

발간등록번호

11-1543000-000137-01

Medi-Farm 산업화 연구사업단

(Medi-Farm Industrialization Research Center)

동 아 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Medi-Farm 산업화 연구사업단”의 보고서로 제출합니다.

2013년 7월 31일

주관연구기관명 : 동아대학교

주관연구책임자 : 정영기

제1세부연구책임자 : 정영기

연 구 원 : 최영현

연 구 원 : 설상철

연 구 원 : 서민정

연 구 원 : 박정욱

연 구 원 : 강병원

연 구 원 : 김민정

연 구 원 : 이해현

제2세부연구책임자 : 조영수

연 구 원 : 김정인

연 구 원 : 안희영

제3세부연구책임자 : 이재현

연 구 원 : 이진우

제4세부연구책임자 : 정민호

연 구 원 : 서수영

연 구 원 : 이상화

협동연구기관명 : 순천대학교

협동연구책임자 : 서권일

연 구 원 : 이미경

연 구 원 : 권순재

연 구 원 : 이진

참여기업 : S&J푸드(주), 천호식품(주),

청원농산(주), 삼삼(주), 세부식품(주),

요 약 문

I. 제 목

Medi-Farm 산업화 연구사업단

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- FTA와 더불어 급변하는 국제 농업시장에서 국내농업의 경쟁력을 갖추기 위해 최신 경향에 맞는 국내 바이오산업의 활성화 유도
- 바이오산업의 활성화를 통하여 웰빙시대 국민의 건강생활 증진
- 전략농산물 가공제품 개발 및 산업화로 농가수익 및 기업수익 증대

III. 연구개발 내용 및 범위

□ 농산물소재 면역증강 제품의 상용화

- 코디세핀 고함량 동충하초의 면역증강 효과
 - 코디세핀 고함량 동충하초의 코디세핀 함량 측정
 - 코디세핀 고함량 동충하초의 면역활성
 - 코디세핀의 항암효과 연구
 - 흑마늘 추출물의 면역상승효과 연구
- 붉은 덕다리 버섯의 물질분석 및 생리기능성 확인
 - 균사체 배양으로부터 생산된 다당류의 구조규명
 - 분리된 다당류의 항염증 활성
 - 분리된 다당류의 면역활성
- 발효 농산물 소재의 면역증강 활성
 - 와송 발효 추출물의 제조 및 면역증강활성 연구
 - Epicatechin gallate의 면역활성 연구
 - 꾸지뽕 발효 추출물의 제조 및 면역증강활성 연구
 - 미강 발효 추출물의 제조 및 면역증강활성 연구
- 농산물과의 융합을 위한 해산물 소재 기능성 검증
 - 해조류 톳의 추출 및 기능성 물질 구조 규명
 - Hf-1의 항산화 효과 연구

- Hf-1의 항염증 효과 연구
- 토마토의 기능성을 이용한 기능성 토마토 제품 개발
 - 박테리아를 이용한 라이코펜 고함량 토마토 육종 및 재배
 - 라이코펜 함량 검증
- 농산물 소재 기능성 제품의 제조
 - 기능성 국수의 제조 및 이화학적 특성 분석
 - 토마토 퓨레 조청 함유 기능성 고추장의 제조 및 이화학적 특성 분석
- 카페인의 항염증효과 연구
 - 세포로부터 카페인의 항염증 활성 연구
- 코디세핀의 항암효과 연구
 - 코디세핀에 의한 인체백혈병 세포의 증식억제 기전 확인
 - 코디세핀에 의한 인체 전립선암세포의 항암활성 및 암세포 전이 억제 효능 검토
 - 인체 전립선암세포에서 Akt 불활성화를 코디세핀의 암세포 전이 억제 기전 확인
 - 코디세핀의 항염증, 항전이 및 항암제 내성 극복 효능 및 관련 기전 연구

□ 농산물소재 간 기능 개선 및 혈당조절 효과 검증

- 농산물 소재를 이용한 간질환 개선 제품의 개발
 - 간 독성 모델 흰쥐를 이용한 코디세핀 고함유 동충하초 분말의 지방간 개선효과 규명
 - 간기능 보호 및 개선제로서의 코디세핀 고함유 동충하초 건강기능식품 개발
 - 발효 와송, 발효 꾸지뽕 열매의 비알콜성 지방간 개선효과 규명
- 농산물 소재를 이용한 혈당조절 제품의 개발
 - 제2형 당뇨병 동물 모델에 있어서 고코디세핀 동충하초의 혈당조절 효과
 - 비만형당뇨 및 비알콜성 지방간 동물모델에 있어서 고코디세핀 동충하초의 비만 및 비알콜성 지방간 개선효과
 - 고지방·고단순당 식이로 인슐린저항성을 유발한 마우스에 있어서 와송 및 발효 와송의 인슐린저항성 개선효과 및 비알콜성 지방간 개선효과

□ 약용작물유래 항염증 효능 제품의 상용화

- 약용작물유래 항염증 효능 물질의 탐색 및 독성실험
 - 한약재 HTR에서 추출한 새로운 화합물 JNP3가 PMA로 유도한 MCF-7 사람 유방암세포에서 암세포 침윤과 전이억제 확인
 - HeLa 세포에서 MP-2, 황칠나무에서 추출한 새로운 화합물, 에 의해 유도된 Apoptosis (세포자멸사) 와 세포주기억제의 상호관련 확인
- 섬유소 분해효소 활용을 위한 기능성 생물고분자 및 섬유소 분해효소 생산공정 최적화
 - 생물고분자 폴루란의 생산공정 최적화
 - 생물고분자 PS-7의 생산공정 최적화
 - 섬유소 분해효소의 생산공정 최적화

□ 약용작물의 유용물질을 이용한 항암보조제 및 항장제품의 상용화

- 코디세핀 고탐유 동충하초를 이용한 항암치료 보조제 개발
 - 코디세핀 고탐유 동충하초의 안정성 및 유효성 검증
 - 코디세핀 고탐량 동충하초 추출물의 항암 방사선 치료에 대한 정상세포의 방호효과
- 코디세핀 고탐유 동충하초를 이용한 항장품 소재 개발
 - 코디세핀 고탐유 동충하초의 항장효과 검증

□ 라이코펜 고탐량 토마토를 이용한 체중조절 개선 제품의 상용화

- 토마토를 주원료로 한 발효원액 제조
 - 주모 및 종초의 배양
 - 토마토 속성 발효원액 제조
 - 발효원액에 대한 이화학적 분석
- 토마토를 주원료로 한 항비만 효능 시제품 제조 및 기능성 검증 주원료로 한 발효원액 제조
 - 토마토 발효 원액을 이용한 기능성 음료의 제조
 - *in vitro* 및 *in vivo*에서 토마토 발효원액 및 항비만 후보 물질들의 항비만 효과 검증
 - 1차 시제품 제조 완료

- 토마토 발효 원액을 이용한 항비만 효능 제품의 상품화 주원료로 한 항비만 효능 시제품 제조 및 기능성 검증 주원료로 한 발효원액 제조
 - 토마토 발효원액을 이용한 다이어트 음료의 개발
 - 개발된 제품의 최종 시제품 생산
 - 제품에 대한 안정성 평가
 - 제품의 디자인 및 상품화 추진

IV. 연구개발결과

- 육중한 코디세핀 고함유 변태기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 코디세핀 함량은 증류수를 이용하여 초음파추출을 하였을 때 가장 효율적이며, 코디세핀 함량은 7.42 mg/g으로 시판의 변태기 동충하초 보다 최고 7배 정도 높게 나타났으며 눈꽃 동충하초는 cordycepin이 검출되지 않았다.
- 동충하초의 면역활성은 Th1 cytokine인 IL-2, TNF- α 의 생성은 억제되었으며, Th2 cytokine인 IL-4, IL-10의 생성은 증가하였다. LPS와 Con A의 자극제에 대하여 cytokine IL-2, TNF- α 의 생성은 LPS와 Con A 처리군보다 낮은 생성을 보였으나 IL-4, IL-10에서 높은 생성을 나타내었으며, C. *militaris* JLM 0636 추출물이 C. *militaris* 보다 높은 생성을 나타내어 C. *militaris* JLM 0636 추출물은 Th1 cell에 의해 매개될 수 있는 세포성 면역은 억제되며, Th2 cell에 의해 매개되는 체액성 면역을 활성화시키며, 코디세핀이 면역효과를 증대시키는 것으로 사료된다.
- 코디세핀 농도 의존적으로 신경아세포종과 흑색피부 종양세포의 증식저해 효과를 나타내었고, 코디세핀처리 시간이 경과함에 따라 세포사멸을 나타내는 sub G1기가 증가되는 반면에 G0/G1기의 DNA 함량이 감소되었으며 세포사멸 관련 단백질의 활성화가 증가하는 것으로 나타나 세포사멸이 진행됨이 확인되었다.
- 트립톨리드 농도 의존적으로 흑색피부 종양세포의 증식저해 효과를 나타내었고 세포사멸을 나타내는 sub G1기가 증가되었으며 annexin V-positive세포가 트립톨리드 처리시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내어 세포사멸이 증가함을 알 수 있었다. 트립톨리드 처리 농도가 증가함에 따라 세포사멸 관련 단백질들의 활성화가 증가되었는데 특히 외인성 세포사멸 관련 단백질인 Fas와 FADD의 증가 및 caspase-8, Bid 활성화를 경유한 내인성 세포사멸 관련 단백질인 미토콘드리아 시토크롬 방출과 caspase-9의 활성화가 관찰되었다. 이러한 결과는 트립톨리드에 의한 흑색피부 종양세포의 세포사멸은 내인성과 외인성 기전 모두에 의해 일어남을 알 수 있었다.
- 생리활성물질을 다량함유하고 있는 마늘의 발효산물인 흑마늘의 면역활성을 검증하기 위하여 C57BL6 마우스 비장세포를 이용하여 흑마늘이 비장세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다. 흑마늘 추출물은 시판되는 남해 흑마늘 엑기스를 농축하여 사용하였다. 그 결과 IL-2에서 흑마늘 추출물만 처리한 군에서 생성이 증가하였으며, LPS와 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때 IL-2와 TNF- α , IFN- γ 의 생성이 LPS만 처리한 군보다 증가하여 대식세포나 T림프구의 발현에 의해 일어나는 세포성 매개 면역을 활성화를 유도하는 Th1 세포의 발현을 활성화 하였다. 그리고 IL-6는 흑마늘 추출물만 처리하였을 때 후기생성이 증가하였으며, LPS와 흑마늘 추출물을 함께 처리한 경우 LPS만 처리한 군보다 IL-4와 IL-6의 생성이 증가하였다. IL-10은 LPS와 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때 후기 생성이 감소하였는데, 이는 B 림프구의 활성화에 따른 항체생성 면역을 활성화

하며 Th1 세포로부터 유도되는 세포성 면역반응을 억제함으로써 항체유도 체액성 면역 반응으로 전환을 효과적으로 조절하는 것을 확인하였다. 따라서 흑마늘 추출물은 마우스 비장세포에서 T 림프구의 활성화에 따른 Th1 세포와 Th2 세포가 활성화되어 면역계의 세포성 면역과 체액성 면역반응을 활성화하여 면역조절에 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

- 붉은 덩다리 버섯의 균사체 배양액으로부터 다당류를 분리·정제하여 NMR, GC-MS를 이용하여 구조를 규명한 결과 비환원성 Glcp-(1→)잔기, →4-Glcp-1→, →4,6-Glcp-1→ 결합을 가진 다당류임을 유추 할 수 있었다. 또한, U937 인체 혈구암 세포에 있어서 다당류의 면역활성에 대하여 조사한 결과, 다당류로 처리한 세포에서는 Bax와 Bad 단백질이 비처리 때보다 각각 23배와 18배 높게 발현되었음을 알 수 있었다.
- 분리된 다당류의 면역활성은 마우스 비장세포내 IL-2의 발현이 유도됨에 따라 T 림프구의 성장에 영향을 미치며, LPS자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, IFN- γ 의 발현이 억제되고, IL-4, IL-5, IL-10의 분비가 증가됨에 따라 Th2 cell의 활성화에 의해 B 림프구를 활성화하여 항체생성 면역반응인 체액성 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 conA의 자극에 의해서는 염증성 cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성이 유도됨에 따라 T 림프구의 발현을 유도하며, 초기 염증반응을 일으켜 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.
- 꾸지뽕 열매의 면역증강 작용을 검토하기 위하여 유산균을 이용하여 발효한 후 70% 에탄올 추출하여 그 추출물을 마우스 비장세포에 작용한 후 분비되는 cytokine으로 면역활성을 조사하였다. 그 결과 발효에 의해 성분의 변화로 총 페놀함량을 측정된 결과 발효에 의해 폴리페놀 함량이 약 47% 증가하였으며, 면역활성에서는 발효 꾸지뽕 열매에서 cytokine IL-2와IL-4의 분비량이 증가하였다. 그리고 LPS 자극제와 함께 처리하였을 때, Th1 cell 유도 cytokine인 IL-2, IL-12, TNF- α 의 분비는 억제되었으나, Th2 cell 유도 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10의 분비량이 유의적으로 증가하였다. 이는 발효 꾸지뽕 나무 열매 추출물이 Th1 cell의 발현에 의해 유도되는 세포성 면역작용 반응은 억제하며, B 림프구에 의한 항체생성과 관련된 체액성 면역작용을 유도하는 Th2 cell의 발현을 활성화 하는 것으로 사료된다.
- 와송 유산균 발효 추출물은 마우스 비장세포내 LPS에 의해 유도된 면역반응에서 Th1 cytokine인 IL-2, IL-12의 분비를 억제하며, Th2 cytokine인 IL-5, IL-10의 분비를 증대하였으며, conA의 자극에 의해 IL-2, IL-12, IFN- γ 의 분비는 감소하였으며, IL-6, IL-10의 분비를 증대하여 발효가 Th2 cell의 활성화에 의한 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.
- Epicatechin gallate의 면역활성은 마우스 비장세포내 LPS 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, IFN- γ 의 분비는 억제되었으며, IL-5, IL-10의 분비는 증가하였다. 또한 conA자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, IFN- γ 의 분비는 억제되었으며, IL-6, IL-10의 분비는 증

가하였다. 또한 이들의 활성은 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 Th2 cell의 활성화에 영향을 미치는 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.

- 현미 발효 추출물의 면역증강효과는 마우스 비장세포내 cytokine IL-2, IL-4의 분비를 유도하였으며, LPS자극에 의해 IL-2, IL-12는 억제되었고, IL-4, IL-10의 분비는 증가하는 것으로 보아 발효가 Th2 cytokine발현에 따른 면역증강에 효과가 있는 것으로 사료된다.
- 건조 톱을 80% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 n-hexane, ethyl acetate, n-BuOH, Aqueous n-BuOH fraction으로 순차적으로 분리하였다. 분리된 4개의 분획물 중에 항산화 활성이 높은 n-BuOH 분획물을 reserve-phase column chromatography를 실시하여 분리된 3개의 BA, BB, BC 분획물에 대한 항산화 활성을 검토하였다. 가장 항산화능이 높은 BB 분획물은 모든 실험에서 농도의존적으로 활성이 증가하는데, 시료의 농도가 1.0 mg/ml일때 DPPH radical scavenging activity와 Reducing power activity는 $45\pm 0.14\%$, 1.34 ± 0.23 로 가장 높게 나타난다. β -carotene-linoleic acid activity와 Hydrogen peroxide scavenging activity도 $76\pm 0.12\%$ 와 $82\pm 0.06\%$ 로 가장 높았으며, ABTS radical scavenging activity도 $65\pm 0.17\%$ 의 활성을 나타낸다. 이상의 연구 결과에서, 최종 분리된 BB분획물은 높은 항산화능을 가진 물질을 함유하고 있을 것으로 예상되며, 이는 앞으로 새로운 천연 기능성 식품으로서의 이용 가능성을 시사하고 있다.
- Hf-1의 항염증 활성은 BV2 microglia 세포에서 PARP protein의 분해에 의한 세포독성은 나타나지 않았으며, NO의 생성과 iNOS 발현이 억제됨에 따라 항염증활성이 나타나고 이들의 반응은 핵내의 NF- κ B의 활성저해를 통해서 조절하게 된다. 또한 Heme HO-1의 발현에 의해 NO의 생성이 억제되며, Nrf-가 HO-1을 활성화 시켜 iNOS의 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다.
- Hf-1의 RAW 264.7 cells에 대하여 세포독성을 나타내지 않았으며, LPS로 유도된 iNOS, COX-2, IL-1 β , TNF- α 의 발현 증가가 HF-1에 의해 억제되며, 이는 Hf-1이 NF- κ B의 전사활성을 억제하여 이들 유전자의 발현을 저해하는 것으로 판단된다.
- 미생물 자극으로부터 토마토 기능성성분인 라이코펜 고함량 토마토를 육종하여 재배하였으며, 라이코펜 합성에 관련된 phytoene synthase의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 라이코펜의 함량이 증가하는 것을 확인하였다. 토마토를 재배하는데 있어 본 실험에서 이용한 세가지의 박테리아를 처리하게 되면 수확량에서는 큰 차이를 찾을 수 없지만, lycopene의 합성에 관여하는 유전자의 발현이 증가함으로써 인해 lycopene의 함량도 증가한 토마토를 생산할 수 있을 것이다. 이는 현재 많이 이용되고 있는 분자생물학적 방법을 이용하지 않고 순수 무해한 토양 미생물을 재배시에 첨가해 주는 것 만으로도 유용 물질인 lycopene을 다량 함유한 토마토를 생산할 수 있다는데 의의가 있을 것이다.

- 쌀을 이용하여 국수제조에 한계점을 개선하기 위하여 다양한 영양소를 함유한 현미를 사용하여 이를 발효한 후 국수를 제조하여 특성을 확인하였다. 국수는 백미와 현미를 이용하여 백미국수, 발효백미국수, 현미국수, 발효 현미국수를 각각 제조하여 사용하였다. 제조된 국수의 일반성분 분석 결과 발효하였을 때 조단백질 함량은 증가되었으며, 조지방, 탄수화물의 함량은 감소하였다. 또한 수분의 함량은 현미국수가 백미보다 2배 이상의 함량을 보였으며 발효하였을 때 약간 감소하는 것을 확인하였다. 색도는 발효함에 따라 약간의 변화는 있었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 조리시 중량, 부피는 증가하였으나 백미로 만든 국수에서 그 변화가 가장 낮았으며, 조리된 국물의 탁도는 백미로 만든 국수에서는 높게 나타났지만 다른 국수에서는 일정한 탁도를 나타내었다. 조리된 국수의 texture은 조리시에 수분의 함유로 조직이 부드러워짐에 따라 대부분 감소되었으나, 발효함에 따라 탄성도는 증대되었다. 따라서 영양학적 성분을 다량 함유하는 현미를 이용한 발효현미국수를 제조함으로써 쌀을 이용한 국수제조의 단점을 개선하고 현대인의 기호도에 적합한 쌀 가공식품으로의 개발이 가능하다고 사료된다.
- 쌀전통발효식품인 고추장의 기능성을 부가하고 맛과 기호성을 개선하기 위하여 토마토 퓨레조청을 첨가한 고추장을 최적발효조건을 설정하기 위해 소금의 농도를 달리하여 GCJ 14, 16, 18, 20의 조건으로 제조한 후 발효하여 고추장의 이화학적 성분의 변화로 발효의 최적조건을 설정하였으며, 기능성 성분인 라이코펜의 함량을 분석하였다. 그 결과 토마토 퓨레 조청 함유 고추장의 pH의 변화는 발효기간동안 감소하였으며, 당도는 감소하였다 증가를 반복하였으며, 수분과 염도, 색도는 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 미생물의 변화는 발효가 진행됨에 따라 총균수와 유산균수는 증대되었으며, 총균수 대비 유산균의 생성비율은 GCJ 18와 GCJ 20조건에서 높은 비율을 확인하였다. 토마토 기능성 성분인 라이코펜의 함량의 변화는 발효과정 동안 유의적 변화를 나타내지 않았다. 그리고 제조된 고추장의 조단백질, 조지방, 조회분, 탄수화물의 일반성분함량의 변화와 맛, 기호성 등의 관능검사에서 GCJ 20에서 가장 발효에 적합한 조건으로 판단된다. 따라서 토마토 퓨레조청 함유 고추장으로 현대인의 기호에 맞으면서 기능성이 부과된 고추장의 개발의 가능하다고 사료된다.
- 카페인은 LPS에 의해 microglia cell에 세포독성을 나타내지 않았으며, NO, PGE₂, TNF- α 의 발현이 저해됨에 따라 항염증 활성이 나타나고, NF- κ B의 활성은 Akt억제를 통해서 저해됨에 따라 염증성 유전자의 발현을 조절하는 것으로 판단된다.
- 코디세핀에 의한 apoptosis 유도가 ROS 생성 의존적으로 이루어지고 있음을 알 수 있었고 LNCaP 세포에서 코디세핀은 PI3K/Akt 경로의 불활성화를 통해 LNCaP 세포의 이동성 및 invasion을 억제할 수 있을 가능성을 보여주었다. 또한, TRAIL/cordycepin에 의해 유발된 apoptosis에서 JNK가 중요한 역할을 한다고 사료된다.
- 코디세핀 고함유 번데기 동충하초의 지방간 개선효과를 검토하기 위해 오르트산 유발 지방간 흰쥐에 눈꽃 동충하초, 번데기 동충하초, cordycepin 함량을 높인 번데기 동충하초를 각각 3% 식이 첨가 시킨 후 혈청 임상생화학적 특성과 간장 조직 검사를 조사하였

다. 그 결과, 간장에서의 triglyceride 농도가 증가함으로써 지방간 유발이 확인되었고 혈청 triglyceride 농도가 감소함으로써 지방간에서 나타나는 전형적인 현상이 확인되었다. 이에 반해 OA투여와 함께 동충하초를 동시에 투여한 군들에서는 간장의 triglyceride 농도가 감소하고 혈청 triglyceride 농도가 증가해서 지방간이 개선되는 효과가 확인되었다. 또한 간장의 형태학적 및 조직병리학적 관찰에서도 OA유발 지방간에서는 지방의 침착과 지방세포수가 현저히 증가되었으나, 각각의 동충하초 동시투여에 의한 간장 및 혈청 triglyceride의 감소와 함께 간장 조직의 지방침착 정도 및 지방 세포수의 감소로 지방간 개선 효과가 다시 한번 확인되었고, 그 중 cordycepin 고함유 번데기 동충하초 투여군에서 가장 근접하게 정상군의 간장과 유사한 형태를 보임으로서 cordycepin이 OA 유발 지방간에 개선효과가 있는 것으로 사료된다.

- 본 실험에서는 젖산 발효한 와송의 오르트산으로 유도된 지방간의 보호효과에 대하여 고찰하였다. 자연 건조 시킨 와송 (*Orostachys japonicus*)분말과 이 건조 분말에 유산균 Mix (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*)로 발효시킨 와송을 실험 재료로 사용하였으며, Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 6일간 적응기간 후, 각 군에서 체중이 동일하게 난괴법(randomized complete block design)으로 분류하여 정상군 (N), Orotic acid (OA), 오로트산+2.5%(w/w) *Orostachys japonicus* (2.5OJ), 오로트산+5%(w/w) *Orostachys japonicus* (5OJ),오로트산+2.5%(w/w) 발효 시킨 *Orostachys japonicus* (2.5FOJ), 오로트산+5% 발효 시킨 *Orostachys japonicus* (5FOJ) 투여군으로 나누어 실험을 진행 하였다. TBARS를 각 장기 별로 측정된 결과, liver에서 OA군이 N군보다 높게 나타났으며, 2.5OJ, 5OJ, 2.5FOJ, 5FOJ군 모든 시료 군에서 N군 수준으로 감소하여 유의적인 감소 효과를 확인할 수 있었다. Liver 분획에서 얻은 microsome에서는 OA군에서 N군보다 높게 나타났고, 모든 시료 군에서는 농도 의존적으로 약간의 감소 형태를 보이나, 유의적인 차이는 없었다. 혈청 total lipid, total cholesterol, phospho lipid, free fatty acid의 농도 모두 N군에서 높았고, OA군에서 낮게 측정되었다. 2.5OJ군, 5OJ군, 2.5FOJ군, 5FOJ군에서 또한 total lipid, total cholesterol, phospho lipid의 농도 변화는 OA군과 차이가 없었지만, free fatty acid의 농도에서 OA군에 비해 증가 경향을 보였다. 5FOJ에서 free fatty acid는 N군 수준으로 증가함을 알 수 있었고, OJ와 FOJ는 혈중 지질에 크게 유의한 영향을 나타내지 않는 것으로 확인하였다. 또한, H&E 염색을 통해 광학 현미경으로 관찰한 결과, N군에서 간 세포들은 뚜렷하게 둥근 핵을 가지고, 세포 간극이 좁은 일정한 소엽 구조를 유지하고 있었다. OA군의 간 조직은 간 세포의 핵이 일정하지 않고, 간 소엽 사이에 지방 입자들이 끼여 균일하게 배열되어 있지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 2.5OJ군과 5OJ군은 뚜렷한 변화를 보이지 않았고, 2.5FOJ군에서 어느 정도 개선된 것으로 관찰되었다. 5FOJ군에서 뚜렷한 개선 효과를 보였으며, OA군과 비교하였을 때, 5FOJ군은 지방 입자들의 수가 감소된 것을 확인할 수 있었고, 간 세포의 핵 또한 N군과 같이 뚜렷한 둥근 모양을 보였다. 간 소엽의 간격 또한 좁아져 5FOJ가 Orotic acid 투여의 지방 축적으로 인한 간 조직 손상에 개선 효과가 있는 것으로 사료된다.

- 본 실험에서는 발효한 꾸지뽕의 오르트산으로 유도된 지방간의 보호효과에 대하여 고찰하였다. 4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 구입하여 일주일간 시판 고형사료를 급여하면서 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 체중이 동일하게 난피법 (randomised complete block design)으로 분류하였고 각 군마다 6마리씩 나누고, 식이와 물은 10일간 자유 섭취시켰다. 정상군 (N), 오르트산(Orotic acid) 투여 대조군 (OA), 오르트산+2.5% 꾸지뽕나무 열매 분말 투여군 (2.5CT), 오르트산+5% 꾸지뽕나무 열매 분말 투여군 (5CT), 오르트산+2.5% 유산균 발효 꾸지뽕나무 열매 분말 투여군 (2.5FCT) 및 오르트산+5% 유산균 발효 꾸지뽕나무 열매 분말 투여군 (5FCT)으로 나누어 실험을 진행하였다. AST, ALT 활성은 정상군을 제외한 Orotic acid 1% 수준 식이 투여군에서 유의적으로 증가하였으나 5CT 식이 첨가 군에서 OA투여 대조군보다 약간 낮은 양상을 보였다. Cholinesterase활성은 Orotic acid 투여 대조군에서 증가 경향을 보였으나, Orotic acid를 1% 수준과 각 시료를 식이에 첨가한 2.5CT, 5CT, 2.5FCT 및 5FCT군에서는 정상군과 비슷한 수준으로 감소하였다. 한편, ALP 및 LDH활성은 OA투여 대조군보다는 감소한 경향을 보였으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 혈청 총 지질농도 및 총 콜레스테롤 농도는 Orotic acid 1% 수준 식이 투여군에서 정상군(N)에 비해 감소한 경향을 보였으며, 혈청 인지질 농도도 Orotic acid 1% 수준 식이 투여군에서 정상군(N)에 비해 감소한 경향을 보인 반면, 5CT군에서 약간의 차이를 보여 꾸지뽕나무 열매분말 5% 농도가 혈중 인지질 농도에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 혈청 유리지방산 농도는 대조군(OA)에서 정상군(N)에 비교하였을 때 감소하는 경향을 보였으나, 2.5CT, 5CT, 2.5FCT, 5FCT군에서는 대조군(OA)과 달리 정상군(N)과 비슷한 수준을 나타내었다(Fig. 2). 이와 같은 결과로 보아 Orotic acid 1% 수준의 식이 첨가는 VLDL의 분비 감소로 인해 혈청 지질농도에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 꾸지뽕나무 열매 분말 5%수준의 식이첨가는 Orotic acid 투여로 인해 감소한 혈청 지질농도를 약간 증가시켜 유의적인 효과를 나타내는 것으로 사료된다.
- 제2형 당뇨병모델인 db/db mouse에게 대조식이, 저코디세핀 동충하초 또는 고코디세핀 동충하초를 3% 수준으로 첨가한 식이를 6주간 제공하였다. 저코디세핀 동충하초는 혈당 당화혈색소 감소 및 인슐린 증가효과를 나타내었고, 고코디세핀 동충하초의 경우 저코디세핀 동충하초보다 더 큰 효과를 나타내었다. 고코디세핀 동충하초는 혈장 중성지방 및 콜레스테롤, ALT 및 AST 활성을 감소시켰다. 따라서 동충하초는 혈당조절 효과가 우수하고, 고코디세핀 동충하초는 저코디세핀 동충하초에 비해 이상지질혈증 개선에 도움을 주는 것으로 나타났다.
- 비만형 당뇨병모델인 ob/ob mouse에게 대조식이 또는 고코디세핀 동충하초를 식이의 1% 또는 3% 수준으로 10주간 제공하였다. 3% 동충하초군의 혈당, 당화혈색소 농도, HOMA-IR, 간조직의 지질축적량은 대조군에 비해 감소하였으며, 혈청 지질 profile이 개선되었다. 1% 및 3% 동충하초의 섭취는 ALT 및 AST 활성, 간조직 지질과산화물을 감소시켰고, SOD 및 catalase 활성을 증가시켰다. 따라서 고코디세핀 동충하초는 혈당 조절 및 비알콜성 지방간 개선 효과가 우수한 것으로 나타났다.

- C57BL/6J mouse를 네 군으로 나누어 대조군에게는 대조식이, 고지방·고단순당(HFHS)군에게는 고지방·고단순당 식이를, 와송군 및 발효 와송군에게는 HFHS 식이에 동결건조한 와송 및 발효와송을 5% 수준으로 첨가한 식이를 12주간 제공하였다. 와송 및 발효와송의 섭취는 고지방·고단순 당식으로 당뇨병을 유도한 마우스에 있어서 인슐린 저항성을 개선하고 고혈당과 고콜레스테롤혈증을 개선하였으며, 비알콜성지방간을 완화하였다.

- 본 연구에서는 한약재로부터 분리한 JNP3가 PMA 유도된 MCF-9세포에 있어서 MMP-9의 발현에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. JNP3로 처리하였을 때에는 MMP-9과 mRNA, 단백질의 발현이 선택적으로 저해되었으며 이 결과는 MMP 유도된 MCF-9세포에 있어서 세포 침윤과 전이의 감소를 나타내는 결과이다. 또한, 2개의 AP-1 binding sites에 mutation을 일으켜 transfection 하면 luciferase activity가 농도 의존적으로 감소하게 되는데 이것은 AP-1 binding sites는 MMP-9의 expression에는 중요한 역할을 하지 못한다는 것을 암시하며 NF- κ B binding site에 mutation을 일으켜 transfection 하면 luciferase activity에 영향을 미치지 않으므로 MMP-9 expression에 NF- κ B binding site가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 JNP3는 PMA-induced MMP-9 activity와 expression을 유의적으로 억제하였는데 이것은 전사인자인 NF- κ B activation의 blocking에 의한 것이었다. 또한 JNP3는 MCF-7세포의 침윤과 전이를 억제시켰는데. 이 결과로 JNP3는 암의 전이를 억제하는 항암제로 개발될 수 있다는 포텐셜이 있다고 사료된다.

- 황칠나무로부터 분리된 oleifolioside A의 새로운 항암제로서의 가능성을 알아보고자 HeLa세포에 있어서 oleifolioside A의 생화학적 기전에 대하여 알아보았다. Oleifolioside A의 처리에 의한 caspases의 활성 정도를 기질을 이용하여 직접 분석한 결과 MP-2 처리시간 증가에 따라 caspase-3,8,9가 현저히 증가되었고 caspase-3의 활성이 상대적으로 큰 변화가 있었음을 알 수 있었다. 또한, oleifolioside A가 농도 의존적으로 Bad의 발현양 증가 시키고 Bid의 발현량은 감소시키는 것을 확인 할 수 있었고 oleifolioside A 처리에 의하여 MMP loss가 현저하게 증가되었으며, 이러한 현상은 시간 의존적으로 진행되는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 oleifolioside A가 항암활성을 지니고 있다는 첫 연구결과이며, oleifolioside A는 apoptosis의 주요한 인자인 Bcl-2 family 단백질 발현 변화에 의한 미토콘드리아의 막 전위의 변화 유도과 caspase-3 활성 증가 및 PARP의 분절을 통해 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

- 기능성 생물고분자인 플루란과 PS-7의 생산공정을 최적화하였으며, 섬유소 분해효소를 생산하는 미생물을 해수에서 분리하고 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 생산조건을 최적화하였다.

- 코디세핀 고함유 동충하초(*Cordyceps militaris* JLM 0636) 열수 추출물의 유전독성시험과 설치류에서 단회 투여 독성시험에서는 특별한 이상소견을 발견할 수 없었다.

- 항암치료를 받고 있는 환자의 항종양 면역반응을 유도할 수 있는 항암 보조 식이 요법으로 코디세핀 고탐유 동충하초(*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 활용 가능성을 제시한다.
- 코디세핀 고탐유 동충하초(*Cordyceps militaris* JLM 0636) 추출물은 항암 방사선치료 과정 중에 정상세포의 방사선에 의한 DNA 및 세포 손상을 효과적으로 경감할 수 있음을 확인하였다. 이는 항암치료에 있어서 항종양 면역반응을 유도함으로써 암세포에 대한 항암효과를 극대화할 뿐만 아니라, 항암치료 과정에서 불가피하게 손상을 받게 되는 주변 정상세포에 대한 방호효과를 동시에 얻을 수 있음을 시사한다. 따라서 코디세핀 고탐유 동충하초(*Cordyceps militaris* JLM 0636)는 항암치료의 보조제로서 최적의 조건을 갖추고 있음을 알 수 있다.
- 와송 추출액은 자외선 흡수 작용과 피부 착색에 대한 작용은 없지만, 탁월한 항산화 작용으로 활성산소에 의하여 피부조직 성분이 산화되는 것을 효과적으로 억제할 수 있으며, 피부 주름에 관여하는 효소에 대하여도 상당한 억제 효과를 보인다. 또한 자외선에 대한 섬유아세포의 유전자 발현과 광노화에 대하여도 우수한 방어 효과를 나타내었다.
- 잉여 토마토를 효율적으로 활용하기 위해 발효를 통해 토마토 식초를 제조하기 위하여 알코올 발효와 초산 발효로 나누어 발효시키는 2단계 발효를 사용하여 토마토 식초의 제조 조건을 최적화하였다.
- 알코올 발효는 토마토를 파쇄하여 가수하고 사과 농축액으로 당도를 13°brix로 조절한 후 알코올 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용해 25°C에서 발효를 하였다. 시간에 따른 알코올 함량 변화 및 당도 변화를 측정된 결과 효모 균주를 이용한 토마토 착즙액의 발효시간은 4일이 가장 적합 한 것으로 나타났다.
- 초산 발효는 토마토 알코올 발효액을 여과 후, 그 여액을 초산균주인 *Acetobacter sp.* PA97을 알코올 발효 종료액에 초기산도 1%로 조절한 후 30°C에서 200 rpm으로 발효조에서 발효시켰다. 초산 발효시 시간에 따른 알코올 함량 변화 및 초산함량의 변화를 측정된 결과 30일째 초산함량이 5.3%로 가장 많이 나타났다.
- 토마토 식초 제조 과정 중 유리당 변화를 분석한 결과 식초의 주요 당 성분으로는 glucose, maltose, fructose 및 sucrose가 확인되었다. 그 중 glucose가 가장 높은 함량을 나타내었고, 유리당들은 발효가 진행됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 유기산을 함량을 측정된 결과 발효 초기 착즙액일 때 유기산은 malic, citric 및 oxalic acid가 확인되었다. 그러나 사과농축액으로 보당한 후에는 lactic, succinic acid와 같은 유기산이 발견되었으며, 최종적으로 식초로 발효가 된 후에는 acetic acid가 가장 높은 함량을 나타내는 것을 확인하였다.

- 토마토 식초의 유리아미노산 함량은 asparagine, valine, phenylalanin, ammonium chloride 및 lysine이 비교적 높게 나타났으며, 그 외에는 미량의 함량으로 나타났다. 토마토 식초의 무기성분 함량은 K가 가장 높게 나타났고, 그 외에 P, Na, Ca, 및 Mg의 함량이 높았으며 나머지는 다소 낮은 함량으로 나타났다.

- 토마토 식초 및 음료 제조를 위한 후보 물질군의 항비만 효과를 확인하기 위해 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 실시하였다. 먼저 *in vitro* 실험은 전구지방 세포인 3T3-L1세포를 이용하여 Oil Red O 염색을 통하여 lipid droplet 생성정도를 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하여 토마토 식초와 후보물질 B, D에서 lipid droplet 의 감소가 관찰되었으며 그 중 후보 물질 중 B의 효능이 가장 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다.

- *in vivo* 실험을 위해 실험동물에 고지방식이를 섭취시킨 후 토마토 식초 및 각각의 후보 물질들을 5주간 급여하고 실험동물의 성장 parameter 측정 및 항비만 실험들을 실행하였다. 그 결과 고지방식을 급여한 흰쥐에게 토마토식초 및 후보물질 A, B, C군에서 체중이 다소 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 토마토 식초 및 후보물질 A, B, C, D 의 투여가 식이섭취량 및 식이효율에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

- 장기 및 지방조직 무게를 측정된 결과 토마토 식초가 고지방식을 급여한 실험동물의 부고환지방, 신장 주변지방 및 복부지방의 축적을 억제하여 비만경감에 영향을 미치며, 후보물질 4군 중 B군이 가장 높은 지방조직 감소를 나타내는 것을 확인하였다. 혈청 중 중성지질, 총 콜레스테롤 함량을 측정된 결과 토마토 식초군과 모든 후보물질들은 대조군에 비해 중성지질 및 총 콜레스테롤의 함량을 감소시키는 것으로 나타났다.

- HDL 및 LDL-콜레스테롤의 함량을 측정된 결과 토마토 식초군과 후보물질 군들은 HDL-콜레스테롤의 합성을 증가시켰으며 LDL-콜레스테롤의 합성은 감소시킨 것으로 확인되었다. 간 조직 중 지질 및 콜레스테롤 함량 변화를 측정된 결과 토마토 식초가 고지방식으로 유발되는 간 조직 중의 중성지질 및 콜레스테롤 축적을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 후보물질 4종 중 B군이 중성지질 및 콜레스테롤 감소에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

- 앞선 결과들을 바탕으로 1차 시제품을 제조하고 여러 가지 배합비를 정해 관능평가를 바탕으로 배합조성, 제조특성, 품질특성 등을 고려하여 최종 시제품을 생산하였다. 제조된 최종 시제품의 항비만 효능을 검증하기 위해 실험동물을 이용한 *in vivo* 실험을 진행하였다. 그 결과 토마토 식초음료군은 고지방 섭취로 인한 체중 및 내장 지방량 증가 개선에 효과적이었으며, 이는 변으로 중성 지질 배설 촉진과 간에서의 지방산 산화 증가와 관련되며, 당대사 개선으로 인슐린 저항성 개선에도 효과적인 것으로 평가되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 동충하초의 주요 생리활성 물질인 cordycepin 함량을 높인 코디세핀 고함유 변태기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM0636)는 OA-유발 지방간 모델에서 간 조직의 지방 축적 억제에 의한 지방간 개선 효과가 있는 것으로 밝혀져 간 질환 개선용 기능성식품 원료로 사용될 가능성이 높은 것으로 사료 되어 진다.
- 코디세핀 고함유 변태기 동충하초 분말 투여는 알코올에 의해 증가된 ALT, γ -GTP 및 LDH 활성을 유의적으로 감소시킴으로서 알코올성 간 질환을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재로 활용할 가능성이 있는 것으로 사료되어진다.
- 와송을 유산균 발효시킨 발효 와송과 일반 와송은 orotic acid로 지방간이 유발된 흰쥐에서 5%의 발효와송을 투여하였을 때 각 조직의 지질 과산화 억제능과 간장의 중성지질에 개선효과가 있어 간 기능 개선제로서 긍정적인 가능성이 있는 것으로 사료된다.
- 일반 꾸지뽕나무 열매와 유산균으로 발효한 꾸지뽕나무 열매는 orotic acid로 지방간이 유발된 흰쥐에서 5%의 일반 꾸지뽕나무 열매를 투여하였을 때 각 조직과 혈청의 지질 과산화 억제능과 간장의 중성지질에 개선효과가 있어 간 기능 개선제로서 긍정적인 가능성이 있는 것으로 사료된다.
- 동물 모델을 사용하여 항당뇨 효과, 비알콜성 지방간 개선효과 및 작용기작을 종합적으로 구명하는 시스템을 확립하고, 동충하초 및 와송의 혈당 조절 및 비알콜성 지방간 개선효과를 규명하였음. 천연물을 건강기능성 제품의 소재로 활용할 수 있을 것으로 기대 된다.
- 버섯유래 항당뇨 물질은 다른 제품에 비해 안전성측면에서 유리하여 산업화가 용이할 것으로 기대되므로, 참여기업 또는 참여기업이 포함된 컨소시엄을 구성하여 반드시 산업화시켜 국내외 당뇨병 관련 기능성 식품시장에서 주력 상품이 가능할 것으로 판단된다.
- 본 연구개발을 통하여 확립한 공정을 이용하여 폴루란, PS-7 및 섬유소 분해효소를 대량 생산할 것이며, 확립된 기술 등을 기술이전하여 폴루란, PS-7 및 섬유소 분해효소의 국내생산을 가능하게 할 것이다.
- 섬유소 분해효소를 생산하는 해양 미생물에 대한 최적 생육온도, 최적 탄소원 및 질소원 등과 같은 생리적인 특성 연구를 통하여 일반적인 토양 미생물과의 다른 해양 미생물에 대한 기초적인 자료를 확보할 수 있다. 또한 해양미생물이 생산하는 섬유소 분해효소에 대한 효소학적 연구를 통하여 토양 미생물이 생산하는 효소와의 차이점 등과 같은 특성에 대하여 많은 자료를 얻을 것이다.

- 해양 미생물의 섬유소 분해효소 유전자의 염기서열을 밝히고 이 염기서열과 이미 보고된 섬유소 분해효소 유전자의 염기서열과 비교하여 섬유소 분해효소 유전자들에 대한 비교 연구를 수행할 수 있을 것이다. 보고된 섬유소 분해효소의 유전자는 주로 *Bacillus* 속 균주들에 대한 것이므로 이번 연구를 통하여 목표로 하는 해양 미생물은 *Bacillus* 속과는 다른 종이므로 섬유소 분해효소 유전자의 염기서열 비교를 통하여 유전자에 대한 많은 정보를 얻을 것이다.

- 해양 미생물이 생산하는 섬유소 분해효소를 생산할 수 있는 생산공정을 개발 할 수 있을 것이며, 공정개발의 내용은 플라스크를 이용한 기초 실험에서 100L 생물배양기를 사용한 pilot 규모의 생산조건 최적화를 포함하는 것이다. 또한 분리공정의 최적화를 통하여 1) 균체 제거 조건 확립, 2) 농축조건 확립 및 3) 건조 조건 확립과 같이 산업화에 필요한 모든 공정의 기술을 개발할 수 있을 것이다.

- *Bacillus* 속 균주의 섬유소 분해효소 유전자를 *E. coli* 균주에 도입하여 재조합한 균주의 생산성은 모균주에 비하여 3~10배의 생산성 향상을 나타냈다. 해양 미생물의 섬유소 분해효소 유전자를 분리하여 생육 속도가 높은 *E. coli*에 도입하여 재조합 균주를 재조합 것이며, 이 재조합 균주의 최적 생육조건 및 섬유소 분해효소 생산 조건 등을 최적화하여 섬유소 분해효소의 생산성을 향상시킬 수 있을 것이다.

- 본 연구 사업의 결과로 확립된 해양 미생물을 이용한 섬유소 분해효소의 생산기술은 특허로 출원하여 지적 재산권으로 보호를 받을 것이며 지적 재산권은 일반 기업에서 기술료를 지불하고 사용할 수 있도록 할 것이다.

- 해양 미생물을 이용한 섬유소 분해효소의 생산기술은 사용하여 섬유소 분해효소 생산기술의 산업화를 진행할 계획이며 이는 국내의 효소산업의 활성화와 선진국형 생산체계에 의한 해양생물자원의 상품화라 점에서 의의가 있는 것이다. 또한, 전량 외국에서 수입하고 있는 산업용 섬유소 분해효소를 국내의 기술로 생산하여 보급할 수 있을 것이다.

- 토마토 발효기술은 다른 농산물에도 적용이 가능하므로 향후 농가의 잉여 농산물에 대한 문제점을 해결할 수 있고 토마토를 산업적으로 응용할 수 있는 기초 자료로 활용됨이 기대된다.

- 토마토를 이용한 발효원액을 제조함으로써 그 원액을 이용하여 다양한 가공식품의 개발이 기대된다.

- 토마토 식초와 기능성 부용제를 이용하여 기존의 다이어트 음료보다 체중 조절 효과가 탁월한 음료의 개발과 토마토 식초와 기능성 부용제의 항비만 효과에 대한 연구는 다른 학문 분야에서도 응용이 가능하며 인접학문의 발전에 활용이 기대된다.

- 토마토를 이용한 발효원액 제조에 따른 토마토의 저장성 문제를 해결할 수 있고 토마토를 이용한 발효원액으로 2차 가공 음료를 개발함으로써, 토마토를 단기간에 대량 소비가 가능해지며, 농가의 소득증대 또한 기대된다.
- 토마토 발효원액 및 기능성 부용제를 이용한 다이어트 음료 개발에 따른 고부가가치 창출과 개발 제품을 수출상품화 함으로서 외화 획득에 기여함이 기대된다.

SUMMARY

I. Title

Commercialization of Bio Well-Being Products Using the Strategic Agricultural and Medicinal Crops

II. Purposes and Necessity of Research Development

- Creation of national bio-industry activation suitable for new trends to provide national agricultural markets with the competitiveness in suddenly changing international agricultural market along with FTA.
- Promotion of national health life through the bio-industry activation.
- Construction of manufactural products based on strategic agricultural crops and increase of farm family and business profits.

III. Contents and Scopes of Research Development

- Commercialization of Agricultural Product Based Immunostimulation Candidates
 - Effect of Immunostimulation by *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin
 - Estimation of the *Cordyceps militaris* Cordycepin Contents
 - Immune Activities of *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin
 - Studies of *Cordyceps militaris* Effect on Anti-Cancer
 - Studies of Immunostimulation Through *Cordyceps militaris* and Crop Fusion Effect
 - Analysis of Functional Constituents from a Mushroom, *Laetiporus sulphureus* and Its Physiological Function
 - Structural Elucidation of Polysaccharides Produced from Mycelial Culture
 - Anti-Inflammatory Activities of Purified Polysaccharides

- Immune Activities of Purified Polysaccharides
- Immunostimulatory Activities of the Fermented Crop Constituents
 - Construction of Fermented *Orostachys japonicus* Extracts and Studies of Immunostimulatory Studies
 - Studies of Epicatechin Gallate Immunoactivities
 - Construction of Fermented *Cudrania tricuspidata* Extracts and Studies of Immunostimulatory Effect
 - Construction of Fermented Rice Bran Extracts and Studies of Immunostimulatory Effect
- Sea Product Based Functional Investigation
 - Purification of a Seaweed, *Hizikia fusiforme* and Structural Analysis of Functional Constituents
 - Studies on Antioxidative Effects of Hf-1
 - Studies on Anti-Inflammatory Effects of Hf-1
- Development of Functional Tomato Products Employing Tomato Constituents
 - Breeding and Cultivation Using Bacteria Containing High Levels of Lycopene
 - Estimation of Lycopene Contents
- Construction of Crop-Based Functional Products
 - Construction of Functional Noodles and Analysis of Biochemical Characters
 - Construction of Functional *Gochujang* Including Grain Syrup with Tomato Puree and Analysis of Biochemical Characters
- Studies of Anti-Cancer Effects by Caffeine
 - Anti-Inflammatory Studies of Caffeine in Cultured Cells
- Studies of Anti-Cancer Effects by Cordycepin
 - Studies of Suppression Mechanism in Human Leukemia Cells by Cordycepin
 - Anti-Cancer Activities in Human Prostate Cancer Cells and Analysis of Cancer Cell Transmission Suppression Efficacy

- Analysis of Cancer Cell Transmission Suppression Efficacy Inactivating Akt in Human Prostate Cancer Cells
 - Anti-Inflammation, Anti-Transmission and Anti-Cancer Resistance Overcoming Efficacy, and Studies on the Related Mechanism
- **Verification of Improvement Products of Liver Disease and Blood Sugar-Controlling Effect Using Crop Materials**
- Development of Improvement Products of Liver Disease Using Crop Materials
 - Improvement Effect of Liver Diseases Using a White Mouse as a Hepatotoxicity Model by *Cordyceps militaris* Powders Containing High Levels of Cordycepin
 - Development of Health Function Foods Supplemented with High Levels of Cordycepin for the Protection of Liver Function and Improvement Constituents
 - Improvement Effect of Nonalcoholic Liver Diseases by Fermented *Orostachys japonicus* and *Cudrania tricuspidata* Fruits
 - Development of Blood Sugar-Controlling Products Using Crop Materials
 - Blood Sugar-Controlling Efficacy Through *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin in the Type 2 Diabetes Animal Model
 - Improvement Effect of Liver Diseases by *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin in Pyknic Diabetes and Nonalcoholic Liver Disease Animal Models
 - Improvement Effect of Insulin Resistance and Nonalcoholic Liver Diseases by *Orostachys japonicus* and Fermented *Orostachys japonicus* in the Insulin Resistance Mouse Induced by the Diet of High Levels of Lipids and Simple Sugars

□ Commercialization of Agricultural Product Based Anti-Inflammatory Candidate

- Investigation of Anti-Inflammatory Products Based on Medicinal Crops and Its Toxicity Test
 - Cancer Cell Infiltration and Transmission Suppression of New JNP-3 Compound Extracted from a Chinese Medicine in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Induced by PMA
 - Relationship of Apoptosis and Interrelationship on Cell Cycle Suppression by New Compounds, MP-2 Extracted from *Dendropanax morbilifera* in HeLa Cells

- Optimization of Functional High Molecules and Cellulase Degradation Enzyme-Producing Process for the Cellulase Appliance
 - Production Process Optimization of High Molecular Weight of Biomolecules, Pullulan
 - Production Process Optimization of High Molecular Weight of Biomolecules, PS-7
 - Production Process Optimization of Cellulase

□ Commercialization of Anti-Cancer Aids and Cosmetics Products Using Functional Materials of Medicinal Crops

- Development of Anti-Cancer Treatment Aiding Drugs Using *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin
 - Safety and Efficacy Validation of *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin
 - Protective Effect of Normal Cells for the Treatment of Anti-Cancer Radiation Treatment Induced by *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin

- Development of Cosmetics Products Using *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin
 - Cosmetics Effect of *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin

□ Commercialization of Body Weight-Controlling Tomatoes Containing High Levels of Lycopene

- Construction of Fermented Original Sum Using Tomatoes as a Main Materials
 - Culture of Parents and Seeding Plants
 - Manufacture of Fermented Original Liquid Based on Tomatoes
 - Biochemical Analysis of Fermented Original Liquid

- Construction of Anti-Diabetic Efficacy Trial Goods Using Tomatoes as a Main Material and Function Validation Using Fermented Original Liquid as a Main Material
 - Manufacture of Functional Beverages Using Tomato Fermentation Liquid
 - Investigation of Anti-Diabetics Effect by the Original Liquid of Tomatoes and Anti-Diabetics Candidates *in vitro* and *in vivo*
 - Production of Primary Trial Products

- Manufacture of Anti-Diabetics Efficacy Trial Products Using the Tomato Original Liquid as a Main Material and Construction of Fermented Original Liquid as Function Validation Materials
 - Development of Diet Beverages Using the Original Liquid of Tomato Fermentation
 - Production of Final Trial Products Using Developed Products
 - Safety Evaluation of Products
 - Designing and Commercialization Promotion of Products

IV. Results of Research Development

- Extraction with water for 30 minute by ultrasonic treatment was most efficient method for the extraction of cordycepin from *Cordyceps militaris* JLM 0636. The concentration of cordycepin produced by crossbred *Cordyceps militaris* JLM0636 was 7.42 mg/g dry weight and it was 7-fold higher than that of *Cordyceps militaris* but cordycepin was not detected in *Paecilomyces japonica*.
- Cordycepin was purified from a mushroom, *Cordyceps militaris*, and its effect on Th1 and Th2 cytokines was examined. The level of cytokine induction in mouse splenocytes was estimated after co-inoculation of purified cordycepin and LPS. When 5 µg/ml of purified cordycepin was exposed to mouse splenocytes for 72 h, the level of a Th1 cytokine IL-12 increased by 2.9-fold. The addition of the purified cordycepin to splenocytes also increased the level of Th2 cytokines, IL-4 and IL-10, by 1.9- and 1.8-fold, respectively. Therefore, cordycepin increases the cytokine levels and may contribute to the up-regulation of cellular and humoral immunity.
- Cordycepin significantly inhibited the proliferation of human neuroblastoma SK-N-BE(2)-C and human melanoma SK-MEL-2 cells with IC₅₀ values of 120 µM and 80 µM, respectively. Cordycepin treatment at 120 mM and 80 mM, respectively, induced apoptosis in both cells and caused the increase of cell accumulation in a time-dependent manner at the apoptotic sub G1 phase. Western blot analysis revealed the induction of active caspase-3 and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) cleavage by cordycepin treatment.
- Treatment of human melanoma cells with triptolide (TPL) significantly inhibited cell growth and induced apoptosis, as evidenced by flow cytometry and annexin V-fluorescein isothiocyanate analyses. TPL increased the levels of Fas and Fas-associated death domain (FADD), and induced cleavage of Bid by activation of caspase-8 and cytochrome C release from mitochondria to the cytosol, which resulted in activation of caspase-9 and caspase-3. These results demonstrated that TPL induces apoptosis by both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways in human melanoma cells, and identified that RIP shuttles between Fas and FAK to mediate apoptosis.

- The effect of black garlic extract on the activation of spleen cells from a C57BL6 mouse was investigated to examine immune activities of fermented black garlic containing a variety of bioactive substances. Extract obtained from the concentration of commercial Namhae black garlic was used for the analysis of immune activities. Treatment with the extract increased the expression of interleukin-2 (IL-2) cytokine. The simultaneous administration of the extract plus lipopolysaccharide (LPS) increased the expression of IL-2, tumor necrosis factor (TNF)- α , and interferon (IFN)- γ compared with that of a control group. This result suggests that cellular immunity can be induced by macrophages, resulting in the expression of T lymphocytes and T helper type 1 (Th1) cells. In addition, treatment with the extract increased the late response of IL-6 cytokines, and the extract plus LPS augmented the expression of IL-4 and IL-6 compared with that of an LPS-treated group. Meanwhile, the extract plus LPS decreased the late response of IL-10, suggesting that humoral immunity can be activated by stimulating B lymphocytes, suppressing cellular immunity, and effectively modulating the conversion into humoral immune responses. These findings demonstrate that the black garlic extract activates Th1 and Th2 cells by stimulating T lymphocytes in mouse spleen cells and leads to immunomodulation by activating cellular and humoral immune responses of the immune system.

- The extracellular polysaccharide (EPS) was isolated from mycelial cultures of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and purified by DEAE cellulose and Sephadex G-50 column chromatography. The purified EPS (EPS-2-1) was composed of only glucose units and its molecular mass was 6.95 kDa. The chemical structure of EPS-2-1 consisted of a main chain containing (1 \rightarrow 4)-GlcP units with branches at the C-6 position of the chain carrying -GlcP-(1 \rightarrow 4)-linked residues. The effect of purified EPS on immunomodulatory genes and proteins of the Bcl-2 family was observed using cultured U937 human leukemia cells. Of note, the levels of Bax and Bad proteins treated with the EPS (4 mg/ml) were approximately 23- and 18-times higher than those in non-treated cells, respectively. These results may suggest that the EPS purified from the mushroom *L. sulphureus* is associated with the activation of immunomodulatory mediators, Bax and Bad proteins.

- Culture supernatants of splenocytes from C57BL/6 mice were exposed to 0.3, 1.0, and 3.0 µg/ml cordycepin plus 3.0 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) to investigate the effects of purified exopolysaccharide (EPS) on the production of inflammatory cytokines. Co-administration of EPS with LPS in cultured murine spleen cells significantly down-regulated the expression of the inflammatory cytokines, IL-2, IL-12 and IFN- γ in a time-dependent manner. Expression of the inflammatory cytokines, IL-4, IL-5 and IL-10 were substantially up-regulated in a time-dependent manner.

- We investigated a physiological function by fermenting a medicinal mushroom, (*Cudrania tricuspidata* fruit). A fermentation using lactic acid bacteria and the extracts isolated from 70% ethanol fractionation was included in cultured mouse spleen cells for cytokine secretion. As a result, total polyphenol content improved by 47% by organic acid fermentation. This was regarded as immune activity in fermented *C. tricuspidata* fruits, as the levels of interleukin (IL)-2 and IL-4 secretion increased. In addition, when the extracts were treated with a stimulant lipopolysaccharide, the secretion of helper T (Th)1 cytokines IL-2, IL-12, and tumor necrosis factor- α was suppressed, while the secretion of Th2 cytokines IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10 significantly increased. Therefore, this study suggests that fermentative *C. tricuspidata* fruit extracts can contribute to the suppression of cellular immune reactions induced by the expression of Th1 cells and activation of the expression of Th2 cells inducing humoral immune reactions associated with the antibody generation by B lymphocytes.

- A fermentation using lactic acid bacteria and the extract of *Orostachys japonicus* was included in cultured mouse spleen cells for cytokine secretion. As a result, when the extracts were treated with a stimulant lipopolysaccharide, the secretion of helper T (Th)1 cytokines, IL-2, IL-12 was decreased, while the secretion of Th2 cytokines IL-5 and IL-10 significantly increased. And also, IL-2, IL-12 and IFN- γ levels were decrease, while the IL-6 and IL-10 increased stimulated by con A. Therefore, this study suggests that fermentative OJ extracts can contribute to the suppression of cellular immune reactions induced by the activation of the expression of Th2 cells inducing humoral immune reactions associated with the antibody generation by B lymphocytes.

- Epicatechin gallate was included in cultured mouse spleen cells for cytokine secretion. As a result, when the Epicatechin gallate was treated with a stimulant LPS, the cytokines, IL-2, IL-12 and IFN- γ were decreased, while the IL-5 and IL-10 cytokines increased. And also, IL-2, IL-12 and IFN- γ levels were decrease, while the IL-6 and IL-10 increased stimulated by conA. Futhermore, Epicatechin gallate was contribute to the suppression of cellular immune reactions induced by the activation of the expression of Th2 cells at 3 μ g/ml concentration.

- A fermented rice bran was included in cultured mouse spleen cells for cytokine secretion. As a result, when the fermented rice bran was treated with a stimulant lipopolysaccharide, the secretion of IL-2 and IL-4 were increased. And the secretion of IL-2 and IL-12 were decrease, while the IL-4 and IL-10 increased stimulated by conA. This study suggests that fermented rice bran can contribute to the suppression of cellular immune reactions induced by the activation of the expression of Th2 cells inducing humoral immune reactions associated with the antibody generation by B lymphocytes.

- The 80% EtOH extract of dried *Hizikia fusiformis* was subjected to sequential fractionation using n-hexane, ethyl acetate, n-BuOH, and aqueous n-BuOH. The results showed that among the four isolated fractions, the n-BuOH fraction showed the highest antioxidation activities. The n-BuOH fraction was applied to reserve-phase silica gel column chromatography, which produced three fractions: BA, BB, and BC. Among these fractions, BB showed the highest antioxidation activities, which increased in a concentration-dependent manner. At a concentration of 1.0 mg/ml n-BuOH fraction, the activities of DPPH radical scavenging and reducing power were approximately 45 \pm 0.14% and 1.34 \pm 0.23, respectively. In addition, the activities of β -carotene-linoleic acid, hydrogen peroxide scavenging, and ABTS radical scavenging were 76 \pm 0.12%, 82 \pm 0.06%, and 65 \pm 0.17%, respectively. These findings suggest that the BB fraction contains potent antioxidation properties and that it could be used in the production of natural and functional foods.

- Hf-1 from *Hizikia fusiforme* considerably inhibits lipopolysaccharide (LPS)-stimulated NO production by suppressing the expression of inducible

NO synthase (iNOS) in BV2 microglia. In addition, Hf-1 blocked LPS-induced phosphorylation of I κ B, resulting in suppression of the nuclear translocation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) subunits, namely p65 and p50, which are important molecules involved in the regulation of iNOS expression. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), a specific NF- κ B inhibitor, along with 20S proteasome inhibitor (PSI) significantly inhibited LPS-induced iNOS expression, which indirectly suggested that Hf-1 downregulated iNOS expression by suppressing NF- κ B activity. Thus, we found that Hf-1 enhances heme oxygenase-1 (HO-1) expression via nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation. In addition, cobalt protoporphyrin (CoPP), a specific HO-1 inducer, predominantly suppressed LPS-induced NO production. In contrast, zinc protoporphyrin (ZnPP), a specific HO-1 inhibitor, showed a partial suppressive effect of Hf-1 on LPS-induced NO production. Further, Hf-1 increased specific DNA-binding activity of Nrf2, and transient knockdown with Nrf2 siRNA subsequently reversed Hf-1-induced NO inhibition, which was followed by suppression of HO-1 activity. Taken together, our findings indicate that Hf-1 suppresses NO production through modulation of iNOS, consequently suppressing NF- κ B activity and induction of Nrf2-dependent HO-1 activity.

- The immunostimulatory activities of Hf-1 from *Hizikia fusiforme* in RAW 264.7 macrophages and whole spleen cells were investigated. Hf-1 has non-toxicity in RAW 264.7 cells, and induced cytokines such as iNOS, COX-2, IL-1 β , TNF- α were down-regulated in a dose-dependent manner. Taken together, the results demonstrate that Hf-1 is inhibitor of NF- κ B and potentially activates the immune function by regulating cytokines in RAW 264.7 macrophage.
- Through microbial stimuli, tomato containing high levels of a functional constituent, lycopene was constructed and cultured. Expression of phytoene synthase involved in lycopene biosynthesis and lycopene contents significantly increased. When three kinds of bacteria developed in this center applied to tomato cultures, recovery yields had no big difference, but tomatoes containing improved lycopene levels could be produced because of the gene expression increase of lycopene biosynthesis. This result suggests that without conventional molecular engineering techniques, tomatoes containing a

high level of a useful constituent, lycopene can be produced by only adding unharmed soil microbes in tomato cultures.

- To address the limitations of manufacturing noodle products using rice, brown rice noodles were created by the fermentation of brown rice containing several nutrients and the quality of these noodles were evaluated. White rice noodles, fermented white rice noodles, brown rice noodles, and fermented brown rice noodles were developed using white rice and brown rice, respectively. We found that the content of crude proteins present in the noodles during the fermentation process increased and the content of crude fat and carbohydrates in the noodles was reduced. In addition, the water content of brown rice noodles was twofold higher than that of white rice, although under fermentation conditions, the water content of brown rice noodles decreased slightly. A slight change of chromaticity was observed during the fermentation process. In cooking, the weight and volume of the noodles increased, with the change being lowest in noodles based on white rice. White rice-based noodles exhibited significantly higher turbidity in the cooked noodle soup, while other noodle products showed relatively constant turbidity. Most of the products showed a decreased texture, becoming soft with cooking; however, the elasticity of the cooked products increased. Our results suggest that the disadvantages of producing rice noodles can be overcome by the development of fermented brown rice noodles containing a variety of nutritional components. This would potentially develop a market for rice-based manufactured foods that appeal to modern preferences.

- To add functional specialty in a traditional fermentation product, Gochujang, and improve the taste and preference, an optimum fermentation condition of Gochujang supplemented with tomato puree was established in the conditions of GCJ 14, -16, -18, and -20. Varying the salinity concentration and the manufactured fermentation products, Gochujang was analyzed by the chemical nature, change in bacterial characteristics and contents of a functional chemical, lycopene, and sensory taste. As a result, the pH change of Gochujang containing tomato puree with grain syrup was diminished during the fermentation process. Its sugar contents were repeated by the increase and decrease. In addition, the water contents, salinity, and chromaticity of the Gochujang showed no significant change. Regarding the change in bacterial

characteristics, total bacterial number and lactic acid bacteria number increased, with the rate of increase depending on the fermentation process. The ratio of lactic acid bacteria number against total bacterial number was confirmed to be significantly high at the conditions of GCJ 18 and -20. No significant change in the contents of lycopene was observed during the fermentation process. Notably, the change in crude proteins, crude fat, crude ash, and carbohydrates in addition to a sensory examination including taste and preference of the manufactured Gochujang suggest that the optimal fermentation product is produced in the condition of GCJ 20. Therefore, functional Gochujang satisfying a modern preference can be produced by using tomato puree with grain syrup.

- Caffeine substantially suppressed the LPS-induced pro-inflammatory mediators nitric oxide (NO), prostaglandin E(2) (PGE(2)) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in BV2 microglial cells. These effects resulted from the inhibition of their regulatory genes inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and TNF- α . In addition, caffeine significantly decreased LPS-induced DNA-binding activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) by suppressing the nuclear translocation of p50 and p65 subunits. A specific NF- κ B inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), attenuated the LPS-induced expression of iNOS, COX-2 and TNF- α genes. In addition, we elucidated that inhibition of Akt phosphorylation plays a crucial role in caffeine-mediated NF- κ B regulation in LPS-stimulated BV2 microglial cells. Caffeine also attenuated the LPS-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and a specific inhibitor of ERK, PD98059, subsequently downregulated the expression of the pro-inflammatory genes iNOS, COX-2 and TNF- α . Taken together, our data indicate that caffeine suppresses the generation of pro-inflammatory mediators, such as NO, PGE(2) and TNF- α as well as their regulatory genes in LPS-stimulated BV2 microglial cells by inhibiting Akt-dependent NF- κ B activation and the ERK signaling pathway.

- In this study, the relationship between inhibition of cell motility and anti-invasive activity by cordycepin in LNCaP human prostate carcinoma cells was investigated. Within the concentration range that was not cytotoxic, cordycepin time-dependently inhibited cell motility and invasiveness of LNCaP cells. The inhibitory effects of cordycepin on cell invasiveness were associated

with tightening of tight junctions (TJs), which was demonstrated by an increase in transepithelial electrical resistance (TER). Immunoblotting indicated that cordycepin decreases levels of claudin proteins, which are major components of TJs that play a key role in control and selectivity of paracellular transport. Furthermore, cordycepin inhibited the expression and activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and simultaneously increased levels of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. These effects were related to inactivation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway in LNCaP cells. These findings suggest that cordycepin inhibits the migration and invasion of LNCaP cells by downregulating the activity of TJs and MMPs, possibly in association with suppression of Akt activation.

- The improvement effects of CMa, CM and PJ on orotic acid (OA)-induced fatty liver in male Sprague-Dawley rats was investigated. Rats were randomly divided into five groups (n=6) based on five dietary categories: normal (N), OA control (C), OA plus 3% (w/w) PJ (PJ), OA plus 3% CM (CM), and OA plus 3% CMa (CMa). OA treatment induced the retardation of body weight gain and enlargement of liver. The concentration of hepatic triglyceride was markedly increased by OA-feeding, whereas this raise was significantly reduced by simultaneous feeding of OA and PJ, CM, CMa and this phenomenon was more pronounced by cordycepin-enriched CMa. The contents of total lipid, triglyceride, and free fatty acid in the serum were significantly or slightly lower in the OA control group than those of the N group, but there were not significantly different among the OA treatment groups. The hepatocytes in the OA-induced fatty liver contained numerous largely lipid droplets, but PJ, CM, and CMa feeding prevented the OA induced lipid droplet accumulation in the hepatocytes. This effect was more pronounced cordycepin-enriched CMa than that in PJ or CM in OA treatment rats. Accordingly, cordycepin-enriched CMa could be an ideal candidate material as a dietary supplement of healthy functional foods having improvement effect of fatty liver.

- This study is aimed to evaluate the protective effect of Cordycepin-increased *Cordyceps militaris*(CMa) strain on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. Male Sprague-Dawley rats were

and randomly divided into 5 groups (n=6) based on six dietary categories: Normal (N), CCl₄ control (C), CCl₄ plus *Paecilomyces japonica* (CPJ) (3%, w/w), CCl₄ plus *Cordyceps militaris* (CCM) (3%,w/w) and CCl₄ plus Cordycepin-increased *Cordyceps militaris* (CCMa) (3%, w/w). The activities of liver marker enzymes, ALT, AST, LDH and the levels of lipid peroxidation were increased when CCl₄ was treated but these parameters were significantly decreased by CCMa group. A significant elevation of TBARS contents in the liver homogenate, microsome, and mitochondrial fractions of the C group compared with N group, however, among the CCl₄ treated groups, CCMa group was significantly lowered in the TBARS levels of hepatic homogenate and microsomal fractions. C group resulted in a significant decrease in the levels of plasma and hepatic glutathione, but these reductions were significantly increased by CCMa group. Accordingly, Cordycepin-increased *Cordyceps militaris* (CMa) may be an ideal candidate for the hepatoprotective effect in animal model.

- Current study was to investigate the potential effects of *Paecilomyces japonica* (PJ), *Cordyceps militaris* (CM), and cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* (CMa) at the 3% (w/w) levels against antioxidant and antihyperlipidemic activity in Sprague-Dawley rats, which was intoxicated with 30% (v/v) alcohol for 4 weeks. Specially, alcohol intoxicated rats showed a significant elevation in the contents of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and lowered the antioxidant defense system reduced glutathione (GSH) when compared to the normal rats. In the lipid profiles, the contents of serum total lipid, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and nonestrified fatty acids (NEFA) and hepatic TG were significantly elevated in the ethanol-induced rats. Supplementation of CMa improved the antioxidant status by decreasing the levels of TBARS and altering the lipid profiles to near normal. These activities were also compared to the standard drug silymarin treatment. Thus, the findings of the present study indicated a significant antioxidant and antihyperlipidemic activity of cordycepin-enriched *C.militaris* against ethanol-induced toxicity.
- This study is aimed to evaluate the improvement effect of fermented *Orostachys japonicus* (OJ) with the mixture lactic acid bacteria (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*) on the lipid

metabolism in Orotic acid (OA)-induced fatty liver in rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into six groups by body weight: N (Normal), OA (OA-feeding rats), 2.5OJ (OA+2.5%(w/w)OJ), 5OJ (OA+5%(w/w)OJ), 2.5FOJ (OA+2.5%(w/w) fermented OJ), 5FOJ (OA+5%(w/w) fermented OJ). Dietary is administered to rats for 10 days and dissecting the rats. Result of OA administration, observed significant increase of the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) level. But, 5FOJ treatment was significantly lowered in TBARS level of hepatic, hepatic mitochondria, testis, kidney and spleen homogenate. And OA administration exhibited decrease in serum concentration of total lipid, total cholesterol, phospho lipid and free fatty acid and also decreased in OJ and FOJ treatment. In addition, concentrations of liver triglyceride was increased in OA administration and decreased in OJ and FOJ treatment and concentrations of serum triglyceride was increased in OA, OJ and FOJ treatment. 5FOJ treatment was slightly mitigated on the hepatic histopathologic changes in OA-induced fatty liver.

- This study was aimed to investigate the protective effect of fermented fruit of *Cudrania tricuspidata* with *Lactobacillus* sp. on Orotic acid(OA)-induced fatty liver in rat. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups(6 rats/group) based on six dietary categories: Normal, OA control, OA plus 2.5%(w/w) fruit of *Cudrania tricuspidata* (2.5CT), OA plus 5%(w/w) fruit of *Cudrania tricuspidata* (5CT), 2.5%(w/w) fermented fruit of *Cudrania tricuspidata* (2.5FCT), OA plus 5%(w/w) fermented fruit of *Cudrania tricuspidata* (5FCT). When OA was treated, the activity of liver indicator enzymes, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), cholinesterase and the levels of lipid peroxidation were significantly increased relative to the normal rats. But administration of 5CT prevented activities of serum AST and ALT from increasing because of OA treatment. OA treatment exhibited decrease in serum concentrations of triglyceride, total cholesterol, total lipid, phospho-lipid and free fatty acids but these were increased by 5%(w/w) fruit of *Cudrania tricuspidata* (5CT). The current study observed significant elevations of the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels in the liver homogenate, mitochondrial and microsomal fractions, serum of OA control group compared with normal group. However, among the OA treated

groups, CT and FCT administration was significantly lowered in the TBARS levels of liver homogenate, mitochondrial and microsomal fractions, serum. OA resulted in a significant decrease in the levels of liver and serum glutathione, but these reductions were significantly increased by fermented fruit of *Cudrania tricuspidata*(FCT). Accordingly, 5%(w/w) fruit of *Cudrania tricuspidata* can did ate for the hepatoprotective effect in animal model.

- db/db Mice were fed basal diet or diet containing low-cordycepin *Cordyceps militaris*(LCCM) or high-cordycepin *Cordyceps militaris*; *Cordyceps militaris* JLM0636(HCCM) at 3% level of the diet for 6 weeks. LCCM decreased blood glycated hemoglobin and plasma glucose and increased insulin compared with the control group. Hypoglycemic effect of HCCM was stronger than that of LCCM. HCCM reduced plasma triglyceride, cholesterol, ALT and AST compared with the control group.
- ob/ob Mice were fed a basal diet or diet containing high-cordycepin *Cordyceps militaris* at 1% (LCM) or 3% level of the diet (HCM) for 10 weeks. HCM reduced blood glycated hemoglobin, serum glucose, HOMA-IR, and hepatic lipid accumulation, and improved serum lipid profile compared with the control group. LCM and HCM decreased serum ALT and AST and hepatic lipid peroxides and increased the activities of antioxidant enzymes compared with the control group. We concluded that *Cordyceps militaris* could be beneficial in improvement of insulin resistance and alleviation of nonalcoholic fatty liver disease in ob/ob mice.
- C57BL/6J mice were fed a basal diet, HFHS(High-fat high-sugar) diet, or HFHS diet containing 5% *Orostachys japonicus*(OJ) or fermented *O. japonicus*(FOJ) for 12 weeks. OJ and FOJ improved insulin resistance and alleviated hyperglycemia, hypercholesterolemia, and nonalcoholic fatty liver disease in HFHS diet-induced diabetic mice.
- In the present study, we examined the inhibitory effects of JNP3, a new compound which was isolated from traditional Chinese medicine, on cell invasion and MMP-9 activation in phorbol myristate acetate (PMA)-induced MCF-7 cells. Treatment with JNP3 significantly and selectively inhibited PMA-induced MMP-9 secretion, mRNA expression and protein levels, and

these results led to reduction of cell invasion and migration in PMA-induced MCF-7 cells. The results of MMP-9 promoter assay and EMSA showed that JNP3 specifically inhibited PMA-induced MMP-9 gene expression by blocking NF- κ B-dependent transcriptional activity. In addition, PMA-induced phosphorylation of ERK1/2 and JNK were suppressed by JNP3 treatment, whereas the phosphorylation of p38 MAPK was not affected by JNP3. These results suggest that JNP3 can be potential anti-cancer agents through specific inhibition of NF- κ B-dependent MMP-9 gene expression.

- To develop new anticancer agents, oleifolioside A was isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille and the biochemical mechanisms of oleifolioside A-induced apoptosis in HeLa cells were investigated. Exposure to oleifolioside A resulted in caspase activation and typical features of apoptosis, although cell death was not prevented by caspase inhibition. Oleifolioside A treatment induced up-regulation of Bad, loss of mitochondrial membrane potential, nuclear relocation of mitochondrial factors, apoptosis-inducing factor (AIF), endonuclease G (EndoG), and apoptosis induction. This is the first report of anticancer activity of oleifolioside A, and nuclear translocation of AIF and EndoG in oleifolioside A-treated HeLa cells might represent an alternative death signaling pathway in the absence of caspase activity.
- Process for production of pullulan and PS-7 have been developed in this study. Marine microorganism producing cellulases was isolated and identified. Eventually, Conditions for production of marine cellulases were optimized in a 100 L bioreactor and process for mass production of marine cellulases has been developed in this study.
- In a genetic toxicity test of hot extracts from the developed *Cordyceps militaris* JLM 0636 strain containing a high level of cordycepin and a single administration toxicity test in rodents, no particular symptom was observed.
- *Cordyceps militaris* JLM 0636 may be applied in anticancer-aiding diet treatment which can induce antitumor immune responses of patients treated by anticancer agents.

- *Cordyceps militaris* JLM 0636 strain containing a high level of cordycepin might diminish DNA and cell damage during a radiation treatment process. This result may provide a maximum anticancer treatment by inducing antitumor immune responses and protective effect of neighboring normal cells carrying damages provoked by an anticancer treatment process. Thus, *Cordyceps militaris* JLM 0636 may become a candidate for aiding an anticancer treatment.
- *Orostachys japonicus* extracts do not act on the reaction of radiation absorption and skin coloring, but effectively suppress the oxidation of skin tissue components owing to superior antioxidation action. In addition, the extracts showed a considerable suppression on the enzyme associated with skin wrinkle. Moreover, the extracts exhibited a superior protective effect on the gene expression of fibroblast cells to radiations and light aging.
- To develop surplus tomatoes as a high value product, tomato vinegar was produced under optimal fermentation conditions. Tomato vinegar was produced in a two-stage fermentation process: alcoholic fermentation, involving conversion of sugars to ethanol, and acetic acid fermentation, involving oxidation of ethanol to acetic acid.
- Prior to alcoholic fermentation, mature tomatoes were cut and crushed without the stems in a mechanical juicer, after which the tomato juice was fortified with apple extract to 13°Brix. In the alcoholic fermentation step, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 34709 (5%, v/v) was inoculated into the tomato juice as a starter, followed by cultivation in an incubator at 25°C. Optimum conditions for alcoholic fermentation were an initial sugar concentration of 13°Brix, a temperature of 25°C, and a fermentation time of 4 days.
- At the end of alcoholic fermentation, the tomato wine was filtered and developed in a shaking incubator containing *Acetobacter* sp. KCCM 40085 (10%, v/v) at 30°C and 200 rpm. Optimum conditions for acetic acid fermentation were a fermentation time of 30 days with an acetic acid content of 5.3%.

- The free sugar contents of tomato vinegar were confirmed as glucose, maltose, fructose, and sucrose. The glucose content of tomato vinegar was highest among the free sugars, whereas the others tended to decrease during fermentation. Before initiating alcoholic fermentation, malic acid, citric acid, and oxalic acid were present in crushed tomato juice. However, contents of other organic acids such as lactic acid and succinic acid increased in tomato juice fortified with apple extract.
- After the two-stage fermentation, tomato vinegar contained high contents of acetic acid. Free amino acid contents of tomato vinegar were high in asparagine, valine, phenylalanin, ammonium chloride, and lysine. Mineral contents of tomato vinegar were highest in K, followed by P, Na, Ca, and Mg.
- To determine the anti-obesity effects of tomato vinegar and candidate materials on the production of a functional drink, we assessed their effectiveness in treating lipid accumulation *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, we treated confluent 3T3-L1 cells with or without tomato vinegar or candidate materials (A-D) for 8 days. Following various treatments, differentiated 3T3-L1 cells in 6-well plates were subjected to Oil-Red O staining to analyze lipid droplet contents. Oil-Red O-stained cells eluted with isopropanol, which suggests that both tomato vinegar and candidates B and D significantly inhibited lipid accumulation during adipogenic differentiation compared to control 3T3-L1 cells.
- *In vivo*, rats were randomly divided into seven groups: normal diet (ND)-fed rats, high-fat diet (HFD)-fed rats with 45% of calories from fat, HFD-fed rats treated with tomato vinegar, and HFD-fed rats treated with candidate materials A-D. Tomato vinegar and candidate materials A-D were administered to the rats for 5 weeks. At the end of the experimental period, the rats were anesthetized with ethyl ether after food was withheld for 12 h. At this time, blood samples and white adipose tissues were taken from rats, and the anti-obesity effects of tomato vinegar and candidate materials A-D were analyzed. Tomato vinegar and candidates A, B, and C tended to decrease body weight of rats fed HFD without altering food intake or food efficiency rate.

- Weights of perirenal, abdominal, and epididymal adipose tissues in rats fed tomato vinegar and candidate material B were significantly reduced compared to those of HFD control rats. Both plasma triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) levels were markedly reduced in rats administered tomato vinegar and candidate materials A–D compared to HFD control rats.
- Furthermore, tomato vinegar and candidate materials A–D increased plasma HDL-cholesterol contents and decreased plasma LDL-cholesterol levels in HFD-fed rats. Further, HFD for 5 weeks resulted in increased hepatic lipid contents. However, tomato vinegar and candidate material B treatment significantly reduced hepatic TG and cholesterol levels compared to the HFD control group.
- Taken together, we employed various mix rates to produce a functional drink using tomato vinegar. We tested the anti-obesity effects of this drink in HFD-fed rats. Consequently, tomato drink reduced body weight gain and visceral fat weight in HFD-fed rats by increasing TG excretion in feces and lipid oxidation in the liver. Tomato drink also improved sugar metabolism in HFD-fed rats, resulting in insulin resistibility.

V. Research Achievements and Achievement Application Plan

- Activation of rural economy and quality improvement of farmer lives can be created by completing the basic studies of anticancer activities and immunostimulatory activities using the mushrooms including *Cordyceps militaris* and fermented crops. In addition, through continuous studies, competitiveness onto agricultural products and national health promotion can be strengthened.
- Currently, functional activities of *Cordyceps militaris* have been patented and functional foods based on this data have been commercialized. Massive consumption of *Cordyceps militaris* contributes to the farmer family income.
- When bacteria developed in this center applied to tomato cultures, tomatoes containing improved lycopene levels could be produced because of the gene expression increase of lycopene biosynthesis. This result suggests that without conventional molecular engineering techniques, tomatoes containing a high level of a useful constituent, lycopene can be produced by only adding unharmed soil microbes in tomato cultures, contributing to the farmer family income.
- Elucidation of the mechanism in anticancer actions of cordycepin contained in *Cordyceps militaris* can play a role in the development of functional foods using the mushroom.
- *Cordyceps militaris* JLM0636 containing a high level of bioactive constituent, cordycepin showed fat liver improvement effect owing to the suppression of lipid accumulation in a OA-induced fat liver model which could be used in raw materials of functional foods for improving fat liver diseases.
- Administration of *Cordyceps militaris* powders containing a high level of cordycepin significantly decreased ALT, γ -GTP and LDH activities induced by alcohol. This result suggests that the powders can be used in a material for health function foods to improve alcoholic liver diseases.

- *Orostachys japonicus* fermented by *Lactobacilli* and non-fermented *Orostachys japonicus* improved the suppression of lipid peroxidation and neutral lipids of livers in fat liver-induced mice caused by orotic acid when 5% fermented *Orostachys japonicus* was treated. This result suggests that fermented *Orostachys japonicus* may be used in liver function improvement candidate.
- In a fat liver white mouse stimulated by orotic acid, administration of 5% *Cudrania tricuspidata* fruits showed improvement effects on the suppression of lipid peroxidation and neutral lipids of tissues and serum, suggesting that the tree fruits may be a liver function improvement agents.
- Using an animal model, the systems involved in anti-diabetics effect, nonalcoholic fat liver improvement effect and mechanisms have been established. In addition, blood sugar control by *Cordyceps militaris* and *Orostachys japonicus* and improving effects of nonalcoholic fat livers have been elucidated. Thus, natural products may be used in the material of health function candidates.
- Mushroom-oriented anti-diabetics substances have advantages in the safety concept, compared to other non-mushroom candidates, and so commercialization can be achieved easily. Participating companies and/or consortium including the companies have to be consisted and needs commercialization in international diabetics and related markets as a leading goods.
- A physiological substance was isolated from a Chinese medicine material used in the treatment agent for artery hardening and cardiovascular system and its possibility was investigated. Thus, functional foods using this material can be developed and the income promotion of the farm family may be achieved.
- Massive production of Pulluran, PS-7 and cellulase developed in this center may can be conducted and established techniques may be trasferred for national pproduction of cellulose-degrading enzymes.
- Through physiological studies including optimum growth temperature, carbon and nitrogen sources, and so on of marine microorganisms producing

cellulose-degrading enzymes, basic data of marine microbes differentiated from soil organisms can be established. In addition, through the enzymatic studies on cellulase produced by marine microbes, a number of data including the different aspects, compared to cellulase produced by soil microbes, can be obtained.

- The base sequence of cellulase genes from marine microbes was identified and compared with other cellulase genes reported in other strains for comparison studies. Reported cellulase genes are mainly found Bacillus genus strains and so marine microbes in this research team are different from Bacillus strains, giving more understanding in the genes through the sequence comparison.
- A production process for cellulase generated by marine microbes can be established. The contents of the process is the optimization of production conditions in the basic work using experimental flasks and 100 L fermentor. In addition, through the optimization of isolation process, 1) establishment of cellular debris disposal conditions, 2) establishment of concentration conditions, and 3) establishment of drying conditions may be developed for process techniques necessary to industrialization.
- The production of a recombinant strain created by introducing a cellulase gene of a Bacillus genus strain into *E. coli* showed 3-10 times higher, compared to that of a parent strain. By isolating a cellulase gene of marine microorganisms and introducing into a high growth rate *E. coli* strain, a recombinant strain was created. Optimum growth condition and cellulase production condition of the recombinant strain was optimized to improve the production yield of the cellulose-decomposing enzyme.
- Production techniques of cellulase using marine microbes established in this center is patented and protected as an intellectual property which will be used in other companies with paying a skill fee.
- Industrialization of a cellulose-degrading enzyme production technique using marine microorganisms is proceeded. This result is meaningful in that it reflects the activation of national enzyme industry and commercialization of

marine microbe resources according to the production system of the advanced countries. In addition, Industrial cellulase enzyme imported in total amounts by other countries will be supplied by producing national skills.

- By producing cosmetics candidates through the application of superior antioxidation effect of cosmetics materials and wrinkling improvement effect, local economy is activated and bio-industry activation is achieved through continuous research development.
- Tomato fermentation skills can be applied to other agricultural products, solve the problems of excessive crops and basic data for industrial application of tomatoes.
- By constructing the original liquid of tomatoes, a diverse manufactured food containing the liquid can be developed.
- By using tomato vinegar beverages and functional materials, superior diet beverages better than conventional diet beverages, which show a body weight controlling effect, can be developed. Anti-obesity studies of tomato vinegar beverages and functional materials can be applied to other research fields and the development of neighboring fields.
- The storage problems of tomatoes can be solved by manufacturing their original liquid and the secondary manufactured beverages may be constructed by using the original liquid of tomatoes. This enhances the massive consumption of tomatoes within a short time and the promotion of farmer family income.
- Creation of a high value diet beverages using the original liquid of tomatoes and functional materials and developed products can be exported and contribute to the acquisition of foreign currencies.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of Research Development Project

1. Purposes and Backgrounds of Research Development Work
2. Expected Effects of Research Development Work

Chapter 2. Current Situations of International and Domestic Skill Development

Chapter 3. Contents and Results of Research Development Performance

1. Commercialization of Agricultural Product Based Immunostimulation Candidates

- 1) Development of Agricultural Product Based Immunostimulation Candidates
 - a) Estimation of *Cordyceps militaris* JLM 0636 Carrying a High Level of Cordycepin Developed and Cultured in This Research Center
 - b) Immune Activities of *Cordyceps militaris* JLM 0636 Carrying a High Level of Cordycepin
 - c) Studies of Anti-cancer Effect Research
 - d) Studies on Immunostimulatory Effects by the Fusion of Cordycepin and Crops
 - e) Constituent Analysis of *Laetiporus sulphureus* and Its Physiological Function
 - f) Immunostimulatory Activities of Fermented Agricultural Products
 - g) Functional Investigation of Seaweed Products
 - h) Development of Functional Tomatoes Using Their Function
 - i) Manufacture of Agricultural Produce-Based Functional Candidates

- 2) Studies on a Mechanism Understanding of Cancer Cell Proliferation Suppression by Cordycepin
 - a) Mechanism Studies of Proliferation Suppression in Human Leukemia Cells by Cordycepin
 - b) Anticancer Activities of Human Prostate Cancer and Efficacy Investigation of Cancer Cell Transmission Suppression
 - c) Antiinflammation, Anti-transmission, Anticancer Resistance Resolving Efficacy and Related Mechanism Studies

2. Verification of Improvement Products of Liver Disease and Blood Sugar-Controlling Effect Using Crop Materials

- 1) Development of an Improvement Efficacy Candidate for Liver Diseases Based on Agricultural Products
 - a) Improving Effect of *Cordyceps militaris* powders Carrying a High Level of Cordycepin on Orotic Acid-Induced Fat Liver White Mice
 - b) Elucidation of Improvement Efficacy for Alcoholic Liver Toxicity Using *Cordyceps militaris* powders Carrying a High Level of Cordycepin
 - c) Liver Disease Improvement Effect of *Orostachys japonicus* and Fermented *Orostachys japonicus* on Orotic Acid-Induced White Mice
 - d) Liver Disease Improvement Effect of *Cudrania tricuspidata* Fruit Powders on Orotic Acid-Induced White Mice
- 2) Development of Blood Sugar-Controlling Candidate Using Agricultural Products
 - a) Blood Sugar-Controlling effect of *C. militaris* Carrying a High Level of Cordycepin in a Type 2 Diabetics Animal Model
 - b) Effect of Obesity and Nonalcoholic Liver Disease Improvement of in *Cordyceps militaris* Carrying a High Level of Cordycepin on Obese Diabetics and Nonalcoholic Liver Disease Animal Model
 - c) Insulin Resistance and Nonalcoholic Liver Disease Improvement Effect of *Orostachys japonicus* and Fermented *Orostachys japonicus* in a Insulin Resistance Mouse Induced by High Lipid and High Simple Sugar Diet

3. Commercialization of Agricultural Product Based Anti-inflammatory Candidate

- 1) Investigation of Anti-Inflammatory Products Based on Medicinal Crops and its Toxicity Test
 - a) Cancer Cell Infiltration and Transmission Suppression of New JNP-3 Compound Extracted from a Chinese Medicine in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Induced by PMA
 - b) Relationship of Apoptosis and Interrelationship on Cell Cycle Suppression by New Compounds, MP-2 Extracted from *Dendropanax morbiifera* in HeLa Cells

- 2) Optimization of Process for Production of Function Biopolymers for Application of Cellulases and Development for Process for Production of Marine Cellulases
 - a) Production Process Optimization of High Molecular Weight of Biomolecules, Pullulan
 - b) Production Process Optimization of High Molecular Weight of Biomolecules, PS-7
 - c) Production Process Optimization of Cellulase

4. Commercialization of Anti-Cancer Aiding and Cosmetics Candidates Using Functional Constituents of Medicinal Plants

- 1) Development of Anti-Cancer Treatment Aiding Drugs Using *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin
 - a) Safety and Efficacy Validation of *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin
 - b) Protective Effect of Normal Cells for the Treatment of Anti-Cancer Radiation Treatment Induced by *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin

- 2) Development of Cosmetics Products Using *Cordyceps militaris* Containing High Levels of Cordycepin
 - a) Cosmetics Effect of *Cordyceps militaris* Containing High Levels of

Cordycepin

5. Commercialization of Body weight-Controlling Improvement Candidate Using Tomato Function

- 1) Optimized Manufacture Condition Establishment of Tomato Vinegar Beverages
- 2) Biochemical Analysis of Tomato Vinegar Beverages
- 3) Effect of Anti-obesity by Tomato Vinegar Beverages and Their Candidates
- 4) Manufacture of the Primary Trial Product Using Tomato Vinegar Beverages and SK-1
- 5) Efficacy Validation of Diet Beverages using the Original Liquid of Tomato Fermentation
- 6) Analysis of Indicator Components by Tomato Diet Beverages
- 7) Quality Characteristics Change during Storage by Tomato Diet Beverages

Chapter 4. Aim Achievement Degree and Contribution to the Related Fields

Chapter 5. Research Development Achievement and Achievement Application Plan

Chapter 6. International Science Techninque Information Collected in a Research Development Process

Chapter 7. Research Facilities and Instruments States

Chapter 8. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발사업의 목표와 배경
2. 연구개발사업의 기대효과

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 농산물 소재 면역증강 제품의 상용화

1. 농산물 소재 면역증강 제품 개발

- 가. 사업단 보유 균주를 이용하여 재배한 코디세핀 고함량 번데기동충하초(*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 코디세핀 함량 측정
- 나. 코디세핀 고함량 번데기동충하초(*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 면역 활성화
- 다. 코디세핀의 항암효과 연구
- 라. 코디세핀과 농산물 융합 면역 상승효과 연구
- 마. 붉은 덩다리 버섯의 물질분석 및 생리기능성 확인
- 바. 발효 농산물 소재의 면역증강 활성화
- 사. 해산물 소재 기능성 검증
- 아. 토마토의 기능성을 이용한 기능성 토마토 제품의 개발
- 자. 농산물 소재 기능성 제품의 제조

2. 코디세핀에 의한 암세포 증식억제 효과의 기전 해석 연구

- 가. 동충하초의 주요 생리활성 성분인 코디세핀에 의한 인체백혈병 세포의 증식억제 기전 연구
- 나. 동충하초의 주요 생리활성 성분인 cordycepin에 의한 인체 전립선암세포의 항암활성 및 암세포 전이 억제 효능 검증
- 다. 동충하초의 주요 생리활성 성분인 cordycepin의 항염증, 항전이 및 함암제 내성 극복 효능 및 관련 기전 연구

제2절 농산물 소재 간 기능 개선 및 혈당조절 효과 검증

1. 농산물 소재를 이용한 간질환 개선효과 제품의 개발

- 가. Cordycepin 고함유 동충하초 분말을 첨가한 식이가 Orotic acid 유발 지방간 흰쥐에 미치는 개선효과
- 나. Cordycepin 고함유 동충하초 분말을 이용한 알코올성 간독성 개선효과 규명
- 다. 와송과 발효 와송의 Orotic Acid 유발 흰쥐의 지방간 개선효과
- 라. 꾸지뽕나무 열매 분말을 첨가한 식이가 Orotic acid 유발 지방간 흰쥐에 미치는 개선효과

2. 농산물 소재를 이용한 혈당조절 제품의 개발

- 가. 제2형 당뇨병 동물 모델에 있어서 고코디세핀 함유 동충하초의 혈당조절 효과
- 나. 비만형당뇨 및 비알콜성 지방간 동물모델에 있어서 고코디세핀 동충하초의 비만 및 비알콜성 지방간 개선효과
- 다. 고지방·고단순당 식이로 인슐린저항성을 유발한 마우스에 있어서 와송 및 발효와송의 인슐린저항성 개선효과 및 비알콜성 지방간 개선효과

제3절 약용작물 유래 항염증 효능 물질의 상용화

1. 약용작물 유래 항염증 효능 물질의 탐색 및 독성실험

- 가. 한약재 HTR에서 추출한 새로운 화합물 JNP3가 PMA로 유도한 MCF-7사람 유방암 세포에서 암세포 침윤과 전이억제 효과
- 나. HeLa 세포에서 MP-2, 황칠나무에서 추출한 새로운 화합물, 에 의해 유도된 Apoptosis (세포자멸사) 와 세포주기억제의 상호관련 확인

2. 섬유소 분해효소 활용을 위한 기능성 생물고분자 및 섬유소 분해효소 생산공정 최적화

- 가. 생물고분자 폴루란의 생산공정 최적화
- 나. 생물고분자 PS-7의 생산공정 최적화
- 다. 섬유소 분해효소의 생산공정 최적화

제4절 약용작물의 유용 물질을 이용한 항암보조제 및 항장제품의 상용화

1. 코디세핀 고함유 동충하초를 이용한 항암치료 보조제 개발

- 가. 코디세핀 고함유 동충하초의 안전성 및 유효성 검증
- 나. 개량 동충하초 추출물의 항암 방사선치료에 대한 정상세포 방호효과

2. 코디세핀 고탐유 동충하초를 이용한 향장품 소재 개발

가. 코디세핀 고탐유 동충하초의 향장효과 검증

제5절 토마토의 기능성을 기용한 체중조절 개선제품의 상용화

1. 토마토 식초의 최적 제조 조건 확립
2. 토마토 식초의 이화학적 성분분석
3. 토마토 식초와 후보물질군의 항비만 효과 확인
4. 토마토 식초 및 SK-1 등을 이용한 1차 시제품 제조
5. 토마토 발효원액을 이용한 다이어트 음료의 효능 검증
6. 토마토 다이어트음료의 지표 성분 분석
7. 토마토 다이어트음료 최종시제품의 저장 중 품질 특성 변화

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황

제 8 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발사업의 목표와 배경

가. 연구개발사업의 최종 목표

- FTA와 더불어 급변하는 국제 농업시장에서 국내농업의 경쟁력을 갖추기 위해 최신 경향에 맞는 국내 바이오산업의 활성화 유도
- 바이오산업의 활성화를 통하여 웰빙시대 국민의 건강생활 증진
- 전략농산물 가공제품 개발 및 산업화로 농가수익 및 기업수익 증대

나. 목표설정의 배경

- 버섯은 국내시장만 1조원에 이를 정도의 고소득 농작물이며, 다양한 생체기능조절 물질을 함유하고 있어 최근 웰빙 추세에 따라 크게 각광받고 있음.
- 국내 버섯농가의 경쟁력은 중국산 제품이 무차별 유입됨에 따라 점점 약화되고 있어, 기능성 식·의약소재로의 전환을 통한 고부가 제품개발이 절실히 필요한 실정임.
- 각종 약용/식용 버섯의 항비만 활성에 관한 논문과 특허가 많이 발표되어 왔으나, 산업화수준의 기술개발성과가 미흡하고, 실제로 상품화된 사례는 전 세계적으로 3건에 불과한 실정임.
- 농산물은 수확시기가 한정되어 있고, 수확시기에 맞추어 전량 소비가 불가능하여 항상 저장성 문제가 대두되고 있어, 이에 따른 해결책으로 농산물의 1차 및 2차, 3차의 가공이 절대적으로 필요함.
- 우리나라 전략 농산물중의 하나인 토마토(Lycopersicon esculentum)는 세계 각국에서 해마다 생산량이 증가하고 있고, 우리나라에서도 기후풍토가 적합하여 전국에 걸쳐 재배되고 있음.
- 우리나라에서는 토마토가 주로 1차 상품으로 소비되므로 저장에 많은 고충을 겪고 있으며 지칫, 완숙되거나 부패되어 상품가치를 잃게 되는 사례가 많아 2차, 3차 가공이 절실히 요구됨.
- 우리나라에서 소비되는 케찹, 소스, 주스 등은 대부분 칠레산의 토마토 페이스트를 수입하여 부분 가공한 것으로 신선한 토마토 재료를 사용하는 경우가 드물다.
- 일본의 경우 라이온사에서 토마토 식초 “구스민”을 개발하여 판매하여 현재 2006년 11월까지 300만병의 판매 실적을 올리고 있으며 앞으로 우리나라 시장의 수출을 계획하고

있어 이에 대한 대체 품목개발이 시급한 상황임.

- 토마토의 lycopene에 의한 전립선암 억제효과를 비롯하여, 항산화효과, 콜레스테롤 대사 촉진효과 등이 있고 식이섬유에 의한 변비개선효과 및 면역력 증강 등이 보고되고 있으며 특히 식초와의 병용 시 상당한 다이어트 효과가 있는 것으로 알려져 있음.
- 현재 생산되고 있는 토마토 관련 제품의 대부분을 차지하는 수입 토마토 페이스트가 아닌 순수 국내산 토마토를 사용함으로써 신선함과 green food의 이미지를 높여 소비자의 구매도를 높일 것으로 기대된다. 현재 국내에서 시판중인 토마토 제품은 토마토 주스와 케찹 등에 한정되어 있다. 그에 반하여 토마토제품에 기능성을 포함시킨 제품은 국내외를 막론하여 거의 없는 실정임.
- 부산시 강서구의 토마토 농업민을 위한 부산시의 보조금 지원 사업(지원금 3억원/년)으로, 농민들의 주요 고민 중에 하나인 토마토의 완숙 등으로 인한 상품 불가한 잉여농산물 처리가 시급한 상황.
- 우리나라에서는 토마토가 케찹, 소스, 주스 등으로 대부분이 가공되고 있으나, 수확기에 생산량의 전량을 소비하기에는 역부족임.
- 일본의 경우 라이온사에서 토마토 식초 “구스민”을 개발하여 판매하여 현재 2006년 11월까지 300만병의 판매 실적을 올리고 있으며 앞으로 우리나라 시장의 수출을 계획하고 있어 이에 대한 대체품목개발이 시급한 상황임.
- 토마토의 lycopene에 의한 전립선암 억제효과를 비롯하여, 항산화효과, 콜레스테롤대사 촉진효과 등이 있음.
- 최근 면역 세포의 활성화 기작에 대한 분자 수준에서의 자세한 작용기전에 관한 연구가 국내외적으로 활발히 이뤄지고 있음. 그러나 아직 이를 대상으로 한 조절 물질의 개발은 미미한 상태임.
- 부산시 강서구의 토마토 농업민을 위한 부산시의 보조금 지원 사업(지원금 3억원/년)으로, 농민들의 주요 고민 중에 하나인 토마토의 완숙 등으로 인한 상품 불가한 잉여농산물 처리가 시급한 상황.
- 잉여 농산물(토마토 등)의 가공 및 고부가가치화와 저장성을 높일 필요성이 있음.
- 당뇨병은 우리나라 국민의 주요 사망요인 중 5위를 차지하고 있으며, 당뇨병 유병율이 급증하고 있어 당뇨병치료제에 대한 수요가 증가하고 있음. 당뇨병은 대사 장애로 인해 고혈당, 고지혈증을 나타내고 인슐린 저항성으로 인해 비알콜성 지방간을 나타냄.

- 당뇨병은 완치법이 확립되어 있지 않아 식생활을 포함한 생활습관을 개선하여 당뇨병을 예방, 개선할 필요가 절실함.
- 당뇨병 치료의 주요 목표는 혈당을 조절하고 당뇨합병증을 개선하는 것임.
- 섬유소 분해효소의 이용은 섬유소 자원의 재활용 이외에도 식품, 사료 및 섬유산업 등 다양한 산업의 부재료로 사용되고 있다.
- 또한, 바이오 에탄올을 생산하기 위하여 기능성이 향상된 섬유소 분해효소의 생산공정 최적화가 필요하다.

2. 연구개발사업의 기대효과

가. 시장성 : 기술 및 상품경쟁력 제고효과

- 국민건강시대 웰빙 트렌트를 파고든 상품개발 전략으로 시장성 개척 및 상품경쟁력 확보.
- 건강에 대한 국민적 관심을 이용한 제품으로 시장성 확보와 GLP센터를 이용한 기능 검정과 독성을 비롯한 안전성 검정으로 소비자 불안감 해소와 시장 점유.
- 전략농산물을 이용한 제품화로 우리 농산물의 안정성 홍보 및 시장 접근 증대.
- 국내 어디에서도 재배 가능한 토마토를 산업적으로 응용할 수 있는 기초 자료를 제공할 수 있음.
- 토마토를 이용한 발효원액을 제조함으로써 그 원액을 이용하여 다양한 가공식품 개발 가능.
- 토마토에 함유되어 있는 기능성 성분과 기능성 부용재를 이용하여 기존의 다이어트 음료보다 체중 감량 효과가 탁월한 음료를 개발 할 수 있음.

나. 농림식품업 연계효과

- 지역 농산물생산 조합과 대학 및 연구소 연구진의 연계 구축: 국내 방울토마토 생산기술의 선두를 달리는 강서 토마토연합작목반(300여 농가, 년 매출액 500억)과의 연계를 통하여 현장연계 바이오산업화가 가능함.
- Medi-Farm 산업화 연구사업단은 부산·경남 인근의 바이오산업체에게 동아대학교를

중심으로 한 연구진이 개발 완료한 원천기술을 제공함으로써 연구실바이오기술을 상업화로 바로 연결시킬 수 있음.

- 부산·경남 인근의 전략농산물 생산 단지와 연구소의 참여로 현장과 지역연구소를 연계한 사업화 기반 구축 - 양파연구소, 경남도원 약초연구팀, 전함양약초연구소, 농업기술센터, 대저 토마토 연합작목회 (매출 320농가 년 450억, 창녕명품양파영농조합(매출 700농가 년 140억), 함양약초재배단지.
- 기능성 성분증대를 통하여 농산물 고부가가치화를 위한 재배법 연구 및 신규 기술 농가 공급.
- FTA시행으로 우려되는 국내 농산물 경쟁력 하락을 막기 위해 대학, 산업체, 국가연구소, 농업현장을 연계한 산업화 모델 창출.
- 토마토를 주원료로 한 속성 발효원액에 기능성 부용제를 첨가하여 기존의 다이어트 음료보다 훨씬 체중감량 효능이 뛰어난 고부가가치적 음료를 개발하여 국내 및 국외 시장을 개척함으로써 농가의 소득에 기여하고자 함.
- 본 연구를 통해 얻어진 토마토 발효기술은 다른 농산물에도 적용이 가능하여 향후 농가의 잉여 농산물에 대한 문제점의 해결방안 제시함.
- 토마토 관련 기존의 제품은 주로 단일 소재로서 단순 제품화하여 판매되고 있으나 본 연구 사업단에서는 항비만 효능을 지니고 있는 SK1과의 배합으로 기능성에 있어서 시너지 효과를 나타내고 장년층뿐만이 아닌 청년층에게 까지도 소비범위를 넓힐 수 있어 시장 확대와 넓은 소비층을 형성할 수 있다.

다. 기타 파급효과와 전망

- FTA대비를 위한 농업1차상품의 고부가가치화.
- 웰빙 트렌드 제품개발에 따른 지역 바이오 산업체 활성화.
- 고령화시대 대비 바이오실버 기능성 식품생산.
- 공인기관 기능검정을 통한 개발상품 Life cycle 연장.
- 부산시 실버의료산업조성에 따른 바이오특산물 개발.
- 지역 특산물인 토마토의 잉여작물에 대한 수요창출을 유도하고 고부가가치화 함으로써 궁극적으로 부산지역 경제의 활성화와 재배농가의 수익증대로 이루어질 것임.
- 개발 제품을 수출상품화 함으로서 외화 획득에 기여함.
- 본 연구결과로부터 수득한 독자적인 연구기술을 이용함으로써 기존 제품과는 차별화된 고 기능성 제품의 생산이 가능.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 제품 및 시장 분석

가. 국내 관련 유사 제품의 생산 및 시장현황

- 국내에서는 한약자원의 조사 및 보전 관리에 대한 조직적인 연구는 아직 실현되지 않고 있으나, 환경부의 자연생태계 조사의 일환으로 지역적 한약재 조사 및 표본 수집이 이루어지고 있으며, 생물다양성협약에서는 국내 학계 연구자들을 중심으로 국내 생물자원 연구의 현황, 보전, 지속적인 이용 등에 대한 국가적 전략을 수립하기 위한 기초조사 연구의 결과로 “한국의 생물다양성 2000”을 발간하여 국가적 정책 대안을 제시한바 있으나, 생물다양성 보전 및 이용에 관한 연구는 과학기술처지원으로 “G7 신기능 생물소재기술개발사업” 및 “생명공학 기술개발사업”으로 일부 부분적으로 수행되었음.
- 국내에서는 주로 단일 소재를 기본으로 순환계 기능개선 제품이 개발되고 있으며, 약용작물 유래 제품 개발은 부분적으로 수행되고 있으나, 공신력 있는 곳에서의 효능검정시험 등의 미비로 소비자들의 호응이 좋지 않음.
- 버섯재배면적은 95년 이후 증가되지 않고 있으나 생산량은 꾸준히 증가하고 있어 농가당 재배규모가 점차 확대되고 전업화 되어 가고 있다.
- 버섯산업은 기술, 자본, 노동 집약적 농업이나 생산량은 매년 증가추세로 농산물 생산액의 약 3%를 차지하는 작목이며 전업농규모가 늘고 있고, 이와 함께 고품질의 생버섯 소비도 늘어나고 있으며, 약용버섯은 이를 이용한 건강 보조식품의 소비시장이 확대되고 있음.
- 현재 국내시장에 당뇨병 환자용 식품은 수십 가지가 시판 중인데, 주로 저칼로리의 맞춤형 식품들로, 예를 들어 설탕 대용품으로 나온 자일리톨 설탕, 저칼로리 감미료, 당노쌀, 당노 사탕, 당노 영양식, 당노 차(茶), 설탕이 전혀 들어있지 않아 혈당에 큰 영향을 주지 않고 당뇨병 환자도 안전하게 먹을 수 있는 초콜릿 샌드위치 쿠키, 무설탕 딸기맛 잼, 무설탕 초콜릿 등을 들 수 있음. 또한, 효소, 효모, 누에분말, 동충하초 등이 건강보조식품으로 개발돼 관련시장에서 판매되고 있으며 식이섬유 가공식품과 HCA함유 저열량 식품도 특수영양식품으로 개발돼 판매되고 있음.
- 제1형 당뇨동물 모델에서 동충하초의 고혈당 및 고지혈증 개선효과를 조사한 연구는 발표되었으며 와송의 고혈당 및 고지혈증 개선, 항염증, 항암효과 관련 연구가 발표되어 있음. 그러나 제2형 당뇨동물모델에 있어서 항당뇨 및 항산화 효과, 비알콜성 지방간 개선효과를 종합적으로 조사한 연구는 부족한 실정임.

- 국내 식초 시장의 매출 규모는 2008년 현재 약 700억원으로 2008년 기준 전체 시장의 약 40%를 차지하는 조미 식초의 경우 2004년 대비 약 4.1%의 신장률을 기록한 데 이어, 마시는 식초의 경우 2004년 대비 595%의 신장률을 기록하는 등 큰 성장세를 보임.
- 식초시장은 점차 감소세를 보이는 반면 식초음료 시장은 매년 증가세를 보이다가 12월에는 일반식초보다 앞서는 결과를 나타냄.
- 국내 암 환자수는 매년 약 10만명이 새롭게 발생하고 5만명이 사망하며 년평균 암환자의 증가율은 약 10% 정도를 보이고 있으나, 농산물을 활용한 암예방 및 항암 제품은 정식 등록 보고된 제품이 없으며, 이에 관한 구체적 제품의 생산 및 시장의 형성 현황은 현재까지 파악되지 못하고 있다.

나. 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 세계 생명공학산업은 1995년-2005년 사이 22%에 달하는 고도 성장이 예상되어 반도체 등의 타 첨단 산업분야의 성장률을 크게 앞설 것으로 예측되고 있고, 국내 생명공학분야 시장은 1995년 2,500억원 규모에서 1998년 6,500억원 규모로 급성장 하였으며, 연평균 22%의 고성장을 예상 적용할 경우 2010년에는 9조원의 시장이 형성될 것으로 예상된다. 이와 같은 추세를 적용할 경우 세계 생물 산업의 시장규모는 2010년 1900억\$을 초과할 것으로 예상된다.
- 1997년 산업자원부 평가 국내 생물 산업의 시장규모는 세계시장대비 2% 수준이나 2010년에는 4.6%로 90억\$ 규모로 성장할 것으로 예측됨.
- 미국의 경우 혈당강화 관련 제품시장이 35억 달러 이상, 일본의 경우 혈당 조절 관련 특정 보건용 식품은 2001년 전체 승인 품목 299건 중 33건으로 11%를 차지하고 전체 매출 4120억엔 중 184억엔 이상의 시장을 형성하고 있는 것으로 알려지고 있음. 또한 국내의 경우에도 한국인에게 주로 발병하는 제 2형 당뇨병 관련 치료제 시장이 지난 97년 약 40억원에서 최근 급격히 성장, 2003년 270억 원대를 육박하고 있음.
- 미국 등 서구의 경우 규제상의 문제로 혈당강화 보조식품 관련 시장이 제약 위주로 성장하고 있으나 최근기능성 제품들이 틈새시장을 형성, 올 한 해 전체 40억 달러를 넘어설 것으로 파악되고 있음. 반면 700만 명에 달하는 당뇨병자와 1370만 명의 잠재 환자수를 가지고 있는 일본의 경우에는 전체 299개 품목의 특정보건용식품의 11%(33건)가 혈당조절관련 제품으로 이들 제품의 매출액도 184억엔에 달하고 있음.
- 세계 당뇨병 치료제 시장규모는 2007년 212억달러 (미국이 전체시장의 약 50% 점유)에서, 2012년이 되면 350억 달러 안팎이 될 것으로 예측되고 있는데, 세계시장이 가장 큰 미국의 경우, 1995년 약 10억달러에서 2005년 현재 약 50억달러로 5배 이상 증가한

것임.

- 일본건강식품 시장규모는 1조 2850억엔, 성장률은 4%이며, 2006년 상반기 판매액의 순위로 2위는 다이어트 식품, 4위가 식초음료로 선정될 만큼 선풍적인 일기를 얻고 있어 국내시장에 급속히 파급될 것이 예상되므로 이에 따른 대책 마련이 시급함.
- 전세계의 항암제 시장은 2007년에 346억 \$ 규모로서 전세계 의약품 약 4,100억 \$의 8.4%를 점하고 있으며, 항암제 시장은 심순환계 약물(20.0%)이나 중추신경계 약물(17.7%)에 비하여 시장 규모는 작으나, 항암제 시장 성장률은 15%로서 의약품 시장 평균 성장률을 능가할 뿐 아니라 모든 약효군 중에서 가장 높은 시장 성장률을 보이고 있음.
- 이러한 사실은 질환별 사망자 수와 비교해 볼 때, 암은 아직도 필요 약물 개발이 미진한 성장성이 큰 분야이다. 각국의 전통 약물을 이용한 단일제제의 함예방 및 항암 효능소재의 상품화는 이루어져 있으나, 식품 자체에 의한 암 관련 기능성의 확보에 문제가 있는 관계로 암을 표적으로만 한 농산물 유래 식품에 대한 통계는 불확실한 실정이다.
- 중국은 2002년부터 바이오 연료 에틸알코올 시범사업을 가동했으며, 이에 앞서 2001년 4월 2일에 바이오 연료 에틸알코올 보급 및 사용 계획에 관한 ‘변성(變性) 바이오 연료 에틸알코올’과 ‘차량용 에틸알코올 휘발유’제품 국가 표준을 공식 발표했다. 2003년부터는 생산 지점과 유통 지점을 확정하고, 해룽장성, 지린성, 료우닝성, 허난성, 안후이성, 허베이성, 산둥성, 장쑤성, 후베이성 등에는 일반 휘발유 사용을 전면 금지하고 10%의 알코올을 첨가한 에틸알코올 휘발유 사용을 의무화했다. 중국의 대표적인 에탄올 생산업체는 표 3과 같으며, 이들의 생산량은 연간 82만톤에 이른다. 중국은 브라질과 미국에 이어 세계 3대 바이오 연료 에틸알코올 생산국이자 사용국이 되었다.
- 일본이 2030년까지 자동차 연료의 10%를 바이오에탄올로 대체할 계획이다. 일본 정부는 2030년까지 국내 자동차용 가솔린 전량을 E10(바이오에탄올 10%+휘발유 90%)으로 교체할 방침이라고 보도했다. 이는 이산화탄소 배출량을 줄이기 위한 것으로 일본 정부는 교토의정서 협정 이행기간 (2008~2012년) 동안 모든 휘발유 사용 신차에 E10 연료를 쓸 수 있게끔 관계 법령을 정비키로 했다. 바이오에탄올은 사탕수수 옥수수 등의 줄기에서 짜낸 즙을 발효, 증류시켜 만든다. 이를 연소시킬 때 나오는 이산화탄소는 식물이 자라는 과정에서 흡수한 이산화탄소가 재방출되는 것으로 간주돼 교토의정서에서 규정한 지구온난화 가스로 계산하지 않는다. 일본 환경성 계획에 따르면 2008~2012년에 우선 휘발유 수요의 최대 절반 정도를 E3 (바이오에탄올 3% 혼합연료)로 대체한다. 이어 2020년 E10 공급을 시작하며 2030년 전량 E10화 한다는 목표를 세웠다. 일본과 같이 미국, 브라질, EU 및 중국은국제 원유가격 상승 및 이산화탄소의 배출량을 줄이기 위하여 바이오에탄올의 생산에 대한 연구를 진행 중이다.

2. 기술개발 현황

- 현재 10조 원대에 이르는 기능성 식품 시장은 해마다 꾸준한 증가세를 보이고 있으며, 국외 유명 기능성 식품 제조 회사의 국내 진출이 현저히 증가하고 있음. 기존의 단순 가공형태의 제품을 탈피하여, 기능성이 구명된 다양한 제품의 개발로 재배 농가 및 관련 가공업체의 고부가가치 창출이 시급한 실정임.
- 최근 고지방, 고단백 식생활로 인해 암과 성인병의 발병률이 높고, 사망원인으로서 동맥경화, 고혈압, 당뇨 등으로 인한 뇌, 심장 등 혈관 순환계 질병에 의한 사망률이 압도적인 순위임.
- 각종 성인병의 원인이 되는 동맥경화는 식생활과 관련된 생활 습관의 개선과 건강 기능 식품의 지속적인 섭취에 의해 예방하는 것이 보다 중요함. 동맥경화로 유발되는 각종 성인병은 식생활과 운동, 보건 기능성 식품의 지속적인 섭취에 의하여 예방이 가능함.
- 기존의 버섯 유래 항당뇨 활성과 관련한 연구 논문은 대부분 버섯 자실체로부터 추출한 유효물질에 대한 것으로, 버섯 균사체 배양을 통해 항당뇨 활성을 가진 물질생산에 대한 연구논문은 지난 10년간 20여편에 불과한 실정임. 특히, 동충하초 유래 항당뇨 물질의 임상적 효능에 대한 평가는 거의 이루어지지 않은 편임.
- 현재 과실자체의 당을 이용한 식초개발에 대한 특허가 출원되고 있으나 특허자체에만 국한되어 있고, 산업화 되지 못함. 더구나 토마토를 이용한 특허는 전무한 실정임.
- 기존의 약용작물 유래 순환계 기능 개선에 관련된 연구 논문은 대부분 단일 소재로부터 추출한 유효물질에 대한 기능분석이 대부분이나, 약용작물 소재는 단일 소재 보다는 복합 소재의 적절한 배합을 통해 약리 효과의 상승 작용을 가져올 수 있으며, 인체에도 그 효능에 관련된 모든 부분의 기능을 촉진 시켜서 매우 뛰어난 효능을 가져올 수 있기 때문에 본 연구팀에서 개발한 제품은 기존의 제품과 차별이 되므로 국제적 우수 논문에 투고 가능 함.
- 기존 식초에 관한 논문은 식초의 제조방법 등에 대한 것이 주류를 이루며, 식초제조 원리는 간단하므로 제조방법 등의 논문보다는 이를 산업화하는 것이 중요함.
- 대부분 토마토쥬스, 소스, 케첩 등의 제품 생산 및 판매가 이루어지고 있으며 일본 및 서구유럽에서는 식초를 조미료가 아닌 음료로 사용되고 현재 우리나라도 식초가 조미료의 개념에서 음료의 개념으로 바뀌고 있음.
- 따라서 주정을 희석하여 만든 저품질의 식초가 아닌 토마토 자체의 당을 발효시킨 고품질의 식초를 개발한다면 음료개발업체로부터 음료의 원료로 많은 구매수요가 예상된다.

또한 발효원액을 이용한 2차 가공품 기능성 다이어트 음료 제품 역시 기업체의 기술이 전 및 상품화가 가능함.

- 국내에서의 토마토에 관한 연구는 대부분이 토마토 재배 기술과 생과를 이용한 성분 분석 및 기능성 검증 등에 대한 내용들이 대부분으로 토마토를 이용한 가공품에 대한 연구는 한정적인 1차 가공품들이 주를 이루고 있음.
- 토마토를 이용한 가공품과 기능성을 가진 성분에 대한 연구가 부족하고 토마토를 이용한 와인에 대한 연구는 존재를 하나 발효식초에 대한 연구는 전무한 실정임.
- 토마토를 이용한 가공식품은 전 세계적으로 다양한 종류가 있으나 대부분이 케첩이나 페이스트의 원료로 이용이 되고 있으며, 주로 성분에 대한 연구들이 대부분을 차지하고 있고, 우리나라와 마찬가지로 토마토를 이용한 제품은 1차 가공품이 주를 이루고 있음.
- 국외의 토마토 발효 연구로는 미생물을 이용한 발효연구가 대부분을 차지하고 있으며 알코올이나 초산 발효에 대한 연구는 부족한 실정임.
- 최근 주목 받고 있는 토마토의 기능성 성분인 lycopene에 대한 연구가 주를 이루고 있음.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 농산물 소재 면역증강 제품의 상용화

1. 농산물 소재 면역증강 제품 개발

(제 1 세부 : 동아대학교, 정영기)

가. 사업단 보유 균주를 이용하여 재배한 코디세핀 고함량 번데기동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 코디세핀 함량 측정

(1) 실험재료 및 방법

(가) 재료 및 기기

동충하초는 본 연구단에서 보유하고 있는 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)와 온라인 마켓에서 구입한 번데기 동충하초를 동결 건조한 후, 분쇄하여 사용하였다. 표준 코디세핀은 Sigma사에서 구입하였으며 HPLC는 Prekin-Elmer사의 series 200 system을 사용하였고 MeOH은 B&J사의 HPLC grade를 사용하였다.

(나) 추출 및 함량 분석

동결건조한 동충하초를 분쇄기로 분쇄한 후, 중량대비 10배의 증류수 또는 EtOH를 가하고 60℃~121℃에서 1시간~3시간 동안 열수 추출 또는 초음파(40 KHz)를 이용하여 실온에서 5분~60분 동안 추출하였다. 추출물을 여과지로 여과한 후, 원심분리(8,000 rpm)하여 얻어진 상등액을 동결건조 하였다. 추출물의 코디세핀 함량은 동결건조물을 적당량의 증류수로 녹인 후, 0.45mm membran filter로 여과하여 HPLC의 시료로 사용하였다. 이때, 코디세핀 표준품을 이용하여 검량선을 작성하였으며 시료의 코디세핀 피크 면적비로부터 추출물의 코디세핀 함량을 계산하였다. HPLC의 분석조건을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. HPLC conditions for cordycepin content analysis

Apparatus		Mobile phase
Column	X Bridge C18	A; 0.01M Phosphate buffer (pH 6.5)
Column length	250 mm	B; MeOH
Column diameter	4.6 mm	Gradient elution : 0 - 15% B for 10 min
Particle size	3.5 mm	15 - 10% B for 5 min
Column Temp.	40 °C	10 - 20% B for 2 min
Detector	UV (260 nm)	20% B for 12 min
Injection volume	10 ml	Flow rate : 1ml/min

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 초음파 추출법을 이용한 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 코디세핀 함량

Fig. 1은 초음파를 이용하여 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 코디세핀 추출 효과를 나타낸 것이다. 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636) 분말 100 mg에 증류수 1ml를 가하고 실온에서 5분~60분간 추출하였다. 그 결과, 추출 시간의 증가에 따라 추출물의 코디세핀 함량은 증가하였으나 추출시간 20분~30분을 기점으로 코디세핀 함량은 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났으며, 최고 7.6 mg/g의 코디세핀 함량을 나타내었다. 이 결과로부터 초음파를 이용한 코디세핀 추출시간은 30분이 적절한 것으로 판단되었다.

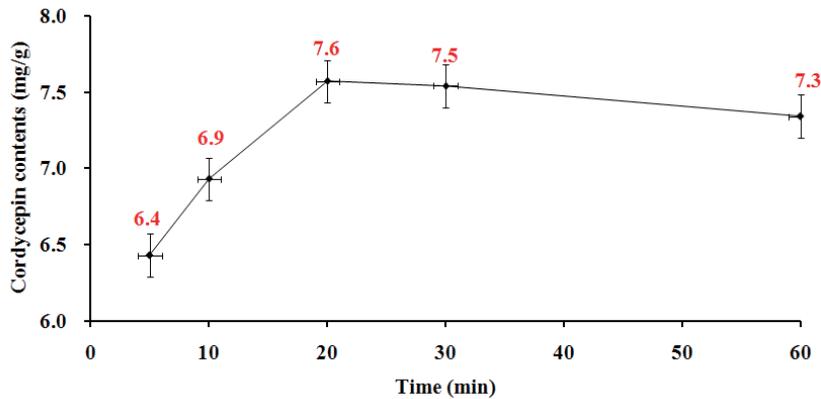


Fig. 1. Extraction effect for cordycepin content by sonication

(나) 코디세핀 함량에 미치는 EtOH 농도 효과

추출용매에 EtOH를 첨가함으로써 EtOH의 농도에 따른 코디세핀 추출 효과에 대하여 검토하였다. 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636) 분말 100 mg에 각각 증류수, 10% EtOH, 20% EtOH, 40% EtOH, 60% EtOH, 80% EtOH, 100% EtOH를 1ml씩 가하고 실온에서 30분간 초음파 추출하였다. 그 결과, Fig. 2에 나타난 것과 같이 EtOH의 농도가 높아질수록 코디세핀 함량은 조금씩 감소하였으며 100% EtOH 농도에서는 1.2 mg/g으로 거의 추출되지 않았다. 이는 코디세핀의 용해도가 EtOH보다 증류수에서 더 높음으로 인한 결과로 판단되며 이 결과로, 동충하초로부터 코디세핀을 효과적으로 추출하기 위해서는 증류수만으로도 충분하다는 결과를 얻었다.

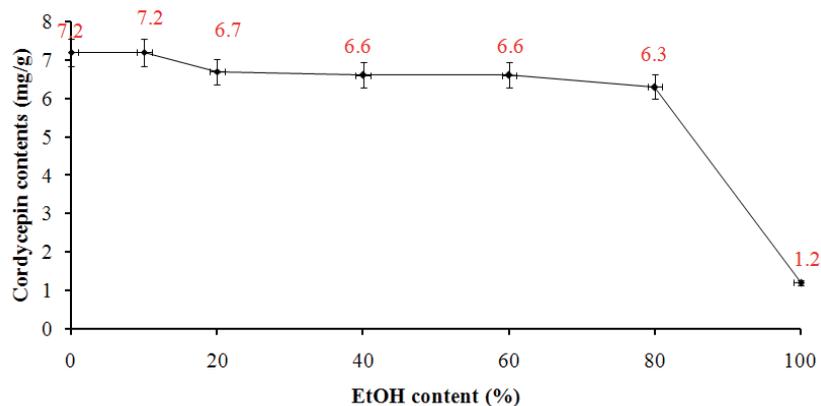


Fig. 2. EtOH concentration effect for cordycepin content

(다) 동충하초 종류에 따른 코디세핀 함량의 비교 분석

본 사업단이 보유하고 있는 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)와 시판의 번데기 동충하초 및 눈꽃 동충하초(*P. Japonica*)의 코디세핀 함량을 비교, 분석하였다. 각 동충하초 분말 100 mg에 증류수 1ml를 가하고 실온에서 30분간 초음파 추출하여 추출물의 코디세핀 함량을 알아 보았다. 그 결과, 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)유래 코디세핀 함량은 7.42 mg/g으로 시판의 번데기 동충하초보다 최고 7배 정도 높게 나타났으며 눈꽃 동충하초는 코디세핀이 검출되지 않음을 알 수 있었다(Table 2). 이 결과의 HPLC 크로마토그래피를 Fig. 3a에 나타내었다. 그리고 분리된 코디세핀을 LC/MS (fig. 3b)로 분석하여 확인하였다.

Table 2. Cordycepin content of *Cordyceps militaris*

Strain	Cordycepin content (mg/g)
<i>C. militaris</i> (JLM0636)	7.42 ± 0.10
<i>C. militaris</i> (Market 1)	5.88± 0.22
<i>C. militaris</i> (Market 2)	1.01 ± 0.37
<i>P. Japonica</i>	N.D.

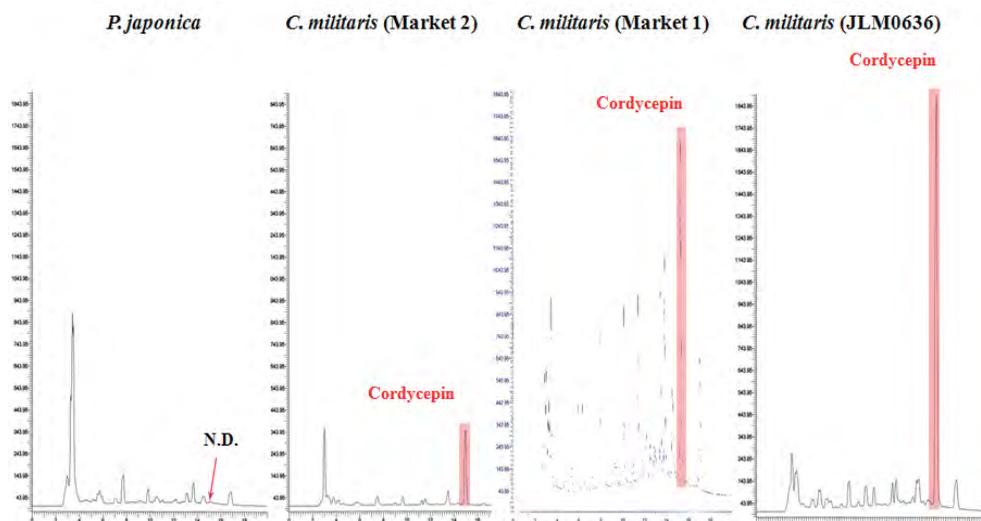


Fig. 3a. HPLC chromatograms of extract at three different *C. militaris* strains.

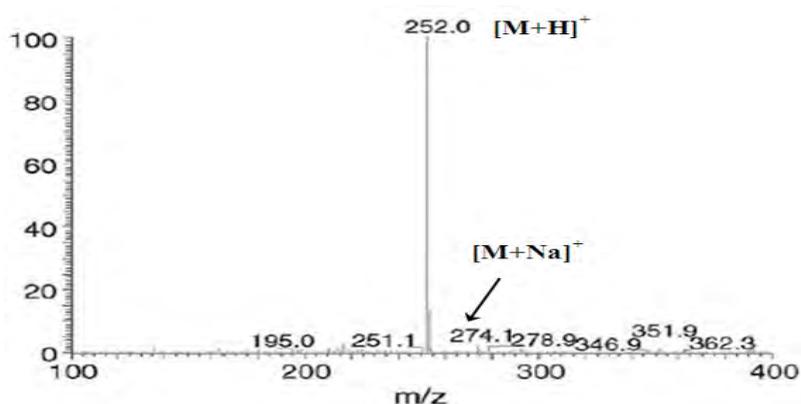


Fig. 3b. LC/MS spectrum of extracted cordycepin from *Cordyceps militaris* JLM 0636

(라) 열수 추출법을 이용한 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 코디세핀 함량

번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636) 분말 50 g에 증류수 500 ml를 가하고 60℃ ~ 121℃에서 1시간~3시간 동안 열수 추출하였다. 그 결과, Fig. 4에 나타난 것과 같이 열수 추출에 있어서는 추출 시간의 변화에 따른 코디세핀 함량의 변화는 크지 않음을 알 수 있었고, 추출 온도가 높아짐에 따라 코디세핀의 함량은 증가하는 것으로 나타났으며 100℃에서 3시간 추출하였을 경우 7.2 mg/g로 가장 높은 코디세핀 함량을 나타내었다. 또한, 일반적인 멸균 조건인 121℃에서 3시간 동안 추출 하였을 경우에도 7.1 mg/g의 코디세핀 함량을 나타내고 있음으로서 코디세핀은 고온, 고압 추출에 있어서도 분해 등은 잘 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

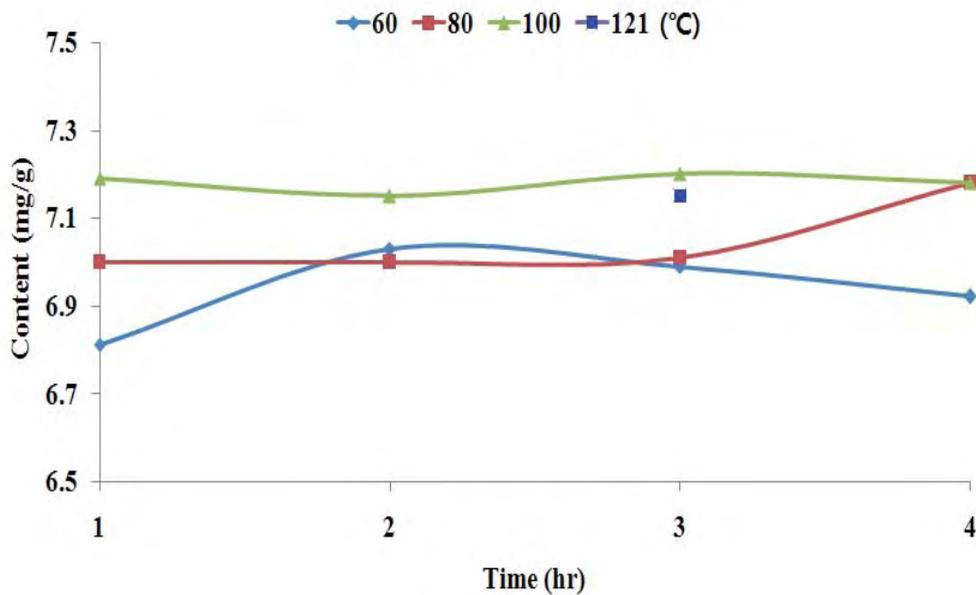


Fig. 4. Extraction effect for cordycepin by autoclave

(마) 동충하초 추출물의 시작품 제조

번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636) 분말 100 kg, 감초 2 kg, 양파 1kg을 넣은 500 L 대형 추출기에 증류수 400 L를 가하고, 번데기의 비린 냄새를 제거하기 위하여 100℃에서 3시간 동안 환류 시키 후, 멸균을 위하여 121℃에서 1시간 동안 가온, 가압하였다. 대형 추출기의 여과 필터로 추출액을 여과하여 번데기 동충하초 자실체를 제거함과 동시에 가압 펌프를 이용하여 멸균 상태에서 시작품 포장을 하였다(Fig. 5). 각 시작품은 80 ml용량으로 포장 하였으며 제작된 시작품의 코디세핀 함량을 측정하여 현재 시판중인 동충하초 추출물과 함량 비교를 하였다(Fig. 6). 그 결과, 본 사업단에서 제작한 시작품의 코디세핀 함량은 6.51 mg/pack으로 이는 시판중인 동충하초 추출 상품 보다 약 3배 정도 높은 것으로 나타났다.



Fig. 5 Pilot plant for *Cordyceps militaris* JLM 0636 extract and a trial product.

Product	Codycepin content (mg/80 ml)
JLM0636 product (A)	6.51
Market product (B)	3.22

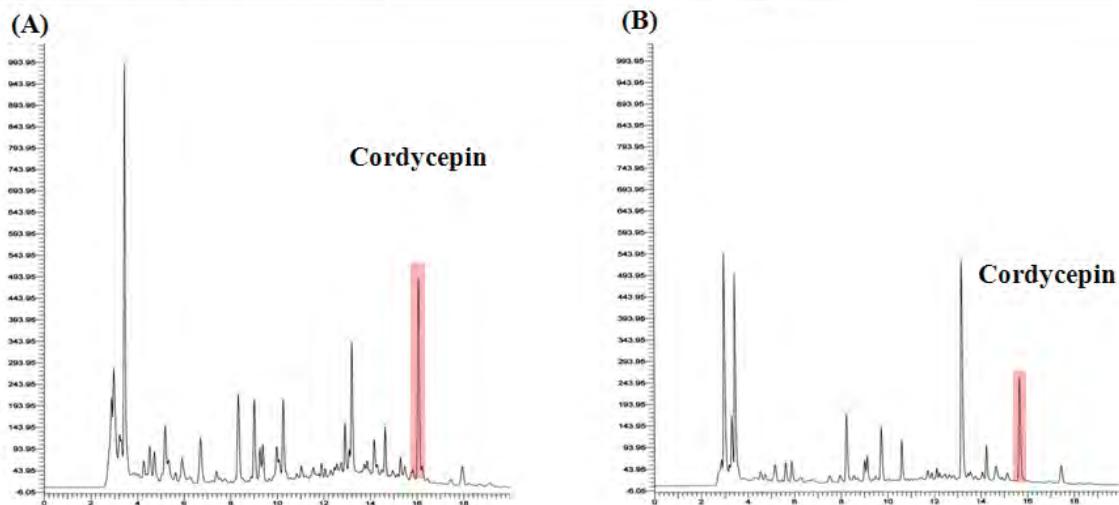


Fig. 6. Cordycepin content of *Cordyceps militaris* JLM 0636 trial product.

나. 코디세핀 (Cordycepin) 고함량 번데기동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM 0636)의 면역 활성

(1) 실험재료 및 방법

(가) 실험동물과 시약

암컷 C57BL/6 마우스로서 생후 8주 내외, 체중 25 g 내외의 것을 대한바이오링크(충청북도 음성군)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 시료는 본 발명에서 사용한 밀리타리스 동충하초와 시중에서 구입한 동충하초의 추출물, 코디세핀 표준품을 사용하였고(각각 JLM0636, P사, Cordycepin), LPS는 *Escherichia coli* (serotype 026:B6)에서 분리 정제된 표준품 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, USA)을 사용하였고 Con A는 Pharmacia사 제품 (Pharmacia Fine Chemicals, Code 17-0450-01, Sweden)을 사용하였다. IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α 를 측정하기 위한 시약은 Mouse IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α ELISA kit (BioLegend, San Diego, CA, USA)을 이용하였다.

(나) 비장세포배양

마우스 비장세포의 분리는 경부를 탈구하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 4°C의 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco, Grand Island, U.S.A.)으로 2회 세척하였다. 이를 직경 60 mm의 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, U.S.A.)에 옮기고 다시 신선한 HBSS를 가한 후 핀셋으로 가볍게 문질러 비장세포를 유리시켰다. 이 세포부유액을 15 ml 원심관(Falcon, Oxnard, U.S.A.)에 옮긴 후 2 - 3분 동안 실온에 방치한 다음 세포부유액의 상층액을 새로운 15 ml 원심관에 옮겼다. 이 세포를 300 g에서 5 - 10분 원심한 후 HBSS로 1회 원심 세척한 다음 혼합된 적혈구를 tris-buffered 0.87% NH₄Cl용액으로 3분간 처리한 후 HBSS로 2회 원심 세척하여 사용하였다.

비장세포배양 상층액 준비는 미리 준비된 비장세포 부유액을 10% 가 되게 소 태아혈청을 가한 RPMI 1640 (Gibco BRL., Grand Island, NY, USA) 배지로 ml 당 2×10^6 세포가 되도록 조절하여, 24 wells tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 1 ml씩 분주한 후 시료 1.0, 3.0, 10.0 μ g을 각각 작용시켜 37°C, 5% CO₂배양기에 배양하였다. 또한 LPS 2.0 μ g이나 Con A 2.0 μ g 과의 복합작용도 함께 시험하였다. 대조군은 증류수를 사용하였다. 배양시간은 상기의 조건에 6, 24, 48, 72시간으로 하였다. 배양이 끝난 후 전량 배양액을 수거한 다음 300×g에서 10분간, 10,000×g에서 30분간 원심 시킨 후 그 상층 액을 수거하여 -70°C에 보관하였다.

(다) IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10, IL-12 측정

미리 96 wells microplate에 mouse IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α 에 대한 capture 항체를 coating buffer에 희석하여 100 μ l 씩을 분주한 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 plate를 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 assay diluent 200 μ l 씩을 분주한 후 실온에서 1시간동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 plate의 각 well에 시료(배양액) 100 μ l 씩을 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 detection 항체 100 μ l 씩을 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한

후 avidin-horseradish peroxidase 액 100 μ l 씩을 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 7 번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 100 μ l 씩을 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액 100 μ l 씩을 가하여 반응을 정지시켰다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) Th1 cytokines의 생성의 변화

Cordycepin 고함유 동충하초 *C. militaris* JLM 0636 추출물에 의해 유도되는 Th1 cytokine IL-2와 TNF- α 의 생성은 C57/BL6 마우스로부터 분리된 비장세포에 3 μ g/ml의 *C. militaris* JLM 0636 추출물과 *C. militaris* 추출물을 각각 처리하여 비교하였으며, 또한 2 μ g/ml의 LPS와 Con A를 *C. militaris* JLM 0636 추출물과 *C. militaris* 추출물과 각각 함께 처리하여 분비되는 양을 6, 24, 48, 72 시간 동안 측정하여 확인하였다.

Th1 cytokines의 생성에 있어서 IL-2의 생성은 *C. militaris* JLM 0636 추출물과 *C. militaris* 추출물만 처리하였을 때 대조구보다 초기 생성은 낮았으나, 72 시간부터 생성이 유의적으로 증대되어 대조구보다 높은 생성을 나타내었으며, TNF- α 에서는 대조구 보다 낮은 생성량을 나타내었다(Fig. 1).

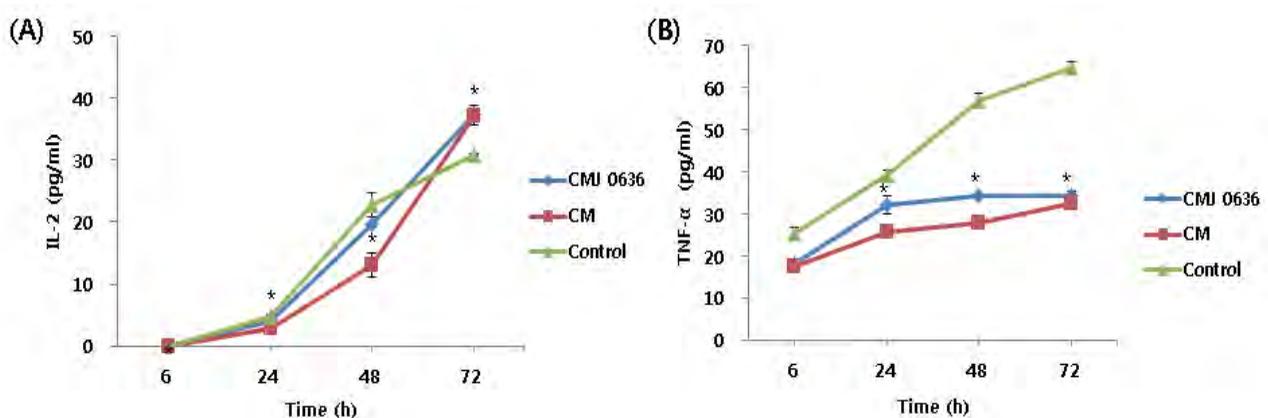


Fig. 1. Production of IL-2 (A) and TNF- α (B) cytokines by *C. militaris* JLM 0636 extract (CMJ 0636) and *C. militaris* extract (CM) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 3 μ g/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p < 0.05$.

LPS를 함께 처리하였을 때 IL-2의 생성은 6, 24, 48시간에 LPS 단독 처리군과 유사한 생성을 나타내었으며, 72시간에 LPS 단독 처리군 보다 낮은 생성을 나타내었다. TNF- α 의 생성에서는 초기 6시간에 *C. militaris* JLM 0636 추출물이 LPS와 같은 생성을 하였다가 24시간부터 생성이 증가하였으며, LPS 단독 처리 군에서는 생성이 감소하였으며, *C. militaris* 추출물은 초기에는 낮은 생성을 보이다 48시간부터 *C. militaris* JLM 0636 추출물과 같은 생성을 나타내었다(Fig. 2).

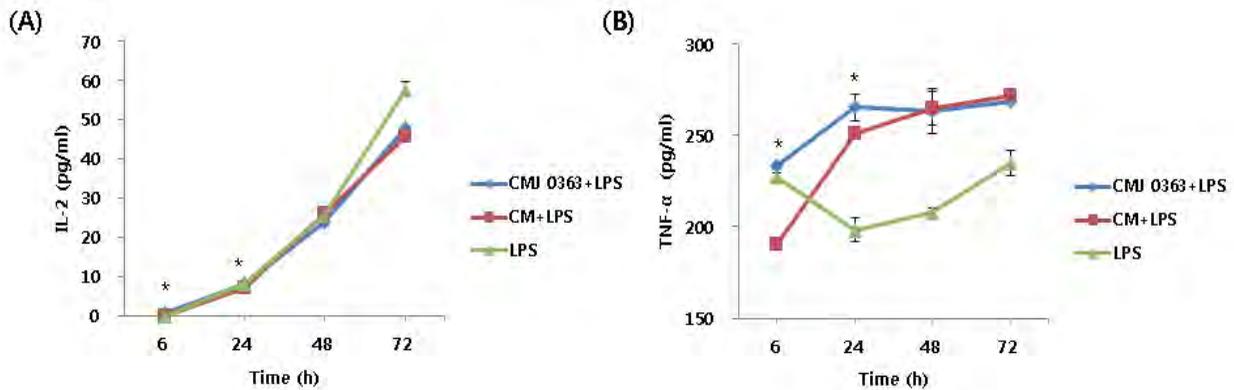


Fig. 2. Production of IL-2 (A) and TNF- α (B) cytokines by *C. militaris* JLM 0636 extract (CMJ 0636) and *C. militaris* extract (CM) and LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 3 μ g/ml extracts and 2 μ g/ml LPS for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p < 0.05$.

Con A를 함께 처리하였을 때 IL-2의 생성은 6시간에 *C. militaris* JLM 0636 추출물과 *C. militaris* 추출물에서 Con A 단독 처리 군보다 낮은 생성을 보였으나, 24시간부터 유사한 생성을 나타내었으며, TNF- α 생성은 시간에 따라 생성이 증대되었으며, Con A 단독 처리 군보다 낮은 생성을 나타내었다(Fig. 3).

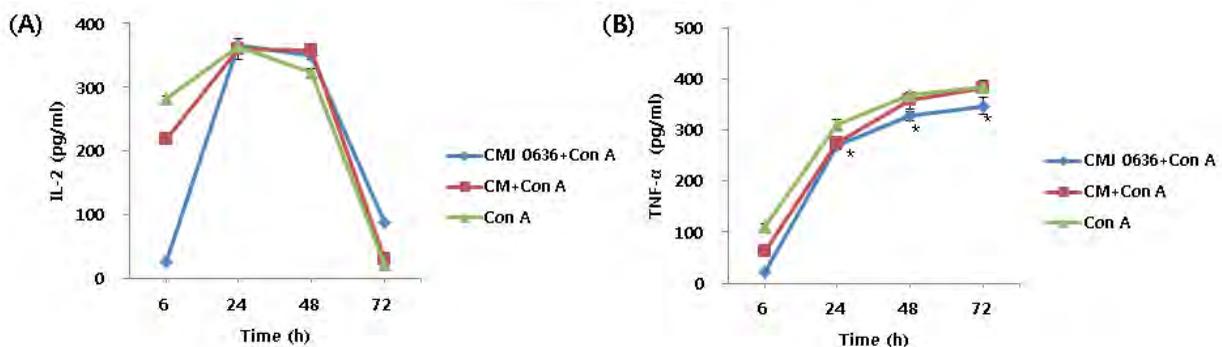


Fig. 3. Production of IL-2 (A) and TNF- α (B) cytokines by *C. militaris* JLM 0636 extract (CMJ 0636) and *C. militaris* extract (CM) and Con A in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 3 μ g/ml extracts and 2 μ g/ml Con A for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p < 0.05$.

C. militaris 이 LPS 자극에 의해 macrophages과 mast cells과 같은 염증관련 세포의 작용에서 TNF- α 의 발현을 억제하며, *C. militaris*의 기능성 성분인 codycepin이 마우스 비장세포로부터 IL-2의 생성이 억제되는 것과 일치함을 확인하였다. 이러한 IL-2와 TNF- α 은 Th1 cell의 발현에 작용하는 cytokines으로서 주로 지연성 과민성 면역 반응에 관여를 하며, 그 중 IL-2는 세포독성을 나타내는 T lymphocyte의 성장을 유도하거나 유지하는 반응에 작용하며, TNF- α 은 LPS의해 자극되어 T lymphocyte와 Natural killer cell에 의해 생성되는 IFN- γ 에 의해 생성되며 주로 급성염증반응을 매개하여 자연면역과 적응면역의 초기면역

면역작용인 세포성 면역에 작용을 한다. 따라서 cordycepin 고함유 동충하초 *C. militaris* JLM 0636는 IL-2와 TNF- α 의 분비를 저해함으로써 T lymphocyte에 의해 작용하는 세포성 면역활성이 억제되는 것으로 사료된다.

(나) Th2 cytokines의 생성의 변화

Cordycepin 고함유 동충하초 *C. militaris* JLM0636 추출물에 의해 유도되는 Th1 cytokine IL-4와 IL-10의 생성은 *C. militaris* JLM 0636 추출물과 *C. militaris* 추출물만 처리하였을 때 대조구보다 높게 나타났으며, 시간에 따라 유의적으로 증가하였다. 그리고 *C. militaris* JLM 0636 추출물에서 가장 높은 생성을 확인하였다(Fig. 4).

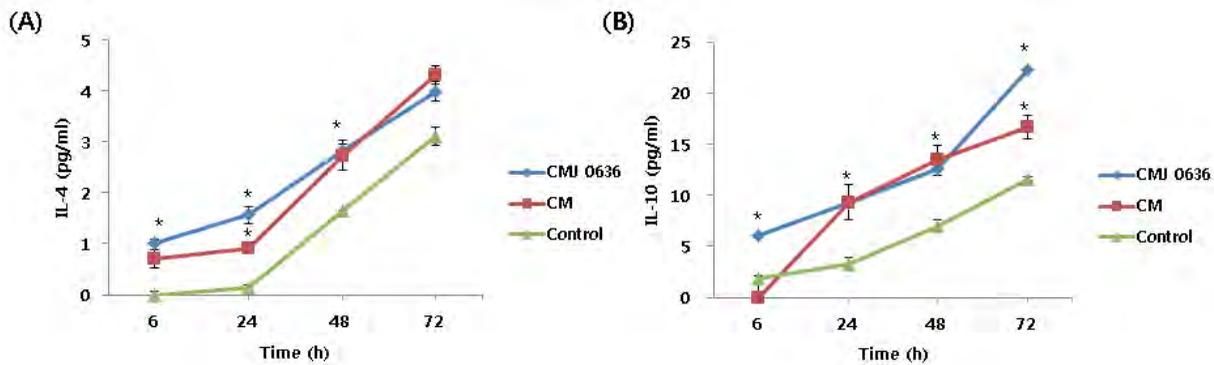


Fig. 4. Production of IL-4 (A) and IL-10 (B) cytokines by *C. militaris* JLM 0636 extract (CMJ 0636) and *C. militaris* extract (CM) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 3 μ g/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p < 0.05$.

LPS를 함께 처리하였을 때 IL-4의 초기 생성은 낮게 나타났으며, 24시간부터 유의적으로 증가하였으며 *C. militaris* JLM0636 추출물에서 가장 높은 생성의 변화를 나타내었다. IL-10의 분비는 24시간동안 모두 비슷한 생성의 변화가 있었으나 48시간부터 *C. militaris* JLM0636 추출물에서 가장 높은 생성의 변화를 나타내었다(Fig. 5).

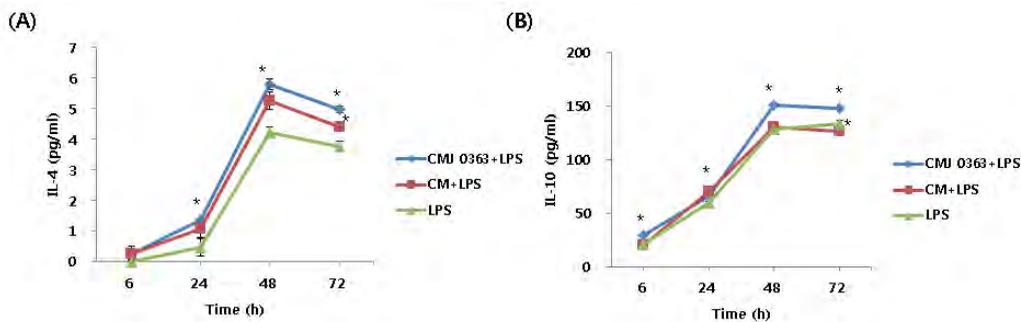


Fig. 5. Production of IL-4 (A) and IL-10 (B) cytokines by *C. militaris* JLM 0636 extract (CMJ 0636) and *C. militaris* extract (CM) and LPS in mouse spleen cells. Spleen cells

were cultivated with 3 $\mu\text{g/ml}$ extracts and 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p<0.05$.

Con A 를 함께 처리하였을 때 IL-4 의 생성은 24 시간까지 Con A 단독 처리군과 유사한 생성 변화를 나타내었으며 48 시간부터 높은 생성의 변화를 확인하였다. 생성의 변화는 *C. militaris* JLM0636 추출물이 높은 생성의 변화를 확인하였다. IL-10 은 생성이 증가하다 Con A 단독 처리군에서 48 시간에 감소하였으며, *C. militaris* JLM 0636 추출물과 *C. militaris* 추출물만을 처리한 군에서는 생성이 유의적으로 증가하였다. 또한 생성의 변화는 *C. militaris* 추출물이 높은 생성을 나타내었으며 72 시간에 유사한 생성을 확인하였다(Fig. 6).

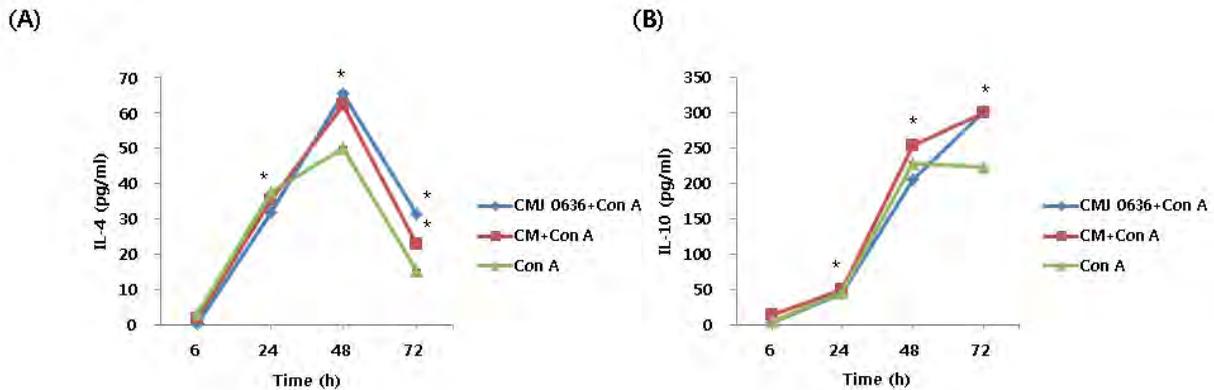


Fig. 6. Production of IL-4 (A) and IL-10 (B) cytokines by *C. militaris* JLM 0636 extract (CMJ 0636) and *C. militaris* extract (CM) and Con A in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 3 $\mu\text{g/ml}$ extracts and 2 $\mu\text{g/ml}$ Con A for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p<0.05$.

이는 *C. militaris* 의 기능성 성분인 cordycepin 이 LPS 자극에 의해 마우스 비장세포로부터 IL-4 와 IL-10 의 생성이 증가와 말초혈관단핵구로부터 IL-10 의 발현이 유도되는 결과와 일치함을 확인하였다. 이로서 cordycepin 고함량 *C. militaris* JLM 0636 이 일반 *C. militaris* 보다 면역증강작용이 있음을 뒷받침하였다. 이러한 IL-4 와 IL-10 은 Th2 cell 의 발현에 작용하는 cytokines 으로서 주로 항체생성 반응에 관여를 하며, 그 중 IL-4 는 B lymphocyte 의 DNA 합성을 자극하는 세포성장인자이며, 주로 T lymphocyte, macrophage 등에서 많이 생성되어 B lymphocyte 에서 여러 표면분자발현 및 세포증식, 세포분화, T lymphocyte 의 활성화조절에 관여하는 주요 cytokine 으로 알려져 있다. 그리고 IL-10 은 Th2 cell 에서 생성되어 Th1 cell 유도 cytokine 의 생성을 억제하며, 면역조절반응에서 억제와 자극을 조절하는 작용을 한다[17]. 이러한 작용으로서 cordycepin 고함량 *C. militaris* JLM 0636 은 IL-4 와 IL-10 의 분비를 유도하여 항체생성에 관여하는 B lymphocyte 의 발현 및 면역조절작용을 하는 Th2 cell 을 활성화하여 체액성 면역작용에 중요하게 작용하는 것으로 사료된다. 최근 연구에 의하면 *C. militaris* 의 에탄올 추출물이 면역억제 동물모델에서 IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α 같은 Th1 cytokine 의 분비를 증가시켰으나, IL-4 와 IL-10 같은 Th2 cytokine 의 분비에는 영향을 미치지 않은 연구와 상반되는 결과를 유추할 수 있는데, *C. militaris* 이 면역이 억제되어 있을 때 초기 면역작용에 작용하는 Th1 cell 의 작용을 활성화하는 세포성 면역을 유도하지만 정상세포에서는 후기면역작용에 관여하는 체액성 면역으로

유도되는 것을 확인하여 효율적으로 면역반응을 조절하는 것으로 사료된다. 앞선 결과를 토대로 Cordycepin 고함유 동충하초 *C. militaris* JLM 0636 은 정상 마우스 비장세포에서 Th1 cell 에 의해 매개될 수 있는 세포성 면역은 억제되며, Th2 cell 에 의해 매개되는 체액성 면역은 활성화되어 항체를 유도하는 면역을 증대시켜 면역증강효과를 가지며, Th1 cell 과 Th2 cell 의 균형에 면역작용이 조절되는 것으로 사료된다.

다. 코디세핀 (cordycepin)의 항암효과 연구

(1) 신경아세포종과 흑색피부 종양세포에 대한 동충하초 유래 cordycepin의 항암효과 연구

(가) 항암효과 확인

코디세핀에 의한 암세포의 증식능력 조사: 본 연구에서는 코디세핀에 의한 항암효과가 규명되어 있지 않은 신경아세포종 SK-N-BE(2)-C와 흑색 피부 종양 세포 SK-MEL-2에서의 항암효과를 조사하였다. 먼저 48시간 동안 코디세핀의 농도별 처리에 의한 세포증식능력을 조사한 결과, Fig. 1에 나타낸 바와 같이 농도 의존적으로 암세포의 증식저해 효과를 나타내었고, SK-MEL-2 세포는 80 μ M, SK-N-BE(2) C는 120 μ M에서 50%의 세포증식 저해율을 나타내었다.

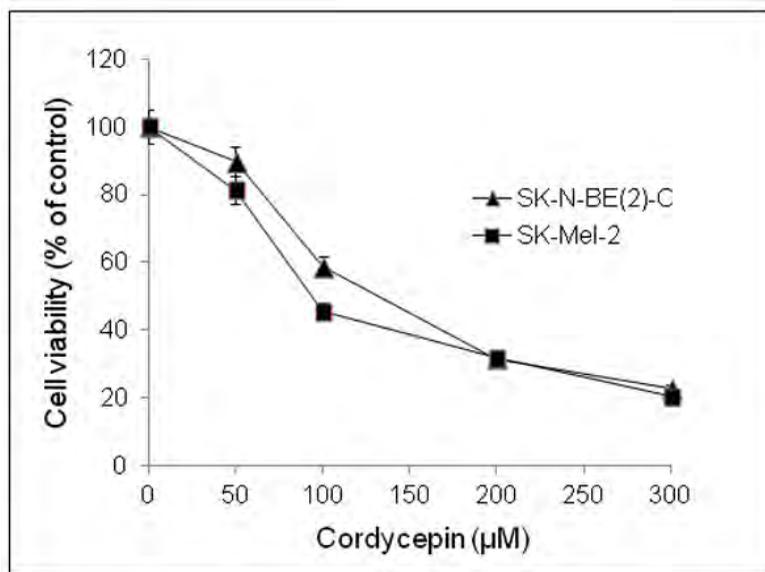


Fig. 1. Effect of cordycepin on viability of SK-N-BE(2)-C and SK-MEL-2 cells. The cytotoxic effects of cordycepin on SK-N-BE(2)-C and SK-MEL-2 cells were evaluated by MTT assay. Cells were treated with various concentrations of cordycepin (0-300 μ M) for 24 h or 48h and their absorbance at 490 nm was measured on an ELISA reader. The results were expressed as percentage of cell proliferation in the control (0 μ M cordycepin) and represent the mean \pm SD of three independent experiments.

(나) 코디세핀에 의한 암세포의 형태변화 조사

코디세핀의 시간별 처리에 의한 세포형태 변화를 조사한 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이, SK-N-BE(2) C 세포는 150 μ M 처리 후 48시간, SK-MEL-2 세포는 80 μ M 처리 후 12시간부터 세포사멸을 나타내는 세포형태의 변화가 관찰되었다.

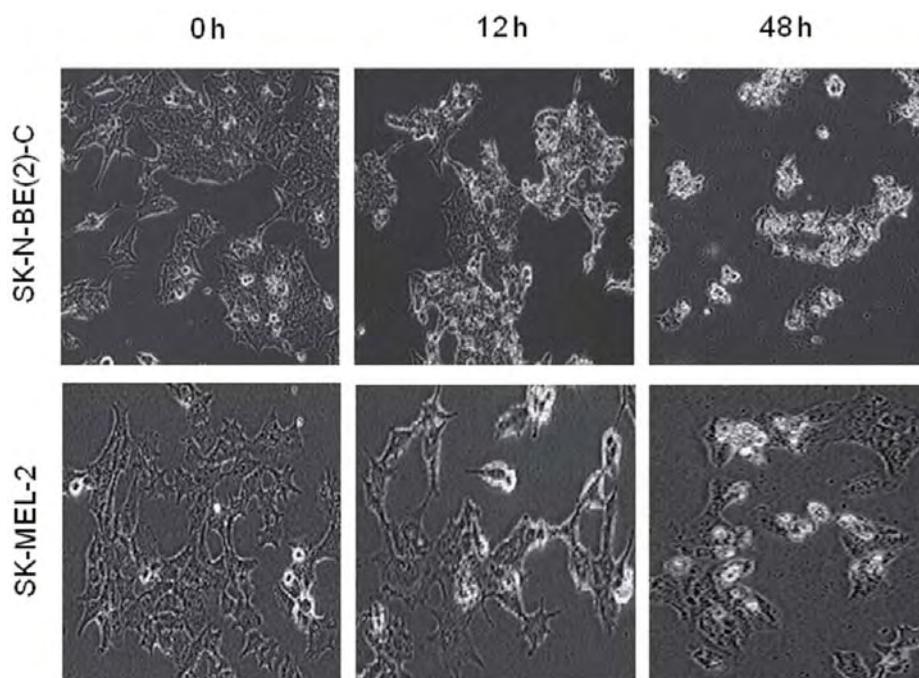


Fig. 2. Time-dependent changes of cell morphology in response to cordycepin. SK-N-BE(2)-C and SK-MEL-2 cells were cultured in DMEM containing 120 μ M and 80 μ M, respectively, for 0, 12 or 48 h. At each time point, the cells were examined microscopically in order to monitor for changes in cell morphology not present in the negative control (0 h).

(다) 코디세핀에 의한 암세포의 세포주기 조사

암세포의 세포주기에 대한 코디세핀의 영향을 알아보기 위하여 상기의 암세포 생존능력과 형태변화 조사 결과를 바탕으로 코디세핀을 각각의 농도와 시간별로 처리한 후 flow cytometry (FCM)에 의해 세포주기를 관찰하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 코디세핀 120 μ M을 처리한 SK-N-BE(2)-C세포와 코디세핀 80 μ M을 처리한 SK-MEL-2세포에서 24시간부터 세포사멸을 나타내는 sub G1기가 나타나고 증가되는 반면에 G0/G1기의 DNA 함량이 감소 되는 것으로 나타나 apoptosis가 진행됨이 확인되었다.

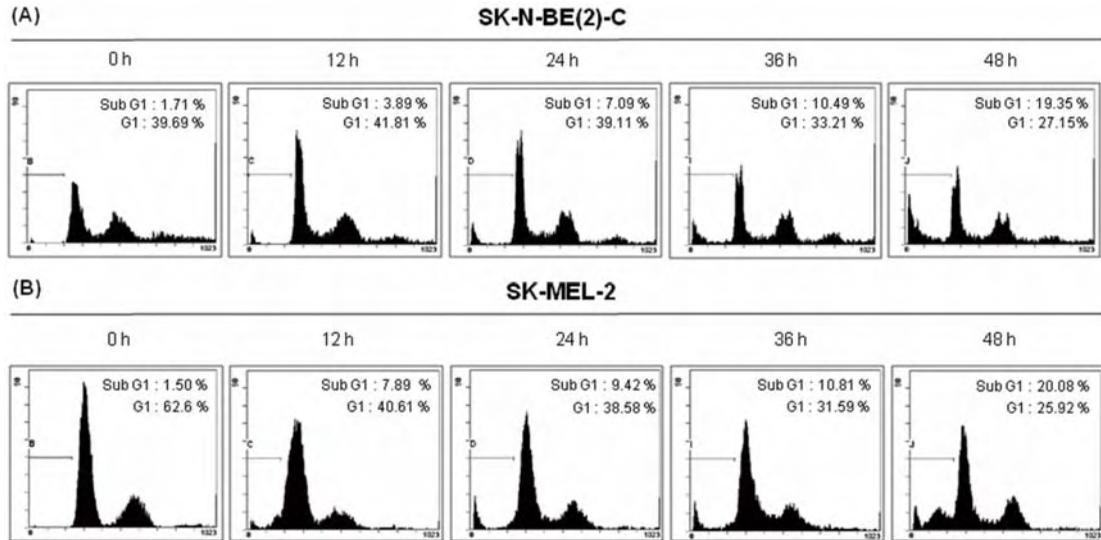


Fig. 3. Effect of cordycepin on cell cycle progression of SK-N-BE(2)-C and SK-MEL-2 cells. SK-N-BE(2)-C (A) and SK-MEL-2 (B) cells were treated with cordycepin at the concentration of 120 μ M and 80 μ M, respectively for the indicated times. Thereafter, the cells were washed, fixed, stained with propidium iodide (PI), and analyzed for DNA content by flow cytometry.

(라) 코디세핀에 의한 암세포의 세포사멸(apoptosis) 조사

코디세핀에 의한 암세포의 세포사멸을 각종 항체를 이용한 Western blotting에 의해 조사한 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 코디세핀 처리 12시간부터 caspase-3와 PARP 1/2가 절단됨으로서 감소되는 현상이 관찰되었는데 이 결과는 코디세핀에 의해 SK-N-BE(2)-C세포와 SK-MEL-2세포에서 세포사멸이 일어난 것으로 판단되었다. 한편 세포주기 조절 관련 단백질인 cyclin A, D, E의 발현을 각 단백질에 대한 항체를 이용한 Western blotting에 의해 조사해 본 결과 이들 단백질의 발현에는 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었다.

또한 annexin V-FITC를 이용한 Flow cytometry (FCM)에 의해 세포사멸을 관찰한 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 SK-N-BE(2)-C세포와 SK-MEL-2세포에서 annexin V-positive 세포가 코디세핀 처리시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내어 세포사멸이 증가함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 동충화초 유래의 코디세핀은 신경아세포종 SK-N-BE(2)-C와 흑색 피부암 세포 SK-Mel-2에서 세포사멸을 통하여 항암효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

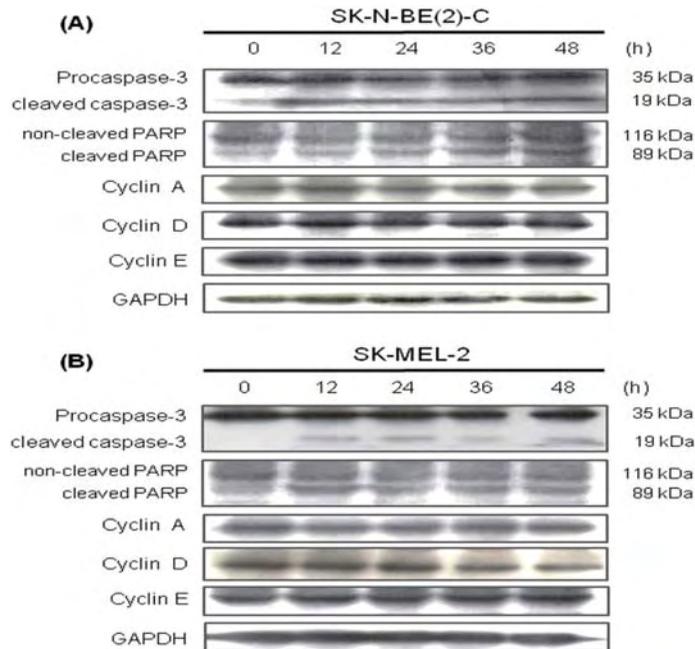


Fig. 4. Effect of cordycepin on caspase-3 activation, PARP cleavage and protein expression levels of cell cycle regulatory proteins in SK-N-BE(2)-C and SK-MEL-2 cells. SK-N-BE(2)-C and SK-MEL-2 cells were treated with cordycepin at the concentration of 120 μ M and 80 μ M, respectively for the indicated time. Caspase-3 activation, PARP cleavage and protein expression levels were determined by Western blot analysis. GAPDH was used as an internal control.

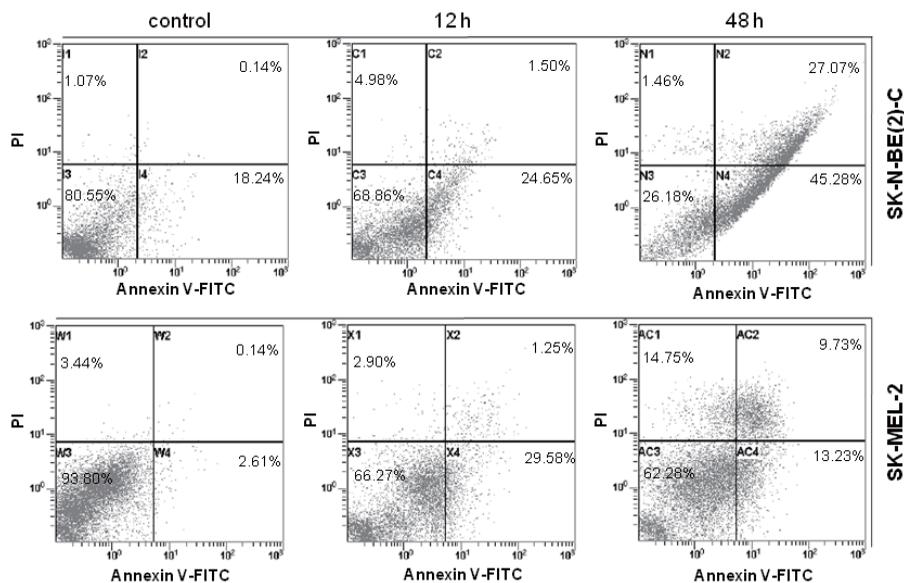


Fig. 5. Effect of cordycepin on apoptosis of SK-N-BE(2)-C and SK-MEL-2 cells. SK-N-BE(2)-C and SK-MEL-2 cells were treated with cordycepin at the concentration of 120 μ M and 80 μ M, respectively for 0, 12 or 48 h. Thereafter, the cells were washed, and stained with annexin V-FITC and apoptosis rates were analyzed by flow cytometry.

(2) 흑색피부 종양세포에 대한 트립톨리드(Triptolide, TPL)의 항암효과 연구

(가) 트립톨리드에 의한 흑색피부 종양세포의 증식능력 조사

본 연구에서는 트립톨리드에 의한 항암효과가 규명되어 있지 않은 인간 흑색피부 종양 세포 SK-MEL-2와 SK-MEL-28 및 마우스 흑색피부 종양세포 B16F10에서의 항암효과를 조사하였다. 먼저 24시간 동안 트립톨리드의 농도별 처리에 의한 세포증식능력을 조사한 결과, Fig. 6A에 나타낸 바와 같이 농도 의존적으로 암세포의 증식저해 효과를 나타내었고, SK-MEL-2세포는 63 nM, SK-MEL-28세포는 70 nM, B16F10세포는 89 nM에서 50%의 세포 증식 저해율을 나타내었다. 또한 50 nM을 처리한 SK-MEL-2세포에서는 24시간 이후 급격한 세포증식 저해효과를 나타내었다 (Fig. 6B).

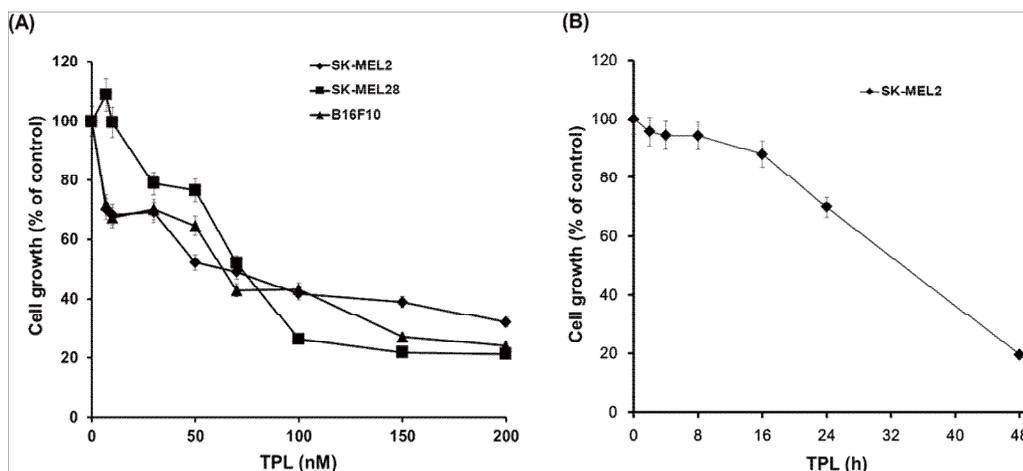


Fig. 6. Effect of TPL on viability of melanoma cells. (A) Human melanoma cell lines, SK-MEL-2 and SK-MEL-28, and B16F10 mouse melanoma cells were treated with various concentration of TPL for 24 h. (B) Time-dependent effect of TPL on SK-MEL-2 cell growth after treatment of 50 nM TPL. Cell growth was measured by MTT assay. Data were presented as percentage of control and were mean \pm SEM (n=3-4).

(나) 트립톨리드에 의한 암세포의 세포사멸(apoptosis) 조사

트립톨리드에 의한 흑색피부 종양세포의 세포사멸을 각종 항체를 이용한 Western blotting에 의해 조사한 결과, Fig. 7에 나타낸 바와 같이 SK-MEL-2 세포는 50 nM이상의 농도에서 24시간 처리 했을 때 세포사멸을 나타내는 세포형태의 변화가 관찰되었고, 세포사멸을 나타내는 sub G1기가 나타나고 증가되는 것으로 나타났으며 annexin V-positive세포가 트립톨리드 처리시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내어 세포사멸이 증가함을 알 수 있었다. 또한 Fig. 8에 나타낸 바와 같이 트립톨리드 처리 농도가 증가함에 따라 세포사멸 관련 단백질들의 활성화가 증가되었는데 특히 외인성 세포사멸 관련 단백질인 Fas와 FADD의 증가 및 caspase-8, Bid 활성화를 경유한 내인성 세포사멸 관련 단백질인 미토콘드리아 시토크롬 방출과 caspase-9의 활성화가 관찰되었다. 이러한 결과는 트립톨리드에 의한 흑색피부 종양세포의 세포사멸은 내인성과 외인성 기전 모두에 의해 일어남을 알 수 있었다.

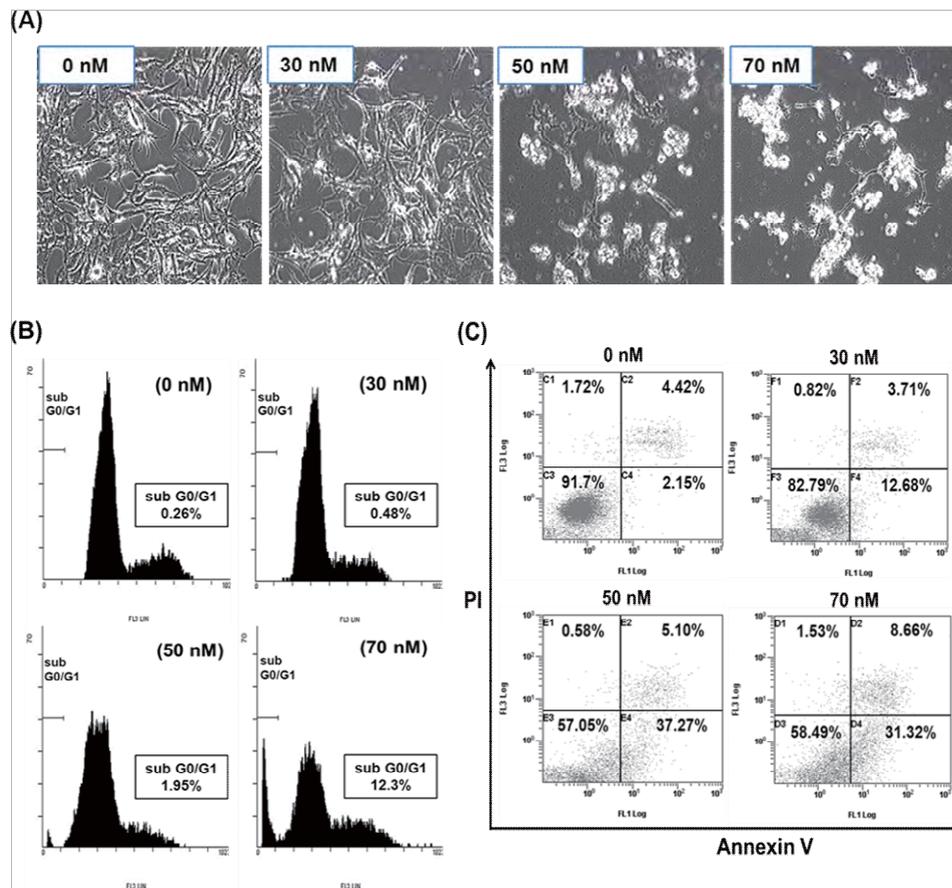


Fig. 7. Effect of TPL on apoptosis of SK-MEL-2 cells. SK-MEL-2 cells were treated with 0, 30, 50, 70 nM of TPL for 24 h. (A) Cells morphology was evaluated under the microscope. (B) Cells were washed, fixed, stained with propidium iodide (PI), and analyzed for DNA content by flow cytometry. (C) Apoptotic cells were measured by Annexin V assay and followed by analysis with flow cytometry.

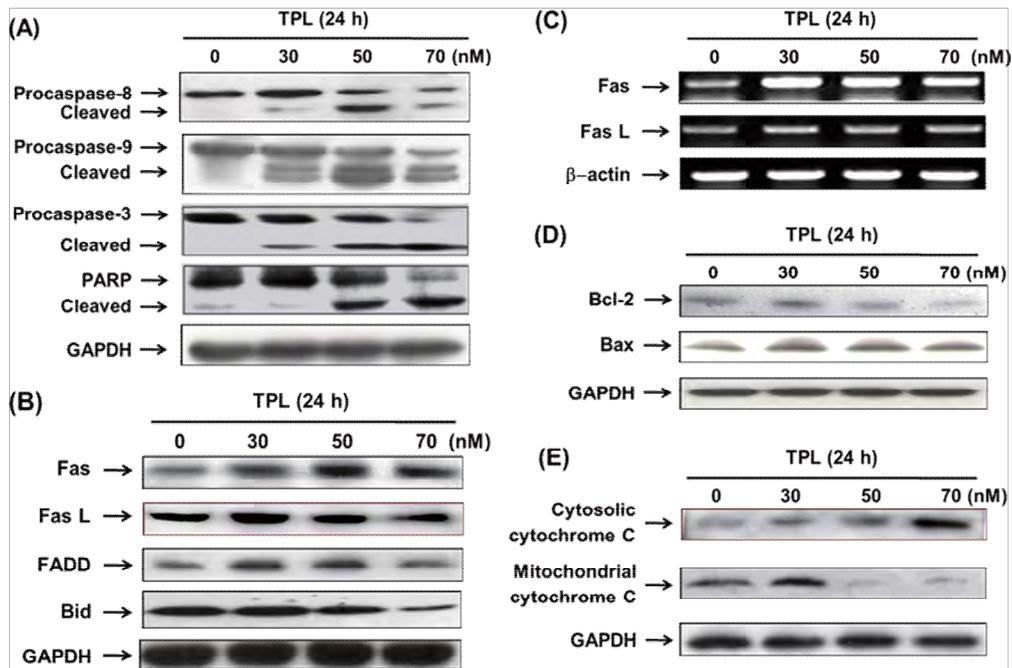


Fig. 8. Effects of TPL on caspases activation in SK-MEL-2 cells. Human SK-MEL-2 cells were treated with 0, 30, 50, 70 nM of TPL for 24 h and then cells were collected. (A) Cell lysates were subjected to Western blotting analysis to detect caspase-8, -9, -3 and PARP. (B and C) Effects of TPL on protein expressions related to apoptosis through Fas death receptor. (B) The cell lysates were subjected to Western blot analysis. Each protein was detected using Fas, Fas L, FADD and Bid antibodies, (C) Total RNA was extracted in SK-MEL2 cells treated with TPL. The mRNAs level of Fas receptor and Fas ligand were examined by RT-PCR. (D and E) Effects of TPL on protein expressions related to apoptosis through mitochondria. (D) Each protein was detected using Bcl-2, Bax. (E) The cytosolic and mitochondrial fraction proteins were collected and then detected using cytochrome C antibody. GAPDH and β -actin were used as internal controls.

라. 코디세핀 (Cordycepin)과 농산물 융합 면역 상승효과 연구

(1) 흑마늘 추출물에 의해 유도되는 Th1 cytokine 생성의 변화

흑마늘 추출물에 유도되는 Th1 cytokine의 생성의 변화는 C57/BL6 마우스로부터 분리된 비장세포에 대조구와 10 μ l/ml 흑마늘 추출물만 처리한 군, 그리고 2 μ l/ml의 LPS만 처리한 군과 2 μ l/ml의 LPS와 10 μ l/ml의 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때 생성되는 cytokine IL-2, TNF- α , IFN- γ 의 분비량을 6, 24, 48, 72 시간 동안 측정하여 확인하였다.

IL-2는 비장세포 부유액에 흑마늘 추출물만 처리하였을 때 24, 48 시간에 8.33 ± 0.24 , 26.32 ± 0.59 pg/ml로 대조구 10 ± 0.01 , 26.49 ± 0.44 pg/ml 와 낮은 생성을 보였지만 72시간에는 39.73 ± 0.82 pg/ml로 대조구 35.15 ± 0.48 pg/ml 보다 생성량이 증가하였다(Fig. 1). 그리고 LPS와 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때 LPS만 처리하였을 때 보다 24시간에는 16.16 ± 0.71 pg/ml로 LPS 처리군 17.33 ± 0.47 pg/ml보다 낮은 생성을 나타내었으나 48시간부터 유의적으로 생성이 증가하여 72시간에 74.47 ± 0.94 pg/ml 으로 LPS처리군 59.81 ± 2.36 pg/ml 보다 생성이 현저히 증가함을 확인하였다(Fig. 2A). TNF- α 는 LPS와 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때 6시간에는 277.93 ± 5.14 pg/ml으로 LPS처리군 299.91 ± 18.32 pg/ml 보다 낮은 생성을 나타내었으나 24시간에 392.69 ± 20.89 으로 LPS처리군 333.91 ± 21.53 pg/ml 보다 유의적으로 높은 생성을 나타내어 TNF- α 생성이 증가함을 확인하였다(Fig. 2B). 그리고 IFN- γ 은 LPS와 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때 1484.53 ± 68.94 , 1699.52 ± 57.16 , 1774.1 ± 34.18 pg/ml으로 LPS처리군 1257.03 ± 2.95 , 1434.94 ± 107.24 , 1473.69 ± 123.15 pg/ml으로 24시간부터 유의적으로 높은 생성을 나타내었다(Fig. 2C).

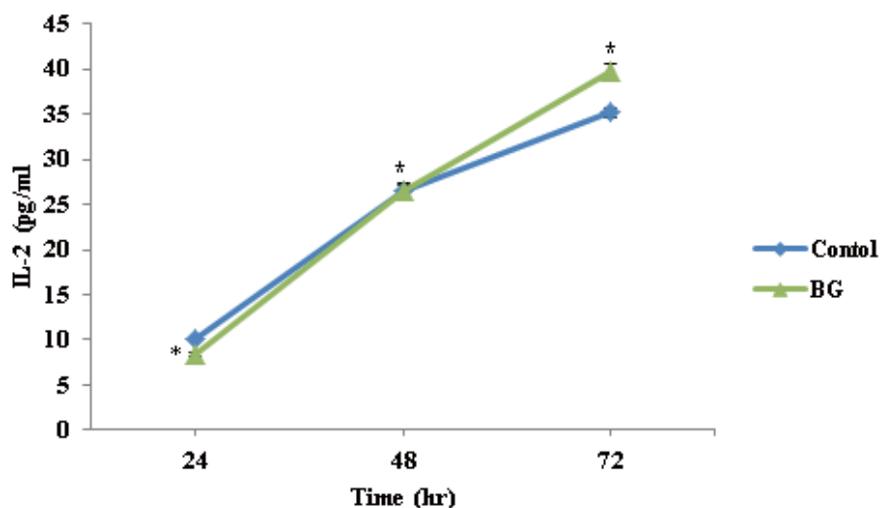


Fig. 1. Production of IL-2 cytokine by black garlic extract (BG) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml black garlic extract for 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p<0.05$.

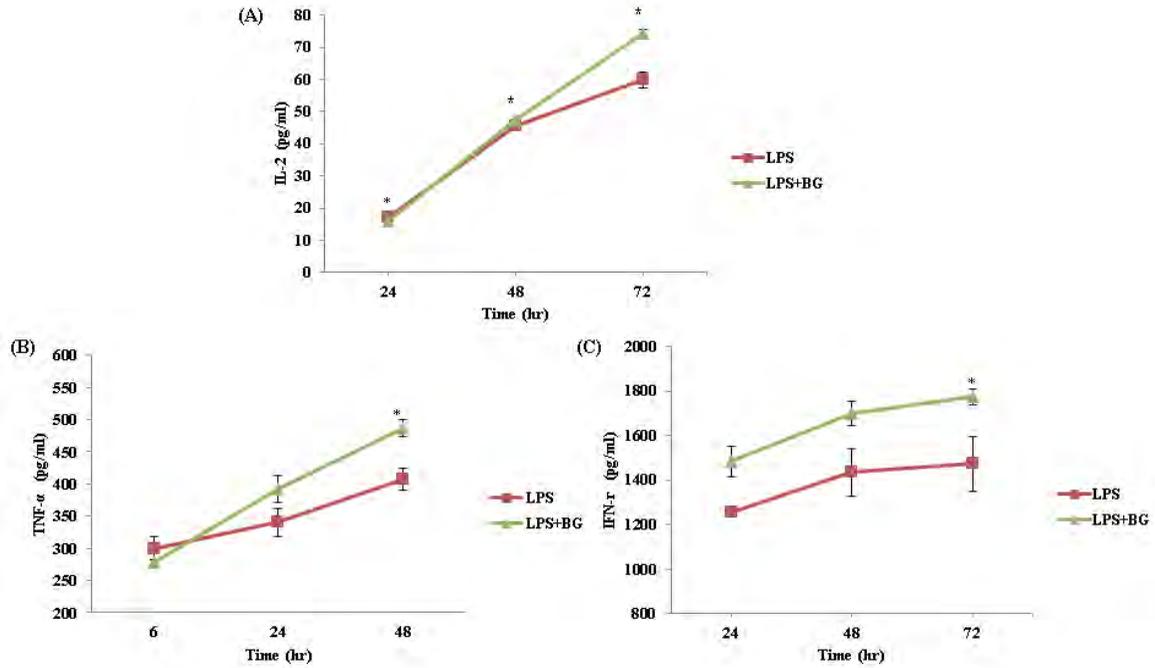


Fig. 2. Production of Th 1 cytokines by black garlic extract (BG) and LPS in mouse spleen cells (A : IL-2 cytokine, B : TNF- α cytokine, C : IFN- γ cytokine). Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml black garlic extract and 2 μ g/ml LPS for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control (LPS) $p < 0.05$.

(2) 흑마늘 추출물에 의해 유도되는 Th2 cytokine 생성의 변화

흑마늘 추출물에 유도되는 Th1 cytokine의 생성의 변화는 C57/BL6 마우스로부터 분리된 비장세포에 대조구와 10 μ l/ml 흑마늘 추출물만 처리한 군, 그리고 2 μ l/ml의 LPS만 처리한 군과 2 μ l/ml의 LPS와 10 μ l/ml의 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때 생성되는 cytokine IL-4, IL-6, IL-10 의 분비량을 6, 24, 48, 72 시간 동안 측정하여 확인하였다.

IL-6는 비장세포 부유액에 흑마늘 추출물만 처리하였을 때 6시간에 5.00 \pm 0.01 pg/ml로 대조구 4.21 \pm 1.12 pg/ml과 같은 생성을 나타내었으며 24시간에는 14.21 \pm 1.12 pg/ml로 대조구 16.84 \pm 2.61 pg/ml보다 생성이 감소하였지만 48시간부터 32.10 \pm 0.37 pg/ml로 대조구 27.10 \pm 0.01 pg/ml로 생성이 증가하였다(Fig. 3). 그리고 LPS와 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때 6시간에는 159.73 \pm 2.23 pg/ml로 LPS 처리군 158.68 \pm 9.68 pg/ml로 같은 생성을 나타내었으나 24시간부터 619.19 \pm 2.23, 779.71 \pm 38.7 pg/ml로 LPS 처리군 339.97 \pm 21.53, 407.23 \pm 16.39 pg/ml보다 생성이 유의적으로 증가하였다(Fig. 4A). IL-4는 6시간부터 0.71 \pm 0.08, 3.09 \pm 0.01, 8.58 \pm 0.47 pg/ml로 LPS 처리군 0.61 \pm 0.08, 1.59 \pm 0.54, 6.87 \pm 0.71 pg/ml 보다 생성량이 유의적으로 증가하였다(Fig. 4B). IL-10의 생성은 LPS와 흑마늘 추출물을 함께 처리하였을 때

24, 48시간에는 70.01 ± 7.07 , 220.01 ± 3.54 pg/ml로 LPS 처리군 68.75 ± 12.37 , 197.51 ± 0.11 pg/ml로 약간 높은 생성을 나타내었으나 72시간부터 235.17 ± 7.07 pg/ml로 LPS 처리군 281.25 ± 15.91 pg/ml로 생성이 감소하였다(Fig. 4C).

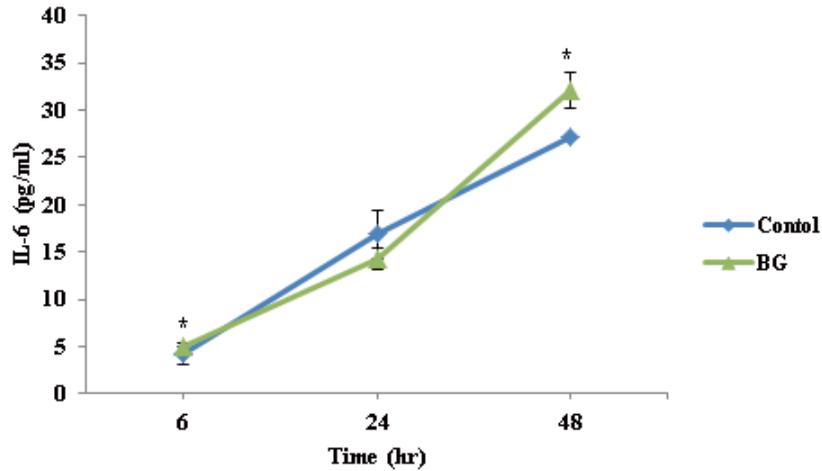


Fig. 3. Production of IL-6 cytokines by black garlic extract (BG) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml black garlic extract for 6, 24, 48 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control (LPS) $p < 0.05$.

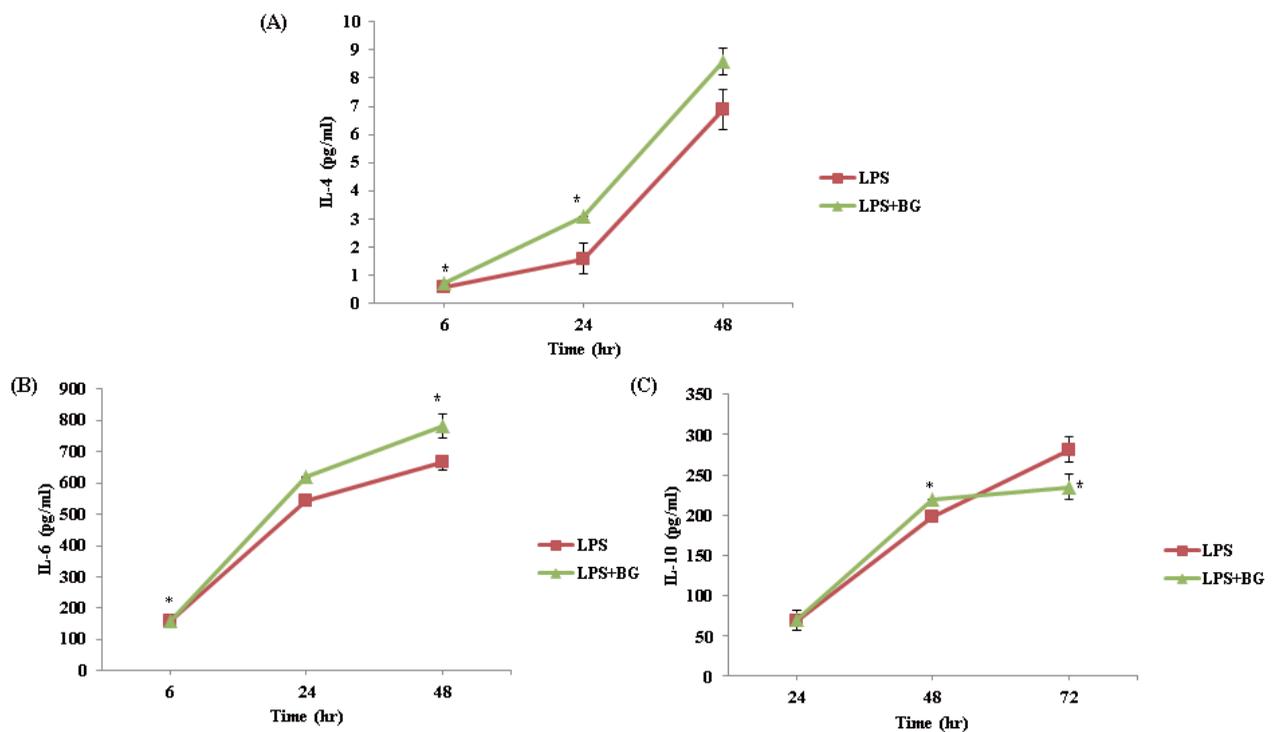


Fig. 4. Production of Th 2 cytokines by black garlic extract (BG) and LPS in mouse spleen cells (A : IL-5 cytokine, B : IL-6 cytokine, C : IL-10 cytokine). Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml black garlic extract and 2 μ g/ml LPS for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control (LPS) $p < 0.05$.

마. 붉은 턱다리 버섯 (*Laetiporus sulphureus*)의 물질분석 및 생리기능성 확인

(1) 실험 재료 및 방법

(가) 균주 및 배양방법

붉은 턱다리 버섯 (*Laetiporus sulphureus* JM 27)은 어릴때 식용이 가능한 버섯으로 중국 등 아시아에서 많이 자라는 버섯으로 균사체에서는 독성을 가지지 않아 본 연구에 사용된 버섯은 동아대학교 연구실에서 보관된 균주를 사용하였다. *L. sulphureus* JM 27의 고체배양은 고체배지 (2% Malt extract, 1.5% agar)에서 25℃에서 14일간 배양하여 4℃에서 보관하여 사용하였다 (Fig. 2A). 액체배양은 250 ml flask에 100 ml의 배지 (3% maltose, 0.2% soy-peptone, 2mM MnSO₄ · H₂O)에 고체배양 한 균사체를 접종하여 25℃에서 20일간 배양한 균사체 배양액을 본 연구의 시료로 사용하였다 (Fig. 2B).



Fig. 1. Mushroom, *Laetiporus sulphureus* JM 27

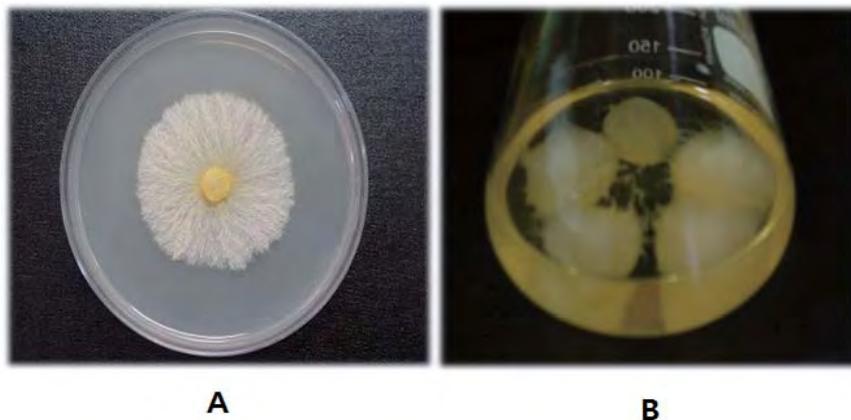


Fig. 2. Mycelial cultures of *Laetiporus sulphureus* JM 27

A : Mycelium cultivation on malt extract agar plate

B : Mycelium growth in the culture broth

(나) 다당류 (exopolysaccharide, EPS) 추출 및 분리 방법

액체 배양한 *L. sulphureus* JM 27의 균사체 배양액에 95% EtOH를 최종농도가 30%되게 혼합하여 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균사체를 제거하였으며, 상등액에 대해 EtOH농도가 70%되게 하여 혼합액을 4°C에서 12시간 방치한 후 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전된 침전물을 회수하여 이를 동결건조하여 crude EPS를 회수하였다. 추출한 crude EPS를 H₂O에 용해하여 DEAE cellulose column에 0~0.3M NaCl의 용매로 농도구배하여 4개의 fraction (EPS-1, EPS-2, EPS-3, EPS-4)을 회수하였으며, 분리된 EPS-2에 대하여 Sephadex G-50 column으로 분당 0.2ml의 유속으로 분리하여 EPS-2-1의 fraction을 회수하여 이를 동결건조하여 사용하였다.

(다) 다당류의 분석

① 구성당의 분석

분리된 EPS-2-1을 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP)를 유도체화하여 HPLC 분석법으로 분석하였다. 분리된 EPS-2-1 (10 mg)에 2 M TFA (2 ml)를 첨가하여 120°C에서 2시간동안 산가수분해한 후, 증류수로 산을 제거하였다. 산가수분해 한 용액 EPS-2-1 (100 µl)에 0.5 M PMP (100 µl)와 0.3 M sodium hydroxide (100 µl)를 첨가하여 70°C에서 30분간 반응하였다. 이를 8°C에서 5분간 chloroform 1 ml으로 추출하여 원심분리하여 chloroform층을 제거한 후 남은 수용액 층에 대하여 HPLC 분석하였다. HPLC 분석은 HPLC system (Perkin-Elmer, Germany)으로 분석하였으며 standard monosaccharide로서는 Glc, Gal, Man, Ara, Xyl, Fuc를 사용하였다.

② 분자량 측정

분리된 EPS-2-1의 분자량 측정은 HPLC system (GPC Breeze system, USA)를 사용하였으며, standard로서는 다양한 분자량을 가진 pullulan standard (788-, 404-, 212-, 120-, 22.8-, 11.8-, 5.9 kDa)를 사용하여 측정하였다.

③ Methylation 분석

EPS-2-1를 2 M TFA와 함께 가수분해 한 후 NaBH₄로 환원한 후 acetic anhydride-pyridine으로 acetylation하여 GC/MS로 분석하였다.

④ NMR 분석

EPS-2-1을 D₂O에 용해하여 ¹H-과 ¹³C NMR, 2D NMR (COSY, HMBC, HSQC)를 DRX-500 spectrophotometer (Bruker, Germany)로 측정하였다.

(라) 항염증활성 측정

① Cell culture와 viability

BV2 murine microglia cell은 인제대학교에서 분양받아 사용하였다. Cell의 culture은 37°C에서 5% FBS와 antibiotic가 함유된 DMEM에서 배양하였다. Cell viability는 BV2 cell (1×10⁵ cells/ml)에 다양한 농도의 EPS-2-1 (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0)에 대해 MTT assay에 의해 측정하였다.

② NO 측정

BV2 cell (1×10⁵ cells/ml)을 24-well plate에서 LPS 처리 전에 각각의 농도의 EPS-2-1을 처리

하여 1시간동안 전처리한 후 24동안 반응하였다. 배양액을 회수하여 Griess reagent를 처리하여 540 nm 에서 측정하였다. NO의 측정은 sodium nitrate를 사용하여 nitrate 함량으로 정량하였다.

③ Enzyme immunoassay (ELISA)

BV2 cell의 PEG2와 TNF- α 의 발현은 시판제품인 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였다.

④ Total RNA의 추출 및 RT-PCR

Total RNA는 esay-BLUE™ total RNA extract kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 추출하였다. 1 ug RNA를 reverse-transcriptase (Promega, Madison, WI)를 사용하여 합성하였으며, 합성된 cDNA는 iNOS, COSX-2, TNF- α , β -action primer를 사용하여 PCR 하였다.

⑤ Western blot analysis

Total cell 추출물은 PRO-PREP protein extraction kit (iNtRON Biotechnoloy; Sungnam, Republic of Korea)로 추출하여 준비하였으며, Cytoplasmic과 nuclear 추출물은 NE-PER nuclear and cytosolic extraction reagents (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. Total cell extracts는 polyacrylamide gel로 분리하여 nitrocellulose membrane로 transfer하였다. Membrane는 ECL reagent (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)을 사용하여 확인하였다.

⑥ Electrophoretic mobility assay (EMSA)

DNA-protein binding assay는 nuclear extract와 같이 수행하였다. Synthetic complementary NF- κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') binding oligosaccharide (Santa Cruz Biotechnology)는 3'-end DNA labeling kit (Pierce)를 사용하여 3'-biotinylate하였으며, 실온에서 30분간 annealing하였다. 반응액은 electrophoretically를 사용하여 분리하였고, DNA transfer는 120 ml/cm² membrane에서 cross-linked하였다.

(라) 면역활성

① 동물 및 시약

실험에 사용된 마우스는 C57BL/6 마우스로서 생후 6~8주령, 체중 25 g 내외의 것을 대한 바이오 링크(음성군, 충청북도)로부터 구입하여 실험에 사용하였으며, 배지는 RPMI 1640 (Gibco BRL., Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Epicatechin gallate, fetal bovine serum (FBS), concanavalin A (Con A)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였으며, lipopolysaccharide (LPS)는 Escherichia coli (serotype 026:B6)에서 분리정제 된 제품을 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 마우스 cytokines의 측정은 ELISA MAX™ Deluxe set kit (BioLegend, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 흡광도 측정은 microplate reader (Bio-Rad, Richmond, VA, USA)를 사용하여 측정하였다.

② 마우스 비장세포의 분리

마우스 비장세포를 얻기 위하여 CO₂gas처리하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하였으며, 유출된 비장세포는 10% FBS를 함유하고 있는 RPMI 1640에 세포의 농도가 2×10⁵cells/ml이 되도록 현탁하여 24 wells tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 각각 1 ml씩 분주하였

다. 준비된 세포배지에 최종농도가 LPS와 발효 외송 추출물에 대하여 2 µg/ml 와 10 µg/ml가 되도록 각각 처리하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 6, 24, 48, 72 시간 배양 하였다. 이때 EPS는 10 µg/ml 에서는 세포독성이 없었으므로 이 농도를 처리농도로 하였다. 배양한 배양액은 300×g에서 10 분간 원심분리 한 후 분리된 상층액을 취하여 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

③ 마우스 cytokine IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, TNF-α의 측정

마우스 비장세포로부터 분리되는 cytokines은 IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, TNF-α를 각각 측정하였다. 측정은 96 wells microplate에 마우스 cytokine IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, TNF-α의 capture antibody를 coating buffer에 희석한 후 100 µl 분주하여 4°C에서 16~18 시간 동안 방치하였다. Capture antibody를 코팅한 96 wells microplate 는 washing buffer (1 M phosphate buffer containing 0.5% Tween 40)으로 4회 washing한 후 assay diluent 200 µl를 분주하여 실온에서 1 시간 동안 교반하여 반응하였으며, 반응 후 washing buffer으로 세척하여 세포 배양액을 100 µl 분주하여 2 시간 동안 반응하였다. 그리고 다시 washing buffer으로 washing 하여 detection antibody를 100 µl 분주 1 시간 동안 반응하였으며, 이를 washing buffer로 세척 후 avidine-horseradish peroxidase를 100 µl 분주하여 30 분간 반응하였다. 반응한 96 wells microplate 를 washing buffer으로 washing 하여 tetramethylbenzidine액을 넣은 후 20 분간 정치반응 한 후 stop solution (2N H₂SO₄)을 분주하여 반응을 정지하였으며, optical density는 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

④ 통계학적 분석

동일 실험을 3회 반복하여 실시하였으며 실험성적은 평균±표준편차로 나타내었고 각 군의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하여 P값이 0.05 미만 수준에서 통계적 유의성을 검토하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) EPS-2-1의 추출 및 분리

L.sulphureus JM 27 배양액을 에탄올 추출법에 균사체 배양한 배양액에 95% EtOH를 첨가하여 최종 농도가 30%와 70%로 처리하여 균사체를 제거하고 crude EPS를 회수하였다. 추출한 EPS의 확인은 phenol-sulfuric acid법에 의해 측정한 결과 98.9%의 carbohydrate로 구성되어 있음을 확인하였다. Crude EPS는 DEAE cellulose coloum을 사용하여 0~0.3 M NaCl로 분리하여 총 4개 (EPS-1, EPS-2, EPS-3, EPS-4)의 fraction을 얻었으며, main fraction인 EPS-2를 Sephadex G-50을 사용하여 분리하여 3개의 fraction (EPS-2-1, EPS-2-2, EPS-2-3)을 얻었으며 main인 EPS-2-1을 분석하였다 (Fig. 3). EPS-2-1의 분자량을 측정한 결과 6.95 kDa이었으며, optical specific rotatio $[\alpha]_D^{25}$ 는 +87.1° (*c*1, H₂O)임을 확인하였다.

(나) 다당류의 분석

① 구성당 분석

분리된 EPS-2-1의 구성당의 분석은 HPLC를 이용한 PMP 유도체법으로 결정하였다. EPS-2-1는 glucose로만 구성된 다당임을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

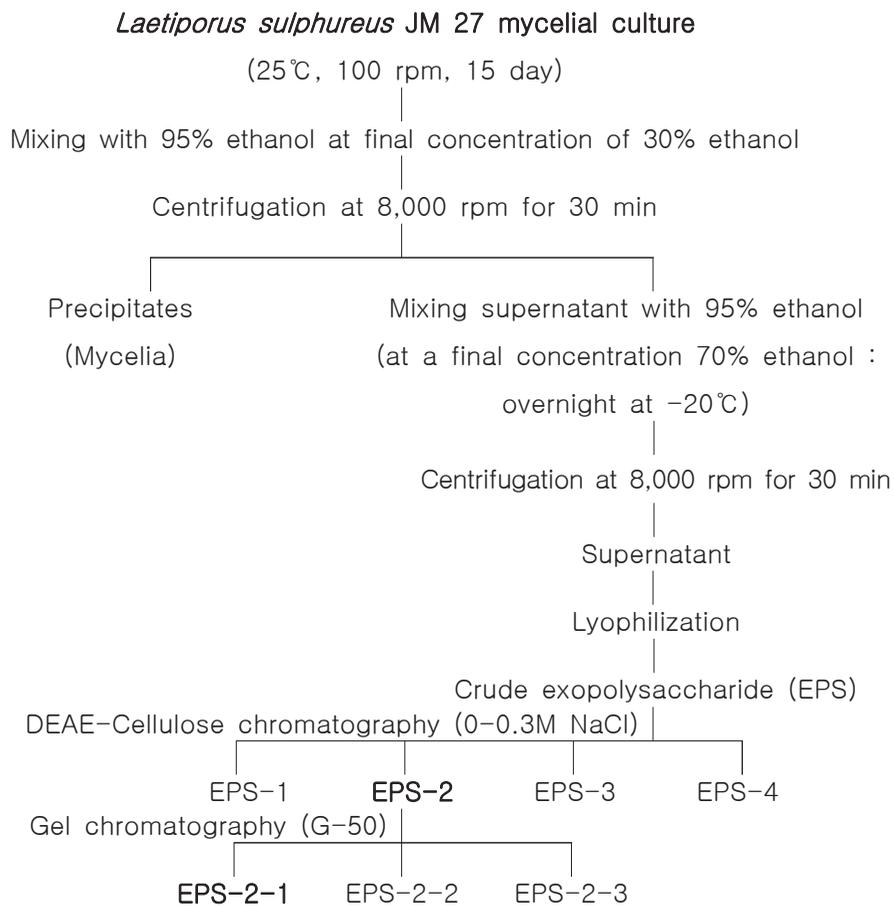


Fig. 3. A Scheme of the extraction and purification of an EPS from mycelia cultures of the *L. sulphureus* JM 27.

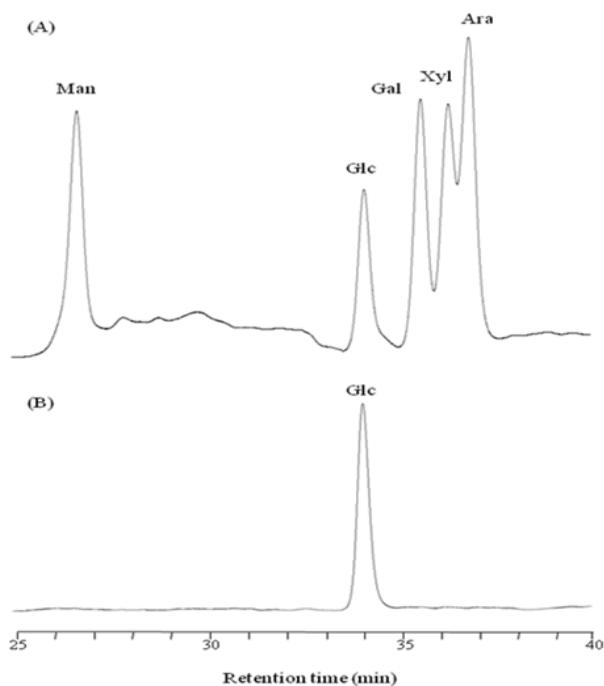


Fig. 4. HPLC profiles of a PMP derivatized monosaccharide. (A) standard sugar and (B) acidic hydrolysate of EPS-2-1.

EPS-2-1의 linkage을 확인하기 위해 methylation, acetylation하여 GC/MS로 분석하였다. 그 결과 0.68:2.01:0.35로 비율로 2,3,4,6-Me₄-Glc_p, 2,3,6-Me₄-Glc_p and 2,3-Me₄-Glc_p로 구성된 glucitol임을 확인하였으며 (Table. 1), 이는 EPS-2-1가 non-reducing Glc_p-(1→)잔기, →4-Glc_p-1→ 결합잔기와 소량의 →4,6-Glc_p-1→ 결합잔기를 가진 다당임을 유추 할 수 있었다.

Table 1. GC and GC - MS data for alditol acetates of the methylated EPS-2-1 purified from the *L. sulphurus* JM 27 mycelia.

Retention time (min)	Molar ratios ^a	Methylated sugar ^b	Mass fragments (m/z)	Linkage Type
19.77	0.68	2,3,4,6-Me ₄ -Glc _p	43, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	1 →
21.28	2.01	2,3,6-Me ₃ -Glc _p	43, 45, 71, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 173, 233	1, 4 →
22.84	0.35	2,3-Me ₂ -Glc _p	43, 58, 85, 87, 101, 117, 127, 142, 159, 161, 201, 261	1, 4, 6 →

^a Molar ratio was calculated by peak area.

^b 2,3,4,6-Me₄-Glc_p means 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl glucitol.

② NMR분석

Fig. 5에서와 같이 EPS-2-1은 ¹H NMR data에서 →4-Glc_p-1→연결과 →6-Glc_p-1→연결을 각각 δ_H 5.843 ppm과 δ_H 5.466 ppm에서 확인하였다. 그리고 chemical shifts가 δ_H 4.0 ppm에서 δ_H 4.5 ppm인 범위에서 H2에서 H6의 glucopyranosidic ring을 확인하였다. 그리고 →4-Glc_p-1→와 →6-Glc_p-1→의 anomeric configuration에서 각각 *J*_{1,2} 2.5- 와 *J*_{1,2} 3.0 Hz에서 coupling constant에 의해 α-conformation으로 존재함을 확인할 수 있었다.

¹³C NMR과 DEPT 결과는 Fig. 6에서 나타내었다. ¹³C NMR spectrum에서는 α-D-glucan임을 알 수 있었으며, δ_C 100.28 ppm과 δ_C 99.48 ppm의 2개의 peak에서 →4-Glc_p-1→과 →6-Glc_p-1→의 anomeric proton을 각각 확인하였다. 61-68 ppm의 high field에서 chemical shifts는 DEPT에 의해 확인하였다. 이 data는 Glc_p의 methylene carbon과 methyn carbon은 서로 반대로 나타나게 되는데 61.47과 67.85 ppm은 1,4-linked과 1,6-linked Glc_p의 C-6임을 확인할 수 있었다. 1,6-linked Glc_p의 C-6는 5-9 ppm에서 downfield되었다. ¹H-과 ¹³C NMR spectra에서 다른 singal은 2D NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC)을 이용하여 분석하였다. ¹H와 ¹³C NMR chemical shifts는 table 2에서 나타내었다.

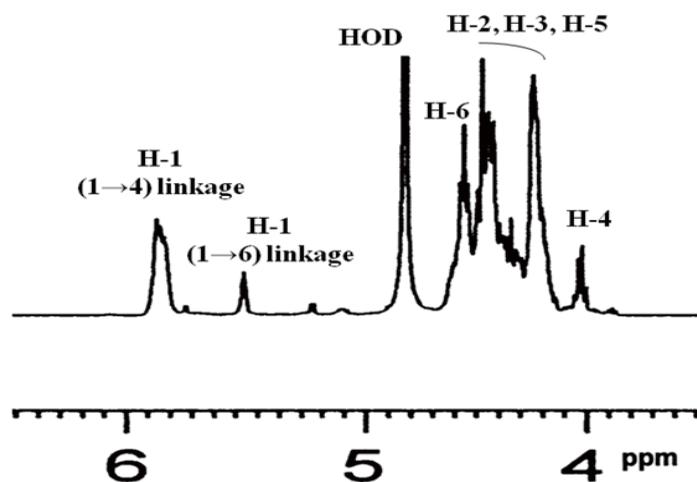


Fig. 5. 500 MHz ^1H -NMR spectrum of EPS-2-1^a.

^aSpectrum was recorded in D_2O and Values of chemical shifts were recorded with respect to the HOD signal fixed at d_{H} 4.816 ppm at 80°C.

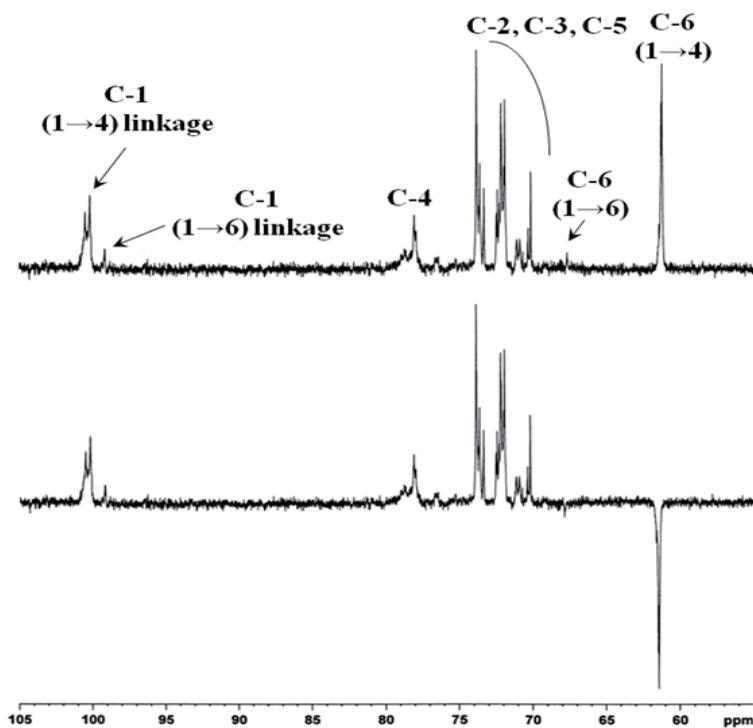


Fig. 6. 125 MHz ^{13}C -NMR (A) and DEPT spectrum (B) of EPS-2-1^a.

^aSpectra were recorded in D_2O and Values of chemical shifts were recorded with respect to the acetone signal fixed at d_{C} 30.08 ppm at 80°C.

Table 2. ¹H and ¹³C-NMR chemical shifts of EPS-2-1.

Residue	Chemical shift (δ, ppm)						
	H1 /C-1	H2 /C-2	H3 /C-3	H4 /C-4	H5 /C-5	H6a /C-6	H6b
α-D-Glc _p - (1→	5.822	4.092	4.218	4.238	4.073	4.341	4.365
→4)-α-D-Glc _p - (1→	100.28	72.12	73.48	73.97	72.27	61.40	-
→4)-α-D-Glc _p - (1→	5.843	4.136	4.238	4.136	4.451	4.281	4.337
→6)-α-D-Glc _p - (1→	100.61	72.31	72.06	78.02	73.97	61.47	-
→6)-α-D-Glc _p - (1→	5.466	4.142	4.261	4.115	4.315	4.388	4.449
→6)-α-D-Glc _p - (1→	99.48	72.27	72.06	78.07	73.75	67.85	-

(다) 항염증활성

① Cell viability

BV2 microglia cells에서 EPS-2-1에 의한 cell viability는 LPS (1 μg/ml)의 존재하에 유의적인 세포독성효과를 나타내지 않았다 (Fig. 7.).

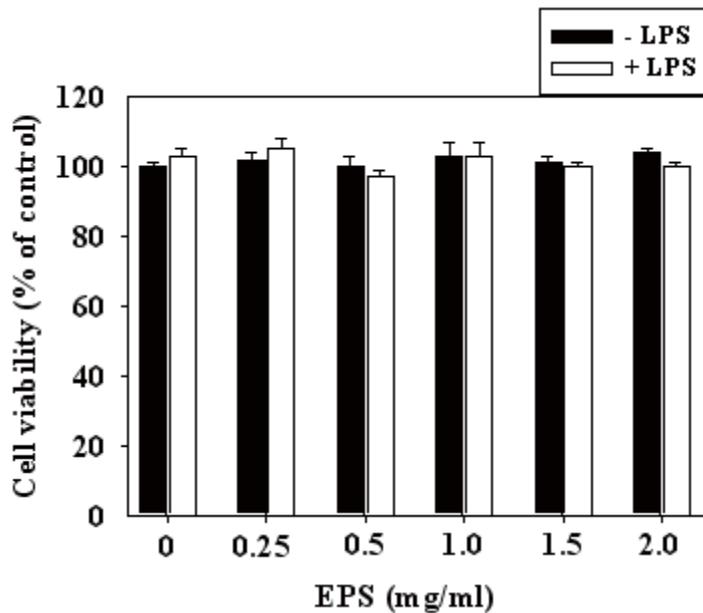


Fig. 7. Effects of EPS on the viability of BV2 microglia cells.

Cells (1×10^5 cells/ml) were incubated with the indicated concentrations of EPS (0.25-2 mg/ml) for 1 h before LPS (1.0 μg/ml) treatment for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Each value indicates mean \pm SD and is representative of results obtained from 3 independent experiments.

② NO 생산, iNOS protein과 mRNA 발현에 대한 EPS-2-1의 효과

NO production과 iNOS의 발현에 대한 EPS-2-1의 효과를 확인한 결과, NO의 생산은 control (5.8 ± 1.4 M) 또는 EPS-treated group (5.0 ± 0.56 M)에서는 낮은 생산을 보였다. 그러나 LPS 처리군에서 NO의 생산은 50% (10.2 ± 1.3 M)이상 증가하였다. iNOS protein과 mRNA의 발현을 Western blot과 RT-PCR 분석법으로 각각 측정하였다. 그 결과 LPS 처리군에서는 iNOS 발현이 증가하였으나 EPS-2-1 처리군에서는 iNOS protein의 발현은 유의적으로 감소하였다. 이 결과에서 EPS-2-1은 LPS에 의해 증가된 NO의 생산과 iNOS의 발현 모두 저해하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

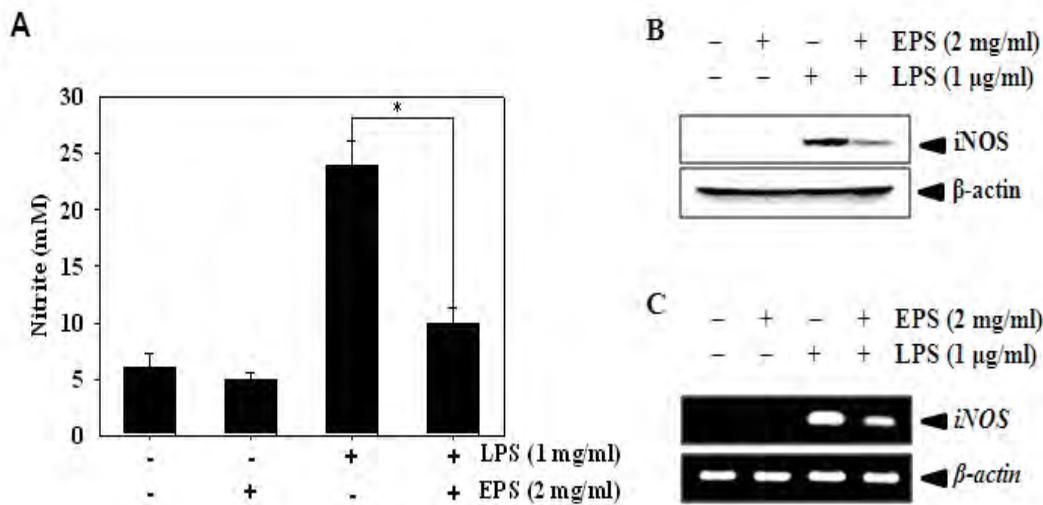


Fig. 8. Effect of EPS on LPS-induced NO production (A), iNOS protein (B) and mRNA expression (C) in BV2 microglia cells.

BV2 microglia cells were pretreated with the indicated concentrations of EPS for 1h before being incubated with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for indicated time. Culture supernatants were then isolated and analyzed for nitrite production. The amounts of NO were determined using Griess reagent (A), and a standard curve was constructed using NaNO_2 in culture medium. Cell lysates were resolved on SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with antibodies against iNOS (B). Total cellular RNA was subjected to RT-PCR and the final PCR product resolved using 1% agarose gel electrophoresis (C). The relative amounts of iNOS protein and mRNA were normalized with β -actin mRNA.

③ PGE₂ 생산, COX-2 protein과 mRNA 발현에 대한 EPS-2-1의 효과

PGE₂ 생산에 대한 EPS-2-1의 효과를 확인하였다. 대조군 ($54 \pm 4 \mu\text{M}$)과 비교한 결과 10배 ($598 \pm 35 \text{ pg/ml}$) 이상 PGE₂ 생산이 증가하는 것을 확인하였다. EPS-2-1을 단독 처리한 군에서는 PGE₂의 생산은 $65 \pm 7 \text{ pg/ml}$ 로 control과 비슷하게 나타났으나 LPS-induced PGE₂ 생산은 $598 \pm 35 \text{ pg/ml}$ 를 증가를 보였다 (Fig. 9A). 그리고 COX-2의 발현에 의한 PGE₂ 생산에 따른 EPS-2-1 저해 효과를 Western blot과 RT-PCR로 확인하였다. LPS 유도에 따른 COX-2 protein과 COX-2 mRNA 발현은 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 9B,C). 그 결과 EPS-2-1은

LPS에 의해 유도된 COX-2의 발현을 저해하여 PGE₂ 생산의 저해를 나타내었다.

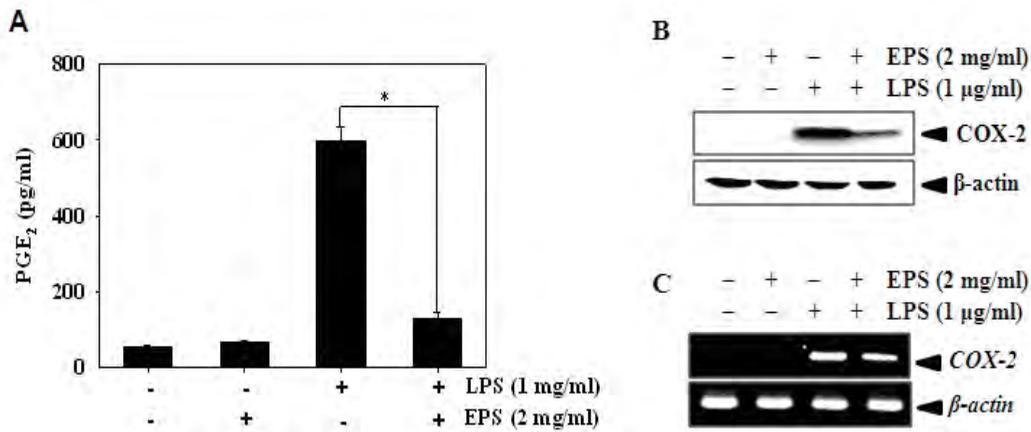


Fig. 9. Effect of EPS on LPS-induced PGE₂ production (A), COX-2 protein (B) and mRNA expression (C) in BV2 microglia cells.

BV2 cells were pretreated with the indicated concentrations of EPS for 1h before being incubated with LPS (1 µg/ml) for indicated time. Culture supernatants were then isolated and analyzed for PGE₂ production (A). The levels of PGE₂ in the media were detected using a specific enzyme immunoassay according to the manufacturer's instruction. Cell lysates were resolved on SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with antibodies against COX-2 (B). Total cellular RNA was subjected to RT-PCR and the final PCR product resolved using 1% agarose gel electrophoresis (C). The relative amounts of COX-2 protein and mRNA were normalized with β-actin mRNA.

④ TNF-α 생산과 mRNA 발현에 대한 EPS-2-1의 효과

EPS-2-1가 TNF-α의 생산과 발현에 대한 효과를 확인하였다. LPS치리에 의해서 TNF-α는 2257 ± 31 pg/ml으로 증가하였으나, EPS-2-1를 처리하였을 때 835 ± 26 pg/ml으로 발현이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 10A). 대조군(153 ± 16 pg/ml)과 EPS-2-1 (229 ± 21 pg/ml)에서 낮게 확인되었다. TNF-α 유전자의 발현에 대한 EPS-2-1의 작용은 RT-PCR로 확인해본 결과 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 10B). 따라서 EPS-2-1은 TNF-α의 생산과 유전자의 발현을 조절하는 것을 확인할 수 있었다.

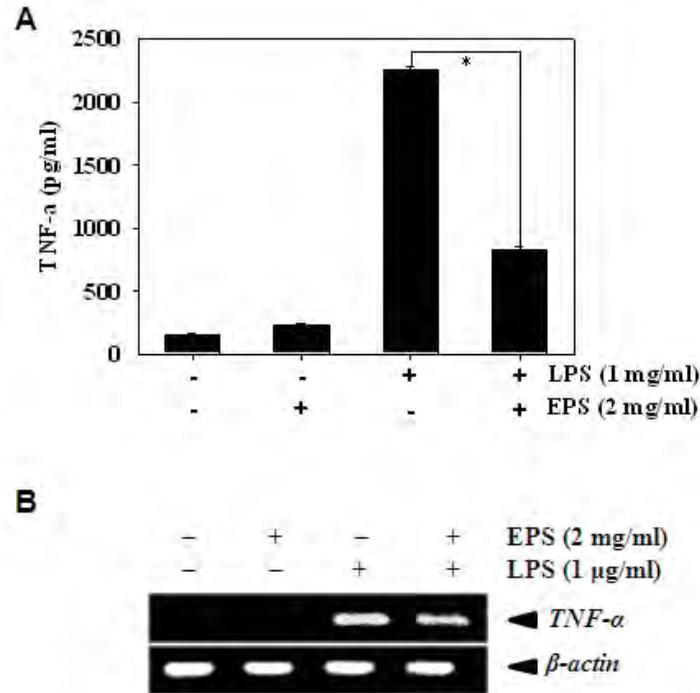


Fig. 10. Effects of EPS on LPS-induced TNF- α production (A) and TNF- α mRNA expression (B) in BV2 microglia cells.

Cells (2 ± 10^5 cells/ml) were incubated with 2 mg/ml concentration of EPS for 1 hr before LPS (1.0 μ g/ml) treatment for indicated time. After incubation for 24 hr, the supernatants were collected, and the amount of TNF- α was measured by ELISA (A). The level of TNF- α mRNA expression was determined by RT-PCR analysis (B). β -Actin was used as an internal control for RT-PCR. The experiment was repeated 3 times and similar results were obtained.

⑤ NF- κ B활성에 대한 EPS-2-1의 효과

NF- κ B는 iNOS, COX-2, TNF- α mRNA의 발현을 조절하는 인자로서, EPS-2-1이 NF- κ B에 대한 활성을 확인하였다. LPS 처리하였을 때 NF- κ B의 DNA-binding activity는 감소하였다(Fig. 11A). 그리고 NF- κ B는 LPS 처리에 의한 핵으로 이동과 유전자 발현을 유도하는데, EPS-2-1 처리에 따른 NF- κ B subunit p65의 핵내 이동을 확인하였다. 그 결과 세포질에서 p65의 발현이 유도되었으며, 핵내로 이동은 저해되는 것을 확인하였다 (Fig. 11B). 더 나아가, Rel/NF- κ B 활성저해제인 *N*-acetyl-L-cysteine (NAC)의 존재에 따른 iNOS, COX-2, TNF- α mRNA 발현의 확인한 결과, LPS에 의해 유도된 iNOS, COX-2, TNF- α mRNA의 발현이 저해되는 것으로 보아 EPS-2-1은 p65 이동을 억제하여 NF- κ B의 발현을 억제 시키는 것으로 사료된다(Fig. 11C).

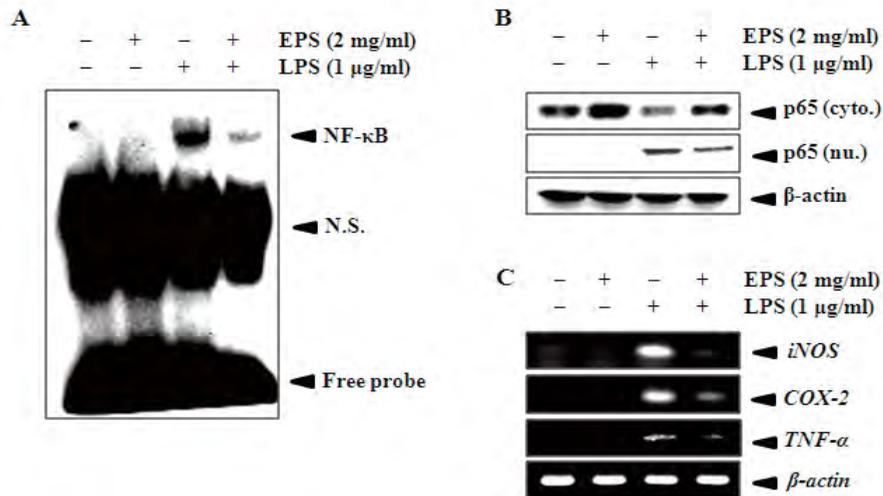


Fig. 11. Effects of EPS on NF-κB DNA binding activity (A), p65 protein expression (B) and effects of NAC on LPS-induced iNOS, COX-2 and TNF-α mRNA expression (C) in LPS-stimulated BV2 microglia cells.

Cells were pre incubated with EPS (2 mg/ml) for 1 hr before stimulation of LPS (1.0 μg/ml) for 30 min. Then the nuclear extracts were assayed for NF-κB activity by EMSA. The nuclear and cytoplasmic extracts were prepared to determine the levels of p65 by Western blot analysis (B). Cells (2×10^5 cells/ml) were incubated with the indicated concentration of NAC (10 mM) 1 hr before LPS (1.0 μg/ml) treatment for 6h. Total RNA was isolated, and RT-PCR analyses of iNOS, COX-2 and TNF-α were performed (C). β-Actin was used as an internal control for RT-PCR. The experiment was repeated 3 times and similar results were obtained. N.S.: non-specific.

(라) 면역증강활성

① Exopolysaccharide에 의한 cytokines IL-2의 변화

IL-2는 주로 T cell proliferation factor로서 활성화된 T 림프구에 의해 분비되거나 활성화된 T cell의 증식에 필수적인 cytokine으로서 exopolysaccharide (EPS)에 의해 유도되는 Th1 cytokine인 IL-2의 분비 변화는 1, 3, 10 μg/ml의 농도로 처리하였을 때 생성되는 cytokine 분비량으로 확인하였다(Fig. 12). 그 결과 6시간에 대조구 보다 낮은 분비를 나타내었으나 24시간 후부터 생성이 유도되어 48시간에는 높은 분비를 나타내었으며 72시간에는 10 μg/ml에서 약간 높은 분비의 변화를 확인하여 면역반응에 의한 T cell의 증식을 유도하는 것으로 사료된다.

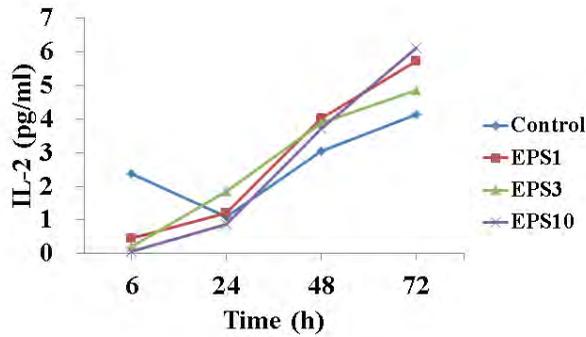


Fig. 12. Production of IL-2 cytokine by exopolysaccharide (EPS) of *Laetiporus sulphureus* in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 1, 3 10 $\mu\text{g/ml}$ EPS for 6, 24, 48, 72 h respectively. Data are shown as mean \pm SD.

② Exopolysaccharide 의 LPS 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, IFN- γ 의 변화

EPS 에 의해 유도되는 Th1 cytokine 인 IL-2, IL-12, IFN- γ 의 분비 변화는 EPS 를 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 자극제 LPS 와 함께 처리하였을 때 생성되는 cytokine 분비량으로 확인하였다(Fig. 13). 그 결과, IL-2 에서 EPS 는 모든 농도에서 LPS 와 유사한 분비의 변화를 나타내었다. 그리고 IL-12 은 LPS 보다 낮은 분비의 변화를 나타내었으며, IFN- γ 는 초기의 분비량은 같았으나 후기에 분비가 억제되는 것으로서 LPS 자극에 의한 EPS 로부터 분비되는 Th1 cytokine 인 IL-2, IL-12, IFN- γ 의 분비는 억제되는 것으로 확인되었다.

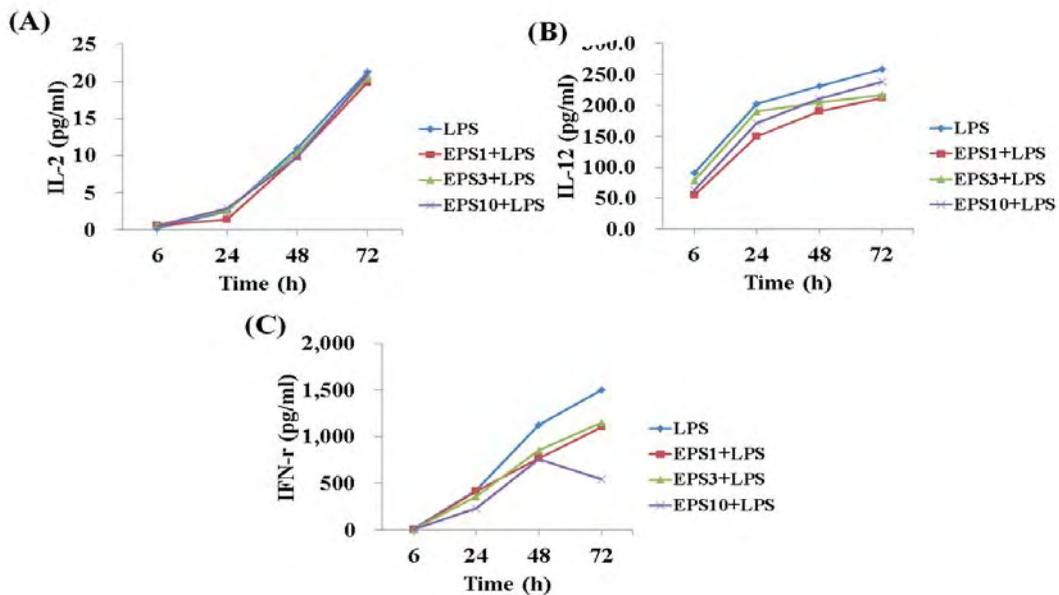


Fig. 13. Production of IL-2 (A), IL-12 (B) and IFN- γ (C) cytokines by exopolysaccharide (EPS) of *Laetiporus sulphureus* with LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ EPS and 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 6, 24, 48, 72 h respectively. Data are shown as mean \pm SD.

③ Exopolysaccharide의 LPS 자극에 의한 cytokines IL-4, IL-5, IL-10의 변화

EPS에 의해 유도되는 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-10 분비의 변화를 확인하였다(Fig. 14). 그 결과, IL-4의 분비량의 변화는 6시간에 1, 3 $\mu\text{g/ml}$ 이 LPS와 EPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도보다 낮은 분비를 나타내었으나 시간에 따라 EPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 이 급격히 증가하는 것을 확인하였으며 72시간에는 2배 이상의 높은 분비를 나타내었다. IL-5의 분비의 변화는 6시간에는 LPS와 유사한 분비의 변화를 나타내었으나, 24시간에 EPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 높은 분비를 보였지만 후기에 LPS보다 감소하였으며, EPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 72시간에 높은 분비량을 확인하였다. 그리고 IL-10의 분비의 변화는 24시간까지 LPS와 유사한 분비의 확인하였으며 1, 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약간 높은 분비량을 확인하였다. 따라서 EPS는 항체생성은 EPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 확인하였으며, 면역조절은 낮은 농도에서 나타남을 확인하였다. 이로서 EPS는 Th2 cell의 활성화에 의해 B 림프구를 활성화하여 항체생성 면역반응인 체액성 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.

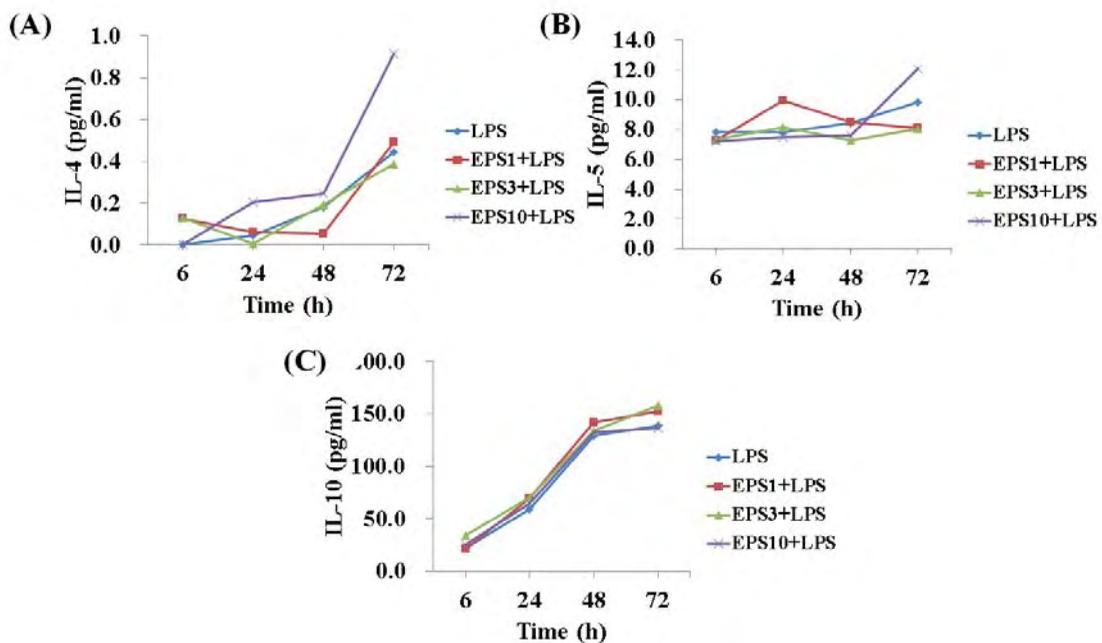


Fig. 14. Production of IL-4 (A), IL-5 (B) and IL-10 (C) cytokines by exopolysaccharide (EPS) of *Laetiporus sulphureus* with LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ EPS and 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 6, 24, 48, 72 h respectively. Data are shown as mean \pm SD.

④ Exopolysaccharide 의 conA 자극에 의한 cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 변화

EPS 가 conA 의 자극에 의해 유도되는 cytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비를 확인하였다(Fig. 15) 이들 cytokine 들은 전 염증성 cytokine 으로서 IL-1 β 은 염증초기에 분비되어 숙주면역반응의 주요 염증의 매개자로서 작용하며, IL-6 는 주로 염증반응을 매개하며 B 림프구의 항체 생성을 촉진시키고 T 림프구의 분화를 유도하여 염증부위에서 증가하는 것으로 알려져 있으며, TNF- α 는 면역에 중요한 매개물질이며, 세포독성 물질로서의 작용과 T 림프구와 상호작용하여 T 림프구의 활성화와 성장을 조절하여 염증부위에서 그 생성이 증가되는 알려져 있다. 이에 EPS 를 각각의 농도로 처리한 결과 IL-1 β 은 conA 보다 높은 분비량을 나타내었으며 시간에 따라 증가하는 것을 확인하였다. 또한 분비량은 3 μ g/ml 에서 가장 높은 분비량을 나타내었다. IL-6 은 6 시간에 conA 와 유사한 분비를 나타내었으나 24 시간을 전후로 분비량이 증가하여 conA 보다 높은 분비 변화를 확인하였다. TNF- α 은 6 시간에 conA 보다 낮은 분비를 나타내었으나 72 시간에 3 μ g/ml 에서 약간 높은 분비의 변화를 확인하였다. 이로서 cytokine 인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비가 증가하는 것으로 T 림프구의 발현을 유도하며, 초기 염증반응을 일으켜 면역반응에 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

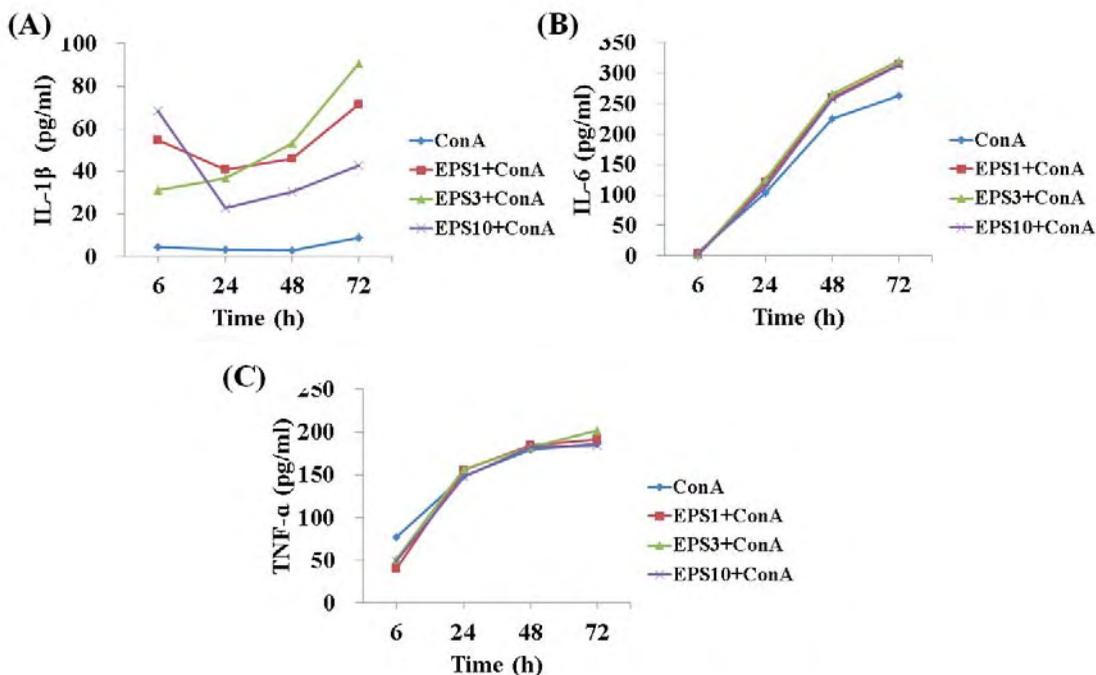


Fig. 15. Production of IL-1 β (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) cytokines by exopolysaccharide (EPS) of *Laetiporus sulphureus* with LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 1, 3, 10 μ g/ml EPS and 2 μ g/ml con A for 6, 24, 48, 72 h respectively. Data are shown as mean \pm SD.

바. 발효 농산물 소재의 면역증강활성

(1) 실험재료 및 방법

(가) 동물 및 시약

실험에 사용된 마우스는 C57BL/6 마우스로서 생후 6~8주령, 체중 25 g 내외의 것을 대한 바이오 링크(음성균, 충청북도)로부터 구입하여 실험에 사용하였으며, 배지는 RPMI 1640 (Gibco BRL., Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS), concanavalin A (Con A), Epicatechin gallate는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였으며, lipopolysaccharide (LPS)는 *Escherichia coli* (serotype 026:B6)에서 분리정제 된 제품을 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 마우스 cytokines의 측정은 ELISA MAX™ Deluxe set kit (BioLegend, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 흡광도 측정은 microplate reader (Bio-Rad, Richmond, VA, USA)를 사용하여 측정하였다.

(나) 발효 및 추출물의 제조

① 와송 발효 추출물 제조

본 실험에 사용한 와송 열매는 온라인 마켓에서 건조 된 것을 구입하여 사용하였다. 발효에 사용한 균주는 분양받은 *Lactobacillus casei* KCRZ 1121, *Lactobacillus plantarum* ATCC 10830 균을 사용하였으며, 각각의 균은 37℃에서 18시간 동안 MRS broth (Difco™ Lactobacilli MRS broth, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 전 배양하여 사용하였다. 와송 열매의 발효는 분쇄하여 80℃에서 10분간 건조하여 살균한 후 전 배양한 균주를 각각 10% 접종하여 37℃에서 72시간 동안 incubator (Multi Room Incubator LMI-2004R, 대한과학, 한국)에서 발효하였다. 발효된 와송은 10배수의 70% Ethanol을 가하여 24시간 동안 추출하였으며, 추출한 여액은 0.45 mm membrane filter (EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA)로 여과하여 감압농축 한 후 농축액을 동결 건조한 발효 와송 추출물을 실험재료로 사용하였다. 대조구로서는 와송 추출물을 사용하였다.

② 꾸지뽕 열매 추출물 제조

꾸지뽕 열매는 300 ml 삼각 플라스크에 50 g당 100 ml의 증류수를 가하여 분쇄한 후, 고압증기멸균기 (WiseClave(R)WAC Steam Sterilizers, 대한과학, 한국)에서 121℃로 20min간 멸균하여 동아대학교 생명공학과 식품기능학실험실에서 분양받은 *Lactobacillus acidophilus* D4의 균주를 전배양한 후 이를 1% 접종하여 37℃에서 72시간 발효하였다. 발효한 발효액은 70% EtOH를 처리하여 실온에서 24시간 추출한 후 농축하여 발효꾸지뽕 추출물 (FCT)을 얻었으며, 대조구로서 꾸지뽕 열매를 70% EtOH로 추출 꾸지뽕 추출물 (CT)을 실험재료로 사용하였다.

③ 미강 발효 추출물 제조

미강을 효모(*Saccharomyces cerevisiae* IFO-2363)를 사용하여 37℃에서 48시간 고체 발효하여 이를 70% EtOH 추출하여 추출액으로부터 EtOH을 제거한 잔사를 본 실험의 시료로 사용하였으며, 대조구로서 미 발효 미강을 70% EtOH 추출하여 사용하였다.

(다) 마우스 비장세포의 분리

마우스 비장세포를 얻기 위하여 CO₂gas 처리하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하였으며, 유출된 비장세포는 10% FBS 를 함유하고 있는 RPMI 1640 에 세포의 농도가 2×10⁵cells/ml 이 되도록 현탁하여 24 wells tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA. USA)에 각각 1 ml 씩 분주하였다. 준비된 세포배지에 최종농도가 LPS 와 발효 와송 추출물에 대하여 2 µg/ml 와 10 µg/ml 가 되도록 각각 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6, 24, 48, 72 시간 배양 하였다. 이때 추출물들은 10 µg/ml 에서는 세포독성이 없었으므로 이 농도를 처리농도로 하였다. 배양한 배양액은 300×g 에서 10 분간 원심분리 한 후 분리된 상층액을 취하여 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

(라) 마우스 cytokine의 측정

마우스 비장세포로부터 분비되는 cytokines 은 IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, IFN- γ 를 각각 측정하였다. 측정은 96 wells microplate 에 마우스 cytokine IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, IFN- γ 의 capture antibody 를 coating buffer 에 희석한 후 100 µl 분주하여 4°C에서 16~18 시간 동안 방치하였다. Capture antibody 를 코팅한 96 wells microplate 는 washing buffer (1 M phosphate buffer containing 0.5% Tween 40)으로 4 회 washing 한 후 assay diluent 200 µl 를 분주하여 실온에서 1 시간 동안 교반하여 반응하였으며, 반응 후 washing buffer 으로 세척하여 세포 배양액을 100 µl 분주하여 2 시간 동안 반응하였다. 그리고 다시 washing buffer 으로 washing 하여 detection antibody 를 100 µl 분주 1 시간 동안 반응하였으며, 이를 washing buffer 로 세척 후 avidine-horseradish peroxidase 를 100 µl 분주하여 30 분간 반응하였다. 반응한 96 wells microplate 를 washing buffer 으로 washing 하여 tetramethylbenzidine 액을 넣은 후 20 분간 정치반응 한 후 stop solution (2N H₂SO₄)을 분주하여 반응을 정지하였으며, optical density 는 microplate reader 를 이용하여 450 nm 에서 측정하였다.

(마) 통계학적 분석

동일 실험을 3 회 반복하여 실시하였으며 실험성적은 평균±표준편차로 나타내었고 각 군의 통계학적 검정에는 Student's t-test 를 사용하여 P 값이 0.05 미만 수준에서 통계적 유의성을 검토하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 발효 와송의 면역증강활성

① 발효 와송의 LPS 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12 생성의 변화

발효 와송 추출물이 유산균 발효에 의해 유도되는 Th1 cytokine 인 IL-2, IL-12 의 분비 변화는 발효 와송과 와송 추출물을 자극제 LPS 와 함께 처리하였을 때 생성되는 cytokine 분비량으로 확인하였다(Fig. 1). 그 결과 발효 와송과 와송에서 IL-2 의 분비량의 변화는 LPS 처리군보다 낮은 분비의 변화를 보였으며, 발효 와송에서 24 시간에는 분비량이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. IL-12 분비량의 변화는 6, 24 시간에 발효 와송과 와송은 유사한 분비량을 나타내었으나, 48 시간 후부터 발효 와송에서 낮은 분비량을 나타내었다.

그리고 이들 분비는 LPS 처리군보다 현저히 낮은 분비량을 확인하였다. 따라서 LPS 자극에 의한 발효 와송 추출물로부터 Th1 cytokine 인 IL-2, IL-12의 분비는 억제되는 것을 확인하였다.

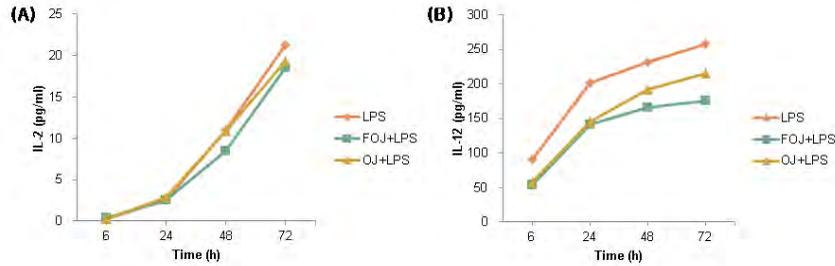


Fig. 1. Production of IL-2 (A) and IL-12 (B) cytokines by Fermented *Orostachys japonica* extract (FOJ), *Orostachys japonica* extract (OJ) and LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 µg/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

② 발효 와송의 LPS 자극에 의한 cytokines IL-5, IL-10 생성의 변화

와송 발효 추출물이 유산균 발효에 의해 유도되는 Th2 cytokine 인 IL-5, IL-10 분비의 변화를 확인하였다(Fig. 2). 그 결과, IL-5의 분비량의 변화는 초기 6 시간에 가장 높은 분비량을 나타내었으며, 24 시간 이후부터 LPS 처리군보다 분비량이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 와송을 발효하였을 때 분비는 LPS 보다 낮게 나타났으나 발효에 의해 초기 분비량이 증가하는 것으로 보아 발효에 의한 면역증강이 있는 것으로 사료된다. IL-10의 Th1 과 Th2의 면역반응을 교차조절(cross regulation)하여 면역반응을 조절하는 cytokine으로서 발효 와송과 와송 추출물이 LPS 처리군보다 높은 분비량을 나타내었으며, 특히 발효 와송에서 높은 분비량을 나타내는 것으로 보아 cytokine의 분비가 후기에 높게 나타남에 따라 Th1 cell의 작용과 Th2 cell에 의한 면역반응을 균형 있게 조절하는 것으로 사료된다. 따라서 와송 발효에 의해 Th2 cytokine IL-5, IL-10의 분비량은 증가하는 것으로 보아 Th1 cell 유도 cytokine의 발현은 억제되며, Th2 cell 유도 cytokine의 발현이 증대되며, 이 결과로서 Th2 cell의 활성화에 의해 B 림프구를 활성화하여 항체생성 면역반응인 체액성 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.

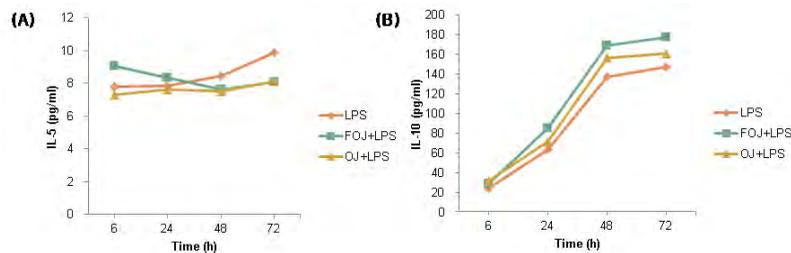


Fig. 2. Production of IL-5 (A) and IL-10 (B) cytokines by Fermented *Orostachys japonica* extract (FOJ), *Orostachys japonica* extract (OJ) and LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 µg/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

③ 발효 와송의 conA 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, IFN- γ 생성의 변화

발효 와송 추출물이 유산균 발효에 의해 유도되는 Th1 cytokine 인 IL-2, IL-12의 분비 변화는 발효 와송과 와송 추출물을 자극제 conA와 함께 처리하였을 때 생성되는 cytokine 분비량으로 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 IL-2의 분비량의 변화는 발효 와송과 와송에서 conA보다 초기의 분비량은 낮게 나타났으나 24시간을 전후로 생성이 증가하였으며 72시간에는 높은 분비량을 확인하였으며 발효에 의한 생성의 변화는 나타나지 않았지만 와송에 의해 생성이 증가함을 확인하였다. IL-12의 생성은 시간에 따라 증가하였지만 conA보다 낮은 분비량을 나타내었다. IFN- γ 의 분비량은 conA와 유사한 분비량을 나타내었다.

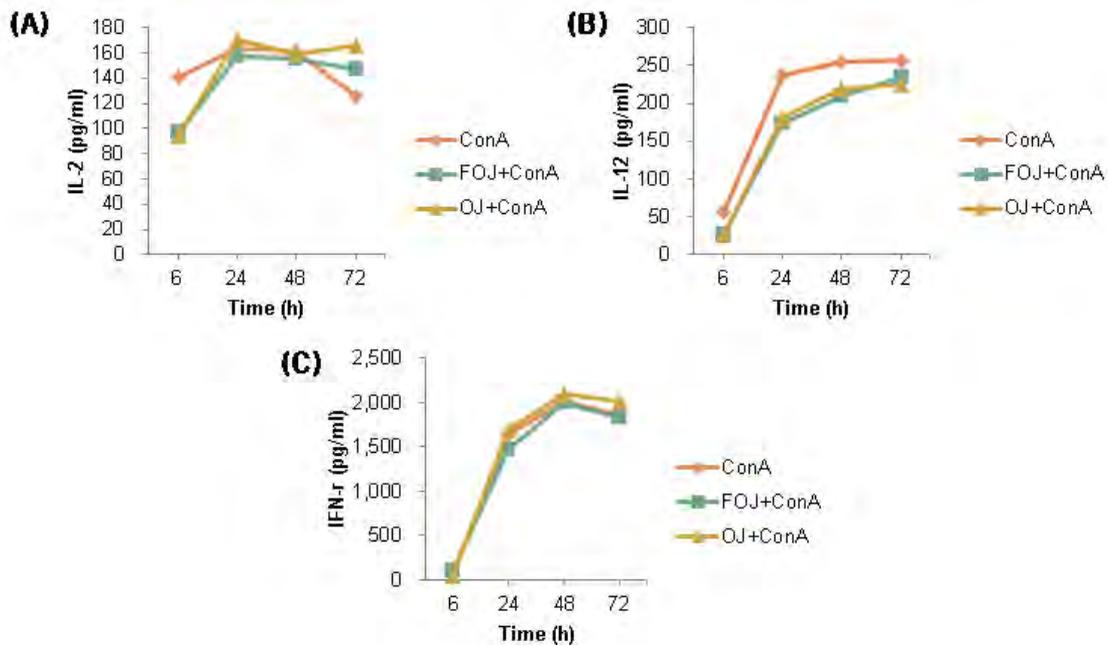


Fig. 3. Production of IL-2 (A), IL-12 (B) and IFN- γ (C) cytokines by Fermented *Orostachys japonica* extract (FOJ), *Orostachys japonica* extract (OJ) and Con A in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

④ 발효 와송의 conA 자극에 의한 cytokines IL-6, IL-10 생성의 변화

와송 발효 추출물이 유산균 발효에 의해 유도되는 Th2 cytokine 인 IL-5, IL-10 분비의 변화를 확인하였다(Fig. 4). 그 결과, IL-6의 분비량의 변화는 24시간까지 유사한 분비량을 나타내었으나 48시간부터 생성이 conA보다 생성이 증가하였으며, 72시간에는 발효 와송에서 높은 분비를 확인하였다. IL-10은 6시간에 같은 분비를 나타내었으나 24시간부터 conA보다 높은 분비를 보였으며 72시간에는 발효와송이 와송과 conA보다 낮은 분비의 변화를 나타내었다. 이는 발효 와송에서 낮은 분비량을 나타내는 것으로 보아 cytokine의 분비가 후기에 높게 나타남에 따라 Th1 cell의 작용을 억제하고 Th2 cell에 의한 면역반응을 유도하여 면역반응을 조절하는 것으로 사료되며, 이 결과에서 발효와송은 Th2 cell의 활성화에 의해 B 림프구를 활성화하여 항체생성 면역반응인 체액성 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.

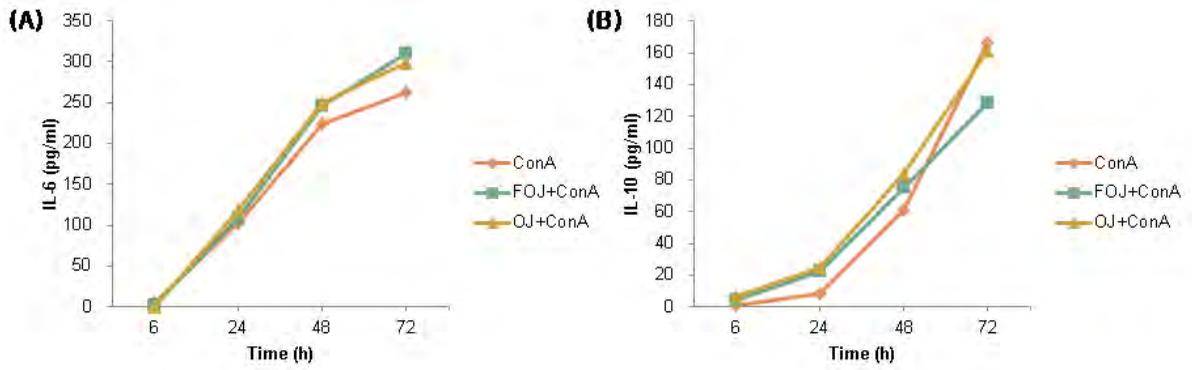


Fig. 4. Production of IL-6 (A) and IL-10 (B) cytokines by Fermented *Orostachys japonica* extract (FOJ), *Orostachys japonica* extract (OJ) and Con A in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 µg/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

(나) Epicatechin gallate의 면역증강활성

① Epicatechin gallate의 LPS 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, IFN-r의 변화

Epicatechin gallate(EG)에 의해 유도되는 Th1 cytokine인 IL-2, IL-12, IFN-r의 분비 변화는 EG를 1, 3, 10 µg/ml의 농도로 자극제 LPS와 함께 처리하였을 때 생성되는 cytokine 분비량으로 확인하였다(Fig. 5). 그 결과 EG는 LPS와 유사한 분비의 변화를 나타내었으며, 72 시간에 10 µg/ml의 농도에서 LPS보다 높은 분비를 확인하였다. IL-12와 IFN-r 분비량의 변화는 LPS보다 낮은 분비의 변화를 확인하였으며, 1 µg/ml의 농도에서 72 시간째 억제되는 변화를 확인하였다. 이로서 LPS 자극에 의한 EG로부터 분비되는 Th1 cytokine인 IL-2, IL-12, IFN-r의 분비는 억제되는 것으로 확인되었다.

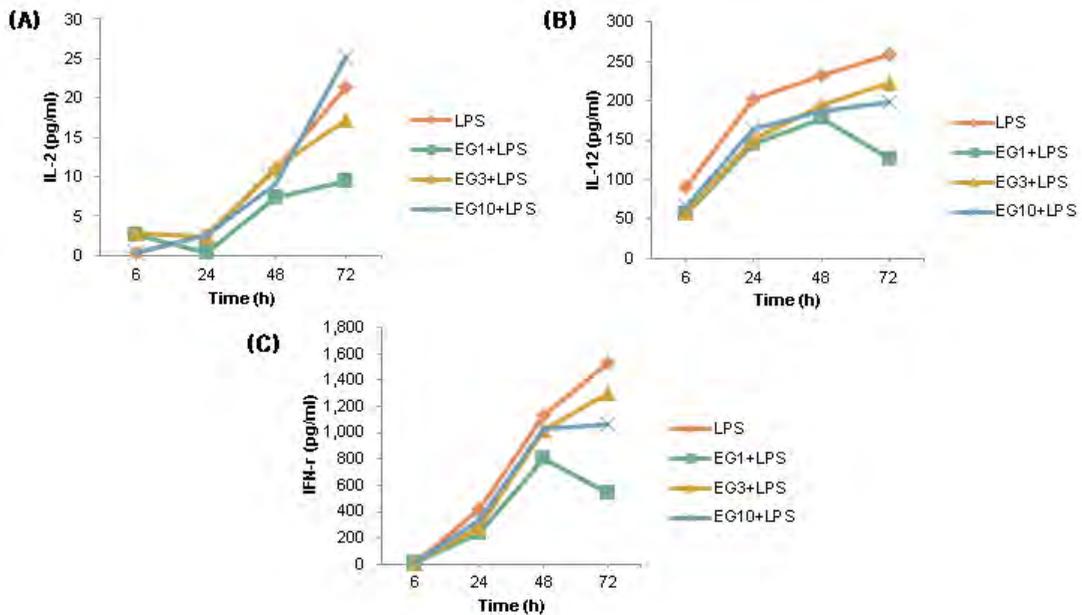


Fig. 5. Production of IL-2 (A), IL-12 (B) and IFN-r (C) cytokines by concentration of Epicatechin gallate (EG) and LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 1, 3, 10 µg/ml EG for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

② Epicatechin gallate 의 LPS 자극에 의한 cytokines IL-5, IL-10 의 변화

EG 에 의해 유도되는 Th2 cytokine 인 IL-5, IL-10 분비의 변화를 확인하였다(Fig. 6). 그 결과, IL-5 의 분비량의 변화는 LPS 와 유사한 분비의 변화를 나타내었으며, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 시간에 따라 억제되는 경향을 나타내었으나 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 72 시간에 증가하는 것으로 확인되었다. 그리고 IL-10 의 분비의 변화는 24 시간까지 유사한 분비이 변화를 확인하였으며 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 LPS 보다 약간 높은 분비량을 확인하였다. 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 72 시간에 LPS 보다 억제되는 것을 확인하였다. IL-5 는 Th2 cytokine 으로서 B 세포의 성장에 관여하고, immunoglobulin 의 생성에 기여하는 것으로 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 이를 유도함을 확인하였으며, IL-10 의 조절도 유도하는 것으로 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 EG 에서 Th2 cell 의 활성화에 의해 B 림프구를 활성화하여 항체생성 면역반응인 체액성 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.

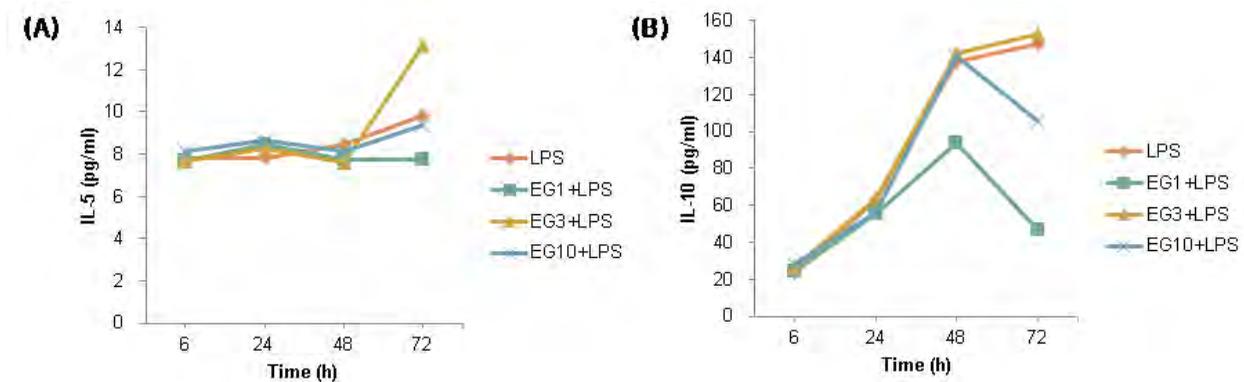


Fig. 6. Production of IL-5 (A) and IL-10 (B) cytokines by concentration of Epicatechin gallate (EG) and LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ EG for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

③ Epicatechin gallate 의 conA 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, IFN- γ 의 변화

EG 에 의해 유도되는 Th2 cytokine 인 IL-2, IL-12, IFN- γ 분비의 변화를 확인하였다(Fig. 7). 그 결과 IL-2 의 분비는 6 시간에 conA 보다 낮은 분비의 변화를 확인하였으나 24 시간부터 유사한 분비의 변화를 나타내었다. 그리고 72 시간에 1, 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 conA 보다 높은 분비를 나타내는 것으로 보아 IL-2 의 후기 생성을 유도하는 것으로 보아 이는 IL-2 가 주로 T cell proliferation factor 로서 활성화된 T 림프구에 의해 분비되거나 활성화된 T cell 의 증식에 필수적인 cytokine 으로 작용하는 것으로 T cell 의 성장 분화를 유도하는 것으로 사료된다. IL-12 의 생성은 conA 보다 낮은 분비량을 나타내었으며, IFN- γ 에서는 conA 와 유사한 분비의 변화를 확인하였다. 이로서 conA 자극에 의한 EG 로부터 분비되는 Th1 cytokine 인 IL-2, IL-12, IFN- γ 의 분비는 억제되는 것으로 확인되었다.

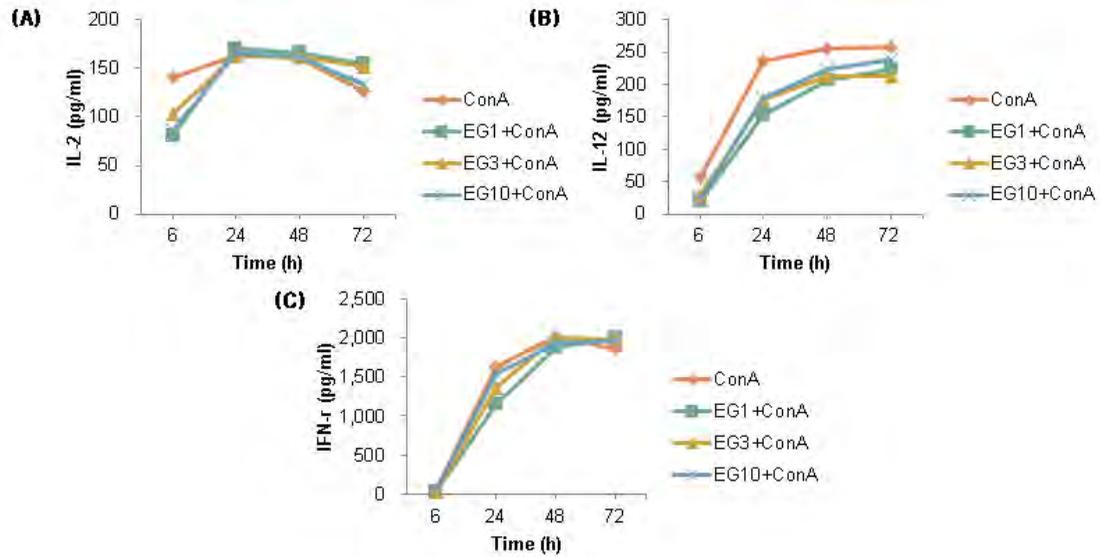


Fig. 7. Production of IL-2 (A), IL-12 (B) and IFN- γ (C) cytokines by concentration of Epicatechin gallate (EG) and con A in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ EG for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

④ Epicatechin gallate 의 LPS 자극에 의한 cytokines IL-6, IL-10 의 변화

EG 에 의해 유도되는 Th2 cytokine 인 IL-6, IL-10 분비의 변화를 확인하였다(Fig. 8). 그 결과, IL-6 의 분비량의 변화는 24 시간까지 conA 와 유사한 분비의 변화를 나타내었으나 48 시간부터 모든 농도에서 높은 분비량을 보였으며 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 높은 분비량을 확인하였다. 그리고 IL-10 의 분비의 변화는 48 시간까지 유사한 분비 변화를 확인하였으며 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 conA 보다 약간 높은 분비량을 확인하였으며, 유사한 분비의 변화를 확인하였다. 따라서 IL-6 의 생성과 IL-10 의 분비를 유도하는 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 EG 에서 Th2 cell 의 활성화에 의해 B 림프구를 활성화하여 항체생성 면역반응인 체액성 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.

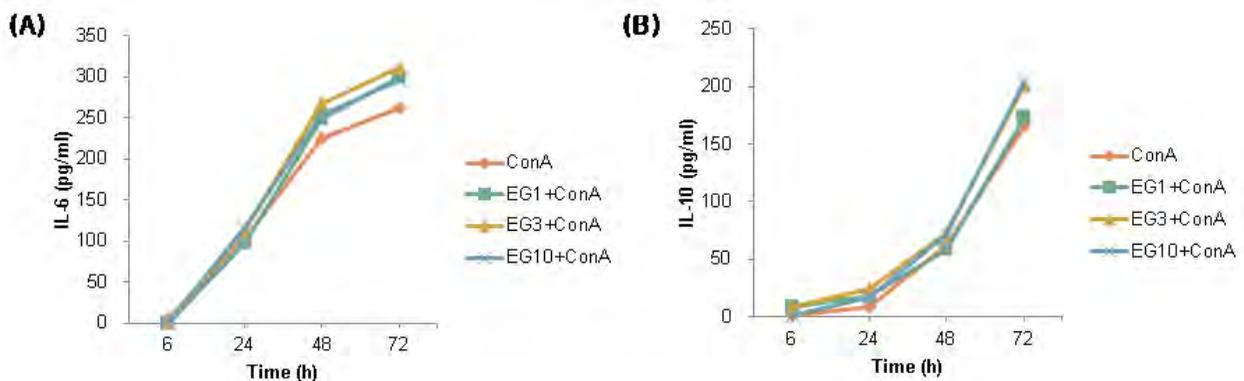


Fig. 8. Production of IL-6 (A) and IL-10 (B) cytokines by concentration of Epicatechin gallate (EG) and Con A in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ EG for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

(다) 발효 꾸지뽕의 면역증강효과 검증

① Cytokines IL-2의 생성의 변화

꾸지뽕 열매가 발효에 의해 유도되는 cytokine IL-2의 생성의 변화는 C57/BL6 마우스로부터 분리된 비장세포에 10 µg/ml의 CT와 FCT를 각각 처리하여 비교하였으며, 분비되는 양을 6, 24, 48, 72 시간 동안 측정하여 확인하였다. 그 결과 cytokine IL-2의 생성은 6, 24시간에는 FCT가 대조구와 CT 보다 낮은 분비량을 나타내었으나, 48시간부터 생성량이 증가하였다. 그리고 72시간부터 생성량이 대조구보다 높은 분비량을 나타내었으며, FCT가 CT보다 72시간에 1.6배 이상의 높은 분비량을 나타내어 꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 IL-2의 분비가 증대하는 것을 확인하였다(Fig. 9).

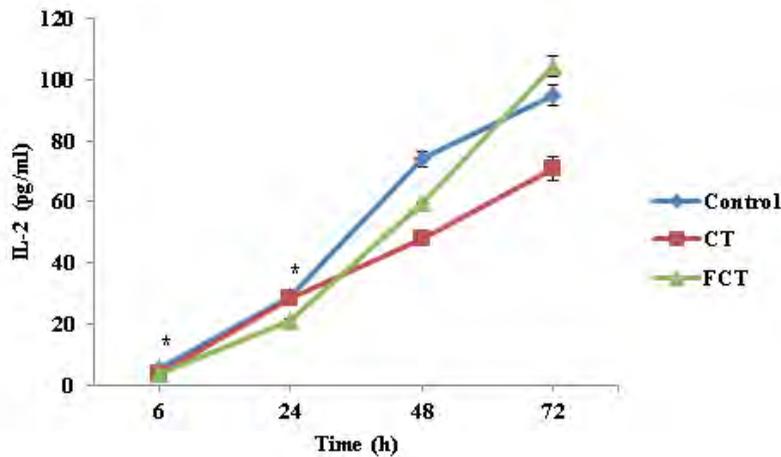


Fig. 9. Production of IL-2 cytokine by fermented *C. tricuspidata* fruit extract (FCT) and *C. tricuspidata* fruit extract (CT) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 µg/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean±SD. *Significant difference from control $p<0.05$.

② Cytokines IL-4의 생성의 변화

꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 유도되는 cytokine IL-4의 분비의 변화는 FCT가 대조구와 CT보다 높은 분비량을 나타내었으며, 시간이 경과함에 따라 분비량이 유의적으로 증가하였다. 그리고 생성의 변화는 CT에서는 6시간에 분비가 증가되어 24시간부터 분비량이 일정하게 유지되어 변화가 없었으나, FCT에서는 6시간에 분비량이 증가하다 24시간에는 감소하였지만 48시간부터 증가하였으며 전체적인 분비량은 증가하는 것을 확인하여 꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 IL-4의 분비량을 증대하였음, 시간에 따라 분비의 변화도 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 10).

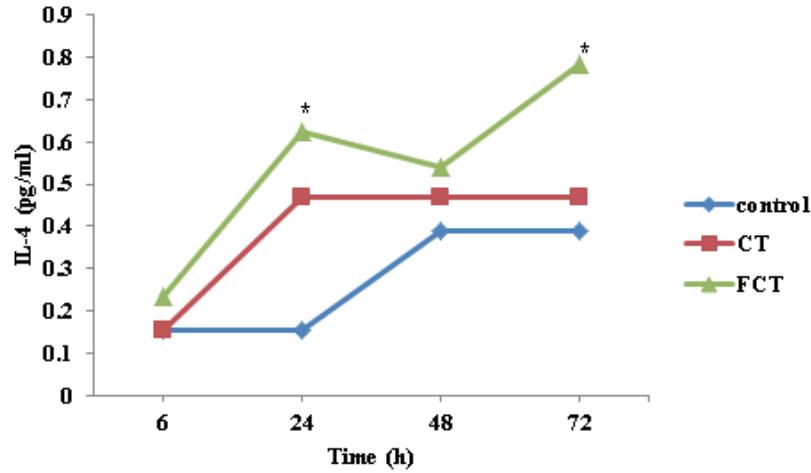


Fig. 10. Production of IL-4 cytokine by fermented *C. tricuspidata* fruit extract (FCT) and *C. tricuspidata* fruit extract (CT) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 $\mu\text{g/ml}$ extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p<0.05$.

③ LPS 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, TNF- α 생성의 변화

꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 유도되는 Th1 cytokine인 IL-2, IL-12, TNF- α 의 분비의 변화는 FCT와 CT를 자극제 LPS와 함께 처리하였을 때 생성되는 cytokine 분비량으로 확인하였다. 그 결과 FCT와 CT에서 IL-2의 분비량의 변화는 LPS 처리군과 유사한 분비의 변화를 보였으며, 24시간에는 높은 분비를 나타내었으나 72시간에는 LPS 처리군보다 낮은 분비량을 나타내었으며, FCT가 CT보다 높은 분비량을 나타내었다(Fig. 11A). IL-12 분비량의 변화는 6, 24시간에 FCT와 CT가 LPS처리군과 유사한 분비량을 나타내었으나, 48시간 후부터 LPS처리군 보다 낮은 분비량을 나타내었다(Fig. 11B). TNF- α 분비의 변화는 6시간에 LPS 처리군 보다 CT는 높은 분비량을 나타내었으나, FCT는 낮은 분비량을 나타내었다. 그리고 24, 48시간에는 LPS 처리군보다 높은 분비량을 나타내며 유사한 분비의 변화를 보였으며 72시간에는 LPS 처리군과 같은 분비량을 나타내었다(Fig. 11C). 따라서 LPS 자극에 의한 발효 꾸지뽕 열매 추출물로부터 Th1 cytokine인 IL-2, IL-12, TNF- α 의 분비는 억제되는 것을 확인하였다

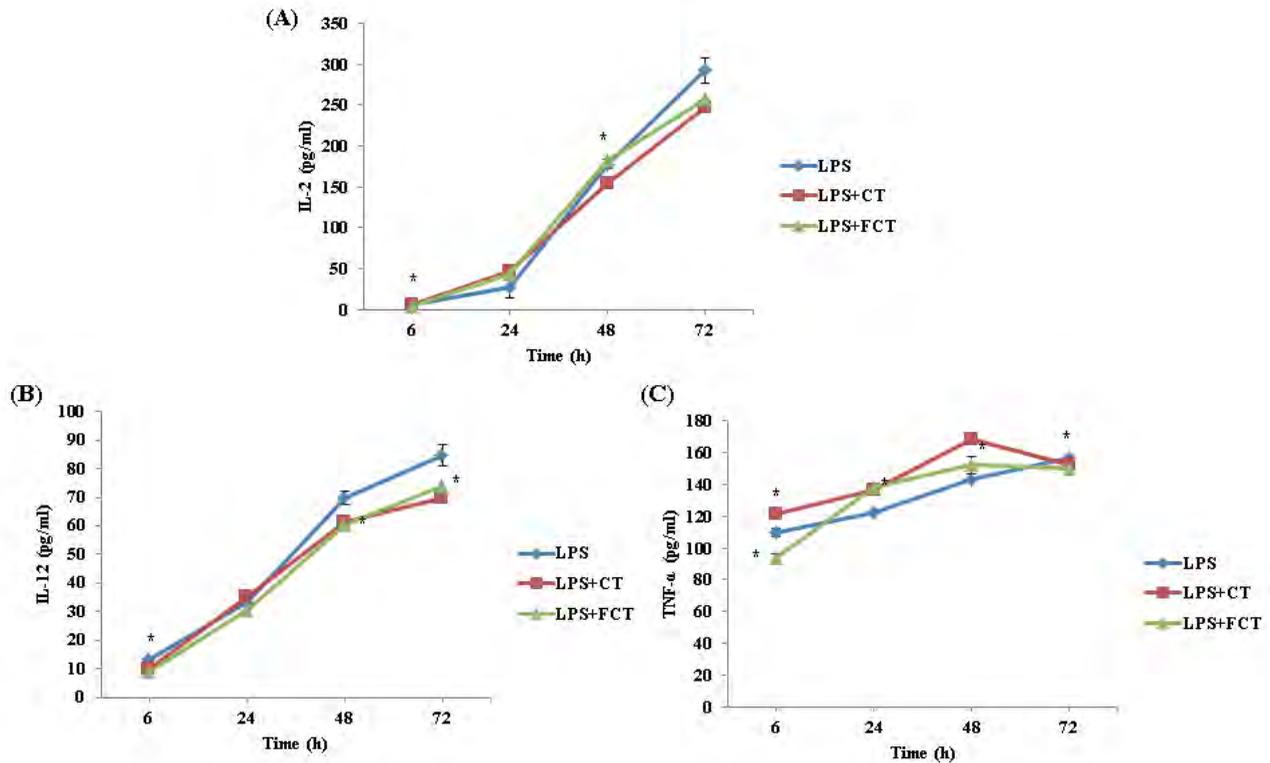


Fig. 11. Production of IL-2 (A), IL-12 (B) and TNF- α (C) cytokines by fermented *C. tricuspidata* fruit extract (FCT) and *C. tricuspidata* fruit extract (CT) with LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml extracts and 2 μ g/ml LPS for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p < 0.05$.

④ LPS 자극에 의한 cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 생성의 변화

꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 유도되는 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 분비의 변화를 확인하였다. 그 결과, IL-4의 분비량의 변화는 FCT와 CT가 LPS 처리군보다 높은 분비량을 나타내었다. 그리고 분비의 변화는 6시간에 CT가 FCT와 유사한 분비량이 나타났으나, 24시간부터 FCT가 유의적으로 분비량이 증가하다 72시간에는 CT와 유사한 변화를 나타내어 FCT가 시간에 따라 분비량이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 12A). IL-5의 분비는 초기 6, 24시간에는 FCT, CT, LPS 처리군 모두 유사한 분비의 변화를 나타내었으나, 48시간 후부터 LPS 처리군은 분비량이 감소하였으나, FCT, CT에서는 분비량이 증가하였으며, FCT가 더 높은 분비량을 나타내었다(Fig. 12B). IL-6의 분비는 6시간에서는 유사한 분비량을 보였으나, 24시간에는 FCT와 CT가 LPS처리군보다 높은 분비를 나타내었으며, CT가 FCT보다 높은 분비를 보였지만 48시간에는 LPS 처리군과 CT에서는 분비의 변화가 없으나 FCT의 분비량이 유의적으로 증가하여 72시간에 높은 분비량을 확인하였다(Fig. 12C). IL-10의 분비는 LPS 처리군, CT, FCT에서 거의 같은 분비의 변화를 보였으나, 48시간 후부터 FCT에서 유의적으로 분비량이 증가하여 72시간에 높은 분비량을 나타내었으며, CT와 LPS처리군에서는 분비량이 감소하였다(Fig. 12D). 따라서 꾸지뽕 열매가 발효에 의해 Th2 cytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 의 분비량은 증가하였으며, 시간이 경과함에 따라 발현이 증대되는 것을 확인하였다.

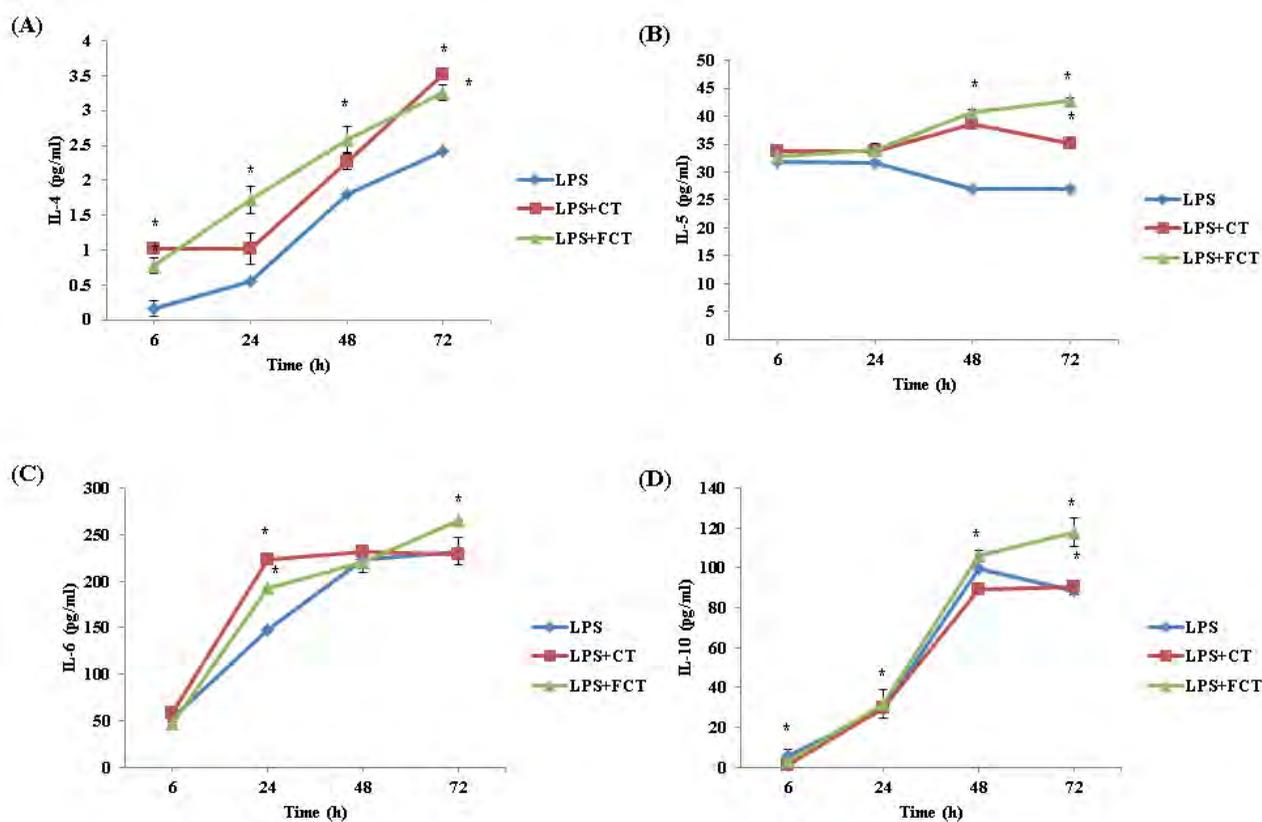


Fig. 12. Production of IL-4 (A), IL-5 (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) cytokines by fermented *C. tricuspidata* fruit extract (FCT) and *C. tricuspidata* fruit extract (CT) with LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml extracts and 2 μ g/ml LPS for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control $p < 0.05$.

(라) 미강 추출물의 면역증강활성

① 발효 미강 추출물에 의한 cytokines IL-2의 변화

발효 미강 추출물에 의해 유도되는 cytokine IL-2의 생성의 변화는 C57/BL6 마우스로부터 분리된 비장세포에 10 μ g/ml의 RB와 FRB를 각각 처리하여 비교하였으며, 분비되는 양을 6, 24, 48, 72 시간 동안 측정하여 확인하였다(Fig. 13). 그 결과 cytokine IL-2의 생성은 6시간에 FRB의 생성이 높게 나타났으며 이후 대조구 보다 감소되었다 72시간에 다시 생성이 증가되는 것을 확인하였다. 이는 IL-2는 주로 T cell proliferation factor로서 활성화된 T 림프구에 의해 분비되거나 활성화된 T cell의 증식에 필수적인 cytokine으로 작용하기 때문에 IL-2의 초기와 후기의 증가는 T cell의 증식을 유도하는 면역반응으로 전환을 효과적으로 유도하며, 발효에 의해 면역증강이 나타나는 것으로 사료된다.

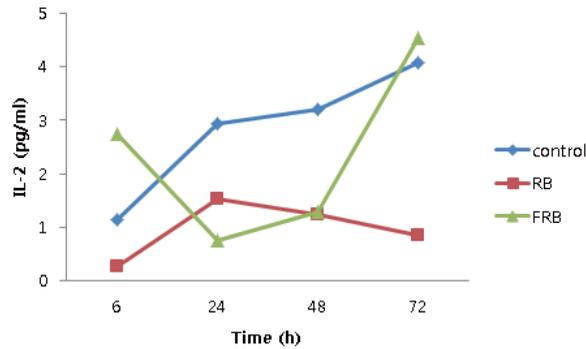


Fig. 13. Production of IL-2 cytokine by fermented rice bran (FRB) and rice bran (RB) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 3 $\mu\text{g/ml}$ FRB and RB for 6, 24, 48, 72 h respectively. Data are shown as mean \pm SD.

② 발효 미강 추출물에 의한 cytokines IL-4 의 변화

발효 미강 추출물에 의해 유도되는 cytokine IL-2 의 생성의 변화는 C57/BL6 마우스로부터 분리된 비장세포에 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 RB 와 FRB 를 각각 처리하여 비교하였으며, 분비되는 양을 6, 24, 48, 72 시간 동안 측정하여 확인하였다(Fig. 14). 그 결과 6 시간의 생성은 대조구보다 낮으며 RB 와 FRB 의 분비 차이가 나타나지 않았으나 24 시간 이후부터 FRB 의 생성이 증가하여 72 시간에 높은 생성을 나타내었다. 이는 IL-4 가 B cell 의 성장과 분화를 유도하는 cytokine 으로서 후기 항체생성을 유도하는 면역에 효과가 있는 것으로 사료된다.

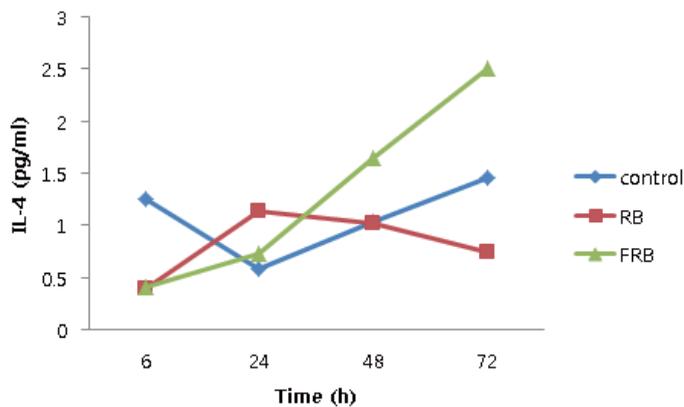


Fig. 14. Production of IL-4 cytokine by fermented rice bran (FRB) and rice bran (RB) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 3 $\mu\text{g/ml}$ FRB and RB for 6, 24, 48, 72 h respectively. Data are shown as mean \pm SD.

③ 발효 미강 추출물이 LPS 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12 의 변화

발효 미강 추출물에 의해 유도되는 Th1 cytokine 인 IL-2, IL-12 분비의 변화를 확인하였다(Fig. 15). 그 결과, IL-2 의 분비량의 변화는 발효미강에서 6 시간에 초기 분비량이 약간 높게 나타났으나 24 시간이후부터 급격히 감소하였으며, 미강에서는 24 시간부터 LPS 보다는 낮았지만 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 IL-12 의 분비의 변화는 LPS 보다

낮았으며 발효미강에서 가장 낮은 분비의 변화를 나타내었다. 이는 IL-2가 T 림프구의 성장을 유도하는데 반해 IL-12는 면역반응 초기에 NK cell 과 T 림프구에 작용하여 세포성 면역계를 유도하여 적응면역으로의 전환조절 작용을 하는 것으로 알려져 있는데 이러한 작용을 억제하여 체액성 면역으로의 전환을 유도하는 반응으로 전환에 역할을 하는 것으로 사료된다.

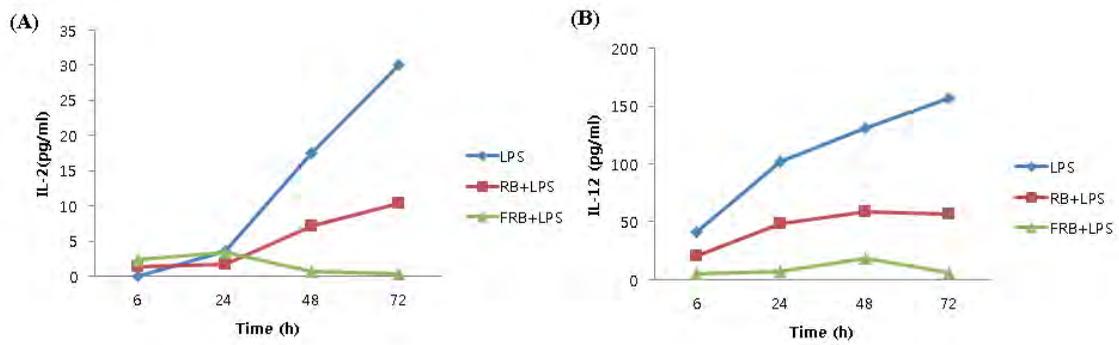


Fig. 15. Production of IL-2 (A) and IL-12 (B) cytokines by fermented rice bran (FRB), rice bran (RB) and Con A in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml extract and 2 μ g/ml con A for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

④ 발효 미강 추출물이 LPS 자극에 의한 cytokines IL-4, IL-10 의 변화

발효 미강에 의해 유도되는 Th2 cytokine 인 IL-4, IL-10 분비의 변화를 확인하였다(Fig. 16). 그 결과, IL-4의 분비량의 변화는 발효미강에서 초기의 생성이 LPS와 대조구 미강보다 가장 낮은 생성을 나타내었으나 시간에 따른 생성이 증대되어 72 시간에는 가장 높은 생성을 나타내었으며 미강 초기 생성은 가장 높게 나타났으나 후기에 대조구와 비슷하게 감소하는 것을 확인하였다. IL-10은 6시간부터 시간에 따라 생성이 가장 유지되었다. 이는 IL-10의 생성이 낮게 유지됨에 따라 IL-4에 의해 유도되는 항체생성 면역반응은 활성화되며, 이에 반해 세포성 면역반응을 억제함으로써 면역반응의 균형을 조절하는 것으로 사료된다. 따라서 발효 미강은 Th2 cell의 활성화에 의해 B 림프구를 활성화하여 항체생성 면역반응인 체액성 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다.

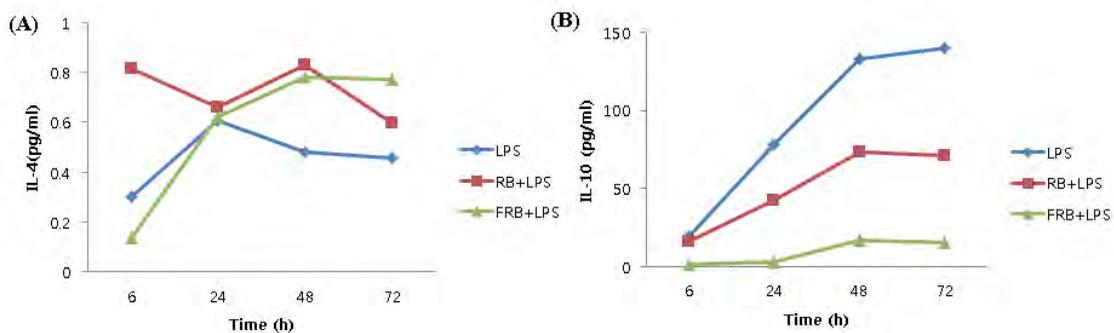


Fig. 16. Production of IL-4 (A) and IL-10 (B) cytokines by fermented rice bran (FRB), rice bran (RB) and Con A in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 μ g/ml extract and 2 μ g/ml con A for 6, 24, 48, 72 hr respectively.

사. 해산물 소재 기능성 검증

(1) 실험재료 및 방법

(가) 해조류의 유효성분 확인

① 실험재료

본 실험에 사용된 툷(*Hizikia fusiformis*)은 2008년 3월 전라남도 남해해서 구입하여 실험 전 수세, 음건하여 실험 전까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다.



Fig. 1. *Hizikia fusiformis*.

A. Natural habitat of *Hizikia fusiformis* was collected from the geo-je island coast of Korea in March and June 2008. B. Dry *Hizikia fusiformis* was salt and sand were removed using tap water and the samples were rinsed with deionized water.

② 툷 에탄올 추출 및 분획

시료의 메탄올 추출물은 건조시료 10배의 80% 에탄올을 가하여 4°C 에서 24시간, 3회 반복 추출하였다. 추출된 추출액은 여과(pore size $6\mu\text{m}$) 후 40°C rotary vacuum evaporator (EYELA Co., N-N series, Japan)로 농축 후 동결건조(BioTron, Hannil Co., Korea) 하였다. 추출된 80% 툷 에탄올 추출물을 극성에 따라 용매별로 분획하여 Fig. 1과 같이 분획물을 얻었다. 농축한 추출물을 증류수에 희석한 후 n-hexane, ethylacetate, n-butanol, 증류수(water) 순으로 각각 3회 연속 반복 추출한 다음 rotary vacuum evaporator로 유기용매를 증발시킨 후 동결 건조시켜 사용하였다.

③ n-butanol 분획물의 silica gel column chromatography

n-BuOH 분획물을 RP-18 silica gel column chromatography를 실시하였다. 전개용매는 MeOH : Water = 10:1로 용출시키고 각각의 분획들은 60 F254platesTLC(0.2 mm , $5 \times 7\text{ cm}$, Merck)를 이용하여 유사한 pattern들을 합쳐 3개의 fraction을 얻었다. 그중 가장 활성이 높은 BB fraction을 silica gel column chromatography를 실시하여 3개의 fraction을 선별하였다. 전용매는 Chloroform : Methanol = 3:2 로 용출시켰으며 위와 같은 TLC분석을 통하여 물질을 분리하였다. 분리된 물질중 가장 항산화 활성이 높게 선별된 BB-2 fraction이 단일 성분 인지를 확인하기 위하여 analytical HPLC로 분석하였다

④ Compound 1 물질 동정

분리된 물질의 구조 동정을 위하여 분리한 물질에 DMSO-d₆에 용해하여 ESI-LC/MS spectrum(Agilent 6410 QQQ, Agilent), ¹H nuclear magnetic resonance(NMR, 500 MHz, VANCE III 500, Bruker), ¹³C NMR(125 MHz), 2D NMR을 이용하여 그 구조를 확인하였다.

(나) 항산화 활성 검증

① Free radical scavenging activity

Free radical scavenging activity의 측정은 Brand-Williams method을 이용하여 측정하였다. 6×10^{-5} MDPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)MeOH용액 195 μ L와 증류수로 희석한 추출물 5 μ l를 96-microwell plate에 혼합하였다. 이때, 혼합용액 중의 추출물 최종 농도는 1.0 mg/ml가 되도록 하였다. 실온에서 30분간 방치한 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였고 기존의 항산화제로 알려진 BHA (butylated hydroxy anisole), BHT (butylated hydroxytoluene), ascorbic acid를 대조구로 사용하였다. 시료의 항산화 효능은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도비로 산출하였다.

② Redcing power activity

Reducing power activity의 측정은 Oyaizu method 을 이용하여 측정하였다. 시료 50 μ l에 Phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) 50 μ l와 1% potassium ferricyanide 50 μ l를 넣고 50°C에서 20분간 반응시켰다. 이때, 혼합용액 중의 추출물 최종 농도는 1.0 mg/ml가 되도록 하였다. 반응 종료 후 반응액에 10% trichloroacetic acid 용액 50 μ l를 가하고 5000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 100 μ l취하여 증류수 100 μ l와 1% ferric chloride 20 μ l을 혼합한 후 10분간 반응시킨 뒤 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 항산화 효능은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도비로 산출하였다.

③ β -carotene-linoleic acid activity

β -carotene-linoleic acid activity는 Miller method을 이용하여 측정하였다. 0.1 mg의 β -carotene을 chloroform 500 μ l에 용해시킨 후 20 mg의 linoleic acid 및 100 mg의 Tween 40을 첨가하여 50°C에서 chloroform을 감압 농축하여 제거하고 얻어진 잔류물에 증류수 50 ml를 가하여 정용한 것을 기질액으로 사용하였다. 기질액 10 μ l와 시료 200 μ l를 96-microwell plate 가하여 혼합하였다. 이때, 혼합용액 중의 추출물 최종 농도는 1.0 mg/ml가 되도록 하였다. 50°C 에서 2시간 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 항산화 효능은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도비로 산출하였다.

④ Hydrogen peroxide scavenging activity

Hydrogen peroxide scavenging activity의 측정은 Miller method을 이용하여 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonicacid(ABTS)-peroxidase system에서 측정하였다. 96-microwell plate에 시료 80 μ l, 10 mM H₂O₂ 20 μ l, phosphatebuffer(pH5.0,0.1M)100 μ l를 넣고 혼합하였다. 이때, 혼합용액 중의 추출물 최종 농도는 1.0 mg/ml가 되도록 하였고 37°C에서 5분간 반응하였다. 반응액에 1.25 mM ABTS 30 μ l와 1 U/ml peroxidase 30 μ l를 가하고 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시료의 항산화 효능은

시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도비로 산출하였다.

⑤ ABTs radical scavenging activity

ABTs radical scavenging activity ABTs 라디칼 소거능 측정은 7mM ABTs 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12시간 동안 반응 시켰다. 반응액을 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 희석 시킨 다음이 용액 3 ml에 시료용액 1 ml를 가하여 실온에서 10분간 반응 시킨 다음 414 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시료의 항산화 효능은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도비로 산출하였다.

⑥ Oxygen radical absorbance capacity

ORAC를 이용한 항산화 활성 측정은 peroxy radical scavenging capacity(ORACROO·) 법을 사용하였다. 100 mM AAPH(2,2'-azobis[2-amidinopropane]dihydrochloride) 100 μ l와 0.1 μ M pyrogallol red 50 μ l와 phosphate buffer(75 mM, pH 7.4)로 혼합하여 Reaction reagent를 만든다. 시료 10 μ l와 Reaction reagent 190 μ l를 혼합하여 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 60분동안 10분 간격으로 그 변화를 관찰하였다.

(다) LPS에 의해 유도된 BV2 microglia cell의 항염증 효과

① 시료

실험에 사용한 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (Hf-1) (Fig. 1)의 구조는 Kim [1]의 NMR 데이터를 기준으로 결정 하였으며, HPLC 분석을 통해 98% 이상의 순도를 확인 하였다.

② 세포 배양

본 실험에 사용된 BV2 세포는 DMEM 배지에 5% FBS와 antibiotics (WelGENE)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양 하였다. 모든 실험에서 BV2 세포는 Hf-1을 각각 2시간 선처리한 후 LPS (500 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양 하였다. 세포의 독성은 MTT assay를 실시하였다.

③ Total RNA 분리 및 RT-PCR

배양된 세포로부터 easy-blue RNA Extraction Reagent (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Republic of Korea)를 이용하여 total RNA를 준비하고 MMLV (Bioneer, Daejeon, Republic of Korea)로 cDNA를 합성한 뒤, 합성된 cDNA를 template로 하여 iNOS primer (forward 5'-cct cct cca ccc tac caa gt-3' and reverse 5'-cac cca aag tgcttc agt ca-3'), HO-1 primer (forward 5'-tga agg agg cca cca agg agg-3' and reverse 5'-aga ggt cac cca ggt agc ggg-3')와 β -actin primer (forward 5'-tgt gat ggt ggg aat ggg tca g-3' and reverse 5'-ttt gat gtc acg cac gat ttc c-3')를 이용 하여 다음과 같은 조건하에서 PCR을 행 하였다. iNOS: 94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 30초, 24cycle; HO-1: 94°C 30초, 61°C 30초, 72°C 30초, 24cycle; β -actin: 94°C 30초, 57°C 30초, 72°C 30초, 23cycle PCR 반응산물들은 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 상대적 발현량을 비교하였다.

④ Western blot analysis

세포에 PRO-PREPTMProtein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology)을 처리하여 단백질을 확보하고, 12% SDS-PAGE를 진행하였다. 이들을 nitrocellulose membrane으로 transffer 한 후 actin 및 HO-1에 대한 항체 (santacruz)와 HSP72 (stressgen) 항체를 이용하여 western blotting을 수행하였다.

⑤ DAN fragmentation assay

세포에 DNA extraction buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10mM Tris-HCl)를 넣고 얼음 위에서 30분간 반응시킨 후 10,000 X g에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 취한 후 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1)을 이용하여 추출하고 분석 하였다.

⑥ NO 생성량 측정

RAW264.7 대식세포를 1×10^5 cells/ml 농도로 24-well plate에 분주하여 2시간 배양 한 후 에 Hf-1을 농도별처리다음, LPS (500 ng/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액 100 μ L와 Griess 시약100 μ L를 혼합 하여 상온에서 10분 동안 반응 시킨 후, ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정 하였고 sodium nitrate로 표준 곡선을 작성하여 NO 함량을 산출 하였다.

⑦ Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

DNA-protein binding assay는 nuclear extract와 같이 수행하였다. Synthetic complementary NF- κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') bindind oligosaccharide (Santa Cruz Biotechnology)는 3'-end DNA labeling kit (Pierce)를 사용하여 3'-biotinylate하였으며, 실온에서 30분간 annealing하였다. 반응액은 electrophoretically를 사용하여 분리하였고, DNA transfer은 120 ml/cm² membrane에서 cross-linked하였다.

⑧ Luciferase assays

세포에 P/S이 첨가되지 않은 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양 하였다. Antioxidant response elements(ARE)의 transcriptional activity는 mouse HO-1의 enhancer 2와 minimal promoter region을 포함하는 ARE reporter plasmid를 이용하여 측정하였다. 먼저 Nucleofector-II(Amaxa, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 ARE reporter plasmid를 pCMV- β -galactosidase control vector와 co-transfection 하였다. Transfection된 세포를 24-well plate에 분주하고, 다음날 SDM으로 24시간 동안 serum deprivation한 후, 다양한 농도의 piceatannol이 첨가된 배양액에서 6시간 배양하였다. Transcriptional activity는 luciferase assay system(Promega)를 이용하여 측정하였고 β -galactosidase activity로 normalize 하였다.

⑨ Statistical analyses

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고 Sigma Plot 을 이용하여 Student t-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

(라) LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 cell의 항염증 효과

① 세포배양

본 연구에서 사용한 RAW 264.7(murine macrophage cells) 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하여, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (100 U pen/mL, 100 µg strep/mL)을 첨가한 RPMI 1640(GIBCO BRL, Grand Island, NY) 배지에 부착 배양하였으며 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다.

② MTT assay에 의한 세포독성 조사

세포 배양용 6-well plate에 BV2 세포를 6×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 안정화시킨 후, 톱에서부터 분리된 Hf-1을 농도별로 1시간 선처리 후 LPS를 후처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 모두 제거하고, tetrazolium bromide salt (MTT)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 well 당 1 ml씩 분주하였다. 2시간 배양 후 상층액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)로 formazin을 모두 용해시켜 96 well plate에 200 µl씩 옮긴 다음 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다.

③ Measurement of NO and PGE₂ production

Griess assay를 통하여 NO 생성량을 측정하였다. 이를 위해 세포 배양용 6 well plate에 상기한 방식으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상층액을 100 µl씩 회수하여 각각 Griess reagent [1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride, 2.5% H₃PO₄] 100 µl와 혼합하여 96 well plate에 분주하였다. ELISA reader (540nm)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

④ Cytokine의 측정

세포를 배양한 후, 각 well에서 상층액을 회수하였다. 상층액 내 TNF-α와 IL-1β의 양은 각각 R&D System Inc (Minneapolis, MN, USA) 에서 구입한 Fluorokine MAP Mouse TNF-α, IL-1β kit를 사용하여 제시된 방법에 따라 처리 한 다음, ELISA reader로 흡광도를 측정한 후 TNF-α와 IL-1β의 생성량을 계산하였다.

⑤ RT-PCR에 의한 mRNA의 분석

상기와 동일 조건에서 배양된 세포를 모아서 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)에 lysis 시켜 total RNA를 분리하고, 정량을 통해 동량의 RNA를 준비한 후 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 primer, Hf-1, ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 각각 혼합 하여 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)로 증폭시켰다. 그 후 1% agarose gel 에 ethidium bromide (EtBr)를 첨가하여 굳힌 다음, 각 sample을 동량 loading하여 100 V에서 전기영동 시킨 후, UV 하에서 mRNA 발현의 차이를 비교하였다.

⑥ Western blot analysis

상기와 동일 조건에서 배양된 세포들을 모아서 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF),

5 mM dithiothreitol (DTT)]에 1시간 가량 lysis시켰다. 그 후 Bio-rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법을 따라 정량 후, Laemmli sample buffer (Bio-rad)를 동량으로 섞어 SDS-polyacrylamide gel에 loading한 후 90 V로 전기영동으로 분리하고, electroblotting을 통해 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 옮긴 다음, 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고 4°C에서 1차 항체를 붙여 1시간 이상 반응시켰다. 그 후 PBS-T로 수차례 세척하고 상온에서 1시간 동안 2차 항체를 붙인 후 다시 PBS-T로 세척하고 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp.)에 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광시켰다.

⑦ Statistical analyses

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고 Sigma Plot 을 이용하여 Student t-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 활성물질의 추출 및 정제

Fig.2와 같이 건조한 톳 2kg하여 4°C, 80% 에탄올에서 24시간 3회 반복추출하고, 잔사는 여과 한 후 이를 감압 농축한 에탄올 추출물을 물에 용해시켜 n-hexane, ethylacetate, n-butanol을 극성에 따라 순차적으로 추출한 후 항산화 활성의 지표가 되는 Free radical scavenging activity를 측정하여 그 중 항산화 활성이 가장 높다고 판단된 n-butanol층을 RP-18 silica gel column chromatography을 실시하여 BA, BB, BC의 세 개의 fraction을 얻었다. 3개의 fraction또한 같은 항산화 활성을 측정하여 가장 활성이 높은 BB fraction을 선별하였다. 선별된 BB fraction을 silica gel column chromatography를 실시하여 다시 BB-1, BB-2, BB-3의 3개의 fraction으로 분리하였다. 분리된 fraction 또한 항산화 활성이 평가하여 가장 활성이 뛰어난 BB-2 fraction에 대해서 HPLC 분석을 통하여 1개의 compound를 얻었고, chromatography에서 확인되어진 1개의 main peak에 대하여 구조를 분석하였다.

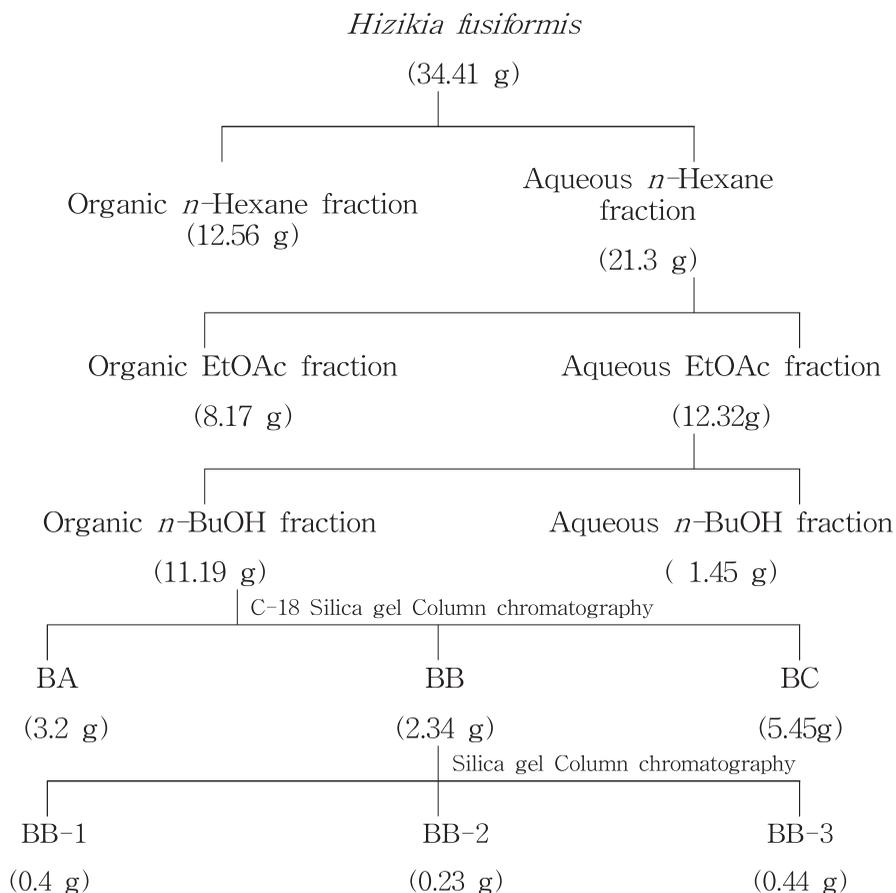


Fig. 2. Scheme of solvent fractionation of *Hizikia fusiformis*.
The fractionation was guided by the DPPH radical scavenging activity.

(나) 구조분석

ESI-LC/MS spectrum을 통해서 Fig.3에서 m/z 419[M+H] molecular ion peak를 관찰할 수 있었다. 분리한 Compound 1의 physical data는 다음과 같다.(Table 1) ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6)은 d (ppm) 7.77 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-2'), 7.19 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5') 7.85 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 9.31 (OH, s, H-5), 61.44, 61.59, 150.10, 71.75, 55.39, 55.62 (6 s, $\text{OCH}_2\text{-H}$, C-3, -6, -7, -8, -3', -4')이다 (Fig. 4).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6)은 d (ppm) 171.24 (s, C-4), 150.08 (s, C-2), 150.10 (s, C-7), 55.39 (s, C-3'), 55.62 (s, C-4'), 147.00 (s, C-5), 62.00 (s, C-9), 61.44 (s, C-3), 61.59 (s, C-6), 71.75 (s, C-8), 110.4 (s, C-10), 120.91 (d, C-6'), 112.24 (d, C-5'), 111.72 (d, C-2'), 124.63 (s, C-1'), 61.44, 61.59, 150.10, 71.75, 55.39, 55.62 (6 q, OMe at C-3, -6, -7, -8, -3', -4')이다 (Fig. 5). 이 화합물의 2D NMR을 Fig.6에 나타내었다. 이상의 분석 결과, compound 1은 Fig.7과 같이 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone의 구조를 가지고 있다.

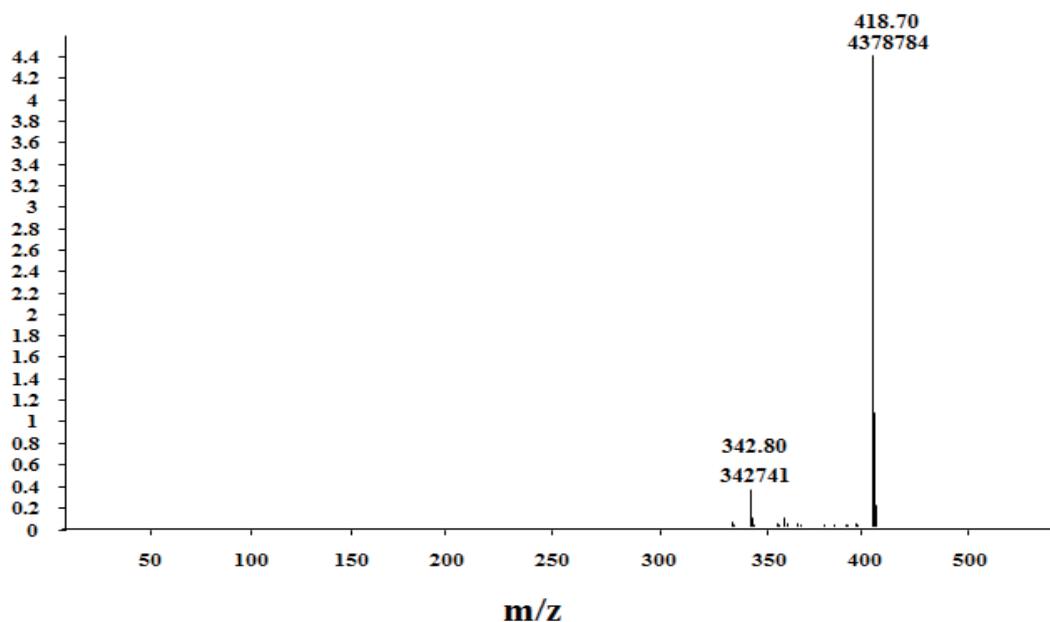


Fig. 3. Fig . ESI-LC/MS spectrum of compound 1.

Table1. ^1H and ^{13}C -NMR chemical shifts of compound 1 in DMSO-d_6 .

Positions		Chemical shift (δ , ppm)	
		^1H NMR ¹⁾	^{13}C NMR ²⁾
-OH	5	9.31 (s, 1H)	147.00
	2		150.80
Ar-H	4		171.24
	9		62.00
	10		110.03
	1'		123.63
	2'	7.77 (d, J=2.5 Hz, 1H)	111.72
	5'	7.19 (d, J=8.5 Hz, 1H)	112.24
	6'	7.85(dd, J=8.5 and 2.0 Hz, 1H)	120.91
-OCH ₂ -H	3		61.44
	6		61.59
	7	4.03(s, 3H), 3.98(s, 3H), 3.855(s, 3H),	150.10
	8	3.84(s, 3H), 3.83(s, 3H), 3.34(s, 3H)	71.75
	3'		55.39
	4'		55.62

¹⁾ δ values in ppm and coupling constants (in parentheses) in Hz, measured at 500MHz.

²⁾ δ values in ppm and coupling constants (in parentheses) in Hz, measured at 125MHz.

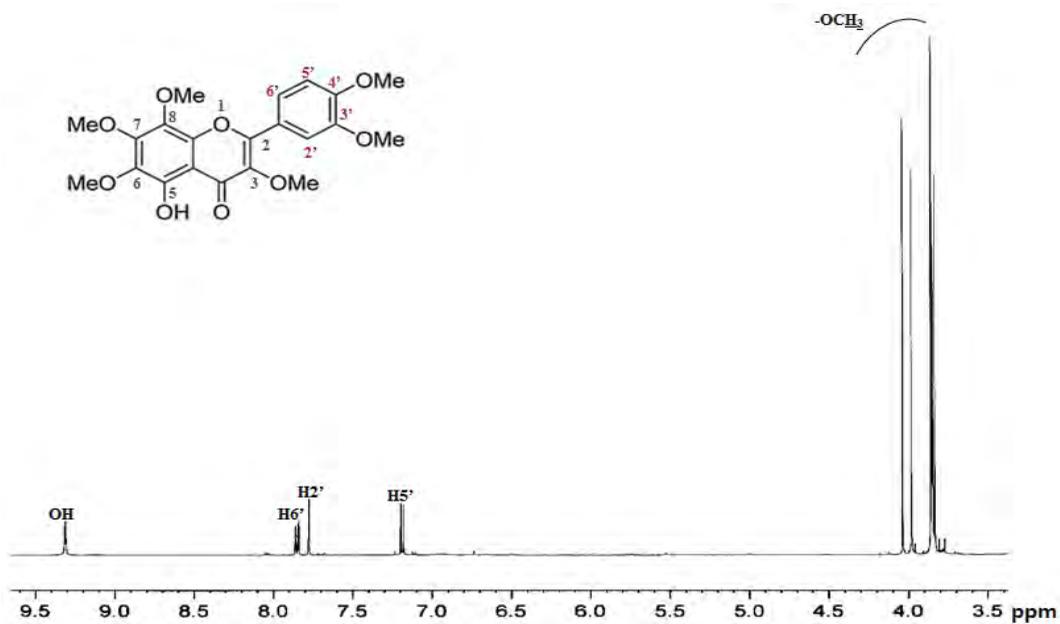


Fig. 4. 500 MHz ¹H-NMR spectrum of compound 1.

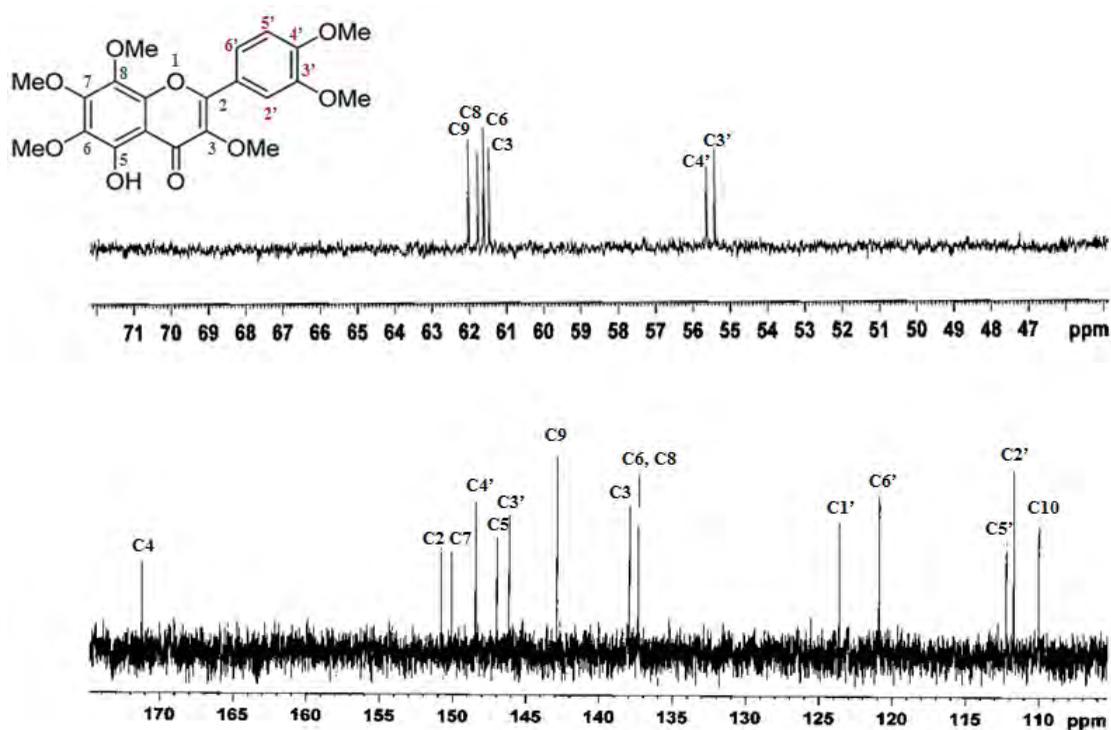


Fig. 5. 125 MHz ¹³C-NMR spectrum of compound 1.

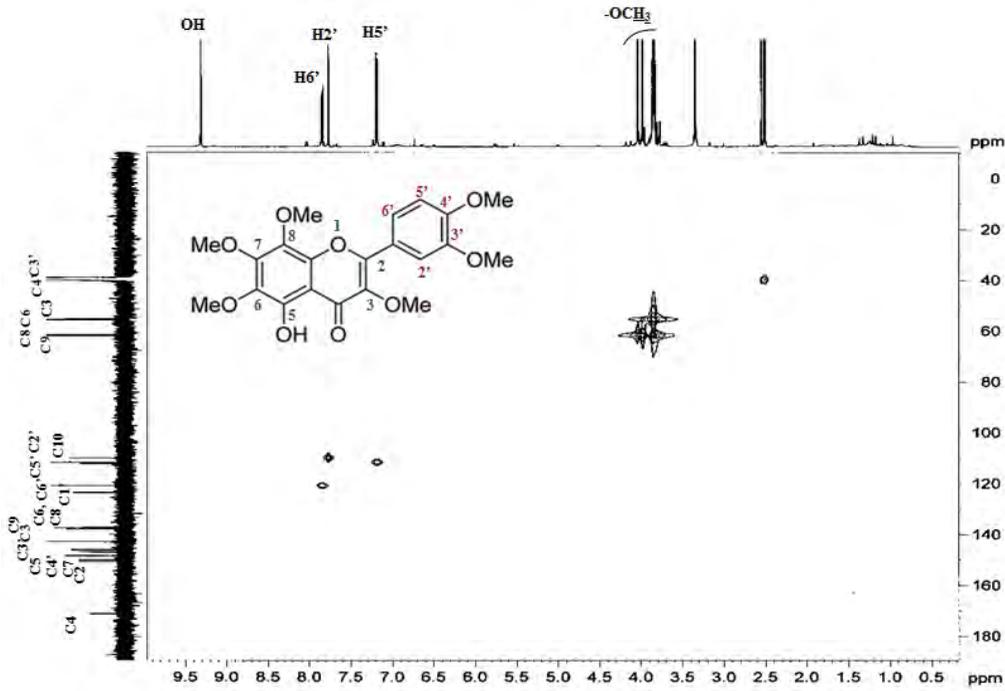
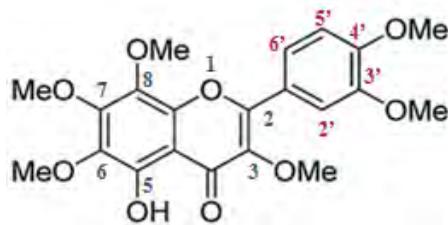


Fig. 6. HMQC spectrum of compound 1.



5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone
Fig. 7. Chemical structures of compound 1.

(다) 항산화 활성

① Free radical scavenging activity

추출물의 항산화 효능을 DPPH에 대한 전자 공여능(electron donation ability, %)으로 측정하였다. 전자공여능은 항산화 측정에 대표적으로 쓰이는 방법이다. DPPH는 항산화 활성을 측정하기 위한 기질로 사용되고, phenol, flavonoid와 같은 페놀성 물질에 대한 항산화작용의 지표라고 알려져 있으며, 유리 라디칼에 전자를 공여하여 식품 중의 지방산화를 억제하고 인체 내 노화를 억제시키는 작용으로 많이 이용되어 인체의 질병과 노화를 방지하는데 중요한 역할을 한다. 기존에 항산화능이 우수하다고 알려진 Ascibic acid와 BHT, BHA를 대조군으로 사용하였고, 이와 더불어 Compound 1에 대한 전자공여능을 측정한 결과 모든 시료에서 전자공여능이 나타났으며 농도에 의존하여 전자공여능이 유의적으로 상승하였다 (Fig. 8). 대조구인 Ascibic acid와 BHA의 경우 농도가 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 90%이상의 높은 활성을 나타내나 compound 1

은 66%로 그 활성이 다소 떨어지나 BHT와는 높은 농도에서 유사한 활성을 보인다.

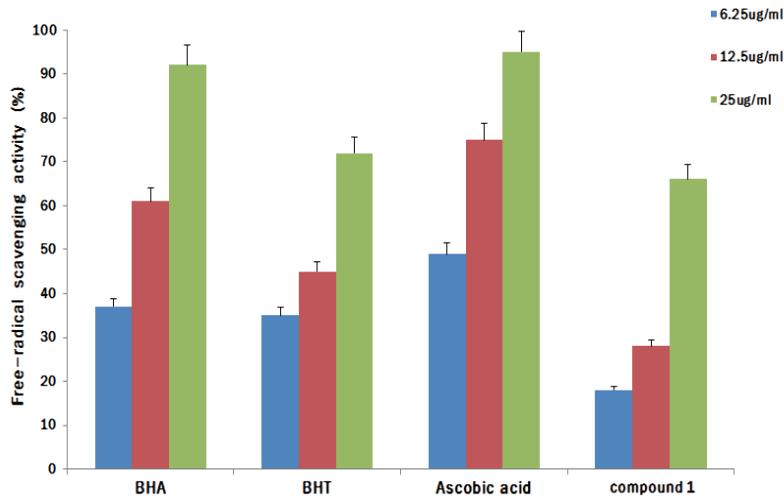


Fig. 8. Free-radical scavenging activity of compound 1.

BHT : Butylated hydroxy toluene, BHA : butylated hydroxy ani-sole.

② Reducing power activity

산화작용의 여러 기작 중에서 활성산소종 및 유리기에 전자를 공여하는 능력을 말하며, 700 nm에서 ferricferricyanide(Fe^{3+}) 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous(Fe^{2+})로 전환하는 값을 나타낸 것이다. 일반적으로 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 알려져 있고 전자공여능은 phenolic 물질에 대한 항산화 효능의 지표라고 할 수 있다. 측정된 결과 (Fig. 9), 농도 높아질수록 환원력은 증가하였으며, compound 1은 25 $\mu g/ml$ 의 농도에서 Ascorbic acid와 BHA와 유사한 95% 이상의 활성을 나타내나 농도가 떨어짐에 따라 급격히 활성이 낮아지는 것을 볼 수 있어 농도에 따른 유의성은 낮은 것으로 보인다. 하지만 대조구 중의 하나인 BHT 보다는 그 농도가 낮아짐에 따라 2배가 높은 활성을 나타낸다.

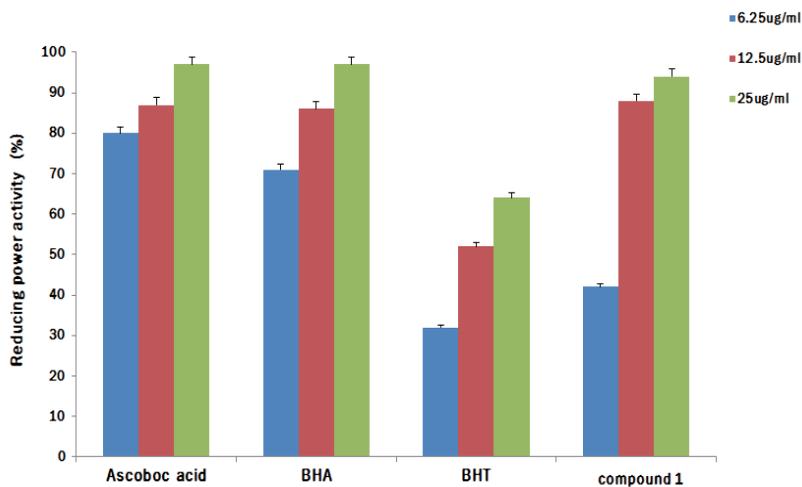


Fig. 9. Reducing power activity of compound 1.

BHT : Butylated hydroxy toluene, BHA : butylated hydroxy ani-sole.

③ β -Carotene linoleic acid activity

추출물의 지질과산화 억제능을 β -carotene이 함유된 linoleic acid emulsion계에서 측정하였다. 대조구인 BHA와 BHT가 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 92%와 82%의 높은 활성에 비해 다소 떨어지나 Ascorbic acid와는 70%의 유사한 활성을 나타낸다(Fig. 10). 모든 시료들이 농도에 따라 그 활성이 유의적인 것을 확인 할 수 있다. 생체 내에서 Fe과 같은 금속류는 과산화수소와 빠르게 반응하여 hydroxyl radical을 형성함으로써 2차 산화가 진행되는데, 세포막의 지질과산화 반응이 radicals에 의해 진행되고 생체 내 DNA의 손상까지 초래한다는 것을 볼 때, hydroxyl radical 소거 및 지질과산화 억제능이 있는 compound 1은 2차 산화물의 생성억제제로 유효할 것으로 예상된다.

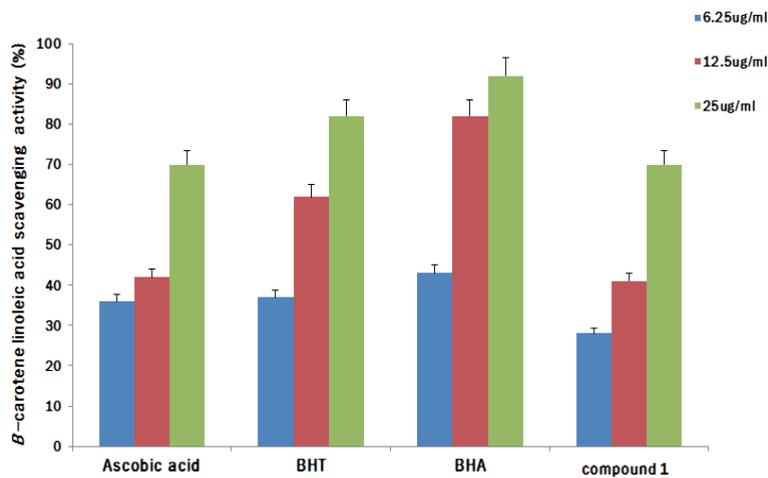


Fig. 10. β -Carotene linoleic acid activity of compound 1.

BHT : Butylated hydroxy toluene, BHA : butylated hydroxy ani-sole.

④ Hydrogen peroxide scavenging activity

Hydrogen peroxide는 산소의 환원대사물질로서 미토콘드리아나 peroxisome 등의 정상세포로부터 형성되거나 다양한 외부 요소에 의해 형성 되는데, DNA 및 단백질 손상을 유발하거나 생체막 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화지질을 생성함으로써 생체기능 저하 또는 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다. Hydrogen peroxide는 세포에 대하여 독성물질로 작용하며 전이 금속이온과 함께 활성산소 종들을 생산하며, 체내의 항산화 방어효소들의 작용으로 물로 전환되어 분해된다. 과산화수소에 대한 분획물의 소거능 효과를 아래와 같이 나타내었다.(Fig. 11) Compound 1의 경우 6 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 67%의 소거율을 나타냈으며 농도에 따라 그 활성이 유의적으로 나타나는 것을 볼 수 있다. 대조구로 쓰인 Ascorbic acid, BHA, BHT에 비해서는 다소 활성이 떨어지는 것을 확인 할 수 있다.

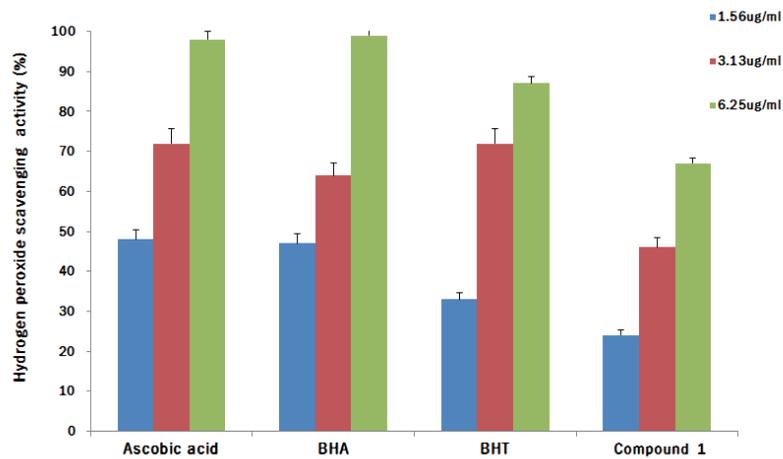


Fig. 11. Hydrogen peroxide scavenging activity of compound 1.
 BHT : Butylated hydroxy toluene, BHA : butylated hydroxy ani-sole.

⑤ ABTs radical scavenging activity

ABTS법은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 $ABTs \cdot +$ 이 시료 중의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화력을 측정하는 방법이다. ABTS법에 의한 항산화력 측정법은 DPPH는 자유라디칼을 ABTS는 양이온 라디칼을 소거하는 점에서 서로 차이가 있다. Fig. 12는 compound 1의 ABTs radical 소거능에 대한 결과이다. 이는 농도 의존적으로 소거능이 증가함을 보였고 25 $\mu g/ml$ 에서 67%로 50%가 넘는 활성을 띠었지만, 대조구들에 비해서는 다소 낮은 활성을 확인하였다.

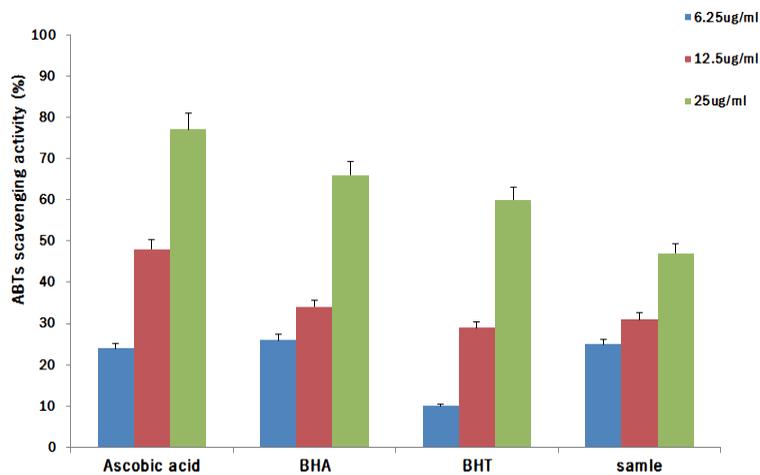


Fig. 12. ABTs radical scavenging activity of compound 1.
 BHT : Butylated hydroxy toluene, BHA : butylated hydroxy ani-sole.

⑥ Oxygen radical absorbance capacity

ORAC assay는 식품이나 음료의 total antioxidant capacity(TAC)를 양적으로 측정하여 항

산화 활성을 평가하기 위한 도구로 널리 활용되는 방법으로 free radical에 의해 유도되는 손상으로부터 시료에 의한 보호 능력을 측정하는 것이다. Asbic acid의 경우 시간에 따른 radical의 소거능의 변화가 없는 것으로 보아 ORAC assay를 통한 항산화 검증에는 효과가 없는 것으로 판별된다. compound 1의 경우 BHA보다는 그 변화가 낮으나 BHT 보다는 그 변화가 큰 것으로 보이며 그 변화 또한 유사한 패턴으로 진행되는 것을 확인 할 수 있다(Fig. 13). 대조구인 BHA와 BHT와 대등한 활성을 나타내는 것으로 사료 된다. 본 연구에 사용한 ORAC assay는 항산화 작용의 표준화를 위한 세계학술대회에서 선정된 방법 중 하나로서 측정 감도가 예민하여 정확도를 높일 수 있는 방법이다. 위의 결과에서 compound1 계통의 hexmethoxyflavone가 항산화 활성 메카니즘의 자세한 규명이 필요할 것이다.

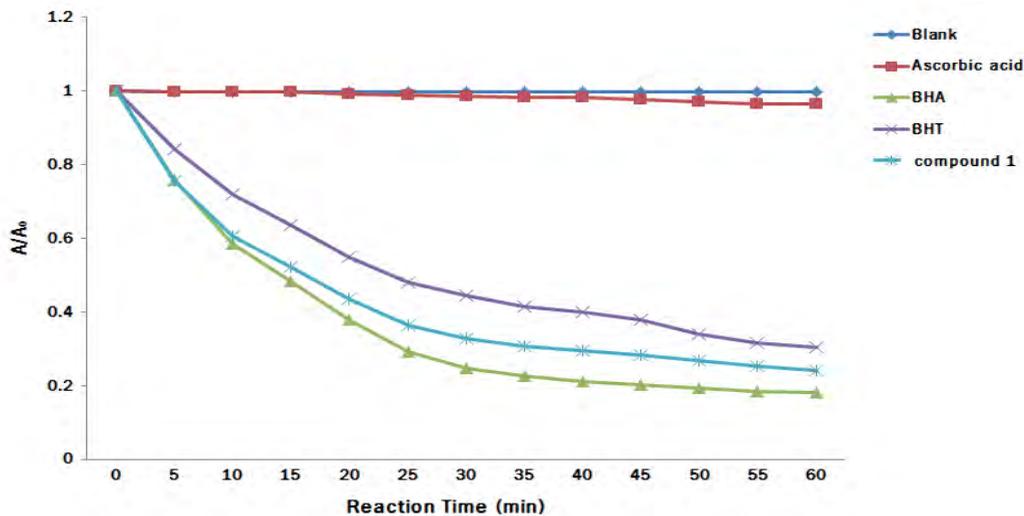


Fig. 13. Kinetic profiles of pyrogallol red consumption mediated by AAPH in presence of fractions. Consumption of pyrogallol red induced by AAPH in absence of fractions and control (Trolox).

AAPH : 2,2'-azo-bis 2-amidinopropane deihydrochloride,
 BHT : Butylated hydroxy toluene,
 BHA : butylated hydroxy anisole.

(라) 톳에서부터 분리된 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone의 항염증 효과

① Hf-1의 세포독성

Hf-1이 BV2 microglia 세포에 미치는 항염증 효과를 확인하기 위해서 우선 MTT assay를 실시하였다. 24시간동안 Hf-1을 농도별로 처리한 다음 MTT의 환원력을 통해서 세포의 생존정도를 측정한 결과 0-30 μM의 낮은 농도에서 세포가 80% 이상 생존하여 세포독성을 나타내지 않았으나, 40 μM의 고농도에서는 세포의 생존율이 35% 감소하여 높은 세포 독성을 나타내었다. 또한, LPS의 존재 하에서도 동일한 결과가 나타남을 확인하여 0-30 μM의 저 농도에서 낮은 세포독성을 나타내었다 (Fig. 14A). LPS로 유도된 BV2 microglia 세포에서 어떠한 pathway에 의해서 세포사멸에 이르는 지를 확인해 보기 위해서 RT-PCR과 western blot을 사용하였다(Fig. 14B-C). 특정 내, 외부 자극에 의하여 apoptosis가 일어나면 PARP 단백질은 부분적으로 잘리는 단백질 분해 과정을 거친다. 그 결과 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편을 관찰할 수

있다. 특히 PARP는 정상세포의 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며, apoptosis의 과정 중 caspase라는 효소의 활성화에 의해 단백질의 분해가 일어나며, PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다. 염증을 유발하는 대표적인 물질인 H₂O₂는 PARP protein의 cleavage된 형태를 확인할 수 있었으며, 이를 western blot에서 다시 확인하였다. 하지만 Hf-1에는 이러한 PARP protein의 cleavage의 변화가 없어 LPS로 유도된 BV2 microglia 세포는 아무런 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

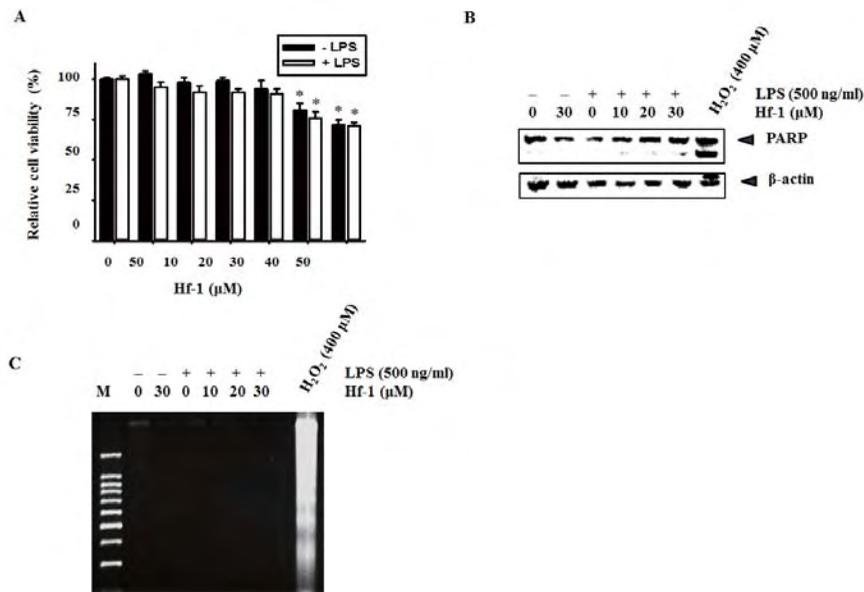


Fig. 14. Low concentration of Hf-1 does not affect cell viability in BV2 microglia. Cells (1×10^5 cells/ml) were treated with the indicated concentrations of Hf-1 (0-50 μM) 2 h before 500 ng/ml LPS treatment for 24 h. A) Cell viability was measured by an MTT assay, and the results were expressed as the percentage of surviving cells compared with the untreated control groups. B) Cell lysates were prepared and Western blot analysis was executed using antibodies specific for PARP. C) In a parallel experiment, fragmented DNAs were extracted from the treated cells and analyzed on 1.5% agarose gel. H₂O₂ was used to positive control in cell death. Data represent the mean \pm SE of at least three independent experiments (*, $p < 0.05$ vs. untreated control group).

② LPS에 의한 NO의 생성과 iNOS 발현에 대한 Hf-1의 억제효과

다음으로 HF-1이 LPS로 자극된 BV2 microglia 세포로부터 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 이 실험은 MTT assay와 동일한 조건으로 진행이 되었으며, 24시간 후 세포 배양액을 획득하여 NO의 활성을 Griess액을 이용하여 측정하였다. 결과 Fig. 15A에 나타난 바와 같이 LPS 처리 후 최대 $16.9 \pm 1.9 \mu\text{M}$ 까지 증가했던 NO 생성량이 Hf-1 처리에 의해 농도 의존적으로 각각 유의하게 감소하여 최고농도인 $30 \mu\text{M/ml}$ 에서 $6.7 \pm 0.35 \mu\text{M}$ 까지 NO생성량을 감소시켰다. 이러한 결과가 Hf-1에 의하여 NO의 생성을 조절하는 inducible nitric oxide synthase의 발현조절에 의해서 일어나는지를 Western blot과 RT-PCR을 이용해서 측정하였다. 그 결과 Fig.15B-C에서와 마찬가지로 LPS에 의해서 증가된 inducible nitric oxide

synthase 단백질과 mRNA의 양이 Hf-1에 의해서 저해됨을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼때 Hf-1은 inducible nitric oxide synthase의 유전자발현을 조절해서 최종적으로 NO의 활성을 저해하는 것으로 판단된다.

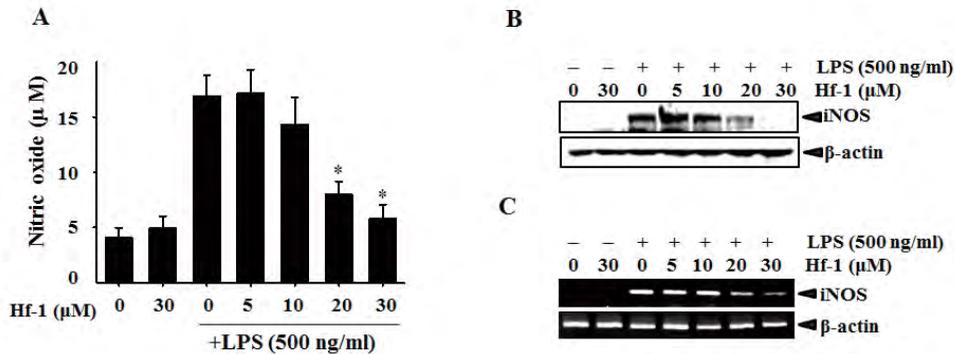


Fig. 15. Hf-1 suppresses LPS-induced NO production in accordance with iNOS expression in BV2 microglia. A) Cells were pretreated with Hf-1 (0-30 µM) for 2 h and then incubated with 500 ng/ml LPS for 24 h. The amount of NO production in the medium was measured using the Griess reaction. B) In a parallel experiment, cell lysates were prepared and Western blot analysis was executed using antibodies specific for iNOS. C) After treatment with LPS for 6 h, the total cellular RNA was subjected to RT-PCR and the amount of PCR product was determined using 1.5% agarose gel electrophoresis. β-Actin was used as an internal control for the Western blot analysis and RT-PCR. Data represent the mean ± SE of at least three independent experiments (*, $p < 0.05$ vs. untreated control group).

③ NF-κB의 translocation 에 미치는 Hf-1의 영향

NF-κB는 DNA 의 전사를 조절하는 단백질 복합체로 자극이 없는 세포에서는 NF-κB는 세포질에서 그들의 inhibitor로 알려져 있는 IκB와 결합되어 비활성화 상태로 존재한다. NF-κB의 활성화는 세포가 자극을 받아 IκB 단백질이 IκB kinase (IKK)에 의해 인산화되어 활성화된 NF-κB는 핵 안으로 translocation이 용이해지며 염증반응을 유도한다. 염증성인자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 promoter에 강력한 염증활성화 전사인자인 NF-κB의 결합부위를 가지고 있으며, 이는 LPS에 의해서 활성화된다. 따라서 iNOS의 발현이 전사조절인자인 NF-κB에 의 영향으로 조절되는지 확인하기 위해서 EMSA를 실시한 결과, Fig. 16A에서 Hf-1은 LPS에 의해 유도되어진 NF-κB의 활성화를 강력히 저해함을 알 수 있었다. 이러한 저해가 NF-κB의 소단위체인 p50과 p65의 핵내로 translocation에 의해서 나타나는지를 확인하기 위해서 핵과 세포질을 분리하여 추출한 후 western blot을 실시하였다. 그 결과 Fig. 16C에서 Hf-1은 NF-κB의 소단위체들의 핵내로 translocation을 저해하였다. NF-κB의 활성억제가 염증성유전자의 발현에 영향에 의한것인지 확인하기 위하여 위하여 NF-κB억제제인 PDTC와 PSI를 전처하여 유전자의 발현을 조사한 결과 PDTC와 PSI는 염증성인자들의 발현을 저해하는 것을 확인하였다 (Fig. 16D). 이는 Hf-1이 NF-κB의 활성저해를 통해서 염증성인자의 유전자 발현을 조절한다는 결과이다.

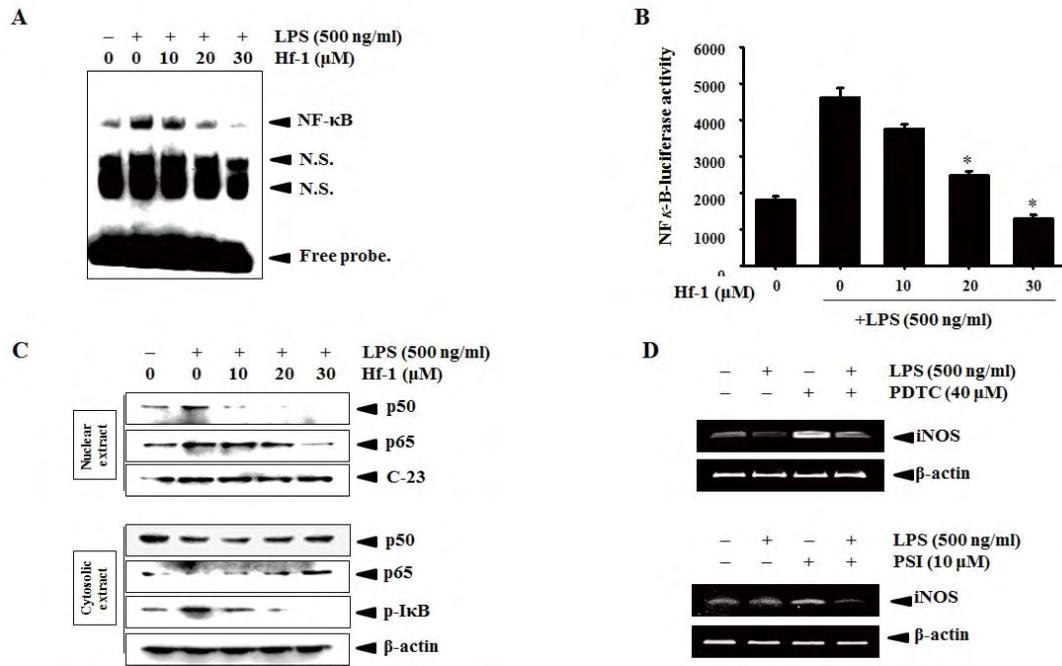


Fig. 16. Hf-1 inhibits LPS-induced NF-κB activity. A) Cells were preincubated with Hf-1 (0-30 μM) 2 h before stimulation with 500 ng/ml LPS for 30 min and then the nuclear extracts were assayed for specific DNA-binding activity of NF-κB. B) Cells were transiently transfected with a reporter vector that has NF-κB-binding sites. Luciferase activity was measured as described in the Materials and methods. C) The levels of p50 and p65 in the nuclear and cytosolic compartments were assessed by Western blot analysis at 30 min. D) Cells (1×10^5 cells/ml) were incubated with 40 μM of PDTC and 10 μM PSI 2 h before 500 ng/ml LPS treatment. The total RNA was isolated and RT-PCR analyses of iNOS expression were performed at 6 h. C-23 and β-actin were used as the internal controls. Data represent the mean \pm SE of at least three independent experiments (*, $p < 0.05$ vs. untreated control group).

④ HO-1 발현에 의한 NO 생성에 미치는 Hf-1 영향

Heme oxygenase-1(HO-1)은 heme을 biliverdin, carbon monoxide(CO)와 iron으로 전환시키는 효소이며, 그 대사산물은 항염증 및 항세포사멸에 관련된 유전자 발현에 영향을 주는 항산화 효소로 알려져 있다. 활성화된 대식세포에서 HO-1을 유도하여 과발현 시켰을 때, 염증성 사이토카인, COX-2, iNOS의 발현을 감소시켜 그에 의해서 생성되는 PGE₂, NO의 생성도 억제한다고 알려져 있다. Hf-1에 의해 발현되는 HO-1에 의한 NO 생성량이 변화를 통하여 항염증 효과를 규명하였다. Hf-1이 시간별로 농도별로 RT-PCR과 Western blot 을 통하여 HO-1이 유도 되는 것을 시간에 따라 농도에 따라 유의적으로 증가하는 것을 확인 하였다. Hf-1을 농도와 시간에 따라 BV2 microglia 세포에 처리하였을 때 10-20 μg/ml에서는 HO-1이 발현되지 않는 미미한 정도를 보였지만 30 μM에서는 HO-1이 뚜렷하게 발현되었으며, Hf-1을 처리하여 6시간부터는 HO-1이 현저하게 발현됨을 알 수 있었다 (Fig. 17A-B). LPS에 의한 세포내 NO 생성에 대한 HO-1의 역할을 조사하기 위하여 HO-1 유도제인 CoPP와 HO-1 효소 활성 저해제인 ZnPP를 처리한 후 NO의 생성량을 측정하였다. 그 결과 LPS 처리 시 대조군에

비하여 증가 하였던 NO의 양이 CoPP 전처리에 의해 현저히 감소 하였으며, 이때 CoPP 자체 영향은 없었다. 그러나 ZnPP 전 처리시 LPS에 의해 생성 증가된 NO의 양은 증가하는 양상을 보였으며, 특히 ZnPP 단독 처리군에서 현저히 증가하였다 (Fig. 17C-D). 이상의 결과로 HO-1의 활성화에 의해 iNOS의 발현이 억제됨으로써, 그 생산물인 NO의 생성이 감소되는 것을 확인하였다.

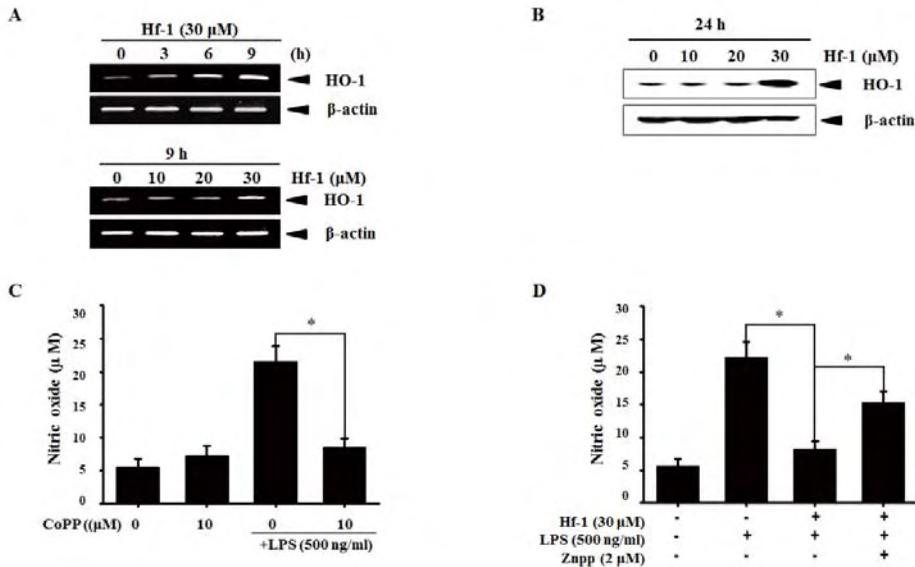


Fig. 17. Hf-1 induces HO-1 protein and mRNA expression in BV2 microglia. A) Cells were treated with Hf-1 (30 μM) for 0-9 h (upper panel) and treated with 0-30 μM Hf-1 for 6 h (lower panel). Total cellular RNA was subjected to RT-PCR and the amount of PCR product was determined using 1.5% agarose gel electrophoresis. β-Actin were used as the internal controls. B) In a parallel experiment, cell lysates were prepared and Western blot analysis was executed using antibodies specific for HO-1 at 24 h. C) Cells were pretreated with 10 μM CoPP for 2 h and then incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. D) Cells were pretreated with 30 μM Hf-1 in the presence or absence of 1 μM ZnPP for 2 h and then incubated with 500 ng/ml LPS for 24 h. The amount of NO production in the medium was measured using the Griess reaction. Data represent the mean ± SE of at least three independent experiments (*, $p < 0.05$ vs. untreated control group).

⑤ Nrf-2 발현에 의한 HO-1에 미치는 Hf-1 영향

HO-1 유전자 발현을 조절하는 전사인자인 Nrf-2는 세포질에서 Keap1과 결합하여 불활성화 되어 있다가 자극에 의해 Keap1이 thiol기를 산화시켜 Nrf-2를 분리시켜 핵내로 translocation 한다. Keap1은 세포질에서 Nrf-2의 붕괴를 막는 역할을 한다. 핵내로 이동한 Nrf-2는 small Maf와 이량체를 이루어 HO-1 유전자 promoter의 antioxidant response element (ARE) 염기서열 부위에 결합함으로써 HO-1의 발현시킨다. 또한 HO-1 발현은 전사 억제인자로 알려져 있는 Bach1의 불활성화가 요구되는데, Bach1은 자극이 없는 경우에는 HO-1 유전자 promoter의 ARE 부위에 결합하고 있다가 자극이 오면 떨어져 세포질로 나가면서

Nrf2/small Maf 이량체가 ARE에 결합이 가능하도록 하여 HO-1 유전자 발현이 된다. Hf-1에 의해서 Nrf2가 활성화 되어 HO-1의 발현을 유도하는지에 확인하기 위해서 EMSA를 실시한 결과, Fig. 18A에서 Hf-1의 농도에 따라 핵내의 Nrf2의 농도가 증가되는 것을 확인하였다. Hf-1에 의하여 Keap1이 thiol기를 산화시켜 Nrf-2을 분리시켜 핵내로 translocation 되는지 확인하기 위해서 핵과 세포질을 분리하여 추출한 후 western blot을 실시하였다. 그 결과 Fig. 18B에서 Hf-1은 Nrf-2를 핵내로 translocation을 한 것을 확인하였다. siRNA를 이용한 Nrf-2의 유전자 발현 억제는 iNOS, HO-1의 발현량을 현저하게 감소시키는 것을 RT-PCR과 NO의 생산량을 측정하여 확인하였다(Fig. 18C-D). 이는 Hf-1에 의해 발현된 Nrf-2가 HO-1을 활성화 시켜 iNOS의 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다.

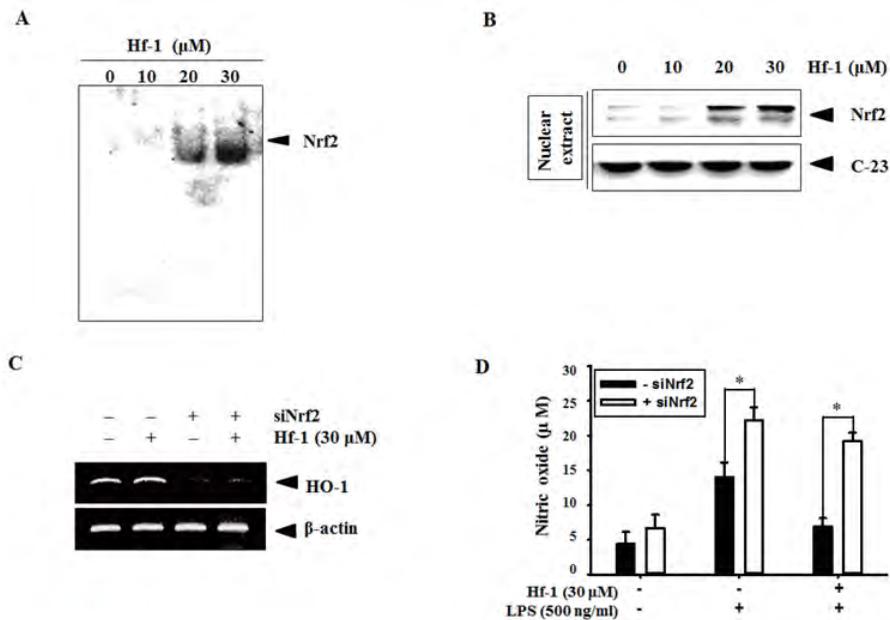


Fig. 18. Hf-1 induces Nrf-2 activity. A) Cells were preincubated with Hf-1 (0-30 μM) for 30 min and the nuclear extracts were assayed for ARE-binding activity of Nrf-2 by EMSA. B) The levels of Nrf-2 in the nuclear were assessed by Western blot analysis at 30 min. C) Cells were transiently transfected with Nrf2 siRNA and then treated with or without Hf-1 for 6 h. Total cellular RNA was isolated and the amount of PCR product was determined onto 1.5% agarose gel electrophoresis. D) In a parallel experiment, cells were transiently transfected with Nrf-2 siRNA for 24 h and then treated the indicated concentration of Hf-1 in the presence or absence of 500 ng/ml LPS. The amount of NO production in the medium was measured using the Griess reaction. Data represent the mean ± SE of at least three independent experiments (*, $p < 0.05$ vs. untreated control group).

(라) LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 cell의 항염증 효과

① Hf-1의 RAW 264.7 cells에 대한 세포독성 여부

HF-1이 RAW 264.7 cells에 독성을 나타내지 않는 조건에서 항염증효과를 조사하기 위해 MTT assay를 시행하여 RAW 264.7 cells의 생존율을 측정하였다. 그 결과 Fig. 19B 에 나타난 바와 같이 HF-1을 단독 처리 시 15 µg/ml 처리군 까지는 Raw 264.7 세포가 90% 이상 생존하여 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 RAW 264.7 cells의 생존율에 큰 영향을 미치지 않는 조건인 15 µg/ml을 최종농도로 하여 LPS (100 ng/ml)를 후처리하여 24시간 경과 후에 생존율을 측정한 결과 Fig. 19C에서 나타난 바와 같이 Hf-1의 모두 생존율이 LPS 단독 처리군에 비해 높은 생존율로 BV2 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다.

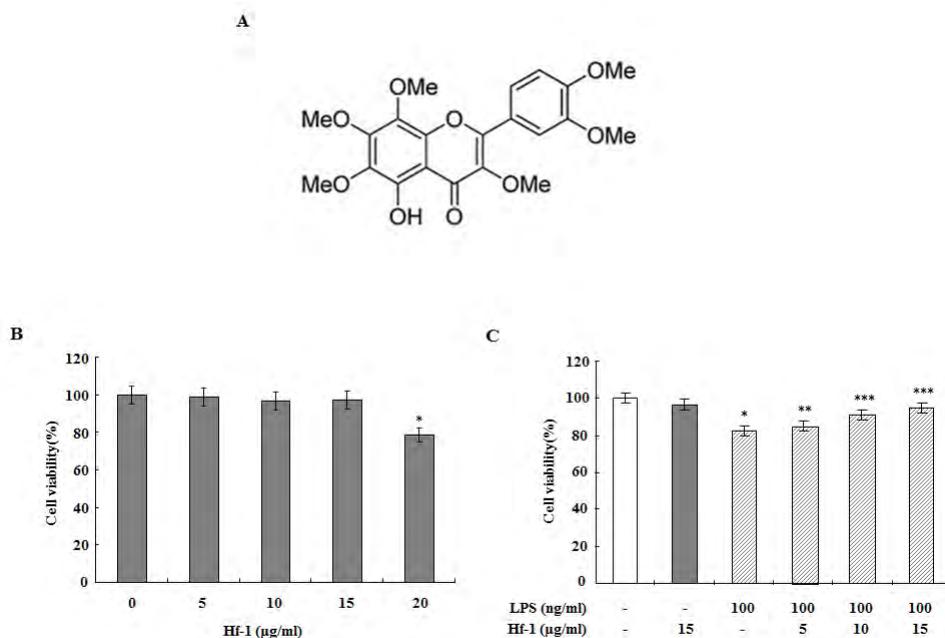


Fig. 19. Effects of Hf-1 on the cell viability of RAW 264.7 cells. A) The chemical structure of Hf-1. (B and C) Cells were treated with the indicated concentrations of Hf-1 alone B) or combination with LPS (100 ng/ml) for 24 h C). Cell viability was assessed using MTT reduction assays, and the results are expressed as the percentage of surviving cells over control cells (no addition of Hf-1). Each value indicates the mean \pm SD and is representative of results obtained from four independent experiments. * $p < 0.001$ vs untreated cells. ** $p < 0.05$ and *** $p < 0.01$ vs LPS alone.

② LPS에 의한 NO와 PGE₂의 생성증가에 대한 Hf-1의 억제효과

RAW 264.7 cells은 LPS에 의해 activation되어 NO(nitric oxide), PGE₂, 전구염증 cytokine을 생성시켜 독성을 유발한다. Hf-1이 LPS로 유도된 NO와 PGE₂의 증가에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Hf-1를 각각 단독 처리(15 µg/ml)하거나, 1시간 선처리 한후 LPS(100 ng/ml)를 처리하여 Griess assay를 통해 NO 생성량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 20A에 나타난 바와 같이 LPS 단독 처리시 현저히 증가했던 NO 생성량이 Hf-1의 처리에 의해 농도 의존적으로 각각 유의하게 감소하여 NO 생성량을 감소시켰다. 다음으로 중요한 염증 매개 산물인 PGE₂의 증가에 Hf-1이 미치는 영향을 조사하였다. NO 측정과 마찬가지로 조건으로 Hf-1를 처

리하여 24시간 경과 후 PGE₂를 측정된 결과, LPS 처리에 의해 급격히 증가했던 PGE₂ 생성량이 Hf-1에 의하여 농도 의존적으로 감소한다 (Fig. 20B). Hf-1은 RAW 264.7 cells에 대해 독성을 나타내지 않는 농도인 15 µg/ml에서 LPS(100 ng/ml)에 의하여 유도된 NO와 PGE₂의 생성 증가를 억제하였다.

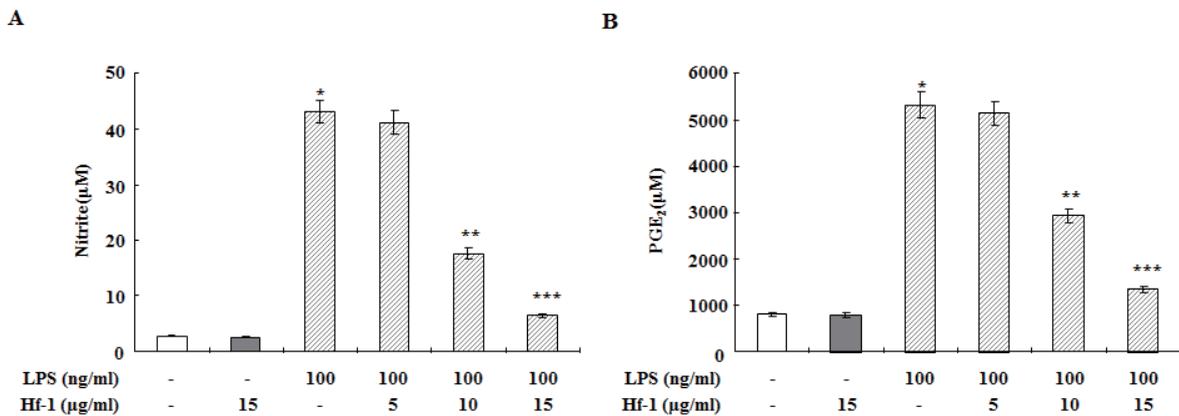


Fig. 20. Inhibition of NO and PGE₂ production by Hf-1 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with various concentrations of Hf-1 (5, 10 and 15 µg/ml) for 1 h before incubation with LPS (100 ng/ml) for 24 h. Nitrite content was measured using the Griess reaction. A) The PGE₂ concentration was measured in culture media using a commercial ELISA kit. B) Each value indicates the mean ± SD and is representative of results obtained from four independent experiments. **p* < 0.001 vs untreated cells. ***p* < 0.05 and ****p* < 0.01 vs LPS alone.

③ LPS에 의한 iNOS와 COX-2의 발현 증가에 대한 Hf-1의 억제효과

염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO 생성하고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하여 혈관 투과성을 증가시켜서 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다. PGE₂는 통증과 발열에 주로 관여하는 염증 인자로서 염증반응이 일어나면 대식세포의 COX-2에 의해 생성된다. 따라서, 염증 반응에서 생성되는 NO, PGE₂와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있다. 따라서 Hf-1의 RAW 264.7 cells에 대한 NO와 PGE₂ 생성 억제 효과가 이들을 만들어내는 유전자의 mRNA 및 단백질 변화와의 관련성을 알아보기 위하여 Fig. 21에서 각각 NO와 PGE₂를 생산한다고 알려진 iNOS와 COX-2 유전자의 변화를 RT-PCR과 Western blot으로 관찰하였다. 그 결과 iNOS와 COX-2 유전자의 mRNA 및 단백질 발현이 LPS에 의해 증가하였으나 Hf-1을 처리하자 농도 의존적으로 감소하였다. Hf-1은 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켜 NO와 PGE₂ 생성을 억제한다.

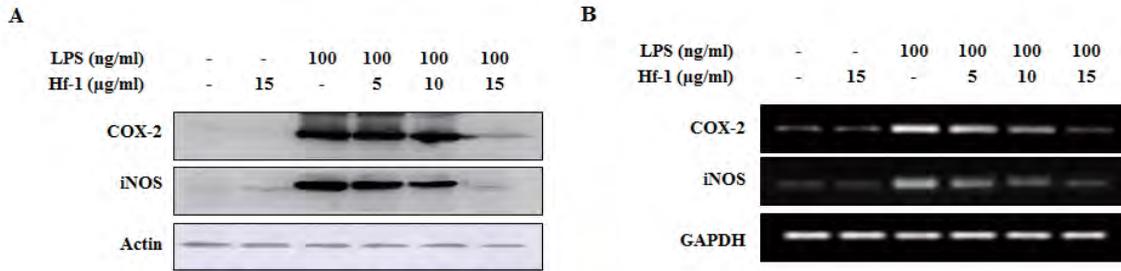


Fig. 21. Inhibition of iNOS and COX-2 expression by Hf-1 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. A) RAW 264.7 macrophage were pre-treated with Hf-1 (5, 10 and 15 µg/ml) 1 h prior to incubation with LPS (100 ng/ml) for 24 h. Cell lysates were then prepared and Western blots were performed using an antibody specific for murine iNOS and COX-2. B) Total RNA was prepared for RT-PCR analysis of iNOS and COX-2 gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Actin and GAPDH were used as internal controls for the western blot analysis and RT-PCR assays, respectively. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

④ LPS에 의한 염증성 cytokine 생성량 증가에 대한 Hf-1의 억제효과

염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)은 염증을 나타내는 중요한 지표이다. IL-1β는 interleukin 1 cytokine family의 하나로 염증반응을 매개하며 세포증식과 분화 및 apoptosis 등에 관련된 중요한 작용을 하며 중추신경계에서는 COX-2를 유도하여 염증성 통증과 관련되어 기여하며, TNF-α(tumor necrosis factor alpha)도 전신성 염증에서 급성 단계의 발증과 관련된 사이토카인이다. 따라서 RAW 264.7 cells에서 Hf-1이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인에 미치는 영향을 ELISA를 관찰하였다. 그결과 Hf-1은 LPS 처리에 의하여 증가된 TNF-α와 IL-1β의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었으며, 동시에 그들의 mRNA의 발현을 억제함을 확인하였다 (Fig. 22). 이러한 결과로 미루어 볼 때 Hf-1은 TNF-α와 IL-1β의 유전자 발현을 조절해서 최종적으로 NO와 PGE2의 활성을 저해하는 것으로 판단된다.

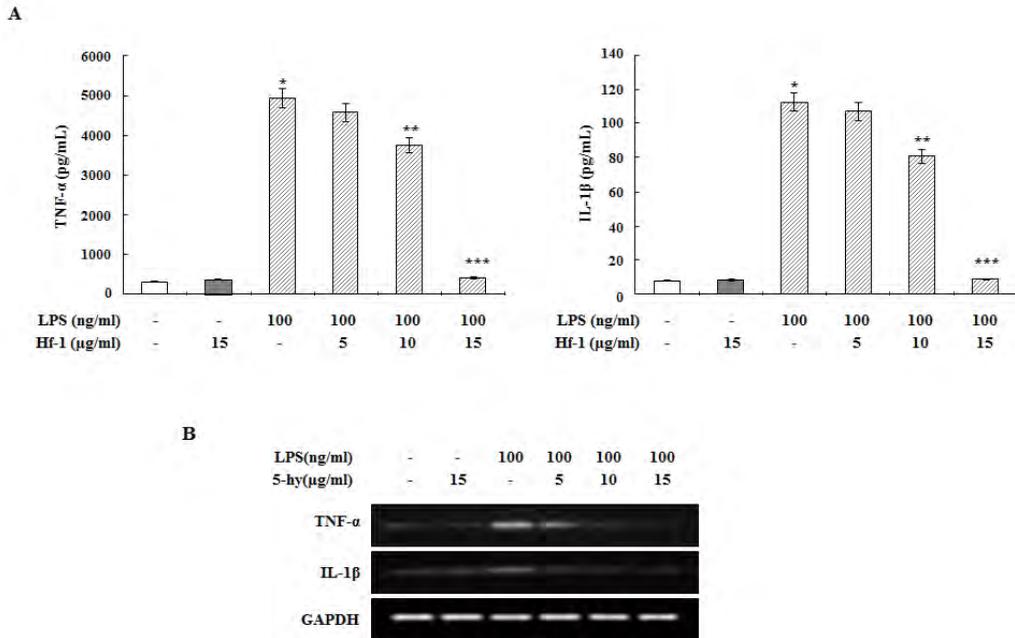


Fig. 22. Effects of Hf-1 on LPS-stimulated TNF- α and IL-1 β expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with Hf-1 (5, 10 and 15 μ g/ml) for 1 h before LPS treatment (100 ng/ml), and the total RNA and supernatants were isolated at 24 h after LPS treatment, respectively. A) The levels of IL-1 β and TNF- α present in the supernatants were measured. B) The levels of IL-1 β and TNF- α mRNA were determined using RT-PCR. Each value indicates the mean \pm S.D. and is representative of results obtained from four independent experiments. * p < 0.001 vs untreated cells. ** p < 0.05 and *** p < 0.01 vs LPS alone.

⑤ LPS에 의한 NF- κ B translocation에 미치는 Hf-1의 영향

iNOS와 COX-2 유전자의 발현을 조절하여 염증반응을 매개하는 전사인자로 알려진 NF- κ B의 활성을 조사하였다. NF- κ B는 I κ B와 결합하여 불활성화 상태로 세포질에 존재하고 있다가 자극에 의하여 I κ B와 분리되면서 subunit인 p65가 핵으로 translocation되어, iNOS, COX-2, IL-1 β , TNF- α 를 포함한 다양한 세포증식 및 염증 매개 유전자들의 전사를 활성화시킨다. 세포질과 핵을 분리하여 관찰한 결과(Fig. 23), LPS처리 15분부터 30분까지 핵 내에 NF- κ B의 subunit인 p65가 증가하였으나, Hf-1에 의해 억제되었으며, 세포질에서는 이와 반대로 LPS 처리로 감소했던 p65가 Hf-1에 의해 다시 증가되었다. 세포질에서 NF- κ B와 결합하여 NF- κ B를 불활성화 시키는 I κ B도 LPS에 의해 분해되었다가 Hf-1 처리 시 다시 회복되었다. 이것으로 LPS로 유도된 iNOS, COX-2, IL-1 β , TNF- α 의 발현 증가가 HF-1에 의해 억제되며, 이는 Hf-1이 NF- κ B의 전사활성을 억제하여 이들 유전자의 발현을 저해한 결과임을 확인하였다.

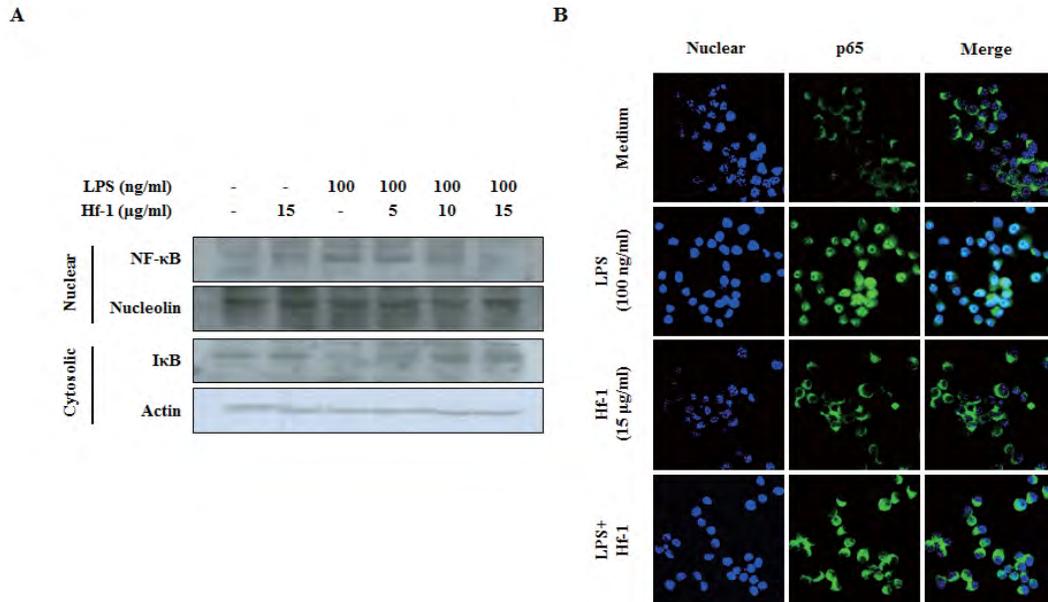


Fig. 23. Effects of Hf-1 on NF-κB pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. A) Cells were treated with Hf-1 (5, 10 and 15 μg/ml) for 1 h before LPS treatment (100 ng/ml) for the 15 min. Equal protein was subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Western blotting using anti-NF-κB p65 and IκB-α. Results are representative of those obtained from three independent experiments. B) RAW 264.7 macrophage cells were pre-treated with 15 μg/ml Hf-1 for 1 h prior to stimulation with LPS (100 ng/ml) for 1 h. p65 protein localization was determined using an anti-p65 antibody and an FITC-labeled anti-rabbit IgG antibody, and cells were visualized using laser confocal scanning microscopy. A representative of three independent experiments is shown.

아. 토마토의 기능성을 이용한 기능성 토마토 제품의 개발

(1) 이론적, 실험적 접근 방법

Lycopene은 1 kg의 신선하고 잘 익은 토마토에서 0.02 g 정도 함유되어 있는 진한 적색의 침상결정이며 성질은 카로틴과 비슷하다. Lycopene은 세포의 대사에서 생기는 활성화 산소와 결합해 몸 밖으로 배출하는 역할을 함으로 토마토가 인체세포의 노화를 방지하는 것으로 알려져 있다. 또한 Lycopene은 전립선암을 비롯한 각종 암 발생 위험을 현저히 줄이고, 동맥의 노화진행을 늦추는 것으로 보고되었고, 토마토의 항암효과는 항암 특효물질로 알려진 베타-카로틴보다 강력한 것으로 발표되었다. 이런 유용한 Lycopene을 토마토에서 분자 생물학적 방법이 아니라 재배 시에 특정 미생물이나 호르몬을 처리하여 Lycopene의 함량을 높이는 재배방법을 연구하였다. Lycopene의 함량이 높은 토마토를 재배 하는 방법을 찾기 위하여 다양한 논문 찾아 보던 중 고려대 김기덕 교수(Sang et al. 2008)과 강원대 송홍규 교수(Lee et al. 2008)의 논문에서 사용되어진 박테리아가 Lycopene의 함량에 관련이 있는 것으로 확인되어 분양을 받았다. Rhodospseudomonas sp. strain KL9은 강원대 송홍규 교수님으로 부터 분양받았고, Phytophthora capsici strain GSE09, ISE14은 고려대 김기덕 교수님으로 부터 분양 받아 실험을 수행하였다. 분양 받은 박테

리아 (*Rhodospseudomonas* KL9, *Phytophthora capsici* ISE14, GSE09)와 일반 적인 이차대사 산물의 유도체로 사용되어지는 Elicitor (Killed *Botrytis*, *E.coli*, 5% Yeast extract, 5mg/ml Chitin)를 토마토 재배시 처리 하여 화방별 숙기별로 토마토를 수확하여 lycopene의 함량을 측정하였다. 그리고, Lycopene의 함량을 확인하는 것과 함께 Lycopene 생합성(Fig. 1)에 관여하는 PSY1, PSY2, PDS, ZDS1, ZDS2, LCY-b, LCY-e 유전자의 발현과 Lycopene의 함량과의 상관관계에 대해 연구하였다.

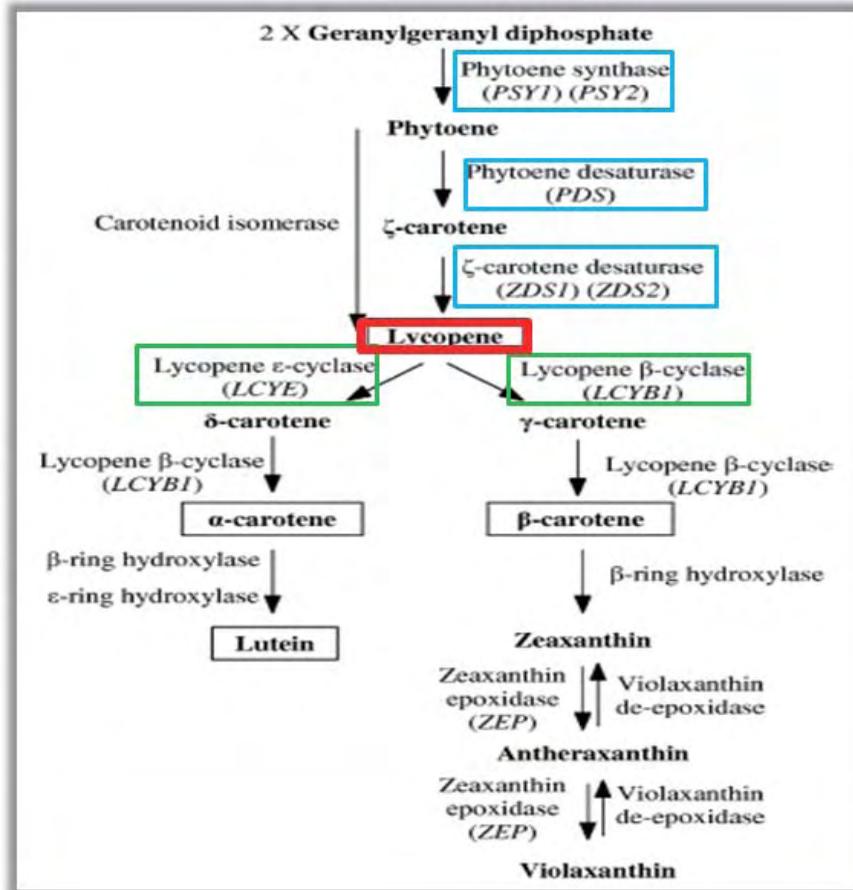


Fig. 1. Lycopene 생합성과정 도식도.

(2) 실험재료 및 방법

(가) 토마토 재배 및 elicitor 및 Bacteria 접종

1년차에는 부산광역시 농업기술센터 방문하여 김재숙 소장, 박우청 실장, 유미복 계장, 김영석 박사등과 토마토 실험의 진행 과정과 농민과의 연계실험을 논의 후, 대저 토마토 농가에서 9월 10-15일경에 토마토 종자를 파종하여, 55-60일 정도 키운 후 11월5-10일경 정식을 하였고, 같은 방법으로 학교 온실에서 동시에 실험을 진행하였다(Fig. 2).



Fig. 2. 대저 농가와 학교 온실에서 정식 및 Bacteria 처리. A: 대저 농가 토마토 하우스 B: 토마토 묘종 (파종 후 1개월); C, D: 대저 하우스 정식 E: 학교 온실에서 정식 F,G,H: *Phytophthora capsici* ISE14, GSE09 접종

정식과 함께 Bacteria (*Rhodopseudomonas* sp. strain KL9, *Phytophthora capsici* ISE14, GSE09)를 토양에 바로 접종하였다. 이 후 매 2주에 한번씩 1화방의 종자가 익기 시작하는 시기까지 총 4번을 elicitor를 처리 후 잎 시료를 채취하였다(Fig. 3). 잎 시료를 채취 후 익기 시작한 토마토를 그림 4에서와 같이 익는 stage별로 수확하였다.



Fig. 3. Elicitor 처리. A-E: 정식 후 첫번째 화방의 꽃이 피었을 시기부터 Elicitor을 처리(2주에 한번씩 4번 처리). F-I: 처리 후 2주 간격으로 잎 시료 채취.>

대저에서 총 90개(2-4화방), 학교 온실에서 12개(1-4화방)의 종자를 수확하였다(Table 1, 2). 이 후 수확한 토마토 종자는 lycopene 함량 측정과 RNA를 추출하여 유전자의 발현 그리고 당도 측정을 수행하였다. 그리고 2-3년차에는 1년차 실험결과에서 Lycopene의 함량증가와 유전자의 발현이 증가하는 균주 위주로 정밀 실험을 수행하기 위하여 학교 온실에서 실험을 진행하였다. 2년차에는 3가지 균주와 chitin을 처리하여 실험을 진행하였고(Table 3), 3년차에는 3가지 균주만을 처리하여 실험을 진행하였다.



Fig. 4. 토마토 수확. A: ripening stage 별 토마토, B: 수확 시기의 토마토, C: 수확 후 토마토

Table 1. 2011년 대저농가에서 수확한 토마토 list

sample number	처리			sample number	처리		
대저-1	2회방	control	stage1	대저-46	3회방	Yeast extract(5%)-spray	stage1
대저-2			stage2	대저-47			stage2
대저-3			stage3	대저-48			stage3
대저-4		ISE14(OD600=0.5)	stage1	대저-49		Sodium acetate(10mM)-spray	stage1
대저-5			stage2	대저-50			stage2
대저-6			stage3	대저-51			stage3
대저-7		GSE09(OD600=0.5)	stage1	대저-52		Botrytis(kill)-spray	stage1
대저-8			stage2	대저-53			stage2
대저-9			stage3	대저-54			stage3
대저-10		MgSO4(10mM)	stage1	대저-55		E.coli(OD600=0.5)-spray	stage1
대저-11			stage2	대저-56			stage2
대저-12			stage3	대저-57			stage3
대저-13		Chitin(5mg/ml)-spray	stage1	대저-58		MgSO4(10mM)-spray	stage1
대저-14			stage2	대저-59			stage2
대저-15			stage3	대저-60			stage3
대저-16		Yeast extract(5%)-spray	stage1	대저-61		control	stage1
대저-17			stage2	대저-62			stage2
대저-18			stage3	대저-63			stage3
대저-19		Sodium acetate(10mM)-spray	stage1	대저-64		ISE14(OD600=0.5)	stage1
대저-20			stage2	대저-65			stage2
대저-21			stage3	대저-66			stage3
대저-22		Botrytis(kill)-spray	stage1	대저-67		GSE09(OD600=0.5)	stage1
대저-23			stage2	대저-68			stage2
대저-24			stage3	대저-69			stage3
대저-25		E.coli(OD600=0.5)-spray	stage1	대저-70		MgSO4(10mM)	stage1
대저-26			stage2	대저-71			stage2
대저-27			stage3	대저-72			stage3
대저-28		MgSO4(10mM)-spray	stage1	대저-73		Chitin(5mg/ml)-spray	stage1
대저-29			stage2	대저-74			stage2
대저-30			stage3	대저-75			stage3
대저-31	3회방	control	stage1	대저-76	4회방	Yeast extract(5%)-spray	stage1
대저-32			stage2	대저-77			stage2
대저-33			stage3	대저-78			stage3
대저-34		ISE14(OD600=0.5)	stage1	대저-79		Sodium acetate(10mM)-spray	stage1
대저-35			stage2	대저-80			stage2
대저-36			stage3	대저-81			stage3
대저-37		GSE09(OD600=0.5)	stage1	대저-82		Botrytis(kill)-spray	stage1
대저-38			stage2	대저-83			stage2
대저-39			stage3	대저-84			stage3
대저-40		MgSO4(10mM)	stage1	대저-85		E.coli(OD600=0.5)-spray	stage1
대저-41			stage2	대저-86			stage2
대저-42			stage3	대저-87			stage3
대저-43		Chitin(5mg/ml)-spray	stage1	대저-88		MgSO4(10mM)-spray	stage1
대저-44			stage2	대저-89			stage2
대저-45			stage3	대저-90			stage3

Table 2. 2011년 학교 온실에서 수확한 토마토 list

sample number	처리			sample number	처리		
온실-1	1화방	control	stage1	온실-61	3화방	control	stage1
온실-2			stage2	온실-62			stage2
온실-3			stage3	온실-63			stage3
온실-4		ISE14(OD600=0.5)	stage1	온실-64		ISE14(OD600=0.5)	stage1
온실-5			stage2	온실-65			stage2
온실-6			stage3	온실-66			stage3
온실-7		GSE09(OD600=0.5)	stage1	온실-67		GSE09(OD600=0.5)	stage1
온실-8			stage2	온실-68			stage2
온실-9			stage3	온실-69			stage3
온실-10		MgSO4(10mM)	stage1	온실-70		MgSO4(10mM)	stage1
온실-11			stage2	온실-71			stage2
온실-12			stage3	온실-72			stage3
온실-13		Chitin(5mg/ml)-spray	stage1	온실-73		Chitin(5mg/ml)-spray	stage1
온실-14			stage2	온실-74			stage2
온실-15			stage3	온실-75			stage3
온실-16		Yeast extract(5%)-spray	stage1	온실-76		Yeast extract(5%)-spray	stage1
온실-17			stage2	온실-77			stage2
온실-18			stage3	온실-78			stage3
온실-19		Sodium acetate(10mM)-spray	stage1	온실-79		Sodium acetate(10mM)-spray	stage1
온실-20			stage2	온실-80			stage2
온실-21			stage3	온실-81			stage3
온실-22		Botrytis(kill)-spray	stage1	온실-82		Botrytis(kill)-spray	stage1
온실-23			stage2	온실-83			stage2
온실-24			stage3	온실-84			stage3
온실-25		E.coli(OD600=0.5)-spray	stage1	온실-85		E.coli(OD600=0.5)-spray	stage1
온실-26			stage2	온실-86			stage2
온실-27			stage3	온실-87			stage3
온실-28		MgSO4(10mM)-spray	stage1	온실-88		MgSO4(10mM)-spray	stage1
온실-29			stage2	온실-89			stage2
온실-30			stage3	온실-90			stage3
온실-31		2화방	control	stage1		온실-91	4화방
온실-32	stage2			온실-92	stage2		
온실-33	stage3			온실-93	stage3		
온실-34	ISE14(OD600=0.5)		stage1	온실-94	ISE14(OD600=0.5)	stage1	
온실-35			stage2	온실-95		stage2	
온실-36			stage3	온실-96		stage3	
온실-37	GSE09(OD600=0.5)		stage1	온실-97	GSE09(OD600=0.5)	stage1	
온실-38			stage2	온실-98		stage2	
온실-39			stage3	온실-99		stage3	
온실-40	MgSO4(10mM)		stage1	온실-100	MgSO4(10mM)	stage1	
온실-41			stage2	온실-101		stage2	
온실-42			stage3	온실-102		stage3	
온실-43	Chitin(5mg/ml)-spray		stage1	온실-103	Chitin(5mg/ml)-spray	stage1	
온실-44			stage2	온실-104		stage2	
온실-45			stage3	온실-105		stage3	
온실-46	Yeast extract(5%)-spray		stage1	온실-106	Yeast extract(5%)-spray	stage1	
온실-47			stage2	온실-107		stage2	
온실-48			stage3	온실-108		stage3	
온실-49	Sodium acetate(10mM)-spray		stage1	온실-109	Sodium acetate(10mM)-spray	stage1	
온실-50			stage2	온실-110		stage2	
온실-51			stage3	온실-111		stage3	
온실-52	Botrytis(kill)-spray		stage1	온실-112	Botrytis(kill)-spray	stage1	
온실-53			stage2	온실-113		stage2	
온실-54			stage3	온실-114		stage3	
온실-55	E.coli(OD600=0.5)-spray		stage1	온실-115	E.coli(OD600=0.5)-spray	stage1	
온실-56			stage2	온실-116		stage2	
온실-57			stage3	온실-117		stage3	
온실-58	MgSO4(10mM)-spray		stage1	온실-118	MgSO4(10mM)-spray	stage1	
온실-59			stage2	온실-119		stage2	
온실-60			stage3	온실-120		stage3	

Table 3. 2012년 학교 온실에서 수확한 토마토 list>

		control	KL9	ISE14	GSE09	Chitin
2화방	stage 1	1	2	3	4	5
	stage 2	6	7	8	9	10
	stage 3	11	12	13	14	15
3화방	stage 1	16	17	18	19	20
	stage 2	21	22	23	24	25
	stage 3	26	27	28	29	30
4화방	stage 1	31	32	33	34	35
	stage 2	36	37	38	39	40
	stage 3	41	42	43	44	45

(3) 연구결과 및 고찰

(가) Lycopene 합성에 관련된 유전자의 발현 유무 확인.

Fig. 5의 1-3에서와 같이 3개의 stage를 정하여 토마토를 수확하였고, Lycopene 생합성과정에서 PSY1, PSY2, PDS, ZDS1, ZDS2, LCY-b, LCY-e 유전자의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 최초 PSY1, DXS, LCY-b, LCY-e 의 유전자의 발현이 토마토가 익어 가면서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 후 대조구인 처리를 하지 않은 토마토와 처리구를 비교하여 PSY1, PSY2, PDS, ZDS1, ZDS2 유전자의 발현량은 증가하고, LCY-b, LCY-e의 발현이 감소하는 처리구를 찾기 위해 실험을 진행하였다.

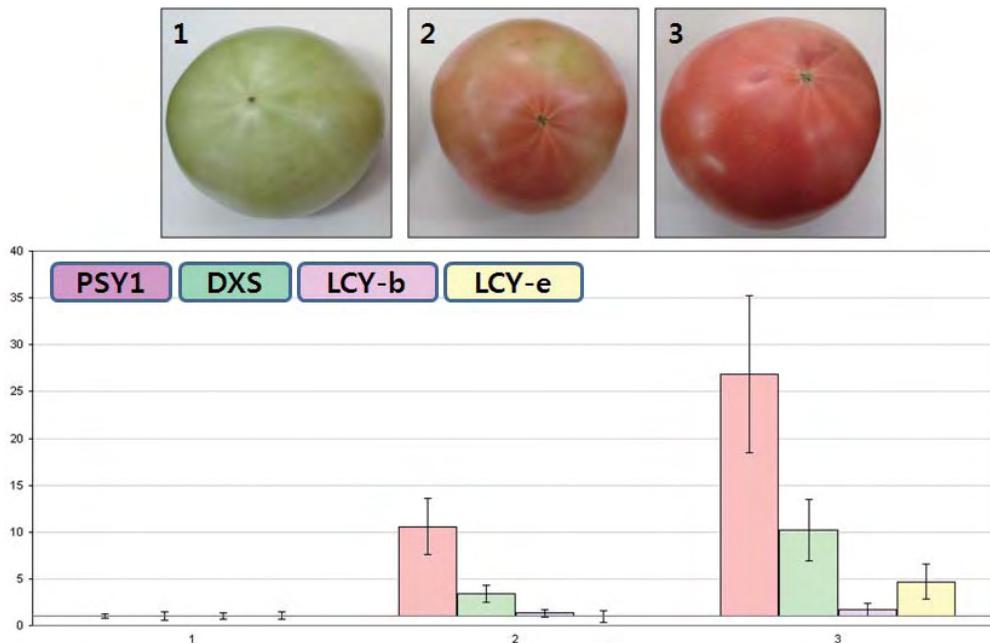


Fig. 5. 토마토 종자 disc에서 RNA를 추출하여 PSY1, DXS, LCY-b, LCY-e 유전자의 발현을 RT-PCR로 확인. 토마토가 익어 가면서 네 유전자가 증가 함을 확인할 수 있다.

2011년 봄 각 처리구 별로 익은정도에 따라 3개의 stage로 분리하여 수확한 토마토를 이용하여 lycopene 합성에 관여하는 Phytoene synthase (PSY1, PSY2), Phytoene desaturase (PDS), zeta-carotene desaturase (ZDS), Lycopene cyclase (LCYE, LCYB)의 유전자의 발현 정도를 real-time PCR을 이용하여 확인하였다 (Fig. 6, 7).

Fig. 6은 전 처리구의 숙기별 화방별 유전자의 발현을 확인하였는데 완숙토마토에서 유전자의 발현이 상대적으로 증가하였고, 또한 박테리아를 처리한 샘플에서 유전자의 발현 변화를 확인하였고, 이에 박테리아 처리구에서만 다시 RNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하였다(Fig. 7). 그 결과 박테리아를 처리한 샘플에서 lycopene 합성에 관련된 phytoene synthase의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 얻은 결과를 토대로 유전자의 발현이 증가한 처리구의 완숙 토마토를 이용하여 Lycopene의 함량을 측정하였다.

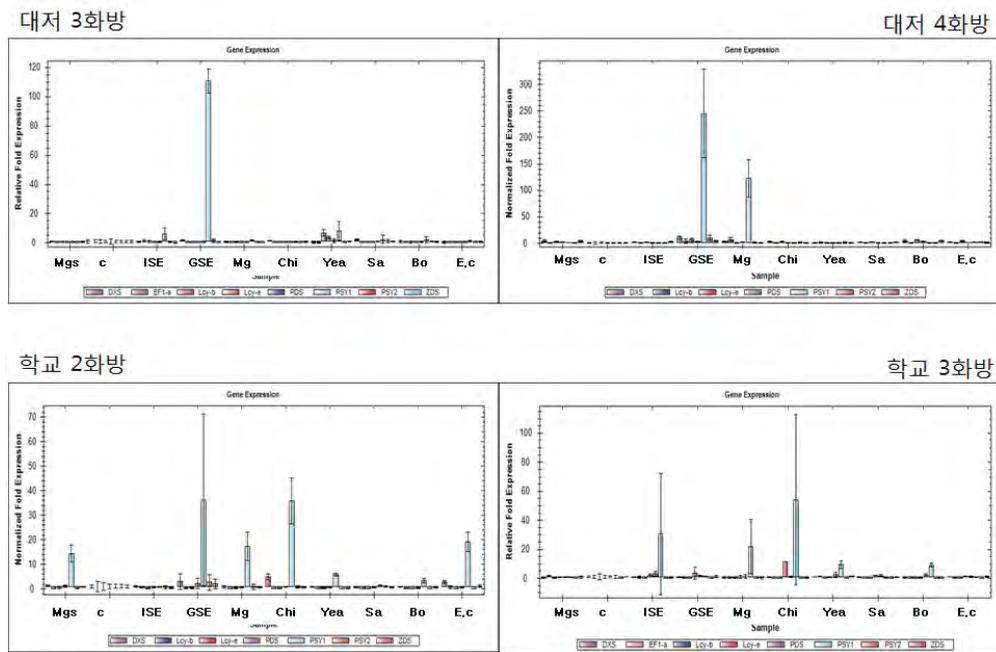


Fig. 6. 9개 처리구에서 수확한 완숙 토마토에서 Lycopene 합성에 관련된 7개의 유전자의 발현을 real-time PCR로 확인

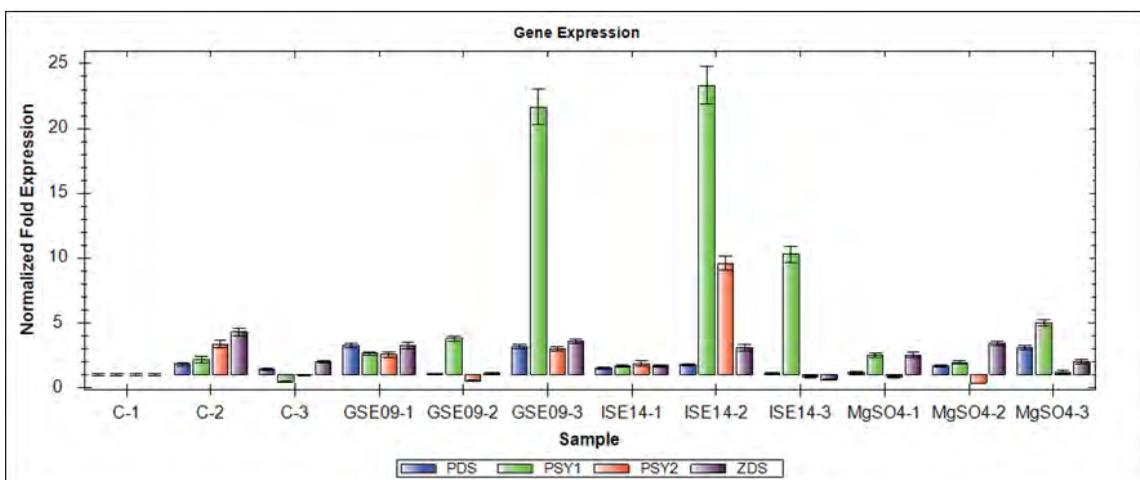


Fig. 7. Bacteria (ISE14, GSE09) 를 처리한 토마토 샘플의 각각의 stage에서 유전자의 발현을 real-time PCR로 확인

2년차에도 같은 방법으로 실험을 수행하였다. PSY1 유전자의 발현이 증가했던 3개의 처리구인 ISE14, GSE09, Chitin과 1년차에서는 분양받지 못했던 KL9을 포함하여 총 4개의 처리구에서 3개의 다른 토마토의 숙기에 따른 유전자의 발현을 확인 하였다. 4개의 처리구에서 Lycopene의 합성에 관련된 유전자의 발현을 real-time PCR을 이용하여 확인 하였다(Fig. 8).

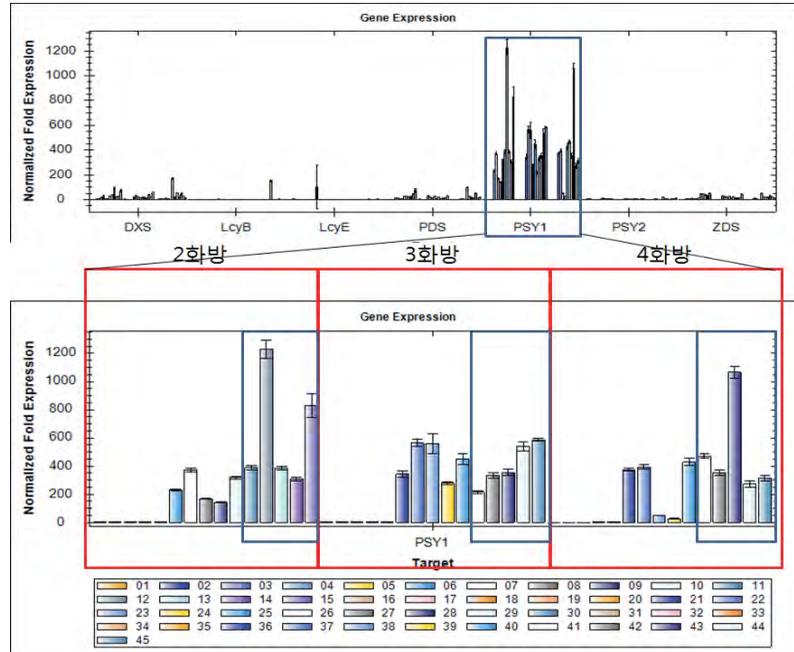


Fig. 8. Bacteria (ISE14, GSE09, KL9)와 Chitin을 처리한 토마토 샘플의 각각의 stage에서 유전자의 발현을 real-time PCR로 확인

Fig. 8.에서 3개의 박테리아와 하나의 elicitor인 chitin을 처리한 토마토에서 lycopene 합성에 관여하는 Phytoene synthase 1의 발현양이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 3년차에서는 3개의 박테리아만을 이용하여 실험을 진행하였다. 이전 연차와는 달리 완숙 토마토만을 수확하여 실험을 진행하였다. 그 결과 그림 9에서처럼 이전결과와 마찬가지로 박테리아를 처리한 토마토의 경우 Phytoene synthase 1의 발현양이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과로 박테리아를 처리하게 되면 lycopene 합성에 관여하는 유전자의 발현이 증가함을 확인 할 수 있다.

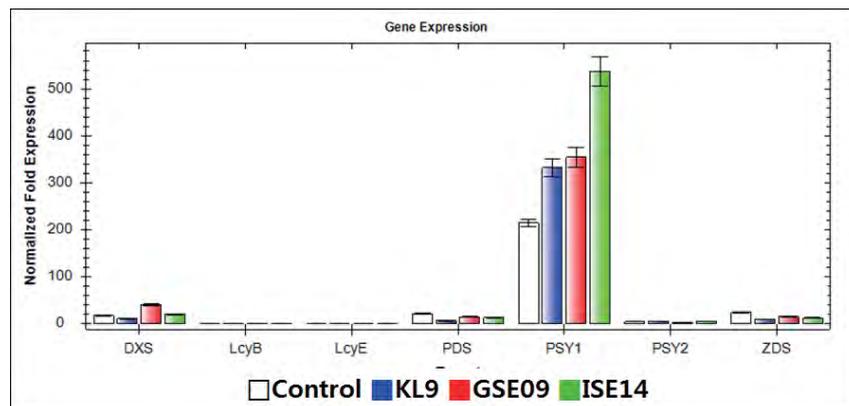


Fig. 9. Bacteria (ISE14, GSE09, KL9)를 처리한 완숙 토마토 샘플에서 유전자의 발현을 real-time PCR로 확인

(나) Lycopene 함량 측정 및 기초 농업형질 조사

토마토를 재배 과정에 박테리아를 처리하게 되면 lycopene의 합성에 관여하는 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그래서 유전자의 발현 증가가 lycopene의 함량 증가에 영향을 주는지 확인 하기 위하여 lycopene 함량을 완숙토마토를 이용하여 측정하였다(Fig. 10). 다른 elicitor를 처리한 토마토에서는 유전자의 발현이 큰차이가 없는것과 비슷하게 lycopene의 함량 역시 차이를 보여 주지 않았다. 하지만 박테리아를 처리하여 재배한 완숙토마토에서는 lycopene의 함량이 크게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

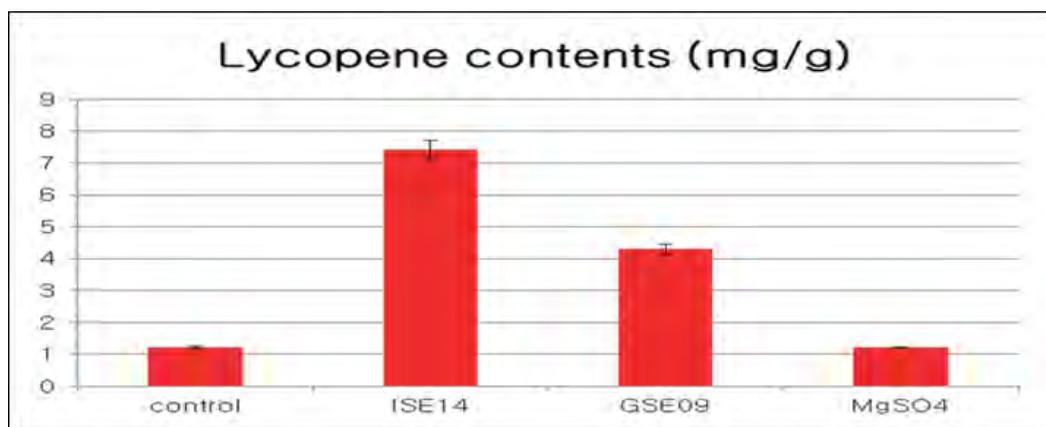


Fig. 10. 완숙 토마토에서 Lycopene의 함량 측정

그리고 이전 연구 논문에서처럼 수확량에서도 차이를 보이는지 확인하기 위하여 2년(2012-2013)에 걸쳐 토마토 기초 농업형질조사를 수행하였다(Table 5). 그 결과 기본 적인 생육형태 및 수확량에서는 큰 차이를 보여 주지 않고 있음을 확인할 수 있었다.

Table 4. 토마토 기초 농업형질 조사

	초장(cm)	경경(cm)	과중(g)	과장(cm)	과폭(cm)	당도(Brix°)	생체중(g)
C	114.4±6.9	1.0±0.01	164.4±48.8	5.2±0.7	6.5±0.7	5.9±0.08	1170±100.4
KL9	113.8±4.2	1.0±0.01	220.7±7.8	6.1±0.3	7.1±0.3	6.0±0.07	1262±33.1
GSE09	115.6±5.2	1.0±0.008	220.6±6.7	6.1±0.2	7.2±0.2	6.0±0.08	1264±48.8
ISE14	118.8±2.7	0.9±0.01	220.5±9.2	6.0±0.3	7.1±0.3	6.0±0.06	1279±45.8

이것으로 토마토를 재배하는데 있어 본 실험에서 이용한 세가지의 박테리아를 처리하게 되면 수확량에서는 큰 차이를 찾을 수 없지만, lycopene의 합성에 관여하는 유전자의 발현이 증가함으로 인해 lycopene의 함량도 증가한 토마토를 생산할 수 있을 것이다. 이는 현재 많이 이용되고 있는 분자생물학적 방법을 이용하지 않고 순수 무해한 토양 미생물을 재배시에 첨가해 주는 것 만으로도 유용 물질인 lycopene을 다량 함유한 토마토를 생산할 수 있다는데 의의가 있을 것이다.

자. 농산물 소재 기능성 제품의 제조

(1) 실험재료 및 방법

(가) 기능성 웰빙 국수 제조

① 재료 및 국수 제조

쌀은 도정한 백미와 현미를 농협에서 구입하였으며, 소금은 천일염을 농협에서 구매하여 사용하였다. 발효 쌀국수는 SM제분에서 제조하였다. 발효 쌀국수의 제조는 쌀을 효모를 사용하여 발효·숙성시킨 다음 이를 분쇄하여 발효쌀가루를 준비하였다. 발효쌀가루, 물, 소금을 Table 1의 배합비로 배합한 다음 반죽하였다. 반죽한 쌀 반죽물을 30~35℃의 온도에서 6시간 숙성하여 성형기에 반죽을 성형한 제면기를 사용하여 면을 제조하였다 (Fig. 1). 실험은 쌀 국수 (RN), 발효 쌀 국수 (FRN), 현미국수 (BN), 발효 현미국수 (FBN)의 총 4종을 제조하여 본 실험의 재료로 사용하였다 (Fig. 2).

Table 1. Mixing ration used in rice noodle dough processing.

Sample	Rice flour (g)	Salt (g)	Water (ℓ)
Rice noodle (RN)	75	0.7	25
Fermented Rice noodle (FRN)	75	0.7	25
Brown Rice noodle (BN)	75	0.7	25
Fermented Brown Rice noodle (FBN)	75	0.7	25

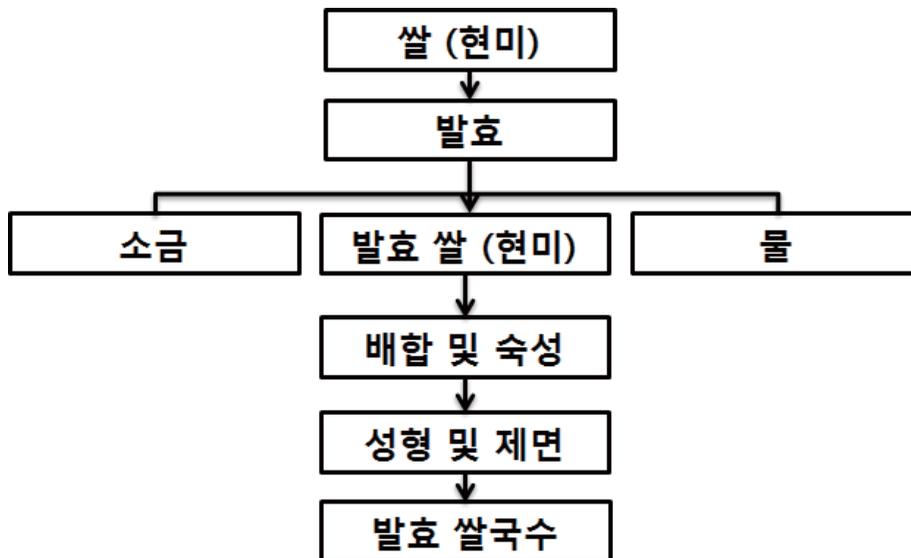


Fig. 1. The manufacture process of fermented noodle.



Fig. 2. Photograph of noodles

② 일반성분 분석 및 색도분석

제조된 발효 쌀국수는 식품공전의 시험법에 따라서 열량, 조단백, 조지방, 조지질, 콜레스테롤, 당, 염, 탄수화물을 분석하였으며 이는 부경푸드바이오센터에서 분석을 실시하였다. 수분측정은 105°C 상압건조법을 통하여 측정하였다. 색도는 색차계(UltraScan XE, HunterLab, USA)를 이용하여 Hunter값의 명도(L), 적색도(a), 황색도(b)를 측정하였다. 실험은 5회 반복하여 측정된 평균치로 나타내었다.

③ 국수의 중량, 부피, 흡수율 및 국물의 탁도 측정

국수 중량 10 g을 300 ml의 끓는물에 넣고 3분간 조리한 후 건져내어 냉수에 1분간 냉각시킨 후 10분간 물을 뺀 무게로 계산하였다. 국수의 부피는 중량을 측정한 직후 500 ml 메스실린더에 300 ml의 증류수를 담아 국수를 넣은 후 증가하는 물의 부피로 계산하였다. 조리국수의 흡수율은 조리 후 건져낸 국수의 중량에서 생국수의 중량을 빼고 다시 생국수의 중량을 나눈 후 100을 곱하여 구하였다. 조리 후 국물의 탁도는 spectrophotometer를 사용하여 675 nm에서 측정하여 그 흡광도를 나타내었다.

④ 국수의 조직감 측정

발효 쌀국수의 조직감은 rheometer (Compac-100, Sun Scientific, Japan)을 사용하여 측정하였다. 국수의 물리적인 특성은 hardness, cohesiveness, springness, gumminess 및 brittleness를 측정하였으며, 측정조건은 table 2와 같다. 사용된 시료의 크기는 국수 1가닥씩 2×2×30의 크기로 절단하여 직경 20 mm의 원형 probe plunger를 사용하여 같은 시료를 두 번

누를 때 얻어지는 texturometer curve로부터 얻어지는 값을 분석하여 texture 측정치를 계산하였다.

Table 2. Measurement conditions of Rheometer

Parameters	Conditions
Table speed (mm/min)	60.00
Chart speed (mm/sec)	50.00
Critical dia (mm)	20.00
Load cell (kg)	10.00
Sample height (mm)	2.00
Sample width (mm)	2.00
Span length (mm)	30.00

⑤ 조리국수의 관능평가

발효 쌀국수 조리면의 관능평가는 색, 맛, 향, 조직감, 전체적인 기호도의 평가항목에 따라 동아대학교의 20~30대 15명을 상대로 실시하였다. 시료는 발효 쌀국수를 3분간 조리하여 흐르는 물에 냉각시킨 후 건져서 물기를 제거한 다음 즉시 관능용 검사시료로 사용하였다. 평가는 평점법으로 최고 7점 최저 1점으로 7단계 평가하여 통계 처리하였다.

(나) 토마토를 이용한 기능성 고추장의 개발

① 실험재료

퓨레제조에 사용된 토마토는 대저완숙토마토를 구입하였으며, 고추장제조에 사용된 일반재료로서 고춧가루는 선비마을고춧가루, 찹쌀가루와 엿질금은 산과들천연마을, 메주가루는 하늘가애, 소금은 하늘가애에서 천일염을 구입하여 사용하였다.

② 토마토 퓨레 조청 제조

토마토 퓨레는 토마토 100 kg를 꼭지를 제거하여 수세하여 끓는 물에 데쳐서 믹서기로 믹서한다. 이를 60℃의 농축기에서 3배 농축하여 퓨레를 제조한다. 조청은 엿기름과 찹쌀을 넣고 삭혀서 이를 3배정도 농축하여 제조하였다. 이를 1:1의 비율로 혼합하여 토마토 퓨레 조청을 만들어서 사용하였다 (Fig. 3).



Fig. 3. The production methods of tomato puree

③ 고추장의 제조

고추장의 제조는 table 3의 비율대로 고춧가루, 메주가루, 소금, 물, 토마토 퓨레 조청을 첨가하여 Fig. 4의 방법대로 제조하였으며, 제조된 고추장은 멸균한 항아리에 넣어 25°C에서 60일간 발효하였다. 토마토 퓨레 조청의 발효의 최적 조건을 확인하기 위해 소금의 농도를 달리해 최적의 발효조건을 설정하였다. 제조된 토마토 고추장은 0, 15, 30, 45, 60일에 일정량을 취하여 실험재료로 사용하였다.

Table 3. Mixing ratio of raw materials for preparation of *tomato kochujang*

Ingredient (g)	K-14	K-16	K-18	K-20
Red pepper	320	320	320	320
Meju power	180	180	180	180
Tomato puree	900	900	900	900
Glutinous rice	900	900	900	900
Salt	140	160	180	200

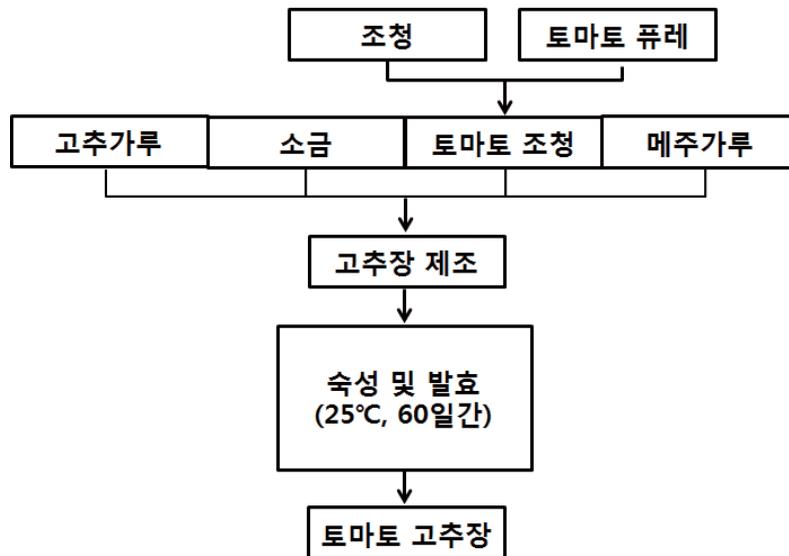


Fig. 4. The production method of *tomato kochujang*

④ pH, 염도, 당도, 수분함량측정

pH는 pH meter(Twin pH, Japan), 염도는 염도계(PAL-03S, ATAGO, Japan), 당도는 당도계(PAL-1, ATAGO, Japan), 수분함량의 측정은 105℃에서 상압건조법을 이용해서 측정하였다.

⑤ 색도측정

색도는 색차계(UltraScan XE, HunterLab, USA)를 이용하여 Hunter값의 명도(L), 적색도(a), 황색도(b)를 측정하였다. 실험은 5회 반복하여 측정된 평균치로 나타내었다.

⑥ 라이코펜 함량 측정

고추장 200 mg에 extract solvent (Acetone:Ethanol:n-Hexane=1:1:1) 400 µl를 첨가하여 20분간 vortexing 한 후 증류수 100 µl를 가하여 5분간 vortexing하였다. 이를 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 감압농축기로 농축하여 이를 Acetone과 n-Hexane를 1:1의 비율로 혼합한 용액을 1 ml 첨가하여 이를 HPLC하여 라이코펜 함량을 측정하였다.

⑦ 관능검사

고추장의 관능검사는 동아대학교 20~30대 15명을 대상으로 맛, 향기, 색과 종합적인 기호도를 각 항목별로 최고 7점 최저 1점으로 7단계 평가하여 통계 처리하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 기능성 웰빙 국수 제조

① 성분분석

발효 쌀국수의 일반성분을 분석한 결과는 Table 4에서 확인하였다. 100 g당 열량은 대조구인 RN과 BN는 302.1, 290.6 kcal로 나타났으며, 발효를 하였을 때 280.4, 280.5 kcal로 낮아지는 것을 확인하였으며 탄수화물, 조지방 또한 감소하였다. 조단백의 경우는 5.7, 5.8에서 6.3, 6.5로 증가하였다. 이는 발효과정 중에서 탄수화물과 지방의 소모가 일어나며 단백질은 합성이 되면서 열량 또한 감소한 것으로 사료된다. 수분의 함량은 현미로 만든 국수가 쌀로 만든 국수보다 2배의 수분의 함량을 나타냈으며, 발효하였을 때 낮은 함량을 확인하였다. 이는 현미가 전분의 다양한 성분을 함유하고 있어 수분을 다량 함유할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Compositions of rice noodle

	RN	FRN	BN	FBN
Calorie (Kcal/100g)	302.1	280.4	290.6	280.5
Carbohydrate (g)	69.6	63.8	66.4	63.4
Crude protein (g)	5.7	6.3	5.8	6.5
Crude fat (g/100g)	0.1	0	0.2	0.1
Saturated fat (g/100g)	-	-	-	-
Trans fat (g/100g)	-	-	-	-
Cholesterol (g/100g)	-	-	-	-
Sodium chloride (mg/100g)	307.7	305.2	308.5	341.2
Sugar (g/100g)	0.4	0.3	0	2.2
Moisture (%)	44.86±2.7	30.35±2.4	72.10±5.1	69.62±4.1

② 색도분석

국수의 색도는 Table 5와 같다. 색도는 명도(L), 적색도(a), 황색도(b)를 나타낸 것으로 명도(L) 쌀을 이용한 RN, FRN이 37.30±4.12, 32.50±1.31로 현미를 이용한 BN, FBN인 31.23±1.24, 31.53±1.96보다 높게 나타났으며, 발효과정에서 변화는 FRN에서 감소하였으며 FRN은 변화가 거의 없었다. 적색도(a)는 RN, BN이 -1.79±0.27, 0.36±0.61에서 발효한 국수 FRN, FBN는 0.24±0.30, 0.60±0.39로 높아졌다. 황색도(b)는 쌀로 만든 국수인 RN이 FRN과 비교되면서 그 값이 증가하여 이는 FRN, BN, FBN는 거의 차이가 나타나지 않았다. 이는 특유의 색을 가지는 현미는 발효과정에서 색도의 변화가 나타나지 않았지만 명도가 높은 쌀은 발효가 일어남에 따라 대사산물의 생성 및 당의 변화로 인한 색의 변화가 일어나 적색과 적색도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Table 5. Color parameters of rice noodles

Sample	L ¹⁾	a ²⁾	b ³⁾
RN	37.30±4.12	-1.79±0.27	5.00±0.80
FRN	32.50±1.31	0.24±0.30	7.25±0.57
BN	31.23±1.24	0.36±0.61	7.56±0.61
FBN	31.53±1.96	0.60±0.39	7.00±0.73

¹⁾Measures lightness and varies from 100 for perfect white to zero for black

²⁾Measures redness when positive, gray when zero and greenness when negative

³⁾Measures yellowness when positive and blueness when negative

③ 국수의 중량, 부피, 함수율 및 국물의 탁도

쌀국수의 조리 특성은 Table 6와 같다. 조리 후 국수의 중량을 측정한 결과 쌀국수인 RN, FRN은 11.83±0.31, 13.57±0.50 g으로 발효한 국수의 조리 후 중량이 증가하였으며 현미 국수인 BN, FBN은 14.13±0.21, 13.00±0.20 g으로 조리 후 중량이 감소하였다. 부피와 함수율의 변화는 쌀 발효국수에서 약간의 증가를 보였으며 현미를 이용한 국수에서는 유의적인 차이는

나타내지 않았다. 조리 후 국물의 탁도는 RN에서 높게 나타났는데 FRN, BN, FBN은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 상대적으로 발효 후 탁도가 감소하였다.

Table 6. Cooking properties of cooked rice noodles

Sample	Volumnofcookedno odle	Turbidity (absorbance)	Water absorption (%)	Weight of cooked noodle (g)
RN	318.67±1.15	0.39±0.01	18.32±3.1	11.83±0.31
FRN	328.00±1.00	0.20±0.02	35.72±5.0	13.57±0.50
BN	325.67±0.58	0.22±0.02	41.34±2.1	14.13±0.21
FBN	330.33±0.58	0.20±0.02	30.00±2.0	13.00±0.20

④ 국수의 조직감

쌀국수의 조직감을 측정한 결과는 Table 7와 같다. 경도는 현미국수가 쌀로 만든 국수보다 높게 나타났으며 발효 후 경도가 감소하는 것을 보였으며, 점착성의 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 응집력, 검성, 깨짐성은 발효 후 경도와 같은 결과를 나타냈다. 그러나 탄력성은 발효 전에 비하여 발효 후 증가하였다. 이는 쌀이 발효과정을 거치면서 면으로 조직감은 부드러워지고 탄력성은 향상되어 좋은 식감을 줄 수 있다고 보며, 또한 쌀과 현미를 비교하였을 때 현미가 높은 결과를 나타내어 면으로 더 적합하다고 사료된다.

Table 7. Texture properties of rice noodles

	RN	FRN	BN	FBN
Hardness (g/cm ²)	1623.08±165.51	835.71±7.08	3823.16±140.18	1112.70±48.87
Adhesiveness (g)	0.00±0.00	0.00±0.00	-21.33±1.53	0.00±0.00
Cohesiveness (g)	76.97±5.71	74.32±6.25	74.41±2.83	69.94±1.86
Springiness (%)	41.00±9.90	74.26±1.28	65.87±3.40	79.44±2.07
Gumminess (g)	416.70±41.07	258.80±29.67	653.24±101.53	323.61±12.75
Brittleness (g)	339.01±71.11	243.95±42.78	784.49±72.95	389.74±40.20

⑤ 조리국수의 관능평가

쌀과 현미를 발효하여 만든 국수를 조리하여 색, 향, 맛, 조직감 및 전체적인 기호도를 평가한 결과 Table 8과 같이 나타났다. 조리한 국수의 경우 색, 맛, 향과 조직감 모두 발효한 국수에서 기호도가 증가하였으며, 이로 인해 전체적인 기호도 또한 발효한 국수에서 높게 나타났다. 그리고 쌀과 현미를 비교한 국수에서는 발효현미국수가 높은 선호도를 나타내는 었다.

Table 8. Sensory evaluation of cooked noodles

	RN	FRN	BN	FBN
Flavor	2.00±1.00	5.00±1.00	3.33±0.58	6.33±0.58
Color	3.33±0.58	4.67±0.58	5.00±0.00	5.33±0.58
Taste	1.33±0.58	4.67±0.58	3.67±0.58	5.67±0.58
Appearance	4.00±0.00	4.33±0.58	4.67±0.58	4.67±0.58
Overall acceptability	1.67±0.58	5.00±0.00	3.67±0.58	5.67±0.58

현미와 쌀을 각각 발효시켜 제조한 국수의 특성을 분석한 결과 발효가 쌀을 이용한 국수 제조에 가지는 문제점을 해결해 주는 동시에 열량과 영양학적 성분도 유용하게 변화하였다. 그리고 모든 물성검사에서 쌀보다는 다양한 영양학적 성분을 가진 현미가 높은 결과를 보였으며 관능검사결과 또한 발효현미국수가 높은 선호도를 보여 쌀을 이용한 대체식품으로 개발이 가능하다고 사료된다.

(나) 토마토를 이용한 기능성 고추장의 개발

① 토마토 고추장의 pH, 염도, 당도, 수분함량의 변화

소금의 농도를 달리하여 제조된 토마토 고추장을 발효시간에 따라 pH, 염도, 당도, 수분함량의 변화를 확인하였다. Fig. 5는 다양한 소금농도의 차이에 따라 제조된 토마토 고추장의 발효시간에 따라 pH의 변화로서 제조 후 pH는 7.8이었지만 발효가 진행됨에 K16~20에서는 15일째 pH가 7이하로 가 낮아지지만 K-14는 그 변화가 45일 이후에 낮게 나타나는데 이는 발효과정 중 미생물에 의해 생성되는 유기산에 의해 pH가 낮아지는 것으로 사료된다.

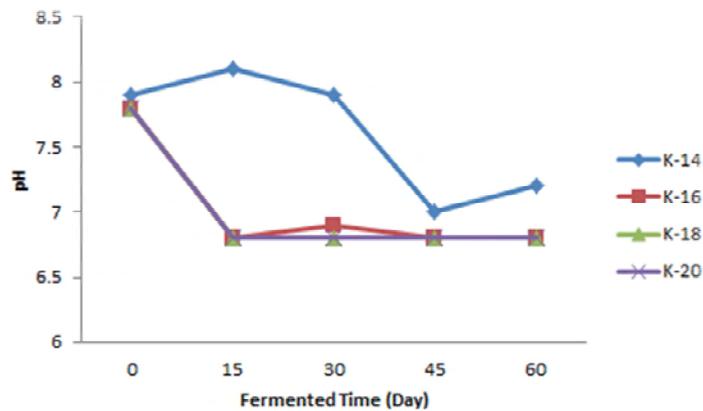


Fig. 5. Change in the pH of *tomato kochujang*

발효과정 중 염도의 변화는 K-14, 16, 18, 20에서 7.1, 7.2, 7.3 7.4%를 나타내었으나 발효 30일째 약간 감소하다 45일째 증가하는 경향을 나타냈으며 소금의 농도가 가장 낮은 K-14에서는 변화가 현저히 낮았다 (Fig. 6).

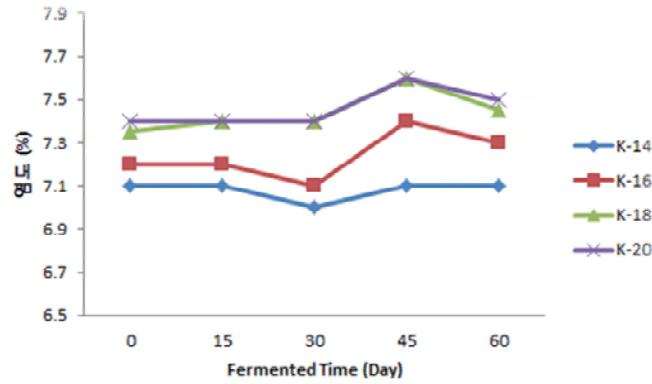


Fig. 6. Change in the salt contents of *tomato kochujang*

발효과정 중 토마토 고추장 K-14, 16, 18, 20의 당도의 변화는 Fig. 7에서와 같이 초기에 8.15, 8.0, 7.9, 7.7 brix를 나타냈으며, 발효과정 중 감소하는 경향을 나타내었으나 당도량이 가장 낮은 K-20의 경우 증가하여 전체적인 당도는 7.8~7.9 brix로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 발효과정중 발효미생물의 생장에 필수적으로 이용되며 함량이 낮은 경우는 생장에 적당하게 합성하여 유지하는 것으로 사료된다.

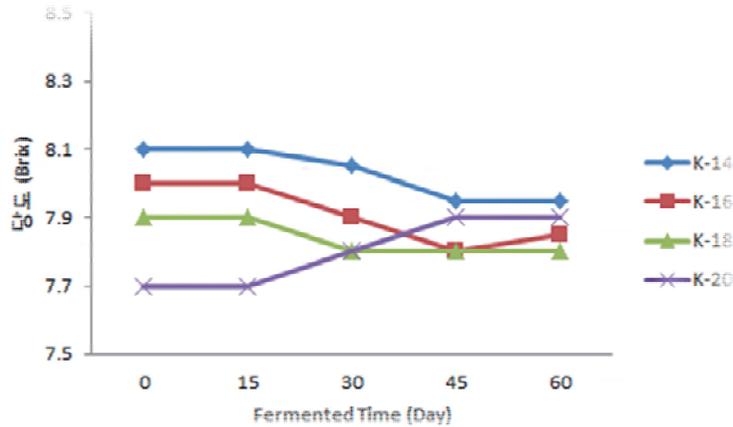


Fig. 7. Change in the sugar contents of *tomato kochujang*

발효과정 중 토마토 고추장 K-14, 16, 18, 20의 수분함량의 변화는 Fig. 8에서 확인하였다. 그 결과 발효시간에 K-18, 20의 경우 발효가 진행됨에 따라 약간 증가하다 감소하는 경향을 보였지만 49.2~50.03%로 유지되었으며, K-14, 16은 약간 증가하다 감소하였는데 수분은 발효에 필수적이므로 수분함량이 증가된다는 것은 발효가 잘 이루어 진다는 것을 확인할 수 있는 지표로 상대적으로 수분함량이 증가하는 K-18, 20에서 발효가 진행된 것으로 사료된다.

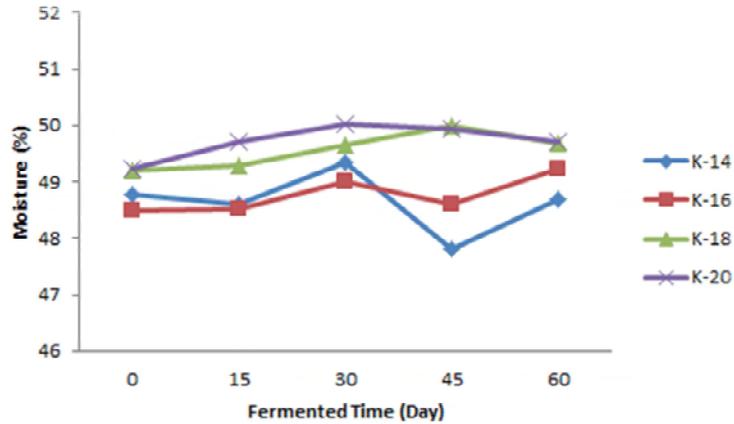


Fig. 8. Change in the moisture (%) of *tomato kochujang*

② 토마토 고추장의 색도 변화

Fig. 9은 토마토 고추장의 색도로서 명도(L), 적색도(a), 황색도(b)를 나타낸 것으로 명도(L)는 초기에 24.06~25.62를 보였으나 60일 발효후 25.86~26.49로 약간 증가하는 경향을 보였다. (fig.7A)). 적색도(a)는 초기에는 19.56~21.52로서 60일 발효 후에 18.62~19.53로 감소하였다 (fig.7(B)). 황색도(b)는 초기에 11.74~12.66을 나타내었으나 발효 후 13.45~13.72로 약간 증가하였다 (fig.7(C)). 색도 측정결과, 전체적으로 약간의 색도변화는 있었지만 각 시료간에 유의적인 차이는 없었다

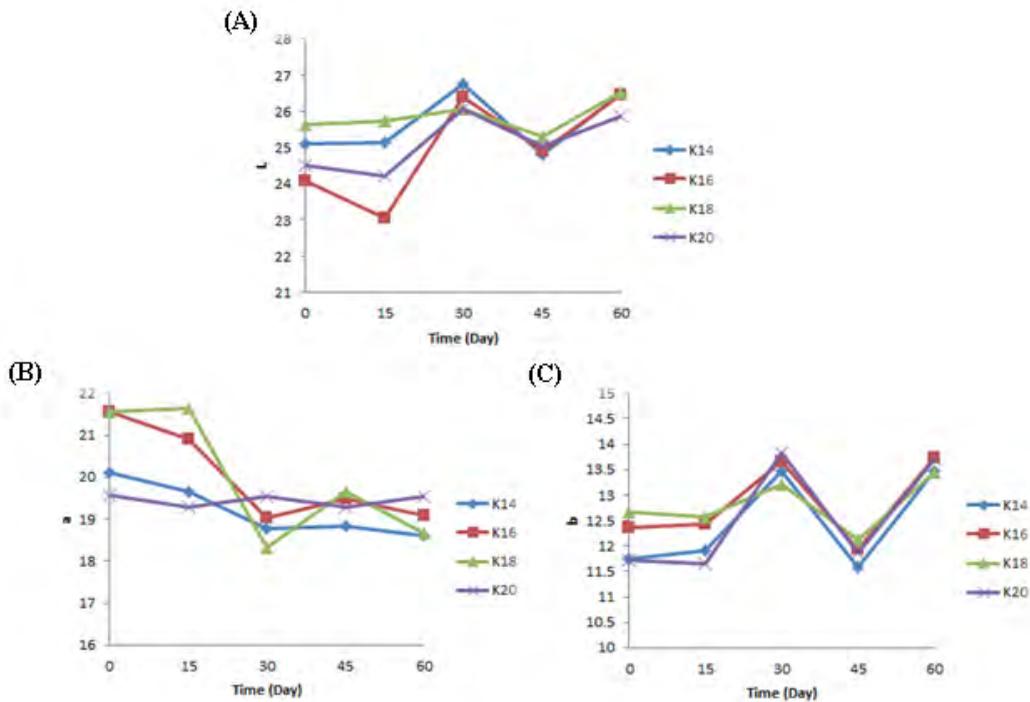
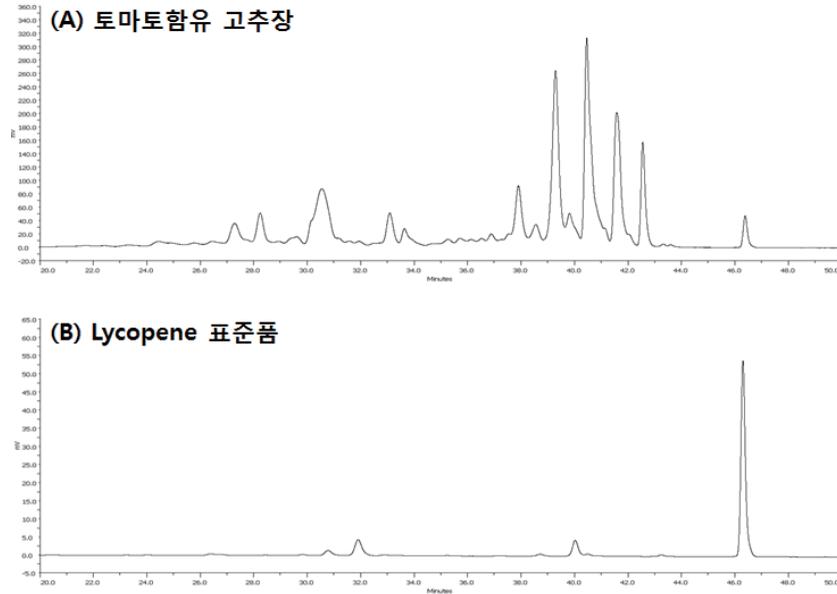


Fig. 9. Change in color values of lightness (L), redness (a) and yellowness (b) of *tomato kochujang*. A : Measures lightness and carries from 100 for perfect white to zero for black, B : Measures redness when positive, gray when zero and greenness when negative, C : Measures yellowness when positive and blueness when negative

③ 토마토 고추장의 라이코펜 함량 변화

토마토 고추장의 발효시간에 따른 라이코펜 함량의 변화를 Fig. 10에서 나타내었다. 라이코펜 함량은 초기 고추장에 토마토의 배합비가 차이를 보여 0.024~0.12 mg/g의 함량을 보였으며, 발효시간에 따라 라이코펜의 함량변화는 거의 이루어지지 않았다. 이는 발효과정 중에 미생물에 의한 라이코펜의 변화가 없어 토마토가 함유된 기능성 고추장 개발이 가능하다고 사료된다.

(A)



(B)

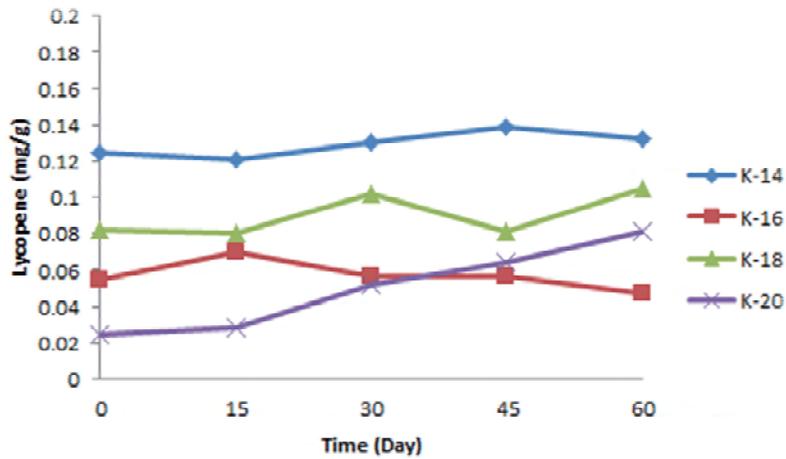


Fig. 10. The HPLC chromatogram (A) and change in lycopene contents (B) of *tomato kochujang*

④ 관능검사

관능검사 결과는 색, 맛, 점성도, 전체적인 기호도로 Table 9와 같이 확인하였다. 그 결과 전체적으로 초기보다 발효가 진행됐을 때 좋은 판정을 받았으며 색, 맛, 점성도, 전체적인 기호도 모두 K-20이 가장 높게 나타났으며, 전체적인 결과를 보면 소금의 비율이 높을수록 점수가 높게 나타나는 경향이 있는데 이는 발효정도와 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

Table 9. Result of sensory evaluatio of *tomato kochujang* for 60 days

	K-14	K-16	K-18	K-20
Color	6.33±0.58	6.00±1.00	6.33±0.58	6.67±0.58
Flavor	5.33±0.58	6.33±0.58	6.33±0.58	6.33±1.15
Viscosity	6.33±1.15	6.00±0.00	5.67±0.58	6.00±0.00
Overall acceptability	5.00±0.00	6.67±0.58	6.67±0.58	6.67±1.15

차. 카페인의 항염증효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) Cell culture와 viability

BV2 murine microglia cell은 인제대학교에서 분양받아 사용하였다. Cell의 culture은 37°C에서 5% FBS와 antibiotic가 함유된 DMEM에서 배양하였다. Cell viability는 BV2 cell (1×10^5 cells/ml)에 다양한 농도의 caffeine (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0)에 대해 MTT assay에 의해 측정하였다.

(나) NO 측정

BV2 cell (1×10^5 cells/ml)을 24-well plate에서 LPS 처리 전에 각각의 농도의 EPS-2-1을 처리하여 1시간동안 전처리한 후 24동안 반응하였다. 배양액을 회수하여 Griess reagent를 처리하여 540 nm에서 측정하였다. NO의 측정은 sodium nitrate를 사용하여 nitrate 함량으로 정량하였다.

(다) Enzyme immunosolvent assay (ELISA)

BV2 cell의 PEG2와 TNF- α 의 발현은 시판제품인 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였다.

(라) Total RNA의 추출 및 RT-PCR

Total RNA는 esay-BLUETM total RNA extract kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 추출하였다. 1 ug RNA를 reverse-transcriptase (Promega, Madison, WI)를 사용하여 합성하였으며, 합성된 cDNA는 iNOS, COSX-2, TNF- α , β -action primer를 사용하여 PCR 하였다.

(마) Western blot analysis

Total cell 추출물은 PRO-PREP protein extraction kit (iNtRON Biotechnoloy; Sungnam,

Republic of Korea)로 추출하여 준비하였으며, Cytoplasmic과 nuclear 추출물은 NE-PER nuclear과 cytosolic extraction reagents (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. Total cell extracts는 polyacrylamide gel로 분리하여 nitrocellulose membrane로 transfer하였다. Membrane는 ECL reagent (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)을 사용하여 확인하였다.

(바) Electrophoretic mobility assay (EMSA)

DNA-protein binding assay는 nuclear extract와 같이 수행하였다. Synthetic complementary NF- κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') binding oligonucleotide (Santa Cruz Biotechnology)는 3'-end DNA labeling kit (Pierce)를 사용하여 3'-biotinylate하였으며, 실온에서 30분간 annealing하였다. 반응액은 electrophoretically를 사용하여 분리하였고, DNA transfer은 120 ml/cm² membrane에서 cross-linked하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) Cell viability

카페인이 microglia cell에 미치는 영향을 확인하기 위해서 우선 MTT를 실시하였다. 간단히, 24시간동안 카페인을 농도별로 처리한 다음, MTT의 환원력을 통해서 세포의 생존정도를 측정된 결과 2mM의 카페인에서도 세포성장에는 어떠한 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과 LPS의 존재하에서도 동일한 결과가 나타남을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

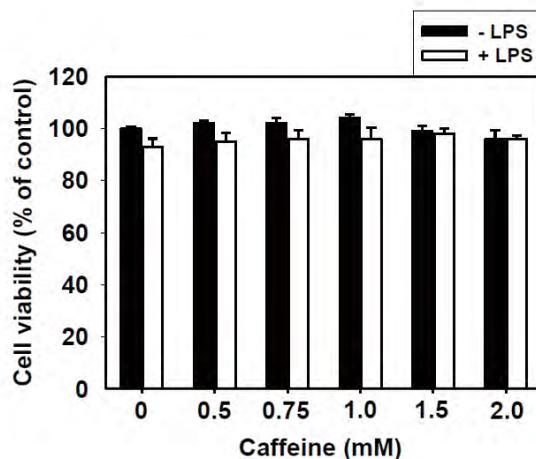


Fig. 1. 카페인에 의한 세포독성 측정

(나) NO 측정

카페인이 LPS로 자극된 마이크로글리아세포로부터 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 이 실험은 MTT assay와 동일한 조건으로 진행이 되었으며, 24시간 후 세포배양액을 획득하여 NO의 활성을 Griess액을 이용하여 측정하였다. 그 결과 그림2에서 보는 바와 같이 LPS의 존재하에서 NO의 양이 약 30uM정도로 증가함을 알 수 있었다. 그러나 카페인은 LPS에 의해서 증가된 NO의 양을 약 60%정도 감소시킴을 확인할 수 있었다. 이러한 카페인에 의한 결과가 NO의 생성을 조절하는 inducible nitric oxide synthase의 발현조절에 의해서 일어나

는지를 웨스턴블랏과 RT-PCR을 이용해서 측정하였다. 그 결과 그림에서와 마찬가지로 LPS에 의해서 증가된 inducible nitric oxide synthase 단백질과 mRNA의 양이 카페인에 의해서 저해됨을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼때 카페인은 inducible nitric oxide synthase의 유전자발현을 조절해서 최종적으로 NO의 활성을 저해하는 것으로 판단된다.

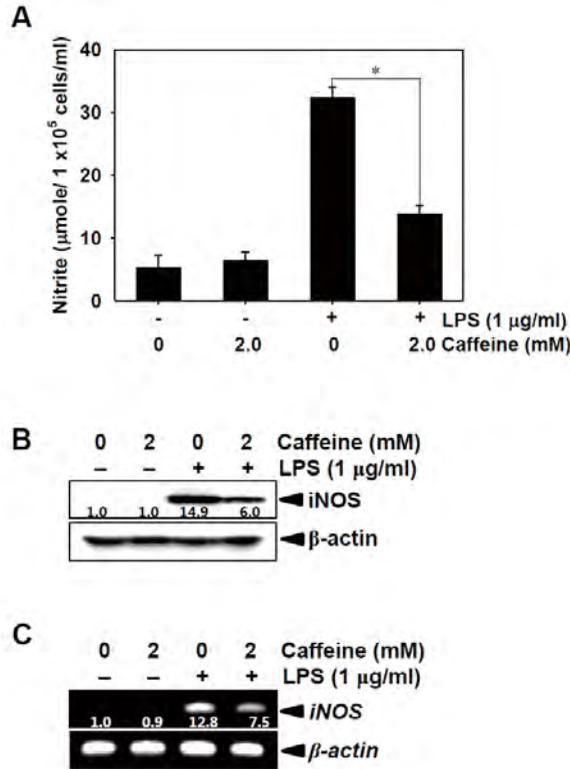


Fig. 2. 카페인의 NO생성 억제능

(다) PGE₂의 발현

염증인자인 PGE₂의 발현조절에 카페인의 조절능을 확인하기 위하여 NO측정방법과 동일한 방법으로 세포배양액을 회수한 다음, ELISA를 이용해서 PGE₂의 발현양을 조사하였다. 그 결과 LPS에 의해서 과발현된 PGE₂가 카페인의 존재하에서 약 70%정도 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). PGE₂의 발현은 cyclooxygenase-2에 의해서 조절이 되므로, 이들의 단백질과 mRNA내에서 발현양상을 비교하였다. inducible nitric oxide synthase의 발현조절과 마찬가지로, 카페인은 LPS에 의해서 강력하게 발현된 cyclooxygenase-2의 단백질과 mRNA의 발현을 강력하게 저해함을 확인하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 카페인은 cyclooxygenase-2의 유전자발현을 조절해서 최종적으로 NO의 활성을 저해하는 것으로 판단된다.

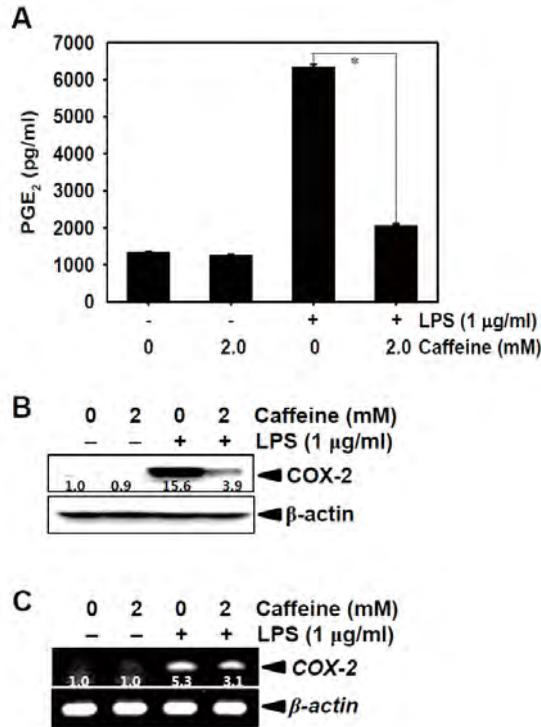


Fig. 3. 카페인의 PGE₂생산 억제능

(라) TNF- α 의 발현

염증성인자중 강력한 사이토카인인 TNF- α 의 발현조절에 카페인이 미치는 영향을 ELISA를 통해서 조사하였다. 카페인은 TNF- α 의 발현을 약 50%정도 감소시킴을 확인할 수 있었으며, 동시에 TNF- α mRNA의 발현을 억제함을 확인하였다 (Fig. 4A와 4B). 이러한 결과로 미루어 볼 때 카페인은 TNF- α 의 유전자발현을 조절해서 최종적으로 NO의 활성을 저해하는 것으로 판단된다.

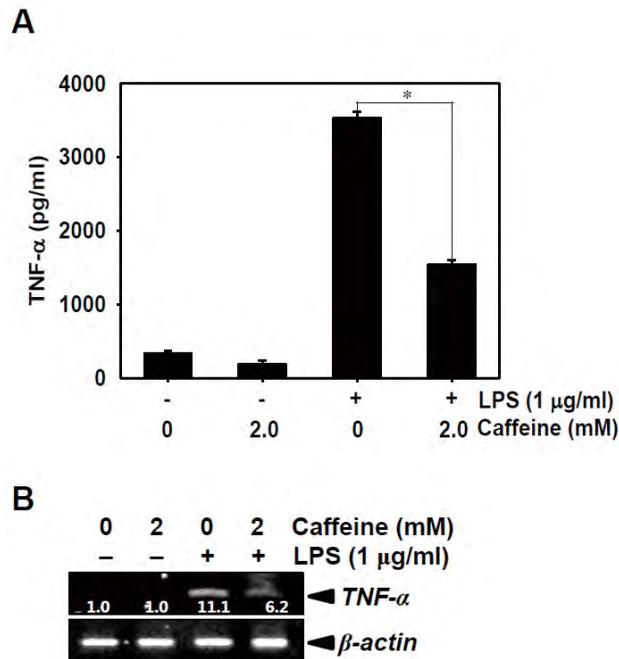


Fig. 4. 카페인의 TNF- α 생산억제능

(마) 전사인자인 NF-κB의 발현

Fig. 2-4에 조사되어진 염증성인자인 inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2와 TNF-α는 이들의 프로모터부분에 강력한 염증활성화 전사인자인 NF-κB의 결합부위를 가지고 있으며, 이는 LPS에 의해서 강력히 활성화되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 염증성인자들의 발현이 전사조절인자인 NF-κB에 의해서 조절되는지를 확인하기 위하여 EMSA를 실시하였다. Fig. 5A에서 보는 바와 같이 카페인은 LPS에 의해 유도되어진 NF-κB의 활성화를 강력히 저해함을 알 수 있었다. 이러한 저해가 NF-κB의 소단위체인 p50과 p65의 핵내로 이동에 의해서 나타나는지를 확인하기 위해서 핵단백질과 세포질단백질을 분리해서 추출한 후 웨스턴블랏을 실시하였다. 그 결과 카페인은 NF-κB의 소단위체들의 핵내로 이동을 저해하여 전사를 억제하고 있음을 확인 할 수 있었다. 마지막으로 NF-κB의 활성억제가 실제로 본 연구에서 조사되어진 염증성유전자의 발현에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 NF-κB억제제인 PDTC를 전처리한 후 이들 유전자의 발현을 조사한 결과 PDTC는 염증성인자들의 발현을 강력히 저해하는 것으로 확인되었다. 이는 카페인이 NF-κB의 활성저해를 통해서 이들 유전자의 발현을 조절하고 있음을 뒷받침한다.

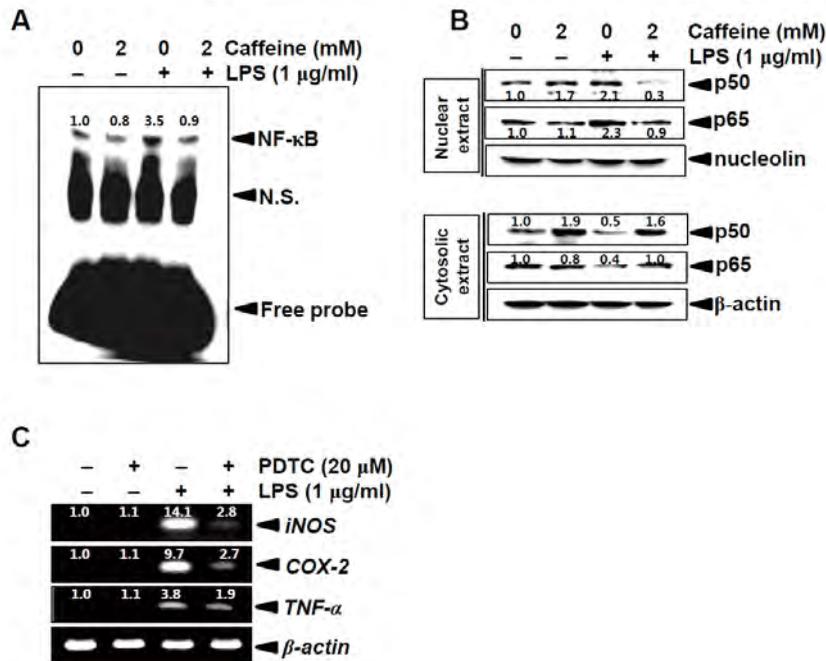


Fig. 5. 카페인의 NF-κB활성억제능

(바) Akt조절억제능

강력한 염증성인자들의 조절 전사인자인 NF-κB의 핵내로 이동은 상위분자인 Akt에 의해서 조절되는 것이 잘 알려져 있으므로 카페인이 LPS에 의해서 유도되는 Akt에 미치는 영향을 웨스턴블랏을 통해서 조사해보았다. 우선 LPS는 기존에 알려진 바와 같이 Akt의 발현을 강력히 증가시킴을 확인 할 수 있었으며, 이러한 효과는 카페인의 존재하에서 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6A). 다음으로 Akt에 활성저해가 실제로 LPS에 의해서 유도되어진 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해서 Akt억제제인 LY294002를 전처리한 후 LPS의 효과에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Akt억제제인 LY294002는 LPS에 의해 유도되

어진 NF- κ B의 활성을 강력히 억제함을 알 수 있었다(Fig. 6B). 또한, 이들은 NF- κ B소단위체인 p50과 p65의 핵내로의 이동을 억제하고 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 6C). 이러한 결과는 카페인이 LPS에 의해서 유도된 NF- κ B의 활성을 Akt억제를 통해서 조절하고 있음을 뒷받침한다.

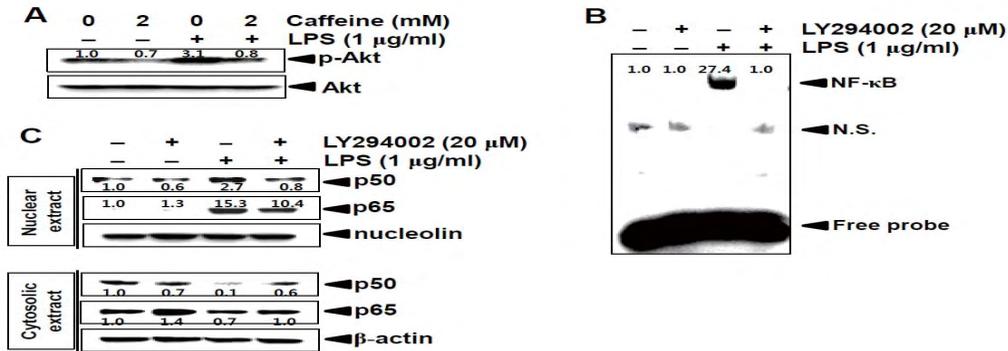


Fig. 6. 카페인에 의한 Akt조절억제능

마지막으로 염증성인자의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 MAP kinase의 활성조절에 미치는 영향을 조사하였다. 우선 LPS는 3종의 MAPK의 인산화를 강력히 유도함을 알 수 있었다(Fig. 7A). 그러나, 카페인은 단지 ERK의 인산화만 저해함을 알 수 있었다. 이는 카페인에 의한 ERK의 조절이 염증성인자에 영향을 미칠 수 있다는 판단하에 ERK 억제제인 PD98059를 전처리 한 후 LPS에 의해서 유도되는 염증성인자들의 발현을 조사한 결과 ERK 억제제는 조사되어진 모든 염증성인자들의 발현을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 7C).

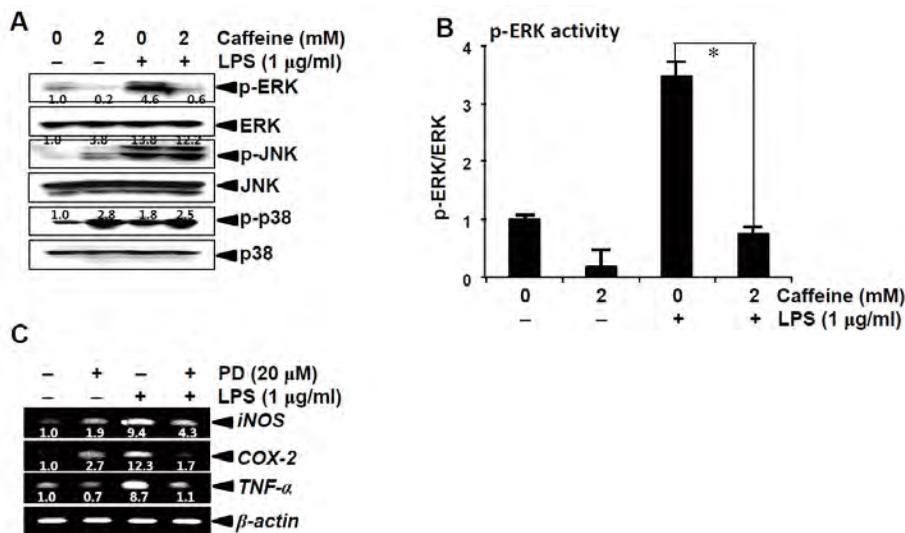


Fig. 7. 카페인의 ERK인산화억제능

본 연구에서는 카페인이 염증성인자인 inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2와 TNF- α 의 발현을 저해하여 염증억제기전에 작용할 수 있음을 증명하였다. 추가적으로 이러한 염증성인자들의 발현을 조절하는 NF- κ B의 활성화와 이의 상위분자인 Akt의 억제를 통해서 카페인의 항염증효과가 나타남을 알 수 있었다. 또한, ERK의 활성저해도 이러한 염증인자들의 발현조절에 중요한 역할을 담당하고 있음을 확인하였다.

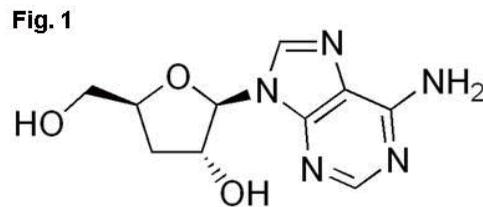
2. 코디세핀에 의한 암세포 증식억제 효과의 기전 해석 연구

(제 1 세부 : 동의대학교, 최영현)

가. 동충하초의 주요 생리활성 성분인 코디세핀에 의한 인체백혈병 세포의 증식억제 기전 연구

(1) 연구개발의 목적 및 필요성

동충하초(*Cordyceps militaris*)의 주요 활성성분인 cordycepin (3'-deoxyadenosine, Fig. 1)의 생리활성을 항암기전 측면에서 조사하였음 → 이를 위하여 U937 및 THP-1 인체 백혈병 세포를 대상으로 cordycepin 처리에 의한 항암활성이 세포사멸(apoptosis) 유도과 연관이 있으며, 이는 reactive oxygen species (ROS, 활성 산소종) 생성 의존적으로 이루어지고 있음을 보고함

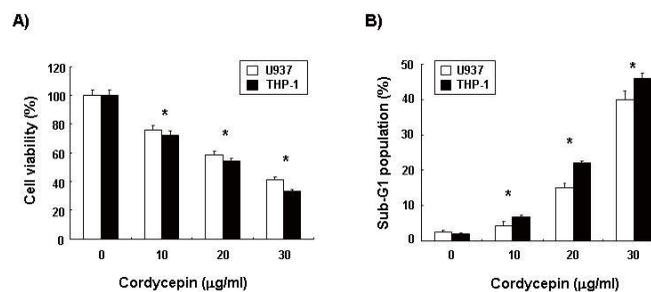


(2) 연구결과 및 고찰

(가) Cordycepin에 의한 U937 및 THP-1 세포의 증식억제

U937 및 THP-1 세포의 증식에 미치는 cordycepin의 영향을 조사하기 위하여 농도의 cordycepin (10, 20 및 30 $\mu\text{g/ml}$)을 처리한 후 24시간 배양하고 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, Fig. 2A에 나타낸 바와 같이 cordycepin은 U937 및 THP-1 세포의 증식을 처리 농도의 존적으로 억제하였음을 알 수 있었다.

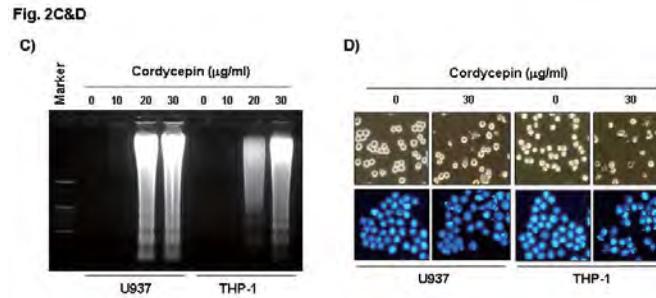
Fig. 2A&B



(나) Cordycepin에 의한 U937 및 THP-1 세포의 apoptosis 유도

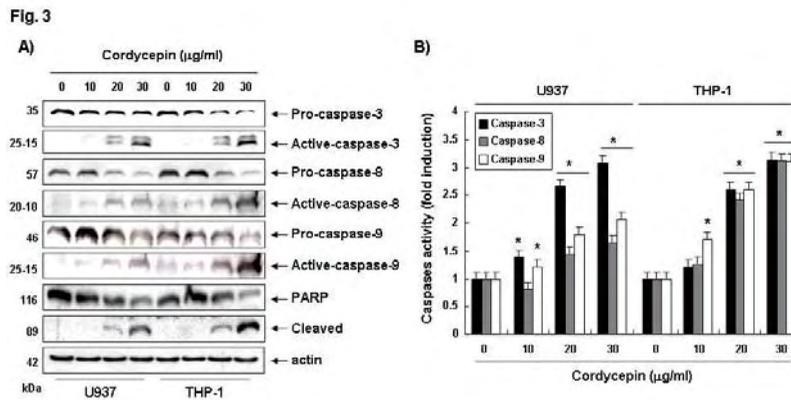
이상의 증식억제 결과가 apoptosis 유도에 의한 것임을 flow cytometry 분석, agarose gel electrophoresis 및 DAPI staining 등의 방법으로 확인하였다. Fig. 2C 및 D에 나타낸 바와 같이 cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 전형적인 apoptosis가 유발된 세포에서 관찰되는 DNA 단편화 및 염색질 응축 현상의 증가가 관찰되었으며, apoptosis가 유도된 세포의 빈도에 해당되는 세포주기 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 U937 및 THP-1 세포 모두에서

cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 현저히 증가되어 cordycepin 처리에 의한 백혈병 세포의 증식억제는 apoptosis 유도에 의한 것임을 알 수 있었다.



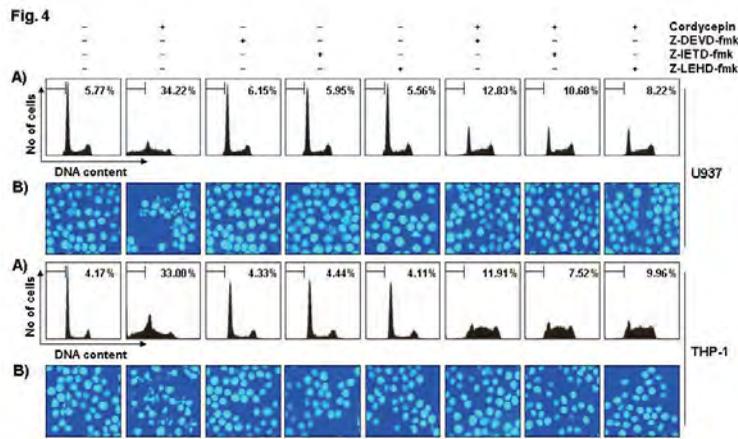
(다) Cordycepin에 의한 U937 및 THP-1 세포에서 caspase 활성화의 증가

Cordycepin 처리에 의한 백혈병 세포의 apoptosis 유도 기전 해석을 위하여 apoptosis 유도에서 핵심적인 역할을 하는 caspase 효소 활성화의 증가 여부를 Western blot analysis 및 *in vitro* caspase activity 측정을 실시하였다. Fig. 3A에서 알 수 있듯이 두 백혈병 세포에서 cordycepin 처리의 농도 증가에 따라 조사된 3가지 caspase의 비활성형의 발현은 억제되었으나, 활성형 단백질들의 발현은 매우 증가되었으며, 활성화된 caspase-3의 기질 단백질에 해당되는 PARP 단백질의 단편화가 관찰되었음. Cordycepin에 의한 조사된 caspase 효소들의 활성화 정도를 정량적으로 평가하기 위하여 각 효소들의 fluorogenic substrates를 이용한 *in vitro* caspase activity를 측정된 결과에서도 cordycepin 처리에 따라 그들의 활성이 처리 농도 의존적으로 증가되었음을 확인하였다(Fig. 3B).



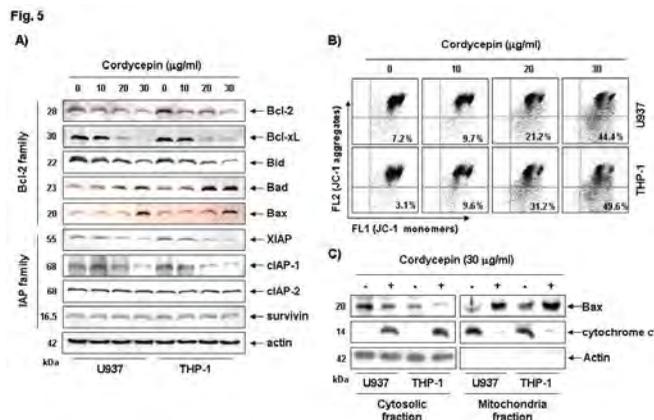
(라) Caspase 의존적 apoptosis 유도의 확인

Fig. 3에서 관찰된 3가지 종류의 caspase 활성화 증가가 cordycepin에 의한 apoptosis 유도에 직접적으로 관여하는지의 여부를 조사하기 위하여 각 caspase의 선택적 저해제 (z-DEVD-fmk, z-IETD-fmk 및 z-LEHD-fmk: caspase-3, -8 및 -9 저해제)와 cordycepin을 동시에 처리한 결과 Fig. 4에서 알 수 있듯이 U937 및 THP-1 세포에서 caspase 저해제 처리에 의하여 cordycepin에 의해 유도된 염색질의 응축 현상이 차단되었으며, sub-G1기에 해당되는 세포의 빈도도 대조군 수준으로 나타났다. 이는 cordycepin에 의한 백혈병 세포의 apoptosis 유도가 caspase 활성화 의존적으로 일어나고 있음을 보여주는 결과이다.



(마) Bcl-2 및 IAP family 단백질과 MMP ($\Delta\Psi_m$) 변화에 미치는 cordycepin의 영향

U937 및 THP-1 세포에서 cordycepin 처리에 의한 apoptosis 유도과정에서 Bcl-2 및 IAP family에 속하는 단백질들의 역할과 이와 연관된 미토콘드리아의 기능 손상 관련성을 조사하였다. 이를 위하여 Bcl-2 및 IAP family에 속하는 단백질들의 발현과 세포 내 위치 변화를 총 단백질, 세포질 및 미토콘드리아 단백질을 분리하여 Western blot analysis를 실시하였으며, MMP의 변화를 측정하였다. Fig. 5A에 나타난 바와 같이, cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 pro-apoptotic 단백질인 Bax 및 Bad의 전체적인 발현은 현저하게 증가된 반면, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현은 매우 감소하였으며, Bid 단백질의 발현은 현저히 감소되어 tBid로 전환되었음을 보여 주었고, anti-apoptotic 단백질로서 caspase의 활성을 저해하는 XIAP 및 cIAP-1 단백질의 발현이 cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 현저히 감소되었음. 또한 미토콘드리아의 기능 손상 관련성을 조사를 위한 MMP 변화 값의 측정 결과, cordycepin 처리에 따라 MMP의 소실이 증가되어 cordycepin 처리에 의한 apoptosis 유도에 미토콘드리아의 기능 손상이 동반되었음을 알 수 있었으며(Fig. 5B), cordycepin이 처리된 세포에서 cytochrome *c*가 세포질로 유리되었고, 세포질 내의 Bax 발현 양을 감소된 반면, 미토콘드리아 내 cytochrome *c*의 양은 감소되었고, Bax의 양은 현저히 증가되었다(Fig. 5C). 이는 cordycepin 처리에 의한 apoptosis 유도 과정에서 미토콘드리아로의 Bax 전이에 따른 미토콘드리아 막의 손상에 따른 cytochrome *c*의 유출을 의미하는 것으로서 cordycepin에 의한 apoptosis 유도에 미토콘드리아 기능 손상이 동반되었음을 의미하고 있다.



(바) Cordycepin에 의한 apoptosis에서 ROS의 역할

세포 내 ROS의 생성 증가는 미토콘드리아 기능의 손상과 밀접한 연관성이 있기 때문에 Fig. 5에서 관찰된 cordycepin에 의한 apoptosis 유도에서의 미토콘드리아 기능 손상에 ROS가 관련되었는지의 여부를 조사하기 위하여 ROS-detecting fluorescent dye인 DCF-DA를 이용하여 세포 내 ROS 생성의 정도를 비교하였다. 그 결과, Fig. 6A에 나타난 바와 같이 조사된 두 종류의 백혈병 세포 모두에서 cordycepin 처리 15분 이내에 ROS의 생성량이 증가되어 2시간 전후까지 지속되었으며, ROS 생성 저해제인 NAC (ROS scavenger) 처리는 cordycepin에 의한 ROS의 생성을 거의 완벽하게 차단시켰다. Fig. 6A의 결과를 직접 확인하기 위하여 DCF-DA 염색에 따른 형광현미경적 관찰을 실시한 결과, Fig. 6B에서 볼 수 있듯이 cordycepin이 처리된 세포에서는 ROS의 생성이 매우 증대된 반면, NAC와 cordycepin의 동시 처리군에서는 ROS의 생성이 대조군 수준으로 현저히 줄었음을 알 수 있었다.

Fig. 6A

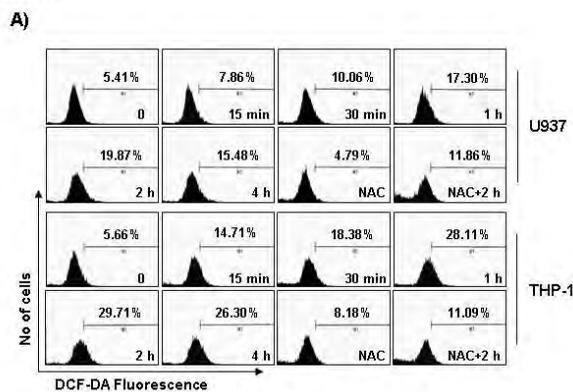
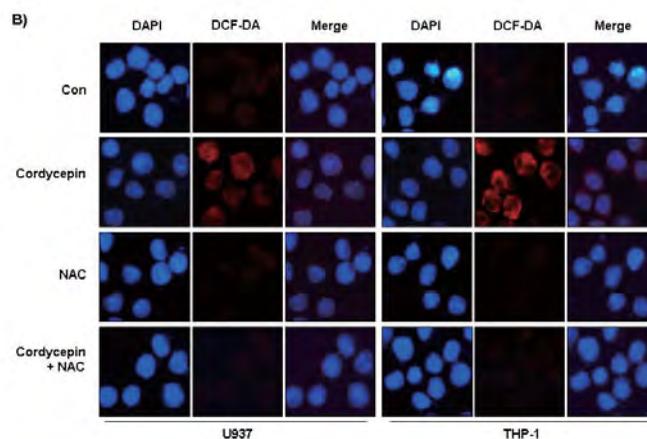


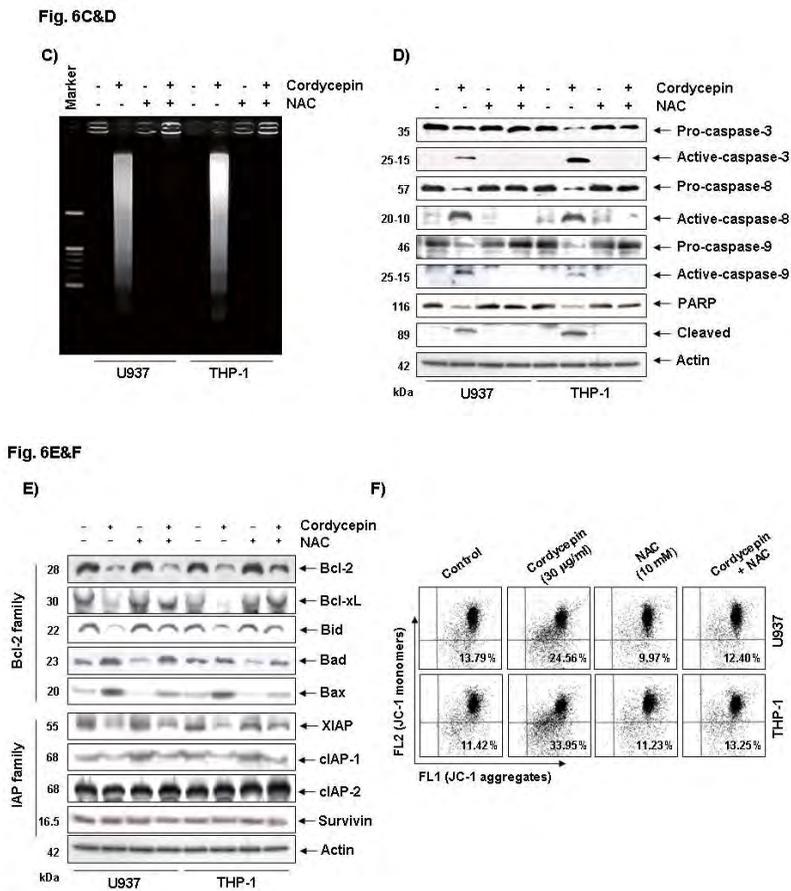
Fig. 6B



(사) Cordycepin에 의한 ROS 의존적 apoptosis 유도

Cordycepin 처리에 의한 ROS의 생성 증가가 apoptosis 유도에 직접적으로 관여하는지의 여부를 조사하기 위하여, cordycepin 단독 처리군과 NAC 동시 처리군을 대상으로 cordycepin 단독 처리에 의하여 변화된 다양한 apoptosis 조절인자들 및 관련 단백질의 발현과 MMP 값의 변화를 비교하였다. Fig. 6E에서 알 수 있듯이 cordycepin 단독 처리에 의하여 변화된 다양한 apoptosis 조절인자들(Bcl-2 및 IAP family 단백질) 뿐만 아니라 PARP의 발현이 NAC 동시 처리에 의한 ROS 생성 억제군에서 모두 대조군 수준으로 회복되었으며, MMP의

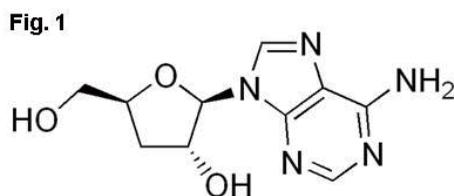
소실도 NAC 동시 처리에 의하여 완벽하게 차단되었다(Fig. 6F). 아울러 Fig. 6C 및 D에 나타내었듯이 cordycepin 처리에 의하여 유도된 DNA 단편화 및 caspase의 활성화도 모두 차단되었다. 이상의 결과는 cordycepin에 의한 apoptosis 유도가 ROS 생성 의존적으로 이루어지고 있음을 의미하는 결과이다.



나. 동충하초의 주요 생리활성 성분인 cordycepin에 의한 인체 전립선암세포의 항암활성 및 암세포 전이 억제 효능 검증

(1) 연구개발의 목적 및 필요성

동충하초(*Cordyceps militaris*)의 주요 생리활성물질인 cordycepin (3'-deoxyadenosine, Fig. 1)의 효과를 항암 및 항전이 측면에서 조사하였다. 이를 위하여 항암에는 전립선암 PC3 세포, 항전이에는 전립선암 LNCaP 세포를 사용하였으며, 각각의 세포에 cordycepin을 처리하였을 때, 어떠한 기전으로 작용하는지 확인하였다.



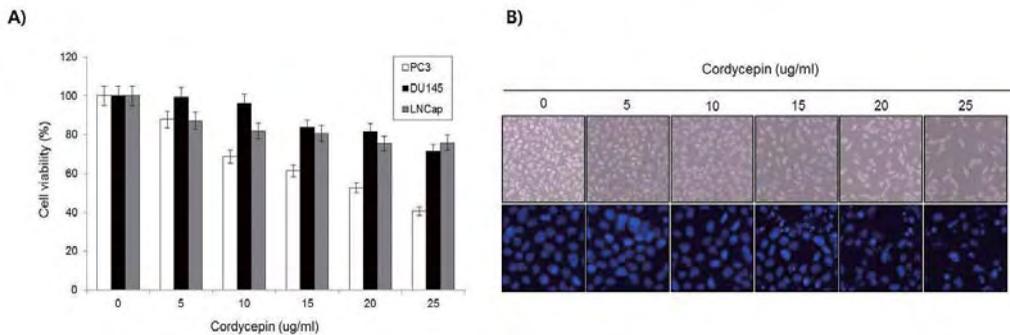
(2) 연구결과 및 고찰

(가) Cordycepin 처리에 의한 인체 전립선암세포에서 apoptosis 유도 기전 연구

① Cordycepin의 인체 전립선암 세포에 대한 독성 및 apoptosis와의 관계

다양한 인체 전립선암 세포에서 cordycepin의 세포 증식 억제 확인 및 apoptosis와의 관련성을 확인하기 위해 24시간 동안 다양한 농도의 cordycepin 처리 후 MTT assay를 실행하여 세포 생존율을 측정하고, 현미경을 통하여 세포의 형태학적 변형도 관찰하였다. 그 결과, Fig. 2과 같이 cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 전립선암세포의 증식이 모두 억제되었다. 특히 PC3 세포에서 강력한 항암활성이 관찰되었으며(A), cordycepin의 처리 농도가 증가함에 따라 PC3 세포의 밀도 감소 및 세포 형태 변형, 염색질의 응축 및 apoptotic body의 형성을 확인할 수 있었다(B). 이를 통해 cordycepin에 의한 세포 증식 억제는 apoptosis와 연관이 있음을 유추할 수 있었다.

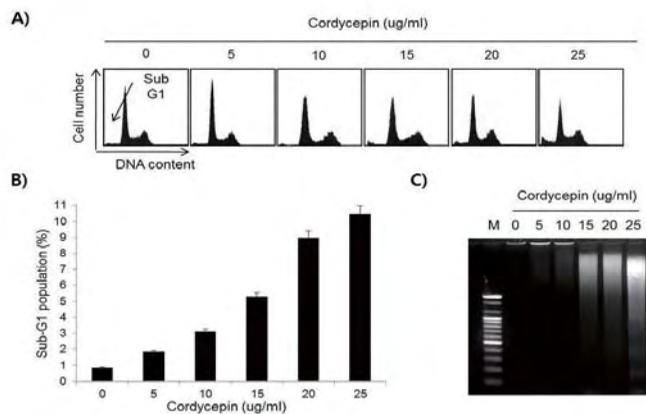
Fig. 2



② Cordycepin에 의한 PC3 인체 전립선암 apoptosis 유발 확인

인체 전립선암세포 PC3에서 cordycepin에 의한 세포 증식 억제가 apoptosis와 관련이 있는 것을 더욱 더 명확히 하기 위하여 PC3 세포에 cordycepin을 농도별로 24시간 처리한 후, FACS를 통한 sub-G1기 측정 및 DNA fragmentation을 실행하였다. Cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 세포주기 분포도 중 apoptosis가 유발된 세포의 빈도에 해당되는 sub-G1기 빈도의 증가(Fig. 3A 및 B) 및 agarose gel electrophoresis에 의한 DNA의 단편화 유발(Fig. 3C)을 확인함으로써, cordycepin에 의한 PC3 세포의 증식 억제가 apoptosis 유도과 밀접한 관련성이 있는 것을 다시 한 번 더 확인하였다.

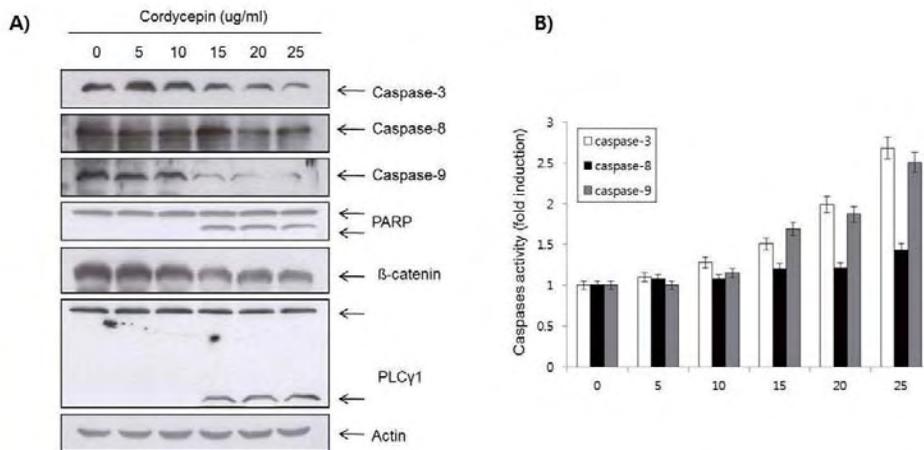
Fig. 3



③ Cordycepin에 의해 유도된 PC3 세포 apoptosis 에 caspase의 영향

PC3에서 cordycepin에 의한 apoptosis 유발 경로를 분석하기 위해, cordycepin을 24 시간 처리 후 apoptosis에 가장 중요한 역할을 하는 caspase의 발현 및 활성의 정도와 활성화된 caspase-3의 기질 단백질 단편화 등을 western blotting 및 *in vitro* caspase activity assay 실시하여 확인하였다. 그 결과, Fig. 4에서처럼, cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 caspase-3 및 -9의 활성이 caspase-8 보다 높게 관찰되었으며, 활성화된 caspase-3의 대표적인 표적 단백질인 PARP, β -catenin 및 PLC γ 1의 단편화를 확인함으로써, PC3 세포에서 cordycepin에 의해 유발되는 apoptosis는 caspase 활성 증가가 동반되었음을 확인하였다.

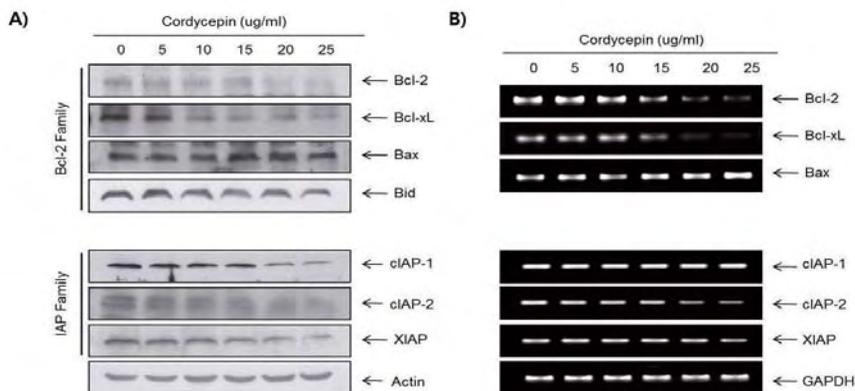
Fig. 4



④ Intrinsic pathway 관련 단백질의 발현에 대한 cordycepin의 영향

Cordycepin에 의해 유발되는 apoptosis 과정에서 intrinsic 경로와 관련된 Bcl-2 family 및 caspase 활성억제에 관여하는 IAP family 인자들의 발현 변화를 조사하기 위해 western blotting 및 RT-PCR 실시하였다. 그 결과, cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 Bcl-2 family 중, anti-apoptotic Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현 감소, pro-apoptotic Bax의 발현 증가, BH3-only protein인 Bid의 whole form의 발현 감소와 IAP family인 cIAP-1, -2 및 XIAP의 발현이 번역(Fig. 5A) 및 전사(Fig. 5B) 단계에서 변화되었음을 확인하였다.

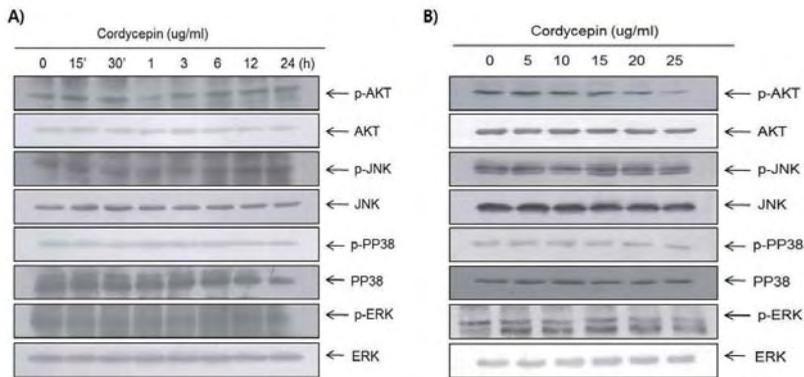
Fig. 5



⑤ Cordycepin에 의한 apoptosis 유발과 MAP kinases 및 PI3K/Akt 경로와의 관계

Cordycepin에 의한 apoptosis 유발에서 신호전달계 중 MAP kinases 및 PI3K/Akt 경로들의 관련성 여부의 확인하기 위해 일정 농도의 cordycepin (25 μ g/ml)을 시간별로 처리 (Fig. 6A)하거나 다양한 농도의 cordycepin을 1시간 처리(Fig. 6B) 한 후 해당 주요 인자들 발현 변화를 western blotting으로 조사하였다. 그 결과, cordycepin 처리 1시간 후 부터 Akt의 인산화가 억제되는 것을 확인하였으나 MAPKs 들은 발현에는 큰 차이 없음을 확인함으로써, cordycepin에 의한 PC-3 세포의 apoptosis 유발에는 MAPKs보다는 PI3K/Akt 경로의 억제가 관여할 가능성을 확인 하였다.

Fig. 6

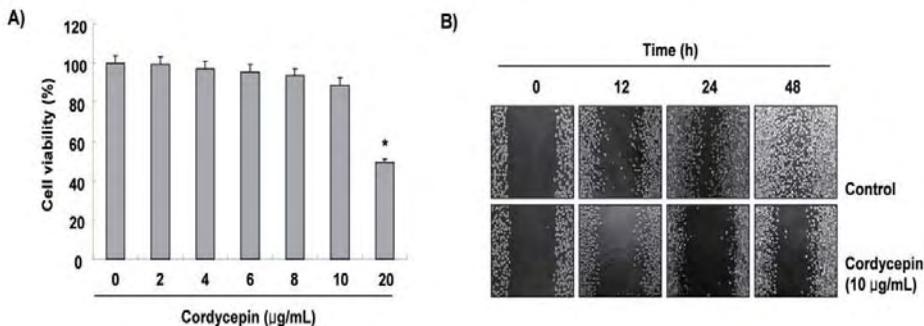


(나) 인체 전립선암세포에서 Akt 불활성화를 Cordycepin의 암세포 전이 억제기전 연구

① Cordycepin의 LNCaP 세포에 대한 세포이동 억제 효과

LNCaP 인체 전립선암세포를 대상으로 cordycepin의 세포 증식억제 여부 및 암세포 이동 억제능을 확인하기 위해, 제일 먼저 48시간 동안 다양한 농도의 cordycepin 처리 후 MTT assay를 실행하여 세포에 독성이 없는 조건을 설정하였으며, 이후, Wound healing migration assay를 실행하여 cordycepin에 의한 암세포 이동 억제 여부 확인하였다. 그 결과, Fig. 7에서 나타난 바와 같이 cordycepin 10 μ g/ml 처리군까지 생존율이 90% 이상을 보였으며, 20 μ g/ml 이상 처리군에서는 강력한 증식억제 현상이 관찰되었으며 (A), 세포독성이 없는 범위의 농도 (10 μ g/ml)에서 암세포의 이동성이 억제 (B)되었음을 확인하였다. 이 결과를 토대로 이후의 실험은 위와 동일한 조건으로 수행하였다.

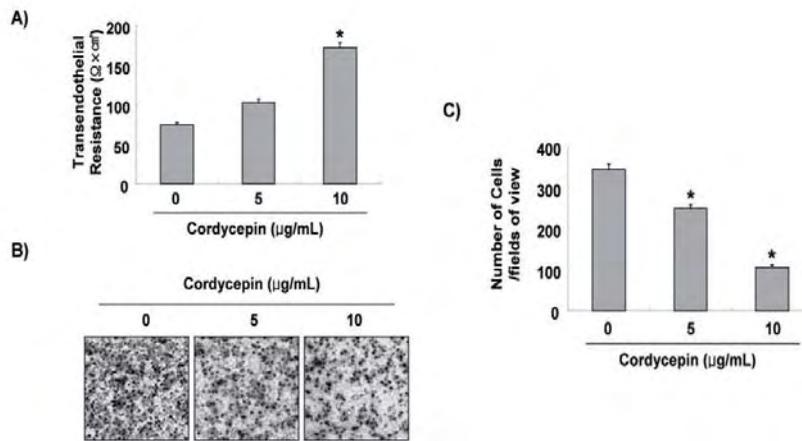
Fig. 7



② Cordycepin에 의한 LNCaP 세포의 tight junctions (TJ)의 tightness 증가

Cordycepin에 의한 암세포의 이동성 억제가 LNCaP 세포의 TJ 기능 변화 및 invasion과 연관이 있는지 조사하기 위해서, cordycepin 처리 후 transepithelial electrical resistance (TER) 변화 여부 및 *in vitro* invasiveness assay를 실시하였다. TER 값의 증가는, TJ의 기능이 강화되어 세포의 결합효과를 더욱더 상승시키는 것을 대변하는데, Fig. 8에서 알 수 있듯이 cordycepin의 처리 농도 증가에 따라 TER의 값이 증가되어 cordycepin이 tightness를 증가됨을 유추할 수 있었으며(A), 이는 invasion의 현저한 억제와 연관되어 있음을 확인(B & C)함으로써, cordycepin 처리에 의한 암세포 이동성 및 invasion의 억제는 세포의 치밀결합 강화와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

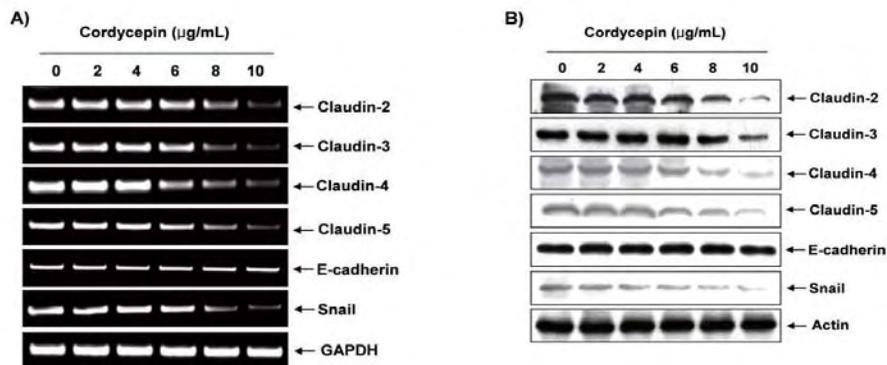
Fig. 8



③ LNCaP 세포에서 TJ 조절인자들의 발현에 미치는 cordycepin의 영향 조사

Cordycepin에 의한 LNCaP 세포의 TJ 기능 강화에 따른 기전 연구를 위하여 세포 접착에 관련된 유전자(claudin family, E-cadherin, Snail)의 발현 변화를 RT-PCR (Fig. 9A) 및 western blot analysis (Fig. 9B)을 통해 확인하였다. 그 결과, TJ의 중요 구성성분인 claudin family와 암세포 전이 조절 관련 유전자들의 전사활성에 중요한 역할을 하는 Snail의 발현이 cordycepin의 처리에 의해 억제되는 것을 전사 (A) 및 번역 (B) 과정에서 확인하였으나 E-cadherin은 상대적으로 큰 변화가 없었음을 확인하였다.

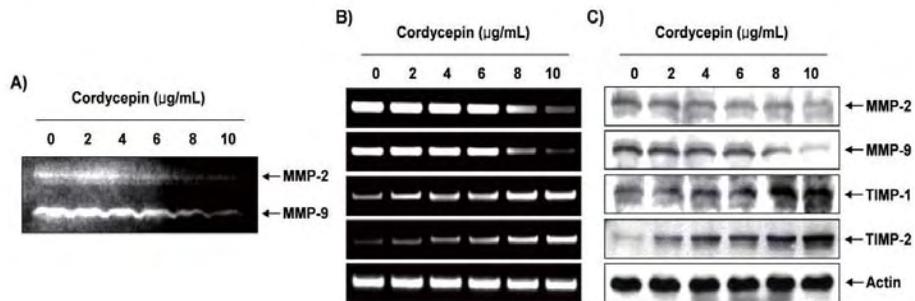
Fig. 9



④ LNCaP 세포에서 MMPs의 발현과 활성화에 미치는 cordycepin의 영향

Cordycepin에 의한 LNCaP 세포의 invasion 억제에서 matrix metalloprotease (MMP)의 관련성 여부의 확인하기 위해 cordycepin 처리에 따른 MMP-2 및 -9의 발현/활성 및 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 10에 나타난 바와 같이 cordycepin 처리 농도 증가에 따라 MMP-2 및 -9의 활성과 발현이 현저히 감소되었음을 Gelatin zymographic analysis (A), RT-PCR (B) 및 western blot analysis (C)로 확인하였으며 이는 MMPs의 억제유전자로 알려진 TIMPs (-1 & -2)의 발현 증가에 의한 것임을 알 수 있었다.

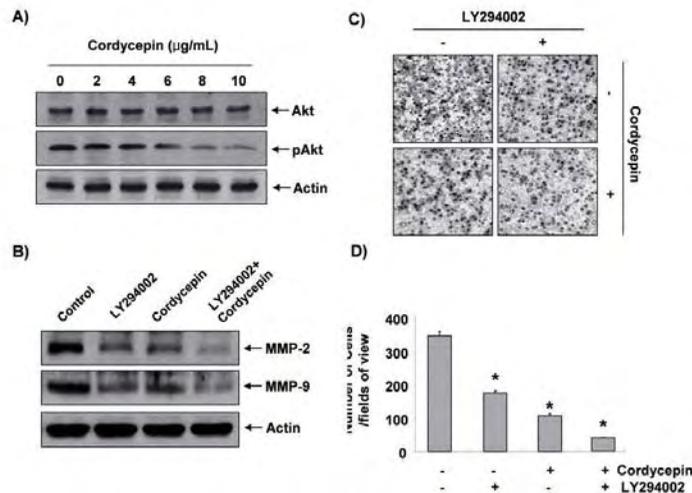
Fig. 10



⑤ LNCaP 세포의 invasion 억제에 미치는 PI3K/Akt 경로의 영향 조사

Cordycepin에 의한 LNCaP 세포의 invasion 억제에 연관된 신호 전달계의 역할 조사 및 PI3K/Akt 경로의 관련성을 확인하기 위하여, cordycepin 처리에 따른 Akt 발현 및 Akt 선택적 저해제에 의한 invasion 억제능 증가 확인하였다. Fig. 11에서 알 수 있듯이 cordycepin의 처리에 따라 농도 의존적으로 Akt의 인산화가 감소(A)하였으며, PI3K/Akt 경로 inhibitor로 알려진 LY294002을 cordycepin과 함께 처리하였을 경우 MMP-2 및 -9의 발현이 cordycepin 단독 처리보다 현저하게 감소되었으며(B), *in vitro* invasiveness assay를 통하여 cordycepin 처리에 의한 invasion의 억제활성도 현저히 증가되었음을 확인(C & D)하였다. 이상의 결과를 통해 LNCaP 세포에서 cordycepin은 PI3K/Akt 경로의 불활성화를 통해 LNCaP 세포의 이동성 및 invasion을 억제할 수 있을 가능성을 보여주었다.

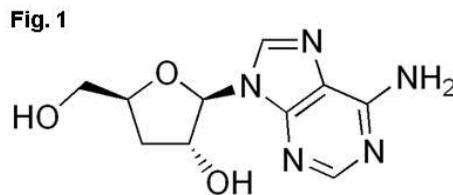
Fig. 11



다. 동충하초의 주요 생리활성 성분인 cordycepin의 항염증, 항전이 및 항암제 내성 극복 효능 및 관련 기전 연구

(1) 연구개발의 목적 및 필요성

동충하초의 주요 생리활성물질인 cordycepin (Fig. 1)의 효과를 항염증, 항암 및 전이, 더 나아가 항암제 내성 극복 가능성 측면에서 조사하였다. 이를 위하여 항염증효능 조사에는 대식세포인 Raw 264.7 세포를, 항암에는 위암세포 AGS 세포를, 항전이 효능 검증에는 대장암 HCT116 세포를 사용하였으며, 항암제 내성 극복 가능성 여부를 확인하기 위한 실험에는 TRAIL에 저항성을 가지는 간암세포 Hep3B를 사용하였다. 그 이후 각각의 세포에 cordycepin을 처리하였을 때, 어떠한 기전으로 작용하는지 확인하였다.



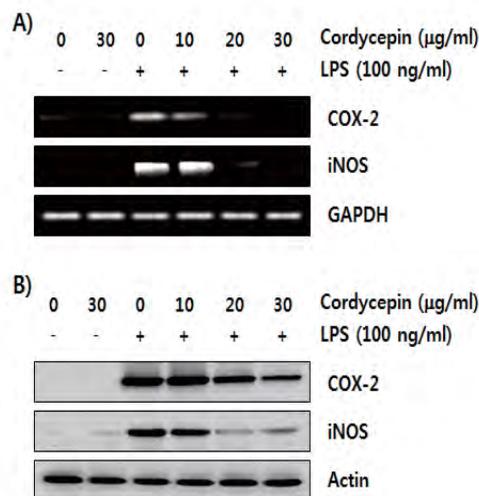
(2) 연구결과 및 고찰

(가) 암예방 측면에서 cordycepin의 염증억제 가능성

① LPS로 유도한 RAW 264.7 세포의 iNOS 및 COX-2 발현 증가에 미치는 cordycepin의 영향

LPS 처리에 의하여 활성화된 RAW 264.7 세포에서 cordycepin의 항염증 효과 조사하기 위해 대표적 염증 매개 유전자인 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 cordycepin의 영향을 번역 및 전사 과정에서 조사하였다. 그 결과 LPS에 의해 유발된 iNOS와 COX-2 유전자의 발현을 cordycepin이 농도의존적으로 억제하는 것을 확인함으로써 cordycepin이 항염증 효능이 있음을 유추할 수 있었다(Fig. 2).

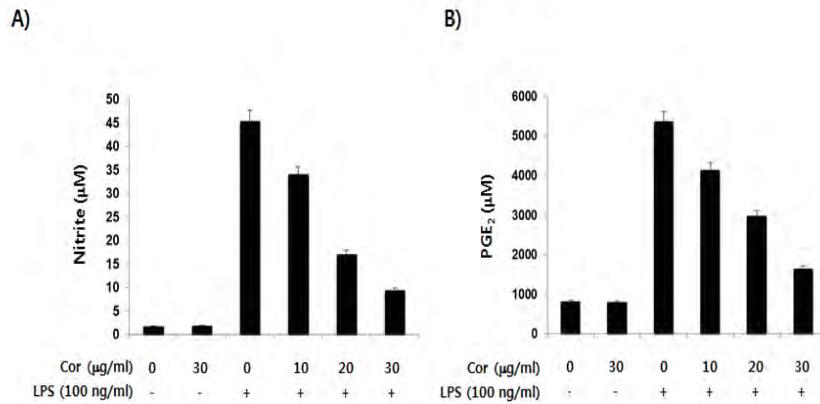
Fig. 2



② LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 NO 및 PGE₂의 생성 증가에 미치는 cordycepin의 영향

Cordycepin에 의한 iNOS, COX-2 발현 억제 효능이 각각의 반응 산물인 NO 및 PGE₂의 생성 억제와 연관되어 있는지 확인하기 위해 LPS 처리 후 cordycepin을 처리하여 NO와 PGE₂의 생성 변화를 관찰하였다. 그 결과 LPS 처리에 의해 현저히 증가했던 NO 및 PGE₂의 생성량이 cordycepin 처리에 의해 처리 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

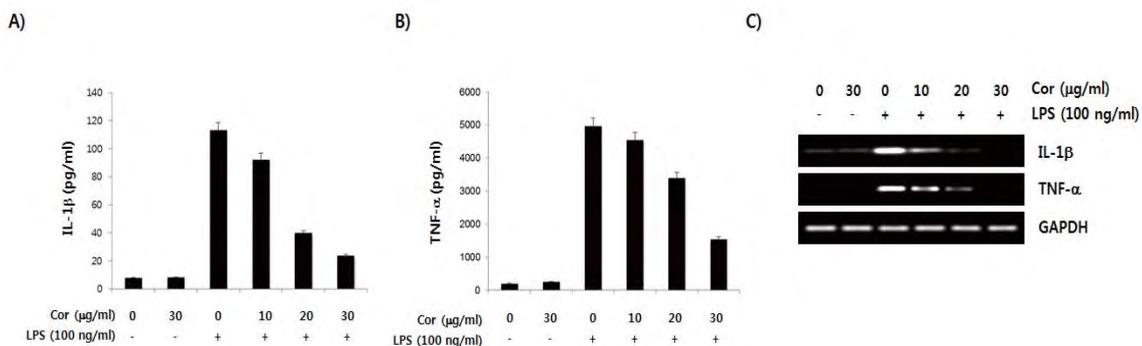
Fig. 3



③ LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 염증성 cytokine 발현 증가 및 생성에 미치는 cordycepin의 영향

대식세포가 활성화되었을 때 분비되는 대표적인 염증성 cytokine인 TNF-α와 IL-1β 발현 및 생성에 cordycepin이 미치는 영향을 확인한 결과 LPS 단독 처리에 의해 증가되었던 전구염증 cytokine IL-1β와 TNF-α의 생성량이 cordycepin에 의해 유의적으로 감소하며 mRNA 수준 또한 cordycepin이 억제 되는 것을 확인함으로써 cordycepin이 iNOS 및 COX-2와 함께 cytokine들의 발현 및 생성 억제를 통하여 염증반응을 억제할 수 있을 가능성을 제시하였다(Fig. 4).

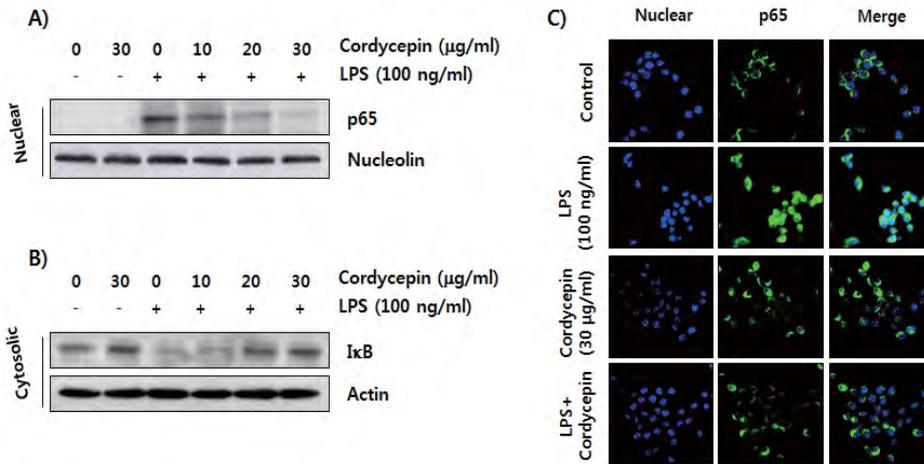
Fig. 4



④ LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 NF-κB 활성화에 cordycepin의 영향

염증 유발 유전자의 전사인자로 알려져 있는 NF-κB의 활성화에 cordycepin이 미치는 영향을 조사하기 위해 nuclear 및 cytosolic으로 분획하여 핵 안으로 translocation 된 NF-κB 변화 확인하였다. 그 결과 LPS 처리에 의해 핵 안으로 translocation 되었던 NF-κB가 cordycepin 처리에 의해 농도 의존적으로 translocation이 억제되는 것을 확인하며, 세포질에 존재하는 IκB 또한 cordycepin에 의해 발현이 회복되는 것을 Western blot 및 confocal 현미경으로 확인함으로써 cordycepin에 의한 항염증 효과가 NF-κB의 활성을 억제함으로써 이루어진다는 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

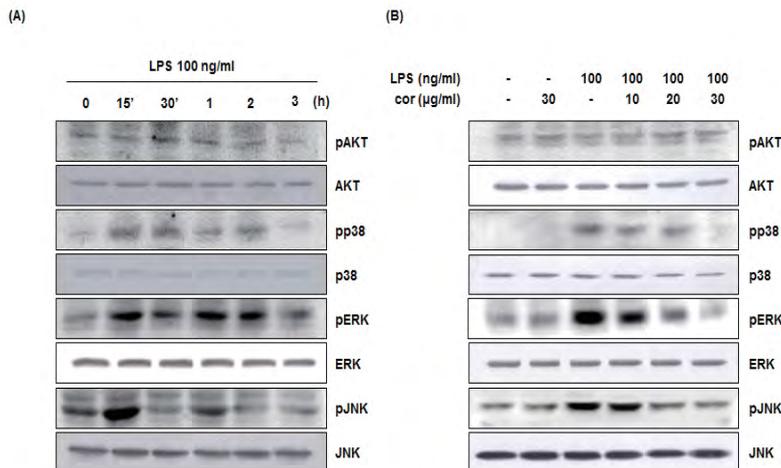
Fig. 5



⑤ Cordycepin에 의한 항염증효과와 MAP kinases 및 PI3K/Akt 경로와의 연관성 확인

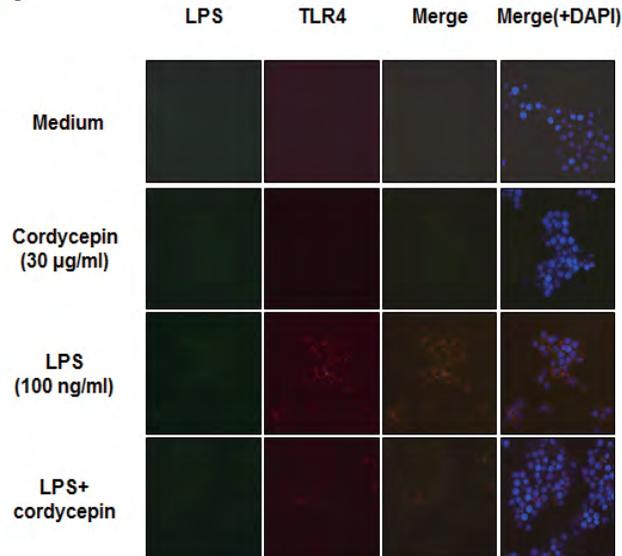
LPS에 의해 유발된 염증반응을 cordycepin이 억제할 때 신호전달계 중 MAP kinases 및 PI3K/Akt 경로들이 관련이 있는지 확인을 위해 western blotting을 실시하였다. 그 결과 LPS를 단독으로 시간별로 처리하였을 때 15분에 MAPK의 인산화가 현저하게 증가되는 것을 확인하였고 이를 cordycepin이 억제시키는 것을 확인하였다(Fig. 6).

Fig. 6



⑥ Cordycepin에 의한 항염증 효과와 TLR4 signaling pathway와의 관계 규명
 세포막에 존재하는 LPS 수용체인 TLR4의 경로를 통하여 이루어지는 염증반응에 cordycepin이 미치는 영향을 확인하기 위해 해 conjugated LPS를 처리하여 confocal 현미경으로 확인하였다. 그 결과 cordycepin에 의한 항염증 효과가 TLR4 신호경로를 억제시킴으로써 이루어진다는 것을 유추할 수 있었다(Fig. 7).

Fig. 7

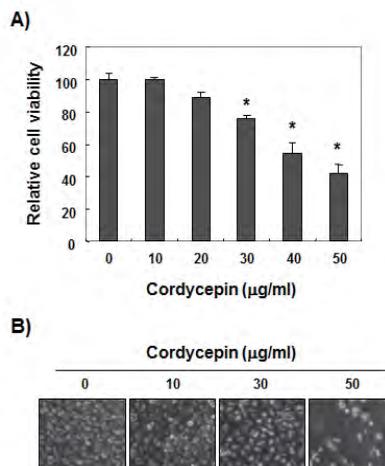


(나) Cordycepin 처리에 의한 인체 위암세포에서 apoptosis 유도 기전 연구

① Cordycepin의 인체 위암 세포에 대한 독성 및 apoptosis와의 관계

인체 위암세포인 AGS에서 cordycepin의 세포 증식 억제능을 확인하기 위해 cordycepin을 24시간 동안 다양한 농도로 처리하여 MTT assay를 실행하여 세포 생존율을 측정하고 현미경을 통하여 세포의 형태학적 변형도 함께 관찰하였다. 그 결과 cordycepin의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 현저하게 저하되는 것을 확인하였으며 현미경을 통해 고농도의 cordycepin 처리군에서 세포의 형태가 변형됨과 동시에 세포의 밀도가 감소되는 것을 확인함으로써 AGS 세포에서 cordycepin이 세포 증식을 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 8).

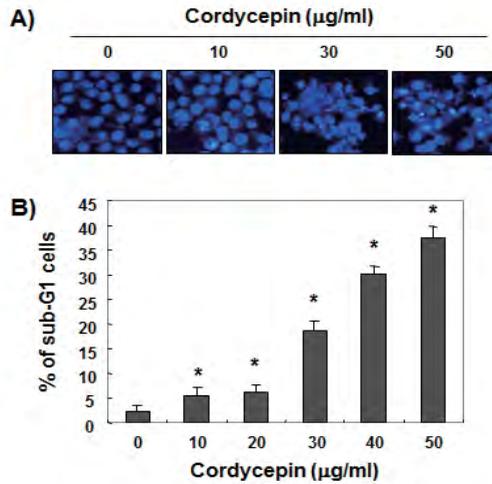
Fig. 8



② Cordycepin에 의한 AGS 인체 위암 apoptosis 유발 확인

Cordycepin에 의한 세포증식 억제가 apoptosis와도 관련성이 있는지 확인한 결과 cordycepin 농도 의존적으로 염색질의 응축 및 apoptotic body가 증가하는 것을 확인하였고 처리 농도의 증가에 따라 세포주기 분포도 중 apoptosis가 유발된 세포의 빈도에 해당되는 sub-G1기 빈도의 증가를 확인함으로써, cordycepin에 의한 AGS 세포의 증식 억제가 apoptosis 유도과 밀접한 연관성이 있는 것을 확인하였다(Fig. 9).

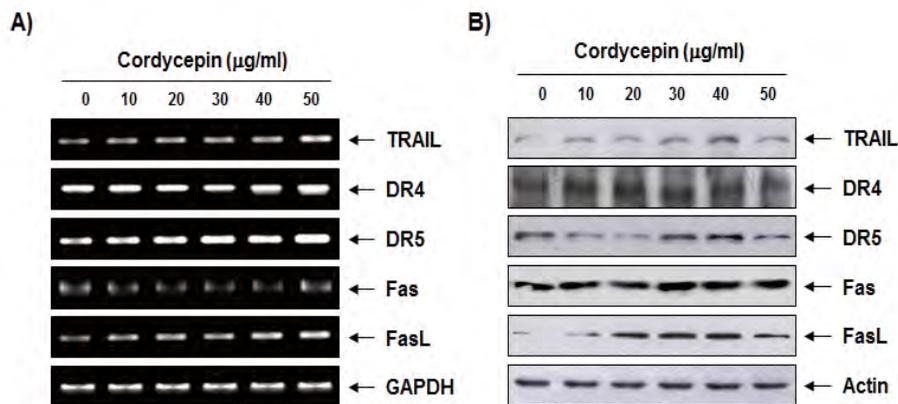
Fig. 9



③ Extrinsic pathway 관련 단백질의 발현에 대한 cordycepin의 영향

Cordycepin에 의해 유발되는 apoptosis 과정이 extrinsic 경로와 관련이 있는지 확인하기 위해 death receptor 관련 유전자를 전사 및 번역 수준에서 관찰하였다. 그 결과 농도 의존적으로 TRAIL, DR5, FasL 의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10).

Fig. 10

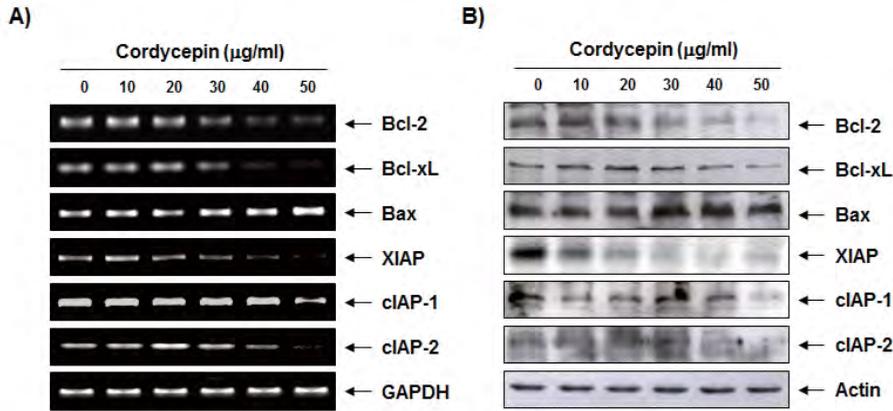


④ Intrinsic pathway 관련 단백질의 발현에 대한 cordycepin의 영향

Cordycepin에 의해 유발되는 apoptosis 과정에서 intrinsic 경로와 관련된 Bcl-2 family 및 caspase 활성억제에 관여하는 IAP family 인자들의 발현 변화를 조사하기 위해 western blotting 및 RT-PCR 실시하였다. 그 결과, cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 Bcl-2 family 중, anti-apoptotic Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현 감소, pro-apoptotic Bax의 발현 증

가, BH3-only protein인 Bid의 whole form의 발현 감소와 IAP family인 cIAP-1, -2 및 XIAP의 발현이 번역(A) 및 전사(B) 단계에서 변화되었음을 확인하였다(Fig. 11).

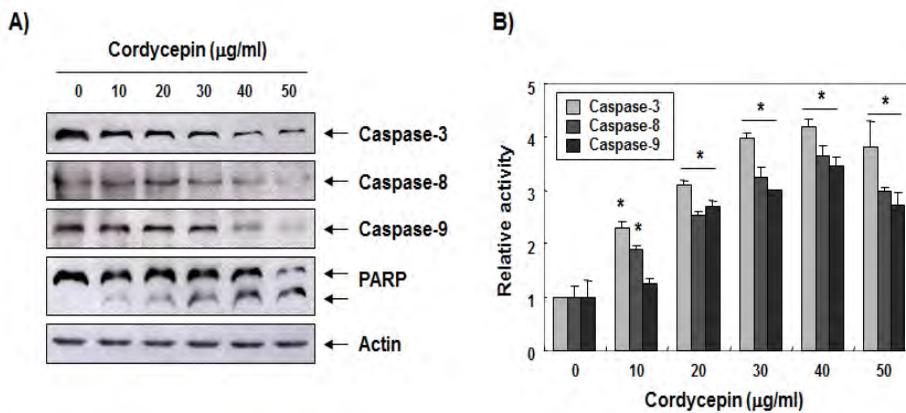
Fig. 11



⑤ Cordycepin에 의해 유도된 apoptosis에 caspase의 영향

AGS에서 cordycepin에 의한 apoptosis 유발 경로를 분석하기 위해, cordycepin을 24시간 처리 후 apoptosis에 가장 중요한 역할을 하는 caspase의 발현 및 활성의 정도와 활성화된 caspase-3의 기질 단백질 단편화 등을 western blotting 및 *in vitro* caspase activity assay 실시하여 확인하였다. Fig. 12의 결과에서처럼, cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 caspase의 활성이 증가하는 것을 알 수 있었고, 활성화된 caspase-3의 대표적인 표적 단백질인 PARP의 단편화를 확인함으로써, AGS세포에서 cordycepin에 의해 유발되는 apoptosis는 caspase 활성 증가가 동반되었음을 확인하였다.

Fig. 12



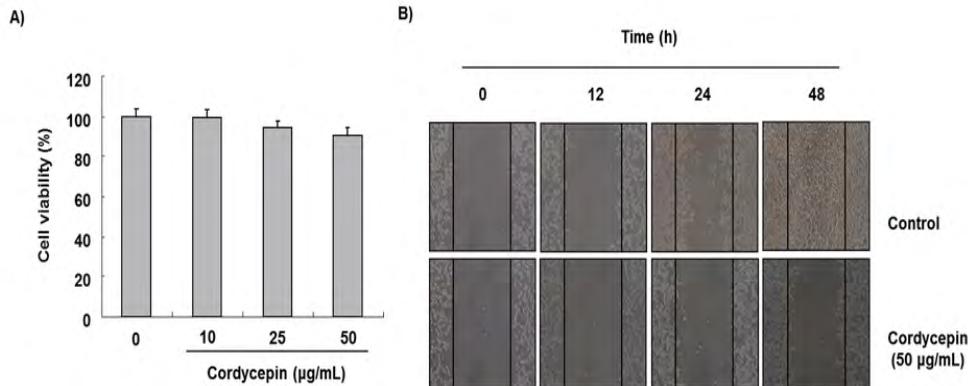
(다) Cordycepin 암세포 전이 억제기전 연구

① Cordycepin의 HCT116 세포에 대한 세포이동 억제 효과

인체 대장암세포주인 HCT116을 대상으로 cordycepin의 세포 증식억제 여부 및 암세포이동 억제능을 확인하기 위하여 48시간 동안 다양한 농도의 cordycepin 처리하였다. 그 이후 MTT assay를 통한 세포독성을 확인하였고 Wound healing migration assay를 통해 암세포 이동 억제 여부를 확인하였다. 그 결과 cordycepin 50 μg/ml 처리군까지 생존율이 90% 이

상인 것을 확인하였으며(Fig. 13A), 이렇게 세포독성이 없는 범위의 농도에서 cordycepin에 의해 암세포의 이동성이 억제(Fig. 13B) 되는 것을 확인할 수 있었다.

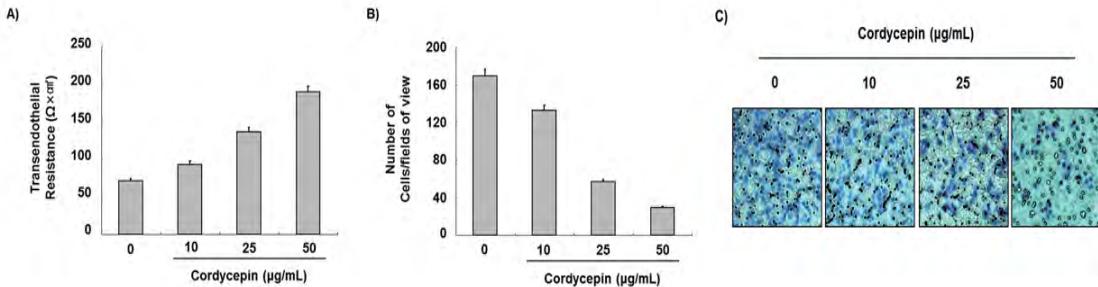
Fig. 13



② Cordycepin에 의한 HCT116 세포의 tight junctions (TJ)의 tightness 증가

HCT116 세포의 TJ 기능 변화와 cordycepin에 의한 암세포의 invasion 억제사이의 연관성의 조사하기 위해서 cordycepin 처리 후 transepithelial electrical resistance (TER) 변화 여부 및 *in vitro* invasiveness assay를 실시하여 확인하였다. 그 결과 cordycepin의 처리 농도 증가에 따라 TER의 값이 증가되어 cordycepin이 tightness를 증가시켰으며(Fig. 14A), 이는 invasion의 현저한 억제와 연관되어 있음을 확인(Fig. 14B & C)함으로써 cordycepin 처리에 의한 암세포 이동성 및 invasion의 억제는 세포의 치밀결합 강화와 연관성이 있음을 확인하였다.

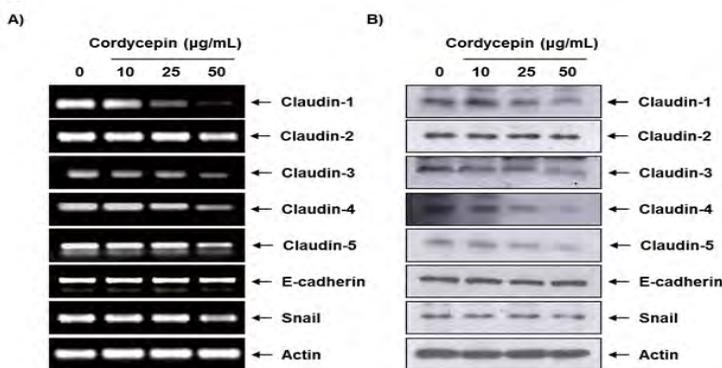
Fig. 14



③ HCT116 세포에서 TJ 조절인자들의 발현에 미치는 cordycepin의 영향 조사

Cordycepin에 의한 HCT116 세포의 TJ 기능 강화에 따른 기전 연구를 위하여 세포 접착에 관련된 유전자 (claudin family, E-cadherin, Snail)의 발현 변화 확인하기 위해 cordycepin 처리 후 RT-PCR 및 Western blotting을 통해 전사 및 번역수준에서 관찰하였다. 그 결과 TJ의 중요 구성성분인 claudin family의 발현이 cordycepin 처리에 의해 억제되는 것을 전사 및 번역 과정에서 확인하였으나 암세포 전이 조절 관련 유전자들의 전사활성에 중요한 역할을 하는 Snail 및 E-cadherin은 상대적으로 큰 변화가 없었음을 확인하였다(Fig. 15).

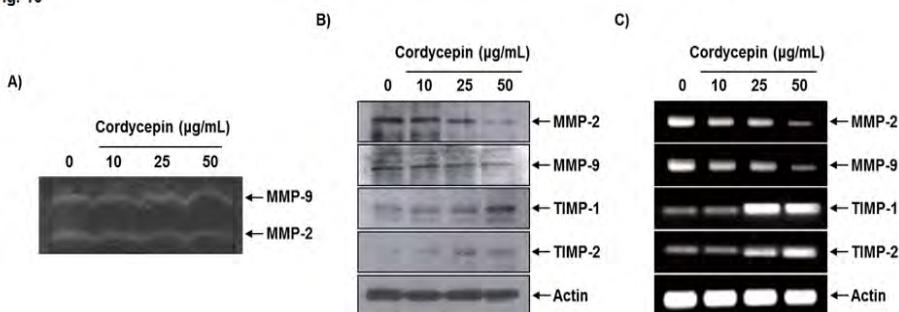
Fig. 15



④ HCT116 세포에서 MMPs의 발현과 활성화에 미치는 cordycepin의 영향

Cordycepin에 의한 HCT116 세포의 invasion 억제에서 matrix metalloproteinase (MMP)의 관련성 여부확인하기 위해 MMP-2 및 -9의 발현/활성 및 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)의 발현 변화를 조사하였다. 그 결과 cordycepin 처리 농도 증가에 따라 MMP-2 및 -9의 활성과 발현이 현저히 감소되었음을 Gelatin zymographic analysis (A), Western blot analysis (B) 및 RT-PCR (C)로 확인하였으며 이는 TIMPs (-1 & -2)의 발현 감소에 의한 것임을 알 수 있었다(Fig. 16).

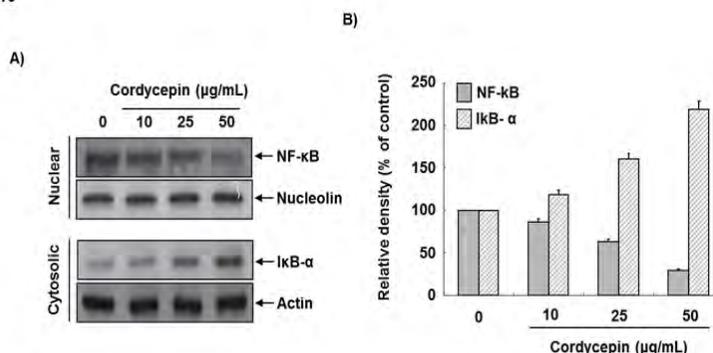
Fig. 16



⑤ HCT116 세포의 invasion 억제와 NF-κB의 연관성 조사

Cordycepin에 의한 HCT116 세포의 invasion 억제와 NF-κB와의 연관성을 확인하기 위해 HCT116세포에 cordycepin을 처리한 후 nuclear와 cytosolic으로 분획하여 NF-κB 발현 변화 확인하였다. 그 결과 cordycepin의 처리에 따라 농도 의존적으로 핵 안으로 translocation 되는 NF-κB가 억제되고, IκB의 degradation이 회복되는 것을 확인(A & B)하였다.

Fig. 16



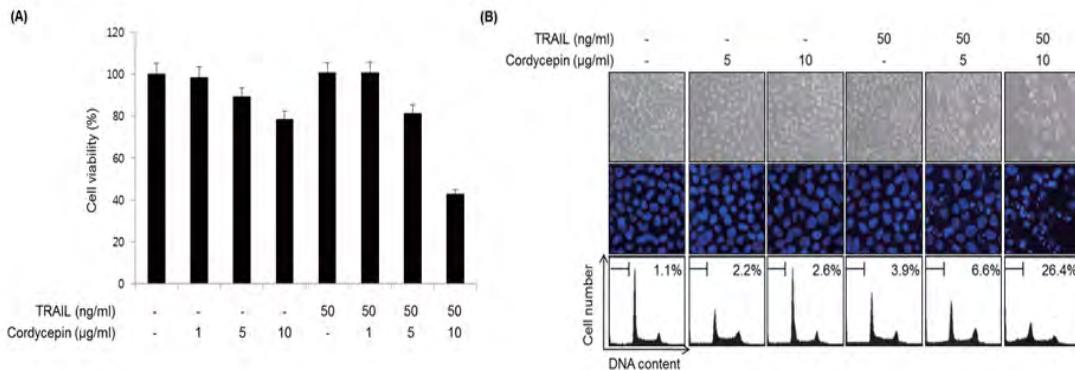
이상의 결과는 HCT116 세포에서 cordycepin이 NF- κ B가 핵 안으로 translocation 되는 것을 억제함으로써 HCT116 세포의 이동성 및 invasion을 억제할 수 있을 가능성을 보여주는 결과이다.

(라) Cordycepin 항암제 내성 극복 가능성

① TRAIL에 저항성을 가지는 암세포에서 cordycepin에 의한 암세포 증식억제 확인

TRAIL에 저항성을 가지고 있는 인체 간암 세포 Hep3B에서 cordycepin과 TRAIL 병행 처리하였을 때 세포의 증식이 억제되는지 확인하고 이 세포증식 억제가 apoptosis와 관계가 있는지 확인하기 위해 TRAIL과 cordycepin을 병행 처리 후 MTT assay를 실행하였다. 그 결과 TRAIL, cordycepin 단독 처리시 세포의 큰 영향을 미치지 않는 농도를 병행처리하였을 때 Hep3B 세포 증식이 현저하게 억제됨을 확인(Fig. 17A)하였고 현미경 관찰을 통하여 TRAIL과 cordycepin 병행처리에 의해 세포의 밀도가 감소하고 세포의 형태가 변형되는 것을 확인(B)하였다. 이러한 세포증식억제가 apoptosis와 관련있는지를 확인하기 위해 DAPI staining을 하여 형광현미경으로 관찰한 결과 염색질의 응축 및 apoptotic body의 형성을 확인하였고 FACs를 통한 sub-G1기 측정된 결과 세포주기 분포도 중 apoptosis가 유발된 세포의 빈도에 해당되는 sub-G1기 빈도의 증가 확인(Fig. 17B)함으로써 TRAIL에 저항성을 가지는 Hep3B세포에서 cordycepin이 세포증식억제 효과가 있음을 확인하였고, 이는 apoptosis 유도과 밀접한 연관성이 있는 것을 확인하였다.

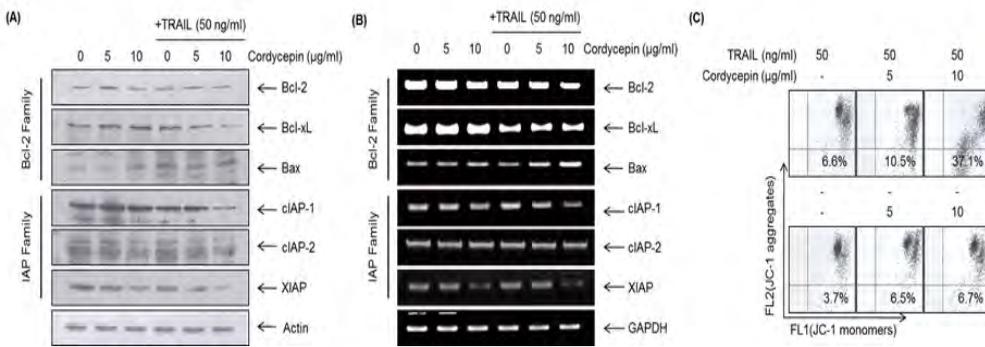
Fig. 17



② Intrinsic pathway 관련 단백질의 발현에 대한 cordycepin의 영향 조사

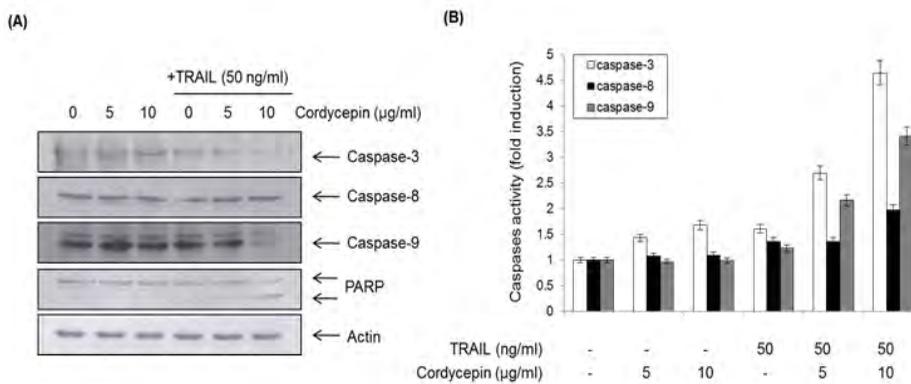
Apoptosis 유발 경로 중 intrinsic 경로의 관련 인자인 Bcl-2 family 과 caspase 활성억제에 관여하는 IAP family 인자들의 발현 변화 조사하고 더 나아가서 미토콘드리아와의 연관성을 확인하기 위해 MMP loss를 확인하였다. 그 결과 TRAIL과 cordycepin 병행처리에 의해 Bcl-2 family 중, anti-apoptotic Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현이 감소하고, pro-apoptotic Bax의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 IAP family인 cIAP-1, -2 및 XIAP의 발현이 변역(Fig. 18A) 및 전사(Fig. 18B) 단계에서 변화되었음을 확인하였다. 동일한 조건에서 TRAIL과 cordycepin 병행처리에 의해 미토콘드리아 막 전위의 변화도 관찰됨으로써 TRAIL/cordycepin 병행처리에 의해 유발되는 apoptosis는 intrinsic pathway와 관련이 있음을 유추할 수 있었다.

Fig. 18



③ Cordycepin에 의해 유도된 Hep3B 세포 apoptosis 과정에서 caspase의 활성화 조사
TRAIL에 저항성을 가지는 Hep3B에서 TRAIL과 cordycepin 병행처리에 의한 apoptosis 유발 경로 분석을 위해 다양한 종류의 caspases의 발현 및 활성의 정도와 활성화된 caspase-3 기질 단백질의 단편화 유도 여부를 확인하였다. 그 결과 TRAIL/cordycepin 처리에 따라 caspase-3 및 -9의 활성이 caspase-8 보다 높게 관찰되었으며, 활성화된 caspase-3의 대표적인 표적 단백질인 PARP의 단편화를 확인함으로써 Hep3B 세포에서 TRAIL/cordycepin에 의해 유발되는 apoptosis는 caspase 활성 증가가 동반되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 19).

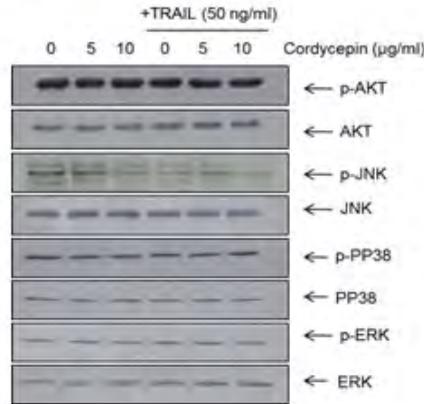
Fig. 19



④ Cordycepin에 의한 apoptosis 유발과 MAP kinases 및 PI3K/Akt 경로와의 관계 조사

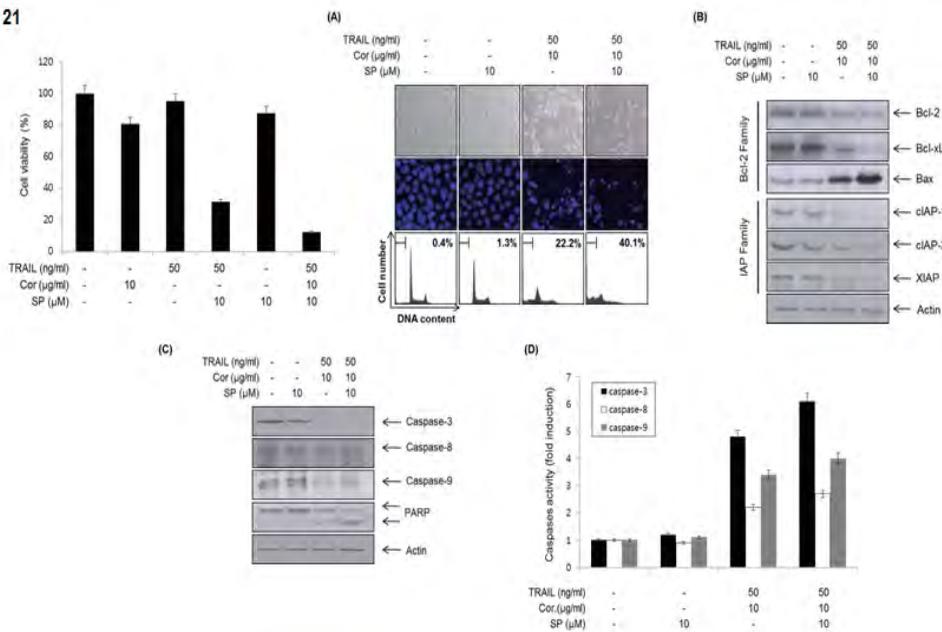
Cordycepin에 의한 apoptosis 유발에 신호전달계 중 MAP kinases 및 PI3K/Akt 경로들이 관련이 있는지 확인을 위해 western blotting을 실시하였다. 그 결과 TRAIL/cordycepin 처리에 의해 JNK의 인산화가 억제되는 것을 확인하였으나 나머지 MAPKs들과 AKT의 발현에는 큰 차이 없음을 확인하여 TRAIL/cordycepin에 의한 Hep3B 세포의 apoptosis에 JNK의 불활성화가 관련 있을 것이라 추정된다(Fig. 20).

Fig. 20



⑤ JNK와의 연관성을 재확인하기 위하여 JNK의 inhibitor로 알려져 있는 SP600125를 TRAIL/cordycepin과 함께 처리하여 세포증식억제능을 확인한 결과 JNK inhibitor 처리시 TRAIL/cordycepin 병행처리보다 더욱 더 현저하게 세포증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 이 때 apoptosis 또한 증가하는 것을 확인(Fig. 21)함으로써 TRAIL/cordycepin에 의해 유발된 apoptosis에서 JNK가 중요한 역할을 한다고 사료된다.

Fig. 21



제2절 농산물 소재 간 기능 개선 및 혈당조절 효과 검증

1. 농산물 소재를 이용한 간 질환 개선효과 제품의 개발

(제 2 세부 : 동아대학교, 정영수)

가. Cordycepin 고함유 동충하초 분말을 첨가한 식이가 Orotic acid 유발 지방간 흰쥐에 미치는 개선효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) 실험재료

본 실험에 사용한 동충하초 분말은 청원농산 (김해, 경남)에서 구입 하였다. 육종에 의해 Cordycepin 함유량이 높은 *Cordyceps militaris* (JLM0636)를 실험재료로 사용하였으며, *Paecilomyces japonica* 와 *Cordyceps militaris* 분말을 대조구로 사용하였다. 외관상 세 가지 종류의 동충하초 분말 모두 외관상 노란색을 띠었으며, 색깔의 농도는 *Paecilomyces japonica*, *Cordyceps militaris*, Cordycepin 고함유 *Cordyceps militaris* (JLM0636) 순으로 진하였다.

(나) 실험조성 및 실험군

식이 조성은 Table 1과 같으며, 정상군 (N), 오르트산 투여 대조군 (C), 오르트산 +*Paecilomyces japonica* 투여군 (PJ), 오르트산+*Cordyceps militaris* 투여군 (CM), 오르트산 +Cordycepin 고함유 *Cordyceps militaris* (JLM0636) 투여군 (CM α)으로 나누어 실험을 진행 하였다. 동충하초 분말의 식이중 첨가량 결정은 전보의 방법에 준하였으며, 식이 중에 첨가한 동충하초 분말은 탄수화물원인 Corn starch로 대체하여 첨가하였다.

Table 1. Compositions of experimental diets(%)

Component	N*	Orotic acid			
		C*	PJ*	CM*	CM α *
Casein	20	20	20	20	20
α -Corn starch	15	15	12	12	12
Corn oil	10	10	10	10	10
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>Paecilomyces japonica</i>	-	-	3.0	-	-
<i>Cordyceps militaris</i>	-	-	-	3.0	-
<i>Cordyceps militaris</i> α	-	-	-	-	3.0
Orotic acid	-	1.0	1.0	1.0	1.0
Sucrose	45	44	44	44	44
Total (%)	100	100	100	100	100

N* = Normal, C* = Control, PJ* = *Paecilomyces japonica*,

CM* = *Cordyceps militaris* CM α * = *Cordyceps militaris* α

(다) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 구입하여 일주일간 시판 고형사료를 급여하면서 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 체중이 동일하게 난피법 (randomized complete block design)으로 분류하여 사육실 온도($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)와 습도($50\pm 5\%$) 및 명암주기(명주기: 07:00~19:00)가 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다. 실험동물은 각 군마다 6마리씩 나누고, 식이와 물은 10일간 자유섭취시켰다. 사육 기간 중 식이 섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 3일에 한번씩 일정한 시간에 측정하였다.

(라) 동물실험, 시료 채취 및 분석시료 조제

동물실험은 10일간 각 군별로 조제사료를 급여하면서 사육한 후, 실험 최종일 12시간 이상 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 혈액을 채취하고, 약 30분간 실온에 방치시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 얻어 혈청 생화학적 분석에 제공하였다. 채혈 후 각 조직을 적출하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 분석시료로 제공 하였다.

(마) 혈청 지질농도 및 생화학적 지표분석

혈청 중의 Triglyceride, Total-cholesterol, Total lipid, Free fatty acid, Phospholipid 농도 및 ALT, AST, Alk.phosphatase, Cholinesterase, LDH활성은 의료전문수탁검사기관인 네오딘의학연구소(서울, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

(바) 간 조직의 분획 조제

간 조직으로부터 homogenate 분획 조제는 간을 일정량 취해 ice-cold potassium phosphate buffer 용액(0.1 mol/L potassium phosphate containing 1 mmol/L sodium EDTA and 1 mmol/L dithiothreitol, pH 7.4)을 9배량 첨가하여 IKA-ULTRA-TURRAX T25 basic homogenizer (IKA-WERKE GMBH & CO., KG, Staufen, Germany)를 이용하여 균질액을 제조하였다. Homogenate 용액을 먼저 800 x g에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 다시 고속원심분리기(VS-24SMTi, Vision Scientific Co., Ltd.)에서 10,000 x g로 20분간 원심분리 하여 침전된 pellet은 mitochondria fraction으로 하였다. 이때 microsome이 함유된 상등액은 105,000 x g에서 60분간 초원심분리하여 상층의 cytosol 분획과 침전된 microsome 분획을 얻어 실험에 제공하였다. Homogenate, mitochondria 및 microsome 분획의 단백질 농도는 Lowry 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정 하였다.

(사) 과산화지질 측정

분획한 homogenate와 microsome 생체막의 과산화지질 함량은 전보의 방법에 준하여 정량 하였다. 즉, 단백질 량으로 1 mg을 함유한 분획 용액 1 ml에 각각 thiobarbituric acid(TBA) 시약 2 ml을 가하여 잘 혼합하고, 끓는 물에서 30분간 반응 시킨 후 실온에서 방냉하여 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질 함량은 malondialdehyde를 nmol/g으로 나타내었다.

(아) 미네랄 함량 측정

간 조직의 미네랄 함량은 A.O.A.C. 분석 방법에 준하여 측정하였다[4]. 즉, 간 조직 1 g 을 각 550°C 회화로에서 3시간 회화 시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시켜 수용상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl를 가하여 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석하여 원자흡광 분광광도계(AAnalyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

(자) Glutathione 함량 측정

간 조직의 glutathione 함량은 간 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml과 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 가하여 혼합하고 원심분리 시킨 뒤 상등액 0.3 ml에 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 발색시약을 첨가하여 412 nm 흡광도에서 측정하여 glutathione의 표준 검량 곡선에 의해 함량을 산출하였으며 간 조직 g당 mg으로 표시하였다.

(차) 간조직의 병리조직학적 관찰

동물해부 직후 적출한 간을 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거시킨 상태에서 조직의 일정한 부위의 일부를 취하여 10% 중성포르말린 용액에 고정하여 통상적인 조직처리인 파라핀 포매 과정을 거쳐 3~4 μ m 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 한 후 광학현미경(Olympus BX41, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

(카) 통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차 (mean \pm SE)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 체중, 식이 및 음료 섭취량 변화

Orotic acid 1% 수준을 첨가하여 지방간을 유도한 흰쥐에 Cordycepin 고함유 *Cordyceps militaris* (JLM0636) (CMa군)분말이 미치는 영향을 살펴보기 위해 대조군인 *Paecilomyces japonica* (PJ군)와 *Cordyceps militaris* (CM군)분말과 함께 3% 농도를 10일간 기본식이에 첨가하여 투여하였다. 그 결과 체중 증가량이 정상군에 비해 많이 증가하지 않은 것으로 보아 orotic acid에 의해 성장에 영향을 미친 것으로 나타났으며, 식이 섭취량은 N군과 C군은 유의적인 차이가 없지만 CMa군, CM군, PJ군 순으로 섭취량이 감소하는 경향이였다. 식이 섭취량은 감소하는 반면에 음료 섭취량은 반대로 증가하였으며, 그 중 CMa군이 가장 많이 섭취하였다(Table 2). 이러한 결과로 보아 orotic acid 1%와 PJ군, CM군, CMa군 3% 첨가 수준은 체중 증가량 뿐만 아니라, 식이 섭취량 및 음료 섭취량에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 2. Effect of PJ, CM and CM α on body weight, food intake and water consumption in rats fed diet containing orotic acid.

Groups	N	C	PJ	CM	CM α
Initial weight (g)	213.22 \pm 3.27 ^a	213.83 \pm 3.26 ^a	213.79 \pm 3.90 ^a	212.99 \pm 1.92 ^a	212.35 \pm 2.42 ^a
Final weight (g)	327.27 \pm 2.63 ^a	293.47 \pm 6.22 ^b	264.45 \pm 8.08 ^c	279.98 \pm 5.42 ^{bc}	290.69 \pm 3.41 ^b
Weight gain (g)	114.06 \pm 2.47 ^a	79.64 \pm 4.31 ^b	50.66 \pm 4.65 ^c	66.99 \pm 4.50 ^d	78.34 \pm 2.50 ^b
Food intake (g/day)	26.86 \pm 0.43 ^a	26.12 \pm 0.58 ^a	17.15 \pm 0.84 ^b	21.99 \pm 1.11 ^c	22.60 \pm 0.35 ^c
Water consumption (ml/day)	27.75 \pm 0.34 ^{ad}	25.33 \pm 0.66 ^a	29.25 \pm 0.57 ^{bd}	31.71 \pm 1.34 ^b	42.86 \pm 1.13 ^c

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

(나) 각 장기의 절대 및 상대 중량

체중에 대한 각 장기의 절대중량과 상대중량을 각각 Table 3와 4에 나타내었다. 절대 중량에서는 정상군에 비해 모든 실험군에서 유의적인 차이를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effects of PJ, CM and CM α on the tissues absolute weight in rats fed diet containing orotic acid.

Groups	N	C	PJ	CM	CM α
Liver (g)	10.58 \pm 0.43 ^a	16.07 \pm 0.58 ^b	10.70 \pm 0.51 ^a	10.69 \pm 0.41 ^a	12.36 \pm 0.52 ^c
Kidney (g)	2.69 \pm 0.04 ^a	2.42 \pm 0.07 ^b	2.45 \pm 0.15 ^{ab}	2.27 \pm 0.07 ^b	2.38 \pm 0.05 ^b
Testis (g)	2.85 \pm 0.10 ^a	2.98 \pm 0.07 ^a	2.88 \pm 0.08 ^a	2.88 \pm 0.07 ^a	2.90 \pm 0.06 ^a
Perirenal fat pad (g)	5.08 \pm 0.45 ^a	3.37 \pm 0.56 ^b	1.77 \pm 0.23 ^c	2.74 \pm 0.22 ^{bc}	2.37 \pm 0.14 ^{bc}
Epididymal fat pad (g)	5.26 \pm 0.16 ^a	4.30 \pm 0.26 ^b	3.13 \pm 0.19 ^c	3.78 \pm 0.15 ^{bd}	3.71 \pm 0.17 ^d

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

간장의 무게는 기본식을 투여한 N군과 비교해서 orotic acid 1% 투여한 C군에서는 유의적으로 증가하여 중성지방의 축적에 의한 지방간 유발이 확인되었다. 그러나 C군에 비교해 CM α 군, PJ군, CM군 순으로 유의적으로 감소하여 중성지방의 축적을 감소시킴으로써 이들의 식이첨가로 인해 지방간의 개선효과가 나타났으나, N군보다는 약간 증가하는 경향을 보였다. 한편, 신장, 고환의 무게는 각 실험군 간 유의적인 차이는 인정되지 않았으며, 비장, 신장주변 지방조직 및 고환주변 지방조직의 경우 군 간에 약간의 차이를 나타내 보였다(Table 4).

Table 4. Effects of PJ, CM and CM α on the relative tissues weight in rats fed diet containing orotic acid.

Groups	(% of terminal BW)				
	N	C	PJ	CM	CM α
Liver	3.23±0.12 ^a	5.47±0.12 ^b	4.04±0.15 ^c	3.82±0.13 ^c	4.27±0.22 ^c
Kidney	0.82±0.01 ^a	0.82±0.02 ^a	0.93±0.05 ^b	0.81±0.01 ^a	0.82±0.02 ^a
Testis	0.87±0.03 ^a	1.01±0.02 ^b	1.09±0.04 ^b	1.03±0.04 ^b	1.00±0.03 ^b
Perirenal fat pad (g)	1.55±0.13 ^a	1.13±0.17 ^b	0.66±0.07 ^c	0.97±0.07 ^{bc}	0.81±0.05 ^c
Epididymal fat pad(g)	1.61±0.04 ^a	1.46±0.06 ^{ac}	1.18±0.05 ^b	1.35±0.05 ^{cd}	1.28±0.06 ^{bd}

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

한편, 신장, 고환의 무게는 각 실험군 간 유의적인 차이는 인정되지 않았으며, 비장, 신장주변 지방조직 및 고환주변 지방조직의 경우 군 간에 약간의 차이를 나타내 보였다(Table 4).

(다) 혈청 지질 농도에 미치는 영향

혈중 지질 농도는 동맥경화, 고혈압, 심장병, 고지혈증과 같은 심혈관계 질환원인 진단지표로 사용되고 있는 가운데, 고콜레스테롤혈증, 고중성지혈증, 저HDL-콜레스테롤혈증도 이들 질환의 위험 인자로 주목 받게 되면서 유럽과 미국 등에서 새로운 임상 지침이 설정되었다. 최근 천연 식물자원을 대상으로 혈중 콜레스테롤 농도뿐만 아니라 중성지질 농도를 감소시키고 HDL-콜레스테롤 농도를 증가시키려는 시도가 활발하게 전개되고 있다. 한편 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 항 동맥경화의 지표로서 주로 간장에서 합성되고 다른 지단백질과는 달리 혈관벽에 침착되어 있는 LDL-콜레스테롤을 분리해내어 간장으로 운반하여 에너지로 이용하거나 체외 배설을 촉진하는 작용을 함으로써 심혈관계 질환의 유발 위험성을 감소시킬 수 있는 유익한 콜레스테롤로 널리 알려져 있다. 혈청 총 콜레스테롤 농도는 대조군과 orotic acid 1% 수준을 첨가한 C군을 비교 하였을 때 유의적인 차이가 없었으며, PJ군, CM군, CM α 군 또한 대조군과 유사한 경향을 보였다. 이와 같은 결과로 보아 orotic acid 1%수준의 식이 첨가는 콜레스테롤에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 혈청 중성지방 농도는 대조군과 비교했을 때 C군에서는 감소경향을 보였고, CM군, CM α 군에서는 감소하였지만 PJ군에서는 대조군과 유사한 결과를 나타내 보임으로서, 실험군간 유의적인 차이는 인정되지 않았다(Fig. 1). 한편, 혈청 인지질 농도 또한 대조군과 실험군간 유사한 결과를 나타내 보임으로서 각각의 동충하초 분말 3% 농도가 혈중 인지질 농도에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. Total lipid 함량과 Free fatty acid 함량에서는 PJ군, CM군, CM α 군 대조군과 비교할 때 약간의 차이는 있었으나, 큰 영향은 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 PJ군, CM군, CM α 군의 3% 수준의 식이 첨가는 실험군간 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 Cordycepin은 orotic acid 유발 지방간 실험에서는 혈중 지질대사에 영향은 미치지 않는 것으로 사료된다.

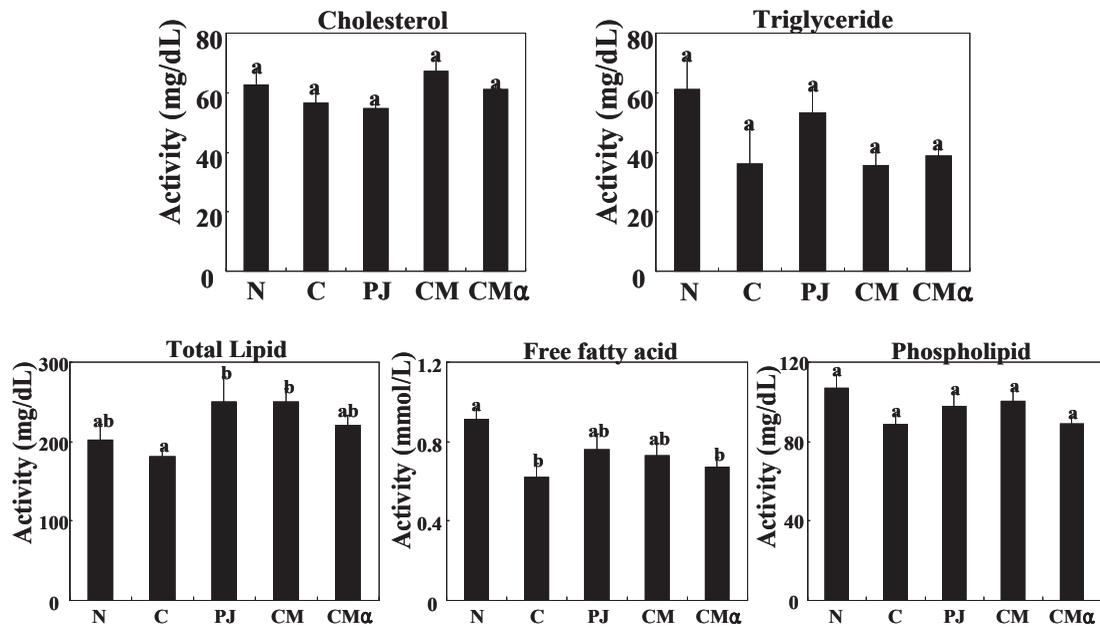


Fig. 1. Effect of PJ, CM and CMα on the serum lipid concentrations in rats fed diet containing orotic acid. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(라) 혈중 ALT, AST, ALP, LDH, 및 Choline esterase 활성 변화

간 손상의 임상적 지표로 사용되고 있는 ALT, AST, ALP, LDH 및 Choline esterase 활성 측정을 통하여 간 기능 효능을 검증한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 혈청 ALT 및 AST 활성은 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상 지표의 중요한 단서가 된다. 본 실험에서 ALT, AST는 orotic acid 1% 수준 식이 투여 C군에서 유의적으로 증가하였고, PJ군, CM군, CMα군에서는 대조군과 비슷한 양상을 보였다. Orotic acid 1% 식이 투여 C군에서의 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성 증가는 PJ 투여, CM 투여 및 CMα 투여에 의해 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 각각의 동충하초 분말 3% 식이 투여가 간 보호 효과에 더욱 우수하다는 것을 암시하고 있다. Glutathione, S-adenosylmethionine, amino acids, zinc를 많이 함유한 효모를 급여한 실험에서 혈중 ALT, AST활성을 감소시켜 강력한 간보호 효과를 나타내는 실험들이 수행되었다. 또한 glutathione 고함유 효모 *S. cerevisiae*를 급여한 사염화탄소 유발 간독성 모델에서도 ALT 및 AST 활성을 감소시키는 결과가 이전 실험에서도 보고된 바 있다. Sugimura 및 Yamamoto는 acetaminophen유발 간 독성 실험에서 glutathione 고함유 효모의 투여에 의해 AST 및 ALT 활성이 농도 의존적으로 감소되었으나, glutathione 저함유 빵효모 투여에 의해서는 이러한 효과가 없었다고 하였다. 이러한 효과는 glutathione 고함유 효모의 투여에 의해 간 세포내 glutathione 농도가 높아지면서 간독성 개선효과가 나타난 것으로 보여지며, 본 실험에서도 발효 누에분말 투여에 의해 간 세포내 glutathione 농도가 높아지는 결과를 얻음으로서 이를 뒷받침 하고 있다.

간 기능적 임상지표로 사용되고 있는 혈중 ALP, LDH 및 Choline esterase 활성도 지방간 모델 실험에서 증가됨으로서 간 독성 유발과 깊은 관련성을 가진 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서도 LDH 활성은 orotic acid 1% 수준 식이 투여 C군에서 증가 경향을 보였으나, 이러한 증가는 PJ군, CM군, CMα군에서 유의적으로 감소하였고 특히 CM군, CMα군에 의해서

크게 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, ALP 및 Choline esterase 활성은 대조군과 비슷하게 감소하는 결과를 얻었다. 그러나, 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 따라서 PJ, CM, CM α 투여는 orotic acid 식이 첨가로 증가된 ALT, AST, ALP, LDH, 및 Choline esterase 활성을 유의적으로 감소시킴으로서 orotic acid 유발 간 질환을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재로 활용될 가능성이 있는 것으로 사료되어진다.

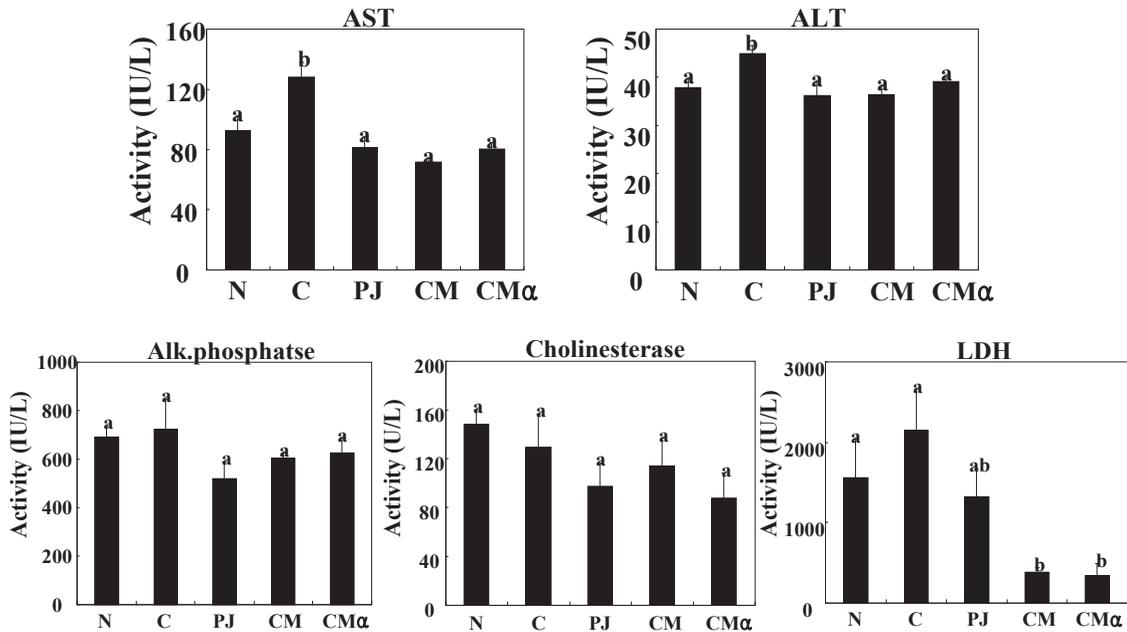


Fig. 2. Effects of PJ, CM and CM α on the activities of AST, ALT, Alk. Phosphatase, Cholinesterase and LDH in rats fed diet containing orotic acid.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

(마) 간 조직 중성지질 농도

간은 많은 지질과 지질대사에 관련된 중요한 조직으로 알려져 있으며, 혈중 중성지질 농도는 간 중성지질 대사와 밀접한 관련성이 있다. 특히 간 지질 중에서 중성지질 축적은 비 알코올성 또는 알코올성 지방간 유발 원인 물질로 잘 알려져 있다. 본 실험에서 Orotic acid 1% 식이 투여에 의해 간 중성지질 농도가 현저히 증가하여 오르트산 유발 지방간의 특징을 잘 나타내었다(Fig. 3). 흰쥐에서 간독성에 의한 간 지질의 축적은 glycine, arginine, taurine, cysteine, alanine 등과 같은 항산화 및 간독성 개선 효과를 가지는 아미노산에 의해 어느 정도 개선되는 것으로 알려져 있다. 높은 항산화활성을 가지고 있는 것으로 알려진 동충하초 분말에 의해 오르트산 유발에 의한 간 중성지질 축적을 현저하게 경감시키는 효능이 있는 것으로 밝혀졌다.

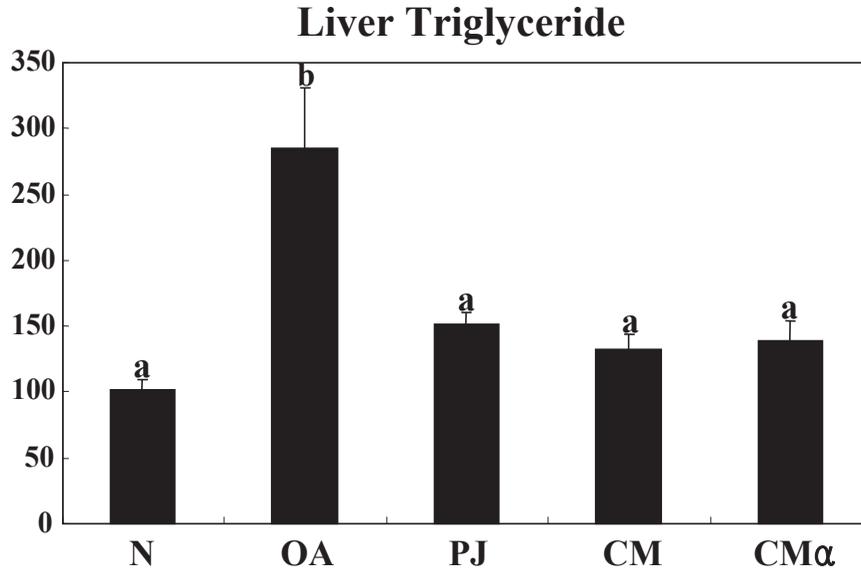


Fig. 3. Effect of PJ, CM and CMα on the concentrations of Liver triglyceride in Orotic acid feeding rats
 Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(바) 조직 및 혈중 과산화지질 농도 변화

간독성의 정도를 나타내는 지표인 ALT 및 AST 활성과 같이 간 조직 중의 과산화지질 농도도 간 독성의 지표로 사용되고 있다. 지질과산화 반응은 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화 유발을 촉진하고, 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde의 농도가 증가되어 세포에 산화적 손상이 일어나게 되면 생리적 기능 저하에 의해 간 질환 등의 여러 가지 질병을 초래하여 노화나 유전적 장애의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 이러한 지질과산화 반응은 여러가지 독성 화합물이나 약물 등에 의한 간 손상 발생의 가장 중요한 기전으로서 세포내 유리라디칼 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인해 야기되는 산화적 스트레스의 증가에 기인한다고 하였다. 또한 간 조직은 체내로 흡수된 모든 영양성분과 알코올, 약물 등을 포함하는 외인성 물질을 분해 시켜 독성을 경감시키는 주요 작용을 하기 때문에 이 과정에서 다양한 독성물질에 노출될 기회가 많아 체내에서 이들의 주된 축적 부위로 알려져 있으며, 이 때문에 항산화계가 저하되어 지질 과산화물을 생성하는데 좋은 환경을 제공함으로써 조직의 손상을 초래할 수가 있다고도 하였다.

본 실험에서 생체막 지질의 과산화물 생성 정도의 지표로 알려져 있는 TBARS를 측정된 결과, 정상군(N군)에 비해 orotic acid 1% 식이 투여한 대조군(C군)에서 과산화지질 농도는 간장, 혈청, 신장, 고환에서 유의적으로 증가하였고, PJ군 > CM군 > CMα군 순으로 감소하는 경향을 나타내 보였다(Fig. 4).

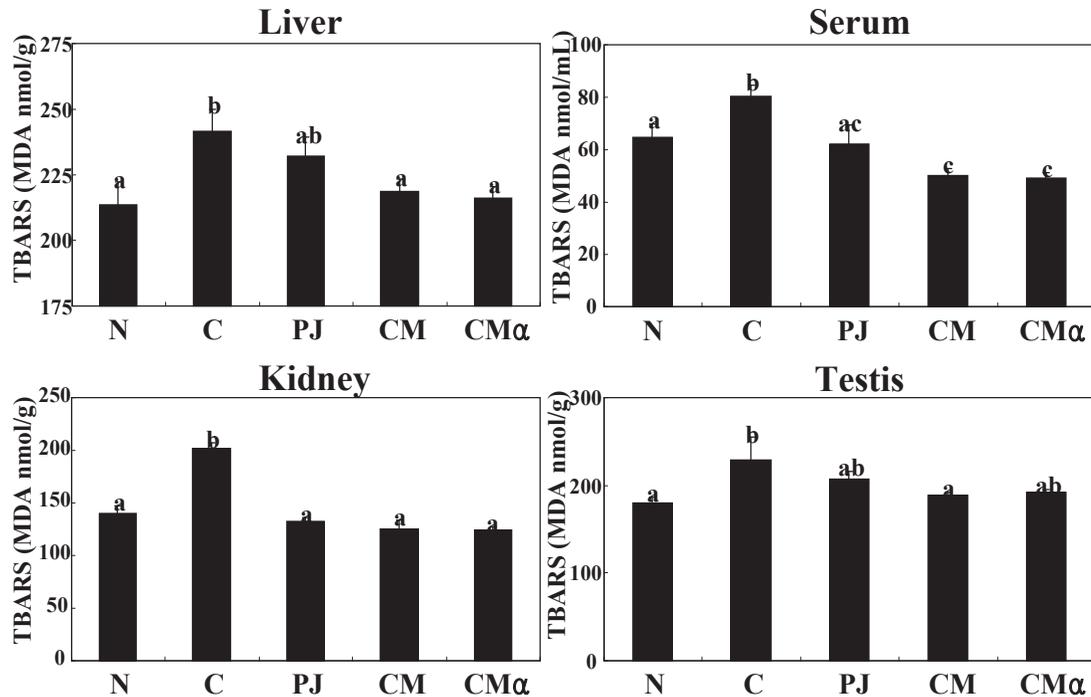


Fig. 4. Effects of PJ, CM and CMα on TBARS in the hepatic fractions, tissue and serum in rats fed diet containing orotic acid.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(사) 비헴철 및 아연 함량 측정

필수 미량원소인 철은 지방산화를 촉진시키는 물질로 알려져 있으며, 체내 H_2O_2 를 제거하는 catalase의 구성 성분으로 체내의 비타민 C의 함량과 H_2O_2 의 농도 차에 의해서 과산화지질 반응에 영향을 미침으로서 생체 내 과산화지질 반응을 조사하는데 있어서 비헴철 함량 측정은 중요한 요인으로 시사되어 있다. 간 조직 중의 비헴철 함량은 정상군에서 0.85ppm, Orotic acid 식이투여 C군에서 0.55ppm, PJ군에서 0.76ppm, CM군에서 0.77 및 CMα군에서 0.79ppm 으로 나타났다. N군에 비해 C군에서 유의적으로 감소하였으나 CMα군 > CM군 > PJ군 순으로 순차적으로 증가하는 경향을 보였다(Table 5). 간장 중의 지질 과산화물 함량은 철분 함량에 의해 영향을 받는다는 결과가 보고된 바 있다. 따라서 본 실험에서도 대조군에 비해 C군에서 간장 중의 비헴철 함량이 감소하였고, 각각의 동충하초 분말 3% 식이 투여에 의해 비헴철의 함량이 증가하였음을 확인하였다. 한편, 생체 내 항산화 물질로 잘 알려져 있는 간 조직 중의 아연 농도 역시 각 실험 군 간에 비헴철 함량과 유사한 경향차이를 보였다. 즉, 정상군에서 0.25ppm, C군에서 0.16ppm, PJ군에서 0.23ppm, CM군에서 0.25ppm 및 CMα군에서 0.25ppm 으로 나타났다. 따라서, 아연함량도 각각의 동충하초 분말 3% 식이 투여에 의해 증가하였음을 확인하였다.

Table 5. Effect of PJ, CM and CM α on the nonheme iron and zinc contents of liver in Orotic acid feeding rats

Groups	N	C	PJ	CM	CM α
Liver					
Zn	0.25±0.01 ^{ac}	0.16±0.01 ^b	0.23±0.00 ^a	0.25±0.01 ^c	0.25±0.00 ^c
Fe	0.85±0.02 ^a	0.55±0.02 ^b	0.76±0.02 ^c	0.77±0.01 ^c	0.79±0.04 ^{ac}
Kidney					
Zn	0.23±0.01 ^{ab}	0.22±0.01 ^a	0.22±0.01 ^{ab}	0.24±0.01 ^{ab}	0.25±0.01 ^b
Fe	0.17±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	0.07±0.01 ^b	0.07±0.01 ^b	0.05±0.01 ^b
Testis					
Zn	0.24±0.00 ^a	0.21±0.00 ^b	0.23±0.00 ^a	0.24±0.00 ^a	0.30±0.00 ^c
Fe	0.07±0.01 ^a	0.03±0.00 ^b	0.03±0.00 ^b	0.05±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(아) 간 조직 및 혈중 Glutathione 농도 변화

간은 알코올 대사에서 중심적인 역할을 수행하고, 유리기 생산에 의해 조직 손상을 일으키는 동시에 세포내 항산화 방어 시스템이 작동함으로써 이를 경감시키는 작용도 함께 일어나는 조직이다. 간 조직에서 glutathione은 L-glutamate, L-cysteine 및 glycine으로 구성된 non-protein thiol tripeptide의 항산화 물질로 최근의 연구에서 동물 간 조직에서 독성제거 반응을 통한 항산화 방어계에서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 조직 내 glutathione 수준은 지질과산화 농도, 활성 유리기 및 다른 산화기의 독성 작용으로부터 세포를 방어하는 항산화 시스템과 밀접하게 관련되어 있다. 체내 항산화작용 물질로 잘 알려진 간 조직의 glutathione 농도는 정상 대조군(N군)에 비해 orotic acid 1% 식이 투여군(C군)에서 유의적으로 감소하였고, 이러한 감소현상은 PJ군과 CM군 및 CM α 군에서 증가경향을 보였고, 특히 cordycepin 고함유 분말이 동충하초 분말인 CM α 군에서 높은 glutathione 함량을 보였다(Fig. 5). 지방간 모델 흰쥐는 정상군에 비해 간 조직 및 혈중 glutathione 농도를 낮춘다. 그러나 Orotic acid 1% 식이 투여에 의한 간 조직 및 혈중 glutathione 농도의 감소는 각각의 동충하초 분말 3% 투여에 의해 정상군 수준으로 회복되는 것으로 나타났다. 이전의 연구에서도 glutathione 고함유 효모 투여가 사염화탄소 및 알코올 투여로 인한 간 손상을 효과적으로 막는 것으로 보고한 바 있다. Orotic acid 유발 지방간 흰쥐에 특히 cordycepin 고함유 분말이 동충하초 분말로 인한 과산화지질 농도의 감소는 항산화 활성의 증가와 밀접한 관련성을 가지는 것으로 보이며 간 질환 개선 효과에도 큰 영향을 미칠것으로 사료된다.

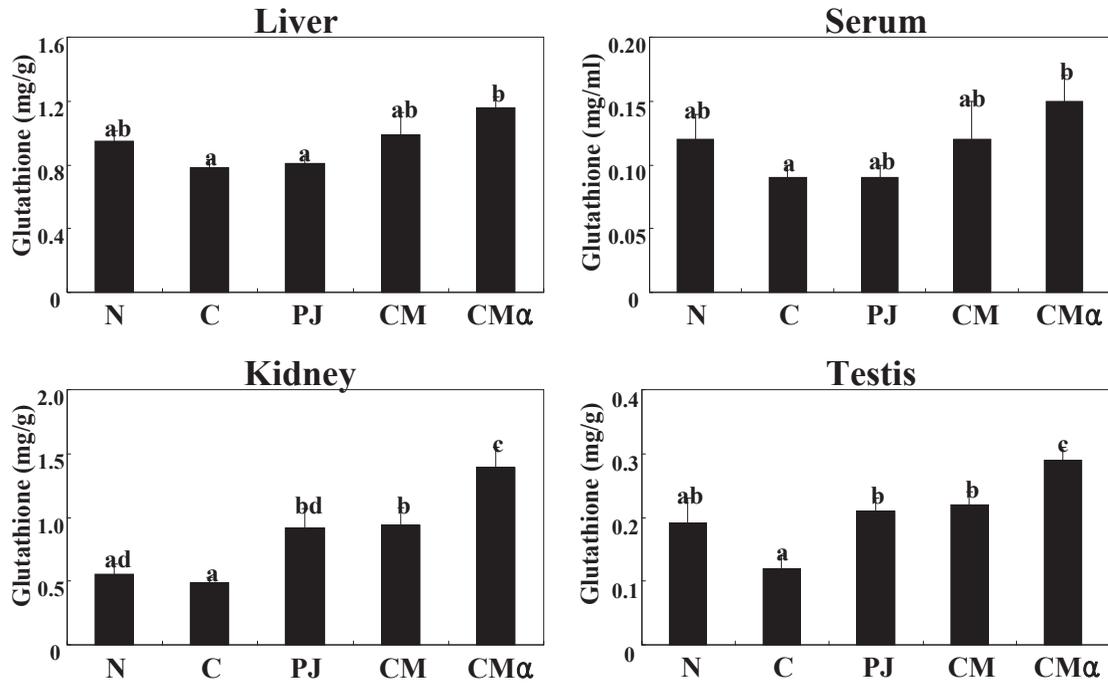


Fig. 5. Effect of PJ, CM and CM α on the glutathione content in OA feeding rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

(자) 간장의 morphology

Fig. 6은 실험동물의 희생직후 촬영한 간장의 형태를 나타낸 것이다. Orotic acid 1% 식이 투여한 C군을 제외한 정상 대조군인 N군과 실험군인 PJ군, CM군, CM α 군은 진한 선홍색으로 유사한 형태를 보였다. C군의 간장은 Orotic acid 1% 수준의 첨가로 인하여 흐린 적색으로 변하고 황색의 지방들이 간장 전체에 분사, 침착되어 있는 전형적인 지방간의 형태를 보였다. 반면, 실험군 중 눈꽃 동충하초 3%와 Orotic acid 1%를 섭취시킨 PJ군의 간장은 지질 침착이 C군보다 개선된 형태를 확인할 수 있었다. 한편, 번데기 동충하초와 cordycepin 고함유 번데기 동충하초를 각각 3%, orotic acid 1%를 섭취시킨 CM군과 CM α 군의 간장은 대조군인 N군의 간장 색과 유사할 정도로 지질의 침착이 개선된 것을 확인하였다. PJ군, CM군, CM α 군 모두 지질침착에 개선된 효과를 나타내 보였지만 정상 대조군인 N군의 간장과 매우 유사한 형태를 보임으로서 Cordycepin 고함유 번데기 동충하초 식이 투여 CM α 군에서 높은 지방간 개선 효과가 육안으로도 확인할 수 있었다.

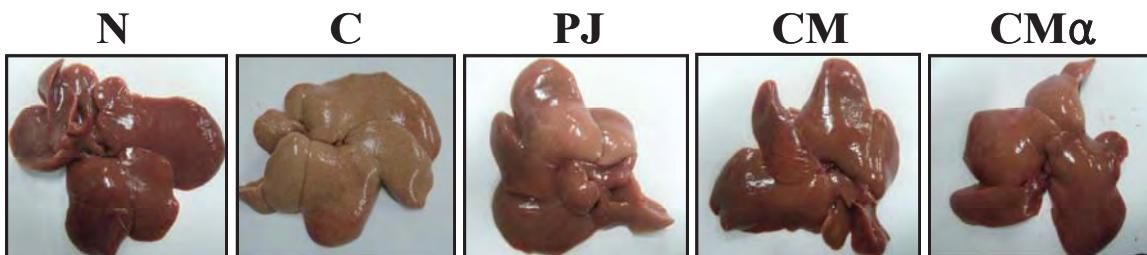


Fig. 6. Effect of PJ, CM and CM α on Orotic acid induced fatty liver rats.

(차) 간장의 조직학적인 관찰

적출한 간조직의 광학 현미경에 의한 관찰 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8과 같다. 대조군인 정상군은 간소엽의 구조가 잘 유지되었으며, 간세포들은 풍부한 호산성 세포질과 둥근핵을 가지고 있었으며 간세포관은 대부분 한층으로 잘 유지되어 있었다. 이와 유사하게 CM α 군에는 간소엽을 구성하고 있는 간세포들이 전반적으로 균일하게 배열되어 있어 정상적인 대조군의 간소엽과 비슷한 양상을 보였다(Fig 7). 이에 반해, C군은 간세포의 풍선양 변성, 소포성 지방 변성이 소엽 중심대에 주로 나타나 있고, 지방세포들이 균일하게 배열되어 있을 뿐만 아니라 그 크기도 대조군과 비교했을 때 상당한 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 이와 같이 C군은 orotic acid에 의해 간장에 전체적으로 지방세포가 나타나 전형적인 지방간이 유발되었음을 알 수 있었다.

실험군인 PJ군, CM군, CM α 군 모두에서 C군보다 소포성 지방과 지방세포들의 그 크기와 수가 줄어들었음을 관찰할 수 있었다. 먼저 PJ군은 C군에 비해 지방세포가 개선된 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 반면 CM군과 CM α 군은 C군에 비해 지방과 지방세포의 크기와 수가 유의적으로 감소하였으며 CM보다 cordycepin 고함유 변태기 동충하초군인 CM α 군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig8).

C군과 실험군 중 CM α 군의 조직학적 관찰 결과, PJ군과 CM군의 경우보다 지방세포의 수다 현저히 감소하였고 그 크기 역시 감소하여 cordycepin 고함유 변태기 동충하초분말이 지방간 개선에 효과가 있는 것으로 본 실험에서 확인할 수 있었다.

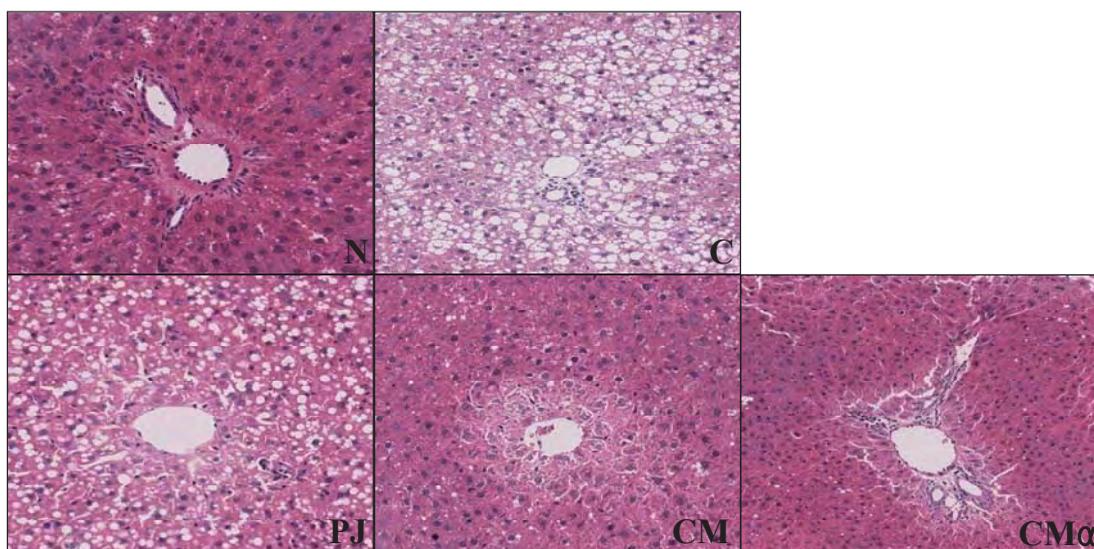


Fig. 7. Hepatic histopathologic changes of central vein of liver in Orotic acid induced fatty liver rats. The liver sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E stain, x200)

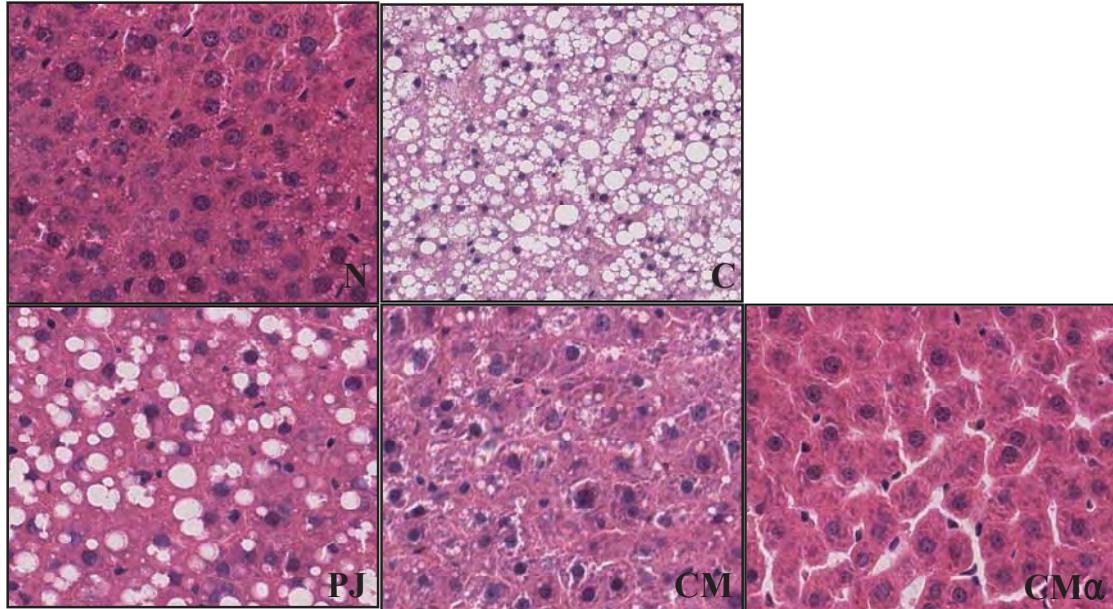


Fig. 8. Hepatic histopathologic changes of portal area of liver in Orotic acid induced fatty liver rats. The liver sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E stain, x400)

나. Cordycepin 고함유동충하초 분말을 이용한 알코올성 간독성 개선효과 규명

(1) 실험재료 및 방법

(가) 실험재료

실험재료인 동충하초 분말을 청원농산 (김해, 경남)에서 구입하였다. 육종된 Cordycepin 고함유 *Cordyceps militaris* (JLM0636)를 실험재료로 사용하였으며, *Paecilomyces japonica* 와 *Cordyceps militaris* 분말을 대조구로 사용하였다. 외관상 세 가지 종류의 동충하초 분말 모두 노란색을 띄었으며, 색깔의 농도는 *Paecilomyces japonica*, *Cordyceps militaris*, Cordycepin 고함유 *Cordyceps militaris* (JLM0636) 순으로 진하였다.

(나) 실험조성 및 실험군

식이 조성은 Table 1과 같으며, 정상군 (N), 알코올 투여 대조군 (C), 알코올 +*Paecilomyces japonica* 투여군 (CPJ), 알코올+*Cordyceps militaris* 투여군 (CCM), 알코올 +Cordycepin 고함유 *Cordyceps militaris* (JLM0636) 투여군 (CCMα), 알코올+Silymarin 투여군 (CSM)으로 나누어 실험을 진행 하였다. 식이 중에 첨가한 동충하초 분말은 탄수화물원인 Corn starch로 대체하여 첨가하였다.

Table 1. Compositions of experimental diets(%)

Component	Alcohol					
	N*	C*	CPJ*	CCM*	CCM α *	CSM*
Casein	20	20	20	20	20	20
α -Corn starch	15	15	12	12	12	15
Corn oil	10	10	10	10	10	10
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>Paecilomyces japonica</i>	-	-	3.0	-	-	-
<i>Cordyceps militaris</i>	-	-	-	3.0	-	-
Cordycepin-increased <i>Cordyceps militaris</i>	-	-	-	-	3.0	-
Silymarin	-	-	-	-	-	0.1
Sucrose	44.5	44.5	44.5	44.5	44.5	44.4

N* = Normal, C* = Control, CPJ* = *Paecilomyces japonica*,

CCM* = *Cordyceps militaris*, CCM α * = Cordycepin-increased *Cordyceps militaris*,

CSM* = Silymarin

(다) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 효창사이언스(대구, 한국)로부터 구입하여 일주일간 시판 고형사료를 급여하면서 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 체중이 동일하게 난괴법(randomized complete block design)으로 분류하여 사육실 온도(22±2℃)와 습도(50±5%) 및 명암주기(명주기: 07:00~19:00)가 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다. 사육 기간 중 식이 섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 매주 한번씩 일정한 시간에 측정하였다. 이 때 알코올 투여는 실험동물에서 알코올에 의한 급성독성을 막기 위하여 알코올 농도를 처음 10%로 시작해서 최종 30% 농도로 1주일마다 단계적으로 높이면서 본 실험을 시작하면서 시료를 함께 투여하였다.

(라) 동물실험, 시료 채취 및 분석시료 조제

동물실험은 4주간 각 군별로 조제사료를 급여하면서 사육한 후, 실험 최종일 12시간 이상 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 혈액을 채취하고, 약 30분간 실온에 방치시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 혈청을 혈청 생화학적 분석에 제공하였다. 채혈 후 각 조직을 적출하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 분석시료로 제공 하였다.

(마) 혈청 지질농도 및 생화학적 지표분석

혈청 중의 total lipid, triglyceride, total-cholesterol, HDL-cholesterol, 유리지방산, total protein, albumin 농도 및 ALT, AST, γ -GTP, LDH 활성은 의료전문수탁검사기관인 네오딘의 학연구소(서울, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

(바) 혈중 alcohol 및 acetaldehyde 농도 측정

혈청에 함유된 alcohol 및 acetaldehyde 농도는 시판용 R-Biopharm사의 UV-Test kit (Darmstadt, Germany)를 이용하여 측정하였다. 즉 혈중 alcohol 농도는 NAD와 phosphate buffer(pH 9.0) 3 ml 혼합액에 혈청 0.1 ml를 첨가한 후 약 3분간 반응하여 340 nm 흡광도를 측정하고, 혼합액에 ADH 0.05 ml를 첨가하여 20°C에서 10분간 incubation 시켜 흡광도 340 nm에서 생성된 NADH의 농도에 따른 흡광도의 변화를 관찰하였다. 이때 혈액중의 alcohol 농도(%)는 표준용액을 이용하여 계산하였다. 혈청 acetaldehyde 농도는 NAD와 phosphate buffer(pH 9.0) 3 ml 혼합액에 혈청 0.2 ml를 첨가한 후 약 3분간 반응하여 340 nm 흡광도를 측정하고, 혼합액에 ALDH 0.05 ml를 첨가하여 20~25°C에서 5분간 반응시켜 흡광도 340 nm에서 생성된 NADH의 농도에 따른 흡광도의 변화를 관찰하였다. 이때 혈액중의 acetaldehyde 농도는 표준용액을 이용하여 계산하였다.

(사) 간 조직의 분획 조제

간 조직으로부터 homogenate 분획 조제는 간을 일정량 취해 ice-cold potassium phosphate buffer 용액(0.1 mol/l potassium phosphate containing 1 mmol/l sodium EDTA and 1 mmol/l dithiothreitol, pH 7.4)을 9배량 첨가하여 IKA-ULTRA-TURRAX T25 basic homogenizer (IKA-WERKE GMBH & CO., KG, Staufen, Germany)를 이용하여 균질액을 제조하였다. Homogenate 용액을 먼저 800 x g에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 다시 고속원심분리기(VS-24SMTi, Vision Scientific Co., Ltd.)에서 10,000 × g로 20분간 원심분리 하여 침전된 pellet은 mitochondria fraction으로 하였다. 이때 microsome이 함유된 상층액은 105,000 x g에서 60분간 초원심분리하여 상층의 cytosol 분획과 침전된 microsome 분획을 얻어 실험에 제공하였다. Homogenate, mitochondria 및 microsome 분획의 단백질 농도는 Lowry 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정 하였다.

(아) ADH 및 ALDH 효소 활성 측정

간 조직 유래의 ADH 활성 측정은 Bergmeyer's의 방법을 약간 변형하여 흡광도 340 nm에서 NADH의 생성속도를 측정하였다. 즉, 반응액 조성은 증류수 1.5 ml, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.75 ml, 20 mM NAD⁺ 0.3 ml, ethanol 0.3 ml, 효소원 0.15 ml를 cuvette에 넣고 총 3ml이 되도록 조절하여 30°C에서 5분간 preincubation 시킨 후 5분 동안 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 간 조직 유래의 ALDH 활성 측정은 Koivula등의 방법을 약간 변형하여 acetaldehyde에서 acetate를 생성하는 효소로 NAD로부터 NADH를 생성하는 원리를 이용하였다. 즉 반응액의 조성은 증류수 2.2 ml, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.3 ml, 20 mM NAD⁺ 0.1ml, 1.0M aetaldehyde 0.1 ml, 3.0 M KCl 0.1 mL, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1ml, 효소원 0.1 ml를 총 3 ml이 되도록 조절하여 cuvette에 넣고 30°C에서 5분간 preincubation 한 후, 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

(자) 과산화지질 측정

분획한 homogenate와 microsome 생체막의 과산화지질 함량은 전보의 방법에 준하여 정량 하였다. 즉, 단백질 량으로 1 mg을 함유한 분획 용액 1 ml에 각각 thiobarbituric acid(TBA) 시약 2 ml을 가하여 잘 혼합하고, 끓는 물에서 30분간 반응 시킨 후 실온에서 방냉하여 3,000

rpm으로 10분간 원심분리 한 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질 함량은 malondialdehyde를 nmol/g으로 나타내었다.

(차) 미네랄 함량 측정

간 조직의 미네랄 함량은 A.O.A.C. 분석 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 간 조직 1 g을 각 550°C 회화로에서 3시간 회화 시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시켜 수용상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl를 가하여 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석하여 원자흡광 분광광도계(AAnalyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

(카) Glutathione 함량 측정

간 조직의 glutathione 함량은 간 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml과 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 가하여 혼합하고 원심분리 시킨 뒤 상등액 0.3 ml에 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 발색시약을 첨가하여 412 nm 흡광도에서 측정하여 glutathione의 표준 검량 곡선에 의해 함량을 산출하였으며 간 조직 g당 mg으로 표시하였다.

(타) 간조직의 병리조직학적 관찰

동물해부 직후 적출한 간을 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거시킨 상태에서 조직의 일정한 부위의 일부를 취하여 10% 중성포르말린 용액에 고정하여 통상적인 조직처리인 파라핀 포매 과정을 거쳐 3~4 μ m 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 한 후 광학현미경(Olympus BX41, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

(파) 통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차 (mean \pm SE)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 체중, 식이 및 음료 섭취량 변화

4주 동안 알코올 급여에 의해 체중 증가량이 정상군에 비해 많이 증가하지 않은 것으로 보아 알코올에 의해 성장에 영향을 미친 것으로 보여지며, 식이 섭취량도 동시에 많이 줄어든 것으로 나타났다(Table 2). 한편 알코올은 소화흡수 기관인 소장에서 영양소나 식이성분의 흡수를 떨어트려 영양불균형을 초래함으로써 체중 증가량의 감소를 가져온다고 하였다. 알코올 급여 흰쥐에 CPJ, CCM, CCMa의 첨가식이 투여는 식이섭취량에 비해 체중이 다소 감소하는 것으로 나타났다.

Table 2. Effects of CPJ, CCM, CCMa and CSM on the body weight, food intake, water consumption, and the relative tissues weight in alcohol feeding rats.

Groups	N	C	CPJ	CCM	CCMα	CSM
Initial weight (g)	167.7±2.95 ^a	167.2±3.25 ^a	166.1±2.48 ^a	166.0±2.25 ^a	164.8±1.86 ^a	164.8±1.86 ^a
Final weight (g)	407.3±10.9 ^a	362.7±7.78 ^b	327.3±11.0 ^c	349.0±9.81 ^{bc}	326.9±16.7 ^{bc}	356.7±10.4 ^{bc}
Weight gain (g)	239.6±8.24 ^a	195.5±9.49 ^b	161.2±9.68 ^c	182.9±8.99 ^{bc}	162.0±15.1 ^c	189.6±9.73 ^{bc}
Food intake (g/day)	19.05±0.42 ^a	13.93±0.30 ^b	12.56±0.41 ^b	12.80±0.52 ^b	10.93±0.50 ^c	16.06±0.62 ^d
Water consumption (ml/day)	29.71±1.02 ^a	21.07±1.01 ^b	21.63±1.46 ^b	26.24±0.88 ^c	25.40±1.37 ^c	23.31±1.04 ^{bc}

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(나) 각 장기의 절대 및 상대중량

체중에 대한 각 장기의 절대중량과 상대중량을 각각 Table 3와 4에 나타내었다. 절대 중량에서는 정상군에 비해 모든 실험군에서 유의적인 차이를 나타내었다(Table 3). 또한 체중에 대한 각 장기의 상대중량은 간장에서 정상군에 비해 모든 실험군에서 유의적인 차이를 보였고, 신장, 심장, 고환에서는 각 실험군간에 차이가 없었으나, 신장주변 지방조직 및 고환주변 지방조직의 경우 군간에 약간의 차이를 보였다(Table 4).

Table 3. Effects of CPJ, CCM, CCMa and CSM on the tissues weight in alcohol feeding rats

Groups	N	C	CPJ	CCM	CCMα	CSM
Liver	12.41±0.86 ^a	12.91±0.79 ^a	9.38±0.44 ^b	9.33±0.55 ^b	10.20±0.63 ^b	10.40±0.62 ^b
Kidney	2.80±0.09 ^a	2.79±0.09 ^a	2.34±0.11 ^b	2.37±0.08 ^b	2.60±0.10 ^{ab}	2.58±0.05 ^{ab}
Heart	1.41±0.02 ^a	1.3±0.03 ^{ac}	1.20±0.04 ^{bc}	1.26±0.05 ^{bc}	1.15±0.40 ^b	1.26±0.04 ^{bc}
Spleen	0.84±0.04 ^{ab}	0.75±0.03 ^{ab}	0.81±0.04 ^{ab}	0.79±0.03 ^{ab}	0.88±0.09 ^a	0.71±0.04 ^b
Testis	3.80±0.11 ^a	3.6±0.08 ^{ab}	3.63±0.14 ^{ab}	3.33±0.17 ^b	3.64±0.16 ^{ab}	3.62±0.10 ^{ab}
Perirenal fat pad	9.14±0.43 ^a	5.61±0.64 ^b	5.02±0.51 ^b	4.03±0.30 ^b	4.82±0.43 ^b	5.15±0.65 ^b
Epididymal fat pad	8.94±0.88 ^a	6.38±0.35 ^b	6.14±0.56 ^{bc}	5.59±0.23 ^{bc}	4.65±0.21 ^c	5.67±0.59 ^{bc}

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

Table 4. Effectsof CPJ, CCM, CCMa and CSM on the relative tissues weight in alcohol feeding rats.

Groups	N	C	CPJ	CCM	CCMα	CSM
Liver	3.05±0.20 ^{ac}	3.56±0.20 ^b	2.86±0.07 ^{ac}	2.67±0.13 ^a	3.12±0.09 ^c	2.91±0.12 ^{ac}
Kidney	0.69±0.01 ^a	0.77±0.03 ^{bc}	0.71±0.02 ^{ac}	0.68±0.01 ^a	0.81±0.05 ^b	0.73±0.02 ^{ac}
Heart	0.35±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a	0.37±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a
Spleen	0.21±0.01 ^a	0.21±0.01 ^a	0.25±0.01 ^{bc}	0.22±0.01 ^{ac}	0.27±0.02 ^b	0.20±0.01 ^a
Testis	0.94±0.03 ^a	0.99±0.03 ^{ab}	1.11±0.03 ^b	0.96±0.05 ^a	1.12±0.04 ^b	1.02±0.06 ^{ab}
Perirenal fat pad	2.26±0.14 ^a	1.54±0.15 ^b	1.53±0.14 ^b	1.15±0.06 ^b	1.47±0.09 ^b	1.43±0.16 ^b
Epididymal fat pad	2.18±0.18 ^a	1.76±0.10 ^{bc}	1.87±0.16 ^{ac}	1.61±0.06 ^{bc}	1.43±0.05 ^b	1.58±0.14 ^{bc}

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(다) 혈중 alcohol 및 acetaldehyde 농도 변화

알코올과 그 일차 대사산물인 acetaldehyde는 음주 후 숙취를 경험하게 하는 주요 원인 물질로서 강력한 독성물질로서 생체 내 활성 아민류와 축합반응을 거쳐 간 손상의 주요 매개체로 작용하는 동시에 숙취에 영향을 미치는데, ALDH에 의해 대사되어 acetic acid를 형성한 후 이산화탄소와 물로 가수분해 되어 완전히 분해과정을 거치게 된다. Acetaldehyde의 독성으로는 미토콘드리아 기능저해로 인한 간경변과 심장 및 뇌 기능 저해 등이 보고되어 있다. 일반적으로 알코올에 과일즙이나 향신료, 그리고 여러 한방 약재를 혼합하여 음용시 취기가 다르게 나타나는데, 이는 알코올에 함유된 여러 물질들에 의해 알코올 대사가 촉진되었다고 고려해 볼 수 있다. 최근에 알코올을 투여한 동물실험에서 홍국 추출물이 알코올 대사를 촉진시킨다는 보고가 있으며, 홍삼을 홍국으로 대체시킨 발효홍삼에서도 숙취 해소 효과가 확인되었다.

혈중 알코올 농도는 정상 대조군의 혈중에서는 검출되지 않았으나, 알코올을 투여한 모든 실험군에서는 혈중 알코올이 검출되었다(Table 5). 혈중 알코올 농도는 정상군에 비해 알코올 대조군에서 유의적으로 증가하였고, 이러한 증가는 CPJ, CCM, CCMa의 투여군에서 동일한 농도로 유의적인 감소를 나타내었다. 혈중 아세트알데히드 농도는 정상군에 비해 알코올 대조군에서 유의적으로 증가하였으며, 이러한 알코올군에서의 증가는 누에동충하초에 비하여 번데기 동충하초 투여군에서 감소하는 경향을 보였으며 특히, cordycepin 함량을 높은 번데기 동충하초 투여군에서 양성대조군인 실리마린 투여군과 비슷한 감소 경향을 보였다. 동충하초 분말은 혈중의 알코올 농도뿐만 아니라 아세트알데히드 농도도 감소시키는 효능을 가진 것으로 보여지는데, 이는 간 조직속의 알코올 대사 관련 효소 ADH 및 ALDH 활성 증가에 의한 것으로 나타났다. 이전의 연구에서 *B. breve* 균주로 발효시킨 soymilk 급여에 의해 ALDH 활성 증가로 acetaldehyde 농도가 낮아지면서 알코올성 간독성을 개선시키는 것으로 보고된 바 있다. 본 실험에서도 누에동충하초 분말 또는 번데기 동충하초분말 보다는 cordycepin 고함유 번데기동충하초분말 투여에 의해 알코올성 간독성이 더욱 개선되는 것으로 나타나 특히 cordycepin 함유량 의해 간 독성 개선 효능이 증가되는 것으로 나타났다.

Table 5. Effect of CPJ, CCM, CCM α and CSM on the serum concentrations of alcohol and acetaldehyde in alcohol feeding rats.

Groups	Serum alcohol (g/L)	Serum acetaldehyde (mg/100 mL)
N	0.00±0.00 ^a	2.66±0.38 ^{ad}
C	0.42±0.00 ^a	4.66±0.52 ^b
CPJ	0.33±0.01 ^b	3.05±0.28 ^a
CCM	0.31±0.02 ^b	2.52±0.17 ^{ad}
CCM α	0.30±0.01 ^b	1.67±0.42 ^{cd}
CSM	0.21±0.02 ^c	1.40±0.26 ^c

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(라) 간 조직 ADH 및 ALDH 활성 변화

체내로 흡수된 알코올은 대부분 위장과 소장에서 흡수되어 간으로 이동된 후 대사과정을 거쳐 분해되는데, 만성적인 알코올 섭취는 영양소의 흡수장애와 간 기능 손상을 초래할 수 있다. 간에서 대사되는 알코올 분해는 먼저 alcohol dehydrogenase (ADH)와 cytochrom P-450에 의해 알코올이 acetaldehyde로 전환되는데, 이때 만성적 알코올 섭취로 인한 중독시에는 microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)에 의해 acetaldehyde가 증가하게 된다. 주로 만성적 알코올 섭취 후 간 조직에 축적되는 acetaldehyde는 ADH 및 ALDH 활성에 의해 영향을 받게 된다. 이들 ADH 및 ALDH 효소 활성은 체내 알코올 대사에서 필수적인 역할을 하기 때문에 천연 생리활성 성분에 의해 활성증가를 기대할 수 있는 가능성이 제기되고 있다. 실험동물에서 만성적 알코올 투여시 ADH 활성은 증가하고 ALDH 활성은 오히려 감소하는데, 이는 알코올의 장기간 섭취에 의해 생체조직 내에 acetaldehyde의 축적현상이 초래될 가능성을 시사해주고 있다. 본 동물 실험에서 간 조직 중의 ADH 활성은 정상군에 비해 알코올 대조군에서 약간의 증가 경향을 보였으나, CPJ, CCM, CCM α 투여에 의해서는 유의적으로 활성이 증가하였다(Fig. 1). ALDH 활성은 정상군에 비해 알코올 대조군이 감소하였으며, CPJ, CCM, CCM α 투여군에서 모두 활성이 증가된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 동충하초 분말이 알코올 투여 흰쥐의 혈중 알코올 및 acetaldehyde 농도를 효과적으로 감소시키는 것은 간 조직 중의 알코올 대사 효소 ADH 및 ALDH 활성을 촉진시키기 때문인 것으로 나타났다. 특히 CCM α 투여군에서 ADH 및 ALDH 활성 모두 가장 높은 것으로 나타나 이러한 효소 활성의 증가로 체내 알코올이 기질로 사용됨으로서 혈중의 알코올 및 acetaldehyde 농도가 감소한 것으로 보여진다.

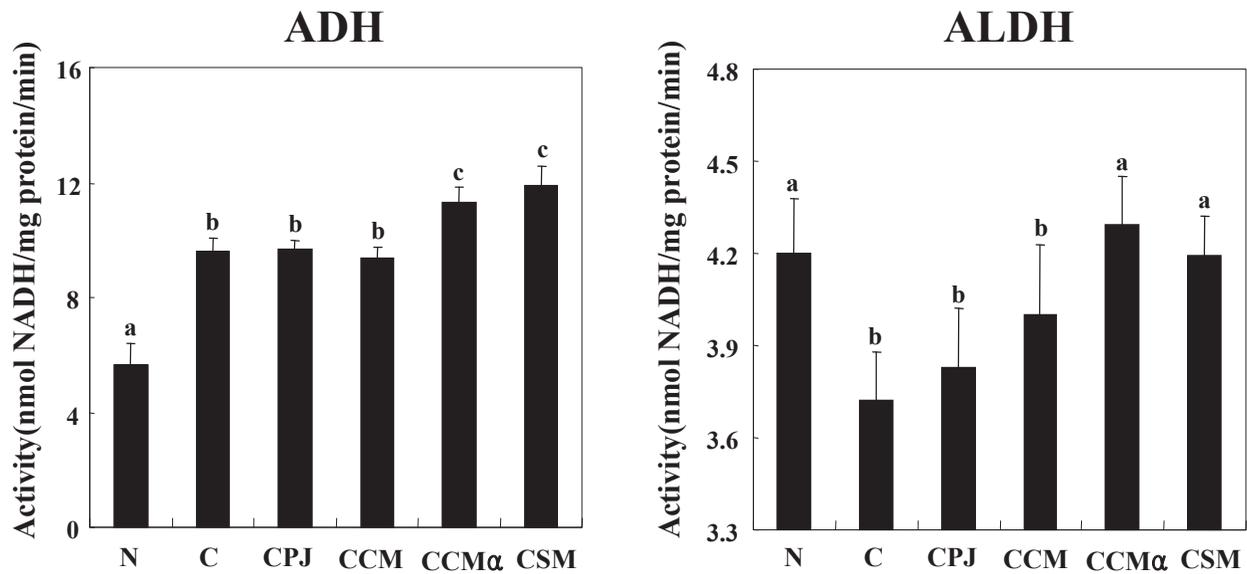


Fig. 1. Effects of CPJ, CCM, CCM α and CSM on the activities of hepatic alcohol dehydrogenase(ADH) and acetaldehyde dehydrogenase(ALDH) in alcohol feeding rats.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

(마) 혈중 ALT, AST, γ -GTP, Alk. phosphatase 및 LDH 활성 변화

간 손상의 임상적 지표로 사용되고 있는 ALT, AST, γ -GTP, Alk. phosphatase 및 LDH 활성 측정을 통하여 간 기능 효능을 검증한 결과를 Fig. 2 에 나타내었다. 혈청 ALT 및 AST 활성은 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상 지표의 중요한 단서가 된다.

본 실험에서 ALT, AST 활성은 알코올 투여군에서 유의적으로 증가하였으나, γ -GTP 활성은 통계상의 유의적인 차이 없이 증가하는 경향을 보였다. 알코올 급여 대조군에서의 ALT 및 AST 활성 증가는 cordycepin 고함유 번데기 동충하초 분말 투여에 의해 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 cordycepin 고함유에 의해 간 보호 효과가 더욱 우수하다는 것을 암시하고 있다.

Glutathione, S-adenosylmethionine, amino acids, zinc를 많이 함유한 효모를 급여한 실험에서 혈중 ALT, AST, γ -GTP 활성을 감소시켜 강력한 간보호효과를 나타내는 실험들이 수행되었다. 또한 glutathione 고함유 효모 *S. cerevisiae*를 급여한 사염화탄소 유발 간독성 모델에서도 ALT 및 AST 활성을 감소시키는 결과가 이전 실험에서도 보고된 바 있다. Sugimura 및 Yamamoto는 acetaminophen 유발 간 독성 실험에서 glutathione 고함유 효모의 투여에 의해 AST 및 ALT 활성이 농도 의존적으로 감소되었으나, glutathione 저함유 빵효모 투여에 의해서는 이러한 효과가 없었다고 하였다. 이러한 효과는 glutathione 고함유 효모의 투여에 의해 간 세포내 glutathione 농도가 높아지면서 간독성 개선효과가 나타난 것으로 보여지며, 본 실험에서도 동충하초 투여에 의해 간 세포내 glutathione 농도가 높아지는 결과를 얻음으로서 이를 뒷받침 하고 있다. 간 기능적 임상지표로 사용되고 있는 혈중 LDH 및 ALP 활성도 알코

을 섭취에 의해 증가됨으로서 알코올성 간 독성 유발과 깊은 관련성을 가진 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서도 LDH 활성은 알코올 섭취군에서 증가 경향을 보였으나, 이러한 알코올에 의한 증가는 CPJ, CCM, CCM α 투여에 의해 유의적으로 감소하였고 양성대조군인 실리마린 투여에 의해서는 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 cordycepin 고함유 변태기 동충하초 분말 투여는 알코올에 의해 증가된 ALT, γ -GTP 및 LDH 활성을 유의적으로 감소시킴으로서 알코올성 간 질환을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재로 활용할 가능성이 있는 것으로 사료되어진다.

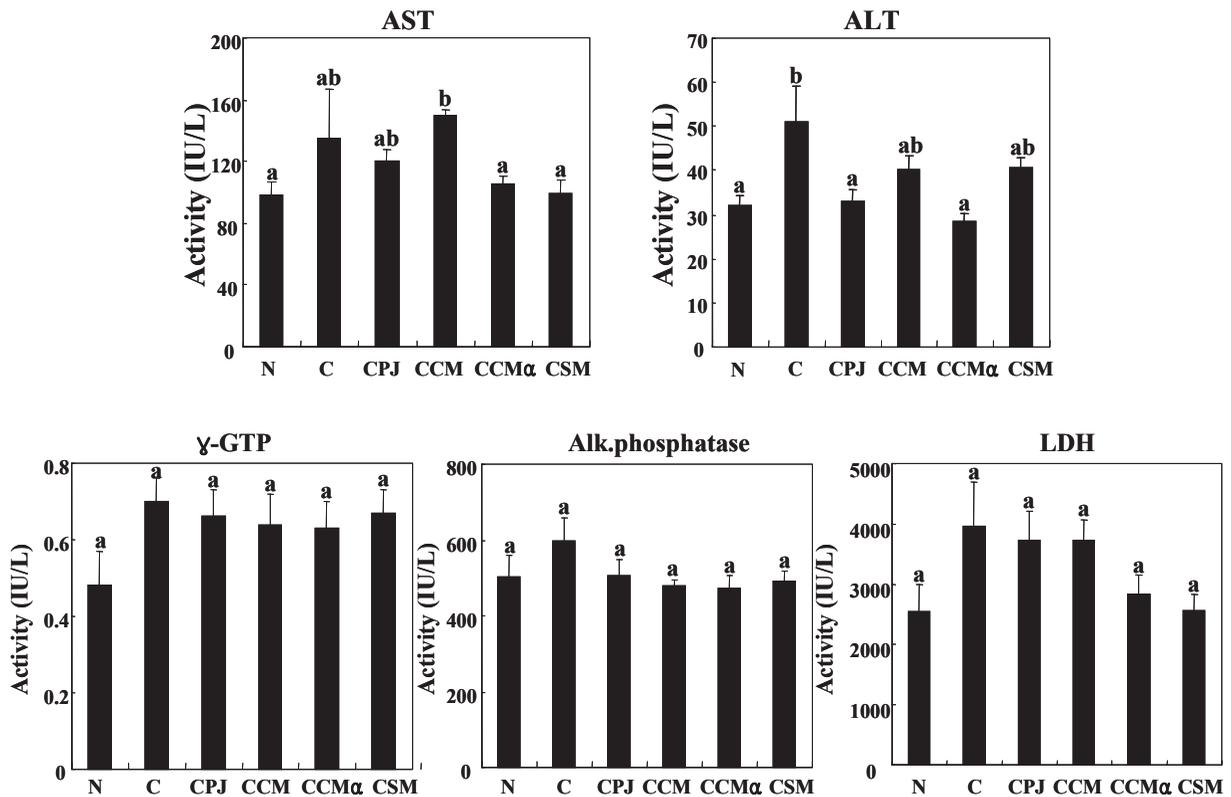


Fig. 2. Effects of CPJ, CCM, CCM α and CSM on the activities of AST, ALT, γ -GTP, Alk. phosphatase and LDH in alcohol feeding rats.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

(바) 혈중 단백질, 알부민 및 글로부린 농도 변화

혈중 총 단백질 농도는 만성 감염증, 만성 간장애, 간경변 등에서 증가하는데, 정상군에 비해 알코올 투여 모든 실험군에서 유의적으로 감소하였다(Table 6). 알부민은 간에서 합성되는 혈액 단백질로 혈장 총 단백질의 60% 정도를 차지할 정도로 중요하며, 중증 간질환에서 감소되는 중요 간 질환 기능지표로 이용되고 있다. 본 실험에서 알부민 농도는 정상군에 비해 알코올 투여 모든 실험군에서 유의적으로 감소하였다. 또한 혈중 globulin 농도는 혈중에서 albumin을 제외한 혈청 단백질의 대부분을 차지하며, 감염증, 염증성질환 및 악성종양 등에서 증가하는데, 정상군 대비 알코올 대조군은 함량이 증가하였으며 모든 실험군에서 점차 감소하는 경향을 보였으며, 그 중 cordycepin 고함유 변태기 동충하초 분말 투여군에서 가장 낮은 수치를 나타내었다.

Table 6. Effects of CPJ, CCM, CCMa and CSM on the concentrations of total protein, albumine, globulin, serum lipid concentrations in alcohol feeding rats.

Groups	Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Globulin (g/dL)	Total Lipid (mg/dL)	Free fatty acid (mmol/L)	Cholesterol (mg/dL)	HDL-Cholesterol (mg/dL)
N	5.53±0.08 ^a	2.73±0.06 ^a	3.13±0.08 ^{ac}	367.3±24.9 ^{ab}	1.06±0.04 ^a	65.17±5.40 ^a	32.20±0.65 ^{ac}
C	5.78±0.05 ^b	2.53±0.03 ^b	3.27±0.05 ^a	398.1±18.0 ^a	1.13±0.15 ^{ab}	93.17±7.39 ^b	33.40±1.67 ^a
CPJ	5.70±0.06 ^{ab}	2.61±0.03 ^{ab}	2.94±0.05 ^b	365.8±25.2 ^{ab}	1.33±0.06 ^b	70.14±1.71 ^a	28.04±0.42 ^b
CCM	5.74±0.05 ^b	2.69±0.03 ^{ac}	3.06±0.04 ^{bc}	357.1±12.7 ^{ab}	1.36±0.08 ^b	70.00±2.14 ^a	28.86±0.46 ^{bc}
CCM α	5.75±0.02 ^b	2.60±0.04 ^{bc}	3.20±0.05 ^{ac}	356.0±15.1 ^{ab}	1.34±0.07 ^b	69.00±6.55 ^a	29.50±1.26 ^{ab}
CSM	5.75±0.07 ^b	2.55±0.04 ^b	3.20±0.06 ^{ac}	315.0±19.0 ^b	1.02±0.05 ^a	71.17±7.82 ^a	28.50±2.31 ^{bc}

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(사) 혈중 지질 농도 변화

혈중 지질 농도는 동맥경화, 고혈압, 심장병, 고지혈증과 같은 심혈관계 질환인의 진단지표로 사용되고 있는 가운데, 고콜레스테롤혈증, 고중성지혈증, 저HDL-콜레스테롤혈증도 이들 질환의 위험 인자로 주목 받게 되면서 유럽과 미국 등에서 새로운 임상 지침이 설정되었다. 최근 천연 식물자원을 대상으로 혈중 콜레스테롤 농도뿐만 아니라 중성지질 농도를 감소시키고 HDL-콜레스테롤 농도를 증가시키려는 시도가 활발하게 전개되고 있다. 한편 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 항 동맥경화의 지표로서 주로 간장에서 합성되고 다른 지단백질과는 달리 혈관벽에 침착되어 있는 LDL-콜레스테롤을 분리해내어 간장으로 운반하여 에너지로 이용하거나 체외 배설을 촉진하는 작용을 함으로써 심혈관계 질환의 유발 위험성을 감소시킬 수 있는 유익한 콜레스테롤로 널리 알려져 있다. 혈중 총 콜레스테롤 농도의 증가는 알코올 투여 동물에서 나타나는 일반적인 현상 중의 하나로 받아들여지고 있다. 본 실험에서도 혈중 총 콜레스테롤 및 유리 지방산 농도가 정상군에 비해 알코올 투여군에서 유의적으로 증가하였으나, 혈중 총 지질 및 HDL-콜레스테롤 농도는 각 실험군간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Table 6). 그러나 혈중 총 지질 농도는 알코올 대조군에 비해 CPJ, CCM, CCM α 투여군에서 현저히 감소된 것으로 나타났다. 따라서 동충하초 분말은 알코올에 의한 혈중 총 콜레스테롤 농도를 감소시키는 효과가 강한 것으로 관찰되었다.

(아) 간 조직 및 혈중의 중성지질 농도

간은 많은 지질과 지질대사에 관련된 중요한 조직으로 알려져 있으며, 혈중 중성지질 농도는 간 중성지질 대사와 밀접한 관련성이 있다. 특히 간 지질 중에서 중성지질 축적은 비알코올성 또는 알코올성 지방간 유발 원인 물질로 잘 알려져 있다. 본 실험에서 알코올 급여에 의해 간 중성지질 농도가 현저히 증가하여 알코올성 지방간의 특징을 잘 나타내어(Fig. 3) 이전의 실험 결과와 일치하였다. 흰쥐에서 간독성에 의한 간 지질의 축적은 glycine, arginine, taurine, cystein, alanine 등과 같은 황산화 및 간독성 개선 효과를 가지는 아미노산에 의해 어

는 정도 개선되는 것으로 알려져 있다. 높은 항산화 활성을 가지고 있는 CCMa 투여에 의해서도 알코올에 의한 간 중성지질 축적을 현저하게 경감시키는 효능이 있는 것으로 밝혀졌으며, 특히 CCMa투여군의 간 중성지질 수준이 정상군 수준까지 감소하는 것으로 나타났다. CPJ투여군에서 혈중 중성지질 농도는 감소경향을 보였고, CCMa투여군에서는 현저한 감소를 보여 발효시 사용한 균주 간에 차이를 나타내었다. 이러한 CCMa투여에 의한 혈중 중성지질의 감소는 유리지방산 감소에 기인하는 것으로 사료되어 진다.

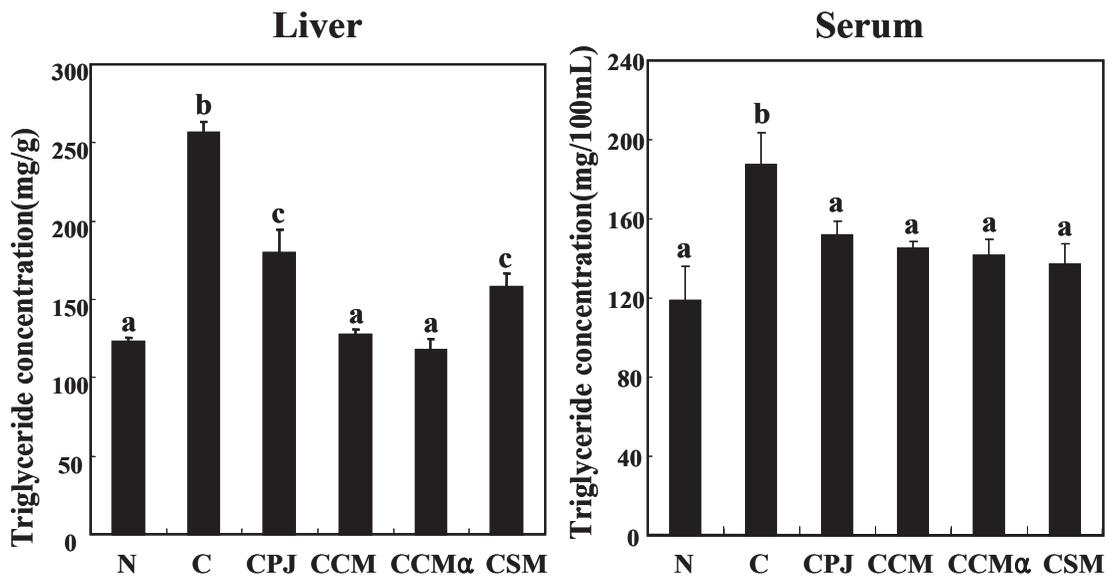
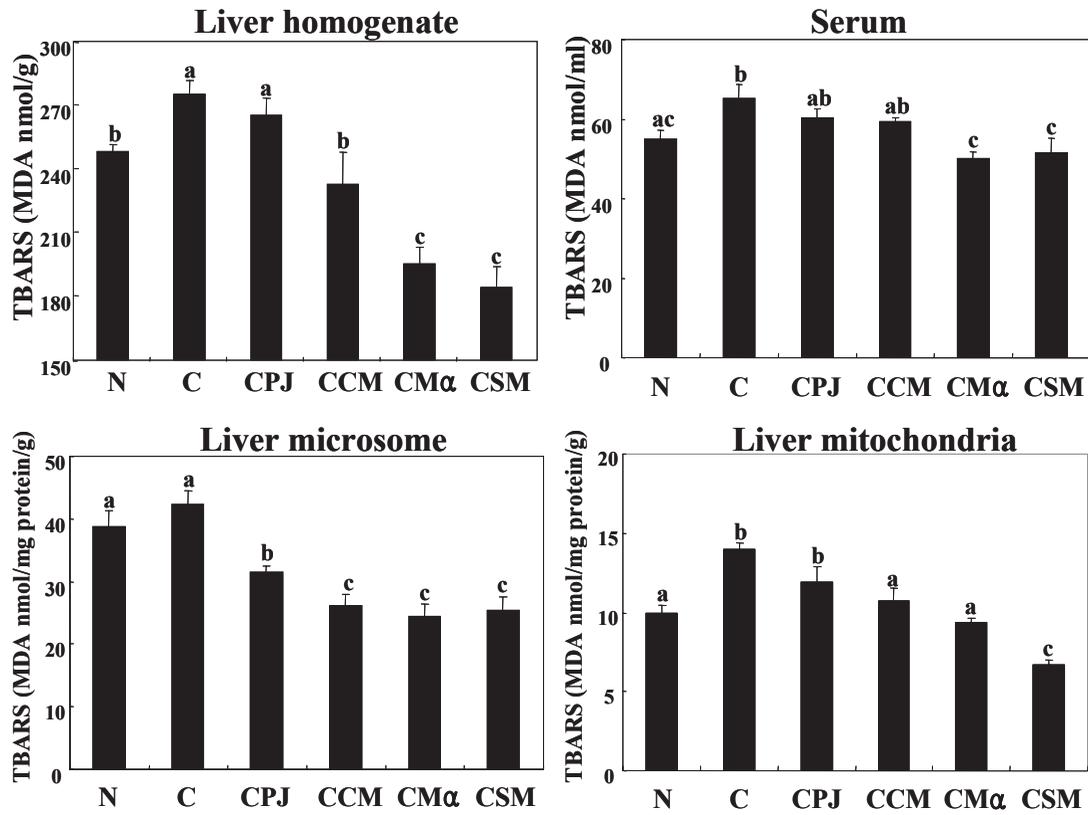


Fig. 3. Effects of CPJ, CCM, CCMa and CSM on the concentrations of triglyceride in the liver and serum in alcohol feeding rats.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=6).

(자) 과산화지질 및 항산화 관련 물질 농도 변화

초기 급성 간독성의 정도를 나타내는 지표인 ALT 및 AST 활성과 같이 간 조직 중의 과산화지질 농도도 간 독성의 지표로 사용되고 있다. 간 조직에서 산화스트레스의 측정 지표로 사용되고 있는 과산화지질 농도는 만성적인 알코올 섭취와도 밀접한 관련성을 가지는 것으로 알려져 있다. 만성적인 알코올 섭취는 조직 중의 과산화지질 및 유리기의 과잉생산과 체내 항산화 물질인 glutathione 농도의 감소를 가져 오는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과는 알코올 섭취 후 간 조직의 homogenate, mitochondria 및 microsome 분획에서 과산화지질 농도가 증가한 본 연구에서도 확인되었다(Fig. 4). 알코올 섭취 흰쥐에 CCMa 투여로 간 조직의 분획들에서 과산화지질 농도가 현저히 감소하였고, CCM 투여에 의해서는 mitochondria 및 microsome분획에서는 유의적으로 감소하였으나 homogenate 분획에서는 감소하는 경향을 보였으며, 이러한 결과는 cordycepin 함량을 높은 변태기 동충하초 분말이 간 조직에서 항산화 효과가 있다는 것을 의미하는 것이다. 혈중 과산화지질 농도 역시 알코올 섭취에 의해 현저히 증가하였는데, 동충하초 분말 투여에 의해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다.



간은 알코올 대사에서 중심적인 역할을 수행하고, 유리기 생산에 의해 조직 손상을 일으키는 동시에 세포내 항산화 방어 시스템이 작동함으로써 이를 경감시키는 작용도 함께 일어나는 조직이다. 간 조직에서 glutathione은 L-glutamate, L-cysteine 및 glycine으로 구성된 non-protein thiol tripeptide의 항산화 물질로 최근의 연구에서 동물 간 조직에서 독성제거 반응을 통한 항산화 방어계에서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 조직 내 glutathione 수준은 지질과산화 농도, 활성 유리기 및 다른 산화기의 독성 작용으로부터 세포를 방어하는 항산화 시스템과 밀접하게 관련되어 있다. 흰쥐에서 알코올 섭취는 정상군에 비해 간 조직 및 혈중 glutathione 농도를 낮춘다. 그러나 알코올 섭취에 의한 간 조직 및 혈중 glutathione 농도의 감소는 CPJ, CCM, CCMα 투여에 의해 정상군 수준으로 회복되는 것으로 나타났다(Fig. 5).

이전의 연구에서도 glutathione 고함유 효모 투여가 사염화탄소 및 알코올 투여로 인한 간 손상을 효과적으로 막는 것으로 보고한 바 있다. 알코올 섭취 흰쥐에 CCMα 투여로 인한 과산화지질 농도의 감소는 항산화 활성의 증가와 밀접한 관련성을 가지는 것으로 보였다. 간 조직에서 glutathione 대사의 전구체로서 methionine 또는 cysteine은 내인성 glutathione 합성에 중요한 역할을 수행하는 것으로 최근 보고되었으, cysteine 및 cysteine 함유 구성성분의 투여에 의해 간 및 신장 조직에 있어서 glutathione 농도를 증가시키는 것으로 보고되었다.

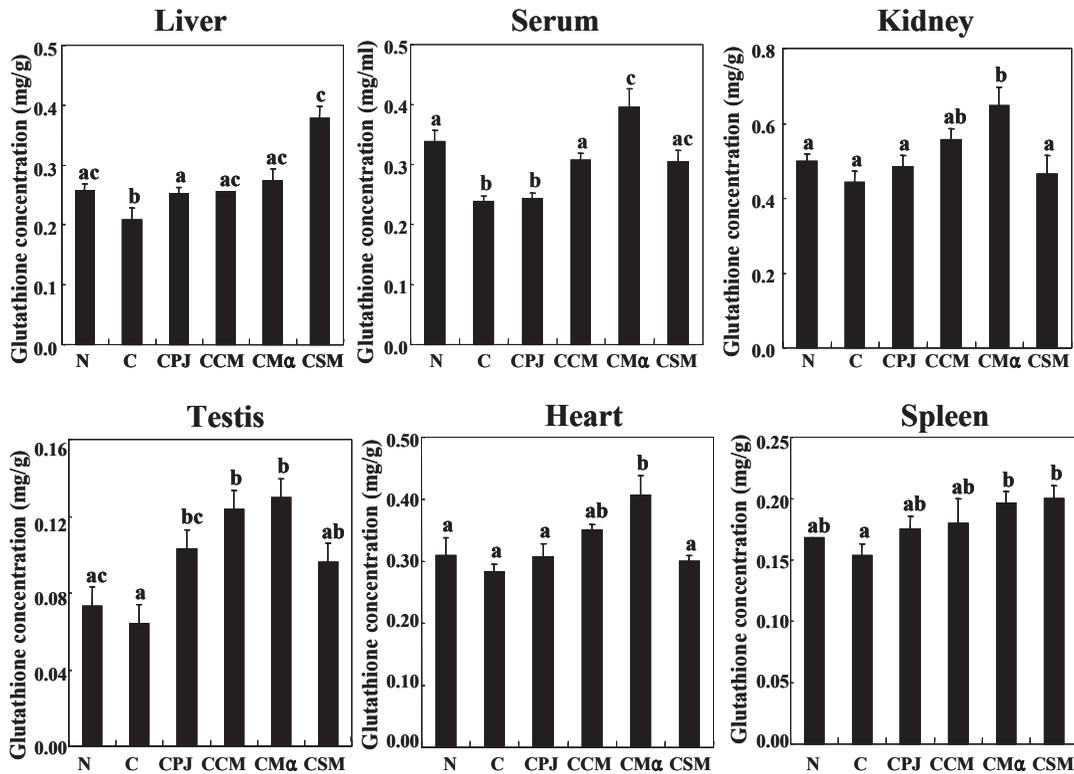


Fig. 5. Effects of CPJ, CCM, CCM α and CSM on glutathione concentrations in the hepatic and serum of alcohol feeding rats.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

(차) 간 조직의 morphology 변화

지방간은 과잉의 알코올 섭취로 인한 간 독성 유발의 시발점으로서 간 세포에 산소나 영양적인 측면의 불균형을 초래하는 것으로 알려져 있다. 간 세포에서의 지질의 축적인 지방간은 알코올성 간 독성 초기에 가장 흔하게 나타나는 증상이다. 실험동물을 해부한 직후 간 조직을 적출하여 조직학적 검사를 실시한 결과 대조군에서는 혈관을 중심으로 간 소엽 구조가 잘 유지되었으며, 간세포들은 풍부한 호산성 세포질과 둥근핵을 가지고 있었고 간세포관은 대부분의 층으로 잘 유지되어 있었다(Fig. 6). CPJ, CCM, CCM α 투여군에서는 혈중 ALT 및 AST 활성의 감소와 간 조직의 과산화지질 농도의 감소에 의해 알코올성 간 독성이 개선되는 효과로 인해 조직학적 검사 결과에서도 정상군과 비슷한 모양을 보였다.

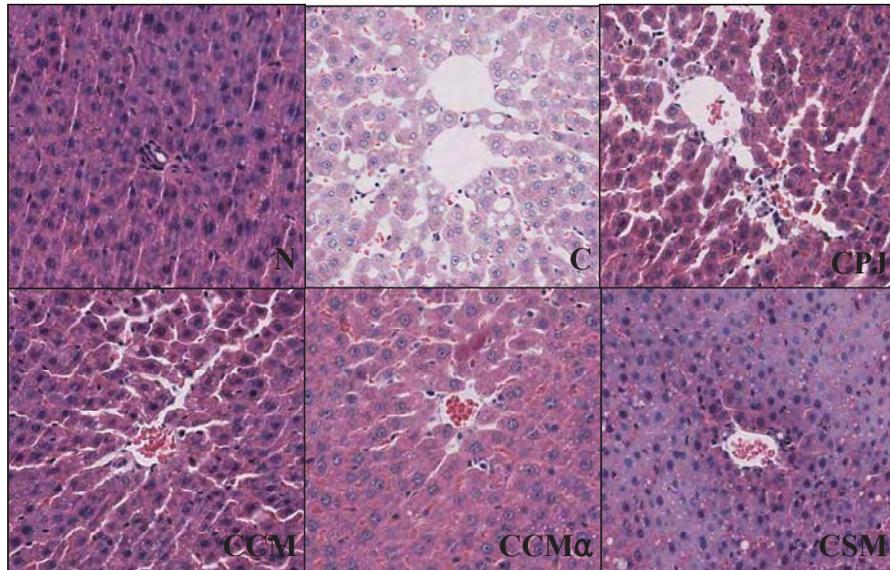


Fig. 6. Effects of CPJ, CCM, CCM α and CSM on hepatic histopathologic changes in alcohol feeding rats.

Hepatic histopathologic changes in alcohol treated rats (magnification x 200).

Hepatocyte staining was carried out with the hematoxylin and eosin staining method.

알코올 투여에 의해 대부분의 간 세포 내에 지방구의 증가에 의한 지방간 유발이 본 실험에서도 관찰되었으며, 이러한 모양은 전형적인 알코올성 지방간의 모습을 나타내는 것이다. 알코올은 탄수화물이나 단백질과 같은 영양소는 없으면서도 칼로리는 높아 결국은 간 조직에서 지방 축적의 원인이 될 수 있다. 한편 CCM α 투여군은 알코올에 의한 간세포 내의 지방 축적은 개선되었으며, 간 조직학적 관찰에서도 정상군과 매우 유사한 모습을 보여 cordycepin 함량을 높인 번데기 동충하초 분말의 간세포 보호 효과를 나타내는 증거가 되는 것이다(Fig. 7).

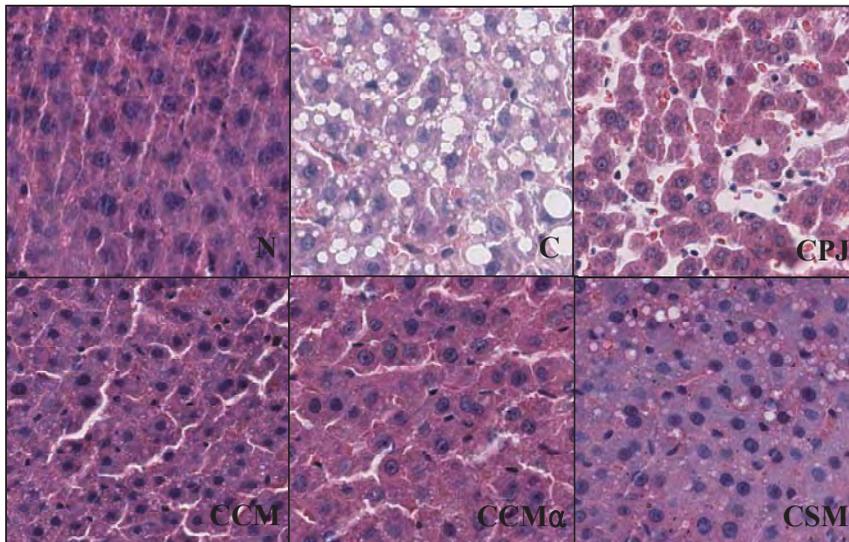


Fig. 7. Effects of CPJ, CCM, CCM α and CSM on hepatic histopathologic changes in alcohol feeding rats.

Hepatic histopathologic changes in alcohol treated rats (magnification x 400).

Hepatocyte staining was carried out with the hematoxylin and eosin staining method.

다. 와송과 발효 와송의 Orotic Acid 유발 흰쥐의 지방간 개선효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) 실험 재료 및 식이 조성

본 실험에 사용한 와송 분말은 (주)정우당에서 구입 하였다. 자연 건조 시킨 와송 (*Orostachys japonicus*)분말과 이 건조 분말에 유산균 Mix (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*)로 발효시킨 와송을 실험 재료로 사용 하였으며, 식이에 각각 2.5%와 5%로 첨가하였다. orotic acid와 타 영양성분을 혼합하여 대조 구로 사용하였고, 식이에 orotic acid, 와송과 발효 와송은 sucrose를 대체하여 첨가하였다 (Table 1).

Table 1. Compositions of experimental diets(%)

	N	Orotic acid				
		OA ¹⁾	2.5OJ ²⁾	5OJ	2.5FOJ ³⁾	5FOJ
Casein	20	20	20	20	20	20
α -Corn starch	15	15	15	15	15	15
Corn oil	10	10	10	10	10	10
Cellulose	5	5	5	5	5	5
AIN-93 mineral mixture ⁴⁾	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93 vitamin mixture ⁵⁾	1	1	1	1	1	1
L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
OJ	-	-	2.5	5	-	-
FOJ	-	-	-	-	2.5	5
Orotic acid	-	1	1	1	1	1
Sucrose	45	44	41.5	39	41.5	39
Total(%)	100	100	100	100	100	100

1) OA : Orotic acid

2) OJ : *Orostachys japonicus*

3) FOJ : *Lactobacillus* Fermented *Orostachys japonicus*

4) AIN 93 M-MX mineral mix, MP Biomedicals, Illkirch, France

5) AIN 93 VX vitamin mix, MP Biomedicals, Illkirch, France

(나) 실험 동물 및 사육 조건

실험 동물은 4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 효창 사이언스(Daegu, Korea)로부터 구입하여 온도 22±2 °C, 습도 50±5%, 명암주기 12시간 (9:00~21:00)이 자동 설정된 동물 사육실에서 사육하였다. 일주일간 시판 고형 사료를 급여하면서 일주일간 환경에 적응시켰다.

적응기간 후, 각 군에서 체중이 동일하게 난괴법(randomized complete block design)으로 분류하여 정상군 (N), Orotic acid (OA), 오로트산+2.5%(w/w) *Orostachys japonicus* (2.5OJ), 오로트산+5%(w/w) *Orostachys japonicus* (5OJ), 오로트산+2.5%(w/w) 발효 시킨 *Orostachys japonicus* (2.5FOJ), 오로트산+5% 발효 시킨 *Orostachys japonicus* (5FOJ) 투여군으로 나누어 실험을 진행 하였다. 실험동물은 각 군마다 6마리씩 나누고, 식이와 물은 10일간 자유급여 시켰다. 사육 기간 중 식이 섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 4일을 주기로 일정한 시간에 측정 하였다.

(다) 동물 실험, 시료 채취 및 분석시료 조제

동물 실험은 10일간 각 군별로 조제 시료를 급여하면서 사육한 후, 실험 최종일 12시간 이상 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 혈액을 채취하고, 약 30분간 실온에 방치시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 혈청을 생화학적 분석에 제공하였다. 채혈 후 각 조직을 적출하여 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 분석시료로 제공하였다.

(라) 간 조직의 분획 조제

간 조직으로부터 homogenate 분획 조제는 간을 일정량 취해 ice-cold potassium phosphate buffer 용액(0.1 mol/l potassium phosphate containing 1 mmol/l sodium EDTA and 1 mmol/l dithiothreitol, pH 7.4)을 9배량 첨가하여 IKA-ULTRA-TURRAX T25 basic homogenizer(IKA-WERKE GMBH & CO., KG, Staufen, Germany)를 이용하여 균질액을 제조하였다. Homogenate 용액을 먼저 800 × g에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 다시 고속원심분리기(VS-24SMTi, Vision Scientific Co., Ltd.)에서 10,000 × g로 20분간 원심분리 하여 침전된 pellet은 mitochondria fraction으로 하였다. 이 때 상등액은 105,000 × g에서 1분간 초원심분리 하여 상층의 cytosol 분획과 침전된 microsome 분획의 단백질 농도는 Bradford 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준액으로 하여 측정하였다.

(마) 과산화 지질 측정

과산화 지질 함량은 TBARS 방법에 준하여 정량하였다. 각 조직으로부터 분획한 homogenate, microsome 및 mitochondria 획분 용액 1 ml에 각각 thiobarbituric acid(TBA) 시약 2 ml을 가하여 잘 혼합하고, 100 °C에서 가열한 후 방냉하여 3,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상층액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각 조직의 과산화지질 농도는 malondialdehyde를 nmol/g으로 나타내었다.

(바) 비헴철 및 아연 함량 측정

간 조직의 미네랄 함량은 A. O. A. C. 분석 방법에 준하여 측정하였다. 간 조직 1 g을 각각 550 °C 회화로에서 3시간 회화 시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시킨 후 수용상에서 산을 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl을 가하여 Adventec 110 mm 2 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)로 여과하여 원자 흡광 분광광도계를 이용하여 측정하였다.

(사) Glutathione 함량 측정

Glutathione 함량은 각 조직의 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml과 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 첨가하여 혼합하고 원심분리 시킨 후 상등액 0.3 ml에 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 발색시약을 첨가하여 412 nm 흡광도에서 측정하였다. 측정값은 glutathione 표준 검량 곡선에 의해 산출하였으며, 간 조직 g당 mg으로 나타내었다.

(아) 혈청 지질 농도 및 생화학적 지표 분석

혈청 중의 Total-lipid, Total-cholesterol, Phospho-lipid, Free fatty acid 농도 및 AST, ALT, ALP, Cholinesterase, LDH 활성은 임상검사 수탁전문기관인 삼광의료재단(Seoul, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

(자) 간조직의 병리조직학적 관찰

동물해부 직후 적출한 간을 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거시킨 상태에서 조직의 일정한 부위의 일부를 취하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정하고, 통상적인 조직 처리인 파라핀 포매 과정을 거쳐 3~4 μm 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 후 광학현미경(Olympus BX41, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

(차) 통계 처리

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean \pm SE)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 체중, 식이 및 음료 섭취량 변화

Orotic acid 1% 수준으로 첨가하여 지방간을 유발한 흰 쥐의 와송(*Orostachys japonicus*)과 유산균으로 발효된 와송 분말이 미치는 영향을 확인하기 위해 와송(OJ)과 발효 와송(FOJ) 분말을 각각 2.5%와 5% 농도로 기본 식이에 첨가하여 10일간 투여하였다. Orotic acid 1%를 식이에 첨가하면 단기간에 지방간이 유발되며, 정상군(N)에서 체중이 증가한 것에 비해 대조군(OA), OJ군과 FOJ군에서는 체중이 감소한 경향을 보였는데 이는 orotic acid가 영향을 미친 것이라고 사료된다. 식이 및 음료 섭취량은 각 군마다 유의적인 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Effects of OJ and FOJ on the body weight, food intake and water consumption in orotic acid-induced fatty liver model rats.

	N	OA	2.5OJ	5OJ	2.5FOJ	5FOJ
Initial weight (g)	132.25±2.00 ^a	134.80±3.81 ^a	133.33±3.31 ^a	133.92±3.72 ^a	133.50±3.32 ^a	133.75±3.03 ^a
Final weight (g)	234.00±3.57 ^a	210.30±5.79 ^b	209.75±5.41 ^b	211.25±6.30 ^b	199.92±2.61 ^b	199.75±4.42 ^b
Weight gain (g)	101.75±4.34 ^a	75.50±6.67 ^b	76.42±4.89 ^b	77.33±6.45 ^b	66.42±2.42 ^b	66.00±3.40 ^b
Food intake (g/day)	15.61±0.40 ^a	13.82±0.22 ^b	15.75±0.03 ^a	16.24±0.16 ^a	15.76±0.58 ^a	14.26±0.43 ^b
Water consumption (ml/day)	18.33±0.16 ^a	17.78±0.48 ^a	18.7±0.55 ^a	18.03±0.47 ^a	16.22±0.14 ^b	17.37±0.68 ^{ab}

Values are mean± S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

(나) 각 장기의 무게

각 장기의 무게는 체중에 대한 상대 중량(%)으로 Table 3에 나타내었다. 간장의 무게는 N군과 비교하여 OA군에서 증가하여, 등[12] 연구에서 orotic acid를 이용하여 중성지방의 축적에 의해 지방간 유발시킨 Rat 간장의 무게가 orotic acid군에서 증가한다는 결과와 일치하였다. 그러나 OA군에 비해 OJ군과 FOJ군의 간장 무게는 유의적으로 감소한 결과를 보여 OJ와 FOJ의 식이첨가에 의한 간 개선효과가 나타났다. 한편, 신장과 심장의 무게는 실험군 간 비슷하였고, 고환과 비장의 무게가 약간의 차이를 보였다.

Table 3. Tissue relative weight (% of terminal body weight)

	N	OA	2.5OJ	5OJ	2.5FOJ	5FOJ
Liver	3.61±0.06 ^a	5.49±0.35 ^b	4.82±0.10 ^c	4.89±0.21 ^c	4.79±0.09 ^c	4.96±0.15 ^{bc}
Testis	1.08±0.03 ^a	1.24±0.04 ^b	1.23±0.03 ^b	1.13±0.03 ^{ab}	1.16±0.04 ^{ab}	1.19±0.05 ^{ab}
Kidney	0.88±0.06 ^a	0.83±0.04 ^a	0.78±0.01 ^a	0.78±0.02 ^a	0.78±0.03 ^a	0.78±0.03 ^a
Spleen	0.35±0.01 ^a	0.29±0.02 ^b	0.28±0.01 ^b	0.27±0.01 ^b	0.27±0.01 ^b	0.29±0.02 ^b
Heart	0.41±0.02 ^a	0.42±0.02 ^a	0.41±0.01 ^a	0.41±0.01 ^a	0.42±0.01 ^a	0.42±0.01 ^a

Values are mean± S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

(다) 간 조직 중의 비헴철 및 아연 농도 변화

생체 내 항산화 물질로 알려져 있는 간 조직의 아연 농도는 N군에서 0.35ppm으로 가장 높게 나타났으며, OA군에서 0.22ppm, 2.5OJ군에서 0.24ppm, 5OJ에서 0.24ppm, 2.5FOJ에서 0.21ppm, 5FOJ에서 0.22ppm으로 나타났다(Table 4). 각 군 중에서 2.5OJ군, 5OJ군, 2.5FOJ군, 5FOJ군의 아연 농도는 OA군의 아연 농도와 비슷한 수치를 보였다. 철은 체내 과산화수소를 제거하는 catalase의 구성 성분으로 체내의 비타민 C의 함량과 과산화수소의 농도 차에 의해서

과산화지질 반응에 영향을 미치므로 생체 내 과산화지질 측정에 비헴철 농도는 중요한 요인으로 알려져 있다. 간 조직의 비헴철 농도는 N군에서 0.48ppm, OA군에서 0.57ppm, 2.5OJ군에서 0.51ppm, 5OJ군에서 0.49ppm, 2.5FOJ에서 0.45ppm, 5FOJ에서 0.45ppm으로 나타났다. OA군에서 비헴철의 농도가 높게 나타난 것은 과산화지질에 영향을 받아 비헴철의 농도가 간 조직에 N군보다 높아진 것으로 사료되며, 2.5FOJ군, 5FOJ군에서는 과산화지질에 영향을 OA군보다 적게 받아 낮은 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of OJ and FOJ on the nonheme iron and zinc contents of liver in rats fed diet containing orotic acid (ppm)

	N	OA	2.5OJ	5OJ	2.5FOJ	5FOJ
Zn	0.35±0.01^a	0.22±0.03^b	0.24±0.03^b	0.24±0.01^b	0.21±0.01^b	0.22±0.00^b
Fe	0.48±0.01^{ac}	0.57±0.00^b	0.51±0.00^a	0.49±0.02^a	0.45±0.00^c	0.45±0.00^c

Values are mean± S.E, n=3. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

(라) 각 조직의 과산화지질 농도 변화

지질과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 등에 의한 간 손상 발생의 가장 중요한 기전으로, TBARS는 지질 과산화 생성물질 중의 하나로, 과산화지질 정도의 지표로서 이용되고 있으며, 세포의 산화적 손상을 유발하고 각종 기능장애를 야기함으로써 노화 또는 각종 성인병의 원인이 되고 있다. 본 실험에서 TBARS를 각 장기 별로 측정된 결과(Fig. 1), liver에서 OA군이 N군보다 높게 나타났으며, 2.5OJ, 5OJ, 2.5FOJ, 5FOJ군 모든 시료 군에서 N군 수준으로 감소하여 유의적인 감소 효과를 확인할 수 있었다. Liver 분획에서 얻은 microsome에서는 OA군에서 N군보다 높게 나타났고, 모든 시료 군에서는 농도 의존적으로 약간의 감소 형태를 보이나, 유의적인 차이는 없었다. Liver mitochondria의 측정 결과, OA군에서 높았고, 2.5OJ, 5OJ, 2.5FOJ, 5FOJ군에서 감소한 것을 확인할 수 있었다. Kidney에서 OA군에서 높았고, 2.5OJ군 5OJ군에서는 OA군과 큰 차이가 없었으며, 2.5FOJ와 5FOJ군에서는 감소한 것으로 나타났다. Spleen에서 또한 OA군에서 높았고, 모든 시료군에서 감소하였으며, serum, testis, heart에서는 각 군마다 특별한 차이를 보이지 않았다. 이로써 OJ와 FOJ는 지질 개선에 어느 정도 효과를 보이는 것으로 사료된다.

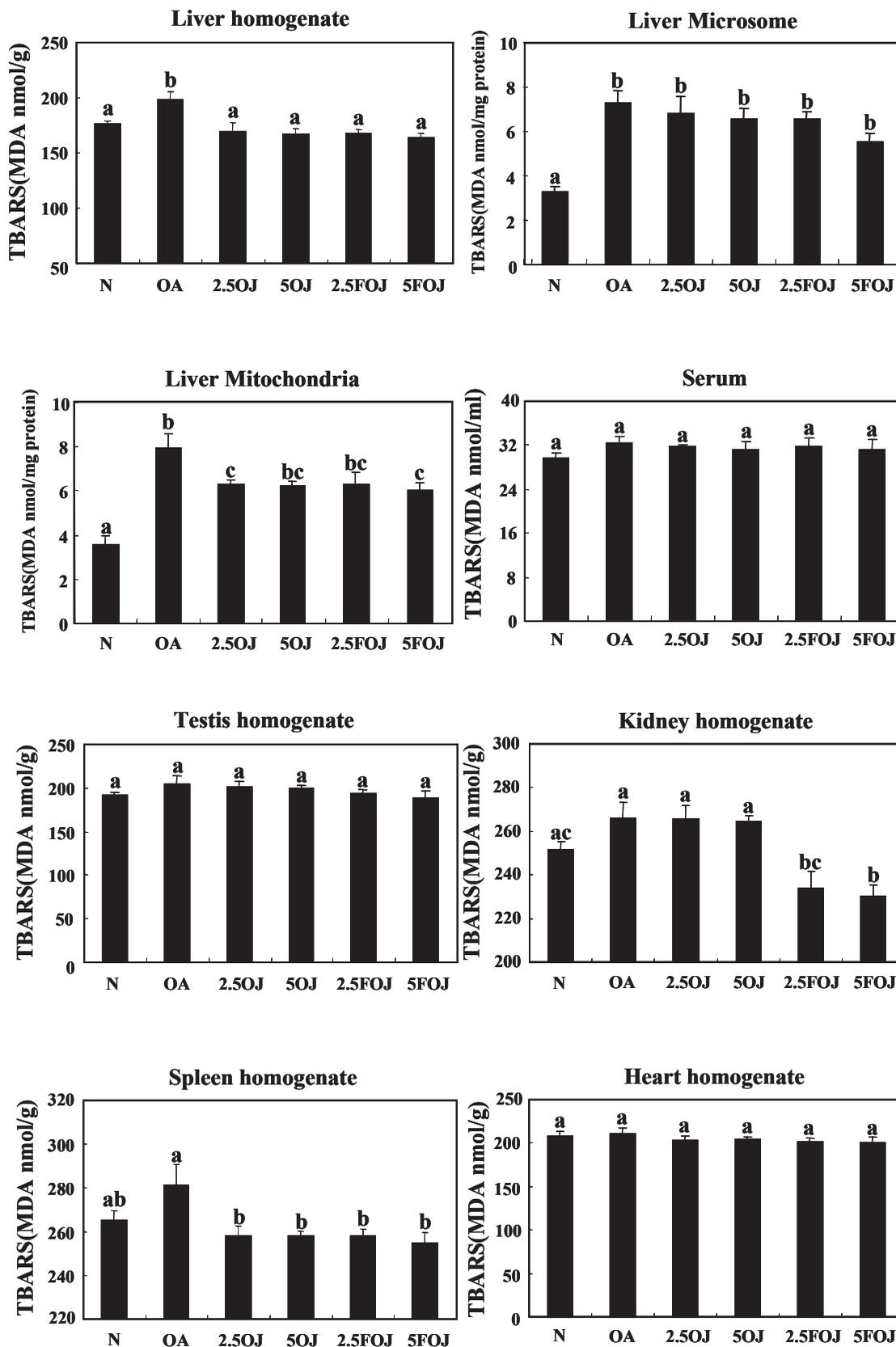


Fig. 1. Effects of OJ and FOJ on TBARS in the hepatic fractions, tissue and serum in Orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values are mean± S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

(마) 조직 및 혈중 glutathione 변화

Glutathione은 주로 간과 신장에서 glutamic acid, cystein과 glycine을 기질로 하여 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase에 의해 합성되어, 혈액을 통해서 폐 등 다른 장기로 이동한다. Glutathione은 단백질이나 DNA 합성, 물질의 이동, thiol기의 저장 및 효소 활성 조절 등 생물학적으로 중요한 여러 반응에 관여하며, 활성산소에 대한 해독반응에도 관여한다. Liver의 glutathione 함량은 N군에서 높게 나타났고, OA군에서 낮게 나타났으며, 2.5OJ와 5OJ군에서는 OA군의 수준으로 glutathione 함량을 나타냈다(Fig. 2). 2.5FOJ군과 5FOJ군에서는 농도의존적으로 glutathione 함량이 높아져, FOJ가 liver의 glutathione 함량을 높이는데 어느 정도 영향을 준 것으로 사료된다. Serum의 glutathione 함량 또한 N군에서 높고, OA군에서 낮게 나타났으며, 2.5OJ군, 5OJ군, 2.5FOJ군에서는 차이가 없었고, 5FOJ군에서 함량이 높게 나타났지만 다른 시료 군과는 큰 차이를 나타내지 않았다. Testis와 kidney의 glutathione 함량은 모든 군에서 뚜렷하게 차이를 나타내지 않았고, spleen과 heart의 glutathione 함량에서 N군, OA군, 2.5OJ군, 5OJ군에서는 큰 차이를 나타내지 않았지만, 2.5FOJ군과 5FOJ군에서 glutathione 함량이 높았음을 알 수 있었다. 이러한 결과로 FOJ에서 조직 중의 glutathione의 함량을 높이는데 영향을 주는 것으로 보인다.

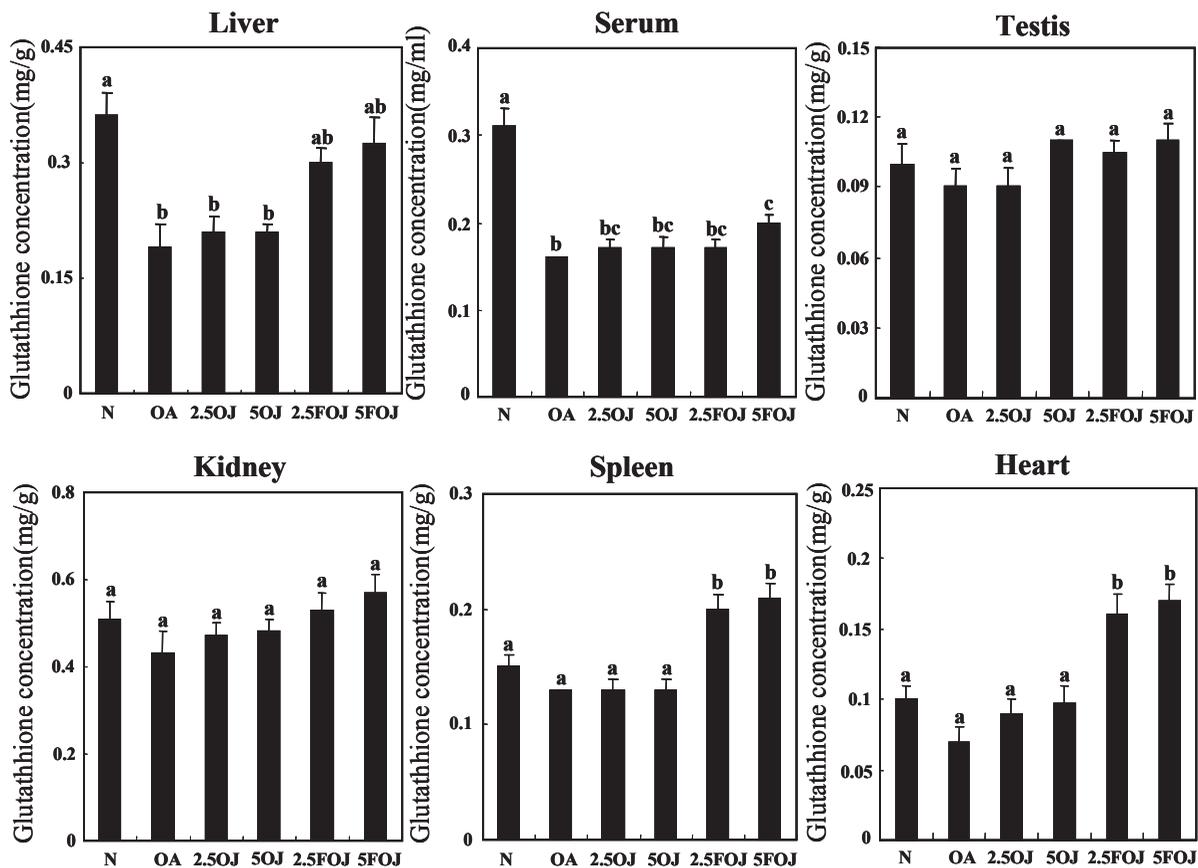


Fig .2. Effects of OJ and FOJ on glutathione concentrations in orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values are mean± S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

(바) 혈청 중의 AST, ALT, ALP, Cholinesterase 및 LDH의 활성 변화

혈청 중의 AST, ALT, ALP, Cholinesterase 및 LDH의 활성은 Fig. 3에 나타내었다. AST와 ALT는 amino acid와 α -keto acid와의 사이에 amino기 전이 반응을 촉매 하는 효소로 체내에 널리 분포되어 있다. AST와 ALT는 간 손상 지표로서 널리 사용되는 효소이며, 간 세포질에 존재하여 손상을 받게 되면 혈중으로 유출된다. AST와 ALT의 증가는 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨을 의미하므로 이들 효소의 혈중 유리 정도를 측정하여 연구에 이용하고 있다. AST와 ALT의 활성은 N군에서 낮고, OA군에서 활성이 높았으며, 2.5OJ군, 5OJ군, 2.5FOJ군, 5FOJ군에서 OA군에 비해 유의적으로 감소한 경향을 보였다. 간장 기능적 임상 지표로 사용되고 있는 혈청 ALP, Cholinesterase 및 LDH의 활성도 지방간 조직 모델에서 증가함으로써 간장 독성 유발과 관련성을 가진 것으로 보고되고 있다. ALP와 Cholinesterase 활성에서 OA군에서 증가 경향을 보였고, 이러한 증가는 2.5OJ군, 5OJ군, 2.5FOJ군, 5FOJ군 순으로 점차 감소 경향을 보였다. LDH 활성에서는 N군과 OA군에서는 차이가 없었고, 2.5OJ군, 5OJ군, 2.5FOJ군 또한 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 5FOJ군에서 감소 경향을 보였다.

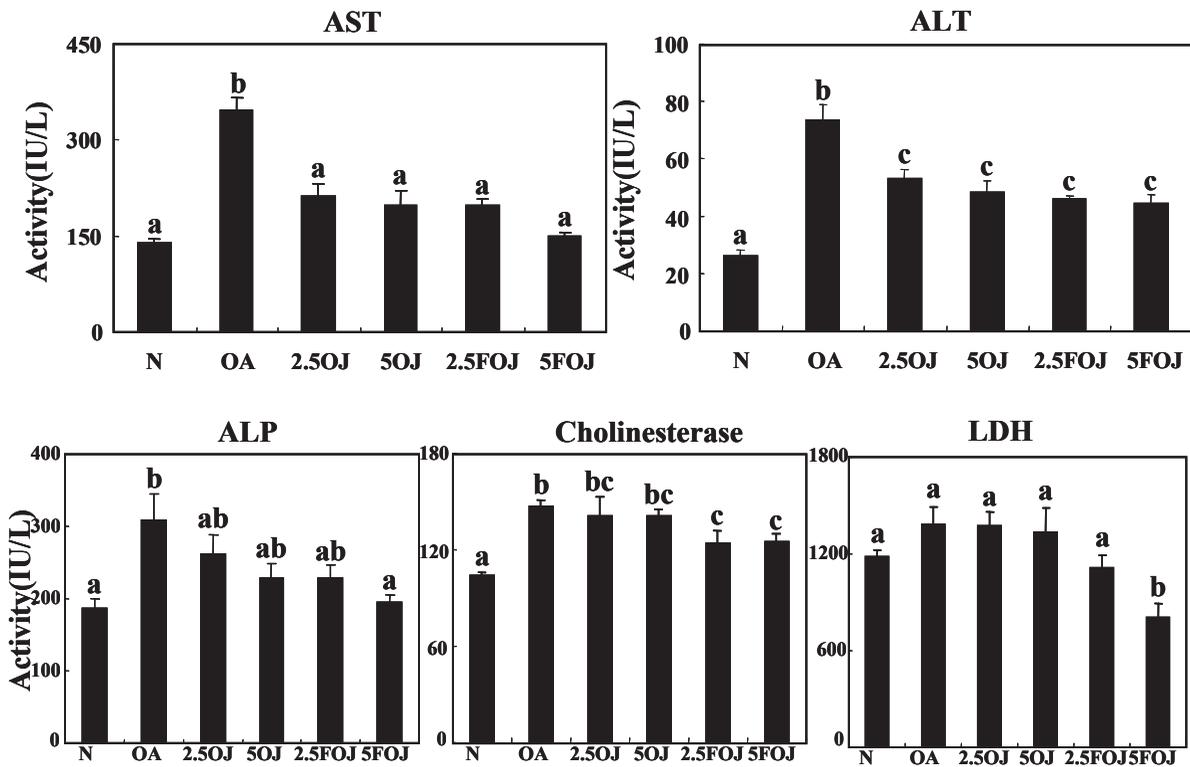


Fig .3. Effect of OJ and FOJ on the activities of ALP, ALT, AST, Cholinesterase and LDH in orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values are mean± S.E, n=3. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

(사) 간장 및 혈중 중성지질 농도

간장 조직은 지질과 지질 대사에서 중요한 조직으로서 혈중 중성지질 농도 조절에 밀접한 관련성이 있다. 간장에서 중성지질은 MTP (microsomal triglyceride transfer protein)에 의해 수송을 받아 활면 소포체에서 VLDL 입자가 만들어지고 골지체로 이동해 성숙된 VLDL 입

자로서 혈중으로 분비되어 진다. Orotic acid는 pyrimidine nucleotide 생합성의 중간 생성물로서, 과잉 투여 시 간장에 중성지질이 축적되어 지방간을 유발시키는 것으로 보고되었고, 이는 Orotic acid가 간장에서 MTP 활성화와 전사를 억제 시켜 혈중으로의 지질 분비를 저해함으로써 간장으로부터 VLDL (very low density lipoprotein)의 분비를 저해하여 간장에 중성지질이 축적되는 것으로 보고되어 있다. OA군의 간장 중성지질 농도는 높았고, 혈중 중성지질 농도는 낮았으며(Fig. 4), 이는 Orotic acid의 투여로 인한 증상으로, Cha 등의 연구에서 Orotic acid 1%로 투여한 흰쥐의 간장 중성지질 농도는 높게, 혈중 중성지질 농도는 낮게 측정된 결과와 일치하였다. 2.5OJ군, 5OJ군, 2.5FOJ군, 5FOJ군의 중성지질 농도는 OA군에 비해 비슷한 수준으로 감소하였고, 혈중 중성지질 농도는 OA군에 비해 어느 정도 증가한 경향을 보였다. 모든 OJ군과 FOJ군은 간장 중성지질 농도 개선에 어느 정도 영향을 주었고, 혈중 중성지질 농도에서는 OA군에 비해 5FOJ군에서 유의적인 수치를 보였다.

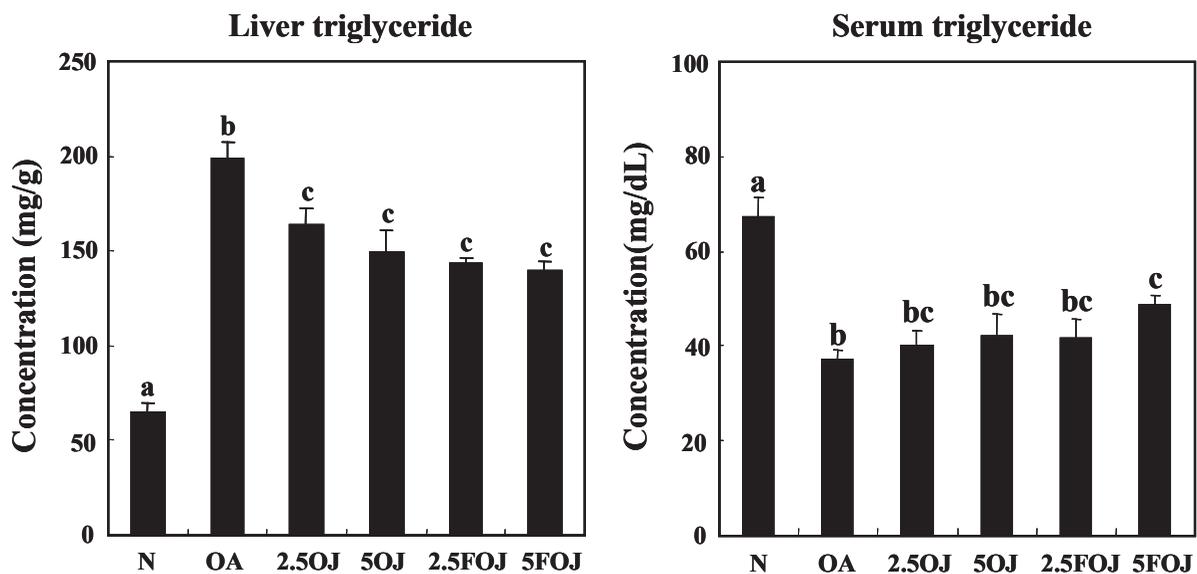


Fig. 4. Effects of OJ and FOJ on the concentrations of triglyceride in the liver and serum. Values are mean± S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

(아) 혈청 중의 지질 농도 변화

혈청 중의 지질 농도 변화는 total lipid, total cholesterol, phospho lipid와 free fatty acid의 함량은 Fig. 5에 나타내었다. 혈청 total lipid, total cholesterol, phospho lipid, free fatty acid의 농도 모두 N군에서 높았고, OA군에서 낮게 측정되었다. 이는 간장과 혈청 중의 중성지질 농도와 같이 orotic acid 1% 투여시 간장으로부터 지질이 분비 되지 않아 혈청 중의 중성지질이 낮는데, 이와 마찬가지로 혈중 total lipid, total cholesterol, phospho lipid에서도 OA군이 N군보다 낮게 측정된 것으로 사료된다. 2.5OJ군, 5OJ군, 2.5FOJ군, 5FOJ군에서 또한 total lipid, total cholesterol, phospho lipid의 농도 변화는 OA군과 차이가 없었지만, free fatty acid의 농도에서 OA군에 비해 증가 경향을 보였다. 5FOJ에서 free fatty acid는 N군 수준으로 증가함을 알 수 있었고, OJ와 FOJ는 혈중 지질에 크게 유의한 영향을 나타내지 않는 것으로 확인하였다.

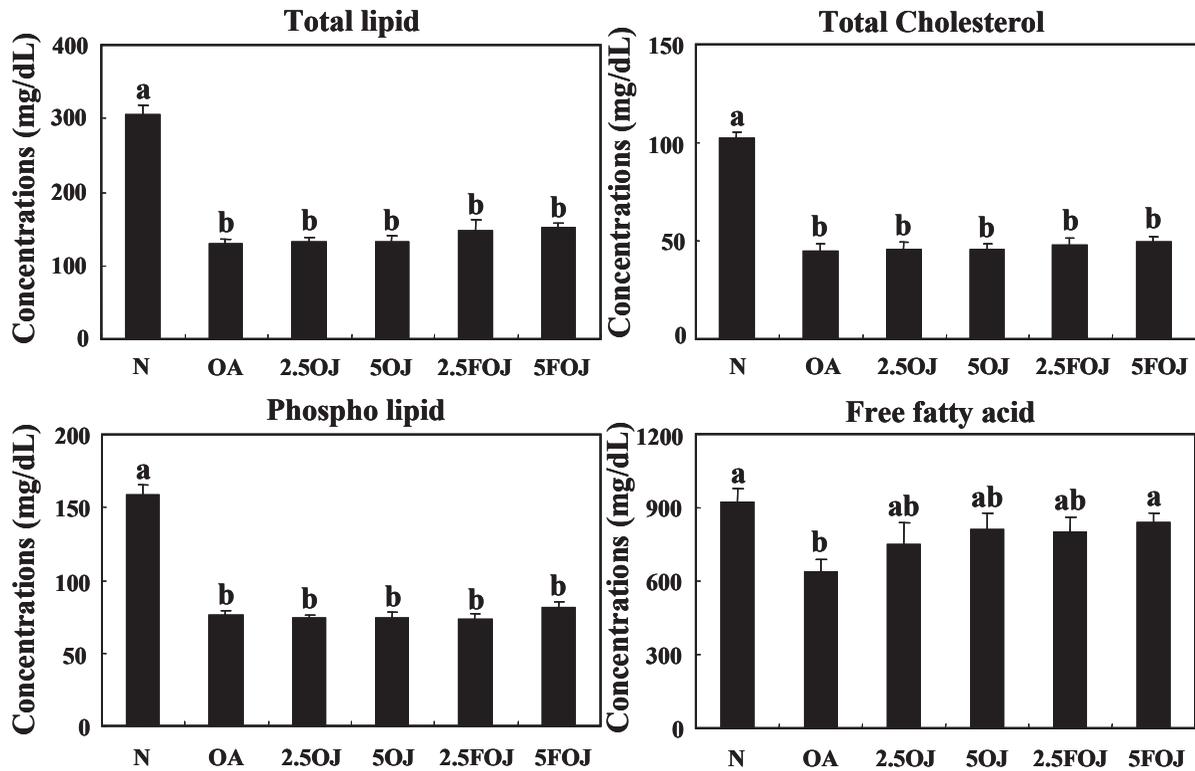


Fig .5. Effect of OJ and FOJ on the serum lipid concentrations in orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values are mean± S.E, n=3. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

(자) 간 조직의 병리조직학적 관찰

간 조직은 H&E 염색을 통해 광학 현미경으로 관찰하여 Fig. 6에 나타내었다. 간 세포 내의 지방 입자는 지방간이 유발됨으로서 수와 부피가 증가하게 된다. N군에서 간 세포들은 뚜렷하게 둥근 핵을 가지고, 세포 간극이 좁은 일정한 소엽 구조를 유지하고 있었다. OA군의 간 조직은 간 세포의 핵이 일정하지 않고, 간 소엽 사이에 지방 입자들이 끼여 균일하게 배열되어 있지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 2.5OJ군과 5OJ군은 뚜렷한 변화를 보이지 않았고, 2.5FOJ군에서 어느 정도 개선된 것으로 관찰되었다. 5FOJ군에서 뚜렷한 개선 효과를 보였으며, OA군과 비교하였을 때, 5FOJ군은 지방 입자들의 수가 감소된 것을 확인할 수 있었고, 간 세포의 핵 또한 N군과 같이 뚜렷한 둥근 모양을 보였다. 간 소엽의 간격 또한 좁아져 5FOJ가 Orotic acid 투여의 지방 축적으로 인한 간 조직 손상에 개선 효과가 있는 것으로 사료된다.

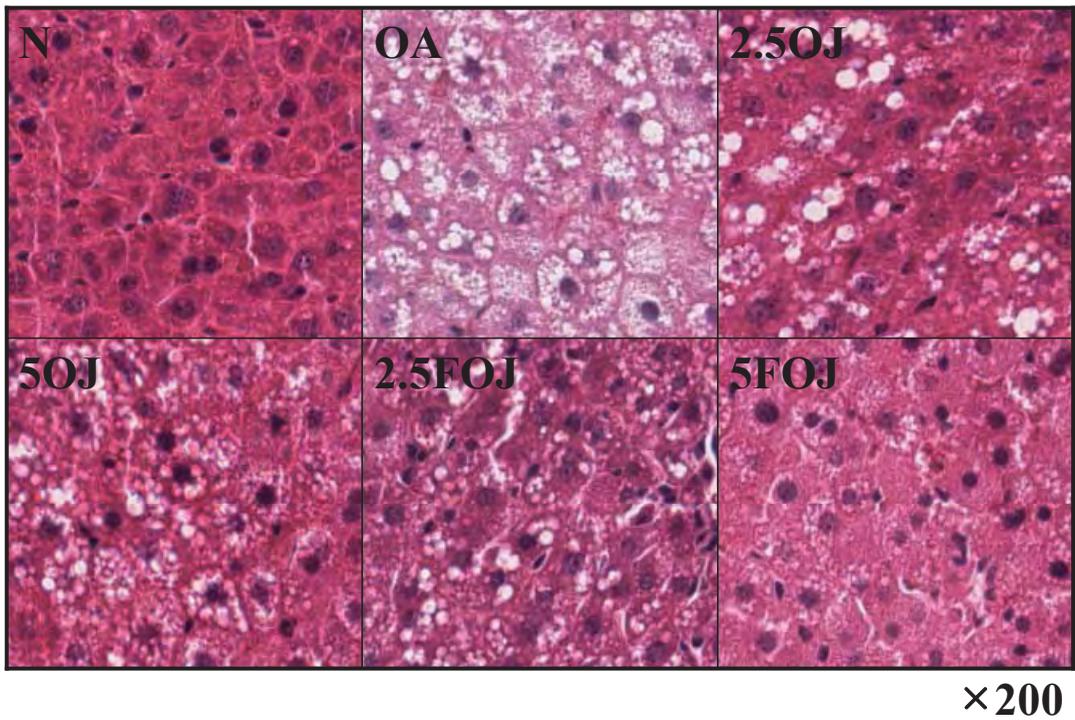
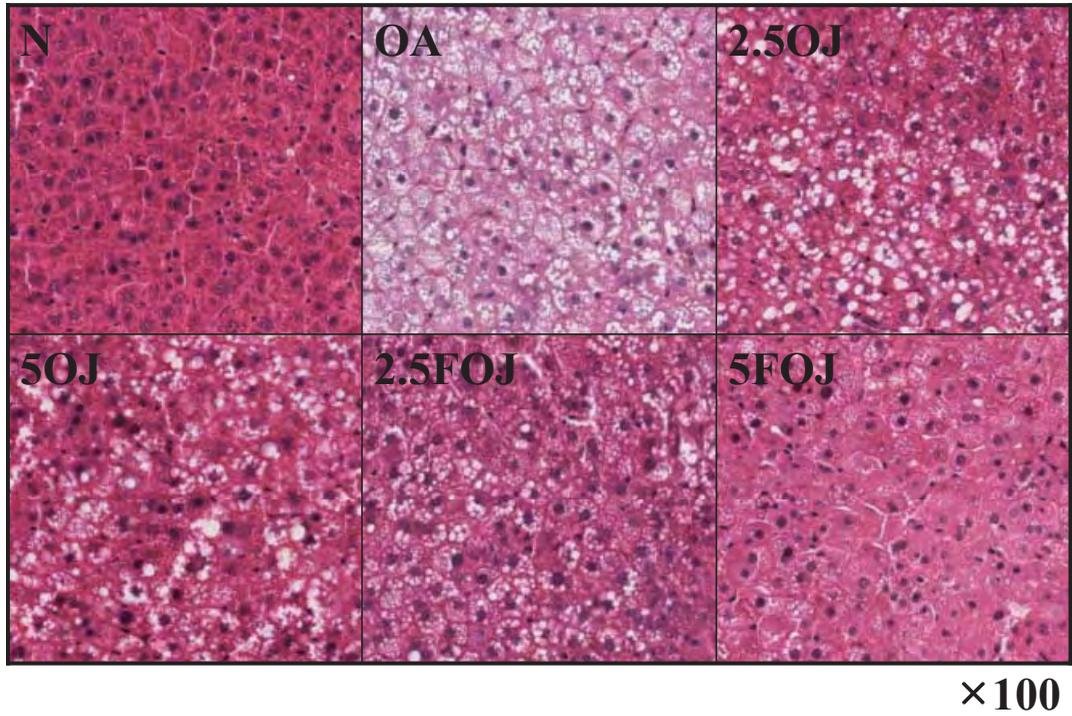


Fig. 6. Effect of OJ and FOJ on the hepatic histopathologic changes in orotic acid-induced fatty liver model rats.

라. 꾸지뽕나무 열매 분말을 첨가한 식이가 Orotic acid 유발 지방간 흰쥐에 미치는 개선효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) 실험재료

본 실험에 사용된 꾸지뽕나무 열매는 2012년 10월에 경남 밀양시 밀양꾸지뽕 농장에서 구입하였다. 꾸지뽕나무 열매는 동결건조 후 분쇄하여 발효에 사용되었다. 전 배양시킨 3종의 유산균을 동결 건조한 꾸지뽕나무 열매에 1:1 비율로 접종한 후 일정량의 증류수를 넣고 37°C에서 24시간 발효시킨 후 다시 동결 건조하여 얻은 시료를 실험동물 식이에 사용하였다.

(나) 식이조성 및 실험군

식이 조성은 Table 1과 같으며, 정상군 (N), 오르트산(Orotic acid) 투여 대조군 (OA), 오르트산+2.5% 꾸지뽕나무 열매 분말 투여군 (2.5CT), 오르트산+5% 꾸지뽕나무 열매 분말 투여군 (5CT), 오르트산+2.5% 유산균 발효 꾸지뽕나무 열매 분말 투여군 (2.5FCT) 및 오르트산+5% 유산균 발효 꾸지뽕나무 열매 분말 투여군 (5FCT)으로 나누어 실험을 진행하였다. 발효 꾸지뽕나무 열매 분말의 식이 중 첨가량 결정은 전보의 방법에 준하였으며, 이때 식이 중에 첨가한 발효 꾸지뽕나무 열매 분말은 당질원인 설탕으로 대체하여 첨가하였다.

Table 1. Compositions of experimental diets(%)

Ingredients	N	OA	2.5CT	5CT	2.5FCT	5FCT
Casein	20	20	20	20	20	20
α-Corn starch	15	15	15	15	15	15
Corn oil	10	10	10	10	10	10
Cellulose	5	5	5	5	5	5
AIN-93 mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93 vitamin mixture	1	1	1	1	1	1
L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
CT ¹⁾	-	-	2.5	5	-	-
FCT ²⁾	-	-	-	-	2.5	5
Orotic acid	-	1	1	1	1	1
Sucrose	45	44	41.5	39	41.5	39
total	100	100	100	100	100	100

¹⁾CT: Fruit of *Cudrania tricuspidata*,

²⁾FCT: Fermented fruit of *Cudrania tricuspidata* by *Lactobacillus*.

N: Normal group,

OA: orotic acid feeding control group,

CT: orotic acid+ fruit of *Cudrania tricuspidata* feeding group,

FCT: orotic acid+ fermented fruit of *Cudrania tricuspidata* by *Lactobacillus* feeding group.

(다) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 효창사이언스(대구, 한국)로부터 4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 구입하여 일주일간 시판 고형사료를 급여하면서 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 체중이 동일하게 난괴법(randomised complete block design)으로 분류하여 사육실 온도($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)와 습도($50\pm 5\%$) 및 명암주기(명주기: 7:00~19:00)가 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다. 실험동물은 각 군마다 6마리씩 나누고, 식이와 물은 10일간 자유 섭취시켰다. 사육기간 중 식이섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 3일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

(라) 동물실험, 시료 채취 및 분석시료 조제

동물실험은 10일간 각 군별로 조제사료를 급여하면서 사육한 후, 실험 최종일 12시간 이상 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 혈액을 채취하고, 약 30분간 실온에 방치시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 혈청을 혈청 생화학적 분석에 제공하였다. 채혈 후 각 조직을 적출하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 분석시료로 제공하였다.

(마) 혈청 지질농도 및 생화학적 지표분석

혈청 중의 ALP, ALT, AST, Cholinesterase, LDH활성 및 Free fatty acid, Phospho-lipid, Total Cholesterol, Total Lipid, Triglyceride 농도는 의료전문수탁검사기관인 삼광의료재단(서울, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

(바) 간 조직의 분획 조제

간 조직으로부터 homogenate 분획 조제는 간을 일정량 취해 ice-cold potassium phosphate buffer 용액(0.1 mol/L potassium phosphate containing 1 mmol/L sodium EDTA and 1 mmol/L dithiothreitol, pH 7.4)을 9배량 첨가하여 IKA-ULTRA-TURRAX T25 basic homogenizer (IKA-WERKE GMBH & CO., KG, Staufen, Germany)를 이용하여 균질액을 제조하였다. Homogenate 용액을 먼저 800 x g에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 다시 고속원심분리기(VS-24SMTi, Vision Scientific Co., Ltd.)에서 $10,000 \times g$ 로 20분간 원심분리 하여 침전된 pellet은 mitochondria fraction으로 하였다. 이때 microsome이 함유된 상층액은 $105,000 \times g$ 에서 60분간 초원심분리하여 상층의 cytosol 분획과 침전된 microsome 분획을 얻어 실험에 제공하였다. Homogenate, mitochondria 및 microsome 분획의 단백질 농도는 Lowry 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정 하였다.

(사) 과산화지질 측정

분획한 homogenate와 microsome 생체막의 과산화지질 함량은 전보의 방법에 준하여 정량 하였다. 즉, 단백질 량으로 1 mg을 함유한 분획 용액 1 ml에 각각 thiobarbituric acid(TBA) 시약 2 ml을 가하여 잘 혼합하고, 끓는 물에서 30분간 반응 시킨 후 흐르는 물에서 방냉하여

3,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질 함량은 malondialdehyde를 nmol/g으로 나타내었다.

(아) 미네랄 함량 측정

간 조직의 미네랄 함량은 A.O.A.C. 분석 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 간 조직 1 g을 각 550°C 회화로에서 3시간 회화 시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시켜 수용상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl를 가하여 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석하여 원자흡광 분광광도계(AAnalyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

(자) Glutathione 함량 측정

간 조직의 glutathione 함량은 간 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml과 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 가하여 혼합하고 원심분리 시킨 뒤 상등액 0.3 ml에 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 발색시약을 첨가하여 412 nm 흡광도에서 측정하여 glutathione의 표준 검량 곡선에 의해 함량을 산출하였으며 간 조직 g당 mg으로 표시하였다.

(차) 간 조직의 병리조직학적 관찰

동물해부 직후 적출한 간을 냉각 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거시킨 상태에서 조직의 일정한 부위의 일부를 취하여 10% 중성포르말린 용액에 고정하여 통상적인 조직처리인 파라핀 포매 과정을 거쳐 3~4 μ m 두께로 절편하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 한 후 광학현미경(Olympus BX41, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

(카) 통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차 (mean \pm SE)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 체중, 식이 및 음료 섭취량 변화

Orotic acid 1% 수준을 첨가하여 지방간을 유도한 흰쥐에 꾸지뽕나무 열매 분말과 유산균 발효 꾸지뽕나무 분말이 미치는 영향을 살펴보기 위해 각각 2.5%, 5% 농도로 기본식이에 첨가하여 10일간 투여하였다. 그 결과 정상군(N)에 비해 Orotic acid 투여군의 체중 증가량이 적은 것으로 보아 Orotic acid에 의해 성장에 영향이 미친 것으로 보여진다. 식이섭취량은 정상군(N)에서 가장 높은 반면 대조군(OA)에서는 낮은 결과를 보였으며 꾸지뽕나무 열매 분말과 발효 꾸지뽕나무 열매 분말을 식이에 첨가하여 투여한 2.5CT, 5CT, 2.5FCT, 5FCT군에서는 대조군(OA)에 비해 식이섭취량이 높은 경향을 보였다(Table 2).

Table 2. Changes in body weight gain, food intake and water consumption

Groups	N	OA	2.5CT	5CT	2.5FCT	5FCT
Initial weight (g)	135.42±3.19 ^a	132.30±1.22 ^a	133.75±3.49 ^a	133.75±3.21 ^a	133.92±3.03 ^a	133.58±3.12 ^a
Final weight (g)	233.08±5.12 ^a	209.40±7.86 ^b	203.00±4.09 ^b	193.00±8.31 ^b	200.25±6.20 ^b	201.92±2.90 ^b
Weight gain (g)	97.67±5.29 ^a	77.10±7.20 ^b	69.25±2.32 ^{bc}	59.25±5.77 ^c	66.33±4.37 ^{bc}	68.33±4.08 ^{bc}
Food intake (g/day)	16.88±0.45 ^a	14.97±0.32 ^b	16.16±0.36 ^{ab}	15.79±0.42 ^{ab}	15.97±0.38 ^{ab}	15.88±0.40 ^{ab}
Water consumption (ml/day)	20.63±0.33 ^a	20.63±0.22 ^{ac}	18.50±0.38 ^{bd}	18.57±0.45 ^{bd}	17.72±0.64 ^b	19.25±0.47 ^{cd}

Values are mean± S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

(나) 각 장기의 절대 및 상대 중량

체중에 대한 각 장기의 절대중량과 상대중량을 각각 Table 3과 Table 4에 나타내었다. 간장의 무게는 기본식을 투여한 정상군(N)과 비교해서 Orotic acid 1% 수준으로 식이 투여한 대조군(OA)에서는 유의적으로 증가하여 중성지방 축적에 의한 지방간 유발이 확인되었다. 그러나 대조군(OA)과 비교하여 2.5CT, 5CT, 2.5FCT, 5FCT군에서 정상군(N)보다는 증가하는 경향을 보였지만 중성지방 축적을 감소시킴으로써 이들의 식이첨가로 인해 지방간 개선 효과를 확인할 수 있었으며, 특히 2.5CT와 5CT군에서는 꾸지뽕나무 열매 분말의 식이첨가 농도가 높을수록 지방간 개선효과가 더 높은 것을 확인하였다(Table 3).

Table 3. Tissue absolute weight (g)

Groups	N	OA	2.5CT	5CT	2.5FCT	5FCT
Liver	8.59±0.21 ^a	11.31±0.93 ^b	9.97±0.46 ^{ab}	8.73±0.54 ^{ac}	9.09±0.51 ^{ac}	10.26±0.31 ^{bc}
Testis	2.72±0.09 ^a	2.43±0.11 ^a	2.52±0.06 ^a	2.43±0.11 ^a	2.42±0.09 ^a	2.58±0.09 ^a
Kidney	1.83±0.26 ^a	1.70±0.08 ^a	1.60±0.04 ^a	1.53±0.09 ^a	1.67±0.08 ^a	1.64±0.02 ^a
Spleen	0.80±0.04 ^a	0.63±0.07 ^b	0.55±0.01 ^{bc}	0.52±0.03 ^{bc}	0.51±0.04 ^{bc}	0.50±0.03 ^c
Heart	0.93±0.04 ^a	0.83±0.05 ^a	0.82±0.03 ^a	0.82±0.03 ^a	0.85±0.04 ^a	0.92±0.03 ^a

Values are mean± S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

한편, 상대중량에서는 고환의 경우 정상군(N)과 대조군(OA)을 제외한 2.5CT, 5CT, 2.5FCT 및 5FCT군에서는 유의적인 차이는 없었고, 신장과 심장의 경우 모든 군 간의 유의적인 차이가 없었으며 비장에서는 OA 1% 투여군 간에는 차이가 없었으나 정상군(N)에서는 약간 차이를 보였다(Table 4).

Table 4. Tissue relative weight (% of terminal BW)

Groups	N	OA	2.5CT	5CT	2.5FCT	5FCT
Liver	3.69±0.12 ^a	5.37±0.27 ^b	4.91±0.18 ^{bc}	4.51±0.13 ^c	4.52±0.12 ^c	5.08±0.11 ^b
Testis	1.17±0.03 ^a	1.16±0.02 ^a	1.24±0.03 ^{ab}	1.26±0.03 ^{ab}	1.21±0.02 ^{ab}	1.28±0.00 ^b
Kidney	0.79±0.12 ^a	0.81±0.02 ^a	0.79±0.02 ^a	0.79±0.04 ^a	0.83±0.02 ^a	0.81±0.01 ^a
Spleen	0.34±0.02 ^a	0.29±0.03 ^b	0.27±0.01 ^b	0.27±0.02 ^b	0.25±0.01 ^b	0.25±0.01 ^b
Heart	0.40±0.02 ^a	0.40±0.01 ^a	0.39±0.01 ^a	0.43±0.01 ^{ab}	0.43±0.01 ^{ab}	0.46±0.02 ^b

Values are mean± S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p<0.05$.

(다) 혈중 ALT, AST, ALP, LDH 및 Choline esterase 활성 변화

간 손상의 임상적 지표로 사용되고 있는 ALT, AST, ALP, LDH 및 Choline esterase 활성 측정을 통하여 간 기능 효능을 검증한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 혈청 ALT와 AST는 간세포 내에 존재하는 효소로 이 효소의 활성은 주로 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내므로 간 손상 지표의 중요한 단서가 된다. 본 실험에서 AST, ALT 활성은 정상군을 제외한 Orotic acid 1% 수준 식이 투여군에서 유의적으로 증가하였으나 5CT 식이 첨가 군에서 OA투여 대조군보다 약간 낮은 양상을 보였다. Kim 등의 연구에서 꾸지뽕나무 열매의 10%, 80% 에탄올 및 증류수 추출물 모두에서 인간 간암 세포주 HepG2에 대한 세포 독성이 나타나지 않았다고 보고되고 있어 꾸지뽕나무 열매 추출물이 간세포 보호효과가 있다고 사료되며 2.5%보다 5% 수준으로 식이 첨가하였을 때 농도 유의적으로 효과가 있다고 보여진다. 간 기능적 임상지표로 사용되고 있는 혈중 ALP, LDH 및 Cholinesterase 활성도 지방간 모델 실험에서 증가됨으로서 간 독성 유발과 깊은 관련성을 가진 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서 Cholinesterase 활성은 Orotic acid 투여 대조군에서 증가 경향을 보였으나, Orotic acid를 1% 수준과 각 시료를 식이에 첨가한 2.5CT, 5CT, 2.5FCT 및 5FCT군에서는 정상군과 비슷한 수준으로 감소하였다. 한편, ALP 및 LDH 활성은 OA투여 대조군보다는 감소한 경향을 보였으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 따라서 꾸지뽕열매 분말을 5% 수준으로 첨가하였을 때 AST, ALT, Cholinesterase 등의 활성을 어느 정도 유의적으로 감소시킴으로서 Orotic acid 유발 간장 질환을 개선할 수 있는 건강식품 소재로 활용한 가능성이 있는 것으로 사료되어진다.

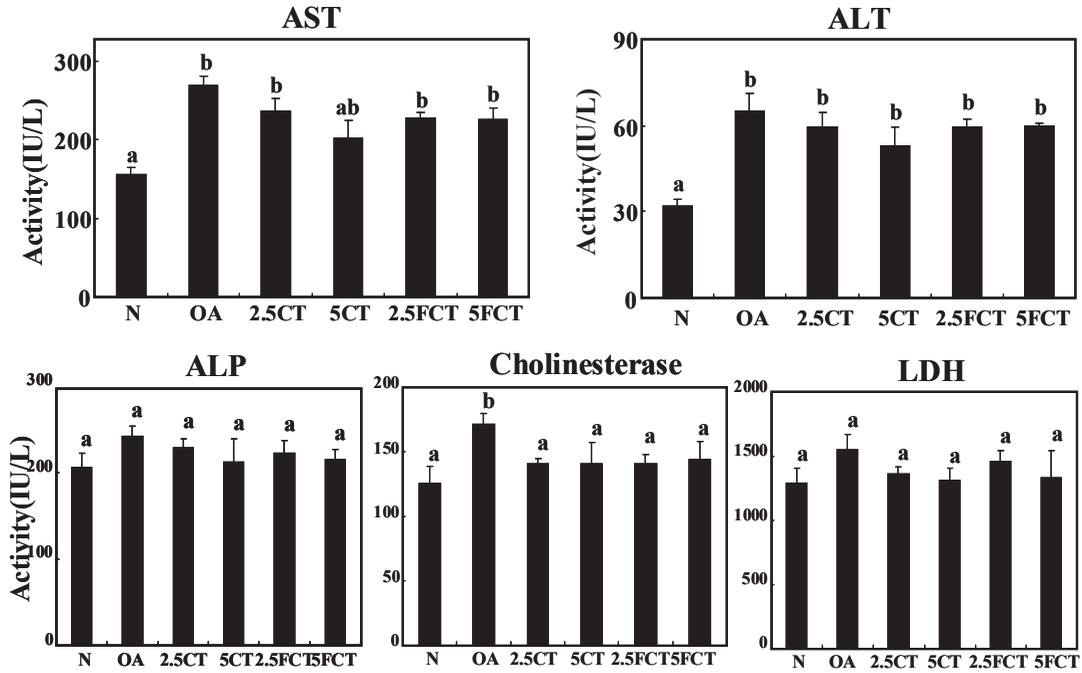


Fig. 1. Effects of 2.5CT, 5CT, 2.5FCT and 5FCT on the serum enzyme activities of ASP, ALT, AST, Cholinesterase and LDH in orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

(라) 혈청 지질농도에 미치는 영향

Orotic acid의 투여는 간 조직에서 microsomal triglyceride transfer protein(MTP) 활성의 저해로 인해 혈중으로 분비되는 지질 운반체 VLDL의 분비 저하를 시켜 혈중 중성지질 농도를 감소시키는 것으로 알려져 있다. 혈청 총 지질농도 및 총 콜레스테롤 농도는 Orotic acid 1% 수준 식이 투여군에서 정상군(N)에 비해 감소한 경향을 보였으며, 혈청 인지질 농도도 Orotic acid 1% 수준 식이 투여군에서 정상군(N)에 비해 감소한 경향을 보인 반면, 5CT군에서 약간의 차이를 보여 꾸지뽕나무 열매분말 5% 농도가 혈중 인지질 농도에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 혈청 유리지방산 농도는 대조군(OA)에서 정상군(N)에 비교하였을 때 감소하는 경향을 보였으나, 2.5CT, 5CT, 2.5FCT, 5FCT군에서는 대조군(OA)과 달리 정상군(N)과 비슷한 수준을 나타내었다(Fig. 2). 이와 같은 결과로 보아 Orotic acid 1% 수준의 식이 첨가는 VLDL의 분비 감소로 인해 혈청 지질농도에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 꾸지뽕나무 열매분말 5%수준의 식이첨가는 Orotic acid 투여로 인해 감소한 혈청 지질농도를 약간 증가시켜 유의적인 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

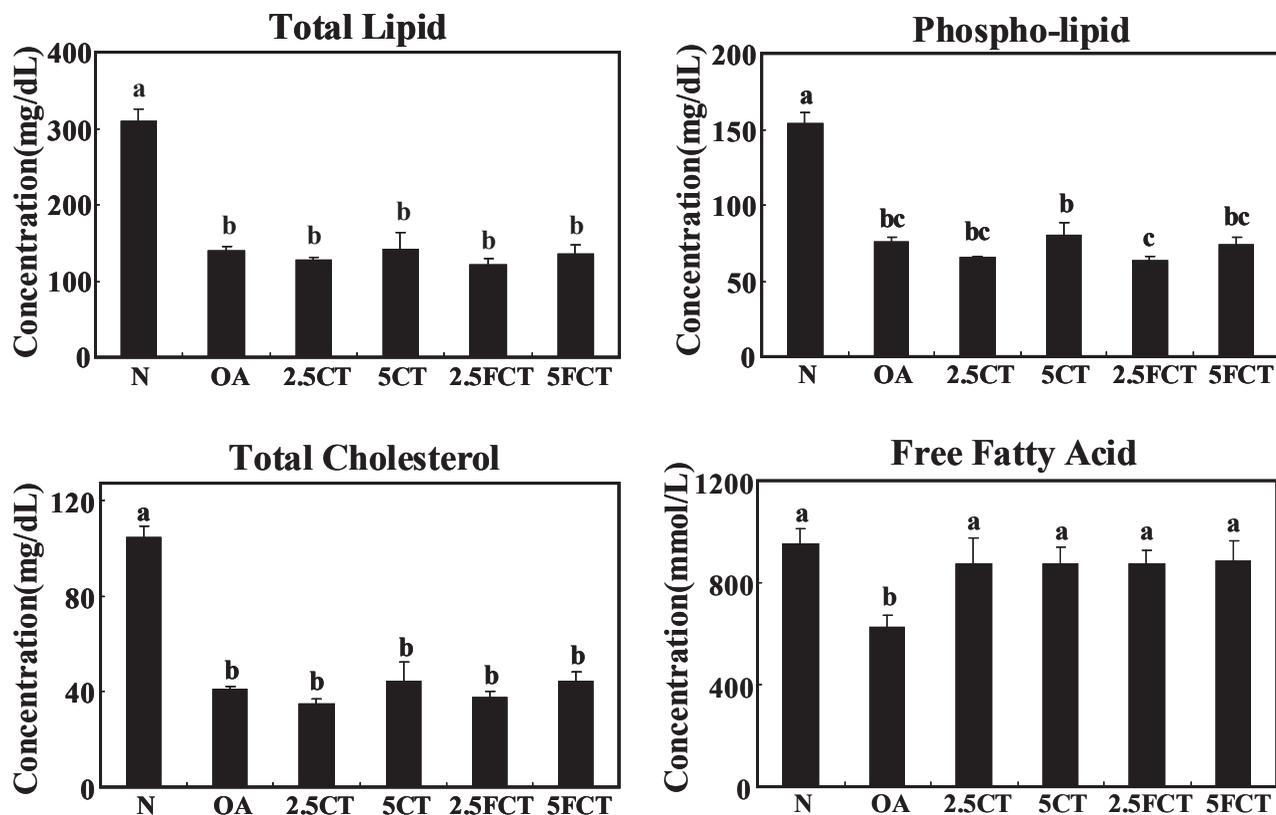


Fig. 2. Effect of 2.5CT, 5CT, 2.5FCT and 5FCT on the serum lipid concentrations in orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., n=6).

(마) 간 조직 및 혈청 중성지질 농도

간 조직 중의 중성지질 농도는 정상군(N)에 비해 대조군(OA)에서 유의적으로 증가하였고 2.5CT, 5CT, 2.5FCT 및 5FCT군에서는 대조군에 비해 간 조직의 중성지질 농도가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 특히 꾸지뽕나무 열매 투여군에서는 농도 유의적으로 간 조직의 중성지질 농도가 낮아져 꾸지뽕 나무 열매의 식이첨가량이 증가하면 지방간 개선 효과도 어느 정도 증가하는 것으로 보였다. 한편, 혈중 중성지질 농도는 정상군(N)에 비해 대조군(OA)에서 유의적으로 감소하였고, 2.5CT, 5CT, 2.5FCT 및 5FCT군에서는 대조군(OA)과 통계상으로 유의적인 차이가 없었다. 2.5CT, 5CT, 2.5FCT 및 5FCT군의 식이에 첨가한 꾸지뽕나무 열매와 발효 꾸지뽕나무 열매는 Orotic acid 투여로 높아진 간 조직의 중성지질 농도를 낮추었으나 혈청 중성지질 농도를 증가시키지 못하였다.

Orotic acid 섭취에 의한 지방간 유발 원인은 MTP 활성 저해에 의한 VLDL 분비저하, 중성지질 합성 경로의 주요 조절 효소인 phosphatidate phosphohydrolase (PAP), 및 diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 효소 활성의 촉진 및 지방산 산화 억제가 주요 기작으로 알려져 있다. 본 실험에서는 대조군(OA)에서 간 조직의 중성지질 농도 증가는 혈중 중성지질 농도의 감소로 나타나 주로 간으로부터의 VLDL 분비저하에 인한 것으로 보여지나, 정상군(N)과 대조군(OA)을 제외한 실험군에서는 간 조직의 중성지질 농도 변화와 혈중 중성지질 농도 변화 사이에 정의 상관관계가 성립되기에는 혈중 중성지질 농도가 대조군과 실험군 간의

통계적인 유의 값 차이가 크지 않아 VLDL 분비 저해만으로는 설명하기 어렵기 때문에 향후 좀 더 구체적인 실험이 진행되어야 할 것이다.

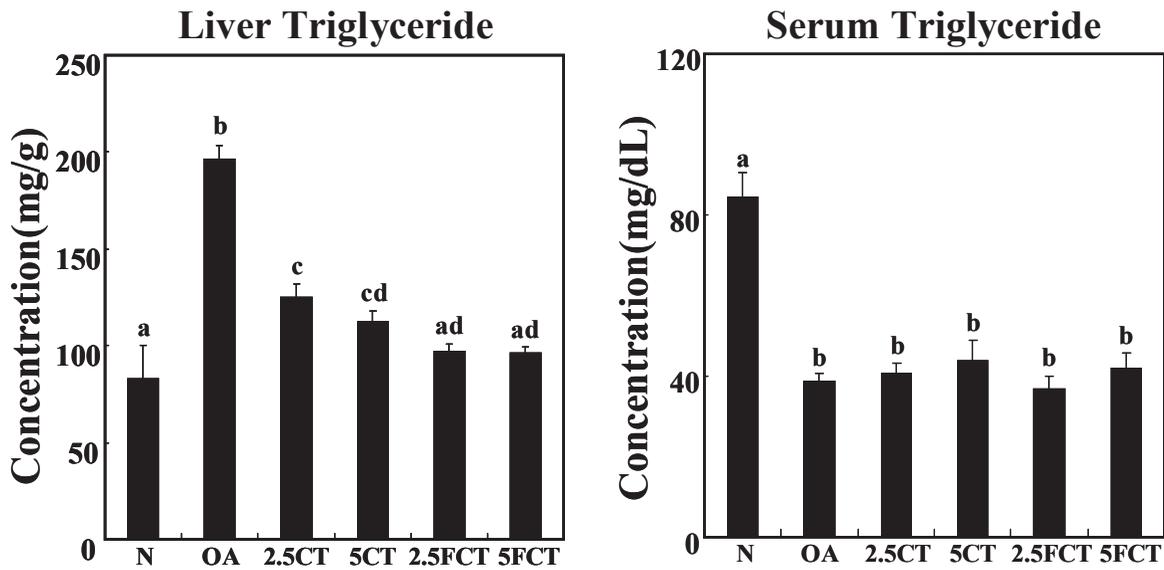


Fig. 3. Effects of 2.5CT, 5CT, 2.5FCT and 5FCT on the concentrations of triglyceride in the liver and serum in orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values are mean \pm S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

(바) 조직 및 혈중 과산화지질 농도 변화

지질과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 등에 의한 간 손상 발생의 가장 중요한 기전으로서 세포내 유리라디칼 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인해 야기되는 산화적 스트레스의 증가에 기인한다고 하였다. 본 실험에서 생체막 지질의 과산화물 생성 정도의 지표로 알려져 있는 TBARS를 측정된 결과, 대조군(OA)에서 정상군(N)에 비해 간, 고환, 신장, 비장, 심장 조직 및 혈청에서 모두 과산화지질 농도가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 시료군에서는 orotic acid 투여로 인해 증가된 과산화지질 농도가 꾸지뽕나무 열매 투여로 인해 정상군(N)과 유의값이 동일하거나 대조군(OA)에 비해 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 특히 5CT군에서 고환, 비장 조직에서 다른 시료군에 비해 과산화지질 농도가 조금 더 낮아진 경향을 보였고 유의적인 차이가 있었다. 5CT군의 고환과 비장 조직을 제외한 다른 조직 및 혈청에서는 과산화 지질 농도가 수치상으로는 낮은 결과를 보였으나 다른 시료군과 비교하여 유의적인 차이는 없었다.

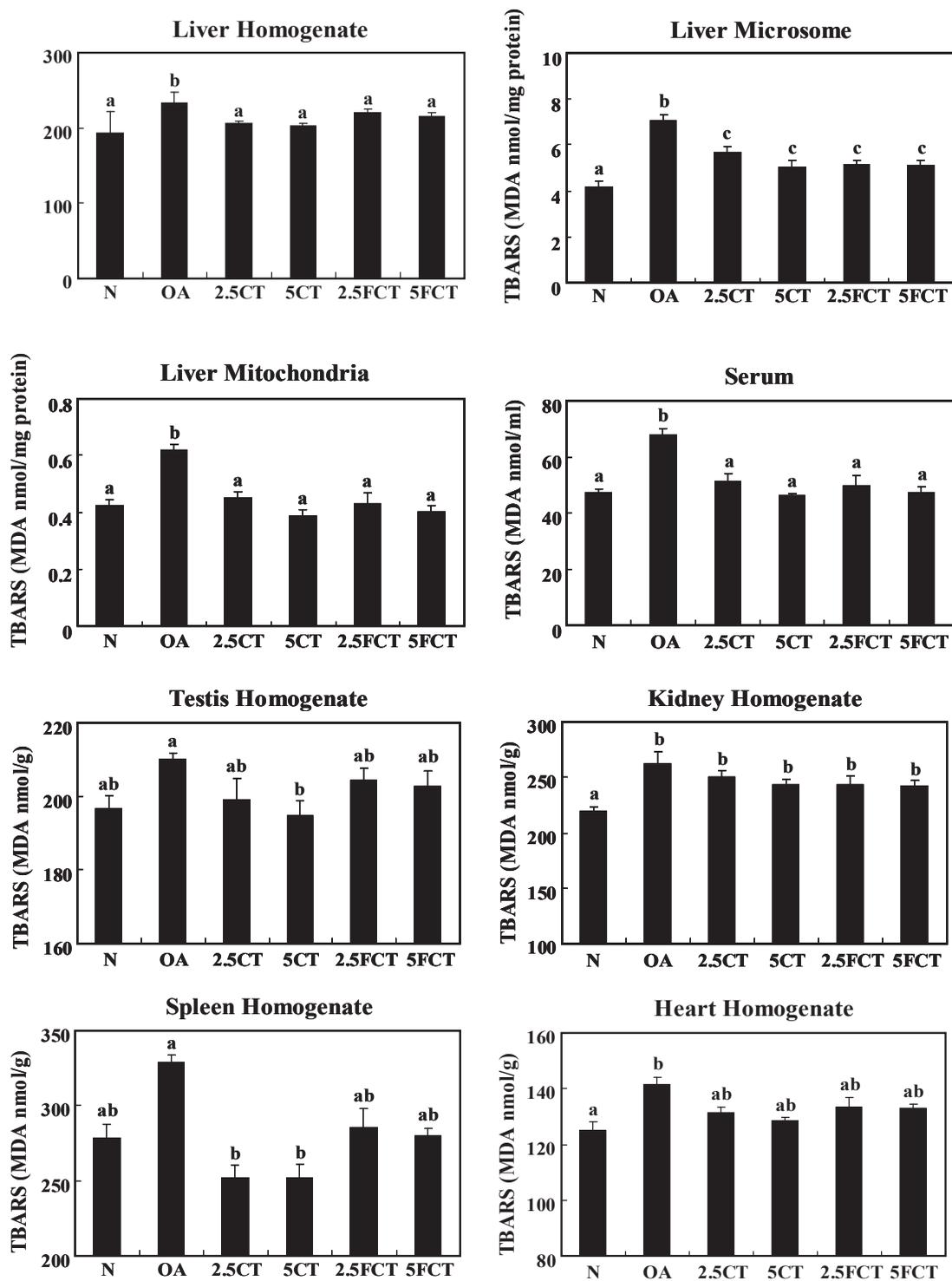


Fig. 4. Effects of 2.5CT, 5CT, 2.5FCT and 5FCT on TBARS in the hepatic fractions, tissue and serum in orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean \pm S.E., $n=6$)

(사) 조직 및 혈중 항산화 관련 물질 농도 변화

필수 미량원소인 철은 지방산화를 촉진시키는 물질로 알려져 있으며, 체내 H₂O₂를 제거하는 catalase의 구성 성분으로 체내의 비타민 C의 함량과 H₂O₂의 농도 차에 의해서 과산화지질 반응에 영향을 미침으로서 생체 내 과산화지질 반응을 조사하는데 있어서 비헴철 함량 측정은 중요한 요인으로 시사되어 있다. 간 조직 중의 비헴철 함량은 정상군(N)에 비해 대조군(OA)에서 유의적으로 감소하였으나 5CT를 제외한 시료군에서 대조군에 비해 증가한 경향을 보였다(Table 4).

Table 4. Effect of 2.5CT, 5CT, 2.5FCT and 5FCT on the nonheme iron and zinc contents in orotic acid-induced fatty liver model rats

Groups	N	OA	2.5CT	5CT	2.5FCT	5FCT
Liver						
Fe	0.57±0.02 ^a	0.50±0.01 ^b	0.56±0.01 ^a	0.47±0.01 ^b	0.57±0.03 ^a	0.58±0.03 ^a
Zn	0.35±0.01 ^a	0.20±0.01 ^b	0.21±0.00 ^b	0.23±0.00 ^c	0.24±0.00 ^c	0.24±0.00 ^c

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. (mean±S.E., n=3).

간장 중의 지질 과산화물 함량은 철분 함량에 의해 영향을 받는다는 결과가 보고된 바 있어, 본 실험에서도 정상군에 비해 대조군에서 간 조직 중의 비헴철 함량이 감소하였고 각각의 꾸지뽕나무 열매와 발효 꾸지뽕나무 열매를 식이 투여함에 의해 비헴철의 함량이 증가하였음을 확인하였다. 그러나 5CT군에서의 비헴철 함량은 대조군(OA)보다 낮은 경향을 나타내 향후 구체적인 실험이 필요할듯하다. 한편, 생체 내 항산화 물질로 잘 알려져 있는 아연의 간 조직 중의 농도는 비헴철 함량과 유사한 경향을 보였으나 비헴철 함량과 달리 5CT군에서 대조군(OA)보다 증가하였고, 꾸지뽕나무 열매의 식이 투여 농도에 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 체내 항산화작용 물질로 잘 알려진 glutathione은 glutathione peroxidase를 위한 기질로서 과산화물을 무독화시켜 OH생성을 억제하는 작용이외에, 세포내 환원제로서 촉매 및 물질대사를 포함한 세포내 수송, disulfide exchange 반응 촉진, 외인성물질의 대사과정 중에 생기는 활성산소종과 친전자성 대사물질들의 무독화 등의 기능이 있다. 본 실험에서 glutathione 농도는 간, 고환, 신장, 심장, 비장 조직 및 혈청에서 대조군(OA)이 정상군(N)에 비해 유의적으로 감소하였다. orotic acid 식이 투여에 의해 감소된 glutathione 농도는 고환과 심장 조직에서는 각 군마다 유의적인 차이는 없었으나 시료군의 간, 신장 및 비장 조직에서 정상군(N) 수준 또는 그 이상으로 증가하였고, 특히 발효 꾸지뽕 나무 열매 투여군(FCT)에서 현저하게 증가하였다 (Fig. 5).

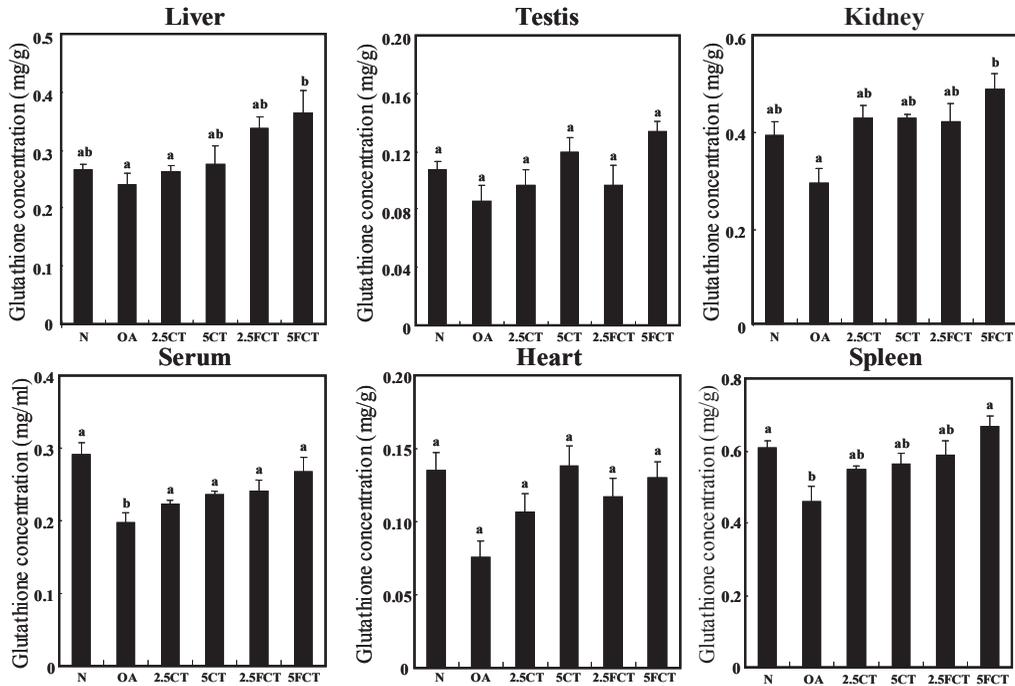
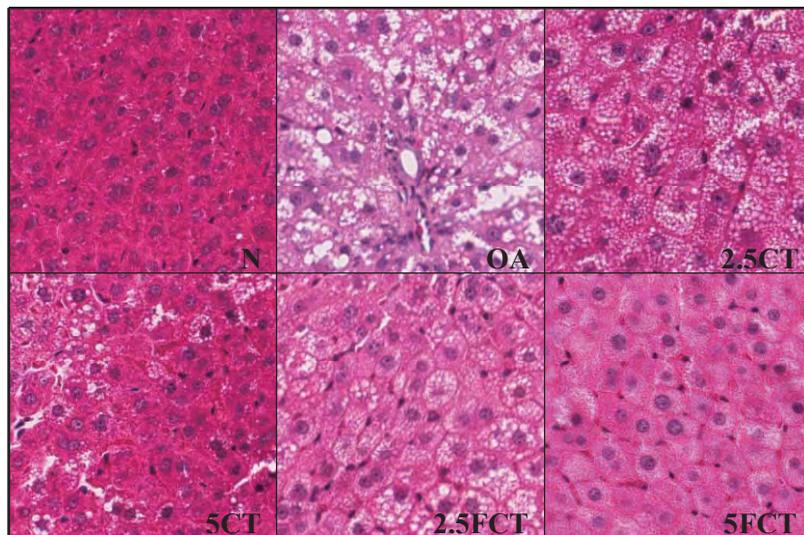


Fig. 5. Effect of 2.5CT, 5CT, 2.5FCT and 5FCT on the glutathione in orotic acid-induced fatty liver model rats.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (mean±S.E., n=6).

(아) 간 조직의 병리조직학적인 관찰

H&E 염색을 통한 간 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과는 Figure. 6과 같다. 정상군(N)은 간소엽의 구조가 잘 유지되었으며, 간세포들은 뚜렷한 둥근핵을 가지고 있으면서 그 간격이 일정하고, 세포 간극이 좁은 잘 짜여진 소엽구조를 하고 있었다. 그러나 대조군(OA)은 소포성 지방 변성이 소엽 중심대에 주로 나타나 있고, 간 조직에 전체적으로 지방세포가 균일하게 배열되어 있어 전형적인 지방간 유발이 관찰 되었다. 5CT군은 간 조직에 지방세포가 조금 배열되어 있긴 하나 그 수가 대조군(OA)에 비해 적고, 간 소엽을 구성하고 있는 간세포들이 전반적으로 균일하게 배열되어 있어 정상군(N)의 간 소견과 비슷한 양상을 보여 지방간의 개선효과가 있는 것으로 보였다.



2. 농산물 소재를 이용한 혈당조절 제품의 개발

(제 2 세 부 : 인제대학교, 김정인)

가. 제2형 당뇨병 동물 모델에 있어서 고코디세핀 함유 동충하초의 혈당조절 효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) 일반성분 분석

시판되는 저코디세핀 동충하초(코디세핀 함량 0.1%, Low Cordycepin *Cordyceps militaris*, LCCM)와 고코디세핀 동충하초(코디세핀 함량 0.7%, High Cordycepin *C. militaris* JLM0636, HCCM)를 동결건조하여 일반성분 분석을 AOAC법으로 실시하였다. 고코디세핀 동충하초는 동아대에서 제공받았다. 동결건조한 저코디세핀 동충하초의 수분은 7.4%, 단백질은 25.9%, 지방은 1.9%, 회분은 2.8% 그리고 총 식이섬유는 10.0%이었다. 동결건조한 고코디세핀 동충하초의 수분은 4.3%, 단백질은 76.5%, 지방은 1.7%, 회분은 5.7% 그리고 총 식이섬유는 11.1%이었다.

Table 1. Proximate composition of freeze-dried LCCM and HCCM

	LCCM	HCCM
Moisture	7.4	4.3
Crude protein	25.9	76.5
Crude lipid	1.9	1.7
Crude ash	2.8	5.7
Total dietary fiber	10.0	11.1

(나) 실험동물 및 실험디자인

생후 4주령의 수컷 C57BL/Ks-db/db mouse를 구입하여 1주일간 적응기간이 끝난 후 난괴법에 따라 동물을 세 군으로 나누었다. 대조군에게는 AIN-93G 식이를, 고코디세핀 동충하초(HCCM)군에게는 동결건조한 HCCM powder를 식이의 3% 수준으로, 저코디세핀 동충하초군(LCCM)군에게는 동결건조한 LCCM powder를 식이의 3% 수준으로 6주간 *ad libitum*으로 공급하였다. 실험기간 동안 체중과 식이섭취량은 주 2회 측정하였다. 식이 섭취 시작일로부터 6주가 지난 후, 동물을 12시간 절식시키고, 동물을 심장채혈법으로 희생시켰다. 肝組織은 적출하여 무게를 측정하였고, 0.9% 생리식염수에 헹구어 물기를 제거한 다음 분석시까지 -70℃에서 보관하였다. 혈액은 3,000×g에서 15분간 원심 분리한 후 血漿을 수집하여 -70℃에서 보관하였다.

Table 2. Composition of basal and experimental diets

Ingredient	Basal diet (%)	LCCM diet (%)	HCCM diet (%)
Corn starch	39.75	37.89	39.43
Dextrinized cornstarch	13.20	13.20	13.20
Casein	20.00	19.22	17.71
Soybean oil	7.00	6.94	6.95
Alpha-cellulose	5.00	4.70	4.67
Sucrose	10.00	10.00	10.00
AIN-93G mineral mixture	3.50	3.50	3.50
AIN-93G vitamin mixture	1.00	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
Tert-butyl hydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
LCCM ¹	-	3.00	-
HCCM ²	-	-	3.00

¹Low Cordycepin *Cordyceps militaris*

²High Cordycepin *C. militaris* JLM0636

(다) 혈당, 혈장 지질 profile 및 신장기능 지표 측정

혈당은 효소법으로 측정하였고, 자혈장 인슐린 농도는 ELISA법으로 측정하였다. 혈액 당화헤모글로빈 농도는 칼럼 크로마토그래피법으로 측정하였다. 혈장 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도는 효소법으로 측정하였다. 신장기능 지표를 측정하기 위하여 혈장 BUN, creatinine, albumin 농도는 효소법을 사용하였다.

(라) 간조직의 지질함량 및 혈장 간기능 지표 조사

간조직의 지질은 Folch법으로 추출하여 중성지방 함량을 효소법으로 측정하였다. 혈장 ALT 및 AST 효소활성을 측정하였다.

(마) 간조직의 지질과산화물 농도 및 항산화 효소 측정

간조직의 지질과산화물 측정은 Ohkawa 등의 방법을 이용하여, thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였고 표준용액으로 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 사용하였다. 간조직의 SOD 활성은 Marklund의 방법을 이용하여 측정하였고, 1분 동안 pyrogallol의 자동산화를 50%까지 억제하는데 요구되는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

(바) 통계처리

실험 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 각 군의 평균치의 유의성 검정은 ANOVA로 실시하였고, Tukey's test를 follow-up test로 사용하였다(p<0.05).

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 체중 및 식이섭취량

대조군, LCCM군, HCCM군의 체중은 각각 40.2 ± 2.1 , 40.6 ± 2.6 , 39.2 ± 3.4 g으로 세 군간 유의적인 차이가 없었다. 대조군, LCCM군, HCCM군의 식이섭취량은 각각 4.3 ± 0.4 , 4.2 ± 0.3 , 4.0 ± 0.4 g/day로 세 군간 유의적인 차이가 없었다.

Table 3. Body weight and food intake of db/db mice

Group	Body weight (g)	Food intake (g/day)
Control	40.2 ± 2.1	4.3 ± 0.4
LCCM	40.6 ± 2.6	4.2 ± 0.3
HCCM	39.2 ± 3.4	4.0 ± 0.4

(나) 혈당 조절효과

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈액 당화헤모글로빈 농도는 각각 9.3 ± 1.3 , 7.9 ± 0.7 , $5.8 \pm 0.4\%$ 로 나타났다. LCCM군 및 HCCM군의 당화헤모글로빈 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), HCCM군의 경우 LCCM군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

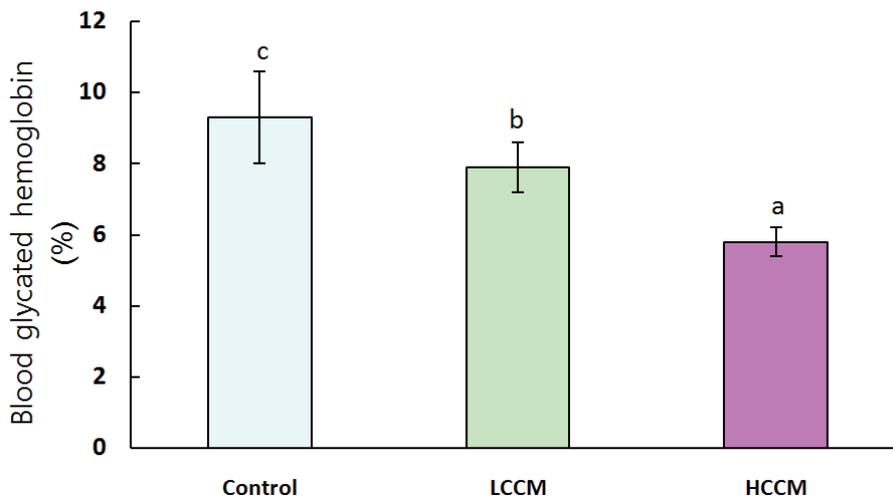


Fig. 1. Blood glycyated hemoglobin levels of db/db mice.

LCCM군 및 HCCM군의 혈당은 각각 361.7 ± 55.8 , 136.0 ± 32.4 mg/dL로 대조군(507.7 ± 71.7 mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). HCCM군의 혈당은 LCCM군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

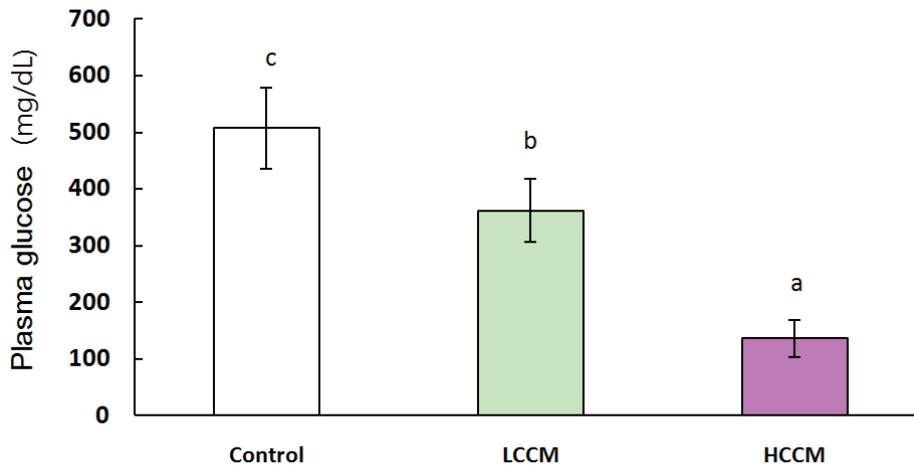


Fig. 2. Plasma glucose levels of db/db mice.

LCCM군 및 HCCM군의 혈장 인슐린 농도는 각각 8.0 ± 1.2 , 10.5 ± 1.0 ng/mL로 대조군(6.4 ± 0.9 ng/mL)에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). HCCM군의 혈장 인슐린 농도는 LCCM군에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$).

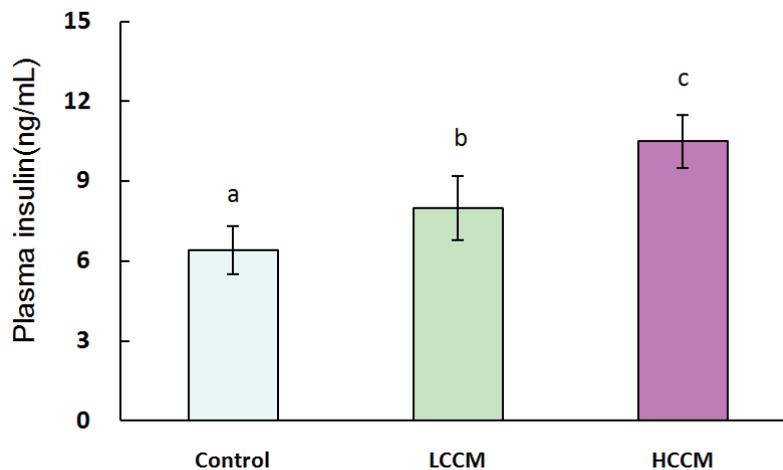


Fig. 1-3. Plasma insulin levels of db/db mice.

(다) 지질대사 개선효과

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈장 콜레스테롤 농도는 각각 183.3 ± 25.5 , 159.0 ± 20.5 , 146.1 ± 18.4 mg/dL로 나타났다. HCCM군의 혈장 콜레스테롤 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), LCCM군과는 유의적인 차이가 없었다. 대조군과 LCCM군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

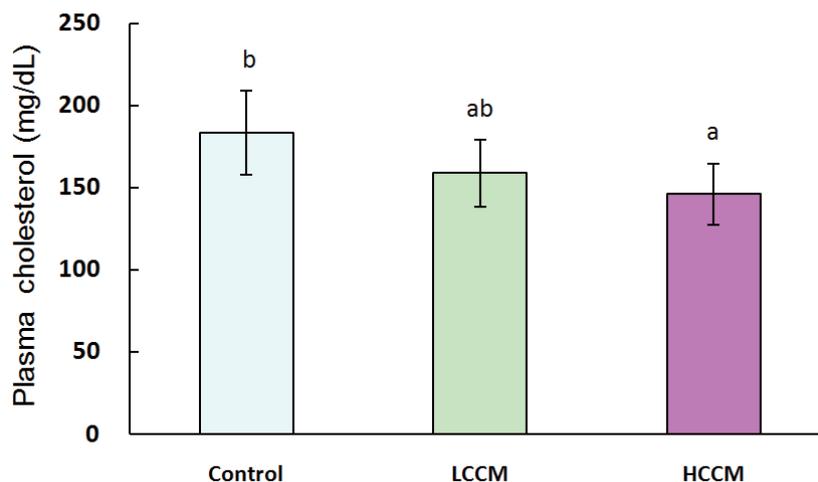


Fig. 4. Plasma cholesterol levels of db/db mice.

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈장 중성지방 농도는 각각 173.5 ± 22.3 , 154.4 ± 14.4 , 143.7 ± 15.3 mg/dL로 나타났다. HCCM군의 혈장 중성지방 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), LCCM군과는 유의적인 차이가 없었다. 대조군과 LCCM군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

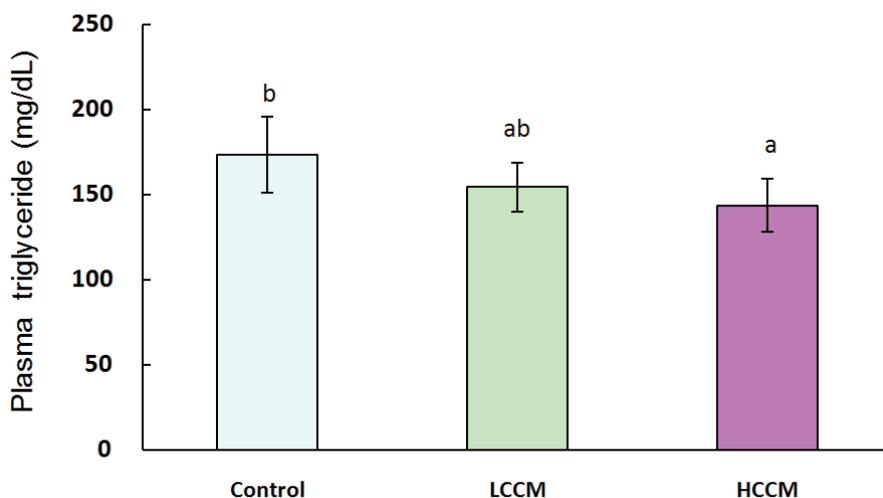


Fig. 5. Plasma triglyceride levels of db/db mice.

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈장 HDL-콜레스테롤 농도는 각각 58.5 ± 8.3 , 61.2 ± 9.4 , 67.0 ± 8.6 mg/dL로 나타나 세 군간 유의적인 차이가 없었다.

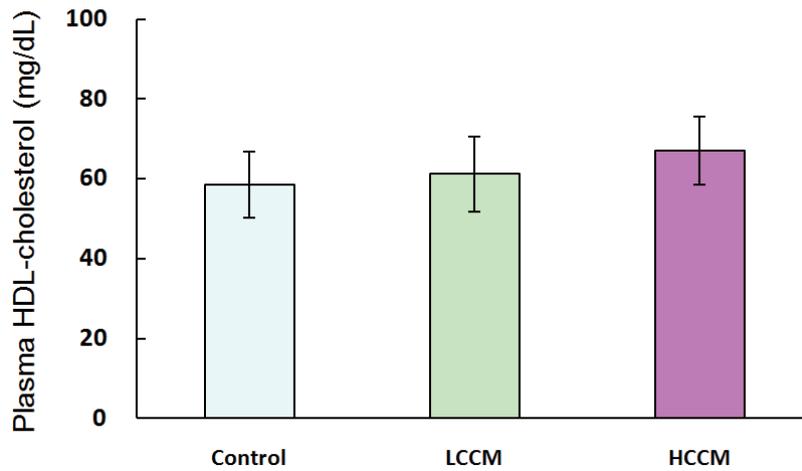


Fig. 6. Plasma HDL-cholesterol levels of db/db mice.

(라) 혈장 BUN, creatinine, albumin 농도

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈장 BUN 농도는 각각 22.7 ± 3.7 , 23.4 ± 3.5 , 25.7 ± 3.7 mg/dL로 나타나 세 군간 유의적인 차이가 없었다.

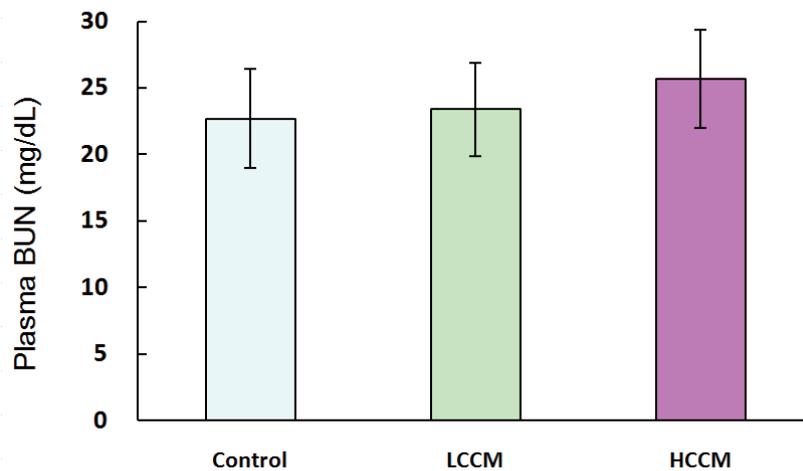


Fig. 7. Plasma BUN levels of db/db mice.

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈장 creatinine 농도는 각각 0.55 ± 0.07 , 0.51 ± 0.09 , 0.52 ± 0.09 mg/dL로 나타나 세 군간 유의적인 차이가 없었다.

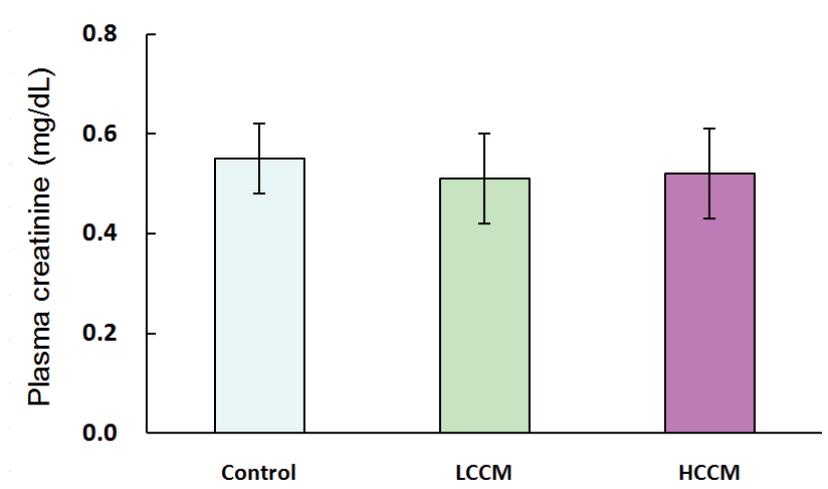


Fig. 8. Plasma creatinine levels of db/db mice.

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈장 albumin 농도는 각각 2.5 ± 0.4 , 2.6 ± 0.3 , 2.7 ± 0.4 mg/dL로 나타나 세 군간 유의적인 차이가 없었다.

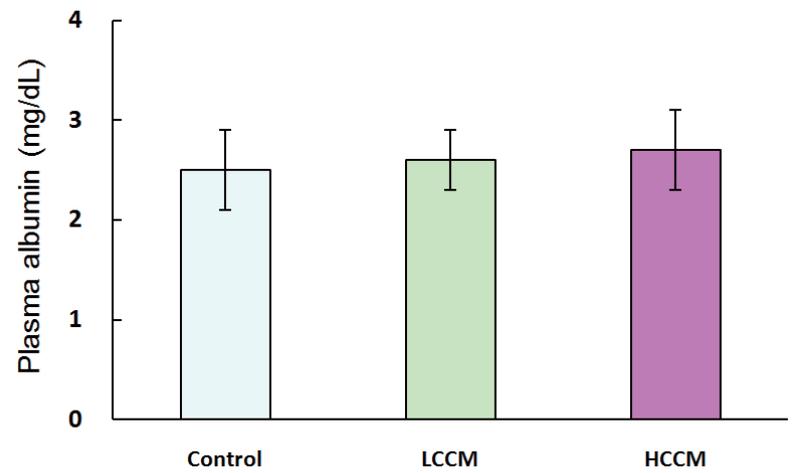


Fig. 9. Plasma albumin levels of db/db mice.

(마) 혈장 ALT 및 AST 활성

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈장 ALT 활성은 각각 120.0 ± 17.1 , 108.5 ± 15.0 , 90.3 ± 15.3 U/L로 나타났다. HCCM군의 혈장 ALT 활성은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고 ($p < 0.05$), LCCM군과는 유의적인 차이가 없었다. 대조군과 LCCM군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

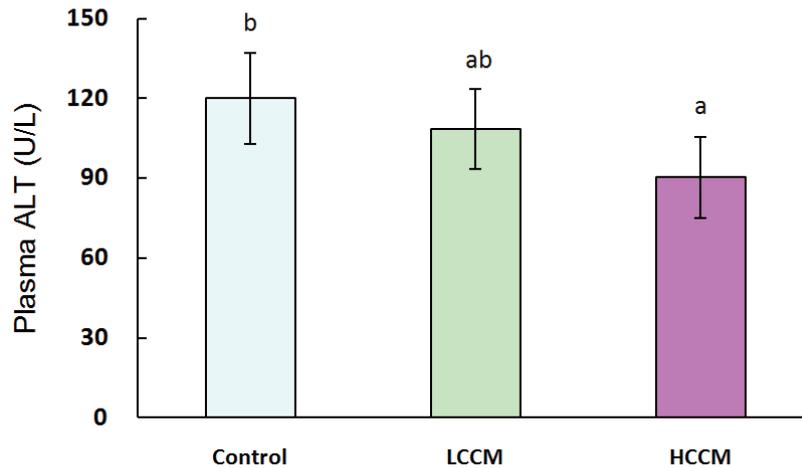


Fig. 10. Plasma ALT activities of db/db mice.

대조군, LCCM군, HCCM군의 혈장 AST 활성은 각각 237.0 ± 31.3 , 211.2 ± 26.8 , 184.3 ± 24.1 U/L로 나타났다. HCCM군의 혈장 AST 활성은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고 ($p < 0.05$), LCCM군과는 유의적인 차이가 없었다. 대조군과 LCCM군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

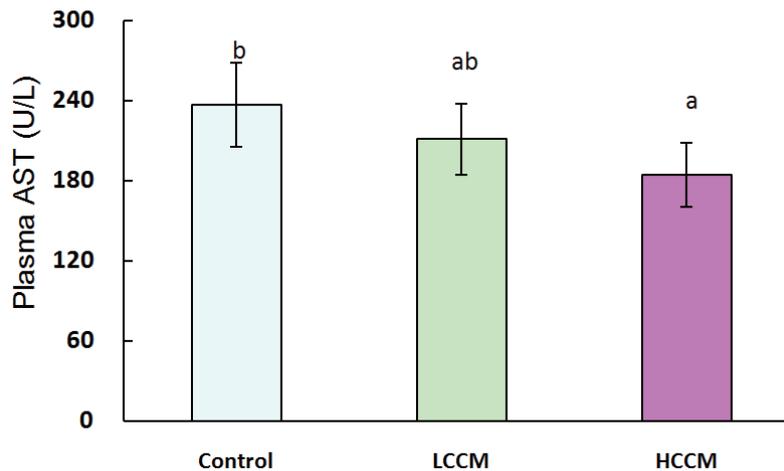


Fig. 11. Plasma AST activities of db/db mice.

(바) 간조직 중성지방 함량

대조군, LCCM군, HCCM군의 간조직의 중성지방 함량은 각각 227.3 ± 33.4 , 230.3 ± 24.6 , 218.3 ± 24.8 mg/g liver로 나타나 세 군간 유의적인 차이가 없었다.

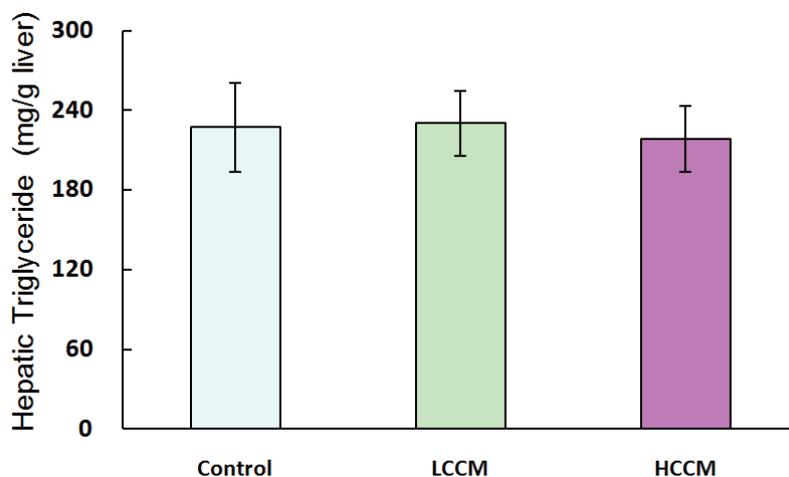


Fig. 12. Hepatic triglyceride levels of db/db mice.

(사) 간조직의 지질과산화물 함량 및 SOD 활성

대조군, LCCM군, HCCM군의 간조직 TBARS 함량은 각각 2.18 ± 0.32 , 1.68 ± 0.26 , 1.53 ± 0.24 nmol MDA/mg protein로 나타났다. LCCM군 및 HCCM군의 간조직 TBARS 함량은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), LCCM군 및 HCCM군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

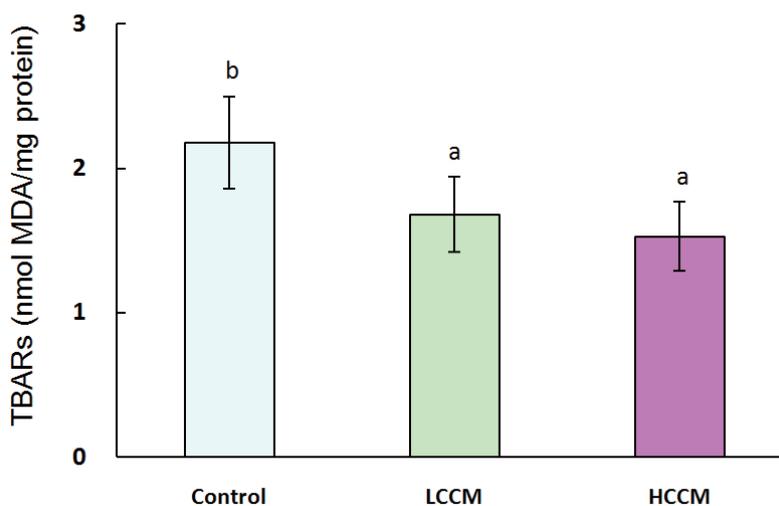


Fig. 1-13. Hepatic TBARS levels of db/db mice.

LCCM군, HCCM군의 간조직 SOD 활성은 각각 37.4 ± 4.9 , 40.1 ± 5.9 U/mg protein으로 대조군(29.5 ± 5.0 U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). LCCM군 및 HCCM군 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

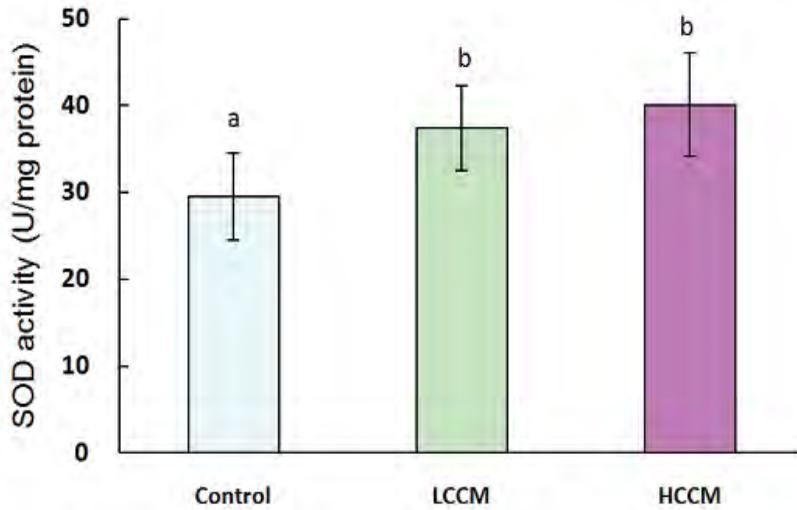


Fig. 14. Hepatic SOD activities of db/db mice.

나. 비만형당뇨 및 비알콜성 지방간 동물모델에 있어서 고코디세핀 동충하초의 비만 및 비알콜성 지방간 개선효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) 실험동물 및 실험디자인

육종된 cordycepin 고함유 동충하초(JLM0636, 코디세핀 함량 0.7%)을 실험재료로 사용하였다. 생후 4주령의 수컷 C57BL/6J-ob/ob mouse를 구입하여 1주일간 적응기간 후, 난피법에 따라 동물을 3군으로 나누었다. 대조군에게는 AIN-93G 식이를, LCM(Low *Cordyceps militaris*)군 및 HCM(High *C. militaris*)군에게는 고코디세핀 동충하초(코디세핀 함량 0.7%, *C. militaris* JLM0636)를 식이의 1% 및 3% 수준으로 10주간 *ad libitum*으로 제공하였다. 실험기간 동안 체중과 식이섭취량은 주 2회 측정하였다. 식이 섭취 시작일로부터 10주가 지난 후, 동물을 12시간 절식시키고, 동물을 심장채혈법으로 희생시켰다. 간조직, 부고환 백색지방 무게, 갈색지방 무게를 적출하여 무게를 측정하였고, 간조직은 0.9% 생리식염수에 헹구어 물기를 제거한 다음 분석시까지 -70°C 에서 보관하였다. 혈액은 $3,000 \times g$ 에서 15분간 원심 분리한 후 혈청을 수집하여 -70°C 에서 보관하였다.

Table 1. Composition of basal and experimental diets

Ingredient	Basal diet (%)	LCM diet (%)	HCM diet (%)
Corn starch	39.75	39.64	39.43
Casein	20.00	19.24	17.71
Dextrinized cornstarch	13.20	13.20	13.20
Sucrose	10.00	10.00	10.00
Alpha-cellulose	5.00	4.89	4.67
AIN-93G mineral mixture	3.50	3.50	3.50
AIN-93G vitamin mixture	1.00	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
<i>Tert</i> -butyl hydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Soybean oil	7.00	6.98	6.95
LCM ¹	-	1.00	-
HCM ²	-	-	3.00

¹Low *C. militaris* JLM0636

²High *C. militaris* JLM0636

(나) α -glucosidase 저해 활성 측정

Cordycepin의 α -glucosidase의 저해활성은 watanabe 등의 방법에 따라 측정하였다. Yeast α -glucosidase와 시료를 넣은 후 기질인 para-nitrophenyl- α -D-glucoopyranoside를 혼합하여 측정한 후 흡광도 변화로부터 효소저해활성을 측정하였다.

(다) 비만, 고혈당개선효과 조사

비만 개선 효과를 조사하기 위해 부고환지방 및 갈색지방 무게를 측정하였다. 혈당은 효소법으로 측정하였고, 혈청 인슐린 농도는 ELISA 법으로 측정하였다. 혈액 당화헤모글로빈 농도는 칼럼 크로마토그래피법으로 측정하였으며, 혈청 인슐린 농도로부터 인슐린 내성(HOMA-IR)을 구하였다. Adiponectin 농도는 ELISA법으로 측정하였다.

(라) 혈청 지질 profile 및 간조직의 지질함량 분석, 혈청 간기능 지표 측정

혈장 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도는 효소법으로 측정하였으며, 동맥경화지수는 [(총 콜레스테롤 - HDL-콜레스테롤)/HDL-콜레스테롤]로 계산하였다. 간조직의 지질을 Folch법으로 추출하여 총 지방 축적량을 측정하고, 간조직의 중성지방, 콜레스테롤 함량을 효소법으로 측정하였다. 간조직을 고정하고 염색한 후, 광학현미경으로 지방병변 개선도를 조사하였다. 혈청 ALT 및 AST 농도를 assay kit로 측정하였다.

(마) 신장기능 지표 및 혈청 항염증 지표 측정

혈청 BUN 농도는 효소법으로 측정하였고, 혈청 cytokine 조사를 위해 TNF- α 농도를 ELISA법으로 측정하였다.

(바) 간조직의 지질과산화물 농도 및 항산화 효소 측정

간조직의 지질과산화물 측정은 Ohkawa 등의 방법을 이용하여, thiobarbituric

acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였고, SOD활성은 Marklund 등의 방법으로, catalase 활성은 Aebi법으로 측정하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) Cordycepin의 α -glucosidase 저해활성 측정

Cordycepin의 α -glucosidase 저해활성은 0.5 mg/mL의 농도에서 27.8%로 나타났으며, 표준품인 acarbose의 저해활성은 40.2%로 나타나, cordycepin의 저해활성이 표준품 대비 69.2%로 나타났다.

Table 2. α -glucosidase inhibitory activity of cordycepin

	Inhibition (%)
Cordycepin	27.8±1.4
Acarbose	40.2±2.1

(나) 체중 및 식이섭취량

대조군, LCM군(1% 고 cordycepin 동충하초군), HCM군(3% 고 cordycepin 동충하초군)의 체중과 식이섭취량은 유의적인 차이가 없었다.

Table 3. Body weight and food intake of ob/ob mice.

Group	Body weight (g)	Food intake (g/day)
Control	46.2±3.0	4.7±0.4
LCM	45.2±2.7	4.4±0.3
HCM	44.8±3.8	4.5±0.4

(다) 부고환지방 및 갈색지방 무게

부고환 백색지방 무게는 대조군, LCM군, HCM군이 각각 58.1±6.1, 55.2±5.5, 53.6±5.5 mg/100 g BW으로 나타났고 대조군, LCM군, HCM군의 갈색지방(BAT) 무게는 각각 11.8±1.8, 13.6±2.3, 14.3±2.0 mg/100 g BW로 나타났다. 부고환지방 및 갈색지방의 무게는 세 군간에 유의적인 차이가 없었다. 따라서 고코디세핀 동충하초의 섭취는 ob/ob mice의 체중과 체지방에는 유의적인 영향을 주지 않았다.

Table 4. Weight of epididymal fat pad and brown fat weights

Group	Epididymal fat pad weight (mg/100 g BW)	Brown adipose tissue weight (mg/100 g BW)
Control	58.1±6.1 ^{ns}	11.8±1.8
LCM	55.2±5.5	13.6±2.3
HCM	53.6±5.5	14.3±2.0

(라) 혈당 조절효과

HCM군의 혈당(168.0±25.5 mg/dL)은 대조군(218.6±31.3 mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였으며(p<0.05), LCM군의 혈당(189.0±28.7 mg/dL)은 대조군 및 HCM군과 유의적인 차이가 없었다.

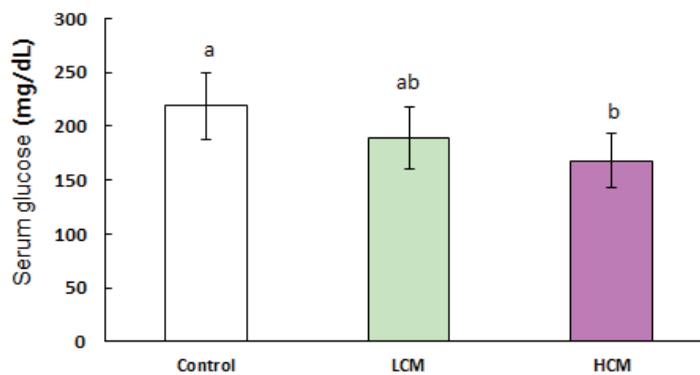


Fig. 1. Serum glucose levels of ob/ob mice.

대조군, LCM군, HCM군의 혈액 당화헤모글로빈 농도는 각각 6.9±0.5, 6.7±0.5, 6.0±0.5%로 나타났다(p<0.05). HCM군의 당화헤모글로빈 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고(p<0.05), LCM군의 경우 대조군 및 HCM군과 유의적인 차이가 없었다.

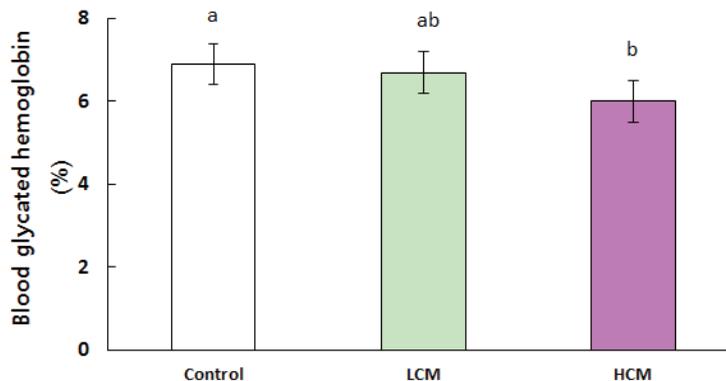


Fig. 2. Blood glycated hemoglobin levels of ob/ob mice.

대조군, LCM군 및 HCM군의 혈청 인슐린 농도는 세 군간에 유의적인 차이가 없었다. HCM군의 HOMA-IR(62.3 ± 8.3)은 대조군(88.7 ± 12.7)에 비해 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), LCM군의 HOMA-IR(74.7 ± 15.4)은 대조군 및 HCM군과 유의적인 차이가 없었다. 따라서 고코디세핀 동충하초를 3% 섭취한 경우, 인슐린저항성이 개선되고, 고혈당이 개선되었다. α -glucosidase 저해제인 acarbose를 장기간 섭취하면 인슐린저항성이 개선된다고 보고되었다. 따라서 α -glucosidase 저해활성을 나타낸 코디세핀이 인슐린저항성을 개선하는데 부분적으로 기여한 것으로 사료된다.

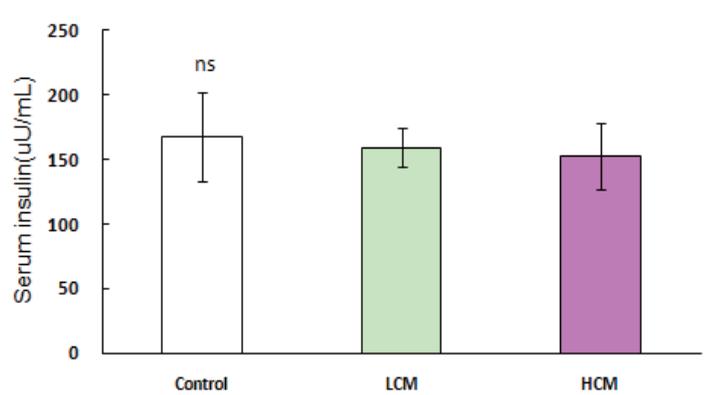


Fig. 3. Serum insulin levels of ob/ob mice.

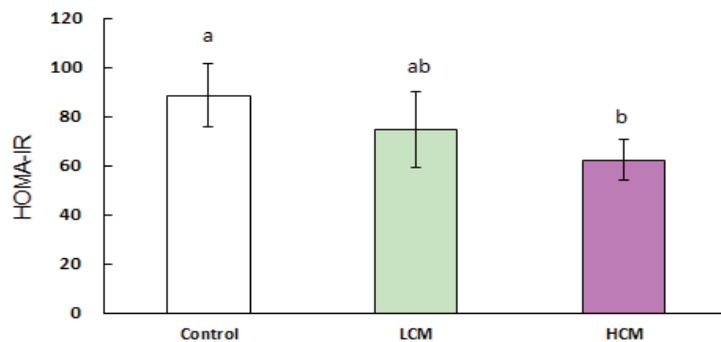


Fig. 4. HOMA-IR values of ob/ob mice.

(마) 지질대사 개선효과

대조군, LCM군, HCM군의 혈청 중성지방 농도는 각각 121.8 ± 20.0 , 107.6 ± 17.3 , 93.7 ± 14.1 mg/dL로 나타나, HCM군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

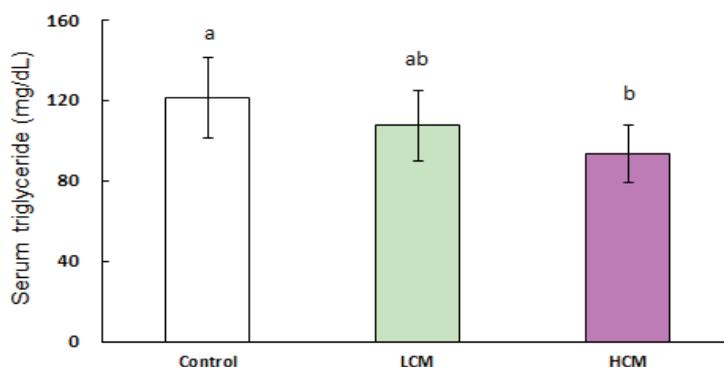


Fig. 5. Serum triglyceride levels of ob/ob mice.

대조군, LCM군, HCM군의 혈청 콜레스테롤 농도는 각각 192.5 ± 23.3 , 173.3 ± 25.8 , 153.6 ± 17.3 mg/dL으로 나타났다. HCM군의 혈청 콜레스테롤 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

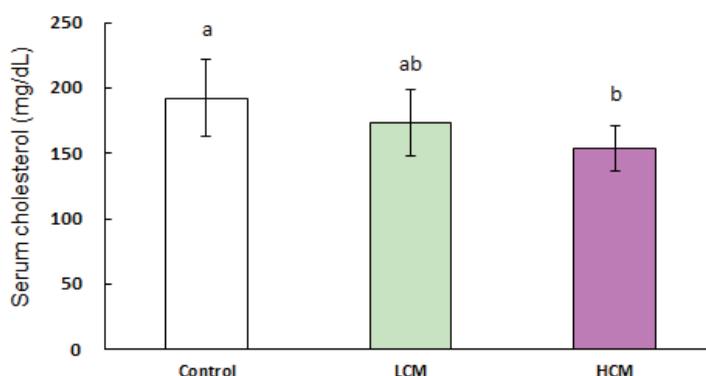


Fig. 6. Serum cholesterol levels of ob/ob mice.

대조군, LCM군 및 HCM군의 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 유의적인 차이가 없었다.

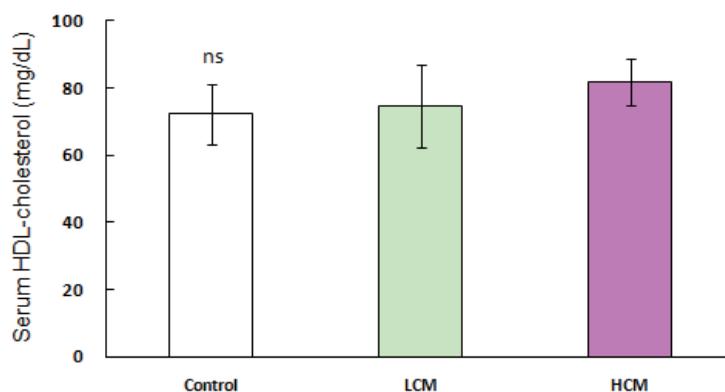


Fig. 7. Serum HDL-cholesterol levels of ob/ob mice.

HCM군의 동맥경화지수는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), LCM군의 경우 대조군 및 HCM군과 유의적인 차이가 없었다. 따라서 고코디세핀 동충하초를 3% 섭취한 경우 이상지질혈증 개선효과를 나타내었다.

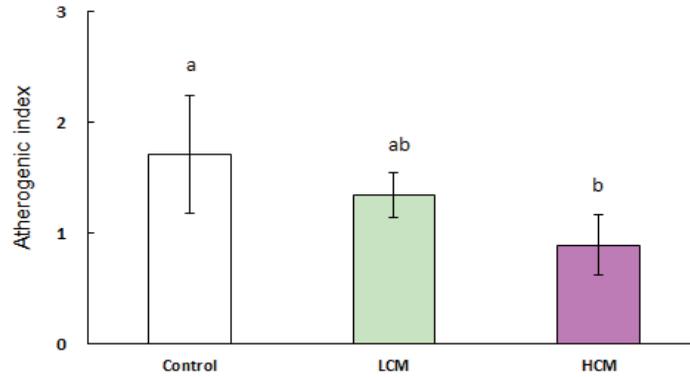


Fig. 8. Atherogenic index of ob/ob mice.

(바) 신기능 개선효과

대조군, LCM군, HCM군의 혈청 BUN은 유의적인 차이가 없었다. 따라서 고코디세핀 동충하초는 ob/ob 마우스의 신기능에 유의적인 영향을 주지 않았다.

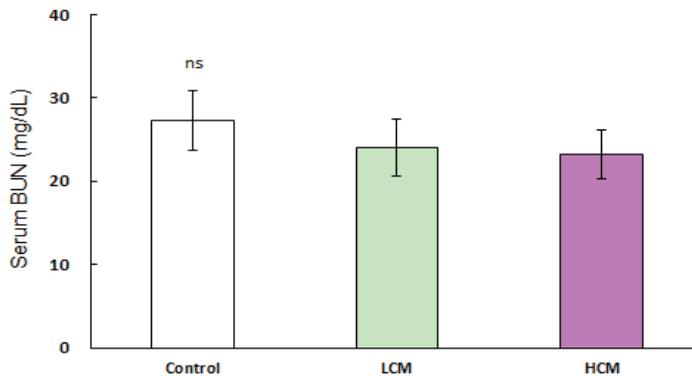


Fig. 9. Serum BUN levels of ob/ob mice.

(사) 간조직의 지질함량 및 간조직 병변 변화

대조군, LCM군 및 HCM군의 간조직 총 지질함량은 각각 226 ± 34 , 190 ± 28 , 174 ± 26 mg/g liver로 나타나 HCM군의 간조직 총 지질함량이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$).

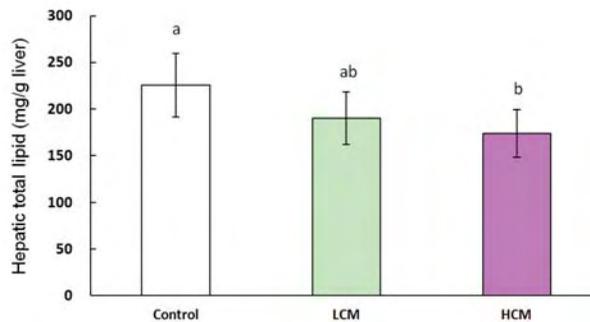


Fig. 10. Hepatic total lipid levels of ob/ob mice.

대조군, LCM군 및 HCM군의 간조직 중성지방 함량은 60.6 ± 9.2 , 53.0 ± 7.5 , 49.3 ± 7.3 mg/g liver로 나타나, HCM군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

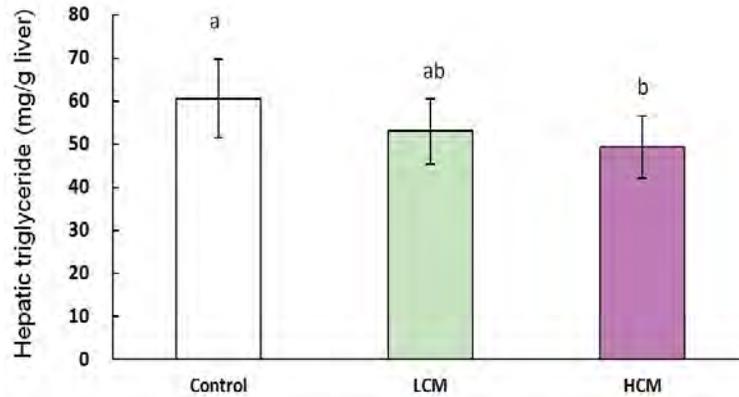


Fig. 11. Hepatic triglyceride levels of ob/ob mice.

대조군, LCM군 및 HCM군의 간조직 콜레스테롤 함량은 4.8 ± 0.4 , 4.7 ± 0.5 , 4.2 ± 0.3 mg/g liver로 나타나, HCM군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 따라서 고코디세핀 동충하초는 인슐린저항성을 개선하고 고지혈증을 개선하여 제2형 당뇨병을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재로 활용할 가능성이 큰 것으로 사료된다.

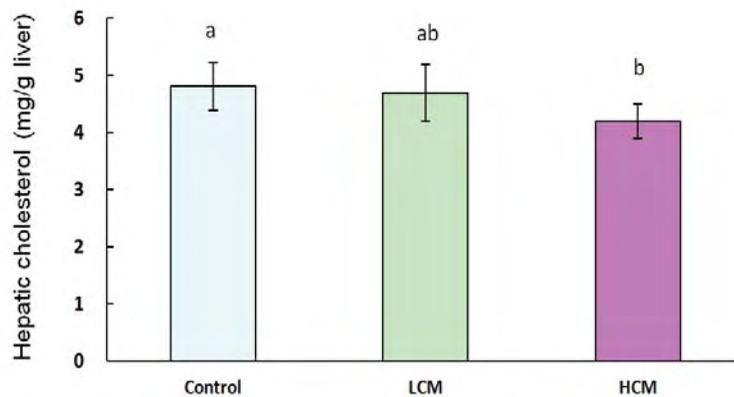


Fig. 12. Hepatic cholesterol levels of ob/ob mice.

농도별 동충하초의 섭취가 간조직의 지방변성에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Fig. 13에 나타내었다. 대조군은 간조직의 지방변이(fatty change)가 심하게 나타난 것으로 관찰되었고, HCM군의 경우 지방변이가 다소 완화된 것으로 나타났다. 따라서 고코디세핀 동충하초를 3% 섭취한 경우, 간의 총지방, 중성지방, 콜레스테롤 축적을 억제하여 비알콜성 지방간 개선효과를 나타내었다.

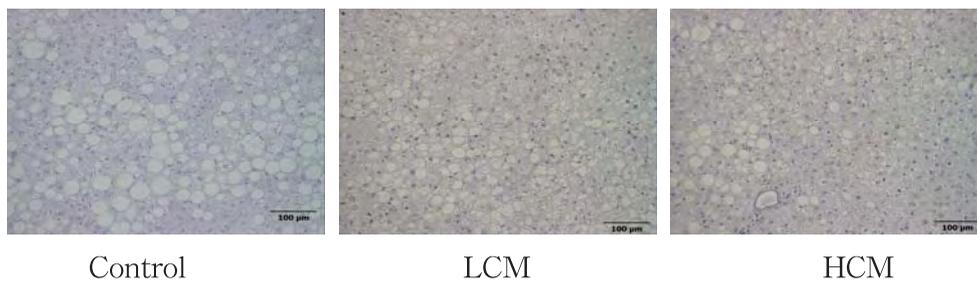


Fig. 13. Hepatic histology of ob/ob mice.

(아) 혈액 간기능 지표

대조군, LCM군, HCM군의 혈청 ALT 활성을 측정한 결과는 Fig. 14에 나타내었다. LCM군의 혈청 ALT 활성(172.0 ± 27.0 U/L)은 대조군(212.0 ± 37.0 U/L)에 비해 유의적으로 감소하였고, HCM군의 혈청 ALT 활성(132.0 ± 18.1 U/L)은 LCM군에 비해 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$).

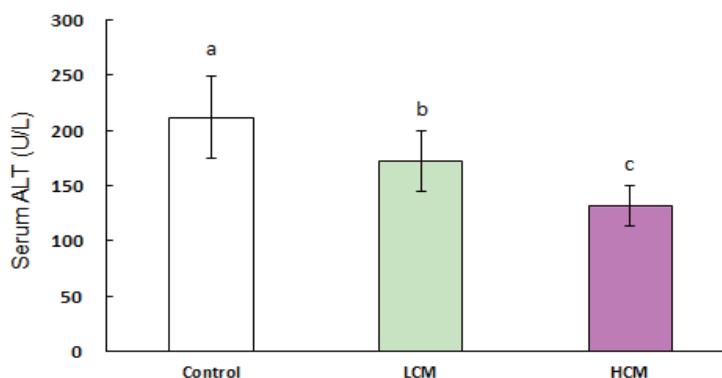


Fig. 14. Serum ALT activities of ob/ob mice.

대조군, LCM군, HCM군의 혈청 AST 활성은 각각 277.0 ± 46.0 , 225.0 ± 32.0 , 179.0 ± 24.3 U/L으로 나타났다. LCM군 및 HCM군은 대조군에 비해 혈청 AST 활성이 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 따라서 고코디세핀 동충하초는 간기능을 개선하는 효과가 우수한 것으로 나타나, 비알콜성 간 질환을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재로 활용할 가능성이 큰 것으로 사료된다.

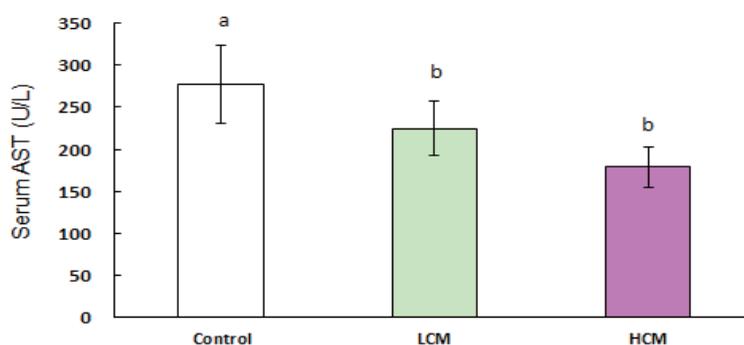


Fig. 15. Serum AST activities of ob/ob mice.

(자) 혈청 adiponectin 및 TNF- α 농도

혈청 adiponectin 농도를 측정한 결과 대조군, LCM군, HCM군이 각각 12.9 ± 2.2 , 12.5 ± 2.0 , 15.3 ± 2.3 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타나, 세 군간에 유의적인 차이가 없었다. Adiponectin은 인슐린저항성을 개선시키는 것으로 알려져 있으나, 고코디세핀 동충하초의 인슐린저항성 개선효과는 adiponectin과는 관련이 없는 것으로 사료된다.

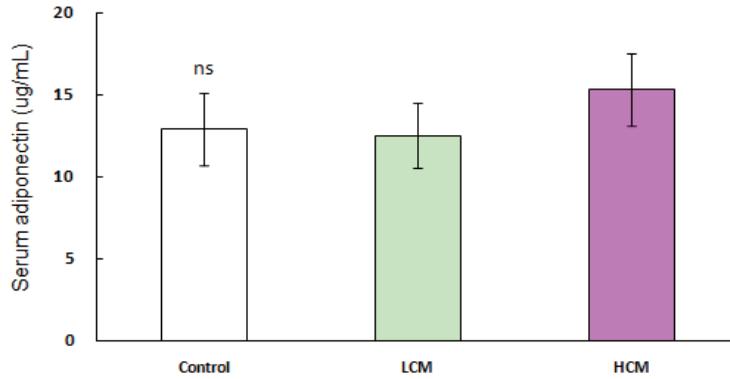


Fig. 16. Serum adiponectin levels of ob/ob mice.

혈청 TNF- α 농도를 측정한 결과, 대조군, LCM군, HCM군이 각각 87.7 ± 10.8 , 68.5 ± 12.9 , 64.0 ± 10.64 pg/mL 로 나타났다. LCM군 및 HCM군의 혈청 TNF- α 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). TNF- α 는 inflammation에 관련된 cytokine으로, 동충하초는 염증성 cytokine의 분비를 억제하는 것으로 사료된다. Inflammation은 비알콜성 지방간을 악화시키는 중요 인자로 알려져 있다. 따라서 고코디세핀 동충하초는 항염증활성을 나타내어, 비알콜성 지방간을 억제하는 것으로 사료된다.

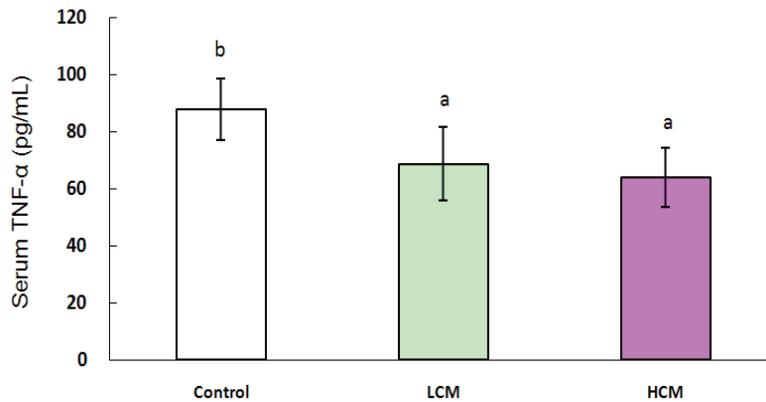


Fig. 17. Serum TNF- α levels of ob/ob mice.

(차) 간조직의 지질과산화물 농도 및 항산화 효소계 활성

LCM군, HCM군의 간조직 지질과산화물(TBARS) 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 따라서 고코디세핀 동충하초를 1% 및 3% 섭취한 경우, 지질과산화를 억제하는 것으로 나타났다.

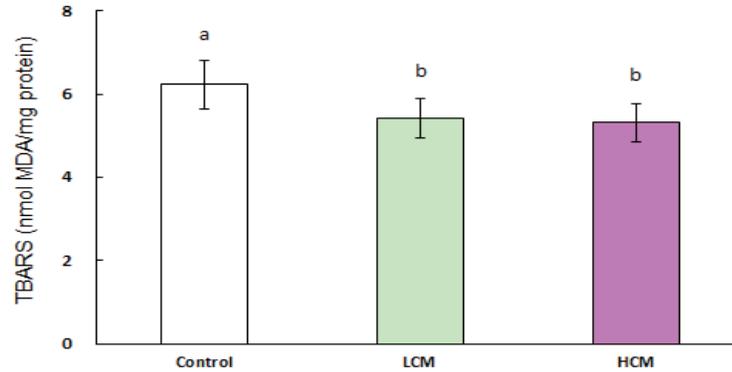


Fig. 18. Hepatic TBARS levels of ob/ob mice.

LCM군, HCM군의 간조직 SOD 및 catalase 활성은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 따라서 동충하초의 섭취는 항산화능을 증가시키는 것으로 사료된다. 산화적 스트레스는 비알콜성 지방간을 악화시키는 중요 인자로 알려져 있다. 고코디세핀 동충하초는 항산화 효소 활성을 증가시키고, 지질 과산화를 억제시켰으며, 이러한 항산화 활성으로 비알콜성 지방간을 억제하는데 기여하는 것으로 사료된다.

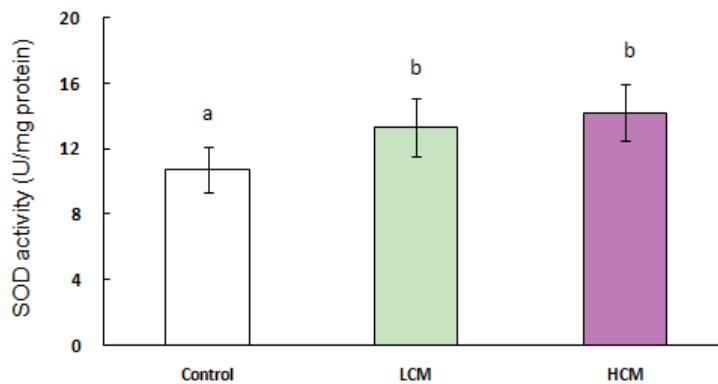


Fig. 19. Hepatic SOD activities of ob/ob mice.

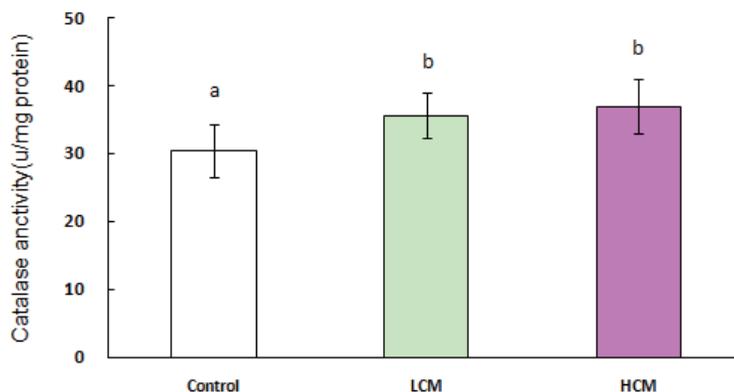


Fig. 20. Hepatic catalase activities of ob/ob mice.

다. 고지방·고단순당 식이로 인슐린저항성을 유발한 마우스에 있어서 와송 및 발효와송의 인슐린저항성 개선효과 및 비알콜성 지방간 개선효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) 동결건조 와송 및 발효와송의 일반성분 분석

와송 및 발효와송을 동결건조한 후 일반성분을 AOAC법으로 분석하였다. 동결건조한 와송의 수분은 6.1%, 단백질은 8.7%, 지방은 4.4%, 회분은 11.5%, 총 식이섬유는 37.6%로 나타났으며, 동결건조한 발효와송의 수분은 6.2%, 단백질은 8.8%, 지방은 2.3%, 회분은 15.6%, 총 식이섬유는 33.0%로 나타났다.

Table 1. Proximate composition of freeze-dried *Orostachys japonicus* and fermented *Orostachys japonicus*

	<i>Orostachys japonicus</i> (OJ)	Fermented <i>Orostachys japonicus</i> (FOJ)
Moisture	6.1	6.2
Crude protein	8.7	8.8
Crude lipid	4.4	2.3
Crude ash	11.5	15.6
Total dietary fiber	37.6	33.0

(나) 실험동물 및 실험디자인

생후 5주령의 수컷 C57BL/6J mice(n=24)를 구입하여 1주일간 적응기간 후, 난괴법에 따라 동물을 네 군으로 나누었다. 대조군(Control, CON)에게는 5.0% corn oil과 65.0% corn starch가 포함된 식이(basal diet)를, 고지방·고단순당(High-fat high-sugar, HFHS)군에게는 3.0% corn oil, 33.0% lard 및 27.1% sucrose를 포함한 HFHS 식이를, 와송군(*Orostachys japonicus*, OJ)에게는 HFHS 식이에 동결건조한 와송 분말을 식이의 5% 수준으로 첨가한 식이를, 발효와송군(Fermented *Orostachys japonicus*, FOJ)에게는 HFHS 식이에 동결건조한 와송 분말을 식이의 5% 수준으로 첨가한 식이를 12주간 제공하였다. C57BL/6J mouse에 있어서 12주 이상의 HFHS 식이 섭취는 비만, 인슐린저항성, 고혈당, 제2형 당뇨병을 나타내는 것으로 보고되었다. 실험기간 동안 체중과 식이섭취량은 각각 주 1회 및 3회 측정하였다. 식이 섭취 시작일로부터 12주가 지난 후, 동물을 12시간 절식시키고, 동물을 심장채혈법으로 희생시켰다. 부고환 백색지방 무게를 측정하였고, 혈청과 간조직을 -70℃에서 보관하였다.

Table 2. Composition of control and experimental diets(%)

Ingredient	Basal	HFHS	OJ	FOJ
Casein	20.00	20.00	19.57	19.56
Corn starch	65.00	11.00	6.66	6.56
Sucrose	-	27.10	27.10	27.10
Alpha-cellulose	5.00	-	-	-
Corn oil	5.00	3.00	2.78	2.89
Lard	-	33.00	33.00	33.00
Vitamin mixture	1.00	1.20	1.20	1.20
Mineral mixture	3.50	4.20	4.20	4.20
D,L-Methionine	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline bitrtrate	0.20	0.20	0.20	0.20
<i>Tert</i> -butyl hydroquinone	0.001	0.007	0.007	0.007
<i>Orostachys japonicus</i>	-	-	5.00	-
Fermented <i>Orostachys japonicus</i>	-	-	-	5.00

(다) 비만 개선효과 조사

비만 개선효과를 조사하기 위해 부고환지방 측정하였으며, 혈당 leptin 농도는 ELISA 방법으로 측정하였다.

(라) 내당능, 혈당 조절 및 인슐린저항성 개선효과 조사

식이섭취 11주 후, 절식시킨 동물에게 glucose 용액(2 g/kg)을 경구투여한 후 2시간 동안 30분 간격으로 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여, 혈당을 측정하고, 혈당 증가곡선의 면적(AUC)을 구하였다. 동물을 해부한 후, 혈당은 효소법으로, 혈청 인슐린 농도는 ELISA법으로 측정하였다. 인슐린저항성 지표인 HOMA-IR은 [공복혈당(mmol/L)×공복인슐린(uU/mL)/22.5]로 계산하였다.

(마) 혈청, 간조직의 지질 분석 및 간기능 지표 측정

혈청 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도는 효소법으로 측정하였다. 간조직의 지질을 추출한 후, 총 지방 축적량을 측정하고, 간조직의 중성지방, 콜레스테롤 함량을 효소법으로 측정하였다. 간기능 지표인 혈청 ALT 및 AST 효소 활성을 측정하였다.

(바) 항염증 지표 및 항산화 상태 측정

혈청 cytokine인 MCP-1, TNF- α 농도를 ELISA법으로 측정하였다. 간조직의 지질과산화물 측정은 Ohkawa 등의 방법을 이용하여, thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였고, SOD 활성은 Marklund 등의 방법으로, catalase 활성은 Aebi법(Aebi, 1984)으로 측정하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 비만 개선효과

대조군, HFHS군, OJ군, FOJ군의 체중은 각각 26.3 ± 1.2 , 36.8 ± 1.8 , 34.5 ± 1.6 , 36.3 ± 1.7 g으로 나타났다. HFHS군의 체중은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.01$), OJ군 및 FOJ군의 체중은 HFHS군과 유의적인 차이가 없었다. 대조군, HFHS군, OJ군, FOJ군의 식이섭취량은 각각 3.1 ± 0.3 , 3.1 ± 0.2 , 3.1 ± 0.4 , 3.2 ± 0.3 g/day로 나타나, 네 군간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 3. Body weight and food intake of C57BL/6J mice

Group	Body weight (g)	Food intake (g/day)
Control	26.3 ± 1.2^a	3.1 ± 0.3^{ns}
HFHS	36.8 ± 1.8^b	3.1 ± 0.2
OJ	34.5 ± 1.6^b	3.1 ± 0.4
FOJ	36.3 ± 1.7^b	3.2 ± 0.3

$p < 0.01$

네 군의 부고환 백색지방 무게는 각각 0.29 ± 0.06 , 1.67 ± 0.21 , 1.66 ± 0.18 , 1.80 ± 0.25 mg/g BW로 나타났다. HFHS군의 부고환 백색지방 무게는 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.01$), OJ군 및 FOJ군의 부고환 백색지방 무게는 HFHS군과 유의적인 차이가 없었다. 따라서 와송 및 발효와송의 섭취는 식이로 유도한 비만 동물에 있어서 체중 및 체지방량에는 유의적인 영향을 주지 않았다.

Table 4. Epididymal fat pad weight of C57BL/6J mice

Group	Epididymal fat pad weight (mg/g body weight)
Control	0.291 ± 0.06^a
HFHS	1.665 ± 0.21^b
OJ	1.655 ± 0.18^b
FOJ	1.798 ± 0.25^b

$p < 0.01$

대조군, HFHS군, OJ군, FOJ군의 혈청 leptin 농도는 각각 4.63 ± 0.88 , 11.52 ± 1.99 , 10.03 ± 1.78 , 9.42 ± 1.57 ng/mL로 나타났다. HFHS군의 혈청 leptin 농도는 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), OJ군 및 FOJ군의 혈청 leptin 농도는 HFHS군과 유의적인 차이가 없었다.

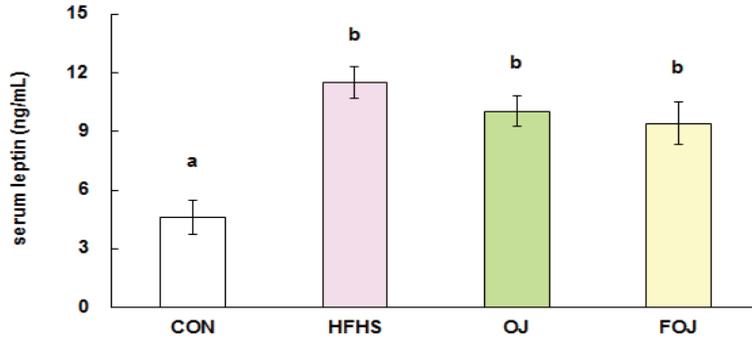


Fig. 1. Serum leptin levels of C57BL/6J mice.

(다) 혈당 및 인슐린저항성, 내당능 개선효과

대조군, HFHS군, OJ군 및 FOJ군의 혈당은 각각 104.8 ± 17.3 , 197.4 ± 24.2 , 159.8 ± 21.7 , 164.1 ± 17.5 mg/dL로 나타났다. HFHS군의 혈당은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$) OJ군 및 FOJ군의 혈당은 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), 대조군과 유의적인 차이가 없었다.

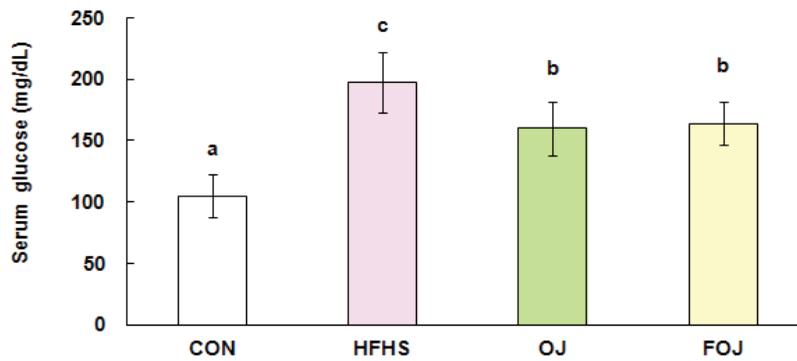


Fig. 2. Serum glucose levels of C57BL/6J mice.

대조군, HFHS군, OJ군 및 FOJ군의 혈청 인슐린 농도는 각각 17.7 ± 3.0 , 36.7 ± 4.7 , 28.7 ± 5.0 , 29.5 ± 4.3 $\mu\text{U/mL}$ 로 나타났다. HFHS군의 혈청 인슐린 농도는 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고, OJ군 및 FOJ군의 혈청 인슐린 농도는 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$).

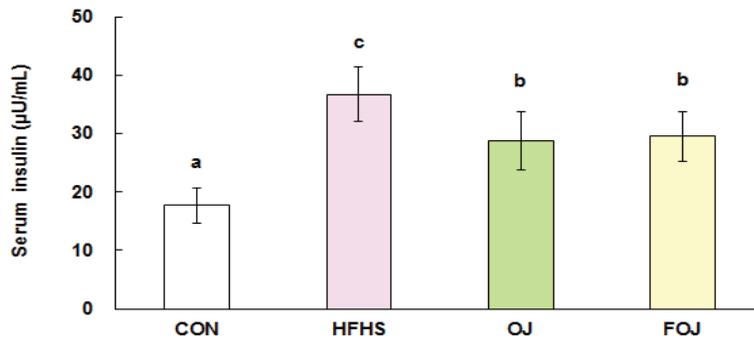


Fig. 3. Serum insulin levels of C57BL/6J mice.

HFHS군의 HOMA-IR은 17.8 ± 2.7 로 대조군(4.5 ± 0.6)에 비해 유의적으로 증가하였고 ($p < 0.01$), OJ군 및 FOJ군의 HOMA-IR은 각각 11.2 ± 1.5 , 12.0 ± 2.2 로 나타나 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). C57BL/6J mice에 있어서 HFHS 식이의 섭취는 인슐린저항성을 유도하여 고인슐린혈증, 고혈당을 나타내었으나 와송 및 발효와송의 섭취는 혈당, 인슐린 농도 및 HOMA-IR을 감소시켜 인슐린저항성 개선효과 우수하게 나타났다.

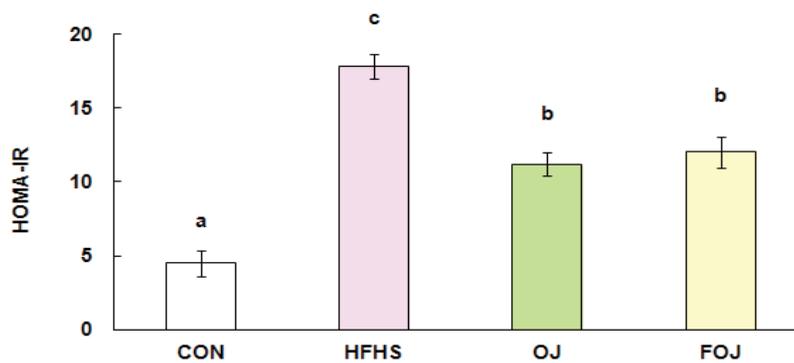


Fig. 4. HOMA-IR of C57BL/6J mice.

네 군의 경구 당부하검사 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 포도당 투여 후 30, 60분의 혈당은 HFHS군의 경우 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.01$). OJ군 및 FOJ군의 30, 60분의 혈당은 HFHS군 및 대조군과 유의적인 차이가 없었다. HFHS군의 혈당증가 곡선의 면적은 $6,188 \pm 1,171 \text{ mg} \cdot \text{min}/\text{dL}$ 로, 대조군($3,545 \pm 891 \text{ mg} \cdot \text{min}/\text{dL}$)에 비해 유의적으로 증가하여, 내당능이 감소한 것으로 나타났다($p < 0.01$). OJ군 및 FOJ군의 혈당증가 곡선의 면적은 각각 $5,028 \pm 952$, $5,075 \pm 888 \text{ mg} \cdot \text{min}/\text{dL}$ 로, HFHS군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었으며, 대조군과도 유의적인 차이가 없었다.

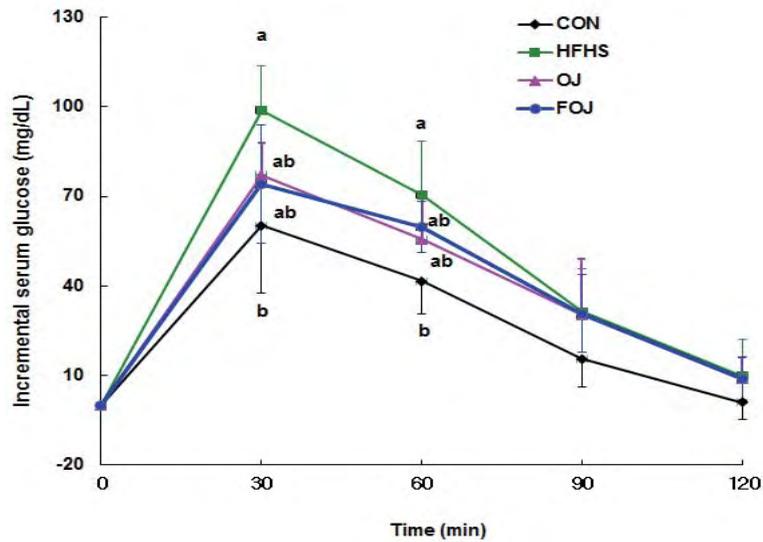


Fig. 5. Oral glucose tolerance test curves of C57BL/6J mice.

Table 5. Area under the oral glucose tolerance curves(AUC)

Group	AUC (mg · min/dL)
CON	$3,545 \pm 891^a$
HFHS	$6,188 \pm 1,171^b$
OJ	$5,028 \pm 952^{ab}$
FOJ	$5,075 \pm 888^{ab}$

$p < 0.01$

(라) 지질대사 개선효과

네 군의 혈청 중성지방 농도는 117.1 ± 12.8 , 133.2 ± 20.0 , 120.3 ± 19.8 , 128.1 ± 19.9 mg/dL로 네 군간 유의적인 차이가 없었다.

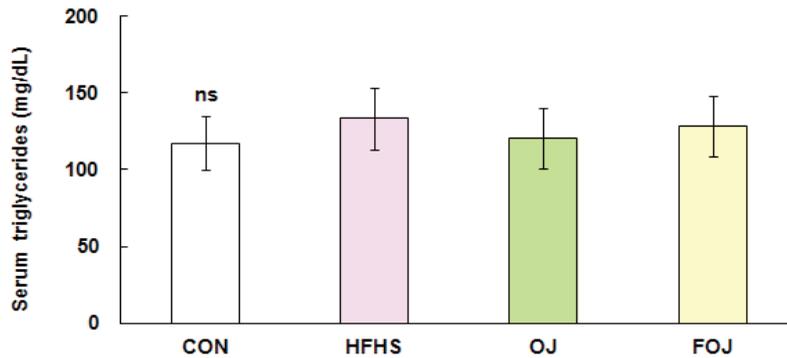


Fig. 6. Serum triglyceride levels of C57BL/6J mice.

HFHS군의 혈청 콜레스테롤 농도는 165.7 ± 18.5 mg/dL로 대조군(109.3 ± 10.6 mg/dL)에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), OJ군(138.4 ± 14.3 mg/dL) 및 FOJ군(140.8 ± 16.9 mg/dL)의 혈청 콜레스테롤 농도는 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 따라서 와송 및 발효와송의 섭취는 HFHS식으로 당뇨병을 유도한 동물에 있어서 고콜레스테롤혈증 개선효과가 우수한 것으로 나타났다.

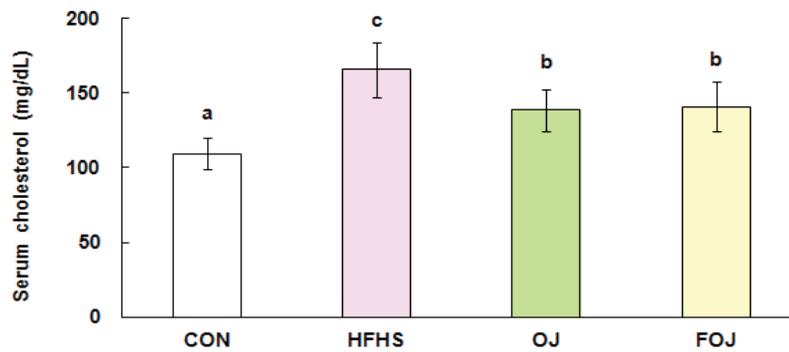


Fig. 7. Serum cholesterol levels of C57BL/6J mice.

대조군, HFHS군, OJ군, FOJ군의 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 각각 57.5 ± 10.7 , 64.4 ± 14.0 , 71.8 ± 12.3 , 68.4 ± 12.9 mg/dL로 나타나 네 군간 유의적인 차이가 없었다.

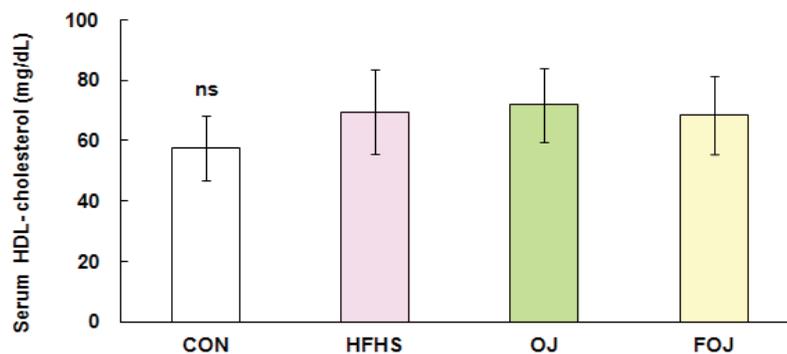


Fig. 8. Serum HDL-cholesterol levels of C57BL/6J mice.

(마) 비알콜성 지방간 개선효과

대조군, HFHS군, OJ군, FOJ군 간조직의 총 지질함량을 측정된 결과 HFHS군 (151.2 ± 16.9 mg/g liver)이 대조군(89.8 ± 14.7 mg/g liver)에 비해 유의적으로 증가하였고 ($p < 0.05$), OJ군(122.0 ± 18.2 mg/g liver) 및 FOJ군(118.3 ± 19.7 mg/g liver)은 경우 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

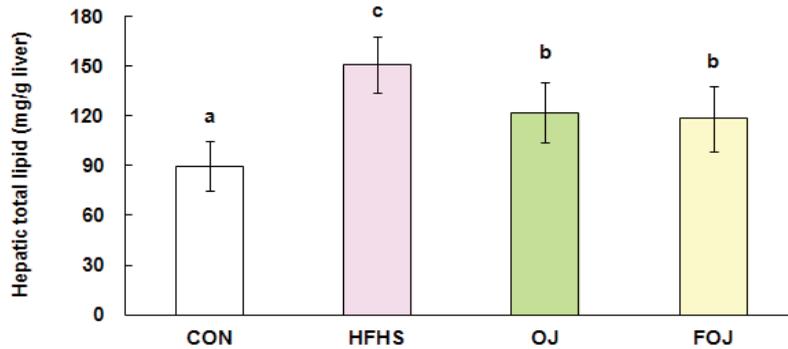


Fig. 9. Hepatic total lipid levels of C57BL/6J mice.

HFHS군의 간조직 중성지방 함량은 44.2 ± 7.7 mg/g liver로 대조군(18.9 ± 3.3 mg/g liver)에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.01$), OJ군(33.0 ± 5.7 mg/g liver) 및 FOJ군(34.4 ± 5.1 mg/g liver)의 간조직 중성지방 함량은 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.01$). 따라서 와송 및 발효와송의 섭취는 HFHS식으로 당뇨병을 유도한 동물에 있어서 간조직의 지방축적을 억제하여 비알콜성 지방간 개선에 도움을 줄 것으로 사료된다.

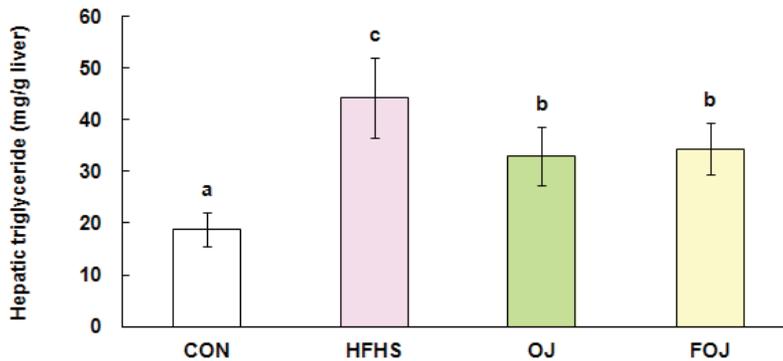


Fig. 10. Hepatic triglyceride levels of C57BL/6J mice.

대조군, HFHS군, OJ군, FOJ군의 간조직 콜레스테롤 함량은 각각 4.55 ± 0.87 , 6.07 ± 0.80 , 5.75 ± 0.77 , 5.30 ± 1.07 mg/g liver로 나타났다. HFHS군의 간조직 콜레스테롤 함량은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), OJ군 및 FOJ군의 간조직 콜레스테롤 함량은 HFHS군 및 대조군과 유의적인 차이가 없었다.

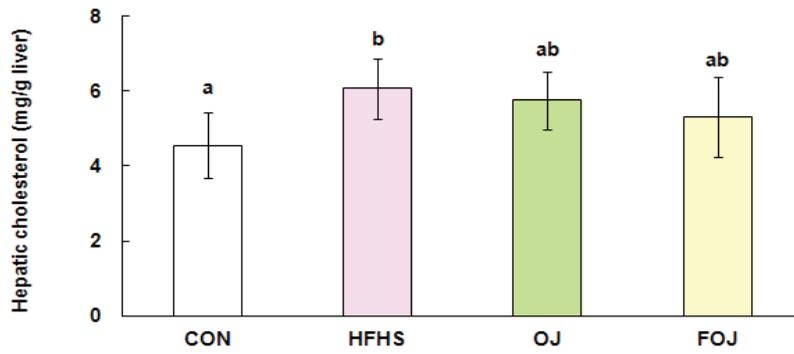


Fig. 11. Hepatic cholesterol levels of C57BL/6J mice.

네 군의 혈청 ALT 활성은 각각 9.7 ± 1.4 , 18.5 ± 2.4 , 13.8 ± 2.6 , 14.3 ± 2.8 U/L로 나타나 HFHS군의 ALT 활성이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), OJ군 및 FOJ군의 ALT 활성은 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 따라서 와송 및 발효와송의 섭취는 HFHS식으로 당뇨병을 유도한 동물에 있어서 간기능 개선에 도움을 주었으며, 이는 지방간을 억제한 것에 기인한 것으로 사료된다.

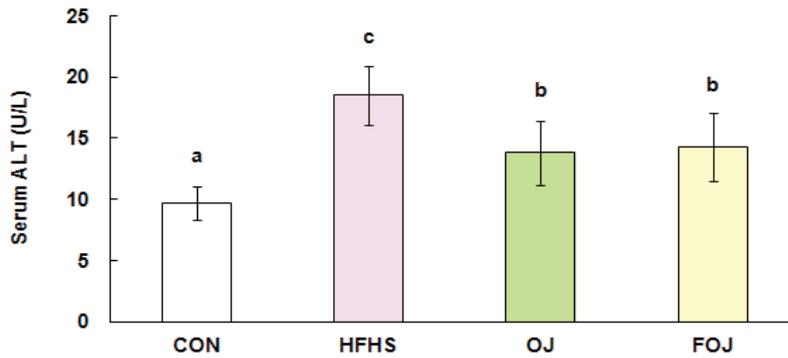


Fig. 12. Serum ALT activities of C57BL/6J mice.

대조군, HFHS군, OJ군 및 FOJ군의 혈청 AST 활성은 각각 17.3 ± 3.1 , 24.7 ± 4.5 , 21.8 ± 3.8 , 22.2 ± 4.4 U/L으로 나타나 HFHS군의 AST 활성이 대조군에 비해서 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), OJ군과 FOJ군의 AST 활성은 대조군과 HFHS군과 유의적인 차이가 없었다.

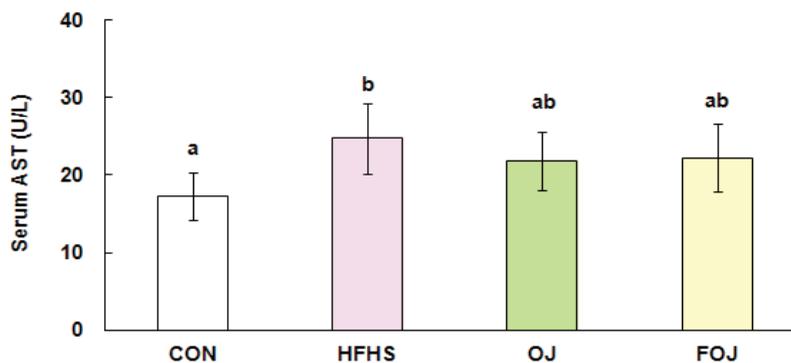


Fig. 13. Serum AST activities of C57BL/6J mice.

(바) 항염증 효과

대조군, HFHS군, OJ군, FOJ군의 혈청 TNF- α 농도는 각각 14.7 ± 2.6 , 21.2 ± 3.6 , 18.2 ± 3.0 , 19.8 ± 3.4 pg/mL로 나타나, HFHS군의 혈청 TNF- α 농도는 대조군에 비해서 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), OJ군과 FOJ군의 TNF- α 농도는 대조군 및 HFHS군과 유의적인 차이가 없었다.

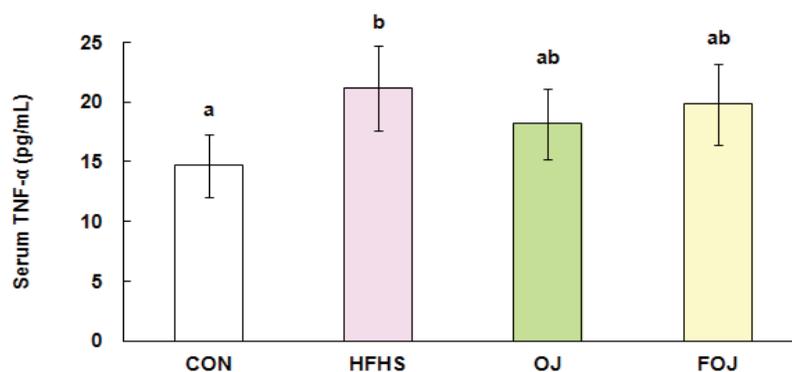


Fig. 14. Serum TNF- α levels of C57BL/6J mice.

HFHS군의 혈청 MCP-1 농도는 41.2 ± 6.4 pg/mL로 대조군(28.7 ± 4.4 pg/mL)에 비해서 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), OJ군(32.8 ± 5.5 pg/mL)과 FOJ군(34.8 ± 6.5 pg/mL)의 혈청 MCP-1 농도는 대조군 및 HFHS군과 유의적인 차이가 없었다.

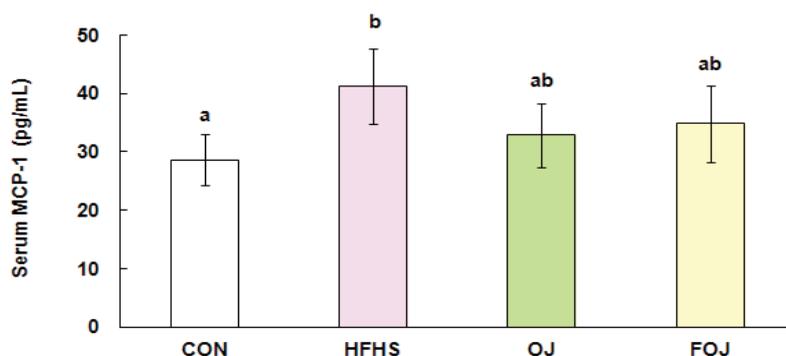


Fig. 15. Serum MCP-1 levels of C57BL/6J mice.

(사) 항산화능 개선효과

HFHS군의 간조직 지질과산화물 농도(1.05 ± 0.13 nmol MDA/mg protein)가 대조군(0.68 ± 0.11 nmol MDA/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였고($p < 0.05$), OJ군(0.80 ± 0.13 nmol MDA/mg protein) 및 FOJ군(0.83 ± 0.11 nmol MDA/mg protein)의 경우 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), 대조군과는 유의적인 차이가 없었다.

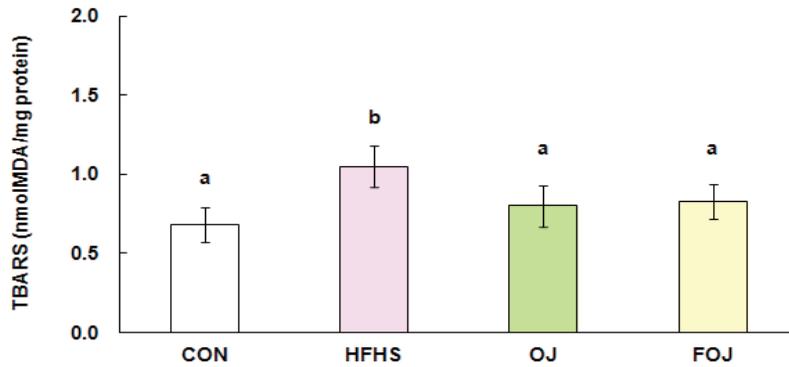


Fig. 16. Hepatic TBARS levels of C57BL/6J mice.

HFHS군(1.85 ± 0.34 U/mg protein)의 간조직 SOD 활성은 대조군(2.57 ± 0.56 U/mg protein)에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), OJ군(2.07 ± 0.34 U/mg protein) 및 FOJ군(2.20 ± 0.33 U/mg protein)의 간조직 SOD 활성은 HFHS군 및 대조군과 유의적인 차이가 없었다.

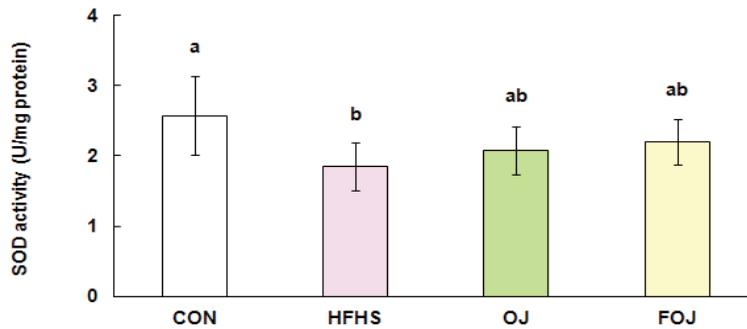


Fig. 17. Hepatic SOD activities of C57BL/6J mice.

HFHS군의 간조직 catalase 활성은 18.6 ± 3.0 U/mg protein로 대조군(27.0 ± 3.5 U/mg protein)에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), OJ군(24.2 ± 3.2 U/mg protein) 및 FOJ군(25.4 ± 3.4 U/mg protein)의 간조직 catalase 활성은 HFHS군에 비해 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 따라서 와송 및 발효와송의 섭취는 HFHS식이로 당뇨병을 유도한 동물에 있어서 간조직의 지질과산화물 농도를 감소시키고 항산화계 효소인 catalase 활성을 증가시켜, 간조직의 항산화 상태를 개선시키는 것으로 사료된다.

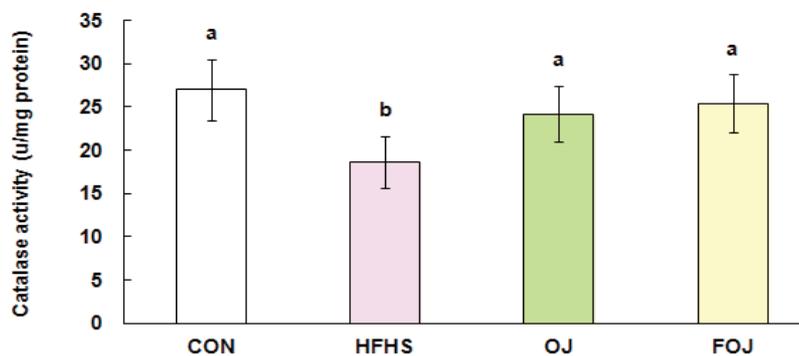


Fig. 18. Hepatic catalase activities of C57BL/6J mice.

제3절 약용작물 유래 항염증 효능 물질의 상용화

1. 약용작물 유래 항염증 효능 물질의 탐색 및 독성실험

(제 3 세부 : 동아대학교, 이재현)

가. 한약재 HTR에서 추출한 새로운 화합물 JNP3가 PMA로 유도한 MCF-7사람 유방암 세포에서 암세포 침윤과 전이억제 효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) 재료 및 기기

실험방법에 있어서 세포독성은 MTT assay, MMP-9 enzyme activity는 Zymography assay, mRNA expression level 은 RT-PCR 분석, MMP-9 protein expression level과 Signaling pathway regulator protein levels 은 Western blot analysis , Promoter activity는 luciferase assay, transcription factor activity는 EMSA, 암세포의 침윤과 전이는 Invasion assay와 Wound healing assay 로 분석하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

(가) HTR로 부터 분리한 4개의 화합물이 MMP-9 활성화에 미치는 영향

HPLC 로 분리한 4개의 화합물을 PMA로 MMP-9을 유도시킨 MCF-7 유방암세포에 24시간 처리하여 MMP-9 활성을 Zymography로 확인한 결과 JNP3는 완벽하게 MMP-9 활성이 억제된 반면, JNP4는 매우 강력한 MMP-9 inducer로 작용하였다 (Fig. 1).

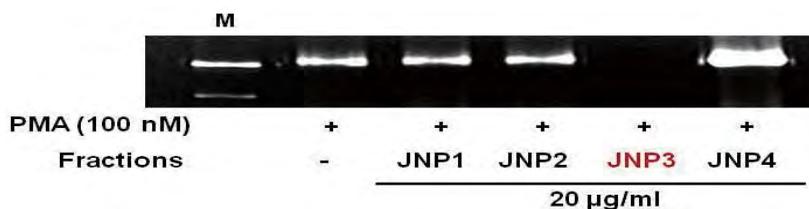


Fig. 1.

(나) 기존에 알려진 MMP-9 inhibitors 와 JNP3의 MMP-9활성 비교

JNP3가 MMP-9 inhibitor로 작용 할 수 있는지를 확인하기 위하여 기존에 알려진 물질과 비교한 결과, 녹차에서 분리한 EGCG와 플라폴리스에서 분리한 CAPE를 같은 농도로 처리하였을 때 JNP3가 EGCG나 CAPE 보다 MMP-9 활성 억제능이 우수하다는 것이 확인되었다 (Fig.2).

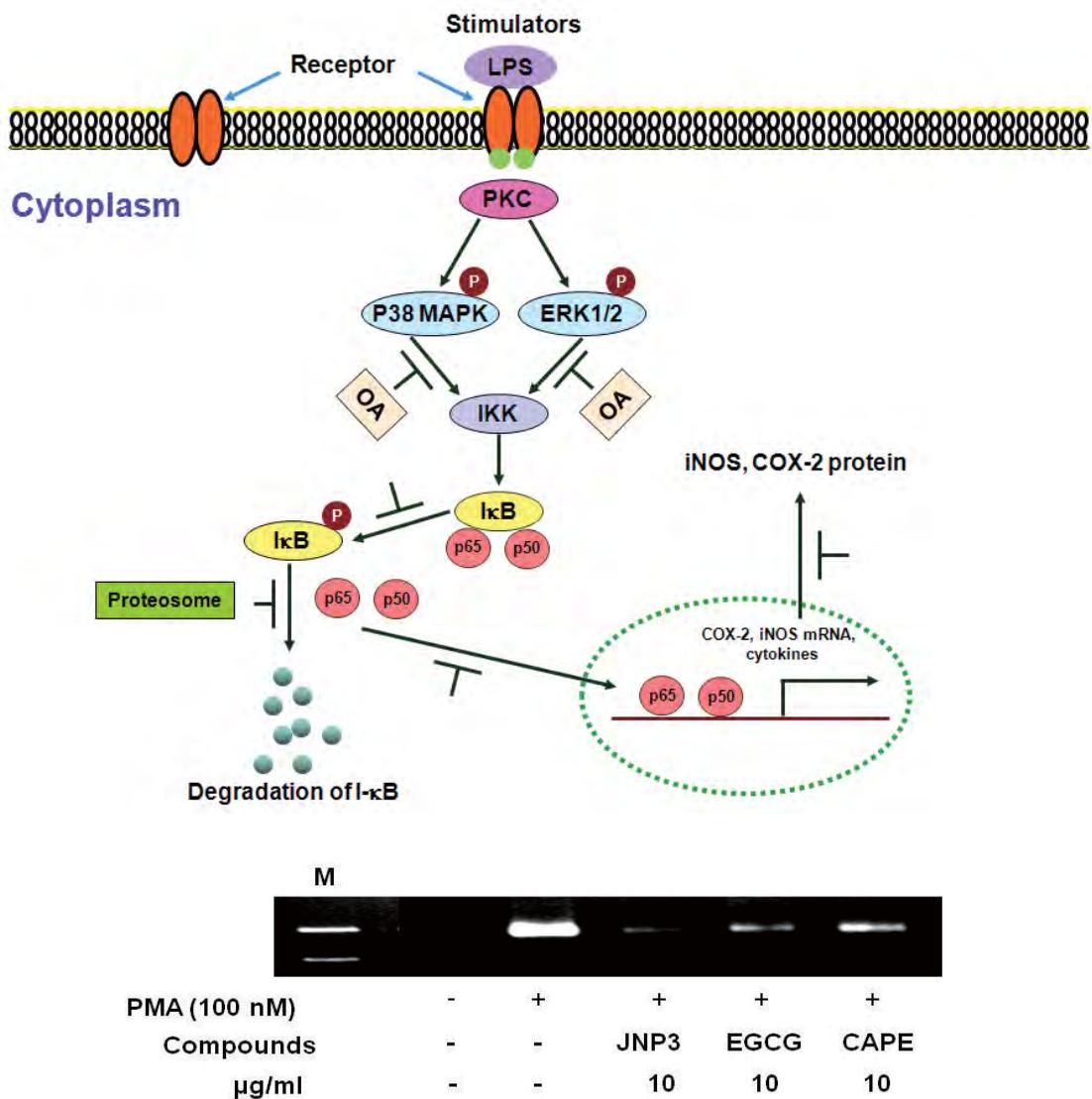


Fig. 2.

(다) 새로운 화합물 JNP3 및 JNP4의 구조분석

MMP-9 활성을 억제하는 새로운 화합물 JNP3와 MMP-9 inducer 로 작용하는 JNP4를 분리하여 구조를 동정한 결과, 복잡한 입체구조를 가졌으며 정반대의 활성차이는 2개의 이중결합의 유무에 있었다고 사료되었다 (Fig. 3).

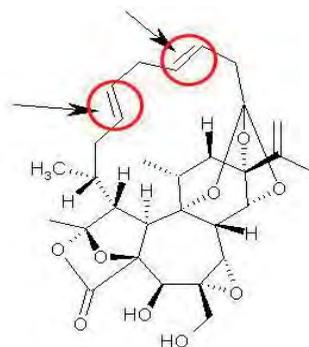


Fig. 3.

(라) 암세포의 성장에 미치는 JNP3의 영향

JNP3가 Cell cytotoxicity에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과, 20 mg/ml까지는 90% 이상 세포생존율을 나타내었으므로 20 mg/ml 이하의 농도에서 모든 실험을 이행하였다 (Fig. 4).

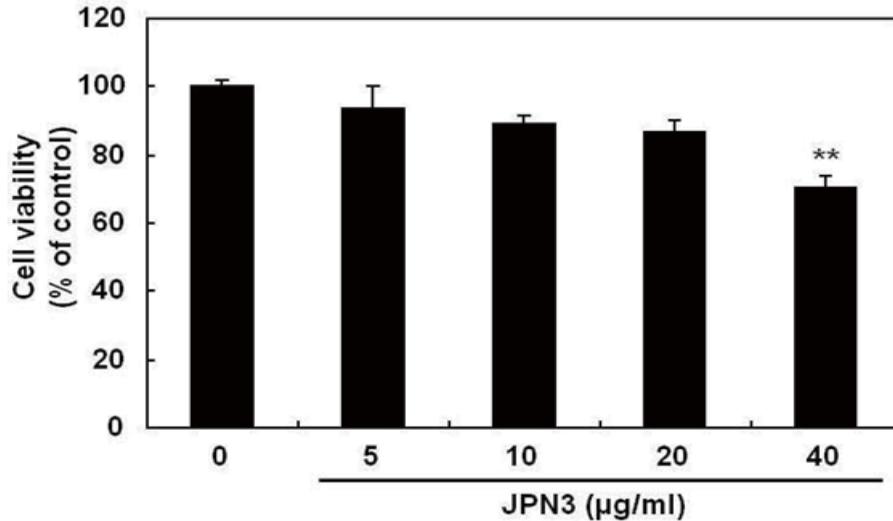


Fig. 4.

(마) MMP-9 expression에 미치는 JNP3의 영향

JNP3가 MMP-9 expression에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PMA로 MMP-9을 유도한 MCF-7세포에 JNP3를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 다음 Zymography방법으로 MMP-9 enzyme activity를 측정하였다.

MMP-9 활성은 농도 의존적으로 감소하다가 20 mg/ml에서 활성이 완전히 감소하였고, 이 결과와 일치하여 Western blotting에서도 MMP-9 단백질 level의 감소가 확인되었으며, RT-PCR분석에서 mRNA expression도 감소되었음을 확인되었다. 이때 이러한 MMP-9 level의 감소가 endogenous inhibitor의 작용에 의한 것인지 확인하기 위하여 TIMP의 발현을 체크한 결과 TIMP expression은 감소되지 않았으므로 JNP3에 의한 억제 효과라는 것이 확인되었다 (Fig. 5).

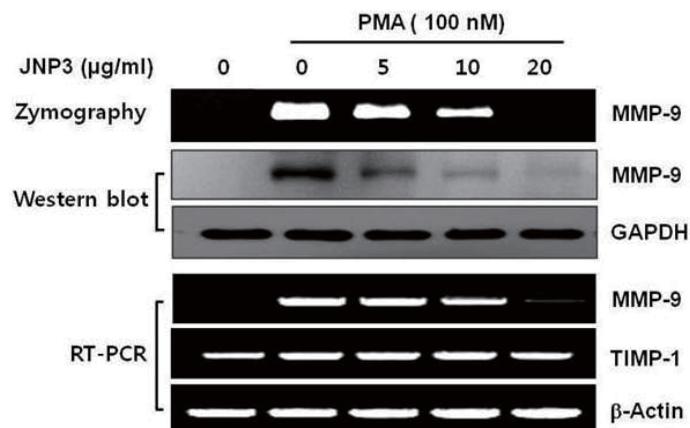


Fig. 5.

(바) MAPK signaling pathways 에 미치는 JNP3의 영향

MAPK pathways 는 MMP-9 induction 에 중요한 역할을 하는데 JNP3가 어느 signaling cascades 에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실험하였음. JNP3는 ERK와 JNK의 phosphorylation은 농도 의존적으로 억제시켰지만 p38의 phosphorylation에는 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 6).

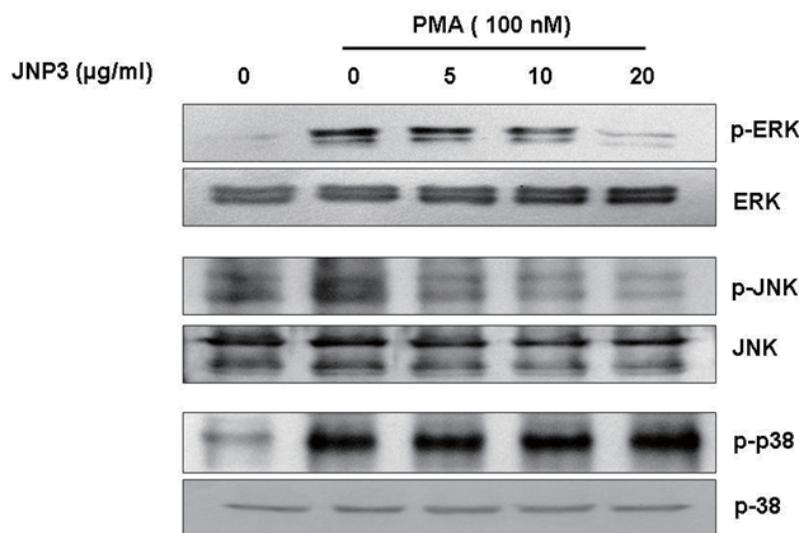


Fig. 6.

(사) Transcription factor activation 에 미치는 JNP3의 영향

JNP3가 어느 transcription factor의 activation을 억제하는지 확인하기 위하여 promoter assay를 실시하였다. MMP-9 promoter영역에는 2개의 AP-1 binding sites와 1개의 NF-kB binding site가 존재하는데 A)는 아무것도 mutation을 시키지 않은 wild type의 promoter 영역을 가진 reporter plasmid를 MCF-7 cells에 transfection하여 JNP3를 처리한 다음, luciferase assay를 하면 luciferase activity가 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다.

B)는 2개의 AP-1 binding sites에 mutation을 일으켜 transfection 하면 luciferase activity가 농도 의존적으로 감소하게 되는데 이것은 AP-1 binding sites는 MMP-9 의 expression에는 중요한 역할을 하지 못한다는 것을 암시하며, C)에서 NF-kB binding site에 mutation을 일으켜 transfection 하면 luciferase activity에 영향을 미치지 않으므로 MMP-9 expression에 NF-kB binding site가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다

(아) 전사인자 AP-1 과 NF-kB binding activities 에 미치는 JNP3 의 영향

PMA로 MMP-9을 유도시킨 MCF-7세포에 농도별로 JNP3를 처리한 다음, 세포로부터 세포핵을 분리하여 transcription factor DNA binding activity를 분석한 결과 AP-1 DNA binding activity 에는 영향을 미치지 못하는 반면에 NF-kB DNA binding activity를 감소시키는 것이 확인되었다 (Fig. 7A).

Fig. 7B는 핵속으로 translocation 된 transcription factor의 main subunit에 대한 Western blotting 결과로 Fig. 10A의 EMSA결과를 뒷받침 하는 것임. c-Jun은 transcription factor AP-1 의 main subunit이고, p65는 NF-kB 의 main subunit 인데 핵 속으로

translocation 된 이들 subunit들의 단백질 발현량을 보면 c-Jun 의 phosphorylation은 변화가 없는 반면에 NF- κ B 의 main subunit 인 p65는 농도 의존적으로 감소하는 것으로 보아 JNP3는 AP-1 이 아닌 NF- κ B activity 의 억제를 통하여 MMP-9 의 transcriptional activation을 조절하는 것을 알 수 있었다.

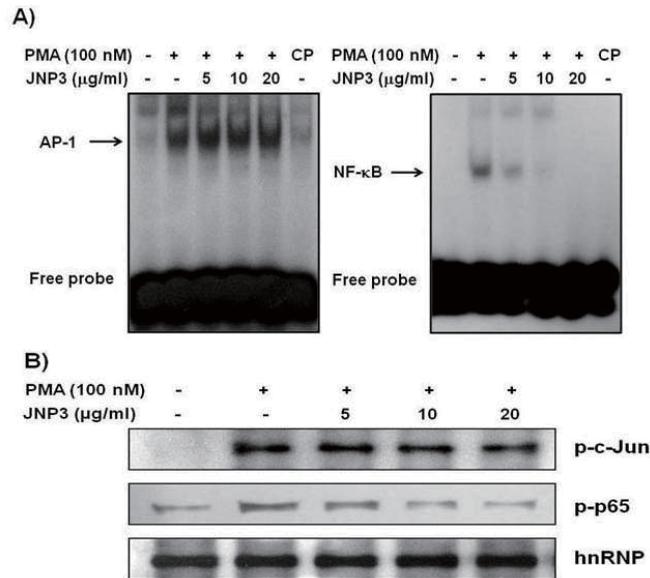


Fig. 7.

(자) PMA유도된 암세포의 전이에 미치는 JNP3의 영향

JNP3가 예상도 처럼 암세포의 전이 억제능을 확인하기 위하여 Wound healing assay를 실시하였다.

A)는 PMA를 처리하지 않은 control 세포이고, B)는 PMA를 처리한 것, C)는 PMA에 JNP3를 처리 한 세포임. PMA를 처리하지 않은 control 은 yellow tip 끝으로 세포에 상처를 낸 다음 24시간 배양해도 세포가 없는 안쪽 방향으로 migration 되지 않는 반면에, PMA를 처리한 세포에 상처를 내고 24시간 배양하면 안쪽으로 migration 되는것을 알 수 있다. 그러나 PMA 와 JNP3를 동시에 처리하게 되면 Control 처럼 migration 이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 8, 9).

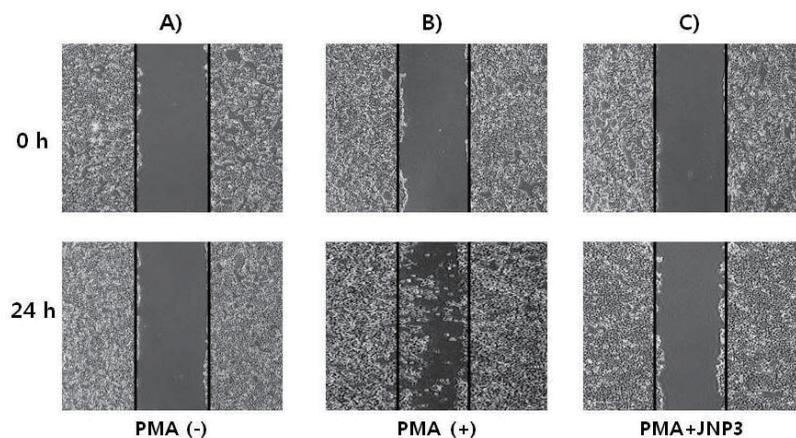


Fig. 8.

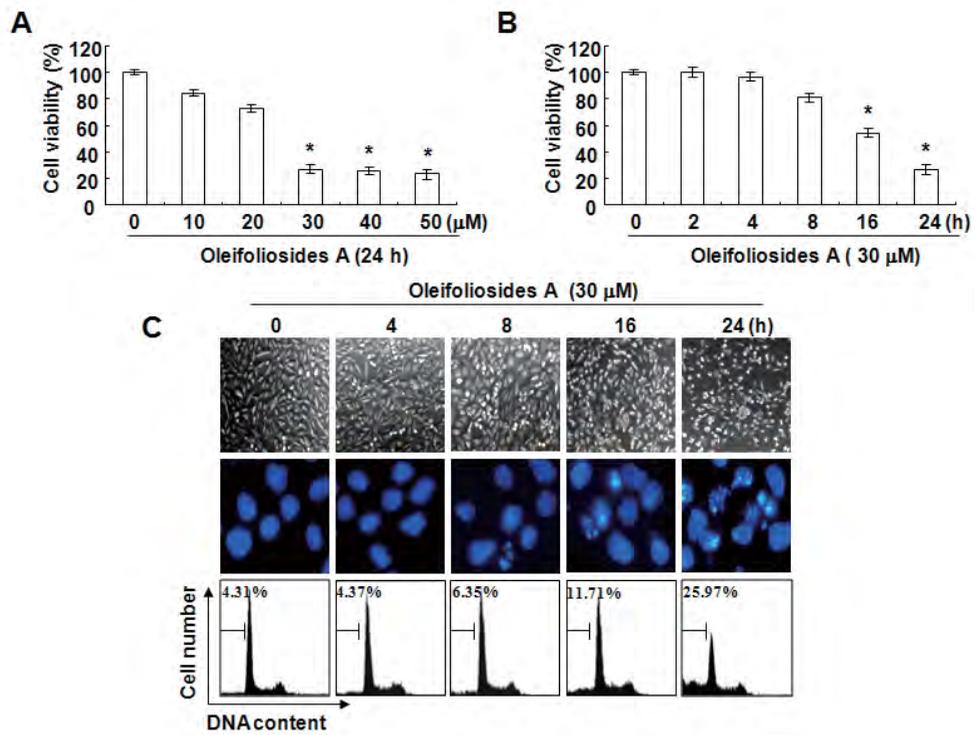
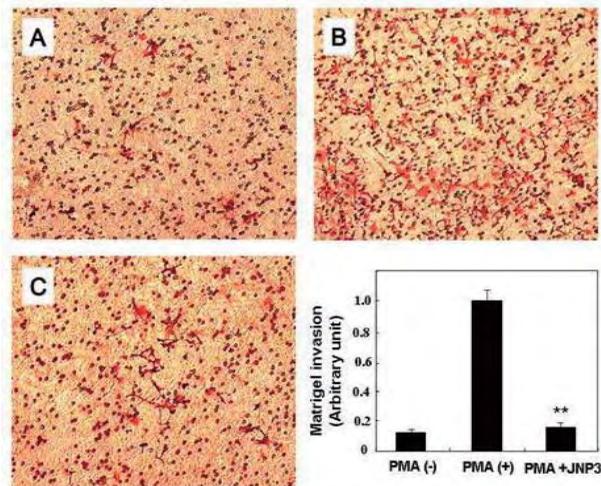


Fig. 9.

(차) 암세포의 침윤에 미치는 JNP3의 영향

JNP3가 암세포의 침윤도 억제 할 수 있는지를 알아보기 위하여 Matrigel invasion assay 를 실시하였다 (Fig. 10). A)는 PMA를 처리하지 않은 control의 세포이고, B)는 PMA를 처리한 것, C)는 PMA에 JNP3를 처리 한 것 임. PMA를 처리하지 않은 control 은 Matrigel 아래로 거의 invasion되지 않는 반면에, PMA를 처리한 세포는 많은 세포가 Matrigel 을 뚫고 침윤되는 것을 알 수 있음. 그러나 PMA에 JNP3를 동시에 처리하게 되면 거의 control 수준 만큼 침윤이 억제됨을 확인 할 수 있었다.



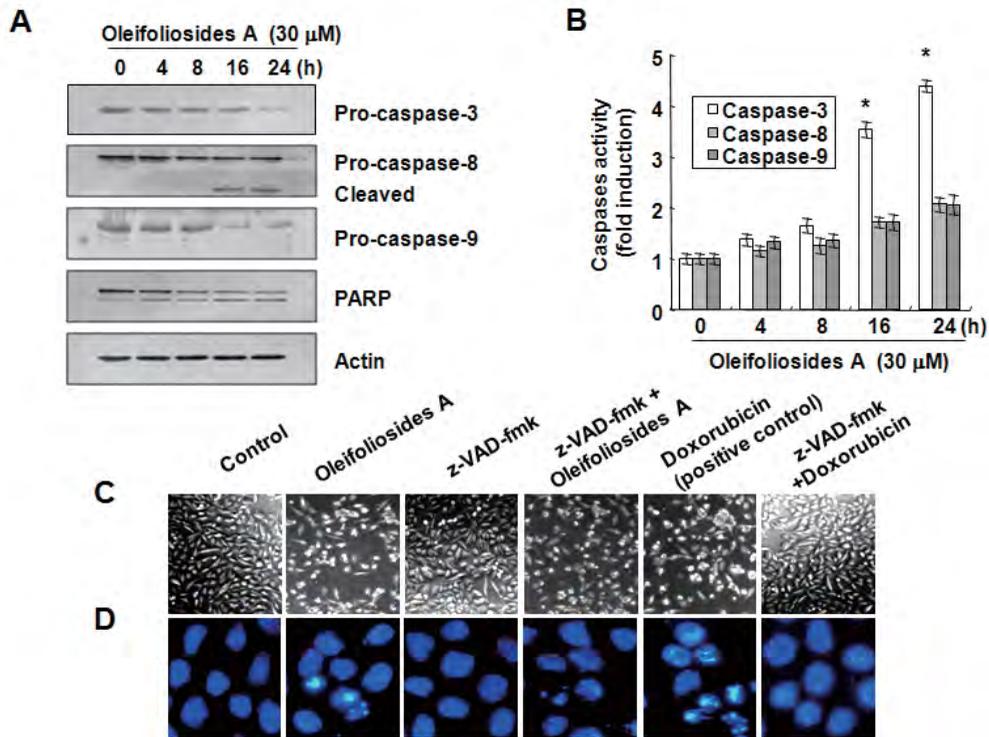


Fig. 10.

(카) JNP3가 암의 진행과정에서 치료에 적용 될 수 있는 단계의 예상도

metastasis 실험과 invasion 실험 결과, JNP3가 암의 진행과정 중에서 두 번째 단계에 해당하는 metastasis와 invasion 단계를 Targetting 된다고 생각된다.

이상의 결과에서 JNP3는 PMA-induced MMP-9 activity와 expression을 유의적으로 억제하였는데 이것은 전사인자인 NF-kB activation의 blocking에 의한 것이었다. 또한 JNP3는 MCF-7세포의 침윤과 전이를 억제시켰는데, 이 결과로 JNP3는 암의 전이를 억제하는 항암제로 개발될 수 있다는 포텐셜이 있다고 사료된다.

나. HeLa 세포에서 MP-2, 황칠나무에서 추출한 새로운 화합물, 에 의해 유도된 Apoptosis (세포자멸사) 와 세포주기억제의 상호관련 확인

(1) 연구결과 및 고찰

(가) 암세포의 성장에 미치는 MP-2의 영향

MP-2의 처리에 따른 HeLa세포의 성장억제작용을 알아보기 위하여 MP-2를 시간별 (0, 2, 4, 8, 16, 24 h)로 처리하여 MTT assay를 이용하여 조사하였다(Fig. 1A). A)에 나타난 바와 같이 MP-2 처리 4시간 경과 후 농도 의존적으로 세포의 성장이 억제되는 것으로 나타났다. 다음으로 MP-2 처리에 의하여 유발되는 세포의 형태 변화를 알아보기 위하여 HeLa세포에 MP-2를 시간별로 처리하여 배양한 후 DAPI 염색을 실시하여 핵의 형태변화를 현미경하에서 관찰하였다 (Fig. 1B). MP-2 처리에 따른 apoptosis 유발정도를 정량적으로 비교평가하

기 위하여 상기와 동일한 조건으로 배양된 세포들을 대상으로 DNA flow cytometry 분석을 통한 세포주기의 sub-G1기에 해당되는 세포들의 빈도를 조사한 결과 MP-2 처리시간의 증가에 따라 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 1C). 특히 MP-2를 4-8시간 처리하였을 경우 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도가 소폭 증가하였으나 16시간 처리군에서는 약 12% 정도로 증가하였으며 24시간 처리군에서는 약 26% 정도로 급격하게 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1D). 이상의 결과를 살펴 볼 때 MP-2 처리에 의한 HeLa세포의 생존율감소가 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

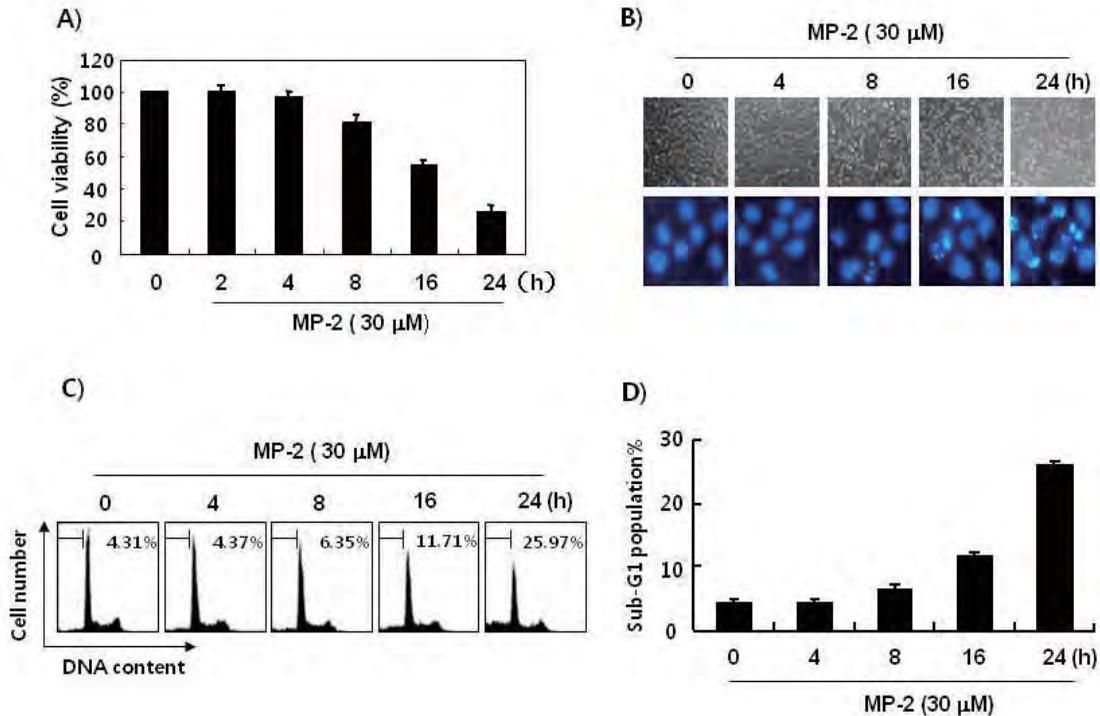


Fig. 1.

(나) Caspases의 발현 및 활성화에 미치는 MP-2의 영향

Caspase protease라는 효소는 apoptosis 유발에 중요한 조절인자로서 작용하는 것으로 알려져 있으며 이 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재한다. 많은 caspases 중 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 caspase-3, -8 및 -9의 발현에 미치는 MP-2의 영향에 대해서 조사하였다(Fig. 2). Fig. 2A에 나타난 바와 같이 MP-2의 처리에 의하여 initiator caspase로 알려진 caspase-8,9 중에서 caspase-8의 활성화형 단백질이 증가하였으며 caspase-9과 effector caspase로 알려진 caspase-3의 활성화형 단백질은 나타나지 않았지만 전체 단백질의 발현이 처리시간 의존적으로 현저히 감소되는 것으로 관찰되었으며 caspase-3의 기질단백질로서 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질의 단편화 현상이 관찰되었다. 이상의 Western blotting에 의한 결과를 재확인하기 위하여 caspases의 활성화정도를 기질을 이용하여 직접 분석한 결과 MP-2 처리시간 증가에 따라 caspase-3,8,9가 현저히 증가되었고 caspase-3의 활성화가 상대적으로 큰 변화가 있었음을 알 수 있었다(Fig. 2B). 이상의 결과를 살펴 볼 때 MP-2 처리에 따른 HeLa 세포에서의 apoptosis 유발은 caspase-3,-8-9의 활성화가 중요한 역

할 수 있다는 가능성을 제시함을 알 수 있었다.

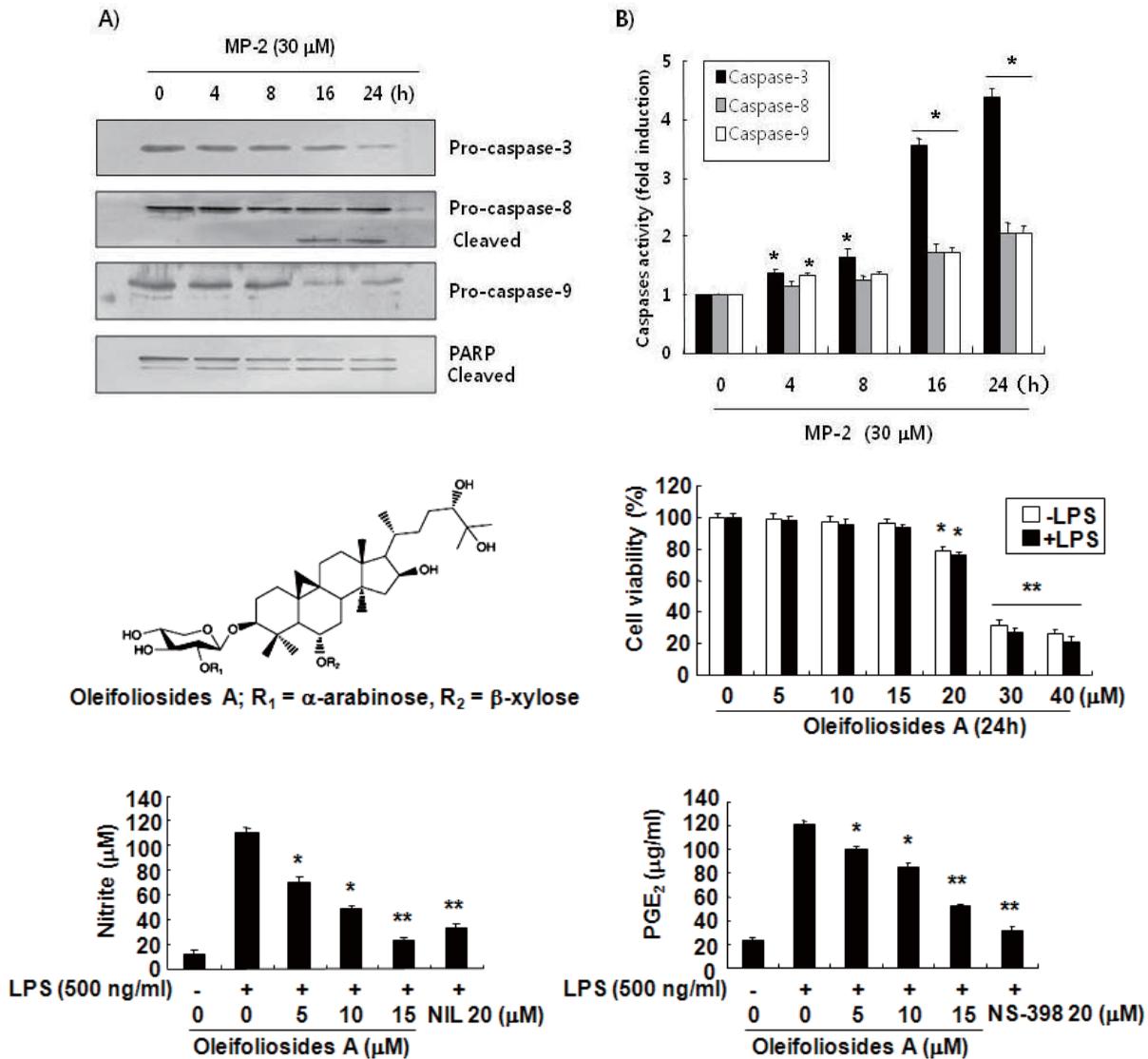


Fig. 2.

(다) Apoptosis 관련 단백질의 발현에 미치는 MP-2의 영향

Apoptosis의 유도는 세포 내의 apoptosis 관련 단백질의 발현에 영향을 주게 되는데 그 중 Bcl-2 family는 Bax, Bak 및 Bim 등과 같은 apoptosis 유도 단백질(pro-apoptotic protein) 과 Bcl-2, Bcl-x 등과 같은 apoptosis 억제 단백질(anti-apoptotic protein)으로 구성되어 있다. 두 구성성분들은 평소 세포 내에서 일정하게 균형을 유지하고 있으나 ROS, UV 및 호르몬 등의 자극으로 인해 불균형이 유발됨으로써 세포를 apoptosis 기전으로 유도시킨다. 한편 Caspases 의존적인 apoptosis는 여러 단계로 조절되는데 그 중 inhibitors of apoptosis (IAPs) family는 caspases를 직접적으로 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 HeLa세포에서 MP-2의 apoptosis 유도경로를 확인하기 위해 Bcl-2와 IAPs family의 단백질 발현량을 western blotting을 통해 확인한 결과, MP-2가 농도 의존적으로 Bad의 발현양 증가 시키고 Bid의 발현량은 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3A). 다음으로 caspases의 활성을 억제하는 것으로 알려진 IAP family가 MP-2 처리에 의하여 유발되는 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는

지를 조사한 결과는 Fig. 3B에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 HeLa 세포에서 MP-2 처리에 의한 IAP family에 속하는 유전자의 발현의 변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 MP-2 처리에 의한 apoptosis의 유발에 있어서 Bcl-2 family 단백질의 변화가 조사되었지만 IAP family가 관여하지 않는다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3B).

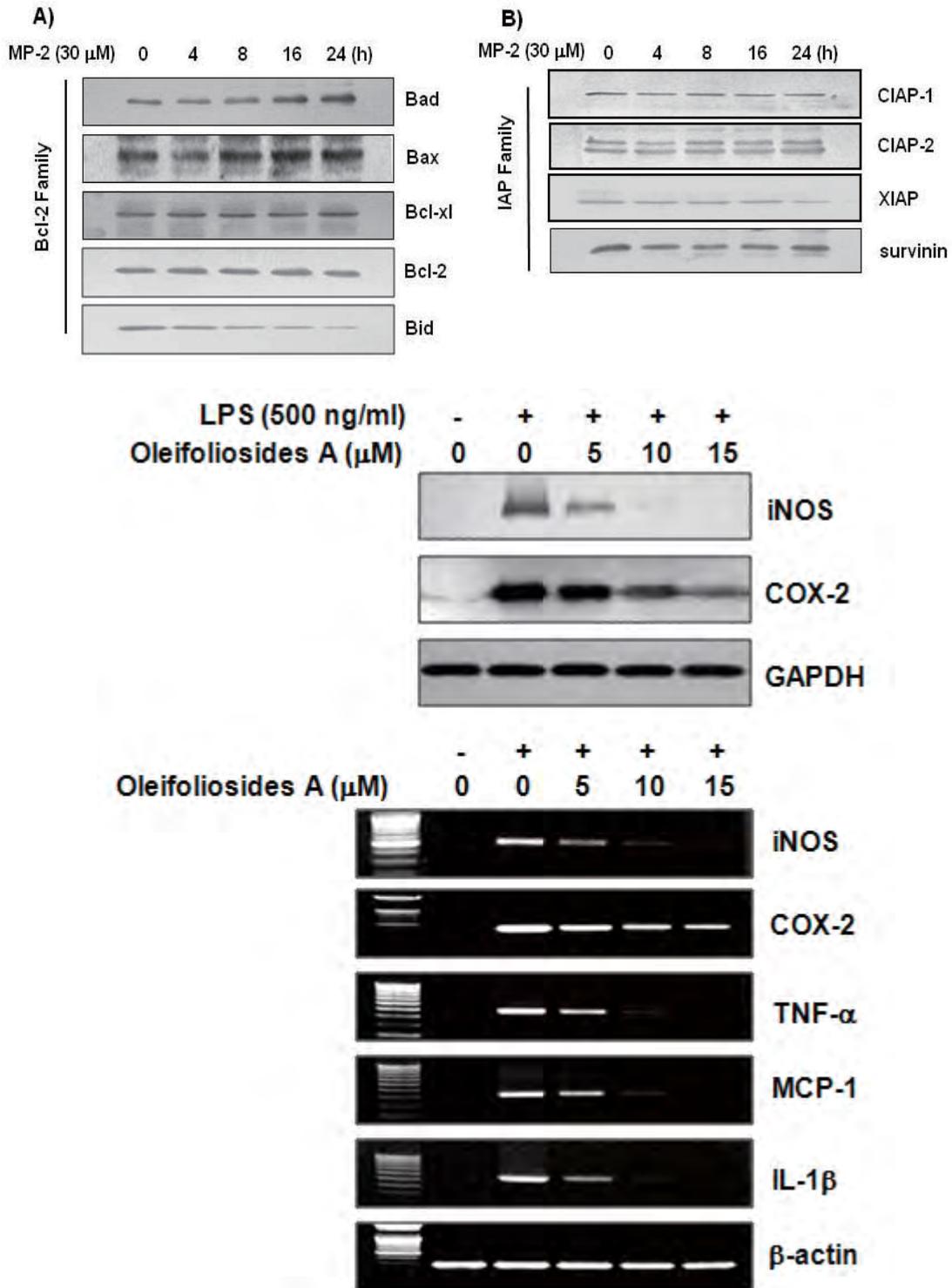


Fig. 3.

(라) Mitochondrial membrane potential (MMP) 에 미치는 MP-2의 영향

MMP의 변화는 apoptosis의 시작과 활성화에 관련이 있다. Apoptosis 유도 단백질 (pro-apoptotic protein)과 apoptosis 억제 단백질(anti-apoptotic protein)의 두 구성성분들은 평소 세포 내에서 일정하게 균형을 유지하고 있으나 어떤 자극으로 인해 불균형이 유발됨으로써 세포를 apoptosis 기전으로 유도시킨다. 또한, Bax나 Bak 등은 막이 붕괴된 미토콘드리아 내부로 유입되어 cytochrome c를 방출하게 되고, 방출된 cytochrome c는 caspase-9을 활성화시키며, 활성화된caspase-9은 caspase-3를 활성화 시키고, caspase-3는 PARP를 분절시킴으로써 apoptosis 신호가 전달되게 된다. 따라서 미토콘드리아 세포막의 파괴 정도를 측정하기 위하여 JC-1 염색법을 이용하여 MP-2에 의한 HeLa 세포의 MMP의 상실정도를 측정하였다 (Fig. 4). Fig. 4A에 나타난 바와 같이 MP-2 처리에 의하여 MMP loss가 현저하게 증가되었으며, 이러한 현상은 시간 의존적으로 진행됨을 알 수 있었다(Fig. 4B).

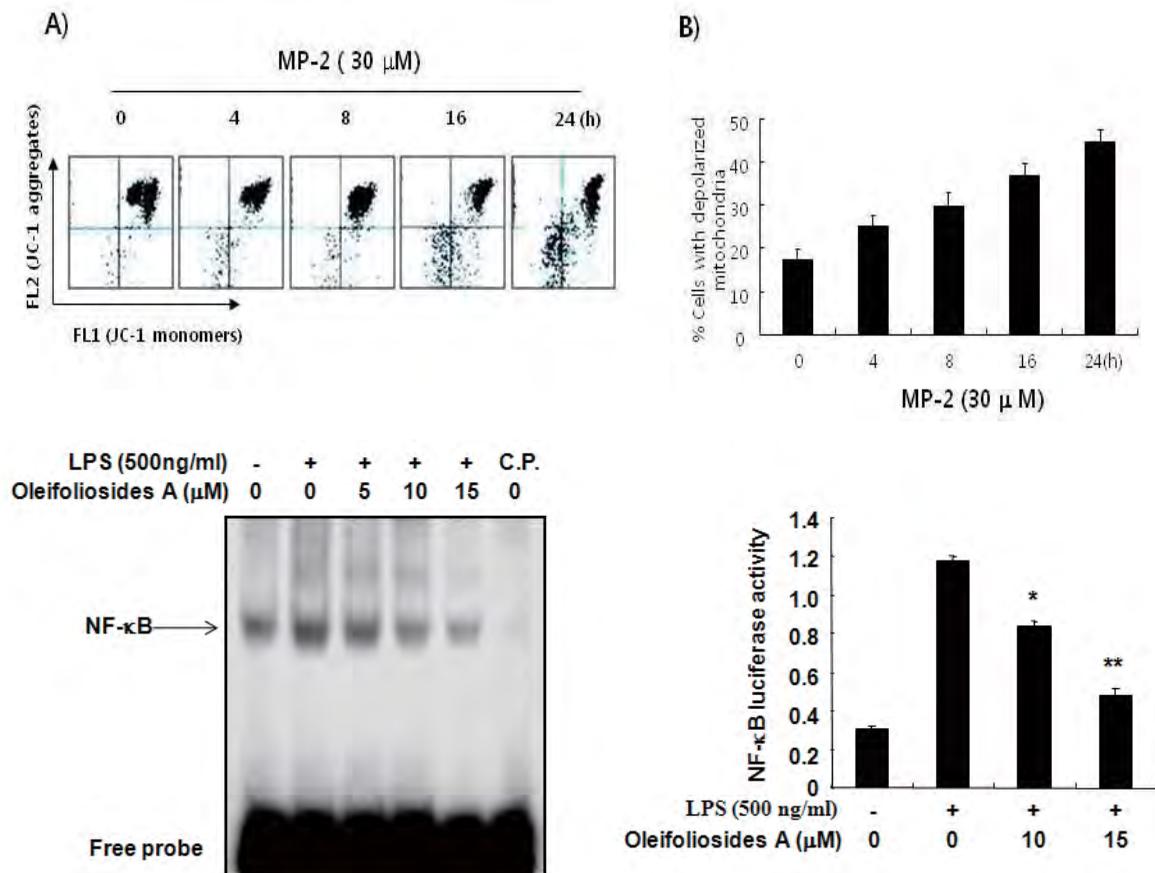
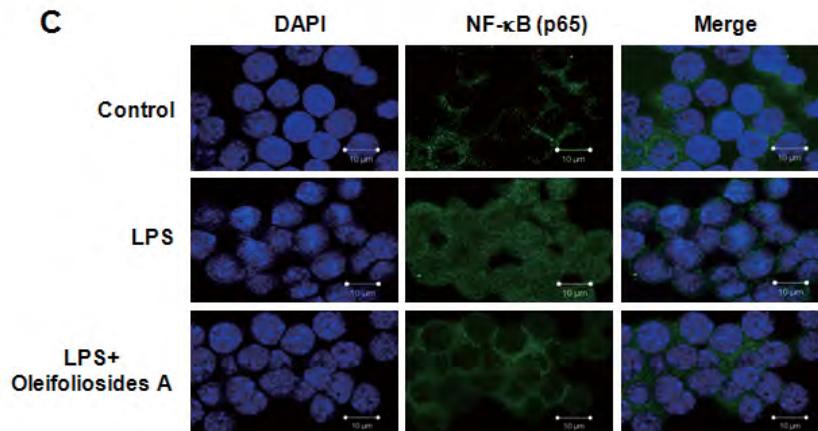
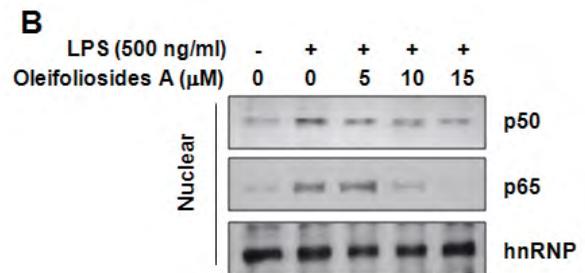
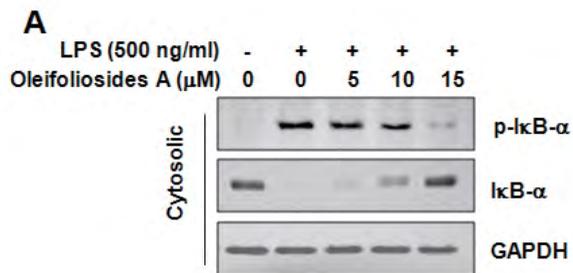
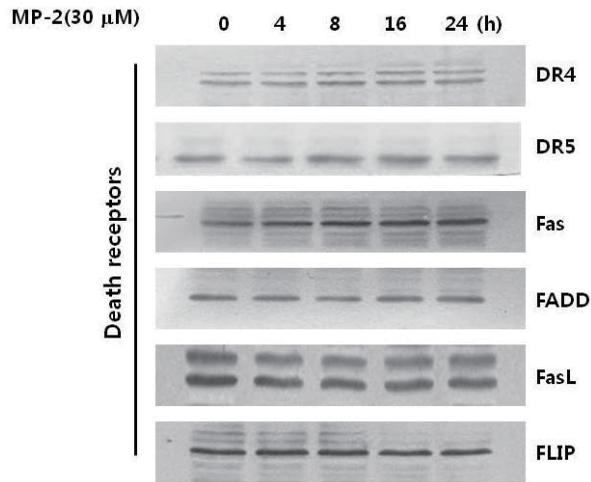


Fig. 4.

(마) Death receptor 관련 단백질의 발현에 미치는 MP-2의 영향

Apoptosis 유발은 intrinsic pathway 및 extrinsic pathway의 두 가지 중요한 apoptotic pathway에 의하여 유발되는데, extrinsic pathway의 경우는 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 또는 Fas ligand (FasL)와 같은 death receptor들에 의하여 조절된다. 따라서 MP-2에 의한 apoptosis 유발에 death receptor들이 관여하는지를 확인 해 본 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 HeLa 세포에서 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 그러므로 MP-2에 의한 apoptosis 유발은 extrinsic pathway와는 관련이 없는 것으로 생각된다.



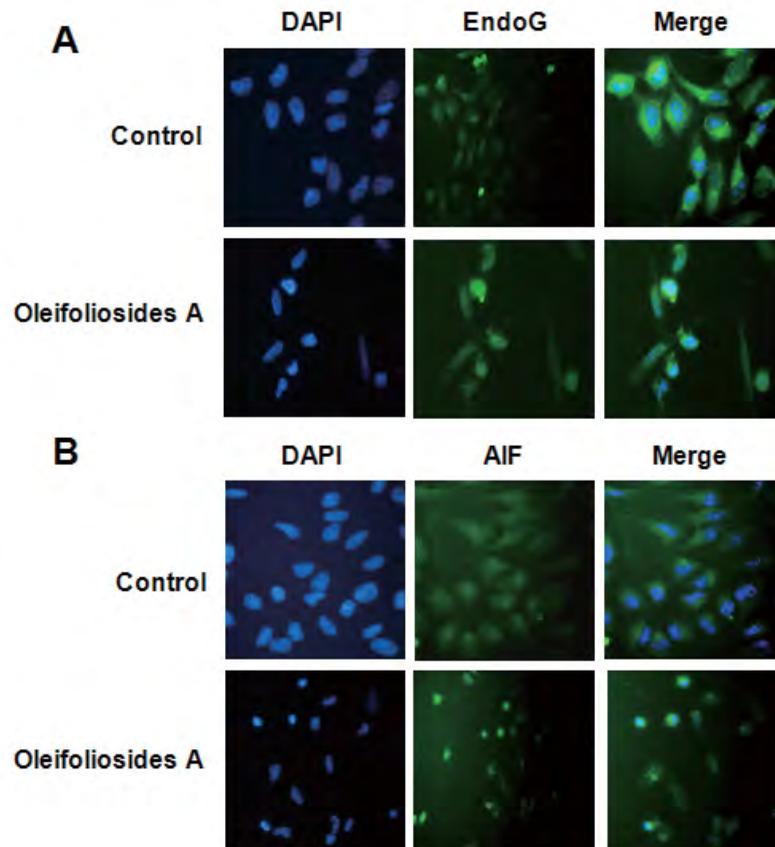


Fig. 15.

이상의 결과에서 MP-2는 apoptosis의 주요한 인자인 Bcl-2 family 단백질 발현 변화에 의한 미토콘드리아의 막 전위의 변화 유도 및 caspase-3 활성 증가 및 PARP의 분절을 통해 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

2. 섬유소 분해효소 활용을 위한 기능성 생물고분자 및 섬유소 분해효소 생산공정 최적화

(제 3 세부 : 동아대학교, 이진우)

가. 생물고분자 풀루란의 생산공정 최적화

(1) 플라스크 규모에서의 생산조건 최적화

(가) At-a-time-at-one-factor 방법을 사용한 배지 조성 최적화

풀루란 생산 균주인 *A. pullulan* HP-2001을 사용하여 탄소원으로 사용된 포도당의 농도를 최적화하였다. 사용한 포도당의 농도는 0.0 ~ 300.0 g/L이었으며, 배양시간은 120 시간이었다. 표 1과 같이 포도당의 농도가 증가할수록 균체의 증식 및 풀루란의 생산량은 증가하였다. 포도당에서 풀루란으로의 변화율은 포도당의 농도가 50.0 g/L 일 때 가장 높았다. 이는 포도당의 농도가 증가함에 따라 대사작용을 억제하는 catabolite repression 현상에 의한 것으로 판단된다.

Table 1. Effect of glucose on cell growth and production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001¹⁾

Glucose (g/L)	Final pH	DCW (g/L)	Pullulan (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Yield		
					$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
0.0	7.51	0.63	0.14	0.12	-	-	0.22
25.0	6.22	5.19	5.76	2.24	0.23	0.21	1.11
50.0	4.82	12.15	15.56	5.76	0.31	0.24	1.29
100.0	4.07	13.12	20.12	25.87	0.21	0.13	1.53
150.0	3.96	14.23	20.84	51.55	0.14	0.09	1.46
200.0	4.35	16.05	19.19	86.65	0.10	0.08	1.20
300.0	4.40	15.53	16.21	125.19	0.05	0.05	1.04

질소원으로 사용한 yeast extract의 농도를 최적화하기 위하여 풀루란의 생산을 위한 배지의 포도당 농도를 50.0 g/L로 하고, 질소원인 yeast extract의 농도를 0.0 ~ 20.0 g/L로 하여 배양하였다. 표 2와 같이 yeast extract의 농도가 증가할수록 균체의 생육이 증가되었으며 풀루란의 생산도 향상되었으나 풀루란의 변환율이 가장 높은 yeast의 농도는 2.5 g/L이었다. 또한 균체의 증식 수율이 가장 높은 yeast extract의 농도는 7.5 g/L이었다. 탄소원으로 사용된 포도당과 다르게 균체의 증식에 최적인 yeast extract의 농도는 풀루란의 생산에 최적인 yeast extract의 농도와 일치하지 않음을 확인하였다. 풀루란의 생산에 최적인 농도의 포도당과 yeast extract를 사용하여 생산한 풀루란의 생산은 18.42 g/L이며 기질에 대한 수율은 0.37이었다.

배지의 초기 pH를 최적화하기 위하여 배지의 pH를 5.0 ~ 8.5로 제조하고 풀루란 생산 균주를 접종하고 3일간 배양하였다. 탄소원과 질소원을 각각 50.0 g/L 포도당 및 2.5 g/L로 하였으며 30°C에서 배양하였다. 배지의 초기 pH에 따라 균체 증식 및 풀루란 생산량은 차이가 있었다. 균체의 증식에 최적인 배지의 초기 pH는 7.5이었으나, 풀루란의 생산에 최적인 pH는 6.0이었다. 풀루란의 생산에 최적인 배지의 초기 pH로 배양할 경우에 기질의 변화율이 가장 높았다.

Table 2. Effect of yeast extract on cell growth and production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001

Yeast extract (g/L)	Final pH	DCW (g/L)	Pullulan (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Yield		
					$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
0.0	3.62	5.74	2.98	36.30	0.06	0.11	0.52
1.0	3.64	11.21	11.33	8.14	0.23	0.22	1.01
2.5	4.33	12.45	18.42	0.26	0.37	0.25	1.48
5.0	5.63	13.58	9.22	0.24	0.18	0.27	0.68
7.5	5.88	14.39	6.05	0.44	0.12	0.29	0.42
10.0	6.11	12.75	3.69	0.47	0.08	0.26	0.29
15.0	6.31	7.51	3.55	1.87	0.07	0.15	0.47
20.0	7.59	3.52	2.12	5.67	0.04	0.07	0.60

Table 3. Effect of initial pH of medium on cell growth and production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001

Initial pH	Final pH	DCW (g/L)	Pullulan (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Yield		
					$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
5.00	2.89	10.69	16.73	4.34	0.33	0.22	1.57
5.50	3.01	11.89	17.50	1.05	0.35	0.24	1.47
6.00	3.47	11.92	20.58	0.16	0.41	0.24	1.72
6.50	4.50	11.96	17.44	0.19	0.35	0.24	1.46
7.00	4.43	13.00	13.90	0.26	0.28	0.26	1.07
7.50	5.05	13.30	12.66	0.28	0.25	0.27	0.95
8.00	6.05	11.40	12.69	0.25	0.25	0.23	1.11
8.50	6.12	11.77	11.84	0.30	0.24	0.24	1.01

(2) Orthogonal array method를 사용한 배지 조성 최적화

(가) 포도당, yeast extract 및 배지의 초기 pH 최적화

포도당, yeast extract 및 배지의 초기 pH가 균체의 증식 및 풀루란의 생산에 미치는 복합적인 영향을 확인하기 위하여 orthogonal array method를 사용하여 실험하였다. 풀루란 생산의 최적인 포도당, yeast extract 및 배지의 초기 pH를 확립하였다. 실험의 계획 및 결과 분석은 Qualitek-4 (W32b version) software를 사용하였다. 포도당의 농도는 각각 25, 50, 75 및 100 g/L, yeast extract의 농도는 1.0, 2.5, 5.0 및 7.5 g/L이었으며 배지의 초기 pH는 5.5, 6.0, 6.5 및 7.0이었다. Orthogonal array method에 의하여 16가지 서로 다른 조건으로 배양하였다. 표 4와 같이 3일간 배양한 후에 측정된 균체의 건조중량은 9.13 ~ 12.23 g/L이었으며 풀루란의 생산량은 7.10 ~ 12.17 g/L이었다.

Table 4. Simultaneous effect of glucose, yeast extract, and initial pH of the medium on cell growth and the production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 designed using Qualitek-4(W32b) software based on $L_{16}(4^3)$ orthogonal array experiment

Run	Glucose (g/L)	Yeast extract (g/L)	Initial pH	DCW (g/L)	Pullulan (g/L)
1	25	1.0	5.5	9.13	8.70
2	25	2.5	6.0	9.90	10.10
3	25	5.0	6.5	10.10	8.73
4	25	10.0	7.0	10.26	7.10
5	50	1.0	6.0	9.87	8.83
6	50	2.5	5.5	10.30	11.60
7	50	5.0	7.0	10.43	10.13
8	50	10.0	6.5	11.07	8.97
9	75	1.0	6.5	9.83	10.67
10	75	2.5	7.0	10.20	11.70
11	75	5.0	5.5	11.67	11.50
12	75	10.0	6.0	12.23	10.23
13	100	1.0	7.0	9.63	10.67
14	100	2.5	6.5	10.47	12.17
15	100	5.0	6.0	11.87	11.87
16	100	10.0	5.5	12.10	10.33

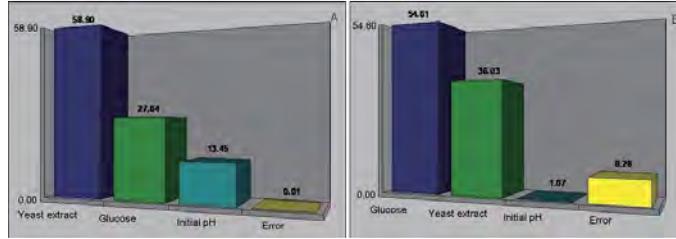


Fig. 1. The percentage contributions of glucose, yeast extract, and initial pH for cell growth (A) and the production of pullulans by *A. pullulans* HP-2001 (B) analyzed using Qualitek-4 (W32b) software. X-axis shows factors and Y-axis shows percentage contributions of each factor.

포도당, yeast extract 및 배지의 초기 pH가 균체의 증식에 미치는 영향은 표 5와 같이 ANOVA (analysis of variance)의 결과로 알 수 있었다. 결과 분석에 사용한 software의 계산에 의하면, 균체의 증식에 가장 많은 영향을 미치는 인자는 yeast extract이었으며 상대적인 비율은 58.90%이었다. 그림 1과 같이 포도당 및 배지의 초기 pH가 미치는 상대적인 비율은 각각 27.64 및 13.45%이었다. *A. pullulan* HP-2001 균주의 풀루란 생산에 미치는 포도당, yeast extract 및 배지의 초기 pH의 상대적인 비율은 각각 54.61, 36.03 및 1.07%이었다. 균체의 증식에 미치는 배지의 초기 pH 영향에 비하여 풀루란의 생산에 미치는 영향은 매우 미미하였다. 표 6과 같이 균체의 증식에 최적인 포도당, yeast extract 및 배지의 초기 pH는 각각 100.0 g/L, 10.0 g/L 및 6.0이었으며, 풀루란의 생산에 최적인 포도당, yeast extract 및 배지의 초기 pH는 각각 100 g/L, 2.5 g/L 및 5.5 이었다. *A. pullulan* HP-2001의 생육에 최적인 조건은 이 균주가 생산하는 풀루란의 최적 생산 조건과 다르다는 사실을 확인하였다 [2]. 최적의 조건에서 예측되는 균체의 최대 생육은 12.27 g/L이며 풀루란의 최대 생산량은 12.77 g/L이었다.

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) of cell growth and the production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 analyzed using Qualitek-4(W32b) software based on $L_{16}(4^3)$ orthogonal array experiment

	Factor	DOF (f)	Sums of squares (S)	Variance (V)	F-ratio (F)	Pure sum (S')	Percent of participation ($P, \%$)
DCW	Glucose	3	3.67	1.22	46717.48	3.66	27.64
	Yeast extract	3	7.80	2.60	99521.13	7.80	58.90
	Initial pH	3	1.78	0.59	22729.05	1.78	13.45
	Other/error	6	0.00	0.00	-	-	0.01
	Total	15	13.25	-	-	-	100.00
Pullulan	Glucose	3	17.14	5.71	33.97	16.63	54.61
	Yeast extract	3	11.48	3.83	22.75	10.97	36.03
	Initial pH	3	0.83	0.28	1.65	0.33	1.07
	Other/error	6	1.01	0.17	-	-	8.28
	Total	15	30.45	-	-	-	100.00

(나) 배지의 무기염 농도 최적화

배지의 염성분인 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 $(NH_4)_2SO_4$ 들의 복합적인 영향을 확인하기 위하여 orthogonal array method를 사용하여 실험하였다. 각 염들의 농도를 4가지로 하여 4가지의 염들의 영향을 동시에 확인하기 위하여 전통적인 방법으로 실험을 한다면 $4 \times 4 \times 4 \times 4 = 4^4 = 256$, 즉 256가지의 서로 다른 조건의 배지를 제조하여 동시에 실험을 하여야 한다. 같은 결과를 얻기 위하여 $L_{16}(4^4)$ orthogonal array method를 사용한다면 16가지의 서로 다른 조건의 배지를 조제하여 실험을 하면 된다. 본 실험에서 사용한 software에서 제시한 16가지 조건으로 배양을하고 균체 증식 및 풀루란의 생산을 측정한 결과는 표 7과 같다. 탄소원으로 50.0 g/L 포도당, 2.5 g/L yeast extract 및 초기 배지의 pH를 5.5로 조절하고 각각의 염들의 농도를 달리하여 배양한 결과, 균체 증식은 11.89 ~ 12.50 g/L이었으며, 풀루란의 생산량은 9.06 ~ 11.39 g/L이었다.

Table 6. Optimal conditions for cell growth and production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 analyzed using Qualitek-4 (W32b) software based on L₁₆ (4³) orthogonal array experiment

Factor	DCW			Pullulan		
	Optimized condition	Level	Contribution	Optimized condition	Level	Contribution
Glucose	100.0 g/L	4	0.45	100.0 g/L	4	1.05
Yeast extract	10.0 g/L	4	0.85	2.5 g/L	2	1.19
Initial pH	6.0	2	0.40	5.5	1	0.33
Total contribution	-	-	1.70	-	-	2.56
Current yield	-	-	10.57 g/L	-	-	10.21 g/L
Expected yield	-	-	12.27 g/L	-	-	12.77 g/L

Table 7. Simultaneous effect of mineral salts in the medium on cell growth and the production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 designed using Qualitek-4 (W32b) software based on L₁₆(4⁴) orthogonal array experiment

Run	K ₂ HPO ₄ (g/L)	NaCl (g/L)	MgSO ₄ •7H ₂ O (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	DCW (g/L)	Pullulan (g/L)
1	1.0	0.10	0.1	0.15	11.90	9.06
2	1.0	0.25	0.2	0.30	11.89	10.28
3	1.0	0.50	0.4	0.60	11.94	9.69
4	1.0	1.00	0.8	1.20	12.22	9.57
5	2.5	0.10	0.2	0.60	12.03	10.01
6	2.5	0.25	0.1	1.20	12.29	10.64
7	2.5	0.50	0.8	0.15	12.02	11.04
8	2.5	1.00	0.4	0.30	12.11	11.39
9	5.0	0.10	0.4	1.20	12.33	9.91
10	5.0	0.25	0.8	0.60	12.14	10.84
11	5.0	0.50	0.1	0.30	12.20	11.28
12	5.0	1.00	0.2	0.15	12.23	10.87
13	7.5	0.10	0.8	0.30	12.19	10.26
14	7.5	0.25	0.4	0.15	12.20	10.60
15	7.5	0.50	0.2	1.20	12.50	10.17
16	7.5	1.00	0.1	0.60	12.40	10.23

K₂HPO₄, NaCl, MgSO₄•7H₂O 및 (NH₄)₂SO₄ 등과 같은 배지의 염들이 균체의 증식에 미치는 영향은 표 8과 같이 ANOVA (analysis of variance)의 결과로 알 수 있었다. 결과 분석에 사용한 software의 계산에 의하면, 균체의 증식에 가장 많은 영향을 미치는 인자는 상대적인 영향 비율 54.43%인 K₂HPO₄ 이었으며, (NH₄)₂SO₄, NaCl 및 MgSO₄•7H₂O 각 각각 35.49,

8.30 및 1.67%의 상대적인 영향 비율을 나타냈다. *A. pullulans* HP-2001 균주의 풀루란 생산에 가장 높은 영향을 미치는 염은 K_2HPO_4 이었으며 이 염의 상대적인 영향 비율은 52.48%이었다. 그다음으로 NaCl 및 $(NH_4)_2SO_4$ 이었으며 각각 26.88 및 19.99%의 상대적인 영향 비율을 나타냈다. 풀루란의 생산에 미치는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 영향은 매우 미미하였다.

표 9와 같이 균체의 증식에 최적인 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 $(NH_4)_2SO_4$ 등과 같은 배지의 염들의 농도는 각각 7.5, 1.00, 0.1 및 1.20 g/L이었으며, 풀루란 생산에 최적인 염들의 농도는 각각 2.5, 0.25, 0.8 g/L이었다. 균체 증식에 최적인 포도당과 yeast extract 농도 및 배지의 초기 pH가 풀루란 생산에 최적인 조건과 다른 것과 같이 균체의 증식에 최적인 염들의 농도는 풀루란 생산에 최적인 염들의 농도와 다르다는 사실을 확인하였다.

Table 8. Analysis of variance (ANOVA) for cell growth and the production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 analyzed using Qualitek-4 (W32b) software based on $L_{16}(4^4)$ orthogonal array experiment

	Factor	DOF (<i>f</i>)	Sums of squares (<i>S</i>)	Variance (<i>V</i>)	F-ratio (<i>F</i>)	Pure sum (<i>S'</i>)	Percent of participation (<i>P</i> ,%)
DCW	K_2HPO_4	3	0.25	0.08	2506.58	0.25	54.43
	NaCl	3	0.04	0.01	383.15	0.04	8.30
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3	0.01	0.00	77.65	0.01	1.67
	$(NH_4)_2SO_4$	3	0.16	0.05	1634.58	0.16	35.49
	Other/error	3	0.00	0.00	-	-	0.11
	Total	15	0.46	-	-	-	100.00
Pullulan	K_2HPO_4	3	3.23	1.08	32294.02	3.23	52.48
	NaCl	3	1.65	0.55	16541.23	1.65	26.88
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3	0.04	0.01	397.00	0.04	0.64
	$(NH_4)_2SO_4$	3	1.23	0.41	12298.98	1.23	19.99
	Other/error	3	0.00	0.00	-	-	0.01
	Total	15	6.15	-	-	-	100.00

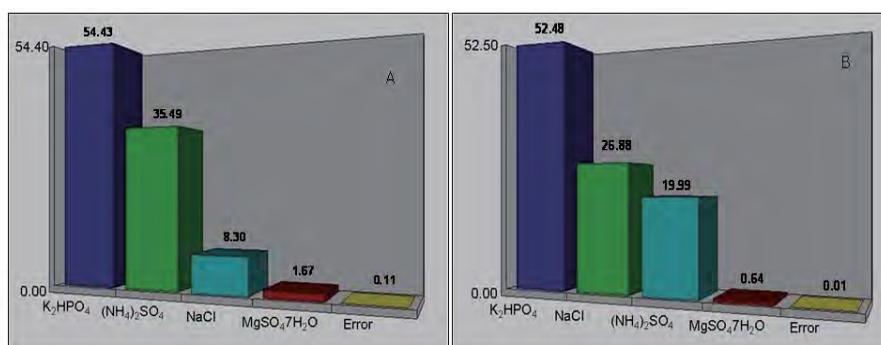


Fig. 2. The percentage contributions of salts in the medium for cell growth (A) and the production of pullulans by *A. pullulans* HP-2001 (B) analyzed using Qualitek-4 (W32b) software.

Table 9. Optimal conditions for cell growth and production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 analyzed using Qualitek-4 (W32b) software based on L₁₆(4⁴) orthogonal array experiment

Factor	DCW			Pullulan		
	Optimized condition	Level	Contribution	Optimized condition	Level	Contribution
K ₂ HPO ₄	7.5 g/L	4	0.16	2.5 g/L	2	0.41
NaCl	1.00 g/L	4	0.08	0.25 g/L	2	0.23
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.1 g/L	1	0.04	0.8 g/L	4	0.07
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.20 g/L	4	0.17	0.30 g/L	2	0.44
Total contribution	-	-	0.45	-	-	1.13
Current yield	-	-	12.16 g/L	-	-	10.36 g/L
Expected yield	-	-	12.61 g/L	-	-	11.49 g/L

(다) 배양온도 최적화

배양 온도가 균체 증식 및 *A. pullulans* HP-2001의 풀루란 생산에 미치는 영향을 확인하였다. 배양 온도의 범위는 20 ~40°C이었으며, 포도당, yeast extract, 배지의 초기 pH 및 염들의 농도는 본 연구에서 최적화된 조건으로 수행하였다. 표 10과 같이 균체의 증식에 최적인 온도는 30°C이었으며, 풀루란의 생산에 최적인 온도는 25°C로 균체의 증식에 최적인 온도는 풀루란의 생산에 최적인 온도와 다르다는 사실을 확인하였다.

탄소원으로 50.0 g/l의 포도당을 사용하였을 경우, 25°C에서 배양하였을 때의 균체 및 풀루란의 변환율은 각각 0.21 및 0.40이었으나, 30°C에서 배양하였을 때에는 각각 0.25 및 0.35이었다. 즉, 25°C에서 배양하였을 경우의 탄소 이용율이 30°C에서 배양하였을 경우에 비하여 다소 높음을 알 수 있었으며, 각각 배양한 후에 배지에 존재하는 환원당의 농도도 25°C일 경우에 다소 낮음을 알 수 있었다.

Table 10. Effect of culture temperature on cell growth and production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001¹⁾

Temperature (°C)	Final pH	DCW (g/L)	Pullulan (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Yield		
					Y _{p/s}	Y _{x/s}	Y _{p/x}
20	3.31	10.15	17.75	0.46	0.36	0.20	1.75
25	3.57	10.57	19.94	0.53	0.40	0.21	1.89
30	3.61	12.54	17.70	3.83	0.35	0.25	1.41
35	4.21	10.13	1.65	4.63	0.03	0.20	0.16
40	6.28	2.26	0.53	45.83	0.01	0.05	0.23

1) Concentrations of glucose and yeast extract as carbon and nitrogen sources were 5.0 (w/v) and 0.25% (w/v), respectively. Initial pH of medium was 6.0.

(2) 생물배양기 규모에서의 생산조건 최적화

(가) 교반속도의 최적화

생물배양기의 교반속도와 통기량이 균체의 증식 및 *A. pullulans* HP-2001의 풀루란 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 7 L 생물배양기의 교반속도는 각각 300, 400, 500 및 600 rpm이었으며, 통기량은 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 vvm이었다. 7 L 생물배양기의 배양조건은 플라스크 규모에서 최적화한 조건으로 50.0 g/L 포도당, 2.5 g/L yeast extract, 초기 배지의 pH 6.0 및 배양온도 25°C이었다. 그림 3과 같이 교반속도가 증가할수록 균체 및 풀루란의 생산성이 향상되었다. 균체증식에 최적인 교반속도는 600 rpm이었으나, 풀루란의 생산에 최적인 교반속도는 500 rpm이었다. *A. pullulans* HP-2001 균주가 생산하는 풀루란의 생산성은 통기량 1.0 vvm일 경우에 교반속도에 따라 차이가 있으며, 교반속도가 각각 300, 400, 500 및 600 rpm일때, 16.51, 17.12, 17.73 및 16.84 g/L이었다.

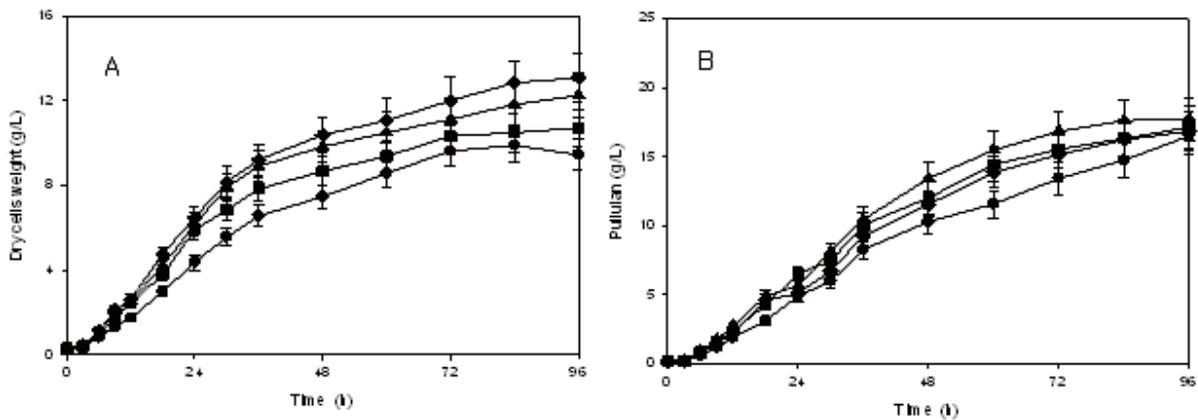


Fig. 3. Effect of agitation speed on cell growth (A) and the production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 in the culture medium in a 7 L bioreactor(●, 300 rpm; ■, 400 rpm; ▲, 500 rpm and ◆, 600 rpm).

(나) 통기량의 최적화

그림 4와 같이 교반속도를 풀루란의 생산에 최적인 500 rpm으로 고정하고, 통기량을 증가할수록 균체 및 풀루란의 생산성은 향상되었다. 균체증식에 최적인 통기량은 2.0 vvm이었으나, *A. pullulans* HP-2001 균주가 생산하는 풀루란의 생산에 최적인 통기량은 1.0 vvm이었다. 교반속도를 500 rpm으로 고정하고 통기량은 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 vvm일 경우에 풀루란의 생산성은 통기량에 따라 차이가 있었으며, 통기량이 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 vvm이었을 때, 생산성은 각각 16.05, 18.13, 17.61 및 14.43 g/L이었다. 따라서 풀루란 생산에 최적인 교반속도와 통기량은 500 rpm에서 1.0 vvm으로 판단되었다.

(3) 파이롯트 (pilot) 규모에서의 생산조건 최적화

생물배양기의 내압이 균체증식 및 풀루란 생산에 미치는 영향을 확인하였다. 그림 5와 같이 100 L 생물배양기의 내압을 각각 0.0, 0.2, 0.4, 0.6 및 0.8 kgf/cm²로 유지하면서 균체의 증식 및 풀루란의 생산성을 측정하였다. 표 11과 같이 균체의 최적인 내압은 0.0 kgf/cm²이었으나, 풀루란 생산에 최적인 내압은 0.4 kgf/cm²이었다. 최적 조건의 내압에서 풀루란의 생산성은

1.38배 향상되었다.

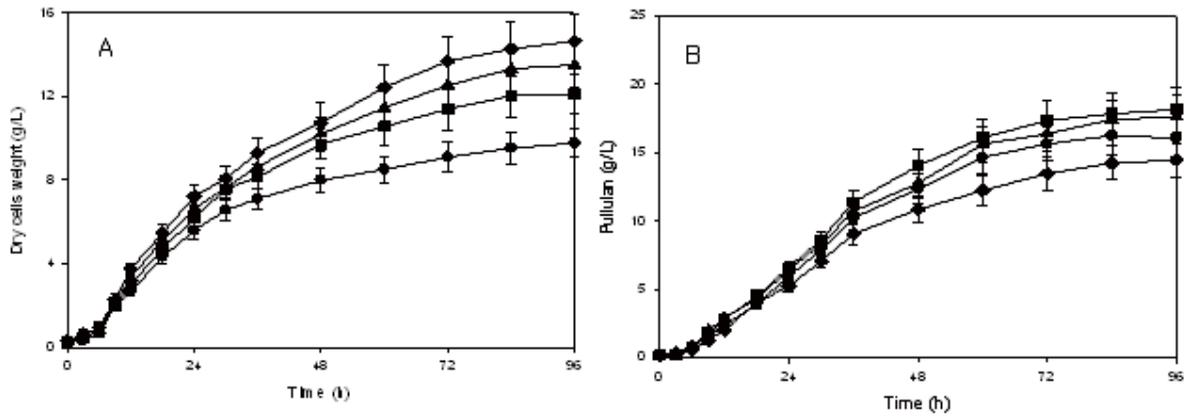


Fig. 4. Effect of aeration rate on cell growth (A) and the production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 (B) in a 7 L bioreactor (●, 0.5 vvm; ■, 1.0 vvm; ▲, 1.5 vvm and ◆, 2.0 vvm).

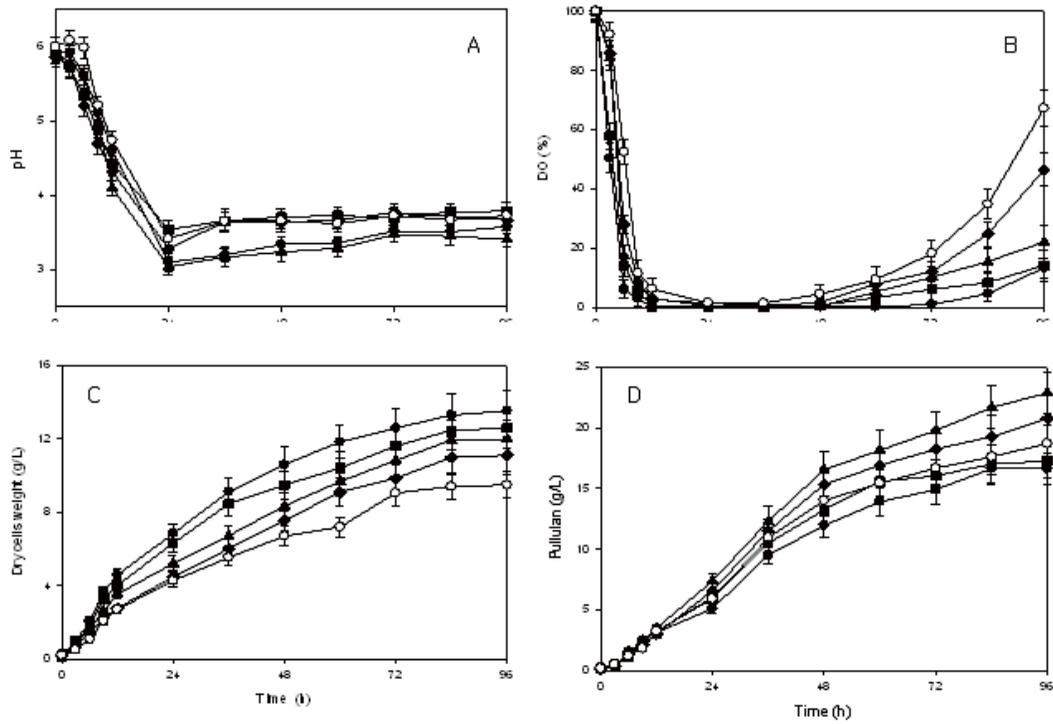


Fig. 5. Effect of the inner pressure on the pH of medium (A), dissolved oxygen (B), cell growth (C), the production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 and (D) in a 100L bioreactor (●, 0.0 kgf/cm²; ■, 0.2 kgf/cm²; ▲, 0.4 kgf/cm²; ◆, 0.6 kgf/cm² and ○, 0.8 kgf/cm²).

Table 11. Effect of inner pressure on cell growth and production of pullulan by *A. pullulans* HP-2001 in a 100L bioreactor

Inner pressure (Kgf/cm ²)	Final pH	DCW (g/L)	Pullulan (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Yield		
					Y _{x/s}	Y _{p/s}	Y _{p/x}
0.0	3.58	13.54 ± 1.12 ^{a*}	16.63 ± 1.24 ^c	2.33 ± 0.41 ^{b*}	0.27	0.33	1.25
0.2	3.79	12.60 ± 1.06 ^{ab*}	17.78 ± 1.46 ^c	3.86 ± 0.62 ^{a*}	0.25	0.36	1.41
0.4	3.41	12.00 ± 1.07 ^{ab*}	22.89 ± 1.68 ^{a*}	1.13 ± 0.43 ^c	0.24	0.46	1.91
0.6	3.67	11.12 ± 1.04 ^{bc}	20.78 ± 1.83 ^{ab*}	2.93 ± 0.61 ^{ab*}	0.22	0.42	1.87
0.8	3.73	9.50 ± 0.74 ^c	18.71 ± 1.49 ^{bc}	3.50 ± 0.54 ^{a*}	0.19	0.37	1.96

(4) 분리공정 최적화

(가) 균체 제거 조건의 최적화

배양액에서 균체를 제거하고 풀루란의 회수하는 공정의 최적화를 위하여 100 L 배양기를 사용하여 *A. pullulans* HP-2001 균주를 배양하였다. 배양액의 pH는 그림 6과 같이 배양 24시간까지 급격히 낮아졌으며, 용존산소의 농도도 급격히 감소하여 배양 24시간 후의 용존산소 농도는 0%이었다. 이후 용존산소의 농도가 서서히 증가되었으며 풀루란의 생산이 증가하였다. 100 L 배양기에서 96시간 배양한 후에 균체의 농도는 13.4 g/L 이었으며, 풀루란의 생산성은 17.5 g/L 이었다. 탄소원으로 사용한 50.0 g/L 포도당의 35.0%가 풀루란으로 변환되었다.

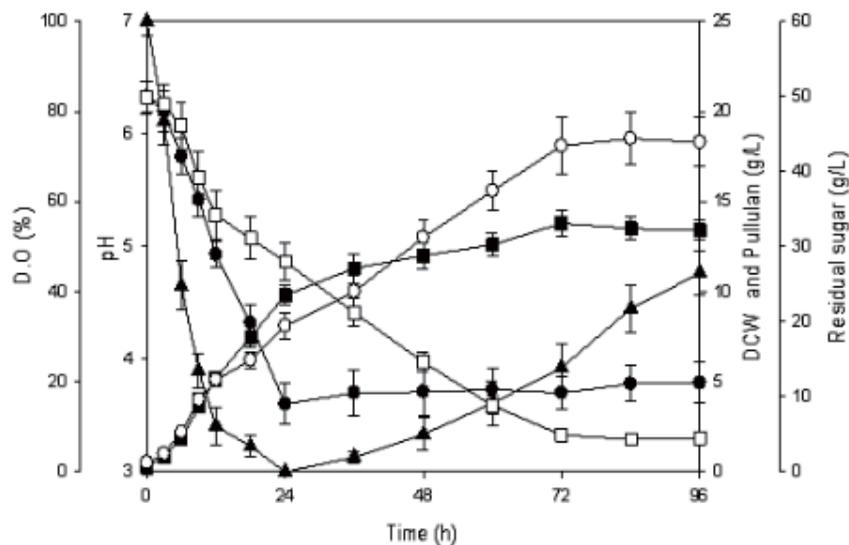


Fig. 6. Cell growth and the production of pullulan by *A. pullulans* HS-2001 in a 100L bioreactor (●, pH; ■, dry cells weight; ▲, dissolved oxygen; ○, pullulan; and □, residual sugars).

배양액에서 균체를 제거하는 방법으로 필터프레스를 사용하는 방법과 연속원심분리기를 사용하는 방법에 대하여 각각의 최적 조건을 확립하였다. 본 연구에 사용한 필터프레스는 2개의 chamber가 있는 필터프레스이며 각 chamber의 면적 및 부피는 0.11 m² 및 1.7 L이었다. 배양액 10 L에 첨가하는 규조토의 양을 0.0%에서 2.0%로 하여 균체 제거율 등을 측정하였다. 그림 7과 같이 배양액에 첨가하는 규조토의 양을 증가할수록 균체의 제거율이 증가하였으나, 균체를 제거한 상등액의 부피가 감소함으로써 풀루란의 회수율은 감소하였다. 배양액에 첨가하는 규조토의 농도가 2.5%일 때, 풀루란의 회수율이 가장 높았으며 이때의 회수율은 94.4% 이었다.

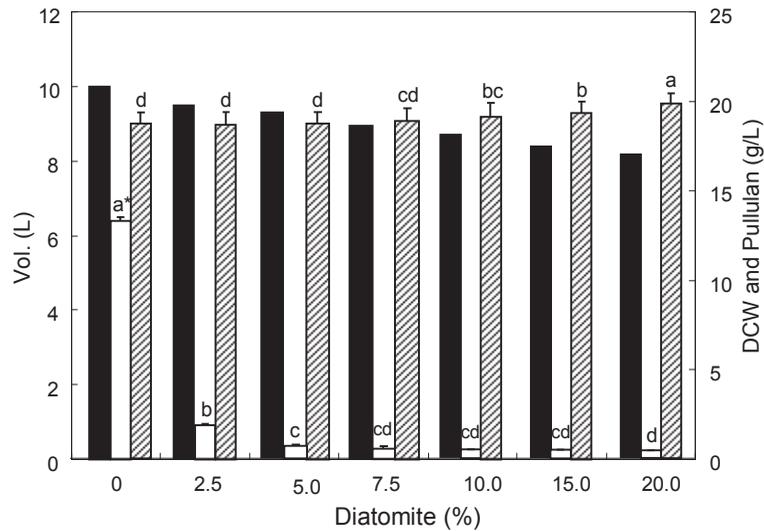


Fig. 7. Effect of diatomite in a filter press on removal of cells and recovery of pullulan from the culture broth of *A. pullulans* HP-2001 (■, volume of culture broth after filtration; □, dry cells weight; and ▨, pullulan). Different letters above bars mean that each value with a different letter is significantly different at $p < 0.05$.

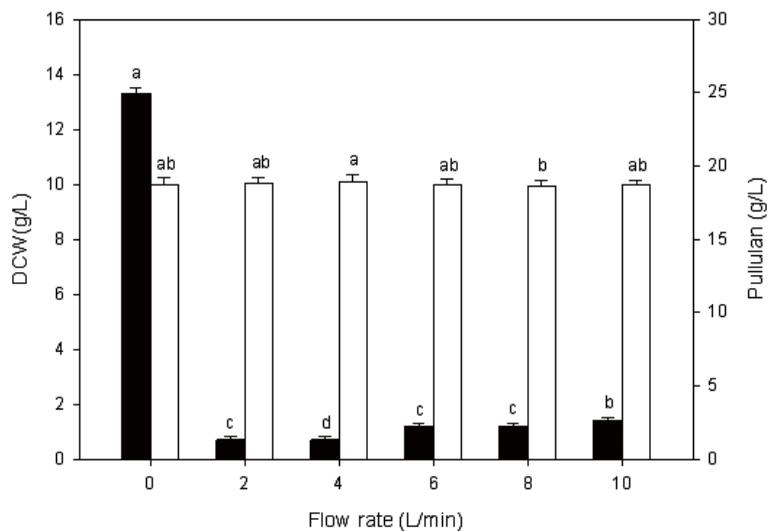


Fig. 8. Effect of flow rate in a continuous flow centrifuge on removal of cells and recovery of pullulan from the culture broth of *A. pullulans* HP-2001 (■, dry cells weight and □, pullulan).

연속원심분리기에 삽입하는 배양액의 속도가 균체제거 및 풀루란의 회수에 미치는 영향을 검토하였다. 사용한 연속원심분리기 내부에서 회전하는 bowl의 부피는 9.0 L 이었으며, 지름은 12.2 cm이었으며 회전속도는 12,000 rpm이었다. 연속원심분리기에 삽입되는 배양액의 유입속도는 0 ~ 100 L/h이었다. 그림 8과 같이 유입속도가 2.0 L/h에서 가장 높은 회수율을 나타냈으며, 이때의 회수율은 95.0%이었다. 연속원심분리기는 생물학적 제품의 회수에 가장 많이 사용되고 있으며 분리하고자 하는 물질의 크기 및 분자량에 따라 회수율에 차이가 있다.

(나) 에탄올을 사용한 풀루란의 농축 조건의 최적화

균체가 제거된 상등액에 유기용매인 에탄올 또는 아이소프로필 알코올을 처리하여 풀루란을 침전시키는 방법으로 풀루란을 농축하였다. 실험방법은 response surface method를 이용하였으며, 유기용매의 첨가량, 반응온도 및 반응시간을 변수로 하여 실험하였다. 실험 계획 및 결과의 분석은 Design-Expert software를 사용하였다. 표 12와 같이 유기용매로 에탄올을 사용하여 20 가지의 서로 다른 조건으로 처리하여 얻은 풀루란의 침전량은 14.03 ~ 15.23 g/L 이었으며 아이소프로필 알코올을 사용하여 얻은 풀루란의 침전량은 15.37 ~ 16.33 g/L 이었다.

Table 12. Central composite design and determined response values (Y_1 and Y_2 were obtained using ethanol or isopropanol for recovery of pullulan by precipitation, respectively)

Run	X_1	X_2	X_3	Y_1 (g/L)	Y_2 (g/L)
1	3.0:1.0	18	24	14.97	15.97
2	3.0:1.0	30	30	15.17	16.27
3	2.0:1.0	18	30	14.73	15.93
4	3.0:1.0	30	18	15.23	16.33
5	1.0:1.0	18	18	14.20	15.50
6	1.0:1.0	30	30	14.27	15.50
7	1.0:1.0	6	18	14.10	15.43
8	2.0:1.0	6	18	14.70	15.93
9	2.0:1.0	18	30	14.73	15.93
10	1.0:1.0	30	18	14.33	15.56
11	1.0:1.0	6	30	14.03	15.37
12	2.0:1.0	30	18	14.93	16.07
13	3.0:1.0	30	30	15.17	16.27
14	3.0:1.0	6	30	14.93	16.13
15	1.5:1.0	24	24	14.33	15.40
16	1.0:1.0	30	30	14.27	15.50
17	3.0:1.0	6	18	15.00	16.20
18	3.0:1.0	6	30	14.93	16.13
19	1.0:1.0	6	30	14.03	15.37
20	2.0:1.0	6	24	14.57	15.63

에탄올을 사용하여 침전시킨 결과를 ANOVA한 결과는 표 13과 같이 유기용매로 사용된 에탄올의 양과 반응시간이 풀루란의 침전에 미치는 영향이 크다는 사실을 알 수 있었다. 에탄올을 사용하여 풀루란을 침전시키는 반응에서 반응온도는 미미한 영향을 미쳤다. 에탄올의 양, 반응시간 및 반응온도를 변수로 하여 얻은 풀루란의 침전에 대한 식은 $Y = 14.62 + 0.46X_1 + 0.11X_2 - 0.03X_3 - 0.14X_1^2 + 0.15X_3^2$ 와 같다. 이 식의 multiple correlation coefficient (R^2)는 0.9958이었다. 이와 같은 식은 에탄올의 양, 반응온도 및 반응시간의 변수에 따라 실험의 결과 값으로 얻어진 위의 식이 정확하다는 것이다. Design-Expert software를 사용하여 얻은 풀루란 침전의 최적 조건은 에탄올과 균체를 제거한 상등액의 비율이 3.0 : 1.0, 반응시간 30시간 및 반응온도 18℃이었다. 이 조건에서 예상되는 풀루란의 침전 농도는 15.24 g/L이며, 이와 같은 결과는 상등액에 존재하는 풀루란의 79.8%가 침전으로 회수한다는 의미이다.

Table 13. Parameter estimates and analysis of variance using ethanol for recovery of pullulan by precipitation

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F-value	Probe>F
Model	9	3.11	0.35	294.98	<0.0001
X ₁	1	2.72	2.72	2325.72	<0.0001
X ₂	1	0.18	0.18	154.94	<0.0001
X ₃	1	0.02	0.02	15.36	0.0029
X ₁ X ₂	1	0.00	0.00	0.03	0.8638
X ₁ X ₃	1	0.00	0.00	0.02	0.8973
X ₂ X ₃	1	0.00	0.00	0.13	0.7214
X ₁ ²	1	0.07	0.07	57.35	<0.0001
X ₂ ²	1	0.00	0.00	1.00	0.3400
X ₃ ²	1	0.04	0.04	35.00	0.0001
Error	5	0.00	0.00	-	-
Total	19	3.12	-	-	-

아이소프로필 알코올을 사용하여 침전시킨 결과를 ANOVA한 결과는 표 14와 같이 유기용매로 사용된 아이소프로필 알코올의 양과 반응시간이 풀루란의 침전에 미치는 영향이 크다는 사실을 알 수 있었다. 아이소프로필 알코올을 사용하여 풀루란을 침전시키는 반응에서 반응온도는 미미한 영향을 미쳤다. 아이소프로필 알코올의 양, 반응시간 및 반응온도를 변수로 하여 얻은 풀루란의 침전에 대한 식은 $Y = 15.66 + 0.39X_1 + 0.062X_2 - 0.033X_3 - 0.11X_1^2 + 0.30X_3^2$ 과 같다. 이 식의 multiple correlation coefficient (R^2)는 0.9937이었으며, 이와 같은 수치가 의미하는 것은 이 식이 변수에 대한 결과를 99.37%까지 설명할 수 있다는 것이다. 이와 같은 식은 아이소프로필 알코올의 양, 반응시간 및 반응온도의 변수에 따라 실험의 결과 값으로 얻어진 위의 식이 정확하다는 것을 의미한다. Design-Expert software를 사용하여 얻은 풀루란 침전의 최적 조건은 아이소프로필 알코올과 균체를 제거한 상등액의 비율이 3.0 : 1.0, 반응시간 30시간 및 반응온도 18℃이었다. 이 조건에서 예상되는 풀루란의 침전 농도는 16.34 g/L이며, 이와 같은 결과는 상등액에 존재하는 풀루란의 85.5%가 침전으로 회수한다는 의미이다.

Table 14. Parameter estimates and analysis of variance using isopropanol for recovery of pullulan by precipitation

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F-value	Probe>F
Model	14	2.26	0.25	332.90	<0.0001
X ₁	1	1.98	1.98	2620.98	<0.0001
X ₂	1	0.06	0.06	75.32	<0.0001
X ₃	1	0.02	0.02	23.09	0.0007
X ₁ X ₂	1	0.00	0.00	0.15	0.7081
X ₁ X ₃	1	0.00	0.00	0.08	0.7844
X ₂ X ₃	1	0.00	0.00	0.02	0.8848
X ₁ ²	1	0.04	0.04	52.94	<0.0001
X ₂ ²	1	0.00	0.00	0.02	0.8957
X ₃ ²	1	0.19	0.19	251.14	<0.0001
Error	5	0.00	0.00	-	-
Total	19	2.27	-	-	-

Response surface method를 사용한 실험에서 얻어진 결과를 Design-Expert software로 분석하여 얻은 3차원 그래프는 그림 9와 같다. 두 가지 변수가 에탄올을 사용한 풀루란의 침전에 미치는 영향을 나타내고 있으며, 상대적인 영향이 클수록 3차원 그래프의 기울기는 가파르다. 풀루란의 침전에 미치는 복합적인 두 가지 변수의 조합- 에탄올의 양과 반응시간, 에탄올의 양과 반응온도 및 반응시간과 반응온도- 중에서 Probe>F 값이 작을수록 풀루란의 침전에 미치는 영향이 크다.

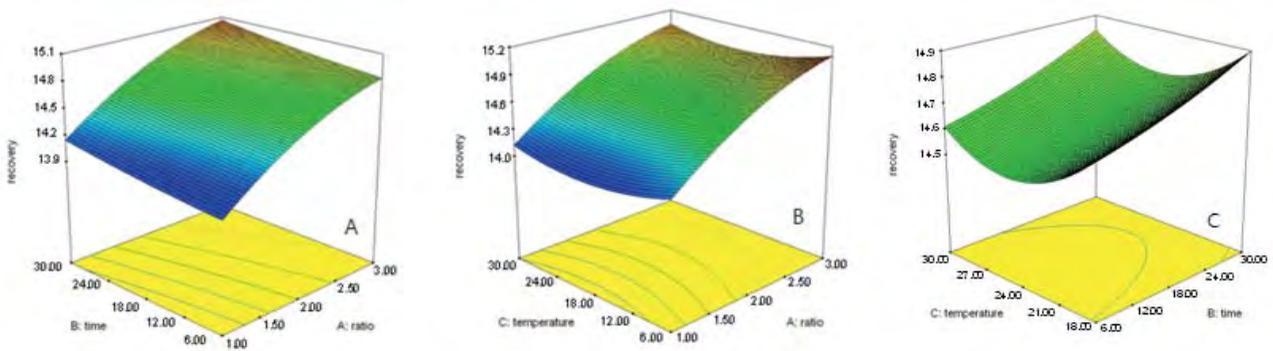


Fig. 9. Three-dimensional contour plots of three factors on recovery of pullulan by ethanol. When the two factors were plotted, the other one factor was set at middle-level values

(다) 농축된 풀루란의 건조 조건 최적화

균체를 제거한 상등액에 에탄올 혹은 아이소프로필 알코올을 처리하여 농축된 풀루란의 건조조건을 검토하였다. 사용한 건조기는 디스크 타입 분무건조기, 노즐 타입 분무건조기, 드럼 건조기, 진공냉동건조기 및 유기용매로 추출한 후의 열풍건조 등을 비교하였다. 표 15와 같이 건조기의 종류에 따라 회수율 및 비용에 차이가 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 분무건조기

가 회수율 및 비용에서 비교적 경제적이었으며, 드럼 건조기의 회수율이 가장 높았으나, 드럼 건조기의 가격이 비교적 비싼 것이 단점으로 나타났다.

Table 15. Effect of drying type on recovery yield and cost

Type	flow rate (L/h)	Temperature (°C)	Recovery (%)	cost (US \$/kg)
Disc type spray dryer	100	120~130	87	10
Nozzle type spray dryer	100	120~130	92	10
Drum dryer	1,000	155 ± 5	96	6~8
Freeze drying	-	-	98	30~40
Solvent extraction	-	-	less than 40	30

(5) 풀루란 생산공정 확립

본 연구를 통하여 확립된 풀루란의 대량 생산공정은 그림 10과 같이 생물배양기를 사용하여 *A. pullulans* HP 2001균주를 배양하고 필터프레스와 연속원심분리기를 사용하여 균체를 제거한 후, 균체가 제거된 상등액을 ultra filtration system을 사용하여 농축한 후에 진공냉동건조하는 것이다. 이를 간단히 정리하면 아래와 같다.

- at-a-time-one-factor 방법에 의한 생산조건의 최적화
- orthogonal array method를 이용한 생산조건의 최적화
- 필터프레스를 사용한 균체 제거조건의 최적화
- 연속원심분리기를 사용한 균체 제거조건의 최적화
- UF (ultrafiltration) 및 MF (microfiltration)을 사용한 풀루란의 농축조건 최적화
- 여러 종류의 건조기를 사용한 건조조건의 최적화

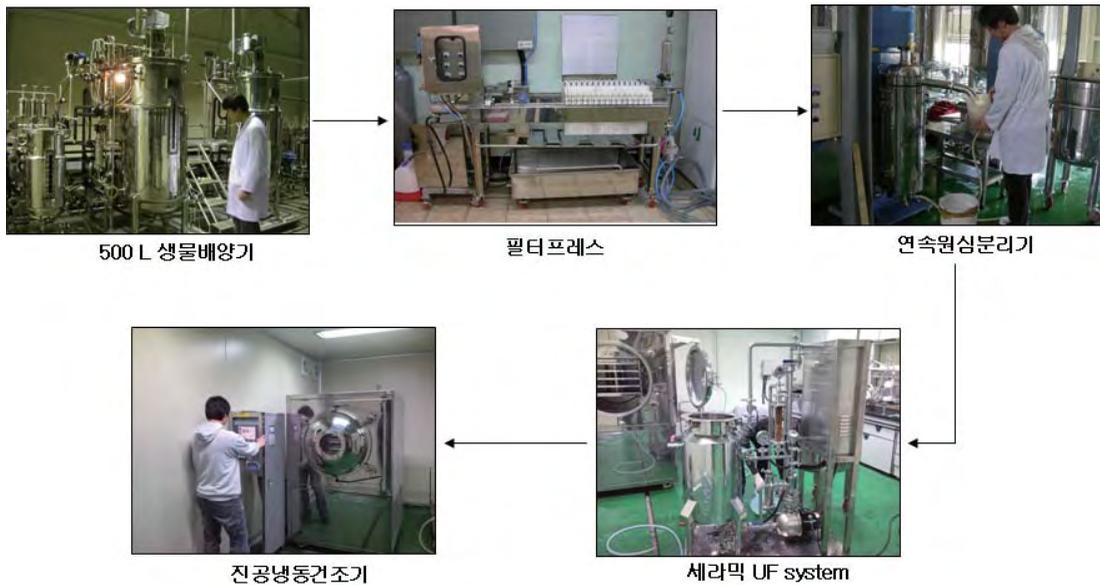


Fig. 10. General process for production of pullulan from fermentation to recovery

나. 생물고분자 PS-7의 생산공정 최적화

(1) 플라스크 규모에서의 생산조건 최적화

(가) 탄소원의 최적화

탄소원이 *B. indica* HS-2001의 생육 및 heteropolysaccharide-7 (PS-7)의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 배지의 탄소원으로 20.0 g/L의 glucose, fructose, maltose, sucrose, dextrin 및 starch를 사용하였다. 그림 1과 같이 균체의 생육에 최적인 탄소원은 sucrose이었으나, PS-7의 생산에 최적인 탄소원은 glucose이었다. 각 값들의 significance 계산은 DPD software (DPS Co., Middlesex, UK)를 사용하여 계산하였으며, 각 값들이 각기 다른 문자를 갖고 있는 것은 각 값들이 서로 다른 의미를 갖는다고 해석할 수 있다. Glucose의 농도를 20.0 g/L로 사용하였을 경우에 PS-7의 생산량은 6.57 g/L로 변환율은 33.0%이었다. 그러나 sucrose를 탄소원으로 사용하였을 경우에 균체의 증식 및 PS-7의 생산에 사용되는 수율이 가장 높았었다. 일반적으로 PS-7의 생산을 위하여 *B. indica* HS-2001의 탄소원으로 glucose를 사용한다고 보고되었었다. 하지만 glucose를 사용하여 높은 수율로 PS-7을 생산하기 위하여 glucose의 농도를 낮게 사용하였었다. 이는 높은 농도의 glucose를 사용할 경우에 catabolite repression 현상이 일어나기 때문이다. 따라서 높은 농도의 탄소원을 사용하여 생산량을 증가시키기 위하여 *B. indica* HS-2001의 최적 탄소원으로 sucrose를 선택하였다.

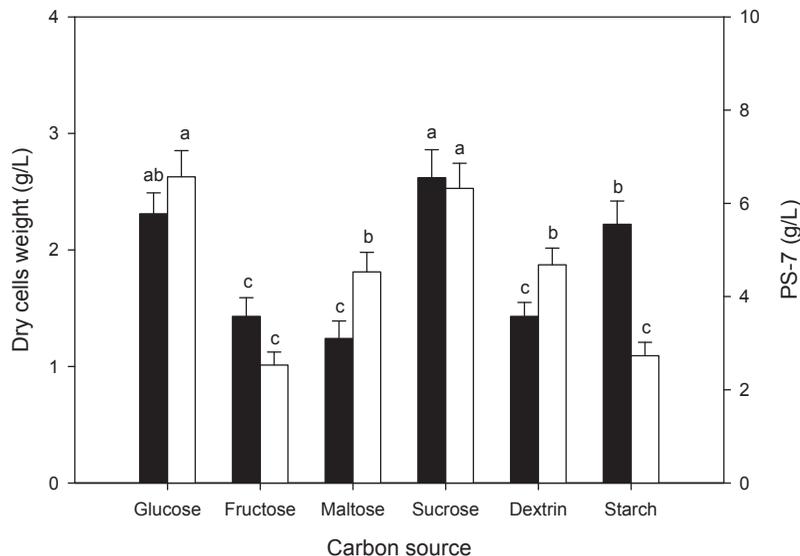


Fig. 1. Effect of carbon source on growth and production of heteropolysaccharide-7 (PS-7) by *B. indica* HS-2001 (■, DCW; □, PS-7)

(나) 탄소원으로 sucrose의 농도 최적화

탄소원으로 사용한 sucrose의 농도가 *B. indica* HS-2001의 생육 및 PS-7의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 배지의 PS-7의 생산을 위한 배지의 탄소원으로 sucrose를 0에서 100 g/L의 농도로 사용하여 균체의 증식 및 PS-7의 생산을 확인하였다. 그림 2와 같이 sucrose의 농도가 증가함에 따라 생산되는 PS-7의 양도 증가함을 알 수 있었으나, sucrose의 농도가 50.0 g/L 이상인 경우에 PS-7의 생산량은 크게 변화가 없었다. Sucrose의 농도가 75.0 g/L일때, PS-7의 생산량은 9.2 g/L로 최대이었으나. 가장 높은 변화율은 sucrose의 농도가 10.0 g/L일때 33.0%이었다. PS-7의 생산량 및 변환율을 참고로 PS-7의

생산을 위한 sucrose의 최적 농도를 30.0 g/L로 결정하여 다음 실험을 수행하였다. *A. pullulan*을 사용하여 풀루란을 생산하기 위한 탄소원으로 glucose를 사용하였으나, glucose에 의한 catabolite repression 현상을 극복하고 풀루란의 생산성을 향상시키기 위하여 sucrose를 사용한다는 보고가 있다.

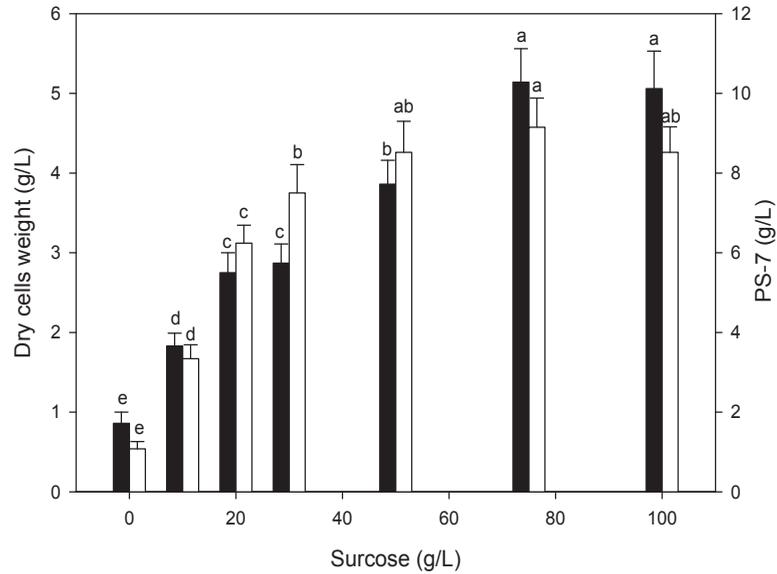


Fig. 2. Effect of sucrose concentration on cell growth and production of PS-7 by *B. indica* HS-2001(■,DCW and □,PS-7).

(2) 생물배양기 규모에서의 생산조건 최적화

(가) 접종량의 최적화

산업화 규모로 기능성 물질을 대량 생산하기 위하여 최적화해야 할 조건 중의 하나가 전배양액의 접종량이다. 접종량에 따라 본 배양을 위한 전배양액의 배양기 규모가 결정될 수 있다. 접종량이 *B. indica* HS-2001의 생육 및 PS-7의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 전배양을 하고 본 배양의 접종량을 각각 2.5, 5.0 및 10.0%로 접종하여 균체의 증식 및 PS-7의 생산을 확인하였다.

Table 1. Effect of inoculum size on cell growth and the production of PS-7 by *B. indica* HS-2001 in a 7 L bioreactor

	Inoculum size (%)		
	2.5	5.0	10.0
Culture time (h)	72	72	72
Final pH	5.64 ± 0.14 ^b	5.52 ± 0.16 ^{a*}	5.35 ± 0.12 ^{a*}
DCW (g/L)	2.47 ± 0.22 ^c	2.92 ± 0.24 ^b	3.53 ± 0.28 ^{a*}
PS-7 (g/L)	7.08 ± 0.68 ^{a*}	8.04 ± 0.74 ^{a*}	8.32 ± 0.78 ^{a*}
Y _{x/s}	0.08	0.10	0.12
Y _{p/s}	0.24	0.27	0.28
Y _{p/x}	2.89	2.75	2.36

그림 3과 같이 접종량이 증가할수록 균체의 생육이 빠름을 알 수 있었으나, PS-7의 생산은 접종량이 5.0%와 10.0%인 경우에 큰 차이가 없었다. 표 1과 같이 접종량이 각각 2.5, 5.0 및 10.0일때, 72 시간 배양후의 건조 균체량은 각각 2.47, 2.92 및 3.53 g/L로 접종량이 증가할수록 건조 균체량은 증가하였으나, PS-7의 생산량은 각각 7.08, 8.04 및 8.32 g/L로 접종량이 2.5%에 비하여 5.0%일 경우에 생산량의 증가를 확인하였으나, 접종량이 5.0 및 10.0%일 경우에 PS-7 생산량의 큰 차이는 없었다. 따라서 파이로트 규모의 생물배양기를 사용하여 PS-7을 생산할 경우의 접종량을 5.0%로 결정하였다. 접종량 및 접종하는 전배양액의 배양시간이 본 배양의 균체 증식 및 생산성에 영향을 미친다고 보고되어 있다. 또한 접종량 및 접종하는 전배양액의 배양시간을 최적화하여 균체가 생산하는 기능성 물질의 생산성을 향상시킬 수 있다는 보고도 있다.

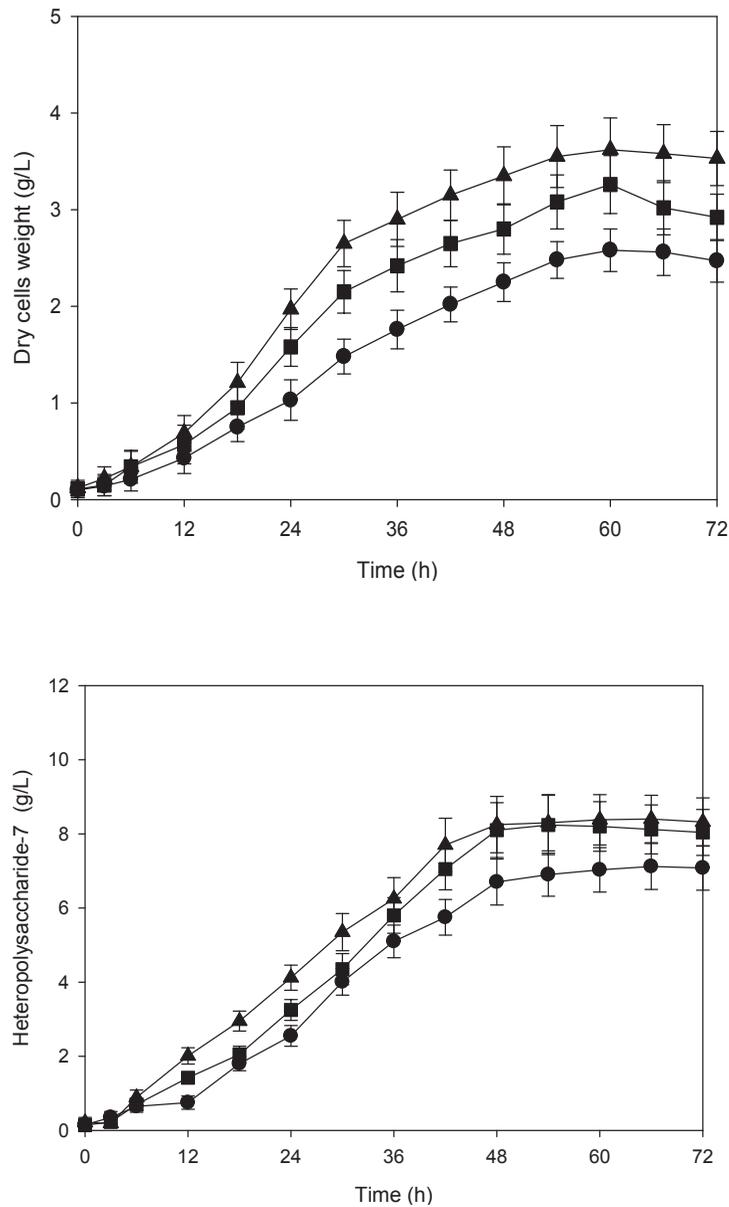


Fig. 3. Effect of inoculum size on (A) cell growth and (B) production of PS-7 by *B. indica* HS-2001 in a 7 L bioreactor(●,2.5%;■,5.0%;and▲,10.0%inoculum).

(나) 교반속도의 최적화

생물배양기의 교반속도가 *B. indica* HS-2001의 생육 및 PS-7의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 생물배양기의 교반속도를 각각 300, 400, 500 및 600 rpm으로 72 시간 배양하였다. 생물배양기의 통기량은 1.0 vvm으로 고정시켜 배양하였다. 그림 4와 같이 생물배양기의 교반속도가 증가할수록 균체의 생육이 촉진됨을 알 수 있었다. 균체의 증식에 최적인 생물배양기의 교반속도는 400 rpm이었으나, 균체가 생산하는 PS-7의 생산에 최적인 교반속도는 300 rpm이었다. 균체의 생육에 최적인 교반속도와 균체가 생산하는 PS-7의 최적인 교반속도가 서로 다름을 알 수 있었다. *B. indica* HS-2001이 생산하는 PS-7의 생산량은 최적 교반속도인 400 rpm에서 8.27 g/L이었다.

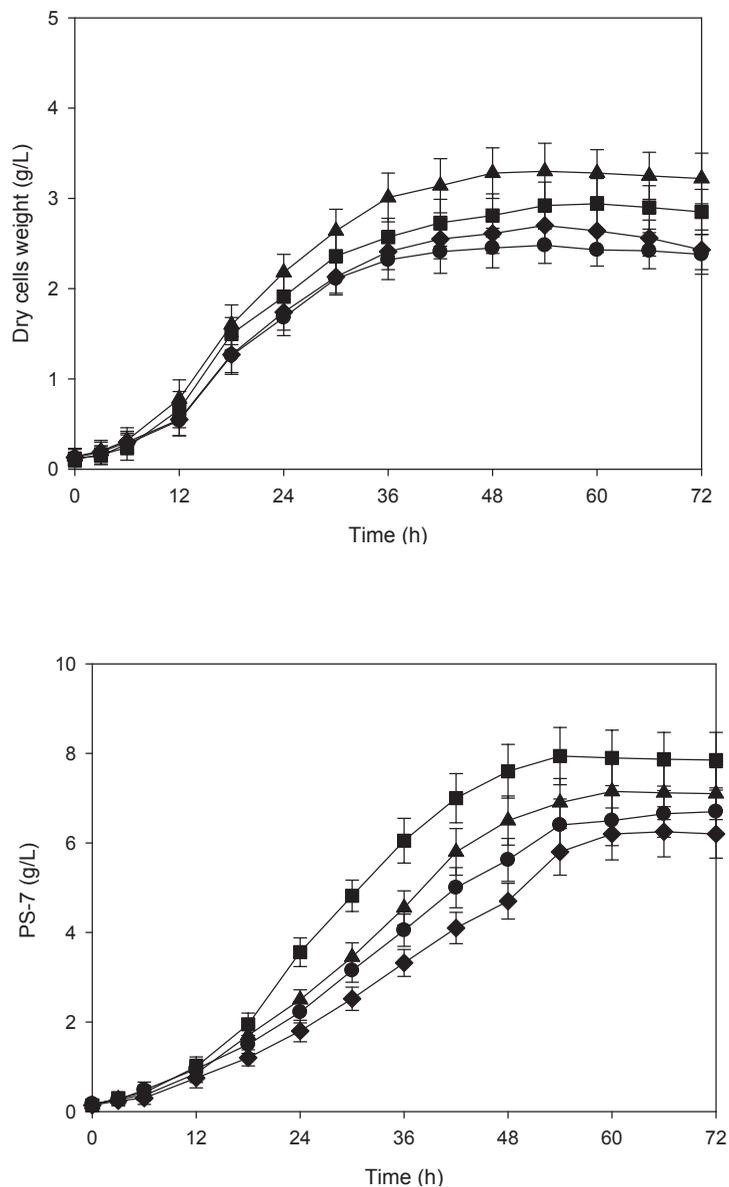


Fig. 4. Effect of agitation speed on dissolved oxygen (A), cell growth (B), and production of PS-7 (C) by *B. indica* HS-2001 in a 7 L bioreactor (●, 200rpm; ■, 300rpm; ▲, 400 rpm; and ◆, 500 rpm).

(다) 통기량의 최적화

생물배양기의 통기량이 *B. indica* HS-2001의 생육 및 PS-7의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 생물배양기의 통기량을 각각 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 vvm으로 72 시간 배양하였다. 생물배양기의 교반 속도는 400 rpm으로 고정시켜 배양하였다. 그림 5와 같이 생물배양기의 통기량이 증가할수록 균체의 생육이 촉진됨을 알 수 있었다. 균체의 증식에 최적인 생물배양기의 통기량은 1.5 vvm이었으나, 균체가 생산하는 PS-7의 생산에 최적인 통기량은 1.0 vvm이었다. 생물배양기의 교반속도와 같이 균체의 생육에 최적인 통기량은 균체가 생산하는 PS-7의 최적인 통기량과 서로 다름을 알 수 있었다. 일반적으로 생육에 최적인 교반속도 및 통기량이 생산에 최적인 교반속도 및 통기량에 비하여 높음을 알 수 있었다.

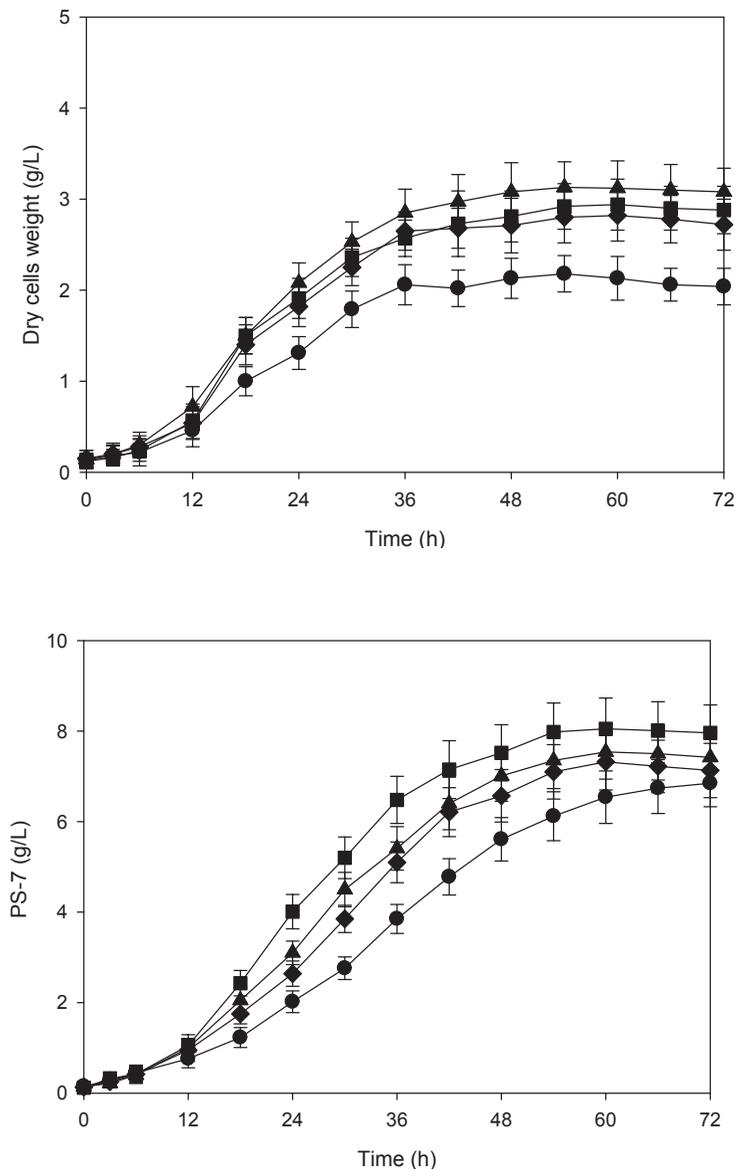


Fig. 5. Effect of aeration rate on dissolved oxygen (A), cell growth (B), and production of PS-7 (C) by *B. indica* HS-2001 in a 7 L bioreactor (●, 0.5vvm; ■, 1.0vvm; ▲, 1.5 vvm; and ◆, 2.0 vvm).

B. indica HS-2001의 생육 및 이 균주가 생산하는 PS-7의 생산에 미치는 영향은 그림 5와 같이 생육에 최적인 생물배양기의 교반속도 및 통기량이 PS-7의 생산에 최적인 교반속도 및 통기량과 다를 수 있었으나, 이 실험의 결과는 one-factor-at-a-time 방법에 의하여 얻은 결과이므로 교반속도와 통기량의 복합적인 영향은 알 수 없었다. 즉, 생물배양기의 교반속도가 균체의 증식 및 PS-7에 미치는 영향은 통기량을 1.0 vvm으로 고정하였을 때에 얻은 결과이며 생물배양기의 통기량이 균체의 증식과 PS-7의 생산에 미치는 영향은 교반속도를 400 rpm으로 고정하였을 때에 얻은 결과이다.

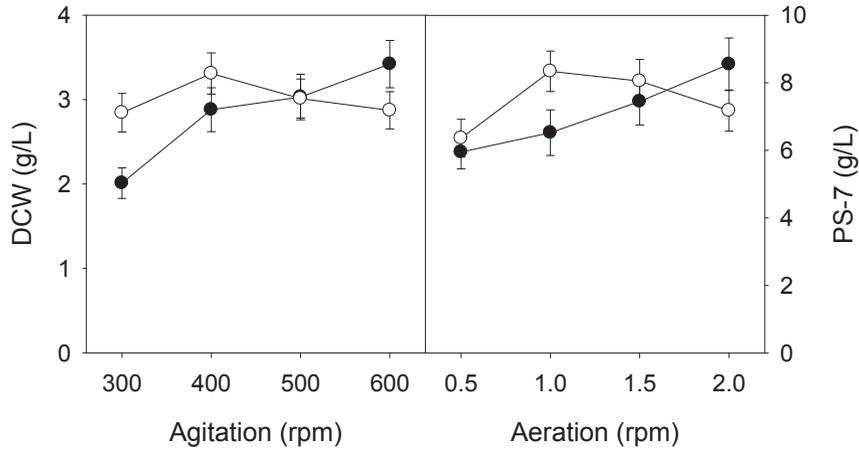


Fig. 6. The optimal agitation speed and aeration rate for cell growth and production of PS-7 by *B. indica* HS-2001 in a 7 L bioreactor(●, DCW and○,PS-7).

(라) 통계학적 방법에 의한 교반속도 및 통기량의 최적화

생물배양기의 교반속도와 통기량이 *B. indica* HS-2001의 생육 및 PS-7의 생산에 미치는 복합적인 영향을 확인하기 위하여 response surface method (RSM) 실험을 수행하였다. RSM은 통계학적인 원리를 사용하는 실험 방법으로 Design Expert (version 7.1.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) software를 사용하여 실험을 design하고 그 결과를 분석하였다. 통계학적인 RSM은 고전적인 최적화 방법에 비하여 실험량 및 실험에 필요한 노동력을 최대한 줄일 수 있으며, 각 요소들이 결과에 미치는 영향을 계산할 수 있는 장점이 있다. RSM에 의한 실험을 수행하기 위하여 표 2와 같이 생물배양기의 교반속도와 통기량을 각각 300, 400 및 500 rpm과 1.0, 1.5 및 2.0 vvm을 code levels로 사용하여 실험을 수행하였다. 이는 one-factor-at-a-time의 결과를 바탕으로 결정한 것이다.

Table 2. Central composite design (CCD) for optimization of agitation speed and aeration rate

Variables	Symbol	Coded levels		
		-1	0	1
Agitation speed (rpm)	X ₁	300	400	500
Aeration rate (vvm)	X ₂	1.0	1.5	2.0

RSM에 의하여 결정된 13가지 조건은 교반속도로 260, 300, 400 및 500 rpm과 통기량으로 0.8, 1.0, 1.5 및 2.0 vvm을 조합하여 얻은 것이며 각각의 조건에서 72시간 배양한 결과는 표 3과 같다. *B. indica* HS-2001의 건조 균체량 범위는 2.31 ~ 3.30 g/L이었으며, 이 균체가 생산하는 Ps-7의 생산량은 7.15 ~ 8.13 g/L이었다. 이와 같은 결과는 RSM에 의한 결과 분석에 필요한 값으로 사용된다.

Table 3. Central composite design and determined response values (Y_1 and Y_2 were DCW and PS-7, respectively.)

Run	X_1 (rpm)	X_2 (vvm)	Y_1 (g/L)	Y_2 (g/L)
1	500	1.0	2.87	7.99
2	400	1.5	2.93	8.01
3	400	1.5	2.99	8.13
4	300	2.0	2.72	7.15
5	400	0.8	2.69	7.75
6	400	1.5	3.01	8.11
7	300	1.0	2.31	7.68
8	400	1.5	2.87	7.90
9	400	1.5	2.92	7.96
10	260	1.5	2.37	7.39
11	400	2.2	3.16	7.25
12	540	1.5	3.10	7.75
13	500	2.0	3.30	7.46

Design Expert software를 사용하여 분석한 결과는 P value가 작을수록 각 요소가 결과에 미치는 영향이 크다는 것이다. 생물배양기의 교반속도 및 통기량이 균체의 증식에 미치는 영향은 표 4와 같이 교반속도와 통기량이 균체의 증식에 미치는 영향이 매우 높음을 알 수 있었다 (P value > less than 0.0001). 또한 생물배양기의 교반속도와 통기량의 복합적인 영향도 균체의 증식에 비교적 높은 영향을 준다는 사실을 확인하였다 (P value > less than 0.0500). P value를 참고로 생물배양기의 교반속도가 통기량에 비하여 균체의 증식에 더 많은 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 교반속도 (X_1)와 통기량 (X_2)을 사용하여 균체의 증식을 나타낸 식은 아래와 같으며 이 식에 의하여 균체의 최대 건조중량은 3.20 g/L임을 예측할 수 있었다.

$$Y_j = 2.940 + 0.270X_1 + 0.200X_2 + 0.030X_1X_2 - 0.120X_1^2 - 0.005X_2^2$$

P value를 비교한 결과, 생물배양기의 통기량이 교반속도 보다 PS-7의 생산에 미치는 영향이 크다는 사실을 알 수 있었다. 교반속도 (X_1)와 통기량 (X_2)을 사용하여 PS-7의 생산량을 나타낸 식에 의하여 PS-7의 최대 생산량은 8.06 g/L임을 예측할 수 있었다.

생물배양기의 교반속도와 통기량의 복합적인 영향은 PS-7의 생산 보다 균체의 증식에

미치는 영향이 크다는 사실을 알 수 있었으며 이 결과를 그림 7과 같이 3차원 그래프로 나타낼 수 있었다. 3차원 그래프의 기울기가 급할수록 각 요소들의 복합적 영향이 더욱 더 크다는 것을 나타내는 것이다.

Table 4. Parameter estimates and analysis of variance (ANOVA) of the design for cell growth of *B. indica* HS-2001 in a 7 L bioreactor

	Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value (Probe>F)
Cell growth	Model	5	1.000	0.200	36.70	<0.0001
	X ₁	1	0.570	0.570	103.95	<0.0001
	X ₂	1	0.320	0.320	58.94	0.0001
	X ₁ X ₂	1	0.004	0.004	0.66	0.4435
	X ₁ ²	1	0.110	0.110	19.75	0.0030
	X ₂ ²	1	0.000	0.000	0.03	0.8769
	Error	4	0.013	0.00	-	-
	Total	12	1.040	-	-	-
PS-7	Model	5	1.090	0.220	31.17	0.0001
	X ₁	1	0.110	0.110	15.66	0.0055
	X ₂	1	0.410	0.410	58.80	0.0001
	X ₁ X ₂	1	0.001	0.001	0.09	0.7741
	X ₁ ²	1	0.230	0.230	33.05	0.0007
	X ₂ ²	1	0.410	0.410	58.34	0.0001
	Error	4	0.024	0.006	-	-
	Total	12	1.140	-	-	-

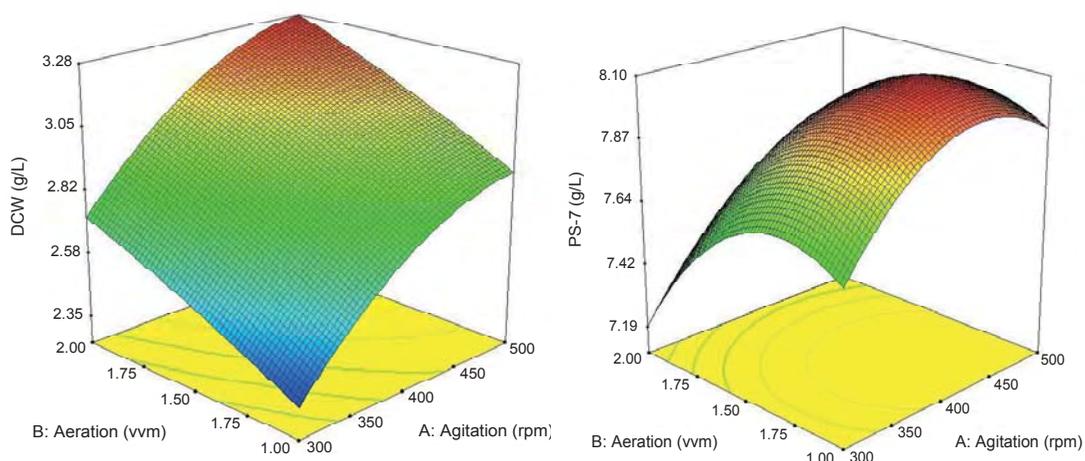


Fig. 7. Three dimensional response surface displaying relative effect of two variables on cell growth and the production of PS-7 by *B. indica* HS-2001 in a 7 L bioreactor; interaction between agitation speed and aeration rate for cell growth (A) and production of PS-7 (B) by *B. indica* HS-2001 in a 7 L bioreactor.

(3) 파이로트 (pilot) 규모에서의 생산조건 최적화

파이로트 규모 생물배양의 내압이 *B. indica* HS-2001의 생육 및 PS-7의 생산에 미치는 영향을 확인하였다. 생물배양기의 규모는 100 L이며 내압을 조정할 수 있는 장치를 가지고 있는 배양기를 사용하였다. 생물배양기의 교반속도와 통기량은 각각 250 rpm 및 1.2 vvm이었다. RSM에 의하여 실험한 결과 7 L 생물배양기의 최적 교반속도 및 통기량은 440 rpm 및 1.2 vvm이었다. 이와 같은 최적 조건과 7 L 및 100 L 생물배양기의 임펠라 직경을 참고로 계산한 결과 100 L 생물배양기의 교반속도 및 통기량을 각각 250 rpm 및 1.2 vvm으로 결정하였다. 생물배양기의 내압을 각각 0.000, 0.004, 0.020, 0.0040, 0.060 및 0.080 MPa로 조정하여 72시간 배양하였다. 그림 7과 같이 생물배양기의 내압이 증가할수록 배양액의 용존산소농도가 높다는 것을 알 수 있었다. 내압이 각각 0.000, 0.004, 0.020, 0.0040, 0.060 및 0.080 MPa인 경우에 72시간 후에 측정된 균체의 건조 중량은 각각 2.66, 2.88, 3.03, 2.83, 2.66 및 2.23 g/L이었으며, PS-7의 생산량은 각각 7.73, 8.43, 9.30, 10.20, 8.96 및 7.03 g/L이었다. 균체의 증식에 최적인 내압은 0.020 MPa이었으나, 균체가 생산하는 PS-7의 생산에 최적인 내압은 표 5와 같이 0.040 MPa이었다. 이는 균체의 증식에 최적인 내압과 균체가 생산하는 PS-7의 생산에 최적인 내압이 다르다는 것이다.

Table 5. Effect of inner pressure on cell growth and the production of PS-7 by *B. indica* HS-2001 in a 100L bioreactor

Inner pressure (MPa)	Final pH	DCW (g/L)	PS-7 (g/L)	Yield		
				$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$
0.000	5.61 ± 0.20 ^a	2.66 ± 0.28 ^{ab}	7.73 ± 0.62 ^{bc}	0.09	0.26	2.72
0.004	5.52 ± 0.18 ^a	2.88 ± 0.26 ^a	8.43 ± 0.64 ^{ab}	0.10	0.28	2.75
0.020	5.21 ± 0.16 ^{b*}	3.03 ± 0.28 ^a	9.30 ± 0.62 ^{a*}	0.11	0.31	3.00
0.040	5.15 ± 0.18 ^{c*}	2.83 ± 0.26 ^a	10.20 ± 0.74 ^{a*}	0.09	0.34	3.18
0.060	5.24 ± 0.17 ^{bc*}	2.66 ± 0.28 ^{ab}	8.96 ± 0.66 ^{ab}	0.09	0.30	3.11
0.080	5.70 ± 0.18 ^{b*}	2.23 ± 0.24 ^b	7.03 ± 0.58 ^c	0.07	0.23	2.93

용존산소 농도의 증가는 균체의 증식 및 균체가 생산하는 물질의 생산성을 높일 수 있다. 생물배양기의 교반속도 및 통기량을 증가시켜 배양액의 용존산소 농도를 증가시킬 수 있다. 동일한 산소를 생물배양기에 공급한 경우에 생물배양기의 내압을 증가시켜 배양액의 용존산소 농도를 높일 수 있다. 생물배양기의 내압을 최적화를 통하여 PS-7의 생산성을 1.32 배 증가할 수 있었다. 본 연구를 통하여 PS-7의 생산을 위한 탄소원으로 sucrose를 사용하였으며 sucrose의 농도 및 접종량을 최적화하였다. 배양액의 용존산소 농도에 영향을 주는 생물배양기의 교반속도 및 통기량을 통계학적인 방법인 response surface method를 사용하여 최적화하였다. 또한 파이로트 규모의 생물배양기의 내압을 최적화하여 산업화가 가능한 최적 조건을 확립하였다 이를 통하여 최적화 전에 비하여 PS-7의 생산성을 1.55배 향상시켰다.

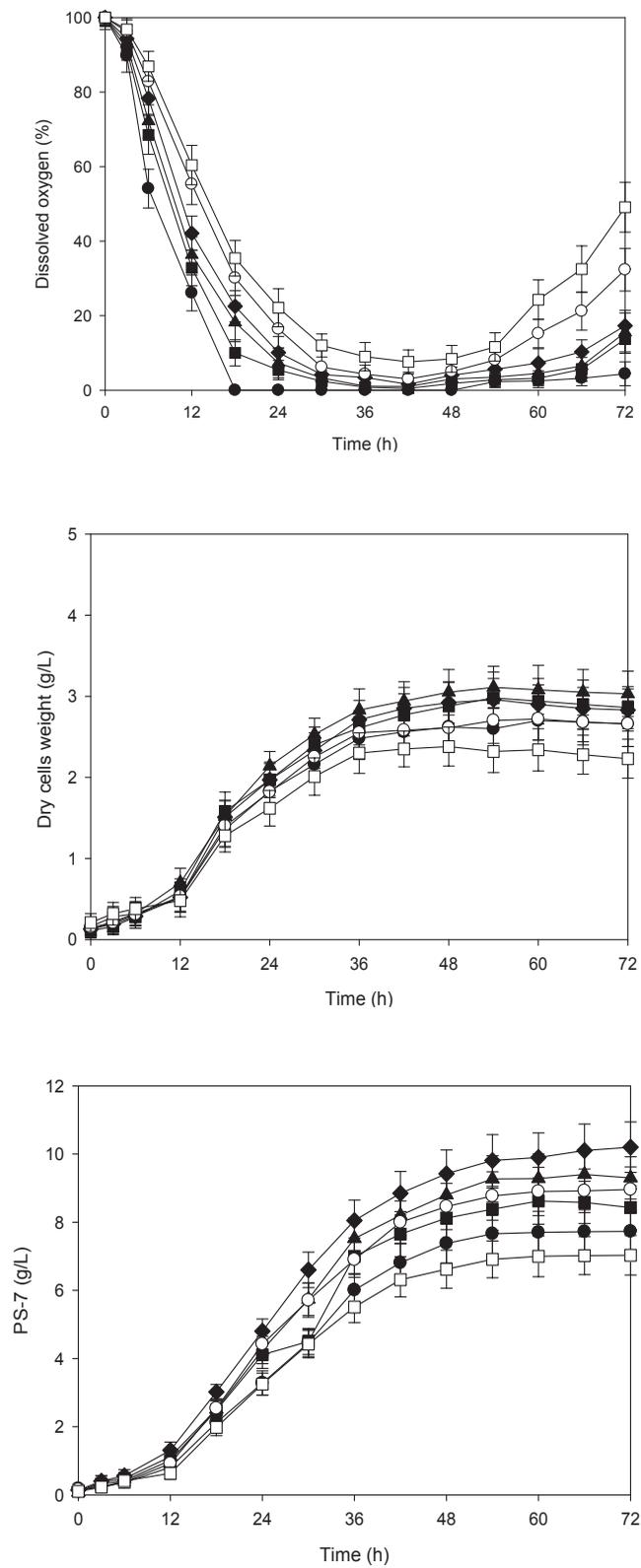


Fig. 8. Effect of inner pressure on the dissolved oxygen in the medium (A), cell growth (B), and production of PS-7 by *B. indica* HS-2001 (C) in a 100 L bioreactor (●, 0.000; ■, 0.004; ▲, 0.020; ◆, 0.040; ○, 0.060; and □, 0.080 MPa).

다. 섬유소 분해효소의 생산공정 최적화

(1) 섬유소 분해효소의 분리 및 동정

섬유소 분해효소 (carboxymethylcellulase, CMCase)를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 경상북도 해안에서 해수를 수집하여 0.85% NaCl용액에 희석하였다. 희석한 용액을 marine agar 배지에 도말한 후에 30°C에서 3일간 배양하였다. 섬유소 분해효소를 생산하기 위한 배지의 조성은 20.0 g/l carboxymethylcellulose (CMC), 2.5 g/l yeast extract, 5.0 g/l K₂HPO₄, 1.0 g/l NaCl, 0.2 g/l MgSO₄·7H₂O, 및 0.6g/l(NH₄)₂SO₄이었다. 분리한 균주들의 섬유소 분해효소 생산성을 측정하여 가장 높은 생산성을 나타낸 균주를 LBH-14로 명명하고 16S rDNA의 염기서열을 분석하여 이 균주를 동정을 하였다. 16S rDNA의 염기서열을 분석하기 위하여 Wizard Genomic DNA Prep. Kit (Promega Co., Madison,USA)를 사용하였다.

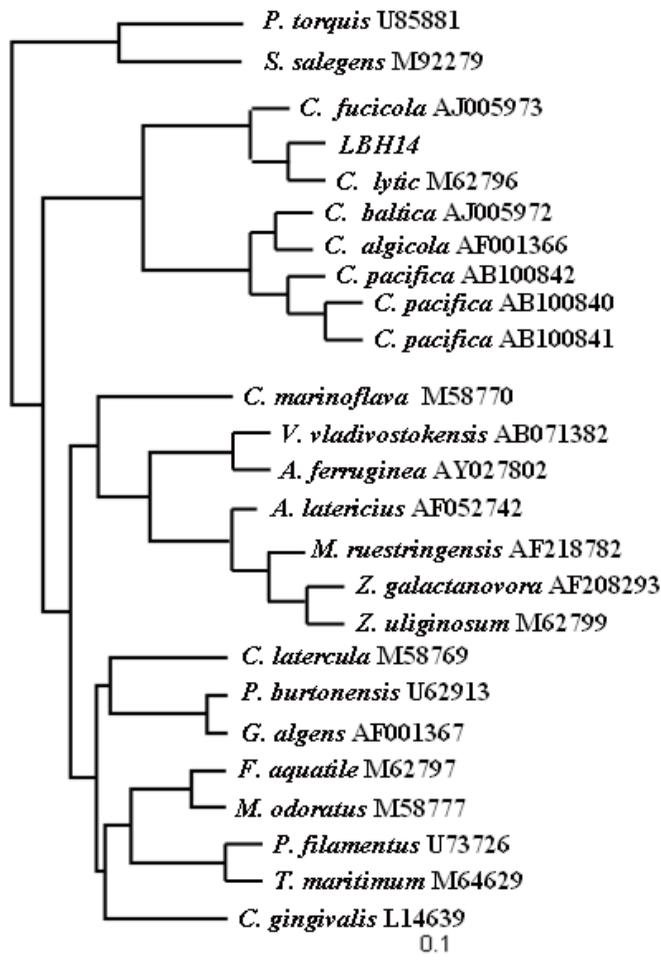


Fig. 1. Neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences of *Cellulophagalytica*. Numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on a neighbour-joining analysis of 1,000 resampled dataset. Scale bar indicates 0.1 nucleotide substitution per nucleotide position.

Polymerase chain reaction (PCR)으로 분리한 DNA를 증폭하였으며 1.0% (w/v) agarose gel을 사용하여 전개한 후에 특정 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 pGEM-T Easy vector (Promega Co., Madison, USA)을 사용하여 클로닝하였으며 ALF Red automated DNA sequencer (Pharmacia, Sweden)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열을 GenBank database와 비교하여 균주를 동정하였다 [9]. 염기서열을 분석하고 비교한 결과, 섬유소 분해효소를 생산하는 균주는 *Cellulophaga lytica* M62796 균주와 99.2%의 동일성을 가지고 있어서 그림 1과 같이 *Cellulophaga lytica* LBH-14로 명명하였다.

(2) 플라스크 규모에서의 생산조건 최적화

(가) 탄소원 및 질소원의 최적화

C. lytica LBH-14 균주를 사용한 섬유소 분해효소 생산의 탄소원 및 질소원을 최적화하기 위하여 탄소원으로 20.0 g/L의 glucose, fructose, maltose, sucrose, dextrin 및 starch를 사용하였으며, 질소원으로 2.5 g/L의 malt extract, peptone, tryptone, yeast extract, ammonium chloride 및 ammonium nitrate를 사용하였다. 그림 2와 같이 *C. lytica* LBH-14 균주의 생육에 최적인 탄소원과 질소원은 maltose와 tryptone이었으며 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 탄소원과 질소원은 미강과 tryptone이었다. 배지의 경제성과 섬유소 분해효소의 생산성을 고려하여 탄소원과 질소원을 각각 미강과 ammonium chloride를 사용하여 다음 실험을 진행하였다.

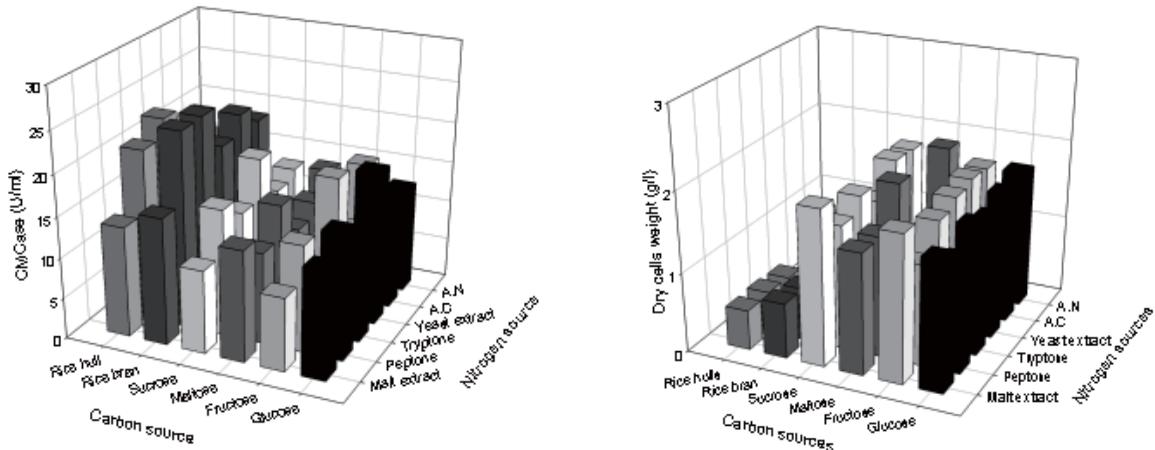


Fig. 2. Effect of carbon and nitrogen sources on cell growth (A) and production of CMCase (B) by *C. lytica* LBH-14.

(나) 미강, ammonium chloride 및 배지의 초기 pH 최적화

① one-factor-at-a-time 실험

C. lytica LBH-14 균주를 사용한 섬유소 분해효소 생산의 탄소원으로 사용한 미강과 ammonium chloride의 농도 및 배지의 초기 pH를 one-factor-at-a-time 방법으로 최적화하였다. 탄소원으로 사용한 미강의 농도는 25 ~ 125 g/L이었으며, 배양시간은 72시간이었다. 그림 3과 같이 미강의 농도가 증가할수록 균체의 생육은 증가되었으나, 섬유소 분해효소의 생산은 미강의 일정한 농도 이상에서 증가하지 않았다. 균체의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 최적인 미강의 농도는 각각 125 g/L 및 75 g/L이었다.

C. lytica LBH-14 균주를 사용한 섬유소 분해효소 생산의 질소원으로 사용한 ammonium chloride의 농도는 2.5 ~ 12.5 g/L이었다. 균체의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 최적인 ammonium chloride의 농도는 각각 5.0 g/L 및 7.5 g/L이었다. 배지의 초기 pH를 5.5 ~ 7.5를 조절하여 균체의 생육 및 섬유소 분해효소의 생산을 비교한 결과, *C. lytica* LBH-14 균주의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 최적인 배지의 초기 pH는 각각 7.0 및 6.0이었다. *C. lytica* LBH-14 균주의 생육에 최적인 미강, ammonium chloride 및 배지의 초기 pH는 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소 생산의 최적인 조건과 다르다는 사실을 확인하였다 [11].

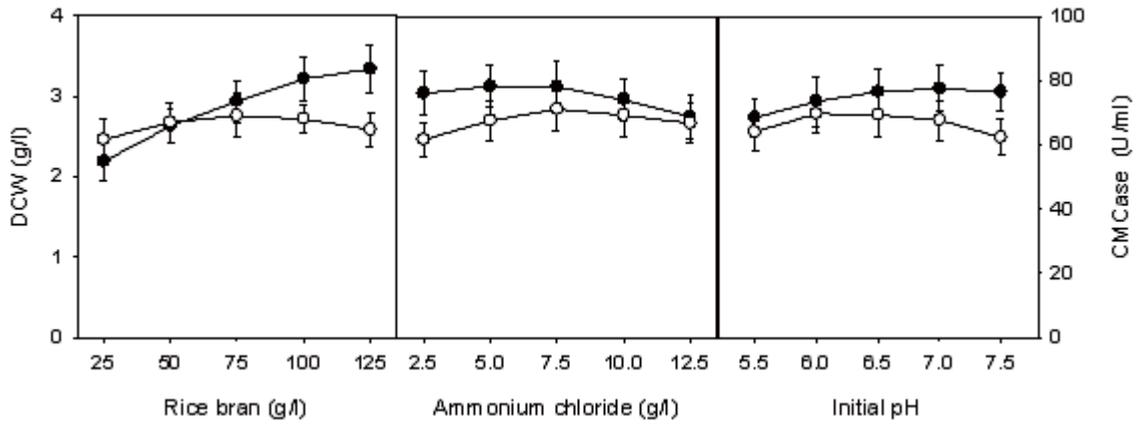


Fig. 3. Effect of rice bran, ammonium chloride, and initial pH of the medium on cell growth (●) and production of CMCase (○) by *C. lytica* LBH-14.

Table 1. Central composite design (CCD) and determined response values.

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	75	7.5	6.5	3.04	69.8
2	75	3.3	6.5	3.03	67.5
3	75	7.5	6.5	3.07	70.6
4	100	10.0	6.0	3.04	67.0
5	100	5.0	6.0	3.10	67.2
6	117	7.5	6.5	3.16	65.2
7	100	5.0	7.0	3.15	65.3
8	50	5.0	7.0	2.97	60.6
9	75	7.5	6.5	3.08	70.1
10	75	7.5	6.5	3.06	69.2
11	75	11.7	6.5	2.99	68.7
12	75	7.5	5.7	2.96	69.5
13	75	7.5	7.3	3.05	66.3
14	50	10.0	7.0	2.90	66.9
15	75	7.5	6.5	3.02	68.6
16	75	7.5	6.5	3.00	69.5
17	50	10.0	6.0	2.88	68.1
18	100	10.0	7.0	3.04	67.3
19	33	7.5	6.5	2.84	58.6
20	50	5.0	6.0	2.90	65.5

② response surface method

One-time-at-a-factor 실험의 결과를 참고로 미강, ammonium chloride 및 배지의 초기 pH를 response surface method를 사용하여 최적화하였다. 미강, ammonium chloride 및 배지의 초기 pH에 대한 최저 및 최대값을 각각 50 g/L 및 100 g/L, 5.0 g/L 및 10.0 g/L 그리고 pH 6.0 및 7.0으로 설정하였으며, Design-Expert (Version 7.1.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) 프로그램을 사용하여 표 1과 같은 central composite design을 하였다. 이 프로그램을 사용하여 20개의 서로 다른 조건으로 실험하였으며, 균체의 생육 및 섬유소 분해효소의 생산성을 프로그램에 대입하여 최적 조건 등을 계산하였다. 서로 다른 20가지의 조건에서 배양한 결과, 균체의 건조 중량을 측정하여 균체의 생육은 2.84 ~ 3.16 g/L이었으며 섬유소 분해효소 생산성은 58.6 ~ 70.6 U/mL이었다. 이와 같은 결과를 프로그램에 대입하여 분석한 결과, 표 2와 같이 모델의 F 값은 21.60으로 이 결과가 상당히 신빙성이 있다고 확인되었다.

Table 2. Parameters estimated and analysis of variance (ANOVA) of the design for cell growth and CMCase by *C. lytica* LBH-14.

	Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F-value	p-value
Cell growth	Model	9	0.013	0.015	21.60	<0.0001
	X ₁	1	0.110	0.110	158.30	<0.0001
	X ₂	1	0.008	0.008	11.43	0.0070
	X ₃	1	0.006	0.006	9.06	0.0131
	X ₁ ²	1	0.004	0.004	6.05	0.0336
	X ₂ ²	1	0.003	0.003	3.80	0.0800
	X ₃ ²	1	0.003	0.003	4.86	0.0521
	Error	5	0.005	0.001	-	-
	Total	19	0.140	-	-	-
CMCase	Model	9	163.79	18.20	16.12	<0.0001
	X ₁	1	20.67	20.67	18.31	0.0016
	X ₂	1	11.84	11.84	10.49	0.0089
	X ₃	1	12.53	12.53	11.10	0.0076
	X ₁ ²	1	103.73	103.73	91.90	<0.0001
	X ₂ ²	1	3.47	3.47	3.08	0.1100
	X ₃ ²	1	4.54	4.54	4.03	0.0726
	Error	5	2.45	0.49	-	-
	Total	19	175.08	-	-	-

균체의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 미치는 미강, ammonium chloride 및 배지의 초기 pH에 대한 영향은 p 값으로 비교할 수 있었는데, p 값이 작을수록 각 요소가 균체의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향이 크다는 것을 의미한다. 따라서 균체의 생육 및 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 가장 큰 요소는 미강임을 알 수 있었다. 그림 4와 같이 미강과 ammonium chloride, 미강과 배지의 초기 pH 및 ammonium chloride와 배지의 초기 pH 등이 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 복합적인 영향을 확인하였다. 각 그래프의 기울기가 급할수록 각각의 요소가 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향이 크다는 것을 의미한다. Design-Expert 프로그램으로 분석한 균체 생육의 최적인 미강과 ammonium chloride의 농도 및 배지의 초기 pH는 100.0 g/L, 5.0 g/L 및 pH 7.0이었으며, 예상되는 최대값은 3.15 g/L 이었다. 또한, 섬유소 분해효소 생산에 최적인 미강과 ammonium chloride의 농도 및 배지의 초기 pH는 79.0 g/L, 8.5 g/L 및 pH 6.1이었으며, 예상되는 최대값은 70.1 U/mL 이었다.

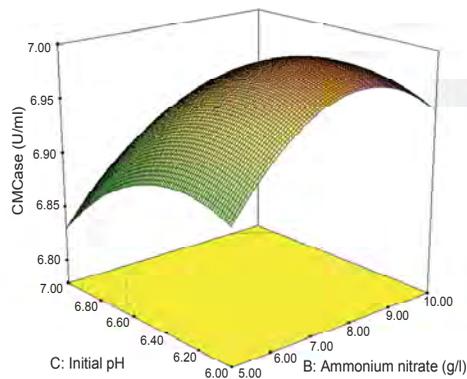
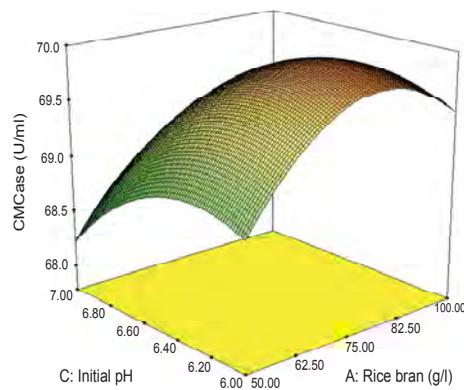
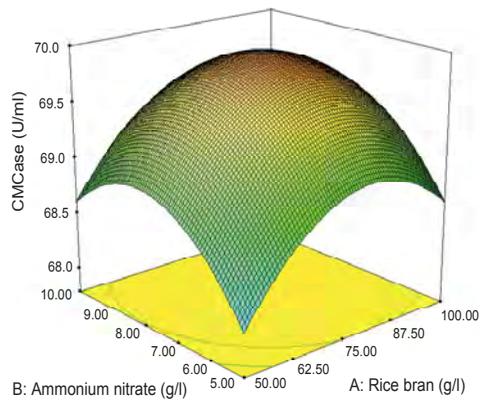


Fig. 4. Three-dimensional response surface of production of CMCCase by *C. lytica* LBH-14 as functions of rice bran and ammonium chloride (A), rice bran and initial pH (B), and ammonium chloride and initial pH (C).

(다) 배지의 염성분 최적화

① one-factor-at-a-time 실험

C. lytica LBH-14 균주를 사용하여 섬유소 분해효소 생산을 위한 배지의 염농도를 최적화하기 위하여 one-factor-at-a-time 실험을 수행하였다. 배지의 탄소원과 질소원으로 사용한 미강과 ammonium chloride의 농도 및 배지의 초기 pH는 각각 79.9 g/l, 8.52 g/l 및 6.1이었다. 배지에 첨가되는 4가지 염인 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 및 $(NH_4)_2SO_4$ 들의 농도는 각각 0.0 ~ 10.0g/L, 0.0 ~ 2.0 g/L, 0.0 to 0.8 g/L 및 0.0 to 1.2g/L이었다. 기본배지에 첨가

하는 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도는 각각 5.0, 1.0, 0.4, 및 0.6 g/L이었다. 그림 5와 같이 균체 생육에 최적인 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 및 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도는 각각 7.5, 0.5, 0.2, 및 0.3 g/L이었으며 섬유소 분해효소 생산에 최적인 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 및 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도는 각각 2.5, 0.5, 0.6, 및 0.3 g/L이었다.

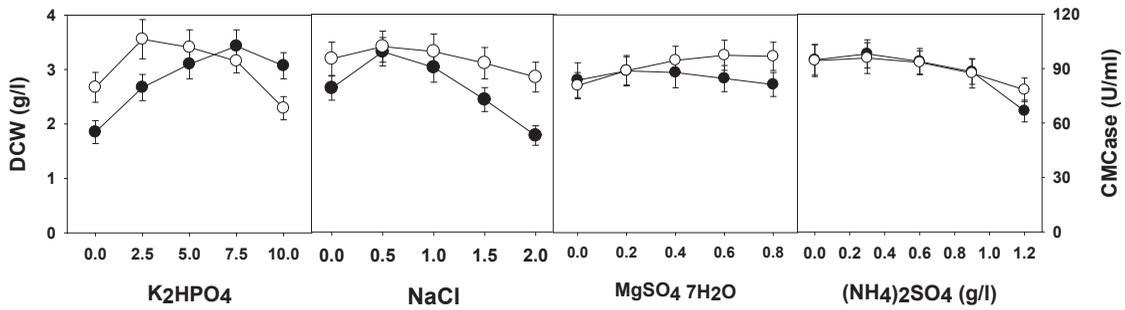


Fig. 5. Effect of K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and $(NH_4)_2SO_4$ on cell growth(●) and production of CMCCase(○) by *C. lytica* LBH-14.

② response surface method

One-time-at-a-factor 실험의 결과를 참고로 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 및 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도를 response surface method를 사용하여 최적화하였다. K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 및 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도에 대한 최저 및 최대값을 각각 2.5와 7.5 g/L, 0.25와 0.75 g/L, 0.25와 0.75 g/L 및 0.3과 0.9 g/L로 설정하고, Design-Expert (Version 7.1.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) 프로그램을 사용하여 표 3과 같은 central composite design을 하였다. 이 프로그램을 사용하여 30개의 서로 다른 조건으로 실험하였으며, 균체의 생육 및 섬유소 분해효소의 생산성을 프로그램에 대입하여 최적 조건 등을 계산하였다. 서로 다른 30가지의 조건에서 배양한 결과, 균체의 건조 중량을 측정할 균체의 생육은 3.49 ~ 4.07 g/L이었으며 섬유소 분해효소 생산성은 95.4 ~ 104.6 U/mL이었다. 이와 같은 결과를 프로그램에 대입하여 분석한 결과, 표 4와 같이 모델의 F 값은 9.88로 이 결과가 상당히 신빙성이 있다고 확인되었다.

균체의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 미치는 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 및 $(NH_4)_2SO_4$ 에 대한 영향은 p 값으로 비교할 수 있었는데, p 값이 작을수록 각 요소가 균체의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향이 크다는 것을 의미한다. 따라서 균체의 생육 및 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 가장 큰 요소는 K_2HPO_4 임을 알 수 있었다. Design-Expert 프로그램으로 분석한 균체 생육의 최적인 K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 및 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도는 6.25, 0.62, 0.28, 및 0.42 g/L이었으며 예상되는 균체 생육의 최대값은 3.57g/L이었다. K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 및 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도에 따른 균체의 생육에 대한 모델식은 아래와 같다.

$$Y_1 = 3.56 + 0.01X_1 + 0.01X_2 - 0.01X_3 - 0.01X_4 - 0.01X_1^2 - 0.01X_2^2 - 0.01X_3^2 - 0.01X_4^2$$

Table 3. Central composite design (CCD) and determined response values.

Run	X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃ (g/L)	X ₄ (g/L)	Y ₁ (g/L)	Y ₂ (U/mL)
1	5.0	1.00	0.50	0.6	3.53	101.3
2	5.0	0.50	1.00	0.6	3.50	103.9
3	7.5	0.25	0.75	0.9	3.51	99.4
4	7.5	0.75	0.25	0.3	3.57	97.5
5	5.0	0.50	0.50	0.6	3.56	103.6
6	2.5	0.75	0.75	0.9	3.50	102.5
7	2.5	0.75	0.25	0.9	3.52	99.1
8	7.5	0.75	0.75	0.9	3.53	98.9
9	5.0	0.50	0.50	0.6	4.07	103.4
10	5.0	0.50	0.50	1.2	3.52	100.3
11	2.5	0.25	0.25	0.3	3.53	101.8
12	5.0	0.00	0.50	0.6	3.51	101.5
13	5.0	0.50	0.50	0.6	3.55	103.0
14	7.5	0.25	0.25	0.3	3.56	98.1
15	5.0	0.50	0.50	0.0	3.56	103.8
16	5.0	0.50	0.50	0.6	3.57	103.9
17	7.5	0.25	0.75	0.3	3.53	101.5
18	7.5	0.75	0.25	0.9	3.55	95.4
19	2.5	0.25	0.75	0.9	3.49	103.1
20	2.5	0.75	0.75	0.3	3.51	104.6
21	5.0	0.50	0.00	0.6	3.52	98.8
22	2.5	0.75	0.25	0.3	3.54	101.2
23	2.5	0.25	0.25	0.9	3.51	99.7
24	7.5	0.75	0.75	0.3	3.54	101.0
25	10.0	0.50	0.50	0.6	3.56	94.7
26	5.0	0.50	0.50	0.6	3.57	104.5
27	0.0	0.50	0.50	0.6	3.50	99.8
28	2.5	0.25	0.75	0.3	3.51	105.2
29	5.0	0.50	0.50	0.6	3.56	103.6
30	7.5	0.25	0.25	0.9	3.54	96.0

또한, 섬유소 분해효소 생산에 최적인 K₂HPO₄, NaCl, MgSO₄ · 7H₂O, 및 (NH₄)₂SO₄의 농도는 3.72, 0.54, 0.70, 및 0.34 g/L이었으며 예상되는 섬유소 분해효소 생산성은 105.4 U/mL 이었다. K₂HPO₄, NaCl, MgSO₄ · 7H₂O, 및 (NH₄)₂SO₄의 농도에 따른 섬유소 분해효소 생산에 대한 모델식은 아래와 같다.

$$Y_2 = 103.67 - 1.65X_1 - 0.21X_2 + 1.57X_3 - 0.99X_4 + 0.01X_1 \cdot X_2 + 0.01X_1 \cdot X_3 + 0.01X_2 \cdot X_3 - 1.64X_1^2 - 0.06X_2^2 - 0.61X_3^2 - 0.44X_4^2$$

Table 4. Parameter estimates and analysis of variance (ANOVA) of the design for cell growth and production of CMCase by *C. lytica* LBH-14.

	Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F-value	p-value Probe>F
Cell growth	Model	14	0.016	0.001	9.88	<0.0001
	X ₁	1	0.002	0.002	20.37	0.0004
	X ₂	1	0.001	0.001	5.09	0.0394
	X ₃	1	0.002	0.002	20.37	0.0004
	X ₄	1	0.002	0.002	17.12	0.0009
	X ₁ ²	1	0.005	0.005	40.62	<0.0001
	X ₂ ²	1	0.002	0.002	20.83	0.0004
	X ₃ ²	1	0.004	0.004	33.30	<0.0001
	X ₄ ²	1	0.001	0.001	4.63	0.0482
	Total	29	0.018	-	-	-
CMCase	Model	14	229.77	16.41	52.81	<0.0001
	X ₁	1	65.34	65.34	210.25	<0.0001
	X ₂	1	1.04	1.04	3.35	0.0871
	X ₃	1	58.91	58.91	189.55	<0.0001
	X ₄	1	23.60	23.60	75.94	<0.0001
	X ₁ ²	1	73.55	73.55	236.66	<0.0001
	X ₂ ²	1	9.87	9.87	31.77	<0.0001
	X ₃ ²	1	10.29	10.29	33.11	<0.0001
	X ₄ ²	1	5.25	5.25	16.89	0.0009
	Total	29	234.43	-	-	-

(라) 생산 온도의 최적화

C. lytica LBH-14 균주의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 온도의 영향을 검토하였다. 균체의 생산과 섬유소 분해효소의 생산을 위한 최적 온도를 확인하기 위하여 동일한 배지에 균체를 접종하고 20, 25, 30, 35 및 40°C에서 3일간 배양한 후에 균체의 생육과 섬유소 분해효소의 생산성을 측정하였다. 배지의 구성성분은 79.9 g/L 미강, 8.52 g/L ammonium chloride 및 배지의 초기 pH는 6.1이었다. 배지에 첨가되는 K₂HPO₄, NaCl, MgSO₄ • 7H₂O, 및 (NH₄)₂SO₄의 농도는 3.72, 0.54, 0.70, 및 0.34 g/L이었으며, 이는 섬유소 분해효소의 생산에 최적으로 확인된 조건이었다. 그림 6과 같이 균체의 생장에 최적인 온도는 35°C이었으나, 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 온도는 25°C이었다. 최적 온도에서 균체의 생육을 나타내는 건조중량은 3.18 g/L이었으며 섬유소 분해효소의 생산성은 110.8 U/mL이었다.

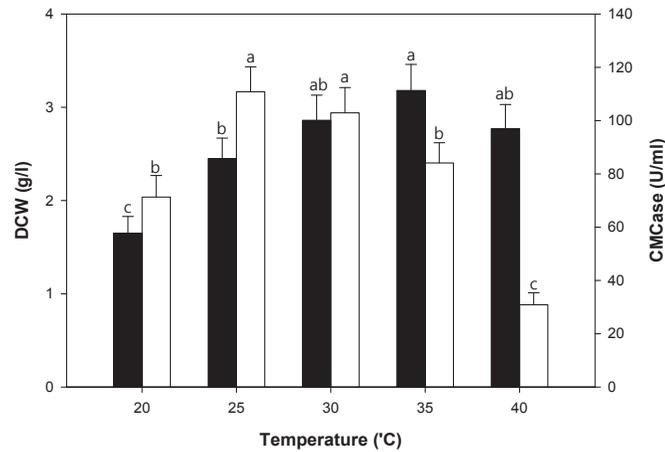


Fig. 6. Effect of temperature on cell growth and production of CMCase by *C. lytica* LBH-14 (■, DCW and □, CMCase).

(3) 생물배양기 규모에서의 생산조건 최적화

(가) 교반속도 및 통기량의 최적화

C. lytica LBH-14 균주를 사용한 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 교반속도와 통기량에 대한 실험을 수행하였다. 섬유소 분해효소의 생산에 사용한 배지의 구성성분은 80.0 g/L rice bran, 8.52 g/L ammonium chloride, 3.72 g/L K_2HPO_4 , 0.54 g/L NaCl, 0.70 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0.34 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 이었다. 교반속도 및 통기량의 최적화에 사용한 생물배양기는 한국바이오텍에서 제작한 7 L 규모의 생물배양기로 온도, 배지의 pH, 교반속도 및 통기량이 자동으로 조절되는 기능을 갖고 있었다. 섬유소 분해효소를 생산하기 위하여 전배양한 배양액을 본 배양액에 5% 접종한 후, 25°C에서 일간 배양한 후에 균체의 생육 및 섬유소 분해효소의 생산성을 측정하였다. 통계학적 방법으로 섬유소 분해효소를 생산하기 위한 교반속도와 통기량을 최적화하기 전에 one-factor-at-a-time 방법으로 교반속도와 통기량을 최적화하였다. 교반속도를 최적화하기 위하여 통기량을 1.0 vvm으로 고정하고 교반속도를 각각 200, 300, 400 및 500 rpm으로 조정하여 배양하였다. 그림 7과 같이 균체의 생육 및 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 교반속도는 400 rpm이었다. 통기량을 1.0 vvm으로 고정하고 교반속도를 400 rpm으로 3일간 배양한 경우에 균체의 생육은 3.23 g/L이었으며, 섬유소 분해효소의 생산은 118.2 U/mL이었다.

또한, 교반속도를 400 rpm으로 고정하고 통기량을 각각 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 vvm으로 3일간 배양한 결과는 그림 8과 같이 균체의 생육에 최적인 통기량은 1.0 vvm이었으나, 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 통기량은 0.5 vvm이었다. 교반속도 400 rpm 및 통기량 0.5 vvm으로 3일간 배양한 결과, 균체의 생육은 3.15 g/L이었으며, 섬유소 분해효소의 생산성은 121.9 U/mL이었다. 그림 9와 같이 one-factor-at-a-time 방법으로 교반속도와 통기량을 최적화한 결과, 균체의 생육에 최적인 교반속도와 통기량은 각각 400 rpm 및 1.0 vvm이었으나, 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 교반속도와 통기량은 각각 400 rpm 및 0.5 vvm이었다. 이는 균체의 생육에 최적인 생물배양기의 교반속도와 통기량이 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 최적인 조건과 다르다는 사실을 확인할 수 있었다.

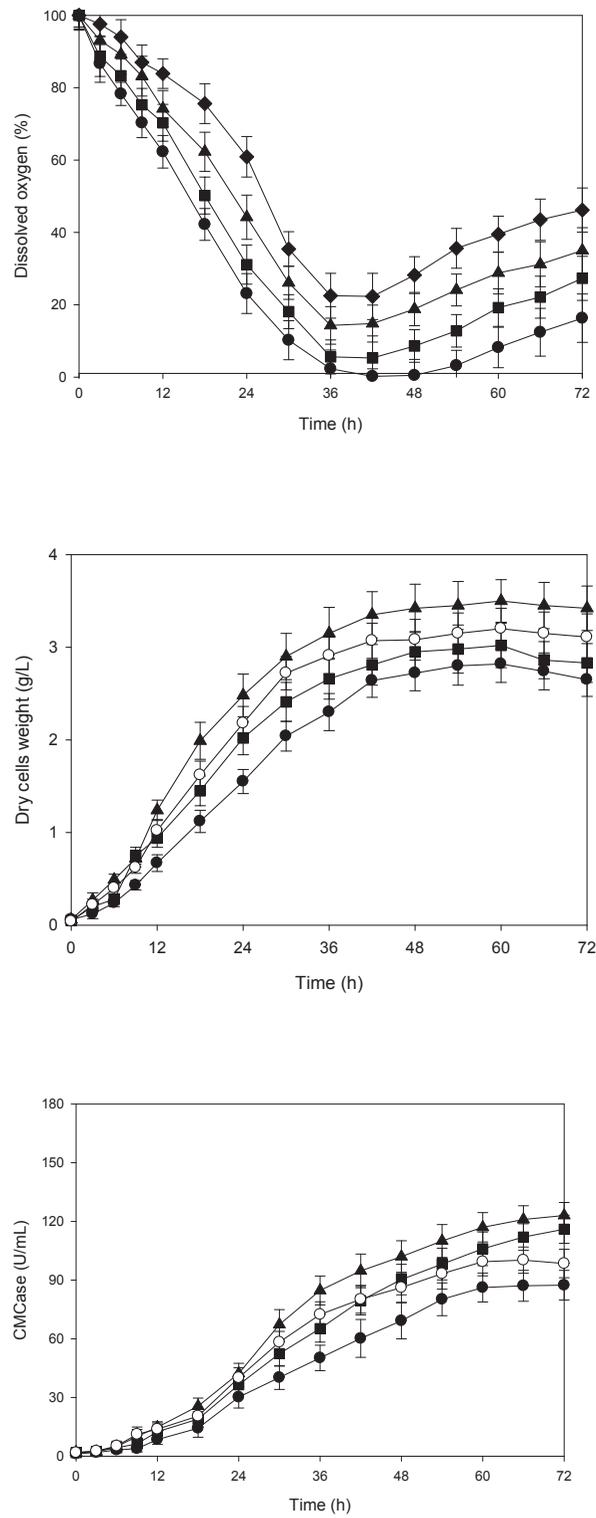


Fig. 7. Effect of agitation speed on dissolved oxygen (A), cell growth (B), and production of CMCase (C) by *C. lytica* LBH-14 in 7 L bioreactor (●, 200rpm; ■, 300 rpm; ▲, 400 rpm; and △, 500 rpm).

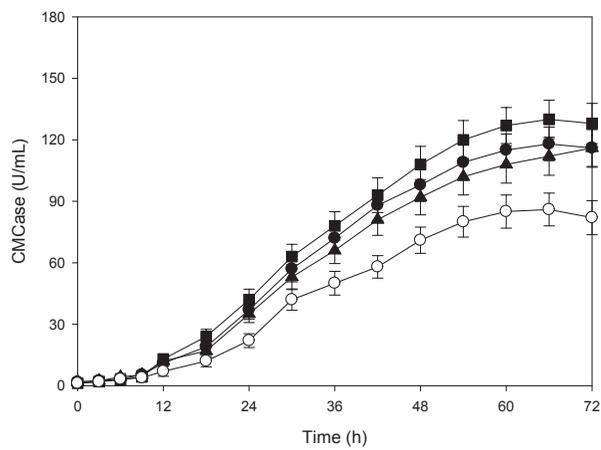
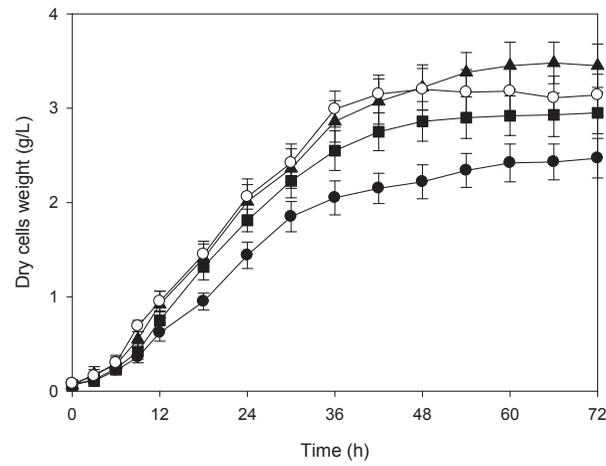
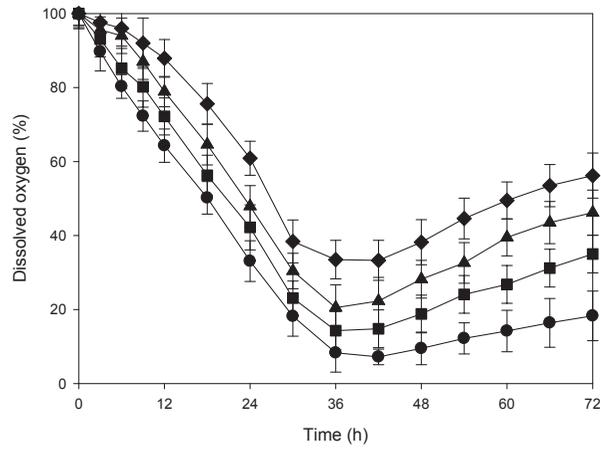


Fig. 8. Effect of aeration rate on dissolved oxygen (A), cell growth (B), and production of CMCase (C) by *C. lytica* LBH-14 in 7 L bioreactors (●, 0.5vvm; ■, 1.0 vvm; ▲, 1.5 vvm; and △, 2.0 vvm).

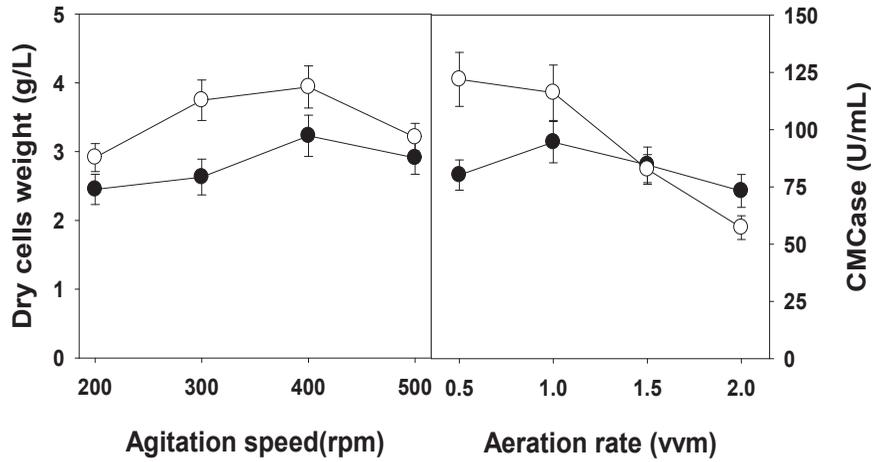


Fig. 9. Comparison of optimal agitation speed and aeration rate for cell growth and production of CMCCase by *C. lytica* LBH-14 in 7 L bioreactors (●, DCW and ○, CMCCase).

(나) 통계학적 방법에 의한 교반속도 및 통기량 최적화

One-time-at-a-factor 실험의 결과를 참고로 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 생물배양기의 교반속도와 통기량을 response surface method를 사용하여 최적화하였다. 교반속도와 통기량의 최저 및 최대값을 각각 300과 500 rpm 및 0.5와 1.5 vvm으로 설정하고, Design-Expert (Version 7.1.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) 프로그램을 사용하여 표 5 같은 central composite design을 하였다.

Table 5. Central composite design and determined response values

Run	X ₁ (rpm)	X ₂ (vvm)	Y ₁ (g/L)	Y ₂ (U/mL)
1	540	1.00	3.08	97.5
2	400	0.29	2.98	117.1
3	400	1.00	3.21	119.4
4	300	1.50	3.05	102.9
5	400	1.00	3.18	118.2
6	300	0.50	3.03	119.2
7	400	1.71	3.07	89.6
8	500	0.50	3.03	110.0
9	400	1.00	3.19	118.4
10	500	1.50	3.08	85.4
11	260	1.00	3.01	116.3
12	400	1.00	3.23	112.4
13	400	1.00	3.24	112.0

이 프로그램을 사용하여 13의 서로 다른 조건으로 실험하였으며, 균체의 생육 및 섬유소 분해효소의 생산성을 프로그램에 대입하여 최적 조건 등을 계산하였다. 서로 다른 13가지의 조건에서 배양한 결과, 균체의 건조 중량을 측정된 균체의 생육은 2.98 ~ 3.24 g/L이었으며 섬유소 분해효소 생산성은 89.6 ~ 118.4 U/mL이었다. 이와 같은 결과를 프로그램에 대입하여 분석한 결과, 표 6과 같이 균체의 생육에 대한 모델의 F 값은 34.02이었으며 섬유소 분해효소의 생산에 대한 모델의 F 값은 41.84로 이 결과가 상당히 신빙성이 있다고 확인되었다.

Table 6. Parameter estimates and analysis of variance (ANOVA) of the design for cell growth and production of CMCase by *C. lytica* LBH-14 in a 7 L bioreactor.

	Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F-value	Probe>F
Cell growth	Model	5	0.095	0.019	34.02	<0.0001
	X ₁	1	0.002	0.002	3.72	0.0952
	X ₂	1	0.004	0.004	8.69	0.0215
	X ₁ X ₂	1	0.000	0.000	0.40	0.5462
	X ₁ ²	1	0.044	0.044	78.31	<0.0001
	X ₂ ²	1	0.056	0.056	99.29	<0.0001
	Error	4	0.004	0.001	-	-
	Total	12	0.099	-	-	-
CMCase	Model	5	1575.570	315.110	41.84	<0.0001
	X ₁	1	354.940	354.940	47.13	0.0002
	X ₂	1	795.820	795.820	105.67	<0.0001
	X ₁ X ₂	1	17.220	17.220	2.29	0.1742
	X ₁ ²	1	158.780	158.780	21.08	0.0025
	X ₂ ²	1	298.680	298.680	39.66	0.0004
	Error	4	51.090	12.770	-	-
	Total	12	1628.290	-	-	-

균체의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 미치는 생물배양기의 교반속도 및 통기량에 대한 영향은 p 값으로 비교할 수 있었는데, p 값이 작을수록 각 요소가 균체의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향이 크다는 것을 의미한다. 따라서 균체의 생육에 미치는 통기량의 영향은 교반속도의 영향 보다 높음을 알 수 있었으며, 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 교반속도의 영향은 통기량의 영향보다 높음을 알 수 있었다. Design-Expert 프로그램으로 분석한 균체 생육의 최적인 교반속도 및 통기량은 각각 398 rpm 및 1.10 vvm이었으며, 이 조건에서 균체의 생육은 3.21 g/L로 예측되었다. 교반속도와 통기량이 변화에 따른 균체 생육에 대한 모델식은 아래와 같다.

$$Y_I = 2.72 + 0.01X_1 + 0.03X_2 - 0.01X_1X_2 - 0.05X_1^2 - 0.11X_2^2$$

또한, 섬유소 분해효소 생산에 최적인 교반속도 및 통기량은 각각 371 rpm 및 0.70 vvm이었으며, 이 조건에서 섬유소 분해효소의 생산은 120.8 U/mL로 예측되었다. 교반속도와 통기량이 변화에 따른 섬유소 분해효소의 생산에 대한 모델식은 아래와 같다.

$$Y_2 = 120.94 - 8.42X_1 - 13.06X_2 - 0.27X_1X_2 - 7.94X_1^2 - 6.92X_2^2$$

그림 9와 같이 생물배양기의 교반속도와 통기량이 균체의 생육과 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 복합적인 영향을 확인하였다. 각 그래프의 기울기가 급할수록 각각의 요소가 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향이 크다는 것을 의미한다. 각각의 그래프는 교반속도와 통기량이 균체의 생육 및 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 복합적인 영향 및 최대값을 나타내고 있다.

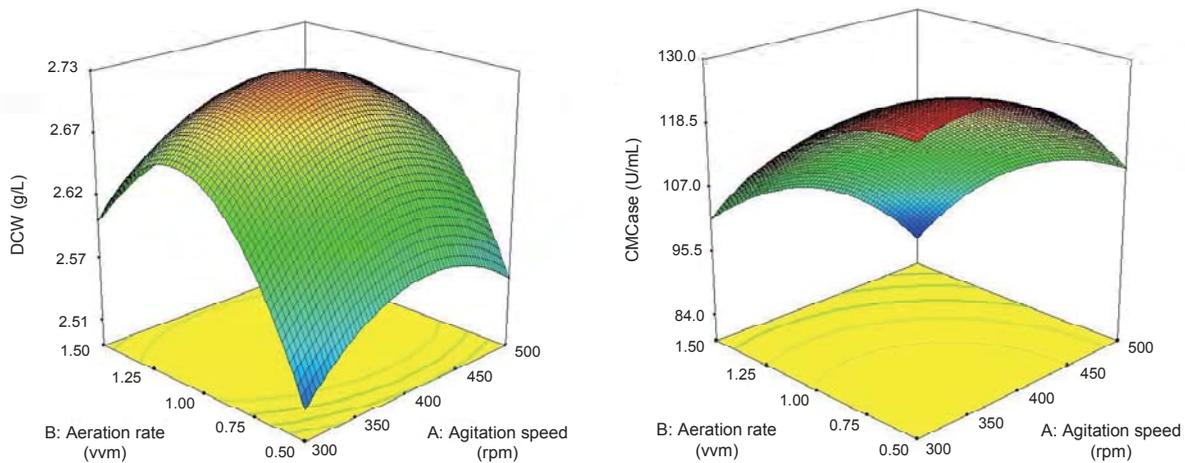


Fig. 9. Three dimensional response surface plots displaying combined effect of agitation speed and aeration rate on cell growth (a) and production of CMCCase (b) by *C. lytica* LBH-14 in 7 L bioreactors.

(4) 파이롯트 (pilot) 규모에서의 생산조건 최적화

파이롯트 규모 생물배양의 내압이 *C. lytica* LBH-14의 생육 및 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 생산에 영향을 확인하였다. 생물배양기의 규모는 100 L이며 내압을 조정할 수 있는 장치를 가지고 있는 배양기를 사용하였다. 생물배양기의 교반속도와 통기량은 각각 250 rpm 및 0.7 vvm이었다. RSM에 의하여 실험한 결과 7 L 생물배양기의 최적 교반속도 및 통기량은 371 rpm 및 1.2 vvm이었으나, 7 L 및 100 L 생물배양기의 임펠라 직경을 참고로 계산한 결과 100 L 생물배양기의 교반속도 및 통기량을 각각 250 rpm 및 0.7 vvm으로 결정하였다. 생물배양기의 내압을 각각 0.000, 0.004, 0.020, 0.0040, 0.060 및 0.080 MPa로 조정하여 72시간 배양하였다. 그림 10과 같이 생물배양기의 내압이 증가할수록 배양액의 용존산소농도가 높다는 것을 알 수 있었다. 내압이 각각 0.00, 0.02, 0.004, 0.06 및 0.08 MPa인 경우에 72시간 후에 측정된 섬유소 분해효소의 생산성은 각각 111.5, 135.6, 146.3, 153.6 및 71.4 U/mL이었다. 최적의 내압하에서 생산하는 섬유소 분해효소의 생산성은 내압을 가하지 않은 경우에 비하여 1.38배 향상되었다. 이는 균체의 생육에 최적인 내압과 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 내압과 다름을 알 수 있었다.

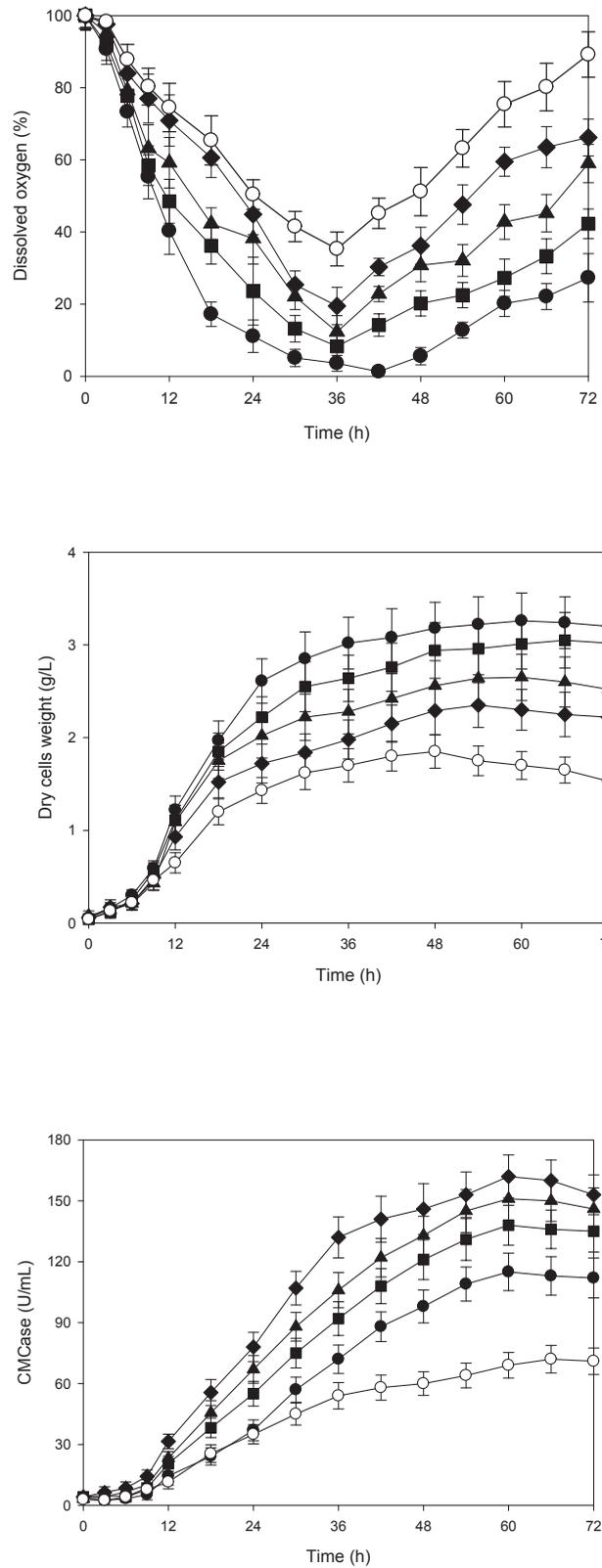


Fig. 10. Effect of inner pressure in a 100 L bioreactor on dissolved oxygen in medium (a), cell growth (b), and production of CMCCase (c) by *C. lytica* LBH-14 in 100 L bioreactors (●, 0.00 MPa; ■, 0.02 MPa; ▲, 0.04 MPa; ◆, 0.06 MPa; and ○, 0.08 MPa).

용존산소 농도의 증가는 균체의 증식 및 균체가 생산하는 물질의 생산성을 높일 수 있다. 생물배양기의 교반속도 및 통기량을 증가시켜 배양액의 용존산소 농도를 증가시킬 수 있다. 동일한 산소를 생물배양기에 공급한 경우에 생물배양기의 내압을 증가시켜 배양액의 용존산소 농도를 높일 수 있다. 생물배양기의 내압을 최적화를 통하여 섬유소 분해효소의 생산성을 증가할 수 있었다. 본 연구를 통하여 섬유소 분해효소의 생산을 위한 탄소원과 질소원을 최적화 하였으며, 생물배양기의 교반속도 및 통기량을 최적화하였다. 또한, 표 7과 같이 파이롯트 배양기의 내압을 최적화하여 섬유소 분해효소의 생산성을 플라스크 규모의 70.1 U/mL에서 파이롯트 규모의 153.6 U/mL까지 향상시킬 수 있었다.

Table 7. Comparison of optimal conditions for cell growth and production of CMCase by *C. lytica* LBH-14 using two experimental methods

Scale	Optimal conditions	One factor at a time experiment		Response surface method	
		DCW	CMCase	DCW	CMCase
Flask scale 1	Rice bran (g/L)	125	75	100.0	79.9
	Ammonium chloride (g/L)	5.0	7.5	5.00	8.52
	Initial pH	7.0	6.0	7.0	6.1
	Maximal production	3.19 g/L	70.0 U/mL	3.15 g/L	70.1 U/mL
Flask scale 2	Temperature (°C)	35	25	-	-
	Maximal production	3.18 g/L	110.8 U/mL	-	-
Lab bioreactor	Agitation speed (rpm)	400	400	398	371
	Aeration rate (vvm)	1.0	0.5	1.10	0.70
Pilot bioreactor	Maximal production	3.45 g/L	128.0 U/mL	3.21 g/L	120.8 U/mL
	Inner pressure (Mpa)	0.00	0.06	-	-
	Maximal production	3.51 g/L	153.6 U/mL	-	-

제4절 약용작물의 유용 물질을 이용한 항암보조제 및 항장제품의 상용화

1. 코디세핀 고탐유 동충하초를 이용한 항암치료 보조제 개발

(제 4 세부 : 동아대학교, 정민호)

가. 코디세핀 고탐유 동충하초의 안전성 및 유효성 검증

(1) 실험재료 및 방법

(가) 코디세핀 고탐유 동충하초의 안전성 시험

① 설치류 단회 투여 독성시험

SD rat 5주령 동물을 (주)오리엔트에서 구입하여 식품의약품안전청 제2005-60호(10.21)의 “의약품등의독성기준시험” 및 비임상관리기준에 따라 시험하였다. 시험물질은 건강기능성식품의 단회 독성시험에서 적용되는 최고용량(2,000 mg/kg body weight)로부터 공비2로 투여 용량을 설정하였다.

② 미생물 복귀돌연변이 시험

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA 1537 및 *E.coli* WP2uvrA 균주는 Molecular Toxicology사로부터 구입하였다. 이들 균주는 본 시험에 앞서 histidine 요구성, crystal violet 감수성, UV 감수성, 항생제 내성 및 자연 복귀돌연변이 빈도 등의 형질확인시험을 통해 유전적인 특성을 확인하였다.

시험은 OECD guideline for the testing of chemicals [OECD, 1993a]에 준하여 Ames [Ames et al., 1975; Maron et al., 1983]의 방법에 따라 비교적 유전독성에 대한 민감도가 높은 preincubation 방법으로 실시하였다. 시험물질 농도설정 시험을 직접법(-S9)과 대사활성화법(+S9)에 따라 실시하여 균의 생육저해가 나타나지 않는 것을 확인하였다.

③ 염색체 이상 시험

시험에 사용한 Chinese hamster lung (CHL) fibroblast 세포주는 ATCC에서 구입하였으며, 염색체수(chromosome number)는 25개이며, 세포주기는 15~18 시간이다. 시험의 최고농도를 결정하기 위하여 MTT 방법으로 최고 농도 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 로부터 7 단계로 희석하여 세포성장 IC50을 산출하였으며, 이 농도에서 다시 4 단계로 희석하여 mitotic index IC50을 산출하였다. 염색체 이상 시험은 GLP 규정에 따라 실시하였으며, 구조이상(structural aberration)과 수적이상(numerical aberration)으로 분류하였고, 구조이상은 gap (chromatid and chromosome gap), ctb (chromatid break), cte (chromatid exchange), csb (chromosome break), cse (chromosome exchange)로 세분하여 판정하였다.

④ 소핵시험

생후 7주된 수컷 ICR mouse를 (주)코아텍에서 구입하여 식품의약품안전청 제2005-60호(10.21)의 “의약품등의독성기준시험” 및 비임상관리기준에 따라 시험하였다. 시험물질은 단회

투여 독성시험에서와 동일하게 적용하였다. 골수 도말표본 제작은 Schmid(1975)의 방법에 따라 실시하였으며, 광학현미경하에서 2,000개의 다염성적혈구(PCE)에서 소핵(MNPCE) 출현빈도수를 계수하였다.

(나) 코디세핀 고함유 동충하초의 유효성 시험

- ① 개량 동충하초에서 분리한 코디세핀의 C57BL6 마우스(8주령) 비장세포에 대한 면역 활성화
 - ㉠ 시험물질: *Cordyceps militaris* JLM 0636 주에서 분리한 코디세핀 10 마이크로그램
 - ㉡ 용매(대조물질): 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline)
 - ㉢ 자극물질: 면역자극제인 리포포리사카라이드(LPS) 2 마이크로그램
 - ㉣ 실험: 자극물질 단독 처리와 자극물질과 시험물질을 병용 처리한 경우의 배양 기간에 따른 (즉시, 24시간, 48시간, 72시간) 비장세포의 사이토카인 생산량 비교.

- ② 개량 동충하초 식이와 음용에 의한 종양이식 C3H/He 마우스(6주령)의 면역지표 변화와 종양성장 억제 및 생존 기간 연장 효과
 - ㉠ 실험동물군
 - a. 정상 대조군(normal): 기본 식이와 기본 음용수 제공
 - b. 종양 대조군(control): 기본 식이와 기본 음용수 제공
 - c. 야생형 동충하초 종양 실험군(CMloC): 야생형 동충하초 첨가 식이 음용수 제공
 - d. JLM 0636 주 종양 실험군(CMhiC): JLM 0636 주 첨가 식이 음용수 제공
 - ㉡ 사료
 - a. 대조 식이: casein 20%, cornstarch 15%, sucrose 44.5%, cellulose 5%, corn oil 10%, AIN 93 M-MX mineral mixture 4%, AIN 93 VX vitamin mixture 1%, choline bitartrate 0.2%, and DL-methionine 0.3%
 - b. 실험 식이: cornstarch 대신 동충하초 건조 자실체 가루를 3% 되도록 첨가
 - ㉢ 음용수
 - a. 대조 음용수: 자외선 멸균 처리한 물
 - b. 실험 음용수: 동충하초 열수추출액을 1% 되도록 첨가
 - ㉣ 실험디자인
 - a. 실험동물군에 해당하는 식이와 음용수 2 주간 제공
 - b. 실험 1일차: FM3A 마우스 유방암 세포주 2×10^6 cells/50 μ l saline을 우측 골반부에 피하주사
 - c. 생존기간 및 종양 부피 측정[(width)² × length × 0.52]
 - d. 종양 부피가 100 mm³ 이상에서 비장세포 분리
 - e. T 세포에 선택적으로 활성화를 유도하는 concanavalin A에 대한 반응 배양 24시간째 cytokine (IL-2와 IL-4)을 ELISA 방법으로 측정
배양 72시간째 세포증식(SI)을 BrdU incorporation assay 방법으로 측정
 - f. 비장세포의 CD4 발현 T 세포 분포
표면분자(CD4, CD25)와 세포내 분자(FoxP3)를 형광특이항체 염색, 유세포분석기로 측정

g. 비장세포의 CD8 발현 T 세포 분포

표면분자(CD8)와 세포내 분자(IFN- γ)를 형광특이항체 염색, 유세포분석기로 측정

(2) 연구결과 및 고찰

(가) 코디세핀 고함유 동충하초의 안전성 시험

① 설치류 단회 투여 독성시험

모든 시험물질 투여그룹에서 시험물질에 기인한 외견상의 임상적 증상변화도 관찰되지 않았으며, 사망 동물도 발생하지 않았다. 또한 체중에서도 암수 모든 군에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 차이가 나타나지 않았으며, 부검시 시험물질을 투여한 모든 군에서 어떠한 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다.

Clinical signs and body weight changes of SD rats orally treated with the hot water extract of *Cordyceps militaris* fruiting bodies (CMWE)

Sex	Dose (mg/kg)	No.	Sign	Day(s) after administration (Mean \pm SD)				
				0	1	3	7	14
Male	0	5	N	192.2 \pm 7.5	221.0 \pm 7.0	231.9 \pm 4.8	262.7 \pm 2.8	297.1 \pm 4.8
	500	5	N	199.1 \pm 7.1	216.7 \pm 8.2	230.0 \pm 9.7	259.8 \pm 12.0	294.9 \pm 17.5
	1,000	5	N	196.6 \pm 6.4	216.4 \pm 8.2	224.8 \pm 8.5	259.6 \pm 13.5	299.3 \pm 17.4
	2,000	5	N	195.4 \pm 7.9	214.7 \pm 8.6	223.8 \pm 9.1	258.7 \pm 10.1	297.9 \pm 10.3
Female	0	5	N	154.5 \pm 6.6	166.9 \pm 6.4	171.9 \pm 6.2	184.4 \pm 7.0	202.5 \pm 10.5
	500	5	N	156.0 \pm 5.1	165.4 \pm 5.0	173.4 \pm 5.5	184.6 \pm 8.3	211.3 \pm 10.3
	1,000	5	N	154.7 \pm 4.3	167.8 \pm 3.3	170.2 \pm 2.0	183.9 \pm 3.9	203.7 \pm 8.0
	2,000	5	N	153.9 \pm 4.9	161.9 \pm 7.3	165.9 \pm 5.4	181.3 \pm 8.9	197.3 \pm 9.4

No.: number of animal
Sign: clinical sign
N: normal,

② 미생물 복귀돌연변이 시험

사용된 시험물질은 각 농도별 처리군에서 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 E. coli WP2uvrA 5 균주를 사용한 직접법(-S9)과 대사활성화법(+S9) 모두에서 음성대조군과 비교하여 변이원성 콜로니의 생성 수치는 증가하지 않았으며, 용량의존성도 확인되지 않았다. 본 시험에서의 결과는 GLP 규정에 따라 동일한 과정으로 재확인시험을 실시하여 검증하였다.

**Mutagenicity (main test) of
the hot water extract of *Cordyceps militaris* fruiting bodies (CMWE)**

S-9 Mix	Test materials ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of colonies/plate (Mean \pm SD)				
		Base substitution			Frame shift	
		TA100	TA1535	E. coli	TA98	TA1537
Without S-9 mix	DW	123 \pm 0.6	15 \pm 2.3	37 \pm 7.1	21 \pm 1.2	13 \pm 1.5
	50	114 \pm 9.8	14 \pm 2.1	41 \pm 7.5	22 \pm 1.5	15 \pm 1.7
	100	114 \pm 9.6	15 \pm 3.5	37 \pm 6.0	24 \pm 1.0	12 \pm 2.1
	500	110 \pm 17.0	20 \pm 2.6	42 \pm 4.5	25 \pm 2.1	16 \pm 2.1
	1,000	108 \pm 8.7	21 \pm 1.7	49 \pm 3.5	26 \pm 1.2	14 \pm 1.5
	5,000	146 \pm 11.4	18 \pm 4.0	45 \pm 5.6	24 \pm 1.7	14 \pm 3.0
	Positive control ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	AF-2 0.01	NaN3 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1	9-AA 80
		520 \pm 13.7	160 \pm 12.5	354 \pm 23.3	212 \pm 15.4	175 \pm 9.5
With S-9 mix	DW	115 \pm 5.5	16 \pm 3.0	41 \pm 1.5	33 \pm 1.5	12 \pm 2.1
	50	121 \pm 12.1	20 \pm 3.2	40 \pm 5.1	30 \pm 8.5	11 \pm 1.7
	100	122 \pm 20	16 \pm 3.6	39 \pm 8.1	30 \pm 3.6	13 \pm 3.1
	500	127 \pm 15.9	16 \pm 2.3	56 \pm 1.2	28 \pm 5.3	15 \pm 2.5
	1,000	125 \pm 7.2	17 \pm 3.2	55 \pm 1.5	27 \pm 4.5	14 \pm 1.5
	5,000	148 \pm 21.6	18 \pm 2.5	50 \pm 6.7	29 \pm 1.0	13 \pm 1.5
	Positive control ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	2-AA 1.0	2-AA 2.0	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2.0
		499 \pm 71.8	118 \pm 12.5	292 \pm 21.5	209 \pm 22.8	192 \pm 23.6

**Mutagenicity (reconfirmation test) of
the hot water extract of *Cordyceps militaris* fruiting bodies (CMWE)**

S-9 Mix	Test materials ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of colonies/plate (Mean \pm SD)				
		Base substitution			Frame shift	
		TA100	TA1535	E. coli	TA98	TA1537
Without S-9 mix	DW	121 \pm 1.5	15 \pm 1.2	34 \pm 4.6	24 \pm 2.5	9 \pm 1.0
	50	118 \pm 7.8	13 \pm 2.5	36 \pm 6.7	26 \pm 1.7	8 \pm 0.6
	100	117 \pm 9.5	12 \pm 1.5	37 \pm 11.1	24 \pm 2.0	8 \pm 2.1
	500	134 \pm 18.6	22 \pm 0.6	36 \pm 5.5	28 \pm 2.6	7 \pm 1.5
	1,000	128 \pm 15.9	15 \pm 2.5	45 \pm 7.0	28 \pm 2.3	8 \pm 2.0
	5,000	141 \pm 19.6	18 \pm 4.5	45 \pm 2.5	28 \pm 2.5	9 \pm 1.0
	Positive control ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	AF-2 0.01	NaN3 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1	9-AA 80
		469 \pm 27.6	115 \pm 5.6	313 \pm 115	163 \pm 9.0	153 \pm 20.8
With S-9 mix	DW	115 \pm 10.3	14 \pm 2.3	36 \pm 0.6	26 \pm 3.8	14 \pm 4.0
	50	129 \pm 1.5	15 \pm 2.5	30 \pm 2.5	30 \pm 2.6	16 \pm 3.1
	100	127 \pm 12.7	10 \pm 1.5	38 \pm 5.1	35 \pm 3.8	14 \pm 3.8
	500	136 \pm 18.7	17 \pm 1.5	46 \pm 5.5	35 \pm 4.6	15 \pm 3.1
	1,000	149 \pm 5.6	17 \pm 3.6	49 \pm 2.5	36 \pm 1.0	15 \pm 3.2
	5,000	143 \pm 11.6	19 \pm 3.0	47 \pm 2.6	36 \pm 7.0	10 \pm 1.0
	Positive control ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	2-AA 1.0	2-AA 2.0	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2.0
		496 \pm 19.1	115 \pm 8.9	409 \pm 21.4	179 \pm 12.7	222 \pm 18.7

③ 염색체 이상 시험

시험 결과 직접법인 6-S, 24-S 조건과 대사활성화제인 6+S 조건에서 음성대조군의 염색체이상 빈도는 gap 포함 유무에 상관없이 1~3.5%, 양성대조물질(MMC)에 의한 염색체이상 빈도는 20.5~67.5%로 나타났으며, 시험물질은 각 농도단계에서 3~5% 빈도로 용량의존성도 나타나지 않았으며, 통계적인 유의성도 없었다.

IC₅₀ of growth in CHL cells in the presence and absence of S-9 mix of the hot water extract of *Cordyceps militaris* fruiting bodies (CMWE)

hr	Test materials	S-9 mix	Treatment (µg/ml)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
6 (6-S)	DW	-	0	100	312.5
		-	5,000	30	
	Extract	-	1,250	42	
		-	625	47	
		-	312.5	51	
		-	78.1	64	
		-	19.5	80	
6 (6+S)	DW	+	0	100	5,000
		+	5,000	62	
	Extract	+	1,250	78	
		+	625	80	
		+	312.5	85	
		+	78.1	95	
		+	19.5	102	
24 (24-S)	DW	-	0	100	78.1
		-	5,000	12	
	Extract	-	1,250	20	
		-	625	25	
		-	312.5	30	
		-	78.1	51	
		-	19.5	62	
-	9.8	71			

IC₅₀ of mitotic index in CHL cells in the presence and absence of S-9 mix of the hot water extract of *Cordyceps militaris* fruiting bodies (CMWE)

hr	Test materials	S-9 mix	Treatment (µg/ml)	Mitotic index	Inhibition (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
6 (6-S)	DW	-	0	32.4	100	-
		-	312.5	13.0	40	19.5
	Extract	-	78.1	14.8	45	
		-	19.5	17.0	52	
		-	9.8	27.9	86	
6 (6+S)	DW	+	0	32.5	100	-
		+	5,000	15.2	46.7	1,250
	Extract	+	1,250	16.9	52	
		+	625	29.0	89.2	
		+	312.5	31.8	97.8	
24 (24-S)	DW	-	0	23.8	100	-
		-	78.1	8.9	37.3	4.9
	Extract	-	19.5	9.9	41.6	
		-	9.8	11.2	47	
		-	4.9	12	50	

**Chromosomal aberration in CHL cells of
the hot water extract of *Cordyceps militaris* fruiting bodies (CMWE)**

Treatment			Chromosome aberrations / 200 cells				Total aberrations (%)	Extra aberrations (PP+ER)
			Chromitid type		Chromosome type			
hr	Compound / S-9 mix	Conc. (µg/ml)	ctb	cte	csb	cse		
6 (6-S)	DW	0	1	1	0	0	*1	0
	Extract	19.5	2	4	0	0	3	1
	(without S-9 mixture)	9.8	1	9	0	0	5	0
	MMC	4.9	2	5	0	0	3.5	0
6 (6+S)	DW	0.5	33	99	3	0	*67.5	1
	DW	0	1	6	0	0	*3.5	0
	Extract	1,250	2	3	0	1	3	0
	(with S-9 mixture)	625	0	3	1	1	2.5	0
24 (24-S)	CPA	312.5	4	4	0	0	4	0
	DW	10	10	26	1	4	*20.5	0
	DW	0	1	3	0	0	*2	0
	Extract	4.9	2	4	0	1	3.5	0
24 (24-S)	(without S-9 mixture)	2.4	2	4	0	0	3	0
	MMC	1.2	0	8	0	0	4	0
	CPA	0.5	13	28	0	6	*23.5	0

Con.: concentration
 ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange
 MMC: mitomycin C, CPA: cyclophosphamide
 PP: polyploidy, ER: endoreduplication
 * Significantly different from the control at P < 0.05. on chromosomal aberration of CHL cells

④ 소핵시험

시험물질의 용량별 투여군에서 MNPCE의 빈도가 음성대조군과 비교하여 증가하지 않았으며, 용량의존적으로 재현성 있는 증가도 보이지 않았다. 또한 세포독성을 나타내는 총적혈구 중 다염성적혈구(PCE/[PCE+NCE]) 비율에 있어서도 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군과 거의 유사하였으며, 용량상관성도 나타나지 않았고 통계학적으로 유의성도 없었다.

**Micronucleus formation in ICR mice of
the hot water extract of *Cordyceps militaris* fruiting bodies (CMWE)**

compound	Route	Dose (mg/kg)	No. of mice	Sampling time (hr)	MNPCE (Mean±SD)	PCE/PCE + NCE (Mean±SD)
DW	P.O.	0	5	24	*0.27±0.06	0.44±0.04
CPA	I.P.	70	5	24	*5.24±0.96	0.37±0.05
Extract	P.O.	2,000	5	24	0.21±0.11	0.44±0.06
	P.O.	1,000	5	24	0.17±0.03	0.42±0.07
	P.O.	500	5	24	0.17±0.09	0.38±0.08

MNPCE: PCE with one or more micronuclei,
 PCE: polychromatic erythrocyte,
 NCE: normochromatic erythrocyte
 CPA: cyclophosphamide.
 * Significantly different from the control at P < 0.05.

⑤ 결론

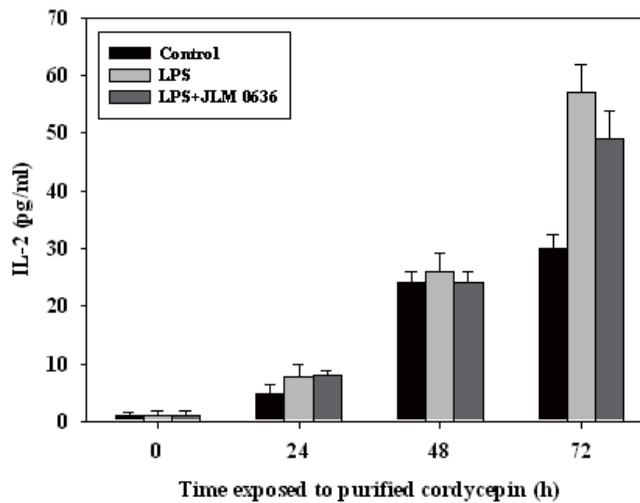
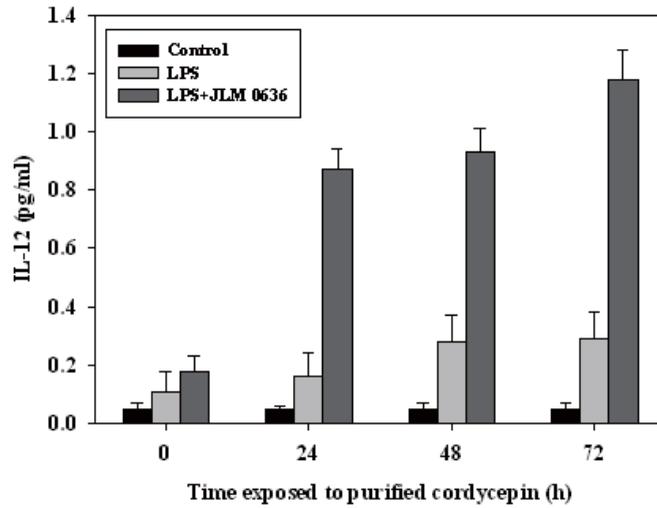
개량 동충하초(코디세핀 고함유 *Cordyceps militaris* JLM 0636 주) 열수 추출물의 유전독성시험과 설치류에서 단회 투여 독성시험에서는 특별한 이상소견을 발견할 수 없었다.

(나) 코디세핀 고함유 동충하초의 유효성 시험

① 코디세핀 고함유 동충하초에서 분리한 코디세핀의 C57BL6 마우스(8주령) 비장세포에 대한 면역 활성화

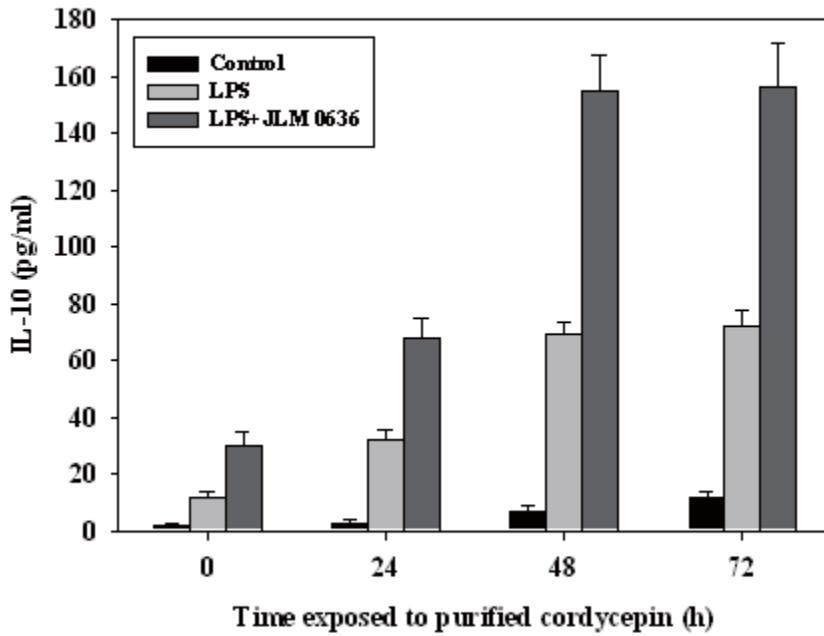
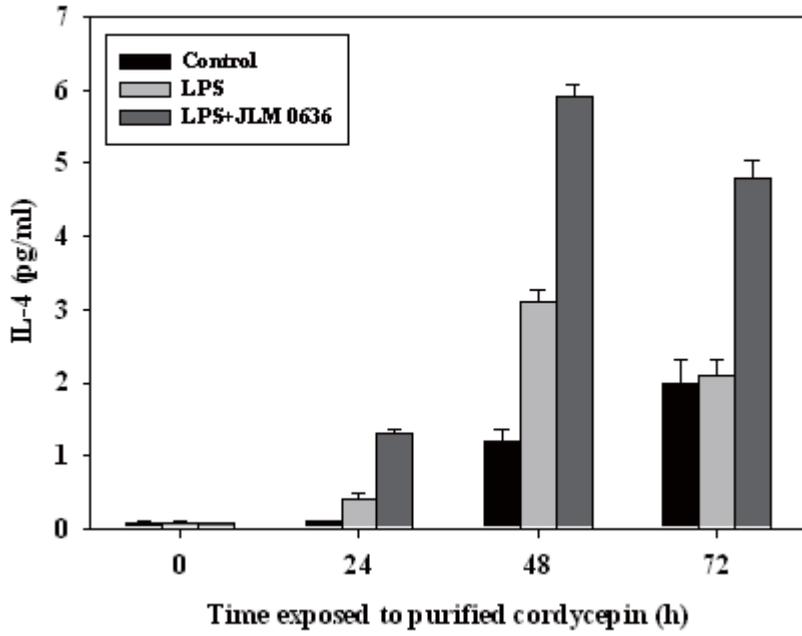
㉠ Th1 사이토카인

세포성 면역반응의 조절 역할을 담당하는 IL-12는 LPS 단독 자극에 비하여 2.9배 증가한다. 반면 세포성 면역반응 실행 세포인 T 세포에 직접 작용하는 IL-2는 LPS 단독 자극과 유의한 차이 없으며 오히려 배양 기간이 경과함에 따라 약간 감소하는 경향을 보인다.



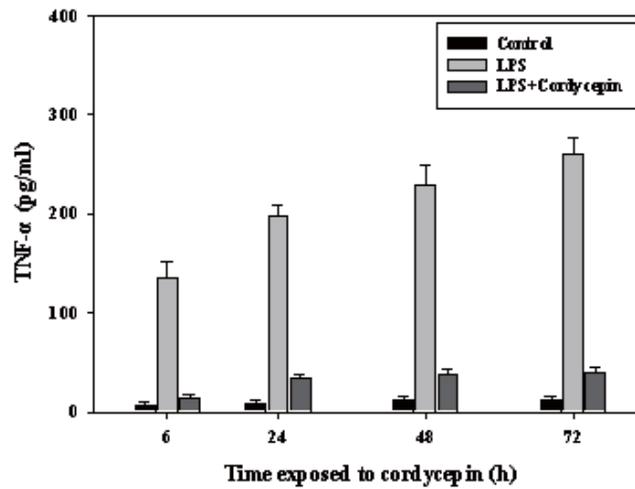
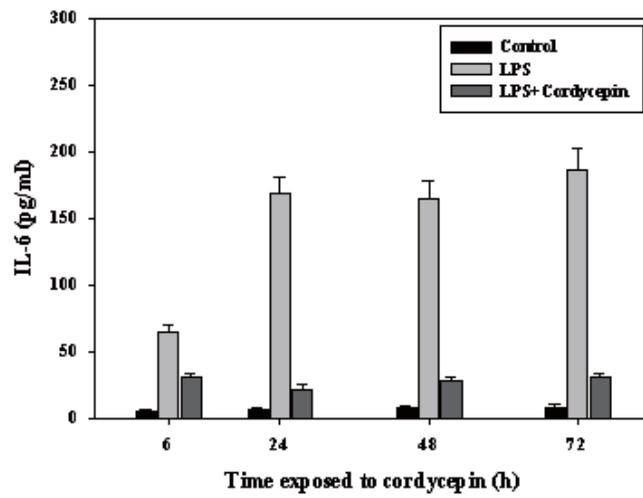
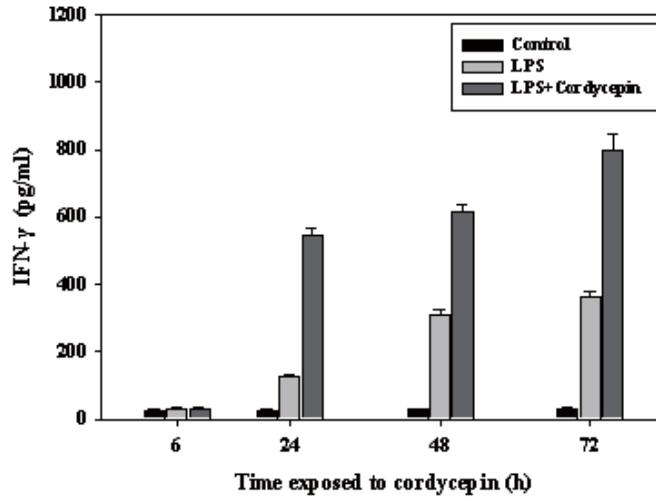
⊕ Th2 사이토카인

체액성 면역반응을 조절하는 IL-4와 IL-10은 LPS 단독 자극에 비하여 각각 1.9배와 1.8배 증가한다.



㉔ 염증 사이토카인

LPS 단독 자극에 비하여 인터페론 감마는 증가하는 반면 IL-6와 TNF- α 는 감소한다.



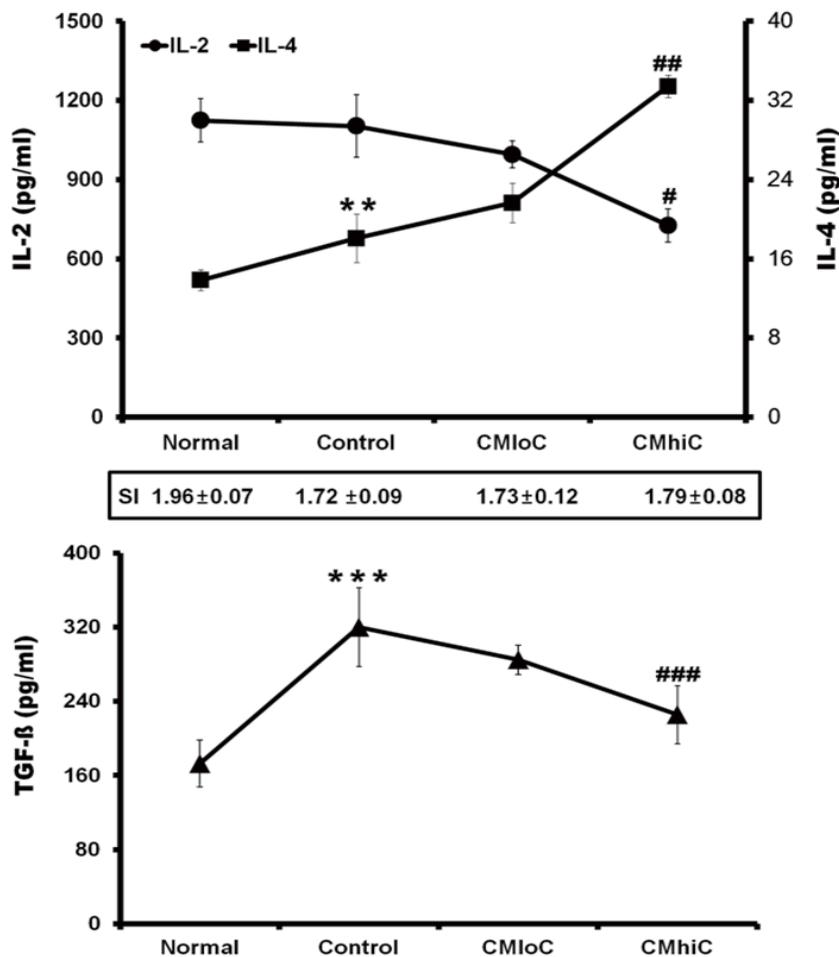
㉠ 결론

코디세핀이 면역 반응에 관여하는 전반적인 양상은 염증 반응과 같은 선천면역은 억제하면서 획득면역은 증강하는 방향인 것 같으나, 특기할 사항으로 IL-2의 감소와 인터페론 감마의 생산을 촉진한다는 것이다. 이는 regulatory T cell (Treg 세포)의 기능 감소와 cytotoxic T lymphocyte (CTL)의 기능 증가에 기여할 수 있는 현상으로 해석할 수 있다. 즉 종양 면역반응이 증강되는 방향으로 작용할 수 있음을 시사한다.

② 개량 동충하초 식이와 음용에 의한 종양이식 C3H/He 마우스(6주령)의 면역지표 변화와 종양성장 억제 및 생존 기간 연장 효과

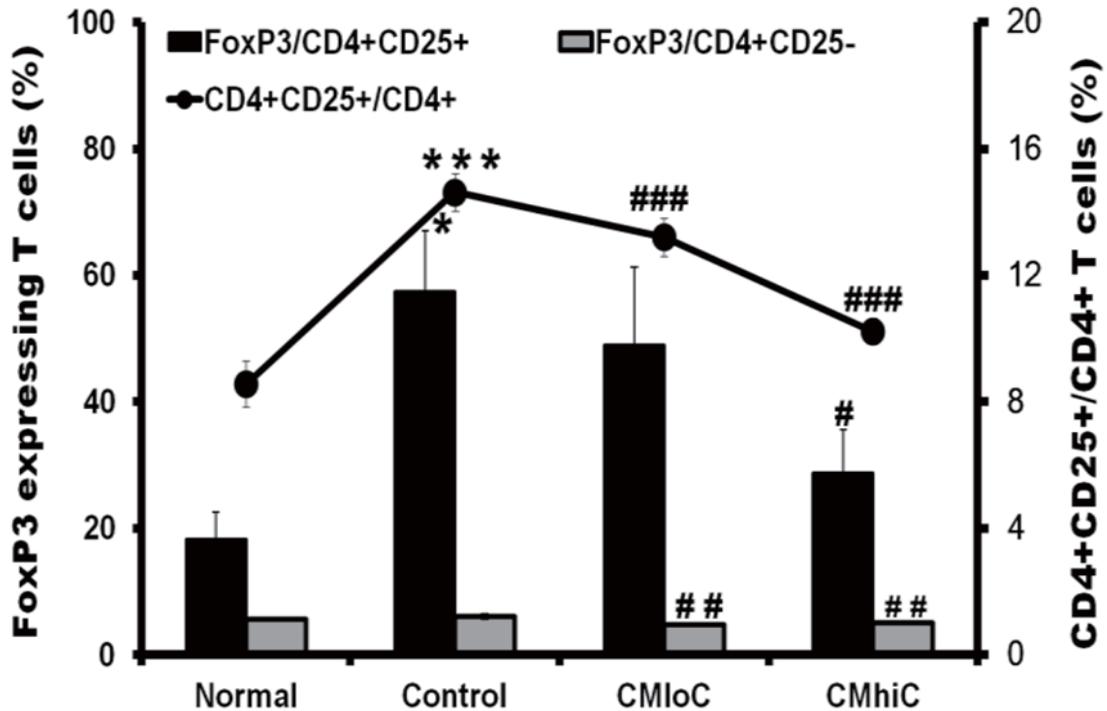
㉡ T 세포에 선택적으로 활성화를 유도하는 concanavalin A에 대한 반응

T 세포 증식 정도를 나타내는 stimulation index (SI)는 정상 대조군에 비하여 종양 실험군은 모두 감소하였으나, 종양 실험군 간에는 차이가 없다. 비장세포 배양 24시간째 IL-2 생산량은 CMhiC 군에서 유의한 감소를 보인다. 비장세포 배양 24시간째 IL-4 생산량은 CMhiC 군에서 유의한 증가를 보인다. 이는 동충하초가 T 세포의 증식에는 영향을 주지 않지만, 사이토카인 생산에 있어서는 앞의 실험 결과가 종양 형성 마우스의 T 세포에 대한 선택적 자극에서도 동일하게 나타남을 보여준다. 즉 regulatory T lymphocyte (Treg cell)의 기능 감소로 인한 종양 면역반응의 증가가 일어날 수 있음을 시사한다.



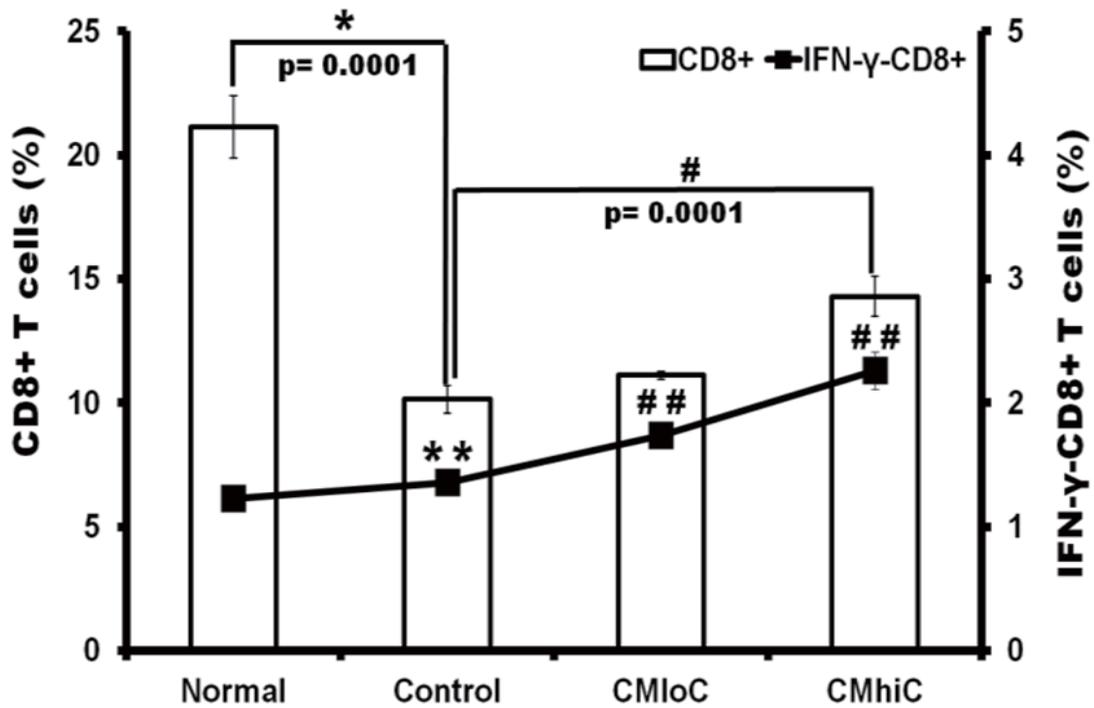
㉔ 비장세포의 CD4 발현 T 세포 분포

CD4를 발현하는 T 세포 중에서 CD25를 함께 표면에 발현하는 면역조절T세포 (regulatory T lymphocyte; Treg cell)는 정상 대조군에 비하여 종양 대조군에서 증가하지만, 동충하초를 먹인 종양 실험군에서는 감소하는 경향을 보인다. 특히 CMhiC 군에서는 정상 대조군 정도의 수준으로 돌아간다. 한편 Treg 세포의 특징인 세포 내 FoxP3 발현도 CD4와 CD25를 함께 발현하는 세포에서는 동일한 패턴을 보이는 반면, CD25를 발현하지 않는 세포에서는 변화가 없다. 따라서 식이에 따라 분명한 Treg 세포의 분포 차이를 나타낸다.



㉕ 비장세포의 CD8 발현 T 세포 분포

CD8을 발현하는 세포는 정상 대조군에 비하여 종양 대조군에서는 확연히 감소하지만, 동충하초를 먹인 종양 실험군 특히 CMhiC 군에서는 유의하게 증가하는 경향을 보인다. 일반적으로 종양세포에 작용하는 세포독성T세포(Cytotoxic T Lymphocyte; CTL)로 인식되는 인터페론 감마 발현 CD8 T 세포도 CMhiC 군에서 유의하게 증가하고 있다. 따라서 코디세핀 고 함유 *Cordyceps militaris* JLM 0636 주 식이와 음용이 항종양 면역반응을 유도할 수 있을 것으로 보인다.



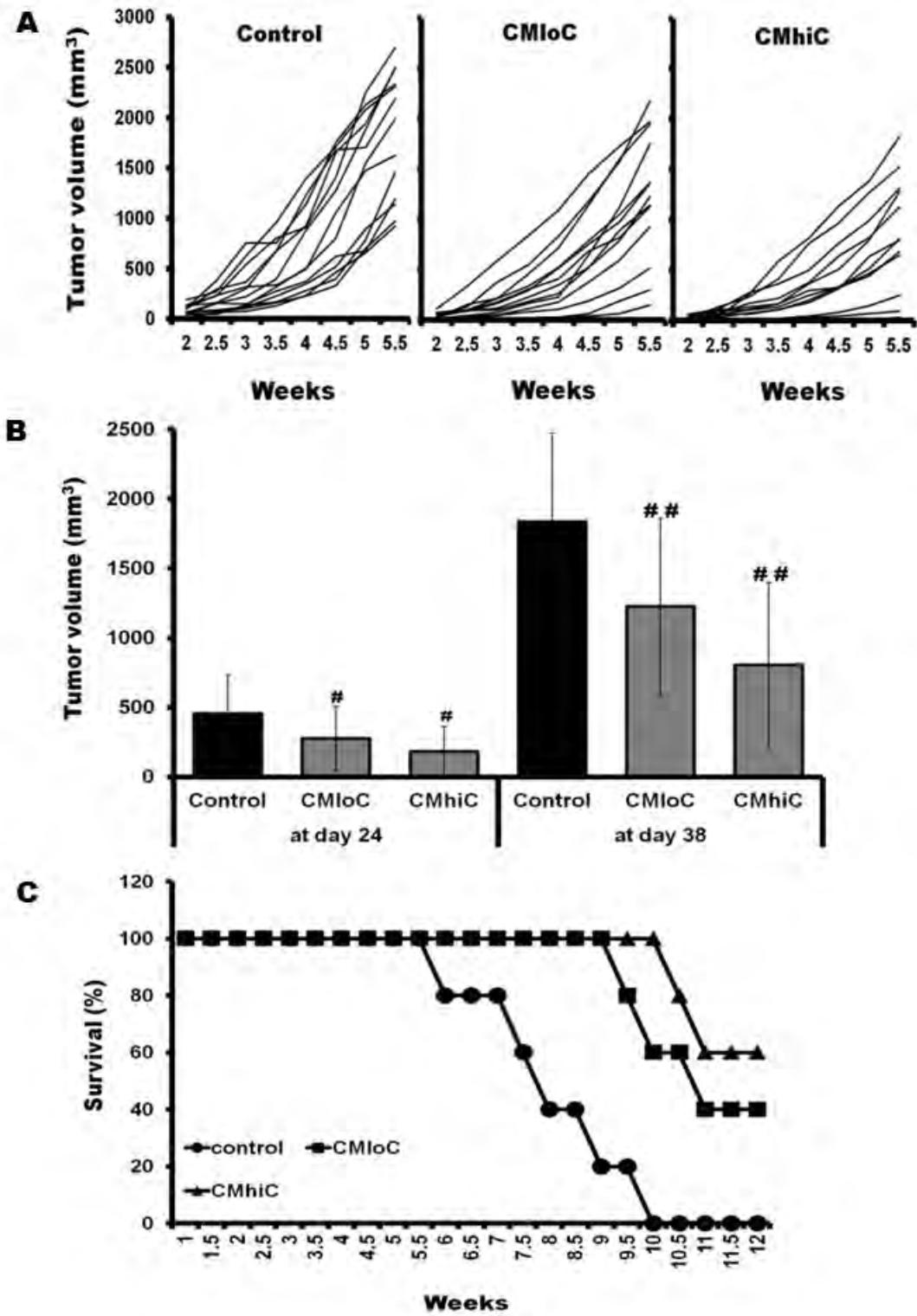
㉔ 종양성장 억제 및 생존 기간 연장 효과

그림 A: 종양이식한 실험동물군에서 개별 동물의 종양 부피 증가 추이.

그림 B: 종양이식일(1일)로부터 24일과 38일째의 실험동물의 종양 부피 결과.

그림 C: 종양이식한 실험동물군(군당 13마리)의 생존율 결과.

종양 실험군의 개체별 종양 부피는 대조군에 비하여 동충하초 식이와 음용군에서 분명한 차이를 보인다. 실험 24일과 38일차의 평균치를 보면 더욱 명확한 차이를 볼 수 있다. 종양으로 인한 사망률도 CMhiC 군에서 유의하게 감소한다.



㉞ 결론

항암치료를 받고 있는 환자의 항종양 면역반응을 유도할 수 있는 항암 보조 식이 요법으로 코디세핀 고향유 *Cordyceps militaris* JLM 0636 주의 활용 가능성을 제시한다.

나. 코디세핀 고함유 동충하초 추출물의 항암 방사선치료에 대한 정상세포 방호효과

(1) 실험재료 및 방법

(가) 개량 동충하초 열수추출물(DWS)는 배지 또는 PBS로 희석하여 사용하였다.

(나) 세포배양

차이니스 햄스터 유래 생식기 세포주인 CHO-K1 (Chinese hamster ovary) 세포를 사용하였으며, American Type Tissue Collection (ATCC, USA)로부터 구매하였다. 이들 세포는 10% FBS, 100 unit/ml penicillin, 그리고 100 μ g/ml streptomycin을 포함하는 Ham's F-12 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂조건 하에서 배양하였다.

(다) 방사선 조사 장비

방사선 조사는 혈액조사기(137Cs, 81.4TBq (2200Ci))를 사용하여 실시하였으며, 선량은 2.6 Gy/min로 확인하였다.

(라) 라디컬 소거능

DWS에 대한 라디컬 소거능을 확인하기 위해 DPPH법과 NBT/XO법을 사용하였다.

① DPPH 소거능을 평가하기 위해 농도별로 희석된 DWS (0.031~1%)에 에탄올에 용해시킨 DPPH 용액을 첨가하여 잘 혼합한 다음 10분 동안 암상태로 반응시킨 후 Microplate reader(Opsys MR, DYNEX, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 소거능은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH 소거능 = (대조군의 흡광도 - 시료의 흡광도)/대조군의 흡광도 X 100

② NBT/XO 방법을 이용하여 superoxide radical 소거능을 평가하기 위해 Hypoxanthine과 Xanthine oxidase의 반응에 의해 생성된 superoxide radical생성을 유도한 후, 유도된superoxide radical에 의해 산화된 NBT (Nitroblue Tetrazolium)로 인한 흡광도의 변화를 측정하였다. 즉, 농도별로 희석된 DWS (0.031~1%)에 Hypoxanthine과 NBT (Nitroblue Tetrazolium)가 포함된 혼합용액을 첨가하여 혼합한 다음 Xanthine oxidase를 첨가한 후 즉시 Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 10분 동안 암상태로 반응시킨 후 다시 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거능(IP)은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

Superoxide radical 소거능(IP) = [1- (반응 후 - 반응 전)/음성] X 100

(마) 방사선 유도 플라스미드 DNA 손상 방호능

방사선에 의한 이중가닥의 절단을 확인하기 위해 사용된 플라스미드는 pSK DNA(5524 bp)이다. 실험에 필요한 플라스미드를 얻기 위해 E. coli 균주인 DH5a competent cell에 pSK DNA을 형질전환시켜 세균 콜로니를 확보하였으며, 이들을 대량배양시켜 얻어진 균체로부터 플라스미드 DNA kit를 사용하여 충분한 양의 플라스미드를 확보하였다. Micro tube에 pSK DNA 농도가 0.5~1 μ g/2 μ l 되도록 첨가한 다음 각 농도별로 희석한 DWS (0.063~1%)를 첨가

한 다음 최종 부피가 20 μ l가 되도록 멸균된 3차증류수로 조정하였다. 플라스미드 DNA 손상에 대한 최적 방사선 선량을 근거로 혈액조사기를 이용하여 5 Gy를 조사한 후 1% 아가로스 겔(agarose gel)을 사용하여 전기영동을 통해 밴드를 확인하였다. 이미지 분석프로그램을 이용하여 전기영동이 끝난 DNA band로부터 이중가닥이 절단된 band와 절단되지 않은 정상적인 circular DNA에 대한 density를 비교하여 방사선 조사량에 따른 DNA 손상도를 분석하여 DWS에 대한 효능을 확인하였다.

(바) 세포독성 평가

DWS의 세포독성을 확인하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(Sigma, MO, USA) 법을 사용하였다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 세포를 접종하고 37°C, 5% CO₂ 의 조건하에서 약 24시간 동안 안정화 시킨 후, 농도별로 희석한 DWS (0.031~1%)를 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후, 배양액을 제거하고, 각 well에 MTT를 첨가한 후 추가로 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 의 조건하에서 반응하였다. 반응 후 배양액을 모두 제거하고 DMSO 용액 150 μ l을 첨가하여 생성된 formazan을 용해시킨 뒤, Microplate reader 를 이용하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포생존율 (% of control)을 계산하였다.

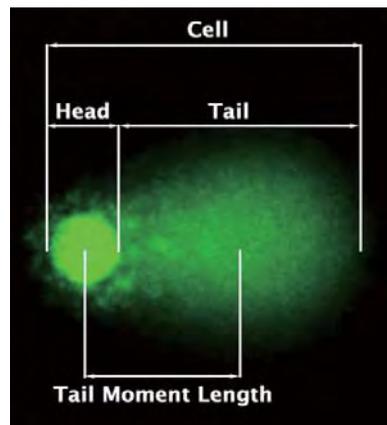
(사) 방사선유도 세포 내 ROS 생성 억제능

DWS에 대해 세포내에서 방사선 노출로 인해 생성되는 ROS에 대한 소거능을 확인하기 위해 DCFH-DA법을 사용하였다. 96 well plate (dark상태의 배양용기)에 3×10^4 cells/well의 세포를 접종하고 37°C, 5% CO₂ 의 조건하에서 약 24시간 동안 안정화 시켰다. 방사선 조사 전 농도별로 희석한 DWS (0.031~0.5%)를 처리한 다음 37°C, CO₂ 배양기에서 1시간동안 반응하였다. 방사선을 조사하기 전 DCFH-DA (dichlorofluorescein diacetate)를 각 well에 첨가한 후 즉시 방사선 (2Gy)을 조사하였다. 조사 후 37°C, 5% CO₂ 의 조건하에서 10분간 반응하였으며, 반응한 끝난 후 생성되는 형광강도를 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 480 nm 및 emission 파장 530 nm에서 측정하였다.

(아) 방사선에 의한 DNA 손상 방호능(Comet assay)

Alkaline comet assay 법은 in vitro 연구에서 DNA single strand break, alkali-labile site 및 crosslink의 발생을 탐지하여 진핵세포에서 DNA손상을 평가하는 방법이며, Tice et al. (2000)이 고안한 방법에 따라 실시하였다. CHO-K1 세포를 6 well plate에 3×10^5 /well 이 되도록 접종한 다음 6~24시간 동안 안정화 시켰다. 또한 방사선 조사 전 농도별로 희석된 DWS (0.031~0.5%)를 처리한 다음 37°C, CO₂ 배양기에서 15분동안 반응하였다. 이들 세포는 혈액조사기를 이용하여 2 Gy를 조사한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 15분간 반응하였다. 세포 회수 1시간 전에 깨끗한 슬라이드에 1% normal melting agarose gel을 입혀 4°C에서 10분간 굳힌 후 다시 그 위에 1% agarose gel을 점적하고 cover glass로 덮은 후 4°C에서 10분간 굳혔다. 배양이 끝난 후 PBS로 세척하여 회수한 세포현탁액 5-10 μ l에 1% low melting point agarose (LPMA) 100 μ l를 혼합하여 미리 coating시킨 slide glass 위에 70 μ l를 점적하고 cover glass로 덮은 다음 4°C에서 10분간 굳혔다. 다시 cover glass를 제거하고 0.5% LPMA를 점적하고 다시cover glass로 덮은 다음 4°C에서 10분간 굳혔다. Cover glass를 제거하고 lysis

buffer에 슬라이드를 넣고 빛을 차단시켜 1시간 30분 동안 lysis 시킨 후 꺼내어 다시 unwinding buffer에 넣고 빛을 차단시켜 20분 동안 담가두었다. Unwinding이 끝난 슬라이드를 0.4M Tris buffer에 10분씩 3회 담가 중화시킨 다음 70% Ethanol에서 dehydration시킨 후 실온에서 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 분석 전 Sybr으로 staining한 후 DNA손상도를 확인하기 위해 Metafer system (Zeiss, Germany)의 Comet 분석 프로그램을 사용하였으며, 50-100개의 세포분석을 통해 다음의 값을 각각 산출하였다.



$$\text{Tail DNA\%} = 100 \times \text{Tail DNA Intensity} / \text{Cell DNA Intensity}$$

Tail Moment

$$(a) \text{Olive Tail Moment} = \text{Tail DNA\%} \times \text{Tail Moment Length}$$

$$(b) \text{Tail Moment} = \text{Tail DNA\%} \times \text{Length of Tail}$$

(자) 방사선에 의한 gamma-H2AX (γ -H2AX) foci 형성 억제능

Phosphorylated H2AX (γ -H2AX)은 DNA 이중가닥이 절단된 부위(DSB)를 인식하는데 필요한 히스톤 단백질 중에 하나다. H2AX은 DSB부위에서 빠르게 인산화되며 이들 항체를 사용할 경우 핵안에서 foci형태로 보여진다. 따라서 방사선에 의해 야기되는 DNA손상을 확인하는데 있어서 가장 많이 활용되고 있는 바이오마커 중에 하나이다. 본 평가법은 세포내에서 방사선에 의해 야기되는 γ -H2AX foci를 통해 DNA 손상정도를 평가함으로써 DWS에 대한 방사선의 DNA 손상 보호 효능을 평가하고자 하였다. CHO-K1 세포를 6 well plate에 3X10⁵/well 이 되도록 접종한 다음 약 24시간 동안 안정화 시켰다. 농도별로 희석한 DWS (0.031~0.5%)를 15분간 처리한 후 혈액조사기를 이용하여 2 Gy를 조사한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 45분간 반응하였다. 반응이 끝난 세포는 회수하여 PBS로 1회 원심분리(1,200 rpm, 3 min)하여 세척하였으며, 상등액 제거하고 남은 세포 pellet은 PBS로 다시 현탁시켰다. Cytospin을 이용하여 세포 부유액 3 x 10⁴ cells/100 ul를 넣고 900 rpm, 실온에서 1 min 원심분리한 다음, 실온에서 건조시켰다. 4% PFA (paraformaldehyde)용액에 넣고, 실온에서 30분간 고정시킨 다음 PBS용액으로 암상태에서 5분간 3회 세척하였다. Permeabilization 과정을 위해 챔버에 0.2% Triton X-100 (in PBS) 용액반응이 실온에서 10분간 암상태로 반응시킨 다음 PBS용액으로 암상태에서 5분간 3회 세척하였다. Blocking과정을 위해 0.15% BSA (in PBS) 용액에 넣고 실온에서 10분간 암상태로 반응하였다. γ -H2AX 1차 항체를 PBS로 1:100이 되도록 희석하여 슬라이드 위에 시료가 충분히 잠길 만큼의 1차항체 용액을 처리한 다음 실온에서

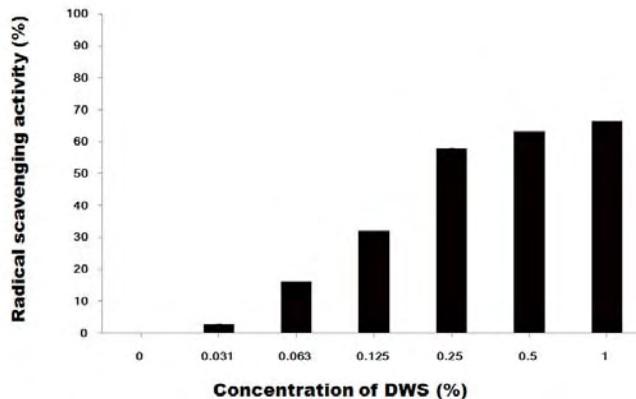
12시간 dark상태로 반응한 후 PBS용액으로 dark상태에서 5분간 3회 세척하였다. 2차항체로 FITC가 결합된 anti-mouse FITC를 PBS로 1:100이 되도록 희석하여 슬라이드를 충분히 잠길 만큼의 2차항체 용액을 처리한 다음 37°C에서 1시간 dark상태로 반응시킨 후 PBS용액으로 암 상태에서 5분간 3회 세척하였다. 대조염색을 위해 Hoechst 33342 (4 ug/ml) 용액을 슬라이드에 처리한 다음, 37°C에서 15분간, 암상태로 반응하였다. 마지막으로 PBS용액으로 암상태에서 5분간 3회 세척하였으며 물기를 충분히 제거한 다음 실온에서 살짝 건조시킨 슬라이드는 mounting (glycerol 3 : PBS 1)을 수행하였다. 결과분석을 위해 슬라이드를 공초점현미경 (Confocal laser microscope)를 이용하여 이미지를 촬영하였으며, 방사선 선량에 따른 γ -H2AX foci 빈도율을 확인하기 위해 분석소프트웨어를 사용하여 γ -H2AX foci를 발현하는 세포수를 계수하여 비교분석하였다.

(2) 연구결과 및 고찰

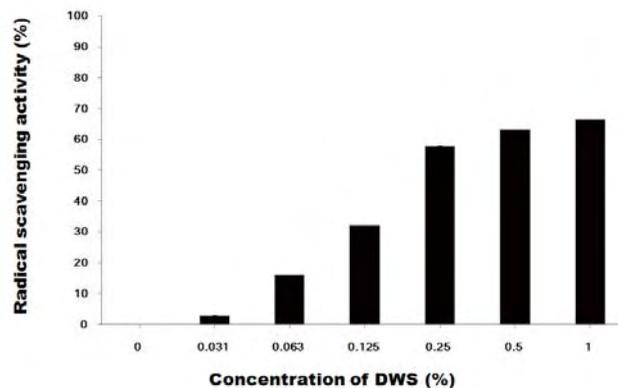
(가) DWS의 라디칼 소거능 확인

방사선에 의해 야기되는 라디칼 생성을 통해 DNA 손상을 일으켜 세포사멸을 유도할 수 있으므로 DWS에 대한 직접적인 라디칼 소거능을 확인하고자 하였다. DWS는 DPPH radical, superoxide radical에서 농도증가에 따라 소거능이 증가함을 확인하였다.

a. DPPH radical scavenging activity

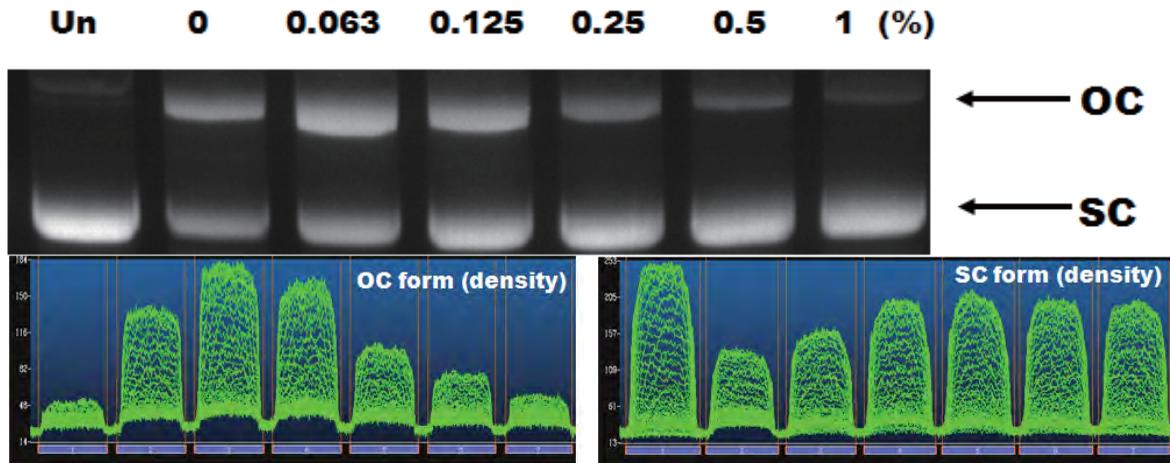


b. superoxide radical scavenging activity.



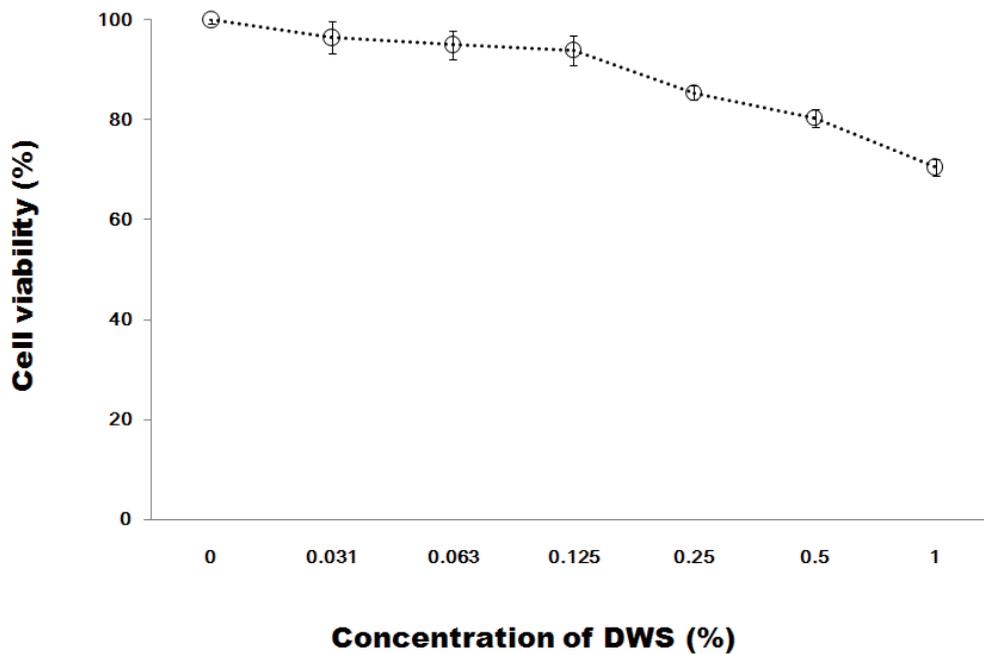
(나) 방사선 유도 플라스미드 DNA 손상으로부터 DWS의 효능 확인

방사선에 의해 유발되는 DNA 손상에 대한 DWS의 보호 효능을 확인하고자 하였다. DWS의 농도가 증가함에 따라 이중절단 가닥의 밴드가 감소하는 것을 알 수 있었고, 이를 통해 DNA 손상으로부터 보호효과가 있음을 확인하였다.



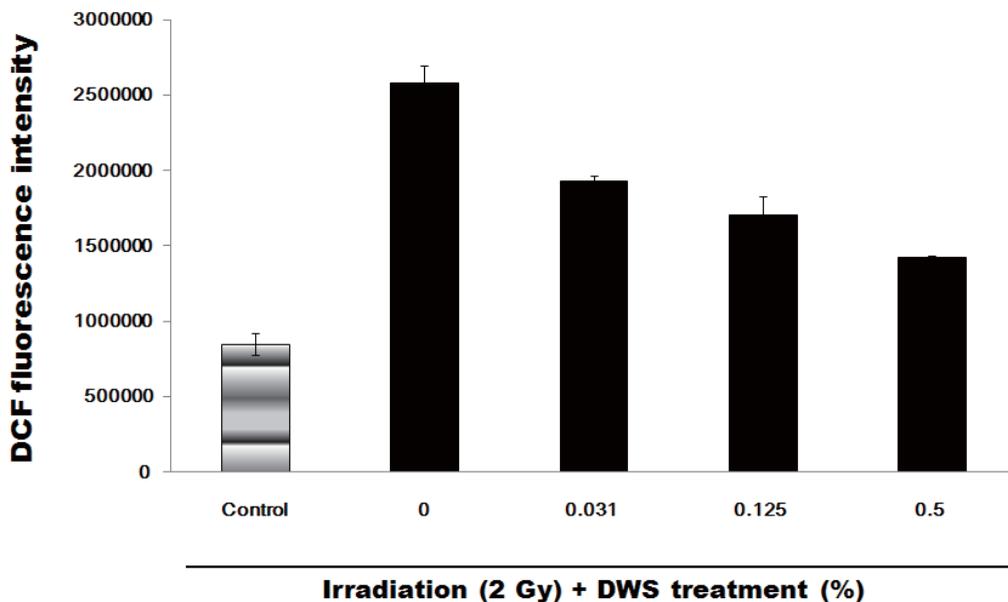
(다) MTT assay를 통한 DWS의 세포독성 확인

MTT법을 이용하여 DWS의 세포독성을 확인한 결과, 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 저해되었으나, 시험한 최고농도인 1%에서 세포 생존률이 70%로 독성이 다소 낮았다. 따라서, 이러한 세포독성 결과를 근거로 하여 CHO-K1세포를 이용한 시험에서는 IC20 농도인 0.5%를 최고농도로 결정하였다.



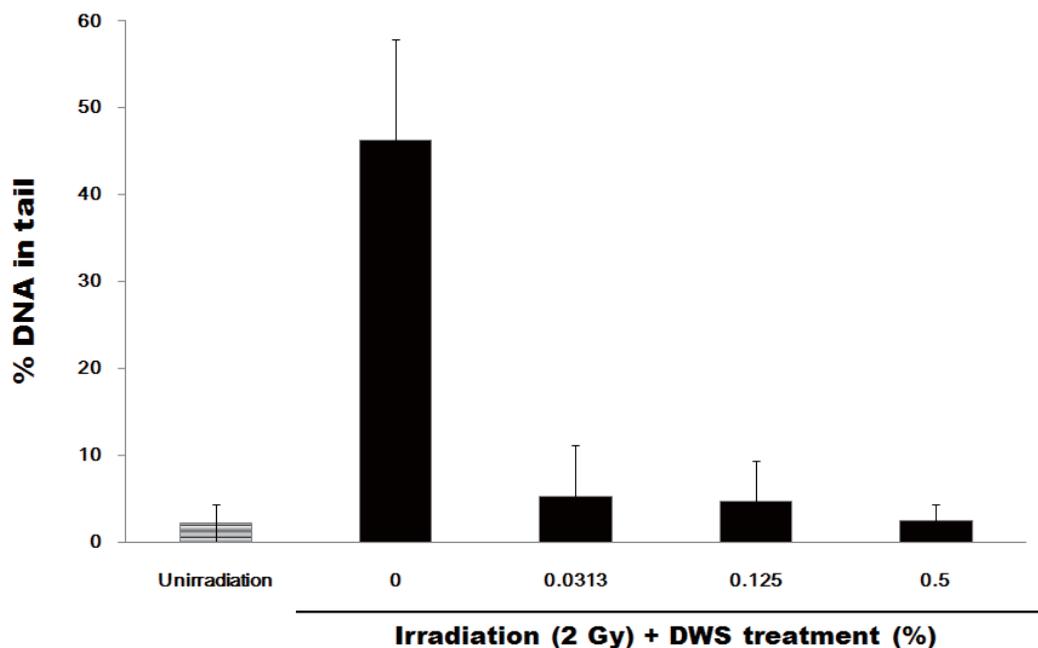
(라) 방사선유도 세포 내 ROS 생성에 대한 DWS의 억제능 확인

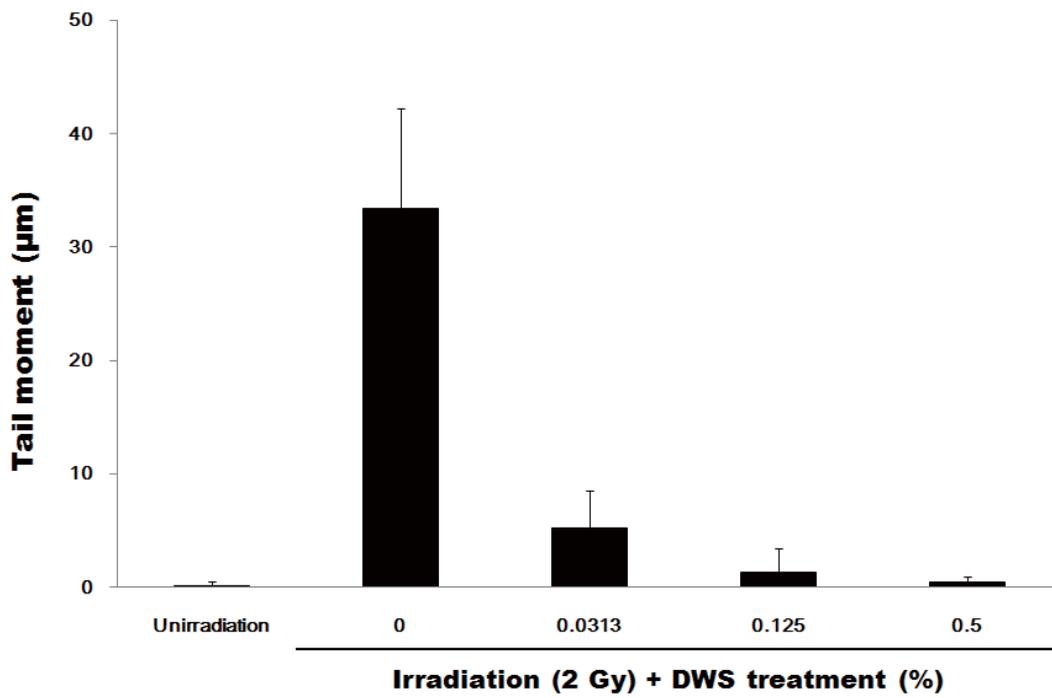
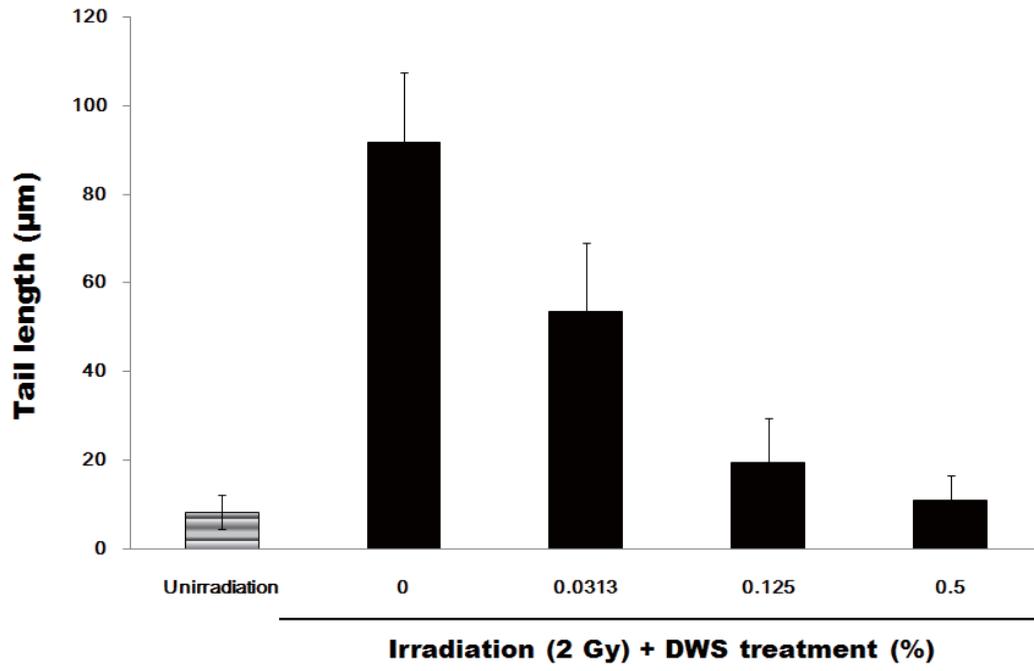
세포독성시험 결과를 근거로 0.5%를 최고 농도로하여 방사선에 의해 유도되는 세포내 ROS 생성으로부터 DWS의 억제 효과를 확인하였다. DWS 농도가 증가함에 따라 ROS 생성이 뚜렷하게 억제됨을 확인하였다.

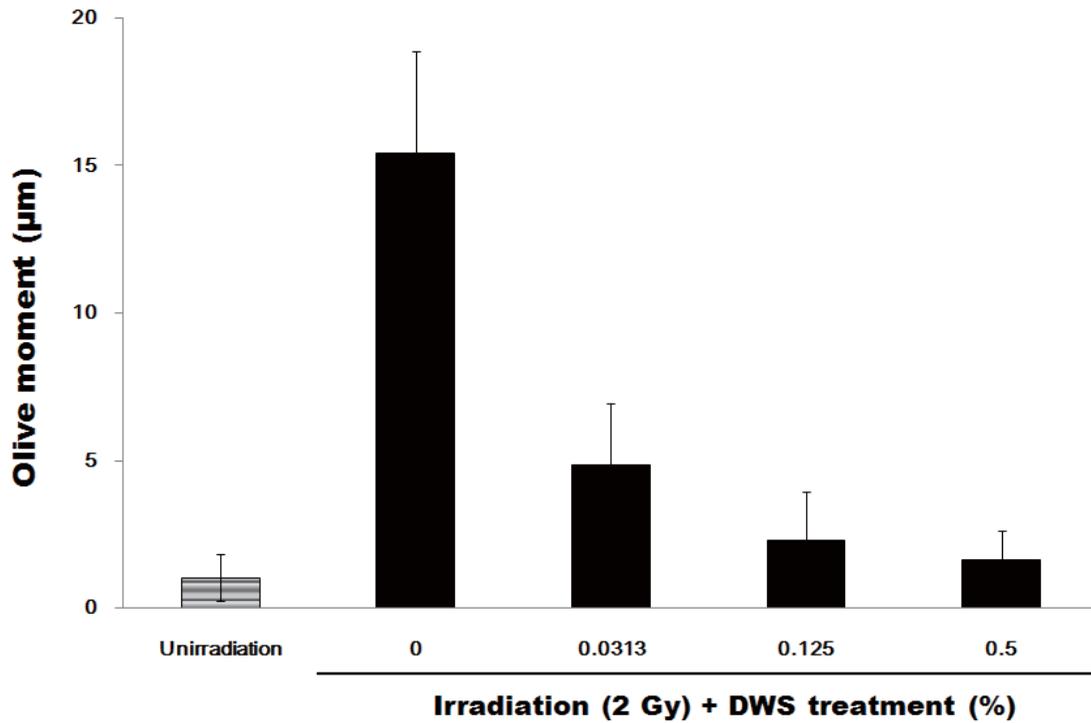


(마) Comet assay를 이용하여 방사선에 의한 DNA 손상으로 부터 DWS의 효능확인

세포독성시험 결과를 근거로 0.5%를 최고농도로 하여 방사선에 의해 유도되는 세포내 DNA 손상으로 부터 DWS의 보호효과를 확인하였다. DWS 농도가 증가함에 따라 tail내 DNA 함량 (%), tail length, tail moment 및 olive moment 의 지표를 통해 DNA 손상이 뚜렷하게 감소됨을 확인하였다.

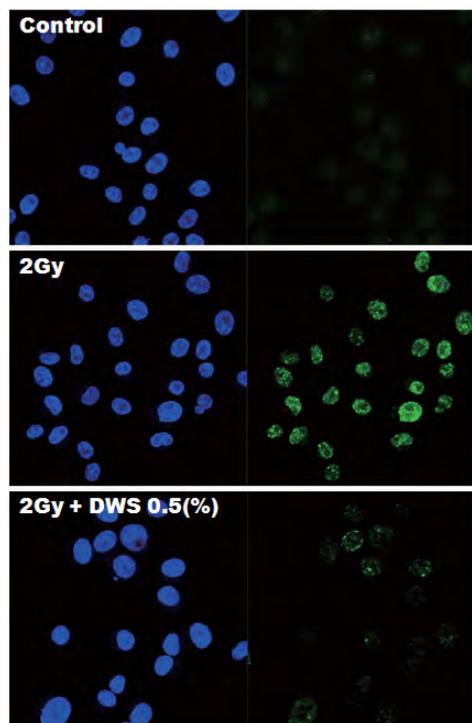


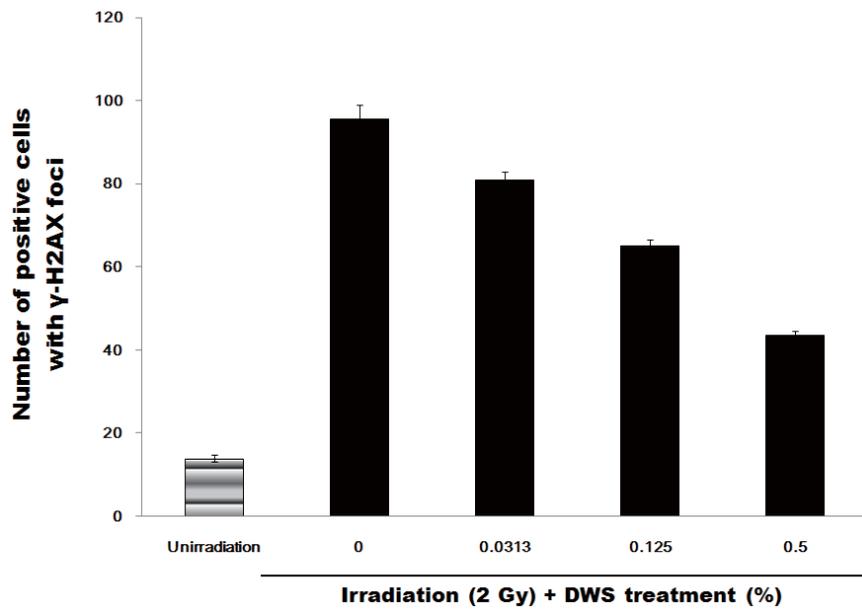




(바) 방사선에 의한 gamma-H2AX (γ -H2AX) foci 형성에 있어 DWS의 효능확인

세포독성시험 결과를 근거로 0.5%를 최고농도로 하여 방사선에 의해 유도되는 세포내 gamma-H2AX foci 형성으로부터 DWS의 억제 효과를 확인하고자 하였다. DWS 농도가 증가함에 따라 gamma-H2AX foci 형성이 뚜렷하게 감소됨을 확인하였다.





(사) 결론

코디세핀 고함유 *Cordyceps militaris* JLM 0636 주 추출물은 항암 방사선치료 과정 중 정상세포의 방사선에 의한 DNA 및 세포 손상을 효과적으로 경감할 수 있음을 확인하였다. 이는 항암치료에 있어서 항종양 면역반응을 유도함으로써 암세포에 대한 항암효과를 극대화할 뿐만 아니라, 항암치료 과정에서 불가피하게 손상을 받게 되는 주변 정상세포에 대한 방호효과를 동시에 얻을 수 있음을 시사한다. 따라서 코디세핀 고함유 *Cordyceps militaris* JLM 0636 주는 항암치료의 보조제로서 최적의 조건을 갖추고 있음을 알 수 있다.

2. 코디세핀 고함유 동충하초를 이용한 향장품 소재 개발

(제 4 세 부 : 동아대학교, 정민호)

가. 코디세핀 고함유 동충하초의 향장효과 검증

(1) 실험재료 및 방법

(가) 시험물질(WSF)

- ① 동결건조한 와송 에탄올추출물 건조중량 100 mg 당 증류수 1 ml로 녹이고 원심분리로 고형성분 제거하였음.
- ② 시험물질의 농도 표시는 액상으로 만들어진 원액을 100%로 하여 각각의 시험계에서 최종 희석되는 %로 표시함.
- ③ 양성대조물질은 해당 시험계에서 최대치를 보이는 최소농도 값으로 설정함.
- ④ 화장품 원료로 사용하기 위하여 최종 2% 이내에서 양성대조물질과 유사한 정도의 결과를 보일 경우 우수하다고 판정함.

(나) 자외선 흡수 작용

- ① 시료 용액의 전자가 자외선을 흡수하여 기저상태에서 여기상태로 옮길 때의 흡수 스펙트럼 상태를 분석하여 특정 파장의 자외선 흡수 정도를 측정한다.
- ② 양성 대조 물질 농도 선정: 최대 흡수 파장에서 흡광도 >3.0를 나타내는 최저 농도
UVA (Avobenzon): 358 nm, 0.05 mg/ml
UVB (Octyl methoxycinnamate, OMC): 310 nm, 0.05 mg/ml 기준

(다) 항산화 작용(DPPH radical assay)

- ① 생성된 자유전자를 제거하는 효과를 보기 위하여 자체가 매우 안정한 DPPH 라디칼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)을 이용한다.
- ② 양성 대조 물질 농도 선정
Ascorbic acid: 0.25 mg/ml 이상에서 최대치

(라) 피부 주름에 관여하는 효소에 대한 작용

피부 주름은 진피 속 섬유조직의 퇴화·위축 또는 수분이나 피하지방의 감소 등에 의하여 일어난다. 특히 진피 결체조직 섬유소의 감소는 광노화에 의한 피부 주름과 밀접한 연관성이 있다. 결체조직 섬유소의 주성분인 교원섬유는 콜라겐 성분으로 피부에 장력을 제공해 주며 탄력 섬유와 함께 그물 모양으로 서로 짜여 있어 피부에 탄력성과 신축성을 부여한다. 탄력 섬유는 엘라스틴 성분으로 탄력성이 있어서 변형된 피부가 고무줄처럼 원래의 모습으로 되돌아오도록 한다. 이러한 콜라겐과 엘라스틴이 콜라게나제(collagenase)와 엘라스타제(elastase) 같은 가수분해 효소에 의하여 파괴됨으로써 피부 진피층의 함몰이 유도되고 피부의 주름이 생성되는 것으로 알려져 있다. 따라서 진피 결체조직 섬유소의 파괴와 광노화에 의한 피부 주름 형성 방지 효과를 확인하기 위하여 이들 효소의 활성 저해 정도를 측정한다.

① Collagenase 활성 저해 작용

㉠ 기질: 4-Phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Sigma P8383)

㉡ 효소: Collagenase (Sigma C0130)

㉢ 측정: UV Spectrophotometer (SpectraMax M5) 320 nm

㉣ 양성 대조 물질 농도 선정

Epigallocatechin gallate E414 (EGCG): 0.5 mg/ml 이상에서 최대치

② Elastase 활성 저해 작용

㉠ 기질: N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Sigma S4760)

㉡ 효소: Elastase (Sigma E1250)

㉢ 측정: ELISA reader (Molecular Devices) 410 nm

㉣ 양성 대조 물질 농도 선정

Ursolic acid: 0.5 mg/ml 이상에서 최대치

③ 섬유아세포 elastase 활성 저해 작용

㉠ 기질: N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Sigma S4760)

㉡ 효소: 배양한 섬유아세포(Fibroblast) cell lysate 0.1 mg

㉢ 측정: ELISA reader (Molecular Devices) 410 nm

㉣ 양성 대조 물질 농도 선정

Ursolic acid: 0.5 mg/ml 이상에서 최대치

(마) 섬유아세포의 주름 관련 유전자 발현에 대한 작용

① 자외선을 조사한 섬유아세포의 MMP-1 및 procollagen 유전자 발현 정도를 Real time PCR로 측정한다.

② 세포배양: 10 ml

③ 양성 대조 물질: Adenosine 0.4 mg/ml - 세포독성 없음.

④ 시험물질: 0.1 ml - 최종 1% 이하에서 세포독성 없음.

⑤ 자외선 조사: UV-B (100 mJ; 1 mW/cm² × 100 sec)

⑥ RNA분리: Trizol (Ambion 1596-026)

⑦ cDNA 합성: Maxime RT premix (Intron bio 25081)

⑧ Real-time PCR: Master mix (Universal taqman 4304437)

⑨ House keeping gene: GAPDH (probe: TaqMan Hs99999905_m1)

⑩ T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad)

⑪ MMP-1 probe: TaqMan Hs00233958_m1

⑫ Procollagen probe: TaqMan Hs00164004_m1

(바) 섬유아세포의 SA-βG (senescence-associated β-galactosidase) 활성 저해 작용

① 자외선에 의한 섬유아세포의 광노화 관련 SA-βG 활성을 X-gal 염색 정도로 측정한다.

② 세포배양: 2 ml, 12 well plate

- ③ 양성 대조 물질: Adenosine 0.4 mg/ml
- ④ 시험물질: 0.02 ml
- ⑤ 자외선 조사: UV-B (100 mJ; 1 mW/cm² × 100 sec)
- ⑥ 염색기질: X-gal (Sigma B4252)

(사) 피부 착색에 대한 작용

피부의 색조를 결정하는 것은 피부 자체의 색과 두께, 멜라닌의 양과 분포, 카로틴 등의 색소량, 혈액 중의 헤모글로빈 등이지만 멜라닌의 양적 차이가 특히 중요하다.

멜라닌은 피부 아래층에 존재하는 멜라닌세포 속의 멜라노솜이라는 세포소기관에 들어있는 흑갈색 알갱이의 색소이다. 멜라닌세포에서 멜라닌이 만들어 지는 과정은 티로시나아제 (tyrosinase)라는 효소의 생합성에서 시작하며, 이 효소의 적용으로 아미노산의 일종인 타이로신(tyrosine)이 도파(DOPA)를 비롯한 몇 단계의 산화중합반응을 거친다(그림). 멜라닌세포는 완성된 멜라노솜을 포함하고 있는 돌기를 뺏어서 피부 위쪽의 케라틴세포 등 주변의 다른 세포에 멜라닌을 전달한다. 그 양이 많으면 피부색이 황갈색에서 흑갈색을 띠고, 적을수록 색이 옅어진다.

피부가 햇빛에 노출되면, 자외선 자극에 의해 멜라닌세포에서 멜라닌을 많이 만들게 된다. 만들어진 멜라닌은 표피에서 일정량 이상의 자외선을 흡수하여 유해한 자외선이 피부 깊숙이 침투하는 것을 차단함으로써 인체를 보호하는 역할을 한다. 따라서 햇빛에 많이 노출된 사람일수록 자외선으로부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌이 많이 생성되고 피부가 검게 된다.

① L-tyrosine 기질에 대한 tyrosinase 활성 억제 작용

- ㉠ 멜라닌 합성 시작인 tyrosine 기질에 대한 tyrosinase 효소의 활성 억제 정도를 측정한다.
- ㉡ 기질: L-Tyrosine (Sigma T8566)
- ㉢ 효소: mushroom Tyrosinase (Sigma T3824)
- ㉣ 측정: ELISA reader (Molecular Devices) 490 nm
- ㉤ 양성 대조 물질 농도 선정
Arbutin: 2.5 mg/ml (화장품 제조 시 0.25%에 해당, 기준농도는 2-5%)
Ascorbic acid: 0.25 mg/ml

② 멜라닌세포의 tyrosinase 활성 억제 작용

- ㉠ PMA로 자극한 Melan-a 세포에서 생성된 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 DOPA 기질을 이용하여 측정한다.
- ㉡ 세포배양: 30 ml
- ㉢ 양성 대조 물질: Albutin 0.125 mg/ml - 세포독성 없음.
- ㉣ 시험물질: 3 ml - 최종 1% 이하에서 세포독성 없음.
- ㉤ 기질: L-DOPA (Sigma D9628)
- ㉥ 측정: ELISA reader (Molecular Devices) 490 nm

- ③ 멜라닌세포의 멜라닌 생성 억제 작용
- ㉠ PMA로 자극한 Melan-a 세포의 total protein 대비 405 nm 흡광도로 측정된 멜라닌 함량을 계산한다.
 - ㉡ 세포배양: 1 ml
 - ㉢ 양성 대조 물질: Albutin 0.125 mg/ml - 세포독성 없음.
 - ㉣ 시험물질: 0.1 ml - 최종 1% 이하에서 세포독성 없음.
- ④ 멜라닌세포의 멜라닌 합성 관련 유전자 발현에 대한 작용
- ㉠ PMA로 자극한 Melan-a 세포의 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 유전자 발현 정도를 Real time PCR로 측정한다.
 - ㉡ 세포배양: 10 ml
 - ㉢ 양성 대조 물질: Albutin 0.125 mg/ml - 세포독성 없음.
 - ㉣ 시험물질: 1 ml - 최종 1% 이하에서 세포독성 없음.
 - ㉤ RNA분리: Trizol (Ambion 1596-026)
 - ㉥ cDNA 합성: Maxime RT premix (Intron bio 25081)
 - ㉦ Real-time PCR: Master mix (Universal taqman 4304437)
 - ㉧ House keeping gene: GAPDH (probe: TaqMan Mm.304088)
 - ㉨ T100TM Thermal Cyclor (Bio-Rad)
 - ㉩ Tyrosinase probe: TaqMan Mm.238127
 - ㉪ TRP-1 probe: TaqMan Mm.30438
 - ㉫ TRP-2 probe: TaqMan Mm.19987
- ⑤ 멜라닌세포의 멜라닌 합성 관련 단백질 생성에 대한 작용
- ㉠ PMA로 자극한 Melan-a 세포의 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질 생성 정도를 Western blotting으로 측정한다.
 - ㉡ 세포배양: 30 ml
 - ㉢ 양성 대조 물질: Albutin 0.125 mg/ml - 세포독성 없음.
 - ㉣ 시험물질: 3 ml - 최종 1% 이하에서 세포독성 없음.
 - ㉤ SDS-PAGE: Mini-Protean®Tetra system (Bio-Rad), 30% Acrylamide
 - ㉥ Blotting: Semi-dry transfer (Bio-Rad)
 - ㉦ First Antibodies: Tyrosinase (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SC-7833), TRP-1 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SC-10443), TRP-2 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SC-34127), β -actin (Sigma A5441)
 - ㉧ Second Antibody: Horseradish peroxidase-lonked Rabbit anti-goat IgG (INVITROGEN T21459) and anti-mouse IgG (Sigma A5441),
 - ㉨ Detection: Super signal west pico chemiluminescent substrate
- ⑥ 멜라닌세포에서 각질세포로의 melanosome transfer에 대한 작용
- ㉠ α -MSH로 자극한 Melanocyte (B16-F10)에서 생성된 melanosome이 Keratinocyte (A-431)로 이동하는지를 혼합배양과 Fontana-Masson silver staining으로 확인한

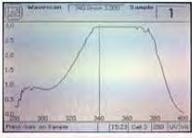
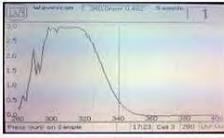
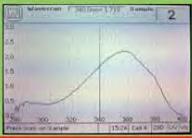
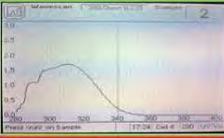
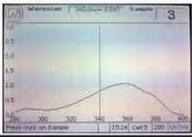
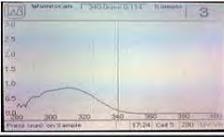
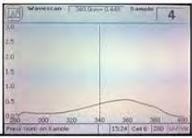
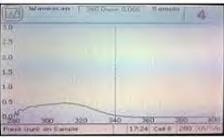
다.

- ㉔ 세포배양: 3 ml, 6 well plate, α -MSH로 자극한 B16-F10 세포를 먼저 부착시키고, A-431 세포를 첨가 배양
- ㉕ 양성 대조 물질: Niacinamide - 세포독성 없음.
- ㉖ 시험물질: 0.3 ml - 최종 1% 이하에서 세포독성 없음.
- ㉗ 염색 : Fontana-Masson silver stain (Muto 40592)

(2) 연구결과 및 고찰

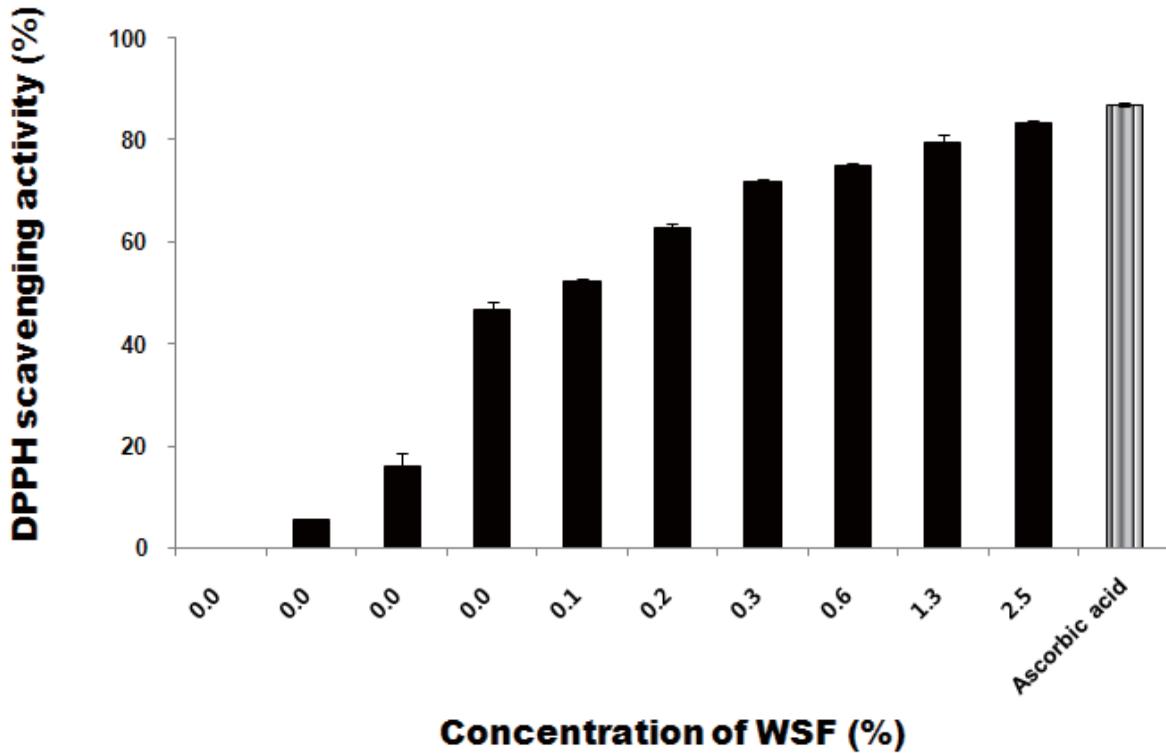
(가) 자외선 흡수 작용

2% 농도에서 UVB와 UVA 모두 자외선 흡수 효과 보이지 않음.

Concentration (mg/ml)	Avobenzone		OMC	
	UV spectrum	Absorbance ($\lambda = 358\text{nm}$)	UV spectrum	Absorbance ($\lambda = 310\text{nm}$)
0.05		> 3.0		> 3.0
0.025		2.214		1.816
0.0125		1.100		0.945
0.00625		0.585		0.496

(나) 항산화 작용(DPPH radical assay)

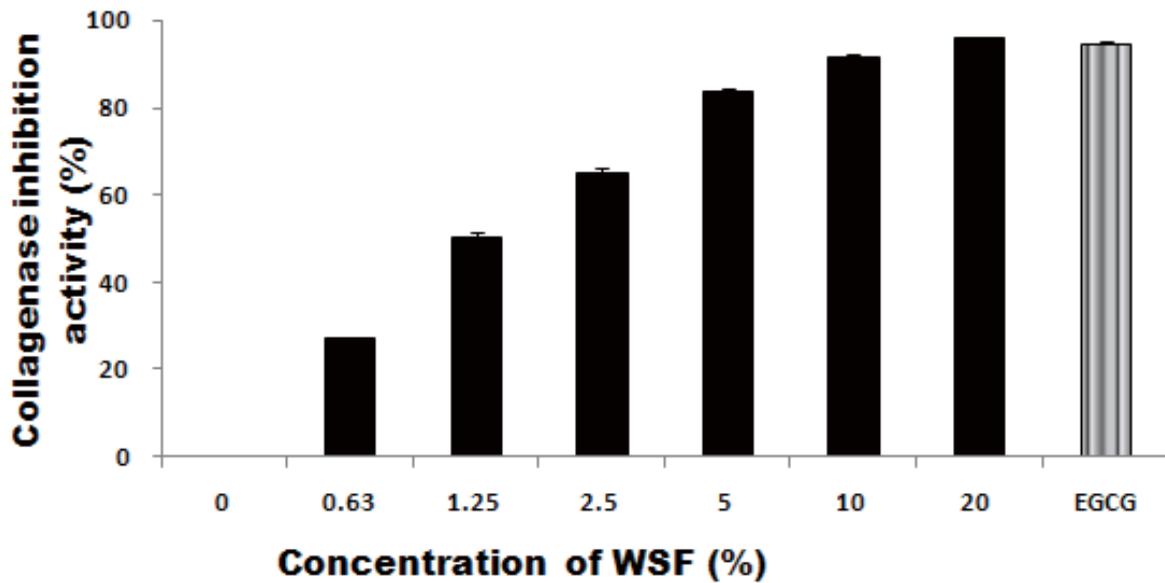
최종 2% 이하 농도에서 양성대조물질과 유사한 효과 보임 - 우수.



(다) 피부 주름에 관여하는 효소에 대한 작용

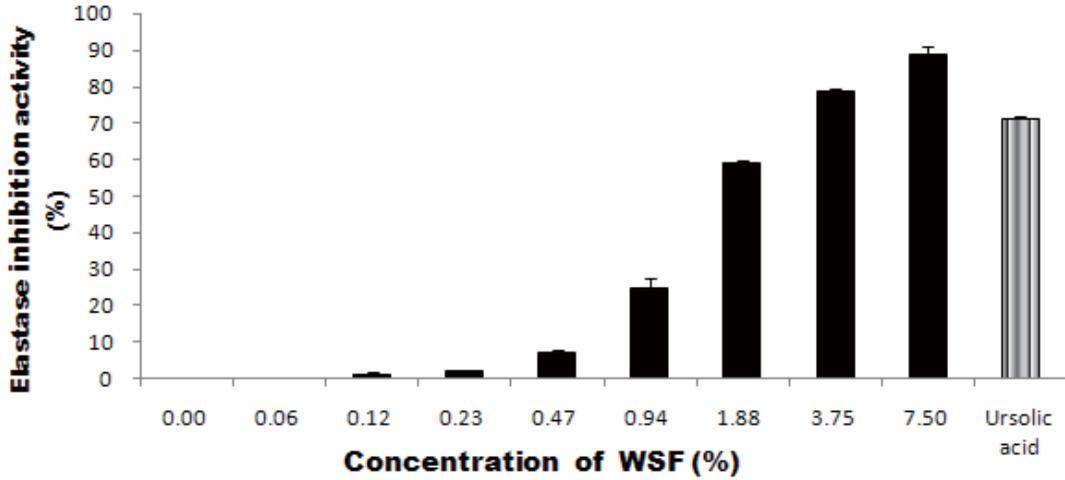
① Collagenase 활성 저해 작용

최종 2%에서는 양성대조물질의 절반 정도의 효과로 우수한 원료 적용을 위하여 농축이 필요함.



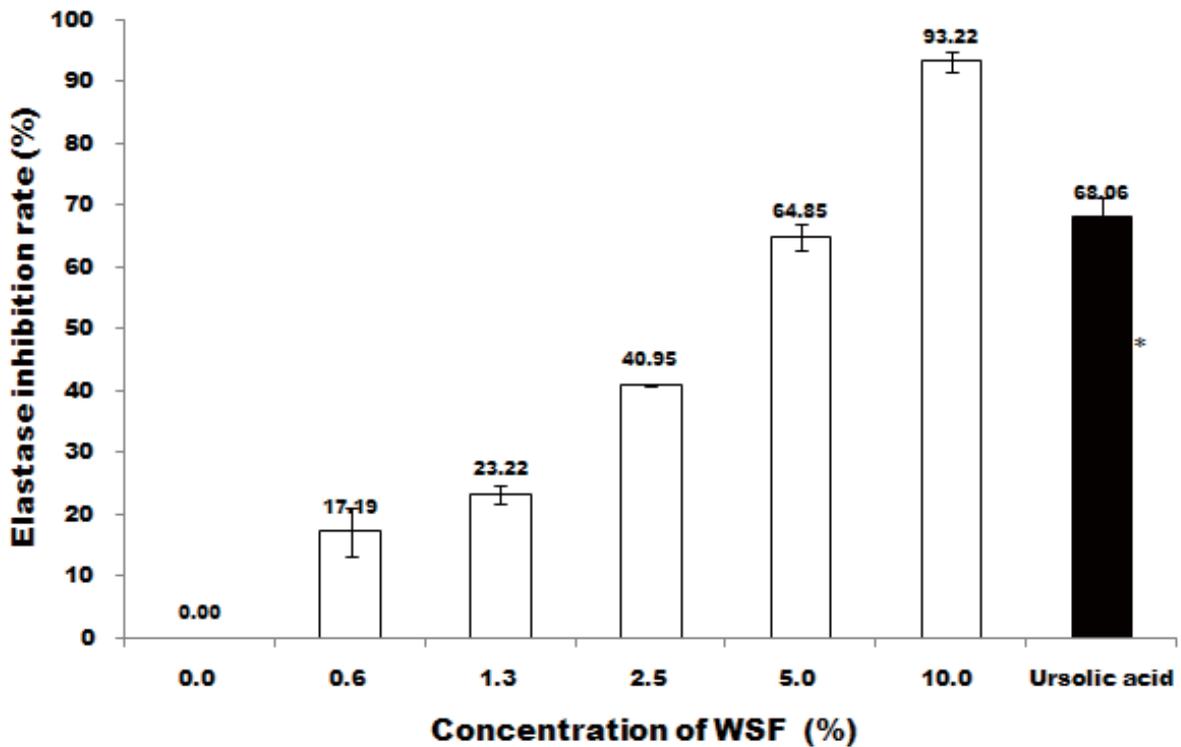
② Elastse 활성 저해 작용

최종 2%에서는 양성대조물질에 비하여 약간 떨어지는 효과로 비교적 우수한 효과를 보이지만, 우수한 원료 적용을 위하여 약간의 농축이 필요함.



③ 섬유아세포 elastase 활성 저해 작용

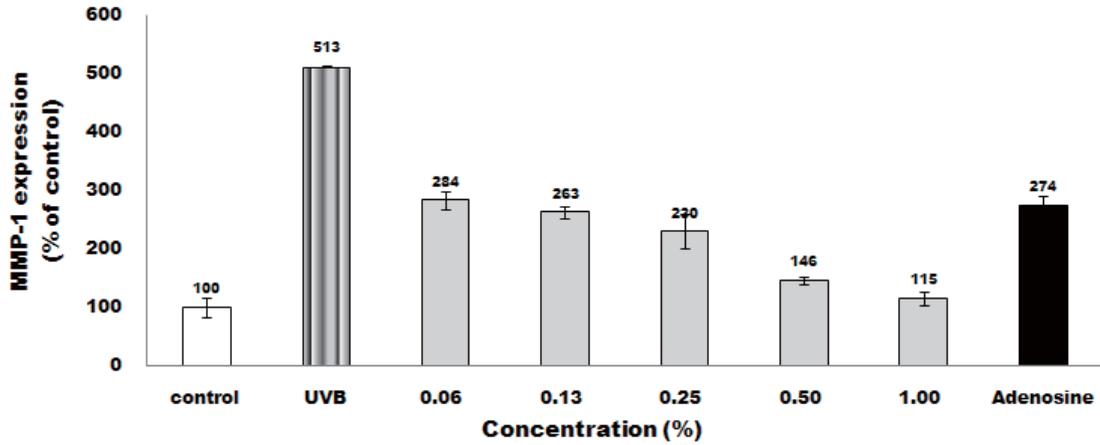
최종 2%에서는 양성대조물질의 절반 정도의 효과로 우수한 원료 적용을 위하여 농축 필요함.



(라) 섬유아세포의 주름 관련 유전자 발현에 대한 작용

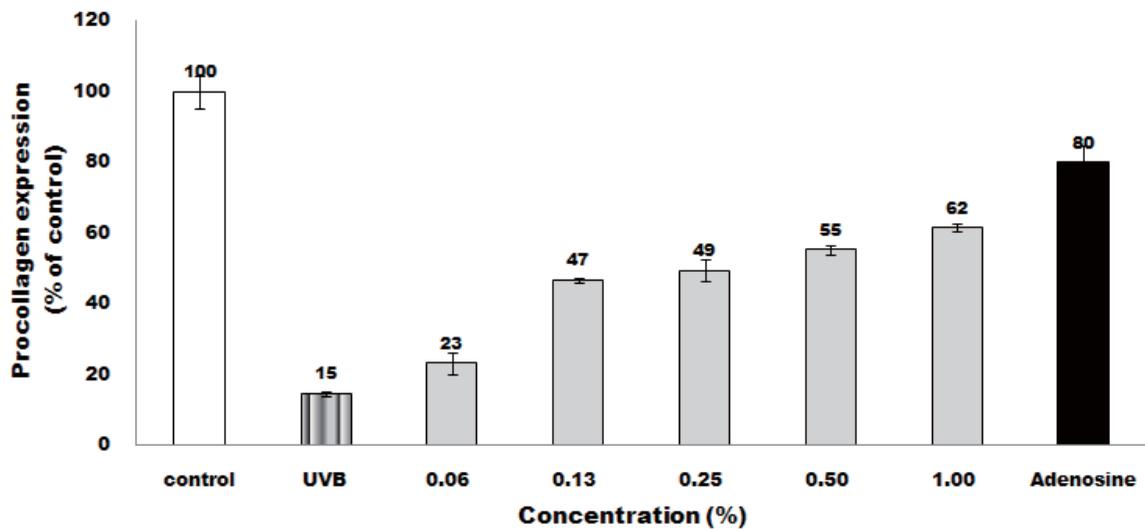
① MMP-1

양성대조 이상의 효과를 나타냄 - 우수.



② Procollagen

양성대조 이상의 효과를 나타냄 - 우수.

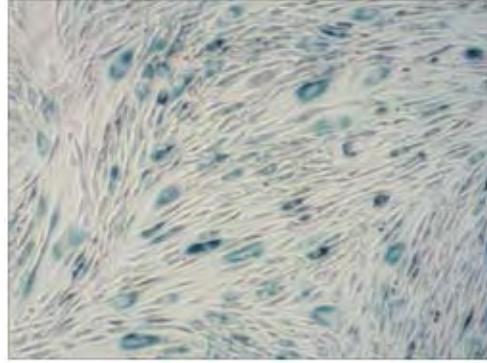


(마) 섬유아세포의 SA-βG (senescence-associated β-galactosidase) 활성 저해 작용
양성대조 이상의 효과를 나타냄 - 우수.

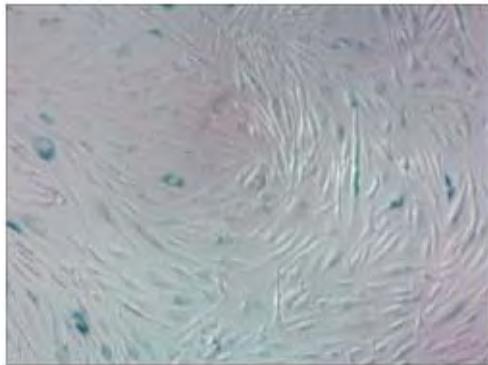
control



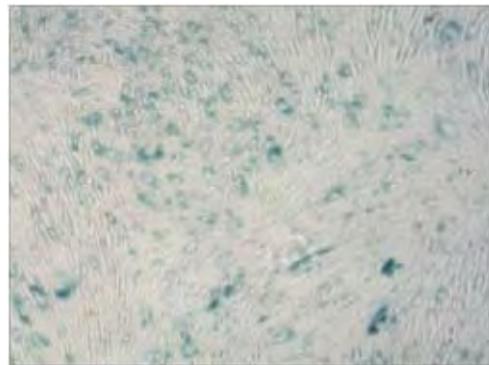
UVB



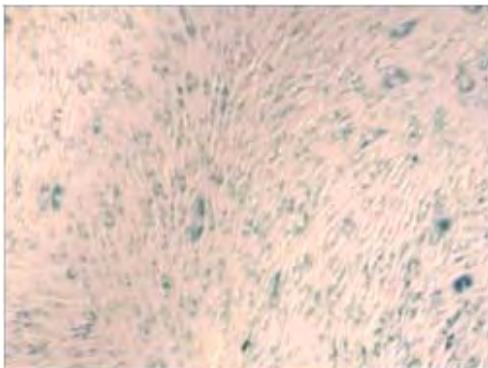
Adenosine



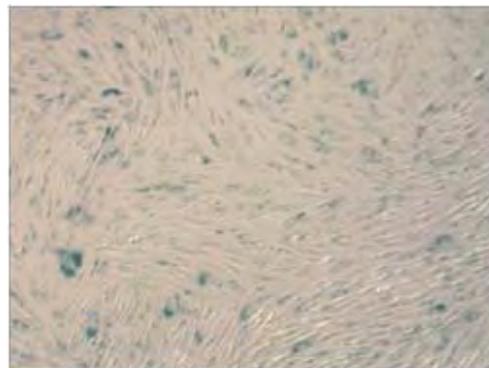
WSF 0.0625%



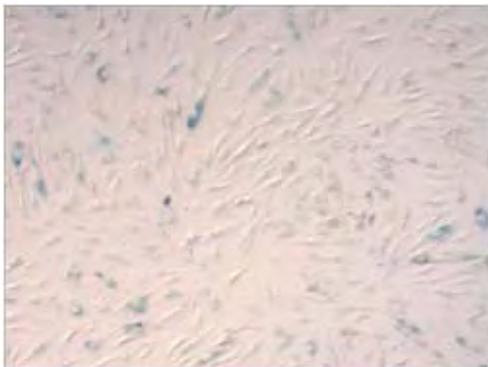
WSF 0.125%



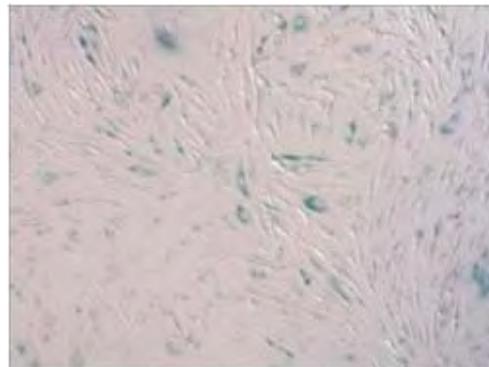
WSF 0.25%



WSF 0.5%

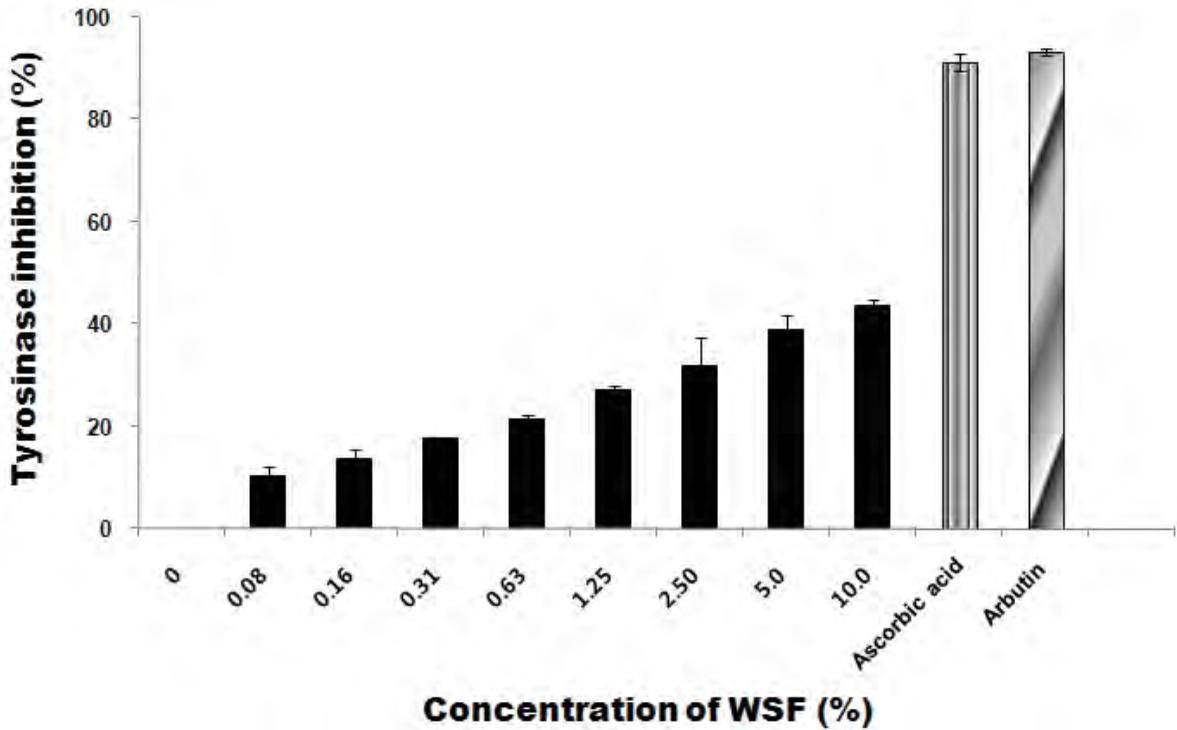


WSF 1%

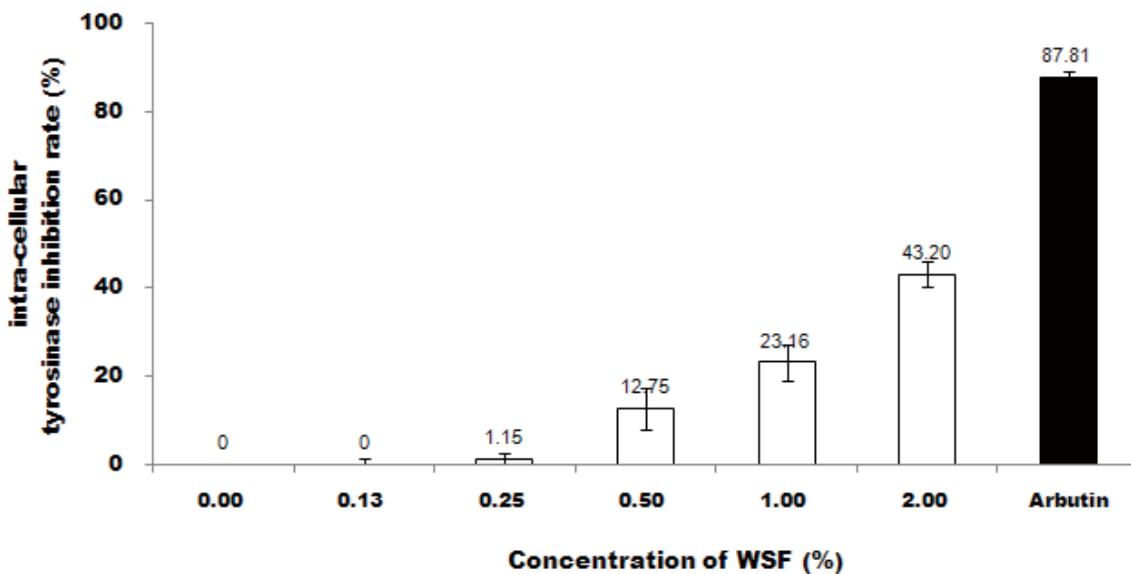


(바) 피부 착색에 대한 작용

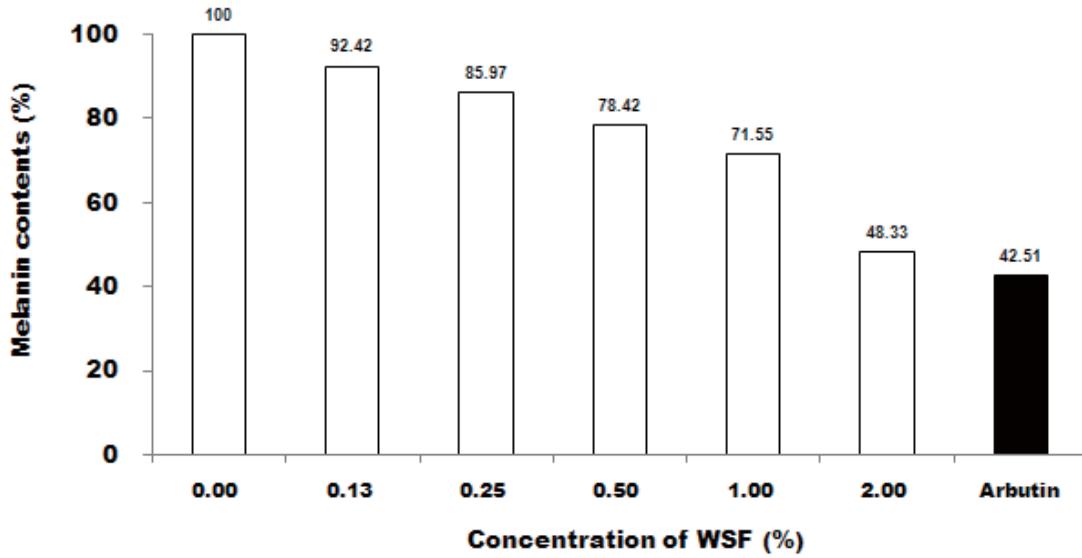
① L-tyrosine 기질에 대한 tyrosinase 활성 억제 작용
양성물질 대비 최종 2% 이내에서 유의한 효과 없음.



② 멜라닌세포의 tyrosinase 활성 억제 작용
양성물질 대비 유의한 효과 없음.



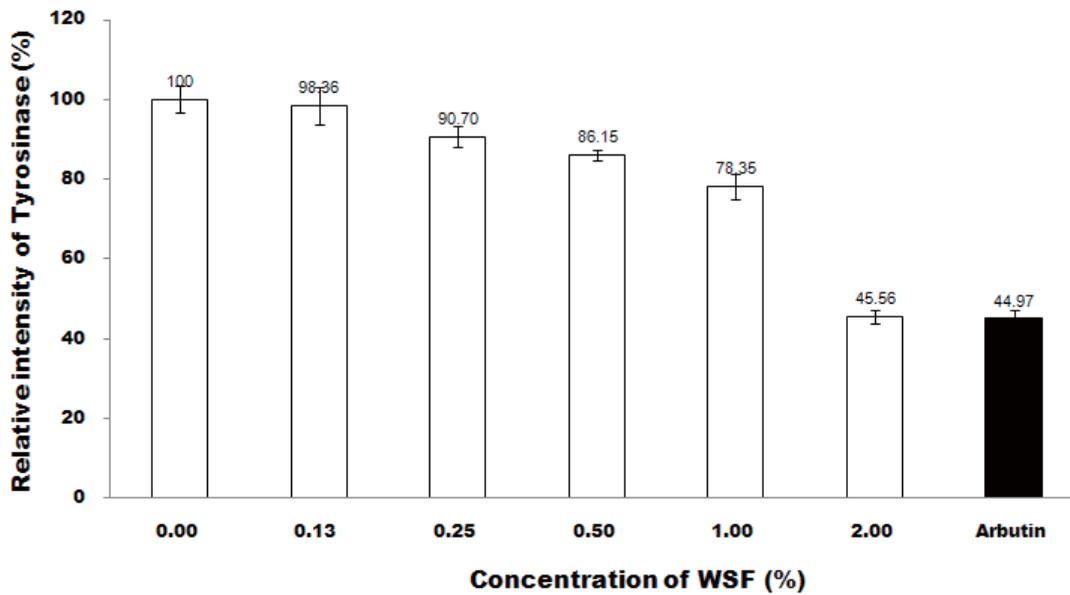
③ 멜라닌세포의 멜라닌 생성 억제 작용
양성물질 대비 유의한 효과 없음.



④ 멜라닌세포의 멜라닌 합성 관련 유전자 발현에 대한 작용

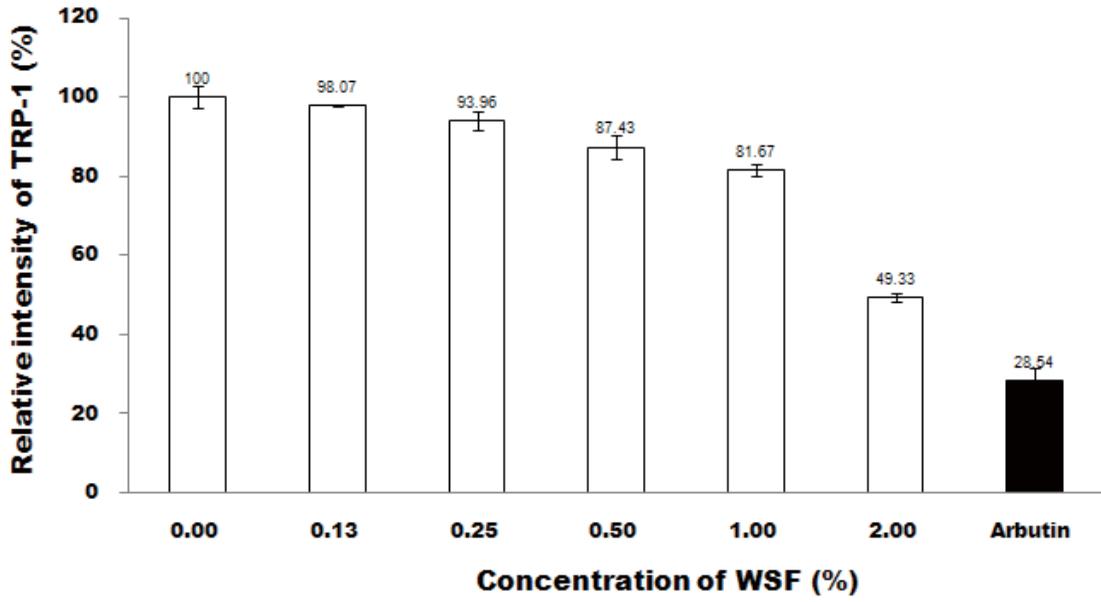
㉠ Tyrosinase

양성물질 대비 유의한 효과 없음.



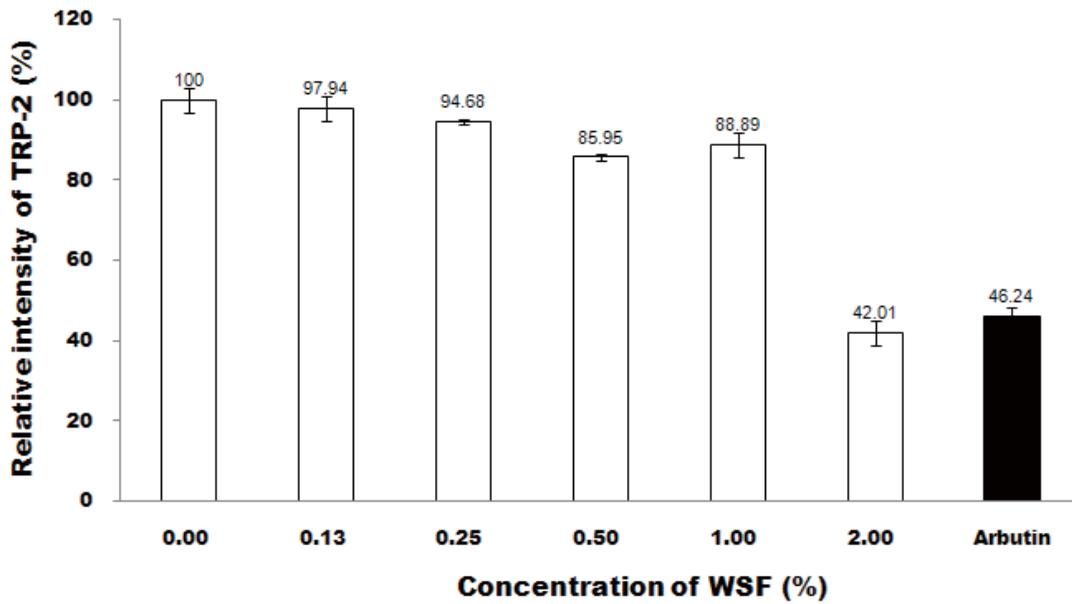
㉞ TRP-1

양성물질 대비 유의한 효과 없음.

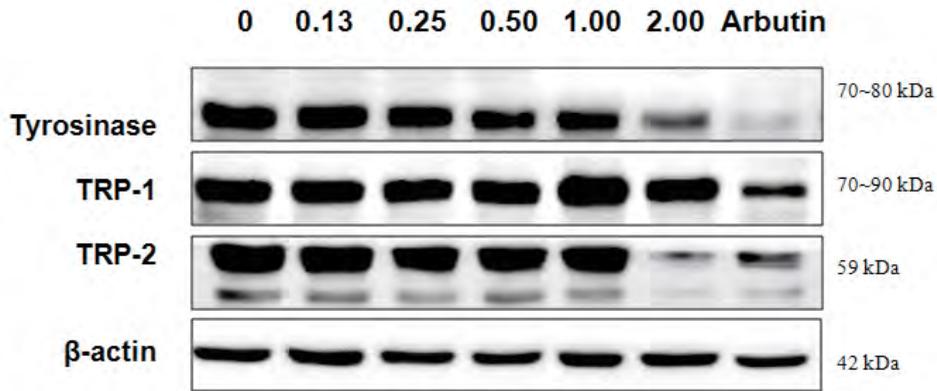


㉞ TRP-2

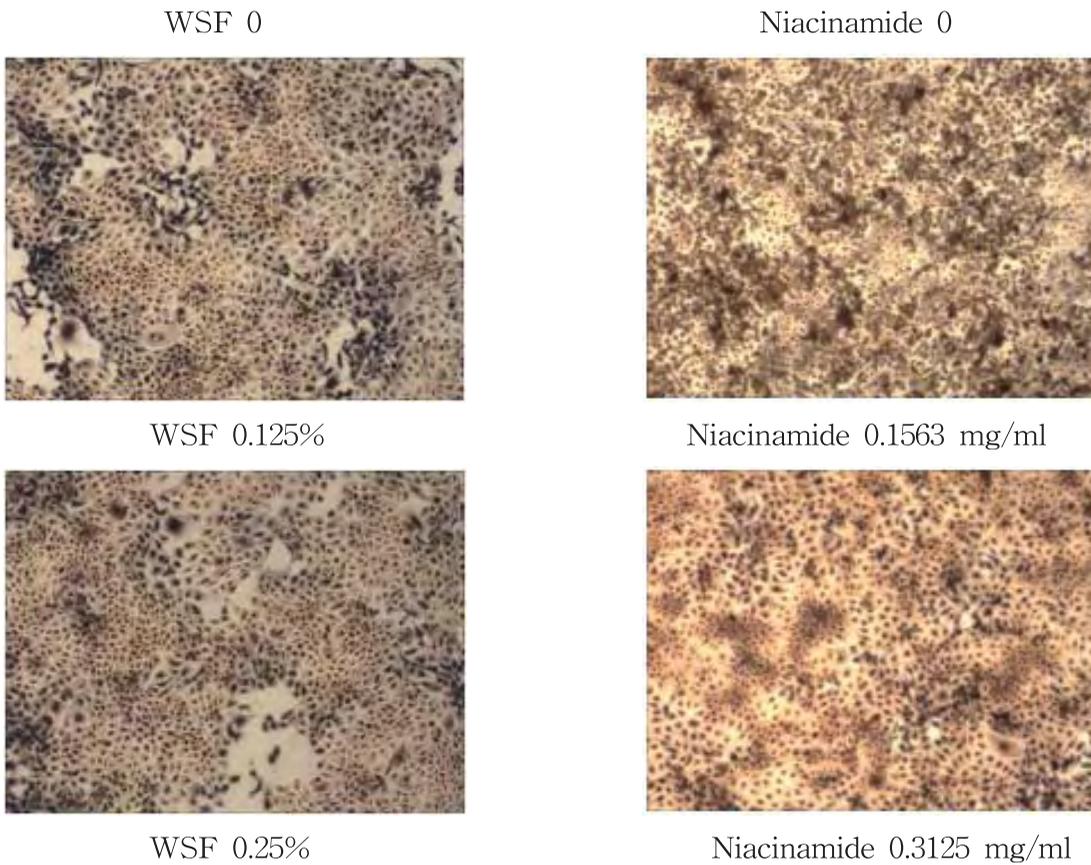
양성물질 대비 유의한 효과 없음.

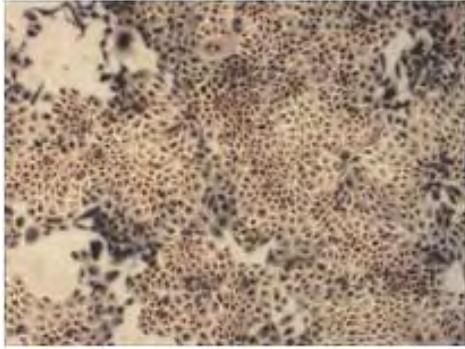


⑤ 멜라닌세포의 멜라닌 합성 관련 단백질 생성에 대한 작용
양성물질 대비 유의한 효과 없음.

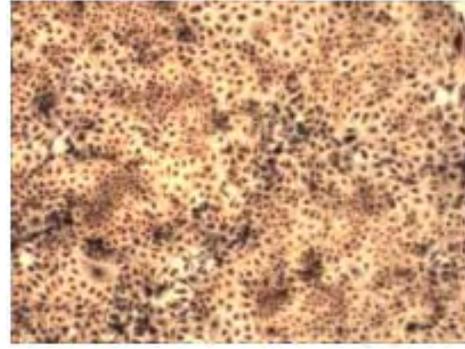


⑥ 멜라닌세포에서 각질세포로의 melanosome transfer에 대한 작용
양성물질 대비 유의한 효과 없음.

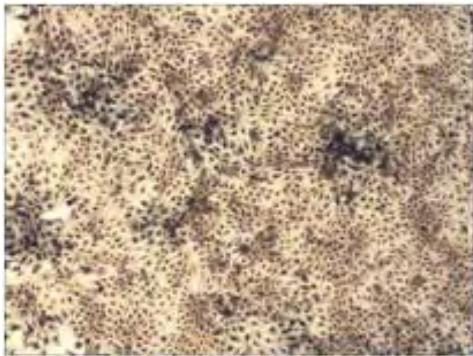




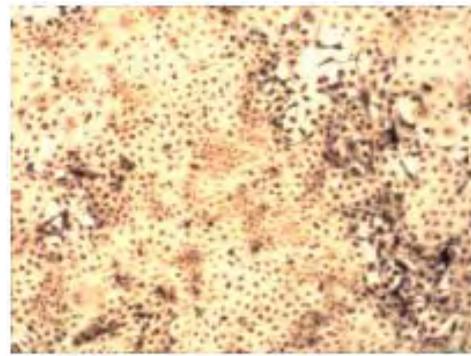
WSF 0.5%



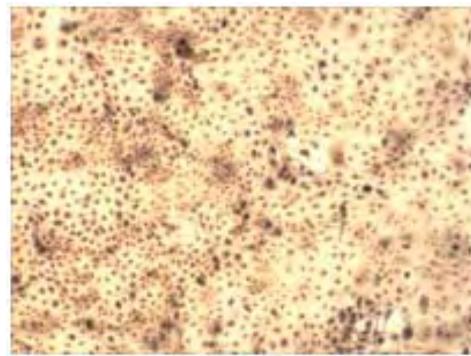
Niacinamide 0.625 mg/ml



WSF 1%



Niacinamide 0.125 mg/ml



(사) 결론

와송 추출액은 자외선 흡수 작용과 피부 착색에 대한 작용은 없지만, 탁월한 항산화 작용으로 활성산소에 의하여 피부조직 성분이 산화되는 것을 효과적으로 억제할 수 있으며, 피부 주름에 관여하는 효소에 대하여도 상당한 억제 효과를 보인다. 또한 자외선에 대한 섬유아세포의 유전자 발현과 광노화에 대하여도 우수한 방어 효과를 나타내었다.

제5절 토마토의 기능성을 기용한 체중조절 개선제품의 상용화

(협동 : 순천대학교, 서권일)

1. 토마토 식초의 최적 제조 조건 확립

가. 실험재료 및 방법

(1) 실험재료

본 연구에 사용된 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill)는 2010~2011년 국산을 대형 마트에서 구입하여 믹서기로 파쇄 한 것을 원료로 사용하였다.

(2) 사용균주 및 배지조성

알코올 발효 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*(KCTC7904)을 YPD 평판배지에 계대배양 후, YM 액체배지에서 24℃에서 24시간 정치 배양하여 사용하였으며, 초산균은 *Acetobacter sp.* PA 97을 Table 1의 배지 조성으로 30℃에서 72시간 배양하여 사용하였다.

Table 1. Cultural medium composition of acetic acid bacteria

Liquid Medium	
Components	Ratio(%)
Yeast extract	0.5
Glucose	0.5
Glycerin	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
Ethanol	5.0
Acetic acid	1.0

나. 연구방법

(1) 토마토를 이용한 발효 원액 제조 조건

식품공전에 과일 식초의 경우 과즙이 30%이상 함유되어야 한다고 규정되어 있으며, 본 연구에서는 예비실험을 한 결과 토마토 식초 제조 시 30%이상 함유하는 것이 좋은 것으로 나타났다. 즉 토마토 파쇄액의 농도를 30%, 40%, 50%(v/v) 달리하여, 여기에 당을 첨가하여 5일 동안 알코올발효와 30일간의 초산발효를 한 결과 농도에 따라 큰 차이를 나타내지 않았으며, 산업화나 경제적인 차원을 고려 시에도 30%가 가장 적합하다고 판단되어 본 연구에서는 30% 토마토 파쇄액을 사용하기로 하였다.

(2) 천연과실을 이용한 발효 원액 제조 조건

알코올 발효시에는 당이 충분히 있어야 발효가 가능하지만 토마토 경우에는 당이 4.8°Brix로 다소 적은 함량을 나타내므로 보당이 필요하다. 이전 연구 결과 시에도 11-15°Brix 범위 내에서 알코올 발효가 잘되었으며 최종적으로 식초 제조 시 13°Brix에서 가장 적합하였고 기호적인 면에서도 우수한 것으로 나타났다. 본 연구에서는 예비실험 및 이전의 연구 결과를 토대로 천연과실 및 단당류들을 이용하여 최적 알코올 발효 조건을 검토하고자 하였다.

(3) 알코올 발효 조건

(가) 주모

토마토를 파쇄 하여 각각의 액상 과당(73°Brix)과 100% 사과 농축액(72°Brix)을 당도 11, 13 및 15°Brix로 조절한 후 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하여 25°C에서 48시간 배양하여 주모로 사용하였다.

(나) 초기당도에 따른 영향

발효 초기의 당도가 알코올발효에 미치는 영향을 알아보기 위하여 선별된 액상 과당과 사과농축액을 이용하여 11, 13 및 15°Brix가 되도록 조절한 후 주모 5%를 접종하고 25°C에서 3일간 정치 배양하면서 24시간 간격으로 알코올 함량 및 당도 변화를 측정하였다.

(다) 보당액의 영향

보당액이 알코올 발효에 미치는 영향을 알아보기 위해 선별된 사과 농축액만을 이용하여 초기당도를 13°Brix로 조절한 것과 토마토와 사과 농축액을 배합하여 초기당도를 13°Brix로 조절한 것에 주모 5%(v/v)를 접종하고 25°C에서 4일간 정치 배양하면서 24시간 간격으로 알코올 함량 및 당도 변화를 측정하였다.

(라) 발효시간에 의한 영향

발효시간이 알코올 발효에 미치는 영향을 알아보기 위해 토마토 30%와 보당액인 액상 과당과 사과 농축액을 16% 및 정제수 54%로 농도를 맞춰 초기당도를 13°Brix로 조절한 후 주모 5%(v/v)를 접종하고 25°C에서 4일 동안 정치 배양하여 24시간 간격으로 당도변화 및 알코올 함량 변화를 측정하였다.

(4) 초산 발효 조건

(가) 종초의 배양

주모 제조 시 동일방법으로 제조된 토마토 알코올 발효액을 여과한 후, 그 여액을 초산균주 *Acetobacter sp.* PA97을 접종하여 30°C에서 200rpm으로 72시간 배양하여 종초로 사용하였다.

(나) 보당액의 영향

보당액이 초산 발효에 미치는 영향을 알아보기 위해 사과 농축액 알코올 발효액을 여과한 것과 토마토 파쇄액과 사과 농축액의 알코올 발효액을 여과한 것에 초기산도를 1%로 조정하고 30°C에서 200rpm으로 진탕 배양하면서 총산 변화 및 pH 변화를 측정하였다.

(다) 발효시간에 의한 영향

발효시간이 초산 발효에 미치는 영향을 알아보기 위해 알코올 발효 종료 액에 초기산도를 1%로 조정하고 30℃에서 200rpm으로 진탕 배양하면서 총산 변화 및 pH 변화를 측정하였다.

다. 연구결과 및 고찰

(1) 토마토와 액상 과당(fructose)을 이용한 발효 조건 확립

(가) 초기당도에 따른 알코올발효 특성

발효초기 당도가 토마토 알코올발효에 미치는 영향을 알아보기 위하여 토마토를 파쇄하여 가수한 후 fructose로 당도를 11, 13 및 15°Brix로 조절하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용해 25℃에서 3일간 정치 배양시킨 후 알코올 발효 함량 및 당도를 측정한 결과 Fig. 1에 나타내었다. 알코올 함량은 각각 4.4, 5.6 및 7.4%로 나타나 당도가 높을수록 높게 나타났으며, 당도의 차이도 7.2, 9.1, 9.7%로 비슷한 경향을 나타내었다. Fig. 2는 초기당도에 따른 품질특성을 알아보기 위하여 총산과 pH를 측정한 결과이다. 총산은 0.332, 0.372 및 0.594%로 나타나 초기당도가 높아질수록 다소 증가하는 경향으로 나타났다. pH는 3.08, 3.05 및 3.05로 초기 당도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다. 초기당도가 높을수록 알코올 함량이 높았으며 총산 및 pH는 큰 차이를 보이지 않았다. 과실양조 식초의 품질 규격은 총산 4.0%이상으로 토마토 파쇄액과 보당액인 액상 과당을 배합하여 초기당도가 13°Brix 함량으로 알코올발효를 하였을 때 알코올 함량이 5.6%로 초산발효에 적합한 알코올 함량으로 생각되어 토마토 식초를 제조하기 위한 초기당도를 13°Brix로 설정하였다.

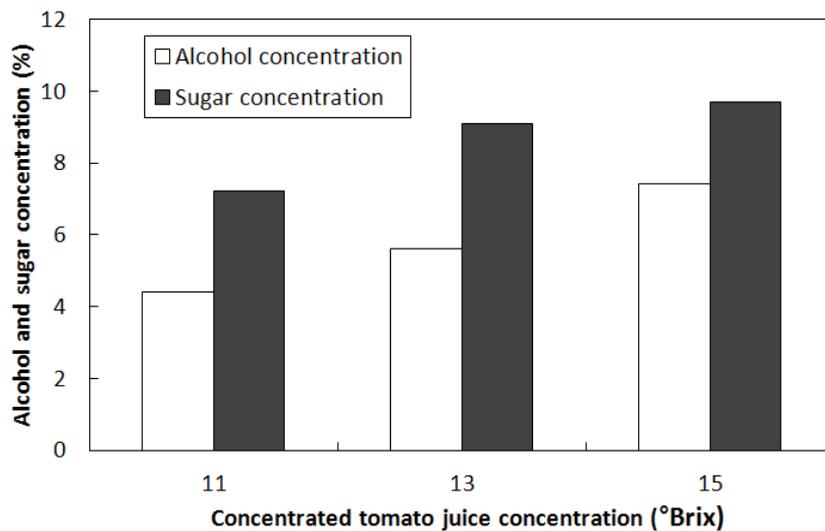


Fig. 1. Comparison of alcohol and sugar concentration on alcohol fermentation by different concentrated tomato juice concentration.

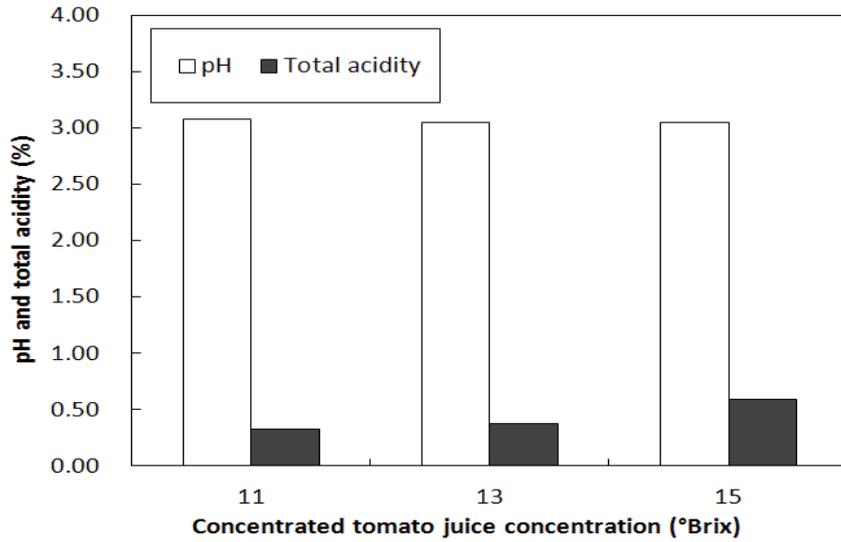


Fig. 2. Comparison of pH and total acidity on alcohol fermentation by different concentrated tomato juice concentration.

(나) 알코올발효 시간에 따른 품질특성

알코올 생산 최적 시간을 설정하기 위하여 최종적으로 토마토 파쇄액에 액상 과당으로 당도를 13°Brix로 조절한 후 주모 5%(v/v)를 접종하여 25°C에서 4일간 정치 배양 시키면서 24시간 간격으로 알코올 함량 변화 및 당도 변화를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 알코올 함량의 경우 발효 1일째부터 급격히 증가하기 시작하여 발효 종료 시 5.6%를 나타냈다. 당도는 알코올 함량과 반대의 경향으로 발효가 진행될수록 감소하기 시작하여 발효 종료 후 3.9°Brix를 나타냈다. 4일째부터는 알코올 함량 및 당도의 변화를 보이지 않아 토마토 식초를 제조하기 위한 알코올발효 시간은 4일로 가장 적합한 것으로 나타났다.

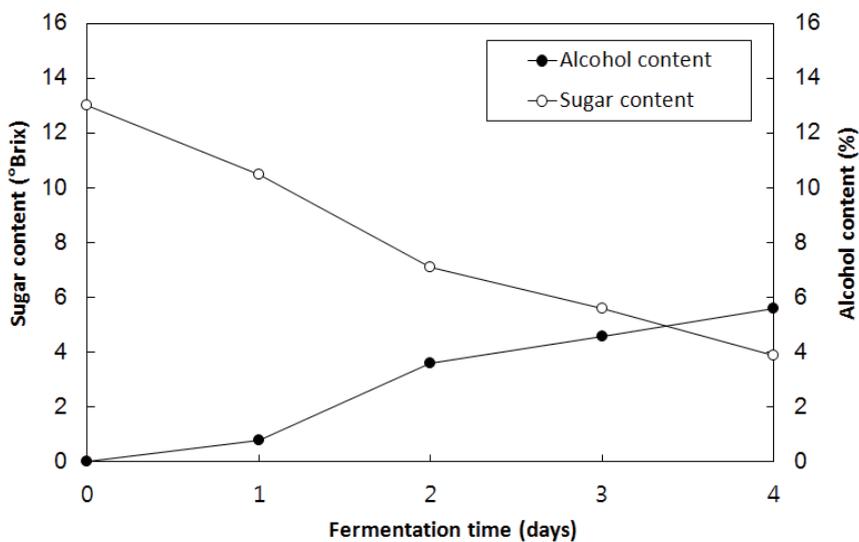


Fig. 3. Effect of fermentation times on alcohol fermentation.

(다) 토마토와 액상 과당(fructose)을 이용한 초산 발효 조건 확립

토마토 식초를 제조하기 위해 알코올발효 종료액에 증초 10%(v/v)를 접종하여 진탕 배양기에서 30°C에서 200rpm으로 30일간 배양시키면서 24시간 간격으로 품질변화를 조사하였다. Fig. 4는 알코올발효 종료액에 초기산도 1%로 조절한 후 시간에 따른 총산 변화 및 pH의 변화를 측정된 결과이다. 총산은 초기 1.01%에서 발효 16일째부터 3.42%로 급격히 증가하였고, 발효 30일째에 5.96%를 나타내었다. pH는 발효초기 3.19에서 발효 30일째까지 2.59로 감소하였으며, 발효 30일 이후에는 변화가 없었다.

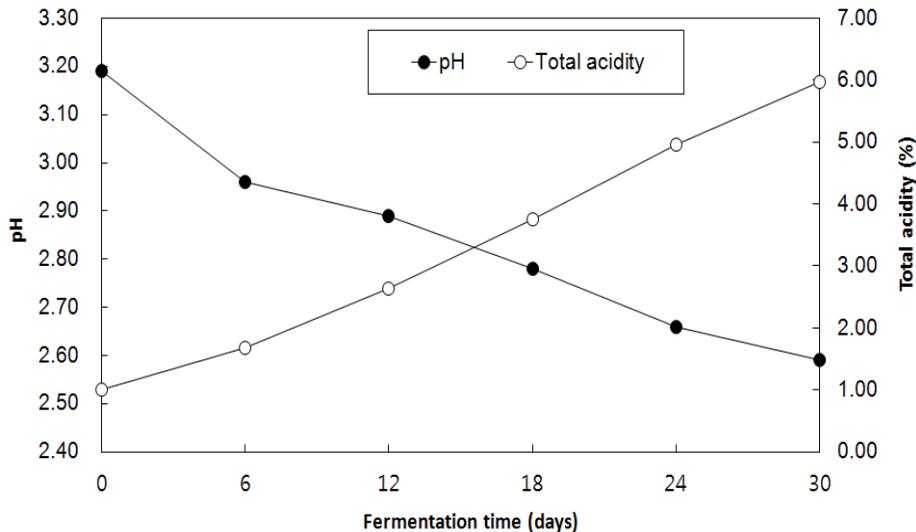


Fig. 4. Effect of fermentation times on acetic acid fermentation.

(2) 토마토와 사과농축액을 이용한 발효 조건 확립

(가) 초기당도에 따른 알코올발효 특성

발효초기 당도가 토마토 알코올발효에 미치는 영향을 알아보기 위하여 토마토를 파쇄하여 가수한 후 사과농축액으로 당도를 11, 13 및 15°Brix로 조절하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용해 25°C에서 3일간 정치 배양시킨 후 알코올 발효 함량 및 당도를 측정된 결과 Fig. 5에 나타내었다. 알코올 함량은 각각 5.0, 5.8 및 7%로 나타나 당도가 높을수록 높게 나타났으며, 당도의 차이도 7.0, 7.8 및 9.5%로 비슷한 경향을 나타내었다.

Fig. 6는 초기당도에 따른 품질특성을 알아보기 위하여 총산과 pH를 측정된 결과이다. 총산은 0.52, 0.531 및 0.536%로 나타나 초기당도가 높아질수록 다소 증가하는 경향으로 나타났다. pH는 3.55로 초기 당도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다.

토마토 파쇄액에 액상 과당으로 보당하여 2단 발효한 식초와 마찬가지로 초기당도가 높을수록 알코올 함량이 높았으며 총산 및 pH는 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 초기당도가 13°Brix 함량으로 알코올발효를 하였을 때 알코올 함량이 5.8%로 초산발효에 적합한 알코올 함량으로 생각되어 토마토 식초를 제조하기 위한 초기당도를 13°Brix로 설정하였다.

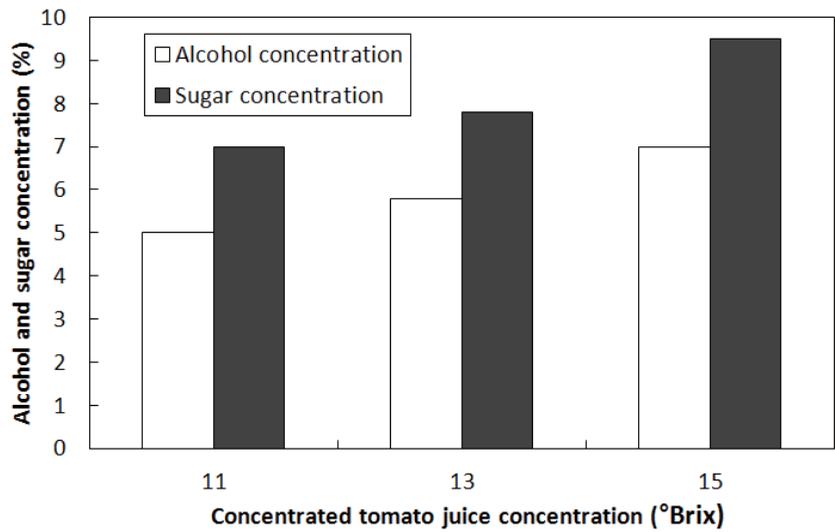


Fig. 5. Comparison of alcohol and sugar concentration on alcohol fermentation by different concentrated tomato juice concentration.

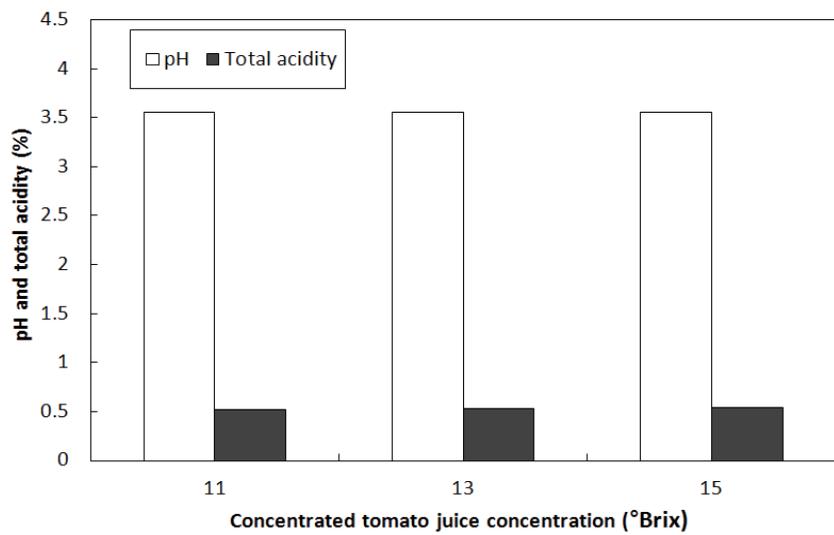


Fig. 6. Comparison of pH and total acidity on alcohol fermentation by different concentrated tomato juice concentration.

(나) 보당액의 영향

토마토 파쇄액이 알코올발효에 미치는 영향을 알아보기 위하여 사과 농축액만을 당도를 13°Brix로 조절 한 것과 토마토 파쇄하여 가수한 후 사과농축액으로 당도를 13°Brix로 조절 한 것을 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용해 25°C에서 4일간 정치 배양시킨 후 알코올 발효 함량 및 당도를 측정 한 결과 Fig. 7에 나타내었다. 사과 농축액 자체만을 알코올 발효한 결과 토마토 파쇄액을 첨가한 알코올 발효 종료액보다 알코올 함량과 당도의 차이는 0.5%와 0.2%로 차이가 나지 않아 보당액으로 사용하기에 적합하다고 판단된다.

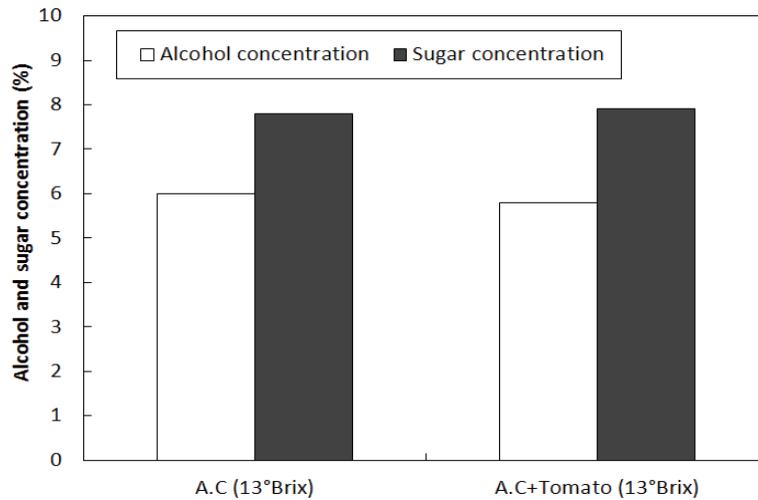


Fig. 7. Comparison of alcohol and sugar concentration on alcohol fermentation by apple concentrate(A.C) and tomato wine(A.C+Tomato).

(다) 알코올발효 시간에 따른 품질특성

알코올 생산 최적 시간을 설정하기 위하여 최종적으로 토마토 파쇄액에 사과 농축액으로 당도를 13°Brix로 조절 한 후 주모 5%(v/v)를 접종하여 25°C에서 4일간 정치 배양시키면서 24시간 간격으로 알코올 함량 변화 및 당도 변화를 측정 한 결과는 Fig. 8과 같다. 알코올 함량의 경우 발효 1일째부터 급격히 증가하기 시작하여 발효 종료 시 5.8%를 나타냈다. 당도는 알코올 함량과 반대의 경향으로 발효가 진행될수록 감소하기 시작하여 발효 종료 후 5.1°Brix를 나타냈다. 4일째부터는 알코올 함량 및 당도의 변화를 보이지 않아 토마토 식초를 제조하기 위한 알코올 발효 시간은 4일로 가장 적합한 것으로 나타났다.

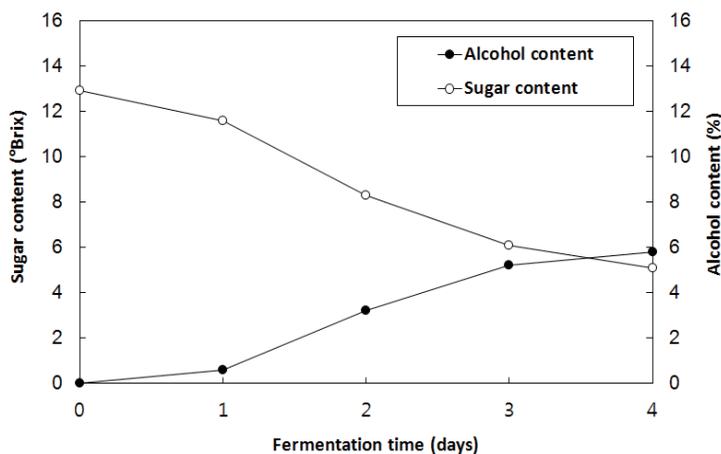


Fig. 8. Effect of fermentation times on alcohol fermentation.

(라) 보당액이 초산발효에 미치는 영향

보당액이 초산 발효에 미치는 영향을 알아보기 위해 사과 농축액 알코올 발효액을 여과한 것과 토마토 파쇄액과 사과 농축액의 알코올 발효액을 여과한 것에 초기산도를 1%로 조정하고 30℃에서 200rpm으로 진탕 배양하면서 총산 변화 및 pH 변화를 측정된 결과는 Fig. 9에 나타내었다. 사과 농축액만을 이용하여 초산발효한 결과 총산은 4.4%이었으며 pH는 3.02이었다. 토마토 파쇄액에 사과 농축액으로 보당하여 초산발효한 결과 총산은 5.38%이었으며 pH는 3.13이었다. 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초는 사과 농축액 식초에 비해 총산이 0.98%가 높았는데 이는 토마토 자체의 유기산에 의해 증가한 것으로 사료된다.

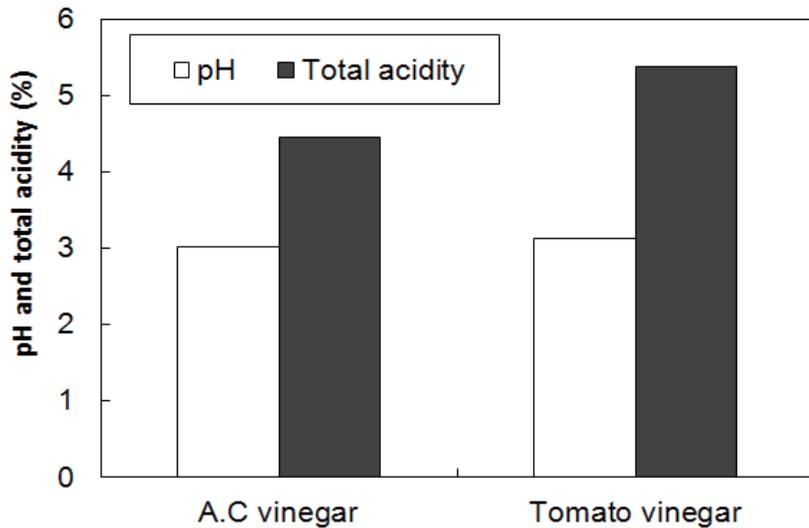


Fig. 9. Comparison of pH and total acidity on alcohol fermentation by apple concentrate(A.C) vinegar and tomato vinegar

(마) 토마토와 사과 농축액을 이용한 초산 발효 조건 확립

토마토 식초를 제조하기 위해 알코올 발효 종료액에 종초 10%(v/v)를 접종하여 진탕배양기에서 30℃에서 200rpm으로 30일간 배양시키면서 24시간 간격으로 품질변화를 조사하였다. Fig. 10은 알코올발효 종료액에 초기산도 1%로 조절한 후 시간에 따른 총산 변화 및 pH의 변화를 측정된 결과이다. 총산은 초기 1.176%에서 발효 18일째부터 3.40%로 급격히 증가하였고, 발효 30일째에 5.3%를 나타내었다. pH는 발효초기 3.56에서 발효 30일째까지 3.13로 감소하였으며, 발효 30일 이후에는 변화가 없었다.

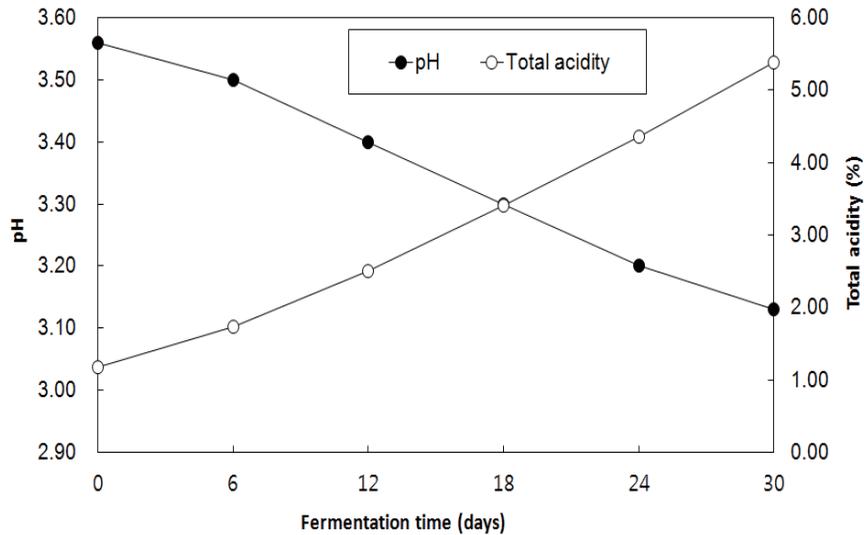


Fig. 10. Effect of fermentation times on acetic acid fermentation.

2. 토마토 식초의 이화학적 성분분석

가. 실험재료 및 방법

(1) 알코올 함량 및 당도 측정

주류분석규정에 따라 알코올발효액을 원심분리 하여 균체를 제거한 후 상정액 100 mL를 증류한 후 유액이 70 mL이 되면 중지하고 물을 가하여 증류액을 100 mL로 채운다음 주정계 (alcohol hydrometer)로 측정하여 Gay-Lussac 주정환산표에서 15°C 온도로 보정 후 측정하였다. 당도는 300 μ L을 취하여 당도계(ATAGO : PAL-3, Japan)를 사용하여 °Brix(%) 측정하였다.

(2) pH 및 총산 측정

pH측정은 시료 10 mL 취하여 pH meter(720p, Istek, Korea)를 사용하여 측정하였으며, 총산은 0.1 N NaOH 용액으로 중화 적정하여 초산으로 환산하였다.

(3) 유리당 및 유기산 분석

시료액을 원심분리 시킨 후 Sep-pek C₁₈ cartridge(Water Associate, U.S.A)에 통과시키고 0.45 μ m membrane filter 여과로 색소 및 단백질성분을 제거한 다음 분석하였고, 각각의 분석 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Operating conditions of ion chromatography

Items	Conditions	
	Free sugars	Organic acids
Column	IonPac AS11-HS Analytical, 4-mm	InertsilODS-3V (250×4.6mm I.D)
Column temp.	IonPac AG11-HS Guard, 4-mm	40°C
ELUENT	EGC-KOH Cartridge-23mM KOH	0.1M Ammonium dihydrogenphosphate + Phosphoric acid (pH 2.5)
Flow rate	1.0 mL/min	1.0 mL/min
Inj.Volume	10 µL	20 µL
Detection	ELSD	RI

(4) 유리 아미노산 분석

토마토 식초의 유리아미노산 분석은 여액 10 mL에 sulfosalicylic acid 25 mg을 첨가하여 4°C에서 4시간 동안 방치시킨 후 원심분리(50,000 rpm, 30분)하여 단백질을 제거하고, 상등액을 0.22 µm membrane filter로 여과하여 얻은 여액을 취하여 분석시료로 사용하였으며 분석 조건은 Table 3과 같다.

Table 3. Operating conditions of amino acid analyzer for amino acid content analysis

Instrument	S433-H (SYKAM)
Column	Cation separation column (LCA K07/Li)
Column size	4.6 × 150mm
Column temperature	37 ~ 74°C
Flow rate	Buffer 0.45ml/min, reagent 0.25ml/min
Buffer pH range	2.90 ~ 7.95
Wavelength	440nm and 570nm

(5) 무기성분

토마토 식초 무기성분 분석은 습식분해법으로 행하였다. 시료용액 100 mL에 분해제 (HClO₄ : H₂SO₄ : H₂O₂ = 9 : 2 : 5, v/v) 25 mL를 가하여 낮은 온도에서 서서히 가열하여 완전하게 무색으로 변할 때까지 hot plate에서 분해한 후 여과 (Whatman No.2)하여 100 mL 정용하였으며, 이를 시료로 하여 atomic absorption spectrometer을 사용해서 Table 4과 같은 조건으로 분석하였다.

Table 4. Operating for analysis of minerals by atomic absorption spectrophotometer

Item	Minerals (AA-6501GS(SHIMADZU))							
	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Cu	Na	Zn
Wave length(nm)	422.7	248.3	766.5	285.2	279.5	324.8	330.2	213.9
Current(mA)	10	12	10	8	10	6	10	8
Slit Width(nm)	0.5	0.2	0.5	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5
Lighting Mode	BGC-D ₂	BGC-D ₂	Non-BGC	BGC-D ₂	BGC-D ₂	BGC-D ₂	Non-BGC	BGC-D ₂
Burner Height(mm)	7	7	7	7	7	7	7	7
Fuel Gas Flow(/min)	2.0	2.0	2.0	1.8	2.0	1.8	1.8	2.0

나. 연구결과 및 고찰

(1) 액상 과당으로 보당한 토마토 식초의 알코올 함량 및 당도의 변화

Table 5는 식초 제조 과정 중 알코올 함량과 당도의 변화를 측정 한 결과이다. 알코올 발효 과정에서 당도는 발효 초기 착즙액일 때 13°Brix에서 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하여 알코올 발효가 종료 후에는 3.9°Brix로 나타났다. 알코올 함량은 발효 초기 착즙액일 때 0%에서 발효가 진행됨에 따라 점차 증가하여 알코올 발효 종료 후에는 5.6%로 나타났다. 초산 발효 과정 후에는 당도는 5.8 °Brix로 변화가 거의 없었으며, 잔류 알코올 함량은 0%로 나타났다.

Table 5. Changes in alcohol and °Brix concentration after alcohol and acetic acid fermentation of tomato juice

Samples Items	Juice	Wine	Vinegar
°Brix	13	3.9	3.9
Alcohol(%)	0	5.6	0

(2) 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초의 알코올 함량 및 당도의 변화

식초 제조 과정 중 알코올 함량과 당도의 변화를 측정 한 결과는 Table 6과 같다. 알코올 발효 과정에서 당도는 발효 초기 착즙액일 때 13 °Brix에서 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하여 알코올 발효가 종료 후에는 5.1 °Brix로 나타났다. 알코올 함량은 발효 초기 착즙액일 때 0%에서 발효가 진행됨에 따라 점차 증가하여 알코올 발효 종료 후에는 5.8%로 나타났다. 초

산 발효 과정 후에는 당도는 5.1 °Brix로 변화가 거의 없었으며, 잔류 알코올 함량은 0%로 나타났다.

Table 6. Changes in alcohol and °Brix concentration after alcohol and acetic acid fermentation of tomato juice

Samples Items	Juice	Wine	Vinegar
°Brix	13	5.1	5.1
Alcohol(%)	0	5.8	0

(3) 액상 과당으로 보당한 토마토 식초의 pH 및 총산의 변화

식초 제조 과정 중 pH 및 총 산도의 변화를 측정한 결과는 Table 7과 같다. pH는 발효 전 착즙액일 때 3.74이었으며, 발효가 진행됨에 따라 감소하여 알코올발효 종료 후에는 3.05이었다. 초산발효 과정에서도 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하여 초산발효 종료 후에는 2.59이었다. 산도의 변화는 발효초기 착즙액일 0.192%이었고, 알코올 발효 종료 후에는 0.372%로 큰 변화는 없었다. 초산 발효 과정에서의 산도는 발효가 진행됨에 따라 서서히 증가하여 발효 30일에 5.96%로 최고치를 나타냈다.

Table 7. Changes in pH and acidity after alcohol and acetic acid fermentation of tomato juice

Samples Items	Juice	Wine	Vinegar
pH	3.74	3.05	2.59
Acidity(%)	0.192	0.372	5.96

(4) 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초의 pH 및 총산도의 변화

식초 제조 과정 중 pH 및 총 산도의 변화를 측정한 결과는 Table 8과 같다. pH는 발효 전 착즙액일 때 3.58이었으며, 발효가 진행됨에 따라 감소하여 알코올발효 종료 후에는 3.33이었다. 초산발효 과정에서도 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하여 초산발효 종료 후에는 3.13이었다. 산도의 변화는 발효초기 착즙액일 0.192%이었고, 알코올 발효 종료 후에는 0.372%로 큰 변화는 없었다. 초산 발효 과정에서의 산도는 발효가 진행됨에 따라 서서히 증가하여 발효 30일에 5.96%로 최고치를 나타냈다.

Table 8. Changes in pH and acidity after alcohol and acetic acid fermentation of tomato juice

Samples Items	Juice	Wine	Vinegar
pH	3.58	3.33	3.13
Acidity(%)	0.488	0.531	5.38

(5) 액상 과당으로 보당한 토마토 식초의 유리당 변화

Table 9는 식초에 함유된 30% 토마토 과쇄액의 유리당 함량과 토마토 식초 제조과정 중 유리당 변화를 HPLC로 분석한 결과이다. 발효경과에 따른 유리당 성분은 glucose, maltose, fructose 및 sucrose으로 확인되었다. 토마토 과쇄액에서는 fructose, sucrose 및 maltose가 미량으로 확인되었으며 발효를 진행함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 알코올 발효 과정에서는 fructose함량이 가장 높았으며, 발효시간이 경과됨에 따라 발효 전 8,021.52 mg%에서 발효 후 19.83 mg%로 감소하였다. 그 외 유리당 성분인 glucose, maltose 및 sucrose 함량도 발효시간이 경과됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 9. Changes in contents of free sugars after alcohol and acetic acid fermentation of tomato vinegar (mg%)

Samples Items	Tomato	Juice	Wine	Vinegar
Glucose	-	5,052.96	3,107.53	3,058.52
Fructose	10.81	8,021.52	29.30	19.82
Sucrose	72.53	74.88	75.11	418.30
Maltose	42.73	126.00	46.59	-

(6) 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초의 유리당 변화

식초에 함유된 30% 토마토 과채액의 유기산과 토마토 식초 제조과정 중 유리당 변화를 측정된 결과는 Table 10과 같다. 발효경과에 따른 유리당 성분은 glucose, maltose, fructose 및 sucrose으로 확인되었다. 토마토 과채액에서는 fructose, sucrose 및 maltose가 미량으로 확인되었으며 발효를 진행함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 알코올 발효 과정에서는 fructose함량이 가장 높았으며, 발효시간이 경과됨에 따라 발효 전 8,556.80 mg%에서 발효 후 0.00 mg%로 감소하였다. 그 외 유리당 성분인 glucose, maltose 및 sucrose 함량도 발효시간이 경과됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 10. Changes in contents of free sugars after alcohol and acetic acid fermentation of tomato vinegar and tomato paste was added by 30% concentration

(mg%)

Samples Items	Tomato	Juice	Wine	Vinegar
Glucose	-	4,518.40	3,660.00	3,058.52
Fructose	10.81	8,556.80		-
Sucrose	72.53	960.00		-
Maltose	42.73	-		-

Table 11은 토마토 식초에 보당액으로 사용한 사과 농축액이 영향을 미치는지 확인하기 위하여 사과 식초를 제조하였으며, 식초 제조과정 중에 유리당 변화를 측정된 결과이다. 사과 농축액 발효초기 원액일 때 유기산은 glucose, maltose, fructose 및 sucrose가 확인 되었다. 알코올 발효 과정에서는 glucose와 maltose 함량이 높았으며 그 외 유기산들은 나타나지 않았다. 초산 발효가 진행되면서 glucose와 maltose가 나타났으며 알코올 발효시보다 다소 낮은 함량을 나타내었다. 사과 농축액 식초와 사과 농축액으로 보당하여 발효한 토마토 식초는 glucose를 함유하고 있었다.

Table 11. Changes in contents of free sugars after alcohol and acetic acid fermentation of apple concentrate vinegar

(mg%)

Samples Items	Apple juice	Apple wine	Apple vinegar
Glucose	3,488.00	2,745.00	2,695.12
Fructose	7,476.38	-	-
Sucrose	1,823.36	-	-
Maltose	400.01	338.05	328.59

(7) 액상 과당으로 보당한 토마토 식초의 유기산 변화

식초에 함유된 30% 토마토 파쇄액의 유기산과 토마토 식초 제조과정 중 유기산 변화를 측정된 결과는 Table 12와 같다. 토마토 파쇄액에서는 malic acid, citric acid 및 oxalic acid가 미량으로 확인되었으며 발효를 진행함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 토마토 발효 초기 착즙액일 때 유기산은 malic, citric, lactic, succinic 및 oxalic acid가 확인 되었다. 알코올 발효 과정에서는 malic acid와 citric acid함량이 높았으며 그 외 유기산들은 미량의 함량으로 나타났다. 초산 발효가 진행되면서 acetic acid 4,747.13 mg%로 가장 높은 함량을 나타내었으며 그 외에는 미량으로 나타났다.

Table 12. Changes in organic acids contents after alcohol and acetic acid fermentation of tomato vinegar and tomato paste was added by 30% concentration

(mg%)

Samples Items	Tomato	Juice	Wine	Vinegar
Acetic acid	-	-	-	4,747.13
Malic acid	10.81	92.24	128.91	164.61
Citric acid	72.53	181.35	155.49	174.08
Lactic acid	-	10.23	75.24	164.56
Succinic acid	-	33.63	42.03	121.55
Oxalic acid	42.73	69.42	70.08	88.29

(8) 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초의 유기산 변화

식초에 함유된 30% 토마토 파쇄액의 유기산 함량과 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초 제조과정 중 유기산 변화를 측정된 결과는 Table 13과 같다. 토마토 파쇄액에서는 malic acid, citric acid 및 oxalic acid가 미량으로 확인되었으며 발효를 진행함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 토마토 발효 초기 착즙액일 때 유기산은 malic, citric, lactic, succinic 및 oxalic acid가 확인 되었다. 알코올 발효 과정에서는 malic acid, succinic acid 및 lactic acid 함량이 높았으며 그 외 유기산들은 미량의 함량으로 나타났다. 초산 발효가 진행되면서 acetic acid 4,099.45 mg%로 가장 높은 함량을 나타내었으며 그 외에는 미량으로 나타났다.

Table 13. Changes in organic acids contents after alcohol and acetic acid fermentation of tomato vinegar and tomato paste was added by 30% concentration

(mg%)

Samples Items	Tomato	Juice	Wine	Vinegar
Acetic acid	-	-	-	4,099.45
Malic acid	10.81	101.70	119.11	205.03
Citric acid	72.53	99.36	120.83	359.67
Lactic acid	-	53.01	259.72	386.77
Succinic acid	-	67.50	65.20	76.72
Oxalic acid	42.73	54.01	56.53	82.53

Table 14는 토마토 식초에 보당액으로 사용한 사과 농축액이 영향을 미치는지 확인하기 위하여 사과 식초를 제조하였으며, 식초 제조과정 중에 유기산 변화를 측정된 결과이다. 사과 농축액 발효초기 원액일 때 유기산은 malic, citric, lactic, succinic 및 oxalic acid가 확인 되었다. 알코올 발효 과정에서는 malic acid과 lactic acid 함량이 높았으며 그 외 유기산들은 미량의 함량으로 나타났다. 초산 발효가 진행되면서 acetic acid 2,695.12 mg%로 가장 높은 함량으로 나타났으며 그 외에는 미량으로 나타났다. 사과 농축액은 다소 유기산 함량은 낮으나 보당액으로써 유기산 함량을 증진시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

Table 14. Changes in organic acids contents after alcohol and acetic acid fermentation of apple concentrate vinegar

(mg%)

Samples Items	Apple juice	Apple wine	Apple vinegar
Acetic acid	-	-	2,695.12
Malic acid	259.20	391.30	492.06
Citric acid	2.25	8.29	-
Lactic acid	144.90	175.70	529.82
Succinic acid	6.13	24.95	590.08
Oxalic acid	53.32	55.30	57.57

(9) 액상 과당으로 보당한 토마토 식초의 유리아미노산의 함량

Table 15은 2단계 발효과정으로 제조한 토마토 식초에 대한 유리아미노산을 분석한 결과이다. 액상 과당으로 보당한 토마토 식초의 유리아미노산 성분은 15종으로 나타났으며, 총 함량은 122.4 µg/mL로 나타났다. 식초의 유리아미노산 성분 중 valine, phenylalanine, ammonium chloride, lysine 및 histidine이 높았으며, 그 외에는 미량으로 나타났다.

Table 15. Comparison free amino acid contents in tomato vinegar

(µg/mL)

Free amino acids	Contents	Free amino acids	Contents
O-Phosphoethanolamine	3.8	L-Leucine	4.4
L-Serine	2.5	L-Tyrosine	9.7
Glycine	1.2	L-Phenylalanine	19.9
L-Citrulline	1.7	Ammonium Chloride	6.9
L-Valine	20.6	L-Ornithine	5.3
L-Cystine	7.2	L-Lysine	19.4
L-Methionine	1.6	L-Histidine	12.9
L-Isoleucine	5.3		
Total free amino acids			122.4

(10) 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초의 유리아미노산의 함량

Table 16은 토마토 식초에 대한 유리아미노산을 분석한 결과이다. 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초의 유리아미노산 성분은 총 15종으로 나타났으며, 총 함량은 161.25 µg/mL로 나타났다. 식초의 유리아미노산 성분 중 asparagine, valine, phenylalanine ammonium chloride 및 lysine이 높았으며, 그 외에는 미량으로 나타났다.

Table 16. Comparison free amino acid contents in tomato vinegar

(µg/mL)

Free amino acids	Contents	Free amino acids	Contents
L-Serine	2.8	L-Leucine	5.0
L-Asparagine	20.0	L-Tyrosine	6.5
L-Glutamic acid	4.0	L-Phenylalanine	20.8
L-Alanine	3.8	Ammonium Chloride	10.6
L-Citrulline	9.3	L-ornithine	2.5
L-Valine	33.1	L-Lysine	18.4
L-Cystine	5.8	L-Histidine	9.4
L-Methionine	0.9	L-Arginine	5.3
L-Isoleucine	3.6		
Total free amino acids			161.8

사과 농축액이 토마토 식초에 미치는 영향을 알아보기 위하여 자체만을 가지고 식초를 제조 후 유리아미노산을 분석한 결과 Table 17과 같다. 사과 식초의 유리아미노산 성분은 총 14종으로 나타났으며, 총 함량은 토마토 식초보다 함량이 적은 140.9 µg/mL로 나타났다. 사과 식초의 유리아미노산 성분 중 citrulline, valine, phenylalanine, ammonium chloride 및 lysine이 높았으며, 그 외에는 미량으로 나타났다.

사과 식초와 토마토 식초에서의 유리아미노산은 대부분 valine, phenylalanine, ammonium chloride 및 lysine이었으며, 그 외에는 다소 차이가 있었다. 또한 토마토 식초가 다소 높은 것은 토마토 자체의 유리아미노산으로 인하여 증가한 것으로 사료된다.

Table 17. Comparison free amino acid contents in apple concentrate vinegar

(µg/mL)

Free amino acids	Contents	Free amino acids	Contents
L-Serine	5.4	L-Leucine	7.2
L-Asparagine	-	L-Tyrosine	6.8
L-Glutamic acid	5.3	L-Phenylalanine	26.2
L-Alanine	4.2	Ammonium Chloride	14.9
L-Citrulline	13.6	L-ornithine	2.8
L-Valine	24.0	L-Lysine	12.5
L-Cystine	2.7	L-Histidine	9.3
L-Methionine	0.2	L-Arginine	-
L-Isoleucine	5.8		
Total free amino acids			140.9

(11) 액상 과당으로 보당한 토마토 식초의 무기성분 함량

토마토 식초 제조 후 무기성분을 분석한 결과는 Table 18과 같다. 토마토 식초의 무기성분 중 K의 함량이 338 ppm으로 가장 높게 나타났다. 그 외에 Na, P, Ca 및 Mg의 함량이 94.14, 72.86, 61.06 및 27.12 ppm으로 높았으며, Fe, Zn, Cu, Mn은 다소 낮은 함량을 나타내었다.

Table 18. Content of mineral in tomato vinegar

(ppm)

Minerals	Contents	Minerals	Contents
Fe	5.04	Ca	61.06
Zn	1.94	Mg	27.12
Cu	0.86	Na	94.14
Mn	0.52	P	72.86
K	338		

(12) 사과 농축액으로 보당한 토마토 식초의 무기성분 함량

토마토 식초 제조 후 무기성분을 분석한 결과는 Table 19와 같다. 토마토 식초의 무기성분 중 K의 함량이 853.60 ppm으로 가장 높게 나타났다. 그 외에 P, Na, Ca 및 Mg의 함량이 98.33, 81.46, 61.84 및 40.80 ppm으로 높았으며, Fe, Zn, Cu, Mn은 다소 낮은 함량을 나타내었다.

Table 19. Content of mineral in tomato vinegar

(ppm)

Minerals	Contents	Minerals	Contents
Fe	2.48	Ca	61.84
Zn	1.16	Mg	40.80
Cu	0.86	Na	81.46
Mn	0.60	P	98.33
K	853.60		

사과 농축액이 토마토 식초에 미치는 영향을 알아보기 위하여 자체만을 가지고 식초를 제조 후 무기성분을 분석한 결과 Table 20과 같다. 사과 식초의 무기성분 중 K의 함량이 920.00 ppm으로 가장 높게 나타났다. 그 외에 P, Na, Ca 및 Mg의 함량이 133.90, 91.82, 72.34 및 44.90 ppm으로 높았으며, Fe, Zn, Cu, Mn는 다소 낮은 함량을 나타내었다.

사과 식초와 토마토 식초는 대부분 K의 함량이 가장 높았으며, 그 외에 P, Na, Ca 및 Mg 성분들이 높은 것으로 나타났다.

Table 20. Content of mineral in apple concentrate vinegar

(ppm)

Minerals	Contents	Minerals	Contents
Fe	2.72	Ca	72.34
Zn	3.52	Mg	44.90
Cu	0.82	Na	91.82
Mn	0.72	P	133.90
K	920.00		

3. 토마토 식초와 후보물질군의 항비만 효과 확인

가. 실험재료 및 방법

(1) 시료 제조

토마토 식초는 2010~2011년 대형 마트에서 구입한 국산 토마토(부산 대저)를 원료로 하여 30°C 4일간의 알코올 발효와 30°C에서 8일간의 초산발효를 수행하여 제조한 최종 산도 5.6%의 식초를 본 실험에 사용하였다.

(2) 세포 배양

실험에 사용한 3T3-L1 pre-adipocyte cell (전구지방세포)은 American Type Culture Collection (ATCC) 로부터 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지에 10% Newborn calf serum (NBCS) 과 1% antibiotics-antimycotic을 첨가하여 5% CO₂가 존재하는 37°C 세포 배양기에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

(3) 3T3-L1 지방전구세포의 분화유도

3T3-L1 세포는 5~10x10⁴ cells/mL의 농도로 희석하여 6 well-plate에 분주 후 세포밀도가

100%가 될 때까지 10% NBCS을 포함한 DMEM로 배양하였다. 2일 후(day 0), 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM에 insulin, dexamethasone (DEX) 그리고 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)이 각각의 농도로 첨가된 differentiation-induction medium (분화 유도 배지)로 교체하여 2일간 처리하였다. 그 후 2일 간격으로 10% FBS를 포함한 새 배지에 insulin이 첨가된 성숙 촉진 배지로 교체하여 배양하였다. 분화유도과정 중에 토마토 발효 원액 및 항비만 효능 후보 물질 4종의 분화 억제 효능을 확인하기 위해 분화 유도 0일 부터 8일간 각각의 시료를 처리하였다.

(4) Oil Red O 염색 및 정량

분화된 3T3-L1 세포를 PBS로 세척한 후 3.7% formalin으로 1시간 동안 고정하여 증류수로 세척한 다음 Oil Red O solution을 처리하여 실온에서 1시간 염색하였다. 염색 후 Oil Red O solution을 제거하고 증류수로 3회 세척한 다음 염색된 세포를 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. 또한 정량적 분석을 위하여 Oil Red O 염색 성분을 100% isopropanol로 용출시켜 회수 한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 실험동물 사육 및 식이조성

실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley(SD)계 웅성 흰쥐 42마리를 (주)다물사이언스로부터 구입하여 사용하였다. 이들은 1주간 고품식으로 적응기간을 둔 후 난괴법(randomized complete block design)으로 정상식이군 (normal diet; N), 고지방식이군 (high-fat diet; HFD), 고지방식이와 토마토 식초군 (HFD-TV), 고지방식이와 후보물질 A군 (HFD-A), 고지방식이와 후보물질 B군 (HFD-B), 고지방식이와 후보물질 C군 (HFD-C), 고지방식이와 후보물질 D군 (HFD-D)으로 각 처리 군 당 6마리씩 7군으로 나누어 5주간 사육하였다. 동물사육실의 환경은 항온 (22±2℃) 및 항습 (50±5%) 조건을 유지하였고, 조명은 12시간 간격 (8:00-20:00)의 광주기로 일정하게 유지하였다.

실험에 사용된 식이는 AIN-93G 에 준하였으며 Table 21과 같다. 토마토식초와 후보물질은 사람이 섭취하는 양을 기준으로 체중 kg당 7 mL씩 매일 일정한 시각에 5주간 경구투여 하였다. 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고 모든 실험 식이는 사육기간 동안 냉장 보관 하였다.

체중은 매일 일정한 시간에 측정하여 최종 체중에서 실험개시 전의 체중을 감하여 실험개시 전의 체중으로 나누어 체중증가율로 표시하였고, 식이섭취량은 2 일에 한 번씩 총 5주 간 측정하여 사육기간의 체중증가량을 동일 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율을 구하였다.

Table 21. Composition of the experimental diet

	HFD 45%cal		Regular diet	
	g%	kcal%	g%	kcal%
Protein	23	20	20	20
Carbohydrate	40	34	63	63
Fat	24	45	7	16
Ingredient				
Casein	200	800	200	800
Sucrose	172.8	691.2	100	400
Dextrose	100	400	132	528
Corn starch	72.8	291.2	397.5	1,590
Cellulose	50	0	50	0
Soybean oil	25	225	70	630
Lard	177.5	1,597.5	0	0
Mineral mix ¹	45	0	35	0
Vitamin mix ²	10	40	10	40
L-Cystine	3	12	3	12
Choline bitartrate	2	0	2.5	0
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.012	0	0.012	0
Total	858.112	4,056.9	1,000	3,902

¹Mineral mixture according to AIN-93G

²Vitamin mixture according to AIN-93G

(6) 실험동물의 처리

실험동물은 실험이 종료된 시점부터 12시간 절식시킨 후 에테르를 흡입시켜 마취시킨 다음 복부 하대정맥(inferior vena cava)으로부터 공복혈액을 채취하였다. 헤파린 처리된 혈액은 900 ×g (4℃)에서 15분 간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 실험동물의 장기조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 0.9% 생리식염수로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거하여 칭량하였으며, 즉시 액체질소로 급냉시켜 -80℃에 보관하였다.

(7) 혈청 지질 함량 측정

혈청 중 중성지방(TG), 총콜레스테롤(TC), HDL-콜레스테롤 함량은 상업용 측정 kit(Asan Pharmaceutical Co. Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며, LDL-콜레스테롤 함량은 Friedwald의 계산법 {총콜레스테롤-(HDL-콜레스테롤-중성지방/5)} (1)에 의하여 계산하였다. 혈청 중 alanine transaminase(ALT) 및 aspartate transaminase(AST) 활성은 혈액생화학적 검사 자동분석기 (Fuji Dri-chem 3,500, Fujifirm Japan)를 사용하여 측정하였다.

(8) 간조직 중 중성지방과 콜레스테롤 함량 측정

간조직 중의 지질 함량은 Folch 등(2)의 방법을 수정, 보완하여 사용하였다. 간조직 내의 지질 함량 분석을 위하여 간조직 0.1 g을 CM solution(Chloroform 2: Methanol 1) 2 mL과 혼합 후 Homogenizer로 균질화 하였다. 균질화 된 용액을 25℃ shaking water bath에서 3시간 동안 방치한 후 1M H₂SO₄를 첨가하고 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 chloroform 층을 수거하였다. 최종적으로 chloroform 층은 질소가스를 이용하여 건조시킨 후 혈청 지질을 측정하였을 때와 동일한 kit(Asan Pharmaceutical Co. Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

(9) 통계처리

실험 결과는 평균값과 표준오차로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS statistics (IBM Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 유의성을 p<0.05 수준에서 검증하였다.

나. 연구결과 및 고찰

(1) 토마토 식초와 SK-1 및 후보물질군의 항 비만효과 확인

(가) Oil Red O 염색 및 정량

8일간 분화를 유도한 후 Oil Red O 염색하여 lipid droplet 생성 정도를 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 대조군과 비교하여 토마토식초, 후보물질 B 및 D 에서 lipid droplet 의 감소가 관찰되었다. 그러나 후보물질 A와 C를 처리한 군에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 중성지방 축적량을 정량적으로 조사하기 위하여 중성지방을 염색한 Oil Red O 염색 성분을 isopropanol로 용해시킨 후 흡광도를 측정한 결과, 대조군에 비해 토마토식초, 후보물질 B 및 D에서 지방 축적량이 유의하게 감소되었다. 이러한 결과를 통해서 다섯 종류의 시료 중 토마토식초, 후보물질 B 및 D가 3T3-L1 지방전구 세포의 분화 억제하며, 그 중 후보물질 B의

효과가 가장 높음을 알 수 있었다.

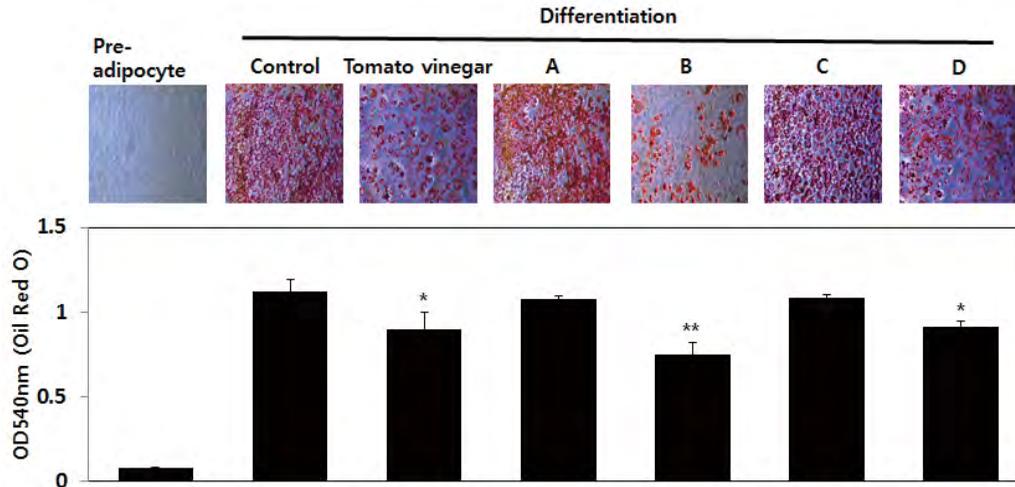


Fig. 11. Effect of tomato vinegar and anti-obesity exact candidates on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Cells were cultured in the medium containing different concentrations from Day 0 to Day 8, and lipid accumulation was measured by Oil Red O staining.

(나) 체중,식이섭취량 및 식이효율

고지방식이와 토마토 식초 및 각각의 후보물질들을 5주간 급여한 흰쥐의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율을 비교한 결과는 Table 22와 같다.

Table 22. Effect of various samples on body weight, weight gain, food intake and food efficiency ratio in rat fed high-fat diet

Groups	Body weights (g)		weight gains (g/day)	Food intake (g/day)	¹ FER (%)
	Initial	Final			
ND	138.33±11.69	325.00±24.08 ^a	5.49±5.88	21.81±2.70 ^b	24.88±26.38
HFD	142.50±5.24	360.83±22.45 ^b	6.42±4.20	19.87±1.95 ^a	33.01±23.20
TV	139.16±3.76	348.33±19.66 ^{ab}	6.15±3.34	19.63±1.64 ^a	31.65±17.01
A	140.00±6.32	335.00±33.46 ^{ab}	5.73±3.70	19.54±0.84 ^a	29.13±18.32
B	142.50±6.12	315.83±36.52 ^a	5.09±5.77	19.46±1.99 ^a	26.64±27.32
C	141.66±6.05	316.66±25.23 ^a	5.14±3.84	19.31±1.93 ^a	26.23±20.43
D	142.50±5.24	362.50±15.08 ^b	6.47±3.68	19.54±0.84 ^a	34.26±20.95

Values are expressed as means ± S.E. (n=6). Values with different superscripts within a column indicate significant difference (p < 0.05) by Duncan's multiple range test. ND; Normal diet, HFD; High-fat diet, ¹ FER; Food efficiency ratio

흰쥐의 1일 평균 체중증가량은 고지방식이군(HFD)이 정상식이군(ND)에 비하여 증가하는 경향을 나타내어 고지방식으로 인한 비만유도를 관찰할 수 있었다. 고지방식을 급여한 흰쥐에게 토마토식초 및 후보물질 A, B, C, D를 투여한 결과 토마토식초와 추출물 A, B, C군이 고지방식이군에 비하여 체중이 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 이러한 결과는 모두 유의적이지는 않았다.

식이섭취량은 고지방식이군이 정상식이군에 비하여 유의적으로 감소하였으나 식이효율은 고지방식이군이 정상식이군보다 높았다. 이는 고지방식이가 위 배출을 지연시키고 열량밀도가 높기 때문인 것으로 여겨진다. 고지방식을 급여한 흰쥐에게 토마토식초 및 후보물질 A, B, C, D의 투여는 식이섭취량 및 식이효율에 유의한 변화는 나타나지 않았다.

(다) 장기 및 지방조직 무게

토마토식초 및 후보물질 A, B, C, D를 5주간 급여한 흰쥐의 100 g당 장기 및 지방조직 무게를 비교한 결과는 Table 23과 같다.

Table 23. Effect of various samples on organ weight and visceral fat weight in rat fed high-fat diet

Groups	Heart	Liver	Kidney	Visceral fats			
				Abdo- -minal	Epidi- -dymal	Perirenal	Total ¹
ND	0.35±0.02	3.23±0.22	0.79±0.03	1.05±0.26	1.45±0.35 ^a	0.31±0.07 ^a	2.81±0.64 ^a
HFD	0.33±0.02	3.27±0.13	0.68±0.03	1.48±0.27	2.22±0.39 ^b	0.49±0.14 ^b	4.20±0.72 ^b
TV	0.34±0.02	3.19±0.10	0.73±0.06	1.09±0.17	1.58±0.11 ^a	0.36±0.08 ^a	3.04±0.27 ^a
A	0.33±0.03	3.19±0.23	0.76±0.15	1.45±0.57	1.82±0.48 ^{ab}	0.37±0.10 ^{ab}	3.65±1.12 ^{ab}
B	0.33±0.04	3.35±0.61	0.75±0.11	1.03±0.45	1.50±0.51 ^a	0.27±0.12 ^a	2.81±1.06 ^a
C	0.33±0.02	3.11±0.31	0.71±0.10	1.42±0.49	1.73±0.52 ^{ab}	0.39±0.09 ^{ab}	3.55±0.99 ^{ab}
D	0.33±0.02	3.38±0.37	0.72±0.05	1.39±0.24	1.91±0.31 ^{ab}	0.34±0.10 ^a	3.65±0.51 ^{ab}

Values are expressed as means ± S.E. (n=6). Values with different superscripts within a column indicate significant difference (p < 0.05) by Duncan's multiple range test. ND; Normal diet, HFD; High-fat diet

심장, 간 및 신장의 무게는 정상식이군을 포함한 모든 실험군에서 유의적인 차이가 확인되지 않았다.

Ku 등(4)은 지방조직축적의 증가는 비만의 일반적인 증상이라 보고하였으며, Jang 등(5)은 고지방식으로 비만을 유도한 흰쥐의 경우 일반적으로 부고환에 지방이 많이 축적되는 경향을 보인다고 보고하였다. 본 연구에서 부고환지방조직의 무게는 고지방식이군이 정상식이군에 비하여 52.72% 유의하게 증가하였으며, 토마토식초와 후보물질 B군은 고지방식이군에 비하여 각각 28.82%와 32.10% 유의하게 감소하였다. 나머지 후보물질 A, C 및 D군도 고지방식이군에

비하여 각각 17.89%, 21.96%, 14.00% 감소하는 경향을 나타내었지만, 통계적 유의차는 나타나지 않았다.

신장주변지방 조직의 무게도 고지방식이군이 정상군에 비하여 59.52% 유의하게 증가되었으며, 토마토식초 및 후보물질 B, D군에서는 각각 27.40%, 45.21%, 29.83% 유의하게 감소하였다. 나머지 후보물질 A 및 C군에서도 신장주변지방조직의 무게가 각각 24.38%, 20.63% 감소하는 경향을 나타내었지만 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 복부지방조직의 무게에서는 모든 실험군 간 유의적인 차는 나타나지 않았으나 토마토식초 및 후보물질 B, D군이 고지방식이군에 비하여 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

따라서 본 연구결과 토마토식초가 고지방식이를 급여한 흰쥐의 부고환지방, 신장주변지방 및 복부지방의 축적을 억제하여 비만경감에 영향을 미치며, 후보물질 4종 중 B군이 가장 높은 지방조직 감소 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

(라) 혈청 중 중성지질, 총콜레스테롤, HDL 및 LDL-콜레스테롤 함량

고지방식이와 토마토식초 및 후보물질 A, B, C, D를 5주간 급여한 흰쥐의 혈청 중 지질함량은 Table 24와 같다. Ghasi 등(6)은 일반적으로 고지방식이는 혈장 중의 지질함량을 유의적으로 증가시킨다고 보고하였고, Kim 등(7)은 비만 증상의 주요한 요소 중 하나로 혈청 중 총콜레스테롤 함량이 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서 혈청 중의 중성지질 및 총콜레스테롤 함량은 정상식이군과 비교하여 고지방식이군이 다소 높게 나타났으며, 고지방식이군과 비교하여 토마토식초군 포함한 모든 후보물질군은 중성지질 및 총콜레스테롤 수치가 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 24. Effect of various samples on plasma lipid contents in rat fed high-fat diet

Groups	Tri-glyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	LDL cholesterol (mg/dL)	¹ HTR (%)	² AI
ND	58.82±23.40	76.62±7.02	44.16±4.91 ^{bc}	44.22±12.27 ^{ab}	58.09±8.80 ^{ab}	0.75±0.27 ^a
HFD	74.19±14.92	78.25±10.70	35.41±4.00 ^a	57.67±13.49 ^b	46.10±8.74 ^a	1.24±0.48 ^b
TV	62.96±15.91	67.30±9.53	40.00±3.16 ^{ab}	39.90±13.63 ^a	60.66±11.31 ^b	0.70±0.34 ^a
A	75.66±22.34	72.33±10.46	44.16±7.52 ^{bc}	43.30±7.88 ^{ab}	61.49±9.64 ^b	0.65±0.24 ^a
B	63.63±13.57	65.97±9.70	40.83±4.37 ^{abc}	37.87±11.85 ^a	63.13±12.29 ^b	0.63±0.31 ^a
C	70.64±14.20	77.51±7.37	45.83±6.45 ^{bc}	45.77±13.71 ^{ab}	59.74±11.40 ^b	0.72±0.32 ^a
D	64.30±15.69	69.52±9.60	47.08±5.79 ^c	35.30±6.85 ^a	68.59±11.11 ^b	0.47±0.24 ^a

Values are expressed as means ± S.E. (n=6). Values with different superscripts within a column indicate significant difference (p < 0.05) by Duncan's multiple range test. ND; Normal diet, HFD; High-fat diet; ¹HTR: (HDL-cholesterol / Total cholesterol) × 100; ²AI (atherosclerosis index): (Total cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol

혈청 중 HDL-콜레스테롤 함량은 고지방식이군이 정상식이군에 비하여 19.81% 유의하게 감소하였고, 토마토식초를 포함한 모든 시료 투여군은 고지방식이군에 비하여 그 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, 후보물질 A, C, D군은 각각 24.70%, 15.29% 및 32.94% 유의적인 증가를 나타내어 정상군보다도 높은 함량을 나타내었다. 반면, LDL-콜레스테롤 함량은 정상식이군에 비하여 고지방식이군은 유의적이지는 않았으나 30.41% 증가하는 경향을 나타내었다. 토마토식초 및 후보물질 A, B, C, D군 모두 고지방식이와 비교하였을 때 LDL-콜레스테롤수치가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히, 토마토식초 및 후보물질 B, C군은 각각 30.81%, 34.34%, 38.79% 유의적인 감소를 나타내어 정상식이군보다도 낮은 경향을 나타내었다. 또한, 동맥경화증의 발병지표로 활용되고 있는 AI 수치를 조사해 본 결과 정상식이군과 비교하여 고지방식이군의 AI 수치는 약 1.65배 유의하게 증가하였으며, 고지방식이군에 비하여 토마토식초 및 후보물질 A, B, C, D군은 AI 수치를 모두 유의하게 감소시켰다.

고지혈증은 소장에서의 중성지방의 합성증가, HDL-콜레스테롤의 합성 감소, LDL-콜레스테롤의 합성 및 분비증가에 기인한 것으로, 본 실험에서 토마토식초군과 후보물질들의 혈중 중성지방과 총콜레스테롤의 감소, HDL-콜레스테롤의 합성증가 및 LDL-콜레스테롤의 합성감소로 보아 토마토 식초 및 후보물질들이 고지방식으로 유발될 수 있는 혈청지질의 변동을 개선하여 이로부터 유래할 수 있는 동맥경화, 고지혈증 등의 심혈관계질환을 예방하는 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

(마) 간 조직 중 지질 및 콜레스테롤 함량변화

간은 지방대사가 일어나는 중심 장기로서, 콜레스테롤 합성을 통해 유리형 콜레스테롤 또는 ester형 콜레스테롤로 지단백을 구성하여 순환계로 분비하는데 이는 혈액 중의 콜레스테롤 농도를 조절하는 역할을 한다. Gashi 및 Sung 등은 고지방식이에 의해 간의 중성지방 및 콜레스테롤 함량이 증가한다고 보고하였으며, Kim 등은 비만동물의 지방조직에 있어서 지방축적의 원인이 지방분해력의 저하보다는 지방합성의 증가에 있다고 보고하였다.

고지방식이와 토마토식초 및 후보물질 A, B, C, D를 5주간 급여한 흰쥐의 간 조직 중 지질함량은 Table 25와 같다.

간 조직 중 중성지방과 콜레스테롤의 함량은 정상식이군과 비교하여 고지방식이군에서 중성지방의 함량이 각각 14.58%, 39.26% 유의하게 증가하였는데, 이는 고지방식이를 급여한 흰쥐의 경우 혈청 내 중성지질과 총콜레스테롤 함량이 증가하면 간의 중성지질과 콜레스테롤의 함량도 증가한다는 연구와 일치하였다(14). 중성지방 함량의 경우, 토마토식초를 포함한 모든 시료 투여군에서 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, 토마토식초 및 후보물질 A, B군은 고지방식이군에 비하여 각각 19.80%, 17.59%, 22.14% 유의하게 감소하였으며, 이는 정상식이보다 낮은 수치였다. 콜레스테롤의 함량의 경우, 추출물 C군을 제외한 모든 실험군에서 고지방식이군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 토마토 식초군에서 22.68% 유의적인 감소를 보였다.

따라서 본 결과는 토마토식초가 고지방식으로 유발되는 간 조직 중의 중성지질 및 콜레스테롤 축적을 효과적으로 억제하는 것으로 여겨진다. 또한, 후보물질 4종 중 B군이 중성지질 및 콜레스테롤 감소에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

Table 25. Effect of various samples on hepatic lipid contents in rat fed high-fat diet

Groups	Triglyceride	Cholesterol
	(mg/g)	(mg/g)
ND	6.49±1.05 ^a	1.06±0.11 ^a
HFD	7.44±0.23 ^c	1.48±0.14 ^b
TV	5.97±0.70 ^{ab}	1.14±0.14 ^a
A	6.13±1.46 ^{ab}	1.21±0.34 ^{ab}
B	5.79±1.51 ^a	1.23±0.26 ^{ab}
C	6.63±1.00 ^{abc}	1.51±0.25 ^b
D	7.25±0.45 ^{bc}	1.31±0.26 ^{ab}

Values are expressed as means ± S.E. (n=6). Values with different superscripts within a column indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ND; Normal diet, HFD; High-fat diet

4. 토마토 식초 및 SK-1 등을 이용한 1차 시제품 제조

가. 실험재료 및 방법

(1) 1차 시제품의 제조

2단계 속성 발효법을 이용하여 제조한 토마토 발효원액에 기호성과 기능성 증진을 위하여 환류 추출하여 얻은 각종 추출물과 당류와 산류를 첨가하고 여러 가지 비율로 배합한 후 자체 평가를 통하여 세 가지 최적 배합비율 A, B, C를 선정하고 시제품으로 제조하였다.

(2) 1차 시제품의 관능검사

관능검사 패널은 순천대학교 식품영양학과 대학생 20명을 대상으로 음료를 4°C에서 24시간 보관한 후 흰색 컵에 취하여 관능 평가를 실시하였다. 음료의 색깔(color), 향(flavor), 맛(taste), 전반적인 기호도(overall palatability)에 대하여 최저 1점, 최고 5점의 5점 척도법으로 평가하였다.

(3) 최종 시제품의 제조

토마토 식초 및 기타 부형제 성분을 개별 용해하여 혼합한 다음 원심분리 및 필터 여과하여 상정액을 일정용량으로 조정한다. 93°C에서 15초간 순간 살균한 다음 100ml병에 담아 capping하고 80°C에서 15분간 후 살균하고 포장하여 최종 시제품을 제조하였다.

(4) 최종 시제품의 안정성 평가

토마토 발효원액 첨가에 따른 최종 시제품 음료의 저장기간 및 온도에 대한 안정성을 아

래와 같은 실험방법들을 이용하여 검증하였다.

(가) pH 및 총산 정량

음료의 pH는 pH meter(720p, Istek, Korea)를 사용하여 측정하였고 음료의 총산의 함량은 0.1 N-NaOH로 적정하고 NaOH의 소요량을 citric acid(%) 양으로 환산 하였다.

(나) 색도 측정

음료의 색도 측정은 색차계(CR-300, Minolta, Japan)를 사용하여 Hunter L(lightness), a(redness), 및 b(yellowness) 값을 각각 3회 반복 측정하여 그 평균값으로 나타내었다.

(다) 당도 측정

음료 1 mL을 취하여 당도계(PAL-3, Atago, Japan)를 이용하여 °BRIX로 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

(라) 탁도 측정

음료의 탁도는 650nm에서 흡광도계(U-1800, Hitachi, Japan)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

(마) 미생물 검사

음료를 무균적으로 채취한 후 펠트리 필름(Petrifilm, 3M Co., Minneapolis, USA)을 이용하여 일반 세균 수 및 대장균 수를 확인하기 위하여, 25±2°C에서 24시간 배양한 후 음료에 대한 미생물학적 오염여부를 확인하였다.

나. 연구결과 및 고찰

(1) 토마토 식초를 이용한 다이어트 음료의 1차 시제품 제조

토마토식초, SK-1 및 항비만 후보물질 B를 자체 평가를 통하여 선정된 비율에 따라 배합하고 기능성 및 기호성을 향상시키기 위해 당류와 산류 같은 기타첨가물을 첨가하여 1차 시제품을 제조하였다.



Fig. 12. Manufacture of trial product using Tomato vinegar.

(2) 1차 시제품의 관능검사

토마토 발효원액과 SK1, 항비만 추출물 및 부형제의 배합비를 달리하여 세 종류의 1차 음료 시제품 제조하였다. 이 중 최종 시제품 생산에 가장 적합한 기호도를 가진 시제품을 선별하기 위해 맛, 향, 색 및 전체적인 기호도에 대하여 5점 척도법으로 관능검사를 실시한 결과는 다음과 같다. 배합비를 달리한 음료 시제품의 관능검사에서 시제품 A가 맛, 향기 및 전체적인 기호도 부분에서 다른 시제품인 B와 C보다 높은 점수를 나타냈다. 특히 음료의 품질을 결정하는 요소 중 가장 중요한 맛이 다른 두 개의 시제품보다 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다.

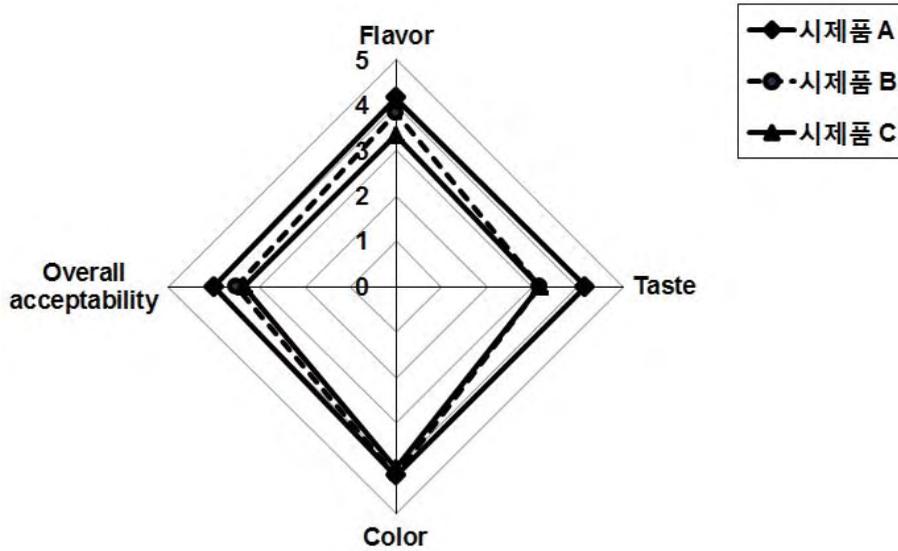


Fig. 13. Sensory test of trial product.

(3) 최종 시제품의 제조

1차 시제품의 평가를 바탕으로 배합조성, 제조특성, 품질특성 등을 고려하여 최종 시제품의 배합성분과 비율을 선정하여 다음과 같은 공정으로 최종 시제품을 제조하였다.

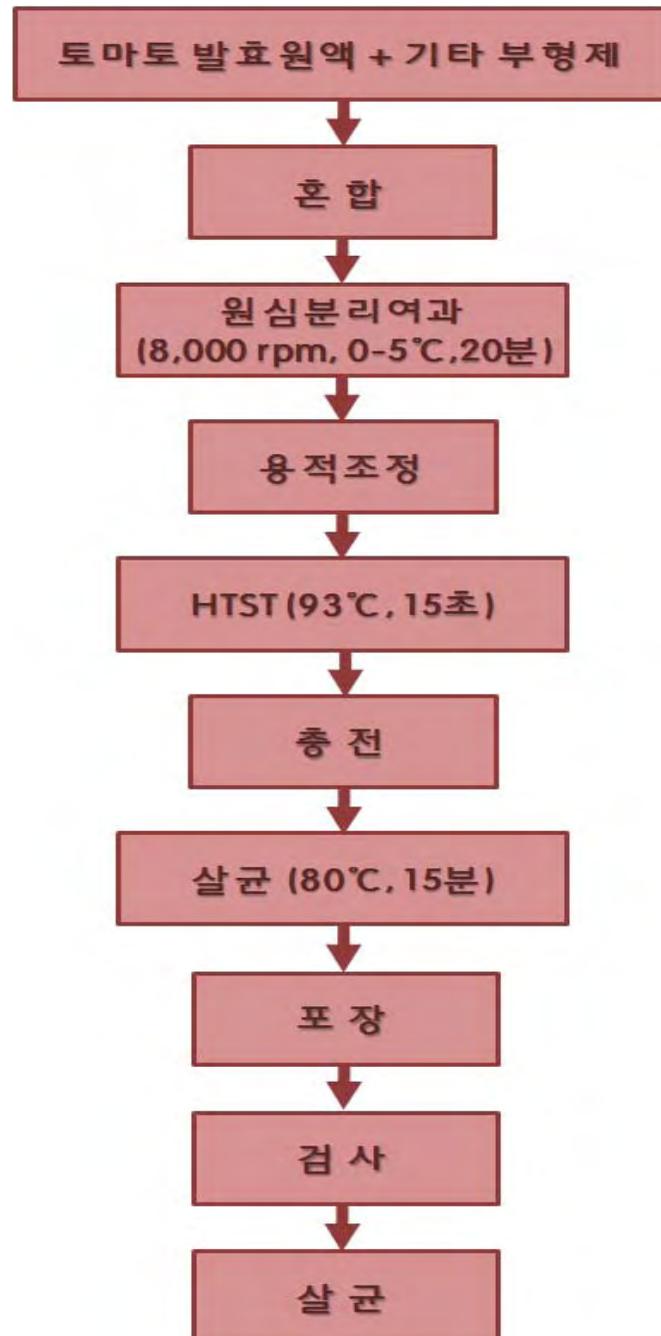


Fig. 14. The manufacturing process of trial product using Tomato vinegar.

5. 토마토 발효원액을 이용한 다이어트 음료의 효능 검증

가. 실험재료 및 방법

(1) 동물사육 및 실험설계

실험동물은 4주령의 수컷 C57BL/6N계 마우스를 Biogenomics사(Seoul, Korea)로부터 40마리 구입하여 사용하였다. 이들은 1주간 고품사료(Purinafeed, Seongnam, Korea)로 적응기간을 둔 후 난괴법에 의해 정상군(NC), 고지방대조군(HF), 고지방식이에 토마토 식초 음료군(HF+TVB)과 양성대조군으로 고지방식이에 시판품군(HF+PC)으로 각각 10마리씩 나누어 6주간 사육하였다.

식은 AIN-93(Table 1, Reeves et al., 1993)에 준하였으며, 고지방군은 전체 열량의 37%를 지방(3% soybean oil + 18% lard)으로 제공하였다. 토마토 식초 음료와 시판품은 성인이 하루에 섭취하는 양과 종간의 안전계수를 고려하여 각각 체중 kg당 14 mL와 7 mL 씩을 매일 일정한 시각에 경구투여 하였다.

동물 사육실의 환경은 항온(22±2°C), 항습(50±5%) 그리고 12시간 간격(light on 07:00~19:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하고, 폴리카보네이트 사육상자에 한 마리씩 분리하여 사육하였다. 식이와 식수는 자유롭게 섭취(*ad libitum*)토록 하고 모든 실험식은 사육기간 동안 4°C에서 냉장 보관하였으며, 식이섭취량 및 체중은 매일, 매주 일정한 시간에 측정하여 기록하였다.

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후 에테르를 흡입시켜 마취시킨 다음 복부 하대정맥(inferior vena cava)으로부터 공복혈액을 채취하였으며, 채취한 혈액은 3,000 rpm(4°C)에서 15분간 원심분리 하여 혈장을 분리하고 분석시까지 -70°C에 보관하였다. 각 실험동물의 장기조직(간, 심장, 신장, 지방조직)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 인산완충액으로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거하여 칭량한 다음 즉시 액체질소로 급냉시켜 -70°C에 보관하였다.

동물사육, 희생 및 처지에 관련된 모든 실험 과정들은 순천대학교 동물실험윤리위원회(SCNU-IACUC-2012-1)의 규정에 따라 실시하였다.

Table 26. Compositon of experimental diet

Ingredient	Groups	
	Normal	High-fat
	(unit: % of diet)	
Casein	20	20
Corn starch	39.7486	25.7486
Sucrose	10	10
Maltodextrine	13.2	13.2
Cellulose	5	5
Soybean oil	7	3
Lard	-	18
AIN93-mineral Mix	3.5	3.5
AIN93-vitamin Mix	1	1
Butylhydroquinon	0.0014	0.0014
L-cystine	0.3	0.3
Cholin babitrate	0.25	0.25
Total (%)	100	100

(2) 혈장 중의 지질 함량 측정

(가) 중성지질 함량

중성지질 (TG)은 McGowan 등(1983)의 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 중성지질 측정용 kit(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈장 내 중성지질은 lipoprotein lipase (LPL)에 의해 글리세롤과 지방산으로 분해된다. 이 중 글리세롤은 ATP와 glycerol kinase의 작용으로 L- α -glycerophosphate를 형성하며, 이것은 O₂ 및 glycerophospho oxidase(GPO)와 반응하여 H₂O₂를 발생시켰다. 여기에 peroxidase와 4-amino-antipyrin을 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 글리세롤 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

(나) 유리지방산 함량

유리지방산 (FFA)은 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 유리지방산 측정용 kit (Wako, Osaka, Japan)를 사용하여 측정하였다. 혈장 유리지방산에 acyl coenzyme A synthetase를 작용시켜 acyl-CoA, AMP 및 pyrophosphoric acid를 생성시킨 후, 여기에 acyl coenzyme A oxidase를 첨가하여 2,3-trans-enoyl-CoA 및 H₂O₂를 생성시켰다. 이를 peroxidase와 4-amino-antipyrin 및 N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-*m*-toluidine으로 처리하여 적색으로 발색시킨 후 555 nm에서 흡광도를 측정하여 유리지방산 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

(다) 총 콜레스테롤 함량

총 콜레스테롤 (TC) 정량은 Allain 등(1974)의 효소법을 응용한 측정용 kit(Asan Pharmaceutical)를 사용하였다. 혈장 콜레스테롤은 에스테르형 콜레스테롤 (CE)과 유리 콜레스테롤 (FC) 두 형태로 존재하므로, 이들 모두를 정량하기 위하여 CE를 cholesterol esterase에 의해 지방산과 유리 콜레스테롤로 전환시켰다. 유리 콜레스테롤을 cholesterol oxidase에 의해 Δ^4 -cholestenon으로 전환시키고, 이 생성물과 기질인 H₂O₂를 peroxidase, phenol 및 4-amino-antipyrine과 반응시켜 적색으로 발색시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 콜레스테롤 표준용액과 비교하여 정량하였다.

(라) HDL-콜레스테롤 함량

혈장 100 μ L를 취하여 인텅스텐 나트륨 500 μ g과 염화마그네슘 1 mg을 처리하면 인텅스텐산과 마그네슘 양이온의 작용으로 지단백질 중 apo B를 포함하는 LDL 및 VLDL이 침전된다(Warnick, 1982). 이를 원심분리한 후 상층액을 총 콜레스테롤과 같은 방법으로 발색 반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하고, 콜레스테롤 표준용액과 비교하여 정량하였다.

(마) HDL-C/TC(HTR)

총 콜레스테롤 농도에 대한 HDL-콜레스테롤 비율은 다음 수식에 의해 산출하였다.

$$\text{HTR}(\%) = \text{HDL-C/TC} \times 100$$

(3) 간 조직과 분변 중의 지질 함량 분석

간 조직 중의 지질은 Folch 등(1957)의 방법에 따라 추출하였으며 콜레스테롤 및 중성지질 함량은 Omodeo 등(1984)의 방법을 수정·보완하여 측정하였다. 간 조직 0.1 g을 잘게 자른 후 chloroform : methanol (2:1) 용액 2 mL로 균질화시킨 후 25 °C에서 3시간 동안 지질을 추출하였다. 여기에 1 M H₂SO₄ 200 µL을 첨가하여 혼합한 후 실온에서 430 ×g로 20분간 원심분리하였다. 아래층 1 mL을 옮겨 1 % Triton X-100 chloroform 용액 1 mL을 첨가하여 혼합한 후, 질소가스로 건조시킨 다음 일정량의 증류수에 녹인 후 혈장의 지질 측정 방법과 동일하게 정량하였다.

분변 중의 지질 함량도 Folch 등(1957)의 방법을 수정·보완하여 측정하였다. 건조된 분변을 막자사발에 갈아 0.5 g을 취한 후 chloroform : methanol (2:1) 용액 10 mL을 첨가하여 4 °C에서 24시간 추출하였다. 추출액은 900 ×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 질소가스로 건조시킨 후 동일한 추출용매 1 mL에 다시 녹였다. 중성지방과 콜레스테롤 측정용 각각 200 µL를 취하여 다시 질소가스로 건조시키고 1 mL의 에탄올로 용해시킨 다음 간조직과 동일한 효소반응법으로 정량하였다.

(4) 조직세포의 형태학적 분석

동물 희생시 적출한 간조직과 지방조직을 10% formaldehyde 용액에 24시간 고정된 다음, 수세하고 60% 알코올에서부터 상승농도로 탈수하여 파라핀에 포매하고, 이것을 4 µm 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin(H-E)으로 염색한 다음 광학현미경에서 200배 배율로 관찰하였다.

(5) 간조직의 효소원 분리

간조직 0.5 g을 취해 잘게 자른 후, 0.1 M triethanolamine, 0.02 M EDTA(ethylene diamine tetracetate, pH 7.4)와 2 mM DTT(dithiothreitol, pH 7.0)을 포함한 완충용액을 이용하여 20 % (w/v) 균질화(Glascol, 099CK33, USA)한 다음 600 ×g (4 °C)에서 10분간 원심분리 하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 상층액을 얻었다. 이를 10,000 ×g (4 °C)에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 다시 10,000 ×g (4 °C)에서 20분간 재원심분리 하였다. 미토콘드리아 침전물은 동일한 완충용액에 녹여 효소원으로 사용하였다. 분리된 상층액을 100,000 ×g (4 °C)에서 1시간 동안 초원심분리 하여 시토졸 분획을 얻었으며, 상층액의 시토졸 분획과 분리된 침전물은 동일 완충용액을 첨가하여 100,000 ×g (4 °C)에서 1시간 동안 다시 초원심분리한 마이크로솜 침전물은 사용된 완충용액에 녹여 효소원으로 사용하였다. 각 효소원의 단백질 함량은 BSA (bovine serum albumin)을 표준으로 하는 Bradford (1976)의 방법을 사용하여 측정하였다.

(6) 간 조직 중의 지질대사 관련 효소 활성화도 측정

Fatty acid β -oxidation(β -oxidation) 활성화도는 45.75 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mM NAD⁺, 1.65 mM DTT, 0.1 mM CoA, 10 µM FAD, 1 mM KCN, 25 µM palmitoyl-CoA와 2 % Triton X-100 10 µL, 1.5 % BSA 5 µL를 가한 반응액에 미토콘드리아 분획을 첨가하여 반응을 개시한 후 37 °C, 340 nm에서 5분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다. β -oxidation 활성화도 단위는 미토콘드리아 단백질 1 mg 당 1분간 생성된 NADH의 nmol로 나타내었다. Carnitine palmitoyl-CoA transferase (CPT) 활성화도는 123.52 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.1 mM Na₂-EDTA, 1.1 mM *L*-carnitine, 120 µM DTNB, 35 µM palmitoyl-CoA, 0.09 % Triton X-100 반응액에 미

토콘드리아 분획을 첨가하여 반응을 개시한 후 25 °C, 412 nm에서 2분 동안 흡광도 변화를 측정하였다.

Phosphatidate phosphohydrolase(PAP) 활성도는 0.05 M Tris-HCl(pH 7.0), 1.25 mM Na₂-EDTA, 1.0 mM MgCl₂의 첨가와 무첨가 반응액 50 µL에 1 mM phosphatidate 및 phosphatidylcholine을 0.9 % NaCl 용액에 용해시킨 기질 50 µL를 가한 다음 마이크로솜을 가하여 반응을 개시하였다. 37 °C에서 15분간 반응시킨 후 1.8 M H₂SO₄ 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후, 1.25 % ascorbic acid, 0.32% ammonium molybdate를 각각 0.25 mL와 0.13 % sodium dodecyl sulfate 용액 0.1 mL 가하고, 45 °C에서 20분간 가온 발색시킨 후 820 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fatty acid synthase(FAS) 활성도는 156.25 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.0), 1 mM Na₂-EDTA, 82.5 nM acetyl-CoA, 500 nM malonyl-CoA, 100 nM NADPH, 1 mM β-mercaptoethanol 및 세포질 분획을 섞어 30°C에서 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 시토졸 단백질 1 mg 당 1분간 산화되는 NADPH의 nmol로 나타내었다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 활성도는 3.3 mM MgCl₂를 함유한 45.1 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.8)에 240 µM NADP⁺, 4 mM glucose-6-phosphate 그리고 시토졸 효소원을 첨가한 후 25°C, 340 nm에서 90초 동안 NADPH의 흡광도 변화를 측정하였다.

(7) 간조직 중의 당대사 관련 효소 활성도 측정

Glucokinase(GK) 활성도는 47.08 mM Hepes(pH 7.4)에 100 mM KCl, 2.5 mM dithioerythritol, 7.5 mM MgCl₂, 10 mg/mL BSA를 50 µL, 1 mM NAD⁺, 4 IU/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20 mM glucose, 10 mM ATP를 첨가한 후, 효소원을 가하여 37°C, 340 nm에서 10분간 NAD⁺가 NADH로 환원되는 정도인 흡광도 변화를 측정하였다. 효소활성의 단위는 1분간 시토졸 단백질 1 mg 당 생성되는 NADH의 nmol로 나타내었다. Glucose-6-phosphatase(G6Pase) 활성도는 100 mM Hepes(pH 6.5)에 26.5 mM glucose-6-phosphate(pH 6.5), 1.8 mM EDTA(pH 6.5), 2 mM NADP⁺, 0.6 IU/mL mutarotase 및 0.6 IU/mL glucose dehydrogenase를 첨가하여 37°C에서 4분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 효소활성의 단위는 1분간 마이크로솜 단백질 1 mg 당 생성되는 NADPH의 nmol로 나타내었다.

(8) 간조직 중의 항산화대사 효소 활성도 및 지질과산화물 함량 측정

Superoxide dismutase(SOD) 활성도는 10 mM EDTA를 포함한 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.5) 1.5 mL에 효소원 0.1 mL와 7.2 mM pyrogallol 용액 0.1 mL를 순서대로 잘 혼합하여 25 °C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 50 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰고, 420 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. SOD 활성 단위는 효소원을 넣지 않고 10분간 반응시킨 7.2 mM pyrogallol 용액의 자동산화를 50 % 억제하는데 필요한 1 mg 단백질에 대한 unit로 나타내었다. Glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성도는 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.2) 2.6 mL에 30 mM 환원형 GSH 용액 0.1 mL, 6 mM NADPH 용액 0.1 mL, 그리고 25 µM H₂O₂ 0.1 mL을 순서대로 첨가하여 25°C에서 5분간 반응시킨 후 효소원 0.1 mL를 첨가하여 340 nm에서 반응 전 흡광도를 측정한 다음, 25 °C에서 5분간 더 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 단위는 단백질 1 mg 당 1분 동안 산화되는 NADPH 정도를 나타내었다. Catalase(CAT) 활성도는

50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 8.5) 2.89 mL와 효소원 10 μ L를 혼합하여 25°C에서 5분간 반응시킨 후 0.3 M H₂O₂용액 0.1 mL를 첨가하여 240 nm에서 반응 전 흡광도를 측정한다. 다음, 25°C에서 5분간 더 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 H₂O₂ 흡광도 변화를 구하였다. CAT 활성은 1분간 1 mg 단백질에 의해 손실되는 H₂O₂ 양을 나타내었다.

간 조직 중의 지질과산화물(LPO) 측정은 200 μ L의 간 조직 균질액을 8.1% sodium dodecyl sulfate(w/v) 200 μ L, 20% acetic acid(pH 3.5, w/v) 0.75 mL와 0.8% triobarbituric acid(w/v) 0.75 mL를 혼합한 후 95°C에서 60분간 가열하였다. 가열이 끝난 후 0.5 mL 증류수와 butanol : pyridine (15:1) 용액을 2.5 mL 첨가하였다. 반응이 완료된 시료는 800 \times g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(9) 인슐린저항성 관련 지표 분석

(가) 혈당 및 혈장 인슐린 함량 측정

혈당은 실험 종료시 6시간의 절식 후 꼬리 채혈하여 혈당 측정기(GlucoDr super sensor, Allmedicus, Korea)를 이용하여 glucose oxidase 방법으로 측정하였다. 혈장 중의 인슐린 함량은 마우스 인슐린 ELISA kit (Crystal Chem Inc., IL, USA)를 사용하여 정량하였다.

(나) 인슐린저항성 지표(Homeostatic index of insulin resistance: HOMA-IR)

HOMA-IR은 다음과 같은 수식에 의해 산출하였다.

$$\text{HOMA-IR} = [\text{공복혈당}(\text{mmol/L}) \times \text{공복인슐린}(\mu\text{IU/mL})] / 22.5$$

(다) 포도당 내성 검사(Glucose tolerance test)

포도당 내성 검사를 위하여 실험 6주째 6시간의 절식 후 포도당 용액을 체중 kg당 1 g씩 복강 내로 투여하고 각각 0, 30, 60, 120분 경과 후에 꼬리 채혈하여 혈당측정기로 혈당을 측정하였다.

(10) 간독성 지표 분석

혈장 중의 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 활성은 혈액 생화학분석기(Fuji Dri-Chem 3500, Fujifilm, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(11) 통계처리

실험결과는 SPSS package 프로그램을 이용하여 실험군당 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 각 군간의 평균치의 통계적 유의성 검정은 one-way ANOVA를 실시하고 다군간의 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 사후 검정하였다.

나. 연구결과 및 고찰

(1) 체중변화에 미치는 영향

고지방 급여는 정상군에 비하여 유의적인 체중증가를 보이고 있으나 토마토 식초 음료군은 실험 1주부터 고지방대조군에 비하여 체중이 유의적으로 낮아졌으며 6주 후 실험 종료 시

13%의 체중감소 효과가 나타났다. 또한 체중증가량도 고지방대조군과 시판품군에 비하여 유의적으로 낮았다.

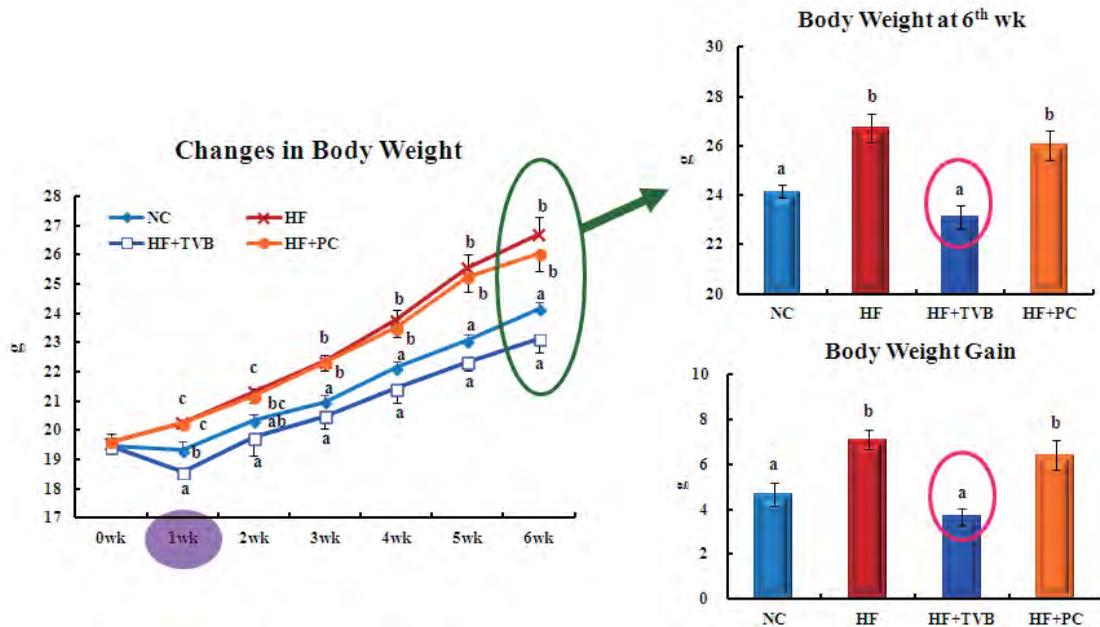


Fig. 15. Effect of tomato vinegar beverage on changes in body weight, final body weight at 6th week and body weight gain in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{ab}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05).

(2) 식이섭취량 및 식이효율에 미치는 영향

고지방 급여 시 식이섭취량은 정상군에 비하여 유의적으로 낮아졌는데 이는 열량밀도가 높기 때문에 사료된다. 토마토 식초 음료는 식이섭취량에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다, 식이효율은 고지방대조군보다 낮아 정상군과 유사하였다.

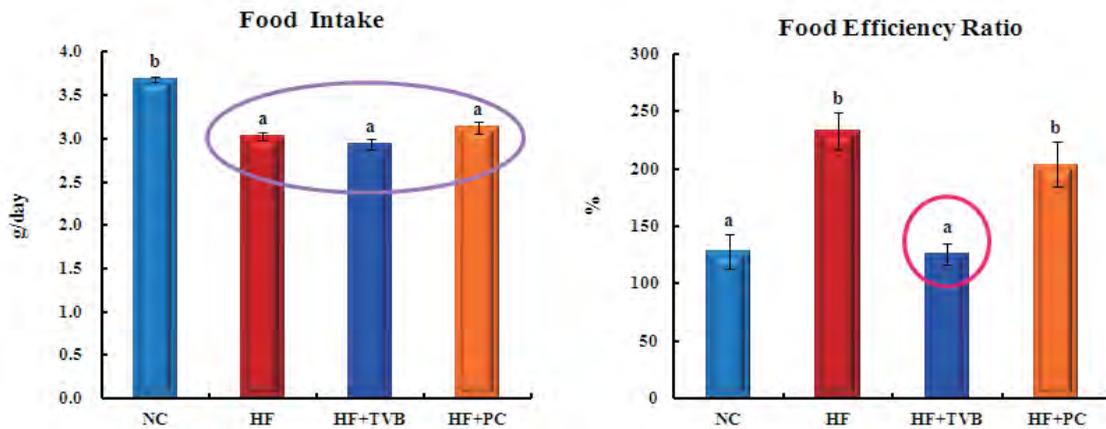


Fig. 16. Effect of tomato vinegar beverage on food intake (left) and food efficiency ratio (right) in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{ab}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05).

(3) 내장지방 무게에 미치는 영향

비만의 민감한 지표가 되는 내장지방(부고환, 신장주변, 복부지방) 무게는 고지방대조군이 정상군에 비하여 높았으나 토마토 식초 음료군에서 부고환, 신장주변 및 복부지방무게가 유의적으로 낮아져서 총 내장지방무게가 고지방대조군에 비하여 29% 감소하였다. 반면 시판품은 신장주변 지방무게만 감소되어 총 내장지방무게 감소는 토마토 식초 음료가 더 효과적이었다.

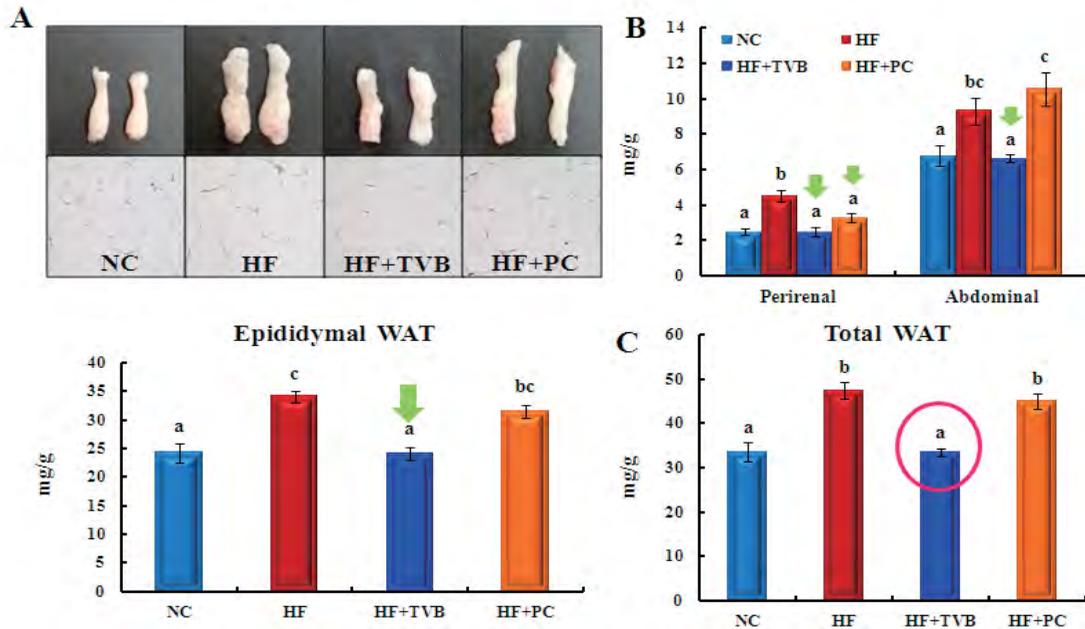


Fig. 17. Effect of tomato vinegar beverage on epididymal weight (A), perirenal and abdominal weight (B) and total white adipose tissue weight (C) in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). Morphology of adipocyte was shown by magnification (200 \times).

(4) 간, 신장 및 심장 무게에 미치는 영향

간무게는 정상군에 비하여 고지방대조군이 유의적으로 높았으나 토마토 식초 음료와 시판품 급여에 따른 유의적인 영향은 나타나지 않았다. 또한 신장과 심장의 상대적 무게는 실험군 간에 차이가 없었다.

Table 27. Effect of tomato vinegar beverage on organ weights in high-fat diet-induced obese mice*

	NC	HF	HF+ TVB	HF+ PC
	(mg/g)			
Liver	39.51 \pm 1.28a	44.10 \pm 0.65b	44.62 \pm 1.31b	42.20 \pm 1.01ab
Kidney	11.85 \pm 0.40	10.85 \pm 0.31	11.85 \pm 0.21	11.20 \pm 0.27
Heart	4.08 \pm 0.23	3.91 \pm 0.20	3.89 \pm 0.12	3.88 \pm 0.14

*Mean \pm S.E. (n=10).

^{ab}Means in the same row not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$).

(5) 혈장의 지질함량에 미치는 영향

혈장 중의 유리지방산 함량은 고지방대조군에 비하여 토마토 식초 음료군과 시판품군에서 유의적으로 낮았다. 중성지질 함량은 토마토 식초 음료군이 고지방대조군보다 낮은 경향을 보였고 시판품은 유의적으로 낮았다.

총 콜레스테롤 함량은 고지방대조군이 정상군보다 높았으며 토마토 식초 음료나 시판품에 대한 영향은 나타나지 않았다. 반면, HDL-콜레스테롤 함량은 고지방대조군에 비하여 토마토식초 음료군과 시판품군에서 유의적으로 높았다. 따라서 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 비는 토마토 식초 음료와 시판품군이 고지방대조군에 비해 높아졌다.

Table 28. Effect of tomato vinegar beverage on plasma lipid profiles in high-fat diet-induced obese mice*

	NC	HF	HF+ TVB	HF+ PC
FFA (mmol/L)	0.69±0.06ab	0.80±0.08b	0.57±0.05a	0.59±0.05a
TG (mg/dL)	122.83±10.15ab	143.61±7.91b	127.75±8.05ab	117.25±4.17a
TC (mg/dL)	110.37±3.26a	172.28±5.88b	167.40±3.75b	173.75±5.32b
HDL-C (mg/dL)	78.30±2.37a	87.19±5.48a	101.94±2.72b	106.54±2.03b
HTR (%)	70.94±1.83c	50.07±3.10a	60.64±1.37b	61.52±1.53b

Mean±S.E. (n=10).

^{ab}Means in the same row not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05).

FFA: free fatty acid, TG; triglyceride, TC; total cholesterol, HDL-C; HDL-cholesterol, HTR; (HDL-cholesterol/total cholesterol) ×100.

(6) 간조직의 지질함량에 미치는 영향

6주간의 고지방 급여에 따른 지방간 생성을 확인하였다. Fig. 4에서 보듯이 정상군에 비하여 고지방대조군에서 지방구들이 증가되었으나, 토마토 식초 음료와 시판음료에서 지방구가 현저히 감소되는 것을 관찰하였다. 따라서 간조직에서 지방함량을 측정된 결과 토마토 식초 음료군이 고지방대조군에 비하여 유의적인 중성지질 함량 감소가 나타났으며, 콜레스테롤 함량은 감소 경향을 보였다. 이와 같이 토마토 식초 음료가 시판음료에 비하여 고지방식으로 인한 지방간 개선에 더 효과적인 것으로 판단된다.

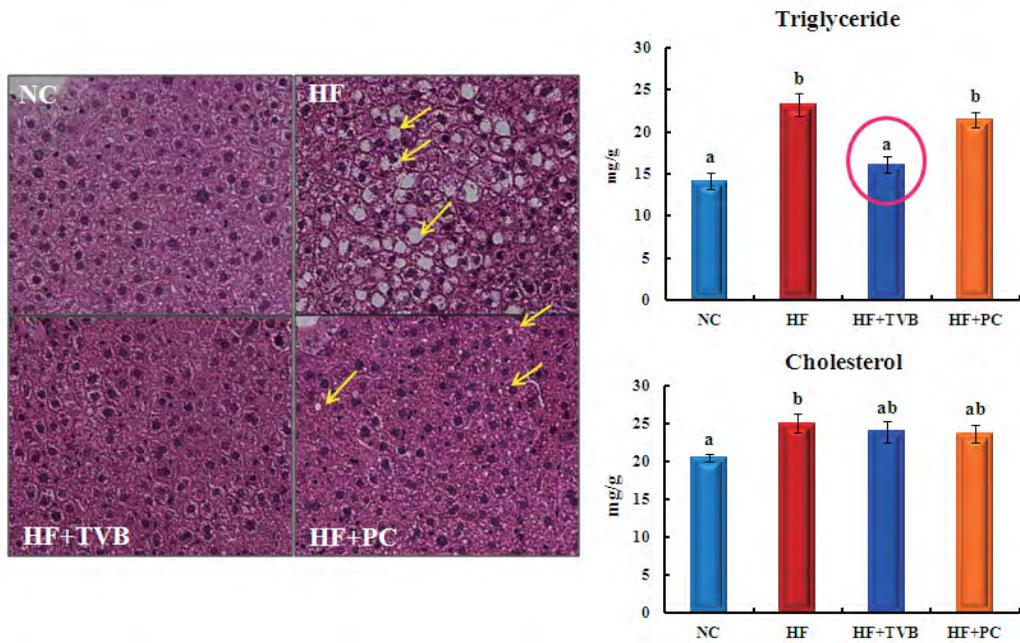


Fig. 18. Effect of tomato vinegar beverage on hepatic morphology (left) and lipid contents (right) in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{ab}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05). White arrows indicate lipid droplets (200 \times magnification).

(7) 분변 중의 지질함량에 미치는 영향

고지방 섭취로 인하여 분변으로의 중성지질 배설이 유의적으로 증가되었다. 이러한 중성지질 배설은 고지방대조군에 비하여 토마토 식초 음료군에서 유의적으로 증가된 것으로 미루어 분변으로의 중성지질 배설 축진은 중성지질의 흡수를 저해하는 것으로 사료된다. 반면, 분변으로의 콜레스테롤 배설은 실험군간 차이가 없었다.

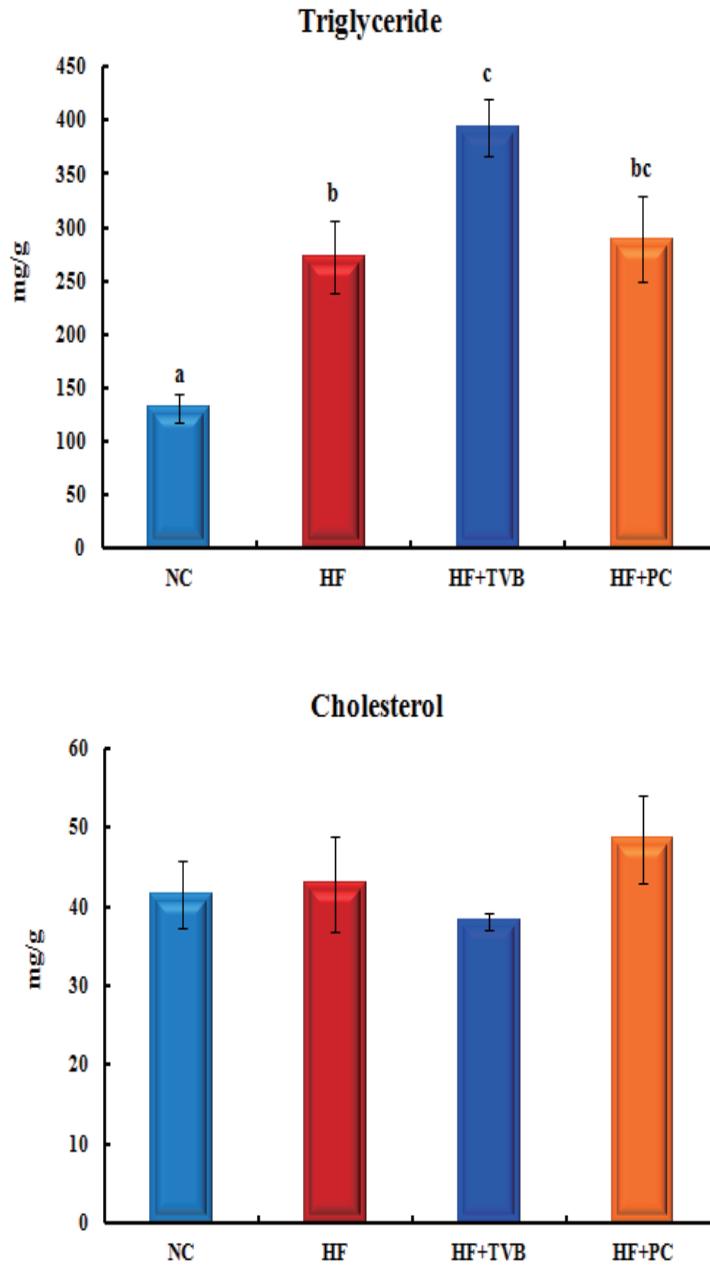


Fig. 19. Effect of tomato vinegar beverage on fecal lipid contents in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$).

(8) 간조직의 지질대사에 미치는 영향

지방산 산화 반응에 관여하는 β -oxidation 활성은 토마토 식초 음료군이 고지방대조군에 비하여 높았으며, CPT는 토마토 식초 음료군과 시판품군 모두 고지방대조군에 비하여 높았다. 반면, 지방산 합성 반응에 관여하는 효소 중의 FAS 활성은 시판품군이 고지방대조군에 비하여 유의적으로 낮아졌으나 토마토 식초 음료군은 유의적인 영향을 미치지 않았다. 중성지질 합성 효소인 PAP와 지질합성대사에 필요한 NADPH를 만드는 효소인 G6PD 역시 FAS와 같은 경향을 보였다. 이와 같이 고지방대조군이 정상군보다 지방산 산화가 증가하고 지방산 합성이 감소한 것은 고지방 섭취로 인한 체내 항상성을 유지에 기인되는 것으로 사료되며, 이때 토마토 식초 음료는 지방산 산화를 촉진함으로써 지방간 개선에 기여할 것으로 생각된다.

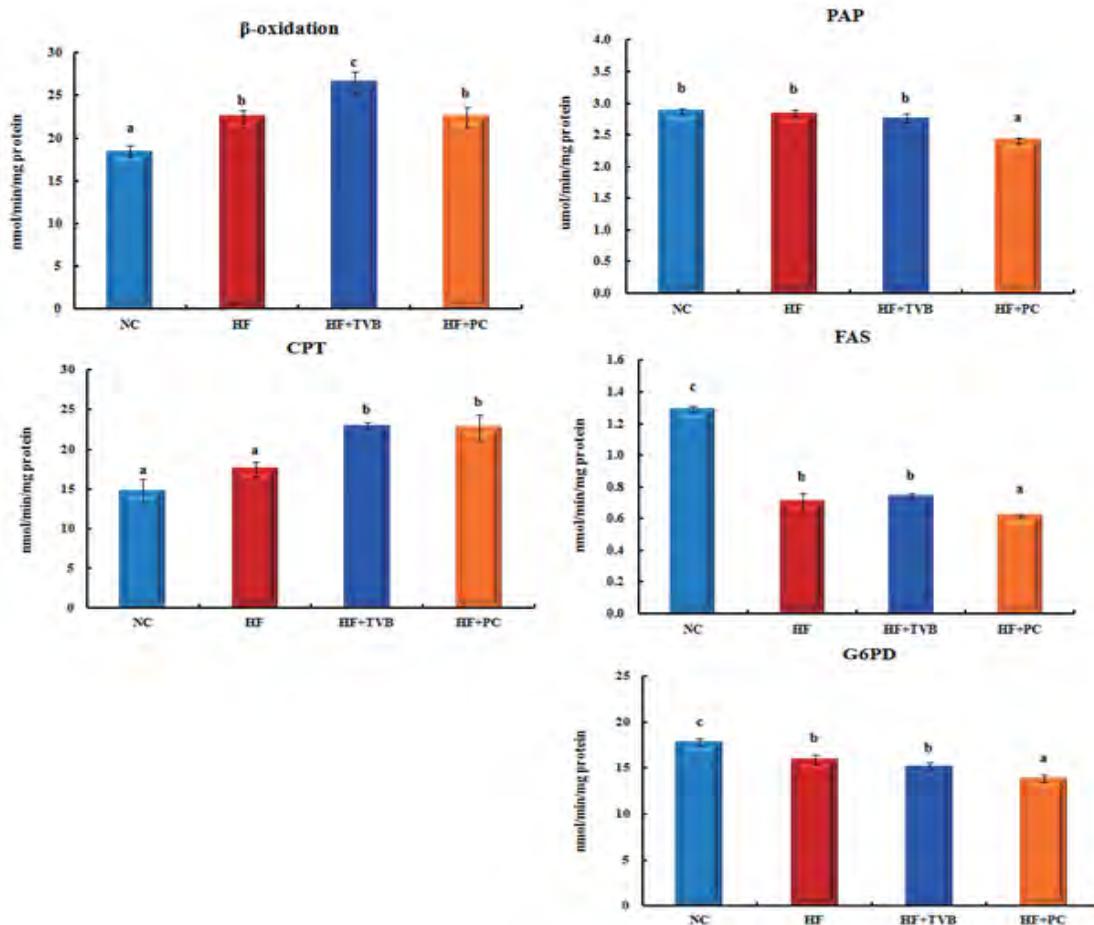


Fig. 20. Effect of tomato vinegar beverage on hepatic lipid metabolic enzymes activities in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05). β -oxidation: fatty acid β -oxidation, CPT: carnitine palmitoyl-CoA, PAP: phosphatidate phosphohydrolase, FAS: fatty acid synthase, G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase.

(9) 인슐린 저항성에 미치는 영향

고지방 섭취로 인하여 혈장의 인슐린 함량은 유의적으로 높아져서 정상군에 비하여 인슐린 저항성 지표가 유의적으로 높았다. 토마토 식초 음료와 시판품은 혈당을 유의적으로 개선하지 못하였으나 인슐린 함량을 정상군 수준으로 개선하여 인슐린 저항성을 효과적으로 개선할 수 있는 것으로 사료된다.

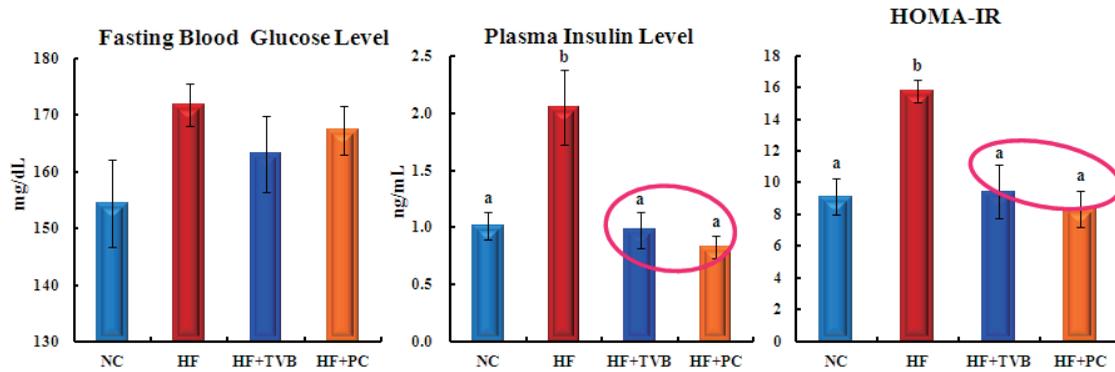


Fig. 21. Effect of tomato vinegar beverage on fasting blood glucose levels, plasma insulin concentration and HOMA-IR in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{ab}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05). HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance was calculated from fasting glucose (mmol/L) \times fasting insulin (μ IU/mL)/22.5.

(10) 인슐린 민감성에 미치는 영향

간접적인 인슐린 민감성 지표로 사용되는 포도당내성은 고지방대조군이 정상군에 비하여 유의적으로 높았으나 토마토 식초 음료 급여로 유의적으로 낮아졌다. 이는 토마토 식초 음료가 고지방으로 인해 감소된 인슐린 민감성을 개선할 것으로 사료된다.

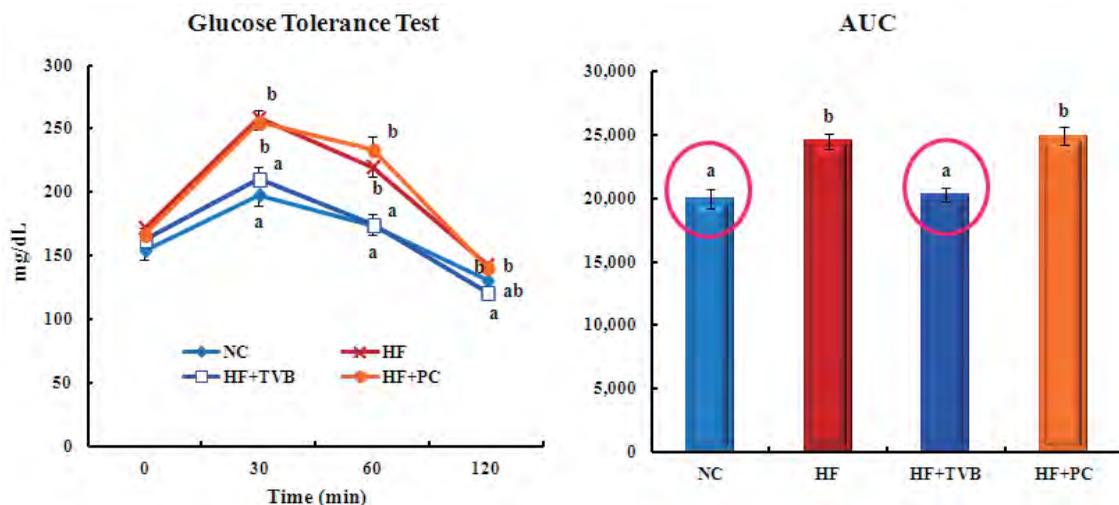


Fig. 22. Effect of tomato vinegar beverage on glucose tolerance test in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{ab}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05).

(11) 당대사에 미치는 영향

해당과정에 관여하는 효소인 GK 활성도는 고지방 급여시 정상군에 비하여 유의적으로 감소하였으나 토마토 식초 음료 급여로 정상군과 유사한 수준으로 회복하였다. 반면, 당 신생과정을 조절하는 효소 중의 하나인 G6Pase 활성도는 토마토 식초 음료군과 시판품군에서 고지방대조군에 비하여 유의적으로 낮았다. 이와 같이 토마토 식초 음료는 GK 활성도를 높이는 반면 G6Pase 활성을 낮추어 GK/G6Pase 활성비를 높이는 것으로 나타났다.

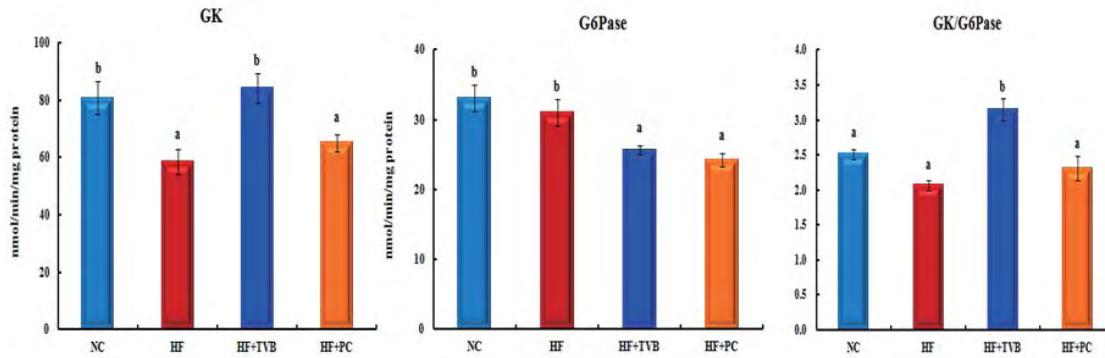


Fig. 23. Effect of tomato vinegar beverage on hepatic glucose metabolic enzymes activities in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{ab}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05).

GK: glucosekinase, G6Pase: glucose-6-phosphatase.

(12) 항산화 효소 활성과 지질과산화물 생성에 미치는 영향

체내에는 활성산소에 대한 자가 방어기능을 수행하기 위하여 SOD, GSH-Px, CAT 등과 같은 항산화 효소가 작용한다. 이때 SOD는 체내 생성된 O_2^- 을 H_2O_2 로 전환시켜 산소독으로부터 생체를 보호하는데 고지방대조군이 정상군보다 유의적으로 높아졌다. 또한, SOD에 의해 생성된 H_2O_2 를 H_2O 로 무독화 하는 GSH-Px와 CAT도 유의적으로 높아졌다. 그러나 토마토 식초 음료군과 시판음료군의 SOD와 GSH-Px 활성은 고지방대조군에 비하여 낮아지는 경향이있으며, CAT 활성은 유의적으로 낮았다. 이는 토마토 식초 음료와 시판음료는 고지방으로 인한 활성산소 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

한편 지질과산화물 생성에 대한 토마토 식초 음료와 시판음료의 효과는 나타나지 않았다.

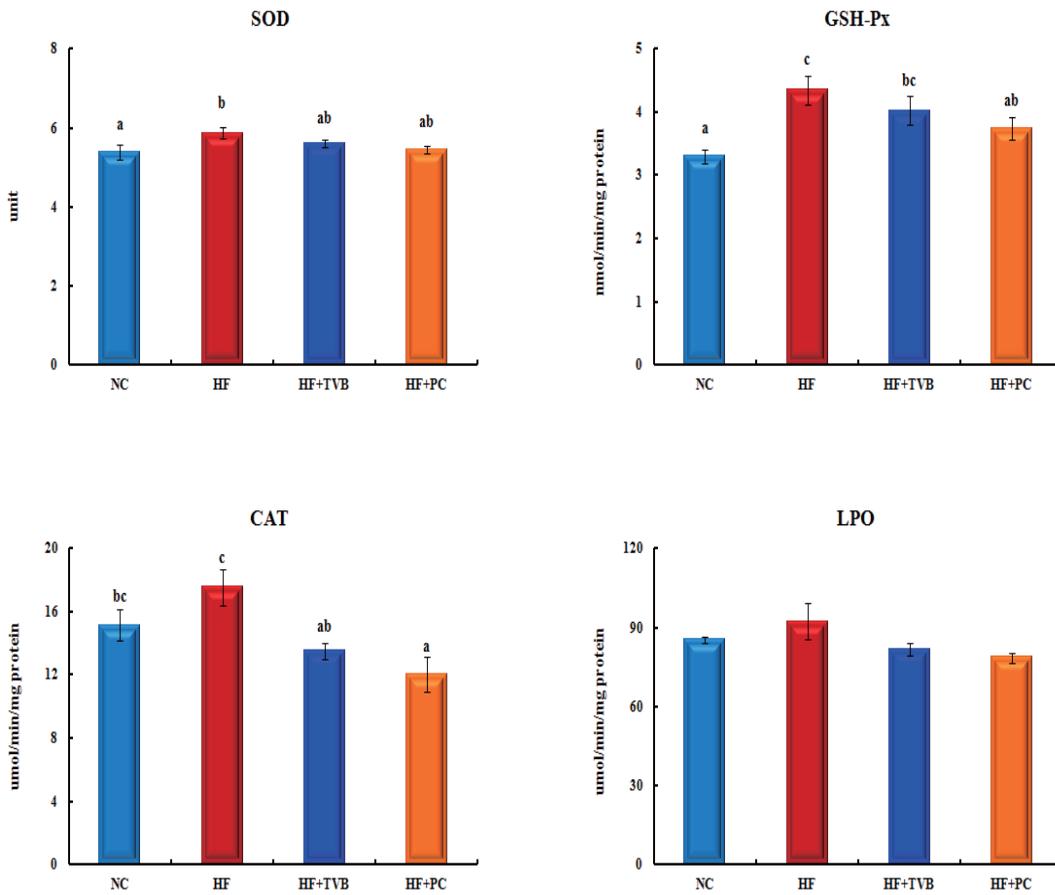


Fig. 24. Effect of tomato vinegar beverage on hepatic antioxidant enzymes activities in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05).

SOD: superoxide dismutase, GSH-Px: glutathione peroxidase, CAT: catalase, LPO: lipid peroxidation.

(13) 간독성지표에 미치는 영향

간독성지표인 혈장의 ALT와 AST를 측정 한 결과, 고지방대조군은 정상군보다 ALT 활성이 유의적으로 높았으나 토마토 식초 음료와 시판품은 개선되었다. 또한 AST 활성 역시 토마토 식초 음료 급여로 유의적으로 낮았다.

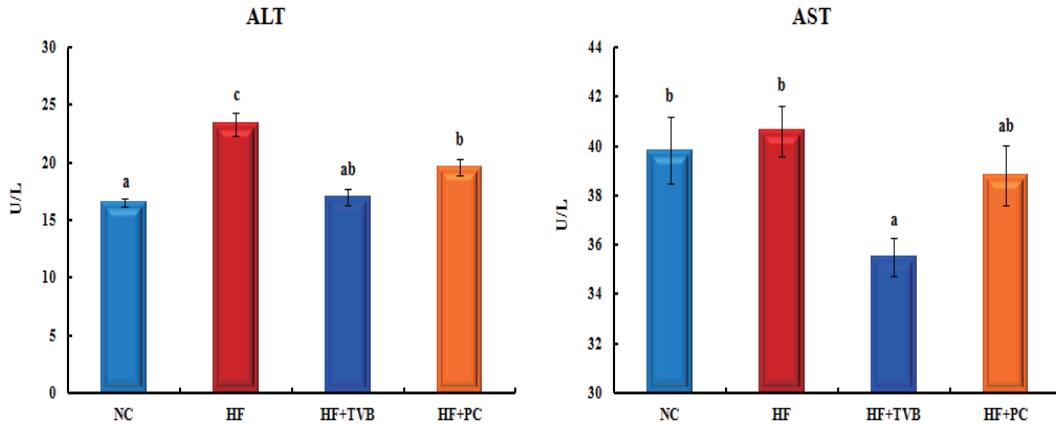


Fig. 25. Effect of tomato vinegar beverage on plasma ALT and AST in high-fat diet-induced obese mice. Values are expressed as means \pm S.E. (n=10). ^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different among groups (p<0.05).

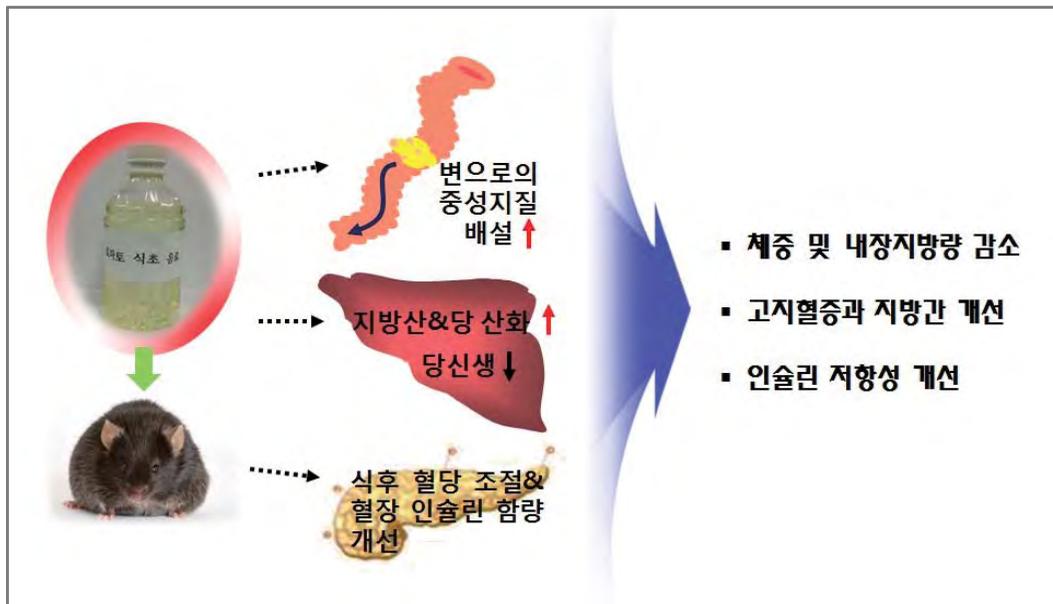


Fig. 26. Proposed mechanism of tomato vinegar beverage on the anti-obesity action in high-fat diet-induced obese mice.

6. 토마토 다이어트음료의 지표 성분 분석

가. 연구목적

토마토 발효원액을 이용한 다이어트 음료의 지표 성분을 확인하고자 음료에 함유된 기능성 성분들을 HPLC를 통하여 분석하였다.

나. 실험내용 및 방법

(1) 라이코펜 분석

시료 10 mL, hexane: acetone: ethanol (50: 25: 25) 30 mL, 10 mL 물을 250 mL 삼각플라스크에 넣고, 진탕기(1000rpm, 1시간, 상온)에서 추출한다. 추출 후 원심 분리기에서 4000rpm으로 원심분리 하여, hexane층 15 mL을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 Table 29와 같은 분석조건에서 라이코펜을 분석하였다.

Table 29. HPLC analytical conditions for lycopene

Instrument	Waters HPLC system (2695 Separation Module, 2996 Photodiode Array Detector)
Column	μ Bondapak TM C ₁₈ (stainless steel, 3.9 x 300mm)
Detector	PDA 200.0 to 650.0nm at 1.2nm UV 470 nm
Mobile phase	Methanol-acetonitrile(15 : 85)
Flow rate	1.5 ml/min
Injection volume	10 μ l

(2) 유기산 분석

시료를 0.45 μ m membrane filter로 색소 및 단백질 성분을 제거한 후 Table 30과 같은 분석조건에서 유기산의 함량을 분석하였다.

Table 30. The operating conditions of HPLC for analysis of acetic acid

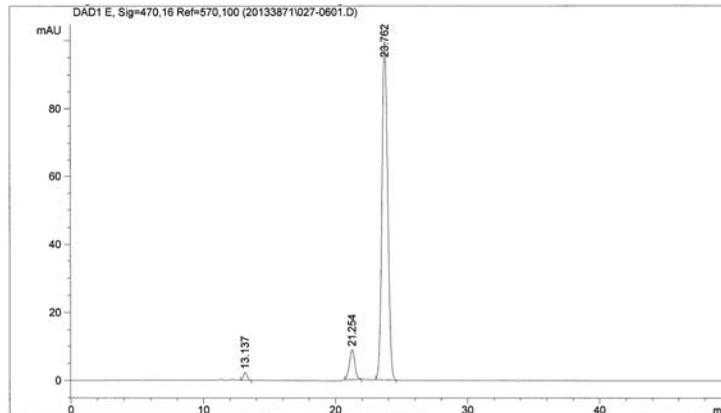
Column	Inertsil ODS-3V(4.6x 250 mm, 5 μ m)
Guard	CarboPAC TM-PA10 (4 x 250 mm)
Eluent	0.1 M Ammonium dihydrogenphosphate + Phosphoric acid (pH 2.5)
Flow rate	1 ml/min
Inj. volume	20 μ L
Detector	RI

다. 연구결과 및 고찰

(1) 라이코펜 함량

토마토 식초 음료의 라이코펜 함량을 분석한 결과는 Fig 27과 같다. 토마토식초음료의 라이코펜 함량은 0.875 ppm으로 미량으로 나타났으며, 이는 토마토에서 라이코펜이 $0.09 \pm 0.02 \sim 3.87 \pm 0.46$ mg/100g 으로 나타났다는 Kim 등(2002)의 보고와는 차이가 있었다.

(A)



(B)

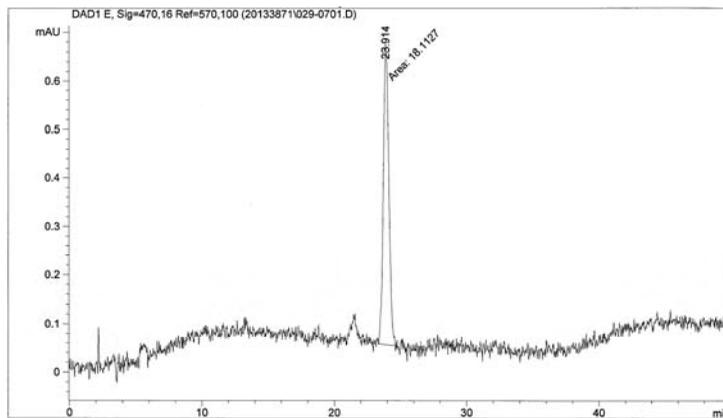


Fig. 27. Contents of lycopene in tomato vinegar beverage.
(A) Standard, (B) Tomato vinegar beverage

(2) 유기산 함량

토마토 식초 음료의 유기산 함량을 분석한 결과는 Fig. 28과 같다. 주요 유기산은 Acetic acid로 458 mg%로 나타났으며, 다음으로 citric acid, succinic acid, oxalic acid 순으로 미량 나타났다.

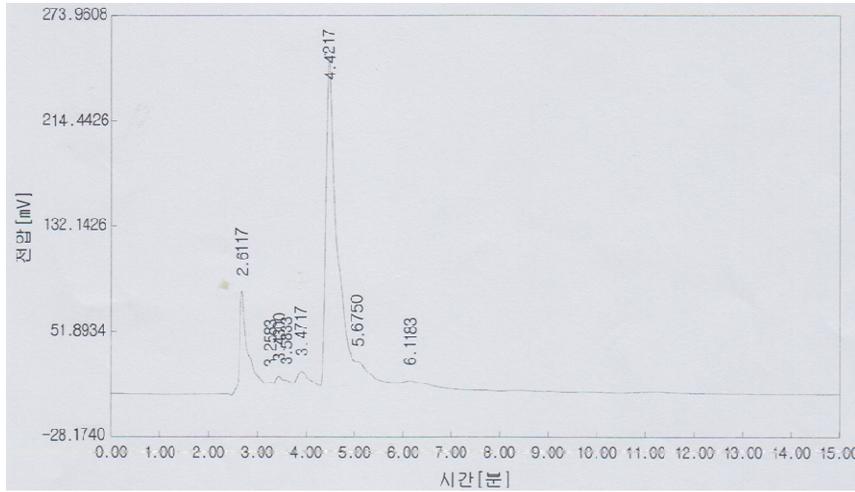


Fig. 28. Contents of Organic acid in tomato vinegar beverage.

Table 31. Contents of Organic acid in tomato vinegar beverage

(Unit : mg%)

Organic acids	Contents
Acetic acid	458.25
Oxalic acid	34.12
Malic acid	18.27
succinuc acid	12.53

7. 토마토 다이어트음료 최종시제품의 저장 중 품질 특성 변화

가. 연구목적

완성된 토마토 다이어트음료 최종시제품의 저장 안정성을 확인하기 위하여 온도를 다르게 하여 저장 중 품질 특성 변화 정도를 다양한 실험방법을 통해 조사하였다.

나. 실험재료 및 방법

토마토 발효원액을 이용한 다이어트음료 최종시제품의 저장성을 확인하기 위해 아래와 같은 실험방법들을 이용하여 35℃ 및 45℃에서 저장성을 측정하였다.

(1) pH 및 총산 정량

음료의 pH는 pH meter(720p, Istek, Korea)를 사용하여 측정하였고 총산의 함량은 0.1 N NaOH로 적정하고 NaOH의 소요량을 citric acid(%) 양으로 환산 하였다.

(2) 색도 측정

음료의 색도 측정은 색차계(CR-300, Minolta, Japan)를 사용하여 Hunter L(lightness), a(redness), 및 b(yellowness) 값을 각각 3회 반복 측정하여 그 평균값으로 나타내었다.

(3) 당도 측정

음료 1 mL을 취하여 당도계(PAL-3, Atago, Japan)를 이용하여 °Brix로 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

(4) 탁도 측정

음료의 탁도는 650nm에서 흡광도계(U-1800, Hitachi, Japan)를 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값으로 나타내었다.

(5) 미생물 검사

음료 1 mL을 무균적으로 채취한 후 페트리 필름(Petrifilm, 3M Co., Minneapolis, USA)에 접종하고 이를 35±2℃에서 24시간 배양 하였다. 음료의 일반 세균과 대장균 수를 측정하여 대한 미생물학적 오염여부를 확인하였다.

다. 연구결과 및 고찰

(1) 토마토 식초음료의 pH와 산도 변화

토마토 식초음료의 온도별 저장 시 변화하는 pH와 총산의 측정 결과는 Fig. 29 및 Fig. 30과 같다. 각 온도에서 저장된 토마토 식초음료의 pH는 저장기간 동안 큰 변화를 나타내지 않았으나 산도는 저장기간이 늘어날수록 약간 증가하는 것을 확인할 수 있었다

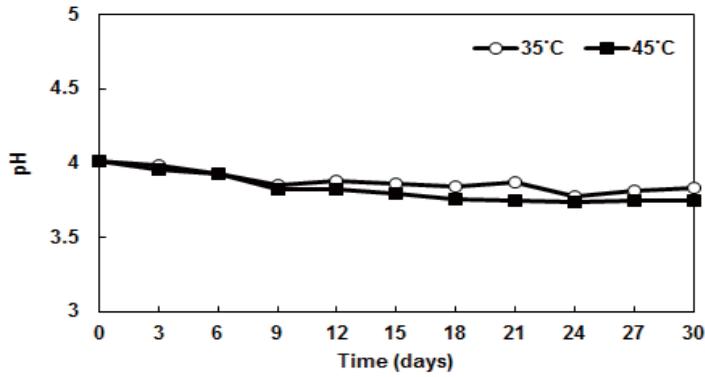


Fig. 29. Change in pH of tomato vinegar drink.

Data values are expressed as mean \pm SD (n=3).

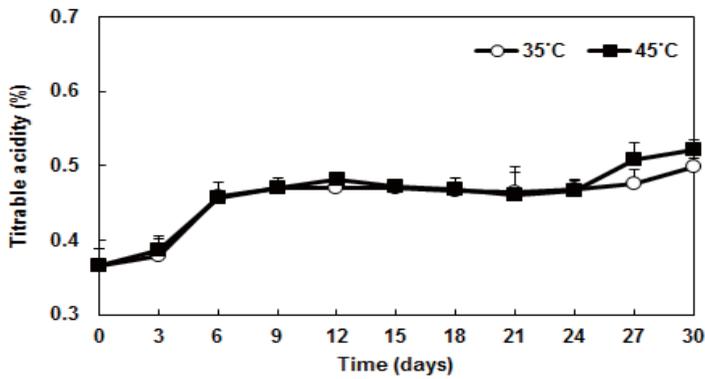


Fig. 30. Change in titratable acidity of tomato vinegar drink.

Data values are expressed as mean \pm SD (n=3).

(2) 토마토 식초음료의 색도 변화

각 저장 온도에 따른 토마토 식초음료의 색도 변화를 측정된 결과는 Table 32 및 33과 같다. 35°C에서 저장 시 명도를 나타내는 L값은 저장기간이 늘어나도 거의 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 또한 적색도를 나타내는 a값은 저장 6일째부터 약간 증가하는 것으로 나타났다. 황색도를 나타내는 b값은 저장기간이 지나도 거의 변화가 없었다. 45°C에서 저장 시에는 L값은 35°C 저장 시와 큰 차이가 없었다. 본 결과로 미루어 볼 때, 토마토 식초음료의 적색도는 시간이 지남에 따라 높아지는 것으로 생각된다.

Table 32. Change in Hunter's color value of tomato vinegar drinks stored at 35°C

		35°C (days)										
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
L		24.89±	23.67±	22.79±	21.87±	25.64±	23.00±	23.35±	22.16±	21.62±	24.05±	23.83±
		0.00 ^e	0.04 ^{cd}	0.01 ^b	0.03 ^a	0.01 ^f	0.59 ^b	0.36 ^{bc}	0.91 ^a	0.31 ^a	0.11 ^d	0.21 ^{cd}
a		1.20±	1.69±	1.83±	1.88±	0.37±	2.00±	2.12±	1.99±	2.07±	1.86±	1.83±
		0.04 ^b	0.05 ^c	0.03 ^d	0.07 ^d	0.02 ^a	0.02 ^e	0.02 ^f	0.14 ^e	0.02 ^{ef}	0.03 ^d	0.05 ^d
b		4.58±	5.87±	4.69±	5.02±	3.36±	4.09±	3.63±	4.64±	4.79±	5.16±	4.14±
		0.02 ^d	0.01 ^f	0.00 ^d	0.01 ^e	0.02 ^a	0.07 ^c	0.20 ^b	0.32 ^d	0.10 ^d	0.04 ^e	0.10 ^c

Data values are expressed as mean ± SD (n=3).

^{abc}The means not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 33. Change in Hunter's color value of tomato vinegar drinks stored at 45°C

		45°C (days)										
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
L		24.89±	24.49±	23.05±	21.64±	25.99±	23.98±	25.09±	23.22±	23.71±	24.06±	23.73±
		0.00 ^e	0.94 ^{de}	0.79 ^b	0.01 ^a	0.02 ^f	0.85 ^{cd}	0.12 ^e	0.00 ^{bc}	0.04 ^{bcd}	0.16 ^{cd}	0.06 ^{bcd}
a		1.20±	1.52±	1.76±	2.07±	0.47±	2.18±	2.24±	2.43±	2.21±	2.81±	2.55±
		0.04 ^b	0.11 ^c	0.10 ^d	0.04 ^d	0.05 ^a	0.02 ^{de}	0.05 ^e	0.04 ^f	0.04 ^e	0.12 ^h	0.05 ^g
b		4.58±	4.84±	4.48±	4.45±	3.58±	3.85±	3.48±	5.14±	4.22±	5.88±	4.43±
		0.02 ^{de}	0.41 ^{ef}	0.08 ^{cd}	0.06 ^{cd}	0.02 ^{ab}	0.07 ^b	0.09 ^a	0.32 ^f	0.01 ^c	0.37 ^g	0.17 ^{cd}

Data values are expressed as mean ± SD (n=3).

^{abc}The means not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

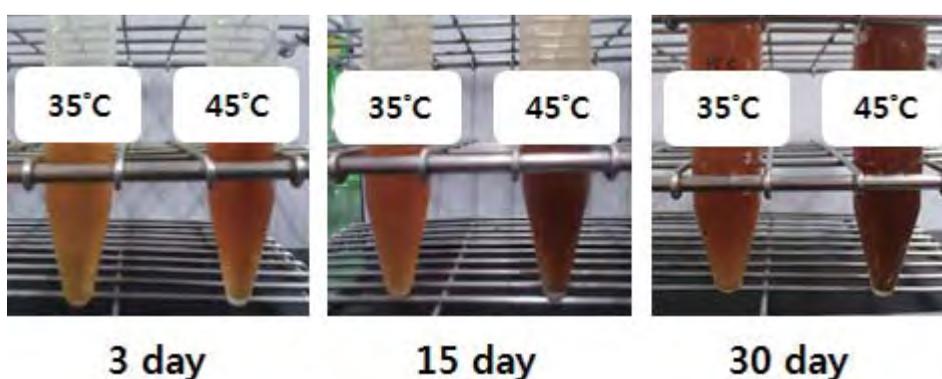


Fig. 31. Change in color of tomato vinegar drinks.

(3) 토마토 식초음료의 당도 변화

저장온도에 따라 변화하는 당도 측정 결과는 Fig. 32과 같다. 각각의 온도에서 음료의 당도는 시간이 경과해도 거의 변화하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

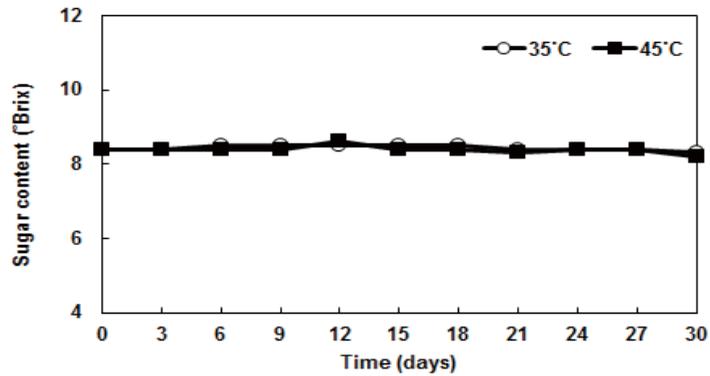


Fig. 32. Change in sugar contents of tomato vinegar drink.

Data values are expressed as mean \pm SD (n=3).

(4) 토마토 식초음료의 탁도 변화

각 저장 온도에 따른 음료의 탁도를 측정한 결과는 Fig. 33과 같다. 그 결과 저장 기간이 길어질수록 모든 군에서 탁도 값이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 45°C 저장 시 35°C에서 저장할 때 보다 값이 더 빨리 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 이는 실온 이상의 온도에서 땅콩 추출물을 음료를 장기간 저장하면 탁도값이 증가할 수는 있지만 이 수치가 음료의 품질에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

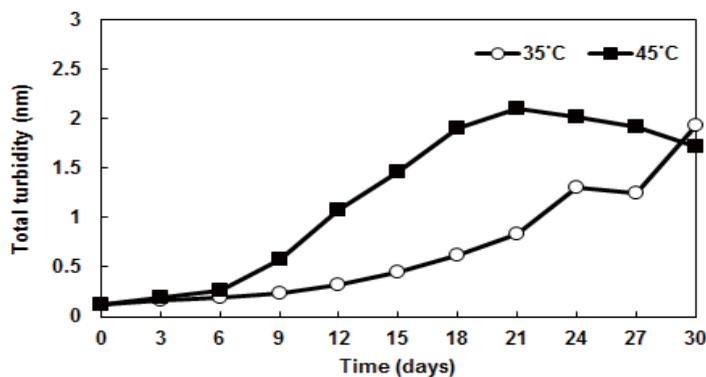


Fig. 33. Change in total turbidity of soy milk added to 1% peanut sprout extract.

Data values are expressed as mean \pm SD (n=3).

(5) 토마토 식초음료의 미생물수 변화

저장온도에 따른 음료에 생존하는 일반 미생물과 대장균의 변화는 Table 34와 같다. 일반 미생물과 대장균은 35℃ 및 45℃ 저장 시 30일째까지 모두 검출되지 않았다. 미생물들이 생육하기 쉬운 온도임에도 불구하고 일반미생물과 대장균 모두 검출되지 않은 것을 미루어 볼 때, 살균력이 강하다고 알려진 식초가 음료의 저장성 및 품질 향상에 도움을 준 것이라고 생각된다.

Table 34. Changes of colony of tomato vinegar drink

Preservation condition		General Bactria (Log cfu/g)	E.coli (Log cfu/g)
Sample	Time (Days)		
35℃	0	-	-
	3	-	-
	6	-	-
	9	-	-
	12	-	-
	15	-	-
	18	-	-
	21	-	-
	24	-	-
	27	-	-
	30	-	-
45℃	0	-	-
	3	-	-
	6	-	-
	9	-	-
	12	-	-
	15	-	-
	18	-	-
	21	-	-
	24	-	-
	27	-	-
	30	-	-

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 농산물 소재 면역증강 제품의 상용화

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)	기 여 도
코디세핀 고함량 동충하초의 면역증강효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 코디세핀 고함량 동충하초의 코디세핀 함량 측정 ▪ 코디세핀 고함량 동충하초의 면역활성 ▪ 코디세핀의 항암효과 연구 ▪ 코디세핀과 농산물 융합 면역상승효과 연구 	100	코디세핀 고함량 동충하초의 면역 및 항암효과를 과학적으로 검증함으로써 동충하초를 이용한 기능성 제품의 개발에 공헌하고 농가수익의 증대에 기여하였음
붉은 덩다리 버섯의 물질분석 및 생리기능성 확인	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 균사체 배양으로부터 생산된 다당류의 구조규명 ▪ 분리된 다당류의 항염증 활성 ▪ 분리된 다당류의 면역활성 	100	붉은 덩다리 버섯의 기능성 성분과 면역활성이 확인되어 농산물의 소비증대에 기여하였음
발효 농산물 소재의 면역증강 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 와송 발효 추출물의 제조 및 면역증강활성 연구 ▪ Epicatechin gallate의 면역활성 연구 ▪ 꾸지뽕 발효 추출물의 제조 및 면역증강활성 연구 ▪ 미강 발효 추출물의 제조 및 면역증강활성 연구 	100	농산물 발효를 통하여 생리기능성이 뛰어난 농산물의 개발이 가능하고 발효기술을 활용한 고부가가치의 농산물 관련 제품의 개발에 기여하였음.
해산물 소재 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 해조류 톳의 추출 및 기능성 물질 구조 규명 ▪ Hf-1의 항산화 효과 연구 ▪ Hf-1의 항염증 효과 연구 	100	해조류와 농산물의 융합을 통하여 새로운 기능성 식품의 개발이 가능하였음.
토마토의 기능성을 이용한 기능성 토마토 제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 박테리아를 이용한 라이코펜 고함량 토마토 육종 및 재배 ▪ 라이코펜 함량 검증 	100	Lycopene 고함유 토마토 생산으로 농작물의 고부가가치화에 큰 기여를 할 것으로 기대됨.
농산물 소재 기능성 제품의 제조	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 기능성 국수의 제조 및 이화학적 특성 분석 ▪ 토마토 푸레 조청 함유 기능성 고추장의 제조 및 이화학적 특성 분석 	100	영양학적 성분을 다량 함유하는 현미를 이용한 발효 현미국수를 제조함으로써 쌀 소비를 증가시키는데 기여할 것임

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)	기여도
카페인 항염증효과 연구	<ul style="list-style-type: none"> 세포로부터 카페인의 항염증 활성 연구 	100	항염증 활성으로 인하여 카페인의 활용 가치를 넓히는데 기여할 것으로 기대됨
코디세핀의 항암효과 연구	<ul style="list-style-type: none"> 코디세핀에 의한 인체백혈병 세포의 증식억제 기전 확인 코디세핀에 의한 인체 전립선암세포의 항암활성 및 암세포 전이 억제 효능 검토 인체 전립선암세포에서 Akt 불활성화를 코디세핀의 암세포 전이 억제 기전 확인 코디세핀의 항염증, 항전이 및 함암제 내성 극복 효능 및 관련 기전 연구 	100	과학적 근거를 바탕으로 동충하초의 기능성 물질인 코디세핀의 항암작용을 조사함으로써 동충하초 소비 증가가 기대되어 이로 인하여 버섯농가의 소득증대와 바이오 산업의 활성화에 기여하였음

2. 농산물 소재 간 기능 개선 및 혈당조절 효과 검증

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)	기여도
농산물 소재를 이용한 간질환 개선 제품의 개발	<ul style="list-style-type: none"> 간 독성 모델 흰쥐를 이용한 코디세핀 고함유 동충하초 분말의 지방간 개선효과 규명 간기능 보호 및 개선제로서의 코디세핀 고함유 동충하초 건강기능식품 개발 발효 와송, 발효 꾸지뽕 열매의 비알콜성 지방간 개선효과 규명 	100	농산물 및 발효 농산물을 섭취함으로써 간장 질환 관련 기능성 제품의 개발에 기여하였다고 사료됨
농산물 소재를 이용한 혈당조절 제품의 개발	<ul style="list-style-type: none"> 제2형 당뇨병 동물 모델에 있어서 고코디세핀 동충하초의 혈당조절 효과 비만형당뇨 및 비알콜성 지방간 동물모델에 있어서 고코디세핀 동충하초의 비만 및 비알콜성 지방간 개선 효과 고지방·고단순당 식이로 인슐린저항성을 유발한 마우스에 있어서 와송 및 발효 와송의 인슐린저항성 개선효과 및 비알콜성 지방간 개선효과 	100	안전성 측면에서 유리한 천연물을 항당뇨 기능성 제품의 소재로 활용하여 국민 건강과 농가산업의 활성화에 기여하였음.

3. 약용작물유래 항염증 효능 제품의 상용화

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)	기여도
약용작물유래 항염증 효능 물질의 탐색 및 독성실험	<ul style="list-style-type: none"> 한약재 HTR에서 추출한 새로운 화합물 JNP3가 PMA로 유도한 MCF-7 사람 유방암세포에서 암세포 침윤과 전이억제 확인 HeLa 세포에서 MP-2, 황칠나무에서 추출한 새로운 화합물, 에 의해 유도된 Apoptosis (세포자멸사) 와 세포주기억제의 상호관련 확인 	100	한약재의 생리기능성 물질을 확인하여 이를 이용함으로써 삶의 질을 높이고 한약재의 재배량 증가를 유도할 수 있다.
섬유소 분해효소 활용을 위한 기능성 생물고분자 및 섬유소 분해효소 생산공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> 생물고분자 폴루란의 생산공정 최적화 생물고분자 PS-7의 생산공정 최적화 섬유소 분해효소의 생산공정 최적화 	100	전량 외국에서 수입하고 있는 산업용 섬유소 분해효소를 국내의 기술로 생산하여 보급할 수 있을 것을 기대된다

4. 약용작물의 유용물질을 이용한 항암보조제 및 항장제품의 상용화

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)	기여도
코디세핀 고함유 동충하초를 이용한 항암치료 보조제 개발	<ul style="list-style-type: none"> 코디세핀 고함유 동충하초의 안정성 및 유효성 검증 코디세핀 고함량 동충하초 추출물의 항암 방사선 치료에 대한 정상세포의 방호효과 	100	동충하초의 안정성을 과학적으로 입증하였고 항암제 보조제로서의 가능성을 제시하였다.
코디세핀 고함유 동충하초를 이용한 항장품 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> 코디세핀 고함유 동충하초의 항장효과 검증 	100	동충하초를 이용한 새로운 항장산업으로의 응용이 가능해 졌다.

5. 라이코펜 고함량 토마토를 이용한 체중조절 개선 제품의 상용화

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)	기여도
토마토를 주원료로 한 발효원액 제조	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 주모 및 종초의 배양 ▪ 토마토 숙성 발효원액 제조 ▪ 발효원액에 대한 이화학적 분석 	100	토마토를 주원료로 하여 발효원액을 제조함으로써 토마토와 같은 잉여 작물들의 대량소비와 저장기간이 짧은 과채류의 저장기능 향상이라는 측면에서 기여하였음
토마토를 주원료로 한 항비만 효능 시제품 제조 및 기능성 검증 주원료로 한 발효원액 제조	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 토마토 발효 원액을 이용한 기능성 음료의 제조 ▪ <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>에서 토마토 발효 원액 및 항비만 후보 물질들의 항비만 효과 검증 ▪ 1차 시제품 제조 완료 	100	기능성 물질들을 이용하여 항비만 효과를 검증을 함으로써 체중조절 기능성 식품을 개발하는데 기초 자료로써 사용이 가능함
토마토 발효 원액을 이용한 항비만 효능 제품의 상품화 주원료로 한 항비만 효능 시제품 제조 및 기능성 검증 주원료로 한 발효원액 제조	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 토마토 발효원액을 이용한 다이어트 음료의 개발 ▪ 개발된 제품의 최종 시제품 생산 ▪ 제품에 대한 안정성 평가 ▪ 제품의 디자인 및 상품화 추진 	100	최종 시제품 음료에 대한 체중조절 기능 평가와 안정성을 검증함으로써 유사 계통 제품 개발에 기초 자료로써 활용이 가능

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

가. 논문성과

게재 연도	논문명	학술지명	Vol. (No.)	비고
2010	Purification and Biochemical Characterization of a 17 kDa Fibrinolytic Enzyme from <i>Schizophyllum commune</i>	The Journal of Microbiology	48(6)	SCIE
2010	Initial Acidic pH Is Critical for Mycelial Cultures and Functional Exopolysaccharide Production of an Edible Mushroom, <i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>miniatus</i> JM 27	The Journal of Microbiology	48(6)	SCIE
2010	Purification and Biochemical Characterization of a 17 kDa Fibrinolytic Enzyme from <i>Schizophyllum commune</i>	The Journal of Microbiology	48(6)	SCIE
2010	Triptolide downregulates human GD3 synthase (hST8Sia I) gene expression in SK-MEL-2 human melanoma cells	BMB Reports	42(12)	SCI
2011	Application of statistical experimental design for optimization of physiological factors and their influences on production of pullulan by <i>Aureobasidium pullulans</i> HP-2001 using an orthogonal array method	Korean J. Chem. Eng.	28(11)	SCI
2011	Comparison of ststistical methods for optimization of salts in medium for production of CMCcase of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DL-3 by a recombinant <i>E. coli</i> JM109/DL-3	Jouranl of Life Science	21(9)	Non-SCI
2011	Induction of apoptosis by cordycepin via reactive oxygen species generation in human leukemia cells	Toxicology in Vitro	25(4)	SCI
2011	Fermented <i>Viola mandshurica</i> inhibits melanogenesis in B16 melanoma cells	Biosci. Biotechnol. Biochem.	75(5)	SCI

2011	Biochemical analysis of a fibrinolytic enzyme purified from <i>Bacillus subtilis</i> Strain A1	The Journal of Microbiology	49(3)	SCIE
2011	Biochemical Characterization of the Exopolysaccharide Purified from <i>Laetiporus sulphureus</i> Mycelia	J. Microbiol. Biotechnol.	21(12)	SCIE
2011	Application of statistical experimental design for optimization down stream process for recovery of pullulan produced by <i>Aureobasidium pullulans</i> HP-2001	Korean J. Chem. Eng.	28(7)	SCI
2011	Effects of cordycepin on the cell growth, cell cycle and apoptosis of human carcinoma cells	BMB Reports	submi ssion	SCI
2011	Exopolysaccharide of <i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>miniatus</i> downregulates LPS-induced production of NO, PGE2, and TNF- α in BV2 microglia cells via suppression of the NF- κ B pathway	Food and Chemical Toxicology	49(1)	SCI
2011	Exopolysaccharide Purified from <i>Laetiporus sulphureus</i> Mycelia	J. Microbiol. Biotechnol.	21(1)	SCI
2011	Extracts of <i>Allium fistulosum</i> attenuates pro-inflammatory action in the lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia cells	Jouranl of Life Science	21(6)	Non-SCI
2011	Inhibition of Cell Invasion by Indole-3-Carbinol in OVCAR-3 Human Ovarian Cancer Cells	Jouranl of Life Science	21(7)	Non-SCI
2011	Improvement Effect of Cordycepin-Enriched <i>Cordyceps militaris</i> JLM 0636 Against Orotic acid-Induced Fatty Liver in Rats	Jouranl of Life Science	21(9)	Non-SCI
2011	Induction of apoptosis by ethanol extract of <i>Prunus mume</i> in human leukemia U937 cells through activation of caspases	Oncology Reports	26 (4)	SCI
2011	Effect of Cordycepin-Enriched <i>Cordyceps militaris</i> Powder on Tissues Lipid Peroxidation and Antioxidative Activity in Orotic Acid-Induced Fatty Liver Model Rats	Jouranl of Life Science	21(10)	Non-SCI
2012	Fibrinolytic Activity and Chemical Properties of Cordycepin-Enriched <i>Cordyceps militaris</i> JLM 0636	Jouranl of Life Science	22(2)	Non-SCI

2012	Cordycepin-enriched <i>Cordyceps militaris</i> induces immunomodulation and tumor growth delay in mouse-derived breast cancer	J. Microbiol. Biotechnol.	22(8)	SCI
2012	Effect of Dongchunghacho (<i>Cordyceps militaris</i>) on hyperglycemia and dyslipidemia in type 2 diabetic db/db mice	Food Sci. Biotechnol.	21	SCI
2012	JNP3, a new compound, suppresses PMA-induced tumor cell invasion via NF- κ B down regulation in MCF-7 breast cancer cells.	Biochemical and Biophysical Research Communications	421(2)	SCI
2012	Cordycepin induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-BE(2)-C and melanoma SK-MEL-2 cells	Indian J. Biochem. Biophys.	49(2)	SCI
2012	Inhibition of migration and invasion of human prostate carcinoma LNCaP cells by cordycepin through inactivation of Akt	Int. J. Oncol.	40 (5)	SCI
2012	Effect of Cordycepin Purified from <i>Cordyceps militaris</i> on Th1 and Th2 Cytokines in Mouse Splenocytes	J. Microbiol. Biotechnol.	22(8)	SCIE
2012	Noodle Development and Its Quality Characteristics Using Fermented White and Brown Rice	Journal of Life Science	22(10)	Non-SCI
2012	Effects of White Radish (<i>Raphanus sativus</i>) Enzyme Extract on Hepatotoxicity.	Toxicol. Res.	28(3)	SCI
2012	Characterization Analysis of Functional Gochujang including Grain Syrup with Tomato Puree	Journal of Life Science	22(11)	Non-SCI
2012	Identification of 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone from <i>Hizikia fusiforme</i> Involved in the Induction of the Apoptosis Mediators in Human AGS Carcinoma Cells	J. Microbiol. Biotechnol.	22(12)	SCIE
2012	Oleifolioside A, a New Active Compound, Attenuates LPS-Stimulated iNOS and COX-2 Expression through the Downregulation of NF- κ B and MAPK Activities in RAW264.7 Macrophages.	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	637512	SCI

2012	Oleifoliosides A Mediates Caspase-Independent Human Cervical Carcinoma HeLa Cells Apoptosis Involving Nuclear Relocation of Mitochondrial Apoptogenic Factors AIF and EndoG.	Journal of Agricultural and Food Chemistry	60(21)	SCI
2012	Anticomplement activity of isolated compounds from <i>Artemisia montana</i> .	Immunopharmacology and Immunotoxicology	34(1)	SCI
2012	Detection of a unique fibrinolytic enzyme in <i>Aeromonas sp</i> JH1	The Journal of Microbiology	49(6)	SCIE
2013	유용 발효 미생물에 의해 발효된 Cordycepin 고함유 동충하초 분말의 이화학적 특성 및 생리 활성	Korean Journal of Food Preservation	submi ssion	Non- SCI
2013	Anti-Oxidant Activity and Chemical Properties of Cordycepin-Enriched <i>Cordyceps militaris</i> JLM 0636 extracted by organic solvents	Jouranal of Life Science	23(2)	Non- SCI
2013	<i>Cordyceps militaris</i> alleviates non-alcoholic fatty liver diseases in ob/ob mice	Nutir. Res. Pract.	submi ssion	SCI
2013	Enhanced production of heteropolysaccharide-7 by <i>Beijerinckia indica</i> HS-2001 in pilot-scaled bioreactor under optimized conditions involved in dissolved oxygen using sucrose-base medium	Biotechnology and Bioprocess Engineering	18(1)	SCI
2013	Triptolide-mediated apoptosis by suppression of focal adhesion kinase though extrinsic and intrinsic pathways in human melanoma cells	Evid.-based Complement Altern. Med.	172548	SCI
2013	Inhibitory effects of <i>Asterina pectinifera</i> extracts on melanin biosynthesis through tyrosinase activity.	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE	31	SCI
2013	New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model	Food Chemistry	141(3)	SCI
2013	Cordycepin increases sensitivity to TRAIL-mediated apoptosis	Oncology Reports	30(3)	SCI
2013	Apoptosis induction of human prostate carcinoma cells by cordycepin through reactive oxygen species mediated mitochondrial death pathway	International Journal of Oncology	42(3)	SCI

2013	Effect of Black Garlic Extract on Cytokine Generation of Mouse Spleen Cells	Journal of Life Science	23(1)	Non-SCI
2013	Effect of Cordycepin on the Expression of the Inflammatory Cytokines TNF-alpha, IL-6, and IL-17A in C57BL/6 Mice	J. Microbiol. Biotechnol.	23(2)	SCIE
2013	Antioxidation Activities of Organic Solvent Fractions Obtained from Seaweed, <i>Hizikia fusiformis</i>	Journal of Life Science	23(3)	Non-SCI
2013	5-Hydroxy-3,6,7,8,3040-hexamethoxyflavone inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia via NF-jB suppression and Nrf-2-dependent heme oxygenase-1 induction	Food and Chemical Toxicology	57	SCI
2013	Place-of-Origin and Brand Awareness on Purchase Intentions: Focused on the Moderating Effect of the Purchase Purpose	소비문화연구	16(3)	Non-SCI

나. 특허성과

1) 특허 출원

출원 연도	특허명	대표 출원인	출원국	출원번호
2010	The anticancer composition containing herbal extract	이재현	미국	025079-000056
2011	밀리타리스 동충하초 추출물 제조방법 및 이에 따라 제조된 밀리타리스 동충하초 추출물을 포함하는 건강보조식품	정영기	대한민국	10-2011-0058711
2012	토마토 푸레를 이용한 기능성 고추장의 개발	정영기	대한민국	10-2012-0154235
2012	박테리아(<i>Phytophthora capsici</i>)치리에 의한 라이코펜 합성 관련 유전자의 발현 증가와 라이코펜 고 함유 토마토의 재배방법	정영수	대한민국	10-2012-0068043
2011	황칠나무로부터 분리한 덴드로파녹사이드를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물	이재현	대한민국	10-2011-0014116

출원 연도	특허명	대표 출원인	출원국	출원번호
2011	유비퀴틴 결합 효소 E2 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 스트레스에 대한 저항성 증가용 조성물	이재헌	대한민국	10-2011-0089232
2011	스트레스 저항성을 증진시키는 유전자 및 이의 용도	이재헌	대한민국	10-2011-0082947
2010	치커리 뿌리 추출물을 함유하는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물	조영수	대한민국	10-2010-0109108
2012	눈꽃동충하초 추출물을 유효성분으로 포함하는 인슐린저항성 개선용 조성	김정인	대한민국	10-2012-0040227
2012	항비만 효능이 있는 토마토 발효 식초의 제조방법	서권일	대한민국	10-2012-0053065
2012	밀리타리스 동충하초 추출물 제조방법, 이에 따라 제조된 밀리타리스 동충하초 추출물을 포함하는 암 예방 및 치료용 약학 조성물 및 건강보조식품	정민호	대한민국	10-2012-0068293
2013	밀리타리스 동충하초와 그 추출물을 함유한 기능성 장류의 제조방법	정영기	대한민국	10-2013-0089279

2) 특허 등록

등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	바실러스 서브틸리스 서브스페이스 서브틸리스 A-53 유래 셀룰라아제 및 이의 형질전환된 에세키 콜리 A-53 균주	동아대학교 산학협력단 (주)진상	대한민국	10-1036331
2010	한약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물	이재헌	대한민국	10-0950564
2012	제비꽃 발효추출물을 포함하는 화장품 조성물	이재헌	대한민국	10-1107614

다. 기술이전 및 사업화 성과

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요			
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태
전략농산물 유래 대사개선 웰빙 제품 상업화	코디세핀 고함유 동충하초 추출물을 이용한 면역증강 물질의 상품화	천호식품(주)	김영식	500 명	중소기업
밀리타리스 동충하초 추출물 제조방법 및 이에 따라 제조된 밀리타리스 동충하초 추출물을 포함하는 건강보조식품 제조기술	밀리타리스 동충하초 추출물을 이용한 건강기능성 식품의 상품화	(주)씨엠지 바이오팜	이재운	10명	중소기업
밀리타리스 동충하초와 그 추출물을 함유한 기능성 장류의 제조	동충하초의 기능성을 이용한 발효 장류의 상품화	산정	이광옥	25	대중 음식점

라. 인력양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
16	5	6	5	-	6	10	-	-	14

마. 경제사회파급 효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
8	4	4	16	1	62	63

2. 성과활용 계획

- 본 연구의 주요 성과를 활용하면 FTA시행으로 우려되는 국내 농산물 경쟁력 하락을 막을 수 있고 지역 농산물생산 조합과 대학 및 연구소 연구진의 현장연계 바이오산업화 구축으로 인하여 농가소득의 증대가 기대된다.
- GLP/임상센터를 이용한 기능 검정으로 소비자 신뢰도 향상 및 개발상품 Life cycle을 연장하고 전략농산물을 이용한 고부가가치화로 고기능성 제품을 생산함으로써 바이오 산업화의 원천기술 확보할 수 있다.
- 최근 사회의 트렌드인 웰빙에 맞춘 제품을 생산함으로써 국내 농산물의 인식전환 및 고부가가치화에 크게 기여하고 나아가 부산시 의료산업조성에 따른 바이오특산물의 생산이 가능하다.
- 본 사업단에 참여한 기업체는 물론, 부산테크노파크 해양생물산업육성센터를 통하여 부산지역의 생물산업 관련 업체에게 안내할 것이며, 해양생물산업육성센터 홈페이지의 지역BT정보란 및 본 사업단의 홈페이지를 통하여 개발된 기술을 항상 열람할 수 있도록 할 것이다.
- 지역전략농산물의 수요창출과 가격안정화를 위한 대학과 산업체와 현장 농민을 연계한 네트워크 형성하여 전략농산물의 수요를 극대화시킬 계획이다.
- 본 연구성과를 활용한 가능성 신제품(전략농산물 유래 항비만 웰빙제품, 면역증강 제품 및 약용작물유래 순환계 기능개선 제품, 그 외 Medi-Farm Bio 제품)들에 대한 시장창조 전략을 수립하고 시장예측, 신제품의 포지셔닝전략과 제품믹스, 캐즘(chasm) 극복전략, 시장접근 전략, 가격 및 커뮤니케이션 전략, 선발이점 방어전략 및 신제품의 강화전략 방향 등을 고안하여 미래 성장 산업의 원동력이 될 것으로 기대함.
- 지금까지의 버섯 균사체 유래 항당뇨 물질 관련 특허건수가 최근 5년간 12건에 불과하고 본 연구개발을 통하여 발표한 버섯관련 특허는 신규성이 우수하여 국내외의 기능성 식품 또는 당뇨치료용 원료의약품으로 신규 시장형성이 기대됨.
- 토마토의 발효기술은 특허자체보다도 발효기술의 노하우가 중요하며, 본 연구진의 기술적 노하우를 바탕으로 토마토 식초(발효원액)를 개발하였고 이를 이용한 기능성 다이어트 음료를 개발함으로써 실제적인 산업화를 통한 바이오 산업의 활성화가 기대된다.
- 기존 특허는 주로 단일소재를 사용하여 기능성 식품 개발에 치중되어 있으므로, 본 연구 성과는 전통적인 한방 비법을 과학적 검증을 통하여 그 효능을 입증함으로써 소비자들에게 신뢰를 줄 수 있으므로 산업화 성공 가능성 매우 큼.

- 지금까지 약용작물 유래 기능성 식품 개발에 대한 특허는 최근 5년간 26건에 달하고 있으나, 소비자들의 불신과, 효능 검증 시스템의 공신력이 미비하여 산업화 과정에서 매우 미미한 성공만을 거두었으나, 본 연구결과로부터 개발된 기능성 제품은 국제적 저명 논문에 의하여 검증 과정을 거치고, 전임상 및 임상 시험을 거쳐 효능이 인정된 것이므로 신규성 및 효능이 매우 우수하여 국내외 산업화 성공이 기대됨.
- 동충하초의 주요 생리활성 물질인 cordycepin 함량을 높인 변태기 동충하초 (*Cordyceps militaris* JLM0636)는 OA-유발 지방간 모델에서 간 조직의 지방 축적 억제로 인한 지방간 개선 효과가 있는 것으로 밝혀져 간 질환 개선용 기능성식품 원료로 사용될 가능성이 높은 것으로 사료 되어 진다.
- 코디세핀 고함유 변태기 동충하초 분말 투여는 알코올에 의해 증가된 ALT, γ -GTP 및 LDH 활성을 유의적으로 감소시킴으로서 알코올성 간 질환을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재로 활용할 가능성이 있는 것으로 사료되어진다.
- 와송을 유산균 발효시킨 발효 와송과 일반 와송은 orotic acid로 지방간이 유발된 흰쥐에서 5%의 발효와송을 투여하였을 때 각 조직의 지질 과산화 억제능과 간장의 중성지질에 개선효과가 있어 간 기능 개선제로서 긍정적인 가능성이 있는 것으로 사료된다.
- 일반 꾸지뽕나무 열매와 유산균으로 발효한 꾸지뽕나무 열매는 orotic acid로 지방간이 유발된 흰쥐에서 5%의 일반 꾸지뽕나무 열매를 투여하였을 때 각 조직과 혈청의 지질 과산화 억제능과 간장의 중성지질에 개선효과가 있어 간 기능 개선제로서 긍정적인 가능성이 있는 것으로 사료된다.
- 동물 모델을 사용하여 항당뇨 효과, 비알콜성 지방간 개선효과 및 작용기작을 종합적으로 구명하는 시스템을 확립하고, 동충하초 및 와송의 혈당 조절 및 비알콜성 지방간 개선효과를 규명하였음. 천연물을 건강기능성 제품의 소재로 활용할 수 있을 것으로 기대 된다.
- 버섯유래 항당뇨 물질은 다른 제품에 비해 안전성측면에서 유리하여 산업화가 용이할 것으로 기대되므로, 참여기업 또는 참여기업이 포함된 컨소시엄을 구성하여 반드시 산업화 시켜 국내외 당뇨병 관련 기능성 식품시장에서 주력 상품이 가능할 것으로 판단된다.
- 본 연구개발을 통하여 확립한 공정을 이용하여 풀루란, PS-7 및 섬유소 분해효소를 대량 생산할 것이며, 확립된 기술 등을 기술이전하여 풀루란, PS-7 및 섬유소 분해효소의 국내생산을 가능하게 할 것이다.
- 섬유소 분해효소를 생산하는 해양 미생물에 대한 최적 생육온도, 최적 탄소원 및 질소원 등과 같은 생리적인 특성 연구를 통하여 일반적인 토양 미생물과의 다른 해양 미생물에 대한 기초적인 자료를 확보할 수 있다. 또한 해양미생물이 생산하는 섬유소 분해효소에

대한 효소학적 연구를 통하여 토양 미생물이 생산하는 효소와의 차이점 등과 같은 특성에 대하여 많은 자료를 얻을 것이다.

- 해양 미생물의 섬유소 분해효소 유전자의 염기서열을 밝히고 이 염기서열과 이미 보고된 섬유소 분해효소 유전자의 염기서열과 비교하여 섬유소 분해효소 유전자들에 대한 비교 연구를 수행할 수 있을 것이다. 보고된 섬유소 분해효소의 유전자는 주로 *Bacillus* 속 균주들에 대한 것이므로 이번 연구를 통하여 목표로 하는 해양 미생물은 *Bacillus* 속과는 다른 종이므로 섬유소 분해효소 유전자의 염기서열 비교를 통하여 유전자에 대한 많은 정보를 얻을 것이다.
- 해양 미생물이 생산하는 섬유소 분해효소를 생산할 수 있는 생산공정을 개발 할 수 있을 것이며, 공정개발의 내용은 플라스크를 이용한 기초 실험에서 100L 생물배양기를 사용한 pilot 규모의 생산조건 최적화를 포함하는 것이다. 또한 분리공정의 최적화를 통하여 1) 균체 제거 조건 확립, 2) 농축조건 확립 및 3) 건조 조건 확립과 같이 산업화에 필요한 모든 공정의 기술을 개발할 수 있을 것이다.
- *Bacillus* 속 균주의 섬유소 분해효소 유전자를 *E. coli* 균주에 도입하여 재조합한 균주의 생산성은 모균주에 비하여 3~10배의 생산성 향상을 나타냈다. 해양 미생물의 섬유소 분해효소 유전자를 분리하여 생육 속도가 높은 *E. coli*에 도입하여 재조합 균주를 재조합할 것이며, 이 재조합 균주의 최적 생육조건 및 섬유소 분해효소 생산 조건 등을 최적화하여 섬유소 분해효소의 생산성을 향상시킬 수 있을 것이다.
- 본 연구 사업의 결과로 확립된 해양 미생물을 이용한 섬유소 분해효소의 생산기술은 특허로 출원하여 지적 재산권으로 보호를 받을 것이며 지적 재산권은 일반 기업에서 기술을 지불하고 사용할 수 있도록 할 것이다.
- 해양 미생물을 이용한 섬유소 분해효소의 생산기술은 사용하여 섬유소 분해효소 생산기술의 산업화를 진행할 계획이며 이는 국내의 효소산업의 활성화와 선진국형 생산체계에 의한 해양생물자원의 상품화라 점에서 의의가 있는 것이다. 또한, 전량 외국에서 수입하고 있는 산업용 섬유소 분해효소를 국내의 기술로 생산하여 보급할 수 있을 것이다.
- 토마토 발효기술은 다른 농산물에도 적용이 가능하므로 향후 농가의 잉여 농산물에 대한 문제점을 해결할 수 있고 토마토를 산업적으로 응용할 수 있는 기초 자료로 활용됨이 기대된다.
- 토마토를 이용한 발효원액을 제조함으로써 그 원액을 이용하여 다양한 가공식품의 개발이 기대된다.
- 토마토 식초와 기능성 부용제를 이용하여 기존의 다이어트 음료보다 체중 조절 효과가 탁월한 음료의 개발과 토마토 식초와 기능성 부용제의 항비만 효과에 대한 연구는 다른

학문 분야에서도 응용이 가능하며 인접학문의 발전에 활용이 기대된다.

- 토마토를 이용한 발효원액 제조에 따른 토마토의 저장성 문제를 해결할 수 있고 토마토를 이용한 발효원액으로 2차 가공 음료를 개발함으로써, 토마토를 단기간에 대량 소비가 가능해지며, 농가의 소득증대 또한 기대된다.
- 토마토 발효원액 및 기능성 부용제를 이용한 다이어트 음료 개발에 따른 고부가가치 창출과 개발 제품을 수출상품화 함으로서 외화 획득에 기여함이 기대된다.
- 이상에 기술한 연구개발기술을 바탕으로 국가 차원의 생물자원관리 통합전산 시스템을 구축한다면 고부가가치의 신기능 물질, 기능식품, 의약품, 신기능유전자 발굴 등의 제반 연구의 신속한 정보를 제공함으로써 생명공학을 통한 생물자원의 산업적 개발 기술에 막대한 파급효과 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 동충하초로부터 분리한 다당류는 간경화 모델인 HL-7702 cell에서 과산화수소로 유도된 활성산소종 생성, apoptosis, mitochondrial dysfunction, ATP 농도 저하를 완화시켰다.
- 동충하초 다당류의 mitochondrial dysfunction 완화효과는 산화적 스트레스를 저하하고 mitochondrial apoptotic signaling을 개선하기 때문인 것으로 나타났다.
- 토마토에 관한 국외문헌을 보면, 토마토를 이용한 알코올 및 초산 발효에 대한 조사는 미미한 실정 ⇒ 주로 기타 미생물을 이용한 발효에 대한 연구가 주를 이루고 있음.
- 토마토를 이용한 국외 발효식품으로는 식초나 소금을 이용하는 절임류 등이 대부분을 차지하고 있으며 가공식품으로는 케찹이나 페이스트의 원료로 한정적으로만 이용되어지고 있음.
- 우리나라와 마찬가지로 국외의 식초에 관한 국외 문헌을 보면, 다양한 종류의 식초에 관한 연구는 활발히 이루어지고 있으나 토마토를 이용한 식초에 대한 연구는 전무한 실정임.

제 7 장 연구시설·장비 현황

품명	용도
동결건조기	시료 동결건조
디지털 당도계	시료의 당도 측정
진공건조기	시료 건조
Fraction Collector	기능성 물질의 분리 및 정제
원치	시료 운반
진공제어기	추출용액의 감압증발
Deep Freezer(Nihon Freezer)	시료 동결보관
Balance	시료 질량 측정
pH Meter	pH측정
Solvent Delivery System	HPLC용 용매 펌프 시스템
Shaking Incubator	미생물 배양
Vortex, 믹서기	시료 혼합 및 분쇄
Absorbance Microplate Reader	반응 물질의 흡광도 측정
Light Scattering Detector	HPLC용 검출기
ICE maker	효소반응 저온 실험
Low Temp. Circulator	용매 농축기용 냉각 장치
현미경	동물 세포 관찰

제 8 장 참고문헌

1. Agrawal, P. K. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 3: 3307-3330.
2. Alquini, G., E. R. Carbonero, F. R. Rosado, C. Cosentino, and M. Iacomini. 2004. Polysaccharide from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.; Fr.) Murr. *Microbiol. Lett.* 230: 47-52.
3. Burdsall, H. H. and M. T. Banik. 2001. The genus *Laetiporus* in North America. *Harv. Pap. Bot.* 6: 43-55.
4. Cao, W., X. Q. Li, L. Liu, T. H. Yang, C. Li, H. T. Fan, et al. 2006. Structure of an anti-tumor polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Carbohydr. Polym.* 6: 149-159.
5. Chauveau, C., P. Talaga, J. M. Wieruszkeski, G. Strecker, and L. Chavant. 1996. A water-soluble β -D-glucan from *Boletus erythropus*. *Phytochemistry* 4: 413-415.
6. Ciucanu, I. and F. Kerek. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 13: 209-217.
7. Dong, Q., X. Yang, and J. N. Fang. 2002. Structural characterization of water soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydr. Res.* 33: 1417-1421.
8. Dubois, M., K. A. Gillers, J. K. Hamilton, P. A. Robers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 2: 350-352.
9. Dwek, R. A. 1996. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* 96: 683-720.
10. Guldur, T. and Y. C. Lee. 2002. Analyses of carbohydrates of apolipoprotein E in VLDL and IDL + LDL of rat serum. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2: 257-262.
11. Hwang, H. S., S. H. Lee, Y. M. Baek, S. W. Kim, Y. K. Jeong, and J. W. Yun. 2008. Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and their insulinotropic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 419-429.

12. Hong, M. R., Y. S. Kim, A. R. Joo, J. K. Lee, Y. S. Kim, and D. K. Oh. 2009. Purification and characterization of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 818-822.
13. Jansson, P. E., L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg, and J. Lonngren. 1976. A practical guide to the methylation of sugars. *Chem. Commun. Stockholm Univ.* 8: 1-72.
14. Jung, Y. S., B. K. Yang, Y. T. Jeong, R. Islam, S. M. Kim, and C. H. Song. 2008. Immunomodulating activities of watersoluble exopolysaccharides obtained from submerged cultures of *Lentinus lepideus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1431-1438.
15. Kamada, S., A. Shimono, Y. Shinto, T. Tsujimura, T. Takahashi, T. Noda, et al. 1995. Bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: Accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res.* 55: 354-359.
16. Kobayashi, H. and H. Kim. 2003. Characterization of aspartic proteinase from Basidiomycete, *Laetiporus sulphureus*. *Food Sci. Technol. Res.* 9: 30-34.
17. Lehninger, A. L. 1992. *Principles of Biochemistry*, pp. 277-298. Worth Publishers, New York.
18. Liu, F., V. E. C. Ooi, and S. T. Chang. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* 60: 763-771.
19. Martinet, W., D. V. den Plas, H. Raes, R. Reekmans, and R. Contreras. 1999. Bax-induced cell death in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 21: 821-829.
20. Motoyama, N., T. Kimura, T. Takahashi, T. Watanabe, and T. Nakano. 1999. Bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J. Exp. Med.* 189: 1691-1698.
21. Murrill, W. A. 1904. The Polyporaceae of North America IX. *Inonotus*, *Sesia* and monotypic genera. *Bull. Torrey Bot. Club* 31: 593-610.
22. Nicholson, D. W. 2000. From bench to clinic with apoptosisbased therapeutic agents. *Nature* 407: 810-816.
23. Padmanabhan, A., S. Liu, and Z. Song. 2008. Bad plays a more significant role than Bid and Bim in mediating cell death signals in batch cultures of HEK 293 cells. *Biotechnol.*

Lett. 30: 819–827.

24. Papp-Szabo, E., M. I. Kanipes, P. Guerry, and M. A. Monteiro. 2005. Cell-surface α -glucan in *Campylobacter jejuni* 81–176. *Carbohydr. Res.* 340: 2218–2221.
25. Vlachou, S., A. Politou, P. Dais, K. Mazeau, and F. R. Taravel. 2001. Structure and dynamics of the branched polysaccharide scleroglucan in dilute solutions studied by 1D and 2D NMR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* 46: 349–363.
26. Wolfrom, M. L. and A. Thompsom. 1963. Reduction with sodium borohydride. *Methods Carbohydr. Chem.* 2: 65–65. 27. Wolfrom, M. L. and A. Thompsom. 1963. Acetylation. *Methods Carbohydr. Chem.* 2: 211–215.
27. Yang, L. and L. M. Zhang. 2009. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydr. Polym.* 76: 349–361.
28. Zhang, J. J., Q. Zhang, J. Wang, X. Shi, and Z. Zhang. 2009. Analysis of the monosaccharide composition of fucoidan by precolumn derivation HPLC. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 27: 578–582.
29. Baarrett, K. E. 1996. Cytokines: Sources, receptors and signalling. *Bailliere' Clin. Gastroenterol.* 10: 1–15. 2. Bok, J. W., L. Lermer, J. Chilton, H. G. Klingeman, and G. H. Towers. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 51: 891–898.
30. Cho, M. A., D. S. Lee, M. J. Kim, J. M. Sung, and S. S. Ham. 2003. Antimutagenicity and cytotoxicity of cordycepin isolated from *Cordyceps militaris*. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 472–475.
31. Choi, S. B., C. H. Park, M. K. Choi, D. W. Jun, and S. M. Park. 2004. Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 2257–2264.
32. Cunningham, K. G., W. Manson, F. S. Spring, and S. A. Hutchinson. 1950. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.). *Nature* 166: 949.

33. D'lios, M. and G. D. Prete. 1998. Th1/Th2 balance in human disease. *Transplant. Proc.* 30: 2373-2377.
34. Hopkins, S. J. 2003. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Med.* 5: S45-S57.
35. Kodama, E. N., R. P. McCaffrey, K. Yusa, and H. Mitsuya. 2000. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT+) leukemic cells. *Biochem. Pharmacol.* 59: 273-281.
36. Nakamura, K., K. Konoha, N. Yoshikawa, Y. Yamaguchi, S. Kagota, K. Shinozuka, and M. Kunitomo. 2005. Effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on hematogenic lung metastatic model mice. *In Vivo* 19: 137-141.
37. Nakamura, K., N. Yoshikawa, Y. Yamaguchi, S. Kagota, K. Shinozuka, and M. Kunitomo. 2006. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation. *Anticancer Res.* 26: 43-48.
38. Ni, H., X. H. Zhou, H. H. Li, and W. F. Huang. 2009. Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waste medium. *J. Chromatogr. B* 877: 2135-2141.
39. Old, L. J. 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230: 630-632.
40. Sadir, R., E. Forest, and H. Lortat-Jacob. 1998. The heparan sulfate binding sequence of interferon-gamma increased the on rate of the interferon-gamma-interferon-gamma receptor complex formation. *J. Biol. Chem.* 273: 10919-10925.
41. Schoenborn, J. R. and C. B. Wilson. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* 96: 41-101.
42. Smith, K. A., L. B. Lachman, J. J. Oppenheim, and M. F. Favata. 1980. The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* 151: 1551-1556.
43. Sugar, A. M. and R. P. McCaffrey. 1998. Antifungal activity of 3-deoxyadenosine (cordycepin). *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1424-1427.
44. Thomadaki, H., A. Scorilas, C. M. Tsiapalis, and M. Havredaki. 2008. The role of cordycepin in cancer treatment via induction or inhibition of apoptosis: Implication of polyadenylation in a cell type specific manner. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61:

251-265.

45. A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis., 15th eds., Association of Official Analysis Chemists, Washington D.C., USA.
46. Chun, H. S., You, J. E., Kim, I. H. and Chom, J. S. 1999. Comparative antimutagenic and antioxidative activities of rice with different milling fractions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31, 1371-1377. 3. Chong , H. S. and Park, C. S. 2003. Quality of noodle added powder of *Opuntia Ficus-indica* var. *Saboten*. *Korean J. Food Preserv.* 10, 200-205.
47. Delcour, J. A. and Hosoney, R. C. 2010. Principles of cereal science and technology (3rd ed). AACC Inte W National, Inc., St. Paul, MN, USA. pp. 229-235.
48. Ha, T. Y. 2002. Nutritional and functional properties of rice. Proceedings of the Korean Society of Postharvest Science and Technology of Agricultural Products Conference. pp. 64-71.
49. Jeong, C. H., Kim, J. H., Cho, J. R., Ahn, C. G. and Shim, K. H. 2007. Quality characteristics of wet noodles added with Korean paprika powder. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36, 779-784.
50. Jim, S. Y., Kang, M. Y. and Kim, M. H. 2008. Quality characteristics of noodle added with browned oak mushroom (*Lentinus edodes*). *Korean J. Food Cookery Sci.* 24, 665-671.
51. Johnston, M. R. 1979. Sensory evaluation methods for the practicing food technologist. 1st short course committee, pp. 1-6.
52. Jung, B. M., Park, S. O. and Shin, T. S. 2009. Development and quality characteristics of rice noodles made with added *Capsosiphon fulvescens* Powder. *Korean J. Food Cookery Sci.* 25, 180-188.
53. Kang, M. Y., Lee, Y. R., Koh, H. J. and Nam, S. H. 2004. Antioxidantive and antimutagenic activity of ethanolic extracts from giant embryonic rice. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47, 61-66.
54. Kim, B. K., Park, J. E. and Genuine, Z. 2011. Effects of semolina on quality characteristics of the rice noddles. *Food Eng. Prog.* 15. 56-63.
55. Kim, Y. S. 1998. Quality of wet noodle prepared with wheat flour and mushroom

powder. Korean J Food Sci. Technol. 30, 1373-1380.

56. Ko, M. R., Choi, H. J., Han, B. K., Yoo, S. S., Kim, H. S., Choi, S. W., Hur, N. Y., Kim, C. N., Kim, B. Y. and Baik, M. Y. 2011. Antioxidative components and antioxidative capacity of brown and black rices. Food Eng. Prog. 15, 195-202.
57. Na, G. S., Lee, S. K. and Kim, S. Y. 2007. Antioxidative effects and quality characteristics of the rice cultivated by organic farming and ordinary farming. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50, 36-41.
58. Park, B. H., Jeon, E. R., Kim, S. D. and Cho, H. S. 2010. Quality characteristics of dried noodle added with lotus leaf powder. Korean F. Food Culture 25, 225-231.
59. Park, G. S. and Kim, J. Y. 2010. Quality characteristics of rice noodles with added allium victorialis powder. Korean J. Food Cookery Sci. 26, 772-780.
60. Park, J. H., Ko, S. H. and Yoo, S. S. 2010. Quality characteristics of wet noodles added with freeze-dried Maesangi powder. Korean J. Food Cookery Sci. 26, 831-739.
61. Park, S. I. and Cho, E. J. 2004. Quality characteristics of noodle added with Chlorella extract. Korean J. Food Nutr. 17, 120-127.
62. Sohn, H. Y., Kwon, C. S., Son, K. H., Kwon, G. S., Kwon, Y. S., Ryu, H. Y. and Kum, E. J. 2005. Antithrombosis and antioxidant activity of methanol extract from different brands of rice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34, 593-598.
63. Stinissen, H. M., Prumans, W. J. and Carlier, A. R. 1983. Occurrence and immunological relationships of lectins in gramineous species. Planta 159, 105-111.
64. We, G. J., Cho, Y. S., Yoon, M. R., Shin, M. S. and Ko, S. H. 2010. Development of rice flour-based puffing snack for early childhood. Food Eng. Prog. 14, 322-327.
65. Yoon, S. S. 1991. Cultural history of Korea's noodles. Korean J. Dietary Culture 6, 85-94.
66. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. 1998. Cellular and molecular immunology. pp. 229-330, 3rd eds., W. B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.
67. Abbas, A. K., Murphy, K. and Sher, A. 1996. Functional diversity of helper T

lymphocytes. *Nature* 383, 787–793.

68. Alder, J. K., Georgantas 3rd., R. W., Hildreth, R. L., Kaplan, I. M., Morisot, S. and Yu, X. 2008. Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *J Immunol* 180, 5645–5652.
69. Ankri, S. and Mirelman, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect* 1, 125–129.
70. Asadullah, K., Sterry, W. and Volk, H. D. Interleukin-10 therapy - review of a new approach. *Pharmacol Rev* 55, 241–269.
71. Bae, S. E., Cho, S. Y., Won, D. Y, Lee, S. H. and Park, H. J. 2012. A comparative study of the different analytical methods for analysis of S-allyl cysteine in black garlic by HPLC. *LWT - Food Sci Technol* 46, 532–535.
72. Bakri, I. M. and Douglas, C. W. I. 2005. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 50, 645–651.
73. Butt, M. S., Sultan, M.T., Butt, M. S. and Iqbal, J. 2009. Garlic: nature's protection against physiological threats. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49, 538–551.
74. Cho, S. J., Rhee, D. K. and Pyo, S. 2006. Allicin, a major component of garlic, inhibits apoptosis of macrophage in a depleted nutritional state. *Nutrition* 22, 1177–1184.
75. Clement, F., Pramod, S. N. and Venkatesh, Y. P. 2010. Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (*Allium sativum*) with the major garlic lectins or agglutinins. *Int Immunopharmacol* 10, 316–324.
76. Clerici, M. and Shearer, G. M. 1994. The Th1–Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 15, 575–581.
77. Colić, M., Vučević, D., Kilibarda, V., Radicević, N., Savić, M. 2002. Modulatory effects of garlic extracts on proliferation of T-lymphocytes in vitro stimulated with concanavalin A. *Phytomedicine* 9, 117–124.
78. Dissing-Olesen, L., Ladeby, R., Nielsen, H. H., Toft-Hansen, H., Dalmau, I. and Fisen, B. 2007. Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience* 149, 112–122.
79. Elenkov, I. J. and Chrousos, G. P. 1999. Stress hormones, Th1/Th2 patterns,

pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrin Met* 10, 359–368.

80. Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A. Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matusi, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. and Kishimoto, T. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73–76.
81. Kang, N. S., Moon, E. Y., Cho, C. G. and Pyo, S. 2001. Immunomodulating effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. *Nutr Res* 21, 617–626.
82. Kim, S. H. 2001. Cytokines in chronic hepatitis B and C virus infection. *Korean J Clin Pathol* 21, 6–12.
83. Kim, S. H., Jung, E. Y., Kang, D. H., Chang, U. J., Hong, Y. H. and Suh, H. J. 2012. Physical stability, antioxidative properties, and photoprotective effects of a functionalized formulation containing black garlic extract. *J Photochem Photobiol B* 117, 104–110.
84. Lawson, L. D. 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*, ACS Symposium Series, 691. American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 176–209.
85. Li, X. H., Li, C. Y., Lu, J. M., Tian, R. B. and Wei, J. 2012. Allicin ameliorates cognitive deficits ageing-induced learning and memory deficits through enhancing of Nrf 2 antioxidant signaling pathways. *Neurosci Lett* 514, 46–50.
86. Liu, Y., Qi, H., Wang, Y., Wu, M., Cao, Y., Huang, W., Li, ., Ji, Z. and Sun, H. 2012. Allicin protects against myocardial poptosis and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 19, 693–698.
87. Makris, A., Thornton, C. E., Xu, B. and Hennessy, A. 2006. arlic increases IL-10 and inhibits TNF-alpha and IL-6 production n endotoxin-stimulated human placental explants. *lacentia* 26, 828–834.
88. Montano, A., Casado, F. J., de Castro, A., Sanchez, A. H. nd Rejano, L. 2004. Vitamin content and amino acid composition f pickled garlic processed with and without ermentation. *J Agric Food Chem* 52, 7324–7430.

89. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. . and Coffman, R. L. 2005. Two types of murine helper cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 175, 5-14.
90. Nagatoshi, I., Benjamin, H. S., Kenjiro, R., Hiromichi, M. nd Yoichi, I. 1999. Antioxiant effects of fructosyl, arginie, Marillard reaction product in aged garlic extract. *J Nutr iochem* 10, 373-376.
91. Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O. N., vila-Lombardo, R., Berenice Zuniga-Bustos, A. and rozco-Ibarra, M. 2006. Reactive oxygen species scavenging apacity of different cooked garlic preparations. *Life Sci* 78, 61-770.
92. Rengarajan, J., Szabo, S. J. and Glimcher, L. H. 2000. ranscriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol oday* 21, 479-483.
93. Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K. and Zhu, Y. Z. ioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the enus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *at. Prod. Rep.* 22, 51-68.
94. Wang, D., Feng, Y., Jiu, J., Yan, J., Wang, M., Sasaki, J. I. nd Lu, C. 2010. Black Garlic (*Allium sativum*) Extracts nhance the Immune System. *Med Aro Plant Sci Biotech* 4, 7-40.
95. You, B. R., Kim, H. R., Kim, M. J. and Kim, M R. 2011. Comparison of the quality characteristics and antioxidant activities of the commercial black garlic and lab-prepared fermented and aged black garlic. *J Korean Soc Food Nutr* 40, 366-371.
96. Jemal A, Ward E and Thun M: Declining death rates reflect progress against cancer. *PLoS One* 5: e9584-e9591, 2010.
97. Sciarra A, Salciccia S and Panebianco V: Proton spectroscopic and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance: a modern approach in prostate cancer imaging. *Eur Urol* 54: 485-488, 2008.
98. Crawford ED: Epidemiology of prostate cancer. *Urology* 62: 3-12, 2003.
99. Zhang L, Yang BX, Zhang HT, Wang JG, Wang HL and Zhao XJ: Prostate cancer: an emerging threat to the health of aging men in Asia. *Asian J Androl* 13: 574-578, 2011.
100. Xia SJ, Cui D and Jiang Q: An overview of prostate diseases and their characteristics

specific to Asian men. *Asian J Androl* 14: 458-464, 2012.

101. Neto CC, Amoroso JW and Liberty AM: Anticancer activities of cranberry phytochemicals: an update. *Mol Nutr Food Res* 52: S18-S27, 2008.
102. Kaur M, Pop M, Shi D, Brignone C and Grossman SR: hHR23B is required for genotoxic-specific activation of p53 and apoptosis. *Oncogene* 26: 1231-1237, 2007.
103. Igney FH and Krammer PH: Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71: 907-920, 2002.
104. Hu W and Kavanagh JJ: Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol* 4: 721-729, 2003.
105. Pathak N and Khandelwal S: Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicol Lett* 169: 95-108, 2007.
106. Chatterjee S, Kundu S, Bhattacharyya A, Hartinger CG and Dyson PJ: The ruthenium(II)-arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53-JNK pathways. *J Biol Inorg Chem* 13: 1149-1155, 2008.
107. Huppertz B, Kadyrov M and Kingdom JC: Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 195: 29-39, 2006.
108. Zhou H, Liu X, Liu L, Yang Z, Zhang S, Tang M, Tang Y, Dong Q and Hu R: Oxidative stress and apoptosis of human brain microvascular endothelial cells induced by free fatty acids. *J Int Med Res* 37: 1897-1903, 2009.
109. Wang MF, Liao YF, Hung YC, Lin CL, Hour TC, Lue KH, Hung HC and Liu GY: Hydroxydibenzoylmethane induces apoptosis through repressing ornithine decarboxylase in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Exp Mol Med* 43: 189-196, 2011.
110. Cunningham KG, Manson W, Spring FS and Hutchinson SA: Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris*. *Nature* 166: 949, 1950.
111. Paterson RR: Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry* 69: 1469-1495, 2008.
112. Horowitz B, Goldfinger BA and Marmur J: Effect of cordycepin triphosphate on the nuclear DNA-dependent RNA polymerases and poly(A) polymerase from the yeast,

Saccharomyces cerevisiae. Arch Biochem Biophys 172: 143-148, 1976.

113. Müller WE, Seibert G, Beyer R, Breter HJ, Maidhof A and Zahn RK: Effect of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178Y cells and on nucleic acid-synthesizing enzyme systems. Cancer Res 37: 3824-3833, 1977.
114. Foss FM: Combination therapy with purine nucleoside analogs. Oncology 14: 31-35, 2000.
115. Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K and Kunitomo M: Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation. Anticancer Res 26: 43-47, 2006.
116. Sugar AM and McCaffrey RP: Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin). Antimicrob Agents Chemother 42: 1424-1427, 1998.
117. Ahn YJ, Park SJ, Lee SG, Shin SC and Choi DH: Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. J Agric Food Chem 48: 2744-2748, 2000.
118. Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin DJ, Han SK, Park SM, Park JH, Park HI, Sung JM, Jang Y, Chung N, Hwang KC and Kim TW: Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. Eur J Pharmacol 545: 192-199, 2006.
119. Jeong JW, Jin CY, Kim GY, Lee JD, Park C, Kim GD, Kim WJ, Jung WK, Seo SK, Choi IW and Choi YH: Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. Int Immunopharmacol 10: 1580-1586, 2010.
120. Zhou X, Gong Z, Su Y, Lin J and Tang K: Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. J Pharm Pharmacol 61: 279-291, 2009.
121. Lee K, Lee MH, Kang YW, Rhee KJ, Kim TU and Kim YS: Parkin induces apoptotic cell death in TNF- α -treated cervical cancer cells. BMB Rep 45: 526-531, 2012.
122. Kim IH, Kim SW, Kim SH, Lee SO, Lee ST, Kim DG, Lee MJ and Park WH:

Parthenolide-induced apoptosis of hepatic stellate cells and anti-fibrotic effects in an in vivo rat model. *Exp Mol Med* 44: 448-456, 2012.

123. Wang X, Chen S, Ma G, Ye M and Lu G: Involvement of proinflammatory factors, apoptosis, caspase-3 activation and Ca²⁺ disturbance in microglia activation-mediated dopaminergic cell degeneration. *Mech Ageing Dev* 126: 1241-1254, 2005.
124. Chang HY and Yang X: Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-846, 2000.
125. Jin Z and El-Deiry WS: Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: 139-163, 2005.
126. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS and Reed JC: IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17: 2215-2223, 1998.
127. Borner C: The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39: 615-647, 2003.
128. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C and Hickman JA: Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144: 903-914, 1999.
129. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG and Youle RJ: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139: 1281-1292, 1997.
130. Bruce-Keller AJ, Begley JG, Fu W, Butterfield DA, Bredesen DE, Hutchins JB, Hensley K and Mattson MP: Bcl-2 protects isolated plasma and mitochondrial membranes against lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 70: 31-39, 1998.
131. Fiers W, Beyaert R, Declercq W and Vandenabeele P: More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18: 7719-7730, 1999.
132. Fleury C, Mignotte B and Vayssière JL: Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84: 131-141, 2002.

133. Sang M.K., Chun S-C., Kim K.D. (2008). Biological of Phytophthora blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control* 46:424-433.
134. Lee K-H., Koh R-H., Song H-G., (2008). Enhancement of Growth and Yield of Tomato by *Rhodopseudomonas* sp. under Greenhouse Condition. *J Microbiol.* 46(6):641-646.
135. J. W. Yoon, S. K. Rhee, K. B. Lee. Effects of silkworm extract powder on plasma lipids and glucose in rats. *Korean J Food Nutr* 18: 140-145 (2005)
136. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. S. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275 (1951)
137. H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358 (1979)
138. A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 12th ed., Association of official analytical chemists. Washington, D.C., U.S.A.
139. E. Beutler, O. Duron, B. M. Kelly. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61: 882-888 (1963)
140. J. Y. Cha, B. S. Jun, Y. S. Cho. Prevention of orotic acid-induced fatty liver in rats by capsaicin. *Food Sci Biotechnol* 13: 597-602 (2004)
141. D. B. Duncan. Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* 13: 164-176 (1957)
142. V. Manninen, L. Tenkanen, P Koskinen, J. K. Huttunen, M. Manntari, O. P. Heinonen, M. H. Frick. Triglycerides and LDL-cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. *Circulation* 85: 37-45 (1992)
143. J. Y. Cha, H. J. Kim, Y. S Cho. Effect of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 531-536 (2000)
144. T. Gordon, W. P.Casfelli, M. C. Hjortland, W. B. Kennel, T. R. Dawher. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart diseases, the Framingham study. *Am J Med* 62: 707-714 (1977)

145. J.Y. Cha, H. S. Kim, S.C. Kang, and Y.S. Cho. 2009c. Alcoholic hepatotoxicity suppression in alcohol fed rats by glutathione-enriched yeast FF-8 strain. *Food Sci. Biotechnol.* 18, 1411-1416.
146. J. Y. Cha, J. S. Heo, Y. S. Cho. Effect of zinc-enriched yeast FF-10 strain on the alcoholic hepatotoxicity in alcohol feeding rats. *Food Sci Biotechnol* 17: 1207-1213 (2008)
147. H. Izu, M. Shobayashi, Y. Manabe, K. Goto, H. Iefuji, S-adenosylmethionine(SAM)-accumulating sake yeast suppresses acute alcohol-induced liver injury in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2982-2989 (2006)
148. M. H. Shon, J. Y. Cha, C. H. Lee, S. H. Park, Y. S. Cho. Protective effect of administrated glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Sci Biochemol* 16: 967-974 (2007)
149. Y. Sugiyama, K. Yamamoto. The protective effect of glutathione-enriched yeast extract on acetaminophen-induced liver damage in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food* 51: 189-193 (1998)
150. J. Y. Cha, Y. Mameda, K. Oogami, K. Yamamoto and T. Yanagita. 1998. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 508-513.
151. J. Y. Cha, Y. S. Cho, I. Kim, T. Anno, S. M. Rahman, T. Yanagita. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Human Nutr* 56: 349-58 (2001)
152. M. R. Stuart, L. S. Chou and B. C. Weimer. 1999. Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 665-673.
153. S. W. Jung, N. K. Lee, S. J. Kim and D. S. Han. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27, 891-896.
154. S. Lee, W. G. Kim, E. Kim, I. J. Ryoo, H. K. Lee, J. N. Kim, S. H. Jung and I. D. Yoo. 2005. Synthesis and melanin biosynthesis inhibitory activity of (+/-)-terrein

produced by *Penicillium* sp. 20135. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 15, 471-473.

155. J. Ma, Y. Li, Q. Ye, J. Li, Y. Hua, D. Ju, D. Zhang, R. Cooper and M. Chang. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5220-5225.
156. Y. Ming, K. Ikejima, G. E. Arteel, V. Seabra, B. U. Bradford, H. Kono, I. Rusyn, Thurman R.G. 1998. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 1014-1019.
157. J. Y. Cha, H. Y. Jung, J. J. Jeong, H. J. Yang, Y. T. Kim and Y. S. Lee. 2009. Effects of amino acids on the activities of alcohol metabolizing enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). *J. Life Sci.* 19, 1321-1327.
158. D. Adawi, F. B. Kasravi, G. Molin, B. Jeppsson. Oral arginine supplementation in acute liver injury. *Nutrition* 12: 529-533 (1996)
159. J. Balkan, O. Kanbagli, G. Aykac-Toker, M. Uysal. Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol treated rats. *Biol Pharm Bull* 25: 1231 - 1233 (2002)
160. H. Thor, R. Moldeus, S. Orrenius. Metabolic activation and hepatotoxicity: effect of cysteine, N-acetylcysteine, and methione on glutathione biosynthesis and bromobenzene toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 192: 405-413 (1979)
161. S. Inkeles, D. Eisenberg. Hyperlipidemia and coronary atherosclerosis. *Medicine* (Baltimore) 60: 110-123 (1981)
162. Y. G. Li, D. F. Ji, S. Chen, G. Y. Hu. Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. *Alcohol* 43: 246-253 (2008)
163. E. Baldi, P. Burra, M. Plebani. Serum malondialdehyde and mitochondrial aspartate aminotransferase activity as markers of chronic alcohol intake and alcoholic liver disease. *Italian J Gastroenterol* 25: 429 - 432(1993)
164. Plaa GL and Witschi H. 1976. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 16: 125-141.
165. Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M and Nordmann R. 1997.

Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 25: 351-355.

166. A. Murakami, M. Kishimoto, M. Kawaguchi, T. Matsuura, T. Ichikawa. Lipid peroxides and their relatives in organs of female rats fed diets containing excessive heme iron. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 51: 9-15 (1998)
167. H. Chiba, M. Takasaki, R. Masuyama, M. Uehara, Y. Kanke, K. Suzuki, S. Goto. Time course of change in hepatic lipid peroxide level in iron-deficient rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 51: 201-206 (1998)
168. J. Y. Cha, H. J. Kim, Y. S. Cho. Effect of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 531-536 (2000)
169. A. Goel, V. Dani, D. K. Dhawan. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 156: 131-140 (2005)
170. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. S. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275 (1951)
171. H. U. Bergmeyer. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp. 28, (1974)
172. T. Koivula, M. Koivusalo, K. O. Lindros. Liver aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem Pharmacol* 24: 1807-1811 (1975)
173. H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358 (1979)
174. A.O.A.C. 1975. *Official methods of analysis*. 12th ed., Association of official analytical chemists. Washington, D.C., U.S.A.
175. E. Beutler, O. Duron, B. M. Kelly. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61: 882-888 (1963)
176. J. Y. Cha, B. S. Jun, Y. S. Cho. Prevention of orotic acid-induced fatty liver in rats by capsaicin. *Food Sci Biotechnol* 13: 597-602 (2004)

177. D. B. Duncan. Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* 13: 164-176 (1957)
178. C. L. Mendenhall, R. H. Bradford, R. H. Furman. Effects of ethanol on glycerolipid metabolism in rat liver. *Biochem. Biophys Acta* 187: 501 - 509 (1969)
179. T. J. Peters. Ethanol metabolism. *Bri Med Bull* 38: 17-20 (1982)
180. A. Helander, O. Tottmar. Effect of acute ethanol administration on human alcohol aldehyde dehydrogenase activity. *Alcohol Clin Exp Res* 12: 643-646 (1988)
181. T. S. Yu, H. J. Choi, C. G. Yoon. Effect of *Monascus* pigment extract on the alcohol metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 603-607 (2003)
182. M. Kano, F. Ishikawa, S. Matsubara, H. Kikuchi-Hayakawa, Y. Shimakawa. Soymilk products affect ethanol absorption and metabolism in rats during acute and chronic ethanol intake. *J Nutr* 132: 238-244 (2002)
183. H. Gueri. Influence on prolonged ethanol intake on the level and turnover of alcohol and aldehyde dehydrogenase and glutathione. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 23: 12 - 14 (1995)
184. J.Y. Cha, H. S. Kim, S.C. Kang, and Y.S. Cho. 2009c. Alcoholic hepatotoxicity suppression in alcohol fed rats by glutathione-enriched yeast FF-8 strain. *Food Sci. Biotechnol.* 18, 1411-1416.
185. J. Y. Cha, J. S. Heo, Y. S. Cho. Effect of zinc-enriched yeast FF-10 strain on the alcoholic hepatotoxicity in alcohol feeding rats. *Food Sci Biotechnol* 17: 1207-1213 (2008)
186. M. H. Shon, J. Y. Cha, C. H. Lee, S. H. Park, Y. S. Cho. Protective effect of administrated glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Sci Biochemol* 16: 967-974 (2007)
187. Y. Sugiyama, K. Yamamoto. The protective effect of glutathione-enriched yeast extract on acetaminophen-induced liver damage in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food* 51: 189-193 (1998)
188. N. Saravanan, N. Nalini. *Hemidesmus indicus* protects against ethanol-induced liver toxicity. *Cell Mol Biol Lett* 13: 20-37 (2008)

189. R. B. Friedman, R. E. Anderson, S. M. Entine, S. B. Hirshberg. Effects of diseases on clinical laboratory tests. *Clinical Chemistry* 26: 1D - 476D (1980)
190. C. Ramírez-Farías, E. Madrigal-Santillán, J. Gutiérrez-Salinas, N. Rodríguez-Sánchez, M. Martínez-Cruz, I. Valle-Jones, I. Gramlich-Martínez, A. Hernández-Ceruelos and J. A. Morales-González. Protective effect of some vitamins against the toxic action of ethanol on liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol* 14: 899-907 (2008)
191. J. Y. Cha, H. J. Kim, Y. S. Cho. Effect of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 531-536 (2000)
192. T. Gordon, W. P. Casfelli, M. C. Hjortland, W. B. Kennel, T. R. Dawher. Hight density lipoprotein as a protective factor against coronary heart diseases, the Framingham study. *Am J Med* 62: 707-714 (1977)
193. J. Y. Cha, Y. Mameda, K. Oogami, K. Yamamoto and T. Yanagita. 1998. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 508-513.
194. J. Y. Cha, Y. S. Cho, I. Kim, T. Anno, S. M. Rahman, T. Yanagita. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Human Nutr* 56: 349-58 (2001)
195. M. R. Stuart, L. S. Chou and B. C. Weimer. 1999. Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 665-673.
196. S. W. Jung, N. K. Lee, S. J. Kim and D. S. Han. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27, 891-896.
197. S. Lee, W. G. Kim, E. Kim, I. J. Ryoo, H. K. Lee, J. N. Kim, S. H. Jung and I. D. Yoo. 2005. Synthesis and melanin biosynthesis inhibitory activity of (+/-)-terrein produced by *Penicillium* sp. 20135. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 15, 471-473.
198. J. Ma, Y. Li, Q. Ye, J. Li, Y. Hua, D. Ju, D. Zhang, R. Cooper and M. Chang. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J. Agric. Food*

Chem. 48, 5220–5225.

199. L. Oliva, F. Beauge, D. Choquart, A. M. Montet, M. Guitaoui, J. C. Montet. Ursodeoxycholate alleviates alcoholic fatty liver damage in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 1538 - 1543 (1998)
200. Y. Ming, K. Ikejima, G. E. Arteel, V. Seabra, B. U. Bradford, H. Kono, I. Rusyn, Thurman R.G. 1998. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 1014–1019.
201. J. Y. Cha, H. Y. Jung, J. J. Jeong, H. J. Yang, Y. T. Kim and Y. S. Lee. 2009. Effects of amino acids on the activities of alcohol metabolizing enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). *J. Life Sci.* 19, 1321–1327.
202. D. Adawi, F. B. Kasravi, G. Molin, B. Jeppsson. Oral arginine supplementation in acute liver injury. *Nutrition* 12: 529–533 (1996)
203. J. Balkan, O. Kanbagli, G. Aykac-Toker, M. Uysal. Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol treated rats. *Biol Pharm Bull* 25: 1231 - 1233 (2002)
204. H. Thor, R. Moldeus, S. Orrenius. Metabolic activation and hepatotoxicity: effect of cysteine, N-acetylcysteine, and methione on glutathione biosynthesis and bromobenzene toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 192: 405–413 (1979)
205. S. Inkeles, D. Eisenberg. Hyperlipidemia and coronary atherosclerosis. *Medicine* (Baltimore) 60: 110–123 (1981)
206. Y. G. Li, D. F. Ji, S. Chen, G. Y. Hu. Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. *Alcohol Alcohol* 43: 246–253 (2008)
207. E. Baldi, P. Burra, M. Plebani. Serum malondialdehyde and mitochondrial aspartate aminotransferase activity as markers of chronic alcohol intake and alcoholic liver disease. *Italian J Gastroenterol* 25: 429 - 432(1993)
208. M. H. Stipanuk, R. M. Coloso, R. A. G. Garcia, M. F. Banks. Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulfate and taurine in rat hepatocytes. *J Nutr* 122: 420–427 (1992)
209. C. C. Hsu, C. N. Hiang, Y. C. Hung, M. C. Yin. Five cysteine-containing compounds

have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J Nutr* 134: 149-152 (2004)

210. S. I. Seong, K. E. Park, M. Nagata and N. Yoshitake. 1985. Effect of metamorphosis on the major hemolymph proteins of the silkworm. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2, 91-104.
211. Yoon JW, Rhee SK, Lee KB. Effects of silkworm extract powder on plasma lipids and glucose in rats. *Korean J Food Nutr* 18: 140-145 (2005)
212. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RS. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275 (1951)
213. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358 (1979)
214. A.O.A.C. Official methods of analysis. 12th ed., Association of official analytical chemists. Washington, D.C., U.S.A. (1975)
215. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61: 882-888 (1963)
216. Cha JY, Jun BS, Cho YS. Prevention of orotic acid-induced fatty liver in rats by capsaicin. *Food Sci Biotechnol* 13: 597-602 (2004)
217. Duncan DB. Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* 13: 164-176 (1957)
218. Cha JY, Heo JS, Cho YS. Effect of zinc-enriched yeast FF-10 strain on the alcoholic hepatotoxicity in alcohol feeding rats. *Food Sci Biotechnol* 17: 1207-1213 (2008)
219. Cha JY, Kim HS, Kang SC, Cho YS. Alcoholic hepatotoxicity suppression in alcohol fed rats by glutathione-enriched yeast FF-8 strain. *Food Sci Biotechnol* 18: 1411-1416 (2009)
220. Kim OK, Ho JN, Nam DE, Jun WJ, Hwang KT, Kang JE, Chae OS, Lee JM. Hepatoprotective Effect of *Curdrania tricuspidata* Extracts against Oxidative Damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 7-13 (2012)
221. Sugiyama Y, Yamamoto K. The protective effect of glutathione-enriched yeast extract on acetaminophen-induced liver damage in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food* 51: 189-193

(1998)

222. Cha JY, Mameda Y, Oogami K, Yamamoto K, Yanagita T. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 508–513 (1998)
223. Cha JY and Cho YS. Effects of orotic acid and di-(2-ethylhexylphthalate on microsomal triglyceride transfer protein (MTP) and mRNA levels in liver and intestine of rats. *KoreanJ. Food Sci. Technol.* 33: 492–496 (2001)
224. Hebbachi AM, Seelaender MCL, Baker PW and Gibbons GF. Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B is associated with decreased intercellular triglyceride lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids. *Biochem. J.* 325: 711–719 (1997)
225. Cha JY, Maeda Y, Oogami K, Yamamoto K and Yanagita T. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 62: 508–513 (1998)
226. Cha JY, Cho YS, Kim I, Anno T, Rahman SM and Yanagita T. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *PlantFoodsHumanNutr.* 56: 349–358 (2001)
227. Pottenger L. A., Getz G.S. 1971. Serum lipoprotein accumulation in the livers of orotic acid-fed rats. *J Lipid Res.* 12: 450–462 (1971)
228. Miyazawa S, Furuta S and Hashimoto T. Reduction of beta-oxidation capacity of rat liver mitochondria by feeding orotic acid. *Biochim.Biophys.Acta.* 711: 494–502 (1982)
229. Plaa G. L, Witschi H. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 16: 125–141 (1976)
230. Rouach H. V., Fataccioli M, Gentil S. W, French M, Morimoto, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation in relation to liver pathology. *Hepatology.* 25: 351–355 (1997)
231. Murakami A, Kishimoto M, Kawaguchi M, Matsuura T, Ichikawa T. Lipid peroxides and their relatives in organs of female rats fed diets containing excessive heme iron. *J*

Jpn Soc Nutr Food Sci 51: 9-15 (1998)

232. Chiba H, Takasaki M, Masuyama R, Uehara M, Kanke Y, Suzuki K, Goto S. Time course of change in hepatic lipid peroxide level in iron-deficient rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 51: 201-206 (1998)
233. Goel A, Dani V, Dhawan DK. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 156: 131-140 (2005)
234. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. 1985. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25:715-744.
235. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126
236. Folch J, Less M, Sloane-Stanley GH. 1957. A sample method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509
237. Jeong JH, Ryu DS, Suk DH, Lee DS. 2011. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Orostachys japonicus* on modulation of signal pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *BMB Rep.* 44:399-404
238. Liu Y, E Q, Zuo J, Tao Y, Liu W. 2011. Protective effect of Cordyceps polysaccharide on hydrogen peroxide-induced mitochondrial dysfunction in HL-7702 cells. 2011. *Mol Med Rep.* 7:747-754
239. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47:469-474
240. Ohkawa H, Ohisi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-3587
241. Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R. 1997. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from Tochu-cha. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61:177-178
242. Yun YH, Han SH, Lee SJ, Ko SK, Lee CK, Ha NJ, Kim KJ. 2003. Antidiabetic effects of CCCA, CMEMSS, and cordycepin from *Cordyceps militaris* and the immune responses in streptozotocin-induced diabetic mice. *Nat Prod Sci.* 9:291-298

243. Lee, J. W., W. G. Yeomans, A. L. Allen, F. Deng, R. A. Gross, and D. L. Kaplan (1999) Biosynthesis of Novel Exopolymers by *Aureibasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 12:5265–5271.
244. Lee, J. H., J. H. Kim, M. R. Kim, S. M. Lim, S. W. Nam, J. W. Lee, and S. K. Koo (2002) Effect of dissolved oxygen concentration and pH on the mass production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *J. Microbial. Biotechnol.* 12:1–7.
245. Seo, H. P., K. I. Jo, C. W. Son, J. K. Yang, C. H. Chung, S. W. Nam, S. K. Kim, and J. W. Lee (2006) Continuous production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with feeding of high concentration of sucrose. *J. Microbial. Biotechnol.* 16:374–380.
246. Jin, H., H. S. Kim, S. K. Kim, M. K. Shin, J. H. Kim, and J. W. Lee (2002) Production of heteropolysaccharide-7 by *Beijerinckia indica* from agro-industrial byproducts. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 822–827.
247. Jin, H., J. K. Yang, K. I. Jo, C. H. Chung, S. K. Kim, S. W. Nam, and J. W. Lee (2006) Mass production of heteropolysaccharide-7 (PS-7) by *Beijerinckia indica* HS-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. *Process Biochem.* 41:270–275.
248. Jin, I. H., D. Y. Jung, C. W. Son, S. K. Kim, W. Gao, W., C. H. Chung, J. W. Lee (2011) Enhanced production of heteropolysaccharide-7 in repeated batch culture with optimized substitution of culture medium. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16:245–255.
249. Kumar, S., K. Tamura, and N. Nei. 1993. *MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis. Version 1.01*, The Pennsylvania State University, University Park.
250. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletire, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697–703.
251. Jo, K. I., Y. J. Lee, B. K. Kim, B. H. Lee, C. H. Chung, S. W. Nam, S. K. Kim, and J. W. Lee. 2008. Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13:182–188.
252. Kim, H. J., Y. J. Lee, W. Gao, C. H. Chung, and J. W. Lee. 2011. Statistical optimization for production of cellulases by a psychrophilic marine bacterium, *Psychrobacter aquimaris* LBH-10 from rice bran using an orthogonal array method. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16:542–548.

253. Lee, B. H., B. K. Kim, Y. J. Lee, C. H. Chung, and J. W. Lee. 2010. Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme Microb. Technol.* 46:38-42.
254. Lee, Y. J., H. J. Kim, W. Gao, C. H. Chung, and J. W. Lee. 2011. Comparison of statistical methods for optimization of salts in the medium for production of carboxymethylcellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 by a recombinant *E. coli* JM109/DL-3. *J. Life Sci.* 21:1205-1213.
255. A.O.A.C. 1990, Official method of analysis. 15th Ed., Association of Official Analytical Chemists Inc. p 1048. American Institute of nutrition. 1977, Report of the american institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.* 107, 1340-1348.
256. Alshatwi AA, Al Obaaid MA, Al Sedairy SA, Al Assaf AH, Zhang JJ & Lei KY. (2010). Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats. *Nutrition Research*, 30(1), 66-73.
257. Arab L & Steck S. (2000). Lycopene and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1691S-1695S.
258. Arai T, Kim HJ, Hirako S, Nakasatomi M, Chiba H & Matsumoto A. (2013). Effects of dietary fat energy restriction and fish oil feeding on hepatic metabolic abnormalities and insulin resistance in KK mice with high-fat diet-induced obesity. *J Nutr Biochem*, 24, 267-73.
259. Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J & Rossetti L. (1999). Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 48(1), 94-98.
260. Bicanic D, Swarts J, Luterotti S, Helander P, Fogliano V & Anese M. (2005). Optothermistor as a breakthrough in the quantification of lycopene content of thermally processed tomato-based foods: verification versus absorption spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3295-3299.
261. Budak NH, Kumbul Doguc D, Savas CM, Seydim AC, Kok Tas T, Cris MI & Guzel-Seydim ZB. (2011). Effects of apple cider vinegars produced with different techniques on blood lipids in high-cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 6638-6644.

262. Choi SH, Kim HR, Kim HJ, Lee IS, Kozukue N, Levin CE & Friedman M. (2011). Free amino acid and phenolic contents and antioxidative and cancer cell-inhibiting activities of extracts of 11 greenhouse-grown tomato varieties and 13 tomato-based foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12801-12814.
263. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS & Obin MS. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 46(11), 2347-2355.
264. Enqelhard YN, Gazer B & Paran E. (2006). Natural antioxidants from tomato extract reduce blood pressure in patients with grade-1 hypertension: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *American Heart Journal*, 151(1), 100.
265. Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological chemistry*, 226(1), 497-509.
266. Fornelli F, Leone A, Verdesca I, Minervini F & Zacheo G. (2007). The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicology In Vitro*, 21(2), 217-223.
267. Foster MT, Shi H, Seeley RJ & Woods SC. (2010). Transplantation or removal of intra-abdominal adipose tissue prevents age-induced glucose insensitivity. *Physiology & Behavior*, 101(2), 282-288.
268. Friedewald WT, Levy RI & Fredrickson DS. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499-502.
269. Fushimi T & Sato Y. (2005). Effect of acetic acid feeding on the circadian changes in glycogen and metabolites of glucose and lipid in liver and skeletal muscle of rats. *British Journal of Nutrition*, 94(5), 714-719.
270. Fushimi T, Suruga K, Oshima Y, Fukiharu M, Tsukamoto Y & Goda T. (2006). Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. *British Journal of Nutrition*, 95(5), 916-924.
271. Ghasi S, Nwobodo E & Ofili J. O. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of moringa oleifera lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of*

Ethnopharmacology, 69, 21–25.

272. Gouranton E, Thabuis C, Riollet C, Malezet-Desmoulins C, El Yazidi C, Amiot MJ, Borel P & Landrier JF. (2011). Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(7), 642–648.
273. Greenwood MR, Cleary MP, Gruen R, Blasé D, Stem JS, Triscari J & Sullivan AC. (1981). Effect of (-)-hydroxycitrate on development of obesity in the Zucker obese rat. *Am J Physiol*, 240(1), E72–E78.
274. Gullo M & Giudici P. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, 30(1), 46–53.
275. Haslam DW & James WP. (2005). Obesity. *Lancet*, 366(9492), 1197–1209.
276. Hayamizu K, Ishii Y, Kaneko I, Shen M, Okuhara Y, Shigematsu N, Tomi H, Furuse M, Yoshino G & Shimasaki H. (2003). Effects of garcinia cambogia (hydroxycitric acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Current Therapeutic Research*, 63(8), 551–567.
277. Horiuchi J, Kanno T & Kobayashi M. (1999). New vinegar production from onions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(1), 107–109.
278. Horiuchi J, Kanno T & Kobayashi M. (2000). Effective onion vinegar production by a two-step fermentation system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(3), 289–293.
279. Hsu YM, Lai CH, Chang CY, Fan CT, Chen CT & Wu CH. (2008). Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 677–685.
- Ibrahim HS, Ahmed LA & El-din MM. (2008). The functional role of some tomato products on lipid profile and liver function in adult rats. *Journal of Medicinal Food*, 11(3), 551–559.
280. Ilic D, Forbes KM & Hased C. (2011). Lycopene for the prevention of prostate cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9(11), CD008007.
281. James WP. (2008). The epidemiology of obesity: the size of the problem. *Journal of internal medicine*, 263(4), 336–52.

282. Kim AY, Jeong YJ, Park YB, Lee MK, Jeon SM, McGregor RA & Choi MS. (2012). Dose dependent effect of lycopene enriched tomato-wine on liver and adipose tissue in high-fat diet fed rats. *Food Chemistry*, 130, 42-48.
283. Kim SW, Park JH & Jun HK. (2008). Analysis of optimum condition for production of an onion vinegar by two-step fermentations. *Journal of Life Sciences*, 18, 1410-1414.
284. Kim YI, Shizuka hirai, Tsuyoshi goto, Chie ohyane, Haruya takahashi, Taneaki tsugane, Chiaki konishi, Takashi fuji, Shuji Inai, Yoko lijima, Daisuke shibata, Nobuyuki takahashi & Teruo kawada. (2012). Potent PPAR α activator derived from tomato juice, 13-oxo-9, 11-octadecadienoic acid, decreases plasma and hepatic triglyceride in obese diabetic mice. *PloS ONE*, 7(2), e31317.
285. Kim YJ & Park T. (2008). Genes are differentially expressed in the epididymal fat of rats rendered obese by a high-fat diet. *Nutr Res*, 28, 414-22.
286. Kondo S, Tayama K, Tsukamoto Y, Ikeda K & Yamori Y. (2001). Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(12), 2690-2694.
287. Kondo T, Kishi M, Fushimi T & Kaga T. (2009). Acetic acid upregulates the expression of genes for fatty acid oxidation enzymes in liver to suppress body fat accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5982-5986.
288. Kondo T, Kishi M, Fushimi T, Ugajin S & Kaga T. (2009). Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(8), 1837-1843.
289. Lee MH, Kim MS, Shim HG & Shon HY. (2011). Evaluation of antimicrobial antioxidant, and antithrombin activity of domestic fruit and vegetable juice. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39, 146-152.
290. Markovits N, Ben Amotz A & Levy Y. (2009). The effect of tomato-derived lycopene on low carotenoids and enhanced systemic inflammation and oxidation in severe obesity. *The Israel Medical Association Journal*, 11(10), 598-601.
291. Omoni AO & Aluko RE. (2005). The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 334-350.

292. Palozza P, Colangelo M, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Lanza P, Monego G & Ranelletti FO. (2010). Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 31(10), 1813–1821.
293. Pannellini T, Iezzi M, Liberatore M, Sabatini F, Iacobelli S, Rossi C, Alberti S, Di Ilio C, Vitaglione P, Fogliano V & Piantelli M. (2010). A dietary tomato supplement prevents prostate cancer in TRAMP mice. *Cancer Prevention Research*, 3(10), 1284–1291.
294. Rao AV. (2002). Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 227(10), 908–13.
295. Rao AV & Agarwal S. (2000). Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(5), 563–569.
296. Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssonen K & Salonen JT. (2002). Lycopene, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 227(10), 900–907.
297. Saito M, Ueno M, Ogino S, Kubo K, Nagata J & Takeuchi M. (2005). High dose of garcinia cambogia is effective in suppressing fat accumulation in developing male Zucker obese rats, but highly toxic to the testis. *Food Chem Toxicol*, 43(3), 411–419.
298. Sakakibara S, Yamauchi T, Oshima Y, Tsukamoto Y & Kadowaki T. (2006). Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(2), 597–604.
299. Setorki M, Asgary S, Eidi A, Rohani AH & Khazaei M. (2010). Acute effects of vinegar intake on some biochemical risk factors of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Lipids in Health and Disease*, 28(9), 10.
300. Shoji K, Maeda K, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y & Shimomura L. (2008). Measurement of visceral fat by abdominal bioelectrical impedance analysis is beneficial in medical checkup. *Obesity Research & Clinical Practice*, 2, 269–275.
301. Silaste ML, Alfthan G, Aro A, Kesaniemi YA & Horkko S. (2007). Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation. *British Journal of Nutrition*, 98(6), 1251–1258.
302. Siracusa L, Patanè C, Avola G & Ruberto G. (2012). Polyphenols as

chemotaxonomic markers in Italian "long-storage" tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 309–314.

303. Slinkard K & Singleton VL. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–56.
304. Sluijs I, Beulens JW, Grobbee DE & van der Schouw YT. (2009). Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men. *Journal of Nutrition*, 139(5), 987–992.
305. Softic S, Kirby M, Berger NG, Shroyer NF, Woods SC & Kohli R. (2012). Insulin concentration modulates hepatic lipid accumulation in mice in part via transcriptional regulation of fatty acid transport proteins. *PLoS One*, 7(6), e38952.
306. Stewart AJ, Bozonnet S, Mullen W, Jenkins GI, Lean ME & Crozier A. (2000). Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2663–2669.
307. Stringer DM, Zahradka P, Declercq VC, Ryz NR, Diakiw R, Burr LL, Xie X & Taylor CG. (2010). Modulation of lipid droplet size and lipid droplet proteins by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid parallels improvements in hepatic steatosis in obese, insulin-resistant rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(12), 1375–1385.
308. Sun L, Yuan B, Zhang M, Wang L, Cui M, Wang Q & Leng P. (2012). Fruit-specific RNAi-mediated suppression of SINCED1 increases both lycopene and β -carotene contents in tomato fruit. *The Journal of Experimental Botany*, 63(8), 3097–3108.
309. Tonucci LH, Holden JM, Beecher GR, Khachik F, Davis CS & Mulokozi G. (1995). Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 579–586.
310. Tyssandier V, Feillet-Coudray C, Caris-Veyrat C, Guillard JC, Coudray C, Bureau S, Reich M, Amiot-Carlin MJ, Bouteloup-Demange C, Boirie Y & Borel P. (2004). Effect of tomato product consumption on the plasma status of antioxidant microconstituents and on the plasma total antioxidant capacity in healthy subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(2), 148–156.
311. Vallverdú-Queralt A, Oms-Oliu G, Odriozola-Serrano I, Lamuela-Raventos RM,

- Martín-Belloso O & Elez-Martínez P. (2012). Effects of pulsed electric fields on the bioactive compound content and antioxidant capacity of tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3126-3134.
312. Wang MF, Shao Y, Li JG, Zhu NQ, Rngarajan M, Lavoie EJ & Ho CT. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4869-4873.
313. Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM & Wang XD. (2010). Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *International Journal of Cancer*, 126(8), 1788-1796.
314. Wayne W.F, Penelope P-V & Julie K.C. (2002). A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 309-317.
315. Yae MJ, Lee GH, Nam KH, Jang SY, Woo SM & Jeong YJ. (2007). Establishment of quality control standardization for pomegranate vinegar. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 36, 1425-1430.
316. USDA foreign agricultural service (United States Government printing office, Washington, DC). The U.S. and world tomato situation, 2008. URL http://www.fas.usda.gov/http/2008_Tomatoes.pdf