

최 종
연구보고서

자연 식물자원 유래 퇴행성 뇌질환 제어성 소재의
탐색 및 기능성 식품화

Research and Industrialization of Functional Food
as Brain Disorder Control Material from Natural
Plant Resource

뇌신경세포 손상으로부터 뇌세포 보호물질의 소재화
Development of Protector against Neurotoxicity from Natural
Plant Resources

아세틸콜린 생성촉진을 위한 합성효소 활성화 물질의
소재화

Development of Choline Acetyltransferase Activator from
Natural Plant Resources

고려대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “자연 식물자원 유래 퇴행성 뇌질환 제어성 소재의 탐색 및 기능성 식품화” 과제 (세부과제 “뇌신경세포 손상으로부터 뇌세포 보호물질의 소재화”, “아세틸콜린 생성촉진을 위한 합성효소 활성화 물질의 소재화”)의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 8월 9일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 신동훈

세부연구책임자 : 신동훈

세부연구책임자 : 홍범식

연 구 원 : 김미정

연 구 원 : 최수정

연 구 원 : 정석만

연 구 원 : 김주형

요 약 문

I. 제 목

자연 식물자원 유래 퇴행성 뇌질환 제어성 소재의 탐색 및 기능성 식품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

뇌라는 기관은 신체의 중심 부위로서 매우 복잡한 구조를 갖고 있으며, 타 기관에 비해 접근이 쉽지 않고 다루기가 쉽지 않아 그에 대한 생리학적 이해나 병리가 잘 알려져 있지 않고 있다. 이러한 배경을 살펴 볼 때, 최근 주요선진국가의 연구방향은 생명공학을 중심으로 특히 뇌 질환 중심으로 연구 진행을 하고 있음을 알 수 있다.

최근 국민생활 수준의 향상과 더불어 의학기술의 발달에 의한 노인의 인구가 증가되어 인구의 고령화 현상이 두드러지게 나타나고 있다. 우리나라의 경우 평균 수명 연장 및 출산율의 저하로 인해 전체 인구에서 고령화 인구가 차지하는 비율이 증가되어 1955년에는 전체인구 중 65세 이상의 노인 인구가 3.7%이었으나, 2000년 7.3% (약 3만 명), 2026년엔 20.8% (약 10만 명)로 예상되고 있으며 미국의 경우도 1900년의 4.7%가 2000년 15%이상으로 예상되고 있다. 이러한 고령화 현상과 함께 국제경쟁력을 확보하기 위하여 조직사회의 구성원들에게 치열한 경쟁을 요구함으로써 이들로 인한 성인병의 발병률이 급격한 증가 추세를 보이고 있다. 사망원인 또한 대표적인 성인병에 의한 사망비율이 전체의 절반을 넘기기에 이르렀다. 이에 따라 국민들도 고령화 사회를 인식하게 되었고, 건강하게 장수하고자 하는 욕구와 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다.

본 연구그룹이 선정한 자연 식물자원은 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 많았던 작물로서 빈번한 수요·공급의 불균형으로 농산물 가격의 등락과 생산 농민의 경제적, 사회적 문제로 대두되기도 하였다. 자연 식물자원의 가격 안정을 통한 생산량 증대와 경쟁력을 갖는 하나의 산업 종으로 육성하기 위해서는 이들로부터 고부가가치성 물질의 개발과 제품화가 전제되어야 하며 WTO 체제

의 출범으로 인한 시장개방 아래에서 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 식용 농·임산자원을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발해야 한다고 여겨진다. 따라서 본 연구는 자연 식물자원을 대상으로 고령화의 대표적 질환인 노인성 치매의 예방 또는 치료에 이용될 수 있는 미량성분을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 제품을 실용화함으로써 국내 농림산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 자연 식물자원들로부터 약리·생리활성 성분을 의약 및 식품용 중간원료의 소재로 실용화하고 이를 주제로 한 기능성 식품을 개발하고자 하였다. 최종 목표에 도달하기 위해서 본 대표적인 고령화 질환에 따라 1, 2, 세부과제 로 구분하였으며 이를 통하여 수행한 연구 개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

(1) 금앵자로부터 amyloid β peptide (A β)에 의한 뇌신경 독성 저해 미량소재를 추출 정제, 구조해석 및 소재화를 연구개발 내용으로 하며 ICR-mouse를 이용한 *in vivo* assay계를 도입하여 인지능력과 독성 등을 검사하고 저해활성 물질의 실용화를 검토하는 것을 연구 범위로 함

(2) 칩에서 choline acetyltransferase 활성 성분을 추출 정제, 구조 해석 및 소재화를 연구 개발 내용으로 하며 [¹⁴C] acetyl-CoA를 이용한 *in vitro* assay계를 확립하고 ICR-mouse를 이용한 *in vivo* assay계를 도입하여 인지능력과 독성검사 등을 시행하여 활성화 성분 물질의 실용화를 검토하는 것을 연구 범위로 함

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

자연 식물자원들로부터 약리·생리활성 성분을 의약 및 식품용 중간원료의 소재로 실용화를 최종 목적으로 수행한 연구 개발 결과를 요약하면 다음과 같다.

-자연 식용식물자원을 극성별 계통으로 용매 추출 후 각각의 획분에 대하여 amyloid β peptide (A β)에 의한 뇌신경 독성 저해 및 choline acetyltransferase (ChAT) 활성을 검색한 결과 각각 금앵자와 칩이 선정되었다.

(1) 금앵자로부터 추출 분리한 amyloid β peptide (A β)에 의한 뇌신경 독성 저해 활성물질은 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester 이었으며 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 한 결과 높은 저해 활성과 보호 작용을 보였으며 독성검사에서도 무독성을 나타내었다 (특허 출원 제 10-2005-0054837, J. Amyloid submitted).

(2) 칩으로부터 ChAT 활성을 갖는 물질을 추출, 정제한 결과 daidzein 이었으며, 동시에 *in vitro*와 *in vivo*에서 독성실험과 인지력, 기억력 실험을 한 결과 ChAT 의 높은 활성과 보호 작용을 보였으며 무독성을 나타내었다 (특허 출원 제 10-2005-0057720, J. BBB in press).

SUMMARY

Highly bio-reactive substances from natural plants were screened, purified and industrialized as functional foods.

The A β (amyloid β peptide) accumulates in the AD (Alzheimer's disease) brain. And many researchers believe this peptide plays central role to the pathogenesis of this disorder. In addition, AD brains are characterized by extensive oxidative stress. That is manifested by lipid peroxidation, free radical formation, protein oxidation and DNA/RNA oxidation. Overproduction of A β by genetic [i.e. mutations in APP or in presenilins or the presence of apolipoprotein *E4* allele (ApoE4)] or other mechanisms (i.e. oxidative stress) leads to A β -associated free-radical oxidative stress. This oxidative stress is manifested by reactive oxygen species (ROS) formation, lipid peroxidation and subsequent modification of proteins by the reactive lipid peroxidation products such as 4-hydroxy-2-trans-nonenal (HNE) and acrolein. Other consequences of A β -associated oxidative stress are free fatty-acid (FFA) release, protein oxidation, Ca²⁺ dyshomeostasis (with subsequent alterations in mitochondrial function, oxidative stress, activation of phospholipase A2, cytoskeletal proteins, and induction of apoptosis pathways), mitochondrial impairment, peroxynitrite formation, inflammatory response, apoptosis and other cellular responses. Ultimately, the neuron dies. Antioxidants are able to interfere with most, if not all, of these processes, including the neurotoxicity. This is consistent with the concept of A β -associated oxidative stress and neurodegeneration in AD brain.

To search for a protector against A β -induced oxidative stress, we screened various plant material extracts. The methanol extract of *Rosa laevigata* was selected by screening. The methanol extract of *Rosa laevigata* was solvent partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively. The second fraction of chloroform showed the highest protective effect against oxidative stress. The fraction was separated by silica-gel open column

chromatography. The eighth fraction (second fraction of chloroform and methanol = 80:20, v/v) of thirty three fractions was selected. The fraction was separated by TLC. The fifth band (R_f value 0.54) represented the highest activity. Then the obtained sample was dissolved in methanol and performed on HPLC using C_{18} μ -bondapakTM column. The peak appeared at 317.6 nm. A significant single peak was measured at 35 min. The isolated sample was analyzed by EI-MS and $^{13}C/^1H$ -NMR to predict chemical structures. The protector was identified as the 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester.

In vivo experiment, treatment with the methanol extract of *Rosa laevigata* increased spontaneous alternation behavior of the $A\beta_{1-42}$ injected mice. Also treatment of methanol extract of *Rosa laevigata* attenuated the $A\beta$ -induced impairment of mice in the passive avoidance test.

The choline acetyltransferase activation of 90 Korean natural plants was compared for treating AD. From the screening results, the methanolic extract of *Pueraria thunbergiana* was selected as the most potent candidate containing choline acetyltransferase activation component. The methanol extracts of *Pueraria thunbergiana* were separated into hexane, chloroform and ethyl acetate respectively. The ethyl acetate fraction was selected from the ChAT assay. From the first silica gel column chromatography, each subfraction exhibited high activation effect on ChAT when chloroform to methanol ratio was 90:10. On the second silica gel column chromatography further separated with chloroform and methanol, the fraction represented activation effect on ChAT when chloroform to methanol ratio was 85:15. then the fraction was purified by HPLC and identified by $^1H/^{13}C$ NMR and EI-MS. The activator is identified as the daidzein.

To investigate the effect of *Pueraria thunbergiana* on the scopolamine-induced impairment learning and memory and acute toxicity in mice, *in vivo* test was performed. Mice were allowed free access to water containing the methanol extract of *Pueraria thunbergiana*. Injection of control mice with scopolamine impaired performance on the Y-maze test (58% decrease in alternation behavior) and the passive avoidance test (46%

decrease in step-through latency). In contrast, mice treated with the methanol extract of *Pueraria thunbergiana* against scopolamine injection were protected from these changes. An acute toxicity experiment was undertaken to find the toxicity of the methanol extract of *Pueraria thunbergiana* on the activity of GOT and GPT in the blood serum of the mice. Values of GOT and GPT represented no significant differences. These results demonstrated that *Pueraria thunbergiana* affected improvement of learning and memory ability against scopolamine *in vivo* and suggested that *Pueraria thunbergiana* might be useful for the prevention of AD.

The bio-reactive compounds of selected samples, *Rosa laevigata* and *Pueraria thunbergiana* were isolated and purified with industrial-level procedure. Extracts of each samples were decolorized with low cost absorbents and purified by ultrafiltration using Milipore masterflex system. Finally, each purified bio-reactive compounds was formulated as the types of beverage, capsule and granule.

CONTENTS

Summary (Korean)	2
Summary (English)	5
Contents (English)	8
Contents (Korean)	12
Part 1. The Outline for Research and Development	16
Chapter 1. The Purpose and Limit for Research and Development	16
Chapter 2. The Need of Research and Development	16
Part 2. The Present Condition of Technical development	19
Part 3. Research development and Results	21
Chapter 1. Development of protector against neurotoxicity from natural plant resources	21
1. Introduction	21
2. Materials and Methods	23
A. Samples and Reagents	23
B. Experimental Approach	23
a. Sample preparation from edible plant material	23
b. <i>In vitro</i> measurement of protective effect against neurotoxicity	25
c. Cytotoxicity test	25
d. <i>In vivo</i> ability of learning and memory test of protective effect against A β -induced oxidative stress	25
e. Extraction and isolation of active phytochemicals	27
f. Characterization of active phytochemicals	28
3. Results and Discussion	28

A. <i>In vitro</i> measurement of protective effect against A β -induced oxidative stress	28
a. Establish of protection effects against A β -induced oxidative stress assay from natural edible plants	28
b. Screening of protector against A β -induced oxidative stress from natural edible plants	29
B. <i>In vitro</i> cytotoxicity test	36
C. <i>In vivo</i> ability of <i>Rosa laevigata</i> extract	39
a. <i>In vivo</i> toxicity test	39
b. Y-maze test	40
c. Passive avoidance test	43
D. Purification and characterization of active phytochemicals	45
a. Extraction and isolation of active phytochemicals	45
b. Characterization of active phytochemicals	51
 Chapter 2. Development of Choline acetyltransferase Activator from natural plant resource	 55
1. Introduction	55
2. Materials and Methods	56
A. Samples and Reagents	56
B. Experimental Approach	57
a. Sample preparation for screening of choline acetyltransferase activator	57
b. <i>In vitro</i> measurement of choline acetyltransferase activator	57
c. <i>In vivo</i> ability test and toxicity test of choline acetyltransferase activator	61
d. Purification and characterization of choline acetyltransferase activator from <i>Pueraria thunbergiana</i>	62

3. Results and Discussions	63
A. Screening of choline acetyltransferase activating substance from natural edible plants	63
a. Establishment of choline acetyltransferase assay for inhibitor screening from natural edible plants	63
b. Screening of choline acetyltransferase activator	63
B. <i>In vivo</i> ability test and toxicity test of choline acetyltransferase activator	71
a. <i>In vivo</i> toxicity of choline acetyltransferase	71
b. Y-maze test	72
c. Passive avoidance test	73
C. Purification and characterization of choline acetyltransferase activator	74
a. Separation of choline acetyltransferase activator from <i>Pueraria thunbergiana</i>	74
b. Search of effect of choline acetyltransferase activator from <i>Pueraria thunbergiana</i> in silica-gel column chromatography	75
c. Separation of choline acetyltransferase activator from <i>Pueraria thunbergiana</i> by HPLC	78
D. Characterization of choline acetyltransferase activator	79
Chapter 3. Development of micro-material from natural edible plants as functional foods	83
1. Introduction	83
2. Optimization of extracting conditions in the industrial point	84
A. Extraction and purification procedures of protector against neurotoxicity from <i>Rosa laevigata</i> for industrial use	84
B. Extraction and purification procedures of choline acetyltransferase activator from <i>Pueraria thunbergiana</i> for industrial use	86

Chapter 4. Development of bio-reactives from natural edible plants as the functional foods	89
1. Materials and Methods	89
A. Production of capsule	89
B. Production of beverage	89
C. Production of granule	89
2. Results	89
A. Production of capsule	89
B. Production of beverage	91
C. Production of granule	92
D. Appearance of end-product and contamination of microorganism	95
Part 4. Achievements of purpose and rest of relative field	97
Chapter 1. Purpose of research and development and achievement	97
Chapter 2. The rest of relative field	100
Part 5. Results of research and development and applicative plan	101
Part 6. Collection of foreign informations	102
Part 7. References	104
APPENDIX	110
Publications	111
Patents	127

목 차

요약문 (한글)	2
요약문 (영어)	5
목 차 (영어)	8
목 차 (한글)	12
제 1장 연구 개발 과제의 개요	16
제 1절 연구 개발 과제의 목적과 범위	16
제 2절 연구 개발의 필요성	16
제 2장 국내·외 기술 개발의 현황	19
제 3장 연구 개발 및 결과	21
제 1절 뇌신경 세포 손상으로부터 뇌세포 보호물질의 소재화	21
1. 서 설	21
2. 재료 및 방법	23
가. 재 료	23
나. 실험 방법	23
1) 식용식물자원으로부터 검색시료 제조	23
2) <i>In vitro</i> assay계의 확립 및 후보 식용식물의 1차 선정	25
3) Cytotoxicity test	25
4) <i>In vivo</i> assay계의 확립 및 최종시료의 <i>in vivo</i> 활성 측정	25
5) 활성 phytochemicals의 추출 및 정제	27
6) 정제 활성 phytochemicals의 구조 해석과 수식	28
3. 결 과	28
가. 자연 식물자원으로부터의 뇌신경세포 보호물질 검색	28

1) <i>In vitro</i> assay계 확립	28
2) 뇌신경세포 손상으로부터 뇌세포 보호성분의 검색	29
나. 선정된 뇌세포 손상 보호물질의 cytotoxicity test	36
다. <i>In vivo</i> assay계의 확립과 최종시료의 <i>in vivo</i> 활성 및 독성검사	39
1) <i>In vivo</i> cytotoxicity test	39
2) Y-maze test	40
3) Passive avoidance test	43
라. 선정된 뇌세포 보호물질의 추출 및 정제	45
1) 활성 phytochemicals의 추출 및 정제	45
2) 정제 활성 phytochemicals의 구조 해석과 수식	51
제 2절 아세틸콜린 생성 촉진을 위한 합성효소 활성화 물질의 소재화	55
1. 서 설	55
2. 재료 및 실험 방법	56
가. 재 료	56
나. 실험 방법	57
1) 아세틸콜린 합성효소 활성화 물질의 검색 시료 제조	57
2) 아세틸콜린 합성효소 활성 효과 측정	57
3) <i>In vivo</i> assay계의 확립과 최종시료의 <i>in vivo</i> 활성 및 독성검사	61
4) 칩으로부터 아세틸콜린 합성효소 활성물질의 정제 및 구조 분석	62
3. 결 과	63
가. 자연식물자원으로부터의 아세틸콜린 합성효소 활성 검색	63
1) 아세틸콜린 합성효소 활성성분의 검색 assay 계 확립	63
2) 아세틸콜린 합성효소 활성물질의 검색 및 선정	63
나. 아세틸콜린 합성효소 활성 물질의 <i>in vivo</i> 실험 및 독성검사	71
1) 최종 선정된 아세틸콜린 합성효소 활성물질의 <i>in vivo</i> 상의 독성실험 ..	71
2) Y-maze test	72
3) Passive avoidance test	73

다. 선정된 아세틸콜린 합성효소 활성성분의 정제	74
1) 칩에서의 활성 물질의 탐색을 위한 1차 물질 분리	74
2) Silical-gel column chromatography에 의한 <i>Pueraria thunbergiana</i> 추출 물의 아세틸콜린 합성효소 활성화	75
3) HPLC에 의한 <i>Pueraria thunbergiana</i> 추출물의 활성물질 분리	78
라. 칩(<i>Pueraria thunbergiana</i>)으로부터 정제된 활성물질의 구조 해석	79
제 3절 자연 식물자원 함유 미량소재의 실용화	83
1. 서 설	83
2. 최종적으로 선정된 시료들로부터 생리활성물질 추출조건의 최적화 및 공 업적 수준의 정제방법 확립	84
가. 금앵자(<i>Rosa laevigata</i>)로부터 뇌세포 보호물질 성분의 공업적 추출 및 정제	84
나. 칩(<i>Pueraria thunbergiana</i>)으로부터 choline acetyltransferase 활성화 성분 의 공업적 추출 및 정제	86
제 4절 자연 식물자원 함유 생리활성물질의 기능성 식품화	89
1. 재료 및 방법	89
가. 연질 캡슐 제작	89
나. 드링크제 제작	89
다. 과립제 제작	89
2. 결 과	89
가. 연질 캡슐 제작	89
나. 드링크제 제작	91
다. 과립제 제작	92
라. 제품의 외관 및 안정성 검사	95
제 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도	97
제 1절 연구개발 목표 및 달성도	97

제 2절 관련분야에의 기여도	100
제 5장 연구개발 결과 활용계획	101
제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보	102
제 7장 참고 문헌	104
부록	110
학회 발표 및 논문 발표	111
특허 출원	127

제 1장 연구 개발 과제의 개요

제 1절 연구 개발 과제의 목적과 범위

최근 국민생활 수준의 향상과 더불어 의학기술이 고도로 발달함에 따라 노인의 인구가 증가되어 인구의 고령화 현상이 두드러지게 나타나고 있다. 우리나라의 경우 평균 수명의 연장 및 출산율 저하로 인해 전체 인구에서 고령화 인구가 차지하는 비율이 증가되어 1955년에는 전체인구 중 65세 이상의 노인인구가 3.7%이었으나, 2000년 7.3%, 2026년엔 20.8% (약 10만 명) 예상되고 있으며 미국의 경우도 1900년의 4.7%가 1986년 11%로, 2000년 15%이상으로 예상되고 있다. 이러한 고령화 현상으로 인한 성인병의 발병률이 급격한 증가 추세를 보이고 있다. 사망원인 또한 감염형 질환의 비율은 감소한 반면 대표적인 성인병인 순환기계 질환, 암, 간장 질환, 뇌질환에 의한 사망비율이 전체의 절반을 넘기기에 이르렀다. 이에 따라 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 현대의료 기술에 대한 불안감을 갖게 됨과 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다.

본 연구그룹이 선정한 자연 식용식물자원은 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 많았던 작물로서 빈번한 수요·공급의 불균형으로 농산물 가격의 등락과 생산 농민의 영농의욕을 떨어뜨려 경제적, 사회적 문제로 대두되기도 하였다. 식·약용류의 가격 안정을 통한 생산량 증대와 경쟁력을 갖는 하나의 산업으로 육성하기 위해서는 이들로부터 고부가가치성 물질의 개발과 제품화가 전제되어야 한다. 뿐만 아니라 WTO 체제의 출범으로 인한 농업 시장개방 하에서 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 식용 농·임산자원을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 따라서 본 연구는 국내산 자연 식용식물자원을 대상으로 고령화의 대표적 질환인 노인성 치매의 예방 또는 치료에 이용될 수 있는 미량성분을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 제품을 실용화함으로써 국내 농림산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 한다.

제 2절 연구 개발의 필요성

제 1 세부과제에서는 자연 식물 자원으로부터 amyloid β peptide ($A\beta$) induced 뇌신경 독성 저해 미량소재를 검색하고 소개시키고자 한다. 고유의 자연 식물 자원으로부터 $A\beta$ -induced 뇌신경 독성 저해 미량소재를 검색하고 이를 소

재화 시키고자 한다. A β 는 amyloid precursor protein (APP)의 abnormal cleavage로부터 생성된 40-42개의 peptide 물질이고 Alzheimer's disease (AD)에서 중요한 pathogenetic material로 생각되어지고 있다. AD에서의 뇌신경세포 과사의 원인은 아직 불분명하지만 oxygen free radical의 생성, reactive oxygen species (ROS)와 같은 oxidative injury가 뇌신경세포 파괴 및 pathogenesis와 관련되어 있을 것으로 추정된다. AD 환자의 brain에서 이들 oxidative stress (ROS, lipid peroxidation, protein modification, mitochondrial DNA oxidation)의 증가는 증명되고 있으며 이러한 생리적 대사 이상은 amyloid plaques와 neurofibrillary tangles (NFT)와 같은 AD brain 고유의 임상적 결과를 초래한다. 또한 A β 는 intracellular free radical status를 유발시키고 궁극적으로 cell death를 유도하여 A β 와 뇌신경세포 파괴는 상관성이 있는 것으로 보인다. A β 에 의한 ROS, free radical 등의 생성은 A β -induced free radical-mediated neurotoxicity의 추정을 가능하게 하기 때문에 이들에 대한 연구는 필수적이라 할 수 있다.

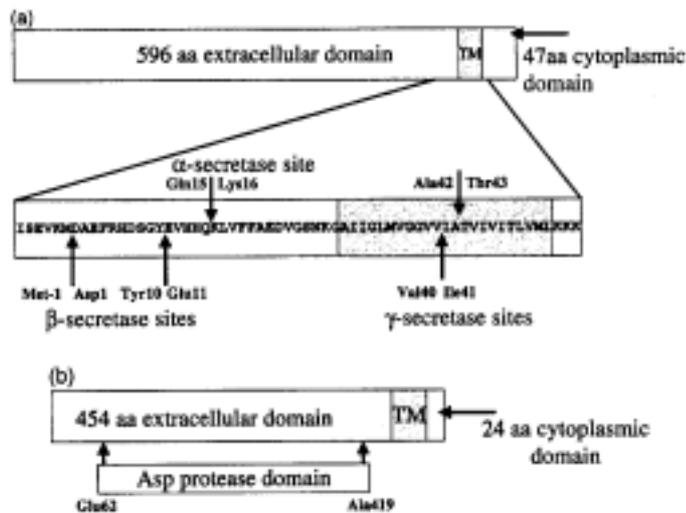


Figure 1. Domain structure of (a) human amyloid precursor protein (APP) and (b) human BACE. Sites for α , β , and γ -secretase cleavage are denoted in (a).

제 2 세부과제에서는 뇌기능 신경전달물질 합성효소를 활성화시키는 미량소재를 식용식물자원으로부터 분리하고 이를 실용화시키고자 한다. ChEIs는 뇌에서 신호전달을 원활하게 해주는 신경전달 물질인 acetylcholine을 보호하는 기능을 갖지만 이와는 달리 직접적으로 acetylcholine의 생성을 활성화시켜주는 인자가 choline acetyltransferase (ChAT)로 알려져 있다. 뇌의 전두엽 (basal forebrain)은 cholinergic neuron을 상당수 포함하고 있고, 이 부위에 있는 cholinergic neuron이 인지능력을 관장하고 있는 것으로 보인다. 노인성 치매환자에 있어서 ChAT의 양은 급격히 감소되는 것을 볼 수 있고, ChAT의 활성도 감소되어 acetylcholine의 농도가 낮아진다. ChAT는 신경의 pre-synaptic 부분에서 choline과 acetyl-CoA로부터 acetylcholine을 생성하는 효소로 활성을 증진시켜주기 위해 신경 성장인자 (nerve growth factor, NGF)나 신경영양물질(neurotrophin)을 투여하기 위한 연구도 진행 중이지만, 이는 drug delivery에서 문제점을 갖고 있다. 인간의 두뇌는 강력한 뇌막 (blood brain-barrier)으로 보호를 받고 있고, 이 막은 특정물질에 대한 선택성을 보이기 때문에 생리적으로 단백질과 지방과 같은 큰 분자량을 갖는 물질의 투과가 쉽지 않다. ChEIs와는 달리, 환자의 인지능을 향상시켜 주기 위한 ChAT activator로 보고된 FDA 승인 약품은 아직 없으나 최근 일본 Kitasato 연구소에서 한약재로부터 NGF-like factor를 찾아냈고, 이 물질이 ChAT 활성을 증진시킨다는 보고가 있었다. 현재까지의 치매의 치료는 증상완화 또는 질병의 진행속도를 늦추는 것에 지나지 않고 질병자체를 치료하지는 못하고 있다. 노인성 치매는 대부분 65세 이상의 고령인구에서 발병하고 고령인구의 증가 추세에 따라 향후 노인성 치매환자를 돌보는 보호자들의 고통과 치료비용을 포함한 경제적인 손실까지 고려한다면 노인성 치매는 점차 공중보건문제에 있어 더욱 중요한 위치를 차지하게 될 것이다.

제 2장 국내외 · 기술 개발 현황

Alzheimer's disease (AD)의 발병이 amyloid precursor protein (APP), presenilin (PS)1, PS2와 같은 단백질의 구조이상으로 일어난다는 사실은 이들 이상단백질이 신경세포의 변성과 사멸을 가져오는 것이라 생각되고 있다. 최근의 AD 연구는 amyloid β peptide ($A\beta$)에 의한 뇌세포 파괴, 그리고 이들 단백질의 구조, 생리작용, 뇌 안에서의 축적에 의한 acetylcholine (ACh: neurotransmitter)의 level 감소 등이 중심이 되고 있다.

AD의 치료는 병의 원인을 근본적으로 제거한다기보다 환자의 증세를 가볍게 하고, 병의 진행속도를 지연시키는데 주안을 두고 있다. AD 환자에서 보는 주 증세는 기억력, 인지능력, 학습능력의 감퇴에 있고, 이어서 감정 장애와 이상행동을 가져온다. 이 중에서 가장 보편적인 증세인 기억력과 인지능력 장애에 대한 대증요법, 즉 증세를 가볍게 해주는 치료가 유일한 치료법이 되었다.

AD 환자의 뇌에서는 basal forebrain 있는 mynert nucleus 신경세포가 대부분 죽어 있어서 이 뇌신경세포가 지배하는 synapse와 대뇌피질과의 연결이 퇴화되어 있다. 이들 신경세포는 신경전달 물질인 ACh를 생산하는 cholinergic nerve cell인데, 그 사멸로 인해서 AD 환자 뇌에서는 ACh 생산량이 현저하게 감소되어 있다. 이러한 이유로 뇌에서의 ACh 농도를 높게 유지시키면 환자의 기억력, 인지능력이 크게 회복된다고 보고된 바 있다. 실제로 임상에서는 이를 위해서 뇌 안에 있는 ACh를 분해시키는 enzyme inhibitor를 사용하고 있다. 현재 각국에서 사용되고 있는 AD치료제는 이러한 ACh 분해효소 억제제가 대부분이며 tacrine, 그리고 aricept 등이 이에 속한다. 이밖에도 머크, 바이엘 등의 제약회사가 이와 비슷한 약제를 시장에 내놓고 있다. Tacrine의 경우 간독성의 부작용이 커서 치료중지의 경우가 많은데, 최근에 개발된 aricept는 이러한 부작용이 덜하다고 한다. ACh의 합성을 촉진시키기 위해서 그 전구체인 콜린, 레시틴 아세틸 카니틴 등을 투여하는 임상실험이 여러 번 시도되었으나, 이들 물질이 blood brain-barrier를 통과하지 못하고 그 효력이 단기간이라는 결점으로 현재는 주목을 받지 못하고 있다. 현재 AD 환자를 치료하는 데 사용되고 있는 대증요법을 종합해보면 아세틸콜린 보충 요법이 가장 효과적이며, 다른 치료약제는 별로 효능을 나타내지 못하고 있다. 앞으로 더욱 효율적인 대증요법을 개발하려면 acetylcholinesterase (AChE) inhibitor 하나만을 대상으로 하지 않고

acetylcholine synthesis activator, brain nerve cell protector와 같은 여러 가지 약제를 고려해 놓고, 여러 신경전달물질의 뇌 안에서의 증가를 가져오는 약제를 개발할 필요가 있다.

또한 A β 의 생성과 A β -induced cytotoxicity를 inhibition 또는 blocking 시켜 주는 연구는 genetic approach에 한해서 국내 연구진에서도 비교적 활발히 이루어지고 있지만 개발된 신소재나 drug은 현재 전무한 실정이다.

제 3장 연구 내용 및 결과

제 1절 뇌신경세포 손상으로부터 뇌세포 보호물질의 소재화의 내용 및 결과

1. 서설

고유의 식용식물 자원으로부터 amyloid β peptide ($A\beta$) induced 뇌신경 독성 저해 미량소재를 검색하고 이를 소재화 시키고자 한다. $A\beta$ 는 amyloid precursor protein (APP)의 abnormal cleavage로부터 생성된 40-42개의 peptide 물질이고 Alzheimer's disease (AD)에서 중요한 pathogenetic material로 생각되어지고 있다. AD에서의 뇌신경세포 괴사의 원인은 아직 불분명하지만 oxygen free radical의 생성, reactive oxygen species (ROS)와 같은 oxidative injury가 뇌신경세포 파괴 및 pathogenesis와 관련되어 있을 것으로 추정된다. AD 환자의 brain에서 이들 oxidative stress (ROS, lipid peroxidation, protein modification, mitochondrial DNA oxidation)의 증가는 증명되고 있으며 이러한 생리적 대사 이상은 amyloid plaques와 neurofibrillary tangles (NFT)와 같은 AD brain 고유의 임상적 결과를 초래한다. 또한 $A\beta$ 는 intracellular free radical status를 유발시키고 궁극적으로 cell death를 유도하여 $A\beta$ 와 뇌신경세포 파괴는 상관성이 있는 것으로 보인다. $A\beta$ 에 의한 ROS, free radical 등의 생성은 $A\beta$ -induced free radical-mediated neurotoxicity의 추정을 가능하게 하기 때문에 이들에 대한 연구는 필수적이라 할 수 있다.

최근 식품성분에 대해 새로운 관점에서의 체계적인 연구가 발전함에 따라 식품 기원의 특정 성분들이 인체의 신경계, 생체 방어계, 세포분화 등 각종 생리기능 조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체 조절계 및 생체 방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 가장 자연스러운 건강유지를 위한 최적의 수단일 수 있음을 의미한다. 식품에 도입되고 있는 생체 조절성 3차 기능은 발병의 전 단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품 및 식품의약의 수요가 합성의약품을 상회할 것으로

예측되고 있기도 하다.

본 연구그룹은 노인성 치매의 예방 및 치료용 phytochemicals를 자연 식용식물 자원으로부터 탐색하고 이를 의약, 식품의약 및 기능성식품의 원료로 소재화 함에 있어 최종물질의 안전성을 확보, 의약품 및 기능성식품 소재로 실용화될 확률을 높이고자 하며, 뿐만 아니라 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안으로 자연 식용식물자원을 대상으로 신 물질을 탐색하고 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

본 연구에 사용한 금앵자 [金櫻子, *Rosa laevigata*]는 분류학상 장미목 장미과의 덩굴성 상록 관목이다. 금앵자의 줄기는 길게 뻗어 다른 것에 기대어 감아 올라가며, 아래에는 갈색의 역센 가시가 있다. 잎은 겹잎으로 길이는 5~10cm이며, 짙은 녹색으로 광택이 있고 털이 없으며 단단하다. 작은 잎은 3개이며, 긴 타원형 또는 바소꼴 달걀 모양으로 길이는 3~5cm이고, 끝은 날카롭고 뾰족하다. 잎축에 가시가 있고, 턱잎은 잘 떨어진다. 5월 초순, 작은 가지의 끝에 약한 방향성의 꽃이 1개씩 늘어서 달리는데, 꽃잎은 5개이다. 꽃부리는 순백색으로 평평하게 열려 있고, 지름 6~8cm의 대륜이다. 열매는 서양 배 모양으로 작은 가시가 있으며, 말려서 한약재로 쓴다. 중국 중남부, 일본, 타이완 등지에 분포한다. 성분으로는 꽃받침과 열매에 유기산(사과산, 레몬산), 탄닌, 정유, 비타민 c, 수지, 사포닌이 있다.

본 연구에서는 고유의 자연 식용식물자원으로부터 amyloid β peptide (A β) induced 뇌신경 독성 저해 미량소재를 검색하였고 검색과정에서 가장 높은 저해율을 보인 금앵자 (*Rosa laevigata*)의 methanol 추출물로부터 저해 물질을 분리하여 활성물질의 A β induced 뇌신경 독성 저해 효과와 인지력 향상 효과를 조사하였고 아울러 그 구조적 특징을 조사하여 산업화의 기초자료로 사용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

본 실험에 사용한 식용식물 자원들은 서울 경동시장에서 직접 구입하였다.

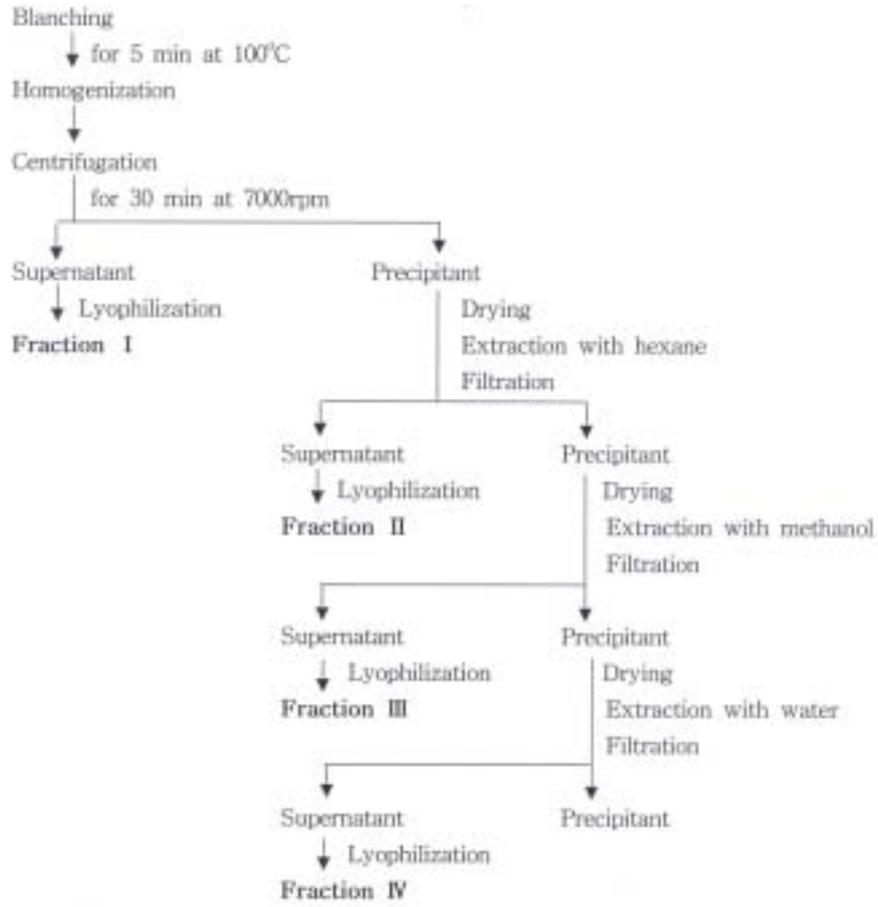
실험에 사용된 A₂₅₋₃₅, A₁₋₄₂, hydrogen peroxide (H₂O₂), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), trypan blue, ascorbic acid 는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고. A₄₂₋₁ 는 BACHEM (Bubendorf, Switzerland), Silica-gel and TLC plate 는 Merck Co. (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. C₁₈-bondapak column은 Waters Co. (Milford, MA, USA)에서 구입하였다. 또한 인지능력 향상 실험을 위한 ICR mouse는 샘타코 바이오코리아에서 분양받아 사용하였다. 그 밖에 분석에 사용한 시약은 모두 특급 수준의 시약을 사용하였다.

PC12 cell line (Rat pheochromocytoma cell)는 American type culture collection (ATCC, CRL-1721)에서 분양받아 사용하였다. Cell culture에 사용된 RPMI 1640 medium, horse serum donor herd, fetal bovine serum and antibiotic-antimycotics는 Gibco-BRLTM (Gaithersburg, MD, USA), sodium bicarbonate는 Sigma Co, filter membrane (pore size 0.22 μm)는 Millipore Co.(Bedford, MA, USA)에서 구입하였다.

나. 실험 방법

1) 식용식물자원으로부터 검색시료 제조

식용식물자원을 Scheme 3-1-1 에서 표시한 것처럼 계통추출 하였다. 구입한 시료를 위의 추출 방법에 따라 100℃에서 5분간 끓여서 효소 활성을 실활 시키고 분쇄한 후 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상등액을 동결건조 하여 Fr. I의 시료를 조제하였다. 침전물은 건조시킨 후 연속적으로 hexan, methanol, ethylacetate 순으로 환류추출 한 뒤 각각의 상등액을 농축, 동결 건조하여 Fr. II, III, IV을 얻었다.



Scheme 3-1-1. 식용식물자원으로부터 계통추출을 통한 검색시료 제조

2) *In vitro* assay계의 확립 및 후보 식용식물의 1차 선정

식용식물자원을 대상으로 추출조건과 방법에 따라 시료를 추출한 후 신경세포 피사저해 성분을 다음과 같이 검색함. PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 세포수가 10^4 - 10^6 cell/ml가 되었을 때 10 μ M의 A β protein을 처리하여 oxidative stress를 유도한다. A β -induced oxidative injury는 DCF-DA (2',7'-dichlorofluoresine diacetate)를 이용하여 생성된 oxidative stress 정도를 spectrofluorometer를 통해서 측정한다. 이후 oxidative stress에 의한 cell cytotoxicity는 MTT assay를 통하여 측정하고 대조군과 식용식물자원으로부터 추출한 추출액을 전처리한 군과 비교한다.

3) Cytotoxicity test

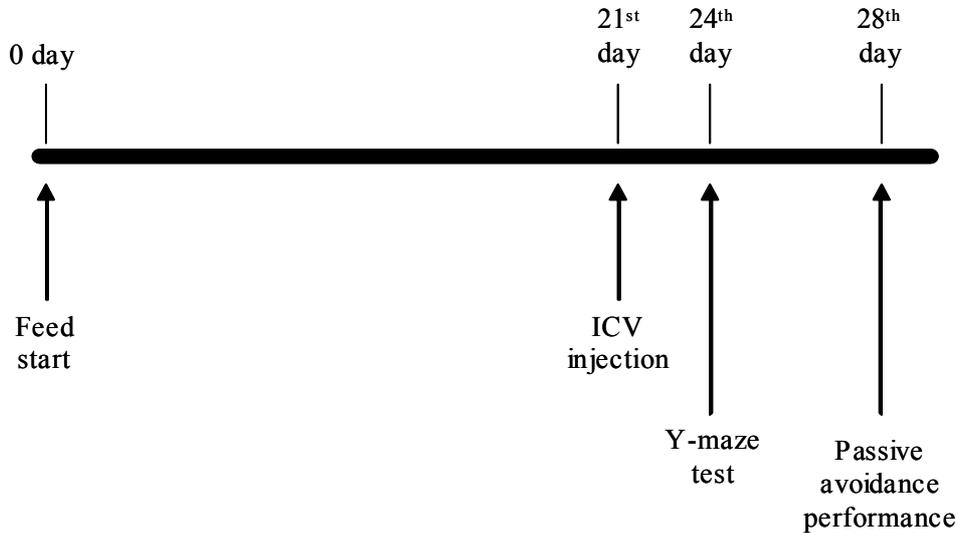
위의 *in vitro* assay계에 의하여 각 과제별로 선정된 시료를 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 등과 같은 cytotoxicity test 방법으로 cell 독성을 검사함.

상기 독성검사를 끝으로 *in vitro* 최대 활성, 유효효능 및 무독성을 보인 시료를 각 과제별 최종시료로 선정하여 *in vivo* test를 실시함.

In vivo behavioral test를 위한 ICR-male mouse와 최종선정 시료를 농도별로 variation을 두어 준비한다. 최종 선정 시료는 각 group당 준비된 10마리의 mouse에 자유롭게 제공하고, ICR-male mouse는 20-24 $^{\circ}$ C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photoperiod chamber에서 food를 *ad lib*의 상태로 공급한다.

4) *In vivo* assay계의 확립 및 최종시료의 *in vivo* 활성 측정

In vivo behavioral test를 위해 ICR-male mouse를 준비하고 최종선정 시료를 각 group당 dose dependent 하게 제공한다. ICR-male mouse는 20-24 $^{\circ}$ C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photoperiod chamber에서 사육한다. Scheme 3-1-2와 같이 injection한 후 *in vivo* 활성을 시험한다.



Scheme 3-1-2. *In vivo* experimental design

가) Y-maze test

위의 조건처럼 ICR-male mouse는 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 A β 를 I.C.V (intracerebroventricular) injection 하여 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시한다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록했다. Mouse를 arm에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

나) Passive avoidance test

위의 조건처럼 ICR-male mouse는 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 A β 를 각각 test 전에 I.C.V injection 하여 기억력 실험을 실시한다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 training을 시킨 다음 행동실험을 실시한다. 모든 mice를 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련(명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동

안 실험한다.

5) 활성 phytochemicals의 추출 및 정제

선정된 금앵자 (*Rosa laevigata*)를 hand mixer로 곱게 마쇄한 후 2 kg의 금앵자 조말을 methanol 5배 부피로 4°C에서 2주 동안 정치시키면서 5회 추출한 후 감압 농축하여 금앵자 methanol 추출물을 조제하다. 추출물로부터 methanol을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethyl acetate를 각각 3배 부피로 환류 추출하여 1차적인 물질 분리를 실시하였다. 추출된 crude methanolic extract는 극성도에 따라 solvent partitioning을 실시하여 저해 활성을 확인하였다. 저해 활성이 높게 나온 부분을 가지고 open silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH)을 시행하여 11개의 소분획 (CHCl₃:MeOH = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)으로 분획 하였다. 각각의 분획을 Aβ-induced oxidative stress 저해 활성을 측정하여 그 중 저해 활성이 높은 획분을 선정하여 분리하였다.

선정된 획분을 preparative silica-gel plate (glass, 100 × 200 mm)를 사용하여 thin layer chromatography (TLC)를 실시하였다. 선정 획분을 3 × 10⁵ mg/ml 농도로 methanol에 녹인 후 0.5 μl씩 4회 spotting하여 건조시킨 후 chloroform과 methanol (80:20, v/v)으로 전개시킨 후 저해 활성을 측정하여 band를 분리하였다.

분리된 활성 band를 Waters 2690 HPLC와 Waters μ-bondapack C₁₈ revers phase (3.9 × 300 mm) column을 사용하여 활성 물질을 분리하였다. 0-100%의 methanol과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 80 분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 1.0 ml로 하였으며 한번에 10 μl씩 시료 주입을 하였다. 사용 용매는 특급 methanol과 3차 증류수를 사용하였다 (Table 3-1-1).

Table 3-1-1. Condition of the analytical HPLC for purification of active component from *Rosa laevigata*.

Instrument	Waters 2690
Detector	Waters 996 (at 200-800 nm)
Column	μ -bondapak C ₁₈ (reverse phase, 3.9×300 mm)
Flow rate	1 ml/min
Mobile phase	0%~100% Methanol (gradient elution)
Injection volume	10 μ l

6) 정제 활성 phytochemicals의 구조 해석과 수식

정제된 물질 (4 mg)을 ¹H-NMR (600MHz)과 ¹³C-NMR (MHz) (Brucker German, Advace-600)를 이용하여 측정하였으며, 정제된 물질 (1mg)을 Electronic ionization (EI) mass (JEOL, JMS-AX505WA)를 이용하여 그 구조와 mass size를 측정하였다.

3. 결과

가. 자연 식물자원으로부터의 뇌신경세포 보호물질 검색

1) *In vitro* assay계 확립

식용식물자원을 대상으로 추출조건과 방법에 따라 시료를 추출한 후 신경세포 피사저해 성분을 검색하기 위해 다음과 같은 *in vitro* assay를 확립하였다(Scheme 3-1-3).

Cell were cultured in 96-well plate
(100 μl /well, at a density of $10^6 \sim 10^7$ cells/ml)

↓ overnight

Treated with 20 μl of sample (1 mg/ml)

↓ for 48 hr

Treated with or without 40 μl of 500 μM H_2O_2

↓ for 2 hr

Incubated with 40 μl of 250 μM DCF-DA

↓ for 50 min

Quantified using fluorometer
(Excitation wavelength 485 nm, Emission wavelength 535 nm)

Scheme 3-1-3. Analysis of oxidative stress using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)

2) 뇌신경세포 손상으로부터 뇌세포 보호성분의 검색

식용 식물자원을 Scheme 3-1-1에서 표시한 것처럼 계통추출 하였다. 즉 시료를 먼저 균질기를 이용하여 냉수로 추출한 후 상등액은 동결건조 하여 냉수추출획분 (Fr. I)으로 하고 잔사는 헥산으로 환류 추출하여 헥산추출획분 (Fr. II)으로 하였다. 잔사는 다시 메탄올로 환류추출하고 상등액은 동결 건조하여 메탄올추출획분 (Fr. III)으로 조제하고 마지막으로 잔사를 다시 열수로 환류 추출하여 이를 열수추출획분 (Fr. IV)으로 하였다. 이와 같이 조제된 시료를 이용하여 뇌세포 보

호 성분을 검색한 결과, 냉수추출물 (Fr. I), hexan추출물 (Fr. II), 열수추출 (Fr. IV)에서는 보호 효과가 매우 낮았기 때문에 활성 검토가 불가능하였다. Table 3-1-2과 Fig. 3-1-1에서 나타난 바와 같이 메탄올추출물 (Fr. III)에서는 들국화, 치자, 죽즙, 금앵자가 좋은 효과를 보였다.

Table 3-1-2. Protective effect of the Korean traditional plant extracts against oxidative stress

Sample name	Scientific name	Protective effect (%)
Beefsteak plant	<i>Perilla sikokiana</i>	89.9
Tosaja	<i>Cuscuta japonica</i>	95.1
Hasuoh	<i>Polygonum multiflorum</i>	88.8
Pumpkin	<i>Cucurbita moschata</i>	82.1
Hwangjung	<i>Polygonatum sibiricum Red.</i>	49.5
White leek	<i>Allium fistulosum</i>	84.1

Sample name	Scientific name	Protective effect (%)
Solomon's seal (stem)	<i>Polygonatum japonicum</i> (stem)	61.4
Wild chrysanthemum	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	92.2
Chinese quince	<i>Pseudocydonia sinensis</i>	68.2
Dandelion	<i>Taraxacum platycarpum</i>	78.6
Peppermint	<i>Menta arvensis</i> var. <i>japonica</i>	74.9
Cactus	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. Saboten Makino	75.6
Barley	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i>	68.8
Bipa (leaf)	<i>Eriobotrya japonica</i>	53.2
Mulberry (leaf)	<i>Morus alba</i>	73.2
Mountain berry	<i>Rubus coreanus</i>	92.2
Sansooyu	<i>Cornus officinalis</i>	80.7
Eumyangquak	<i>Epimedium koreanum</i>	88.3
Pomegranate	<i>Punica granatum</i>	90.7
Wormwood	<i>Artemisia asiatica</i>	68

(to be continued)

Sample name	Scientific name	Protective effect (%)
Sweet potato	<i>Ipomoea batatas L.</i>	93.7
Dried persimmon	<i>Disopyrus kaki (dried)</i>	84.7
Cherokee rose	<i>Rosa laevigata</i>	100.3
Dongkwa	<i>Benincasa cerifera Savi.</i>	96.1
Mokdanpi	<i>Paeonia suffruticosa Andrews</i>	88.3
Dropwort	<i>Oenanthe siolonifera</i>	89.2
Bangpung	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	61.6
Baekbongryung	<i>Poria cocos Wolf.</i>	76.1
Scallion	<i>Allium tuberosum</i>	83.8
Apricot	<i>Prunus armeniaca var. ansu</i>	35.3
Spinach	<i>Spinacia oleracea L.</i>	79.8
Osuyu	<i>Evodia officinalis</i>	30.1
Pine nuts	<i>Pinus koraiensis</i>	70.9
Bamboo juice	<i>Sasamorpha purpurascens Nakaki var. borealis Nakaki</i>	98.2

Sample name	Scientific name	Protective effect (%)
Araliaceous shrubs root bark	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	77.9
Fruit of the Maximowiczia chinensis	<i>Schizandra chinensis</i>	68.9
Citron	<i>Citrus junos</i>	80.9
Clematis	<i>Akebia quinata</i>	65.8
Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	87.6
Honghwa	<i>Carthamus tinctorius</i>	99.4
Jandae	<i>Adenophora tryphilla var. japonica</i>	97.5
Plantain	<i>Plantago asiatica</i>	96.7
Gardenia seed	<i>Gardenia jasminoides</i>	97.4
Chicory	<i>Cichorium intybus L.</i>	90
Trifoliate orange	<i>Poncirus trifoliata</i>	107.6
Sweetbrier	<i>Rosa rugosa</i>	104
Sunflower	<i>Helianthus annus</i>	96.6
Uncleaned rice	<i>Euryale ferox</i>	94.1

(to be continued)

Sample name	Scientific name	Protective effect (%)
Persimmon leaf	<i>Diospyros kaki</i> (leaf)	45.9
Licorice root	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	58.9
Cinnamon bark	<i>Cinnamomum loureirii</i>	87.7
Chinese matrimony vine	<i>Lycium chinense</i>	5.7
Shepherd's purse	<i>Capsella bursa-Pastoris</i>	85.3
Green tea	<i>Cinamomum camphora</i>	91.4
Kelp (Dasima)	<i>Laminaria japonica</i>	66.2
Milk vetch	<i>Astragalus membranaceus</i>	61.9
Angelica	<i>Angelica gigas</i>	49.7
Jujube	<i>Zizyphus jujube</i> var. <i>inermis</i>	63.5
Dedug	<i>Codonosis lanceolata</i>	80.7
Balloon flower	<i>Platycodon grandiflorum</i>	68
Doochung	<i>Eucommia ulmoides</i>	87.9
Doochung (leaf)	<i>Eucommia ulmoides</i> (leaf)	87

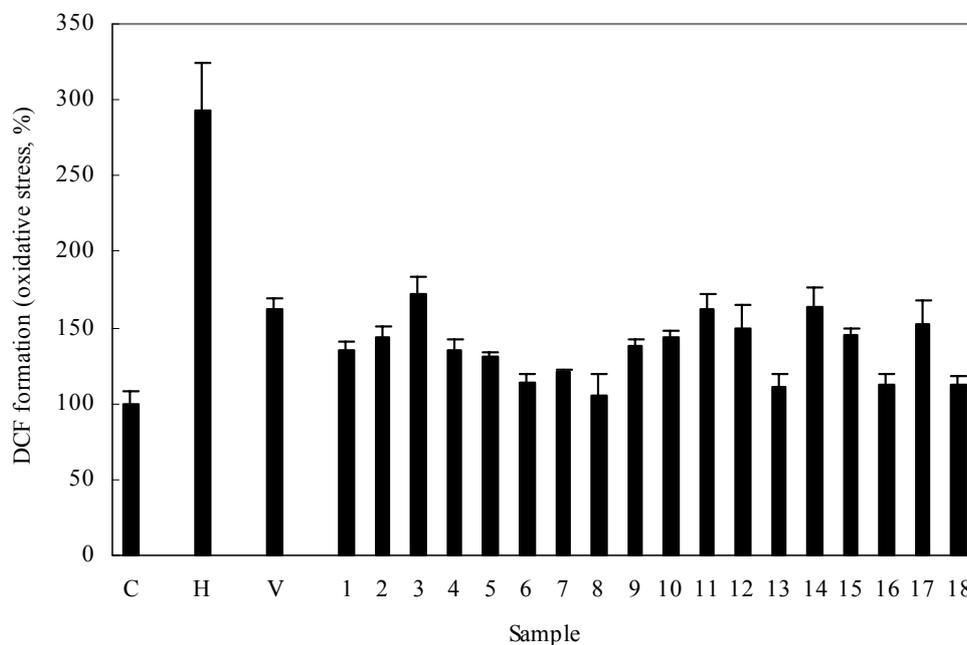


Fig. 3-1-1. Protective effect of the plant extracts against oxidative stress.

Group C was untreated control cultures. Group H was treated with 100 μM H_2O_2 . Group V was pre-incubated with 100 μM Vit C for 48 hr before H_2O_2 treatment. Sample groups were pre-incubated with sample (20 μl , 1 mg/ml) for 48 hr before H_2O_2 treatment. Data represent the mean (n=4) \pm S.D.

1: *Cinnamomum loureirii*, 2: *Capsella bursa-Pastoris*, 3: *Cinamomum camphora*, 4: *Eucommia ulmoides*, 5: *Eucommia ulmoides* (leaf),

6: *Chrysanthemum morifolium*, 7: *Rubus coreanus*, 8: *Epimedium koreanum*, 9: *Punica granatum*, 10: *Carthamus tinctorius*,

11: *Adenophora tryphilla* var. *japonica*, 12: *Plantago asiatica*,

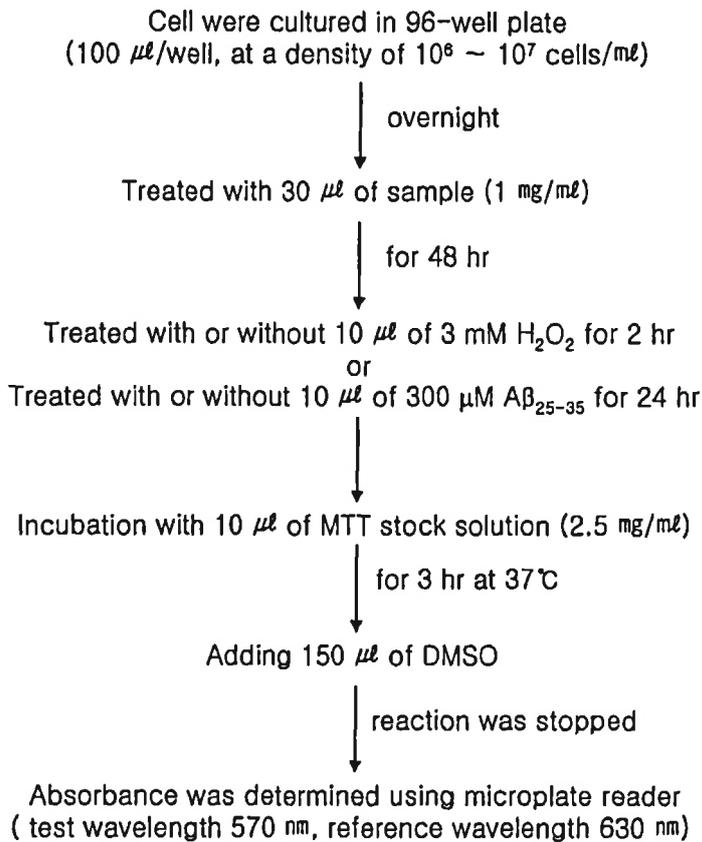
13: ***Gardenia jasminoides***, 14: *Poncirus trifoliata*, 15: *Rosa rugosa*,

16: ***Rosa laevigata***, 17: *Benincasa cerifera* Savi.,

18: ***Sasamorpha purpurascens Nakaki* var. *borealis Nakaki***

나. 선정된 뇌세포 손상 보호물질의 cytotoxicity test

선정된 시료를 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] cytotoxicity test (Scheme 3-1-4) 방법으로 cell 독성을 검사하였고 그 결과 독성이 없음을 확인하였다(Figs. 3-1-2, 3-1-3). 선정 시료들 중 가장 안정적인 보호효과를 보인 금앵자를 최종 시료로 선정하였다.



Scheme 3-1-4. Assessment of cell viability by MTT reduction assay

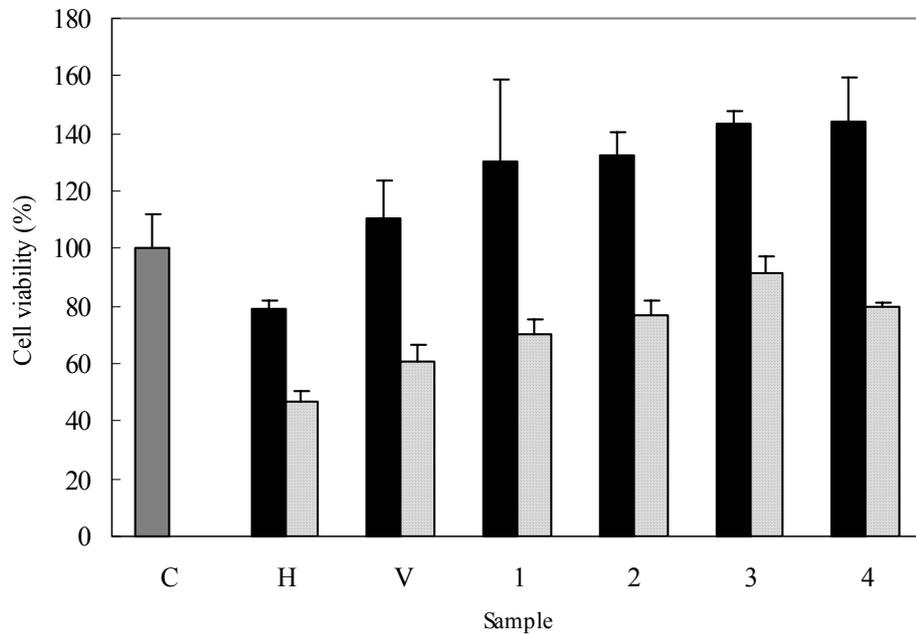


Fig. 3-1-2. Protective effect of the plant extracts against hydrogen peroxide-induced cell death.

Group C was untreated control cultures. Group H was treated with H₂O₂ (■: 100 μM, ■: 200 μM). Group V was pre-incubated with 100 μM Vit C for 48 hr before H₂O₂ treatment. Sample groups were pre-incubated with sample (30 μl, 1 mg/ml) for 48 hr before H₂O₂ treatment. Data represent the mean (n=4)±S.D.

1: *Chrysanthemum morifolium*, 2: *Gardenia jasminoides*, 3: *Rosa laevigata*,
 4: *Sasamorpha purpurascens* Nakaki var. *borealis* Nakaki

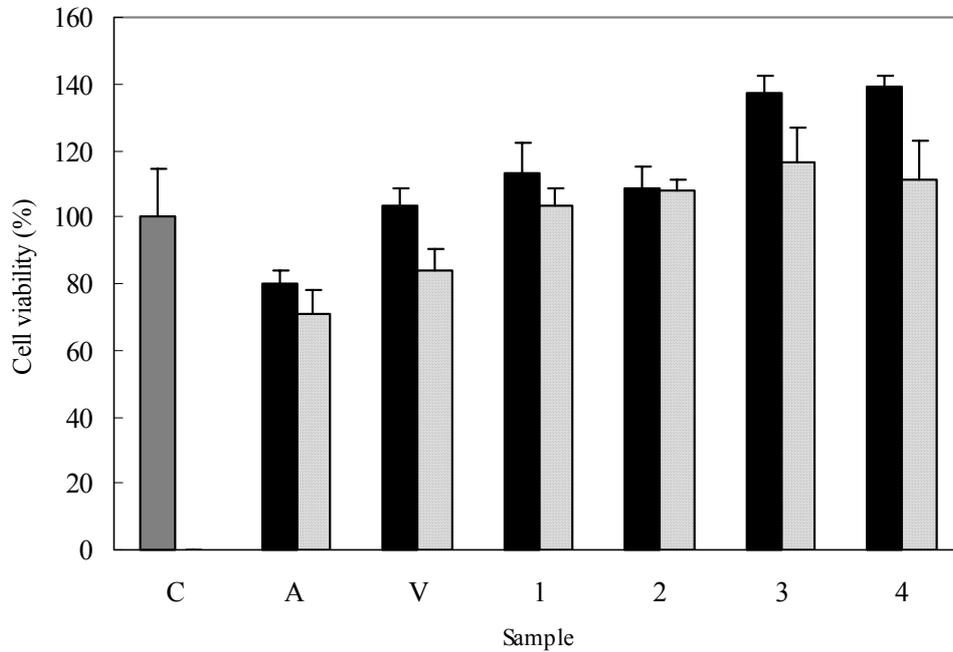


Fig. 3-1-3 Protective effect of the plant extracts against A β -induced cell death.

Group C was untreated control cultures. Group A was treated with A β (■: 10 μ M, ▨: 20 μ M). Group V was pre-incubated with 100 μ M Vit C for 48 hr before A β treatment. Sample groups were pre-incubated with sample (30 μ l, 1 mg/ml) for 48 hr before A β treatment. Data represent the mean (n=4) \pm S.D.

1: *Chrysanthemum morifolium* (들국화), 2: *Gardenia jasminoides* (치자), 3: *Rosa laevigata* (금앵자), 4: *Sasamorpha purpurascens Nakaki var. borealis Nakaki* (죽즙)

다. *In vivo* assay계의 확립과 최종시료의 *in vivo* 활성 및 독성검사

In vivo behavioral test를 위해 ICR-male mouse를 준비하고 최종선정 시료를 각 group당 dose dependent하게 제공한다. ICR-male mouse는 20-24℃, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photo period chamber에서 사육한다.

1) *In vivo* cytotoxicity test

금앵자(*Rosa laevigata*) 추출물에 대한 methanol 희분을 농도별 (0, 400, 800, 1200 mg/kg)로 하여 독성 실험을 실시한 결과 실험 전·후의 body weight check에서 비정상적인 변화는 발견되지 않았다. 특히 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice의 생존율이 100%였다(Table 3-1-3).

Table 3-1-3. Survival rate of experimental mice

Group	Dose (mg/kg, day)	No. of mice	No. of survival mice	Survival rate (%)
C	-	8	8	100
A	-	8	8	100
R400	400	8	8	100
R800	800	8	8	100
R1200	1200	8	8	100

Group C : Injected with Aβ₄₂₋₁, supplied with water

Group A : Injected with Aβ₁₋₄₂, supplied with water

Group R400 : Injected with Aβ₁₋₄₂, supplied with methanol extract of *Rosa laevigata* (400 mg/kg, day)

Group R800 : Injected with Aβ₁₋₄₂, supplied with methanol extract of *Rosa laevigata* (800 mg/kg, day)

Group R1200 : Injected with Aβ₁₋₄₂, supplied with methanol extract of *Rosa laevigata* (1200 mg/kg, day)

2) Y-maze test

위의 조건처럼 ICR-male mouse는 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 A β 를 I.C.V (intracerebroventricular) injection하여 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시한다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록했다. Mouse를 arm에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

A β 를 주사하지 않은 control group은 A β 를 group에 비해서 약 15% 이상의 안정된 brain 활성을 나타내었고 400, 800, 1200의 sample 투여 group은 control group의 brain 활성과 비교할 때 거의 같거나 오히려 더 높은 활성을 보였다. 이는 금앵자 sample (*Rosa laevigata*)이 A β 의 효과를 blocking하여 거의 control 수준의 brain 활성으로 회복시키거나 오히려 인지능력의 향상을 가져왔음을 의미한다(Fig. 3-1-4). 그리고 A β 가 신체적인 운동기능의 저하가 아닌 기억학습능력의 저하만을 초래하는 것을 확인하기위해 총 arm 통과횟수를 계산한 결과 group 간의 차이는 없었다(Fig. 3-1-5).

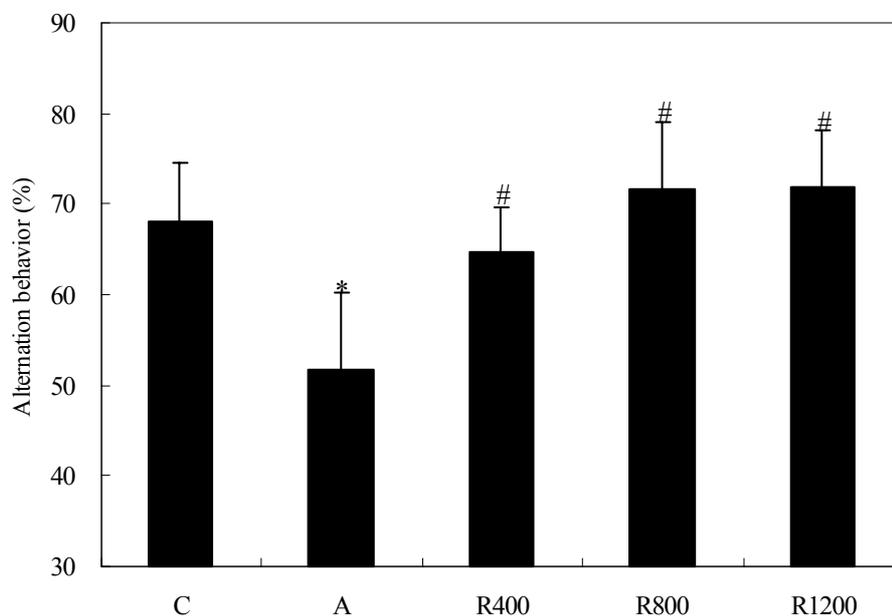


Fig. 3-1-4. Protective effects of *Rosa laevigata* extract against spontaneous alternation behavior.

Group C was injected with $A\beta_{1-42}$. Group A was injected with 410 pmol of $A\beta_{1-42}$ per mouse. And sample groups (R400, R800, R1200) were injected with $A\beta_{1-42}$ after supplied with methanol extract of *Rosa laevigata* (400 mg/kg, 800 mg/kg, 1200 mg/kg per day). Spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min. Values indicate mean ($n=8$) \pm S.D. * $P<0.01$ vs Control group, # $P<0.01$ vs $A\beta_{1-42}$ group.

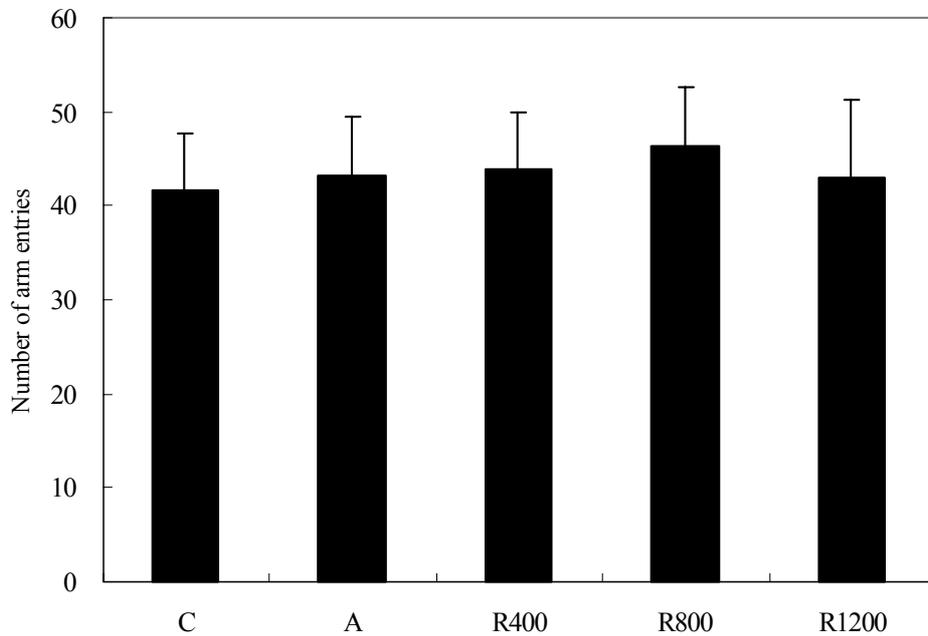


Fig. 3-1-5. The number of arm entries in the Y-maze test.

Group C was injected with A β_{1-42} . Group A was injected with 410 pmol of A β_{1-42} per mouse. And sample groups (R400, R800, R1200) were injected with A β_{1-42} after supplied with methanol extract of *Rosa laevigata* (400 mg/kg, 800 mg/kg, 1200 mg/kg per day). The number of arm entries was measured during 8 min. And the number of arm entries did not change ($P < 0.01$). Values indicate mean ($n=8$) \pm S.D.

3) Passive avoidance test

위의 조건처럼 ICR-male mouse는 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 A β 를 각각 test 전에 I.C.V injection 하여 기억력 실험을 실시한다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 training을 시킨 다음 행동실험을 실시한다. 모든 mice를 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련(명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다.

A β 를 주사하지 않은 control group은 A β group에 비해서 약 120 sec 정도의 안정된 기억학습능력을 나타내었고 400 sample 투여 group은 A β 의 기억학습능력 저해를 극복시키거나 보완/예방하지 못하였다. 하지만 800, 1200 group은 control group의 학습능력 활성과 비교할 때 control group과 거의 같거나 상회하는 인지능력의 회복을 보여주었다. 이는 금앵자(*Rosa laevigata*) sample이 A β 의 기억학습능력 저해 효과 (인지능력과 학습능력의 상실유도)를 blocking하여 control group이 보여주는 인지 능력을 나타내어줌으로써 뇌세포 신호전달을 정상적으로 보호/회복시켜줌을 확인하였다(Fig. 3-1-6).

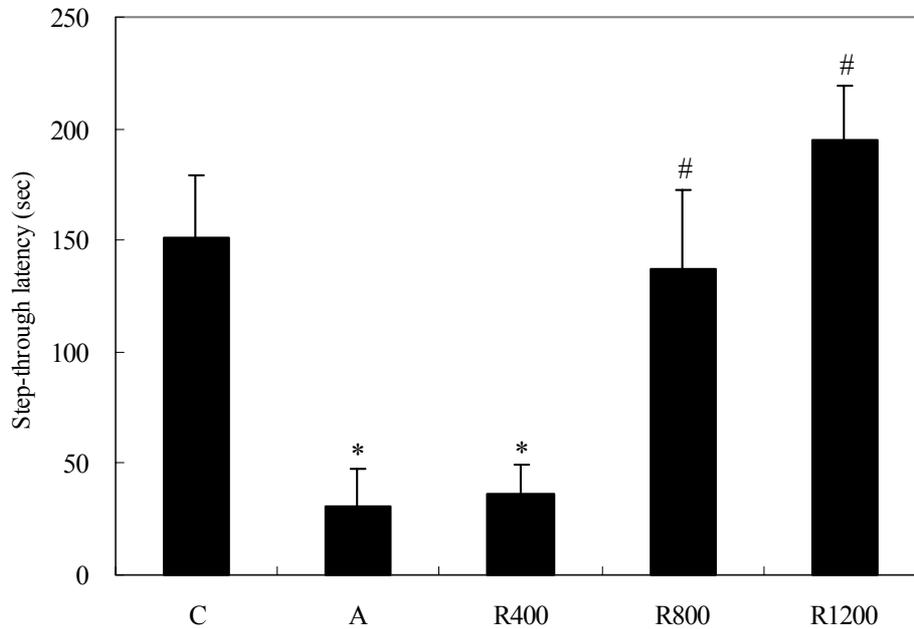


Fig. 3-1-6. Protective effect of *Rosa laevigata* extract against step-through latency in the passive avoidance test.

Group C was injected with $A\beta_{1-42}$. Group A was injected with 410 pmol of $A\beta_{1-42}$ per mouse. And sample groups (R400, R800, R1200) were injected with $A\beta_{1-42}$ after supplied with methanol extract of *Rosa laevigata* (400 mg/kg, 800 mg/kg, 1200 mg/kg per day). The step-through latency was measured during 300 sec. Values indicate mean ($n=8$) \pm S.D. * $P<0.01$ us Control group, # $P<0.01$ us $A\beta_{1-42}$ group.

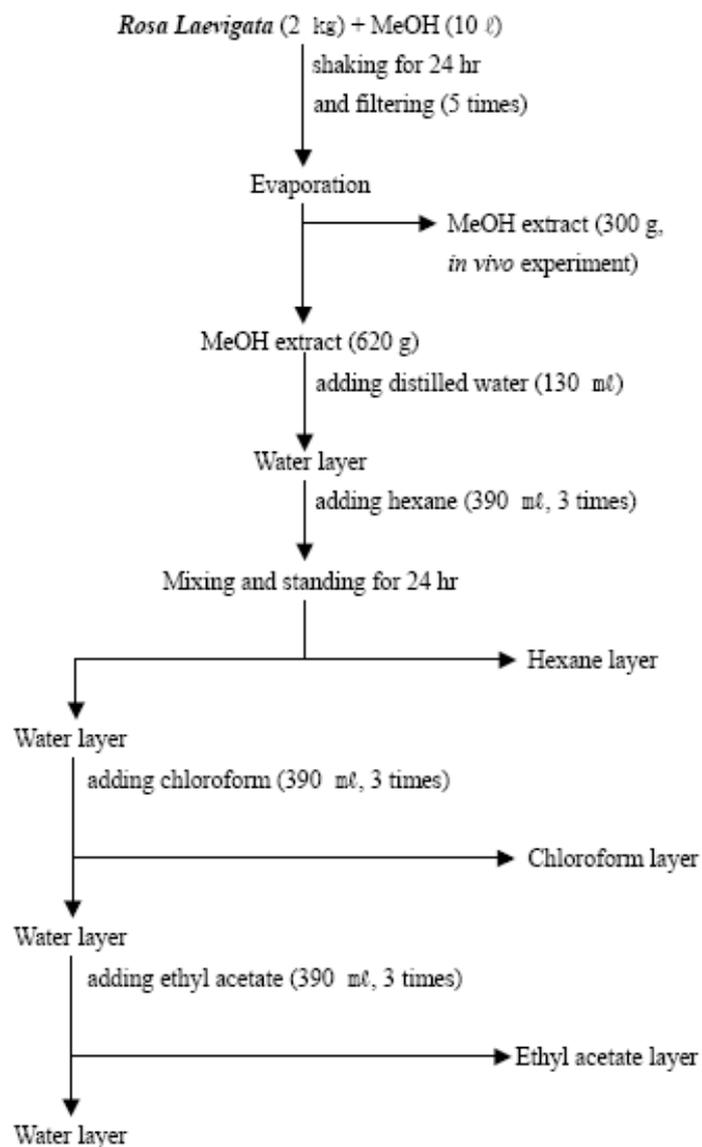
라. 선정된 뇌신경 세포 보호물질의 추출 및 정제

1) 활성 phytochemicals의 추출 및 정제

선정된 금앵자 (*Rosa laevigata*)를 Scheme 3-1-5에 따라 추출을 실시하여 저해 활성을 확인하였다(Fig. 3-1-7). 저해 활성이 높게 나온 부분을 가지고 open silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH)을 시행하여 11개의 소분획 (CHCl₃:MeOH = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)으로 분획 하였다. 각각의 분획을 A β -induced oxidative stress 저해 활성을 측정하여 그 중 저해 활성이 높은 80:20 획분을 선정하여 분리하였다 (Fig. 3-1-8).

선정된 획분을 preparative silica-gel plate (glass, 100 × 200 mm)를 사용하여 thin layer chromatography (TLC)를 실시하였다. 선정 획분을 3 × 10⁵ mg/ml 농도로 methanol에 녹인 후 0.5 μ l씩 4회 spotting하여 건조시킨 후 chloroform과 methanol (80:20, v/v)으로 전개시킨 후 저해 활성을 측정하여 band를 분리하였다(Fig. 3-1-9).

분리된 활성 band를 Waters 2690 HPLC와 Waters μ -bondapack C₁₈ revers phase (3.9 × 300 mm) column을 사용하여 활성 물질을 분리하였다(Fig. 3-1-10).



Scheme 3-1-5. Solvent partition of methanol extract from *Rosa laevigata*

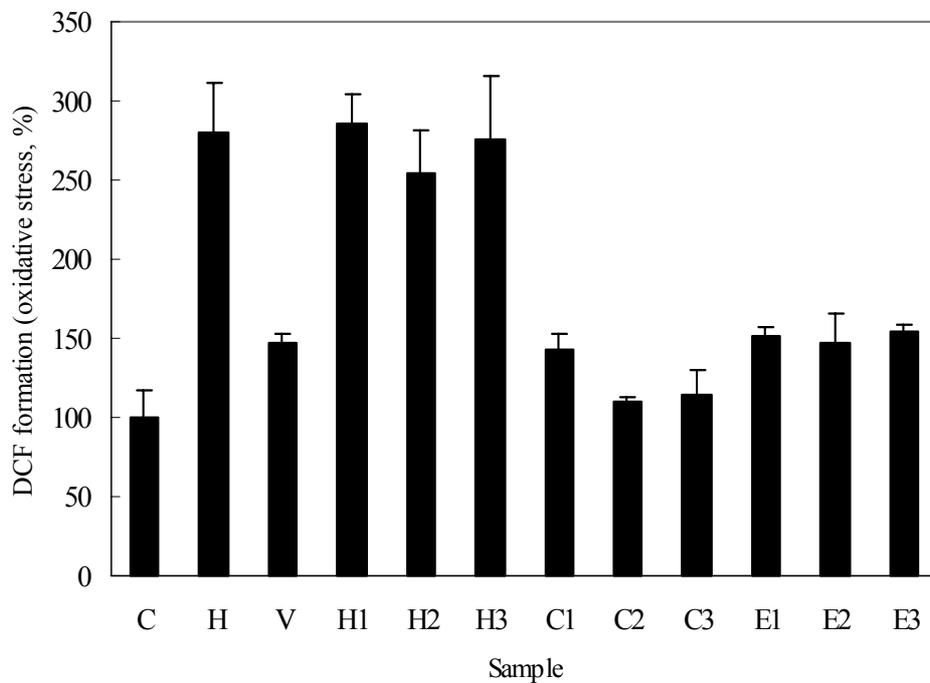


Fig. 3-1-7. Protective effect of solvent-partitioned *Rosa laevigata* extract against oxidative stress.

Group C was untreated control cultures. Group H was treated with 100 μ M H_2O_2 . Group V was pre-incubated with 100 μ M Vit C for 48 hr before H_2O_2 treatment. Sample groups (H1 ~ H3: hexane fractions, C1 ~ C3: chloroform fractions, E1 ~ E3: ethyl acetate fractions) were pre-incubated with sample (20 μ l, 1 mg/ml) for 48 hr before H_2O_2 treatment. Data represent the mean (n=4) \pm S.D.

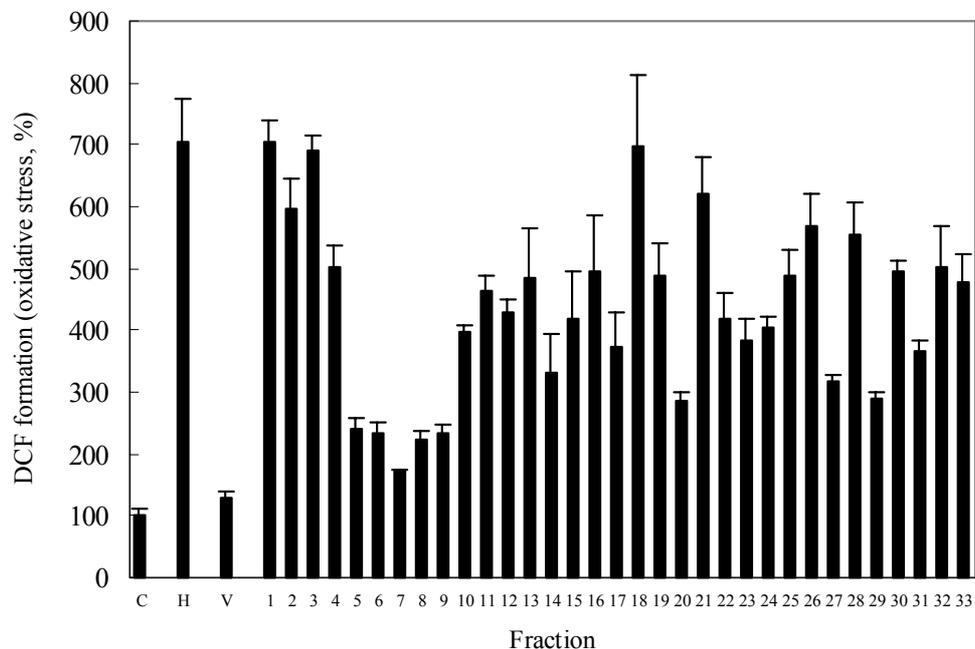


Fig. 3-1-8. Protective effect of *Rosa laevigata* extract against oxidative stress by the silica-gel open column chromatography fraction.

Group C was untreated control cultures. Group H was treated with 100 μM H_2O_2 . Group V was pre-incubated with 100 μM Vit C for 48 hr before H_2O_2 treatment. Sample groups (fractions 1 ~ 33) were pre-incubated with sample (20 μl , 1 mg/ml) for 48 hr before H_2O_2 treatment. The fraction was separated by stepwise gradient consisting chloroform and methanol (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100, respectively, repeated 3 times). Data represent the mean (n=4) \pm S.D.

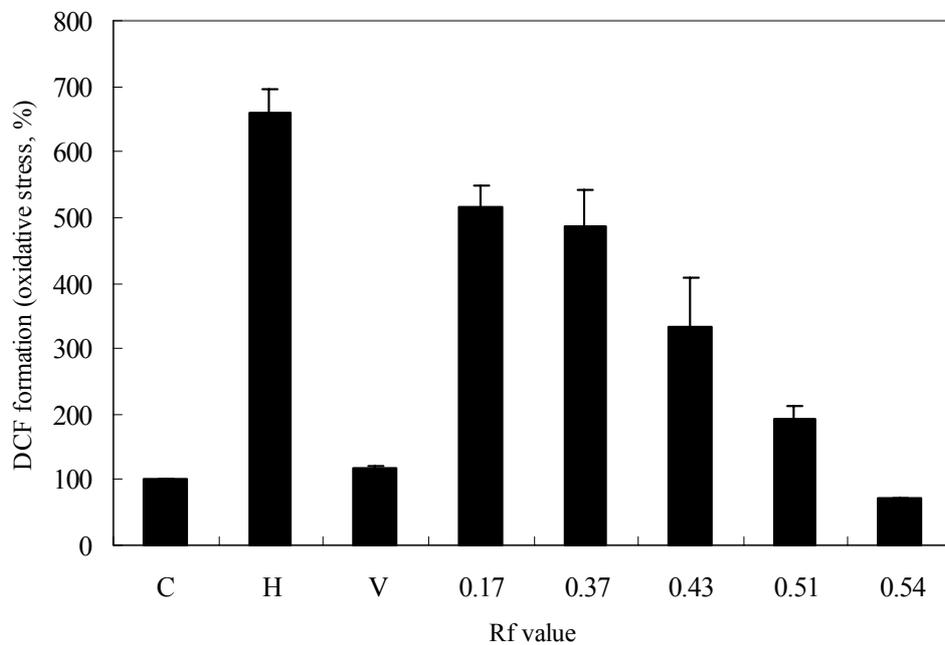


Fig. 3-1-9. Protective effect of *Rosa laevigata* extract separated by TLC against oxidative stress.

Group C was untreated control cultures. Group H was treated with 100 μM H_2O_2 . Group V was pre-incubated with 100 μM Vit C for 48 hr before H_2O_2 treatment. Sample groups were pre-incubated with sample (20 μl , 1 mg/ml) for 48 hr before H_2O_2 treatment. The fifth band (R_f value 0.54) exhibited the highest protective activity. Data represent the mean (n=4) \pm S.D.

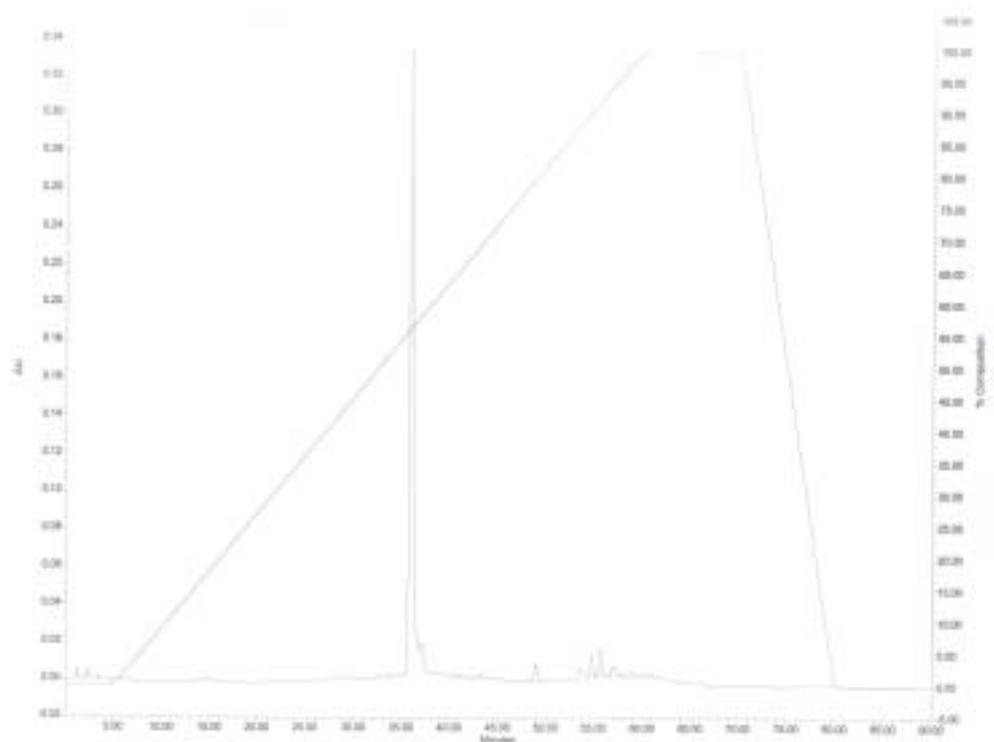


Fig. 3-1-10. Isolation and purification of *Rosa laevigata* extract by HPLC.

The data were collected over the range 200 ~ 800 nm and detection was performed at 317.6 nm. A significant single peak was measured at 35 min. C₁₈ μ -bondapak reverse column: 3.9×300 mm, mobile phase: 55 min gradient of 0 ~ 100% methanol in water, flow rate: 1 ml/min, detector: PDA, injection volume was 10 μ l (20 mg/ml).

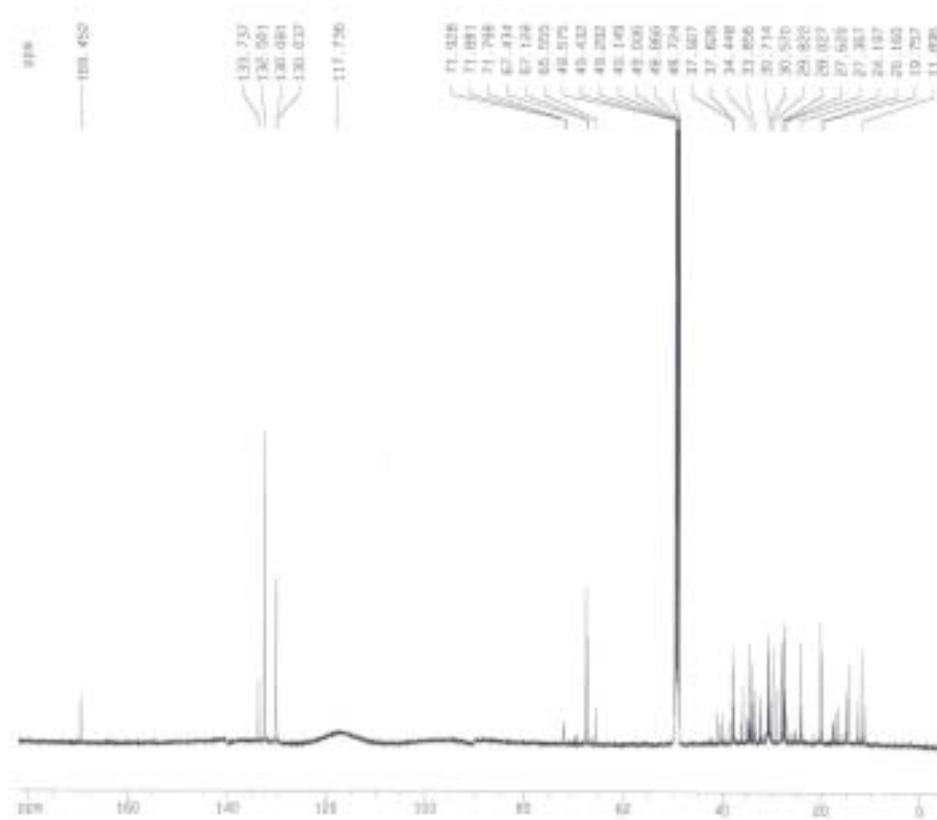


Fig. 3-1-12 . ^{13}C -NMR spectrum of active component from *Rosa laevigata*.

Sample was dissolved in MeOD (methyl- d_3 alcohol- d_1) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German) operating at 600 MHz and 25°C.

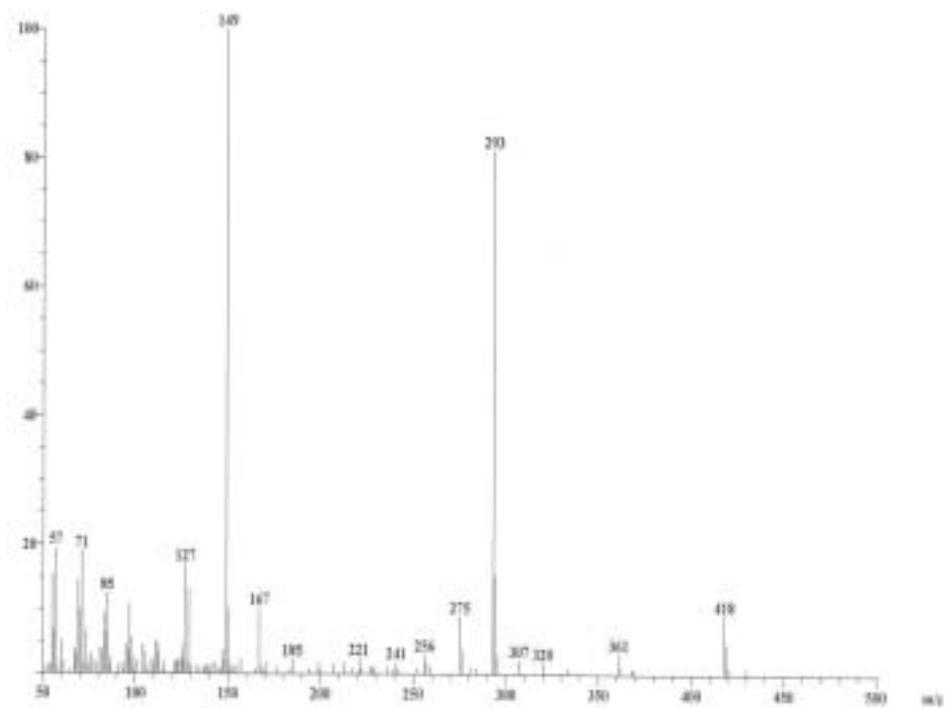


Fig. 3-1-13. EI-MS spectrum of active component from *Rosa laevigata*. The spectrum was recorded on positive ion EI mass spectrometer (JMS AX505WA, JEOL, Japan).

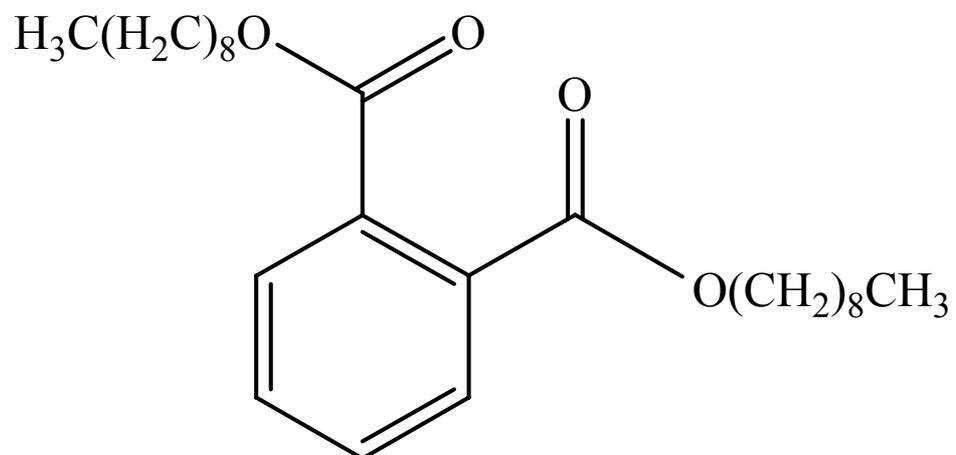


Fig. 3-1-14. Supposed structure of protector against A β -induced oxidative stress.

In current study, the protector is guessed as the dinonyl phthalate. The 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester has a benzene ring and two ester group.

제 2절 아세틸콜린 생성촉진을 위한 합성효소 활성화 물질의 소재화의 내용 및 결과

1. 서설

고도의 경제성장과 함께 현대 사회는 복지수준 및 의료 기술의 향상으로 인해 사람들의 평균수명이 점차 늘어가고 있으며 이에 따라 노인성 질환에 대한 관심, 특히 치매에 대한 관심이 증가되고 있다. 실제로 치매의 발병률은 60세 이상에서 증가되는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서 뿐만 아니라 미국, 일본, 중국 등지에서도 그 발병율과 그에 따른 사망률은 해마다 증가되어 그에 따른 크나 큰 사회적 문제를 일으키고 있다. 치매의 형태는 다양한데 50%는 알츠하이머병 치매, 20~30%는 혈관성 치매, 그리고 나머지는 알코올성 치매와 파킨슨병 치매 등이 있으며 그 중 15~20%는 알츠하이머와 혈관성 치매를 동시에 앓고 있는 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)은 대부분 치매의 일반적 형태이며 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 노령화가 되고 있는 현대사회에서 최대의 질환일 뿐만 아니라 21세기에 당면할 심각한 문제가 될 것으로 예상된다. 치매는 초기에 건망증으로 시작해서 기억력, 추상적 사고력, 창의력의 상실, 판단력의 저하 등이 점차적으로 일어나며 시간 감각과 방향감각의 상실까지 일어나 결국엔 일상적인 생활을 할 수 없게 되고 결국엔 죽음에 이르게 된다. 알츠하이머병의 원인은 여러 연구의 진행이 있었음에도 불구하고 아직까지 정확하게 밝혀진 바가 없으며 단지 신경전달물질인 acetyl choline의 수준을 높이는 것으로 대부분 치료의 목적을 두고 있다. Acetylcholine의 생성을 직접적으로 활성화 시켜주는 인자가 choline acetyltransferase (ChAT)로 알려져 있는데 이것은 뇌의 전두엽의 cholinergic neuron에 존재한다. 뇌의 전두엽 (basal forebrain)은 cholinergic neuron을 상당수 포함하고 있고, 이 부위에 있는 cholinergic neuron이 인지능력을 관장하고 있는 것으로 보인다. 노인성 치매환자에 있어서 ChAT의 양은 급격히 감소되는 것을 볼 수 있고, ChAT의 활성도 감소되어 acetylcholine의 농도가 낮아진다. ChAT는 신경의 pre-synaptic 부분에서 choline과 acetyl-CoA로부터 acetylcholine을 생성하는 효소로 활성을 증진시켜주기 위해 신경 성장인자 (nerve growth factor, NGF)나 신경영양물질 (neurotrophin)을 투여하기 위한 연구도 진행 중이지만, 이는 drug delivery에서 문제점을 갖고 있다. 인간의 두뇌는 강력한 뇌막 (blood brain-barrier)으로 보호를 받고 있고, 이 막은 특정물질에 대한 선택성을 보이기 때문에 생리적으로 단백질과 지방과 같은 큰 분자량을 갖는 물질의 투과가 쉽지 않다. ChEIs와는 달리, 환자의 인지 능을 향상시켜 주기 위한 ChAT activator로 보고된 FDA 승인 약품은 아직 없으나 최근 일본 Kitasato 연구소에서 한약재로부터 NGF-like

factor를 찾아냈고, 이 물질이 ChAT 활성을 증진시킨다는 보고가 있었다.

본 연구에 사용한 칩 (*Pueraria thunbergiana*)는 콩과에 딸린 여러해살이 덩굴나무로 우리나라 각지의 산 양지쪽이나 골짜기 같은데 흔히 자란다. 칩은 약 70%가 물로 되어 있으나 그 밖에 당분, 섬유질, 단백질, 철분, 인, 비타민 등이 골고루 들어 있으며 다이드제인, 다이드진 등 열을 내리고 머리 아픈 것을 낮게 하며 혈압을 낮추는 성분이 들어 있다. 칩의 어린 순은 '갈용'이라 하여 몸의 원기를 돋우는 약으로 쓰이기도 하며 칩뿌리는 감기, 두통, 협심증, 갈증이 나는데, 당뇨병, 설사, 이질 등에 약으로 쓰인다, 또한 칩꽃은 열을 내리고 가래를 잘 나오게 하면 술독을 푸는데 쓰인다. 이 밖에도, 동의보감에 명시된 칩의 약성은 '풍한으로 머리 아픈 것을 낮게 하고 술독을 풀어주며 입맛으로 좋게 하고 소화를 잘되게 하며 허해서 나는 갈증에 아주 좋다.' 라고 되어 있으며 그 밖에도 부종 및 황달, 고혈압 등에도 효과가 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 자연식용식물자원이 추출물에 대하여 choline acetyltransferase (ChAT) 활성 검색과정에서 가장 높은 활성을 보인 칩 (*Pueraria thunbergiana*)의 methanol 추출물로부터 활성물질은 분리하여 그것의 ChAT 활성 효과와 인지력 향상 효과를 조사하고 아울러 그 구조적 특징을 조사하여 산업화 하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

가. 재료

본 실험에 사용한 시료들은 서울 경동시장에서 직접 구입하였다. Choline acetyltransferase 활성도를 측정하기 위해 choline chloride와 eserinhemisulfate, sodium tetraphenylborate, toluene은 Sigma 제품을 사용하였으며, acetyl coenzyme A [acetyl-1-¹⁴C]는 NEN (Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Aquasol은 Packard(CT, USA)에서 구입하였으며 cell culture를 위하여 minimum essential medium과 FBS (fetal bovine serum), Trypsin-EDTA, Penicillin-Streptomycin은 Gibco-BRLTM (Gaithersburg, MD, USA)제품을 사용하였다. 시료의 분석을 위해 Analytical HPLC column은 μ -bondapack C₁₈ reverse phase (3.9 × 300mm)를 Waters Co. (Miliford MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 인지능력 실험을 위해 ICR mouse를 샘타코에서 분양받아 사용하였다. 그 밖의 분석에 사용한 시약은 모두 특급 수준의 시약을 사용하였다.

나. 실험 방법

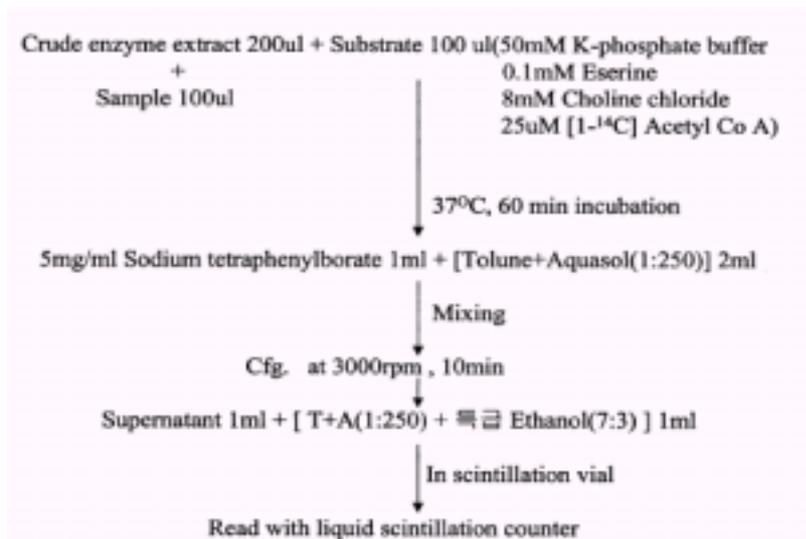
1) 아세틸콜린 합성효소 활성화 물질의 검색시료 제조

자연 식용식물자원을 세부과제 1과 같이 계통추출 하였다. 구입한 시료를 파쇄한 재료와 파쇄하지 않은 재료로 구분하여 위의 추출 방법에 따라 100°C에서 5분간 끓여서 효소 활성을 실험 시키고 분쇄한 후 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상등액을 동결건조 하여 Fr. I의 시료를 조제하였다. 침전물은 건조시킨 후 연속적으로 hexan, methanol, ethyl acetate 순으로 환류추출 한 뒤 각각의 상등액을 농축, 동결건조 하여 Fr. II, III, IV을 얻었다.

2) 아세틸콜린 합성효소 활성화효과 측정

가) 아세틸콜린 합성효소 활성화도 측정을 위한 *in vitro* assay 기 확립

MC-IXC cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 MEM 배지에서 배양하여 세포 수가 10^7 - 10^8 cell/ml가 되었을 때 cell lysis buffer를 이용하여 세포로부터 choline acetyltransferase (ChAT)를 조제한다. Enzyme의 농도는 Bradford 법을 이용하여 측정한다. 10,000 x g에서 원심분리 하여 얻은 crude enzyme (ChAT)와 기질용액 (50 mM Potassium phosphate buffer, 0.1 mM Eserine, 8 mM Choline chloride)과 25 μ M [1 - 14 C]Acetyl Co A를 넣고 반응시킨 후 toluene과 Aquasol의 cocktail용액을 넣고 반응 정지시켜서 그 상등액을 liquid scintillation counter를 이용하여 측정한다(Scheme 3-2-1).



Scheme 3-2-1. ChAT assay for screening.

나) 용매별 추출 회분에서의 아세틸콜린 합성효소 활성화 성분 검색

위에서 확립한 1차 assay계를 이용하여 활성을 검색한다. 상기에서 추출한 각각의 회분을 1 mg/ml의 시료로 만든 후 그 중 100 μ l (250 μ g/ml)을 기질, enzyme과 함께 넣어 반응 시켜 그 활성을 측정한다.

다) 아세틸콜린 합성효소 활성화 성분의 2차 검색 방법

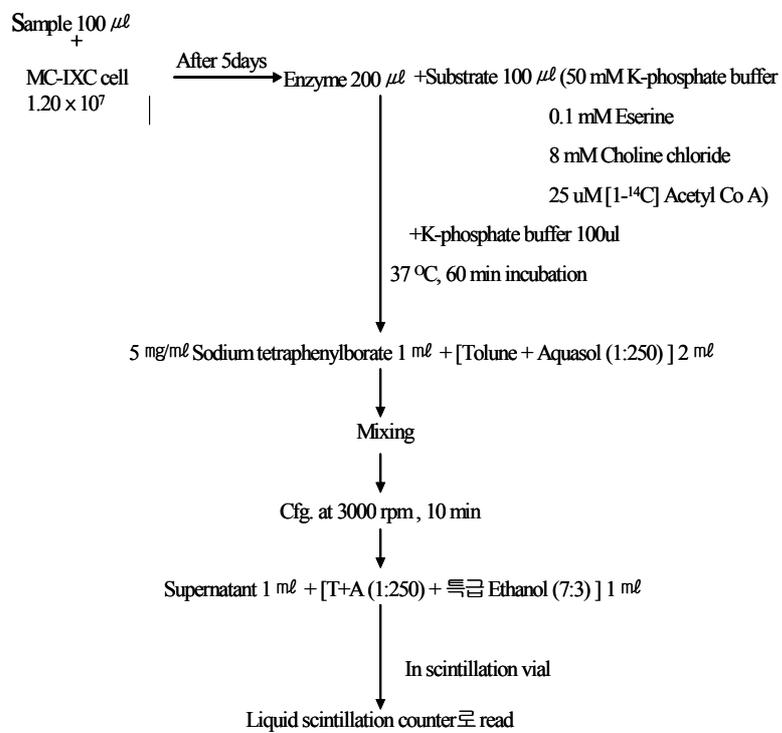
MC-IXC cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 MEM 배지에서 배양하여 세포수가 10^6 - 10^7 cell/ml가 되었을 때 추출한 sample을 첨가한다. 3일 경과 후 cell lysis buffer를 이용하여 cell로부터 choline acetyltransferase (ChAT)를 조제한다. 10,000 x g에서 원심분리 하여 얻은 ChAT를 Bradford assay 법을 이용하여 단백질 정량을 한 후 기질용액(8 mM choline chloride) 90 μ l와 25 μ M [14 C] acetyl CoA를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 incubation시킨다. 생성된 acetylcholine을 5 mg/ml sodium tetraphenyl borate와 Toluene+Aquasol solution으로 처리 한 후 3,000 rpm에서 원심분리 하여 상층액을 취하고 이를 liquid scintillation counter로 측정한다(Scheme 3-2-2).

* **활성도(%)**

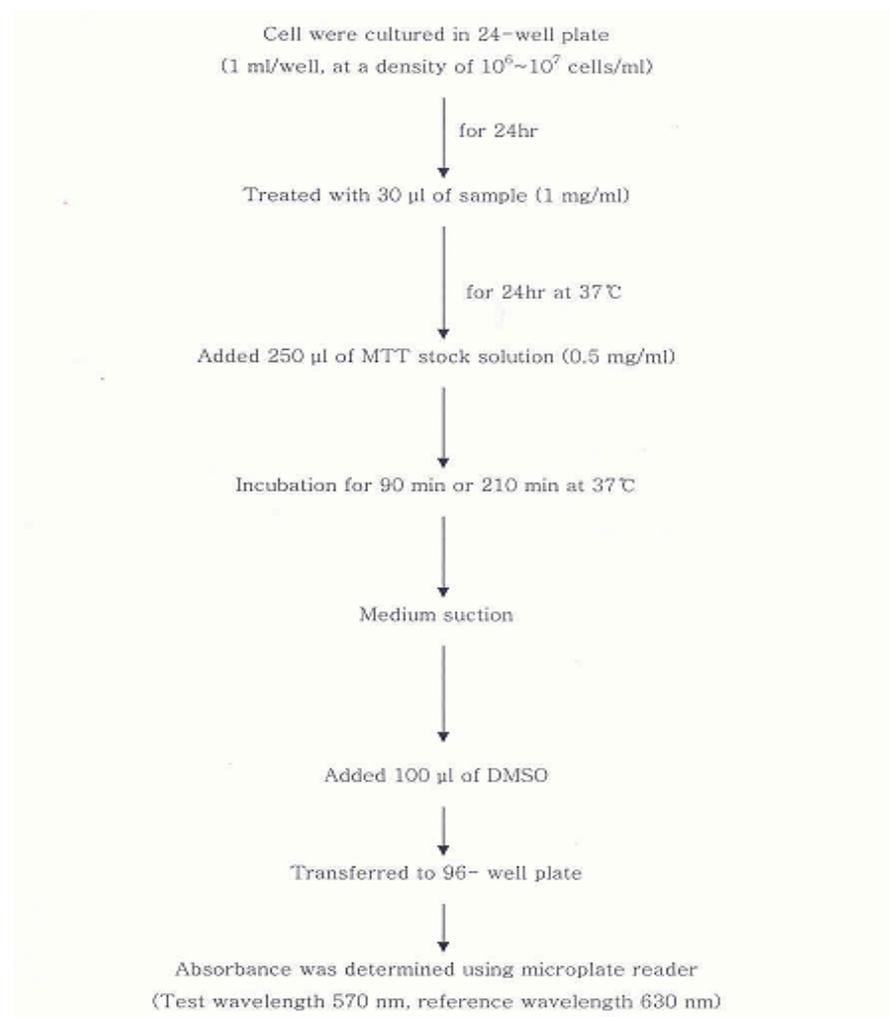
$$= \{(\text{sample reaction}-\text{enzyme reaction})/(\text{enzyme reaction})\} \times 100$$

라) *In vitro* cytotoxicity

위의 1, 2차 screening을 통해서 선정된 시료를 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 등과 같은 cytotoxicity test 방법으로 cell 독성을 검사한다. 상기 독성검사를 끝으로 *in vitro* 최대 활성, 유효효능 및 무독성을 보인 시료를 각 과제별 최종시료로 선정하여 *in vitro*, *vivo* test를 진행한다(Scheme 3-2-3).



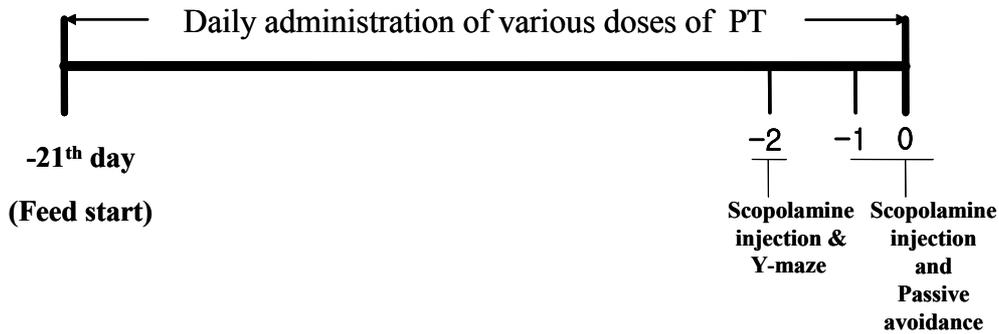
Scheme 3-2-2. ChAT assay for second screening



Scheme 3-2-3. Assessment of cell viability by MTT reduction assay

3) *In vivo assay*계의 확립과 최종시료의 *in vivo* 활성 및 독성 검사

실험동물로 ICR mouse (5주령)를 샘타코에서 구입하여 사용하였다. 실험동물을 2일간 적응시킨 후 최종 시료의 조시료를 0.15%, 0.32%, 0.53%로 물에 녹여서 각 group당 준비된 10마리의 mouse에 3주간 급여 하였다. Mice는 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photo-period chamber에서 food and water를 *ad lib.* 의 상태로 공급하였다(Scheme 3-2-4).



Scheme 3-2-4. Experimental schedules for pre-treatment for 3 weeks various doses of *Pueraria thunbergiana* (PT)

가) Y-maze test

치매 유발 물질로 scopolamine (1.0 mg/kg) 100 μ l을 대조군과 실험군에 주사하여 일시적인 memory impairment를 유도 한 다음 30 분 후 실험을 실시한다. 정상군은 scopolamine 대신에 sodium chloride 0.85% (W/V)를 주사하였다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms을 기록했다. Mouse를 arm에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

나) Passive avoidance test

모든 mice를 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련 (명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다. 실험 당일 scopolamine (1.0 mg/kg) 100 μ l을 복강 주사하여 memory impairment을 유도한 다음 30 분 후 test를 실시하여 암실로 들어가는 시간 (step through latency)을 측정한다. 대조군은 정상 사육한 다음, 시험당일 sodium chloride 0.85% (w/v)를 주사한다.

다) *In vivo* 상의 독성검사

독성 여부를 보기 위해 몸무게의 변화와 간 독성을 측정하였다.

(가) 급성 독성과 몸무게의 변화

급성독성을 보기위해 생존율(%)과 몸무게의 변화를 보았다.

(나) GOT (glutamic oxaloacetate transaminase) 및 GPT (glutamic pyruvate transaminase) 활성도

간 독성을 보기위해 GOT, GPT kit을 이용하여 혈청에서 검사하였다. 각각의 기질을 1 ml 씩 시험관에 넣고 37°C 수조에서 가온한 후 혈청 0.2 ml씩 넣은 후 GOT의 경우 60 분, GPT의 경우 30 분간 반응시킨 다음 발색액 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 1.0 ml 씩 넣고 실온에서 20 분간 반응시킨 후 0.4 N-NaOH을 10.0 ml씩 넣어 반응을 중지 시켰다. 반응 중지 30 분 후에 505 nm 에서 측정하고 여기서 얻은 검량 곡선을 이용하여 효소의 활성단위로 환산하였다.

4) 칩(*Pueraria thunbergiana*)으로부터 아세틸콜린 합성효소 활성물질의 정제 및 구조 분석

가) Choline acetyltransferase 활성물질의 분리

선정된 칩 (*Pueraria thunbergiana*)을 곱게 마쇄 한 후 methanol을 무게의 5 배 부피로 상온에서 5일간 정치시키면서 2회 추출한 후 감압 농축하여 칩 methanol 추출물을 조제하였다. 추출된 crude methanolic extract는 극성도에 따라 solvent partitioning을 실시하여 ChAT 활성을 확인하였다. 활성이 높게 나온 부분을 가지고 open silica gel column chromatography (chloroform : methanol) 을 시행하여 11개의 소분획(CHCl₃:MeOH = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)으로 분획 하였다. 각각의 분획을 가지고 활성을 측정하여 그 중 활성이 높은 획분을 선정하여 2차 open silica gel column chromatography (chloroform : methanol) 시행하여 8개의 획분 (CHCl₃:MeOH = 100:0, 96:4, 92:8, 90:10, 88:12, 85:15, 80:20, 0:100)으로 나누고 그 중 활성이 가장 높은 획분을 분리하였다.

나) HPLC에 의한 칩 (*Pueraria thunbergiana*)의 ChAT 활성물질 분리

Waters 2690 HPLC와 Waters μ -bondapack C₁₈ revers phase (3.9 × 300 mm) column을 사용하였다. 0-100%의 methanol과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 80분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는

분당 1.0 ml로 하였으며 한번에 20 μ l씩 시료 주입을 하였다. 사용 용매는 특급 methanol과 3차 증류수를 사용하였다(Table 3-2-1).

Table 3-2-1. Condition of the analytical HPLC for purification of ChAT activator from *Pueraria thunbergiana*

Instrument	Waters 2690
Detector	Waters 996 (PDA:photodiode array detector)
Column	μ -bondapak C18 (reverse phase, 3.9 \times 300 mm)
Flow rate	1.0 ml/min
Mobile phase	0 %~100 % Methanol (gradient elution)
Injection volume	0.02 ml

다) 활성 물질의 NMR 및 EI mass 분석

HPLC에서 정제된 물질과 내부 기준 물질 (daidzein)을 $^1\text{H-NMR}$ (600MHz)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (MHz) (Brucker German, Advace-600)를 이용하여 측정하였으며, 정제된 물질을 Electronic ionization (EI) mass (JEOL, JMS-AX505WA)를 이용하여 그 구조와 mass size를 보았다.

3. 결 과

가. 자연 식물자원으로부터의 아세틸콜린 합성효소 활성 검색

1) 아세틸콜린 합성효소 활성성분의 assay계 확립

노인성 치매에 있어서 신경전달 물질인 acetylcholine을 합성시켜 주며 뇌기능을 유지시켜 주는 효소로 보고되어 있는 choline acetyltransferase를 활성화시키는 물질의 assay계를 neuroblastoma cell line (MC-IXC) 과 radioisotope ($[\text{C}^{14}]$ -acetyl Co-A)를 이용하여 Scheme 3-2-1 같이 확립했다.

2) 아세틸콜린 합성효소 활성물질의 검색 및 선정

자연 식용식물자원을 이용하여 확립한 assay계에 적용하여 냉수 추출 획분 (Fr. I), hexane 추출 획분 (Fr. II), methanol 추출 획분 (Fr. III) 및 열수 추출 획분 (Fr. IV)을 대상으로 검색한 결과 구기자(*Lycium chinense*), 칩(*Pueraria thunbergiana*), 탕자(*Poncirus trifoliata*)에서 각각 32.8%, 46%, 25.8%의 활성을 보였다(Table 3-2-2). 대부분의 활성은 주로 methanol 추출물에서 높게 나타났으며 열수 및 냉수 추출물에서는 활성이 낮거나 거의 나타나지 않았다. 1차 활성검색 시 높은 활성을 보인 시료들을 대상으로 2차 활성검색을 실시한 결과, Table

3-2-3에 나타난 것처럼 예서의 칩의 methanol 추출물이 가장 높은 활성을 가지고 있음이 밝혀졌다. 또한 이들 시료의 cytotoxicity를 측정한 결과 칩이 가장 안전하게 나타났다(Fig. 3-2-1). 그러므로 합성효소의 활성화 효과와 수율 및 안정성을 고루 만족시키는 점을 고려하여 칩을 선정하였다.

Table 3-2-2. Choline acetyltransferase (ChAT) activation effect of the extract from natural edible plants.

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Diospyros kaki</i>	감입차	-	-10.0
<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	감초차	7.4	10.7
<i>Glycine max</i>	검정콩차	-1.5	—
<i>Cassia tora</i>	결명자차	-27.6	-25.0
<i>Lyciumchinense</i>	구기자차	-7	32.8
<i>Capsella bursa-Pastoris</i>	냉이차	18.8	-9.4
<i>Cinamomum camphora</i>	녹차	-	-15.8
<i>Laminaria japonica</i>	다시마차	-	0.5
<i>Astragalus membranaceus</i>	단터섬차(황기)	1.4	3.9
<i>Angelica gigas</i>	당귀차	9.1	3.9
<i>Puerariathunbergiana</i>	취차	-	46.0
<i>Codonosis lanceolata</i>	더덕차	-8.6	9.5
<i>Platycodon grandiflorum</i>	도라지차	20.7	-21.5
<i>Eucommia ulmoides</i>	두충차(껍질)	-22.4	10.3
<i>Eucommia ulmoides</i>	두충차(잎)	-	-2.1
<i>Polygonatum japonicum</i>	둥글레차(잎)	-	—
<i>Polygonatum japonicum</i>	둥글레차(줄기)	-	—
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	들국화차	-	-10.7
<i>Perilla frutescens Var. japonica</i>	들깨차	-	—
<i>Pseudocydonia sinensis</i>	모과차	-	-12.1
<i>Taraxacum platycarpum</i>	민들레차	-	-6.0
<i>Menta arvensis var. japonica</i>	박하차	-	-8.9
<i>Opuntia ficus-indica Mill.</i>	백년초차	-	-5.1
<i>Saboten Makino</i>			
<i>Hordeum vulgare var. hexastichon</i>	보리차	-	—
<i>Eriobotrya japonica</i>	비파잎차	-	-3.3
<i>Morus alba</i>	뽕잎차	-	8.3
<i>Rubus coreanus</i>	산딸기차	-	—
<i>Cornus officinalis</i>	산수유차	-	8.3
<i>Epimedium koreanum</i>	삼지구엽차(음양곽)	12.8	-6.1
<i>Atractylodes japonica</i>	삼주차(창출)	-	11.5
<i>Punica granatum</i>	석류차	-	-28.5

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Zingiber officinale</i>	생강차	-	-
<i>Pinus densiflora</i>	솔잎차	-	3.8
<i>Artemisia asiatica</i>	쑥차	-	-13.7
<i>Nelumbo nucifera</i>	연차	-	-8.8
<i>Schizandra chinensis</i>	오미자차	-	-25
<i>Zea mays</i>	옥수수차	1.9	2.3
<i>Citrus junos</i>	유자차	-	-17.2
<i>Coix lacryma-jobi var. ma-yuen</i>	ؤل무차	-	0.8
<i>Akebia quinata</i>	으름덩굴차	-	10.9
<i>Ginko biloba</i>	은행차	-	-
<i>Panax ginseng</i>	인삼차	-	1.8
<i>Carthamus tinctorius</i>	잇꽃차(홍화)	-	-0.3
<i>Adenophora tryphilla var. japonica</i>	잔대차	-	10.0
<i>Plantago asiatica</i>	질경이차	-	3.9
<i>Gardenia jasminoides</i>	치자차	-	-0.3
<i>Cichorium intybus L.</i>	치커리차	-	0.5
<i>Poncirus trifoliata</i>	탱자차	-	25.8
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	하늘타리차	-	-
<i>Rosa rugosa</i>	해당화차	0.8	-7.9
<i>Helianthus annus</i>	해바라기차	-	9.8
<i>Oryzae sativa</i>	현미차	-	0.4
<i>Juglans sinensis</i>	호도차	-	4.1
<i>Cucurbita moschata</i>	호박차	-	1.3
<i>Triticum aestivum</i>	우리밀차	-13.9	16.0
<i>Achyranthes ascendens</i>	Amaranth	0	14.8
<i>Allium cepa L.</i>	Onion	0	5.1
<i>Allium fistulosum L.</i>	Scallion (thick)	0	16.35
<i>Allium fistulosum L.</i>	Scallion	0	25
<i>Allium fistulosum L.</i>	Scallion (thin)	0	29
<i>Allium fistulosum L.</i>	Scallion (thin young)	0	10.8
<i>Allium monanthum</i>	Wild rocambole	0	1
<i>Allium ouensanense L.</i>		1	15.4
<i>Allium sativum L.</i>	Garlic (young)	3	5.2
<i>Allium sativum L.</i>	Garlic (leaf)	0	0
<i>Allium sativum L.</i>	Garlic (trunk)	4	4.2
<i>Allium sativum L.</i>	Garlic	0	10
<i>Allium tuberosum L.</i>	Leek (leaf)	0	13.7

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Allium tuberosum L.</i>	Leek (trunk)	0	24.1
<i>Allium tuberosum L.</i>	Leek (from China)	0	24
<i>Amaranthus mangostanus L.</i>		0	5
<i>Anethum graveolens L.</i>	Dill seed	0	2
<i>Angelica archangelica L.</i>		0	0
<i>Apium graveolens L.</i>	Celery	0	10
<i>Apium graveolens L.</i>	Celery (seed)	3	22.4
<i>Aralia elata seemann</i>	Japanese anelica tree	0	11
<i>Armoracia rusticana</i>	Horseradish	6	0
<i>Artemisia draccucculus</i>	Tarragon	4	0
<i>Artemisia vulgaris</i>	Mugwort	0	0
<i>Astar scaber</i>	Chwi	0	0
<i>Beta vulgaris</i>	Beet	0	1
<i>Beta vulgaris var.</i>	Swiss chard	0	0
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf	0	0
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf (wild type)	1	1
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf	0	1
<i>Brassica alba</i>	Mustard leaf	3	11.5
<i>Brassica alba</i>	Mustard	2	4.2
<i>Brassica alba</i>	Mustard (trunk)	9	1.8
<i>Brassica oleracea L. botrytis</i>	Cauliflower	0	6.4
<i>Brassica oleracea L. capitata</i>	Cabbage	1	18.1
<i>Brassica oleracea L. var. italica</i>	Broccoli	10	19.3
<i>Brassica oleracea L. var. acephala</i>	Kale	0	1
<i>Brassica oleracea L. var. acephala</i>	Kale (root)	0	4
<i>Brassica rapa</i>	Green vitamin (young)	0	0
<i>Brassica rapa</i>	Green vitamin	0	0
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Pickpurse	0	0
<i>Capsicum annuum L.</i>	Paprika	0	0
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper corn (pink)	0	15.2
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper corn (green)	1	12.3

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (leaf)	0	16
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (seed)	1	23
<i>Capsicum annuum L.</i>	Green bell pepper	4	24.7
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (trunk)	0	19
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pimento (sweet pepper)	0	13
<i>Carum carvi</i>	Caraway	0	13
<i>Chilicon carne</i>	Pepper (hot)	10	13.7
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Crown daisy	1	23.8
<i>Cichorium endivia</i>	Endive	0	6.4
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (root)	11	1
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (leaf)	0	5
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (red)	0	11
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamon	0	0
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriander	0	0
<i>Coriandrum sativum L.</i>	Coriander (Mexico)	0	0
<i>Crocus sativus</i>	Saffron	0	4
<i>Cuminum cyminum</i>	Cummin	0	5
<i>Cymbopogon citrus</i>	Lemon	0	3
<i>Curcuma longa L.</i>	Turmeric	0	17
<i>Cucurbita moschate</i>	Pumpkin leaf	0	25
<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamon	0	16
<i>Eugenia caryophyllate</i>	Clove	0	11.5
<i>Eruca vesicaria</i>	Summer salad	0	14.2
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fennel	0	20.7
<i>Hemerocallis fulva</i>	Kuansh	0	24.6
<i>Illicium verum Hooker</i>	Star anis	0	13
<i>Ipomoea batatas</i>	Sweet potato	1	6.8
<i>Ixeris dentata</i>	Lettuce (green)	2	0
<i>Laurus nobilis</i>	Bay laurel	0	0
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type	7	0
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (leaf)	0	1
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (flower)	1	0
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (young)	2	0
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (old)	1	0
<i>Malva verticillate</i>	Mallow	0	10
<i>Medicago sativus</i>	Alfalfa	0	11.3

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Mentha spp</i>	Mint	0	10.4
<i>Myristica fragrans Houtt</i>	Nutmeg	0	0
<i>Myristica fragrans Houtt</i>	Mace	0	0
<i>Ocimum basilicum L.</i>	Basil	0	0
<i>Oenanthe javanica</i>	Drop wort (wild type)	0	12
<i>Oenanthe javanica</i>	Drop wort	0	16.3
<i>Origanum vulgare L.</i>	Oregano	0	12.7
<i>Papaver somniferum</i>	Poppy seed	0	15.4
<i>Paphanus acanthiformis</i>		4	18.9
<i>Perilla frutescens</i>	Perillae folium (leaf)	8	5
<i>Perilla frutescens</i>	Perillae folium (young leaf)	3	24.3
<i>Perilla frutescens</i>	Perillae folium (green leaf)	11	18.9
<i>Petasites japonicus</i>	Butter bur	0	25.1
<i>Petroselinum crispum</i>	Italian seasoning	0	0
<i>Petroselinum crispum</i>	Parsley (leaf)	0	0
<i>Petroselinum crispum</i>	Parsley	0	1
<i>Physalis francheti</i>	Green young pepper	0	10
<i>Pimenta dioicalis</i>	Allspice	0	12.4
<i>Pimpinella anisum</i>	Anise	4	19.7
<i>Pimpinella brachycarpa</i>	Young	5	18.3
<i>Pimpinella brachycarpa</i>		11	11.5
<i>Piper nigrum L.</i>	Pepper (black)	5	10.8
<i>Piper nigrum L.</i>	Pepper (white)	1	1
<i>Raphanus sativus</i>	Raddish	4	0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	0	0
<i>Salvia officinalis</i>	Sage	0	0
<i>Sedum sarmentosum</i>	Stringy stone crop	0	10.2
<i>Sinapis alba L.</i>	Mustard	0	11.8
<i>Taraxacum officinale L.</i>	Dandelion	0	22.4
<i>Trigonella foenungraecum</i>	Fenugreek	5	25.2

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Valerianella locusta</i>	Corn salad	0	16.8
<i>Vilola diamantica</i>	Butter bur leaf	11	13.2
<i>Wasabia japonica</i>	Wasabia	0	5
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Japanese pepper	0	1
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	0	17.8
<i>Petroselinum crispum</i>	Italian seasoning	0	7.4
<i>Petasites japonicus</i>	Butter bur	0	15.6
<i>Petroselinum crispum</i>	Italian seasoning	0	7.4
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Japanese pepper	0	1
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	0	17.8
<i>Petasites japonicus</i>	Butter bur	0	15.6
<i>Petroselinum crispum</i>	Italian seasoning	0	7.4
<i>Artemisia capillaris</i>	인진쑈	-	22.2
<i>Gymnema sylvestre</i>	김네마	-	16.6
<i>Cuscuta japonica</i> Chois	새삼(seed)	-	-3.9
<i>Euphoria longana</i>	용안육	-	9.5
<i>Althaca rosea</i> Cav.	접시꽃	0	5.4
<i>Malva verticilata</i> L.	아욱(seed)	0	3.4

* ChAT activity (%): The percentage of enzyme activity value for each sample was calculated with the control activity (100%). The final concentration of each sample in assay mixture was 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Table 3-2-3. Second screening for ChAT activity

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Lycium chinense</i>	구기자차	-19	7.9
<i>Pueraria thunbergiana</i>	쑈차	-	12.0
<i>Poncirus trifoliata</i>	탱자차	-	6.2

* The final concentration of each sample in assay mixture was 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

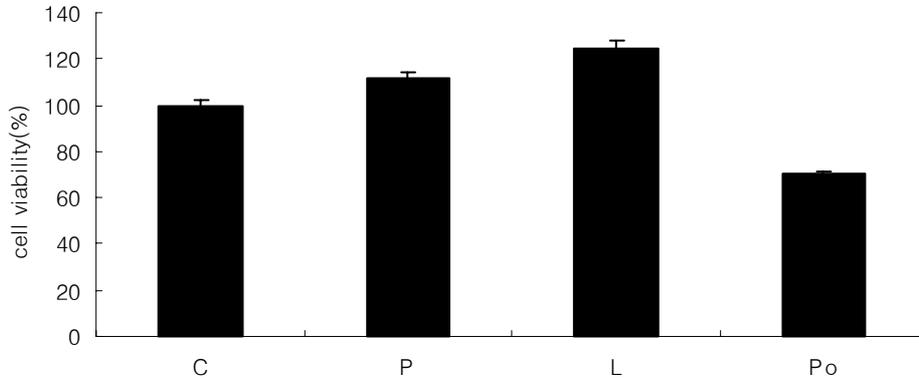


Fig. 3-2-1. Effect of the plant extracts on cell death.

Control was untreated. Sample groups were pre-incubated with sample (30 μ l, 1 mg/ml) for 24 hr. C: control, P: *Pueraria thunbergiana*(쑥), L: *Lycoum chinense*(구기자), Po: *Poncirus trifoliata*(탱자)

나. 아세틸콜린 합성효소 활성 물질의 *in vivo* 실험 및 독성검사

1) 최종 선정된 아세틸콜린 합성효소 활성물질의 *in vivo*상의 독성실험

쑥(*Pueraria thunbergiana*) methanol 추출물을 농도별(0, 100, 500, 1,500 mg/kg)로 하여 독성 실험을 실시한 결과 급성독성 실험 전·후의 body weight 에서 비정상적인 변화는 발견되지 않았다. 특히 농도에 관계없이 각 group의 모든 mouse의 생존율이 100%였고, serum의 GPT (glutamic pyruvate transaminase), GOT (glutamic oxaloacetate transaminase) 변화도 SAS analysis 결과 유의성을 보이지 않음으로서 선정된 sample의 독성은 없는 것으로 확인되었다 (Tables 3-2-4, -5, -6).

Table 3-2-4. Body weight and survival rate of scopolamine-induced mice orally administrated *Pueraria thunbergiana* on acute toxicity.

Group	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No. of mice survived	Survival rate (%)
Control	8	30	31.2 \pm 2.5	8	100
100 mg/kg	8	30	32.0 \pm 2.7	8	100
500 mg/kg	8	30	33.0 \pm 2.7	8	100
1,500 mg/kg	8	26.0 \pm 5.4	31.3 \pm 2.5	8	100

Table 3-2-5. Effect of *Pueraria thunbergiana* methanolic extract on GPT in scopolamine-induced mice for 10 days.

GPT (glutamic pyruvate transaminase) (kunits)	
Control	38 ± 1.20 ^{1)a}
100 mg/kg	42 ± 0.43 ^a
500 mg/kg	39 ± 0.64 ^a
1,500 mg/kg	38 ± 0.54 ^a

¹⁾Values represent the means (n=8) ± S.D.

^{a)}Duncan's multiple range tests of SAS (statistical analysis system) showed no difference (P<0.05).

Table 3-2-6. Effect of *Pueraria thunbergiana* methanolic extract on GOT in ICR mouse for 10 days

GOT (glutamic oxaloacetate transaminase) (kunits)	
Control	124.5 ± 18 ^{1)a}
100 mg/kg	124.7 ± 21 ^a
500 mg/kg	133.3 ± 35 ^a
1,500 mg/kg	123.8 ± 37 ^a

¹⁾Values represent the means (n=8) ± S.D.

^{a)}Duncan's multiple range tests of SAS (statistical analysis system) showed no difference (P<0.05).

2) Y-maze test

Scopolamine group은 sample을 전혀 먹이지 않은 group에 scopolamine을 주사한 것이고, 나머지는 sample을 각각의 농도 (0.15, 0.32, 0.53%)로 급여하였던 group에 scopolamine을 주사하여 실험을 실시한 것이다. Scopolamine을 주사하지 않은 control group의 brain 활성을 100%로 보았을 때, scopolamine group은 약 41%로서 control에 비해 약 16%의 저해를 보였다. 반 면 칩 methanol 추출물을 투여한 group들은 각각 scopolamine group에 비해 25%, 19%, 16%의 brain 활성을 보였다. 즉 scopolamine의 저해효과를 억제하였으며 특히 0.15%의 추출물을 투여한 group은 control 만큼 약물의 저해효과를 회복/예방하였음을 확인하였다 (Fig. 3-2-2).

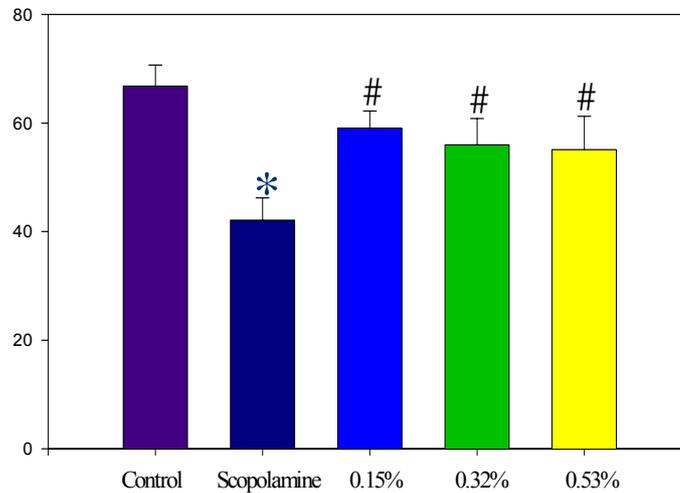


Fig. 3-2-2. Effects of *Pueraria thunbergiana* extract on spontaneous alternation behavior in the scopolamine-treated mice.

Spontaneous alternation behavior during an 8 min session in the Y-maze task were measured on 30 min after scopolamine injection. Values indicate means \pm S.D. (n=8). *P<0.01, #P<0.01 vs Control group, #P<0.01 vs Scopolamine group.

3) Passive avoidance test

실험 전 날 training 후 다음날 실험을 실시하였다. Scopolamine을 주사하여 일시적 뇌기능 장애를 일으켜서 실험하였다. Scopolamine을 주사하지 않은 control group의 인지 및 학습능력을 100%로 보았을 때, scopolamine group은 73%로서 약 27%의 인지 및 학습능력 저해를 보였다. 대추 sample을 각각 0.003, 0.006%를 pre-treatment한 group들은 78%, 89%의 인지 및 학습능력을 보임으로써 5%와 16%의 약물 저해 억제효과를 보였다. 즉 scopolamine의 인지 및 학습능력저하 효과는 대추sample의 pre-treatment로 상당부분 억제/회복되었다 (Fig. 3-2-3).

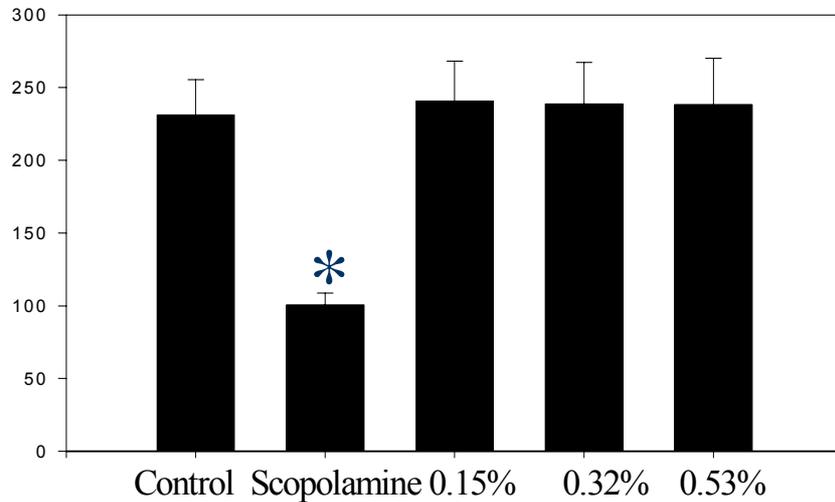


Fig 3-2-3. Effect of *Pueraria thunbergiana* extract on step-through latency in the retention trial of the multi-trial passive avoidance test in the scopolamine-treated mice.

Test was carried out on 30 min after scopolamine injection. Values indicate means \pm S.D. (n= 8). P<0.01 vs Control and sample treated groups.

다. 선정된 아세틸콜린 합성효소 활성성분의 정제

1) 칩(*Pueraria thunbergiana*)에서의 활성 물질의 탐색을 위한 1차 물질 분리

최종 선정된 칩의 crude methanolic extract를 극성도에 따라 분획한 다음 각 분획의 ChAT에 대한 효소 활성을 검색하였다. Hexane, chloroform, ethyl acetate의 순으로 분획한 결과 ethylacetate layer에서 136%의 유의적인 ChAT activation을 보였다 (Fig. 3-2-4).

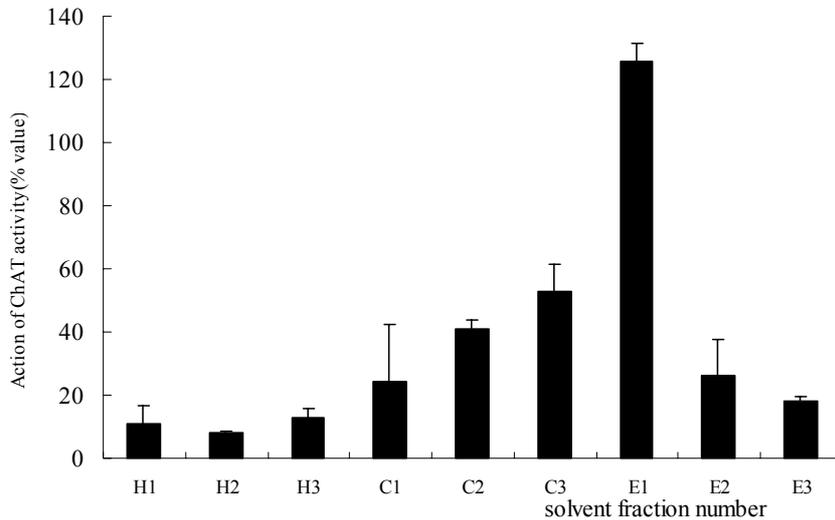


Fig. 3-2-4. Activation effect of *Pueraria thunbergiana* extract on ChAT by the solvent partitioning.

The highest activation effect of the first fraction of ethyl acetate is 136%. Sample concentration was 250 g/mL. Each value is the means (n=2) \pm S.D.

H: hexane fraction

C: chloroform fraction

E: ethyl acetate fraction

2) Silica-gel open column chromatography에 의한 칩(*Pueraria thunbergiana*) methanol 추출물의 아세틸콜린 합성효소 활성화

Active component를 찾기 위해서 활성이 높았던 ethyl acetate 층을 first silica gel open column을 걸어 33개의 fractions를 얻었다 (Fig. 3-2-5). 이 중에서 chloroform과 methanol의 비율이 90:10의 2번째 (5번) fraction에서 180.5 %의 유의적인 activity를 보였다. 이 fractions를 대상으로 second silica gel open column을 실시하였다. 그 결과 24개의 fraction 중에서 chloroform : methanol = 85 : 15의 3개의 fractions(16, 17, 18)에서 약 370%의 activation effect를 확인하였다(Fig. 3-2-6).

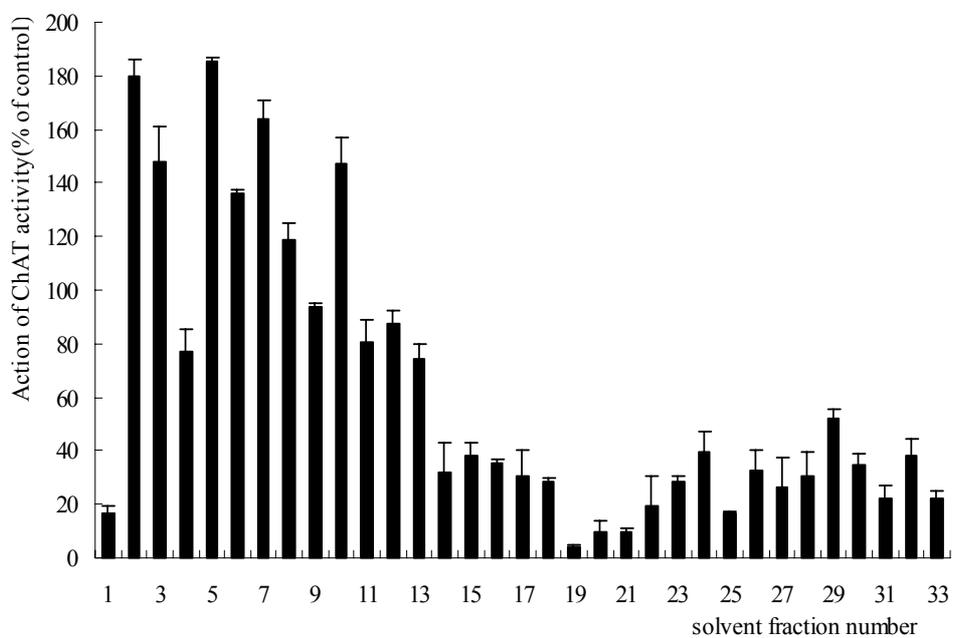


Fig. 3-2-5. Activation effect of *Pueraria thunbergiana* extract on ChAT by the first silica gel open column chromatography.

The highest activation effect of fraction is 180.4%. Sample concentration was 250 g/mL. Each value is the means (n=2) ± S.D. Solvent ratio is chloroform : methanol = (90 : 10).

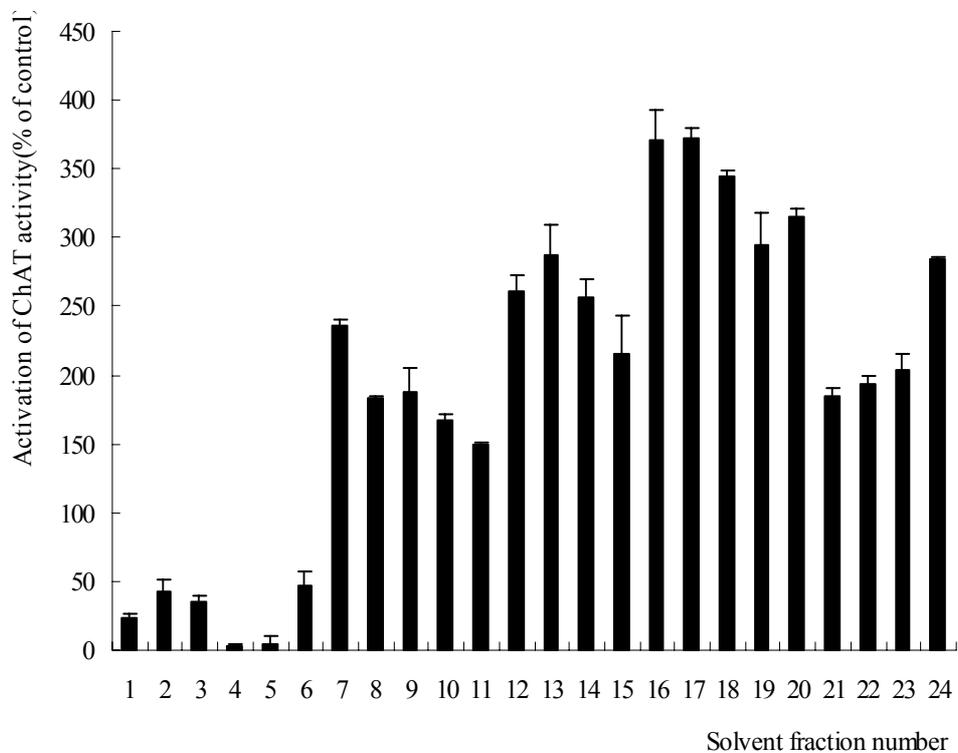


Fig. 3-2-6. Activation effect of *Pueraria thunbergiana* extract on ChAT by the second silica gel open column chromatography.

The highest activation effect of fraction is proximately 370%. Sample concentration was 250 g/mL. Each value is the means (n=2) \pm S.D. Solvent ratio is chloroform : methanol = (85 : 15).

3) HPLC에 의한 *Pueraria thunbergiana* methanol 추출물의 활성물질 분리

Waters 2690 HPLC에서 PDA detector와 C₁₈ reverse column을 사용하였으며 UV detector로 흡광도 248.5 nm, 39 min에서 single peak을 확인하였다(Fig. 3-2-7).

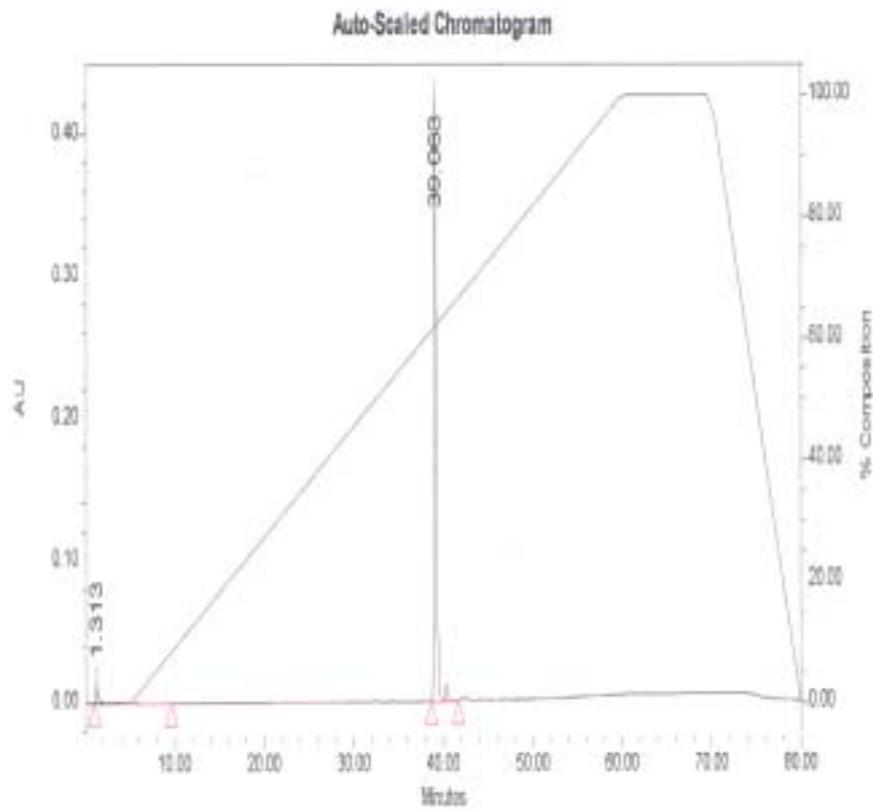


Fig. 3-2-7. Gradient reversed Waters 2690 HPLC analysis of ChAT activator isolated from *Pueraria thunbergiana*.

μ-bondapak C₁₈ reverse column: 3.9 300 mm, mobile phase: a 55 min gradient of 0 ~ 100% methanol in water, flow rate: 1 mL/min, detector: PDA, monitoring absorbance: 248.5 nm. Injection volume was 20 μl.

라. 칩 (*Pueraria thunbergiana*)으로부터 정제된 활성물질의 구조 해석

칩으로부터 정제된 물질을 구조를 해석하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 3-2-8), $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 3-2-9), EI-MS (Fig. 3-2-10)등을 실시하였다. 그 결과 정제된 활성 물질은 분자량 254인 daidzein (*4', 7-dihydroxyisoflavone*)임을 확인하였다 (Fig. 3-2-11).

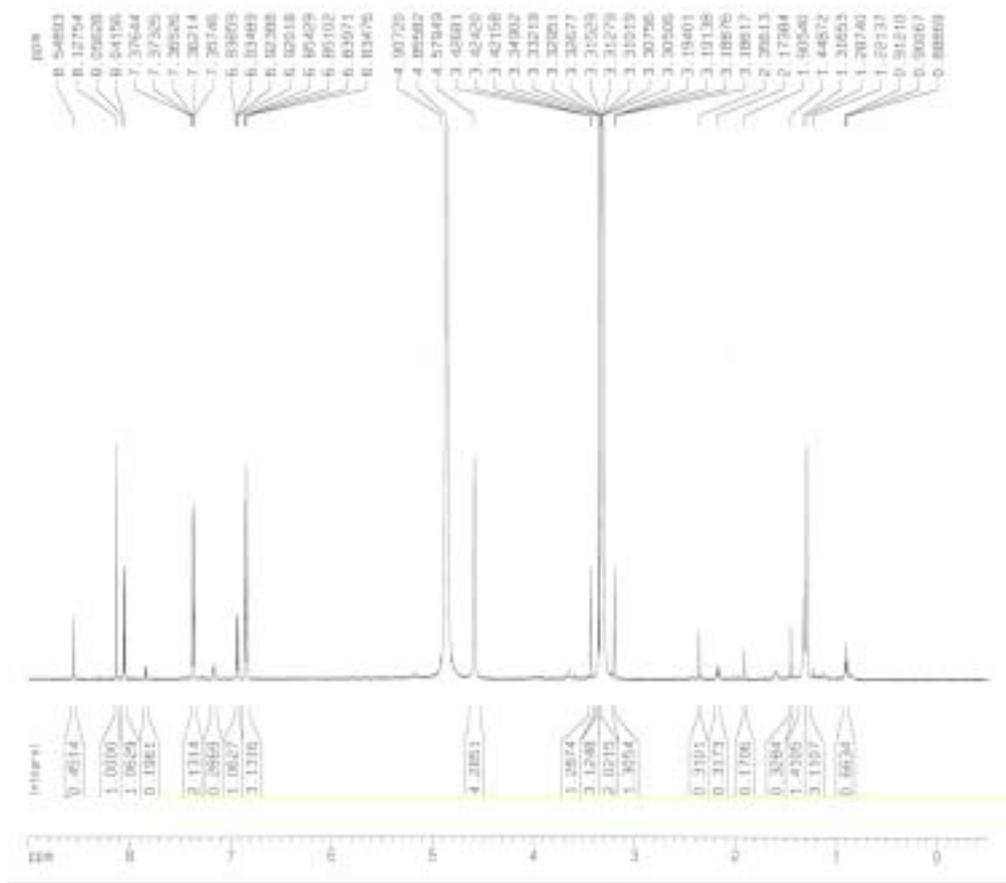


Fig. 3-2-8. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of ChAT activator isolated from *Pueraria thunbergiana*.

Sample was dissolved in MeOD (methyl- d_3 alcohol- d_1) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German) operating at 600 MHz and 25°C.

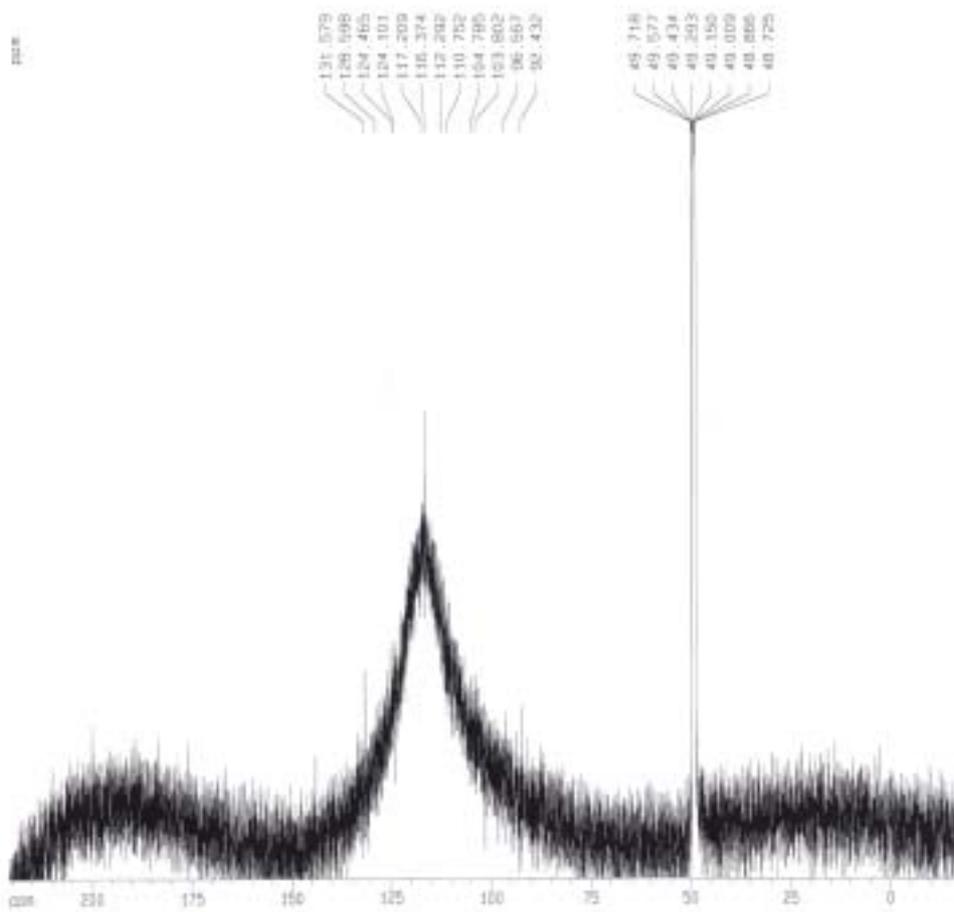


Fig. 3-2-9. ^{13}C -NMR spectrum of ChAT activator isolated from *Pueraria thunbergiana*.

Sample was dissolved in MeOD (methyl- d_3 alcohol- d_1) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German) operating at 600 MHz and 25°C.

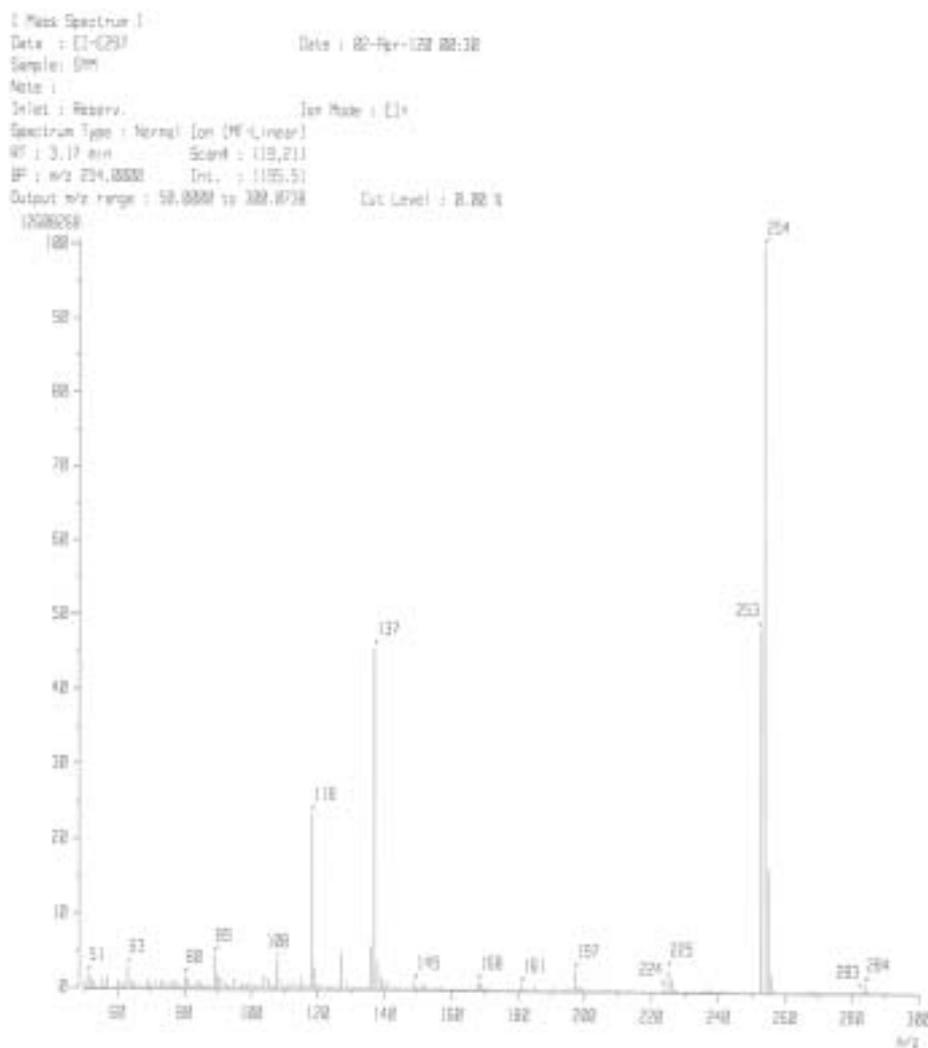


Fig. 3-2-10. EI-MS spectrum of ChAT activator isolated from *Pueraria thunbergiana*. The spectrum was recorded on positive ion EI mass spectrometer (JMS AX505WA, JEOL, Japan).

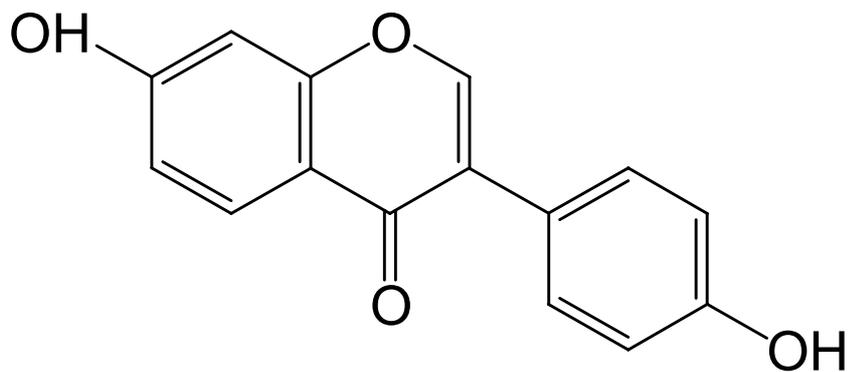


Fig. 3-2-11. Molecular structure of ChAT activator, daidzein.

Daidzein shows a structure of isoflavone and is one of flavonoids, which is contained in *Pueraria thunbergiana* and other various foods, known to be biologically active compounds. Isoflavones, with a polyphenolic structure in which the β -ring is at carbon 3 instead of the more typical carbon 2, is found in natural plants. All contains 15 carbons in there nuclei structure, diphenylpropane (C6-C3-C6).

제 3절 자연 식물자원 함유 미량소재의 실용화

1. 서 설

자연 식물자원 중 식품으로 사용할 수 있는 식물 중에는 이미 알려져 있는 영양소 이외의 각종 생체 조절 기능성을 갖는 성분이 존재한다는 것이 판명되고 있다. 최근 치료만을 목적으로 하는 의료행위만으로는 다양한 질병에 대해 효과적으로 대응할 수 없다는 판단에 따라 일상생활에서 질병을 예방하는 예방의학에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 식품에 의한 질병 예방은 식품이 갖고 있는 기능성에 대한 중요성을 더욱 크게 하고 있다.

일반적으로 기능성 성분은 미량으로 식품에 존재하기 때문에 충분한 효과를 볼 수 없다. 따라서 이것을 양적인 면과 과 질적인 면 두 가지 모두 증강 시키고 효과적인 기능이 발현될 수 있도록 식품으로 만들어야 한다. 가장 간단한 방법은 식품중 함유된 기능성 성분의 양을 높은 순도로 분리, 정제 하는 것이다. 이 경우 식품 중에 있는 지질, peptide, polysaccharide, oligo 당 등은 기능성 식품으로 사용 할 수 있으며, 그 또한 저해제, phytochemical 등의 물질은 의약품화 할 수 있다. 다른 방법은 농축으로 식품 내의 기능성 성분의 양을 증가시키거나 기능성 성분을 식품에 첨가하여 기능적으로 강화된 식품을 설계할 수 있다. 또한 이들 못지않게 중요한 것은 기능성 성분들을 공업적으로 대량생산하고자 할 때 원료의 탐색과 확보로서 미사용 식용자원들의 이용 가능성에 대한 적극적 검토가 필요로 한다.

외국의 경우 cereal 제품에 미국 NCI의 연구결과를 표기한 것이 계기가 되어 1993년 ‘Nutrition Labeling and Education Act’를 작성, 공포하였다. 또한 7개 항목(지방 식품과 심장혈관질환, 저지방식품과 암, 칼슘 고함유 식품과 골다공증, 저염 식품과 고혈압, 식이섬유를 함유한 곡류제품, 과일, 야채와 암, 식이섬유 특히 수용성 식이 섬유를 함유한 곡물 및, 과일, 야채, 곡류제품과 심장관상동맥질환)에 대해 식품의 건강 강조 표시를 인가하였다. EU의 소비자들은 기능성 식품에 대해 식사의 일부로 천연 물질에서 유래하는 식품을 섭취함으로써 질병의 예방과 치료와 기타 의학적, 건강학으로 이익을 가져온다는 개념과 안전성의 문제로 정제, 캡슐제의 사용보다는 식품이나 음료 등의 형태로 된 제품을 선호하고 있다. Pro-biotic 음료 와 어유가 함유된 빵, 영양 드링크, 정신활성 드링크, 섬유분이 풍부한 빵, 우유, 칼슘강화 오렌지 주스, 우유, 요구르트 등이 대표적이다.

국내 기능성식품에 대한 연구는 식품 및 천연물 중 생체 조절기능성분에 대한 활성검사관계로 보고된 활성 물질은 고혈압 저해 및 억제제, 항암활성물질, 당노

개선물질, 뇌질환개선물질 등 여러 부분에 다양하게 있으나 기능성식품에 대한 시장도입이 활성화되어 있지 않으며 이를 위한 제도적 장치 또한 미비한 편이다. 현재 ‘건강보조식품’의 형태로 각종 생리활성이 표시된 제품들이 시판되고 있으나 기능성 식품에 따라 그 개념이 정립되어 있지 못한 상태이다. 본 연구에서는 이미 오랫동안 식용 또는 약용으로 사용하여 안정성이 검증된 천연 생물자원에서 각종 생리활성을 분석하고, 유효한 성분들을 분리하여 기능성 식품의 소재로 개발하고자 한다.

2. 최종적으로 선정된 시료들로부터 생리활성물질 추출조건의 최적화 및 공업적 수준의 정제방법 확립

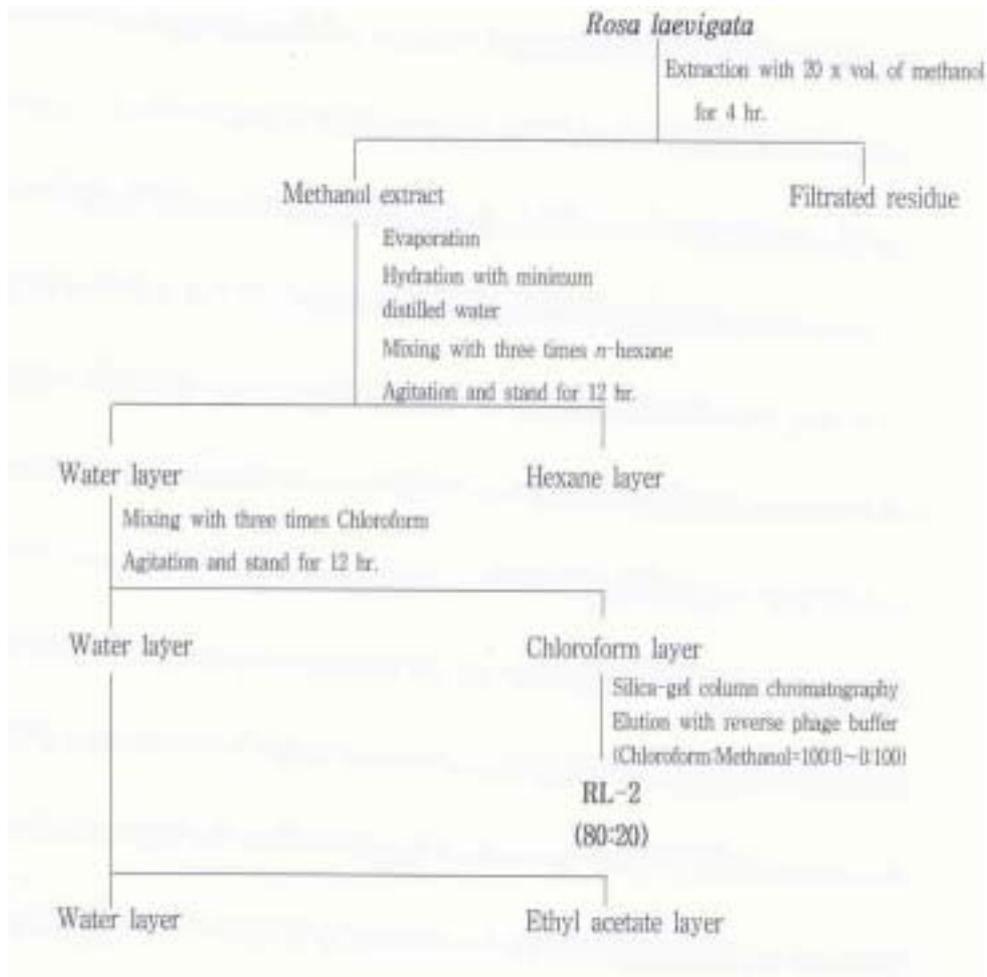
가. 금앵자(*Rosa laevigata*)로부터 뇌세포 보호물질 성분의 공업적 추출 및 정제

금앵자 (*Rosa laevigata*) 20 kg으로부터 뇌세포 보호 물질 성분을 공업적으로 대량 추출하기 위해 10 L용 steam jacket이 부착된 추출기를 사용하였다 (Scheme 3-3-1). 약 5배의 methanol로 16 시간 동안 4회 반복 추출하였고 그 결과 약 3 kg의 수율을 획득하였으며 lab-scale의 data와 크게 다르지 않는 보호 활성을 보였다 (Table 3-3-1).

Table 3-3-1. Protective effect of *Rosa laevigata* methanolic extract against oxidative stress .

	Sample conc. 50 $\mu\text{g/ml}$	90 $\mu\text{g/ml}$	130 $\mu\text{g/ml}$
Lab scale	25 %	43 %	54 %
Bench scale	23 %	45 %	55 %

* 공업적 순도의 정제 공정



Scheme 3-3-1. Purification procedure of neuronal cell protector against A β -induced oxidative stress for industrial purity from *Rosa laevigata*

나. 칩으로부터 choline acetyltransferase 활성화 성분의 공업적 추출 및 정제

경동시장에서 구입한 칩(*Pueraria thunbergiana*)으로부터 choline acetyltransferase 활성물질의 공업적 추출조건을 다음과 같이 검토하였다. 시료 10 kg을 blader mixer로 미세하게 분쇄한 후 상기의 추출기를 사용하여 약 5 배의 methanol로 4 시간씩 4회 반복 추출하였고 그 결과 약 2.2kg의 수율을 획득하였으며 lab-scale의 data와 크게 다르지 않는 활성수율을 보였다. 한편 온도별, 추출 시간별로 추출한 후 choline acetyltransferase activation에 대한 추출 조건을 검토한 후 실험실적 방법과 비교하였다. 그 결과 추출시간의 영향은 4 hr에서 가장 높았으나 온도의 영향은 초기 추출물에 다소 영향을 주었고 활성에서의 변화도 미비하였다 (Tables 3-3-2, -3, -4). 이는 heating이 활성화에 미치는 영향이 미비하므로 공업적 추출 방법에 있어서 불필요한 에너지를 절감할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 3-3-2. Activation effect of *Pueraria thunbergiana* methanolic extract on choline acetyltransferase

	Sample conc.100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	150 $\mu\text{g}/\text{ml}$	250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Lab scale	27%	36 %	46 %
Bench scale	20 %	42 %	49 %

Table 3-3-3. Effect of extraction temperature on choline acetyltransferase activity

	20 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$	50 $^{\circ}\text{C}$
Lab scale	35 %	43 %	45 %
Bench scale	40 %	45 %	47 %

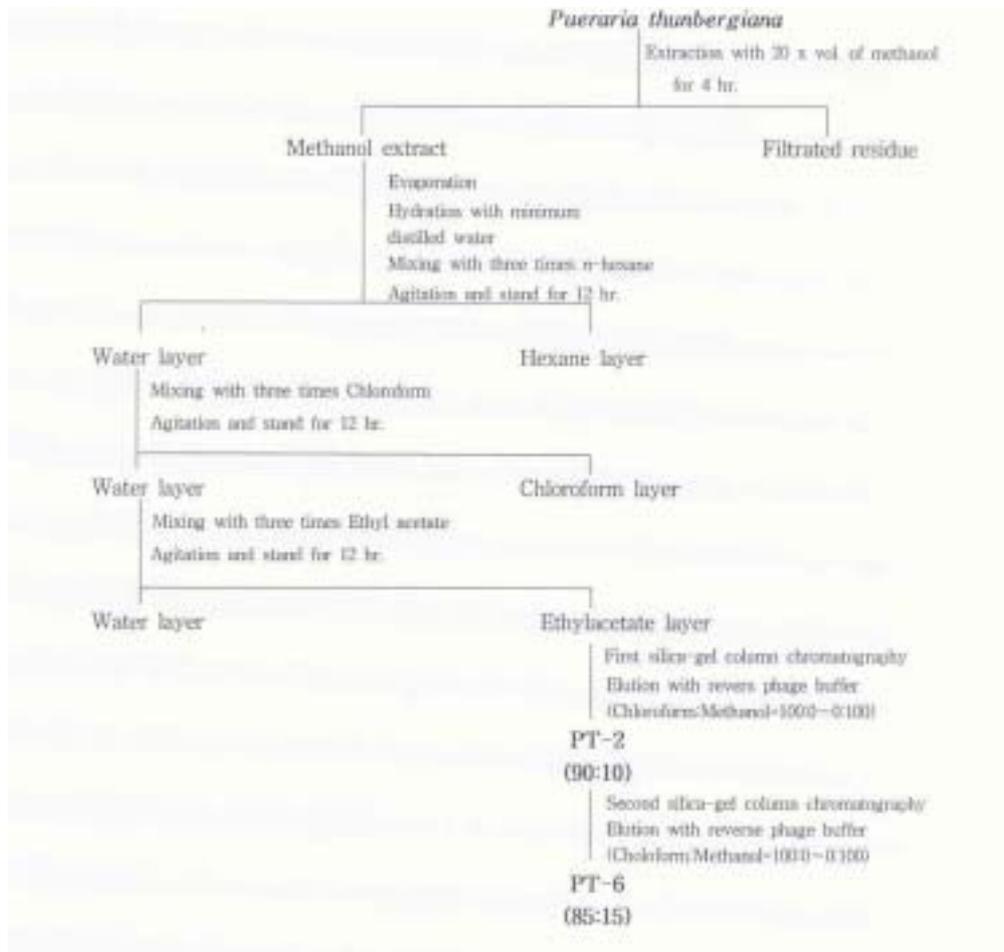
* Sample concentration was 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Table 3-3-4. Effect of extraction time on choline acetyltransferase activity

	1 hr	2 hr	4 hr
Lab scale	21 %	35 %	47 %
Bench scale	30 %	37 %	49 %

* Sample concentration was 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

* 공업적 순도의 정제 공정



Scheme 3-3-2. Purification procedure of choline acetyltransferase activator for industrial purity from *Pueraria thunbergiana*.

제 4절 자연 식물자원 함유 생리활성물질의 기능성 식품화

1. 재료 및 방법

가. 연질 캡슐 제작

금앵자 (*Roasa laevigata*), 칩 (*Pueraria thunbergiana*)의 추출 분말 100 mg에 소맥 배아유를 30-50%, 미강 추출물 10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토코페롤 1% 등을 부형제로 사용하고, 맛을 고려하여 생강추출물, 인삼분 등의 각종 추출물을 미량 첨가하였다.

나. 드링크제 제작

금앵자 (*Roasa laevigata*), 칩 (*Pueraria thunbergiana*)의 추출 분말의 이용하여 내용액 제제를 만들었다. 제제의 맛, 향, 안정성 등을 고려하여 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상 과당, 올리고당, 벌꿀 등을 사용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨을, 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 항산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였다. 그 외 식미 향상을 위해 사과과즙 같은 과일과즙을 혼합해 준다. 주 성분의 배합은 100 mg 으로 하여 조제하였다.

다. 과립제 제제

금앵자 (*Roasa laevigata*), 칩 (*Pueraria thunbergiana*)의 추출 분말 300 mg에 부형제로 유당 700 mg, 옥수수 전분 3.5 mg, 산미제로 구연산 5 mg을 혼합하고 spray dry 한 후 제과 하였으며 함습도를 시험한 후 정립하고 최종 혼합하였다.

2. 결 과

가. 연질 캡슐 제작

금앵자 (*Roasa laevigata*), 칩 (*Pueraria thunbergiana*)의 추출분말 100 mg을 이용하여 연질 캡슐을 제작하였으며 제품의 향, 맛 등을 고려하여 제작하였다 (Table 3-4-1). 부형제로서 소맥 배아유를 30-50%, 미강 추출물 10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토코페롤 1% 등을 사용하였고, 맛을 고려하여 생강추출물, 인삼분 등의 각종 추출물을 미량 첨가하였다.

Table 3-4-1. 기능성 연질 캡슐 제제의 배합 예

배합 예 1.

단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품(연질캡슐) 성분: · Extract 소재 100 mg · 소맥배아유 30% · 미강유 20% · 대두박 추출물 3% · D- α -토코페롤 1% · 베타카로틴 3% · 레시틴 1% · 인삼분, 생강추출물 기타. 권장섭취량 및 섭취방 · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능

배합 예 2.

단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품(연질캡슐) 성분: · 분말소재 100 mg · 소맥배아유 50% · 미강추출물 10% · 베타카로틴 3% · 레시틴 2% · 비타민 C 1% · 생강추출물, 인삼분 기타 권장섭취량 및 섭취방법 · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능



사진 1. 연질 캡슐 제제의 예

*** 보존 및 유통기준**

본 제품의 효능 성분은 공기접촉, 온도, 물리적 충격에 안정한 천연화합물로서 물질 변화에 대한 위험은 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통 상 바람직함.

나. 드링크제 제조

금앵자 (*Roasa laevigata*), 칩 (*Pueraria thunbergiana*)의 추출 분말을 이용하여 100 ml 용 내용액 제제를 제작하였다. 제품의 향, 맛, 안정성 등을 고려하여 3 가지 정도의 배합을 만들었다. 재료 및 방법에서와 같이 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상 과당, 올리고당, 벌꿀 등을 사용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨 또는 L-글루타민산나트륨을, 산미제 및 pH조절제로 구연산을 사용하였다. 향산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였다. 그 외에 식미의 향상을 위해 사과즙, 배즙 등을 혼합 하였다. 주성분의 배합은 100 mg으로 조제하였다 (Table 3-4-2).

Table 3-4-2. 기능성 드링크 제제의 배합예

배합예 1.

용량: 100 mL
제품유형: 내용액제제
성분:
분말소재 100 mg
백당 9%
포도당 5.8%
식염 0.05%
호박산이 나트륨 0.05%
구연산 0.08%
안식향산나트륨 0.01%
에탄올 0.001%
니코틴산아미드 0.01%

배합예 2.

용량: 100 mL
제품유형: 과즙희석음료
성분:
분말소재 100 mg
사과과즙 10%
칩즙 3%
배과즙 1%
벌꿀 0.5%
구연산 0.05%
비타민 C 0.05%
비타민 B6 염산염 0.01%
L-글루타민산나트륨 0.01%
니코틴산아미드 0.01%
액상과당 0.01%
안식향산나트륨 0.01%



사진 2. 드링크 제제 예

다. 과립제 제작

금앵자 (*Roosa laevigata*), 칩 (*Pueraria thunbergiana*)의 추출분말 300 mg에 배합 예(Table 3-4-3)와 같이 부형제로 유당 700 mg, 옥수수 전분 3.5g, 산미제로 구연산 5mg을 혼합하여 제과하였으며 함습도를 시험 후 정립 최종 혼합하였다.

Table 3-4-3. 기능성 과립제제의 배합예

<p>제품유형: 건강보조식품(과립제제)</p> <p>성분 :</p> <ul style="list-style-type: none"> · 분말소재 300 m · 옥수수 전분(부형제) : 3.5 g · 유당(부형제) : 0.65g · 백당(감미제) : 0.5 g · 구연산(산미제) : 5 mg <p>권장섭취량 및 섭취방법</p> <ul style="list-style-type: none"> · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 · 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능
--

<p>단위: 1포(5g)</p> <p>제품유형: 건강보조식품(과립제제)</p> <p>성분:</p> <ul style="list-style-type: none"> 분말소재: 50 mg 옥수수 전분(부형제) : 3.5 g 유당 (부형제) : 0.65 g 백당 (감미제) : 0.5 g 구연산 (산미제) : 5 mg <p>권장섭취량 및 섭취방법</p> <ul style="list-style-type: none"> 1일 3회, 1회 1포 씩 식전 또는 식후에 섭취 필요에 따라 증감 가능



사진 3. 과립제재 형태 및 병 포장시의 예



사진 4. 과립제재의 캡슐 포장시의 예



사진 4. 과립제제의 파우치 포장의 예

***보존 및 유통기준**

본 제품의 효능 성분은 공기접촉, 온도, 물리적 충격에 안정한 천연화합물로서 물질 변화에 대한 위험은 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통상 바람직함.

라. 제품의 외관 및 안정성 검사

본 제품들은 일종의 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속하므로 외관검사는 6개월 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가혹실험(고온, 고압)을 실시하여 제품의 외관과 미생물 검사를 실시하였다(Tables 3-4-4, -5).

Table 3-4-4. 제품의 미생물검사

- 연질 캡슐 제제의 저장 조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
금앵자	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출
취	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출

- 드링크제제의 저장조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
금앵자	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출
취	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출

- 과립 제품 저장 조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
금앵자	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출
취	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출

- 연질 캡슐제제 저장 조건: 50°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
금앵자	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출
취	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출

- 드링크제제의 저장조건: 50°C, 1주일

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
금앵자	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출
취	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출

-과립 제품 저장 조건: 50℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
금앵자	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출
츄	1×10 ² 이하	1×10 ² 이하	불검출	불검출

Table 3-4-5. 제품의 외관검사

-연질 캡슐제제의 저장조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
금앵자	없음	없음	없음	없음
츄	없음	없음	없음	없음

-드링크제제의 저장 조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
금앵자	없음	없음	없음	없음
츄	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
금앵자	없음	없음	없음	없음
츄	없음	없음	없음	없음

-연질 캡슐제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
금앵자	없음	없음	없음	없음
츄	없음	없음	없음	없음

-드링크제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
금앵자	없음	없음	없음	없음
츄	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
금앵자	없음	없음	없음	없음
츄	없음	없음	없음	없음

제 4장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구 개발 목표의 달성도

1. 1차년도 연구 개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
<p>○ 제 1 세부과제 : 뇌신경세포 손상으로부터 뇌세포 보호물질의 소재화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PC 12 cell (rat pheochromocytoma cell)에 세포괴사를 유도할 수 있는 Aβ-induced oxidative stress를 인위적으로 가한 상태에서 이를 저해 또는 개선시킬 수 있는 sample을 자연 식물자원에서 검색 - 자연 식용식물자원 세포 전 성분을 가용화 시키기 위해 계통적 추출방법 도입 - 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 저해활성 검색 - Positive control로서 Vitamin C, E 등과 같은 anti-oxidant 대조군과의 Aβ-induced oxidative stress 저해능 비교 검토 및 최대 활성을 갖는 식용 식물의 선정 	100
<p>○ 제 2 세부과제 : 아세틸콜린 생성 촉진을 위한 합성효소 활성화 물질의 소재화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - [¹⁴C] acetyl-CoA를 기질로 한 MC-IXC cell 유래 choline acetyltransferase의 활성화 물질 측정을 위한 enzymatic <i>in vitro</i> assay계 확립 - 각종 식용 생물자원의 세포 전 성분을 가용화 시키기 위해 계통적 추출방법을 도입하여 추출 - 파쇄한 각종 식용식물자원의 용매별 추출물로부터 성립된 assay계를 통해 활성화 성분 검색 - 선정된 식용식물을 MC-IXC cell에 pre-treatment 한 후 choline acetyltransferase의 activity 정도를 검색함으로써 2차 assay계 확립 - 1, 2차 검색을 통하여 최종 시료 선정 	

2. 2차년도 연구개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
<p>○ 제 1 세부과제 : 뇌신경세포 손상으로부터 뇌세포 보호물질의 소재화</p> <p>○ 제 2 세부과제 : 아세틸콜린 생성 촉진을 위한 합성효소 활성화 물질의 소재화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 선정된 시료들의 cytotoxicity를 <i>in vitro</i> assay 를 통하여 규명 - 무독성 및 최대 보호 효능을 갖는 최종시료의 선정 - <i>In vivo</i> assay계를 사용하여 선정 시료의 보호 효능 및 <i>in vivo</i> 상에서의 독성을 검정함 - 공업적 최적 추출 조건 및 실험적 추출 조건의 확립 - 공업적 순도 수준의 분리 정제 및 소재화 확립 - <i>In vivo</i> 에서의 신경전달물질 합성효소 활성화 물질의 독성 실험 및 인지능력 실험 - 선정된 시료로부터 합성효소 활성화 물질의 추출, 정제 및 특성화 - 선정된 식물자원으로부터 합성효소 활성화 물질의 정제 조건, 전처리 방법, 정제단계 검토, 정제 실시 및 구조 분석 - 공업적 추출 조건 확립 및 공업적 순도 수준의 분리 정제법, 소재화 확립 <p>-1, 2 세부과제 모두 시작품화를 위한 기술이전</p>	100

3. 평가 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	달성도 (%)
1차년도(2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○소재 검색 시 활성 측정법의 적합성 ○검색방법의 효율성 및 창의성 ○생리활성 식·약용류의 선정결과 	20 30 50	100
2차년도(2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○<i>In vivo</i> 상에서의 독성 검사 및 효능 검정의 창의성 ○생리활성 물질의 정제결과와 정제 물질 순도 측정법의 명확성 ○공업적 순도수준의 대량 정제법 및 확립 여부 ○물질의 구조규명 결과 ○소재화의 적성 검토 및 시작품 제조 	20 20 20 20 20	100
최 종 평 가	<ul style="list-style-type: none"> ○약리·생리활성 물질의 구조해석 여부 ○물질의 소재화 여부 	80 20	100

제 2절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

- 종래의 방법과 달리 재료를 파쇄한 후 활성을 측정함으로써 세포내의 성분을 동시에 검색할 수 있는 기법의 도입
- 하나의 추출조건이 아닌 다양한 추출조건 별로 활성을 검색하는 기법의 도입
- 추출 폐기박의 감량화를 이룰 수 있는 추출방법의 확립
- 고형물 중량당 추출률을 향상시킬 수 있는 추출방법의 확립
- 생리활성 물질의 신속한 정제법의 도입
- 공업적 순도 수준의 대량 정제법 확립
- 생리활성 미량소재의 기능성 식품화 기술의 도입
- 국내 고유의 식용식물로부터 약리성·생리활성 신규후보 물질의 개발 모델 제시
- *In vitro, in vivo* 활성측정계의 도입

2. 경제·산업적 측면

- 1차 산물의 고부가 가치화로 시장 경쟁성 확보
- 1차 산물의 생산의욕 고취로 농가의 소득증대에 기여
- 1차 산물의 미 이용부 및 폐기처리부를 자원화 함으로써 폐기물의 감량화와 농촌 환경의 개선 기대
- 기술의존도가 높은 무공해 산업 종으로 향후 국내산업 개편의 모델이 됨
- 외국의 기존 물질특허와 마찰을 일으키지 않는 신규물질이 창출될 가능성이 높고 신규물질에 따라서는 거대 수출품목이 될 수 있음
- 현재 수입되고 있는 유사소재의 수입대체 효과
- 제약, 식품 산업의 영역을 넓힘으로써 이들 산업의 경쟁력 제고에 기여
- 농업과 제조업 연계로 지역경제의 활성화에 기여

제 5장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 추가 연구의 필요성

본 연구를 수행하여 자연 식물 자원을 이용하여 고령화 질환의 대표적인 노인성 치매의 예방 또는 치료에 적용될 수 있는 미량 성분을 소재화 하고 이들 소재를 주제로 한 제품을 실용화하기 위한 기초를 마련하였다. 각각의 소재가 뇌 질환을 일으키는 원인으로부터 방어해 주거나 그 질환에 의해 감소되는 인자를 증가 시켜주는 효과가 있음을 밝혔으나 어떠한 기전으로 작용하는지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 판단되어지며, 각각의 소재를 응용하여 다른 질환에도 적용가능한지에 대해서도 연구할 필요성이 있는 것으로 사료된다.

제 2절 타 연구에의 응용

자연 식물자원으로부터 얻은 미량소재를 이용한 예방과 치료는 비단 본 연구에서 적용한 질환에 국한되지 않고 타 질환에도 이용이 가능할 것으로 여겨진다. 또한 미량소재를 개발하기 위해 사용한 순수 물질 분리방법은 의약품 및 기능성 식품 소재의 개발에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료 된다.

제 3절 기업화 추진 방안

본 연구를 바탕으로 한 기능성 식품 및 의약품 소재로서의 개발은 특별한 시설이 필요하지 않고 개발이 가능할 것으로 생각되어지며 그렇기 때문에 여러 분야에 응용이 가능할 것으로 생각된다.

- 1) 기능성 차의 개발로 기호 식품화 할 수 있으며 건강관리가 필요한 중·장년층을 대상으로 할 수 있다.
- 2) 식용식물자원에서 추출한 조추출물을 이용하여 드링크 음료화 하여 기능성 음료로의 개발이 가능하다.
- 3) 연질 캡슐 및 과립화를 이용하여 섭취방법을 쉽게 함으로써 기존의 동물성 원료를 이용한 기능성 식품을 선호하지 않거나 또는 섭취할 수 없는 사람들을 대상으로 하여 기능성 식품으로써 개발이 가능하다.
- 4) 자연식물자원으로부터 기능성 미량소재를 얻는 방법이 체계화 되고 용이해짐으로써 더 나아가 미량소재와 병의 작용기작을 연구하여 이를 통한 의약품 소재로서의 개발도 가능하다.

제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1. Measurement of oxidative stress (DCF-DA method)

PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 A β peptide를 처리하여 oxidative stress를 유도한다. A β -induced oxidative injury는 DCF-DA (2',7'-dichlorofluoresine diacetate)를 이용하여 생성된 oxidative stress 정도를 spectrofluorometer를 통해서 측정한다.

- *Free Radical Biology and Medicine*, 2001; 30: 447-450
- *Mutation Research*, 2001; 496: 181-190
- *Molecular Brain Research*, 2002; 104: 55-65
- *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000; 164: 305-311

2. Assessment of cell viability (MTT reduction assay)

PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 A β protein을 처리하여 A β -induced cytotoxicity를 유도한 후 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)]를 이용하여 spectrophotometer를 통해서 측정한다.

- *Journal of Neurochemistry*, 1997; 69: 2285-2293
- *Life Sciences*, 2002; 70: 833-841
- *Pharmacological Research*, 2001; 43: 173-178
- *Neuroscience Letters*, 1998; 251: 105-108

3. Choline acetyltransferase activator assay

MC-IXC cell에서 얻은 crude enzyme과 [14 C] acetyl-CoA를 이용하여 choline acetyltransferase의 활성을 측정한다.

- *Biochemical Journal*. 2000;349: 141-151.
- *Journal of Neurochemistry*. 1985;45: 611-620.
- *Brain research*. 1996;80: 99-109.

4. Y-maze test

A, B, C의 3개의 arm이 Y자로 결합되어진 Y-maze를 이용하며 한 지점을 출발점으로 하여 mice를 arm에 넣은 다음 mouse가 들어간 arm을 기록하여 점수화 하여 인지력을 측정하는 방법이다.

- *European Neuroscience Asociacion*. 1999:11: 83-90.
- *British Journal of Pharmacology*. 2001:133: 89-96.

5. Passive avoidance test

Mice를 훈련과정을 거친 후 암실로 mouse가 들어간 시간을 체크하고 점수화 하여 인지력 측정한다. 암실로 들어가는 시간이 길수록 학습이 잘 되었다고 본다.

훈련:

- ① 명(明)실에서 빛 전기 쇼크(0.5 mA, 1sec) 없는 상태에서 1분간 적응
- ② 명(明)실에서 전기 쇼크 없고 빛있는 상태에서 2분간 적응
- ③ 명(明)실에서 암실로 mouse 들어가면 전기 쇼크를 줌

실험: mouse가 명실에서 암실로 들어갈 때의 시간을 측정하여 점수화 함

- *European Neuroscience Asociacion*. 1999:11: 83-90.
- *British Journal of Pharmacology*. 2001:133: 89-96.
- *Neurochemical Research*. 2002:27: 277-281.
- *European Neuroscience Asociacion*. 2001:421: 265-272.

제 7장 참고 문헌

Ai Ling Fu, Qian Li, Zhaohui Cong, Shi Jie Hauang, Yu Xia Whang, Man Ji Sun: Alternative therapy of Alzheimer's disease via supplement with choline acetyltransferase. *Neuroscience letter*, 368: 258-262 (2004)

Axelrod, J. D., Pilch, P. F. Unique cytochalasin B binding characteristics of the hepatic glucose carrier. *Biochemistry*, 22: 2222-2227 (1983)

Benishin, C. G., Carroll, P. T. Acetylation of choline and homocholine by membrane bound choline-O-acetyltransferase endings. *J. Neurochem.*, 36: 732-740 (1981)

Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R., Schubert, D. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell*, 77: 817-827 (1994)

Bird, T. D., Stranhan, S., Sumi, S. M., Raskind, M. Alzheimer's disease: choline acetyltransferase activity in brain tissue from clinical and pathological subgroups. *Ann. Neurol.*, 14: 284-293 (1983)

Broadwell, R. D., Sofroniew, M. V. Serum Proteins Bypass the Blood-Brain Fluid Barriers for Extracellular Entry to the Central Nervous System. *Exp. Neurol.*, 120: 245-263 (1993)

Bruce A. Pappas, Peter J. Bayley, Barbara K. Bui, Lawrence A. Hansen, Leon J. Thal: Choline acetyltransferase activity and cognitive domain score of Alzheimer's patients. *Neurobiology of Aging*, 11-17 (2000)

Carr, D. B., Goate, A., Morris, J. C. Current concepts in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am. J. Med.*, 103: 3S-10S (1997)

Chung, Y. K., Heo, H. J., Kim, E. K., Kim, H. K., Heo, T. L., Lim, Y. H., Kim, S. K. and Shin, D. H. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Organum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells*, 11(2): 137-143 (2001)

Claude S., Manabu K., Laura M. and Lester P., Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation induced NF-Kappa-B activation on a human keratinocyte cell line. *Free radical Biol. & Med.*, 26: 174-183 (1999)

Collerton, D. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 19: 1-28 (1986)

Ellwood, K. C., Chatzidakis, C. and Failla, M. L. Fructose utilization by the human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 202: 440-446 (1993)

Flood, J. F., Morley, J. E., Roberts, E. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid β protein from patients with Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 3363-3366 (1991)

Fonnum, F. A rapid radiometric method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.*, 24: 407-409 (1975)

Gao, Z., Huang, K., Xu, H. Protective effects of flavonoids in the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacological Research*, 43: 173-178, (2001)

Gasparin, L., Rasshi, M., Binetti, G., Trabucchi, M., Solerte, S. B., Alkon, D., Etcheberrigary, R., Gibson, G., Blass, J., Paoletti, R., Govoin, S. Peripheral markers in testing pathophysiological hypothesis and diagnosing Alzheimer's Disease. *FASEB J.*, 12: 17-34 (1998)

Gianni Benzi, Antonio Noretta: Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease?. *European Journal of Pharmacology*, 346: 1-13 (1998)

Glennner, G. G., Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 10739-10741 (1984).

Gray J. Fisher, Subhash C., Datta, Harvinder S., Tawar and John J., Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature*, 375: 335-339 (1996).

Hensley, K., Carney, J. M., Mattson, M. P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J. F., Floyd, R. A., Butterfield, D. A. A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 3270-3274, (1994)

Heo, H. J., Hong, S. C., Kim, H. K., Kim, E. K., Cho, H. Y., Hong, B. S. and Shin, D. H. Inhibitory effect of zeatin, isolated from *Fiatoua villosa*, on acetylcholinesterase activity from PC12 Cells. *Mol. Cells*, 13(1): 113-117 (2002)

Heo, H. J., Yang, H. C., Cho, H. Y., Hong, B. S., Lim, S. T., Park, H. J., Kim, K. H., Kim, H. K. and Shin, D. H. Inhibitory effect of *Artemisia asiatica* alkaloids on acetylcholinesterase activity from rat PC12 cells. *Mol Cells*, 10(3): 253-262 (2000)

Jang, J. H., Surh, Y. J. Protective effect of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutation Research*, 496: 181-190, (2001)

Kang S., Fisher J. and John J., Photoaging and topical tretinoin. *Arch. Dermatol.*, 133: 1280-1284 (1997)

Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., Butterfield, D. A. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 273-281, (2002)

Li, Y., Walker, D. W., King, M. A. Peroxide mediates ethanol-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 389-392, (2001)

Liu, Y. Schubert, .D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *Journal of Neurochemistry*, 69: 2285-2293 (1997)

Mario, B., Luigi, F., Sperandian, L. and Maggi, A. New acetylcholinesterase inhibitors. *Drug Fut.*, 22(4): 397-411 (1997)

Monji, A., Utsumi, J., Ueda, T., Imoto, T., Yoshida, I., Hashioka, S., Tashiro, K., Tashiro, N. Amyloid- β -protein (A β) (25-35)-associated free radical generation is strongly influenced by the aggregational state of the peptides. *Life Sciences*, 70: 833-841 (2002)

Oku, A., Ueta, K., Arakawa, K., Ishihara, T., Nawano, M., Kuronuma, Y., Matsumoto, M., Saito, A., Tsujihara, K., Anai, M., Asano, T., Kanai, Y. and Endou, H. T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes. *Diabete*, 48: 1794-1800 (1999)

Oda, Y. Choline acetyltransferase the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol. Int.*, 49: 921-937 (1999)

Park, C. H., Kim, S. H., Choi, W., Lee, Y. J., Kim, J. S., Kang, S. S., Suh, Y. H. Novel acetylcholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.*, 62: 405-409 (1996).

Peng, Q. L., Buz'Zard, A. R., Lau, B. H. S. Pycnogenol® protect neurons from amyloid- β peptide-induced apoptosis. *Molecular Brain Research*, 104: 55-65, (2002)

- Puntarulo, S., Cederbaum, A. I. Inhibition of ferritin-stimulated microsomal production of reactive oxygen intermediates by nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 340: 19-26, (1997)
- Resendiz-Huitron, S., Gombart, L., Cravatt, B. F., Henriksen, S. J. Effect of oleamide on sleep and its relationship to blood pressure, body temperature and locomotor activity in rats. *Exp. Neurol.*, 172: 235-243 (2001)
- Rieger, F., Shelanski, M. L., Greene, L. A. The effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase and its multiple forms in cultures of rat PC12 pheochromocytoma cells: Increased total specific activity and appearance of the 16S molecular form. *Dev. Biol.*, 76: 238-243 (1980)
- Rottkamp, C. A., Raina, A. K., Zhu, X., Gaier, E., Bush, A. I., Atwood, C. S., Chevion, M., Perry, G., Smith, M. A. Redox-active iron mediated amyloid- β toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 447-450, (2001)
- Serron, S. C., Dwivedi, N., Backes, W. L. Ethylbenzene induces microsomal oxygen free radical generation: antibody-directed characterization of the responsible cytochrome P450 enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164: 305-311, (2000)
- Stefan B. and Richard D. Granstein, UV-induced cutaneous photobiology. *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.*, 31: 381-404 (1995)
- Tsujihara, K., Hongu, M., Saito, K., Kawanishi, H., Kuriyama, K., Matsumoto, M., Oku, A., Ueta, K., Tsuda, M. and Saito, A. Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors as antidiabetic agents. 4. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives substituted on the B ring. *J. Med. Chem.*, 42: 5311-5324 (1999)
- Vedavanam, K., Sriyayanta, S., O'Reilly, J., Raman, A. and Wiseman, H. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE). *Phytother Res.*, 13: 601-608 (1999)

Wright, E. M. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.*, 55: 575-589 (1993)

Yoshioka, K., Saito, M., Oh, K.B., Nemoto, Y., Matsuoka, H., Natsume, M. and Abe, H. Intracellular fate of 2-NBDG, a fluorescent probe for glucose uptake activity, in *Escherichia coli* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60: 1899-1901 (1996)

Yallampalli, S., Micci, M. A., Tagliatela, G. Ascorbic acid prevent β -amyloid-induced intracellular calcium increase and cell death in PC12 cells. *Neuroscience Letters*, 251: 105-108, (1998)

Yamada, K., Nakata, M., Horimoto, N., Saito, M., Matsuoka, H. and Inagaki, N. Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 22278-22283 (2000)

최옥자, 약초의 성분과 이용. 일월서각, 1999.

부 록

학회 발표 및 논문 발표

2004년 한국식품과학회
제71차 학술대회
FUSION TECHNOLOGY in FOOD SCIENCE

기간 : 2004년 6월 23일(수)~25일(금)

장소 : 강원도 용평리조트



한국식품과학회

후원 : 강원도청, 한국학술진흥재단
한국과학기술단체총연합회

P7-121

식용식물 자원으로부터 amyloid β peptide-induced oxidative stress 저해 미량소재 검색

최수정*, 김미정, 조홍연, 홍범식, 김영준¹, 김혜경², 신동훈
고려대학교 생명공학원, ¹고려대학교 식품생명공학과, ²한서대학교 식품생물공학과

본 연구는 고유의 식용식물 자원으로부터 amyloid β peptide ($A\beta$)-induced 뇌신경 독성 저해 미량소재를 검색하고 이를 소재화 시키고자 식용식물자원을 대상으로 신경세포 과사저해 성분을 검색하였다. $A\beta$ 는 oxidative stress를 유발시키고 궁극적으로 cell death를 유도하여 뇌신경세포 파괴를 일으키는 것으로 보인다. 그러므로 $A\beta$ 는 Alzheimer's disease(AD)에서 중요한 pathogenetic material로 간주되고 있다. $A\beta$ -induced oxidative stress 저해 미량소재를 검색하기 위해 PC12 cell을 RPMI-1640 배지에서 배양하여 세포수가 10^4 - 10^6 cell/mL가 되었을 때 $A\beta$ 를 처리하여 oxidative stress를 유도한 후 oxidative stress 정도를 DCF-DA(2',7'-dichlorofluoresine diacetate) assay를 이용하여 측정하였다. 이후 oxidative stress에 의한 cell cytotoxicity를 MTT reduction assay를 통하여 측정하고 대조군과 식용식물자원 추출물을 전 처리한 군과 비교하였다. 그 결과 금앵자(*Rosa laevigata*)가 선정 시료들 중 $A\beta$ -induced oxidative stress로부터 가장 안정적인 보호효과를 보였다.

P7-122

**천연 식용자원으로부터 choline acetyltransferase(ChAT)
활성 촉진 물질의 검색**

김미정*, 최수정, 조홍연, 홍범식, 김영준¹, 김혜경², 신동훈
고려대학교 생명공학원, ¹고려대학교 식품생명공학과, ²한서대학교 식품생물공학과

Alzheimer's disease(AD)의 다양한 발병 원인 중 신경전달물질인 acetylcholine(Ach)의 현저한 감소에 연구초점을 두고 Ach의 생합성에 관여하는 효소인 choline acetyltransferase(ChAT)의 활성 촉진물질을 찾기 위해 약 100여 가지의 천연식용식물을 검색하였다. 각 시료의 활성 촉진효과를 측정하기 위해 MC-IXC (brain neuroblastoma) cell 과 [¹⁴C] acetyl-CoA를 이용하여 ChAT assay 계를 확립하여 사용하였다. 검색 결과, 1차 screening 단계에서 효과가 높은 구기자(32.8%), 쑥(46%), 탕자(25.8%)를 선정하였으며, 이들을 다시 2차 screening과 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용한 cytotoxicity test를 거친 결과, 촉진 효과가 높으며 또한 안정성이 있는 쑥(*Pueraria thunbergiana*)을 선택하였다.

2004 Annual Meeting
and International Symposium

"The Current Prospects of Functional and Medicinal Food"

November 17-19, 2004
Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju Island, Korea

Sponsored by

Korea Research Foundation
Korea Science and Engineering Foundation
The Korean Federation of Science of Science and Technology Societies
MONGSAM Co., Ltd.
WORLD WAY Co., Ltd.
Korea Nutrition Association
Korea Saenghik Association
ASA-USA
Jeju City

K&N

The Korean Society of
Food Science and Nutrition
Jeju-do, Cheju Natl Univ
Korea Food & Drug Administration

P10-78

The Behavioral Effects of Arrowroot (*Pueraria thunbergiana*) Treatment in Scopolamine-treated Mice

Mi-Jeong Kim^{1*}, Young-Min Seo¹, Soo-Jung Choi¹, Hong-Yon Cho¹, Bum-Shik Hong¹, Hye-Kyung Kim² and Dong-Hoon Shin¹. ¹Graduate school of Biotechnology, Korea University, Seoul, ²Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Seosan

Ninety Korean traditional tea plants were screened in search of the choline acetyltransferase (ChAT) activator from phytochemical. The arrowroot (*Pueraria thunbergiana*) was selected that showed highly activating effect. To investigate the effect of arrowroot (*Pueraria thunbergiana*) on the scopolamine-treated impairment learning and memory and acute toxicity in mice, *in vivo* test was performed. Mice were allowed free access to drinking water or containing methanol extract of arrowroot (*Pueraria thunbergiana*) water at the concentration of 0.15%, 0.32% and 0.53% for 3 weeks. After 3 weeks, scopolamine was intraperitoneal injected to the mice. Mice injected with scopolamine impaired performance compared to the control on the Y-maze test(43% decrease in alternation behavior) and the passive avoidance test(53% decrease in step-through latency). In contrast, mice treated with the methanol extract of arrowroot (*Pueraria thunbergiana*) prior to scopolamine injection were protected from these changes (approximately 2.5% increase in alternation behavior; 12~15% decrease in step-through latency). The acute toxicity experiment was undertaken to review the toxicity of methanol extract of arrowroot (*Pueraria thunbergiana*) on the activity of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) in blood serum of the mice. Values of GOT and GPT presented no significant differences.

P10-79

Protective Effect of *Rosa laevigata* against Amyloid Beta Peptide-induced Oxidative Stress

Soo Jung Choi^{1*}, Mi Jeong Kim¹, Hong Yon Cho², Bum Shik Hong², Hye Kyung Kim³ and Dong Hoon Shin². ¹Department of Food Technology, Korea University, ²Department of Food and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in aged population. The clinical feature of this disease is the senile plaque. The senile plaque is a small protein composed of approximately 40 to 42 amino acids,

known as the amyloid β peptide (A β). This peptide is derived from a precursor gene called the amyloid precursor protein (APP). The A β accumulates in the brain of AD patient. And many researchers believe this peptide is central to the pathogenesis of this disorder. In addition, AD brains are characterized by extensive oxidative stress. To find a protector against A β -induced oxidative stress, we screened various phytochemical extracts. The methanol extract of *Rosa laevigata* was selected by screening. The methanol extract of *Rosa laevigata* was solvent partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively. The second fraction of chloroform showed the highest defensive effect against oxidative stress. And the fraction was separated by silica-gel open column chromatography. The eighth fraction (second fraction of chloroform and methanol = 80:20, v/v) of thirty three fractions showed the best protective effect against oxidative stress.



2005 Program & Exhibit Directory

Saturday, July 16 – Wednesday, July 20

Morial Convention Center
New Orleans, Louisiana, USA



In this directory . . .

- A** Technical Program
- B** Directory of Exhibitors
- C** Exhibitors by Category
- D** Products/Services

IFT Annual Meeting DAYS

Saturday, July 16
Sunday, July 17
Monday, July 18
Tuesday, July 19
Wednesday, July 20

Food Expo® DAYS and HOURS

Sunday, July 17, 11:00a–5:30p
Monday, July 18, 11:00a–5:30p
Tuesday, July 19, 11:00a–5:30p

 **INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS**

The Society for Food Science and Technology

TECHNICAL PROGRAM

- 540-16 Potential of naturally derived phytochemicals as antioxidants and hypercholesterolemia management. **APOTINDO**, Univ. of Massachusetts, U.S.A., **Y. J. Liu, S. Terry**
- 540-17 Radical scavenging activity of phenolic compounds isolated from molberry (*Morus sp.*) fruit. **GAO**, Catholic Univ. of Daegu, R. O. K., **Y. Shin, S. Lim, S. Kim**
- 540-18 Radical scavenging properties and chelating capacities of ferulic and p-coumaric acids. **2002**, Univ. of Maryland, U.S.A., **Y. L. Yu, L. Yu**
- 540-19 Protective effect of *Alcea sativifolia* against ammonia toxic effects on rainbow trout. **2002**, Univ. of Daegu, R. O. K., **Y. Shin, S. Lim, S. Kim, H. Y. Cho, B. S. Hong, S. K. Kim, D. H. Min**
- 540-20 Antioxidant effects of flavonoids on DNA oxidative damage by the mechanism of hydrogen peroxide. **2002**, National Chung Cheng Univ., G. C. T.
- 540-21 Induction of apoptosis by anthracycline in human gastric cancer cell lines. **2002**, National Chung Cheng Univ., G. C. T.
- 540-22 Characterization of choline acetyltransferase (ChAT) activity expressed from *Panax ginseng* roots. **2002**, Korea Univ., Y. H. Cho, S. J. Cho, H. P. Cho, S. Y. Hong, H. B. Kim, S. H. Cho
- 540-23 Protective effects of ethanol extract against learning and memory impairment. **2002**, U.S.M., Korea Univ., S. J. Cho, H. P. Cho, S. Y. Hong, H. B. Kim, D. H. Min
- 540-24 The effect of scavenging activity and antioxidant effects of black currant polyphenol extract. **2002**, Seoul National Univ. of Technology, M. Kim, J. W. Kim, Y. J. Chung
- 540-25 Flavonoid content and antioxidant capacities of selected species genotypes determined by high-performance liquid chromatography. **2002**, Univ. of Arkansas, L. R. Brown
- 540-26 Isolation and characterization of anti-oxidant and antioxidant agents from ziziphi granules and their application in edible film. **2002**, Hanyang Univ., P.O. Box 127, Seoul, S. Korea, **S. Y. Lee, M. Suh, F. O. Iqbal, H. W. Park, S. C. Kim**
- 540-27 Treatment of lactulose with long chain (LC) PUFA by spray-dried technology: optimization by RSM-A. **2002**, U.S.M., Technical Univ.
- 540-28 Effect of riboflavin on the formation and binding of aflatoxin B₁ complex from corn, alfalfa and soybean in an *in vitro* simulation of the digestive tract. **2002**, U.S.M., **J. M. Gonzalez, J. S. Gonzalez, J. M. Gonzalez, B. J. McCarroll, J. P. Miller**
- 540-29 Cytotoxicity of terpenoids against tumor cell protein kinase C. **2002**, Louisiana State Univ. Agricultural Center, R. S. Barakat, S. Barakat, J. B. Lewis, A. Ezzamel
- 540-30 Omega-3 polyunsaturated fatty acid oxidation in egg yolk. **2002**, Louisiana State Univ. Agricultural Center, J. B. Lewis
- 540-31 Effect of water regulation on hardened permeability barrier disruption. **2002**, U.S.M., **Enji Cepanovic, A. Haidich, A. Gernig, J. Sogha, T. Yoshida, J. Kawai, E. Kawan, J. Nishida**

Session 548, Hall 1-2 POSTER SESSION: Quality Assurance-General

Session 548, Hall 1-2 Quality Assurance-General

- 548-1 Effect of long term storage on quality of retail packaged whole eggs. **2002**, Brigham Young Univ., A. S. Olson, L. S. Ogden, D. A. Pike
- 548-2 Effect of long term storage on the quality of commercially packaged whole eggs. **2002**, Brigham Young Univ., H. Farnsworth, L. S. Ogden, D. A. Pike
- 548-3 Quality of retail packaged whole egg products during long-term storage. **2002**, Brigham Young Univ., M. A. Lloyd, L. S. Ogden, D. A. Pike
- 548-4 Factors for quality maintenance of long-term storage shell eggs. **2002**, Univ. of Missouri, M. Park, M. Kim, C. H. Song, H. Park, S. G. Cho
- 548-5 Development of a new rapid method for measuring laying hen quality. **2002**, Univ. of Illinois, S. Park, L. K. Martin, A. A. Miron
- 548-6 Comparison of shelf-life of eggs stored with chlorine dioxide under various chlorination and desiccation times. **2002**, Catholic Univ. of Daegu, S. D. Kim, W. Park, H. K. Park, S. P. Moon
- 548-7 ISO laboratory standards: A guarantee of product safety and quality. **2002**, Mexican State Academy of Technology, Mirenia A. L. Mirenia
- 548-8 Effect of long term storage on quality of retail packaged whole eggs. **2002**, Brigham Young Univ., D. J. Beal, L. V. Ogden, D. A. Pike
- 548-9 Use of volatile acids to assess the bacteriological condition of an ISO 22000 certification program. **2002**, Univ. of Illinois, C. Bunn, M. Hoag, J. J. Nisbet
- 548-10 Evaluation of safety systems of cottage cheese. **2002**, Y.P.P.P.A.B.W. Univ. of Wisconsin, M. J. Mielke, M. J. Mielke
- 548-11 Microbial and physical-chemical changes in Danish type soft-ripened cheese. **2002**, U.S.M., **M. J. Hernandez, M. A. Naranjo**
- 548-12 Determination of total protein production. **2002**, Univ. of Illinois, E. Kim, L. D. Howe, E. SETABANIAN, Pennsylvania State Univ.
- 548-13 Rapid measurement of quality parameters in dry-lactating lactations by near-infrared spectroscopy. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**

- 548-14 Sensory quality control of functional food with an electronic instrument. **2002**, Univ. of Illinois, A. Baskin, M. D. Lee, T. Nopoulos, J. C. Hwang, Alpha-02, America, G. Calzini
- 548-15 Use of modulation as a sensory tool for food acceptance: influence on microbial load, functional properties, and yield of yogurt and whey. **2002**, Univ. of Illinois, M. H. Parvizi, L. J. Francis
- 548-16 Chemical and sensory characteristics of an herb blend made in Tuscany. **2002**, Univ. of Illinois, M. H. Parvizi, L. J. Francis
- 548-17 Measurement of dietary fiber in dairy feed rations using NDF. **2002**, Univ. of Illinois, M. H. Parvizi, L. J. Francis
- 548-18 Differentiation of milk origin and origin using NDF and sensory analysis. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 548-19 Protein changes in dairy rations of different compositions. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 548-20 Quality changes of raw milk blends of different lactations. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 548-21 Taste properties of commercial whole milk blends during storage. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 548-22 Microbiological survey of commercial RTU vegetable products in different types of MAP packaging. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 548-23 Effect of consumer information about the microbial quality of commercial fresh apple and orange juice. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 548-24 Microbial survey of three different brands of retail packaged turkey. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 548-25 Changes of physical and chemical characteristics and sensory properties of meat for long-term storage. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**

Session 548, Hall 1-2 POSTER SESSION: Technology & Safety Evaluation-General

Session 548, Hall 1-2 Technology & Safety Evaluation-General

- 549-1 Effect of freezing on removal of milk protein from a stainless steel surface. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-2 Evaluation of protein protein to milk fats from stored material. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-3 Commercial 1184 kits for protein residue detection, compared to methods to protein residue detection. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-4 Sensitivity of 1184 kits for protein residue detection. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-5 Sensitivity of 1184 kits for protein residue detection. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-6 Sensitivity of 1184 kits for protein residue detection. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-7 Sensitivity of 1184 kits for protein residue detection. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-8 Sensitivity of 1184 kits for protein residue detection. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-9 Sensitivity of 1184 kits for protein residue detection. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-10 Sensitivity of 1184 kits for protein residue detection. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-11 Case study for natural gas burner tank generality modified fuel to fuel emergency. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-12 Acrylamide occurrence and its control in potato chips. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-13 Reduction of the occurrence of acrylamide in potato chips. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-14 Effect of frying oil quality and frying time on the acrylamide content of food. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-15 Monitoring of acrylamide in food products produced in France. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-16 Occurrence of protein allergens M1 in human breast milk from Asian area of Turkey by high performance liquid chromatography. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-17 High performance liquid chromatography of acrylamide from potato chips. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**
- 549-18 Evaluation of acrylamide in cereals after treatment. **2002**, U.S.M., **J. W. Ross, J. W. Ross**

54G-19

Protective effect of *Rosa laevigata* against amyloid beta peptide-induced neuronal cell death

S. J. CHOI¹, M. J. Kim¹, H. J. Hoo¹, H. Y. Cho¹, B. S. Hong¹, H. K. Kim², and D. H. Shin¹. (1) Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea Univ., 1, 5-ga, Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul, 130-701, South Korea, (2) Dept. of Food and Biotechnology, Hangeo Univ., Deogok-1 360, Haewi-myeon, Seosan, Chungnam, 366-706, South Korea

The excessive accumulation of amyloid beta peptide (A β) in the brain is a major characteristic of Alzheimer's Disease (AD). Overproduction of A β by genetic or other mechanisms leads to A β -associated free-radical oxidative stress. The oxidative stress is manifested by reactive oxygen species (ROS) formation. Ultimately, the neuron is injured. Antioxidants are able to cope with these processes. The ameliorative effect against A β -induced oxidative stress was investigated using PC12 cells. We screened various edible plant extracts. The methanol extract of *Rosa laevigata* was selected by screening. The extract was evaluated by the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. To find the active component, the methanol extract of *Rosa laevigata* was solvent partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively. The second fraction of chloroform showed the highest defensive effect against oxidative stress. This fraction was submitted to the open silica-gel column chromatography. The eighth fraction (second fraction of chloroform and methanol=80:20, v/v) of thirty three fractions was selected. The fraction was separated by TLC. And then the fifth band (R_f value 0.54) represented the highest activity. The obtained sample was performed on HPLC. The significant single peak was detected at 317.6 nm. In this study the methanol extract of *Rosa laevigata* attenuated the A β -induced oxidative stress on PC12 cells. Therefore, *Rosa laevigata* should be useful to slow or reverse the pathology and course of AD.

Session 24G, Neurobiology & Functional Foods, General II
2:00 PM - 5:30 PM, Monday PM Room Hall 1-2

2005 IFT Annual Meeting, July 15-20 - New Orleans, Louisiana

54G-22

Characterization of choline acetyltransferase (ChAT) activating compound from *Pueraria thunbergiana* Benth

M. J. KIM¹, Y. M. Seo¹, S. J. Choi¹, H. Y. Cho¹, B. S. Hong¹, H. K. Kim², and D. H. Shin¹, (1) Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea Univ., 1,5-ga Anam-dong Sungbuk-gu, Seoul, 136-701, South Korea, (2) Dept. of Food and Biotechnology, Hansoo Univ., DaeGok-4 360, HeeMi-myeon, Seosan, ChungNam, 366-706, South Korea

Alzheimer's Disease (AD) is most common cause of progressive cognitive dysfunction. ChAT activity was significantly lower in patients with AD than in age-matched control subjects in frontal cortex, hippocampus, and cerebellum. ChAT catalyzes the synthesis of acetylcholine (ACh) in cholinergic neurons. The goal of the study is to clarify information concerning ChAT activating compound from *Pueraria thunbergiana* Benth, which is mainly focused on purification and structural characteristics. *Pueraria thunbergiana* Benth was selected by screening. The methanol extract of *Pueraria thunbergiana* Benth was solvent partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively. ChAT activity was determined by measuring the conversion of [¹⁴C]acetyl coenzyme A to [¹⁴C]acetylcholine with liquid scintillation counter. Our results showed that the fraction of ethyl acetate exhibited the highest ChAT activating effect from the methanol extract of *Pueraria thunbergiana* Benth. This fraction was submitted to the first and the second silica-gel column chromatography. Then, 16-18 fractions (first, second and third fractions of chloroform: methanol=85:15, v/v) of twenty four fractions were selected at second silica-gel column chromatography. These fractions were separated by TLC. The obtained sample was performed on HPLC. The significant single peak was detected at 248.5 nm. Finally, the purified fraction was characterized by structural analysis. The structure of ChAT activating compound was similar to that of isoflavone. These results suggest that the compound, which is similar to isoflavone, from *Pueraria thunbergiana* Benth should be useful for the prevention of neurodegenerative disease such as Alzheimer's Disease.

Session 54G, Nutraceutical & Functional Foods, General II
2:00 PM - 5:30 PM, Monday PM Room Hall 1-2

2005 IFT Annual Meeting, July 15-20 - New Orleans, Louisiana

(2005/07/29 14:28:51)

Close

Temporary Manuscript Number: ey18768799
 Manuscript Number: 50294

Corresponding Author

Affiliation	Graduate School of Biotechnology, Korea University
Full address	Graduate School of Biotechnology (#206), Korea University, 5-1, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-701, Korea
Postal code	136-701
Country	Republic of Korea
TEL	82-2-923-8732
Extensist	
FAX	82-2-3290-3429
First Name	Dong-Hoon
Last Name	Shin
Membership No.	
E-MAIL	dhsin@korea.ac.kr

Manuscript classification

Kind of paper	Regular Paper
Subject Categories	Food & Nutrition Science
Classification of Research Field (Primary)	II - 2) Isolation and Structure Determination of Bioactive Substances
Classification of Research Field (Secondary)	V - 2) Chemistry and Biochemistry
Title	
Title	Daidzein activates choline acetyltransferase from MC-1XG cells and improves drug-induced annesia
Running title	Daidzein activates choline acetyltransferase
Statement of originality	Yes

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

**Daidzein activates choline acetyltransferase
from MC-IXC cells and
improves drug-induced amnesia**

Ho Jin Heo^{1,2}, Young-Min Suh², Mi-Jeong Kim², Soo-Jung Choi²,
Nam Shik Mun³, Hye-Kyung Kim⁴, Eun-ki Kim⁵,
Chang-Joo Kim⁶, Dong-Hoon Shin^{1,*}

¹*Jeonnam Innovation Agency, Industrial-University Cooperation Center Building # 205,*

Maegok-dong 313, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea.

²*Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea.*

³*Department of Psychiatry, College of Medicine, Chonnam University,*

Gwangju 501-759, Korea.

⁴*Department of Food Biotechnology, Hanyang University, Seoul 156-706, Korea.*

⁵*Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea.*

⁶*Department of Physiology, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea.*

* Corresponding author: TEL.: + 82-2-923-8732; fax +82-2-3290-3429

E-mail address: dshin@korea.ac.kr (D. H. Shin).

1 **ABBREVIATIONS USED**

2 AD, Alzheimer's disease; ACh, acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase; ChAT,
3 choline acetyltransferase; SCOP, scopolamine

4

5 **ACKNOWLEDGEMENT**

6 This work was supported by Technology Development Program of the Ministry of
7 Agricultural and Forestry, Republic of Korea

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

July 21, 2006

Dr. Dong H. Shin
Graduate School of Biotechnology
Korea University
Anam-dong 5-1
Seongbuk-gu
Seoul 136-701
Republic of Korea

Re: MS 405-100647

Dear Dr. Shin:

The policy of *AMYLOID: The Journal of Protein Folding Disorders* is that all authors have read and agreed with the content of manuscripts submitted to or published in our journal. Since multiple authors are often spread about the globe in this international journal, we are willing to simplify matters by having the corresponding author signify the above.

Please sign and enclose the following on submission of your manuscript:

Title of manuscript:

*"Protective effect of *Beta faecigata* against amyloid beta peptide-induced oxidative stress"*
S.J. Choi, M.J. Kim, H.J. Hoo, H.K. Kim, E. Kim, B. Hong and D.H. Shin

All listed authors of the manuscript mentioned above have read and agree with the content of this paper.

Signed:  (Corresponding Author)

Date: July 22, 2006

1 **Protective Effect of *Rosa laevigata* against**
2 **Amyloid Beta Peptide-induced Oxidative Stress**

3
4 SOO JUNG CHOI¹, MI JEONG KIM¹, HO JIN HEO², HYE KYUNG KIM³, EUNKI
5 KIM⁴, BUMSHIK HONG⁵ AND DONG HOON SHIN⁵

6
7 1. Department of Food Technology, Korea University, Seoul, 136-701, Korea.

8 2. Joanneum Innovation Agency, Suncheon National University, Suncheon 540-742,
9 Korea.

10 3. Department of Food Biotechnology, Hansoo University, Seosan 356-706, Korea.

11 4. Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea.

12 5. Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea.

13
14 **Key Words:** amyloid beta peptide, oxidative stress, rat pheochromocytoma cells

15
16 **Abbreviations:** A β = amyloid β ; AD = Alzheimer's disease; ROS = reactive oxygen
17 species; DCFDA = 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-
18 yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

19
20 Corresponding author (D. H. Shin: Graduate School of Biotechnology, Korea University,
21 Anam-dong 5-1, Seongbuk-gu, Seoul 136-701, Republic of Korea
22 Tel.: +82-2-923-8732, Fax: +82-2-3290-3429, E-mail address: jhshin@korea.ac.kr)

1 A β -induced oxidative stress and might be used to ameliorate chemopreventive agents in

2 AD.

3

4

5 **Acknowledgement**

6 This work was supported by Technology Development Program of the Ministry of

7 Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

특허 출원

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2005.06.30
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2005-0057720 (결구번호 1-1-2005-0353526-58)
출원명칭 고려대학교 신학대학원(2-2004-017068-0)
대리인 설명 이문섭(9-1999-000251-8)

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하나 출원번호통지서는 출원일과 출원료 납부일(출원일로부터 1년 6개월 경과) 심사청구순서에 따라, 특별출원 및 심의종결 출원료 납부 후(출원일로부터 1년 6개월 경과) 심사청구순서에 따라, 특별출원 및 심의종결 출원료 납부 후(출원일로부터 1년 6개월 경과) 심사청구순서에 따라, 심사청구 특별출원료 출원일로부터 5년 이내에 특허청사정규칙 별지 제24호서식에 따라 심사청구료 납지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
2. 무선심사 특허출원 또는 특별출원출원료 대해 조기에 심사청구를 원하시면 무선심사제도를 이용하실 수 있습니다. (* 무선심사료 대상, 신청일자 및 자택한 내용은 특허청 홈페이지 <http://www.kipo.go.kr> 기재내역안내내의 무선심사안내내를 참조하시기 바랍니다.)
3. 기술평가 상용신인의 경우 제3자에 대하여 권리행사를 하기 위해서는 기술평가물 청구하여야 하며 기술평가물 생략하여 특허 기술평가물청구순서에 따라 기술평가물 납부합니다.
4. 주소 및 변경신고 출원인의 주소 변경 변경신고 하는 경우에는 특허청 사정규칙 별지 제4호의 고서식에 의한 출원인 정보변경(공정) 신고서를 제출하여야 합니다. 신고서식은 지방 상공회의소에 비치되어 있으며, 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr>)에 게재되어 있습니다.
5. 산업재산권 표시, 출고요청 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다른과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조를 따라 처벌 받게 됩니다.
- 6) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 의공등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 우리청 종합민원실(042-481-5220~2)이나 출원과(042-481-5201~3) 또는 특허청 서울 사무소(02-568-6079)에 문의하시기나 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr>)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 풍산동 929 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한라지식센터
FAX 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-568-8404

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【관리구분】 특허
【수신처】 특허청
【제출일자】 2005.06.30
【발명의 국문명칭】 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제 활성화 기능을 갖는
귀 추출물
【발명의 영문명칭】 Pueraria thurbergiana extract having an activity of
activating choline acetyltransferase in brain nerve
cells
【출원인】
【명칭】 고려대학교 신약협력단
【출원인코드】 2-2004-017068-0
【대리인】
【성명】 이문섭
【대리인코드】 9-1999-000251-8
【포괄위임등록번호】 2005-016440-4
【대리인】
【성명】 권여강
【대리인코드】 9-2002-000126-9
【포괄위임등록번호】 2004-090886-1
【발명자】
【성명】 신동훈
【성명의 영문표기】 SHIN, Dong Hoon
【주민등록번호】 560327-1002521
【우편번호】 135-991
【주소】 서울 강남구 일선동 716 목련아파트 106-304

【국적】 KR
【발명자】
【성명】 조홍연
【성명의 영문표기】 CHO, Hong Youn
【주민등록번호】 510921-1458517
【우편번호】 136-773
【주소】 서울 성북구 돈암1동 633 동부센트럴빌아파트 103-1002
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 홍번식
【성명의 영문표기】 HONG, Ban Shik
【주민등록번호】 541021-1004711
【우편번호】 110-530
【주소】 서울 종로구 혜화동 15-162
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 김혜경
【성명의 영문표기】 KIM, Hyei Kyung
【주민등록번호】 530203-2066846
【우편번호】 449-160
【주소】 경기 용인시 죽전동 새터마을 현대아파트 708-001
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 김미경
【성명의 영문표기】 KIM, Mi Jeong
【주민등록번호】 760419-2473510
【우편번호】 122-043
【주소】 서울 은평구 불광3동 421-7

【국적】 KR
【발명자】
【성명】 최수정
【성명의 영문표기】 Choi, Soo Jung
【주민등록번호】 781212-2390015
【우편번호】 120-180
【주소】 서울 서대문구 월계동 5-88 201호
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 서영민
【성명의 영문표기】 Suh, Young Min
【주민등록번호】 740315-1156811
【우편번호】 402-025
【주소】 인천 남구 동천5동 627-288 9/5
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 허홍진
【성명의 영문표기】 Heo, Ho Jin
【주민등록번호】 700301-1550518
【우편번호】 640-742
【주소】 전남 순천시 해곡동 315 순천대학교 신학협력관 205호 전남
 전학산업기획단
【국적】 KR
【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제80조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이현섭 (인) 대리인
윤여경 (인)

【수수료】

【기본출원료】	0	면	38,000	원
【가산출원료】	25	면	0	원
【우선권우장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	5	항	209,000	원
【합계】	307,000 원			
【관련서류】	전달조직원			
【관련후 수수료】	153,500 원			
【첨부서류】	1. 전달조직원들 증명하는 서류_1통			

【요약】

【요약】

본 발명은 귀 추출물의 새로운 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제(cholineacetyltransferas, ChAT) 활성화 기능을 갖는 귀 추출물, 상기 귀 추출물에서 분리된 콜린아세틸트랜스퍼라제 활성화 기능을 갖는 저분자성 Flavonoid류인 다이드제인(Daidzein) 및 그의 정제 방법에 관한 것이다.

본 발명은 뇌 신호전달 관련 연구가 전무한 국내 식용 생물자원인 귀으로부터 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제 활성화 물질인 다이드제인(Daidzein)을 분리 및 정제하였고 그 정제공정의 효율성을 제고하였다. 따라서, 귀 추출물에 포함된 저분자성 유효 성분은 뇌신경 질환의 치료 및 예방을 위한 기능성 식품 또는 의약품의 신호전달로서 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 5

【색인어】

귀, 콜린아세틸트랜스퍼라제

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2005.06.24
 액기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2005-0054837 (광수번호 1-1-2005-0335690-84)
 출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
 대리인성명 이문섭(9-1999-000251-8)

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하므로 출원번호통지서는 출원번호가 필요할 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 심사 특허출원일 출원 공개 후 (출원일로부터 1년 6개월 경과) 심사청구순서에 따라, 최종등록출원 및 심도특허 출원은 출원순서에 따라 실시하여 심사결과를 출원인에게 통지합니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 따라 심사청구를 하지 않으면 그 출원권 출원취하된 것으로 간주하여 기간경과를 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 의결특허출원의 대해 조기에 심사봉기를 요청하면 우선심사제도를 이용할 수 있습니다. (※ 우선심사의 대상, 신청절차 및 자세한 내용은 특허청 홈페이지 <http://www.kipo.go.kr> 지재경제도움데스크 우선심사안내코너를 참조하시기 바랍니다.)
5. 기술평가 실용신안의 경우 제3자에 대하여 권리행사를 하기 위해서는 기술평가물 청구하여 일체유지결정을 받거나 특허 기술평가청구순서에 따라 기술평가물 실시합니다.
6. 주소 및 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 변경변경(공정) 신고서를 제출하여야 합니다. 신고서작성 지원 공공화민소통 위치되어 있으며, 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr>)에 게재되어 있습니다.
7. 산업재산권 표시, 광고모형 특허 등 산업재산권을 출원 출원 있는 경우에는 해당 산업재산권 출원상태를 다른과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 따라 처벌 받게 됩니다.
 (※) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 우리청 통합민원실(042-481-5770~2101) 출원과(042-481-5201~5) 또는 특허청 서울 사무소(02-569-6070)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr>)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 둔산동 925 정부대전청사 4층
 특허청 서울사무소 주소 535-011 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-966-8454

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【관리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2005.06.24
【발명의 국문영칭】 아밀로이드 베타에 의한 뇌세포 손상 저해 활성을 갖는 분
자 추출물
【발명의 영문영칭】 *Rosa laevigata* Michx extract having an activity of
inhibiting amyloid β -induced brain cell damages
【출원인】
【명칭】 고려대학교 산학협력단
【출원인코드】 2-2004-017068-0
【대리인】
【성명】 이문성
【대리인코드】 9-1999-000251-9
【모글워딩등록번호】 2005-016440-4
【대리인】
【성명】 공여강
【대리인코드】 9-2002-000126-9
【모글워딩등록번호】 2004-090685-1
【발명자】
【성명】 신동훈
【성명의 영문표기】 SHIN, Dong Hoon
【주민등록번호】 560227-1002521
【우편번호】 135-503
【주소】 서울 강남구 도곡동 105-8 옥상환신아파트 4-1201
【국적】 KR
【발명지】

27-1

【성명】 조홍연
【성명의 영문표기】 CHO, Hong Youn
【주민등록번호】 500821-1458517
【우편번호】 136-773
【주소】 서울 성북구 돈암1동 633 동부센트레빌아파트 103-1002
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 홍병석
【성명의 영문표기】 HONG, Sun Shik
【주민등록번호】 541021-1004711
【우편번호】 110-070
【주소】 서울 종로구 내수동 72 경희궁여과초 3단지 1210
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 최수정
【성명의 영문표기】 CHOI, Soo Jung
【주민등록번호】 781212-2390015
【우편번호】 120-113
【주소】 서울 서대문구 연희3동 58-25 301호
【국적】 KR
【발명자】
【성명】 김미경
【성명의 영문표기】 KIM, Mi Jeong
【주민등록번호】 760419-2473510
【우편번호】 122-043
【주소】 서울 은평구 불광3동 421-7
【국적】 KR
【발명자】

【성명】 김혜경
【성명의 영문표기】 KIM, Hye Kyung
【주민등록번호】 530203-2066846
【우편번호】 356-706
【주소】 충남 서산시 해미면 마곡리 360 한서대학교 식품생명공학과
【국적】 KR
【발령지】
【성명】 허호진
【성명의 영문표기】 HEO, Ho Jin
【주민등록번호】 700301-1550518
【우편번호】 540-742
【주소】 경남 순천시 대곡동 315 순천대학교 경남권학신입기숙사
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 이문섭 (인) 대리인
 공여광 (인)
【수수료】
【기본출원료】 0 원 38,000 원
【가신출원료】 24 원 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 5 원 260,000 원
【합계】 307,000 원
【관련사유】 전담조직
【관련후 수수료】 153,500 원



【중부서류】

1.관급조직원을 증명하는 서류_18

27-4

【요약서】

【요약】

본 발명은 근염자 추출물의 새로운 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 아밀로이드 베타(amyloid β)에 의한 뇌세포 손상 저해 활성을 갖는 근염자 추출물 및 상기 추출물에서 분리된 유효성분인 1,2-벤젠디카르복실산 디노닐에스터(1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester)에 관한 것이다.

본 발명은 뇌 신호세포 관련 연구가 전무한 국내 식용 생물자원인 근염자로 부터 아밀로이드 베타(amyloid β)에 의한 뇌신경 독성 저해 물질을 분리 및 정제 하였고 그 정제과정의 효율성을 제고하였다. 따라서, 근염자에 포함된 저분자성 유효 성분은 뇌신경 질환의 치료 및 예방을 위한 기능성 식품 또는 의약품의 산소 재료로서 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 5

【색인어】

근염자, 아밀로이드 베타