm in Fig. 4-B were assigned to the protons of double bonds of CLA.

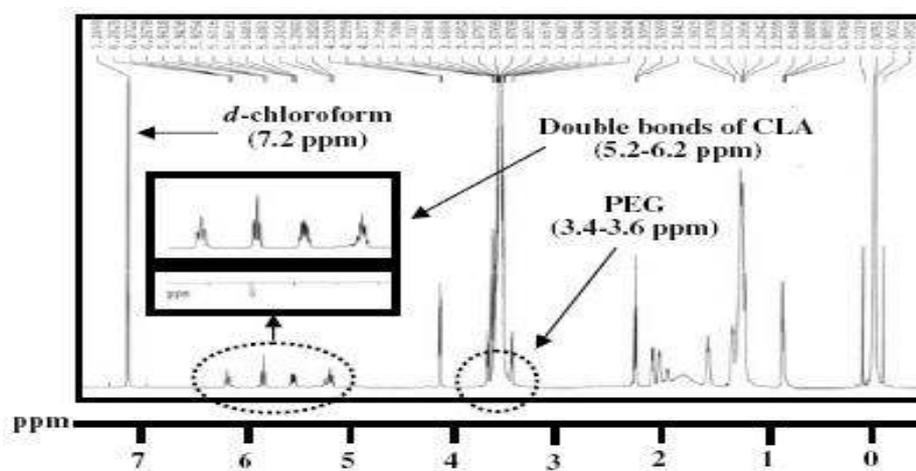


Fig 5. Representative  $^1\text{H}$  NMR spectra of synthesized PCLA. The peaks of double bonds of CLA were clearly detected, indication of the successful PEGylation of CLA through ester linkage between the hydroxyl group of PEG and the carboxylic group of CLA.

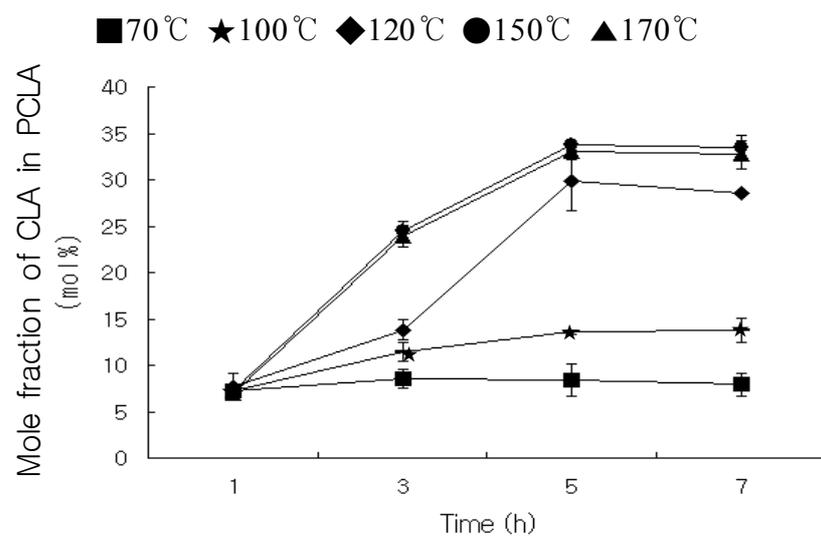


Fig 6. Plots of mole fraction of CLA in PCLA according to reaction times (1, 3, 5 and 7 h) and reaction temperatures (70, 100, 120, 150 and 170 °C).

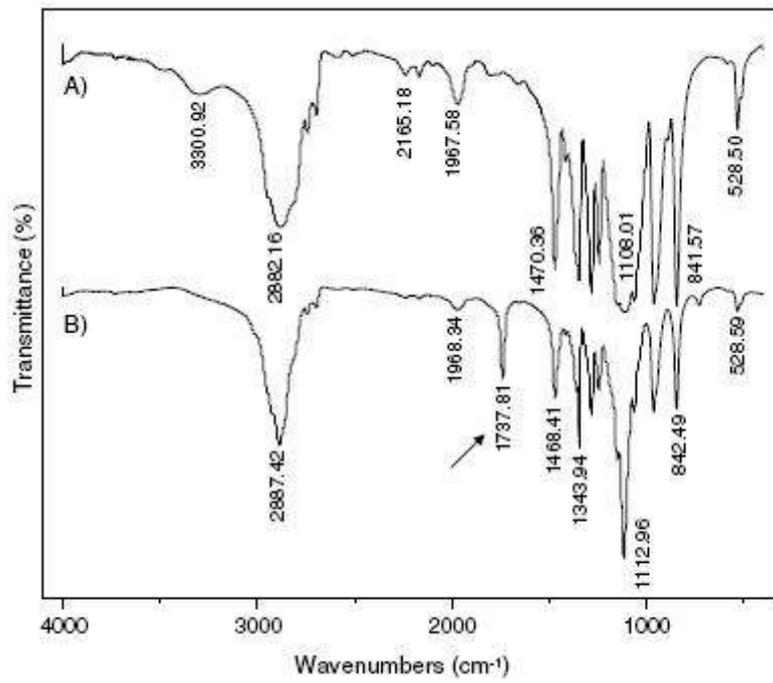


Fig 7. FT-IR spectra of PEG (A) and PCL (B).

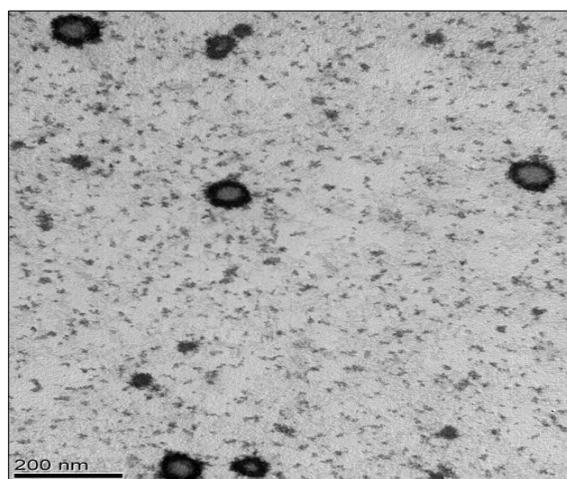


Fig 8. TEM image of PEG 5000

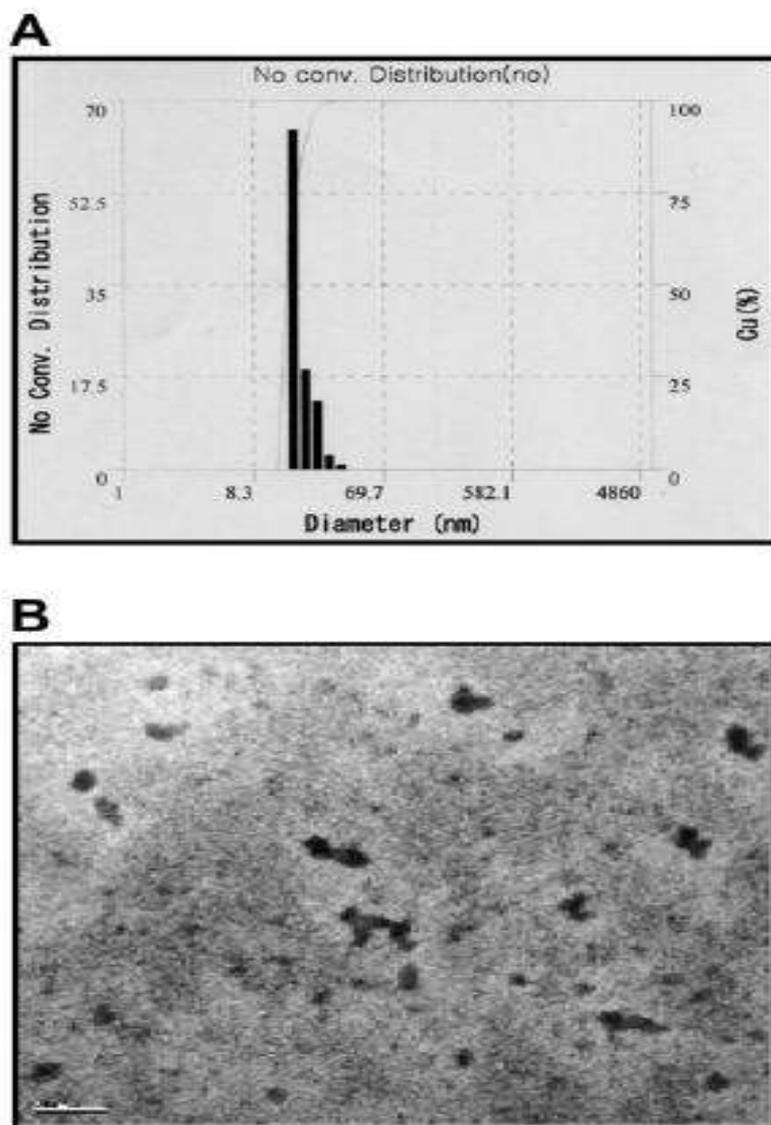


Fig 9. ELS measurement (A) and TEM image (B) of PEG 2000

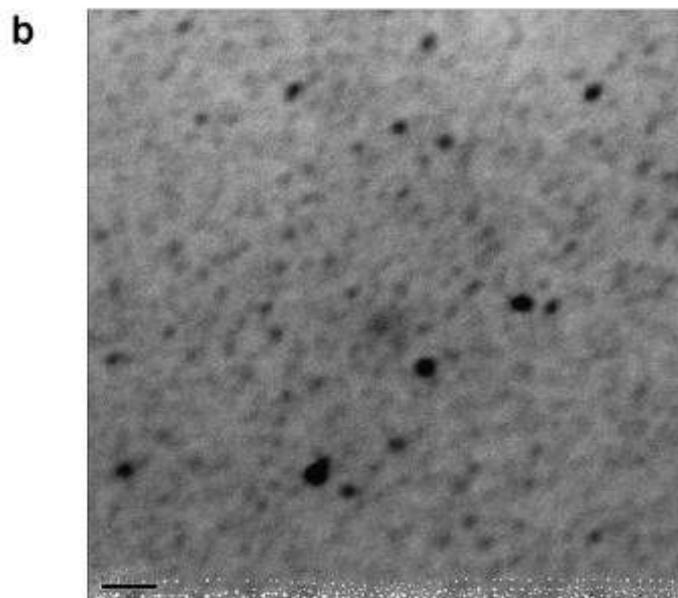
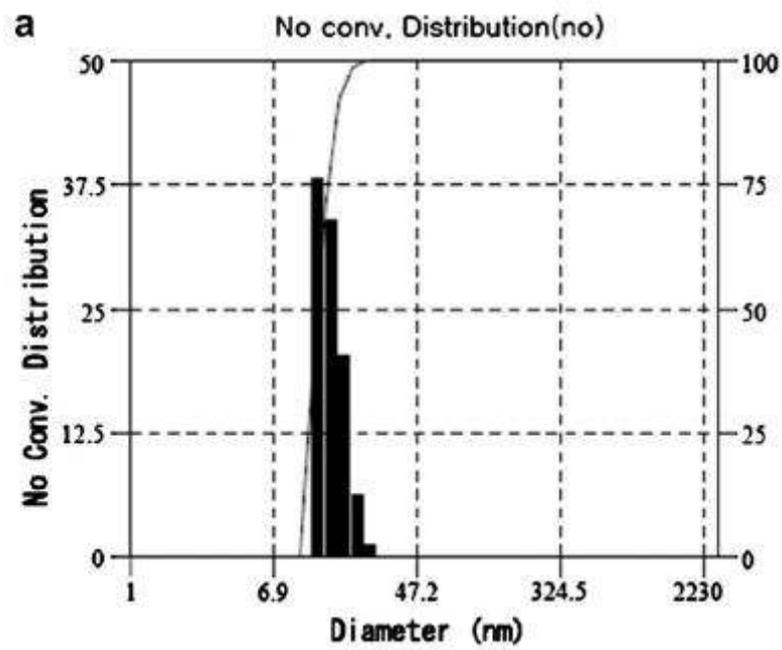


Fig 10. DLS measurement (a) and TEM image (b) of Plu-CLA NPs.

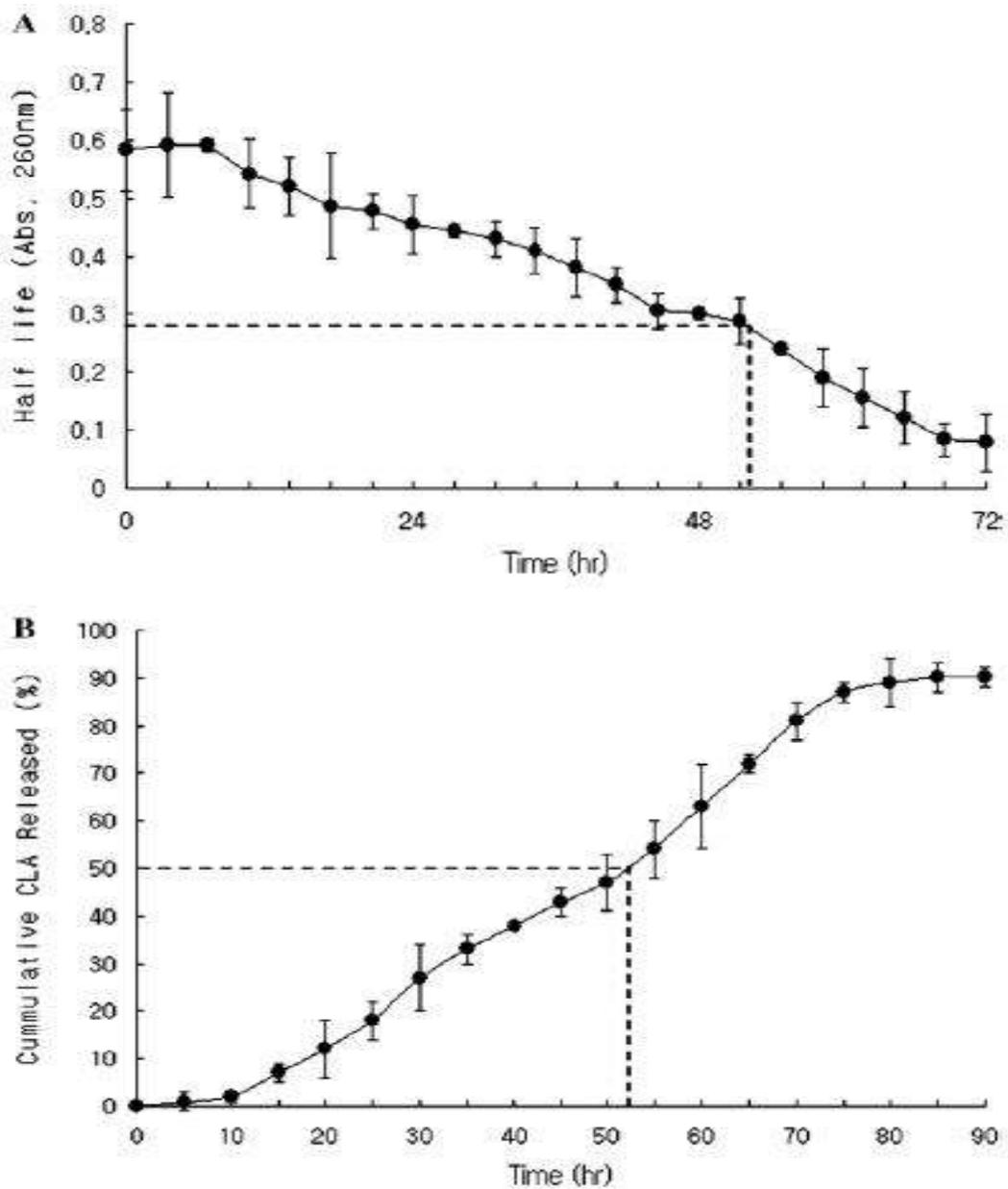


Fig 11. In vitro drug half-life (A) and release (B) study. (A) In vitro half-life of PCLA was carried out in cell culture medium at pH 7.4 and 37 °C. The half-life time was measured by UV spectrophotometer at pre-determined time intervals. (B) In vitro release test of CLA from PCLA was investigated in DMEF (pH 7.4 and 37 °C). At specific time intervals, CLA release was measured by using HPLC and UV detection of CLA was operated at 260nm wavelength.

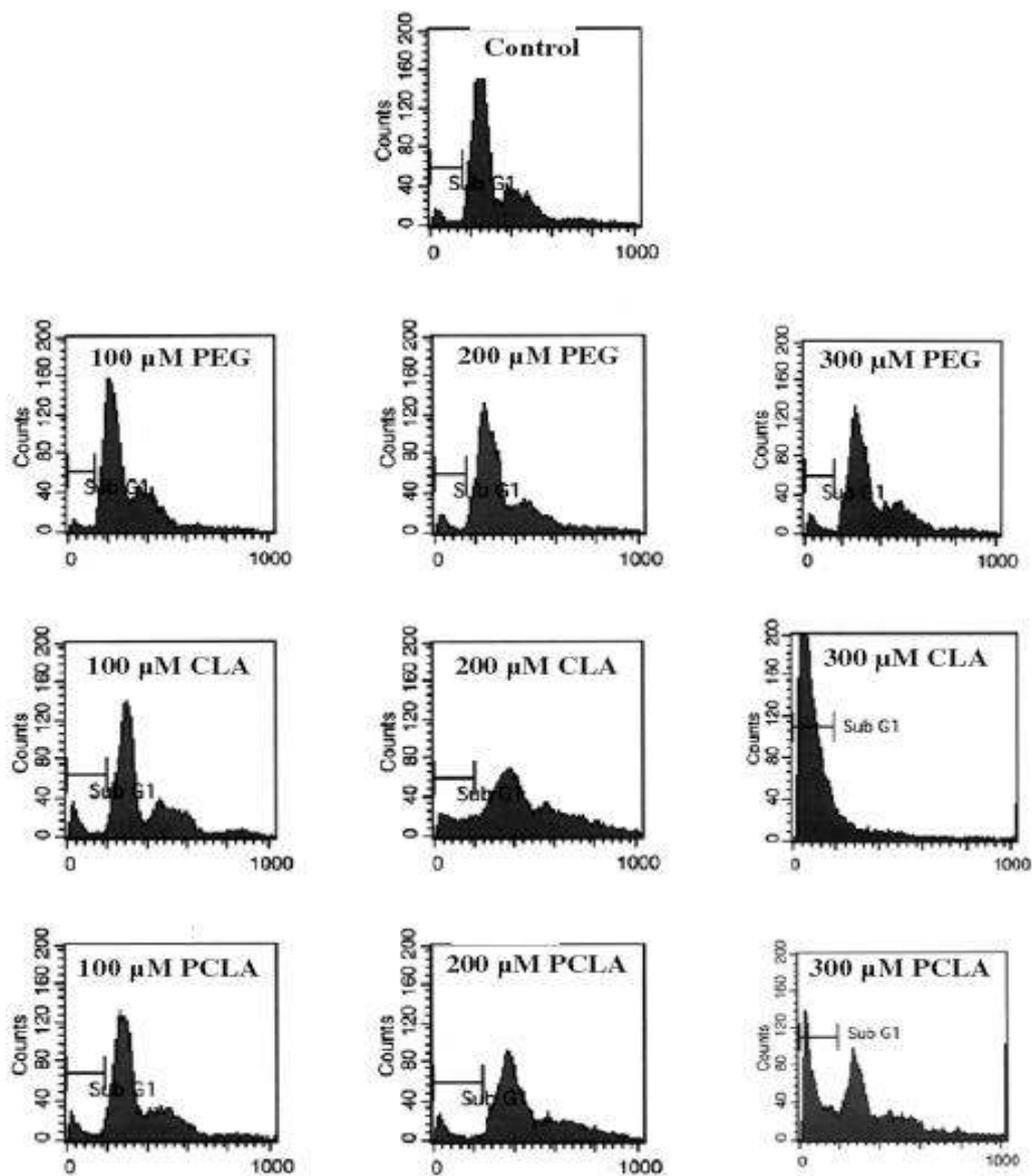


Fig 12. Cell cycle and apoptosis analysis after treatment of CLA and PCLA in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were seeded in 12-well polystyrene surface (PS) plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well containing DMEM and treated with CLA and PCLA for 72 h. The 3T3-L1 cells were harvested and analyzed by FACS. The sub-G1 region represents cells undergoing apoptosis-associated DNA degradation.

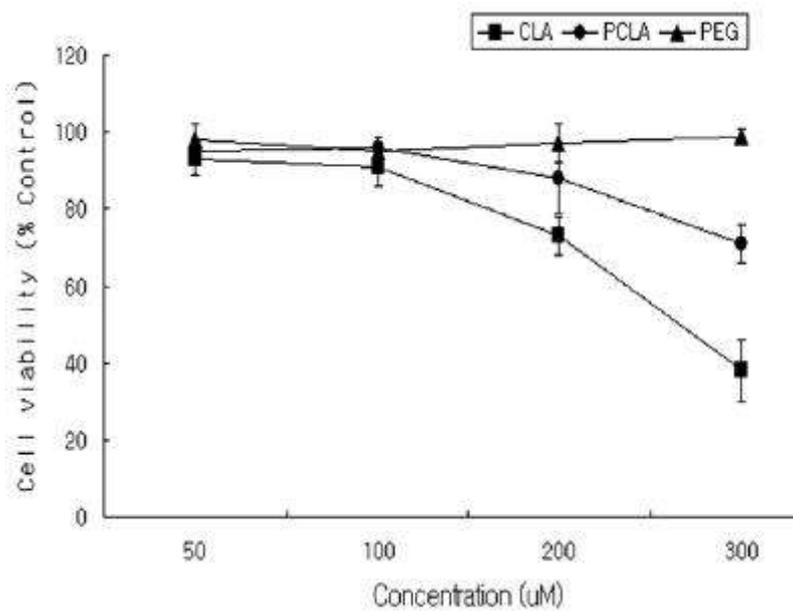


Fig 13. Effect of CLA and PCLA on cell viability in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were seeded in 12-well polystyrene surface (PS) plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well containing DMEF and treated with CLA and PCLA for 72 h. The 3T3-L1 cells were analyzed by MTT proliferation kit.

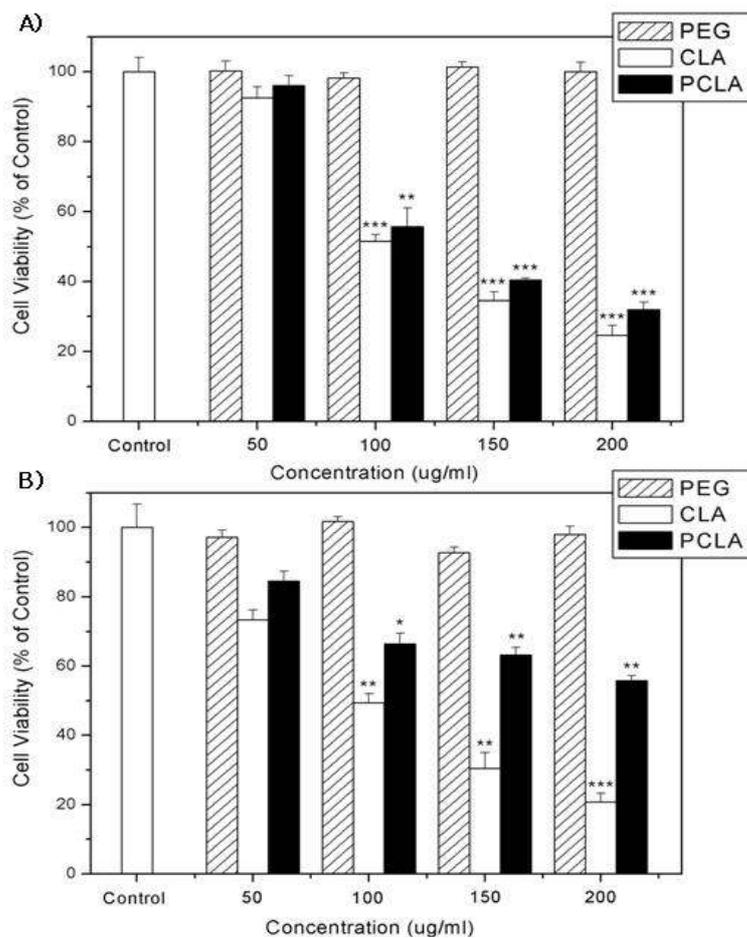


Fig 14. Cell viability of PEG, CLA and PCLA. (A) MCF-7 breast cancer cells and (B) NIH 3T3 fibroblast cells.

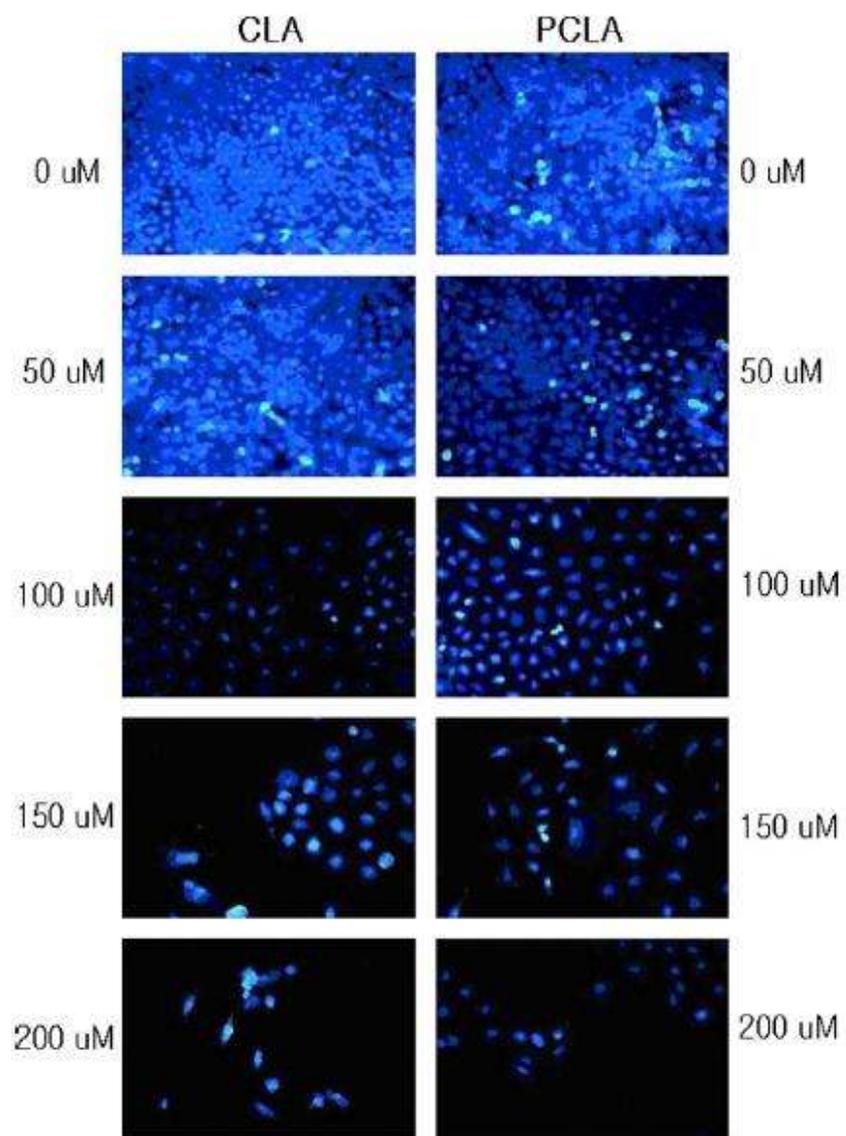


Fig 15. DAPI staining of CLA and PCLA.

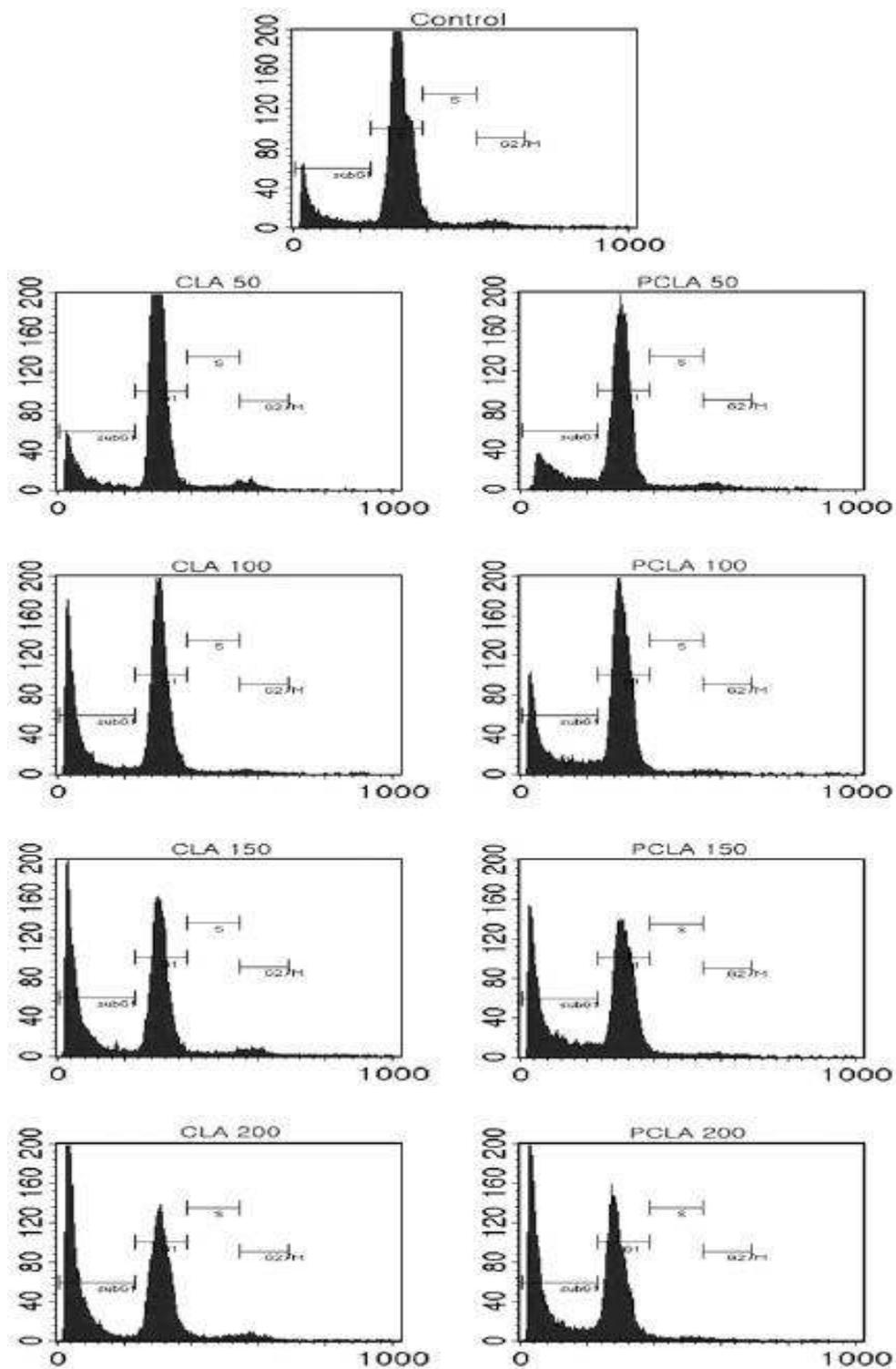


Fig 16. Cell cycle and apoptosis analysis after treatment of CLA and PCLA in MCF-7 breast cancer cells.

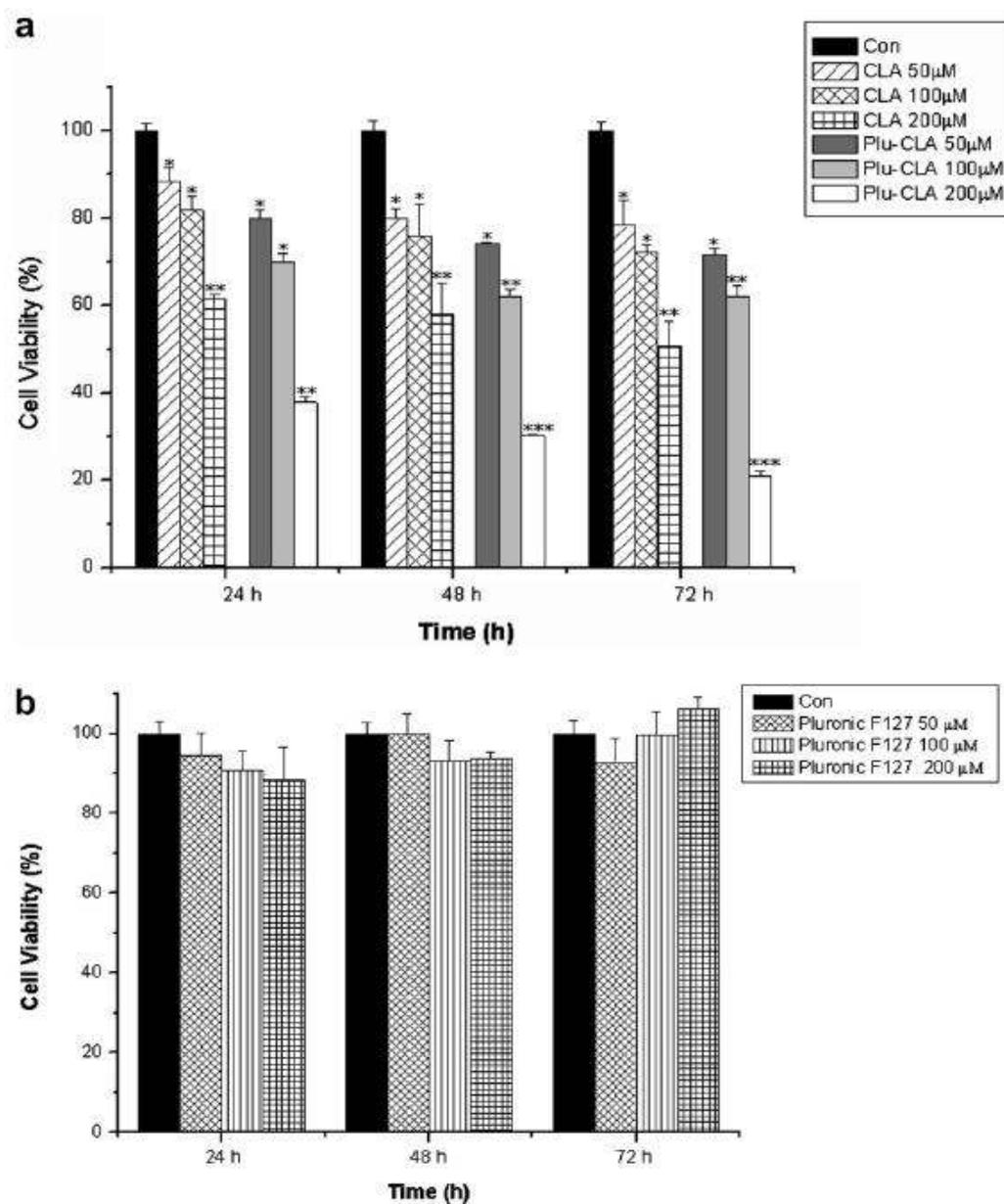


Fig 17. Effect of CLA, Plu-CLA and Pluronic F127 on cell viability in MCF-7 breast cancer cells. MCF-7 cells were seeded in 24-well plates at a density of  $10 \times 10^4$  cells/well and treated with CLA, Plu-CLA (a) or Pluronic F127 (b) for 24, 48 and 72 h.

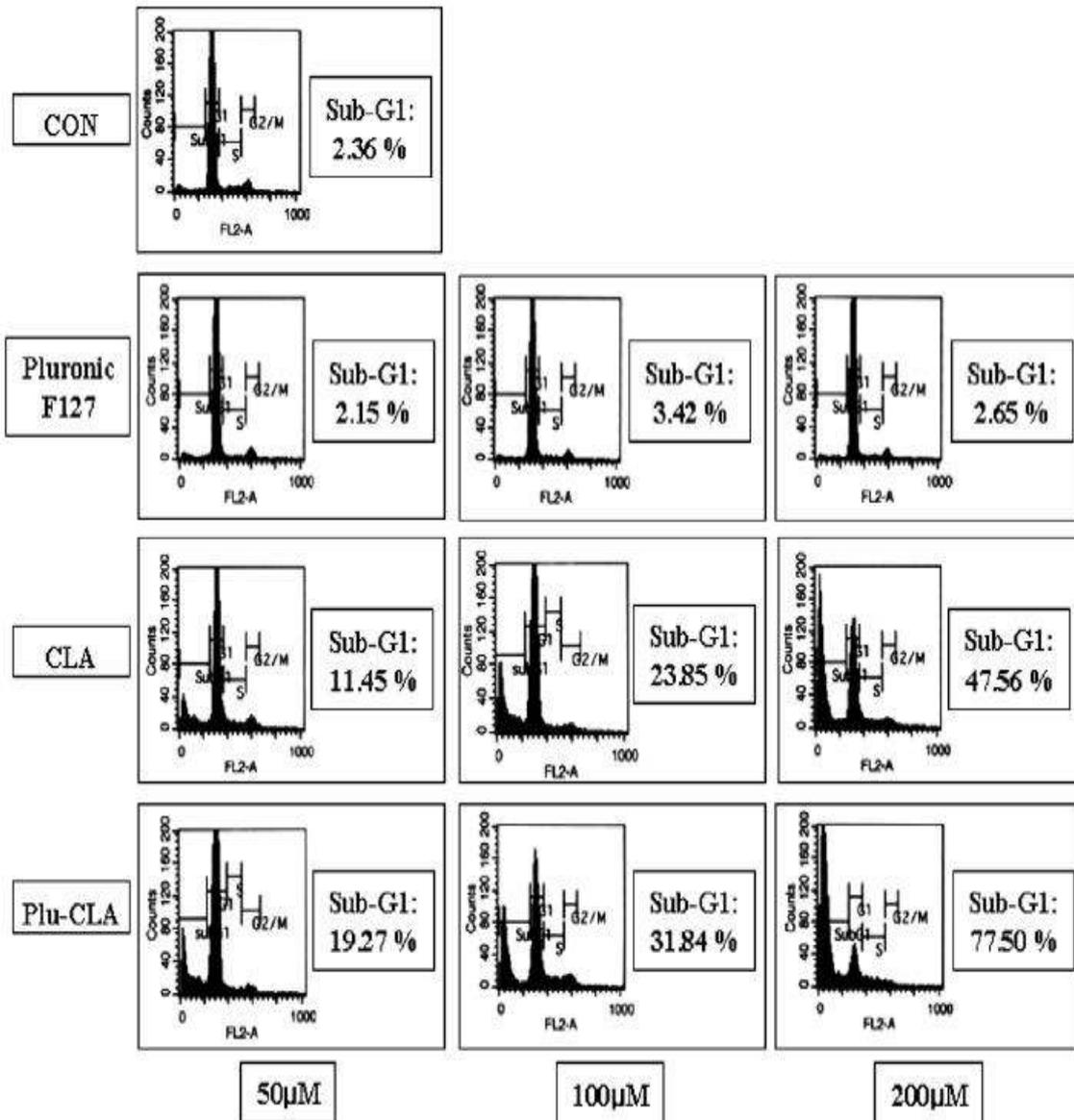


Fig 18. Effect of CLA and Plu-CLA on apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. MCF-7 cells were seeded in 12-well plate at a density of  $20 \times 10^4$  cells/well and treated with CLA or Plu-CLA for 72 h. The MCF-7 cells were harvested and analyzed by FACS. The sub-G1 region represents cells undergoing apoptosis-associated DNA degradation.

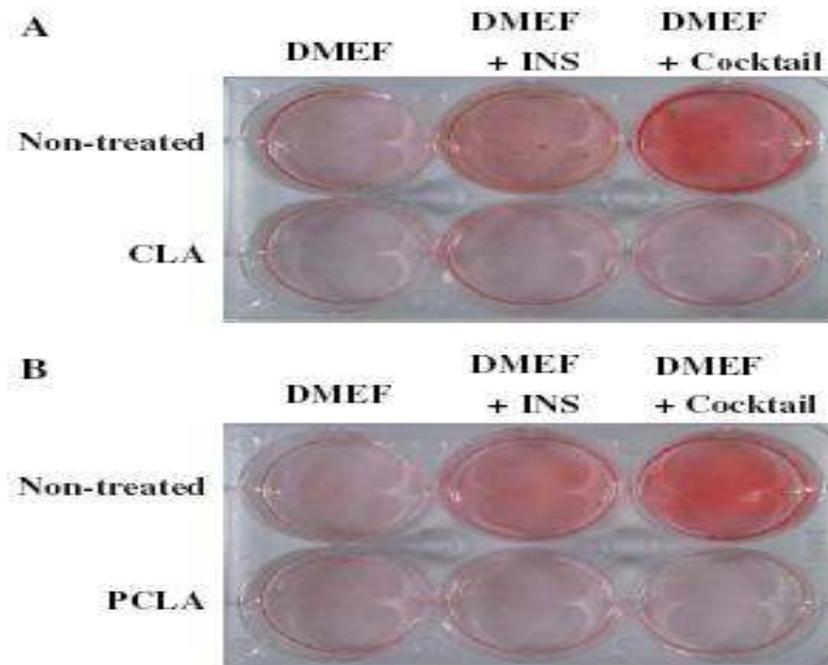


Fig 19. ORO staining after treatment of CLA and PCLA in 3T3-L1 cells.

3T3-L1 cells were treated with DMEF + INS or DMEF + cocktail for 15 days in the absence or presence of CLA and PCLA. Adipocyte precursor cells placed on DMEF + cocktails were able to undergo full maturation into adipocytes, whereas both CLA and PCLA treatments of adipocytes blocked the accumulation of lipid droplets in the cytoplasm on either DMEF + INS or DMEF + cocktail conditions.

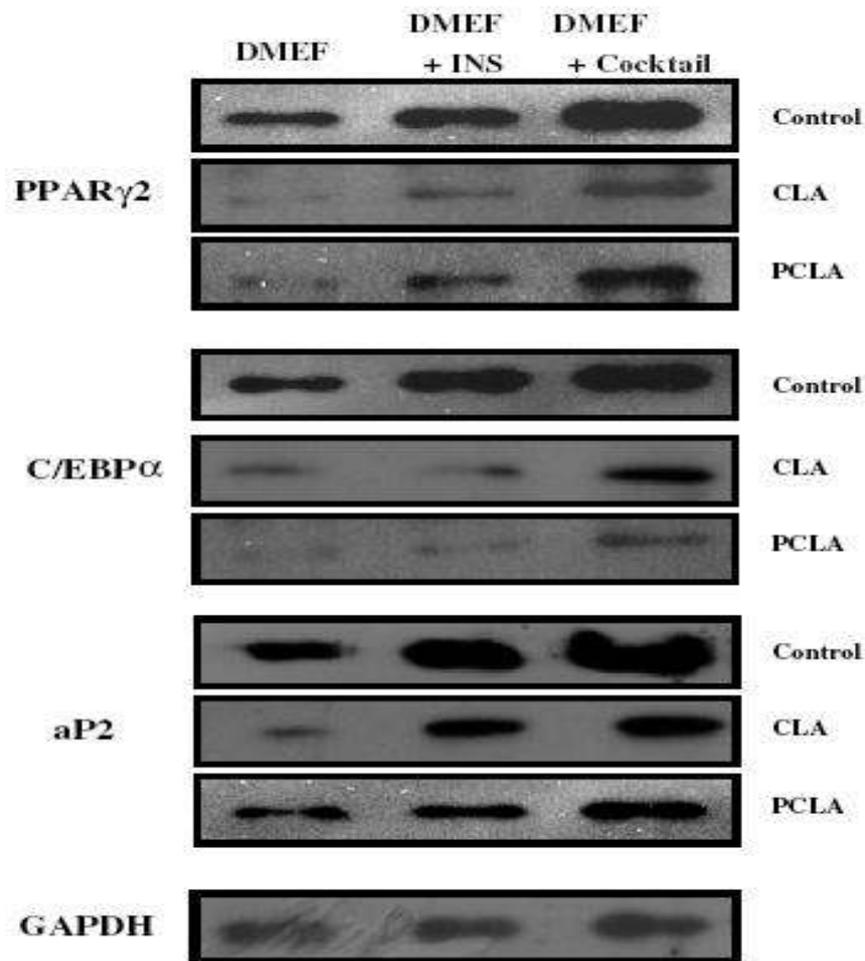


Fig 20. Effect of CLA and PCLA on expression of adipocyte marker proteins by hormone-induced adipogenesis. 3T3-L1 cells were treated with DMEF + INS or DMEF + cocktail for 15 days in the absence or presence of either CLA or PCLA. Western blot analysis revealed that treatments of both CLA and PCLA inhibited the expression of major adipocyte marker proteins on both DMEF + INS and DMEF + cocktail conditions, which normally increase during adipocyte differentiation (non-treated control included for comparison).

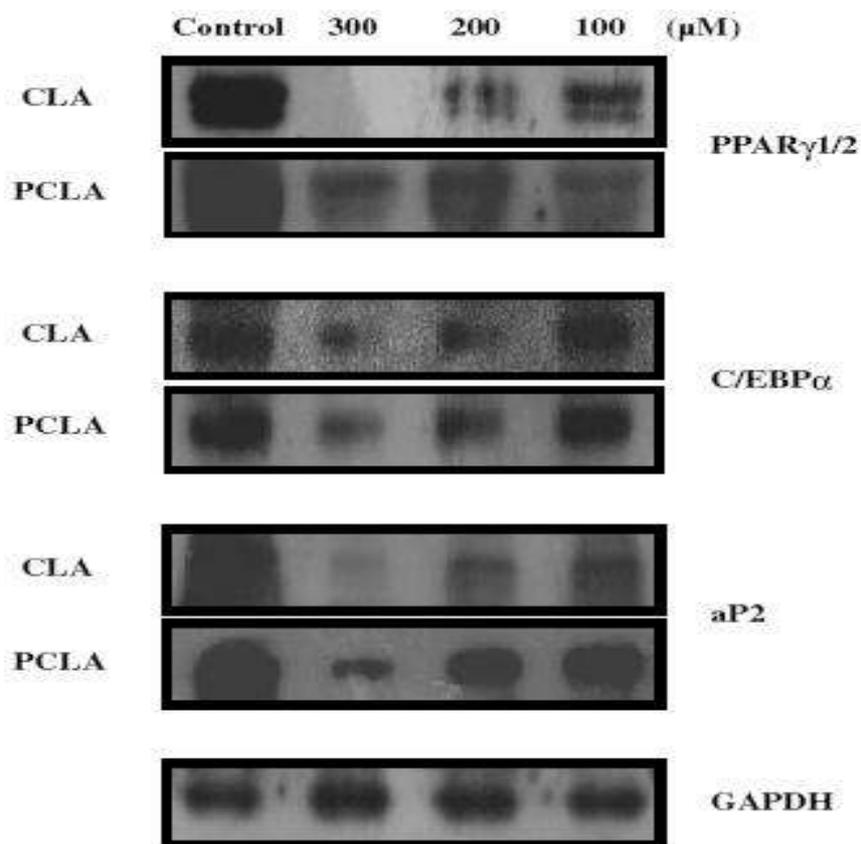


Fig 21. Expression of PPAR2, C/EBP, and aP2 after CLA and PCLA treatment of 3T3-L1 cells in dose-dependent manners. Adipogenesis was induced by DMEF + cocktail in the absence or presence of CLA and PCLA for 15 days. Western blot analysis revealed that treatment with CLA or PCLA inhibited the expression of major adipocyte marker proteins, which normally increase during adipocyte differentiation (non-treated control included for comparison).

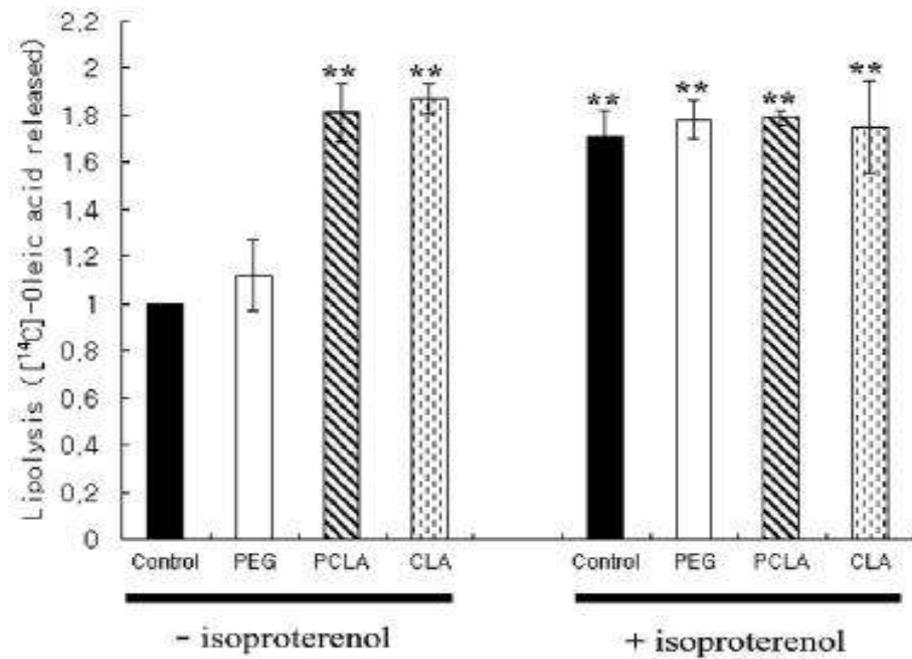


Fig 22. Effect of CLA and PCLA on lipolysis of cultured 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells, after serum-starved cultures, were treated for 72 h with PEG, CLA, and PCLA in the absence (-) or presence (+) of 10 M isoproterenol. Lipolysis, expressed as the amount of [<sup>14</sup>C]-oleic acid released into conditioned medium after treatment, was determined by scintillation counting. Data are expressed as a percentage of control level (control, -isoproterenol).

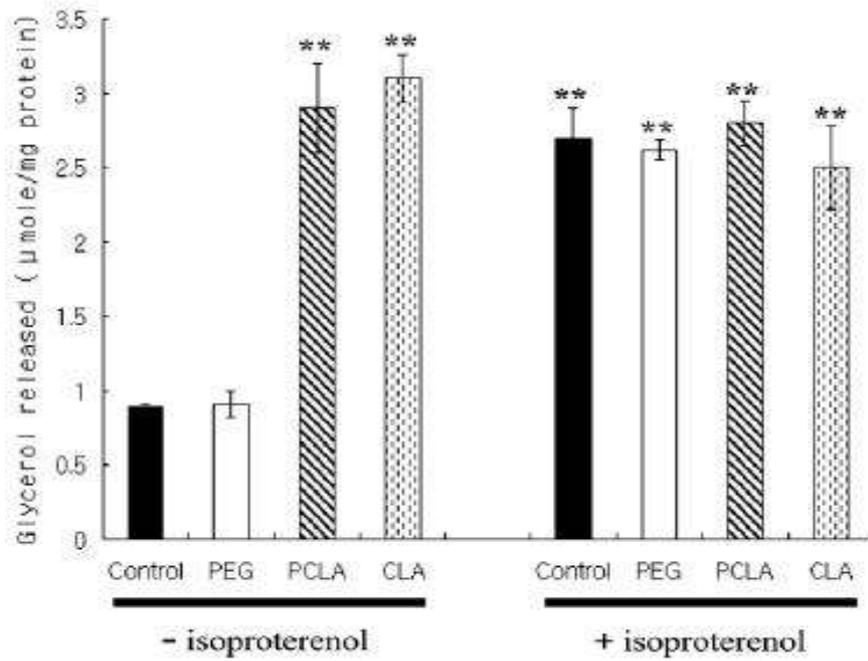


Fig 23. Effect of CLA and PCLA on glycerol release of cultured 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells, after serum-starved cultures, were treated for 72 h with PEG, CLA, and PCLA in the absence (-) or presence (+) of 10 M isoproterenol. Glycerol release test in the media was determined by using a GPO trinder assay.

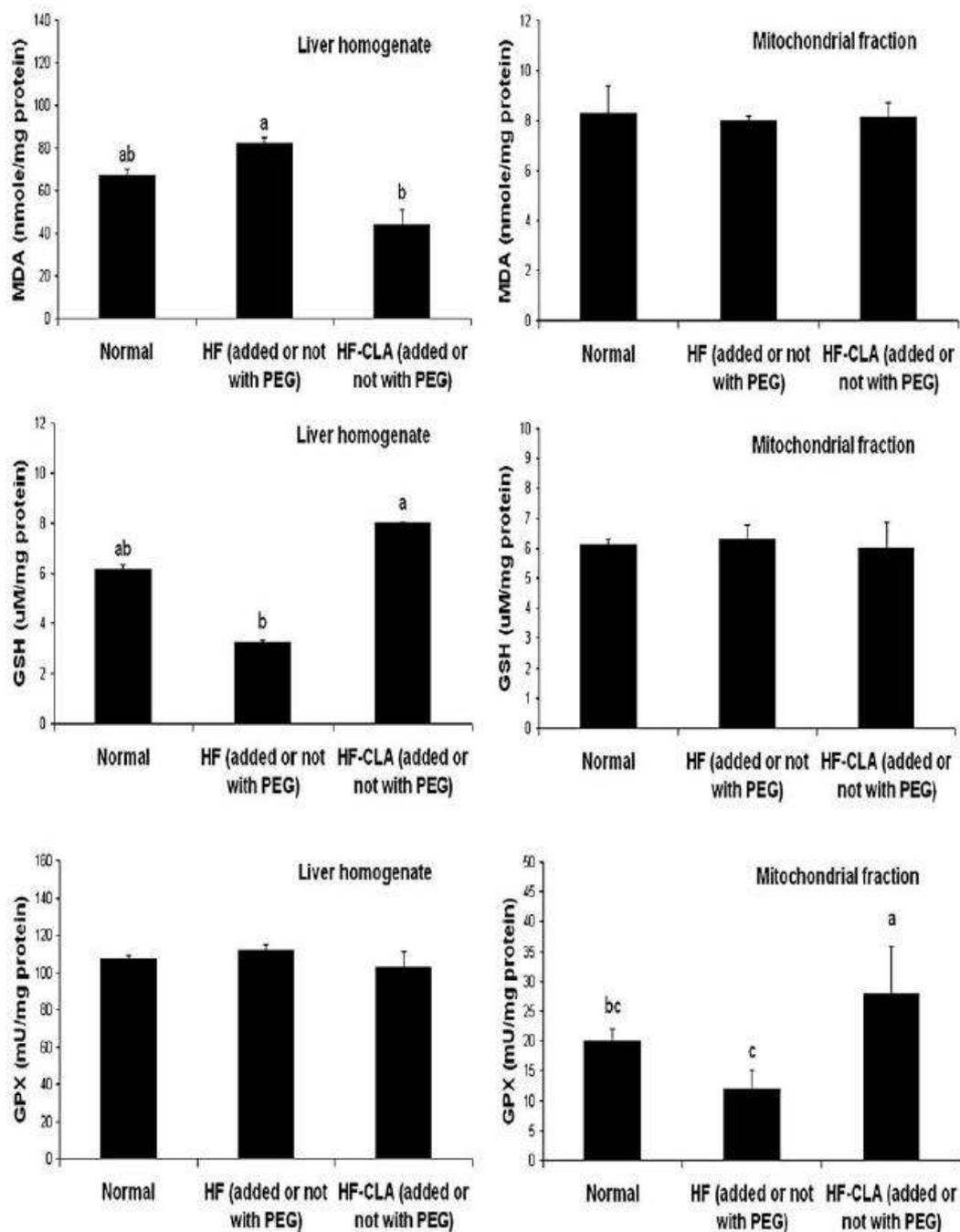


Fig 24. Effect of PCLA diet on MDA and antioxidant defense levels in whole homogenate and mitochondrial fraction of liver. Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by paired Student's t test for multiple comparisons.

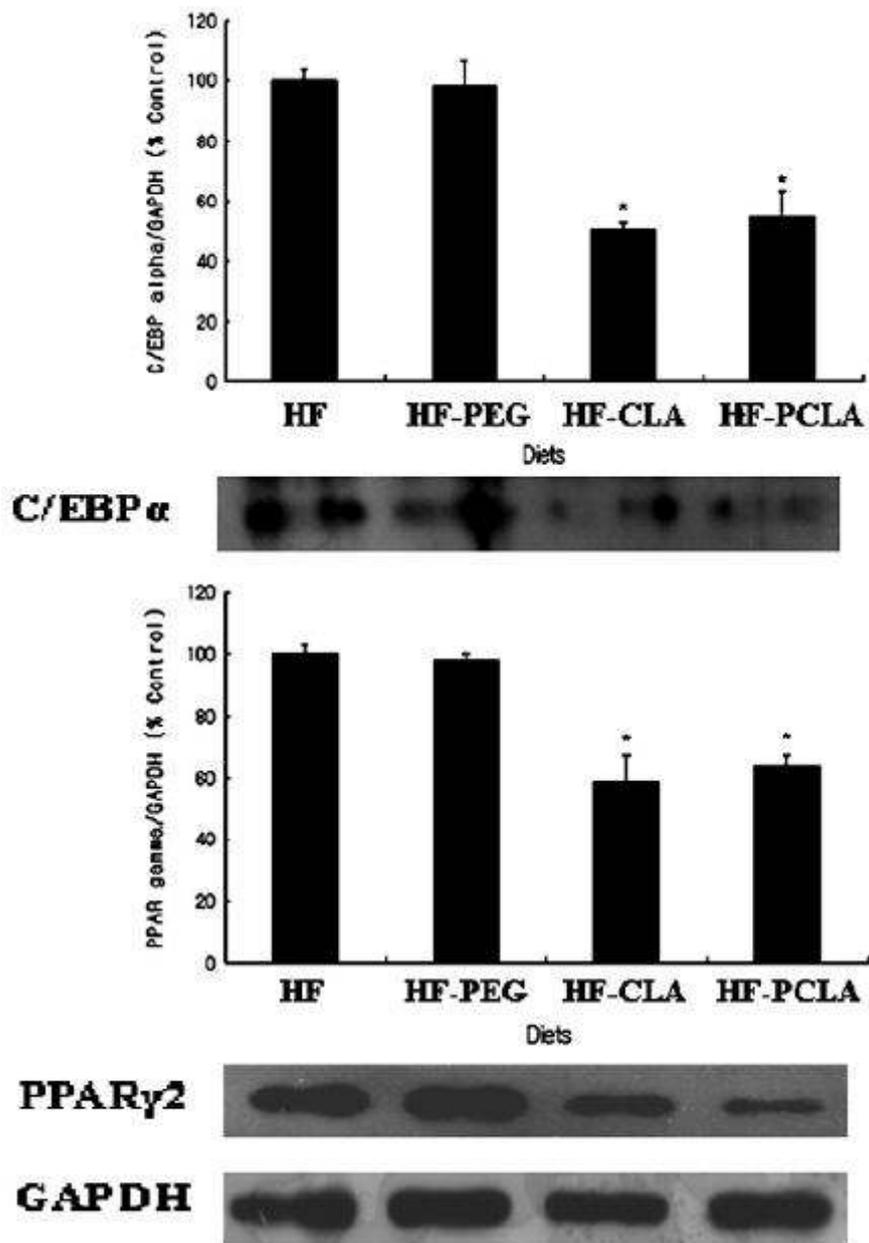


Fig 25. Effect of PCLA diet on adipocyte marker protein expression. The primary antibodies used were mouse monoclonal PPAR $\gamma$ 2 antibody recognizing both PPAR $\gamma$  isoforms and mouse monoclonal antibody against mouse C/EBP $\alpha$ . Secondary antibody used was horseradish peroxidaseconjugated antimouse antibody. Data are expressed as a percentage of the control level.

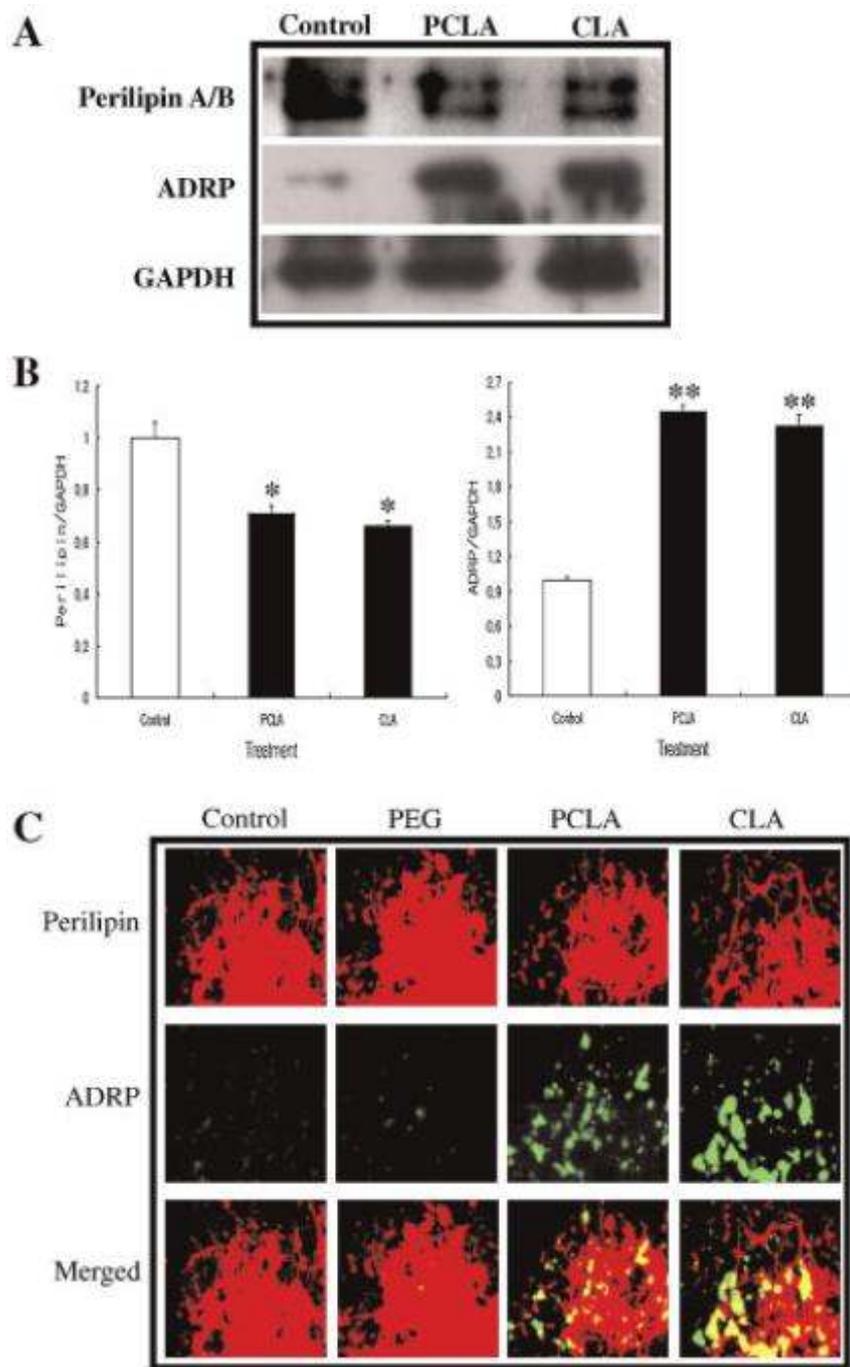


Fig 26. Effect of PCLA on lipid droplet-associated protein expression and localization of cultured in 3T3-L1 cells.

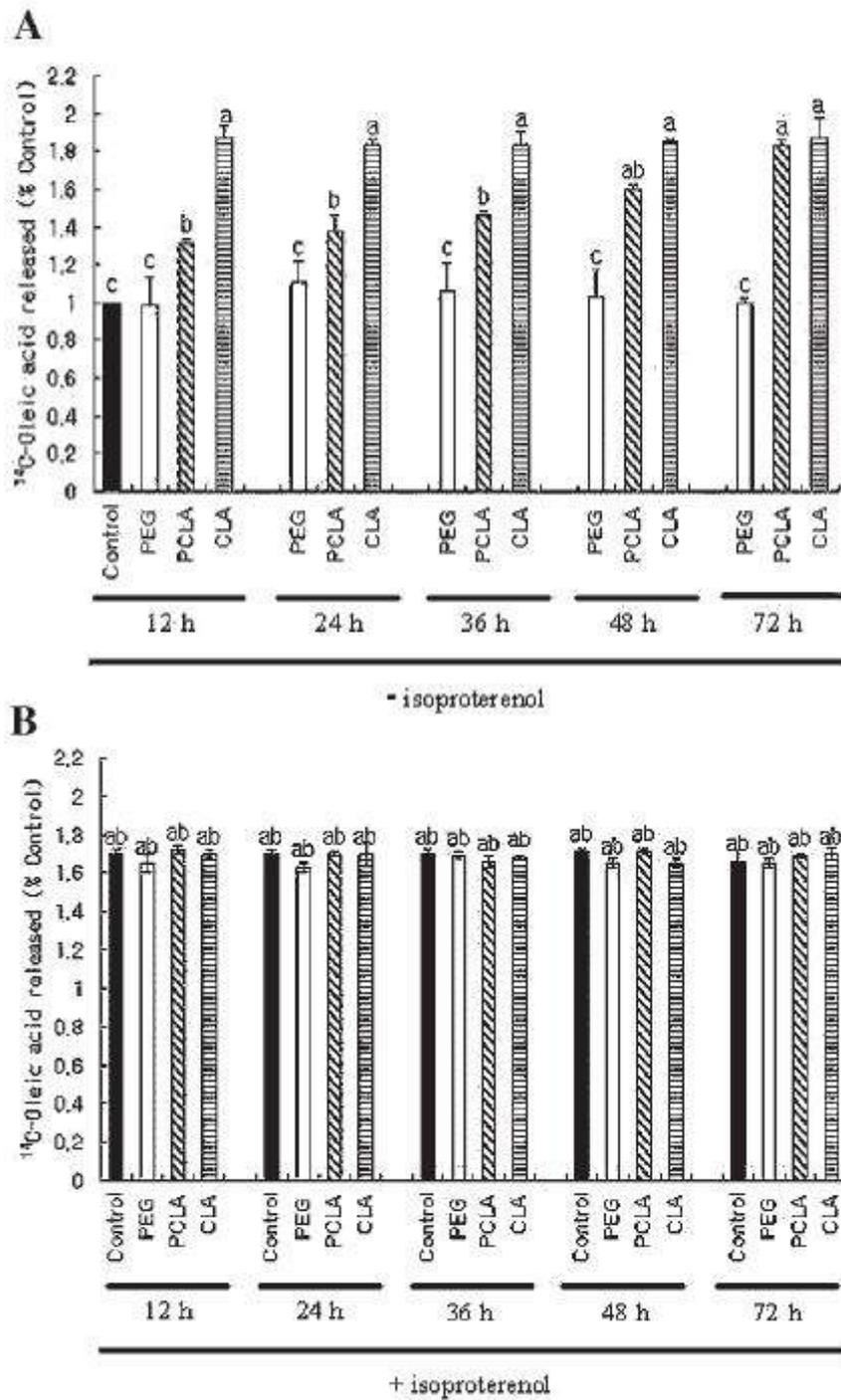
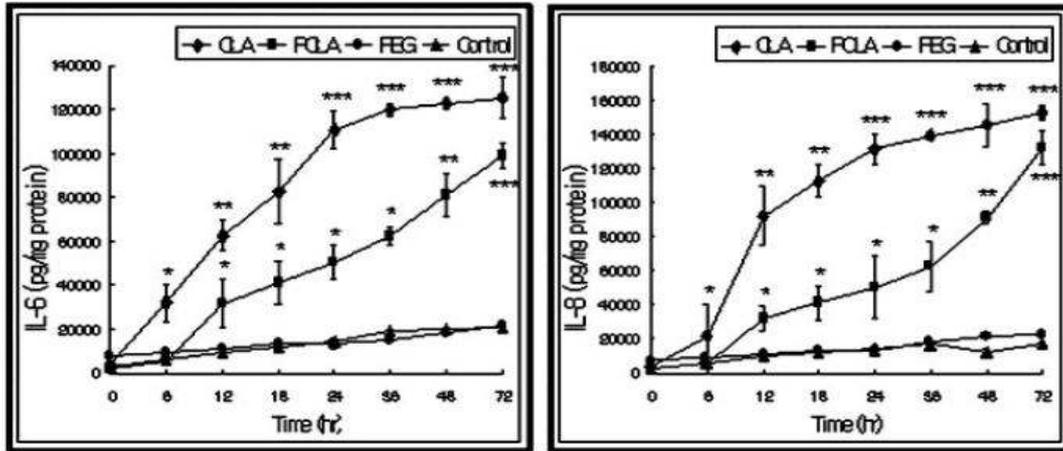


Fig 27. Effect of PCLA on lipolysis of cultured 3T3-L1 cells in the absence (A) or presence (B) of  $\beta$ -adrenergic receptor agonist.

A



B

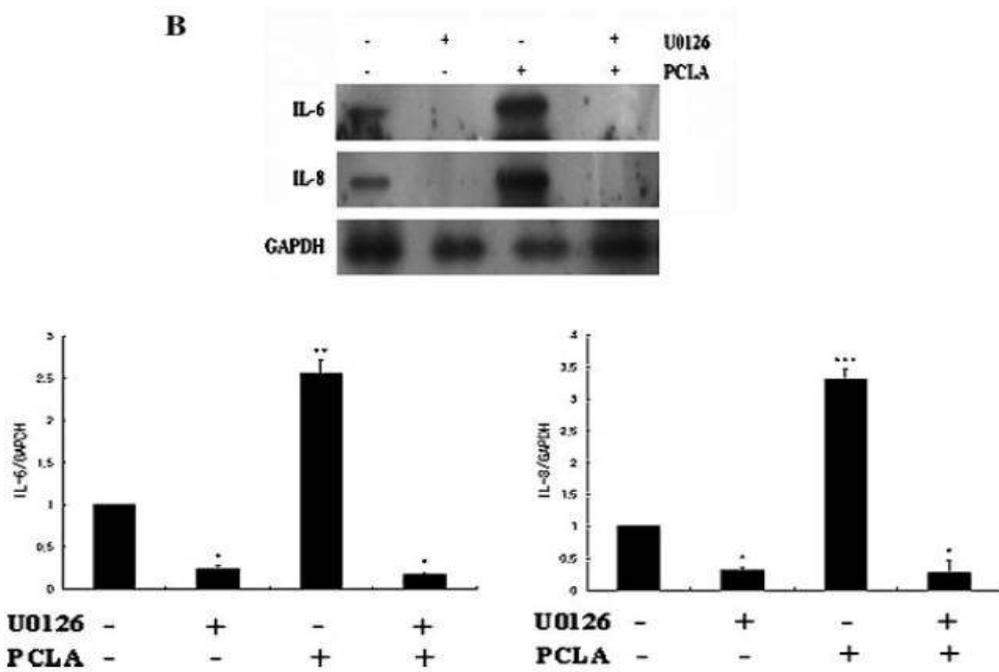


Fig 28. Effect of PCLA on adipo-cytokine secretion and expression in cultured of 3T3-L1 cells.

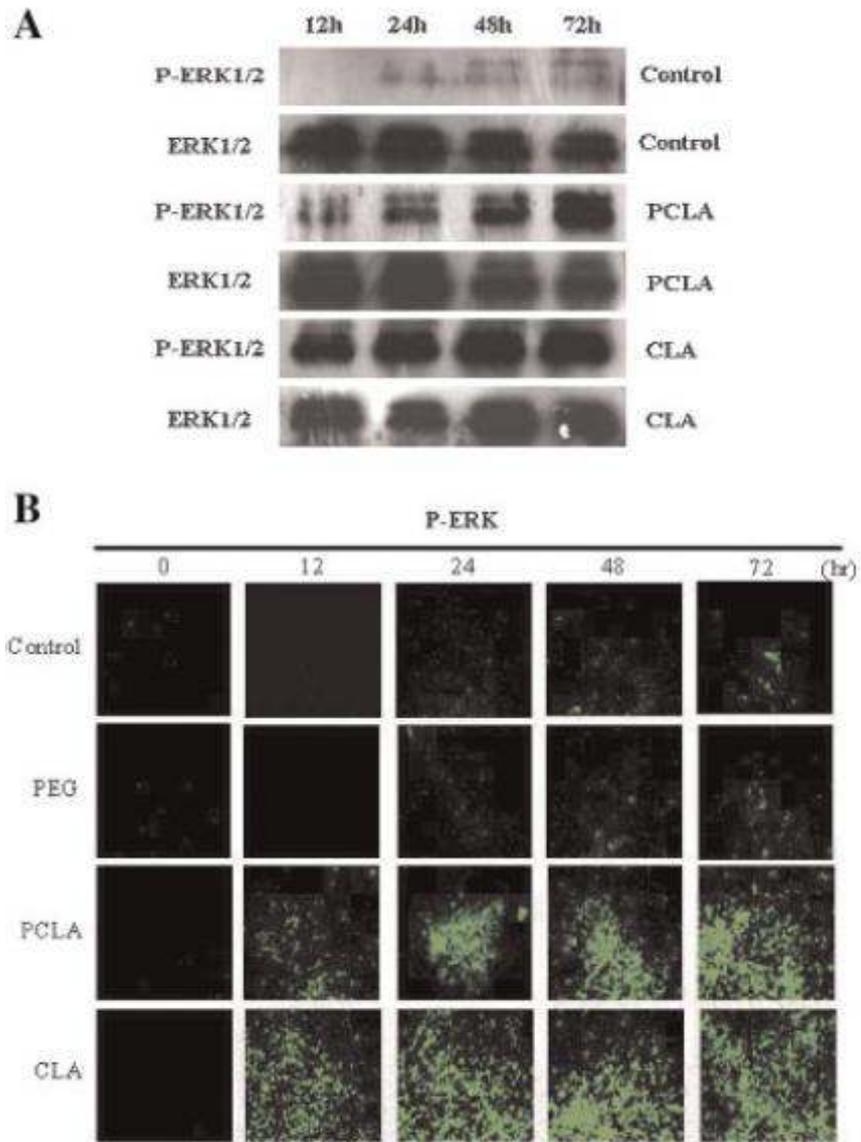


Fig 29. Effect of PCLA on lipolysis depends on the ERK activation of cultured in 3T3-L1 cells.

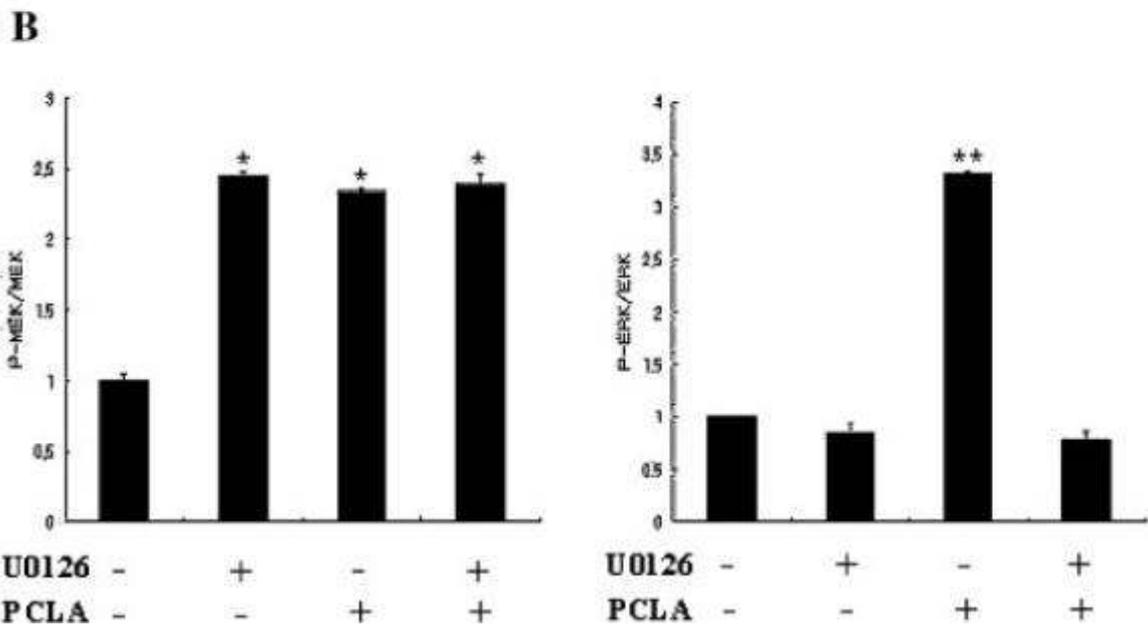
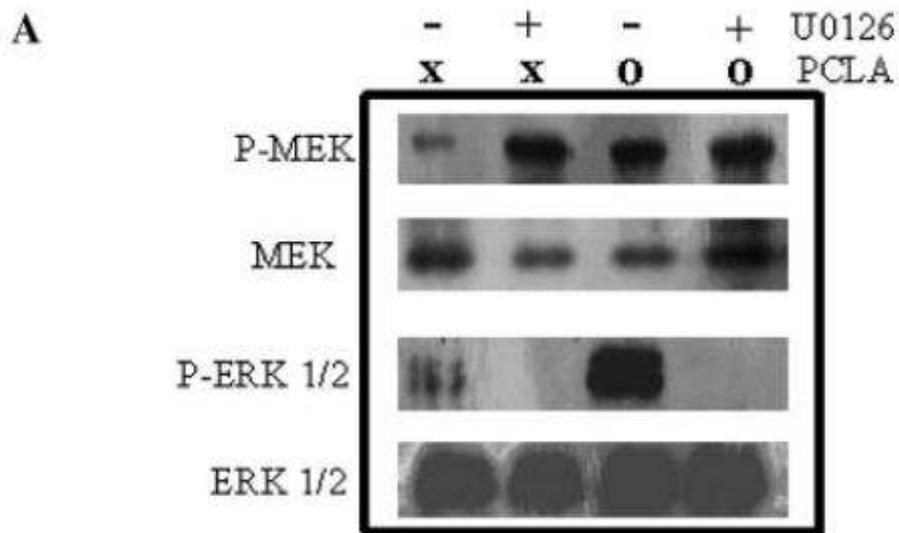


Fig 30. Effect of a pharmacological inhibitor on PCLA-mediated activation of ERK1/2 of cultured in 3T3-L1 cells.

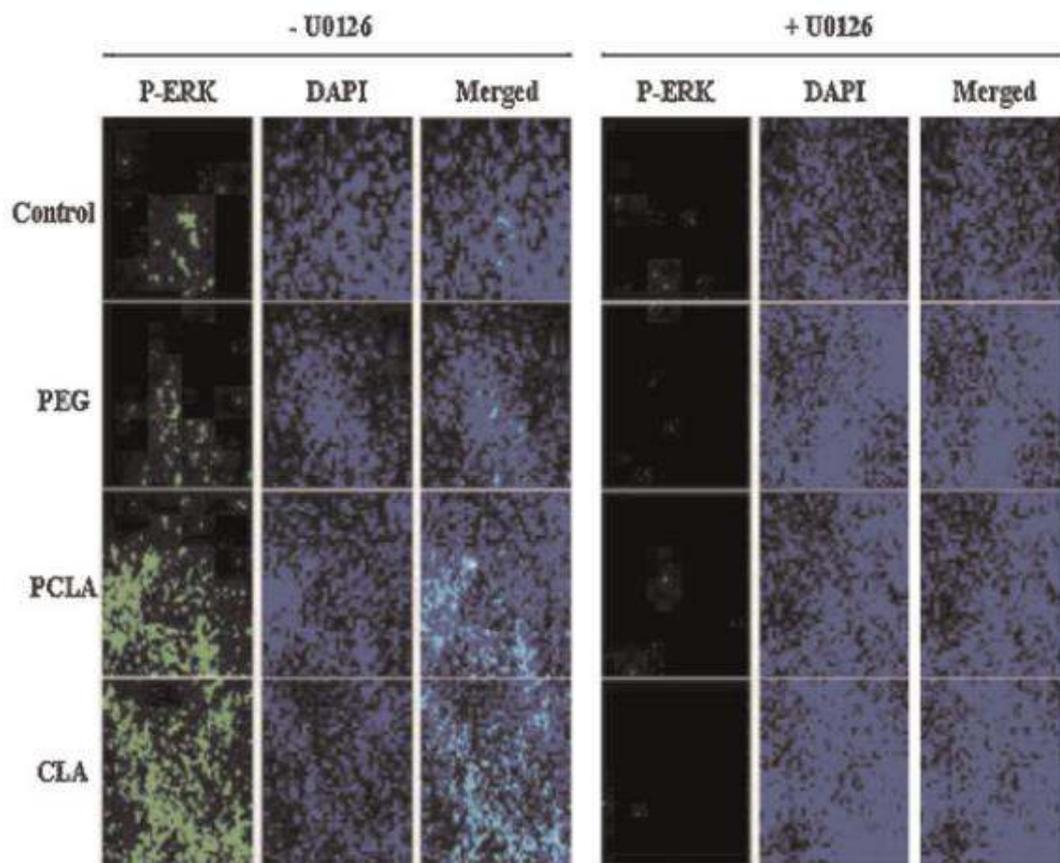


Fig 31. Effect of pharmacological inhibitor on PCLA-mediated nuclear accumulation of p-ERK of cultured in 3T3-L1 cells.

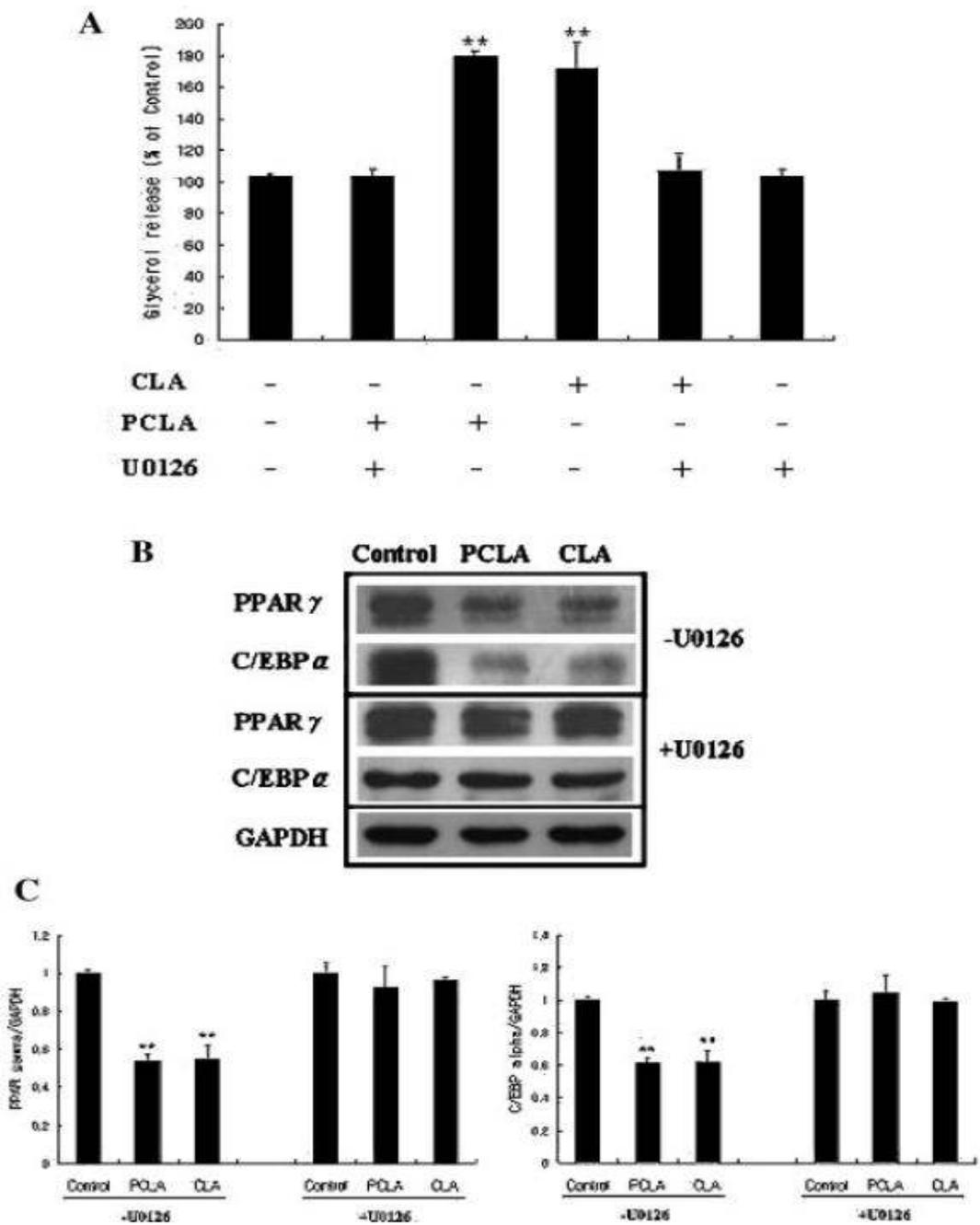


Fig 32. Effect of MEK inhibitor U0126 on PCLA-induced lipolysis - Differentiation of 3T3-L1 cells was induced.

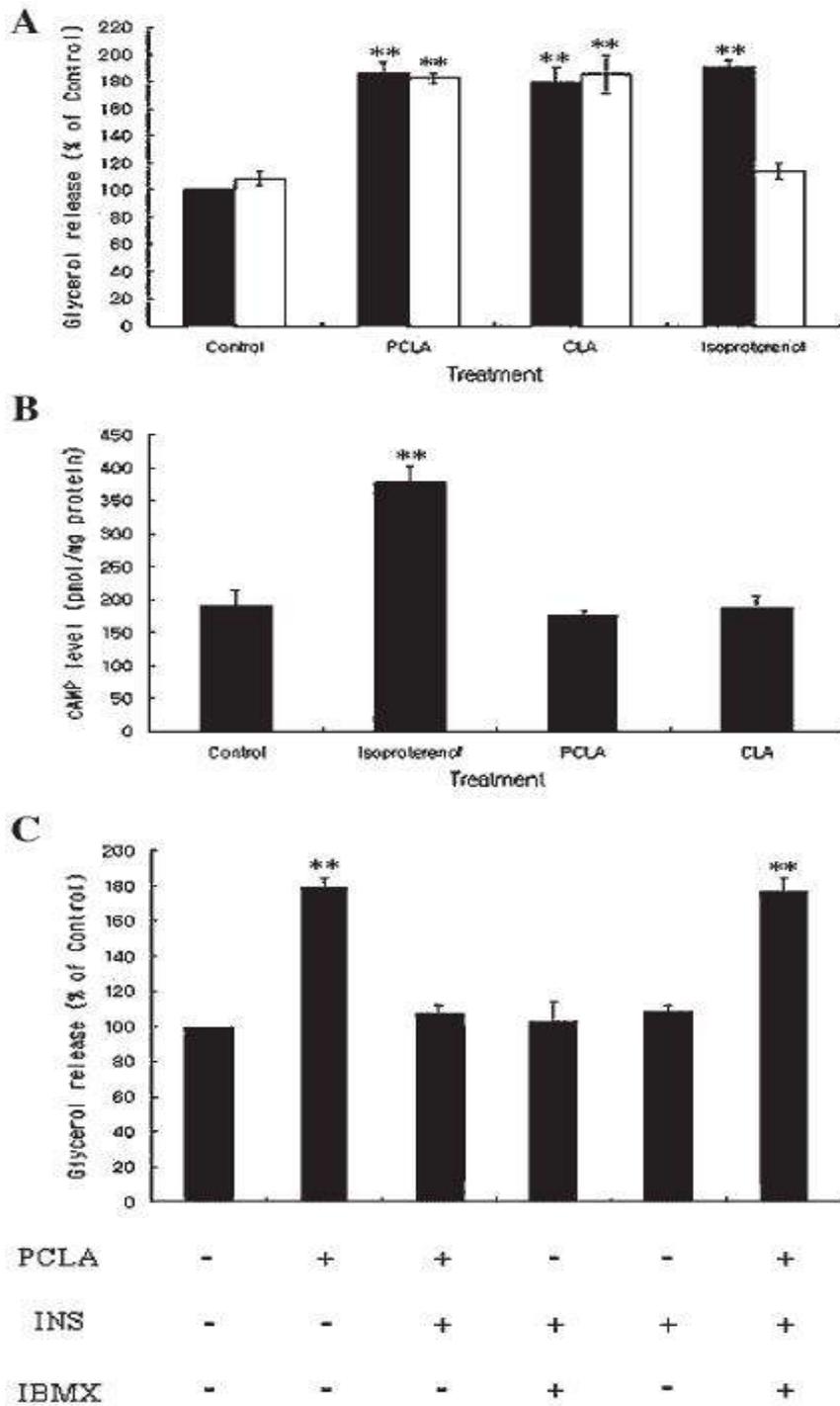


Fig 33. Effect of an adenylyl cyclase inhibitor on PCLA-induced lipolysis.

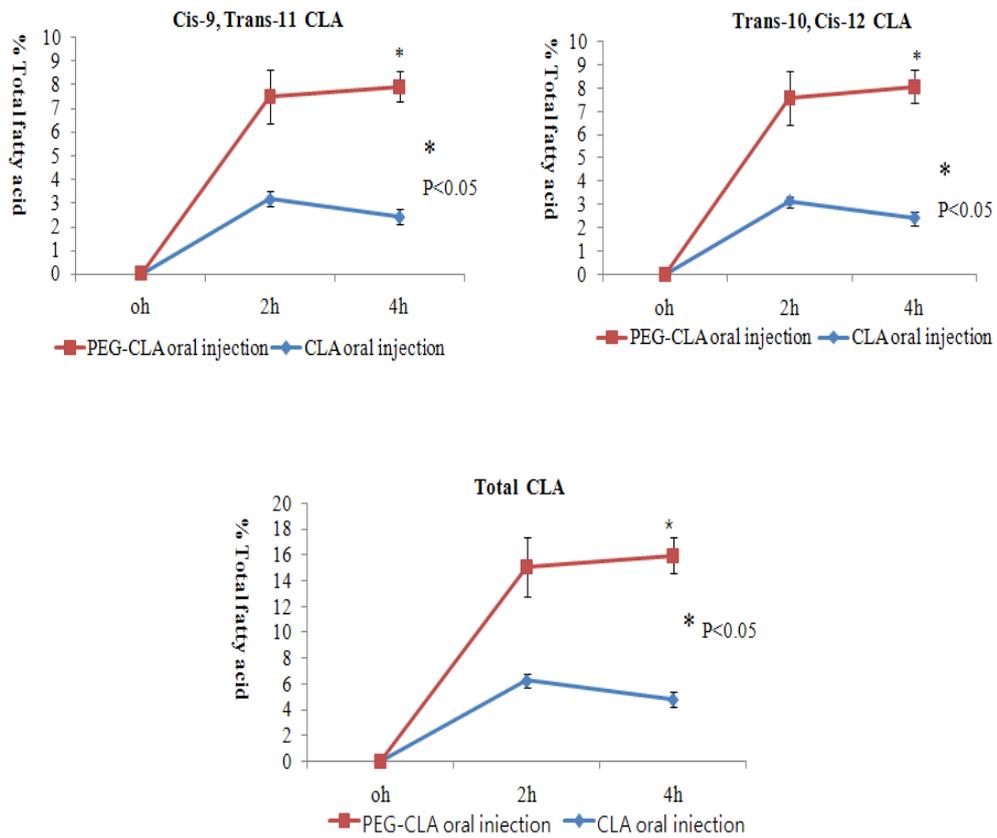


Figure 34. Changes in blood CLA concentration after oral injection of PEG-CLA in SD male Rat.

The plasma CLA was not detected at 0 hr and normal group

\* p<0.05

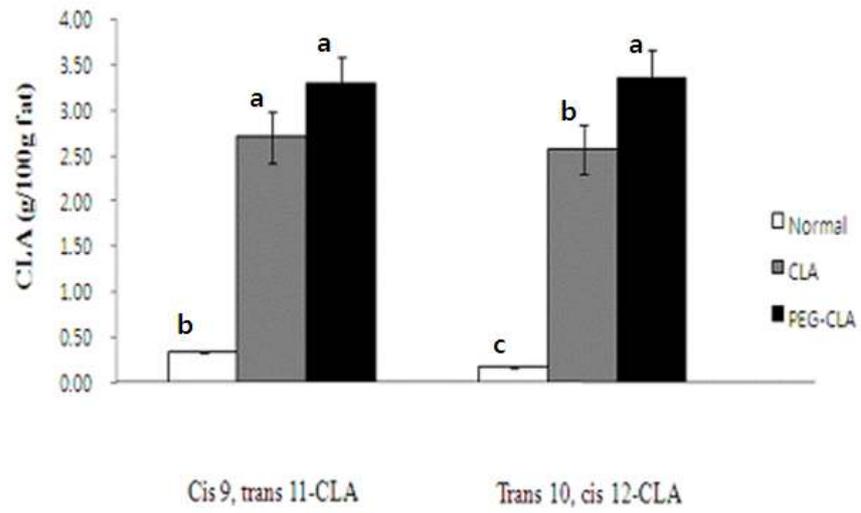


Figure 35. Effect of PEG-CLA supplementation in feed on CLA concentration of visceral adipose tissues in SD male Rat  
 \*  $p < 0.05$

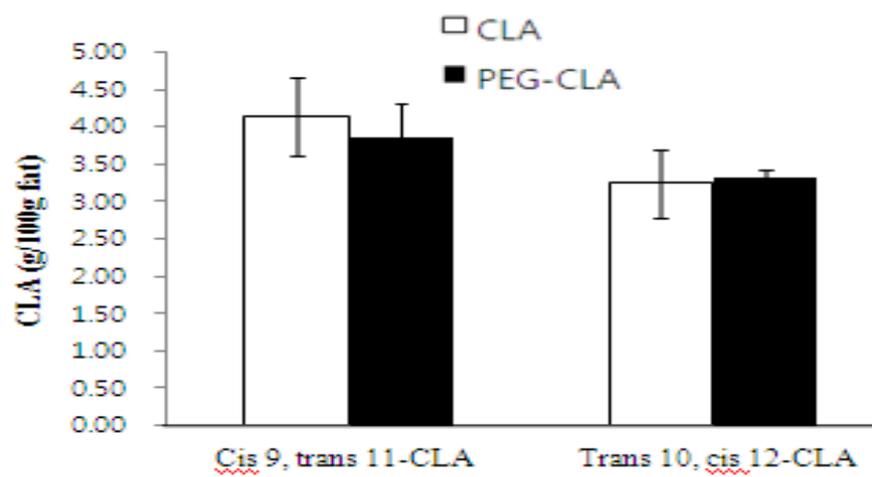


Figure 36. Effect of PEG-CLA supplementation in feed on blood CLA concentration in SD male Rat

\*\* The blood CLA was not detected in normal diet group.

## 제 4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

구분	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도	기여도
1차 년도	CLA의 PEGylation	반응온도, 반응시간, 반응후 CLA의 생리활성 유지	100%	10 %
	PEGylation의 확인 및 정량	정성 및 정량 실험	100%	10 %
	PEGylated CLA의 나노입자 제조	나노입자 및 형태확인, CLA의 보호확인	100%	10 %
	PEGylated CLA의 반감기 및 산화 안정성	pH 1.5 및 7.4에서 반감기, 온도와 시간에 대한 안정성	100%	10 %
	제조된 PEGylated CLA의 GC 분석 방법 확립	PEGylated된 CLA에서 CLA의 추출방법확립	100%	10%
	PEGylated CLA의 반추위 발효 및 보호효율 조사	반추위 조건에서 CLA의 보호효율 조사	100%	20 %
	PEGylated CLA의 인공 위액에서 안정성 조사	인공위액 pH 1.5-2에서의 안정성 조사	100%	10 %
	비유헌취에서PEGylated CLA 처리효과 규명	유선에 CLA전이 정도 조사	100%	20 %
2차 년도	CLA의 PEGylation에서 PEG 분자량 효과	PEG 분자량 2,000-100,000, 고체상태 및 신장에서의 배출성	100%	5 %
	CLA의 PEGylation에서 PEG 구조효과	선상이나 가지상 구조차이, mono 또는 diol 형태	100%	5 %
	CLA의 PEGylation에서 결합형태효과	PEG와 CLA사이에 ester결합이나 amide결합차이	100%	5 %
	최적화한 PEGylated CLA의 산화안정성 및 반감기	온도와 시간, pH 1.5와 7.4	100%	5 %
	in vivo에서 PEGylated CLA의 항비만효과	C57BL/6J mice를 이용, 사료실험	100%	20%
	PEGylated CLA의 소장 흡수효율조사	<i>In vivo</i> tracking assay	100%	30 %
	PEGylated CLA의 유산양에 투여시 혈중 및 유중 CLA전이 정도 평가	유산양을 이용 혈액 및 유중 CLA함량	100%	30 %

구분	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도	기여도
3차 년도	CLA의 PEGylation에서 대량생산 시스템 구축	관련기업체 협의, 경제성	100%	20 %
	PEGylated CLA의 특성조사	MTT, DAPI 및 FACS 방법차이	100%	10 %
	PEGylated CLA의 지방세포 분화능력억제	중성지방합성방법 사용	100%	10 %
	PEGylated CLA의 지방세포 분화억제에서 PEG의 최적화	농도, 분자량, 구조, ORO 염색 및 GPDH 활성화도	100%	10 %
	PEGylated CLA의 지방세포 분화기전 구명	Western blot 방법	100%	10 %
	PEGylated CLA의 거세한우 첨가 적합성 검사	거세한우이용, 사료분석	100%	20 %
	한우거세 우육 중 CLA 침착 및 육성상에 미치는 영향 조사	거세한우이용, 시험기간, 초음파이용	100%	20 %
최종 평가	CLA의 PEGylation 및 대량생산시스템 구축	최적화 조건 확립 및 경제성 있는 대량생산 시스템 구축	100%	30 %
	in vitro에서의 흡수율 증대 및 기전 구명	in vitro에서의 흡수율 및 활성기전 구명	100%	30 %
	in vivo에서의 CLA 침착 및 안정성 조사	우육에서 CLA 침착 및 안정성 조사	100%	40 %

## 제 5장 연구 개발 성과 및 성과 활용 계획

### 1절 연구 성과

#### 1. 연차별 연구 성과 실적

(단위 : 건수)

구분	특허출원	특허등록	국외(SCI)논문	기타
1차년도	1		1	
2차년도	1		6	
3차년도	2	1	3	
계	4	1	10	

#### 2. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자	학술지명	Vol. (No.)	SCI 구분
2009	Antiobesity Effect of PEGylated Conjugated Linoleic Acid on High-Fat Diet-Induced Obese C57BL/6J( <i>ob/ob</i> ) Mice : Attenuation of Insulin Resistance and Enhancement of Antioxidant Defenses	문현석, 이홍구, 서지혜, 정중수, 김태규, 최윤재, 조중수	J. Nutri. Biochem.	20 (3)	SCI
2008	Physico-Chemical Modifications of Conjugated Linoleic Acid for Ruminal Protection and Oxidative Stability	문현석, 이홍구, 정중수, 김태규, 최윤재, 조중수	Nutr Metab (Lond)	5	SCI
2008	Pegylated Conjugated Linoleic Acid Stimulation of Apoptosis via a p53-mediated Signaling Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells	서지혜, 문현석, 김인용,곽정정, 이홍구, 최윤재, 조중수	Euro. J. Pharmac. Biopharm.	70 (2)	SCI

게재 연도	논문명	저자	학술지명	Vol. (No.)	SCI 구분
2008	Lipolysis is stimulated by PEGylated conjugated linoleic acid through the cyclic adenosine monophosphate-independent signaling pathway in 3T3-L1 cells: Activation of MEK/ERK MAPK signaling pathway and hyper-secretion of adipo-cytokines.	문현석, 이홍구, 서지혜, 광정정, 김인용, 정중수, 김태규, 최윤재, 조중수	J Cell Physiol.	214 (2)	SCI
2007	Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on Lipid Accumulation of 3T3-L1 Cells	문현석, 정정수, 이홍구, 김태규, 최윤재, 조중수	Obesity	15 (11)	SCI
2007	Enhanced anticancer effect of conjugated linoleic acid by conjugation with Pluronic F127 on MCF-7 breast cancer cells	광정정, 문현석, Arote Rohidas, 서지혜, 전희선, 최윤재, 조중수	Cancer Letters	254 (2)	SCI
2007	Regulation of adipocyte differentiation by PEGylated all-trans retinoic acid: reduced cytotoxicity and attenuated lipid accumulation	문현석, 광정정, 송호현, 김인용, 강호림, 김유경, 정중수, 최윤재, 이홍구, 조중수	J Nutr Biochem.	18 (5)	SCI
2007	Leptin-induced matrix metalloproteinase-2 secretion is suppressed by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid	문현석, 이홍구, 서지혜, 정정수, 광정정, 김태규, 최윤재, 조중수	Biochem. Biophys. Res. Commun.	356 (4)	SCI
2007	Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity	문현석, 이홍구, 최윤재, 김태규, 조중수	Chem. Biol. Interact.	167 (2)	SCI

게재 연도	논문명	저자	학술지명	Vol. (No.)	SCI 구분
2006	Down-regulation of PPAR $\gamma$ 2 -induced Adipogenesis by PEGylated Conjugated Linoleic Acid as the Pro-drug : Attenuation of Lipid Accumulation and Reduction of Apoptosis	문현석, 이홍구, 서지혜, 정중수, 김태규, 김인용, 최윤재, 조종수	Arch. Biochem. Biophys.	456 (1)	SCI

### 3. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2007	항암용 불포화 고급지방산 유도체 및 그 제조 방법	서울대학교	한국	10-2007 -0068172
2008	항비만 활성 폐길화된 공액화 리놀레산	서울대학교	한국	10-2008 -0138061
2009	과클리탁셀 적재 공액화 리놀레산 폴록사마 하이드로겔 약물전달장치	서울대학교	한국	10-2009 -0014996
등록된 특허의 경우				
등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2008	불포화 고급지방산의 폐길화방법	서울대학교	한국	10-0856938

## 2절 연구 결과의 활용 계획

1. 참여기업에 기술 이전
  - 고 기능성 축산물 사료 개발에 활용 (현재 국제 특허 준비 중)
2. PEG-CLA의 물에 용해성을 이용한 CLA첨가 음료제로 개발
  - (음료회사와 공동 개발 타진 중)
3. 한우 고급브랜드에 활용
  - (광역 및 지역 브랜드연계를 통한 고품질 기능성 한우 브랜드 탄생)
4. 사양시험 결과를 특허출원

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

### 1절 고분자 나노 입자의 생물공학에의 응용

1. 미국 NC 대학 Lim 교수팀은 백금을 포함한 배위 결합 나노 입자에 항암제를 담지하여 독성이 없는 항암 효력을 나타냈다 (Rieter et al., 2008).
2. 미국 Wayne 주립대학 Panyam 교수팀은 고분자 나노 입자에 항암제와 염료를 같이 담지하여 빛을 쬐이면 항암 효과가 배가 된다는 결과를 발표하였다 (Khdair et al., 2008).

### 2절 고분자 나노 입자의 제조 방법에 대한 정보

1. 이란 Shiraz 대학의 Rafiei 교수팀은 hydrogel 나노입자를 만든 것에 대한 약물 전달의 정보를 입수하였다 (Hamidi et al., 2008).
2. 일본 Hoshi 대학의 Machida 교수팀은 고분자 prodrug로 구성된 미립자를 약물 전달에 응용한 것에 대한 정보를 입수하였다 (Onishi et al., 2008).

### 3절 항암제를 PEG에 결합시키는 방법에 대한 정보

1. 미국 Wisconsin 대학의 Kwon 교수팀은 항암제인 carboxypeptidase A를 PEG와 결합시켜 효소의 안정화를 가져왔다 (Tom et al., 2005).
2. 미국 Ancancer회사는 항암제인 methioninase를 PEG와 결합시키면 면역 억제 효과가 있다는 것을 발표하였다 (Yang et al., 2004).

## 제 7장 참고문헌

- W. J. Rieter et al., J Am Chem Soc, 130, 11584 (2008)
- A. Khdair et al., Mol Pharm, 5, 795 (2008)
- M. Hamidi et al., Adv Drug Deliv Rev, 14, 1638 (2008)
- H. Onishi et al., Molecules, 13, 2136 (2008)
- G. N. Ton et al., J Control Release, 104, 129 (2005).
- Z. Yang et al., Cancer Res, 64, 6673 (2004)
- Y. Park et al., Lipids, 32, 853 (1997)
- Y. L. Ha et al., Carcinogenesis, 8, 1881 (1997)
- Y. Choi et al., J Nutr, 130, 1920 (1999)
- R. B. Greenwald et al., Adv Drug Deliv Rev, 5, 217 (2003)
- A. Abuchowski et al., J Biol Chem, 252, 3582 (1997)
- D. Bauman et al., In Proceedings of the American Society of Animal Science. [Http: //www.sas.org/jas/symposiC2/C3roceedings/0937.pdf](http://www.sas.org/jas/symposiC2/C3roceedings/0937.pdf) (1999)
- H. Blankson et al., J. Nutr. 130, 2943 (2000)
- M. Cook et al., Poult Sci, 72, 1301 (1993)
- C. Corino et al., J Anim Sci, 81, 2219 (2003)
- T. Dhiman et al., J Dairy Sci, 82, 2146 (1999)
- J. Folch et al., J Biol Chem, 226, 497 (1957)
- J. Folch et al., J Biol Chem, 226, 497 (1957)
- G. Lepage et al., J Lipid Res, 27, 114 (1986)
- P. Mir et al., Am J Clin Nutr, 79, 1207S (2004)
- D. L. Palmquist et al., J Dairy Sci, 69, 1020 (1986)
- Z. Wu et al., Adv Drug Deliv Rev, 28, 323 (1997)