발간등록번호
11-1543000-001020-01

미강 발효추출물을 이용한 항혈전 및 뇌기능개선 기능성 소재화 및 제품화

(Anti-thrombotic and brain function improving activities of rice bran fermentation extract and development of food materials and products)

인제대학교

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미강 발효추출물을 이용한 항혈전 및 뇌기능개선 기능성 소재화 및 제품화”의 보고서로 제출합니다.

2015 년 9 월 21 일

주관연구기관명 : 인 제 대
주관연구책임자 : 홍 정 화
세부연구책임자 : 홍 정 화
연 구 원 : 김 진 우
연 구 원 : 파 자 리
연 구 원 : 송 우 태
연 구 원 : 이 상 현
협동연구기관명 : 인 제 대
협동연구책임자 : 박 화 진
협동연구기관명 : 인 제 대
협동연구책임자 : 강 성 구

요 약 문

Ⅰ. 제 목

미강 발효추출물을 이용한 항혈전 및 뇌기능개선 식품 소재 및 제품화

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 최종목표

미강의 가공 문제점을 개선하기 위해 bio-conversion 기술을 이용한 발효공정과 추출공정을 개발하여 유효성분(GABA(γ-aminobutyric acid), Inositol 등)이 증진된 추출물의 기능성 항혈전 및 뇌질환에 대한 예방 또는 개선효과 검증을 통해 미강의 고부가가치 식품 소재 및 응용제품을 개발하고자 함

2. 연구 필요성

미강의 생산량은 연간 385,000톤에 달하며 지방, 비타민B 군 및 양질의 단백질과 섬유질을 풍부하게 함유하고 있으나 30% 정도가 미강유 제조에 사용되고 있을 뿐 나머지70%는 사료나 비료 등의 저 가치물질로 이용되거나 농산폐기물로 처리되고 있어 미강의 고부가가치화 및 폭넓은 산업적 이용에 대한 연구가 요구되고 있음.

미강은 지방, 단백질, 식이섬유가 영양소의 많은 부분을 차지하고 있고, 비타민 A와 티아민, 피리독신, 니아신 등의 비타민 B군 및 칼슘, 아연, 철분 등의 미네랄이 주성분을 이루고 있으며, 특히 곡류에 부족한 필수 아미노산인 리신이 다량 함유되어 있고, 구성지방산의 70% 이상이 올레인산, 리놀레산, 리놀렌산 등의 불포화지방산으로 영양적인 가치가 뛰어남.

현재까지의 연구에 따르면 다가불포화지방산의 섭취는 혈중 콜레스테롤이 상승하는 것을 억제하여 심혈관계 질환을 예방하여 주는 것으로 알려져 있는데, 특히 DHA(도코사헥사엔산) EPA(에이코사펜타엔산)와 함께 대표적인 오메가-3 지방산의 하나인 리놀렌산은 고지방식으로 인한 면역력의 저하를 막아주고, 유선암의 증식에 억제효과를 보인 것으로 최근 연구에서 밝혀져 암에 효과가 있을 것으로 기대됨.

미강을 미강유로 정제하는 과정에서 오리자놀, 토코페롤, 레시틴 등 다양한 생리활성 물질이 부산물로서 발생하며, 이중 오리자놀은 페룰산과 스테롤류와 알코올류가 결합된 화합물로 갱년기 장애 및 자율신경 실조증 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 토코페롤, 레시틴과 함께 항산화 활성이 높아 활성산소로 인한 세포의 손상을 막아주어 암의 발생을 줄여줄 수 있음.

미강에 9.5~14.5%로 다량 함유되어 있는 피틴산은 암세포의 이상 증식을 억제시켜 항암 효과도 있는 것으로 알려져 있으며, 헤미셀루로스 등의 식이섬유와 함께 미강의 다당성분인 아라비

녹실란은 아라비노스와 자일로스로 구성된 복합 다당체로 항알레르기, 면역활성 및 항암에 관련된 생리활성 물질인데 최근 다양한 연구들이 발표되고 있음.

미국 등에서는 가공된 미강을 package하여 밀가루와 같이 건강식품재료로 판매하고 있으며, 일본의 경우 피부보습효과를 목적으로 미강을 미생물 발효시킨 발효액을 화장품 및 입욕제에 이용하고 있고 다양한 생리활성 정제물질들이 판매되고 있음.

국내에서의 경우 미곡은 주식이외에도 다양한 가공식품의 원료로 이용되고 있음. 전통적인 떡과자로부터 미곡추출 식이섬유를 밀가루 및 빵, 스낵 등에 이용하려는 연구, 도정 부산물인 미강을 스넥 등의 건강 편이식품의 소재로 이용하려는 연구 그리고 미강유 제조를 위한 연구 및 미강 안정화를 위한 extruder 설계 등 다양한 미곡 가공연구가 진행되었으며, 이러한 제품의 부가가치는 낮은 실정임.

국내 미강에 대한 연구은 2000년 이전 미강의 산패와 관련된 연구와 미강유 토코페롤 또는 불포화 지방산에 대한 연구가 주를 이루고 있으며, 2000년 이후에는 미강을 건강식품으로서의 인식이 새로워지면서 이들을 이용한 많은 가공 및 건강보조식품에 대한 연구가 진행되고 있음.

그러나 대부분의 연구는 미강의 유용성분 중 옥타코사놀 및 오리자놀, 토코트리에놀 등 한가지 성분이나 곰팡이, 효모, 균사체를 이용하여 생성되는 면역성분을 분리, 정제기술개발과 면역, 항암, 항산화 활성에 규명에 국한되어 있음

상업적인 경제성을 확보하기 위해서는 어떤 특정성분의 단일 분리방법 보다는 생물전화 기법을 이용한 발효와 연속적인 추출 및 가공공정의 확립을 통해 기능성이 강화된 미강발효추출물의 소재화 및 제품화 함으로써 미강의 부가가치를 올려 농경산업의 안정적인 발전을 도모할 수 있을 것으로 사료됨

인제대학교 연구팀은 탈지미강을 균으로 단시간 발효하고 가압물추출한 후 동결건조한 미강추출물(FRB)을 이용하여 혈전증을 일으키는 병리현상인 ADP유인 rat 혈소판응집반응에 미치는 효과를 검토한 결과, FRB는 ADP(10uM)유인 rat 혈소판의 응집을 농도 의존적으로 강하게 억제시켰음

이 미강 발효에 사용된 원료 미강은 배아를 포함한 것으로 미강함유 GABA도 발효추출물에 강화될 것임

이와 같은 결과는 더 강력한 균주 선별과 최적의 추출공정이 확립되어 본 연구가 성공적으로 수행된다면 미강발효추출물은 혈소판 응집이 매개하는 혈전증의 치료제 또는 예방제로서의 기능성식품 또는 의약품의 소재로 사용할 수 있을 것으로 사료됨

또한 뇌로 흐르는 혈류개선은 기억력 개선에 매우 중요한 인자이므로 그 메커니즘을 설명하는데 있어서 혈류개선 연구는 매우 중요함

따라서 효율적이고 경제적인 미강 발효 및 추출공정 확립으로 미강의 활용률을 높일 수 있으며, 추출물로 부터 항혈전, 항비만, 뇌기능 활성에 대한 기능성 물질의 본체 규명과 구조 결정기술, in vitro 및 vivo test, 활성성분의작용 기작 및 생체에서의 정확한 기능 파악으로 기능성 식품의 개발 또는 의약품 제재로서의 응용에 큰 진전을 보일 것으로 사료됨.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 주요내용

(1) 미강 발효공정과 유용성분 추출공정을 확립하고 가공적성에 따른 용도를 다양화 하고자 한다.

(2) 미강 유용성분 추출을 위한 대량 연속공정확립과 추출물을 이용한 건강기능성 식품을 개발한다.

(3) 미강 추출물의 ADP수용체 P_2Y_{12}의 $G_{\alpha i}$매개 혈소판응집 신호전달 표적분자 조절특이성을 규명한다.

(4) 미강 추출물의 ADP수용체 P_2Y_1매개 TXA_2생성관련효소의 활성억제특이성을 규명한다.

(5) 미강 추출물의 ADP수용체 P_2Y_1을 거쳐 일어나는 Ca^{2+}-의존성 혈소판응집 신호전달 표적분자 억제특이성을 규명한다.

(6) 미강발효 추출물의 뇌질환 예방 및 기능개선 응용을 위한 생리활성을 연구한다.

(7) 추출방법별 미강발효 추출물의 뇌질환 동물모델에서 예방 및 회복 효과를 조사한다.

(8) Compound X에 의한 뇌질환 예방 및 기능개선 응용을 위한 생리활성을 연구한다.

2. 연구개발의 범위

가. 미강 발효 및 추출공정 확립

(1) 전처리 조건 확립

(가) 탈지, 효소 불활성화

(2) 미강 발효조건 확립

(가) 발효균 선별

(나) 온도, 시간, pH, 배합비 등

(3) 유용성분 추출법 확립

(가) 화학적 및 물리적 처리에 따른 추출수율

(나) 경제성 및 효율성 고려

나. 연속적이고 순차적인 미강발효 및 추출공정 최적화와 추출물의 가공적성에 따른 용도 검토

(1) 추출물 제형별 규격설정

(2) 추출공정 및 유용물질 분리 조건 확립

(가) 주요 단위공정별 제한요건 확정

(나) 추출정도와 경제성에 기초한 공정 최적화
(3) 가공적성에 따른 용도 다변화
(가) 추출 성분별 가공적성 확립
(나) 용도별 가공조건 확립
(다) 공정설비 및 조건검토

다. 대량 연속공정 확립과 추출물을 이용한 건강기능성 식품개발
(1) 발효와 유효성분 분리공정 확립
(2) 소재의 가혹조건하 안정성 평가
(가) 고온다습조건 포함
(3) 뇌경색, 우울증과 인지능력 향상에 필요한 유효성분 정량화를 통한 규격 설정
(4) 추출물을 활용한 기능성 식품소재 및 제품개발
(가) 1차적으로 일반식품에 기능성 소재 첨가로 고부가가치화
(다) 2차적으로 기능성 소재 개별인정을 위한 기초자료 확보

라. ADP 수용체 P_2Y_{12}의 $G_{\alpha i}$ 매개 혈소판응집 신호전달 표적분자 조절특이성 규명
(1) $G_{\alpha i}$ 매개 신호전달 표적 측정
(가) 혈소판응집의 IC_{50} 측정
(나) Adenylate cyclase 활성에 미치는 영향 측정
(다) cAMP 생성 측정
(라) VASP 인산화 측정

마. ADP 수용체 P_2Y_1 매개 TXA_2 생성 관련 효소의 활성억제특이성 규명
(1) TXA_2 생성 측정
(2) 혈소판의 cytosol 및 microsomes 분리
(3) Microsomes의 marker enzyme의 측정
(4) COX-1 활성 측정
(5) TXA_2 synthase 활성 측정
(6)뇌기능개선모델 실험동물과 항혈전 상관관계 규명
(가) 혈소판응집 반응 측정
(나) 혈액응고 반응 측정

바. ADP 수용체 P_2Y_1을 거쳐 일어나는 Ca^{2+}-의존성 혈소판 응집 신호전달 표적분자 억제특이성 규명
(1) IP_3 receptor 인산화 측정
(2) Ca^{2+} 동원 측정
(3) Ca^{2+}-의존성 단백질(myosin light chain, pleckstrin) 인산화 측정
(4) Serotonin 방출 측정
(5) ATP 방출 측정
(6) 미강 추출물의 안전성 및 side effect 시험

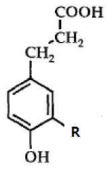
(가) 미강추출물 일정기간 투여 후 행동관찰, 외부 특이사항 관찰 확인
(나) 혈액 내 간독성 및 신장독성 관련인자 (AST, ALT LDH 등) 측정

사. 추출방법별 미강발효 추출물의 뇌질환 동물모델에서 예방 및 회복 효과 조사
(1) 뇌졸중동물모델에서 예방 및 기능개선 조사
(2) 우울증, 불안장애 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사

아. Compound X에 의한 뇌질환 예방 및 기능개선 응용을 위한 생리활성 연구
(1) 신경세포배양을 이용한 compound X(SCX/3)의 BDNF, NGF, GDNF, 신경회로, 항산화 유전자들의 발현에 대한 평가
(2) compound X(SCX/3)를 사용하여 뇌경색 모델에서 뇌세포 사멸, 신경회로망, 신경영양유전자 발현을 sham 대조군과 비교 평가
(3) 뇌경색 모델에서 Compound X(SCX/3)를 함유하는 L.w 추출물에 의한 인지 기능 평가

3. 연구수행 방법 및 구제척인 내용

연 구 범 위		연구수행방법 (이론적・실험적 접근방법)	구체적인 내용
제1세부과제	전처리 조건 확립	가열처리를 통한 오염세균 제거와 효소의 불활성화 D값을 가열온도별로 log(Cell count) vs time 관계를 이용하여 구함	미강원료의 품질 안정화를 위하여 가열시 D값을 산출하였음 100℃에서 D값 = 7.56분, 121℃에서 D값 =1.08분
	유용성분 추출법 확립	미강단순 추출과 발효추출물의 지표물질을 선정 - GABA와 ferulic acid 제 2와 3세부과제 결과와 연계하여 결정	미강발효 추출물의 GABA와 ferulic acid 함량 profile과 제 2와 3세부과제 결과를 비교분석하여 GABA를 지표물질로 선정하였으며, 초고압추출로 지표물질 추출수율을 증진시켰음
	발효조건 확립	발효미생물 선별과 동정, 실험을 통한 최적의 배양조건 확인	분리균주 Lw가 제2, 3세부과제에서 우수한 효과를 도출하였으며, 이를 동정하여 특허기탁하였음(KFCC 11556P) 발효공정조건은 고형물 비 1:9, 35℃, 24시간, 120rpm
	복합발효균주를 이용한 유용성분 증진공정	복합발효균주로서 기존의 L.p와 L.w외 L.k균주의 조합효과 평가	복합발효균주를 사용하였을 경우 단일균주로만 발효했을 때 보다 GABA수율 증진 효과가 있었음 미강배지에 MSG 1%를 첨가한 경우 현저한 GABA생산증진 효과가 있었음 Compound X는 L.w 발효물에만 존재하며, 이의 수율은 ferulic acid 첨가로 크게 높일 수 있었음
	단위공정 설계 평가와 공정설비 및 조건조사	미강원료 안정성 확보단계부터 발효추출 단위공정별 물질수지 평가 후 기본공정 설계	미강발효추출물의 제품화를 위하여 원료의 안정성확보단계부터 발효추출 단위공정별 물질수지 평가 및 기본공정설계를 작성하였음.

제1세부과제	Ferulic acid 대사산물인 compound X의 분리 및 특성 규명	미강발효추출물을 분획하여 얻은 Sample을 이용하여 TLC와 HPLC를 이용하여 compound X의 특성 규명	 HPLC retention time과 spectra를 ferulic acid 대사물질들과 비교하여 기본구조를 확인하였음
	미강 발효공정 최적조건 설정과 추출물의 가공적성에 따른 용도검토	발효기 사용한 미강발효 최적조건수립 미강 발효추출물의 가공적성에 따른 용도검토를 위하여 초고압, 열처리, pH변화 등에 따른 GABA함유량을 비교분석	발효기사용 최적조건은 미강 고형물비 1:10, 온도 35℃, 교반조건 0~100rpm 미강발효추출물에 함유된 GABA는 열처리는 121℃에 30분, pH조건은 pH4-7, 초고압은 2000psi에 10분 처리에도 안정하였음
	발효와 유효성분 분리공정 확립	미강 발효 공정과 유용성분을 분리하는 공정 최적화 및 공정도 작성	발효공정을 RSM 분석법을 이용하여 공정 최적화 모델을 정하고, 실측치로 확인하였음 활성성분 고함유 소재와 저함유 소재로 구분한 분리공정 설계, 확인하였음
	소재의 가혹조건하 안정성 평가	개발된 소재의 지표물질이 생산공정 중 가혹조건에서 안정성 유무 분석	지표물질인 페룰산은 낮은 pH 조건에서 고압, 고온 처리에서도 안정성을 나타내어 공정과정 중 실활의 우려는 없는 것으로 판단됨
	유용성분 정량화를 통한 규격설정	기능성 유용성분의 정성 및 정량화를 통한 제품화 규격 확립	HFA 기준으로 하여 복강투여한 동물실험에서 유효량을 기준으로 하여 성인 기준 하루 투여량을 결정하였음 이를 기준으로 각 소재의 HFA 함량에 따른 제품화가 가능하게 되었음
	식품소재 및 제품 개발	일반식품에 기능성 소재 첨가 및 기능성 소재 개별인정을 위한 기초자료 확보	소재화 제품으로서, 분무건조, 동결건조, 농축액 형태로 개발하였음 HFA 강화된 요구르트분말형 제품을 개발하였음 HFA 함유 소재를 동물식이에 혼합하여 뇌경색 예방효과를 확인하였음

제2세부과제	혈소판 응집의 IC_{50} 측정	Collagen, thrombin, ADP가 유도한 응집반응 측정 Aggregometer를 이용한 light transmission 증가로 혈소판 응집반응 측정 후 각 시료의 응집억제율 계산으로 미강의 항혈소판작용 평가	미강발효추출물 Lw는 collagen 및 thrombin에 의해 응집된 혈소판에서 분비되는 ADP에 의한 혈소판응집반응을 강하게 억제시켰다
	Adenylate cyclase 활성에 미치는 영향 측정	adenylate cyclase inhibitor (SQ22536) 이용 혈소판 응집반응 시 미강과 SQ22536을 함께 처리하여 응집율 변화에 따른 영향 확인으로 AC활성의 촉진효과 및 cAMP 생성평가와 항혈소판작용 평가	미강발효추출물은 [AC의 활성화 → cAMP의 생성증가 → A-kinase의 활성화 → VASP(Ser^{157}) 인산화]라는 혈소판응집억제 pathway를 통해 ADP유인 혈소판응집억제 반응에 관여.
	cAMP 및 cGMP의 생성측정	혈소판 응집반응 시 미강을 농도별로 처리하여 반응정지 후 각 반응별로 생성된 cAMP 생성량을 EIA kit를 이용하여 측정. 이것의 증가로 미강의 항혈소판작용 평가	Lw 미강발효추출물은 대조군에 대한 cAMP 증가량이 105%, AC활성은 192.7이었음
	VASP-p 측정	혈소판 응집반응 시 미강을 농도별로 처리한 후 반응정지 후 단백질을 분리하여 VASP의 인산화를 Western blot으로 확인하여 미강의 항혈소판작용 평가 (인산화 증가 시 응집반응 억제됨)	미강추출물 RB(, Lp, Lp+Lw 및 Lw는 각각 ADP 유인 혈소판응집반응에서 VASP(Ser^{157})의 인산화를 촉진시켰음
	TXA_2 생성 측정	ADP가 유도한 응집반응 후 생성된 thromboxane A_2 (TXA_2)를 EIA kit로 측정하여 미강의 항혈소판작용 평가	미강발효추출물 Lw는 ADP에 의해 응집된 혈소판에서 생성되는 TXA_2를 강하게 억제시켰음
	혈소판의 cytosol 및 microsomes 분리	혈소판 부유액을 lysate하여 ultracentrifuge를 이용하여 각 fraction을 분리	혈소판 부유액을 lysate하여 ultracentrifuge를 이용하여 각 fraction을 분리하였음
	Microsomes의 marker enzyme의 측정	microsome marker enzyme인 cytochrome c reductase를 측정함으로써 분리된 fraction이 microsome임을 증명	각각 분리된 fraction을 western blot (anti-COX-1, anti-TXAS)으로 확인하였다 cytochrome c reductase activity 측정결과 분리된 microsome fraction임을 증명하였음
	COX-1 활성 측정	microsome fraction을 sample로 하여 COX-1 fluoroscent activity kit를 이용하여 미강추출물의 효과 평가	미강발효추출물 Lw는 COX-1 activity를 농도의존적으로 억제시켰음
	TXA_2 synthase 활성 측정	microsome fraction을 sample로 하여 thromboxane A_2 synthase (TXAS) activity에 미치는 미강추출물의 효과 평가	미강발효추출물 Lw는 TXAS activity를 억제하지는 않았음
	뇌기능개선실험 종료시점에 혈액채취하여 혈소판응집 반응과 혈액응고 비교평가	제3세부과제 실험 종료 후 rat으로부터 혈액을 채취하여 혈소판 응집반응과 혈액응고 반응 측정	Collagen, ADP, Thrombin에 의해 유도된 혈소판응집반응을 억제하였고, 응고반응 역시 시료 미투여군에 비해 응고시간이 연장되는 결과를 보였음.

제2세부과제	$[Ca^{2+}]_i$ 동원 측정	ADP가 유도한 응집반응 중 세포질로 동원되는 Ca^{2+}와 Fura-2의 결합복합체로부터 나오는 형광강도를 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 측정	미강발효추출물 Lw는 ADP에 의해 동원한 $[Ca^{2+}]_i$를 억제시켰음
	IP_3 receptor 인산화 측정	ADP가 유도한 응집반응 후 lysis 후 western blot으로 확인	미강발효추출물 Lw는 IP_3 receptor를 농도의존적으로 인산화시켰음
	Ca^{2+}-의존성단백질 (MLC, pleckstrin) 인산화 측정	ADP가 유도한 응집반응 후 lysis 후 western blot으로 확인 PKC activity kit로 확인	미강발효추출물은 ADP에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 동원 → MLC의 인산화(MLC-p) → pleckstrin 인산화(pleckstrin-p) → serotonin/ATP release 촉진 → 혈소판응집반응 촉진 → 혈전의 강화하는 일련의 ADP매개 혈소판응집분자의 활성을 억제시켰음
	ATP 및 serotonin 방출 측정	ADP가 유도한 응집반응 후 방출된 ATP 및 serotonin을 EIA kir로 확인	미강발효추출물 Lw는 ADP에 의해 증가한 ATP 및 serotonin 방출을 농도의존적으로 억제시켰음
	안정성 및 side effect 시험	미강추출물을 일정기간 복강투여 후 행동관찰, 외부 특이사항 관찰, 해부를 통한 장기 손상 유무 확인	체중증가량은 감소하였지만 장기무게 변화는 차이가 없음 행동변화, 특이사항 관찰되지 않았음
		혈액 내 간독성 및 신장 독성 관련 인자 (AST, ALT, LDH 등) 측정	대부분의 인자는 차이를 보이지 않았지만 고농도 투여시 AST, LDH가 상승
제3세부과제	뇌졸중 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사	MCAO 기법으로 뇌졸중을 유도하여 24시간 뒤와 3일째 되는날 mNSS 행동평가를 한다. MCAO 수행 후 3일째 TTC염색을 하며, 뇌조직을 얻어 RT-PCR, TUNEL assay, IHC assay를 한다.	MCAO 수행 3일째에 발효미강(L.p, L.p+L.w, L.w) 추출물 처리군은 Infarct volume이 크게 감소하였으며, 항산화 유전자인 PDI, Nrf2가 증가되었고, 신경조절물질인 BDNF, NGF, GDNF 또한 증가하였다 또한 기능행동회복에서 Lp+Lw군과 Lw군의 행동평가가 유의적으로 개선
	우울증 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사	Restraint Stress를 2주 동안 매일 4시간씩 시행하여 우울증과 불안장애를 유도한다. Restraint Stress가 끝나는 날 FST와 EPM 행동평가를 시행하고, 뇌조직을 얻어 RT-PCR, TUNEL assay, IHC assay를 한다.	우울증 행동평가인 Forced Swimming Test(FST)를 통해 발효미강추출물에서 immobility time이 줄어듦을 확인하였다. 그리고 불안장애 행동평가인 Elevated Plus Maze test(EPM)에서도 발효추출물을 처리한 실험동물이 open arms time이 증가함을 확인하였다. 따라서 발효미강추출물(L.w)은 우울증과 불안장애와 같은 실험동물에서 행동평가의 향상효과가 있음을 검증
	불안장애 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사		

제3세부과제	뇌졸중 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사	MCAO 기법으로 뇌졸중을 유도하여 24시간 뒤와 3일째 되는날 mNSS 행동평가를 한다. MCAO 수행 후 3일째 TTC염색을 하며, 뇌조직을 얻어 RT-PCR, TUNEL assay, IHC assay를 한다.	MCAO 수행 3일째에 발효미강(L.p, L.p+L.w, L.w) 추출물 처리군은 Infarct volume이 크게 감소하였으며, 항산화 유전자인 PDI, Nrf2가 증가되었고, 신경조절물질인 BDNF, NGF, GDNF 또한 증가하였다 또한 기능행동회복에서 Lp+Lw군과 Lw군의 행동평가가 유의적으로 개선
	우울증 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사	Restraint Stress를 2주 동안 매일 4시간씩 시행하여 우울증과 불안장애를 유도한다. Restraint Stress가 끝나는 날 FST와 EPM 행동평가를 시행하고, 뇌조직을 얻어 RT-PCR, TUNEL assay, IHC assay를 한다.	우울증 행동평가인 Forced Swimming Test(FST)를 통해 발효미강추출물에서 immobility time이 줄어듦을 확인하였다. 그리고 불안장애 행동평가인 Elevated Plus Maze test(EPM)에서도 발효추출물을 처리한 실험동물이 open arms time이 증가함을 확인하였다. 따라서 발효미강추출물(L.w)은 우울증과 불안장애와 같은 실험동물에서 행동평가의 향상효과가 있음을 검증함
	불안장애 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사		
	미강열수 추출물과 미강발효 추출물을 사용하여 뇌경색 모델에서 뇌세포사멸, 신경회로망, 신경보호 유전자 발현을 sham 대조군과 비교평가	MCAO 기법으로 뇌졸중을 유도하여 24시간 뒤와 3일째 되는날 mNSS 행동평가를 한다. MCAO 수행 후 3일째 TTC염색을 하며, 뇌조직을 얻어 RT-PCR, TUNEL assay, IHC assay를 측정	항산화 유전자인 PDI, Nrf2가 증가됨을 확인하였다. 또한 신경조절물질인 BDNF, NGF, GDNF 등이 증가 뇌졸중에 의한 apoptotic cells의 수를 측정한 결과, 미강발효추출물을 처리한 실험동물의 대뇌피질과 선조체에서 감소 Immunohistochemistry를 이용하여 미강발효추출물을 처리한 실험동물에서 해마의 신경세포들이 증가 synaptophysin과 GABA 신경세포를 증가
	우울증 모델의 해마에서 뇌세포사멸, 신경회로망, 관련 유전자 발현을 양성대조군 fluoxetine 그룹과 비교	Restraint Stress를 2주 동안 매일 4시간씩 시행하여 우울증과 불안장애를 유도한다. Restraint Stress가 끝나는 날 FST와 EPM 행동평가를 시행하고, 뇌조직을 얻어 RT-PCR, TUNEL assay, IHC assay를 측정	스트레스호르몬인 Corticosterone을 감소시켰으며 행동평가의 향상 효과가 있음 Restraint stress에 의해 유도된 우울증/불안장애의 apoptotic cells의 수를 측정한 결과, L.w 그룹에서 Hippocampus의 DG, CA1과 CA3부위에서 감소 synapse marker인 synaptophysin과 5-HT가 증가 우울증/불안장애에서 L.w에 의한 기능회복 효과를 실험을 통하여 확인
	뇌경색 모델에서 천마추출물의 혼합 효과 평가	뇌질환의 효과적인 치료효과를 보인다고 알려진 천마추출물인 HBA를 L.w와 혼합 처리하여 허혈성 뇌졸중에서의 치료 효과를 확인하기 위해 infarct volume 측정과 TTC염색, 그리고 신경학적 기능평가인 mNSS를 실시	L.w와 HBA+L,w처리 그룹간의 큰 차이는 없었음 행동기능검사인 mNSS를 시행 결과, L,w와 HBA+L,w 처리군의 행동 평가에서 큰 차이가 없었음

Ⅳ. 연구개발 결과

이 연구에서는 1) 미강 발효 및 추출공정 확립과 건강기능성 식품 및 제품화, 2)미강발효추출물이 ADP수용체가 매개하는 혈전증병리현상인 혈소판응집 신호전달 표적의 억제특이성 규명, 3) 미강발효추출물의 뇌질환 예방 및 기능개선 응용을 위한 생리활성 연구를 수행하였다.

첫 번째로, 미강 발효 및 추출공정 확립과 건강기능성 식품 및 제품화는 아래와 같다.

1) 미강원료의 품질 안정화를 위한 전처리 조건을 확립하기 위해 가열처리를 통한 오염세균 제거와 효소의 불활성화를 D값을 가열온도별로 log(Cell count) vs time 관계를 이용하여 산출하였고, 유용성분 추출법 확립을 위해 미강발효 추출물의 GABA와 ferulic acid 함량 profile과제 2와 3세부과제 결과를 비교 분석하여 GABA를 지표물질로 선정하였으며, 초고압추출로 지표물질 추출수율을 증진시켰으며, 분리균주 Lw가 제2, 3세부과제에서 우수한 효과를 도출하였으며, 이를 동정하여 특허기탁하였다(KFCC 11556P).
2) 복합발효균주를 이용한 유용성분 증진을 위해 그존 L.p와 L.w외 L.k 균주와의 조합효과를 평가한 결과 단일균주로만 발효했을 때 보다 GABA수율 증진효과가 있었으며, 미강배지에 MSG 1%를 첨가한 경우 현저한 GABA 생산증진효과가 있었습니다. 특히, Compound X는 L.w 발효물에만 존재하며, 이의 수율은 ferulic acid 첨가로 크게 높일 수 있었다.
3) 미강발효추출물의 제품화를 위하여 원료의 안정성확보단계부터 발효추출 단위공정별 물질수지 평가 및 기본공정설계를 작성하였고, 미강발효추출물을 분획하여 얻은 Sample을 이용하여 TLC와 HPLC 분석을 통해 compound X의 특성 규명하였으며, HPLC retention time과 spectra를 ferulic acid 대사물질들과 비교하여 기본구조를 추정하였다.
4) 발효기 사용한 미강발효 최적조건수립 미강 발효추출물의 가공적성에 따른 용도검토를 위하여 초고압, 열처리, pH변화 등에 따른 GABA함유량을 비교분석한 결과, 발효기사용 최적조건(미강 고형물비 1:10, 온도 35℃, 교반조건 0~100rpm)을 확립하였고, 미강발효추출물에 함유된 GABA는 열처리는 121℃에 30분, pH조건은 pH 4-7, 초고압은 2000psi에 10분 처리에도 안정하였다.
5) 발효공정의 최적화를 위하여 3가지 factor와 3단계 level로 실험하여 RSM 분석을 실시하였다. 그 결과, 0.0545% 페룰산을 첨가한 미강배지에서 발효온도 34.4℃, 발효시간 45.84시간으로 발효를 마치면 HFA가 최대치인 142.4mg/L 생산되는 것으로 예측하였다. 동일 조건에서 미강발효를 실시하여 HFA 생산량을 측정한 결과, 148.2mg/L였다. 이로써 최적화 모델식이 HFA생산량을 성공적으로 예측하고 있음을 추정할 수 있었다. 또한 유효성분 분리공정을 두 종류의 소재를 모델로 하여 설계, 시험하여 유효성분의 함량에 따라 고HFA 소재와 저HFA소재로 생산하였다. 또한 소재의 지표성분에 대한 공정 중 가혹조건하 안정성 시험을 하였고, 이의 안정성을 확인하였다.
6) Rat을 실험동물로 하여 복강주사로 뇌경색 예방과, 우울증 경감효과 및 인지능력 향상 실험

을 한 결과 1회 복강으로 주입한 HFA는 0.055mg이었으며 이때 rat의 평균 체중은 250g이었다. 체중이 60kg인 성인을 기준으로 한 유효투여량은 아래 계산에 따라 2.14mg HFA이다. 이러한 기준으로 뇌경색 예방모델에 실시한 식이실험의 결과는 복강실험의 결과와 일치하였다.

7) 농축 미강발효액 (Brix 28%)을 말토덱스트린 (DE 22, 10, 5)와 2:1의 비율로 혼합하여 분무건조하여 소재화하였다. 입구 온도 180·℃, 출구 온도 80℃로 하였으며 분사속도는 8,525rpm이었다. 분무건조분말의 bulk density는 0.776, 수분함량은 3.63%였다. 농축 미강발효액을 동결건조하여 소재화 하였다. 동결온도, -47 ℃; 진공도, 18 Pa; 건조시간, 48시간으로 처리하였으며, 동결건조분말의 bulk density는 0.694이고, 수분함량은 8.97%였다. 미강발효 소재가 가장 쉽게 시장에 진입하는 모델제품으로 우유나 쥬스에 혼합하여 음용하는 분말요구르트형 제품을 설계하였다. 분무건조분말 또는 동결건조 분말을 사용할 수 있는데, 요구르트형 제품에는 부형제가 들어있지 않은 동결건조분말을 주 재료로 사용하였다.

두 번째로, 미강발효추출물이 ADP수용체가 매개하는 혈전증병리현상인 혈소판응집 신호전달 표적의 억제특이성 규명의 연구결과는 아래와 같다.

1) ADP는 adenylate cyclase(AC)의 활성을 억제시킴으로써 ATP로부터 cAMP의 생성을 억제시킨다. 이것은 IP_3 receptor가 매개하는 $[Ca^{2+}]_i$의 증가와 깊은 연관성을 가지고 있다. 하지만 Lw는 cAMP의 생성을 증가시키고(1차년도 연구결과), 이것을 이용하여 IP_3R을 인산화시킴으로써 $[Ca^{2+}]_i$의 동원을 억제시킨다(3차년도 연구결과). 또한 Lw가 증가시킨 cAMP는 VASP를 인산화시켜 혈소판응집반응을 억제시켰다(1차년도 연구결과).

2) 혈소판의 세포질에 동원된 $[Ca^{2+}]_i$은 myosin light chain kinase (MLCK)와 PKC의 활성을 촉진시킨다. MLCK의 활성촉진에 의해 myosin light chain (MLC)가 MLC-p로 인산화된다. PKC의 활성촉진에 의해 pleckstrin이 pleckstrin-p로 인산화된다. 인산화된 MLC-p와 pleckstrin-p는 serotonin/ATP release 반응에 관여하여 혈소판응집을 촉진시킴으로써 혈전형성을 강화시킨다. 그러나, Lw는 ADP에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 동원 → MLC의 인산화(MLC-p) → pleckstrin 인산화(pleckstrin-p) → serotonin/ATP release 촉진 → 혈소판응집반응 촉진 → 혈전의 강화하는 일련의 ADP매개 혈소판응집분자의 활성을 억제시켰다(3차년도 연구결과)

3) 또한, ADP는 cyclooxygenase-1 (COX-1)의 활성을 촉진시켜 arachidonic acid로부터 혈소판응집촉진분자인 thromboxane A_2 (TXA_2)의 생성을 촉진시킨다. 그러나, Lw는 COX-1의 활성을 억제시킴으로써 TXA_2의 생성을 억제시켜 항혈소판작용을 가진다는 것을 명확히 했다.

4) Lw를 rat의 복강으로 투여한 후 얻은 혈소판과 혈장으로 혈소판응집반응과 혈액응고반응에 미치는 영향을 조사한 결과, Lw 투여에 의해 혈액응고가 억제되고, 혈소판응집반응 또한 억제되었다(2차년도 연구결과, 3세부과제와의 연관성 확인).

5) Lw를 rat의 복강으로 투여한 후 혈액중의 안전성평가지표(각종 질환 관련 지표)를 측정한 결과, 간질환, 심장질환, 근육/골격근질환, 췌장질환, 신장질환 관련 지표는 혈액 중에 증가하지 않았다. 즉, 간, 심장, 근육/골격근, 췌장 및 신장의 기능을 정상적으로 유지시킨다(3차년도

연구결과). 또한, Lw 투여시 food intake와 체중증가분의 감소를 통해 Lw가 체중을 감소시키는 다이어트 효과를 가져올 수 있다고 생각된다(3차년도 연구결과).

세 번째로, 미강발효추출물의 뇌질환 예방 및 기능개선 응용을 위한 생리활성 연구 결과는 아래와 같다.

1) 뇌졸중 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사에서는 허혈성 뇌졸중이 발생되면 infarct이 생성됨과 동시에 여러 가지 항산화 유전자와 신경조절물질들이 감소하게 된다. 또한, apoptosis가 증가하게 되며 따라서 neuronal cell death가 일어난다. 미강열수추출물(RB)을 이용해 뇌졸중의 신경학적 기능 회복을 검증하였다. 허혈성 뇌졸중의 infarct이 감소됨을 TTC염색을 통해 확인되었고, RT-PCR을 통하여 항산화 유전자인 PDI, Nrf2가 증가됨을 확인하였다. 그리고 신경조절물질인 BDNF, NGF, GDNF 또한 증가함을 보였다. 뇌졸중에 의한 apoptotic cells의 수를 측정한 결과, 미강열수추출물을 처리한 실험동물의 cortex와 striatum에서 감소함을 보였다. 그리고 Immunohistochemistry를 통해 신경세포를 해마에서 detection한 결과, 미강열수추출물을 처리한 실험동물에서 신경세포들이 증가함을 나타내었다. 미강열수추출물의 구성성분 중의 하나인 Ferulic acid(FA)는 항산화 증진효과가 있음을 나타낸 논문들이 있다. 이를 통해 실험동물에 각각 처리된 미강열수추출물과 FA가 신경학적 기능회복에 효과를 실험을 통하여 확인하였다. 그리고 발효미강추출물(L,p, L.p+L.w, L.w) 또한 뇌졸중의 infarct과 행동평가에서 신경학적 기능회복을 검증하였다.

2) 우울증 / 불안장애 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사에서는 Restraint stress를 통해 유도된 우울증/불안장애 실험동물에서 미강열수추출물과 발효미강추출물(L.w)이 행동평가에서 회복이 있었다. 우울증 행동평가인 Forced Swimming Test(FST)를 통해 발효미강추출물에서 immobility time이 줄어듦을 확인하였다. 그리고 불안장애 행동평가인 Elevated Plus Maze test(EPM)에서도 발효추출물을 처리한 실험동물이 open arms time이 증가함을 확인하였다. 따라서 발효미강추출물(L.w)은 우울증과 불안장애와 같은 실험동물에서 행동평가의 향상효과가 있음을 검증하였다.

3) 세포배양을 이용한 Compound X(SCX/3)의 BDNF, NGF, GDNF, 신경회로, 항산화 유전자들의 발현에 대한 평가 는 SCX/3의 주요 성분이 dFA임을 밝혀냈다. SCX/3, FA, dFA에서 생존율이 통계적으로 유의하게 높았고 dFA가 생존율이 제일 높다. dFA를 농도별로 처리하였을 때 50μM까지 점차적으로 생존율이 높았다.

4) Compound X(SCX/3)를 사용하여 뇌경색 모델에서 뇌세포 사멸, 신경회로망, 신경영양유전자 발현을 sham 대조군과 비교 평가는 SCX/3를 쥐의 복강에 3일간 주사한 후 흰 쥐 뇌 손상은 통계적으로 유의하게 줄어들었으며 이에 따른 신경 기능 회복은 유의하게 개선되었다. L.w에 의하여 뇌세포 사멸은 감소하였으며 신경회로망 관련 유전자인 SYP, ChAT, DCX등의 발현은 증가하였다

5) 뇌경색 모델에서 Compound X(SCX/3)를 함유하는 L.w 추출물에 의한 인지 기능 평가는

MCAO 수행 후 흰 쥐를 water maze test하였을 때 positive control인 DPZ와 L.w group은 vehicle group보다 통계적으로 유의하게 escape latency가 감소하였고, retention time이 증가하였다. 또 NOR test를 하였을 때 DPZ와 L.w group은 vehicle group보다 새로운 물체를 탐색하는 시간이 더 많았다. L.w는 뇌경색 흰 쥐의 학습과 기억을 개선시킨 것으로 추측된다.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 논문 및 학술발표 실적

구분	논문명	잡지 또는 학회명
논문(SCI)	Neuroprotective effect of rice bran extract supplemented with ferulic acid in the rat model of ischemic brain injury	Animal Cells and Systems 2014, 18(2): 93-100
논문(KCI)	Inhibitory Effects of Water Extract from Rice Bran Due to cAMP-dependent Phosphorylation of VASP (Ser^{157}) on ADP-induced Platelet Aggregation	Biomedical Science Letters 2014, 20(3): 129~138
논문(KCI)	Effects of Rice Bran Extracts Fermented with Lactobacillus plantarum on Neuroprotection and Cognitive Improvement in a Rat Model of Ischemic Brain Injury	Biomedical Science Letters 2015, 21(2): 92~102
논문(KCI)	Inhibitory Effects of Rice Bran Water Extract Fermented *Lactobacillus plantarum* due to cAMP-dependent Phosphorylation of VASP(Ser^{157}) on human Platelet Aggregation	Biomedical Science Letters 2015, 21(2): 103~114
학술발표	Antiplatelet Effects of Hot Water Extract from Rice Bran *via* Elevation of cAMP production and phosphorylation of Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein(VASP-Ser^{157}) on ADP-induced Human Platelet Aggregation	2013 제19회 대한의생명과학회 추계학술개회
학술발표	Inhibitory effects of water extract from rice bran fermented with *Lactobacillus plantarum* Hong on activity of thromboxane A_2 production-associated microsomal enzymes	2014 제20회 대한의생명과학회 추계학술개회
학술발표	Water, and ethyl acetate-extract from rice bran fermented with *Lactobacillus plantarum* Hong inhibit platelet aggregation and blood coagulation	2014 제20회 대한의생명과학회 추계학술개회
학술발표	The Effect of Fermentation of Rice Bran Extract by Lactobacillus plantarum KCCM 12116 on the Antioxidant Activity	2013 한국약용작물학회 춘계학술대회
학술발표	Comparison of Rice Bran Extraction and Fermentation Method for Increased Yield of GABA	2013 International Conference on Natural Products for Agriculture

학술발표	Optimum Condition for Fermentation of Rice Bran for GABA Production Using Lactobacillus plantarum	2013 International Conference on Natural Products for Agriculture
학술발표	Neuroprotection and Functional Recovery of Rice Bran Extracts Fermented by Lactobacillus plantarum in the Rat Model of Ischemic Brain	2013 International Conference on Natural Products for Agriculture

3. 특허 실적

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	미강 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0065155
2013	미강 발효 추출물을 유용성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0116649
2014	미강 발효 추출물을 유용성분으로 포함하는 뇌졸중 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0054874
2014	미강 발효 추출물을 유용성분으로 포함하는 우울증 또는 인지장애의 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0062111

4. 연구인력 활용 및 양성 성과

총인원	대상(학위별, 취득자)		성별	
	박사	석사	남	여
4	2	2	2	2

5. 연구개발결과의 활용방안 및 기대성과

가. 활용방안

(1) 미강발효 추출물의 기능성을 규명함으로서 새로운 기능성 식품소재를 우리나라 식품산업에 도입이 가능하다.

(2) 부산물활용 기술은 생리활성 생산뿐만 아니라 다른 대상 물질생산에도 적용이 가능할 것으로 추후 기술적용 대상물질을 확대 선정하여 부산물 활용기술을 확대할 수 있다.

(3) 지금까지 원료로부터 용매 등을 이용한 단순 유용물질 추출에만 국한되었던 유용물질 획득 방식에 생물전화 기법에 기초한 발효를 행함으로써 기능성이 강화된 미강관련 제품화가 가능하다.

(4) 최적생산 공정기술을 개발함으로써 고부가가치의 기능성 가공제품의 생산성을 향상시켜 산업화를 이루는데 커다란 기여가 가능하다.

나. 기대성과

(1) 미강의 다양한 성분들을 그대로 또는 물리, 화학적 특성에 따라 식품소재, 의약품, 향장품의 원료로 정제, 가공할 수 있는 기술확보가 가능하다.

(2) 미강유 제조 시 다량의 부산물이 생성되는바 이의 폐기에는 환경오염과 비용이 수반되지만 미강부산물을 발효와 추출, 분리, 정제하여 식품소재 및 화장품 소재로 활용하므로서 산업적 애로를 해결할 수 있다.

(3) 미강발효추출물로부터 항혈전, 항비만, 뇌기능 활성물질을 활용하여 건강기능성 식품으로 개발하여 국제 경쟁력을 가질 수 있고 세계시장으로 진출 가능하다.

(4) 개발된 추출공정 기술의 기술이전을 통한 사업화 실현가능하며, 특허를 통한 지적재산권 취득으로 시장 매출증대에 기여하고 타 기술의 발전 등 산업발전에의 효과가 있다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Anti-thrombotic and brain function improving activities of rice bran fermentation extract and development functional materials and products

Ⅱ. The purpose and necessity of research and development

Rice bran is a thin layer of brown rice which make up approximately 8-10% of the rough rice weight. The rice bran layer is a rich source of steryl ferulate esters, commonly referred to as oryzanols. This layer part is the most nutritious, rich of phytochemical compounds, and most commonly used in animal feed or as a food ingredient due to its high nutritional content. In addition, rice bran is a potential source of tocopherols, tocotrienols, and phenolic compound. These bioavailable materials have shown a potential for antioxidant activity

As interest in value-added processing research grows, attempts are being made to increase the value of agricultural crop by products, including rice bran, by increasing their pharmaceutical or nutraceutical potential. The properties like a good source of antioxidant properties and others of rice bran was revealed in many studies. Therefore, it is generally assumed that rice bran might be a potential raw material sources to make a value-added product of improving human health

Ⅲ. Scope and content of this study

- part 1

1. The purpose of this study
   (1) Development of functional components extraction and fermentation process to rice bran by using bioconversion method

2. The main contents of this study
   (1) Development of extraction and fermentation process to rice bran
   (2) Establishment of optimal condition of sequential fermentation and extraction, investigation of processing quality about rice bran extracts

(3) Establishment of manufacturing process of rice bran extracts, development of functional food ingredients and products using rice bran extracts

3. The range of this study

가. Development of extraction and fermentation process to rice bran

(1) Pre-treatment method of rice bran

(2) Investigation of fermentation condition of rice bran

(3) Investigation of function components extraction method of rice bran

나. Establishment of optimal condition of sequential fermentation and extraction, investigation of processing quality about rice bran extracts

(1) Optimization of operation conditions of fermentation and extraction process

(2) Diversification of utilization of fermented rice bran extracts by processing quality

다. Establishment of manufacturing process of rice bran extracts, development of functional food ingredients and products using rice bran extracts

(1) Establishment of manufacturing process of rice bran extracts

(2) Development of commercial products using fermented rice bran extracts

- part 2

1. The purpose of this study

(1) Elucidation of inhibitory specificity of rice bran extract for target molecules of signal transduction in ADP-induced platelet aggregation, a phenomena of thrombosis

2. The main contents of this study

(1) Elucidation of inhibitory specificity of rice bran extract for target molecules of signal transduction in ADP receptor P_2Y_{12} $G_{\alpha i}$-mediated platelet aggregation

(2) Elucidation of inhibitory specificity of rice bran extract on thromboxane A_2 production associated enzymes in ADP receptor P_2Y_1-mediated platelet aggregation

(3) Elucidation of inhibitory specificity of rice bran extract for target molecules of Ca^{2+}-dependent signal transduction in ADP receptor P_2Y_1-mediated platelet aggregation

3. The range of this study

가. Elucidation of inhibitory specificity for target molecules of signal transduction in ADP receptor P_2Y_{12} $G_{\alpha i}$-mediated platelet aggregation

(1) Measurement of target molecules in $G_{\alpha i}$-mediated platelet aggregation

(가) Determination of IC_{50} value in platelet aggregation

(나) Effect on adenylate cyclase activity

(다) Measurement of cAMP production

(라) Western blot analysis of VASP phosphorylation

나. Elucidation of inhibitory specificity on thromboxane A_2 production associated enzymes in ADP receptor P_2Y_1-mediated platelet aggregation

(1) Measurement of thromboxane A_2 production

(2) Isolation of platelet cytosolic and microsomal fraction

(3) Measurement of marker enzyme of microsomes

(4) Measurement of COX-1 activity

(5) Measurement of TXA_2 activity

(6) Elucidation of correlation between anti-thrombotic and brain function improving activities

(가) Measurement of platelet aggregation

(나) Measurement of blood coagulation

다. Elucidation of inhibitory specificity for target molecules of Ca^{2+}-dependent signal transduction in ADP receptor P_2Y_1-mediated platelet aggregation

(1) Western blot analysis of IP_3 receptor phosphorylation

(2) Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ mobilization

(3) Measurement of phosphorylation of Ca^{2+}-dependent protein (myosin light chain, pleckstrin)

(4) Measurement of serotonin release

(5) Measurement of ATP release

(6) Safety and side effect assessment of rice bran extract

(가) Observation of behavior and external change after intraperitoneal administration of rice bran extract

(나) Blood analysis of disease-related parameters

- part 3

1. The purpose of this study

(1) This work aimed to study whether rice bran extract fermented with *Lactobacillus plantarum* (L.w) promotes functional recovery and anxiolytic/antidepressive effects reduces cognitive impairment after ischemic brain injury.

2. The main contents of this study

(1) The effect of fermented rice bran extract on the animal model of brain diseases.

(2) The effect of compound X, an active fraction of fermented rice bran extracts on the neural cells and animal model.

3. The range of this study

가. The effect of fermented rice bran extract on the animal model of brain diseases.

(1) Effects of Rice Bran Extracts Fermented with *Lactobacillus plantarum* on Neuroprotection in a Rat Model of Ischemic Brain Injury
(2) Anxiolytic/Antidepressive effects of Rice Bran extracts fermented with *Lactobacillus plantarum* Hong in rats exposed to repeated Restraint Stress

나. The effect of compound X, an active fraction of fermented rice bran extracts on the neural cells and animal model.
(1) The effect of compound X on the apoptosis and neural gene expressions.
(2) Effects of Rice Bran Extracts containing Compound X Fermented with *Lactobacillus plantarum* on Cognitive Improvement in a Rat Model of Ischemic Brain Injury

Ⅳ. Results

- part 1

1) From these results we conclude that the fermentation of rice bran by *Lactobacillus plantarum* KCCM 12116 (LP) and *Lactobacillus plantarum* KFCC 11556P (LW) starter cultures showed significantly increase on antioxidant assay values (TPC, DPPH, FRAP, and ORAC) compared to non-fermented rice bran. *In vivo* experiment was also confirmed that the rice bran fermented had an effect to reduce a total infarct volume of ischemia brain injury in the rat model. In addition, rice bran fermentations were able to metabolize the ferulic acid to other bioactive compounds during fermentation. This leads to a consideration of what the metabolites and bioactive compounds converting after fermentation of rice bran are and what a suitable of fermentation condition to produce these compounds.

2) From the results obtained in this part, it is possible to state that FA is a precursor of compound X production in the rice bran fermentation by LW strain. Suitable fermentation condition in the rice bran media supplemented with 0.01% FA to produce the compound X was discovered at 35℃ for 36 hours. Preliminary purification was done by PREP-HPLC and LC/MS. Among 5 fractions received from PREP-HPLC, fraction 4 contained the highest content of compound X. Further analysis was done by LC/MS and found that the compound X might be a hydroferulic acid. Conversion product of LW cell-free extract incubated in 0.01 % FA media was also investigated. Possible pathway of compound X production might occur by the inducible reductase enzyme from 4VG. In addition, *in vivo* experiment on ischemia effect in the rat treated with SCX/3 (fraction 4) showed percent total infarct volume less than the control group.

3) The experimental design approach allowed the determination of the significant effects and polynomial functions that describe the effects of LW fermentation condition of rice

bran on compound X production yield. RSM was successfully employed to determine the optimal fermentation variables to obtain the maximum compound X yield. A polynomial regression model was proposed to reasonably describe the experimental results, and based on the proposed model, the optimal LW fermentation condition of rice bran for compound X production was found to be at 34.5°C, 45.8 h, with addition of FA at 0.0545% w/v. At this condition, the predicted compound X yield was 142.34 mg/L. Thus, from the present study it can be concluded that compound X production can be improved by controlling various factors simultaneously viz. fermentation time, fermentation temperature, and percent FA addition and this interaction could only be well understood by suitable RSM selection.

- part 2

1) ADP inhibits adenylate cyclase (AC), cAMP production enzyme from ATP, and amplifies platelet aggregation. This involves in IP_3 receptor (IP_3R)-mediated $[Ca^{2+}]_i$ mobilization. But rice bran extract Lw elevated the cAMP production (1^{st} year study) and inhibited $[Ca^{2+}]_i$ mobilization *via* phosphorylation of IP_3R (3^{rd} year study), and phophorylated VASP (Ser^{157}) to inhibit platelet aggregation(1^{st} year study).
2) Mobilized $[Ca^{2+}]_i$ activates myosin light chain kinase (MLCK) and protein kinase C (PKC). Myosin light chain (MLC) is phosphorylated by MLCK and pleckstrin is phosphorylated by PKC. Phosphorylated MLC (MLC-p) and pleckstrin (pleckstrin-p) involve in serotonin/ATP release, and amplify platelet aggregation. Lw inhibited ADP-induced platelet aggregation molecules activation cascade that intensifying thrombus formation [ADP-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization → MLC phosphorylation (MLC-p) → pleckstrin phosphorylation (pleckstrin-p) → serotonin/ATP release → platelet aggregation → intensification of thrombus] (3^{rd} year study).
3) ADP activates cyclooxygenase-1 (COX-1) activity, producing thromboxane A_2 (TXA_2), aggregation-inducing molecule, from arachidonic acid. But Lw inhibited TXA_2 production *via* inhibition of COX-1 activity, inhibiting platelet aggregation (2^{nd} year study).
4) After intraperitoneal administration of Lw to rat, rat platelet aggregation and blood coagulation were inhibited compared control (saline) (elucidation of correlation between anti-thrombotic and brain function improving activities, 2^{nd} year study).
5) After intraperitoneal administration of Lw to rat, disease (liver, heart, muscle/skeletal muscle, pancreas, kidney disease)-related parameters in blood were not changed(3^{rd} year study). Lw administration could be good for diets because of reducing food intake and weight increasement(3^{rd} study).

- part 3

1) The effect of fermented rice bran extract on the animal model of brain diseases. Our findings indicate that L.w treatment showed the largest effects in functional recovery

and cognitive improvement after ischemic brain injury through stimulation of the acetylcholine receptor, antioxidant genes, neurotrophic factors, and expression of NeuN, SYP, DCX, and ChAT. In our results, administrations of L.w exerted anxiolytic/anti-depressant effect by behavior test. It also lowered CORT levels and suppressed body weight loss following repeated RS. The L.w treatment not only protected neuronal cells in the hippocampus by apoptosis but also increased the expression of neurotrophic factors, BDNF, NGF and GDNF. The immuno-histochemical investigation revealed that the L.w treatment prevented severe loss of synaptic vesicle marker, SYP and increased intensity of the serotonergic neurons.

2) The effect of compound X, an active fraction of fermented rice bran extracts on the neural cells and animal model. Compound X promoted the survival rate of pc12 cells in the H_2O_2 media through the expressions of NGF, PDI and Nrf2 genes. L.w and compound X reduced the brain injury and promoted functional recovery in a rat model of ischemic brain through the stimulation of antioxidant and neural trophic factor genes.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction 26

Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development 32

Chapter 3. Contents and results of study 34

Chapter 4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study 170

Chapter 5. Achievement of the study and application plan of the results 178

Chapter 6. Collected foreign scientific technology information for studying 182

Chapter 7. Current status of research installation 183

Chapter 8. Reference 184

목 차

제1장 연구개발과제의 개요 26

제2장 국내외 기술개발 현황 32

제3장 연구개발 수행내용 및 결과 34

제4장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 174

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 178

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 182

제7장 연구시설 장비 현황 183

제8장 참고문헌 184

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서..... 186

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

o 미강의 가공 문제점을 개선하기 위해 bio-conversion 기술을 이용한 발효공정과 추출공정을 개발하여 유효성분(GABA(γ -aminobutyric acid), Inositol 등)이 증진된 추출물의 기능성 항혈전 및 뇌질환에 대한 예방 또는 개선효과 검증을 통해 미강의 고부가가치 식품 소재 및 응용제품을 개발하고자 함

제 2절 연구개발의 필요성

o 통계청이 발표한 2008년도 양곡소비량조사에 따르면 우리나라의 1인당 연간 쌀 소비량은 75.8kg으로 전년(76.9kg)에 비해 1.4% 감소한 것으로 나타났다. 이는 10년전('98)보다 23.4kg가 줄어든 수치로, 1인당 연간 23.4㎏의 쌀을 덜 소비하고 있는 것을 나타낸다. 농가와 비농가로 보면, 상대적으로 대체식품 소비가 많은 비농가의 1인당 연간 쌀소비량은 72.4㎏으로, 농가(122.5㎏)의 59.1% 수준이었으며, 시도별로는 1인당 쌀 소비량이 전북이 86.6kg으로 가장 많았으며 서울이 61.7kg으로 가장 적게 나타났음

o 쌀의 소비가 지속적으로 감소하고, 외국 쌀과 품질 및 가격경쟁을 하고 있는 현시점 에서, 국내산 쌀의 우수성을 홍보하고, 신품종 발굴과 농가소득 증진을 위해서는 건강기능성 규명 및 산업적 유용성 증진을 위한 국제적 수준의 연구가 필요하다. 과거와 달리 미래농업은 지식·정보·과학기술 기반사회로 변화될 전망이며, 농업의 수요자 지향적 구조변화는 과학기술에 대한 의존도를 더욱 높게 할 것으로 예상된다. 농업환경의 급속한 변화에 대응하기 위해서는 보다 신축적이고 효율적인 농업연구투자 시스템의 구축이 필요하고, 농업기술의 경제적 성과와 공급측면 뿐만 아니라 농업기술의 특성과 수요측면 등을 종합적으로 반영함으로써 보다 효율적인 투자와 농업연구정책의 방향을 제시할 수 있는 연구개발이 필요함

1. 기술적 측면

o 미강의 생산량은 연간 385,000톤에 달하며 지방, 비타민B 군 및 양질의 단백질과 섬유질을 풍부하게 함유하고 있으나 30% 정도가 미강유 제조에 사용되고 있을 뿐 나머지70%는 사료나 비료 등의 저 가치물질로 이용되거나 농산폐기물로 처리되고 있어 미강의 고부가가치화 및 폭넓은 산업적 이용에 대한 연구가 요구되고 있음.

o 미강은 지방, 단백질, 식이섬유가 영양소의 많은 부분을 차지하고 있고, 비타민 A와 티아민, 피리독신, 니아신 등의 비타민 B군 및 칼슘, 아연, 철분 등의 미네랄이 주성분을 이루고 있으며, 특히 곡류에 부족한 필수 아미노산인 리신이 다량 함유되어 있고, 구성지방산의 70% 이상이 올레인산, 리놀레산, 리놀렌산 등의 불포화지방산으로 영양적인 가치가 뛰어남.

o 현재까지의 연구에 따르면 다가불포화지방산의 섭취는 혈중 콜레스테롤이 상승하는 것을 억제하여 심혈관계 질환을 예방하여 주는 것으로 알려져 있는데, 특히 DHA(도코사헥사엔

산) EPA(에이코사펜타엔산)와 함께 대표적인 오메가-3 지방산의 하나인 리놀렌산은 고지방식으로 인한 면역력의 저하를 막아주고, 유선암의 증식에 억제효과를 보인 것으로 최근 연구에서 밝혀져 암에 효과가 있을 것으로 기대됨.

o 미강을 미강유로 정제하는 과정에서 오리자놀, 토코페롤, 레시틴 등 다양한 생리활성 물질이 부산물로서 발생하며, 이중 오리자놀은 페룰산과 스테롤류와 알코올류가 결합된 화합물로 갱년기 장애 및 자율신경 실조증 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 토코페롤, 레시틴과 함께 항산화 활성이 높아 활성산소로 인한 세포의 손상을 막아주어 암의 발생을 줄여줄 수 있음.

o 미강에 9.5~14.5%로 다량 함유되어 있는 피틴산은 암세포의 이상 증식을 억제시켜 항암 효과도 있는 것으로 알려져 있으며, 헤미셀루로스 등의 식이섬유와 함께 미강의 다당성분인 아라비녹실란은 아라비노스와 자일로스로 구성된 복합 다당체로 항알레르기, 면역활성 및 항암에 관련된 생리활성 물질인데 최근 다양한 연구들이 발표되고 있음.

o 미국 등에서는 가공된 미강을 package하여 밀가루와 같이 건강식품재료로 판매하고 있으며, 일본의 경우 피부보습효과를 목적으로 미강을 미생물 발효시킨 발효액을 화장품 및 입욕제에 이용하고 있고 다양한 생리활성 정제물질들이 판매되고 있음.

o 국내에서의 경우 미곡은 주식이외에도 다양한 가공식품의 원료로 이용되고 있음. 전통적인 떡과자로부터 미곡추출 식이섬유를 밀가루 및 빵, 스낵 등에 이용하려는 연구, 도정 부산물인 미강을 스넥 등의 건강 편이식품의 소재로 이용하려는 연구 그리고 미강유 제조를 위한 연구 및 미강 안정화를 위한 extruder 설계 등 다양한 미곡 가공연구가 진행되었으며, 이러한 제품의 부가가치는 낮은 실정임.

o 국내 미강에 대한 연구은 2000년 이전 미강의 산패와 관련된 연구와 미강유 토코페롤 또는 불포화 지방산에 대한 연구가 주를 이루고 있으며, 2000년 이후에는 미강을 건강식품으로서의
인식이 새로워지면서 이들을 이용한 많은 가공 및 건강보조식품에 대한 연구가 진행되고 있음.

o 그러나 대부분의 연구는 미강의 유용성분 중 옥타코사놀 및 오리자놀, 토코트리에놀 등 한가지 성분이나 곰팡이, 효모, 균사체를 이용하여 생성되는 면역성분을 분리, 정제기술개발과 면역, 항암, 항산화 활성에 규명에 국한되어 있음

o 상업적인 경제성을 확보하기 위해서는 어떤 특정성분의 단일 분리방법 보다는 생물전화 기법을 이용한 발효와 연속적인 추출 및 가공공정의 확립을 통해 기능성이 강화된 미강발효추출물의 소재화 및 제품화 함으로써 미강의 부가가치를 올려 농경산업의 안정적인 발전을 도모할 수 있을 것으로 사료됨

o 인제대학교 연구팀은 탈지미강을 균으로 단시간 발효하고 가압물추출한 후 동결건조한 미강추출물(FRB)을 이용하여 혈전증을 일으키는 병리현상인 ADP유인 rat 혈소판응집반응에 미치는 효과를 검토한 결과(Table 1), FRB는 ADP(10uM)유인 rat 혈소판의 응집을 농도 의존적으로 강하게 억제시켰음

o 이와 같은 결과는 더 강력한 균주 선별과 최적의 추출공정이 확립되어 본 연구가 성공적으로 수행된다면 미강발효추출물은 혈소판 응집이 매개하는 혈전증의 치료제 또는 예방제로서의 기능성식품 또는 의약품의 소재로 사용할 수 있을 것으로 사료됨

Table 1. 미강발효 물추출물(RB)의 ADP-유인 혈소판응집억제효과

	Platelet aggregation (%)	Inhibition (%)
ADP(10uM)	55±2.6	0
ADP + FRB(300ug/ml)	11±1.0	80
ADP + FRB(500ug/ml)	5.5±1.4	90

o 따라서 효율적이고 경제적인 미강 발효 및 추출공정 확립으로 미강의 활용률을 높일 수 있으며, 추출물로 부터 항혈전, 항비만, 뇌기능 활성에 대한 기능성 물질의 본체 규명과 구조결정기술, in vitro 및 vivo test, 활성성분의작용 기작 및 생체에서의 정확한 기능 파악으로 기능성 식품의 개발 또는 의약품 제재로서의 응용에 큰 진전을 보일 것으로 사료됨.

2. 경제・산업적 측면

o WTO 체제의 출범으로 인한 시장 개방하에서 국내 농산물 특히 주식인 쌀의 부산물로부터 고부가가치성물질의 창출은 농산물가격의 안정화를 기할 수 있기 때문에 전체적인 소비자 물가의 안정에 기여도가 클 것으로 예상됨.

o 농업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 식용농산자원을 대상으로 한 유용성 있는 물질을 개발하여 경쟁력 있는 의약용, 식품용, 화장품용 신소재의 창출임.

o 약리·생리활성물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 녹색산업종으로 현재 재편되고 있는 국내산업에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것이며 특히 제조공정 확립으로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종생산이 가능함.

o 우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 먹어온 식품 중에 함유되어있는 물질이므로 유기합성에 의한 신규물질들보다 안전성의 확보가 용이함.

o 최근 국내제약과 식품업체들이 의약품의 판매량 감소와 식품산업의 물류비 증가로 수익악화에 처해있는 실정임 그러나 식품과의 약품의 특성을 공유하는 새로운 영역의 제품들을 도입하게 될 경우 다시 경쟁력을 갖게 될 것이며 이는 국내생물산업육성이라는 국가정책에 부응하는 계기가 될 것임.

3. 사회·문화적 측면

o 생물공학적 기법에 의해 유용성분의 대량생산이 필요하다는 데는 사회적 공감대가 많이 형성되어 있으나, 장기적인 측면에서 안전성이나 환경에 미치는 영향에 있어서 아직 불안감을 많이 가지고 있는 현실을 고려할 때, 이미 오래 전부터 이용하여온 미강의 다양한 특정성분을 생물 공학적 방법으로 대량 함유하게 하여 추출, 정제 후 활용하는 데 있어서는 식품안전성에 대한 불확실성이 상대적으로 낮아 사회적 거부감이 적음.

o 건강식품에 관심이 많은 국내의 사회·문화적 환경변화에 따른 소비자의 요구를 충족시킬 수 있는 과학적으로 효능이 검증된 다기능 가공제품 개발 필요

o 항혈전 및 항비만, 뇌기능 활성 강화 기능에 탁월한 효능을 지닌 생리활성물질 관련 다양한 가공제품을 개발하여 국민건강 증진에 기여

o 국민들의 고령화 사회 인식, 건강하게 장수하고자 하는 욕구 증대, 고령화병에 대한 불안감 및 일상생활을 통한 높은 예방에 관심은 일본 및 미국의 특정 식품의 수입을 초래하였으며, 건강기능성 식품소재를 통하여 고령화로 기인하는 질병을 예방함으로 활동력을 갖는 고령화 노동인력 확보가 가능

제 3절 연구범위

1. 미강 발효 및 추출공정 확립

o 전처리 조건 확립
  - 탈지, 효소 불활성화

o 미강 발효조건 확립
  - 발효균 선별
  - 온도, 시간, pH, 배합비 등

o 유용성분 추출법 확립
  - 화학적 및 물리적 처리에 따른 추출수율
  - 경제성 및 효율성 고려

2. 연속적이고 순차적인 미강발효 및 추출공정 최적화와 추출물의 가공적성에 따른 용도 검토

o 추출물 제형별 규격설정

o 추출공정 및 유용물질 분리 조건 확립
  - 주요 단위공정별 제한요건 확정
  - 추출정도와 경제성에 기초한 공정 최적화

o 가공적성에 따른 용도 다변화
  - 추출 성분별 가공적성 확립

- 용도별 가공조건 확립
- 공정설비 및 조건검토

2. 대량 연속공정 확립과 추출물을 이용한 건강기능성 식품개발
o 발효와 유효성분 분리공정 확립
o 소재의 가혹조건하 안정성 평가
- 고온다습조건 포함
o 제품화 공정의 원가계산
- 제품화 시 경제성 여부 확인
o 뇌경색, 우울증과 인지능력 향상에 필요한 유효성분 정량화를 통한 규격 설정
o 추출물을 활용한 기능성 식품소재 및 제품개발
- 1차적으로 일반식품에 기능성 소재 첨가로 고부가가치화
- 2차적으로 기능성 소재 개별인정을 위한 기초자료 확보

4. ADP 수용체 P_2Y_{12}의 $G_{\alpha i}$ 매개 혈소판응집 신호전달 표적분자 조절특이성 규명
o $G_{\alpha i}$ 매개 신호전달 표적 측정
- 혈소판응집의 IC_{50} 측정
- Adenylate cyclase 활성에 미치는 영향 측정
- cAMP 생성 측정
- VASP 인산화 측정

5. ADP 수용체 P_2Y_1 매개 TXA_2 생성 관련 효소의 활성억제특이성 규명
o TXA_2 생성 측정
o 혈소판의 cytosol 및 microsomes 분리
o Microsomes의 marker enzyme의 측정
o COX-1 활성 측정
o TXA_2 synthase 활성 측정
o 뇌기능개선모델 실험동물과 항혈전 상관관계 규명
- 혈소판응집 반응 측정
- 혈액응고 반응 측정

6. ADP 수용체 P_2Y_1을 거쳐 일어나는 Ca^{2+}-의존성 혈소판 응집 신호전달 표적분자 억제특이성 규명
o IP_3 receptor 인산화 측정
o Ca^{2+} 동원 측정
o Ca^{2+}-의존성 단백질(myosin light chain, pleckstrin) 인산화 측정
o Serotonin 방출 측정
o ATP 방출 측정
o 미강 추출물의 안전성 및 side effect 시험
- 미강추출물 일정기간 투여 후 행동관찰, 외부 특이사항 관찰 확인

- 혈액 내 간독성 및 신장독성 관련인자 (AST, ALT LDH 등) 측정

7. 추출방법별 미강발효 추출물의 뇌질환 동물모델에서 예방 및 회복 효과 조사
 o 뇌졸중동물모델에서 예방 및 기능개선 조사
 o 우울증, 불안장애 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사

8. Compound X에 의한 뇌질환 예방 및 기능개선 응용을 위한 생리활성 연구
 o 신경세포배양을 이용한 compound X(SCX/3)의 BDNF, NGF, GDNF, 신경회로, 항산화 유전자들의 발현에 대한 평가
 o compound X(SCX/3)를 사용하여 뇌경색 모델에서 뇌세포 사멸, 신경회로망, 신경영양유전자 발현을 sham 대조군과 비교 평가
 o 뇌경색 모델에서 Compound X(SCX/3)를 함유하는 L.w 추출물에 의한 인지 기능 평가

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내 제품 및 시장 현황

o 통계청이 내놓은 최근 6년 간 쌀 생산량은 2004년 500만 톤에서 2009년 468만2000톤이며, 평균 456만5,000톤이 생산되고 있음

2004년	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년
500만톤	476만8000톤	468만톤	440만8000톤	484만3000톤	468만2000톤

o 쌀에서 미강이 차지하는 비중이 약 10%이며, 쌀 생산량 대비 미강생산량으로 환산하면 매년 50만톤의 미강이 생산되고 있음

o 국내에서 생산되고 있는 미강은 대부분 미강유 착유에 이용되고 있으며, 착유율 12.5%로 계산하면 연간 6만2500t이나 되는 미강유를 얻을 수 있으나, 미강의 관리소홀에 의해 겨우 5만분의 1정도만이 착유되고 있음

o 현재 우리나라의 벼는 전국에 산재되어 있는 1만8,000여 정비소에서 도정되고 있으며, 이때 부산물로 생겨나는 50만톤에 달하는 쌀겨는 나오자마자 미강 안정화 엑스트루더를 통과시켜 쌀겨속의 지방가수분해 효소를 불활성화 시킨 후 모아두었다가 미곡 처리종합장에서 착유, 정제하여 양질의 미강유를 좋은 수율로 얻을 수 있게 되었음

o 미강유 착유실적은 아래와 같으며 쌀 재배량이 감소함에 따라 미강유 착유량도 감소하고 있음

단위 : 천톤

연도별	착유원료(M/T)	미강유			탈지강
		식용	비식용	계	
'90	123	11	8	19	98
'91	125	10	8	18	95
'92	135	11	10	21	105
'93	153	11	13	24	121
'94	136	10	11	21	108
'95	146	13	9	22	115
'96	127	11	7	18	100
'97	87	8	5	13	69
'98	67	5	4	9	54

o 이외에 미강의 이용 가능분야는 식품용도로 전통 식품에 적용시켜 기능성이 우수한 제품 개발

(예) 미강 식이섬유를 적용 하여서 기능성이 우수한 고추장 개발)하거나 곡류음료에 첨가하여 기능성이 강화된 음료개발(예) 일회용 현미 차, 현미 라이스 음료), 다이어트 식품으로 개발(선식 분말 또는 요플레에 타서 아침, 점심 식사대용)이 시도 중임

o 또한 미용용도로 기능성이 우수한 고급 라이스 화장품 첨가 소재, 안정화 처리된 쌀겨 팩, 안정화
처리된 세안 팩, 천연비누 첨가 소재로 이용 중에 있음

o 국내에서 시판되고 있는 미강관련 제품은 아래와 같음

제품명	제조회사	식품유형
쌀겨가루	지리산한약나라	건조분말
쌀겨가루	가루나라	
무농약 미강가루	대양식품	
미강유 클렌징 바	(주)클린센스코스메틱	유지
이탈롤리	유니스코(이탈리아)	
아로마 바스&마사지	바이네이쳐	
프리미엄 오일	피에트로 꼬리첼리	
라온 현미유	자연애	
미강유	세림(비누베이스)	
미강유	Allinmarket	
미강환	김정규자연건강영농조합법인	정제(환/캅셀)
발아미강환	김정규자연건강영농조합법인	
들찬 천연미강	들찬	천연팩
다이어트 웰패스153	(주)동서바이오팜	미강발효분말
바로콜	한미양행	
현미김치	대양식품	

o 대부분 선식용 가루나 미강유를 이용한 유지상품류와 발효미강을 이용한 건강보조식품으로 이용되고 있으며, 미용목적으로 이용은 대부분 마스크 팩 등 천연팩으로 이용되고 있는 실정임

o 그동안 미강 유용성분에 대한 추출, 정제에 대한 연구는 꾸준히 있었지만, 한가지 성분을 고순도로 정제하는 연구가 대부분이어서 제품으로 출시는 미비한 실정임

제 2절 국외 제품 및 시장 현황

o 일본, 미국, 인도 등에서는 미강성분에 깊은 관심을 가지고 연구하여 미강을 Biobran이라는 말로 부르면서 생리기능 면역성물질의 소재로 미강을 활용하고 있고, 일본의 다이와 제약회사는 오래 전에 미강성분에서 면역성소재를 분리하여 버섯효소로 처리한 후에 면역강화기능성 물질 arabinoxylane유도체를 상품화하고 있으며 이것에 대한 항암효과의 연구결과가 미국과 인도에서 보고되었으며, 국내에서는 미강에서 분리한 옥타코사놀을 건강식품의 원료로 사용하고 있는 실정임

o 미국 등에서는 가공된 미강을 package하여 밀가루와 같이 건강식품재료로서 판매하고 있으며 이러한 가공미강의 이용도에 관해서도 일부 연구가 이루어지고 있으며, 미강을 활용한 신제품 개발도 증가추세에 있으며, 1989년에는 미강을 활용한 신상품이 24품목이었던 것이 1995년에는 45품목으로 증가하고 있음

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 미강 발효 및 추출공정 확립과 건강기능성 식품 및 제품화

1. 미강 원료 전처리 조건 확립

가. 실험방법

(1) 경남 김해 종합미곡처리장에서 도정공정 완료 직후 미강을 지원받아 밀봉용기에 넣어 냉장저장하면서 사용하였다.

(2) 미강 1.0kg을 진공포장하여 100℃와 121℃의 가열조건으로 일정시간 처리한 후 생균수를 계수하였다.

(3) D값은 log 생균수 vs 가열시간으로 표시된 자료를 회귀분석하여 산출하였다.

나. 실험결과

(1) 미강 중의 lipase와 lypoxygenase등 유지산화관련 효소는 오염 세균이 사멸되면 자동으로 불활성화 되므로 잔존 미생물을 확인하는 방식으로 전처리 조건을 결정하였다.

(2) 미곡종합처리장에서 부산물로 나오는 미강에 대한 처리는 단순포장처리하여 적재하고 있으며, 주변의 온,습도 조절이 되지 않는 환경이 대부분이다. 부산물인 쌀겨를 활용한 steam chamber 또는 압력 steam chamber를 활용 가능성을 검토하였다.

(3) 표 1의 결과는 상압 steam chamber에서 미강을 1시간 정도 처리하면 효소불활성화와 오염 미생물 제거를 동시에 달성할 수 있을 것으로 판단된다.

(4) 아래 자료를 활용하여 decimal reduction time을 linear regression으로 계산하여 Fig. 1에 나타내었으며 100℃에서 D값 = 7.56분, 121℃에서 D값 =1.08분이었다.

(5) 이러한 결과를 바탕으로 미강원료의 품질안정화를 위한 전처리 chamber를 설계할 수 있으며, 고가의 고압멸균설비를 사용할 수 없는 현장조건에서는 다단 원료 적재장치를 활용한 상압 steam chamber를 concrete 소재로 제작하고 미곡처리시 발생하는 겨를 활용하여 steam을 제조하는 장치를 현장에 구축함으로써 경비절감을 꾀할 수 있을 것으로 믿어지며, 최종 공정설계 시 전처리 시설에 대한 설계를 수립하고자 한다.

Table 1-1. Changes in viable cell count of rice bran material as affected by heating conditions

Heating temperature	Heating time (min)	Viable cell count (cfu/g)
100℃	30min	4.0×10^{5}
	40	7.2×10^{3}
	50	5.5×10^{1}
	60	ND
121℃	15	1.4×10^{4}
	20	2.1×10^{2}
	25	ND
	30	ND

*ND: not detected

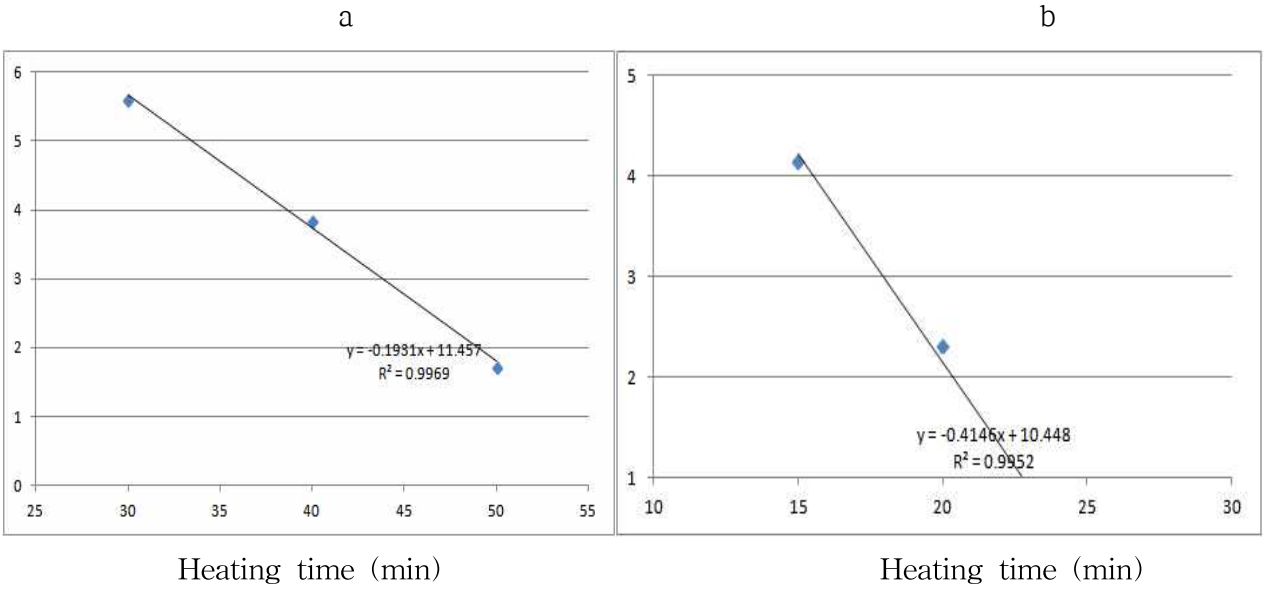


Fig. 1-1. D-value estimation curve during heat treatment of 100℃(a) and 121℃(b)

(6) 현재 조건에서 적정 열처리 시간은 safety margin을 감안하여 100℃ 처리시는 70분, 121℃ 처리 경우는 25분이 적정한 것으로 판단된다. 하지만 원료의 초기오염상태는 다양하므로 오염 정도에 따라 D값을 활용하여 처리시간을 결정하는 것이 바람직하나, 생균수 측정 시간이 36시간 소요되므로 이 기간 동안 다시 미강 중 균이 증식할 수 있다. 따라서 고체 미강원료의 최대 오염 한계치인 10^{8} cfu/ml로 부터 D값을 활용하여 열처리시간을 산출하여 활용하는 것이 안전할 것으로 판단된다.

(7) 즉, 100℃ 10D =7.56min × 10cycle =75.6min, 121℃ 10D =1.08min × 10cycle = 10.8min 가 전처리 적정조건으로 계산되었다.

2. 미강 추출물의 지표물질 선정 및 규격화

가. 실험방법

(1) 미강 발효추출물의 유용성분 중 하나인 GABA 함량은 Zhang 등의 방법을 이용하여 비색법으로 측정하였다. Eppendorf tube에 시료 0.1 g과 methanol 400 μL를 가하고 75℃ 항온수조에서 완전히 건고시켰다. 여기에 70 mM $LaCl_3$ 1mL를 가하고 10분 동안 교반한 후 원심분리(15,000×g, 15 min)하여 상등액 700 μL를 취하여 0.1M KOH 160 μL를 미리 넣어 둔 또다른 eppendorf tube에 첨가한 다음 5분 동안 교반하고 원심분리(15,000×g, 10 min)하였다. 상등액 550 μL를 새로운 eppendorf tube에 취하고 0.5M $K_4P_2O_7$ 200 μL, 4 mM NADP 150 μL, GABase(2 U/mL) 50 μL를 혼합한 후 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하고 20 mM α-ketoglutaric acid(α-KG) sodium salt 50 μL를 첨가하여 실온에서 1시간 방치한 후 340 nm에서 재차 흡광도를 측정하여 GABA함량을 구하였다. 이때 GABA(99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 표준곡선을 구하였다.

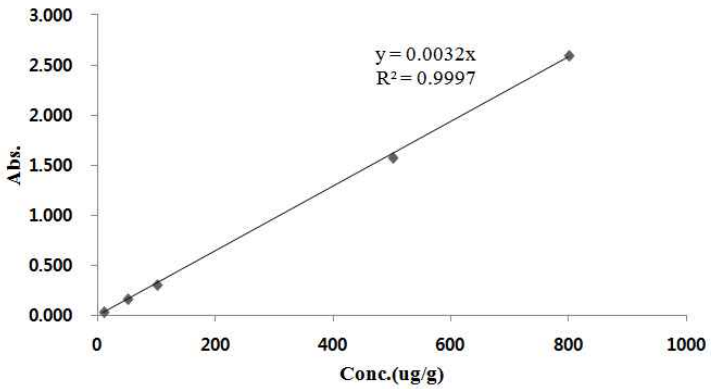


Fig. 2-1. Standard curve of GABA

(2) 또 다른 지표물질로서 ferulic acid 함량을 측정하였다. 표준물질로서 Sigma-Aldrich의 제품(Cat. No.128708-5G)을 이용하였다. Ferulic acid의 농도를 측정하기 위해 HPLC를 이용한 Standard curve를 작성하였다. Ferulic acid 0.01 ~ 0.5mg/ml 범위에서 농도 대 면적 관계를 이용하여 표준곡선을 준비하였다.

Table 2-1. HPLC conditions for ferulic acid analysis

Column	TSKgel ODS-100V 5um, 21455, 4.6*150(mmI.D.*mm), 5(um)
Mobile Phases	methanol / 50mM NaH_2PO_4 (pH2.5 with phosphoric acid) = 30 / 70
Flow rate	1.0mL/min
Temperature	40℃
Detection	310nm
Injection Volume	5uL

(3) Ferulic acid 정량을 위한 standard curve와 HPLC 자료는 아래와 같다. Ferulic acid의 HPLC retention time은 13.6~13.8 이였다.

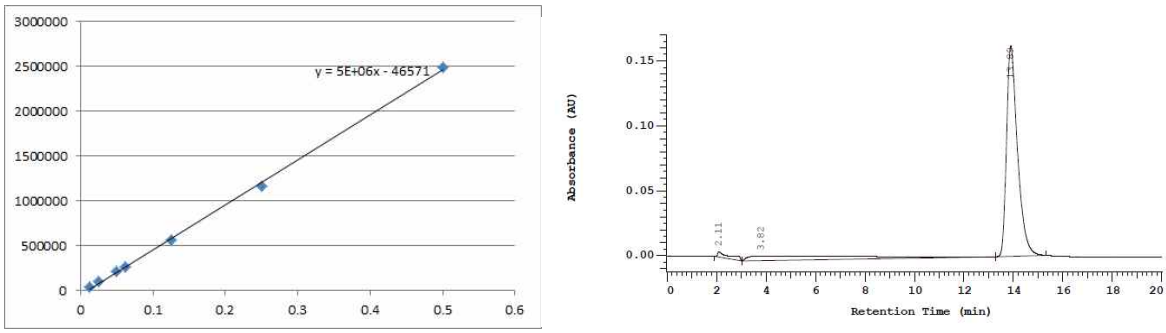


Fig. 2-2. Standard curve of ferulic acid and HPLC chromatogram

(4) 열수추출물(HWE), LP, LW 시료에 대한 각각의 농도를 측정하기 위해 증류수에 용해하여 100mg/ml 농도로 맞춘 후 2N HCl로 pH 2~3으로 조절하였다. 이 시료를 ethylacetate 0.5ml로 3회 추출한 후 ethylacetate 층을 모아 진공농축한 잔류물을 0.5ml methanol에 용해한 후 HPLC로 분석하였다.

나. 실험결과

(1) 미강 열수추출물과 발효추출물의 수율 및 GABA 함량을 비교한 결과는 아래와 같다. 즉, 열수추출물이 1.59mg/100g, LP가 2.37mg/100g, 그리고 LW가 4.5mg/100g 순으로 GABA 함량이 증가하였다. LW 균주에 의한 미강의 발효가 GABA함량을 열수추출물에 비하여 3배 가까이 증가시키는 것을 알수 있었다.

(2) 제 2와 3세부과제 결과에서 효과 측면에서 LW가 가장 좋았으며, 이는 GABA함량과 비례적으로 나타났다. 즉, active compound가 GABA인지는 향후 실험에서 규명되겠지만, 지표물질로서는 적정한 것으로 판단되었다.

(3) 따라서 미강 발효추출물의 동결건조 제품의 규격은 GABA함량으로 4.0mg/100g 이상으로

정하여 이후 실험을 진행하고자 한다.

Table. 2-2. Comparison of GABA content of fermented extract with hot water extract of rice bran

Sample	mg/100g
LW	4.50±0.25
LP	2.37±1.15
HWE	1.59±0.18

※ HWE : Hot water extract

(4) 미강에는 감마 오리자놀의 형태로 존재하는 ferulic acid ester와 free ferulic acid가 존재한다. ferulic acid는 식물 내와 인체내에서 다양한 물질로 전환되어 생리활성을 나타낸다. 따라서 이 연구에서는 ferulic acid를 지표물질로 선정 가능성을 조사하였다.

(5) 각 시료에 대한 HPLC 결과와 각각의 ferulic acid 농도는 아래와 같다. LP, LX, LW의 ferulic acid peak에 해당하는 UV spectrum 또한 아래에 나타내었다.

(6) 처음 기대한 바와는 달리 미강을 발효시킨 경우 ferulic acid 함량이 감소하였으며 그 감소 정도는 LW에서 가장 크게 나타났다. 즉, HWE 21.1mg, LP 18.4mg, 그리고 LW 13.5 순이었다. 이것은 ferulic acid가 발효과정 중 다른 물질로 전환된다는 것을 의미한다.

(7) 그림에 표시된 X 물질의 peak의 증가 추세를 고려한다면 ferulic acid는 X 물질로 전환되는 것으로 추정되며 현재 이 물질의 구조 규명을 위한 작업을 진행 중이다. X 물질은 특히 인지기능 개선과 관련된 것으로 믿어진다.

(8) Ferulic acid는 지표물질로 사용할 수 없다는 것을 알 수 있었다.

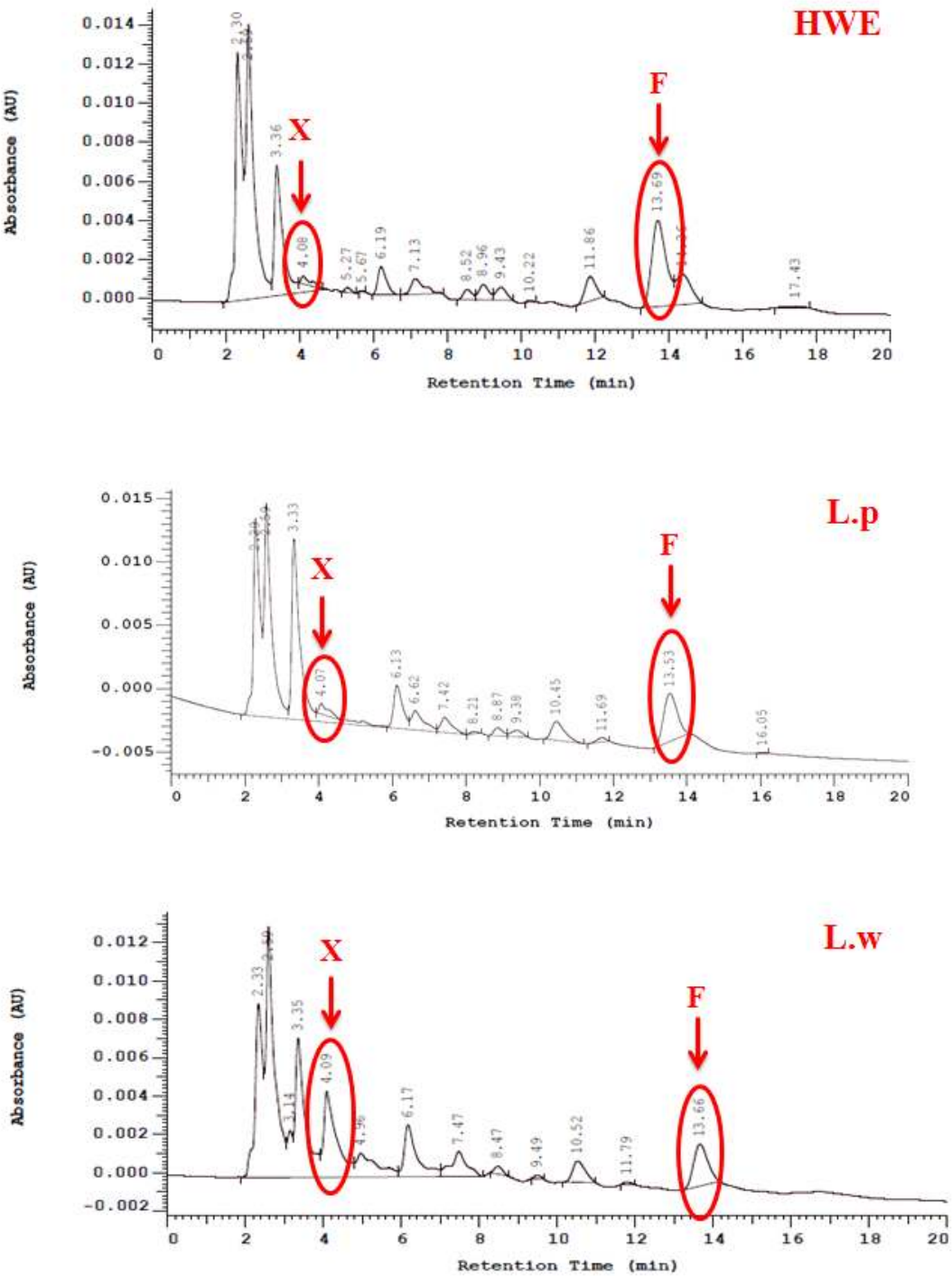


Fig. 2-3. HPLC chromatogram of hot water extract of rice bran, Lactobacillus fermented extract of rice bran.

*HWE, hot water extracted; L.p, plantarum KCCM12116; L.w, plantarum Hong KFCC11556P

Table 2-3. Ferulic acid content of hot water extract of rice bran, Lactobacillus fermented extract of rice bran

Sample code	mg ferulic acid/ 100g sample
LW	13.5
LP	18.4
HWE	21.1

3. 유용성분의 추출법에 따른 수율평가

물리화학적 방법을 활용하여 유용물질을 최대한 추출할 수 있는 방법을 조사하였다. 물리적 방법으로는 초고압처리를, 화학적 방법으로는 추출수의 pH를 조절하여 확인하였다. 앞의 실험에서 제 2와 제3세부과제의 결과와 종합하여 지표물질을 GABA로 선정하였으며, 수율평가는 이를 기준으로 실시하였다.

나. 실험방법

(1) 미강발효추출물의 유용성분 추출법 확립을 위하여 화학적 처리와, 물리적 처리를 한 Sample의 유용성분인 GABA함유량을 각각 측정하여, 유용성분 추출법을 확립하였다. 이를 위하여 화학적 처리는 pH환경을 pH4, pH 7.0, pH10으로 조절하였고, 물리적 처리는 초고압추출기를 이용하여 Sample을 초고압 처리(2,500psi, 15min)하여, 각각의 Sample의 GABA함유량을 측정하여 유용성분 추출법을 확립하였다.

나. 실험결과

(1) 미강발효추출물을 화학적 처리와 물리적 처리를 하여 GABA함유량을 분석하였다. 먼저 화학적 처리는 미강열수 추출 시 pH 4, pH 7.0, pH 10으로 조건으로 맞춘 것으로 분류한 Sample의 GABA함유량은 pH 4의 경우 100g당 2.10±0.54mg의 함유량을 보였으나, pH 10에서는 GABA가 측정되지 않았다.

(2) 이러한 결과는 미강의 발효가 진행됨에 따라 pH가 감소하게 되고 따라서 GABA의 추출도 증가하는 것을 의미하며 발효에 의해 GABA 함량이 증가하는 현상에 일부 기여함을 알 수 있다.

Table. 3-1. Changes in GABA content of rice bran extract as affected by different pH

Sample	mg/100g
pH 4.0	2.10±0.54
pH 7.0	1.59±0.18
pH 10.0	N.D

(3) 물리적 처리에서는 초고압추출기를 이용하여 미강과 증류수를 1:9로 혼합한 시료를 Fig. 5와 같이 처리하였다. 즉, 혼합시료를 바로 초고압 처리한 것을 RBR, 혼합시료를 retort 처리한 후 초고압 처리한 것을 RBR, 혼합시료를 retort 처리한 후 여과한 액을 초고압처리 한 것을 RBF로 표시하였다.

<table>
<tr><td rowspan="3">Rice
Bran
Extract
(1:9)</td><td colspan="5">⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨</td><td rowspan="3">초고압 처리
2,500psi, 15min</td><td>RB</td></tr>
<tr><td>⇨⇨</td><td rowspan="2">Retort
121C, 15min</td><td colspan="2">⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨⇨</td><td>⇨⇨</td><td>RBR</td></tr>
<tr><td>⇨⇨</td><td>⇨⇨</td><td>Filtration</td><td>⇨⇨</td><td>RBF</td></tr>
</table>

Fig. 3-1. Process flow of ultra high pressure treatment of rice bran extract

(4) 각 시료에 함유된 GABA량을 측정한 결과 Table 3-2와 같다. RBR의 GABA 함량이 가장 높았으며, RB에 비하여 2배 이상 높은 수율을 나타내었다. 즉, 초고압처리는 미강의 GABA 추출을 용이하게 하는 효과를 나타내었으며 2차년도에 미강발효액에서 유용물질 회수 공정에 적용하고자 한다.

Table. 3-2. Changes in GABA content of rice bran extract as affected by ultra high pressure treatment before or after retort

Sample	mg/100g
Rice bran extract without retort(RB)	0.97±0.43
Rice bran extract with retort(RBR)	3.44±0.81
Rice bran extract after retort and filtrated(RBF)	2.20±0.57

4. 미강의 발효공정 조건 조사

4-1 발효균의 특성과 분리균의 동정

가. 실험방법

(1) 열수 추출한 미강 Sample의 발효를 위해서 표준균주 *Lactobacillus plantarum*(KCCM 12116)과 물김치에서 분리한 L.w균주를 선별하여 미강발효 시 미강열수추출물의 총량에 5%의 유산균을 접종하여 24시간 발효 시킨 후 121℃에 15분간 멸균하여 유산균을 불활성화 하여 여과, 농축하여 미강발효추출물을 제조하였다.

(2) 미강발효 시 사용한 L.w균주의 경우 성질을 알아보기 위하여 16s rDNA sequencing을 이용하여 분리균 Lw를 동정하였다.

(3) L.p, L.w 균주의 성장특성을 알아보기 위하여 Bio screen C (MBR) 미생물 성장분석 장비를 이용하여 미생물성장곡선 실험을 실시하였다. 실험조건은 다음과 같이 설정하였다. 배양온도는 35℃, 교반시기는 측정 전 10초간 교반한 후 5초간 정치하여 Sample을 안정화 시켰고, 흡광도 측정파장은 600nm로 설정한 후 총 48시간 동안 30분 간격으로 흡광도를 측정하여 그래프로 나타내었다.

나. 실험결과

(1) Lw 균주의 16s rDNA sequencing의 결과는 Fig. 4-1과 같으며 한국미생물보존센터의 분석차트에서 *Lactobacillus plantarum* (Gene Bank Data homology search result : 99%)과 가장 유사성이 높은 것으로 분석되었다. 한국미생물보존센터에 특허기탁을 하였으며 기탁번호는 KFCC 11556P이다.

Fig. 4-1. Homology tree and 16s rDNA sequencing result of Lw strain

(2) L.p, L.w 균주의 성장특성을 알아보기 위하여 Bio screen C (MBR) 미생물 성장분석 장비를 이용하여 미생물성장곡선 실험을 실시한 결과 액상상태로 8시간 배양 이후 급격히 성장하였다가 20시간 배양하였을 때 최고의 성장률을 보이며 유지가 되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4-2).

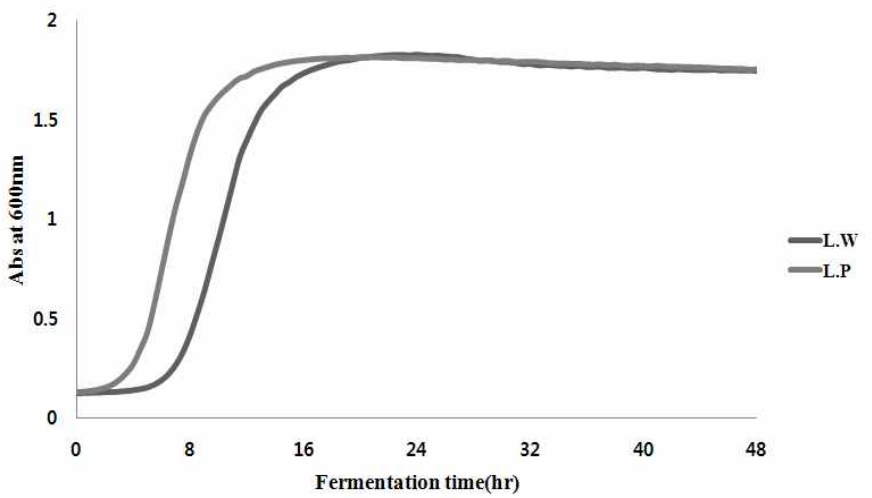


Fig. 4-2. Growth curve of Lp and Lw strain

4-2 미강 발효공정의 최적조건 조사

가. 실험방법

(1) 최적의 발효온도조건을 확인하기 위하여 미강열수추출물에 각각의 유산균주를 접종하여 배양온도를 25℃, 35℃, 40℃로 하여 36시간 배양하여 일정시간별로 pH변화량을 측정하였다.

(2) 유산균수의 변화는 MRS 배지를 이용하여 생균수를 측정하였으며, 환원당은 DNS법으로 포도당을 표준물지로 하여 550nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다. 미강발효추출물의 산도측정 실험은 검체 10m/에 탄산가스를 함유하지 않은 물 10m/를 가하고 페놀프탈레인 시액 0.5m/를 가하여 0.1N 수산화나트륨액으로 30초간 홍색이 지속할 때까지 적정하여, 그 데이터 값을 계산하여 산도를 측정하였다.

(3) 항산화능 측정실험의 경우 TEAC, ORAC실험법을 이용하였다. Trolox equivalent antioxidan t(TEAC)는 Sample 20㎕와 200㎕의 ABTS시약과 섞은 후 4분간 방치한 후 micro plate reader를 이용하여 파장을 734nm로 설정한 다음 흡광도를 측정하였다. Oxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC)는 Sample 20㎕와 120㎕의 working solution 과 섞은 후 37℃ incubator에서 15분간 방치한 다음 120㎕의 AAPH시약을 섞어준 후 micro plate를 이용하여 37℃에 2시간 방치 한 후 reader는 485nm로 exctitation은 528nm

로 파장을 설정하여 흡광도를 측정하였다.

나. 실험결과

(1) 최적의 미강발효조건을 알아보기 위하여 미강열수추출물에 각각의 유산균주를 접종하여 배양온도를 25℃, 35℃, 40℃로 하여 36시간 배양하여 일정 시간별로 pH변화량을 측정한 결과 35℃로 미강을 발효하였을 경우 발효 12시간 정도에 pH가 가장 빨리 떨어져 안정화되는 것을 확인되었다. 미강 중 유산균수 계수한 결과와 같이 고려하여 적정 배양온도는 35℃로 결정하였다(Table 4-1, Fig. 4-3).

(2) Starter는 대수기에 도달한 유산균으로 배지량의 5%를 가하였으며 35℃ 배양조건에서 초기 4시간에 균이 급속한 속도로 증식함을 관찰하였다.

Table 4-1. Viable cell count of rice bran extract during fermentation

Sample / Time	L.w	L.p
4hr	4.4E7	1.2E10
12hr	4.1E11	5.0E10
24hr	3.8E12	1.2E11
28hr	2.1E13	5.0E12

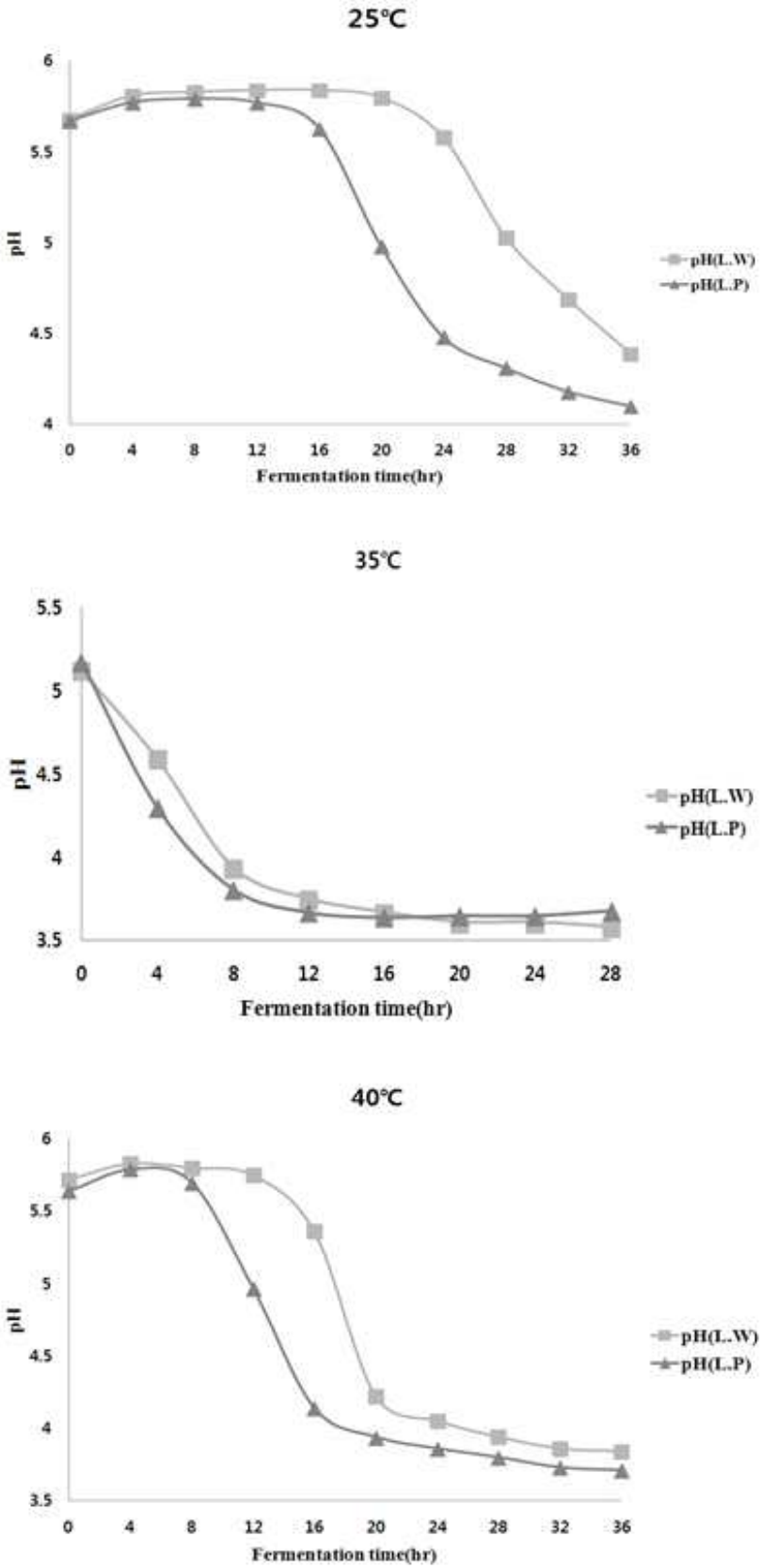


Fig. 4-3. pH changes of rice bran extract as affected by the growth temperature during fermentation with Lp and Lw.

(3) 미강 발효추출물 중의 환원당의 변화를 관찰한 결과는 Table 4-2과 같다. 발효초기에는 환원당이 감소하다가 미강의 다당류가 분해되고 소비되는 속도가 평형을 이루면서 일정 수준인 0.15g/L를 유지하였다.

Table. 4-2. Changes in reducing sugar content of rice bran extract during fermentation (unit g/L)

Sample / Time	L.w	L.p
4hr	0.20	0.17
16hr	0.16	0.15
24hr	0.16	0.15
28hr	0.15	0.15

(4)동일한 발효과정 중 산도의 변화를 측정한 결과 발효시간이 경과함에 따라 유산균주의 성장으로 인하여 산도가 서서히 증가하는 것을 보였다(Fig. 4-4).

(5)최종적으로 주요균주인 Lw 균주의 적정 발효온도는 35℃이며 교반속도는 120rpm, 고형물비는 1:9로 결정되었다.

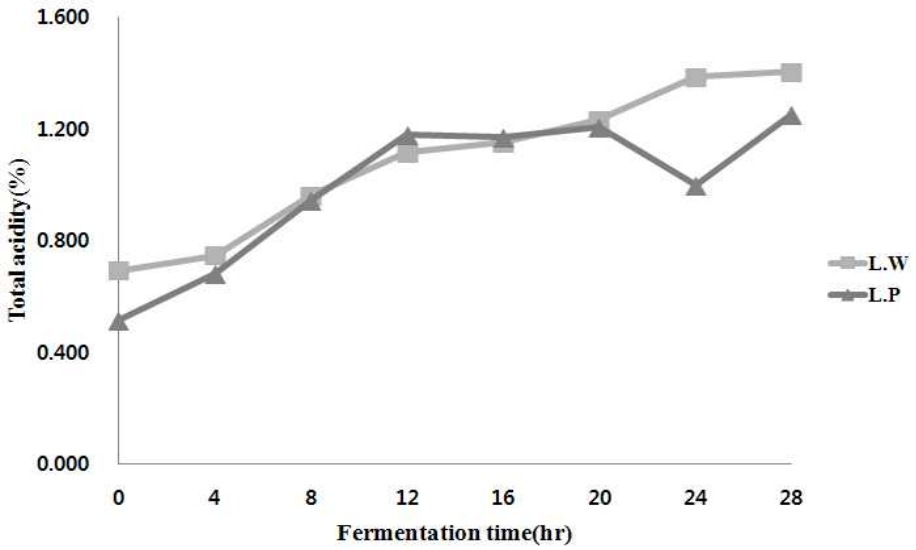


Fig. 4-4. Changes in total acidity of rice bran extract during fermentation at 35℃.

(6) 미강발효추출물의 소재화와 제품화를 위하여 공정 중 산화안정성은 매우 중요한 요소이다. 이를 위하여 항산화능을 측정하였으며 그 결과는 Table 4-5와 같다.

(7) 열수추출물과 Lp 및 Lw 발효추출물 모두 TEAC 값과 ORAC 값에서 매우 높은 항산화능을 보유한 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과로 미루어 미강발효 추출물은 가공적성과

안정성이 우수한 것으로 판단된다.

Table 4-5. TEAC and ORAC result of rice bran extracts

Sample	mg of TE/g dry sample	
	TEAC assay	ORAC assay
Hot water extract	46.03±0.96	136.25±3.81
L.p	49.85±0.66	149.06±1.71
L.w	40.43±0.85	120.49±3.33

5. 혼합균주의 미강 발효를 이용한 기능성 성분 증진효과

두개의 균주를 조합하여 미강의 유용성분 증진 가능성을 조사하였다. 사용한 균주는 표준균주인 *Lactobacillus plantarum*(KCCM 12116), *Lactobacillus plantarum* Hong(KFCC 11556P), *Pediococcus pentosaceus* 였다(이하 각각 L.p, L.w, L.k로 표시). 지표 기능성 성분으로는 GABA를 기준으로 하였다. 이 실험에 신규로 사용된 *Pediococcus pentosaceus*는 김치에서 분리된 균주로서 *Pediococcus pentosaceus* AJ305321와 99% 일치성을 나타내어 신균주로 등록 예정이다 (Fig. 5-1).

>LK
TGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAAC
ACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAA
CACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAG
ATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGC
TCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGA
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAG
AACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGC
ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGC
TGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAAC
GATGATTACTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAAT
CCGCCTGGGGAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTCGGGGACAGAATGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACC
ATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGA
GAGTTTGAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCTAAGGTGACCA
GAGTTGG

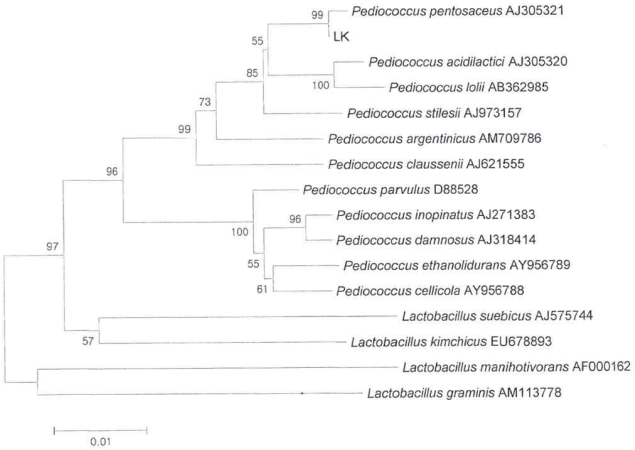


Fig. 5-1. Homology tree and 16SrDNA sequencing result of L.k strain

5-1 복합균주를 이용하여 발효한 미강추출물의 GABA함량

가. 실험방법

(1) 열수 추출한 미강 Sample의 발효를 위해서 표준균주 *Lactobacillus plantarum*(KCCM 12116)과 김치에서 분리한 L.w와 L.k균주를 선별하여 미강발효 시 2종류의 복합균주 starter를 1:1의 비율로 미강배지의 부피비로 5%로 접종하여 36시간 발효 시킨 후 여과하였다. 여과한 Sample은 121℃에 15분간 멸균하여 유산균을 불활성화 시킨 후 본 실험에 사용하였다.

(2) 복합균주로 발효한 미강발효추출물의 pH를 측정하였고, 검체 10ml에 탄산가스를 함유하지 않은 물 10m/를 가하고 페놀프탈레인시액 0.5ml를 가하여 0.1N 수산화나트륨액으로 30초간 홍색이 지속할 때까지 적정하여 산도를 측정하였고, 연속희석법으로 Sample을 희석한 다음 MRS Agar를 이용하여 pour plate법으로 유산균수를 측정하였다.

(3) 복합균주를 이용하여 발효한 것과 단일균주로 발효 한 미강발효추출물의 GABA 함량은 Zhang 등의 방법을 이용하여 비색법으로 측정하였다. Eppendorf tube에 시료 0.1 g과 methanol 400 μL를 가하고 75℃ 항온수조에서 완전히 건고시켰다. 여기에 70 mM $LaCl_3$ 1mL를 가하고 10분 동안 교반한 후 원심분리(15,000×g, 15 min)하여 상등액 700 μL를 취하여 0.1M KOH 160 μL를 미리 넣어 둔 또 다른 eppendorf tube에 첨가한 다음 5분 동안 교반하고 원심분리(15,000×g, 10 min)하였다. 상등액 550 μL를 새로운 eppendorf tube에 취하고 0.5M $K_4P_2O_7$ 200 μL, 4 mM NADP 150 μL, GABase(2 U/mL) 50 μL를 혼합한 후 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하고 20 mM α-ketoglutaric acid(α-KG) sodium salt 50 μL를 첨가하여 실온에서 1시간 방치한 후 340 nm에서 재차 흡광도를 측정하여 GABA함량을 구하였다. 이때 GABA(99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 표준곡선을 구하였다.

나. 실험결과

(1) 복합균주를 이용하여 36시간 동안 발효한 미강발효추출액의 pH는 L.w+L.k의 경우 4.06, L.w+L.p의 경우 4.08, L.k+L.p의 경우 4.04로 나타났으며, 산도는 L.w+L.k의 경우 0.87%, L.w+L.p의 경우 0.86%, L.k+L.p의 경우 0.89%로 복합균주로 발효한 미강발효추출물의 pH와 산도는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Table 5-1).

Table. 5-1. pH and total acidity of fermented rice bran extract fermented with mixed lactic acid bacteria

Sample	L.w+L.k	L.w+L.p	L.k+L.p
pH	4.06	4.08	4.04
Total Acidity	0.87%	0.86%	0.89%

(2) 복합균주를 이용하여 36시간 동안 발효한 미강발효추출의 유산균수의 경우 L.w+L.k와 L.w+L.p의 경우 5.1×10^{12}, 4.2×10^{12}으로 유의적 차이를 보이지 않았으나, L.k+L.p의 경우

4.5×10^{10}으로 가장 낮은 발효균 증식을 나타내었다 (Table 5-2).

Table 5-2. Viable cell count of complex strains fermented rice bran extract

Sample	L.w+ L.k	L.w+ L.p	L.k+ L.p
Viable cell (cfu/ml)	5.1×10^{12}	4.2×10^{12}	4.5×10^{10}

(3) 복합균주로 발효한 미강발효추출물의 GABA수율 증진효과를 확인하고자 GABA함유량을 측정한 결과 L.w+L.p의 조합으로 발효한 미강 발효추출물의 GABA함유량이 37.5±1.1mg/100g으로 가장 높았으며, L.k+L.p의 경우 22.6±0.6mg/100g, L.w+L.k의 경우 22.6±0.6mg/100g의 순으로 GABA함유량을 나타내었다(Table 5-3).

(4) 단일균주로만 미강을 발효했을 때에 비하여 복합균주를 이용하여 발효하는 한 경우, 오직 L.w+L.p 조합만이 유의적으로 크게 GABA 생산량이 증가하였으며, 다른 조합에서는 유의적 차이를 볼 수 없었다.

(5) 상승효과를 평가하기 위하여 각 개별균주 생산치를 합한 예상치를 실측치와 비교한 결과, L.w+L.p 조합의 생산량 실측치를 각 단일 균주를 사용하였을 경우 생산량의 합(예상치)와 비교한 결과, 실측치의 비율은 예상치의 88.7%에 불과하였다. 즉, 복합균주의 GABA생산 상승작용효과는 산술합계로서는 나타나지 않았으며, 대량 생산을 위하여는 복합균주발효보다는 GABA 전구체인 glutamic acid를 첨가하여 배지를 개량시키는 것이 더 타당할 것으로 판단하였다.

Table 5-3. GABA content of complex strains fermented rice bran extract

Strain(s)	실측치 (mg/100g)	예상치 (mg/100g)	실측치/예상치(%)
L.w	20.6±0.5	-	-
L.k	20.3±0.3		
L.p	21.7±0.3		
L.w+ L.k	22.0±0.5	40.9±0.8	53.8
L.w+ L.p	**37.5±1.1**	42.3±0.8	88.7
L.k+ L.p	22.6±0.6g	42.0±0.6	53.8

5-2 MSG를 첨가한 미강배지로 발효한 미강발효 추출물의 GABA 생산량 증진효과

가. 실험방법

(1) 미강 발효추출물의 GABA함유량 증진효과를 확인하기 위하여, 먼저 미강과 증류수를 1:10의 비율로 섞어준 다음 Autoclave를 이용하여 121℃에 15분간 멸균처리하였다. 이 후

미강배지의 전체량에 MSG(mono sodium glutamate)를 각각 1, 3, 5, 7% 비율로 무균적으로 첨가한 다음 L.w균주 starter를 5% 비로 가하여 35℃, 50rpm으로 48시간, 96시간 배양한 후 GABA함량을 비교 분석하였다.

나. 실험결과

(1) 미강열수추출물에 무균적으로 MSG를 1, 3, 5, 7%를 첨가한 후 L.w균주를 이용하여 48, 96시간 발효한 미강 발효추출물의 GABA함유량을 비교하였을 때, 1% MSG를 첨가하여 48시간 동안 발효한 경우, 219.6±15.7mg/100g으로 가장 높은 GABA함량을 보였다 (Table 5-4).

(2) 미강배지에 첨가한 MSG의 GABA생산량 변화경향은 MSG 1% 첨가의 경우 무첨가군에 비하여 48시간 발효시점에서 10배 정도 GABA생성량이 증가하였으나, MSG 첨가량이 증가할수록 GABA 생성량이 역으로 감소하는 경향을 나타내었다.

(3) MSG 3% 첨가한 경우를 제외하고는 발효시간을 96시간까지 늘려도 GABA 생산량은 유의적으로 증가하지 않았다.

(4) GABA의 전구체인 glutamic acid 함량이 기질 중 증가하면 효소의 활성을 저해하는 것으로 추정되며, 1% 이하의 첨가만으로도 GABA 생성량이 크게 증가하는 효율을 보였으므로 효율적인 GABA 생산이 가능할 것으로 판단된다.

(5) 미강의 함유량을 높여 넣은 것보다 낮은 것의 GABA함유량이 높은 경향을 보이며, 발효시간에 따른 GABA함유량 비교 시 MSG를 3%첨가한 경우 48시간 발효한 것(145.9±16.1mg/100g)에 비하여 96시간 발효한 것의 GABA함유량(195.6±27.7mg/100g)이 더 높았으나 대부분의 경우 48시간 발효한 것의 GABA함유량이 더 높은 것을 알 수 있다.

Table 5-4. The effect of MSG addition on the production of GABA when fermented with L.w

Sample	GABA content(mg/100g)	
	48hr	96hr
L.w	22.1±0.9	20.8±0.6
L.w + MSG 1%	**219.6±15.7**	217.7±10.8
L.w + MSG 3%	145.9±16.1	195.6±27.7
L.w + MSG 5%	80.4±16.9	77.1±5.9
L.w + MSG 7%	43.9±10.1	43.3±0.6

(6) 복합균주의 GABA 생산 증진효과를 확인하기 위하여 미강배지에 무균적으로 MSG를 1, 3%첨가한 후 복합균주를 이용하여 발효한 후, GABA함유량을 비교하였다.

(7) MSG 3%를 첨가한 후 L.k균주와 L.p균주 복합처리군과 MSG 1%를 첨가한 후 L.w균주와

L.p균주를 복합적으로 첨가하여 96시간 발효한 경우 각각 224.5±9.1과 221.0±15.8mg/100g의 GABA를 생산하여 가장 효과적이었다 (Table 5-5). 하지만 MSG 1%를 첨가한 L.w 발효군과 비교하면 유의적 차이가 없었으므로 복합균주의 효과는 L.w처리보다 효과적이지 못 하였다.

(8) 유산균 복합균주의 사용은 효율성도 중요하지만 바이러스 오염시 한종류의 유산균이라도 잔존하여 발효를 계속시켜 생산을 유지시키는 장점 때문에 사용하므로 이에 대한 검토는 경제성을 검토하는 과정에서 더 고려할 예정이다.

Table 5-5. GABA content of complex strains fermented rice bran extract as MSG addition

Sample	GABA content (mg/100g)	
	48hr	96hr
WK	25.4±0.8	22.9±2.6
WK + 1%MSG	155.9±14.9	188.4±20.5
WK + 3%MSG	**194.7±7.9**	**202.1±4.6**
WP	37.7±1.8	36.5±0.9
WP + 1%MSG	**208.3±8.7**	**221.0±15.8**
WP + 3%MSG	90.34±22.9	157.9±3.4
KP	23.4±0.4	25.4±0.1
KP + 1%MSG	143.5±14.1	193.3±2.2
KP + 3%MSG	181.2±3.2	**224.5±9.1**

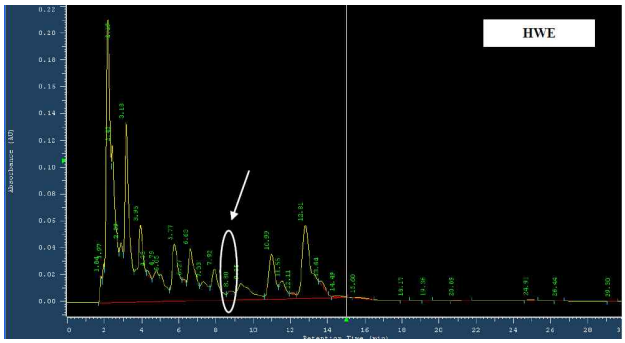
※ WK(L.w+L.k), WP(L.w+L.p), KP(L.k+L.p)

5-3. Ferulic acid 첨가의 Compound X 함량 증진 효과

(1) 미강의 복합균주 사용하여 발효한 추출물을 뇌경색 모델에 적용한 결과, 모든 조합이 L.w 발효추출물에 비하여 동물실험 결과가 좋지 않았다. 따라서 L.w 발효를 중심으로 유효성분을 조사하였다.

(2) 미강을 L.w로 발효시키면 ferulic acid의 함량이 감소하면서 늘어나는 성분을 확인하여 이를 ferulic acid metabolite인 Compound X로 표시하였다(Fig 5-2, Table 5-6).

(3) Table 5-6의 측정 결과치를 비교하면 L.w 발효로 인하여 미강의 ferulic acid 함량은 2.98에서 0.64mg/100g으로 감소한 반면, compound X는 0.28에서 0.68mg/100g으로 증가하였다. 따라서 compound X 함량을 증가시키려면 전구체인 ferulic acid 농도를 증가시키면 될 것으로 추정된다.



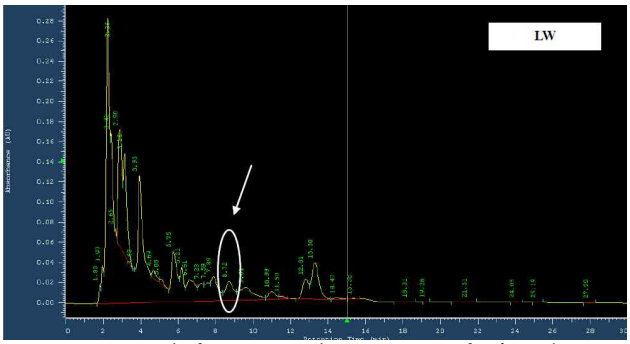


Fig. 5-2. HPLC chromatogram of hot water extract and fermented extract of rice bran (elution time 13.3min, ferulic acid; 8.8min, compound X)

Table 5-6. Concentration of ferulic acid and compound X of hot water extract and fermented extract of rice bran

	Ferulic acid (mg/100g)	Compound X (mg/100g)
Hot water extract	2.98	0.28
L.w fermented extract	0.64	0.86

(4) 미강 기본배지에 ferulic acid를 중량비로 0.01%와 0.05% 첨가하여 L.w로 발효시킨 후 compound X의 함량변화를 HPLC로 분석하였으며, 그 결과는 Fig. 5-3과 같다.

(5) Ferulic acid의 첨가는 compound X의 생산량을 증가시켰다. 다만, 0.05% 첨가의 경우 compound X의 생산효과는 0.01% 첨가의 2배에도 미치지 못 하였다.

(6) 따라서 ferulic acid의 첨가의 최적비율은 발효시간과 ferulic acid 첨가에 따른 원가 상승을 감안하여 결정할 예정이다.

Table 5-7. Effect of ferulic acid addition on the production of ferulic acid and compound X when fermented with L.w

	Ferulic acid (mg/100g)	Compound X (mg/100g)
No ferulic acid addition	0.64	0.86
0.01% ferulic acid addition	1.78	4.38
0.05% ferulic acid addition	2.31	6.72

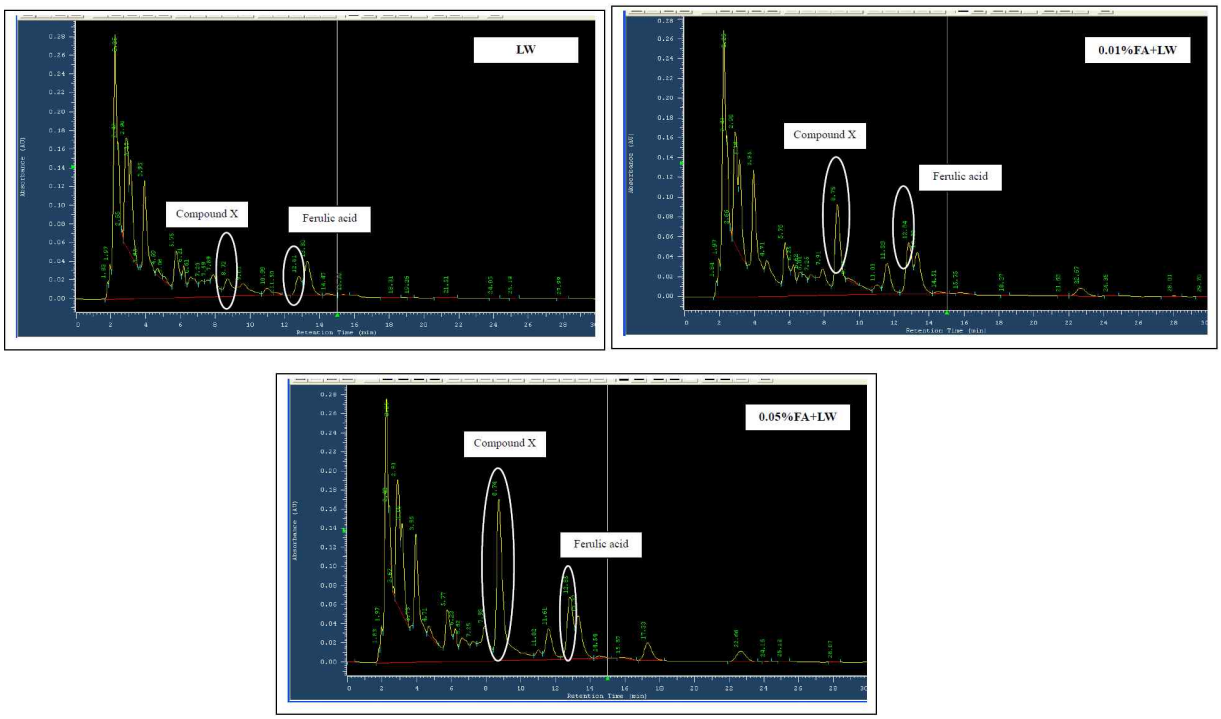


Fig. 5-3. HPLC chromatograms of L.w fermented extract of rice bran with addition of ferulic acid at different concentrations.

5-4. Compound X의 화학구조적 특성 규명

(1) Ferulic acid의 미생물 대사산물에 대한 연구는 주로 vanilin 생산에 집중되어 있으며, 이와 관련된 다양한 대사산물의 생성반응 형태가 규명되어져 있다.
(2) 일차적으로 알려진 대사산물의 표준물질과 유산물발효 추출물을 hexane과 ethylacetate로 분획하여 TLC로 비교 확인하였다.
(3) 분리된 compound X 가 포함된 페놀산 대사물 중 뇌기능 관련 효능이 높은 물질을 분리하기 위해 prep-HPLC 방법으로 대량 분리하며, 생리활성이 높은 분획을 확인한 후 HPLC-MS를 이용하여 분자량을 확인한다.

가. 실험방법

(1) Hexane과 ethyl acetate를 이용한 분리여과 방법은 다음과 같다. 여과된 미강발효추출물 100ml과 hexane100ml을 분액깔대기에 분주한 후 2분간 흔들어 준 다음 10분간 방치하여 미강발효추출물은 모우고 hexane을 걸러냈다. 이 과정을 총 2회 반복한 후 남은 미강 발효추출물을 다시 분액깔대기에 분주한 다음 용액의 pH를 2로 맞추기 위하여 1.55M HCl 9.5ml을 첨가한 후 10분간 정치시킨다. 이후 ethyl acetate 100ml을 첨가한 다음 2분간 흔들어 주어 40분간 정치시킨 후 미강발효추출물과 ethyl acetate를 각각 모아둔 다. 분리한 미강발효추출물을 다시 분액깔대기에 분주한 후 ethyl acetate 100ml을 다시 첨가하여 흔들어 주는 과정을 총 3회 반복하여 최종적으로 모인 ethyl acetate를 감압농축한다. 농축

된 Sample은 vacuum dryer를 이용하여 30℃의 온도로 2시간 건조시켜 TLC실험에 사용한다.

(2) TLC 측정은 TLC측정 챔버에 methanol 0.5ml과 ethyl acetate 2.5ml을 분주하여 TLC판에 준비된 Sample을 이용하여 spot을 찍어 roading을 시킨 후 UV lamp를 이용하여 254nm조건으로 확인한다.

(3) TLC Plate는 Silica gel 60 F_{254}(aluminumsheet,7x3cm)를 사용하였으며 전개용매는 Methanol : Ethyl acetate (1 : 5)이다.

(4) 비교용으로 사용한 phenolics standard는 ferulic acid(Fer), Gallic acid(Gal), Sinapic acid(Sin), *p*-Coumaric acid (Cou), Vanillic acid (Van), Hydroxycinnamic acid (Hyd), 4-vinylguaiacol (4 VG)였다.

(5) Compound X가 포함된 유기용매 추출물의 대량 분획을 위하여 prep-HPLC 방법으로 분리하였다. 분리조건은 Table 5-8과 같다.

(4) prep-HPLC분리된 분획 중 뇌기능 활성 높은 분획에 대한 HPLC-MS 분석을 실시하였다.

Table 5-8. prep-HPLC Condition of compound X

Solvent A	MeOH
Solvent A	NaH_2PO_4
Flow rate	1.0 mL/min
Temperature	40 ℃
Gradient	Solvent A : Solvent B = 30 : 70

나. 실험결과

(1) Rf값을 비교하여 보면 위쪽 밴드의 성분들은 ferulic acid와 그 대사산물의 혼합물로 판단되나, 전개속도가 느린 아래쪽 밴드는 발효에 의하여서만 생성되었다 (Fig. 5-4).

(2) 아래쪽 밴드의 실리카만 긁어서 다시 용매로 추출한 후 spectra를 확인하여 보았으며 그 결과는 Fig. 4의 우측에 표시되었다. Lw 타 대사산물과 compound X의 혼합물이 함께 존재하는 것으로 판단되어, 다시 HPLC로 low band 부분을 확인하였으며, 8.79분 peak의 spectra를 확인한 결과 compound X로 확인되었다.

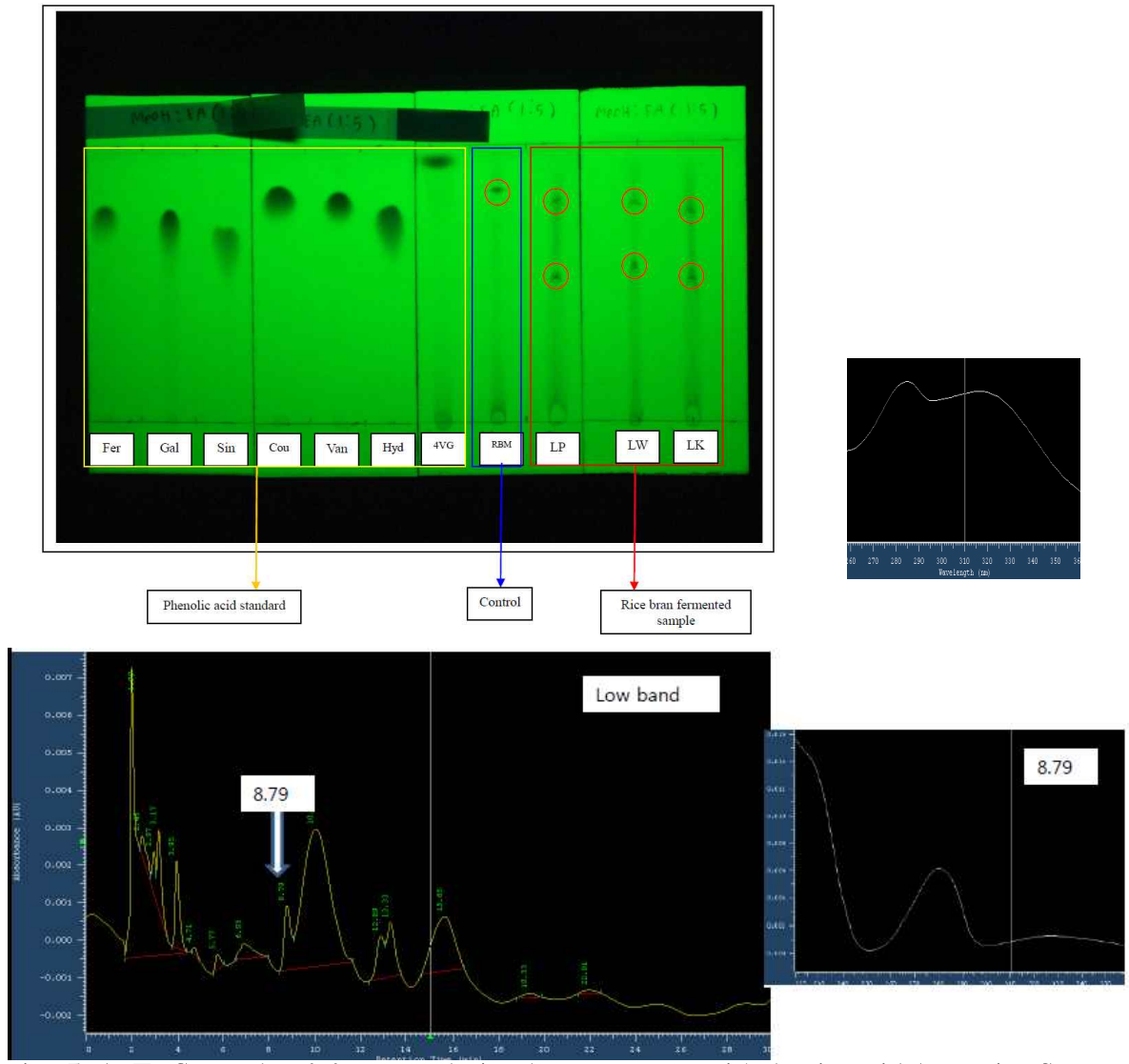


Fig. 5-4. TLC result of fermented rice bran extract with lactic acid bacteria. Spectra of low band part was shown on the right.

(3) Ferulic acid 0.01%를 첨가하여 L.w로 발효한 HPLC 결과에서 8.8min에 나타나는 Compound X peak의 spectra의 특성(Fig. 5-4)은 TLC의 low band에 속하는 성분과 일치하였다. 즉, compound X는 ferulic acid의 대사 생성물임을 재확인할 수 있었다.

(4) 이를 ferulic acid metabolites들과 비교하여 추론한 화학적 구조를 Fig. 5-6에 표시하였다.

(5) L.w 발효에서는 ferulic acid의 carboxyl기와 결합한 이중결합이 saturation 되고, methoxyl group이 수산화기 또는 수소기 등으로 전환된 것으로 추정되어 R로 표시하였다.

(6) Silica TLC의 low band는 spectra가 혼합물의 형태로 나타난 반면 ferulic acid를 첨가한 발효추출물은 한가지 화합물로 특징되는 spectra를 나타내었다.

(7) prep-HPLC로 Compound X 분획을 분리한 결과(Fig. 5-6), 5개의 분획을 얻을 수 있었고, 4번 분획에서 높은 뇌기능 활성을 확인할 수 있었다.

(8) 뇌기능 활성이 높은 4번 분획에 대한 HPLC-MS 분석을 위해 HPLC profile에서 peak 면적이 가장 높게 나타난 retention time(Fig. 5-7)의 구간의 분자량을 분석한 결과, 분자량은 약 186.9 Da으로 나타났다.

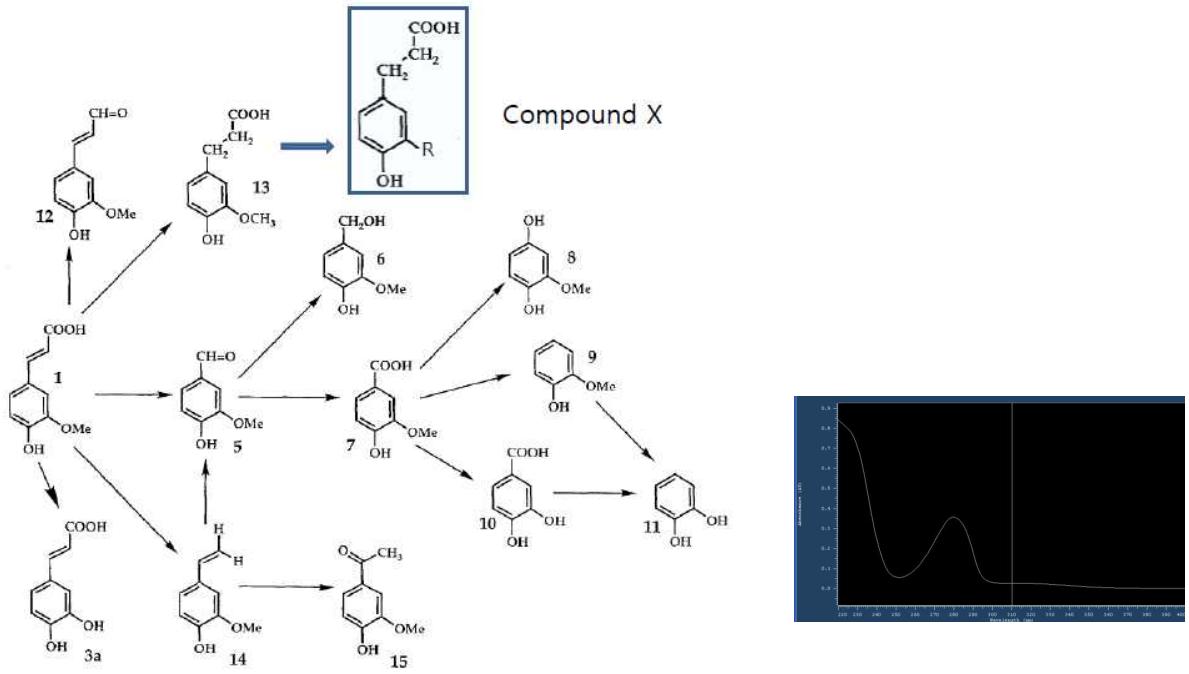


Fig. 5-5. Chemical structure of microbial metabolites of ferulic acid and Compound X (Spectra of Compound X was shown on the right)

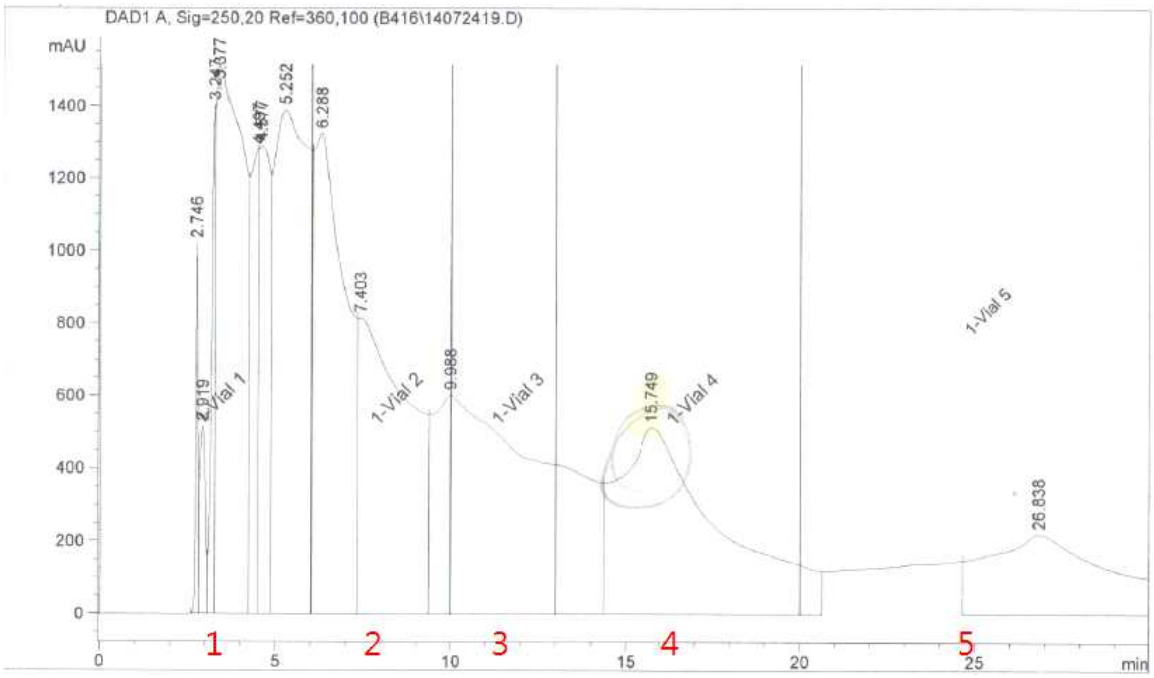


Fig. 5-6. prep-HPLC chromatograms of hexane-ethyl acetate sequential extracts form L.w fermented extracts

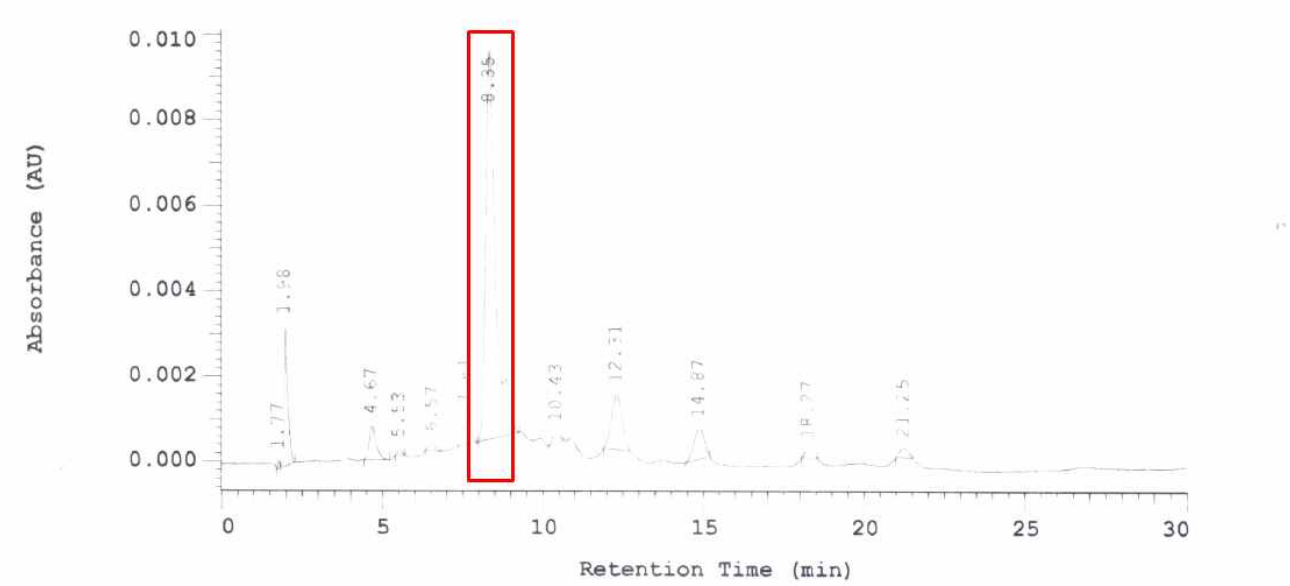


Fig. 5-7. HPLC chromatograms of no. 4 fraction by separated prep-HPLC

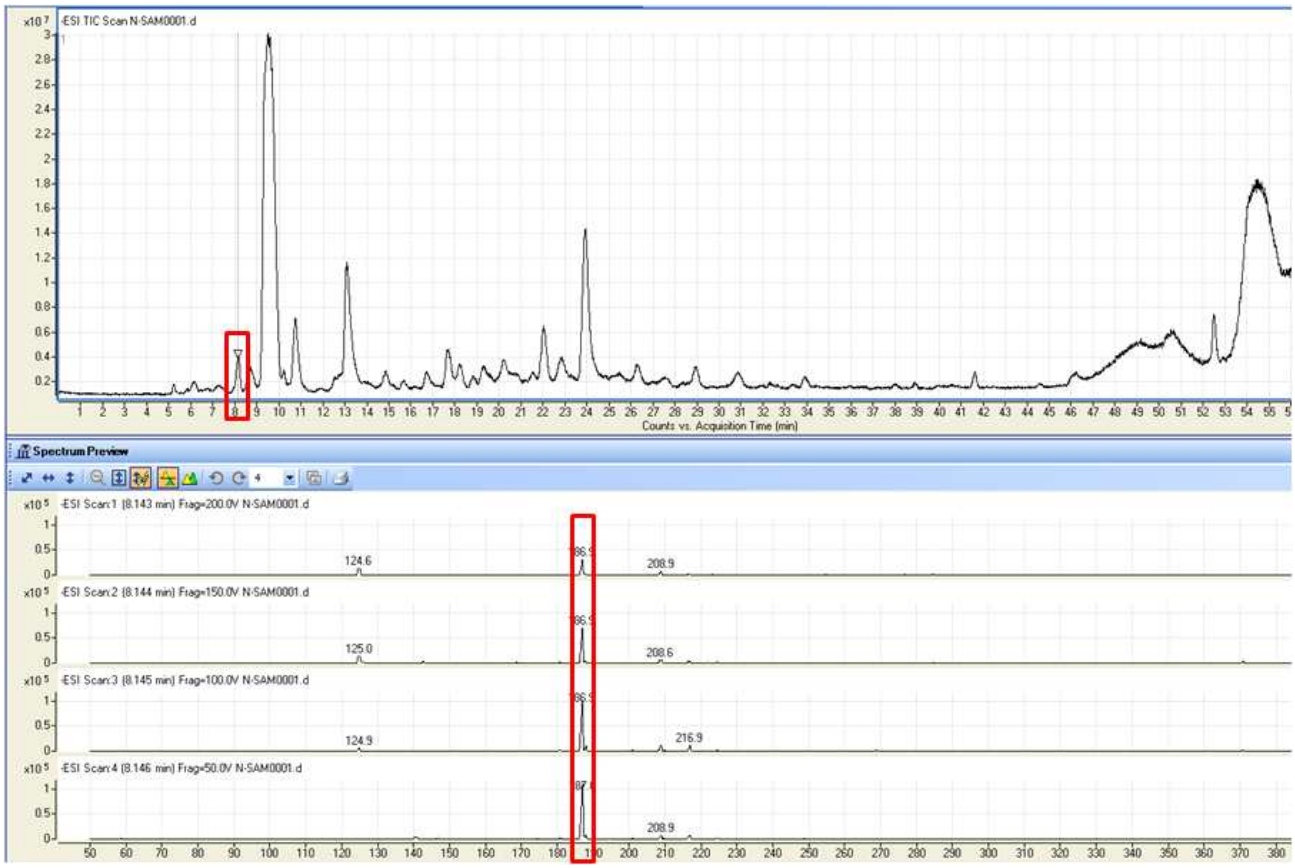


Fig. 5-8. LC-MS spectrum profiles of no. 4 fraction of compound X complexs

6. 단위공정 설계 평가와 공정설비 및 조건조사

6-1 발효기를 이용한 단일균주 최적발효조건 확인

가. 실험방법

(1) 단일균주의 최적발효조건을 알아보기 위한 실험은 발효기(모델명 LiFlus GX)장치를 이용하여 35℃의 배양온도에서 교반속도를 0, 100, 200rpm으로 달리하는 조건으로 L.w 유산균주로 배양한 미강발효추출물을 배양시간에 따른 pH, 유산균수, GABA함유량을 측정하여 비교해보았다.

(2) 발효기를 이용하여 발효한 초기 발효조건은 아래의 표대로 1.80×E9로 배양한 L.w균주를 전체량에 5%첨가하여 발효하였다.

나. 실험결과

(1) 교반속도를 달리하여 배양한 미강발효추출물의 발효시간에 따른 pH변화는 발효시작 12시간 만에 모든 rpm조건에서 pH 4 이내로 떨어지는 것을 보였으며, 이후 pH가 일정하게 유지되는 것을 알 수 있다.

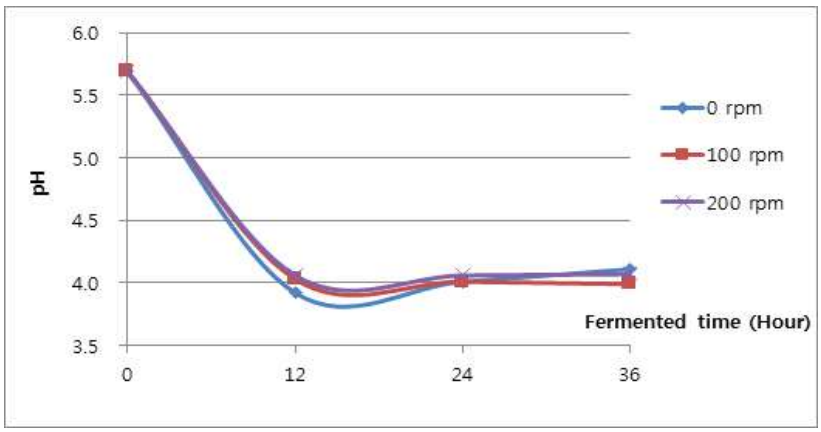


Fig. 6-1. pH changes of rice bran extract as affected by the agitation speed during fermentation with L.w

(2) 교반속도를 달리하여 배양한 미강발효추출물의 발효시간에 따른 유산균수는 발효시작 12시 동안 모든 rpm조건에서 유산균 성장률이 최고치를 보이다가 이후 유산균수가 줄어드는 것을 알 수 있다.

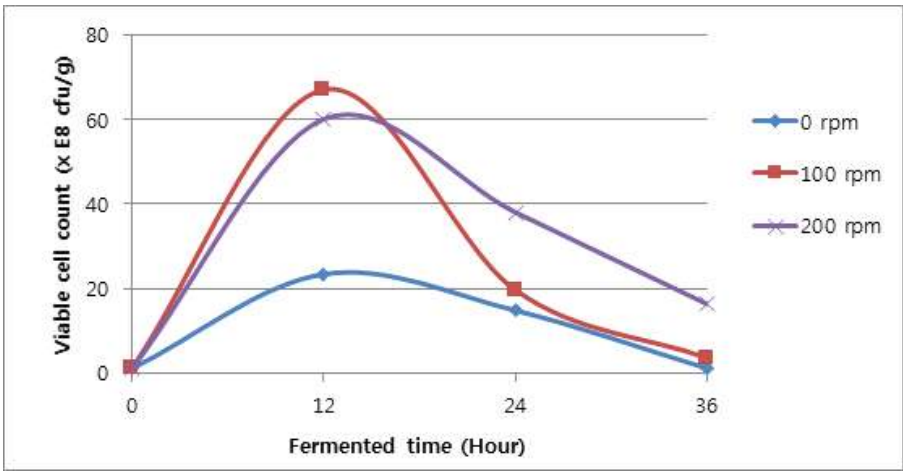


Fig. 6-2. Viable cell count changes of rice bran extract as affected by the agitation speed during fermentation with L.w

(3) 교반속도를 달리하여 배양한 미강발효추출물의 발효시간에 따른 GABA함유량은 발효시간이 가면 갈수록 증가함을 보이며 0rpm의 경우 36시간 발효 시 14.6±0.5mg/100g으로 100rpm 13.4±0.3mg/100g, 200rpm 13.4±0.5mg/100g에 비해 높은 것을 알 수 있다. 이것은 발효기를 사용하여 미강을 발효할 경우 rpm을 주어 미강배지를 섞어주는 것 보다는 정치하여 배양하는 것이 더 효율적임을 보여준다.

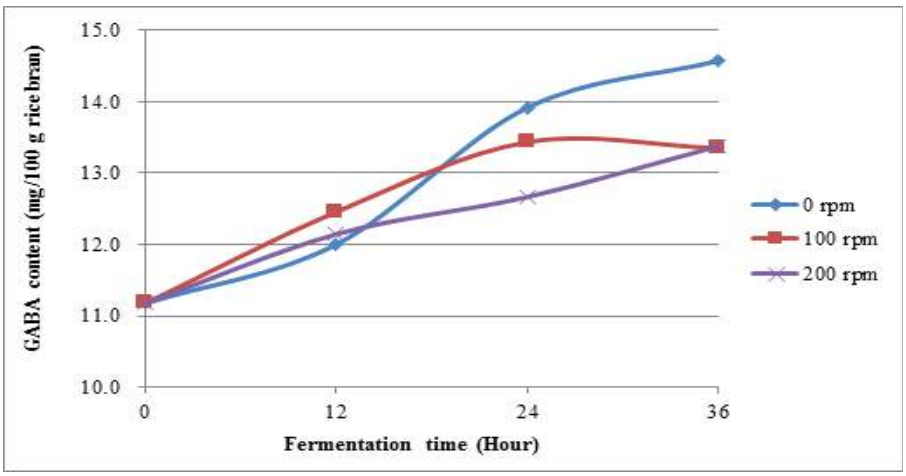


Fig. 6-3. GABA content changes of rice bran extract as affected by the agitation speed during fermentation with L.w

6-2 미강원료 안정성 확보단계부터 발효추출 단위공정별 물질수지 평가 후 기본공정 설계

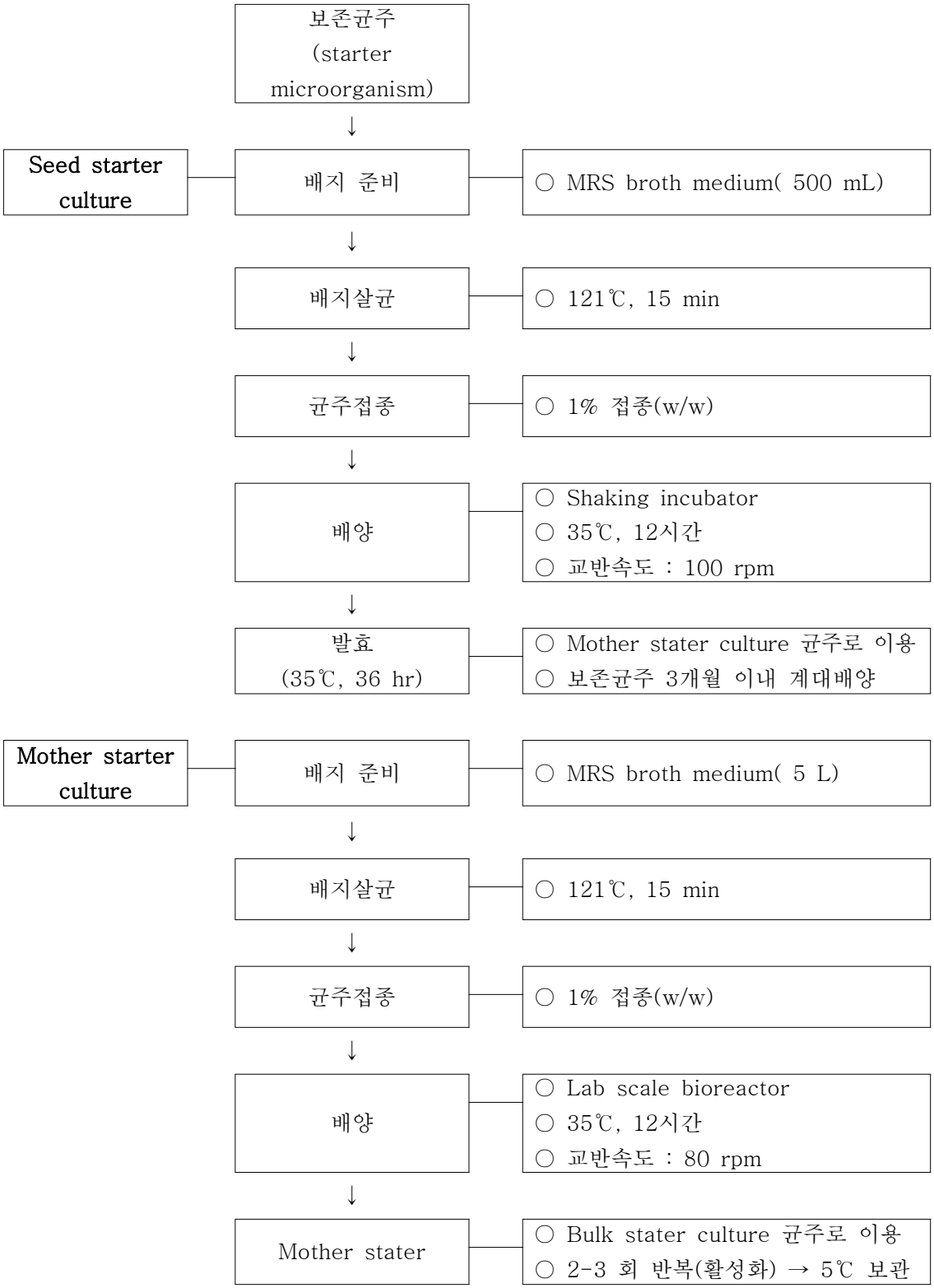
(1) 미강발효추출물의 제품화를 위하여 원료의 안정성 확보단계부터 발효추출 단위공정별 물질수지 평가 및 기본공정 설계는 아래의 모식도대로 설계하였다.

(2) 미강발효추출물 생산을 위한 발효균주는 seed, mother, bulk 배양으로 이어지는 3단계 배양공정으로 제조하며(Fig. 6-4), 공정별 생산방법은 아래와 같다.
- 미강 발효를 위한 starter는 보존균주(stock, 5 g)를 살균된 MRS broth 배지(500 mL)에 접종한 후 shaking incubator에서 12시간 seed 배양(35 ℃, 100 rpm) 한 다음, mother 배양을 위한 균주로 이용한다.
- mother 배양은 seed 배양된 균주 50 mL을 살균된 MRS broth 배지(5 L)에 접종한 후 lab scale bioreactor에서 12시간 배양(35 ℃, 80 rpm)하여 생산하며, 생산된 균주는 bulk 배양용 균주로 사용한다.
- Bulk 배양은 mother 배양 균주 500 mL을 살균처리 된 MRS broth 배지(50 L)에 접종한 후 pilot scale bioreactor에서 12시간(35 ℃, 80 rpm) 배양한 후 미강 본 발효를 위한 생산 균주로 사용한다.

(3) 미강 발효공정은 Fig. 6-5로 도식화 하였으며, 공정별 생산방법은 아래와 같다.
- 미강발효용 배지제조를 위해 균질화 된 미강 분말 1,000 kg과 정제수 9,000 L를 조제탱크에서 교반한 후 steam chamber(100 ℃)에서 75.6분간 살균처리 한다.
- 살균된 미강 발효 배지는 발효 탱크로 이송하여, 35 ℃로 냉각 시킨 후 bulk starter 500 kg을 접종한 다음 35℃에서 36시간 발효한다.
- 발효가 완료된 후 조제탱크로 이송한 후 100℃에서 75.6분간 가열처리를 통해 발효균을 불활성 한다.

(4) 발효된 미강의 추출과 농축공정은 Fig. 6-6로 도식화 하였으며, 공정별 생산방법은 아래와 같다.
- 미강발효물은 원심분리와 마이크로 필터여과를 실시하여 불용성분을 제거한다.
- 여과과정을 거친 미강발효물의 가용성 성분은 용매처리 및 물리적 방법으로 추출한 후 농축기로 농도가 26.5 Brix가 되도록 농축한다.
- 용매추출 농축법은 hexane과 ethyl actate를 순차적으로 추출하는 방법으로 용매의 극성에 따라 유용성분을 분리하며, 분리된 추출물은 감압 농축한다.

(5) 농축된 발효미강의 제품화를 위한 건조공정은 Fig. 6-7로 도식화 하였으며, 공정별 생산방법은 아래와 같다.
- 미강 물리적 추출농축물의 경우 진공 및 동결, 분무건조방법을 이용하여 건조한 후 고속회전 믹서를 이용하여 분쇄한 후 베이커리 및 건강기능성 식품 소재로 상품화 한다.
- 미강 용매 추출농축물은 동결 및 분무 건조를 이용하여 건조한 후 분쇄한 다음 뇌기능개선 및 건강기능식품 소재로 상품화 한다.



(Continued to next page)

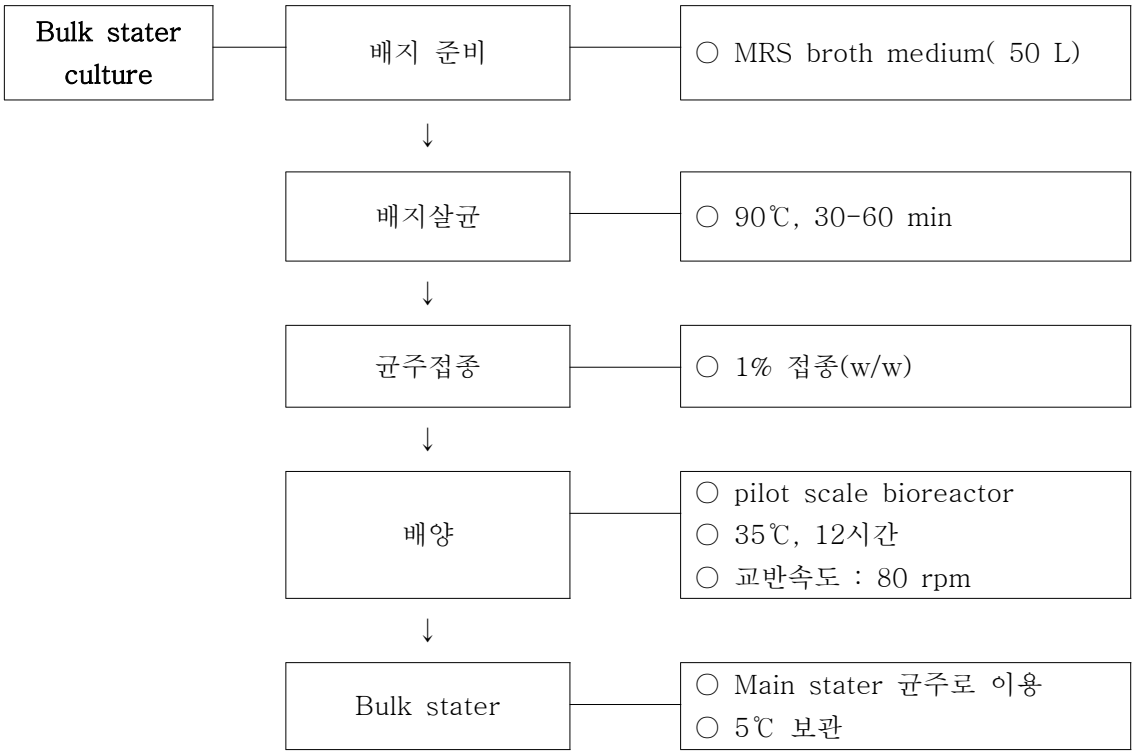
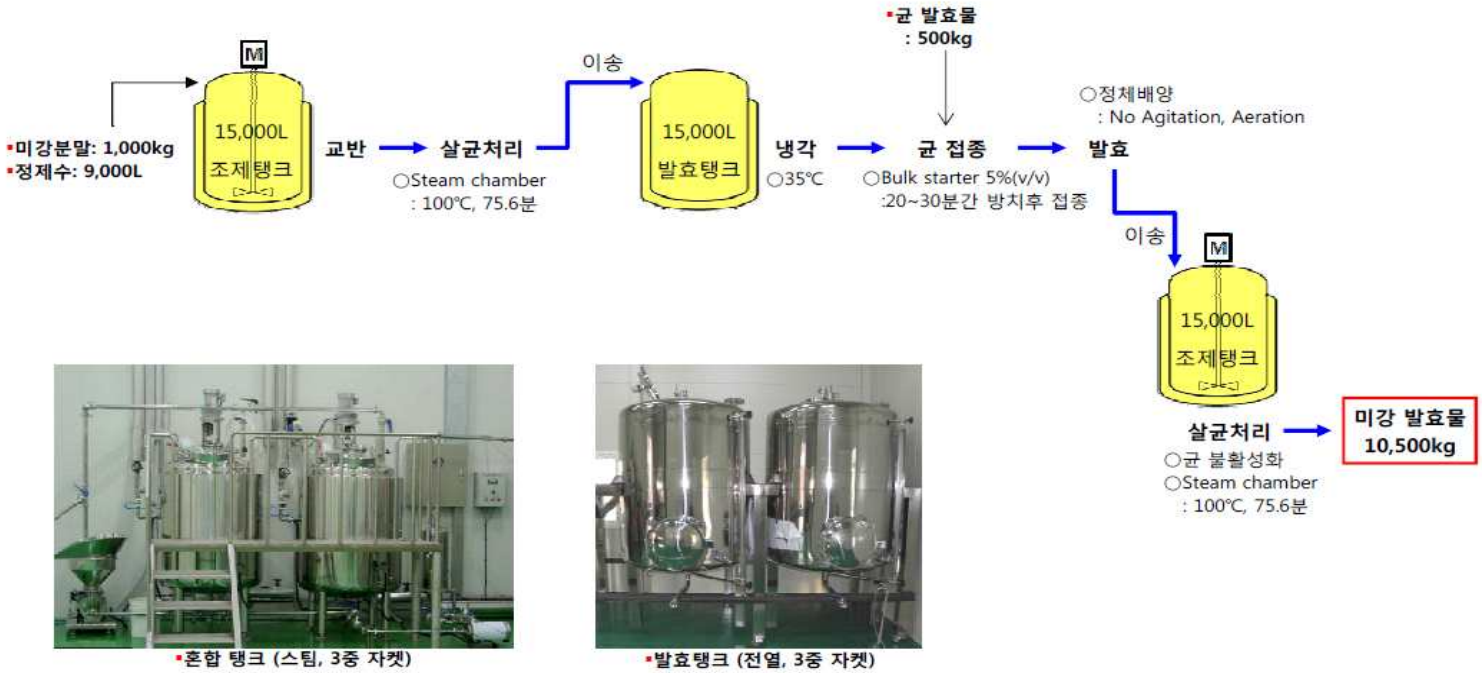


Fig. 6-4. Flow chart of microorganism starter for main fermentation

미강 발효 공정



▪혼합 탱크 (스팀, 3중 자켓)

▪발효탱크 (전열, 3중 자켓)

▶**혼합탱크:**열원이 스팀으로 고온 살균이 가능하고
상수를 공급하여 냉각도 시킬수 있음.
교반 임페라가 부착되어 분말 분산이 가능함.

▶**발효탱크:**열원이 전열로 장기적으로 안정된 온도를
유지하면서 저온에서 발효가 가능하며
상수를 공급하여 냉각도 시킬수 있음.

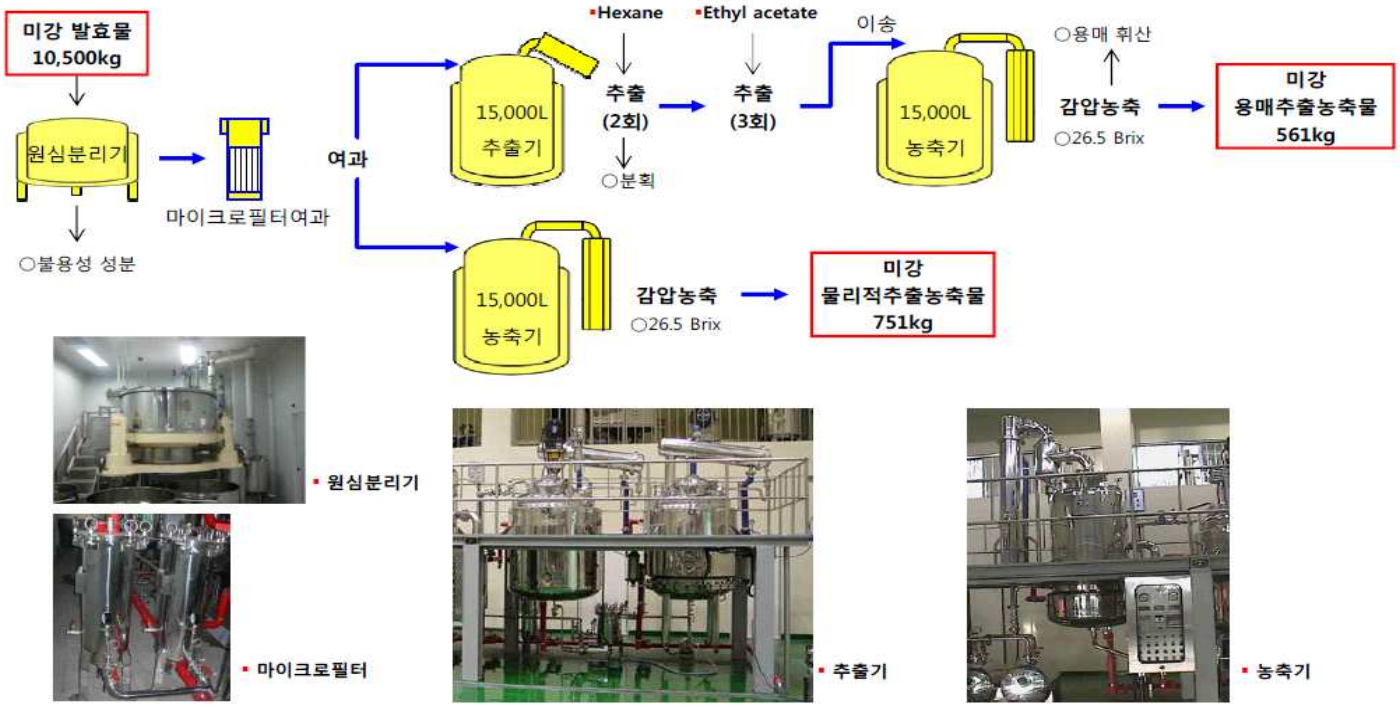
▶**설비참고 업체**

1)한성에프앤씨주식회사 (hansungfc.com)
: 혼합탱크, 발효탱크

2)제일기공 (jeilm.co.kr)
: 혼합탱크

Fig. 6-5. Flow chart for fermentation process of rice bran

미강 발효물 추출.농축 공정도



▶**추출기:** 열원이 스팀으로 고온 추출이 가능하고 상부에 환류냉각 장치(용매회수장치)가 부착되어 추가용매 없이 연속추출이 가능함.

▶**농축기:** 열원이 스팀이며, 진공 농축방식으로 저온에서 농축이 이루어지며 가열관과 농축관이 나누어져 연속증발 농축이 이루어진다. 자연순환식과 강제순환식이 있다.

▶**설비참고 업체**

1)한성기계공업㈜(han-seong.co.kr) : 원심분리기

2)한성에프앤씨㈜(hansungfc.com) : 마이크로필터여과기,추출기,농축기

3)제일기공(jeilm.co.kr) : 추출,농축기

Fig. 6-6. Flow chart for extraction and concentration process of fermented rice bran

미강 발효물 추출.농축물 제품화 공정도

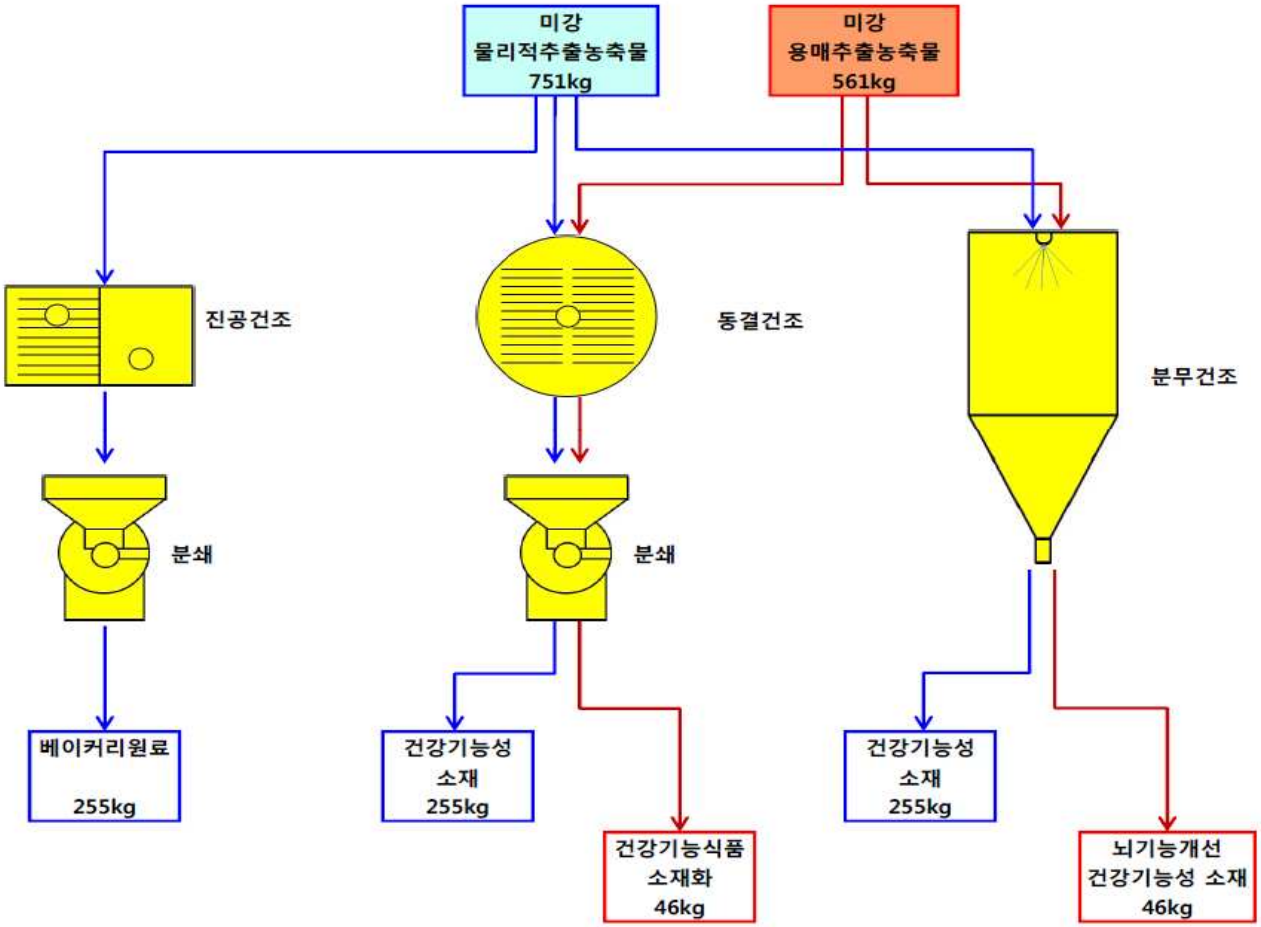


Fig. 6-7. Flow chart for dehydration process of feremented rice bran

(6) 미강 발효추출물 생산과 관련 한 물질수지 이동은 Fig. 6-8과 같다.

- 미강 1,000kg과 정제수 9,000 mL로 제조된 미강 발효용 배지는 혼합 및 살균, 냉각등 미강 전처리 공정에서는 질량 변화가 없으며, 발효공정 시 발효균주 500 kg의 접종으로 전체질량이 10,500 kg으로 증가한다.
- 이후 미강발효물의 농축건조 공정에서 미강발효물은 여과 및 물리적 농축으로 수분 및 불용성 성분 9,749 kg이 제거되고, 동결 및 진공, 분무 건조등에 의해 수분 496 kg이 제거되어 255 kg의 미강발효 분말을 얻을 수 있다.
- 또한, 미강발효물의 여과 후 hexane과 ethylactate 순차적 농축과정을 거치면서 수분 및 불용성 성분과 용매 난용해성 성분이 제거되어 561 kg의 미강 용매농축물을 얻을 수 있으며, 농축물의 건조과정에서 515 kg의 수분이 제거되어 46kg의 뇌기능 개선 및 건강기능성 소재용 미강발효을 생산할 수 있다.

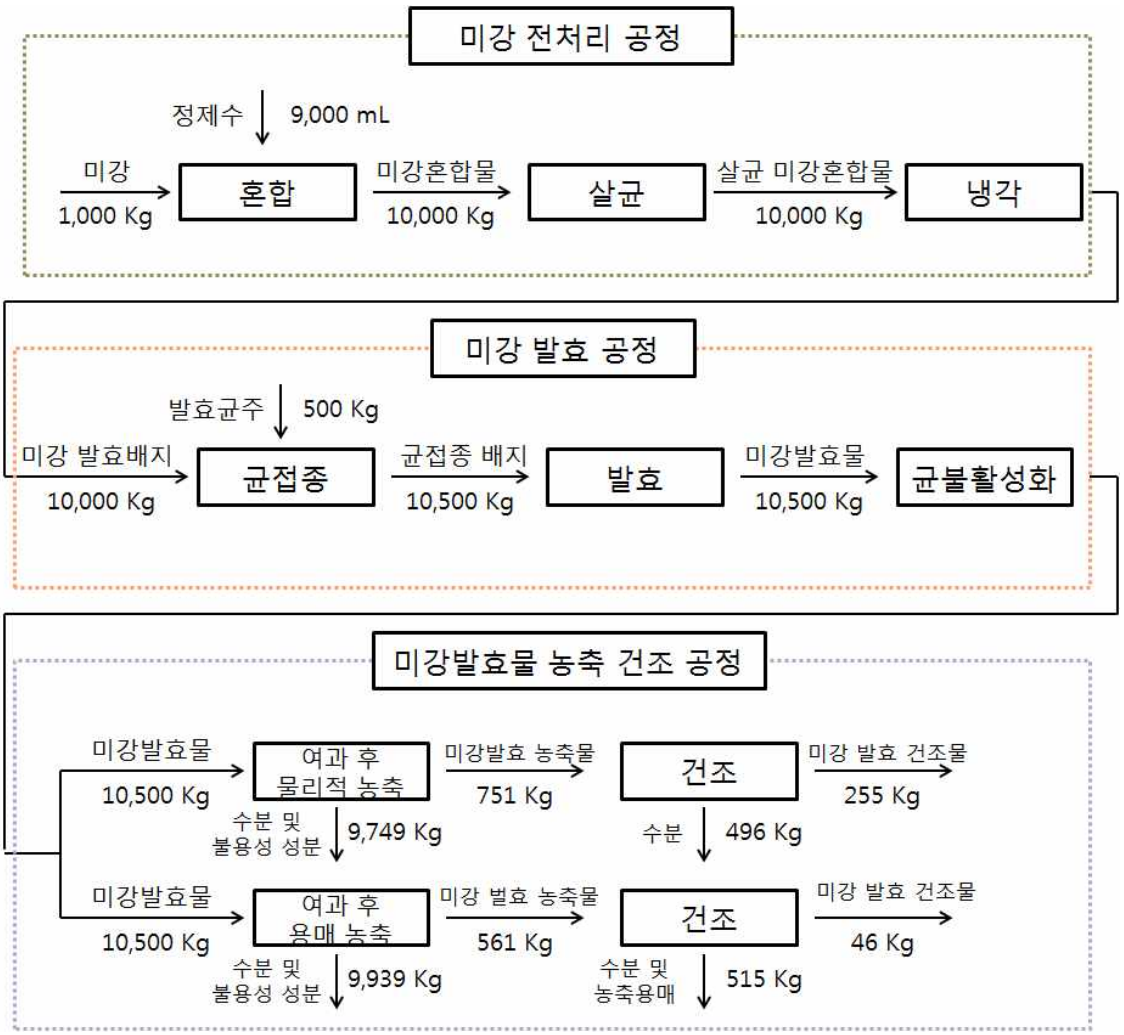


Fig. 6-8. Material blance of rice bran fermentation process

7. 미강발효추출물의 가공적성에 따른 용도검토

7-1 가열온도 및 시간에 따른 미강발효추출물의 GABA의 열안정성 조사

(1) 대부분의 식품제조는 가열공정이 수반된다. 따라서 기능성성분의 열안정성은 제품화에 있어 필수적인 특성이다. 따라서 이 실험에서는 기능성성분인 GABA의 열안정성을 상압가열과 고압가열조건에서 평가하였다.

가. 실험방법

(1) 미강발효추출물의 가열처리에 따른 GABA의 열안정성을 알아보고자 상압가열(100℃의 온도에서 30분, 60분), 고압가열(121℃의 온도에서 15분 30분간) 처리하여 GABA함량을 조사하였다.

나. 실험결과

(1) 가열조건에 따른 미강발효추출물의 GABA함량은 121℃에 30분간 처리한 군에서 24.8±1.1 mg/100g로 가장 높게 측정되었으며, 100℃에 30분간 처리한 Sample은 23.3±151mg/100g, 100℃에 60분은 20.2±0.8 mg/100g, 121℃ 15분은 19.4±0.6 mg/100g의 순으로 측정되었다. 따라서, 미강발효추출물의 가열처리에 의한 열안정성은 상압 및 고압가열에서 안정정인 것으로 나타났다.

Table 7-1. Changes in GABA content of rice bran extract as affected by heating conditions

Sample / Unit	Control	100℃ 30min	100℃ 60min	121℃ 15min	121℃ 30min
mg/100g	21.7±1.5	23.3±1.5	20.2±0.8	19.4±0.6	24.8±1.1

7-2 pH에 따른 미강발효추출물의 GABA 안정성 조사

(1) 대부분의 식품가공식품은 제품 특유의 pH를 갖는다. 따라서 목적으로 하는 식품의 특정 pH에 대한 기능성성분의 안정성은 제품화에 있어 필수적인 요인이 된다. 따라서 이 실험에서는 기능성성분인 GABA의 pH에 대한 안정성을 평가하였다.

가. 실험방법

(1) pH변화에 따른 GABA 안정성은 미강발효추출물에 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 첨가하여 pH 2, 4, 7, 8로 조절한 후 1시간 상온방치한 후 GABA함량을 측정하였다.

나. 실험결과

(1) pH에 대한 GABA 안정성은 pH 4에서 21.9±0.9 mg/100g으로 가장 높게 측정되었으며, pH 7은 21.2±0.8 mg/100g, pH 8은 16.9±0.7 mg/100g, pH 2는 11.8±0.6 mg/100g의 순으로 나타났다. 따라서 미강발효추출물은 pH 4-7 사이의 범위에서 식품을 제조할 때 안정성을 갖는 것으로 판단된다.

Table 7-2. Changes in GABA content of rice bran extract as affected by different pH

Sample / Unit	pH 2	pH 4	pH 7	pH 8
mg/100g	11.8±0.6	21.9±0.9	21.2±0.8	16.9±0.7

7-3 동결건조 된 미강추출물의 GABA 안정성 조사

(1) 식품소재의 경우 대부분 건조과정을 거쳐 생산되고 있다. 다양한 건조방법 중 동결건조법은 소재식품의 기능성 성분의 변화를 최소화 하는 목적으로 이용되고 있다. 따라서 이 실험에서는 기능성성분인 GABA의 동결건조에 대한 안정성을 평가하였다.

가. 실험방법

(1) 가열, 여과, 농축 된 미강발효추출물(26.5 Brix)을 Deep freezer(-60℃)에서 12시간 동결시킨 후 동결건조기를 이용하여 24시간 건조한 후 GABA함량을 측정하였다.

나. 실험결과

(1) 동결건조 된 미강추출물의 GABA 함량은 573.7±40.1 mg/100g로 측정되었으며, 건조 전후의 GABA함량 변화는 없었다. 따라서, 동결건조법으로 미강추출물을 건조할 때 지표물질인 GABA의 안정성이 있는 것으로 판단된다.

Table 7-3. GABA content of freeze dried rice bran extract

Sample / Unit	Rice bran extracts (solid)	Freeze dried rice bran extracts
mg/100g	573.7±40.1	573.7±40.1

7-4 초고압 처리에 의한 미강추출물의 GABA 안정성 조사

(1) 초고압 처리는 비가열 식품살균방법 중 하나로 100기압 이상의 압력으로 미생물을 사멸시키는 기술이다. 미강추출물의 균 불활성화를 통한 안정적인 미강추출물을 생산하기 위해 초고압처리에 따른 기능성 성분인 GABA의 안정성을 평가하였다.

가. 실험방법

(1) 미강발효추출물을 1,000, 2,000 psi 압력으로 10, 20, 30분으로 초고압 처리한 후 GABA 함량을 측정하였다.

나. 실험결과

(1) 1,000 psi조건으로 처리한 미강발효추출물은 20분간 처리한 군의 GABA함량이 28.1±0.8

mg/100g으로 가장 높았으나, 전체적으로 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 2,000 psi 조건으로 처리한 미강발효추출물은 10분간 처리한 군의 GABA함량이 30.3±0.0 mg/100g으로 가장 높게 나타났으나, 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서, 미강발효추출물의 초고압 처리는 1,000 psi 에서 30분까지 기능성 지표인 GABA의 안정성이 있는 것으로 사료된다.

Table 7-4 Changes in GABA content of fermented rice bran extract as affected by ultra high pressure treatment(1,000psi) before or after retort

Pressure	0min	10min	20min	30min
1,000 psi	27.8±0.4	27.9±0.1	28.1±0.8	27.5±0.1
2,000 psi	27.8±0.4	30.3±0.0	28.5±1.1	29.5±1.6

다. 요약

미강추출물에 다양한 식품가공방법을 적용하여 가공적성을 평가한 후 적용 가능한 용도를 검토하고자 하였다. 가공방법은 가열, 초고압, pH 조절 처리와 소재화를 위한 동결건조법을 적용하여 기능성 지표물질인 GABA 함량변화를 조사하여 안정성을 검토하였다.

미강발효추출물은 상압 및 고압 가열과 초고압 처리에서 GABA 안정성을 갖는 것으로 나타났고, pH의 경우 4-7 범위에서 사용가능한 것으로 검토되었다. 식품소재화를 위한 동결건조 처리에서 GABA 안정성을 갖는 것으로 나타났다. 따라서, GABA를 기능성 물질로 미강발효추출물은 pH의 사용범위가 제한적이므로 산성식품을 제외한 식품의 소재로 이용이 가능하며, 유제품과 젤리 및 제과·제빵용 제품의 뇌기능 보호 기능성 소재로 이용이 가능할 것으로 기대된다.

8. 발효공정과 유효성분 분리공정 확립

8-1 발효공정

유효성분의 함량을 최대화하기 위하여 compound X의 전구물질인 ferulic acid를 첨가하여 발효최적 공정을 조사하였다. 최적화를 위하여 선행공정조건 조사를 실시하여 parameter를 결정하였으며, 이에 따라 최적화 실험을 실시 한 결과는 다음과 같다.

8-1-1 초기 최적조건 탐색실험 (one-at-a-time method)

반응표면분석법으로 최적조건을 구하기 위하여 독립변수를 확정하기 위한 실험을 실시하였다. 변수로서 교반조건, 발효시간과 온도, 고형물비, 배지에 첨가되는 포도당과 철분 및 마그네슘 함량을 조사하였다. 모든 실험에서 미강배지를 기본을 하였으며 페룰산을 0.01% 첨가한 배지로 실험하였다.

1) 교반속도

페룰산 0,01%를 미강배지에 첨가하여 35°C에서 36시간 발효시키면서 생성되는 HFA함량을 비교한 결과는 표 8-1과 같다. 교반속도 0과 100rpm에서 생성한 HFA 함량은 유의적 차이를 보이지 않았고, 200rpm에서는 HFA가 생성되지 않았다. 에너지 수율 측면을 고려하여 적정 교반속도는 0rpm이 적정하다고 판단되었으나, 1시간 간격으로 간헐 교반으로 처리하여 고형물이 하부에 집적되는 것을 방지하기로 하였다.

Table 8-1. Effect of agitation speed on the production yield of HFA

Agitation speed (rpm)	mgHFA/L culture broth
0	56.32
100	57.90
200	ND

2) 발효시간

페룰산 0,01%를 미강배지에 첨가하여 35°C에서 정치배양하면서 HFA 생성량을 비교하였다 (Table 8-2). 발효시간은 생성량을 증가시키기 위하여 최대 3일로 하였다. HFA는 1.5일차에서 최대 생성량을 보였으나 유의성은 크지 않았다. 다음 단계에서 독립변수로서 실험을 계속하였다.

Table 8-2. Effect of fermentation time on the production yield of HFA

Fermentation time (day)	mgHFA/L culture broth
0	ND
1	60.2
1.5	64.7
2	61.1
3	61.4

3) 고형물 함량 비

미강배지에서 미강과 정제수의 함량비를 비교하여 HFA 생성량을 평가하였다 (Table 8-3). 고형물비 1:5 이하에서는 정제수 대부분이 미강에 흡수되어 최소비율을 1:5로 결정하였다. 최대 HFA 생성량은 1:10 비율에서 달성되었으므로 계속되는 실험에서는 1:10을 고형물 비로 사용하였다.

Table 8-3. Effect of solid ratio in rice bran medium on the production yield of HFA

RB:DW ratio	mgHFA/L culture broth
0.5 : 10	72.3
1 : 10	77.3
2 : 10	54.9

4) 포도당의 첨가 효과

미강배지에 탄소원으로 포도당을 보강하여 첨가효과를 평가하였다(Table 8-4). 포도당의 첨가는 HFA생성 효율을 크게 떨어뜨렸다.

Table 8-4. Effect of glucose addition on the production yield of HFA

Glucose addition (%)	mgHFA/L culture broth
0	64.73
10	62.28
20	54.55

5) 마그네슘 첨가 효과

마그네슘은 유산균의 증식을 촉진하는 것으로 보고되고 있어 이의 첨가효과를 확인하였다 (Table 8-5).

0.05% 마그네슘 첨가는 HFA 생성을 증진시켰으나 대조구에 비하여 유의적인 차이는 없었다.

Table 8-5. Effect of magnesium addtion on the production yield of HFA

Magnesium addition (%)	mgHFA/L culture broth
0	72.37
0.05	76.17
0.10	69.83

6) 페룰산 첨가 효과

HFA 전구체로 확인된 페룰산을 첨가하여 HFA 생성 증진효과를 평가하였다 (Table 8-6). 페룰산의 첨가는 HFA의 생성을 크게 증진시켰으며 0,05% 첨가한 경우 가장 생성량이 높았다.

Table 8-6. Effect of ferulic acid addition on the production yield of HFA

Ferulic acid addition (%)	mgHFA/L culture broth
0	3.66
0.01	63.48
0.05	142.51
0.10	131.73

7) 발효온도

발효온도 실험에서는 35℃가 최적으로 판단되었으며, 45℃에서는 그 생성량이 크게 감소하였다 (Table 8-7).

Table 8-7. Effect of fermentation temperature on the production yield of HFA

Fermentation temperature (°C)	mgHFA/L culture broth
25	56.03
35	63.48
45	1.03

8-1-2 미강발효조건의 최적화 실험

1) 독립변수의 수준과 범위

전술한 실험에 의하여 반응표면분석법에 이용할 3개의 독립변수의 수준과 범위를 결정하였으며 그 결과를 Table 8-8에 나타내었다. 발효시간과 온도 및 페룰산 첨가량이 HFA 생성량을 결정하는 가장 중요한 factor이며, 각각의 factor는 세가지 수준을 설정하였다.

Table 8-8. Range of levels of RSM

Variables	Symbol	Range of levels		
		Low (-1)	Center (0)	High (+1)
Fermentation time (h)	X_1	12	36	60
Fermentation temperature (℃)	X_2	30	35	40
Ferulic acid addition (%)	X_3	0.025	0.050	0.075

2) 반응표면분석

3가지 독립변수가 HFA 생산에 미치는 영향을 실험한 FCCCD 결과는 표 8-9와 같다.

Table 8-9. Result of FCCCD using three independent variables and six center points showing observed and predicted response

Run order	X_1		X_2		X_3		HFA yield (mg/L)	
	Coded value	Actual value	Coded value	Actual value	Coded value	Actual value	Observed	Predicted
1	+1	60	+1	40	+1	0.075	101.07	102.89
2	0	36	+1	40	0	0.050	105.73	99.95
3	0	36	-1	30	0	0.050	115.62	120.42
4	+1	60	0	35	0	0.050	142.17	138.39
5	-1	12	+1	40	-1	0.025	79.64	78.95
6	0	36	0	35	0	0.050	134.47	140.45
7	-1	12	+1	40	+1	0.075	72.22	74.16
8	0	36	0	35	-1	0.025	132.19	133.44
9	-1	12	0	35	0	0.050	123.94	126.74
10	0	36	0	35	0	0.050	137.94	140.45
11	0	36	0	35	+1	0.075	136.71	134.48
12	0	36	0	35	0	0.050	142.86	140.45
13	-1	12	-1	30	-1	0.025	112.23	110.66
14	0	36	0	35	0	0.050	145.50	140.45
15	0	36	0	35	0	0.050	142.51	140.45
16	+1	60	+1	40	-1	0.025	83.56	86.28
17	0	36	0	35	0	0.050	137.18	140.45
18	-1	12	-1	30	+1	0.075	98.61	96.14
19	+1	60	-1	30	-1	0.025	106.94	105.24
20	+1	60	-1	30	+1	0.075	111.19	112.13

표면분석 데이터는 미니탭으로 분석하였으며 HFA 생산공정에 미치는 독립변수들의 영향을 나타낸 회귀식은 아래와 같다:

$$Y = 140.45 + 5.83X_1 - 10.24X_2 + 0.52X_3 - 7.89(X_1)^2 - 30.27(X_2)^2 - 6.49(X_3)^2$$

$$+ 3.19X_1X_2 + 5.35X_1X_3 + 2.43X_2X_3$$

상기 식에서 Y는 세가지 독립변수의 함수로서 HFA의 생성량이다. ANOVA 분석의 결과는 Table 8-10에 나타내었으며, 제안된 모델이 통계학적으로 유의함을 알 수 있었으며, 모델식이 실제 실험데이터와 일치도가 높음을 알 수 있었다(8-11)

Table 8-10. Analysis of variance (ANOVA) of the fitted quadratic regression model

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value	Significance
Model	9769.34	9	1085.48	55.06	0.000	Significant
Residual (error)	197.15	10	19.72			
Lack of fit	112.97	5	22.59	1.34	0.377	**Not significant**
Pure error	84.18	5	16.84			
Total	9966.50	19				

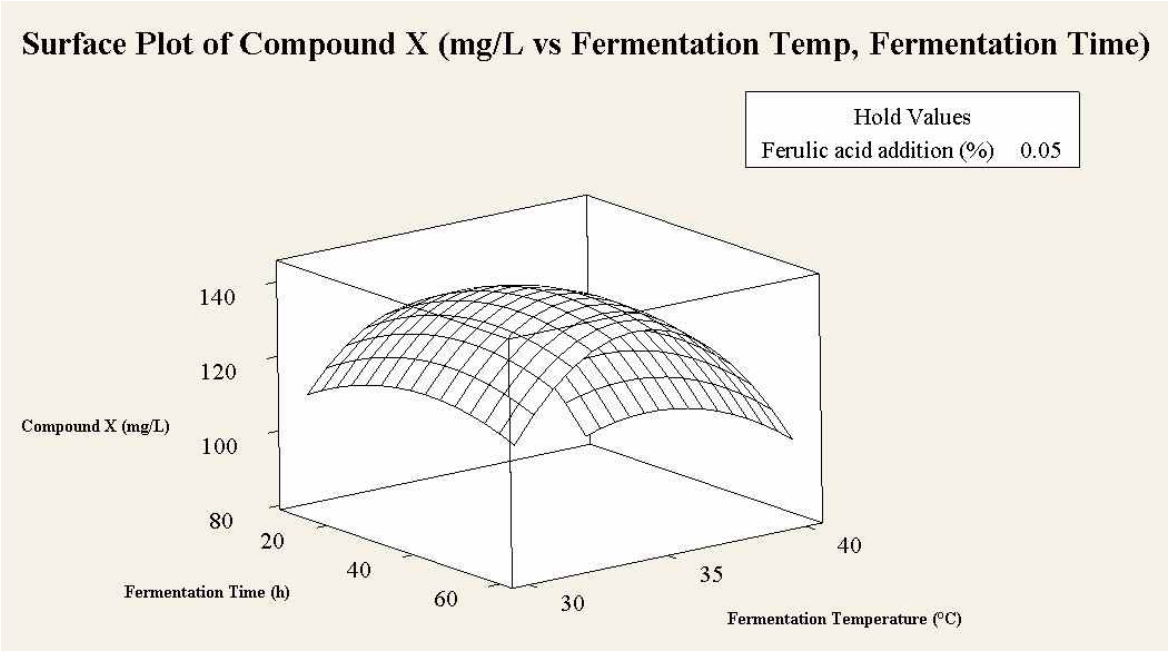
Coefficient of determination (R^2)=98.0%; Adjusted R^2=96.2%

Table 8-11. Regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for the response of HFA production yield

Model term	Parameter estimated	*P*-value
β_0	-1240.97	0.000*
β_1	-0.15	0.808
β_2	80.77	0.000*
β_3	57.70	0.928
β_{12}	0.03	0.070
β_{13}	8.92	0.007*
β_{23}	19.46	0.152
β_{11}	-0.01	0.015*
β_{22}	-1.21	0.000*
β_{33}	-10388.4	0.036*

*$P<0.05$ indicates that model terms are significant at the 5% level

반응표면분석 결과를 그래프로 나타낸 결과는 다음과 같다 (Fig. 8-1 ~8-5). Fig. 8-1은 페룰산 첨가량이 0.05% 일 때 발효온도와 시간에 따른 HFA 생성량을 3D로 나타낸 것으로 발효최적조건인 34℃, 발효시간 45시간일 때 HFA 생성량이 140mg/L으로 최대치가 됨을 보여준다. Fig. 8-2와 8-3은 각각 페룰산 첨가량과 발효시간의 효과와 발효온도와 페룰산 첨가효과를 나타낸 것이다.



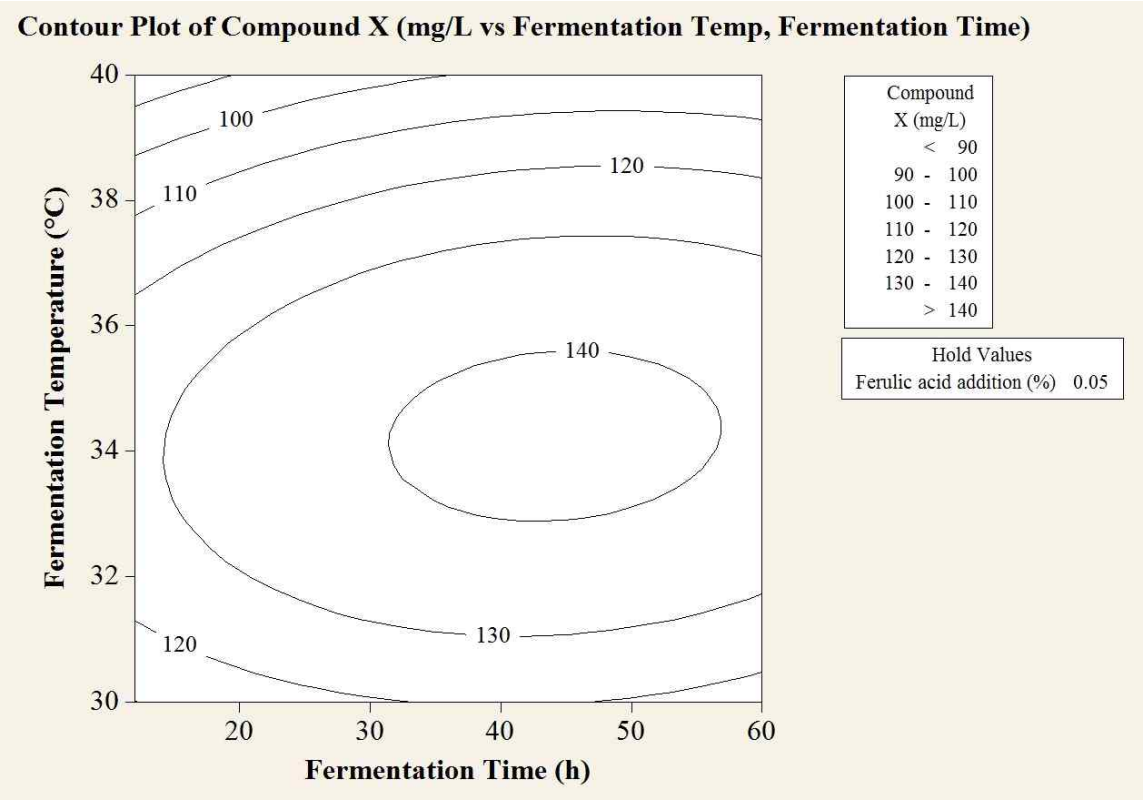


Fig. 8-1. Response surface and contour plots of combining effects of fermentation time and fermentation temperature with constant of percent FA addition (0.05%)

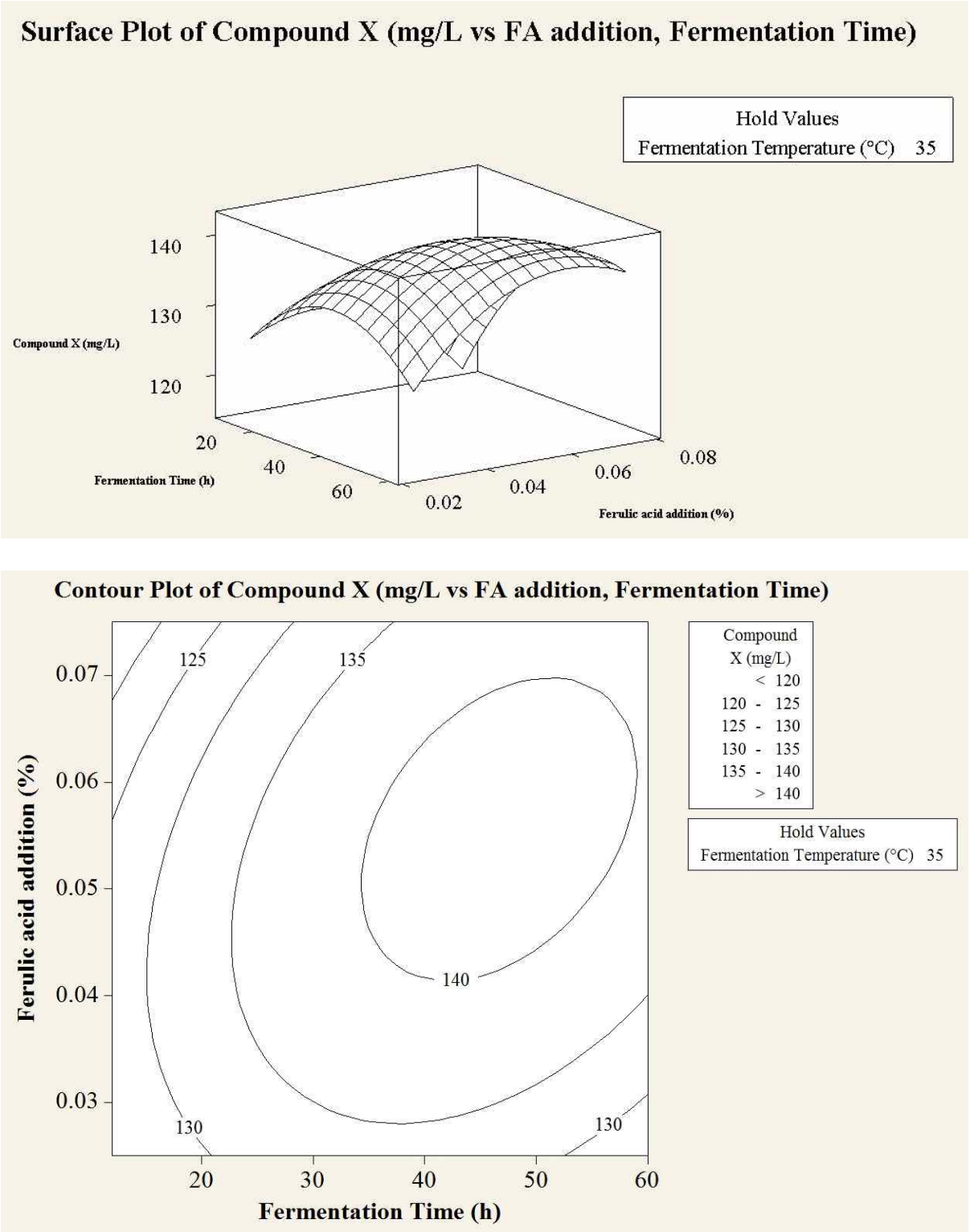
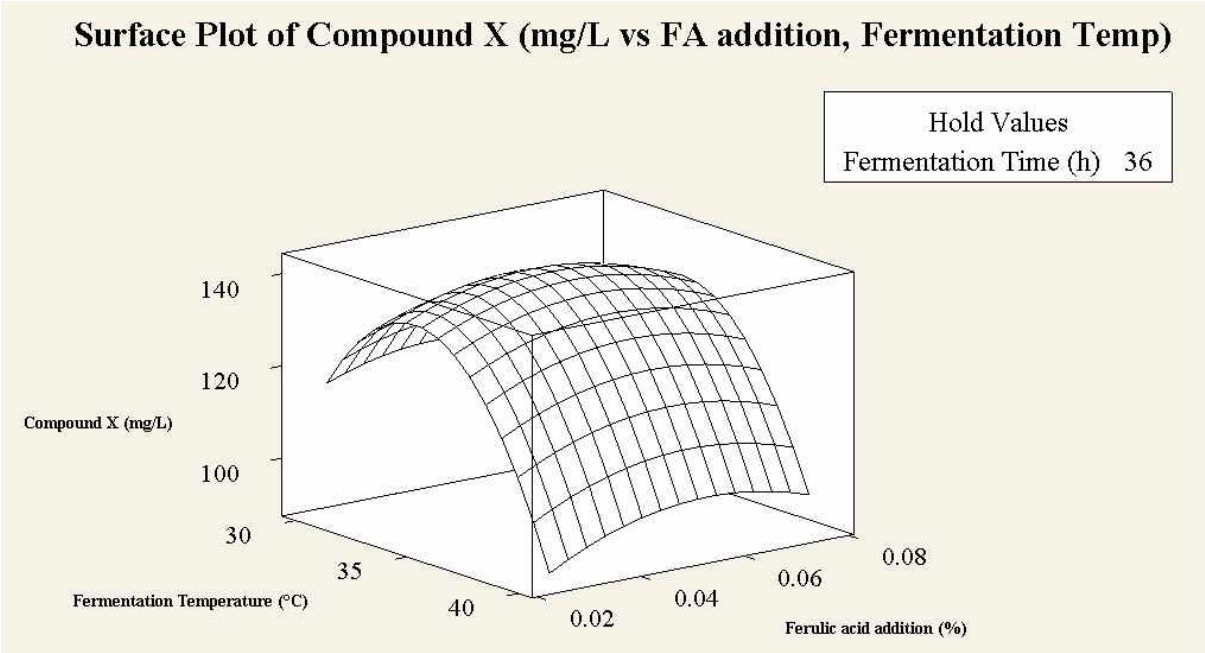


Fig. 8-2. Response surface and contour plots of combining effects of fermentation time and percent FA addition with constant of fermentation temperature (35°C)



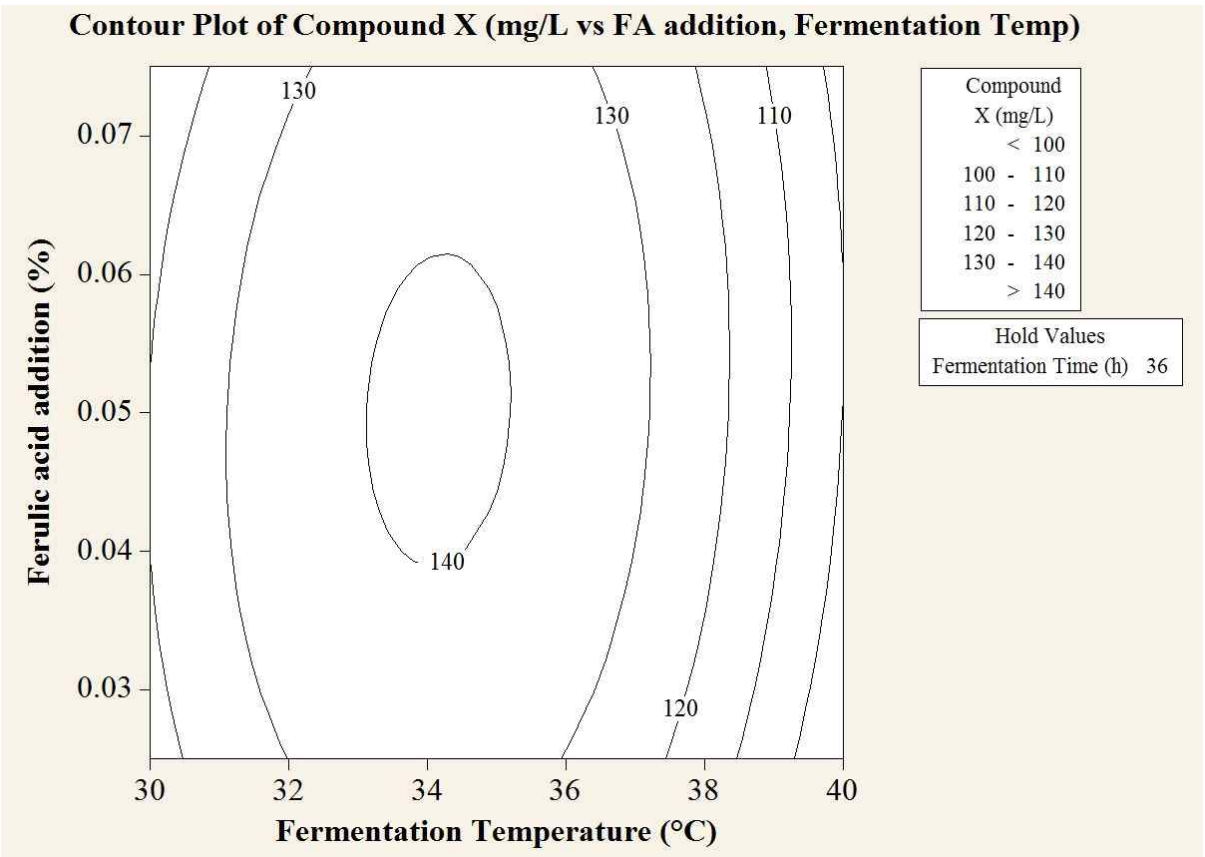


Fig. 8-3. Response surface and contour plots of combining effects of fermentation temperature and percent FA addition with constant of fermentation time (36 h)

8-1-3 발효공정의 최적화와 검증모델(verification model)

최적화 프로그램 분석의 결과 HFA 생산을 위한 최적 조건은 Fig. 8-4 와 같았다. 즉, 0.0545% 페룰산을 첨가한 미강배지에서 발효온도 34.4℃, 발효시간 45.84 시간으로 발효를 마치면 HFA 가 최대치인 142.4mg/L 생산되는 것으로 예측하였다. 동일 조건에서 미강발효를 실시하여 HFA 생산량을 측정한 결과, 148.2mg/L 였다 (Table 8-12). 이로서 최적화 모델식이 HFA 생산량을 성공적으로 예측하고 있음을 추정할 수 있었다.

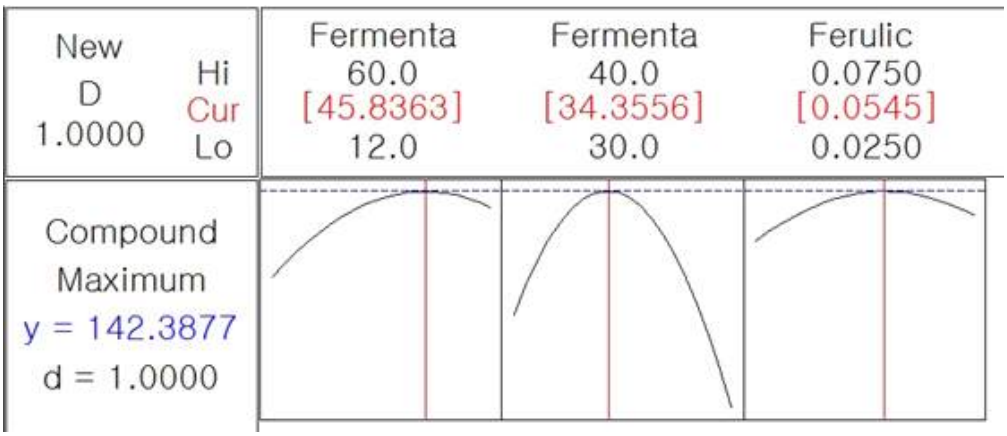


Fig. 8-4 Optimization condition based on software analysis program

Table 8-12. Confirmation of model optimization

Ferm. Time(h)	Ferm. Temp.(°C)	FA addition(%)	Compound-X yield			
			Actual (mg/L)	Predicted (mg/L)	Residual (mg/L)	Error (%)
45.84	34.5	0.0545	148.21	142.34	5.87	3.96

최적화 모델식이 실제 발효공정에 적용시킬 경우 결과치가 예측치와 얼마나 차이가 있는지 확인하기 위하여 검증 모델실험을 실시하였으며 그 결과는 Table 8-13과 같다.

Table 8-13. Validation of model

No.	Ferm. Time(h)	Ferm. Temp.(°C)	FA addition(%)	Compound-X yield			
				Actual (mg/L)	Predicted (mg/L)	Residual (mg/L)	Error (%)
1	24	32	0.07	118.15	124.72	-6.57	5.56
2	48	32	0.03	135.14	130.14	4.56	3.39
3	50	35	0.05	142.07	141.17	0.91	0.64
4	55	38	0.04	129.92	121.07	8.85	6.81

발효시간과 온도 및 페룰산 첨가농도 조합을 다르게 한 4가지 조건의 발효에서 실측치는 예

측치와 유사하게 나타남으로서 예측모델로 얻은 값이 실험으로 얻은 값에 매우 근접하여 예측모델의 정확성이 검증되었다.

8-2 페룰산 대체소재 개발

페룰산을 대체할 천연소재를 개발하기로 하고, 미강과 콘브랜으로부터 페룰산을 분리하기 위하여 알칼리 처리를 하여 수율을 비교하였다(Table 8-15). 콘브랜은 미강에 비하여 5배 정도의 페룰산을 더 얻을 수 있었다

Table 8-15. Production of ferulic acid by alkali hydrolysis of rice bran and corn bran

Material	FA(mg/g Bran)	Total FA(mg)
Rice Bran(5g)	1.1	5.3
Corn Bran(5g)	5.2	25.5

미강과 콘브랜의 가수분해액을 사용하여 Lw로 발효시킨 결과 발효액 중 페룰산과 HFA 함량은 Table 8-16과 같다. 페룰산을 많이 함유한 콘브랜은 가수분해물을 희석함에 따라 증식이 활발하여 졌으나 HFA는 생성하지 않았다. 반면 미강 가수분해액은 2배 희석한 경우 HFA를 생성하였다. 콘브랜의 영양성분과 미강의 영양성분의 차이로 Lw가 페룰산 대사능이 상이한 것으로 추정된다.

Table 8-16. Production of FA and HFA after fermentation of corn bran hydrolysate and rice bran hydrolysate

Hydrolysate	Dilution fold	FA(mg/L broth)	HFA(mg/L broth)	pH
Corn Bran	1	64.4	ND	7.04
	2	32.3	ND	5.37
	5	32.3	ND	4.24
Rice Bran	1	18.2	ND	7.01
	2	ND	1.91	6.21
	5	ND	0.69	4.42

위의 결과를 바탕으로 기존의 콘브랜 가수분해물에 미강을 혼합한 후 물을 가하여 개선배지를 제조하였으며, 이를 최적조건에서 발효시켜 그 결과를 미강배지에 페룰산을 0.0545% 첨가하여 발효한 결과와 비교하였다(Table 8-17). 미강배지에 페룰산을 첨가한 배지는 HFA를 148mg/L 생산하였으나 콘브랜 가수분해물을 가한 미강배지는 135.9mg/L의 HFA를 생산하였다. 콘브랜가수분해물의 FA 농도가 페룰산 첨가 미강배지의 페룰산 농도의 50%인 점

을 고려한다면 고가의 페룰산을 미강배지에 첨가하는 것보다 콘브랜 가수분해물을 첨가하는 것이 원가측면에서 더 효과적인 것으로 판단된다.

Table 8-17. The effect of con bran hydrolysate addtion on the production of HFA

Medium composition (g / L)	Comp.X (mgHFA/L broth)	FA (mgFA/L broth)
Corn bran hydrolysate containing 0.26g FA + Rice bran 100g	135.88	ND
Rice bran 100g + 0.545g FA	148.21	ND

8-3 유효성분 분리공정

미강 발효물로부터 유효성분을 분리하는 공정은 일반 식품용과 건강기능성 식품용 소재로 구별하여 설계하였다. 즉, 일반식품용 소재는 HFA 순도가 낮은 것으로, 건강기능성 식품용 소재는 HFA 순도가 높도록 하였다.

8-3-1 고순도 HFA 분리 공정

미강 발효액으로부터 HFA를 고농도 함유한 소재를 제조하는 공정은 Fig. 8-5와 같다. 원심분리 후 상층액을 헥산처리하여 지질 성분을 제거하고, 에틸아세테이트로 유효성분을 추출 농축하였다. 농축액 4.5g 중 HFA 함량은 148mg이었다. 이 소재는 건강기능성 식품용 소재로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

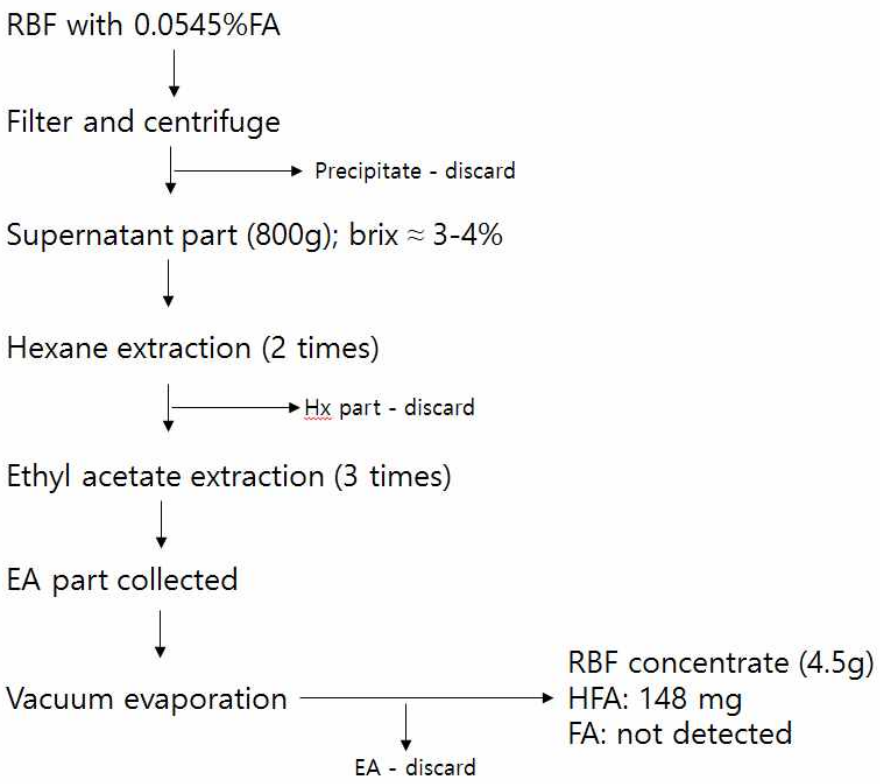


Fig. 8-5. Separation and partial purification of HFA from fermented broth

8-3-2 저순도 HFA 분리 공정

일반 식품용으로 일회 서빙사이즈가 큰 경우 저순도 HFA를 사용하는 것이 더 경제적이다. 따라서 아래 두 종류의 저순도 HFA 함유 소재 생산 공정을 설계하였다 (Fig. 8-6).

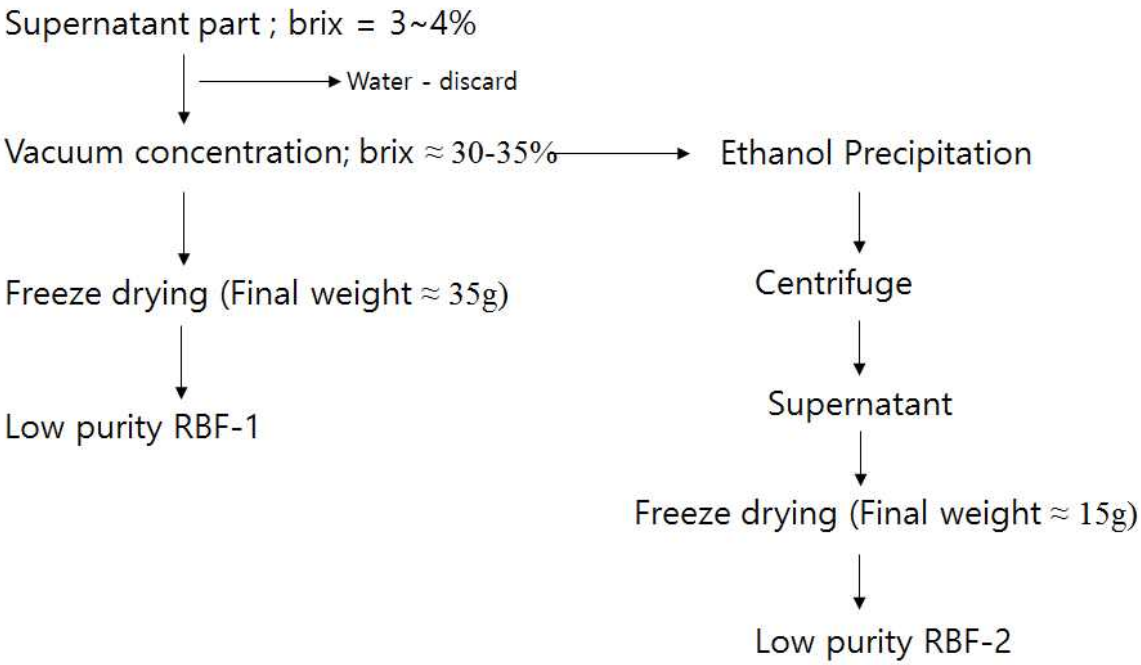


Fig. 8-6. Separation and partial purification of HFA from fermented broth

9. 뇌경색, 우울증과 인지능력 향상에 필요한 유효성분 정량화를 통한 규격 설정

9-1 유효물질 생성 대사과정 조사

LW의 페룰산 대사과정을 유산균 균체에 0.01% 페룰산 배지를 혼합하여 발효하면서 생성물을 조사하였다. Lw의 세포벽은 초음파 충격처리로 파괴하였으며, 세포내액을 포함한 세포파쇄액을 페룰산배지에 가하여 반응시간에 따라 생성된 화합물을 분석하였다 (Fig. 9-1).

기질은 페룰산이 반응 전기간을 통하여 대사되어 감소되는 반면, HFA는 반응 24시간 이후부터 크게 증가하였다. 페룰산 배지에 혼재하였던 쿠마린산과 4-VG도 반응시간이 경과됨에 따라 서서히 감소하였다. HFA는 페룰산에서 바로 생성되는 것으로는 보이지 않으며, 페룰산이 다른 대사중간물질로 변환되고, 그것이 HFA로 변환되는 것으로 추정된다.

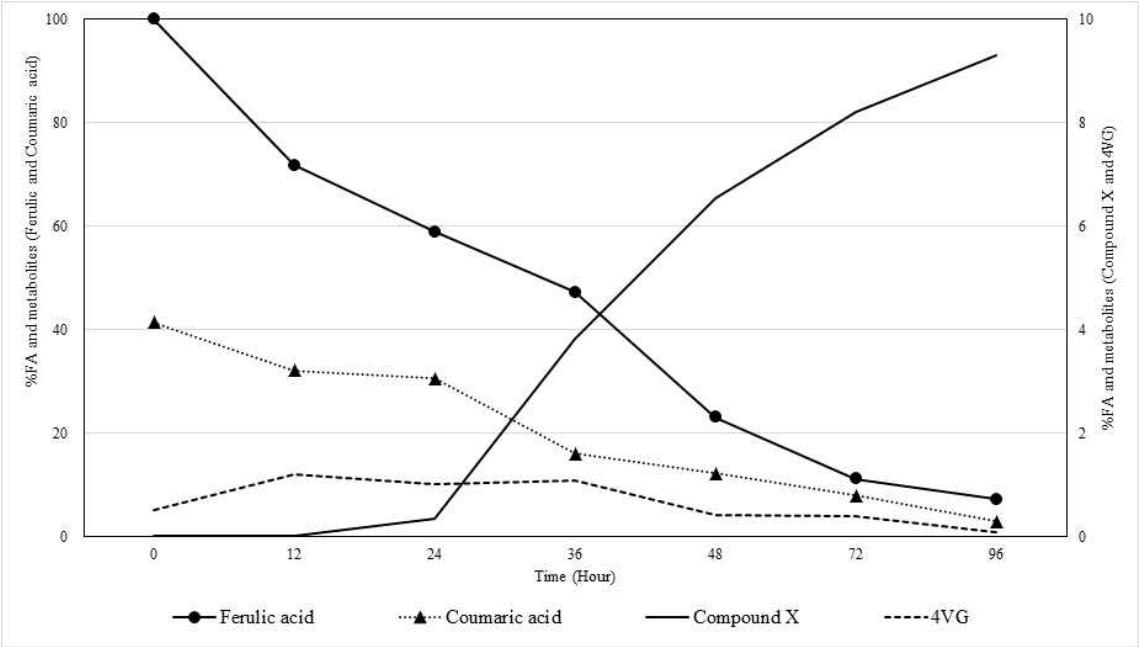


Fig. 9-1. Changes in the metabolite profile during reaction of FA with Lw

9-2 발효에 따른 활성물질과 지표물질 규격화

동물실험에서 미강발효추출물 복강주사 단계, 에틸아세테이트 추출 단계, prepLC 정제물 단계로 구분하여 각각 뇌경색 효과를 나타낸 양을 비교 분석하였으며, 이를 근거로 인체 유효 투여량을 추정하였다. Rat을 실험동물로 하여 복강주사로 뇌경색 예방과, 우울증 경감효과 및 인지능력 향상 실험을 한 결과 1회 복강으로 주입한 HFA는 0.055mg이었으며 이때 rat의 평균 체중은 250g이었다. 체중이 60kg인 성인을 기준으로 한 유효투여량은 아래 계산에 따라 2.14mg HFA이다.

0.22mg HFA/kg rat X 6/37 X 60kg =2.14mg

Formula for Dose Translation Based on BSA

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{Animal dose (mg/kg)} \ \textit{multiplied by} \ \frac{\text{Animal } Km}{\text{Human } Km}$$

이러한 기준으로 뇌경색 예방모델에 실시한 식이실험의 결과는 복강실험의 결과와 일치하였다. 실험동물에게 8일간에 걸쳐 미강발효물이 혼합된 펠렛을 식이로 제공하였으며, 이후 MCAO 처리한 후 3일 후 희생하여 효과를 확인하였다(Fig. 9-2)

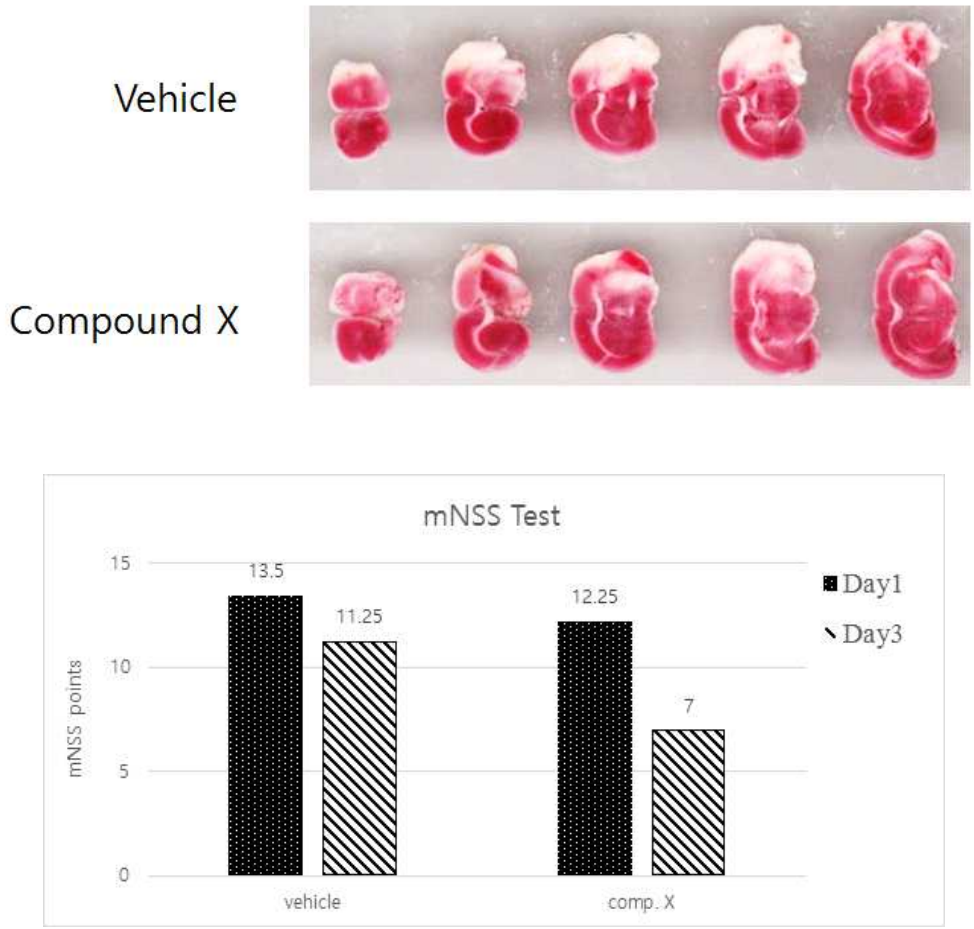


Fig. 9-2. Result of preventive effect of feeding test of rat after fed pellet fortified with RBF before MCAO

10. 발효액을 활용한 기능성 식품소재 및 제품 개발

미강발효액을 소재로 활용하기 위하여 발효, 여과, 원심분리, 농축의 과정을 거쳐 농축 미강발효액을 준비하였다. 각 단계별 소재의 물리적 특성은 Table 10-1과 같았다. 농축단계로 갈수록 비중과 점도가 증가하였으며, 액체의 색은 어두워졌다

Table 10-1. Physical properties of fermented rice bran

구 분	Brix	pH	비중	점도(CP)*	색도
미강배지	3.5	6.39	1.024	18.7	L:22.08 a:-0.54 b:10.94
미강발효액	4.1	4.05	1.045	23.4	L:16.14 a:0.32 b:13.38
농축 미강발효액	28	4.05	1.195	253.1	-

* 점도측정 : T-bar spindle #95, rpm 100, 1분후 측정

10-1 분무건조

농축 미강발효액 (Brix 28%)을 말토덱스트린 (DE 22, 10, 5)와 2:1의 비율로 혼합하여 분무건조하였다. 입구 온도 180·℃, 출구 온도 80℃로 하였으며 분사속도는 8,525rpm이었다. 분무건조 분말의 bulk density는 0.776, 수분함량은 3.63%였다. 분무건조 분말의 성상은 Fig. 10-1과 같다. 전자현미경 사진에 나타난 것과 같이 분무건조의 입자들은 대체로 고른 입자의 분포를 보였으며, 혼합시 균일하게 분산될 것으로 판단된다.

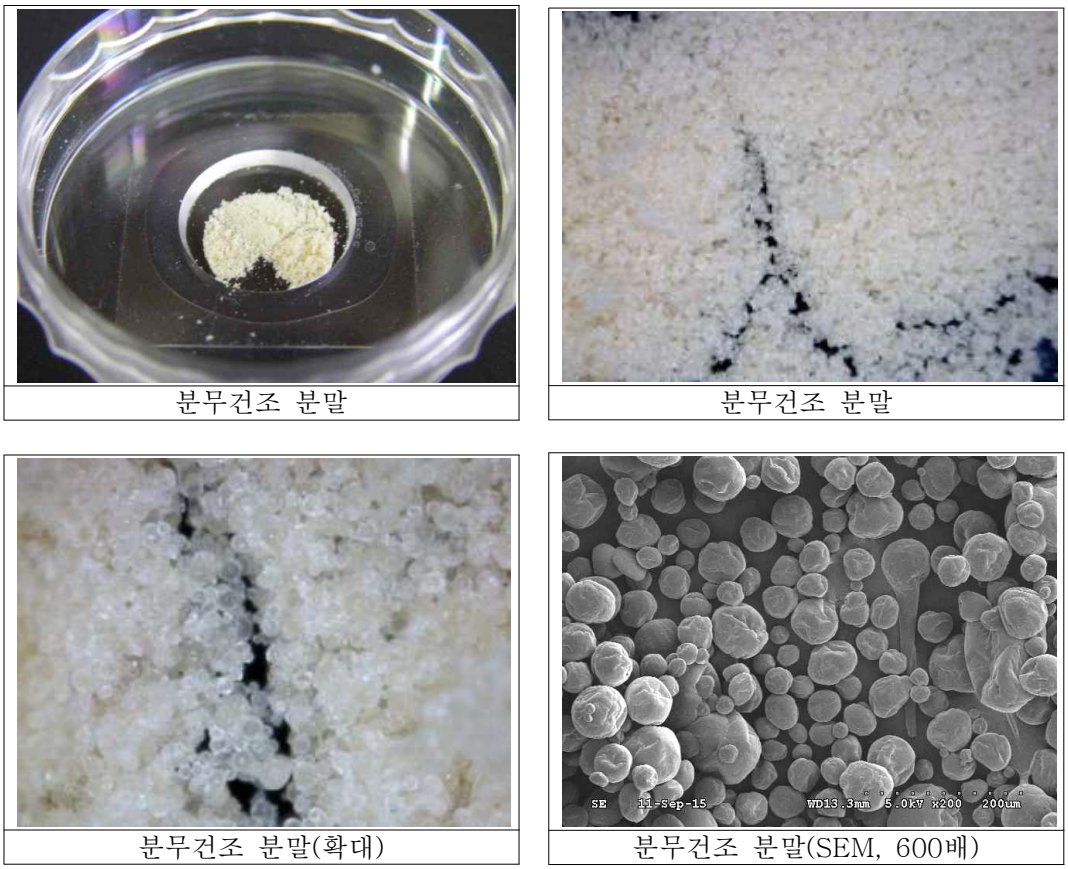


Fig. 10-1. Microscopic appearance of spray dried powder.

10-2 동결건조

농축 미강발효액을 동결건조하였다. 동결온도, -47 ℃; 진공도, 18 Pa; 건조시간, 48시간으로 처리하였으며, 동결건조분말의 bulk density는 0.694이고, 수분함량은 8.97%였다. 분말의 성상은 Fig. 10-2와 같았다.

동결건조분말은 분쇄 후 입자의 크기가 불균일한 특징을 나타내었다. 따라서 분쇄와 sieving을 동시에 수행하여야 균일한 입자를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

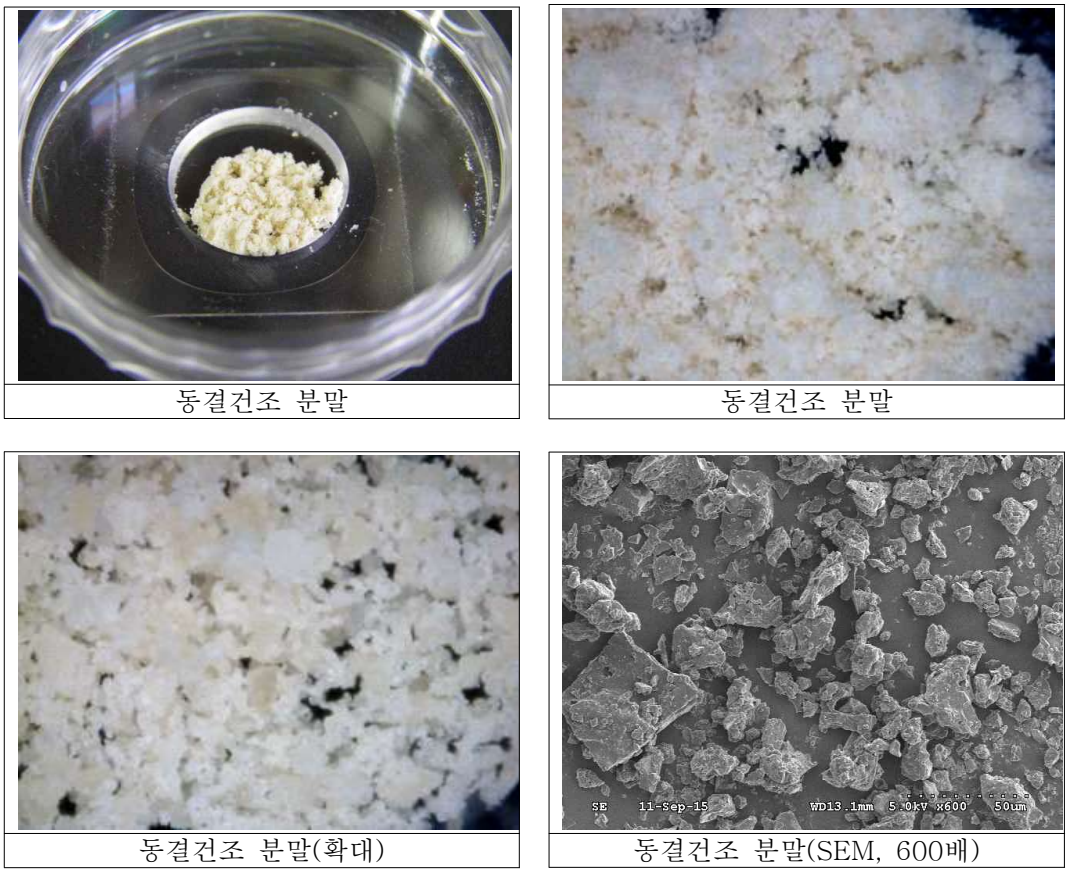


Fig. 10-2 Microscopic appearance of freeze dried powder.

10-3 분말요구르트형 제품

미강발효 소재가 가장 쉽게 시장에 진입하는 모델제품으로 우유나 쥬스에 혼합하여 음용하는 분말요구르트형 제품을 설계하였다. 분무건조분말 또는 동결건조 분말을 사용할 수 있는데, 요구르트형 제품에는 부형제가 들어있지 않은 동결건조분말을 주 재료로 사용하였다 (Table 10-2).

맛과 향은 분말형 제품에서 매우 중요한 요소이다. 세립당의 단맛을 기본으로 하여 칼로리를 일정수준 유지하면서 수화성도 증진시키고자 하였으며, 구연산으로 흐름성과 청량감을 주고자 하였다. 유청분말은 floc현상을 막아주며 검류는 용해도와 점도를 유지하는 용도로 첨가하였다.

일반인 선호도 조사에서는 배합비 2가 가장 좋은 평가를 받았으며, 쥬스나 우유에 타지 않고 분말의 형태로 바로 섭취하여도 된다는 응답이 많았다. 다만, 기능성을 강화하고 당의 섭취를 더 줄이기 위하여 향후 개발 제품에서는 감미 대체제를 사용하여야 할 것으로 판단된다.

각 성분 배합비에 따른 성상은 Fig. 10-3과 같다. 미강발효 분말의 비율이 커질수록 황색의 입자가 크게 나타나는 것을 관찰할 수 있다.

Table 10-2. Formulation examples of yoghurt type product using fermented rice bran powder

원 료	배합비 1	배합비 2	배합비 3	비 고
요구르트분말	11.0	11.0	11.0	
세립당	**60.4**	**50.4**	**40.4**	
RBFC FD	**10.0**	**20.0**	**30.0**	
유청분말	5.0	5.0	5.0	
말토덱스트린	5.0	5.0	5.0	
구연산	3.4	3.4	3.4	
파인애플과즙분말	2.5	2.5	2.5	
탈지분유	1.5	1.5	1.5	
구아검	0.5	0.5	0.5	
요구르트분말 향	0.5	0.5	0.5	
비타민 C	0.1	0.1	0.1	
로커스트,잔탄검	0.1	0.1	0.1	
합 계	100.00	100.00	100.00	

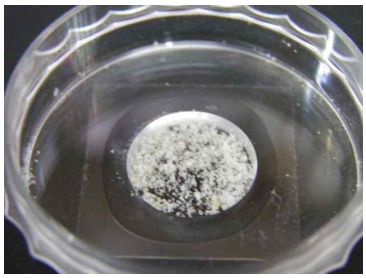
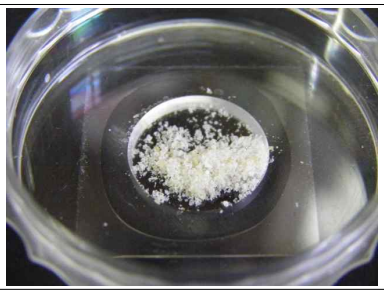
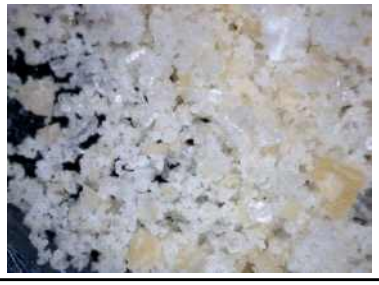
구분	성 상		
배합비 1			
배합비 2			
배합비 3			

Fig. 10-3. Physical appearance of yoghurt type products

10-4 음료형 제품

미강발효 소재를 이용한 음료제품을 설계하였다. 동결건조분말을 원료로 사용하였으며 기본형인 미강발효 소재만을 사용한 제품과 여기에 과일농축분말을 첨가하여 과일맛을 부여한 제품 2종을 설계하였다. 제품의 포장형태는 파우치와 병 형태의 2종으로 구성하여 판매 계층에 따른 다양성을 부가하였다. (Table 10-3).

단맛과 신맛의 조화는 음료제품에서 가장 중요한 요소이다. 정백당과 고과당의 단맛을 기본으로 하여 원료 자체의 신맛과 구연산의 신맛으로 제품의 당산비를 조정하였으며, 다른 음료들과 차별되도록 복합안정제를 사용하여 제품의 볼륨감을 부여하였다. 첨가하는 과일농축분말 및 향의 변화에 따라 제품의 다양성을 이룰 수 있으며 비타민 및 무기영양성분을 추가함으로 영양성분의 강화가 가능한 제품으로 설계하였다.

포장 형태에 따른 성상은 Fig. 10-4와 같다. 사용하는 과일농축분말에 따라 제품의 색이 특징적으로 변화하는 것을 관찰할 수 있으며, 과일의 색에 맞춘 천연색소를 사용 시 더 선명한 색을 나타낼 수 있다.

Table 10-3. Formulation examples of beverage type product using fermented rice bran powder

원 료	배합비 1	배합비 2	배합비 3	비 고
고과당	12.0	12.0	12.0	
정백당	12.0	12.0	12.0	
RBFC FD	**1.0**	**1.0**	**1.0**	
과일농축분말	**-**	**1.0(망고)**	**1.0(블루베리)**	
포도당	1.0	1.0	1.0	
복합안정제	0.60	0.60	0.60	
젖산칼슘	0.20	0.20	0.20	
구연산	0.15	0.15	0.15	
비타민 C	0.04	0.04	0.04	
정제수	73.010	72.010	72.010	
합 계	100.00	100.00	100.00	

구분	병 타입	파우치 타입
성 상		

Fig. 10-4. Physical appearance of beverage type products

11. 소재의 안정성 평가

식품소재로서 공정 중 거치게 되는 가혹조건으로는 pH와 고온 가열이 있으며, 이러한 처리 조건에 대한 안정성은 매우 중요하다. 액상소재로 제조된 미강발효추출물을 pH 3.5와 7.0으로 조정한 후 121℃로 가열함에 따른 시간별 페룰산 함량을 조사하여, 소재의 안정성을 평가하였다.

pH 무조절 군과 3.5, 7.0 조절군의 페룰산 함량은 가열시간이 증가함에 따라 함량이 소량 감소하는 것으로 보이나 유의적으로 차이를 나타나지 않았다(Fig. 11). 이러한 결과로부터 액상소재는 산성조건에서 안정성을 갖는 것으로 판단된다.

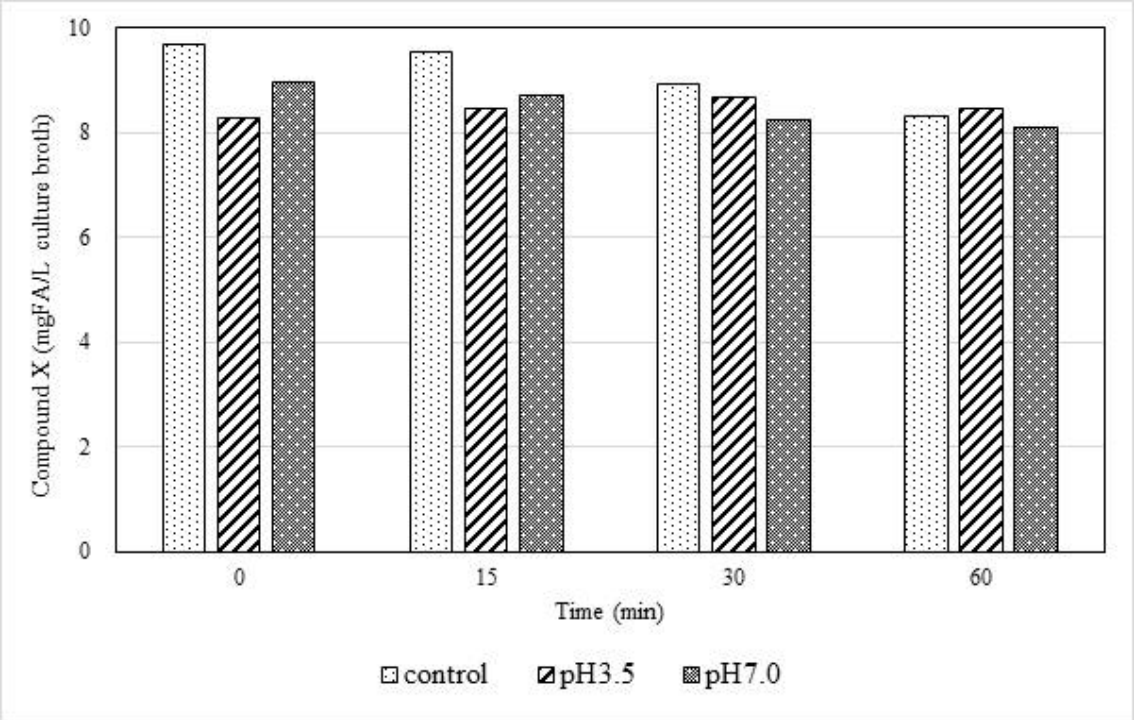


Fig. 11. Stability test of ferulic acid at various heated time condition with different pH of rice bran fermentation.

제 2절 미강발효추출물이 ADP수용체가 매개하는 혈전증병리현상인 혈소판 응집 신호전달 표적의 억제특이성 규명

1. ADP 수용체 P_2Y_{12}의 $G_{\alpha i}$ 매개 혈소판응집 신호전달 표적분자 조절특이성 규명

가. 요약

(1) 혈소판응집반응은 혈전형성에 깊게 관여하는 병리현상으로서, 혈전증의 치료를 목적으로 하는 약물은 혈소판응집반응의 억제를 표적으로 한다.

(2) 본 연구에서는 혈소판응집반응의 신호전달분자 중에 혈소판응집억제분자 cAMP의 생성과 이것의 기능에 관여하는 A-kinase에 의한 VASP(Ser^{157}) 인산화 등에 미치는 미강추출물의 효과를 조사하여 미강추출물이 항혈소판작용이 있는지 평가했다.

(3) 미강추출물은 collagen, thrombin 및 ADP가 유인하는 혈소판응집반응을 강하게 억제시켰다 (Fig. 1~12, Table 5). 특히 미강추출물 Lw는 collagen 및 thrombin에 의해 응집된 혈소판에서 분비되는 ADP에 의한 혈소판응집반응을 강하게 억제시켰다(Fig. 12, Table 5).

(4) 미강추출물은 [AC의 활성화 → cAMP의 생성증가 → A-kinase의 활성화 → VASP(Ser^{157}) 인산화]라는 혈소판응집억제 pathway를 통해 ADP유인 혈소판응집억제반응에 관여했다.

(5) 따라서, 이상의 결과들로부터 생각하면 미강추출물은 혈소판응집이 매개하는 혈전증의 치료 또는 예방적인 측면에서 응용가능하리라 생각된다.

나. 이론적 배경

(1) 혈소판 응집은 혈관 벽이 손상되었을 때, 지혈을 위해 혈병(hemostatic plug)을 생성하는데 필수적인 반응이지만, 혈전증, 관상동맥질환, 심근경색 등의 병리현상을 야기한다. 따라서, 혈소판 응집반응의 억제는 각종 심혈관계 질환의 예방 및 치료 물질 탐색과 평가에 있어서 중요한 요소이다. 혈소판 응집반응을 야기할 수 있는 물질로 collagen, thrombin, ADP 등이 있으며, 이들을 응집유도물질이라고 한다. 이들 혈소판응집유도물질은 공통적으로 혈소판막 표면에 있는 각각의 수용체에 결합하여 Ca^{2+}외존성 phospholipase C 활성화 → 혈소판막인지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 분해 → inositol 1,4,5-trisphosphate와 diacylglycerol 생성 → 혈소판응집관여물질 생성 및 동원(Ca^{2+}과 thromboxane A_2)과 과립물질(ADP, ATP, serotonin 등)의 분비의 과정을 거쳐 혈소판을 응집시킨다. 혈소판의 응집반응은 혈전형성에 관여한다. 혈소판응집이 매개하는 혈전형성에는 혈소판응집에 관여하는 Ca^{2+}이 중추적인 역할을 하므로 본 연구에서는 Ca^{2+}의 감소작용을 하는 cAMP와 VASP-p의 증가에 미치는 미강추출물의 효과를 조사하여 미강추출물의 항혈소판작용을 평가했다.

(2) 본 [연구범위 및 연구수행방법]에서 기술한 혈소판응집신호전달분자들의 기능특성을 가지고 미강의 항혈소판작용을 평가하는 방법을 소개한다.

Table 1-1. 혈소판응집 억제 신호전달분자의 기능 특성

혈소판응집 신호전달분자	기능	미강에 의한 반응결과 평가	
		억제	증가
ADP, collagen, thrombin	혈소판응집 유도	미강의 항혈소판작용 있음	미강의 항혈소판작용 없음
Adenylate cyclase	기질 ATP로부터 cAMP 생성증가	-	미강이 cAMP 생성촉진 → 혈소판응집촉진분자인 Ca^{2+}의 감소 → 혈소판응집억제 → 미강의 항혈소판작용 있음
cAMP	혈소판응집촉진분자인 Ca^{2+}의 감소	-	미강이 cAMP 생성촉진 → 혈소판응집촉진분자인 Ca^{2+}의 감소 → 혈소판응집억제 → 미강의 항혈소판작용 있음
Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)의 인산화 (VASP-p)	혈장 중의 혈액응고인자 fibrinogen과 혈소판막의 표면에 있는 integrin인 $\alpha\Pi_b/\beta_3$와의 결합을 억제시켜 혈소판의 완전한 응집 억제	-	• 미강이 fibrinogen과 $\alpha\Pi_b/\beta_3$와의 결합을 억제시켜 혈소판의 완전한 응집을 억제 → 미강의 항혈소판작용 있음 • Ca^{2+} 동원억제 → 혈소판응집 억제 → 미강의 항혈소판작용 있음

다. 실험방법

(1) Preparation of human platelets

대한적십자사 경남혈액원으로부터 구입한 platelet rich plasma(혈소판풍부혈장)를 1650 ×g에서 10분간 원심분리하여 하층의 platelet pellets을 얻고, washing buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 0.36mM NaH_2PO_4, 5.5mM glucose, 1mM EDTA, pH 6.5)로 platelet pellets을 washing한 후, suspension buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 0.36mM NaH_2PO_4, 0.49mM $MgCl_2$, 5.5mM glucose, 0.25% gelatin, pH 6.9)에 부유하여 5×10^8 platelets/ml 농도의 platelet suspension을 준비한다. 본 실험은 한국 보건복지부지정 공용기관생명윤리위원회의 승인(PIRB12-071)을 받았다.

(2) Measurement of platelet aggregation

Human 혈소판(10^8/ml)을 미강으로부터 제조한 추출물(RB, Lp, Lp+Lw 및 Lw)을 첨가하거나 첨가하지 않은 상태로 37℃에서 3분간 preincubation 시킨 후, 응집유도물질로 자극하여 5분간 응집율을 측정한다. 응집 유도물질(ADP, collagen, thrombin)의 자극에 의해 혈소판응집이 일어나면 aggregometer (Chrono-Log, Corp., Havertown, PA)에서 측정되는 빛의 투과도(suspension buffer를 blank로 함)가 증가하게 되고, 이 투과도를 혈소판 응집율로 평가

한다.

(3) Measurement of cAMP

미강으로부터 제조한 추출물(RB, Lp, Lp+Lw 및 Lw)을 농도별로 첨가하거나 첨가하지 않은 human 혈소판(10^8/ml)을 37℃에서 3분간 preincubation한 후, 응집유도물질로 자극하여 혈소판응집반응을 유도하고 5분간 반응시킨다. 그 후, 즉시 ice-cold 80% ethanol을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, cAMP를 추출하여 cAMP EIA kit를 이용하여 측정한다.

(4) Western blot for analysis of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)

미강으로부터 제조한 추출물(RB, Lp, Lp+Lw 및 Lw)을 농도별로 첨가하거나 첨가하지 않은 human 혈소판(10^8/ml)을 37℃에서 3분간 preincubation한 후, 응집유도물질로 자극하여 5분간 반응시킨다. 그 후, 즉시 반응정지액으로 cell lysis buffer(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1mM serine/threonine phosphatase inhibitor β-glycerophosphate, 1 mM ATPase, alkaline and acid phosphatase, and protein phosphotyrosine phosphatase inhibitor Na_3VO_4, 1 μg/mL serine and cysteine protease inhibitor leupeptin, and 1mM serine protease and acetylcholinesterase inhibitor phenylmethanesulfonylfluoride, pH 7.5)를 첨가하여 lysis시키고 단백질정량 후, SDS-PAGE로 단백질 (15 μg)을 분리하여 anti-phospho-VASP를 이용하여 immunoblotting으로 인산화된 정도를 측정한다.

라. 연구결과

(1) Collagen이 유도하는 사람혈소판응집반응에 미치는 미강추출물의 효과

(가) 미강추출물 RB가 collagen유인 사람혈소판응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-1A, B)

- 미강추출물 RB(12.5~100 μg/ml)는 collagen(10 μg/ml)이 유인한 혈소판응집율(66.0%)을 농도의존적으로 억제하였으며, 특히 RB 100 μg/ml은 collagen(10 μg/ml)에 의한 혈소판응집율(66.0%)을 22.67%까지 저하시켰고(Fig. 1-1A), 이것에 의한 collagen응집억제정도는 66%였다.
- Collagen(10 μg/ml)이 유인한 혈소판 응집반응을 50% 억제시키는 RB의 IC_{50} value는 21.2 μg/ml로 계산되었다(Fig. 1-1B).

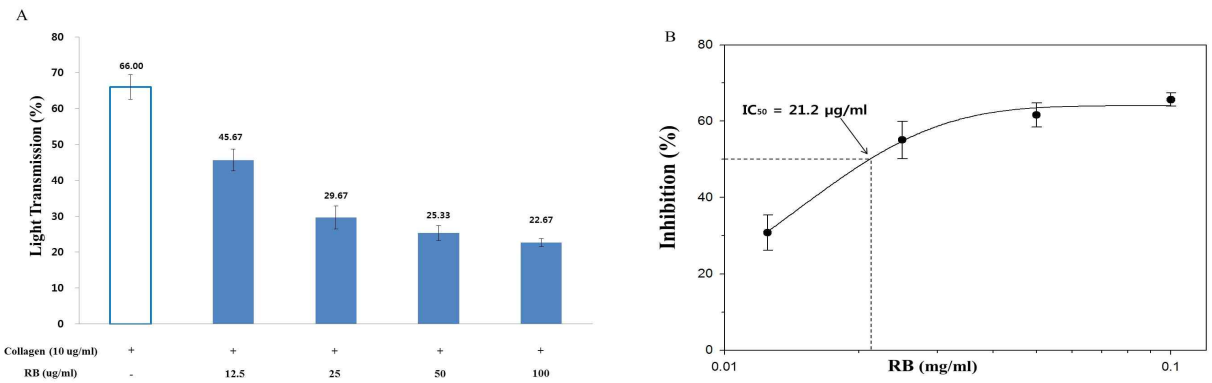


Fig. 1-1. Effects of extract RB from fermented bran on collagen-induced human platelet

aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(나) 미강추출물 Lp가 collagen유인 사람혈소판응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 2A, B)

- 미강추출물 Lp(100~1000 μg/ml)는 collagen(10 μg/ml)이 유인한 혈소판응집율(66.67%)을 농도의존적으로 억제하였지만, 이 농도는 RB의 그것보다 아주 높은 농도이므로, collagen유인 혈소판응집의 억제에 있어서 Lp는 Rb보다 아주 약함을 알 수 있다(Fig. 1-2A).
- 미강추출물 Lp 100 μg/ml은 collagen(10 μg/ml)에 의한 혈소판응집율(66.67%)을 60.67%까지 저하시켰고, 이것에 의한 collagen응집억제정도는 9.0%였다.
- Collagen(10 μg/ml)이 유인한 혈소판응집반응을 50% 억제시키는 Lp의 IC_{50} value는 637.2 μg/ml이었고, 이것은 RB의 IC50 value (21.2 μg/ml)보다 30배 높은 농도로 계산되었다(Fig. 1-2B).

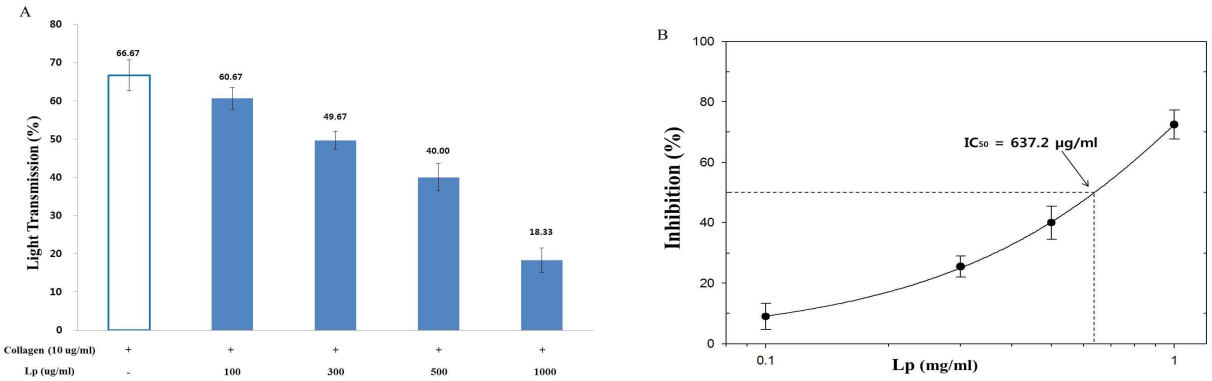


Fig. 1-2. Effects of extract Lp from fermented bran on collagen-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(다) 미강추출물 Lp+Lw가 collagen유인 사람혈소판응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-3A, B)

- 미강추출물 Lp+Lw(100~400 μg/ml)은 collagen(10 μg/ml)이 유인하는 혈소판응집율(59.33%)을 농도의존적으로 억제하였고, Lp+Lw는 비교적 낮은 농도에서 collagen유인 혈소판응집을 억제시키고 있지만(Fig. 1-3A), 미강추출물 RB(Fig. 1A)보다 높은 농도에서 collagen유인 혈소판응집을 억제시키고 있음을 알 수 있다.
- Lp+Lw 100 μg/ml은 collagen(10 μg/ml)에 의한 혈소판응집율(59.33%)를 45.33%까지 저하시켰고, 이것에 의한 collagen응집억제정도는 23.6%이었다.
- Collagen(10 μg/ml)이 유인한 혈소판응집반응을 50% 억제시키는 Lp+Lw의 IC_{50} value는 218.8 μg/ml로 계산되었고(Fig. 1-3B), 이것은 RB의 IC_{50} value (21.2 μg/ml)보다 약 10배 정도 높다.

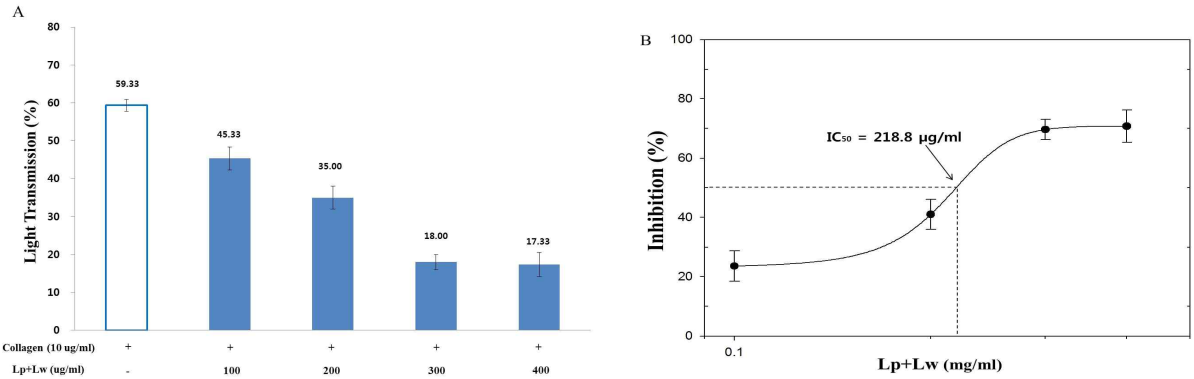


Fig. 1-3. Effects of extract Lp+Lw from fermented bran on collagen-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(라) 미강추출물 Lw가 collagen유인 사람혈소판응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-4A, B)

- 미강추출물 Lw(50~1000 μg/ml)은 collagen(10 μg/ml)이 유인하는 혈소판응집율(80.00%)을 농도의존적으로 억제하였지만(Fig. 1-4A), 비교적 높은 농도에서 collagen유인 혈소판응집을 억제시키고 있다. 이 Lw의 농도는 RB, Lp 및 Lp+Lw의 collagen유인 혈소판응집억제농도(Fig. 1-1A, 1-2A, 1-3A)보다 높으므로, collagen유인 혈소판응집억제에 있어서 Lw가 가장 약하다는 것을 알 수 있다.
- Lw 100 μg/ml은 collagen(10 μg/ml)에 의한 혈소판응집율(80.00%)을 70.33%까지 저하시켰고, 이것에 의한 collagen응집억제정도는 12.1%였다.
- Collagen(10 μg/ml)이 유인한 혈소판응집을 50% 억제시키는 Lw의 IC_{50} value는 725.9 μg/ml으로 계산되었다(Fig. 1-4B).

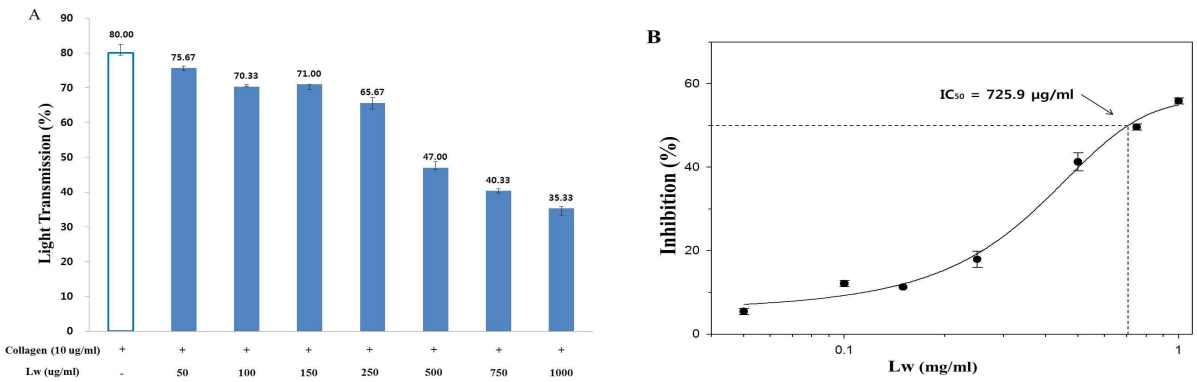


Fig. 1-4. Effects of extract Lw from fermented bran on collagen-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

Table 1-2. 미강추출물의 동일농도에 의한 collagen유인 사람혈소판응집억제율 비교

미강추출물	Collagen유인 혈소판응집억제율 비교 (%)*
RB (100 μg/ml)	66.6
Lp (100 μg/ml)	9.0
Lp+Lw (100 μg/ml)	23.6
Lw (100 μg/ml)	12.1

* Fig. 1-1A, 1-2A, 1-3A, 1-4A로부터 계산하였음.

* 억제율(%) = [{Collagen - (미강추출물+Collagen)} / Collagen] × 100

- Fig. 1-1A, 1-2A, 1-3A 및 1-4A에서 볼 수 있듯이 collagen(10 μg/ml) 단독으로 혈소판응집을 유도하였을 때의 응집율은 Fig. 1-1A에서 66.00%, Fig. 1-2A에서 66.67%, Fig. 1-3A에서 59.33%, Fig. 1-4A에서 80.00%로 관찰되었다. 이것은 동일한 혈소판이 아닌 것과 동일한 날에 혈소판응집반응을 시험하지 않은 탓이고, 혈소판은 donor의 다양한 생리적 상태에 따라 다르기 때문에 collagen 단독에 의한 혈소판응집율은 다르게 나올 수 있다는 것을 알 수 있다.
- 따라서, 혈소판응집반응을 억제하는 미강추출물의 효과를 비교하기 위해서 혈소판응집을 50% 억제하는 IC_{50} value를 측정했고, 또한 동일한 농도에서 혈소판응집억제율을 비교했다.
- Table 1-2에서 볼 수 있듯이 collagen유인 사람혈소판응집에 대한 미강추출물의 동일한 농도 (100 μg/ml)에 의한 억제율을 보면, RB에 의해 66.6%, Lp에 의해 9.0%, Lp+Lw에 의해 23.6% 및 Lw에 의해 12.1% 억제되었고, collagen유인 혈소판응집반응억제에 있어서 RB가 가장 강하고, Lp가 가장 약했다.

(2) Thrombin이 유도하는 혈소판응집에서 미강추출물의 억제효과

(가) 미강 추출물 RB가 thrombin유인 사람혈소판 응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-5A, B)

- 미강추출물 RB(100~1000 μg/ml)는 thrombin(0.2 U/ml)이 유인한 혈소판 응집율(64.33%)를 농도의존적으로 억제하였으며(Fig. 1-5A), RB 100 μg/ml은 thrombin (0.2 U/ml)에 의한 응집(64.33%)를 59.00%까지 저하시켰으며(Fig. 1-5A), 이것에 의한 thrombin응집억제정도는 8.3%였다.
- Thrombin(0.2 U/ml)이 유인한 혈소판 응집반응을 50% 억제시키는 RB의 IC_{50} value는 841 μg/ml로서 비교적 높은 농도이다(Fig. 1-5B).

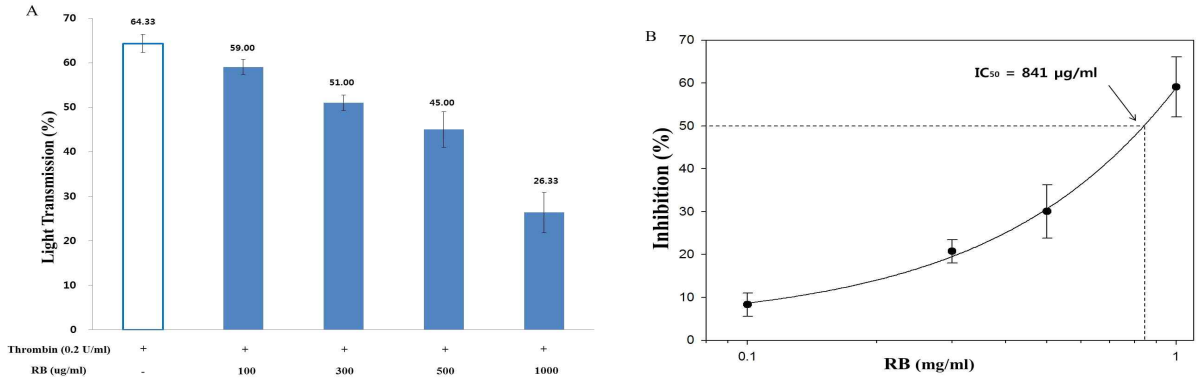


Fig. 1-5. Effects of extract RB from fermented bran on thrombin-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(나) 미강 추출물 Lp가 thrombin유인 사람혈소판 응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-6A, B)

- 미강추출물 Lp (100~2000 μg/ml)는 thrombin(0.2 U/ml)이 유인한 혈소판 응집율(68.33%)를 농도의존적으로 억제하였으며(Fig. 6A), Lp 100 μg/ml은 thrombin(0.2 U/ml)에 의한 응집율(68.33%)를 66.67%까지 저하시켰으며(Fig. 1-6A), 이것에 의한 thrombin응집억제정도는 2.4%였다.
- Thrombin(0.2 U/ml)이 유인한 혈소판 응집반응을 50% 억제시키는 Lp의 IC50 value는 2000 μg/ml 이상으로서 IC_{50} 범위를 초과하는 높은 농도였다 (Fig. 1-6B).

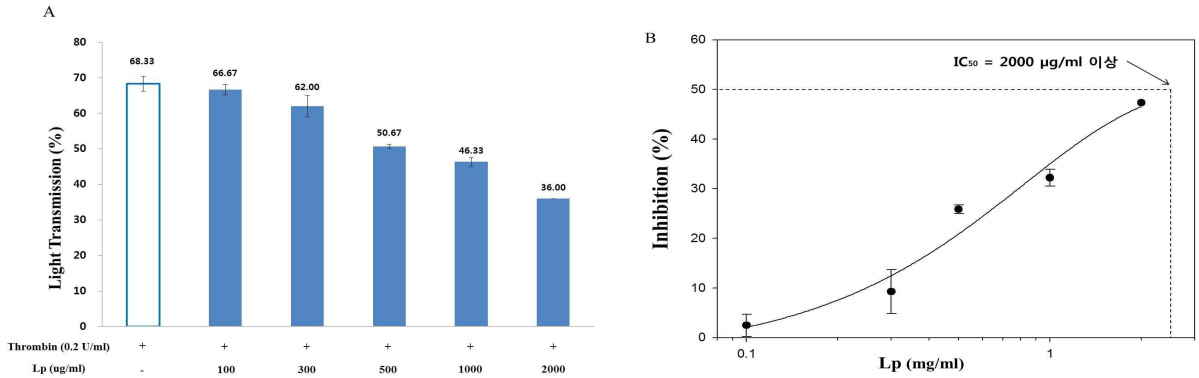


Fig. 1-6. Effects of extract Lp from fermented bran on thrombin-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(다) 미강 추출물 Lp+Lw가 thrombin유인 사람혈소판 응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-7A, B)

- 미강추출물 Lp+Lw (100~1000 μg/ml)는 thrombin(0.2 U/ml)이 유인한 혈소판 응집률(73.67%)를 농도의존적으로 억제하였으며(Fig. 1-7A), Lp+Lw 100 μg/ml은 thrombin(0.2 U/ml)에 의한 응집율 (73.69%)를 72.00%까지 저하시켰으며(Fig. 1-7A), 이것에 의한 thrombin응집억제정도는 2.3%였다.

• Thrombin(0.2 U/ml)이 유인한 혈소판 응집반응을 50% 억제시키는 Lp+Lw의 IC_{50} value는 740.7 μg/ml 으로서 비교적 높은 농도였다(Fig. 1-7B).

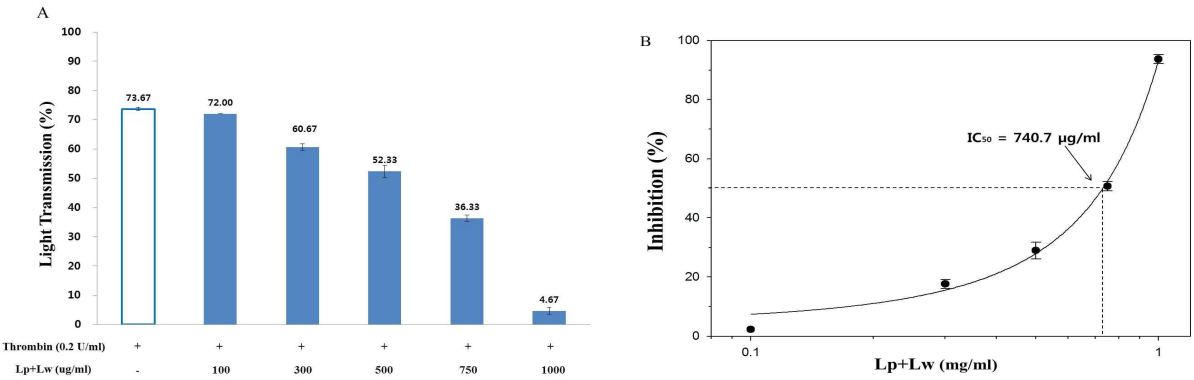


Fig. 1-7. Effects of extract Lp+Lw from fermented bran on thrombin-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(라) 미강 추출물 Lw가 thrombin유인 사람혈소판 응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-8A, B)

• 미강추출물 Lw (500~1000 μg/ml)는 thrombin(0.2 U/ml)이 유인한 혈소판 응집률 (71.00%)를 농도의존적으로 억제하였으며(Fig. 1-8A), Lw 100 μg/ml은 thrombin(0.2 U/ml)에 의한 응집율 (71.00%)를 64.75%까지 저하시켰으며(Fig. 1-8A), 이것에 의한 thrombin응집억제정도는 8.8%였다.

• Thrombin(0.2 U/ml)이 유인한 혈소판 응집반응을 50% 억제시키는 Lw의 IC_{50} value는 389.4 μg/ml 으로서 다른 추출물에 비해 낮은 농도였다(Fig. 1-8B).

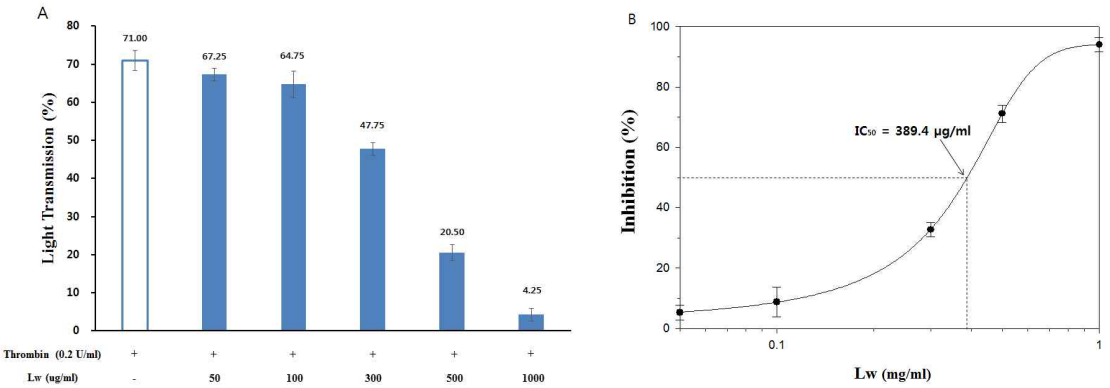


Fig. 1-8. Effects of extract Lw from fermented bran on thrombin-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

Table 1-3. 미강 추출물의 동일농도에 의한 thrombin유인 사람혈소판 응집억제율 비교

미강 추출물	Thrombin유인 혈소판 응집율에 대한 미강추출물의 억제율(%)*
RB (100 μg/ml)	5.9
Lp (100 μg/ml)	2.4
Lp+Lw (100 μg/ml)	2.3
Lw (100 μg/ml)	8.8

* Fig. 1-5A, 1-6A, 1-7A, 1-8A로부터 계산하였음.

* 억제율(%) = [{Thrombin - (미강추출물+Thrombin)} / Thrombin] × 100

- Fig. 1-5A, 1-6A 1-7A 및 1-8A에서 볼 수 있듯이 thrombin(0.2 U/ml) 단독으로 혈소판 응집을 유도하였을 때의 응집율은 Fig. 1-5A에서 64.33%, Fig. 1-6A에서 68.33%, Fig. 1-7A에서 73.67%로 Fig. 1-8A에서 71.00%로 관찰되었다. 이것은 동일한 혈소판이 아닌 것과 동일한 날에 혈소판 응집반응을 시험하지 않은 탓이고, 혈소판은 donor의 다양한 생리적 상태에 따라 다르기 때문에 thrombin단독에 의한 혈소판응집율이 다르게 나올 수 있다는 것을 알 수 있다.
- 따라서, 혈소판 응집반응을 억제하는 미강추출물의 효과를 비교하기위해 혈소판 응집을 50% 억제시키는 IC_{50} value를 측정했고, 또한 동일한 농도에서 혈소판 응집억제율을 비교했다.
- Table 1-3에서 볼 수 있듯이 thrombin유인 혈소판 응집에 대한 미강 추출물의 동일한 농도 (100 μg/ml)에 의한 억제율을 보면, RB에 의해서 5.9%, Lp에 의해서 2.4%, Lp+Lw에 의해서 2.3% 억제되었고, Lw에 의해서 8.8% 억제되었으며, thrombin유인 혈소판 응집반응 억제에 있어서 Lw가 가장 강하게 작용함을 알 수 있다.

(3) ADP가 유도하는 혈소판응집에서 미강추출물의 억제효과

(가) 미강추출물 RB가 ADP유인 사람혈소판응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-9A, B)

- 미강추출물 RB(50~1000 μg/ml)는 ADP(20 μM)이 유인한 혈소판응집율(64.5%)을 농도의 존적으로 억제하였다(Fig. 1-9A).
- RB 100 μg/ml은 ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집율(64.5%)을 52.3%까지 저하시켰고(Fig. 1-9A), 이것에 대한 ADP응집억제정도는 18.9%였다.
- ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집반응을 50% 억제시키는 RB의 IC_{50} value는 비교적 낮은 농도로서 224.0 μg/ml로 계산되었다(Fig. 1-9B).

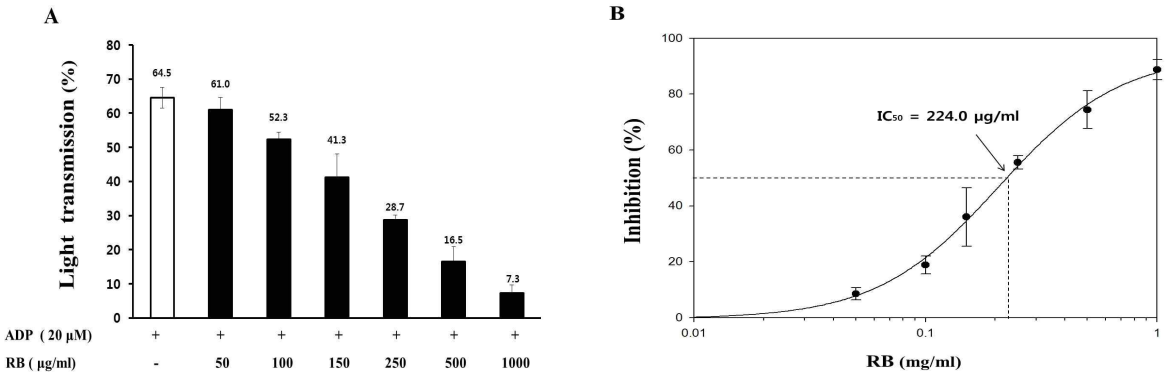


Fig. 1-9. Effects of extract RB from fermented bran on ADP-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(나) 미강추출물 Lp가 ADP유인 사람혈소판응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-10A, B)

- 미강추출물 Lp(100~1000 μg/ml)은 ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집율(56.25%)을 농도의 존적으로 억제하였다(Fig. 1-10A).
- Lp 100 μg/ml은 ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집율(56.25%)를 50.00%까지 저하시켰고(Fig. 1-10A), 이것에 대한 ADP응집억제정도는 11.1%였다.
- ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집반응을 50% 억제시키는 Lp의 IC_{50} value는 501.1 μg/ml로서 RB의 그것보다 높았다(Fig. 1-10B).

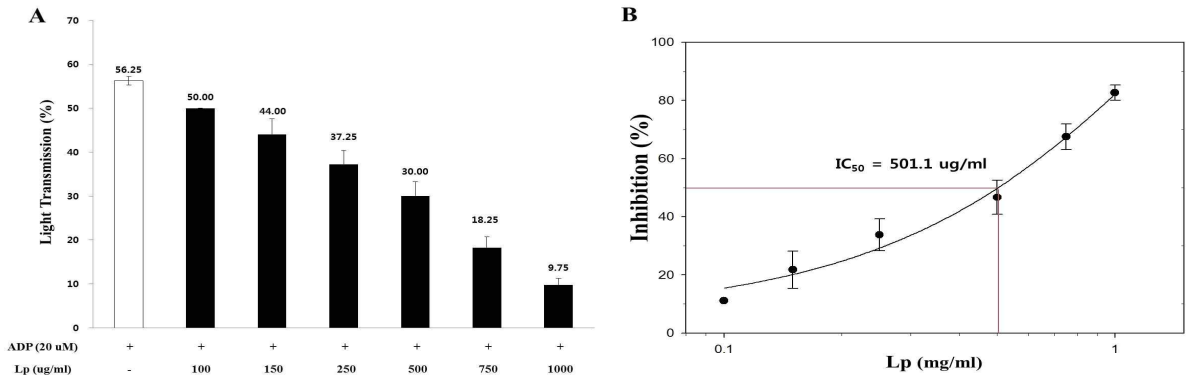


Fig. 1-10. Effects of extract Lp from fermented bran on ADP-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(다) 미강추출물 Lp+Lw가 ADP유인 사람혈소판응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-11A, B)

- 미강추출물 Lp+Lw(10~500 μg/ml)은 ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집율(56.25%)를 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 1-11A).
- Lp+Lw 100 μg/ml은 ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집율(56.25%)를 33.25%까지 저하시켰다(Fig. 1-11A). 이것에 의한 ADP응집억제정도는 40.9%였다.
- ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집반응을 50% 억제시키는 Lp+Lw의 IC_{50} value는 131.9 μg/ml로서 비교적 낮은 농도였다(Fig. 1-11B).

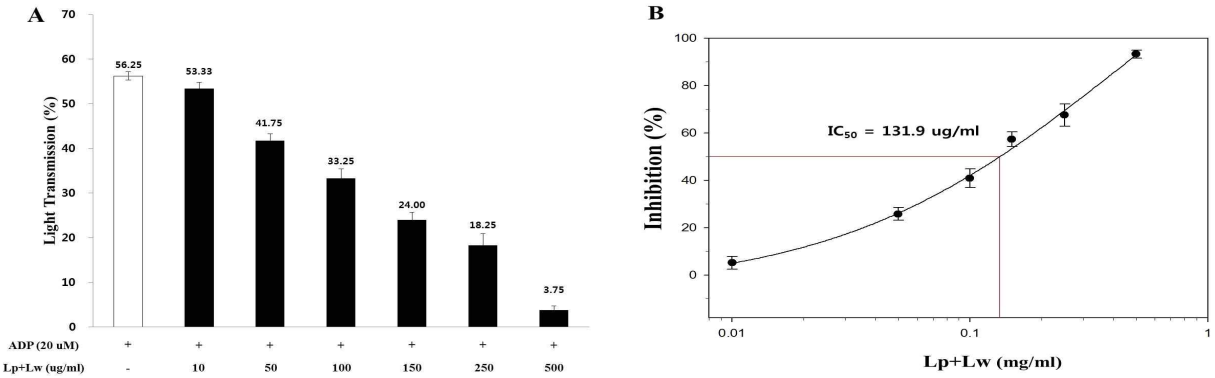


Fig. 1-11. Effects of extract Lp+Lw from fermented bran on ADP-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

(라) 미강추출물 Lw가 ADP유인 사람혈소판응집반응에 미치는 억제효과(Fig. 1-12A, B)

- 미강추출물 Lw(10~500 μg/ml)은 ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집율(56.25%)를 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 1-12A).
- Lw 100 μg/ml은 ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집율(56.25%)를 30.25%까지 저하시켰다(Fig. 1-12A). 이것에 의한 ADP응집억제정도는 46.2%였다.
- ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집반응을 50% 억제시키는 Lw의 IC_{50} value는 아주 낮은 농도로서 104.2 μg/ml이었다(Fig. 1-12B).

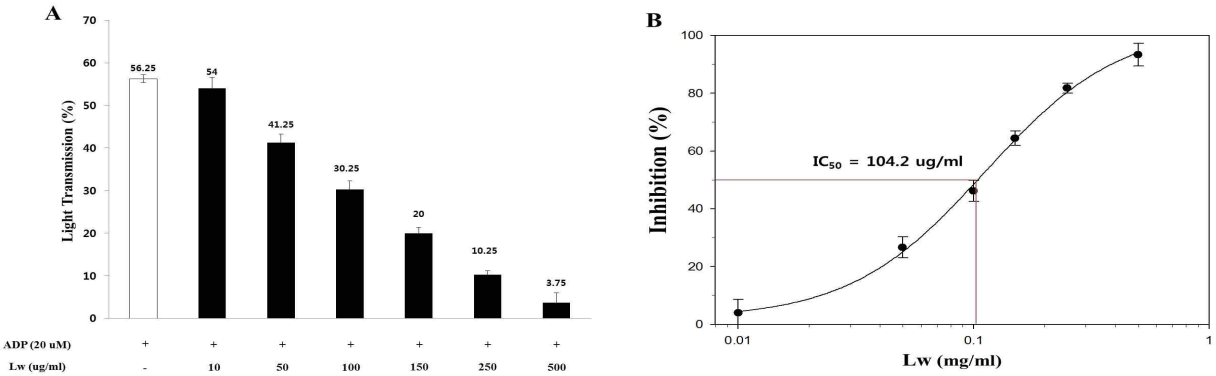


Fig. 1-12. Effects of extract Lw from fermented bran on ADP-induced human platelet aggregation A; Effect on platelet aggregation B; IC_{50} value

Table 1-4. 미강추출물의 동일농도에 의한 ADP유인 사람혈소판응집억제율 비교

미강추출물	ADP유인 혈소판응집억제율 비교 (%)*
RB (100 μg/ml)	18.9
Lp (100 μg/ml)	11.1
Lp+Lw (100 μg/ml)	40.9
Lw (100 μg/ml)	46.2

* Fig. 1-9A, 1-10A, 1-11A, 1-12A로부터 계산하였음.

* 억제율(%) = [{ADP - (미강추출물+ADP)} / ADP] × 100

- ADP 단독에 의한 혈소판응집반응은 thrombin 및 collagen에 비해 비교적 일정하게 나타났다. 그러나 Fig. 1-9A에서 64.5%, Fig. 1-10A에서 56.25%, Fig. 1-11A에서 56.25%, Fig. 1-12A에서 56.25%로 관찰되었다. 따라서, IC_{50} value를 측정했고, 동일한 농도에서 혈소판응집억제율을 비교했다.
- Table 1-4에서 볼 수 있듯이 ADP유인 혈소판응집에 대한 미강추출물의 동일한 농도 (100 μg/ml)에 의한 억제율을 보면, RB에 의해서 18.9%, Lp에 의해서 11.1%, Lp+Lw에 의해서 40.9% 및 Lw에 의해서 46.2% 억제되었고, ADP유인 혈소판응집반응에 있어서 Lw가 가장 강하게 작용함을 알 수 있다.

(4) 혈소판응집유도물질에 의한 혈소판응집억제능 평가·비교

Table 1-5. 미강추출물의 혈소판응집 억제효과 평가 비교

혈소판응집 유도물질	응집억제에 있어서 미강추출물의 IC_{50} value (μg/ml) 순서	미강추출물의 동일한 농도 (100 μg/ml)에 의한 혈소판응집 억제능 순서
Collagen (10 μg/ml)	Lw (725.9) > Lp (637.2) > Lp+Lw (218.8) > RB (21.2)	RB > Lp+Lw > Lw > Lp
Thrombin (0.2 U/ml)	Lp (2000이상) > RB (841) > Lp+Lw (740.7) > Lw (389.4) *Lw의 것은 금후 실험예정임	Lw > RB > Lp > Lp+Lw
ADP (20 μM)	Lp (501.1) > RB (224.0) > Lp+Lw (131.9) > Lw (104.2)	Lw > Lp+Lw > RB > Lp

- 본 실험에서 혈소판응집 유도물질 중 collagen은 혈관이 손상되었을 때 혈관내피세포로부터 돌출되는 단백질로서 최초의 혈소판응집반응에 관여하고, thrombin은 혈액응고 과정 중에 생기는 응고단백질로서 혈소판응집반응을 강하게 유도한다. ADP는 혈소판내부의 과

립(dense body)에 저장되어 있는 물질로서 collagen이나 thrombin의 자극에 의해 혈소판이 응집되는 과정 중에 dense body로부터 분비되어 또다른 혈소판응집반응을 강하게 유도한다.

- 따라서, 어떤 물질이 thrombin이나 collagen에 의한 혈소판응집을 억제시키지 않더라도 ADP에 의한 혈소판응집반응을 억제시키면 강한 항혈소판물질로서 평가한다.
- IC_{50}는 물질의 상대적평가에 이용되고, IC_{50}가 적으면 적을수록 혈소판응집억제능이 강함을 의미한다.
- Table 5에서 보면, collagen(10 μg/ml)에 의해 유도되는 혈소판응집을 가장 강하게 억제시키는 미강추출물은 RB(21.2 μg/ml)이고, thrombin(0.2 U/ml)에 의한 혈소판응집을 가장 강하게 억제시키는 미강추출물은 Lw(389.4 μg/ml)이며, ADP(20 μM)에 의한 혈소판응집을 가장 강하게 억제시키는 것은 Lw(104.2 μg/ml)임을 알 수 있다.
- **RB**는 collagen(10 μg/ml)유인 혈소판응집을 가장 강하게 억제시켜 혈소판으로부터 ADP의 방출을 억제시킬 것으로 예상되지만, 실제로 ADP에 의한 혈소판응집을 억제시키는 RB의 IC_{50} value(224.0 μg/ml)는 Lp+Lw(131.9 μg/ml) 및 Lw(104.2 μg/ml)보다 높다.
- 또한 thrombin(0.2 U/ml)에 의한 혈소판응집을 억제시키는 RB의 IC_{50} value(841 μg/ml)은 Lw(389.4 μg/ml)보다 높으므로 thrombin 유인 혈소판응집을 억제시키는 작용은 RB가 Lw보다 약한 것을 알 수 있다.
- **Lw**는 collagen(10 μg/ml)에 의한 혈소판응집을 50% 억제시키는 농도가 725.9 μg/ml로서 미강추출물 중 가장 낮은 억제활성을 가지므로 collagen 응집 동안에 혈소판으로부터 ADP의 방출이 많아 ADP에 의한 혈소판응집을 가장 약하게 억제시킬 것으로 예상되지만, Lw는 ADP(20 μM)가 유인하는 혈소판응집을 50% 억제시키는 IC_{50} value (104.2 μg/ml)은 RB의 IC_{50} value(224.0 μg/ml)과 Lp+Lw(131.9 μg/ml)보다 낮았다(Table 5). 이것은 Lw는 collagen과 thrombin에 의해 일어나는 혈소판응집을 가장 강하게 억제시키는 RB 및 Lp+Lw보다 강하게 ADP유인 혈소판응집을 억제시킴을 알 수 있다.
- 결론적으로 혈소판응집을 가장 강하게 억제시키는 미강추출물은 **Lw>Lp+Lw>RB>Lp**순이라고 생각된다.

(4) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물이 Adenylate cyclase 활성에 미치는 효과

(가) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 RB가 adenylate cyclase (AC) 저해제 SQ22536에 미치는 효과(Fig. 1-13)

- 본 연구에서 [ADP수용체 P_2Y_{12}의 $G_{\alpha i}$매개 혈소판응집 신호전달 표적분자 조절특이성 규명]을 위해, ADP유인 혈소판응집반응에 미치는 미강추출물의 효과를 thrombin 및 collagen유인 혈소판응집억제율과 비교하였고, 또한 ADP유인 혈소판응집을 저해시키는 것이 혈소판응집이 유인하는 혈전증의 치료에 중요하다.
- 전술한 바와 같이(table 1-1 참조) 혈소판의 응집이 일어나기 위해서는 Ca^{2+}이 필수적이

다.

- Ca^{2+}의 증가를 감소시켜 혈소판의 응집을 억제시키는 분자는 혈소판 내부의 ATP (adenosine triphosphate)에 adenylate cyclase (AC)가 작용하여 생성시키는 cAMP (cyclic adenosine monophosphate)이다.
- 특히 ADP는 그 수용체 P_2Y_{12}의 $G_{\alpha i}$에 작용하여 AC의 활성 억제를 거쳐 cAMP의 생성을 억제시킴으로서 혈소판 내부에 Ca^{2+}을 증가시켜 혈소판의 응집을 촉진한다.
- 따라서, 미강추출물은 ADP에 의한 혈소판응집을 억제시키기 위해(Fig. 1-9~12) AC의 활성 촉진과 더불어 cAMP의 생성을 촉진시킬 수 있다.
- 그래서, ADP유인 혈소판응집반응에 있어서 미강추출물의 AC활성에 미치는 효과를 조사하기 위해 AC저해제 SQ22536를 이용하였다.
- 미강추출물 RB(250 ㎍/ml)은 ADP유인 혈소판응집율(64.5%)를 28.7%까지 저하시켰다 (Fig. 1-13).
- RB(250 ㎍/ml)에 의해 28.7%까지 저하된 ADP유인 혈소판응집반응은 AC저해제 SQ22536에 의해 51.7%까지 증가되었다(Fig. 12). 이것은 SQ22536이 RB(250 ㎍/ml)이 저해시킨 혈소판응집율(28.7%)에 대해 80.1%까지 혈소판응집을 촉진시키고 있음을 의미한다.
- 따라서, RB에 의한 혈소판응집의 저해는 RB의 AC활성촉진에 의한 cAMP의 생성에 기인한 것을 의미한다.

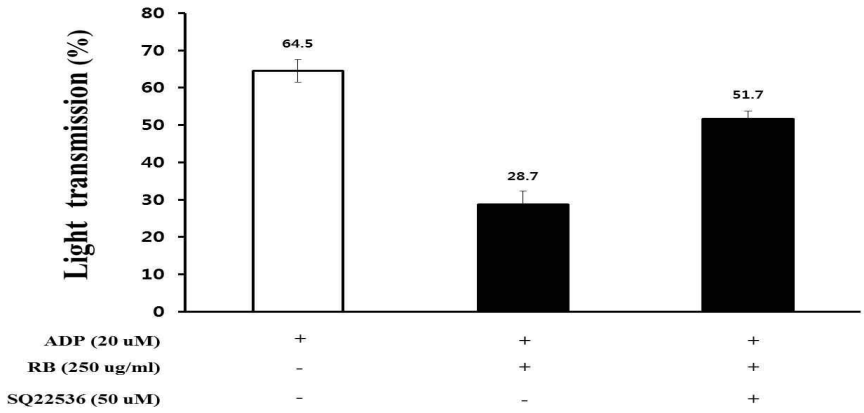


Fig. 1-13. Effects of extract RB from fermented bran with SQ22536 on ADP-induced human platelet aggregation

(나) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 Lp가 adenylate cyclase (AC) 저해제 SQ22536에 미치는 효과(Fig. 1-14)

- 미강추출물 Lp(750 ㎍/ml)는 ADP유인 혈소판응집율(56.25%)을 18.25%까지 저하시켰다 (Fig. 14).
- Lp(750 ㎍/ml)에 의해 18.25%까지 저하된 ADP유인 혈소판응집반응은 AC저해제

SQ22536에 의해 29.0%까지 증가했다(Fig. 1-14). 이것은 SQ22536이 Lp(750 μg/ml)가 저해시킨 ADP유인 혈소판응집율(18.25%)에 대해 58.9%까지 혈소판응집을 촉진시키고 있음을 의미한다.

- 따라서, Lp에 의한 혈소판응집의 저해는 Lp의 AC활성 촉진에 의한 cAMP의 생성에 기인한 것을 의미한다.

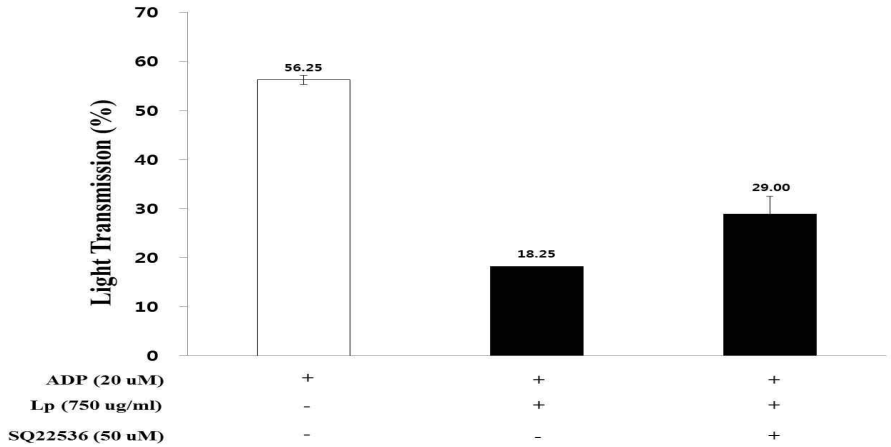


Fig. 1-14. Effects of extract Lp from fermented bran with SQ22536 on ADP-induced human platelet aggregation

(다) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 Lp+Lw가 adenylate cylase (AC) 저해제 SQ22536에 미치는 효과(Fig. 1-15)

- 미강추출물 Lp+Lw(250 μg/ml)은 ADP유인 혈소판응집율(56.25%)을 18.25%까지 저하시켰다(Fig. 1-15).
- Lp+Lw(250 μg/ml)에 의해 18.25%까지 저하된 ADP유인 혈소판응집반응은 AC저해제 SQ22536에 의해 30.67%까지 증가했다(Fig. 1-15). 이것은 SQ22536이 Lp+Lw(250 μg/ml)가 저해시킨 ADP유인 혈소판응집율(18.25%)에 대해 68.0%까지 혈소판응집을 촉진시키고 있음을 의미한다.
- 따라서, Lp+Lw에 의한 혈소판응집저해는 Lp+Lw의 AC활성 촉진에 의한 cAMP의 생성에 기인한 것을 의미한다.

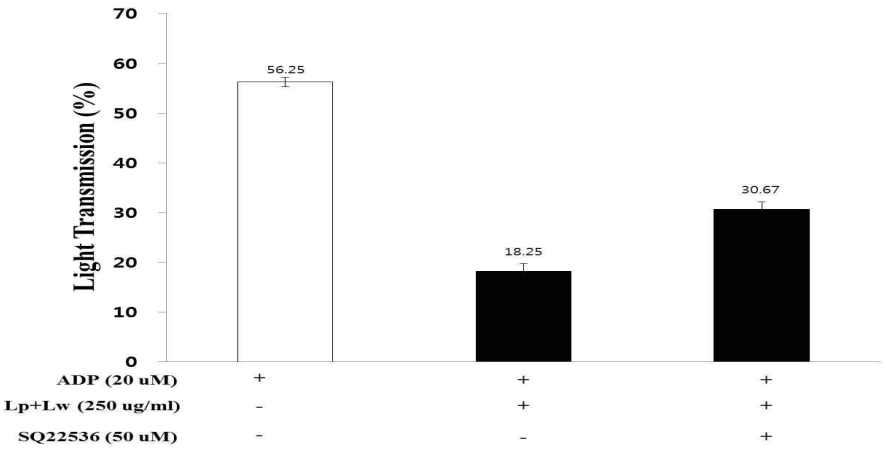


Fig. 1-15. Effects of extract Lp+Lw from fermented bran with SQ22536 on ADP-induced human platelet aggregation

(라) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 Lw가 adenylate cyclase (AC) 저해제 SQ22536에 미치는 효과(Fig. 1-16)

- 미강추출물 Lw(250 μg/ml)은 ADP유인 혈소판응집율(56.25%)을 10.25%까지 저하시켰다(Fig. 1-16)
- Lw(250 μg/ml)에 의해 10.25%까지 저해된 ADP유인 혈소판응집반응은 AC저해제 SQ22536에 의해 30.0%까지 증가했다(Fig. 1-16). 이것은 SQ22536이 Lw(250 μg/ml)가 저해시킨 ADP유인 혈소판응집율(10.25%)에 대해 192.7%까지 혈소판응집을 촉진시키고 있음을 의미한다.
- 따라서, Lw에 의한 혈소판응집저해는 Lw의 AC활성 촉진에 의한 cAMP의 생성에 기인한 것을 의미한다.

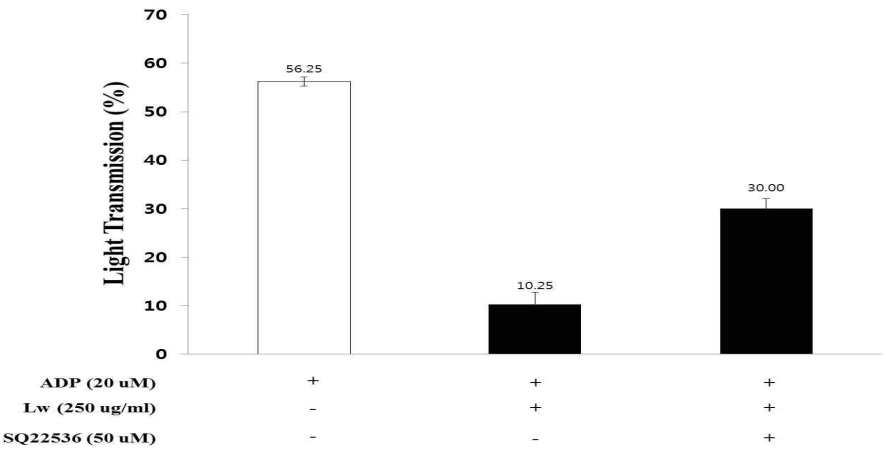


Fig. 1-16. Effects of extract Lw from fermented bran with SQ22536 on ADP-induced human platelet aggregation

(마) 미강추출물의 adenylate cyclase (AC) 저해제 SQ22536에 미치는 효과 비교(Table 1-6)

Table 1-6. AC저해제 SQ22536에 의한 ADP응집촉진증가율

미강추출물	AC저해제 SQ22536에 의한 ADP응집율 증가 (%)
RB (250 μg/ml)	80.1
Lp (750 μg/ml)	58.9
Lp+Lw (250 μg/ml)	68.0
Lw (250 μg/ml)	192.7

- 위 Table 1-6에서 볼 수 있듯이 미강추출물들에 의해 저해되었던 혈소판응집율이 AC저해제 SQ22536에 의해 유의성있게 58.9%에서 192.7%까지 증가되었으므로 미강추출물에 의한 ADP유인 혈소판응집반응의 저해 효과(Fig. 1-9A~12A)는 미강추출물이 혈소판 내부의 AC의 활성을 촉진시켜 cAMP의 생성을 증가시킨 것에 기인함을 알 수 있다.
- 미강추출물 중 Lw가 가장 강하게 AC의 활성을 촉진시킨 것(192.7%)은 ADP유인 혈소판응집을 Lw가 가장 강하게 억제시킨 것과 일치한다(Fig. 1-12A).

(5) 미강추출물이 ADP유인 혈소판응집반응에서 cAMP생성에 미치는 영향

(가) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 RB가 cAMP의 생성에 미치는 효과(Fig. 1-17)

cAMP는 전술한 바와 같이 혈소판응집억제분자로서 어떤 물질이 혈소판내부의 cAMP 생성을 촉진시킨다면 그 물질은 항혈소판작용을 가짐으로써 혈전증치료에 이용되므로 cAMP의 생성량은 혈소판응집억제능의 평가지표가 된다. Fig. 1-13~16에서 보았듯이 미강추출물은 AC의 활성을 강하게 촉진시키기 때문에 미강추출물은 AC의 활성촉진을 거쳐(Fig. 1-13~16) cAMP의 생성을 증가시킬 수 있다. 그래서, cAMP의 생성에 미치는 미강추출물의 효과를 조사했다.

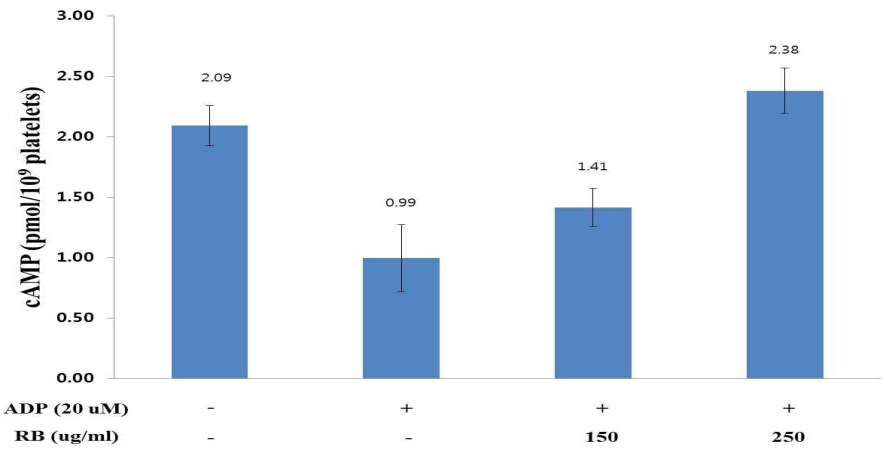


Fig. 1-17. Effects of extract RB from fermented bran on cAMP production in ADP-induced human platelet aggregation

• Fig. 17에서 볼 수 있듯이 ADP(20 μM)은 intact platelets 즉 control의 cAMP(2.09±0.17 pmol/10^9 platelets)를 유의성있게 0.99±0.28 pmol/10^9 platelets까지 저하시켰다. 이것은 ADP가 AC의 활성을 억제시킴으로써 ATP로부터 cAMP의 생성을 억제시킨 것을 의미한다.

• 그러나, 미강추출물 RB(150, 250 μg/ml)은 ADP(20 μM)에 의해 생성이 저하된 cAMP의 생성을 강력히 증가시키고 있다(Fig. 1-17). 특히 미강추출물 RB 250 μg/ml은 ADP유인 혈소판응집반응에서 0.99±0.28 pmol/10^9 platelets로부터 2.38±0.19 pmol/10^9 platelets까지 cAMP 생성을 증가시켰다(Fig. 1-17). 이것은 미강추출물 RB는 혈소판에서 AC의 활성을 증가시킴으로써 cAMP의 생성을 촉진시킨 것을 의미한다. 이것은 또한 미강추출물 RB가 ADP에 의한 혈소판응집을 강하게 억제시킨 것과 깊은 연관이 있다(Fig. 1-9A).

(나) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 Lp가 cAMP의 생성에 미치는 효과(Fig. 18)

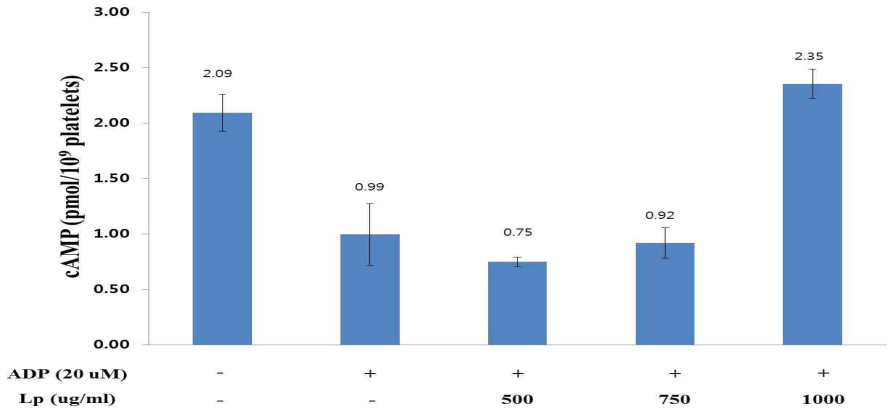


Fig. 1-18. Effects of extract Lp from fermented bran on cAMP production in ADP-induced human platelet aggregation

• Fig. 1-18에서 보면, Lp은 비교적 높은 농도(500, 750 μg/ml)의 Lp에 의해서도 ADP에 의해 저하된 cAMP의 농도(0.99±0.28 pmol/10^9 platelets)에 비해 증가되지 않았다. 아주 높은 농도(1000 μg/ml)의 Lp에 의해서만 cAMP가 2.35±0.13 pmol/10^9 platelets까지 증가되었다(Fig. 1-18). Lp(750 μg/ml)에 의해 ADP유인 혈소판응집이 억제되고(Fig. 1-10A), Lp 750 μg/ml에 의해서 AC의 활성이 증가하는 것으로 관찰되었음에도 불구하고(Fig. 1-14), Lp 750 μg/ml에 의해서 cAMP의 생성이 증가하지 않고 이것보다 높은 농도인 1000 μg/ml의 Lp에 의해서 cAMP의 생성이 증가한 것은 cAMP의 생성을 높이기 위해서는 아주 높은 농도의 Lp가 필요하다는 것을 의미한다.

(다) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 Lp+Lw가 cAMP 생성에 미치는 효과(Fig. 1-19)

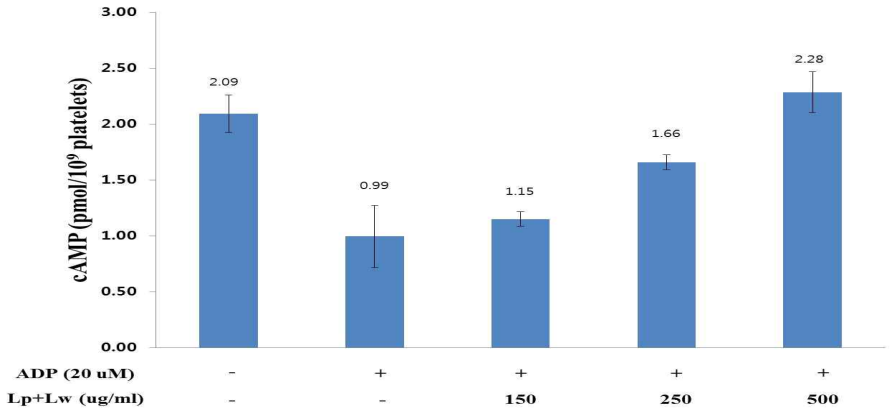


Fig. 1-19. Effects of extract Lp+Lw from fermented bran on cAMP production in ADP-induced human platelet aggregation

• 미강추출물 Lp+Lw(150~500 μg/ml)은 ADP(20 μM)에 의해 생성이 저하된 cAMP의 생성을 강력히 농도의존적으로 증가시키고 있다(Fig. 1-19). 특히 미강추출물 Lp+Lw 250 μg/ml은 ADP유인 혈소판응집반응에서 cAMP생성을 0.99±0.28 pmol/10^9 platelets에서 1.66±0.07 pmol/10^9 platelets까지 증가시켰다(Fig. 1-19). 이것은 미강추출물 Lp+Lw는 혈소판에서 AC의 활성을 증가시킴으로써 cAMP의 생성을 촉진시킨 것을 의미한다. 또한 이것은 미강추출물 Lp+Lw가 ADP에 의한 혈소판응집을 강하게 억제시킨 것과 깊은 연관이 있다(Fig. 1-11A).

(라) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 Lw가 cAMP 생성에 미치는 효과(Fig. 1-20)

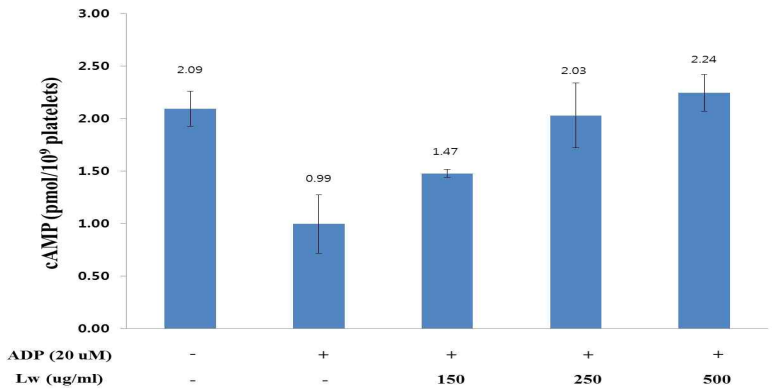


Fig. 1-20. Effects of extract Lw from fermented bran on cAMP production in ADP-induced human platelet aggregation

• Fig. 1-20에서 볼 수 있듯이 미강추출물 Lw(150~500 μg/ml)은 ADP(20 μM)에 의해 생성이 저하된 cAMP의 생성을 강력히 증가시키고 있다(Fig. 1-20). 특히 미강추출물 Lw 250 μg/ml은 ADP유인 혈소판응집반응에서 cAMP의 생성을 0.99±0.28 pmol/10^9 platelets로부터 2.03±0.31 pmol/10^9 platelets까지 증가시켰다(Fig. 1-20). 이것은 미강추출물 Lw는

혈소판에서 AC의 활성을 증가시킴으로써 cAMP의 생성을 촉진시킨 것을 의미한다. 이것은 또한 미강추출물 Lw가 ADP에 의한 혈소판응집을 강하게 억제시킨 것과 깊은 연관이 있다(Fig. 1-12A).

(마) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물의 cAMP 생성에 미치는 효과 비교(Table 1-7)

Table 1-7. ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물의 cAMP 생성에 미치는 효과 비교

미강추출물	대조군(ADP)에 대한 cAMP 증가 (%)	AC의 활성
RB (250 μg/ml)	140	80.1
Lp+Lw (250 μg/ml)	67.7	68.0
Lw (250 μg/ml)	105.1	192.7

- 위 Table 1-7에서 볼 수 있듯이, cAMP의 생성은 RB, Lp+Lw 및 Lw에 의해서 증가되었다.
- Lw는 AC의 활성이 RB보다 높음에도 불구하고 cAMP의 생성은 약간 낮은 수준으로 cAMP의 생성을 증가시켰다.

(6) ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물이 cyclic AMP dependent protein kinase (A-kinase) 활성에 미치는 효과(Fig. 1-21)

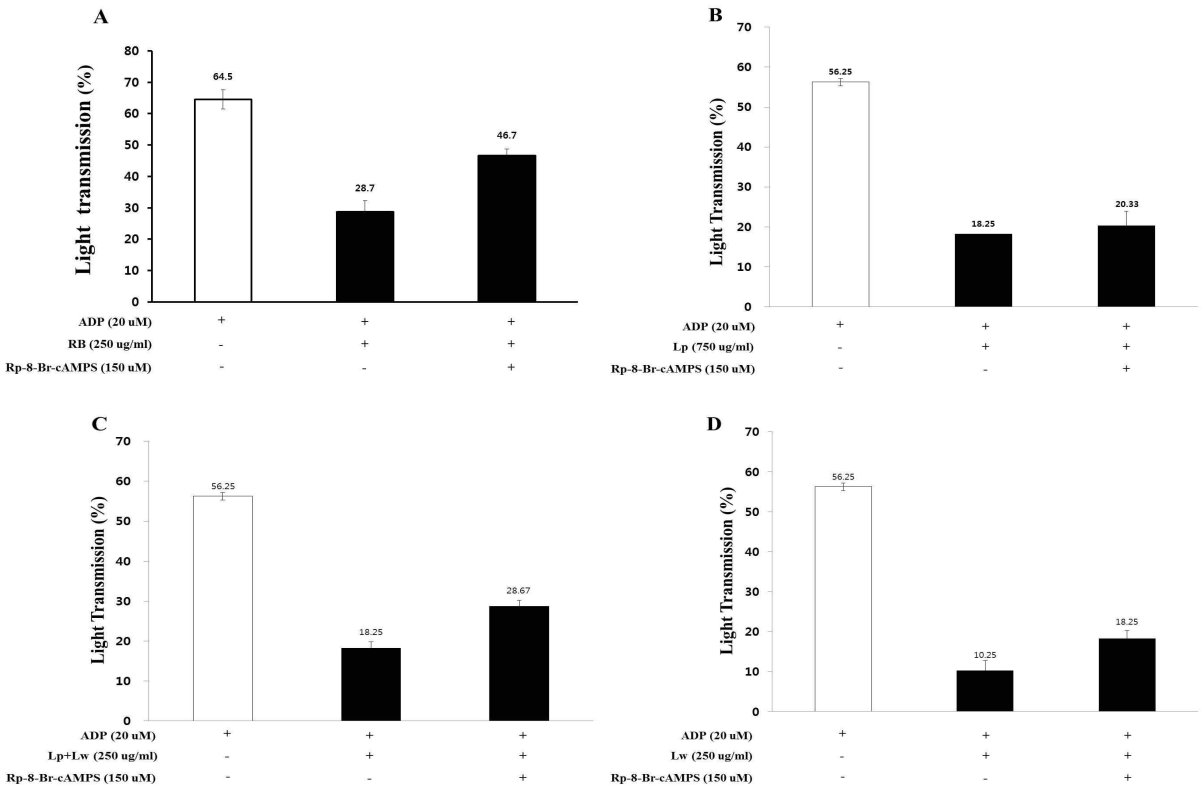


Fig. 1-21. Effects of extract Lw from fermented bran with A-kinase inhibitor Rp-8-Br-cAMPS on ADP-induced human platelet aggregation A; RB B; Lp C; Lp+Lw D; Lw

- 전술한 바와 같이 미강추출물은 [AC 활성화 → cAMP의 생성증가]라는 경로를 통해 혈소판의 응집억제에 관여하고 있었다.
- 혈소판에서 생성된 cAMP는 [A-kinase의 활성화 → VASP 또는 IP_3 receptor 인산화 → Ca^{2+}의 동원억제]경로를 통해서 혈소판응집억제에 관여하고 있다.
- 미강추출물은 cAMP의 생성을 증가시켰으므로(Fig. 1-17~20), 미강추출물은 ADP유인 혈소판응집을 억제하기 위해(Fig. 1-9~12) [AC활성화 → cAMP 생성증가 → A-kinase 활성화 → VASP 또는 IP_3 receptor 인산화 → Ca^{2+} 동원억제]의 경로에 관여할 것으로 생각된다. 따라서, 우선 cAMP 증가에 의한 A-kinase의 활성화에 미치는 미강추출물의 효과를 조사하기 위해 A-kinase의 저해제 Rp-8-Br-cAMPS를 이용하였다.
- Fig. 1-21A~D에서 볼 수 있듯이 미강추출물 RB(250 μg/ml), Lp(750 μg/ml), Lp+Lw(250 μg/ml) 및 Lw(250 μg/ml)은 ADP(20 μM)이 유인하는 혈소판응집율(64.5±3.0%)을 RB(250 μg/ml)은 28.7±1.5%(Fig. 1-21A), Lp(750 μg/ml)은 56.25±0.96%에서 18.25±2.50%(Fig. 1-21B), Lp+Lw(250 μg/ml)은 56.25±0.96%에서 18.25±2.63%(Fig. 1-21C), Lw(250 μg/ml)은 56.25±0.96%에서 10.25±0.96%까지(Fig. 1-21D) 저하시켰다.
- 그러나, A-kinase 저해제 Rp-8-Br-cAMPS (150 μM)은 ADP유인 혈소판응집반응에서 미강추출물 RB, Lp, Lp+Lw 및 Lw가 저해시키는 혈소판응집을 증가시켰다(Fig. 1-21A~D). 이것은 A-kinase 저해제 Rp-8-Br-cAMPS가 cAMP의 기능을 억제시킨 결과로서 미강추출물은 [cAMP → A-kinase]경로를 거쳐 ADP유인 혈소판응집의 억제에 관여함을 의미한다.

(7) ADP유인 혈소판응집반응에서 VASP의 인산화에 미치는 미강추출물의 효과(Fig. 1-22A~D)

- cAMP/A-kinase는 VASP의 Ser^{157}에 phosphate를 결합시켜 VASP-Ser^{157}로 인산화시켜, 혈액 중의 fibrinogen이 혈소판막의 표면에 있는 integrin α IIb/β_3에 결합되는 것을 억제시킴으로써 혈소판의 완전한 응집을 억제시킬 뿐만 아니라 혈소판응집에 필요한 Ca^{2+}의 동원을 억제시킨다.
- 미강추출물 RB(Fig. 1-22A lane3, 4), Lp(Fig. 1-22B lane3, 4), Lp+Lw(Fig. 1-22C lane3, 4) 및 Lw(Fig. 1-22D lane3, 4)는 각각 ADP유인 혈소판응집반응에서 VASP(Ser^{157})의 인산화를 촉진시키고 있다. 이것은 미강추출물이 cAMP 생성증가/A-kinase 활성화 촉진을 통해 VASP(Ser^{157})을 강하게 인산화시킴을 의미한다.

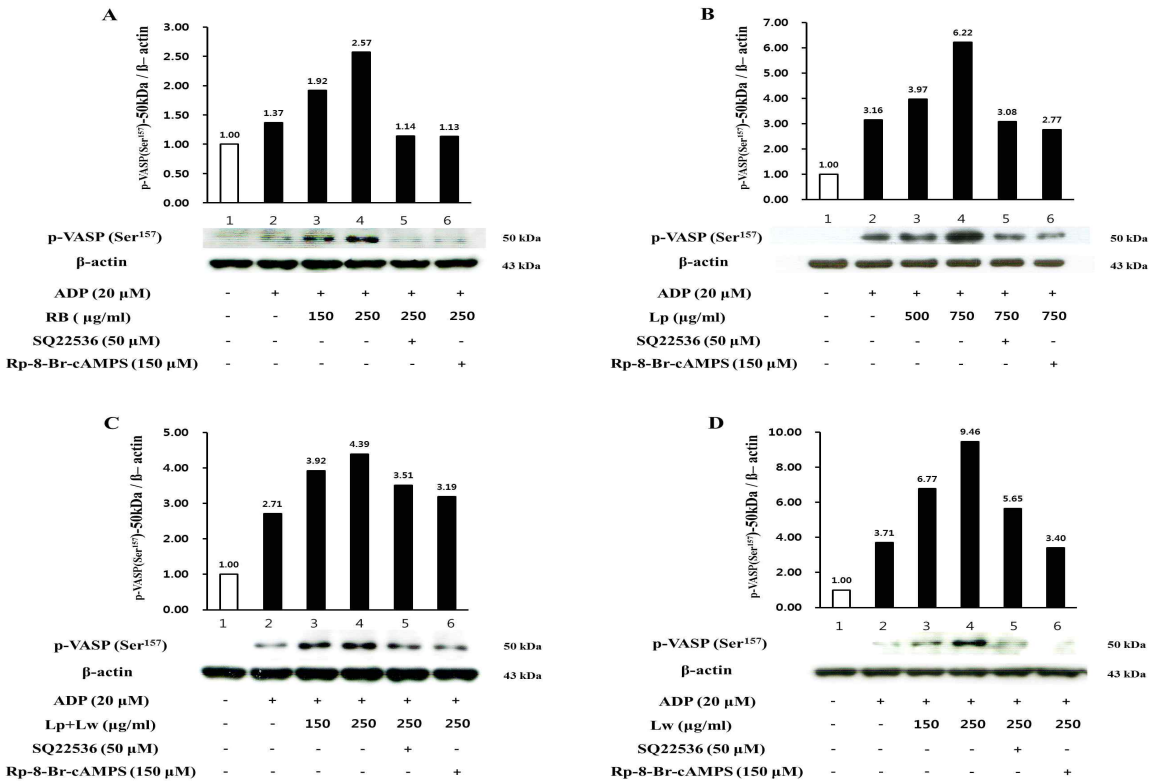


Fig. 1-22. Effects of extract from fermented bran on VASP phosphorylation in ADP-induced human platelet aggregation

A; Effect of RB on VASP phosphorylation B; Effect of Lp on VASP phosphorylation C; Effect of Lp+Lw on VASP phosphorylation D; Effect of Lw on VASP phosphorylation

- 반대로 미강추출물 RB, Lp, Lp+Lw 및 Lw에 의해 인산화된 VASP(Ser^{157})은 AC저해제 SQ22536에 의해 아주 완전히 억제되었다(Fig. 1-22A, lane 5; Fig. 1-22B, lane 5; Fig. 1-22C, lane 5; Fig. 1-22D, lane 5). 이것은 SQ22536이 AC의 활성을 억제시킴으로써 cAMP의 생성을 억제시킨 결과임을 의미하므로, RB, Lp, Lp+Lw 및 Lw는 혈소판응집반응을 억제시키기 위해 AC의 활성촉진(Fig. 1-13~16)과 cAMP의 생성촉진(Fig. 1-17~20)을 거쳐 VASP(Ser^{157})을 인산화시켰음을 의미한다. 그렇지 않으면 미강추출물에 의해 인산화된 VASP(Ser^{157})은 AC저해제 SQ22536에 의해 억제되지 않을 것이다.
- 또한 미강추출물 RB, Lp, Lp+Lw 및 Lw에 의해 인산화된 VASP(Ser^{157})은 A-kinase 저해제인 Rp-8-Br-cAMPS에 의해 완전히 억제되었다(Fig. 1-22A, lane 6; Fig. 1-22B, lane 6; Fig. 1-22C, lane 6; Fig. 1-22D, lane 6). 이것은 Rp-8-Br-cAMPS가 A-kinase의 활성을 억제시킨 결과임을 의미하므로, RB, Lp, Lp+Lw 및 Lw는 ADP유인 혈소판응집을 억제시키기 위해 cAMP/A-kinase의 경로를 거쳐 VASP(Ser^{157})를 인산화시켰음을 의미한다. 그렇지 않으면 미강추출물에 의해 인산화된 VASP(Ser^{157})은 A-kinase 저해제 Rp-8-Br-cAMPS에 의해 억제되지 않을 것이다.

2. ADP 수용체 P_2Y_1 매개 TXA_2생성 관련 효소의 활성억제 특이성 규명

가. 요약

(1) 혈소판응집반응은 혈전형성에 깊게 관여하는 병리현상으로서, 혈전증의 치료를 목적으로 하는 약물은 혈소판응집반응의 억제를 표적으로 한다.

(2) 본 연구에서는 혈소판응집반응의 신호전달분자 중에 혈소판응집촉진분자 thromboxane A_2 (TXA_2)의 생성에 관여하는 cyclooxygenase-1 (COX-1)과 thromboxane A_2 synthase (TXAS) activity 등에 미치는 미강추출물의 효과를 조사하여 미강추출물의 항혈소판작용을 평가했다.

(3) 미강추출물은 ADP가 유인하는 혈소판응집반응에서 생성된 TXA_2를 강하게 억제시켰다 (Fig. 2-1).

(4) 미강추출물은 [COX-1 activity 억제 → TXA_2 생성 억제]라는 혈소판응집억제 pathway를 통해 ADP유인 혈소판응집억제반응에 관여했다.

(5) 따라서, 이상의 결과들로부터 생각하면 미강추출물은 혈소판응집이 매개하는 혈전증의 치료 또는 예방적인 측면에서 응용가능하리라 생각된다.

나. 이론적 배경

혈소판 응집은 혈관 벽이 손상되었을 때, 지혈을 위해 혈병(hemostatic plug)을 생성하는 데 필수적인 반응이지만, 혈전증, 관상동맥질환, 심근경색 등의 병리현상을 야기한다. 따라서, 혈소판 응집반응의 억제는 각종 심혈관계 질환의 예방 및 치료 물질 탐색과 평가에 있어서 중요한 요소이다. 혈소판 응집반응을 야기할 수 있는 물질로 collagen, thrombin, ADP 등이 있으며, 이들 혈소판응집유도물질은 공통적으로 혈소판막에 있는 각각의 수용체에 결합하여 Ca^{2+}외존성 phospholipase C 활성화 → 혈소판막인지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 분해 → inositol 1,4,5-trisphosphate와 diacylglycerol 생성 → 혈소판응집관여물질 생성 및 동원(Ca^{2+}과 thromboxane A_2)과 과립물질(ADP, ATP, serotonin 등)의 분비의 과정을 거쳐 혈소판을 응집시켜 혈전증을 일으킨다. 본 연구에서는 혈소판응집촉진분자인 TXA_2의 생성과 그 생성에 관여하는 효소 (COX-1, TXAS)의 활성에 미치는 미강추출물의 효과를 조사하여 미강추출물의 항혈소판작용을 평가했다.

다. 실험방법

(1) Preparation of human platelets

대한적십자사 경남혈액원으로부터 구입한 platelet rich plasma(혈소판풍부혈장, PRP)를 1650 ×g에서 10분간 원심분리하여 하층의 platelet pellets을 얻고, 혈장에 부유시켜 5×10^8 platelets/ml 농도의 platelet suspension을 준비한다. 본 실험은 한국 보건복지부지정 공용기관생명윤리위원회의 승인(PIRB12-071)을 받았다.

(2) Preparation of washed rat platelets

미강추출물을 복강으로 투여했던 Rat의 복대정맥에서 3.8% sodium citrate를 이용하여 항응

고처리하여 blood를 채혈한 후, blood를 250×g에서 10분간 원심하여 상층의 PRP를 분리하고, 이 PRP를 1650 ×g에서 10분간 원심분리하여 하층의 platelet pellets을 얻고, washing buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 0.36mM NaH_2PO_4, 5.5mM glucose, 1mM EDTA, pH 6.9)로 platelet pellets을 washing한 후, suspension buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 0.36mM NaH_2PO_4, 0.49mM $MgCl_2$, 5.5mM glucose, 0.25% gelatin, pH 7.4)에 부유하여 5×10^8 platelets/ml 농도의 platelet suspension을 준비한다.

(3) Measurement of platelet aggregation

Human 혈소판 (10^8/ml)을 미강으로부터 제조한 추출물(Lw)을 첨가하거나 첨가하지 않은 상태로 37℃에서 3분간 preincubation 시킨 후, 응집유도물질로 자극하여 5분간 응집율을 측정한다. 응집 유도물질의 자극에 의해 혈소판응집이 일어나면 aggregometer (Chrono-Log, Corp., Havertown, PA)에서 측정되는 빛의 투과도(suspension buffer를 blank로 함)가 증가하게 되고, 이 투과도를 혈소판 응집율로 평가한다. 마찬가지로 rat 혈소판 (10^8/ml)을 37℃에서 3분간 preincubation 시킨 후, 응집유도물질로 자극하여 5분간 응집율을 측정한다.

(4) Measurement of TXA_2

Thromboxane A_2 (TXA_2)는 불안정하여 안정한 대사체인 thromboxane B_2 (TXB_2)로 분해되기 쉽다. 따라서 TXB_2를 측정하여 TXA_2의 농도로 평가하였다. 미강으로부터 제조한 추출물(Lw)을 농도별로 첨가하거나 첨가하지 않은 human 혈소판(10^8/ml)을 37℃에서 3분간 preincubation한 후, ADP (20 μM)으로 자극하여 5분간 반응시켰다. 반응을 정지시킨 후, TXB_2 EIA kit (Cayman Chemical)를 이용하여 TXB_2의 농도를 측정하였다.

(5) Isolation of cytosol and microsomes

TXA_2의 생성에 관여하는 효소 cyclooxygenase-1 (COX-1)과 TXA_2 synthase (TXAS)의 source를 제조하기 위해 Lee의 방법[Lee et al. (2012) J. Ginseng Res. 36, 40-46]을 이용하여 원심분리기(ultra-high speed centrifuge)로 cytosol 및 microsome을 분리했다.

(6) Cytochrome c reductase assay

COX-1과 TXAS는 혈소판의 microsome에 존재하기 때문에 microsome이 정확히 분리되었는지 확인하기 위해 Lee의 방법[Lee et al. (2012) J. Ginseng Res. 36, 40-46]을 이용하여 microsome의 marker enzyme인 cytochrome c reductase의 활성을 측정했다.

(7) Expression of COX-1 and TXAS

혈소판으로부터 분리한, cytosol 또는 microsome의 어느 세포분획에 COX-1과 TXAS 단백질이 발현되는지를 조사하기 위해 Lee의 방법[Lee et al. (2012) J. Ginseng Res. 36, 40-46]을 이용하였다.

(8) COX-1 and TXAS activity assay

혈소판으로부터 분리한 microsome을 가지고 Lee의 방법[Lee et al. (2012) J. Ginseng Res.

36, 40-46]에 따라 COX-1 및 TXAS의 활성을 측정했다.

(9) PT (prothrombin time) 및 APTT (activated partial thromboplastin time) 측정

PRP를 3000 rpm 10분간 원심하여 platelet poor plasma (PPP)를 분리해낸다. 이 PPP를 sample로 하여 혈액응고의 지표가 되는 PT와 APTT를 측정하였다. 측정은 PT 및 APTT 측정시약에 명시된 방법으로 이루어졌으며, 결과는 초 단위 (sec)로 나타낸다.

라. 연구결과

(1) 미강추출물 Lw가 ADP유인 사람혈소판응집반응에서 TXA_2생성에 미치는 억제효과 (Fig. 2-1)

- 혈소판을 ADP (20 μM)로 응집시켰을 때 TXA_2의 양은 23.95±3.40 ng/10^8 platelets로서 대조군(base)의 그것(4.23±0.20 ng/10^8 platelets)보다 약 5.7배 증가되었다.
- 그러나 Lw는 ADP가 증가시킨 TXA_2의 양을 농도의존적으로 억제시켰고, Lw 50 μg/ml은 base 수준의 양 (4.60±1.18 ng/10^8 platelets)까지 억제시켰다(Fig. 1-1).
- 이 결과는 Lw가 ADP유인 혈소판응집을 억제시킨 것(1차년도 연구결과)을 반영한다. 또한, Lw는 혈소판응집촉진물질인 TXA_2의 생성을 억제시키기 위해 TXA_2의 생성에 관여하는 효소 cyclooxygenase-1 (COX-1) 또는 TXA_2 synthase (TXAS)의 활성의 억제에 관여했을 것으로 생각된다.
- 그래서, COX-1 및 TXAS를 측정하기 위해 COX-1 및 TXAS가 존재하는 microsome을 분리하고, microsome이 정확히 분리되었는지 확인하기 위해 microsome의 marker enzyme (표지효소)인 cytochrome c reductase의 활성을 측정하고, COX-1 및 TXAS의 단백질발현을 조사했다.

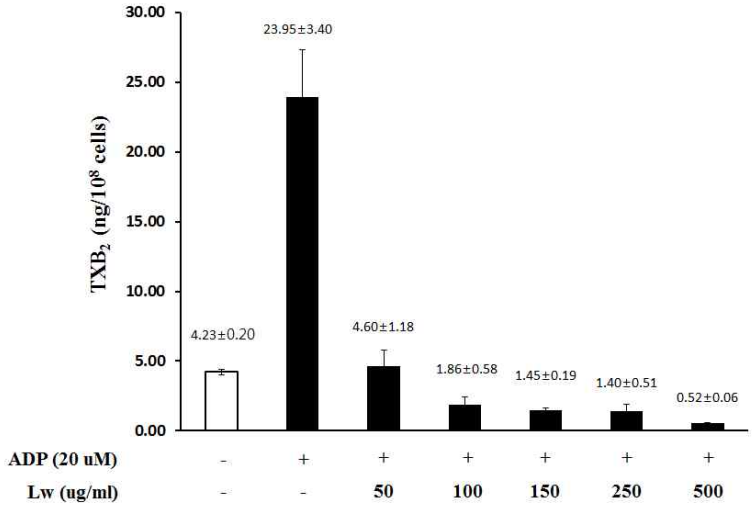


Fig. 2-1. Effects of extract Lw from fermented bran on TXA_2 production in ADP-induced human platelet aggregation.

(2) COX-1과 TXAS 활성측정용 효소급원 결정 (Fig. 2-2A, B)

• Fig. 2-2A는 microsome의 표지효소인 cytochrome c reductase의 활성을 나타낸 것이다. Fig. 2-2A에서 볼 수 있듯이, 혈소판의 homogenates, microsomal fraction 및 cytosolic fraction에는 cytochrome c reductae의 활성이 나타났다.

• 이들 중 microsomal fraction에 있는 cytochrome c reductase의 활성이 8.67±0.12 mU/ml로서 homogenates와 cytosolic fraction에서보다 강하게 높았다.

• 이것은 COX-1 또는 TXAS의 효소급원으로서 microsome이 분리되었다는 것을 의미한다.

• 다음으로 COX-1과 TXAS 단백질의 발현을 Western blot으로 조사했다. Fig. 2-2B에서 제시했듯이, 혈소판의 homogenates나 cytosolic fraction에서보다 microsomal fraction에서 COX-1 (70 kDa) 및 TXAS (58 kDa)가 가장 강하게 발현되었다.

• 이 결과 (Fig. 2-2B)는 microsomal fraction에서 cytochrome c reductase의 활성이 가장 높았던 결과 (Fig. 2-2A)와 일치한다.

• 따라서, cytochrome c reductase의 활성과 COX-1과 TXAS 단백질 발현이 가장 높은 microsomal fraction을 가지고 COX-1과 TXAS의 활성을 측정했다 (Fig. 2-3A, B).

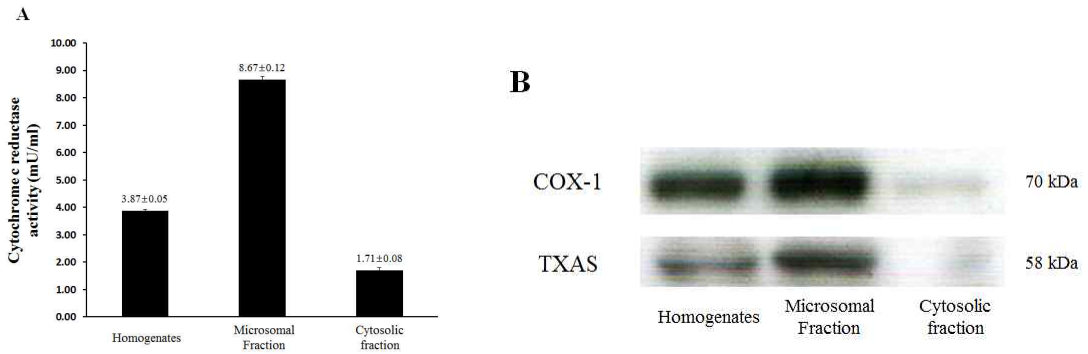


Fig. 2-2. Determination of enzyme source of COX-1 and TXAS. A; Cytochrome c reductase activity in homogenates, microsomal fraction, and cytosolic fraction B; Western blot analysis of COX-1 and TXAS in homogenates, microsomal fraction, and cytosolic fraction.

(3) Lw가 COX-1 및 TXAS activity에 미치는 효과 (Fig. 2-3A, B)

• TXA_2는 혈소판응집과정 중에 혈소판막의 인지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate로부터 생성되는 arachidonic acid (20:4)에 COX-1과 TXAS가 작용하여 생성된다.

• 따라서, 20:4를 COX-1과 TXAS의 기질로 사용하여 Lw가 COX-1과 TXAS의 활성에 미치는 효과를 조사하여, Fig. 2-1에서 제시한 Lw의 TXA_2의 생성억제효과를 평가했다.

(가) COX-1 활성에 미치는 Lw의 효과

• Lw나 COX-1 저해제 aspirin을 첨가하지 않은 microsomal fraction에 나타나는 대조군의 COX-1의 활성은 18.331±2.068 nmol/mg-protein/min이었다.

• Lw (150, 250 μg/ml)를 microsomal fraction에 첨가하였을 때 Lw의 농도가 증가함에 따

라 COX-1의 활성이 저하하는 것을 볼 수 있다 (Fig. 2-3A).

- 특히, Lw 250 ㎍/ml에 의한 COX-1의 활성은 대조군의 그것 (18.331±2.068 nmol/mg-protein/min)보다 낮은 활성 (10.476±1.546 nmol/mg-protein/min)으로 대조군보다 42.9% [(18.331-10.476)/18.331×100] 억제되었다 (Fig. 2-3A).
- 또한 COX-1 저해제 aspirin을 비교적 높은 농도 (500 ㎛M)로 microsomal fraction에 첨가하여 COX-1의 활성을 측정하였을 때, 대조군 (18.331±2.068 nmol/mg-protein/min)에 비해 억제되어 13.659±2.457 nmol/mg-protein/min이었다 (Fig. 2-3A).
- 이것은 대조군의 COX-1 활성을 25.5 % [(18.331-13.659)/18.331×100] 억제시킨 것을 의미한다.
- Aspirin (500 ㎛M)에 의한 COX-1의 억제율은 25.5%이고, Lw (250 ㎍/ml)에 의한 COX-1의 억제율은 42.9%이므로, Lw은 aspirin보다 강한 COX-1 저해작용을 가진다는 것을 의미한다 (Fig. 2-3A).

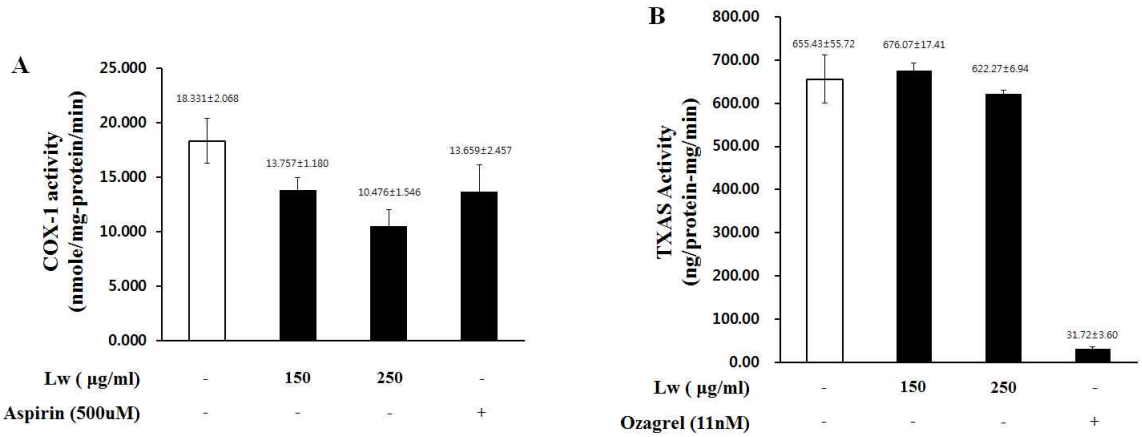


Fig. 2-3. Effects of Lw on COX-1 and TXAS activity A; Effect on COX-1 activity B; Effect on TXAS activity

(나) TXAS 활성에 미치는 Lw의 효과

- Fig. 2-3B에 제시한 듯이, Lw나 TXAS 저해제 ozagrel을 첨가하지 않은 microsomal fraction에 나타나는 대조군의 TXAS의 활성은 655.43±55.72 ng/mg-protein/min이었다.
- TXAS 저해제 ozagrel (11nM)을 microsomal fraction에 첨가하였을 때, TXAS의 활성은 31.72±3.60 ng/mg-protein/min로서 대조군의 TXAS 활성 (655.43±55.72 ng/mg-protein/min)을 강하게 감소·억제시켰다 (Fig. 2-3B).
- 그러나, Lw (150, 250 ㎍/ml)을 microsomal fraction에 첨가하였을 경우, Lw 150 ㎍/ml에 의해서는 TXAS의 활성이 676.07±17.41 ng/mg-protein/min으로서 대조군의 그것 (655.43±55.72 ng/mg-protein/min)에 비해 TXAS 활성이 억제되지 않고 약간 높은 경향을 보인다.
- 그러나, Lw 250 ㎍/ml을 microsomal fraction에 첨가하였을 경우, TXAS의 활성은 대조

군의 그것 (655.43±55.72 ng/mg-protein/min)보다 낮은 622.27±6.94 ng/mg-protein/min으로서 약 5% [(655.43-622.27)/655.43×100] 억제되었다.

- Lw 250 μg/ml에 의한 TXAS의 억제율 (5%)은 Lw 250 μg/ml에 의한 COX-1의 억제율 (42.9%)보다 약 8.6배 낮다.
- 이것은 Lw가 COX-1의 활성을 가장 강하게 억제한다는 것을 의미한다.
- 따라서, Fig. 2-1에서 제시한 Lw (250 μg/ml)에 의한 TXA2 생성저해는 Lw (250 μg/ml)에 의한 COX-1의 활성저해와 깊은 관계가 있다는 것을 의미한다.
- 이상의 결과 [Lw의 TXA_2 생성억제작용 (Fig. 2-1) 및 Lw의 COX-1 활성억제작용 (Fig. 2-3A)]과 2차년도 연구결과 [Lw의 ADP유인 혈소판응집억제작용]는 Lw가 혈소판응집반응이 매개하는 혈전증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화증을 치료하거나 예방하는 천연물소재가 될 수 있다는 것을 강하게 시사한다.

(4) 뇌기능개선실험과 혈소판응집 반응과 혈액응고 비교 평가

- 제3세부과제 “미강발효추출물의 뇌질환 예방 및 기능개선 응용을 위한 생리활성연구”와 연계한 동물실험이다.
- 미강추출물 Lw와 Lw로부터 제조한 compound-X를 복강으로 투여한 후 rat으로부터 혈액을 채취하여 혈소판응집과 혈액응고 반응을 측정하였다.

(가) 혈소판응집반응에 미치는 Lw와 compound-X 투여효과

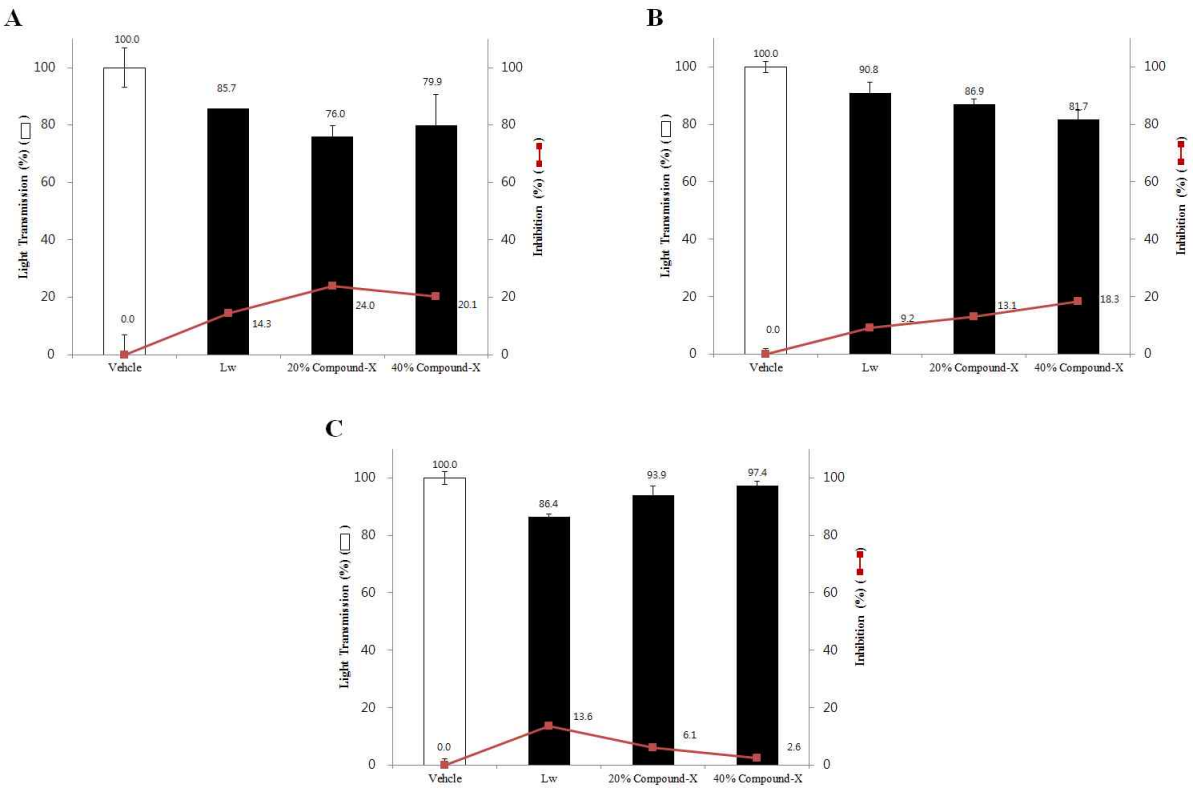


Fig. 2-4. Effects of Lw and compound-X from Lw treatment on platelet aggregation. A; Effect on ADP-induced rat platelet aggregation B; Effect on collagen-induced rat platelet aggregation C; Effect on thrombin-induced rat platelet aggregation

① ADP유인혈소판응집반응에서 Lw와 compound-X 투여효과

- Vehicle투여군(대조군)으로부터 얻은 혈소판(10^8/ml)을 20 μM의 ADP로 반응시켰을 때 일어나는 혈소판응집반응은 51.3±3.5% 일어났다 (Fig. 2-4A).
- 이것(51.3±3.5%)을 100%로 환산하였을 때, Lw투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 85.7%로서 vehicle에 비해 14.3% 억제되었다 (Fig. 2-4A).
- 20% compound-X 투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 76.0%로서 vehicle에 의한 혈소판응집반응 100%에 비해 24% 억제되었다 (Fig. 2-4A).
- 40% compound-X 투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 79.9%로서 vehicle에 의한 혈소판응집반응 100%에 비해 20.1% 억제되었다 (Fig. 2-4A).

② Collagen유인혈소판응집반응에서 Lw와 compound-X 투여효과

- Vehicle투여군(대조군)으로부터 얻은 혈소판(10^8/ml)을 10 μg/ml의 collagen으로 반응시켰을 때 일어나는 혈소판응집반응은 76.3±1.5% 일어났다 (Fig. 2-4B).
- 이것(76.3±1.5%)을 100%로 환산하였을 때, Lw투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 90.8%로서 vehicle에 비해 9.2% 억제되었다 (Fig. 2-4B).
- 20% compound-X 투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 86.9%로서 vehicle에 의한 혈소판응집반응 100%에 비해 13.1% 억제되었다 (Fig. 2-4B).
- 40% compound-X 투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 81.7%로서 vehicle에 의한 혈소판응집반응 100%에 비해 18.3% 억제되었다 (Fig. 2-4B).

③ Thrombin유인혈소판응집반응에서 Lw와 compound-X 투여효과

- Vehicle투여군(대조군)으로부터 얻은 혈소판(10^8/ml)을 0.2 U의 thrombin으로 반응시켰을 때 일어나는 혈소판응집반응은 77.0±1.7% 일어났다 (Fig. 2-4C).
- 이것(77.0±1.7%)을 100%로 환산하였을 때, Lw투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 86.4%로서 vehicle에 비해 13.6% 억제되었다 (Fig. 2-4C).
- 20% compound-X 투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 93.9%로서 vehicle에 의한 혈소판응집반응 100%에 비해 6.1% 억제되었다 (Fig. 2-4C).
- 40% compound-X 투여군에서 일어나는 혈소판응집반응은 97.4%로서 vehicle에 의한 혈소판응집반응 100%에 비해 2.6% 억제되었다 (Fig. 2-4C).

(나) 혈액응고에 미치는 Lw와 compound-X 투여효과

Table 2-1. Effects of Lw, and compound-X treatment on PT and APTT

	PT (sec)	PT prolongation rate of vehicle (%)	APTT (sec)	APTT prolongation rate of vehicle (%)
Vehicle	12.5±0.3	0	29.1±1.7	0
Lw	28.2±1.8	125.6	55.4±0.8	90.4
20% compound-X	15.8±0.6	26.4	35.8±1.0	23.0
40% compound-X	15.3±0.6	22.4	46.0±1.5	58.1

① PT의 연장에 미치는 Lw와 compound-X 투여효과

- PT (prothrombin time)은 혈장에 thromboplastin을 첨가하여 혈액응고인자 Ⅱ, Ⅶ, Ⅸ 및 Ⅹ에 의해서 fibrin clot이 형성되어 혈액이 응고될 때까지 소요시간을 의미하는 것으로서, PT의 연장(prolongation)은 fibrin clot의 형성이 즉, 혈액응고가 억제되는 것을 의미한다. 이것은 혈전형성을 억제한다는 것을 반영한다.
- Vehicle을 투여하였을 때, PT는 12.5±0.3 (sec)이었고, Lw투여에 의한 PT는 28.2±1.8 (sec), 20% compound-X 투여에 의한 PT는 15.8±0.6 (sec), 40% compound-X 투여에 의한 PT는 15.3±0.6 (sec)이었다 (Table 8).
- Lw, 20% 및 40% compound-X를 투여함에 따라, vehicle에 의한 PT가 각각 125.6%, 26.4%, 22.4% 연장되었다 (Table 2-1).
- 이것은 Lw, 20% 및 40% compound-X의 투여에 의해 조직손상때 혈액응고에 의해 일어나는 뇌혈관질환, 심혈관질환 등이 치료될 수 있다는 것을 의미한다.

② APTT의 연장에 미치는 Lw와 compound-X 투여효과

- APTT (activated partial thromboplastin time)은 혈관이 손상되었을 때 혈액응고인자 Ⅷ 및 Ⅸ 등에 의해서 fibrin clot이 형성되어 혈액이 응고될 때까지 소요되는 시간을 의미한다.
- APTT의 연장 역시 fibrin clot의 형성이 억제되는 것을 의미하는 것으로서 혈전형성이 억제되다는 것을 반영한다.
- Vehicle을 투여하였을 때, APTT는 29.1±1.7 (sec)이었고, Lw투여에 의한 APTT는 55.4±0.8 (sec), 20% compound-X 투여에 의한 APTT는 35.8±1.0 (sec), 40% compound-X 투여에 의한 APTT는 46.0±1.5 (sec)이었다 (Table 2-1).
- Lw, 20% 및 40% compound-X를 투여함에 따라, vehicle에 의한 APTT가 각각 90.4%, 23.0%, 58.1% 연장되었다 (Table 1-7).
- 이것은 Lw, 20% 및 40% compound-X의 투여에 의해 혈관손상때 혈액응고에 의해 일어나는 뇌혈관질환, 심혈관질환 등이 치료될 수 있다는 것을 의미한다.

(다) Lw, 20% 및 40% compund-X 투여에 의한 혈소판응집반응과 혈액응고반응의 억제 비교

Table 2-2. Comparison of inhibitory effects of Lw and compound-X on platelet on platelet aggregation and blood coagulation (PT, APTT)

	Inhibitory degree of platelet aggregation (%)			Inhibitory degree of blood coagulation	
	ADP	Collagen	Thrombin	PT	APTT
Lw	14.3	9.2	13.6	125.6	90.4
20% compound-X	24.0	13.1	6.1	26.4	23.0
40% compound-X	20.1	18.3	2.6	22.4	58.1

- ADP에 의한 혈소판응집반응은, collagen 및 thrombin에 의해 응집반응이 일어났을 때, 혈소판의 과립으로부터 분비되는 ADP에 의한 것으로서, ADP에 의한 혈소판응집반응을 억제하는 물질은 심혈관질환 및 뇌혈관질환치료를 위한 후보물질이 될 수 있다.
- Table 2-2에서 볼 수 있듯이 20% compund-X > 40% compound-X > Lw순으로 ADP에 의한 혈소판응집을 억제시킨다.
- 그래서, 20% compound-X가 ADP유인혈소판응집을 억제시키기 때문에 3가지 추출물 중에 가장 유력한 항혈소판물질로 생각할 수 있다.
- 그러나, 실제 손상된 혈관 또는 조직에서는 혈소판응집과 혈액응고(fibrin clot)가 상호반응으로 혈전 (fibrin clot)을 최종적으로 형성시켜 심혈관질환, 뇌혈관질환 및 동맥경화증을 일으킨다.
- 따라서, Lw 및 40% compound-X보다 20% compound-X가 ADP유인혈소판응집을 강하게 억제시켰지만 (Table 9), 혈액응고의 지표가 되는 PT와 APTT는 Lw에 의해 가장 강하게 연장되었으므로 (Table 2-1, 2-2), Lw가 가장 유력한 항혈전성 효과를 가질 수 있다고 결론 내릴 수 있다.
- 따라서, 또한 제3과제의 수행결과 “Lw의 뇌기능개선효과”와 연계하여 생각하면, Lw는 뇌질환관련질환의 치료를 위한 후보물질이 될 수 있다고 생각한다.

3. ADP 수용체 P_2Y_1을 거쳐 일어나는 Ca^{2+}-의존성 혈소판 응집 신호전달 표적분자 억제 특이성 규명

가. 요약

(1) 혈소판응집반응은 혈전형성에 깊게 관여하는 병리현상으로서, 혈전증의 치료를 목적으로 하는 약물은 혈소판응집반응의 억제를 표적으로 한다.

(2) 본 연구에서는 혈소판응집반응의 신호전달분자 중에 혈소판응집촉진분자인 Ca^{2+}의 동원과 그에 따른 Ca^{2+}-의존성 단백질[myosin light chain (MLC)]의 인산화, IP_3 receptor의 인산화, granule release(serotonin, ATP) 등에 미치는 미강발효추출물 Lw의 효과를 조사하

여 그것의 항혈소판작용을 평가했다.

(3) 미강발효추출물 Lw는 ADP가 유인하는 혈소판응집반응에서 Ca^{2+}의 동원을 억제시켰다 (Fig. 3-2).

(4) 미강발효추출물 Lw은 [IP_3 receptor 인산화 촉진(Fig. 3-3) → Ca^{2+}동원 억제(Fig. 28) → Ca^{2+}의존성 단백질 인산화 억제(Fig. 3-4, 3-5) → granule release 억제(Fig. 3-6A, B)]라는 pathway를 통해 ADP유인 혈소판응집억제반응(Fig. 3-1)에 관여했다.

(5) 따라서, 이상의 결과들로부터 생각하면 미강발효추출물 Lw은 혈소판응집이 매개하는 혈전증의 치료 또는 예방적인 측면에서 응용가능하리라 생각된다.

나. 이론적 배경

혈소판 응집은 혈관 벽이 손상되었을 때, 지혈을 위해 혈병(hemostatic plug)을 형성하는 한편 혈전증, 관상동맥질환, 심근경색 등의 병리현상을 일으킨다. 따라서, 혈소판 응집반응의 억제는 각종 심혈관계 질환의 예방 및 치료 물질 탐색과 평가에 있어서 중요한 요소이다. 혈소판 응집반응을 야기할 수 있는 물질로 collagen, thrombin, ADP 등이 있으며, 이들 혈소판응집유도물질은 공통적으로 혈소판막에 있는 각각의 수용체에 결합하여 Ca^{2+}외존성 phospholipase C 활성화 → 혈소판막인지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 분해 → inositol 1,4,5-trisphosphate와 diacylglycerol 생성 → 혈소판응집관여물질 생성 및 동원(Ca^{2+}과 thromboxane A_2)과 과립물질(ADP, ATP, serotonin 등)의 분비과정을 거쳐 혈소판을 강하게 응집시켜 혈전증을 일으킨다. 본 연구에서는 혈소판응집촉진분자인 Ca^{2+}의 동원과 Ca^{2+}의존성 인자들의 변화에 미치는 미강발효추출물 Lw의 효과를 조사하여 그것의 항혈소판작용을 평가했다.

다. 실험방법

(1) Preparation of human platelets

대한적십자사 경남혈액원으로부터 구입한 platelet rich plasma(혈소판풍부혈장, PRP)를 1650 ×g에서 10분간 원심분리하여 하층의 platelet pellets을 얻고, 혈장에 부유시켜 5×10^8 platelets/ml 농도의 platelet suspension을 준비했다. 본 실험은 한국 보건복지부지정 공용기관생명윤리위원회의 승인(PIRB12-071)을 받았다.

(2) Measurement of platelet aggregation

Human 혈소판 (10^8/ml)을 미강으로부터 제조한 추출물(Lw)을 첨가하거나 첨가하지 않은 상태로 37℃에서 3분간 preincubation 시킨 후, ADP (20 μM)을 첨가하여 5분간 혈소판응집반응을 시켜 aggregometer (Chrono-Log, Corp., Havertown, PA)에서 측정되는 빛의 투과도(혈장을 blank로 함) 증가 유무를 혈소판 응집율로 평가한다. 혈소판이 응집되면 투과도는 증가하고, 억제되면 투과도가 감소한다.

(3) Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ mobilization

세포내부의 Ca^{2+} probe인 fura-2/AM을 preloading시켜 얻은 세척혈소판부유액에 Lw를 함유시키거나 함유시키지 않은 상태에서 ADP (20 μM)을 첨가하여 5분간 반응시킨다. 이때 Ca^{2+}

저장체(dense tubular system)로부터 세포질로 동원되는 Ca^{2+}와 fura-2의 결합복합체로부터 나오는 형광강도를 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 측정했다. 형광강도가 증가하면 Ca^{2+}이 동원이 되는 것을, 감소하면 Ca^{2+}의 동원이 억제된 것을 의미한다.

(4) Western blot for analysis of IP_3 receptor (IP_3R), myosin light chain (MLC) phosphorylation

Lw를 첨가하거나 첨가하지 않은 human platelet (10^8/ml)을 37℃에서 3분간 preincubation한 후, ADP (20 μM)로 자극하여 5분간 반응시켰다. 이 반응을 lysis buffer(pH 7.5)로 정지/용해시킨 후 SDS-PAGE로 단백질을 분리하고, IP_3R, MLC에 phospho-antibody를 결합시켜 immunoblotting으로 phosphorylation(인산화)를 관찰·측정하였다. Phospho-antibody의 결합은 인산화에 비례한다.

(5) Protein kinase C (PKC) activity assay

혈소판응집반응 중 PKC는 pleckstrin을 인산화시킴으로써 분비반응 등에 관여하는데 이를 PKC activity EIA kit를 이용하여 측정했다. PKC의 활성으로 pleckstrin의 인산화 정도를 평가했다.

(6) Measurement of ATP and serotonin release

혈소판응집반응 중에 MLC 및 pleckstrin이 인산화되면 혈소판의 응집을 촉진시키는 ATP와 serotonin 등이 혈소판내부의 농과립(dense body)로부터 분비된다. 이들의 분비량을 각각의 assay kit로 측정하여 Lw의 항혈소판작용을 평가했다.

(7) Rat blood chemical assay (rat 혈액 내 성분 분석)

1주일간 Lw를 제3세부과제의 유효농도(123mg/kg-body weight)를 기준으로 하여 Lw의 투여량을 결정하여 농도별(saline, 62.5mg/kg, 123mg/kg, 246mg/kg)로 복강 투여한 후, 실험 마지막 날에 zoletil로 마취하여 개복한 후 복대정맥을 통해 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 각종 화학성분을 측정하는데 사용했다. 본 동물실험은 인제대학교 동물실험윤리위원회의 승인(2014-55호)을 받았다.

라. 연구결과

(1) 미강발효추출물 Lw가 ADP유인 사람혈소판응집반응에 미치는 효과 (Fig. 3-1)

ADP (20 μM)은 사람혈소판응집반응을 56.25±0.96%까지 증가시켰지만, Lw는 그 농도(10, 50, 100, 150, 250, 500 ug/ml)의존적으로 ADP가 유인한 사람혈소판응집반응을 억제시켰다 (Fig. 3-1).

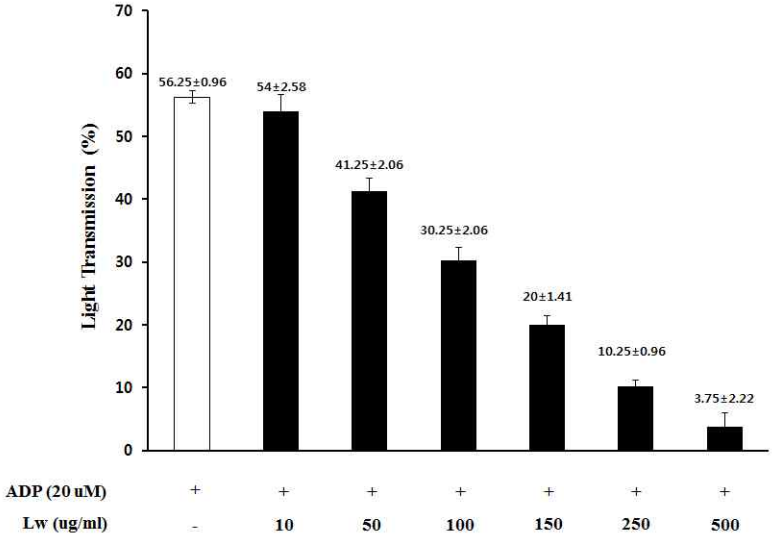


Fig. 3-1. Effects of Lw on ADP-induced human platelet aggregation

(2) 미강발효추출물 Lw가 ADP유인 $[Ca^{2+}]_i$ mobilization 및 IP_3 receptor 인산화에 미치는 억제 효과 (Fig. 3-2, 3-3)

(가) ADP유인 $[Ca^{2+}]_i$ mobilization에 미치는 Lw의 효과 (Fig. 3-2)

$[Ca^{2+}]_i$의 증가는 혈소판의 응집반응을 촉진시키므로 ADP가 응집반으을 일으키기 위해 혈소판의 내부에 동원되는 $[Ca^{2+}]_i$의 변화에 미치는 Lw의 효과를 조사했다. 그 결과, ADP (20 μM)은 basal 농도 (약 121 nM)로부터 $[Ca^{2+}]_i$를 약 289 nM까지 강하게 증가시켰지만, Lw는 농도의존적으로 ADP가 증가시킨 $[Ca_{2+}]_i$를 억제시켰다. 이것은 Lw가 ADP유인 혈소판응집반응을 강하게 억제시킨 것(Fig. 27)과 깊은 상관관계가 있음을 의미한다.

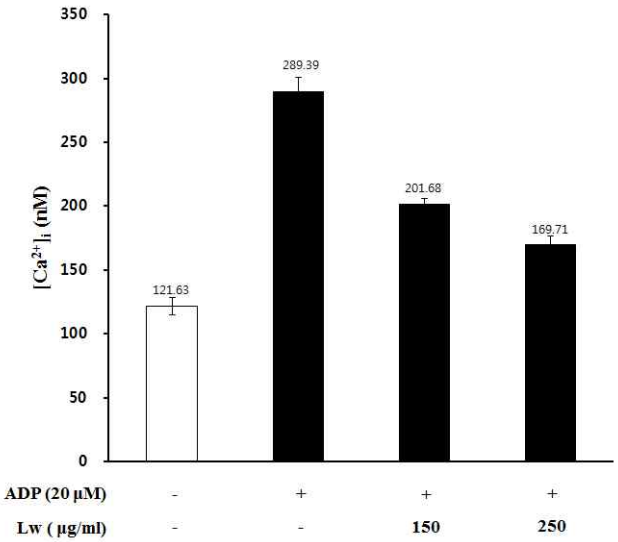


Fig. 3-2. Inhibitory effects of Lw on ADP-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization

(나) IP_3 receptor 인산화에 미치는 Lw의 효과

• ADP에 의해 증가하는 $[Ca^{2+}]_i$은 IP_3R의 인산화[p-IP_3R]에 의해 억제된다. 따라서 Lw에

의한 $[Ca^{2+}]_i$ 동원의 억제(Fig. 28)가 p-IP_3R의 촉진에 의한 것인지 조사했다(Fig. 3-3).

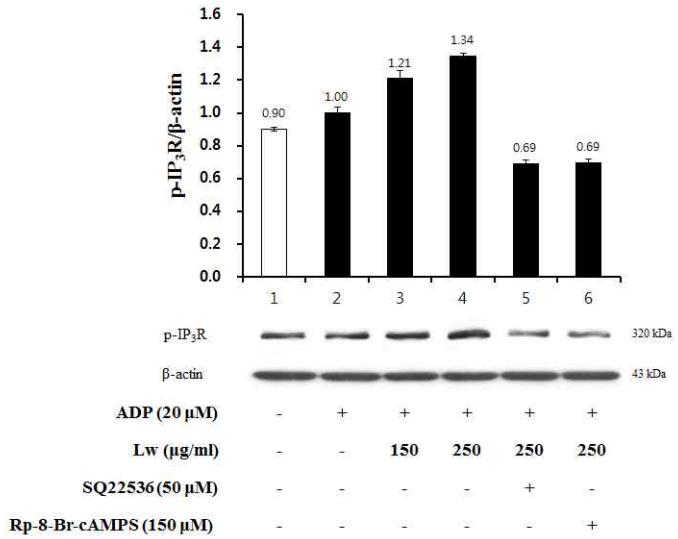


Fig. 3-3. Effect of Lw on inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R) phosphorylation on ADP-induced human platelet aggregation.

- Fig. 3-3에서 보면, Lw는 농도 (150, 250 μg/ml)의존적으로 ADP유인 혈소판응집반응에서 IP_3R을 인산화시켰다.
- 이것은 Lw가 IP_3R을 인산화시킴으로써 ADP가 동원시키는 $[Ca^{2+}]_i$을 억제한다는 것(Fig. 3-2)을 의미한다.
- IP_3R은 cAMP/cAMP-dependent protein kinase(A-kinase)에 의해 인산화되므로 cAMP의 생성을 억제시키거나 A-kinase의 활성을 억제시키면 IP_3R의 인산화는 억제된다. 따라서 ATP로부터 cAMP의 생성을 촉진시키는 adenylate cyclase의 저해제인 SQ22536과 A-kinase저해제인 Rp-8-Br-cAMPS를 이용하여 Lw가 인산화시킨 IP_3R에 미치는 영향을 조사했다.
- Adenylate cyclase 저해제 SQ22536과 A-kinase 저해제 Rp-8-Br-cAMPS는 Lw가 증가시킨 IP_3R의 인산화를 감소시켰다. 이것은 Lw가 cAMP/A-kinase pathway를 거쳐 IP3R을 인산화시킴으로써 $[Ca^{2+}]_i$ 동원의 억제(Fig. 3-2)와 ADP유인 혈소판응집반응의 억제(Fig. 3-1)에 관여했음을 의미한다.

(3) 미강발효추출물 Lw가 Ca^{2+}의존성 단백질 (MLC, pleckstrin) 인산화 에 미치는 억제효과 (Fig. 3-4, 3-5)

(가) Myosin light chain (MLC) 인산화에 미치는 Lw의 효과 (Fig. 3-4)

- ADP에 의해 증가하는 $[Ca^{2+}]_i$은 Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase를 활성화시켜 myosin light chain (MLC)를 인산화시킴으로써 혈소판의 형태변화와 혈소판을 강하게 응집시키는 ATP 및 serotonin 등의 분비에 관여한다..

• $[Ca^{2+}]_i$ 동원을 억제시킨 Lw는 또한 하위 반응인 MLC의 인산화도 억제할 것으로 예상된다.

• Fig. 3-4에서 보는 바와 같이 ADP가 증가시킨 MLC의 인산화(Fig. 30, lane 2)를 Lw는 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 3-4, lane 3, 4). 이 결과는 Lw에 의한 ADP유인 혈소판 응집반응억제(Fig. 3-1), $[Ca^{2+}]_i$ 동원 억제(Fig. 3-2), ATP 및 serotonin 방출억제(Fig. 3-6A, B)와 깊은 상관관계가 있음을 의미한다.

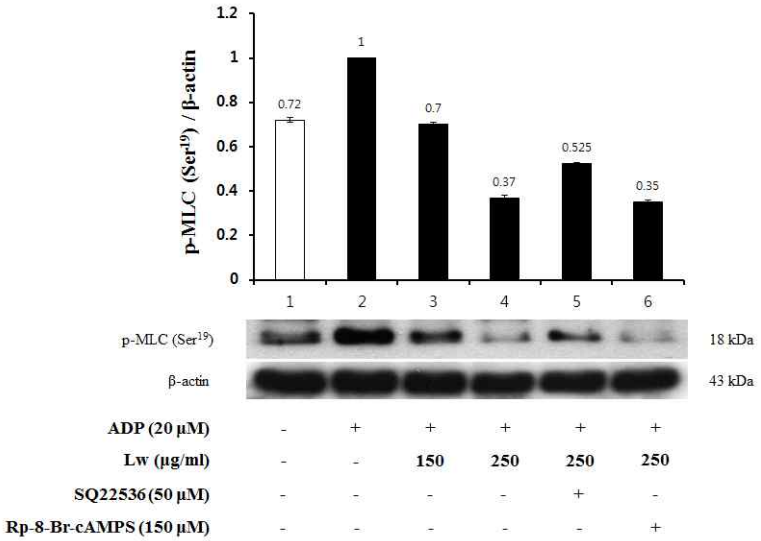


Fig. 3-4. Effect of Lw on myosin light chain (MLC) phosphorylation on ADP-induced human platelet aggregation.

(나) Protein kinase C 활성에 미치는 Lw의 효과 (Fig. 3-5)

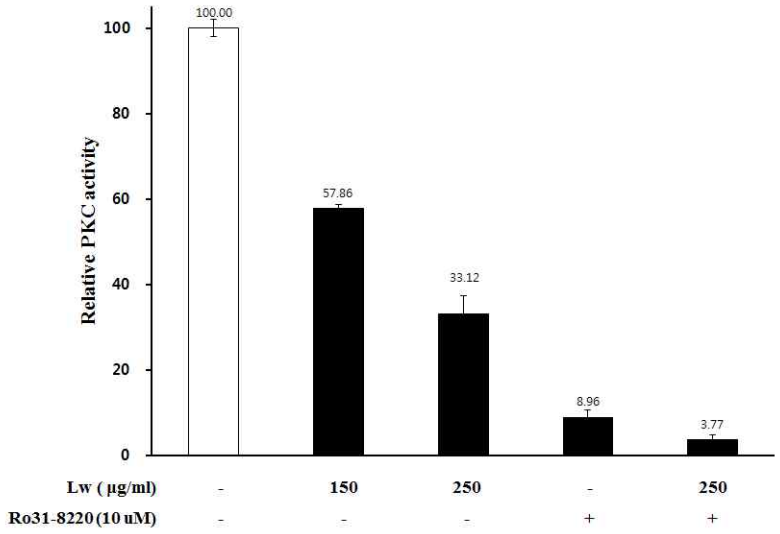
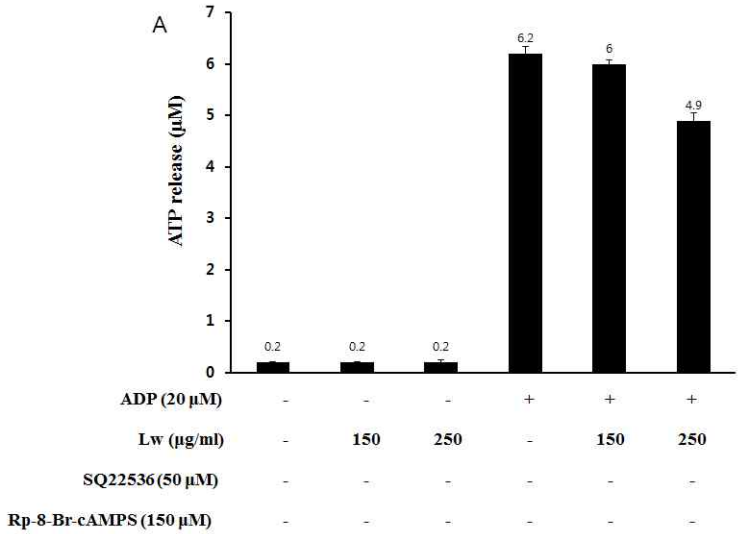


Fig. 3-5. Effect of Lw on protein kinase C (PKC) activity.

- ADP에 의해 증가하는 $[Ca^{2+}]_i$은 Ca^{2+}의존성의 protein kinase C (PKC)를 활성화를 통해 pleckstrin을 인산화시켜 혈소판 과립(예, serotonin, ATP 등)의 방출을 유인한다.
- Lw나 PKC 저해제인 Ro31-8220을 첨가하지 않은 실험계의 PKC activity를 100%으로 하여 대조군으로 했을 때, PKC 저해제 Ro31-8220 (10 μM)은 8.96%로 강하게 억제시켰다 (Fig. 3-5).
- Lw 또한 농도의존적으로 (150, 250 ug/ml) PKC activity를 억제시켰으며, Ro31-8220과 Lw 250ug/ml을 함께 처리한 경우 상승적으로 억제되었다.
- 이것은 Lw가 PKC의 활성을 억제시킴으로써 pleckstrin의 인산화를 억제시킬 수 있음을 의미함과 동시에 serotonin과 ATP의 방출반응(Fig. 32A, B)도 억제시킬수 있음을 의미한다.

(4) ATP 및 serotonin release에 미치는 Lw의 효과 (Fig. 3-6)

혈소판응집이 일어날 때 증가하는 $[Ca^{2+}]_i$은 ATP 및 serotonin의 방출 반응에 깊게 관여하고, ADP에 의해 증가되는 $[Ca^{2+}]_i$ 동원과 MLC 인산화 및 PKC activity를 억제시키는 Lw는 혈소판의 dense body로부터 ATP 및 serotonin의 release를 억제할 것으로 예상되므로, Lw가 ADP에 의한 ATP 및 serotonin의 release를 억제하는지 조사했다.



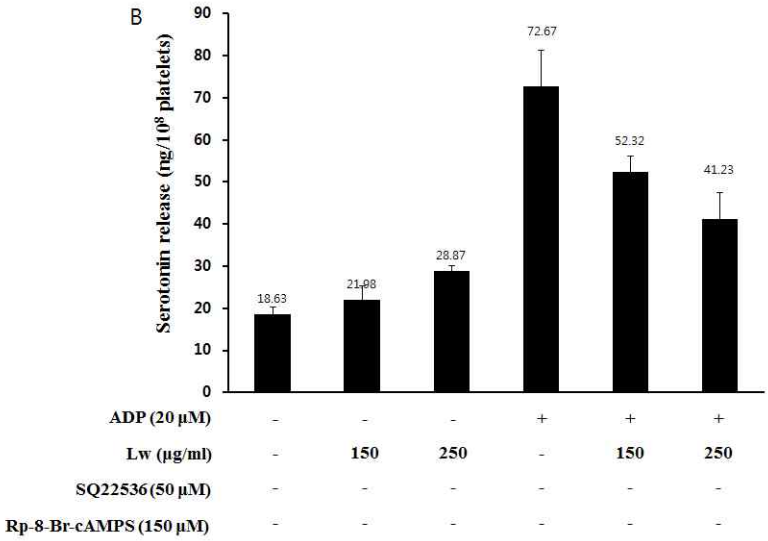


Fig. 3-6. Effects of Lw on ATP and serotonin release. (A) Effects of Lw on ATP release in ADP-activated platelets. (B) Effects of Lw on serotonin release

- Fig. 3-6A에서 보면, ADP는 ATP를 강하게 release시키지만, Lw는 농도 (150, 250 μg/ml) 의존적으로 ADP가 증가시킨 ATP release를 억제시키고 있다.
- 또한, serotonin release에 대해서 Fig. 3-6B에서 보면, ADP 역시 serotonin release를 강하게 촉진시키지만, Lw는 농도 (150, 250 μg/ml)의존적으로 ADP가 증가시킨 serotonin release를 억제시켰다.

(5) Lw의 안전성 평가

- Lw의 안전성을 평가하기 위해 Lw를 SD rat (6week, male)에 1주일간 복강 투여하였다 (saline, 62.5mg/kg, 123mg/kg, 246mg/kg).
- 제3세부과제의 1~2차년도 결과에 따르면 Lw를 123mg/kg 투여하였을 때 뇌질환의 개선 또는 예방효과가 있었기 때문에, 그에 따라 123mg/kg을 유효농도로 정하여, 유효농도의 1/2배, 1배 및 2배 농도로 복강 투여하였다.

Table 3-1. 안전성 평가지표의 의의

안전성 평가지표	혈액 중에 증가했을 경우의 의의
Alanine aminotransferase (ALT)	간질환 (급・만성간염, 간경변)
Aspartate aminotransferase (AST)	간질환, 심장질환, 근육/골격근질환
Lactate dehydrogenase (LDH)	간질환, 심장질환
γ-glutamyltransferase (γ-GT)	간질환
Alkaline phosphatase (ALP)	간질환
Creatine kinase (CK)	심장질환, 골격근질환
Amylase	췌장질환

- 위 Table 3-1의 안전성 평가지표는 모든 조직과 세포가 생명을 유지하는데 필요한 효소

이며 ALT, AST, LDH, ALP, CK 및 amylase는 어떤 물질(예, 독성물질)에 의한 관련조직/세포에 손상을 받으면 혈액 중으로 방출되어 혈액 중에 증가하며, γ-GT는 관련조직/세포가 손상을 받으면 유도되는 효소로서 혈액 중에 증가한다.

- 따라서, 이들 효소는 정상적으로 건강을 유지할 때는 어떤 독성물질에 의해 증가되지 않는다.
- 미강발효추출물 Lw의 투여에 의한 혈액 중의 증가유무를 측정하여 안전성을 평가했다.

Table 3-2. 간질환, 심장질환, 근육/골격근질환 및 췌장질환 지표의 변화

	Control	Lw 61.5mg/kg -body weight	Lw 123mg/kg -body weight	Lw 246mg/kg -body weight
ALT (U/L)	34.6±6.0	28.1±2.4	22.9±2.0[a]	28.6±0.3
AST (U/L)	60.7±4.1	46.9±2.2[b]	47.5±3.4[b]	47.1±3.7[b]
LDH (U/L)	75.8±11.1	76.4±3.0	65.5±4.9	87.7±11.9[NS]
γ-GT (U/L)	36.4±4.3	29.2±0.8[a]	29.6±1.7[a]	28.2±1.6[a]
ALP (U/L)	454.8±30.7	341.4±26.8[b]	264.2±22.6[b]	256.1±18.6[b]
CK (U/L)	294.1±16.9	229.9±18.6[b]	248.4±21.0[a]	249.3±10.8[a]
Amylase (U/L)	342.3±30.1	346.2±10.5[NS]	352.6±11.8[NS]	334.1±29.5[NS]

The data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 5). ap<0.05, bp<0.001 vs. control

- **ALT**는 간질환 발병의 진단지표로서, Lw의 투여에 의해 대조군에 비해 감소했다(Table 3-2). 이것은 Lw가 간질환을 일으키지 않고 간의 기능을 강화시키는 효과가 있음을 의미한다.
- **AST**는 간질환, 심장질환, 근육/골격근질환에서 혈액 중에 증가한다. 하지만 Lw의 투여에 의해 대조군에 비해 감소했다(Table 3-2). 이것은 Lw가 간질환, 심장질환 및 근육/골격근질환을 일으키는 독성이 없고, 오히려, 간, 심장 및 근육/골격근의 기능을 강화시키는 효과가 있음을 의미한다.
- **LDH**는 간질환 및 심장질환 등에서 혈액 중에 증가한다. Lw 61.5mg을 투여했을 때의 LDH(76.4±3.0 U/L)는 대조군의 그것(75.8±11.1 U/L)에 비해 유의적인 변화가 없었다(Table 11). Lw 123mg을 투여했을 때의 LDH(65.5±4.9 U/L)는 대조군의 그것(75.8±11.1 U/L)보다 약간 감소했다. Lw 246mg을 투여하였을 때의 LDH(87.7±11.9 U/L)는 대조군의 그것(75.8±11.1 U/L)보다 증가하는 것처럼 보이지만 통계처리에 의해 유의성이 없는 것으로 나타났다(Table 3-2).
- **γ-GT**는 간질환에서 증가한다. Lw의 투여에 의해 γ-GT는 증가하지 않았고, 오히려 유

의성있게 감소했다(Table 3-2). 이것은 Lw가 간의 기능을 강화시키는 효과가 있음을 의미한다.

- **ALP**도 간질환에서 증가하지만, Lw의 투여에 의해 ALP는 대조군에 비해 증가하지 않고, 오히려 유의성있게 감소했다(Table 3-2). 이것은 Lw가 간의 기능을 강화시키는 효과가 있음을 의미한다.
- **CK**는 심장질환 및 골격근질환에서 증가하지만, Lw의 투여에 의해 CK는 대조군에 비해 증가하지 않고 오히려 감소했다(Table 3-2). 이것은 Lw가 심장의 기능 또는 근육 및 골격근의 강화에 효과가 있음을 의미한다.
- **Amylase**는 췌장질환의 경우 증가한다. Lw의 투여에 의해 amylase는 대조군의 것과 유의성이 없었다(Table 3-2).
- 이상과 같이, Lw의 투여에 의해 간질환, 심장질환, 근육 및 골격근질환과 췌장질환의 발생위험이 없다는 것을 알 수 있기 때문에, Lw를 실제 섭취했을 때 안전하다고 결론내릴 수 있다.

Table 3-3. 신장기능 및 간기능

	Control	Lw 61.5mg/kg -body weight)	Lw 123mg/kg -body weight	Lw 246mg/kg -body weight
Blood urea nitrogen (BUN) (mg/dL)	19.7±1.8	19.9±1.4^{NS}	19.8±0.9^{NS}	17.9±2.7^{NS}
Creatinine (mg/dL)	1.2±0.1	1.2±0.1^{NS}	1.1±0.3^{NS}	1.1±0.2^{NS}

The data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 5). NS vs. control

- **BUN**은 urea 분자 중의 질소량을 의미하며, urea는 간에서 독성이 있는 암모니아로부터 생성되는 것으로서 독성이 없고, 뇨(urine)로 배출된다.
- Urea는 간기능이 저하되었을 때 혈액 중에 감소하므로 간기능의 지료로서 이용된다.
- Lw를 투여했을 경우의 BUN의 농도는 대조군에 비해 유의성있는 변화가 없었다(Table 12). 이것은 Lw가 간질환을 일으키지 않는 것을 증명하는 것으로서 Lw가 간기능의 지표로서 이용되는 ALT, AST, LDH, γ-GT 및 ALP의 활성변화에 영향을 미치지 않아 간기능을 손상시키지 않는다는 결과(Table 3-2)와 일치한다.
- **Creatinine**은 신장을 거쳐 뇨중으로 배출되지만, 신장질환의 경우 혈액으로 역류되어 혈액 중에 증가하므로, creatinine이 혈액에 증가하는 것은 신장질환의 발생지표로 이용된다.
- Lw의 투여에 의해 creatinine의 농도는 대조군에 비해 유의성있는 변화가 없었다(Table

3-3). 따라서, Lw는 신장질환을 유발하지 않음을 알 수 있다.

- 이상과 같이 Lw는 간질환, 신장질환을 일으키지 않는 안전성이 있음을 알 수 있다.

(6) Lw의 안전성 평가 요약

- 간, 신장, 근육/골격근, 췌장 및 신장의 기능을 정상적으로 유지시킨다.

(7) Lw의 다이어트 조절 기능 가능성?

Table 3-4. Food intake와 Body weight의 변화

		Control	Lw 61.5mg/kg -body weight	Lw 123mg/kg -body weight	Lw 246mg/kg -body weight
Food intake (g)		26.9±1.0	20.5±1.2[b]	20.8±3.0[a]	14.4±2.8[b]
Body weight (g)	Start BW (g)①	250	226	244	231
	Δ (g)②	39.4±5.7	15.4±6.7[b]	12.6±13[b]	12.6±8.7[b]
Δ(g)/Food intake(g) ×100 (평균)		146.5	75.1	60.6	87.5
BW (①+②)		289.4	241.4	256.6	243.6

The data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 7). ap<0.05, bp<0.001 vs. control

- Lw의 다이어트 조절 기능 가능성을 food intake에 따른 체중(body weight)의 변화(g)로 평가했다.
- Lw를 투여했을 때 food intake는 대조군에 비해 유의성있게 감소했다(Table 3-4).
- 최초 체중(start BW)을 기준으로 하였을 때 Lw 투여 7일간의 체중변화 역시 Lw를 투여했을 때 대조군에 비해 유의성있게 감소했다(Table 3-4).
- 7일간의 체중변화에 대한 food intake의 변화율을 보면 역시 대조군에 비해 Lw를 투여했을 때 낮았다(Table 3-4). 또한 Lw 투여량이 증가하여도 그 변화율은 거의 일정했다.
- 이와 같은 결과는 Lw의 투여는 다이어트 조절효과가 있음을 반영해주는 것으로서 매우 흥미스러운 것이다.
- 또한, 체중의 감소는 질환의 발생과 상관관계가 있다고 생각하면, 전술한 바와 같이 Lw의 투여에 의해 간, 심장, 근육/골격근, 췌장 및 신장의 기능이 손상되지 않았다는 것(Table 3-2, 3-3)을 감안하면 Lw의 투여에 의해 food intake와 체중이 감소하는 것은 Lw의 투여에 의한 질환발생에 의한 것이 아님을 의미한다.
- 따라서 Lw의 투여는 체중을 감소시키는 다이어트 효과를 가져올 수 있다고 생각한다.

마. 미강발효추출물 Lw의 혈전증억제특이성 규명 (요약)

(1) ADP에 의한 혈소판응집반응과 혈전강화(intensification of thrombus) 메카니즘

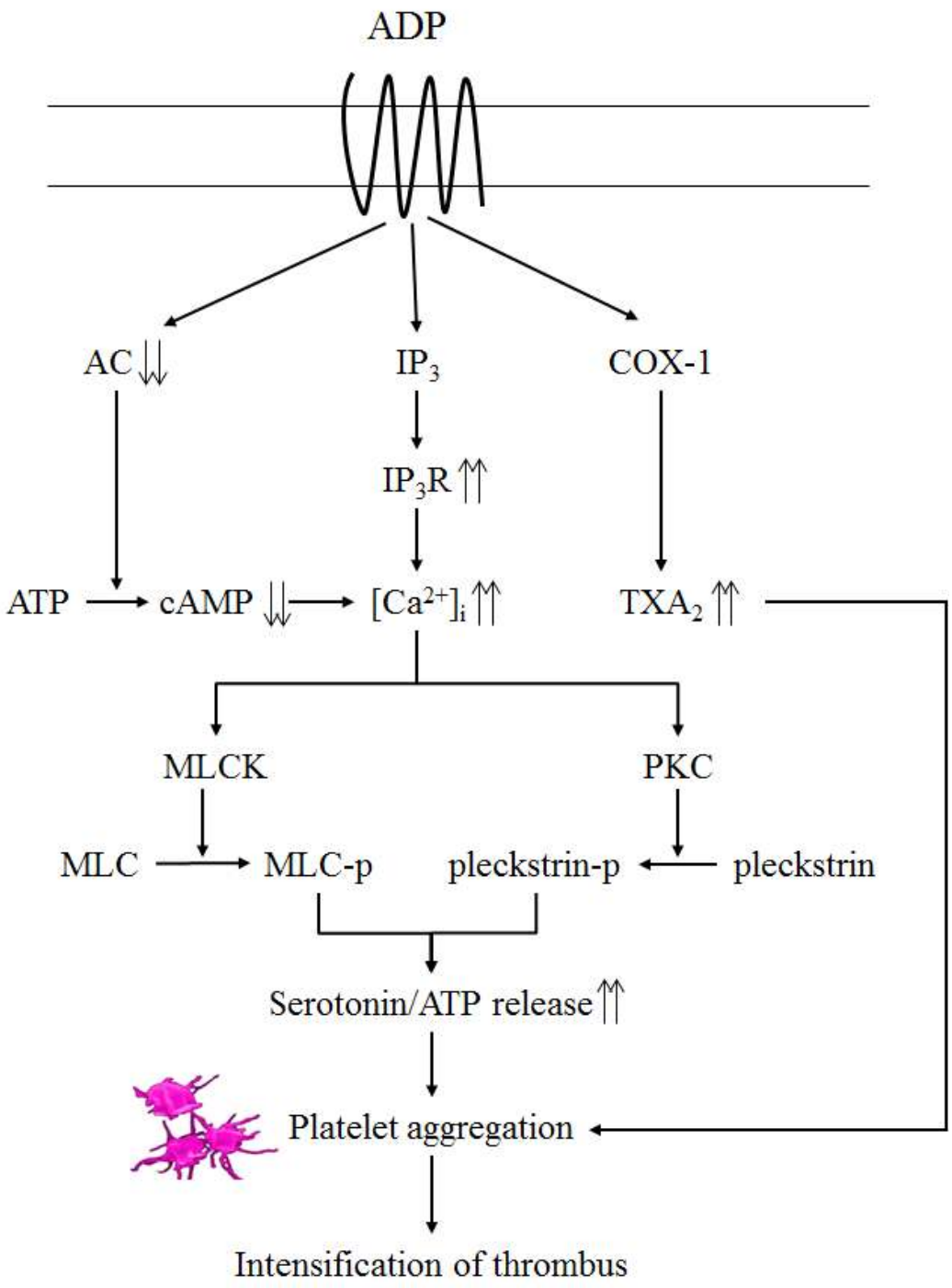


Fig. 3-7. Mechanism of platelet aggregation by ADP

Table 3-5. 혈소판응집 억제기전

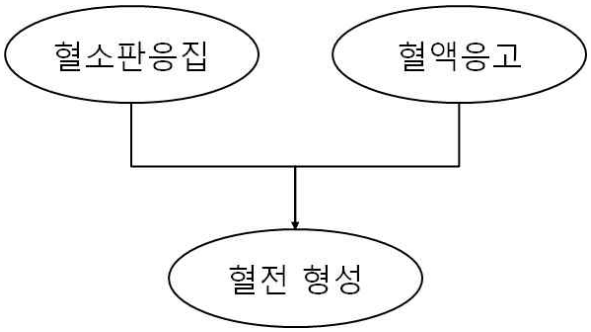
	혈소판응집 억제기전	보고서
· ADP유인 사람혈소판응집 억제 (*in vitro*)	· cAMP 생성 증가 · cAMP-의존성 VASP(Ser^{157}) 인산화 촉진	1차년도 : Fig. 16, 20, 22
	· COX-1 억제에 의한 TXA_2 생성 억제	2차년도 : Fig. 23, 25
	· IP_3R 인산화 촉진 · $[Ca^{2+}]_i$ 동원 억제 · MLC 인산화 억제 · PKC activity 억제 · Serotonin 및 ATP 방출 억제	3차년도 : Fig. 28, 29, 30, 31, 32

(2) 이용 :

「Antiplatelet effects of Lw due to inhibition of protein phosphorylation in ADP-induced human platelet aggregation」이란 title로 SCI paper에 투고/게재 예정임.

- ADP는 adenylate cyclase(AC)의 활성을 억제시킴으로써 ATP로부터 cAMP의 생성을 억제시킨다(Fig. 33). 이것은 IP_3R이 매개하는 $[Ca^{2+}]_i$의 증가와 깊은 연관성을 가지고 있다. 하지만 Lw는 cAMP의 생성을 증가시키고(Table 3-5, 1차년도 연구결과), 이것을 이용하여 IP_3R을 인산화시킴으로써 $[Ca^{2+}]_i$의 동원을 억제시킨다(Table 3-5, 3차년도 연구결과).
- 혈소판의 세포질에 동원된 $[Ca^{2+}]_i$은 myosin light chain kinase (MLCK)와 PKC의 활성을 촉진시킨다(Fig. 3-7).
  - MLCK의 활성촉진에 의해 myosin light chain (MLC)가 MLC-p로 인산화된다(Fig. 3-7).
  - PKC의 활성촉진에 의해 pleckstrin이 pleckstrin-p로 인산화된다(Fig. 3-7).
  - 인산화된 MLC-p와 pleckstrin-p는 sertonin/ATP release 반응에 관여하여 혈소판응집을 촉진시킴으로써 혈전형성을 강화시킨다(Fig. 3-7).
  - 그러나, Lw는 ADP에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 동원 → MLC의 인산화(MLC-p) → pleckstrin 인산화(pleckstrin-p) → serotonin/ATP release 촉진 → 혈소판응집반응 촉진 → 혈전의 강화하는 일련의 ADP매개 혈소판응집분자의 활성을 억제시켰다(Table 3-5, 3차년도 연구결과)
- 또한, ADP는 cyclooxygenase-1 (COX-1)의 활성을 촉진시켜 arachidonic acid로부터 혈소판응집촉진분자인 thromboxane A_2 (TXA_2)의 생성을 촉진시킨다(Fig. 3-7).
  - 그러나, Lw는 COX-1의 활성을 억제시킴으로써 TXA_2의 생성을 억제시켜 항혈소판작용을 가진다는 것을 명확히 했다(Table 3-4, 2차년도 연구결과).

(3) Lw 투여에 의한 ADP유인 혈소판응집반응 억제 및 혈액응고 억제 작용 (요약)



- 혈전(thrombus)은 혈소판응집반응과 혈액응고반응에 의해 발생된다.
- Lw를 rat의 복강으로 투여하여 얻은 혈소판과 혈장을 가지고 혈소판응집반응 및 혈액응고반응에 미치는 효과를 조사했다.
  - Lw를 123mg/kg-body weight로 rat의 복강으로 투여했을 때 ADP유인 혈소판응집반응이 유의적으로 억제되었다(2차년도 연구결과).
  - 또한, 혈액응고의 지표가 되는 prothrombin time (PT)와 activated partial thromboplastin time (APTT)가 Lw의 투여에 의해 연장되었다(2차년도 연구결과). 이것은 Lw 투여에 의해 혈액응고가 억제됨을 의미한다.
- 결론적으로 Lw는 *in vitro*에서의 ADP유인 혈소판응집과 *ex vivo*에서의 ADP유인 혈소판응집 및 혈액응고작용을 억제하였으므로 Lw는 항혈전제의 신소재로 사용될 수 있음을 의미한다.

제 3절 미강 발효 추출물의 뇌질환 예방 및 기능개선 응용을 위한 생리활성 연구

1. 뇌졸중 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사

가. 실험방법

(1) 중대뇌동맥 결찰(middle cerebral artery occlusion; MCAO)에 의한 뇌손상 유도는 실험동물은 평균 체중 250±20g의 Sprague Dawley를 사용하며, 실험동물 마취 후 사지를 고정시킨 뒤 좌측 총경동맥을 속목동맥과 바깥목동맥의 분지지점까지 노출시킨다. 속목동맥 양쪽을 묶은 후 중간지점을 자른다. 날개구개동맥를 폐쇄시킨 후 바깥목동맥를 묶고 절단한다. 절단된 바깥목동맥로부터 나일론사를 이용해 속목동맥를 폐쇄한다. 그 후 1시간 동안 중대뇌동맥(MCA)의 혈관폐쇄를 통한 혈액공급의 중단을 유지한다. 1시간동안 반응 후, Reperfusion 과정을 거친다.

(2) 행동테스트는 모든 실험동물이 MCAO 수행 1일 전과 MCAO 수행 후 1, 3일에 종합적인 행동 테스트를 한다. 행동테스트는 modified Neurological Severity Score(mNSS)로 MCAO 수행 전과 후의 행동 양상을 비교 및 평가하기 위해 만들어졌다. MCAO 전 3일 간 훈련시킨다. 실험은 3번을 반복하여 평균을 백분율로 나타낸다. mNSS에서 신경학적인 기능을 0에서 18점으로 나타내며, 정상일 때는 0이고, 최대치의 손상을 18로 나타낸다. mNSS는 모터, 지각, 반사, 균형을 시험하는 혼합 테스트이다.

(3) 조직염색(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride : TTC) : MCAO에 의해 뇌손상이 유도된 흰쥐들을 희생시켜 뇌조직을 조심스럽게 얻어 metallic brain matrix를 이용하여 2mm 두께로 조직을 절편하여 2% TTC용액에 조직을 염색한다. TTC가 살아있는 미토콘드리아에 염색이 되어 손상된 뇌조직은 하얗게, 정상조직은 빨갛게 염색이 된다.

(4) In situ cell death detection (Apoptotic cells) : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰행을 시행 후 각 그룹별로 Perfusion을 시행하게 된다. 실험동물을 희생한 후, Apoptotic cell을 확인 할 뇌 부위를 molding 한 후 Cryostat으로 고정한 뇌조직을 동결절편 한다. 절편된 조직은 고정을 진행하고, TUNEL reagent 을 처리하여 Apoptosis가 일어난 cell을 확인한다.

(5) Immunohistochemistry : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰을 시행 후, 각 그룹별로 Sampling을 진행한다. Sampling은 Perfusion과 Molding 그리고 Cryostat으로 인한 조직 Section이다. Sampling 후, section한 조직을 고정하게 되고, Primary antibody 처리와 Secondary antibody 처리를 통해 원하는 유전자를 Detection 할 수 있다. 이에 사용 되는 Antibody들은 다음과 같다. Primary antibody로써 잡아내는 유전자는 BDNF, GDNF가 있다. BDNF, GDNF는 Neurotrophic factor gene이다.

나. 실험결과

(1) MCAO 수행 3일째에 Infarct volume에서 RB와 FA의 효과. 각 그룹의 Total volume의 Vehicle은 약 54%, RB5%는 약 53%, RB10%는 약 45%, RB20%는 약 36% 그리고 FA는

약 33%의 Infarct 나타내었고, Cortex는 순서대로 각각 약 31%, 30%, 30%, 22%, 20%로 나타났으며, Striatum은 각각 약 23%, 23%, 15%, 13%, 12%로 나타났다. Total volume에서 RB10%, RB20%와 FA의 Infarct은 Vehicle에 비하여 significant 하게 나타났다. Cortex volume에서는 FA에서 significant하게 나타났고, Striatum volume에서는 RB20%와 FA에서 significant하게 나타났다.(Fig. 1-1)

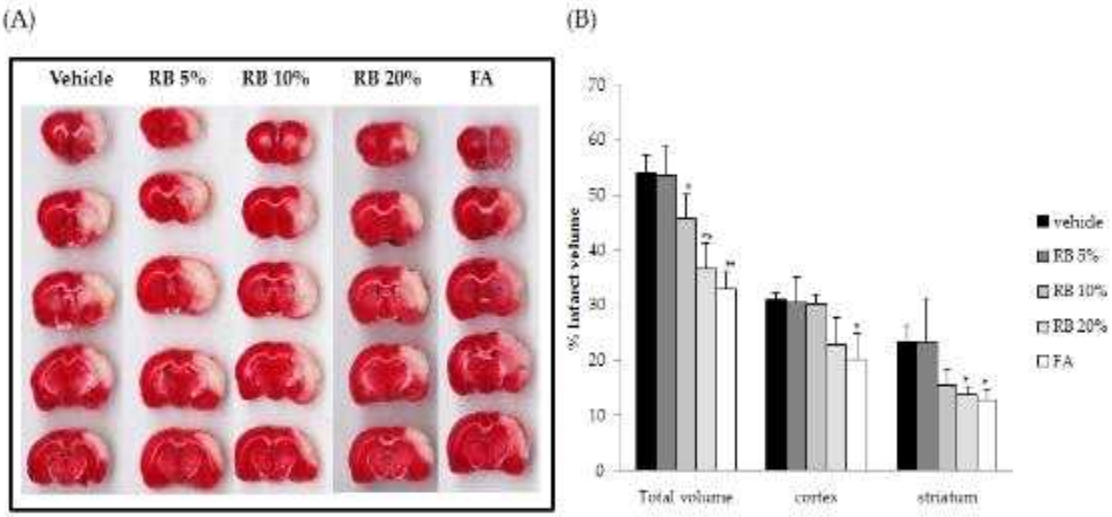


Fig. 1-1. Effect of Rice bran (RB), Ferulic acid (FA) on the infarct volume at 3 days after MCAO. (A) TTC-stained coronal section from vehicle, RB (5%), RB (10%), RB (20%), FA (200mg/kg). (B) The infarct volume was calculated as the infarct areas x thickness (2 mm) and expressed as a percentage of the lesion half of brain. Data are shown as means S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual Rice bran (RB) groups, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual Ferulic acid (FA) groups

(2) Fig. 1-2 MCAO 수행 후 기능 행동 회복에서의 RB와 FA의 효과. MCAO 수행 뒤 1일째, 3일째에 행동기능검사인 mNSS를 시행한다. 1일째에 모든 그룹이 11~13점으로 Severe한 행동양상을 나타냈다. 3일째에는 Vehicle이 약 11점, RB5%는 약 10점, RB10%는 약 9점, RB20%는 약 7점, FA는 약 6점으로 나타났다. RB20%와 FA에서 행동 평가가 significant 하게 나타났다. Vehicle의 MCAO 모델의 운동피질(M1과 M2 자리)에는 Infarct이 나타났으나, RB20%를 처리한 모델에서는 운동피질에 Infarct이 나타나지 않았다.

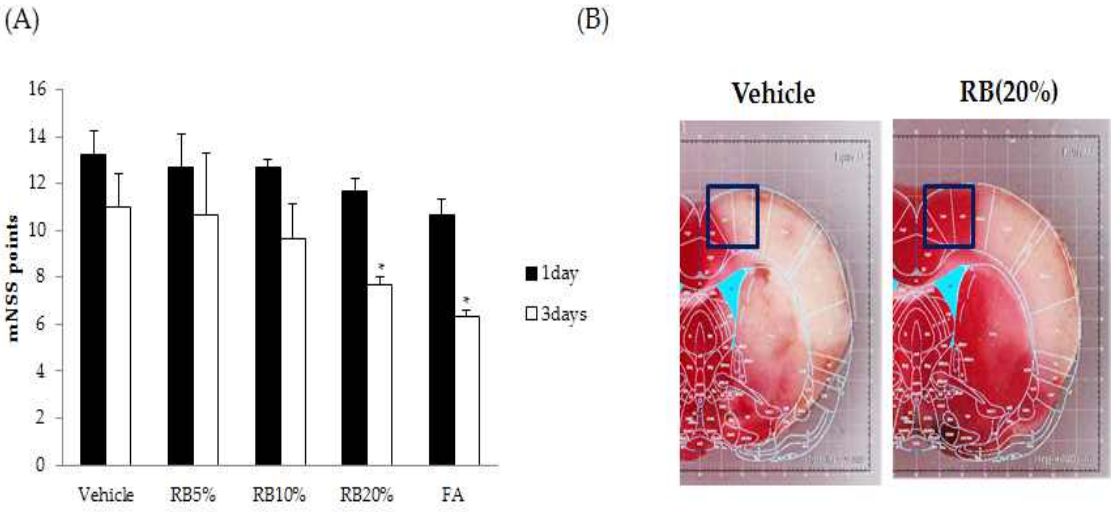


Fig. 1-2. Effect of Rice bran (RB20%) and Ferulic acid (FA) on functional behavioral recovery after MCAO. Neurological functional tests were performed at 1, 3 days after MCAO. (A) Rice bran (RB20%) and Ferulic acid (FA) group showed significantly lower mNSS score than vehicle group 3 days after MCAO. (B) The Rice bran (RB20%) group showed reduce the infarct volume at motor cortex lesion (M1 and M2 site) compared to vehicle gruop. Data are shown as means S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$ vs. individual vehicle group

(3) MCAO 수행 후 RT-PCR을 통한 미강그룹과 FA의 항산화 유전자와 신경조절물질에서의 mRNA의 발현 정도. Vehicle 그룹은 발현정도가 매우 약한 반면, Rice Bran의 추출물인 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹에서는 Vehicle 그룹에 비해 Significant하게 발현정도가 증가하였다. Ferulic acid (FA) 그룹 또한 significant하게 발현정도가 증가함을 보였다. PDI와 Nrf2 발현정도에서 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹이 Ferulic acid (FA) 그룹보다 더 증가함을 확인할 수 있었다. 그리고, Neurotrophic factor gene인 BDNF, NGF, GDNF의 발현정도 또한 확인해보았다. BDNF의 primer를 이용해 발현정도를 확인한 결과, Vehicle에 비해 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹에서 significant하게 발현정도가 증가하였고, Ferulic acid (FA) 그룹 또한 발현정도가 증가하였다. BDNF 발현정도는 Ferulic acid (FA) 그룹보다 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹에서 조금 더 증가하는 경향이 보였다. NGF 발현정도 결과 역시, Vehicle에 비해 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹과 Ferulic acid (FA) 그룹이 증가하는 경향이 보였다. NGF 발현정도는 RB 그룹보다 FA 그룹이 조금 더 증가하는 경향이 나타났다. GDNF 발현정도 결과 역시, Vehicle에 비해 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹과 Ferulic acid (FA) 그룹이 증가하는 경향을 보이는데, 이는 RB 그룹보다 FA 그룹이 더 많이 증가하는 경향을 확인하였다.(Fig. 1-3)

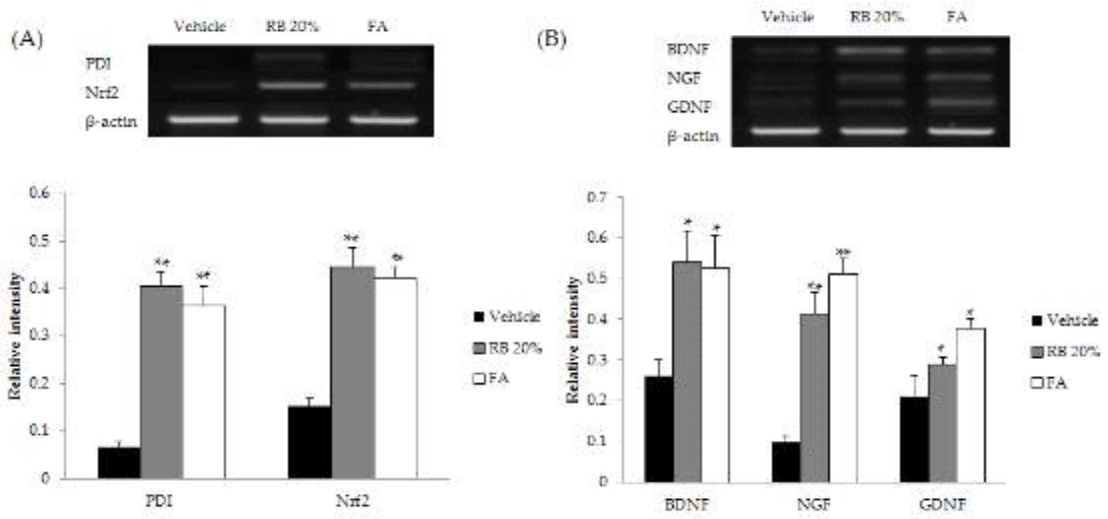


Fig. 1-3. Effect of Rice Bran (RB20%) and Ferulic acid (FA) on mRNA expression by RT-PCR using β-actin as a reference after MCAO. RNA was isolated from ischemic brain after 3 days of reperfusion. Specific expression was determined in relation to the expression of the housekeeping gene β-actin. (A) The levels of PDI and Nrf2 transcription was increased in Rice bran (RB20%) treated group versus vehicle group. The band intensity of PDI and Nrf2 were normalized by the band intensity of β-actin and individual values are expressed as the mean ± S.E.M. Experiments were repeated three times. (B) The levels of BDNF and NGF, GDNF transcription was increased in Rice bran (RB20%) treated group versus vehicle group. The band intensity of BDNF and NGF, GDNF were normalized by the band intensity of β-actin and individual values are expressed as the mean ± S.E.M. Experiments were repeated three times

*p < 0.05 , **p < 0.01 vs. vehicle, *$p<0.05$, **$p<0.01$ vs. individual Rice bran (RB20%) group, *$p<0.05$, **$p<0.01$ vs. individual Ferulic acid (FA) group

(4) MCAO 수행후 Apoptosis에 대한 RB20%와 FA의 효과. TUNEL assay를 통해 Apoptosis에서의 효과를 확인해 보았다. 확인은 Cortex와 Striatum으로 나누어서 측정하였다. Vehicle 그룹의 Cortex에서는 Apoptotic cells가 약 201개, 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹에서는 약 157개, Ferulic acid (FA) 그룹에서는 약 154로 측정이 되었다. Vehicle 그룹의 Striatum에서는 약 134개, 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹에서는 약 110개, Ferulic acid (FA) 그룹에서는 약 116개로 측정이 되었다. Cortex에서의 Apoptotic cells는 미강 열수추출물과 Ferulic acid 그룹이 significant하게 나타났고, Striatum에서의 Apoptotic cells는 significant하게 차이가 나지 않았다.(Fig. 1-4)

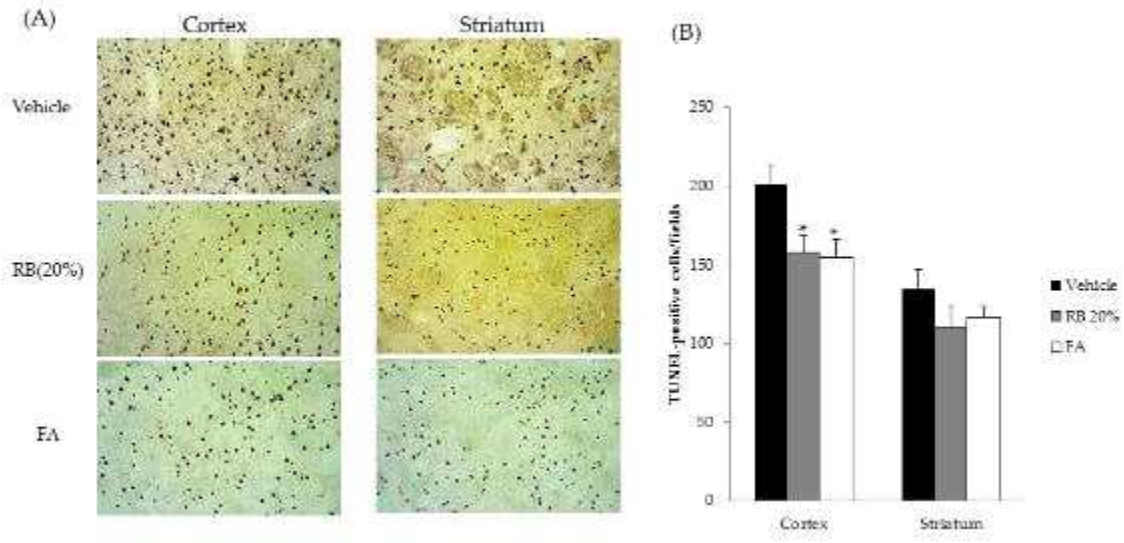


Fig. 1-4. Effect of Rice Bran (RB20%) and Ferulic acid (FA) on apoptosis after MCAO. (A) TUNEL staining in the cortex and striatum area of ischemic lesioned side of vehicle, Rice bran (RB20%), and Ferulic acid (FA) treatment (200x). (B) Quantitative analysis of the number of TUNEL-positive cells. Data are the mean ± S.E.M. (n=3) Experiments were repeated three times

*$p < 0.05$ vs. vehicle, *$p<0.05$ vs. individual Rice bran (RB20%) group, $p<0.05$vs. individual FA (Ferulic acid) group

(5) MCAO 수행 후 RB20%와 FA에서의 뉴런 수 비교 효과. Immunohistochemistry를 통해 Hippocampus의 Dantate Gyrus. CA1, CA3 부위에 존재하는 Neuron의 세포수를 확인해 보았다. Vehicle 그룹에서는 Dantate Gyrus, CA1, CA3 부위의 세포 수는 약 205개, 52개, 73개로 counting 되었고, 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹에서는 약 230개, 67개, 92개, Ferulic acid (FA) 그룹은 약 236개, 63개, 89개로 counting 되었다. Dantate Gyrus와 CA1, CA3 부위에서의 Neuron 수는 Vehicle 그룹에 비해 미강 열수추출물이 주입된 RB 그룹과 Ferulic acid (FA) 그룹이 더 많다는 결과가 나타났다. CA1, CA3 부위에서의 Neuron 수는 significant하게 차이가 나타나진 않았고, Dantate Gyrus 부위에서는 Neuron 수가 significant하게 차이가 나타남을 보였다.(Fig. 1-5)

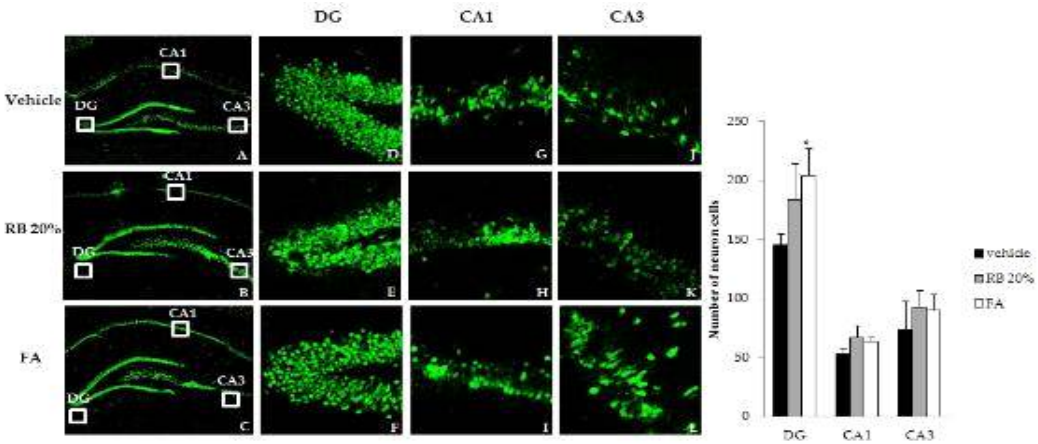


Fig. 1-5. Effect of Rice Bran (RB20%) and Ferulic acid (FA) on neuronal injury after MCAO. NeuN immunohistochemistry (A-L) in the hippocampus of vehicle-group (A, D, G, J) the RB 20% group (B, E, H, K), FA group (C, F, I, L). Neuronal loss is observed in the stratum pyramidale (SP) of the Dentate Gyrus (DG) region 200X (D, E, F), CA1 region 200X (G, H, I) and the CA3 region 200X (J, K, L) at 3 days after ischemia/reperfusion

(6) MCAO 수행 3일째에 Infarct volume에서 발효미강(L.p, L.p+L.w, L.w)의 효과. 각 그룹의 Total volume의 Vehicle은 약 51%, RB 37%, L.p는 약 28%, L.p+L.w는 약 31%, L.w는 약 25%의 Infarct 나타내었고, Cortex는 순서대로 각각 약 30%, 21%, 15%, 14%, 10%로 나타났으며, Striatum은 각각 약 21%, 16%, 12%, 16%, 11%로 나타났다. Total , Cortex, Striatum volume에서 모든 그룹이 significant하게 나타났다.(Fig. 1-6)

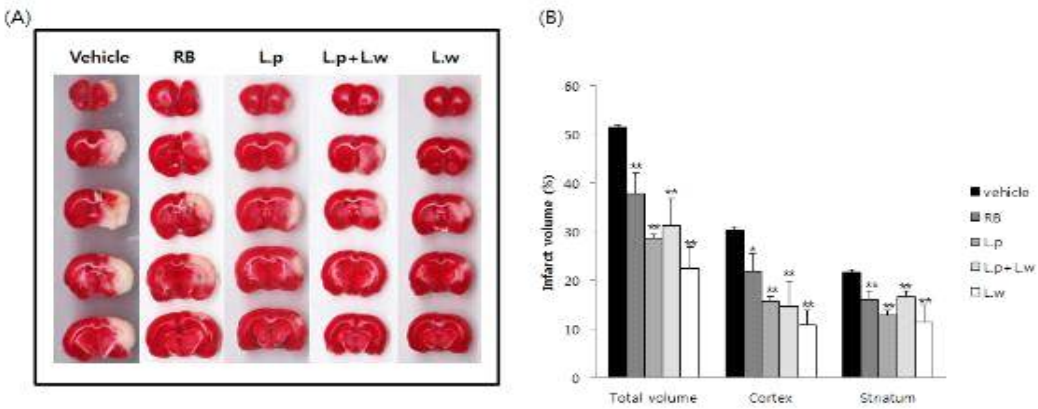


Fig. 1-6. Effect of Rice bran (RB), Fermented Rice bran (L.p, L.p+L.w, L.w) on the infarct volume at 3 days after MCAO. (A) TTC-stained coronal section from vehicle, RB (20%), L.p (20%), L.p+L.w (20%), L.w (20%). (B) The infarct volume was calculated as the infarct areas x thickness (2 mm) and expressed as a percentage of the lesion half of brain

Data are shown as means S.E.M. (n=5) * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual Rice bran (RB) groups, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual L.p groups, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual L.p+L.w groups, *

p<0.05, ** *p<0.01* vs. individual L.w groups.

(7) MCAO 수행 후 기능 행동 회복에서 발효미강(L.p, L.p+L.w, L.w)의 효과. MCAO 수행 뒤 1일째, 3일째에 행동기능검사인 mNSS를 시행한다. 1일째에 모든 그룹이 10~13점으로 Severe한 행동양상을 나타냈다. 3일째에는 Vehicle이 약 10점, RB는 약 7점, L.p는 약 7점, L.p+L.w는 약 7점, L.w는 약 6점으로 나타났다. L.p+L.w와 L.w에서 행동 평가가 significant하게 나타났다.(Fig. 1-7)

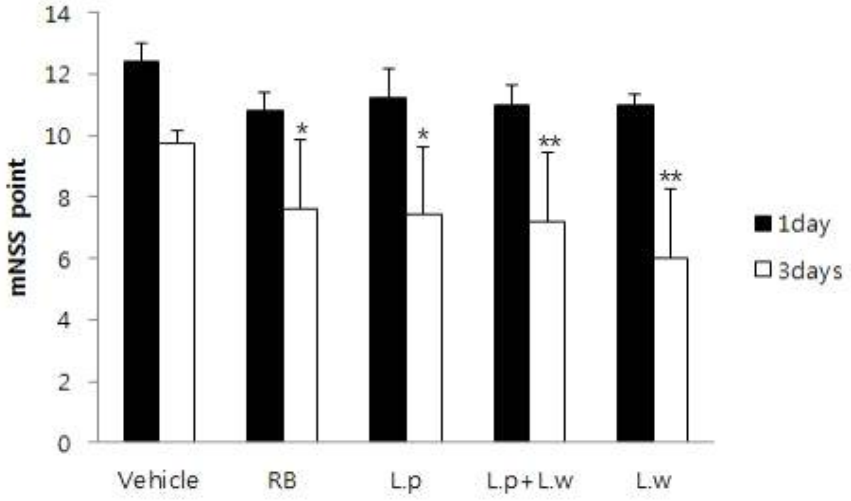


Fig. 1-7. Effect of Rice bran (RB), Fermented Rice bran (L.p, L.p+L.w, L.w) on functional behavioral recovery after MCAO. Neurological functional tests were performed at 1, 3 days after MCAO. RB (20%) and L.p(20%), L.p+L.w(20%), L.w(20%) groups showed significantly lower mNSS score than vehicle group 3 days after MCAO

Data are shown as means S.E.M. (n=5) * *p<0.05*, ** *p<0.01* vs. individual vehicle group, * *p<0.05*, ** *p<0.01* vs. individual Rice bran (RB) groups, * *p<0.05*, ** *p<0.01* vs. individual L.p groups, * *p<0.05*, ** *p<0.01* vs. individual L.p+L.w groups, * *p<0.05*, ** *p<0.01* vs. individual L.w groups.

다. 요약

허혈성 뇌졸중이 발생되면 infarct이 생성됨과 동시에 여러 가지 항산화 유전자와 신경조절 물질들이 감소하게 된다. 또한, apoptosis가 증가하게 되며 따라서 neuronal cell death가 일어난다. 미강열수추출물(RB)을 이용해 뇌졸중의 신경학적 기능 회복을 검증하였다. 허혈성 뇌졸중의 infarct이 감소됨을 TTC염색을 통해 확인되었고, RT-PCR을 통하여 항산화 유전자인 PDI, Nrf2가 증가됨을 확인하였다. 그리고 신경조절물질인 BDNF, NGF, GDNF 또한 증가함을 보였다. 뇌졸중에 의한 apoptotic cells의 수를 측정한 결과, 미강열수추출물을 처리한 실험동물의 cortex와 striatum에서 감소함을 보였다. 그리고 Immunohistochemistry를 통해 신경세포를 해마에서 detection한 결과, 미강열수추출물을 처리한 실험동물에서 신경세포들이 증가함을 나타내었다. 미강열수추출물의 구성성분 중의 하나인 Ferulic acid(FA)는 항산화 증진효과가 있음을 나타낸 논문들이 있다. 이를 통해 실험동물에 각각 처리된 미강열수추출물과 FA가 신경학적 기능회복에 효과를 실험을 통하여 확인하였다. 그리고 발효미강추출물(L,p, L.p+L.w, L.w) 또한 뇌졸중의 infarct과 행동평가에서 신경학적 기능회복을 검증하였다.

2. 우울증 / 불안장애 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사

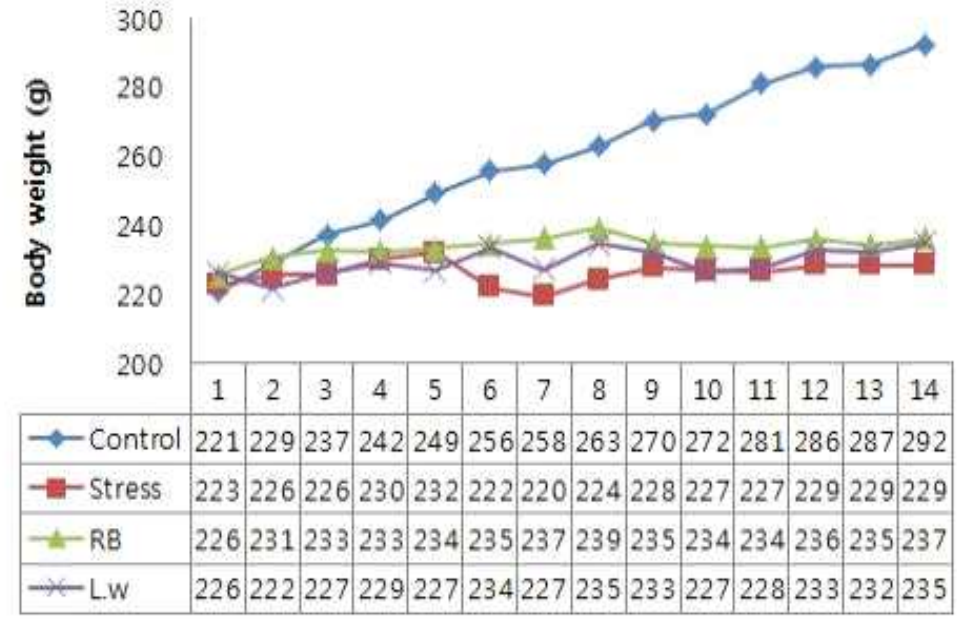
가. 실험방법

(1) 우울증과 불안장애 모델 정립 : 실험동물을 Restrainer에 의해 Stress를 유도하게 된다. Restraint stress는 움직임을 박탈하는 방식으로 짧은 시간동안 우울증과 불안장애 같은 정신질환을 유도할 수 있고, 이는 Learned helplessness의 학습된 무기력을 이용한 방법이다. Restraint Stress는 총 2주 동안 매일 4시간씩 이루어지고, 1주 되는 날부터 2주째 되는 날까지는 Restraint Stress와 함께 미강 추출물과 Ferulic acid의 복강주입이 이루어진다.

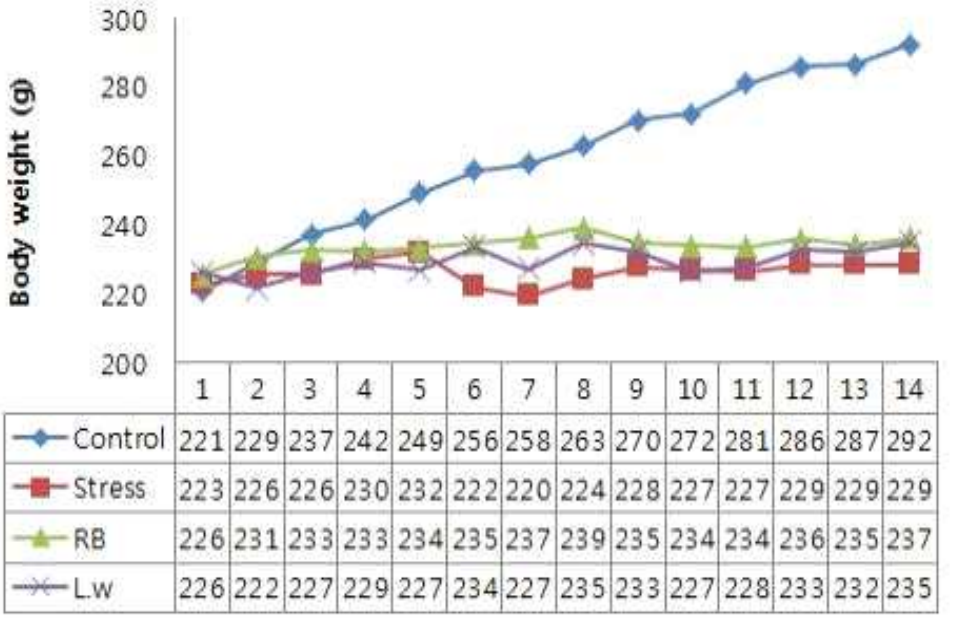
(2) 우울증/ 불안장애 행동평가 : 우울증의 행동평가로는 몸무게 측정과 Forced Swimming Test(FST)을 시행한다. 불안장애의 행동평가로는 몸무게 측정과 Elevated Plus Maze test(EPM)을 시행한다. 우울증과 같은 정신질환은 몸무게 감소의 경향을 나타낸다. 몸무게 측정은 매일 Restraint Stress가 이루어지기 전에 몸무게를 측정하여 기록한다. Forced Swimming Test(FST)는 강제수영평가로 우울증의 행동평가로 흔히 사용되어지는데, Immobility, Swimming 이 2가지 측정으로 이루어진다. 첫 날은 Pre-test session으로 강제로 수영을 15분 동안 시키고 난 후, Test session인 24시간 뒤에 5분 동안 물에 빠뜨려 immobility와 Swimming 정도를 측정한다. 여기서 Immobility는 수면 밖으로 머리를 내 놓는데 필요한 움직임 외에는 아무 움직임이 없는 상태로 절망행동의 지표로 사용된다. 불안장애의 행동평가인 Elevted Plus Maze test(EPM)은 새로운 환경을 탐색하고자하는 경향과 개발되고 높은 공간에 대해 혐오적인 을 보이는 경향을 측정함으로 동물의 혐오적인 응을 확인 할 수 있는 평가이다. 불안장애를 보이는 동물의 경우 기본 탐색활동의 저하가 나타나고 혐오환경에 보다 민감한 반응을 나타내는 경우가 많으므로 정서적인 불안수준을 측정할 수 있다. 실험동물을 Open arms와 Closed arms로 나누어져 있는 장비의 중간 플랫폼에 실험동물을 두고 5분 동안 관찰하는 방식으로 진행된다.

나. 실험결과

(1) Body weight 측정 결과. 그래프와 표에 제시된 바와 같이 Control인 Restraint Stress를 받지 않은 그룹은 몸무게가 날마다 증가하는 반면, Restraint Stress와 Saline이 주입된 Stress 그룹은 몸무게가 계속해서 감소하는 경향을 보인다. Rice Bran의 추출물인 미강 열수추출물을 이용한 RB 그룹은 Stress 그룹과 비교했을 때, 크게 다른 점이 나타나지 않았으나, Stress 그룹보다는 몸무게가 증가하는 양상을 나타낸다. 미강 발효추출물인 L.w 그룹 또한 Stress와는 크게 다른 점을 발견하지는 못했으나. 몸무게가 증가하는 양상을 나타낸다.(Fig. 2-1)



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	221	229	237	242	249	256	258	263	270	272	281	286	287	292
Stress	223	226	226	230	232	222	220	224	228	227	227	229	229	229
RB	226	231	233	233	234	235	237	239	235	234	234	236	235	237
L.w	226	222	227	229	227	234	227	235	233	227	228	233	232	235



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	221	229	237	242	249	256	258	263	270	272	281	286	287	292
Stress	223	226	226	230	232	222	220	224	228	227	227	229	229	229
RB	226	231	233	233	234	235	237	239	235	234	234	236	235	237
L.w	226	222	227	229	227	234	227	235	233	227	228	233	232	235

Fig. 2-1. Effect of repeated restraint stress and extracts (Rice Bran, L.w) administration on body weight gain for 14 consecutive days. Data are shown as means S.E.M. (n=5)

(2) 우울증 행동평가인 Forced Swimming Test(FST) 결과. Control인 Restraint Stress를 받지 않은 그룹은 Immobility time이 약 62초, Swimming time이 약 237초로 나타났다. 반면, Restraint Stress와 Saline이 주입된 Stress 그룹은 Immobility time이 약 127초, Swimming time이 약 172초로 부동성의 시간이 많이 증가하였다. Rice Bran의 추출물인 미강 열수 추출물을 이용한 RB 그룹은 Immobility time이 약 87초, Swimming time이 약 212초로 나타났다. Stress 그룹에 비해 RB 그룹이 우울증을 나타내는 행동평가에서 약간의 효과가 있긴 하지만, significant하게 나타나진 않았다. 미강 발효추출물인 L.w 그룹은 Immobility time이 약 63초, Swimming time이 약 237초로 Stress 그룹에 비해 L.w 그룹이 효과적이었다. L.w 그룹은 Stress 그룹과 비교하였을 때, significant하게 효과가 나타남이 보인다.(Fig. 2-2)

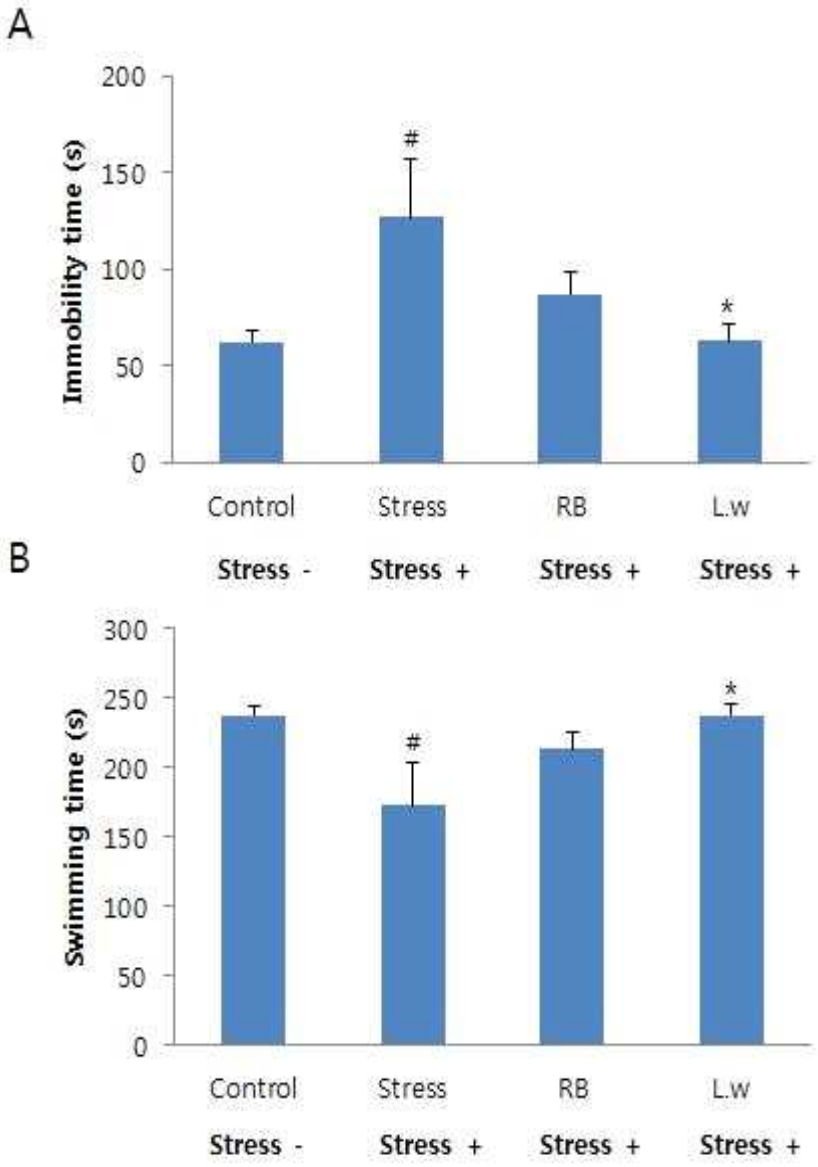


Fig. 2-2. Effect of extracts (Rice Bran, L.w) on immobility time (A), swimming behavior (B) in forced swimming test after repeated restraint stress. Data are shown as means

S.E.M. (n=5)

(3) 불안장애 행동평가인 Elevated Plus maze test(EPM) 결과. Control인 Restraint Stress를 받지 않은 그룹은 Open arms(개방형 통로)로 출입한 시간이 약 123초, Closed arms로 출입한 시간이 약 176초로 활발한 행동을 볼 수 있었다. Restraint Stress를 받은 Stress 그룹은 Open arms time이 약 31초, Closed arms time이 약 268초로 Control 그룹과 비교하였을 때 매우 위축된 행동을 확인할 수 있었다. Rice Bran의 추출물인 미강 열수추출물을 이용한 RB 그룹은 Open arms time이 약 58초, Closed arms time이 약 241초로 Stress와 비교하였을 때, 미미한 효과만 보였을 뿐, significant하진 않았다. 그 반면, 미강 발효추출물인 L.w 그룹은 Open arms time이 약 98초, Closed time이 약 201초로 Stress 그룹과 비교하였을 때, significant하게 효과가 나타났다. 이는 (Fig. 2-2) 의 우울증 행동 평가와 같은 결과를 나타냈다.(Fig. 2-3)

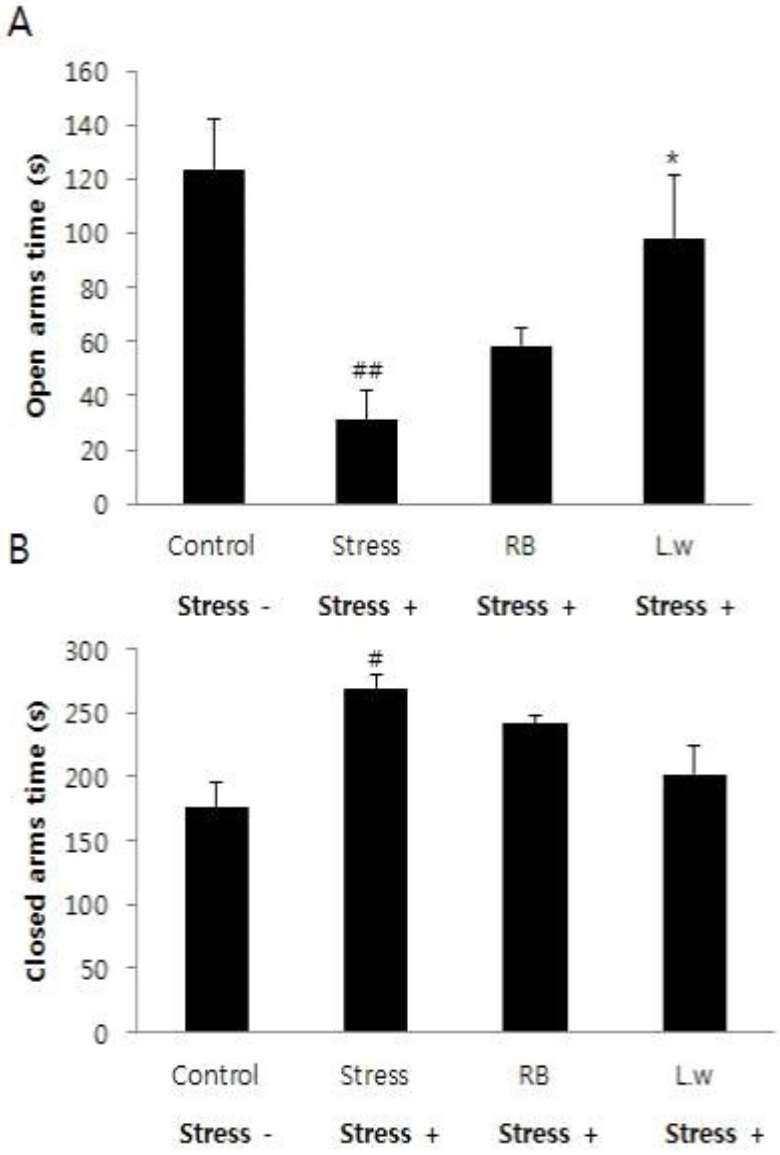


Fig. 2-3. Effect of extracts (Rice Bran, L.w) on open arms time (A), closed arms time (B) in elvated plus maze test after repeated restraint stress. Data are shown as means S.E.M. (n=5)

다. 요약

Restraint stress를 통해 유도된 우울증/불안장애 실험동물에서 미강열수추출물과 발효미강추출물(L.w)이 행동평가에서 회복이 있었다. 우울증 행동평가인 Forced Swimming Test(FST)를 통해 발효미강추출물에서 immobility time이 줄어듦을 확인하였다. 그리고 불안장애 행동평가인 Elevated Plus Maze test(EPM)에서도 발효추출물을 처리한 실험동물이 open arms time이 증가함을 확인하였다. 따라서 발효미강추출물(L.w)은 우울증과 불안장애와 같은 실험동물에서 행동평가의 향상효과가 있음을 검증하였다.

3. 미강열수 추출물과 미강발효 추출물을 사용하여 뇌경색 모델에서 뇌세포사멸, 신경 회로망, 신경보호유전자 발현을 sham 대조군과 비교평가

가. 실험방법

(1) 중대뇌동맥 결찰(middle cerebral artery occlusion; MCAO)에 의한 뇌손상 유도는 실험동물은 평균 체중 250±20g의 Sprague Dawley를 사용하며, 실험동물 마취 후 사 좌측 총경동맥을 속목동맥과 바깥목동맥의 분지지점까지 노출시킨다. 바깥목동맥 양쪽을 묶은 후 중간지점을 자른다. 절단된 바깥목동맥로부터 나일론사를 이용해 속목동맥를 폐쇄한다. 그 후 1시간 동안 중대뇌동맥(MCA)의 혈관폐쇄를 통한 혈액공급의 중단을 유지한다. 1시간동안 뇌경색 후, 재관류 과정을 거친다.

(2) In situ cell death detection (Apoptotic kit) : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰행을 시행 후 각 그룹별로 Apoptotic cell을 확인 할 뇌 부위를 molding 한 후 Cryostat으로 고정한 뇌조직을 동결절편 한다. 절편 된 조직은 고정을 진행하고, TUNEL reagent 을 처리하여 Apoptosis가 일어난 cell을 확인하였다.

(3) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰을 시행 후, 각 그룹별로 뇌조직을 준비한다. TRI-reagent, chloroform과 isopropanol을 이용하여 표본에서 mRNA를 추출한 뒤, cDNA로 합성 후 PCR을 이용하여 확인하고자 하는 항산화, 신경전달물질 유전자를 증폭시켜 전기영동으로 확인하였다.

(4) Immunohistochemistry : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰을 시행 후, 각 그룹별로 뇌조직을 준비한다. 조직은 Perfusion과 Molding 한 후 Cryostat으로 조직을 절편한다. 절편 조직을 고정한 후 Primary antibody 처리와 Secondary antibody를 처리하였다. 이에 사용되는 Antibody는 NeuN, SYP, GAD67, GABA receptor 등이다.

나. 실험결과

(1) MCAO 수행 후 Apoptosis에 대한 RB와 L.w의 효과는 TUNEL assay를 통해 Apoptosis에서의 효과를 확인하였다. Cortex와 Striatum에서의 Apoptotic cells는 RB와 L.w 그룹에서 감소하였다.(Fig. 3-1)

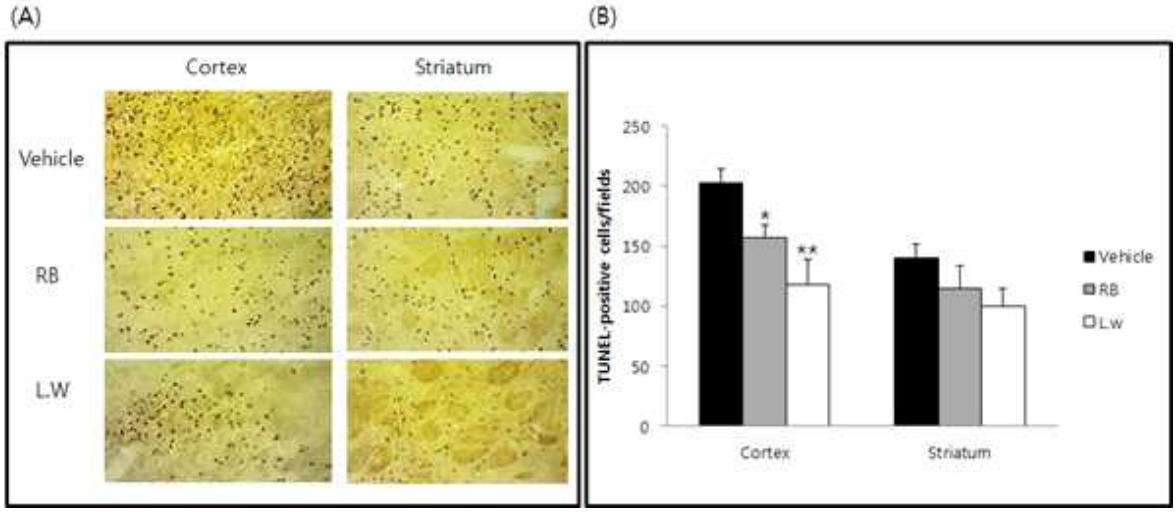


Fig. 3-1. Effects of RB and L.w on TUNEL staining. (A) TUNEL staining in the cortex and striatum area of ischemic lesioned side of vehicle, RB and L.w treatment (200x). (B) Quantitative analysis of the number of TUNEL-positive cells. Data are the mean ± S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group

(2) MCAO 수행 후 RT-PCR을 통한 RB와 L.w의 항산화 유전자와 신경조절물질에서의 mRNA의 발현 정도는 L.w 그룹이 RB 그룹보다 PDI와 Nrf2 발현이 더 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다. Neurotrophic factor gene인 BDNF, NGF, GDNF의 유전자 발현도 L.w 처리군에서 증가하였다. (Fig. 3-2)

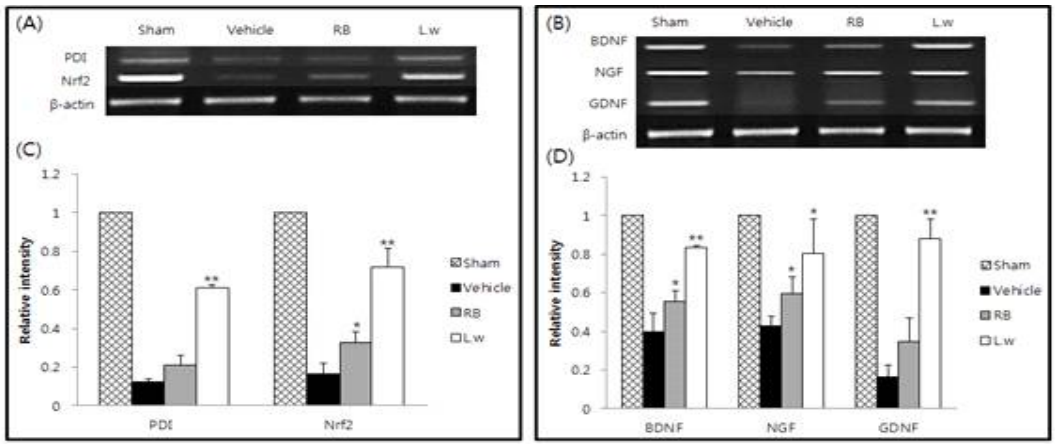


Fig. 3-2. Effects of RB and L.w on the gene expressions of PDI, Nrf2, BDNF, GDNF and NGF in the ipsilateral whole brain of the lesioned area. (A, B) Specific gene expressions were determined in relation to the expression of β-actin using RT-PCR. (C, D) The levels of PDI, Nrf2, BDNF, GDNF and NGF gene expression were significantly increased in the L.w treated group compared with the individual vehicle group. Experiments were repeated three times and individual values are expressed as the mean ± S.E.M.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group.

(3) MCAO 수행 후 RB와 L.w에서의 뉴런 수 비교 효과는 Immunohistochemistry를 통해 Hippocampus의 Dantate Gyrus. CA1, CA3 부위에 존재하는 Neuron의 세포수를 확인하였다. Dantate Gyrus와 CA1, CA3 부위에서의 Neuron 수는 Vehicle 그룹에 비해 RB와 L.w 그룹이 더 많았다. L.w를 처리한 Dantate Gyrus와 CA1 부위에서는 Neuron 수가 유의하게 증가함을 보였다.(Fig. 3-3)

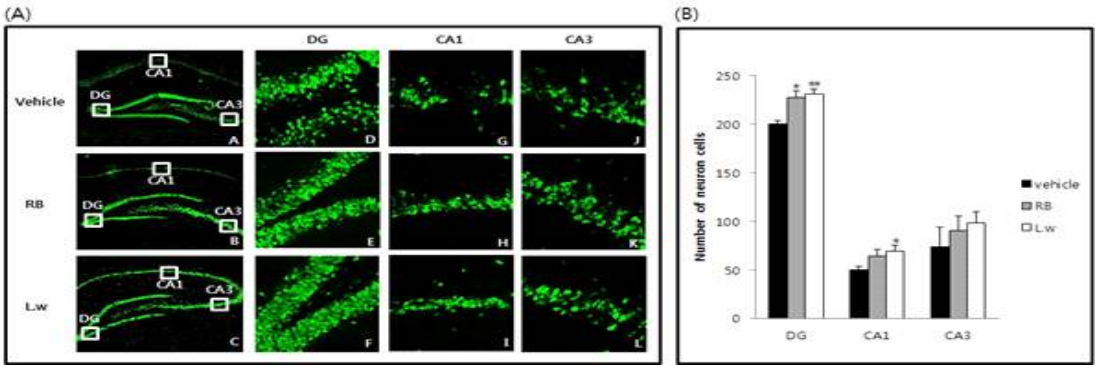


Fig 3-3 Effects of RB and L.w on the expression of NeuN. (A) IHC showed NeuN positive neurons (green); a neuronal marker in the hippocampus at 3 days after MCAO (200x). (B) Density of neural cells expressed NeuN was significantly increased in the extracts of RB and L.w treated group compared with the individual vehicle group. Data are the mean ± S.E.M. (n=3)

* *p<0.05*, ** *p<0.01* vs. individual vehicle group

(4) MCAO 수행 후 RB와 L.w에서의 synaptophysin의 효과는 Immunohistochemistry를 통해 Hippocampus의 CA1 부위에 존재하는 neuron내에 synaptic vesicle의 수를 확인하였다. L.w를 처리한 CA1 부위에서 synaptic vesicle 수가 유의하게 증가함을 보였다.(Fig. 3-4)

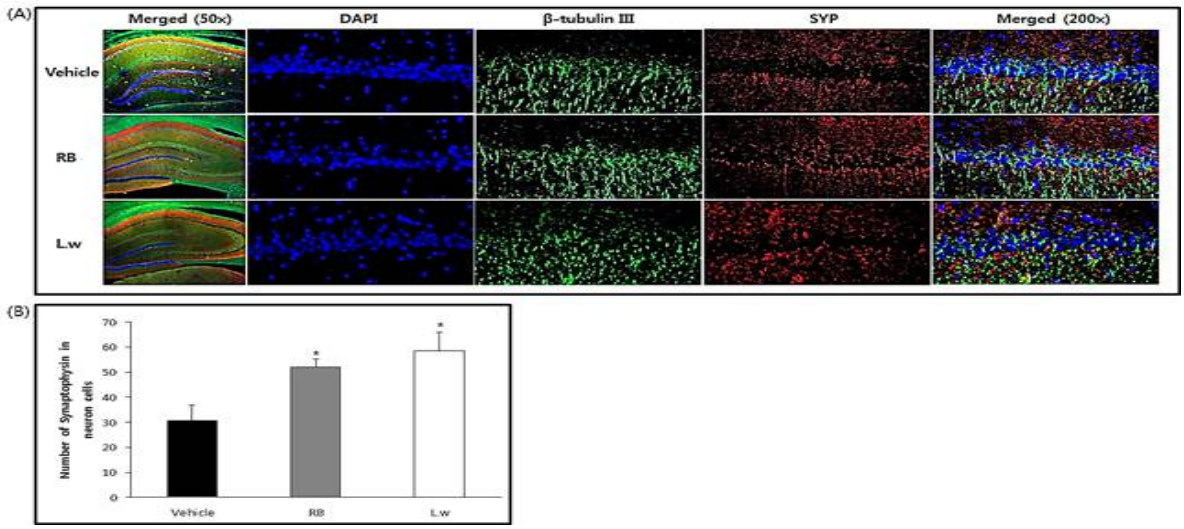


Fig. 3-4. Extracts effect of RB and L.w on the expression of â-Tubulin III and SYP.

(A) IHC showed â-Tubulin III positive (green); a neuronal microtubule marker, SYP positive (red); a synaptophysin marker and the double-labeling of â-Tubulin III (green), SYP (red) in the hippocampal CA1 region at 3 days after MCAO (200x). (B) SYP expression was significantly increased in the extracts of RB and L.w treated group compared with the individual vehicle group. Data are the mean ± S.E.M. (n=3)

* *p<0.05*, ** *p<0.01* vs. individual vehicle group.

(5) MCAO 수행 후 RB와 L.w에서의 GAD6과 GABA receptor의 효과는 Immunohistochemistry를 통해 Hippocampus의 CA1 부위에 존재하는 GAD67을 확인하였다. RB-PCR로 GABA A receptor의 발현을 확인하였다. L.w를 처리한 CA1 부위에서 GAD67 유의하게 증가하였고, GABA A receptor 발현이 증가하였다. (Fig. 3-5)

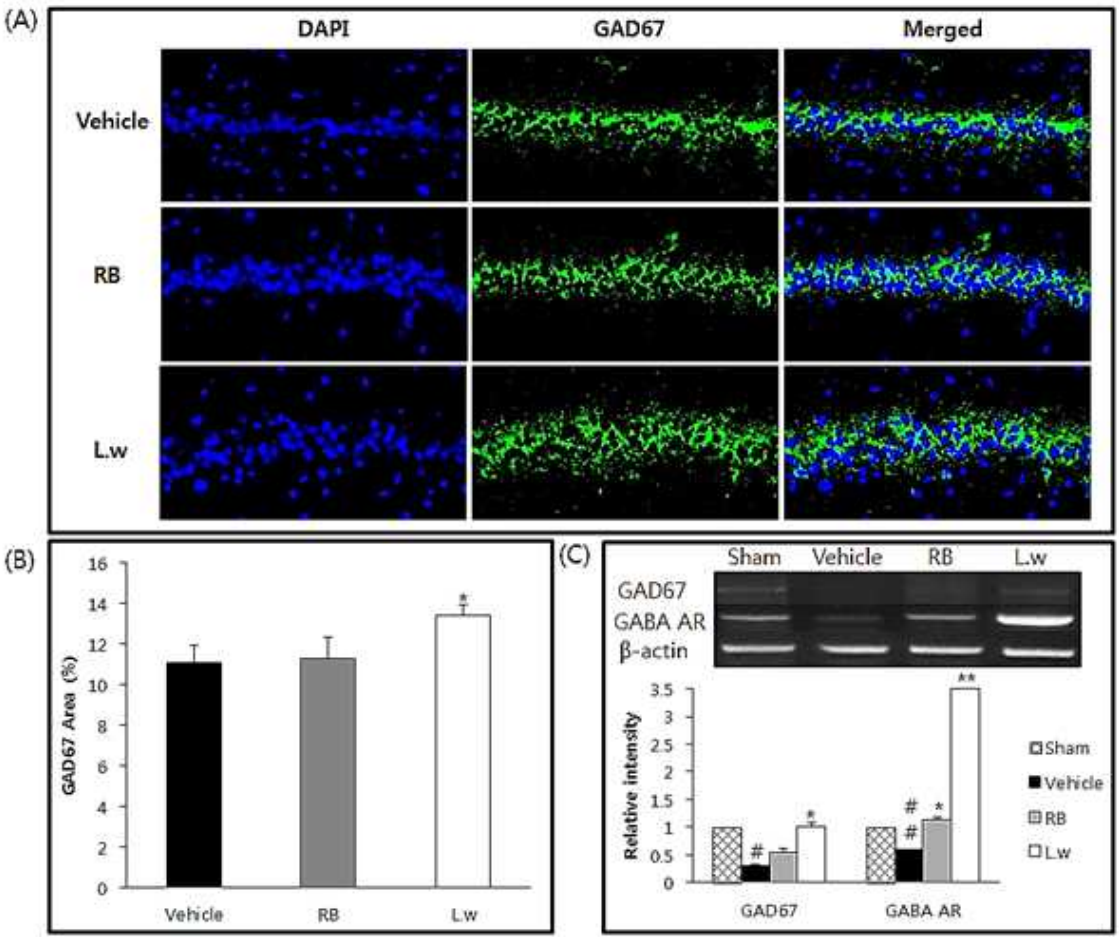


Fig. 3-5. Extracts effect of RB and L.w on the expression of GAD67 and GABA receptor A.

(A) IHC showed GAD67 positive (green); a GAD67 marker in the hippocampal CA1 region at 3 days after MCAO (200x). (B) GAD67 expression was significantly increased in the extracts of L.w treated group compared with the individual vehicle group. (C) GAD67 and GABA receptor A expression was significantly increased in the extracts of L.w treated group compared with the individual vehicle group. Data are the mean ± S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group

다. 요약

허혈성 뇌졸중이 발생되면 infarct이 생성됨과 동시에 여러 가지 항산화 유전자와 신경조절 물질들이 감소하게 된다. 이는 apoptosis를 유발하게 되며 neuronal cell death가 일어난다. 미강열수추출물(RB) 또는 미강발효추출물(L.w)을 이용해 뇌졸중의 신경학적 기능 회복을 검증하

였다. RT-PCR을 통하여 항산화 유전자인 PDI, Nrf2가 증가됨을 확인하였다. 또한 신경조절물질인 BDNF, NGF, GDNF 등이 증가함을 보였다. 뇌졸중에 의한 apoptotic cells의 수를 측정한 결과, 미강발효추출물을 처리한 실험동물의 대뇌피질과 선조체에서 감소함을 보였다. Immunohistochemistry를 이용하여 미강발효추출물을 처리한 실험동물에서 해마의 신경세포들이 증가함을 나타내었다. 또한 미강발효 추출물은 synaptophysin과 GABA 신경세포를 증가시켰다. 이를 통해 실험동물에 각각 처리된 미강발효추출물에 의한 기능회복 효과를 확인하였으며, 이것은 신경전달물질, 신경 회로망의 증가에 기인한다고 추측된다.

4. 우울증 모델의 해마에서 뇌세포사멸, 신경 회로망 관련 유전자 발현을 양성대조군인 fluoxetine 그룹과 비교

가. 실험방법

(1) 우울증과 불안장애 모델 정립 : 실험동물을 Restrainer에 의해 Stress를 유도하였다. Restraint stress는 움직임을 박탈하는 방식으로 짧은 시간동안 우울증과 불안장애 같은 정신질환을 유도할 수 있고, 이는 Learned helplessness의 학습된 무기력을 이용한 방법이다. Restraint Stress는 총 2주 동안 매일 4시간씩 이루어지고, 1주되는 날부터 2주째 되는 날까지는 Restraint Stress와 함께 미강 추출물과 serotonine reuptake inhibitor인 fluoxetine (FLX)을 복강주입 하였다.

(2) Corticosterone 호르몬 측정 : RS 수행 후 실험동물의 복강을 개복하여 혈관에서 혈액을 채취하고 혈장 분리 후 Corticosterone kit을 이용하여 stress hormone인 Corticosterone 호르몬을 측정하였다.

(3) 우울증/ 불안장애 행동평가 : 우울증의 행동평가로는 몸무게 측정과 Forced Swimming Test(FST)을 시행하였다. 불안장애의 행동평가로는 몸무게 측정과 Elevated Plus Maze test(EPM)을 시행하였다. 우울증과 같은 정신질환은 몸무게 감소의 경향을 나타낸다. 몸무게 측정은 매일 Restraint Stress가 이루어지기 전에 몸무게를 측정하여 기록하였다. Forced Swimming Test(FST)는 강제수영평가로 우울증의 행동평가로 흔히 사용되어지며, Immobility, Swimming 이 2가지 측정으로 이루어진다. 첫 날은 Pre-test session으로 강제로 수영을 15분 동안 시키고, Test session인 24시간 뒤에 5분 동안 immobility와 Swimming 정도를 측정하였다. 여기서 Immobility는 수면 밖으로 머리를 내 놓는데 필요한 움직임 외에는 아무 움직임이 없는 상태로 절망행동의 지표로 사용된다. 불안장애의 행동평가인 Elevted Plus Maze test(EPM)은 새로운 환경을 탐색하고자하는 경향과 개발되고 높은 공간에 대해 혐오적인 을 보이는 경향을 측정함으로 동물의 혐오적인 응을 확인 할 수 있는 평가이다. 불안장애를 보이는 동물의 경우 기본 탐색활동의 저하가 나타나고 혐오환경에 보다 민감한 반응을 나타내는 경우가 많으므로 정서적인 불안수준을 측정할 수 있다. 실험동물을 Open arms와 Closed arms로 나누어져 있는 장비의 중간 플랫폼에 실험동물을 두고 5분 동안 관찰하는 방식으로 진행하였었다.

(4) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰을 시행 후, 각 그룹별로 뇌조직을 준비한다. TRI-reagent, chloroform과 isopropanol을 이용하여 Sample에서 mRNA를 추출한 뒤, cDNA로 합성 후 PCR을 이용하여 확인하고자 하는 gene을 증폭시켜 전기영동으로 확인하였다.

(5) In situ cell death detection (Apoptotic kit) : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰행을 시행 후 각 그룹별로 뇌조직을 준비한다. 실험동물을 희생한 후, Apoptotic cell을 확인 할 뇌 부위를 molding 한 후 Cryostat으로 고정한 뇌조직을 동결절편 한다. 절편 된 조직은 고정한 후, TUNEL reagent 을 처리하여 Apoptosis가 일어난 cell을 확인하였다.

(6) Immunohistochemistry : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰을 시행 후, 각 그룹별로 Sampling을 진행하였다. Sampling은 Perfusion과 Molding 그리고 Cryostat으로 조직을 절편하였다. 조직을 고정한 후 Primary antibody 처리와 Secondary antibody 처리를 통해 유전자를 확인히였다. 이에 사용 되는 Antibody는 NeuN, SYP와 serotonine이다.

나. 실험결과

(1) RS 수행 후 Corticosterone 호르몬에 대한 RB와 L.w의 효과는 각 처리군 실험동물의 혈액을 채취하여 ELISA로 스트레스 호르몬인 Corticosterone을 측정하였다. L.w를 처리한 군은 stress군보다 Corticosterone이 감소하였다. (Fig. 4-1)

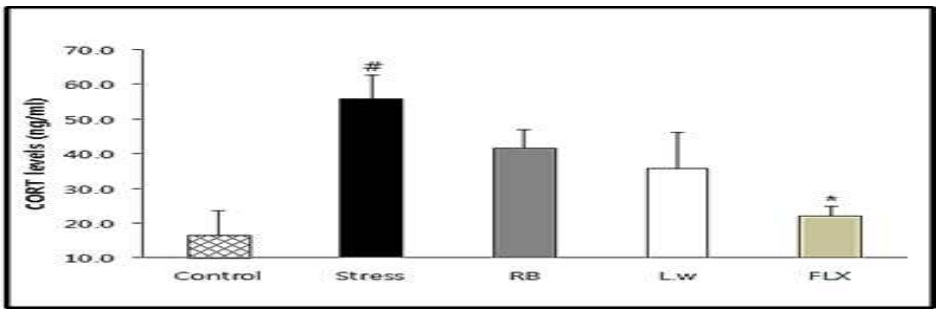


Fig. 4-1. Extracts effect of RB, L.w and FLX on the serum CORT levels

The serum levels of CORT in the blood from Control, Stress, RB, L.w and FLX groups. Data are shown as means S.E.M. (n=5)

* $p<0.05$ vs. individual stress group

(2) RS 수행 후 Apoptosis에 대한 RB와 L.w의 효과는 Hippocampus의 DG, CA1과 CA3부위로 나누어서 TUNEL assay를 하였다. Hippocampus의 DG, CA1과 CA3부위의 Apoptotic cells는 L.w과 FLX 그룹에서 유의성있게 감소하였다.(Fig. 4-2)

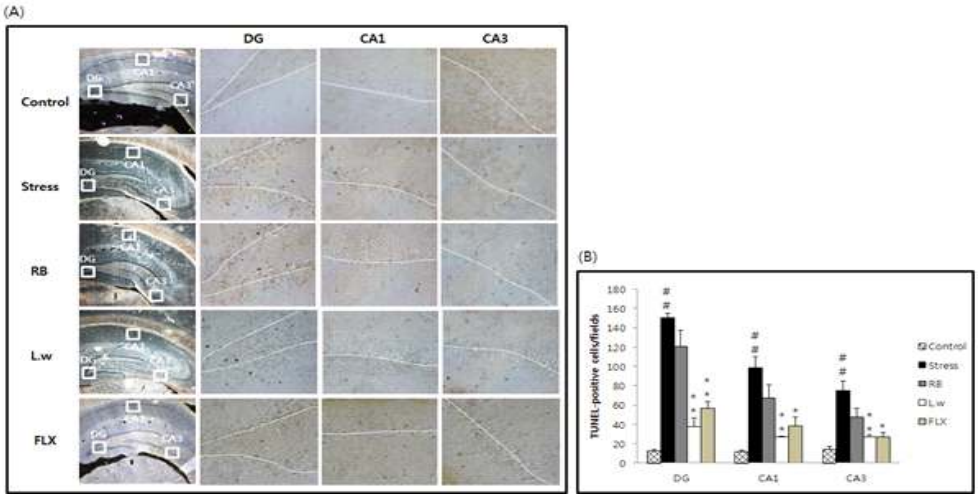


Fig. 4-2. Effects of RB, L.w and FLX on TUNEL staining (A) TUNEL staining in the hippocampus area of CA1, CA3, DG of five experimental groups (200x). (B) Quantitative analysis of the number of TUNEL-positive cells. Data are shown as means S.E.M. (n=3)

* *p<0.05*, ** *p<0.01* vs. individual stress group, # *p<0.05*, ## *p<0.01* vs. individual control group.

(3) RS 수행 후 우울증/불안장애 행동평가는 우울증 행동평가인 Forced Swimming Test(FST)에서 Stress와 Saline이 주입된 Stress 군과 비교하였을 때 Stress와 L.w가 주입된 L.w군의 Immobility time이 감소하고 Swimming time은 증가하였다. 불안장애 행동평가인 Elevated Plus maze test(EPM)에서 L.w 군이 Open arms에 머무르는 시간이 증가하였고, Closed arms에 머무르는 시간은 감소하였다. L.w 주입은 우울증/불안장애 행동을 유의하게 감소시켰다.(Fig. 4-3)

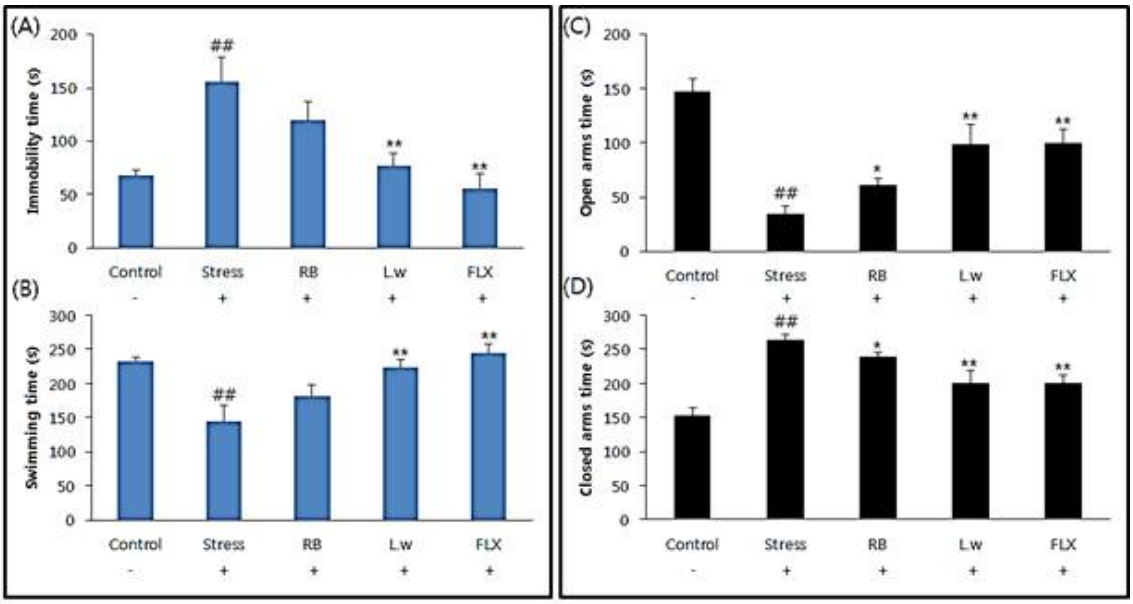


Fig. 4-3. Extracts effect of RB, L.w and FLX on the depression/anxiety-like behavior tests after 14 days RS

(A, B) Statistical analysis of behavioral data from the FST showed that the immobility time and swimming time in Control, Stress, RB, L.w and FLX groups. (C, D) Statistical analysis of behavioral data from the EPM showed that the Closed alleys and Open alleys Control, Stress, RB, L.w and FLX groups. Data are shown as means S.E.M. (n=5)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual stress group, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. individual control group

(4) RS 수행 후 RT-PCR을 통한 RB와 L.w의 신경조절물질에서의 mRNA의 발현은 Neurotrophic factor gene인 BDNF, NGF, GDNF의 발현을 확인하였다. BDNF의 primer를 이용해 발현정도를 확인한 결과, stress에 비해 L.w와 FLX 그룹에서 significant하게 발현정도가 증가하였고, NGF와 GDNF 발현정도 결과, Vehicle에 비해 L.w와 FLX 그룹이 증가하는 경향이 보였다. L.w 그룹의 신경조절물질 유전자의 발현이 가장 유의하게 증가함을 확인하였다.(Fig. 4-4)

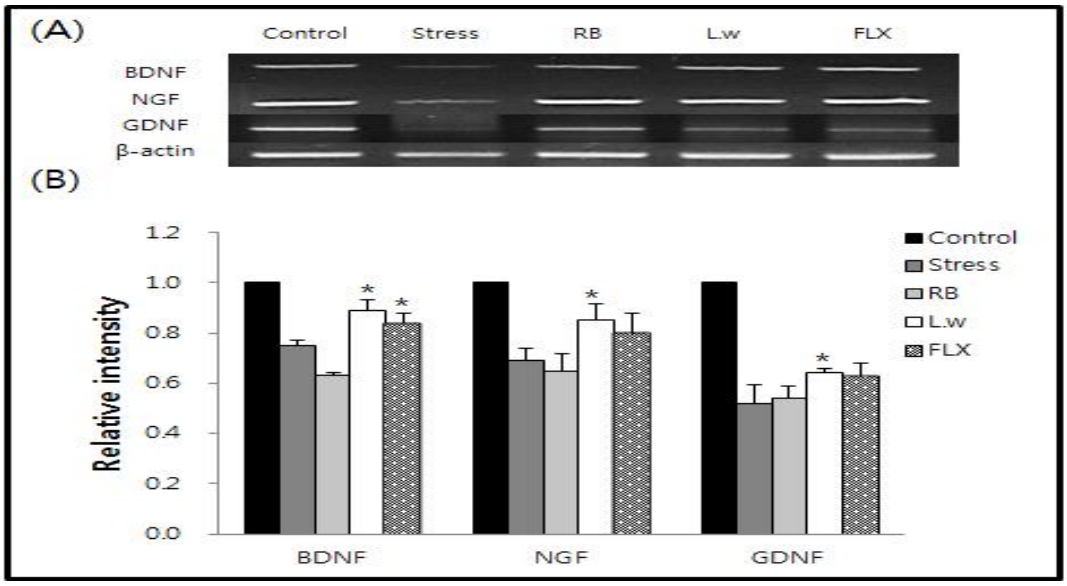


Fig. 4-4. Effects of RB, L.w and FLX on the gene expressions of BDNF, NGF and GDNF in the half whole brain of RS models

Specific gene expressions were determined in relation to the expression of β-actin using RT-PCR. The levels of BDNF and NGF gene expression were significantly increased in the L.w treated group compared with the individual stress group. Experiments were repeated three time and individual values are expressed as the mean ± S.E.M.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual stress group, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. individual control group

(5) RS 수행 후 RB와 L.w에서의 뉴런 수 비교 효과는 Immunohistochemistry를 통해 Hippocampus의 Dantate Gyrus. CA1, CA3 부위에 존재하는 Neuron의 세포수를 확인하였다. Dantate Gyrus와 CA1, CA3 부위에서의 Neuron 수는 Vehicle 그룹에 비해 RB와 L.w 그룹에서 증가하였다. Dantate Gyrus와 CA1 부위에서는 L.w와 FLX의 Neuron 수가 유의성있게 증가하였였다.(Fig. 4-5)

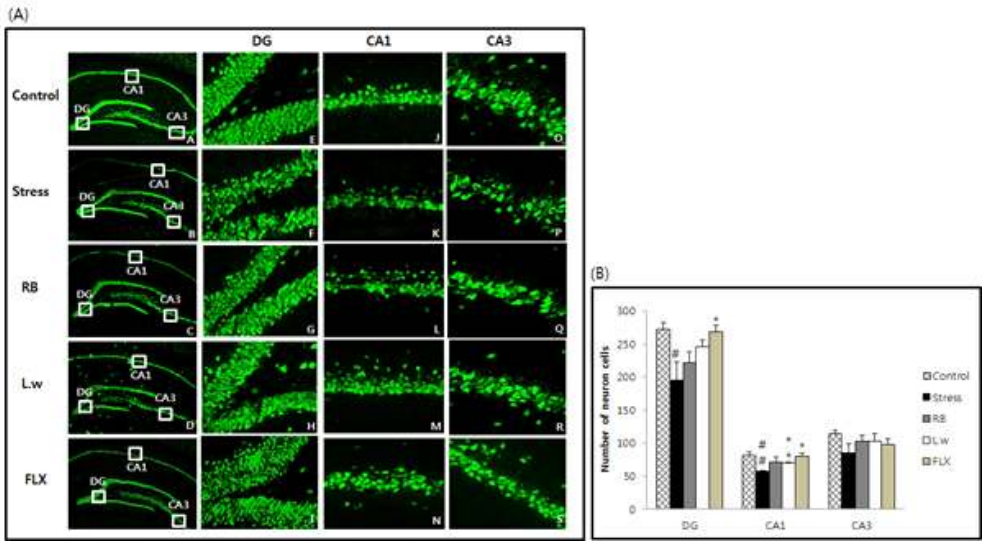


Fig. 4-5. Effects of RB, L.w and FLX on the expression of NeuN (A) IHC showed NeuN positive neurons (green); a neuronal marker in the hippocampus at 16 days after restraint stress (200x). (B) NeuN expression was significantly increased in the extracts of L.w and FLX treated groups compared with the individual stress group. Data are shown as means S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual stress group, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. individual control group

(6) RS 수행 후 RB와 L.w에서의 synaptophysin의 효과는 Immunohistochemistry를 통해 Hippocampus의 CA1 부위에 존재하는 neuron내에 synaptic vesicle의 수를 확인하였다. L.w를 처리한 CA1 부위에서 synaptic vesicle 수가 유의하게 증가함을 보였다. (Fig. 4-5)

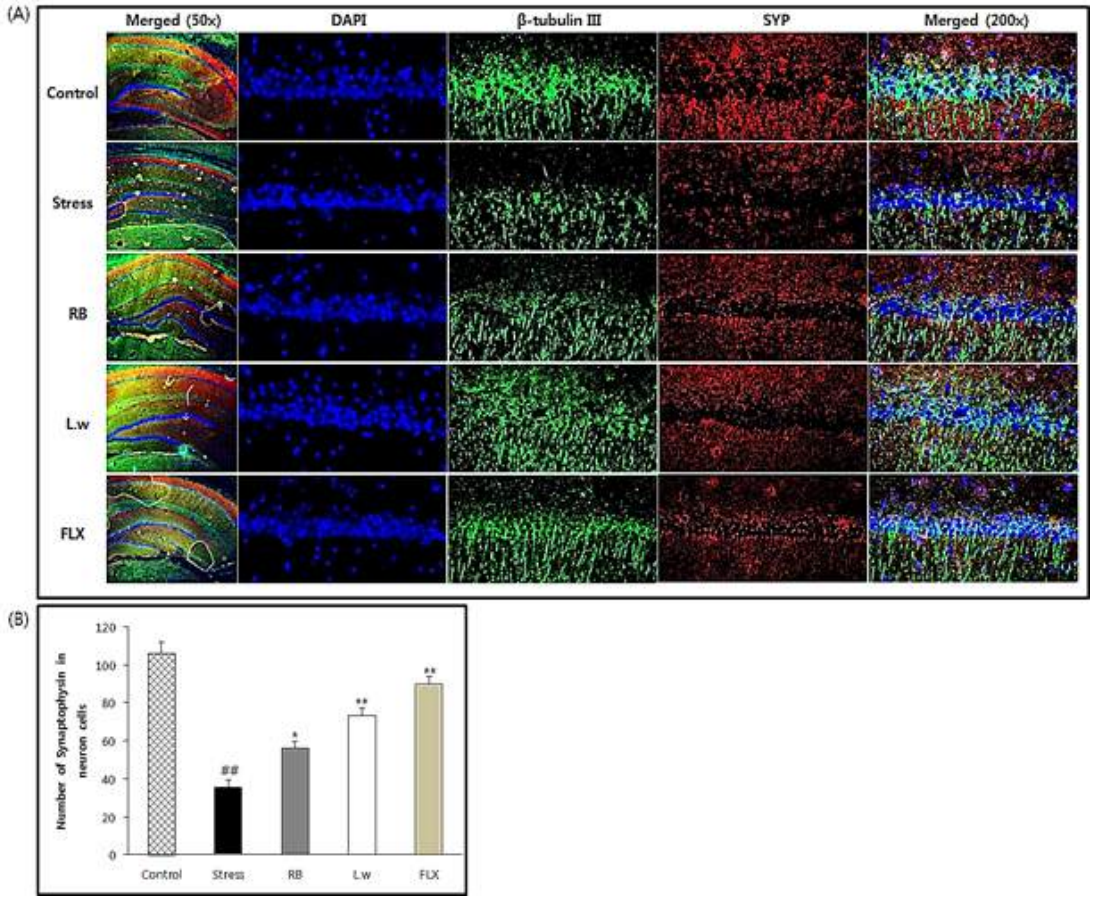


Fig. 4-5. Extracts effect of RB, L.w and FLX on the expression of â-Tubulin III and SYP

(A) IHC showed â-Tubulin III positive (green); a neuronal microtubule marker, SYP positive (red); a synaptophysin marker and the double-labeling of â-Tubulin III (green), SYP (red) in the hippocampal CA1 region at 14 days after restraint stress (200x). (B) SYP expression was significantly increased in the extracts of RB, L.w and FLX treated each group compared with the individual stress group. Data are shown as means S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual stress group, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. individual control group

(7) RS 수행 후 RB와 L.w에서의 5-HT (Serotonine)의 효과는Immunohistochemistry를 통해 Hippocampus의 CA1 부위에 존재하는 neuron내에 Serotonine의 수를 확인하였다. L.w를 처리한 CA1 부위에서 Serotonine수가 유의하게 증가함을 보였다.(Fig. 4-6)

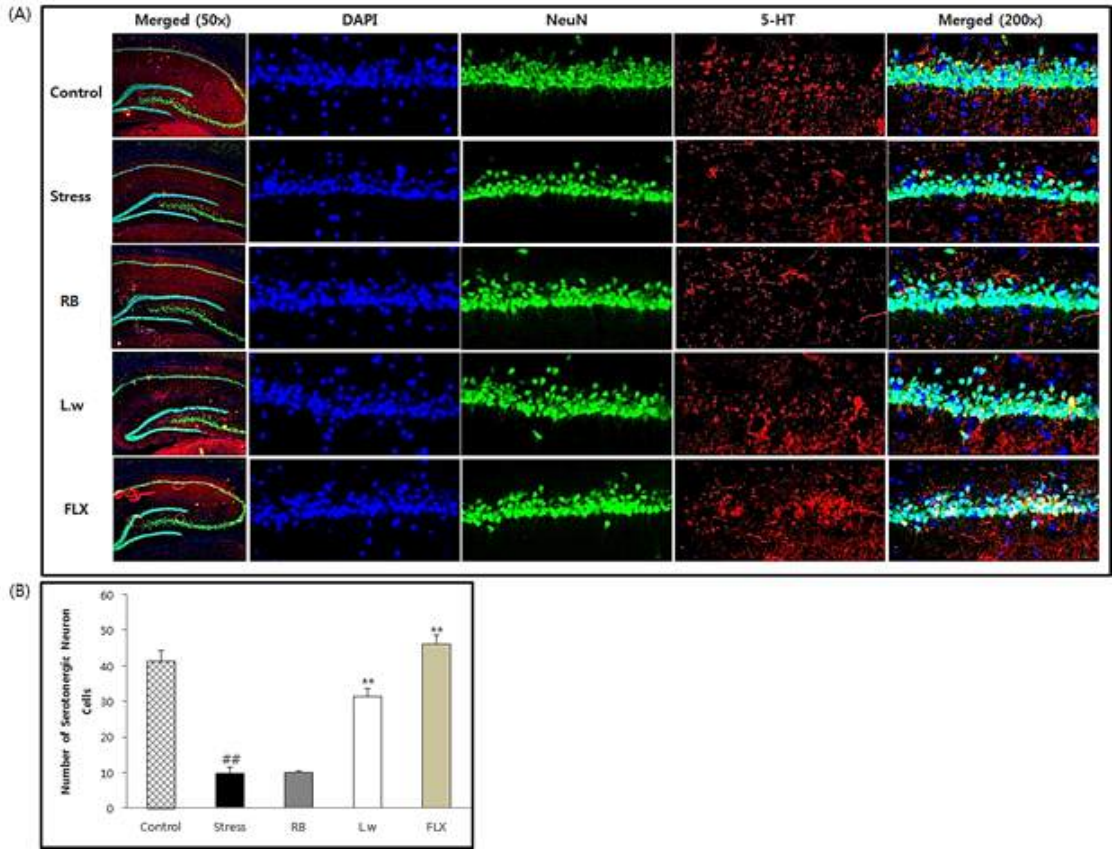


Fig. 4-6. Extracts effect of RB, L.w and FLX on the expression of NeuN and 5-HT

(A) IHC showed NeuN positive neurons (green); a neuronal marker, 5-HT positive (red); a serotonin marker and the double-labeling of NeuN (green), 5-HT (red) in the hippocampal CA1 region at 14 days after restraint stress (200x). (B) 5-HT expression was significantly increased in the extracts of L.w and FLX treated each group compared with the individual stress group. Data are shown as means S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual stress group, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. individual control group

다. 요약

Restraint stress (RS)를 통해 유도된 우울증/불안장애 실험동물에서 미강열수추출물(RB)과 발효미강추출물(L.w)이 스트레스호르몬인 Corticosterone을 감소시켰으며 행동평가의 향상 효과가 있었다. RT-PCR을 통하여 신경조절물질인 BDNF, NGF, GDNF 또한 증가함을 보였다. Restraint stress에 의해 유도된 우울증/불안장애의 apoptotic cells의 수를 측정한 결과, L.w 그룹에서 Hippocampus의 DG, CA1과 CA3부위에서 감소함을 보였다. Immunohistochemistry를 통해 신경세포를 해마에서 L.w를 처리한 실험동물에서 신경세포들이 증가함을 나타내었다. 또한 L.w 처리군에서 synapse marker인 synaptophysin과 5-HT가 증가하였다. 이를 통해 우울증/불안

장애에서 L.w에 의한 기능회복 효과를 실험을 통하여 확인하였다.

5. 뇌경색 모델에서 천마추출물의 혼합효과 평가

가. 실험방법

(1) 중대뇌동맥 결찰(middle cerebral artery occlusion; MCAO)에 의한 뇌손상 유도는 실험동물은 평균 체중 250±20g의 Sprague Dawley를 사용하며, 실험동물 마취 후 좌측 총경동맥을 속목동맥과 바깥목동맥의 분지지점까지 노출시킨다. 바깥목동맥 양쪽을 묶은 후 중간지점을 자른다. 바깥목동맥로부터 나일론사를 이용해 속목동맥를 폐쇄한다. 그 후 1시간 동안 중대뇌동맥(MCA)의 혈관폐쇄를 통한 혈액공급의 중단을 유지한다.

(2) 행동테스트는 모든 실험동물이 MCAO 수행 1일 전과 MCAO 수행 후 1, 3일에 종합적인 행동 테스트를 한다. 행동테스트는 modified Neurological Severity Score(mNSS)로 MCAO 수행 전과 후의 행동 양상을 비교 및 평가하기 위해 만들어졌다. MCAO 전 3일 간 훈련시킨다. 실험은 3번을 반복하여 평균을 백분율로 나타낸다. mNSS에서 신경학적인 기능을 0에서 18점으로 나타내며, 정상일 때는 0이고, 최대치의 손상을 18로 나타낸다. mNSS는 모터, 지각, 반사, 균형을 시험하는 혼합 테스트이다

(3) 조직염색(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride : TTC) : MCAO에 의해 뇌손상이 유도된 흰쥐에서 얻은 뇌조직을 2mm 두께로 조직을 절편하여 2% TTC용액에 조직을 염색한다. TTC가 살아있는 미토콘드리아에 염색이 되어 손상된 뇌조직은 하얗게, 정상조직은 빨갛게 염색이 된다.

나. 실험결과

(1) MCAO 수행 3일째에 Infarct volume에서 L.w, HBA와 HBA+L,w의 효과는 각 그룹의 Total volume의 Vehicle은 약 54%, L.w는 약 22%, HBA는 약 42%, 그리고 HBA+L,w는 약 34%의 Infarct 나타내었고, Cortex는 순서대로 각각 약 28%, 13%, 26%, 22%로 나타났으며, Striatum은 각각 약 25%, 8%, 15%, 12%로 나타났다. L.w와 HBA+L,w처리 그룹간의 큰 차이는 없었다. (Fig. 5-1)

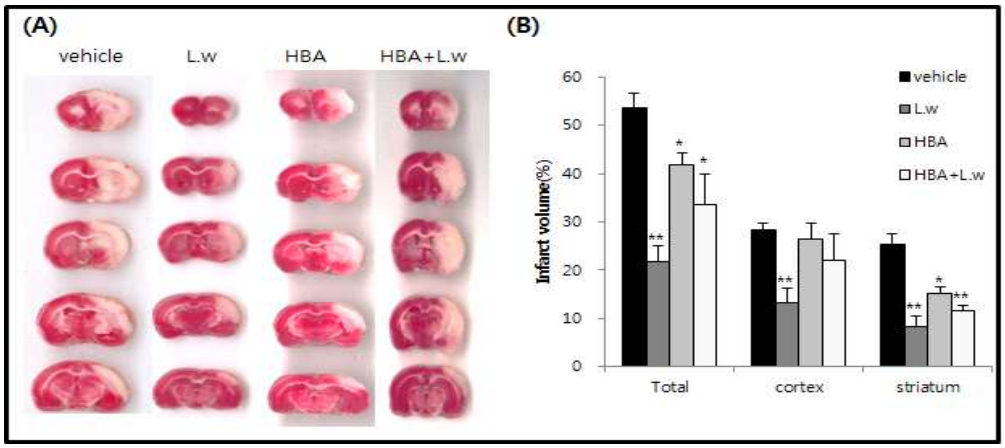


Fig. 5-1. Effects of L.w, HBA and HBA+L.w on the infarct volume at 3 days after MCAO. (A) TTC-stained coronal section from vehicle, L.w, HBA and HBA+L.w (B) The infarct volume was calculated as the infarct areas x thickness (2mm) and expressed as a percentage of the lesion half of the brain. The extracts of L.w, HBA and HBA+L.w groups show a significantly lower infarct volume than the vehicle group 3 days after MCAO. Data are shown as means S.E.M. (n=5)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group

(2) MCAO 수행 후 기능 행동 회복에서의 L.w, HBA와 HBA+L,w의 효과는 MCAO 수행 뒤 1일째, 3일째에 행동기능검사인 mNSS를 시행한다. 1일째에 모든 그룹이 11~13점으로 Severe한 행동양상을 나타냈다. 3일째에는 Vehicle이 약 12.3점, L,w는 약 11.3점, HBA는 약 10.7점, HBA+L,w는 약 11.3점으로 나타났다. L,w와 HBA+L,w 처리군의 행동 평가에서 큰 차이가 없었다. (Fig. 5-2)

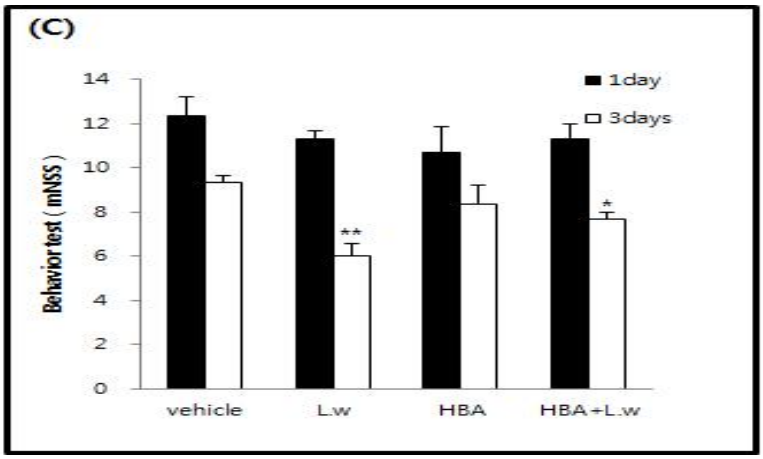


Fig. 5-2. Effects of L.w, HBA and HBA+L.w on functional behavioral recovery after MCAO.

Neurological functional tests were performed at 1 and 3 days after MCAO. The extracts of L.w and HBA+L.w groups shows significantly lower mNSS score than the vehicle group 3 days after MCAO. Data are shown as means S.E.M. (n=5)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group

다. 요약

허혈성 뇌졸중이 발생되면 infarct이 생성됨과 동시에 여러 가지 항산화 유전자와 신경조절 물질들이 감소하게 된다. 미강발효추출물(L.w)을 이용한 뇌졸중의 신경학적 기능 회복은 앞에 결과를 통하여 검증되었다. 뇌질환의 효과적인 치료효과를 보인다고 알려진 천마추출물인 HBA를 L.w와 혼합 처리하여 허혈성 뇌졸중에서의 치료 효과를 확인하기 위해 infarct volume 측정과 TTC염색, 그리고 신경학적 기능평가인 mNSS를 실시하였다.

6. 세포배양을 이용한 Compound X(SCX/3)의 BDNF, NGF, GDNF, 신경회로, 항산화 유전자들의 발현에 대한 평가

가. 실험방법

(1) PC12 cell을 RPMI 1640, 1X, with 2.05mM L-Glutamine(HyCloneTM, #SH30027.01)와 5% fetal bovine seurm(FBS), 10% Heat-inactivated Hourse Serum, 100units/ml penicillin/streptomycin을 넣은 culture media에 37℃, 5% CO_2의 대기조건을 갖춘 Incubator에서 2~3일정도 배양한다.

(2) Drug treatment : 배양한 pc12 cell을 각 well에 1×10^5cell/ml씩 깔아준 후 Group1 : vehicle, SCX/3, Ferulic acid, Dihydroferulic acid(50μM in culture media) Group2 : Dihydroferulic acid(6.25, 12.5, 25, 50μM in culture media)로 나누어 24h동안 처리한 후 H_2O_2를 처리하여 oxidant한 상태로 apoptosis를 유도한다.

(3) Cell Apoptosis 관찰 : Apoptosis가 일어난 cell을 관찰하기 위해 Trypan Blue Assay법을 이용한다. Drug와 H_2O_2 treatment가 끝난 cell을 10,000rpm에서 5분간 centrifuge하여 모아준다. 모은 cell을 serum free media 100μl에 single cell 상태가 되도록 충분히 풀어준다. 충분히 풀어진 cell에 media와 동량의 0.4% trypan blue solution(Sigma-Aldrich, #T8154)를 넣고 5분 동안 반응 시킨 후 apoptosis가 일어난 cell 수와 live cell 수를 counting하여 Viability를 측정한다.

(4) Reverse Trascription - Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) : maker 유전자 탐색을 위해 Tri-reagent(Sigma, T-9424), chloroform, isopropanol을 이용하여 세포에서 total mRNA를 추출한다. 추출한 mRNA를 다시 cDNA로 합성한 후 PCR법을 이용하여 원하는 gene을 증폭시킨 뒤 전기영동을 통해 발현 정도를 관찰한다. 각 gene은 Anti-oxidant, Neurotrophic factor로 발현정도를 밝히는데 Anti-oxidant gene은 nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2)이고 Anti-oxidant에 따른 apoptotic cell death는 PDI를 사용한다. Neurotrophic factor로는 glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF), brain-derived neurotrophic factor(BDNF), nerve growth factor(NGF)를 사용하며 Housekeeping gene으로는 β-actin을 사용하여 관찰한다.

나. 실험결과

(1) H_2O_2로 유도된 세포사멸에서의 SCX/3, FA. dFA와 농도별 dFA의 효과는 예비실험으로 H_2O_2를 농도별 처리했을 때 50mM에서 50% 생존율을 확인 후 vehicle, SCX/3, FA, dFA를 처리하여 효과를 확인하였다. SCX/3, FA, dFA에서 생존율이 통계적으로 유의하게 높았고 dFA가 생존율이 제일 높다(Fig. 6-1a). 또한 dFA 농도가 50μM까지 점차적으로 생존율이 높았다(Fig. 6-1b).

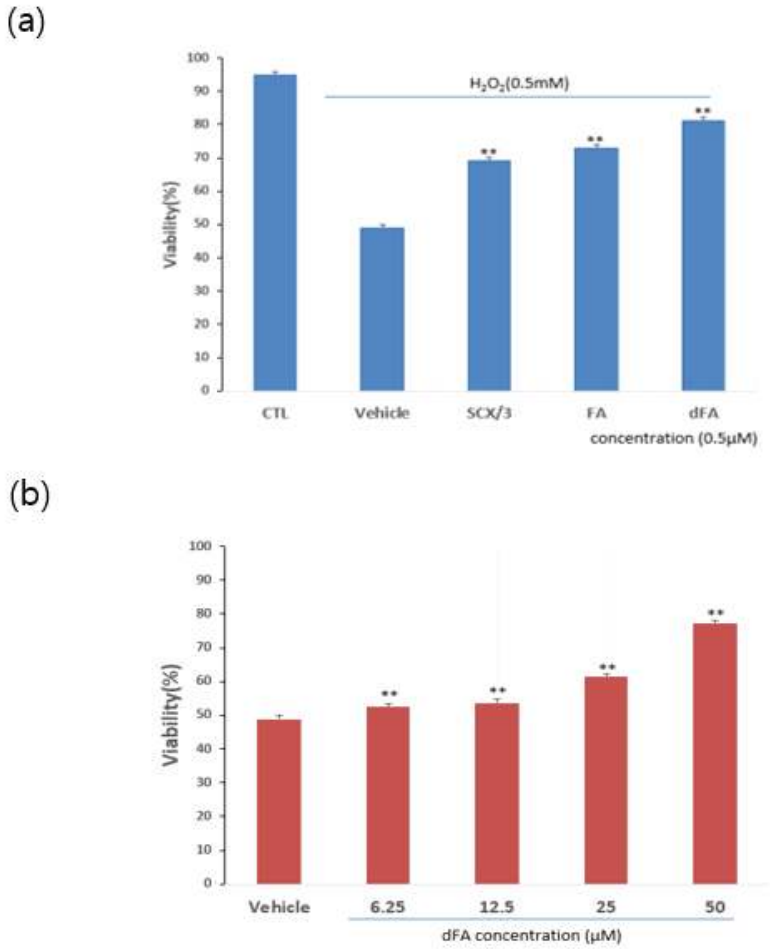


Fig. 6-1. Effect of of SCX/3, FA, dFA treatment on H_2O_2-induced cell death of PC12 cell (a) Viability of vehicle, SCX/3, FA, dFA. vehicle, SCX/3, FA, dFA. (b) Viability of different concentration of dFA. The viability was calculated from the percentage ratio of live cell number to the total cell number. vehicle, SCX/3, FA, dFA, different concentration of dFA was treated to the cell for 24h before 30min-H_2O_2 treatment. Data are shown as means S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$. ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group

(2) 신경회로, 항산화 유전자들의 발현에서 SCX/3, FA, dFA와 농도별 dFA의 효과는 dFA는 NGF, PDI, Nrf2 유전자 발현을 증가시켰고 이는 뇌 기능 회복에 도움을 줄 것으로 추측된다 (Fig. 6-2a). NGF, PDI, Nrf2가 50mM까지 농도가 높을수록 발현이 높았다(Fig. 6-2b).

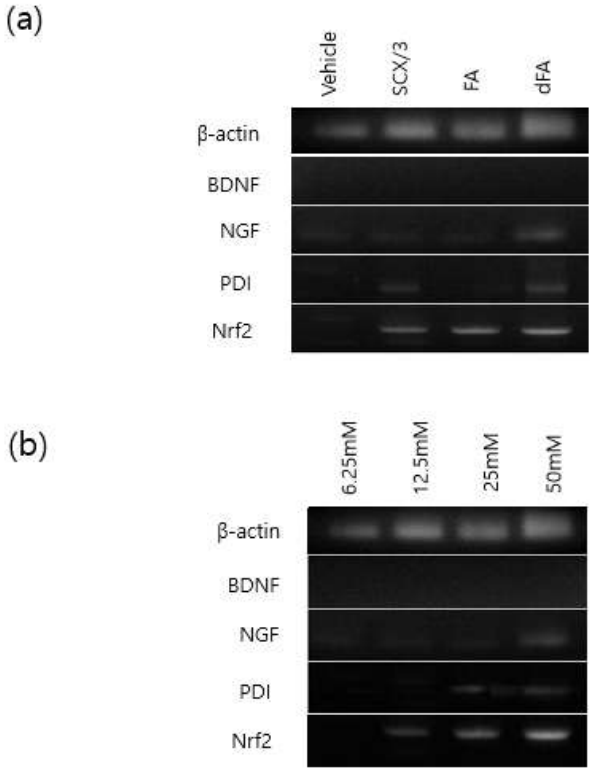


Fig. 6-2. Effect of of SCX/3, FA, dFA on gene expression of nuerotrophic factors and antioxidant genes in PC12

(a) vehicle, SCX/3, FA, dFA on gene expression of neuroproective factor in PC12. (b) Different concentration of dFA on gene expression of neuroprotcetive factor in PC12.

다. 요약

SCX/3의 주요 성분이 dFA임을 밝혀냈다. SCX/3, FA, dFA에서 생존율이 통계적으로 유의하게 높았고 dFA가 생존율이 제일 높다. dFA를 농도별로 처리하였을 때 50μM까지 점차적으로 생존율이 높았다.

7. Compound X(SCX/3)를 사용하여 뇌경색 모델에서 뇌세포 사멸, 신경회로망, 신경영양유전자 발현을 sham 대조군과 비교 평가

가. 실험방법

(1) 중대뇌동맥 결찰(middle cerebral artery occlusion; MCAO)에 의한 뇌손상 유도는 실험동물은 평균 체중 250±20g의 Sprague Dawley를 사용하며, 실험동물 마취 후 사 좌측 총경동맥을 속목동맥과 바깥목동맥의 분지지점까지 노출시킨다. 바깥목동맥 양쪽을 묶은 후 중간지점을 자른다. 절단된 바깥목동맥로부터 나일론사를 이용해 속목동맥를 폐쇄한다. 그 후 1시간 동안 중대뇌동맥(MCA)의 혈관폐쇄를 통한 혈액공급의 중단을 유지한다.

1시간동안 뇌경색 후, 재관류 과정을 거친다

(2) 조직염색(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride : TTC) : MCAO에 의해 뇌손상이 유도된 흰쥐에서 얻은 뇌조직을 2mm 두께로 조직을 절편하여 2% TTC용액에 조직을 염색한다. TTC가 살아있는 미토콘드리아에 염색이 되어 손상된 뇌조직은 하얗게, 정상조직은 빨갛게 염색이 된다.

(3) Reverse Trascription - Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰을 시행 후, 각 그룹별로 뇌 조직을 준비한다. TRI-reagent, chloroform과 isopropanol을 이용하여 표본에서 mRNA를 추출한 뒤, cDNA로 합성 후 PCR을 이용하여 확인하고자 하는 항산화, 신경전달물질 유전자를 증폭시켜 전기영동으로 확인하였다.

(4) Immunohistochemistry : 흰쥐 실험동물에 중대뇌동맥 결찰을 시행 후, 각 그룹별로 뇌조직을 준비한다. 조직은 Perfusion과 Molding 한 후 Cryostat으로 조직을 절편한다. 절편 조직을 고정한 후 Primary antibody 처리와 Secondary antibody를 처리하였다. 이에 사용되는 Antibody는 NeuN, SYP, Iba Ⅰ, MGF-E8 등이다.

나. 실험결과

(1) MCAO 수행 후 3일째에 Infarct volume과 신경 기능 회복에서 SCX/3의 효과는 Group별로 각각 Saline과 SCX/3를 복강에 3일간 주사하였을 때 vehicle group보다 SCX/3 group의 뇌 손상 부위가 적다(Fig. 7-1a). 각 group의 total volume에서 vehicle은 약 46%, SCX/3는 약 17%로 나타났다(Fig. 7-1b). MCAO 수행 뒤 1일째, 3일째에 행동기능검사를 시행하였을 때 1일째 모든 그룹이 12~14점으로 심각한 행동양상을 나타내었고 3일째에는 vehicle이 약 10.4점, SCX/3는 7.8점으로 나타났다(Fig. 7-1c).

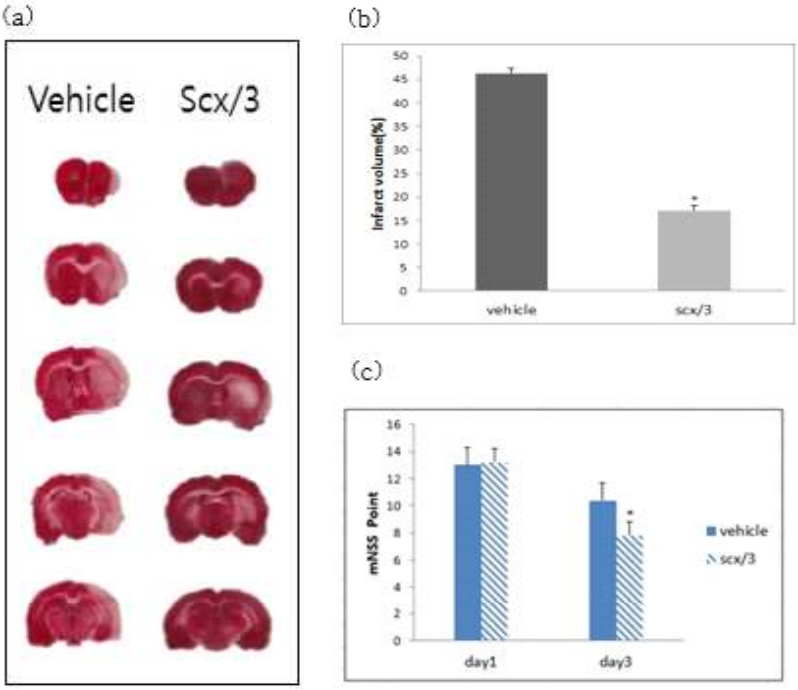


Fig. 7-1. Effect of of SCX/3 on infarct volume and functional behavioral recovery at 3days after MCAO

(a) TTC-stained coronal section from vehicle and SCX/3 group. (b) The infarct volume was calculated as the infarct areas x thickness(2mm) and expressed as a percentage of total section of the brain. (c) Neurological functional tests were performed at 1, 3days after MCAO. Data are shown as means S.E.M. (n=3)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. individual vehicle group.

(2) 뇌경색 모델에서 뇌세포 사멸, 신경회로망 관련 유전자인 SYP 발현에 대한 L.w의 효과는 TUNEL-positive cells 분석은 MCAO 후 3일 째 vehicle group과 비교하였을 때 L.w group에서 cortex의 TUNEL-positive cells이 감소하였고 focal cerebral ischemia 후 3일 째 vehicle group과 비교하였을 때 no anti-apoptotic effect가 나타났다(Fig. 7-2a, b). synaptic vesicle marker인 SYP와 neuronal microtubule β-Tubulin Ⅲ는 vehicle과 treated animals의 hippocampal CA1 지역에서 증가하였다. IHC는 L.w group에서 SYP의 발현이 vehicle group보다 유의 있게 높음을 나타냈다(Fig. 7-2c, d)

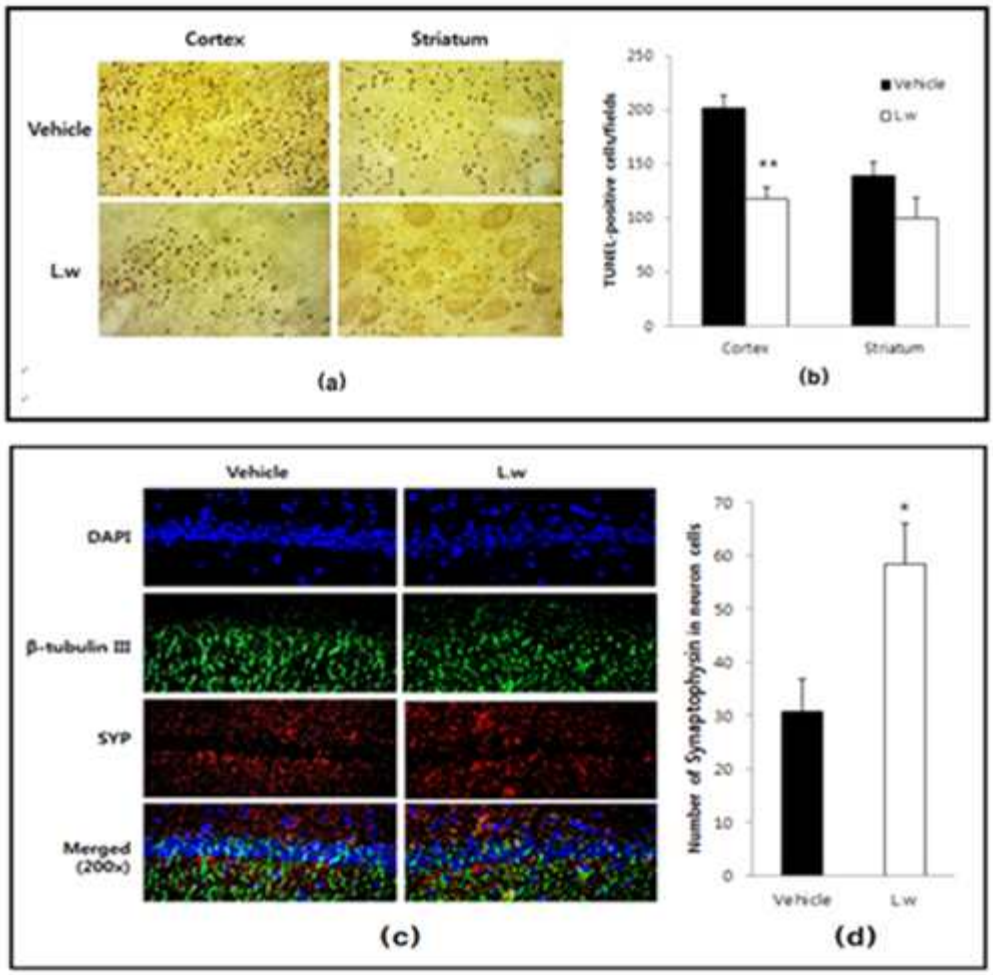


Fig. 7-2. Effect of LW on TUNEL staining and on the expression of SYP

(a) TUNEL staining in the cortex and striatum area of the ischemic lesioned side of vehicle and LW treatment (200×) (b) Quantitative analysis of the number of TUNEL-positive cells (c) IHC showed β-Tubulin III positive (green); a neuronal microtubule marker, SYP positive (red); a synaptophysin, synaptic vesicle marker and the double-labeling of β-Tubulin III (green), SYP (red) in the hippocampal CA1 region at 3 days after MCAO (200x) (d) SYP expression was significantly increased in the LW treated group compared with the individual vehicle group. Experiments were repeated three times and individual values are expressed as the mean ± SEM.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. individual vehicle group.

(3) ChAT, nAchR, DCX들의 발현에서 L.w의 효과는 콜린성 신경 marker ChAt은 vehicle과 treated animals group에서 평가한다. 각각 focal cerebral ischemia후 7일 째, sham, vehicle, DPZ, L.w group에서 ChAT-immunoreactive neurons의 수는 25.00 ± 1.00, 12.33 ± 2.96, 23.00 ± 1.53, and 22.00 ± 0.58이다. Immunohistochemistry는 L.w group에서

vehicle group보다 striatum에서 ChAT positive cell을 나타낸다 (Fig. 7-3a, b). RT-PCR은 acetylcholine receptor의 발현 정도에서 L.w의 효과를 분석하기 위해 실시하였다. acetylcholine receptor gene의 transcriptional level은 vehicle과 비교하였을 때 L.w group에서 의미 있게 증가하였다 (Fig. 7-3c, d). neuronal markers NeuN과 DCX의 발현 정도는 MCAO 후 7일 째 vehicle과 L.w group의 hippocampal dentate gyrus (DG)에서 분석하였다. IHC는 L.w group의 DG에서 NeuN과 DCX의 발현정도가 vehicle group보다 의미 있게 높음을 나타낸다 (Fig. 7-3e, f).

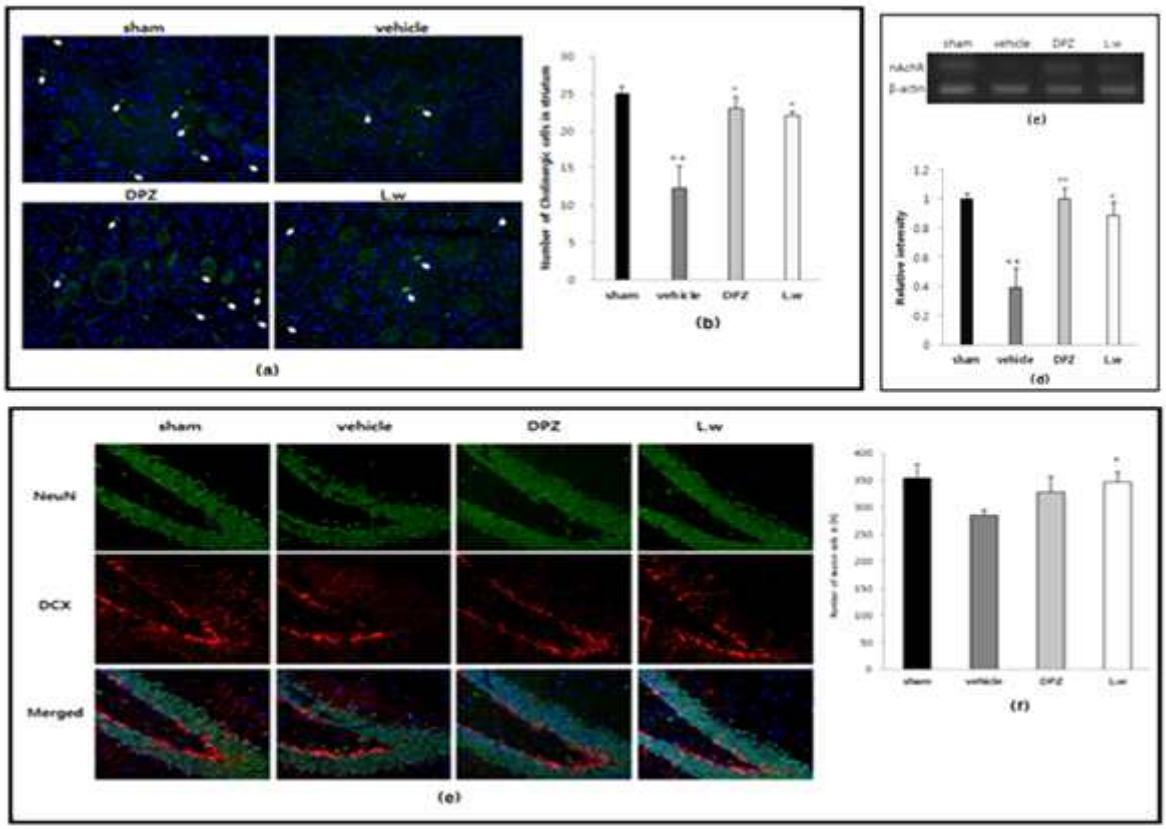


Fig. 7-3. Effect of L.w on the expressions of ChAT, nAchR and DCX
(a) Immunohistochemistry showed ChAT positive neurons (green); a cholinergic neuron marker in the striatum at 7 days after MCAO (200×). (b) Density of cholinergic cells expressing ChAT in the striatum region was significantly increased in the L.w treated group compared with the individual vehicle group (c), (d). The transcriptional level of acetylcholine receptor gene was significantly increased in the L.w treated group compared with the individual vehicle group. (e)Immunohistochemistry showed DCX positive neurons (red); a neuronal marker in the hippocampal DG region at 7 days after MCAO (200×). (f) Number of neural cells expressed DCX was significantly increased in the L.w treated group compared with the individual vehicle group. Data are the mean ± SEM (n = 3)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. individual vehicle group; ++ $P < 0.01$ vs. sham group.

다. 요약

SCX/3를 쥐의 복강에 3일간 주사한 후 흰 쥐 뇌 손상은 통계적으로 유의하게 줄어들었으며 이에 따른 신경 기능 회복은 유의하게 개선되었다. L.w에 의하여 뇌세포 사멸은 감소하였으며 신경회로망 관련 유전자인 SYP, ChAT, DCX등의 발현은 증가하였다.

8. 뇌경색 모델에서 Compound X(SCX/3)를 함유하는 L.w 추출물에 의한 인지 기능과 뇌세포 사멸, 신경회로망 비교평가

가. 실험방법

(1) 4 Group : (1) sham (saline, 1 ml/kg; n = 3), (2) vehicle (saline, 1 ml/kg; n = 3), (3) positive (DPZ) group (Donepezil injection 1 mg/kg; n = 3), and (4) L.w (L.w injection 123 mg/kg; n = 3) groups. Saline에 녹인 DPZ와 L.w를 MCAO 후 6일 동안 매일 복강에 주사한다.

(2) Morris Water Maze test (MWM)는 공간 학습과 기억을 test한다. 수영장 (직경 180cm × 높이 55cm)에 깊이 35cm, 23℃의 수돗물을 채우고 무독성 검은 물감으로 물 표면을 덮는다. platform (직경 10cm)을 물 표면 아래로 1.5cm가 되게 설치한다. 수영장을 4분면으로 나누고 제거할 수 있는 escape platform을 한 사분면 중앙에 물 표면 아래로 설치한다. 숨겨진 platform 위로 동물이 기어 올라가는 시간을 escape latency로 기록한다. test는 연속 4일 동안 각 각 5번의 trial로 이루어져있다. 각 각의 경우에서 Rat은 수영장에서 제거되기 전 15s 동안 platform에 남겨둔다. retention memory test는 다음 날 시행한다. platform을 제거하고 동물을 30s 동안 water maze에 둔다. 이전 platform 위치로 동물이 수영하는데 걸린 시간을 기록한다. 각 각 trial 후 cage로 돌아가기 전에 동물을 수건으로 말린다.

(3) Novel Object Recognition Test (NOR)smms open field box (80 × 80 × 40 cm)에서 시행한다. Rat을 물체 없이 test boxd에 5분 동안 길들인다. 습관화 기간 후에 Rat을 2개의 동일한 물체가 있는 test box에 놓은 다음 10분간 탐색하도록 한다. 훈련 후 24시간 뒤에 Rat을 친숙한 물체와 새로운 물체가 있는 text box에 10분 동안 배치한다. 동물이 새로운 물체와 친숙한 물체를 탐색하는데 소요하는 시간을 기록한다. 동물이 물체를 마주할 때, 냄새 맡을 때, 물 때 탐색하는 것을 간주한다. test box와 물체는 훈련 시간 사이에 70% ethanol로 닦아준다. 결과는 새로운 물체 인지 시간의 percentage로 나타 낸다.

(4) 뇌경색 동물에 대한 Compound X의 feeding 연구는 미강발효추출물을 첨가한 pellet(05 mL/pellet)을 제조한 후 14일간 실시하였다. 그룹은 대조군과 실험군(compound X첨가)으로 나누었으며, 처음 6일간은 일반식이를 제조하여 제공하며, 이 후 8일간 그룹별 식이를 제공하였다. 뇌세포 사멸, 신경회로망 비교평가는 조직염색(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride : TTC) 방법과 Reverse Trascription - Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)로

실시하였다.

나. 실험결과

(1) MWM에서 인지 기능 평가는 학습과 기억에서 L.w의 효과는 escape latency와 retention time으로 결정한다. DPZ와 L.w group은 vehicle group과 비교했을 때 escape latency가 유의하게 감소하였다. MCAO 후 5일 째 sham, vehicle , DPZ, L.w group은 각 각 were 27.88 ± 6.40, 92.44 ± 16.94, 42.28 ± 9.11, and 34.72 ± 8.04 이다 (Fig. 8-1a). vehicle group은 sham group과 비교하여 retention time에서 의미 있게 감소하였다. DPZ와 L.w group은 vehicle group과 비교하였을 때 retention time이 상당히 증가하였다. MCAO 후 6일 째 sham, vehicle, DPZ, L.w group에서 retention time은 각 각 16.8 ± 1.36, 6.4 ± 1.44, 14.2 ± 1.43, and 12.6 ± 1.66이다 (Fig. 8-2b)

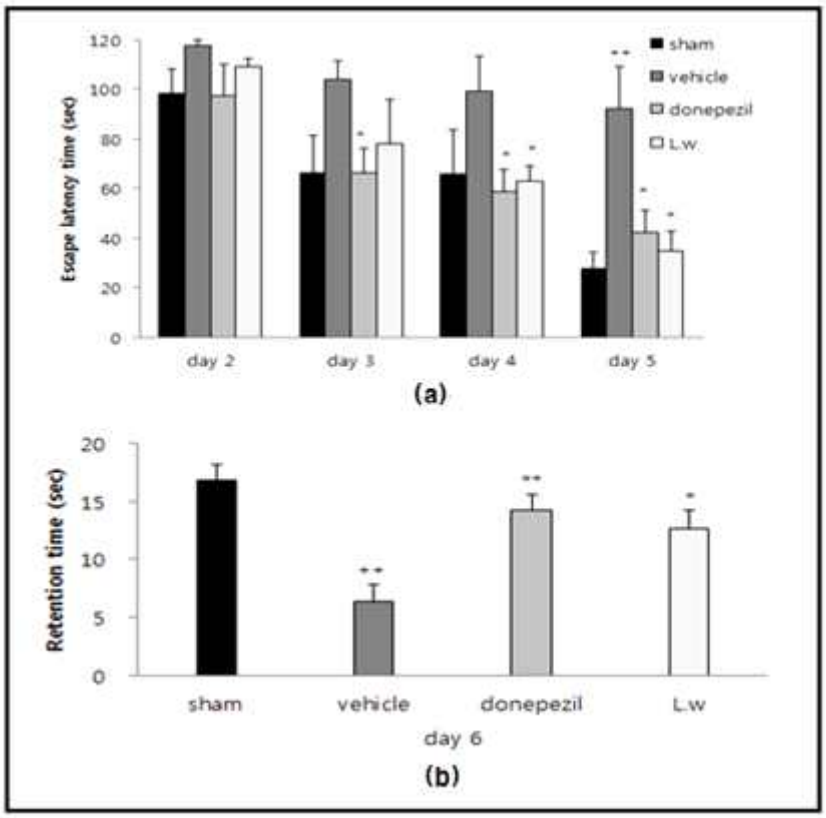


Fig. 8-1. Effect of L.w on the ischemia-induced cognitive deficits in the Morris water maze

(a) Effect of L.w on escape latency time in water maze. (b) Effect of L.w on retention time in water maze on day 6. The L.w group shows a significantly longer retention time than the vehicle group. Data are shown as means SEM (n = 5)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. individual vehicle group; ++ $P < 0.01$ vs. sham group.

(2) NOR은 기억 향상에서 DPZ와 L.w의 효과를 평가하기 위해 시행하였다. vehicle group은 새로운 물체와 친숙한 물체를 탐색하는데 비슷한 percentage의 시간을 보냈다. DPZ와 L.w group은 MCAO 후 7일 째 친숙한 물체보다 새로운 물체를 탐색하는데 시간을 더 보냈다. sham, vehicle, DPZ, L.w group에서 새로운 물체 탐색 시간은 67.92 ± 0.25, 49.88 ± 5.06, 70.87 ± 2.41, and 66.78 ± 3.57이다 (Fig. 8-2).

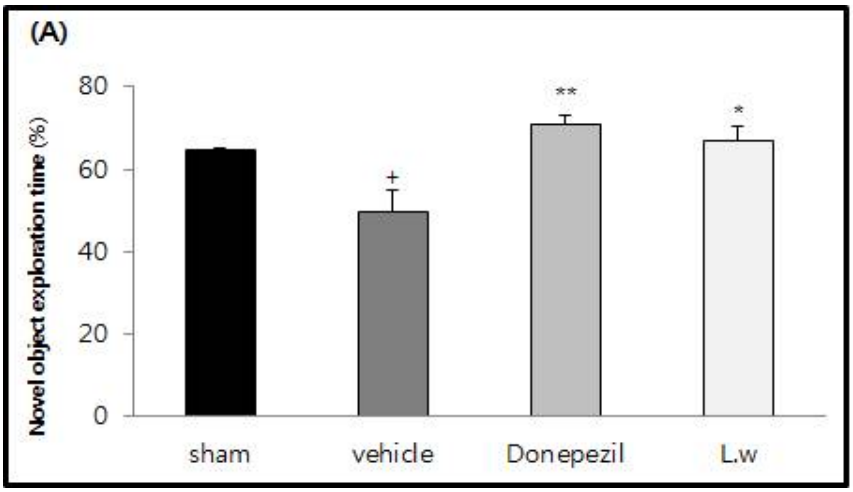


Fig. 8-2. Effect of L.w on the ischemia-induced cognitive deficits in the novel object recognition

(a) novel object recognition test was performed at 7 days after MCAO. Data are shown as means SEM (n = 5)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. individual vehicle group; + $P < 0.05$ vs. sham group

(2) 뇌경색이 유발된 동물의 Infarct volume과 신경 기능 회복에서 compound X의 효과는 vehicle group보다 compound X group의 뇌 손상 부위가 적다(Fig. 8-3). 각 group의 total volume에서 vehicle은 약 57.22%, compound는 약 28.74%로 나타났다(Fig. 8-4). 또한 mNSS 테스트 평가에서 compound X group이 유의적인 수준에서 vehicle group보다 높은 감소율을 나타내는 것으로 나타났다.

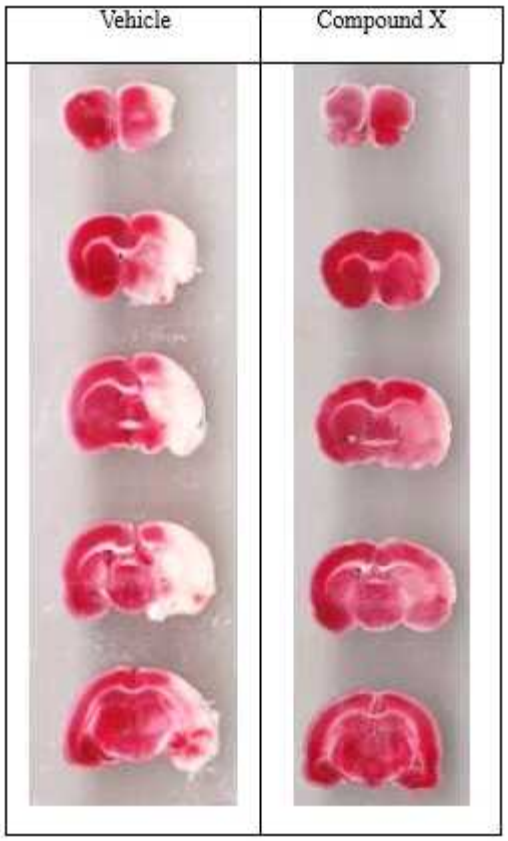


Fig. 8-3. TTC-stained coronal section showing an effect of compound-X feed additives on infarct volume at 3 days after MCAO

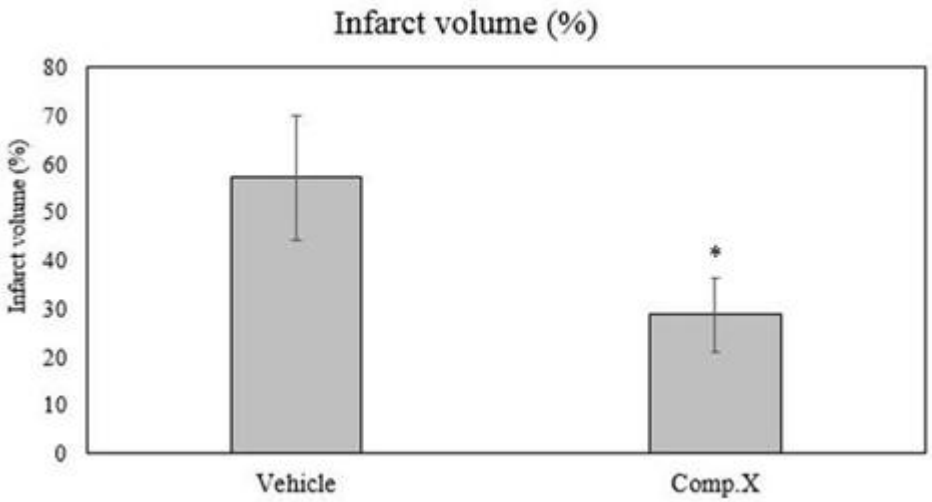


Fig. 8-4. The infarct volume was calculated as the infarct area × thickness (2 mm) and expressed as a percentage of the half of the brain containing the lesion showing an effects

of compound X feed additives on infarct volume at 3 days after MCAO. Data are shown as mean S.E.M. (n=3), $^{*}P < 0.05$ vs. individual vehicle group.

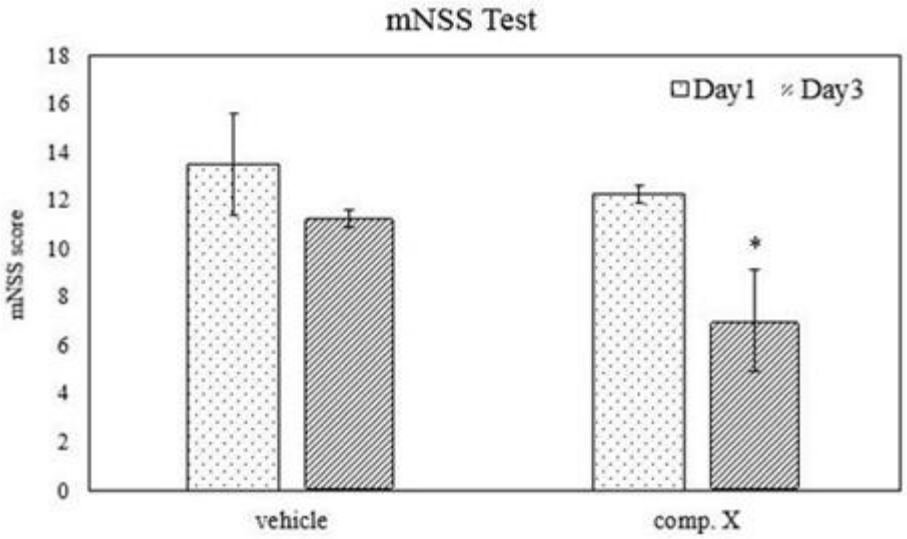


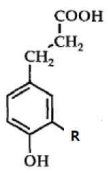
Fig. 8-5. Neurological functional tests were performed at 1 and 3 days after MCAO showing an effect of compound X feed additives on infarct volume. Data are shown as mean S.E.M. (n=3), $^{*}P < 0.05$ vs. individual vehicle group.

다. 요약

MCAO 수행 후 흰 쥐를 water maze test하였을 때 positive control인 DPZ와 L.w group은 vehicle group보다 통계적으로 유의하게 escape latency가 감소하였고, retention time이 증가하였다. 또 NOR test를 하였을 때 DPZ와 L.w group은 vehicle group보다 새로운 물체를 탐색하는 시간이 더 많았다. L.w는 뇌경색 흰 쥐의 학습과 기억을 개선 시킨 것으로 추측된다. 또한 compound X는 복강 및 경구 주입이 아닌 feeding으로 공급을 하여도 뇌기능 개선에 유의적인 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

제 4장 목표 달성도 및 관련분야 기여도

구분 (연도)	세부연구 개발목표	연구개발 수행내용	달성도 및 기여도 (%)
1차 년도 (2013)	전처리 조건 확립	오염세균 멸균 및 효소불활성화	100 미강원료의 품질 안정화를 위하여 가열시 D값을 산출하였음
	유용성분 추출법 확립	화학적 및 물리적 처리에 따른 추출수율 지표물질 선정 및 규격화	100 미강발효 추출물의 GABA와 ferulic acid 함량 profile과제 2와 3세부과제 결과를 비교 분석하여 GABA를 지표물질로 선정하였으며, 초고압 추출로 지표물질 추출수율을 증진시켰음
	미강 발효조건 확립	발효균 선별 및 동정 발효조건 평가 (온도와 시간 등)	100 분리균주 Lw가 제2, 3세부과제에서 우수한 효과를 도출하였으며, 이를 동정하여 특허 기탁하였음(KFCC 11556P)
	ADP 수용체 P_2Y_{12}의 $G_{\alpha i}$ 매개 혈소판응집 신호전달 표적분자 조절특이성 규명	혈소판 응집의 IC_{50} 측정	100 미강발효추출물은 collagen 및 thrombin에 의해 응집된 혈소판에서 분비되는 ADP에 의한 혈소판응집반응을 강하게 억제시켰음 미강발효추출물은 혈소판응집억제 pathway를 통해 ADP유인 혈소판응집억제반응에 관여함을 확인 미강발효추출물은 대조군에 대한 cAMP 증가량이 105%, AC활성은 192.7이었음 미강추출물은 각각 ADP 유인 혈소판응집반응에서 VASP의 인산화를 촉진시켰음
		Adenylate cyclase 활성에 미치는 영향 측정	
		cAMP 생성 측정	
		VASP-p 측정	
	추출방법별 미강발효 추출물의 뇌질환 동물모델에서 예방 및 회복 효과 조사	뇌졸중동물모델에서 예방 및 기능개선 조사	100 미강 발효미강추출물은 항산화 유전자인 PDI, Nrf2와 신경조절물질인 BDNF, NGF, GDNF를 증가시켰음 미강발효추출물(L.w)은 우울증과 불안장애와 같은 실험동물에서 행동평가의 향상효과가 있음을 검증하였음
		우울증동물모델에서 예방 및 기능개선 조사	
		불안장애 동물모델에서 예방 및 기능개선 조사	

구분 (연도)	세부연구 개발목표	연구개발 수행내용	달성도 및 기여도 (%)
2차 년도 (2014)	복합균주를 이용한 발효공정을 설계하여 GABA생산량 증진공정 조건 확립	복합발효균주로서 기존의 L.p와 L.w 외 L.k의 조합효과 평가	100 복합발효균주를 사용하였을 경우 단일균주로만 발효했을 때 보다 GABA수율 증진 효과가 있었음 미강배지에 MSG 1%를 첨가한 경우 현저한 GABA생산증진 효과가 있었음 Compound X는 L.w 발효물에만 존재하며, 이의 수율은 ferulic acid 첨가로 크게 높일 수 있었음
		미강배지에 MSG를 첨가하여 GABA수율 증진효과 평가 미강배지에 ferulic acid 첨가하여 compound X 수율증진효과 평가	
	Ferulic acid 대사산물인 compoud X의 분리 및 성분 규명	TLC를 이용한 미강발효추출물의 유용성분 분석	100  HPLC retention time과 spectra를 ferulic acid 대사물질들과 비교하여 기본구조를 추정하였음
		HPLC를 이용한 미강발효추출물의 유용성분 분석	
	미강발효 및 추출공정 최적화와 추출물의 가공적성에 따른 용도 검토	발효기를 이용한 단일균주 최적발효조건 확인	100 미강발효추출물의 제품화를 위하여 원료의 안정성확보단계부터 발효추출 단위공정별 물질수지 평가 및 기본공정설계를 작성하였음 발효기사용 최적조건 확립 미강발효추출물에 함유된 GABA 안정화를 위한 열처리 및 pH조건 확립
		미강원료 안정성 확보단계부터 발효추출 단위공정별 물질수지 평가 후 기본공정설계	
		가공조건에 따른 GABA함량 분석하여 가공적성 평가	
	ADP 수용체 P_2Y_1 매개 TXA_2생성 관련 효소의 활성억제 특이성 규명	TXA_2 생성 측정	100 미강발효추출물은 ADP에 의해 응집된 혈소판에서 생성되는 TXA_2를 강하게 억제시켰음 혈소판 부유액을 lysate하여 ultracentrifuge를 이용하여 각 fraction을 분리 후 cytochrome c reductase activity 측정결과 분리된 microsome fraction임이 증명되었음
		혈소판의 cytosol 및 microsomes 분리	
		Microsomes의 marker enzyme의 측정	
	뇌기능개선모델 실험동물과 항혈전 상관관계 규명	COX-1 활성 측정	100 Collagen, ADP, Thrombin에 의해 유도된 혈소판응집반응을 억제하였고, 응고반응 역시 시료 미투여군에 비해 응고시간이 연장되는 결과를 확인
		TXA_2 synthase 활성 측정	
		뇌기능개선실험 종료시점에 혈액채취하여 혈소판응집 반응과 혈액응고 비교 평가	

구분 (연도)	세부연구 개발목표	연구개발 수행내용	달성도 및 기여도 (%)
2차 년도 (2014)	미강발효 추출물에 의한 BDNF, NGF, GABA, 항산화 유전자 발현 조절	미강열수 추출물과 미강발효 추출물을 사용하여 뇌경색 모델에서 뇌세포사멸, 신경 회로망, 신경보호 유전자 발현을 sham 대조군과 비교평가	100 뇌졸중에 의한 apoptotic cells의 수를 측정한 결과, 미강발효추출물을 처리한 실험동물의 대뇌피질과 선조체에서 감소를 확인 우울증/불안장애 동물실험에서 미강발효 추출물의 기능회복 효과 확인 행동기능검사인 mNSS를 시행한 결과 천마추출물 혼합군과 큰 차이가 없었음
		우울증 모델의 해마에서 뇌세포사멸, 신경 회로망, 관련 유전자 발현을 양성대조군 fluoxetine 그룹과 비교	
		뇌경색 모델에서 천마추출물의 혼합 효과 평가	
3차 년도 (2015)	대량 연속공정 확립과 추출물을 이용한 건강기능성 식품개발	발효와 유효성분 분리공정 확립	100 미강 발효 공정과 유용성분을 분리하는 공정 최적화 및 공정도 작성함
		소재의 가혹조건하 안정성 평가	100 개발된 액상소재의 지표물질이 공정 중가혹조건에서 안정성 확인
		유용성분 정량화를 통한 규격설정	100 기능성 유용성분의 정성 및 정량화를 통한 제품화 규격 확립
		식품소재 및 제품 개발	100 일반식품에 기능성 소재 첨가를 위한 기초자료 확보

구분 (연도)	세부연구 개발목표	연구개발 수행내용	달성도 및 기여도 (%)
3차 년도 (2015)	ADP 수용체 P_2Y_1을 거쳐 일어나는 Ca^{2+}-의존성 혈소판 응집 신호전달 표적분자 억제 특이성 규명	ADP가 유도한 응집반응 중 세포질로 동원되는 Ca^{2+}와 Fura-2의 결합복합체로부터 나오는 형광강도를 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 측정	100 미강발효추출물이 ADP에 의해 동원한 $[Ca^{2+}]_i$를 억제시키는 것을 확인
		ADP가 유도한 응집반응 후 lysis 후 western blot으로 확인	100 미강발효추출물은 IP_3 receptor를 농도 의존적으로 인산화 시킴
		ADP가 유도한 응집반응 후 lysis 후 western blot으로 확인 PKC activity kit로 확인	100 미강발효추출물은 혈전의 강화하는 일련의 ADP매개 혈소판응집분자의 활성을 억제시켰음
	안전성 및 Side effect 시험	미강추출물을 일정기간 복강투여 후 행동관찰, 외부 특이사항 관찰, 해부를 통한 장기 손상 유무 확인	100 체중증가량은 감소하였지만 장기무게 변화는 차이 없으며, 행동변화, 특이사항 관찰되지 않았음
		혈액 내 간독성 및 신장 독성 관련 인자 (AST, ALT, LDH 등) 측정	100 대부분의 인자는 차이를 보이지 않았지만, 고농도 투여시 AST, LDH가 상승함
	Compound X에 의한 신경세포의 생리 활성 연구	신경세포배양을 이용한 compound X(SCX/3)의 BDNF, NGF, GDNF, 신경회로, 항산화 유전자들의 발현에 대한 평가	100 NGF,PDI, Nrf2 유전자 발현을 증가시켰고, 이는 뇌기능 회복에 도움을 줄 것으로 기대됨
	뇌경색 모델에서 Compound X 에 의한 뇌기능 회복 기작	compound X(SCX/3)를 사용하여 뇌경색 모델에서 뇌세포 사멸, 신경회로망, 신경영양유전자 발현을 sham 대조군과 비교 평가	100 뇌 손상 부위를 감소시켰고, 신경 기능 회복을 개선함 SYP, 콜린성 neuron과 acetylcholine receptor gene의 transcription을 증가시킴 MWM test에서 학습과 기억을 향상시켰음 NOR test에서 novel object의 선호 비율을 증가시킴
		뇌경색 모델에서 Compound X(SCX/3)를 함유하는 L.w 추출물에 의한 인지 기능 평가	

제 5장 연구개발 성과 및 활용계획

제 1절 연구개발 성과

구분	특허		논문		학회발표		기타
	출원	등록	SCI	비SCI	국내	국외	
목표	3		2	3			
성과	4		1	3	4	3	균주특허등록 1회

※ SCI논문 출판계획은 과제 종료시인 3차년도 까지 1편이며, 과제 종류후 인 4차 년도에 1편이 있음

1. 특허

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	미강 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0065155
2013	미강 발효 추출물을 유용성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0116649
2014	미강 발효 추출물을 유용성분으로 포함하는 뇌졸중 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0054874
2014	미강 발효 추출물을 유용성분으로 포함하는 우울증 또는 인지장애의 예방 또는 치료용 조성물	인제대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0062111

2. 논문

구분	논문명	잡지 또는 학회명
논문(SCI)	Neuroprotective effect of rice bran extract supplemented with ferulic acid in the rat model of ischemic brain injury	Animal Cells and Systems 2014, 18(2): 93-100
논문(KCI)	Inhibitory Effects of Water Extract from Rice Bran Due to cAMP-dependent Phosphorylation of VASP (Ser^{157}) on ADP-induced Platelet Aggregation	Biomedical Science Letters 2014, 20(3): 129~138
논문(KCI)	Effects of Rice Bran Extracts Fermented with Lactobacillus plantarum on Neuroprotection and Cognitive Improvement in a Rat Model of Ischemic Brain Injury	Biomedical Science Letters 2015, 21(2): 92~102
논문(KCI)	Inhibitory Effects of Rice Bran Water Extract Fermented *Lactobacillus plantarum* due to cAMP-dependent Phosphorylation of VASP(Ser^{157}) on human Platelet Aggregation	Biomedical Science Letters 2015, 21(2): 103~114

3. 학회발표

구분	논문명	잡지 또는 학회명
학술발표	Antiplatelet Effects of Hot Water Extract from Rice Bran *via* Elevation of cAMP production and phosphorylation of Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein(VASP-Ser^{157}) on ADP-induced Human Platelet Aggregation	2013 제19회 대한의생명과학회 추계학술개회
학술발표	Inhibitory effects of water extract from rice bran fermented with *Lactobacillus plantarum* Hong on activity of thromboxane A_2 production-associated microsomal enzymes	2014 제20회 대한의생명과학회 추계학술개회
학술발표	Water, and ethyl acetate-extract from rice bran fermented with *Lactobacillus plantarum* Hong inhibit platelet aggregation and blood coagulation	2014 제20회 대한의생명과학회 추계학술개회
학술발표	The Effect of Fermentation of Rice Bran Extract by Lactobacillus plantarum KCCM 12116 on the Antioxidant Activity	2013 한국약용작물학회 춘계학술대회

학술발표	Comparison of Rice Bran Extraction and Fermentation Method for Increased Yield of GABA	2013 International Conference on Natural Products for Agriculture
학술발표	Optimum Condition for Fermentation of Rice Bran for GABA Production Using Lactobacillus plantarum	2013 International Conference on Natural Products for Agriculture
학술발표	Neuroprotection and Functional Recovery of Rice Bran Extracts Fermented by Lactobacillus plantarum in the Rat Model of Ischemic Brain	2013 International Conference on Natural Products for Agriculture

4. 인력양성

총인원	대상(학위별, 취득자)		성별	
	박사	석사	남	여
4	2	2	2	2

제 2절 연구성과 활용

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
목표	1	1			1	
달성	참여기업으로 기술이전 예정	소재화 예정				

o 이 연구과제 수행으로 얻은 우수한 연구자료는 국내·외 학회 학술대회에 발표하고, 전문학술지 논문에 게제 및 게제예정

o 미강발효추출물 획득관련 공정기술과 소재에 대한 기능성에 대한 자료는 기술적 우위권을 획득하기 위해 국내 특허로 우선 출원하며, 향후 PCT 출원을 진행할 예정

o 이 과제에서 개발된 미강발효추출물은 뇌기능과 혈류흐름에 도움을 주는 생리활성이 입증되었으므로 참여기업인 (주)콜마비엔에이치에서 일반식품 형태로 상품화를 진행하고자 협의중에 있음

o 이와 더불어 연구결과로 규명된 기능성에 대한 보다 심도있는 연구 및 인체시험 등 추가 기능성 연구 자료규명을 통해 추후 개별인정 소재로 신청하기 위하여 참여기업인 (주)콜마비엔에이치의 소재개발팀과 협의 중임

o 특히, 고령화 사회로 진입하고 있는 국내 노령인구의 노화 관련 질병 중 하나인 뇌 기능저하 질병 발생 및 예방에 효능이 있는 것으로 사료되어 개발제품의 국내 시장보급을 통해 국민건강향상에 이바지 할 수 있음

o 개발제품의 상품화 완료시점에서 메이져 언론 및 건강관련 TV프로그램 출연 등을 통해 개발된 제품에 대한 홍보를 지속적으로 진행할 계획임

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

o 평균 수명의 연장은 인류에 대한 질병의 종류를 크게 바꾸고 있어 과거에 많이 볼 수 있었던 영양실조나 전염병, 기생충질환과 같은 감염성 질환은 급격히 감소한 반면 암, 치매, 고혈압, 당뇨병 등의 성인병이 사회적 문제가 되고 있다. 최근 식품·의약품 업계에서는 이와 같은 고령화 사회 및 식습관에 기인하는 성인병의 예방,치료를 위한 기능성 소재 개발을 위한 연구를 활발히 추진하고 있으며, 그 시장 규모도 급격하게 증가하고 있음

o 감마아미노부티르산(γ-aminobutyric acid, GABA)는 비단백질 구성 아미노산으로서 뇌에서 신경전달물질로서의 역할뿐 아니라 뇌기능 촉진, 정신안정, 혈압저하, 이뇨 작용, 간기능개선, 비만방지, 알콜대사 촉진, 소취작용 등 매우 다양한 생리기능을 갖는다. 특히 의약품으로 등록되어 뇌졸중 또는 뇌동맥 후유증에 의한 두통, 이명, 의욕저하 등의 치료에 사용되고 있음

o GABA는 각종 야채, 과일, 쌀, 콩 등에 널리 분포되어 있는 것으로 알려져 있으나, 그 함량이 낮아 생리작용을 나타내지 못한다. 그러나 최근 일본에서는 GABA 함량을 높인 녹차, 쌀배아, 발아현미 등이 판매되면서 식품업계와 소비자의 관심이 고조되고 있음

o 최근, 유산균을 미강, 쌀눈 및 대두 추출물을 주 발효원으로 이용하여 탄소원 및 질소원을 소량 보강하여 발효하였을 때 5.0~10.0%(w/v)의 monosodium glutamate (MSG)를 90.0% 이상 GABA로 전환시켜 배양액의 분무건조에 의해 15.0% 이상의 GABA를 함유하는 곡물 발효 소재를 얻을 수 있는 연구가 진행되었음

o 미강, 쌀눈 및 대두 추출물을 이용한 발효를 통해 얻어진 GABA 함유 분말의 영양성분 분석 결과 원물에 존재하는 selenium (Se)과 vitamin 등과 같은 영양 성분이검출되었다. 이러한 결과는 녹두 및 백태 등과 같이 각종 기능성 성분을 갖는 곡류를 이용하여 유산균을 발효 하였을 때, GABA와 같은 기능성 성분 뿐 만 아니라곡물에서 유래하는 각종 영양성분이 함유된 발효물을 얻을 수 있으며, 이를 이용한 소재를 개발 할 수 있음을 의미함

o 이와 더불어 페룰산의 경우 강력한 항산화 활성을 가지고 있으며, 뇌기능 보호에 효능이 있다고 알려져 있으며, 미강과 같은 부산물에 다량 함유되어 있음

o 페룰산의 경우 미생물에 의해 여러 가지 대사산물로 변화할 수 있으며, 이러한 페룰산 대사물은 페룰산보다 뛰어난 기능성을 가지는 것을 연구결과 확인할 수 있었고, 특히 뇌기능 보호에 탁월한 효능이 있어 이를 이용한 노령화 산업 시장을 형성활 수 있을 것으로 기대됨

o 생명공학 기술을 바탕으로 환경친화적인 생물전환법을 이용한 기능성 유용성분의 대량 생산 기술에 연구는 최근 꾸준히 진행되고 있으며 특히, 생물촉매의 고효율성, 반응특이성, 선택성을 이용한 생물전환기술은 화학공정의 대체/보완을 위한 환경친화형 생물공정기술의 핵심분야로서 생물촉매/생물전환기술에 의한 고부가가치 첨단생물소재 및 식품소재 개발이 세계 각국에서 경쟁적으로 이루어지고 있음

제 7장 연구 시설·장비 현황

- 해당사항 없음

제 8장 참고문헌

(1) Baek SE, Kim JY, Song WT, Lee SH, Hong JH, Lee CK, Kang SG. Neuroprotective effect of rice bran extract supplemented with ferulic acid in the rat model of ischemic brain injury. Animal Cells and Systems. 2014. 18: 93-100.

(2) Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, Macaluso G, Commeau P, Comet B, Lafont A, Camoin L, Walter U, Eigenthaler M. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoproteinphosphorylation. Catheter Cardiovasc Interv. 2003. 59: 295-302.

(3) Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature. 1987. 312: 315-321.

(4) Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in unstimulated human platelets. J Biol Chem. 1994. 269: 14509-14517.

(5) Cattaneo M. The P2 receptors and congenital platelet function defects. Semin Thromb Hemost. 2005. 31: 168-173.

(6) Gambaryan S, Kobsar A, Rukoyatkina N, Herterich S, Geiger J, Smolenski A, Lohmann SM, Walter U. Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex. J Biol Chem. 2010. 285: 18352-18363.

(7) Gasser JA, Betterridge DJ. Comparison of the effects of carvedilol, propranolol, and verapamil on *in vitro* platelet function in healthy volunteers. J Cardiovasc Pharmacol. 1991. 8: S29-S34.

(8) Goufo P, Trindade H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, ɣ-oryzanol, and phytic acid. Food Sci Nutr. 2014. 2: 75-104.

(9) Guidetti GF, Lova P, Bernardi B, Campus F, Baldanzi G, Graziani A, Balduini C, Torti M. The Gi-coupled P2Y12 receptor regulates diacylglycerol-mediated signaling in human platelets. J Biol Chem. 2008. 283: 28795-28805.

(10) Halbrüge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbäher P, Walter U. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. J Biol Chem. 1990. 265: 3088-3093.

(11) Halbrüge M, Walter U. Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. Eur J Biochem. 1989. 185: 41-50.

(12) Horstrup K, Jablonka B, Höig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. Eur J Biochem. 1994. 225: 21-17.

(13) Hou Z, Qin R, Ren G. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (Oryza sativa

L. Japonica) on chronically alcoho linduced liver damage in rats. J Agric Food Chem. 2010. 58: 3191-3196.
(14) Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. Am J Cardiol. 2009. 103: 4A-10A.
(15) Jun HI, Song GS, Yang EI, Youn Y, Kim YS. Antioxidant activities and phenolic compounds of pigmented rice bran extracts. J Food Sci. 2012. 77: C759-C764.
(16) Kim HH, Hong JH, Ingkasupart P, Lee DH, Park HJ. Inhibitory Effects of Water Extract from Rice Bran Due to cAMPdependent Phosphorylation of VASP (Ser157) on ADP-induced Platelet Aggregation. Biomed Sci Lett. 2014. 20: 129 -138.
(17) Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröe L, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB, Carlier MF. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. J Cell Biol. 1999. 144: 1245-1258.
(18) Lee DH, Kim HH, Cho HJ, Bae JS, Yu YB, Park HJ. Antiplatelet effects of caffeic acid due to Ca2+ mobilization-inhibition *via* cAMP-dependent inositol-1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation. J Atheroscler Thromb. 2014. 21: 23-37.
(19) Menshikov MY, Ivanova K, Schaefer M, Drummer C, Gerzer R. Influence of the cGMP analog 8-PCPT-cGMP on agonistinduced increases in cytosolic ionized Ca2+ and on aggregation of human platelets. Eur J Pharmacol. 1993. 245: 281-284.
(20) Ok WJ, Cho HJ, Kim HH, Lee DH, Kang HY, Kwon HW, Rhee MH, Kim M, Park HJ. Epigallocatechin-3-gallate has an anti-platelet effect in a cyclic AMP-dependent manner. J Atheroscler Thromb. 2012. 19: 337-348.
(21) Qureshi AA, Sami SA, Khan FA. Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus Types I and II. J Nutr Biochem. 2002. 13: 175-187.
(22) Schwartz SM, Heinmark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. Physiol Rev. 1990. 70: 1177-1209.
(23) Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. Biochem Pharmacol. 2001. 62: 1153-1161.
(24) Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965. 16: 144-158.
(25) Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation *in vitro* and in unstimulated cells using a phosphospecific monoclonal antibody. J Biol Chem. 1998. 273: 20029-20035.
(26) Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilatorstimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. Platelets. 2003. 14: 381-390.
(27) Wang BH, Ou-Yang JP. Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system. Cardiovasc Drug Rev. 2005. 23: 161-172.
(28) Yasuda T, Takasawa A, Nakazawa T, Ueda J, Ohsawa K. Inhibitory effects of urinary metabolites on platelet aggregation after orally administering Shimotsu-To, a traditional Chinese medicine, to rats. J Pharm Pharmacol. 2003. 55: 239-244.

[첨부]

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

1. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	*국내, 국외(미국, 일본, 유럽)*
특허 DB	*특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), http://www.uspto.gov, http://www.freepatentsonline.com/*
검색기간	*최근 5년간*
검색범위	*제목 및 초록*

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		*미강 유용성분 추출*	*미강 기능성 소재의 생리활성*
Keyword		Extraction, functional components, rice-bran	Biological activity, functional materials ,rice-bran
검색건수		99	193
유효특허건수		16	11
핵심특허 및 관련성	특허명	미강 내 토코트리에놀의 대량생산방법 및 이를 이용한 고기능성 토코트리에놀 제제	PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOSITION DERIVED FROM RICE BRAN
	보유국	대한민국	Japan
	등록년도	2009	2002
	관련성(%)	50	65
	유사점	미강 내 유용성분인 토코트리에놀의 대량생산방법에 관한 특허	탈지미강을 코오지 균으로 발효한 후 물과 에탄올로 추출한 성분을 소재화
	차이점	미강의 한 가지 유용성분만이 아닌 모든 유용성분을 추출하는 공정을 개발	본 연구에서는 정제미강과 발효미강을 물과 에탄올 외 초임계, 초고압 처리하여 추출한 물질을 소재화 하는 것임

※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

2. 논문분석
가. 논문분석 범위

대상국가	*미국, 일본, 유럽*
논문 DB	*pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)*
검색기간	*최근 5년간*
검색범위	*제목, 초록 및 키워드*

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		*미강의 유용성분 추출*	*미강추출물의 생리활성*
Keyword		Extraction, functional components, rice-bran	Biological activity, rice-bran
검색건수		186	41
유효논문건수		35	23
핵심논문 및 관련성	논문명	Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment	Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran
	학술지명	Bioresource Technology.	Food Research International
	저 자	R. Renuka Devi, C. Arumughan	Elisa Revilla, Consuelo Santa Maria, E. Miramontes, Juan Bautista, Ana García-Martínez, Olga Cremades, Rosa Cert, Juan Parrado
	게재년도	2007	2009
	관련성(%)	55	50
	유사점	미강내 oryzanols, tocols, ferulic acid를 추출하기 위한 공정을 최적화함	탈지미강의 수용성효소추출물의 항산화활성 및 고콜레스테롤혈증 등의 생리활성을 연구함
	차이점	미강내 지질성분뿐만 아니라 다양한 추출기법을 이용하여 모든 유용성분을 추출하는 경제적인 공정을 개발하고자 함	각각의 미강 추출물에서 항산화 및 고콜레스테롤혈증 뿐만 아니라 항혈전, 항비만, 뇌기능 활성에 대해서 폭넓게 연구할 것임

※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

3. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

- 통계청이 내놓은 최근 6년 간 쌀 생산량은 2004년 500만 톤에서 2009년 468만2000톤이며, 평균 456만5,000톤이 생산되고 있음.

2004년	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년
500만톤	476만8000톤	468만톤	440만8000톤	484만3000톤	468만2000톤

- 쌀에서 미강이 차지하는 비중이 약 10%이며, 쌀 생산량 대비 미강생산량으로 환산하면 매년 50만톤의 미강이 생산되고 있음.

- 국내에서 생산되고 있는 미강은 대부분 미강유 착유에 이용되고 있으며, 착유율 12.5%로 계산하면 연간 6만2500t이나 되는 미강유를 얻을 수 있으나, 미강의 관리소홀에 의해 겨우 5만분의 1정도만이 착유되고 있음.

- 현재 우리나라의 벼는 전국에 산재되어 있는 1만8,000여 정비소에서 도정되고 있으며, 이때 부산물로 생겨나는 50만톤에 달하는 쌀겨는 나오자마자 미강 안정화 엑스트루더를 통과시켜 쌀겨속의 지방가수분해 효소를 불활성화 시킨 후 모아두었다가 미곡 처리종합장에서 착유, 정제하여 양질의 미강유를 좋은 수율로 얻을 수 있게 되었음.

- 미강유 착유실적은 아래와 같으며 쌀 재배량이 감소함에 따라 미강유 착유량도 감소하고 있음

단위 : 천톤

연도별	착유원료(M/T)	미강유			탈지강
		식용	비식용	계	
'90	123	11	8	19	98
'91	125	10	8	18	95
'92	135	11	10	21	105
'93	153	11	13	24	121
'94	136	10	11	21	108
'95	146	13	9	22	115
'96	127	11	7	18	100
'97	87	8	5	13	69
'98	67	5	4	9	54

- 이외에 미강의 이용 가능분야는 식품용도로 전통 식품에 적용시켜 기능성이 우수한 제품 개발(예) 미강 식이섬유를 적용 하여서 기능성이 우수한 고추장 개발)하거나 곡류음료에 첨가하여 기능성이 강화된 음료개발(예) 일회용 현미 차, 현미 라이스 음료), 다이어트 식품으로 개발(선식 분말 또는 요플레에 타서 아침, 점심 식사대용)이 시도 중임.

- 또한 미용용도로 기능성이 우수한 고급 라이스 화장품 첨가 소재, 안정화 처리된 쌀겨 팩, 안정화 처리된 세안 팩, 천연비누 첨가 소재로 이용 중에 있음

- 국내에서 시판되고 있는 미강관련 제품은 아래와 같음.

제품명	제조회사	식품유형
쌀겨가루	지리산한약나라	건조분말
쌀겨가루	가루나라	
무농약 미강가루	대양식품	
미강유 클렌징 바	(주)클린센스코스메틱	유지
이탈롤리	유니스코(이탈리아)	
아로마 바스&마사지	바이네이쳐	
프리미엄 오일	피에트로 꼬리첼리	
라온 현미유	자연애	
미강유	세림(비누베이스)	
미강유	Allinmarket	
미강환	김정규자연건강영농조합법인	정제(환/캅셀)
발아미강환	김정규자연건강영농조합법인	
들찬 천연미강	들찬	천연팩
다이어트 웰패스153	(주)동서바이오팜	미강발효분말
바로콜	한미양행	
현미김치	대양식품	

- 대부분 선식용 가루나 미강유를 이용한 유지상품류와 발효미강을 이용한 건강보조식품으로 이용되고 있으며, 미용목적으로 이용은 대부분 마스크 팩 등 천연팩으로 이용되고 있는 실정임.

- 그동안 미강 유용성분에 대한 추출, 정제에 대한 연구는 꾸준히 있었지만, 한가지 성분을 고순도로 정제하는 연구가 대부분이어서 제품으로 출시는 미비한 실정임.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 일본, 미국, 인도 등에서는 미강성분에 깊은 관심을 가지고 연구하여 미강을 Biobran이라는 말로 부르면서 생리기능 면역성물질의 소재로 미강을 활용하고 있고, 일본의 다이와 제약회사는 오래 전에 미강성분에서 면역성소재를 분리하여 버섯효소로 처리한 후에 면역강화기능성 물질 arabinoxylane유도체를 상품화하고 있으며 이것에 대한 항암효과의 연구결과가 미국과 인도에서 보고되었으며, 국내에서는 미강에서 분리한 옥타코사놀을 건강식품의 원료로 사용하고 있는 실정임.

- 미국 등에서는 가공된 미강을 package하여 밀가루와 같이 건강식품재료로서 판매하고 있으며 이러한 가공미강의 이용도에 관해서도 일부 연구가 이루어지고 있으며, 미강을 활용한 신제품 개발도 증가추세에 있으며 1989년에는 미강을 활용한 신상품이 24품목이었던 것이 1995년에는 45품목으로 증가하고 있음.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 건강기능성 음료(드링크)

- 미강발효추출물내 유용성분의 기능성 규명을 통해 음료를 제조한다면, 숙취, 간보호, 집중력 향상 등의 효과가 높은 제품으로 개발이 가능하여 기존 숙취해소 및 수험생을 위한 새로운 음료로 시장 가능성이 크다고 보여짐.

- 우리나라의 음료시장 규모는 2008년 현재 4조원 정도이고 해마다 그 규모가 증가하고 있음.

- 그 중 숙취해소 음료에 대한 수요가 매년 증가하고 있고, 현재 약 1,000억원대의 시장을 형성하고 있으며, 쌀부산물을 실용적인 추출공정을 통해 제조되는 본제품으로 해당시장내 가격경쟁력이 있을 것으로 사료됨.

○ 건강기능성 제품 소재

- 기능성 규명을 통해 생리활성이 증명된 미강추출물을 이용하여 가공적성을 평가한 후 건강기능성제품의 소재로 개발하여, 제약산업 및 건강기능성 식품의 소재로 이용이 가능함

- 국내 제약 및 건강기능성 식품에 첨가되는 미강추출물은 대부분 일본에서 수입되고 있는 실정이며, 본 연구를 통해 제품이 생산된다면 충분히 시장내 품질우수성과 가격경쟁력이 있을 것으로 생각되며, 외화유출을 방지할 수 있을 것임

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	300	500	700	1,000	2,000	4,500
경제적 파급효과	500	600	700	1,000	1,500	4,300
부가가치 창출액	10	30	50	100	200	390
합 계	810	1,130	1,450	2,100	3,700	9,190

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.