

발 간 등 록 번 호

보안과제(), 일반과제(○)

11-1541000-001242-01

감초로부터 지구력 증강 및 운동모방형 체중조절용 기능성 식품 개발

Development of functional food for reinforcement of
endurance and exercise mimetics from licorice

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

농림수산식품자료실



0004544

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “감초로부터 지구력 증강 및 운동 모방형 체중조절용 기능성 식품 개발”
과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 12 월 19 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 안 지 윤

세부연구책임자 : 안 지 윤

세부연구책임자 : 하 태 열

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 이 현 정

연 구 원 : 김 선 아

협동연구기관명 : (주) 머젠스

협동연구책임자 : 박 명 규

연 구 원 : 노 태 철

연 구 원 : 김 누 리

연 구 원 : 이 규 대

위탁연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 강 호 율

연 구 원 : 정 현 령

요 약 문

I. 제 목

감초로부터 지구력 증강 및 운동 모방형 체중조절용 기능성 식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

비만은 비만 그 자체뿐만 아니라 이로 인한 당뇨, 심혈관, 동맥경화와 같은 대사성 질환을 유발하고, 암의 발병율과도 관련성이 높은 것으로 알려져 고령화 사회의 삶의 질을 저하시키고, 막대한 의료비 지출을 초래한다. 뿐만 아니라 비만은 질병의 측면이 아니라 아름다움을 추구하는 미적인 측면에서도 심각한 문제를 초래하므로 항비만 식품에 대한 요구도는 계속 증가하고 있는 실정이다.

특히, 식품성분이 인체에 미치는 효능이 과학적으로 구명되고, 식품의 기능성이 중요시됨에 따라, 종래의 약물에 의한 치료중심에서 식품에 의한 예방중심으로 그 요구가 증대되고 있으며 그중에서도 식품의 선택에 가장 큰 영향을 받는 체중조절용 건강기능식품시장은 전세계적으로 기능성 식품 중 가장 큰 시장을 형성하고 있다. 본 연구에서는 감초로부터 운동모방 (exercise-mimic) 작용을 통한 체중 조절 및 지구력 증강을 통한 운동 수행 능력 향상 효능을 동시에 지니는 새로운 개념의 건강 기능식품 제품화를 위한 기능성 원료를 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 감초 추출물의 기능성 원료 소재화
 - 감초 추출물의 기능/지표 성분 설정
 - 감초 활용 기능성 원료 생산 위한 추출 공정 최적화
 - 기능성 원료 생산을 위한 기능성 증진 공정 개발

2. 감초의 체중조절 효능 평가
 - 고지방 식이 유도 비만에 대한 감초의 효능 평가
 - 감초 기능 성분의 항비만 효능 기전 구명

3. 감초의 지구력 증진 효능 평가
 - 감초 추출물의 운동 수행능 증진 효능 평가
 - 감초 섭취의 저항성 운동 후 반응에 미치는 영향 측정
 - 감초 기능성 소재의 지구력 증진 기전 구명

4. 감초 활용 건강기능식품 제품화
 - 효능 증진 목적의 최적 formula 개발
 - 감초 활용 건강기능식품 시제품개발

IV. 연구개발결과

1. 감초 추출물의 기능성 원료 소재화

감초의 기능/지표 성분 설정 위해서 감초 유래 기능 성분의 지방세포 분화 억제능을 측정하고 결과 글라브리딘이 우수한 효능을 나타냈다. 글라브리딘 함유량이 높은 추출 조건 확립을 위해서 용매별 추출물의 글라브리딘 함량을 측정하고 결과 초임계 추출시 글라브리딘/글리시리진 비가 높은 추출물을 얻을 수 있었다. 추출물 종류별 지방세포 분화 억제능을 비교한 결과 감초 초임계 추출물의 활성이 높았다. 글라브리딘 추출 순도를 높이기 위한 감초 활용 원료 생산 위한 추출 공정은 초임계 추출이 순도가 높은 장점이 있었으나 대량 생산이 어려워 주정을 활용한 추출 조건으로 최적화 하였다. 원료 생산을 위한 기능성 증진을 위해 주정과 물의 조합을 이용하는 제조 공정을 개발하였다.

2. 감초의 체중조절 효능 평가

고지방 식이 유도 비만에 대한 감초의 효능 평가를 위해 8주간 감초 추출물 포함 고지방 실험 식이를 급여하였다. 감초 열수 및 초임계 추출물 급여군에서 체중 증가가 억제되었고 지방 조직의 무게가 감소되었다. 또한 간지방증 및 인슐린 저항성의 개선 효과도 관찰되었다. 이러한 감초의 항비만 효능은 간의 대사관련 효소 유전자 발현 조절과 관계가 있는 것으로 판단되었다. 추출물 뿐 아니라 감초 개발 제형도 고지방 식이 유도 비만을 개선하는 것을 관찰하였다. 즉, 지방세포의 비대 억제, 간 및 혈중 지질 개선, 인슐린 저항성 회복 등의 긍정적인 효능을 보였으며 개

발된 제형의 안전성 또한 확인하였다.

3. 감초의 지구력 증진 효능 평가

감초 소재의 항비만 효능 이외에 운동 지구력에 미치는 영향을 평가하기 위하여 고지방 식이 유도 비만 마우스에서 감초 추출물 함유 실험 식이를 9주간 급여하면서 최대 운동 수행능을 측정하였다. 그 결과 감초 열수 및 초임계 추출물은 체중 증가 억제 효능 뿐 아니라 최대 운동 수행 증진 효능도 유도하는 것을 확인 하였다. 이러한 감초 추출물의 지구력 증진 효능이 감초에 의한 효능이 아닌 체중 감소에 의한 이차적인 효과인지 검증하기 위하여 정상 동물을 대상으로 감초의 지구력 증진 효능을 평가하였다. 감초 추출물은 양성 대조군인 크레아틴 투여군에 비해 최대 운동 수행능을 증진 시켰고 근육 내 산화적 스트레스 억제와 근피로 감소 등의 효능을 나타냈다. 즉 감초가 항비만 효능과 지구력 증진 효능을 동시에 나타내는 소재임을 확인하였다. 또한 감초 추출물 포함 음료 섭취시 혈중 creatine kinase가 감소하고 운동 후 인슐린 및 혈당 수치가 감소하였다. 이러한 감초의 운동 수행능 증진 효능은 근육 대사 조절의 필수적 전사 인자인 PGC-1 α 를 증가를 통한 미토콘드리아생합성 및 활성 증가를 통해 유도됨을 확인하였다.

4. 감초 활용 건강기능식품 제품화

감초 유래 기능성 원료를 활용하여 건강기능 식품 제품화를 위해서 부재료, 부형제, 원료 안정성 등의 검토를 통해 최적 Formula 조건을 확립하였고 연질캡셀 및 경질캡셀의 시제품을 개발하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제 수행을 통하여 감초로부터 체중조절 및 운동 수행능 증진 효능을 동시에 지니는 복합 기능성 원료를 개발하였다. 감초 유래 기능성 원료는 체중 조절 효과 뿐 아니라 운동모방 효능을 동시에 지니는 새로운 컨셉의 복합 기능성 소재로 섭취시 체내가 운동시의 상태로 전환되고 지구력 증강 효능이 있어 운동시 운동 효율이 증가되는 시너지 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 기능성 원료를 활용하여 체중 조절 및 지구력 증진 목적의 건강기능식품 제품 개발 및 산업화를 추진을 통해 항비만 건강기능식품 시장에 새로운 히트 제품이 될 수 있도록 전략적으로 개발 추진하는데 활용될 것이다.

Summary

I. Title

Development of functional food for reinforcement of endurance and exercise mimetics from licorice

II. Objective and Significance

Obesity is closely associated with life-style-related diseases, such as hyperlipidemia, hypertension, arteriosclerosis, type 2 diabetes mellitus, and cancer. It is a widely accepted fact that obesity results from the disequilibrium between energy intake and expenditure, and is highly likely to be the cause of chronic diseases such as heart diseases, type 2 diabetes, high blood pressure, stroke and some forms of cancer, and its prevalence is rapidly rising. Excess energy is conserved in the form of fat in adipose tissues, leading to obesity and obesity-associated fatty liver disease. As a result, there is increased urgency to develop strategies that will be effective for both the prevention and treatment of obesity.

To treat and control obesity, other than diet therapy and exercise, many different approaches have been suggested, such as drugs for weight loss, appetite suppressants, and food supplements. However, some of the treatments have been reported to have serious side effects, such as vomiting, headaches, stomach pain, and heart attacks. Nowadays, some recent studies have focused on the search for functional food ingredients or herbal extracts that can suppress the weight gain and body fat accumulation induced by high fat diet with less significant side effects.

In this study, we tried to develop the functional food material which shows anti-obesity and enhancement of exercise performance at the same time.

III. Scope of Research

1. Development of health functional food material with licorice
 - Establishment of indicator compound from licorice extracts

- Optimization of extract process for production of functional material with licorice
- Improvement for functionality

2. Weight loss effect of licorice

- Effect of licorice extracts on high fat diet-induced obesity
- Effect of licorice product on high fat diet-induced obesity

3. Improvement of endurance exercise performance by licorice

- Effect of licorice extracts on endurance exercise performance
- Effect of licorice on post-exercise response
- Study for mechanism of action

4. Development of functional food using licorice

- Development of the optimum formulation
- Development of functional food product

IV. Results

1. Development of health functional food material with licorice

We tested the anti-adipogenic effect of functional compound from licorice. As a result, glabridin showed effective anti-adipogenic activity in 3T3-L1 cells. To acquire licorice extract with high purity of glabridin, we made various licorice extracts and measured the content of glabridin. We found that supercritical fluid extraction is appropriate for glabridin-rich extraction. Supercritical extract is a good method for acquiring high purity of glabridin, however, there were some problems when we scaled up the extraction volume for pilot study. We tried to seek another extract method and found grain alcohol extraction has beneficial characteristics for mass production.

2. Weight loss effect of licorice

To investigate the anti-obesity effect of licorice we fed mice with high fat diet containing various licorice extracts for 8 weeks. Licorice hot water extract (LHE) and supercritical fluid extract (LSC) markedly reduced the weight gain by high fat diet. Moreover, hepatic steatosis and hypertrophy of adipocyte in white adipose tissue were ameliorated in LHE and LSC groups. The altered expressions of hepatic metabolism-related genes in high fat diet-fed mice were normalized by licorice

supplement. We also performed the safety test of licorice extract and confirmed the safety.

3. Improvement of endurance exercise performance by licorice

To test the effect of licorice on exercise performance, we treated licorice extracts to high fat diet-induced obese mice. We found LHE and LSC showed not only anti-obesity effect but also enhancement of exercise performance. We compared the effect of licorice with creatine as a positive control and demonstrated the efficacy of licorice is even more higher than that of creatine. Licorice increased the mitochondrial biogenesis and induced muscle type transition in skeletal muscle through the upregulation of PGC-1 α .

4. Development of functional food using licorice

To develop functional food using licorice we tried to apply supplement materials or excipients and optimized formulation. We also tested the stability of candidate material. We made 2 types of draft products such as soft capsule and hard capsule. We also standardized the functional food materials.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	19
Section 1. Purpose of the study	19
Section 2. Study needs	19
Section 3. Scope of the research	21
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology	23
Chapter 3. Experimental Methods and Results	27
Section 1. Development of health functional food material with licorice	27
1. Establishment of indicator compound from licorice extracts	27
(1) Functional compounds from licorice	27
(2) Effect of functional compounds from licorice on adipogenesis	28
(3) HPLC analysis of functional compounds from licorice	30
2. The contents of functional compounds in various licorices	31
3. Characteristics of licorice extracts	33
(1) The yields of extracts	33
(2) The contents of functional compounds	33
(3) The anti-adipogenic effect of licorice extracts	34
4. Optimization of extract process for the production of functional material with licorice ..	36
(1) The goal of the optimization	36
(2) pH control	36
(3) Percentage of ethyl alcohol	36
(4) Synthetic adsorbents	38
(5) Supercritical fluid extraction	39
(6) Solvent mixing	44

(7) Isopropyl alcohol	47
(8) Ethyl alcohol	48
(9) Conclusion	52
5. Improvement for functionality	54
(1) Emulsifier	55
(2) Capyrol 90	55
(3) Ethyl alcohol	58
Section 2. Weight loss effect of licorice	61
1. Effect of licorice extracts on high fat diet-induced obesity	61
(1) Materials and methods	61
(2) Results	64
2. Effect of licorice product on high fat diet-induced obesity	73
(1) Materials and methods	73
(2) Results	76
Section 3. Improvement of endurance exercise performance by licorice	87
1. Effect of licorice extracts in obese mice	87
(1) Materials and methods	87
(2) Results	90
2. Effect of licorice extracts in normal mice	98
(1) Materials and methods	98
(2) Results	100
3. Effect of glabridin-rich licorice extract on blood lipid profiles	114
(1) Materials and methods	114
(2) Results	115
4. Effect of licorice on post-exercise response	117
(1) Materials and methods	117

(2) Results	119
5. Study for mechanism of action	122
(1) Materials and methods	122
(2) Results	124
Section 4. Development of functional food using licorice	130
1. Development of the optimum formula	130
(1) Supplement materials	130
(2) Excipients trials	131
(3) Stability test	134
2. Development of functional food product	135
(1) Optimized formulation	135
(2) Standardization of functional food materials	138
(3) Draft product	140
Chapter 4. Evaluation of the study result	141
Section 1. Attainment of study goal	141
Section 2. Contribution of the study	142
Chapter 5. Application plan of the results	143
Section 1. Achievements	143
Section 2. Application plan	145
Chapter 6. Advanced technology Information	146
Chapter 7. References	147

목 차

제 1장. 연구개발과제의 개요	19
제 1절. 연구목표	19
제 2절. 연구개발의 필요성	19
제 3절. 연구 범위	21
제 2장. 국내외 기술개발 현황	23
제 3장. 연구개발 수행 내용 및 결과	27
제 1절. 감초 추출물의 기능성 원료 소재화	27
1. 감초 추출물의 기능/지표 성분 설정	27
가. 감초 유래 기능 성분	27
나. 감초 기능 성분의 지방세포 분화 억제능 평가	28
다. HPLC 이용한 감초 기능성분 함량 분석	30
2. 감초 소재의 원산지별 기능성분 함량 분석	31
3. 추출용매별 조추출물 특성 분석	33
가. 용매별 추출방법 및 수율 비교	33
나. 추출물 종류별 기능 성분 함량 비교	33
다. 추출물 종류별 지방세포 분화 억제능 비교	34
4. 감초 활용 기능성 원료 생산 위한 추출 공정 최적화	36
가. 추출 공정 최적화의 목적	36
나. pH 조정	36
다. 에탄올 함량 변화	36
라. 흡착수지 (synthetic adsorbents)	38
마. 초임계 추출	39

바. 용매 조합	44
사. 이소프로필알코올	47
아. 주정	48
자. 추출 공정 최적화 결론	52
5. 원료 생산을 위한 기능성 증진	54
가. 유화제 검토	55
나. Capyrol 90 최적화	55
다. 주정 활용 제조 방법 개발	58
제 2절. 감초의 in vivo 체중 조절 효능	61
1. 고지방 식이 유도 비만 마우스 활용 감초 추출물 종류별 효능 평가	61
가. 연구 방법	61
나. 연구 결과	64
2. 고지방 식이 유도 비만 마우스 활용 개발 제품의 효능 평가	73
가. 연구 방법	73
나. 연구 결과	76
제 3절. 감초의 지구력 증진 효능	87
1. 고지방 식이 유도 비만 마우스 활용 감초 추출물 종류별 효능 평가	87
가. 연구 방법	87
나. 연구 결과	90
2. 정상 식이 급여 마우스 활용 감초 초임계 추출물 효능 평가	98
가. 연구 방법	98
나. 연구 결과	100
3. Glabridin 고함유 감초 추출물의 혈중 지질 개선 효능	114
가. 연구 방법	114
나. 연구 결과	115

4. 감초 섭취의 저항성 운동 후 반응에 대한 영향	117
가. 연구 방법	117
나. 연구 결과	119
5. 감초의 작용 기전 연구	122
가. 연구 방법	122
나. 연구 결과	124
제 4절. 감초 활용 건강기능식품 제품화	130
1. 효능 증진 목적의 최적 formula 개발	130
가. 상승효과를 위한 부재료 검토	130
나. 용해도 증진을 위한 부형제 검토	131
다. 원료 안정성 검토	134
2. 감초 활용 건강기능식품 시제품	135
가. 최종 formulation	135
나. 원료 기준 규격	138
다. 시제품 생산	140
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	141
제 1절. 목표 달성도	141
제 2절. 관련분야에의 기여도	142
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	143
제 1절. 연구개발 성과	143
제 2절. 성과활용 계획	145
제 6장. 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보	146
제 7장. 참고문헌	147

제 1장. 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구목표

본 연구는 감초로부터 운동모방 (exercise-mimetics) 작용을 통한 체중 조절 및 지구력 증강을 통한 운동 수행 능력 향상 효능을 동시에 지니는 복합 기능성 건강기능식품 제품화를 위한 기능성 원료의 개발을 최종 목표로 한다.

제 2절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

○ 비만은 체내 잉여 에너지가 중성지방 및 기타 지방대사물의 형태로 지방조직에 저장됨으로서 일차적으로 나타나며, 이러한 에너지대사의 불균형에 따른 종합적인 대사이상에 의해 유발되는 질병으로서 생활 습관과 밀접한 연관이 있는 여러 질환-고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 제2형 당뇨 및 암 등-과 관련되어 있다. 비만 예방 및 치료를 위해서는 식이조절뿐만 아니라 식욕조절 호르몬 대사, 지방세포분화, 지방합성 및 분해과정 그리고 열생성반응 등 다양한 측면에서의 접근이 요구되고 있다.

○ 비만 치료제 신약 개발 연구는 전 세계적으로 매우 활발한 연구 분야임에도 불구하고 지금까지 비만 치료제로 FDA로부터 장기간 사용을 승인 받았던 약물은 중성지방 및 인지질의 가수분해를 촉매하는 LPL (lipoprotein lipase) 기능 저해 작용이 있는 Orlistat (1999년 FDA 승인)과 시상하부에서 serotonin 및 norepinephrine의 재흡수를 억제함으로써 식욕을 억제하고 포만감을 증가시키는 Sibutramine (1997년 FDA 승인) 두 종이며, Sibutramine의 경우 뇌졸중과 심근 경색 등의 부작용으로 인해 2011년 FDA 승인이 취소되었다.

○ 기존 비만 치료제의 심각한 부작용에 대한 염려로 항비만 효과는 높고 부작용이 적은 새로운 작용기전을 가진 물질의 개발이 절실히 요구되고 있고 이를 위해 천연물로부터 비만을 예방 및 개선할 수 있는 소재를 개발하고자 하는 시도가 많으나 복합 작용점 및 낮은 효능이라는 식품 소재의 특성 때문에 비만 및 대사성질환 예방을 위한 식품 (천연물 포함) 소재의 개발이 실효를 거두지 못하는 있는 실정으로 이러한 한계를 극복하기 위한 새로운 패러다임의 질환예방 및 조절 기술 개발의 필요성이 대두되고 있다.

○ 특히, 식품성분이 인체에 미치는 효능이 과학적으로 구명되고, 식품의 기능성이

중요시됨에 따라, 종래의 약물에 의한 치료중심에서 식품에 의한 예방중심으로 그 요구가 증대되고 있으며 그중에서도 식품의 선택에 가장 큰 영향을 받는 체중조절용 건강기능식품시장은 전 세계적으로 기능성 식품 중 가장 큰 시장을 형성하고 있다.

- 운동의 효과 (exercise-mimetics)를 지닌 체중/당뇨 조절 소재에 대한 관심이 집중되고 있으며, 운동이 충분하지 못한 현대인에게 있어서 운동의 효과를 내면서 체중/당뇨 조절 효능이 있고 지구력을 증가시키는 건강기능식품이 개발 시 국내외적으로 그 수요는 매우 클 것으로 판단된다.

2. 경제 산업적 측면

- 전 세계적으로 나타나는 비만 인구의 급증은 미국의 의료비용이 2030년에 한해 660억 달러 (약 72조원) 에 육박할 것으로 전망되고 있다. 특히 미국은 비만을 ‘국가 위기’로 규정하고 비만 요소 식품 (소금, 설탕, 지방 등)의 함량을 낮추는 법안을 추진하고 있어 식품산업에도 큰 영향을 미칠 것으로 예상되고 있다.

- 질병 예방 및 치료에 소요되는 직접비용과 질병으로 인해 줄어드는 생산성을 수치화 한 간접비용을 합한 비만의 사회 경제적 비용을 분석한 결과 우리나라의 경우 2005년 1조 8천억원 (GDP의 0.22%)이었던 성인 비만에 따른 사회 경제적 비용이 2011년에는 최소 3조 4천억원 (2.2%)에 달할것으로 전망되고 있으며 이는 1998년에 비해 4.2배나 증가한 수치로 미국을 제외한 서구 선진국과 유사한 정도이다.

- 2010년 우리나라 건강기능식품 시장 규모는 약 3조 6000억원으로 1인당 평균 구입 비용은 29만 1127원으로 조사되었다 (한국건강기능식품협회, 2011). 히트 소재로는 체지방 감소, 피부건강, 혈관 건강, 간 건강 등이며 특히 두 가지 이상의 원료가 복합된 맞춤형 제품과 정신건강, 대사증후군, 대기업 중심의 고급화 전략 등이 건강기능식품의 새로운 마케팅 트렌드로 부각되고 있다.

- 최근 비만에 대한 높은 국민적 관심과 더불어 정부에서도 비만으로 인한 국가적 손실을 자각하고 서구화 식습관을 개선시키고 비만을 예방하기 위한 다양한 대책을 마련 중에 있다. 따라서 비만관리, 혈관관리, 혈당조절 등 대사성 질환 관련 제품의 급성장이 전망되고 있다.

3. 사회적 측면

- 비만, 당뇨 등과 같은 생활습관성 질환은 급증하고 있으며 세계적으로 10억에

가까운 사람들이 비만 (약 2억 8천만명) 혹은 과체중 (약 7억명)이며 (IOTT, 2011) 세계 비만인구는 20%로 기아 인구 15%를 초과하였다 (IFRC, 2011). 미국의 경우 20년후 비만 인구가 현재 1억명 수준에서 1억 6500만명으로 인구의 절반을 웃돌 것으로 예상되고 있다 (Lancet, 2011).

○ 우리나라의 경우 성인 10명 중 3명이 비만과 운동 부족으로 인한 대사성 증후군을 가지고 있으며 한국인의 대사성 증후군 유병률은 1998년 24.9% 였던 것이 2007년 31.3%로 매년 평균 0.6%의 증가세를 보여 왔다. 이는 복부비만이 늘고 혈압과 혈당, 중성지방 수치가 꾸준히 높아졌다는 것을 의미한다.

○ 비만을 증가의 주요 요인으로서 비활동성 라이프스타일과 좌식 도심생활, 운동공간의 부족 및 고열량 가공식품의 범람 등과 같은 비만 환경(obesogenic environment)에 관심이 집중되고 있으며 비만 유병률 증가는 건강수명 단축과 삶의 질 저하 뿐 아니라 막대한 의료비 손실로 이어지고 있는 실정이다.

○ 65세 인구 비중이 7% 이상인 고령화 사회에 본격적으로 진입한 우리나라는 건강 지향적 욕구증대, 식품성분과 건강에 대한 지식증대, 대체의학에 대한 관심도 증가 및 웰빙 추구로 기능성식품소재에 대한 소비자의 기대요구가 크게 증가하고 있으며 건강기능식품 소비경향이 ‘맞춤형’, ‘기능성’ 및 ‘기능’중심으로 이동하고 있다.

○ 이러한 비만, 당뇨와 같은 생활습관성 질환은 치료보다 예방이 매우 중요하며, 예방을 위해서는 약이 아니라 올바른 식품섭취와 운동이 병행되어야 한다. 그러나 운동과 식이 요법의 경우 수반되는 고통, 시간 및 수고에 대한 대가 지불이 불가피하므로 생활 속에서 이를 해결할 수 있는 대안의 제시가 절실히 필요하다.

제 3절. 연구 범위

본 연구에서는 감초로부터 체중 조절 효능과 운동 지구력 증진 효능을 동시에 지니는 복합 기능성 소재를 발굴하여 건강기능식품 제품화를 위한 기능성 원료로 개발하고자 하였으며 이를 위한 세부적인 연구범위는 아래와 같다.

1. 감초 추출물의 기능성 원료 소재화

- 감초 추출물의 기능/지표 성분 설정
- 추출용매별/원산지별 감초 추출물 특성 분석
- 감초 활용 기능성 원료 생산 위한 추출 공정 최적화
- 기능성 원료 생산을 위한 기능성 증진 공정 개발

2. 감초의 체중조절 효능 평가

- 고지방 식이 유도 비만에 대한 감초 추출물 효능 평가
- 고지방 식이 유도 비만에 대한 감초 개발 제품의 효능 평가
- 감초 기능 성분의 항비만 효능 기전 구명

3. 감초의 지구력 증진 효능 평가

- 고지방 식이 유도 비만 마우스 대상 감초 추출물의 운동 수행능 증진 효능 평가
- 정상 마우스 대상 감초 초임계 추출물의 운동 수행능 증진 효능 평가
- Glabridin 고함유 감초 추출물의 혈중 지질 개선 효능 평가
- 감초 섭취의 저항성 운동 후 반응에 미치는 영향 측정
- 감초 기능성 소재의 지구력 증진 기전 구명

4. 감초 활용 건강기능식품 제품화

- 효능 증진 목적의 최적 formula 개발
- 감초 기능성 원료의 기준 및 규격 설정
- 감초 활용 건강기능식품 시제품개발

제 2장. 국내외 기술개발 현황

1. 항비만 관련 연구

○ 비만은 체내 잉여 에너지가 중성지방 및 기타 지방대사물의 형태로 지방조직에 저장됨으로서 일차적으로 나타나며, 이러한 에너지대사의 불균형에 따른 종합적인 대사이상에 의해 유발되는 질병으로서 식이조절 뿐만 아니라 식욕조절 호르몬 대사, 지방세포분화, 지방합성 및 분해과정 그리고 열생성 반응 등 다양한 측면에서의 접근이 요구되고 있다.

○ 이에 따라 항비만 소재개발 연구는 식욕억제 물질인 leptin의 저항성을 유도하는 cytokine signaling 3 suppressor, 시상하부에 존재하는 음식 섭취 조절에 관여하는 cannabinoid receptor 1 antagonist, 식욕 촉진을 일으키는 neuropeptide Y 길항제 등 식욕을 억제하여 체중을 감소시키는 것과 성장 호르몬 합성물 (AOD9604), 지방대사 촉진 및 대사를 증가 활성을 지닌 β 3-adrenergic receptor agonist, UCP 과다발현 통해 에너지 소비 촉진에 관여하는 PPAR δ 등 에너지 소모를 증가시켜 체중을 감소시키는 방향으로 이뤄지고 있다.

○ 비만 치료제는 Orlistat (Xenical, 1999년 FDA 승인)가 대표적으로 소화관 내 식이 지방을 지방산과 글리세롤로 가수분해에 시키는 데 필수적인 lipase 억제제로 소화관 내에서 orlistat는 lipase의 serine residue와 공유결합을 형성하여 효소 활성을 억제하는 작용기전을 가지고 있다.

○ 중추신경계 약물의 경우 신경전달물질인 serotonin이나 norepinephrine의 재흡수를 억제시켜 우울증을 치료하는 효과 외에도 체중 감소에 효과적인 것으로 임상실험 결과 나타났다. 이처럼 5-HT 재흡수 억제제나 serotonin 분비 촉진제의 경우 항우울 효능 외에 식욕 억제의 효과도 나타내 비만 치료에 활용되기도 하였으나 mental disorder나 심근 경색과 같은 심각한 부작용을 유발하는 것으로 알려졌다.

○ 그동안 비만 치료를 위해 개발된 약물들은 효과에 비해 부작용이 심각해 항비만 효과는 높고 부작용이 적은 새로운 작용기전을 가진 물질의 개발이 절실히 요구되고 있다.

○ 따라서, 비만 치료용 약물이 지니는 많은 부작용 때문에 안전하면서도 높은 활성을 지닌 식품 유래 소재에 대한 접근이 이뤄지고 있는 중이다. 특히, 식품성분이 인체에 미치는 효능이 과학적으로 구명되고, 식품의 기능성이 중요시됨에 따라, 종래의 약물에 의한 치료중심에서 식품에 의한 예방중심으로 그 요구가 증대되고 있으며 그중에서도 식품의 선택에 가장 큰 영향을 받는 체중조절용 건강기능식품시장은 전 세계적으로 기능성 식품 중 가장 큰 시장을 형성하고 있다.

○ 미국 내 비만 치료제 시장의 수요는 2010년 까지 지속적으로 성장하여 2002년의 3배에 이를 것으로 전망되고 있으며 현재 많은 다국적 제약 기업들이 차세대 비만 치료제를 개발하여 시장 쟁취하기 위해 치열한 경쟁을 벌이고 있다. 컨설팅 업체인 Evaluate에 따르면 현재 비만 치료제로 연구 중인 후보 물질만 해도 무려 200여종에 이르고 이 가운데 26종은 임상시험에 들어갔다고 알려졌으며 전문가들은 만족시킬만한 효과가 가진 제품이 개발될 경우 약 30억불의 연간 매출액을 거둘 것으로 전망하고 있다.

2. 운동 수행능 증진 연구

○ 지구성 운동 (endurance exercise) 훈련은 골격근의 리모델링 통해 점진적으로 운동 수행능 (performance)을 증진시킨다. 여기에는 근육 내 대사와 근섬유 관련 구조 단백질의 변화에 기인한 운동 에너지 소스 및 근피로도 감소를 위한 근수축 특성 변화가 관련되어 있다. 이러한 근육의 운동 적응은 Type I 근육 (oxidative slow-twitch muscle) 근섬유의 증가를 유도하며 결과적으로 운동성 향상 및 근피로 저하의 효과로 나타난다.

○ 운동시 골격근에서 다양한 전사인자와 serine-threonine kinase가 활성화 되며 이에 기인된 대사계의 변화가 유도된다. 지금까지 알려진 바에 의하면 PPAR β/δ 는 골격근의 전사인자 조절에 매우 중요한 역할을 담당하며 PPAR β/δ 과발현 마우스에서 Type I 근육이 증가하고 운동수행능이 2배 증가된다고 한다. 세포 및 개체 에너지 대사에 있어서 중요한 조절자 역할을 담당하는 AMPK (AMP-activated protein kinase)는 PPAR β/δ 와 함께 근섬유 타입 변화를 유도시킨다고 보고되었다.

○ 이러한 결과를 바탕으로 PPAR β/δ 또는 AMPK 의 agonist나 specific-activator를 처리시 나타나는 변화를 측정 한 실험을 수행한 결과 PPAR δ agonist인 GW1516 처리시 마우스에서 운동 시간을 60-75% 증가시켰고 AMPK agonist인 AICAR를 처리시

달리기 능력이 45% 상승된 것으로 나타났다. 즉 근섬유 타입 변화를 조절 인자인 PPAR β/δ 또는 AMPK의 agonist 처리에 의해서 운동 수행능 증진 효과가 유도될 수 있다는 것이 확인되었다.

○ 고농도의 레스베라트롤 투여 시 (Lagouge 외, 2006) 운동 수행능이 증진 되는 것으로 보고되었으며 이러한 효과는 골격근에서 SIRT1-PGC1 α 활성화를 통해 나타나는 것으로 확인되었다. 그러나 아직 SIRT1-PGC1 신호전달계에 의해 조절되는 타겟 전사인자는 아직 밝혀지지 않았다.

3. 건강기능식품

가. 체지방 감소 효능 건강기능 식품

○ 고시형의 경우 폴리텍스트로스를 비롯한 식이섬유와 공액리놀레산 및 가르시니아 캄보지아 추출물이 체중감량에 도움을 주고 지방 흡수 저해를 통해 체중 증가를 억제하는 건강기능성 식품 원료가 있다.

○ 현재까지 개별인정 승인을 받은 원료·성분 중 체지방 감소 효능을 지닌 것으로 기능성을 인정받은 기능성 원료는 CJ 히비스쿠스등 복합물, 대두배아열수추출물 등 복합물, green mate extract EFLA92, L-카르니틴 타르트레이트, 녹차 추출물, 레몬밤 추출물, 갯잎 추출물, 콜레우스 포스콜리 추출물, 디클리세리아드 함유 유지, 중쇄지방산 함유 유지의 총 9종이 있다.

나. 운동수행능력 향상 및 운동 중 산화적 스트레스 감소 관련 건강기능 식품

○ 고시형의 경우 소맥배아나 미강에서 추출한 유지에서 분리한 옥타코사놀이 지구력 향상 효능이 있는 원료·성분으로 인정되었다.

○ 현재까지 개별인정 승인을 받은 원료·성분으로는 마카 젤라틴화 분말 (생리활성기능 3등급)과 발효생성 아미노산 복합물, L-글루타민, 크레아틴 (3종 모두 생리활성기능 2등급)이 있다.

○ OME-88 메론 추출물은 운동 중 산화적 스트레스 환경에서 항산화 효소의 활성을 높이고 항산화 지표를 개선하여 산화스트레스로부터 인체를 보호하는데 도움을 줄 수 있다는 기능성을 인정받았다 (생리활성기능 2등급).

○ sodium sarcosinate와 cyanamide가 화학적으로 합성되어 만들어지는 크레아틴은 체내에서 인산크레아틴으로 전환되어 ATP 생성에 사용, 에너지 생성을 도와 근력 운동 시 운동수행능력 향상에 도움을 주는 것으로 기능성을 인정받았다 (생리활성 기능 2등급)

제 3장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절. 감초 추출물의 기능성 원료 소재화

1. 감초 추출물의 기능/지표 성분 설정

가. 감초 유래 기능 성분

감초 (licorice)는 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch의 뿌리 부분을 의미하여 예로부터 한방 치료제와 감미료로 널리 사용되어 왔다. 콩과에 속하는 다년생 풀인 감초는 그 종류에 따라 감초 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), 광과감초 (*Glycyrrhiza glabra* Linne), 황감초 (*Glycyrrhiza kansuensis* Chang et Peng.), 창과감초 (*Glycyrrhiza inflata* Batal.) 등으로 나뉘며 각 종마다 특이적인 기능 성분을 보유하고 있다.

감초 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 유래 compound- glycyrrhizin, isoliquiritigenin, licochalcone, 및 glabridin 등-에 대해서는 다양한 생리활성 효능이 보고되어 왔다.

Glycyrrhizic acid (GYC) glycyrrhizin의 hydrophilic part로 감초의 성분 중 가장 많이 연구된 물질로서 설탕의 50배 이상 단맛 (sweet-taste)을 지녀 식품산업의 감미료로 널리 사용되고 있다. 세계적으로 만성 바이러스 감염, 알레르기성 피부염의 치료에 사용되고 이 외에도 항암, 항염, 항위궤양, 간독성 해독 및 항바이러스 등의 여러 생리활성이 보고되었다 (Rahman & Sultana, 2007).

Glabridin (GLB)은 *Glycyrrhiza glabra* L.의 주요 active flavonoid로서 에스트로겐 유사 활성, 미생물 성장 억제, 세포 독성, 항암 효과 등의 다양한 생리활성이 보고되어 왔으며 멜라닌 생성, 염증, LDL-C 산화 및 산화적 스트레스 시 미토콘드리아 기능 등을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Somjen 외, 2004).

Isoliquiritigenin (ISL)는 chalcone 구조를 지닌 flavonoid로서 항염, 항산화 및 다양한 암세포 (폐, 간, 위, 유선 등)에 대한 세포 사멸 유도 등의 생리활성 효능이 보고되었다 (Chin 외, 2007).

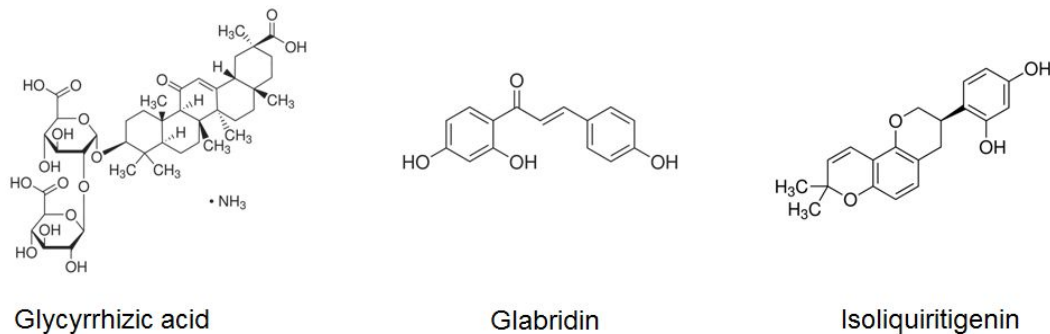


Fig. 1-1 Chemical structures of licorice functional components

나. 감초 기능성분의 지방세포 분화 억제능 평가

(1) 실험방법

(가) 3T3-L1 배양 및 분화 유도

Mouse embryo 3T3-L1 전지방세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 10% bovine serum, 1% penicillin/streptomycin/glutamine이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 2×10^5 cells/ml 농도로 seeding하여 confluent 상태가 되게 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 100% confluent가 되면 48시간 더 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 분화배지 (10% FBS, 1% penicillin / streptomycin / glutamine, 5 μ g/ml insulin, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3 - isobutyl - 1 - methylxanthine)로 교체하여 48시간 배양한다. 이 때, 테스트 할 sample을 함께 처리한다. 그리고 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 5 μ g/ml insulin이 첨가된 10% FBS DMEM 배지로 48시간 배양한 후 10% FBS DMEM로 48시간 간격으로 2번 배지 교환 해주어 adipocyte로의 분화를 유도하였다.

(나) Oil red O 염색

분화된 adipocyte의 lipid droplet의 염색을 위해 lipid droplet에 특이적으로 반응하는 Oil red O로 염색하였다. 배지 제거 후 10% formalin을 5분간 1회 처리한 뒤 새로운 10% formalin을 1시간 동안 처리하여 고정하였다. 60% isopropanol로 washing 후 각 well을 완전히 건조시켰다. Oil red O stock solution과 증류수를 6:4비율로 희석한 solution을 10분간 처리한 뒤 증류수로 4회 세척하였다. 그 후 현미경으로 분화된 cell을 관찰하여 분화가 억제 되었는지를 확인하였다. 관찰 후 증류수를 제거한 well을 완전히 건조시켰다. lipid droplet과 결합한 Oil red O의 용출을 위해 100% isopropanol로 10분간 처리하였고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(다) Western blotting

세포가 자라고 있는 Plate를 ice cold-PBS로 2-3회 washing 후 harvest한 cell에 RIPA buffer (Tris pH 8.0, 150mM Tris NaCl, 0.02% Sodium Azide, 0.2% SDS, PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride) 100 μ L, Aprotinin 50 μ g/mL, NP-40 1%, NaF 100 mM, Sodium Deoxycholate 0.5%, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.1mM) 200 μ L를 넣어 균질화하여 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 new tube에 옮겨 담은 뒤 단백질을 정량하여 20 μ g으로 농도를 일정하게 맞추어 SDS-polyacrylamide gel 전기영동한 후 이것을 western blot 하였다. Gel 위에 transfer 용액으로 평형 시킨 membrane을 올려 놓고 100V, 350 mA로 2시간 동안 transfer 하였다. 단백질이 transfer된 membrane을 5% skin milk이 포함된 TBST 용액으로 blocking 후 TBST 용액으로 membrane을 세척하였다. TBST 완충용액을 이용하여 적당한 농도로 희석시킨 1차 antibody (SREBP-1, C/EBP α , PPAR γ , FAS, β -actin)를 membrane이 충분히 잠길 만큼 가하여 4°C에서 12시간 두어 반응시켰다. TBST 용액으로 membrane을 세척한 후 TBST 용액으로 적당히 희석시킨 anti-rabbit -HRP를 2시간 실온에서 반응시켰다. 암실에서 ECL반응을 시켜 필름 현상하여 band를 확인하였다.

(2) 실험 결과

감초 기능성분의 in vitro 항비만 활성을 평가하기 위하여 마우스 fibroblast인 3T3-L1을 활용하여 후보 기능성분의 지방세포 분화 억제능을 측정하였다. 비만유도 배지 (DM, differentiation medium)에 glycyrrhizic acid (GA), glabridin (GB) 및 isoliquiritigenin (ISL)을 각 50 μ M씩 처리한 뒤 48시간 배양한 후 분화를 계속 유도 하였다. 실험실시 후 제 8일에 분화 종료 된 후 지방 염색법인 oil red O stain으로 세포내 지방 축적 정도를 측정한 결과, glabridin이 지방세포 분화 억제에 매우 효과적인 것을 확인하였다 (Fig. 1-2).

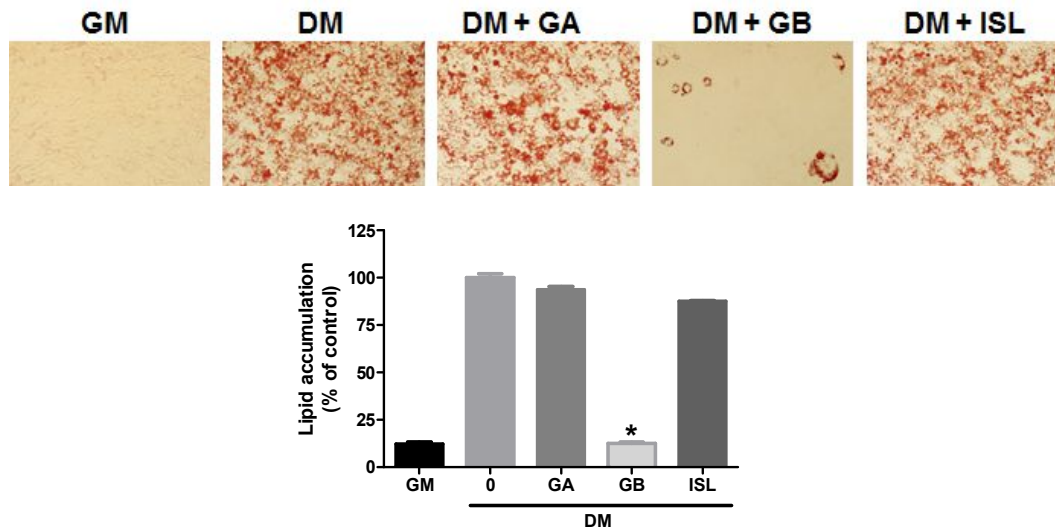


Fig. 1-2. Oil red O staining of 3T3-L1 cells treated with various licorice functional components

다. HPLC 이용한 감초 기능성분 함량 분석

감초의 기능성분 세 가지, 즉 glycyrrhizic acid, glabridin 및 isoliquiritigenin의 동시 분석을 위해 HPLC을 활용한 분석 조건의 확립하였다 (Table 1-1).

Table 1-1. HPLC analysis condition

Eluents	a) 0.2% acetic acid in 10% meoh b) 0.2% acetic acid in 70% meoh c) Meoh
Gradient sys.	0min; 100% a → 10min; 100% a → 12min; 100% b → 25min; 100% b → 29min; 100% a → 30min; 100% c → 35min; 100% c → 37min; 100% a → 40min; 100% a
Flow rate	1.0 ml/min
Column	ZORBAX ECLIPSE XDB-C18 (4.6x250mm, 5um)
Oven temp.	40 °C
UV wavelength	252 nm

감초 기능성분의 HPLC 동시 분석 chromatogram 결과는 아래와 같다 (Fig.1-3). 각 기능성분의 calibration curve는 $R^2 > 0.999$ 이상의 good linearity를 보였다 (Fig. 1-4).

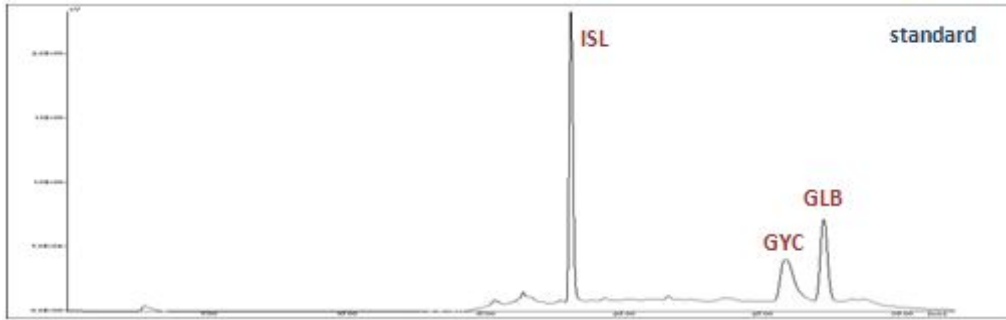


Fig. 1-3. HPLC histogram

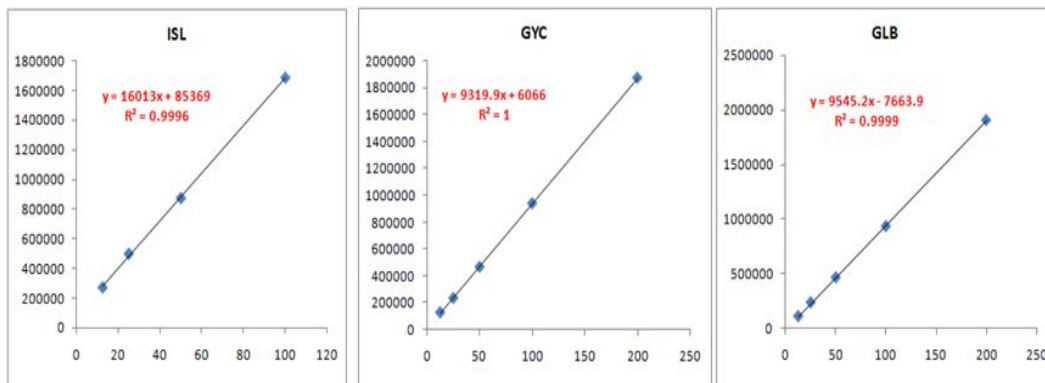


Fig. 1-4. Calibration curves

2. 감초 소재의 원산지별 기능성분 함량 분석

감초 소재의 원료 성분 표준화를 위해서 산지별 감초 시료를 수집하여 기능성분의 함량을 비교 분석하였다. 총 4종의 감초 시료를 수집하였으며 그 세부 사항은 국내산 (KR), 우즈베키스탄산 (UZ), 중국 신양산 (CHN-1), 중국 양외산 (CHN-2)이다. 산지별 감초 소재를 활용하여 70% EtOH 추출물의 제조하여 HPLC로 기능성분 3종 (GA, GB, ISL)의 동시 분석을 수행하였다. HPLC로 산지별 감초 추출물의 기능성분을 분석한 chromatogram은 Fig. 1-5와 같다.

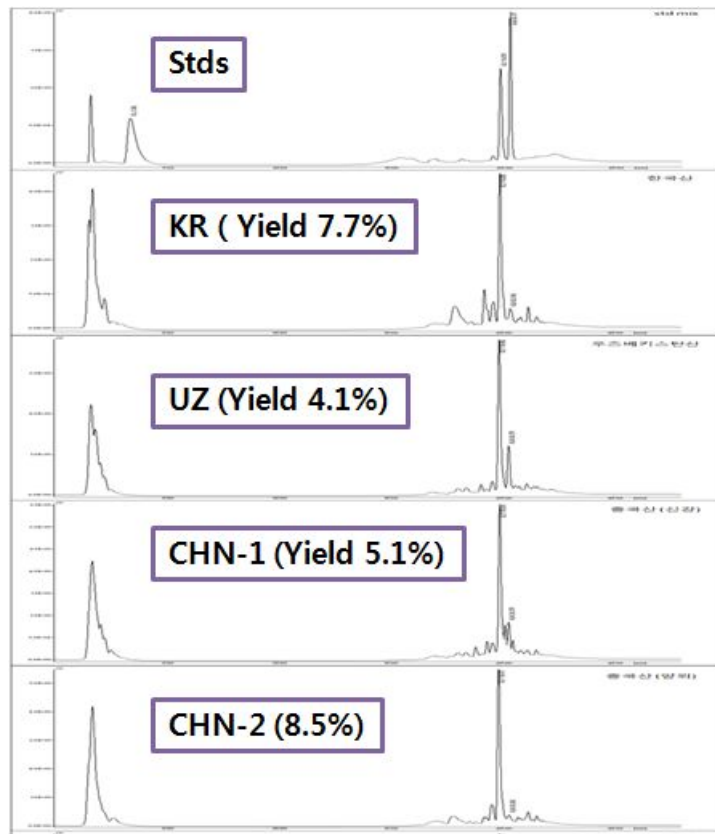


Fig. 1-5. HPLC chromatograms of various licorices

감초 산지별 추출물의 수율은 국내산 (KR), 우즈베키스탄산 (UZ), 중국 신양산 (CHN-1), 중국 양외산 (CHN-2)이 각각 7.7, 4.1, 5.1 및 8.5로 국내산과 중국 양외산이 다소 높게 나타났다.

감초 산지별 추출물의 기능성분의 함량을 비교한 결과 Fig. 1-6에 나타낸 바와 같이 GA의 경우는 UZ가 가장 높게 나타났으며 CHN-1과 CHN-2는 유사하게 나타났다. Grabridin의 경우는 UZ > CHN-1 > KR > CHN-2 순으로 함량이 높았다. ISL의 경우는 각 산지 시료 모두에서 매우 미량으로 나타났다.

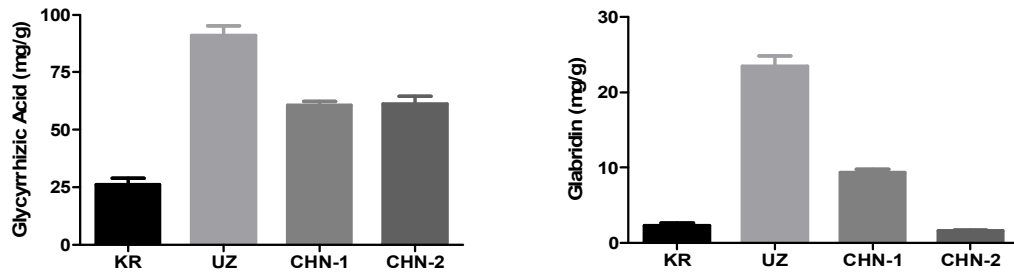


Fig. 1-6. The contents of glycyrrhizic acid (left) and glabridin (right) of various licorices

3. 추출용매별 조추출물 특성 분석

가. 용매별 추출방법 및 수율 비교

감초의 기능성분 중 glabridin의 in vitro 항비만 효능이 우수한 것을 확인하였기 때문에 glabridin 함량이 높은 추출 조건을 확립하기 위하여 여러 추출 방법을 사용하여 감초 조추출물을 얻고 각 추출물 내 감초 기능성분의 함량을 비교 분석해 보았다.

Table 1-2.에 나타낸 바와 같이 감초의 열수 추출물 (LHW, Licorice hot water extract), 에탄올 추출물 (LET, licorice ethanol extract) 및 초임계 추출물 (LSC, licorice supercritical extract)을 얻었으며 추출 수율을 측정한 결과 감초 열수 추출물이 16.3%로 가장 높게 나타났다.

Table 1-2. Licorice extract conditions and yields

	LHW	LET	LSC
solvent	DW, (×10)	70% EtOH, (×10)	10% EtOH (×7)
extract condition	100°C, 4hr	RT, overnight	40°C, 300bar, 196 min
Yields (%)	16.3	10.9	3.56

LHW, Licorice hot water extract; LET, licorice ethanol extract; LSC, licorice supercritical extract

나. 추출물 종류별 기능 성분 함량 비교

극성차이가 대비되는 두 가지 용매 (water, ethanol)와 초임계추출물에 있어서의 기능 성분 용출의 변화를 확립된 동시 분석 조건을 활용하였고 결과 HPLC histogram을

Fig. 1-7에 나타내었다. 또한 이를 정량화 하여 기능성분 함유량의 차이를 측정한 결과를 Table 1-3에 나타내었다.

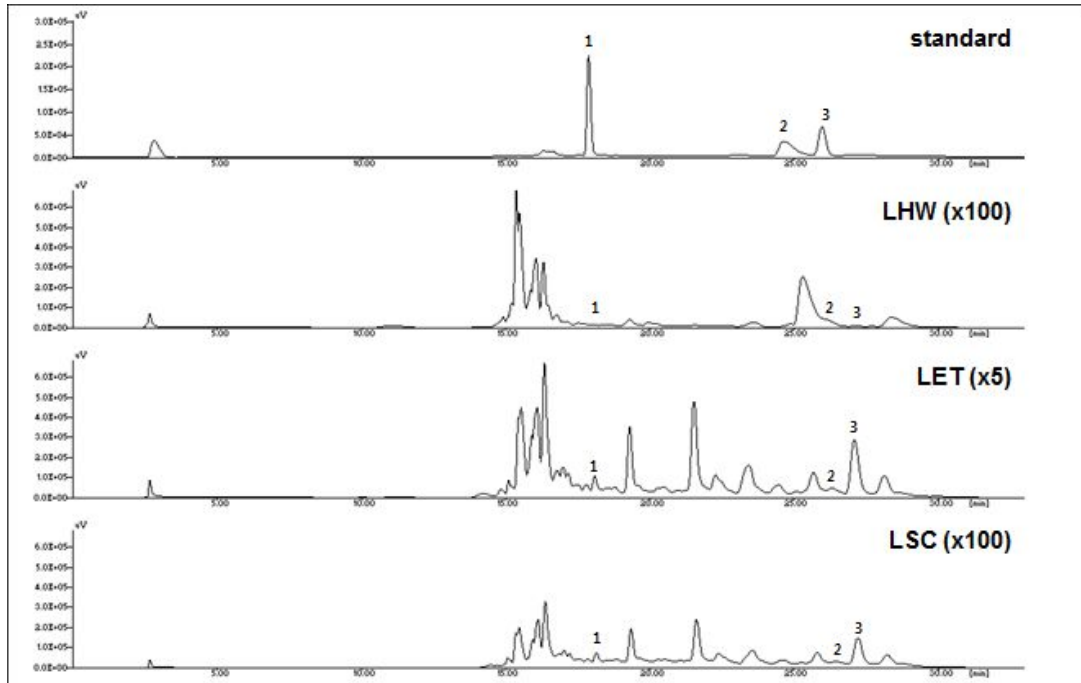


Fig. 1-7. Representative HPLC phenolic profile of various licorice extracts.

Table 1-3. Content of phenolic compounds in various licorice extracts.

	LHW	LET	LSC
Glycyrrhizic acid (GA)	56.65 ± 2.8	2.18 ± 3.75	16.30 ± 0.65
Glabridin (GB)	3.66 ± 0.11	4.19 ± 7.74	45.12 ± 0.14
Isoliquiritigenin (ISL)	0.2 ± 0.04	0.32 ± 0.28	2.62 ± 0.11

즉 극성용매를 사용한 열수 추출물 (LHW)의 경우, glycyrrhizic acid의 함량이 뚜렷이 높았으며 비극성 용매를 사용한 에탄올 추출물 (LET)의 경우는 glycyrrhizic acid의 용출은 매우 낮았고 glabridin이 소량 용출되었다. 이와 달리, 초임계 추출물 (LSC)의 경우, glycyrrhizic acid의 함량은 낮고 glabridin이 다량 용출됨을 확인하였다.

다. 추출물 종류별 지방세포 분화 억제능 비교

추출용매에 따른 감초의 생리활성 차이를 비교하고자, 감초의 에탄올, 열수 및 초임계 추출물을 각각 마우스 preadipocyte인 3T3-L1 세포에 48시간 처리한 뒤 성숙 지

방세포로의 분화를 관찰하였다. 분화가 종료된 지방세포의 세포내 지방을 Oil red O 염색하여 현미경으로 관찰시 정상적으로 분화가 진행된 MDI 군의 경우는 붉은 색으로 염색된 세포내 축적된 지방을 관찰할 수 있다. 또한 ORO elution을 통해 축적된 지방의 정량 비교를 실시하였으며 분화 조절 마커의 발현을 western blot을 통해 확인한 결과는 Fig. 1-8과 같다.

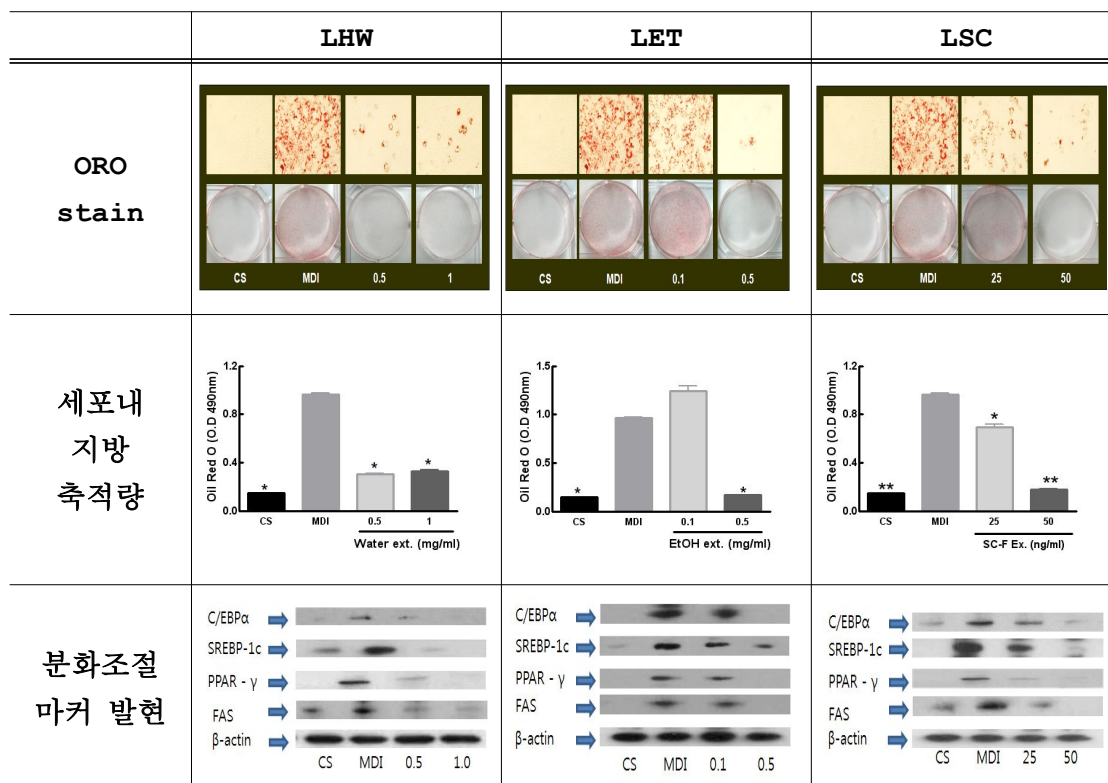


Fig. 1-8. Effects of various licorice extracts on adipocyte differentiation

LHW (감초 열수 추출물)의 경우, 0.5-1.0 mg/mL의 농도로 3T3-L1 세포에 처리 시 지방세포 분화 억제 효능이 유의적으로 나타났으며 이는 지방세포의 분화를 조절하는 중요한 전사 인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 억제함으로써 나타나는 것으로 western blot을 통해 확인되었다. 또한 SREBP-1c 및 FAS의 발현의 경우도 감초 열수 추출물 처리에 의해 뚜렷이 감소하였다.

LET (감초 70% 에탄올 추출물)의 경우는 0.5 mg/mL 농도 처리 시 세포내 지방의 축적이 유의적으로 감소하였으며 이는 지방세포의 분화를 조절하는 중요한 전사 인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 억제함으로써 나타나는 것으로 western blot을 통

해 확인하였다. 이 외에도 SREBP-1c 및 FAS의 발현도 감초 에탄올 추출물 0.5 mg/mL 농도로 처리 시 감소하였다.

LSC (감초 초임계 추출물)의 경우 다른 추출물과 비교해 최고 40배까지 저 농도인 25 및 50 ng/mL의 농도로 처리했음에도 효과적으로 지방세포의 분화가 억제됨을 확인하였다. 이러한 감초 초임계 추출의 anti-adipogenesis 효과는 지방세포의 분화를 조절하는 key factor인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 억제함으로써 유도된 것으로 사료되며 SREBP-1c 및 FAS의 발현도 추출물의 처리 농도에 의존적으로 감소하였다.

4. 감초 활용 기능성 원료 생산 위한 추출 공정 최적화

가. 추출 공정 최적화의 목적

선행 연구 결과 추출물 내의 glabridin의 순도가 높을수록, 즉 glabridin/glycyrrhizic acid 비가 높을수록 활성이 높은 것이 확인되었기 때문에, 글라브리딘을 포함한 플라보노이드 유도체의 추출 순도를 증가시키는 것이 추출 공정 최적화의 목적이며 이를 위해서 감초에 다량 존재하는 글리시리진의 추출을 최소화하는 공정을 개발하고자 하였다.

나. pH 조정

pH를 다양하게 혹은 여러 차례 조정하여 제거물질인 glycyrrhizin의 농도변화를 확인하였으나, pH 조정으로는 Glycyrrhizin 함량이 1%정도에서 더 이상 제거되지 않았다 (Table 1-4).

Table 1-4. Contents of licorice functional components after pH control

공정	감초량	생산량	회수율	glycyrrhizin	glabridin	비고
pH cut (1회)	400 g	14.0 g	3.5 %	1.2 %	5.3 %	
pH cut (2회)	400 g	13.0 g	3.2 %	1.4 %		

다. 에탄올 함량 변화

에탄올 함량 변화에 따른 기능성분의 추출 농도 및 추출 효율을 측정·비교해 보았다. 에탄올 함량을 30-70%로 변화시키면서 glabridin과 glycyrrhizin의 이동을 측정하였다. 에탄올

함량 변화 공정별 glycyrrhizin 및 glabridin의 함량은 Table 1-5와 같다.

30% 에탄올 사용 시 glabridin은 상등액과 침전물 각각 절반으로 나뉘지고, glycyrrhizin은 상등액으로 거의 제거되었다. 50% 에탄올 사용 시 glabridin과 glycyrrhizin은 대부분 상등액 분획으로 같이 이동하였다. 10% 에탄올로 재 결정시 glycyrrhizin은 상등액으로 제거되지만, 침전물 속에 포함된 glabridin의 회수율은 69%로 낮았다. 70% 에탄올에 용해 시 50%에탄올을 사용할 때보다 고효율로 glabridin과 glycyrrhizin이 상등액 분획으로 모였다. 5% 에탄올로 재결정시 침전물 속에 포함된 지표물질의 회수율은 90-95%로 좋지만, glycyrrhizin이 조금 밖에 제거되지 않았다. 5% 에탄올 재결정을 반복 시행 해보았으나, Glycyrrhizin 제거 보다 지표물질의 손실이 더 많았다.

결론적으로, 에탄올을 용해도를 이용한 결정화 방법은 Glycyrrhizin제거에 한계 있고, glabridin의 함량이 낮기 때문에 glycyrrhizin 제거 효율보다 glabridin 손실율이 더 크게 작용하는 것으로 사료된다.

Table 1-5. Contents of licorice functional components after ethanol pH control

공 정	감초량	생산량	회수율	glycyrrhizin	glabridin	비 고
pH cut	400 g	14.0 g	3.5 %	1.2 %	5.3 %	
30%EtOH 불용물	400 g	9.3 g	2.3 %	0.2 %	3.3 %	41 %회수
30%EtOH 상등액	400 g	4.7 g	1.1 %	4.8 %	9.3 %	
50%EtOH 불용물	400 g	3.9 g	0.9 %	-	0.8 %	
10%EtOH 불용물	400 g	6.5 g	1.6 %	0.6 %	7.2 %	69.4 %회수
10%EtOH 상등액	400 g	3.6 g	0.9 %	3.7 %	4.7 %	
70%EtOH 불용물	400 g	2.8 g	0.7 %	0.02 %	0.2 %	
5%EtOH 상등액	400 g	2.3 g	0.5 %	3.7 %	0.09 %	
5%EtOH 불용물	400 g	8.7 g	2.1 %	1.0 %	8.0 %	95.5 %회수
5%EtOH 불용물 1차	400 g	9.4 g	2.3 %	1.1 %	7.1 %	90.4 %회수
5%EtOH 불용물 2차	400 g	7.4 g	1.8 %	0.7 %	7.2 %	80.2 %회수
5%EtOH 불용물 3차	400 g	7.0 g	1.8 %	0.6 %	7.1 %	74.7 %회수

라. 흡착수지

흡착수지를 활용한 고순도 glabridin 최적 추출 조건 도출을 위한 추출 용매량을 결정하기 위하여 감초 시료의 10배 및 20배수 사용 시 각각의 회수율과 glabridin 성분함량을 측정하였다. 감초 대비 20배의 추출용매 사용 시 glabridin의 추출량은 많으나, 회수율이 낮아 추출용매를 10배로 결정하였다 (Table 1-6).

Table 1-6. Contents of licorice functional components after adsorbents treatment

공 정		감초량	생산량	회수율	glycyrrhizin	glabridin	비 고
10배 추출	추출물 (분획전)	100 g	860 ml	-	0.9 g	269.9 mg	
	흡착수지 제거 분획	100 g	25.5 g	25.5 %	3.4 %	0.01 %	
	흡착수지 회수 분획	100 g	1.8 g	1.8 %	0.45 %	12.2 %	219 mg 회수
20배 추출	추출물 (분획전)	100 g	1.99 L	-	1.1 g	309.3 mg	
	흡착수지 제거 분획	100 g	30.0 g	30 %	3.6 %	0.14 %	
	흡착수지 회수 분획	100 g	1.7 g	1.7 %	0.18 %	11.1 %	188 mg 회수

흡착 수지의 washing 량이 glabridin 회수율에 미치는 영향을 알아보기 위해서 다양한 washing 조건 하의 glabridin 회수율을 측정해 본 결과, 흡착 수지의 washing 량이 많을수록 glabridin의 회수율에는 거의 변화가 없으나 washing 회수 분획의 glabridin의 함량은 증가하고, glycyrrhizin은 효과적으로 제거되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과에 근거하여 흡착 수지 washing 량은 10 BV 로 결정하였다.

Table 1-7. Contents of licorice functional components after adsorbents washing

공 정	감초량	생산량	회수율	glycyrrhizin	glabridin	비 고
50% 에탄올 추출	100 g	26.7 g	26.7 %	3.8 %	0.8 %	
5 BV washing 제거 분획	100 g	25.7 g	25.7 %	3.9 %	0.1 %	
5 BV washing 회수 분획	100 g	1.7 g	1.7 %	0.1 %	11.7 %	198 mg 회수
10 BV washing 제거 분획	100 g	26.6 g	26.6 %	3.8 %	0.1 %	
10 BV washing 회수 분획	100 g	1.6 g	1.6 %	0.0 %	12.3 %	196 mg 회수

마. 초임계 추출

초임계 추출 (Supercritical extraction)은 임계온도 및 경계압력을 초과하는 상태의 유체를 의미하는 초임계 유체를 사용하는 추출법으로 이산화탄소나 펜탄 등이 초임계 유체로 사용된다. 임계 온도 이상에서 초임계 유체는 기체와 액체의 성질을 구별할 수 없게 되며 높은 밀도이면서도 낮은 점성과 큰 확산능력을 지녀 높은 효율을 지닌 추출법으로 알려져 있다. 초임계 유체의 특징은 기체와 같이 미세한 패턴의 내부공간까지 완벽하게 도달하여 잔류물과 오염물을 제거하고 혼합물질 내부에 단 하나의 성분만을 정확하게 추출할 수 있다.

일반적으로 이산화탄소는 임계점 (31.1℃, 73.8 atm)이 낮고 불활성, 무미, 무취, 무독성이므로 유용 물질의 추출, 분리가 기대되고 있으며, 식품 분야에서는 커피원두로부터 카페인을 제거하는 공정이나 맥주의 원료인 홉으로부터 유효성분을 추출하고 참기름의 경우 일부러 태우지 않고 볶은 참깨로부터 영양소, 맛, 향 변화 없이 추출하는데 활용되고 있다. 본 연구에서는 고 순도 glabridin을 함유한 감초 추출 공정 확립을 위해 감초의 초임계 추출을 수행하였다.

(1) 추출 조건에 따른 추출 효율 비교

초임계 추출을 위한 추출 압력, 보조용매 종류 및 함량, 온도는 기존 문헌 보고를 참조하여 1차적으로 300bar, 20% 에탄올, 40℃로 결정하였다.

추출 조건 최적화를 위해 추출 용매량에 따른 추출 효율을 비교한 결과 glabridin은 감초 대비 9배의 에탄올을 사용 시 최대 수율을 보였으며 purity를 90% 이상 높이기 위해선 7배의 용매로 추출해야 하는 것을 확인하였다 (Table 1-8).

Table 1-8. Contents of licorice functional components after adsorbents washing

추출용매량	glycyrrhizin		glabridin	
	농도 (µg/ml)	양 (mg)	농도 (µg/ml)	양 (mg)
445 ml	10.88	4.84 mg	564.78	251.3 mg
780 ml	5.34	1.79 mg	186.80	62.6 mg
965 ml	4.75	0.88 mg	108.58	20.1 mg
1,355 ml	4.12	1.61 mg	70.03	27.3 mg
1,770 ml	-	-	36.02	14.9 mg
2,185 ml	-	-	23.68	9.8 mg
2,635 ml	-	-	20.44	9.2 mg

(2) 대량 생산 공정 검토

(가) 300 mL 초임계 장비 (보조용매 함량별 추출 경향)

추출 조건 중 압력과 추출온도는 기존 데이터를 바탕으로 각각 300 bar, 40°C로 결정하였다. 생산 장비별로 보조용매 펌프의 용량이 다르므로, 보조용매 용량별 추출 경향을 살펴 보았다.

Fig. 1-9에 나타낸 바와 같이, 5% 보조 용매 사용 시 최대 감초 추출 시간은 250분이었고, 보조용매 사용량은 원료량 대비 5배수였고, 글라브리딘 회수율은 83%였다. 반면, 10% 보조 용매 사용 시 최대 감초 추출 시간은 300분이었고, 보조용매 사용량은 원료량 대비 11배수였고, 글라브리딘 회수율은 93%였다.

5% 보조용매를 사용하여 추출 시 보조 용매 사용량이 줄어드는 장점이 있으나, 글라브리딘 회수율이 10% 보조용매 사용할 때에 비해 10% 낮았다.

즉, 감초 추출물의 제조 목적은 글라브리딘 최대함량/글리시리진 최소함량이므로 보조용매 함량은 10%를 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단하였다. 그리고 Fig. 1-9에서 보듯이 글라브리딘 회수율 대비 효율적인 보조용매 사용량은 7배수로 결정하였다. 따라서 감초의 최적 초임계 추출 조건은 압력 (300 bar), 보조용매 (10%에탄올), 추출온도 (40°C), 에탄올 사용량 (원료 대비 7배수)로 결정하였다.

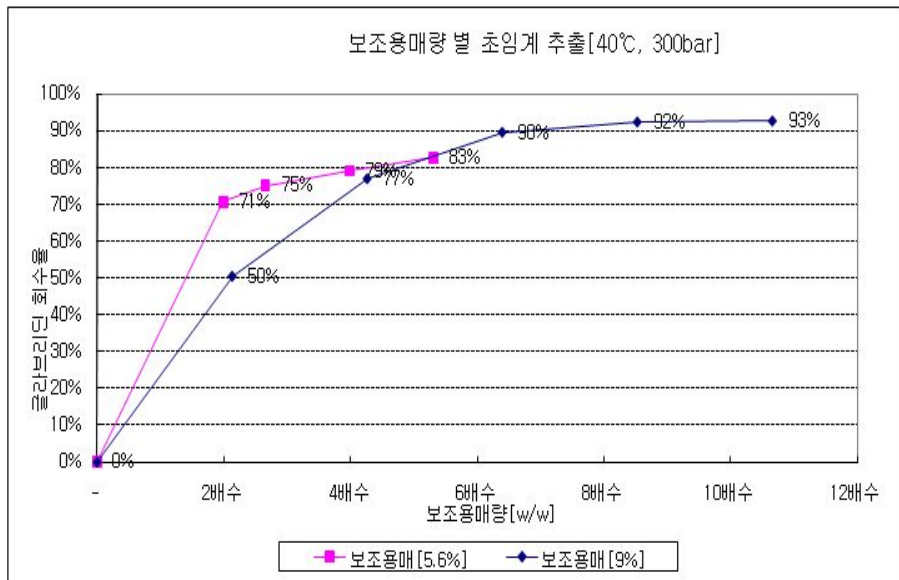
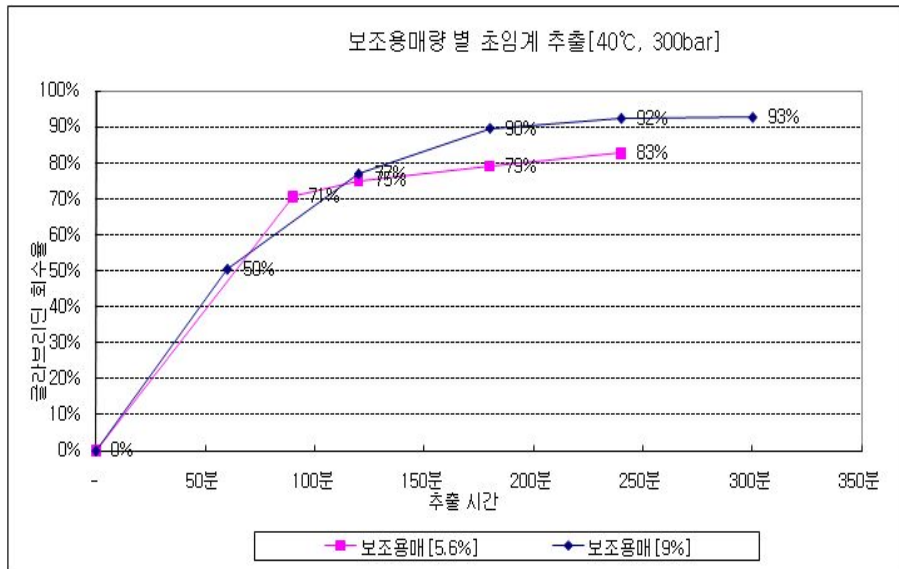


Fig. 1-9. Supercritical fluid extract condition for 300 mL scale

(나) 50 L 초임계 장비

추출 조건은 300 mL scale시 확립된 최적 조건 [압력 (300 bar), 보조용매 (10 %에탄올), 추출온도 (40°C), 에탄올 사용량 (원료 대비 7배수)]을 사용하였다.

감초 원료 17 Kg을 사용하여 추출한 결과, 추출수율은 3.7 %, 글라브리딘 함량은 3.2 %, 글리시리진 함량은 0.11 %로 추출되었고 글라브리딘 회수율은 60 %였다.

Fig. 1-10에 나타낸 바와 같이 추출된 글라브리딘량은 7배수의 보조 용매량에서도 직선적으로 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 보조 용매 펌프의 펌프 용량이 낮아 추출 시간이 3일이나 소요되었고, 더 이상 추출하는 것은 무의미하기 때문에 중단하였다.

50 L 초임계 장비의 보조용매 펌프 교체가 불가능하였기 때문에 해당 장비에서 scale up 시험은 중단하였고, 국내에서 이용 가능한 다른 초임계 장비 물색 한 결과 100 L 초임계 장비가 있어 100 L 용량의 초임계 추출 장비를 이용한 scale up 시험으로 진행하였다.

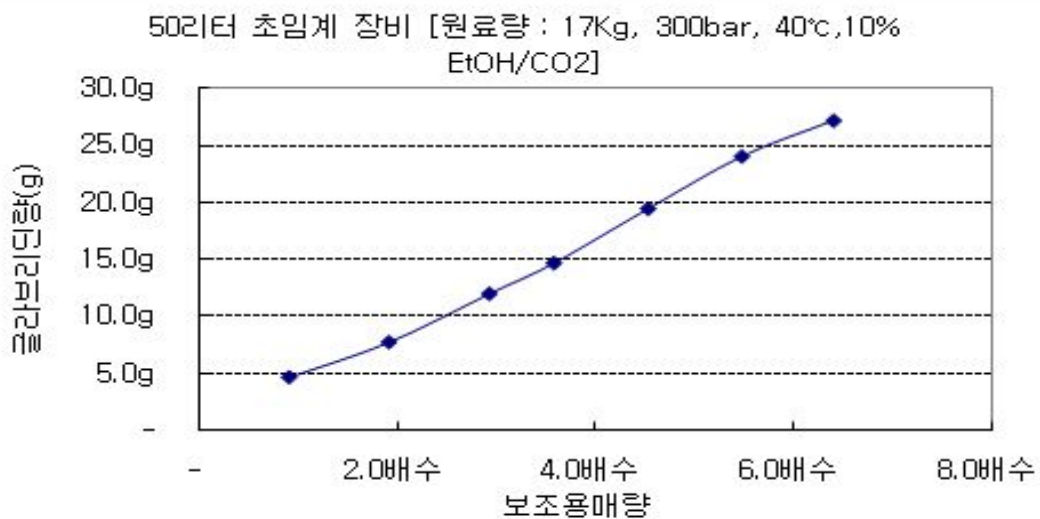


Fig. 1-10. Supercritical fluid extract condition for 50 L scale

(다) 100 L 초임계 장비

추출 조건은 300 mL scale시 확립하고 50 L scale에서도 적용하였던 최적 조건 [압력 (300 bar), 보조용매 (10 % 에탄올), 추출온도 (40°C), 에탄올 사용량 (원료 대비 7배수)]을 동일하게 사용하였다.

원료 35 Kg을 사용하여 추출한 결과, 추출수율은 1.28 %, 글라브리딘 함량은 7.9 %, 글리시리진 함량은 0.06 %로 추출되었고 글라브리딘 회수율은 52 %였다.

Fig. 1-11에 나타낸 바와 같이 에탄올의 사용량이 4배수 이상 일 경우 글라브리딘 추출량은 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 실제 추출된 글라브리딘의 량은 52%이지만, 감초 추출이 완료되는 현상으로 가능한 원인으로 추출조 내부 용매의 흐름성 또는 균일성의 문제일 것으로 판단되었다.

100 L 초임계 장비는 생산 설비 용량상의 문제는 없으나, 추출조 내부의 추출환경이 초임계 감초 추출물 추출조건과 맞지 않아 scale up 하기에는 부적절 한 것으로 판단되었다. 국내에서 이용 가능한 초임계장비 선택의 폭이 제한되어 있었어, 감초 초임계 추출 조건에 맞는 시스템 개발의 필요성이 대두되었다. 따라서 감초의 초임계를 이용한 추출은 잠정적으로 보류하고, 초임계 추출과 유사한 용매 추출 공정을 개발하기로 결정하였다.

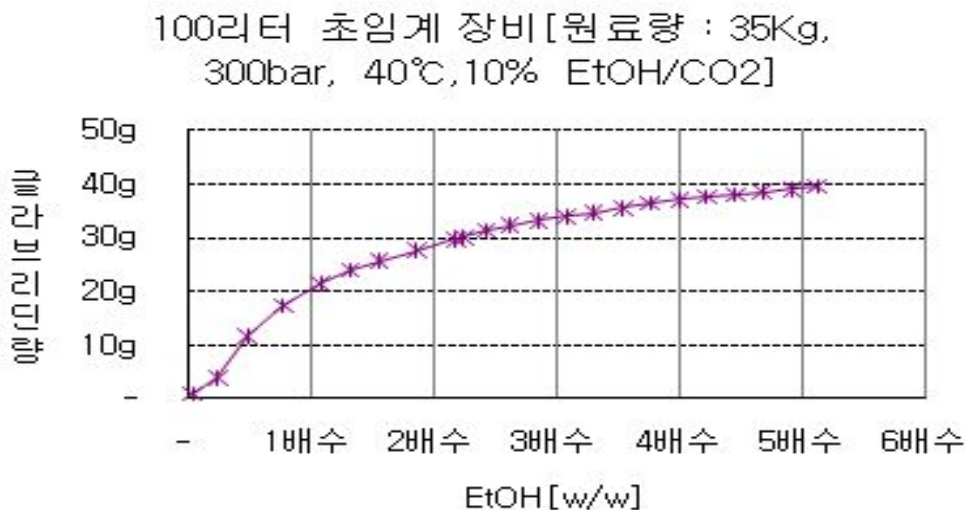


Fig. 1-11. Supercritical fluid extract condition for 100 L scale

바. 용매 조합

(1) 헥산

초임계 추출 시 사용하였던 용매 조건은 10% 에탄올/이산화탄소였기 때문에 초임계 이산화탄소 유체와 유사한 용매는 헥산이므로 헥산과 에탄올의 혼합 비율별로 추출 시험을 실시하였다.

먼저 추출 용매의 섞임성을 살펴보기 위해 헥산과 에탄올을 이용하여, 100%헥산, 10%에탄올/90%헥산, 20%에탄올/80%헥산, 30%에탄올/70%헥산, 40%에탄올/60%헥산, 50%에탄올/50%헥산, 60%에탄올/40%헥산, 70%에탄올/30%헥산, 80%에탄올/20%헥산, 90%에탄올/10%헥산, 95%에탄올/5%헥산, 97%에탄올/3%헥산, 100% 에탄올을 만들었다. 그 중 10%에탄올/90%헥산, 20%에탄올/80%헥산, 30%에탄올/70%헥산, 40%에탄올/60%헥산 용액은 헥산과 에탄올이 섞이지 않고, 분리가 되어 추출 용매로 적합하지 않았다.

감초 1 g에 헥산/에탄올 조합 용매를 10 mL씩 분주 후 Sonication으로 2시간동안 추출하였다. 추출액은 0.2 μ m 여과 후 감압농축 건조하여 추출 수율을 측정하였으며 건조된 시료에 에탄올을 넣어 용해한 후 글라브리딘과 글리시리진 함량을 HPLC로 분석하였다.

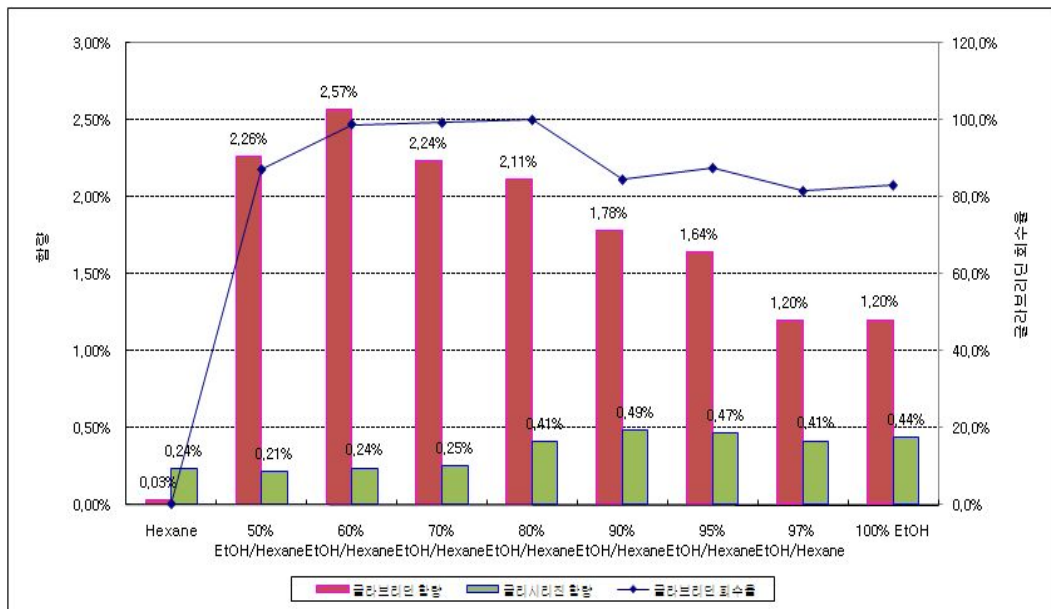


Fig. 1-12. Hexane/Ethanol extract condition

Fig. 1-12와 같이 100 % 헥산 추출 조건에서는 글라브리딘은 거의 추출 되지 않았고, 에탄올이 포함되어야만 글라브리딘이 추출되었다. 이 때 에탄올/헥산 조합용매의 글라브리딘 회수율은 80 %이상 이었고 에탄올 함량이 높아질수록 글라브리딘 함량은 감소하고,

글리시리진함량은 증가하였다.

감초 추출물 제조 공정의 제일 목표는 글라브리딘 최대함량, 글리시리진 최소함량의 추출물을 제조하는 것이므로 Fig. 1-12에서 나타난 바와 같이 글라브리딘 최대함량, 글리시리진 최소 함량으로 추출되는 용매 범위는 50 - 70 % 에탄올/헥산 이였고, 그 중 초임계 추출 용매 (20 % 에탄올/이산화탄소)와 용매극성이 가장 근접한 용매인 50 % 에탄올/헥산 용액으로 결정하였다.

50 % 에탄올/헥산 용매를 사용하여 제조하였을 경우 글라브리딘 회수율과 글리시리진의 함량은 초임계 추출과 유사하지만, 글라브리딘의 함량은 초임계 추출보다 낮게 추출되었다. 이는 감초대비 에탄올 량이 많아 추출 극성이 높아졌기 때문인 것으로 판단되었다. 그리하여 원료대비 에탄올/헥산 량별로 추출 시험을 수행하였다.

50%에탄올/헥산 용매를 원료 무게 대비 2배, 4배, 6배, 8배, 10배, 20배 분주한 후 sonication으로 2시간 동안 추출 후 추출액을 0.2 μ m 여과 후 감압농축 건조하여 추출 수율을 측정하였다. 건조된 시료에 에탄올을 넣어 용해 후 글라브리딘과 글리시리진 함량을 HPLC로 분석하였다.

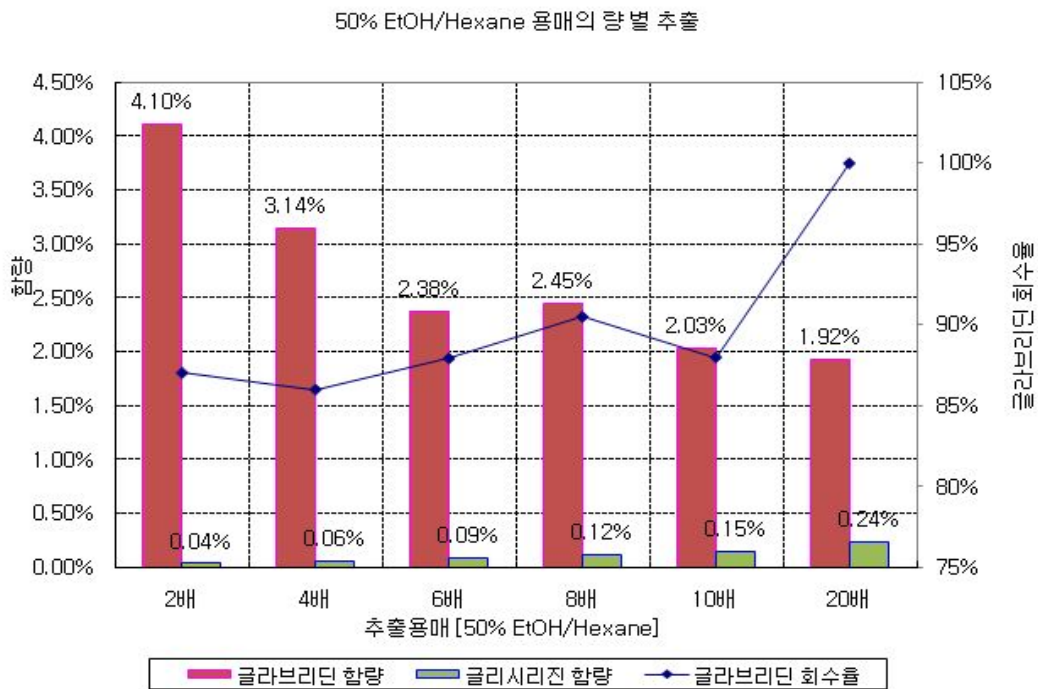


Fig. 1-13. Hexane/Ethanol extract condition with solvent volume modification

그 결과 Fig. 1-13에서 보듯이 글라브리딘 회수율은 초기 시험과 마찬가지로 전부 85% 이상 회수 되었다. 용매량이 증가할수록 글라브리딘 회수율도 조금씩 증가하지만, 예상한 바와 같이 글라브리딘의 함량은 감소하고, 글리시리진 함량은 증가하였다.

결론적으로, 감초 대비 용매의 량을 2배로 사용하여 추출 하였을 경우 글라브리딘 함량 4%, 추출 수율 4.4%로 초임계 추출과 유사한 결과를 보여, 용매를 이용한 추출 가능성을 보여 주었다.

(2) 기타 용매

50% 에탄올/헥산 용매 조합 보다 더 좋은 추출 용매를 탐색하기 위해 식품 공정에 사용 가능하고 용매극성이 비슷한 다양한 용매를 사용하여 시험해 보았다.

건강기능식품 공전에 따르면 추출용매는 식품첨가물의 기준 및 규격에 적합하면 가능하며 잔류용매 기준에 따르면 된다. 이에 해당하는 것으로는 헥산, 이소프로필알콜, 초산에틸이 있다.

원료 10 g에 여러 가지 용매 (아세톤, 이소프로필알콜, 에테르, 에탄올, 에틸아세테이트, 아세톤/헥산, 50% 이소프로필알콜/헥산, 50%에테르/헥산, 50%에탄올/헥산) 20 mL을 분주하고, sonication으로 2시간 동안 추출 하였다. 추출액을 0.2 μm 여과 후 감압농축 건조하여 추출 수율을 측정하였으며 건조된 시료에 에탄올을 넣어 용해 후 글라브리딘과 글리시리진 함량을 HPLC로 분석한 결과를 Fig. 1-14에 나타내었다.

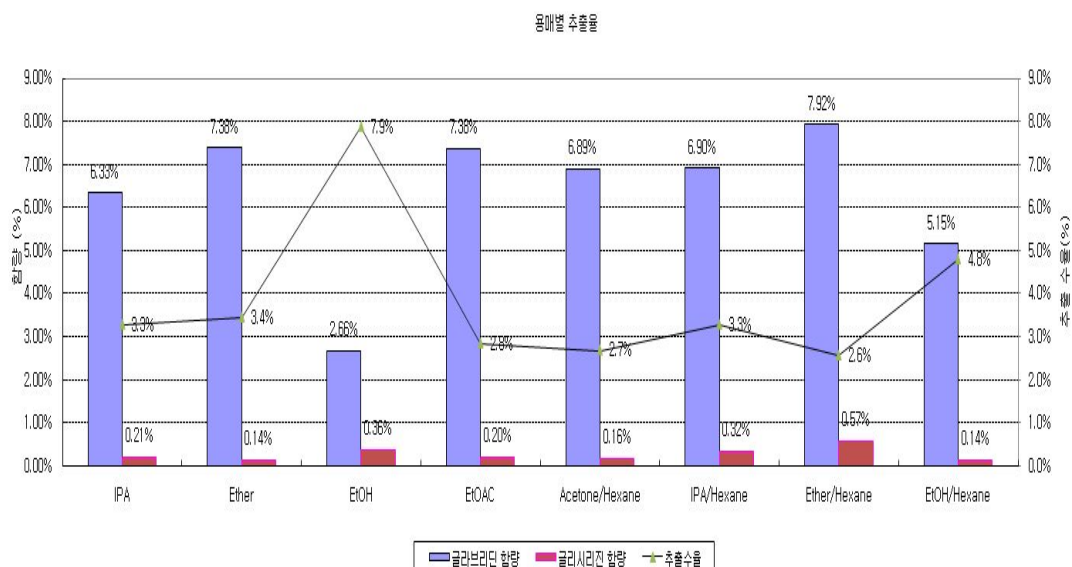


Fig. 1-14. Various solvents extract conditions

50% 에탄올/헥산 용매 조합은 5.2%의 글라브리딘 함량으로 추출 되었고, 용매별 추출물의 글라브리딘 함량을 측정한 결과, 에테르/헥산 (7.9%), 에테르 (7.4%), 에틸아세테이트 (7.4%), 아세톤/헥산 (6.9%), 이소프로필알콜/헥산 (6.9%), 이소프로필알콜 (6.3%), 에탄올 (2.7%) 순으로 추출 되었다.

이 결과에 근거해 감초 용매 추출 공정의 추출용매를 이소프로필알콜로 시도해 보기로 하였다. 그 이유는 첫째, 공정에서 용매의 회수 및 재사용이 조합용매에 비해 용이하고 둘째, 식품 제조 공정에 사용가능한 용매이면서 셋째, 다른 용매 (에테르, 헥산, 에틸아세테이트, 아세톤)보다 취급이 용이하기 때문이다.

사. 이소프로필알코올

이소프로필알콜을 이용한 용매 추출의 최적의 조건을 설정하여야 하지만, 아래 표에서 보듯이 현 조건에서 글라브리딘은 93 %이상 회수되고, 원료대비 추출 용매량도 최소량으로 사용하기 때문에 추출 조건시험은 별도로 수행하지 않기로 하였다.

이소프로필알콜을 이용하여 1배, 10배, 100배 scale up 시험을 수행하였다. 이를 위해 감초 10 g, 100 g, 1 Kg에 이소프로필알콜 20 mL, 200 mL, 2 L을 각 각 분주하고, sonication으로 2시간 동안 추출 하였다. 추출액을 0.2 μ m 여과 후 감압농축 건조하여 추출 수율을 측정 하였다. 건조된 시료에 에탄올을 넣어 용해 후 글라브리딘과 글리시리진 함량을 HPLC로 분석하였다.

Table 1-9. Scale up study of isopropyl alcohol extraction

	감초량	추출 수율	글라브리딘		글리시리진
			함량	회수율	함량
IPA 1배	10 g	3.3 %	6.3 %	99 %	0.21 %
IPA 10배	100 g	3.9 %	5.8 %	93 %	0.03 %
IPA 100배	1,000 g	3.9 %	6.0 %	98 %	0.59 %

Table 1-9에 나타낸 바와 같이 이소프로필 알콜 scale up에 따라 추출 수율은 3.3 - 3.9 %, 글라브리딘 함량은 5.8 - 6.3 %, 글라브리딘 회수율을 93 - 99 %, 글리시리진 함량은 0.03 - 0.59 %로 추출되었다. 100배까지 scale up 시 추출 수율이나, 글라브리딘 함량 변화는 거의 없었다. 따라서 scale up 상의 문제가 없을 것으로 판단하였다.

아. 주장

지금까지 검토 결과, 초임계를 이용한 감초 추출물 제조는 단순한 제조공정, 유기용매가 포함되지 않는 제품, 독성 부담이 없고, 짧은 공정 시간 등 많은 유용한 장점을 가지나, scale up에서 문제점이 야기되었다.

이를 위해 새로운 제조 방법을 검색하였고 간단한 제조공정, 최저의 제조 단가, 짧은 제조 시간을 가지며, 단일용매로 초임계 추출의 효과를 주는 이소프로필알콜(IPA)을 이용한 감초 추출물 제조방법을 확립하였으나, 이소프로필알콜 추출물을 기능성 원료로 개발할 경우, 소재의 안전성 확립을 위한 추가적인 독성시험이 요구되어 개발 기간 및 비용 증가의 문제가 발생하였다. 이를 해결하기 위한 차선의 방법으로 식품제조에 허가된 용매인 주정을 가지고 추출하는 공정을 개발하고자 하였다.

(1) 추출 용매량의 최적화

감초 추출물 제조 목적에 맞는 추출 조건의 최적화를 위해 다음의 2가지의 기준을 바탕으로 진행하였다. 첫 번째로 감초 원료는 추출 시간, 추출 용매량, 추출 효율 등을 높이기 위하여 분말을 사용하였다. 두 번째로 감초 추출 시 감초 분말이 원활하게 혼합되기 위해서는 최소 4배수의 추출 용매가 요구되었다.

추출 용매량의 변화는 4배수와 8배수를 비교하였다.

4배수일 경우 감초 1 g당 글라브리딘은 1.6 g, 글리시리진산은 0.8 g 추출되었고, 8배수일 경우 감초 1 g당 글라브리딘은 1.6 g, 글리시리진산은 1.2 g 추출되었다.

즉, 추출 용매량이 4배수대비 8배수로 증가 시 글라브리딘의 추출량은 0.3%증가했지만, 글리시리진산의 추출량은 42.3%증가하여, 글라브리딘/글리시리진산 비가 2.0에서 1.4로 감소하였다. 따라서 추출 용매량은 8배수보다 4배수가 감초 추출물 제조 목적에 적합하였다.

(2) 추출 온도의 최적화

기존에 최적화된 추출 용매량 (4배수)을 바탕으로 추출 온도를 최적화 하기위하여 실온과 가열 (40℃) 조건을 비교하였다.

실온 추출 시 감초 1 g당 글라브리딘은 1.5 g, 글리시리진산은 0.4 g 추출되었고, 40℃ 추출 시 감초 1 g당 글라브리딘은 1.6 g, 글리시리진산은 0.8 g 추출되었다.

즉, 추출 온도가 실온대비 40℃로 증가 시 글라브리딘의 추출량은 5.4 %증가했지만,

글리시리진산의 추출량은 94.3 %증가하여, 글라브리딘/글리시리진산 비가 3.6에서 2.0으로 감소하였다. 따라서 추출 온도는 가열 (40℃) 추출보다 실온 추출이 감초 추출물 제조 목적에 적합하였다.

Table 1-10. Optimization of extration temperature for licorice ethanol extract

추출 조건	실온	40℃	40℃
	4배수	4배수	8배수
추출된 글라브리딘 량 (감초 1g당)	1,542 µg/g	1,625 µg/g	1,630 µg/g
추출된 글리시리진산 량 (감초 1g당)	423 µg/g	822 µg/g	1,174 µg/g
글라브리딘/글리시리진산 비	3.6 배	2.0 배	1.4 배

(3) 추출 시간의 최적화

앞서 확립된 최적화된 추출 용매량 (4배수)과 추출 온도 (실온)를 이용하여 추출 시간을 최적화하였다. 감초 분말에 주정 4배수를 넣고, 실온에서 혼합하면서 시간별로 추출 수율과 지표물질의 순도 변화를 확인하였다.

Fig. 1-15의 왼쪽 그림에서 보듯이 추출 2시간 이후에는 지표물질의 추출량이 현저하게 감소하지만, 감초 추출물의 추출량은 8시간까지 지속적으로 증가함을 확인하였다.

우측 그림에서 나타난 것과 같이 추출 2시간 이후에는 시간당 지표물질의 추출량이 현저하게 감소하고, 지표물질의 회수율도 추출 2시간 이전에는 급격하게 증가하지만, 이후에는 현저하게 감소함을 확인하였다.

즉, 추출 2시간 이전에는 지표물질의 추출이 높고, 불순물의 추출이 낮아 감초 추출물 제조 목적과 적합하지만, 2시간 이후에는 지표물질의 추출은 감소하고, 불순물의 추출이 증가하게 된다. 따라서 최적 추출 시간은 2시간으로 결정하였다.

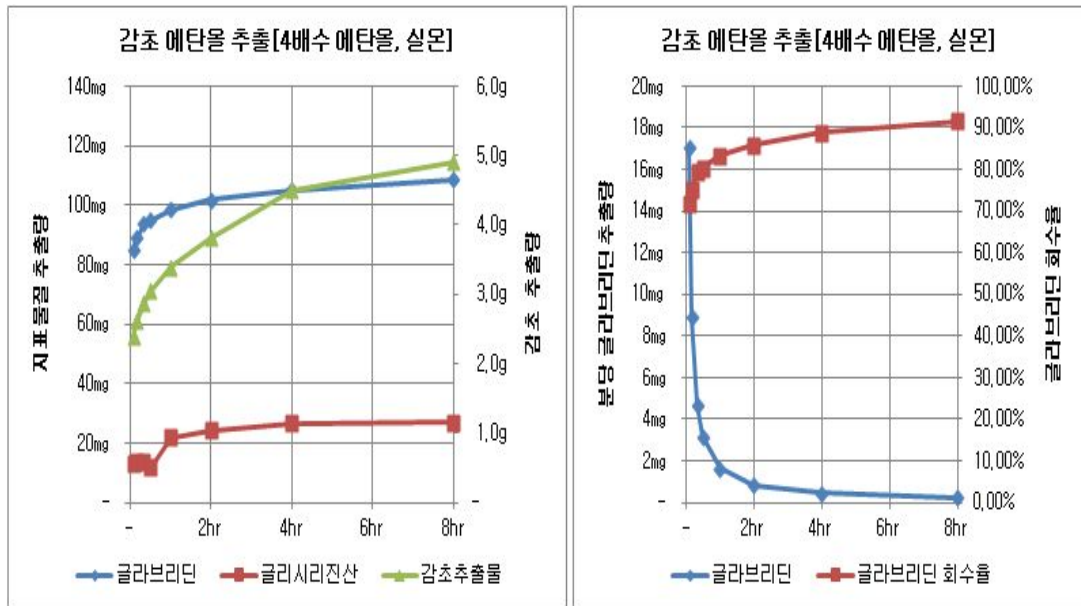


Fig. 1-15. Optimization of extraction time for licorice ethanol extract

(4) 대량 생산 공정 검토

지금까지 확립된 감초 주정 추출 최적 조건은 감초 분말에 원료량 대비 4배수 주정을 넣고, 실온, 8시간 추출 후 여과 건조하는 방법이다. 감초 주정 추출물의 특성은 수율은 12.2 %, 글라브리딘의 함량은 1.52 %, 글리시리진산의 함량은 0.76 %로 확인되었다 (Table 1-11).

Table 1-11. Optimized licorice ethanol extract condition

	주정 사용량	추출 수율	글라브리딘 함량	글리시리진산 함량	글라브리딘 /글리시리진산
감초 주정 추출물	4배수	12.2 %	1.52 %	0.76 %	2.0

감초 200 Kg에 800 L 주정을 투입하고, 실온에서 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 슬러지를 200 L의 주정으로 씻어 재 여과 후 추출액에 혼합하였다. 추출액을 40도 이하에서 감압농축 후 주정 40 L을 이용하여 추출물을 회수 후 15시간 정치하였다. 상등액에 정제수 550 L을 넣고, 1시간동안 교반 후 24시간 정치 후 침전물만 회

수 건조하였다. 글라브리딘 회수율은 추출에 이용한 감초원료의 최대 글라브리딘 함량 (2.1 mg/g)을 분석한 후 계산하였다 (Table 1-12).

Table 1-12. Pilot scale up of licorice ethanol extract

공정	감초 사용량	주정 사용량	추출 수율	글리시리 진산	글라브 리딘	글라브리딘 /글리시리진산	글라브리딘 회수율
주정 추출	200 kg	1,000 l	8.1 %	0.65 %	2.08 %	3.2	80 %
불용물 제거	-	40 l	5.8 %	0.60%	2.90 %	4.8	80 %
추출물 회수	-	-	3.0 %	0.35 %	5.23 %	14.9	75 %

Table 1-13는 감초추출물 1 Kg을 생산하는데 요구되는 공정 단계별 원재료 단가이다. 즉 감초추출물 1 kg을 생산하기 위해서는 감초원료는 31.3 kg이 필요하고 추출을 위해 필요한 주정의 양은 53.2 L, 정제수는 125 L 이며 비용은 약 41만원정도 소요되는 것으로 나타났다.

Table 1-13. Cost for the production of licorice ethanol extract (1 kg)

공정단계	주정 추출		불용물제거	추출물회수
	감초	주정		
원료명	감초	주정	주정	정제수
사용량	31.3 kg	46.9 L	6.3 L	125.0 L
단 가	7,500원	3,222원	3,222원	30원
소 계	234,375원	151,042원	20,139원	3,750원
계	385,417원		20,139원	3,750원
총계	409,306원			

자. 추출 공정 최적화 결론

(1) 흡착 vs 초임계

초임계 추출 공정은 흡착수지 공정에 비해 제조 시 글라브리딘 순도는 낮으나 글라브리딘 유사 유도체등이 다량 추출되어 두 공정별 추출물의 생리활성은 유사하게 나타났으며, 초임계 추출의 경우 흡착수지 활용 추출물에 비해 추출물의 양이 2배 정도 많이 생산되었다 (Table 1-14).

Table 1-14. Comparison between adsorbents applied extract and supercritical fluid extract

	흡착수지 활용 추출물	초임계 추출물
추출물 중량 (감초 1 Kg 당 추출물 g)	15.1	35.6
glabridin 순도 (%)	14.5	7.2
glabridin 중량 (g)	2.19	2.57

또한 흡착 흡착수지 공정은 (추출->여과->흡착수지 로딩->washing->용출->여과->건조 등) 복잡하며 장시간과 많은 인원을 요구하지만, 초임계추출은 (추출->건조) 간단한 제조 공정을 가지며 투입되는 직접비도 흡착수지 공정에 비해 낮았다 (Table 1-15).

Table 1-15. Comparison of cost demand between adsorbents applied extract and supercritical fluid extract

추출물 1kg 제조시	흡착수지 이용 제조시 ^a			초임계 이용 제조시 ^b		
	소요량	단가 (원)	소계 (원)	소요량	단가 (원)	소계 (원)
감초 (Kg)	66	1,200	79,470	28	1,200	33,708
용매 (L)	166	1,767	292,550	164	500	82,081
보조용매 (L)				82	1,767	145,037
흡착수지 (L)	0.3	16,900	5,596			
계			377,616			260,826

^a흡착수지 이용 제조 조건 : 용매 재사용 [농축회수 (흡착수지 통과한 추출액, 흡착수지 용출액), 재사용 (흡착수지 washing액)], Elution용매 새 용매 사용, 에탄올 70%회수, 레진 100회 사용

^b초임계 이용 제조 조건 : 에탄올 70%회수, CO2 는 90% 회수

(2) 초임계 vs ISP

감초의 초임계 추출물과 이소프로필알콜 추출물 간의 추출 효율을 비교한 결과는 Table 1-16과 같다. 즉 이소프로필알콜 추출의 경우 초임계 추출과 유사한 정도의 우수한 고 순도 글라브리딘 함유 추출물을 제조할 수 있음을 확인하였다.

Table 1-16. Comparison between supercritical fluid extract and isopropyl alcohol extract

	초임계추출 이용 제조	이소프로필알콜 추출
제조량	35.6 g	38.9 g
글라브리딘 함량	7.2 %	6.0 %
추출된 글라브리딘 량	2.57 g	2.34 g

또한, 감초의 초임계 추출 제조와 이소프로필알콜 이용 제조 공정의 원료비를 비교한 결과를 Table 1-17에 나타내었다.

Table 1-17. Comparison of cost demand between supercritical fluid extract and isopropyl alcohol extract (1 kg)

	초임계 이용 제조			이소프로필알콜 이용 제조		
	사용량	단 가	소 계	사용량	단 가	소 계
감초	28 Kg	200원	33,708원	5.7 Kg	1,200원	30,840원
용매	164 Kg	500원	82,081원	18 L	2,555 원	46,000원
보조용매	82 L	767원	145,037원			
계			260,826원			76,840원

이소프로필알콜 이용 제조 사용량 계산 시 : 이소프로필알콜 70% 회수

초임계 이용 제조 사용량 계산 시 : 에탄올 70%회수, CO2 는 90% 회수

(3) 결론

글라브리딘 함유량과 순도가 높은 감초 추출물의 제조를 위하여 흡착수지를 이용한 제조 방법을 개발하였다. 그러나 높은 글라브리딘의 함량의 제품을 제조할 수 있지만, 제조 수율이 낮고, 공정단가와 공정시간이 많이 요구되는 문제점이 발생하였다.

그 다음으로 흡착수지를 이용한 제조의 단점을 보완하는 초임계를 이용한 제조 방법을 개발하였다. 단순한 제조공정, 유기용매가 포함되지 않는 제품, 독성 부담이 없고, 짧은 공정 시간, 용매 회수가 용이하고, 환경문제가 없는 등 많은 유용한 장점을 가지나, scale up에서 감초 초임계 조건에 맞는 시스템을 개발하든지 생산용 초임계 추출 장비에 맞는 새로운 추출 조건을 최적화해야하는 문제점이 야기되어 시간과 경비의 문제로 현 과제에서는 이 방법을 적용할 수 없어 새로운 제조 방법을 검색하였다.

그 결과 간단한 제조공정, 최저의 제조 단가, 짧은 제조 시간을 가지며, 식품 제조 시 추출용매로 가능한 단일용매로 초임계 추출의 효과를 주는 이소프로필알콜을 이용한 감초 추출물 제조방법을 개발하였으나, 추가적인 독성시험이 요구되어 개발 시간 및 소요 경비 상승의 문제가 발생하였다.

그래서 차선의 방법으로 주정을 이용한 제조 방법을 개발하게 되었다. 제조 원재료 단가는 이소프로필알콜을 이용한 제조보다 높지만 다른 제조 방법에 비해 저렴하고, 지표물질의 함량은 이소프로필알콜을 이용한 제조와 유사하였다.

결론적으로 이소프로필알콜을 이용한 제조방법이 원재료 단가도 가장 저렴하고, 제조공정도 간단하지만 추가적인 독성시험이라는 난제 때문에 이를 보완한 주정을 이용한 제조방법으로 결정하였다.

5. 원료 생산을 위한 기능성 증진

감초 추출물 제조 공정 최대 목표는 최대함량의 글라브리딘과 최소함량의 글리시리진산을 포함하는 분획제조이다. 하지만 감초 주정 추출물은 글라브리딘/글리시리진산 비가 2.0으로 제조 목적에 적합하지 않았다.

이를 위해 감초 주정 추출물 속에 포함된 글리시리진산의 함량은 낮추고, 글라브리딘의 함량은 높일 수 있는 공정을 추가적으로 개발하였다.

가. 유화제 검토

감초 주정 추출물의 글라브리딘/글리시리진산 비를 높일 수 있는 방법으로 감초 주정 추출물 속에 포함된 글라브리딘만 선택적으로 용해 할 수 있는 유화제를 도입하기로 하였다. 식품에 사용가능하고, 감초 주정 추출물의 용해도가 좋은 유화제를 검색한 결과 Capryol 90, Glycerol MonoLaurate, Sucrose Laurate를 선정하였고 각 유화제의 용해도를 측정하였고 그 결과는 글라브리딘과 글리시리진산의 비율 (ratio)로 확인하였다.

Fig. 1-16과 같이 글라브리딘/글리시리진산 함유 비율은 Capryol 90은 28.7, Glycerol Mono Laurate는 2.2, Sucrose Laurate는 2.1, 감초 주정 추출물은 2.2로 확인되었다.

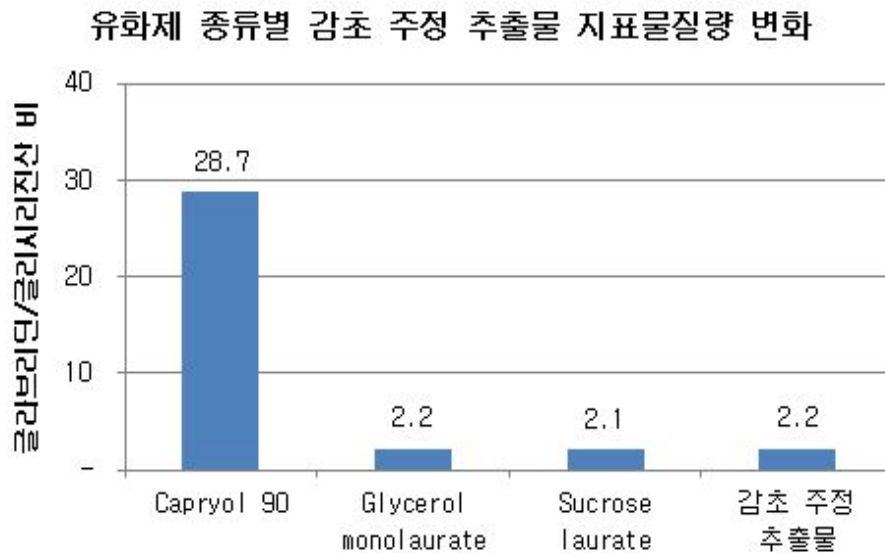


Fig. 1-16. The glabridin/glycyrrhizic acid ratio

나. Capryol 90 최적화

(1) Capryol 90과 감초 주정 추출물의 혼합비 설정

Capryol 90은 감초 주정 추출물에서 글리시리진산은 배제하고, 선택적으로 글라브리딘만 용해 가능한 것이 확인되었으므로 Capryol 90을 이용하여 제제 개발을 시도하였다.

먼저 감초 주정 추출물과 Capryol 90의 혼합비를 결정하기 위하여 혼합 비율별로 지표물질의 용해도와 회수율을 조사하였다.

Fig. 1-17 왼쪽 그림에서 나타낸 바와 같이, 감초 주정 추출물 2.5 - 200 mg/g Capryol 90의 농도까지 글라브리딘과 글리시리진산의 용해량은 직선적으로 증가하였다. 그러나 이와 달리, 글라브리딘/글리시리진산 비는 감초 주정 추출물 2.5 - 100 mg/g Capryol 90 농도까지 직선적으로 증가하지만, 그 이후 농도에서 평형을 이루었다 (Fig. 1-17, Right). 그리고, 지표물질의 회수율은 감초 주정 추출물 2.5 mg/g Capryol 90에서 80%이지만, 감초 주정 추출물 5.0 mg/g capryol 90에서 48%로 감소하였다.

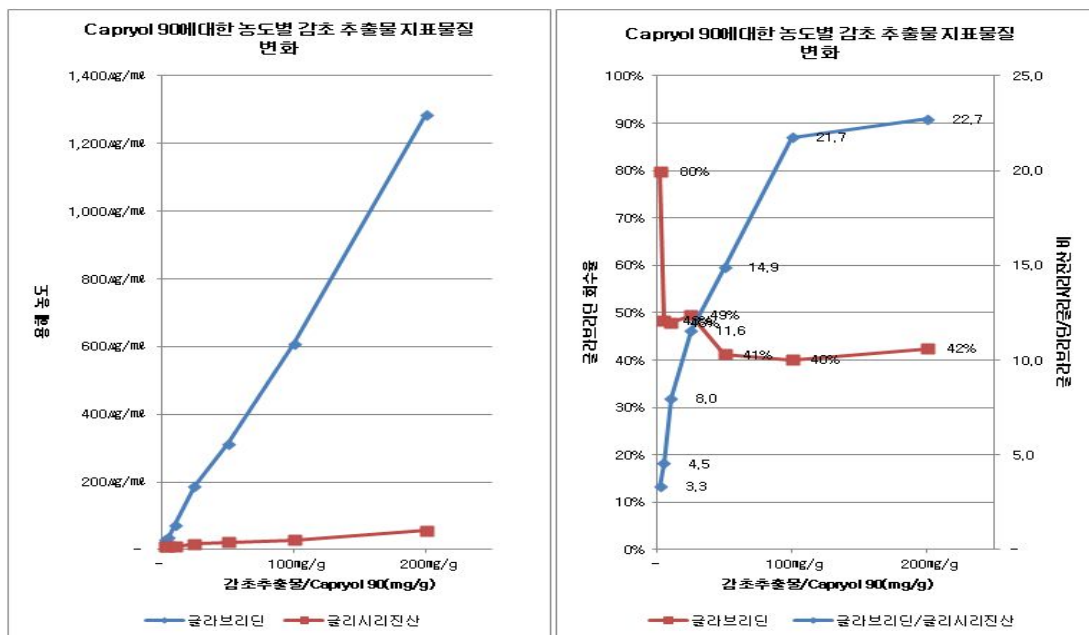


Fig. 1-17. Optimization of mixing ratio between licorice ethanol extract and capryol 90

(2) 보조제 적용

감초 주정 추출물에 대한 Capryol 90 적용은 글라브리딘/글리시리진산의 비를 20배 이상으로 증가시키는 장점을 가지지만, 반면 지표물질의 회수율은 40%로 낮은 단점을 가짐을 확인하였다. Capryol 90을 이용한 제제화는 지표물질의 회수율만 증가되면 유효한 방법이라 판단되어 회수율을 높일 수 있는 방법을 검색하였다. 이를 위해 식품소재에 자유롭게 사용가능하고, 지표물질에 대한 용해력이 뛰어난 주정을 보조제로 선택하여 적용해 보았다.

주정과 Capryol 90의 비율을 조정하면서 감초 주정 추출물 속에 포함된 글라브리딘/글리시리진산 비와 지표물질의 회수율을 조사하였다. Fig. 1-18에 나타낸 바와 같이

글라브리딘/글리시리진산 비는 주정의 비율이 감소할수록 증가함을 확인하였다. 지표물질의 회수율은 100% 주정에서 50% 주정 (Capryol 90 : 주정 = 1 : 1) 사이에서는 80%이상을 유지하지만, 33% 주정 (Capryol 90 : 주정 = 2 : 1) 에서 75.9%로 감소하고, 17% 주정 (Capryol 90 : 주정 = 5 : 1) 에서 34.3%로 보조제로서의 주정의 역할이 사라짐을 확인하였다.

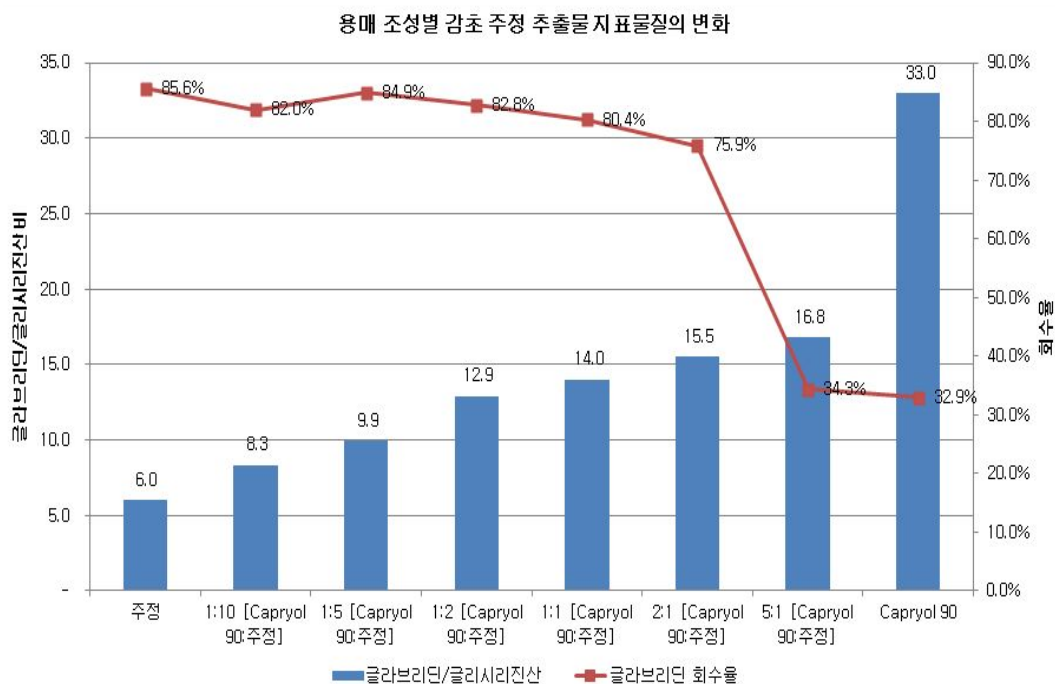


Fig. 1-18. Application of ethanol as a supplement for capryol 90 optimization

(3) 대량 생산 공정

감초 추출물 제조 공정상 지표물질의 회수율이 최소한 80%이상 되어야 하므로 용매는 50% 주정 (Capryol 90 : 주정 = 1 : 1) 선택하여 scale up 시험을 실시하였다. 감초 주정 추출물에 50% 주정 (Capryol 90 : 주정 = 1 : 1)을 넣어 300 mg/mL로 용해 후 원심분리 (3,000 rpm, 30분)로 상등액을 회수하였다. Sucrose laurate 0.7배수 (감초 주정 추출물대비)를 넣고, 감압 농축하여 주정을 제거하였다. 그 결과 황갈색의 투명한 용액상의 제제를 얻었다.

(4) 제제 안정성

유화제 제제의 가장 큰 문제점은 위산에서의 안정성이다. 따라서 제조된 감초 추출물 Capryol 90 제제에 대한 위산 안정성을 검토하였다.

감초 추출물 Capryol 90 제제는 물과 혼합 시 백색유화가 되었다가 점차로 물층과 유화층으로 분리가 일어남을 확인하였다. 그리고, 감초 추출물 Capryol 90 제제와 0.1 M HCl의 혼합 시 백색유화가 되었다가 점차 유화입자가 커져 침전이 일어남을 확인하였다.

따라서 이 제제는 지표물질 회수율이 80.4%이고, 글라브리딘/글리시리진산 비는 14 배이고, 제제 성상도 투명한 액상인 장점을 가졌으나, 소화기관을 거치면서 유화가 불안정해져 체내 흡수가 제대로 되지 않을 것으로 판단되었다.

다. 주정 활용 제조 방법 개발

(1) 지표물질의 용해도 및 회수율

감초 추출물 Capryol 90 제제는 유화제의 큰 문제점인 위산안정성 문제가 야기하여 새로운 제조 방법을 검색하였다. 이를 위해 식품에 자유롭게 사용가능하고, 추가적인 독성 시험의 문제점이 없는 주정을 선택하여 감초 주정 추출물 속의 지표물질의 변화와 회수율을 조사하였다.

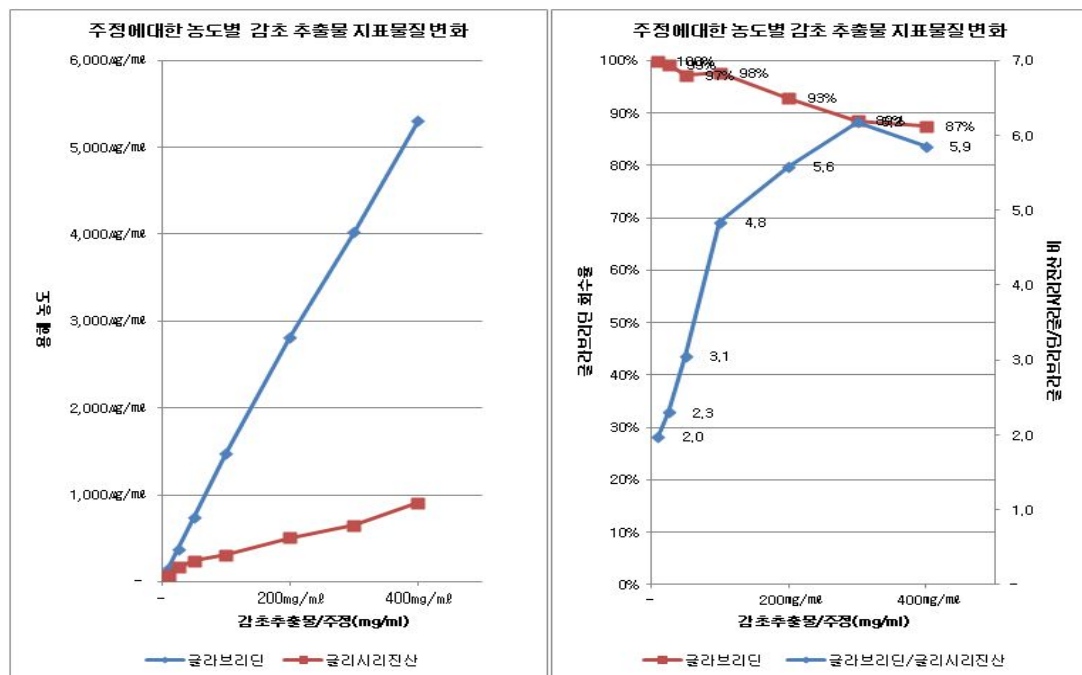


Fig. 1-19. Glabridin solubility measurement after ethanol treatment

Fig. 1-19의 좌측 그래프에서 보이는 바와 같이 감초 주정 추출물 400 mg/mL 농도 까지 글라브리딘과 글리시리진산의 용해량은 직선적으로 증가하였다. 또한 글라브리딘/글리시리진산 비는 감초 주정 추출물 10 - 100 mg/mL 농도까지 직선적으로 증

가하고, 그 이후에서 완만하게 증가하며, 300 mg/mL 에서 6.2로 최대가 되었다 (Fig. 1-19, Right). 그리고, 지표물질의 회수율은 전 농도에서 87 %이상으로 높은 것으로 확인되었다.

(2) 대량 생산 공정

주정은 감초 주정 추출물에서 선택적으로 글라브리딘만 용해 가능한 것을 확인하였으므로 주정을 이용하여 공정 개발을 시도하였다.

먼저 감초 주정 추출물과 주정의 용해 비율은 글라브리딘/글리시리진산 비가 최대인 농도 (300 mg/mL)로 결정하여 공정 적용 가능성을 조사하였다.

감초 주정 추출물에 300 mg/mL이 되도록 주정을 넣고 용해 후 원심분리 (3,000 rpm, 30분)로 상등액을 회수 한 후 건조하였다. 그 결과 Table 1-18에 나타낸 바와 같이 글라브리딘/글리시리진산 비는 2.5에서 4.4로 증가하였고, 지표물질 회수율은 88 %로 확인되었다.

Table 1-18. Extract yield after ethanol use for solubilizer

	공정수율	글라브리딘 함량	글리시리진산 함량	지표물질 회수율	글라브리딘/ 글리시리진산
감초 주정 추출물	100 %	1.47 %	0.58 %	100 %	2.5
주정 용해 분획	74 %	1.73 %	0.39 %	88 %	4.4

(3) 보조제 적용

주정을 이용한 불순물제거 시 회수율은 88%로 높은 장점을 가졌지만, 글라브리딘/글리시리진산 비는 4.4로 낮아 개선이 요구되었다. 감초 주정 추출물의 글라브리딘/글리시리진산의 비를 높이기 위하여 식품공정에 사용가능하고, 주정의 용해도에 영향을 주고, 감초추출물에 영향이 없으며, 글라브리딘에 한하여 선택성이 있는 보조제들을 대상으로 검색하였다.

검색결과 acetic acid, ammonium chloride, 물이 효과적인 것으로 확인되었다. 이들을 바탕으로 글라브리딘/글리시리진산 비 개선 효과를 비교하였다.

Table 1-19에 나타낸 바와 같이, acetic acid를 보조제로 사용 시 회수율은 83.8 %, 글라브리딘/글리시리진산 비는 4.2이고, ammonium chloride를 보조제로 사용 시 회수

율은 87.6 %, 글라브리딘/글리시리진산 비는 6.4로 나타났다. 그리고 물을 보조제로 사용 시 회수율은 78.2 %, 글라브리딘/글리시리진산 비는 10.5로 확인되었다. 이러한 결과를 통해 물과 주정의 조합이 감초 추출물 제조 목적에 적합한 공정임을 확인하였다.

Table 1-19. Extract yield after various supplements treatment

보조제	글라브리딘	글리시리진산	지표물질 회수율	글라브리딘 / 글리시리진산
감초 주정 추출물	1.53 %	0.57 %	100.0 %	2.7
1% Acetic Acid	1.82 %	0.44 %	83.8 %	4.2
과포화 Ammonium Chloride	1.87 %	0.29 %	87.6 %	6.4
95% 물	4.46 %	0.42 %	78.2 %	10.5

결론적으로 감초추출물의 제조 방법은 감초를 주정으로 추출 농축 후 주정에 용해되지 않는 불순물을 제거하고, 95% 물에 용해되지 않는 침전물로 회수하는 방법으로 주정과 물을 이용하여 제조 목적에 적합한 공정으로 개발하였다.

제 2절. 감초의 in vivo 체중 조절 효능

1. 고지방 식이 유도 비만 마우스 활용 감초 추출물 종류별 효능 평가 가. 연구 방법

(1) 실험동물 사육 및 식이조성

생후 4주령 된 수컷 C57BL/6J 마우스를 일반 chow 사료로 1주일간 환경에 적응시켰다. 정상식이 급여군과 고지방식이 급여군으로 나누어 4주 동안 실험 식이를 급여하였다. 4주간의 고지방 식이 급여 결과, 고지방 식이 급여로 인한 체중 증가가 나타나지 않는 마우스 (resistant to high fat diet-induced body weight increase)를 실험군에서 제외시켜 실험동물 자체 특성의 variation으로 인한 데이터 해석의 오류를 줄이고자 하였다.

선별 후 각 그룹별로 10마리씩 배치하여 6그룹으로 나누어 8주 동안 실험식이를 급여하였다. 6군의 구성은 정상식이 급여군 (N), 고지방 식이 급여군 (C), 감초 에탄올 추출물 1% 포함 고지방 식이 급여군 (E), 감초 열수 추출물 1% 포함 고지방 식이 급여군 (W), 감초 초임계 추출물 0.1% (SL) 또는 0.25% (SH) 포함 고지방 식이 급여군으로 하였다. 실험식이 조성은 Table 2-1에 나타난 바와 같으며 9주 동안 일정한 시간에 매 주 한차례 체중을 측정하였고 매일 식이량을 측정하여 일별 평균 식이 섭취량을 측정하였다.

(2) 조직학적 분석

간 조직 및 지방조직 세포의 형태학적 관찰을 위해 적출한 간, 부고환 지방 조직, 갈색 지방 조직의 일부를 적출하여 10 % formaldehyde 용액에 고정 및 탈수 후 paraffin 투과과정을 거쳐 포매하였다. 박절편기로 약 4 μm 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin (HE)으로 염색하고, xylene으로 투명화 시켜 봉입한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

(3) 혈액 생화학적 분석

실험식이 투여 8주 후 12시간 절식을 시킨 뒤 혈액 샘플을 채취하였다. 혈액 샘플은 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 30 μL 씩 분주하여 분석하기 전까지 -80°C 에 보관하였다. 혈청의 중성지방 (triglyceride), 총콜레스테롤 (total cholesterol), HDL 콜레스테롤 및 glucose는 혈액 분석용 kit (신양화학, Korea)를 이용하여 분석하였다. LDL 콜레스테롤은 측정된 콜레스테롤의 함량으로부터 계산하여 산출하였다.

Table 2-1. Experimental diet compositions

Formulation	N	C	E	W	SL	SH
Casein	200	238.792	238.792	238.792	238.792	238.792
Corn starch	150	185.123	175.121	175.121	175.121	175.121
Sucrose	500	217.3	217.3	217.3	217.3	217.3
Cellulose	50	59.698	59.698	59.698	59.698	59.698
Corn oil	50	29.849	29.849	29.849	29.849	29.849
Lard	-	208.943	208.943	208.943	208.943	208.943
Mineral mix	35	41.789	41.789	41.789	41.789	41.789
Vitamine mix	10	11.94	11.94	11.94	11.94	11.94
DL-methionine	3	-	-	-	-	-
Choline Bitartrate	2	3.582	2.985	2.985	2.985	2.985
L-cystine	-	3.582	3.582	3.582	3.582	3.582
Licorice Extract	-	-	10.0022	10.0022	10.0022	5.0011
Total	1000	1000.6	1000	1000	1000	995

(4) 혈청 adipokines 측정

혈청 adiponectin 및 leptin 농도는 각각 mouse adiponectin/Acrp 30 immunoassay kit (R&D, USA)와 mouse leptin immunoassay kit (R&D, USA)를 사용하여 분석하였다.

(5) 간지질 함량 분석

간 조직 내 지질 측정은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 간 조직 0.2 g에 0.9% 식염수 5 mL을 넣고 homogenizer로 갈아 준 뒤 여기에 chloroform : methanol = 2 : 1 로 혼합한 buffer를 20 mL을 넣어 잘 흔들어 준다. 3000 rpm에서 20 min간 원심 분리하여 아래층 용액을 sodium sulfate가 들어있는 여과지에 넣어 여과시킨다. 이것을 감압수기에 넣어 evaporation시킨다. 이 때 사용한 감압 수기는 미리 무게를 측정해 두어야 한다. 완전히 evaporation시킨 뒤 무게를 측정하여 지질양을 측정한다. 여기에 chloroform 3 mL을 넣고 녹인 뒤 10 μ L씩 따서 혈액 생화학적 분석과 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였다.

(6) qRT-PCR 활용 유전자 발현 분석

Total RNA의 추출을 위해서 RNeasy Plus mini kit (Qiagen, USA)를 사용하였다. 추출된 RNA는 분광광도계 (JASCO, V-530)을 이용하여 260 nm와 280 nm에서 측정하여 260 nm/280 nm의 비가 1.8 이상인 total RNA 샘플만을 실험에 사용하였다. 추출된 RNA는 Maxime RT Premix Kit (Intron Bio)를 이용하여 cDNA를 합성하고자 하였다. 이를 위해 total RNA와 oligo dT primer를 혼합하여 45°C에서 60min과 95°C에서 5min 동안 반응시켰다. 얻어진 cDNA를 Table 2-2와 같은 primer set를 활용하여 Light Cycler 480 (Roche, Germany)로 SYBR Green I Master (Toyobo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

Table 2-2. Primers used for RT-PCR

Primers	Sequences
CPT-1a, forward	5'-CTCCGCTGAGCCATGAAG-3'
CPT-1a, reverse	5'-CACCAGTGATGATGCCATTCT-3'
PGC1β, forward	5'-TCCTGTAAAAGCCCGGAGTAT-3'
PGC1β, reverse	5'-GCTCTGGTAGGGGCAGTGA-3'
PDK4, forward	5'-AGGGAGGTCGAGCTGTTCTC-3'
PDK4, reverse	5'-GGAGTGTTT-CTAAGCGGTCA-3'
Sirt1, forward	5'-AGAACCACCAAAGCGG-AAA-3'
Sirt1, reverse	5'-TCCCACAGGAGACAGAAACC-3'
PEPCK, forward	5'-CTCCGTAGCTGGTTCG-3'
PEPCK, reverse	5'-CGATCCGCAACGCAA-3'
G6Pase, forward	5'-GTGTTGACATCGG-CCC-3'
G6Pase, reverse	5'-AACTGAAGCCGGTTAG-3'
Ndufb5, forward	5'-CAAGAGACTGTTTGTCGTCAAGC-3'
Ndufb5, reverse	5'-TGTTCAACAGTG-TTATGCCAAT-3'
Actin, forward	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'
Actin, reverse	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATG T-3'

(7) 호흡량 및 호흡률 변화 측정

운동 수행능 증가에 미치는 호흡율의 영향을 알아보기 위해, 각 그룹의 마우스를 저녁 7시부터 오전 7시까지 12시간 동안 calorimetry로 VO_2 , VCO_2 및 RQ (respiratory quotient, 호흡율)를 측정하였다.

(8) 통계분석

결과 통계분석은 GraphPad Prism 4 software (San Diego, CA, USA)를 사용하였다. One-way ANOVA 는 그룹간에 정량 데이터를 비교하는데 사용되었다. ($P < 0.05$)

나. 연구 결과

식품 소재의 체중조절 효능에 가장 적합한 *in vivo* 모델로 알려진 고지방 식이 급여에 의한 비만 유도 마우스 모델을 활용하여 감초 추출물 종류별 항비만 효능을 평가하였다.

(1) 체중 변화 및 식이 섭취량

8주간의 실험기간 동안의 체중변화를 주별로 측정한 결과 W, SL 및 SH 그룹에서 유의적인 체중의 감소 경향이 나타났다 (Fig. 2-1).

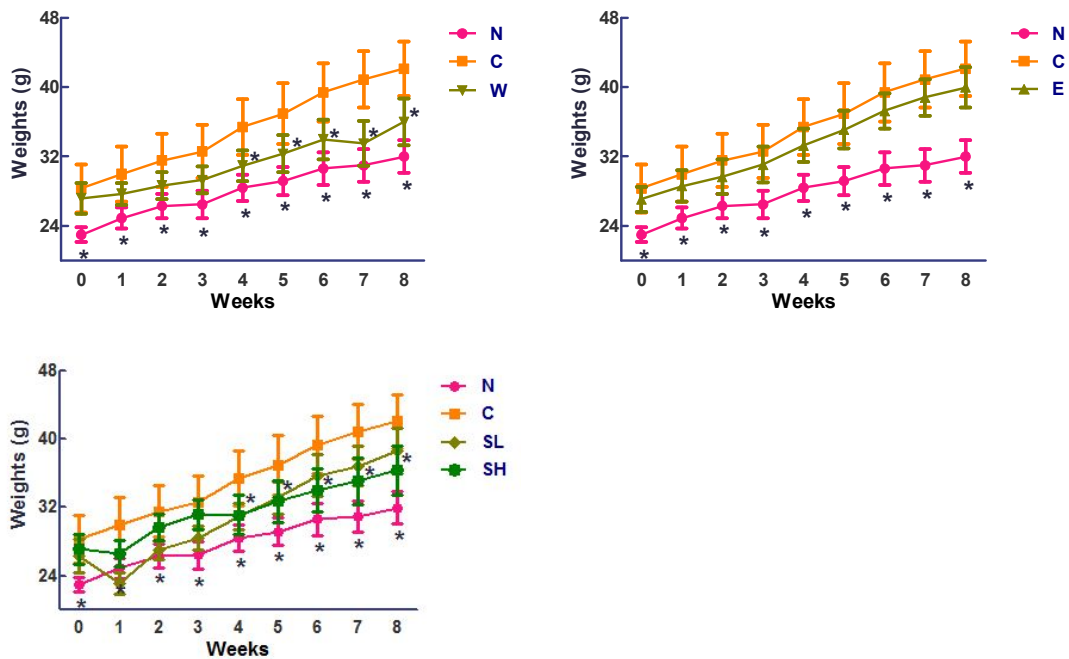


Fig. 2-1. Body weight change

8주간의 실험 기간 동안 체중 증가량을 비교한 결과 N군은 8.65 g 증가한 반면 C 그룹은 14.12 g 증가하였으며 E 그룹은 12.52 g으로 C그룹과 통계적으로 유의차가 없었으나 W, SL 및 SH 그룹은 각각 8.7 6g, 11.96 g 및 9.14 g으로써 C 그룹에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2-2). 그러나 실험기간 중의 식이 섭취량은 실험군별 차이는 나타나지 않아 (Fig. 2-3) 식이 섭취량 감소에 따른 체중 증가가 아닌 것으로 사료된다.

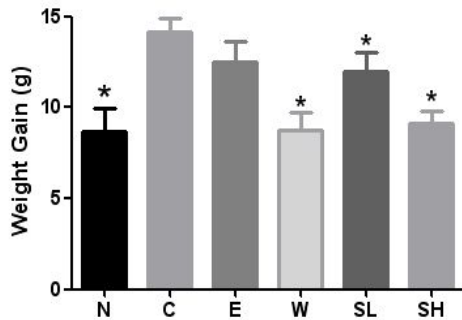


Fig. 2-2. Body weight gain

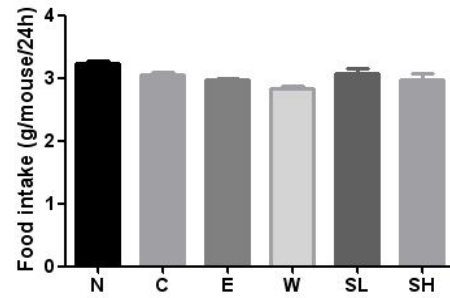


Fig. 2-3. Food intake

(2) 장기 무게

8주간의 실험식이 급여 후 각 그룹별 마우스의 장기무게 (간, 부고환 지방, 신장주위 지방 및 갈색지방)의 비교 결과, 간의 경우 고지방 식이 급여로 인한 무게의 증가가 SL 그룹에서만 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 부고환 지방의 경우 W, SL 및 SH 그룹에서 C에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의적 차이는 없었다. 신장주위 지방은 W 및 SH 그룹에서 C 그룹에 비해 유의적으로 무게가 감소했으며 갈색지방의 경우는 W, SL 및 SH 세 그룹에서 모두 통계적으로 유의한 감소를 보였다 (Fig. 2-4).

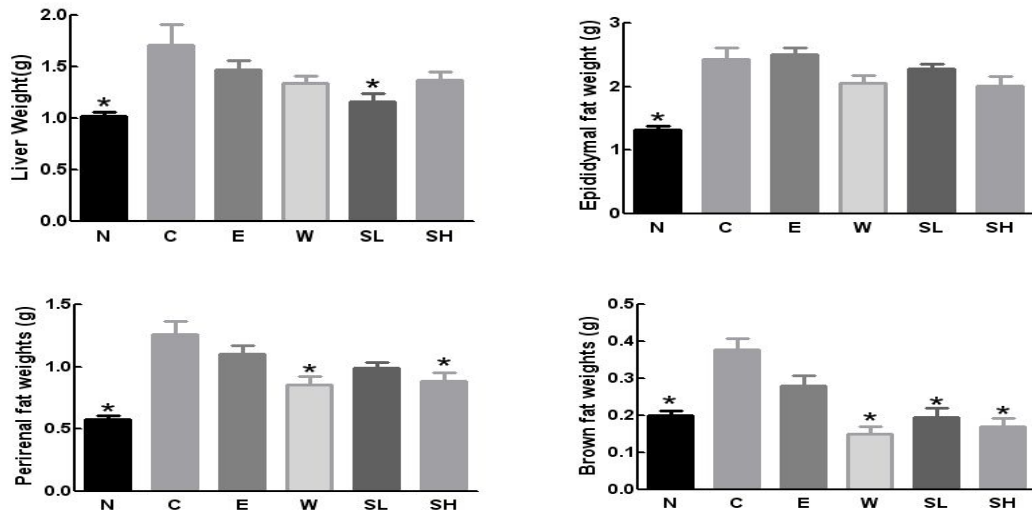


Fig. 2-4. Organs weights

(3) 조직학적 분석

간 (Liver), 부고환 지방 (WAT) 및 갈색지방 (BAT)의 조직 관찰을 위해 포르말린 고정 조직 절편의 H&E stain 결과, 간의 경우, 장기 무게 측정 시 나타났던 경향과는 달리, 감초 추출물이 포함된 고지방 식이의 급여 시 고지방 식이 단독 급여군에 비해 지방간의 병변이 뚜렷하게 억제된 것으로 관찰되었다 (Fig. 2-5). 부고환 지방의 경우는 감초 추출물 급여 시 지방세포의 크기 감소가 관찰되었으며 (Fig. 2-6) 갈색지방의 경우, 조직 무게의 감소가 세포내 지방 침착 억제에 의한 것임을 확인할 수 있었다 (Fig. 2-7).

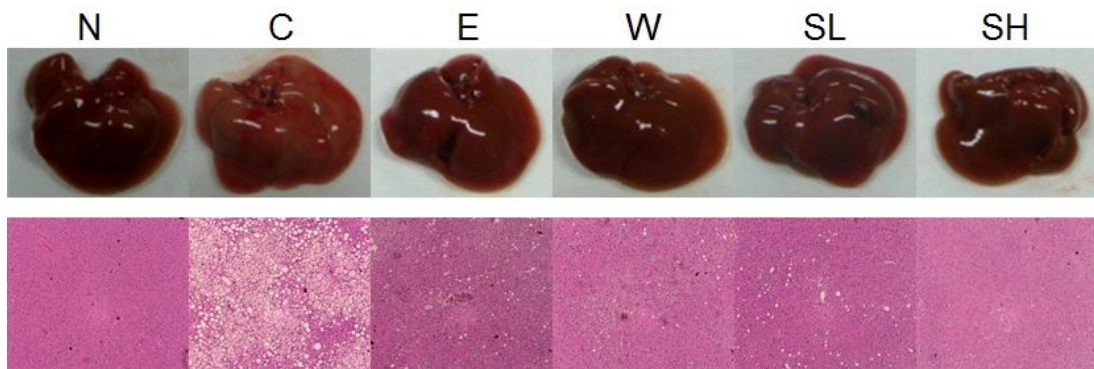


Fig. 2-5. The morphology and H&E stain of liver

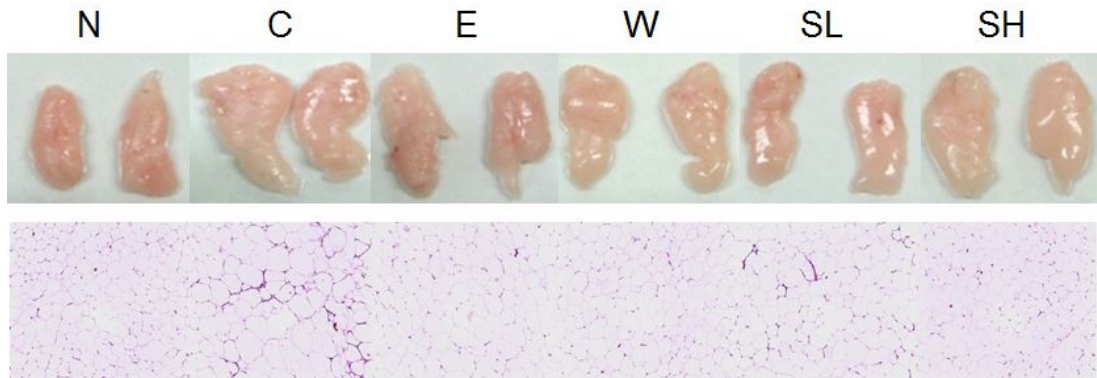


Fig. 2-6. The morphology and H&E stain of white adipose tissue (WAT)

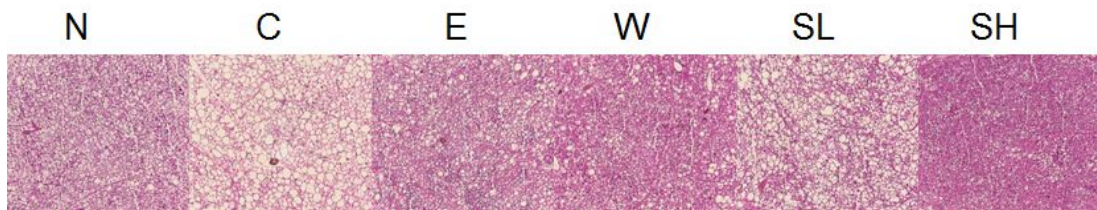


Fig. 2-7. The H&E stain of brown adipose tissue (BAT).

(4) 혈중 지질 변화

감초 추출물 급여가 혈중 지질 함량에 미치는 영향을 측정한 결과 triglyceride의 경우 W 및 SH 그룹에서 C 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한 고지방 식이 급여 시 나타나는 TC의 증가를 모든 감초 추출물 급여가 뚜렷이 감소시켰다. HDL-C의 경우 N과 SL 그룹에서만 C에 비해 유의적으로 감소했으며 LDL-C의 경우 C그룹에 비해 모든 감초 추출물 급여군에서 유의적인 감소가 관찰되었다 (Fig. 2-8).

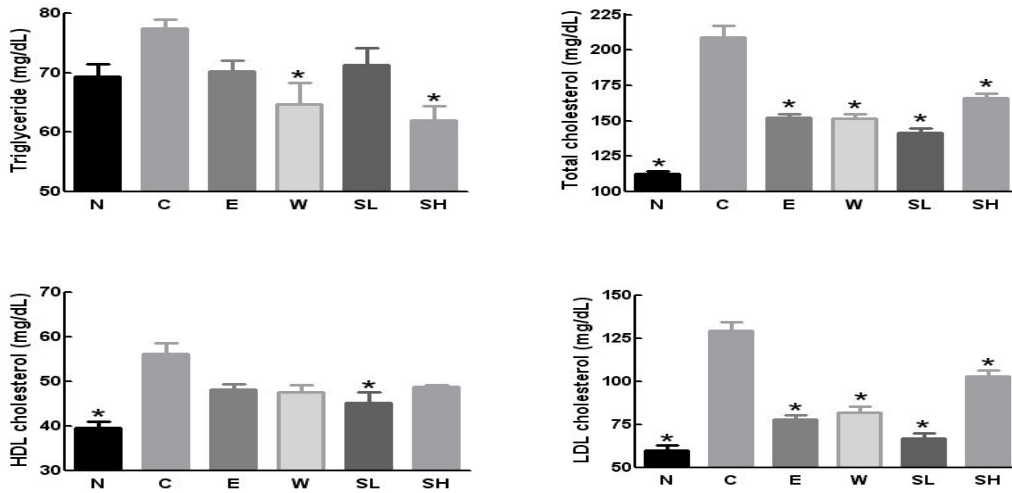


Fig. 2-8. Serum lipid profiles

(5) 혈당 및 혈중 호르몬 변화

12시간 공복 혈당 측정 결과 C 그룹에서 혈당이 크게 증가하였으나 E, SL 및 SH 그룹에서는 유의적으로 낮았다. 인슐린의 경우도 C 그룹은 N의 1.7배인 1.89 ng/mL로 상승하였으나, 감초추출물 급여군의 경우 1.08 - 1.25 ng/mL로 낮아졌다. 즉, 고지방 식이 급여로 인한 당 대사 장애에 대해 감초 추출물이 보호 효능을 나타낸 것으로 사료된다. 식욕을 조절하는 leptin의 경우도 C 그룹에 비해 감초 추출물 급여 시 유의적으로 감소하며 adiponectin은 W 군을 제외하고는 경향이 나타나지 않았다 (Table 2-3).

Table 2-3. Blood glucose and hormones levels

	Glucose (mg/dL)	Insulin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)	Adiponctin (ng/ml)
N	139.4 ± 3.8*	1.06 ± 0.03*	12.02 ± 0.65*	20.97 ± 0.46
C	224.2 ± 8.1	1.89 ± 0.23	52.87 ± 0.78	22.76 ± 0.18
E	195.6 ± 4.8*	1.25 ± 0.03*	30.34 ± 2.81*	20.58 ± 0.67
W	213.6 ± 3.3	1.14 ± 0.06*	21.83 ± 0.85*	19.90 ± 0.59*
SL	187.3 ± 6.2*	1.11 ± 0.04*	22.90 ± 0.66*	20.69 ± 0.41
SH	197.1 ± 0.9*	1.08 ± 0.04*	14.42 ± 3.83*	18.12 ± 0.60*

(6) 간지질 변화

고지방 식이의 급여는 hepatic steatosis를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Hamaguchi 외, 2005). 감초가 고지방 식이 유도 hepatic steatosis의 개선에 미치는 영향을 측정하기 위해서 간 조직의 총 지방량, TC 및 TG를 분석하였다.

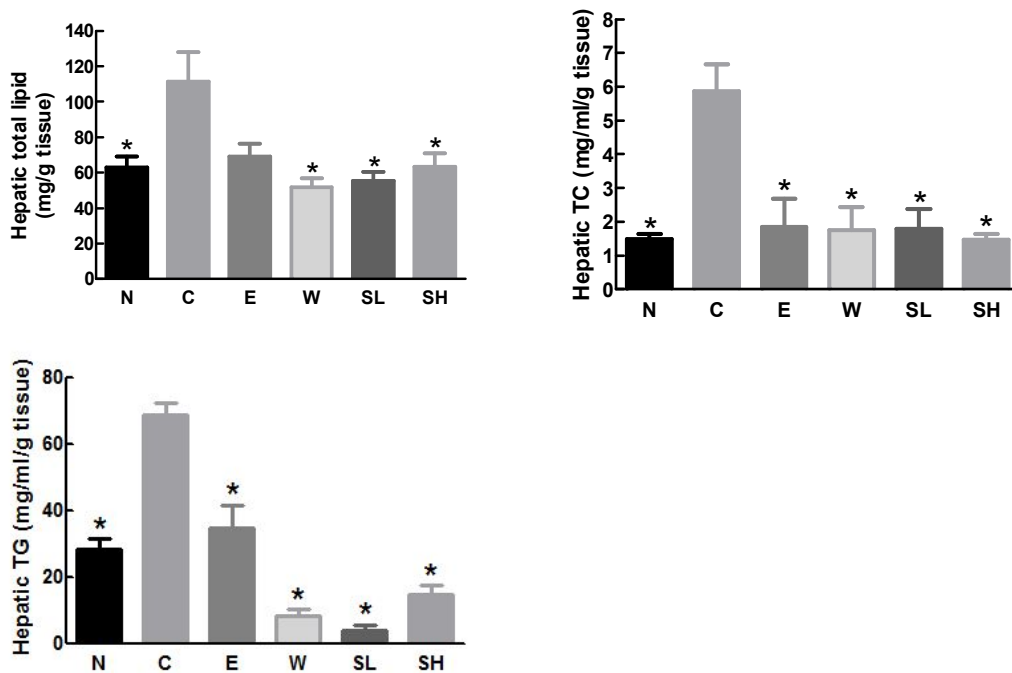


Fig. 2-9. Hepatic lipid profiles

그 결과 조직학 분석 데이터에서 나타난 경향과 일치하게 고지방 식이 급여에 의해서 hepatic total lipid는 유의적으로 증가하였다. 그러나 감초 추출물 W, SL 및 SH 급여 그룹에서 total lipid 양이 유의적으로 감소하였다. hepatic TC 및 hepatic TG의 경우, 감초 추출물은 고지방 식이 급여에 의한 모든 감초 추출물 투여 군에서 유의적으로 감소하였으며 이는 감초가 간 조직 지방 축적을 매우 효과적으로 억제하는 효과가 있음을 나타낸다 (Fig. 2-9).

(7) 간 대사 관련 효소 조절

감초추출물의 급여가 간의 대사 관련 효소에 미치는 영향을 알아보기 위해 대사경로별 효소 및 조절인자들의 유전자 발현 변화를 분석하였다 (Fig. 2-10). 이미 잘 알려진 바와 같이 (Chomczynski 외, 1987) 고지방 식이 급여 시 지방산 대사가 감소되고 당신생이 증가하였다.

감초 추출물 급여 시 W, SL 및 SH 그룹의 경우 지방산 대사에 관련된 PDK4의 유전자 발현을 유의적으로 증가시켰으며 이는 지방산 대사의 증가를 통해 체중 증가의 억제가 유도된 것으로 사료된다. PDK4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4)는 pyruvate를 acetyl CoA로 전환시키는 pyruvate dehydrogenase의 인산화를 유도하여 불활성화 시키는 효소로 알려져 있으며 이를 통해 acetyl CoA가 TCA cycle로 들어가 ATP 생성을 유도하는 것을 억제하게 된다.

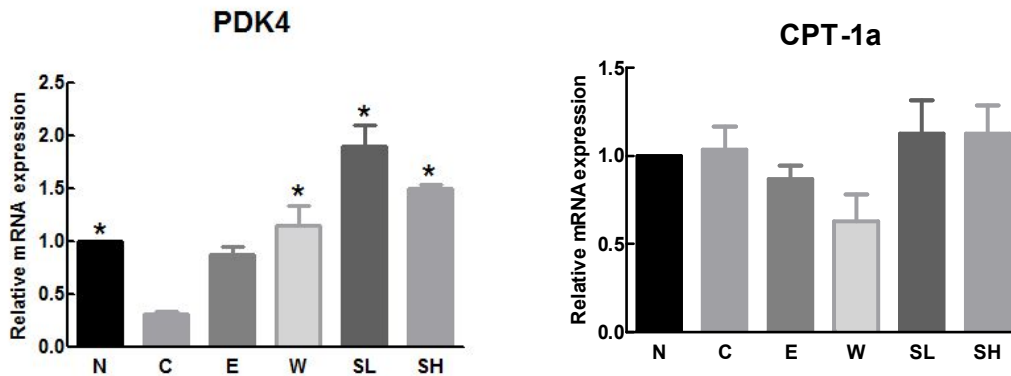


Fig. 2-10. Real-time PCR analysis of fatty acid oxidation-related genes in liver

또한 고지방 식이 급여에 의해 증가된 당생성 관련 효소인 PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxy kinase) 및 G6Pase (glucose-6-phosphatase)의 발현이 감초 추출물 급여 군에서 유의적으로 감소했다 (Fig. 2-11).

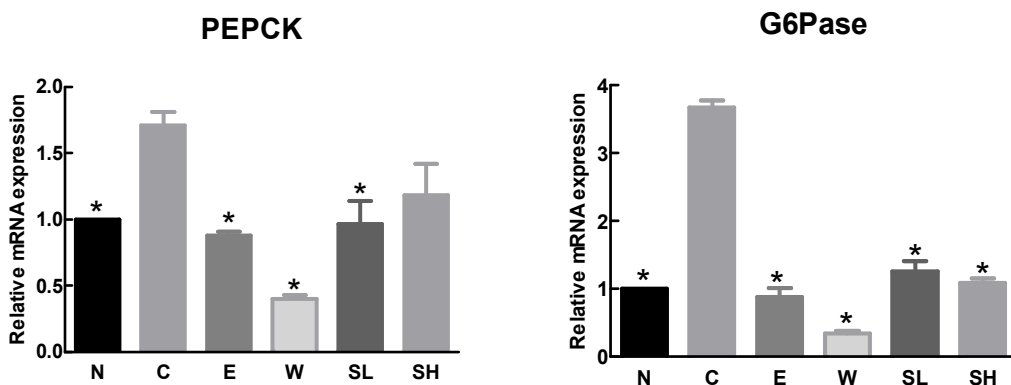


Fig. 2-11. Real-time PCR analysis of gluconeogenesis-related genes in liver

감초 추출물 E, SL 및 SH 그룹 (E 그룹만 통계적으로 유의차 보임)에서 미토콘드리아

아 대사에 관련된 $PGC1\beta$ 가 증가된 것으로 보아 미토콘드리아 biogenesis 증진은 감초의 항비만 효능의 기전 중 하나로 사료 된다 (Fig. 2-12).

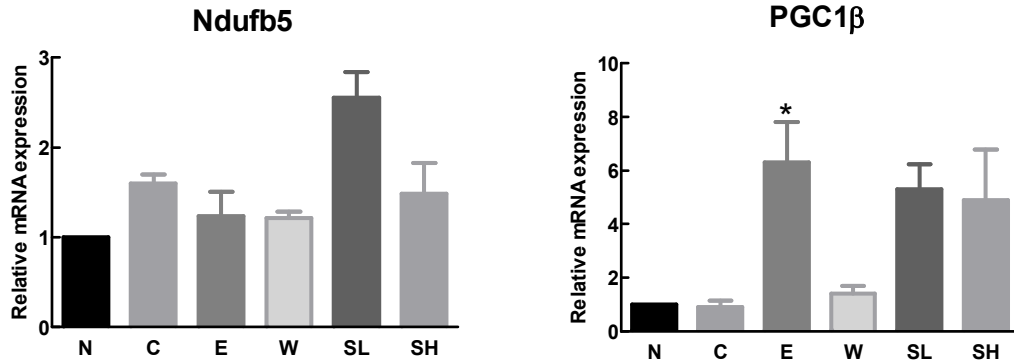
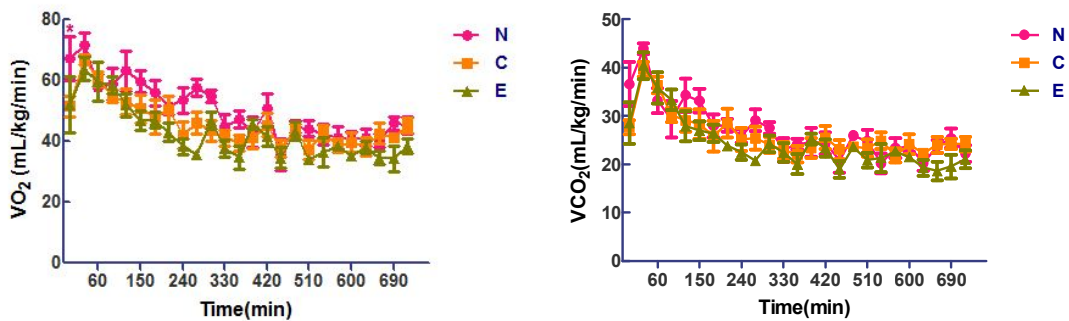


Fig. 2-12. Real-time PCR analysis of mitochondria biogenesis-related genes in liver

(8) 호흡량 및 호흡률 변화

감초 추출물의 급여는 고지방 식이에 의해 유도되는 비만 억제에 효과적인 것으로 나타났고 이러한 감초의 항비만 효능에 호흡 변화가 미치는 영향을 알아보기 위해, 각 그룹의 마우스를 저녁 7시부터 오전 7시까지 12시간 동안 calorimetry로 VO_2 , VCO_2 및 RQ (respiratory quotient, 호흡율)를 측정하였다.

N 그룹과 C 그룹의 경우 RQ의 유의적 차이를 나타내었는데, 이는 N 그룹의 경우 이산화탄소 소비량보다 산소 생산량이 많아 RQ가 감소되었기 때문으로 사료된다. 감초 추출물 투여 군 중에서 E 및 W 군에서는 RQ의 차이가 관찰되지 않았으나, SH 그룹에서 VO_2 및 VCO_2 의 증가가 관찰되었다. 즉 SH 그룹에서는 호흡량이 C 그룹에 비해 유의적으로 증가하였으며 호흡량의 증가가 체중 감소를 유도하는 기전 중 하나로 사료된다.



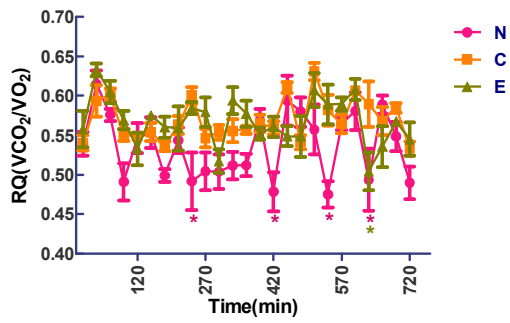


Fig. 2-13. Measurement of VO_2 , VCO_2 and RQ of licorice ethanol extract treated mice

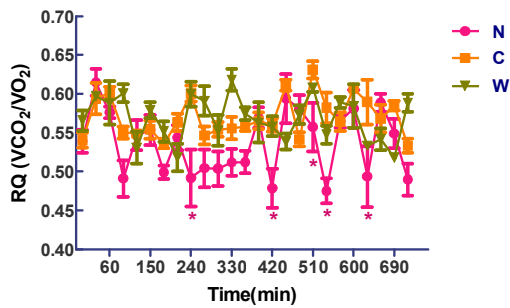
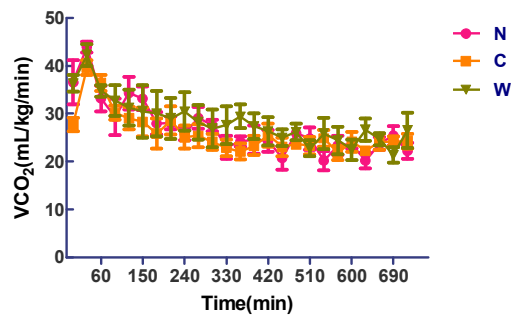
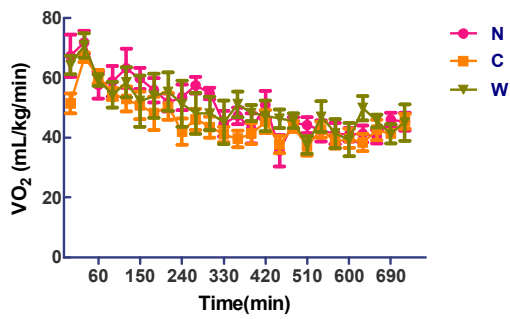
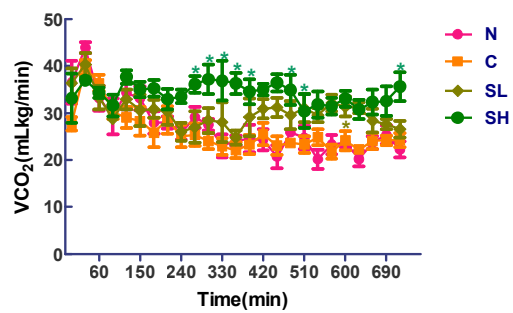
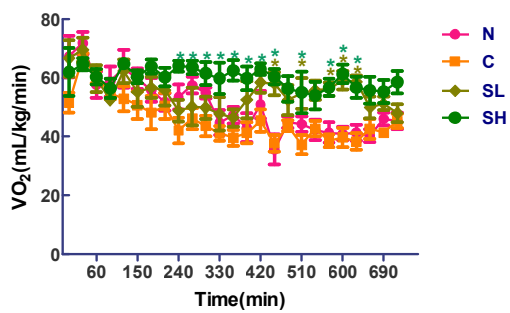


Fig. 2-14. Measurement of VO_2 , VCO_2 and RQ of licorice hot water extract treated mice



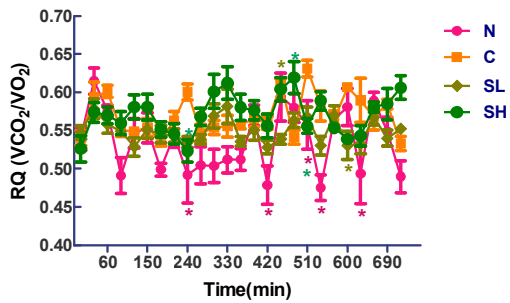


Fig. 2-15. Measurement of VO_2 , VCO_2 and RQ of licorice supercritical extract treated mice

2. 고지방 식이 유도 비만 마우스 활용 개발 제품의 효능 평가

가. 연구 방법

(1) 실험 재료

감초유래 기능성 원료를 이용하여 연질 캡셀용으로 개발된 제품을 사용하였다.

(2) 실험동물 사육 및 식이조성

생후 5주령 된 수컷 C57BL/6J 마우스를 1주일간 환경에 적응시켰다. 이 후 무작위로 10마리씩 6그룹으로 나누고, 정상식이 또는 고지방 식이를 급여하며 6주간 사육하였다.

6군의 구성은 대조군인 정상식이 급여군 (N), 고지방 식이 급여군 (C), 고지방 식이 급여 및 감초 유효 소재 0.5% 함유 제형 물질 투여군 (SEL), 고지방 식이 급여 및 감초 유효 소재 1% 함유 제형 물질 투여군 (SEH), 고지방 식이 급여 및 제형 제조에 사용한 부재료만을 투여한 vehicle군 (V), 고지방 식이 급여 및 reference로 부재료에 0.05% creatine을 용해시켜 투여한 군 (PC)으로 구성하였다.

시험물질은 6주간 1일 1회로 구강투여 하였으며 vehicle의 경우 0.1 ml/day/마리가 넘지 않도록 용량을 조절하였다. 6주 동안 일정한 시간에 매 주 한차례 체중을 측정하였다.

(3) 조직학적 분석

백색지방 및 갈색 지방조직 세포의 형태학적 관찰을 위해 적출한 부고환 지방 조직과 갈색 지방의 일부를 적출하여 10 % formaldehyde 용액에 고정 및 탈수 후

paraffin 투과과정을 거쳐 포매하였다. 박절편기로 약 4 μm 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin (HE)으로 염색하고, xylene으로 투명화 시켜 봉입한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

(4) 혈액 생화학적 분석

실험식이 투여 8주 후 12시간 절식을 시킨 뒤 혈액 샘플을 채취하였다. 혈액 샘플은 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 30 μL 씩 분주하여 분석하기 전까지 -80°C 에 보관하였다. 혈청의 중성지방 (triglyceride), 총콜레스테롤 (total cholesterol), HDL 콜레스테롤, NEFA, glycerol, GOT, GPT 및 glucose는 혈액 분석용 kit (신양화학, Korea)를 이용하여 분석하였다. LDL 콜레스테롤은 측정된 콜레스테롤의 함량으로부터 계산하여 산출하였다.

(5) 혈중 호르몬 측정

혈청 adiponectin, leptin 및 insulin의 농도는 각각 mouse adiponectin/Acrp 30 immunoassay kit (R&D, USA), mouse leptin or insulin immunoassay kit (R&D, USA)를 사용하여 분석하였다.

(6) 간지질 함량 분석

간 조직 내 지질 측정은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 간 조직 0.2 g에 0.9% 식염수 5 mL을 넣고 homogenizer로 갈아 준 뒤 여기에 chloroform : methanol = 2 : 1로 혼합한 buffer를 20 mL을 넣어 잘 흔들어 준다. 3000 rpm에서 20 min간 원심 분리하여 아래층 용액을 sodium sulfate가 들어있는 여과지에 넣어 여과시킨다. 이것을 감압수기에 넣어 evaporation시킨다. 이 때 사용한 감압 수기는 미리 무게를 측정해 두어야 한다. 완전히 evaporation시킨 뒤 무게를 측정하여 지질양을 측정한다. 여기에 chloroform 3 mL을 넣고 녹인 뒤 10 μL 씩 따서 혈액 생화학적 분석과 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였다.

(7) qRT-PCR 활용 유전자 발현 분석

Total RNA의 추출을 위해서 RNeasy Plus mini kit (Qiagen, USA)를 사용하였다. 추출된 RNA는 분광광도계 (JASCO, V-530)을 이용하여 260 nm와 280 nm에서 측정하여 260 nm/280 nm의 비가 1.8 이상인 total RNA 샘플만을 실험에 사용하였다. 추출된 RNA는 Maxime RT Premix Kit (Intron Bio)를 이용하여 cDNA를 합성하고자 하였다. 이를 위해 total RNA와 oligo dT primer를 혼합하여 45°C 에서 60min과 95°C 에서 5min 동안 반응시켰다. 얻어진 cDNA를 Table 2-3와 같은 primer set를 활용하여

Light Cycler 480 (Roche, Germany)로 SYBR Green I Master (Toyobo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

Table 2-3. Primers used for RT-PCR

Primers	Sequences
PPARα, forward	5'-AAC ATC GAG TGT CGA ATA TGT GG-3'
PPARα, reverse	5'-AGC GCA ATA GTT CGC CGA AAG-3'
FASN, forward	5'-AGA GAT CCC GAG ACG CTT CT-3'
FASN, reverse	5'-GCC TGG TAG GCA TTC TGT AGT-3'
SCD-1, forward	5'-TTCTTACACGACCACCACCA-3'
SCD-1, reverse	5'-GCGTTGAGCACCAGAGTGTA-3'

(8) 호흡량 및 호흡률 변화 측정

운동 수행능 증가에 미치는 호흡율의 영향을 알아보기 위해, 각 그룹의 마우스를 저녁 7시부터 오전 7시까지 12시간 동안 calorimetry로 VO₂, VCO₂ 및 RQ (respiroatory quotient, 호흡율)를 측정하였다.

(9) 통계분석

결과 통계분석은 GraphPad Prism 4 software (San Diego, CA, USA)를 사용하였다. One-way ANOVA 는 그룹 간에 정량 데이터를 비교하는데 사용되었다. ($P < 0.05$)

나. 연구 결과

(1) 체중 변화 및 식이 섭취량

6주간의 실험기간 동안의 체중변화를 주별로 측정한 결과 SH 처리군에서 유의적인 체중의 감소 경향이 나타났다 (Fig. 2-16).

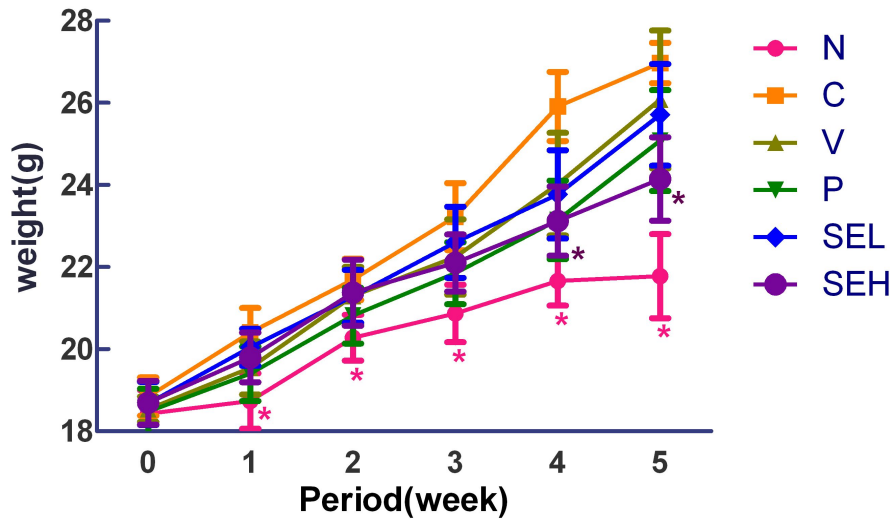


Fig. 2-16. Body weight changes

6주간의 실험 기간 동안 체중 증가량을 비교한 결과 N군은 3.35 g 증가한 반면 C 그룹은 7.87 g 증가하였으며 V 그룹은 7.55 g, PC 그룹은 6.6 g으로 C그룹과 통계적으로 유의차가 없는 것으로 나타났다. 그러나 SL 및 SH 그룹은 체중 증가량이 각각 6.6 g, 및 5.45 g 으로써 SH군에서 C그룹에 비해 체중 증가량이 유의적으로 감소하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2-17).

그러나 실험기간 중의 식이 섭취량은 실험군별 차이는 나타나지 않았으며 이는 감초 개발 제형 소재의 체중 증가 감소 효과가 식이 섭취량 감소에 따른 것이 아닌 것을 나타낸다 (Fig. 2-18).

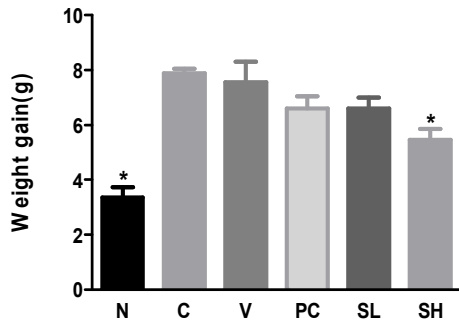


Fig. 2-17. Weight gain

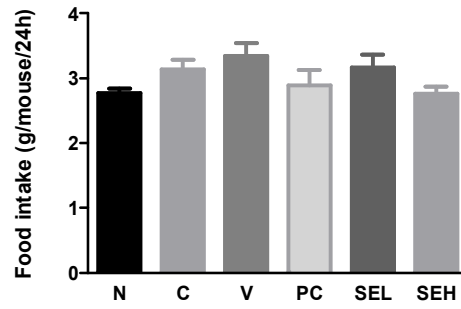


Fig. 2-18. Food intake

(2) 장기 무게

6주간의 실험식이 경구투여 후 각 그룹별 마우스의 장기무게 (부고환 지방 및 신장 주위 지방)를 비교하였다.

부고환 지방의 경우 고지방 식이 급여에 의해서 체중 100 g 당 무게가 유의적으로 증가하였다. V 처리군에서는 변화가 나타나지 않은 것으로 보아 vehicle의 영향은 없는 것으로 나타났다. PC 뿐 아니라 감초 개발 제형의 저 농도 (SL) 및 고농도 (SH) 투여 시 부고환 지방 무게의 유의적인 감소가 나타났다 (Fig. 2-19).

신장주위 지방의 경우, 고지방 식이 급여에 의해 무게가 유의적으로 증가하였고 감초 개발 제형 투여군인 SL 및 SH 그룹에서 C 그룹에 비해 유의적으로 무게가 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2-19).

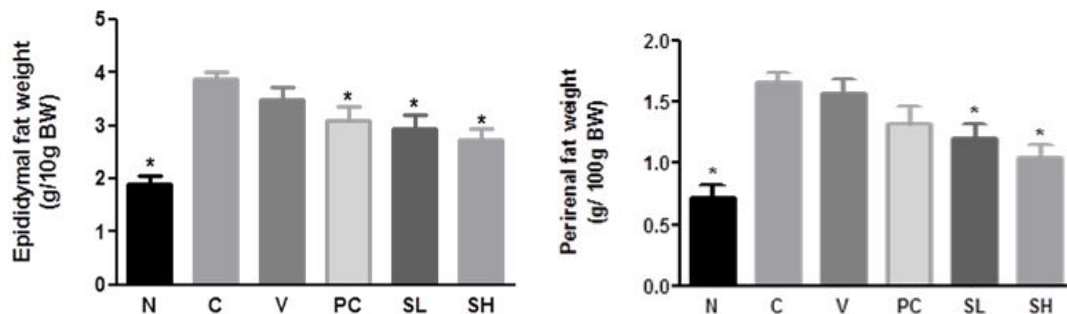


Fig. 2-19. The effect of licorice functional compound on white adipose tissue weight, epididymal fat and ret

(3) 조직학적 분석

6주간의 시험 물질 투여 후 백색지방의 조직을 H&E 염색한 결과 고지방 식이 급여 시 백색지방 조직의 지방세포 크기가 증가됨을 확인하였다. 양성 대조군 (PC)으로 투여한 creatine 처리에 의해서 증가된 백색 지방 세포의 크기에는 변화가 없었지만, 감초 개발 제형 처리군의 경우 지방 세포의 크기가 감소됨을 확인하였다 (Fig. 2-20).

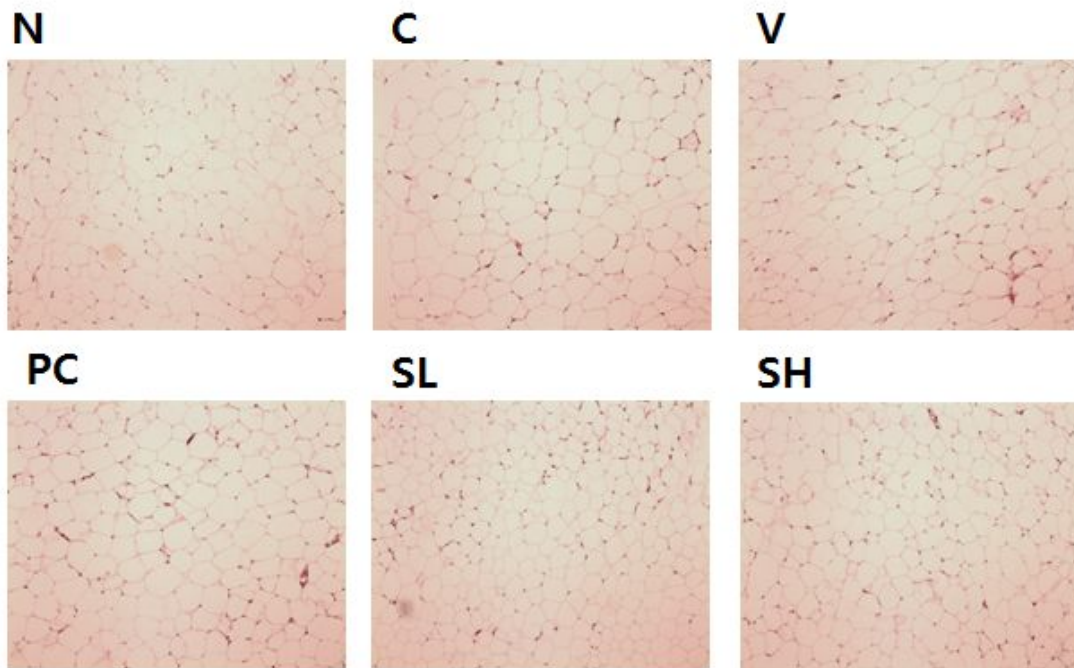


Fig. 2-20. H & E staining of white adipose tissue

갈색 지방 조직의 경우, 고지방 식이 급여 시 지방세포 내 지질 침착 증가로 인한 지방구의 크기가 증가하는 phenotype을 보였고 vehicle 및 PC 투여군에서는 변화가 나타나지 않았다. 그러나 감초 개발 제형 투여군의 경우 지방세포 내 지질 침착이 뚜렷하게 감소하였고 지방구도 관찰되지 않았다 (Fig. 2-21).

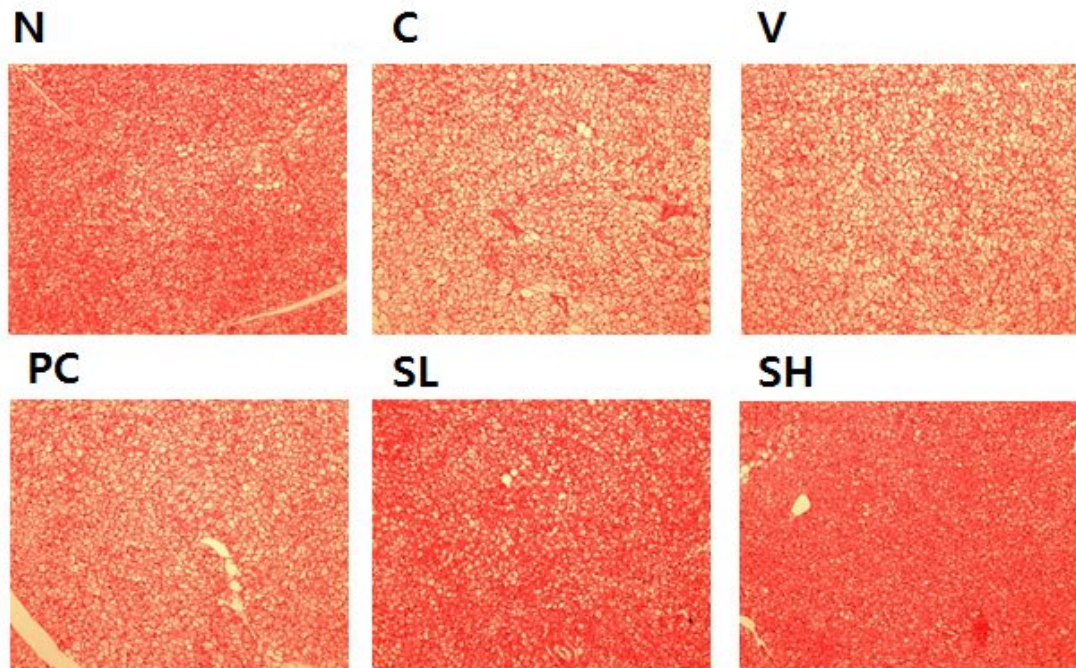


Fig. 2-21. H & E staining of brown adipose tissue

(4) 혈중 지질 변화

감초 추출물 개발 제형의 경구투여가 혈중 지질 함량에 미치는 영향을 측정하였다. 혈청 중성지방 (TG)의 경우 고지방 식이 급여에 의해 크게 증가되었으며 V, PC, SL 및 SH 그룹 대부분에서 C 그룹에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 보였으나 특히 PC 및 감초 개발 제형 투여군에서 효과적으로 억제되었다. 또한 고지방 식이 급여 시 나타나는 혈중 총 콜레스테롤 (TC)의 증가는 감초 개발 제형 경구 투여군 (SL 및 SH)만이 유의적으로 감소시켰다 (Fig. 2-22).

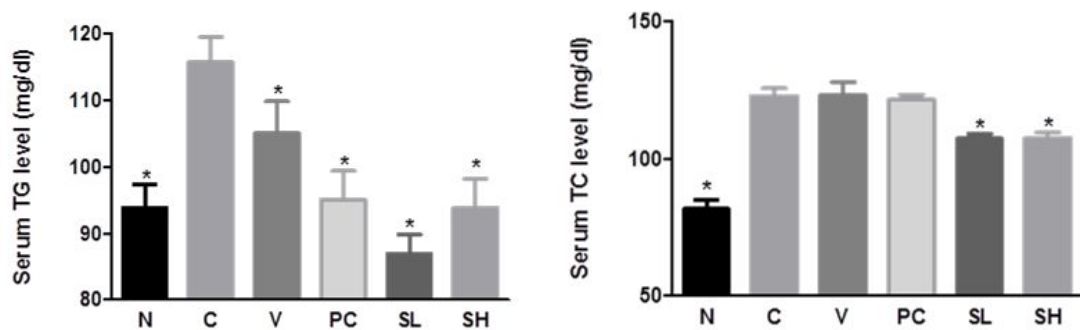


Fig. 2-22. Effect of licorice functional compound on serum TG and TC levels

본 실험에서 고지방 식이를 급여 시 혈중 HDL-콜레스테롤 (HDL-C)은 감소하고 LDL-콜레스테롤 (LDL-C)은 증가하였다. 감초 개발 제형 투여 시 HDL-C은 다소 증가하고 LDL-C의 경우 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (Fig. 2-23).

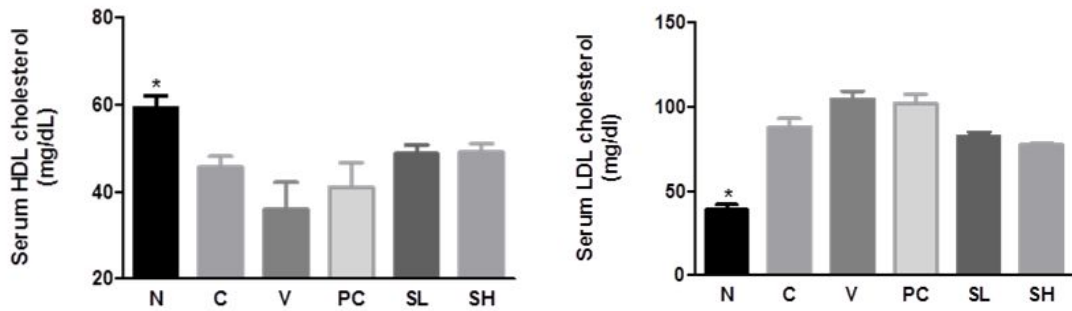


Fig. 2-23. Effect of licorice functional compound on serum HDL-C and LDL-C levels

고지방 식이 시 급여 간 및 지방 조직에서 lipolysis가 증가하여 혈중 glycerol 및 fatty acid가 높아져 인슐린 저항성을 유도하고 지방간증 (hepatic steatosis) 유발의 원인이 된다는 보고가 있다. 본 실험에서 PC로 사용된 creatine의 경우 혈중 glycerol 수치에는 효과가 없었고 NEFA 수치를 낮추는 것으로 나타났다. 그러나 감초 개발 제형 투여 시 혈중 glycerol과 NEFA 모두 유의적으로 감소되었고 이러한 결과를 근거로 감초 개발제형이 고지방 식이 급여에 의한 lipolysis를 효과적으로 억제하는 것으로 사료 된다 (Fig. 2-24).

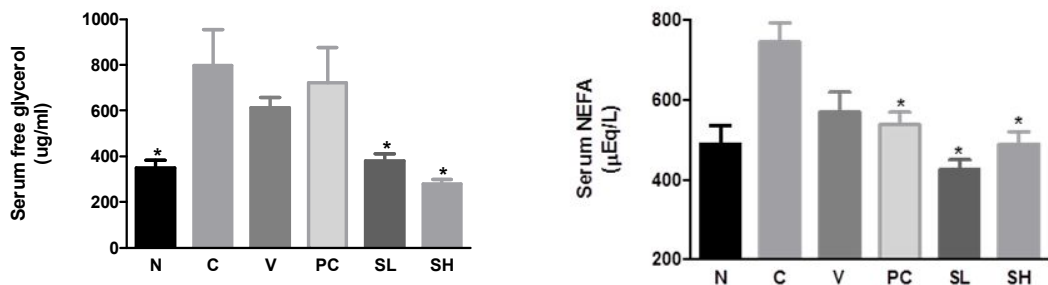


Fig. 2-24. Effect of licorice functional compound on serum glycerol and non-esterified fatty acid levels.

(5) 혈당 및 혈중 호르몬 변화

12시간 공복 혈당 측정 결과 고지방 식이 급여군인 C 그룹에서 정상식이 급여 N 군에 비해 혈당이 크게 증가하였으나 감초 개발 제형 투여군에서 유의적으로 낮게 나타났다. vehicle 단독 투여군에서도 혈당이 낮아졌으나, 감초 제형 고농도 투여군에서 더 크게 감소되었다.

이러한 양상은 혈중 insulin level에서 더 확실히 나타나는데, 고지방 식이 급여 시 공복 혈당과 혈중 인슐린 수치가 증가하는 인슐린 저항성 (insulin resistance) 상태가 유도되는데, 시험 물질을 투여한 모든 군에서 공복혈당과 인슐린 수치의 감소가 관찰되었다. 그러나 감초 제형 투여군에서 가장 효과적으로 혈중 인슐린 수치가 정상군 수치까지 크게 감소하였다. 즉 감초 제형은 고지방식이 급여에 의한 insulin resistance를 억제하는 효과가 있는 것으로 사료되며, 이는 혈중 NEFA의 감소로 인한 효과로 해석될 수 있다 (Fig. 2-25).

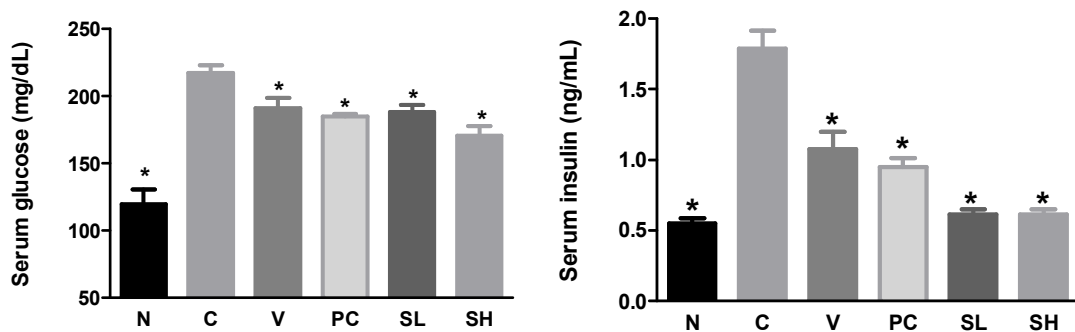


Fig. 2-25. Effect of licorice functional compound on fasting glucose and serum insulin levels.

혈중 leptin의 경우, 고지방 식이 급여로 유도된 비만 시 leptin resistance가 생겨서 혈중 수치가 크게 증가되게 된다. 감초 개발 제형은 이러한 leptin의 상승을 매우 효과적으로 억제하여 정상 수치까지 감소시켰다. 그러나 항염작용 및 인슐린 저항성 개선 등의 긍정적 효과를 지닌 것으로 알려진 adiponectin의 경우, 그룹별 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 2-26).

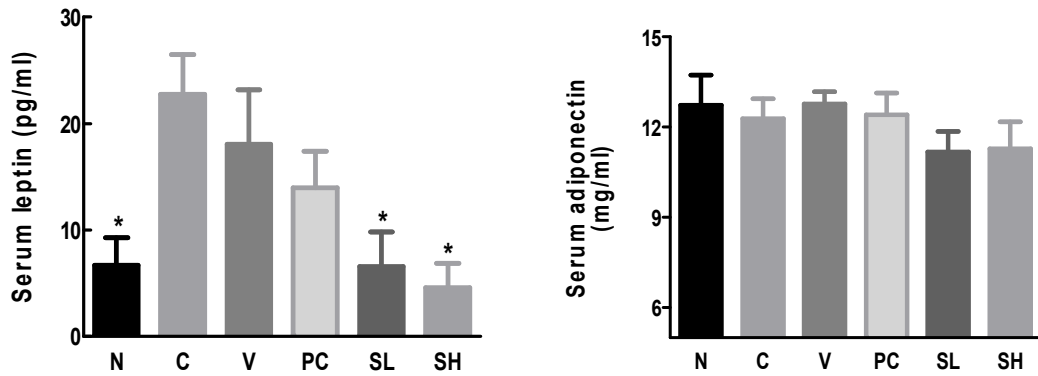


Fig. 2-26. Effect of licorice functional compound on leptin and adiponectin levels.

(6) 감초 개발 제형의 안전성

6주간의 시험물질 투여 후, 실험동물을 희생시켜 장기 적출 시 살펴본 결과, 해부학적으로 특이한 조직 병변이나 염증 소견 등은 관찰되지 않았다.

감초 개발 제형의 투여가 생체 내 독성을 유발하는지 살펴보기 위하여 간독성의 대표적 바이오마커인 혈중 GOP 및 GPT 수치를 측정하였다. Fig. 2-27과 같이 감초 개발 제형 투여에 의한 GOP 및 GPT의 변화는 나타나지 않았다. 이러한 결과를 근거로 감초 개발 제형 투여가 특별한 독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

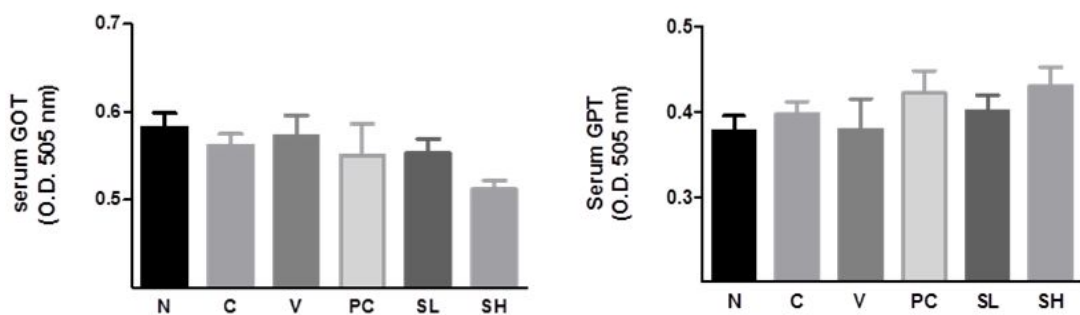


Fig. 2-27. Effect of licorice functional compound on GOT and GPT levels.

(7) 간지질 변화

감초 개발 제형이 고지방 식이 급여에 의한 지방간에 미치는 영향을 평가하기 위해

간 조직의 총 지방량, TC 및 TG를 분석하였다. 고지방 식이 급여에 의해서 hepatic total lipid와 TG가 정상식이 급여군에 비해 유의적으로 증가하였다. 그러나 감초 개발 제형의 투여 시 간 조직 내 총 지질의 함량이 뚜렷이 감소되었다. Hepatic TC의 측정 결과 감초 제형 투여군 (SL 및 SH군)에서 C군에 비해 유의적으로 감소하였다. 특히, 지질 대사 장애로 인한 병인의 주요 원인인 hepatic TG의 경우, 감초 추출물 개발제형 경구투여는 고지방 식이 급여에 의한 혈중 지질 상승을 매우 효과적으로 억제하여 정상 식이 급여군과 유사한 정도로 감소시키는 것으로 관찰되었다.

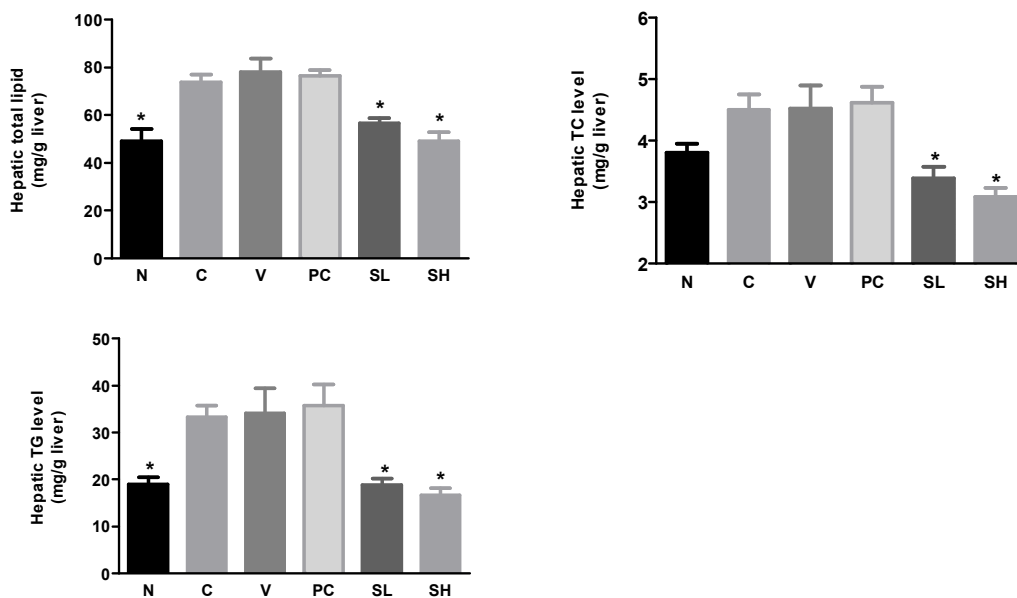


Fig. 2-28. Effect of licorice functional compound on leptin and adiponectin levels.

(8) 간 대사 조절 유전자 발현 변화

감초개발 제형의 급여가 간의 대사 관련 효소에 미치는 영향을 알아보기 위해 대사 경로별 효소 및 조절인자들의 유전자 발현 변화를 분석하였다.

먼저 지방산 산화에 미치는 영향을 알아보기 위해서 지방산 산화와 관련된 유전자인 CPT-1 α , PPAR α 및 PDK4의 발현을 측정하였다. 그 결과, 고지방 식이 급여 시 PPAR α , CPT-1 α 및 PDK4의 발현이 감소되어 지방산 산화가 감소되는데, 감초 개발 제형 급여는 PPAR α , CPT-1 α 및 PDK4의 발현을 유의적으로 증가시켰다 (Fig. 2-29). 이러한 결과로부터 감초 개발 제형은 지방산 산화를 증가시킴으로써 항비만 효능을 나타내는 것으로 사료된다.

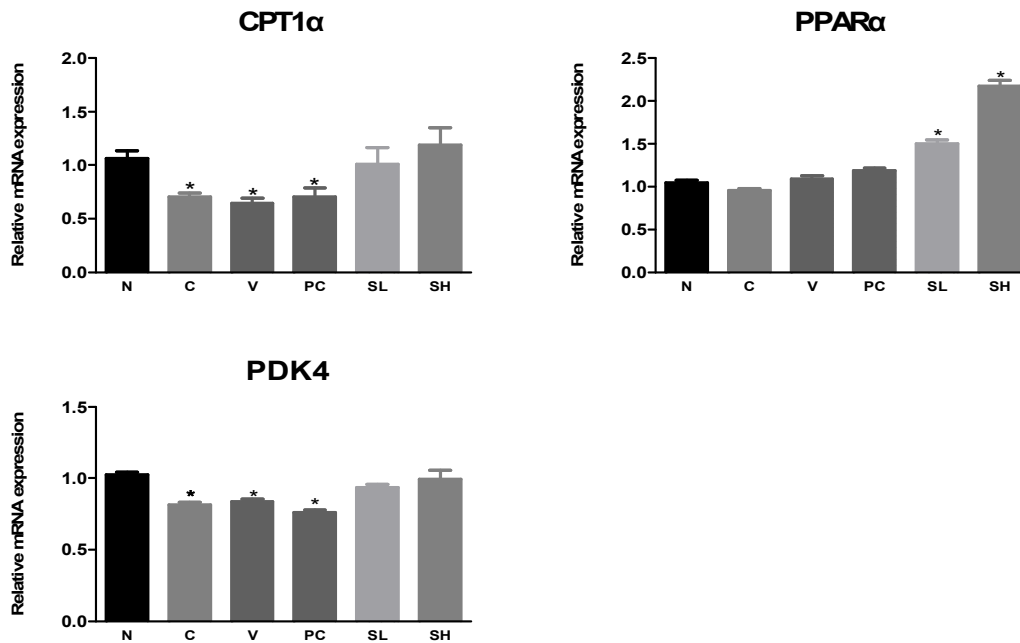


Fig. 2-29. Effect of licorice functional compound on fatty acid oxidation-related genes in liver.

또한 고지방 식이 급여에 의해 증가된 지방 생성 (lipogenesis) 관련 FASN (fatty acid synthase) 및 SCD-1의 경우 감초 개발 제형 투여에 의해 정상 식이 급여군과 비슷한 수치까지 발현이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 2-30).

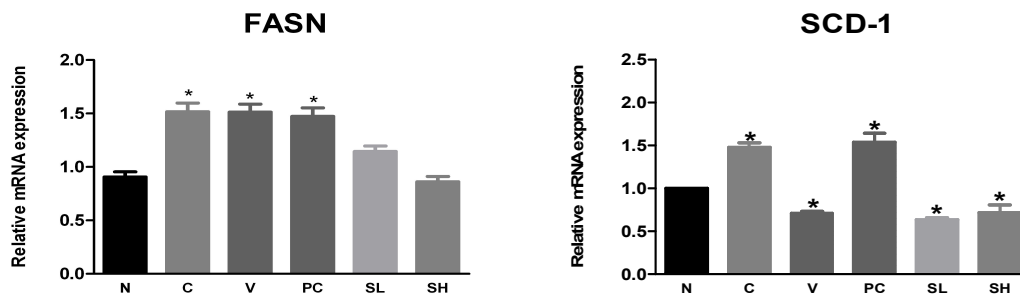


Fig. 2-30. Effect of licorice functional compound on lipogenesis-related genes in liver.

감초 개발 제형의 급여는 미토콘드리아 대사에 관련된 PGC1 β 와 SIRT1을 증가시켰으며 (Fig. 2-31) 이를 근거로 미토콘드리아 biogenesis 증진은 감초의 항비만 효능의 기전 중 하나로 사료된다.

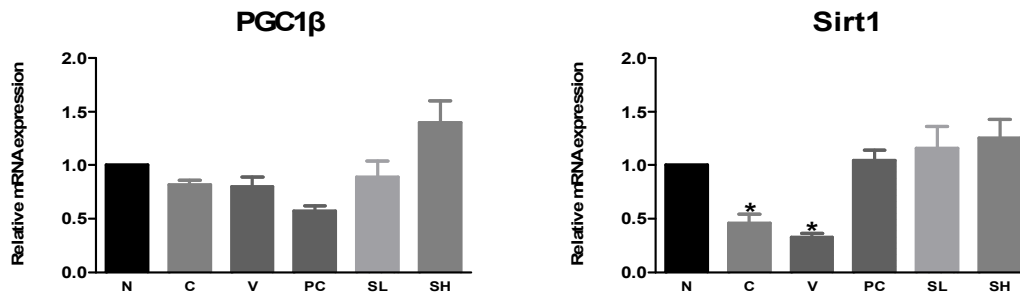


Fig. 2-31. Effect of licorice functional compound on mitochondrial biogenesis-related genes in liver.

(9) 에너지 대사율

체중변화에 미치는 에너지 대사율의 영향을 알아보기 위해, 마우스의 활동기인 저녁 6시부터 12시간동안의 energy expenditure를 측정하였다. 정상식이를 급여한 N군과 고지방 식이 급여 C 군간에는 energy expenditure의 차이는 관찰되지 않았다. Reference로서 creatine을 투여한 PC군의 경우, 오히려 다소 energy expenditure가 낮아지는 경향을 보였다. 감초제형 저 농도 투여군인 SL의 경우, 뚜렷한 차이는 보이지 않았으나 (Fig. 2-32), 감초 제형 고농도 투여군인 SH의 경우, energy expenditure가 크게 상승하는 것이 관찰되었다 (Fig. 2-33). 즉 감초 제형 고농도 투여군은 energy expenditure의 증가를 통해 체중의 증가를 억제하는 것이 하나의 가능성으로 제시될 수 있다.

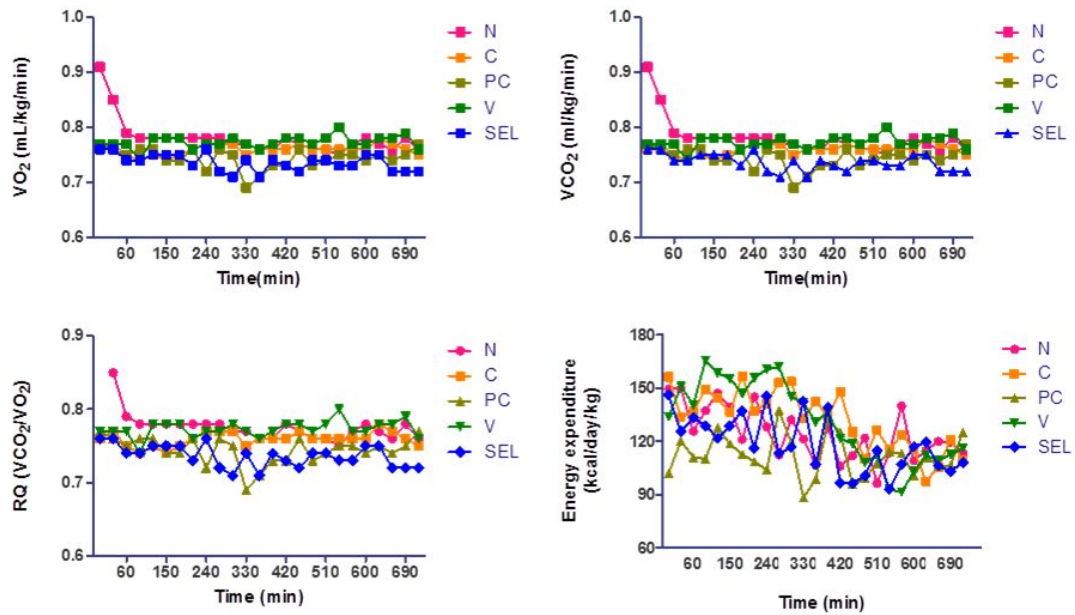


Fig. 2-32. Effect of licorice functional compound (SEL) on energy expenditure

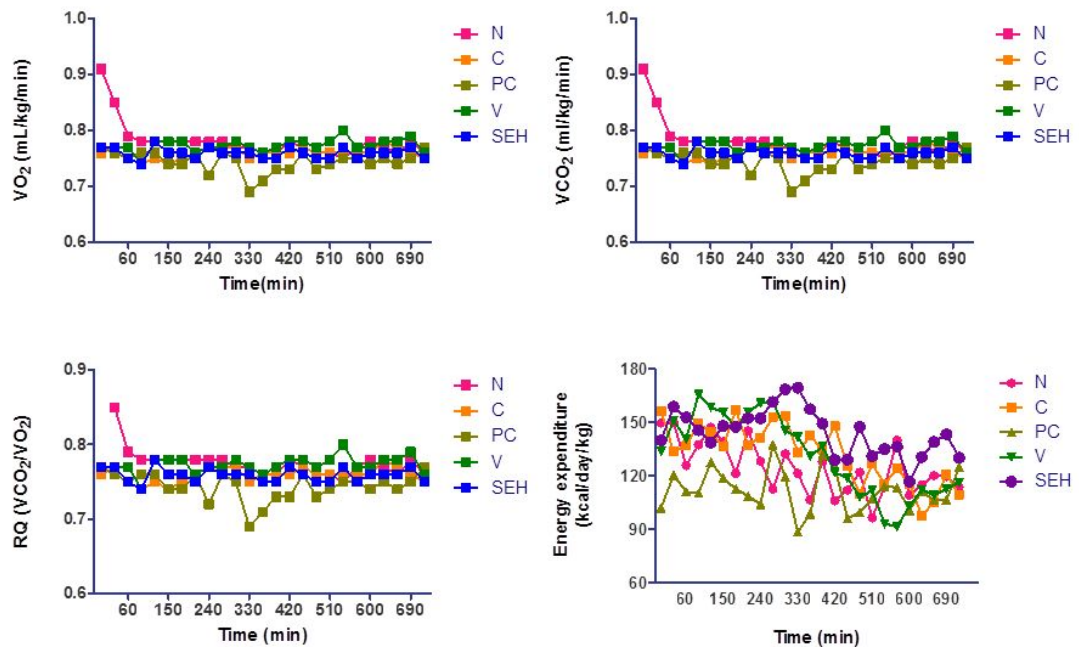


Fig. 2-33. Effect of licorice functional compound (SEH) on energy expenditure

제 3절. 감초의 in vivo 지구력 증진 효능

1. 고지방 식이 유도 비만 마우스 활용 감초 추출물 종류별 효능 평가
가. 연구 방법

(1) 실험동물 사육 및 식이조성

생후 4주령 된 수컷 C57BL/6J 마우스를 일반 chow 사료로 1주일간 환경에 적응시켰다. 정상식이 급여군과 고지방식이 급여군으로 나누어 4주 동안 실험 식이를 급여하였다. 4주간의 고지방 식이 급여 결과, 고지방 식이 급여로 인한 체중 증가가 나타나지 않는 마우스 (resistant to high fat diet-induced body weight increase)를 실험군에서 제외시켜 실험동물 자체 특성의 variation으로 인한 데이터 해석의 오류를 줄이고자 하였다.

선별 후 각 그룹별로 10마리씩 배치하여 6그룹으로 나누어 9주 동안 실험 식이를 급여하였다. 6군의 구성은 정상식이 급여군 (N-E), 고지방 식이 급여군 (C-E), 감초 에탄올 추출물 1% 포함 고지방식이 급여군 (E-E), 감초 열수 추출물 1% 포함 고지방 식이 급여군 (W-E), 감초 초임계 추출물 0.1% 또는 0.25% 포함 고지방 식이 급여군 (각각 SL-E, SH-E)으로 하였다.

실험식이 조성은 Table 2-1에 나타난 바와 같으며 8주 동안 일정한 시간에 매 주 한 차례 체중을 측정하였고 매일 식이량을 측정하여 일별 평균 식이 섭취량을 측정하였다.

(2) 최대 운동 수행능 측정

실험식이의 급여가 정상식이 동물의 운동 수행능에 미치는 영향을 측정하고자, 실험식이 급여 6 및 9주 후에 15°경사로 treadmill 운동을 시켰다. 최대 운동 수행능은 마우스가 지칠 때까지 이동한 거리 (distance to exhaustion)로 측정하였다. treadmill 운동 훈련을 위해 첫째날에는 5 m/min의 속도로 10분간, 10 m/min 10분간 마우스를 운동시켰다. 둘째날에는 5 m/min의 속도로 5분간, 10 m/min 15분간 훈련시켰으며 시험날인 셋째날에는 10 m/min 으로 10분간 워밍업 운동 후 2분마다 1 m/min으로 속도를 증가시켰다. 최대 운동 수행능은 운동을 멈춘 후 grid에서 10초 이상 머무를 때까지의 달린 거리로 환산하였다.

(3) 호흡량 및 호흡률 변화 측정

운동 수행능 증가에 미치는 호흡율의 영향을 알아보기 위해, 각 그룹의 마우스를 저녁 7시부터 오전 7시까지 12시간 동안 calorimetry로 VO_2 , VCO_2 및 RQ (respiratory quotient, 호흡율)를 측정하였다.

(3) 조직학적 분석

간조직 및 지방조직 세포의 형태학적 관찰을 위해 적출한 간과 부고환 지방 및 갈색 지방 조직의 일부를 적출하여 10% formaldehyde 용액에 고정 및 탈수 후 paraffin 투과과정을 거쳐 포매하였다. 박절편기로 약 $4 \mu m$ 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin (HE)으로 염색하고, xylene으로 투명화 시켜 봉입한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

(4) 혈액 생화학적 분석

실험식이 투여 8주 후 12시간 절식을 시킨 뒤 혈액 샘플을 채취하였다. 혈액 샘플은 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 $30 \mu L$ 씩 분주하여 분석하기 전까지 $-80^\circ C$ 에 보관하였다. 혈청의 중성지방 (triglyceride), 총콜레스테롤 (total cholesterol), HDL 콜레스테롤, NEFA, GOP, GPT 및 glucose는 혈액 분석용 kit (신양화학, Korea)를 이용하여 분석하였다. LDL 콜레스테롤은 측정된 콜레스테롤의 함량으로부터 계산하여 산출하였다. 혈 중 LDH 활성은 LDH assay kit (Biovision, USA)으로 측정하였다. 혈청 내 SOD (superoxide dismutase) 활성은 SOD assay kit (Cayman Chemical Company, USA)를 사용하여 측정하였다.

(5) 혈중 호르몬 측정

혈청 leptin 농도는 mouse leptin immunoassay kit (R&D, USA)를 사용하여 분석하였다.

(6) 간지질 함량 분석

간 조직 내 지질 측정은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 간 조직 0.2 g에 0.9 % 식염수 5 mL을 넣고 homogenizer로 갈아 준 뒤 여기에 chloroform : methanol = 2 : 1로 혼합한 buffer를 20 mL을 넣어 잘 흔들어 준다. 3000 rpm에서 20 min간 원심 분리하여 아래층 용액을 sodium sulfate가 들어있는 여과지에 넣어 여과시킨다. 이것을 감압수기에 넣어 evaporation시킨다. 이 때 사용한 감압 수기는 미리 무게를 측정해 두어야 한다. 완전히 evaporation시킨 뒤 무게를 측정하여 지질양을 측정한다. 여

기에 chloroform 3 mL을 넣고 녹인 뒤 10 μ L씩 따서 혈액 생화학적 분석과 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였다.

(7) 조직 효소 활성 분석

간, 근육, 심장 조직은 10 ml 150 mM KCL-Tris-HCl (pH 7.2)용액을 첨가하여 분쇄한 뒤 500 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 필요한 양만큼씩 분주하여 분석하기 전까지 -80°C에 보관하였다. 간 조직에서 glycogen, LDH, CK, 심장조직에서 Catalase, SOD, TBARS, 근육조직에서 glycogen, lactate를 측정하였다. Catalase (CAT)측정은 Beers and Sizer (1952)에 제시된 방법으로 25°C, 240 nm에서 H₂O₂ 시약을 사용하여 측정하였고 Superoxide distumase (SOD)측정은 Sun and Zigman (1978)에 제시된 방법으로 480 nm에서 측정하였다. Glycogen은 Hassid and Abraham에서 제시한 방법을 토대로 측정하였다.

(8) qRT-PCR 활용 유전자 발현 분석

Total RNA의 추출을 위해서 RNeasy Plus mini kit(Qiagen, USA)를 사용하였다. 추출된 RNA는 분광광도계 (JASCO, V-530)을 이용하여 260 nm와 280 nm에서 측정하여 260 nm/280 nm의 비가 1.8 이상인 total RNA 샘플만을 실험에 사용하였다. 추출된 RNA는 Maxime RT Premix Kit(Intron Bio)를 이용하여 cDNA를 합성하고자 하였다. 이를 위해 total RNA와 oligo dT primer를 혼합하여 45°C에서 60min과 95°C에서 5min 동안 반응시켰다. 얻어진 cDNA를 Table 3-1와 같은 primer set를 활용하여 Light Cycler 480 (Roche, Germany)로 SYBR Green I Master (Toyobo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

Table 3-1. Primers used for RT-PCR (프라이머 기준 형식)

Primers	Sequences
Tropolslow, forward	5'-ATGCCGGAAGTTGAGAGGAAA-3'
Tropolslow, reverse	5'-TCCGAGAGGTAACGCACCTT-3'
MyHCI Ib, forward	5'-GGAATCCTTTGGAAATGCGAAGA-3'
MyHCI Ib, reverse	5'-GCCCAACAATATAGCCAGTTAC-3'

(9) 통계분석

결과 통계분석은 GraphPad Prism 4 software (San Diego, CA, USA)를 사용하였다. One-way ANOVA 는 그룹 간에 정량 데이터를 비교하는데 사용되었다.(P < 0.05)

나. 연구 결과

감초 유래의 항비만 효능 및 운동 수행능 증가의 효능을 동시에 지니는 소재를 개발하기 위해 추출용매별 감초 추출물 급여가 비만 동물의 체중 및 운동 수행능에 미치는 영향을 측정하였다.

(1) 체중 변화 및 식이 섭취량

9주간의 실험기간 동안의 체중변화를 주별로 측정한 결과 W-E, SL-E 및 SH-E 그룹에서 유의적인 체중의 감소 경향이 나타났다 (Fig. 3-1).

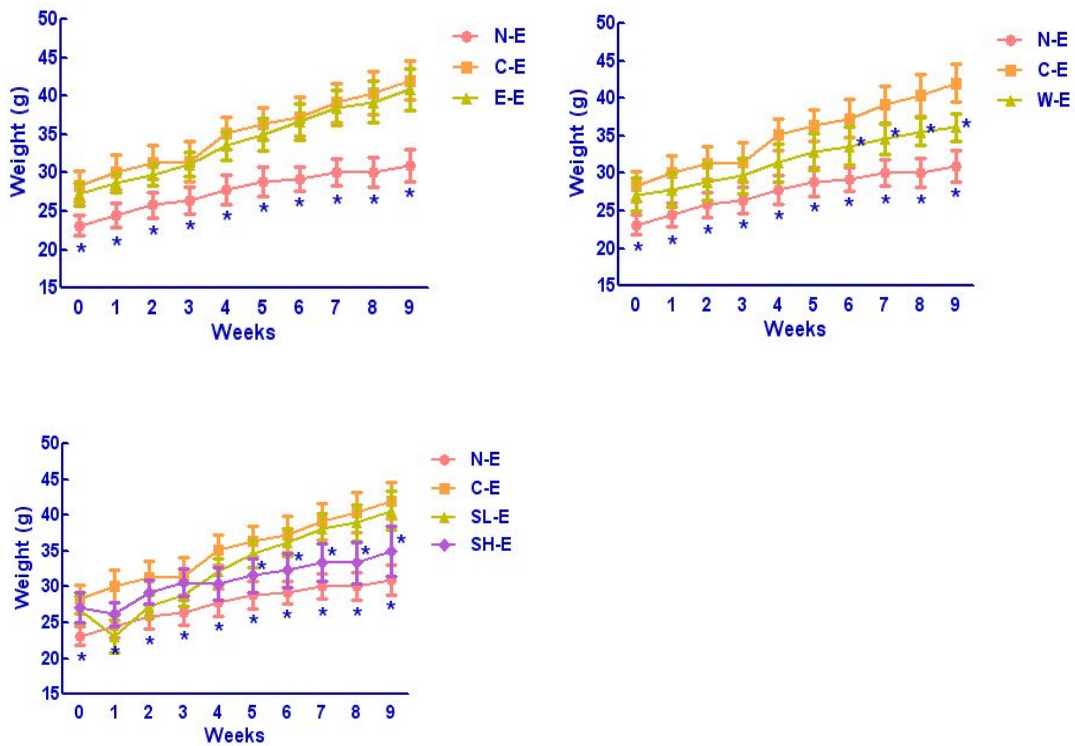


Fig. 3-1. Body weight change

9주간의 실험 기간 동안 체중 증가량을 비교한 결과 N-E군은 7.8 g 증가 (비운동군에 비해 0.85 g 감소)한 반면 C-E 그룹은 14.02 g 증가 (비운동군 실험군에 비해 0.1 g 감소)하였다. W-E 및 SH-E 그룹은 체중 증가가 각각 8.96 g, 6.86 g 으로 유의적으로 감소하였으며 이는 비운동군의 8.76 g, 9.14 g와 비교 시 SH-E 그룹의 경우 운동에 의한 체중 감소 효능이 가장 높게 나타났다 (Fig. 3-2). 그러나 실험기간 중의 식이 섭취량은 실험군별 차이는 나타나지 않아 (Fig. 3-3) 이러한 체중 증가 억제 효과가 식이 섭취량 감소에 따른 것이 아닌 것으로 사료된다.

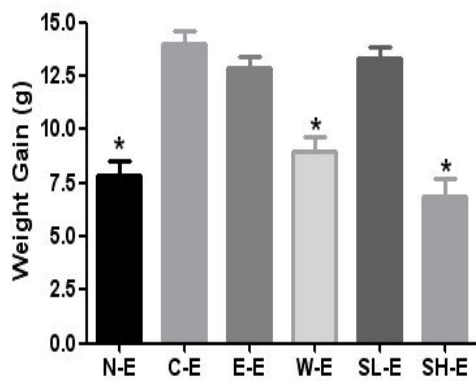


Fig. 3-2. Weight gain

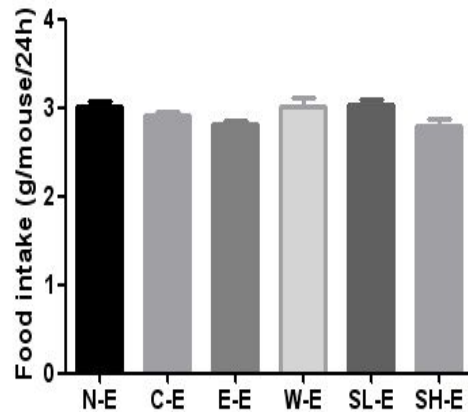


Fig. 3-3. Food intake

(2) 최대 운동 수행능

감초 추출물의 급여가 비만 동물의 운동 수행능에 미치는 영향을 측정하고자, 실험식이 급여 6 및 9주 후에 treadmill 운동을 통해 최대 운동 수행능을 마우스가 지칠 때까지 이동한 거리 (distance to exhaustion)로 측정하였다. 그 결과 실험식이 급여 6주 후 E-E, W-E 및 SH-E에서, 9주의 경우는 W-E 및 SH-E 그룹에서 운동 수행능의 증가가 나타났으며 특히, 9주의 SH-E 그룹의 경우 C-E에 비해 2.3배 이상, N-E 그룹에 비해 1.3배 이상 최대 이동거리가 증가하여 지구력 증진에 매우 효과적으로 나타났다 (Fig. 3-4).

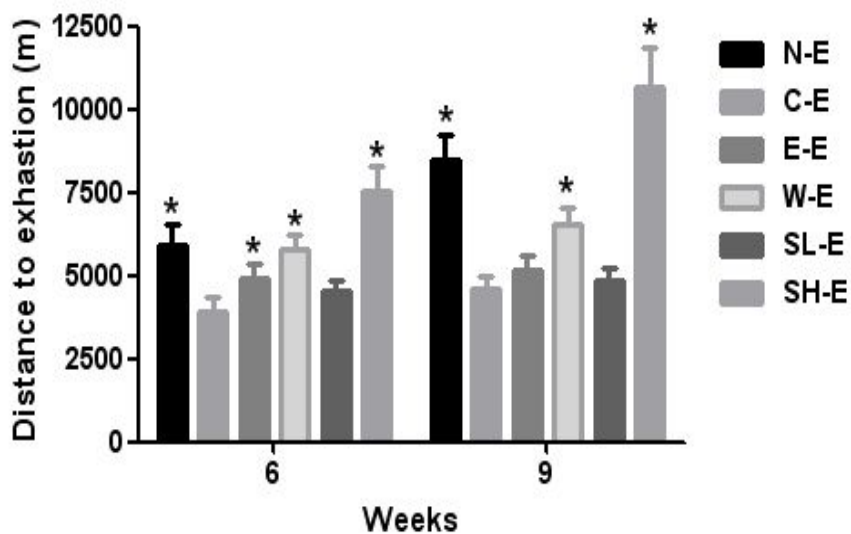


Fig. 3-4. Measurement of exercise endurance performance

(3) 장기 무게

9주간의 실험식이 급여 후 각 그룹별 마우스의 장기무게 (간, 부고환 지방, 신장주위 지방 및 갈색지방)를 비교하였다 (Fig. 3-5). 간조직의 경우 고지방 식이 급여로 인한 무게의 증가가 모든 감초 추출물 급여 그룹에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 백색지방인 부고환 지방 (epididymal fat) 및 신장주위지방 (perirenal fat)의 경우 W-E 및 SH-E 그룹에서 C-E에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 갈색지방의 경우는 모든 감초 추출물 급여 그룹에서 모두 통계적으로 유의한 감소를 보였으나 특히 E-E, W-E 및 SH-E 급여 군에서 크게 감소하였다.

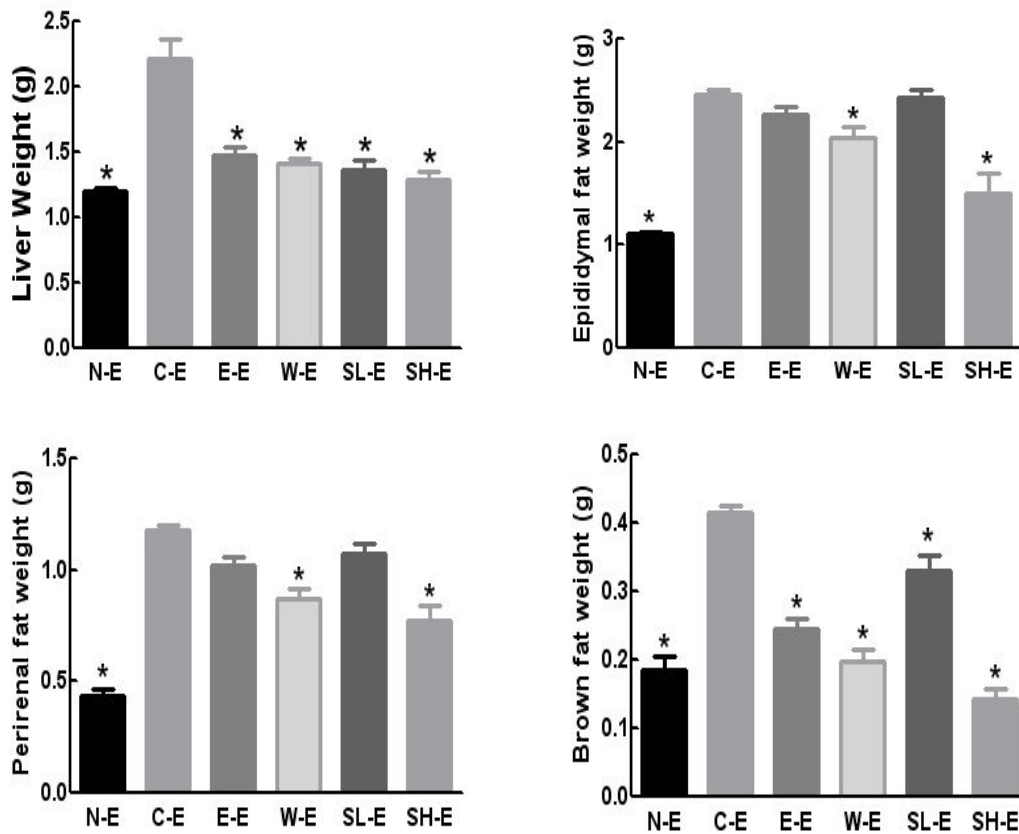


Fig. 3-5. Organ weights

(4) 조직학적 분석

간 (Liver), 부고환 지방 (WAT) 및 갈색지방 (BAT)의 조직 관찰을 위해 포르말린 고정 조직 절편의 H&E stain 결과, 간의 경우, 장기 무게 측정 시 나타났던 경향과 유사하게 고지방 식이 급여에 의한 간 조직 내 지방 축적이 감초 추출물이 포함된 고지방 식이의 급여 시 고지방 식이 단독 급여군에 비해 지방간의 병변이 뚜렷하게

억제된 것으로 관찰되었다. 부고환 지방의 경우는 감초 추출물 급여 시 고지방 식이 급여에 의해 비대된 지방세포의 크기가 감소되는 것으로 관찰되었으며 갈색지방의 경우, 고지방 식이 급여에 의해 지방세포 내 지방구 크기의 증가가 감초 추출물 급여에 의해서 억제된 것을 확인하였으며 이러한 BAT 조직 무게의 감소가 세포내 지방 침착 억제에 의한 것임을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-6).

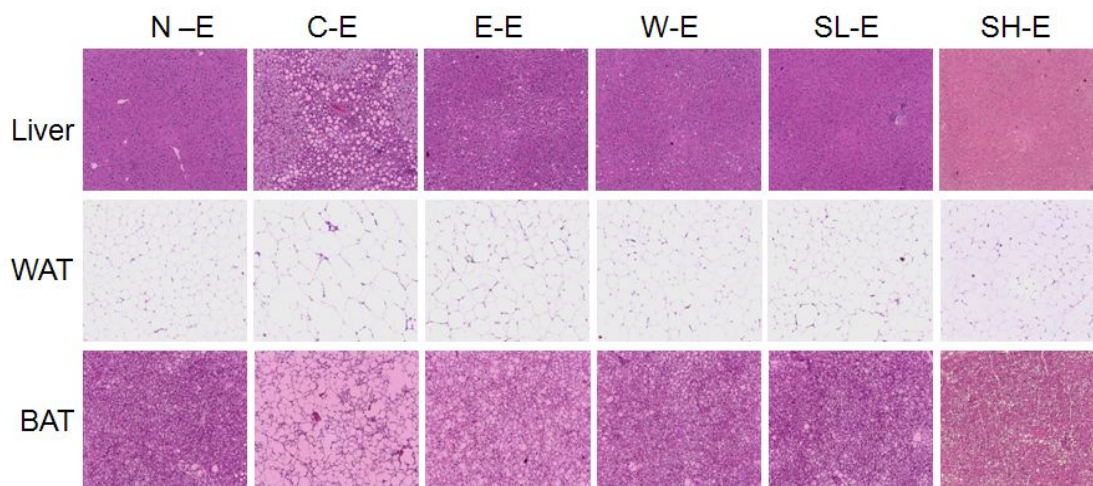


Fig. 3-6. Histological analysis of liver, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT)

(5) 혈중 지질 변화

감초 추출물 급여가 혈중 지질 함량에 미치는 영향을 측정하였다 (Fig. 3-7). 혈중 중성지방 (TG)과 총콜레스테롤 (TC)의 경우 N-E에 비해 C-E군에서 뚜렷하게 증가되었다. TG의 경우는 감초 추출물 급여에 의해서 감소하는 경향을 보였고, 그 중 W-E, SL-E 군에서는 유의적 감소가 나타났다. TC는 모든 감초 추출물 투여군에서 효과적으로 억제되었다. HDL-콜레스테롤의 경우 군간의 차이가 나타나지 않았으나 (data now shown) LDL-콜레스테롤의 경우 고지방 식이 급여군에서 크게 증가하였고, 감초 추출물 급여 모든 군에서 수치가 낮아졌다. NEFA의 경우도 감초 추출물 급여에 의해서 혈중 수치가 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 감초 추출물은 고지방 식이 섭취에 의한 혈중 지질 상승효과에 대해 높은 억제 효과를 나타내는 것을 의미한다.

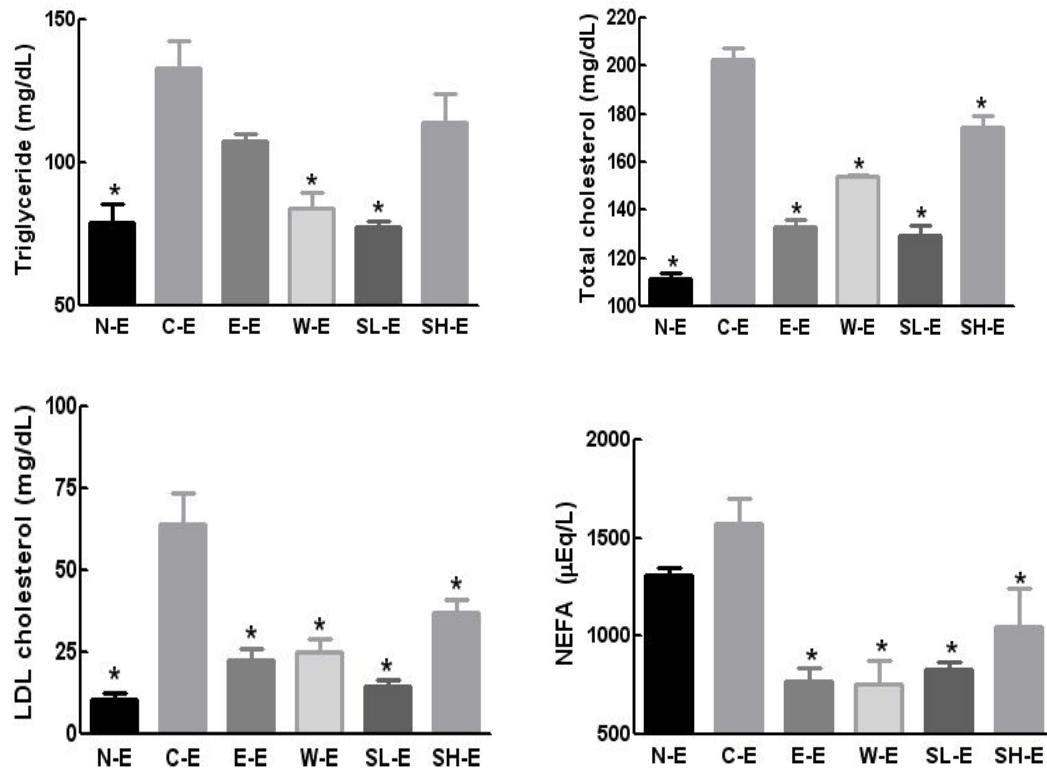


Fig. 3-7. Serum lipid profiles

(6) 혈당, 혈청 호르몬 및 효소 활성

실험 종료 후 혈당의 그룹별 차이는 관찰되지 않았으며 이는 절식 없이 최대 운동 수행능 평가 후 채혈하였기 때문으로 사료된다.

혈중 leptin은 고지방 식이 급여에 의한 수치의 상승을 감소 추출물 투여군 모두에서 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났으며 특히, 지구력 증진 효과가 뛰어났던 SH-E 군에서 가장 낮은 수치를 보였다.

LDH (lactate dehydrogenase)는 glycogen 또는 glucose가 분해되어 ATP를 형성하는 과정에서 세포내에 충분한 양의 산소가 공급되지 못하면 anaerobic metabolism의 결과로 lactate가 축적됨에 따라 LDH의 활성이 증가하게 되며 또한 LDH는 근육 손상의 대표적 마커이기도 하다. C-E 그룹에서는 N-E 그룹에 비해 serum LDH의 유의적 증가가 나타났으며 감소 추출물 급여 군에서 모두 효과적으로 억제된 것이 관찰되었다. 즉 감소 추출물 급여 시 지구력 운동 결과 유도되는 근육 손상에 대해 보호 작용이 있는 것으로 사료된다. 항산화 효소인 SOD의 경우 C-E 군에 비해 감소 추출물을 급여한 모든 군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았다 (Table 3-2).

Table 3-2. Blood glucose and enzyme activity

	glucose (ng/ml)	Leptin (ng/ml)	LDH (IU/L)	SOD (U/min/mg protein)
N-E	241.6 ± 7.9	15.76 ± 0.82*	60.64 ± 3.77*	2.87 ± 0.44
C-E	284.2 ± 15.1	61.83 ± 0.81	107.60 ± 1.73	1.89 ± 0.18
E-E	269.9 ± 7.5	43.81 ± 0.91*	68.85 ± 1.77*	4.35 ± 1.13
W-E	249.2 ± 10.9	30.05 ± 3.46*	59.58 ± 1.39*	2.54 ± 0.24
SL-E	253.7 ± 12.1	43.56 ± 3.82*	82.79 ± 5.08*	2.17 ± 0.33
SH-E	257.8 ± 8.5	21.99 ± 2.60*	81.66 ± 5.06*	4.50 ± 0.81

(7) 간지질 변화

간 조직의 총 지방량, TG, TC 및 NEFA를 분석한 결과 고지방 식이 급여 시 hepatic total lipid, TG, TC 및 NEFA 모든 바이오마커에서 정상식이 급여군에 비해 유의적으로 증가하였다. Hepatic total lipid의 경우 감초 추출물 급여에 의해서 감소되었으며 이는 감초 추출물이 간지질을 낮추는데 매우 효과적인 것을 의미한다. 이 외에도 TC, TG 및 NEFA 모두 감초 추출물 급여 시 유의적으로 감소되었으며 이러한 결과를 근거로 감초 추출물은 고지방 식이 급여에 의한 혈중 지질 상승을 매우 효과적으로 억제하는 것으로 사료 된다 (Fig. 3-8).

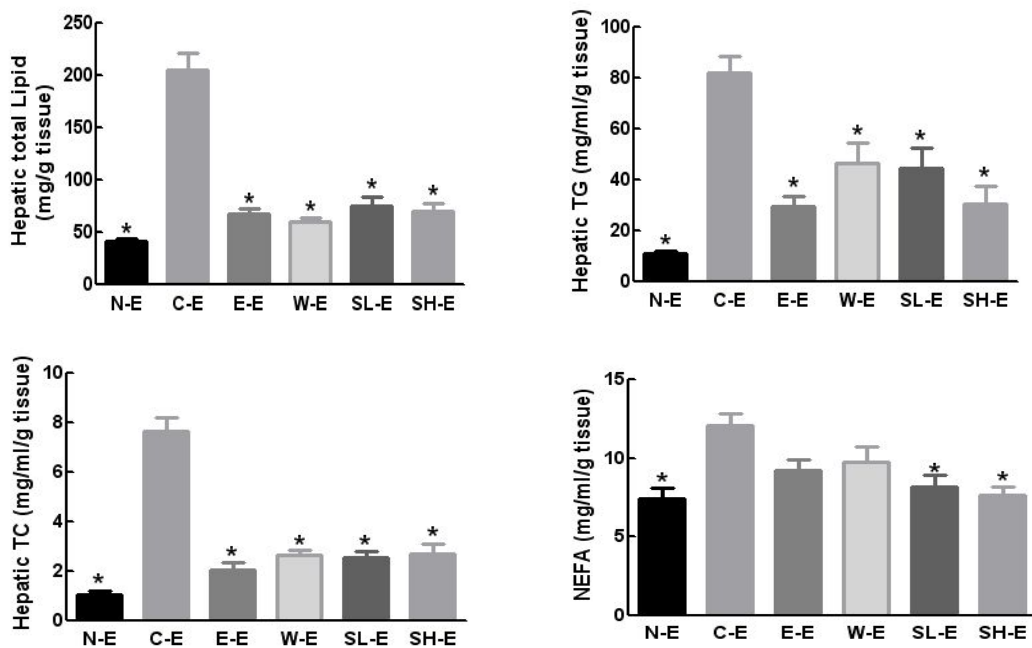


Fig. 3-8. Hepatic lipid profiles

(8) 감초 추출물의 안전성

9주간의 시험물질 투여 후, 실험동물을 희생시켜 장기 적출 시 살펴본 결과, 해부학적으로 특이한 조직 병변이나 염증 소견 등은 관찰되지 않았다.

감초 추출물의 장기간 급여가 생체 내 독성을 유발하는지 살펴보기 위하여 간독성의 대표적 바이오마커인 혈중 GOT 및 GPT 수치를 측정하였다. Fig. 3-9와 같이 고지방 식이를 급여한 운동군에서 혈중 GOT 및 GPT 수치가 상승하였으나 감초 추출물 급여군에서는 GOT의 경우 모든 감초 추출물 투여군에서, GPT의 경우는 E-E 및 SL-E 군에서 유의적으로 감소되었다. 이러한 결과를 근거로 감초추출물은 특별한 독성을 나타내지 않는 것으로 생각되었다.

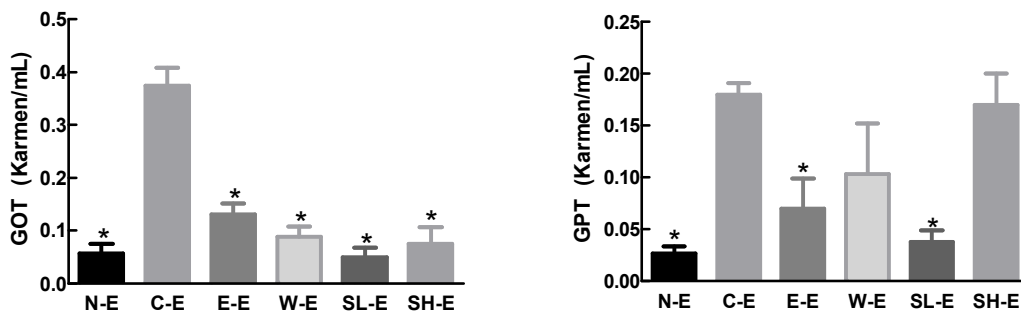


Fig. 3-9. Effect of licorice extracts on GOT and GPT levels.

(9) 간의 운동 마커 변화

무산소 운동 시 ATP를 재합성하는데 필요한 creatine phosphate 합성을 촉매하는 효소인 CPK (creatine phosphokinase)는 근육 손상의 마커로도 알려져 있다. C-E 그룹에서 상승한 CPK는 감초 추출물 급여 군에서 유의적으로 감소하였다. 간 글리코겐의 경우 C-E 그룹에서 현저히 높은 것은 고지방 식이 급여로 인해 과잉 에너지가 글리코겐의 형태로 간에 저장되어 지방간 병변으로 발전했기 때문으로 사료된다. 이 외에도 최대 운동 후 간을 적출하여 상대적으로 적은 양의 운동을 수행한 C-E 그룹은 간의 글리코겐의 사용을 많이 하지 않은 것도 하나의 원인으로 사료 된다 (Fig. 3-10).

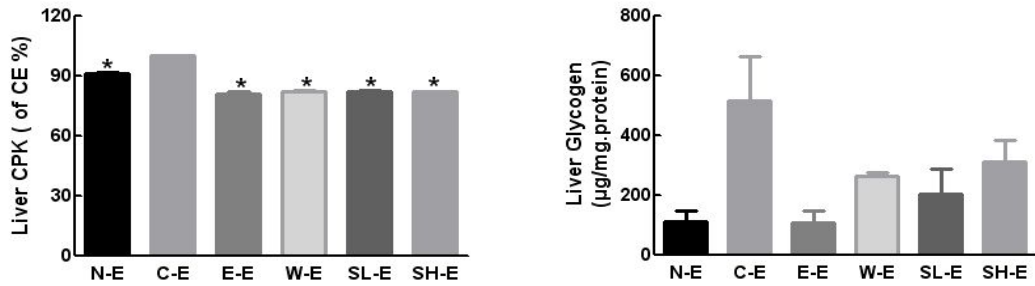


Fig. 3-10. Hepatic creatine phosphokinase and glycogen levels

(10) 근육의 운동 마커 변화

최대 운동 수행 후 근육 내 lactate 및 glycogen의 농도를 측정하였다 (Fig. 3-11). lactate는 무산소 운동 중에 근세포질에 축적되는 피로물질로서 운동에 의해 체내에 축적 시 체내 환경의 산성화를 통해 운동에너지의 급원이 되는 당신생의 억제를 유도하게 된다. C-E 그룹의 경우 근육의 lactate 축적이 증가하였으나 감초 추출물을 급여한 운동군에서는 lactate의 축적이 감소되는 경향을 보였다.

근육의 글리코겐 농도는 지구력 운동수행능력에 영향을 미치는 요인으로 알려져 있는데, 본 실험 결과 감초추출물 투여 군에서 C-E 군에 비해 오히려 근육 내 glycogen 농도가 감소한 것으로 나타났다. 이는 마우스를 탈진시까지 운동을 시킨 후 근육을 채취하였는데, 탈진시까지의 운동거리가 C-E 군에서 다른 실험군에 비해 유의적으로 짧았기 때문에 상대적으로 근육의 glycogen이 덜 고갈되었기 때문으로 사료된다.

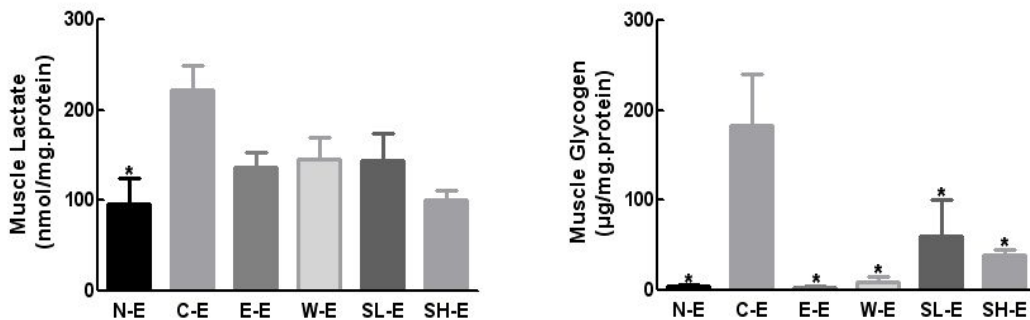


Fig. 3-11. The content of lactate and glycogen in muscle tissues.

(10) Muscle fiber type transition

장기간의 지구력 운동은 속근 (fast and glycolytic)의 특징을 갖는 type II muscle이 지근 (slow and aerobic)의 특징을 갖는 type I muscle로 근섬유 타입이 전환 (transition)된다고 알려져 있다.

본 실험에서는 식이 급여 및 트레드밀 운동이 근섬유 타입에 미치는 영향과 감초 추출물의 급여 시 효과를 알아보기 위해 지근 (slow and aerobic type I muscle) 마커인 troponin I과 속근 마커인 MyHCIIb의 유전자 발현을 측정하였다.

운동 후 적출한 비복근에서의 근섬유 타입별 마커 유전자의 발현을 측정한 결과, 고지방 식이를 급여한 운동군에서 Type II muscle이 증가하고 type I muscle이 감소되는 경향을 보인 반면 감초 추출물 급여 시 Type II muscle은 감소하면서 Type I muscle이 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 3-12).

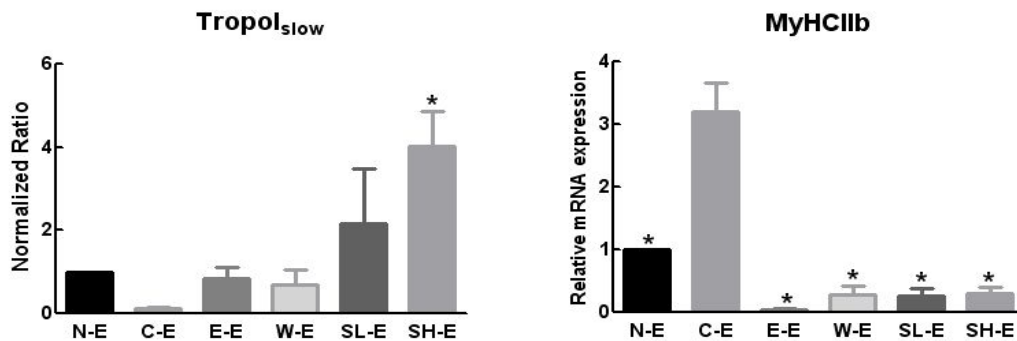


Fig. 3-12. The expressions of muscle type specific markers

2. 정상 식이 급여 마우스 활용 감초 초임계 추출물 효능 평가 가. 연구 방법

(1) 실험동물 및 실험식이

4주령의 마우스 (C57BL/6J)를 구입하여 1주간의 적응 후 각 그룹별로 10마리씩 배치하여 5그룹으로 나누었다. 5군의 구성은 대조군인 정상식이 급여군 (N), positive control 군인 0.1% creatine 포함 정상식이 급여군 (PC), 감초 초임계 추출물 0.5% 포함 정상식이 급여군 (SEL), 감초 초임계 추출물 1% 포함 정상식이 급여군 (SEH), 감초 열수 추출물 1% 포함 정상식이 급여군 (WE)으로 하였다. 실험 식이는 9주 동안 급여하였다.

(2) 최대 운동 수행능 측정

실험식이의 급여가 정상식이 동물의 운동 수행능에 미치는 영향을 측정하고자, 실험식이 급여 6 및 9주 후에 15°경사로 treadmill 운동을 시켰다. 최대 운동 수행능은 마우스가 지칠 때까지 이동한 거리 (distance to exhaustion)로 측정하였다.

Treadmill 운동 훈련을 위해 첫째날에는 5 m/min의 속도로 10분간, 10 m/min 10분간 마우스를 운동시켰다. 둘째날에는 5 m/min의 속도로 5분간, 10 m/min 15분간 훈련시켰으며 시험날인 셋째날에는 10 m/min 으로 10분간 워밍업 운동 후 2분마다 1 m/min으로 속도를 증가시켰다. 최대 운동 수행능은 운동을 멈춘 후 grid에서 10초 이상 머무를 때까지의 달린 거리로 환산하였다.

(3) 혈액 생화학적 분석

실험식이 투여 8주 후 12시간 절식을 시킨 뒤 혈액 샘플을 채취하였다. 혈액 샘플은 3000rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 30 ul씩 분주하여 분석하기 전까지 -80℃에 보관하였다. 혈청의 중성지방 (triglyceride), 총콜레스테롤 (total cholesterol), HDL 콜레스테롤, NEFA, GOP, GPT, BUN 및 glucose는 혈액 분석용 kit (신양화학, Korea)를 이용하여 분석하였다. LDL 콜레스테롤은 측정된 콜레스테롤의 함량으로부터 계산하여 산출하였다. 혈 중 LDH 활성은 LDH assay kit (Biovision, USA), lactate는 lactate assay kit (Biovision, USA)으로 측정하였다. 혈청 내 SOD (superoxide dismutase) 활성은 SOD assay kit (Cayman Chemical Company, USA)를 사용하여 측정하였다.

(4) 혈중 호르몬 측정

혈중 insulin 농도는 mouse insulin immunoassay kit (R&D, USA)로 측정하였다.

(5) 간지질 함량 분석

간 조직 내 지질 측정은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 간 조직 0.2 g에 0.9% 식염수 5 mL을 넣고 homogenizer로 갈아 준 뒤 여기에 chloroform : methanol = 2 : 1로 혼합한 buffer를 20 mL을 넣어 잘 흔들어 준다. 3000rpm에서 20min간 원심 분리하여 아래층 용액을 sodium sulfate가 들어있는 여과지에 넣어 여과시킨다. 이것을 감압수기에 넣어 evaporation시킨다. 이 때 사용한 감압 수기는 미리 무게를 측정해 두어야 한다. 완전히 evaporation시킨 뒤 무게를 측정하여 지질양을 측정한다. 여기에 chloroform 3 mL을 넣고 녹인 뒤 10 μL씩 따서 혈액 생화학적 분석과 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였다.

(6) 조직 효소 활성 분석

간, 근육, 심장 조직은 10 ml 150 mM KCL-Tris-HCl (pH 7.2) 용액을 첨가하여 분쇄한 뒤 500 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 필요양 만큼씩 분주하여 분석하기 전까지 -80℃에 보관하였다. 간 조직에서 glycogen, LDH, CK, 심장조직에서 Catalase, SOD, TBARS, 근육조직에서 glycogen, lactate를 측정하였다. Catalase (CAT)측정은 Beers and Sizer (1952)에 제시된 방법으로 25℃, 240 nm에서 H₂O₂ 시약을 사용하여 측정하였고 Superoxide distumase (SOD)측정은 Sun and Zigman (1978)에 제시된 방법으로 480 nm에서 측정하였다. Glycogen은 Hassid and Abraham에서 제시한 방법을 토대로 측정하였다.

(7) 통계분석

결과 통계분석은 GraphPad Prism 4 software (San Diego, CA, USA)를 사용하였다. One-way ANOVA 는 그룹 간에 정량 데이터를 비교하는데 사용되었다. ($P < 0.05$)

나. 연구 결과

감초 유래의 항비만 효능 및 운동 수행능 증가의 효능을 동시에 지니는 소재를 개발하기 위해 추출용매별 감초 추출물 급여가 비만 동물의 체중 및 운동 수행능에 미치는 영향을 측정한 결과 감초 에탄올, 초임계 및 열수추출물에서 항비만 및 지구력 증가 효능이 동시에 나타나는 것을 확인하였다.

그러나 지구력 증가 효능의 경우, 항비만 효과에 따른 체중 감소로 인해 2차적으로 나타나는 효과일 가능성도 있음에 따라 감초의 운동 수행능 증진 효능의 정확한 구명을 위해 정상식이 급여군을 대상으로 감초초임계 및 열수추출물의 지구력 효능을 평가하였다.

(1) 체중 변화 및 식이 섭취량

9주간의 실험기간 동안의 체중변화를 주별로 측정한 결과 WE, SLE 및 SHE 그룹에서 유의적인 체중의 감소 경향이 나타났다 (Fig. 3-12).

9주간의 실험 기간 동안 체중 증가량을 비교한 결과 N군은 9.72 g하였고, PC군은 9.15 g 증가하였다. SEL군은 7.80 g, SEH군은 6.75 g, WE군은 5.20 g 각각 증가하였으며, 이는 N군과 유의적인 차이를 나타내었다 (Fig. 3-13). 그러나 실험기간 중의 식이 섭취량은 실험군별 차이는 나타나지 않아 식이 섭취량 감소에 따른 체중 증가가 아닌 것으로 사료 된다 (Fig. 3-14).

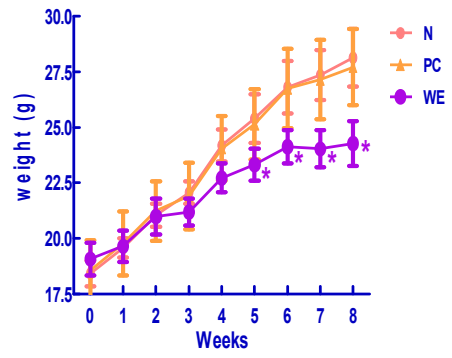
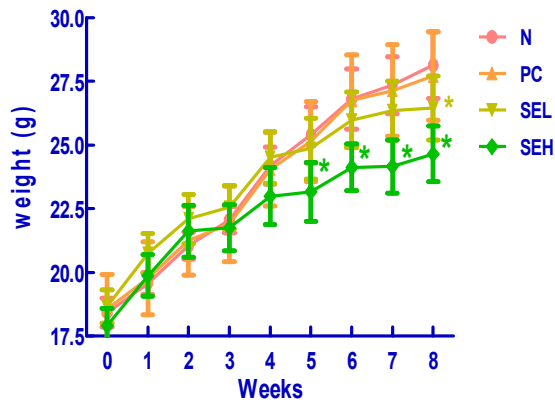


Fig. 3-12. Body weight change

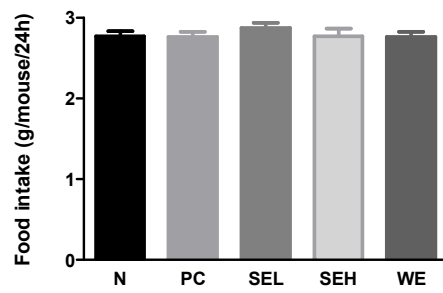
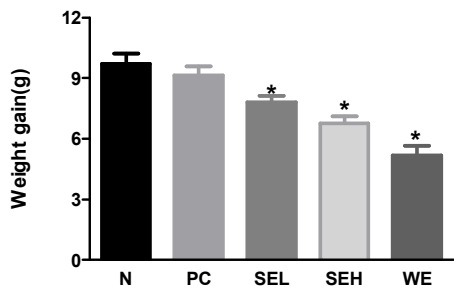


Fig. 3-13. Weight gain

Fig. 3-14. Food intake

(2) 최대 운동 수행능

감초 초임계 열수추출물의 급여가 정상식이 동물의 운동 수행능에 미치는 영향을 측정하고자, 실험식이 급여 6, 9주 후에 treadmill 운동을 통해 최대 운동 수행능을 마우스가 지칠 때까지 이동한 거리 (distance to exhaustion)로 측정하였다.

그 결과 실험식이 급여 6주 후에는 N군에 비해 PC군, SEL군, SEH군 및 WE군이 증가하는 경향을 보였으나, 그룹 간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 9주의 경우는 PC군, SEL군, SEH군 및 WE군에서 지칠 때까지 이동한 거리가 유의적인 증가를 나타냈다. (Fig. 3-15)

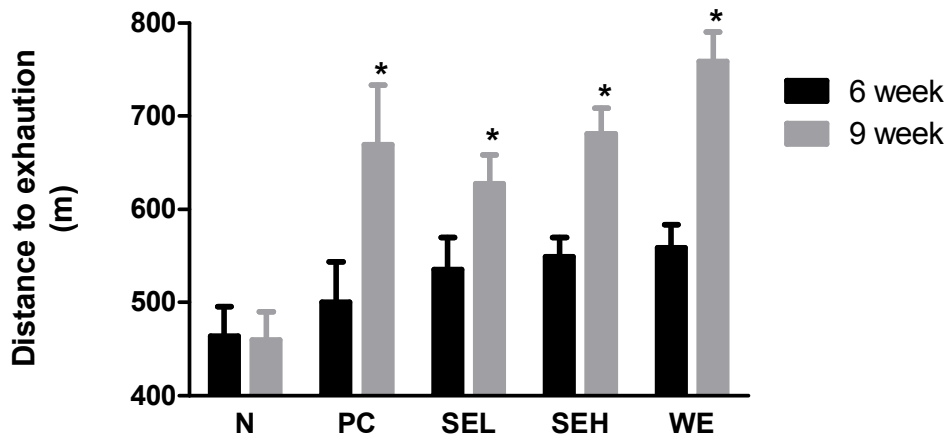


Fig. 3-15. Measurement of exercise performance

(3) 장기 무게

9주간의 실험식이 급여 후 각 그룹별 마우스의 장기무게 (간, 근육 및 심장)를 마우스 무게 100 g당의 무게로 비교한 결과 (Fig. 3-16), 간 조직의 경우 감초 물 및 초임계 추출물을 급여한 군에서 유의적으로 감소하는 경향으로 나타났다. 근육의 경우 운동에 의해서 다소 감소하였으나 감초 물 및 초임계 추출물 급여 시 뚜렷이 증가하였으며 심장의 경우 PC인 creatine 및 감초 추출물 급여군에서 증가하는 경향을 보였고 감초 초임계 추출물의 경우는 그 증가가 통계적으로 유의한 수준이었다.

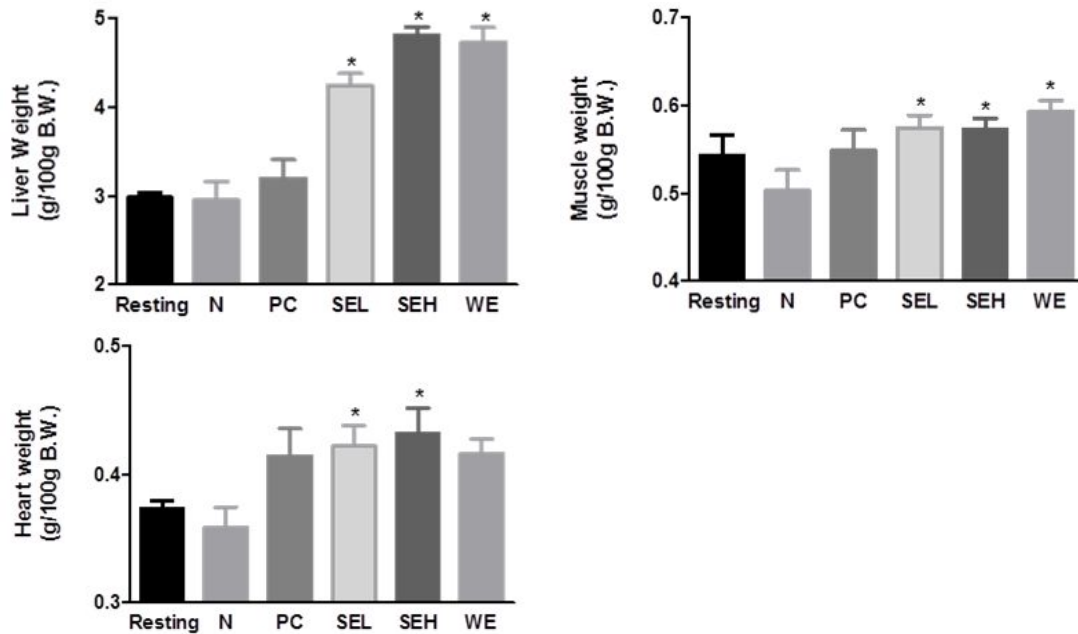


Fig. 3-16. Organ weights

(4) 혈중 지질 변화

감초 추출물 급여가 운동 시 혈중 지질 함량에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈중 lipid profile을 분석하였다 (Fig. 3-17). 혈중 중성지방 (TG)의 경우 운동거리가 유의적으로 증가하였던 감초 물 및 초임계 추출물 급여군에서 감소하는 경향을 보였다. 총콜레스테롤 (TC)의 경우 creatine 및 감초 물 및 초임계 추출물 급여군 모두에서 감소하는 경향을 보였으나 감초 추출물 투여군에서 수치 감소가 유의적이었다. 혈중 HDL-콜레스테롤의 경우는 SEH 및 WE 군에서만 다소 감소하였는데, 이는 TC의 감소가 매우 컸던 것에 기인하는 것으로 사료되며 LDL-콜레스테롤의 경우는 비운동군 보다는 운동군에서 감소하며 PC 및 감초 추출물 투여군에서 다소 더 감소되는 경향을 보였다.

혈중 free glycerol 의 농도는 PC, SEL 및 WE 그룹에서 유의적인 증가를 보였으며, 혈중 NEFA를 측정된 결과, PC 그룹만이 유의적인 증가를 보였으며, 감초 추출물 급여군에서 다소 증가하는 경향을 보였다.

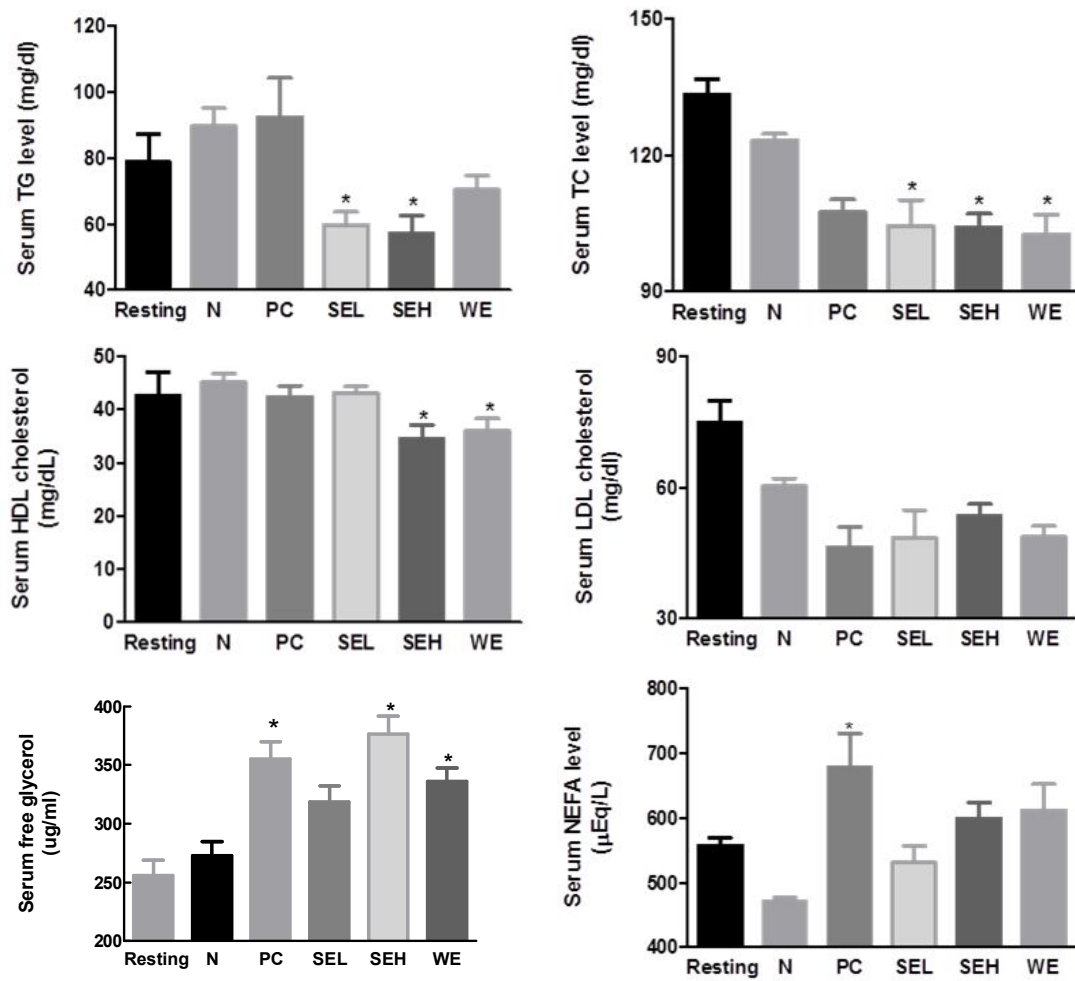


Fig. 3-17. Serum lipid profiles

(5) 혈당, 혈청 호르몬 및 효소 활성

혈청 인슐린 및 혈당 측정을 통해 당대사를 살펴본 결과, 운동군에서는 혈당이 상승하였고 이로 인한 혈중 인슐린 수치의 증가가 관찰되었다. 그러나 PC 및 감초 물 또는 초임계 추출물 투여군에서는 운동으로 인한 혈당의 증가가 관찰되지 않았고 따라서 인슐린 수치도 변화가 없었다. 특히 SEL 및 SEH는 운동군에 비해 유의적으로 감소하였고 비운동군과 유사한 정도까지 낮아졌다 (Fig. 3-18). 이는 감초 추출물이 인슐린과 혈당 조절에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

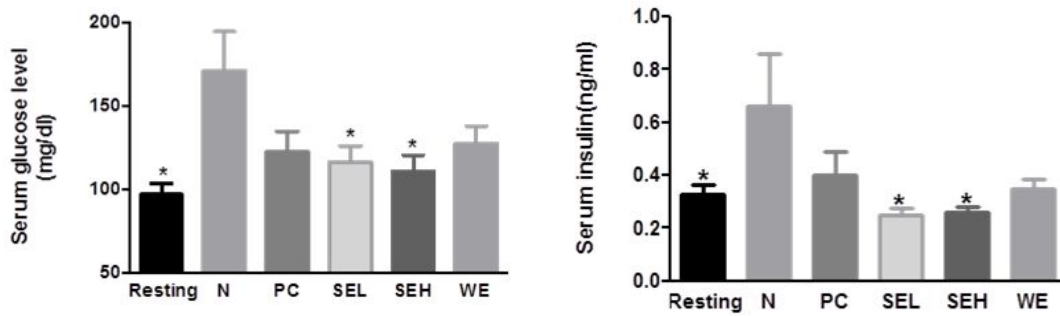


Fig. 3-18. Serum glucose and insulin levels

운동 시 분비되는 catecholamine은 간 Glycogen의 분해를 촉진하며, glycogen 또는 glucose가 분해되어 ATP를 형성하는 과정에서 세포내에 충분한 양의 산소가 공급되지 못하면 anaerobic metabolism의 결과로 LDH의 활성이 증가함에 따라 lactate가 축적되어 혈중 수치가 증가하게 된다. 또한 이로 인해 근내 피로를 유발하게 된다. 즉, LDH는 근 활동 중 근세포에서의 젖산의 형성과 전환을 조절하는 물질으로써, 근손상 지표로 이용된다.

본 실험에서 LDH의 활성을 측정한 결과, N군에 비해 PC, SEL, SEH 그룹에서 혈청 LDH의 활성이 감소되는 경향을 보였으며, WE 그룹에서의 LDH 활성은 유의적으로 감소하였다. 감초 추출물 급여 군에서 모두 효과적으로 억제된 것이 관찰됨을 통해 감초 추출물 급여가 지구력 운동 결과 유도되는 근육 손상에 대해 보호 작용이 있는 것으로 사료된다. 혈청 lactate의 경우 그룹 간 유의적 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 3-19).

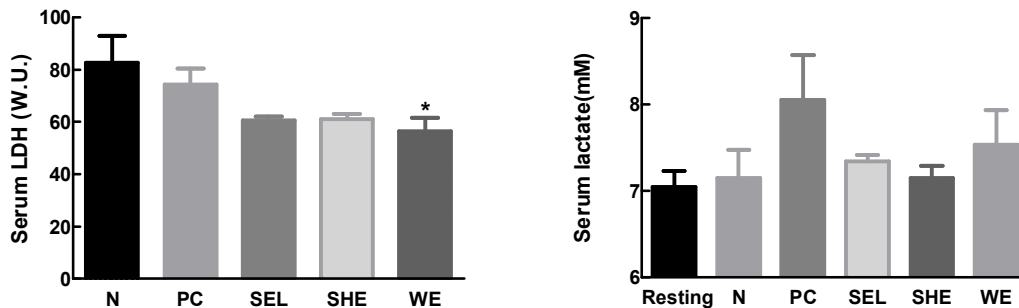


Fig. 3-19. Serum LDH and lactate levels

SOD (superoxide dismutase)는 체내 활성 라디칼에 의한 손상을 예방하고 방지하기 위한 항산화 효소로써, free radical을 제거하고 다른 세포의 파괴를 억제하는 역할을 하여 활성산소에 대한 방어역할을 수행한다. 혈청 SOD를 측정한 결과, N군에 비해 모든 그룹에서 활성이 증가하였으며, 초임계 추출물 그룹에서는 그 활성이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 3-20).

주로 간의 요소회로에서 단백질 이화산물인 암모니아를 요소로 합성에 따라 생성되는 BUN은 신장 기능을 평가하는 표지자로서 혈중 내 농도가 상승할 경우 신장 기능의 저하나 손상을 의미한다. 혈청 내 BUN 측정결과, Resting 그룹에 비해 운동그룹에서 혈청 BUN이 증가하는 경향을 보이나, 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 운동그룹 간에는 경향을 보이지 않았다 (Fig. 3-20).

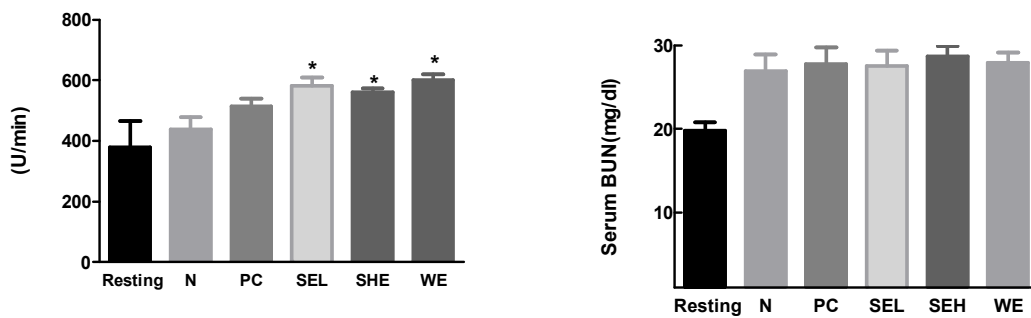


Fig. 3-20. Serum SOD and BUN levels

(6) 간지질 변화

간 조직의 총 지방량, TG, TC 및 NEFA를 분석한 결과 hepatic total lipid 및 TG의 경우 PC는 아무런 영향이 없었으나 감초 물 및 초임계 추출물 급여군에서는 수치가 감소하는 것으로 나타났다. TC의 경우에는 감초 초임계 추출물 급여에 의해서만 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. NEFA의 경우는 SEH 군에서만 유의적으로 감소하였다. 즉, 간 조직 수치의 경우, 혈중 지질 수치 측정 결과와 일치하는 경향을 보였으며, 이를 통해, treadmill을 수행함에 따른 감초 추출물 급여는 지질 농도 개선에 매우 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-21).

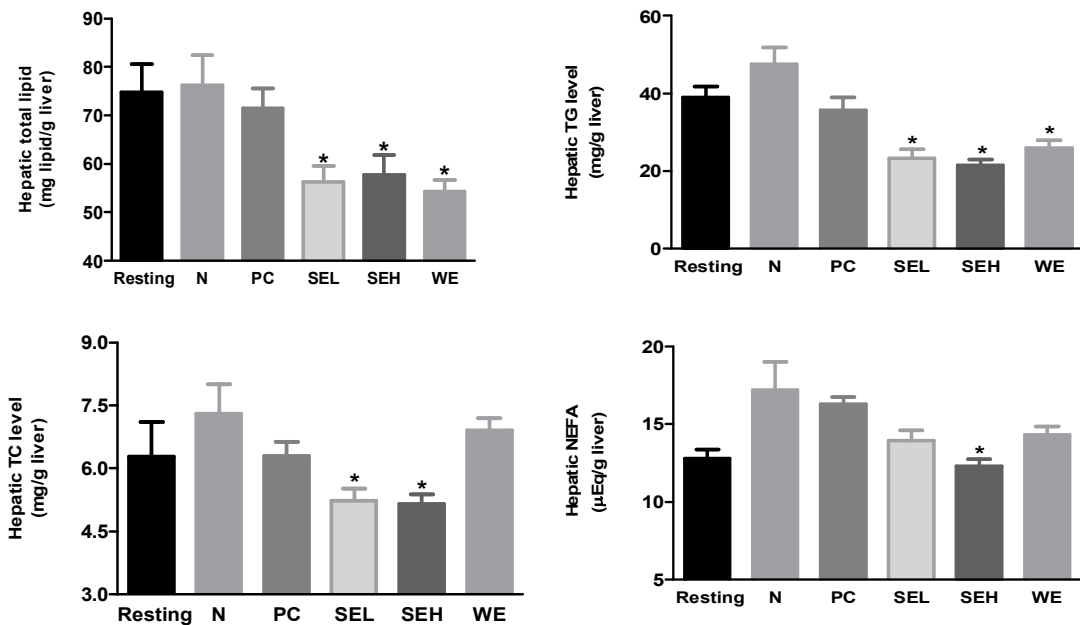


Fig. 3-21. Hepatic lipid profiles

(7) 간의 glycogen 및 운동 관련 마커 변화

간에 존재하는 glycogen의 경우, 1 mole의 glycogen은 무산소성 해당과정을 통해 3 mole의 ATP를 생성하지만 산소공급이 충분한 산화적 해당작용에서는 39 mole의 ATP를 생산할 수 있다. 간 내 글리코젠을 측정된 결과, Resting의 경우 treadmill을 수행하지 않음에 따라 축적된 glycogen을 에너지원으로 사용한 운동 그룹에 비해 높게 나타났다. PC 그룹 및 감초 추출물 급여군에서의 glycogen이 N 그룹에 비해 유의적이진 않으나 증가하는 경향을 보인다. 최대 운동의 거리가 더 높음에도 불구하고 glycogen 저장량에 높게 나타난 것은 그 외의 에너지 공급원이 사용된 가능성을 보인다 (Fig. 3-22).

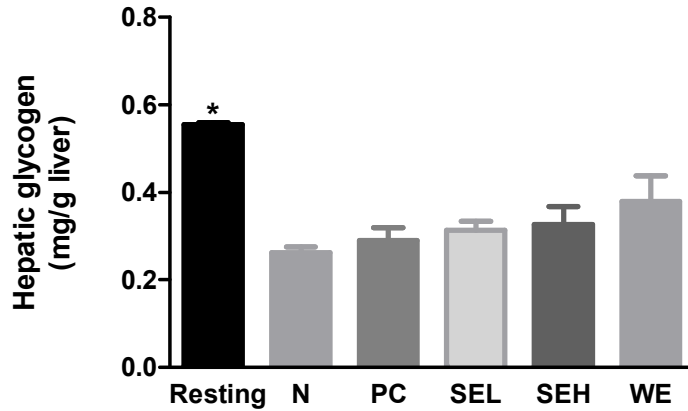


Fig. 3-22. Hepatic glycogen content

간의 운동 관련 마커 활성을 측정하기 위해 Lactate Dehydrogenase (LDH) 및 Creatine kinase (CK)의 활성을 측정하였다 (Fig. 3-23). Anaerobic metabolism의 결과로 증가하는 LDH는 그 활성이 증가함에 따라 lactate가 축적되어 근내 피로를 유발하게 된다. 즉, LDH는 젖산의 형성과 전환을 조절하는 물질로써, 본 실험에서 간의 LDH의 활성을 측정된 결과, 운동군 및 PC군에 비해 감초 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 무산소 운동 시 ATP를 재합성하는데 필요한 creatine phosphate 합성을 촉매하는 효소인 CK는 양성대조군으로 사용한 creatine의 주요 작용점이다. CK의 간에서의 활성도를 측정된 결과, N 그룹에 비해 PC와 감초 추출물에서 CK 활성이 유의적으로 높게 나타났다.

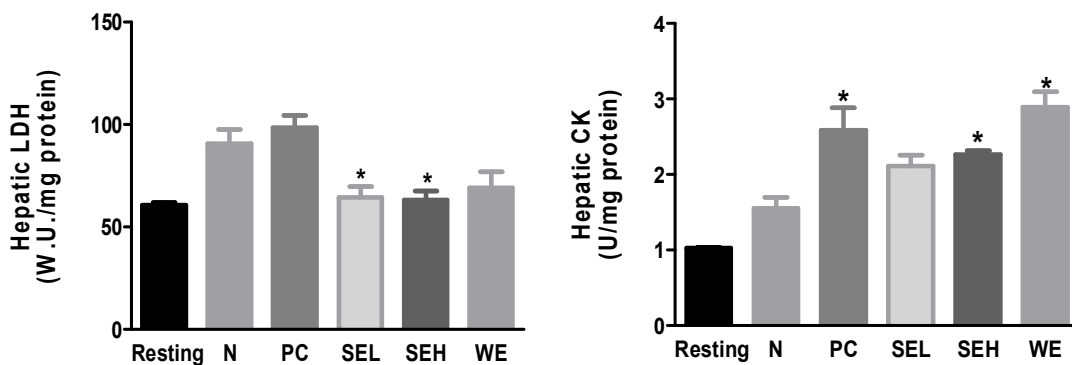


Fig. 3-23. Enzyme activities of LDH and CK in liver tissues

간세포 손상 시 세포막의 투과성 변화로 세포질효소의 누출이 일어나며, 간 기능 검사 시 간세포 누출된 효소 (alanine aminotransferase; ALT, aspartate aminotransferase; AST)의 활성의 측정은 매우 민감한 간 손상의 지표이다. 본 연구에서 양성 대조군인 creatine이나 감초 추출물의 급여는 혈청 ALT 및 AST 수치에 영향을 주지 않

있고 이는 시험물질 급여로 인한 간세포 손상은 나타나지 않았음을 의미 한다 (Fig. 3-24).

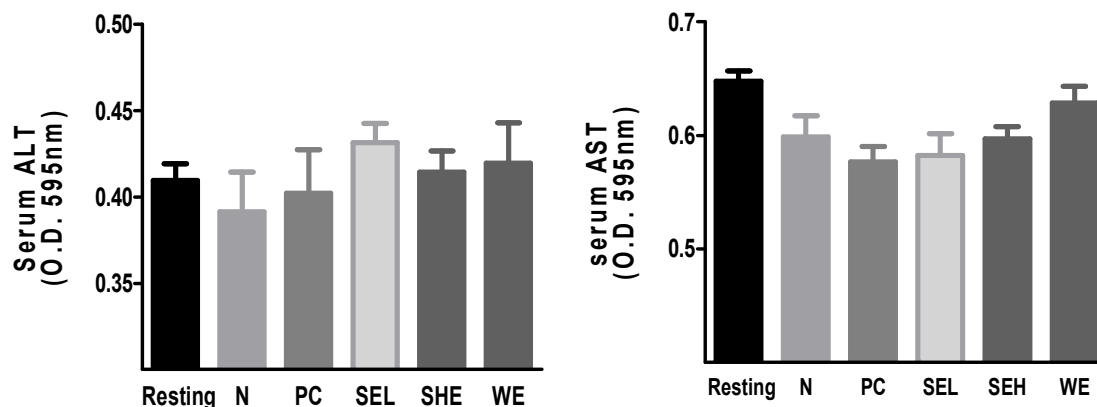


Fig. 3-24. Serum levels of ALT and AST

(8) 심장의 항산화 효소 활성화 측정

운동에 동원되는 근육의 산소이용량에 대한 증가는 미토콘드리아의 호흡능력을 증가시키게 되어 superoxide 라디칼 생성을 촉진시키게 되고, 또한 운동으로 인해 증가된 산소의 이용뿐만 아니라 체조직의 손상 및 환경 오염인자 등도 free radical 생성을 증가시키는 요인으로 간주된다.

심장에서의 Catalase, SOD, TBARS 측정된 결과는 Fig. 3-25와 같다. 과산화 음이온을 과산화수소와 산소로 환원시키는 항산화 효소의 일종인 SOD 활성을 측정된 결과, Resting 그룹에서 N군에 비해 유의적으로 높았으며, N군에 비해 초임계 추출군의 SOD 활성이 유의적으로 높게 나타났다.

SOD의 작용으로 만들어진 H₂O₂와 lipid peroxide를 활성산소를 형성하기 전에 해가 없는 분자로 전환시켜 유해산소 처리를 완결하는 항산화 효소 중 하나인 CAT (catalase)를 측정된 결과, Resting 군에 비해서 N군의 활성이 유의적으로 높게 나타났으며, N군과 비교한 결과, PC 그룹과는 유의적인 차이를 보이지 않으나, 감초 추출물 그룹에서는 유의적으로 감소되었다.

Lipid peroxidation 관련 마커인 TBARS를 측정된 결과, Resting 군에서 N군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, N군에 비해 SEH군과 WE군의 TBARS 활성이 유의적으로 낮게 나타났으며, PC 및 감초 추출물의 TBARS가 낮아지는 경향을 보여 감초

추출물은 운동으로 인한 활성산소 및 지질 산화를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

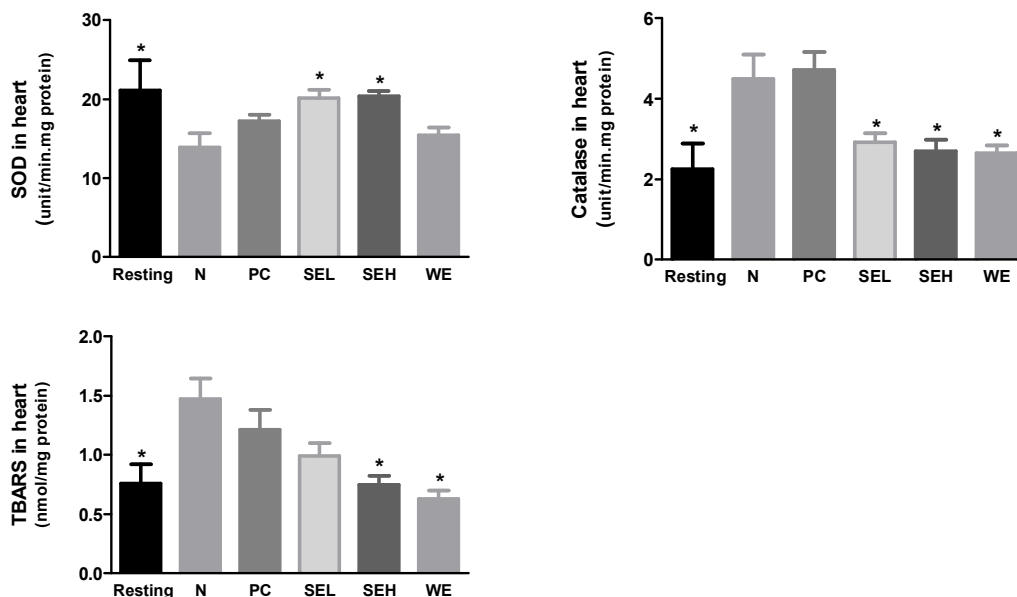


Fig. 3-25. Antioxidant activity in heart

(9) 근육의 운동 마커 변화

최대 운동 수행 후 근육 내 glycogen 및 lactate의 농도를 측정하였다 (Fig. 3-26).

근육의 글리코겐 농도는 지구력 운동수행능력에 영향을 미치는 요인으로 알려져 있다. 본 실험 결과 감초추출물 투여 군에서 N 군에 비해 근육 내 glycogen 농도가 유의적으로 높게 나타났다. 즉 creatine 및 감초 유래 소재는 운동으로 인한 근육의 급격한 glycogen 소실을 억제하는 것으로 사료 된다.

Lactate는 무산소 운동 중에 근세포질에 축적되는 피로물질로서 운동에 의해 체내에 축적 시 체내 환경의 산성화를 통해 운동에너지의 급원이 되는 당신생의 억제를 유도하게 된다. N 그룹의 경우 근육의 lactate 축적이 증가하였으나 감초 추출물을 급여한 운동군에서는 lactate의 축적이 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다.

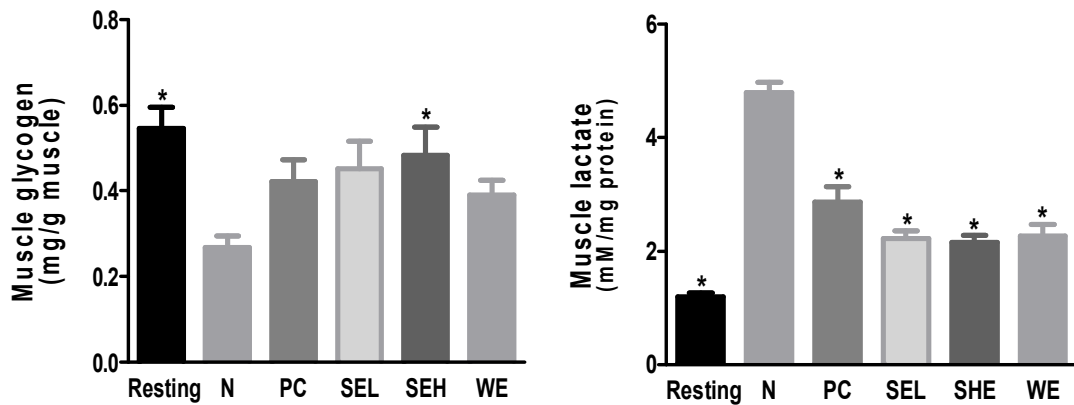


Fig. 3-26. The content of glycogen and lactate in muscle tissues

(10) 호흡량 및 호흡률 변화

유산소성 운동은 산소섭취량과 이산화탄소 생성에 커다란 영향을 주는 것으로 알려져 있는데, 조직으로 가는 산소의 공급량, 폐로 들어오는 이산화탄소, 분당 환기량이 유의하게 증가하게 된다.

운동 수행능 증가에 미치는 호흡율의 영향을 알아보기 위해, 각 그룹의 마우스를 저녁 7시부터 오전 7시까지 12시간 동안 calorimetry로 VO_2 , VCO_2 및 RQ (respiratory quotient, 호흡율)를 측정된 결과, N 그룹과 PC 그룹은 RQ 가 0.75 - 1.0 사이에서 비교적 높게 나타나는 경향을 보였으나 유의적 차이는 없었다. 감초 추출물 그룹의 경우 VO_2 및 VCO_2 모두 증가되어 RQ는 유지되었다 (Fig. 3-27 - Fig. 3-29). VO_2 및 VCO_2 의 증가는 energy expenditure의 증가에 의하므로 감초 추출물의 급여가 에너지 소비를 증가시킨 것으로 사료된다. 또한 RQ가 0.7로 유지된 것은 이론상 에너지원으로 오로지 지방만을 사용한 것을 뜻하므로, 이는 간 및 근육 내 축적된 glycogen의 농도가 덜 감소된 결과와 일치한다. 운동 시 지방이 에너지원으로 사용되는 기여도는 운동의 강도와 기간 뿐만 아니라 식이와 훈련 상태에 따라서도 크게 좌우되고 탄수화물이나 단백질에 비해서 상대적으로 두 배 이상의 열량을 보유하고 있기 때문에 에너지원으로서의 효율성 측면에서는 매우 가치가 높다고 할 수 있으므로 이는 매우 긍정적인 결과라 사료된다.

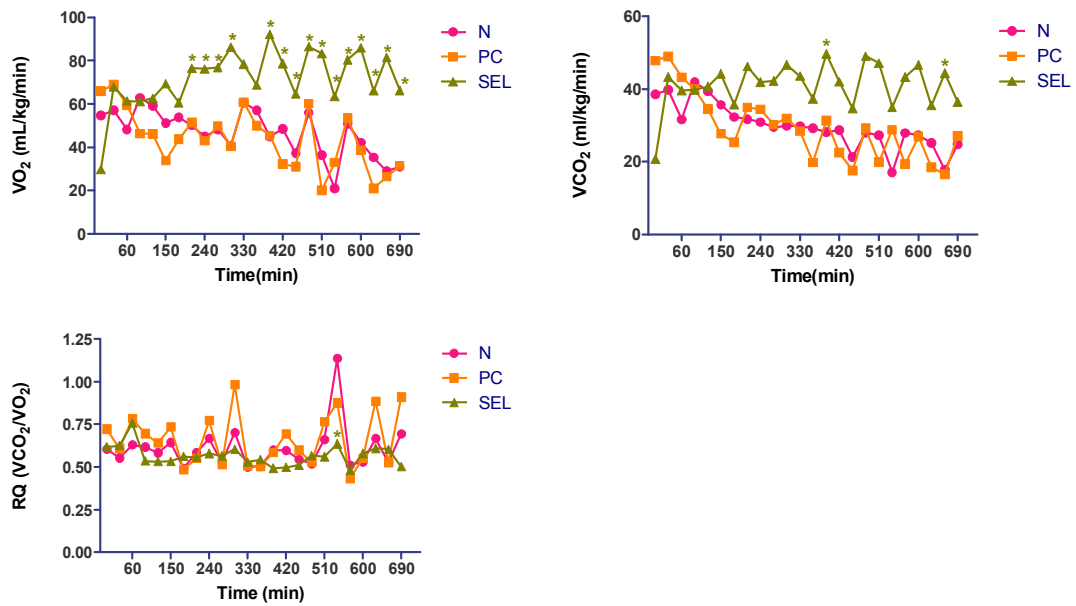


Fig. 3-27. The analysis of respiratory gas exchange in SEL group

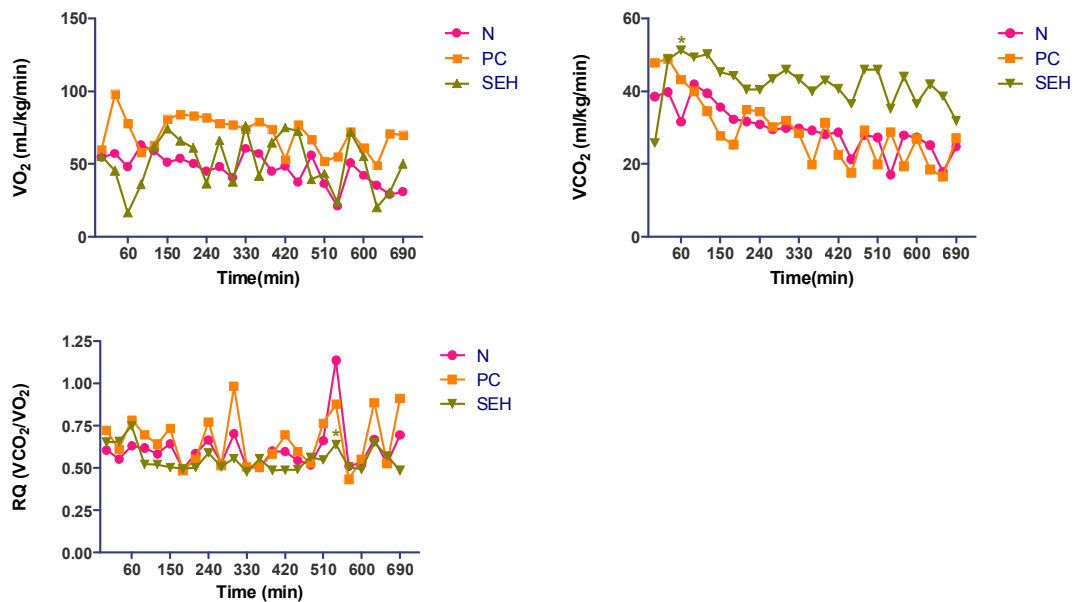


Fig. 3-28. The analysis of respiratory gas exchange in SEH group

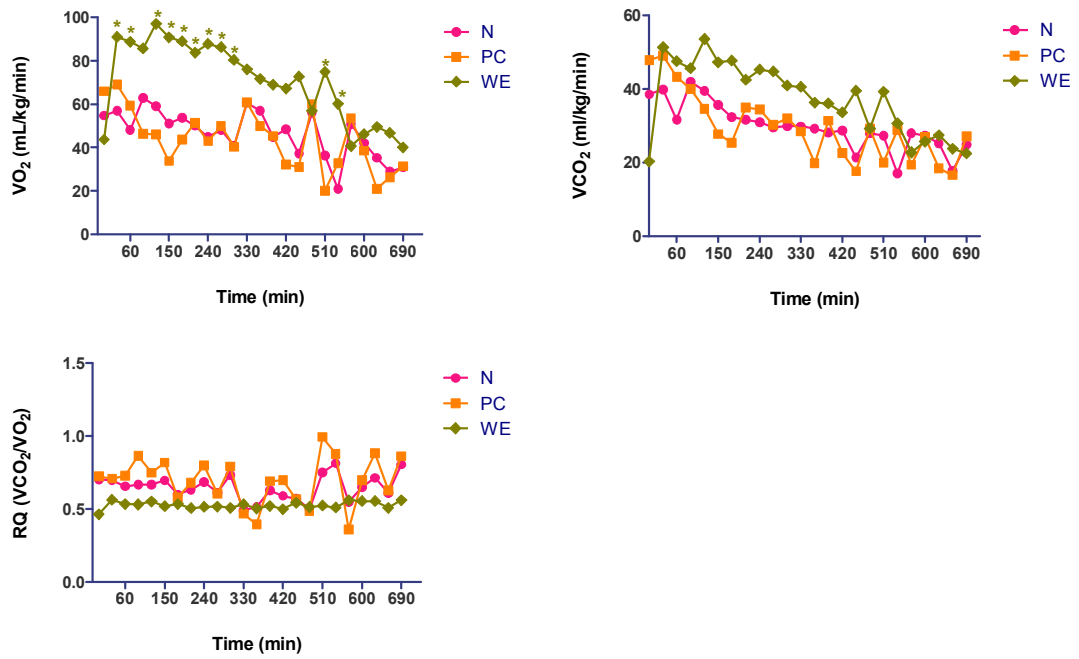


Fig. 3-29. The analysis of respiratory gas exchange in WE group

3. glabridin 고함유 감초 추출물의 혈중 지질 개선 효능

가. 연구 방법

(1) 실험동물 및 시료 투여

본 연구는 3주령의 Sprague-Dawley (SD) 수컷 쥐 16마리로 하였으며 한 케이지 (20.7×35×17 cm)에 1 마리씩 넣어 사육하였다. 사육실의 온도는 21℃로 유지하였으며, 명기와 암기를 각각 12시간으로 조절하여 암기는 오전 7:00~19:00시로 조절하였다. 1 주간의 환경 적응 기간을 거친 후, 무작위로 선정하여 비교집단 (Control group; CON, n=8), 감초집단 (Glycyrrhiza glabra; GU, n=8)으로 구분하였다.

모든 집단은 일반 사료를 제공하였으며 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 감초섭취 집단은 glabridin 고함유 감초 추출물 (50% glabridin 함유)을 corn oil에 녹여 2주간 100 mg/kg 경구 당투여하였으며 비교집단은 동일한 양의 corn oil을 투여하였다. 2 주간의 처치 후 12시간의 금식을 거쳐 체중 100 g당 6.5 mg의 sodium pentobarbital을 이용하여 마취한 후 적출한 근육은 액체 질소로 고정하고 복부동맥에서 채취한 혈액은 원심 분리하여 혈장만 분석 전 까지 -70℃에서 보관하였다. Soleus와 epitrochlearis 근육은 바로 적출하여 근육 내 포도당 운반률을 측정하였다.

(2) 혈중 지질 및 혈당 분석

TC (total cholesterol), TG (triglyceride)의 농도는 모두 아산제약 측정용 시약을 이용하여 효소분석법으로 분석하였다. 유리 지방산은 Noma 등 (1973)의 방법을 이용하여 측정하였다.

혈당은 혈액을 원심 분리하여 얻은 혈장만을 이용하여 자동혈당측정기 (YSI 1500 ATAT plus, USA)로 분석하였고, 인슐린은 Coat-A-Count Kit (Diagnostic Products Corporation, USA)를 이용하여 방사선 면역 측정법 (radioimmunoassay)으로 분석하였다.

(3) 근육 내 포도당 운반률 측정

근육 내 포도당 운반률은 비대사물질인 Methyl [³H]-D-glucose와 D-[I-¹⁴C]mannitol를 이용하여 측정하였다. 측정을 위해 좌측 Soleus와 epitrochlearis 근육을 적출하였고, 근육의 glucose를 제거하기 위해 18 mM mannitol과 0.1% BSA, + 2 mM pyruvate가 함유된 KHB에 10분간 1 회 세척하였다. 세척 후 16 mM mannitol과 0.1% BSA, + 4 mM glucose + (with/without) Insulin (1,000 μIU/mL)이 함유된 KHB에 30분간 배양시키고 다시 10분간 세척 후 4 mM [3-³H]MG(2.2 μCi/mL)와 16 mM

[¹⁴C]mannitol(0.2 μCi/mL)이 함유된 1.5 mL KHB에 30℃, 10분간 배양하였다. 배양 후 soleus 근육은 액체질소로 고정하여 즉시 무게를 잰다. 무게를 잰 근육은 1N NaOH에 넣어 50~60 ℃ water bath에서 60분간 shaking한 후, 1600rpm에서 4분간 원심 분리하였다. 상층액을 덜어 Optiphase Hisafe 2에 넣은 후 Liquid Scintillation counter에서 10분 동안 측정하였다.

(4) 통계 분석

각 측정항목에 대한 결과는 평균과 표준오차 (Mean ± SE)를 산출하였으며, 통계적 분석은 SPSS 17.0 통계 프로그램을 이용하였다. 2주간의 처치 후 비교집단과 감초집단의 차이를 알아보기 위해 독립표본 t 검정을 사용하였으며 경구당부하검사는 시간에 따른 집단 간 차이를 알아보기 위해 two-way ANOVA with repeated measures를 실시한 후 t-test와 contrast를 이용하여 집단과 시간 사이의 차이를 검증하였다. 모든 유의 수준은 0.05로 하였다.

나. 연구 결과

(1) 혈중 지질 및 혈당 변화

중성지방은 비교집단 (57.9±6.6 mg/dL)과 비교하여 감초집단 (48.5±4.6 mg/dL)에서 다소 감소하는 경향을 보였다. 또한 총콜레스테롤은 비교집단 (126.1±6.6 mg/dL)과 비교하여 감초집단 (109.5±6.5 mg/dL)에서 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3-30).

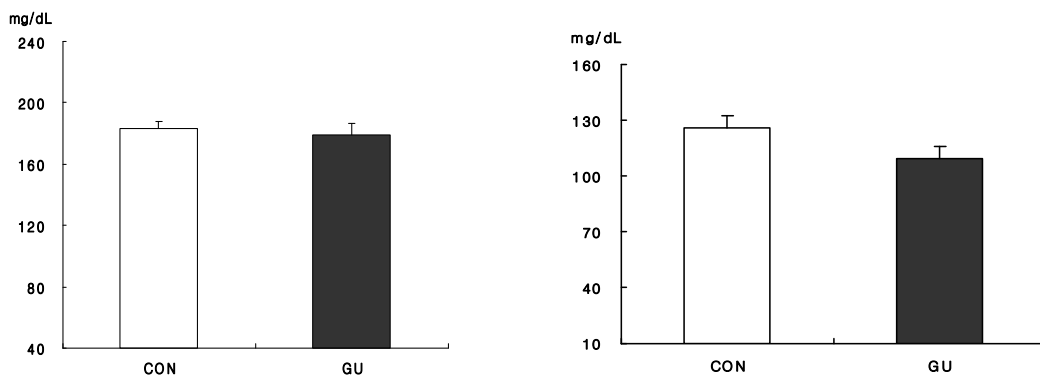


Fig. 3-30. Serum triglyceride (left) and total cholesterol (right) levels after 2 weeks of glabridin-rich licorice extract treatment

유리지방산은 비교집단 (0.19 ± 0.0 mM)과 비교하여 감초집단 (0.23 ± 0.0 mM)에서 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 3-31).

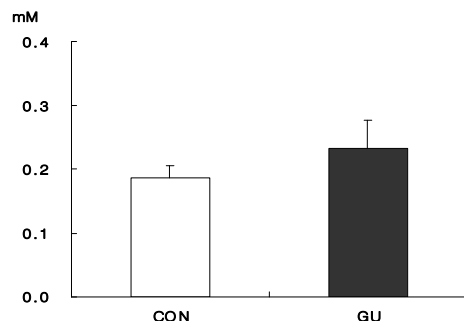


Fig. 3-31. Serum free fatty acid level after 2 weeks of glabridin-rich licorice extract treatment

혈당은 비교집단 (183.4 ± 4.7 mg/dL)과 비교하여 감초집단 (179.3 ± 7.3 mg/dL)에서 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의차가 없는 것으로 나타났다. 경구 당부하 검사 결과 감초 집단의 경우 혈당이 다소 낮을 것으로 나타났으나 두집단간 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Fig. 3-32).

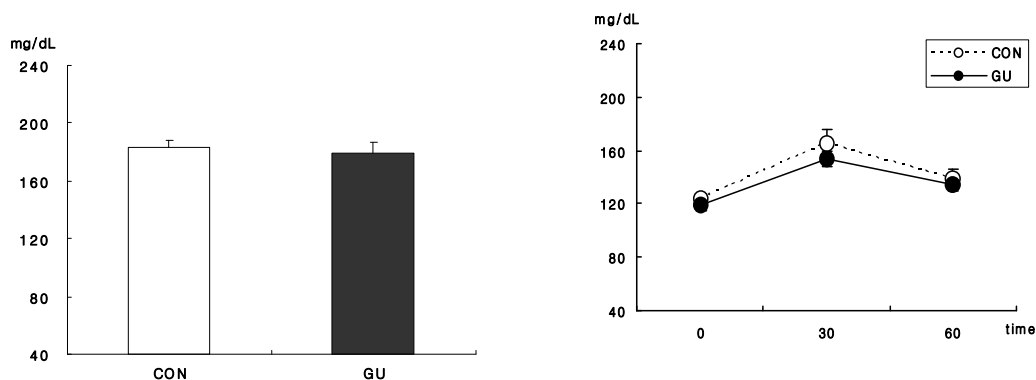


Fig. 3-32. Serum free fatty acid level after 2 weeks of glabridin-rich licorice extract treatment

(2) 근육 내 포도당 운반률

Soleus와 epitrochlearis 근육 내 포도당 운반률 측정한 결과 non-insulin 상태에서 감초 집단의 경우 포도당 운반률이 다소 증가하는 경향을 나타냈으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (Fig. 3-33).

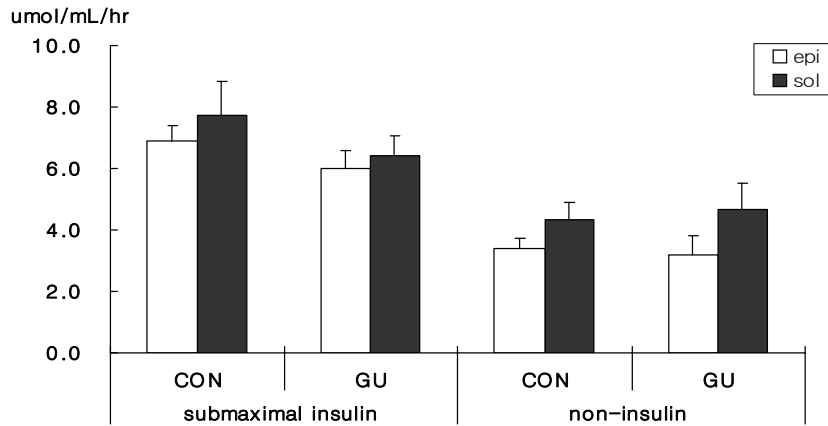


Fig. 3-33. Glucose transport efficacy in muscle tissues

4. 감초 섭취의 저항성 운동 후 반응에 대한 영향

가. 연구 방법

(1) 시험 대상

신체 건강한 D광역시 K대학교 남자 대학생을 20명을 대상으로 실시하였으며 실험 전 실험에 대한 내용을 충분히 설명한 후 실험에 자발적으로 참여한다는 내용의 동의서를 받았다. 실험처치는 무작위 선정하였고, 두 집단으로 나누어 실시하였다. 피험자의 신체적 특성은 다음과 같다.

Table 3-3. Characteristics of subjects

	나이 (yr)	키 (cm)	체중 (kg)
CON (n=10)	25.0 ± 0.6	174.3 ± 1.9	69.9 ± 2.5
GU (n=10)	24.0 ± 0.5	178.0 ± 1.5	70.1 ± 0.5

평균 ± 표준오차; 비교집단 (Control : CON); 감초집단 (Glycyrrhiza glabra: GU)

(2) 시험 방법

본 연구에 사용된 음료는 CON (control : CON) 과 감초 (Glycyrrhiza Uralensis: GU) 음료이다. 음료의 1 회 섭취량은 100 mL 로, 일회성 저항성 운동 7일 전부터 매일 2회 오전 09 : 00, 오후 17 : 00 경에 섭취하였다. 음료 섭취 시 온도는 4℃ 내외로 하였다. 감초음료 100 mL 내에는 건조 감초 4 g이 포함되도록 조제하여 섭취시켰다.

(3) 혈액채취

감초집단과 비교집단은 운동전 7일 동안 감초를 섭취한 후 12시간의 금식 후에 새벽 5시 30분에 상완정맥을 통하여 10 mL을 채혈하였다. 채취한 혈액의 응고를 방지하기 위하여 EDTA 항응고제 튜브에 담아 원심 분리하여 70℃ 냉동 보관하였으며 혈액 채취는 운동 7일전, 운동전, 운동직후, 운동 후 15분, 30분, 60분, 120분, 180분, 24시간 (1일) 48시간 (2일), 72시간 (3일)에 실시하였다.

(4) 운동 방법

1 RM은 직접방법으로 Earle (1999)의 방법을 이용하여 측정하였으며 모든 피험자들은 1 RM을 측정하기 위하여 48시간 동안 피로나 격렬한 운동을 하지 않은 상태에서 실시하였다.

운동종목은 스쿼트를 실시하였으며 운동프로토콜은 1 RM 80%로 8번씩, 5세트로 하였다. 모든 피험자들은 운동전 충분한 준비운동을 실시하였고 세트간의 휴식시간은 1분으로 하였다. 운동 처치 중에 실험실의 온도는 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도는 75%로 유지하였다.

(5) 혈액 분석

인슐린, 코티졸과 테스토스테론은 Coat-A-Count Kit (Diagnostic Products Corporation, USA)를 이용하여 방사선면역측정법 (radioimmunoassay)으로 분석하였다. 혈당은 자동 혈당분석기 (YSI 1500, Springfield, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈중 CK의 분석은 Elitech 社 의 Kit (France)를 사용하였으며, 형광분석기 (Thermo, England)를 이용하여 흡광도 340 nm에서 효소 활성도를 측정하였다.

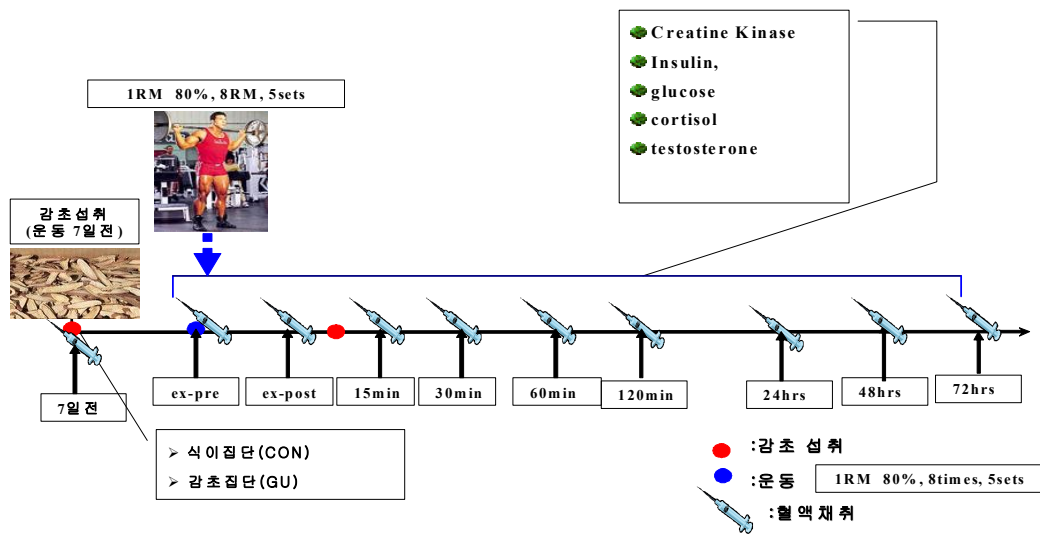


Fig. 3-34. Experimental schedules

(6) 통계 분석

모든 자료는 SPSS 17.0 통계 프로그램을 이용하여 분석하였고, 본 실험의 결과는 two-way ANOVA with repeated measures를 실시한 후 t-test와 contrast를 이용하여 처치와 시간 사이의 차이를 검증하였다. 모든 유의 수준은 0.05로 하였다.

나. 연구 결과

(1) 혈중 크레아틴 키나제

혈중 크레아틴 키나제는 두 처치 간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 감초집단에서는 7일전, 운동 전, 운동 후 1일과 비교하여 운동 후 2일, 3일에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 ($p < .05$).

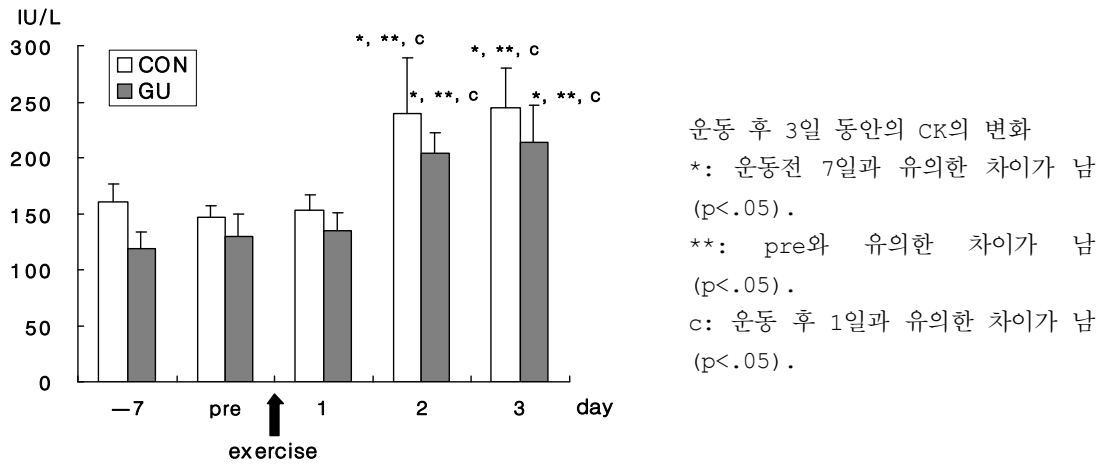


Fig. 3-35. The creatine kinase activity during 3-days exercise

(2) 혈당 및 인슐린 변화

Fig. 4-3에서 보는 바와 같이 혈중 혈당의 수준은 운동일 1일에서 두 처치 간 유의한 차이가 있는 것을 나타냈다 ($p < 0.05$).

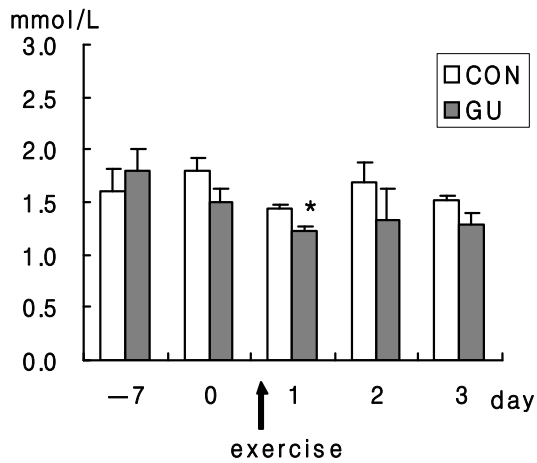


Fig. 3-36. The blood glucose level during 3-days exercise

혈중 인슐린의 수준은 운동일 1일에서 두 처치 간 유의한 차이가 있는 것을 나타냈다 ($p < 0.05$). 그러나 감초집단은 운동 후 30분과 비교하여 운동 후 60, 120분에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$).

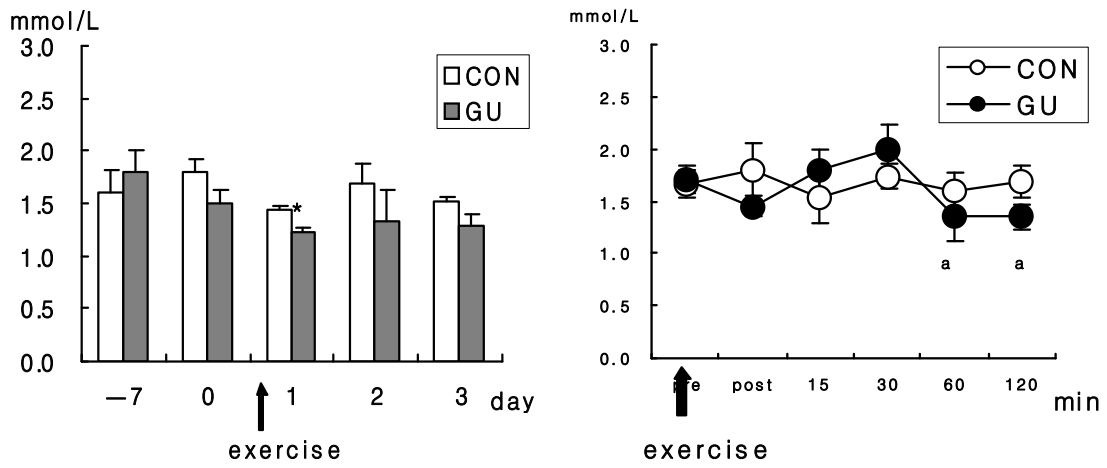


Fig. 3-37. The serum insulin levels

(3) 혈중 호르몬 변화

혈중 코티솔의 농도는 두 처치 간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 3-38).

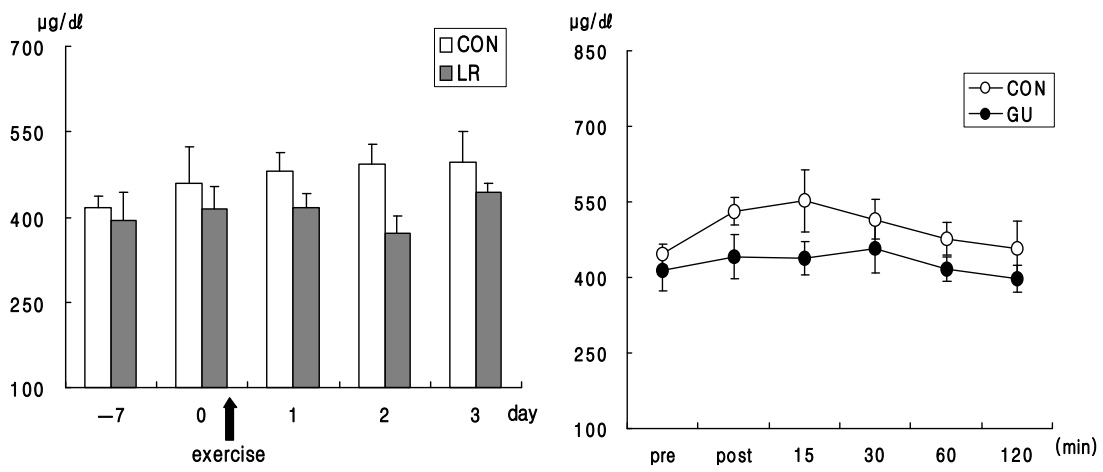


Fig. 3-38. The serum cortisol levels

혈중 테스토스테론의 농도 두 처치 간 유의한 차이가 나타나지 않았다.

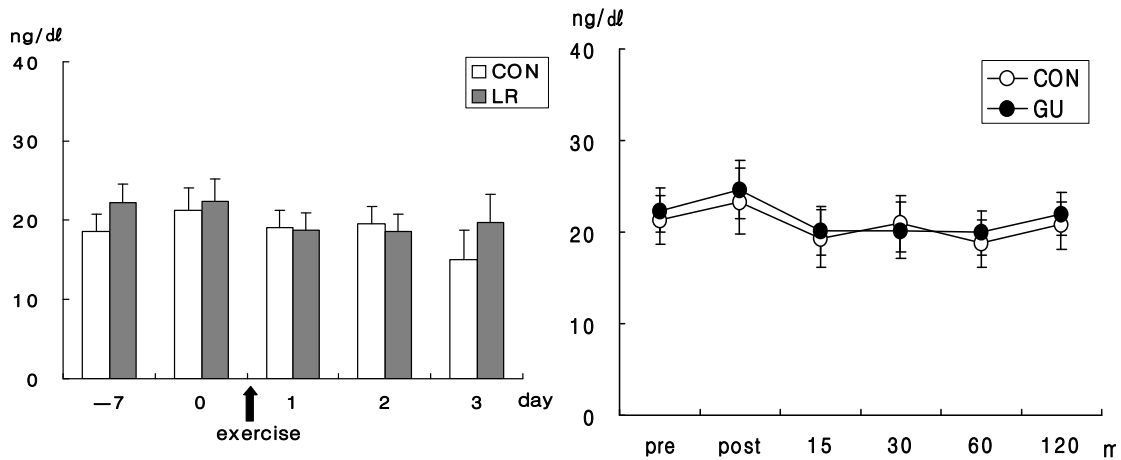


Fig. 3-39. The serum testosterone levels

5. 감초의 작용 기전 연구

가. 연구방법

(1) SDH (succinate dehydrogenase) 염색

SDH (succinate dehydrogenase)는 succinic acid를 fumaric acid로의 산화를 촉진시키는 효소로 활성 측정을 위해서는 적출 후 신선한 상태에서 동결시킨 근육 조직을 tetrazolium 화합물과 함께 succinic substrate와 반응을 시켜야 한다. Tetrazolium은 불용성 물질로서 formazan으로 환원되면 색깔을 띠게 된다. 효소 활성이 있는 경우는 기질로부터 수소 이온을 방출시켜 nitro blue tetrazolium (NBT)에 결합하게 하며 수소 이온의 결합에 의해 tetrazolium이 보라색의 formazan으로 변하며 그 변한 정도에 따라 효소의 활성을 간접적으로 측정하게 된다.

0.2 M phosphate buffer에 sodium succinate와 NBT를 buffer mL 당 각각 27 mg, 1 mg 씩 넣어 배양용 배지를 만들고 조직 슬라이드를 담귀 37°C에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 3번 씻어낸 후 아세톤용액으로 unbound NBT를 제거해 낸 후 다시 증류수로 세척한 후 현미경으로 관찰하였다.

(6) qRT-PCR 활용 근육의 유전자 발현 분석

Total RNA의 추출을 위해서 RNeasy Plus mini kit (Qiagen, USA)를 사용하였다. 추출된 RNA는 분광광도계 (JASCO, V-530)을 이용하여 260 nm와 280 nm에서 측정하여 260 nm/280 nm의 비가 1.8 이상인 total RNA 샘플만을 실험에 사용하였다. 추출된

RNA는 Maxime RT Premix Kit(Intron Bio)를 이용하여 cDNA를 합성하고자 하였다. 이를 위해 total RNA와 oligo dT primer를 혼합하여 45°C에서 60min과 95°C에서 5min 동안 반응시켰다. 얻어진 cDNA를 Table 3-4와 같은 primer set를 활용하여 Light Cycler 480 (Roche, Germany)로 SYBR Green I Master (Toyobo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

Table 3-4. Primers used for RT-PCR

Primers	Sequences
PGC1-α, forward	5'-TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT-3'
PGC1-α, reverse	5'-CCACTTCAATCCACCCAGAAAG-3'
Cytochrome C, forward	5'-GGA GGC AAG CAT AAG ACT GG-3'
Cytochrome C, reverse	5'-TCC ATC AGG GTA TCC TCT CC-3'
Cytochrome C oxidase subunit 3, forward	5'-GCCCCTAGAGAAGCTACGAGA-3'
Cytochrome C oxidase subunit 3, reverse	5'-CCTCTTGCAGCGAAGGAAGT-3'
ERRα, forward	5'-GGA GGA CGG CAG AAG TAC AAA-3'
ERRα, reverse	5'-GCG ACA CCA GAG CGT TCA C-3'
Tfam, forward	5'-GTCGCATCCCCTCGTCTATC-3'
Tfam, reverse	5'-GCTGGAAAAACACTTCGGAATAC-3'
NRF-1, forward	5'-AGCACGGAGTGACCCAAAC-3'
NRF-1, reverse	5'-TGTACGTGGCTACATGGACCT-3'
Myoglobin, forward	5'-CATGGTTGCACCGTGCTCACAG-3'
Myoglobin, reverse	5'-GAGCCCATGGCTCAGCCCTG-3'
MyHC2b, forward	5'-CAC CTG GAG CGG ATG AAG AAC-3'
MyHC2b, reverse	5'-GTC CTG CAG CCT CAG CAC GTT-3'
MyHC1, forward	5'-CCAAGGGCCTGAATGAGGAG-3'
MyHC1, reverse	5'-GCAAAGGCTCCAGGTCTGAG-3'

(3) Western blot

골격근 조직의 일부를 Protein extraction solution (PRO-PREPTM)에 균질화하여 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액에서 얻어진 단백질은 12% SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동을 실시하였다. 이후 transfer된 membrane을 5% skim milk로 2시간 동안 blocking을 한 후 primary antibody (PPAR β/δ , AMPK, phospho-AMPK)와 secondary antibody (mouse and rabbit Ab)를 부착시킨 후, ECL용액을 이용하여 현상하였다.

나. 연구 결과

(1) 골격근의 SDH 활성

운동은 미토콘드리아 생성 (mitochondrial biogenesis) 및 활성을 증가시키며 골격근의 인슐린 민감성을 증가시킨다. 이를 통해 당뇨를 예방하고 치료하는데 있어서 매우 중요한 생활습관으로 여겨진다.

감초 초임계 추출물의 운동 수행능 증진과 골격근의 미토콘드리아 간의 관계를 알아보기 위해 hindlimbs muscle의 SDH (succinate dehydrogenase) 염색을 수행하였다. SDH stain은 보라색의 formazan 침전이 미토콘드리아의 sarcoplasmic network 부분에 축적되어 SDH stain의 염색 정도로 미토콘드리아의 양을 알 수 있다.

SDH 염색 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과, 고지방 식이 급여 시 골격근 내의 미토콘드리아 양이 뚜렷이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며 감초 초임계 추출물의 급여 시 미토콘드리아 양이 뚜렷이 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3-40).

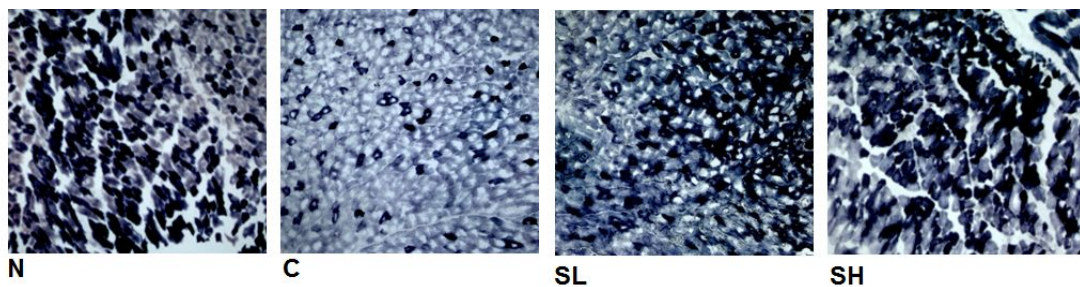


Fig. 3-40. SDH stains of skeletal muscle tissues

(2) 미토콘드리아 생합성

감초 추출물 급여가 골격근의 미토콘드리아 content에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 미토콘드리아 특이 유전자의 발현을 측정하였다.

고지방 식이 급여는 골격근의 미토콘드리아 특이 유전자의 발현을 유의적으로 감소시켰다. 그러나 초임계 추출물 급여 결과 고지방 식이 급여에 의한 미토콘드리아 특이 유전자 발현 감소가 매우 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 3-41).

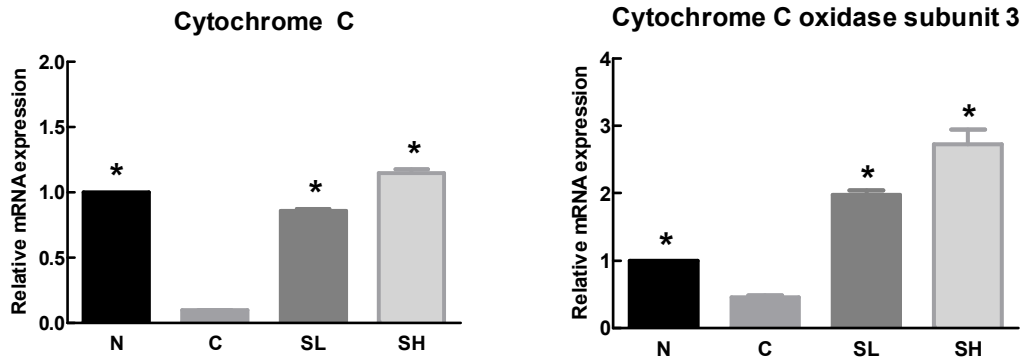


Fig. 3-41. The mRNA expressions of mitochondria-specific genes

미토콘드리아 전사 조절자인 PGC-1 α (peroxisome-proliferators activated receptor gamma coactivator-1 alpha)는 대사 흐름 (metabolic flux)을 조절하는데 매우 중요한 역할을 하고 미토콘드리아 생성 주요 조절 인자이다. PGC-1 α 는 심장이나 골격근과 같이 산화력이 높은 조직에 풍부하다. 즉 운동과 같이 갑자기 많은 에너지가 필요할 때 PGC-1 α 가 유도되어 미토콘드리아 생성을 증가시키게 된다 (Rodgers 등, 2005). PGC-1 α 외에 미토콘드리아 생성을 증가시키는 다른 전사인자로 Tfam (mitochondrial transcription factor A), ERR α (estrogen-related receptors alpha), NRF-1 (nuclear respiratory factor 1) 등이 있다. PGC-1 α 와 ERR α 는 미토콘드리아 생성에 관여하고 Nrf1은 미토콘드리아의 전사를 조절하며 Tfam은 미토콘드리아 DNA 증폭 및 translation을 조절한다.

고지방 식이의 급여는 근육 내 PGC-1 α 의 발현을 감소시켰다. 감초 초임계 추출물은 PGC-1 α 수치를 정상적으로 회복시켰다. 감초 초임계 추출물 급여 시 고지방 식이 급여 시 감소되었던 ERR α 와 Tfam이 정상 수준까지 회복되었다. NRF-1의 경우, 그룹간의 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 3-42).

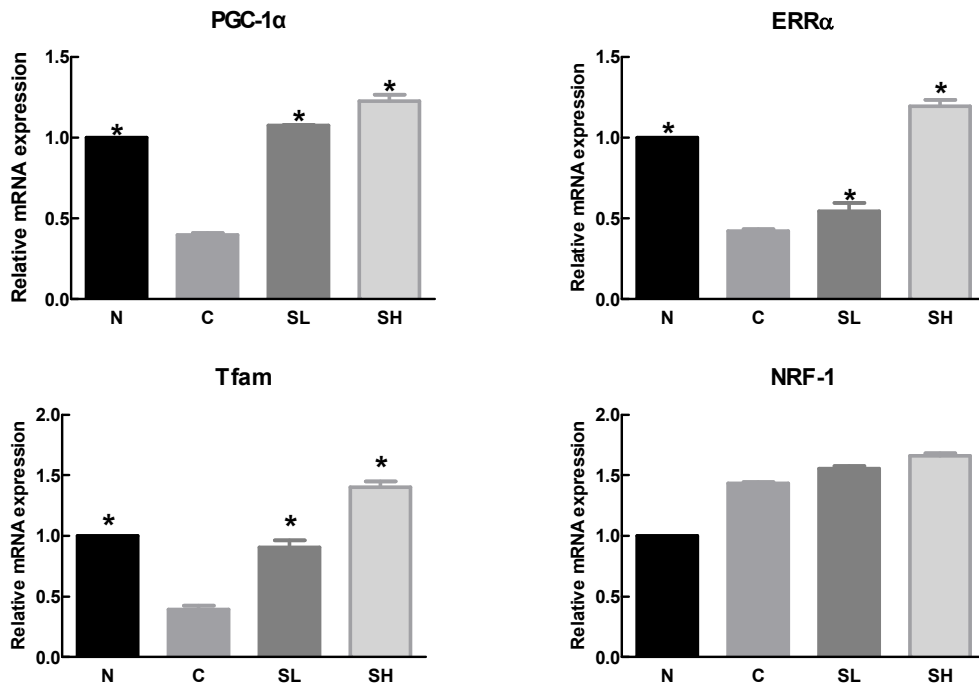


Fig. 3-42. The expressions of mitochondrial biogenesis related transcription factors

PPAR β/δ (Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ)는 근육 대사 조절의 필수적인 전사 인자로서 PGC-1 α 를 증가시켜 미토콘드리아 생성을 증가시키고, catalase 및 superoxide dismutase를 증가시켜 항산화 작용 유도하며, CPT1b (carnitine palmitoyltransferase Ib), CPTII (carnitine palmitoyltransferase II)를 증가시켜 지방산 대사를 증가시킬 뿐 아니라, GLUT4 (glucose transporter 4) 증가 통해 당대사와도 관련이 있다.

본 연구에서 고지방 식이 급여 시 근육 내 PPAR β/δ 발현이 감소되었으나 감초 초임계 추출물 급여에 의해서 효과적으로 회복되었음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3-43).

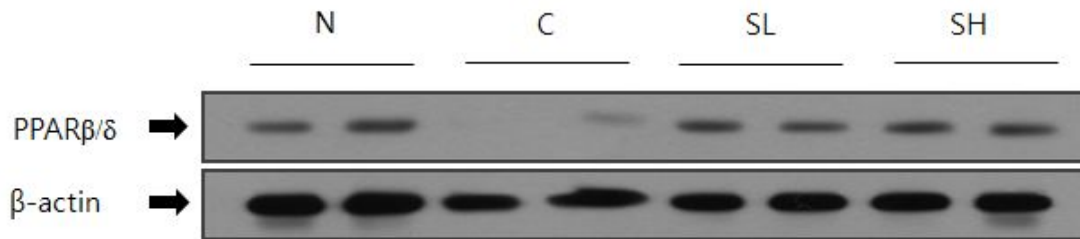


Fig. 3-43. The western blot analysis of PPAR β/δ

AMPK (AMP-dependent protein kinase)는 PGC-1 α 의 Thr177 및 Ser536을 인산화시켜 PGC-1 α promoter의 유도와 이를 통한 미토콘드리아 생성 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Janger 외, 2007).

고지방 식이 급여 시 AMPK의 인산화가 억제되는 경향을 보였으나, 감초 추출물 고농도 급여 시 AMPK 인산화가 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3-44). 즉 감초 초임계추출물은 골격근의 AMPK 활성을 증가시킴으로써 PGC-1 α 의 인산화를 유도하고 이를 통해 미토콘드리아 생성을 증가시켜 운동 시 필요한 에너지를 공급하여 운동 수행능을 증가시키는 것으로 사료된다.

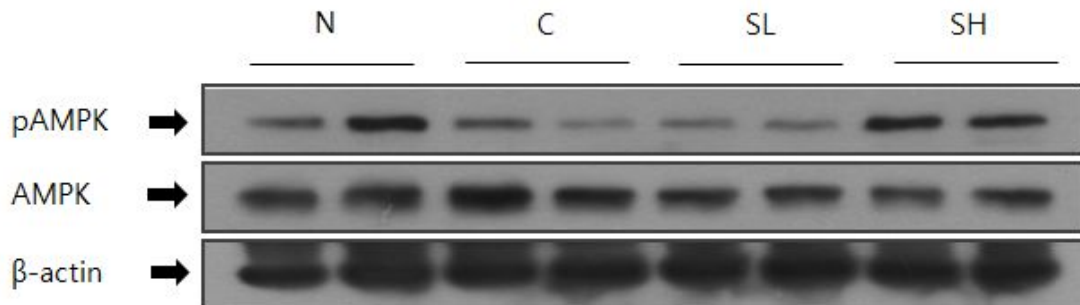


Fig. 3-44. The western blot analysis of phosphorylated AMPK in skeletal muscle

(3) 골격근 근섬유 타입 변화

감초 초임계 추출물이 골격근 타입에 미치는 영향을 측정하기 위해, gastrocnemius muscle의 근육 타입별 마커 유전자의 발현을 측정하였다. 근육은 운동에 의해 glycolytic type II 근육에서 oxidative type I 근육으로 전환될 수 있다.

Type I 근육은 myoglobin이 많이 함유된 red muscle fiber로서 느린 수축 속도와 낮은

최대 장력 및 높은 지구성을 지니고 있어 유산소성 운동에 적합하며 ATPase 와 해당 효소 수치가 낮으며 특이 마커는 myosin heavy chain 1 (MyHC1)이다.

반면, Type II 근육은 myoglobin이 적어서 희게 보이며 미토콘드리아의 수가 적다. 글리코젠을 많이 함유하고 있고 폭발적인 힘을 발휘하거나 근력이 필요한 형태의 활동에 사용되며 낮은 강도의 활동에서는 사용되지 않는다. 특이 마커는 troponin (Tropo_{slow}), myosin heavy chain 2b (MyHC2b) 등이다.

Myoglobin의 경우 고지방식이 급여에 의해 유의적으로 감소하였으나, 감초 초임계 추출물에 의해 증가한 것으로 보아 감초 초임계 추출물은 고지방 식이에 의해 감소된 Type II 근육을 효과적으로 회복시키는 것으로 나타났다. 이 외에도 고지방 식이 급여군에서는 Type I 근육 특이 마커인 MyHC1의 발현이 감소하고 Type II 근육 특이 마커인 MyHC2b 및 Tropo_{slow}의 발현이 증가되었으나, 감초 초임계 추출물 급여 시 이러한 변화가 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 3-45).

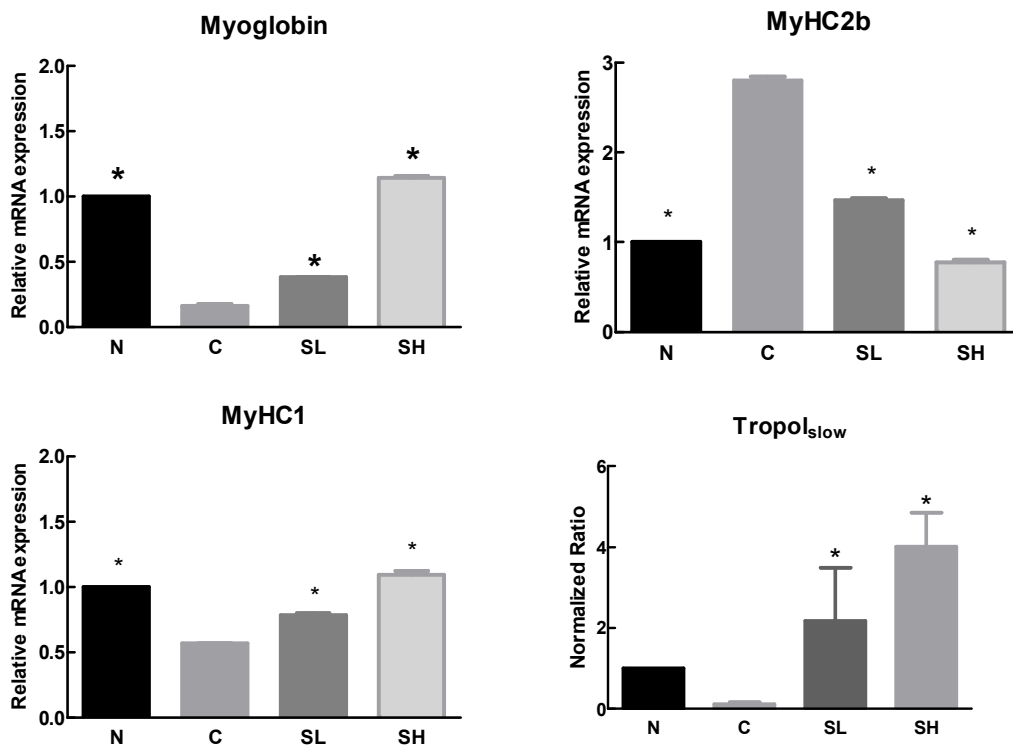


Fig. 3-45. The expressions of muscle type related genes

즉 감초 초임계 추출물은 고지방 식이에 의한 골격근내의 미토콘드리아 및 근섬유 타입의 변화를 효과적으로 억제하는 것으로 보이며, 이러한 기전에 의해서 운동 수행능 증진 효과를 유도하는 것으로 사료된다.

(4) UCP3 발현 변화

UCP (uncoupling protein)는 설치류의 thermogenesis에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 잘 알려져 있고 에너지 소비 (energy expenditure)나 비만과 관련이 있으며 fatty acid 대사에 있어서 중요한 역할을 한다 (Langin 외, 1999). 또한 UCP는 미토콘드리아의 proton leak 산화적 인산화를 탈공역 (uncoupling)시켜 에너지 산화를 통한 ATP 생성을 억제하고 에너지를 열로 전환되게 한다.

UCP3는 골격근 특이 UCP로서 미토콘드리아 innermembrane에서 cytoplasm으로 FA transport를 증가시키고 미토콘드리아를 보호하고 활성 산소종 생성을 억제시켜 산화적 스트레스 억제 효능이 있다. UCP3 transgenic 마우스의 경우 고지방 식이를 급여하게 되면 체중증가가 억제되고 근육 내 지방 (IMCL, intramyocellular lipid)의 축적이 감소되는 것으로 보고되었다 (Choi 외, 2007). 반대로 UCP3 knockout 마우스의 경우는 고지방 식이 급여 시 IMCL이 증가되고, 혈액 내 FA 수치가 증가하고 체중 증가가 상승되는 경향을 보였다 (Costford 외, 2006).

본 실험에서도 고지방 식이 급여 시 골격근내의 UCP3가 정상식이 급여군에 비해 유의적으로 감소했으나, 감초 초임계 추출물 급여 시 고농도 급여군 (SH)에서 UCP-3의 발현이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-46).

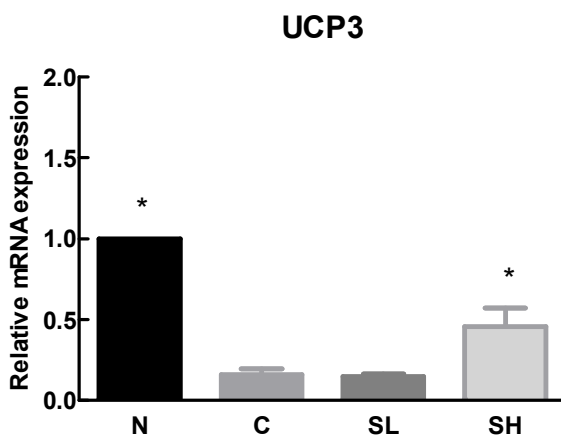


Fig. 3-46. The UCP3 mRNA expression

제 4절. 감초 활용 건강기능식품 제품화

1. 효능 증진 목적의 최적 formula 개발

가. 상승효과를 위한 부재료 검토

(1) Uridine & Inosine

감초 활용 기능성 원료의 효능을 증대시키기 위하여 적절한 부재료를 선정하고자 하였다. 이를 위한 후보 부재료로서 uridine 과 inosine의 가능성을 시험해 보고자 대조군, 감초 추출물 단독투여, 감초 추출물과 Uridine 병용투여, 감초 추출물, uridine, Inosine 병용투여 하여 동물 시험을 3주 동안 진행하였다.

21일 후 체중 증가율을 보면 대조군은 1.8% 증가, 감초추출물 투여군은 4.4% 체중 감소, 감초 추출물과 uridine 병용투여군은 6.2% 체중감소, 감초 추출물과 uridine, Inosine 병용 투여군은 10.7% 체중감소효과를 보였다. Fig. 4-1에서 나타났듯이 감초 추출물과 uridine 병용 투여군은 대조군 및 감초 추출물 단독 투여군에 비해 체중 감소 효과를 상승시켰다. 감초추출물 uridine, inosine 병용 투여군은 대조군 및 감초 추출물 단독 투여군에 비해 체중 감소 효과를 현저히 상승시켰다. 즉 uridine과 inosine은 감초 추출물의 체중 감소 효과를 상승 시키는 부재료 사용 시 상승 효과를 유도할 수 있음을 확인하였다.

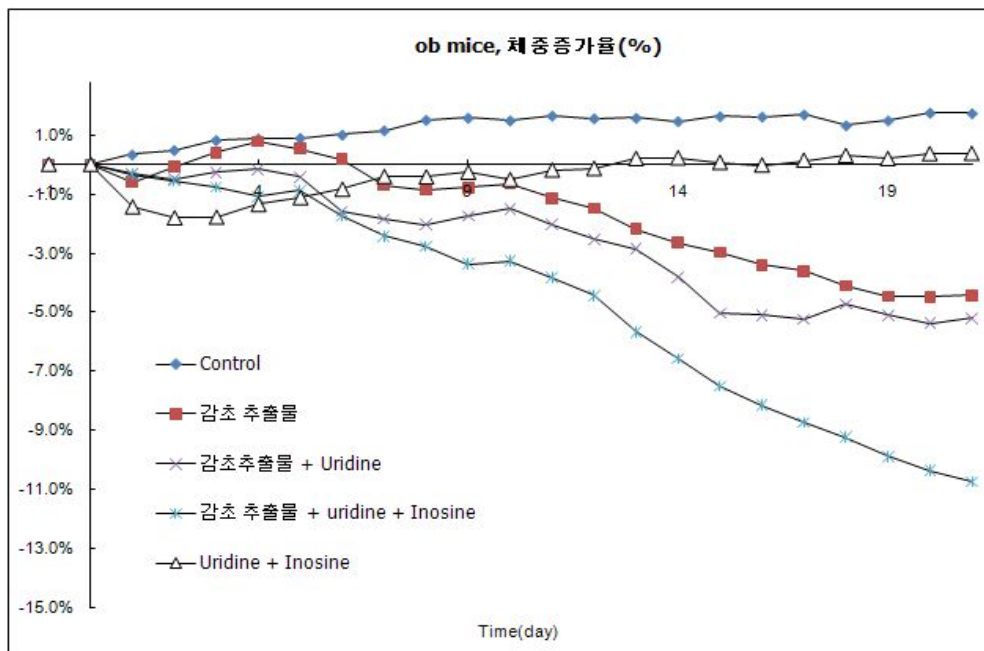


Fig. 4-1. Body weight change

(2) MB11316

초임계를 이용한 감초 추출물의 체내 섭취 시 생체 이용성을 증가시키고자 과제 참여 기업인 (주) 머젠스가 식품 소재 또는 약물의 생체 내 전달 활성 증진용으로 개발한 부재료인 MB11316과의 병용 투여를 통하여 ob/ob 마우스에 있어서 체중 증가에 미치는 영향을 측정하였다.

감초 초임계 추출물 (glabridin 함량 4.3%)과 MB11316의 병용 투여 시 감초 초임계 추출물 단독 투여와 차이가 없었으나 MB11316과 purine을 동시에 부재료로 사용 시 체중 증가를 억제 활성이 증가되었다 (Fig. 4-2).

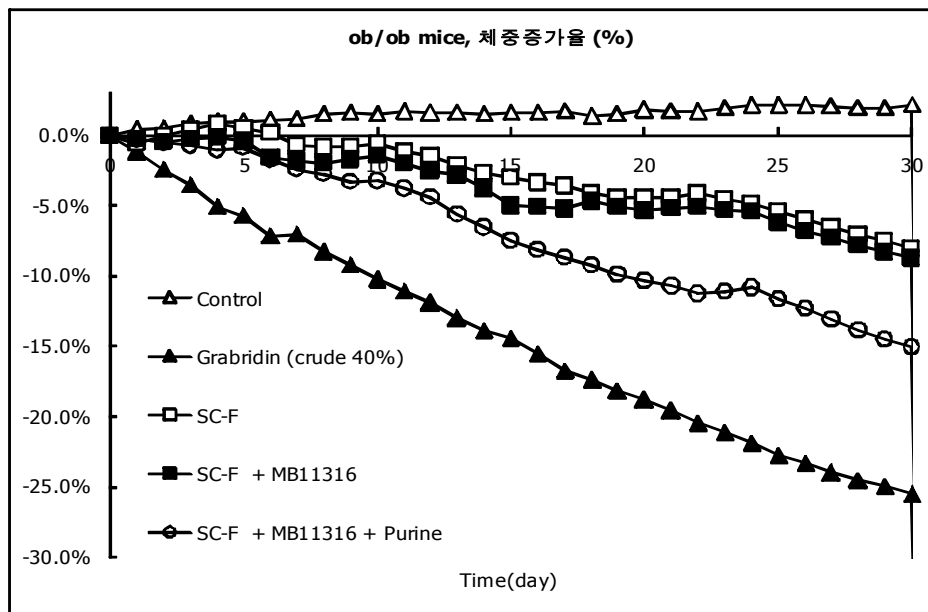


Fig. 4-2. Effect of supplement compound on anti-obesity activity of licorice

나. 용해도 증진을 위한 부형제 검토

(1) 부형제 종류별 용해도 비교

(가) 시험 방법

부형제를 2 mL씩 분주한 후 10 mg 감초 추출물을 각 vial에 첨가하고 20°C에서 300 rpm으로 magnetic bar를 이용하여 섞어주었다. 첨가한 약물이 다 녹으면 다시 10 mg을 첨가하여 녹이고 이 과정을 반복하여 각 오일에 감초 초임계 추출물이 얼마나 녹는지 관찰하였다.

(나) 결과

Table 4-1의 굵은 글씨로 표시한 부형제들은 식품소재로 사용가능하도록 허가된 제품이다. 이를 근거로 하여 Capryol 90과 Lauroglycol 90을 기제로 하고 물과의 분산성을 돕기 위해 Pretex T20을 첨가하는 것을 초기 처방으로 결정 하였다.

Table 4-1. The efficacy of various excipients on licoric extract solubility

용매	용해도
Acetylated monoglyceride (Myvacet 9-45)	<95 mg/mL
Mineral oil	<5 mg/mL
Oleic acid	<5 mg/mL
Olive oil	<15 mg/mL
Propylene glycol monocaprylate (Capryol 90)	>320 mg/mL
Caprylocaproyl macrogolglycerides (Labrasol)	>510 mg/mL
Diethyleneglycol monoethyl ether (Transcutol)	>815 mg/mL
Polyoxyethylene lauryl ether (Brij 30)	>355 mg/mL
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Pretex T20)	>245 mg/mL
Propylene glycol monolaurate (Lauroglycol 90)	<170 mg/mL

(2) 분산성 최적화

(가) 시험 방법

용해도 실험 결과 용해도가 뛰어났던 6가지 중 식품첨가물로 사용될 수 있는 4가지를 가지고 분산성이 좋은 조성을 검색하였다.

Capryol 90은 HLB (hydrophilic lipophilic balance) 값이 6, Lauroglycol 90은 HLB 값이 5인 Lipophilic한 surfactant이며, 이 둘을 섞어 만든 조성을 물에 첨가했을 때는 물과 거의 섞이지 않고 분리되는 현상이 관찰되었다.

Brij 30은 HLB값이 9.7로 Lipophilic surfactant로 분류되지만, Capryol 90이나 Lauroglycol 90에 비해서는 친수성이 있다. Capryol 90과 Brij 30만을 섞어 만든 조성은 Carpyol 90과

Lauroglycol 90을 섞은 조성에 비해서 물에 잘 분산되므로 Lauroglycol 90 대신에 Brij 30을 사용하기로 결정하였다.

Tween 80의 경우 p-glycoprotein inhibitor로서 임계미셀농도 (CMC; critical micelle concentration) 농도 이하의 아주 소량의 농도로 사용하였으며, Tween 80의 함량을 최소화하기 위하여 Co-solubilizing agent로 널리 사용되는 PEG 400을 첨가하여 Capryol 90의 가용화를 돕도록 하였다.

분산성 시험을 위해 15 mL vial에 Capryol 90, Brij 30, Tween 80, PEG 400의 비율을 달리하여 혼합시킨 mixture를 1 mL씩 넣고, 감초 추출물을 100 mg 첨가하여 실온에서 magnetic bar를 사용하여 300rpm으로 stirring하여 녹인 후, 미리 37 °C로 유지시켜 놓은 정제수 100 mL이 담긴 비커에 formulation을 1 mL씩 떨어뜨리고 magnetic bar로 100rpm으로 stirring하여 형성되는 액체의 분산성을 관찰하였다.

(나) 시험 결과

분산성 최적화를 위한 조성 조건을 확립하기 위하여 분산성 시험을 수행한 결과, PEG 400이 Capryol 90의 solubilizing을 돕기 때문에 water phase내로 조금 더 쉽게 분산 될 수 있도록 해 줄 수 있는 것을 확인하였다. 그러나 Capryol 90의 양이 너무 많아지면 방치 시 더 쉽게 oil 입자들이 water phase와 나뉘질 수 있기 때문에 Capryol 90을 50 % 정도 함유하도록 하는 것이 최선으로 사료된다. 또한 Brij 30은 독성이 있을 수 있다고 사료되어 1 % 정도 함유하도록 조정하였다.

위의 사항을 다 고려하여, 최적의 조성은 4번 formulation로 결정하였다 (Table 4-2).

Table 4-2. Dispersion stability for licorice extract

No.	Capryol 90 (%)	Tween 80 (%)	Brij 30 (%)	PEG 400 (%)	분산성
1	80	3	1	16	오일입자가 water phase ^o 퍼져 있다가 방치 시 약간 나누어지나, weak shaking에 의 ^h 재분산 가능
2	70	3	1	26	
3	60	3	1	36	
4	50	3	1	46	
5	40	3	1	56	
6	30	3	1	66	
7	20	3	1	76	

다. 원료 안정성 검토

glabridin 소재의 안정성을 검토를 위해 glabridin 함량이 50 %인 crude glabridin을 실온에서 최장 1년까지 저장 시 글라브리딘의 농도 변화를 측정한 결과는 Table 4-3과 같다. 실온에서 1년 동안 저장해도 glabridin의 함량 저하는 관찰되지 않았다.

Table 4-3. The content of crude glabridin during storage period

	0개월	3개월	6개월	9개월	12개월
글라브리딘 함량	50.0%	49.8%	50.1%	49.9%	49.4%

2. 감초 활용 건강기능식품 시제품

가. 최종 formula

시제품 생산용 연질 캡슐 피막 190 mg의 구성 성분은 Table 4-4와 같다.

Table 4-4. The chemical composition for soft capsule

	성분명	함량	비고
1	젤라틴 (165B)	68.740%	
2	글리세린	22.913%	
3	D-소르비톨액	8.183%	
4	에틸바닐린	0.164%	
합계		100.000%	

(1) 연질 캡셀

일차적으로 설정된 조합에서 Brij 30은 독성 문제 (섭취 시 ocular toxicity 유발 가능) 때문에 배제하였고, PEG 400은 식품에 사용할 수 없기 때문에 식품에 사용가능한 PG로 대체하였다. 최종적으로 감초 추출물 연질 캡셀 내용물 550 mg의 구성 성분은 다음 표와 같이 결정하였다.

Table 4-5. The formula for soft capsule

	성분명	함량	무게	비고
1	감초 추출물	9.091 %	50.000 mg	
2	프로필렌글리콜-지방산-에스테르	86.364 %	475.000 mg	
3	Tween 80	2.727 %	15.000 mg	
4	PG	1.181 %	10.000 mg	
합계		100.000 %	550.000 mg	



Fig. 4-3. Licorice soft capsules

(2) 경질 캡셀

Table 4-6. The formula for hard capsule

NO	원료명	배합비율
1	감초 추출물	24.0000 %
2	효모추출물 (eatless)	19.2000 %
3	효모추출물 (prosol)	9.6000 %
4	Resveratrol	4.8000 %
5	Amino acid mixture	4.8000 %
6	L-carnitine	14.4000 %
7	Creatine	14.4000 %
8	Tartaric acid	2.8800 %
9	Phytic acid	1.9200 %
10	SLS	4.0000 %
합 계		100.0000 %

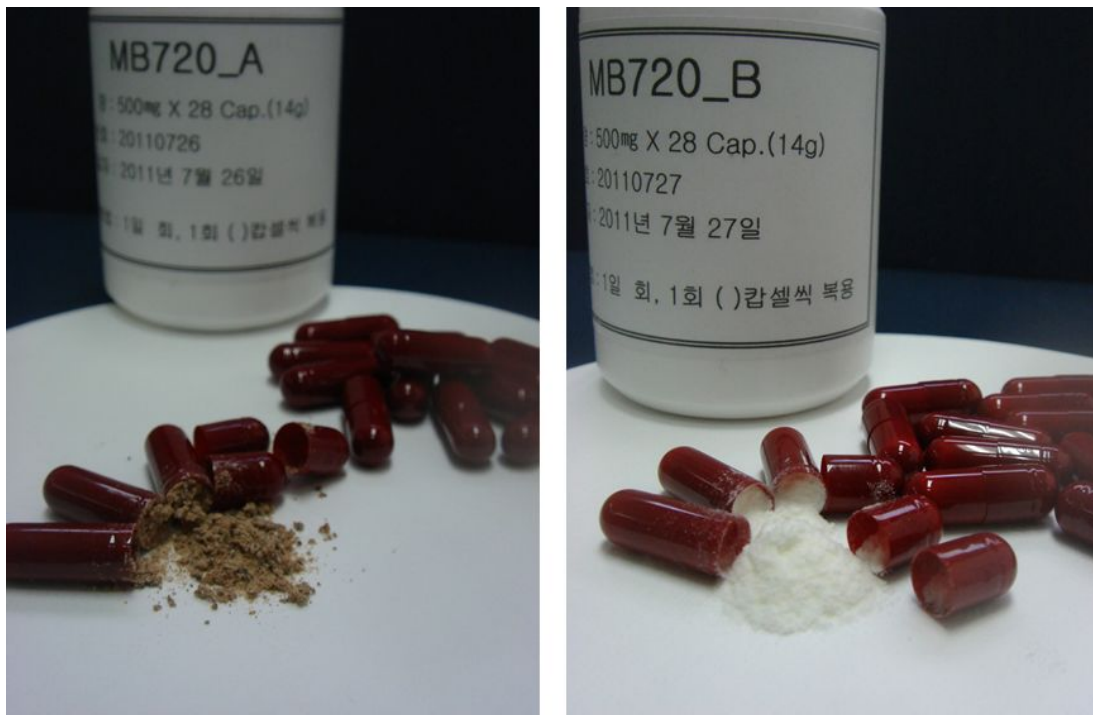


Fig. 4-4. Licorice hard capsules

나. 원료 기준 규격

(1) 원료명 (감초추출물, Licorice(Glycyrrhiza) Extract)

이 원료는 감초 *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et Herder, *Glycyrrhiza uralensis* Fisher 또는 그 밖의 근연식물 (*Leguminosae*)의 뿌리를 주성으로 추출하여 얻은 추출물을 감압 농축하여 가용물질만 취한다. 5%주정이 되도록 정제수를 넣어 용해 후 용해되지 않는 물질을 건조하여 가루로 한 것이다. 이 원료는 정량할 때 글라브리딘 ($C_{20}H_{20}O_4$: 324.38) 4.0% 이상 및 글리시리진산 ($C_{42}H_{62}O_{16}$: 822.93) 0.6% 이하를 함유한다.

(2) 색상

이 원료는 황갈색 또는 적갈색의 가루이다.

(3) 확인시험

정량법의 검액에서 얻은 main peak의 유지시간은 표준액에서 얻은 main peak의 유지시간과 같다.

(4) 중금속

납 (mg/kg) : 5 이하

카드뮴 (mg/kg) : 0.2 이하

총수은 (mg/kg) : 0.3 이하

총비소 (mg/kg) : 2.4 이하

(5) 대장균균 : 음성

(6) 수분

5.0% 이하 (식품공전 제7. 일반시험법 중 1. 일반성분시험법의 1) 수분에 따라 시험한다.)

(7) 정 량 법

(가) 글라브리딘

이 원료 약 250 mg을 정밀하게 달아 에탄올을 넣어 녹여 50 mL로 하고 이 액 10 mL를 정확하게 취하여 에탄올을 넣어 정확하게 50 mL로 한 액을 검액으로 한다. 따로 글라브리딘 표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 에탄올을 넣어 녹여 50 mL로

하고 이 액 10 mL을 정확하게 취하여 에탄올을 넣어 50 mL로 한 액을 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 20 μ L를 가지고 다음의 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 글라브리딘의 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

- 조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 282 nm)

칼 럼 : 안지름 약 2 - 6 mm, 길이 약 15 - 25 cm인 스테인레스강관에 3 - 10 μ m의 액체크로마토그래프용 옥타데실실릴화한 실리카 겔을 충전한다.

칼럼온도 : 40°C

이동상 : 희석시킨 초산 (1→50)·아세토니트릴 혼합액 (1:1)

유 량 : 글라브리딘 피크의 유지시간이 약 14분이 되도록 조정한다.

(나) 글리시리진산

이 원료 약 1 g을 정밀하게 달아 70% 에탄올 40 mL를 넣고 1시간 초음파 추출한 다음 여과한다. 잔류물에 70% 에탄올 30 mL를 넣어 같은 방법으로 조작한다. 여액을 모두 합하여 70% 에탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 따로 글리시리진산 표준품 (미리 수분을 측정한다) 약 25 mg을 정밀하게 달아 70% 에탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하고 이 액 10 mL를 정확하게 취하여 70% 에탄올을 넣어 정확하게 50 mL로 한 액을 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 20 μ L 씩을 가지고 다음의 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액 및 표준품의 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

$$\begin{aligned} & \text{글리시리진산(C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}\text{)의 양(mg) =} \\ & \text{무수물로 환산한 글리시리진산표준품의 양(mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \end{aligned}$$

- 조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 254 nm)

칼 럼 : 안지름 약 2 - 6 mm, 길이 약 15 - 25 cm인 스테인레스강관에 3 - 10 μ m의 액체크로마토그래프용 옥타데실실릴화한 실리카 겔을 충전한다.

칼럼온도 : 40°C

이동상 : 희석시킨 초산 (1→50)·아세토니트릴 혼합액 (3:2)

유 량 : 글라브리딘 피크의 유지시간이 약 10분이 되도록 조정한다.

다. 시제품 생산

감초 추출물을 이용하여 경질캡슐 시제품을 생산하였다. 아래 표와 같이 배합하였으며, 내용물 1 Kg을 생산하였으며, 캡슐당 500 mg을 충전하여 2,000 캡슐을 생산하였다.

NO	원 료 명	배합비율(%)	함량 (mg)	투입량(g)
1	감초 추출물	24.00	120.00	240.00
2	효모추출물 I	19.20	96.00	192.00
3	효모추출물 II	9.60	48.00	96.00
4	Resveratrol	4.80	24.00	48.00
5	Amino acid mixture	4.80	24.00	48.00
6	L-carnitine	14.40	72.00	144.00
7	Creatine	14.40	72.00	144.00
8	Tartaric acid	2.88	14.40	28.80
9	Phytic acid	1.92	9.60	19.20
10	SLS	4.00	20.00	40.00
합 계		100.00	500.00	1,000.00

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 목표 달성도

년도	연차별연구목표	세부연구목표	달성도
1 차 년 도	감초 추출물별 항비만 및 지구력 증진 효능 검증 및 감초 활성 소재 기능성 증진 기술 개발	감초 추출물 종류별 항비만 및 운동 지구력 증진 효능 비교 평가	100%
		감초 기능성 소재의 기능/지표 성분 설정 및 추출 공정 최적화	100%
		감초 기능성 원료 생산 위한 기능성 증진 기술 개발	100%
2 차 년 도	감초 기능성 원료 활용 건강기능식품 최적화 제형 개발 및 개발 제형의 효능 검증	대량생산 공정 검토 및 부재료 선정 통한 건강기능식품 제형 개발	100%
		시판 건기식 제품과 효능 비교 평가 통한 감초 활성 소재의 기능적 우수성 검증	100%
		감초 개발 제형의 체중 조절 효능 평가	100%
3 차 년 도	감초 기능성 원료 표준화/제조공정 개발 및 감초 기능성 소재의 작용기전 구명	감초 기능성 원료의 기준규격 설정 통한 원료표준화	100%
		감초 기능성 원료 제조 공정 표준화	100%
		감초 기능성 소재의 항비만 및 지구력 증진 효능 관련 작용 기전 구명	90%

제 2절. 관련분야에의 기여도

○ 본 연구는 감초로부터 효과가 뛰어난 기능 성분을 발굴하고 해당 기능성분의 함량/순도가 높은 기능성 원료 소재화를 통해 체중조절 효능 뿐 아니라 지구력 증진 효능을 동시에 보유한 새로운 컨셉의 복합성 건강기능식품 기능성 원료를 개발하였다.

○ 기존의 한방 처방이나 드링크 제품 등에서 부재료로서 주로 사용되어 오던 감초가 단독으로도 뛰어난 생리 활성을 보유하고 있음을 검증함으로써 기능성 소재로서의 감초의 우수성을 구명하였다.

○ 감초의 경우 항염 효과, 신경세포 보호능 및 인지기능 개선 등에 대한 연구가 현재까지 보고되었으나 본 연구를 통하여 감초의 항산화 효과가 생체내의 Redox 시스템을 조절하여 운동모방 효과가 있다는 신규 기능성을 발굴하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절. 연구 개발 성과

본 연구과제를 통한 주요 성과물로서는 7편의 학술발표과 3건의 논문 투고/게재하였고 3편의 특허를 출원하여 국내 기술력을 확보하였으며 2종의 건강기능식품 시제품을 개발하였다. 그 자세한 내용은 다음과 같다.

1. 학술 발표

- 가. Effect of the various extracts from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch on high fat diet-induced obesity of mice. 한국생명과학회, 2009
- 나. Effect of the various extracts from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch on exercise performance in high fat diet-induced obesity of mice. 한국식품영양과학회, 2009
- 다. Effect of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch on obesity and exercise performance in High-fat Induced Obese Mouse. 한국실험동물학회, 2010
- 라. Anti-obesity Effects of Licorice Are Mediated by altered Gene Expression in Hepatic Lipid Metabolism in High Fat Diet-induced Obese Mice. 한국식품영양과학회, 2010
- 마. The effect of the supercritical fluid extracts from *Glycyrrhiza glabra* Linn on exercise performance in C578BL/6 mice. 한국식품저장유통학회, 2010
- 바. Licorice improves Endurance Exercise Performance via Upregulation of Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle. 한국식품영양과학회, 2011
- 사. The Supercritical Fluid Extracts of Licorice Improves on Endurance Exercise Performance via Upregulation of Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle. 한국식품저장유통학회, 2011

2. 논문 게재 및 투고

가. Effect of Glycyrrhiza uralensis Fisch on amyloid- β -induced neurotoxicity. Food Sci. Biotechnol.19: 1391-1395, 2010

나. Anti-obesity effects of glabridin-enriched supercritical extract of licorice in high fat-fed obese mice. (Submitted)

3. 특허 출원

가. 감초추출물을 유효성분으로 함유하는 지구력 내지 운동 능력 증진용 조성물 및 그 제조방법, 출원번호 10-2010-0065690

나. 이소리퀴티제닌 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 비만예방 및 치료용 조성물. 출원번호 10-2010-0093978

4. 수상 실적

가. 우수 학술발표상, 한국실험동물학회 (2009. 04. 17)

나. 우수 논문상, 한국식품저장유통학회 (2011. 11. 18)

제 2절. 성과 활용 계획

○ 본 연구로부터 개발된 기능성분의 함량/순도가 높은 감초 유래 기능성 원료 소재 활용하여 체중조절 효능 뿐 아니라 지구력 증진 효능을 동시에 보유한 새로운 컨셉의 복합성 소재로서 건강기능식품 개발에 활용될 수 있을 것이다.

○ 감초 유효 소재의 미토콘드리아 대사 조절 통한 운동 모방 효과 (Exercise mimetics) 연구 결과는 PPAR β/δ 또는 AMPK Agonist를 위주로 진행되고 있는 Exercise mimetics 탐색 연구에 새로운 candidate로 제시될 수 있을 것이다.

○ 감초 유효 성분 및 기능성 원료의 항비만/운동 수행 능력 효능 구명 결과는 논문화되어 기능성 인정 허가 신청을 위한 기능성 자료로 활용 될 것이다.

○ 감초 유래 기능성 원료의 항비만 및 운동 수행능력 증진 효능과 관련하여 출원한 용도 특허를 통해 획득한 독점적 권리를 활용하여 항비만 및 운동 수행능력 증진의 복합 기능성 보유 건강기능식품 제품화 및 산업화에 적극 활용할 계획이다.

제 6장. 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

The 32nd Annual meeting of the molecular biology society of Japan (MBSJ 2009)

○ 일본 Pacifico Yokohama에서 개최되는 The 32th Annual Meeting of the molecular biology society of Japan (09. 12. 9 - 12. 12)의 symposium, workshop, biotech seminar에 참석하여 식품 성분과 비만작용기전 관련 gene expression, molecular biology, metabolomics, 분야의 최신 연구동향 파악 및 정보를 수집하여 과제 수행에 적극 활용하고자 하였음.

○ 본 학회의 발표에서는 생체내 효능검증 및 작용기전 구명에 관한 연구모델로서 rat이나 마우스와 같은 소동물 뿐만 아니라 초파리를 비롯하여 C. elegans, zebrafish 등을 이용한 연구결과가 많았음. 또한 특정 유전자를 knock-out시키거나, overexpression시킨 모델이 거의 필수적으로 이용되고 있었고, 기능성 식품분야에서도 기능성 평가 및 작용기전 연구에 활용되어야 할 것으로 판단되었음.

○ Frontier medical research using model animals 세션을 통하여 다양한 *in vivo* 실험 모델이 소개되었는데, 수면연구를 위한 drosophila, clock-gene-animal 모델, 신규 모델 생물로서 cricket, 파킨슨 모델로서 metaka 등으로 마우스나 rat보다 유전자 조작이 쉬운 장점을 가지고 있음. 즉, 대부분의 *in vivo* 모델에서 RNAi, geneswich, overexpression을 통한 작용기전 확인, gene therapy에 적용하고 있어 이러한 모델은 기능성 식품분야에 있어서도 유익한 모델이 될 것임.

○ Metabolic syndrome과 만성염증과의 관련성 연구에서 지방조직의 remodeling, 지방세포와 macrophage의 co-culture 모델, 대동맥류를 하나의 염증 타임캡슐 모델로 활용하는 연구 등도 발표되었음.

○ 또한 Biotechnology seminars 세션을 통하여 분자생물학 분야의 최신 기기, kit, miRNA의 target gene screening system 및 kit, qRT-PCR의 문제점 등 실험에 있어서의 실질적인 소개도 향후 연구에 도움이 될 것으로 생각됨.

제 7장. 참고문헌

1. Wu, C.H., et al., Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(11): p. 7075-81.
2. Larsson, B., P. Bjorntorp, and G. Tibblin, The health consequences of moderate obesity. *Int J Obes*, 1981. 5(2): p. 97-116.
3. Evans, R.M., G.D. Barish, and Y.X. Wang, PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*, 2004. 10(4): p. 355-61.
4. Park, H.J., et al., Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *J Nutr Biochem*, 2009. 20(2): p. 140-8.
5. Park, Y.S., Y. Yoon, and H.S. Ahn, *Platycodon grandiflorum* extract represses up-regulated adipocyte fatty acid binding protein triggered by a high fat feeding in obese rats. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(25): p. 3493-9.
6. Ho, C.H., J.B. Kingree, and M.P. Thompson, Associations between juvenile delinquency and weight-related variables: analyses from a national sample of high school students. *Int J Eat Disord*, 2006. 39(6): p. 477-83.
7. Shibata, S., A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi*, 2000. 120(10): p. 849-62.
8. Visavadiya, N.P., B. Soni, and N. Dalwadi, Evaluation of antioxidant and anti-atherogenic properties of *Glycyrrhiza glabra* root using in vitro models. *Int J Food Sci Nutr*, 2009. 60 Suppl 2: p. 135-49.
9. Eu, C.H., et al., Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis*, 2010. 9: p. 81.
10. Kamisoyama, H., et al., Investigation of the anti-obesity action of licorice flavonoid oil in diet-induced obese rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008. 72(12): p. 3225-31.
11. Birari, R.B., et al., Antiobesity and lipid lowering effects of *Glycyrrhiza* chalcones: experimental and computational studies. *Phytomedicine*, 2011. 18(8-9): p. 795-801.
12. Klejdus, B., et al., Supercritical fluid extraction of isoflavones from biological samples with ultra-fast high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2005. 28(12): p. 1334-46.
13. Marongiu, B., et al., Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *inodora*. *Phytother Res*, 2004. 18(10): p. 789-92.
14. Chomczynski, P. and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. 162(1): p. 156-9.
15. Plutzky, J., Emerging concepts in metabolic abnormalities associated with coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol*, 2000. 15(6): p. 416-21.

16. Weiss, R., et al., Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med*, 2004. 350(23): p. 2362-74.
17. Chaput, J.P., S. St-Pierre, and A. Tremblay, Currently available drugs for the treatment of obesity: Sibutramine and orlistat. *Mini Rev Med Chem*, 2007. 7(1): p. 3-10.
18. Yun, J.W., Possible anti-obesity therapeutics from nature--a review. *Phytochemistry*, 2010. 71(14-15): p. 1625-41.
19. Isbrucker, R.A. and G.A. Burdock, Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006. 46(3): p. 167-92.
20. Franceschelli, S., et al., Licocalchone-C extracted from *Glycyrrhiza glabra* inhibits lipopolysaccharide-interferon-gamma inflammation by improving antioxidant conditions and regulating inducible nitric oxide synthase expression. *Molecules*, 2011. 16(7): p. 5720-34.
21. Vaya, J., P.A. Belinky, and M. Aviram, Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic Biol Med*, 1997. 23(2): p. 302-13.
22. Kuroda, M., et al., Phenolics with PPAR-gamma ligand-binding activity obtained from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* roots) and ameliorative effects of glycyrin on genetically diabetic KK-A(y) mice. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. 13(24): p. 4267-72.
23. Ahn, J., et al., Protective effects of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. on the cognitive deficits caused by beta-amyloid peptide 25-35 in young mice. *Biogerontology*, 2006. 7(4): p. 239-47.
24. Choi, E.M., The licorice root derived isoflavan glabridin increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol*, 2005. 70(3): p. 363-8.
25. Fuhrman, B., et al., Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr*, 1997. 66(2): p. 267-75.
26. Aoki, F., et al., Suppression by licorice flavonoids of abdominal fat accumulation and body weight gain in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007. 71(1): p. 206-14.
27. Nakagawa, K., et al., Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A(y) mice. *Biol Pharm Bull*, 2004. 27(11): p. 1775-8.
28. Larson, K.A. and M.L. King, Evaluation of supercritical fluid extraction in the pharmaceutical industry. *Biotechnol Prog*, 1986. 2(2): p. 73-82.
29. Lucien, F.P., et al., Separation of biomolecules using supercritical fluid extraction. *Australas Biotechnol*, 1993. 3(3): p. 143-7.
30. Miyachi, H., et al., [Application of supercritical fluid extraction to components of crude drugs and plants. II. Extraction of coumarins, lignans and prenylflavonoids]. *Yakugaku Zasshi*, 1987. 107(6): p. 435-9.

31. Wu, Z., et al., Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev*, 1995. 9(19): p. 2350-63.
32. Day, C.P. and O.F. James, Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 1998. 114(4): p. 842-5.
33. Hamaguchi, M., et al., The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med*, 2005. 143(10): p. 722-8.
34. Commerford, S.R., et al., Diets enriched in sucrose or fat increase gluconeogenesis and G-6-Pase but not basal glucose production in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 283(3): p. E545-55.
35. Dobbins, R.L., et al., Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes*, 2001. 50(1): p. 123-30.
36. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*, 2005. 434: p. 113-118.
37. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM., AMP- activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104: p. 12017-12022.
38. Langin, D., Larrouy, D., Barbe, P., Millet, L., Viguerie-Bascands, N., Andreelli, F., Laville, M. & Vidal, H., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*, 1999. 23: p. S64-67.
39. Choi, C.S. et al., Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 2007. 117: p. 1995-2003.
40. Costford, S.R., Chaudhry, S.N., Salkhordeh, M. and Harper, M.E., Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. 290: p. E1304-1312.
41. S. Rahman and S. Sultana., Glycyrrhizin exhibits potential chemopreventive activity on 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-induced cutaneous oxidative stress and tumor promotion in Swiss albino mice. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2007. 223: p. 363-369.
42. Somjen D, Knoll E, Vaya J, Stern N, Tamir S., Estrogen-like activity of licorice root constituents: glabridin and glabrene, in vascular tissues in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004. 91: p. 147-155.
43. Hamaguchi, M., et al., The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *AnnInternMed*, 2005. 143(10): p 722-8.
44. Chomczynski, P. and N. Sacchi, Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction., *AnalBiochem*, 1987. 162(1): p. 156-9.