

발간등록번호
11-1543000-001283-01

으뜸의 기능성 (항산화 및 간 보호) 탐색 및 이를 활용한 음료 개발에 관한 연구

(Development of new beverages liquor containing Akebia quinata extracts with
antioxidants activity and hepatoprotective effect)

우리술

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “으름의 기능성 (항산화 및 간 보호) 탐색 및 이를 활용한 음료 개발에 관한 연구” 보고서로 제출합니다.

2016년 1월 일

주관연구기관명 : (주) 우리술

주관연구책임자 : 박 찬 대

세부연구책임자 : 박 찬 대

연 구 원 : 육 진 수

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 안 정 희

연 구 원 : 김 경 지

연 구 원 : 송 다 혜

연 구 원 : 이 권 재

연 구 원 : 유 한 석

협동연구기관명 : 이화여자대학교

협동연구책임자 : 고 광 석

연 구 원 : 이 상 훈

연 구 원 : 송 영 선

연 구 원 : 이 서 연

연 구 원 : 김 소 영

요 약 문

I. 제 목

으름의 기능성 (항산화 및 간 보호) 탐색 및 이를 활용한 음료 개발

II. 연구 성과 목표 대비 실적

으름의 기능성 (항산화 및 간 보호) 탐색 및 이를 활용한 음료 개발함으로써 기능성 신소재로서의 으름 개발의 가능성을 제시하고자하는 것이 본 연구의 최종목표이며 으름의 효능을 대표할 수 있는 지표물질의 발굴과 으름 추출물 및 기능성 음료의 항산화 및 간 보호 능력을 과학적으로 구명 하였다. 이러한 결과는 특허와 학술논문의 발간을 통해 그 성과를 입증하였다.

III. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

으름의 기능성 (항산화 및 간 보호) 탐색 및 이를 활용한 음료 개발함으로써 기능성 신소재로서의 으름 개발의 가능성을 제시하고자 함.

- 으름 추출물을 이용한 시제품개발 및 상품화
- 으름의 유효 성분 추출 동정 통한 지표물질 개발 및 oleanolic acid 및 triterpenoide 성분의 이화학적 안전성 확보를 통한 제품의 품질향상 고정 개선 확립
- 으름의 항산화, 간 보호 효과에 대한 분자수준에서의 메커니즘을 세포주(cell lines) *in-vitro* 실험과 알코올성 간질환 유발 생쥐 모델을 이용한 *in-vivo* 실험을 통해 밝힘

2. 연구 개발의 필요성

- 국내 자생 으름을 이용하여 농민의 소득 증대를 기대
- 국내 자생 으름 추출물의 항산화 활성 및 항암 활성 등 생리 활성 구명
- 으름 추출물의 생리 활성 물질 함유된 주류 및 음료 개발을 통한 새로운 시장 개척을 통한 식품 산업 발전
- 만성 알코올성 간질환 개선을 통한 국민 보건 복지 증진 기여

IV. 연구개발 내용 및 범위

주관: 으름을 이용한 음료 개발

- 새로운 으름 관련 주류 및 음료 제품의 기존 기능성 제품 시장에 대한 영향 분석
- 원료의 대량 추출조적 확립 및 최적 추출 공정법을 수립함.
- 원료 수급(열매, 어린잎, 으름덩굴잎) 확보와 장기 저장시 안정성 평가와 장기 저장시 안정

성 평가

- 으름을 이용한 식초음료베이스 개발
- 관능품질 변화 검토
- 생산 공정 적용을 위한 으름의 지표물질 측정
- 으름을 이용한 기능성 음료 시제품 개발
- 으름을 활용한 혼합복합음료 베이스 제조 및 음료 개발
- 으름을 이용한 음료의 저장유통기간 설정 및 경제성 평가
- 으름을 이용한 음료 시제품 개발으름 적용 제품 품질 개선
- 으름음료의 지표물질의 함유량을 결정함

제1협동:

- 국내 자생 으름을 이용한 용매별에 따른 추출 조건 탐색
- 국내 자생 식물 으름에서 oleanolic acid 및 triterpenoide 조건 탐색
- oleanolic acid 및 triterpenoide 의 세포주를 이용한 NO 억제 활성 및 활성 산소종 억제 물질 활성 분석
- 으름열매의 원료 validation 평가 및 대량 추출 시 최적 추출공정 확인 분석함
- 대량 생산의 표준화를 위한 으름 추출 최적 조건 분석 평가함.
- 기타 triperpenoide 추출 조건 확립
- Hederagenin 및 triterpenoide 지표물질의 안전성 개선 및 간보호 효과
- 으름 적용 제품 품질 개선
- 으름 지표물질의 항산화 활성을 확인하기 위한 동물실험

제2협동: 으름의 간 보호 기능 메커니즘 구명

- 으름의 간기능 보호 효과 검증을 위한 in-vivo 연구
- 실험동물을 대상으로 알콜성 간손상에 의한 으름의 간기능 보호에 대한 연구를 수행, 또한 최적 생리활성 농도 검증 및 독성테스트를 시행 하여 안전성 검증
- 간암세포주, 일반간세포주 및 초대배양 간세포의 비교를 통한 으름의 간기능 보호 작용 메커니즘 구명
- 으름의 생리활성의 최적 농도 및 독성 구명 및 In-vitro 실험에서 밝혀진 간기능 보호 기전의 in-vivo 적용 및 최적의 으름 생리활성 농도 검증
- 으름의 간기능 보호 효과 검증을 위한 in-vitro 연구
- 으름 추출물이 간보호효과에 대한 연구를 in-vitro를 통해 구명
- 숙취해소 기능 확인을 위한 인체 적용 실험
- 개발된 으름음료와 현재 시판 되고 있는 숙취 해소 음료간의 비교 실험을 전임상실험을 통해 검증

V. 연구개발결과

주관: 으름을 이용한 음료 개발

1. 새로운 으름 관련 주류 및 음료 제품의 기존 기능성 제품 시장에 대한 영향 분석

국내 및 국외시장 분석결과 으름을 활용한 제품으로는 차(茶), 한약제가 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 전혀 활성화가 되지않고 오히려 감소하는 시점이므로, 본 연구과제에서는 으름의 향산화 활성 효과 방향으로 연구를 추진하여 으름을 이용한 기능성 음료 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

2. 원료의 대량 추출조적 확립 및 최적 추출 공정법을 수립함.

으름잎의 추출수율은 물 추출물에서 추출 수율이 13.95%로 가장 높게 추출되었음. 으름열매 추출수율은 물 추출물은 5.4%이고 70% 에탄올은 9.15%로 70% 에탄올이 추출 수율이 가장 높았음.름덩굴의 추출수율은 70% 에탄올은 9.15% 이고 물 추출물은 5.4%임.

3. 원료 수급(열매, 어린잎, 으름덩굴잎) 확보와 장기 저장시 안정성 평가와 장기 저장시 안정성 평가

어린잎은 4월 20일 함양 마천면 지리산 자락에서 채취하여 상온 건조하여 분말화 하면 수급에는 문제가 없음. 으름 열매와 덩굴과 성숙된 잎은 충청남도 홍성군 광천읍 담산리 부근 자생 열매를 채취하여 사용하였음. 홍성군과 지리산 마천군에서 재배된 것을 대량 구입이 가능. 으름어린의 상온 저장: 상온으로 1, 3, 6개월 보관 시 1개월까지는 변화되지 않았음. 냉장 저장: 3개월에서는 잎 표면에 검은 곰팡이가 피기 시작했음.냉동 저장:건조된 원료는 6개월까지 색상의 변화가 없었고 곰팡이 등 미생물의 침입이 보이지 않았음. 으름 열매의 상온 저장: 열매는 1개월 이상 상온 저장은 어려움, 그러나 상온건조 시 6개월 이상 건조가 가능함.,냉장 저장: 3개월 이상 장기 저장에는 성분변화가 음. 냉동 저장: 6개월까지 색상의 변화가 없었고 곰팡이 등 미생물의 침입이 보이지 않았음.

4. 으름을 이용한 식초음료베이스 개발

으름열매식초를 조제하기위해 쌀 1 kg을 씻고 약 15시간정도 물에 불렸다. 이후 1시간 물을 빼고 거즈에 담아 찹통에 넣고 찌서 고두밥을 만들고 물 3 L와 누룩 300 g, 엿기름 400 g을 가하여 혼합하였다. 그 다음 으름을 첨가하지 않은 대조군과 쌀의 중량 1 kg에 대해서 1, 3, 5, 7%(w/w) 으름 열매를 혼합 한 것을 25°C에서 4일간 1차 알코올 발효시켰다. 1차 발효액에 초산발효를 위해 물과 희석하여 9% 알코올 함량이 되도록 조정한 뒤, 종초 10%(v/v) 접종하여 30°C에서 13일 발효시켜 으름 열매 식초를 제조. 어린잎음료베이스를 제조하기 위해서 쌀 1 kg을 세척하여 15시간 동안 물에 침지한 후, 채에 받쳐 60분 동안 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 쌀을 찹 솥에 넣고 100°C에서 50분 동안 증자하고 10분 뜸을 들인 후 고두밥을 만들었다. 고두밥을 식힌 후(25°C) 10 L의 유리병에 고두밥(1.5 kg), 누룩(500 g), 엿기름(500 g)을 버무린 후 생수(3 L)를 넣고 골고루 섞어주어 대조군을 제조하였다. 으름 첨가군은 대조군에 으름을 각각 0.5% (5 g), 1% (10 g), 2% (20 g), 3% (30 g) 첨가 하여 제조하였다. 3일간 25°C 인큐베이터에 알코올 발효 후 종초 10% (v/v)를 접종하여 19일 간 보관하여 사용.

5. 관능품질 변화 검토

어린잎 식초 원액의 관능검사 결과는 Fig. 14.에 나타내었다. 색은 으름 어린잎 첨가군 2%에서, 신맛 또한 으름 어린잎 첨가군 2%에서 기호도가 높게 나옴. 단맛은 으름 어린잎 첨가군 1%에서 기호도가 높았음. 쓴맛은 으름 어린잎 첨가군 3%에서 기호도가 높게 나왔고, 으름 어린잎을 첨가할수록 유의적으로 증가. 향은 으름 어린잎 첨가군 2%에서, 목넘김은 으름 어린잎 첨가군 1%에서 높았으며 전반적인 기호도는 으름 어린잎 첨가군 1%와 2%에서 가장 높게 나타남. 전체적 관능적인 기호도를 통계적으로 분석한 결과 으름 어린잎 첨가량 2% 첨가군이 가

장 적합하다고 판단.

6. 생산 공정 적용을 위한 으름의 지표물질 측정

으름열매나 으름잎 식초 음료에서 폴리페놀, flavonoid, 탄닌 성분이 지표 성분으로써 이용될 경우 검출함량이 높기 때문에 이용하게 이용될것으로 보여짐.

7. 으름을 이용한 기능성 음료 시제품 개발

완숙과실 및 어린 잎의 이물질을 제거, 물기를 없앤 후 으름열매 또는 잎 10kg을 파쇄 후 당첨가(25%)와 누룩 균 5kg 및 정제효소 5g을 더하여 25° C 조건에서 15일간의 발효과정을 진행한다. 발효 후 알코올 분리를 위하여 75-80° C 조건에서 30분간 열처리를 진행한다. 알코올이 제거된 발효액을 여과과정을 거친 후 정제수 10L에 희석하여 으름음료를 완성

6. 으름을 활용한 혼합복합음료 베이스 제조 및 음료 개발

으름식혜는 물 1L에 고두밥 250g을 끓인 후 물 5L와 1% 으름가루를 첨가하여 100°C에 1시간 동안 끓여 으름식혜를 만듦. 혼합음료제조는 물 5L에 으름 열매 1%와 대추 1%, 감초 0.4%를 넣어 끓이고 식힌 후 4°C에 보관. 으름어린차는 5g 정량하여 20배 따뜻한 (40°C)에 5분간 담가서 용출 한 후 연두빛 차 음료를 만들었다.

9. 으름을 이용한 음료의 저장유통기간 설정 및 경제성 평가

으름잎차와 으름식혜가 관능적 종합 평가에서 우수하였음.

10. 으름음료의 지표물질의 함유량을 결정함

으름 열매 첨가균 3, 5, 7%에서 총 폴리페놀 함량이 발효 1일째보다 각각 136.6, 381.59, 415.35 mg/100 g 유의적으로 증가됨. 또한 발효가 진행될수록 총 폴리페놀 함량이 증가.

제1협동 :으름의 유효 성분 추출 동정통한 지표물질 개발 및 oleanolic acid 및 triterpenoide 성분의 이화학적 안전성 확보를 통한 제품기술개발

1. 국내 자생 으름을 이용한 용매별에 따른 추출 조건 탐색

건조된 으름의 열매(30g)를 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water(300g)로 추출한 결과 아세톤과 메탄올추출물에서 농도에 따라 유의적으로 항산화능이 증가됨을 확인하였음. acetone 층과 70% ethanol 층에서는 free radical 활성이 보여 주었음. 그러나 대량 추출 조건으로 물 fraction에서는 활성이 관찰되지 않았음. 으름 열매의 추출물들의 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제 활성능을 관찰하기 위하여 NO 분석을 한 결과 으름 열매 메탄올 추출물과 70%에탄올의 NO 생성억제능을 보여 주었음. 의 IC₅₀값은 208.53~704.45 $\mu\text{g/ml}$ 으로 계산되었고 RAW 264.7의 생존율에는 영향이 없었다. 메탄올 추출물에서 가장 효과적인 NO생성 억제능이 보였음. 결과에 따르면, 70% ethanol과 methanol 추출물이 가장 높은 NO 생성저하 능력이 있음이 확인됨. IC₅₀농도에서는 메탄올이 207.53 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 낮았으며 70% ethanol이 209.69 $\mu\text{g/ml}$ 로 다음 활성을 보여 주었음.

2. 국내 자생 식물 으름에서 oleanolic acid 및 triterpenoide 조건 탐색

으름에서 oleanolic acid 은 동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리하고 그 중 butanol 가용부 (20g)을 5% HCl(MeOH/H₂O)에 4시간동안 가수분해를 시킴, 그 혼합물을 ethyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척. 그 혼합물을 silica

gel(450-580mesh)을 사용하여 분리함. 으름 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 추출물의 농도의존적으로 소거능 활성이 증가하였으며 BuOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 가장 뛰어난 으라 다음 fraction이 HCl fraction에서는 항산화 활성이 감소되고 부탄올 추출물에서 항산화 활성이 증가 하였음. NO 생성 억제능은 HCl 추출물이나 BuOH 추출물에서 비슷하게 나타났으며 으름 추출물의 농도가 높아질수록 NO 생성 억제활성이 높아지는 결과를 보여줌. oleanolic acid 의 항암활성은 Hela, MCF-7, U87 모두에서 우수한 항암 활성을 보였음

으름에서 triterpenoide를 대량 추출 후 분리 정제함. 80: 20 분리한 샘플은 AM1(80:20 1), AM2(80:20 2), AM3(80:20 3), AM4(80:20 4) 피크가 확인되었음. 에틸아세테이트 추출물의 항암실험결과에서는 U87, SH-Sy5Y, Du145 세포에서 HeLa 세포에서 가장 높은 성장억제효과를 보여줌. DPPH 라디칼 소거능은, 으름의 물추출물과 EtOAc추출물에서 농도에 따라 유의적으로 항산화능이 증가됨. NO 생성능은 EtOAc 추출물에서 물추출물보다 더 높게 나타남. 활성이 보인 에틸아세테이트에서 TLC 컬럼을 이용 분리정제. TLC 컬럼에서 분리된 fraction의 항암활성은 DU145, MCF-7, HeLa, U87 그리고 SH-SY5Y에 대한 확실한 성장 억제능을 보여줌. ethyl acetate의 항암활성은 S.e에서 1.00cm, K.p에서 1.00cm, B.c에서 1.00cm, B.s에서 1.00cm, S.f에서 1.00cm, E.c에서 1.00cm으로 나타남.

3. oleanolic acid 및 triterpenoide 의 세포주를 이용한 NO 억제 활성 및 활성 산소종 억제 물질 활성 분석

oleanolic acid는 RAW 264.7 대식 세포에 대한 독성은 나타내지 않음. IC50 활성은 318.15 μ g/ml에서 NO 50% 억제 활성을 보여줌.. oleanolic acid 50 와 100 μ g/ml농도에서 측정된 결과 각각 51.04%과 91.35% O2- 생성 저해활성을 보여줌.

4. 으름열매의 원료 validation 평가 및 대량 추출 시 최적 추출공정 확인 분석함

oleanolic acid 와 hederagenin은 에탄올 추출물에서 검출되는 성분임. 물 추출물에서는 폴리페놀과 flavonoid, tanin성분이 검출되기 대량 추출 시 물추출물에서 폴리페놀과 flavonoid, tanin을 지표성분이 항산화 활성을 가지면 간 보호 효과를 가지는 것으로 보여짐

5. 대량 생산의 표준화를 위한 으름 추출 최적 조건 분석 평가함.

으름열매와 으름잎의 물 추출물의 효소 처리후 항산화 활성을 확인한 결과 잎과 열매는 활성의 변화가 거의 없었음, 효소처리를 하여도 항산화 활성 변화는 없는 것으로 보여짐, 온도를 달리해도 활성의 변화 없음

6. 기타 triperpenoide 추출 조건 확립

hederagin 동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리. 그 중 butanol 가용부(20g)을 5% HCl(MeOH/H₂O)에 4시간동안 가수분해를 시킴. 그 혼합물을 eathyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척. 그 혼합물을 silica gel(450-580mesh)을 사용하여 분리한후 HPLC C18 column을 이용하여 분리하여 정제. U87, HeLa, MCF-7, DU145, SH-SY5Y 암세포에서는 250 μ g/mL농도에서는 세포 생존율이 평균 30%를 보임. HeLa 암세포에서는 hederagenin투여를 증가함에 따라 G1 arrest가 일어나고 S가 감소 되는 경향을 보임. MCF-7 세포주, U87 세포에서도 농도가 증가함에 따라 G1 arrest가 일어나고 S가 감소 되는 경향을 보임

7. Hederagenin 및 triterpenoide 지표물질의 안전성 개선 및 간보호 효과

oleanolic acid는 항산화 활성이 보이지 않음. 온도별 측정 후에도 활성변화가 없음.그러나 leukemica

세포내에 TPA 유도 후 형성되는 H₂O₂ 활성에서는 free radical을 억제하는 활성을 보여 주었음. oleanolic acid는 항산화 활성이 보이지 않음 pH 변화에 따른 활성 측정이 보이지 않음. hederagenin 역시 DPPH 측정시 항산화 활성이 보이지 않음. 알코올성 간질환을 유발한 동물의 간 기능 회복에 대한 활성은 AST, ALT, TG, TC활성을 통해 분석. AST는 hederagenin 그룹은 208.65±32.94로 ethanol그룹보다 낮은 수치를 나타냄. Total cholesterol(TC)의 결과 hederagenin그룹은 79.75±5.24로 TC의 증가를 억제시킴. Triglyceride(TG)의 결과 hederagenin그룹 41±9.79로 ethanol그룹에 비해 TG가 감소함. ALDH2의 mRNA발현은 hederagenin그룹이 ethanol그룹 보다 증가함.

8. 으름 적용 제품 품질 개선

으름 식혜 제조- 물 1L에 쌀 250g과 설탕 125g을 넣어 끓여 물 5L와 1% 으름가루를 첨가하여 100℃에 1시간동안 끓여 으름식혜를 만듦. 시간에 따라 호흡 중 알콜 농도를 측정.

9. 으름 지표물질의 항산화 활성을 확인하기 위한 동물실험

으름혼합음료제조는 물 5L에 으름 열매 1%와 대추 1%, 감초 0.4%를 넣어 끓임. 알코올성 간질환을 유발한 동물의 으름혼합음료에 대한 간 기능 회복활성은 AST, ALT, TG, TC활성을 통해 분석. ALT에서 정상군은 35.14 IU/L이고, 알코올 군은 42.17 IU/L로 정상보다 증가. 혼합음료를 섭취한 군은 31.85 IU/L로 정상보다 수치가 낮았음. TC에서 정상군은 85.55 mg/dl 이고, 알코올군은 100.05 mg/dl이다. 그리고 혼합음료를 섭취한 군은 77.05 mg/dl 으로 나타남.. TG에서는 정상군은 30.28 mg/dl, 알코올 군은 55.32 mg/dl, 혼합음료를 섭취한 군은 30.66 mg/dl의 결과를 보여줌

<제 2협동>

1. 으름의 간 보호 기능 메커니즘 구명

가. 으름의 항산화 및 간기능 보호기능 생체 구명

으름 추출물 처리에 따른 간보호 효과 검증을 위해 생쥐에서 급성으로 알콜독성을 유발 시간 모델을 구축하여 그에 따른 으름 추출물의 간보호 기능을 탐색하였다. 알콜을 급성 독성을 유발한 생쥐에서 으름의 열매, 잎 추출물의 급여는 Alanine aminotransferase (ALT)와 Aspartate aminotransferase (AST) 수치를 개선하였으며 조직학적 분석을 통해 급성 알코올로 유도된 간독성 중 급성 지방간염의 상태를 완화 시키는 것으로 분석 되었다. 또한 간조직내 항산화 물질인 glutathione synthetic enzyme의 mRNA 발현과 glutathione 농도를 특정한 결과 으름 추출물의 경구 투여는 관련 glutathione synthetic enzyme의 발현을 촉진하고 간조직내 glutathione의 농도를 유의적으로 증가시켜 그 간보호능력의 가능성을 나타내었다. 산화 스트레스 마커인 NADPH oxidase 4 (NOX4) mRNA 발현 정도와 염증반응 마커- tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) mRNA 발현의 정도를 분석한 결과에서도 으름 추출물의 처리는 급성으로 유도된 알콜 독성 생쥐에서 산화적 스트레스와 염증반응을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타내었다.

종합해보면, 실험동물에서 으름의 열매 및 어린 잎 추출물의 경구 투여는 알콜로 인한 급성 간독성 상태에서 AST, ALT 수치를 개선하였고, 지방간 형성을 억제 하였으며, 간조직 내 항산화 물질인 GSH의 농도를 증가 시켰다. 더불어 ROS를 생성하는 NOX4 의 mRNA 발현을 억제 하는 것으로 분석되었으며 염증 반응 지표인 TNF-α 의 mRNA 발현도 억제 할 수 있는 것으로 분석되었다. 따라서 으름의 열매 및 어린잎의 추출물은 알콜로 유발된 지방간, 산화 스트레스, 항 염증 반응에 대한 가능성을 나타내는 것으로 판단된다.

나. 으름의 항산화 및 간기능 보호 작용 메커니즘 in vitro 연구

으름 추출물의 으름의 항산화 및 간기능 보호 작용 메커니즘 in vitro 에서의 효과를 관찰하기 위해 AML12 cell line (정상 마우스 간 세포주) HepG2 cell line을 구축 하여 으름 추출물의 간보호 작용 메커니즘에 대한 연구를 in vitro로 구명 하였다. 으름 추출 지표 물질 처리 농도에 따른 간세포 간암 세포의 증식 정도와 세포자살 테스트를 해본 결과 으름의 추출물은 세포 독성을 유발하지 않고 세포의 증식의 지연에 효과가 있는 것으로 분석 되었다. 하지만 암세포의 세포 증식에 대한 유의적 효과는 관찰 되지 않았다. 으름 지표물에 대한 세포 자살 효과에 대한 분석이 필요하다고 판단되어 분석한 결과 으름 지표 물질 중 하나인 Hederagenin의 처리는 AML-12 세포의 세포자살을 지연 시키는 것으로 확인 되었다. 간 암세포주인 HeG2에서는 정상 세포주와 대조되는 결과로 Hederagenin 의 처리로 인해 암세포 특이적으로 세포 자살을 유도 하는 것으로 사료되어 으름 추출 지표 물질인 Hederagenin은 간암세포 억제 기능을 확인 하였다. 또한 동물 모델에서 확인된 항산화 능력에 으름의 기능성을 세포 모델에서도 동일하게 확인 하였다. 으름의 간보호 메커니즘 구명의 일환으로 진행된 microarray 분석의 경우 angiogenesis, antioxidant activity, apoptotic process, cell proliferation, inflammatory response의 유전자군의 유의적 변화를 확인 하여 으름의 기능성을 분자수준에서 구명하였다.

다. 으름 지표물의 간보호 기능 구명 및 숙취해소 기능 확인을 위한 인체 적용 실험

으름 추출물 내 지표물질로 알려진 oleanolic acid와 hederagenin의 간 보호 기능을 확인하기 위하여 새우 5주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 알코올 처리군과 비처리군, oleanolic acid와 hederagenin을 처리한 그룹으로 나누어 실험을 진행한 결과 oleanolic acid와 hederagenin의 처리는 급성 알콜로 유도된 간독성에서 간보호 효과를 나타는 것으로 분석 되었다. 실제로 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST) 수치에서 개선 가능성을 나타내었으며 알콜 처리후 혈중 알콜 농도와 alcohol dehydrogenase mRNA의 발현을 유의적으로 감소 시켰다. 염증 지표인 Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)도 oleanolic acid와 hederagenin의 개선 효과를 확인 하였다. 또한 으름을 이용한 으름 발효 초음료의 숙취해소 개선 능력을 검증한 결과, ALT의 수치 개선 효과를 나타내었다. 또한 음주 후 5시간째 으름 초음료의 숙취개선 효과가 뚜렷하게 나타나는 것으로 분석 되었다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 으름 추출물 및 으름을 이용한 기능성 음료의 지적재산권 출원 및 활용

가. 개발된 고품질 및 기술의 보호권 또는 특허권 확보

2. 간기능 개선 및 간 보호 천연 물질에 대한 학술적 연구

가. 본 과제를 통해 구명된 연구 결과에 대한 학술지 발표

나. 으름의 간보호 기능 관련 유전자의 과발현과 발현억제 기술을 활용하여 목적 유전자의 발현 조절을 통해 upstream, downstream 기능 구명

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of new beverages liquor containing *Akebia quinata* extracts with antioxidants activity and hepatoprotective effect

II. Object

This study was investigated the physicochemical properties and antioxidant activity hepatoprotective effect of beverage of *Akebia quinata* fruits and leaf.

III. Necessity of research

- Increase of famers income
- Identification of antioxidant and hepatoprotective effect of *Akebia quinata*
- Development of food industry using beverage of the *Akebia quinata* fruits and leaf extracts .
- Thus, our results suggest that the effective antioxidant activity of *Akebia quinata* could be effectively used as functional material of food.

IV. Content of Result research

1part: Development of beverage using *Akebia quinata*

This study was investigated the physicochemical properties and antioxidant activity of vinegar beverage added different levels (0%, 1%, 3%, 5%, and 7%) of *Akebia quinata* fruits by two step fermentation. The physicochemical properties of vinegar were evaluated the pH, total acidity, alcohol, total sugar and amino acid. The antioxidant activities were estimated the ABTS⁺ radical scavenging activity, SOD-like activity and reducing power. During alcohol fermentation, total acidity and the alcohol contents of vinegar increased but total sugar contents decreased. During acid fermentation, total acidities of vinegar increased. Vinegar added 7% *Akebia quinata* fruits showed the highest total sensory score. Total polyphenol contents of vinegar added 0% and 1% *Akebia quinata* fruits were not significant difference. But 3, 5 and 7% *Akebia quinata* fruits increased significantly higher 136.6, 381.59, 415.35 mg/100 g at 13 day than at 1 day fermentation, respectively. Also, total flavonoid contents of vinegar added 0~7% *Akebia quinata* fruits increased significantly higher 21.73, 15.79, 15.15, 26.19, 26.87 mg/100 g at 13 day than at 1 day fermentation, respectively. In addition, tannin contents of vinegar added 0~7% *Akebia quinata* fruits increased significantly higher 0.2042, 0.2004, 0.1255, 0.1384,

0.1255 mg/100 g at 13 day than at 1 day fermentation, respectively. Moreover, ABTS⁺ radical scavenging activities of vinegar added 0~7% *Akebia quinata* fruits increased significantly higher 5.87, 12.59, 25.63, 34.02, 35.25% at 13 day than at 1 day fermentation at concentration of 5 mg/mL, respectively. Additionally, SOD-like activities of vinegar added 0~7% *Akebia quinata* fruits increased significantly higher 8.22, 17.49, 16.86, 16.89, 15.68% *Akebia quinata* at 13 day than at 1 day fermentation, respectively. Reducing power of 7% *Akebia quinata* fruits was 0.527 at 1 day and 1.539 at 13 day. Our results demonstrated that the antioxidant activity significantly increased during fermentation, which indicated them dependent on the adding *Akebia quinata* fruits contents. Also, these results showed that total polyphenol, flavonoid and tannin contents are closely related with antioxidant activities. Thus, our results suggest that the effective antioxidant activity of *Akebia quinata* could be effectively used as vinegar and functional material of food.

2part : Identification of oleanolic acid and triterpenoide and Quality Characteristics of *Akebia quinata* compound

1. Biological activities of different fractions from *Akebia quinata*

The free radical scavenging activity of the extracts was evaluated by using the DPPH method. The result observed that methanol - fraction of AQ fruits showed the highest DPPH scavenging activity among other fractions (Fig. 1). To determine the inhibitory effect of AQ fractions on the formation of NO on RAW 264.7 cells, we performed NO assay. The IC₅₀ values of AQ fruits fractions inhibited NO generation were recalculated as 207.53-704.45 µg/ml at 24 hr. There were no cytotoxic effects in RAW 264.7 cells. The IC₅₀ value of NO inhibition activity of methanol extract of AQ was 207.53 µg/ml. Our results demonstrated that the methanol fractions strongly inhibited NO generation

2. Different extracts of *Akebia quinata* and isolation of oleanolic acid and hederagenin

The fruits of AQ were collected at Hamyang city in Korea. The dried material (30 g) was extracted with hexane, chloroform, acetone, ethyl acetate, 70% ethanol, methanol and water (300 ml) using a shaking incubator (SI-600 Lab, companion) for 12hr at 25°C. The extracts filtered through filter paper (Whatman #2, Whatman, Inc., Clifton, N.J.) were concentrated by a rotary vacuum evaporator (Ecospin 3180C, Hanil Co. Ltd, Korea) under reduced pressure at 40°C.

The air-dried and milled fruits of AQ (4 kg) were subjected to extraction with methanol (40 L) for up to 30 days at room temperature. The filtered extract was concentrated under vacuum to furnish (400 g) of residue, which was dissolved in methanol, followed by sequential partition with ethyl acetate, n-butanol and water using a shaking incubator for 24 hr at 25°C. After filtrating with filter paper (Whatman #2), the n-butanol-soluble

fraction (20 g) was hydrolyzed in 5% HCl in MeOH/H₂O(2:8vol/vol)under reflux for 4hr. After cooling, there action mixture was extracted ethylacetate. The ethylacetate-solublefraction (0.3g) was washed with distilled water and chromatographed on a TLC (ThinLayerChromatography) using EtoAC-MeOH-H₂O (70:27:3 by volume) to produce four subfractions. In order to analyze the compounds in the extract, high performance liquid chromatography (HPLC) were carried out on HPLC Empower Software (Waters, Milford, USA) with the reversed phase column (SunFire C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm diameter, Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase was acetonitrile: methanol: water. The flow rate and injection volume were 1 ml/min and 20 μl, respectively. The chromatograms were detected at 270 nm and collected at 30 °C. Oleanolic acid was purchased from (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 97%) and used as an authentic standard.

3. NO and Super oxide anion radical (O₂⁻)inhibitionactivitiesof oleanolicacid and hederagenin

NO is known to generate in conjunction with the conversion of L-arginine to the stoichiometric amount of L-citrulline. While measurement of nitrite (NO₂⁻) by the Griess assay allows detection of the sumof the NO generation inhibitory and NO scavenging effects, the L-citrulline measurement strictly reflects the former. Therefore, the data in the present study showed the suppressive effect on NO generation from RAW264.7cells. No cytotoxicity was observed at a concentration of 50~500 μg/ml. It is quite interesting that the effects of OA on NO generation are definitely variable (Inhibitory rates: 10.7~ 61.8%), Thus, the IC₅₀ value of OA inhibited formation of NO wase valuated as 318.15μg/ml. This anti-inflammatory effect is a common property of many triterpenoids (Price et al., 1987). The inhibitory effect of a red wine polyphenol, resveratrol (Murakami et al., 2003) was also examined for comparison of activity, and its inhibitory potency was found to be similar to that of OA. And OA is notable triterpenoid compound. Additionally, OA has also been shown to inhibit rat paw edema produced by dextran and to suppress adjuvant-induced arthritis in rats and mice (Singh et al., 1992) Our result demonstrated that the DPPH scavenger activity is not shown, but OA showed inhibition activity of super oxide anion radical.

4. Protective Effects Hederagenin and Ethanol Extract from *Akebia quinata* Fruit on Alcohol-induced Liver Injury

In this study, hederagenin was evaluated for its superoxide radiacal and nitric oxide (NO) inhibition activities. Also, we studied the effects of hederagenin and ethanol extract from

Akebia quinata fruit (EA) on alcohol induced hepatotoxicity in rats. The IC_{50} value of ethanol extract fraction and hederagenin inhibited formation of NO was evaluated as 209.69 and 25 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Experimental animals were randomly divided into four groups: (1) a normal group, (2) a group fed 25% alcohol, (3) 25% alcohol + a group fed Ethanol extract from *Akebia quinata* fruit (4) 25% ethanol + hederagenin. Each groups was fed orally one time per day for 21 days. Alcohol group had significantly increased levels of serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT). On the contrary, ethanol extract group and hederagenin group decreased the levels of serum AST and ALT. The levels of serum triglyceride and cholesterol were increased by alcohol treatment, and EA and hederagenin groups supplementation normalized triglyceride and cholesterol level. The ethanol extract of *Akebia quinata* fruit also activated the mRNA expression of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase-2. These results indicate that *Akebia quinata* fruit may be protected role against alcohol-induced liver injury.

5. Protective Effects of *Akebia quinata* extracts added Beverage and *Akebia quinata* Sikkhye on Alcohol-induced Hepatotoxicity in Rats

The purpose of this study was to investigate the protective effects of *Akebia quinata* sikkhye and *Akebia quinata* water extracts added herb beverage on chronic alcohol-induced liver injury in rats. Wistar rats were divided into four groups: normal, alcohol control (36.8% of total calorie), 10 ml/kg BW of *Akebia quinata* sikkhye group (AS), and 10 ml/kg BW *Akebia quinata* water extracts added herb beverage groups (AB). Each group was fed orally one time per day for 21 days. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were increased by alcohol treatment, and AS and AB groups supplementation normalized ALT and AST level. Serum concentrations of triglyceride and total cholesterol were elevated by the alcohol group, however AS and AB groups were significantly decreased compared to the alcohol group ($p < 0.05$). In human body experiment,

AS and AB was effective in decreasing on the respiration ethanol concentration. These results suggest that *Akebia quinata* fruit may be protect in chronic alcohol-induced liver injury.

3 part : Investigation of hepato-protective effects of *Akebia Quinata*

1 Investigation of anti-oxidative effects of *Akebia Quinata in vivo*

We studied the effects of *Akebia quinata* fruit extract (AQ) on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. AQ (30–1,000 mg/kg body weight (BW) per day) was orally

administered to the study group, once daily for 1 week. On the last day of AQ treatment, ethanol (6 mg/kg BW) was orally administered to induce acute liver injury. The AQ-treated group showed significantly lower levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, compared to the only ethanol-treated group (ETG). The glutathione level in the AQ-treated group elevated up to 20.6%, compared to that observed in the ETG. The mRNA expression of glutathione synthetic enzymes was also higher in the AQ-treated group, compared to the ETG. The AQ-treated group also exhibited lower levels of expression of NADPH oxidase 4 and tumor necrosis factor alpha mRNA. Thus, these results show that AQ treatment can be a potential method to reduce oxidative stress and inflammation in ethanol-treated mouse liver and also that AQ can be a useful therapeutic agent for acute alcohol-induced hepatotoxicity. In addition, We studied the effects of oleanolic acid and hederagenin on acute alcohol-induced hepatotoxicity. Oleanolic acid (10, 20 mg/Kg body weight(BW) per day) or hederagenin(10, 20 mg/Kg body weight(BW) per day) was orally administered to the study group for 1 week. On the last day of treatment, ethanol (5 g/Kg BW) was orally administered to induce acute liver injury. The oleanolic acid-treated group showed lower levels of alanine aminotransferase compared to the ethanol-treated group (EtOH). The mRNA expression level of alcohol dehydrogenase was significantly increased in the high dosage oleanolic acid-treated group (EtOH+OH) compared with the control and EtOH groups. The glutathione levels of the oleanolic acid or hederagenin-treated groups were elevated significantly compared with those of the control and EtOH groups. The mRNA expression levels of glutathione synthetic enzymes were also elevated in the oleanolic acid-treated groups. The oleanolic acid or hederagenin-treated groups also showed lower levels of mRNA expression of tumor necrosis factor alpha. Thus, these results show that oleanolic acid and hederagenin could reduce oxidative stress and hepatotoxicity in ethanol-treated mouse liver.

2 Studies of hepato-protective effects of *Akebia Quinata* *in vitro*

This study was to investigate the effects of *Akebia quinata* (AQ) leaf and fruit extract on acute alcohol-induced hepatotoxicity in AML12 cells. Different concentrations of AQ extracts (250 µg/ml and 2500 µg/ml) were treatment to the AML12 cells with or without ethanol for 24 hours challenging for inducing acute alcohol cytotoxicity for 24 hours. AQ extracts treated AML12 cells showed the enhanced expression of GSH synthetic enzymes and the suppressed expression of oxidative stress maker such as NOX4, and decreased expression of TNF- α , inflammatory marker, in acute alcohol induced hepatotoxicity. Further, it was observed that 100 mM ethanol treatment to AML12 cells resulted in global change of mRNA expression in micro array but AQ leaf extract treatment reversed the global change of mRNA expression pattern into normal condition. AQ extract or functional component from AQ can be useful therapeutic agent in acute alcohol-induced hepatotoxicity by reducing oxidative stress and inflammation responses. In addition, the present study demonstrated that treatment of AQ leaf and fruit extract showed a possibility of

anti-oxidative and anti-inflammatory activities by quantitative PCR and microarray analysis. The response of gene expression changes observed after acute EtOH induced hepatotoxicity was global. The globally changed gene expression, which was subjected to treatment of 100 mM of EtOH, were almost turned into pattern of control by treatment of AQ leaf extracts. Taken together, AQ extract or functional component from AQ can be useful therapeutic agent in acute alcohol-induced hepatotoxicity by reducing oxidative stress and inflammation responses.

3 Pre-clinical test of *Akebia Quinata* beverage

The present study was conducted to investigate the effects of beverage containing fermented *Akebia quinata* extracts on alcoholic hangover. For this study, we recruited 25 healthy young men. All participants consumed 100 mL of water (placebo), commercial hangover beverage A, B, fermented *A. quinata* leaf (AQL) or fruit (AQF) extract before alcohol consumption. After an hour, all participants consumed a bottle of Soju, Korean distilled liquor (360 mL), containing 20% alcohol. Blood was collected in 0h, 1h, 3h, and 5h after alcohol consumption. The plasma ALT activity was highest in placebo group. Compared with control group, AQL and AQF groups showed decreased ALT activity at 5h after alcohol consumption. Plasma ethanol concentration was increased after alcohol intake and peak at 3 hours after alcohol consumption. Compared with Control group, A group showed higher plasma ethanol concentration at 1h ($P < 0.05$). At 3 hours after alcohol consumption, AQF group showed the lowest mean plasma ethanol concentration compared to other groups, however there were no statistical differences. 5 hours after alcohol consumption, AQL and AQF groups showed lower plasma ethanol concentration compared with B group. Sensory evaluation score of fermented *A. quinata* fruit extract was lower than that of commercial hangover beverages. In conclusion, the present intervention study suggested that fermented *A. quinata* extracts alleviates alcoholic hangover and reduce the plasma ethanol concentration.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of the project·	19
1. Necessity of current project	
1.1 Importance of economic and industrial target technology	
1.1.1 Characteristics applications of <i>Akebia Quinata</i>	
2. Objective of the project	
Chapter 2. Current status of the R&D related with this project·	22
1. Current status of the domestic R&D	
1.1 Current status of domestic R&D in functional food	
1.2 Current status of R&D in <i>Akebia Quinata</i> as functional food	
2. Current status of world wide R&D	
Chapter 3. Contents and results of the research·	27
1. Major contents of the research	
2. Method contents of the research	
[1]. 1 part:	
1. 1 year : Method	
2. 2 year : Method	
3. 3 year : Method	
[2]. 2 part ;	
1. 1 year : Method	
2. 2 year : Method	
3. 3 year : Method	
[3]. 3 part :	
3. Result of research	
[1].1. Part	38
1. 1year of the result	
(1) Search market of the <i>Akebia Quinata</i> related materials	
(2) Analysis of effect of food functional market using new <i>Akebia Quinata</i> related beverage	
(3) Purification of the <i>Akebia Quinata</i>	
(4) Safety of the <i>Akebia Quinata</i> compound	

- (5) Development of vinegar of the *Akebia Quinata*
 - 2. 2 year of the result
 - (1) biomaker materials of the *Akebia Quinata beverage*
 - (2) Development of vinegar using the *Akebia Quinata extracts*
 - (3) Sensory test and quality Characteristics
 - (4) Biomaker materials of the *Akebia Quinata* for production process
 - (5) Analysis of beveage market
 - 3. 3 year
 - (1) Development of *Akebia Quinata beverage*
 - (2) Development of *Akebia quinata extracts* added beverage
 - (3) Storage and safety test of the *Akebia Quinata beverage*
 - (4) Development of *Akebia Quinata vineger beverage*

[2.] 2part :75

- 1. 1year of the result
 - (1) *Biological activities of different fractions from Akebia quinata*
 - (2) Oleanolic acid and triterpenoide from *Akebia quinata*
 - (3) Quality Characteristics of safety of oleanolic acid and hederagin
 - (4) *Biological activities of Akebia quinata leaf*
 - 2. 2year of the result
 - (1) *NO and Super oxide anion radical (O₂⁻)inhibitionactivitiesof oleanolicacid and hederagenin*
 - (2) Purification of another triperpenoide
 - (3) new biological compound
 - (4) Validation of *Akebia quinata* 평가 및 대량 추출 시 최적 추출공정 확인, 분석
 - (5) standardzationof the block process of *Akebia quinata extract*
 - (6) *Biological activities of vineger of Akebia quinata*
 - 3. 3year of the result
 - (1) Protective effects of *Akebia quinata sikhye* on alcohol-induced hepatotoxicity in Rats
 - (2) Protective Effects of *Akebia quinata extracts* added Beverage on Alcohol-induced Hepatotoxicity in Rats
 - (3) Content of polyphenol and tanin of vineger from *Akebia quinata fruit*
 - (4) Content of polyphenol and tanin of vineger from *Akebia quinata leaf*
 - (5) Analysis of *Akebia quinata* compounds
 - (6) Protective effects of Hederagenin
 - (7) Quality improvement of *Akebia quinata* compounds

[3]: Investigation of hepato-protective effects of *Akebia Quinata*135

3.1 Investigation of anti-oxidative effects of <i>Akebia Quinata in vivo</i>	
3.2 Studies of hepato-protective effects of <i>Akebia Quinata in vitro</i>	
3.3 Pre-clinical test of <i>Akebia Quinata</i> beverage	
Chapter 4. Achievement and contribution in research area181
Chapter 5. Research results and application plan182
Chapter 6. Collected information in world wide R&D187
Chapter 7. Facilities and equipment189
Chapter 8. Research safety in laboratories190
Chapter 9. References191

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	19
제 1 절 연구개발의 필요성	19
1. 연구개발 대상 기술의 경제적· 산업적 중요성	
가. 으름의 특징 및 활용 현황	
제 2 절 연구개발의 목적	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
제 1 절 국내 연구 현황	24
1. 국내 기능성 식품연구 현황	
2. 으름의 연구 현황	
제 2 절 국외 연구 현황	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절 주요 연구 내용	27
제 2 절 과제별 (세부 · 협동) 연구 개발 수행 방법	28
[1]. 1 세부: 으름을 이용한 음료 개발	
1. 1차년 연구 개발 수행방법	
2. 2차년 연구 개발 수행방법	
3. 3차년 연구 개발 수행 방법	
[2]. 1 협동: 으름의 유효 성분 추출 동정통한 지표물질 개발 및 oleanolic acid 및 triterpenoide 성분의 이화학적 안전성 확보를 통한 제품기술개발	
1. 1차년 연구 개발 수행방법	
2. 2차년 연구 개발 수행방법	
3. 3차년 연구 개발 수행 방법	
[3]. 2 협동 : 으름의 간 보호 기능 메커니즘 구명	
제 3 절 과제별 (세부 · 협동) 연구 개발 수행 결과	38
[1]. 1 세부: 으름을 이용한 음료 개발	
1. 1차년 연구 개발 수행결과	
(1)으름을 이용한 시장 현황 조사	
(2) 새로운 으름 관련 음료 제품의 기존 기능성 제품 시장에 대한 영향 분석	
(3) 원료의 대량 추출조적 확립 및 최적 추출 공정법을 수립	
(4) 원료 수급과 장기 저장시 안정성 평가	
(5) 으름을 이용한 식초음료베이스 개발	
2. 2차년 연구 개발 수행결과	

- (1) 으름음료의 지표물질의 함유량을 결정
- (2) 으름을 이용한 식초음료베이스 개발
- (3) 관능품질 변화 검토 및 이화학적 특성과 관능 검사
- (4) 생산 공정 적용을 위한 으름의 지표물질 측정
- (5) 시제품 개발에 대한 선호도 조사 및 시장분석

3. 3차년 연구 개발 수행 결과

- (1)으름을 이용한 음료 시제품 개발
- (2)으름을 활용한 혼합복합음료 베이스 제조 및 음료 개발
- (3)으름을 이용한 음료의 저장유통기간 설정관능품질 변화 검토
- (4)으름을 이용한 음료의 제품생산 경제성 평가으름을 이용한 식초음료베이스 개발

[2.] 1 협동:

으름의 유효 성분 추출 동정통한 지표물질 개발 및 oleanolic acid 및 triterpenoide 성분의 이화학적 안전성 확보를 통한 제품기술개발75

1. 1차년 연구 개발 수행결과

- (1) 국내 자생 으름을 이용한 용매별에 따른 추출 조건 탐색
- (2) 국내 자생 식물 으름에서 oleanolic acid 및 triterpenoide 조건 탐색
- (3) 으름에서 정제된oleanolic acid 와 hederagin 의 이화학적 안정성 평가 분석 (온도, 산도 안정성 평가)
- (4) 으름 어린잎 추출물의 활성

2. 2차년 연구 개발 수행결과

- (1) Oleanolic acid 및 triterpenoide 의 세포주를 이용한 NO 억제 활성 및 활성산소종 억제 물질 활성분석
- (2) 기타 triperpenoide 추출조건 확립: hederagin 추출 조건 확립
- (3) 신규 생리활성물질 탐색
- (4) 으름열매의 원료 validation 평가 및 대량 추출 시 최적 추출공정 확인, 분석
- (5) 대량 생산의 표준화를 위한 으름 추출 최적 조건 분석 평가
- (6) 으름식초 활용한 기능성 음료의 생리적 활성 측정

3. 3차년 연구 개발 수행 결과

- (1) 으름식체의 간보호효과
- (2) 혼합음료의 간보호효과 으름의 항산화 효과
- (3) 으름 열매 식초의 폴리페놀, 플라보노이드, 탄닌 함량 측정
- (4) 으름 열매 식초의 폴리페놀, 플라보노이드, 탄닌 함량 측정
- (5)으름 적용 제품 품질 개선효과 분석
- (6) Hederagenin 및 triterpenoide에 의해 안전성 및 간 보호효과
- (7) 으름적용제품 품질개선효과

[3]. 2 협동 : 으름의 간 보호 기능 메커니즘 구명.....135

가. 1차년 목표: 으름의 항산화 및 간기능 보호기능 생체 구명

(1) 실험동물 모델 구성

(2) 으름 추출물 처리에 따른 간보호 효과 검증

(가) Alanine aminotransferase (ALT)와 Aspartate aminotransferase (AST) 측정

(나) 체중 및 간 중량

(다) 조직학적 분석 (Histochemical analysis)

(라) 간 조직내 Glutathione synthetic enzyme의 mRNA 발현과 glutathione level

(마) 산화 스트레스 마커- NADPH oxidase 4 (NOX4) mRNA 발현 측정

(바) 염증반응 마커- tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) mRNA 발현 측정

나. 2차년 목표: 으름의 항산화 및 간기능 보호 작용 메카니즘 in vitro 연구

(1) Cell line 구축

(2) 으름 추출 지표 물질 처리 농도에 따른 간세포 간암 세포의 증식 정도와 세포자살 테스트

(가) MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay

(나) 으름 지표물질 처리에 따른 AML-12 및 HepG-2 세포 주의 Hoechst stain (세포자살 분석)

(다) 으름 추출 지표 물질 처리에 따른 간세포 간암세포의 glutathione 농도 측정 및 GSH 합성 촉매 효소 mRNA 및 단백질 발현 측정

① 으름의 열수 추출물(열매 및 잎) 처리

② 으름 메탄올 추출 물 처리

③ 으름 열 수 (hot water) 추출물의 처리에 따른 AML-12 세포주의 Glutathione 농도 변화

④ 으름 추출 지표 물질 처리에 따른 HepG-2 세포주의 Glutathione 농도 변화

(3) 간세포에서의 항염증, 항산화 작용 기능의 메카니즘 구명

(가) ROS 지표 분석

(나) 염증관련 지표 분석

(다) 간기능 개선 유전자 탐구

다. 3차년 목표: 숙취해소 기능 확인을 위한 인체 적용 실험

(1) 으름 추출물 내 지표물질인 oleanolic acid와 hederagenin의 간 보호 기능 확인

(가) 실험동물모델 구성

(나) Oleanolic acid와 hederagenin의 간보호 효과 검증

① Alanine aminotransferase와 aspartate aminotransferase 활성 측정

② 혈중 알코올 농도 및 alcohol dehydrogenase mRNA 발현 측정

③ 간 조직 내 glutathione synthetic enzyme의 mRNA 발현과 glutathione level

(2) 간보호 기능성 으름 초음료의 숙취 해소 기능 검증을 위한 인체 실험

(가) 실험 지원자 모집 및 실험방법

① 인체적용시험 연구대상자 설문지

② 인체 적용 시험 방법

(나) 으름 초음료의 숙취 해소 기능 확인

- ① 혈중 alanine aminotransferase 활성 측정
- ② 혈중 알코올 농도 측정
- ③ 으름 발효초의 관능평가

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	181
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	182
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	187
제 7 장 연구시설 장비 현황.....	189
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	190
제 9 장 참고문헌	191

제 1 장 연구개발과제의 개요

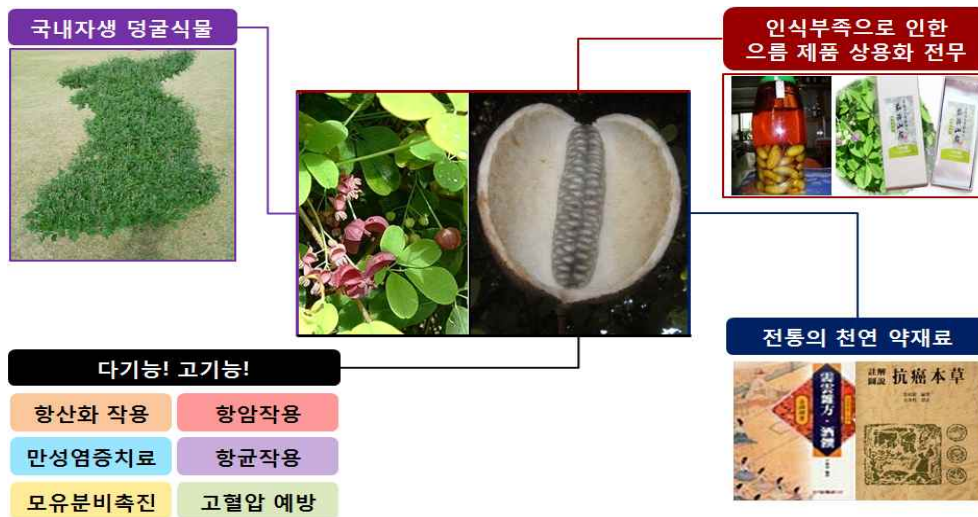
제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성

- 국내 자생 으름을 이용하여 농민의 소득 증대를 기대
- 국내 자생 으름 추출물의 항산화 활성 및 항암 활성 등 생리 활성 구명
- 으름 추출물의 생리 활성 물질 함유된 주류 및 음료 개발을 통한 새로운 시장 개척을 통한 식품 산업 발전
- 만성 알코올성 간질환 개선을 통한 국민 보건 복지 증진 기여

가. 으름의 특징 및 활용 현황

- 한의학에서 목통이라고 불리는 으름 (*Akebia quinata*)은 오래전부터 한국을 비롯한 중국 그리고 일본에서 소염(anti-inflammatory) 및 이뇨(diuretic)를 촉진하는 중요한 약재로 사용되어 왔음.(이상은 등 1992, Kitaoka 등 2009).
- 으름에 관한 연구는 현재까지 그리 활발히 진행되진 않았으나 으름의 병태생리학적인 효과에 관한 기초 연구에 의하면 으름은 각종 인간유래의 암세포주를 사멸시키는 효과를 보였으며 RAW 264.7 macrophage 세포에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유래되는 nitric oxide (NO)의 생성을 감소시키는 효과를 보여주었음 (Jung 등 2004).
- 그 후 Choi 등 (2005)의 보고에 의하면 으름 추출물은 통증을 완화시킬 뿐만 아니라 항염증 효과 또한 관찰되었음을 동물실험을 통해 보여주었음. 으름의 항산화효과 또한 보고되었는데, 박 (2007)의 석사학위논문의 의하면 으름 추출물은 DNA 염기서열 상에서 세포의 산화적 스트레스를 분자 수준에서 조절하는 promoter 지역인 antioxidant response element (ARE)의 활성을 증가시킴. 다시 말해 으름이 동물세포의 산화적 스트레스를 완화시킬 수 있는 유전자 수준에서의 메커니즘을 가지고 있다는 것을 간접적으로 보여주었음.
- 현재까지의 기존 연구를 종합해 볼 때, 으름 추출물이 항산화, 항염증 그리고 항암효과를 나타내는 것으로 사료되고 있으나 그 효과들에 대한 분자생물학적 메커니즘이나 임상에서의 응용에 대한 연구는 전무한 상태이며 으름을 이용한 식품제품도 거의 없는 실정임.



(2) 생약에서 추출한 항산화 및 간 보호 연구 현황

- 산업화와 더불어 증가되는 각종 환경오염 물질, 흡연, 알코올, 방사선 등은 반응성이 높은 활성 산소종을 발생하는 원인이 되며, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, glutathion reductase 등과 같은 인체 내에 존재하는 항산화계의 역할만으로는 방어체계가 초과되어 산화적 스트레스에 의한 세포막과 단백질 분해, DNA 합성 억제 등의 손상이 유발됨.
- 페놀계 합성 항산화제인 BHT(Butylated hydroxytoluene), BHA(Butylated hydroxyanisole)는 지금까지 강한 항산화성 뛰어난 경제성 때문에 식품에 널리 사용되어 왔으나, 이들의 다량섭취로 인한 간비대, 간장 중 microsomal enzyme 활성증가, 체내 발암 가능성 등의 문제점 등 인체에 대한 유해성이 보고되었을 뿐만 아니라 합성 항산화제의 사용 기피 현상으로 최근에 사용이 점차로 줄어들고 있어 인체에 안전하고 항산화 효력이 높은 천연 항산화제를 찾아내는 것이 절실히 요구되고 있음.
- 그러므로 천연식물류 및 한약재로부터 항산화 효과가 높고 경제적인 천연 항산화제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 으름 우리나라와 동양권에서 소염 및 이뇨를 촉진하는 등의 효능이 있어 질병 치료와 예방의 목적으로 활용되고 있음. 또한 일상생활에서도 민간요법으로 오랫동안 이용하여 왔으며 고유의 맛과 향, 미량으로도 생체기능을 조절하는 유용성분을 함유하고 있기 때문에 항산화 등의 생리활성 효과를 얻을 수 있는 대표적인 천연 식물이라고 할 수 있음.
- 국내의 암 예방 식품소개에 관한 연구는 최근 들어서 활발하게 연구되고 있으며, 중심으로 이루어지고 있음. 다. 그러나 주로 약학, 생명공학, 의학과를 중심으로 제약회사가 참여하여 암을 억제하는 특정 물질의 문자 생물학적 작용 기작에 관한 학문적인 연구가 이루어지고 있으며, 연구 투자도 암 예방 식품소재 보다는 암 치료에 이용 할 수 있는 약품 개발 및 작용 기작에 관한 분야에 우선적으로 이용할 만한 암 예방 소재의 개발은 거의 이루어지지 않고 있음.
- 또한 실제 식품 산업에 응용할 때에는 특정 단일 성분보다는 여러 성분이 혼합되었을 때의 효과와, 기호도가 높을 것으로 예상되는 원료로부터 암 예방 효능 식품소재를 탐색하는 것이 필요함.

- 특정한 물질의 암 억제 효능 탐색과는 달리 여러 성분이 포함되어 있는 암 예방 식품소재의 탐색을 위해서는 식품소재 전체의 효능을 측정할 수 있는 탐색법, 그리고 예상되는 물질의 구조적 특정 및 정량 분석이 요구되고, 이를 토대로 효율적인 분리, 정제, 생산을 위한 최적 생산 공정이 이루어져야 하는데, 현재까지 이러한 다단계 기술의 개발이 미진하여 산업현장에 응용되기가 힘든 실정임. 최근 일부 연구팀의 결과는 식품생명공학 관련 업계에 기술이 이전되어 암 예방 식품 및 식품소재로서 이용되기 시작하고 있음.
- 미국 국립연구소는 1990년부터 5년 동안 항암 기능성 식물성분 연구를 수행하면서 마늘, 감초, 대추, 미나리과식품 등 거의 대부분의 식품에 포함된 식물성 화합물의 생리활성평가를 실시했음.
- 그 후 1994년 Dietary Supplement Health and Education Act(DSHEA)가 제정됨에 따라 과학적 근거가 있는 제품에 대한 건강관련 효능을 표시할 수 있는 법적 근거가 마련되었으며 현재 모두 12건의 건강강조표시(health claim)가 가능함.
- 이와 같이 미국, 일본, 유럽 등은 법적 제도가 정비되어감에 따라 활발하게 기능성 식품에 대한 기초연구와 산업체 연구가 진행되고 있다. 미국은 1960년대부터 국립암연구소 (NCI)를 주축으로 천연물 유래 암 치료제 개발을 위한 연구 사업을 본격 추진했으며, 천연물 항암 신약으로 연간 1조원 이상의 매출액을 보이는 Taxus속 식물로부터 개발된 항암제 “Taxol”을 대표적인 예로 들 수 있음.
- 하지만 우리나라의 경우 천연물 기능성 소재 개발에 필요한 원천기술 발굴에 대한 투자가 미흡한 실정이며, 이 분야 연구개발비는 정부 전체 연구 개발비 중 0.07%에 불과함, (2001년 기준).

(3) 국내 음료 시장의 현황

- 통계청 자료에 따르면, 국제 가공차 시장은 최근 10년간 연평균 성장률이 1995년부터 2006년까지의 연평균 성장률보다 증가하고 있으며, 2006년도 국내 가공차 생산량은 652,281톤으로 199년의 8,622톤에 비해 35.9%가 증가하였고, 2002년도의 30,609톤에 비해 5.4% 증가하였음.
- 음료시장의 전반적인 경기침체에도 불구하고 이처럼 가공차 시장이 꾸준한 성장세를 보일 수 있었던 것은 가공차 시장 성장에 저해 요인으로 작용 되었던 관능적인 면을 극복하기 위한 다양한 가공차의 개발과 건강에 대한 소비자들의 관심증대에 기인한 것으로 고려됨..
- 웰빙 풍조를 타고 탄산음료와 과즙음료 시장이 축소되고 있는 가운데 차(茶) 음료 시장 규모가 급속도로 커지고 있다. 음료 업계에 따르면 차 음료 시장은 2004년 600억원 에서 해마다 성장하여 매출 규모가 1천억원(2005년), 1천 900억원(2006년)으로 늘어났으며 2008년도에는 약 5천억원에 이를 것으로 전망됨.
- 반면 전체 음료 시장의 3분의 1가량을 차지하는 탄산음료는 시장규모가 2002년에 1조 2천 억원을 기록했으나 2005년에 1조 700억원, 작년은 9천 200억원대로 급감하였으며, 과즙음료 시장도 8천억원(2002년)에서 작년까지 6천억원으로 감소하였다. 하지만 앞으로 소비자들의 건강 선호 경향이 지속될 것으로 보이면서, 가공 차 제품개발 등 업체들의 노력여하에 따라 가공 차 음료시장의 지속적인 성장이 기대되는 바임.

(4) 국내 자생 으름을 이용한 기능성 음료 생산의 필요성

- 으름은 황해, 이남 지방의 산과 들에서 재배되고 있다. 현재 으름은 온도, 습도에 민감하여 제품 생산에 많은 어려움이 있다고 한다. 대중화가 되어있지 않아 점점 잊혀져가는 추세이지만 황해, 이남 지방에서는 아직도 자연재배를 하고 있음. 생산보다 소비가 많아 가격이 비싸고 하우스 재배화가 되어있지 않아 제철과일로 10월에만 맛 볼 수 있음.
- 하우스 재배가 제대로 이루어 지지 않고 으름으로 한 제품들이 한약제로만 쓰이는 추세임. 으름은 모유분비촉진, 이뇨작용, 항암작용, 고혈압, 만성염증, 눈병 등의 질병들을 예방 할 수 있는 탁월한 능력을 가지고 있어 앞으로 으름의 대중화 및 산업화 가 이루어져 대표 과일로 상품화를 할 수 있다면 이 상품의 큰 효과를 누릴 수 있다고 보여짐.
- 껍질, 덩굴을 말려 한약제로 보편화 되어있음. 으름 속 열매는 바나나를 닮은 것이 특징이며, 맛 또한 바나나와 흡사하다 단점이라면 바나나와 다르게 열매 안에 씨앗이 있어 먹기 불편하다는 점임
- 하지만 바나나보다 뛰어난 효과를 지니고 있음. 으름은 신진대사를 좋게 이뇨작용에 탁월한 효과를 있다. 이와 같은 으름을 한약제 에서만 쓰이는 것이 아닌 식품에 전목 시켜 으름 기능성 식품개발에 발전가능성이 있다고 판단됨.

제 2 절 연구개발의 목적

으름의 기능성 (항산화 및 간 보호) 탐색 및 이를 활용한 음료 개발함으로써 기능성 신소재로서의 으름 개발의 가능성을 제시하고자 함.

- 제 1세부: 으름 추출물을 이용한 시제품개발 및 상품화 위한 특허 출원 2건 이상
- 제 1협동: 으름의 유효 성분 추출 동정통한 지표물질 개발 및 oleanolic acid 및 triterpenoide 성분의 이화학적 안전성 확보를 통한 제품의 품질향상 고정 개선 확립
- 제 2협동 : 으름의 항산화, 간보호 효과에 대한 분자수준에서의 메커니즘을 세포주(cell lines) 및 초대배양세포(primary cell culture)를 이용한 in-vitro 실험과 알코올성 간질환 유발 생쥐 모델을 이용한 in-vivo 실험을 통해 밝힘

1차년:

- 제 1세부: 으름 추출물의 활용 음료 제품 콘셉트 개발
- 제 1협동: 으름의 지표물질 추출 및 동정
- 제 2협동 :으름의 간기능 보호 효과 검증을 위한 in-vivo 연구와 최적 생리활성 농도 검증 및 독성 테스트를 시행하여 안전성 검증
-

2차년:

- 제 1세부: 으름 추출물의 활용 음료 제품 콘셉트 개발
- 제 1협동: 으름의 지표물질 추출 및 동정
- 제 2협동 :으름의 간기능 보호 효과 검증을 위한 in-vivo 연구와 최적 생리활성 농도 검증 및 독성 테스트를 시행하여 안전성 검증



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구 현황

1. 국내 기능성 식품연구 현황

- 우리나라에서는 80년대 말부터 각 대학 및 연구소에서 건강 기능성 식품소재 또는 식품에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재식품 및 관련 산업에 설치된 부설 연구소는 2001년도 현재 57개로 집계되고 있으며 이들 업체 대부분은 기능성 식품 관련 연구를 주요 연구과제로 수행하고 있음. 또한 전국 약 40여 개 4년제 대학이 식품관련 학과 또는 전공이 설치되어 있는데 이들 대부분의 대학 연구실에서는 기능성식품에 관한 연구를 수행하고 있음.
- 1980년 이후 2000년까지 우리나라에서 출원된 기능성 식품 분야 특허출원은 1,303의 기능성 식품 특허출원 상위 10대 출원인에는 우리나라의 제일제당과 롯데제과 등 2개 업체가 포함되어 우리나라도 기능성 식품 분야의 기술개발이 활발히 이루어지고 있는 것으로 나타났음.

2. 으름의 연구 현황

- 2007년 과제 시작 시점에서의 으름의 대한 연구결과는 약 8편으로 으름으로 변비치료 및 비만 예방, 위장질환 예방 또는 치료에 대한 연구이며, 주로 성분분석에 대한 연구가 이루어지고 있음.
- 으름 활성성분의 항산화 항암 및 세포내 신호 전달 체계 조절작용에 대한 연구는 보고된 바 없어 현재의 연구 자료로는 으름을 이용하기 위한 기초 정보가 매우 부족한 상태이므로 이에 대한 정보를 제공할 경우 농산물 이용뿐만 아니라 식·의약품 개방 전반에 걸쳐 활용 가능할 것임.

3. 국내 간암 및 알코올성 간질환 발병 현황

- 보건복지부와 국가암등록센터가 2011년 12월 발표한 우리나라 암 발생 통계에 따르면 간암은 2009년 한 해 동안 15,936명이 발병하여 전체 신규 암환자 192,561명 중 8.3%의 발병률을 보임
- 또한 2010년 한 해 동안 간암으로 인해 사망한 사람은 모두 11,205명으로 인구 10만 명 당 사망자 수로 나타내는 사망률이 22.5로 폐암 31.3 (15,623명)에 이어 암 사망자의 사망원인 중 2위를 차지함. (통계청, 2011)
- 현재 외과적 수술 및 화학적 항암치료 방법 등 간암 치료에 있어 그 성과가 누적되고 있지만 보다 근본적인 간암 및 간암의 원인이 되는 간질환의 분자생물학적 발생기작을 바탕으로 한 간암의 예방 및 치료 방법의 모색이 어느 때보다 필요한 시기임.
- 국민건강보험공단 통계자료에 따르면 2007년부터 2012년 6월까지 음주와 관련된 질환에 지출된 건강보험 진료비는 1조 2천 877억원에 달함2007년 우리나라 통계청의 자료를 인용하여 알코올 간질환 유병률을 살펴보면, 국내 알코올 관련 질환에 의한 사망 수는 한해 4,701

명으로 인구 10만 명당 9.6명으로 전체 간질환 사망수인 10만 명당 15.5명의 거의 62% 차지함

제 2 절 국외 연구 현황

- 미국 : 기능성 식품과 관련하여 '89년부터 nutraceutical(nutrient + pharmaceutical)이라는 용어가 사용되기 시작하였으며 ' 80년대 후반부터 국공립 연구소(NCI)에서는 1990년부터 5년 과제로 “항암 기능성 식물성분(phytochemicals)” 연구를 수행하면서 암 예방 성분을 많이 함유한 식품 즉 “designer food”의 개발을 연구 목표의 하나로 포함하였음. 미국 보건원의 기능성식품 관련연구 예산은 94년까지도 없었으나 이후 98년까지 3,000만불 수준으로 증가하였으며, 관련 논문은 94년 약 200편에서 98년 약 3,000편으로 5년간 약 15배 급 성장하였음.
- 일본 : 어느 나라보다 먼저 기능성 식품 관련 연구가 국책연구로 시작되고, 대학, 연구소, 산업체 등에서 연구가 활성화 되어 이루어 지고 있음. 기능성식품 관련 연구는 1984년부터 1994년까지 3단계에 걸쳐 문부성특정연구의 형태로 수행되었음. 제 1단계 연구가 진행되면서 식품의 제 3차 기능에 역점을 둔 “기능성 식품”이란 용어가 시작되었고, 1990년 “기능성 식품” 대신 “특정보건용 식품” 이라는 용어가 제시되었다. 이 “특정보건용 식품”은 영양 개선법 제 12조에 반영되어 1991년부터 시행되었는데 2001년에 특정보건용 식품과 영양기능성식품을 망라하는 보건기능 식품 제도로 통합되어 운영되고 있음. 특정보건용 식품은 각각의 품목을 허가 받는 개별 허가형 제품인데 2001년의 시장규모는 224개 품목에 2,000억엔 정도이다. 일본에서 상업화되고 있는 기능성 식품 소재로서는 식이섬유, 올리고당, 당 알코올, 다가불포화지방산, 펩타이드 및 단백질, 배당체, 비타민류, 기타 식물성분, 미네랄류 등이 있음.
- 유럽: 각 나라마다 규정이 달라 EU 차원에서 통일된 기능성 식품 규정은 없으나 많은 검토를 진행중에 있음. 현재 EU에서 개발되어 제품화 된 기능성 식품 소재로는 오메가-3 지방산 / 어유, 요구르트, 유산균, 올리고 과당, 식물성 스테롤, 식이섬유 등이 있음.

제 3 절. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 본 연구과제는 으름의 활성성분을 동정하고 다양한 생리활성을 갖는 으름을 소재로 하여 본 과제를 통해 확립된 방법을 통하여 제조한 추출물의 항산화·항염증 활성을 검색하여 추출물 및 활성성분의 암 예방 기능성 소재로서의 가능성을 제시하는 학문 및 산업적 활용 기반을 한 단계 심화시키는 연구임.
- 으름은 이미 잎과 덩굴, 그리고 열매를 이용하고 있으며 본 연구를 통하여 항산화 및 항암 등의 기능성이 증명된다면, 국내 작물이 고부가가치 소재로 발돋움 하여 농가 소득증대에 기여할 수 있으리라 예상됨.
- 또한 이는 본 과제를 통해 확립된 기술을 다른 작목 개발로의 활용을 유도하여 고령화 / 선진화 / 세계화에 들어서 있는 국내 시장에 수입의존도 탈피 및 미활용 식물자원 활용에 의한 고부가가치화 상품의 생산이라는 발전으로 이어질 수 있을 것으로 예상됨. 산업적으

로는 웰빙 시대에 부합하는 건강 지향 nutraceutical 시장의 확대가 더욱 가속화될 것으로 예상됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 주요 연구 내용

- 으름을 이용한 시장 현황 조사
- 새로운 으름 관련 주류 및 음료 제품의 기존 기능성 제품 시장에 대한 영향 분석
- 원료의 대량 추출조적 확립 및 최적 추출 공정법을 수립함.
- 원료 수급(열매, 어린잎, 으름덩굴잎) 확보와 장기 저장시 안정성 평가와 장기 저장시 안정성 평가
- 으름을 이용한 기능성 음료 시제품 개발
- 으름을 이용한 음료의 저장유통기간 설정 및 경제성 평가
- 으름을 이용한 음료 시제품 개발으름 적용 제품 품질 개선
- 으름음료의 지표물질의 함유량을 결정함
- 으름(열매, 어린잎, 으름덩굴잎)의 원료 validation 평가 및 대량 추출 시 최적 추출공정 확인 분석함
- 대량 생산의 표준화를 위한 으름 추출 최적 조건 분석 평가함.
- 국내 자생 으름(열매, 어린잎, 으름덩굴잎)을 이용한 용매별에 따른 추출 조건 탐색
- 국내 자생 식물 으름에서 oleanolic acid 및 triterpenoide 조건 탐색
- oleanolic acid 및 triterpenoide 의 세포주를 이용한 NO 억제 활성 및 활성 산소종 억제 물질 활성 분석
- 기타 triperpenoide 추출 조건 확립
- oleanolic acid 및 triterpenoide 지표물질의 이화학적 안전성 개선
- 으름에서 정제된oleanolic acid 와 hederagin 의 이화학적 안정성 평가 분석 (온도, 산도 안정성 평가)
- 으름 지표물질의 항산화 활성을 확인하기 위한 동물실험
- 으름의 간기능 보호 효과 검증을 위한 in-vivo 연구
- 실험동물을 대상으로 알콜성 간손상에 의한 으름의 간기능 보호에 대한 연구를 수행, 또한 최적 생리활성 농도 검증 및 독성테스트를 시행 하여 안전성 검증
- 간암세포주, 일반간세포주 및 초대배양 간세포의 비교를 통한 으름의 간기능 보호 작용 메커니즘 구명
- In-vitro 실험에서 밝혀진 간기능 보호 기전의 in-vivo 적용 및 최적의 으름 생리활성 농도 검증
- 으름의 간기능 보호 효과 검증을 위한 in-vitro 연구
- 으름 추출물이 간보호효과에 대한 연구를 in-vitro를 통해 구명
- 숙취해소 기능 확인을 위한 인체 적용 실험
- 개발된 으름음료와 현재 시판 되고 있는 숙취 해소 음료간의 비교 실험을 전임상실험을 통해 검증

제 2 절 과제별 (세부 · 협동) 연구 개발 수행 방법

[1]. 1세부: 으름을 이용한 음료 개발(우리술)

1. 1차년 연구개발 수행방법

(1) 으름을 이용한 시장 현황 조사

국회도서관 , NTIS 검색, 특허청 검색

(2) 새로운 으름 관련 음료 제품의 기존 기능성 제품 시장에 대한 영향 분석

국회도서관 , NTIS 검색, 특허청 검색

(3) 원료의 대량 추출조적 확립 및 최적 추출 공정법을 수립함.

건조된 으름의 덩굴, 잎, 열매(30g)를 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water(300g)에 섞어 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (rpm 200, temp 25℃) 24시간 shaking 한 후 filter paper(Whatman)로 여과하여 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water에 대한 분획물을 얻었다. 이를 rotary vacuum evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였다. 농축된 시료를 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water 용매를 농축된 시료에 넣어 농축된 시료를 채취 한 후 vial에 넣고 -70℃ 초저온냉동고 (Ilshin Co., deep freezer)에 1시간 냉동시킨 후 동결건조기(Ilshin Co., freezering dryer)에 동결건조 하였음.

(4) 색도 및 외관 관찰 미생물 검사

- ① 으름 잎으로 상온 저장, 냉장 저장, 냉동 저장
: 1, 3, 6개월 관찰, 생 잎과 건조분말도 관찰
- ② 으름 열매로 상온 저장, 냉장 저장, 냉동 저장
: 1, 3, 6개월 관찰, 생 열매와 건조분말, 냉동 건조 관찰
- ③ 으름 덩굴로 상온 저장, 냉장 저장, 냉동 저장
: 1, 3, 6개월 관찰, 생 줄기와 건조분말도 관찰

(5) pH측정, 산가 함량 측정 알코올 함량 측정, 총당 함량측정, 총균수 측정, 관능검사

① pH측정은 conical tube에 여과한 시료 5 mL 넣어 pH meter(HI 8014, Hanna Instruments, Keysborough, Australia)로 총 3회 측정하였음.

② 산가 함량 측정은 국세청의 주류분석규정에 명시된 내용으로 하였음. 여과한 시료 10 mL에 1% phenolphthalein (Daejung chemicals & Metals Co., LTD., Gyeonggi, Korea) 지시약을 2~3방울 첨가한 후 0.1N NaOH용액(Daejung chemicals & Metals Co.)을 담홍색이 나타날 때까지 적정하여 적정 소비량을 측정한 후 시료중의 총산을 초산함량(%)으로 환산하였음.

③ 알코올 함량 측정은 메스실린더에 시료 100 mL를 취한 후 500 mL 삼각플라스크에 옮긴 후에 증류수 10 mL를 3회 나누어 시료를 담았던 100 mL 메스실린더에 씻은 후 그 액을 500 mL 삼각플라스크에 합친 후 알코올 함량을 측정하였다. 증류액이 70 mL가 되면 중지하고 증류수 30 mL를 보충하여 메스실린더 눈금이 100 mL가 되도록 정용한 후 잘 흔들어 20℃로 온도를 맞추어 주정계로 측정한 후 주류분석법표에 의거하여 환산하였음.

④총당 함량측정은 phenol-sulfuric acid법으로 측정하였음. 알콜 발효 시료 1 mL을 정용 플라스크에 넣고 증류수로 1000배 희석한 후 Vial에 2 mL을 취한 후 5% phenol(Daejung Chemicals & Metals Co.)용액 1 mL를 넣고 혼합 시켰다. 여기에 95% sulfuric acid(Daejung Chemicals & Metals Co.) 5 mL 천천히 가하여 발열시킨 후 30분 동안 상온 방치한 다음 Spectrometer (Genesys 10-S, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였음. 당 정량은 glucose를 표준물질로 사용하여 standard curve으로 환산

⑤ 총균수 측정은 막걸리 시료를 균일하게 섞어 1 mL을 멸균한 생리 식염수에 10진 희석법에 따라 희석하고 희석된 시료 1 mL 와 plate count agar (pancreatic digest of casein 5.0 g, yeast extract 2.5 g, dextrose 1.0 g, agar 15.0 g, distilled water 1.0 L ; Difco Co., MI USA) 20 mL를 petri dish에 균일하게 잘 혼합한 후 37°C에서 24-48시간 동안 배양하여 총균수를 계수하였다.

⑥ 관능검사는 색, 단맛, 신맛, 쓴맛, 향, 묵념감, 전반적 기호도 의 항목으로 7점 척도법으로 서울과학기술대학교 학생 20명을 선정하여 실시하였다.

2. 2차년 연구개발 수행방법

(1) 으름음료의 지표물질의 함유량을 결정

①총 폴리페놀 및 총 플라보노이드, 탄닌 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-ciocalteu법에 의해 725 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로는 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량선에 근거하여 추출물 100 g당 mg gallic acid equivalent (GAE, dry basis)로 총 폴리페놀의 함량을 산출하였다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등과 Zou 등의 방법에 따라 510 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준곡선 작성에는 catechin (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였고, 시료의 총 플라보노이드 함량은 mg catechin equivalents (CE)/100 g로 나타내었다. 탄닌 함량은 AOAC방법에 의해 725 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준곡선 작성에는 tannin acid (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였고, 총 탄닌 함량은 mg tannin acid equivalent (TAE)/100 g로 나타내었다.

② hederagin 분석

HPLC 분석

(2) 으름잎 식초음료베이스, 으름열매 식초 음료베이스 제조

① 으름열매 식초음료 베이스 실험재료

본 실험에서는 쌀(전라남도 나주), 누룩(부산광역시 금정구 금성동), 엿기름(경기도 김포시 통진읍)에서 제조된 것을 구입하여 사용하였다. 성숙한 으름 열매를 충남 홍성군 광천읍 오서산에서 채취된 것을 구입, 동결 건조하여 사용하였다. 종초는 *Acetobacter pasteurianus*를 실험실에서 배양하여 사용하였으며, 미리 액체배지에 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 72시간 정치배양 시켰다.

② 어린 으름잎 식초음료 베이스 실험재료

재료는 지리산 함평지역에서 채취한 으름 어린잎을 깨끗이 수세하여 세정 및 세절하여 자연건조 후 마쇄하여 실험에 사용하였고, 쌀(전라남도 나주), 누룩(부산광역시 금정구 금성동), 엿기름(경기도 김포시 통진읍)은 제조된 것을 구입하여 사용하였다. 종초는 *acetobacter pasteurianus*를 실험실에서 배양하여 사용하였고 미리 액체배지에 2% (v/v)접종하여 37°C에서 72시간 정치배양 시켰다.

(3)으름잎식초 음료베이스, 으름열매 식초 음료이학적 성분측정

①pH, 총산함량 및 알코올 함량 측정

pH 측정은 pH meter(HI 8014, Hanna Instruments, Keysborough, Australia)로 총 3회 측정하였고,

총산 함량은 초산 발효액 1 mL를 취하여 0.1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH(Daejung, Siheung, Gyonggido, Korea)로 적정한 후 acetic acid(%)로 환산하여 나타내었다. 알코올 함량은 시료 100 mL에 증류수 30 mL를 가하고 증화한 후 증류하여 100 mL를 받아서 비중계로 15°C에서 알코올 함량을 측정하였다.

② 총당 함량 및 아미노산 함량 측정

총당 함량측정은 phenol-sulfuric acid법으로 측정하여(33), spectrometer(Genesys 10, Thermo spectronic, NY, USA)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 당 정량은 glucose를 표준물질로 사용하여 표준 곡선에서 환산하였다. 아미노산 함량은 시료 10 mL에 formalin(Daejung) 용액 5 mL를 가하고, 0.1 N NaOH (Daejung) 용액으로 적정하여 시료 중의 아미노산을 glycine으로 측정하였다.

③ 색도

색도 측정은 색차계(CR-400, Konica Minolta, Osaka, Japan)를 이용하여 측정하여, L(명도, lightness), a(적색도, redness), b(황색도, yellowness)값으로 나타내었다.

④ 관능검사

관능검사는 색, 단맛, 신맛, 쓴맛, 향, 묵념감, 전반적 기호도의 항목으로 7점 척도 법으로 서울과학기술대학교 학생 20명을 선정하여 관능평가를 실시하였다.

(4) hederagin, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드, 탄닌 측정

① hederagin 분석

HPLC 분석

② 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드, 탄닌 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-ciocalteu법에 의해 725 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로는 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량선에 근거하여 추출물 100 g당 mg gallic acid equivalent (GAE, dry basis)로 총 폴리페놀의 함량을 산출하였다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등과 Zou 등의 방법에 따라 510 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준곡선 작성에는 catechin (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였고, 시료의 총 플라보노이드 함량은 mg catechin equivalents (CE)/100 g로 나타내었다. 탄닌 함량은 AOAC방법에 의해 725 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준곡선 작성에는 tannin acid (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였고, 총 탄닌 함량은 mg tannin acid equivalent (TAE)/100 g로 나타내었다.

(5) 음료베이스 최적조건의 음료베이스를 선택 시제품 3종

관능검사는 색, 단맛, 신맛, 쓴맛, 향, 묵념감, 전반적 기호도의 항목으로 7점 척도 법으로 일반인 100명을 선정하여 관능평가를 실시함.

[2] 1 협동: 으름의 유효 성분 추출 동정 통한 지표물질 개발 및 oleanolic acid 및 triterpenoide 성분의 이화학적 안전성 확보를 통한 제품기술개발

1. 1차년 연구개발 수행방법

(1) 용매별 추출과 활성 물질을 확인하면서 분리 정제

건조된 으름의 덩굴, 잎, 열매(30g)를 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water(300g)에 섞어 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (rpm 200, temp 25°C) 24시간 shaking 한 후 filter paper(Whatman)로 여과하여 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol,

chloroform, hexane, water에 대한 분획물을 얻었다. 이를 rotary vacuum evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축 하였다. 농축된 시료를 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water 용매를 농축된 시료에 넣어 농축된 시료를 채취 한 후 vial에 넣고 -70℃ 초저온냉동고 (Ilshin Co., deep freezer)에 1시간 냉동시킨 후 동결건조기(Ilshin Co., freezing dryer)에 동결건조 하였음.

(2)활성 측정 은 MTT, DPPH, NO , 항균활성을 이용 분리 정제함.

① Cytotoxicity assay:3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT test)는 살아있는 미토콘드리아 내 탈수소효소가 노란색의 수용성물질인 MTT에 의해서 formazan 으로 전환된 양을 나타내며, 생존하는 세포수와 비례함. 5×10^4 cells/ml의 세포가 분주된 96well plate를 24시간 배양 후, drug를 처리하고 24시간을 추가로 배양함. 그 후 각 well에 MTT용액을 (5mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 배양하였음. 그 후 배양액을 제거한 후, 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 Elasa reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였음. 이 때 측정된 흡광도는 생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 전환된 양을 나타내며 생존하는 세포수와 비례함.

② Free radical-scavenging activity (DPPH):항산화 반응은 활성산소 제거능을 관찰할 수 있는 DPPH 방법을 사용하여 관찰하였음. 시료에 0.2 mM DPPH solutions을 200 μ L 넣어 혼합 후 37℃, 30분간 암반응시킴. 그 후 그 혼합물의 흡광도를 microplate reader를 사용하여 520nm에서 측정한다. DPPH 활성은 반응시키지 않은 DPPH solution을 기준으로 하여 활성을 계산함.

③ Nitric Oxide (NO) assay:NO 측정은 cell의 supernatant에서의 nitric oxide(NO)의 양을 nitrite and nitrate로서 측정을 하였음. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent를 사용하였으며, 96 well plate에 1×10^6 개의 cell을 confluence가 80% 일 때, PBS로 2번 washing한 후에 무혈청 배지로 교체 후 LPS, L-arginine, tetrahydrobropterin, IF-N-r를 well에다 넣어서 자극시켰음. 그 배지에 시료를 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였음.

④ 분리정제 : 건조된 으름열매(10kg)에 methanol (100L)을 한 달간 상온에서 방치 후 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (200 rpm, 25℃) 24시간 shaking 한 후 filter paper (Whatman)에 여과하여 methanol의 분획물을 얻었고, 이를 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음. 농축된 methanol 추출물을 methanol에 재용해하고 다시 이를 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음. 농축한 methanol 추출물에 활성을 확인하였고 ethyl acetate, n-butanol, water층으로 나누어 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (200 rpm, 25℃) 24시간 shaking 한 후 filter paper(Whatman)로 여과하여 얻은 ethyl acetate, n-butanol, water층을 다시 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음

(3)oleanolic 분리정제, TLC와 HPLC 분리 정제

동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출하였다. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리하였다. 그 중 butanol 가용부 (20g)을 5% HCl(MeOH/H₂O)에 4시간동안 가수분해를 시킨다. 그 혼합물을 eathyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척을 한다. 그 혼합물을 silica gel(450-580mesh)을 사용하여 분리한다. 활성이 있는 ethyl acetate 추출물 시료를 silica gel(25g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck, Germany)을 ethyl acetate로 column (1.5×30 cm)에 충전 시킨 후, hexane 100, hexane : ethyl acetate 80 : 20, hexane : ethyl acetate 70 : 30, hexane : ethyl acetate 50 : 50, methanol 으로 층을 나누어 분획하였다. 이후 항균력이 가장 좋은 fraction 80:20(v/v), 50:50(v/v)을 TLC에서 다시 분리하였음. TLC분리 전개용매는 80:20

은 hexane-ethyl acetate(3:1), 50:50은 hexane-ethyl acetate(3:2)로 전개하였다. 이 중 80:20은 1~4 fraction, 50:50은 A~C fraction으로 나누어 활성을 확인하였음. 분리한 샘플은 AM1(80:20 1), AM2(80:20 2), AM3(80:20 3), AM4(80:20 4), AMA(50:50 A), AMB(50:50 B), AMC(50:50 C)으로 나누어 활성 실험 한 후 활성이 나타난 fraction을 HPLC 하였음

(4) 온도, pH 변화에 따른 활성 측정

① oleanolic과 hederagenin 온도별 :-70, -20, 4, 25, 60°C에 24시간 저장 후 항산화 활성(DPPH)을 관찰

② oleanolic과 hederagenin pH 변화에 따른 활성 측정

: 산, 알칼리로 pH를 맞춘 후 2시간 반응 시킴 그 후 다시 중성으로 pH로 전환하여 항산화 활성을 측정함.

③ Free radical-scavenging activity (DPPH): 항산화 반응은 활성산소 제거능을 관찰할 수 있는 DPPH방법을 사용하여 관찰하였음. 시료에 0.2 mM DPPH solutions을 200 µL 넣어 혼합 후 37°C, 30분간 암반응시킴. 그 후 그 혼합물의 흡광도를 microplate reader를 사용하여 520nm에서 측정한다. DPPH 활성은 반응시키지 않은 DPPH solution을 기준으로 하여 활성을 계산함.

(5) 메탄올, 물추출물의 항산화 활성, 항암활성 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

Free radical-scavenging activity (DPPH): 항산화 반응은 활성산소 제거능을 관찰할 수 있는 DPPH방법을 사용하여 관찰하였음. 시료에 0.2 mM DPPH solutions을 200 µL 넣어 혼합 후 37°C, 30분간 암반응시킴. 그 후 그 혼합물의 흡광도를 microplate reader를 사용하여 520nm에서 측정한다. DPPH 활성은 반응시키지 않은 DPPH solution을 기준으로 하여 활성을 계산함.

2. 2차년 연구개발 수행방법

(1) oleanolic acid 분리 정제 및 NO 억제실험과 RAW 세포에서의 oleanolic acid 세포독성 활성산소종 억제 물질 활성분석

① oleanolic 분리정제

동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출하였다. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리하였다. 그 중 butanol 가용부 (20g)을 5% HCl(MeOH/H₂O)에 4시간동안 가수분해를 시킨다. 그 혼합물을 ethyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척을 한다. 그 혼합물을 silica gel(450-580mesh)을 사용하여 분리한다.

② Nitric Oxide (NO) assay: NO 측정은 cell의 supernatant에서의 nitric oxide(NO)의 양을 nitrite and nitrate로서 측정을 하였음. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent를 사용하였으며, 96 well plate에 1×10⁶개의 RAW 264.5 cell을 confluence가 80% 일 때, PBS로 2번 washing한 후에 무혈청 배지로 교체 후 LPS, L-arginine, tetrahydrobiopterin, IFN- γ 를 well에다 넣어서 자극시켰음. 그 배지에 시료를 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였음.

③ 세포독성실험 Cytotoxicity assay: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT test)는 살아있는 미토콘드리아 내 탈수소효소가 노란색의 수용성물질인 MTT에 의해서 formazan 으로 전환된 양을 나타내며, 생존하는 세포수와 비례함. 5×10⁴cells/ml의 세포가 분주된 96well plate를 24시간 배양 후, drug를 처리하고 24시간을 추가로 배양함. 그 후 각 well에 MTT용액을 (5mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 배양하였음. 그 후 배양액을 제거한 후, 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 Elasa reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였음. 이 때 측정된 흡광도는

생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 전환된 양을 나타내며 생존하는 세포수와 비례함.

④세포사멸

apoptosis 분석을 위하여 BD Pharmingen의 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 제품을 사용하여 측정하였다. 실험은 제공된 제조사의 실험방법에 따라 진행되었다. 시료 처리 후 24시간된 세포를 차가운 PBS를 사용하여 두번 세척한다. 그리고 1X binding buffer에 1×10^6 cell/ml로 세포를 분산시킨다. 세포를 분산시킨 용액 100ul (1×10^5 cells)을 5ml 실험관에 옮긴다. 여기에 5ul의 FITC Annexin V와 5ul PI용액을 넣어 준다. 가볍게 혼합시켜준 후, 15분간 암실에서 반응시킨다. 400ul의 binding buffer를 추가하여 flow cytometry를 사용하여 분석하였다.

⑤ 단백질 발현-western blotting

세포를 5x10⁵/6 well plate에 plating 한 후 RPMI과 10% FBS를 이용하여 5% humidity CO₂ chamber에서 키움. 1×10^6 개의 세포가 되면 시료를 투입함. 24시간 후 자성에 끌려온 세포와 바닥에 있는 세포를 각각까지 전부 harvest하여 microtube에 옮긴 후 나머지 세포는 2X lysis buffer [250 mM Tris-Cl (pH 6.5), 2% SDS, 4% β -mercaptoethanol, 0.02% BPB, 10% Glycerol]를 넣어 세포를 깨고, 10~15 polyacrylamide gel를 이용하여 분리함.

polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Millipore, Branford, MA)으로 transfer한 후 5% 탈지분유를 이용하여 blocking한 후 TTBS buffer에 일차항체를 1,000:1~2,000:1 비율로 넣은 후 12시간 냉운에서 결합시킨다. 이차항체 붙인 후 chemiluminescence 로 발색하여 X-ray 필름으로 감광시킴.

(2) 분리정제와 HPLC를 통해서 hederagin 분리 활성 측정 은 세포사멸, MTT, 세포주기 분석

① 분리정제 : 건조된 으름열매(10kg)에 methanol (100L)을 한 달간 상온에서 방치 후 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (200 rpm, 25°C) 24시간 shaking 한 후 filter paper (Whatman)에 여과하여 methanol의 분획물을 얻었고, 이를 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음. 농축된 methanol 추출물을 methanol에 재용해하고 다시 이를 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음. 농축한 methanol 추출물에 활성을 확인하였고 ethyl acetate, n-butanol, water층으로 나누어 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (200 rpm, 25°C) 24시간 shaking 한 후 filter paper(Whatman)로 여과하여 얻은 ethyl acetate, n-butanol, water층을 다시 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음

② HPLC에서 oleanolic acid 분리 정제 하였음 . mobil phase는 acetonitrile: water =50:50 용매를 사용하여 분리 정제함.

③세포독성실험 Cytotoxicity assay:3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT test)는 살아있는 미토콘드리아 내 탈수소효소가 노란색의 수용성물질인 MTT에 의해서 formazan 으로 전환된 양을 나타내며, 생존하는 세포수와 비례함. 5×10^4 cells/ml의 세포가 분주된 96well plate를 24시간 배양 후, drug를 처리하고 24시간을 추가로 배양함. 그 후 각 well에 MTT용액을 (5mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 배양하였음. 그 후 배양액을 제거한 후, 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 Elasa reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였음. 이 때 측정된 흡광도는 생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 전환된 양을 나타내며 생존하는 세포수와 비례함.

④세포사멸

apoptosis 분석을 위하여 BD Pharmingen의 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 제품을 사용하여 측정하였다. 실험은 제공된 제조사의 실험방법에 따라 진행되었다. 시료 처리 후 24시간된 세포를 차가운 PBS를 사용하여 두번 세척한다. 그리고 1X binding buffer에 1×10^6 cell/ml로 세포를 분산시킨다. 세포를 분산시킨 용액 100ul (1×10^5 cells)을 5ml 실험관에 옮긴다. 여기에 5ul의 FITC Annexin V

와 5ul PI용액을 넣어 준다. 가볍게 혼합시켜준 후, 15분간 암실에서 반응시킨다. 400ul의 binding buffer를 추가하여 flow cytometry를 사용하여 분석하였다.

⑤ 세포주기 분석

시료를 24시간 처리한 세포를 2000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 70% 에탄올로 4℃에서 1시간 동안 고정시킨다. PBS로 두번 세척한 후 300ul의 Propidium iodid staistain 용액에 세포를 분산시킨 후 37℃ 암실에서 30분간 방치하고 flow cytometry를 사용하여 세포주기를 분석하였다.

(3) TLC와 HPLC 분리 정제 NMR, FAB-MS 구조 분석

새로운 물질 동정 동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출하였다. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리하였다. 그 중 butanol 가용부 (20g)을 5% HCl(MeOH/H₂O)에 4시간동안 가수분해를 시킨다. 그 혼합물을 eathyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척을 한다. 그 혼합물을 silica gel(450-580mesh)을 사용하여 분리한다. 활성이 있는 ethyl acetate 추출물 시료를 silica gel(25g, 70~230 mesh, column chromatography 용, Merck, Germany)을 ethyl acetate로 column (1.5×30 cm)에 충전 시킨 후, hexane 100, hexane : ethyl acetate 80 : 20, hexane : ethyl acetate 70 : 30, hexane : ethyl acetate 50 : 50, methanol 으로 층을 나누어 분획하였다. 이후 항균력이 가장 좋은 fraction 80:20(v/v), 50:50(v/v)을 TLC에서 다시 분리하였음. TLC분리 전개용매는 80:20은 hexane-ethyl acetate(3:1), 50:50은 hexane-ethyl acetate(3:2)로 전개하였다. 이 중 80:20은 1~4 fraction, 50:50은 A~C fraction으로 나누어 활성을 확인하였음. 분리한 샘플은 AM1(80:20 1), AM2(80:20 2), AM3(80:20 3), AM4(80:20 4), AMA(50:50 A), AMB(50:50 B), AMC(50:50 C)으로 나누어 활성 실험 한 후 활성이 나타난 fraction을 HPLC 하였음. C-NMR, H-NMR, FAB-MS 분석

(4) 에탄올, 물추출물 분리정제 조건

-활성이 있는 ethyl acetate 추출물 시료를 silica gel(25g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck, Germany)을 ethyl acetate로 column (1.5×30 cm)에 충전 시킨 후, hexane 100, hexane : ethyl acetate 80 : 20, hexane : ethyl acetate 70 : 30, hexane : ethyl acetate 50 : 50, methanol 으로 층을 나누어 분획하였다. fraction 별 추출 수율은 표 1과 같음. fraction 추출 수율은 비스한 지만 활성을 뚜렷한 차이를 보였음. 이후 활성이 가장 좋은 fraction 80:20(v/v), 50:50(v/v)을 TLC에서 다시 분리하였음

(5)에탄올, 물추출물의 항산화 활성, 항암활성 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 hederagin 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법(Singleton & Rossi. 1965)을 변형하여 측정하여, 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, 추출물 g당 mg gallic acid equivalent (GAE, dry basis)로 총 폴리페놀의 함량을 산출하였다. 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등과 Zou 등의 방법에 따라 측정하여, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선 작성에는 catechin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였고, 총 플라보노이드 함량은 mg catechin equivalents (CE)/100 mL로 나타내었다. 탄닌 함량은 AOAC방법에 따라 측정하여, 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선 작성에는 tannin acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였고, 탄닌 함량은 mg tannin acid equivalent (TAE)/100 g으로 나타내었다.

hederagin 분석:HPLC

(6)ABST라디칼 소거능 측정세포독성실험(MTT assay)항균활성 SOD 유사활성환원력 측정

①SOD 유사활성

SOD 유사활성 측정은 Marklund S와 Marklund G(40)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료에 pH

8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris amino- methane+10 mM EDTA, pH 8.5)와 7.2 mM pyrogallol을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl를 가하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 대조군의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

② 환원력 측정

환원력은 시료에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide를 각각 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후 1% trichloroacetic acid (w/v)를 가하여 원심분리한 후 상정액에 증류수, 0.1% ferric chloride 용액을 넣어 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며 L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 양성대조군으로 사용하여 나타내었다(41).

③ ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Arano 등(37), Re 등(38)의 방법을 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 결과 값은 추출물 첨가구와 대조군을 비교하여 라디칼의 소거활성을 백분율(%)로 나타내었다.

④ 세포독성실험(MTT assay)

세포독성실험(MTT assay)은 Lee 등(28)의 방법을 이용하여 종양 세포 5×10⁴ cells/mL의 세포가 분주된 96 well plate를 24시간 배양 후, 시료를 5 mg/mL로 처리하고 24시간을 추가로 배양하였다. 그 후 각 well에 MTT용액(Genetrone biotech, Gwangmyong, Gyonggido, Korea) 5 mg/mL을 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 제거한 후, 생성된 formazan 결정을 DMSO (Biosesang, Sungnam, Gyonggido, Korea)에 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 측정된 흡광도는 생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 전환된 양을 나타내며 생존하는 세포수와 비례 하다.

⑤ 항균활성

Plate Count Agar (pancreatic digest of casein 5.0 g, yeast extract 2.5 g, dextrose 1.0 g, agar 15.0 g, distilled water 1.0 L: Difco) 20 mL를 petri dish에 균한 다음 36°C 인큐베이터(Lab. Companion, Kimpo, Gyonggido, Korea)에서 24시간 동안 배양된 Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella enterica subsp, Shigella flexneri, Klebsiella pneumoniae 각각의 균들을 100 µL 씩 도말한 후 paper disk (8 mm)를 배지위에 놓고 그 위에 증류수 1 mL에 동결 건조된 식초 100 mg을 녹여 40 µL를 주입하였다. 36°C 인큐베이터에서 24시간 배양한 후 paper disk주위에 생기는 clear zone의 생성유무를 확인하였다.

3. 3차년 연구개발 수행방법

(1) 으름식혜 제조

물 1L에 고두밥 250g을 끓였다. 그리고 물 5L와 1% 으름가루를 첨가하여 100°C에 1시간동안 끓여 으름식혜(AS)를 만들었다.

(2) 혼합음료제조

혼합음료제조는 물 5L에 으름 열매 1%와 대추 1%, 감초 0.4%를 넣어 끓였다. 식힌 후 4°C에 보관하였다.

(3) 으름가루 혼합음료 제조

으름가루 혼합음료의 제조는 물 5L에 동결건조 시킨 으름 열매 가루 1%와 대추 1%, 감초 0.4%를 넣어 끓이고 식힌 후 4°C에 보관하였다.

(4) 으름잎차 제조

물 5L에 건조시킨 으름 잎을 1% 넣어 끓인 후 식혀 4°C에 보관하였다.

(5) 으름음료의 안전성 평가방법

으름열매가루 혼합음료, 으름열매 혼합음료, 식혜를 제조하여 건국대학교 글로벌 캠퍼스를 다니는 20

대 학생 160명을 대상으로 관능검사를 실시하였다. 학생들에게 질감, 향, 색, 단맛, 신맛, 쓴맛을 7점 척도로 설문조사 하였다.

(3) 실험동물

Wistar rat 수컷 5~6주령을 사용하여 동물 실험을 실시하였다. 실내온도는 21~22°C, 12시간마다 실내등을 조절하였다. 군 (n=6)을 정상군, 25% 알코올만 경구투여한 군, 25% 알코올을 경구투여 한 후 혼합음료를 먹인 군 으로 나누었다. 경구투여한 후 혼합음료와 식혜를 자유롭게 먹도록 하였다. 21일간 실험 후 하루 공복시킨 후에 혈액을 심장으로로부터 채취하였다. 그리고 centrifuge에 3500rpm, 30분 동안 돌려서 분리시켜 plasma를 얻었다.

(4) 간 조직 형상

간 조직을 10%포름알데하이드에 고정시킨 후 파라핀 포매하였다. 5um두께 절단 후 박절편을 만들고 Hematoxylin-Eosin (H&E)로 염색하여 간 조직 손상 정도를 관찰하기 위해 100 × 배율에서 광학 현미경을 사용하였다.

(5) 혈청 효소 활성 측정

AST 와 ALT는 Reitman-Frankel의 방법에 따라 AST/ALT kit(ASAN PHARM. Co., LTD.,Seoul, Korea)를 사용하였다. Total cholesterol은 TC kit(Sigma, St. Louis, MO)를 사용하였고 triglyceride는 TG kit(Sigma, USA)를 사용하였다

(6) 으름식혜와 알코올 섭취 후 음주측정

건국대학교 글로벌 캠퍼스를 다니는 나이 평균 20세인 학생 남녀 10명씩을 대상으로 음주 실험을 실시하였다. 시간에 따라 호흡 중 알콜 농도를 측정해보았다. 실험을 두 번으로 나누어 실험을 실시하였는데 한번은 19 % 알코올 360 ml를 마시기 전에 물을 200 ml를 마시고 음주 한 후 의 알코올 농도를 측정하였고, 다른 한번은 19 % 알코올 360 ml를 마시기전에 으름 식혜(AS) 200 ml를 마시고 음주 한 후 의 알코올 농도를 측정하였다. 여자와 남자의 결과로 나누어서 그래프로 비교해보았다. 그리고 학생들에게 숙취정도를 7점 척도로 설문조사를 하였다.

(7) 세포배양

RAW 264.7(대식세포) 세포주를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin(GIBCO,Grand Island, NY, USA)과 10%의 fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT)이 함유된 DMEM 배지(Welgene,Dalseogu, Daegu, Korea)를 사용하여 37oC, 5% CO2 항온기에서 배양하였다.

(8) hederagein 분리 정제 및 확인

Hederagein 동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출하였다. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리하였다. 그 중 butanol 가용부(20g)을 5% HCl(MeOH/H2O)에 4시간동안 가수분해를 시킨다. 그 혼합물을 eathyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척을 한다. 그 혼합물을 silica gel(450-580mesh)을 사용하여 분리한후 HPLC C18 column을 이용하여 분리하여 정제 하였다. 그결과 oleanolic acid 와 hedragenin성분을 분리 추출 정제 하였다.

(9) Nitric Oxide(NO) assay

대식세포주인 RAW 264.7 세포로부터 일산화질소 생산의 지표로서 배양 상층액 내에 안정된 NO 산화물인 NO2를 Griess 반응으로 측정하였다(Murakami et al., 2000). 96well plate에 1×106개의 cell을 PBS로 2번 수세한 후에 무혈청 배지(Welgene)로 교체 후 LPS(20 µg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), tetrahydrobiopterin (BH4, 10 µg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,USA), 200

mM l-arginine(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 그리고 IFN- γ (100 U/mL, Sigma-Aldrich Co.,St. Louis, MO, USA))을 각각의 well에다 첨가하여 자극시켰다. 그 배지에 시료를 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. 아래의 식에 따라 결과값을 계산하였다. 결과값 산출 후 세포에 대한 시료의 독성여부를 확인하기 위해 MTT solution(5 mg/ml, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용한 MTT assay를 사용하여 세포수를 측정하였다.[(compound Abs540-negative Abs540)/(positive Abs540-negative Abs540)] \times 100 (%)

(10) 실험동물

동물 실험의 모든 실험은 기관 동물 관리 및 사용 건국 대학교에서위원회 (IACUC 승인 번호 KU 15,057), 서울, 대한민국에서 승인 하였다. 5~6주령의 수컷 Wistar rats(오리엔트 바이오, 한국)를 연구에 사용 하였다. 일정한 조건의 (기온21 ° C-22 ° C, 명암주기 12시간, 70%습도) 환경에서 적응시켰으며 사료와 물을 자유급여 하였다. (1) 정상군, (2) 25 % 에탄올 (3) 25 % 에탄올 + hederagenin : 실험 동물은 세 개의 군으로 나누었다. 알코올성 간질환을 유발하기 위해 21 일간의 25%알코올 1ml을 경구 투여 하였다. 21 일 후 개복 전 16 시간 동안 금식시켰으며 마취 후 개복하여 심장으로부터 혈액을 채취하였으며 간, 신장, 비장을 적출하였다. 채취한 혈액은 30 분간 3000 rpm에서 원심 분리 후 혈장을 분리하여 분석에 사용하였다. 시료 중량을 기록 후 -70 ° C에 냉동 보관 하였다.

(11) 간 조직 형상

간 조직을 10%포름알데하이드에 고정시킨 후 파라핀 포매하였다. 5 μ m두께 절단 후 박절편을 만들고 Hematoxylin-Eosin (H&E)로 염색하여 간 조직 손상 정도를 관찰하기 위해 100 \times 배율에서 광학 현미경을 사용하였다.

(12) 혈청 효소 활성 측정

AST 와 ALT는 Reitman-Frankel의 방법에 따라 AST/ALT kit(ASAN PHARM. Co., LTD.,Seoul, Korea)를 사용하였다. Total cholesterol은 TC kit(Sigma, St. Louis, MO)를 사용하였고 triglyceride는 TG kit(Sigma, USA)를 사용하였다

(13) RT-PCR

간조직에서의 RNA 분리는 Trizol용액을 이용하였으며 mRNA 발현 수준은 RT-PCR방법으로 측정하였다. cDNA는 first strand cDNA synthesis kit (18080-051, Invitrogen, MA, USA)을 사용하여 합성하였고 TaKaRa LA PCR kit (RR002A, Takara Bio, Shiga, Japan)을 사용하여 PCR 하였다. Primer는 GAPDH: 5' -ATCCCATCACCATCTTCCAG-3', 5' -CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3', ALDH2: 5' -GCTGTCAGCAAGAAAACATTC-3', 5' -CTTGTCAGCCAGCCAGCATAATA-3' 를 사용하였다.

[3] 2 협동 : 으름의 간 보호 기능 메커니즘 구명

1. 1차년 연구개발 수행방법

(1)으름의 항산화 및 간기능 보호기능 생체 구명

①실험동물 모델 구성

대조군, 알콜처리군, 알콜처리+으름 처리군(농도별)으로 실험 군 조성

②으름 추출물 처리에 따른 간보호 효과 검증

- 알콜 모델의 간손상 정도를 검증하기 위해 알아보기 위해 alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) 과 H & E, oil red O 염색법 시행
- 실험군의 항산화 물질인 GSH 농도 측정
- GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 측정
- 산화스트레스 마커인 NADPH oxidase 4 (NOX4) mRNA 발현 측정
- 염증반응 반응 마커인 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) mRNA 발현 측정

2. 2차년 연구개발 수행방법

(1)간보호 메커니즘 구명을 위한 세포 핵, DNA염색 방법 이용

간세포 및 간암세포의 세포의 증식 정도(BrDU or MTT assay)와 세포자살(Apoptosis) 여부를 Hochest 염색을 통한 DNA fragmentation을 이용하여 측정함

(2) 관련 유전자의 mRNA 발현, 최종 간보호 산물인 GSH 의 농도를 분석함

간세포 및 간암세포주의 glutathione (GSH) 농도를 측정하고 GSH 합성을 촉매하는 효소 (GCLC, GCLM, GSS)의 mRNA 및 단백질 발현 변화를 측정함으로써 으름 지표 물질의 직접적인 항산화 기작을 연구함

(3) 염증 및 ROS 지표의 mRNA 발현 분석

으름의 추출물의 염증 지표 유전자 및 ROS 지표 유전자 발현 비교 (TNF-α, NOX 유전자의 발현 분석)

(4)Micro arrays 분석

Micro array 분석을 통해 간기능 개선에 작용하는 유전자와 관련 단백질을 탐구하여 으름의 간보호기능에 대한 메카니즘 구명함

제 3 절 과제별 (세부 · 협동) 연구 개발 수행 결과

[1] 제1세부: 으름을 이용한 음료 개발 (주관기관: 우리술)

1. 1차년

(1) 으름을 이용한 시장 현황 조사

- 통계청 자료에 따르면, 국내 가공차 시장은 최근 10년간 연평균 성장률이 1995년부터 2006년까지의 연평균 성장률보다 증가하고 있으며, 2006년도 국내 가공차 생산량은 652,281톤으로 1995년의 8,622톤에 비해 35.9%가 증가하였고, 2002년도의 30,609톤에 비해 5.4% 증가하였음.
- 음료시장의 전반적인 경기침체에도 불구하고 이처럼 가공차 시장이 꾸준한 성장세를 보일 수 있었던 것은 가공차 시장 성장에 저해 요인으로 작용되었던 관능적인 면을 극복하기

위한 다양한 가공차의 개발과 건강에 대한 소비자들의 관심증대에 기인한 것으로 고려됨.

- 웰빙 풍조를 타고 탄산음료와 과즙음료 시장이 축소되고 있는 가운데 차(茶) 음료 시장 규모가 급속도로 커지고 있다. 음료 업계에 따르면 차 음료 시장은 2004년 600억원 에서 해마다 성장하여 매출 규모가 1천억원(2005년), 1천 900억원(2006년)으로 늘어났으며 2008년도에는 약 5천억원에 이를 것으로 전망됨.
- 반면 전체 음료 시장의 3분의 1가량을 차지하는 탄산음료는 시장규모가 2002년에 1조 2천 억원을 기록했으나 2005년에 1조 700억원, 작년은 9천 200억원대로 급감하였으며, 과즙음료 시장도 8천억원(2002년)에서 작년까지 6천억원으로 감소하였다. 하지만 앞으로 소비자들의 건강 선호 경향이 지속될 것으로 보이면서, 가공 차 제품개발 등 업체들의 노력여하에 따라 가공 차 음료시장의 지속적인 성장이 기대되는 바임.

(2) 새로운 으름 관련 음료 제품의 기존 기능성 제품 시장에 대한 영향 분석

- 으름은 황해, 이남 지방의 산과 들에서 재배되고 있다. 현재 으름은 온도, 습도에 민감하여 제품 생산에 많은 어려움이 있다고 한다. 대중화가 되어있지 않아 점점 잊혀져가는 추세이지만 황해, 이남 지방에서는 아직도 자연재배를 하고 있음. 생산보다 소비가 많아 가격이 비싸고 하우스 재배화가 되어있지 않아 제철과일로 10월에만 맛 볼 수 있음.
- 하우스 재배가 재대로 이루어 지지 않고 으름으로 한 제품들이 한약제로만 쓰이는 추세임. 으름은 모유분비촉진, 이뇨작용, 항암작용, 고혈압, 만성염증, 눈병 등의 질병들을 예방 할 수 있는 탁월한 능력을 가지고 있어 앞으로 으름의 대중화 및 산업화 가 이루어져 대표 과일로 상품화를 할 수 있다면 이 상품의 큰 효과를 누릴 수 있다고 보여짐.
- 국내 및 국외시장 분석결과 으름을 활용한 제품으로는 차(茶), 한약재가 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 전혀 활성화가 되지않고 오히려 감소하는 시점이므로, 본 연구과제에서는 으름의 항산화 활성 효과 방향으로 연구를 추진하여 으름을 이용한 기능성 음료 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

(3) 원료의 대량 추출조직 확립 및 최적 추출 공정법을 수립함.

1) 시료

어린잎은 4월 20일 함양 마천면 지리산 자락에서 채취하여 상온 건조하여 분말화 하였다. 으름열매와 덩굴과 잎은 충청남도 홍성군 광천읍 담산리 부근 자생열매를 채취하여 사용하였다.

2) 최적 추출 공정법

① 으름잎의 추출수율은 물 추출물에서 추출 수율이 13.95%로 가장 높게 추출되었음.(표1).

Table 1. 으름잎의 용매별 추출수율

용매	추출수율
ethyl acetate	1.91%
H ₂ O	13.95%
acetone	1.82%
chloroform	1.47%
ethanol	6.64%
70% ethanol	12.85%
hexane	2.60%

② 으름열매 추출수율은 물 추출물은 5.4%이고 70% 에탄올은 9.15%로 70% 에탄올이 추출 수율이 가장 높았음. (표2)

Table 2 으름열매의 용매별 추출수율

용매	추출수율
ethyl acetate	0.86%
H ₂ O	5.40%
acetone	2.70%
chloroform	0.78%
ethanol	1.44%
70%ethanol	9.15%
hexane	1.17%

③ 으름덩굴의 추출수율은 70% 에탄올은 9.15% 이고 물 추출물은 5.4%임. (표3)

Table 3. 으름덩굴의 추출수율

용매	추출수율
ethyl acetate	0.86%
H ₂ O	5.40%
acetone	2.70%
chloroform	0.78%
ethanol	1.44%
70%ethanol	9.15%
hexane	1.17%

대량조건의 추출수율은 70% ethanol 과 물 추출물을 이용하여 정제 조건을 삼았음.

(4) 원료 수급과 장기 저장시 안정성 평가

1) 원료 수급

어린잎은 4월 20일 함양 마천면 지리산 자락에서 채취하여 상온 건조하여 분말화 하면 수급에는 문제가 없음.

또한 9월-10월 에 생산되는 으름 열매와 덩굴과 성숙된 잎은 충청남도 홍성군 광천읍 담산리 부근 자생열매를 채취하여 사용하였음. 홍성군과 지리산 마천군에서 재배된 것을 대량 구입이 가능함.

2) 장기 저장시 안정성 평가

① 으름어린잎

(a) 상온 저장: 상온으로 1, 3, 6개월 보관 시 1개월까지는 변화되지 않았음. 건조된 어린잎은 3개월부터는 색상의 변화가 오기 시작했음. 6개월에는 표면에 곰팡이가 피기 시작했음. 분말화된 원료는 6개월까지 색상의 변화를 보이지 않았음.

(b) 냉장 저장: 냉장 보관 시 1, 3, 6개월 단위로 품질 변화를 관찰하였음. 그 결과 생원료를 보관시 1개월에서는 잎이 건조된 상태임. 3개월에서는 잎 표면에 검은 곰팡이가 피기 시작했음. 6개월에서는 수분이 접촉된 부분은 잎이 물러지고 곰팡이가 많이 피기 시작했음.

(c) 냉동 저장: 냉동 보관 시 1, 3, 6개월 단위로 품질 변화를 관찰하였음. 건조된 원료는 6개월까지 색상의 변화가 없었고 곰팡이 등 미생물의 침입이 보이지 않았음.

② 으름 열매

(a) 상온 저장: 상온으로 1, 3, 6개월 보관 시 5일부터 표면이 건조 현상이 오기 시작하면서 1개월 까지 상온 건조 하였지만 열매의 당 성분으로 물러지는 현상이 보이기 시작하였음. 열매는 1개월 이상 상온 저장은 어려움, 그러나 상온건조 시 6개월 이상 건조가 가능함.

(b) 냉장 저장: 냉장 보관 시 1, 3, 6개월 단위로 품질 변화를 관찰하였음. 그 결과 생원료를 보관시 1개월에서는 열매에 곰팡이가 피었음. 3개월 이상 장기 저장에는 성분변화가 오는 것으로 보여짐 열매에서 신맛이 증가하였음.

(c) 냉동 저장: 냉동 보관 시 1, 3, 6개월 단위로 품질 변화를 관찰하였음. 생원료 저장이나 냉동 건조한 원료 모두 6개월까지 색상의 변화가 없었고 곰팡이 등 미생물의 침입이 보이지 않았음.

(5) 으름을 이용한 식초음료베이스 개발

1) 누룩균을 이용한 알콜 제조

쌀 2 kg씩 세척하여 5시간 동안 물에 침지한 후, 체에 받쳐 60분 동안 물기를 제거하였음. 물기를 제거한 쌀을 찹솥에 넣고 100℃에서 50분 동안 증자하고 10분 뜸을 들인 후 고두밥을 만들었음. 누룩을 이용한 알콜 발효는 고두밥을 빠르게 식히고 10 L의 유리병에 고두밥(2 kg), 효모(14 g), 누룩(400 g), 생수 5L을 넣고 골고루 섞어주었고 입국을 사용한 알콜 발효는 고두밥 (2 kg), 효모 (14 g) 입국(200 g)을 골고루 섞어 25℃ 인큐베이터에 15일간 보관하여 사용하였음.

2) 누룩과 입국을 달리한 알코발효의 pH, 산도 측정

- 누룩과 입국을 달리한 알콜발효의 발효 과정 중 pH(A)를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었음. 입국균으로 담근 직후 pH는 A 5.61, B 5.16, C 5.69이었으며, 누룩균으로 담근 직후 pH는 D 5.94, E 6.03, F 6.21로 나타났음. 이후 3일째 급격히 감소하여 A 4.28, B 4.65, C 4.55, D 3.83, E 3.98, F, 3.97으로 실험군 간에 유의적 차이가 나타났음. 5일째부터는 변화 없이 일정한 수준의 pH를 나타내었고 최종 pH는 A 4.57, B 4.45, C 4.87, D 4.13, E 4.2, F 4.43으로 실험군 간에 유의적 차이는 나타나지 않았음. 입국과 누룩의 종류에 관계없이 pH는 큰 차이를 보이지 않았음. pH의 차이는 함유되어 있는 유기산 종류에 따른 수소이온의 해리도에 의한 것이며, pH의 저하는 부패균에 의한 오염방지 역할을 함과 동시에 활발한 효모균의 증식을 가져와 정상적인 발효가 일어나게 함. 술덧에 생육하는 미생물에 의해서 유기산의 생성이 빠르게 진행됨에 따라 발효 2일째부터 pH가 낮아지는 것으로 사료됨. 담근 직후부터 발효 11일까지 감소하다 증가하는 이유는 발효가 진행됨에 따라 생성되는 유기산과 알코올이 서로 반응하여 ester와 같은 향미 형성 등에 이용되므로 pH가 증가하는 것으로 보임. 이는 누룩 종류를 달리하여 담근 알콜 발효 과정 중 술덧의 품질특성과 비슷한 경향을 보였음.
- 누룩과 입국을 달리한 알콜 발효의 발효 과정 중 산도(B)를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 담근 직후 산도는 A 0.110%, B 0.110%, C 0.170%, D 0.140%, E 0.110%, F 0.100%으로 실험군 간에 유의적인 차이를 보여주지 않았다. 이후 발효 5일 A 0.630%, B 0.530%, C 0.640%, D 0.920%, E 1.120%, F 1.000%으로 E에서 가장 높은 값을 보여주었으며 모든 산도가 증가됨을 보여주었다. 이후 점차 증가하는 경향을 보여주었으며 15일째 A 0.933%, B 0.975%, C 1.224%, D 0.972%, E 1.167%, F 1.212%로 실험군 간에 입국을 첨가한 알콜 발효와 누룩을 첨가한 알콜 발효 간에 유의적 차이를 보여주었다. 발효 기간 동안 pH 변화와 총산의 함량 변화를 보면 총산 함량은 증가하고 있으나, pH가 낮아지지 않는 이유로는 단백질 분해로 아미노산이 증가하여 완충능력을 높여주었기 때문이라고 보고되었으며(21). 총산의 변화는 알콜 발효의 성분 변화를 쉽게 알 수 있는 요인일 뿐만 아니라, 알코올 생성과정에서 복합적으로 생성되므로 알콜 발효의 발효 진행상황을 알 수 있는 지표 성분이 됨. 이는 누룩 종류를 달리하여 담근 알콜 발효 과정 중 술덧의 품질특성과 비슷한 경향을 보였음.

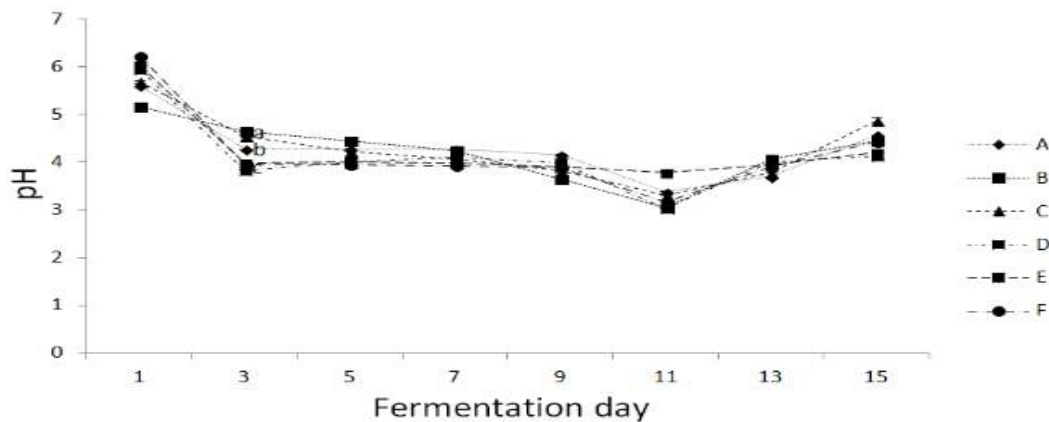
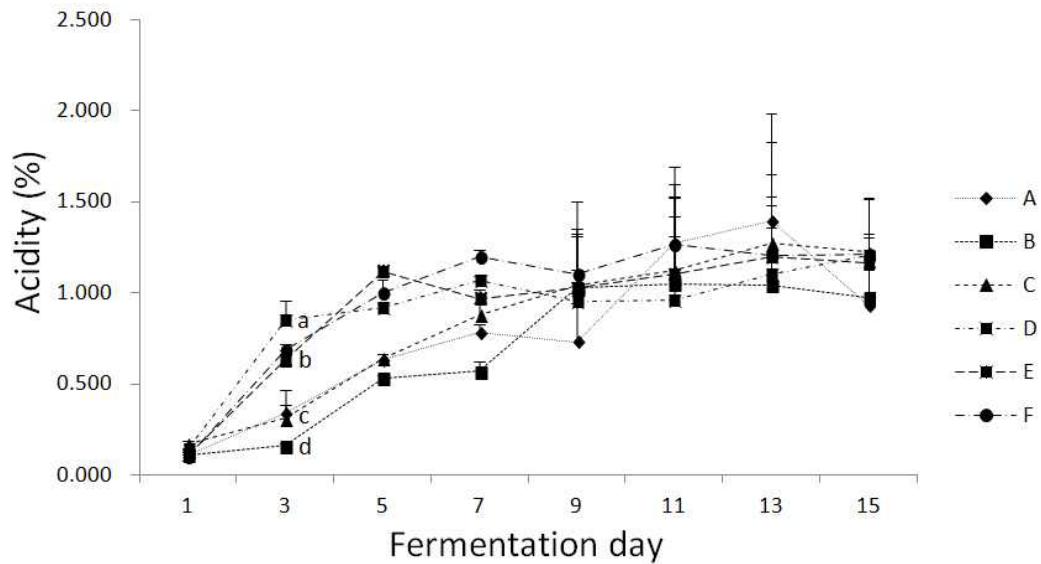


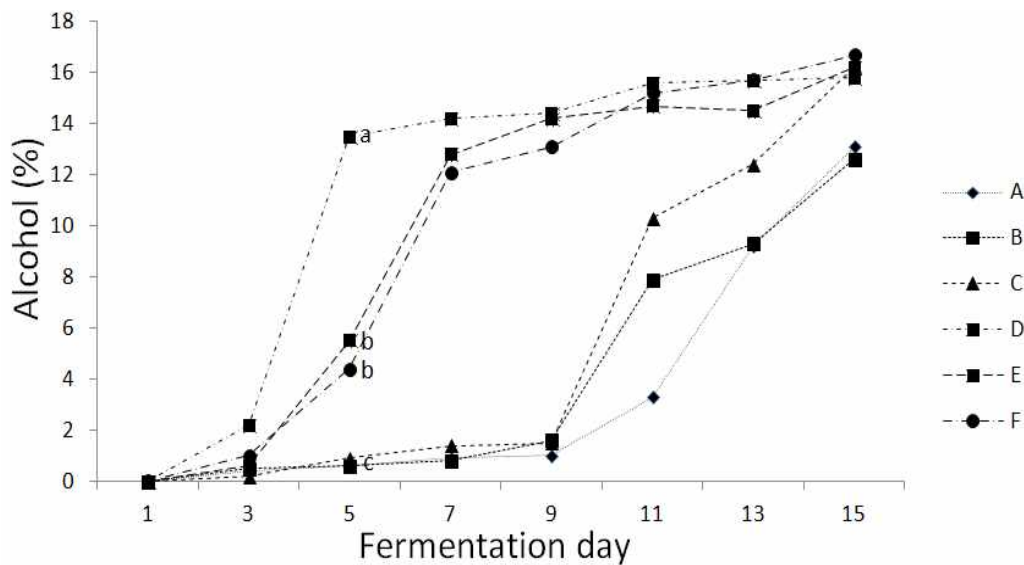
Fig. 1. Changes in pH(A) and Acidity(B) of alcohol fermentation added Koji and Nuruk during fermentation period. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript in a column (a~d) are significant differences ($p < 0.05$).

3) 누룩과 입국을 달리한 알콜발효의 알코올, 총당 함량

- Fig. 2은 누룩과 입국을 달리한 알콜발효의 발효 과정 중 알코올(C)을 측정한 결과임. 탁주의 담금 시 주모에서 유래되어 담금 직후 에탄올 함량은 모든 실험군에서 0%에서 시작하여 담금 3일째 A 0.4%, B 0.5%, C 0.2%, D 2.2%, E 0.6%, F 1% 으로 D에서 가장 높은 알코올 함량이 나타났음. 발효 5일 A 0.6%, B 0.6%, C 0.9%, D 13.5%, E 5.5%, F 4.4% 으로 D에서 가장 높은 값이 13.5 값이 나왔음. 이후 15일 A 13.1%, B 12.6%, C 16.2%, D 15.8%, E 16.2%, F 16.7% 로 F에서 16.7%로 가장 높은 값을 나타내었음. 누룩으로 만든 알콜 발효가 입국으로 만든 알콜 발효에 비해 알코올 함량이 더 높았음. 여기서 보여지는 입국과 누룩의 알코올 함량차이는 탁주의 주질을 좌우하는 가장 중요한 성분으로, 원료에 대한 누룩 중의 효소나 술덧 중에 생육하는 효모의 활성도 및 탄수화물의 비율이 상이하면

에탄올의 함량 차이가 나타난다고 보고되어 있는 것과 같이, 본 연구에서도 당함량(성분)이 다르기 때문에 에탄올 생성에 함량이 달라져 알코올 함량 증가의 차이가 나타나는 경향을 보였음.

- 누룩과 입국을 달리한 알콜 발효의 발효 과정 중 총당(D)을 측정된 결과를 Fig. 2에 보여 주었음. 담금 직후 총당은 A 7.62%, B 8.72%, C 7.82%, D 13.82%, E 12.60%, F 10.36%이었으며 3일째 급격히 감소하여 A 12.10%, B 13.11%, C 11.17%, D 16.47%, E 15.52%, F 14.64%으로 나타났음. 이후 D, E, F 에서는 꾸준히 유지되는 경향을 보였으며 A, B, C 에서는 증가하는 경향을 보였음. 15일 A 7.25%, B 3.88%, C 7.20%, D 2.10%, E 3.00%, F 27%으로 나타났음. 실험구간의 유의적 차이가 보였으며 환원당과 비슷한 경향을 보였음. 탁주에서 당분은 미생물의 발효기질로 이용되어 에탄올을 생성하며 술 향기 생성과 감미에도 영향을 주는 중요 성분임. 입국에서 나온 미생물의 탄수화물 분해능이 좋기 때문에 총당 함량이 더 높은 것으로 사료되며, 관능검사 결과 입국으로 만든 알콜 발효의 단맛 부분에서 높은 기호도가 나왔음.



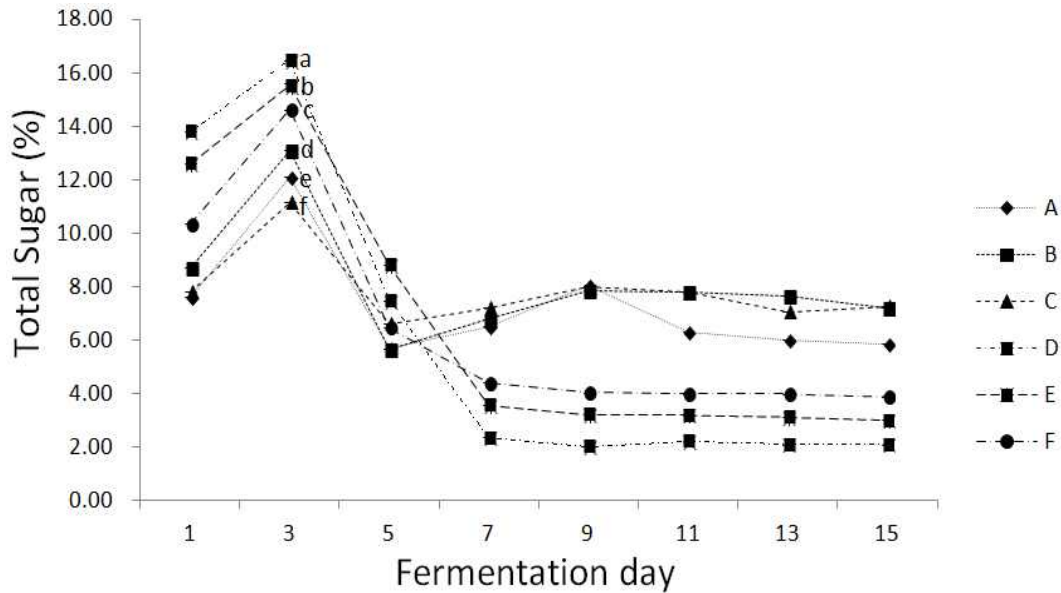


Fig. 2. Changes in Alcohol(C) and Total Sugar(D) of alcohol fermentation added Koji and Nuruk during fermentation period. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript in a column (a~f) are significant differences ($p < 0.05$).

4) 누룩과 입국을 달리한 알콜 발효의 총균수 측정

- 누룩과 입국을 달리한 알콜 발효의 발효 과정 중 총균수를 측정한 결과는 Table. 1과 같음. 담금 직후 총균수는 A $36.67 \pm 5.86 \times 10^8$, B $8.33 \pm 5.03 \times 10^5$, C $264 \pm 9.9 \times 10^7$, D $275.67 \pm 22.72 \times 10^8$, E $60.67 \pm 7.02 \times 10^7$, F $289 \pm 73.54 \times 10^{11}$ 로 발효 1일 F에서 가장 큰 값이 나타났음. 발효 7일째의 총균수는 A $288 \pm 71.53 \times 10^{12}$, B $183.5 \pm 7.78 \times 10^{11}$, C $33 \pm 6.24 \times 10^5$, D $326.67 \pm 107.04 \times 10^{12}$, E $38.33 \pm 4.73 \times 10^5$, F $25 \pm 7 \times 10^4$ 로 A와 D에서 발효 기간 중 가장 큰 값을 나타내었고 7일 이후 감소하는 경향을 보여 발효 15일 짜의 총균수는 A $34.33 \pm 1.15 \times 10^5$, B $4.33 \pm 1.53 \times 10^5$, C $1.33 \pm 1.53 \times 10^5$, D $33 \pm 1 \times 10^3$, E $42.67 \pm 15.7 \times 10^5$, F $20.5 \pm 4.95 \times 10^3$ 로 나타났다. 이와 같은 결과는 누룩보다 입국에서 총당과 환원당 함량이 높은 것으로 나타나기 때문에 입국 알콜 발효에 비해 누룩 알콜 발효의 미생물 수가 줄어든 것으로 보여짐..

Table 1. Changes in Microbial cell counts of Makgeolli added Koji and Nuruk during fermentation period

D	Alcohol fermentaion					
	A	B	C	D	E	F
1	36.67±5.86× 10 ^{8c}	8.33±5.03×1	264±9.9×10 ^{7ab}	275.67±22.7 2×10 ^{8a}	60.67±7.02× 10 ^{7bc}	289±73.54× 10 ^{11abc}
3	115.50±79.9 ×10 ^{8bc}	133.67±15.0 4×10 ^{11b}	103±15.10× 10 ^{10bcd}	37±6.93×10 ^{9cd}	304.50±7.78 ×10 ^{11a}	21±2.65×10 ^{11d}
5	248.33±101.1 9×10 ^{9a}	313±12.12× 10 ^{11a}	314±14.11× 10 ^{11a}	34±4.58×10 ^{8b}	48.33±39.58 ×10 ^{7b}	49±7×10 ^{8b}
7	288±71.53× 10 ^{12a}	183.50±7.78 ×10 ^{11ab}	326.67±107.0 4×10 ^{12a}	33±6.24×10 ^{5bc}	38.33±4.73× 10 ^{7c}	25±7×10 ^{4bc}
9	270±20.95× 10 ^{10a}	96±12.49×1	84±19.67×10 ^{10b}	38.67±1.15× 10 ^{4c}	33±4.36×10 ^{7c}	8.33±8.39×1 0 ^{4c}
11	183.33±45.3 5×10 ^{7a}	33±8.54×10 ^{7bc}	76.67±10.97 ×10 ^{10b}	35±3.61×10 ^{4bc}	47±15×10 ^{7bc}	3.67±2.89×1 0 ^{4c}
13	33±4.24×10 ^{6b}	109.5±40.31 ×10 ^{6a}	46.67±17.95 ×10 ^{7b}	33.33±3.21× 10 ^{3b}	51.33±17.16 ×10 ^{5ab}	38.67±19.86 ×10 ^{3b}
15	34.33±1.15× 10 ^{5a}	4.33±1.53×1 0 ^{5a}	1.33±1.53×1 0 ^{5a}	33±1×10 ^{3a}	42.67±15.7× 10 ^{5a}	20.5±4.95×1 0 ^{3a}

Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscript in a column (a~d) are significant differences ($p<0.05$).

5) 누룩과 입국을 달리한 알콜 발효의 관능검사 결과

- 누룩과 입국을 달리한 알콜 발효의 관능검사 결과는 Fig. 3에 나타내었음. B는 색, 단맛, 향, 목넘김에서 기호도가 높았고 D는 신맛과 쓴맛에서 기호도가 높았다. 전반적인 기호도는 B가 가장 높았다. 입국에서 만든 막걸리의 기호도가 더 높아지는 경향을 보였고 총 기호도를 볼 때 B가 가장 적합하다고 판단되었음.



Fig. 3. Sensory evaluation of alcohol fermentation with different levels of Koji and Nuruk.

2. 2차년

(1) 으름음료의 지표물질의 함유량을 결정

1) 으름 열매 식초의 총 폴리페놀 함량의 변화

- 폴리페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물중의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxy기를 가지고 있기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 나타내며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 가진다는 보고가 있다.
- 으름 열매 식초의 발효 1일째와 발효 13일째의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 발효 1일째에 총 폴리페놀 함량은 대조군 69.93 mg/100 g, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 59.97, 56.7, 570.52, 607.07 mg/100 g으로 나타났으며, 으름 열매 첨가군 5와 7%에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다.
- 발효 13일째의 총 폴리페놀 함량은 대조군이 76.77 mg/100 g, 으름 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 61.04, 193.3, 952.11, 1022.42 mg/100 g을 나타냈다. 으름 열매 첨가량이 증가됨에 따라 총 폴리페놀함량도 유의적으로 증가하였다.
- 이는, 으름 과육의 유효 성분이 발효과정에서 추출된 것으로 사료되었으며, 오디식초에서 오디식초의 농도가 증가할수록 폴리페놀 함량이 높아진 결과와 유사하였다. 또한, 복분자, 상황, 차가, 느타리버섯 발효 식초가 물 추출물 보다 폴리페놀의 함량이 높다고 한 결과와도 유사하였다. 대조군과 으름 열매 첨가 1%에서는 총 폴리페놀 함량에 유의적 차이가 없었으나, 으름 열매 첨가군 3, 5, 7%에서 총 폴리페놀 함량이 발효 1일째보다 각각 136.6, 381.59, 415.35 mg/100 g 유의적으로 증가됨을 볼 수 있었다.
- 또한 발효가 진행될수록 총 폴리페놀 함량이 증가됨을 보여주었는데 이는 알코올 발효가 진행되는 동안 폴리페놀 성분이 용출되어졌기 때문이다. 이러한 결과는 2단계 발효를 통한 사과농축액 식초의 발효가 진행됨에 따라 총 폴리페놀 함량이 증가하는 결과와 유사하였다.

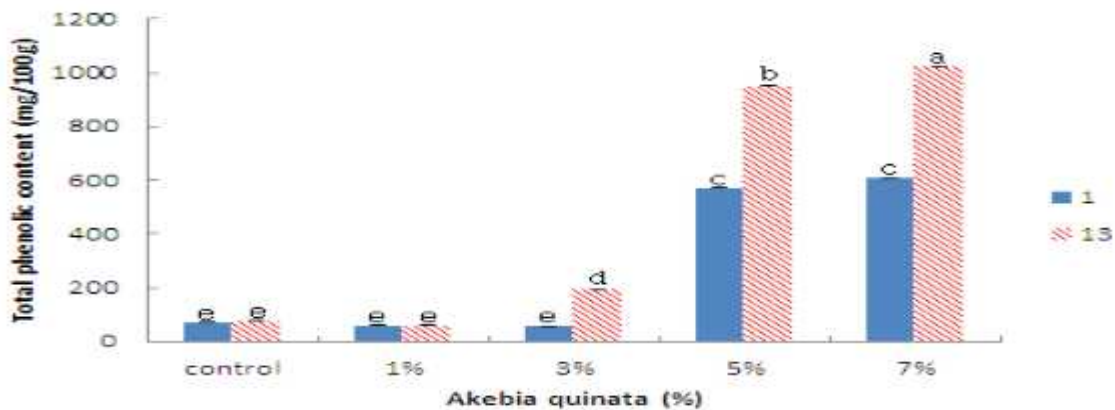


Fig 1. Contents of total phenolics in vinegar added with different levels of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences ($p < 0.05$)

2) 으름 열매 식초의 총 플라보노이드 함량의 변화

- 플라보노이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등으로 구성되어 있으며, 식물에 다량 존재하는 플라보노이드는 항산화작용, 순화기 질환 예방, 항염, 항알러지, 항균, 항바이러스, 면역증강 등 다양한 기능성 생리활성 효과를 보인다고

보고하였다.

- 으름 열매 식초의 발효 과정 중 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 제조한 으름 열매 식초의 발효 1일째 총 플라보노이드 함량은 대조군이 21.35 mg/100 g으로 나타났으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 28.56, 30.65, 34.49, 36.85 mg/100 g을 나타냈다. 모든 실험 군에서 총 플라보노이드 함량의 유의적 차이는 보이지 않았다. 발효 13일째에는 대조군이 43.08 mg/100 g으로 나타났으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 44.35, 45.8, 60.68, 63.72 mg/100 g을 나타냈다. 으름 열매 첨가군 5와 7%에서 총 플라보노이드 함량의 유의적 증가를 보여주었고, 으름 열매 첨가량이 증가될수록 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 증가하였다. 으름 열매 첨가군 5와 7%에서 총 플라보노이드 함량의 유의적 증가를 보여주었고, 으름 열매 첨가량이 증가될수록 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 증가하였다. 또한, 발효가 진행되는 동안 모든 실험 군에서 총 플라보노이드 함량이 발효 초기보다 대조군이 21.73 mg/100 g, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 15.79, 15.15, 26.19, 26.87 mg/100 g로 으름 열매 첨가군 5, 7%에서 유의적으로 증가되어 폴리페놀과 유사한 결과를 보여주었는데, 이는 으름 열매의 유효 성분이 발효과정에서 더 많이 추출된 것으로 보인다.
- 이것은 복분자 식초 착즙액 원료 보다 발효시킨 복분자 식초에서 총 플라보노이드 함량이 높게 나타난 결과와 유사하였다. 으름 열매 식초의 총 플라보노이드 함량은 시판 식초들과 비교하였을 때 현미식초 0.59 mg/100 g, 매실식초 0.86 mg/100 g, 사과식초 0.94 mg/100 g, 감식초 19.49 mg/100 g, 무화과식초 9.18 mg/100 g, 양조식초 8.61 mg/100 g, 쌀식초 1.74 mg/100 g 보다 많았으며, 이는 으름 열매 식초의 항산화 활성이 우수할 것으로 판단된다.

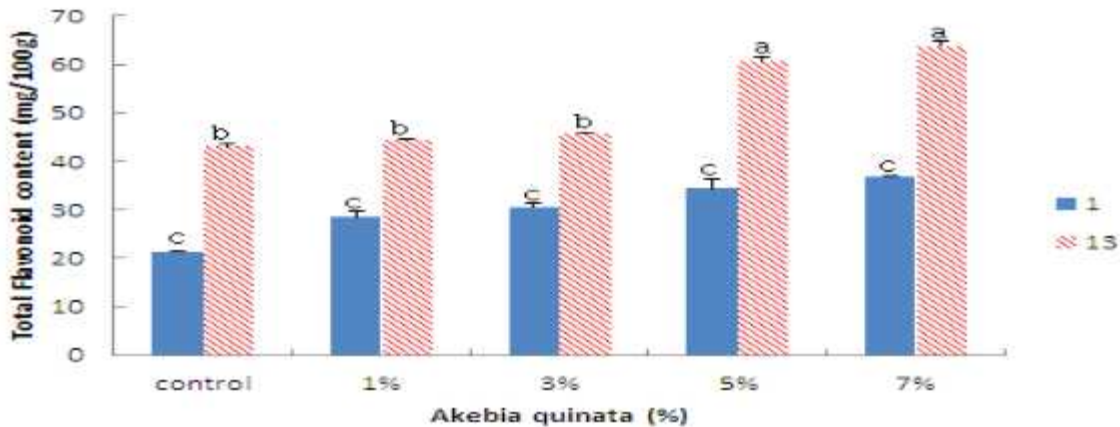


Fig 2. Contents of total flavonoids in vinegar added with different levels of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences ($p < 0.05$)

3) 으름 열매 식초의 탄닌 함량의 변화

- 탄닌 성분은 과일, 야채류 및 식물 종자 등 식물체에 널리 함유되어 있으며, 수렴성이나 지혈작용 등 약리성과 더불어 단백질이나 alkaloid와 결합하는 특성을 가지고 있다. 또한 탄닌에 의한 떫은맛은 blackberry, strawberry, cranberry, apple 등과 같은 과일 및 기호성 음료의 풍미에 관여하여 가공식품의 품질 형성에 필수적인 요인이 되기도 한다. 최근에 탄닌 성분과 관련하여 녹차 탄닌의 angiotensin converting enzyme, xanthine oxidase의 저해효과와 tyrosinase의 저해효과로 식품의 갈변현상을 막는다는 결과가 사료되어 천연 효소 억제제 등의 기능성 식품에 관해 연구된 바 있고, 임상실험을 통해 탄닌의 혈청지질 개선효과도 보여주었다.
- 발효 중 으름 식초 총 탄닌 측정 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 으름 열매의 첨가량을 달리 하여 제조한 으름 열매 식초의 총 탄닌 함량은 발효 1일째에 대조군이 0.1096 mg/100 g을 나타냈으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.1339, 0.2288, 0.2372, 0.2538 mg/100 g을 나타냈다. 으름 열매 첨가군 3, 5, 7%에서 탄닌의 함량이 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째에는 대조군이 0.3140 mg/100 g을 나타냈으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.3343, 0.3543, 0.3756, 0.3793 mg/100 g을 나타냈다. 발효 1일째 보다 발효 13일째에 으름 열매 식초에서 탄닌의 함량이 대조군 0.2042 mg/100 g, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.2004, 0.1255, 0.1384, 0.1255 mg/100 g 각각 유의적으로 증가됨을 보였고, 으름 열매

가 첨가될수록 탄닌 함량의 유의적 차이는 보이지 않았다.

- 이는 감식초 첨가량이 증가될수록 총 탄닌 함량이 증가하는 경향을 보여준 결과와 유사하였으며, Jung과 Mondal의 감 탄닌의 효과로 감의 강력한 항산화 활성의 결과로, 항산화능은 페놀계 화합물에 의한 것으로 사료되었고, 탄닌의 항산화 활성이 페놀 성분과 밀접한 관련이 있어 페놀성 물질 함량이 증가 될수록 탄닌 함량도 증가하는 본 연구와도 일치하는 경향을 보였으며, 이는 항산화 활성의 실험결과도 우수할 것으로 판단되었다.

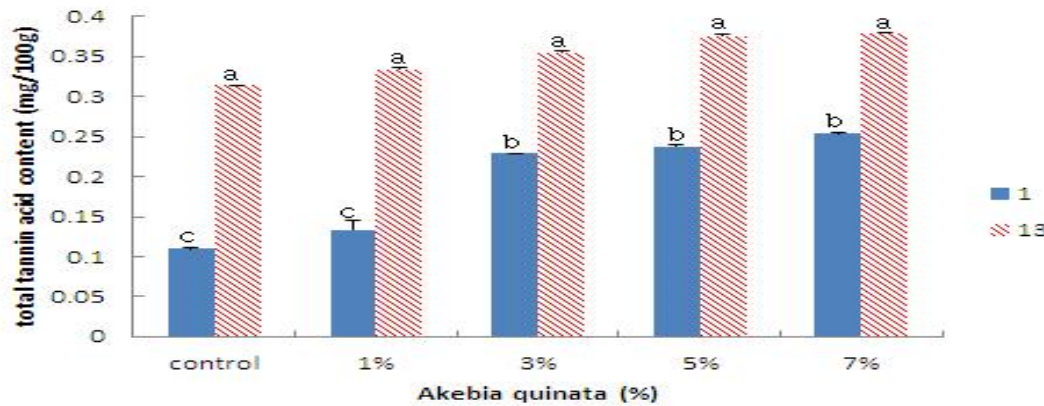


Fig 3 .Contents of total tannin acids in vinegar added with different levels of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences ($p<0.05$)

4) 으름 어린 잎 식초의 총 폴리페놀 함량

- 폴리페놀 화합물은 활성산소에 노출되어 손상되는 DNA의 보호나 세포구성 단백질 및 효소를 보호하는 역할을 하여 항산화 능에 크게 기여하는 물질이라고 보고되었고, 천연물에 많이 함유되어 있는 성분으로 자유라디칼 소거활성과 같은 항산화 활성에 매우 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다. 발효 기간 중 총 폴리페놀 함량 변화는 Fig. 4 에 나타내었다. 식초를 담근 직후 발효 1일째 대조군에서 681.39 mg GAE/100 g였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 841.40 mg GAE/100 g, 771.63 mg GAE/100 g, 731.95 mg GAE/100 g, 840.12 mg GAE/100 g로 으름 어린잎 첨가군이 대조군에 비해 증가하였으나 유의적 차이는 나타나지 않았다. 발효 13일에 으름 어린잎 첨가군 0.5%에서 2037.50 mg GAE/100 g로 가장 높게 나타났다. 대조군과 으름 어린잎 첨가군 1%, 2%, 3%는 1715.70 mg GAE/100 g, 1907.71 mg GAE/100 g, 1939.71 mg GAE/100 g, 1572.97 mg GAE/100 g로 시료간의 유의적 차이는 보이지 않았다. 그러나 발효 22일째 폴리페놀함량은 대조군에서 3555.43 mg GAE/100 g였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 3682.72 mg GAE/100 g, 3976.32 mg GAE/100 g, 4146.70 mg GAE/100 g, 4079.07 mg GAE/100 g로 으름을 첨가할수록 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 증가 되었다($p<0.05$). 또한 발효가 진행됨에 따라 발효 1일째 대비하여 발효 22일째에 평균 5배 유의적으로 증가 되었다. 또한 발효가 진행됨에 따라 발효 1일째 대비하여 발효 22일째에 평균 5배 유의적으로 증가 되었다. 발효 중 페놀의 함량의 증가는 으름잎 식초에서 다양한 생리 활성과 밀접한 상관관계를 보이는 성분이라 생각된다. Jo 등의 시판 2배 산도 식초에서 10.63 mg GAE/100 mL, Hong 등의 오이식초에서 40.14 mg/100 mL의 결과, Hong 등의 25.19 mg/100 mL 보다 본 연구

에서의 총 폴리페놀 함량이 높았다. 또한 Seo와 Jeong의 초콩 실험결과 발효일이 지날수록 페놀함량이 증가하는 결과와 유사하였다.

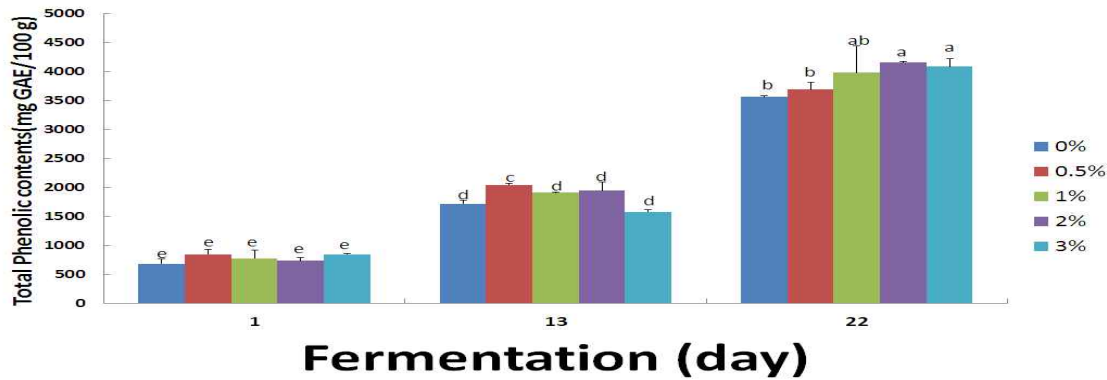


Fig. 4. Contents of Total phenolics in vinegar with different levels of *Akebia quinata*. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

5) 으름 어린 잎 식초의 총 플라보노이드 함량

- 총 플라보노이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins 및 flavonones 등으로 구성되어 있으며, 식물에 다량 존재하는 플라보노이드는 항산화작용, 순화기 질환 예방, 항염, 항균, 면역증강 등 다양한 기능성 생리활성 효과를 보인다고 보고하였다. 발효 기간 중 총 플라보노이드 함량 결과는 Fig. 5에 나타내었다.
- 식초를 담근 직후 발효 1일째 대조군에서 364.58 mg CE/100 g였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 477.08 mg CE/100 g, 635.42 mg CE/100 g, 731.25 mg CE/100 g, 1064.58 mg CE/100 g로 으름 어린잎을 첨가함에 따라 증가하였다. 발효 13일에는 대조군에서 1185.42 mg CE/100 g였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 1431.25 mg CE/100 g, 1343.75 mg CE/100 g, 1277.08 mg CE/100 g, 1198.53 mg CE/100 g로 으름 어린잎 첨가군 1%를 제외한 나머지 그룹에서 유의적 차이가 보이지 않았다. 발효 22일째에 대조군에서 2089.58 mg CE/100 g였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 1927.08 mg CE/100 g, 2114.58 mg CE/100 g, 2822.92 mg CE/100 g, 2927.08 mg CE/100 g로 대조군, 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%간에서 유의적 차이가 없고 대조군에 비해 으름 어린잎 첨가군 2%, 3%의 플라보노이드 함량은 유의적으로 증가되었다($p < 0.05$).
- 한편 발효일이 지남에 따라 플라보노이드 역시 총 폴리페놀과 마찬가지로 유의적으로 증가하였으며 으름 어린잎을 첨가할수록 유의적으로 증가하는 같은 경향을 보였다. 이는 Park 등의 복분자식초의 총 폴리페놀 함량이 높을수록 총 플라보노이드 함량 높은 연구결과와 비슷하다. 또한 Kim 등의 콩감식초 절임 실험 결과 플라보노이드 함량이 발효일이 지남에 따라 증가한 결과와 유사하였다.

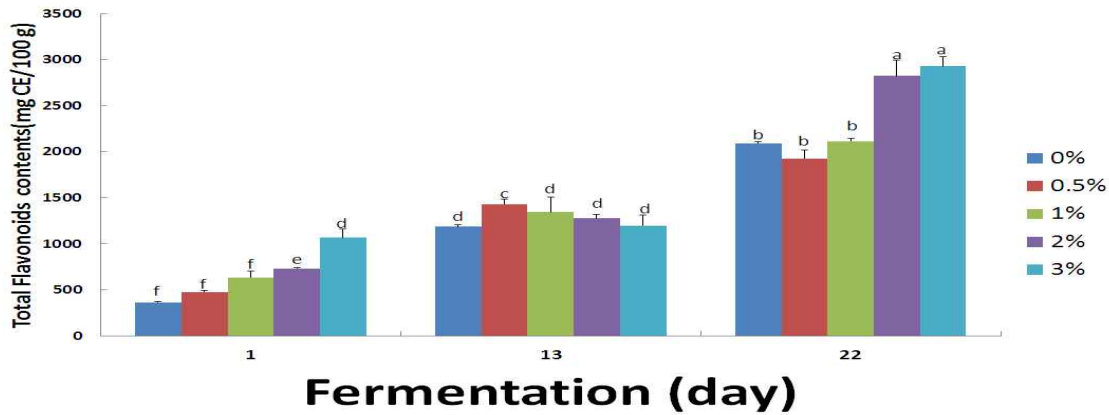


Fig. 5. Contents of flavonoids in vinegar with different levels of *Akebia quinata*. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

6) 으름 어린 잎 식초의 총 탄닌 함량

- 탄닌은 체중 감량 및 체지방 감소에 효과가 있고, 지질성분 개선 효과에 유의한 영향을 미치고, 탄닌 섭취가 SOD활성을 높이고 MDA함량을 억제하는 경향을 보인 연구결과가 있다. 또한 식품의 갈변현상을 일으키는 tyrosinase 저해효과를 가진다. 발효 기간 중 탄닌 함량 결과는 Fig. 6에 나타내었다.
- 발효 1일째의 탄닌의 함량은 대조군에서 1223.0 mg TAE/100 g였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 3073.0 mg TAE/100 g, 2783.0 mg TAE/100 g, 2218.0 mg TAE/100 g, 2883.0 mg TAE/100 g로 대조군보다 으름 어린잎을 첨가한 시료에서 탄닌의 함량이 유의적으로 높았다. 발효 13일째의 대조군에서 3443.0 mg TAE/100 g였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 3298.0 mg TAE/100 g, 3515.7 mg TAE/100 g, 3183.0 mg TAE/100 g, 3468.0 mg TAE/100 g로 발효 1일에 비해 시료 간에 유의적 차이가 없었다. 발효 22일째 탄닌 함량은 대조군에서 3596.3 mg TAE/100 g였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 3538.0 mg TAE/100 g, 3513.0 mg TAE/100 g, 3293.0 mg TAE/100 g, 3618.0 mg TAE/100 g로 유의적 차이가 없었다.

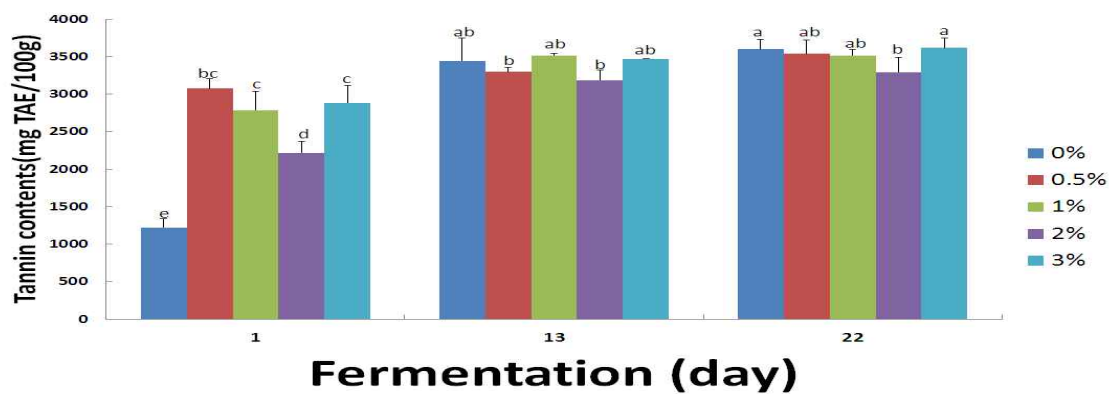


Fig. 6. Contents of Tannin in vinegar with different levels of *Akebia quinata*. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

-hederagin은 으름열매식초, 으름잎식초에서 검출되지 않았다.

hederagin이 검출되기 위해서는 으름을 ethanol 추출 후 첨가하는 방법으로 초음료를 담가야 될것 같다.

-또한 으름음료의 지표 물질을 폴리페놀, flavonold, 탄닌으로 하였을 때는 으름열매를 첨가할수록 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 증가 되었고 또한 발효가 진행됨에 따라 발효 1일째 대비하여 발효 22일째에 유의적으로 증가 되었다. 이에 으름열매음료에서는 7% 가장 우수하였고 으름잎 식초 음료에서도 으름잎 첨가할수록 폴리페놀, flavonold 가 증가하고 발효가 증가됨에 따라 같이 증가 하였다. 그러나 탄닌은 발효가 진행됨에 따라 탄닌이 증가 되었으나 발효 중기부터 발효 최종단계에서는 증가 되지 않았다.

-이런 결과를 미루어 지표 성분을 폴리페놀, flavonold, 탄닌으로 하는 것이 옳을 것 같다.

(2) 으름을 이용한 식초음료베이스 개발

1) 으름열매를 이용한 으름식초 음료 베이스 개발

- 쌀 1 kg을 씻고 약 15시간정도 물에 불렸다. 이후 1시간 물을 빼고 거즈에 담아 찜통에 넣고 찌서 고두밥을 만들고 물 3 L와 누룩 300 g, 엿기름 400 g을 가하여 혼합하였다. 그 다음 으름을 첨가하지 않은 대조군과 쌀의 중량 1 kg에 대해서 1, 3, 5, 7%(w/w) 으름 열매를 혼합한 것을 25°C에서 4일간 1차 알코올 발효시켰다. 1차 발효액에 초산발효를 위해 물과 희석하여 9% 알코올 함량이 되도록 조정 한 뒤, 종초 10%(v/v) 접종하여 30°C에서 13일 발효시켜 으름 열매 식초를 제조하였다.

2) 어린으름잎을 이용한 으름식초 음료 베이스 제조

- 음료베이스를 제조하기 위해서 쌀 1 kg을 세척하여 15시간 동안 물에 침지한 후, 채에 받쳐 60분 동안 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 쌀을 찜 솥에 넣고 100°C에서 50분 동안 증자하고 10분 뜸을 들인 후 고두밥을 만들었다. 고두밥을 식힌 후(25°C) 10 L의 유리병에 고두밥(1.5 kg), 누룩(500 g), 엿기름(500 g)을 버무린 후 생수(3 L)를 넣고 골고루 섞어주어 대조군을 제조하였다. 으름 첨가군은 대조군에 으름을 각각 0.5% (5 g), 1% (10 g), 2% (20 g), 3% (30 g) 첨가 하여 제조하였다. 3일간 25°C 인큐베이터에 알코올 발효 후 종초 10% (v/v)를 접종하여 19일 간 보관하여 사용하였다.

(3) 관능품질 변화 검토 및 이화학적 특성과 관능 검사함.

1) 으름열매를 이용한 으름식초음료

①알코올 발효 중의 이화학적 변화

- 알코올 발효 중 pH, 총산, 총당, 알코올 함량을 측정 한 결과는 Table 1에 나타내었다. 발효 1일째 pH는 대조군이 5.99, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 5.96, 5.99, 5.75, 5.72의 값을 나타내어 으름 열매 첨가군 5, 7%에서 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다. 모든 실험구가 4일째에는 대조군이 4.3, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 4.31, 4.3, 4.29, 4.22를 나타내어 pH가 급격히 감소하였다.
- 총산 함량은 발효 1일째에 대조군이 0.60%, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.60, 0.64, 0.72, 0.78%로 비교적 낮은 함량을 보였으나, 으름 열매 첨가량에 따른 총산 함량이

유의적으로 증가하였다. 이후 발효 4일째에 대조군이 0.61%, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.66, 0.68, 0.74, 0.79%로 담금 직후와 비교해 보았을 때 총산 함량의 유의적 차이는 없었으나 으름 첨가량이 증가 할수록 총산 함량은 증가되어 유의적 차이를 보였다.

- 발효 1일째에 알코올 함량은 대조군과 실험군 모두 0%였으며 알코올 발효 4일째에는 대조군, 으름 열매 첨가 1, 3%에서 알코올 함량이 12%였으며, 으름 열매 첨가 5, 7%에서는 각각 11, 10%였다. 으름 열매 첨가량이 증가될수록 알코올 함량에 유의적 차이는 보이지 않으나 발효 1일째보다 발효 4일째에 알코올 함량이 유의적으로 증가하였다. 이러한 실험결과는 Park 등의 연구와 같은 경향을 보였으며 이는 알코올 발효 시 효모는 당을 영양원이거나 발효 기질로 사용하여 알코올을 생성하므로 알코올 함량이 높아지게 되었기 때문이다.
- 총당 함량은 발효 1일째에 대조군이 7.26%, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7% 각각 9.83, 10.67, 13.06, 13.63%였으며, 발효 4일째에는 대조군이 4.48%, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 6.46, 7.9, 9.76, 11.37%로 발효 1일째보다 감소하였다. 그러나 으름 열매의 첨가량에 따라 총당 함량이 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과는 복분자, 토마토, 오디식초 등에서 발효가 진행될수록 당 함량이 감소하였다는 결과와 유사하였으며, 으름 막걸리에서 으름 첨가량에 따라 총당 함량이 증가한 결과와 유사하였다.

Table 1. Changes in pH, total acidity, alcohol and brix content of vinegar added with different levels of *Akebia quinata* during alcohol fermentation period

	<i>Akebia quinata</i> (%)	1 day	4 day
pH	0	5.99±0.02 ^a	4.31±0.02 ^a
	1	5.96±0.02 ^a	4.30±0.03 ^{ab}
	3	5.99±0.00 ^a	4.30±0.01 ^{ab}
	5	5.75±0.00 ^b	4.29±0.02 ^b
	7	5.72±0.01 ^b	4.22±0.01 ^c
Total Acidity (%)	0	0.60±0.01 ^c	0.61±0.01 ^d
	1	0.60±0.01 ^c	0.66±0.00 ^c
	3	0.64±0.01 ^c	0.68±0.01 ^c
	5	0.72±0.01 ^b	0.74±0.02 ^b
	7	0.78±0.02 ^a	0.79±0.01 ^a
Alcohol (%)	0	0±0	12±0.0 ^a
	1	0±0	12±0.0 ^a
	3	0±0	12±0.0 ^a
	5	0±0	11±0.5 ^a
	7	0±0	10±0.5 ^a
Total sugar (%)	0	7.26±0.01 ^e	4.48±0.01 ^c
	1	9.83±0.00 ^d	6.46±0.01 ^c
	3	10.67±0.00 ^c	7.90±0.01 ^{bc}
	5	13.06±0.00 ^b	9.76±0.01 ^{ab}
	7	13.63±0.01 ^a	11.37±0.00 ^a

Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscript in a column (a-e) are significant differences (p<0.05)

② 초산 발효 시 pH, 총산 함량 변화

발효기간 중 pH의 변화는 Fig. 7와 같다. 초산 발효 1일째에는 pH가 대조군과 으름 열매 첨가군 7%에서 4.3, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5%에서 4.29로 시료 간 유의적 차이가 없었다. 발효가 진행됨에 따라 pH가 약간 증가하여 최종 13일째 pH는 대조군이 4.41, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서는 4.47로 대조군에 비해 pH가 유의적으로 높았으며, 으름 열매 첨가량에 따른 pH의 유의적 차이는 없었다.

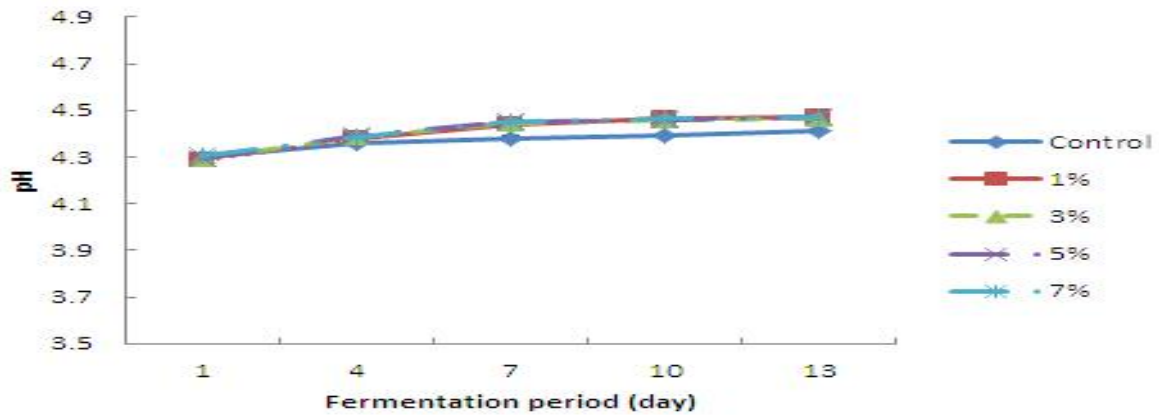


Fig 7.Changes in pH of vinegar added with different levels of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences (p<0.05)

- 으름을 첨가하여 발효한 식초의 발효기간 중 총산 함량의 변화는 Fig. 8와 같다. 총산 함량은 발효 1일째에 대조군이 0.61%, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.66, 0.68, 0.74, 0.79%였고, 발효 4일째에는 2.56~3.46%로 각 실험 군에서 총산 함량이 약간 증가하였다. 발효 7일째에는 대조군이 7.16%, 으름 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 8.16, 8.92, 9.24, 9.52%로 대조군에 비하여 으름 열매 첨가군의 총산 함량이 유의적으로 증가하였으며, 으름 열매의 첨가량이 많을수록 총산 함량도 유의적으로 증가됨을 보여주었다. 발효 10일째에는 발효 과정 중 총산도의 최고치를 나타내 대조군은 7.6%, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 8.44, 9.60, 9.76, 10.12%를 나타내어, 대조군에 비하여 으름 열매 첨가군의 총산 함량이 유의적으로 증가하였으며, 으름 열매 첨가량에 따라 총산 함량도 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째 총산 함량은 감소되어 대조군이 7.4%, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 7.6, 7.82, 8.54, 9.56%를 나타냈다.
- 총산 함량이 증가한 원인은 초산 발효 과정 중 초산균이 알코올을 영양원이나 발효 기질로 사용하여 초산을 포함한 유기산을 생성시켜 산도가 증가한 것으로 사료되었으며, 매실 농축액을 가지고 진탕 발효 한 Ko 등의 발효 1일차부터 산도가 증가하는 모습을 보여준 결과와 유사하였다. 또한, 후 발효 과정에서 pH는 증가되고 산도는 감소하였는데 이는 후 발효 과정이 온도가 높고 호기적인 조건에서 진행시켰기 때문에 초산이 재 산화 된 것으로 보이며, 현미식초에서 적정산도가 5.01~5.22%에서 발효 5~6주에 3~4%, 양파식초에서 발효 8일째에 5.39%로 최고치를 갖고 이후에 산도가 감소하였는데, 이는 초산을 분해하는 과산화가 원인인 것으로 보인다. 오이, 오미자, 오디, 무화과 식초의 총산 함량은 각각 5.8, 5.21, 5, 7.56%로 으름 열매 식초의 총산 함량보다 낮았는데 이는 식초의 원료와 초기 알코올이 총산 함량에 영향을 준 것으로 보여 진다.

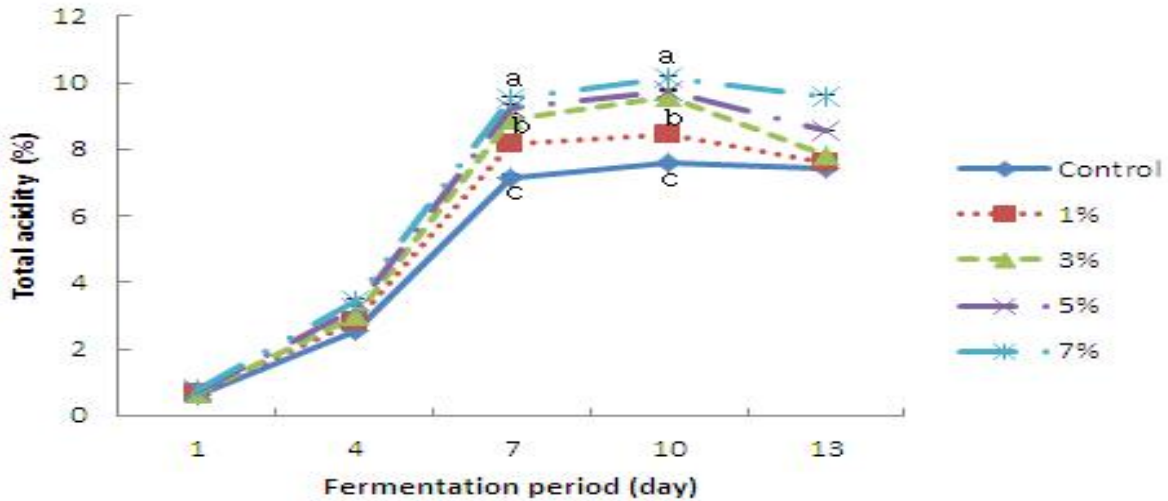


Fig 8.Changes in total acidity contents of vinegar added with different levels of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences (p<0.05)

③초산 발효 중 아미노산 함량의 변화

- 식초의 관능적인 맛과 품질에 영향을 주는 아미노산은 발효에 사용된 원료에서 분해되어 생성되기도 하며, 일부 아미노산은 미생물의 발효에 의하여 생합성 될 수 있으며, 또는 원료자체의 아미노산 성분이 최종 제품에 반영될 수 있다.
- 으름 열매 식초의 발효 후 아미노산을 측정한 결과는 Fig. 9와 같다. 담금 직후 아미노산의 함량은 대조군이 0.31%이며 으름 열매 첨가량이 1, 3, 5, 7%일 때 각각 0.31, 0.36, 0.25%로 나타나 으름 열매 첨가량에 따른 아미노산 함량에 상관관계는 없었으나, 발효 4일째부터 대조군과 으름 열매 첨가 1, 3, 5%에서 비슷해지면서 최종 아미노산 함량이 대조군, 으름 열매 첨가량 1, 3%에서 0.53%, 으름 열매 첨가량 5%에서 0.51%를 나타내 으름 열매 첨가량에 따른 유의적 차이는 없었다. 그러나 으름 열매 첨가 7%는 발효가 종료 될 때까지 지속적으로 증가하여 발효 10일째에서 아미노산 함량이 0.54%, 최종 13일째는 0.61%까지 나타나 다른 실험 군과 유의적 차이를 보였다. 으름 열매 첨가량이 가장 많은 7%에서 아미노산 함량이 대조군 보다 높은 것에는 으름 단백질과 누룩의 발효과정 중 미생물이 생산하는 acid protease와 peptidase 등의 효소 작용으로 분해되어 아미노산이 생성되었기 때문이다.

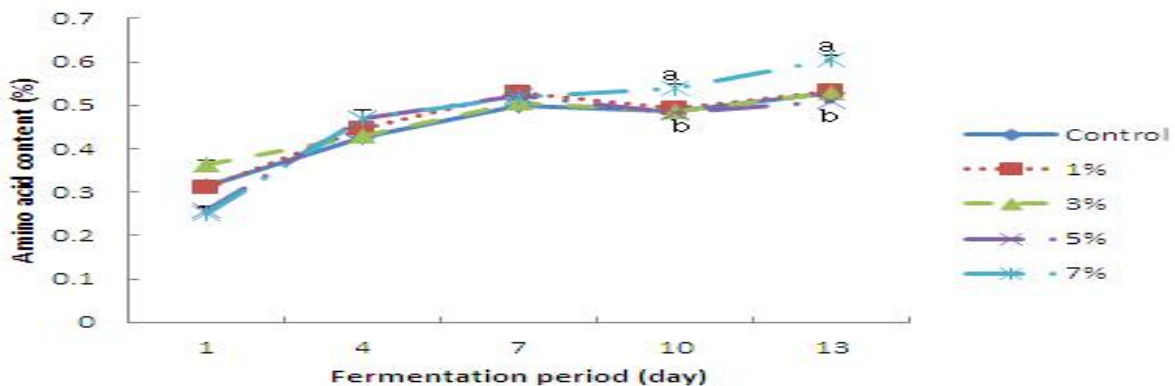


Fig.9 Changes in amino acid of vinegar added control, 1, 3, 5 and 7% of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences (p<0.05)

④ 으름 열매 식초의 색도, 총당 측정

- 으름 열매 식초의 초산 발효 중 색도, 총당 측정결과는 Table 2에 나타내었다. L값의 변화는 발효 1일째에 대조군이 38.62, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 37.45, 36.23, 34.07, 33.63로 으름 열매 첨가량이 증가될수록 L값이 유의적으로 감소하였다. 발효 13일째에 L값은 대조군이 51.99, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 47.18, 46.97, 43.02, 42.49를 나타내, 모든 실험 군에서 발효 1일째보다 13일째의 L값이 유의적으로 증가하여 발효가 진행됨에 따라 L값은 증가하였으나, 으름 열매 첨가량에 따라서는 유의적으로 감소하였다. 적색도를 나타내는 a값은 발효 1일째에 대조군이 -0.13, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.71, 1.67, 2.51, 2.74로 으름 열매 첨가량이 증가될수록 a값이 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째의 a값은 대조군이 -0.47, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 -0.13, 0.68, 1.36, 2.14를 나타냈으며, 모든 실험군에서 발효 1일째보다 감소하였고, 으름 열매가 첨가될수록 a값이 유의적으로 증가하였다. 또한, 황색도를 나타내는 b값은 발효 1일째에 대조군이 5.81, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 8.13, 9.03, 9.69, 9.99로 b값도 으름 열매 첨가량이 증가될수록 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째의 b값은 대조군이 7.09, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 9.46, 11.91, 12.19, 11.73을 나타내어, 모든 실험 군에서 발효 1일째보다 b값이 감소하였으며, 으름 열매 첨가량이 증가될수록 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째의 L, a, b 값은 시판 현미 식초에서 L, a 및 b-value 값이 각각 45.89, -0.66 및 8.15로 나타난 것과 유사하였으며, 무화과식초의 L값이 17.06~19.62인 것에 비해 높았다. 으름 열매 식초는 발효가 진행됨에 따라 L값이 증가된 것으로 보아 맑아진 것으로 보인다.
- 총당의 함량은 발효 1일째에 대조군이 4.48%, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 6.46, 7.9, 9.76, 11.37%로 으름 열매가 첨가됨에 따라 총당 함량이 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째의 총당 함량은 대조군이 2.54%, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 4.4, 5.639, 8.74%로 으름 열매 첨가량이 증가됨에 따라 총당 또한 유의적으로 증가됨을 보여주었다. 발효가 진행됨에 따라 당의 함량이 감소된 것에는 발효 1일째 14.0 °Brix에서 5일째 7.3 °Brix로 급격히 감소한 오디식초와 복분자 식초의 발효가 진행됨에 따라 15.0 °Brix에서 발효 2일째 7.3 °Brix로 감소했다는 결과와 유사하였다.

⑤ 관능검사

- 으름 열매를 첨가하여 만든 식초의 관능검사 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 색, 단맛, 신맛, 향은 으름 7%에서 다른 실험 군에 비하여 유의적으로 차이를 보였으며, 쓴맛은 으름 열매 첨가군 5%에서 유의적인 차이를 보였다. 목넘김, 전반적인 기호도는 다른 실험 군과 비교하였을 때 유의적 차이는 없었으나, 목넘김과 전반적인 기호도는 으름 열매 첨가군 1%에서 기호도가 가장 높았다. 전체적 관능평가에서 볼 때 으름 열매 7% 첨가 군이 가장 적합한 것으로 판단되었다.

Table 2. Changes in color, Total sugar of vinegar added 0, 1, 3, 5 and 7% of *Akebia quinata* during acid fermentation period

<i>Akebia quinata</i> (%)		1 day	13 day
L (Lightness)	0	38.62±0.07 ^a	51.99±0.43 ^a
	1	37.45±0.22 ^a	47.18±0.34 ^b
	3	36.23±0.27 ^a	46.97±0.25 ^b
	5	34.07±0.06 ^b	43.02±0.24 ^c
	7	33.63±0.17 ^b	42.49±0.47 ^c
a (Redness)	0	-0.13±0.02 ^d	-0.47±0.00 ^a
	1	0.71±0.02 ^c	-0.13±0.02 ^d
	3	1.67±0.02 ^b	0.68±0.02 ^c
	5	2.51±0.03 ^a	1.36±0.01 ^b
	7	2.74±0.02 ^a	2.14±0.03 ^a
b (Yellowness)	0	5.81±0.01 ^c	7.09±0.08 ^a
	1	8.13±0.03 ^b	9.46±0.22 ^d
	3	9.03±0.01 ^a	11.91±0.17 ^b
	5	9.69±0.02 ^a	12.19±0.04 ^a
	7	9.99±0.02 ^a	12.66±0.11 ^a
Total sugar (%)	0	4.48±0.01 ^c	2.54±0.01 ^c
	1	6.46±0.01 ^c	4.4±0.05 ^c
	3	7.90±0.01 ^{b,c}	5±0.01 ^{b,c}
	5	9.76±0.01 ^{a,b}	6.39±0.02 ^b
	7	11.37±0.00 ^a	8.74±0.01 ^a

Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscript in a column (a-e) are significant differences (p<0.05)

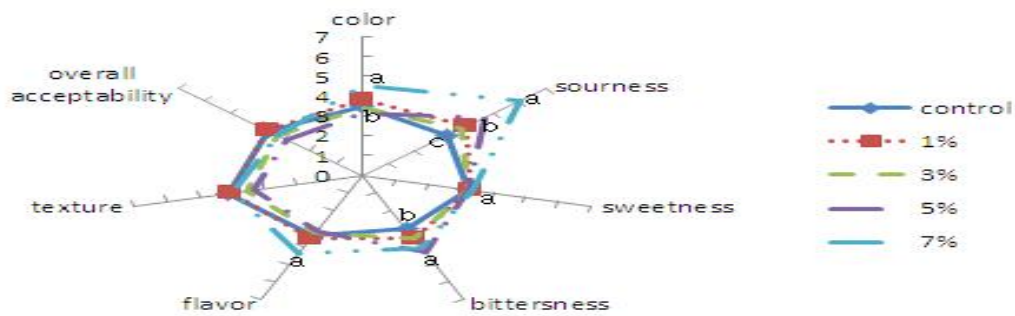


Fig. 10. Sensory evaluation of vinegar with different levels of *Akebia quinata*.

Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences (p<0.05)

2) 으름잎을 이용한 으름식초음료

① 알코올 발효 중 이화학적 특성

- 으름 어린잎을 첨가하여 제조한 식초의 알코올 발효 중 pH, 총산도, 당도 및 총 당과 알코올 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다.
- 알코올발효 1일째 pH는 대조군에서 6.16이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 6.05, 6.01, 6.11, 5.90으로 대조군과 시료간의 유의적 차이가 있으나 으름 어린잎 첨가군 간의 유의적 차이가 보이지 않았다. 알코올발효 4일째 대조군에서 4.25였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 4.24, 4.23, 4.23, 4.24로 대조군과 으름 어린잎 첨가군 간의 유의적 차이가 보이지 않았다. 으름 어린잎 첨가군 간의 유의적 차이는 없었다. 으름 발효 초기의 pH의 감소 원인은 으름에서 생성된 유기산 증가에 의한 것으로 보인다.
- 담금 직후 산도는 대조군에서 0.60%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 0.75%, 0.70%, 0.70%, 0.70%로 대조군과 으름 어린잎 첨가군 사이에 유의적 차이가 있었지만 으름 어린잎 첨가군 간의 유의적 차이는 없었다. 알코올발효 4일째에서 대조군에서 0.83%로 나타났으며 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 0.86%, 0.87%, 0.90%, 0.92%로 특히 대조군에 비해 3% 으름 어린잎을 첨가군에서 산도가 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 이는 Lee 등의 으름 막걸리 연구 결과 으름 첨가량에 따라 총산도가 증가한 결과와 같았다. 한편 Jang 등의 pH와 총산도는 총산이 증가함에 따라 pH는 낮아진다고 보고된 것과 유사한 결과를 보여주었다.
- 담금 직후의 총당은 대조군에서 9.64%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 9.69%, 10.49%, 10.54%, 11.49%로 으름 어린잎을 첨가할수록 총당이 유의적으로 높아지는 경향을 보였다. 그러나 알코올발효 4일째에서 대조군에서 4.84%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 5.77%, 5.88%, 6.27%, 6.98%로 알코올 발효 결과 으름 어린잎을 첨가할수록 총당의 함량이 유의적으로 증가 하였다. 이러한 결과는 Lee 등의 연구에서 으름 첨가량이 증가할수록 총당이 증가 하였다는 결과와 같았다. 담금 직후 총당이 감소하는 경향을 보인 이유는 amylase 작용으로 당분으로 분해됨과 동시에 효모의 영양원이나 발효 기질로 이용되므로 발효가 진행됨에 따라 총당 함량은 감소되는 것으로 보인다.
- 발효 1일째 알코올 함량은 대조군과 으름 어린잎 첨가군 모두에서 0%이었다. 알코올 발효 4일째 알코올 함량은 대조군과 으름 어린잎 첨가군에서 9%가 되었다. 알코올 함량의 급격한 증가이유는 누룩에 의해 당화된 당을 효모가 분해시키는 과정에서 에탄올이 만들어져 알코올 함량이 높아지는 것으로 보인다.

② 초산발효 중 으름 어린 잎 식초의 pH, 총산도 변화

- 초산발효 중 식초의 pH 변화 결과는 Fig. 11에 나타내었다. 초산발효 1일째 대조군에서 4.25였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 4.24, 4.22, 4.23, 4.26으로 시료간의 유의적 차이는 없었다. 그 후 계속 증가하여 초산발효 16일에 pH가 가장 높아 대조군에서 4.60이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 4.61, 4.62, 4.61, 4.58이었고 초산발효 마지막 날인 19일에는 다소 감소하여 대조군에서 4.55였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 4.53, 4.58, 4.56, 4.57을 나타내었으며 으름첨가에 따라 pH는 유의적 차이가 보이지 않았다.

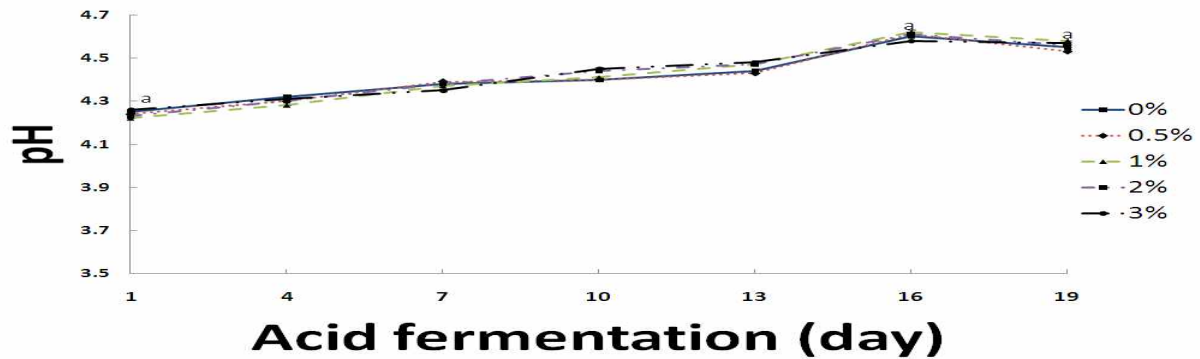


Fig.11 Changes in pH of vinegar added 0, 0.5, 1, 2, and 3% of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 1. Changes in pH, acidity, total sugar and alc *Akebia quinata* during alcohol fermentation period

		Fermentator	
		1	
		<i>Akebia quinata</i> (%)	
pH	0	6.18 \pm 0.00 ^a	
	0.5	6.05 \pm 0.00 ^b	
	1	6.01 \pm 0.01 ^b	
	2	6.11 \pm 0.01 ^{ab}	
	3	5.90 \pm 0.01 ^b	
Acidity (%)	0	0.60 \pm 0.10 ^b	
	0.5	0.75 \pm 0.00 ^a	
	1	0.70 \pm 0.03 ^a	
	2	0.70 \pm 0.03 ^a	
Total sugar (%)	0	9.64 \pm 0.05 ^c	
	0.5	9.69 \pm 0.01 ^c	
	1	10.49 \pm 0.01 ^b	
	2	10.54 \pm 0.01 ^b	
	3	11.49 \pm 0.02 ^a	
	0	0 \pm 0.00	

- 초산 발효 중 총산 함량 변화는 Fig. 12와 같다. 초산발효 중 총산도 변화는 초산발효 1일째에 대조군에서 0.83%로 나타났고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 0.86%, 0.87%, 0.90%, 0.92%로 유의적으로 차이가 보이지 않았다. 그러나 초산발효 4일째에 급격히 증가하여 대조군에서 8.2%로 나타났고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 8.9%,

9.1%, 9.3%, 9.7%로 으름 어린잎을 첨가 할수록 총산도가 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 이후 초산 발효 10일째까지 증가하여 대조군에서 10.48%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 10.48%, 10.76%, 10.38%, 10.30%로 가장 높은 총산도를 나타내었고 시료 간의 유의적 차이가 보이지 않았다. 초산발효 19일째 대조군에서 9.12%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 9.24%, 8.82%, 8.98%, 9.10%로 유의적 차이가 없었다.

- 총산은 식초에 있어서 양조과정 중 초산균의 작용으로 생성되는 초산이 대부분이며 이는 품질 관정에 중요한 성분의 하나로 일반적으로 국내 식초규격은 초산함량은 4% 이상으로 규정하고 있는데, 본 연구 결과에서도 초산함량이 4%이상으로 식초규격을 충족하였다. 한편 발효 10일 이후로는 산도 증가가 보이지 않는데 그 이유는 Kang 등의 유자식초 연구에서도 알 수 있듯이 초기 알코올 농도가 높아 유도기가 길어져 균의 생육이 억제되기 때문이라 보인다. 또 Shin 등 양파식초에서 발효 8일째에 5.39%로 최고치를 갖고 이후에 산도가 감소한 결과와 유사하며 이는 초산을 분해하는 과산화물이 원인인 것으로 보인다. 한편 pH 변화와 총산의 변화를 비교해 보면, 총산은 증가하고 있으나 pH는 비례적으로 감소하지 않음을 알 수 있는데 이것은 단백질 분해로 펩티드와 아미노산이 증가하여 식초의 완충 능력을 높여주었기 때문인 것으로 보인다.

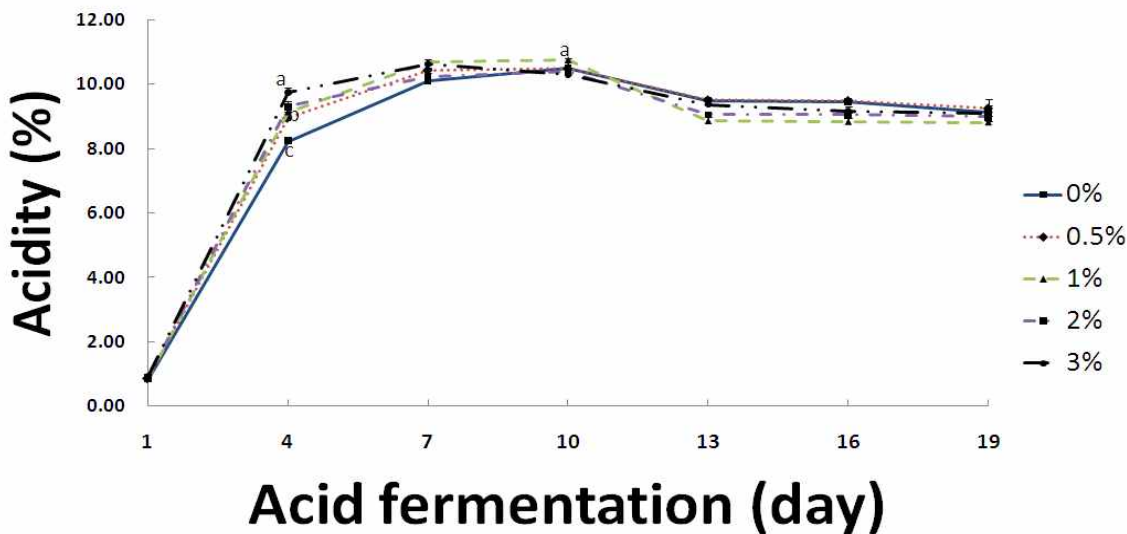


Fig. 12. Changes in acidity of vinegar added 0, 0.5, 1, 2, and 3% of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences ($p<0.05$).

③초산발효 중 으름 어린 잎 식초의 아미노산의 변화

- 초산발효 중 아미노산을 측정된 결과는 Fig. 13에 나타내었다. 초산발효 1일째의 아미노산은 대조군에서 0.42%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 0.42%, 0.44%, 0.44%, 0.44%로 대조군과 으름 어린잎 첨가군 간의 유의적 차이가 없었다.
- 발효일이 지날수록 점점 증가하여 초산 발효 10일째 대조군에서 0.70%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 0.71%, 0.62%, 0.70%, 0.66%로 각 시료마다 유의적 차이를 보이지 않았다. 이후 초산발효 19일째에 대조군에서 0.73%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%,

1%, 2%, 3%에서 0.74%, 0.79%, 0.81%, 0.80%로 으름첨가량이 2%, 3%에서는 아미노산함량이 증가하여 대조군에 비해 증가하여 유의적 차이를 보였다($p<0.05$).

- 으름 첨가군의 아미노산 함량이 높았고 이는 으름 어린잎 단백질과 누룩의 발효과정 중 미생물이 생산하는 acid protease와 peptidase 등의 효소 작용으로 분해되어 아미노산이 생성되어 아미노산 함량에 영향을 준 것으로 보여준다.

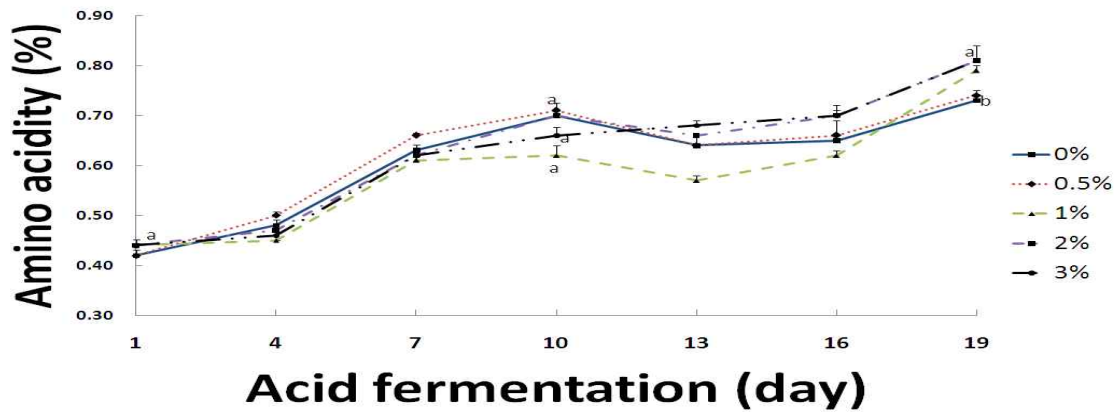


Fig.13 Changes in amino acid of vinegar added 0, 0.5, 1, 2, and 3% of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences ($p<0.05$).

④ 초산발효 중 으름 어린 잎 식초의 색도변화, 총당 결과

- 초산발효 중 식초의 색도변화, 총당 결과는 Table 2.에 나타내었다. L(Light)값은 초산발효 1일째 29.74~40.02를 시작으로 초산발효 마지막 날 20.31~25.43로 감소하였다. Seo 등의 감식초 연구경우 탄닌 첨가량이 높을수록 L값이 낮아지는 것으로 보아 발효일이 지날수록 탄닌 값이 높아져 L값이 낮아 졌을 것이라 보이며 으름 어린잎 첨가에 따라 L값이 낮아 진 것으로 보인다. 또한 Park 등의 고추식초 결과에서 발효초기 69.04~90.07값에서 발효 17일에 48.72~76.54값으로 감소하였다는 보고와 비슷하며, Kim의 무화과식초의 L값이 17.06~19.62인 결과와 유사하다. a(Redness)값은 초산 발효 1일째 -0.82~-0.49이었고 이후 증가하여 초산발효 19일째에 1.41~2.31로 발효일이 지남에 따라 a값이 증가됨을 보였다. Park 등도 고추 식초에서 a값이 -0.44에서 0.40으로 증가된다고 보고하였다. b(Yellowness)값은 초산발효 1일째 6.09~9.11에서 초산발효 19일째에 3.57~4.72로 감소하였다. 이는 Kim 등의 현미식초 b값 3.38과 결과가 유사하다. 총당값은 초산발효 1일째 대조군에서 4.84%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 5.77%, 5.88%, 6.27%, 6.98%로 으름 어린잎 첨가에 따라 총당 값이 유의적으로 증가 하였다. 이 후 총당이 감소하여 초산발효 19일째 대조군에서 4.66%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 5.55%, 5.57%, 5.97%, 5.69%로 대조군에서 가장 낮고 0.5%와 1%간의 유의적 차이는 없었으며 2%시료에서 총당 함량이 가장 높았다. Kim과 Yoon의 석류즙을 첨가하여 제조한 막걸리에서 발효 초기 석류즙 첨가가 될수록 더 높은 당 함량을 나타낸 결과와 비슷한 결과를 나타냈다. 또한 Keum의 호박식초 연구에서 총당이 지속적으로 감소하여 30일째 1.53 mg/mL보여 주었으며, 초

산발효 됨에 따라 총당이 감소하는 이유는 초산균이 당을 효과적으로 이용하였기 때문이다.

Table 2. Changes in color and total sugar of vinegar of *Akebia quinata* during acid fermentation period

Day	Hunter's color	<i>Akebia quinata</i> (%)				
		0	0.5	1	2	3
1	L	37.91±0.36 ^b	36.51±0.20 ^c	40.02±0.50 ^a	34.44±0.27 ^d	29.74±0.13 ^e
19		25.43±0.16 ^a	23.88±0.13 ^b	23.88±0.13 ^c	23.25±0.16 ^d	20.31±0.08 ^e
1	a	-0.81±0.02 ^d	-0.82±0.01 ^d	-0.76±0.02 ^c	-0.54±0.03 ^b	-0.49±0.03 ^a
19		2.28±0.02 ^a	2.31±0.04 ^a	1.80±0.02 ^c	1.94±0.03 ^b	1.41±0.03 ^d
1	b	6.90±0.08 ^d	7.06±0.05 ^c	9.11±0.04 ^a	7.77±0.04 ^b	6.09±0.03 ^e
19		3.96±0.02 ^d	4.58±0.01 ^b	4.23±0.02 ^c	4.72±0.04 ^a	3.57±0.02 ^e
1	Total sugar(%)	4.84±0.01 ^d	5.77±0.39 ^c	5.88±0.01 ^{b,c}	6.27±0.01 ^b	6.98±0.35 ^a
19		4.66±0.02 ^d	5.55±0.02 ^c	5.57±0.00 ^c	5.97±0.02 ^a	5.69±0.01 ^b

Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences (p<0.05).

⑤으름 어린 잎 식초의 관능검사 결과

- 식초 원액의 관능검사 결과는 Fig. 14.에 나타내었다. 색은 으름 어린잎 첨가군 2%에서, 신맛 또한 으름 어린잎 첨가군 2%에서 기호도가 높게 나왔으며, 단맛은 으름 어린잎 첨가군 1%에서 기호도가 높았다. 쓴맛은 으름 어린잎 첨가군 3%에서 기호도가 높게 나왔고, 으름 어린잎을 첨가할수록 유의적으로 증가 하였다. 향은 으름 어린잎 첨가군 2%에서, 목넘김은 으름 어린잎 첨가군 1%에서 높았으며 전반적인 기호도는 으름 어린잎 첨가군 1%와 2%에서 가장 높게 나타났다. 전체적 관능적인 기호도를 통계적으로 분석한 결과 으름 어린잎 첨가량 2% 첨가군이 가장 적합하다고 판단되었다.

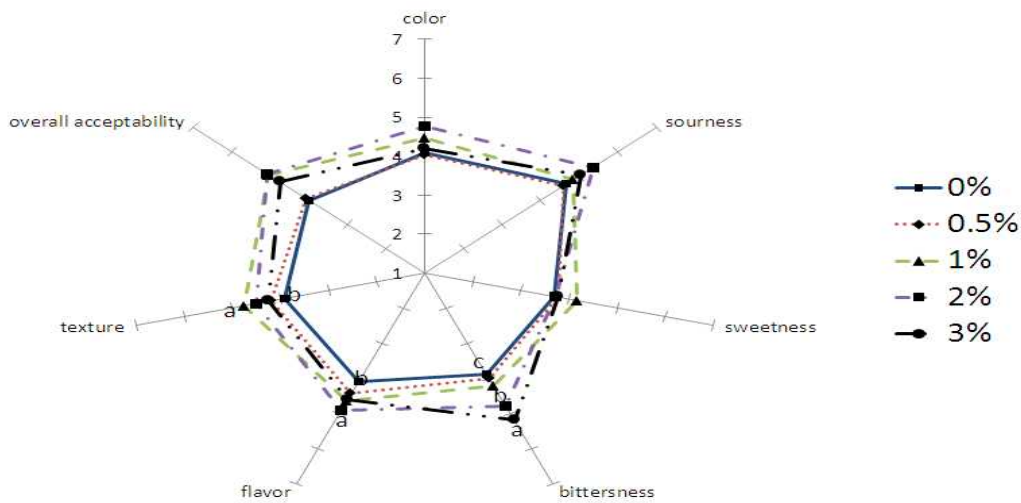


Fig. 14. Sensory evaluation of vinegar with different levels of *Akebia quinata* (vinegars in 22 day fermentation). Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

(4) 생산 공정 적용을 위한 으름의 지표물질 측정

1) 으름열매 식초 음료

	poly phenol mg/100g	flavonoid mg /100g	tanin mg /100g
control	76.77083333	43.07693	0.314
1%	61.04081033	44.35273	0.3343
3%	193.3010374	45.80483	0.3543
5%	952.1139166	60.6761	0.3756
7%	1022.421217	63.72423	0.37925

2) 으름잎 식초 음료

	poly phenol mg GAE/100g	Flavonoid mg CE/100g	Tanin mg TAE/100g
0%	3555.425667	2089.583333	3596.33
0.5%	3682.716774	1927.083333	3538

1%	3976.316305	2114.583333	3513
2%	4146.701775	2822.916667	3293
3%	4079.07614	2927.083333	3618

-으름열매나 으름잎 식초 음료에서 폴리페놀, flavonoid, 탄닌 성분이 지표 성분으로써 이용될 경우 검출 함량이 높기 때문에 이용하게 이용될것으로 보여진다.

(5) 시제품 개발에 대한 선호도 조사 및 시장분석

1) 으름열매 함량 결정

으름열매는 달콤하나 초음료시 누룩발효를 통한 초 음료는 곡취가 발생 거부감을 많이 주었음 그러나 색, 단맛, 신맛, 향은 으름 7%에서 다른 실험 군에 비하여 유의적으로 차이를 보였으며, 쓴맛은 으름 열매 첨가군 5%에서 유의적인 차이를 보였다. 목넘김, 전반적인 기호도는 다른 실험 군과 비교하였을 때 유의적 차이는 없었으나, 목넘김과 전반적인 기호도는 으름 열매 첨가군 1%에서 기호도가 가장 높았다. 전체적 관능평가에서 볼 때 으름 열매 7% 첨가 군이 가장 적합한 것으로 판단되었다. 으름 열매의 함량 결정은 7% 함량을 결정하였다.

2) 음료 base의 종류 및 함량 결정, 향의 종류 및 함량 결정, 감미료, 점증제 등 기타 첨가물은 관능검사를 병행 하면서 수행 하고자 한다,

3) YLFGJA 전날 시료를 제조하여 4℃냉장고에 보관하였고 실험 5분전 냉장고에서 꺼내 검사 직전에 일회용 플라스틱 용기에 30 mLTr 담아 평가시 온도가 5.5℃가 되도록 하였다. 각시료의 용기는 난수표에서 선택한 세자라 숫자를 표시 하였고 제시순서는 excel를 이용하여 무작위로 제시하였다.

시료와 시료사이에 입을 행긋 잇는 정수된 물과 뺀는 컵을 함께 제공하여 시료 평가 전에 시료의 강한 특성에 따른 전 시료의 혼란과 감간의 둔화를 줄이기 위해 2-3번 정도 충분한 입행긋을 하도록 하였다.

4) 평가는 소비자 패널과 1;1면접 방식으로 실시 하였고 전반적 기호도, 단맛의 정도, 향미의 정도,신맛과 목넘김 정도를 가장 좋은 것 7점으로 하고 낮은 점수를 1점으로 배분하였다.

5) 으름열매는 6-7%사이에서 최적배율을 결정하였다.

색	대조군	2%	4%	6%	8%
1	7	5	5	5	7
2	6	7	6	6	6
3	7	3	5	5	5
4	5	3	4	4	6
5	5	4	4	4	3
6	6	5	5	5	5
7	7	6	6	6	6
8	4	3	4	5	3
9	7	6	6	6	6
10	7	6	5	5	6

11	6	4	5	5	4
12	6	4	5	6	5
13	6	5	5	5	5
14	7	6	6	5	7
15	6	5	5	5	4
16	4	5	5	6	6
17	5	6	6	6	6
18	5	5	6	7	7
19	7	6	6	6	6
20	6	5	5	5	5
21	4	3	3	3	4
22	7	6	6	5	4
23	7	6	6	5	1
24	5	5	6	5	6
25	5	5	5	7	6
26	3	4	5	6	7
27	2	4	7	7	4
평균	5.62963	4.888889	5.259259	5.37037	5.185185

5)

단맛	대조군	2%	4%	6%	8%
1	2	3	4	4	3
2	4	2	2	1	1
3	7	6	6	5	4
4	3	4	4	5	5
5	7	6	5	5	7
6	7	6	5	7	7
7	6	6	5	4	4
8	3	3	3	2	2
9	4	3	3	2	2
10	6	6	5	4	4
11	5	4	5	5	5
12	2	2	2	2	3
13	5	4	5	5	4
14	6	7	4	5	4
15	5	5	6	5	5
16	4	4	3	4	3
17	1	3	4	5	4
18	6	6	5	5	4
19	2	3	3	3	3
20	3	4	3	3	3
21	7	6	6	5	4
22	4	1	2	3	2
23	6	6	5	5	5
24	5	5	4	3	2
25	7	6	5	4	3
26	7	6	5	4	2
27	2	7	5	5	4
평균	4.666667	4.592593	4.222222	4.074074	3.666667

향	대조군	2%	4%	6%	8%
1	6	5	5	5	4
2	6	6	5	6	6
3	5	2	6	6	5
4	7	6	6	5	3
5	3	4	3	3	3
6	4	4	3	6	4
7	6	6	5	5	4
8	2	2	2	3	3
9	3	4	3	5	6
10	5	4	7	6	7
11	5	6	4	5	4

12	5	4	6	6	5
13	6	6	6	5	6
14	5	4	4	5	6
15	6	5	4	4	4
16	5	6	7	7	7
17	4	4	5	5	5
18	5	5	5	6	6
19	6	5	4	6	6
20	4	5	5	5	4
21	4	4	4	4	5
22	7	6	7	5	7
23	4	3	3	2	1
24	3	4	5	5	5
25	4	4	5	5	7
26	5	3	4	6	7
27	2	5	7	5	5
평균	4.703704	4.518519	4.814815	5.037037	5

기호도	대조군	2%	4%	6%	8%
1	6	5	4	4	4
2	6	6	5	5	5
3	6	3	5	3	5
4	7	5	5	4	3
5	5	6	3	3	3
6	5	5	3	6	4
7	7	6	5	5	3
8	2	3	3	5	4
9	4	4	3	5	4
10	5	5	6	6	7
11	6	6	4	5	3
12	5	4	4	6	4
13	6	5	5	5	7
14	5	4	5	5	5
15	5	5	5	5	4
16	4	5	5	6	6
17	4	4	4	5	5
18	5	5	4	4	3

19	7	7	6	7	6
20	7	6	6	5	4
21	3	4	4	5	5
22	7	6	7	5	5
23	5	6	7	2	0
24	3	4	5	5	4
25	5	5	7	5	5
26	2	3	4	5	7
27	2	5	7	5	4
평균	4.962963	4.888889	4.851852	4.851852	4.407407

3. 3차년

(1)으름을 이용한 음료 시제품 개발

완숙과실 및 어린 잎의 이물질을 제거, 물기를 없앤 후 으름열매 또는 잎 10kg을 파쇄 후 당 첨가(25%)와 누룩 균 5kg 및 정제효소 5g을 더하여 25° C 조건에서 15일간의 발효과정을 진행한다. 발효 후 알코올 분리를 위하여 75-80° C 조건에서 30분간 열처리를 진행한다. 알코올이 제거된 발효액을 여과과정을 거친 후 정제수 10L에 희석하여 으름음료를 완성한다.

(2)으름을 활용한 혼합복합음료 베이스 제조 및 음료 개발

1) 으름식혜

물 1L에 고두밥 250g을 끓였다. 그리고 물 5L와 1% 으름가루를 첨가하여 100°C에 1시간동안 끓여 으름식혜(AS)를 만들었다.

2) 으름 혼합음료

혼합음료제조는 물 5L에 으름 열매 1%와 대추 1%, 감초 0.4%를 넣어 끓였다. 식힌 후 4°C에 보관하였다.

3) 으름어린차

5g 정량하여 20배 따뜻한 (40°C)에 5분간 담가서 용출 한후 말린 은연두빛 차 음료를 만들었다.

(3)으름을 이용한 음료의 저장유통기간 설정관능품질 변화 검토

	texture	smell	color	sweet	sour	bitter
으름혼합음료	6.2	4.1	5.6	5.5	4.1	4.5
으름열매혼합음료	6	4.6	5	6.1	3.7	4.2
으름식혜	6	6.1	4.6	6.7	4	3.9
으름잎차	6.4	6	6.5	4.7	4	4.9

으름잎차와 으름식혜가 관능적 종합 평가에서 우수하였음.

(4)으름을 이용한 음료의 제품생산 경제성 평가으름을 이용한 식초음료베이스 개발

1)으름열매 초 음료

본 실험에서는 쌀(전라남도 나주), 누룩(부산광역시 금정구 금성동), 엿기름(경기도 김포시 통진읍)에서 제조된 것을 구입하여 사용하였다. 성숙한 으름 열매를 충남 홍성군 광천읍 오서산에서 채취된 것을 구입, 동결 건조하여 사용하였다. 종초는 *Acetobacter pasteurianus*를 실험실에서 배양하여 사용하였으며, 미리 액체배지에 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 72시간 정치배양 시켰다.

식초 제조

쌀 1 kg을 씻고 약 15시간정도 물에 불렸다. 이후 1시간 물을 빼고 거즈에 담아 찜통에 넣고 찌서 고두밥을 만들고 물 3 L와 누룩 300 g, 엿기름 400 g을 가하여 혼합하였다. 그 다음 으름을 첨가하지 않은 대조군과 쌀의 중량 1 kg에 대해서 1, 3, 5, 7% (w/w) 으름 열매를 혼합한 것을 25°C에서 4일간 1차 알코올 발효시켰다. 1차 발효액에 초산발효를 위해 물과 희석하여 9% 알코올 함량이 되도록 조정된 뒤, 종초 10%(v/v) 접종하여 30°C에서 13일 발효시켜 으름 열매 식초를 제조하였다.

2) 으름 어린잎 초 음료

재료는 지리산 함평지역에서 채취한 으름 어린잎을 깨끗이 수세하여 세정 및 세절하여 자연 건조 후 마쇄하여 실험에 사용하였고, 쌀(전라남도 나주), 누룩(부산광역시 금정구 금성동), 엿기름(경기도 김포시 통진읍)은 제조된 것을 구입하여 사용하였다. 종초는 *acetobacter pasteurianus*를 실험실에서 배양하여 사용하였고 미리 액체배지에 2% (v/v)접종하여 37°C에서 72시간 정치배양 시켰다.

본 연구에 사용된 식초는 쌀 1 kg을 세척하여 15시간 동안 물에 침지한 후, 채에 받쳐 60분 동안 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 쌀을 찜 솥에 넣고 100°C에서 50분 동안 증자하고 10분 뜸을 들인 후 고두밥을 만들었다. 고두밥을 식힌 후(25°C) 10 L의 유리병에 고두밥(1.5 kg), 누룩(500 g), 엿기름(500 g)을 버무린 후 생수(3 L)를 넣고 골고루 섞어주어 대조군을 제조하였다. 으름 첨가군은 대조군에 으름을 각각 0.5% (5 g), 1% (10 g), 2% (20 g), 3% (30 g) 첨가하여 제조하였다. 3일간 25°C 인큐베이터에 알코올 발효 후 종초 10% (v/v)를 접종하여 19일간 보관하여 사용하였다.

[2]. 1 협동 : 으름의 유효 성분 추출 동정통한 지표물질 개발 및 oleanolic acid 및 triterpenoide 성분의 이화학적 안전성 확보를 통한 제품기술개발

1. 1차년

(1) 국내 자생 으름을 이용한 용매별에 따른 추출 조건 탐색

1) 생리 활성에 따른 용매의 추출 조건 탐색

- 건조된 으름의 열매(30g)를 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water(300g)에 섞어 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (rpm 200, temp 25°C) 24시간 shaking 한 후 filter paper(Whatman)로 여과하여 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water에 대한 분획물을 얻었음. 이를 rotary vacuum evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음. 농축된 시료를 ethyl acetate, acetone, methanol, 70% ethanol, chloroform, hexane, water 용매를 농축된 시료에 넣어 농축된 시료를 채취 한 후 vial에 넣고 -70°C 초저온냉동고 (Ilshin Co., deep freezer)에 1시간 냉동시킨 후 동결건조기(Ilshin Co., freezing dryer)에 동결건조 하였음.

2) 으름열매 용매별 추출물의 생리활성

① Free radical 소거능

- 으름 열매를 7가지 용매에서 추출한 뒤 DPPH 방법을 이용하여 으름 열매추출물의 항산화능을 알아보았음. 이 실험의 결과로 아세톤과 메탄올추출물에서 농도에 따라 유의적으로 항산화능이 증가됨을 확인하였음. acetone 층과 70% ethanol 층에서는 free radical 활성이 보여 주었음.
- 그러나 대량 추출 조건으로 물 fraction에서는 활성이 관찰되지 않았음(그림 4)

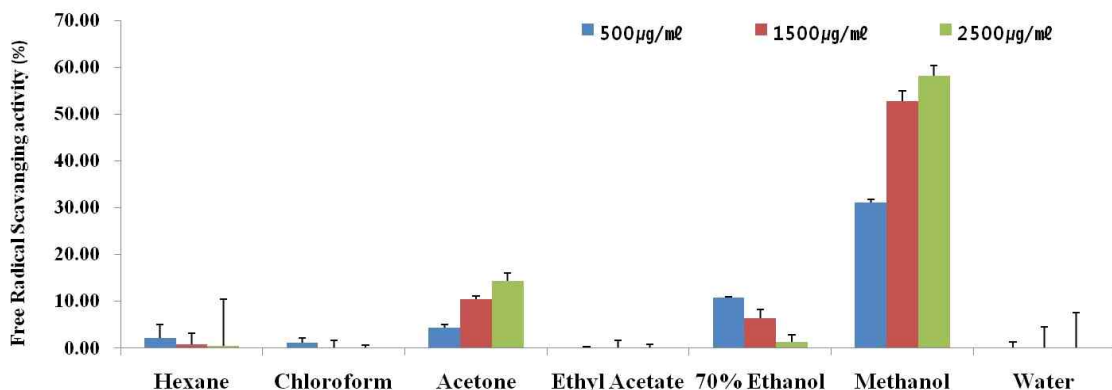


그림4. Free radical scavenging effect of different fractions (500, 1500, 2500 µg/ml) isolated from

AQ fruits compared to control.

② 암세포 성장억제 효과

(a) 전립선암(Du 145) 세포에서의 용매별 항암활성

- 전립선암에서는 50 ug/ml 농도에서는 아세톤 추출물, 70% 에탄올 추출물, 메탄올 추출물에서만 활성이 관찰되었음. 250 ug/ml 농도에서는 유기용매 추출물에서는 활성이 관찰되었으나 물추출은 어떠한 농도에서도 항암 활성이 관찰되지 않았음 (그림5).

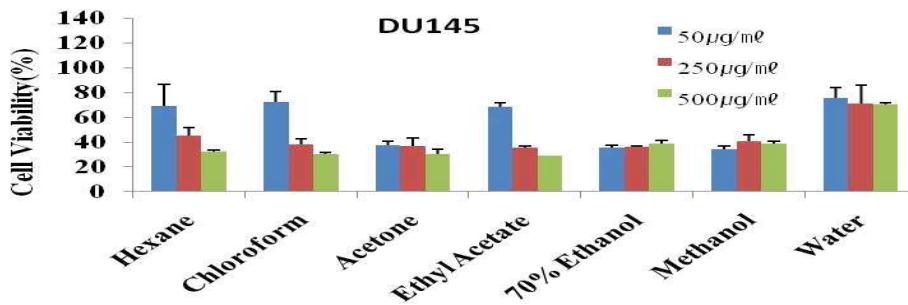


그림 5. Cytotoxicity of OA (5, 25 and 50 µg/ml) from different fractions against Du145 cells using MTT assay.

(b) 뇌종양 세포(U87) 세포에서의 용매별 항암활성

- 뇌종양 세포(U87) 실험에서는 50 ug/ml 농도에서는 70% 에탄올 추출물, 메탄올 추출물에서만 활성이 관찰되었음. 250 ug/ml 농도와 500 ug/ml에서는 유기용매 추출물에서는 활성이 관찰되었으나 물추출물은 어떠한 농도에서도 항암 활성이 관찰되지 않았음 (그림6).

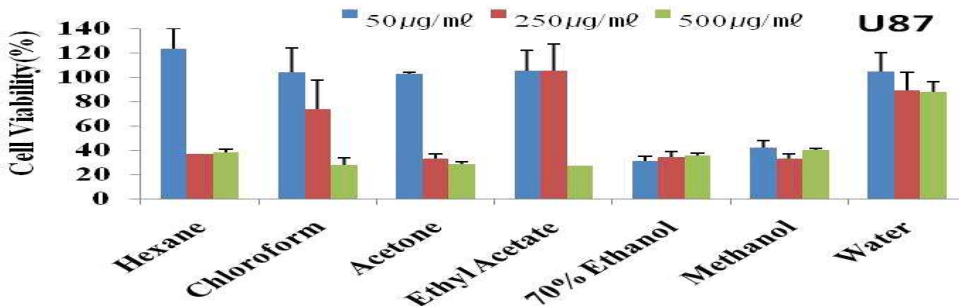


그림6. Cytotoxicity of OA (5, 25 and 50 µg/ml) from different fractions against U87 cells using MTT assay.

(c) 자궁경부암 (Hela) 세포에서의 용매별 항암활성

- 자궁경부암 (Hela) 세포 실험에서는 50 ug/ml 농도에서는 70% 에탄올 추출물에서만 활성이 관찰되었음. 250 ug/ml 농도와 500 ug/ml에서는 유기용매 추출물에서는 활성이 관찰되었으나 물추출물은 어떠한 농도에서도 항암 활성이 관찰되지 않았음 (그림7).

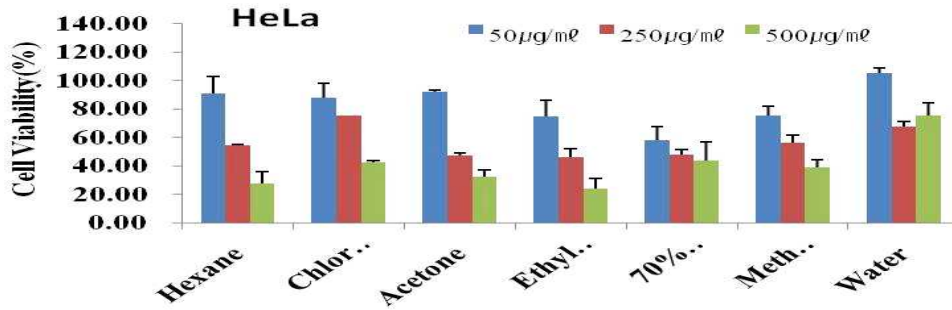


그림7.Cytotoxicity of OA (5, 25 and 50 µg/ml) from different fractions against HeLa cells using MTT assay.

(d) 유방암 (MCF-7) 세포에서의 용매별 항암활성

- 유방암 (MCF-7) 세포실험에서는 50 ug/ml 농도에서는 항암활성이 관찰되지 않았음. 500 ug/ml 농도에서만 hexan 용매 추출물에서는 활성이 관찰되었으나 70% 에탄올, 메탄올, 물추출물은 어떠한 농도에서도 항암 활성이 관찰되지 않았음 (그림8).

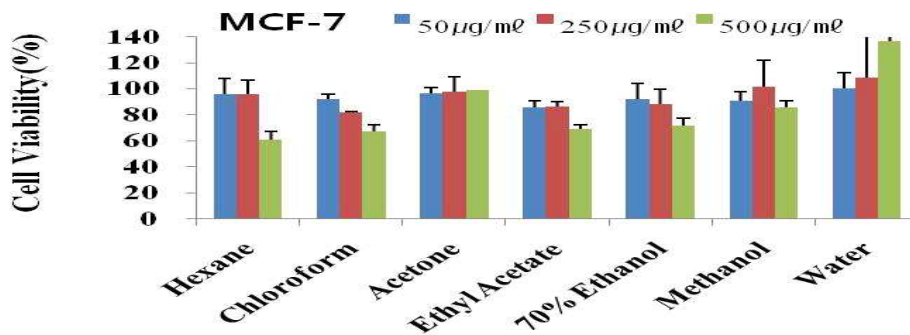


그림8.Cytotoxicity of OA (5, 25 and 50 µg/ml) from different fractions against MCF-7 cells using MTT assay.

- 용매별 활성 실험결과 으름 열매 결과 물 추출물에서는 활성이 관찰되지 않았음. 정제 fraction은 메탄올과 70% 에탄올 추출물 fraction에서 활성 물질을 정제 하는것이 가장 우수한 것으로 보여 짐. 그러나 항산화 활성에서 메탄올 활성이 높았기 때문에 활성 분리 정제는 메탄올을 사용 추출을 결정 하였음.

③ Nitric oxide 생성 억제 활성

- 으름 열매의 추출물들의 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제 활성능을 관찰하기 위하여 NO 분석을 하였음. 으름 열매 메탄올 추출물과 70%에탄올의 NO 생성억제능을 보여 주었음. 의 IC₅₀값은 208.53~704.45 $\mu\text{g/ml}$ 으로 계산되었고 RAW 264.7의 생존율에는 영향이 없었다. 메탄올 추출물에서 가장 효과적인 NO생성 억제능이 보였음. (그림9). 결과에 따르면, 70% ethanol과 methanol 추출물이 가장 높은 NO 생성저하 능력이 있음이 확인됨.
- IC₅₀농도에서는 메탄올이 207.53 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 낮았으며70% ethanol이 209.69 $\mu\text{g/ml}$ 로 다음 활성을 보여 주었음.(표2)

Table 2. NO inhibition effects of the fractions in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophage Cell

Extract	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ^a						
	Hexane	Chloroform	Acetone	Ethyl Acetate	70% Ethanol	Methanol	Water
NO inhibition	387.27 ^b	339.56	248.89	243.45	209.69	207.53	704.45

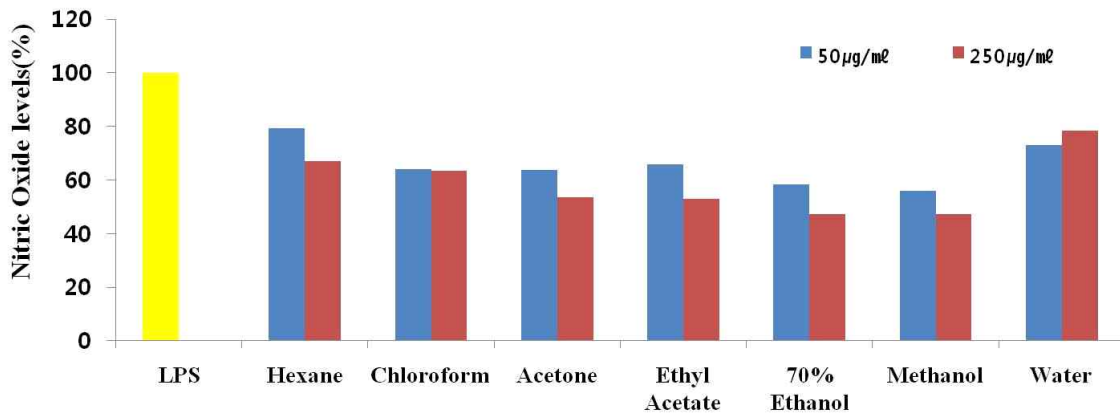


그림9 Inhibitory effect of different fractions on NO production in RAW 264.7 macrophages cells

④ 으름 열매 용매별 추출물의 항균활성

- S.enterica(S.e)균에서 chloroform 추출물이 1.17cm로 가장 높게 나타났고, K.pneumoniae(K.p)에서도 chloroform 추출물이 1.20cm로 가장 높게 나타났음. B.cereus(B.c)에서는 chloroform, ethyl acetate, acetone, 70% ethanol 추출물이 1.00cm로 가장 높게 나타났음. B.subtilis(B.s)에서 methanol 추출물이 1.10cm, S.flexneri(S.f)에서 70% ethanol 1.13cm로 나타났고 E.coli(E.c)에서 chloroform 추출물이 가장 높게 나타났다. 전반적으로 열매에서는 chloroform, methanol, 70% ethanol 층에서 가장 많은 활성을 보였음.(표 3)

Table 3 Antimicrobial effect of solvent extract of *Akebia quinata* fruit

microbial strains	<i>Akebia quinata</i> fruit (10mg/mL)					
	S.enterica	K.pneumoniae	B.cereus	B.subtilis	S.flexneri	E.coli
hexane	1.03±0.23 ^{aAB}	0	0.90±0 ^{aA}	1.00±0 ^{aAB}	0.90±0 ^{aB}	0.93±0.06 ^{aC}
chloroform	1.17±0.12 ^{aA}	1.20±0 ^{aA}	1.00±0 ^{bA}	1.00±0 ^{bAB}	1.00±0 ^{bB}	1.17±0.06 ^{aA}
ethyl acetate	0.97±0.06 ^{aAB}	0.90±0 ^{aB}	1.00±0 ^{aA}	0	0	0.90±0 ^{aC}
acetone	0.90±0 ^{aB}	1.00±0 ^{aA}	1.00±0 ^{aA}	1.00±0 ^{aAB}	1.00±0.10 ^{aB}	1.03±0.06 ^{aB}
Methanol	1.00±0.10 ^{aAB}	1.00±0 ^{aA}	0.97±0.06 ^{aA}	1.10±0.17 ^{aA}	0.97±0.06 ^{aB}	0.93±0.06 ^{aC}
water	0	0.90±0 ^{aB}	0.90±0 ^{aA}	0	0	0.90±0 ^{aC}
70% ethanol	1.00±0.10 ^{aAB}	1.10±0 ^{aA}	1.00±0 ^{aA}	0.95±0.07 ^{aB}	1.13±0.12 ^{aA}	0.90±0 ^{aC}

Values are mean ± standard deviations of triplicate determination. different superscript in a column (a~c),(A~C) are significant differences ($p < 0.05$).

(2) 국내 자생 식물 으름에서 oleanolic acid 및 triterpenoide 조건 탐색

1) 국내 자생 식물 으름에서 oleanolic acid 조건 탐색

- 동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출하였다. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리하였다. 그 중 butanol 가용부 (20g)을 5% HCl(MeOH/H₂O)에 4시간동안 가수분해를 시킨다. 그 혼합물을 ethyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척을 한다. 그 혼합물을 silica gel(450-580mesh)을 사용하여 분리한 결과는 다음 그림 10과 같음.

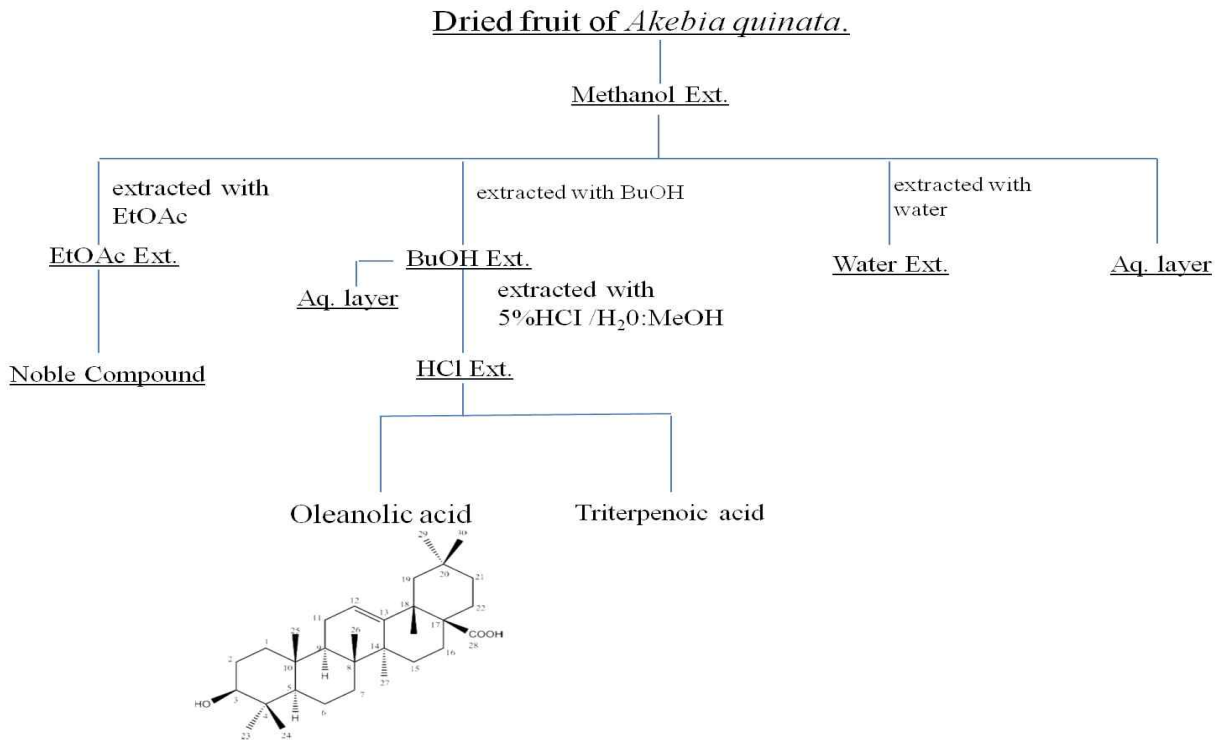


그림10. Isolation scheme of OA from AQ fruits

2) oleanolic 추출 부탄을과 HCl fraction의 활성

① Free radical 소거능

- 으름 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 추출물의 농도 의존적으로 소거능 활성이 증가하였으며 BuOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 가장 뛰어난이라 다음 fraction이 HCl fraction에서는 항산화 활성이 감소되고 부탄을 추출후 물 추출물에서 항산화 활성이 증가 하였음. 그러나 문헌조사 시 **oleanolic 추출은** HCl fraction에서 추출 조건이 검색되어 5% HCl: methano: H₂O = 30 ml: 36ml 144ml 를 처리하였음. 용매별 추출조건에서는 물 추출물에서는 항산화 활성이 검출되지 않았음. 그러나 메탄올 처리후 에틸아세테이트 부탄을 처리후 물 추출물에서는 항산화 활성이 검출되었음. 이 부분에 대한 항산화 활성 정제가 추가로 요구됨(그림11)

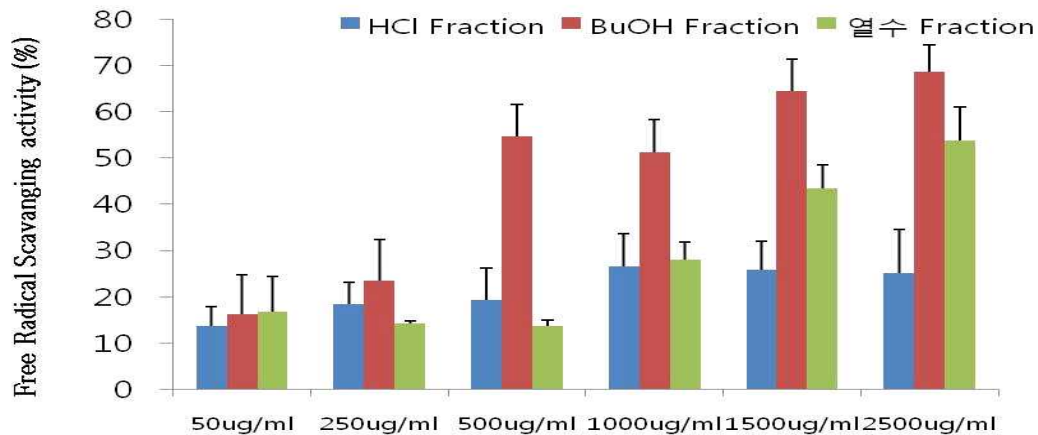


그림11. Free radical scavenging effect of different fractions (50, 250, 500, 1000, 1500, 2500 µg/ml)

isolated from AQ fruits compared to control.

② NO 생성 억제능

- NO 생성 억제능은 HCl 추출물이나 BuOH 추출물에서 비슷하게 나타났으며 으름 추출물의 농도가 높아질수록 NO 생성 억제활성이 높아지는 결과를 보여주었다. 물 추출물에서는 NO생성 억제능을 확인할 수 없었다(그림12).

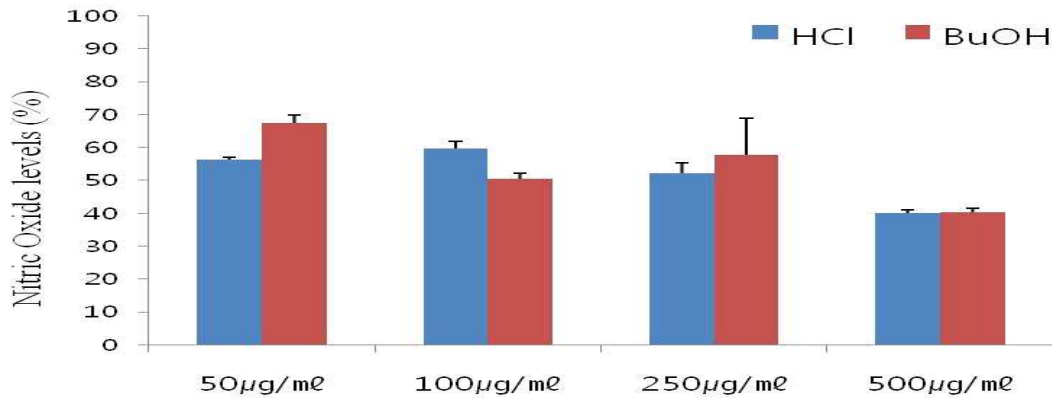


그림12 Inhibitory effect of OA from AQ fruits on NO production in RAW 264.7 macrophages cells

3) oleanolic acid 의 활성

항암활성은 Hela, MCF-7, U87 모두에서 우수한 항암 활성을 보였음.(그림13)

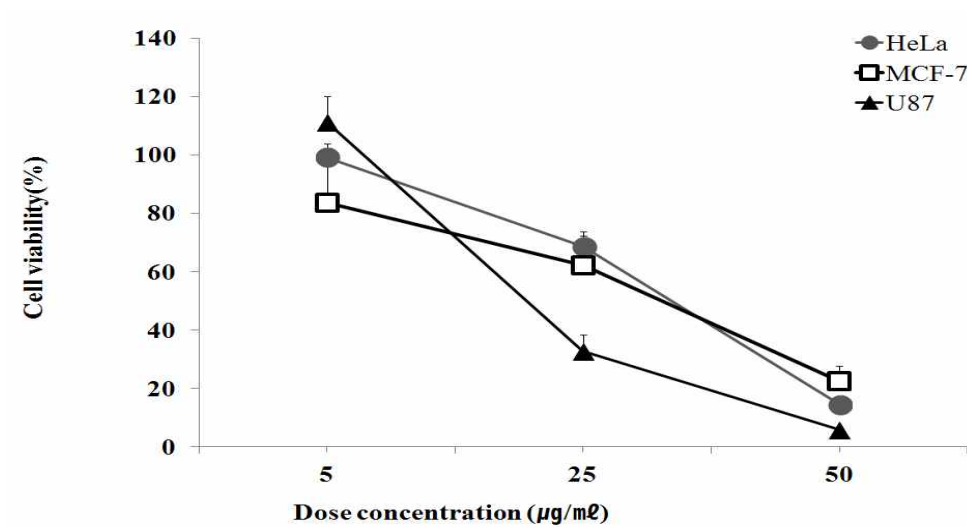


그림 13 Cytotoxicity of OA (5, 25 and 50 µg/ml) from AQ fruits on HeLa, MCF-7 and U87 cells using MTT assay.

4) 국내 자생 식물 으름에서 triterpenoide 조건 탐색

① 활성 물질 정제 과정 : 대량추출

- 건조된 으름열매(10kg)에 methanol (100L)을 한 달간 상온에서 방치 후 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (200 rpm, 25℃) 24시간 shaking 한 후 filter paper (Whatman)에 여과하여 methanol의 분획물을 얻었고, 이를 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음. 농축된 methanol 추출물을 methanol에 재용해하고 다시 이를 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음. 농축한 methanol 추출물에 활성을 확인하였고 ethyl acetate, n-butanol, water층으로 나누어 shaking incubator(SI-600 Lab, companion)에 (200 rpm, 25℃) 24시간 shaking 한 후 filter paper(Whatman)로 여과하여 얻은 ethyl acetate, n-butanol, water층을 다시 evaporator(R-114, Buchi Co., Switzerland)로 감압, 농축하였음(그림14).

② 으름열매 추출물의 분리정제과정

- 활성이 있는 ethyl acetate 추출물 시료를 silica gel(25g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck, Germany)을 ethyl acetate로 column (1.5×30 cm)에 충전 시킨 후, hexane 100, hexane : ethyl acetate 80 : 20, hexane : ethyl acetate 70 : 30, hexane : ethyl acetate 50 : 50, methanol 으로 층을 나누어 분획하였다. fraction 별 추출 수율은 표 1과 같음. fraction 추출 수율은 비스듬한 지만 활성을 뚜렷한 차이를 보였음. 이후 활성이 가장 좋은 fraction 80:20(v/v), 50:50(v/v)을 TLC에서 다시 분리하였음. TLC분리 전개용매는 80:20은 hexane-ethyl acetate(3:1), 50:50은 hexane-ethyl acetate(3:2)로 전개하였다. 이 중 80:20은 1~4 fraction, 50:50은 A~C fraction으로 나누어 활성을 확인하였음.

표4 으름열매 fraction 추출 수율

fraction	추출 수율
80:20	4.49%
70:30	4.26%
50:50	4.47%

③ HPLC 에 의한 활성 성분 확인

- 80: 20 분리한 샘플은 AM1(80:20 1), AM2(80:20 2), AM3(80:20 3), AM4(80:20 4) 피크가 확인되었음. 그림 15, 16, 17과 같음
- 또한 50: 50 fraction에서는 AMA(50:50 A), AMB (50:50 B), AMC(50:50 C)으로 3개의 peak를 확인하였음(그림18.) 결과는 나누어 활성 실험 한 후 활성이 나타난 fraction을 HPLC 하였음(그림14). 또한 HPLC 조건은 표 2와 같음.

Akebi quinata
10kg

Ethanol extract
1kg

ethyl acetate extract butanol extract H₂O extract
81g 51g 함양효과 약간

5% HCl in MeOH/H₂O
(2:8v/v)
Butanol 10g -> 0.36g TLC 0.36g

oleanoic acid hederagenin C18 HPLC

ethyl acetate 5g silicagel

Hexane(100%) Hex : Hex : Hex : Methanol(100%)
1.2g A.A(80:20) A.A(70:30) A.A(50:50))

A, B, C, D B: 황균, 함양 I, II, III II: 황균
 C: 황균, 함양 II: 함양

Sunfire C18 column 이용 HPLC 구조동정 Sunfire C18 column 이용 HPLC → 구조동정

그림14 으름열매의 분리 정제

표5 HPLC 분리 조건

Column	Waters sunfire C18 5µm, 4.6X250mm Column
Oven temp.	25°C
Detector	UV/VIS
Wavelength	AM 1 213nm
	AM 2 228nm
	AM 3 231nm
	AM C 225nm
Solvent	acetonitrile : water 50 : 50
Run time	30 min
Injection vol.	20 µL
Flow rate	1.0 mL/min

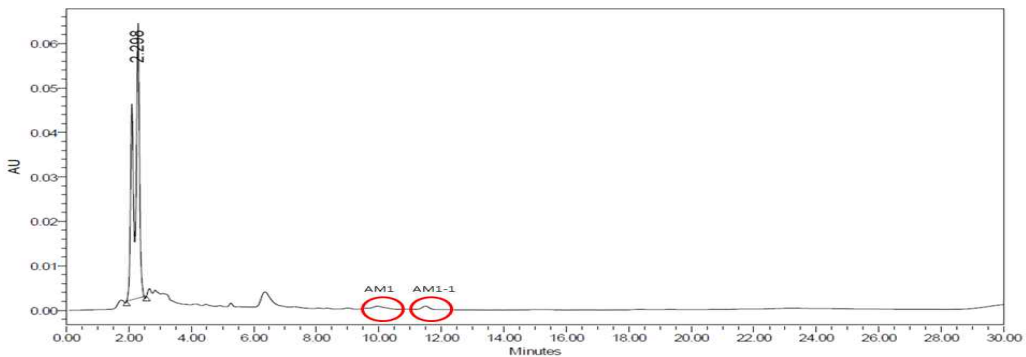


그림 15 HPLC peak of AM1 fraction of 80:20 extraction

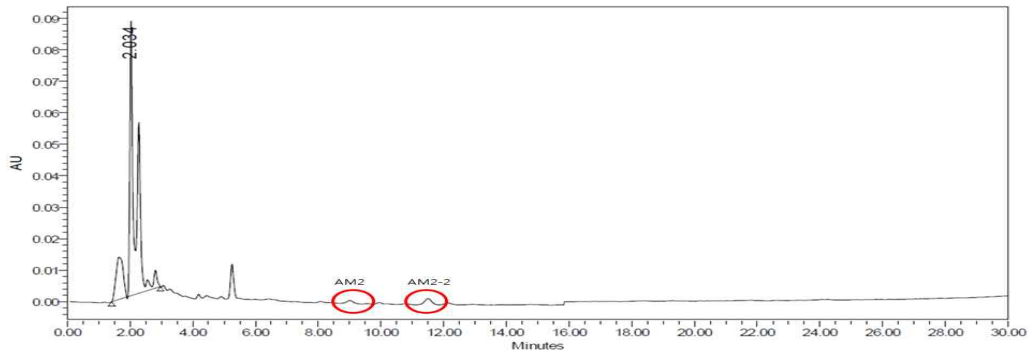


그림 16. HPLC peak of AM2 fraction of 80:20 extraction

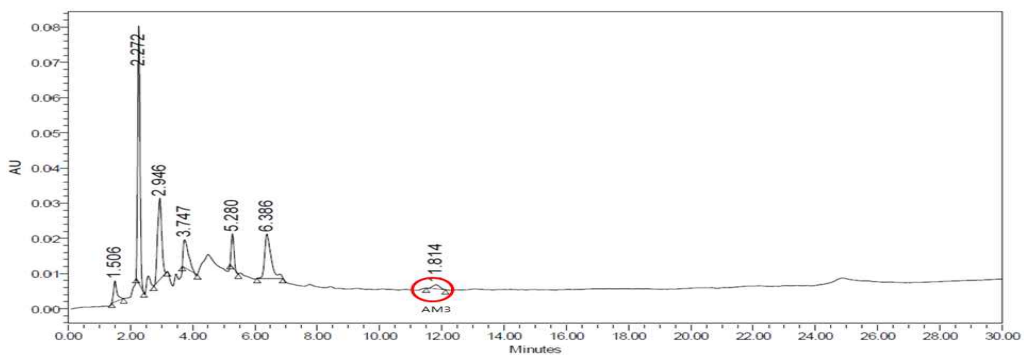


그림 17. HPLC peak of AM3 fraction of 80:20 extraction

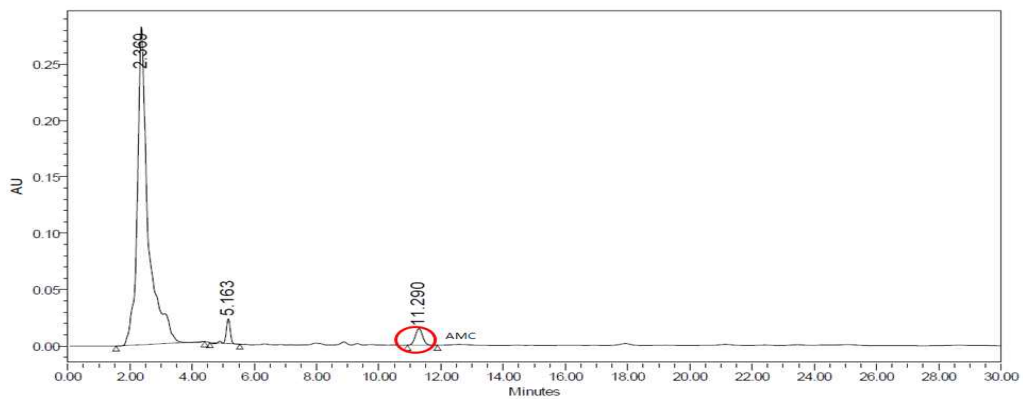


그림 18 HPLC peak of AMC fraction of 50:50 extraction

④ 으름열매 triterpenoide 추출물의 활성

- (a) 메탄올 추출 후 에틸아세트 추출물과 물추출물의 암세포 성장억제 효과
 으름열매 추출물의 암세포 성장억제능을 확인하기 위하여 50~500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 암세포에 으름추출물을 처리하였다. 에틸아세테이트 추출물의 항암실험결과에서는 U87, SH-Sy5Y, Du145 세포에서 HeLa 세포에서 가장 높은 성장억제효과를 보여주었다 (IC_{50} 278.9 $\mu\text{g/ml}$). (그림19)

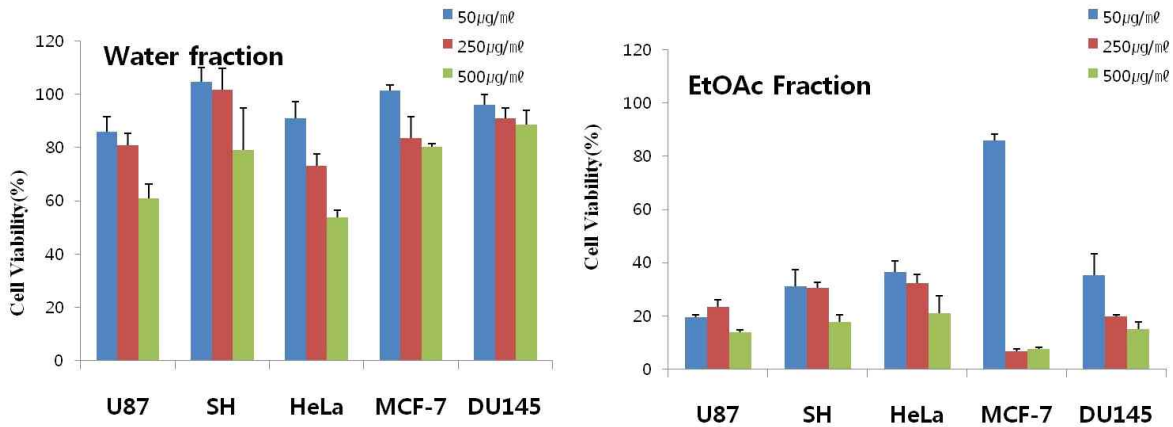


그림 19. Cytotoxicity of etOH and water fractions (50, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) from AQ fruits on HeLa, SH-SY5Y, MCF-7, Du145 and U87 cells using MTT assay.

(b) 에틸아세테이트추출물의 라디칼 소거능

- DPPH 방법을 이용하여 으름 열매추출물의 항산화능을 알아본 결과, 으름의 물추출물과 EtOAc추출물에서 농도에 따라 유의적으로 항산화능이 증가됨을 확인하였다. NO 생성능은 EtOAc 추출물에서 물추출물보다 더 높게 나타났으며 물추출물에서 으름 첨가량에 따라 NO생성억제능이 증가하였고, EtOAc 추출물에서 낮은 농도에서도 굉장히 높은 NO생성 억제 활성이 있었다. (그림20)

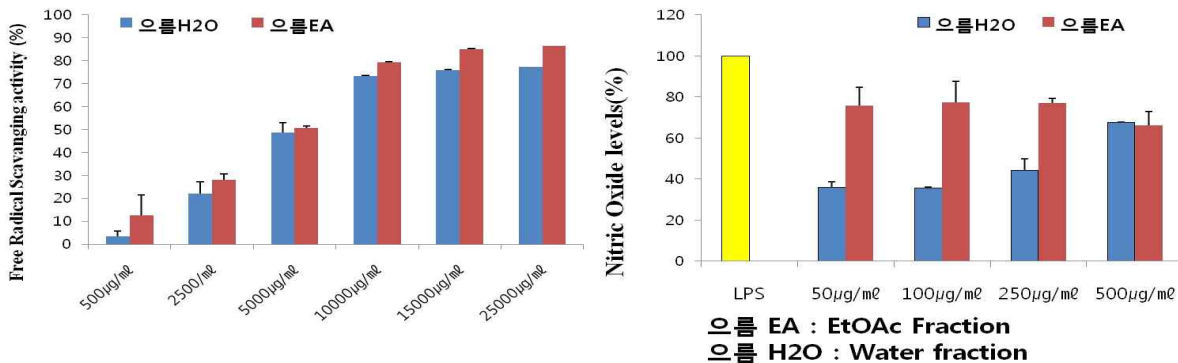


그림20. Inhibitory effect of etOH and water fractions from AQ fruits on NO production in RAW 264.7 macrophages cells

(c) 활성이 보인 에틸아세테이트에서 TLC 컬럼을 이용 분리정제

- 활성이 있는 ethyl acetate 추출물 시료를 silica gel(25g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck, Germany)을 ethyl acetate로 column (1.5×30 cm)에 충전 시킨 후, hexane 100, hexane : ethyl acetate 80 : 20, hexane : ethyl acetate 70 : 30, hexane : ethyl acetate 50 : 50, methanol 으로 층을 나누어 분획하였다. 이후 항균력이 가장 좋은 fraction 80:20(v/v), 50:50(v/v)을 TLC에서 다시 분리하였음. TLC분리 전개용매는 80:20은 hexane-ethyl acetate(3:1), 50:50은 hexane-ethyl acetate(3:2)로 전개하였다. 이 중 80:20은 1~4 fraction, 50:50은 A~C fraction으로 나누어 활성을 확인하였음. 분리한 샘플은 AM1(80:20 1), AM2(80:20 2), AM3(80:20 3), AM4(80:20 4), AMA(50:50 A), AMB(50:50 B), AMC(50:50 C)의 활성을 측정 한 결과는 다음과 같다(그림 21).

(d) TLC 컬럼에서 분리된 fraction의 항암활성

- 으름열매 추출물의 암세포 성장 억제능을 확인하기 위하여 암세포에 으름추출물을 50ug/ml~500ug/ml의 농도로 처리하였다. 5개의 암세포주들은 으름 추출물 처리 농도 의존적으로 암세포의 성장억제효과를 보여주었다. 그 실험결과에 따르면 으름 열매 추출물들은 DU145, MCF-7, HeLa, U87 그리고 SH-SY5Y에 대한 확실한 성장 억제능을 보여주었고 따라서 으름열매는 암에 대한 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 생각된다.

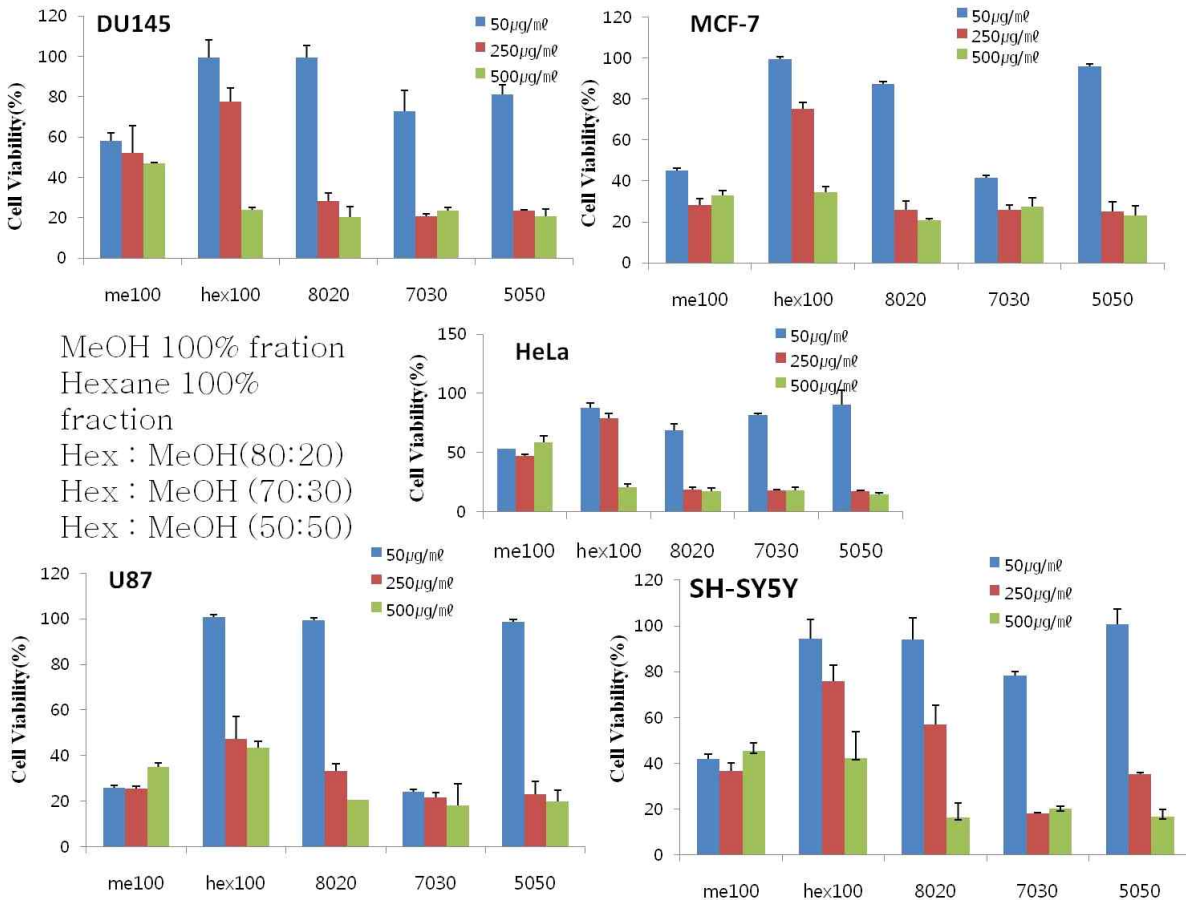


그림21. Cytotoxicity of fractions from AQ fruits on HeLa, MCF-7 and U87 cells using MTT assay

(e) TLC 컬럼에서 분리된 fraction의 Nitric oxide 생성 억제 활성

- 5가지의 으름 열매추출물 중에서 MeOH100% 추출물에서 NO생성 억제능이 낮은 농도에서도 활성을 나타내었으며 다른 추출물에서는 큰 활성을 보이지 않았다. (그림22)

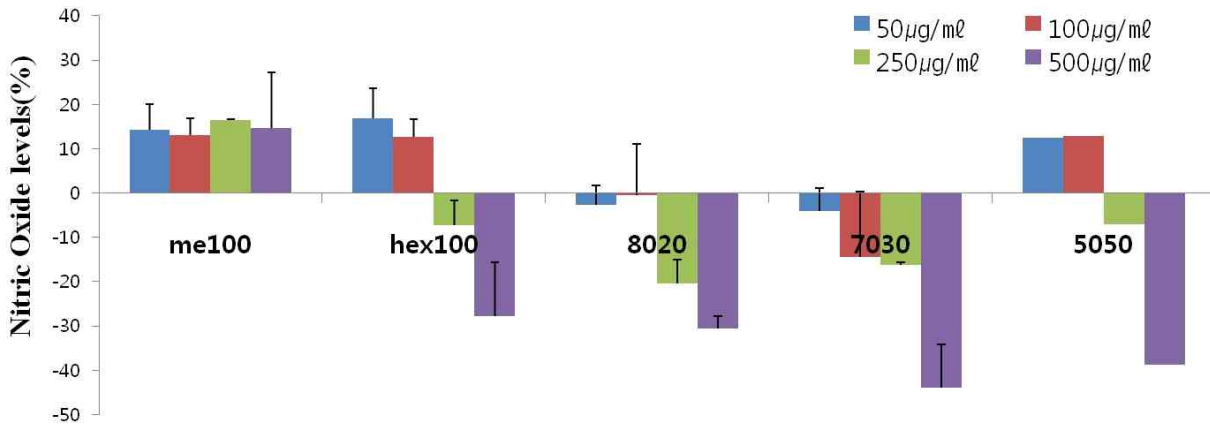


그림22. Inhibitory effect of fractions from AQ fruits on NO production in RAW 264.7 macrophages cells

(f) TLC 컬럼에서 분리된 fraction의 항균활성

- 으름열매를 methanol 용매로 추출하여 만든 추출물을 ethyl acetate, butanol, water로 추출하여 항균활성 결과이다. ethyl acetate층은 S.e에서 1.00cm, K.p에서 1.00cm, B.c에서 1.00cm, B.s에서 1.00cm, S.f에서 1.00cm, E.c에서 1.00cm으로 나타났고 butanol, water에서는 항균력이 보이지 않았다 (표6).

표6. Antimicrobial effect of *Akebia quinata* extract in various solvents

<i>Akebia</i> fruit	<i>quinata</i>	<i>Akebia quinata</i> (%)					
		S.enterica	K.pneumoniae	B.cereus	B.subtilis	S.flexneri	E.coli
Methanol		1.00±0.10 ^a	1.00±0 ^a	0.97±0.06 ^a	1.10±0.17 ^a	0.97±0.06 ^a	0.93±0.06 ^a
ethyl acetate		1.00±0 ^a	1.00±0 ^a	1.00±0 ^a	1.00±0 ^a	1.00±0 ^a	1.00±0 ^a
butanol		-	-	-	-	-	-
water		-	-	-	-	-	-

- : no clear zone

Values are mean ± standard deviations of triplicate determination. different superscript in a column (a~b),(A~B) are significant differences ($p < 0.05$).

- 으름열매를 ethyl acetate 용매로 추출하여 만든 추출물을 silica gel로 분리하여 만든 샘플의 항균활성 결과 표 7. 에서 나타났다. 분리된 80:20, 70:30, 50:50에서 항균활성이 나타났고 80:20, 50:50에서는 모든균에서 항균력이 나타났다. (표7)
- 그리고 분리된 추출물을 TLC로 다시 분리한 결과 Table 9, 10. 에 나타났다. Table 9.에서는 AM1~3에서 항균활성이 나타났고, Table 10.에서는 AMC에서만 항균활성이 나타났다.(표8과 9)

37. Antimicrobial effects *Akebia quinata* fraction separated by silica gel column chromatograph

solvent	<i>Akebia quinata</i> (%)					
	S.enterica	K.pneumon iae	B.cereus	B.subtilis	S.flexneri	E.coli
hexane	-	-	-	-	-	-
80:20	1±0 ^a	1±0 ^a	1±0 ^a	1±0 ^a	1±0 ^a	1±0 ^a
70:30	1±0 ^c	x	1±0 ^c	1.2±0 ^a	1.1±0 ^b	1±0 ^c
50:50	1±0 ^b	1±0 ^b	0.9±0 ^c	1.1±0 ^a	1.1±0 ^a	1±0 ^b
MeoH	-	-	-	-	-	-

- : no clear zone

80 : 20, 70 : 30, 50 : 50(hexane : EtOAc)

Values are mean±standard deviations of triplicate determination, different superscript in a column(a~e) are significant differences($p<0.05$)

38. Antimicrobial effect of AM1~3 fractions separated by preparative TLC

microbial strains	<i>Akebia quinata</i> (%)					
	S.enterica	K.pneumon iae	B.cereus	B.subtilis	S.flexneri	E.coli
AM1	1.0±0 ^a	1.0±0 ^a	0.9±0 ^b	0.9±0 ^b	1.0±0 ^a	0.9±0 ^b
AM2	1.0±0 ^b	1.1±0 ^a	1.1±0 ^a	1.1±0 ^a	1.0±0 ^b	0.9±0 ^c
AM3	1.0±0 ^a	0.9±0 ^b	0.9±0 ^b	0.9±0 ^b	1.0±0 ^a	0.9±0 ^b

- : no clear zone

TLC was carried out on silica coated glass sheets with hexane : EtOAc 3: 1 solvent system, Values are mean±standard deviations of triplicate determination, different superscript in a column(a~e) are significant differences($p<0.05$)

표9. Antimicrobial effect of AMA fractions separated by preparative TLC

microbial strains	<i>Akebia quinata</i> (%)					
	S.enterica	K.pneumoniae	B.cereus	B.subtilis	S.flexneri	E.coli
AMA	-	-	-	-	-	-
AMB	-	-	-	-	-	-
AMC	1.1±0 ^b	1.1±0 ^b	1.2±0 ^a	1.1±0 ^b	1.1±0 ^b	0.9±0 ^c

- : no clear zone

TLC was carried out on silica coated glass sheets with hexane : EtOAc 3: 1 solvent system, Values are mean±standard deviations of triplicate determination, different superscript in a column(a~e) are significant differences($p < 0.05$)

(3) 으름에서 정제된 oleanolic acid 와 hederagenin 의 이화학적 안정성 평가 분석 (온도, 산도 안정성 평가)

1) oleanolic과 hederagenin 온도별 :-70, -20, 4, 25, 60℃에 24시간 저장 후 항산화 활성 (DPPH) 을 관찰

- oleanolic acid는 항산화 활성이 보이지 않음. 온도별 측정 후에도 활성변화가 없음.
- 그러나 leukemia 세포내에 TPA 유도 후 형성되는 H₂O₂ 활성에서는에서는 free radical 을 억제하는 활성을 보여 주었음. 또한 온도 -70, -20, 4, 25 에서는 활성의 변화가 없으나 60℃에서는 활성의 변화가 보여짐. (그림23과 표10)

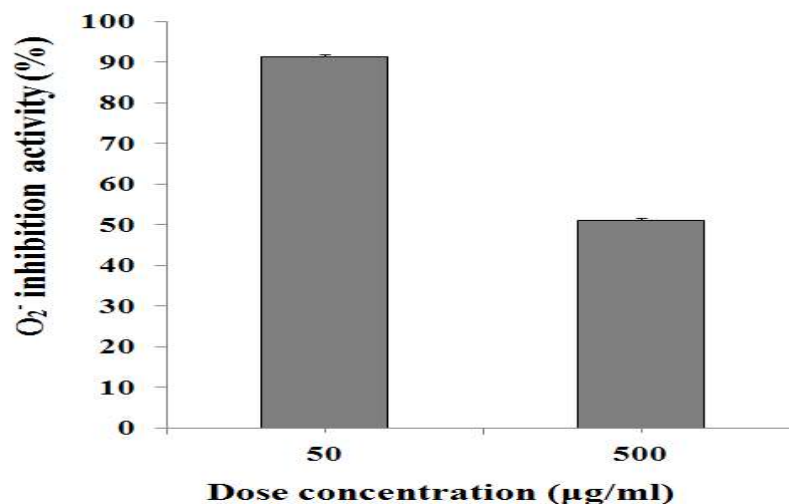


그림23. OA (50, 500 µg/ml) for suppressing in TPA-induced O₂⁻ generation in differentiated HL-60cells.

표 10 Different temperature condition of OA for suppressing in TPA-induced O₂⁻ generation in differentiated HL-60cells.

temperature(°C)	O2 inhibition activity(%)
-70	50
-20	48
4	50
25	50
60	0

2) oleanolic과 hederagenin pH 변화에 따른 활성 측정

- : 산, 알카리로 pH를 맞춘 후 2시간 반응 시킴 그 후 다시 중성으로 pH로 전환하여 항산화 활성을 측정함. oleanolic acid는 항산화 활성이 보이지 않음 pH 변화에 따른 활성 측정이 보이지 않음
- hederagenin 역시 DPPH 측정시 항산화 활성이 보이지 않음

(4) 으름 어린잎 추출물의 활성

1) 으름 어린잎의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

- 으름 어린잎 추출물의 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 확인하였다. 메탄올 추출물보다는 열수추출물에서 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 높은 것이 나타났다. 이는 으름 어린잎 추출물의 라디칼 소거능이 열수추출물에서 더 높은 활성을 나타내는데 폴리페놀과 플라보노이드 함량과 관련이 있음을 확인해주었다.(표11)

Table 11. Total phenol and flavonoid content of methanol and water extracts of young leaf from AQ

Sample	Total phenolic content (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid content (mg CE ²⁾ /g)
으름 어린잎 열수 추출물	0.95±0.07 ³⁾	471.5±7.07
으름 어린잎 메탄올 추출물	0.91±0.06	394.84±25.93

¹⁾Total phenolic content was expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE).

²⁾Total flavonoid content was expressed as mg/g catechin equivalent (CE).

³⁾Each value is mean±SD of triplicate determinations.

2) 으름 어린잎 추출물의 라디칼 소거능

- DPPH법을 사용하여 으름 어린잎이 가진 라디칼 소거능을 확인하였다. 메탄올 추출물에서는 라디칼 소거능이 굉장히 낮게 나타났으나 열수추출물에서는 농도 의존적으로 라디칼 소거활성이 증가하는 것을 확인하였다.(그림24)

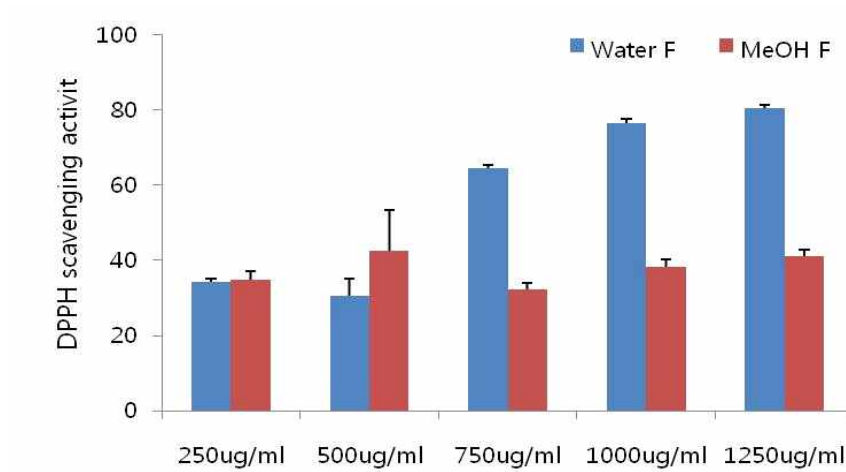


그림24. Free radical scavenger activity of metanol and water extracts of young leaf from AQ

3) 으름 어린잎 추출물의 암세포 성장억제 효과

- 으름 어린잎 열수 추출물과 메탄올 추출물의 암세포 성장억제능을 확인하였다. HeLa, SH-SY5Y, MCF-7 그리고 DU145 세포에서 메탄올 추출물의 강한 암세포 성장억제능을 확인 할 수 있었다. (그림25.)

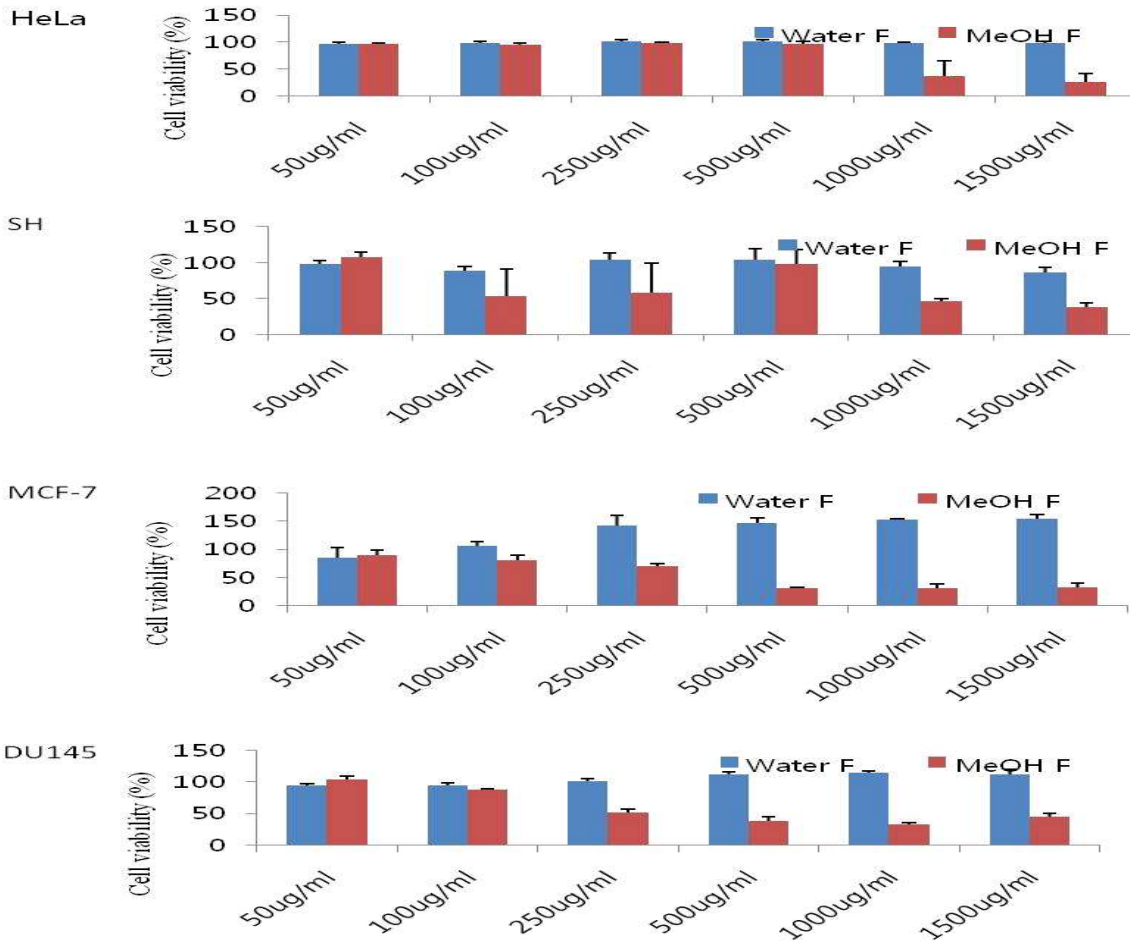


그림25. Cytotoxicity of metanol and water extracts of young leaf from AQ on HeLa, Du145, MCF-7 and SH-SY5Y cells using MTT assay

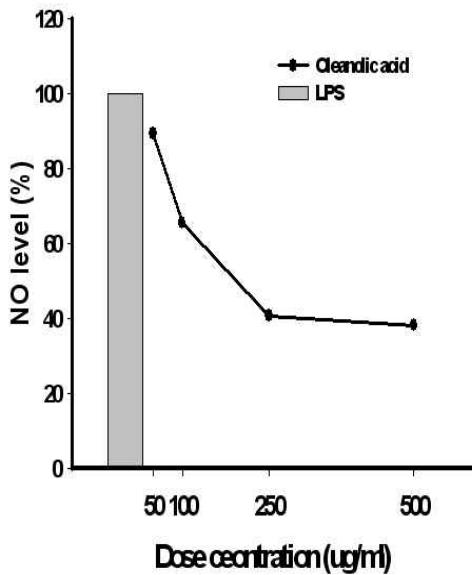
2. 2차년

(1) Oleanolic acid 및 triterpenoide 의 세포주를 이용한 NO 억제 활성 및 활성산소종 억제 물질 활성분석

1) Oleanolic acid 세포주를 이용한 NO 억제 활성

- NO는 면역계에서 외부물질에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호 전달 물질로 nitric oxide synthase(NOS)의 작용에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 생성되며 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환기계에서는 혈관 이완 물질로, 중추신경계에서는 신경 전달 물질로, 면역계에서는 방어 물질로 알려져 있다. 본 연구에서는 oleanolic acid가 세포 내에서 NO 생성에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보기 위하여 대식세포 RAW 264.7에 추출물을 50, 100, 250 와 500 µg/ml의 농도로 처리하였고 그 결과는 그림 1A과 같다. oleanolic acid는 RAW 264.7 대식 세포에 대한 독성은 나타내지 않았다 (그림 1B). IC₅₀ 활성은 318.15 µg/ml에서 NO 50% 억제 활성을 보여 주었다. 이와 같은 oleanolic acid는 높은 NO 생성 억제 활성을 보여 주는 것으로 보아 활성 질소종 억제 및 프리 라디칼 억제 활성을 갖는 물질로 판단되었다.

A



B

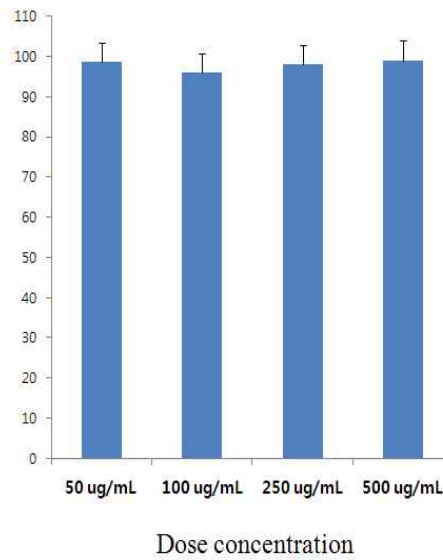


Fig.1 Inhibitory effects of oleanolic acid on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages cells (A) and. Cytotoxicity of oleanolic acid against RAW 264.7 macrophages cells(B) Values with different letters were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value is mean \pm SD (n=3).

2) Oleanolic acid 세포주를 이용한 활성산소종 억제 활성

- 체내에서 지질과산화물을 유발하여 독성을 일으키는 과정에서 일반적으로 free radical이 관여한다고 알려져 있고, free radical을 생성하는 효소계는 non-microsomal oxidizing system인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase들이 알려져 있다. 내부 및 외부의 요인에 의해 과도한 유리 라디칼체인 (free radical chain)의 작용과 그 대사과정에서 생성되는 세포내의 활성 산소종은 DNA손상, 노화와 관련된 세포의 퇴화 및 암의 발생을 일으키게 된다. Free radicals과 관련된 활성 산소들은 산소의 대사동안 생화학적 반응에 의해 생성되며, tumor promotion에 중요한 작용을 한다. 나아가 tumor promotion을 저해하는 것으로 알려진 protease inhibitors가 free radical 형성을 저해 할 수 있고, vitamin A 유도체가 tumor promotion을 억제하고 retinoid 화합물은 phagocyte O_2^- 생성의 저해제이다. 그러므로 free radical scavengers의 섭취에 의해 free radical에 의한 손상에서 정상조직을 보호할 수 있을 것이다. 백혈병 세포주 HL-60에서 TPA에 의해 유도된 O_2^- 생성 저해활성을 측정해보았으며 그 결과는 그림 2와 같다.
- oleanolic acid 50 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 측정된 결과 각각 51.04%과 91.35% O_2^- 생성 저해활성을 보여주었다.

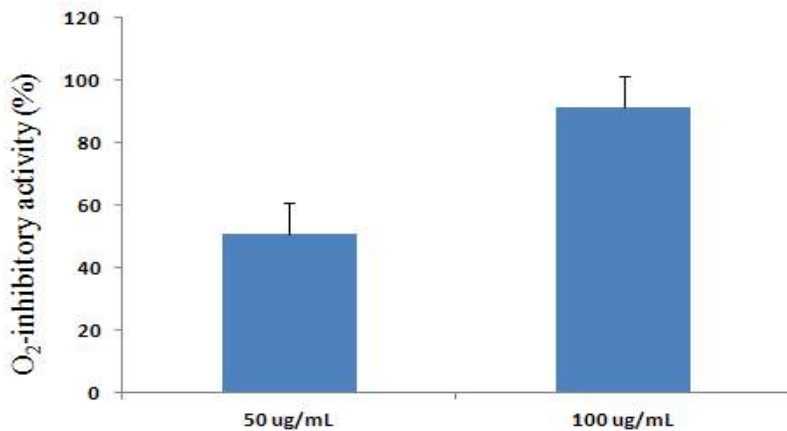


Fig.2. Effects of on TPA-induced superoxide radical(O₂⁻) formation in HL-60 cells. Values with different letters were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. Each value is mean±SD (n=3).

3) 정상세포와 암세포에서의 Oleanolic acid 세포 독성

- 정상간세포와 (BNL CL. 2) 와 피부세포 (Hs 68)에서 oleanolic acid을 0, 25, 50, 100, and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 24시간 처리 후 세포 독성을 한 결과 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 50% 이상의 독성이 나타났다 (그림 3A). 그러나 암세포에서는 낮은 농도에서도 암세포 사멸 효과를 보여 주었다. 특히 자궁경부암 HeLa 세포에서는 oleanolic acid가 IC₅₀ 은 31.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고, 유방암 MCF-7세포에서는 oleanolic acid가 IC₅₀ 은 31.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 뇌종양 세포주인 U87 세포에서는 oleanolic acid가 IC₅₀ 은 24.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 저농도에서 50% 세포 생존률을 보여 주었다 (그림 3B).

4) Oleanolic acid가 암세포에서의 사멸 효과

- 우리는 oleanolic acid의 암세포에 대한 성장억제능이 세포사멸 (apoptosis)효과를 FACSxxhdgotj 확인하였다. 특히 세가지 암세포에 대해 Annexine V-FITC 염색법으로 이를 확인하였다. (그림4) 모든 암세포에 oleanolic acid을 50과 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 24 시간 반응시켰고 oleanolic acid산은 apoptotic 세포의 수가 농도에 따라 증가시키는 결과를 보여주었다. 특히, oleanolic acid은 전립선암세포에서는 가장 강력한 apoptosis 반응을 보여주었다. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 7.69% 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 27% 세포사멸을 보여 주었다. MCF-7세포에서 실험된 apoptosis 결과에 따르면 oleanolic acid농도가 0, 50과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가함에 따라 0, 20.9, 27%으로 apoptotic 세포의 수가 증가하였다. 또한 U87 세포에서는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 4.02% 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 15.7%으로 apoptotic 세포의 수가 증가하였다 이 결과는 으름에서 추출된 올레아놀릭산이 Coleus tuberosus L.에서 추출된 oleanolic acid 더 효과적으로 apoptosis를 유도시키는 것으로 확인되었다. 으름열매에서 추출한 oleanolic acid의 apoptosis 유도 활

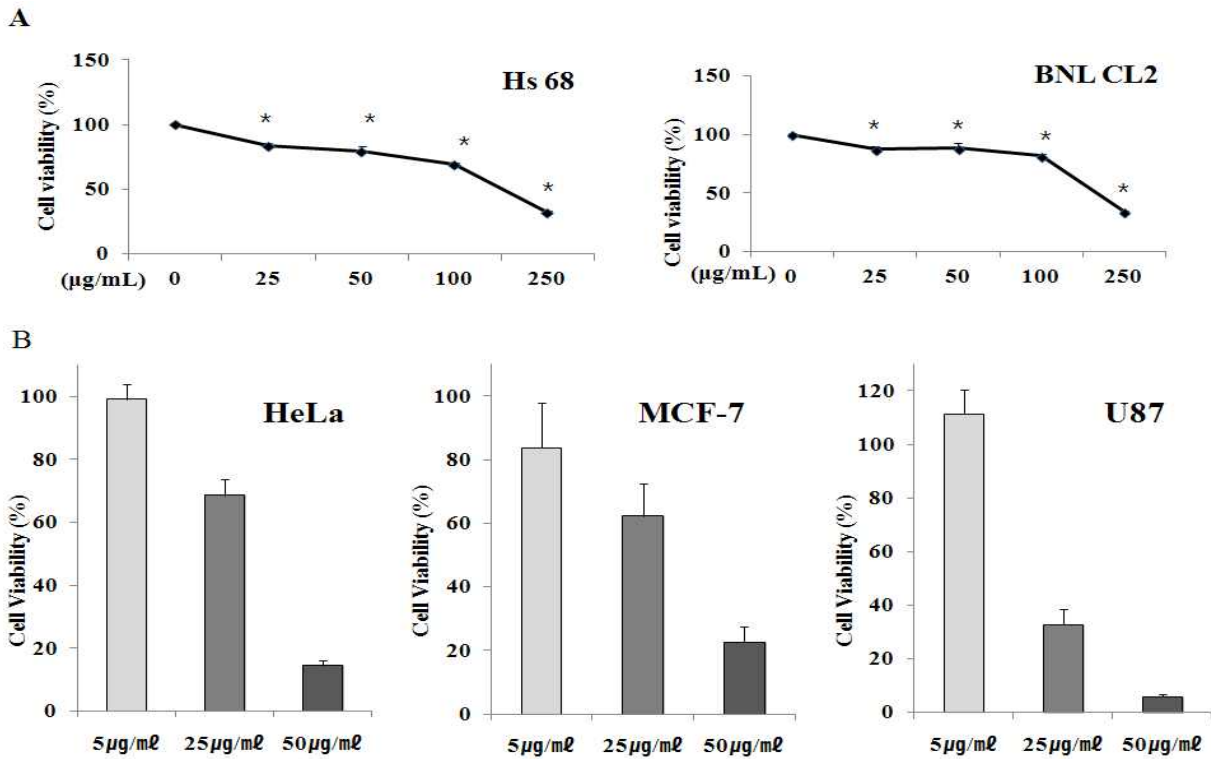
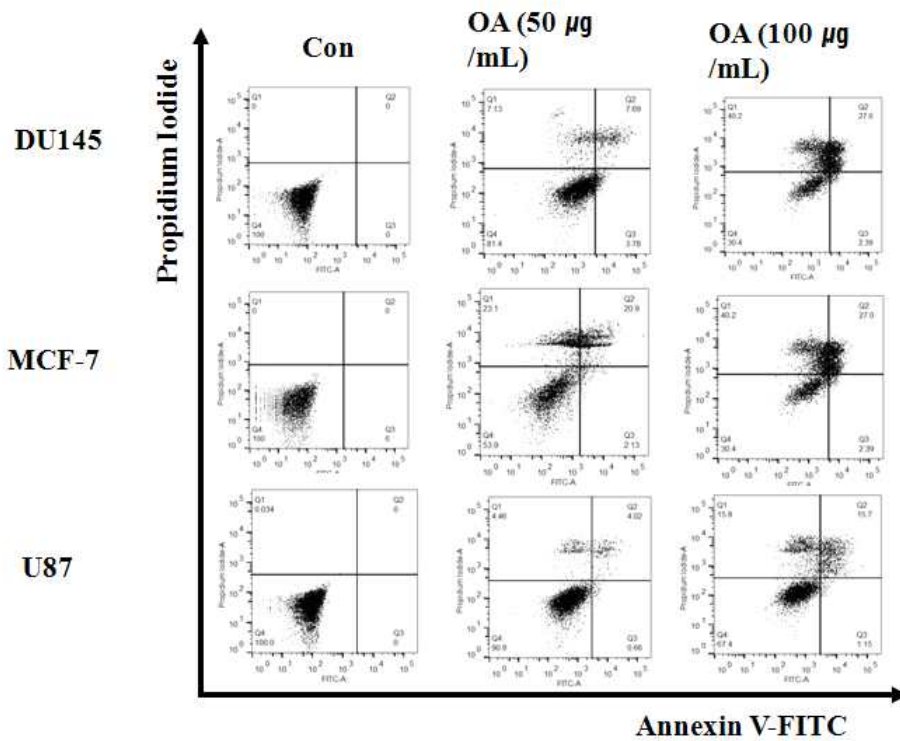


Fig 3. Cytotoxicity of AQ fruit-derived oleanolic acid in cancer cells (DU145, HeLa, U87, and MCF-7) and normal cells (BNL CL. 2 and Hs 68) as determined using the MTT assay.

성에 대한 결과는 거의 보고 되지 않았다. 최근에 *Prunella Vulgaris*에서 추출된 oleanolic acid 이 SPA-1세포의 apoptosis를 유도한다고 발표되었으며, 이전 논문에는 올리브 (*O.europaea*)과 일에서 추출된 올레아놀릭산이 1321N1 세포에서 농도에 따라 apoptosis 유도 활성과 G₀-G₁기에서 세포의 억류가 증가된다는 보고가 있었다. 이 결과로 oleanolic acid은 Du145, MCF-7과 U87 세포에서 효과적인 apoptosis 유도 활성이 확인되었다.

A



B

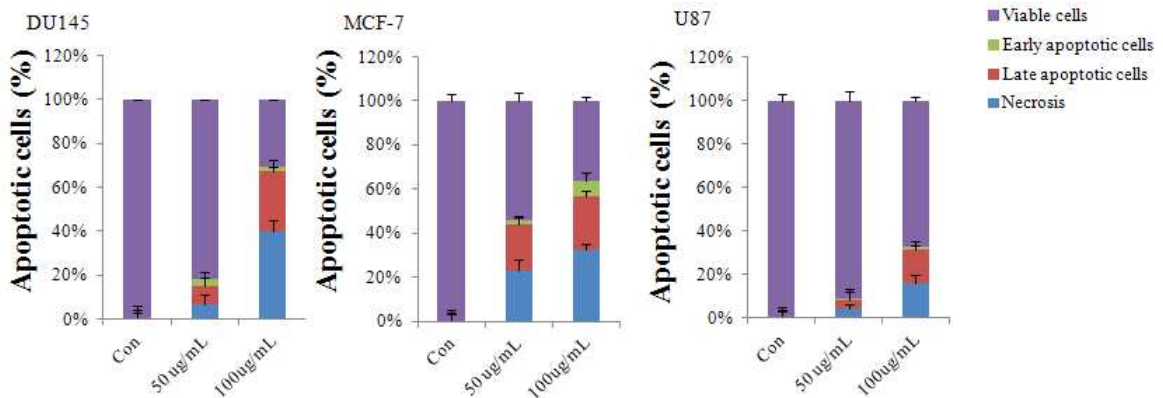


Fig 4. Dose dependence of oleanolic acid-induced apoptotic cell death in DU 145 and MCF-7 and U87 cells. (A) Results of annexin V-FITC/PI staining for detection of apoptotic cells. After treatment with oleanolic acid (0, 50, or 100 µg/mL), cells were stained with annexin V-FITC/PI and subjected to flow cytometry. (B) Quantitation of the FACS data shown in (A)

5) oleanolic acid의 처리에 따른 apoptosis 관련된 단백질의 발현

- Apoptosis는 apoptosis 발현 현상으로 알려진 plasma 막 수포형성, 세포 수축, 염색질의 응축과 분열에 따른 caspase와 endonuclease의 분비로 세포단백질의 단백질 가수분해 분열이라고 한다. apoptosis 신호 전달에서 중요한 통로인 caspase는 단백질 관련 apoptosis 메커니즘에서 중요한 역할을 한다. 그리고 caspase-3는 세포 형태학적 변화와 관련있으며 caspase의 발현이 증가하는 apoptosis 유발이 증가되는 것이라고 할 수 있다. Bax는 cytosols

에서 cytochrome *c*의 생성에 따른 미토콘드리아의 파괴에 관여하여 apoptosis를 제어합니다. 그리고 cytochrome *c*는 세포 사멸 단백질 분해 효소 - 활성화 인자 - 1 (APAF-1)와 상호 작용을 하고 caspase-3의 활성화와 apoptosis의 주요인자인 poly (ADPribose) polymerase (PARP)의 활성을 유도시킨다. 본 연구결과에 따르면, 암세포에 대한 oleanolic acid의 apoptosis 유도활성은 Bax와 caspase-3의 활성화와 관련되어 있음이 확인되었다(그림.5). oleanolic acid는 Du145세포에서는 p53, cytochrome *c*, caspase 3증가를 보였고 MCF-7 세포에서는 p53, cytochrome *c*, Bax, PARP 단백질의 증가를 보였다. U87 세포에서는 100 ug/ml 농도에서 p53, cytochrome *c*, Bax, 발현이 증가됨을 확인하였다. 본 연구결과 oleanolic acid는 암세포에서의 초cytosol 에서는 p53, Bax와 caspase-3의 발현 증가와 관련임이 확인되었고 따라서, oleanolic acid는 mitochondria-mediate apoptosis에 관련된 전구 - 세포사멸유도 단백질의 변화를 유발시키므로 apoptosis을 유도하는 것으로 보여진다.

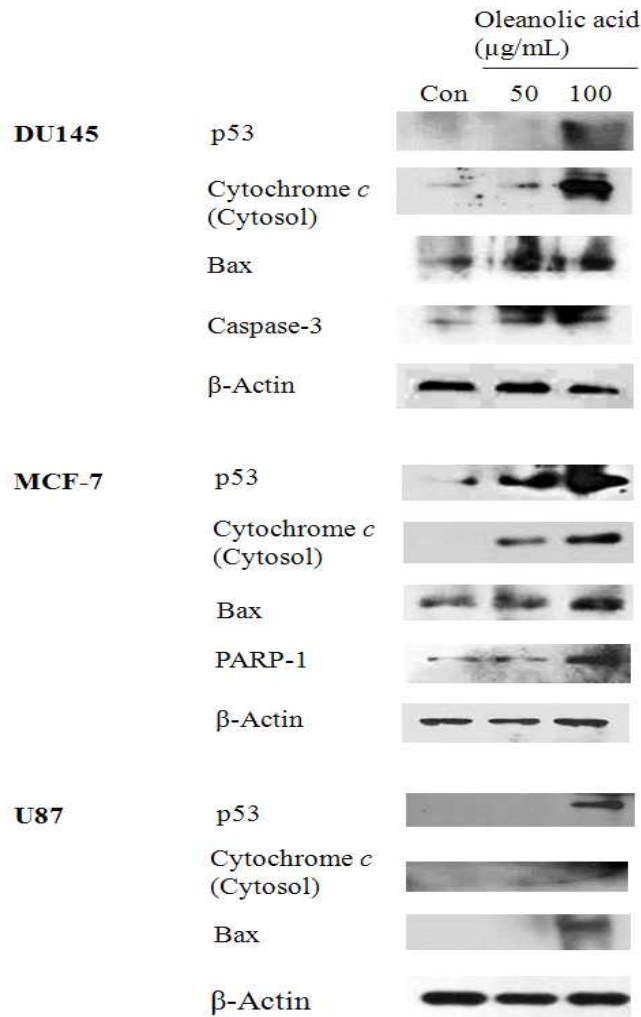


Fig.5 The expression of p53, cytochrome *c*, Bax, and caspase-3 was determined by western-blot analysis in Du145, MCF-7 and U87 cancer cells. Equal loading was confirmed by β-actin quantification.

(2) 기타 triperpenoide 추출조건 확립: hederagin 추출 조건 확립

1) hederagin 분리 정제 및 확인

- hederagin 동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출하였다. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리하였다. 그 중 butanol 가용부 (20g)을 5% HCl(MeOH/H₂O)에 4시간동안 가수분해를 시킨다. 그 혼합물을 ethyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척을 한다. 그 혼합물을 silica gel(450-580mesh)을 사용하여 분리한후 HPLC C18 column을 이용하여 분리하여 정제 하였다. 그결과 oleanolic acid 와 hederagin성분을 분리 추출 정제 하였다. hederagin 추출 과정을 다음 그림 6과 7과 같음.

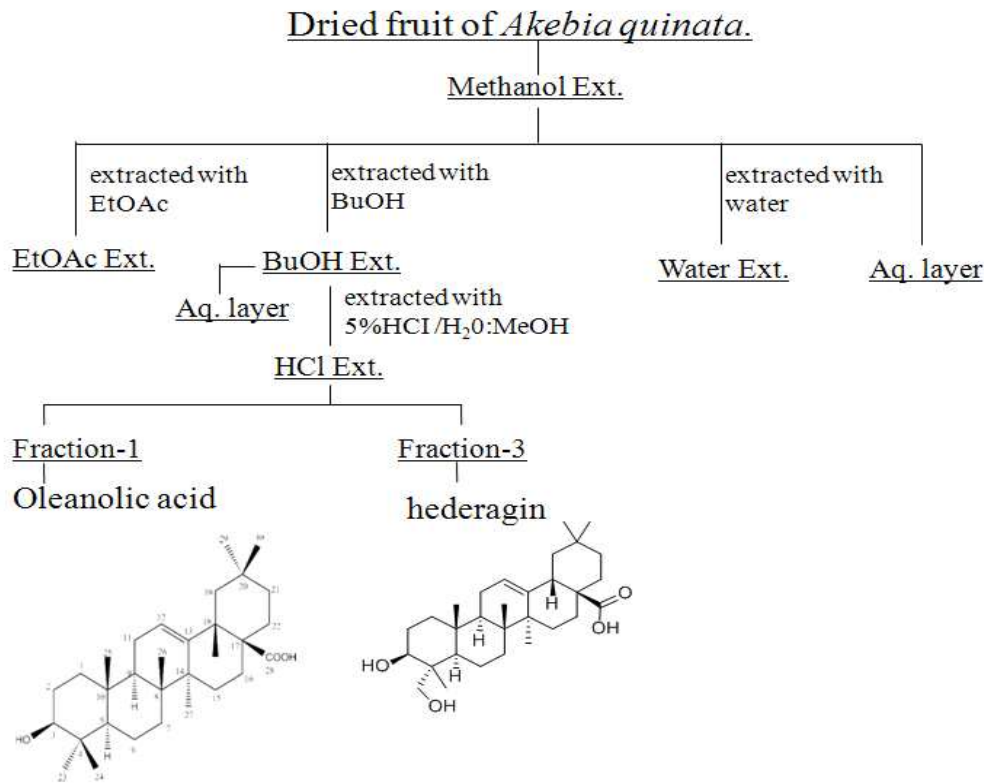
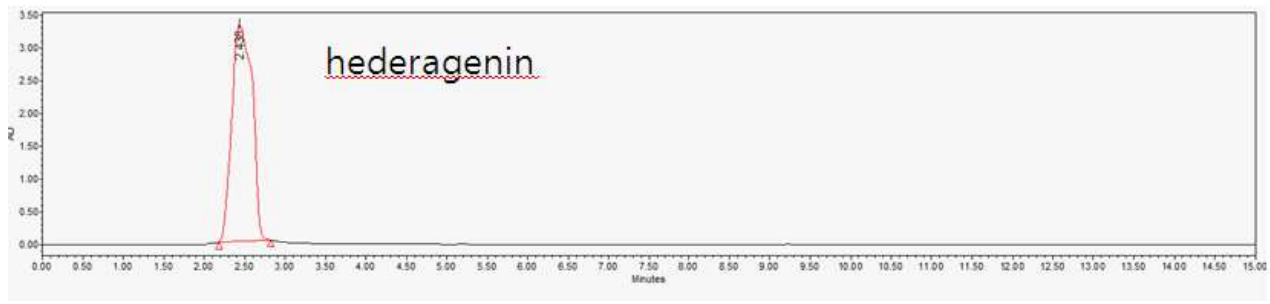


Fig.6 .Isolation scheme of oleanolic acid and hederagin from AQ fruits

표1 HPLC 분리 조건

Column	Waters sunfire C18 5 μ m, 4.6X250mm Column
Oven temp.	25 $^{\circ}$ C
Detector	UV/VIS
Wavelength	220nm
Solvent	acetonitrile : water 50 : 50
Run time	30 min
Injection vol.	20 μ L
Flow rate	1.0 mL/min



Name	Retention Time (min)	Area (μ V 2 sec)	% Area	Height (μ V)	Int Type	Amount	Units	Peak Type
1	2.438	58341218	100.00	3327993	bb			Unknown

Fig 7 HPLC peak of hederagenin from *Akebia quinata* Decne

2) hederagenin NO 억제활성

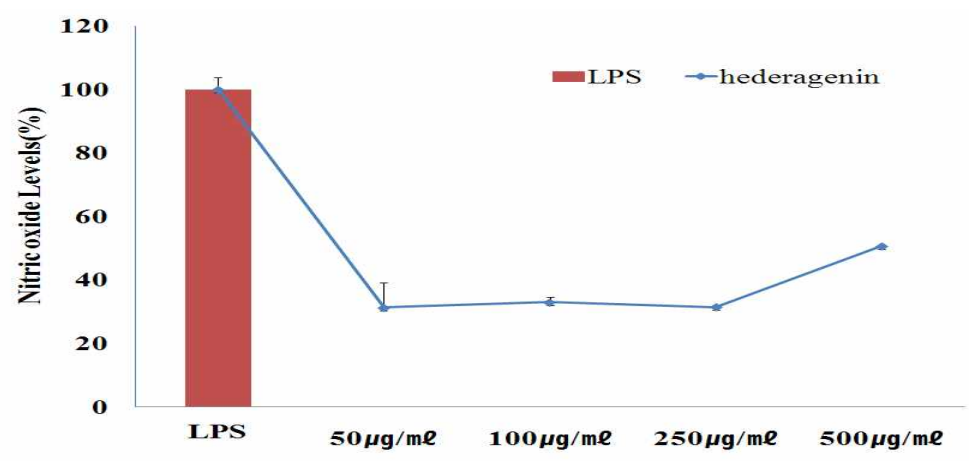


Fig 8. Inhibitory effects of hederagenin on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages

cells

hederagin 50 ug/mL 농도에서 RAW246.7 세포에서 LPS를 첨가후 inflammation 유도 후 hederagin 투여 후 NO 억제 활성을 측정한 결과 62.3 % 억제 활성을 보여 주었다. hederagin 농도별 ghkftjddl 증가되지는 않는 것으로 보여졌다 (Fig 8).

3)hederagenin 의 암세포에서의 항암활성

- U87, HeLa, MCF-7, DU145, SH-SY5Y 암세포에서는 250 ug/mL농도에서는 세포 생존율이 평균 30%를 보였다. 그러나 50 ug/mL에서는 뇌종양 세포인 U87세포는 70% 세포 생존율을 보였으며 우방암세포인 MCF-7 세포주에서는 68%, 전립선암세포에서는 75% 세포 생존율을 보였으나 HeLa 세포주에서는 37.5 % 세포 생존율을 보여주었다, hederagin은 triperpenoid 구조를 가진 물질로 HeLa 세포주에서 62.5% 세포독성 효과를 보여주었다 (Fig 9)
- 다음실험은 MTT 방법에 의해 암세포에서 사멸효과를 보여줄을 확인하였다.

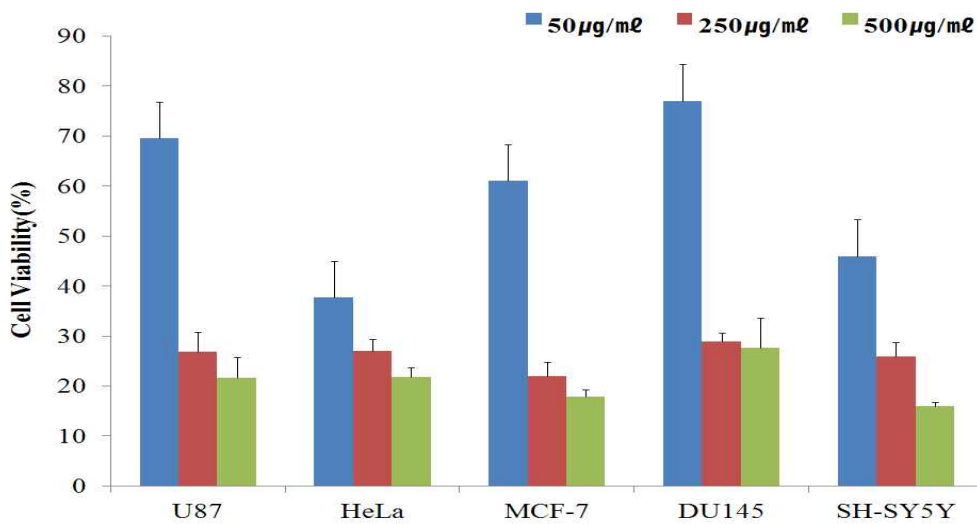


Fig.9. Cytotoxicity of AQ fruit-derived hederagin in cancer cells (DU145, HeLa, U87, and MCF-7)

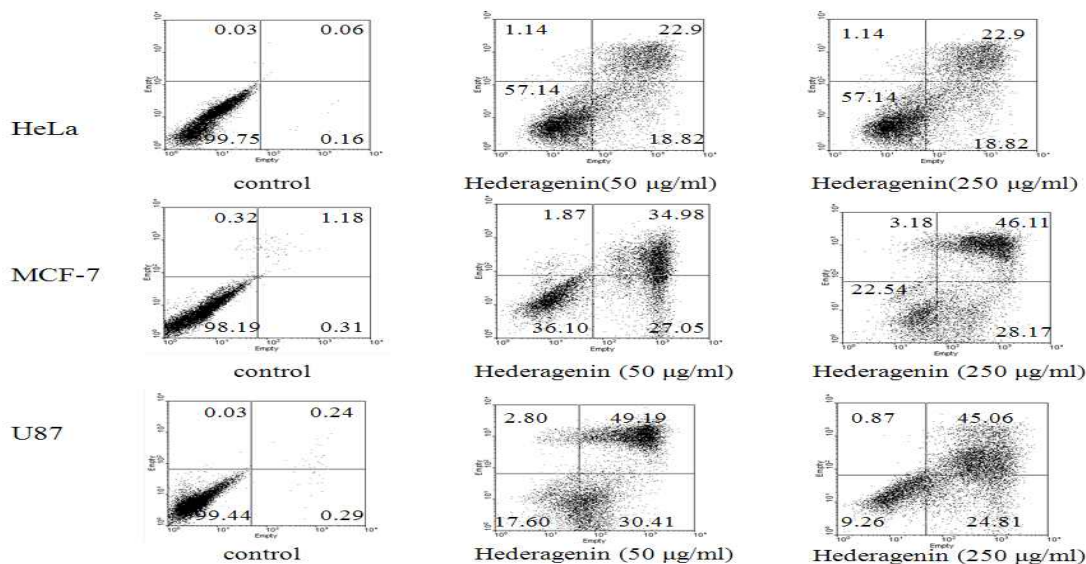
he

4) hederagenin의 암세포에서의 세포사멸 효과

- HeL세포주에서는 heragenin 50 ug/mL 투여시 apoptosis 가 22.9% 일어나고 250ug/mL농도에apptosis 가 22.9%일어났다. hederagenin농도에따라 활성을 증가하지 않았다. MCF-7

유방암세포에서는 hederagenin 50 ug/mL 투여시 apoptosis 가 34.98% 일어나고 250ug/mL농도에 apptosis 가 46.11%일어나서 hederagin 농도에 따라 apoptosiseh 증가하는 것으로 보여진다 (Fig 10).

A



B

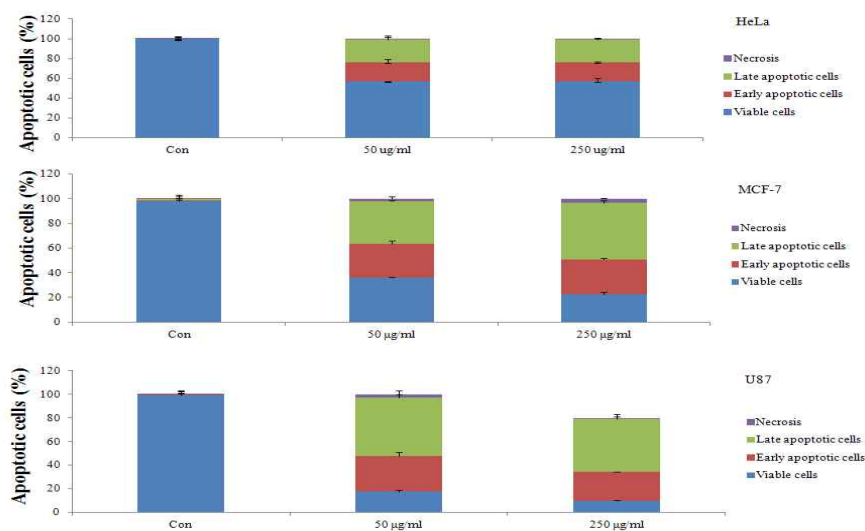


Fig10 Apoptotic cells induced by hederagenin in HeLa, MCF-7, and U87 cell lines. (A) Annexin V-FITC/PI staining analysis for apoptosis. Cells were treated with hederagenin (0, 50, and 250 µg/ml). After treatment, the cells were stained with Annexin V-FITC/PI and subjected to flow cytometry analysis. (B) Quantitative results of the apoptotic cell analysis.

4) hederagenin의 암세포에서의 세포주기에 관여를 확인함

-HeLa 암세포에서는 hederagenin투여를 증가함에 따라 G1 arrest가 일어나고 S가 감소 되는 경향을 보였다. MCF-7 세포주, U87 세포에서도 농도가 증가하여 따라 G1 arrest가 일어나고 S가 감소 되는 경향을 뚜렷이 보였다 (Fig 11).

-으름열매에서 추출된 hederagenin은 함암효과가 높은 물질로 사료된다.

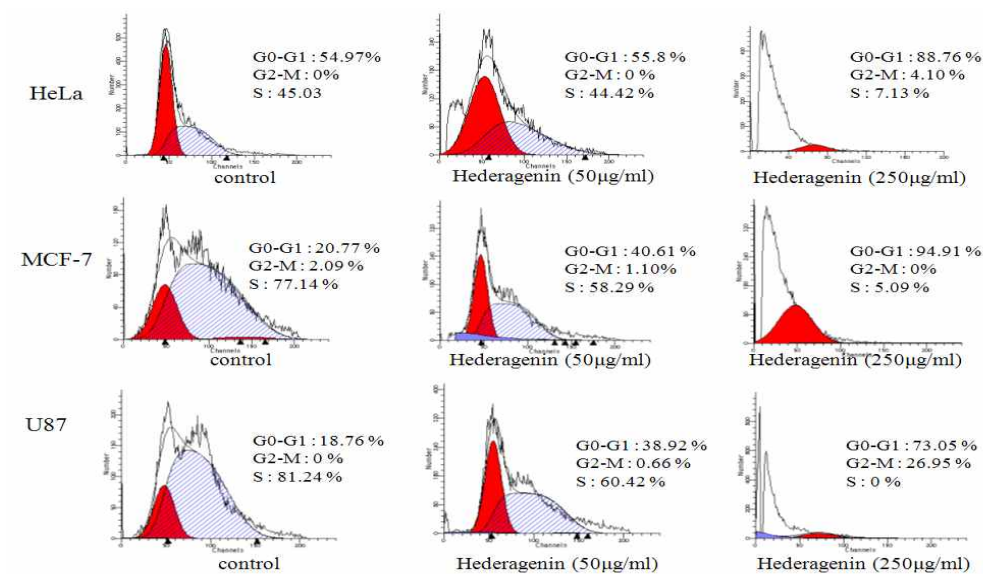


Fig.11 Hederagenin-induced cell cycle arrest in HeLa, MCF-7, and U87 cells. (A) Flow cytometric detection of cell cycle in cancer cells treated with 50 and 250 µg/ml hederagenin

(3) 신규 생리활성물질 탐색

- 활성이 있는 ethyl acetate 추출물 시료를 silica gel(25g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck, Germany)을 ethyl acetate로 column (1.5×30 cm)에 충전 시킨 후, hexane 100, hexane : ethyl acetate 80 : 20, hexane : ethyl acetate 70 : 30, hexane : ethyl acetate 50 : 50, methanol 으로 층을 나누어 분획하였다. fraction 별 추출 수율은 표 1과 같음. fraction 추출 수율은 비스한 지만 활성을 뚜렷한 차이를 보였음. 이후 활성이 가장 좋은 fraction 80:20(v/v), 50:50(v/v)을 TLC에서 다시 분리하였음. TLC분리 전개용매는 80:20은 hexane-ethyl acetate(3:1), 50:50은 hexane-ethyl acetate(3:2)로 전개하였다. 이 중 80:20은 1~4 fraction, 50:50은 A~C fraction으로 나누어 활성을 확인하였음 (Fig.12)

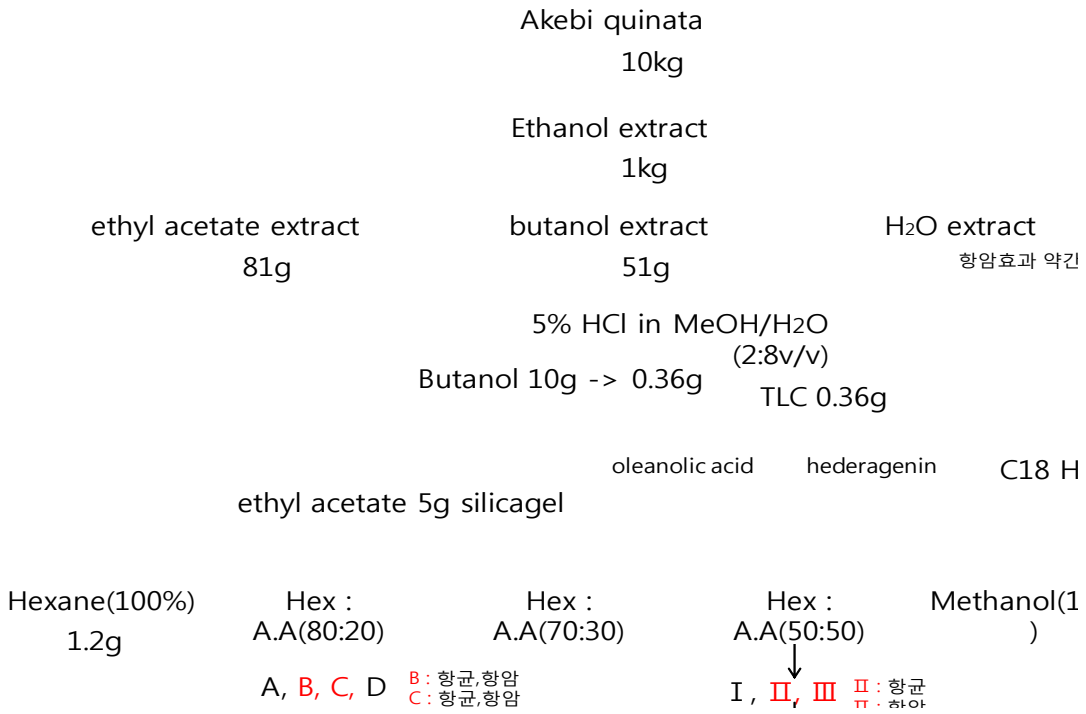
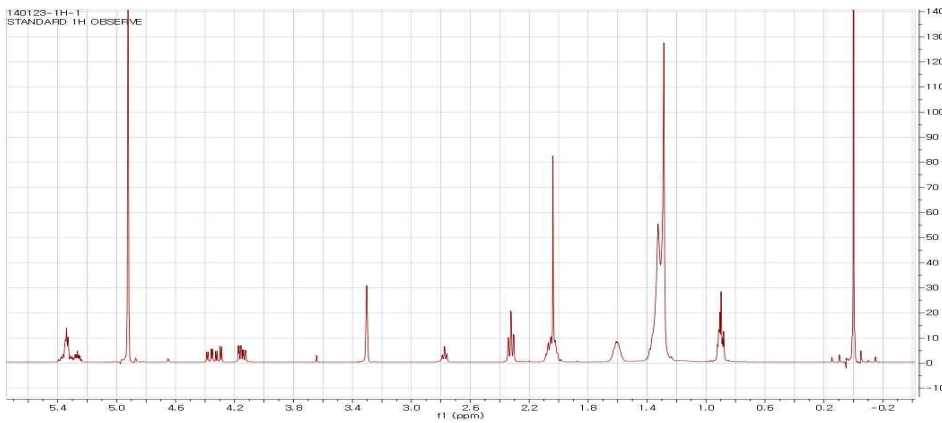


Fig 12. 으름열매의 분리 정제

1) hexan : etoH= 80:20층에서 분리된 B fraction

- 빨간색을 띠고있음(그림13-16)



①H -NMR

Fig 13. B fraction of H-NMR

②C-NMR

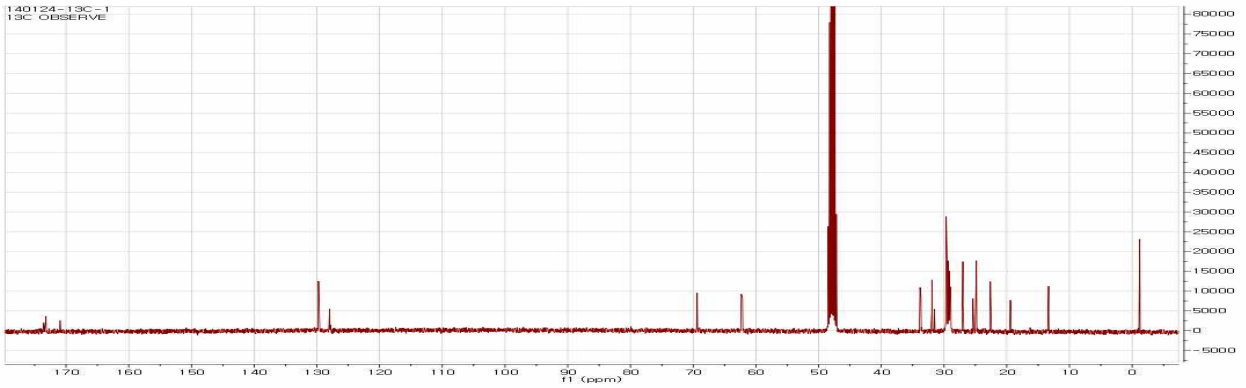


그림14. B fraction of C-NMR

③HPLC

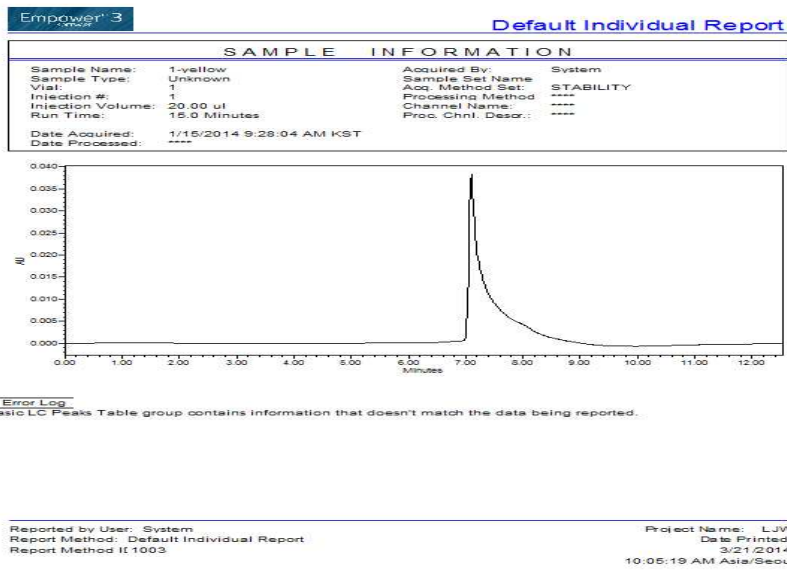


그림15. B fraction of HPLC

④ FAB-MS

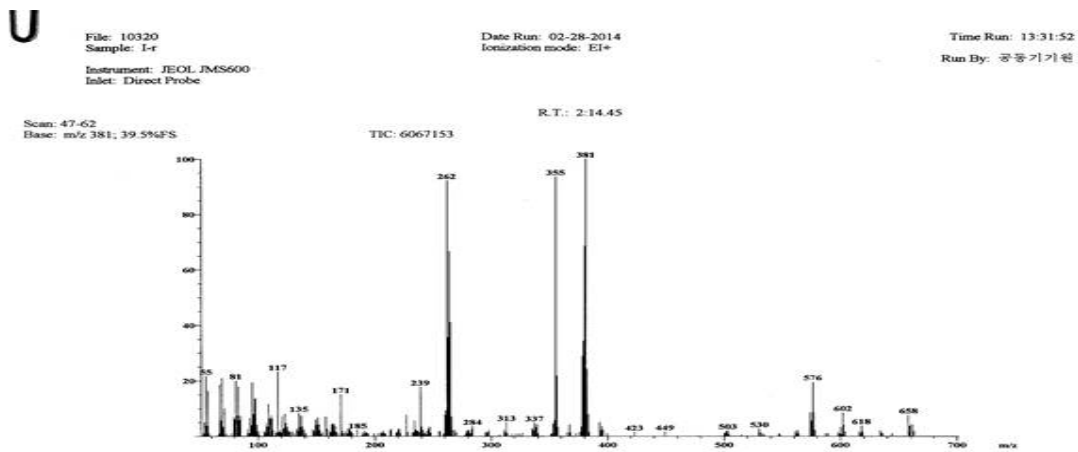


그림16. Braction of FAB MS

⑤ 예상 되는 물질 구조

3-cyano-4-(1-phenyl-2(1H)thiopyrid-3-yl)-6-phenyl-2(1H)-pyridone

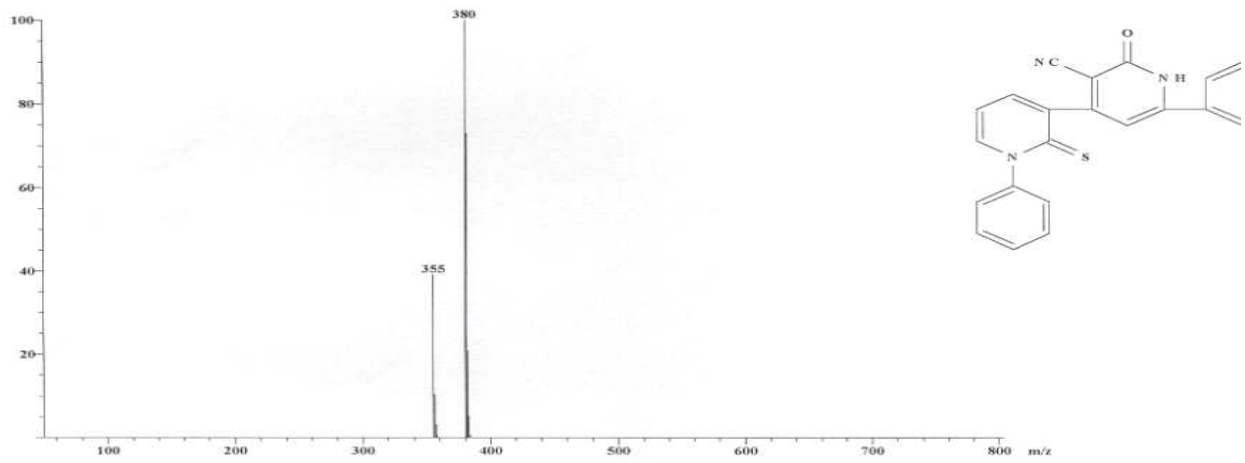


그림 17 Structure of B fraction

2) hexan 80:20층에서 분리된 CB fraction

- 노란색을 띠고있음 B, C fraction은 NMR, FAB MS에서 같은 나왔음 아마도 isomer나 이성질체인 것으로 보여짐.(그림18-21)

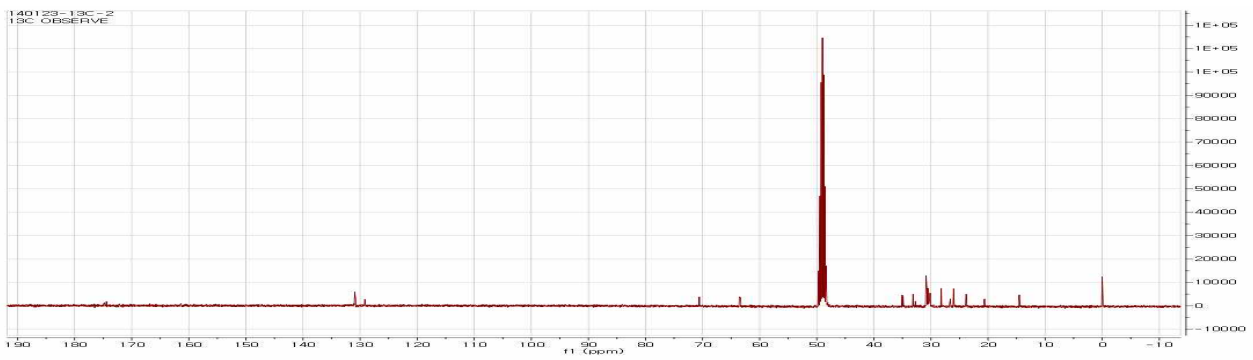


Fig 18. C fraction of C-NMR

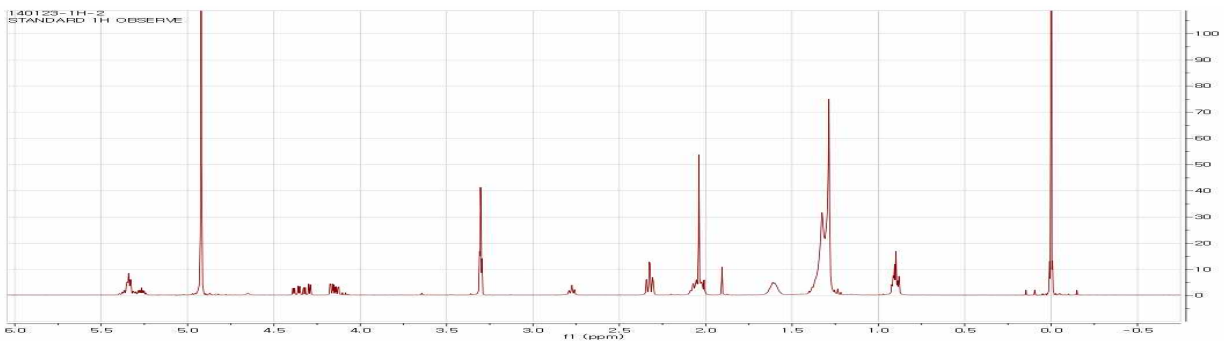


Fig 19. Cfraction of H-NMR

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	1-yellow	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	
Vial:	1	Acq. Method Set:	STABILITY
Injection #:	2	Processing Method	****
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	****
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	****
Date Acquired:	1/15/2014 9:42:47 AM KST		
Date Processed:	****		

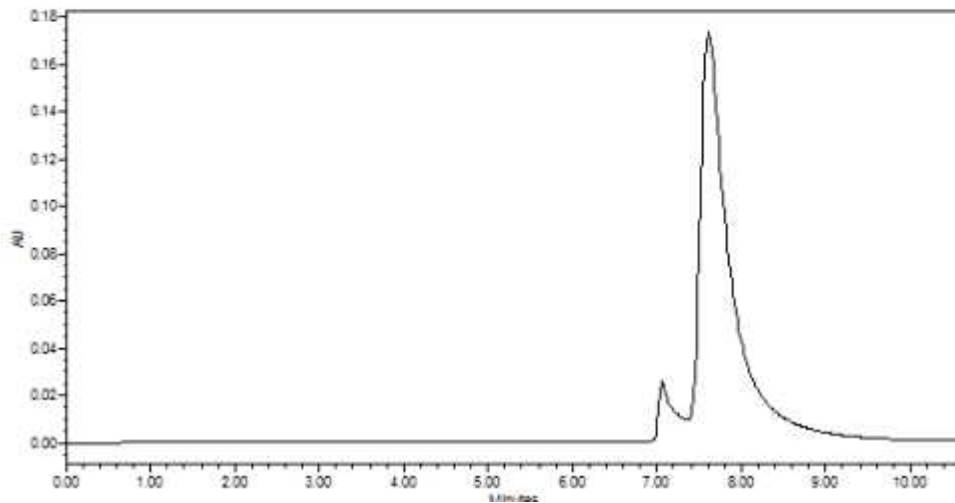


Fig 20 C fraction of HPLC

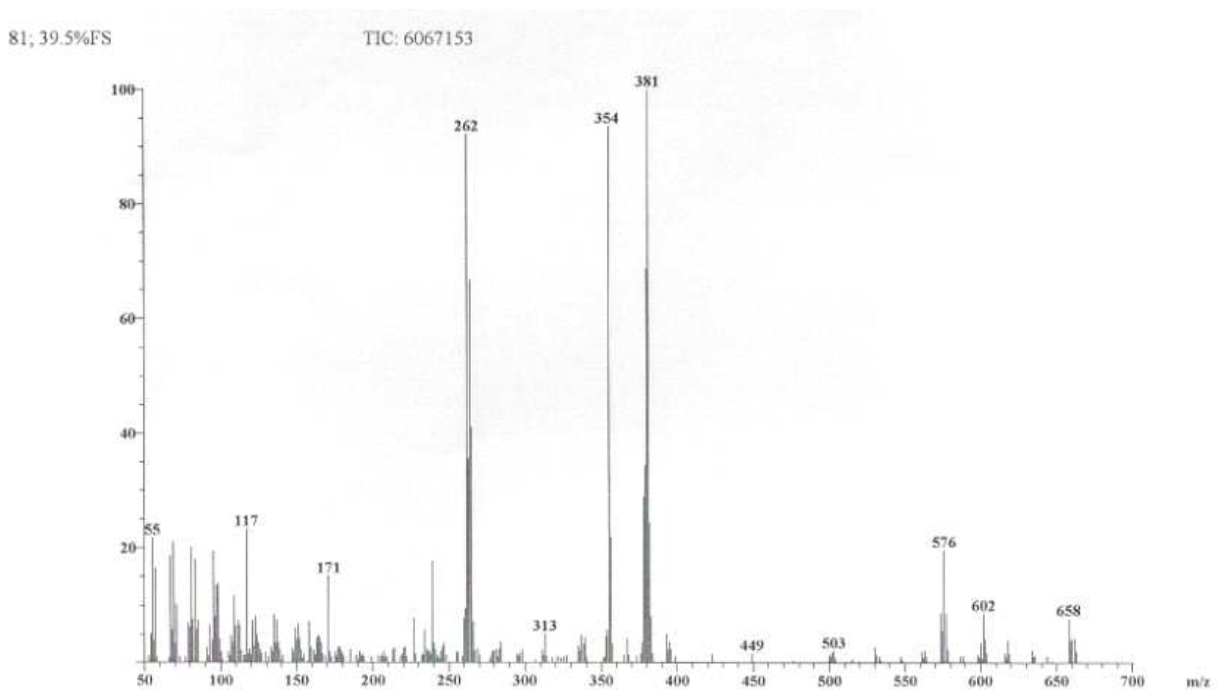


Fig 21 C fraction of FAB-MS

3) hexan : etoH= 50:50층에서 분리된 III fraction 구조 분석

ornosanine 구조로 주황색 DPPH 분석에서 free radical scvenger activity 활성을 가짐 (Fig 22-26)

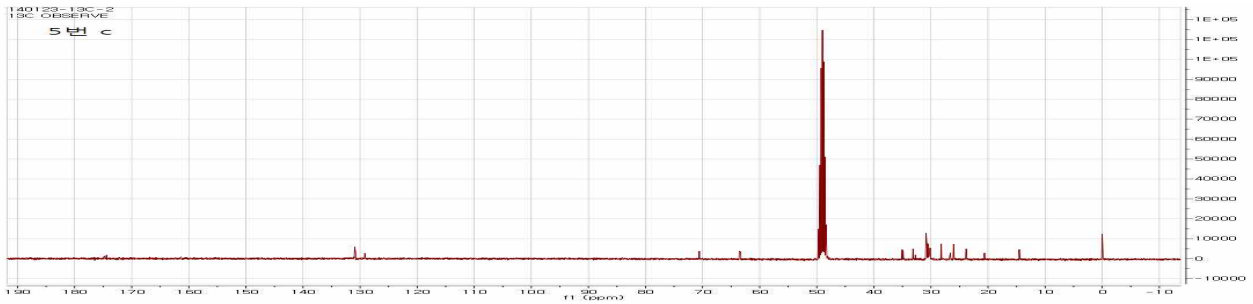


Fig 22 C-NMR of III fraction from hexan:etoh=50:50 extracts

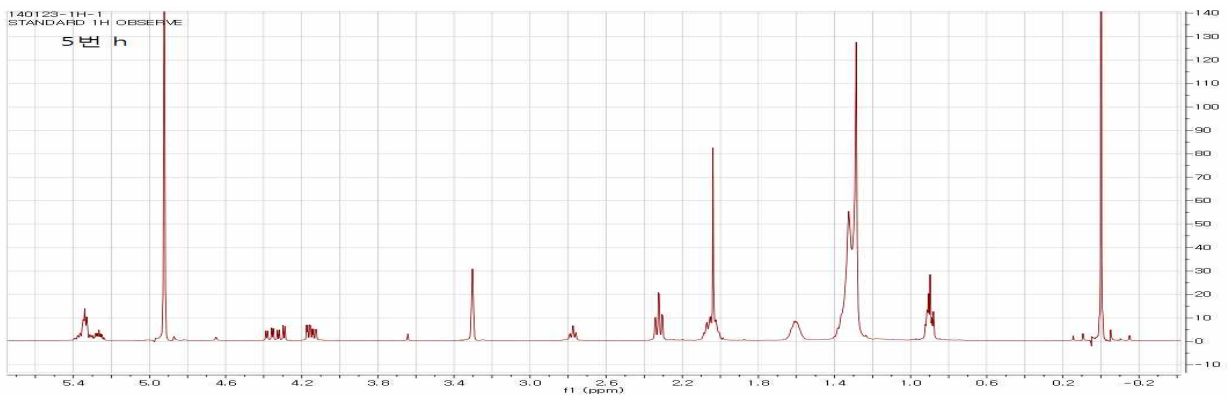


Fig 23 H-NMR of III fraction from hexan:etoh=50:50 extracts

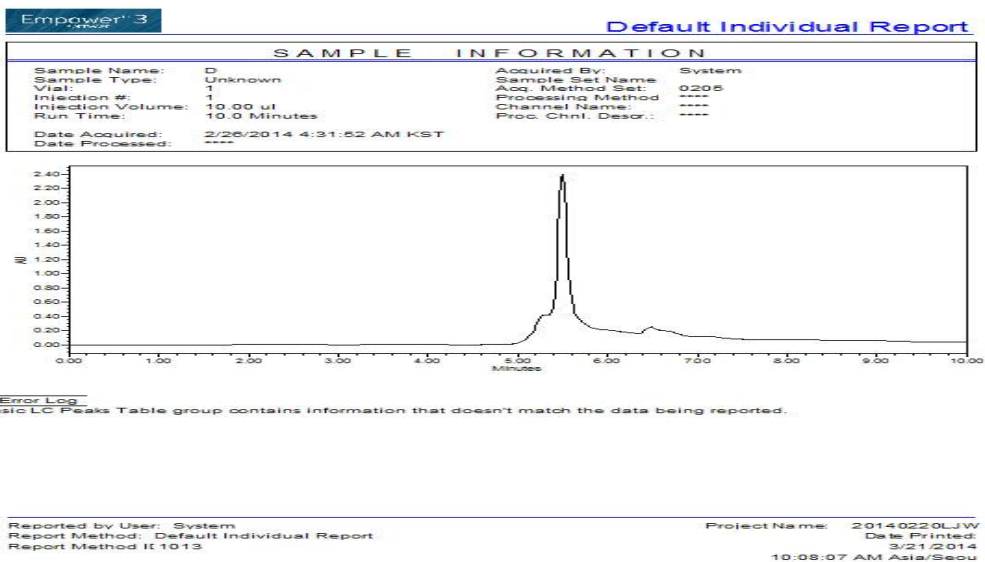


Fig 24 HPLC peaks of III fraction from hexan:etoh=50:50 extracts

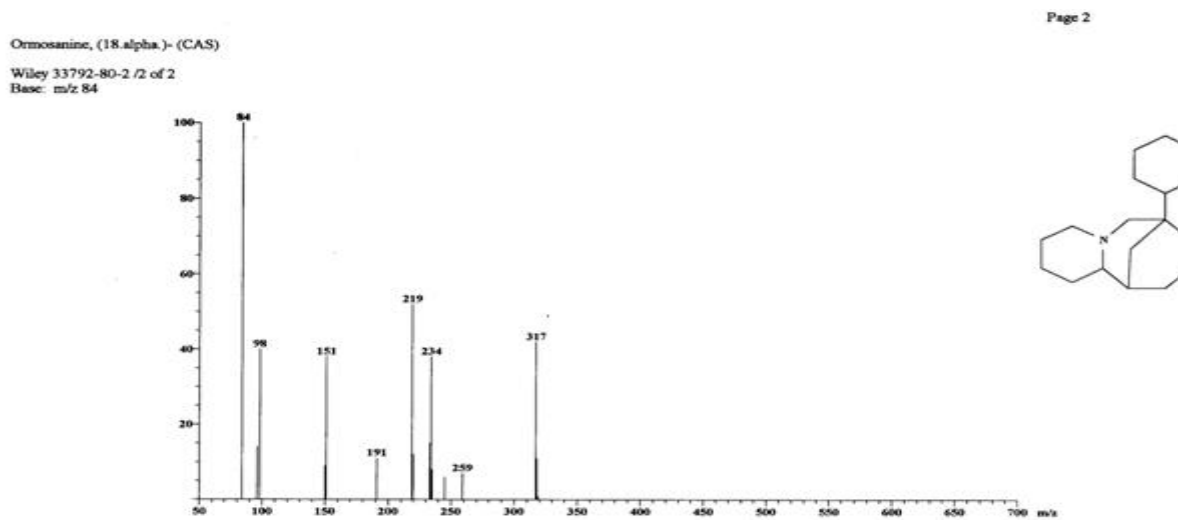


Fig 25 ormosanine of III fraction from hexan:etoh=50:50 extracts

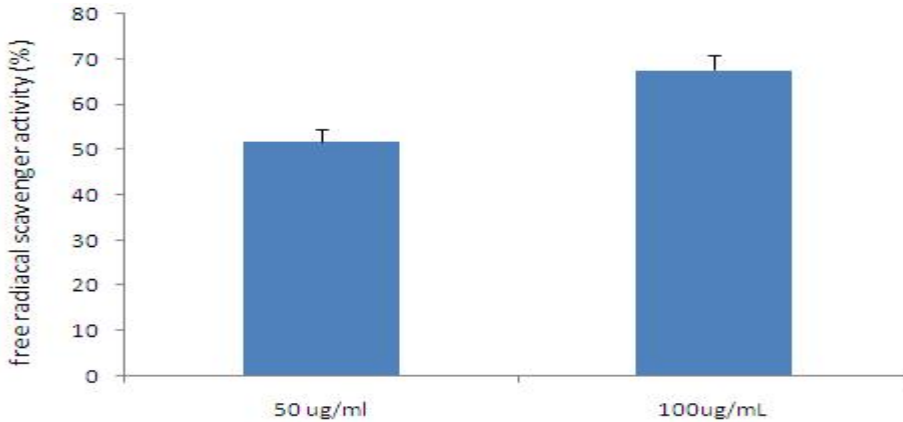


Fig 26. ABST scavenger activity of ornosone

ornosanine은 50ug/ml 농도에서 51.83% free radical scavenger activity 활성을 갖는다.

(4) 으름열매의 원료 validation 평가 및 대량 추출 시 최적 추출공정 확인, 분석

: oleanolic acid 와 hederagenin은 에탄올 추출물에서 검출되는 성분임

물 추출물에서는 폴리페놀과 flavonoid, tanin성분이 검출되기 대량 추출 시 물추출물에서 폴리페놀과 flavonoid, tanin을 지표성분이 항산화 활성을 가지면 간 보호 효과를 가지는 것으로 보여짐

- 활성이 있는 ethyl acetate 추출물 시료를 silica gel(25g, 70~230 mesh, column chromatography-용, Merck, Germany)을 ethyl acetate로 column (1.5×30 cm)에 충전 시킨 후, hexane 100, hexane : ethyl acetate 80 : 20, hexane : ethyl acetate 70 : 30, hexane : ethyl acetate 50 : 50, methanol 으로 층을 나누어 분획하였다. fraction 별 추출 수율은 표 1과 같음. fraction 추출 수율은 비스한 지만 활성을 뚜렷한 차이를 보였음. 이후 활성이 가장 좋은 fraction 80:20(v/v), 50:50(v/v)을 TLC에서 다시 분리하였음. TLC분리 전개용매는 80:20은 hexane-ethyl acetate(3:1), 50:50은 hexane-ethyl acetate(3:2)로 전개하였다. 이 중 80:20은 1~4 fraction, 50:50은 A~C fraction으로 나누어 활성을 확인하였음.

표2 추출 수율 물과 에탄올 그리고 hexan: etOH fraction

fraction	추출 수율
ethanol	15%
water	25%
hexan: etOH	4.49%
80:20	
70:30	4.26%
50:50	4.47%

(5) 대량 생산의 표준화를 위한 으름 추출 최적 조건 분석 평가.

1) 물 추출물을 효소 처리 후 항산화 활성 유지 확인 실험

-으름열매와 으름잎의 물 추출물의 효소 처리후 항산화 활성을 확인한 결과 잎과 열매는 활성의 변화가 거의 없었음, 효소처리를 하여도 항산화 활성 변화는 없는 것으로 보여짐(그림27)

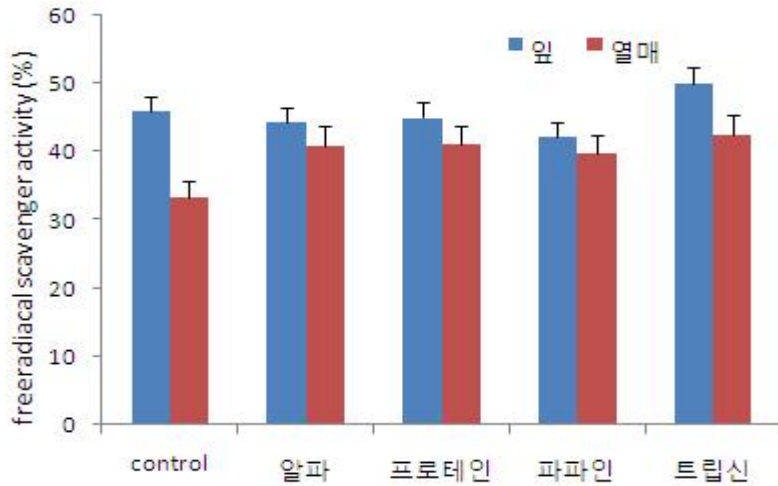


Fig 27. free radical scavenger activity after different enzyme treatment

2) 온도를 다르게 저장후 활성변화

온도를 달리해도 활성의 변화 없음

표 3 온도를 달리 하여 처리 후 항산화 활성 변화

temperature(°C)	free radical scavenger activity (%)
-70	50
-20	48
4	50
25	50
60	0

(6) 으름식초 활용한 기능성 음료의 생리적 활성 측정

1) 으름 열매 식초의 기능성

① ABTS⁺ 라디칼 소거활성

- ABTS⁺ 라디칼 소거활성 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS⁺ free radical이 시료내의 항산화물질에 의해 양이온이 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로, ABTS⁺ 라디칼 탈색 반응은 1분 안에 종료되므로 단시간에 측정할 수 있고 소수성과 친수성 모두에 적용 가능하여 DPPH 라디칼 소거능과 함께 항산화 활성을 스크리닝 하는데 많이 이용되고 있다. ABTS⁺ 방법이 DPPH 방법보다 수소 공여 항산화제와 연쇄 절단형 항산화제 모두를 측정 할 수 있고, 수용상과 유기상 모두에 적

용이 가능하기 때문에 ABTS⁺ 라디칼 소거활성이 더 민감하게 나타난다.

- 본 연구에서도 으름 식초의 항산화 활성측정으로 DPPH 실험을 하였지만 으름 식초 고유의 색과 여러 물질 때문에 간섭반응의 원인으로 결과가 좋지 않아 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 실시하였다.
- 발효 1일째에 초산 발효 중 으름 열매 식초의 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 28와 같다. 2.5 mg/mL 농도에서 대조군은 7.06%의 소거능을 나타냈고, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서는 13.29, 15.27, 29.03, 35.11%의 소거능을 나타냈으며, 5 mg/mL 농도에서는 대조군이 9.33%의 소거능을 나타냈으며, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서는 각각 15.37, 23.1, 41.7, 50.78%의 소거능을 나타냈다. 시료의 농도가 증가될수록 라디칼 소거능이 증가되었고, 으름 열매가 첨가될수록 라디칼 소거능도 유의적으로 증가되었다.
- 발효 13일째에 초산 발효 중 으름 열매 식초의 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 29와 같다. 2.5 mg/mL 농도에서 대조군은 11.38%의 소거능을 나타냈고, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서는 19.98, 35.5, 52.08, 60.26%의 소거능을 나타냈다. 5 mg/mL 농도에서는 대조군이 15.20%의 소거능을 나타냈으며, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서는 각각 27.96, 48.73, 75.73, 86.03%의 소거능을 나타내어 으름 열매 첨가군 7%에서 1 mg/mL 농도의 양성대조군 ascorbic acid의 소거능 90.64%의 활성과 유사하였다. 이는 발효된 으름 열매 첨가군 7% 식초의 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 우수한 것으로 보인다. 또한, 13일째에서 시료의 농도가 증가될수록 라디칼 소거능이 증가됨을 보여주었으며, 으름 열매 첨가량의 증가에 따라서도 라디칼 소거능이 유의적으로 증가됨을 보여주었다. 으름 열매 식초는 발효가 진행되는 동안 라디칼 소거능이 유의적으로 증가하여 발효 초기보다 발효 종료 시 2.5 mg/mL 농도에서 대조군이 4.32% 증가하였고, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서는 각각 6.69, 20.23, 23.05, 25.15% 라디칼 소거능이 더 우수하였다. 5 mg/mL에서는 대조군이 5.87%, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 12.59, 25.63, 34.02, 35.25% 라디칼 소거능이 증가하였다.
- 이를 통하여 발효 과정 중에 항산화 활성이 증가되는 것을 보여주었다. 이는 레몬밤 함량이 높을수록 허브 식초의 항산화 효과가 좋은 것과 유사하였으며, 오미자 식초의 free radical 소거활성이 발효 과정을 거치면서 그 능력이 향상된 결과와 유사하였다. 또한 토마토 식초에서 발효 종료액이 51% 라디칼 소거능을, 오이식초에서 79%의 라디칼 소거능을 나타내 으름 열매 식초 86.03%보다 낮은 값을 나타냈는데, 이는 으름 열매 식초의 항산화 활성이 우수한 것으로 보여 진다.
- 많은 연구결과에서 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량이 항산화 활성과 밀접하게 관련되어 있다고 알려져 있는데, 본 연구에서도 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 탄닌의 함량과 으름 열매 식초의 라디칼 소거능의 결과와 유사하였고, 그중에서도 총 플라보노이드와 탄닌의 함량과 더 비슷한 결과를 보여주었다. 이를 통하여 플라보노이드와 탄닌 성분이 으름 열매 식초의 항산화 활성의 주요 관여물질인 것으로 보여 진다.

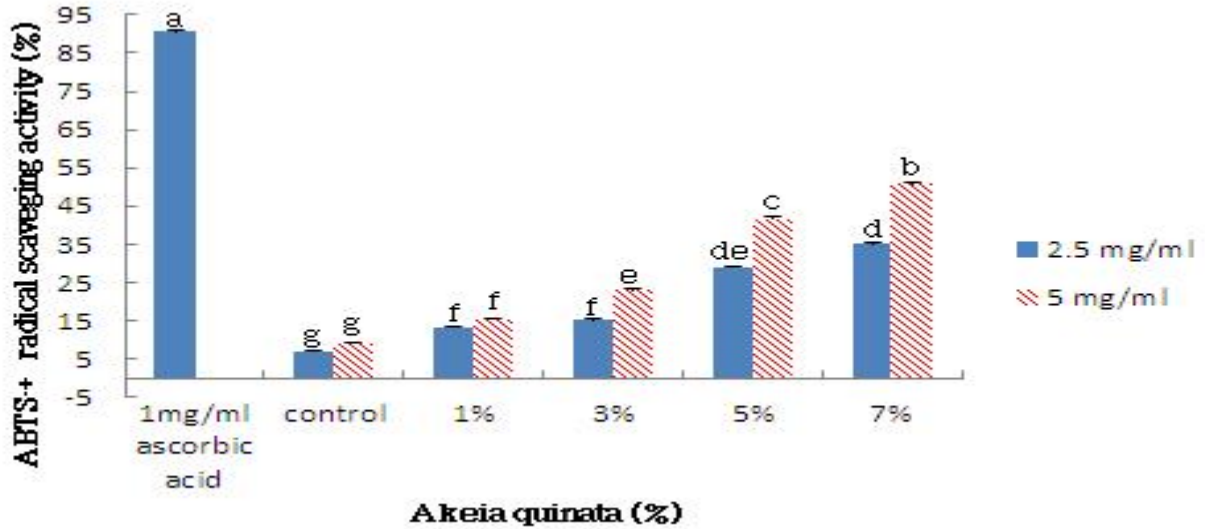


Fig28. ABTS⁺ scavenging activity of vinegar added with different levels of *Akebia quinata* at 1 day . Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences (p<0.05)

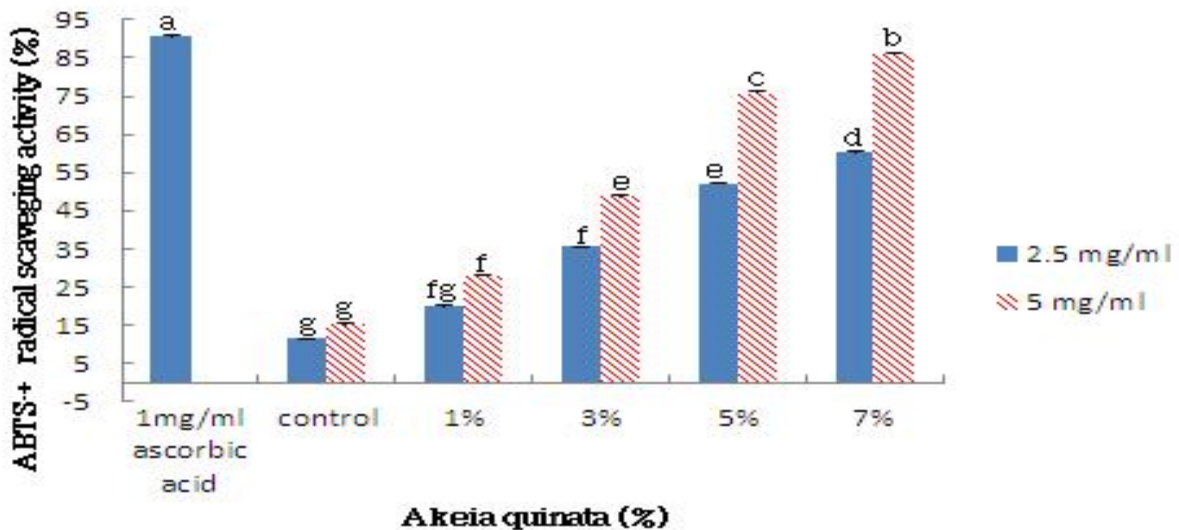


Fig 29. ABTS⁺ scavenging activity of vinegar added with different levels of *Akebia quinata* at 3 day . Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences (p<0.05)

②으름 열매 식초의 SOD 유사활성 측정

- 생체내 항산화 효소 중 하나인 SOD (superoxide dismutase)는 세포내 superoxide radical를 과산화수소로 전환 시키는 반응을 촉매 하는 효소이며 SOD에 의해 생성 된 과산화수소는 catalase 또는 peroxidase에 의해 물 분자와 산소 분자로 전환 한다.

- 발효 1일째에 초산 발효 중 으름 열매 식초의 SOD 유사 활성을 pyrogallol 자동 산화 반응을 이용하여 조사한 결과는 Fig. 6A와 같다. 2.5 mg/mL 농도에서 대조군은 12.32%를 나타냈으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서는 13.53, 15.07, 18.93, 24.36%를 나타냈다. 5 mg/mL 농도에서는 대조군이 14.51%를 나타냈으며, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서는 각각 16.98, 19.64, 24.35, 31.44%를 나타냈다. 시료의 농도가 증가될수록 SOD 유사 활성능이 증가하였으며, 으름 열매가 첨가될수록 SOD 유사 활성능도 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째에 초산 발효 중 으름 열매 식초의 SOD 유사 활성을 pyrogallol 자동 산화 반응을 이용하여 조사한 결과는 Fig. 30와 같다.
- 2.5 mg/mL 농도에서 대조군은 20.38%를 나타냈고, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서는 29.83, 30.54, 33.79, 37.67%를 나타냈다. 5 mg/mL 농도에서는 대조군이 22.73%를 나타냈으며, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서는 각각 34.47, 36.5, 41.24, 47.13%의 소거능을 나타내 으름 열매 첨가군 7%에서 1mg/mL 농도의 양성대조군 ascorbic acid의 소거능 49.96%의 활성과 유사하였다. 이는 발효시킨 으름 열매 첨가군 7% 식초의 SOD 유사활성능이 우수한 것으로 보인다. 13일째에서도 시료의 농도가 증가될수록 SOD 유사 활성능이 증가하였으며, 으름 열매 첨가량이 증가될수록 SOD 유사 활성능 역시 유의적으로 증가하였다. 으름 열매 식초는 발효가 진행됨에 따라 SOD 유사 활성능이 유의적으로 증가하여 발효 초기보다 발효 종료 시 2.5 mg/mL 농도에서 SOD 유사활성능이 대조군이 8.06%, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 16.30, 15.46, 14.86, 13.32% 증가하였다. 5 mg/mL 농도에서는 대조군이 8.22%, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 17.49, 16.86, 16.89, 15.68% 증가하여, SOD 유사 활성물질이 발효 과정 중 추출된 것으로 보여 진다.
- 이는, 발효 과정을 통해 SOD 유사 활성물질이 생긴 것으로 사료된 사과식초의 연구결과와 유사하였으며, 오디식초의 SOD 유사 활성능 17.91%보다 높아, 으름 열매 식초의 SOD 유사활성능이 좋은 것으로 보여 진다. SOD 유사활성의 연구 결과도 라디칼 소거능과 마찬가지로 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 탄닌의 함량과 유사한 경향을 보여주었으며, 그 중에서도 총 플라보노이드와 탄닌의 함량과 더 유사한 경향을 나타내 플라보노이드와 탄닌 성분이 으름 열매 식초의 항산화 활성의 주요 관여물질인 것으로 사료된다.

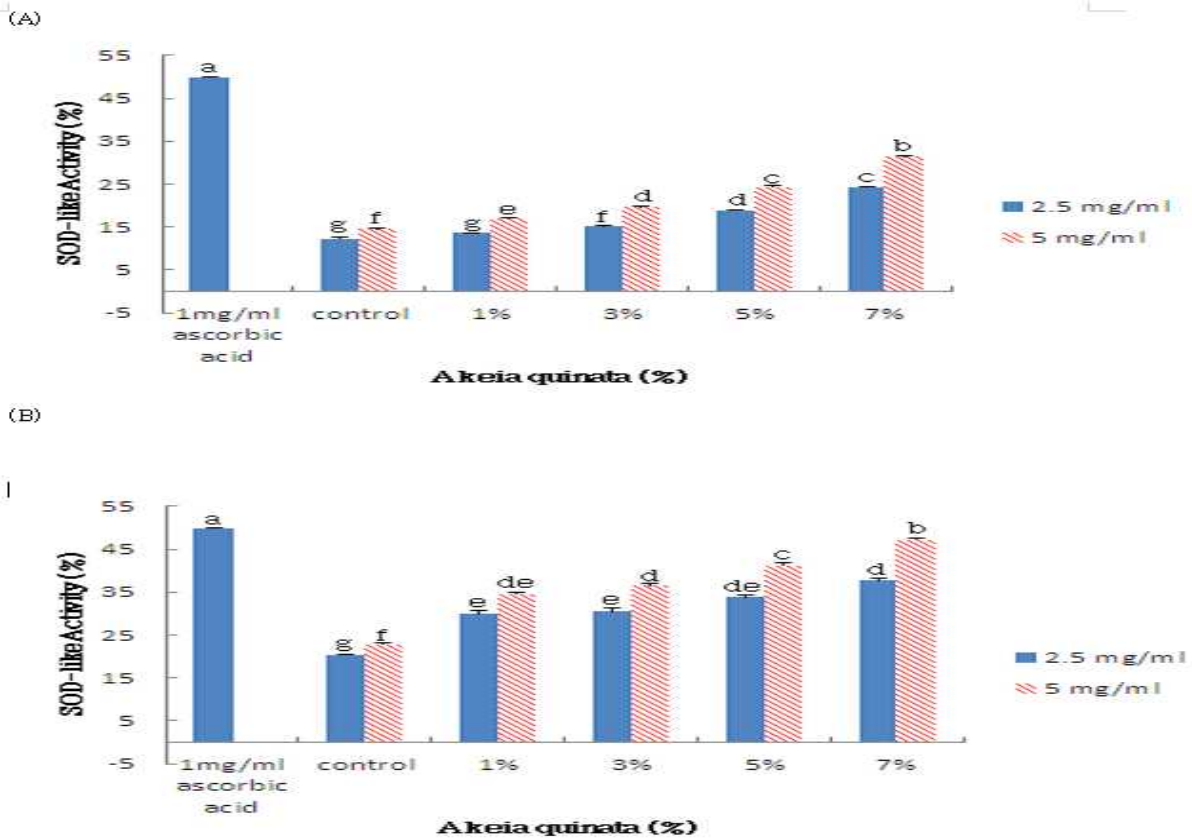


Fig 30 SOD-like activity of vinegar added with different levels of *Akebia quinata* (A) at 1 day (B)at 13 day. Values are mean±standard deviations of triplicate

determination. Different superscripts (a-e) are significant differences ($p < 0.05$)

③ 으름 열매 식초의 환원력

- 어떤 물질이 항산화 작용을 나타내는 여러 가지 기작 중에는 활성산소 및 유리기에 전자를 공여함으로써 안정화 시키는 작용이 있는데 이는 넓은 범위에서 환원에 해당한다. 따라서 환원력을 가진 물질은 전자 공여체로 작용하기 때문에 지질과 산화 과정에서 중간 생성물의 생성을 억제시켜 2차적인 항산화제의 역할을 하는 것으로도 알려져 있으며, 일반적으로 reductone의 존재와 연관이 있는 것으로 보고되었다. 환원력은 potassium ferricyanide reduction method을 사용한 화합물의 환원력을 평가하는 것으로 reduction의 항산화반응은 수소 원자를 제공함으로써 자유 라디칼 연쇄를 변환시키며, 과산화의 전구물질과 반응하여 과산화 형성을 방해 한다. 환원력에서의 흡광도 수치는 그자체가 시료의 환원력을 나타내며, 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도 수치가 높게 나타난다.
- 초산 발효 중 으름 열매 식초의 환원력은 Fig. 31에 나타내었다. 1 mg/mL 농도에서 양성 대조군의 흡광도는 1.306이었다. 모든 시료의 농도는 5 mg/mL로 하였으며, 발효 1일째에 대조군의 흡광도는 0.527로 나타났고, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 흡광도가 각각 0.637, 0.815, 1.161, 1.29로 나타났다. 으름 열매 첨가군 5, 7%에서 양성대조군의 흡광도와 비슷하였으며, 으름 열매 첨가량이 증가될수록 환원력이 유의적으로 증가하였다.
- 발효 13일째에 대조군의 흡광도는 1.122로 나타났으며, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 1.283, 1.324, 1.431, 1.539로 나타났다. 발효가 진행됨에 따라 환원력이 유의적으로 증가하여 환원력에 관여하는 항산화 물질이 발효 과정 중 생성된 것으로 보이며, 으름 열매가 첨가될수록 환원력이 유의적으로 증가하였다. 으름 열매 첨가군 3, 5, 7%에서는 양성 대조군인 1 mg/mL의 L-ascorbic acid 보다 환원력이 높아 으름 열매 식초의 환원력이 우수한 것으로 보여 진다. 이러한 결과는 복분자식초의 환원력이 양성 대조군인 0.1%의 BHT와 유사하게 높은 활성을 나타낸 것과 유사하였고, 500 µg/mL 농도에서 시판 식초 0.05~0.16%의 환원력보다 으름 열매 식초의 환원력이 우수하였다.
- 본 실험에서 으름 열매 첨가량이 증가될수록 라디칼 소거활성능이 좋았고, 환원력도 라디칼 소거활성과 같은 경향을 보여, 라디칼 소거활성이 큰 추출물이 환원력도 높은 것으로 보고된 기존의 연구결과와 같았다. 으름 열매 식초에서 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 탄닌의 함량이 환원력의 결과와 유사하였는데, 그 중에서도 총 플라보노이드와 탄닌의 함량이 환원력과 더 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. 이는, 으름 열매 식초의 항산화 활성에 중요한 물질은 플라보노이드와 탄닌 성분으로 보여지며, Kim 등의 연구 결과에서도 참외 추출물의 항산화 활성이 페놀과 플라보노이드 함량과 높은 상관관계가 있다고 보고하였다.

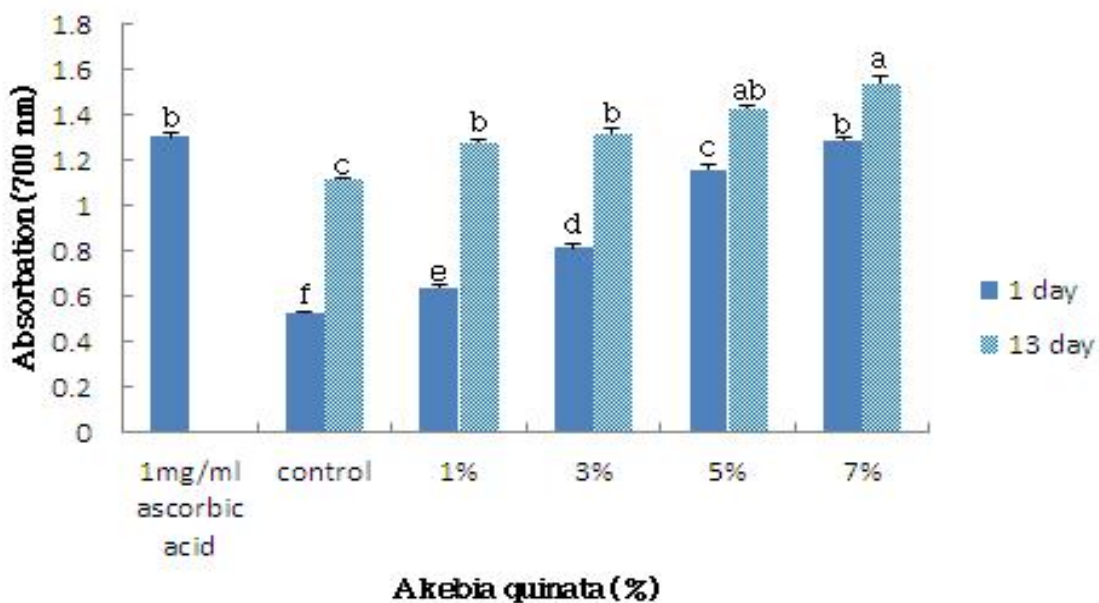


Fig 31. Reducing power effect of vinegar added with different levels of *Akebia*

quinata during acid fermentation period. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts (a-e) are significant differences ($p<0.05$)

2) 으름어린이잎 식초의 기능성

①으름 어린이 잎 식초의 항산화 활성

식초의 항산화활성에 관여하는 주요 물질은 폴리페놀과 플라보노이드 성분이라고 보고되어 (54) 발효 22일째 ABTS+ 라디칼 저해활성 결과를 Fig. 32.에 나타내었다. 시료 1 g/mL 농도 대조군에서 47.41%였고 으름 어린이잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 57.81%, 56.30%, 57.52%, 56.73%로 대조군과 으름 어린이잎 첨가군 간의 유의적 차이가 있었지만 으름 어린이잎 첨가군 내의 유의적 차이는 없었다. 시료 2.5 g/mL 처리 시 대조군에서는 64.69%였고 으름 어린이잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서는 74.87%, 83.69%, 85.75%, 79.63%로 대조군에 비하여 평균 16.30% 이상으로 항산화 활성이 유의적으로 증가하였지만 으름 어린이잎 첨가군 간의 유의적 차이를 보이지 않았다. 이를 통해 본 연구에서 항산화활성은 폴리페놀, 플라보노이드 함량과 유사한 경향으로 보여주었다. 추출물의 항산화 효과가 폴리페놀 함량에 밀접한 관계가 있다고 보고하였고, 기존 연구 결과와 마찬가지로 본 연구의 결과 역시 식초의 항산화활성에 주요 관여 물질이 폴리페놀, 플라보노이드 이었으며, 덧붙여 탄닌 또한 항산화활성에 관여되는 것으로 여겨진다.

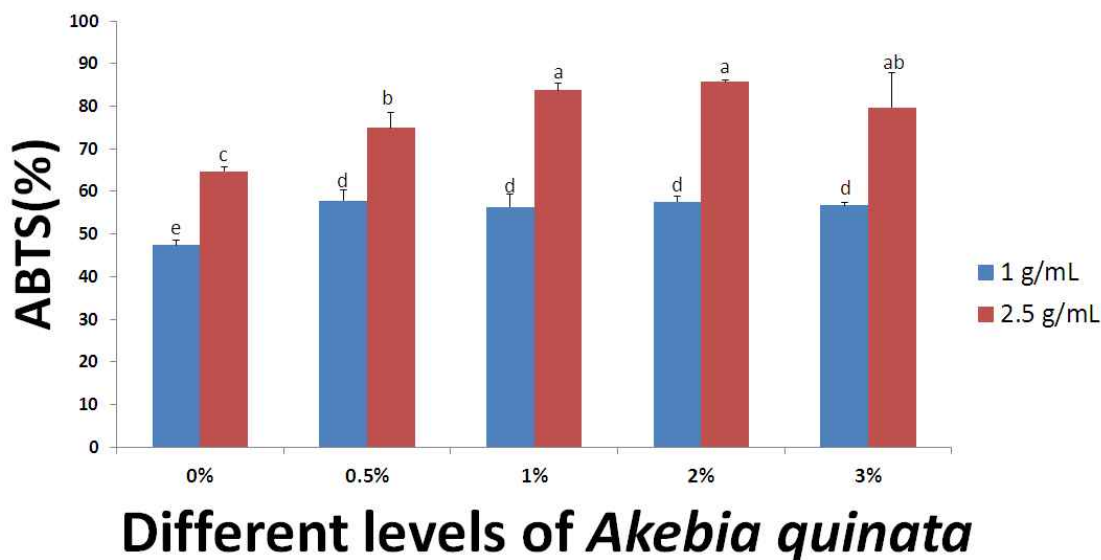


Fig 32. ABTS+ radical scavenging activity of vinegar with different levels of *Akebia quinata* (vinegars in 22 day fermentation). Values are mean ± standard deviations of triplicate determination. Different superscript letters indicate significant differences ($p<0.05$).

②세포독성효과

- 으름 어린잎을 첨가하여 만든 식초의 세포독성효과 결과는 Fig. 33에 나타냈다. 유방암(MCF-7) 세포에서의 결과 종양세포 성장이 대조군에서 86.76%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 83.51%, 89.44%, 55.13%, 51.34%로 세포 생존율을 보였다. 으름 어린잎 첨가군 2%에서 44.87%, 3%에서 48.65% 항암활성을 보여주었고 대조군과의 유의적 차이를 보였다. 간암(HepG2)세포에서의 결과 종양세포 성장이 대조군에서 97.22%였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 93.08%, 94.18%, 41.60%, 47.11% 세포 생존율을 보였다. 으름 어린잎 첨가군 2%에서는 58.40%, 3%에서는 52.90%의 항암활성을 보였다. 한편 Park의 으름의 항산화 및 항암효과는 으름 과피와 열매의 에탄올 추출물을 HepG2에 처리하였을 때 10 μ g의 농도에서 90%와 98%의 억제율을 보고하였다. 또한 세포독성효과는 항산화효과와 관련이 있는 것으로 보이고, 이 항산화효과의 대부분은 플라보노이드 등을 포함하는 식물에서 유래된 페놀계 화합물로 이루어져 있어 본 연구에서 으름 어린잎 식초군에서 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높아 항암활성 효과를 보인 것으로 사료된다.

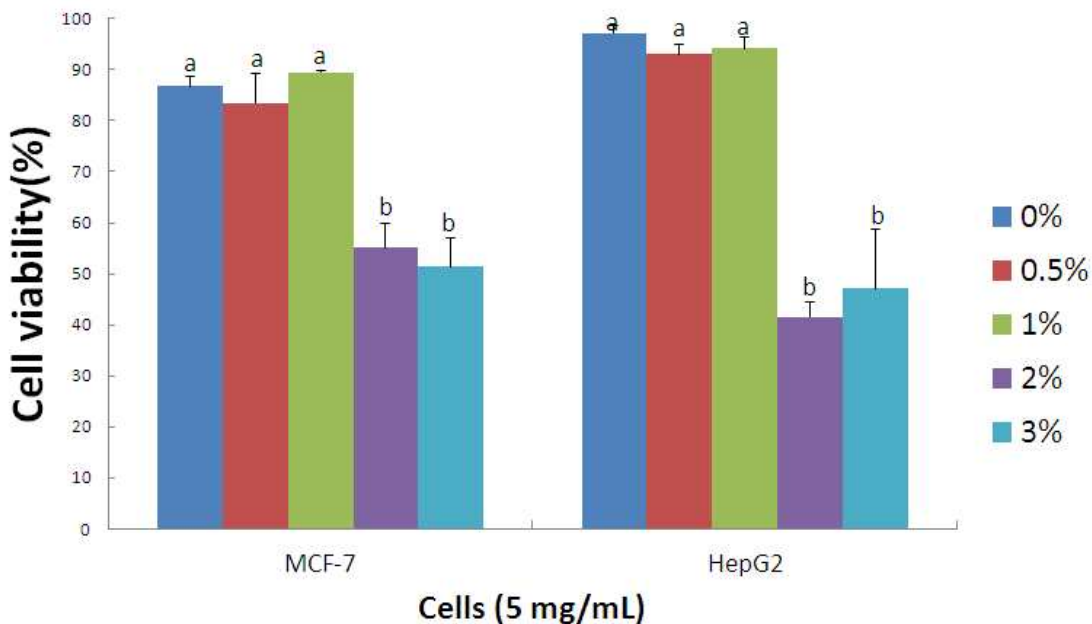


Fig33 Cell viability of vinegar added control, 0.5, 1, 2, and 3% of *Akebia quinata* (vinegars in 22 day fermentation). Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination ($p < 0.05$).

③항균활성

- 식초의 항균력을 paper disc법으로 측정된 결과는 Table 4와 같다. *B. cereus*의 clear zone 크기는 대조군에서 8.33 mm였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 8.67 mm, 8.00 mm, 9.00 mm, 9.33 mm으로 으름 어린잎 첨가군 3%에서 가장 높았다. *E. coli*의 clear zone 크기는 대조군에서 8.67 mm였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 8.67 mm, 8.67 mm, 9.00 mm, 9.33 mm으로 으름 어린잎을 첨가함에 따라 항균력이 커짐을 알 수 있었다. *S. flexneri*의 clear zone 크기는 대조군에서 8.33 mm였고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 8.33 mm, 8.67 mm, 8.67 mm, 9.00 mm으로 *S. flexneri*에 대한 항균력 또한 으름 어린잎 첨가군 3%에서 가장 높았다. *B. subtilis*, *Sal. enterica*, *K. pneumoniae*의 clear zone 크기는 으름 어린잎 첨가군 3%에서 8.67 mm, 9.67 mm, 9.00 mm으로 대조군과의 유의적 차이가 있었다($p < 0.05$). 총 6개 미생물에서 항균력을 실험하였는데 공통적으로 으름 어린잎 첨가군 3%에서 가장 항균력을 보여주었다.
- 이는 대조군에 비해 으름 어린잎 첨가군에서 알코올, 아미노산 등이 증가하면서 나타나는 추출물들에 대한 작용으로 기인하는 것으로 보이며, Lee 등의 으름 덩굴 열매 메탄올추출물이 구강 내 미생물에서 항균력을 보이며 *St. mutans* 및 *St. sobinus*의 사멸효과를 보고하였고, Lee 등의 으름을 첨가한 막걸리 연구결과 으름첨가량에 따라 항균활성에 영향을 미친다는 결과와 비슷하다. 한편 Kim 등의 밀원별 벌꿀의 항균력이 페놀 및 플라보노이드 함량과 깊은 상관관계를 가졌고, Yu 등의 홍화씨 추출물의 항균효과가 추출물에 함유된 페놀성 물질들에 기인한 결과로 나타냈다. 본 연구 또한 항균력을 나타낸 것이 폴리페놀과 플라보노이드 함량과 관련 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Antimicrobial effect of vinegar of *Akebia quinata*

Different strains	<i>Akebia quinata</i> (%) ¹⁾				
	0	0.5	1	2	3
<i>B. cereus</i>	8.33±0.58 ^c	8.67±1.15 ^{ab}	8.00±0.00 ^c	9.00±0.00 ^a	9.33±0.58 ^a
<i>E. coli</i>	8.67±0.58 ^b	8.67±0.29 ^b	8.67±0.58 ^b	9.00±0.00 ^a	9.33±0.58 ^a
<i>S. flexneri</i>	8.33±0.58 ^b	8.33±0.58 ^b	8.67±0.58 ^b	8.67±0.58 ^b	9.00±1.00 ^a
<i>B. subtilis</i>	N.D. ²⁾	N.D	N.D	N.D	8.67±0.58
<i>Sal. enterica</i>	N.D	N.D	8.67±0.58 ^b	9.33±1.15 ^{ab}	9.67±0.58 ^a
<i>K. pneumoniae</i>	N.D	N.D	N.D	N.D	9.00±0.00

Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscript

letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

¹⁾Vinegars in 22 day fermentation.

²⁾Not detected. growth inhibition none

3. 3차년

(1) 으름식혜의 간보호효과

1) 으름식혜 제조

물 1L에 고두밥 250g을 끓였다. 그리고 물 5L와 1% 으름가루를 첨가하여 100°C에 1시간동안 끓여 으름식혜(AS)를 만들었다.

2) 알코올성 간질환을 유발한 rats에 으름식혜 투여

건국대학교 동물 관리 기관으로부터 승인을 받고 동물실험을 실시하였다. (IACUC 승인번호 KU 15057), Wistar rat 수컷 5~6주령을 사용하였다. 실내온도는 21~22°C, 12시간마다 실내등을 조절하였다. 군(n=6)을 정상군, 25% 알코올만 경구투여한 군, 25% 알코올을 경구투여 한 후 으름 식혜를 먹인 군으로 나누었다. 경구투여한 후 으름 식혜를 자유롭게 먹도록 하였다. 21일간 실험 후 하루 공복 시킨 후에 혈액을 심장으로로부터 채취하였다. 그리고 centrifuge에 3500rpm, 30분 동안 돌려서 분리시켜 plasma를 얻었다. plasma로부터 AST, ALT, TC, TG 값을 구하였다. 그리고 간, 신장을 적출 한 후에 무게를 측정하였다. 몸무게, 먹은 양, 간과 신장의 무게는 아래의 표1과 같다.

Table 1. Characteristics of animals.

Treatment	Normal	Ethanol	AS ²⁾
Initial body weight (g)	128.50 ± 3.39 ^a	128.71 ± 5.31 ^a	127.17 ± 5.85 ^a
Final body weight (g)	245.13 ± 41.49 ^a	270.01 ± 31.01 ^a	237.94 ± 13.23 ^a
Weight gain(g/day)	5.6 ± 1.81 ^a	6.7 ± 1.2 ^a	5.27 ± 0.35 ^a
Beverage intake (mL/day)	ND	ND ³⁾	138 ± 9.5
Liver	26.72 ± 0.59 ^a	25.9 ± 0.28 ^a	20.9 ± 0.09 ^b
Kidney	6.37 ± 0.041 ^a	6.6 ± 0.05 ^a	5.14 ± 0.01 ^b
Spleen	2.12 ± 0.037 ^a	2.14 ± 0.047 ^a	1.64 ± 0.01 ^b

¹⁾AB : *Akebiaquinata* water extracts added herb beverage groups

²⁾AS : *Akebiaquinata* sikhye group

³⁾ND : No Detected

The rats were divided into 4 group (6 rats in each group)

Effects of *Akebiaquinata* on bodyweight, weight gain, organ weight and beverage intake in a rat mode of alcohol-induced hepatotoxicity. We measured the body weight twice per week for 3 weeks. Organ weight is g/ 100g of body weight. The weight again was higher in the ethanol-treated group. Results are presented as mean ± standard deviation. Different

superscript in a row are significant differences ($p < 0.05$)

3) 혈청 중 효소의 변화

plasma로부터 얻은 AST, ALT 결과는 Fig 1, Table 2 와 같다. AST에서 정상군은 113.03 IU/L, 알코올군은 235.93 IU/L, 으름식혜는 148.6 IU/L로 나타내었다. ALT에서 35.14 IU/L, 알코올군에서는 42.17 IU/L, 으름 식혜는 27.42 IU/L로 나타내었다. ALT에서는 으름식혜가 정상보다 낮은 수치를 보여주었다. plasma로부터 얻은 TC, TG 결과는 Fig2, Table 3와 같다. TC에서는 85.55 mg/dl, 알코올군에서는 100.05 mg/dl, 으름식혜에서는 84.17 mg/dl로 나타내었다. TG에서는 정상군은 30.28 mg/dl, 알코올 군은 55.32 mg/dl, 으름 식혜에서는 30.2로 나타내었다. 이 네 결과는 전반적으로 알코올 군에서 수치가 증가하였고 으름식혜를 섭취한 군에서 수치가 감소한 것을 볼 수 있다. 이 결과 으름 식혜는 alcohol-induced hepatotoxicity로부터 보호효과를 AST, ALT를 통해서 보여주었다. 또한 혈중 지질 농도를 낮춰주는 효과를 TC, TG를 통해 보여주었다.

Table2. Effects of *Akebia quinata* Sikhye the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase levels (AST) in rats with alcohol-induced liver damage.

Group	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
Normal	113.03 ± 28.21	35.14 ± 2.41
Ethanol	235.93 ± 45.38	42.17 ± 20.48
AS	148.6 ± 27.32	27.42 ± 8.71

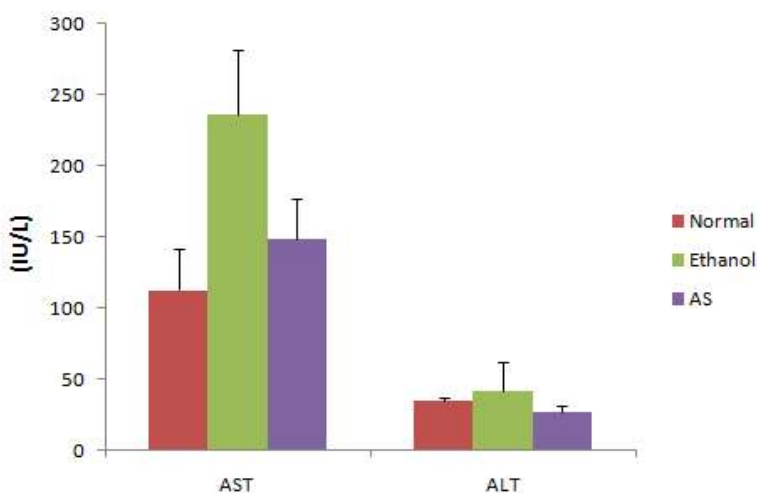


Fig. 1. Effects of *Akebiaquinata* sikhyethe serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate-aminotransferase levels (AST) in rats with alcohol-induced liver damage.

AS :*Akebiaquinata*sikhyegroup

Indicate significant differences ($p < 0.05$).Results are presented as mean ± standard deviation.

Table 3. Effects of *Akebiaquinata* sikhye the serum total cholesterol and triglyceride levels in rats with alcohol-induced liver damage.

Group	TC	TG
Normal	85.55 ± 4.06 ^b	30.28 ± 10.55 ^b
Ethanol	100.05 ± 6.10 ^a	55.32 ± 9.79 ^a
AS	84.17 ± 10.22 ^{ab}	30.2 ± 9.08 ^b

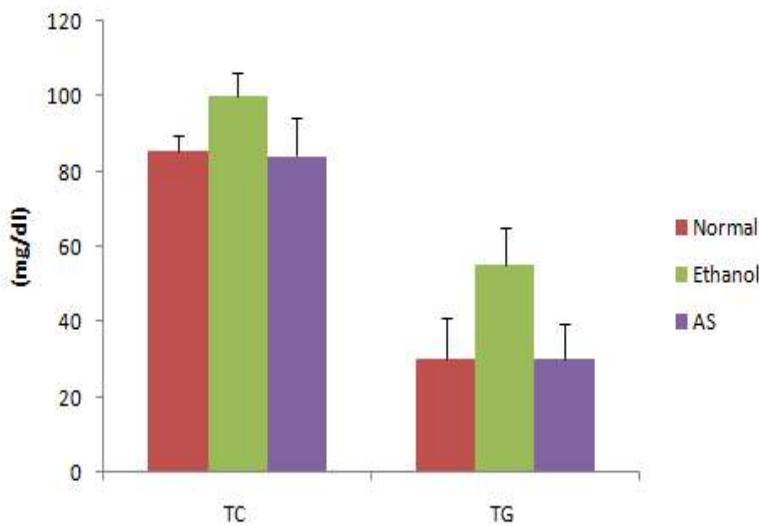


Fig. 2. Effects of *Akebiaquinata* sikhye the serum total cholesterol and triglyceride levels in rats with alcohol-induced liver damage.

AS :*Akebiaquinata* sikhye group

Indicate significant differences ($p < 0.05$). Results are presented as mean ± standard deviation.

4) Histopathological analysis

신장과 간에 대한 조직사진을 Fig 3과 Fig4에 나타내었다.



Fig 3. Effects of *Akebia quinata* sikhye on the morphology of the liver tissue. Representative photomicrographs (magnification ×100) of hematoxylin and eosin-stained sections of the liver and kidney.

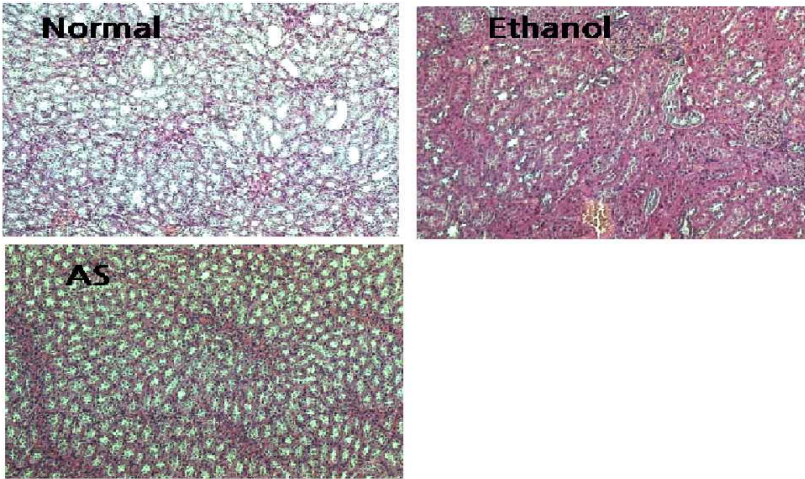


Fig 4. Effects of *Akebia quinata* sikhye on the morphology of the kidney. Representative photomicrographs (magnification $\times 100$) of hematoxylin and eosin-stained sections of the liver and kidney.

(2) 혼합음료의 간보호효과 으름의 항산화 효과

1) 혼합음료제조

혼합음료제조는 물 5L에 으름 열매 1%와 대추 1%, 감초 0.4%를 넣어 끓였다. 식힌 후 4°C에 보관하였다.

2) 알코올성 간질환을 유발한 rats에 혼합음료 투여

Wistar rat 수컷 5~6주령을 사용하여 동물 실험을 실시하였다. 실내온도는 21~22°C, 12시간마다 실내등을 조절하였다. 군 (n=6)을 정상군, 25% 알코올만 경구투여한 군, 25% 알코올을 경구투여한 후 혼합음료를 먹인 군으로 나누었다. 경구투여한 후 혼합음료를 자유롭게 먹도록 하였다.

21일간 실험 후 하루 공복시킨 후에 혈액을 심장으로부터 채취하였다. 그리고 centrifuge에 3500rpm, 30분 동안 돌려서 분리시켜 plasma를 얻었다.

Table4. Characteristic of animals.

Treatment	Normal	Ethanol	AB ¹⁾
Initial body weight (g)	128.50 \pm 3.39 ^a	128.71 \pm 5.31 ^a	131.00 \pm 2.97 ^a
Final body weight (g)	245.13 \pm 41.49 ^a	270.01 \pm 31.01 ^a	243.23 \pm 13.05 ^a
Weight gain(g/day)	5.6 \pm 1.81 ^a	6.7 \pm 1.2 ^a	5.34 \pm 0.48 ^a
Beverage intake (mL/day)	ND	ND ²⁾	142.30 \pm 10.3
Liver	26.72 \pm 0.59 ^a	25.9 \pm 0.28 ^a	20.19 \pm 0.16 ^b
Kidney	6.37 \pm 0.041 ^a	6.6 \pm 0.05 ^a	5.25 \pm 0.01 ^b

Spleen 2.12 ± 0.037^a 2.14 ± 0.047^a 1.68 ± 0.01^b

¹⁾AB : *Akebiaquinata* water extracts added herb beverage groups

²⁾ND : No Detected

The rats were divided into 4 group (6 rats in each group)

Effects of *Akebiaquinata* on bodyweight, weight gain, organ weight and beverage intake in a rat mode of alcohol-induced hepatotoxicity. We measured the body weight twice per week for 3 weeks. Organ weight is g/ 100g of body weight. The weight again was higher in the ethanol-treated group. Results are presented as mean ± standard deviation. Different superscript in a row are significant differences ($p < 0.05$)

3) 혈청 중 효소의 변화

plasma로부터 AST, ALT, TC, TG 값을 구하였다. 그리고 간, 신장을 적출 한 후에 무게를 측정하였다. 몸무게, 먹은 양, 간과 신장의 무게는 아래의 표4와 같다. plasma로부터 얻은 AST, ALT결과는 Fig 3, Table 5과 같다. AST에서 정상군은 113.03 IU/L, 알코올군은 235.93 IU/L 그리고 혼합음료 군은 175.88 IU/L로 나타내었다. ALT에서 정상군은 35.14 IU/L이고, 알코올 군은 42.17 IU/L로 정상보다 증가하였다. 혼합음료를 섭취한 군은 31.85 IU/L로 정상보다 수치가 낮게 나왔다. plasma로부터 얻은 TC, TG 결과는 Fig 4, Table 6과 같다. TC에서 정상군은 85.55 mg/dl 이고, 알코올군은 100.05 mg/dl이다. 그리고 혼합음료를 섭취한 군은 77.05 mg/dl 으로 나타내었다. TG에서는 정상군은 30.28 mg/dl, 알코올 군은 55.32 mg/dl, 혼합음료를 섭취한 군은 30.66 mg/dl의 결과를 보여주었다. 이 결과 혼합음료는 alcohol-induced hepatotoxicity로부터 보호효과를 AST, ALT를 통해서 보여주었다. 또한 혈중 지질 농도를 낮춰주는 효과를 TC, TG를 통해 보여주었다.

Table5. Effects of the water extract of *Akebiaquinata* on the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase levels (AST) in rats with alcohol-induced liver damage.

Group	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
Normal	113.03 ± 28.21	35.14 ± 2.41
Ethanol	235.93 ± 45.38	42.17 ± 20.48
AB	175.88 ± 28.27	31.85 ± 4.15

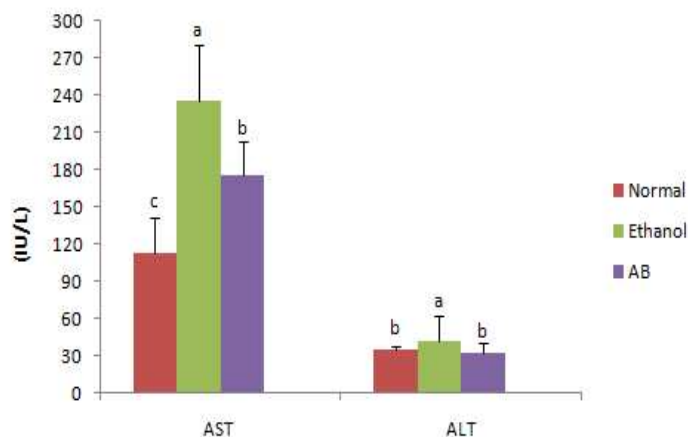


Fig 5. Effects of the beverage containing the water extract of *Akebiaquinata* on the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase levels (AST) in rats with alcohol-induced liver damage.

AB :*Akebiaquinata* water extracts added herb beverage groups

Indicate significant differences ($p < 0.05$). Results are presented as mean \pm standard deviation.

Table 6. Effects of the water extract of *Akebiaquinata* on the serum total cholesterol and triglyceride levels in rats with alcohol-induced liver damage.

Group	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)
Normal	85.55 \pm 4.06 ^b	30.28 \pm 10.55 ^b
Ethanol	100.05 \pm 6.10 ^a	55.32 \pm 9.79 ^a
AB	77.05 \pm 15.62 ^b	30.66 \pm 8.50 ^b

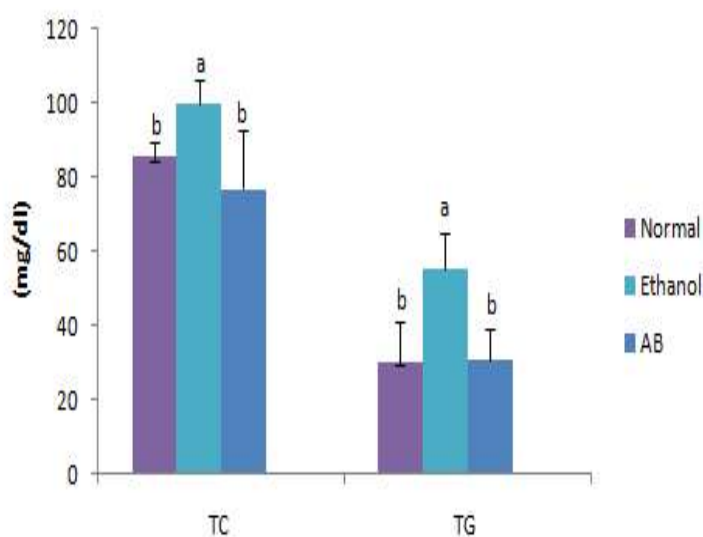


Fig 6. Effects of the beverage containing the water extract of *Akebiaquinata* on the serum total cholesterol and triglyceride levels in rats with alcohol-induced liver damage.

AB :*Akebiaquinata* water extracts added herb beverage groups

Indicate significant differences ($p < 0.05$). Results are presented as mean \pm standard deviation.

4) Histopathological analysis

신장과 간에 대해 조직염색을 하여 Fig 5와 Fig 6 에 나타내었다.

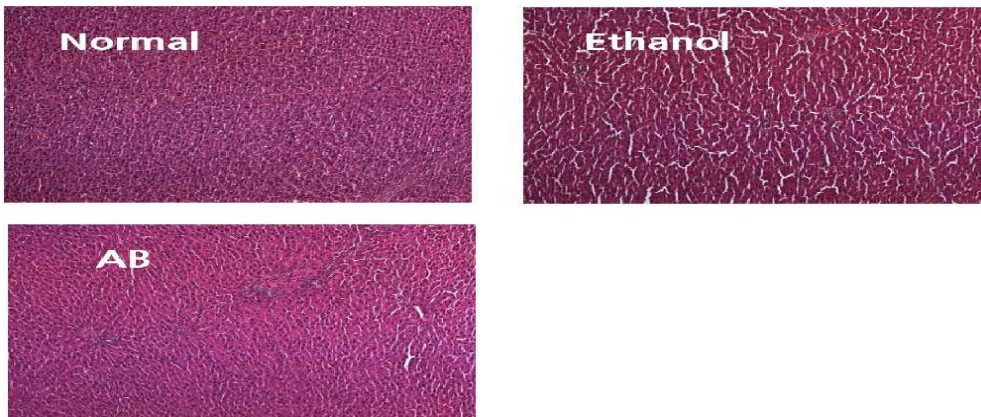


Fig 7. Effects of the herbal beverage containing the water extract of *A. quinata* on the morphology of the liver tissue. Representative photomicrographs (magnification $\times 100$) of hematoxylin and eosin-stained sections of the liver and kidney.

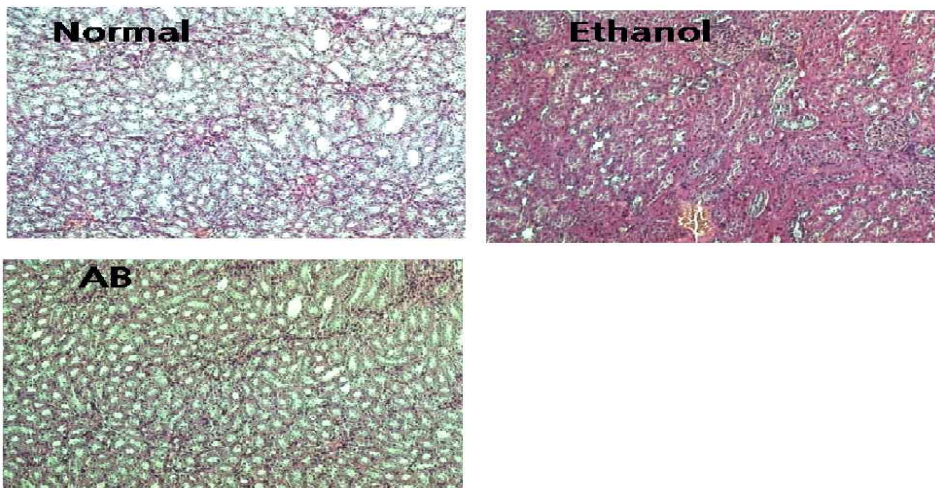
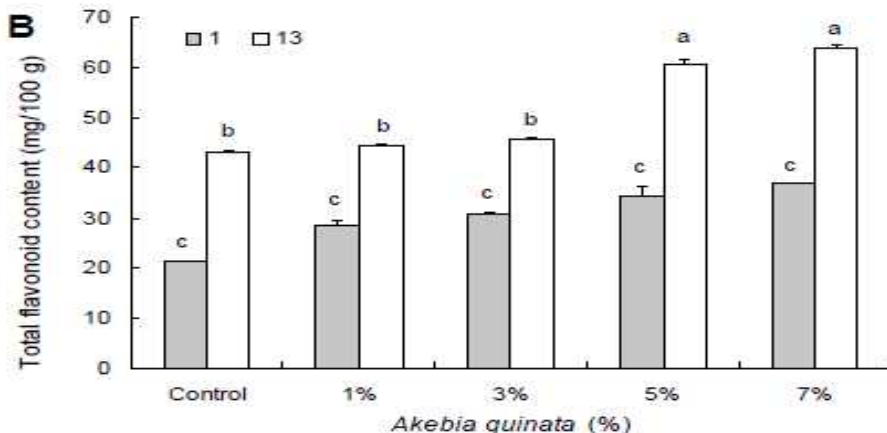
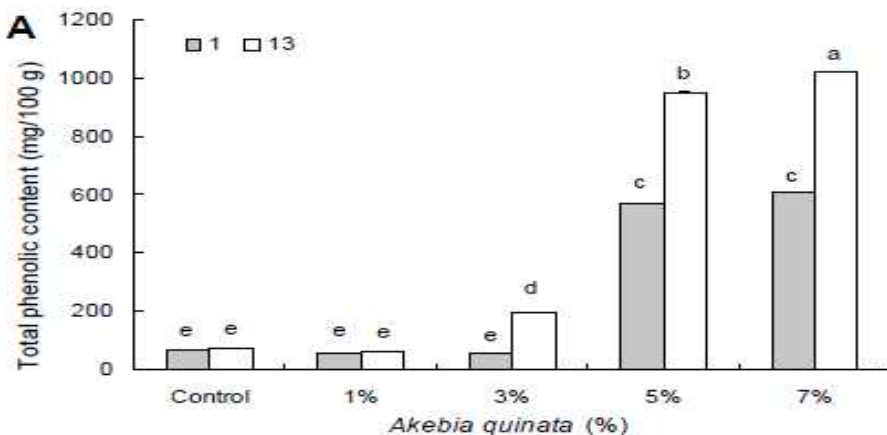


Fig 8. Effects of the herbal beverage containing the water extract of *A. quinata* on the morphology of the kidney . Representative photomicrographs (magnification $\times 100$) of hematoxylin and eosin-stained sections of the liver and kidney.

(3) 으름 열매 식초의 폴리페놀, 플라보노이드, 탄닌 함량 측정

총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 탄닌 함량을 측정하여 항산화효과를 보았다. 으름 열매 식초의 발효 1일째와 발효 13일째의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Fig. 4A와 같다. 발효 1일째에 총 폴리페놀 함량은 대조군 69.93 mg/100 g, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 59.97, 56.7, 570.52, 607.07 mg/100g으로 나타났으며 으름 열매 첨가군 5와 7%에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째의 총 폴리페놀 함량은 대조군이 76.77 mg/100 g, 으름 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 61.04, 193.3, 952.11, 1,022.42 mg/100 g을 나타냈다. 으름 열매 첨가량이 증가됨에 따라 총 폴리페놀 함량도 유의적으로 증가하였다. 제조한 으름 열매 식초의 발효 1일

째 총 플라보노이드 함량은 대조군이 21.35 mg/100 g으로 나타났으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 28.56, 30.65, 34.49, 36.85 mg/100 g을 나타냈다. 모든 실험군에서 총 플라보노이드 함량의 유의적 차이는 보이지 않았다. 발효 13일째에는 대조군이 43.08 mg/100 g으로 나타났으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 44.35, 45.8, 60.68, 63.72 mg/100 g을 나타냈다. 으름 열매 첨가군 5와 7%에서 총 플라보노이드 함량의 유의적 증가를 보여 주었고 으름 열매 첨가량이 증가될수록 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 증가하였다. 으름 열매 첨가군 5와 7%에서 총 플라보노이드 함량의 유의적 증가를 보여주었고 으름 열매 첨가량이 증가될수록 총 플라보노이드 함량이 유의적으로 증가하였다. 또한 발효가 진행되는 동안 모든 실험군에서 총 플라보노이드 함량이 발효 초기보다 대조군이 21.73 mg/100 g, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 15.79, 15.15, 26.19, 26.87 mg/100 g으로 으름 열매 첨가군 5, 7%에서 유의적으로 증가되어 폴리페놀과 유사한 결과를 보여주었는데, 이는 으름 열매의 유효 성분이 발효 과정에서 더 많이 추출된 것으로 보인다. 발효 중 으름 식초 총 탄닌 측정 결과를 Fig. 4C에 나타내었다. 으름 열매의 첨가량을 달리하여 제조한 으름 열매 식초의 총 탄닌 함량은 발효 1일째에 대조군이 0.1096 mg/100 g을 나타냈으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.1339, 0.2288, 0.2372, 0.2538 mg/100g을 나타냈다. 으름 열매 첨가군 3, 5, 7%에서 탄닌의 함량이 유의적으로 증가하였다. 발효 13일째에는 대조군이 0.3140 mg/100 g 을 나타냈으며, 으름 열매 첨가 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.3343, 0.3543, 0.3756, 0.3793 mg/100 g을 나타냈다. 발효 1일째보다 발효 13일째에 으름 열매 식초에서 탄닌의 함량이 대조군 0.2042 mg/100 g, 으름 열매 첨가군 1, 3, 5, 7%에서 각각 0.2004, 0.1255, 0.1384, 0.1255 mg/100 g 각각 유의적으로 증가됨을 보였고 으름 열매가 첨가될 수 록 탄닌 함량의 유의적 차이는 보이지 않았다.



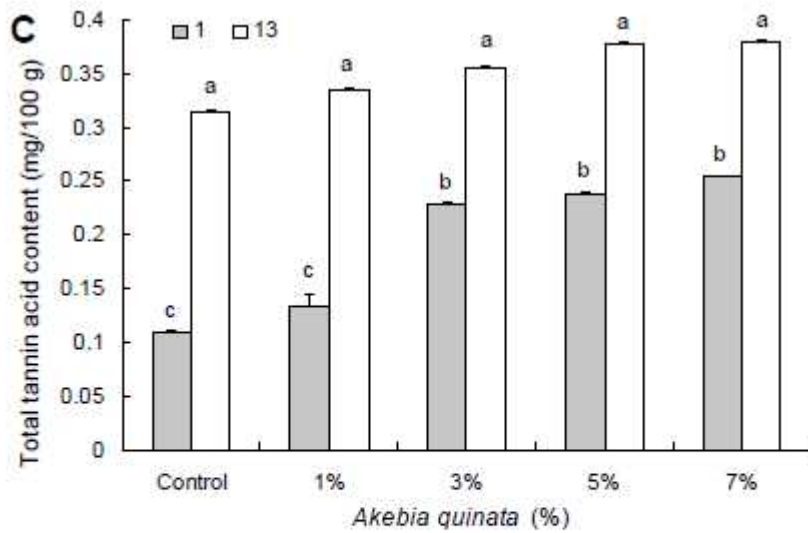


Fig 9, Contents of total phenolics (A), total flavonoids (B), and total tannin acids (C) in vinegar added with different levels of *Akebia quinata* during acid fermentation period. Values are mean± standard deviations of triplicate determination. Different letters (a-e) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

(4) 으름 열매 식초의 폴리페놀, 플라보노이드, 탄닌 함량 측정

발효 기간 중 총 폴리페놀 함량 변화는 식초를 담근 직후 발효 1일째 대조군에서 681.39 mg GAE/100 g이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 841.40 mg GAE/100 g, 771.63 mg GAE /100 g, 731.95 mg GAE/100 g, 840.12 mg GAE/100 g으로 으름 어린잎 첨가군이 대조군에 비해 증가하였으나 유의적 차이는 나타나지 않았다. 발효 13일에 으름 어린잎 첨가군 0.5%에서 2,037.50 mg GAE/100 g으로 가장 높게 나타났다. 대조군과 으름 어린잎 첨가군 1%, 2%, 3%는 1,715.70 mg GAE/100 g, 1,907.71 mg GAE/100 g, 1,939.71 mg GAE/100 g, 1,572.97 mg GAE/ 100 g으로 시료 간의 유의적 차이는 보이지 않았다. 그러나 발효 22일째 폴리페놀 함량은 대조군에서 3,555.43 mg GAE/100 g이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 3,682.72 mg GAE/100 g, 3,976.32 mg GAE/100 g, 4,146.70 mg GAE/100 g, 4,079.07 mg GAE/100 g으로 으름을 첨가할수록 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 증가되었다($P < 0.05$). 또한 발효가 진행됨에 따라 발효 1일째와 대비하여 발효 22일째에 평균 5배 유의적으로 증가되었다. 또한 발효가 진행됨에 따라 발효 1일째와 대비하여 발효 22일째에 평균 5배 유의적으로 증가되었다. 발효 중 페놀 함량의 증가는 으름잎 식초에서 다양한 생리활성과 밀접한 상관관계를 보이는 성분이라 생각된다.

발효 기간 중 총 플라보노이드 함량 결과는 Fig. 4B에 나타내었다. 식초를 담근 직후 발효 1일째 대조군에서 364.58 mg CE/100 g이었고 으름어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 477.08 mg CE/100 g, 635.42 mg CE/100 g, 731.25 mg CE/100 g, 1,064.58 mg CE/100 g으로 으름 어린잎을 첨가함에 따라 증가하였다. 발효 13일에는 대조군에서 1,185.42 mg

CE/100 g이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 1,431.25 mg CE/100 g, 1,343.75 mg CE/100 g, 1,277.08 mg CE/100 g, 1,198.53 mg CE/100 g으로 으름 어린잎 첨가군 1%를 제외한 나머지 그룹에서 유의적 차이가 보이지 않았다. 발효 22일째에 대조군에서 2,089.58 mg CE/100 g이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 1,927.08 mg CE/100 g, 2,114.58 mg CE/100 g, 2,822.92 mg CE/100 g, 2,927.08 mg CE/100 g으로 대조군, 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1% 간에는 유의적 차이가 없고 대조군에 비해 으름 어린잎 첨가군 2%, 3%의 플라보노이드 함량은 유의적으로 증가되었다($P < 0.05$). 한편 발효일이 지남에 따라 플라보노이드 역시 총 폴리페놀과 마찬가지로 유의적으로 증가하였으며 으름 어린잎을 첨가할수록 유의적으로 증가하는 같은 경향을 보였다.

발효 기간 중 탄닌 함량 결과는 발효 1일째의 탄닌의 함량은 대조군에서 1,223.0 mg TAE/100 g이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 3,073.0 mg TAE/100 g, 2,783.0 mg TAE/100 g, 2,218.0 mg TAE/100 g, 2,883.0 mg TAE/100 g으로 대조군보다 으름 어린잎을 첨가한 시료에서 탄닌의 함량이 유의적으로 높았다. 발효 13일째의 대조군에서 3,443.0 mg TAE/100 g이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 3,298.0 mg TAE/100 g, 3,515.7 mg TAE/100 g, 3,183.0 mg TAE/100 g, 3,468.0 mg TAE/100 g으로 발효 1일에 비해 시료 간에 유의적 차이가 없었다. 발효 22일째 탄닌 함량은 대조군에서 3,596.3 mg TAE/100 g이었고 으름 어린잎 첨가군 0.5%, 1%, 2%, 3%에서 3,538.0 mg TAE/100 g, 3,513.0 mg TAE/100 g, 3,293.0 mg TAE/100 g, 3,618.0 mg TAE/100 g으로 유의적 차이가 없었다. 본 연구 결과에서는 발효가 진행됨에 따라 탄닌이 증가되었으나 발효 중기부터 발효 최종단계에서는 증가되지 않았다.

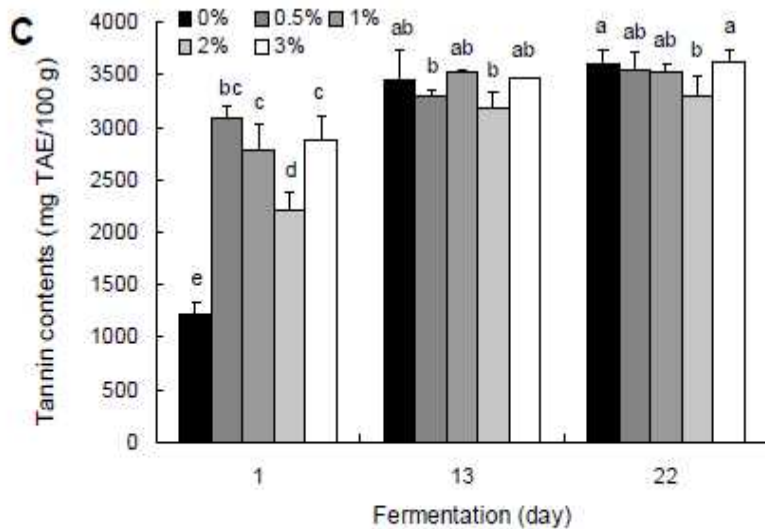
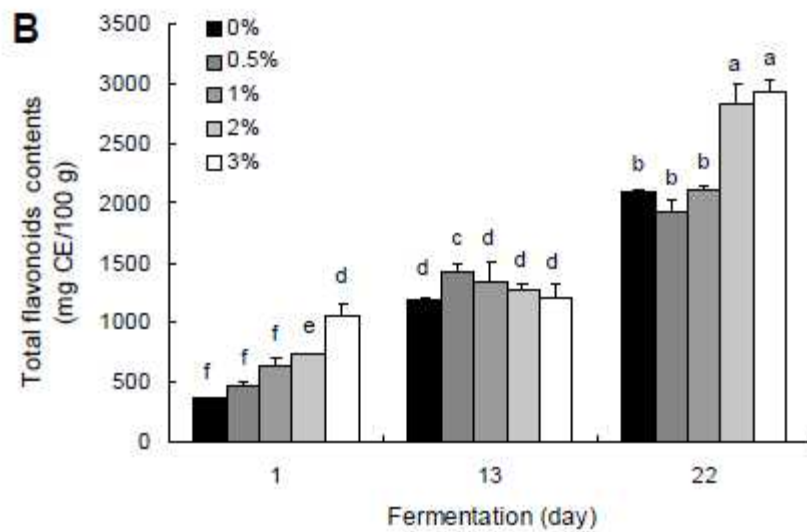
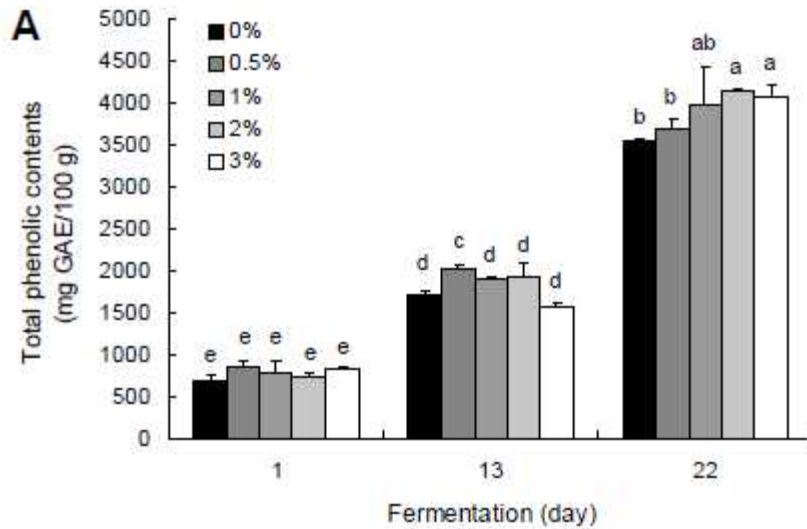


Fig 10. Contents of total phenolics (A), flavonoids (B), and total tannin (C) in vinegar with different levels of *Akebia quinata*. Values are mean \pm standard deviations of triplicate determination. Different letters (a-e) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

(5) 으름 적용 제품 품질 개선효과 분석

1) 으름 식혜 제조

물 1L에 쌀 250g과 설탕 125g을 넣어 끓였다. 그리고 물 5L와 1% 으름가루를 첨가하여 10



0°C에 1시간동안 끓여 으름식혜(AS)를 만들었다.

2) 으름식혜의 안전성 평가

1. 저장성 평가

으름식혜는 4°C에서 1일, 14일, 21일, 30일 저장 후 관능검사, 미생물 검사 건대학생 20명으로 평가하였음.

	1day	14day	21day	30day	60day
신맛	1.3	1.4	1.9	4.5	6.7
단맛	5.8	5.6	5.3	4.8	2.3
쓴맛	1.2	1.2	1.3	1.9	2.5
종합적평가	6.3	6.1	5.2	3.2	2.3
미생물수	0	0	0	4X10 ⁷	5X10 ⁸

7: 매우좋다 (강하다) 6:좋다(강하다) 5약간좋다 (강하다)4보통 3약간나쁘다 2나쁘다 1매우나쁘다.

- 으름식혜 저장시 병에 넣어서 진공 압축하였으나 21일까지는 안전한 것으로 보이나 30일 부터는 미생물의 오염이 확인됨을 관찰하였다.
- 신맛역시 30일 기점으로 초산발효가 진행되는 것으로 보여지는 것으로 보아 21일까지 저장

안정성을 유지하였다.

3) 으름식혜와 알코올 섭취 후 음주측정

건국대학교 글로벌 캠퍼스를 다니는 나이 평균 20세인 학생 남녀 10명씩을 대상으로 음주 실험을 실시하였다. 시간에 따라 호흡 중 알콜 농도를 측정해보았다. 실험을 두 번으로 나누어 실험을 실시하였는데 한번은 19 % 알코올 360 ml를 마시기 전에 물을 200 ml를 마시고 음주 한 후 의 알코올 농도를 측정하였고, 다른 한번은 19 % 알코올 360 ml를 마시기전에 으름 식혜(AS) 200 ml를 마시고 음주 한 후 의 알코올 농도를 측정하였다. 여자와 남자의 결과로 나누어서 그래프로 비교해보았다. 그리고 학생들에게 숙취정도를 7점 척도로 설문조사를 하였다.

Table7. Effect of enzymatically decomposed *Akebia quinata* Sikhye on the respiration ethanol concentration in human

	0	30 min	60 min	90 min
Water	0.19 ± 0.06 ^a	0.17 ± 0.04 ^a	0.14 ± 0.04 ^a	0.13 ± 0.04 ^a
AS	0.12 ± 0.1 ^b	0.11 ± 0.06 ^b	0.12 ± 0.05 ^a	0.11 ± 0.05 ^a

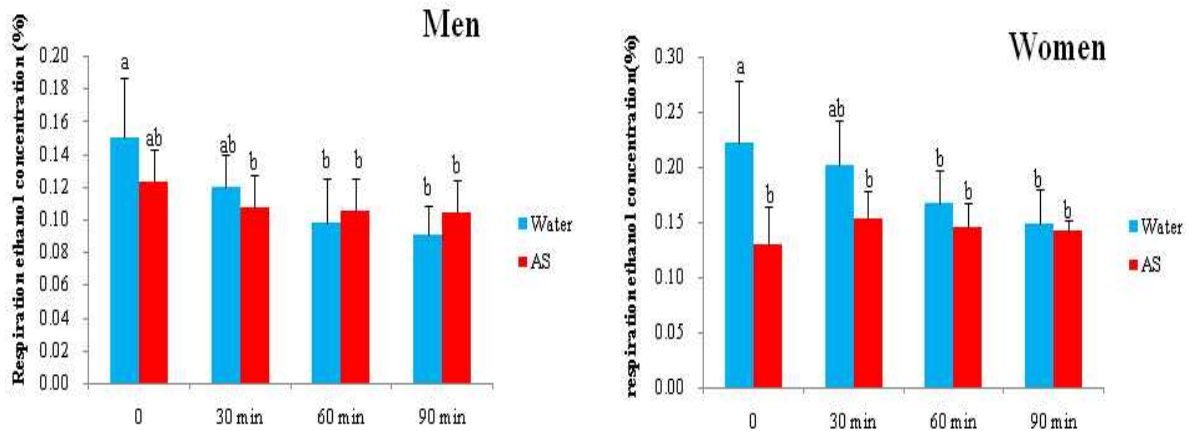


Fig 10. Effect of enzymatically decomposed *Akebia quinata* Sikhye on the respiration ethanol concentration in human

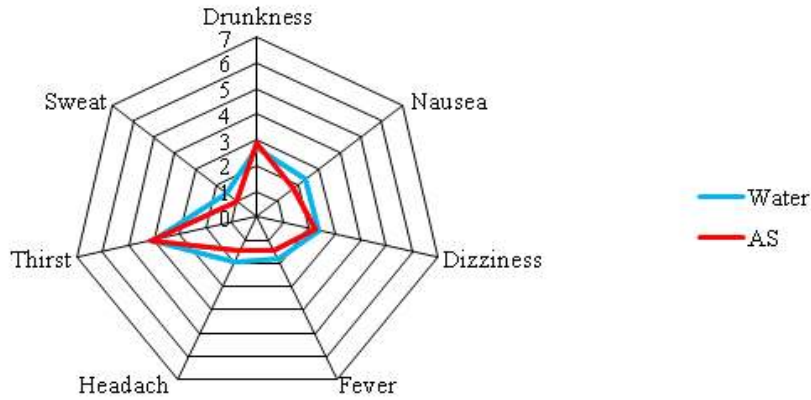
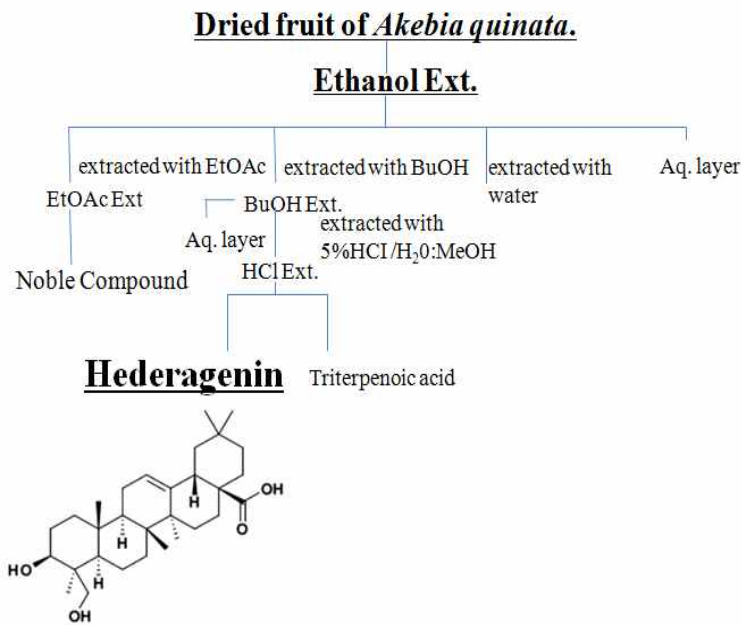


Fig 11. Comparison of symptom severity scores immediately after alcohol consumption

(6) Hederagenin 및 triterpenoide에 의해 안전성 및 간 보호효과

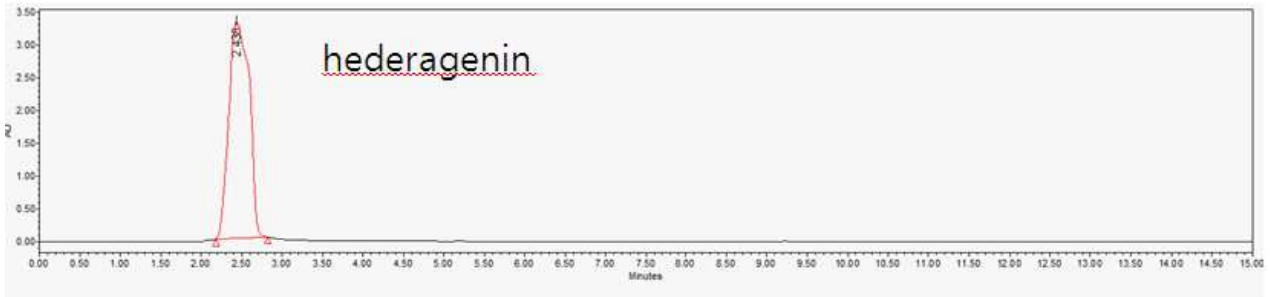
.1) hederagenin 분리 정제 및 확인

Hederagenin 동결건조 및 분말화된 으름 열매(10kg)를 메탄올에 침지시켜 실온에서 30일 동안 추출하였다. 그 열매 분획물(1kg)을 ethyl acetate, butanol과 물 가용부로 분리하였다. 그 중 butanol 가용부 (20g)을 5% HCl(MeOH/H₂O)에 4시간동안 가수분해를 시킨다. 그 혼합물을 eathyl acetate (800ml)과 다시 추출한 후 증류수에 세척을 한다. 그 혼합물을 silica gel(450-580mesh)을 사용하여 분리한후 HPLC C18 column을 이용하여 분리하여 정제 하였다.



그결과 oleanolic acid 와 hedragenin성분을 분리 추출 정제 하였다.

Fig 12 .Isolation scheme of oleanolic acid and hederagin from AQ fruits



Name	Retention Time (min)	Area (µV*sec)	%Area	Height (µV)	Int Type	Amount	Units	Peak Type
1	2.438	58341218	100.00	3327993	bb			Unknown

Fig 13. HPLC peak of hederagenin from *Akebia quinata* Decne

2) Hederagenin을 이용한 NO 억제 활성

Hederagenin 50 µg/mL 농도에서 RAW246.7 세포에서 LPS를 첨가후 inflammation 유도 후 hederagenin 투여 후 NO 억제 활성을 측정된 결과 62.3 % 억제 활성을 보여 주었다. Hederagenin 농도별 활성이 증가되지는 않는 것으로 보여졌다

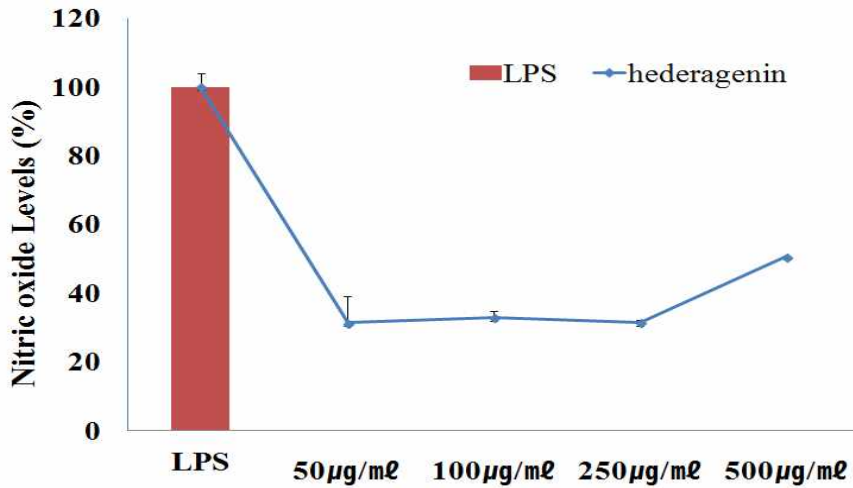


Fig 14. Inhibitory effects of hederagenin on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages cells

3) 알코올성 간질환을 유발한 Rats으로부터 Hederagenin 투여

동물 실험의 모든 실험은 기관 동물 관리 및 사용 건국 대학교에서위원회 (IACUC 승인 번호 KU 15,057), 서울, 대한민국에서 승인 하였다. 5~6주령의 수컷 Wistar rats(오리엔트 바이오. 한국)를 연구에 사용 하였다. 일정한 조건의 (기온 21 ° C-22 ° C, 명암주기 12시간, 70%습도) 환경에서 적응시켰으며 사료와 물을 자유급여 하였다. (1) 정상군, (2) 25 % 에탄올 (3) 25 % 에탄올 + hederagenin : 실험 동물은 세 개의 군으로 나누었다. 알코올성 간질환을 유발하기

위해 21 일간의 25%알코올 1ml을 경구 투여 하였다. 21 일 후 개복 전 16 시간 동안 금식시켰으며 마취 후 개복하여 심장에서부터 혈액을 채취하였으며 간, 신장, 비장을 적출하였다. 채취한 혈액은 30 분간 3000 rpm에서 원심 분리 후 혈장을 분리하여 분석에 사용하였다. 시료 중량을 기록 후 -70 ° C에 냉동 보관 하였다.

4) 몸무게 및 간 중량

체중 및 간 중량은 Table 1에 나타냈다. 체중은 25% ethanol을 투여한 그룹과 hederagenin을 투여한 그룹은 정상그룹보다 높았으나 유의적 차이는 나타나지 않았다. 25% ethanol과 hederagenin 그룹의 간과 신장의 중량은 정상 군에 비해 낮았으나 유의적 차이가 나타나지 않았다.

Table 8. Effects of the ethanol extract from *Akebiaquinata* fruit extract on body weight and liver weight in experimental groups.

Treatment	Normal	Ethanol	Hederagenin
Initial body weight (g)	128.5±3.39 ^a	128.71±5.31 ^a	130.17±3.19 ^a
Final body weight (g)	245.13±41.49 ^a	270.01±31.01 ^a	260.86±9.68 ^a
Body weight gain (g)	5.55±1.81	6.72±1.22	6.22±0.31
Liver weight (g)	10.90±1.43 ^a	9.61±0.92 ^a	9.39±1.07 ^b
Kidney weight (g)	2.61±0.105	2.44±0.17	2.34±0.24
LW/BW	0.045±0.034	0.036±0.030	0.036±0.110

Results are presented as mean ± standard deviation.

Within rows, means with different superscripts are significantly different (p < 0.001).

5) 혈청 중 효소의 변화

알코올성 간질환을 유발한 동물의 간 기능 회복에 대한 활성은 AST, ALT, TG, TC활성을 통해 분석하였으며 Table 2와 Figure 1에 나타냈다. Alanine aminotransferase(AST)와 Aspartate aminotransferase(ALT)는 알코올로 유발된 간질환의 경우 간에서의 활성이 증가된다. AST는 ethanol그룹이 235.93±45.38의 수치를 보여 유의적으로 가장 높았으며 hederagenin 그룹은 208.65±32.94로 ethanol그룹보다 낮은 수치를 나타냈다. ALT는 그룹간의 유의적 차이가 나타나지 않았다. 본 연구 결과 hederagenin은 알코올에 의한 간독성에 대해 보호효과를 나타낼 가능성이 있다고 보여진다.

Total cholesterol(TC)의 결과 ethanol그룹(95.47±8.65)은 정상그룹보다 현저히 높은 수치를 보였으며 hederagenin그룹은 79.75±5.24로 TG의 증가를 억제시켰다. Triglyceride(TG)의 결과, ethanol그룹은 55.32±9.80로 다른 그룹에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타냈다. hederagenin 그룹 41±9.79로 ethanol그룹에 비해 TG가 감소함을 보였다. 본 결과는 hederagenin은 지질을 낮추고 지질 대사를 개선하는데 도움이 됨을 보여준다.

Table 9. Effects of supplementation with hederagenin and the ethanol extract from *Akebiaquinata* fruit on serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels in ethanol treated rats.

Treatment	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)
Normal (n=6)	113.03±28.20 ^C	35.14±2.41 ^a	85.55±4.06 ^b	30.28±10.55 ^c
Ethanol (n=7)	235.93±45.38 ^a	32.77±0.83 ^a	95.47±8.65 ^a	55.32±9.80 ^a
Hederagenin(n=6)	208.65±32.94 ^b	27.53±7.38 ^a	79.75±5.24 ^b	41±9.79 ^b

Results are presented as mean ± standard deviation.

Within rows, means with different superscripts are significantly different ($p < 0.001$).

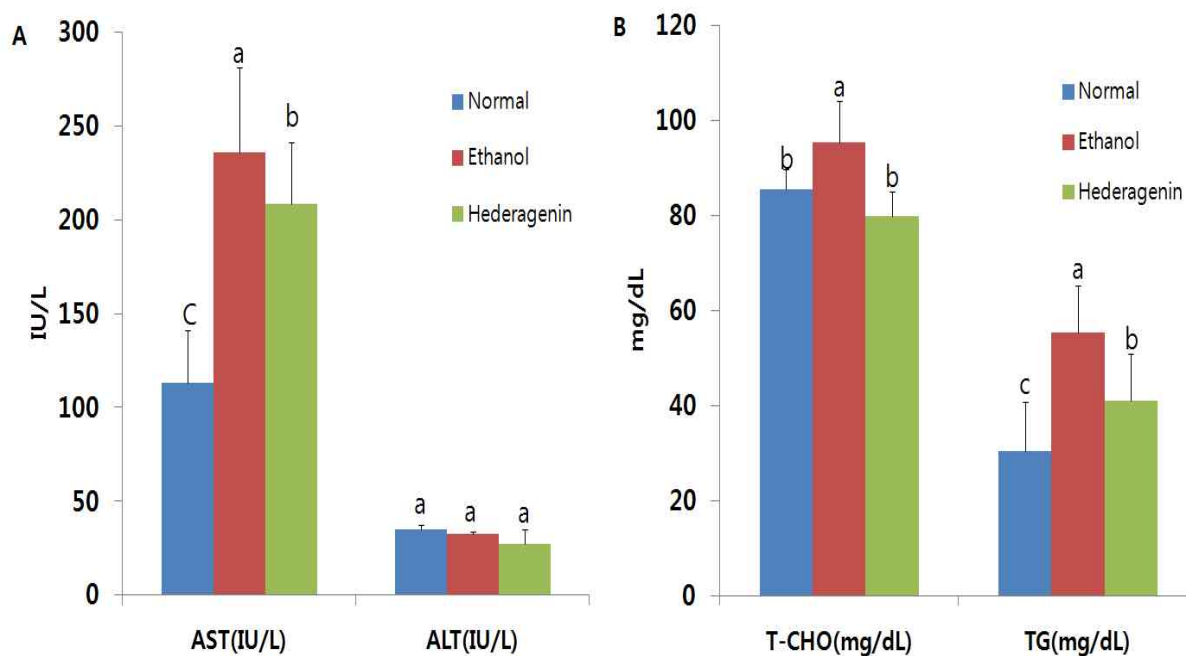


Fig 15. (A) Effects of supplementation with hederagenin and the ethanol extract from *Akebiaquinata* fruit on serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), (B) total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels in ethanol treated rats.

6) Histopathological analysis

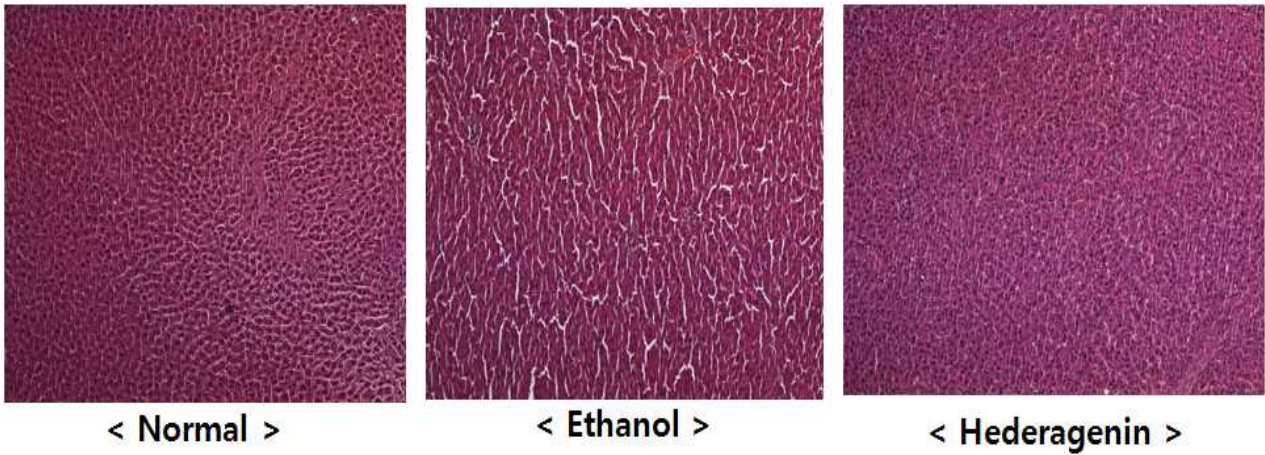


Fig 16. Effect of hederagenin on liver tissue morphology

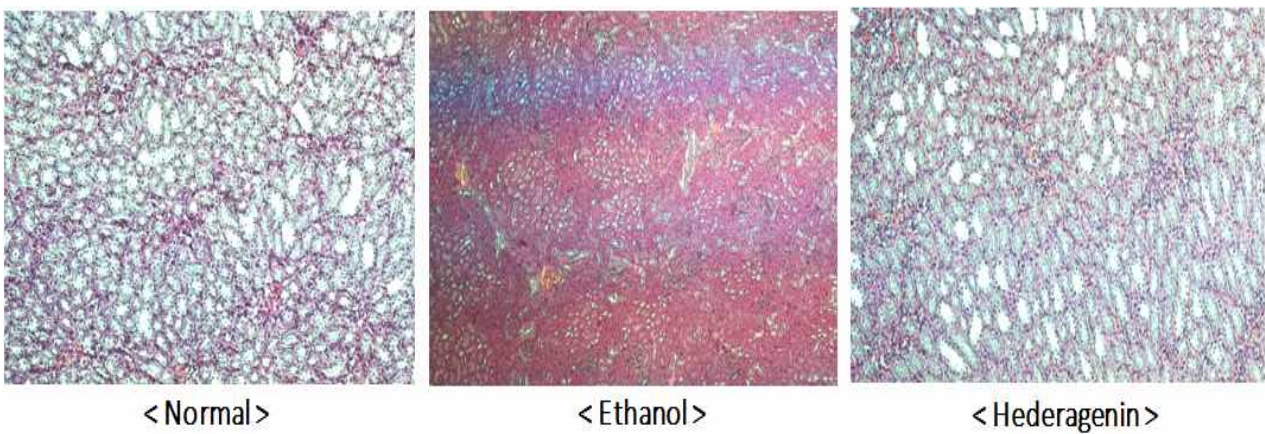


Fig 17. Effect of hederagenin on kidney tissue morphology

7) RT-PCR분석

정상간에서는 ADH pathway가 주로 작용하며 흡수된 에탄올은 간에서 cytosolic ADH에 의해 acetaldehyde로 대사된다. 이것은 다시 mitochondrial aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 acetate로 산화된다. Acetate는 acetyl-CoA로 전환되며 TCA회로를 통해 에너지를 발생시키거나 콜레스테롤과 지방산의 합성에 이용된다. ALDH2의 mRNA발현은 hederagenin그룹이 ethanol그룹 보다 증가함을 보였다.

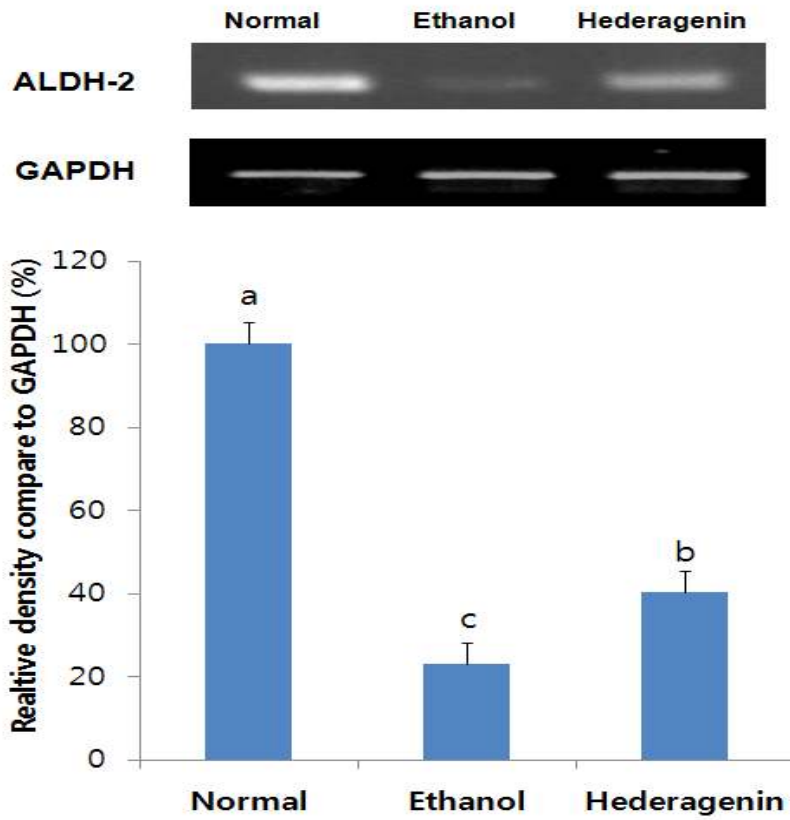


Fig 18. Effect of hederagenin and theethanolextractfrom*Akebiaquinata*fruit (AE) on ALDH-2 expression levels in ethanol treated rats

(7) 으름적용제품 품질개선효과

1) 으름음료 제조방법

혼합음료 제조

으름열매 차

으름식혜

으름잎 차

2) 단맛의 강화, 으료 색깔을 밝게 개선하였으며 그에 대한 설문지 평가는 다음과 같다.

3. 2 협동 : 으름의 간 보호 기능 메커니즘 구명

가. 1차년 목표: 으름의 항산화 및 간기능 보호기능 생체 구명

(1) 실험동물 모델 구성

으름 추출물의 급성 알콜성 간기능 손상의 완화 효과를 관찰하기 위해 생후 1개월령 C57BL/6 생쥐를 으름처리군(AQ)과 알콜처리군(EtOH) 및 으름알콜처리군(AQ-EtOH)에 각각 10마리 씩 배치 한 후에 으름처리군과 으름알콜처리군에게 으름 추출물을 구강 gavage를 통해 매일 일정 농도의 으름 추출물을 2주일간 급여하였다. 으름의 선처리 후에 알콜 처리군에게 고농도의 알콜(에탄올)을 (6mg/kg body weight) 구강 gavage를 통해 강제 투여하였다. 알콜 투여 18시간 후에 실험동물을 희생하여 간 및 혈액 시료를 채취해 으름의 간기능 보호 작용에 검증에 이용 하였다. 한편 으름 추출물은 어린잎과 열매에서 열수 추출된 물질을 동결건조하여 고형물을 얻은 후 멸균 처리 후 각각 아래에 표 3-1과 같이 처리 하였다.

Table 3-1. Treatment of extract of *Akebia quinata* on mice

Treatment	Control (n=10)	EtOH (n=10)	AQ (n=10)	AQ1-EtOH (n=10)	AQ2-EtOH (n=10)	AQ3-EtOH (n=10)	AQ4-EtOH (n=10)
Extract of <i>Akebia quinata</i> concentration*	-	-	30	30	100	400	1000
EtOH concentration**	-	6.00	-	6.00	6.00	6.00	6.00

* Dose (mg/kg body weight) **Dose(g/body weight)

(2) 으름 추출물 처리에 따른 간보호 효과 검증

(가) Alanine aminotransferase (ALT)와 Aspartate aminotransferase (AST) 측정

Plasma ALT 와 AST은 많은 연구에서 간 손상의 지표로 널리 사용되어 지고 있다. 따라서 본 연구에서는 ALT와 AST를 측정 하여 으름 추출물이 간기능 개선에 미치는 영향을 분석하였다. 결과는 표 3-2와 3-3에 나타내었다.

으름 열매 추출물의 경우 ALT, AST의 수준이 비슷한 경향으로 분석되었다. 알콜만 처리한 EtOH 처리구의 경우 각각 37.42 ± 12.48 IU/L 과 38.24 ± 16.08 IU/L의 수치를 보여 실험군내에서 유의적으로 가장 높은 수치를 나타내었다. AQ 처리구의 ALT 수치의 경우는 처리구내 가장 낮은 수치를 보였다. 한편 AQ2-EtOH, AQ4-EtOH 처리구의 경우 대조군과 유의적 차이를 보이지 않아 알콜 처리를 통한 마우스의 간보호 효과를 나타내었다. AST 수치의 경우도 으름 처리구가 알콜만 처리한 실험군에 비해 수치가 낮아지는 경향을 나타내어 으름 열매 추출물의 간 수치 개선을 나타내었다. 으름 어린잎 추출물의 경우도 급성 알콜로 인해 상승된 AST, ALT 수치를 유의적으로 낮추는 경향을 나타내어 으름 열매, 잎 추출물의 경구투여는 마우스의 간보호 효과를 나타내는 것으로 분석 되었다.

Table 3-2. Effects of *Akebia quinata* fruits extract on alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase level in experimental mice groups.

Treatment	Control (n=10)	EtOH (n=10)	AQ (n=10)	AQ1-EtOH (n=10)	AQ2-EtOH (n=10)	AQ3-EtOH (n=10)	AQ4-EtOH (n=10)
Extract of <i>Akebia quinata</i> concentration ¹	-	-	30	30	100	400	1000
EtOH concentration ²	-	6.00	-	6.00	6.00	6.00	6.00
ALT(IU/L) ³	24.32 ±3.91 ^{cd}	37.42 ±12.48 ^a	22.62 ±3.36 ^d	32.47 ±5.43 ^{ab}	29.24 ±5.15 ^{bc}	31.61 ±5.24 ^{ab}	30.14 ±3.75 ^{bc}
AST(IU/L) ³	24.35 ±3.52 ^b	38.24 ±16.08 ^a	24.25 ±2.62 ^b	32.74 ±7.53 ^{ab}	30.83 ±10.43 ^{ab}	30.86 ±6.40 ^{ab}	31.88 ±7.09 ^{ab}

¹ Dose (mg/kg body weight)

² Dose(g/kg body weight)

³ Results are presented as mean ± standard deviation.

^{a-d} Within rows, means with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

Table 3-3. Effects of *Akebia quinata* leaf extract on alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase level in experimental mice groups.

Treatment	Control (n=10)	EtOH (n=10)	AQ (n=10)	AQ1-EtOH (n=10)	AQ2-EtOH (n=10)	AQ3-EtOH (n=10)	AQ4-EtOH (n=10)
Extract of <i>Akebia quinata</i> concentration ¹	-	-	30	30	100	400	1000
EtOH concentration ²	-	6.00	-	6.00	6.00	6.00	6.00
ALT(IU/L) ³	25.44 ±3.49 ^c	44.93 ±21.94 ^a	26.29 ±4.46 ^{bc}	34.59 ±5.18 ^{bc}	35.74 ±5.14 ^b	33.08 ±5.67 ^{bc}	31.11 ±3.31 ^{bc}
AST(IU/L) ³	24.62 ±2.41 ^{cd}	44.46 ±25.01 ^a	22.65 ±4.40 ^d	34.03 ±4.57 ^{bc}	35.13 ±6.51 ^{ab}	31.94 ±2.65 ^{bcd}	28.82 ±2.60 ^{bcd}

¹ Dose (mg/kg body weight)

² Dose(g/kg body weight)

³ Results are presented as mean ± standard deviation.

^{a-d} Within rows, means with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

(나) 체중 및 간 중량

급성 및 만성 알콜에 의한 간손상에 대한 증상은 다양하게 나타나지만 대표적으로 지방간을 들 수 있다. 알콜에 의한 간손상은 지방간으로 간의 부피와 중량을 증가 시킬 수 있다는 보고는 여러 연구를 통해 알려져 있다. 따라서 체중에 대한 간 중량의 비율은 간손상여부의 간접적인 지표로 사용 될 수 있다. 본 실험에서도 실험군의 체중과 간 중량 및 체중에 대한 간 중량의 비율을 표 3-3, 3-4 에 나타내었다. 먼저 으름 열매 추출물 처리 실험의 경우 AQ3-EtOH 처리구의 체중이 다른 그룹에 비해 유적으로 높았다. 하지만 으름 열매 및 어린잎의 추출물을 급여하는 실험 기간 동안 비정상적인 체중의 증가와 감소는 관찰되지 않았다(data not shown).

본 연구의 경우도 알콜의 처리구는 정상 처리구의 비해 체중 대비 간 중량을 유의적으로 상승시키는 결과를 나타내었다. 한편 으름 열매 추출물 처리 및 알콜 처리구의 경우는 처리구 AQ3-EtOH과 AQ4-EtOH의 체중 대비 간 중량이 유의적으로 감소해 간 보호의 효과를 간접적으로 나타내었다. 으름의 어린잎 추출물 처리구의 경우는 간 중량에서는 알콜만 처리한 처리구에 비해 간 중량의 유의적 차이를 보이지 않았다.

Table 3-3. Effects of *Akebia quinata* fruit extract on body weight, liver weight and ratio of liver weight to body weight in experimental mice groups.

Treatment	Control (n=10)	EtOH (n=10)	AQ (n=10)	AQ1-EtOH (n=10)	AQ2-EtOH (n=10)	AQ3-EtOH (n=10)	AQ4-EtOH (n=10)
Extract of <i>Akebia quinata</i> concentration ¹	-	-	30	30	100	400	1000
EtOH concentration ²	-	6.00	-	6.00	6.00	6.00	6.00
Body weight(g) ³	21.59 ±1.23 ^b	22.00 ±1.27 ^b	21.06 ±0.88 ^b	20.98 ±0.42 ^b	22.02 ±0.90 ^b	23.39 ±1.02 ^a	21.61 ±1.11 ^b
Liver weight(g) ³	0.83 ±0.08 ^c	1.00 ±0.08 ^{ab}	0.82 ±0.02 ^c	0.91 ±0.03 ^b	0.95 ±0.04 ^{ab}	1.00 ±0.06 ^{ab}	0.92 ±0.08 ^b
L.W./B.W. ⁴	3.83 ±0.30 ^c	4.57 ±0.27 ^a	3.92 ±0.13 ^c	4.36 ±0.08 ^{ab}	4.31 ±0.26 ^{ab}	4.26 ±0.12 ^b	4.26 ±0.24 ^b

¹ Dose (mg/kg body weight)

² Dose(g/kg body weight)

³ Results are presented as mean ± standard deviation.

⁴ Ratio of liver weight to body weight

^{a-c} Within rows, means with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

Table 3-4. Effects of *Akebia quinata* leaf extract on body weight, liver weight and ratio of liver weight to body weight in experimental mice groups.

Treatment	Control (n=10)	EtOH (n=10)	AQ (n=10)	AQ1-EtOH (n=10)	AQ2-EtOH (n=10)	AQ3-EtOH (n=10)	AQ4-EtOH (n=10)
Extract of <i>Akebia quinata</i> concentration ¹	-	-	30	30	100	400	1000
EtOH concentration ²	-	6.00	-	6.00	6.00	6.00	6.00
Body weight(g) ³	22.19 ±0.86	22.78 ±1.51	21.55 ±0.39	21.13 ±0.88	21.66 ±0.68	21.81 ±0.28	21.12 ±0.76
Liver weight(g) ³	0.91 ±0.02 ^{bc}	1.05 ±0.08 ^a	0.87 ±0.02 ^c	1.04 ±0.14 ^a	1.02 ±0.07 ^{ab}	1.04 ±0.04 ^a	0.99 ±0.11 ^{ab}
L.W./B.W. ⁴	4.11 ±0.10 ^b	4.63 ±0.26 ^a	4.04 ±0.15 ^b	4.92 ±0.46 ^a	4.68 ±0.23 ^a	4.77 ±0.16 ^a	4.70 ±0.43 ^a

¹ Dose (mg/kg body weight)

² Dose(g/kg body weight)

³ Results are presented as mean ± standard deviation.

⁴ Ratio of liver weight to body weight

^{a-c} Within rows, means with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

(다) 조직학적 분석 (Histochemical analysis)

알코올에 의한 간 손상을 조직학적으로 관찰해 보면 다음과 같은 경과를 거치는 것으로 알려져 있다. 가장 먼저 간세포(hepatocyte)의 세포질(cytoplasm)에 H&E 염색(Hematoxylin and Eosin (H&E) stain)에서 분홍빛으로 염색되는 프리-케라틴 필라멘트(pre-keratin filament)라는 단백질(protein)이 축적 되는것을 관찰할 수 있다[이를 말로리체(Mallory body) 또는 알코올 유리질(alcoholic's hyaline)]. 이어서 지방(fat)과 수분, 단백질 등이 간세포 내에 과도하게 축적되어 간세포가 부풀게 되고, 이 후 간세포에 괴사성 손상(necrotic damage)이 일어난다. 이러한 상태를 팽창성 변성(ballooning degeneration)이라고 하며, 이 때를 지방간(fatty liver)이라 하며 조직학적 염색으로 지방구가 관찰 된다. 더불어 팽창한 간세포가 주변의 담관(biliary duct)을 폐쇄시켜서 광범위한 담즙정체(cholestasis)도 발생되기 한다. 따라서 본 연구에서도 알콜 처리에 의한 간손상 및 으름 처리에 의한 간보호 효과에 대한 조직병리검사로 Hematoxylin and eosin (H & E) stain과 알콜성 간독성으로 인한 간세포 내 지방 축적여부를 판단 할 수 있는 Oil red O stain을 실시하였다.

그림 3-1의 경우는 대조구, 알콜 처리구, 으름 열매 추출물 - 알콜 처리구 마우스의 간 H & E stain 결과 이다. 먼저 대조구 (A)의 경우 정상적인 핵과 세포질을 나타내고 있으며 지방간과 세포의 괴사 흔적은 볼 수 없었다. 알콜만 처리한 실험구 (B)의 경우 파란색 화살표로 나타나듯이 간 조직 전반에 걸쳐 지방구 및 세포의 팽윤 현상이 관찰 되어 급성 알콜 실험동물 모델이 잘 성립되었음을 보여 준다. AQ 처리구 (C, 으름 열매 추출 물 30mg/kg 체중)는 정상인 대조군과 병리학적 차이를 보이지 않았다. 또한 D, E, F, G 의 경우 알콜 처리가 세포 괴사와 지방간 형성이 유발한 것으로 판단된다. 하지만 으름 열매 추출물의 처리 농도가 높아질수록 알콜로 인한 세포 괴사 및 지방구의 형성의 정도가 완화되는 것을 관찰 할 수 있었다.

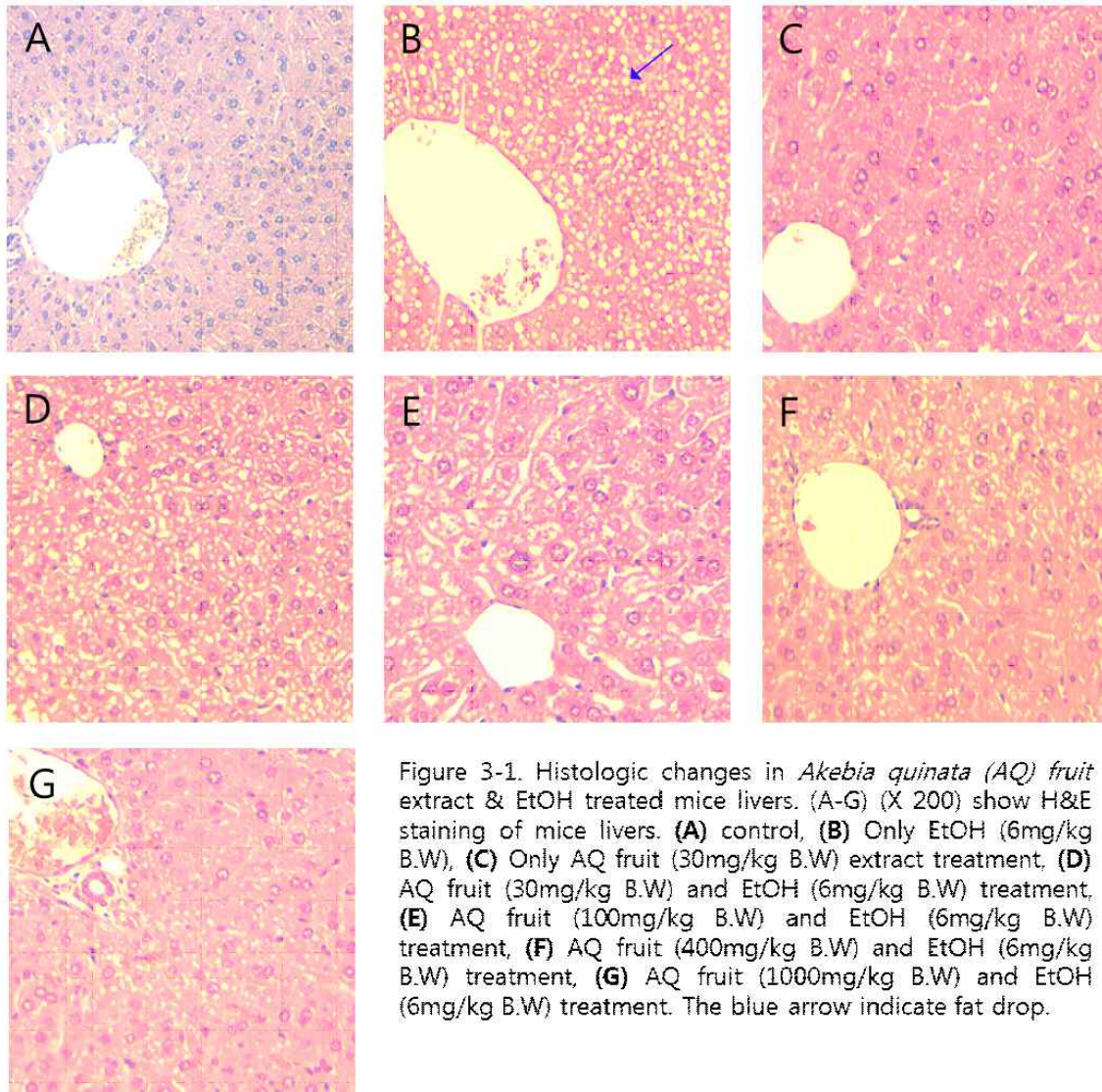


Figure 3-1. Histologic changes in *Akebia quinata* (AQ) fruit extract & EtOH treated mice livers. (A-G) (X 200) show H&E staining of mice livers. (A) control, (B) Only EtOH (6mg/kg B.W), (C) Only AQ fruit (30mg/kg B.W) extract treatment, (D) AQ fruit (30mg/kg B.W) and EtOH (6mg/kg B.W) treatment, (E) AQ fruit (100mg/kg B.W) and EtOH (6mg/kg B.W) treatment, (F) AQ fruit (400mg/kg B.W) and EtOH (6mg/kg B.W) treatment, (G) AQ fruit (1000mg/kg B.W) and EtOH (6mg/kg B.W) treatment. The blue arrow indicate fat drop.

으름 어린잎 추출물이 알콜성 간손상에 미치는 영향정도를 알기 위해 Oil red O stain을 실시한 결과를 그림 3-2에 나타내었다. 알콜만 처리한 경우 (그림 3-2, B) 간 조직내 지방간 형성이 과도하게 이루어진 모습을 확인 할 수 있었다. 한편 으름 어린 잎 추출물의 처리 (100mg/kg 체중)구에서는 지방간 형성이 알콜만 처리한 경우 보다 확연하게 완화된 것으로 확인 되어 으름의 어린 잎 추출물은 지방간 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 사료된다.

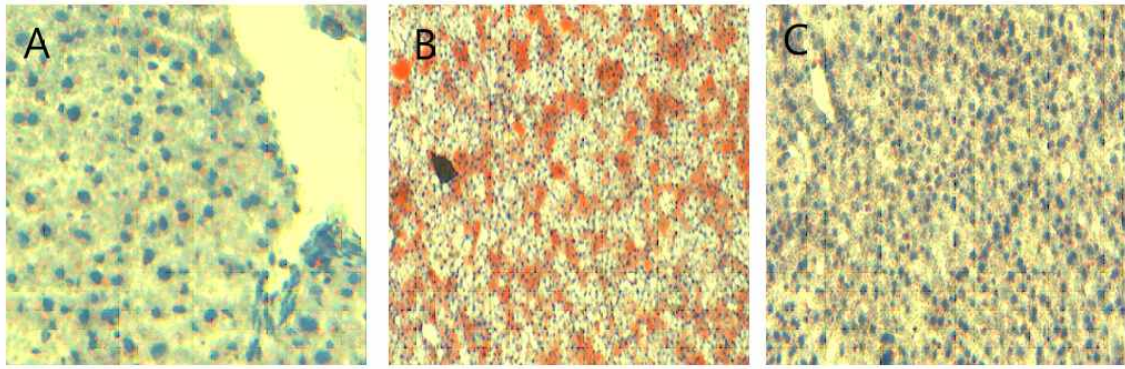


Figure 3-2. Oil red O staining of *Akebia quinata* (AQ) leaf extract & EtOH treated mice livers . (A) control, (B) Only EtOH (6mg/kg B.W), (C) AQ fruit (100mg/kg B.W) and EtOH (6mg/kg B.W) treatment.

(라) 간 조직내 Glutathione synthetic enzyme의 mRNA 발현과 glutathione level

알코올은 과량 또는 만성적으로 섭취할 경우 체내 영양소의 요구량을 증가시키거나 흡수장애를 야기한다. 체내에 흡수된 에탄올은 대사과정에서 아세트알데하이드나 반응성이 높은 라디칼 등의 독성 대사산물을 형성하는 것으로 알려져 있다 (1). 또한, 에탄올에 의한 독성 효과는 고지혈증, 지방간 및 간경변과 같은 에탄올성 간 손상을 유발하며, 만성적으로는 간 조직의 구조 및 기능에 치명적인 손상을 가져오게 된다(2-4). 체내 알코올 대사의 첫 단계인 아세트알데하이드로의 산화에는 주로 alcohol dehydrogenase(ADH)가 관여하고, 아세트알데하이드는 aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 아세테이트로 산화된다(5,6). 만성 알코올 중독의 경우에는 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의해 아세트알데하이드의 생성이 증가하고, 반응성이 강한 아세트알데하이드는 4-8배 정도의 높은 활성 산소종을 생성함으로써 숙취 및 알코올성 간질환의 주요 원인이 되고 있다(7-9). 따라서 이러한 산화적 손상을 예방하거나 복구하고자 체내에서는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), catalase 등의 항산화 효소를 분비하도록 체계화되어 있다 (2,10,11). 그 중에서도 강력한 항산화 및 detoxifying 기능을 가지고 있는 glutathione(GSH)는 만성 간질환에 의해 그 농도가 감소할 뿐만 아니라 노화, 당뇨병, 담즙분비이상 (cholestasis), 내독소혈증 (endotoxemia), 알콜성 간질환, 암치료제 저항성 종양 (cancer drug-resistant tumor) 등의 병변에서 GSH의 세포내 항산화성의 심각한 이상을 초래한다고 한다. 따라서 으름 치료에 의한 간 내 GSH의 농도 변화를 관찰하는 것은 으름의 항산화 및 간기능 보호 효과의 기초적인 척도를 제시할 수 있다. 본 연구에서는 으름 열매 및 어린잎 추출물의 알콜성 간 보호 효과를 알아보기로 간 조직내 GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 정도와 GSH 농도를 분석 하였다.

먼저 간 조직내 GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 정도를 그림 3-5과 3-6에 나타내었다. 으름 열매 추출물의 경우 대조군의 비해 glutamate cysteine ligase modifier subunit (GCML) mRNA의 발현을 증가 시키는 것으로 분석되었다. 하지만 알콜 처리구에서도 GCML의 발현은 처리구 보다 높게 발현되는 경향을 보였다. glutamate cysteine ligase catalytic subunit(GCLC)의 경우는 대조구, 알콜처리구, 으름 열매 추출물-알콜 처리구간 유의적 차이를 보이지 않았다. glutamate synthase (GSS)의 경우는 알콜처리구와 으름 열매처리구-알콜 처리

구 모두 GSS의 발현이 증가하는 것으로 분석되었다.

한편 으름 어린 잎 추출물의 경우 대조구, 알콜처리구, 으름 잎 열매 추출물-알콜처리구간 GCML, GCLC, GSS mRNA의 발현 정도는 유의적으로 차이가 나지 않았다(Figure 3-4).

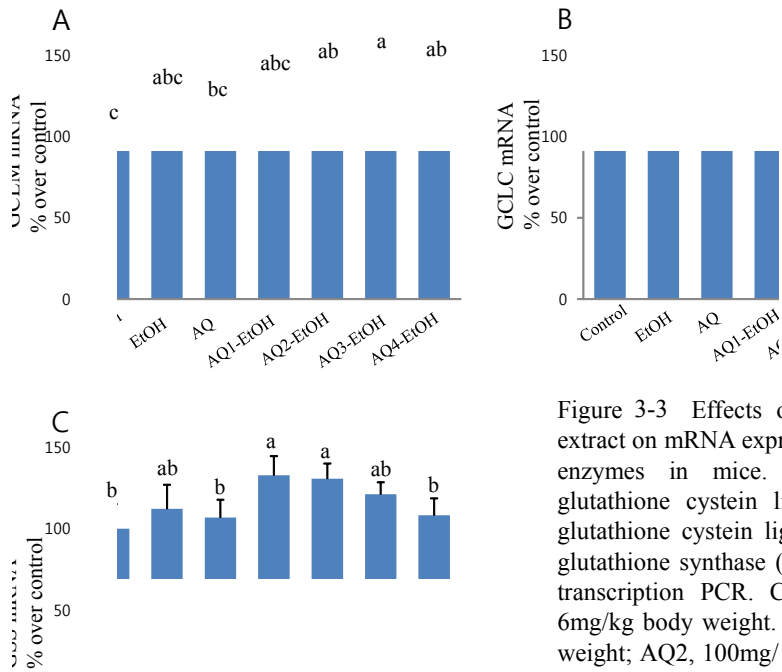


Figure 3-3 Effects of *Akebia quinata* (AQ) fruit extract on mRNA expression on glutathione synthetic enzymes in mice. Relative mRNA levels of glutathione cystein ligase modifier subunit (A), glutathione cystein ligase catalytic subunit (B) and glutathione synthase (C) were performed by reverse transcription PCR. Concentrations of EtOH were 6mg/kg body weight. AQ and AQ1, 30mg/ kg body weight; AQ2, 100mg/ kg body weight; AQ3, 400mg/

GSH 합성에서 속도결정 단계를 촉매하는 gamma-glutamylcysteine ligase는 heterodimer 단백질로 catalytic subunit과 regulatory subunit으로 구성된다. GSH의 함량은 주로 catalytic subunit의 변화와 관련이 있다고 보고되고 있지만(12) 본 연구에서 GCLC의 mRNA 발현은 으름 열매 및 어린 잎 추출물 처리 실험 모두에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 GSH의 항상성은 GSH의 신생합성 외에 소모 반응 및 시간적 차이에 의해서도 조절된다는 점을 고려해야 할 것으로 판단된다.

그림 3-5는 으름 열매 추출물의 처리가 급성 알콜 간독성을 유발한 마우스의 간 조직내 GSH 농도에 미치는 영향을 나타내었다. 대조군과 비교하여 알콜만 처리한 처리구와 으름 열매 추출물 - 알콜 처리구(AQ1-EtOH, AQ4-EtOH) 에서 GSH 농도가 증가 하는 것으로 분석되었다. 하지만 으름 열매 추출물만 처리한 처리구(AQ)에서는 GSH의 농도가 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

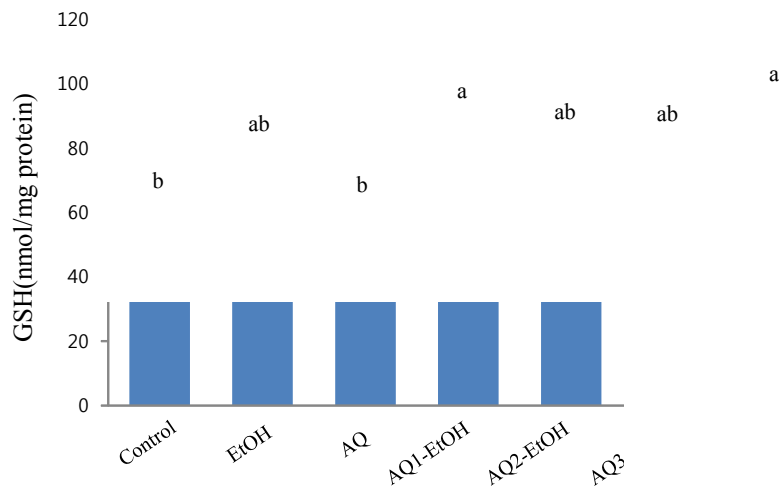


Figure 3-5. Effects of *Akebia quinata* (AQ) fruit extract and EtOH on glutathione level in mice livers. Abbreviations: EtOH, 6mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30mg of AQ fruits extract/kg B.W; AQ1-EtOH, 30mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQ2-EtOH, 100mg of AQ fruits extract/kg B.W; AQ3-EtOH, 400mg of AQ fruits extract/kg B.W; AQ4-EtOH, 1000mg of AQ fruits extract/kg B.W. Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

한편, 으름 잎 추출물 처리의 경우(그림 3-6) 대조군과 비교하여 30mg/kg 체중의 농도로 처리한 처리구에서 (AQ1-EtOH)에서 GSH 의 농도 증가가 관찰 되었다. 본 연구에서 그림 3-5 경우 알콜만 처리한 경우에도 GSH 농도를 증가 시키는 결과를 보였는데 이는 산화적 스트레스에 대한 방어 작용으로 GSH의 수준을 증가시키는 것으로 판단된다. 또한 농도 의존적인 (dose-dependent) 경향을 보이진 않지만 알콜 처리한 처리구와 비교할 때 으름 열매-잎 추출물은 간 조직내 GSH 농도를 증가시키는 것으로 분석 되었다. 따라서 으름 열매, 어린 잎 추출물의 처리는 실험동물의 간 조직에서 항산화 기능이 향상됨을 보여주는 것이며, 알콜에 의한 산화적 스트레스를 저하하는 효과가 있는 것으로 판단된다.

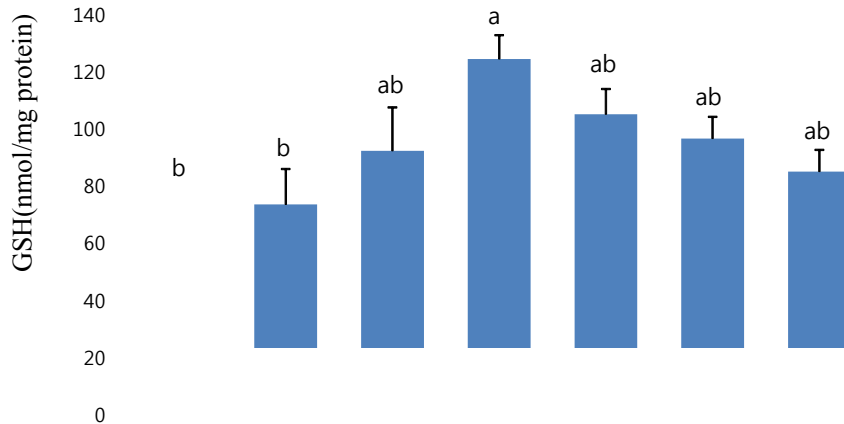


Figure 3-6. Effects of *Akebia quinata* (AQ) leaf extract and EtOH on glutathione level in mice livers. Abbreviations: EtOH, 6mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ1-EtOH, 30mg of AQ leaf extract/kg B.W with EtOH; AQ2-EtOH, 100mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ3-EtOH, 400mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ4-EtOH, 1000mg of AQ leaf extract/kg B.W. Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

(마) 산화 스트레스 마커- NADPH oxidase 4 (NOX4) mRNA 발현 측정

NADPH oxidase (NOX)는 다양한 자극에 반응하여 활성산소기(reactive oxygen species; ROS)를 발생시키는 효소로서 여러 가지 단백질로 구성되어 있다. 간내에서 NOX system에 의해 발생하는 산화스트레스는 알코올성 간질환, 만성 C형 간염, 철분 및 담즙 정체 간손상 등 여러가지 간질환과 간섬유화 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그 중 NOX4 phagocytic form으로 최근 연구들에 따르면 NOX4의 억제와 간섬유화 및 간세포의 apoptosis와 관련이 있다는 연구결과가 보고되고 있다. 본 연구에서 NOX4 mRNA 발현 정도를 분석한 결과를 그림 3-7, 3-8에 나타내었다. 으름 열매 추출물 처리 실험의 경우 알콜만 처리한 처리군(EtOH)과 AQ1-EtOH 처리군에서 NOX4의 mRNA 발현이 유의적인 증가를 나타내었다. 또한 AQ2-EtOH, AQ3-EtOH, AQ4-EtOH의 처리구에서는 대조군 보다도 낮은 수준의 NOX4 mRNA 발현 수준을 보여 으름 열매 추출물 농도 100mg/kg B.W 이상의 농도에서 산화 스트레스 감소 효과를 확인 할 수 있었다. 으름 어린 잎의 실험의 경우도 비슷한 경향을 나타내었지만 으름 어린 잎 추출물 농도 100mg/kg B.W 이상 농도에서는 산화적 스트레스 완화 효과가 감소 하는 것으로 분석 되었다. 결과적으로 으름의 열매 및 어린 잎 추출물의 처리가 알콜로 인한 간 조직의 산화 스트레스 완화에 기여하는 것으로 분석되었다.

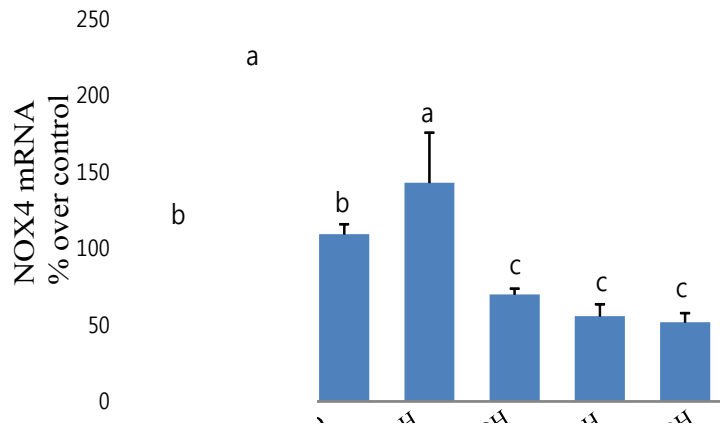


Figure 3-7. Effects of *Akebia quinata* (AQ) fruit extract and EtOH on NADPH oxidase 4 (NOX4) mRNA level in mice livers. Abbreviations: EtOH, 6mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30mg of AQ fruit extract/kg B.W; AQ1-EtOH, 30mg of AQ fruit extract/kg B.W with EtOH; AQ2-EtOH, 100mg of AQ fruit extract/kg B.W; AQ3-EtOH, 400mg of AQ fruit extract/kg B.W; AQ4-EtOH, 1000mg of AQ fruit extract/kg B.W. Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

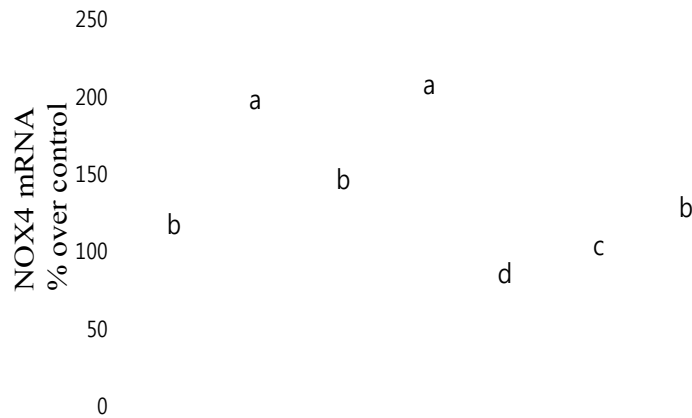


Figure 3-8. Effects of *Akebia quinata* (AQ) leaf extract and EtOH on NADPH oxidase 4 (NOX4) mRNA level in mice livers. Abbreviations: EtOH, 6mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ1-EtOH, 30mg of AQ leaf extract/kg B.W with EtOH; AQ2-EtOH, 100mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ3-EtOH, 400mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ4-EtOH, 1000mg of AQ leaf extract/kg B.W. Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

(바) 염증반응 마커- tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) mRNA 발현 측정

일반적으로 간조직은 섭취된 에탄올을 대사, 분해(digestion) 및 해독하는 주요 기관으로서, 에탄올 대사의 대부분이 간에서 일어난다. 간에서 에탄올은 알코올 산화를 촉진시키는 알코올 탈수소효소(ADH)에 의해 약 90%가 아세트알데하이드로 일차 산화되지만, 만성 알코올 섭취시

에는 시토크롬 P-450 2E1 (CYP2E1) 효소가 증가하여 metabolic stress가 유도되고, 그 결과 염증을 일으켜 간세포가 손상된다. 이러한 알코올성 간 질환-관련 염증 및 다양한 만성 간 손상에서는 간 섬유화가 발생하는데, 간 섬유화에서는 TNF- α , TGF- β , 인터루킨(IL-1 β) 및 IL-6과 같은 사이토카인 수준이 증가하는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 으름 추출물의 처리가 알콜 처리로 인한 염증반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 대표적인 염증 반응 지표인 TNF- α 의 mRNA 발현 수준을 분석하였다. 결과는 그림 3-9, 3-10에 나타내었다.

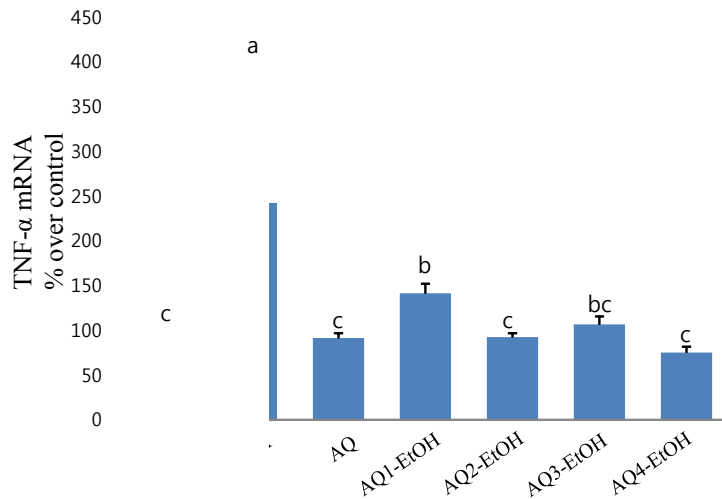


Figure 3-9. Effects of *Akebia quinata* (AQ) fruit extract and EtOH on tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA level in mice livers. Abbreviations: EtOH, 6mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30mg of AQ fruit extract/kg B.W; AQ1-EtOH, 30mg of AQ fruit extract/kg B.W with EtOH; AQ2-EtOH, 100mg of AQ fruit extract/kg B.W; AQ3-EtOH, 400mg of AQ fruit extract/kg B.W; AQ4-EtOH, 1000mg of AQ fruit extract/kg B.W. Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

으름 열매 추출물 처리 실험에서 알콜만 처리한 처리구의 TNF- α mRNA의 발현 정도는 대조구에 대비해 약 335% 증가해 알콜로 인한 간독성 및 염증 반응이 진행되었음을 판단 할 수 있다. 한편 모든 으름 열매 추출물-EtOH 처리구에서 TNF- α mRNA의 발현 정도는 알콜만 처리한 처리구에 비해 유의적으로 크게 감소(대조구 대비 75.1%~141.3%)해 으름 열매 추출물 처리가 알콜로 유발된 급성 염증 반응을 크게 감소시키는 것으로 분석되었다.

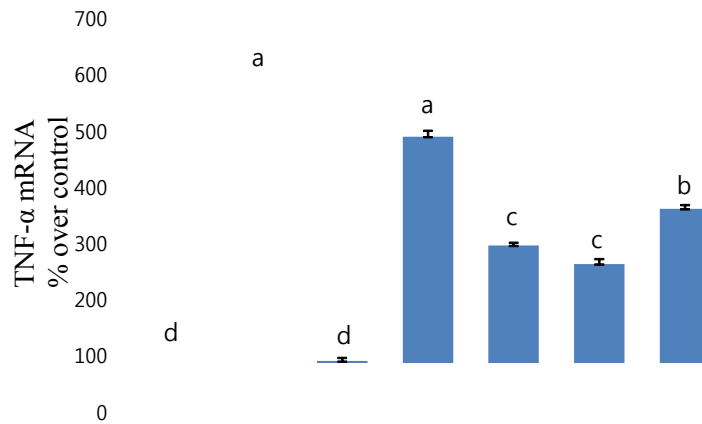


Figure 3-10. Effects of *Akebia quinata* (AQ) leaf extract and EtOH on tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA level in mice livers. Abbreviations: EtOH, 6mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ1-EtOH, 30mg of AQ leaf extract/kg B.W with EtOH; AQ2-EtOH, 100mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ3-EtOH, 400mg of AQ leaf extract/kg B.W; AQ4-EtOH, 1000mg of AQ leaf extract/kg B.W. Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

으름 어린 잎 추출물 처리 실험의 경우는 AQ2-EtOH, AQ3-EtOH, AQ4-EtOH 처리구에서 TNF- α mRNA 발현이 대조구 대비 각각 297.1%, 263.8%, 362.2%로 알콜만 처리한 처리구 527.6% 보다 유의적으로 감소한 것으로 분석되었다. 다만 AQ1-EtOH 처리구의 경우는 알콜만 처리한 처리구와 유의적으로 차이가 없는 490.3% 발현 수준을 보여 염증 완화 효과가 적은 것으로 분석 되었다.

종합해보면, 실험동물에서 으름의 열매 및 어린 잎 추출물의 경구 투여는 알콜로 인한 급성 간독성 상태에서 AST, ALT 수치를 개선하였고, 지방간 형성을 억제 하였으며, 간조직 내 항산화 물질인 GSH의 농도를 증가 시켰다. 더불어 ROS를 생성하는 NOX4 의 mRNA 발현을 억제 하는 것으로 분석되었으며 염증 반응 지표인 TNF- α 의 mRNA 발현도 억제 할 수 있는 것으로 분석되었다. 따라서 으름의 열매 및 어린 잎의 추출물은 알콜로 유발된 지방간, 산화 스트레스, 항 염증 반응에 대한 가능성을 나타내는 것으로 판단된다.

나. 2차년 목표: 으름의 항산화 및 간기능 보호 작용 메카니즘 in vitro 연구

(1) Cell line 구축

으름 추출물의 으름의 항산화 및 간기능 보호 작용 메카니즘 in vitro 에서의 효과를 관찰하기 위해 AML12 cell line (정상 마우스 간 세포주) HepG2 cell line을 각각 cell signal에서 구입하여 실험에 사용되었다. 으름의 추출물의 항산화 및 간기능 보호 기능을 구명하기 위해 정상 처리군과 알콜처리군을 비교하여 실험 하였으며 알콜의 경우 100mM의 농도를 처리하여 세포의 알콜 스트레스를 부여 하였다. 각각의 cell line은 20번이하의 계대 배양에서 얻은 세포를 사용 하였으며 실험 기간동안 형질 이나 형태등의 변화를 보이지 않아 cell line이 잘 유지되었다고 판단 하에 실험을 진행 하였으며 각각의 으름 추출물 및 으름 지표 물질의 처리는 생체

잔류 농도와 생리적 활성을 고려하여 열매와 잎의 열수 추출물은 0~2500ug/ml, 메탄올 추출물의 경우 0~250ug/ml, 으름 지표 물질인 hederagenin 의 경우 0~25ug/ml을 처리 하여 실험에 이용하였다.

(2) 으름 추출 지표 물질 처리 농도에 따른 간세포 간암 세포의 증식 정도와 세포자살 테스트

(가) MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay

세포의 증식 정도 및 독성 정도를 측정 하는 방법으로 널리 쓰이는 분석법인 MTT assay를 이용하여 으름 추출물 (열매, 잎) 처리에 대한 세포의 증식 정도를 분석 하여 Figure 3-11 에 그 결과를 나타내었다.

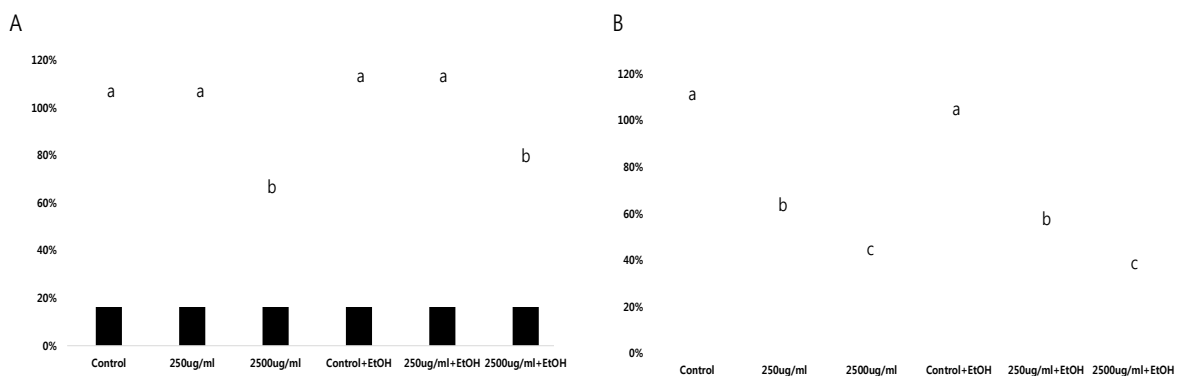


Figure 3-11. Effects of Akebia quinata (AQ) leaf and fruit extract and EtOH on cell proliferation. (A), AQ fruit extract treatment. (B) AQ leaf extract treatment.

분석 결과, 으름의 열매의 경우 2500ug/ml 처리 농도에서 그 세포의 증식이 감소하였으며 으름 잎 추출물의 경우 대조군의 비해 250ug/ml, 2500ug/ml 처리 농도에서 대조군에 비해 AML-12 세포의 증식이 감소한 것으로 분석 되었다. MTT assay는 세포의 독성이 있을 경우 그 세포의 apoptosis의 경우와 구별 할 수 있는 방법은 아니기 때문에 현미경상으로 세포의 apoptosis 여부를 먼저 선별해야 하였다. 현미경 관찰 시 모든 처리 농도에서 세포의 apoptosis의 경우는 관찰 되지 않았다. 이는 세포의 apoptosis의 경우가 아니라 AML-12 세포의 proliferation의 억제 또는 지연으로 해석 할 수 있다. 간 세포의 경우 다양한 스트레스 조건에서 apoptosis와 proliferation이 동시에 일어나는 특징을 보이는 경우가 많다. 이는 간 세포에 대한 스트레스와 그에 대한 보상 작용이 동시에 일어난 간세포의 중요한 특성이다. 본 연구에서는 AML-12 세포주의 apoptosis 가 관찰 되지 않은 것으로 보아 독성을 유발 하지 않은 상태로 간 세포의 항산화와 가능성과 산화 스트레스 억제 가능성을 나타내는 지표들에 대한 증가해석을 바탕으로 위와 같은 결과를 간세포의 안정 상태로 분석 하였다. 위와 같은 결과로 간암 세포주인 HepG-2 세포에서는 항암 작용을 기대 하였으나 그 으름 추출물 처리에 따른 항암 작용은 유의적이지 않았다.

(나) 으름 지표물질 처리에 따른 AML-12 및 HepG-2 세포 주의 Hoechst stain (세포자살 분석)
본 연구에 사용된 으름 지표물질은 hederagenin(3-O-b-D-glucoopyranosyl(1→3))

-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside) 제1 협동연구팀으로부터 공여 받아 사용되었다. 공여 받은 으름 지표물질인 hederagenin 처리가 AML-12 apoptosis에 미치는 영향을 분석하기 위해 Hoechst stain을 실시하였다. Hoechst stain 염색시약 세포를 통과할 수 있고(cell-permeable), 살아있거나 고정된(fixed) 세포의 DNA에 결합할 수 있다. 염색약을 처리해도 세포가 살 수 있기 때문에 세포를 살아있는 그대로 염색하는 기법이다. 따라서 본 연구에서는 Hoechst stain을 통해 세포의 apoptosis 여부를 알아보았다. 그 결과는 Figure 3-12에 나타내었다.

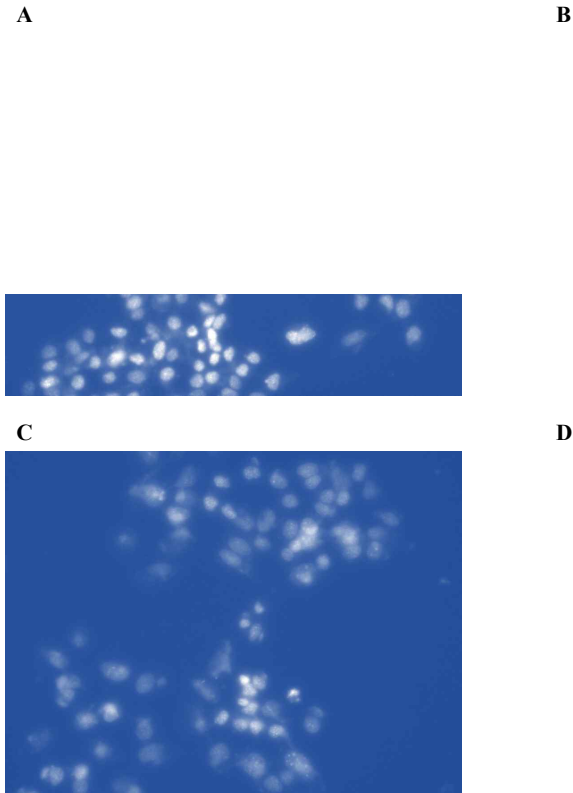


Figure 3-12. Effects of Akebia quinata (AQ) leaf extract and EtOH on AML-12 apoptosis. (A), Control+EtOH; (B), Control; (C), Hederagenin 10ug/ml treatment; (D) Hederagenin 25ug/ml treatment.

Figure 3-12에서 볼 수 있듯이 Hederagenin의 처리는 AML-12 세포의 세포자살을 지연시키는 것으로 확인 할 수 있었다. (밝게 염색된 부분은 세포 자살이 유도됨에 따른 DNA 응축 현상) 으름 열수 추출물의 MTT assay의 결과와 비교해보면 세포의 증식이 지연되었다는 것(세포의 자살의 증가에 따른 MTT assay 수치의 감소)을 확인할 수 있었다. 이는 으름의 추출물 중 다양한 유용성분 중 hederagenin의 경우 세포 자살을 지연시킬 수 있는 것으로 분석되었다.

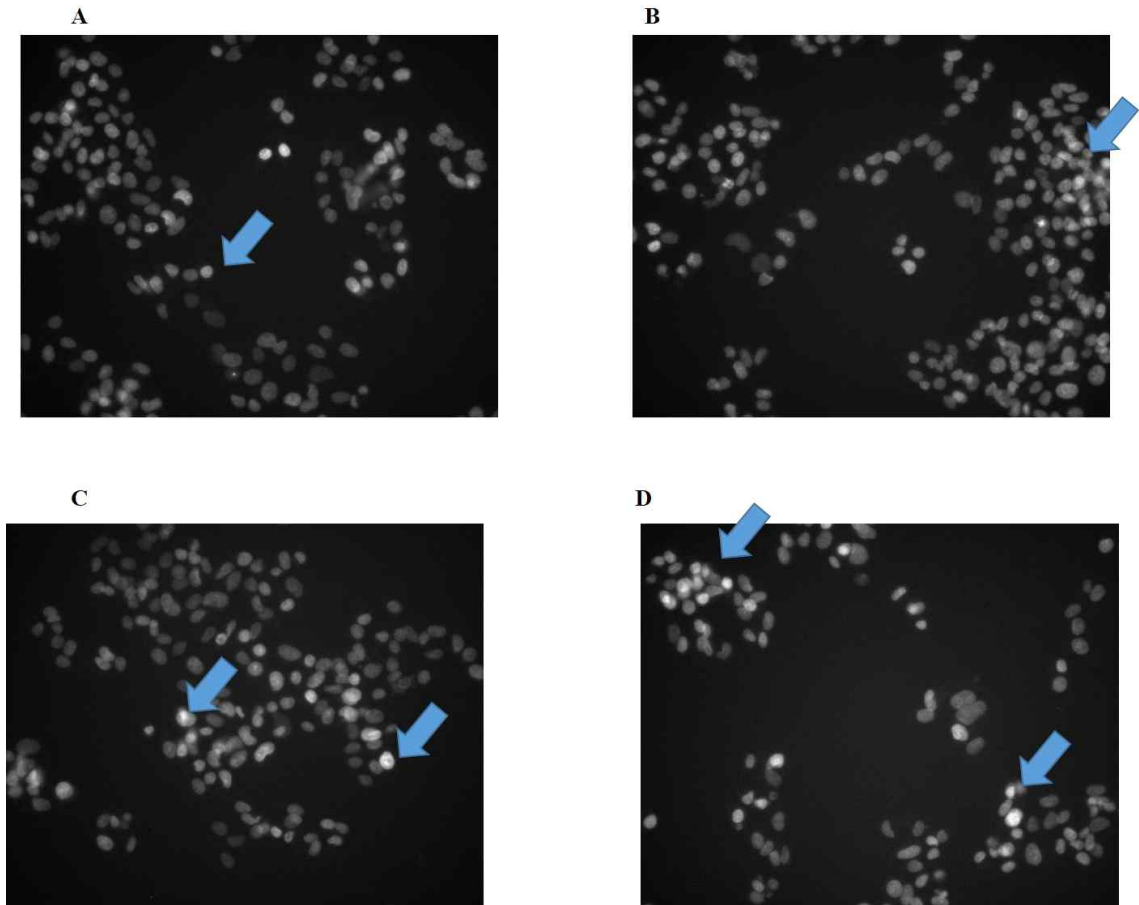


Figure 3-13. Effects of Akebia quinata (AQ) leaf extract and EtOH on HepG-2 apoptosis. (A), Control+EtOH; (B), Control; (C), Hederagenin 10ug/ml treatment; (D) Hederagenin 25ug/ml treatment.

Figure 3-13은 Hederagenin의 처리가 HepG-2 세포 자살에 미치는 영향을 분석 하였다. 그림에서 볼 수 있듯이 대조군의 비해 HepG-2 세포에서 세포 자살이 더욱 유도되는 것을 확인 할 수 있었다.

이는 정상 세포주와 대조되는 결과로 Hederagenin 의 처리로 인해 암세포 특이적으로 세포 자살을 유도 하는 것으로 사료되어 으름 추출 지표 물질인 Hederagenin은 간암세포 억제 기능을 확인 할 수 있었다.

(다) 으름 추출 지표 물질 처리에 따른 간세포 간암세포의 glutathione 농도 측정 및 GSH 합성 촉매 효소 mRNA 및 단백질 발현 측정

① 으름의 열수 추출물(열매 및 잎) 처리

알코올은 과량 또는 만성적으로 섭취할 경우 체내 영양소의 요구량을 증가시키거나 흡수장애를 야기한다. 체내에 흡수된 에탄올은 대사과정에서 아세트알데하이드나 반응성이 높은 라디칼 등의 독성 대사산물을 형성하는 것으로 알려져 있다 (1). 또한, 에탄올에 의한 독성 효과는 고지혈증, 지방간 및 간경변과 같은 에탄올성 간 손상을 유발하며, 만성적으로는 간 조직의 구

조 및 기능에 치명적인 손상을 가져오게 된다(2-4). 체내 알코올 대사의 첫 단계인 아세트알데하이드로의 산화에는 주로 alcohol dehydrogenase(ADH)가 관여하고, 아세트알데하이드는 aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 아세테이트로 산화된다(5,6). 만성 알코올 중독의 경우에는 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의해 아세트알데하이드의 생성이 증가하고, 반응성이 강한 아세트알데하이드는 4-8배 정도의 높은 활성 산소종을 생성함으로써 숙취 및 알코올성 간질환의 주요 원인이 되고 있다(7-9). 따라서 이러한 산화적 손상을 예방하거나 복구하고자 체내에서는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), catalase 등의 항산화 효소를 분비하도록 체계화되어 있다 (2,10,11). 그 중에서도 강력한 항산화 및 detoxifying 기능을 가지고 있는 glutathione(GSH)는 만성 간질환에 의해 그 농도가 감소 할 뿐만 아니라 노화, 당뇨병, 담즙분비이상 (cholestasis), 내독소혈증 (endotoxemia), 알콜성 간질환, 암치료제 저항성 종양 (cancer drug-resistant tumor) 등의 병변에서 GSH의 세포내 항상성의 심각한 이상을 초래한다고 한다. 따라서 으름 처리에 의한 세포내 GSH의 합성에 관여하는 효소들의 변화를 관찰하는 것은 으름의 항산화 및 간기능 보호 효과의 기초적인 척도를 제시할 수 있다. 본 연구에서는 으름 열매 및 어린잎 추출물의 효과를 알아보기로 으름 추출물의 처리 후 AML12 cell의 GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 정도와 GSH 농도를 분석하였다.

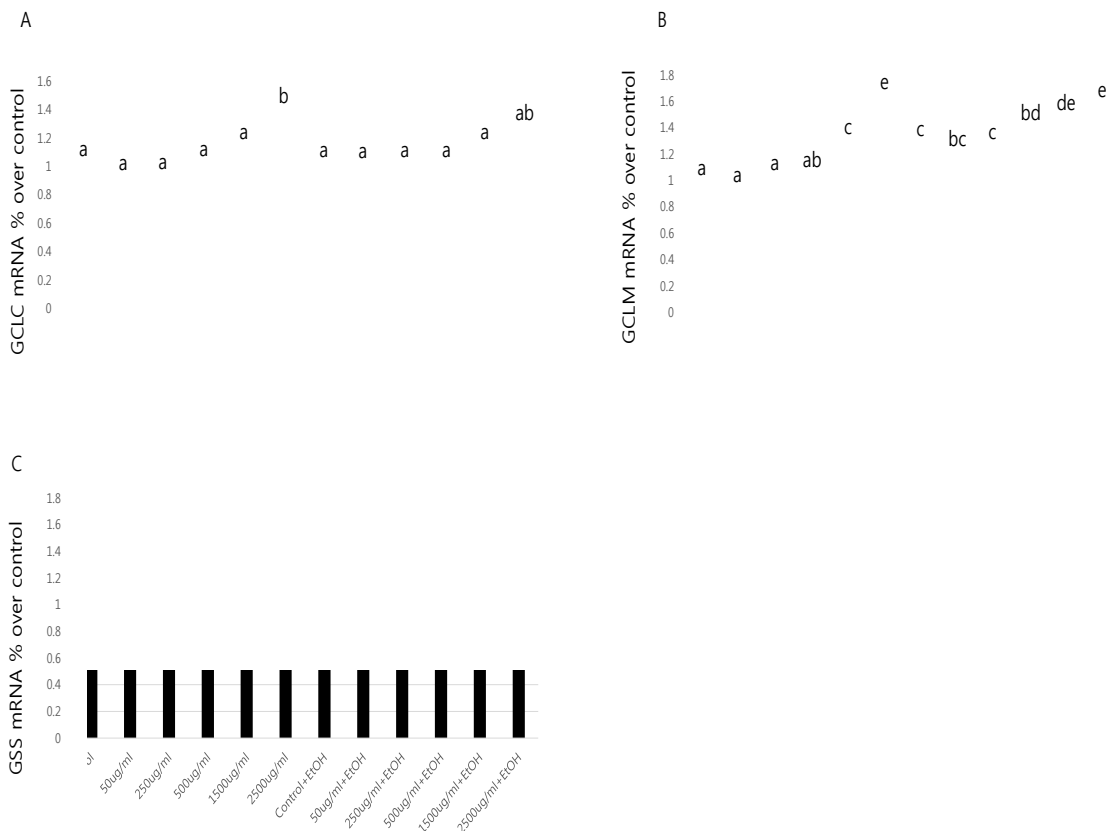


Figure 3-14. Effects of *Akebia quinata* (AQ) fruit extract and EtOH on relative mRNA expression level of glutathione synthetic enzymes a in AML-12 cell (A), relative mRNA expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC); (B), relative RNA expression of glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCML); (C), relative mRNA expression of glutathione synthase (GSS). Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

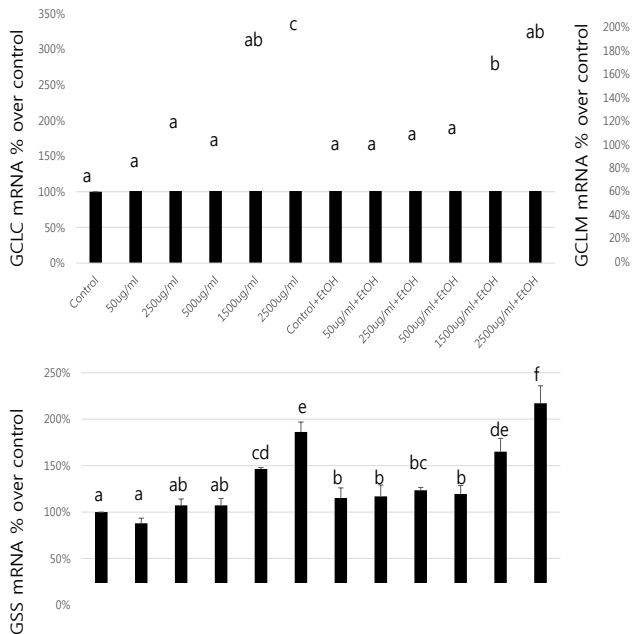


Figure 3-15. Effects of *Akebia quinata* (AQ) leaf extract and EtOH on relative mRNA expression level of glutathione synthetic enzymes a in AML-12 cell (A), relative mRNA expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC); (B), relative RNA expression of glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCML); (C), relative mRNA expression of glutathione synthase (GSS). Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

먼저 AML-12 세포 주에서 으름 열매와 잎 추출물과 알코올 처리에 따른 GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 정도를 figure 3-14에 나타내었다. 으름 열매 추출물의 경우 glutamate cysteine ligase catalytic subunit(GCLC)의 mRNA 발현은 대조군에 비해 2500ug/ml 처리군에서 유의적으로 높게 발현되는 것으로 분석 되었다. glutamate cysteine ligase modifier subunit (GCML) mRNA의 발현의 경우 비 알콜 처리 군의 경우 1500ug/ml, 2500ug/ml 처리군에서 유의적 증가가 관찰 되었고 알코올 처리군에서는 대조군에 비해 500ug/ml, 1500ug/ml, 2500ug/ml 처리군에서 유의적 증가를 나타내었다. 한편, glutamate synthase (GSS)의 경우는 알콜 처리구와 으름 열매처리구-알콜 처리구 모두 GSS의 발현이 으름 열매 처리 농도에 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었지만 통계적 유의를 보이지는 않았다.

한편 으름 잎 추출물의 경우 GCLC, GSS mRNA의 발현 정도가 으름 잎 추출물의 처리 농도 증가에 따라 유의적으로 증가하는 경향을 나타내어 으름 잎 처리에 따른 항산화 능력에 대한

가능성을 보였다. (Figure 3-15)

GSH 합성에서 속도결정 단계를 촉매하는 gamma-glutamylcysteine ligase는 heterodimer 단 백질로 catalytic subunit과 regulatory subunit으로 구성된다. GSH의 함량은 주로 catalytic subunit의 변화와 관련이 있다고 보고되고 있다(12) 본 연구에서 으름의 열매 추출물 처리에 따른 GSS mRNA발현은 유의적 차이를 보이지 않았으나 GCLC의 mRNA 발현의 경우는 으름 열매 및 어린 잎 추출물 처리 실험 모두에서 유의적 차이를 보였다. 이는 으름의 열매 및 잎 추출물의 처리가 GCLC mRNA 발현을 증가 시키고 그에 따른 GSH 합성의 증가를 가져 올수 있는 가능성을 나타낸 것으로 판단된다.

② 으름 메탄올 추출 물 처리

Figure 3-16은 으름 잎의 메탄올 추출물 처리에 따른 AML12 cell의 GSH synthetic enzyme 의 mRNA 발현 정도 분석 하여 나타내었다.

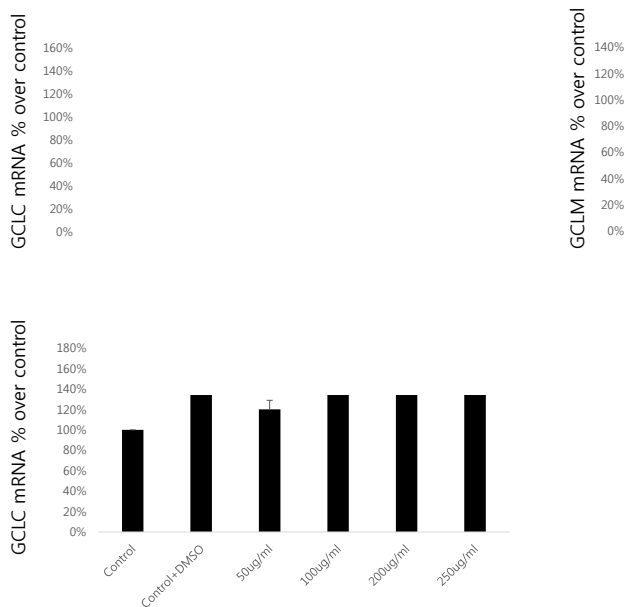


Figure 3-16. Effects of *Akebia quinata* (AQ) leaf extract and EtOH on relative mRNA expression level of glutathione synthetic enzymes a in AML-12 cell (A), relative mRNA expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC); (B), relative RNA expression of glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCML); (C), relative mRNA expression of glutathione synthase (GSS). Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

으름의 잎 메탄올 추출물의 경우 GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 정도는 통계적 유의차를 보이지 않았다. 으름의 메탄올 추출물의 처리농도는 으름 추출과정에서 열 수 추출 보

다 그 농축 정도가 강하기 때문에 처리 농도를 50ug/ml~250ug/ml으로 설정 하였다. 하지만 GSH synthetic enzyme의 mRNA 의 변화는 유의적이지 않은 것으로 분석 되었다.

③ 으름 열 수 (hot water) 추출물의 처리에 따른 AML-12 세포주의 Glutathione 농도 변화

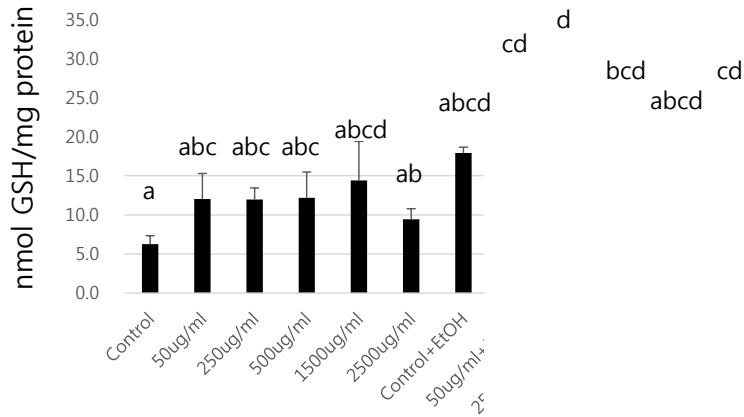


Figure 3-17. Effects of Akebia quinata (AQ) fruit extract and EtOH on glutathione level in AML-12 cell. Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

으름 열매 추출물 처리에 따른 GSH 농도 변화에 대한 결과를 Figure 3-17에 나타내었다. 비 알코올 처리군의 경우 으름 추출물 농도 증가에 따른 GSH 농도가 증가하는 경향을 나타내었지만 2500ug/ml 처리군에서는 그 증가하는 폭이 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 알코올 처리군의 경우 대조군과 비교하여 GSH 의 농도가 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 본 연구에서 알코올 처리한 경우에도 GSH 농도를 증가 시키는 결과를 보였는데 이는 산화적 스트레스에 대한 방어 작용으로 GSH의 수준을 증가시키는 것으로 판단된다. 결과적으로 알콜만 처리한 처리구와 알콜+으름 열매 추출물 처리구를 비교할 때 으름 열매 추출물은 AML-12 세포주에서 알코올 스트레스 하에서 GSH 농도를 증가시키는 것으로 분석 되었다. 따라서 으름 열매, 어린 잎 추출물의 처리는 간 에서 항산화 기능이 향상됨을 보여주는 것이며, 알콜에 의한 산화적 스트레스를 저하하는 효과가 있는 것으로 판단된다.

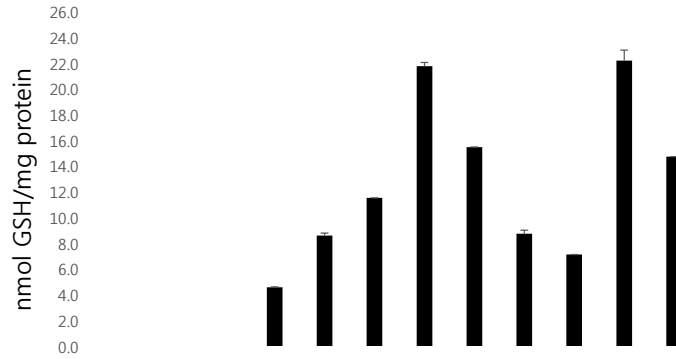


Figure 3-18. Effects of Akebia quinata (AQ) leaf extract and EtOH on glutathione level in AML-12 cell.

으름 잎 추출물 처리에 따른 GSH 농도 변화에 대한 결과를 Figure 8에 나타내었다. 먼저 비알콜 처리군에서는 대조군에 비해 낮아지는 경향을 나타내었으며 알콜만 처리한 군의 경우 GSH 농도가 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다. GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 양상과 일치 하는 결과를 보이지 않았지만 처리 농도 증가에 따른 GSH 농도증가 경향을 나타내는 것은 mRNA 분석결과와 유사하게 분석되었다.

④ 으름 추출 지표 물질 처리에 따른 HepG-2 세포주의 Glutathione 농도 변화

Figure 3-19은 으름 추출 지표물질인 hederagenin 처리에 따른 간암 세포의 glutathione 농도 변화를 나타 내었다. Wu D(13)등은 HepG-2세포내에서 CYP2E1의 과발현이 세포내 glutathione 고갈을 유도하여 세포자살 및 세포 괴사를 유도한다고 보고 하였다. 본 연구 팀에서도 유사한 결과를 보였는데 hederagenin 처리가 glutathione 의 고갈에 영향을 미치는 것으로 분석 되었다. 이는 Hoechst stain 결과와 일치하는 결과로 hederagenin의 처리가 GSH 고갈을 유도하여 세포 자살을 유도한 것으로 유추 할 수 있다. 따라서 hederagenin의 처리로 인한 간 암세포 특이적 세포 자살을 유도 할수 있는 것으로 판단되어 으름 추출 지표물질을 이용한 간암 억제 기능을 기대 할 수 있을 것으로 분석되었다.

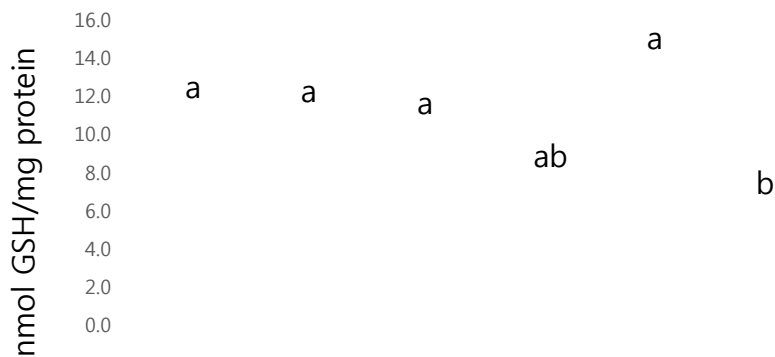


Figure 3-19. Effect of hederagenin from Akebia quinata leaf on glutathione level in HepG-2 cell.

(3) 간세포에서의 항염증, 항산화 작용 기능의 메카니즘 구명

-> 염증 지표유전자 및 ROS 지표 유전자의 발현 비교를 통한 으름 추출물의 간 보호기능 구명

(가) ROS 지표 분석

NADPH oxidase(NOX)는 다양한 자극에 반응하여 활성산소기(reactive oxygen species; ROS)를 발생시키는 효소로서 NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 가 존재하며 간 내에서 NOX system에 의해 발생하는 산화스트레스는 알코올성 간질환, 만성 C형 간염, 철분 및 담즙 정체 간손상 등 여러 가지 간질환과 간섬유화 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 연구에 따르면 NOX4의 억제가 간섬유화와 간세포의 apoptosis 억제와 관련이 있다는 연구결과가 보고되고 있다. 본 연구에서의 으름 열매에 대한 열 수 추출물 처리에 따른 NOX4 mRNA 발현 정도를 분석한 결과를 Figure 3-20과 3-21에 나타내었다.

으름 열매의 추출물의 경우 NOX4의 mRNA 발현이 유의적인 차이를 보이지 않았지만 그 처리 농도에 따른 NOX4 의 mRNA의 발현 감소 경향을 나타내었다.

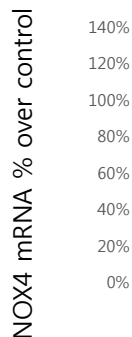


Figure 3-20. Effects of Akebia quinata (AQ) fruit extract and EtOH on relative mRNA expression level of NADPH oxidase 4 (NOX4)

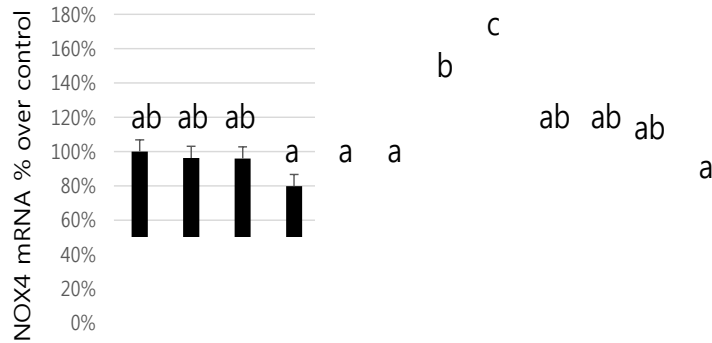


Figure 3-21. Effects of Akebia quinata (AQ) leaf extract and EtOH on relative mRNA expression level of NADPH oxidase 4 (NOX4).

으름 잎 추출물의 경우 비 알콜 처리군에서는 NOX4의 mRNA 발현이 감소하여 산화스트레스를 감소 시키는 것으로 분석 되었으며 알콜 처리군의 경우도 50ug/ml + EtOH 처리군에서 대조군에 비해 가장 높게 발현 하였으며 이후 농도에서는 대조군과 유사한 발현 정도를 보여 결과적으로 으름의 열매 및 어린 잎 추출물의 처리가 AML-12 세포주에서 알콜로 인한 산화 스트레스 완화에 기여하는 것으로 분석되었다.

(나) 염증관련 지표 분석

만성적 또는 급성의 알코올의 섭취는 장벽의 손상을 통해 장내독소 침투를 촉진 시킬 수 있고 이는 Kupffer cell을 활성화 시켜 ROS의 생성과 여러 염증유발 cytokine의 생성을 증가 시킨다고 보고되었다. 특히 여러 연구에 따르면 급성 및 만성적 알코올의 섭취가 간조직에서 대표적 proinflammatory인 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)의 발현을 유의적으로 증가 시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 으름 처리에 따른 AML-12 세포주에서의 TNF-α 발현을 분석하였다. 하지만 처리군 전구간 통계적 유의를 보이지 않았다. (data not shown) 이는 본 연구진이 in vivo 실험을 통해 염증 반응 감소를 구명 내용과 일치 하지 않는 결과로 그 원인은 TNF-α의 발현은 주로 Kupffer cell의 활성화로 이루어진다고 보고되고 있는데 반해 본 연구에서 사용된 세포주의 경우 단일 세포주의 AML-12 cell 로 이루어 진 이유로 추론하고 있다. 하지만 본 연구진의 in-vivo 실험을 통해 으름 추출물의 생쥐 경구 투여는 염증 관련 지표인 TNF-α의 발현을 감소시켜 간 조직내 염증 반응을 완화 하는 것으로 분석 되었었다.

(다) 간기능 개선 유전자 탐구

-> Micro array 분석을 통한 간기능 개선에 작용하는 유전자 탐구

본 연구에서 사용된 microarray 분석은 동시에 수 만개 이상의 유전자 발현양상을 관찰할 수 있는 기술로서 특정 질병의 유전학적 특성과 기전 연구를 더 광범위하게 연구 할 수 있는 기술이다. 목표로 하는 세포에서 mRNA를 분리하여 형광물질을 첨가하여 단일 가닥 형태의 cDNA로 합성시켜, 여기에 microarray chip에 내장되어있는 probe를 이용하여 발산하는 형광을 검출하여 발현 변화 양상을 파악할 수 있다. 본 연구에서는 으름 추출물의 처리가 AML12 세포에서의 다양한 유전자들에 대한 영향을 분석 하기 위해 microarray 분석을 실시하였다.

microarray 분석 시 조사되는 유전자수는 굉장히 많기 때문에 결과에 대한 해석이 중요하다고 할 수 있다. 먼저 Figure 3-22 는 전반적인 유전자 발현 변화를 한 번에 파악 할 수 있는 Hierarchical clustering map을 나타내었다. Control (ALC, 초록색 군) 의 경우와 알콜 처리군 (ALEC, 보라색군)의 군집을 분석해보면 알콜 처리로 인한 유전적 변화가 극명하게 나타난다. 그리고 알콜 + 으름 잎 추출물(2500ug/ml) 처리군의 경우 그 군집이 알콜 만 처리한 군과 달리 대조군과 매우 유사하게 군집이 유도된 것을 확인 할 수 있었다. 이는 알콜로 인한 세포내 환경의 스트레스가 으름 추출물의 처리로 인해 정상 세포인 대조군과 유사하게 유도(완화)되었다고 판단된다.

본 연구에서는 으름 추출물에 대한 간세포에서의 간 보호효과에 대한 유전적 변화에 대한 분석을 위해 다음과 같이 5개의 항목을 기준으로 유전자군을 설정 하였으며 선정 시 발현 변화가 상위 20위를 선정 하였다.

- angiogenesis : 신생혈관 생성으로 암의 발생이나 비만 세포의 증식에서 관찰된다.
- antioxidant activity: 항산화 활성 유전자 군으로 간보호 역할에 중추적 역할을 한다.
- apoptotic process: 세포자살 과정
- cell proliferation: 세포 증식으로 암세포에서는 그 작용이 활발하다.
- inflammatory response: 염증 반응으로 세포의 다양한 스트레스에서 그 염증 반응이 증가하는 것으로 알려져 있다.

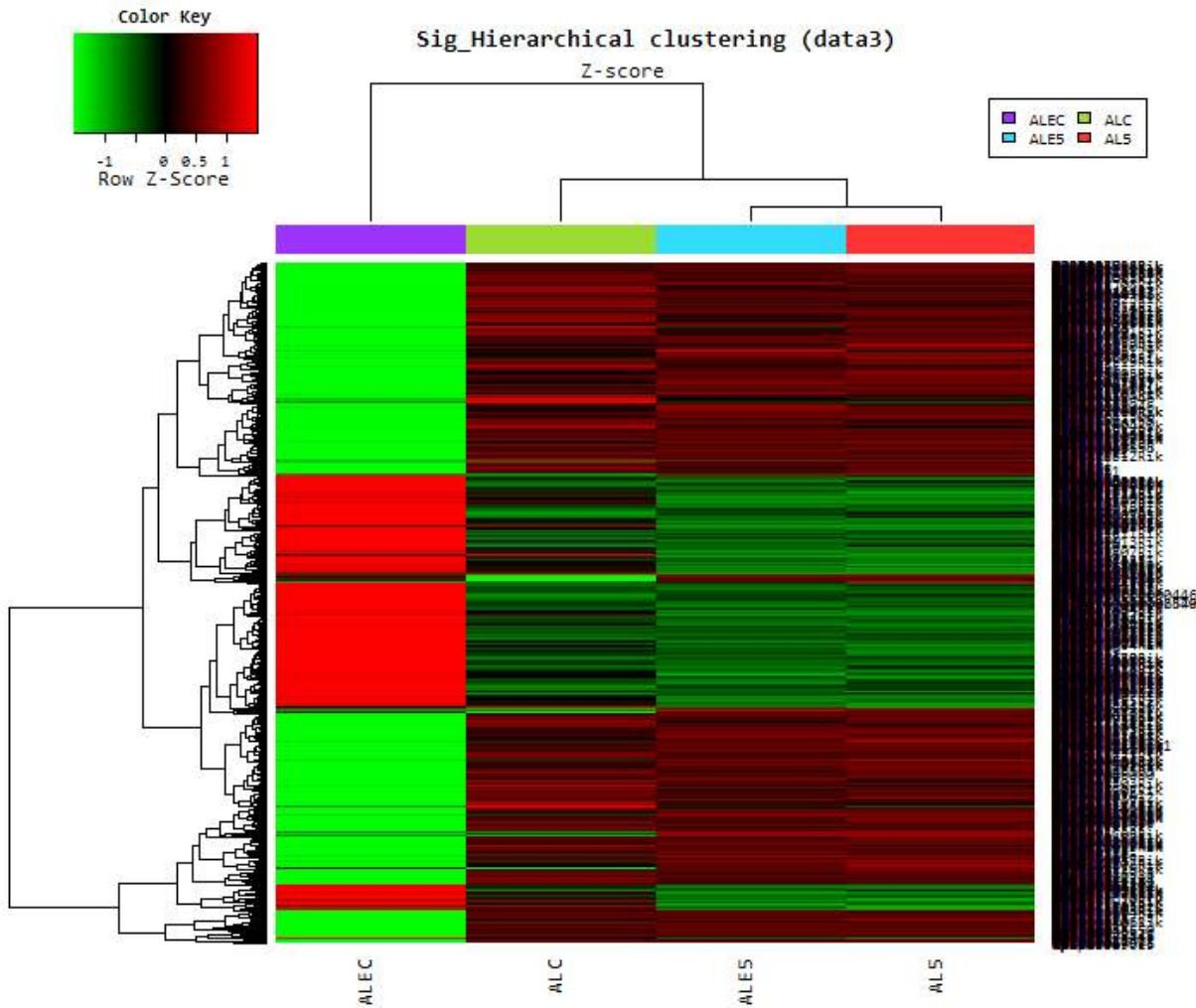


Figure 3-22. Overall comparison among control(ALC), control+EtOH(ALEC), 2500ug/ml of Akebia quinata leaf extract(AL5) and AL5+EtOH(ALE5).

본 연구에서는 ALE5 와 ALEC를 비교 하여 알콜 만 처리한 경우에 비해 으름 추출물과 알콜을 동시에 처리함으로 알콜에 대한 간 보호 및 간 세포의 스트레스 상황을 감소 시켜주는 유전자 발현군을 구별하였다. Table 3-5, 6에 나타내었다. 대부분의 유전자는 한 가지 기능 뿐 아니라 그 생리적, 유전적 특성에 관여하는 다양한 pathway에 관여 한다. 예를 들어 Gpx1의 경우 산화적 스트레스와 발암 유전자로 알려져 있고 또한 신생혈관 생성과 염증반응에 대한 그 기능 또한 밝혀져 있어 영향 범위가 다양하다. 따라서 본 연구에서 설정한 5개 항목 중 통계적으로 유의하게 차이가 있으며 각 항목 상위 20개 유전적 변화 양상을 보인 유전자를 선정 하였다.

Table 3-5. Significantly lowered mRNA expression list: AQ leaf treatment with EtOH versus control with EtOH in AML-12 cell line

Gene Symbol	angiogenesis	antioxidant activity	apoptotic process	cell proliferation	inflammatory response
Itgb6					0
Itgb6					0
Casp4			0		0
Pbk					0
Serpina1a					0
Serpina1b					0
Csf1				0	0
Casp4			0		0
Gja1			0	0	0
Slc11a1				0	0
Sphk1	0		0	0	0
Seh1l					0
Cd40			0	0	0
Zfp36					0
Serpina1a					0
Egfr			0	0	0
Tnfaip3			0	0	0
Ly96					0
Tlr3			0		0
Mapk8			0		0
<hr/>					
Prdx6		0			
Ptgs1		0		0	0
Prdx6		0			
Sep15		0			
Prdx1		0		0	
Gstk1		0			
Txnrd1		0		0	
Ltc4s		0			
Srxn1		0			
Gpx3		0			
Txnrd2		0			
Trp53inp1		0	0	0	
Prdx1		0		0	
Mgst3		0			
Ubiad1		0			
Mgst2		0			
Mgst1		0			
Gpx2		0			0

Park7		0	0	0	0
Gsto2		0			
<hr/>					
Fgf13			0	0	
Aqp1	0		0	0	
Dab2			0	0	
Dab2			0	0	
Aspm				0	
Nox4			0	0	
Sftpd				0	
Brip1				0	
Robo1	0		0	0	
Ccdc88a				0	
Iqgap3				0	
Bex1				0	
Fignl1			0	0	
Ccnb1				0	
Id2				0	
Chek1				0	
Tgfbr1	0		0	0	
Ccnb1				0	
Ift80				0	
Csf1				0	0
<hr/>					
Fgf13			0	0	
Aqp1	0		0	0	
Dab2			0	0	
Dab2			0	0	
Nox4			0	0	
Plk1			0		
Casp4			0		0
Robo1	0		0	0	
Fignl1			0	0	
Tpx2			0		
Tgfbr1	0		0	0	
Serpina3g			0		
Melk			0	0	
Wrm			0		
Atf2			0		
Asah2			0	0	
Id1	0		0		
Casp4			0		0
Gjal			0	0	0
Krit1	0		0	0	
<hr/>					

Ptpnb	O			
Aqp1	O	O	O	
Robo1	O	O	O	
Tnfaip2	O			
Tgfbr1	O	O	O	
Sema3e	O			
Efnb2	O		O	
Parva	O			
Id1	O	O		
Krit1	O	O	O	
Edn1	O	O	O	
Sphk1	O	O	O	O
Nrp1	O	O		
Vegfc	O		O	
Notch4	O			
Nrp1	O	O		
C1galt1	O			
Acvr1	O	O		
Cyp1b1	O	O	O	
Meis1	O			

Table 3-6. Significantly over expression of mRNA list: AQ leaf treatment with EtOH versus control with EtOH in AML-12 cell line

GeneSymbol	angiogenesis	antioxidant activity	apoptotic process	cell proliferation	inflammatory response
Agt	0		0	0	0
Hdac5	0			0	0
Hif1a	0		0	0	0
Per1					0
Rps19					0
Prkcz			0	0	0
Lbp					0
Tnip1					0
Sigirr					0
Apoe		0	0	0	0
Mapkapk2					0
Cyba				0	0
Hspd1			0	0	0
Gstp1			0	0	0
Nupr1			0	0	0
Gpx1	0	0	0	0	0
Gpx4		0			0
C1qbp			0		0
Prdx2		0	0	0	0
Gstp1			0	0	0
Gsto2		0			
Srxn1		0			
Ptgs1		0		0	0
Ces		0			
Gstt1		0			
Mgst3		0			
Hp		0			0
Hp		0			0
Srxn1		0			
Hp		0			0
Sod1		0	0		
Prdx5		0	0		
Prdx3		0	0	0	
Gsto1		0			
Prdx5		0	0		
Apoe		0	0	0	0
Sep15		0			
Gpx1	0	0	0	0	0
Gpx4		0			0

Prdx2		0	0	0	0
Tspo			0	0	
Hspd1			0	0	0
Gstp1			0	0	0
Igfbp4				0	
Naca			0	0	
Nupr1			0	0	0
Gpx1	0	0	0	0	0
Tsc22d1			0	0	
Dctn2				0	
Calr				0	
Prdx2		0	0	0	0
Eif5a			0	0	
Rps9				0	
Tspo			0	0	
Tbrg1				0	
Vim				0	
Tspo			0	0	
Rps6			0	0	
Trf				0	
Gstp1			0	0	0
Traf4			0		
Fis1			0		
Traf4			0		
Lgmn			0		
Sqstm1			0		
Ddit3			0		
Tnfrsf22			0		
Prdx2		0	0	0	0
Eif5a			0	0	
Arl6ip5			0		
Lcn2			0		
Tspo			0	0	
Mtch2			0		
Tspo			0	0	
Hsp90ab1			0		
Hsp90ab1			0		
Rps3			0		
Rps6			0	0	
Ppp1ca			0		
Gstp1			0	0	0
Epha2	0		0	0	

Plcd3	O			O	
Cib1	O		O	O	
Hdac5	O			O	O
Mfge8	O				
Bax	O		O	O	
Agt	O		O	O	O
Hdac5	O			O	O
Rtn4	O				
Htatip2	O		O		
Hipk2	O		O	O	
Rtn4	O				
Sparc	O			O	
Flcn	O		O	O	
Htatip2	O		O		
Cxcl17	O				
Add1	O				
Hif1a	O		O	O	O
Tnfrsf12a	O		O		
Gpx1	O	O	O	O	O

종합해보면, 으름의 열매 추출물은 알콜로 인한 세포의 산화적 스트레스에서 항산화 물질인 GSH의 농도를 증가 시켰다. 더불어 ROS를 생성하는 NOX4의 mRNA 발현을 억제 하는 것으로 분석되었다. 또한 으름 열 수 추출물과 정제된 지표물질은 AML-12 세포주에서 세포의 증식을 지연 시키는 것으로 분석 되었다. HepG-2 세포주의 경우 hederagenin 처리로 인해 세포 자살이 유도되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 으름의 잎 추출물의 처리로 인해 angiogenesis, antioxidant activity, apoptotic process, cell proliferation, inflammatory response에 관여 하는 유전자의 발현에 밀접하게 연관 되어 있다는 것을 Microarray 분석을 통해 구명 하였다.

다. 3차년 목표: 숙취해소 기능 확인을 위한 인체 적용 실험

(1) 으름 추출물 내 지표물질인 oleanolic acid와 hederagenin의 간 보호 기능 확인

(가) 실험동물모델 구성

으름 추출물 내 지표물질로 알려진 oleanolic acid와 hederagenin의 간 보호 기능을 확인하기 위하여 새후 5주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 알코올 처리군과 비처리군, oleanolic acid(Sigma-Aldrich, O5504, St. LOIS, USA)와 hederagenin (을 처리한 그룹으로 나누어 실험

을 진행하였다. Oleanolic acid와 hederagenin (Sigma-Aldrich, H3916, St. LOIS, USA) 추출물 처리군에게 oleanolic acid와 hederagenin을 10mg/kg body weight 또는 20mg/kg body weight으로 2주간 매일 구강 gavage를 통해 투여 하였다. 지표물질 선처리 후에 알코올 처리군에게 고농도의 알코올(에탄올)을 6mg/kg body weight으로 구강 gavage를 통해 강제 투여 하였다. 알코올 투여 18시간 후 실험동물을 희생하여 혈액 및 간 시료를 채취해 oleanolic acid와 hederagenin의 간기능 보호 작용 검증에 이용하였다.

(나) Oleanolic acid와 hederagenin의 간보호 효과 검증

① Alanine aminotransferase와 aspartate aminotransferase 활성 측정

알코올 섭취 및 지표물질의 투여로 인한 간손상 정도를 알아보기 위하여 간손상 지표로 사용되는 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST) 활성을 측정하였다 (Fig. 3-23). 알코올만 처리한 처리구에 비하여 EtOH+OH 처리구에서 ALT 수치가 감소한 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$). 또한 oleanolic acid와 hederagenin을 투여한 처리구간을 비교하였을 때, 각각의 물질을 더 높은 농도로 투여한 처리구에서 ALT 활성이 감소하는 경향을 보였다. 일반적으로 알코올로 유발된 급성 간독성을 보이는 간에서는 ALT와 AST의 활성이 증가된다고 보고되었다(14). 본 연구에서는 알코올의 급여가 ALT와 AST 수치가 유의적으로 증가하지는 않았으나, 알코올 투여 후 oleanolic acid와 hederagenin의 투여가 ALT 감소에 농도 비례적으로 나타나는 경향이 있음을 볼 수 있었다. 이는 기존 연구를 통하여 밝혀진 oleanolic acid의 간보호 효과와 유사한 경향을 확인할 수 있으며(15), 이를 통하여 oleanolic acid와 hederagenin의 간 보호 효과의 가능성을 보았다.

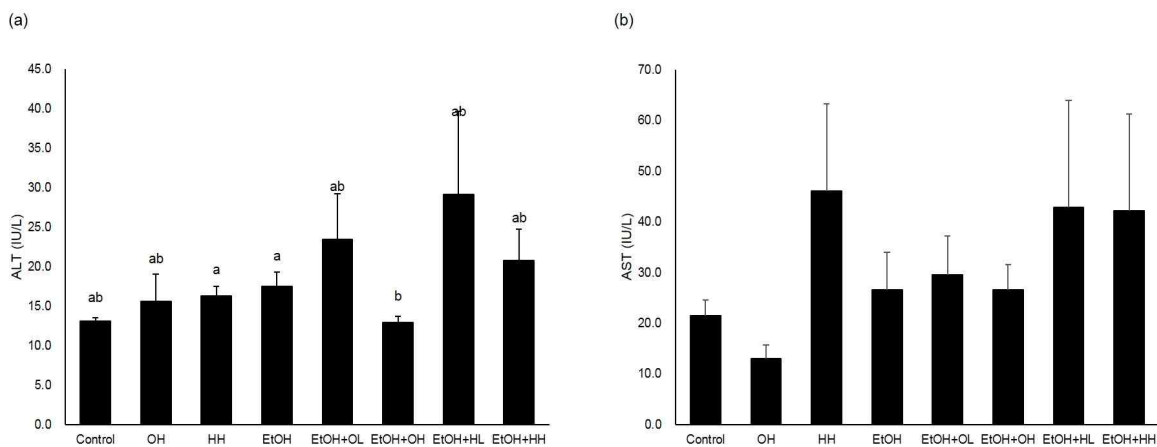


Figure. 3-23. Liver alanine aminotransferase (a) and aspartate aminotransferase activity (b). a,bMeans with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Each bar represents the mean \pm standard error.

② 혈중 알코올 농도 및 alcohol dehydrogenase mRNA 발현 측정

으름 내 유효물질인 oleanolic acid와 hederagenin의 체내 알코올 분해능력을 알아보기 위하여 실험 동물에 알코올을 투여 후 18시간 뒤에 채취한 혈액에서 혈중 알코올 농도를 측정하였다. 실험결과 대조군에 비하여 에탄올을 투여한 처리군에서 혈중 알코올 농도가 높은 것을 확

인할 수 있었으며, oleanolic acid와 hederagenin을 투여함에 따라 혈중 알코올 농도가 감소하는 모습을 보였다(Fig. 3-24). 특히 oleanolic acid와 hederagenin을 처리한 처리군에서 투여 농도가 높을수록 혈중 알코올 농도가 더욱 감소함을 확인할 수 있었다. 체내로 들어온 알코올의 분해는 간에서 alcohol dehydrogenase에 의해 alcohol이 acetaldehyde로 분해되는 과정으로 시작한다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 oleanolic acid와 hederagenin을 투여한 쥐에서 간내 alcohol dehydrogenase mRNA 발현정도를 qPCR을 이용하여 측정하였다. 일반적으로 알코올을 투여한 쥐에서 alcohol dehydrogenase의 발현이 증가한다고 알려져 있으며(16), 본 연구에서도 대조군에 비하여 알코올을 투여한 처리군에서 alcohol dehydrogenase의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-24). 또한 EtOH+OH 그룹에서 그 발현이 증가하는 것을 보아 ($P<0.05$) oleanolic acid의 투여가 alcohol dehydrogenase의 발현이 증가에 효과가 있음을 알 수 있었다.

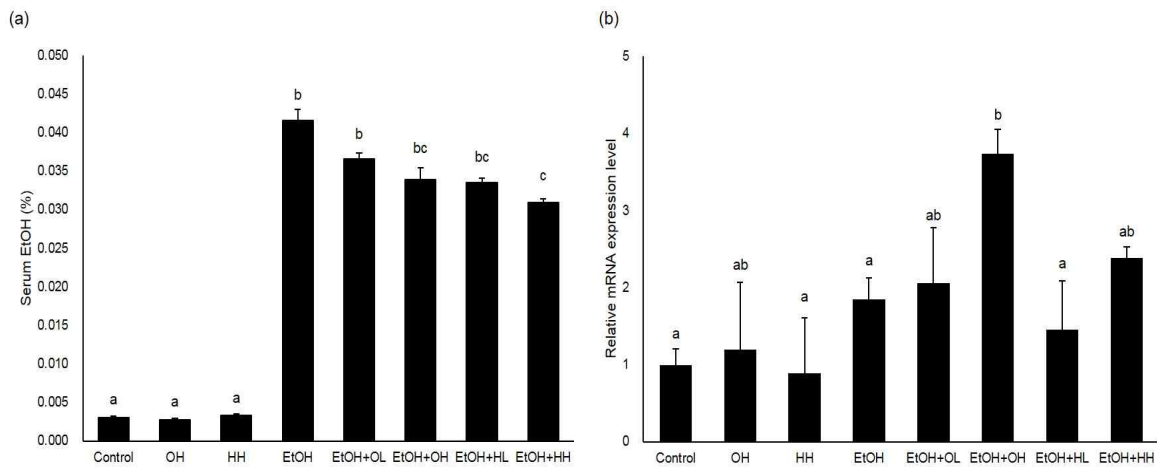


Fig. 3-24. Serum ethanol concentration (a) and liver alcohol dehydrogenase mRNA expression level (b). a-cMeans with different superscripts are significantly different ($P<0.05$). Each bar represents the mean \pm standard error.

③ 간 조직 내 glutathione synthetic enzyme의 mRNA 발현과 glutathione level

항산화 및 해독기능을 하는 GSH는 알코올성 간질환 및 만성 간질환에 의해 그 농도가 감소한다고 알려져 있으며, GSH는 세포 내 항상성의 유지에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(17-20). 본 연구에서는 으름 추출물 내 유효물질로 알려진 oleanolic acid 및 hederagenin이 알코올로 유발된 간 독성에 대한 간 보호 효과를 알아보기 위하여 간 조직내 GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 정도와 GSH 농도를 분석하여 Fig. 3-25A에 나타내었다. 알코올을 투여한 처리군의 경우 대조군에 비하여 GSH level이 높은 것을 확인할 수 있었으며 알코올 투여 후 oleanolic acid 또는 hederagenin을 투여한 처리군에서 대조군에 비하여 GSH level이 높게 분석되었다($P<0.05$). 대조군과 OH, HH 그룹 간에는 GSH level의 유의적 차이를 보이지 않았다. GCLC mRNA 발현의 경우 대조군에 비하여 oleanolic acid를 투여한 그룹에서 높게 발현되는 경향을 보였으며, EtOH 그룹과 비교하였을 때 EtOH+OL 그룹에서 그 발현 정도가 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다($P<0.05$) (Fig. 3-25B). EtOH+HH 그룹의 경우 EtOH 그룹에 비하여 GCLM이 높게 발현되는 것으로 나타났으며($P<0.05$), 다른 그룹 간에는 GCLM의

발현 정도에 유의적 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3-25C). 대조군과 알코올을 투여한 그룹 사이에 GSS mRNA 발현에 차이를 보이지 않았으며, EtOH+OH 그룹의 경우 알코올을 투여한 그룹에 비하여 GSS 발현이 증가하는 것으로 나타났다($P<0.05$) (Fig. 3-25D). EtOH+OL 그룹과 EtOH+HH 그룹의 경우 대조군에 비하여 GSS mRNA 발현에 유의차를 나타내지 않았으나 EtOH 그룹과 비교하였을 때 그 발현이 증가하는 경향을 보였다. 본 연구진의 기존 연구에서 알코올로 인한 급성 간독성에서 으름 추출물의 투여가 항산화 능력의 향상 가능성에 대하여 확인하였다(21). 으름의 열수추출을 통한 추출물 내에는 많은 유기산 및 배당체가 존재한다고 알려져 있으며, 그 중 oleanolic acid, hederagenin, triterpene glycoside, norarjunolic acid 등이 주요 물질로 알려져 있다(22, 23). 본 연구를 통하여 으름 추출물 내 유효물질로 알려진 oleanolic acid와 hederagenin가 급성 알코올성 간독성 마우스에서의 간 보호 효과 및 항산화 기능을 향상시킬 수 있는 가능성을 확인하였다. 이를 통하여 기존 연구를 통하여 확인한 알코올로 인한 만성 또는 급성 간질환에서 으름 추출물의 효능은 추출물 내 oleanolic acid와 hederagenin의 작용일 가능성이 높다고 판단된다.

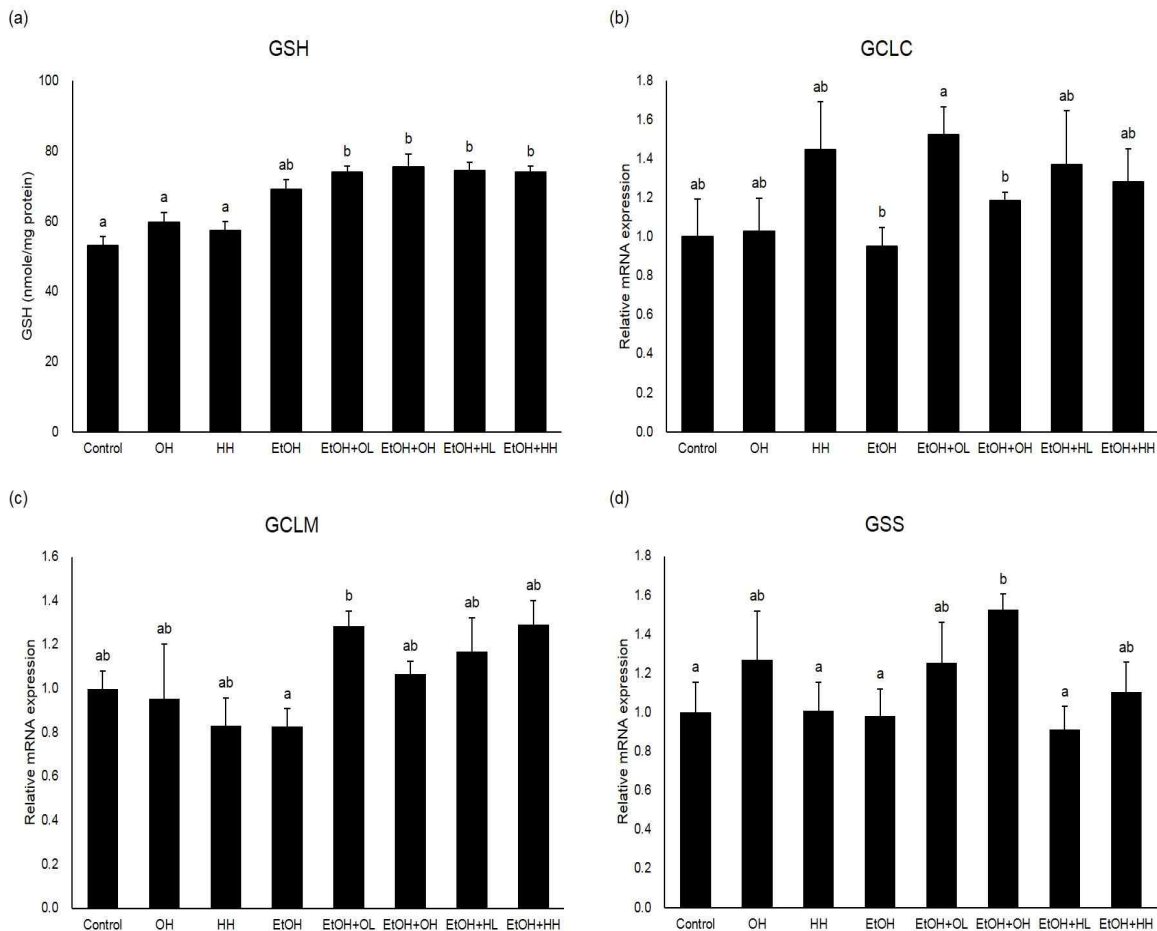


Fig. 3-25. Effects of oleanolic acid, hederagenin and ethanol on relative mRNA expression level of glutathione synthetic enzymes and glutathione concentration in mouse livers. (a), GSH level in mouse livers; (b), relative mRNA expression level of glutamate-cystein ligase modifier subunit (GCLM); (c), relative mRNA expression level of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC); (d), relative mRNA expression level of glutathione synthase (GSS). a,bMeans with different superscripts are significantly different ($P<0.05$). Each bar represents the mean \pm standard error.

④ Tumor necrosis factor- α mRNA 발현 측정

급성 알코올의 섭취는 장벽의 손상을 통해 장내독소 침투를 촉진시키고, 염증유발 cytokine의 생성을 증가시킨다고 알려져 있다(24). 특히 여러 연구에 따르면 급성 또는 만성적 알코올의 섭취는 간조직에서 대표적인 proinflammatory cytokine인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 발현을 유의적으로 증가시킨다고 보고되었다(25). 따라서 본 연구에서는 으름 추출물 내 유효성분 후보물질인 oleanolic acid와 hederagenin의 투여가 알코올 처리로 인한 간 조직 내 염증반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대표적인 염증 반응 지표인 TNF- α 의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 본 연구에서 EtOH 그룹의 TNF- α mRNA 발현 정도는 대조군에 비하여 증가한 것을 통하여 알코올로 인한 간독성 및 염증반응이 발생하였음을 확인할 수 있었다($P < 0.05$) (Fig. 3-26). 반면 EtOH 처리 그룹에 oleanolic acid 또는 hederagenin을 투여한 그룹의 경우 TNF- α mRNA 발현이 감소하는 경향이 있는 것을 통하여, oleanolic acid와 hederagenin이 알코올로 유발된 급성 염증반응을 감소시킬 가능성이 있다고 판단된다. 위의 결과를 통하여 기존 연구에서 확인한 으름 추출물의 알코올로 유발된 급성 염증 반응의 감소 효과가(21) 으름 추출물 내 oleanolic acid와 hederagenin에 의한 효과 때문이라 사료된다.

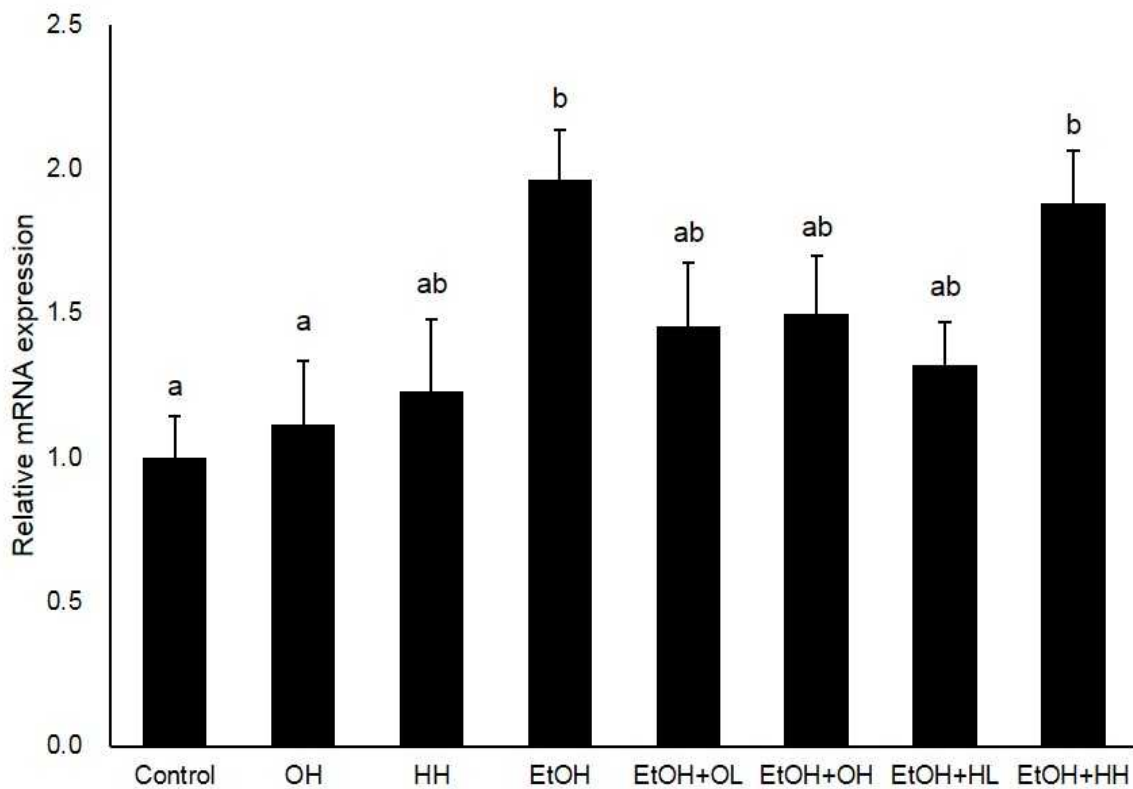


Fig. 3-26. Effects of oleanolic acid, hederagenin and ethanol on relative mRNA expression level of tumor necrosis factor- α in mouse livers. a,bMeans with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Each bar represents the mean \pm standard error.

(2) 간보호 기능성 으름 초음료의 숙취 해소 기능 검증을 위한 인체 실험

기입하여 주십시오, 만약, 2가지 증상을 느끼는 정도가 매우 유사하면, 같은 순위로 기입하여 주십시오.

두통		기억단절 (전날의 일이 기억나지 않음)	
어지러움			
복통		평소보다 피곤	
심한 갈증		심한 졸음	
설사		기타 ()	
집중곤란			

② 인체 적용 시험 방법

으름 초음료의 숙취해소 능력 검증을 위한 인체 적용 방법은 다음과 같은 절차로 진행 되었다.

1. 방문 일정 및 내용

[방문1 (-1주)]

: 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자는 연구대상자 선정 및 제외 기준에 의해 적합여부를 판정 받는다. 선정된 연구대상자는 1주 정도의 run-in period를 갖는다. 연구대상자의 스크리닝 검사를 다음과 같이 실시한다.

- ① 연구대상자를 시험에 참여 시키기 전에 시험 과정을 설명하고 서면동의서를 받는다.
- ② 연구대상자에게 순서대로 연구 ID번호를 지정한다.
- ③ 연구대상자의 인구학적 정보, 병력, 의약품 및 건강기능식품 복용력을 조사한다.
- ④ 체중, 신장, 체질량지수 (BMI)를 측정한다.
- ⑤ 활력징후(혈압 및 맥박)를 측정한다.
- ⑥ 공복시 정맥혈을 취하여 일반혈액검사 (임상병리검사)를 한다.
- ⑦ 음주력 및 흡연력을 조사한다.
- ⑧ 식습관을 조사하고, 식사 교육을 한다.
- ⑨ 적합성을 평가한다.
- ⑩ 다음 방문일자를 지정한다.

[방문2-1 (-1hour)]

: 방문 1에서 등록된 순서에 따라 피험자 활력 징후 등의 신체조사 후 시판군(A사, B사), 으름 앞 초음료군, 으름 열매 초음료군 중 한 군에 무작위 배정한다. 흰 죽을 아침 식사용으로 제공하며, 식사 후에는 각각의 시험군에 적합한 시험물질을 제공한다 (알코올 섭취 한 시간 전).

* 실험 시행 3일 이내 금주 및 저지방 식이를 하며, 시험 전날에는 22시부터 금식한다.

- ① 무작위배정번호를 부여한다.
- ② 의약품 및 건강기능식품 복용력 변화를 확인한다.
- ③ 체중, 신장, 체질량지수 (BMI)를 측정한다.
- ④ 활력징후를 측정한다.
- ⑤ 아침 식사용으로 흰죽을 제공한다.
- ⑥ 알코올 섭취 1시간 전 시험식품 또는 대조식품을 함께 섭취하며, 섭취 후에 다시 채혈 하여 혈액 관련 지표를 분석한다.

[방문2-2 (0주, 0 hour)]

- ① 시험식품 또는 대조식품 처리 1시간 후, 소주 1병과 소량의 안주를 제공한다.
- ② 소주와 소량의 안주는 30분 이내에 섭취하게 한다.
- ③ 순응도를 모니터링한다. .

[방문2-3 (0주, +1 hour)]

- ① 소주 섭취 1시간째, 정맥혈을 취하고, 혈액 관련 지표를 분석한다.
- ② 순응도를 모니터링한다.
- ③ 대상자 모두에게 일정한 양의 식수 (200cc) 를 제공하도록 한다.

[방문2-4 (0주, +3 hour)]

- ① 소주 섭취 3시간째, 정맥혈을 취하고, 혈액 관련 지표를 분석한다.
- ② 순응도를 모니터링한다.
- ③ 채혈 직후, 대상자 모두에게 일정한 양의 식수 (200cc)를 제공하도록 한다.

[방문2-5 (0주, +5 hour)]

- ① 소주 섭취 5시간째, 정맥혈을 취하고, 혈액 관련 지표를 분석한다.
- ② 순응도를 모니터링한다.
- ③ 대상자 모두에게 일정한 양의 식수 (200cc) 를 제공하도록 한다.

2. 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간

2.1 섭취방법

- ① 대상자간의 식사섭취상태로 인한 결과값의 차이를 줄이기 위하여 저지방 식이 (식단제 공)를 유도하며, 시험날 아침에 피험자 전원을 소집하여 아침식사로 흰 죽을 제공한다.
- ② 시험물 또는 위약 투여 1시간 후, 알코올을 30분 안에 섭취한다.
- ③ 알코올을 섭취하는 동안 최소한의 안주 (예 : 새우깡 약 20개 수준)는 섭취를 허용한다.
- ④ 알코올 섭취 후 시험이 진행되는 동안 음식 섭취는 금지하며, 채혈 후 대상자 모두에게 일정하게 제공되는 소량의 식수 (200cc)는 허용한다.

2.2 섭취량

시험물 및 위약 : 각각 75ml (시험품의 1회 복용 포장단위)

알코올 : 알코올 0.78g/body weigh (MSDS화학물질 정보)

* 연구참여자의 체중 및 신장에 맞는 양의 알코올을 포함하는 소주를 제공
(예 : 체중 65kg, 신장 175cm의 경우 시판소주 약 20%, 325ml)

2.3 섭취 기간

단회

3. 무작위배정

연구대상자 선정 기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 경우에 한하여, 방문 2 (0주)에 연구대상자가 등록되는 순서대로 무작위 배정번호 (random No.)를 부여한다. 무작위 배정번호에 따라 연구대상자가 어느 군에 배정될지는 연구와 독립된 제 3자에

의하여 시험 시작 전에 준비된 “computer generated random list”에 따른다. 50 명의 시험 대상자를 모집하여 25 명씩 2 회에 걸쳐 시행한다. 무작위배정방법은 block randomization 방법에 의해 대조군, 시판숙취해소음료 A,B, 으름초음료(일), 으름초음료(열매)으로 배정한다. 본 시험은 이중맹검으로 진행되므로 연구대상자가 어느 군에 배정되었는지는 연구가 종료될 때까지 연구자와 연구대상자에게 공개되지 않는다.

4. 관찰 항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

4.1 인체적용시험 진행 일정표

	screening	1sttest	2ndtest	3rdtest	4thtest	5thtest
일정	-7 day	-1hour	0 hour	+1 hour	+3 hour	+5 hour
피험자 사전 문진	√	√				
선정기준/ 제외기준조사	√	√				
활력징후 조사	√	√	√	√	√	√
서면 동의서 수령	√					
무작위 배정		√				
채혈			√	√	√	√
혈중 알코올 농도 측정			√	√	√	√
혈중 아세트알데히드 농도			√	√	√	√
간 기능 검사			√	√	√	√
숙취 증상 설문조사	√	√	√	√	√	√
이상반응		√	√	√	√	√

- 1) 각 방문은 전 방문으로부터 1주 이상 간격을 두고 수행한다.
- 2) 채혈하기 2일 이내 금주 및 시험 전날 22시부터 금식상태로 방문하여 식사대용식 지시 (저지방 식사) 후 1차 채혈 및 다음의 신체항목을 검사한다.
 - 혈액학적 검사: alcohol concentration, acetaldehyde concentration, ALT, AST
 - 신체적 반응 검사 : 혈압, 맥박, 호흡, 체온, 숙취증상에 대한 visual analogue scale
- 3) 식사대용식과 함께 시험식품 또는 대조식품을 섭취한 후 다음을 측정한다.
- 4) 식사기록지를 이용하여 순응도와 식이/생활습관 지침 준수여부를 모니터링하고 각 방문 시 재확인하도록 한다.

4.2 관찰항목

4.2.1 연구대상자 동의

방문 1 (스크리닝)에서 인체적용시험에 들어가기 전, 본 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 연구대상자에게 상세히 설명한 후 서면 동의를 받고, 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호(screening no.)를 부여한다.

4.2.2 인구학적 조사

방문 1 (스크리닝)에 성별, 생년월일, 연령을 조사한다.

4.2.3 병력 조사

방문 1 (스크리닝)에 문진과 과거 진료 기록 점검 등을 통하여 조사한다. 외과적 수술력을 포함한 병력은 스크리닝 시점을 기준으로 1년 이내 병력을 조사하고 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기 (발생년도 또는 발생년월), 치료기간, 지속여부, 연구자의 의견 등을 조사한다.

4.2.4 의약품 및 건강기능식품 복용력 조사

방문시의약품및건강기능식품복용력을조사한다. 방문 1 (스크리닝)에서는 방문 1을 기준으로 4주 이내 복용 의약품과 건강기능식품을 모두 확인한다. 또한 시험기간 중 의약품 및 건강기능식품을 복용한 경우, 종류, 복용량, 복용기간 등을 모두 조사한다.

4.2.5 음주력 및 흡연력 조사

방문 1 (스크리닝)에서 음주량, 음주습관, 식습관, 흡연여부 및 흡연력, 운동습관, 가족의 음주상태, 음주 후 나타나는 신체증상 및 정도, 음주 관련 행동 특성을 조사한다.

4.2.6 신장, 체중 및 BMI 측정

매방문시체중, 신장, BMI를 측정한다. 연구대상자가 공복상태에서 신발과 외투를 벗고, 최대한 가벼운 옷을 입은 상태로 측정한다. 각 방문에서 동일한 기계를 이용하여, 동일한 시간대에, 동일한 시험담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다한다. 각 측정값은 측정기계의 결과값과 동일한 소수점 자리까지 기재한다.

4.2.7 활력징후

매 방문시 연구대상자에게 10분 이상 안정 상태를 유지시킨 후 맥박, 혈압, 체온을 측정하여 기록한다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 연구대상자의 활력징후를 동일한 시험담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다한다.

4.2.8 임상병리검사

방문 1 (스크리닝)에 임상병리검사를 실시하여 연구대상자의 전신적인 건강상태를 평가한다. 임상병리검사를 위한 채혈은 이화여자대학교 ‘임상영양실습 및 상담실’에서 전문의료인에 의해 수행되며 검체는 연구자가 분석한다. 검사 항목은 아래와 같다.

① 혈액화학적 : ALT, AST, acetaldehyde concentration, alcohol concentration

② 활력징후 : 혈압, 맥박, 호흡, 체온 등 숙취증상에 대한 visual analogue scale

주목할만한 실험실적 비정상치 기준을 벗어나는 임상병리검사 결과는 연구대상자의 기록서 연구자 의견 (comments)란에 평가를 기재하고, 시험자의 판단에 따라 추가 평가가 필요하다고 판단될 경우 추가 평가를 실시한다.

4.2.9 식사교육 및 식이섭취조사

4.2.9.1 식사교육

방문 1 (스크리닝)에 담당 연구원은 Run-in period (-1주)부터 시험 참여기간 (2주)동안 아래 사항을 준수하도록 교육하며, 이후에도 시험 종료 전까지 매 방문 시 연구대상자들에게 관련 내용을 재교육한다.

1) 평소 식습관을 유지하되, 아래를 준수한다.

- 밥의 경우 잡곡의 비율이 1/3 이하가 되도록 한다.
- 과일 및 과일주스의 섭취를 1일 3회 분량 이하로 한다.
- 채소류의 섭취를 1일 7회 분량 이하로 한다.
- 단 간식 (사탕, 과자, 초콜릿, 당분함량이 높은 음료 등)의 섭취를 가능한 줄인다.
- 금주한다.
- 녹즙, 양파즙, 마늘즙, 흑마늘즙, 호박즙 등의 채소 엑기스류와 배즙, 포도즙 등의 과일 엑기스류를 섭취하지 않는다.
- 해조류 환, 채소 환 등을 섭취하지 않는다.
- 비타민/무기질제 등의 건강기능식품을 섭취하지 않는다.

2) 체내 당대사나 지질대사, 항산화능에 영향을 미치는 의약품(지질강하제, 항염증제, 비만 치료제, 호르몬제 등), 건강기능식품, 한약재 또는 항응고제 복용 금지

3) 방문 전날 연구기관에서 제공되는 저녁 식사를 섭취한 후 다음 날 방문 시까지 금식한다.

4.2.9.2 식습관조사

방문1(스크리닝)에는 식습관 조사를 위한 설문조사(Recommended Food Score; RFS)를 실시한다. 또한, 방문 1 (스크리닝)에 담당 연구원은 연구대상자에게 시험기간 동안 준수해야 하는 금기식품리스트를 배부하고, 해당지침 준수 여부를 확인한다.

4.2.10 순응도 및 식이/생활습관 모니터링

Smart phone application을 이용하여 순응도, 식이/생활습관 지침 준수여부를 모니터링 한다. 또한 매 방문 시 지침 준수여부를 재확인하고, 관련 지침을 재교육한다.

4.2.11 선정기준 및 제외기준 확인 (연구대상자 적합성 평가)

방문 1 (스크리닝)에 이루어진 연구대상자 동의여부와 인구학적 조사, 병력 및 의약품 복용력 조사, 신체계측, 활력징후, 임상병리 검사 등을 종합하여 선정기준/제외기준에 적합한 연구대상자를 평가한다.

4.2.12 무작위배정

본 연구는 교차설계 연구로서, 방문 1 (스크리닝)에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 연구대상자는 방문 2 (0주)에 대조군, 시판군(A,B), 으뜸 앞 초음료군, 으뜸

름 열매 초음료군으로 무작위 배정된다.

4.2.13 시험식품/대조식품 섭취

방문 2 (0주)전날 22시 이후에는 다음 날 방문 시까지 금식한다. 방문 2(0주)에 금식한 후, 방문하여 시험 식품을 섭취한다. 시험식품 섭취(0 hour, 0.5 hour, 3.5 hour, 5.5 hour)에 채혈하고, 혈액관련 바이오마커를 측정한다. 채혈은 5분 동안 안정을 취한 후 소량의 식수(200cc)를 시험 대상자에게 동시에 제공한다.

4.2.13 혈액 검사지표

임상병리검사를 위한 채혈(카테터를 이용한 정맥혈 채취)은 전문의료인에 의해 수행되며 이화여자대학교에서 분석한다.

4.2.14 이상반응 점검

연구대상자로 하여금 이상반응 발생여부를 자발적으로 보고하도록 하며, 그 외에 인체적용 시험건강기능식품 섭취기간 동안 시험담당자의 면담을 통하여 이상반응을 확인한다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 시험식품과 관련하여 취해진 조치 및 시험식품과의 인과관계, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함된다.

이상반응으로 분류되는 대표적인 증상조사에 대하여 아래에 기술하였다.

(1) 발열에 대한 점검

발열은 체온을 기록하고 발현 정도를 이상반응 평가기준에 따라 기록하며 인체적용시험용 건강기능식품과의 인과관계 및 알코올 섭취로 인한 문제점을 평가한다.

(2) 자타각적 증상에 대한 점검

자타각적 증상은 담당의사의 진료를 통하여 이상반응 발현 여부를 조사하고, 평가기준에 따라 발현 정도를 기록하며, 시험군 및 알코올 투여와의 인과관계를 평가한다.

(3) 임상병리학적 검사에 대한 점검

임상병리검사에서 어떤 비정상적인 변화는 증상호전 때까지 추적 검사를 실시 하도록 한다.

4.3 추가 방문 (필요 시)

추가방문은 예정된 방문 외에 연구대상자 요청 또는 연구자가 필요하다고 판단할 때 수시로 이루어질 수 있다.

(나) 으름 초음료의 숙취 해소 기능 확인

① 혈중 alanine aminotransferase 활성 측정

알코올 섭취에 따른 간독성 정도를 살펴보고자 혈중 alanine aminotransferase 활성을 측정하였다(Figure. 3-27). 혈중 ALT 활성은 간손상을 대변하는 지표로 알려져 있어 간질환의 마

커로 사용된다고 알려져 있다. 본 연구결과 알코올 섭취 후 1시간 후에는 혈중 ALT 활성에 그룹간의 차이가 없는 것으로 나타났다. 알코올 섭취 후 시간이 지남에 따라 혈중 ALT 활성이 증가하는 모습을 보였다. 알코올 섭취 후 5시간이 지난 후 ALT 활성을 보면 으름 발효초를 섭취한 그룹이 대조군에 비하여 ALT 활성이 낮게 나타났다. 이전의 실험 결과들과 종합하여 보았을 때, 으름 발효초의 섭취가 알코올로 인한 간손상에서 간보호 효과의 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

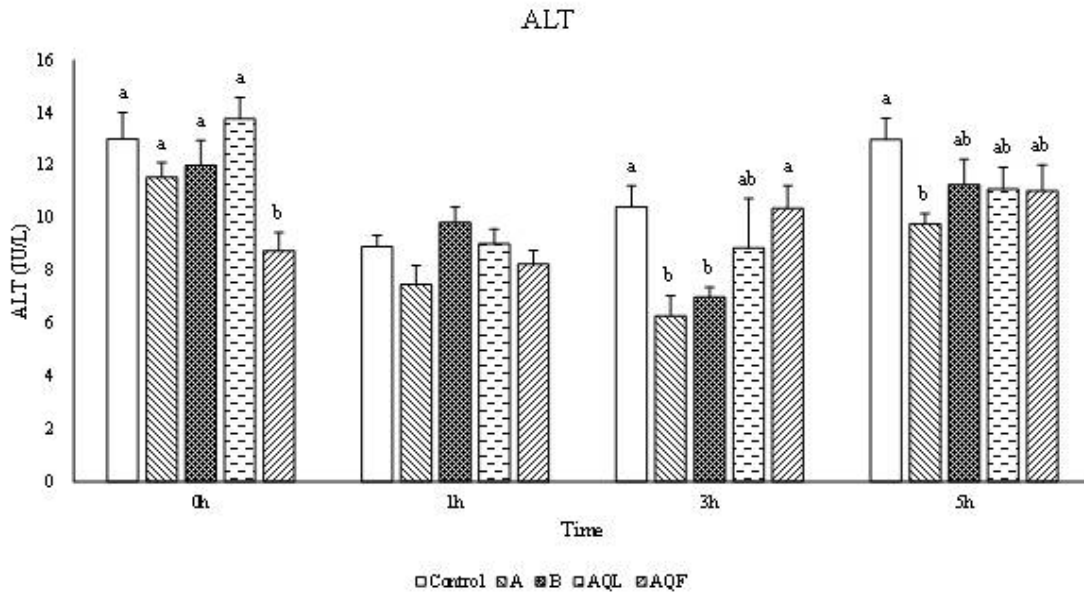


Fig. 3-27. Serum alanine aminotransferase activity between groups. ^{ab}Means with different superscripts are significantly different. Each bar represents the mean \pm standard error.

② 혈중 알코올 농도 측정

알코올 섭취 후 으름 발효초의 혈중 알코올 농도 감소 효과를 살펴보기 위하여 실험대상자를 대상으로 알코올 섭취 전 후 혈중 알코올 농도를 측정하였다(Fig. 3-28). 모든 그룹에서 혈중 알코올 농도는 알코올 섭취 3시간 후 가장 높게 나타났다. 으름 열매 발효초를 먹은 그룹에서 알코올 섭취 3시간 후 혈중 알코올 농도가 가장 낮게 나타났으며, 으름 잎 발효초를 먹은 그룹이 두 번째로 낮게 나타났다. 알코올 섭취 5시간 후 모든 그룹에서 혈중 알코올 농도가 감소하는 모습을 보였으며, 특히 으름 발효초를 먹은 두 그룹에서 대조군에 비하여 혈중 알코올 농도가 낮은 것을 확인할 수 있었다. 실험을 통하여 알코올 섭취 전 으름 발효초의 섭취는 알코올 섭취 후 혈중 알코올 농도 감소에 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 앞선 연구를 통하여 세포와 동물에서 확인한 으름의 간 보호 효과와 함께 인체 적용실험에서도 으름 발효초의 음주 후 숙취 완화 효과의 가능성을 확인할 수 있었다.

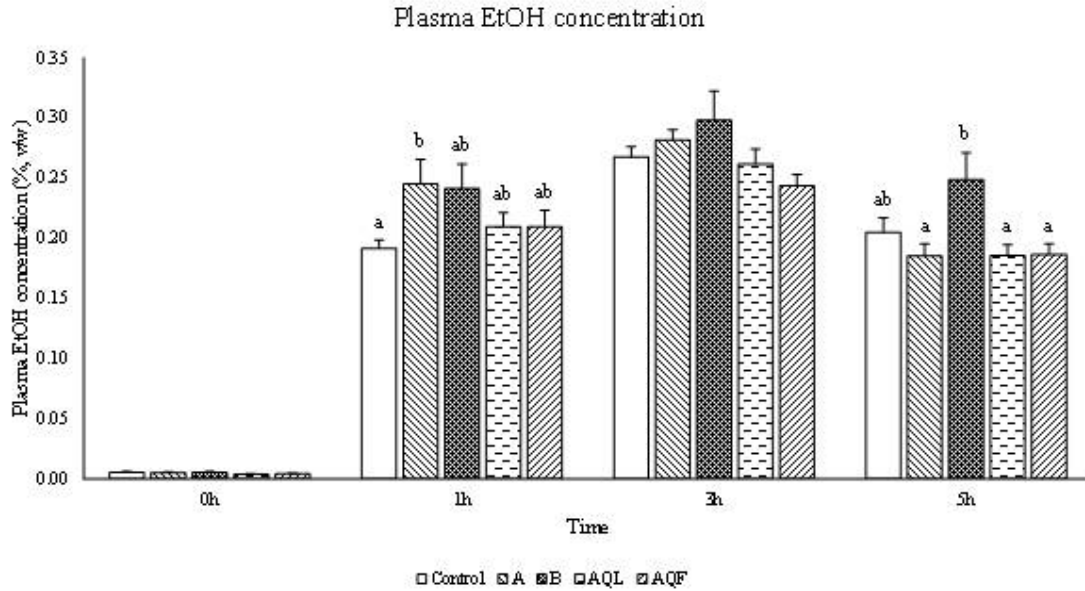


Fig. 3-28. Serum ethanol concentration before and after alcohol consumption. ^{ab} Means with different superscripts are significantly different. Each bar represents the mean±standard error.

③ 으름 발효초의 관능평가

대조군과 기존의 시판 숙취해소음료 2종 그리고 으름 발효초 2종의 관능평가 결과는 Table 3-7 에 나타내었다. 평가결과 외관, 조직감, 색, 향, 이취, 전체적 기호 모든 부분에서 으름 발효초는 기존의 시판 숙취해소음료에 비하여 낮은 점수를 받았으며, 특히 향과 기호도에서 낮은 점수를 받았다. 하지만 실험에 사용한 으름 발효초는 상품화 과정을 거치지 않은 시험제품으로, 시장에 제품으로 출시되기 위해서는 상품성 개선과 같은 발전 과정이 필요할 것이라 생각 된다.

Table 3-7. Sensory evaluation survey of commercial hangover beverages and fermented *A. quinata* extracts.

	Control		A		B		AQL		AQF	
	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
Appearance	4.50	2.37	4.38	1.06	4.30	1.34	1.70	1.16	2.90	1.85
Texture	4.00	1.89	5.88	1.46	4.60	1.26	3.20	0.92	2.90	1.79
Color	4.50	2.17	4.75	1.83	4.10	1.37	2.20	1.14	3.20	1.87
Scent	4.00	1.94	5.63	1.51	4.30	1.25	3.10	1.37	2.10	1.66
Nasty smell	3.60	1.96	2.25	1.91	4.50	0.71	4.70	1.95	3.90	1.60
Overall taste	4.00	1.94	6.00	0.53	5.10	1.10	2.70	0.95	2.20	1.48

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

(1) 연구성과 목표 (2012년 최초 계획서에 나온 목표입니다. 최종적으로 확인 부탁드립니다.)

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종명칭 명칭 등록	품종생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	1							2		
	달성	2							2		
2차 년도	목표	1	1					2	2		
	달성	2						2	3		
3차 년도	목표	1	1					2	2		
	달성	2	1					3	1		
계		6	1					5	6		

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 산업화 성과 및 방향

나. 논문게재 성과

1협동

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013.	으름열매를 첨가한 막걸리의 이화학적 특성 및 생리 활성	이준기	안정희	조현주, 김경임, 윤진아, 정강현, 송병춘	한국식품과학회지	45(5) 879~885,	국내	
2013	으름잎 분말을 첨가한 머핀의 품질특성,	이준기	안정희	이강주, 조현주, 김경임, 윤진아, 정강현, 송병춘	한국식품영양학회지	45(5), 619-627	국내	
2014	누룩과 입국을 달리한 막걸리에서 항균활성을 가진 미생물의 분리동정	이준기	안정희	조현주, 윤진아, 정강현, 송병춘, 김경임	한국식품영양과학회지	43(4), 577~583	국내	
2014	으름 어린잎 식초의 품질특성과 생리 활성	권우영	안정희	이은경, 윤진아, 정강현, 이권재, 송병춘	한국식품영양과학회지	43(7), 989~998	국내	
2014	으름 열매 식초의 품질특성 및 항산화 활성	이은경	안정희	권우영, 이지원, 윤진아, 정가현, 송병춘	한국식품영양과학회지	43(8), 1217~1227	국내	
2014	Targeted Anticancer Activities of Silver-Coated Maghemite	이권재	안정희	정강현, 신재수, 김동희	Science of Advanced Materials	6 (1 1) 2435-2439	국외	sci
2014	Anti-inflammatory and Photoprotective Effects of Magnetic Nanoparticles against Ultraviolet-induced Photoaging in Human Skin Cells	이정민	안정희	신재수	Science of Advanced Materials	6 (1 1) 2501-2504	국외	sci
2015	.Radical Scavenging Activities of Tannin Extracted from	조현주	안정희	이준기, 이권재, 윤진아,	Journal of Microbiology and	25 (6) , 795 -	국내	scie

	A m a r a n t h (<i>Amaranthusspp.L.</i>)			정강현, 송병춘	Biotechnolo gy	802,		
2015	Antitumor and F r e e Radical-Scavengin g Activities of Various Extract Fractions of Fruits and Leaves from Prunus mume	김경지	안정희	노규아, 지현아, 임한솔, 정강현, 이권재, 송병춘,	한국식품 영양과학 회지	44(8) 1137-1 143	국내	
2015	Tumor Targeting of Hederagenin-Loaded M a g n e t i c Nanoparticles for Anti-Cancer Drug Delivery	이권재	안정희		Advanced materials letters	accept	국외	scie
2015	Protective Effects of a Beverage Containing Akebia quinata extract and A k e b i a quinata Sikhye on Alcohol-induced Hepatotoxicity in Rats.	송다혜	안정희	김경지 유한석 정강현 이권재 송병춘	F o o d s c i e n c e a n d Bbiotechnol ogy	u n d e r review	국내	scie
2015	Protective Effects of Hederagenin and an Ethanol Extract from Akebia quinata Fruit on Alcohol-Induced Liver Injury	김경지	안정희	송다혜 유한석 정강현 이권재 송병춘	F o o d s c i e n c e a n d Bbiotechnol ogy	u n d e r review	국내	scie

2협동

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자			
2014	Protective Effects of Akebia quinata Fruit Extract on Acute Alcohol-induced Hepatotoxicity	이상훈	고광석	송영선 이서연 김소영	Food Science and Technology	46(5)	SCI E

	in Mice						
2015	Effects of Oleanolic acid and hederagenin on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice	정수한	고광석	이상훈	한국식품영양과학회지	2015년 12월 개제확 정	SCI E
2015	Effect of beverage containing fermented Akebia quinata extracts on alcoholic hangover	정수한	고광석	이상훈 송영선 이서연 김소영	Preventive Nutrition and Food Science	Under review	SCI E
2015	Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of Akebia quinata extracts in acute alcohol-induced hepatotoxicity in vitro	이상훈 송영선	고광석		Nutrients	Under review	SCI
21015	Effects of morphological characteristics of muscle fiber on porcine growth performance and pork quality	이상훈 김준모	고광석 류연철		Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	Under review	SCI

다. 특허 성과

1협동

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	으름열매에서 올레아놀릭산을 분리정제하는 방법 및 분리정제된 올레아놀릭산을 포함하는 향산화, 향염증 및 향암 조성물	안정희	국내	10-2013-0091838	2015	으름열매를 첨가한 막걸리 제조방법 및 그 제조된 으름열매 막걸리	안정희	대한미국	10-2013-0065540
2013	으름열매를 첨가한 막걸리 제조방법 및 그 제조된 으름열매 막걸리	안정희	국내	10-2013-0065540					
2014	향산화, 향암 및 항균활성을 갖는 으름잎식초의 제조방법, 제조된 으름잎식초 및 이를 함유하는 기능성 식품조성물	안정희	국내	10-2014-0046442					
2014	향산화활성을 갖는 으름열매식초의 제조방법, 제조된 으름열매식초 및 이를 함유하는 기능성 식품조성물	안정희	국내	10-2014-0046443			안정희	국내	10-1610737

2협동

성과발생년도	종류	명칭	인물정보	출원번호
2015	특허	급성 알코올 간독성을 유발한 생쥐에 있	출원인	10-2015-0

		어서 으름 열매 추출물의 간기능 보호효과	이화여자대학교 산학협력단 발명자 고광석 이서연 이상훈 김소영 송영선	022110
2015	특허	으름 발효초음료의 음주후 숙취개선 효과	<출원인> 이화여자대학교 산학협력단 <발명자> 고광석 김소영	출원중 (산학 업무 처리중)

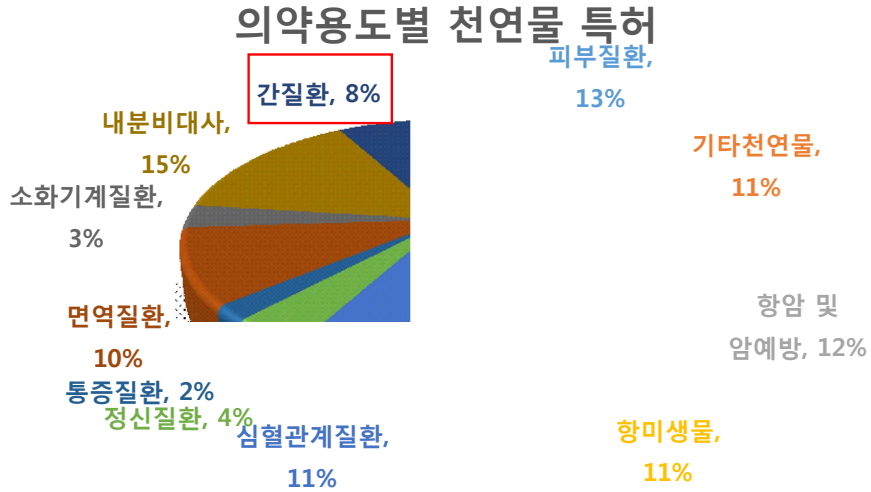
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 현재 간질환 관련 해외 및 국내 약물의 종류와 특징은 다음과 같음

목표 효능	약물종류	기원	대상 질환과 특징
간의 대사 촉진회복	Ursodeoxycholic acid (UDCA)	담즙성분의 하나로 현재는 전세계적으로 합성, 시판 중, 국내는 우루사 과일 야채유래였으나	주로 지방간과 만성피로에 보조약으로 쓰이며 만성 간손상에도 복용함
	Vitamin C	현재는 합성 시판중	
간세포보호손상억제	실리마린(Legalon)	복합추출물 인도에서 8가지의 한약제	간세포 파괴가 일어나는 간염과 간염을 동반한
	Liv-52	복합추출물 DDB제제라 하며 오미자의	간경화, 간암 등에도 처방함. 임상적으로 중요한
	Biphenyl dimethyl dicarboxylate 함유제제	유효성분 Schizandrin C 와 유사한 구조를 가지는	간의 섬유화 예방과 치료는 효과 없음
		합성 동족체	
바이러스 증식억제	인터페론	바이러스 증식 억제	
	라미부딘(제픽스)	싸이토카인 HIV바이러스연구중에발견된Nucleosideanalog	모두가 근본적으로 간염바이러스를 제거하지 못하며 5년 이내 내성 발생
	아데포비르(헵세라)	HBV 바이러스의 역전사효소방해	

- 간질환에 대해 약물은 크게 간염바이러스의 억제를 목표로 하는 약물과 간세포 보호 및 손상회복을 목표로 크게 구별 할 수 있음. 주로 바이러스를 목표로 하는 약물들은 단일 화학 제제로 바이러스의 증식억제를 목표로 하는데 5년 이내의 내성의 바이러스의 출현이 주요 난제임.
- 간세포보호 및 손상회복을 목적으로 하는 약물은 천연물이나 한약물의 추출물 또는 복합제가 주도 하도 있고, 이러한 약물은 바이러스성 간질환 환자에게도 공히 사용가능함.
- 간세포 보호 및 손상회복을 목적으로 하는 천연물이나 복합제가 주도하는 산업구조에서 본 연구의 복합제제는 알콜성 간질환 및 만성 비알콜성 간질환의 개선, 바이러스성 간손상 회복에 그 목적을 두고 있음.
- 본 연구를 통해 천연 추출물의 표준화와 안전성 확보를 통해 경쟁력을 확보 할 수 있을 것으로 사료 됨.
- 간질환에 치료약에 대한 원천기술은 대부분 외국에서 가지고 있는 현실이며 다만 국내에서는 기존의 기술을 응용한 연구는 우리나라를 비롯한 동양권에서 활발히 이루어지고 있음.
- 간질환 중에서도 한약재나 자연 추출물을 통한 간세포보호 및 치료제 개발의 기술과 경험이 매우 뒤쳐져 있는 것이 현실임.
- 국가적 지원에도 불구하고 국외로의 특허 진출도 매우 부진한 상태임.

- 한편 국내에서의 천연물 간질환 관련 특허는 천연물 유래 질병관련 특허 전체의 약 8% 차지함.



- 중국은 풍부한 생약자원 및 축적된 전통지식을 바탕으로 활발한 연구개발을 진행 중이며, 전통 약에 대한 정부의 적극적 지원의 일환으로 국립 신형간병약물연구소를 설립해 한약을 중심으로 한 약물 개발에 3년간(2002~2005년) 1천 1백만불을 투입함.
- 미국의 경우 과거 자료이지만 2003년 기준으로 3억 8천만 불의 연구비를 간질환 연구에 배정 하였으며, 1998년 National Center for Complementary and Alternative Medicine (NCCAM)을 발족 시키면서 천연물을 이용한 간질환 연구에 본격적인 시도를 하고 있음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 해당 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

○ 연구실 안전조치 이행

본 연구실은 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 따른 교내 안전지침을 준수하고 있다.

본교에서는 연구실 안전환경조성법 제 8조(안전점검 실시)에 의거 이화여자대학교 안전관리 팀의 주최 하에 각 분야별 자격과 인력을 갖춘 전문기관에 의뢰하여 매년 정기적인 연구실 안전점검을 통해 정밀안전진단을 실시하고 있다. 또한, 교내 연구실들의 안전을 위해 최근 본교에서는 다음과 같은 지침을 내렸으며, 각 연구실들은 학교의 안전관리를 위한 지침 준수를 통해 안전관리에 최선을 다하고 있다.

*실험실 안전점검 대비 확인사항

- 가. 시약장 보호가대 유무 및 18ℓ 캔통 시약은 실험실내 보관 금지 → 위험물 저장소에 보관.
- 나. 가스용기 밸트고정 및 누설유무는 스프레이로 확인 → 매일점검.
- 다. 실험복, 안전보호구 착용, 80cm 이상 실내 통로확보, 복도(계단)통로 2m이내 물건적재 금지.
- 라. 매일점검표, 매월점검표 작성 및 비치 유무 → 서류 파일
- 마. 유해위험물질, 위험 기계기구 및 전기기구 등의 취급요령 숙지.
- 바. 화재발생시 당황하지 말고 코크와 밸브를 잠그고, 소화기로 화재진압 후 대피.
- 사. 퇴실시 수도, 가스, 전기전원 차단.
- 아. 실내 정리정돈과 사용치않는 집기류는 버리거나 불용처리.

본 연구실은 교내 안전지침에 의거 “매일점검표”와 “매월 안전점검표”를 연구실 내에 비치하여 연구실 내의 안전에 주의하고 있다. 먼저, 매일점검표를 통해 화학물질이나 고압가스 등 안전에의 위험도가 높은 부분에 대한 안전점검을 매일 실시하고 있으며, 매월 4일에는 일반사항, 실험건물 및 실험실, 보호구, 실험실 안전장치, 실험용구 및 기계·기구, 실험실 폐기물의 관리, 화공약품, 기계, 전기 기구 등, 방사성 취급 등에 대한 안전점검을 자체적으로 점검하여 실시하고 있다. 그리고 혹시 모를 비상상황에 대비하여 연구실내에 항상 긴급 비상연락망 및 연구실내 모식도와 시약종류 및 현황을 각각 정리하여 눈에 잘 띄는 곳에 비치해두고 있다. 또한, 매 학기 진행되는 교내 안전교육에 참여하여 연구실 내 안전에 주의를 기울이고 있다.

또한 모든 실험 구성원은 본교에서 진행되는 안전관리 교육(연구자 윤리 교육포함)을 이수하지 못할 경우 연구실 자체의 출입이 제한되고 있어 모든 실험실 구성원은 안전관리 교육을 매년 시행하여 이수 한 후 연구실 출입과 연구 활동에 종사하고 있음을 밝힌다.

제 9 장 참고문헌

1. Kim MJ, Choi JH, Kwon SH, Kim HD, Bang MH, Yang SA. 2013. Characteristics of fermented dropwort extract and vinegar using fermented dropwort extract and its protective effects on oxidative damage in Rat Glioma C6 Cells. *Korean J Food Sci Technol* 45: 350-355.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165: 215-219.
3. Moon JH, Park KH. 1995. Functional components and physiological activity of tea. *J Korean Tea Soc* 1: 175-191.
4. Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci Tech* 6: 75-82.
5. Elena V, Davide T, Angela C. 2007. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem* 105: 564-571.
6. Masinoa F, Chinnicib F, Bendinic A, Montavecchia G, Antinellia A. 2008. A study on relationships among chemical, physical, and qualitative assessment in traditional balsamic vinegar. *Food Chem* 106: 90-95.
7. Woo KS, Ko JY, Song SB, Lee JS, Kang JR, Oh BG, Nam MH, Jeong JH, Jeong HS, Seo MC. 2010. Physicochemical characteristics of vinegars fermented from cereal crops with *Incalgyun*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1171-1178.
8. Hong SM, Moon HS, Lee JH, Lee HI, Jeong JH, Lee MK, Seo KI. 2012. Development of functional vinegar by Using cucumbers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 927-935.
9. Mo HW, Jung YH, Jeong JS, Choi KH, Choi SW, Park CS, Choi MA, Kim ML, Kim MS. 2013. Quality characteristics of vinegar fermented using omija (*Schizandra chinensis* Baillon). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 441-449.
10. Park SY, Chae KS, Son RH, Jung JH, Im YR, and Kwon JW. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of bokbunja (Black Raspberry) vinegars. *Food Engineering Progress* 16: 340-346.

11. Jeong JH. 2013. Development and antioxidant effect of vinegar with concentrated apple Juice. *MS Thesis*. Suncheon National University, Suncheon, Korea.
12. Hong SM. 2012. Antioxidant effect of tomato vinegar. *MS Thesis*. Suncheon National University, Suncheon, Korea.
13. Choi SY. 2010. Studies on biological activity and beverage development of extracts from mulberry. *PhD Dissertation*. Daegu Haany University, Kyeongsan, Korea.
14. Jo YL. 2013. Manufacturing of green tea-treated *Maggeolli* and vinegar. *MS Thesis*. Chonnam National University, Gwangju, Korea.
15. Choi SK. 2013. Quality Characteristics and Antioxidative activity of Herb Vinegar Prepared with puffed rice and lemon balm. *MS Thesis*. Chonbuk National University, Jeonju, Korea
16. Chung BH, Seo HS, Kim HS, Woo SH, and Cho YG. 2010. Antioxidant and Anticancer Effects of Fermentation Vinegars with *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Medical Crop Sci* 18: 113-117.
17. Kwon SH, Jeong EJ, Lee GD, Jeong YJ. 2000. Preparation method of fruit vinegars by two stage fermentation and beverages including vinegar. *Food Indus Nutr* 5: 18-24.
18. Kang SM, Lee HN. 2010. The effect of imbibing collagen and vinegar simultaneously on the serum of climacteric women. *J Kor Soc Cosm* 16: 1051-1064
19. Ann YG, Kim SK, Shin CS. 2001. Studies on Wax Gourd-Ginseng Vinegar. *Korean J Food & Nutr* 14: 52-58.
20. Lee MK, Choi SR, Lee J, Choi YH, Lee JH, Park KU, Kwon SH, Seo KI. 2012. Quality Characteristics and Anti-Diabetic Effect of Yacon Vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 79-86.
21. Lee DS, Ryu IH, Lee KS, Shin YS, Jeon SH. 1999. Lipase activity inhibition effect and fermentation conditions of aloe vinegar of using the *Acetobacter* sp. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 105-110.
22. Kim MK, Kim MY, Youn EK, Kim SD. 2002. Extraction of citrus bioflavonoid with

- vinegar and effect on blood pressure. *Korean Journal of Food Preservation* 9: 411-417.
23. Shim WM, Lee SH. 2000. Bioactive Functions of Vinegar. Jangan College *Industry Academy Cooperation* 9: 29-36.
24. Lee JK, Jo HJ, Kim KI, Yoon JA, Chung KH, Song BC, and An JH. 2013. Physicochemical characteristics and biological activities of *Makgeolli* Supplemented with the fruit of *Akebia quinata* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 45: 619-627.
25. Kang SS. 1998. *Chinese Herbal Medicine Dictionary* Shanghai Science Publisher , Shanghai, China. p 5822-5824.
26. Chang KW, Oh IS, Lee JH. 1997. Effect of dietary erythritol supplemented with chitosan, extracts of *Akebia* and extracts of *Ishige* on the growth of mutans streptococci. *J Korean Acad Oral Health* 21: 545-552.
27. Kang HS, Kang JS, Jeong WS. 2010. Cytotoxic and apoptotic effects of saponins from *Akebia quinata* on HepG2 hepatocarcinoma Cells. *Korean J Food Preserv* 17: 311-319.
28. Han BJ, Woo SK, Shin HK. 1995. Effects of the water extract of *Akebia* (*Akebia quinata* Decaisne) on the growth of *Clostridium perfringens* and some intestinal microorganisms. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 633-640.
29. Mimaki Y, Doi S, Kuroda M, Yokosuka A. 2007. Triterpene glycosides from the stems of *Akebia quinata*. *Chem Pharm Bull* 55: 1319-1324.
30. Kawata J, Kameda M, Miyazawa M. 2007. Constituents of essential oil from the dried fruits and Stems of *Akbia quinata* (THUNB.) DECNE. *Journal of Oleo Sci* 56: 59-63.
31. Mimaki Y, Kuroda M, Yokosuka A, Harada H, Fukushima M, Sashida Y. 2003. Triterpenes and triterpene saponins from the stems of *Akebia trifoliata*. *Chem Pharm Bull* 51: 960-965.
32. Rim AR, Kim SJ, Jeon KI, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2006. Antioxidant Activity of extracts from *Akebia quinata* Decne. *J Food Sci Nutr* 11: 84-87.

33. Kim JY, Yi YH. 2010. pH, acidity, color, amino acids, reducing sugars, total sugars, and alcohol in puffed millet powder containing millet Takju during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 42: 727-732.
34. Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. *Am J Ecol Vitic* 28: 49-56.
35. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
36. Zou Y, Lu Y, Wei D. 2004. Antioxidant activity of flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L in vitro. *J Agric Food Chem* 52: 5032-5039.
37. Park HS. 2013. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Sasa quepaertensis* Extracts. *MS Thesis*. Seoul National University of Science & Technology, Seoul, Korea.
38. Arnao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 73: 239-244.
39. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
40. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
41. Hong SM, Kang MJ, Lee JH, Jeong JH, Kwon SH and Seo KI. 2012. Production of vinegar using *Rubus coreanus* and its antioxidant activities. *Korean J Food Preserv* 19: 594-603.
42. Ko YJ, Jeong DY, Lee JO, Park MH, Kim EJ, Kim JW, KimYS, Ryu CH. 2007. The establishment of optimum fermentation conditions of prunus mume vinegar and its quality evaluation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 361-365.
43. Kim DH. 1999. Studies on the Production of Vinegar from Fig. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 53-60.

44. Baek CH, Jeong DH, Baek SY, Choi JH, Park HY, Choi HS, Jeong ST, Kim JH, Jeong YJ, Kwon JH, Yeo SH. 2013. Quality characteristics of farm-made brown rice vinegar via traditional static fermentation. *Korean J Food Preserv* 20: 564-572
45. Shin JS, Lee OS, Jeong YJ. 2002. Changes in the components of onion vinegars by two stages fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1079-1084.
46. Lee JC, Han WC, Lee JH1, Jang KH. 2012. Quality evaluation of vinegar manufactured using rice and *rosa rugosa* thunb. *Korean J Food Sci Technol* 44: 202-206
47. Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. 1997. Quality characteristics in mash of takju prepared by using different nuruk during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 29: 555-562.
48. Fine AM. 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical application. *Altern Med Rev* 5: 114-151.
49. Na HS, Choi GC, Yang SI, Lee JH, Cho JY, Ma SJ, Kim JY. 2013. Comparison of characteristics in commercial fermented vinegars made with different ingredients. *Korean J Food Preserv* 20: 482-487.
50. Seo JH, Jeong YJ, Shin SR, Kim KS. 2000. Effects of tannins from astringent persimmons in alcohol fermentation for persimmon vinegars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 407-411.
51. Cho YJ, An BJ, Choi C. 1993. Isolation and enzyme inhibition of tannins from korean green tea. *Korean Biochem J* 26: 216-223.
52. Cho YJ, Chun SS, Choi C. 1993. Inhiitory effect of condensed tannins isolated from korean green tea against xanthine oxidase. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 418-422
53. Kim JK, Cha WS, Park JH, Oh SL, Cho YJ, Chun SS, Choi C. 1997. Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from korean green tea. *Korean J Food Sci Technol* 29: 173-177.
54. Choi IS, Lee KH, Lee SS, Oh SH. 1997. Effect of tannin on lipid metabolism in 6 college women. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 920-926.
55. Yoon YD. 2009. Quality Characteristics of Ethanol Induced Hangover in Drink

- Added the Persimmon Vinegar. *MS Thesis*. Kyungpook National University, Daegu, Korea.
56. Shin YK. 2006. Utilization of Persimmon Peel and Its Tannin Extract for Animal Feeding. *PhD Dissertation*. Konkuk University, Seoul, Korea.
57. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activity of the some commercial teas. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727.
58. Cho WG, Han SK, Sin JH, Lee JW. 2008. Antioxidant and antioxidative activities of *Rubus coreanus* Miq. extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 820-825.
59. Moon YG, Choi KS, Lee KJ, Kim KY, Heo MS. 2006. Screening of antioxidant and antibacterial activity from hot water extracts of indigenous plants, Jeju-island. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21: 164-166.
60. Yoshino M, Murakami K. 1998. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40-44.
61. Hassas-Roudsari M, Chang PR, Pegg RB, Tyler RT. 2009. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanol and hot water extraction. *Food Chem* 114: 717-726
62. Nam HS, Chang SM, Kang MY. 2003. Varietal difference in antioxidative activity of ethanolic extracts from colored rice bran. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 16-22.
63. Kim HS, Hong MJ, Kang IY, Jung JY, Kim HK, Shin YS, Jun HJ, Suh JK, Kang YH. 2009. Radical scavenging activities and antioxidant constituents of oriental melon extract. *J Bio-Environment Control* 18: 442-447.
64. Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK. Research advances in ethanol metabolism. *Pathol. Biol.* 49: 676-682 (2001)
65. Lee EH, Chyun JH. Effect of β -carotene supplementation on lipid peroxide levels and antioxidative enzyme activities in alcoholic fatty liver rats. *Korean J. Nutr.* 38: 289-296 (2005)
66. Cha YS, Sachan DS. Acetyl carnitine-mediated inhibition of ethanol oxidation in

hepatocytes. *Alcohol* 12: 289–294 (1995)

67. Rouach H, Clement M, Ofanelli MT, Janvier B, Nordmann J, Nordmann R. Hepatic lipid peroxidation and mitochondrial susceptibility to peroxidative attacks during ethanol inhalation and withdrawal. *Biochem. Biophys. Acta* 753: 439–444 (1983)
68. Peters TJ. Ethanol metabolism. *Brit. Med. Bull.* 38: 17–20 (1982)
69. Pikkarainen PH, Salaspuro MP, Lieber CS. A method for the determination of free acetaldehyde in plasma. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 3: 259–261 (1979)
70. Umulis DM, Gurmen NM, Singh P, Fogler HS. A physiologically based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings. *Alcohol* 35: 3–12 (2005)
71. Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res. Health* 27: 220–231 (2003)
72. Jung BS. Metabolic effects of alcohol. *Korean J. Food Nutr.* 4: 207–211 (1991)
73. Rouach H, Clement M, Ofanelli MT, Janvier B, Nordmann J, Nordmann R. Hepatic lipid peroxidation and mitochondrial susceptibility to peroxidative attacks during ethanol inhalation and withdrawal. *Biochem. Biophys. Acta.* 753: 439–444 (1983)
74. Moncade C, Torres V, Varghese G, Albano E, Israsel Y. Ethanolderived immuno reactive species formed by radical mechanisms.
75. Lu, S. C. : Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13, 1169 (1999).
76. Wu D, Cederbaum AI., Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcohol Clin Exp Res.* Apr;25(4):619–28. (2001)
77. Lettron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. 1996. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 24: 200–208.
78. Balanehru S, Nagarajan B. 1991. Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. *Biochem int* 24: 981–990.
79. Hoog JO, Ostberg LJ. 2011. Mammalian alcohol dehydrogenase—a comparative investigation at gene and protein levels. *Chem Biol Interact* 191: 2–7.
80. Abdellah M, Demelliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. 2001. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver,

- brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 737–743.
81. Ko KS, Yang H, Nouredin M, Iglesia-Ara A, Xia M, Wagner C, Luka Z, Mato JM, Lu SC. 2008. Changes in S-adenosylmethionine and GSH homeostasis during endotoxemia in mice. *Lab Invest* 88: 1121–1129.
 82. Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. 2004. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci* 1019: 346–349.
 83. Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. 1995. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 108: 218–224.
 84. Lee SH, Song YS, Lee SY, Kim SY, Ko KS. 2014. Protective effects of *Akebia quinata* fruit extract on acute alcohol induced hepatotoxicity in mice. *Korean J Food Sci Technol* 46: 622–629.
 85. Higuchi R, Kawasaki T. 1976. Pericarp saponins of *Akebia quinata* Decne. I. Glycosides of hederagenin and oleanolic acid. *Chem Pharm Bull* 24: 1021–1032.
 86. Ikuta A, Itokawa H. 1988. A triterpene from *Akebia quinata* callus tissue. *Phytochemistry* 27: 3809–3810.
 87. Ji C, Deng Q, Kaplowitz N. 2004. Role of TNF- α in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology* 40: 442–451.
 88. Zhao XJ, Dong Q, Bindas J, Piganelli JD, Magill A, Reiser J, Kolls JK. 2008. TRIF and IRF-3 binding to the TNF promoter results in macrophage TNF dysregulation and steatosis induced by chronic ethanol. *J Immunol* 181: 3049–3056.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.