

한식소재인 김(*Porphyra tenera*)의

건강기능성 규명 연구

(Investigation on Health Functionality of Laver,  
a major Korean Food Material)

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 "한식소재인 김(*Porphyra tenera*)의 건강기능성 규명 연구"에 대한 최종 보고서로 제출합니다.

2012년 12월 29일

한경대학교

# 연 구 진

연구기관명 : 한경대학교 영양조리과학과

연구책임자 : 황 은 선

책임연구원 : 황 은 선

연 구 원 : 최 미 희

연 구 원 : 기 경 남

연 구 원 : 김 태 윤

연구기관명 : 건양대학교

책임연구원 : 유 영 춘

연 구 원 : 이 정 립

연 구 원 : 태 인 환

연 구 원 : 강 은 주

# 요 약 문

## I. 제 목

한식소재인 김(*Porphyra tenera*)의 건강기능성 규명 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 김(laver)은 홍조류 보리털과에 속하는 *porphyra yezoensis*로 미역 및 다시마 등과 함께 우리나라에서 가장 많이 애용되는 해조류이며, 최근에는 현대인들의 건강유지를 위하여 필요한 각종 영양소의 작용으로 암예방, 동맥경화 방지, 담석예방, 노화방지, 면역력 증강효과가 있을 것으로 추정되면서 관심이 증가하고 있다. 특히 최근 우리사회에서 커다란 사회적 문제로 대두되고 있는 암, 당뇨, 고지혈증, 비만과 같은 대사성 성인질환에 대해 해조류 산물인 김이 증상개선 효과를 가질 개연성이 아주 높으나, 과학적 연구결과는 거의 없는 실정이다.
- 최근 농림수산식품부는 김을 10대 수출 전략품목으로 선정하여 세계 시장 선점을 위한 육성계획을 세우고(수산물 수출 증대를 위한 워크샵, 2008) 김에 대한 국제표준규격을 2010년 아시아식품규격위원회에 제안하였다. 또한, 2011년 제34회 국제식품규격위원회(CODEX) 총회에서 전 세계 184개 회원국의 동의를 얻어 김의 표준규격을 제정하기로 결정되었다. 이에 따라 우리나라는 향후 김의 국제규격 제정 과정에서 제안국으로서 주도적으로 참여할 수 있으며, 김의 국제규격이 국내 기준과 최대한 동일하게 마련되도록 유도함으로써 김의 세계 수출시장 유지 및 개척에 큰 도움을 줄 것으로 예상된다.
- 특정 식품이 CODEX 식품규격으로 제정되기 위해서는 국제적인 교역량 및 인지도 등을 고려할 때, 다수의 국가에서 유통되고 있어야 하며, 회원국 등의 동의가 있어야 가능하다. 이러한 점을 감안할 때, 한식의 주요 소재인 김의 세계화를 위한 과학적인 기초 자료가 절실히 필요한 상황이며, 김의 우수성 및 효능이 입증되면 향후 한식 식재료의 수출 및 국제규격 제정에 큰 원동력이 될 것으로 예상된다.

- 본 연구는 1) 김 추출물의 유효성분 분석법 개발, 주요 가공제품별(건조김, 조미김), 생산국별(한국, 일본, 중국) 김의 유효성분 함량 분석 비교 및 김 추출물의 *in vitro* 항산화 및 항암 활성 탐색, 2) 김 추출물의 *in vivo* 면역조절, 항암 및 항당뇨 활성조사를 통하여 김의 건강 기능성을 규명하고 한식 식재료의 위상 제고 및 의약소재로 개발하여 김의 부가가치를 높이고자 하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### [제1세부과제]

#### 1. 김의 생리활성 물질 추출법 확립 및 가공방법에 따른 활성 물질의 변화 분석

- 김의 기능성 생리활성 물질 스크리닝
  - 추출용매, 추출방법, 가공조건별 유효성분 추출조건을 최적화
  - 유효성분의 정성 및 정량분석을 위한 최적의 분석조건 확립
  - 재현성 있는 분석방법 및 성분 구명
  - 김의 가공제품 유형별(건조김, 조미김) 생리활성 물질 함량 및 분포 유형 분석
  - 주요 생산국별(한국, 일본, 중국) 김의 유효성분의 함량 분석 비교
  - 김의 중금속 함량 측정

#### 2. 김의 항산화활성 탐색

- 김 추출물의 *in vitro* 항산화 활성 탐색
  - DPPH(diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay를 이용하여 김 추출물의 항산화 능력 평가
  - ABTS(azino-bis3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) assay를 이용하여 김 추출물의 항산화 능력 평가

#### 3. 김 추출물의 항암효능 탐색

- 산화적 손상에 대한 세포독성 예방 활성 억제 효과 측정
  - MTT assay를 통한 세포 독성 및 암세포 성장 억제 활성 측정
- 산화성 물질에 의해 촉진된 암세포의 침윤, 이동, 전이 억제능 측정
  - Zymography를 이용하여 MMP의 발현 및 활성화 측정
  - 암세포의 전이능 및 이동성과 관련된 인자 측정
- DNA 산화, 세포주기 및 세포예정사 평가
  - Annexin V staining에 의한 apoptosis 유발정도 평가
  - PCR과 Western blot에 의한 m-RNA 및 protein 발현 양상 평가

## [제1협동과제]

### 1. 김 추출물을 이용한 면역조절 및 항당뇨 활성 분석

- 김 추출물의 면역세포 기능조절 활성 연구
  - 대식세포(peritoneal macrophage 및 RAW 264.7 세포)의 활성화 유도
  - 사이토카인 분비 유도, Cell surface phenotype 분석, mRNA 분석
  - LPS에 의한 염증모델에서 항염증 작용 해석
- 김 추출물의 경구투여에 의한 마우스 비장세포의 증식 및 면역관련 사이토카인 분비능 측정
  - 세포성 면역 측정, 점막면역세포의 활성화 측정, 사이토카인 분비 유도물질 측정 등
- 김 추출물 또는 김 파우더를 이용한 쥐 사료를 제조하여 추출물 급여와의 비교분석
  - 면역세포 활성화 패턴의 비교, 분석
  - 투여량, 투여간격, 투여기간 별 면역학적 효능 정량화
- Alloxan 투여 마우스에서 항당뇨 활성 측정

### 2. 김 추출물을 이용한 *In vivo* 항암 효과 분석

- 암전이 모델을 이용하여 암전이 억제효과 및 작용기전 해석
  - B16-BL6 melanoma 암세포의 폐전이에 대한 암전이 억제활성 측정
  - Colon 26 carcinoma 암세포의 폐전이 모델에서 암전이 억제활성 조사
  - 담암 마우스(tumor-bearing mice)에서 암세포 증식억제 활성 측정
  - B16-BL6 melanoma 암세포를 이용한 tumor-induced angiogenesis에 대한 억제효과 분석
- 항암활성에 대한 최적화 조건의 확립
  - 최적 투여량, 최적 투여간격, 최적 투여경로 등을 결정
- 암세포 이식 후 김 추출물의 경구투여에 의한 마우스의 항암활성에 관한 작용기전 연구
  - 각 대조군과 시험군의 김 추출물에 대한 항암 효과 조사
  - 대식세포 및 NK 세포 활성화 유도작용 해석

## IV. 연구개발결과

- 김에 함유된 유효성분 및 추출효율을 고려할 때, 물과 70% 에탄올이 가장 적합한 추출용매임을 확인하였다. 김의 가공형태 및 원산지에 따라 폴리페놀 함량이 다르게 나타났다. 70% 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 폴리페놀 함량이 높게 나타났다. 100°C 물추출의 경우, 100°C 추출온도에서는 37°C 추출에 비해 폴리페놀 함량이 낮았다. 일본산 및 중국산 김에서도 국내산 김과 비슷하거나 다소 높은 폴리페놀 함량을

나타냈다.

- 본 실험에 사용한 김 시료에서는 폴리페놀에 비해 매우 낮은 양의 플라보노이드 물질을 확인하였다. 100°C 물 추출물과 70% 에탄올 추출물의 경우는 플라보노이드가 검출되지 않았다. 37°C 물 추출물에서는 마른김, 김밥용김, 및 조미김에서 미량(0.04~1.25 mg catechin equivalent/g extract)의 플라보노이드를 확인하였다.
- 김 추출물의 농도(100~1,000 µg/mL)가 증가할수록 DPPH 및 ABTS radical 소거활성도 증가하는 것으로 나타났다. 일본산 김과 중국산 김에서도 김 추출물의 농도에 비례하여 항산화 활성이 증가하는 것을 관찰하였다.
- 한국산 마른김에서는 taurine, serine, glycine, valine, isoleucine, leucine, gamma-aminobutyric acid(GABA) 등의 아미노산이 검출되었고, 조미김에 비해 함량이 높게 나타났다. 한국산 마른김에서는 asparagine 함량이 22.37 mg 이었으나, 조미김에서는 검출되지 않았다. 한국산 조미김에서는 glutamic acid, alanine 함량이 한국산 마른김에 비해 높게 나타났다. 일본산 김에서는 한국산 마른김에 비해 taurine, aspartic acid, glutamic acid 함량이 높았으나, asparagine, isoleucine, leucine, GABA 등은 검출되지 않았다. 중국산 김은 threonine, serine, alanine, citrulline 함량이 높게 나타났으나, valine과 GABA 등은 검출되지 않았다.
- 김에 함유되어 있는 중금속(수은, 납, 카드뮴, 비소) 함량을 분석한 결과, 개별 중금속 중 비소 함량이 가장 높았으며, 특히 중국산 김에서는 납, 카드뮴, 비소의 함량이 높게 나타났다.
- 한국산 마른김은 한국산 조미김에 비해 암세포 성장 억제 활성이 다소 높은 것으로 나타났으며, 일본산김과 중국산에서도 김 추출물의 농도 및 배양시간에 비례하여 암세포 증식 억제효능을 나타내었다.
- 한국산 김(마른김, 김밥용김) 추출물은 암세포의 침윤, 이동, 전이를 억제하고, 암전이를 유발하는 MMP-2와 MMP-9의 분비를 mRNA 수준에서 감소시키고, TIMP-1과 TIMP-2의 분비를 증가시키는 것으로 나타났다. TIMP-1은 MMP-9의 활성을, TIMP-2는 MMP-2의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 한국산 김 추출물은 TIMP-1/-2의 활성을 증가시킴으로써 MMP-2/-9의 활성을 억제하며, 이는 암세포의 부착, 침투 및 이동을 억제하여 암전이 억제효능을 보이는 것으로 사료된다. 또한, 김 추출물의 처리 농도와 처리시간이 증가함에 따른 apoptosis가 증가하는 것을 확인하였다.

- 한국산, 중국산, 일본산 김에 대해 면역세포 활성화 작용을 비교한 결과, 한국산 김이 가장 높은 효과를 지닌 것으로 나타났다.
- 세균 내독소에 의한 대식세포 염증반응 모델에서 항염증 활성을 측정한 결과, 한국산 김 추출물이 현저하게 높은 활성을 나타냈으며, 한국산 김의 항염증 활성은 MAPK와 NF- $\kappa$ B의 활성화 억제에 기인하는 것으로 관찰되었다
- 항암활성과 혈당조절활성에 있어서는 모든 김 추출물에서 유의한 억제활성이 관찰되지는 않았지만, 한국산 김에서 약간의 감소가 관찰되었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 한식의 주요 식재료인 김의 우수성을 과학적으로 규명하여 국제적인 학술대회 및 SCI 논문에 발표하고 국내외적인 홍보에 활용한다.
- 김의 생리활성 입증을 통해 우리나라 김의 위상을 높이고 수출을 통한 고부가가치 창출, 한식세계화 및 현재 정부가 추진 중인 김의 국제식품규격(Codex) 제정에 기여한다.
- 성인병과 만성질환의 예방과 증상 개선에 유용한 항염증 활성을 지닌 기능성 식품으로서 개발할 수 있다.
- 항염증 활성물질을 분리 동정하여, 고기능성 항염증 바이오 소재로서 기능성 식품 원료 및 의약소재로서 개발할 수 있다.
- 항염증 활성과 아울러 면역작용을 지닌 한식소재로서 신제품 개발에 활용할 수 있다.
- 세계인이 선호할 수 있는 김을 활용한 식단 및 레시피 개발 등의 후속 연구 시 참고 자료로 활용할 수 있다.



## SUMMARY

### (영문요약문)

Laver is one of the most consumed edible seaweed which belongs to the red algae in *Porphyra* genus. It is mostly cultivated in Korea, Japan and China. It is recognized as a health food since it may contain essential amino acids and minerals that have various bio-active function. We collected the most popular consumed laver from the three different countries of Korea, Japan and China. The water or ethanol extracts from laver were evaluated the food components such as amino acid, mineral, trace metals and color. The amount of amino acids, mineral and trace metals in the laver was different between the origins and extraction solvent. Korean laver contained high amount of taurine, alanine and glutamic acid with 979 mg, 936.28 mg and 843.35 mg in 100 g dry weight of laver, respectively. Japanese laver determined high amount of taurine and less amount of asparagine compared to Korean origin. GABA was detected from Korean laver but not detected from China and Japan origin. The mineral content of laver was expressed as dry weight. The mean macro mineral content per 100 g of dried Korean laver was (in descending order): K(28,020 ppm), P(8,201 ppm), Na (4,203 ppm), Mg (4,203 ppm) and Ca (1,514 ppm). There was clear regional variation in the amino acid, mineral and trace metal contents of laver. Significant differences were found in phenolic compound contents among differently processed laver, ranging from 10.81 to 32.14 mg gallic acid equivalent/g extract depending on the extraction solvent and temperature. The laver contained very little amount of flavonoids (1.75 mg and 0.98 mg catechin equivalent/g extracts). The DPPH and ABTS radical scavenging activity of dried, roasted and seasoned laver products increased in a concentration-dependent manner (100~1,000 mg/mL). Water extract at both 37°C and 100°C showed low DPPH radical scavenging activity than 70% ethanol extract at 37°C. The highest DPPH scavenging capacity was observed in the 70% ethanol extract of dried, roasted and seasoned laver at 37°C. The inhibition % of ABTS radical scavenging activities of dried, roasted and seasoned laver in water extract (extraction at 37°C) at 1,000 mg/mL was 26.51%, 19.66%, and 16.58%, respectively. We obtained an inhibitory effect of laver extract on cancer cell proliferation, adhesion, invasion, migration and metastasis in SK-Hep1 human

hepatoma cells. Korean laver extract inhibited the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 and increased mRNA levels of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMPs) 1 and 2. The overall results support that both lavers contain bioactive compounds such as polyphenol and flavonoids and they may play a positive role in our health.

In this study, the effects of the extract of Korean laver (*Porphyra tenera*) harvested in Wan-do island on various biological functions such as immunomodulating and anti-cancer activity, anti-inflammatory activity, and anti-diabetic activity were investigated. And its biological activity was in part compared with that of Japanese and Chinese laver. The results obtained are as in the following.

- All extracts of lavers did not show any cytotoxicity to murine splenocytes for up to the dose of 500 µg/mL. The extract of Korean laver showed strongly induced IL-6 from T lymphocytes at the dose of more than 100 µg/mL. In addition, T lymphocytes isolated from the mice that had given Korean laver extract also secreted IL-6.

- In an inflammation model in which Raw 264.7 macrophages were stimulated by LPS (1 µg/ml), pre-treatment of Korean laver showed higher activity to inhibit inflammatory mediators (NO, TNF-α) compared with Japanese and Chinese lavers.

- In analysis of intracellular mechanisms related to anti-inflammatory activity of Korean laver, it was demonstrated that Korean laver extract strongly inhibited the activation of MAPK and NF-κB during LPS-induced inflammation in Raw 264.7 cells. Furthermore, oral administration of Korean laver extract (3 and 5 mg/mouse) markedly inhibited the level of inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, and IL-6) in sera of the mice injected with LPS (20 mg/kg).

- Oral administration of Korean laver extract did not elicit anti-diabetic activity to decrease the level of blood glucose in alloxan-induced diabetic mice.

- In an experimental lung metastasis model in mice, oral administration of Korean laver extract showed no significant inhibition of lung metastasis produced by B16-BL6 melanoma cells although this laver induced a partial reduction of lung metastasis.

- Collectively, Korean laver extract has the anti-inflammatory activity to inhibit LPS-induced inflammation in Raw 264.7 macrophages. However further study is needed to elucidate its anti-diabetic and anti-cancer activity.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

SUMMARY

Chapter 1 Outline of Research Project

Chapter 2 State of the Report

Chapter 3 Research Performed and Results

Chapter 4 Application Plans for Research Results

Chapter 5 References

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 한식소재인 김( <i>Porphyra tenera</i> )의 건강기능성 규명 연구		
	(영문) Investigation on Health Functionality of Laver ( <i>Porphyra tenera</i> ), a major Korean Food Material		
연구 기관	한경대학교	연구 구	(소속) 한경대학교
참여 기관	건양대학교	책 임 자	(성명) 황 은 선
연구 비	계	1억원	총 연구 기간
			2011. 12. 30~2012. 12. 29(1년 0월)
참여 연구원	8 명 (연구책임자: 1 명, 책임연구원: 1 명, 연구원: 4 명, 연구보조원 2 명)		

### ○ 연구개발 목표 및 내용

본 연구는 1) 김 추출물의 유효성분 분석법 개발, 주요 제품별(건조김, 조미김), 생산국별(한국, 일본, 중국) 김의 유효성분 함량 분석 비교 및 김 추출물의 *in vitro* 항산화 및 항암 활성 탐색, 2) 김 추출물의 *in vivo* 면역조절, 항암 및 항당뇨 활성을 통하여 김의 건강 기능성을 규명하고 한식 식재료의 위상 제고 및 의약소재로 개발하여 김의 부가가치를 높이고자 함.

### ○ 연구결과

- 김에 함유된 유효성분 및 추출효율을 고려할 때, 물과 70% 에탄올이 가장 적합한 추출용매임을 확인함. 김의 가공형태 및 원산지에 따라 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 다르게 나타났으며, 70% 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 폴리페놀 함량이 높게 나타남.
- 한국산 김(마른김, 김밥용김) 추출물은 암세포의 침윤, 이동, 전이를 억제하고, 암전이와 관련된 MMP-2와 MMP-9의 분비를 감소시키는 것으로 나타남. 또한, 김 추출물의 처리농도와 처리시간이 증가함에 따른 apoptosis가 증가하는 것을 확인함.
- 한국산, 중국산, 일본산 김에 대해 면역세포 활성화 작용을 비교한 결과, 한국산 김이 가장 높은 효과를 지닌 것으로 나타남.
- 세균 내독소에 의한 대식세포 염증반응 모델에서 항염증 활성을 측정된 결과, 한국산 김 추출물이 현저하게 높은 활성을 나타냈으며, 한국산 김의 항염증 활성은 MAPK와 NF- $\kappa$ B의 활성화 억제를 기인하는 것으로 관찰함.
- 항암활성과 혈당조절활성에 있어서는 모든 김 추출물에서 유의한 억제활성이 관찰되지는 않았지만, 한국산 김에서 약간의 감소가 관찰됨.

### ○ 연구성과 및 성과활용 계획

- 한식의 주요 식재료인 김의 우수성을 과학적으로 규명하여 국제적인 학술대회 및 SCI 논문에 발표하여 국내외적인 홍보에 활용함.
- 김의 생리활성 입증을 통해 우리나라 김의 위상을 높이고 수출을 통한 고부가가치 창출, 한식 세계화 및 현재 정부가 추진 중인 김의 국제식품규격(Codex) 제정에 기여함.
- 성인병과 만성질환의 예방과 증상 개선에 유용한 항염증 활성을 지닌 기능성식품으로 개발함.
- 항염증 활성물질을 분리, 고기능성 항염증 바이오소재, 기능성식품 원료 및 의약소재로 개발함.
- 항염증 활성과 아울러 면역작용을 지닌 한식소재로서 신제품 개발에 활용함.
- 세계인이 선호할 수 있는 김을 활용한 식단 및 레시피 개발 등의 후속 연구 시 참고자료로 활용함.

# 제 1 장 연구개발 과제의 개요

## 제 1절. 연구의 필요성

### 1. 연구과제의 수행동기

- 지구촌은 지금 음식 전쟁 중이라고 할 만큼 21세기 들어 세계 각 나라들은 자국의 고유한 음식과 식문화 수출을 국가 전략산업으로 정하고 국가적 역량을 집중하고 있는 추세이다. 이는 자국의 전통식품 개발과 지적재산권 보호를 통해 경제적 이익과 국가 이미지 제고 효과를 동시에 거두는 한편, 식품안전·위생 관련 국제적 규제를 강화하여 국내 농식품을 보호할 수 있는 효과가 있다.
- 고유한 음식문화는 부가가치가 높은 대표적인 국가 이미지 상품이며, 음식산업은 새로운 성장동력 산업으로 작용할 수 있다. 음식문화의 해외진출은 우리 농식품의 수출증가, 로얄티 수입 등 외화수입 증대와 고용창출 효과를 높일 수 있다.
- 최근 우리 고유음식의 우수성에 대한 인식이 확산되고 한식에 대한 세계인들의 관심이 높아지고 있다. 우리나라 식재료는 세계적 기능성 식품으로 발전할 가능성이 매우 높으나 식재료의 기능성에 대한 과학적인 기본 자료들이 미비하고 한식의 건강기능성이나 우수성을 입증할 수 있는 국제적으로 공인된 발표 논문들도 매우 취약한 실정이다.
- 우리나라는 세계 최초의 김 양식 국가로써 김이 국내 식품 및 수산가공산업에 있어서 차지하는 비중은 매우 높은 편이다. 김의 2007년 수출액은 6천만 달러(6.6천 톤)로 규모로 수산물 중 참치, 오징어 다음으로 3위를 차지하고 있으며, 2007년 기준 약 1억4,600만 달러 규모인 세계 김 시장의 42%를 점유하고 있다. 또한, 2008년 상반기 김 수출실적은 2007년 상반기에 비해 마른김은 15%, 조미김은 32% 정도 크게 증가하였다. 특히, 조미김의 경우는 국내의 특유한 김 가공제품으로 일반김 및 돌김을 모두 원료로 사용하는데 국내 수출량이 세계 조미김 수출 규모의 43%를 점유하고 있을 정도로 애용되고 있다.
- 국제 교역량이 가장 많은 김 가공제품으로는 조미김(한국형)과 마른김이 있는데 한국, 일본, 중국, 대만, 태국 등 아시아 중심으로 활발한 수출입이 이루어지고 있으며, 서구권에도 점차 교역량이 증가하고 있는 추세에 있어 국제식품규격인 CODEX 규격제정의

필요성 대두되고 있다.

표 1. 수산물 수출 상위 3개 품목

(단위: 톤 천 달러 %)

품목	2003		2004		2005		2006		2007	
	중량	금액	중량	금액	중량	금액	중량	금액	중량	금액
참치	92,318	229,635	80,609	259,481	92,350	233,006	101,049	239,618	114,159	293,458
	(21.7)	(20.3)	(19.8)	(20.3)	(22.4)	(19.5)	(27.4)	(22.0)	(21.3)	(23.9)
오징어	60,566	70,839	69,834	113,020	65,044	102,131	36,688	47,399	156,188	123,768
	(14.2)	(6.3)	(17.1)	(8.8)	(15.8)	(8.6)	(10.0)	(4.3)	(29.1)	(10.1)
김	6,969	41,646	6,899	45,031	7,581	54,244	7,475	61,730	6,672	59,728
	(1.6)	(3.7)	(1.7)	(3.5)	(1.8)	(4.5)	(2.0)	(5.7)	(1.2)	(4.9)

자료 : 농수산물유통공사, 농수산물무역정보([www.kati.net](http://www.kati.net)), 2008., 조승목, 2008  
 주: ( )는 전체 수출액 대비 품목별 비중을 나타냄.


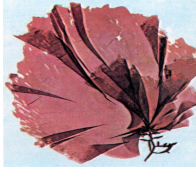


- 최근 농림수산물식품부는 김을 10대 수출 전략품목으로 선정하여 세계 시장 선점을 위한 육성계획을 세우고(수산물 수출 증대를 위한 워크샵, 2008) 김에 대한 국제표준규격을 2010년 아시아식품규격위원회에 제안하였다. 또한, 2011년 제34회 국제식품규격위원회(CODEX) 총회에서 전 세계 184개 회원국의 동의를 얻어 김의 표준규격을 제정하기로 결정되었다. 이에 따라 우리나라는 향후 김의 국제규격 제정 과정에서 제안국으로 주도적으로 참여할 수 있으며, 김의 국제규격이 국내 기준과 최대한 동일하게 마련되도록 유도함으로써 김의 세계 수출시장 유지 및 개척에 큰 도움을 줄 것으로 예상된다.
- 국제식품규격위원회(CODEX)는 식품에 관한 국제기준을 개발하여 소비자의 건강을 보호하고 공정한 식품교역을 실현하는 것을 목적으로 설립된 정부간기구로서 현재 전 세계 184국이 회원국으로 참여 중임.
- 우리나라 전통식품의 CODEX 등록 현황 : 김치('01), 고추장('09), 된장('09), 인삼('09)

## 2. 연구의 필요성

- 지난 40여 년간 전 세계적으로 암의 생성원인 및 치료법 연구에 막대한 투자가 이루어졌음에도 불구하고 전체적으로 암의 발생률 및 사망률은 줄어들지 않고 있다. 암 정복을 위한 대안으로 예방의 중요성이 강조되고 있으며, 경험적으로 안전성이 검증된 식품 유래 화합물을 이용한 기능성 식품소재를 개발함으로써 암 발생률 및 사망률을 실질적으로 낮출 수 있는 새로운 전략이 부각되고 있다.

- 암예방(cancer chemoprevention)은 천연 혹은 합성 화합물을 이용하여 암발생을 차단하거나 단계적으로 진행되는 발암과정을 억제 또는 역전시키는 것으로 수많은 식품 및 천연물 성분들이 암예방 소재로 개발되고 있다. 일차적인 예방은 외관상으로 건강한 개인을 대상으로 암발생의 차단을 목적으로 하며, 이차적인 예방은 악성으로 진행되지 않은 종양을 가진 사람들을 대상으로 암화과정의 진행을 억제 또는 역전시키는 것이 목적이다. 삼차적인 예방은 암의 재발과 악성화, 침윤 및 전이의 억제를 목적으로 하며, 악성암을 가진 환자나 이전에 암을 치료한 적이 있는 사람들을 대상으로 한다.
- 종양의 예방과 치료에 있어서는 숙주의 면역계를 증강시켜 면역학적인 작용에 의해 종양세포를 살해하거나 증식을 억제하는 기전(항암면역)과, 암세포에 대한 선택적인 세포상해활성을 갖는 물질을 이용하여 종양세포를 제어하는 방법(화학요법)이 있다. 김과 같은 해조류에는 수지상 세포(dendritic cell)나 대식세포(macrophage)와 같은 선천면역세포를 활성화하는 유효성분이 함유되어있을 개연성이 높으며, 또한 암세포의 증식을 억제하고 살해할 수 있는 저분자 유기물질 등이 포함되어 있을 가능성이 높다. 그러므로 본 연구의 시료인 김은 종양에 대한 면역학적 억제와 화학적 암예방에 유효한 활성을 나타낼 가능성이 매우 높다.
- 선진 각국에서는 자연계에 널리 존재하는 천연물질로부터 효능이 우수하고 독성이 없는 항암 및 암 예방제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 미국의 경우, 국립암연구소(National Cancer Institute)에서 효능이 확인된 암예방 후보물질 가운데 16종을 선정하여 임상실험을 진행하고 있다. 특히, 브로콜리나 양배추에 함유된 indole-3-carbinol, 카레의 노란색 색소성분인 curcumin, 녹차성분인 EGCG 등이 유방암, 전립선암, 대장암 예방에 효능이 높은 것으로 평가되어 전임상 독성실험 및 임상실험을 진행하고 있다.
- 김(laver)은 홍조류 보리털과에 속하는 *porphyra yezoensis*로 미역 및 다시마 등과 함께 우리나라에서 가장 많이 애용되는 해조류이며, 최근에는 현대인들의 건강유지를 위하여 필요한 각종 영양소의 작용으로 암예방, 동맥경화 방지, 담석예방, 노화방지, 면역력 증강효과가 있을 것으로 추정되면서 관심이 증가되고 있다. 특히 최근 우리사회에서 커다란 사회적 문제로 대두되고 있는 암, 당뇨, 고지혈증, 비만과 같은 대사성 성인질환에 대해 해조류 산물인 김이 증상개선 효과를 가질 개연성이 아주 높으나, 과학적 연구결과는 거의 없는 실정이다.
- 국내에서 주로 양식되고 있는 김은 크게 일반김과 돌김으로 구분되는데 일반김은 참김과 방사무늬김, 돌김은 잇바디돌김과 모무늬돌김이 대표적이다.

표 2. 국내산 김의 종류와 특징


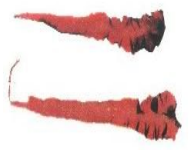
구분	일반김		돌김	
	참김	방사무늬김	잇바디돌김	모무늬돌김
학명	<i>Porphyra tenera</i>	<i>P. yezinensis</i>	<i>P. dentata</i>	<i>P. seriata</i>
사진				
특징	체형	타원형으로 가장자리에 주름이 많음	대나무잎 또는 달걀 모양으로 가장자리가 톱니 모양	원형 또는 콩팥형으로 줄기가 짧음
	색상	자홍색, 갈홍색	밝은 자색	갈홍색
	크기	길이: 15~25 cm 폭: 7~12 cm	길이: 10~20 cm 폭: 3~10 cm	길이: 10~20 cm 폭: 2~10 cm
이용 형태	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 마른김 및 조미김으로 이용</li> <li>- 가공방법 : 김밥김(편김), 채래김(조선김)</li> <li>- 화입유무 : 생김(동철기), 얼구운김 또는 화입김(하절기)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주로 조미김 형태로 이용</li> <li>- 온돌김 : 돌김만 사용</li> <li>- 반돌김 : 일반김과 돌김을 혼합하여 만든 것으로 대부분의 조미김이 이에 해당됨</li> </ul>	

(자료 : 조승목, 2008)

- 일본에서 주로 양식되고 있는 김은 우리나라와 같은 참김, 방사무늬김이 있으며, 이 외에 돌김 종류인 긴잎돌김(*Porphyra pseudolinearis*)이 있는데 주로 일본 동해연안에서 생산되며 김밥용 김, 조림 등에 이용되고 있다.
- 중국의 주요 김 품종은 참김, 방사무늬김 및 단김(*Porphyra haitanensis*)이 있으며, 단김은 중국 김 생산량의 70%를 차지할 정도로 대표적인 품종이며, 방사무늬김 또한 애용되고 있다.
- 김의 주요 성분으로는 탄수화물과 단백질로 탄수화물은 40%, 단백질은 약 30~40% 정도를 차지하고 있으며, 탄수화물은 당질과 섬유질이 있고, 그 중 mannan, xylan 등 난용성 섬유가 약 2% 정도 함유되어 있다. 김의 미끌미끌한 성분은 porphyran으로서 수용성 다당류 중 약 30%를 차지하고 있다. 지질은 약 2% 정도로 소량 함유되어 있고, 무기질은 풍부하며 전체의 10% 정도를 차지하고 있다.



표 3. 일본 및 중국산 주요 김 품종

구분	일반명	학명	사진	특징
일본	긴잎돌김	<i>Porphyra pseudolinearis</i>		- 긴 대잎 모양 - 길이 10~30 cm, 폭 2~45 cm - 적자색
중국	단김	<i>Porphyra haitanensis</i>		- 긴 칼날 모양 - 폭은 30~40cm, 길이 1-2m정도 성장함 - 짙은 보라색

(자료 : 조승목, 2008)

- 김은 다른 채소와 비교하여 칼슘, 마그네슘, 철분, 아연, 망간 등이 균형있게 들어있고, vit A, Vit B complex, Vit C, Vit E, 나이아신, 엽산 등의 함량이 높으며, 특히 EPA와 taurine이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.
- 우리나라의 전체 김 생산량 중 약 80%는 서해와 남해안 지방에서 생산되고 있으며, 생산비 규모로는 약 3,000억원, 소비자 구매기준으로는 약 1조원의 시장규모를 형성하고 있는 매우 경제성이 높은 수산자원이다.
- 1980년대 3천만~4천만 속에 불과하던 우리나라 김 생산량은 국민소득 증가와 소비의 확대, 생산기술의 발달 등에 의해 최근에는 1억 속 전후로 크게 증가하였음. 2008년산 김 생산량은 약 9,900만 속으로 2007년산에 비해 17.4% 정도 증가하였으며, 이는 1980년대 중반과 비교하면 생산량이 두 배 가량 증가하였다.
- 특히, 우리나라 김 수출량은 1900만여 속으로 세계 교역량의 절반 이상을 점유하고 있으며, 매년 수출량을 늘려가고 있는 실정이다. 이는 전 세계적으로 김 소비가 증가하고 있는 것을 감안할 때 향후에도 증가추세가 이어질 것으로 예상된다.
- 전 세계 김 생산량은 약 173만톤(2010년 한국무역협회 통계)으로서 주요 생산국은 한국, 중국, 일본이며, 김은 대부분 마른김, 조미김 등 가공품 형태로 거래되고 있는데 우리나라는 김 가공품의 최대 수출국으로 전 세계 70여 개국 이상에 수출하고 있다.

표 4. 주요 김 생산국가 및 연도별 생산량 (1,000 US\$)

형태	국가	2005	2006	2007	2008	2009
마른김	한국	16,021	24,803	20,569	26,334	23,605
	중국	23,702	19,593	28,774	23,534	25,446
	일본	3,158	1,990	2,509	6,040	3,424
	소계	<b>42,881</b>	<b>46,386</b>	<b>51,852</b>	<b>55,908</b>	<b>52,475</b>
조미김	한국	35,900	34,429	37,351	47,619	56,970
	중국	42,088	41,924	51,071	53,856	52,426
	일본	9,087	9,767	13,033	12,528	10,998
	소계	<b>87,075</b>	<b>86,120</b>	<b>101,455</b>	<b>114,003</b>	<b>120,394</b>
총계		<b>129,956</b>	<b>132,506</b>	<b>153,307</b>	<b>169,911</b>	<b>172,869</b>

(자료 : 한국무역협회, 2010)

- 세계 김 시장은 2009년 기준 약 1억4,600만 달러 규모로 3,100만 속이 거래되고 있으며, 중 중국이 7,900만 달러를 수출해 세계 김 시장의 54%를 점유하고 있음. 일본은 800만 달러의 김을 수출하고 있다. 1988년 이후 우리나라는 세계 시장의 50% 이상을 점유하여 왔다. 2009년 상반기 김 수출실적은 2007년 상반기에 비해 마른김은 14.6%, 조미김은 50.8% 정도 증가하였다.

※ 마른김 수출실적 : (07.6) 20.6백만 불 → (09.6) 23.6백만 불 (↑14.6%)

※ 조미김 수출실적 : (07.6) 37.6백만 불 → (09.6) 56.7백만 불 (↑50.8%)

- 김 제품별 수출 현황을 살펴보면, 마른김 및 조미김의 수출액이 2009년 각각 2,361만 달러(35%) 및 5,697만 달러(62%)로 전체 김 수출의 97%를 차지하고 있으며, 기타 김 제품은 극히 미미한 수준이다. 마른김은 2007년과 2009년에 전년 대비 각각 17.1%, 10.4% 감소하였지만 조미김의 경우는 2006년 이후 지속적으로 증가하는 추세이다.
- 김은 한국, 일본, 중국에서 주로 소비되고 있으며, 생김은 무침이나 조림의 형태로 조리 일부 이용되고, 조미·배소김과 같은 가공품은 도시락 반찬, 기호식품으로 대량 소비가 정착되고 가고 있다. 과거에는 주로 마른 김의 형태로 유통 소비되어 왔으나, 마른 김은 수분함량이 10% 정도로서 변질이 쉬워 2차 가공으로 수분함량을 5% 이하의 수준으로 낮춘 건조 김과 건조김을 다시 식염, 식용유 등으로 조미한 맛김의 생산량이 늘어가고 있는 추세이다.

표 5. 국내에서 시판되는 김의 주요 유형 및 섭취 형태

종류	제품 형태	섭취 형태
건조김		
구운김		
조미김		

(자료 : 농림수산식품부 김 국제식품규격제안서, 2011)

- 국내 시판되는 김 제품으로는 건조김, 구운김, 개량 조미김, 부각의 형태, 김 천연 조미료 등이 소비되고 있다. 일반적으로 구운김은 건조김을 60~80°C에서 2차 건조한 다음 180~200°C 온도에서 구워서 포장한 것이고, 개량김은 건조김에 조미액을 도포한 다음 구워서 절단, 포장한 것이다. 김부각은 찹쌀가루로 풀을 쭈어 김에 바르고 그 위에 다시 김을 덮은 다음 40~60°C에서 2~3시간 동안 1차 건조 시키고, 이것을 적당한 크기로 자른 다음 다시 40~60°C에서 20~50분간 2차 건조를 시키고 170~180°C 온도에서 3~5분 동안 기름에 튀긴 다음 방냉 후 포장한 것이다. 김 천연 조미료는 김에 여러 가지 천연 조미소재를 첨가하여 다양한 맛을 갖게 한 다음 밥 위에 뿌려서 비벼먹는 조미식품이다.

표 6. 2009년 우리나라의 김제품의 해외 교역량

	건조김			조미김		
	국가	수량(tons)	가치 (1000US\$)	Country	수량(tons)	가치 (1000US\$)
수출	태국	726	9,532	일본	776	19,825
	일본	261	5,050	미국	3,522	16,255
	미국	528	3,002	중국	312	6,423
	타이완	221	2,572	캐나다	630	2,695
	중국	106	846	러시아	97	1,653
	인도네시아	79	417	홍콩	125	1,627
	캐나다	89	343	오스트레일리아	281	1,586
	러시아	11	258	타이완	101	1,262
	오스트레일리아	33	198	프랑스	177	779
	싱가포르	11	188	싱가포르	192	717
	프랑스	15	79	브라질	65	513
	파라과이	9	75	뉴질랜드	171	432
	브라질	3	66	영국	124	406
	영국	28	53	독일	31	199
	네덜란드	24	51	아랍에미리트	37	160
	기타	127	875	기타	296	2,437
	<b>총계</b>	<b>2,271</b>	<b>23,605</b>	<b>총계</b>	<b>6,937</b>	<b>56,967</b>
수입	중국	54	446	일본	3	78
	일본	-	3	중국	-	8
	기타	1	4	기타	-	-
	<b>총계</b>	<b>55</b>	<b>453</b>	<b>총계</b>	<b>4</b>	<b>87</b>

(자료 : 한국무역협회, 2010)

- 조미김은 수출 물량 및 금액 모두 미국이 가장 많았으며, 전체 수출량 및 수출액의 55% 및 37%의 비중을 차지하고 있다. 일본의 수출 물량 및 금액 비중은 각각 8% 및 27%로 2006년 수출이 감소하였지만 전체적으로 꾸준히 증가하였다. 특히 일본에 수출되고 있는 조미김은 톤당 단가가 미국에 비해 5배 정도 높게 형성되고 있다. 미국 및 일본 다음으로 수출이 많이 되고 있는 대만 및 캐나다의 경우 비중은 그리 높지 않지만 2004년부터 2007년까지 큰 변화 없이 안정적으로 수출이 이루어지고 있다.
- 우리나라의 김 수입 물량 및 금액은 각각 213톤 및 2백만 달러 규모로, 우리나라의 김 수출량 및 수출액과 비교해 볼 때 3.0%(물량) 및 3.4%(금액) 수준으로 미미하지만

2004년 이후 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 김 제품별 수입 현황을 살펴보면, 마른 김의 수입이 전체의 94%를 차지하고 있으며, 조미김 및 기타김의 경우 미미한 수준이다.

- 건조김의 국내 수입은 일본에서도 소량 이루어지고 있으나 거의 대부분 중국에서 수입되고 있다. 2007년 중국김 수입 물량 및 금액은 2004년 대비 각각 3배 및 5배로 크게 증가하고 있으며, 국내산 김으로 원산지를 속여 판매된 사례도 있다. 조미김의 수입은 극히 미미한 수준으로 대부분 일본에서 수입되고 있는데 한국형 조미김이 아니라 김 후리카케와 같은 일본식 조미김 가공식품이 대부분이다.
- 최근 일본 원전 사고에 따른 방사능 공포가 확산되면서 방사능 해독에 탁월한 효과가 있는 요오드 성분이 김·미역·다시마 등에 다량 함유되어 있다는 언론보도에 의해 해조류가 크게 인기를 끌고 있다. 또한 일본 해조류의 방사선 오염에 따라 김의 주요 소비국인 일본으로의 국내산 김의 수출양이 크게 증가할 것으로 전망하고 있다.

### 3. 연구결과의 유용성

- 지금까지 발표된 김에 대한 연구들은 이화학적 성분 분석이 일반적이며 일반성분, 무기성분, 아미노산, 지방산, 황화합물 및 색소류 등 성분변화, 유기산, 색소 등 특정 성분의 화학적 정량에만 치우쳐 있을 뿐 김에 함유된 유용성분의 기능성 입증을 통한 실질적 활용에 도움이 되는 연구는 거의 이루어지지 않았다.
- CODEX 식품규격으로 제정되기 위해서는 국제적인 교역량 및 인지도 등을 고려할 때, 다수의 국가에서 유통되고 있어야 하며, 회원국 등의 동의가 있어야 가능한 것임을 감안할 때, 한식의 주요 소재인 김의 세계화를 위한 과학적인 기초 자료가 절실히 필요한 상황이며 김의 우수성 및 효능이 입증되면 향후 한식 식재료의 수출 및 국제규격 제정에 큰 원동력이 될 것으로 예상된다.

## 제 2 장 연구개발의 목표 및 범위

### 1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

본 연구는 1) 김 추출물의 유효성분 분석법 개발, 주요 가공제품별(건조김, 조미김), 생산국별(한국, 일본, 중국) 김의 유효성분 함량 분석 비교 및 김 추출물의 *in vitro* 항산화 및 항암 활성 탐색, 2) 김 추출물의 *in vivo* 면역조절, 항암 및 항당뇨 활성조사를 통하여 김의 건강 기능성을 규명하고 한식 식재료의 위상 제고 및 의약소재로 개발하여 김의 부가가치를 높이고자 한다.

### 2. 세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

제1세부과제 : 김 추출물의 유효성분 분석법 개발 및 *in vitro* 항산화 및 항암활성 기전 연구

#### 1) 김의 생리활성 물질 추출법 확립 및 가공방법에 따른 활성 물질의 변화 분석

- 김의 기능성 생리활성 물질 스크리닝
  - 추출용매, 추출방법, 가공조건별 유효성분 추출조건을 최적화
  - 유효성분의 정성 및 정량분석을 위한 최적의 분석조건 확립
  - 재현성 있는 분석방법 및 성분 구명
  - 김의 가공제품 유형별(건조김, 조미김) 생리활성 물질 함량 및 분포 유형 분석
  - 주요 생산국별(한국, 일본, 중국) 김의 유효성분의 함량 분석 비교
  - 김의 중금속 함량 측정

#### 2) 김의 항산화활성 탐색

- 김 추출물의 *in vitro* 항산화 활성 탐색
  - DPPH(diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay를 이용하여 김 추출물의 항산화 능력 평가
  - ABTS(azino-bis3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) assay를 이용하여 김 추출물의 항산화 능력 평가

#### 3) 김 추출물의 항암효능 탐색

- 산화적 손상에 대한 세포독성 예방 활성 억제 효과 측정
  - MTT assay를 통한 세포 독성 및 암세포 성장 억제 활성 측정

- 산화성 물질에 의해 촉진된 암세포의 침윤, 이동, 전이 억제능 측정
  - Zymography를 이용하여 MMP의 발현 및 활성화 측정
  - 암세포의 전이능 및 이동성과 관련된 인자 측정
- DNA 산화, 세포주기 및 세포예정사 평가
  - Annexin V staining에 의한 apoptosis 유발정도 평가
  - PCR과 Western blot에 의한 m-RNA 및 protein 발현 양상 평가

**제1협동과제 : 김 추출물 급여를 통한 면역조절, 항암 및 항당뇨 활성화에 관한 및 작용기전연구**

**1) 김 추출물을 이용한 면역조절 및 항당뇨 활성화 분석**

- 김 추출물의 면역세포 기능조절 활성화 연구
  - 대식세포(peritoneal macrophage 및 RAW 264.7 세포)의 활성화 유도
  - 사이토카인 분비 유도, Cell surface phenotype 분석, mRNA 분석
  - LPS에 의한 염증모델에서 항염증 작용 해석
- 김 추출물의 경구투여에 의한 마우스 비장세포의 증식 및 면역관련 사이토카인 분비능 측정
  - 세포성 면역 측정, 점막면역세포의 활성화 측정, 사이토카인 분비 유도물질 측정 등
- 김 추출물 또는 김 파우더를 이용한 쥐 사료를 제조하여 추출물 급여와의 비교분석
  - 면역세포 활성화 패턴의 비교, 분석
  - 투여량, 투여간격, 투여기간 별 면역학적 효능 정량화
- Alloxan 투여 마우스에서 항당뇨 활성화 측정

**2) 김 추출물을 이용한 *In vivo* 항암 효과 분석**

- 암전이 모델을 이용하여 암전이 억제효과 및 작용기전 해석
  - B16-BL6 melanoma 암세포의 폐전이에 대한 암전이 억제활성 측정
  - Colon 26 carcinoma 암세포의 폐전이 모델에서 암전이 억제활성 조사
  - 담암 마우스(tumor-bearing mice)에서 암세포 증식억제 활성 측정
  - B16-BL6 melanoma 암세포를 이용한 tumor-induced angiogenesis에 대한 억제효과 분석
- 항암활성에 대한 최적화 조건의 확립
  - 최적 투여량, 최적 투여간격, 최적 투여경로 등을 결정
- 암세포 이식 후 김 추출물의 경구투여에 의한 마우스의 항암활성에 관한 작용기전 연구
  - 각 대조군과 시험군의 김 추출물에 대한 항암 효과 조사
  - 대식세포 및 NK 세포 활성화 유도작용 해석

### 3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2012	<p><b>제1세부과제</b>                      김 추출물의 유효성분 분석법 개발 및 <i>in vitro</i> 항산화 및 항암 활성 기전 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 김 추출물의 분획물 제조 및 유효성분 분석조건 최적화</li> <li>- 주요 제품별(건조김, 조미김) 생리활성 물질 스크리닝</li> <li>- 주요 생산국별(한국, 중국, 일본) 유효 성분 함량 분석</li> <li>- 김 추출물의 <i>in vitro</i> 항산화 활성 탐색</li> <li>- 산화성 물질에 의해 촉진된 암세포의 침윤, 이동, 전이 억제능 측정</li> <li>- DNA 산화, 세포주기 및 세포예정사 측정</li> </ul>
		<p><b>제1협동과제</b>                      김 추출물 급여를 통한 면역조절, 항암 및 항당뇨 활성에 관한 및 작용기전연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 김 추출물 급여에 의한 면역세포와의 상호작용 및 활성화 기전 해석</li> <li>- 염증반응에 대한 김 추출물의 억제활성 측정</li> <li>- Mouse의 급여 시 김 추출물의 투여량, 투여간격, 투여기간 별 면역학적 효능 정량화</li> <li>- 마우스 암전이 모델에서 김 추출물의 경구투여에 의한 항암효과 분석</li> <li>- 담압 마우스에서 항암활성과 관련된 기전 해석</li> <li>- 김 추출물 투여에 의한 혈당조절 활성 측정 및 기전 해석</li> </ul>



## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1절. 연구수행방법

제1세부과제 : 김 추출물의 유효성분 분석법 개발 및 *in vitro* 항산화 및 항암활성 기전 연구

#### 1. 김의 생리활성 물질 추출법 확립 및 가공방법에 따른 활성 물질의 변화 분석

##### 1) 김 시료

본 연구에서는 시중에 유통되고 있는 김의 품질특성을 마른김, 김밥용김, 조미김으로 구분하여 조사하였다. 국내산 김과 외국산 김의 품질특성을 비교하기 위하여 일본과 중국에서 널리 유통되고 있는 김을 각국의 현지에서 2012년 1월~2월 사이에 구입하여 연구에 사용하였다. 국내산 김(마른김, 김밥용김, 조미김)과 일본산 김은 주로 밥에 얹어먹거나 김밥이나 스시로 이용되는 반면, 중국산 김은 물을 넣고 끓여 국의 형태로 섭취하거나 다른 채소들과 함께 무침의 형태로 섭취하는 것으로 나타났다. 본 연구에 사용된 각종 김 시료들은 그림 1과 같다.



그림 1. 국내산 마른김, 김밥용김, 조미김, 일본산 김, 중국산 김

## 2) 시약

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St Louis, MO, USA)로 부터 구입하였고, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS)는 Fluk(Heidelberg, Germany)에서 Folin-Ciocalteu's phenol reagent는 Fluka(Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 그 외 시약들은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)과 Junsei chemical Co., Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

## 3) 김 추출물 제조

국내에서 보편적으로 널리 이용되는 마른김(완도산)을 대상으로 신뢰성과 재현성을 갖춘 추출방법을 확립하기 위하여 추출용매, 온도 및 방법을 달리한 추출방법을 적용하여 추출효율 및 유효성분이 최대화되는 추출조건을 알아보려고 하였다.

김을 필립스 믹서기를 사용하여 아래 그림과 같이 곱게 마쇄하였다. 마쇄된 김에 김 무게의 25배가 되는 추출용매(물, 50~100% 에탄올, 50~100% 메탄올, 에틸아세테이트)를 가한 후, 추출온도(실온, 37°C, 100°C)를 달리하여 아래의 조건에서 추출하였다. (김 : 추출용매 = 1:25, w/v)

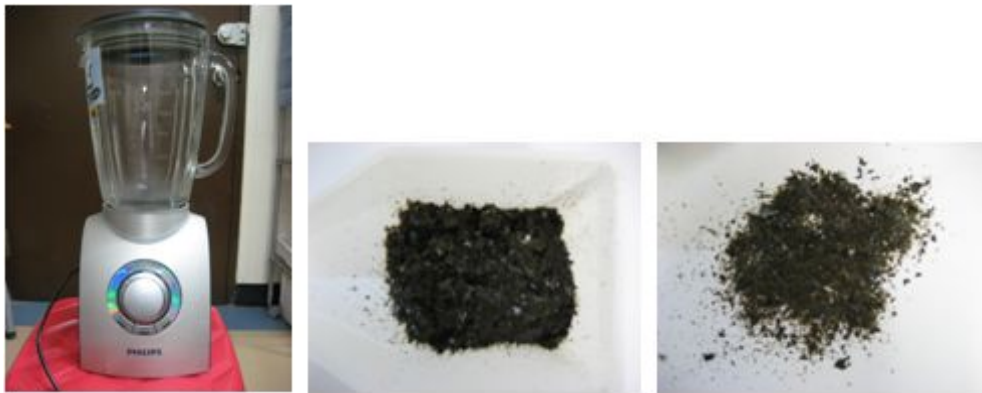


그림 2. 시료의 마쇄

- 실온추출(3일 추출) : 상온에서 24시간 추출 → 여과(1차) → 상온에서 24시간 추출 → 여과(2차) → 상온에서 24시간 추출 → 여과(3차) → 3차에 걸쳐 여과된 추출액을 40°C에서 감압농축
- 열추출(37°C 또는 100°C) : 각 추출온도에서 4시간 추출 → 여과(1차) → 4시간 추출 → 여과(2차) → 4시간 추출 → 여과(3차)  
(37°C 추출은 shaking waterbath 사용, 100°C 추출의 경우는 냉각관을 연결하여 추출)

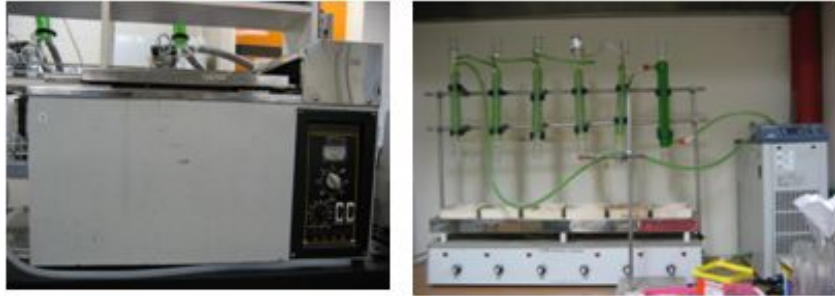


그림 3. 시료 농축에 사용한 장치들

- 여과 및 감압농축 : 물이 들어간 용매의 경우는 여과지로 여과하는 경우 여과속도가 매우 느리기 때문에, 추출조건 설정 시 모든 추출액은 여과지 대신 sieve로 1차 여과한 후 3,500 rpm에서 15분 원심분리한 후 상등액을 모아 rotary evaporator를 이용하여 40°C에서 감압농축 후 동결건조하여 아래와 같은 최종 추출물을 얻었다.

#### 4) 추출온도 및 추출 용매에 따른 수율, 항산화물질 함량 분석

추출 수율, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 스크리닝 하고 안전성 및 향후 식품에 적용 가능한 추출 용매를 고려한 결과, 37°C에서의 70% 에탄올 추출, 실온 및 100°C에서의 물 추출을 향후 실험에 적용하기로 하고 또다시 용매와 추출온도를 달리하여 본 실험에 사용할 시료를 추출하고 동결건조하여 최종 시료를 얻었다.

#### 5) 총 폴리페놀 함량

김 추출물 100  $\mu\text{L}$ 에 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 2 mL을 가하고 3분간 방치 한 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 100  $\mu\text{L}$ 를 가하였다. 30분 후 반응액의 흡광도를 750 nm에서 측정하였다. 표준물질로는 0.1% gallic acid를 사용하였으며, 시료에 함유되어 있는 총 폴리페놀 함량은 gallic acid equivalent(GAE)/100 mL로 나타내었다.

#### 6) 총 플라보노이드 함량

김 추출액 250  $\mu\text{L}$ 에 증류수 1.25 mL와 5%  $\text{NaNO}_2$  용액 75  $\mu\text{L}$ 를 각각 가하였다. 10분 뒤 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  용액을 150  $\mu\text{L}$ 를 가하여 5분간 방치하였다. 위의 반응액에 1 M의  $\text{NaOH}$  500  $\mu\text{L}$ 와 증류수 275  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로는 catechin을 사용하였으며, 시료에 함유되어 있는 총 플라보노이드 함량은 catechin equivalent(CE)/100 mL로 나타내었다.

#### 7) 항산화 활성 측정

(1) DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 측정

김 추출물의 전자공여능을 DPPH assay로 측정하였다. 보라색의 DPPH 라디칼 수용액의 색상의 변화를 이용하여 시료 중의 항산화 활성을 측정하는 방법이다. 96-well plate에 농도별로 김 추출물 100  $\mu$ L와 0.2 mM DPPH 용액 100  $\mu$ L를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. ELISA reader (Spectra MAX M2, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 BHA와 vitamin C를 사용하였다. 시료의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

## (2) ABTS 라디칼에 대한 전자공여능 측정

김 추출물의 전자공여능을 ABTS assay로 측정하였다. Radical inhibitor인 AAPH가 고온에서 ABTS와 반응하면 ABTS가 blue~green 색을 띠는 ABTS radical로 안정된 자유라디칼을 형성한다. 이후 ABTS 라디칼의 흡광도 값을  $0.65 \pm 0.02$ 가 되도록 한 후, 96-well plate에 농도별 추출물 100  $\mu$ L와 0.2 mM ABTS 용액 100  $\mu$ L를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. ELISA reader (Spectra MAX M2, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 BHA와 vitamin C를 사용하였다. 시료의 ABTS 라디칼에 대한 전자공여능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도}) \times 100$$

## 8) 일반성분 분석

일반성분은 AOAC official method (Horwitz, 2000)의 방법에 따라 분석하였다. 수분은 상압가열건조법에 따라 시험하여 수분 함량을 구하였으며, 건조 온도는 105°C로 하였다. 회분은 회화법에 따라 시험하여 회분 함량을 구하였으며, 조단백질의 경우 semi-micro Kjeldahl법에 따라 시험하여 조단백질 함량을 구하였다. 그리고 조지방은 Soxhlet법으로 측정하였다.



그림 4. 조지방 측정

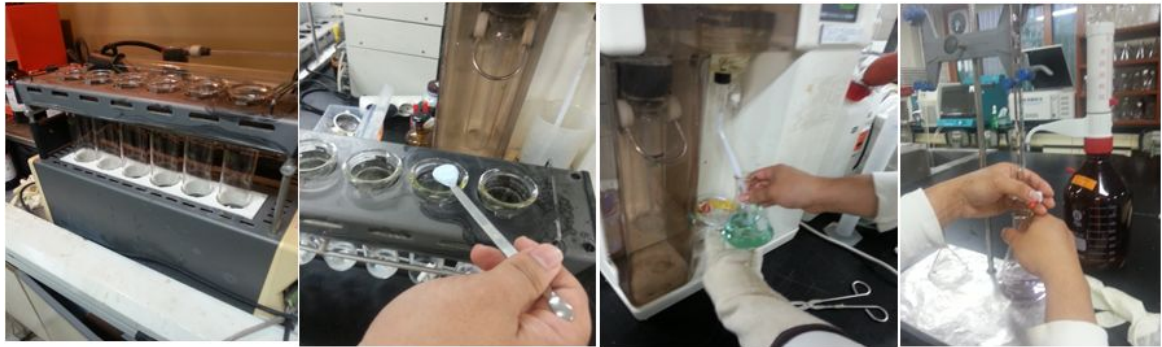


그림 5. 조단백 측정

### 9) 색도 측정

김의 전장을 이용하여 색도를 측정할 경우 위치별로 그 색도 값의 차이가 커 유의적인 색도 측정이 불가능하여 전장 크기의 김을 분쇄하여 petri dish에 담고 색채색차계(CR-400, Minolta, Japan)를 사용하여 Hunter L값(lightness), a(redness), 및 b값(yellowness)을 측정하였다. 실험은 5회 반복하여 측정된 값의 평균치로 나타냈다.

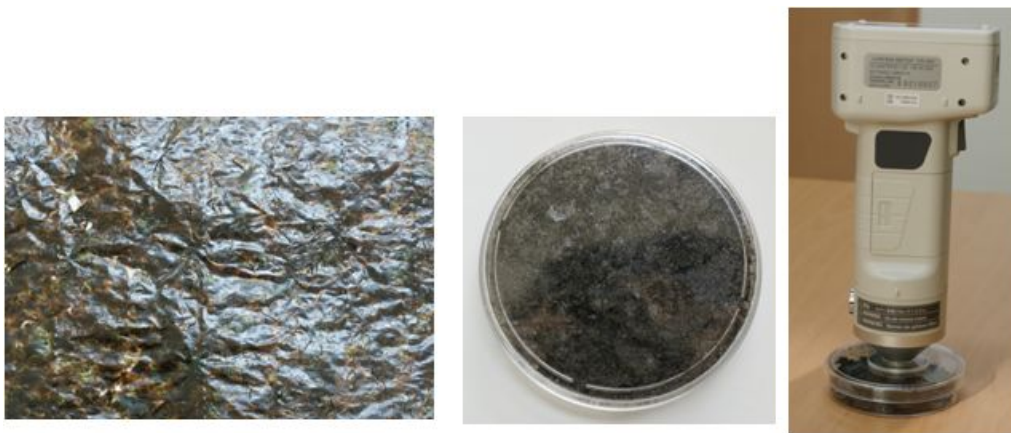


그림 6. 김의 색도 측정

## 10) 김의 무기질 및 중금속 함량 분석

시료를 취하여 beaker 에 넣고 balance 위에서 0.5xxx 까지 무게를 측정한 후, 시료에 HNO<sub>3</sub>를 넣고 watch glass를 닫은 상태에서 hot plate위에서 약 50°C 정도에서 반응을 시켰다. 산에 의해 분해된 시료를 watch glass를 열어 깨끗이 rinse 하여 beaker 에 넣고 증발시켰다. 산을 날린 뒤 산의 농도가 약 1~5%가 되도록 증류수로 희석해가며, 약 50 g 정도로 만들어 주었다.

각 중금속 표준원액은 Accu Standard(USA)사로부터 2~3% HNO<sub>3</sub>에 1000 ppm 농도로 녹아 있는 제품을 구입하여 사용하였다. 각 중금속 표준원액을 2% HNO<sub>3</sub>용액으로 희석하여 검량선 작성에 사용하였다. 시험용액은 표 7과 표 8의 조건에 따라 ICP-MS(ELAM DRCII, Perkin Elmer, USA)와 ICP-OES(JY Ultima2C, Jobin Yvon, France)를 사용하여 측정하였다.



그림 7. ICP-MS (ELAM DRCII, Perkin Elmer, USA)



그림 8. ICP-OES (JY Ultima2C, Jobin Yvon, France)

**표 7. ICP-MS (ELAM DRCII, Perkin Elmer, USA) 분석조건**

---

RF generator power	1300 W
RF frequency	40 MHz
Plasma gas flow	15 L/min
Auxiliary gas flow	1.2 L/min
Nebulizer gas flow	0.9 L /min
Sampler cone	1.1 mm Nickel
Skimmer cone	0.9 mm, Nickel
Ion lens	7.25 V
Analog stage voltage	-1556 V
Pulse stage voltage	900 V
Discriminator threshold	90 V
Resolution	0.75 AMU
Nebulizer	Concentric
Spray chamber	Cyclonic

---

**표 8. ICP-OES (JY Ultima2C, Jobin Yvon, France) 분석조건**

---

RF Generator	Solid state
RF power output variable	1.5 KW
RF frequency	40.68 MHz
Spectrometer	Dual monochromator system
Monochromator 1	Czerny Turner mount Wavelength range : 120~800 nm Focal length : 0.75 meter Linear dispersion in UV : 0.3 nm or better Spectral resolution UV : 0.006 nm
Monochromator 2	Czerny Turner mount Wavelength range : 120~640 nm Focal length : 0.75 meter Grating type and density : 2400 gr/mm holographic grating Linear dispersion in UV : 0.2 nm or better Spectral resolution in UV : 0.005 nm or better

---

표 9. 무기질 분석을 위한 각 원소별 흡수파장

Element	Wavelength (nm)	Element	Wavelength (nm)
Ca	393.366	Fe	259.940
K	766.490	Mg	279.553
Na	589.592	P	214.914
Ti	336.121		

11) 아미노산 분석

(1) 사용기기

- 가. 사용기기 : Agilent 1100 Series(Maker : Agilent)
- 나. Column : Cation exchange 8  $\mu$ m, 3 $\times$ 250mm(Maker : Pickering)
- 다. Column Temp.: 40°C
- 라. Reactor : PININACLE PCX (Maker : Pickering)
- 마. Reactor temp.: 130°C
- 바. 분석조건

표 10. 아미노산 분석을 위한 Mobile phase 조성 (Flow rate : 0.3ml/min)

min	Lithium eluant (pH 2.75)	Lithium eluant (pH 7.50)	Lithium column Regenerant
0	100	0	0
17	100	0	0
65	35	65	0
128	0	100	0
145	0	100	0
185	0	94	6
189	0	90	10
189.01	100	0	0
190	100	0	0
220	100		Post Time

(2) 전처리방법

- 가. 시료추출(3회 반복) : 시료 10 g을 70% ethanol 150 mL로 2시간 reflux (80°C)
- 나. 용매분획 : Hexane 분획을 제거하고, 수층을 감압농축(45°C)
- 다. 용해 및 여과
  - (1) 시료 1 ~ 4 : Uriprep을 사용하여 50 mL 메스플라스크에 정용



- (2) 여과 : 원심분리 후 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과
- (3) 시료 5 ~ 8 : 시료 약 50 mg을 취하여 Uriprep 2.5 mL에 정용
- (4) 여과 : 원심분리 후 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과

라. 희석 : Lithium diluent(pH 2.36)로 약 40배 희석 후 각각 10  $\mu\text{L}$  injection

(3) 표준품 및 반응시약

가. Standard : Catalog No. 011006P (maker : Pickering)

- 45종 mixture

나. Reagent : Catalog No. T200 (maker : Pickering)

- Ninhydrin reagent

**12) 세포배양**

본 연구에 사용된 AGS 인체 위암세포주, SK-Hep1 인체 간암세포주, PC-3 인체 전립선암 세포주는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 DMEM과 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA)에 1% penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 각 세포의 성장속도에 따라 배지를 교환하여 주었고, 세포수 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA(Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적정수의 세포를 분주하여 재배양하였다.

**13) 김 추출물의 *in vitro* 항암 활성 탐색**

AGS 인체 위암세포주, SK-Hep1 인체 간암세포주, PC-3 인체 전립선암 세포주를 대상으로 다양한 김 추출물이 암세포 성장에 미치는 영향을 MTT assay로 측정하였다. 일정한 농도( $1 \times 10^4$  cells/mL)로 희석한 암세포 180  $\mu\text{L}$ 를 96 well plate의 각 well에 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C로 24시간 선배양한 후, 각 well의 배지 80  $\mu\text{L}$ 를 제거한 다음 시료 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 같은 조건의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 각 well에 MTT 용액 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하였다. 각 well에 DMSO:EtOH(1:1, v/v) 용액 150  $\mu\text{L}$ 를 첨가한 다음 진탕배양기에서 30분간 교반한 후 ELISA reader(Versamax, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**14) 김 추출물이 암세포의 이동, 침윤, 부착에 미치는 효과 측정**

Transwell system을 이용하여 암세포의 이동(migration), 침윤(invasion), 부착(adhesion)에 대한 억제 효과를 측정하였다.

### (1) Wound migration assay

SK-Hep1 인체 간암세포를 6-well plate에 100% 짝 차도록 배양한 뒤 세포주기 억제제인 mitomycin 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 30분간 처리하고 세포 위에 injury line을 만들었다. Well을 PBS를 이용하여 세척한 뒤 배지 존재 하에 이동하도록 한 뒤 지정된 시점에서 현미경을 이용하여 관찰하였다.

### (2) Adhesion assay

암세포 부착능을 평가하기 위하여 24-well의 culture plate에 세포에 matrigel을 25  $\mu\text{g}/\text{well}$  농도로 도포한 후 실온에서 40분간 건조시켰다. Serum free media에  $5 \times 10^4$  cell/well 의 농도로 준비한 SK-Hep1 인체 간암세포를 plate에 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. PBS buffer로 부착되지 않은 세포를 제거하고 hematoxylin과 eosin으로 약 20분간 염색시켰다. 염색약을 제거하고 세척한 뒤 말리고 현미경을 이용하여 세포를 관찰하였다.

### (3) Invasion assay

암세포 침투억제능을 평가하기 위하여 Chemicon 사의 Cell Invasion Assay kit를 이용하였다. Invasion chamber를 상온에 맞춘 후 ECM층을 적시기 위해 serum free media 300  $\mu\text{L}$ 를 insert 안쪽에 첨가하였다. Serum free media에  $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$  cell/mL 의 농도로 준비한 SK-Hep1 인체 간암세포를 준비한 뒤 insert 하층부는 혈청을 함유한 배지를 첨가하고 상층부에는 준비한 세포를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 면봉을 이용하여 상층부의 비침투성 세포를 조심스럽게 제거한 뒤 약 20분간 염색시켰다. 염색약을 제거하고 세척한 뒤 말리고 현미경을 이용하여 세포를 관찰하였다.

### (4) Zymography를 이용한 MMP 활성 측정

SK-Hep1 세포를 24 시간 배양한 후, PBS로 씻어내고 김 추출물을 농도별로 serum free media에 녹여 48 시간동안 배양하였다. 상층액을 모아서 원심분리하여 단백질을 정량한 후 동량의 total protein을 0.1% gelatin이 포함된 10% SDS-PAGE gel에 전기영동하였다. Gel은 2.5% triton X-100으로 세 번 씻어내고, 40 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  용액을 넣고 37°C에서 18 시간동안 배양한 후, 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하였다. 이때, 전체적인 배경은 푸른색이고 gelatin이 분해된 부분은 흰색 밴드로 나타났다.

### 15) 세포주기 분석

Apoptosis 유발 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 김 추출물을 처리하여 배양한 SK-Hep1 인체 간암세포를 모아 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후

PI를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 세포를 35 mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson)를 적용하여 형광반응에 따른 cellular DNA content 및 histogram을 Win MDI Software 프로그램을 이용하여 분석하였다.

#### 16) Annexin V를 이용한 flow cytometry (FACS) 분석

Apoptosis 된 세포를 annexin V-FITC kit(Oncogene Research)를 이용하여 측정하였다. SK-Hep1 인체 간암세포를 10 cm culture dish에서 50~60% 정도 되도록 배양한 후, 세포를 일정 농도의 김 추출물로 처리한 후 24시간 및 48시간동안 배양하였다. 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 1,000 g에서 5분 동안 원심분리하여 cell pellet을 모은 후 ice-cold binding buffer에 resuspension 시켰다. Annexin V-FICT (1.25 µL/0.5 mL)와 propidium iodide (10 µL/0.5 mL) 용액을 첨가하고 37°C incubator에 15분 동안 반응시켰다. 15 mV air cooled argon laser가 내장된 FACSCalibur (Becton Dickinson)로 488 nm에서 세포 (10,000개) 내의 DNA 양을 측정하였다.

#### 17) MMP와 TIMP 확인을 위한 RNA extraction 및 RT-PCR

김 추출물을 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양한 세포(SK-Hep1 인체 간암세포)에 Trizol reagent(GibcoBRL, USA) 1 mL을 첨가하여 실온에서 3분간 반응시킨 후에 eppendorf tube에 수거하였다. 0.2 mL의 chloroform을 넣고 vortex 한 후 2~3 분 정치시키고 15,000 rpm, 4°C에서 15 분간 원심분리 한 후 상층액만을 분리하여 isopropyl alcohol을 넣고 10 분간 반응시킨 후 15,000 rpm에서 20 분간 다시 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 75% 에탄올로 세척한 후 pellet을 DEPC-water을 이용하여 용해시킨 후 total RNA는 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Total RNA(3~5 µg)를 70°C에서 10분간 열처리하여 변성시킨 후 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA(0.1~0.2 volume)에 증폭하고자하는 특정 유전자의 primer와 2.5 mM dNTP, Taq polymerase(0.3 U/µL), 10X 완충용액을 첨가하여 PCR을 30~35 cycle을 수행하였다. PCR 산물을 1.0~1.5% agarose gel에 전기영동 하여 증폭된 유전자(MMP-2/-9, TIMP-1/-2)를 확인하였다. 본 연구에서 RT-PCR에 사용한 primer의 sequences는 아래와 같다.

**표 11. Sequences of primers used in this study**

Target gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Size (pb)
MMP-2	sense	GGC CCT GTC ACT CCT GAG AT	474
	antisense	GGC ATC CAG GTT ATC GGG GA	
MMP-9	sense	CGG AGC ACG GAG ACG GGT AT	573

	antisense	TGA AGG GGA AGA CGC ACA GC	
TIMP-1	sense	GAT CCA GCG CCC AGA GAG ACA CC	677
	antisense	TTC CAC TCC GGG CAG CAT T	
TIMP-2	sense	GGC GTT TTG CAA TGC AGA TGT TG	500
	antisense	CAC AGG AGC CGT CAC TTC TCT TG	
GAPDH	sense	TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT	983
	antisense	CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC	

### 18) Western blotting

SK-Hep 세포에 김 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 cell lysate를 Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다. 정량한 단백질을 5X SDS sample buffer를 섞은 후 100°C에서 4분간 변성시켰다. 20 µg의 단백질을 loading하여 SDS-PAGE한 다음 gel을 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 5% skim milk(Difco lab. USA)를 가한 후 TTBS(25 mM Tris-HCl, pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) 용액에서 30분간 반응시킨 후 TTBS 용액으로 세척하고 polyclonal rabbit primary antibody (Santacruz Biotech., CA, USA, 1:200 dilution)를 가하여 2시간 상온에서 배양하였다. Membrane을 세척한 후 horseradish peroxidase가 결합되어 있는 secondary antibody(Santacruz Biotech., CA, USA, 1:2,000 dilution)를 가하여 2시간 반응시킨 후 TTBS 용액으로 세척하고 ECL(Enhanced chemiluminescence) assay system을 사용하여 단백질을 검출하였다.

**제1협동과제 : 김 추출물 급여를 통한 면역조절, 항암 및 항당뇨 활성에 관한 및 작용기전연구**

#### 1) 김 추출

김 추출물의 제조는 제1세부과제의 연구방법에서 기술한 것과 동일한 방법으로, 냉수추출에 의해 6종류의 김으로부터 추출하였다. 본 연구에서 사용한 김의 종류와 추출물의 약자는 다음과 같다.

S1: 한국산 <u>재래김</u>	S2: 한국산 김밥용 김	S3: 한국산 <u>조미김 (광천산)</u>
S4: 한국산 <u>조미김 (완도산)</u>	S5: 일본산 김	S6: 중국산 김

#### 2) 실험동물

본 연구에서 사용한 마우스는 BALB/c와 C57BL/6(female, 7~8 주령)를 (주)다물사이언스에서 구입하였고, 약 1주일 정도 동물실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 모든 동

물실험은 건양대학교 동물실험 윤리위원회(IACUC)의 지침에 따라 수행하였다.

### 3) 세포배양

RAW 264.7 macrophage와 B16-BL6 melanoma 세포는 각각 DMEM 혹은 EMEM 배지에 10% FBS와 1% penicillin 및 streptomycin을 첨가하여 배양하였다. 배양 후 96-well plate 혹은 48-well plate에서  $1 \times 10^4$ cell/well 또는  $3 \times 10^4$ cell/well이 되도록 세포를 넣고 overnight 배양한 후에 실험에 사용하였다.

### 4) 비장세포 배양

본 실험에서 사용한 마우스 비장세포는 Balb/c 마우스의 비장을 이용하였다. 비장세포는 RPMI (10% FBS + 2% penicillin 및 streptomycin 함유)배지에서 배양하였다. Mitogen에 대한 비장세포의 반응성은 96-well plate에  $5 \times 10^5$ cell/well의 농도가 되도록 세포를 넣은 후에, ConA 및 LPS를 최종 5 mg/ml의 농도로 첨가하고 24시간 배양하였다. 한편 이들 세포로부터 분비되는 사이토카인의 정량은, 세포를 48-well plate에  $1 \times 10^6$ cell/well로 넣고 각 김 추출물을 여러 농도로 첨가하여 24시간 배양한 후, 세포 배양액으로부터 측정하였다.

### 5) 세포 증식반응 측정

각 세포의 증식반응은 각 김 추출물 혹은 mitogen을 처리하고 24시간 배양한 후, MTT(3-(4,5-dimethyl -thiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액(5 mg/ml)을 10 ml/well로 각 well에 넣고 2 시간 배양하였다. 그 후 세포배양 상청액을 제거하고, DMSO를 각 well당 100 ml씩 넣고 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

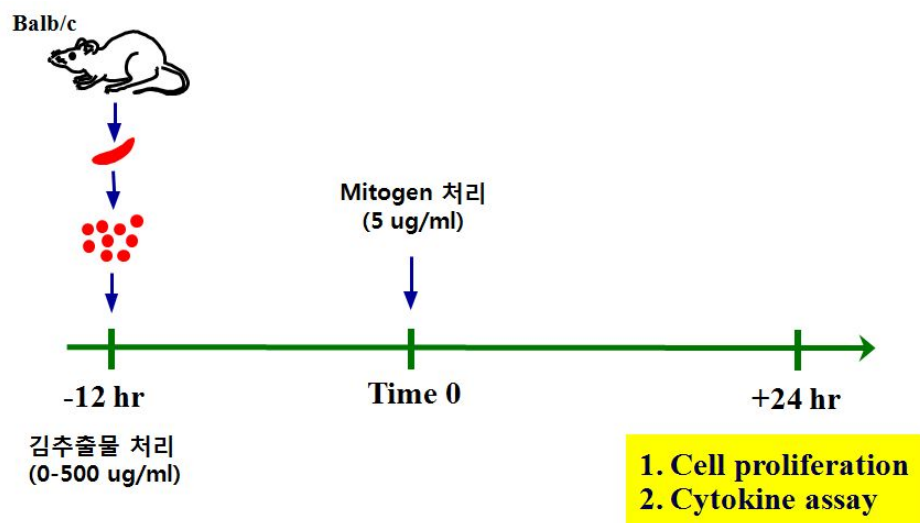


그림 9. 세포의 증식반응 측정

## 6) 경구투여에 의한 면역세포 활성화 실험

김 추출물의 경구투여에 의한 면역세포 활성화 실험에 있어서는 Balb/c 마우스에 김 추출물을 경구적으로 3일간 투여한 후, 마지막 투여 후 1일째에 비장세포를 채취하여 mitogen과 함께 24 시간 배양한 후 MTT법에 의해 세포증식반응을 측정하였다.

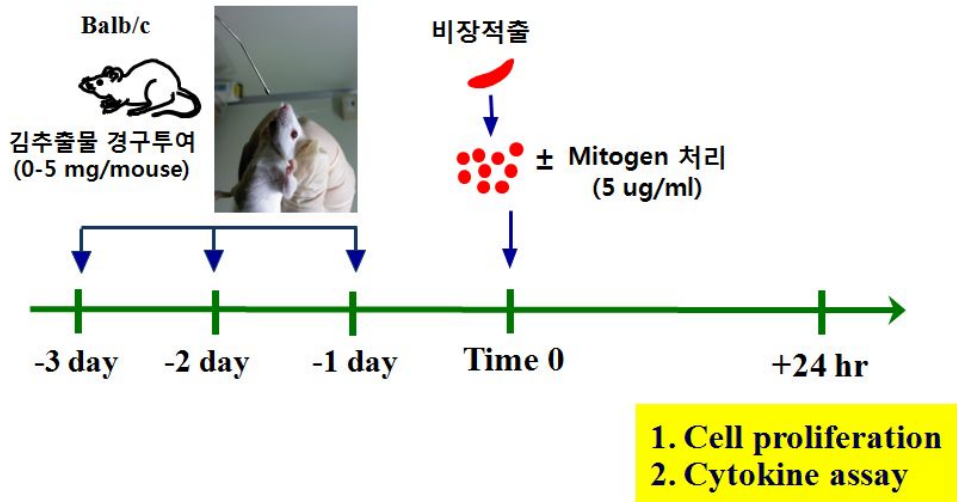


그림 10. 김 추출물 경구투여에 의한 면역세포 활성화 실험

## 7) 항염증 작용 측정법

염증작용에 대한 김 추출물의 항염증 활성은 Raw 264.7세포를 LPS로 자극하여 유발되는 대식세포 염증반응을 이용하여, 염증성 매개인자의 분비에 대한 억제 여부를 통해 측정하였다. 각 김 추출물을 Raw 264.7세포에 15시간 처리한 후 LPS를 1 mg/ml의 농도로 첨가하고 24시간 배양하였다. 그 후 세포 배양액 중의 NO 및 cytokine을 정량하여 비교함으로써 항염증 효과를 측정하였다.

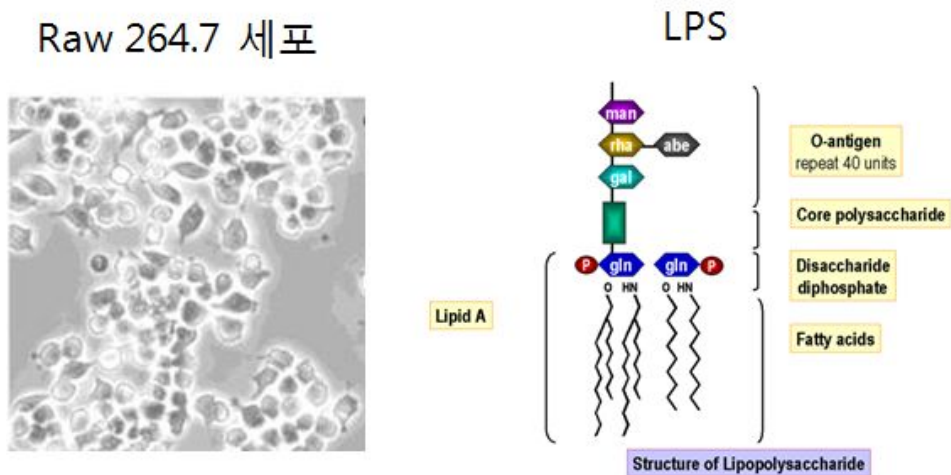


그림 11. 항염증 활성 실험에 사용한 Raw 264.7세포 및 LPS

### 8) Nitric oxide(NO) 및 cytokine 정량

세포 배양액 중에 분비된 NO 및 cytokine은 ELISA kit(R&D biotechnology)를 이용하여 제조사의 측정지침에 따라 정량하였다. 48 well plate에서 24시간 배양한 세포의 배양 상청액을 취하여 정량에 사용하였다.



그림 12. NO 및 cytokine 측정 시험법

### 9) Western blot 실험법

6-well plate에서 배양한 RAW 264.7 세포( $1 \times 10^6$  cells)에 여러 농도의 곰 추출물을 15시간 전처리하고, 그 후 LPS로 20분간 처리한 후에 cold PBS로 3회 세척한 후 세포를 scraper로 회수하였다. 세포를 원심분리한 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (PH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitor cocktail)로 세포를 용해하고 원심분리하였다. 세포 상청액의 단백질을 BCA protein assay kit으로 정량한 후, 각 세포 단백질을 30 mg 씩 각 lane에 넣고 SDS-PAGE를 전개하였다. 그 뒤에 PVDF membrane(Biorad사)에 단백질을 전사한 뒤, 5%의 skim milk를 통해 membrane을 blocking하였다. 그 후 iNOS와 COX-2에 대한 항체를 37°C에서 2시간 반응시키고, PBS-0.05% tween-20용액으로 membrane을 세정하였다. Horseradish peroxidase(HRP)- conjugated secondary antibody를 1시간 반응시킨 후, PBS-0.05% tween-20 용액으로 8회 세정하고 ECL kit을 통해 membrane 상의 protein band를 film위에 기사화시켜 관찰하였다.

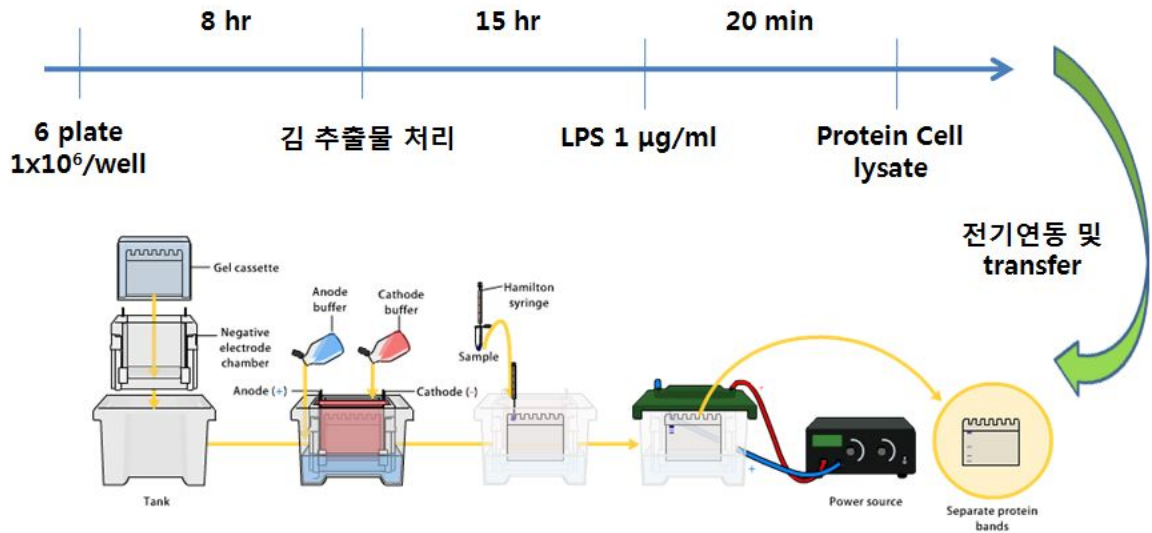


그림 13. Western blot 실험의 순서

### 10) 세포 내 신호전달 해석시험

LPS 자극에 의한 염증반응에 대한 김 추출물의 세포 내 작용기전 해석은 LPS 처리에 의해 Raw 264.7 세포에 전달되는 세포 내 신호전달 체계의 억제활성을 통해 해석하였다. 특히 LPS가 염증반응을 유도할 때에 세포 내 MAPK와 NF- $\kappa$ B의 활성화가 중요한 것으로 알려져 있다.

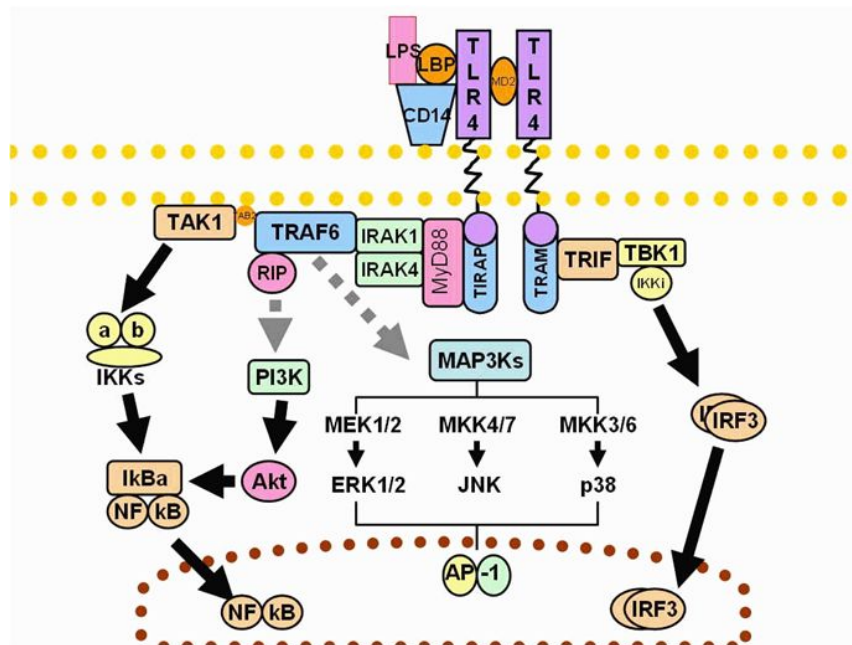


그림 14. LPS 자극에 의한 macrophage의 세포 내 신호전달 체계



그러한 이유로 본 연구에서는 김 추출물에 의한 항염증 활성의 작용기전을 MAPK와 NF- $\kappa$ B의 활성화 억제 관점에서 해석하였다. Western blot법의 설명에서 기술하였듯이, 김 추출물을 15시간 전처리하고, LPS로 20분간 자극한 세포의 cell lysate를 이용하여, MAPK는 p38, JNK 그리고 ERK에 대해, NF- $\kappa$ B는 NF- $\kappa$ B에 결합되어 있다가 인산화에 의해 NF- $\kappa$ B로부터 유리되는 I- $\kappa$ B에 대해, 각각의 분자에 대한 항체를 반응시키고, HRP-conjugate항체를 반응시켜 이들 세포 내 단백질의 인산화의 억제활성을 조사하여 판정하였다.

### 11) In vivo에서의 LPS유도 사이토카인의 억제활성

김 추출물에 의한 항염증 활성을 in vivo모델에서 조사하기 위하여, 20 mg/kg의 양으로 LPS를 C57BL/6 마우스에 정맥주사하고, 2시간 후에 혈청 중의 염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ )을 정량하였다. 이 때 김 추출물은 LPS를 투여하기 48시간, 24시간, 그리고 2시간 전에 5 mg/mouse의 양으로 3회 경구투여하였다. 혈청 중의 사이토카인은 ELISA kit에 의해 정량하였다.

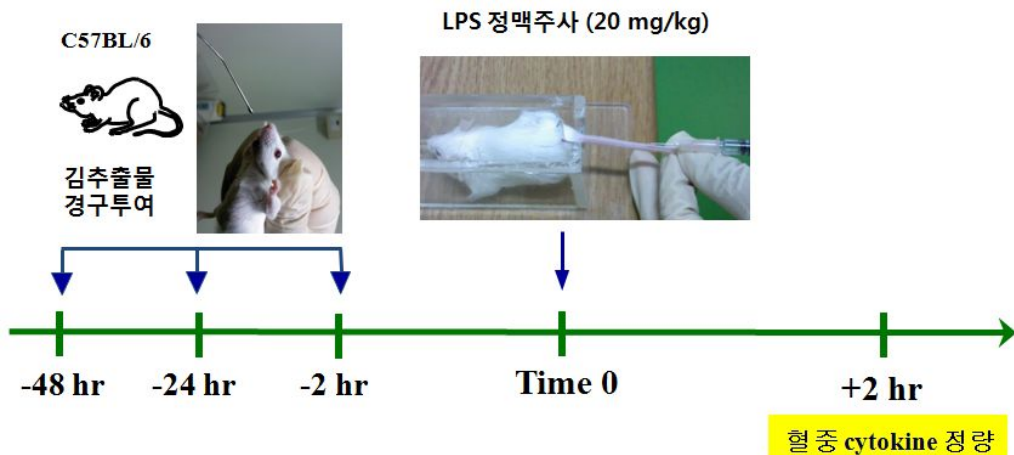


그림 15. In vivo모델에서 김 추출물의 항염증 효과 측정

### 12) 혈당조절 효과 실험법

항당뇨 활성 실험에서는 alloxan (Sigma, USA) 유도 당뇨 모델을 사용하였다. Balb/c 마우스는 0일째에 50 mg/kg의 투여량이 되도록 alloxan을 PBS로 녹인 후, 마우스 당 1.7  $\mu$ g 씩 정맥주사(i.v.)하였다. Pre-treatment group은 alloxan 투여 전에 김 추출물을 3일 동안 매일 1회씩 경구투여 하였고, post-treatment group은 김 추출물을 alloxan 정맥 주사 후에 3일 동안 매일 1회씩 경구투여 하였다. 혈당 조절효과는 alloxan 투여 4일째의 혈청 중의 glucose를 정량하여 판정하였다.

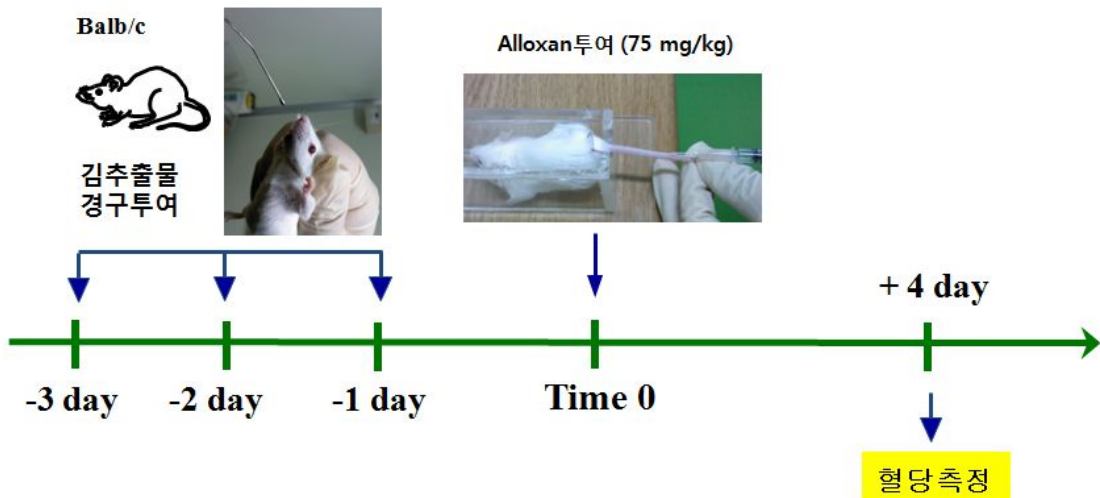


그림 16. 김 추출물의 혈당조절 예방적 효과 실험법

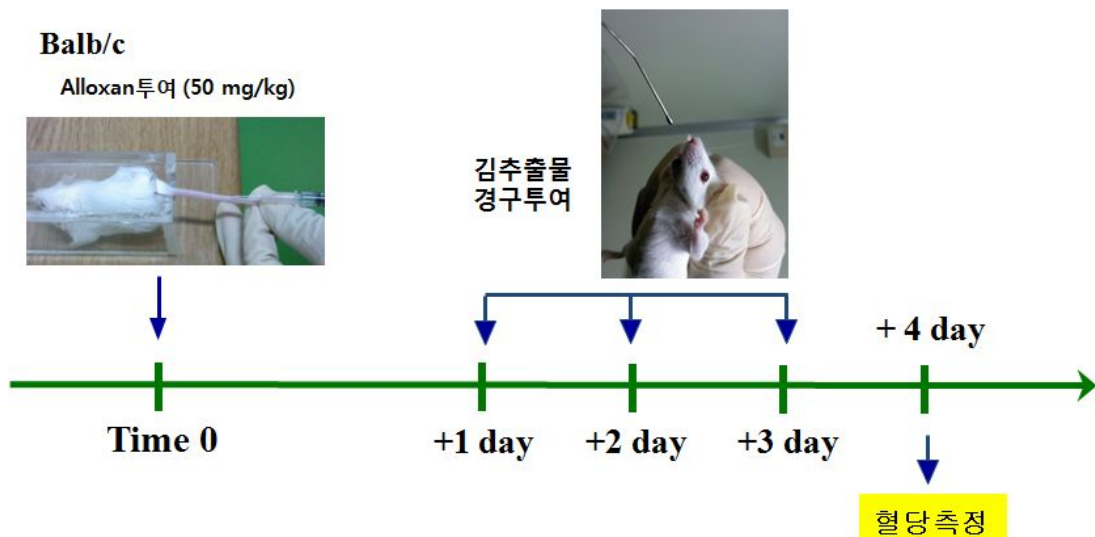


그림 17. 김 추출물의 혈당조절 치료적 효과 실험법

### 13) In vivo모델에서 암전이 억제실험법

김 추출물에 의한 암전이 억제효과는 B16-BL6 melanoma 암세포( $4 \times 10^4$ /mouse)를 C57BL/6 마우스에 정맥주사하고, 14일 후에 폐에 형성되는 암세포의 폐전이 colony를 계측하는 모델을 이용하여 검토하였다. 김 추출물에 의한 암전이 억제의 예방적 효과는 암세포 이식 -3, -2, -1일 전에 5 mg/mouse로 매일 1회씩 총 3회 경구투여하여 검토하였으며, 암전의 치료적 효과는 암세포 이식 후 +1, +2, +3일 후에 5 mg/mouse로 김 추출물을 경구투여하는 방식으로 검토하였다.

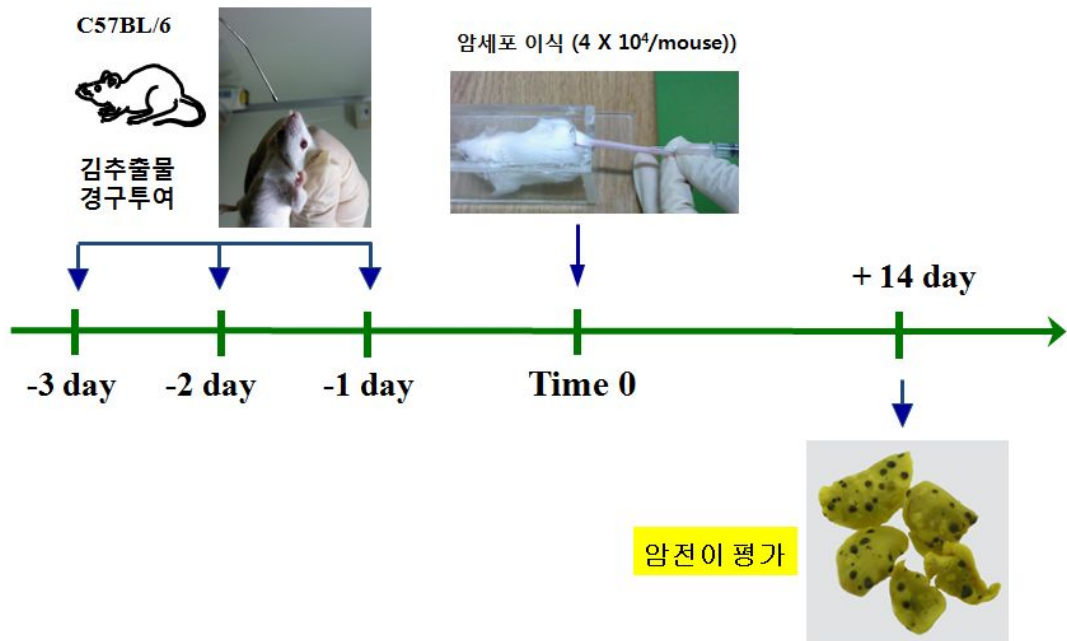


그림 18. 김 추출물에 의한 암전이 억제의 예방효과 실험법

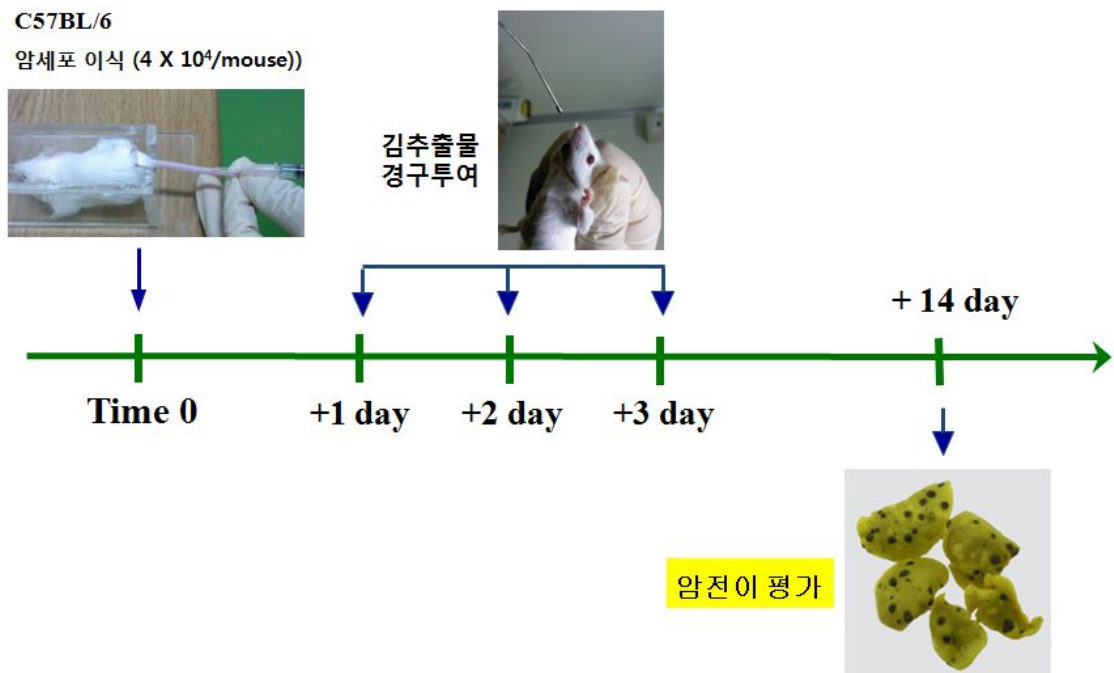


그림 19. 김 추출물에 의한 암전이 억제의 치료효과 실험법

## 제 2절. 연구결과

### 1. 김의 생리활성 물질 추출법 확립

#### 1) 추출용매, 추출방법, 가공조건별 유효성분의 추출조건 최적화

##### (1) 김 추출물 제조

- 김 추출물은 추출용매와 추출온도에 따라 최종 추출물의 색깔이 다르게 나타났다 (그림 20). 이는 김에 함유된 유효성분이 각 추출용매와의 반응에 의해 100% 에탄올, 메탄올에서는 초록색을 70% 에탄올, 메탄올에서는 연한 갈색계통을 50% 에탄올과 메탄올에서는 붉은 빛을 띠는 진한 갈색을 나타냈다. 물에서는 진한 보라색을 나타냈다.

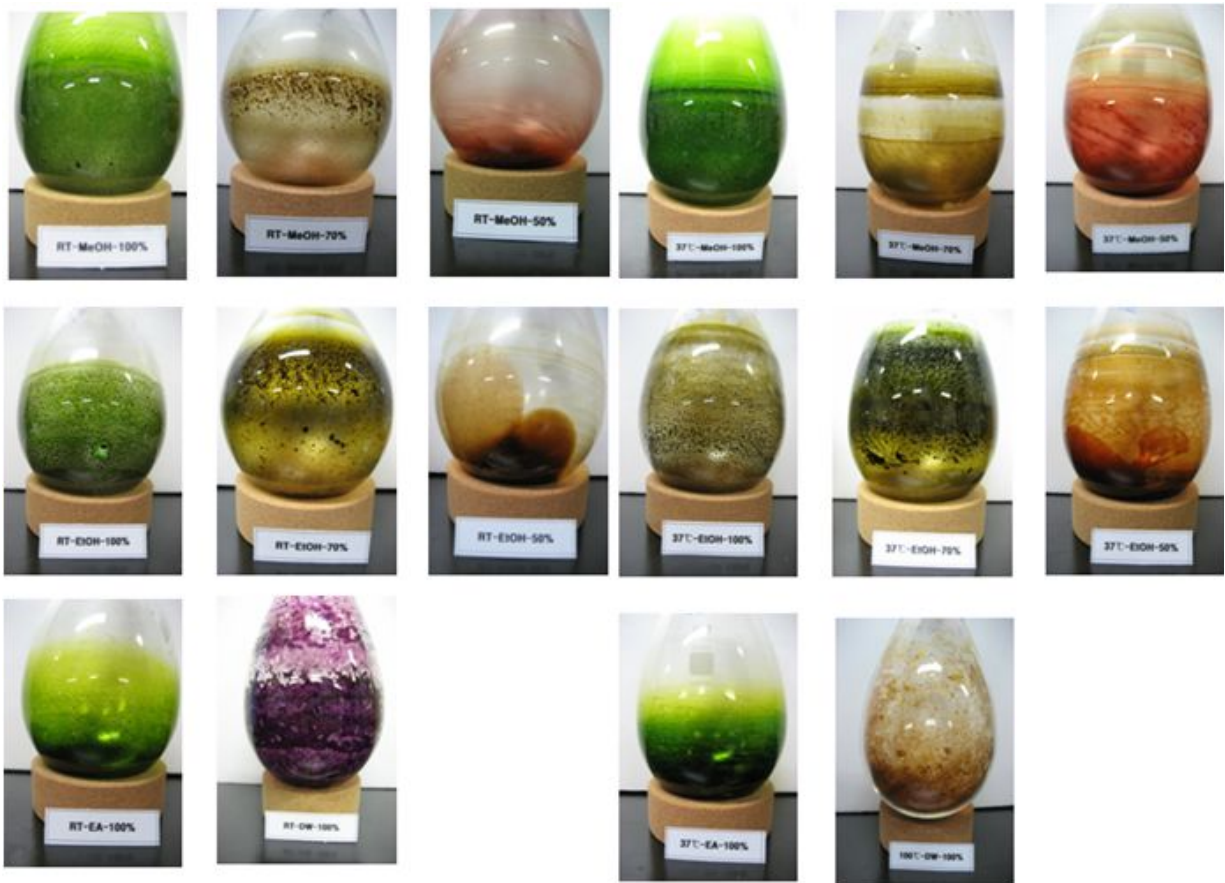


그림 20. 추출용매 및 추출온도를 달리하여 얻은 추출물

표 12. 국내산 건조김의 추출방법에 따른 색깔 및 추출 수율

Temp (°C)	Extraction solvent	Color	Yield (%)
Room temp.	50% Methanol	dark brown	15.0
	70% Methanol	pale brown	14.9
	100% Methanol	green	5.0
	50% Ethanol	dark brown	14.8
	70% Ethanol	pale brown	15.0
	100% Ethanol	green	2.5
	Ethylacetate	green	2.3
	Water	purple	20.2
37°C	50% Methanol	dark brown	19.7
	70% Methanol	pale brown	20.0
	100% Methanol	green	8.0
	50% Ethanol	dark brown	20.5
	70% Ethanol	dark green	17.7
	100% Ethanol	green	4.5
	Ethylacetate	green	0.7
	Water	purple	26.9
100°C	Water	purplish brown	36.5

- 김의 추출조건에 딸 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 다르게 나타났다. 실온의 메탄올 추출에서는 폴리페놀 함량이 21.49~33.05 mg GAE로 70% 메탄올에서 폴리페놀 함량이 가장 높았다. 37°C 메탄올 추출에서는 20~32 mg GAE로 실온과 유사한 폴리페놀 함량을 보였다.
- 에탄올 추출의 경우는 폴리페놀 함량이 메탄올 추출과 비슷한 경향을 보였고, 추출 온도에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다. 37°C 물 추출에서의 폴리페놀 함량은 31.02 mg GAE로 동일 온도에서의 70% 에탄올 추출물에서 얻은 폴리페놀 함량인 33.93 mg GAE와 비슷한 수치를 나타냈다.
- 플라보노이드 함량의 경우, 실온의 100% 메탄올과 100% 에탄올 추출물에서 각각 77.00 mg CE와 118.93 mg CE로 가장 높은 수치를 나타냈다. 실온, 37°C, 100°C 물 추출에서는 플라보노이드 함량(-0.85 ~ 3.35 mg CE)이 매우 낮게 나타났다.

- 향후 진행되는 실험에서는 예비실험 결과를 바탕으로 37°C에서 물추출과 70% 에탄올 추출 및 100°C에서 물 추출을 수행하여 얻은 추출물을 가지고 실험을 진행하였다.

표 13. 국내산 건조김의 추출방법에 따른 항산화물질 함량 비교

온도	추출용매	Total polyphenol content (mg GAE/g extract)	Total flavonoid content (mg CE/g extract)
실온	50% Methanol	29.87±0.35	5.18±0.76
	70% Methanol	33.05±0.32	9.34±0.22
	100% Methanol	21.49±0.21	77.00±2.92
	50% Ethanol	29.85±0.27	9.63±1.40
	70% Ethanol	31.69±0.22	36.63±1.87
	100% Ethanol	32.49±0.33	118.92±2.40
	Ethylacetate	17.18±0.66	46.87±2.24
	Water	28.36±1.16	3.35±0.45
37°C	50% Methanol	23.69±0.42	16.36±1.02
	70% Methanol	32.52±0.77	30.56±0.46
	100% Methanol	20.94±0.16	81.11±1.90
	50% Ethanol	31.77±0.63	15.61±0.91
	70% Ethanol	33.93±0.33	17.22±1.18
	100% Ethanol	19.93±0.11	73.63±1.22
	Ethylacetate	13.00±0.72	35.66±1.46
	Water	31.02±0.24	-0.85±0.81
100°C	Water	12.69±0.46	0.73±0.73

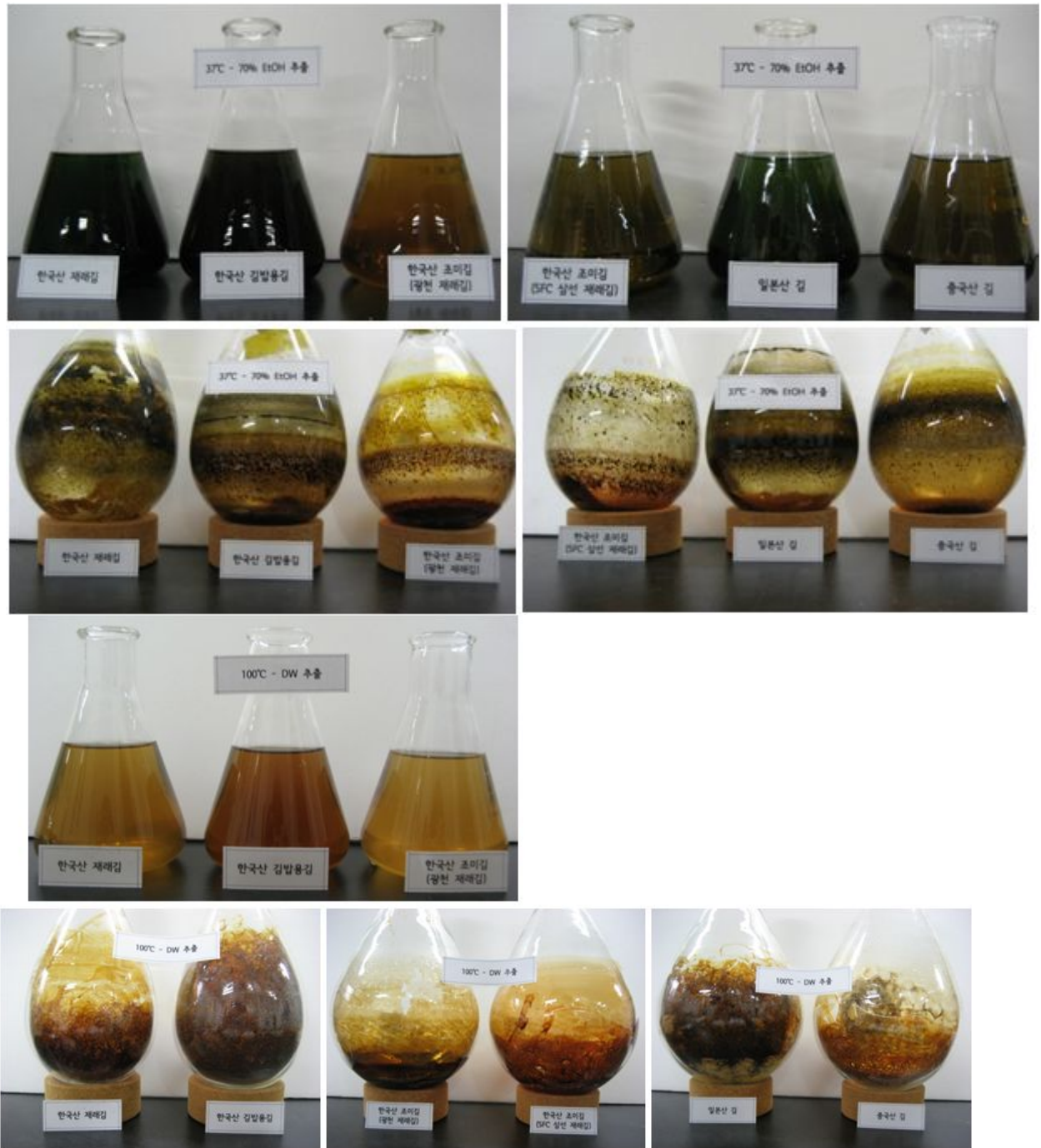


그림 21. 추출용매 및 추출온도를 달리하여 얻은 최종 추출물

- 가공방법 및 원산지에 따른 김 시료 6종을 37°C에서 물추출과 70% 에탄올 추출 및 100°C에서 물 추출을 수행하여 얻은 추출물을 동결건조하여 그림 22와 같은 분말시료를 얻었으며, 이 시료를 사용하여 향후 실험을 진행하였다.



그림 22. 각 추출조건별로 추출 후 동결건조하여 얻은 김 시료

## (2) 용매별 김의 추출수율 분석

- 극성용매는 극성물질(sugar, protein attached polyphenols, tannins, glucosides and organic acids)을 효율적으로 추출한다. 예비실험에서 물과 50~90% 에탄올을 추출용매로 하여 추출수율 및 항산화 활성을 측정하였다. 추출수율과 김에 함유된 항산화 물질 함량을 비교하여 볼 때, 물과 70% 에탄올이 가장 적합한 추출용매임을 확인하였다. 따라서 이후의 실험에서는 추출온도를 달리하여 이들 용매조건에서 추출하였다.
- Table 14는 다양한 추출조건에서 국내산 김의 제품별(마른김, 김밥용김, 조미김) 추출수율을 나타내고 있다. 100°C 물 추출에서 가장 높은 추출수율을 나타낸 반면, 70% 에탄올은 모든 김 제품에서 가장 낮은 추출수율을 보였다. 마른김을 100°C 물에서 추출한 것이 70% 에탄올 추출에 비해 높은 수율을 나타냈는데, 이는 김에 함유된 수용성 물질들이 높은 극성을 나타내기 때문으로 사료된다. 마른김, 김밥용김, 조미김의 물 추출에서의 수율은 26.4~41.3%를 나타냈다. 반면에 물에서는 37°C와 100°C에서는 각각 20.2~32.1%와 26.4~42.2%를 나타냈으며, 추출온도가 높을수록 수율이 높게 나타났다.
- 김에는 수용성 당류, 단백질, 펩타이드와 같은 수용성 물질들이 다량 함유되어 있어 물이 70% 에탄올보다 더 좋은 추출용매임을 확인하였다. 추출 온도가 높을수록 유효성분을 효율적으로 끌어내어 수율을 높였고, 조미김에 비해 마른김이 높은 수율을 나타냈다. 조미김의 경우 참기름과 소금을 함유하고 있고, 이는 물에서의 추출이 잘 되지 않는 것으로 사료된다.



표 14. 추출 조건 별 각 시료의 추출 효율

Samples	100°C, DW	37°C, DW	37°C, 70% ethanol
S1	41.3	25.5	17.9
S2	40.6	32.1	20.2
S3	26.4	21.0	16.0
S4	33.3	20.2	17.0
S5	42.2	25.5	19.2
S6	34.6	20.0	13.6

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

## 2) 김의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석

- 김의 제품형태 및 원산지에 따라 폴리페놀 함량이 다르게 나타났다. 70% 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 폴리페놀 함량이 높게 나타났다. 70% 에탄올 추출물과 100°C 물 추출물에서 국내산 김(마른김, 김밥용김, 조미김)의 폴리페놀 함량은 각각 28.60~36.33 mg gallic acid equivalent/g extract와 10.81~20.06 mg gallic acid equivalent/g extract로 에탄올 추출물에서의 폴리페놀 함량이 약 1.8~2.8 배 높게 나타났다.
- 100°C 물 추출의 경우는 물추출의 경우, 100°C 추출온도에서는 37°C 추출에 비해 폴리페놀 함량이 낮았다. 일본산 및 중국산 김에서도 국내산 김과 비슷하거나 다소 높은 폴리페놀 함량을 확인할 수 있었다.
- 본 실험에 사용한 김 시료에서는 폴리페놀에 비해 매우 낮은 양의 플라보노이드 물질을 확인하였다. 추출조건에 따라 플라보노이드 함량에 차이를 보였으며, 100°C 물추출물과 70% 에탄올 추출물의 경우는 플라보노이드가 검출되지 않았다. 37°C 물 추출물에서는 마른김, 김밥용김, 및 조미김에서 미량(0.04~1.25 mg catechin equivalent/g extract)의 플라보노이드를 확인하였고, 일본산 김에서는 이보다 약간 높은 수치인 2.38 mg catechin equivalent/g extract의 플라보노이드를 확인하였다. 본 결과에 따르면 김은 플라보노이드의 좋은 급원식품은 아닌 것으로 사료된다.

표 15. 김의 가공방법 및 주요 생산국별 항산화물질 함량 비교

Extract condition	samples	TPC (mg GAE/g extract)	TFC (mg CE/g extract)
37°C, DW	S1	28.72±0.51	1.25±0.44

	S2	28.61±0.27	0.55±0.35
	S3	20.88±0.48	0.04±0.39
	S4	29.16±0.54	-0.32±0.49
	S5	33.63±0.31	2.38±1.40
	S6	31.05±0.35	-0.51±0.16
37°C, 70% Ethanol	S1	30.18±0.41	-9.63±0.11
	S2	32.14±0.22	-5.23±0.21
	S3	36.33±0.29	-2.54±0.47
	S4	28.60±0.55	-5.40±0.21
	S5	30.61±0.19	-5.89±0.26
	S6	40.82±0.24	-4.15±0.31
100°C, DW	S1	13.50±0.17	-1.75±0.55
	S2	20.06±0.12	-0.98±0.51
	S3	18.71±0.21	-0.99±0.26
	S4	10.81±0.13	-1.75±0.44
	S5	12.89±0.10	-1.34±0.36
	S6	15.93±0.21	-1.84±0.31

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

### 3) 김의 아미노산 함량 분석

- 주요 가공제품별 및 주요 생산국별 김의 GABA, 타우린을 포함한 아미노산 함량을 분석하였다. 타우린, alanine, glutamic acid 등이 주요 아미노산으로 분석되었다. 특히, 타우린 함량이 가장 높았으며, 한국산 김밥용김과 일본산 김이 다른 김에 비해 타우린이 다량 함유된 것으로 나타났다. GABA의 경우는 일본산과 중국산 김에서는 검출되지 아니하였다.
- 한국산 마른김에 비해 한국산 조미김은 taurine, serine, glycine, valine, isoleucine, leucine, GABA 등의 함량이 낮았으며, 한국산 건조김에서는 asparagine 함량이 22.37 mg이었으나, 조미김에서는 검출되지 않았다. 한국산 조미김에서는 glutamic acid, alanine 함량이 한국산 마른김에 비해 높게 나타났다. 일본산 김에서는 한국산 마른김에 비해 taurine, aspartic acid, glutamic acid 함량이 높았으나, asparagine, isoleucine, leucine, GABA 등은 검출되지 않았다. 중국산 김은 threonine, serine, alanine, citrulline 함량이 높게 나타났으나, valine과 GABA 등은 검출되지 않았다.

표 16. 김의 가공방법 및 주요 생산국별 아미노산 함량(mg/100g)

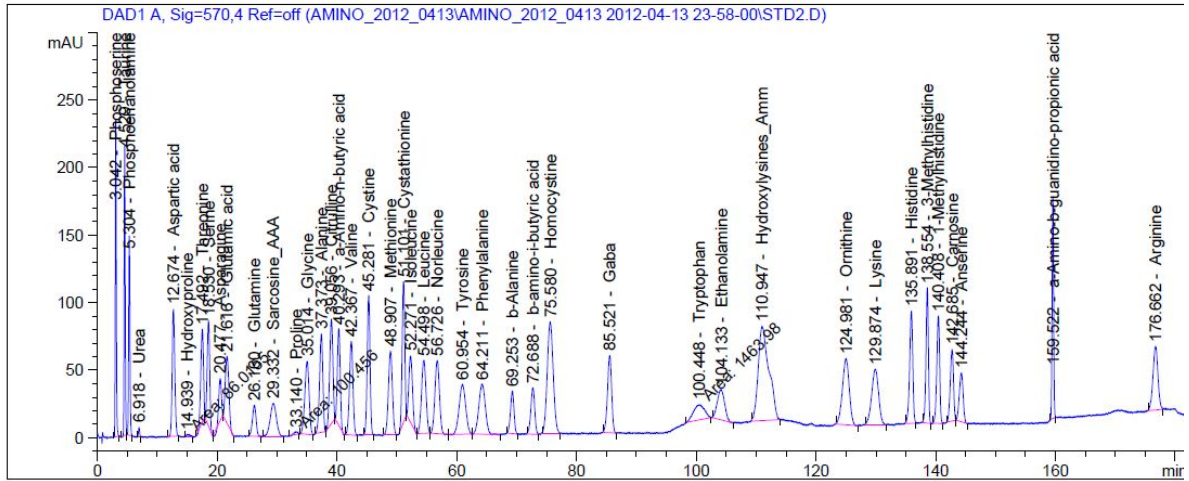
	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6
Taurine	871.10	979.04	653.62	754.55	1200.00	646.55
Aspartic acid	89.80	141.98	80.91	51.46	225.19	171.37
Threonine	18.92	31.80	22.29	21.83	33.65	86.43
Serine	20.26	20.02	12.52	16.07	28.63	44.81
Asparagine	86.41	22.37	-	-	-	86.55
Glutamic acid	719.77	843.35	1283.74	840.97	1477.08	277.45
Glycine	18.77	22.06	10.89	12.85	20.04	26.11
Alanine	833.53	936.28	1298.34	1001.07	958.90	1218.71
Citrulline	41.98	77.80	16.30	249.19	33.47	71.32
Valine	29.44	33.48	13.73	19.49	38.40	-
Isoleucine	37.92	46.67	17.77	30.16	-	49.88
Leucine	29.75	27.92	16.19	16.73	-	33.22
GABA	29.87	31.34	19.34	22.55	-	-

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

```

=====
Acq. Operator   : GIB                               Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1                       Location  : Vial 2
Injection Date  : 4/14/2012 11:02:51 AM             Inj       :    2
                                                    Inj Volume: 10 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\AMINO_2012_0413\AMINO_2012_0413 2012-04-13 23-58-00\AMINO_
                2012_00312.M
Last changed    : 4/13/2012 11:57:56 PM by GIB
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\AMINO_2012_0418.M
Last changed    : 4/18/2012 4:59:06 PM by GIB
                (modified after loading)
=====

```



External Standard Report

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 4/18/2012 4:59:04 PM
Multiplier:         : 1.0000
Dilution:           : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=570,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount nmol/10ul	Grp	Name
3.042	BB	2904.32300	8.60786e-4	2.50000		Phosphoserine
4.529	BB	2710.94165	9.22189e-4	2.50000		Taurine
5.304	BB	2241.22241	1.11546e-3	2.50000		Phosphoethanolamine
6.918	BB	95.45304	2.61909e-2	2.50000		Urea
12.674	BB	2839.70728	8.80372e-4	2.50000		Aspartic acid
14.939	MM	86.01552	2.90645e-2	2.50000		Hydroxyproline
17.492	BB	2247.70605	1.11225e-3	2.50000		Threonine
18.530	BB	2239.53174	1.11630e-3	2.50000		Serine
20.477	BB	924.58057	2.70393e-3	2.50000		Asparagine
21.616	BB	2034.56348	1.22876e-3	2.50000		Glutamic acid
26.160	BB	998.92810	2.50268e-3	2.50000		Glutamine
29.332	BB	1797.58350	1.39076e-3	2.50000		Sarcosine_AAA

Data File C:\CHEM32\1\DATA\AMINO\_2012\_0413\AMINO\_2012\_0413 2012-04-13 23-58-00\STD2.D  
 Sample Name: std

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount nmol/10ul	Grp	Name
33.140	MM	100.45565	2.48866e-2	2.50000		Proline
35.014	BB	2704.39282	9.24422e-4	2.50000		Glycine
37.373	BB	2807.49658	8.90473e-4	2.50000		Alanine
39.056	BB	2932.12451	8.52624e-4	2.50000		Citrulline
40.293	BB	2355.03442	1.06156e-3	2.50000		a-Amino-n-butyric acid
42.367	BB	2830.30688	8.83296e-4	2.50000		Valine
45.281	BB	3414.75659	7.32117e-4	2.50000		Cystine
48.907	BB	2891.82520	8.64506e-4	2.50000		Methionine
51.101	BB	3177.16650	7.86865e-4	2.50000		Cystathionine
52.271	BB	2048.46411	1.22043e-3	2.50000		Isoleucine
54.498	BB	2839.50781	8.80434e-4	2.50000		Leucine
56.726	BB	2896.24292	8.63187e-4	2.50000		Norleucine
60.954	BB	2890.03809	8.65041e-4	2.50000		Tyrosine
64.211	BB	2878.48169	8.68513e-4	2.50000		Phenylalanine
69.253	BB	1299.60608	1.92366e-3	2.50000		b-Alanine
72.688	BB	1559.56201	1.60301e-3	2.50000		b-amino-i-butyric acid
75.580	BB	5709.05762	4.37901e-4	2.50000		Homocystine
85.521	BB	2779.50098	8.99442e-4	2.50000		Gaba
100.448	MM	1463.97900	1.70767e-3	2.50000		Tryptophan
104.133	BB	1888.05334	1.32412e-3	2.50000		Ethanolamine
110.947	BB	8676.05664	2.88149e-4	2.50000		Hydroxylysines_Amm
124.981	BB	3909.14209	6.39527e-4	2.50000		Ornithine
129.874	BB	3306.92749	7.55989e-4	2.50000		Lysine
135.891	BB	3065.48779	8.15531e-4	2.50000		Histidine
138.554	BB	2812.47632	8.88896e-4	2.50000		3-Methylhistidine
140.408	BB	2676.37573	9.34099e-4	2.50000		1-Methylhistidine
142.685	BB	2018.80957	1.23835e-3	2.50000		Carnosine
144.244	BB	1635.94177	1.52817e-3	2.50000		Anserine
159.522	BB	2882.49219	8.67305e-4	2.50000		a-Amino-b-guanidino-propionic acid
176.662	BB	2736.83057	9.13465e-4	2.50000		Arginine

Totals : 105.00000

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

=====  
 \*\*\* End of Report \*\*\*

**그림 23. 아미노산 분석 standard 크로마토그램**

#### 4) 김의 무기질 함량 분석

- ICP-MS(ELAN DRC II / Perkin Elmer, USA)를 이용하여 무기질 함량을 분석하였다. Ca, Fe, K, Mg, Na, P, Ti는 ICP-AES로 분석하였고, 그 외 무기질들은 ICP-MS로 분석하였다. 마른김에 비해 조미김에서 나트륨 함량이 높았고, 그 외(칼슘, 철, 칼륨, 마그네슘 등) 무기질 함량은 마른김에서 더 높게 나타났다. 중국산 김에서는 Fe, Mg, P, Ti 함량이 다른 김들보다 높게 나타났다.

표 17. 가공방법 및 주요 생산국 별 김의 무기질 함량 (ppm)

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6
Ca	4976±0.270	1514±0.172	1015±0.112	1410±0.139	3546±0.217	4606±0.328
Fe	121.0±0.034	180.0±0.027	64.56±0.049	72.64±0.035	135.6±0.082	700.5±0.366
K	31210±3.672	28020±1.140	13340±1.490	20580±0.333	27640±1.271	27340±1.445
Mg	3855±0.220	4203±0.299	2265±0.219	3774±0.441	4365±0.252	6120±0.492
Na	3836±0.582	7811±0.196	16850±1.088	20980 0.482	4836±0.699	1992±0.099
P	7608±0.891	8201±1.900	4043±0.475	5779 0.970	10350±0.529	8854±1.085
Ti	< 0.5	1.089±0.001	< 0.5	< 0.5	< 0.5	12570±0.001

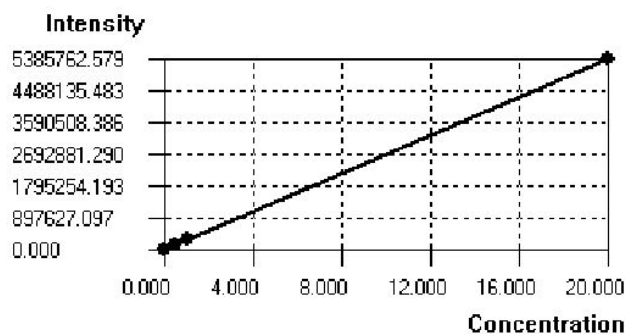
S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

- Determined by ICP-AES
- Resolution: 0.005 nm(UV) and 0.05 nm(Visible)
- Detection limit: 수 ppb- 수백 ppb

**Line:** Fe, 259.940 nm  
**Calibr. curve:** I = 10775 + 268774 \* C

Parameters of curve

**Sigma :** 0.0364409  
**BEC :** 40.1 µg/l  
**LOD :** \*\*\*  
**Correl. :** 0.999995  
**Weight:** not used



#	Sample Name	Intensity	Chem. Conc.	Calc. Conc.	Rel. dev(%)	Valid
1.	0	1027.28	0	0 mg/l		Yes
2.	0.5	145594.54	0.50	0.502 mg/l	0.32	Yes
3.	1	289367.99	1.00	1.04 mg/l	3.65	Yes
4.	20	5385762.5	20.00	20.00 mg/l	0.009	Yes

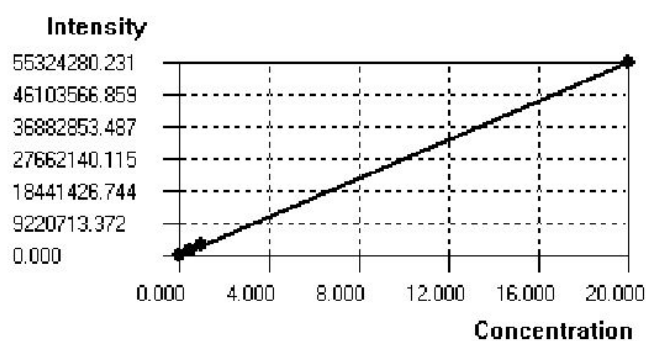
## Analytical method

Analytical method: 120424-HES  
Matrix:  
Source type: ICP  
Author: 3  
Creation: 24/04/2012 14:14  
Last modification: 24/04/2012 16:50

**Line:** Ca, 393.366 nm  
Calibr. curve:  $I = 66396 + 2763051 * C$

Parameters of curve

*Sigma* : 0.0223082  
*BEC* : 24 µg/l  
*LOD* : \*\*\*  
*Correl.* : 0.999998  
*Weight*: not used

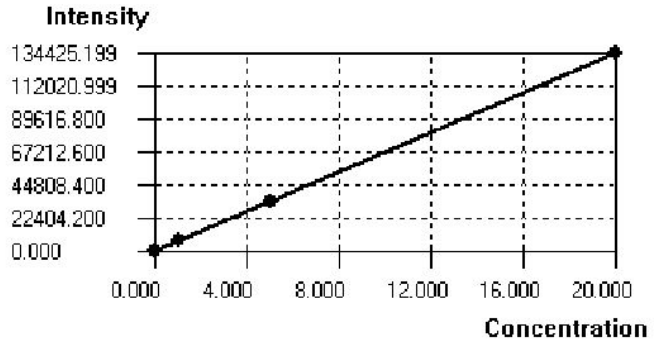


#	Sample Name	Intensity	Chem. Conc.	Calc. Conc.	Rel. dev(%)	Valid
1.	0	1438.07	0	0 mg/l		Yes
2.	0.5	1459032.3	0.50	0.504 mg/l	0.80	Yes
3.	1	2886419.0	1.00	1.02 mg/l	2.06	Yes
4.	20	55324280	20.00	20.00 mg/l	0.005	Yes

**Line:** K. 766.490 nm  
**Calibr. curve:**  $I = 402.8 + 6703 * C$

Parameters of curve

**Sigma :** 0.035695  
**BEC :** 60.1 µg/l  
**LOD :** \*\*\*  
**Correl. :** 0.999995  
**Weight:** not used

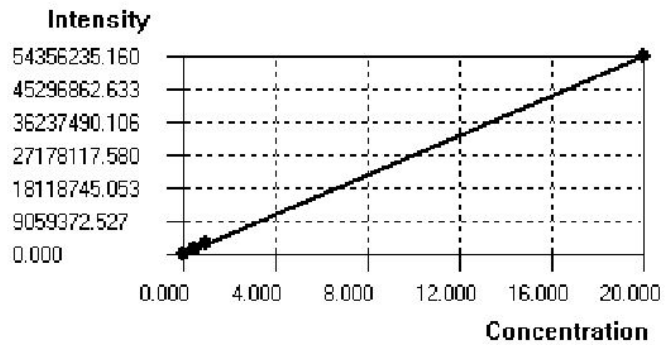


#	Sample Name	Intensity	Chem. Conc.	Calc. Conc.	Rel. dev(%)	Valid
1.	0	144.96	0	0 mg/l		Yes
2.	1	7258.45	1.00	1.02 mg/l	2.27	Yes
3.	20	134425.20	20.00	19.99 mg/l	0.034	Yes
4.	5	34070.69	5.00	5.02 mg/l	0.45	Yes

**Line:** Mg. 279.553 nm  
**Calibr. curve:**  $I = 117836 + 2712217 * C$

Parameters of curve

**Sigma :** 0.0428234  
**BEC :** 43.4 µg/l  
**LOD :** \*\*\*  
**Correl. :** 0.999994  
**Weight:** not used



#	Sample Name	Intensity	Chem. Conc.	Calc. Conc.	Rel. dev(%)	Valid
1.	0	1335.40	0	0 mg/l		Yes
2.	0.5	1480968.1	0.50	0.503 mg/l	0.52	Yes
3.	1	2945478.1	1.00	1.04 mg/l	4.26	Yes
4.	20	54356235	20.00	20.00 mg/l	0.011	Yes

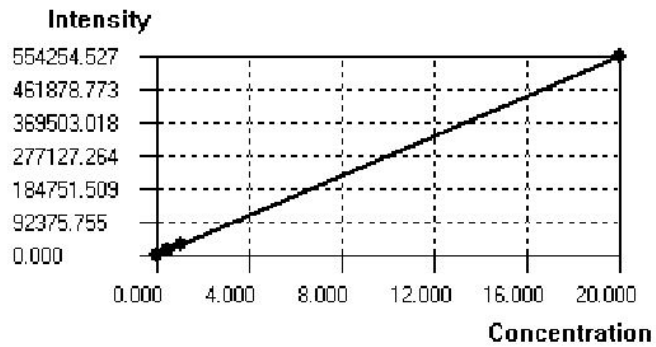


**Line:** Na, 589.592 nm

**Calibr. curve:**  $I = 1583 + 27636 * C$

Parameters of curve

**Sigma :** 0.0343785  
**BEC :** 57.3 µg/l  
**LOD :** \*\*\*  
**Correl. :** 0.999996  
**Weight:** not used



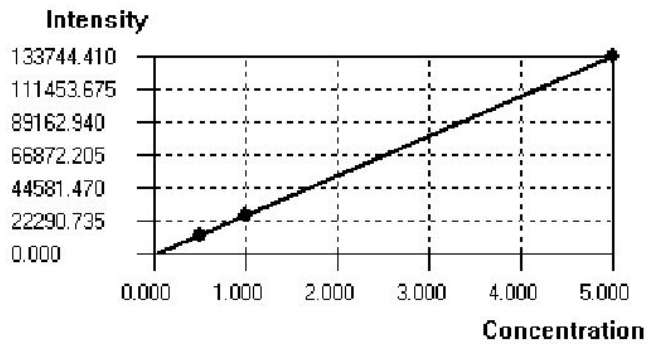
#	Sample Name	Intensity	Chem. Conc.	Calc. Conc.	Rel. dev(%)	Valid
1.	0	682.15	0	0 mg/l		Yes
2.	0.5	15356.05	0.50	0.498 mg/l	0.33	Yes
3.	1	30213.69	1.00	1.04 mg/l	3.60	Yes
4.	20	554254.53	20.00	20.00 mg/l	0.008	Yes

**Line:** P, 214.914 nm

**Calibr. curve:**  $I = -893.5 + 26900 * C$

Parameters of curve

**Sigma :** 0.0278656  
**BEC :** 33.2 µg/l  
**LOD :** \*\*\*  
**Correl. :** 0.999951  
**Weight:** not used

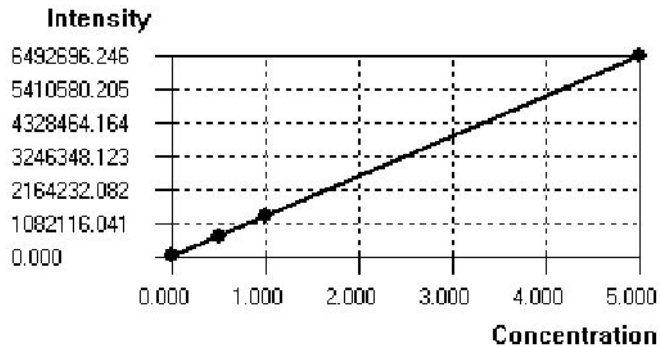


#	Sample Name	Intensity	Chem. Conc.	Calc. Conc.	Rel. dev(%)	Valid
1.	0	-85.05	0	0.0301 mg/l		Yes
2.	0.5	12045.42	0.50	0.481 mg/l	3.80	Yes
3.	1	25570.67	1.00	0.984 mg/l	1.62	Yes
4.	5	133744.41	5.00	5.01 mg/l	0.10	Yes

**Line:** **Ti, 336.121 nm**  
**Calibr. curve:**  $I = 38186 + 1290475 * C$

Parameters of curve

**Sigma :** 0.0282235  
**BEC :** 29.6 µg/l  
**LOD :** \*\*\*  
**Correl. :** 0.999949  
**Weight:** not used



#	Sample Name	Intensity	Chem. Conc.	Calc. Conc.	Rel. dev(%)	Valid
1.	0	67345.35	0	0.0226 mg/l		Yes
2.	0.5	642196.75	0.50	0.468 mg/l	6.39	Yes
3.	1	1338591.0	1.00	1.01 mg/l	0.77	Yes
4.	5	6492696.2	5.00	5.00 mg/l	0.033	Yes

그림 24. 무기질 분석을 위한 표준 곡선

표 18. 가공방법 및 주요 생산국 별 김의 미량 무기질 함량 (ppb)

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6
Li	342	304	246	229	708	911
Be	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Sc	235	282	276	250	281	445
V	8470	4783	18366	8609	17741	18855
Cr	2673	2549	3880	2798	2647	3413
Mn	28032	31922	12111	12377	35879	55641
Co	120	106	<100	<100	115	348
Ni	498	339	290	232	219	1447
Cu	6493	7702	3610	3862	12200	13706
Zn	45109	41909	10818	637	28773	21562
Ga	516	<100	235	<100	202	655
Se	135	204	<100	149	225	126
Rb	4765	5058	2338	3322	8043	4294
Sr	135626	17365	12691	15784	49200	50384
Y	1878	2032	435	922	422	1509
Zr	307	<100	117	219	215	598
Nb	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Mo	798	871	274	451	518	538
Ru	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Rh	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Ag	<100	<100	270	<100	119	208
Sb	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Te	131	<100	<100	<100	<100	<100
Cs	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Ba	6071	251	2389	150	1999	7100
La	225	116	130	<100	<100	582
Ce	115	196	282	<100	<100	1206
Pr	<100	<100	<100	<100	<100	158
Nd	222	225	186	<100	<100	819
Sm	<100	<100	<100	<100	<100	163
Eu	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Gd	167	189	<100	<100	<100	216
Tb	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Dy	165	202	<100	<100	<100	178
Ho	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Er	<100	103	<100	<100	<100	<100
Tm	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Yb	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Lu	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Hf	<100	<100	<100	<100	<100	<100
W	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Re	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Ir	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Pt	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Au	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Bi	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Th	<100	<100	<100	<100	<100	155
U	284	727	183	211	238	<100
Sn	106	<100	<100	<100	<100	120
I	1778	3108	517	3738	1667	2407

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산),  
S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

- Determined by ICP-MS
- Resolution: 0.005 nm(UV) and 0.05 nm(Visible)
- Detection limit: 수 ppb- 수백 ppb

##### 5) 중금속 함량 분석

- ICP-AES (JY Ultima2C, Jobin Yvon, France)를 이용하여 김에 함유되어 있는 중금속(수은, 납, 카드뮴, 비소) 함량을 분석한 결과를 아래 Table 5에 나타내었다. 개별 중금속 중 비소 함량이 가장 높았으며, 특히 S6(중국산김)에서는 납, 카드뮴, 비소의 함량이 높게 나타났다.

표 19. 가공방법 및 주요 생산국 별 김의 중금속 함량 (ng/mL)

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6
Hg	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Pb	365±0.108	256±0.121	505±0.182	169±0.143	131±0.018	1,566±0.218
Cd	2,202±0.453	1,629±0.304	690±0.191	1,220±0.228	331±0.135	3,408±0.447
As	24,348±0.722	32,027±7.437	18,159±4.395	23,126±4.534	24,097±6.114	43,895±12.036

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

- 우리나라에서 수산물에 대한 중금속 허용기준은 어패류에 대해서만 설정되어 있을 뿐 해조류에 대한 기준은 아직 설정되어있지 않다(KFDA 2004).

### ① 수은

- 수은 함량은 모든 김 시료에서 100 ppb 이하로 나타났다. 우리나라에서 수산물에 대한 중금속 허용기준은 어패류에 대해서만 설정되어 있을 뿐 해조류에 대한 기준은 아직 설정되어있지 않다(KFDA 2004). 국내 식품오염물질 기준규격 현황(2008.3.5기준)에서 제시된 모든 품종에 대한 수은은 최대 1.0 mg/kg, 최소 0.1 mg/kg이하로 본 결과에서의 수은함량은 국내 식품오염물질 기준 규격에 비해 소량 포함되어 있어 안전한 수준임을 알 수 있다.

### ② 납

- 국내산 김과 일본산 김에서의 납 함량은 0.12~0.51 µg/mL로 낮게 나타났으나 중국산 김에서 납함량이 1.57 ppm으로 나타났다. 그러나, 국내 식품오염물질 기준규격 현황(2008.3.5기준)에서 나타난 모든 품종의 납의 경우 최소 0.1 mg/kg, 최대 2.0 mg/kg (ppm)이하로 본 실험에 사용된 김들은 매우 안전한 수준임을 알 수 있었다.

### ③ 카드뮴

- 국내산 마른김과 김밥용김 중의 카드뮴 함량은 각각 2.20 ppm과 1.63 ppm으로 조미김 (0.69~1.22 ppm)에 비해 다소 높게 나타났다. 일본산 김에서는 다른 김보다 낮은 카드뮴 함량을 나타낸 반면, 중국산 김에서는 다른 김보다 높은 카드뮴 함량을 나타냈다. 일본산 김의 카드뮴함량은 0.33 ppm으로 매우 낮았으나, 중국산 김에서는 일본산 김의 약 10배에 해당하는 3.41 ppm으로 카드뮴이 검출되었다. 국내 식품오염물질 기준규격 현황(2008.3.5기준)에서 나타난 모든 품종의 카드뮴의 경우 최소 0.05 mg/kg, 최대 2.0 mg/kg이하로 본 실험에서 중국산 김을 제외한 카드뮴함량인 0.33 ~ 2.2 mg/kg 유사한 수치를 나타내어 안전한 것으로 사료된다.

#### ④ 비소

- 김에서 개별 중금속 중 비소가 가장 많은 함량으로 확인되었다. 국내 식품오염물질 기준규격 현황(2008.3.5기준)에서 나타낸 비소의 경우 기타식품류의 식염 0.5 mg/kg와 캡셀류 1.5 mg/kg이 유일했으며, 본 실험에서의 비소함량인 최소 18.2 mg/kg에서 최대 43.9 mg/kg으로 높은 함량을 나타냈다. 특히, 중국산 김에서는 다른 김보다 최대 2배 이상 높은 비소 함량을 나타냈다.

### 6) 김의 일반성분 분석

#### ① 수분

- 김의 수분함량은 가공방법 및 원산지 별로 각기 다르게 나타났다. 국내산 마른 김의 수분함량은 9.69%로 한국산업규격(KS)의 마른김의 수분함량의 평균값인 9.96%와 비슷한 값을 나타냈고, 가이드라인으로 제시한 12.0% 이하에 부합하였다. 국내산 김밥용 김의 수분함량은 3.66%로 마른김에 비해 굵는 과정을 한번 더 거치면서 수분함량이 감소했을 것으로 사료된다. 조미김의 수분함량은 1.49~2.44%로 마른 김에 비해 낮게 나타났으며 이는 조미김에는 다량의 기름 성분이 함유되어 있기 때문으로 사료된다. 조미김의 수분함량은 식품공전에서 제시한 7.0% 이하 및 한국산업규격에서 제시한 2.5% 이하 조건에 모두 부합하였다. 일본산 김은 스시용 김으로 수분함량은 2.68%로 비교적 낮았으며, 중국산 김은 6.74%의 수분을 함유하는 것으로 나타났다.

#### ② 회분

- 김의 회분함량은 가공방법 및 원산지 별로 6.07~10.3%로 다른 성분들에 비해 큰 차이를 나타내지는 않았다. 국내산 마른 김과 김밥용김의 수분함량은 각각 10.3%와 9.07%로 나타났다. 한국산업규격(KS)에서 제시하는 건조김의 회분함량은 특급이 9.0% 이하, 고급이 9.5% 이하로 본 연구에서 분석한 시료들은 모두 이 조건에 부합하였다. 조미김의 회분함량은 6.07~8.54%로 마른 김에 비해 낮게 나타났으며, 조미김의 경우, 회분함량에 대한 규격이 설정되어 있지 않은 상태이다. 스시용으로 사용되는 일본산 김의 회분함량은 9.57%로 국내산 건조김 및 김밥용김과 비슷한 값을 보였다. 중국산 김의 회분함량은 8.78%로 국내산 및 일본산 김의 회분함량보다 다소 낮은 값을 나타냈다.

#### ③ 조단백

- 국내산, 일본산 및 중국산 김의 조단백질 함량은 32.16~39.93%로 제조지역별로 다소 차이를 나타냈다. 국내산 건조김과 김밥용김의 조단백질 함량은 각각 36.83%와 36.88%로 그리 큰 차이를 보이지 않았고, 이는 한국산업규격(KS)(특급 37%이상, 고급 32%이상)과 식품성분표(35.6%)에서 제시한 조단백 함량보다 다소 높은 수치를 나타냈다. 일본산 김의 경우, 조단백질 함량이 39.93%로 국내산김과 중국산 김보다 높은 수치를 보였고, 중국산 김은 32.16%의

조단백질을 함유하고 있어 다른 제품들에 비해 가장 낮은 조단백질 함량을 나타냈다. 국내산 조미김의 경우, 조단백질 함량이 각각 17.24%와 24.08%로 마른김과 김밥용김에 비해 낮은 수치를 보였다.

④ 조지방

- 국내산 마른김의 조지방 함량은 0.73%로 나타났고 김밥용김은 이보다 높은 3.30%로 나타났다. 국내산 조미김의 경우는 조지방 함량이 37.88~42.42%로 마른김이나 김밥용김에 비해 매우 높았다. 이는 조미김에 함유된 다량의 기름(참기름)에 의한 것으로 사료된다. 일본산 김의 경우 4.68%의 조지방을 함유하고 있었고, 이는 국내산 김밥용김보다는 다소 높은 수치였다. 중국산 김에는 1.96%의 조지방이 있는 것으로 나타났다. 한국산업규격상에는 마른김에 대한 조지방 함량이 규정되어있지 않다.

표 20. 김의 가공조건 및 원산지 별 수분, 회분, 조지방, 조단백 함량

	Moisture (%)	Ash (%)	Crude lipid (%)	Crude protein (%)
S1	9.69±1.99	10.3±0.19	0.73±0.43	36.83±0.02
S2	3.66±0.25	9.07±0.29	3.30±0.29	36.88±0.89
S3	1.49±0.48	6.07±0.17	42.42±1.26	17.24±0.56
S4	2.44±0.17	8.54±0.42	37.88±0.84	24.08±0.30
S5	2.68±0.24	9.57±0.14	4.68±0.41	39.93±0.35
S6	6.74±0.51	8.78±0.12	1.96±0.40	32.16±1.17

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

표 21. 마른김과 조미김의 KS 규격

항목	마른 김	
	특급	고급
관능품위	형태가 바르고 일정하여야 하며, 고유의 색깔과 품미 및 조직감을 가지고 이미, 이취 및 이물이 없어야 하며, 표 2의 채점기준에 따라 채점한 결과 특급은 전항목 모두 4점 이상이어야 하며, 고급은 전항목 모두 3점 이상이어야 한다.	
수분(%)	12.0 이하	
회분(%)	9.0 이하	9.5 이하
조단백질(%)	35.0 이상	30.0 이상
무거운 이물(%)	0.15 이하	0.30 이하
구멍기	없어야 한다.	10 이하 (개수/장)

자료 : 한국산업규격(KS) 마른김(H6025), 2004.

표 22. 조미김의 국내 기존 품질규격대비

항목	식품공전	한국산업규격
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미·이취가 없어야 한다.	표 2의 채점기준에 따라 채점한 결과가 평균 3.5점 이상이고 2점 및 1점 항목이 없어야 한다.
이물	-	없어야 한다.
수분(%)	7.0 이하	2.5 이하

자료 : 식품공전 및 한국산업규격 조미김(개정), 2006.

## 7) 김의 색도 분석

### ○ 가공방법 및 주요 생산국 별 김의 색도 분석

- 김을 분말화해 표면색을 측정된 것으로 L값은 명도, a값은 마이너스 값이 커질수록 녹색의 진한 정도를, b값은 플러스 값이 커질수록 황색의 진한 정도를 의미한다. 밝기를 나타내는 L값은 S3(조미김1)이 33.91로 가장 밝은 색이었으며, S2(한국산 김밥김)이 40.10으로 가장 어두운 색으로 나타났다. 황색도를 나타내는 b값은 S5(일본산김)이 2.28로 가장 높은 값을 나타냈으며, S4(조미김2)이 1.50으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 김의 색은 채취장소와 채취 시기 및 가공방법에 따라 다르게 나타나는 것으로 사료된다.

표 23. 가공방법 및 주요 생산국 별 김의 색도 분석

Sample	L(lightness)	a(redness)	b(yellowness)
S 1	38.48±0.86	0.76±0.08	1.99±0.11
S 2	40.10±0.75	0.36±0.07	1.66±0.11
S 3	33.91±1.16	-0.15±0.21	2.01±0.36
S 4	36.33±2.60	-0.02±0.13	1.50±0.17
S 5	39.84±1.03	1.00±0.06	2.28±0.35
S 6	37.02±1.38	0.44±0.11	1.47±0.12

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

## 2. 김 추출물의 항산화활성 탐색

### 1) DPPH(diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay를 이용한 김 추출물의 항산화 능력 평가

- DPPH(diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay는 천연물의 항산화 활성을 측정하기 위해 가장 많이 이용되고 있는 방법으로 항산화 능력이 있는 물질이 안정한 DPPH radical에 전자를 제공하고 환원시켜 탈색반응이 나타나는 원리를 이용하여 항산화 정도를 측정한다(Blois MS 1958). 추출용매 및 농도를 달리한 김 추출물의 DPPH radical 소거활성은 Table 7과 같다. 김 추출물의 농도(100~1,000 µg/mL)가 증가할수록 DPPH radical 소거활성도 증가하는 것으로 나타났다.
- 37°C와 100°C의 일부 김 시료의 물 추출물에서는 DPPH 활성이 마이너스(-) 값을 보였는데, 이는 물 추출물의 색이 보라색으로 DPPH 흡광도 측정에 영향을 주었기 때문으로 사료된다. 반면, 37°C, 70% 에탄올 추출물에서는 DPPH 활성이 양(+)의 값으로 나타났다. 국내산 마른김 추출물에서는 김 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical scavenging activity가 6.84~23.05로 증가하는 것으로 볼 수 있었다. 국내산 조미김에서의 항산화 활성은 마른김에 비해 높게 나타났는데, 이는 조미김에 포함된 참기름 등의 항산화 활성에 의한 것으로 사료된다. 일본산 김과 중국산 김에서도 김 추출물의 농도에 비례하여 항산화 활성이 증가하는 것을 관찰하였다.



표 24. DPPH assay로 측정한 가공방법 및 주요 생산국 별 김의 항산화 활성

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )		S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6
37°C, DW	100	-3.28±0.67	-1.97±0.39	3.35±0.16	2.70±0.35	-1.17±0.78	-1.98±0.53
	200	-5.73±1.71	-2.86±0.16	3.74±0.47	3.48±0.48	-0.85±0.24	-2.42±0.58
	250	-6.30±0.33	-3.71±0.45	4.62±0.36	5.05±0.52	-1.25±0.12	-2.39±0.36
	500	-9.71±2.44	-3.46±0.15	5.61±0.98	12.03±0.68	1.30±1.23	-1.00±0.84
	1,000	-22.66±0.20	-2.84±1.00	9.97±0.91	21.70±1.04	-5.19±2.30	2.54±0.43
100°C, DW	100	-0.03±0.15	-3.51±1.70	0.94±0.22	-0.17±0.14	-2.59±0.50	3.55±0.69
	200	-1.61±2.00	-4.43±0.52	1.07±0.09	-2.16±0.29	-3.01±1.82	3.81±1.08
	250	-1.55±0.90	-5.33±0.30	2.48±0.30	-1.19±0.30	-4.30±0.52	5.30±0.81
	500	-1.02±0.78	-6.49±0.86	2.60±0.48	-3.64±0.34	-6.67±1.18	10.33±0.16
	1,000	1.30±0.33	-6.62±0.87	4.64±2.07	-2.03±0.22	-6.74±3.20	17.27±0.17
37°C, 70% EtOH	100	6.84±0.42	5.50±0.37	8.56±0.71	10.22±0.57	6.07±0.35	6.70±0.53
	200	9.31±1.32	6.90±0.71	13.16±0.05	15.73±0.35	8.59±0.29	10.27±0.25
	250	10.90±0.80	8.19±0.52	14.76±0.46	17.59±0.50	9.63±0.37	11.88±0.70
	500	15.42±0.65	11.76±0.17	24.58±0.80	29.67±0.40	14.65±0.66	18.61±0.39
	1,000	23.05±0.55	19.33±0.36	35.64±0.73	41.30±1.70	22.85±0.38	29.29±0.42

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

2) ABTS(azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) assay를 이용한 김 추출물의 항산화 능력 평가

- ABTS법은 산화 유도물질인 potassium persulfate와 반응하여 생성된  $\text{ABTS} \cdot^+$  이온이 항산화성 물질에 의해 제거되어 ABTS 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화력을 측정하는 방법이다(Pellegrini N 등 1998). 김 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 Table 3에 나타내었다. 김 추출물의 농도(100~1,000  $\mu\text{g/mL}$ )가 증가할수록 ABTS radical 소거활성도 증가하는 것으로 나타났다.
- 37°C 물 추출물에서 ABTS radical 소거 활성이 가장 높게 나타났다. 모든 김 시료에서 김 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS radical scavenging activity가 증가하였으며, 국내산 마른 김의 경우, 100  $\mu\text{g/mL}$  및 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 ABTS radical 소거 활성은 각각 4.07 및 26.51로 증가하였다. 국내산 조미김에서의 항산화 활성은 마른김에 비해 높게 나타났는데, 이는 조미김에 포함된 참기름 등의 항산화 활성에 의한 것으로 사료된다. 일본산 김과 중국산 김에서도 김 추출물의 농도에 비례하여 항산화 활성이 증가하는 것을 관찰하였다.

표 25. ABTS assay로 측정한 가공방법 및 주요 생산국 별 김의 항산화 활성

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6
37°C, DW	100	4.07±0.25	3.31±0.31	2.13±0.29	3.93±0.80	5.79±0.56	4.50±0.43
	200	6.90±0.21	5.37±0.44	3.78±0.24	8.11±0.54	9.68±1.07	7.68±0.83
	250	8.90±0.58	6.45±0.55	5.01±1.13	9.83±0.88	12.37±1.12	8.46±1.68
	500	15.36±0.31	11.31±0.97	8.27±0.30	16.41±1.88	22.90±1.65	16.80±1.52
	1,000	26.51±1.95	19.66±0.73	14.66±0.84	29.99±1.44	39.60±2.47	31.00±2.01
100°C, DW	100	0.87±0.54	2.58±0.50	2.14±0.46	2.64±0.45	2.70±0.49	2.71±0.24
	200	1.80±0.38	4.08±0.38	3.68±0.52	3.44±0.41	4.69±0.42	3.53±0.45
	250	3.10±0.93	4.74±0.91	5.15±0.34	4.48±0.39	5.50±0.74	5.98±0.37
	500	4.97±0.35	8.84±0.51	9.00±1.14	6.19±0.91	10.82±0.72	11.08±0.38
	1,000	8.57±0.85	15.75±0.49	16.58±0.91	11.19±0.93	18.83±0.90	19.86±0.50
37°C, 70% EtOH	100	1.92±0.28	1.32±0.32	3.70±0.19	3.65±0.29	2.01±0.48	2.63±0.38
	200	2.90±0.47	3.12±0.44	7.70±0.22	6.01±0.33	3.34±0.39	3.92±0.68
	250	3.39±0.32	3.19±0.88	8.34±0.77	7.82±0.64	5.04±0.85	5.10±0.33
	500	6.04±0.84	7.08±0.44	15.65±0.38	13.94±0.22	7.48±0.32	10.28±0.74
	1,000	11.40±0.32	13.60±0.68	28.62±0.08	25.83±0.73	13.65±0.57	18.02±0.94

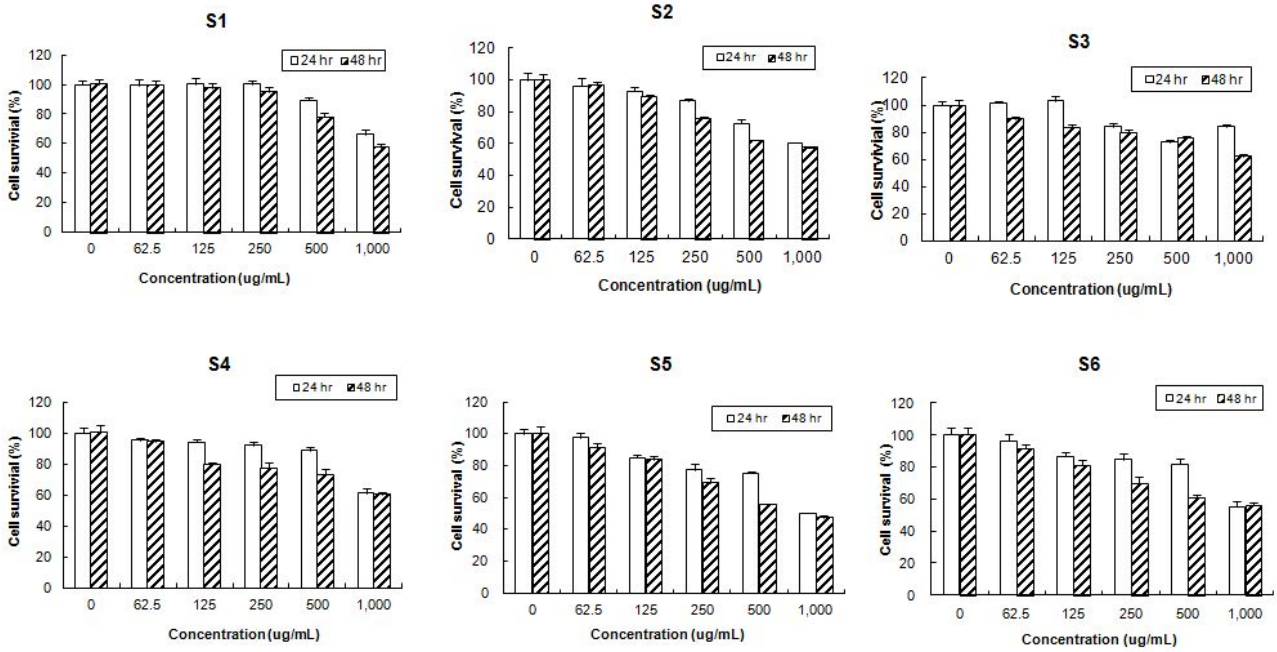
S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

## 2. 김 추출물의 항암활성 탐색

### 1) MTT assay를 통한 세포독성 및 암세포 성장 억제 활성 측정

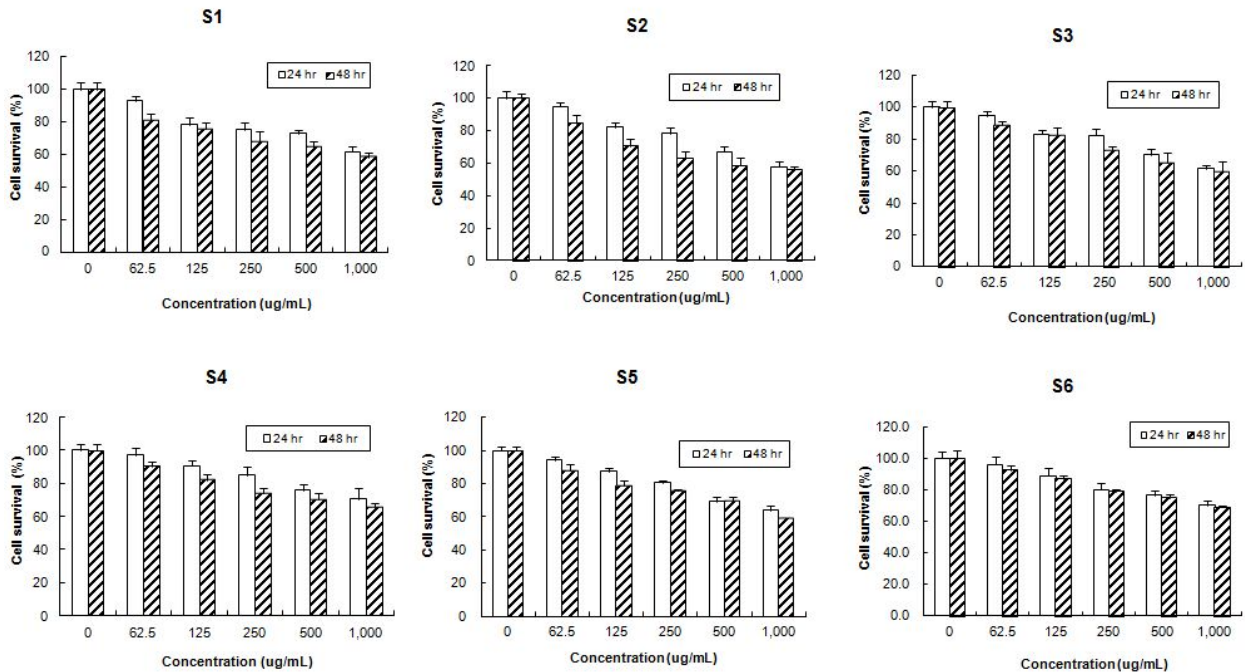
- 추출조건을 달리하여 얻은 김 추출물이 각종 암세포주 (AGS 인체 위암세포, SK-Hep1 인체 간암세포, PC-3 인체 전립선암 세포)의 증식 억제정도를 측정하였다. 저농도의 김 물 추출물(0~62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서는 암세포 증식 억제가 비교적 낮게 나타났으나 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 암세포 증식 억제 효능도 증가하였다. 또한, 김 에탄올 추출물을 24시간 처리한 실험군에 비해 48시간 동안 처리한 실험군에서 암세포 성장 억제 효능이 증가하였다.
- 한국산 김 추출물을 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 SK-Hep1 간암 세포주에 처리하고 48시간 동안 배양한 경우, 각각 12.6%와 18.4%의 암세포 성장 억제효과를 보였다. 한국산 김 추출물 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 SK-Hep1 간암 세포주에 처리하고 24시간 및 48시간 동안 배양하였을 경우, 각각 35.7%와 42.4%의 암세포 성장 억제효과를 관찰하였다.

- 한국산 조미김은 한국산 마른김에 비해 암세포 성장 억제 활성이 다소 낮은 것으로 나타났으며, 일본산김과 중국산 김은 조미김에 비해 다소 높은 암세포 증식 억제효능을 나타내었다. 조미김 추출물 250 ppm을 SK-Hep1 세포주에 24시간과 48시간 동안 처리하고 배양한 결과 각각 45.3%와 55.3%의 성장 억제효과를 보였다. 일본산 김 추출물을 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 AGS 세포주에 처리하고 48시간 배양한 결과, 각각 22.1%와 30.9%의 암세포 성장 억제를 나타냈다. 다양한 김 추출물의 농도와 처리 시간이 증가함에 따라 농도의존적으로 암세포 성장 억제 효과도 증가함을 관찰하였다.
- 한국산 김 에탄올 추출물 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 PC-3 인체 전립선암 세포주에 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양한 경우, 각각 25.3%와 36.6%의 암세포 성장 억제효과를 보였다. 동일한 농도(62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 한국산 김 추출물을 처리하고 48시간 배양한 결과 각각 30.8%와 39.3%의 LNCaP 세포주의 증식 억제를 보여 김 추출물의 처리시간이 길어질수록 암세포 증식 억제 효과도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.
- 37°C 물 추출에 의해 얻은 한국산 김 추출물(S1)을 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  48시간 배양한 결과, 각각 30.2%와 39.1%의 암세포 성장 억제를 나타냈다. 한국산 김 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 AGS 세포주에 24시간과 48시간 동안 처리하고 배양한 결과 각각 34.7%와 40.1%의 성장 억제효과를 관찰하였다. 김 추출물 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 24시간과 48시간 동안 AGS 세포주에 처리하고 배양한 결과 각각 42.8%와 45.6%의 성장 억제효과를 보여 AGS 세포주에서도 다른 세포주와 동일하게 김 에탄올 추출물이 김 증류수 추출물에 비해 다소 높은 암세포 증식 억제효능을 나타냄을 확인하였다.
- 본 실험에 사용한 세포주(AGS, SK-Hep1, PC-3)에서 37°C, 70% 에탄올 추출이 다른 추출방법에 비해 암세포 성장 억제효과가 다소 높은 것으로 타나났다.



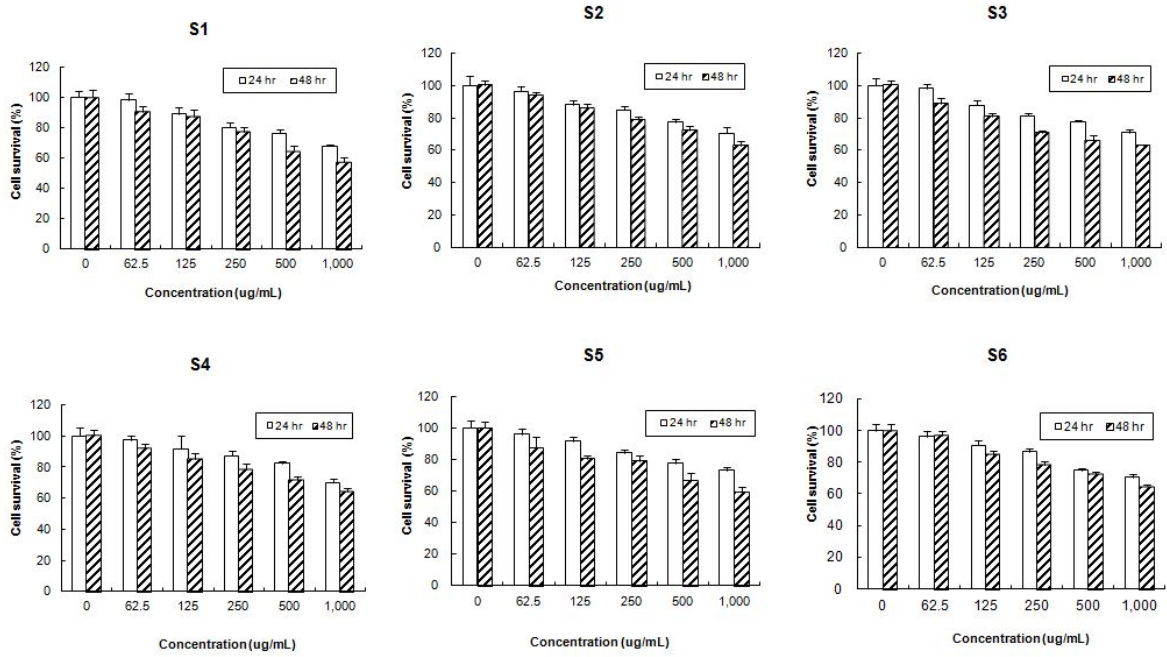
S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산),  
 S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

그림 25. 김 추출물(37°C, 70% ethanol)의 AGS 인체 위암세포의 성장 억제 효과



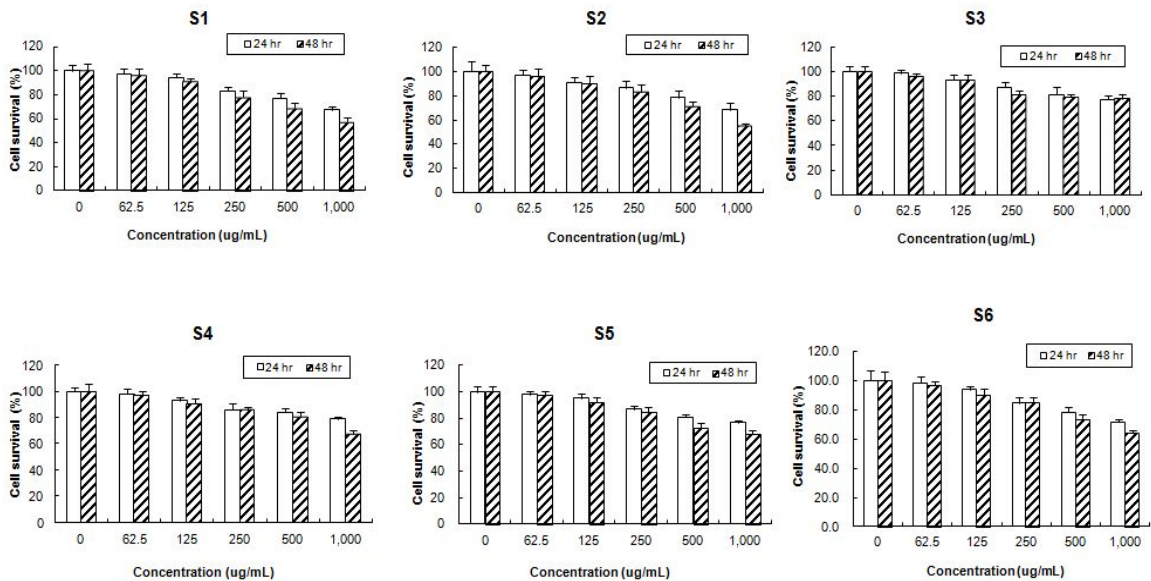
S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산),  
 S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

그림 26. 김 추출물(37°C, DW)의 AGS 인체 위암세포의 성장 억제 효과



S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

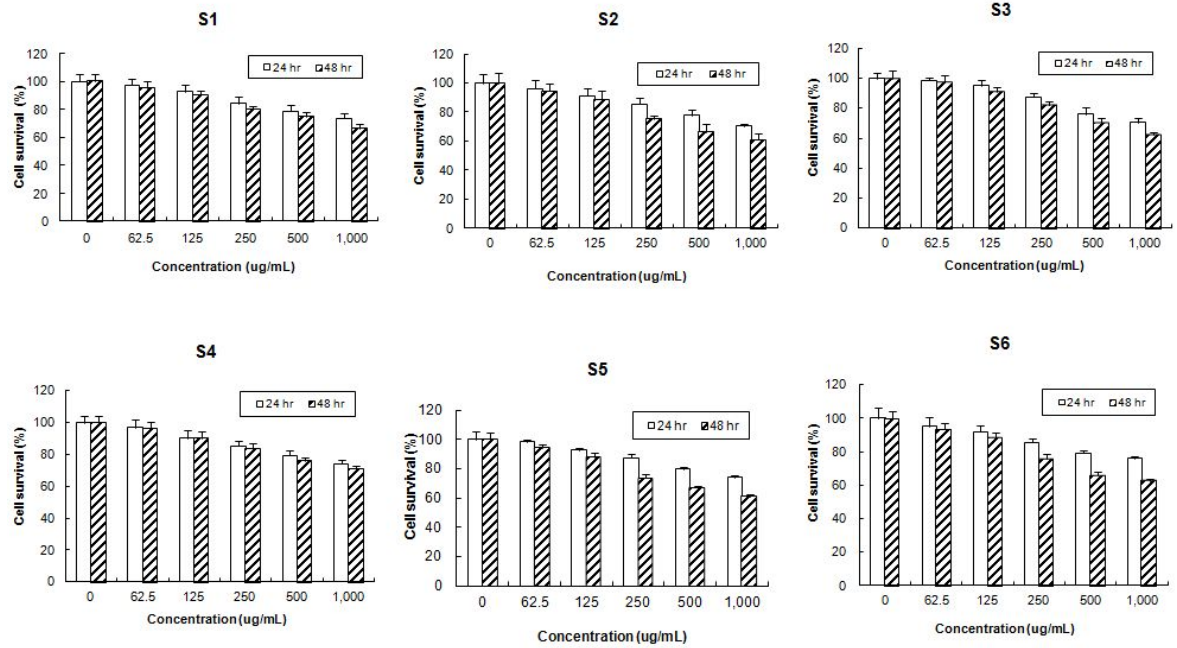
그림 27. 김 추출물(100°C, DW)의 AGS 인체 위암세포의 성장 억제 효과



S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

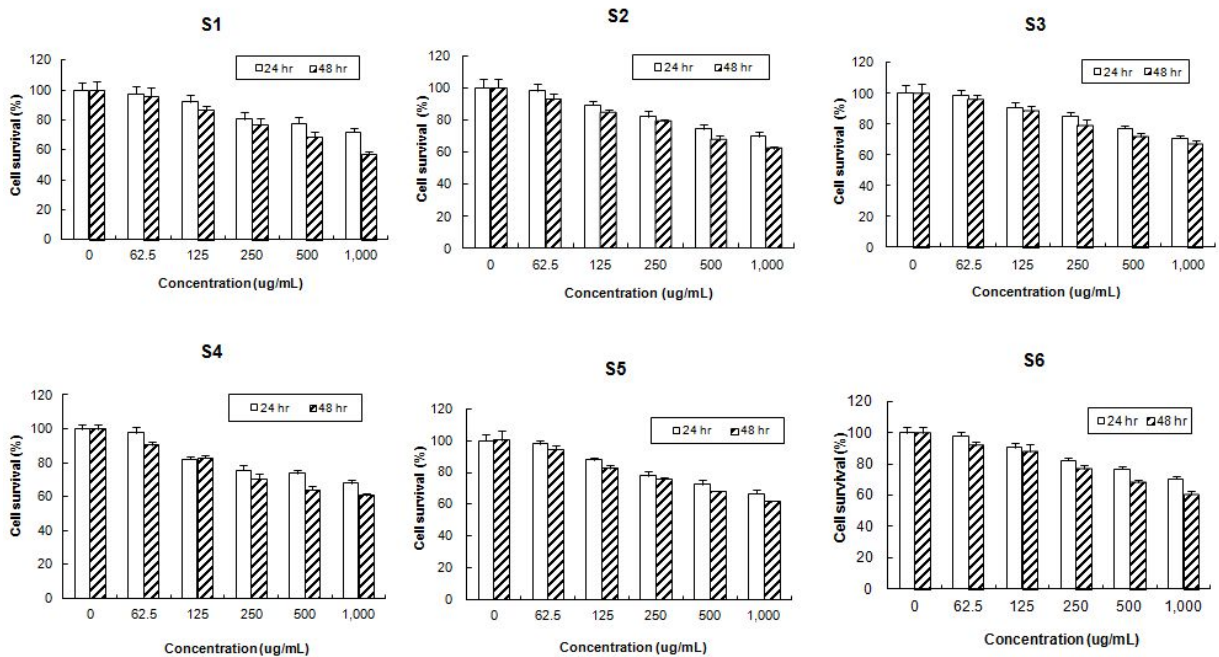
그림 28. 김 추출물(37°C, 70% ethanol)의 SK-Hep1 인체 간암세포의 성장 억제 효과

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김



S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

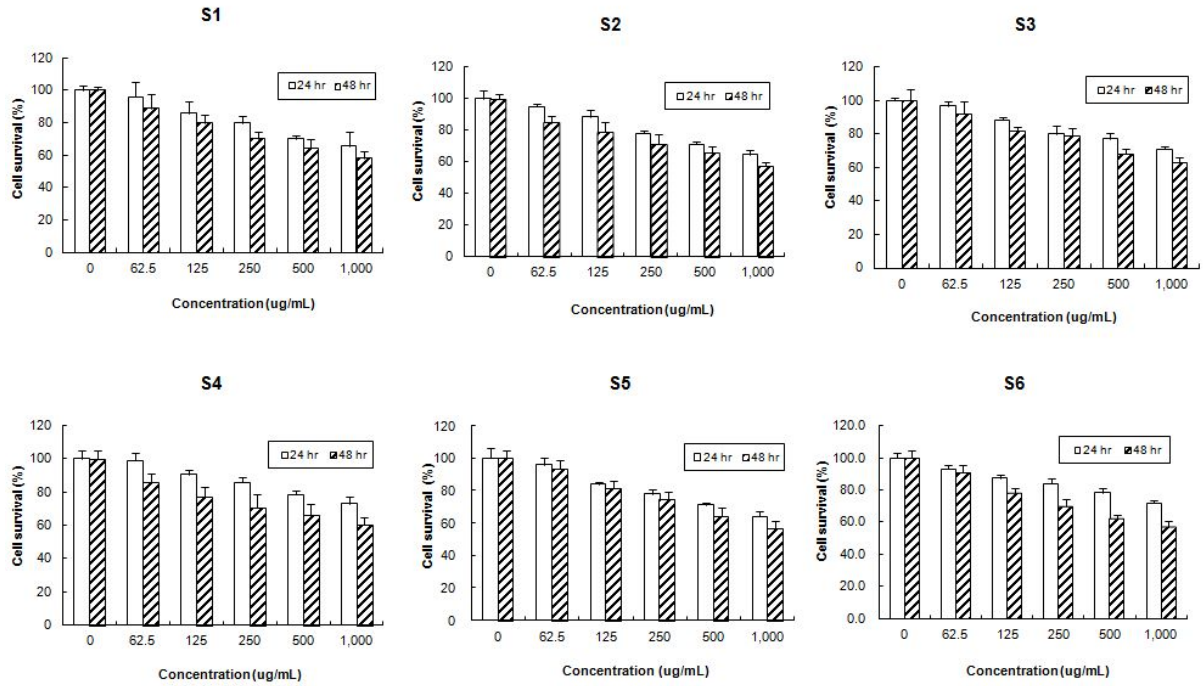
그림 29. 김 추출물(37°C, DW)의 SK-Hep1 인체 간암세포의 성장 억제 효과



S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

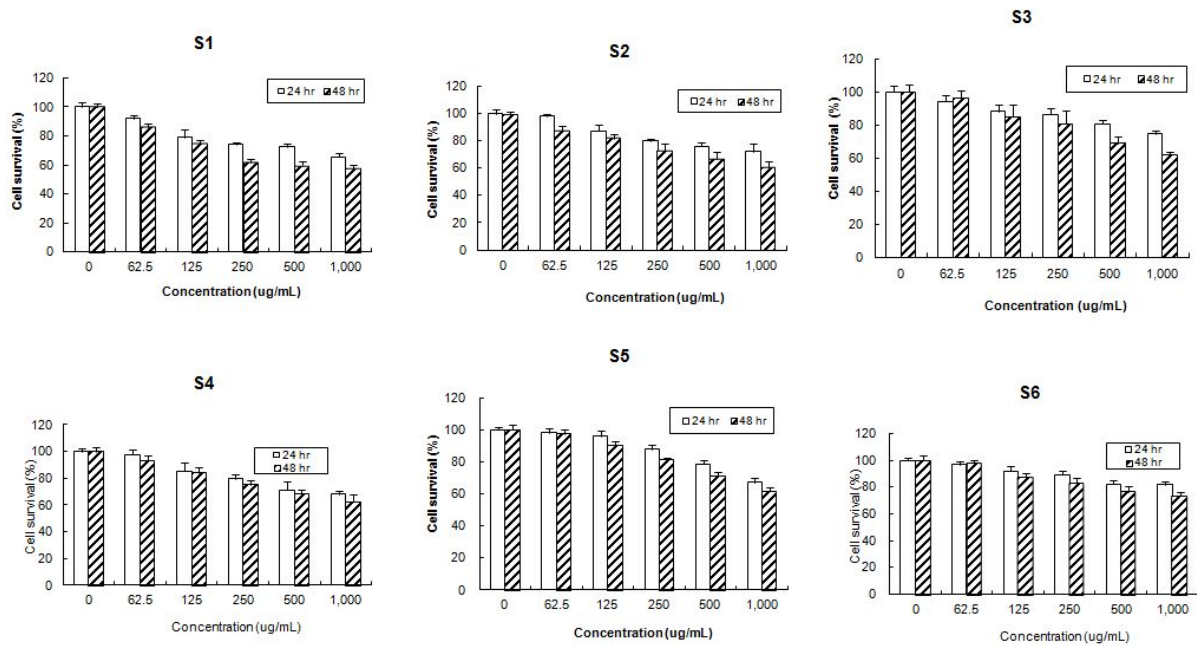
그림 30. 김 추출물(100°C, DW)의 SK-Hep1 인체 간암세포의 성장 억제 효과

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산),



S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

그림 31. 김 추출물(37°C, 70% ethanol)의 PC-3 인체 전립선암세포의 성장 억제 효과



S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

그림 32. 김 추출물(37°C, DW)의 PC-3 인체 전립선암세포의 성장 억제 효과

S1 : 한국산 재래김, S2 : 한국산 김밥용 김, S3 : 한국산 조미김 (광천산), S4 : 한국산 조미김 (완도산), S5 : 일본산 김, S6 : 중국산 김

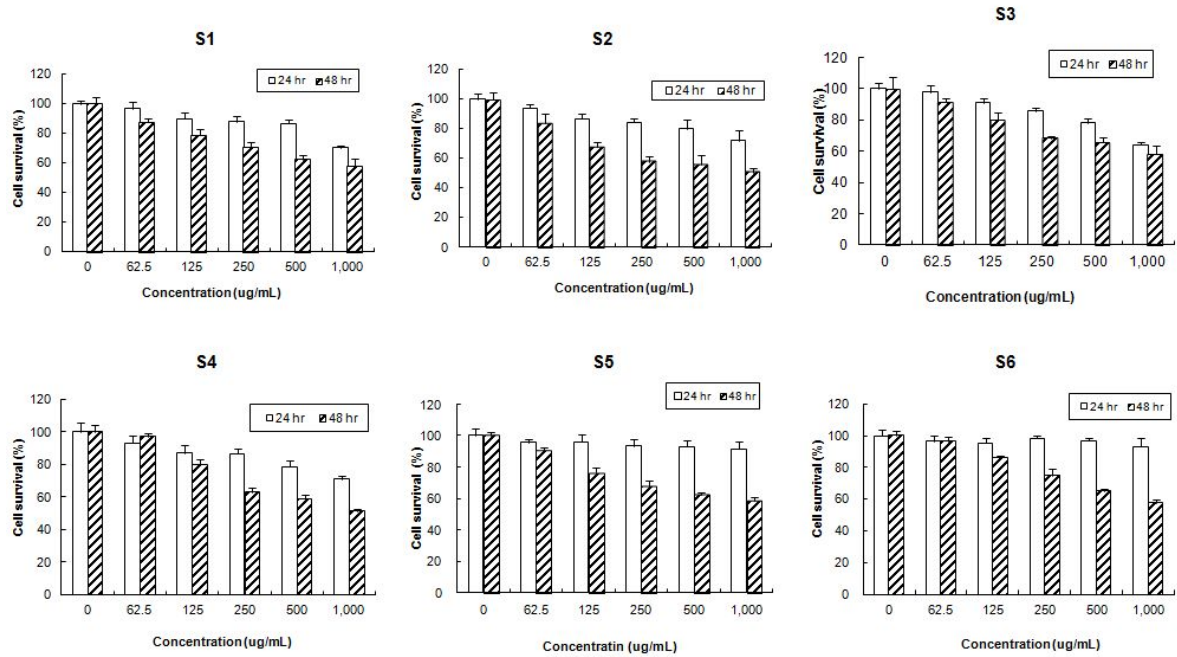


그림 33. 김 추출물(100°C, DW)의 PC-3 인체 전립선암세포의 성장 억제 효과

#### 4) 김 추출물의 암전이 억제 효과 측정

- 암세포의 침윤(invasion)과 전이(metastasis)는 암 치료의 가장 큰 장애 요인이며, 침윤과 전이의 억제는 암 치료 효율 향상을 위한 필수적인 과정이다. 침윤과 전이를 억제하는 가장 기본적인 방법이 암세포의 이동을 차단하는 것이므로 본 연구에서는 한국산 김(마른김, 김밥용김) 추출물을 대상으로 암세포의 침윤, 이동, 전이 억제능을 알아보았다.

##### ① Wound migration assay

- 대조구에 비해 한국산 마른김(S1)과 김밥용김(S2) 에탄올 추출물은 인체 간암세포주인 SK-Hep1 세포의 이동을 처리 농도 및 처리 시간에 비례하여 억제함을 확인하였다. 아래 그림 34와 같이 control에서는 시간이 경과함에 따라 암세포의 이동이 일어나 24~48시간 후에는 사이의 간격이 없이 암세포가 이동함을 관찰하였다. 반면에, 김 추출물 200 µg/mL 농도로 처리한 경우에는 암세포의 이동성이 매우 감소하였고, 12시간까지는 암세포의 이동이 거의 일어나지 않았고 24~48시간이 경과해서도 암세포의 이동이 미미하게 일어남을 확인하였다.



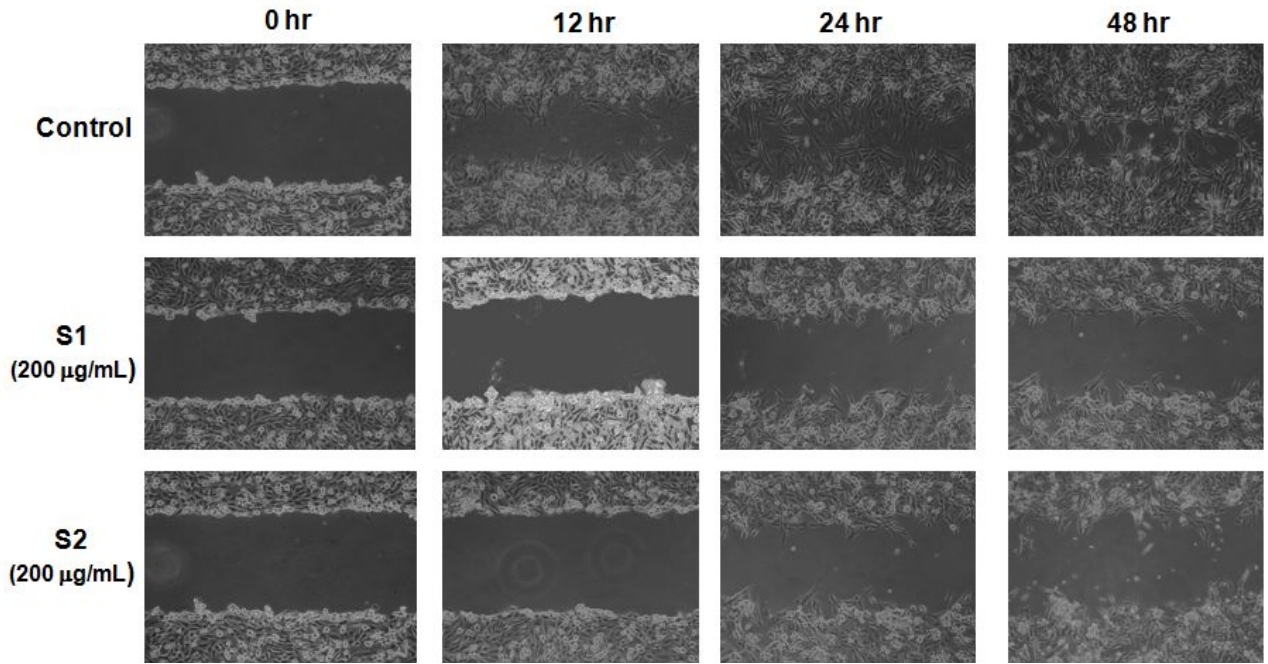


그림 34. 한국산 김 추출물의 SK-Hep1 인체 간암세포 이동 억제 효과

### ② Adhesion assay

- 한국산 마른김(S1)과 김밥용김(S2) 에탄올 추출물을 암세포의 부착을 농도 (100~400  $\mu$ g/mL) 의존적으로 억제하였다. 암세포의 부착을 억제하는 정도는 김 추출물의 농도와 비례함을 확인하였고, 한국산 마른김 100  $\mu$ g/mL과 400  $\mu$ g/mL에서는 대조구와 비교하여 각각 89%와 62%의 암세포가 부착하는 것을 확인하였다. 한국산 김밥용 김의 경우는 100  $\mu$ g/mL과 400  $\mu$ g/mL에서 각각 17%와 42%까지 암세포의 부착을 억제하였다.

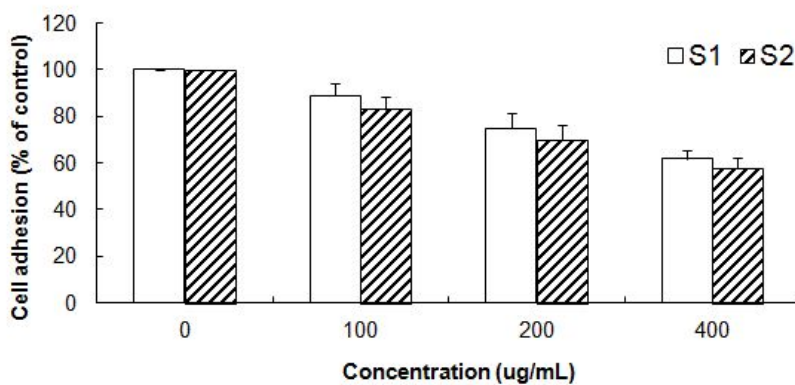


그림 35. 한국산 김 추출물의 SK-Hep1 인체 간암세포 부착 억제 효과

### ③ Invasion assay

- 김 추출물이 암세포의 침윤에 미치는 영향은 위의 adhesion assay와 비슷한 결과를 얻었

다. 한국산 마른김(S1)과 김밥용김(S2) 에탄올 추출물을 암세포의 침윤을 농도 (100~400  $\mu$ g/mL) 의존적으로 억제하였다. 암세포의 침윤을 억제하는 정도는 김 추출물의 농도와 비례함을 확인하였고, 한국산 마른김 200  $\mu$ g/mL과 400  $\mu$ g/mL에서는 대조구와 비교하여 각각 37%와 66%까지 암세포의 침윤을 억제하였다. 한국산 김밥용김은 마른김에 비해 암세포의 침윤을 억제하는 정도가 높았다. 김밥용김 추출물 200  $\mu$ g/mL과 400  $\mu$ g/mL에서 각각 48%와 88%까지 암세포의 부착을 억제함을 확인하였다.

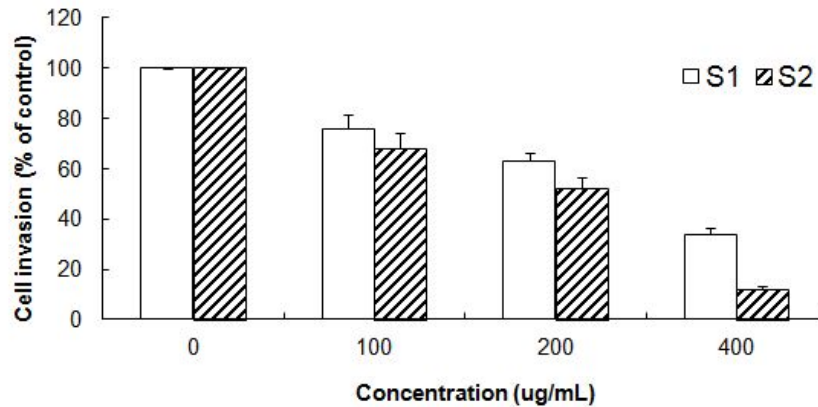


그림 36. 한국산 김 추출물의 SK-Hep1 인체 간암세포 침윤 억제 효과

#### ④ Zymography를 이용한 MMP 활성 측정

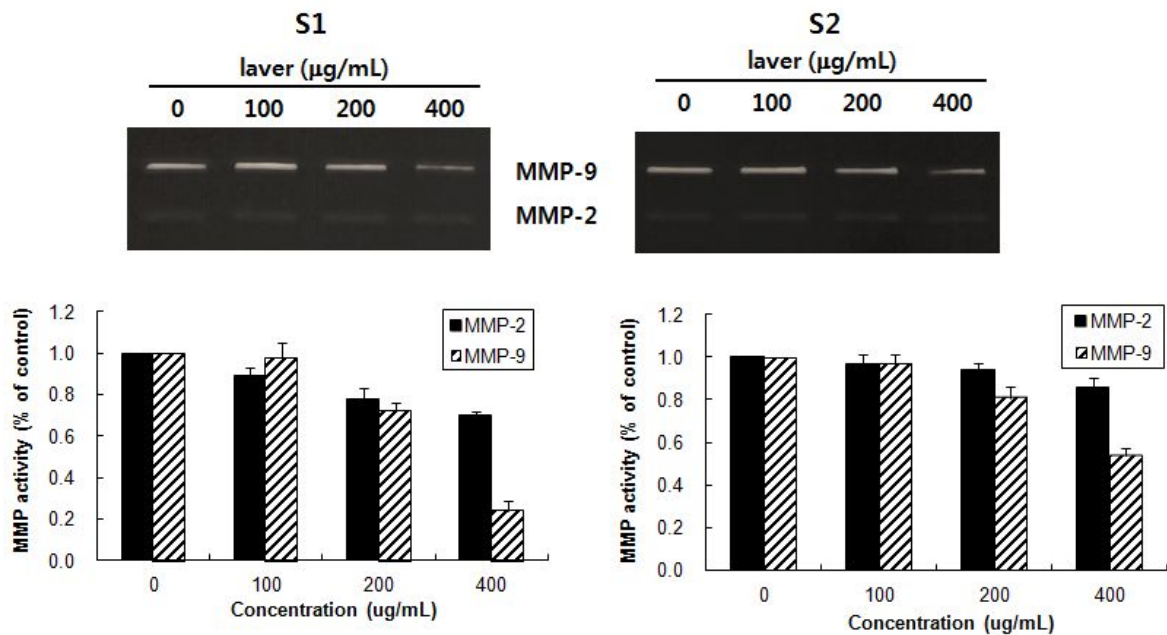
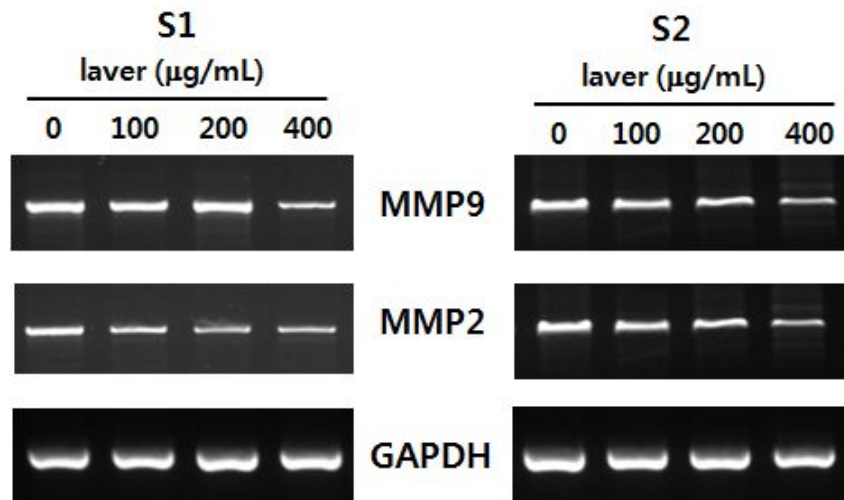


그림 37. 한국산 김 추출물의 SK-Hep1 인체 간암세포의 MMP 활성 억제 효과

- MMP-2와 MMP-9은 암전이와 관련된 효소이며, 인체 간암세포주인 SK-Hep1 세포는 상당히 많은 양의 MMP-9과 약간의 MMP-2를 분비한다. 김 추출물을 처리하지 않은 대조구에서 MMP-9과 MMP-2의 발현을 확인하였다. 김 추출물 농도별로 처리하고 48시간동안 배양한 결과, 한국산 마른김(S1)과 김밥용김(S2)에서 MMP-9의 발현이 감소함을 확인하였다. MMP-2의 경우는 대조구에서도 MMP-9에 비해 발현되는 양이 적었으며, 김 추출물을 처리한 그룹에서도 분비가 감소되는 경향은 확인하였으나, MMP-9에 비해 감소되는 비율이 낮았다.

⑤ MMP와 TIMP 확인을 위한 RNA extraction 및 RT-PCR

- 한국산 김 에탄올 추출물은 암전이에 관여하는 효소인 MMP-2와 MMP-9의 활성을 mRNA 수준에서 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 김 추출물 처리군은 TIMP-1과 TIMP-2의 활성을 농도 의존적으로 증가시켰다. TIMP-1은 MMP-9의 활성을, TIMP-2는 MMP-2의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 한국산 김 추출물은 TIMP-1/-2의 활성을 증가시킴으로써 MMP-2/-9의 활성을 억제하며, 이는 암세포의 부착, 침투 및 이동을 억제하여 암전이 억제효능을 보이는 것으로 사료된다.



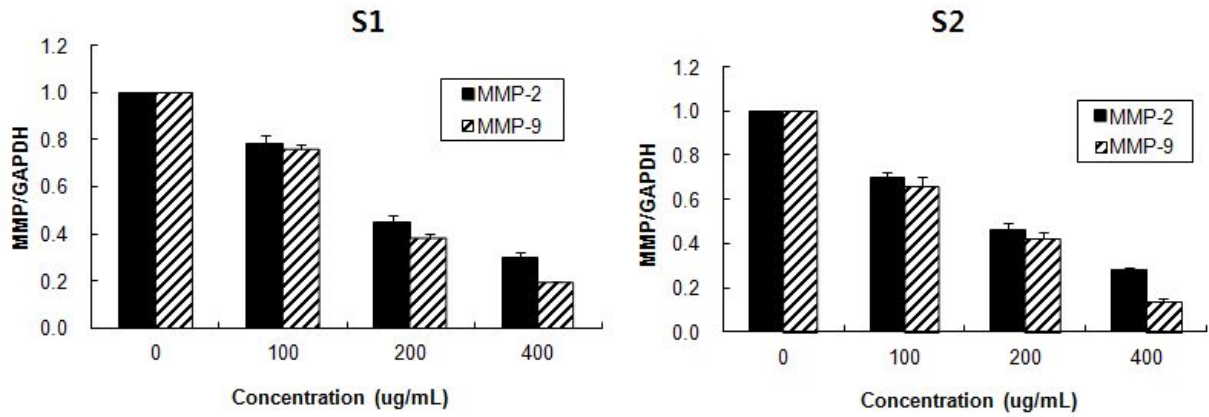


그림 38. 한국산 김 추출물의 SK-Hep1 인체 간암세포의 MMP 활성 억제 효과

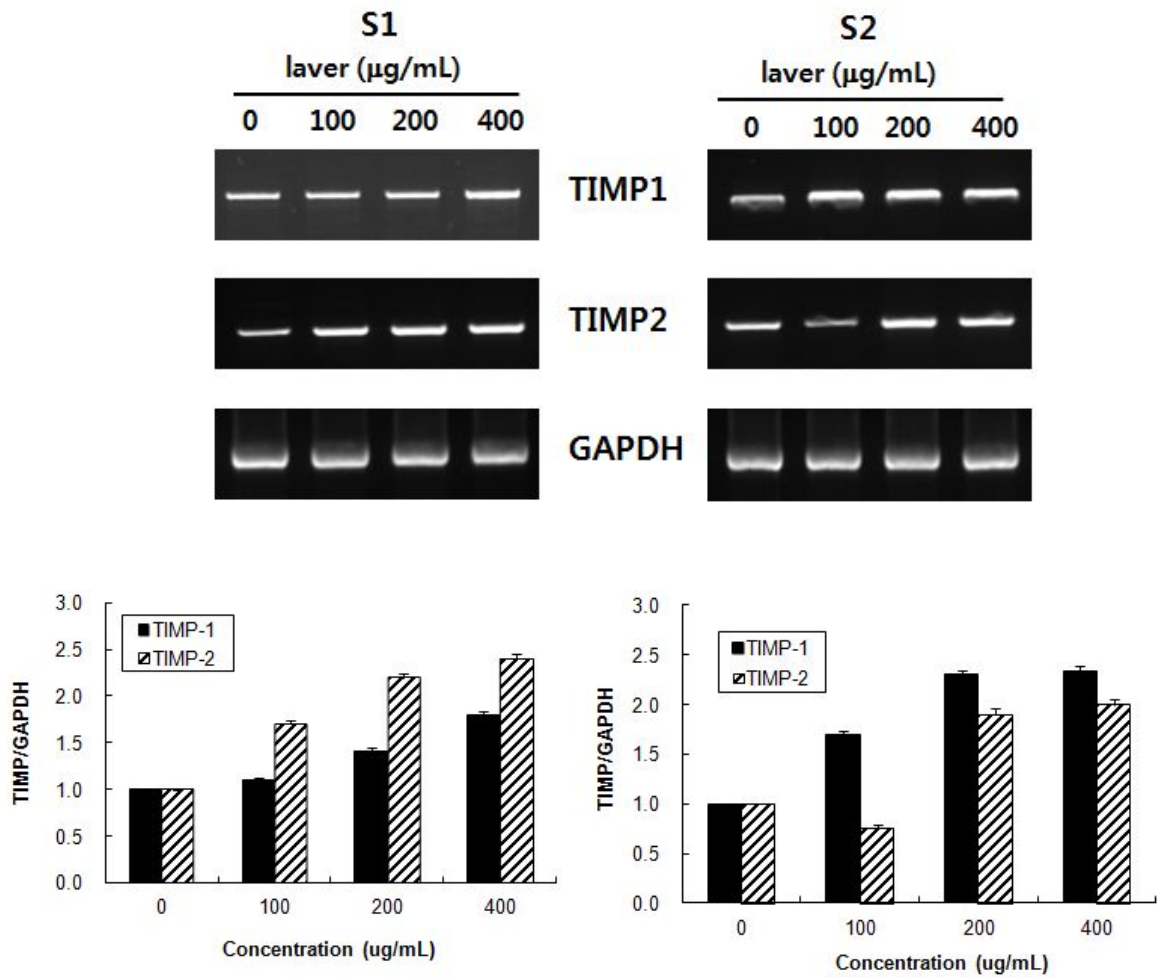


그림 39. 한국산 김 추출물의 SK-Hep1 인체 간암세포의 TIMP 활성 억제 효과

## 5) 체내 대사물질의 세포사멸 기전과 세포 간 신호전달 조절기전 탐색

### ① 김 추출물이 암세포 주기에 미치는 영향

- SK-Hep1 세포에 김 추출물을 농도별로 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리하여 세포주기를 유세포 분석기로 조사하였다. 한국산 마른김(S1)과 김밥용김(S2)을 200~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 24시간 처리한 경우, G<sub>1</sub> phase가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 반면에 S phase와 G<sub>2</sub>/M phase에서는 SK-Hep1 세포가 감소하였다.

- 아래 그림과 같이 control에 비해서 한국산 마른김 추출물(S1)을 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 sub G<sub>1</sub> (apoptotic cells)의 농도가 1.37%에서 5.06%로 증가하였다. G<sub>1</sub> phase의 경우는 63.71%에서 79.11%로 증가하였다. S phase의 경우는 5.21%에서 2.15%로 감소하였고, G<sub>2</sub>/M phase 역시, 29.71%에서 13.68%로 감소하였다.

- 한국산 김밥용김(S2) 추출물을 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 sub G<sub>1</sub> (apoptotic cells)의 농도가 1.45%에서 6.92%로 증가하였다. G<sub>1</sub> phase의 경우는 65.73%에서 80.14%로 증가하였다. S phase의 경우는 7.12%에서 3.45%로 감소하였고, G<sub>2</sub>/M phase 역시, 25.72%에서 9.49%로 감소하였다.

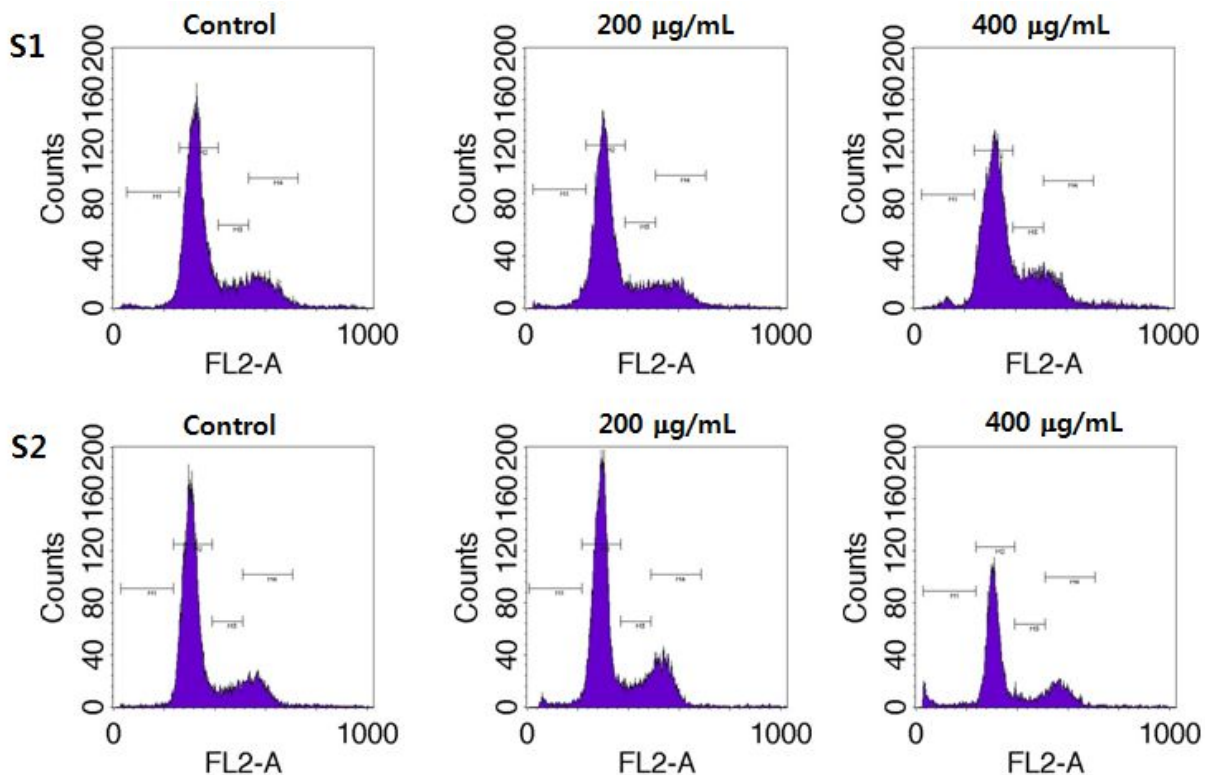


그림 40. 한국산 김 추출물의 SK-Hep1 인체 간암세포에 대한 세포주기 조절 효과

표 26. 한국산 김 추출물의 세포주기 조절 효과

Phase	S1 ( $\mu\text{g/mL}$ )			S2 ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Control	200	400	Control	200	400
Sub G <sub>1</sub>	1.37±0.02	2.11±0.07	5.06±0.34	1.45±0.91	2.93±0.27	6.92±0.78
G <sub>1</sub>	63.71±4.69	70.25±4.52	79.11±4.12	65.73±7.17	72.92±5.11	80.14±7.13
S	5.21±0.45	4.34±0.89	2.15±0.18	7.12±0.53	5.14±0.82	3.45±1.61
G <sub>2</sub> /M	29.71±2.57	23.32±2.14	13.68±1.32	25.72±5.21	19.01±2.54	9.49±0.74

② Annexin V를 이용한 flow cytometry (FACS) 분석

- 유입된 전체 세포에 대한 PI 양성반응 세포의 비율이 김 추출물을 처리하지 않은 대조군의 경우 24시간 및 48시간 배양한 경우 각각 1.65%와 8.70%로 나타났다. 김 추출물의 처리농도와 처리시간이 증가함에 따른 apoptosis가 증가하는 것을 확인하였다.

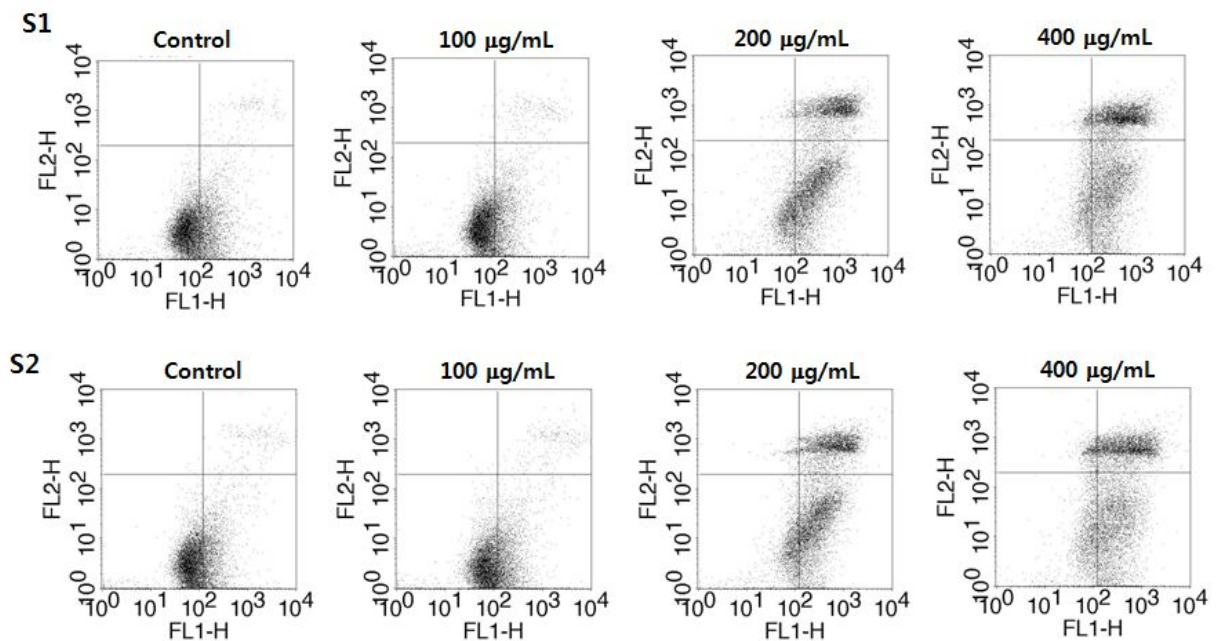


그림 41. 한국산 김 추출물의 SK-Hep1 인체 간암세포에 대한 apoptosis 조절 효과

표 27. 한국산 김 추출물의 apoptosis (%) 조절 효과

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	S1		S2	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
0	1.95 $\pm$ 0.12	2.70 $\pm$ 0.35	1.82 $\pm$ 0.17	2.35 $\pm$ 0.42
100	2.17 $\pm$ 0.84	10.14 $\pm$ 0.11	2.41 $\pm$ 0.68	11.25 $\pm$ 0.64
200	28.19 $\pm$ 1.29	34.75 $\pm$ 2.24	27.27 $\pm$ 2.54	35.27 $\pm$ 3.51
400	37.94 $\pm$ 2.51	45.51 $\pm$ 3.52	36.07 $\pm$ 3.51	47.15 $\pm$ 2.45

\*Sum of early and late apoptotic cells.

### ③ Western blotting

- Anti-apoptosis 유전자로 알려진 Bcl-2와 pro-apoptosis 유전자로 알려진 Bax의 protein level을 조사하였다. SK-Hep1 세포에 100 ~ 400  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 S1과 S2 에탄올 추출물을 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, Western blot 방법을 이용하여 Bcl-2와 Bax의 발현 변화를 관찰한 결과, 아래 그림과 같이 apoptosis를 유발하는 것과 관련이 있는 pro-apoptotic Bax 단백질의 발현은 큰 변화가 없었다 (그림 41).
- 그러나 anti-apoptotic Bcl-2의 발현은 김 추출물의 처리 농도에 의존적으로 점차 감소하는 것을 확인하였다. 한국산 마른김(S1)에 비해 한국산 김밥용김(S2)에서 Bcl-2의 발현의 감소정도가 약간 높게 나타났다. 한국산 마른김과 김밥용김 추출물은 농도 의존적으로 Bcl-2의 발현을 억제하였다. 김 추출물은 SK-Hep1 세포의 Bcl-2 level을 down-regulation 하여 apoptosis를 유도함으로써 SK-Hep1 세포의 성장을 억제하는 것으로 사료된다.

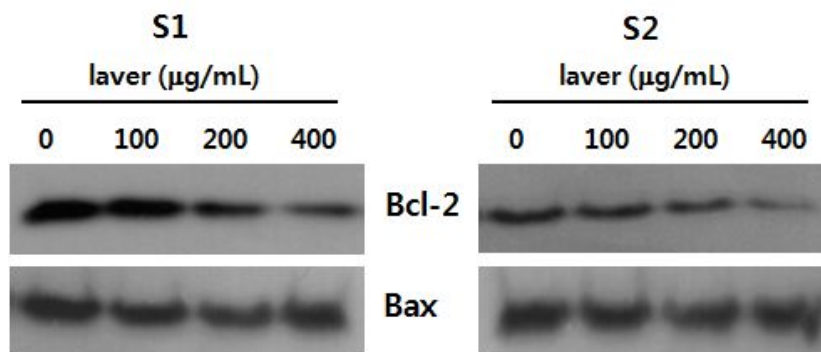
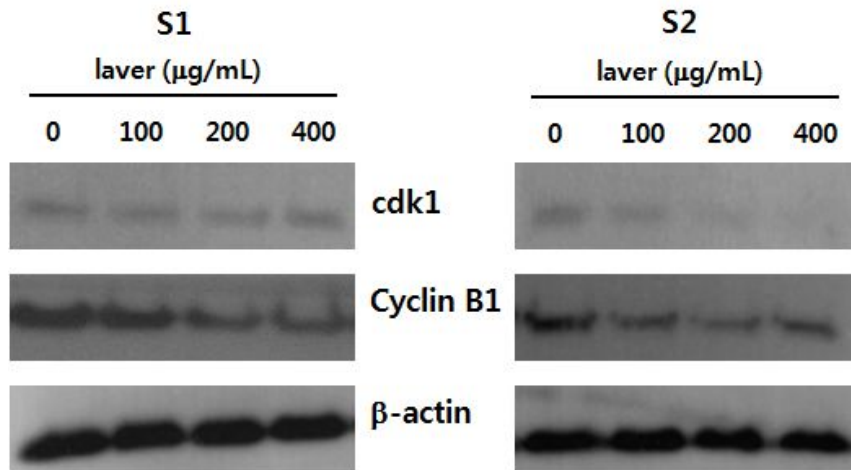
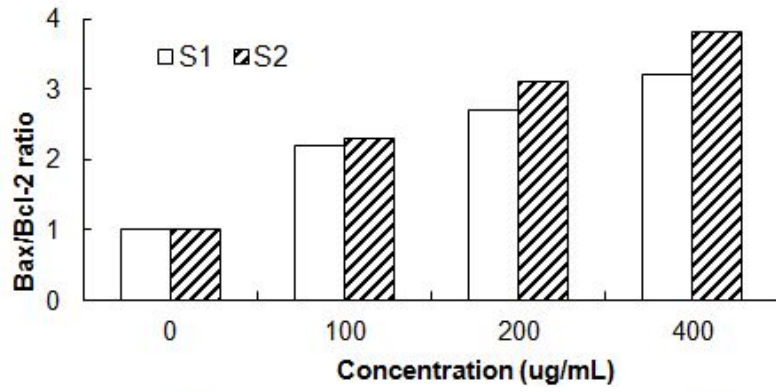


그림 42. 한국산 김 추출물에 의한 SK-Hep1 세포 내 Bcl-2 발현의 억제

- SK-Hep1 세포에 100 ~ 400  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 S1과 S2 에탄올 추출물을 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, Western blot 방법을 이용하여 cdk 1과 cyclin B의 변화를 관찰한 결과, 김 추출물의 농도가 증가함에 따라 G<sub>2</sub>/M regulator로 알려진 cdk1과 cyclin B1의



발현이 감소함을 확인하였다 (그림 42). 한국산 마른김(S1)에 비해 한국산 김밥용김(S2)에서 cdk1과 cyclin B1의 억제활성이 높게 나타났다.

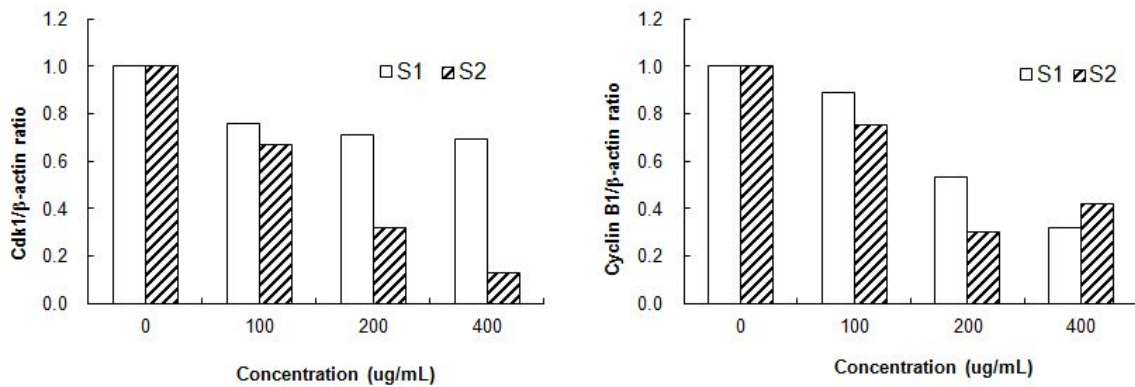


그림 43. 한국산 김 추출물에 의한 SK-Hep1 세포 내 Cdk1과 Cyclin B1 발현의 억제



1. In vitro에서 김 추출물의 림프구 활성화 효과

- 김 추출물의 면역세포 활성화 효과를 측정하기 위하여 마우스의 비장세포에 각 김 추출물을 여러 농도로 처리한 후, 증식반응과 사이토카인 분비활성을 비교하였다. S1은 한국산 재래김, S2는 한국산 김밥용 김, S3는 한국산 조미김 (광천산), S4는 한국산 조미김 (완도산), S5는 일본산 김, S6는 중국산 김을 의미함.
- 비장세포의 증식반응은 T세포에 대한 mitogen인 ConA(5 ug/ml) 혹은 B세포의 mitogen인 LPS(5 ug/ml)를 처리한 그룹과 아무것도 처리하지 않은 그룹으로 나누어, 각 김 추출물과 함께 24 시간 배양한 뒤에 MTT법에 의해 측정하였다.
- T세포를 ConA로 자극한 그룹에서는 T세포로부터 사이토카인 분비 유도에 대한 김 추출물의 효과를 관찰하기 위해 세포 배양액을 이용하여 ELISA kit을 이용하여, Th1-type의 사이토카인인 IL-2, IFN-r, 그리고 Th2-type의 사이토카인인 IL-4와 IL-6를 정량하였다.

1) 림프구 증식에 미치는 김 추출물의 영향

- 림프구 증식반응에 대한 김 추출물의 영향을 검토한 결과, S1~S6까지의 모든 김 추출물은 500 ug/ml의 농도까지 림프구에 대한 세포독성을 보이지 않았으며, LPS로 자극한 B세포 증식에서 20 ug/ml 이상의 높은 농도 쪽에서 증식반응이 약간 상승하였다. 특히 이러한 작용은 한국산 재래김(S1)에서 잘 관찰되었다(그림 44).

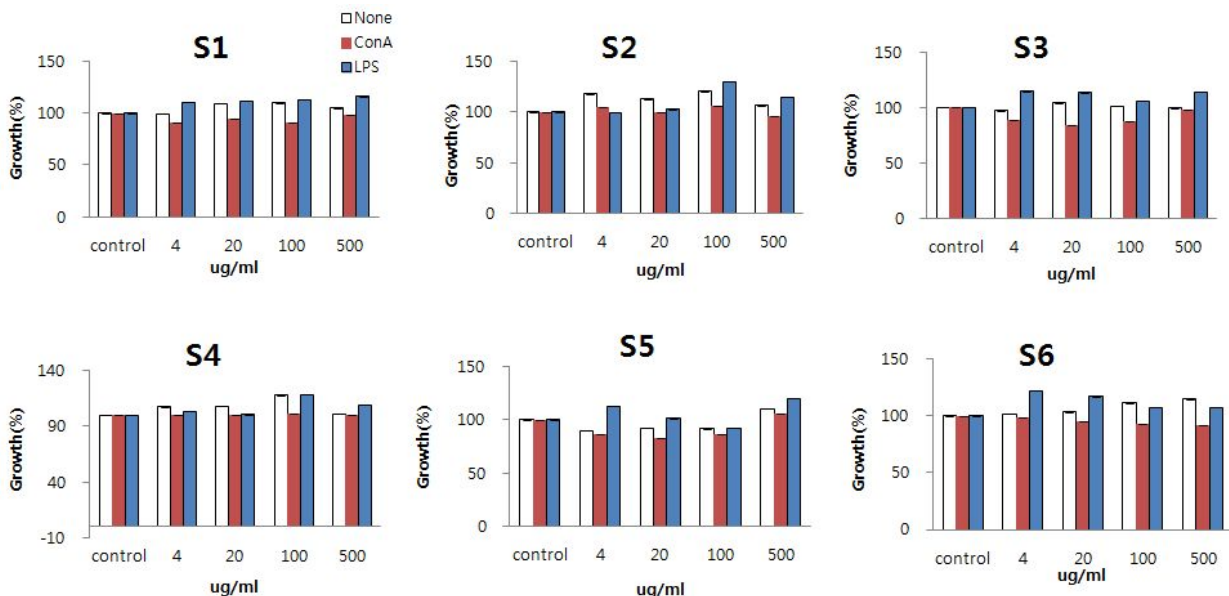


그림 44. 림프구 증식에 대한 김 추출물의 효과

2) T세포의 사이토카인 분비에 대한 김 추출물의 영향

- T세포는 여러 종류의 사이토카인을 분비하여 면역작용을 조절하는 면역세포이다. T세포가 분비하는 사이토카인에는 IL-2와 IFN-r와 같은 Th1-type과 IL-4 및 IL-5, IL-6, IL-10과 같은 Th2-type이 있으며, 이들 사이토카인은 각각 T세포가 주축이 되는 세포성 면역과 항체에 의해 운영되는 체액성 면역을 유도하게 된다.
- 김 추출물의 T세포 기능조절 작용을 사이토카인 분비의 관점에서 해석한 결과, Th1-type의 사이토카인에 있어서는 IL-2분비에는 어떠한 추출물도 별다른 영향을 미치지 않았으나(그림45), IFN-r에서는 한국산 채래김(S1), 한국산 김밥용 김(S2), 그리고 중국김이 ConA를 처리한 T세포에 대해 분비를 상승시키는 것으로 나타났다(그림 46). 또한 Th2-type 사이토카인에서는 IL-4는 거의 아무런 영향이 없었으나(그림 47) IL-6에서는 한국김(S1, S2)과 중국김이 분비를 촉진시키는 것으로 나타났다(그림 48).

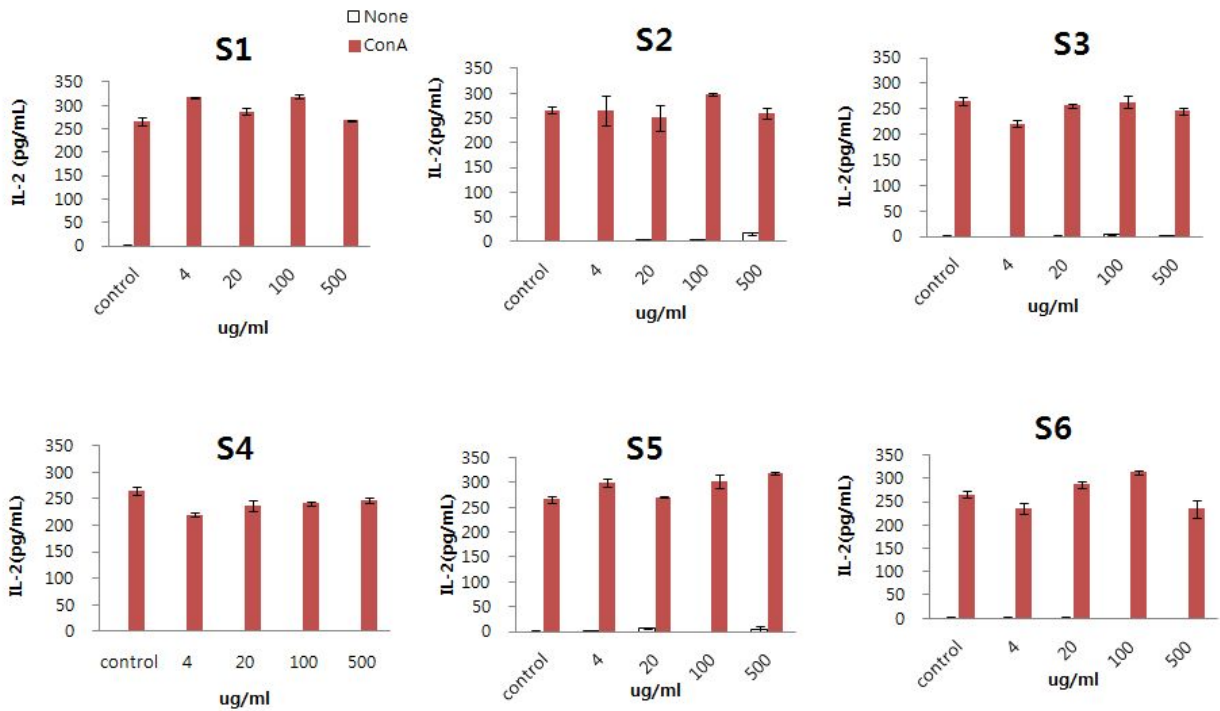


그림 45. 김 추출물이 T세포로부터의 IL-2분비에 미치는 영향

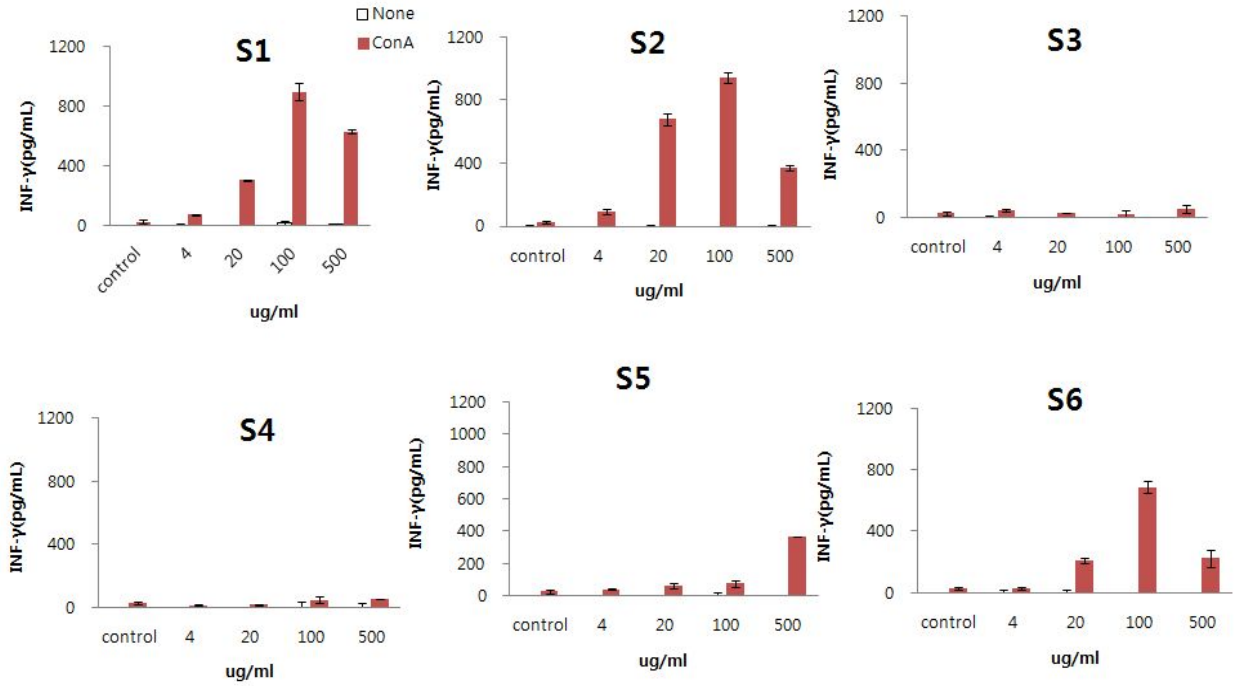


그림 46. 김 추출물이 T세포로부터의 INF- $\gamma$  분비에 미치는 영향

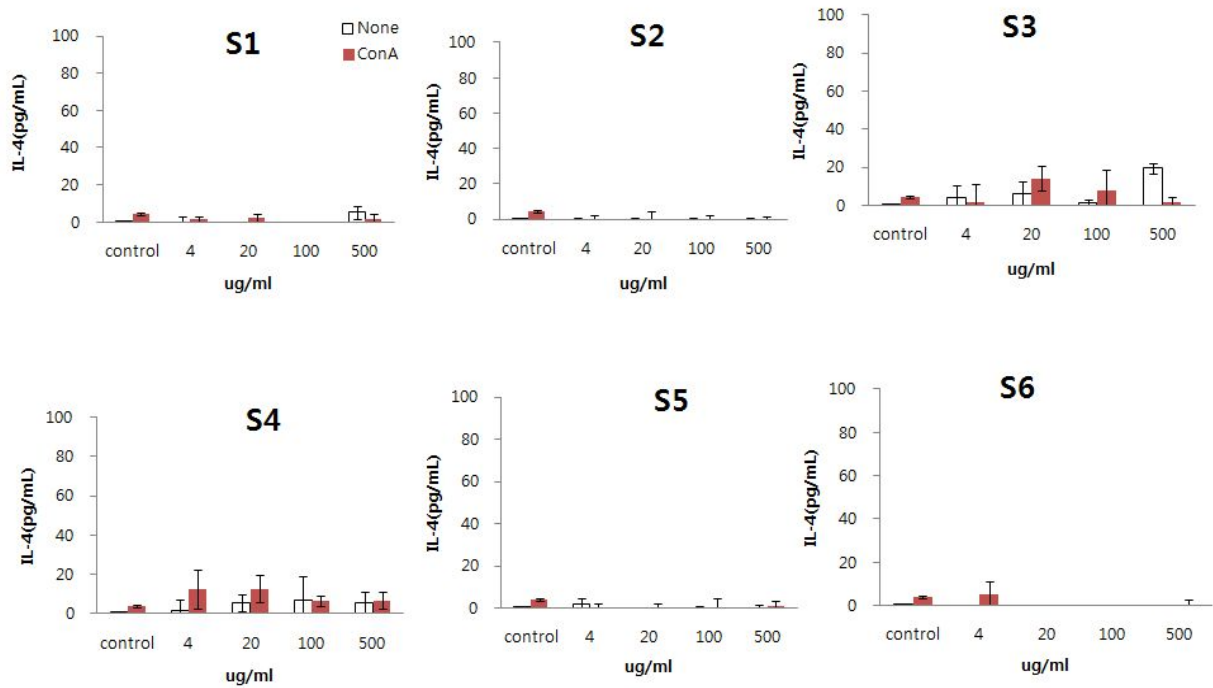


그림 47. 김 추출물이 T세포로부터의 IL-4 분비에 미치는 영향

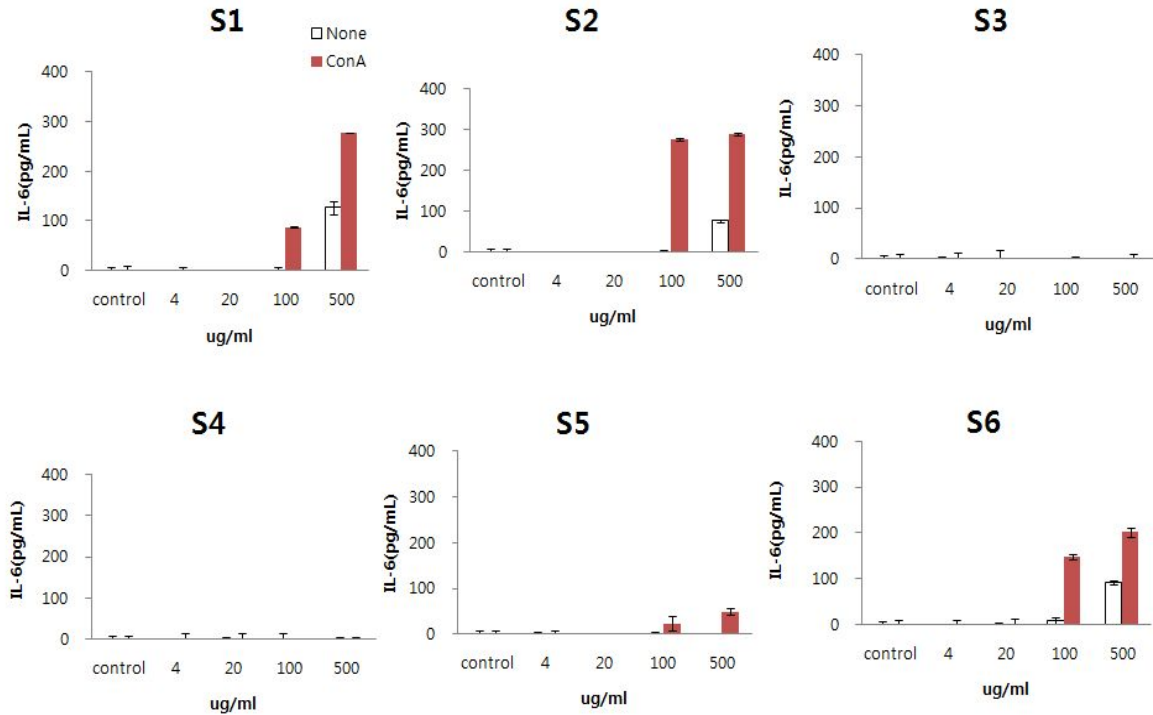


그림 48. 김 추출물이 T세포로부터의 IL-6분비에 미치는 영향

## 2. 김 추출물의 경구투여에 의한 면역세포 활성화 유도

- 위의 *in vitro* 실험에서 한국산 김이 IFN- $\gamma$ 와 IL-6와 같은 사이토카인의 유도를 상승시키는 T세포 활성화 작용을 갖는 것으로 확인되어, *in vivo*에서의 기능을 측정하기 위하여, 한국산 김을 경구투여한 후 비장세포를 회수하여 mitogen에 대한 감수성과 사이토카인 분비기능을 조사하였다.
- 이 실험에서는 한국산 재래김 분말을 1, 3, 5 mg/mouse로 1일 1회 총 3일간 경구투여 하였으며, 최종 투여 후 1일째에 비장을 적출하여 실험에 이용하였다. 비장세포 증식반응은 MTT assay법을 이용하였으며, T세포로부터의 사이토카인 측정은 ELISA kit을 이용하여 정량하였다.
- 비장세포 증식반응에 있어서는 5 mg/mouse로 경구투여한 그룹에서 T세포는 물론 B세포 증식도 증가하는 것으로 나타났다 (그림 49). 사이토카인 분비에 있어서는 *in vitro* 실험의 결과 동일하게 Th1p-type과 Th2-type의 사이토카인으로 각각 IL-2 및 IFN- $\gamma$ , 그리고 IL-4 및 IL-6를 정량하였다. 그 결과 한국산 김을 경구투여한 그룹에서 IFN- $\gamma$ 와 IL-6에서 분비가 증가되는 것으로 관찰되었다 (그림 50).

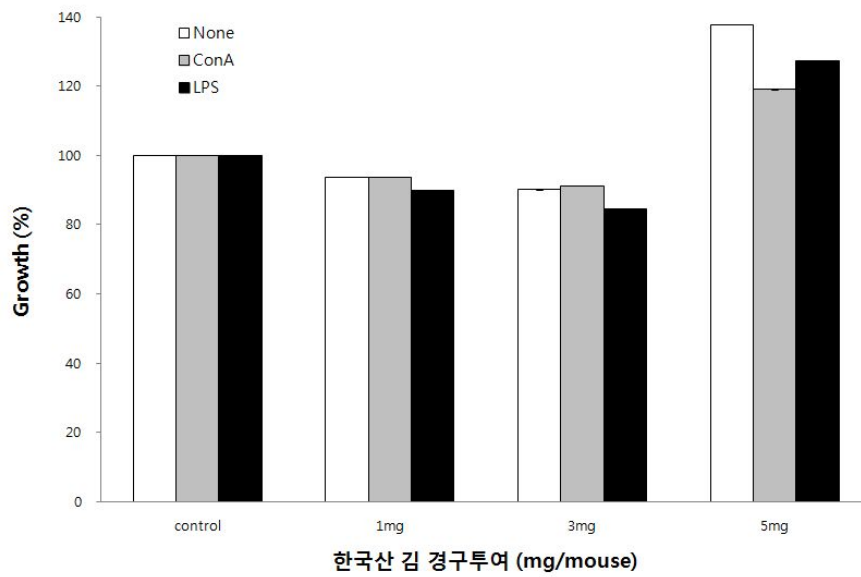


그림 49. 한국산 김 경구투여에 의한 비장세포 증식반응

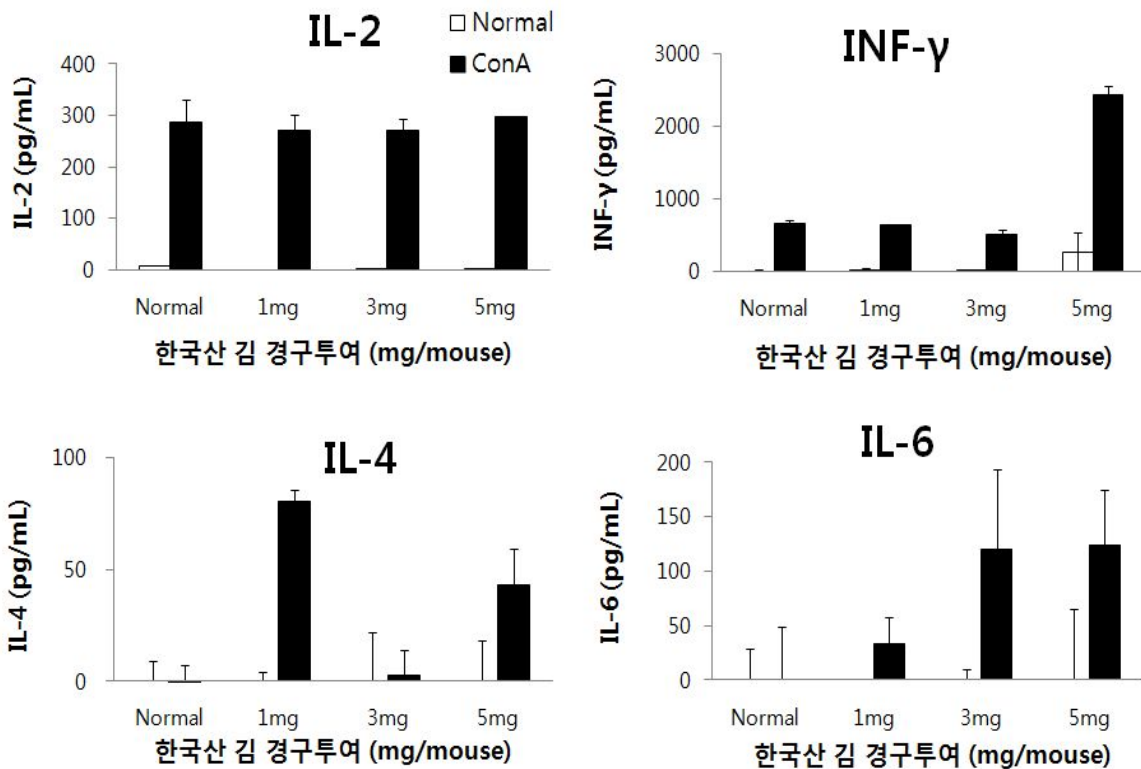


그림 50. 한국산 김 경구투여에 의한 T세포 사이토카인 분비 증가

### 3. 김 추출물에 의한 항염증 작용

- 각 김 추출물의 항염증 작용을 조사하기 위하여, 그람음성균의 세포벽에서 유래하는 세균 내독소인 LPS로 대식세포를 자극하여 염증반응을 유발하는 in vitro 모델을 이용하여 항염증 활성을 측정하였다.
- 실험의 순서에 있어서는 각 김 추출물이 대식세포인 Raw 264.7세포에 세포독성을 나타내는가를 조사하여, 항염증 실험에 적용할 수 있는 안전한 농도를 구하였다. 각 김 추출물 (~500 ug/ml)을 15시간 세포에 전처리한 후, LPS(1 ug/ml)로 염증반응을 유도하고 24시간 배양하였으며, 증식반응은 MTT법에 의해, 세포 배양액 중의 염증성 매개인자(NO, TNF-a, IL-6) 정량은 ELISA kit을 이용하여 정량하였다.

#### 1) Raw 264.7 macrophage 세포에 대한 세포독성

- MTT에 의해 각 김 추출물의 세포독성을 측정한 결과, 한국산 김이 가장 안전한 것으로 나타나, 약 500 ug/ml의 농도까지 세포의 증식에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다 (그림 51). 다른 시료의 경우 한국산 김을 열처리에 의해 조리할 경우 100 ug/ml까지 안전하였으며, 일본김은 20 ug/ml, 중국산 김은 20에서 100 ug/ml 사이의 농도까지 안전한 것으로 확인되었다.

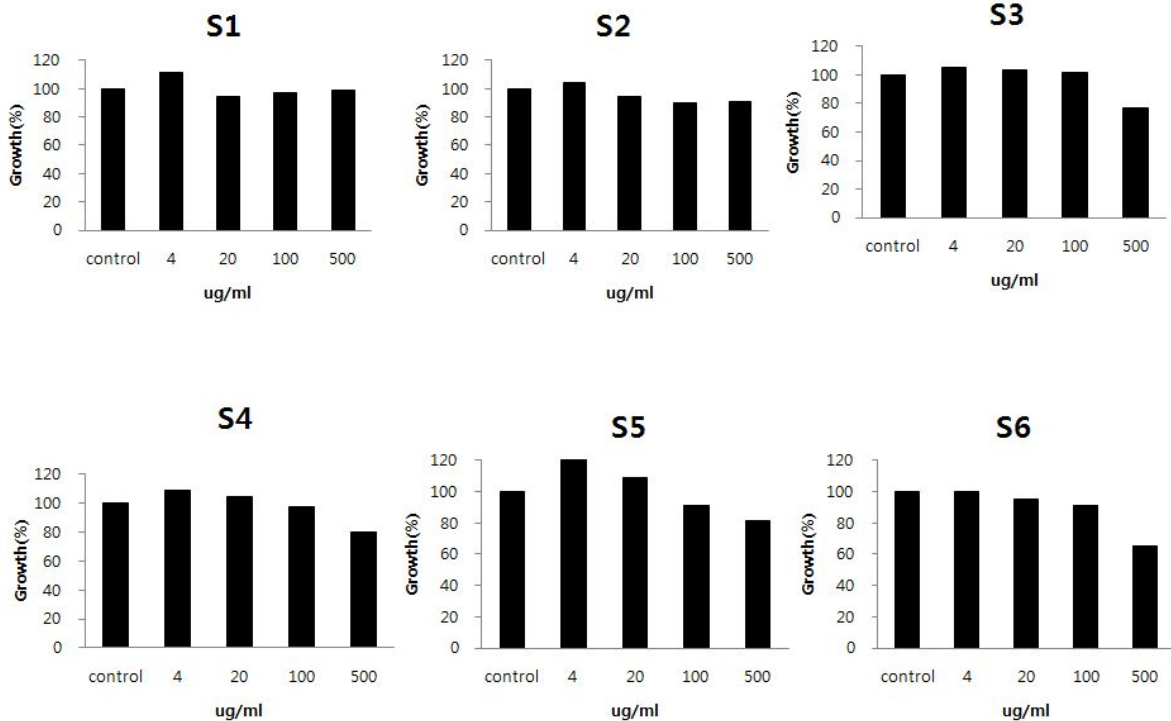


그림 51. Raw 264.7세포에 대한 각 김 추출물의 세포독성

2) NO, TNF-a 및 IL-6분비에 대한 억제활성

- 염증성 매개인자의 하나인 NO의 분비에 대한 억제효과를 측정한 결과, 한국산 김 추출물에서 가장 높은 억제효과가 관찰되었다 (그림 52).
- 한편 염증반응에서 대식세포로부터 분비되는 중요한 염증성 사이토카인으로서 TNF-a와 IL-6가 있으며, 이들 사이토카인의 분비에 대한 각 김 추출물의 억제활성을 조사하였다. 그 결과 TNF-a와 IL-6모두에 있어서 NO에서와 동일하게 한국산 김이 가장 강한 억제활성을 지니는 것을 확인할 수 있었다 (그림 53, 그림 54).
- 이들 결과로부터 한국산 김을 비롯하여 일본산 김과 중국산 김 모두 LPS에 의한 대식세포의 염증반응에 있어서, NO와 염증성 사이토카인의 분비를 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 단지 활성의 크기를 비교하였을 때, 한국산 김이 일본산이나 중국산에 비해 높은 항염증 활성을 지니고 있는 것으로 확인되었다. 한편 한국산 김을 김밥용으로 가공한 김밥용 김도 거의 동등한 활성을 지니지만, 활성의 안정성 면에서는 한국산 재래김이 가장 좋은 것으로 추정되었으며, 한국산 김을 열처리하여 가공한 조미김에 있어서는 세포독성의 증가와 더불어, 항염증 활성도 다소 저하되는 것으로 확인되었다.

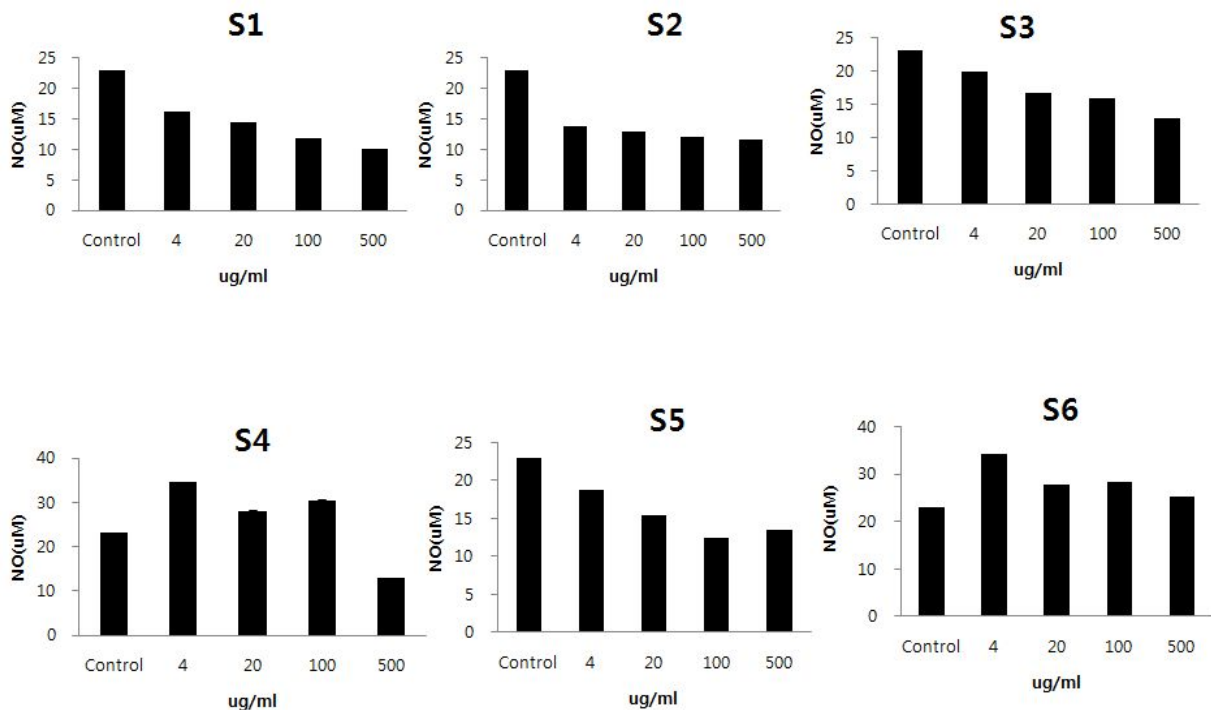


그림 52. LPS자극 Raw 264.7세포에서 NO분비 억제활성

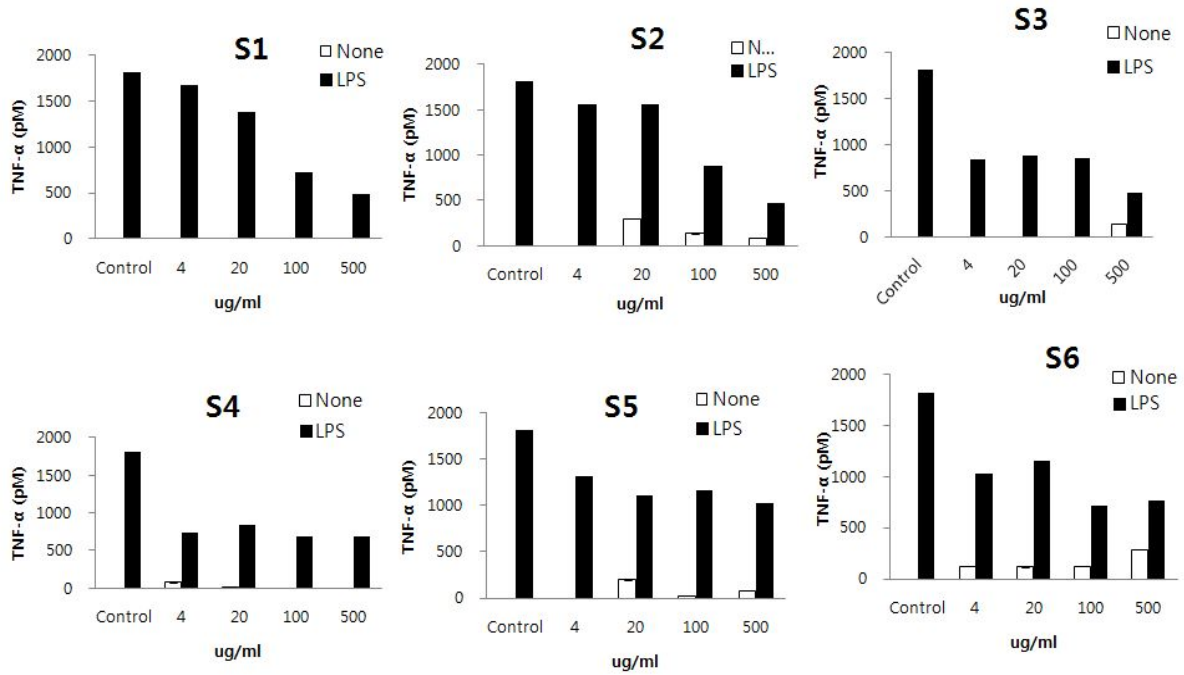


그림 53. LPS 자극 Raw 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$  분비 억제 활성

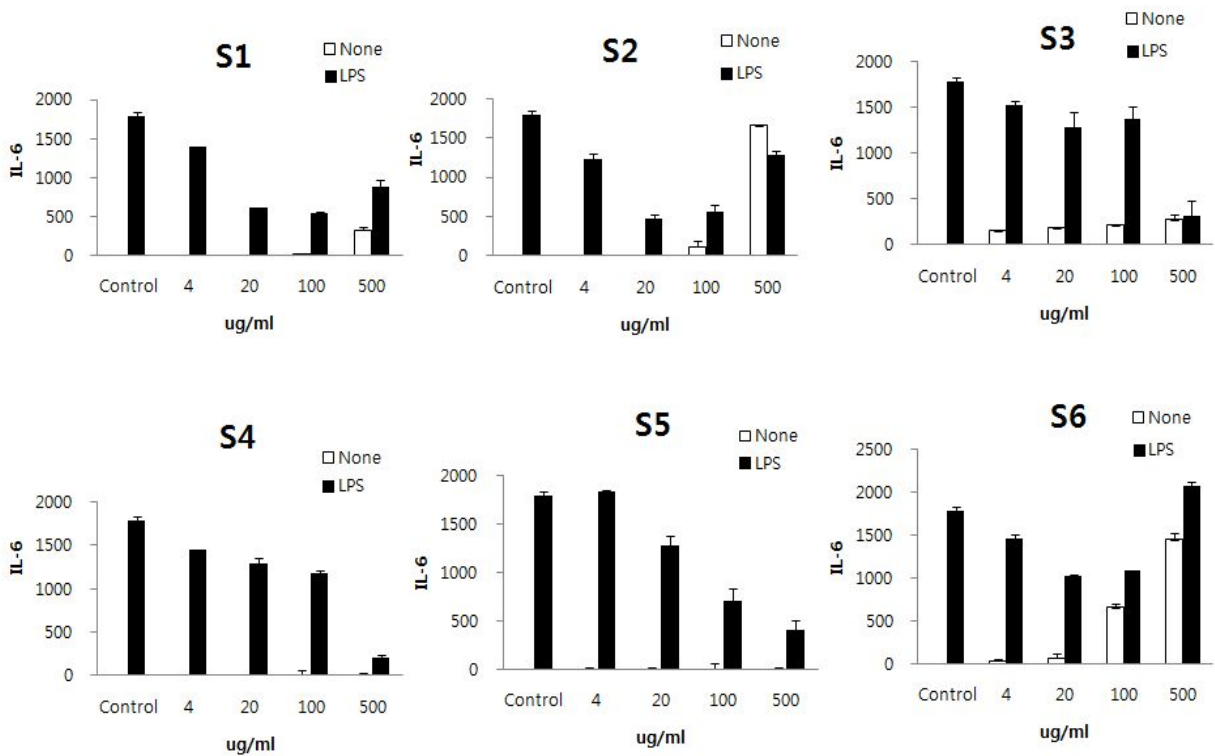


그림 54. LPS 자극 Raw 264.7 세포에서 IL-6 분비 억제 활성



#### 4. 한국산 김의 항염증 활성 기전해석

- 위의 실험에서 한국산 김 추출물이 가장 강 항염증 활성을 나타내는 것으로 확인되어, 한국산 김 추출물을 이용하여 항염증 활성에 관련된 세포 내 작용기전을 해석하였다.

##### 1) iNOS와 COX-2 분자의 세포 내 발현억제

- iNOS는 염증반응의 자극에 의해 유도되는 NO합성 효소로서, 이 효소의 발현량을 조사함으로써 NO분비 억제에 관한 기전해석을 할 수 있다. 또한 COX-2는 염증성 매개인자의 하나인 PGE2를 생성하는 효소로서 역시 LPS자극에 의해 세포 내 발현량이 증가하게 된다. 이들 두 효소의 세포 내 발현을 측정된 결과, 한국산 김 추출물을 처리한 경우에 있어서 이들 효소의 세포 내 발현이 현저하게 억제되었으며, 이 억제효과는 한국산 김 추출물의 농도에 의존하는 것으로 나타났다 (그림 55).

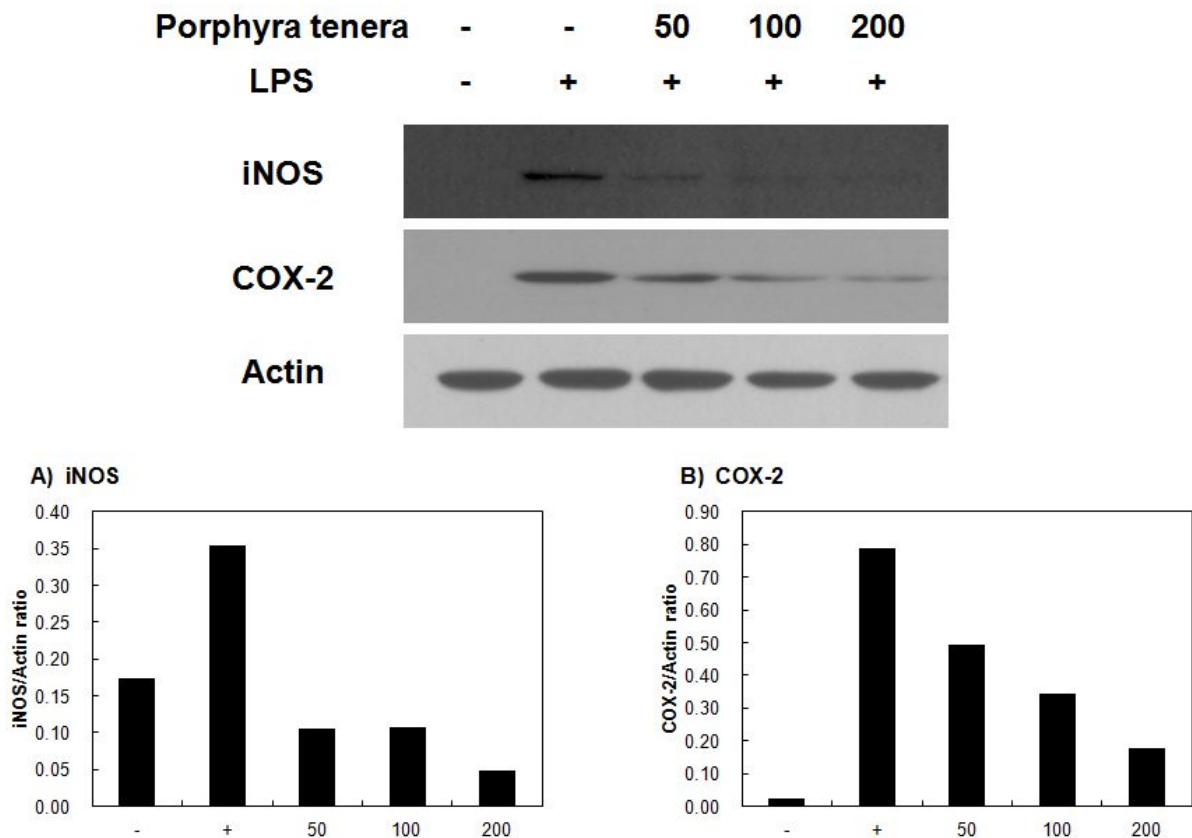


그림 55. 한국산 김 추출물에 의한 세포 내 iNOS 및 COX-2발현의 억제

2) 신호전달 억제 : MAPK 및 NF- $\kappa$ B 활성화 억제

- LPS 자극에 의해 대식세포가 염증작용을 일으킬 때에는 다양한 세포 내 신호전달을 통해 염증이 유도된다. 특히 p38, JNK 및 ERK와 같은 MAPK는 이러한 염증반응에 있어서 매우 중요한 신호전달 분자로서 이들 분자의 인산화에 의해 염증반응이 유발된다.
- 한국산 김 추출물을 처리한 그룹에 있어서 이들 3 분자의 인산화가 현저하게 억제되는 것으로 확인되어, 한국산 김 추출물에 의한 항염증 활성은 MAPK의 활성화 억제와 관련있는 것으로 사료되었다 (그림 56).

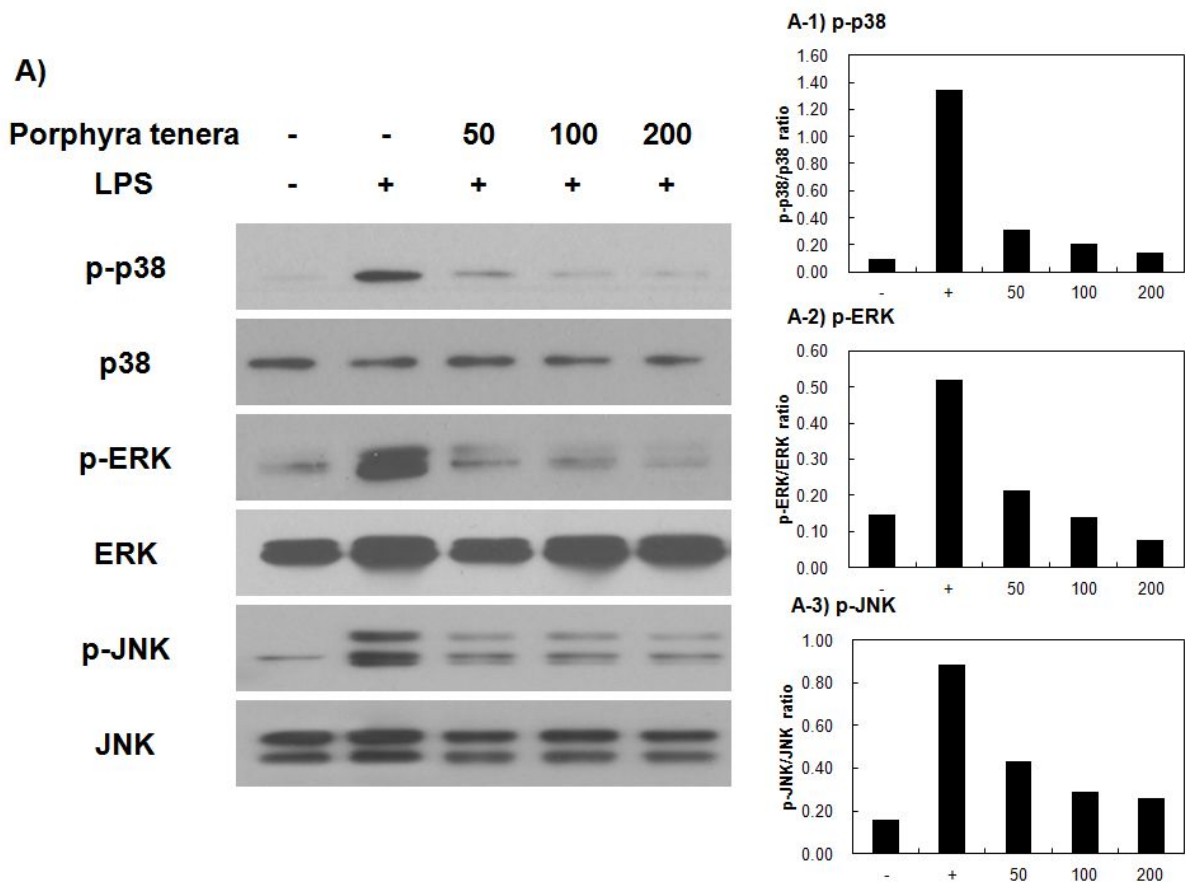


그림 56. 한국산 김 추출물에 의한 세포 내 MAPK의 활성화 억제

- 한편 LPS 자극에 의한 대식세포의 염증 유발 기전에는 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의한 핵 내 전위가 중요하며, 이 NF- $\kappa$ B는 정상 시에는 I- $\kappa$ B와 결합되어 있어 핵 내 전위가 불가능하나, I- $\kappa$ B가 인산화되면 NF- $\kappa$ B가 free한 상태로 바뀌어 핵 내 전위가 일어나게 된다. 그러므로,

NF-kB의 활성화는 I-kB의 인산화를 통해 측정할 수 있다.

- 한국산 김 추출물을 처리한 경우, LPS에 의한 I-kB의 인산화가 농도에 의존하여 억제되는 것으로 확인되었다 (그림 57). 이들 결과를 종합해 보면, 한국산 김 추출물에 의한 항염증 활성은 MAPK와 NF-kB의 활성화 억제, 그리고 COX-2발현의 억제, iNOS 발현억제를 통한 NO생성의 저해, 그리고 염증성 사이토카인의 억제 등의 기전을 통해 일어나는 것으로 추정되었다.

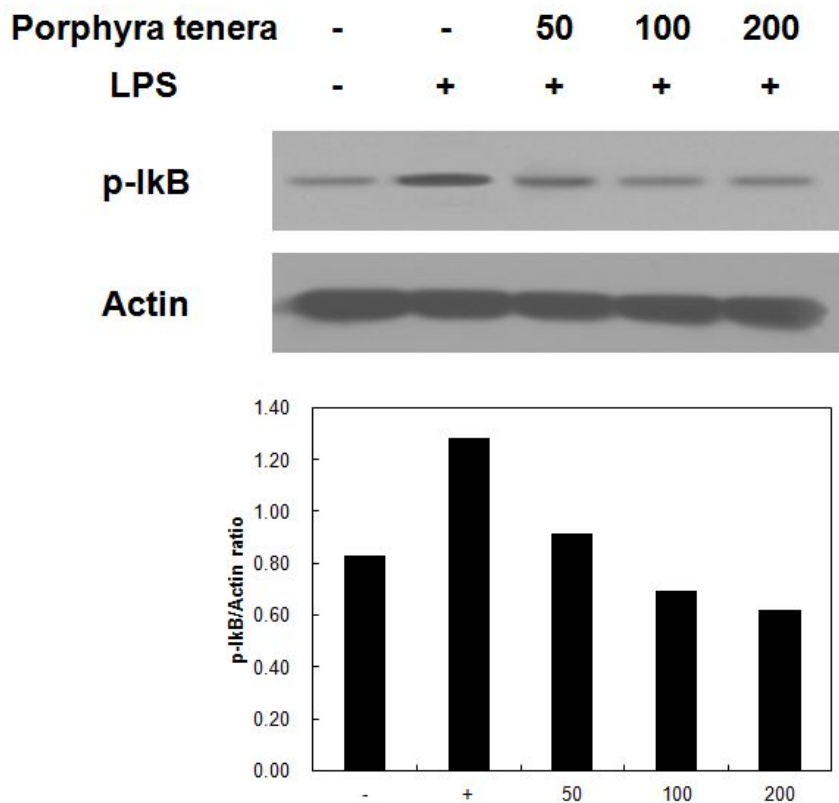


그림 57. 한국산 김 추출물에 의한 NF-kB의 활성화 억제

### 3) In vivo모델에서 한국산 김 추출물의 항염증 효과

- In vitro실험에서 확인된 한국산 김 추출물의 항염증 효과를 in vivo모델에서 검토하였다. Balb/c마우스에 LPS를 400 ug/mouse로 미정맥을 통해 주사하면 2시간 뒤에 혈중 염증성 사이토카인 농도가 최고치에 달하는 실험모델을 이용하였다.
- 한국산 김 추출물을 3 mg 혹은 5 mg/mouse로 1일 1회 총 3일간 경구투여한 후, LPS를 주사하고, 2시간 후의 혈청을 채취하여 ELISA kit에 의해 TNF-a, IL-6 및 IL-1b와 같은 염

증성 사이토카인의 혈중농도를 정량하였다. 그 결과 TNF-a와 IL-1b의 혈중 농도가 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (그림 58). 한편 IL-6에 있어서는 약간의 감소는 인정되었지만, TNF- $\alpha$ 나 IL-1 $\beta$ 에 비해서는 억제율이 떨어지는 것을 평가되었다.

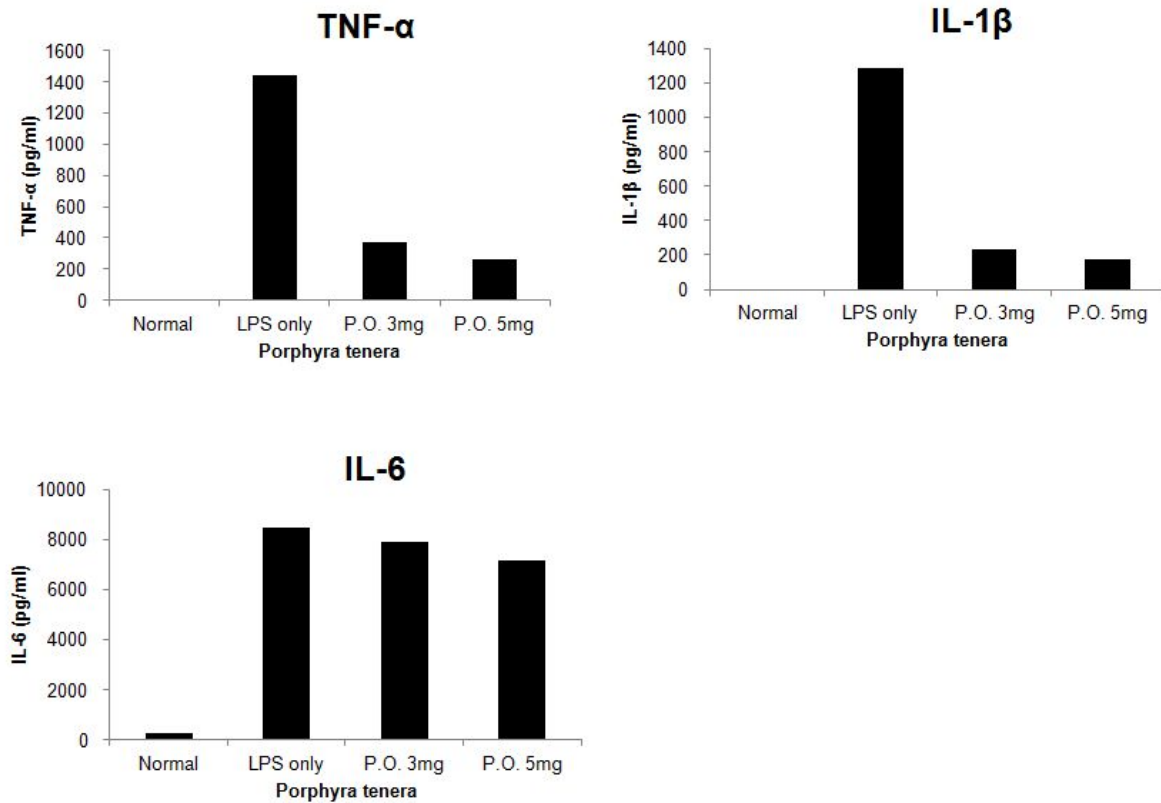


그림 58. LPS투여 마우스에서 혈중 사이토카인의 분비억제효과

### 5. 김 추출물의 혈당조절효과

- 각 김 추출물의 혈당조절 효과는 alloxan을 75 mg/kg의 양으로 Balb/c마우스에 정맥주사하여 당뇨를 유발하는 당뇨 마우스를 이용하여 조사하였다. 각 김 추출물은 5 mg/mouse로 경구투여 하였으며, 혈당조절에 대한 김 추출물의 예방적 효과는 alloxan투여 전 1, 2, 3일 전에 각각 1일 1회 총 3회 투여하였으며, 치료효과는 alloxan투여 후 1, 2, 3일째에 각각 1일 1회씩 총 3회 5 mg/mouse로 경구투여한 후 alloxam투여 4일째에 혈당을 측정하여 판정하였다.
- 혈당치를 비교하여 판정한 결과, 어떤 김 추출물도 당뇨 유발에 대해 예방적 혹은 치료적 관점에서 유의한 억제효과를 나타낸 시료는 관찰되지 않았다 (그림 59, 그림 60). 다만, 한국산 김 추출물의 경우 경구투여에 의해 약간의 혈당치 저하가 관찰되었다.

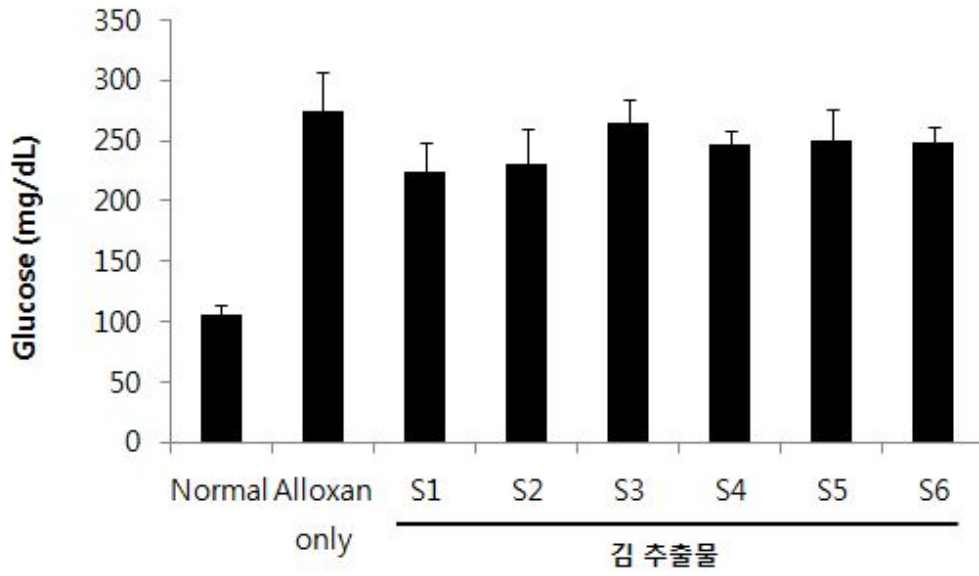


그림 59. 김 추출물의 경구투여에 의한 당뇨 예방효과

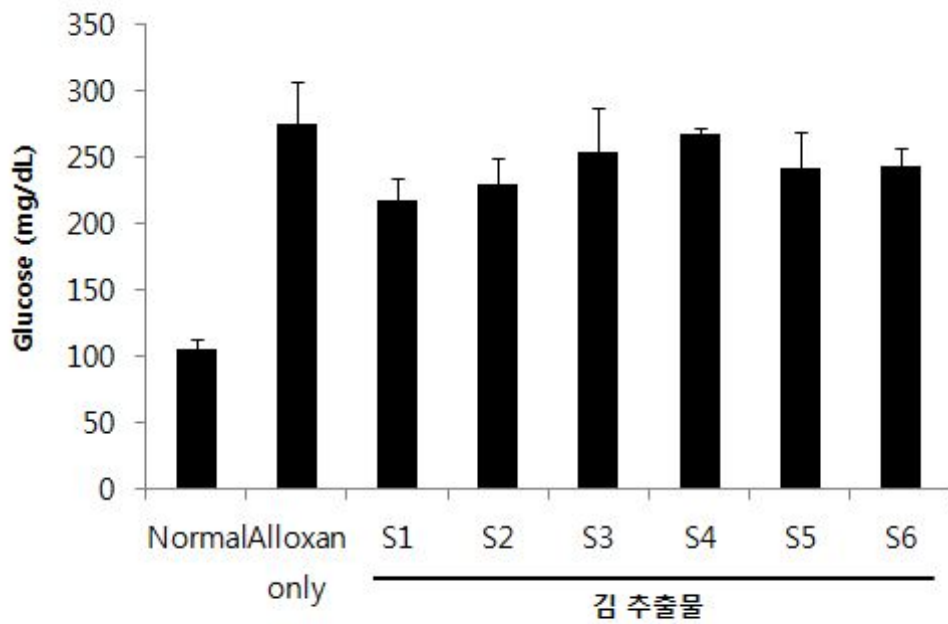


그림 60. 김 추출물의 경구투여에 의한 당뇨 치료효과

## 6. 김 추출물의 항암 활성

- 암전이에 대한 예방효과를 검토한 결과, 한국산 재래김 추출물(S1)과 김밥용 김 추출물(S2)은 각각 26.8%와 22.6%의 암전이 억제율을 나타내었다 (표 28). 하지만 이들 추출물의 억제활성은 통계학적으로 유의한 결과로는 인정되지 않았다. 또한 완도산 한국산 조리김(S4)에 있어서도 11.3%의 약간의 저해율이 관찰되었으나, 일본산 김(S5)과 중국산 김(S6)은 별다른 억제효과를 나타내지 않았다.
- 한편 암전이에 대한 치료효과 실험에 있어서는, 한국산 김(S1, S2)과 일본산 김(S5) 그리고 중국산 김(S6) 모두가 암전이를 15% 이상 억제하는 활성을 보였으나, 통계학적으로 유의한 결과로는 인정되지 않았다 (표 29). 이들 결과를 종합해 보면, 김 추출물은 항암활성을 가지는 종류도 있기는 하나, 투여량과 투여조건 등 효능에 최적화에 필요한 조건설정이 필요한 것으로 요구된다. 비록 통계학적으로 유의한 결과는 아니지만, 암전이에 대한 억제 결과에 있어서 저해율로만 보게 되면 한국산 김이 가장 높은 활성을 지니는 것으로 관찰되어 추후 보다 구체적인 검토가 필요한 것으로 사료된다.

표 28. 각 김 추출물의 경구투여에 의한 암전이 억제 예방효과

Treatment	Number of lung metastasis	
	Mean $\pm$ SD (% inhibition)	Range
Untreated (tumor control)	97 $\pm$ 17	(80 - 114)
S1	71 $\pm$ 25 (26.8)	(46 - 96)
S2	77 $\pm$ 12 (22.6)	(65 - 89)
S3	91 $\pm$ 21	(70 - 112)
S4	86 $\pm$ 16 (11.3)	(70 - 102)
S5	89 $\pm$ 11	(78 - 100)
S6	92 $\pm$ 24	(68 - 116)

Groups of five C57BL/6 mice were inoculated i.v. with  $4 \times 10^4$  B16-BL6 melanoma cells, and given oral administration with 5 mg/mouse of each extract 1, 2 and 3 days before tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

표 29. 각 김 추출물의 경구투여에 의한 암전이 억제 치료효과

Treatment	Number of lung metastasis	
	Mean $\pm$ SD (% inhibition)	Range
Untreated (tumor control)	97 $\pm$ 17	(80 - 114)
S1	67 $\pm$ 31 (30.9)	(36 - 98)
S2	74 $\pm$ 28 (23.7)	(46 - 102)
S3	102 $\pm$ 12	(90 - 114)
S4	94 $\pm$ 21	(73 - 115)
S5	78 $\pm$ 19 (19.6)	(59 - 97)
S6	82 $\pm$ 14 (15.5)	(68 - 96)

Groups of five C57BL/6 mice were inoculated i.v. with  $4 \times 10^4$  B16-BL6 melanoma cells, and given oral administration with 5 mg/mouse of each extract 1, 2 and 3 days after tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

## 제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 정책활용

- 한식의 주요 식재료인 김의 우수성을 과학적으로 규명하여 국제적인 학술대회 및 SCI 논문에 발표하여 국내외적인 홍보에 활용
- 김의 생리활성 입증을 통해 우리나라 김의 위상을 높이고 수출을 통한 고부가가치 창출, 한식세계화 및 현재 정부가 추진 중인 김의 국제식품규격(Codex) 제정에 기여

### 2. 언론홍보 및 대국민교육

- 국내산 김의 건강기능성에 대한 대국민 홍보(방송, 신문, 전문지 등)
- 국내에 유통되고 있는 김의 항산화 효능, 항암활성과 작용기작 등에 대한 새로운 이론과 기술을 세계학회에 보고하여 국내의 연구기술을 해외에 널리 홍보
- 연구결과는 산·학·관·연등 관련분야에 발표 및 홍보하여 국내의 식품 및 의약산업에 기여할 수 있는 정보를 제공

### 3. 기타

- 관련 결과를 국내외 학술대회, 심포지움 등에서 발표
- 항산화 및 암예방 기능성 식품 소재의 개발을 통해 식품생명공학 관련 학문발전에 기여
- 기능성 식품 신소재의 90% 이상이 수입에 의존하는 상황을 개선하여 기능성 식품 소재의 생산 단가가 절감되고, 신소재 개발로 인한 기능성 식품 종류가 다양해질 것이라고 기대되며, 이는 기능성 식품 시장의 확대에 이어질 수 있을 것임
- 기능성 식품 신소재 및 기능성 식품 시장의 확대에 의한 관련 산업의 고용 창출 기대
- 기능성 식품 신소재 개발에서 활용된 탐색기술, 생리 활성 평가 기술, 생산 기술은 의약 개발에서도 활용 가능할 것이며, 기능성 식품 신소재 자체도 식품 뿐 아니라 의약 개발에도 활용될 것으로 기대
- 향후 후속과제로 세계인이 선호할 수 있는 김을 활용한 식단 및 레시피 개발 등의 연구에 참고자료로 활용
- 향후 후속과제로 한식섭취자가 김의 효과를 확인할 수 있는 적정 섭취량 등의 연구에 참고자료로 활용
- 21세기 생명과학의 시대를 대비한 우수 교육 인력의 확보
- 고도의 지식과 실험경험을 갖춘 국제수준급의 연구 인력의 배출



## 제 5 장 참고문헌

- 김규상. 2010. 국내 시판 건조김의 이화학적 특성 분석 및 관능평가. 충북대학교 대학원 석사학위논문
- 김병기. 2005. 한국산 김(*Porphyra tenera*)에서 추출한 porphyrin의 이화학적 특성 연구. 군산대학교 대학원 석사학위논문
- 조승목, 김 가공식품의 CODEX 규격화를 위한 현황조사 및 품질특성 연구, 한국식품연구원, 2008
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed., Association of official analytical chemists. Washington, DC. Ch. 3, pp 1-26.
- Araki S, Ogawa H, Kayama. 1982. Studies on quality preservation of dried laver 'nori', *Porphyra yezoensis*. I. Degradation of ascorbic acid in dried laver 'nori' during storage at different water activities. Japan Soc. Sci. Fish. 48, p643-655.
- Araki S, Ogawa H, Saito M, Kayama M. 1982. Changes of the pigments in dried laver 'nori' at different water activities. Japan Soc. Sci. Fish. 48. p647-652.
- Hirata T, Ishitani T and Yamada T. 1984. Effects of sub-zero temperature, atmosphere and moisture content on the storage stability of dried laver(*Porphyra yezoensis*). Japan Soc Food Tech. 31. p272-280.
- Han H-S, Bae S-J, Kim M. 2004. Effects of *Porphyra tenera* Extracts on formation of collagen cross-link in ovariectomized rats. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 33(2), 324-330.
- Hwang E, Kim GH. 2009. Allyl isothiocyanate influence cell adhesion, migration and metalloproteinase gene expression in SK-Hep1 Cells. Exp Biol Med. 234, 105-111.
- Hwang E, Lee JH. 2006. Phenylethyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis of SK-Hep1 human hepatoma cells. Journal of Nutritional Biochemistry. 17, 837-846.
- Hwang E, Lee HJ. 2008. Benzyl isothiocyanate inhibits metalloproteinase-2/-9 expression by suppressing the mitogen-activated protein kinase in SK-Hep1 human hepatoma cells. Food Chem Toxicol. 46, 2358-2364.
- Jae-Sook Han, Yeon-Jung Lee and Mi-Ra Yoon, 2003. Changes of Chromaticity and Mineral Contents of Laver Dishes using Various Cooking Methods.
- Jeon TI, Hwang SG. 2011. Inhibitory effect of oral administration of Sangwhang mushroom (*Phellinus linteus*) grown on germinated brown rice on experimental lung metastasis and tumor growth in mice. Food Sci. Biotechnol. 20, 209-214.
- Kil Suk Jo. 2003. Effect of storage conditions on quality stability of dried laver(*Porphyra tenera*). Korean J of Food Preservation. 10(1). p32-36.

- Lee CY, Lee YB. 2010. Statistical optimization of culture media contained soy proteins and hypotyl for the growth of *Bifidobacterium lactis* BL740 and production of soy isoflavone aglycones. *J. Appl. Biol. Chem.* 53, 126-131.
- Lee KB, Song KS. 2009. Adjuvant activity of *Cudrania tricuspidata* water extracts to enhance antigen-specific humoral and cellular responses. *J. Applied Biol. Chem.*, 52, 234-240.
- Meehye Kim, Yun Dong Lee, Hyo Jung Park, Eun Joung Kim, and Jong Ok Lee, 2004. Contents of Toxic Metals in Crustaceans Consumed in Korea.
- Meehye Kim, Yun Dong Lee, Hyo Jung Park, Sung Kug Park, and Jong Ok Lee, 2005. Contents of Heavy Metals in Soybean Curd and Starch Jelly Consumed in Korea.
- Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries. 2011. Project document for new work on a standard for laver products.
- New York, N. Y., American Public Health Association, 1970.
- Seo JH, Kim JH. 2007. Ovalbumin modified by gamma irradiation alters its immunological functions and allergic responses. *Int. Immunopharmacol.*, 7, 464-472.
- Shin M-O, Bae S-J. 2005. Anti-proliferating effects of *Porphyra tenera* fractions on several cancer cell lines in vitro. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 34(10), 1514-1519.
- Sho YS, Kim J, Chung SY, Kim M, Hong MK. 2000. Trace metal contents in fishes and shellfishes and their safety evaluation.
- So-Young Chung, Jung Soo Kim, Eun Jeong Kim, Sung Kug Park, Meehye Kim, Mooki Hong, Myung Chul Kim and Jong Ok Lee. 2003. Trace Metal Contents in Tea Products and Their Safety Evaluations.
- So-Young Chung, Meehye Kim, Jung Soo Kim, Mooki Hong, Jong Ok Lee, and Chang Min Kim. 2002. Trace Metal Contents in Sugar Products and Their Safety Evaluation.
- Sung NW, Byun EH. 2009. Immune-enhancing activities of low molecular weight b-glucan depolymerized by gamma irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 78, 433-436.
- Sung NY, Byun EB. 2011. Preparation and characterization of high-molecular-weight sericin by g irradiation. *J. Appl. Polym. Sci.*, 120, 2034-2040.
- Wagley Y, Yoo. YC. 2007. The IL-6/sIL-6R treatment of a malignant melanoma cell line enhances susceptibility to TNF-a-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 985-991.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 한식 우수성·기능성 연구 3차사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 한식 우수성·기능성 연구 3차사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.