

최 종
연구보고서

GA0472-0271

유지자원부산물로부터 치매예방용 식품소재 및 노인식 개발

Development of food material for the prevention of dementia from
oil seed by-products

연 구 기 관
한국식품개발연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유지자원 부산물을 이용한 치매예방용 식품소재 및 노인식 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 27일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 하 태 열

세부연구책임자 : 금 준 석

연 구 원 : 이 현 유

연 구 원 : 한 찬 규

연 구 원 : 이 남 혁

위탁연구기관명 : 호서대학교

위탁연구책임자 : 강 명 화

요 약 문

I. 제 목

유지자원 부산물을 이용한 치매예방용 식품소재 및 노인식 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리나라 65세 이상 노인인구의 약 8.3%가 노인성 치매 환자이며 그 수는 점차 늘어나 2020년까지 전체 노인인구의 약 10%를 차지 할 것으로 전망되고 있어 많은 사회적, 경제적 문제점이 야기 될 것으로 생각된다. 그러므로 치매에 대한 원인과 치료에 대한 연구가 절실히 요구되어 치매치료 또는 개선제의 개발이 의, 약학계를 비롯하여 다양한 측면에서 연구되고 있다. 또한 치매는 일단 발병하면 완전 치료가 쉽지 않은 만큼 예방이 매우 중요하며, 치매예방을 위해서는 식생활이 매우 중요하게 대두되고 있다. 한편 우리나라 고유의 유지자원인 들깨, 참깨, 홍화의 탈지박에는 산화적 스트레스를 억제하는 강한 항산화 작용이 있고 이 산화적 스트레스가 치매의 병인중의 하나라는 점 등으로 미루어 볼 때 탈지박은 치매예방소재로서의 가능성이 매우 높다고 할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 압착 착유한 탈지박으로부터 치매예방기능성을 검색하고 활성소재의 대량분리 및 이용기술을 개발하여 치매예방용 식품소재 및 노인식을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 치매예방 활성 탐색 및 효능평가(*in vitro*, *in vivo*)
2. 탈지박 소재를 이용한 노인식의 개발
3. 탈지박 소재의 구조특성 및 분리

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 치매 예방소재의 탐색 및 효능평가(*in vitro, in vivo*)

*in vitro*계에서의 탈지박 소재의 치매예방 탐색 및 효능 평가는 acetylcholinesterase(AChE) 억제활성, 산화적 스트레스 억제활성 및 PC12 cell의 세포독성 억제활성등을 조사하였다. 탈지박 메탄올 추출물의 AChE 저해활성을 조사한 결과, 볶음 처리한 탈지 참깨박 및 홍화박에서 높은 활성을 나타내었고 첨가농도가 높을수록 높은 저해 활성을 나타내었다. 탈지박 용매 분획물의 AChE 저해활성을 조사한 결과, 볶은 참깨박과 볶은 들깨박의 chloroform과 n-butanol 획분에서 50%이상의 저해활성을 나타내었다. 탈지 들깨박 추출물은 PC-12 cell에 있어서 glutamate 또는 β -amyloid protein유래 세포독성을 효과적으로 억제하였다. 또한 탈지들깨 추출물 및 각종 효소(β -glucosidase, cellulase, deer-land)로 가수분해한 시료를 이용하여 *in vitro*계에서의 치매예방 활성을 평가한 결과, 들깨박 추출물 첨가는 AChE의 활성을 농도 의존적으로 저해하였다.

탈지 참깨 및 들깨박 메탄올 추출물의 *in vivo* 효능을 검토하고자 노화촉진 마우스(SAMP8)를 이용하여 추출물 첨가 식이를 3개월간 급여한 뒤 passive avoidance test와 water maze test로 인지기능의 변화를 측정하였고 뇌중 acetylcholinesterase 활성, 지질과산화물 및 항산화효소활성을 분석한 결과, 탈지 참깨 및 탈지 들깨의 메탄올 추출물이 노화촉진으로 감소한 step through latency를 증가시키고 체내 지질 과산화물을 유의하게 감소시켰으며 SOD와 GPx의 활성은 증가시킴으로서 노화촉진으로 손상된 인지기능을 개선하는 것으로 나타났다. 또한 β -amyloid protein을 투여하여 치매를 유발시킨 ICR mouse와 노화촉진 SAMP8 마우스를 이용하여 탈지 들깨박 유효획분이 인지기능에 미치는 영향을 조사한 결과, 탈지 들깨박 유효획분은 인지기능의 손상을 예방하는 것으로 나타났다. 또한 들깨박 유효획분은 β -amyloid protein투여로 감소된 체내 항산화효소의 활성을 증가시키고, 지질 과산화물의 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

2. 탈지박 소재를 이용한 노인식의 개발

탈지박 추출물을 함유한 노인용 유동식 및 paste, 과립제품 및 음료를 개발하였고 탈지박 유효획분을 함유한 빵 및 음료를 개발하였다. 유동식의 제조에 있어서 특정 질감과 향미를 나타내기 위하여 팽화미보다는 알파화시킨 찹쌀가루를 첨가하는 것이 풍미와 질감이 우수하였고 잔탄검을 첨가함으로써 저장 중 층이 분리되는 것을 억제할 수 있었다. 탈지박 추출물 함유 paste의 경우 탈지박 추출물과 팔 앙금을 주성분으로 하였고 과립 제품은 탈지박 추출물과 말토덱스트린 및 옥수수전분올을 일정비율로 혼합하여 제조하였다. 또한 탈지박 유효획분을 함유한 빵으로 머핀을 개발하였다. 유효획분을 첨가한 머핀은 첨가하지 않은 대조 머핀에 비하여 조직감이나 부피의 변화등에 다른 영향을 미치지 않았고 향 등의 항목에서는 오히려 더 높게 평가되었다. 탈지박 유효획분을 이용하여 감초추출물, 복분자 추출물 및 사과 추출물등을 이용하여 최적 배합비를 검토하고 음료제품을 개발하였다.

3. 탈지박 유효획분의 구조특성 및 분리

볶음 처리, 탈지된 참깨박, 홍화박 및 들깨박을 메탄올로 추출한 뒤 silica gel을 충전한 open column을 이용하여 hexane, chloroform, butanol, ethyl acetate, methanol획분으로 분획하였다. 활성이 높은 분획물은 XAD-2 및 Diaion HP-20을 충전한 open column에 적용하여 분리능을 검토하였다. 참깨를 HP로 분리 하였을 경우 참깨 유효획분(SG)의 수율이 가장 높게 나타났고 이렇게 추출된 SG에 각종 효소(β -glucosidase, cellulase, deerland cellulase 4000) 및 acid, alkali로 분해한 결과 β -glucosidase처리가 가장 좋은 것으로 나타났다. 들깨를 silicagel 충전 open column을 통해 분리한 물질중 F3은 복합 물질임에도 합성항산화제인 BHT와 비슷한 매우 강한 항산화 효과를 가지고 있었다. 또한 들깨박 및 참깨박 함유 유효획분에 대하여 HPLC, LC-Mass, NMR등을 통하여 유효성분을 분리하였고 일부 구조특성을 분석하였다.

SUMMARY

I. Title

Development of food material for the prevention of dementia from oil seed by-products

II. Objective and Significance of Research

Dementia, which is progressive and degenerative neurological disorder has been increased in modern society with increasing of the elderly people. About 8.3 % of elderly people over 65 are suffering from dementia, and would be reached 10% by 2020. However, there is no specific therapeutic or preventing agent for senile dementia. Most of studies in this area are focused on the developing agent from natural sources.

On the other hand, defatted oil seeds such as sesame, perilla and contain various antioxidant materials protecting against from oxidative stress which is well known as one of causes of dementia. This study was performed to evaluate preventing activity for senile dementia from defatted oil seed *in vitro* and *in vivo*. It was also examined the development of the silver food for prevention of senile dementia by using defatted oil seed.

III. Scope of Research

1. Assay of preventive activities for dementia in *in vitro* and in *in vivo*
2. Development of the food for elderly people from the extract of defatted oil seed
3. Isolation and purification of active compound from defatted oil seed

IV. Results and Recommendation

1. Evaluation of preventing activity for dementia *in vitro* and *in vivo*.

Acetylcholinesterase inhibitory activity and protective effect against cytotoxicity induced by beta amyloid protein or glutamate were assayed in defatted oil seed methanol extract and its five solvent fractions. The methanol extracts of oil seeds had the inhibitory acetylcholinesterase activity in a dose-dependant manner. n-Butanol fractions showed the strongest inhibitory activity of acetylcholinesterase among five solvent fractions,. Oil seed methanol extract also inhibited the glutamate or β -amyloid protein ($A\beta$) induced cytotoxicity of PC12 cells in a dose-dependant manner. The formation of TBARS induced by $FeSO_4-H_2O_2$ in rat brain was significantly reduced by oil seeds methanol extracts. The strongest protective activity against the formation of TBARS was shown in n-butanol fractions among five solvent fractions of methanol extract.

It was also investigated the effect of defatted sesame and perilla methanol extracts on the cognitive function and antioxidant activity in SAM P8 mice, which is leaning and memory impairment animal model. As a result, defatted sesame or defatted perilla methanol extracts attenuated the impairment of learning and memory by significant increasing step through latency, reducing brain TBARS contents and increasing brain superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in SAM P8. The effect of defatted oil seeds active fraction on cognitive deficits and oxidative stress induced by beta-amyloid protein in mice was examined. Changes in behavior of mice were evaluated by using the passive avoidance and water maze test. defatted oil seeds active fraction showed the protective effects against beta-amyloid protein induced deficits in learning and memory in dose dependant manner. The supplementation of defatted oil seeds active fraction decreased activities of serum acetylcholinesterase, and TBARS, but increased antioxidant relative enzymes.

2. Development of the food for elderly people from the extract of

defatted oil seeds.

Effect of defatted oil seeds extract on the quality properties of wheat flour muffin were investigated. It was also developed granule, beverage and paste for elderly by examination of ingredients, combination formular and sensory evaluation.

3. Isolation and purification of active compound from defatted oil seed

Ground and defatted oil seeds were extracted with methanol. Methanol extracts were further fractionated with various solvent such as hexane, cholroform, ethyl acetate, butanol and methanol by using open column filled with silicagel. The lignan content in each solvent fraction was analyzed by HPLC. Active fraction was further isolated by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) system and identified by using NMP and LC-Mass. In order to decide the optimal methods for large scale extraction from oil seeds by-products, roasted and defatted oil seeds were extracted with hot water. The water extracts were applied to Diaion HP 20 open column and eluted 60% ethanol. The eluted ethanol fraction was evaporated.

CONTENTS

SUMMARY	
Chapter 1. Objective and Scope	
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology	
Chapter 3. Experimental Methods and Results	
1. 제 1 절 탈지박으로부터 치매예방소재의 탐색 및 효능평가 (<i>in vitro</i>)	
A. Materials and methods	
1) Preparation of sample	
2) Assay of acetylcholinesterase inhibitory activity	
3) Assay of protective activity against cytotoxicity of PC12 cell	
4) Assay of protective activity against oxidative stress	
B. Results and Discussion	
1) Acetylcholinesterase inhibitory activity	
2) Protective activity against cytotoxicity of PC12 cell	
3) Protective activity against oxidative stress	
2. Evaluation of preventive effect of dementis of defatted oil seeds <i>in vivo</i>	
A. Establishment of animal model for preventive effect of dementia <i>in vivo</i>	
I. Establishment of beta amyloid protein induced ICR mouse model	
1. 재료 및 방법	
2. 결과 및 고찰	
II. SAMP8 mouse를 이용한 치매의 유도 및 효능검토를 위한 모델검토	
1. 재료 및 방법	
2. 결과 및 고찰	

제 2 항 탈지박 메탄올 추출물의 *in vivo* 효능 검토

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 3 항 탈지박 유효획분의 *in vivo* 효능 검토

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

I. 들깨박 유효획분의 ICR 마우스에 대한 기억력 개선 효과

II. 들깨박 유효성분의 SAMP8 마우스에 대한 기억력 개선 효과

제 3 절 탈지박 소재의 이화학적 특성 및 이를 활용한 노인식 개발

제 1 항 탈지박 소재의 이화학적 특성조사

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 2 항 노인용 유동식

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 3 항 과립화 제품

제 4 항 머핀

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 5 항 음료

1. 실험재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 6 항 Paste

1. 실험재료 및 방법
2. 결과 및 고찰

제 4 절 탈지박 유효성분의 구조특성 및 분리

제 1 항 실험 재료 및 방법

1. 실험재료
2. 유효성분의 추출방법
3. 향산화효과 측정

제 2 항 실험결과 및 고찰

1. 탈지박 함유 천연 향산화 물질의 추출 및 분리
2. 유효획분의 대량 추출 조건 검토
3. 유효획분의 대량 분리
4. 참깨박, 들깨박 함유 미지 물질 화학구조 동정 및 지표물질 설정

Chapter 4. Attainment of Objectives and Contribution

Chapter 5. Applications of the Results

Chapter 6. Applications of the Results

Chapter 7. References

목 차

요 약

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 탈지박으로부터 치매예방소재의 탐색 및 효능평가 (*in vitro*)

제 1 항 재료 및 방법

1. 시료추출
2. Acetylcholinesterase 억제활성 평가
3. 세포독성 보호효과 평가
4. 산화적 스트레스 억제효과 평가

제 2 항 결과 및 고찰

1. Acetylcholinesterase 억제활성
2. 세포독성 보호효과
3. 산화적 스트레스 억제효과

제 2 절 *in vivo* 계에서의 탈지박의 치매예방 효능 평가

제 1 항 치매예방 효능검토를 위한 모델 검토

I. ICR mouse를 이용한 치매의 유도 및 효능검토를 위한 모델검토

1. 재료 및 방법
2. 결과 및 고찰

II. SAMP8 mouse를 이용한 치매의 유도 및 효능검토를 위한 모델검토

1. 재료 및 방법
2. 결과 및 고찰

제 2 항 탈지박 메탄올 추출물의 *in vivo* 효능 검토

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 3 항 탈지박 유효획분의 *in vivo* 효능 검토

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

I. 들깨박 유효획분의 ICR 마우스에 대한 기억력 개선 효과

II. 들깨박 유효성분의 SAMP8 마우스에 대한 기억력 개선 효과

제 3 절 탈지박 소재의 이화학적 특성 및 이를 활용한 노인식 개발

제 1 항 탈지박 소재의 이화학적 특성조사

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 2 항 노인용 유동식

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 3 항 과립화 제품

제 4 항 머핀

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 5 항 음료

1. 실험재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

제 6 항 Paste

1. 실험재료 및 방법
2. 결과 및 고찰

제 4 절 탈지박 유효성분의 구조특성 및 분리

제 1 항 실험 재료 및 방법

1. 실험재료
2. 유효성분의 추출방법
3. 향산화효과 측정

제 2 항 실험결과 및 고찰

1. 탈지박 함유 천연 향산화 물질의 추출 및 분리
2. 유효회분의 대량 추출 조건 검토
3. 유효회분의 대량 분리
4. 참깨박, 들깨박 함유 미지 물질 화학구조 동정 및 지표물질 설정

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 수집된 해외과학 기술정보

제 7 장 참 고 문 헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

치매의 원인은 다양하지만 노인성 치매는 주로 뇌혈관성 치매와 알츠하이머병이며, 뇌혈관성 치매는 주로 혈류개선에 중점을 두고 있고, 알츠하이머병의 원인에 대해서는 inflammation가설과 산화적 스트레스등에 의한 신경세포의 지속적인 파괴에 대한 β -amyloid protein가설이 지지를 받고 있으며 최근에는 APP secretase의 중요성에 대해서도 관심이 집중되고 있다. 또한 치매증상 완화제로서 뇌속의 acetylcholine 함량을 높일 수 있는 acetyl choline esterase inhibitor(Cognex, Aricept등)가 개발, 허가되어 있으나 구토, 현기증, 간독성등의 부작용이 심하여 실효를 거두지 못하고 있으며 예방차원에서 항산화제인 tocopherol, 항염증제로서 아스피린등의 복용이 권장되고 있는 실정이다.

한편, 식용유지자원인 참깨와 들깨 및 홍화는 적정온도로 볶음 처리한 뒤 압착법으로 착유하며 착유시 필수적으로 수반되는 부산물인 착유박은 인체에 유효한 성분들이 다량 함유되어 있다. 참깨박의 주요 유효성분으로서는 sesamin, sesaminol, sesamol, pinoreisnol 과 같은 lignan 성분들이 약 1% 정도 함유되어 있고 그 효능으로서는 LDL의 산화 방지, 체내 과산화 지질 생성억제 활성, free radical의 scavenging등 강한 항산화 활성이 보고되고 있고 예비실험결과 신경세포의 beta-amyloid protein 에 대한 독성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 탈지 들깨박에서도 들깨유의 다가 불포화 지방산의 산패를 막는 강한 항산화 성분의 존재가 예상되며 실제로 phenolic compound의 항산화 효과가 보고되고 있으며 본 연구팀의 실험결과에서도 강한 free radical 소거능과 과산화 지질 생성억제능이 있음을 확인하였고 초대배양 신경세포를 이용한 검색모델에서도 매우 효과적인 결과를 얻었다. 최근에는 탈지 홍화박에서도 체내 지질함량을 낮추고 phytoestrogene에 관한 연구결과들이 산발적으로 보고 되고 있다.

이상과 같이 탈지박(들깨박, 홍화박, 참깨박)의 강한 항산화 작용은 치매 病因과 관련이 깊은 산화적 스트레스를 억제함으로써 치매예방효과의 높은 가능성을 입증하고 있다. 또한 이 유지자원은 예로부터 섭취해온 우리고유의 유지자원식품이며 용매를 쓰지 않고 압착법으로 착유하여 매우 안전한 소재인 만큼 치매예방을 위한 매우 좋은 소재이나 이에 대한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 치매예방 가능성이 높은 탈지박으로부터 식품소재를 개발하여 활용하기

위해서는 탈지박의 치매예방활성을 탐색하고 그 효능을 정확하게 평가하는 기술이 개발되어야 하며 이들 소재를 활용하여 노인식 개발 및 첨가소재로서의 활용기술을 개발하고 이 소재가 산업화되려면 효율적으로 대량분리 할 수 있는 기술 개발이 필요하였다.

따라서 본 연구에서는 탈지박으로부터 *in vitro*계에서의 치매예방 활성을 평가하고 실험동물을 이용한 *in vivo*계에서 그 효능을 검정하였으며 탈지박 소재로부터 치매 예방과 관련이 깊은 항산화 활성 소재를 분리, 동정하였고 이들 소재를 활용하여 과립, 음료, 제빵 적용시험 및 유동식과 같은 노인식을 개발하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

○유지박의 이용도 및 유효성분에 대한 연구

유지자원부산물물의 국내 연구동향을 보면 주로 참깨박 및 들깨박의 분리, 이화학적 특성 및 단백질의 이용도등에 관한 연구가 보고 되고 있고, 들깨박에 관해서는 *in vitro* 실험에서의 항산화활성 및 phenolic compound에 대한 연구가 몇몇 보고 되고 있으며 이에 대한 연구내용을 요약하면 다음과 같다.

우선, 탈지박 특히 참깨박의 이용도를 검토한 연구예를 보면, 최등은 참깨박에 함유되어 있는 불용성 형태의 단백질을 가용성 형태의 단백질로 용출시키기 위하여 *Bacillus sp.* CW-1121이 생성하는 효소를 처리하여 불용성 단백질을 분해 추출하고 분리 단백질을 제조하여 추출단백질의 특성과 아미노산 조성, 그들의 용해도, 수분 및 유지흡착성등 기능성에 대한 연구결과를 보고하였다, 또한 김등도 과산화 수소, papain처리로 참깨박 단백질의 품질특성 및 기능성을 증대시키려 시도하였다. 하등은 볶음온도와 시간을 달리하여 얻은 탈지 참깨박의 이화학적인 특성의 변화를 조사하여 참깨박의 이용도 증진을 시도하였고. 또한 김등은 탈지 참깨박 추출물을 콩나물 재배에 적용한 결과 콩나물의 비타민 C 함량이 크게 증가하였고 P, Ca등의 무기질 함량도 증가하였으며 세균증식도 억제되었다고 보고하고 있다. 또한 우리나라 고유의 유지자원인 참깨, 들깨 등은 적정온도로 볶음 처리한 뒤 압착법으로 참기름 및 들깨유를 착유하며, 참깨박에 존재하는 주요 유효성분으로서는 질이 우수한 높은 함량의 단백질이 포함되어 있다고 신(1973)과 김 등(1980)이 보고하였으나 이들 단백질의 기능성에 대하여는 별로 연구되어있지 않은 실정이다. 또한 신 등(1973)은 우리나라 들깨 품종 5가지에 대한 지방질 조상에 대해 보고하였는데 들깨의 지방질 함량은 38.6~47.8%로 품종간에 9%의 차이를 보이고, 그 중 중성지방질은 91.2~93.9%, 당지방질은 3.9~5.8%, 인지지방질은 2.0~3.0%이었다고 보고하였다.

황 등(1982)은 생 또는 볶은 한국 참깨박의 메탄올 추출물에서 sesamol의 함량을 측정된 결과 생, 볶은 참깨유의 메탄올 추출물 중의 sesamol 함량은 0.0022와 0.0043%라고 보고하였다. 그리고 참깨박에는 단백질 및 지방질 외의 성분으로는 sesamin, sesamol, sesamolinal, pinoreisnol과 같은 lignan 성분들

로 이들의 항산화 효과가 많은 연구들에 의해 증명되고 있다. Kang 등(2000)의 연구에서 살펴보면, Cu^{2+} 에 의하여 LDL 산화를 유도시 참깨박 추출물이 효과적으로 방지하는 것으로 나타났다. 또한 탈지 참깨박이 에탄올을 공급한 쥐에 유도된 산화적 스트레스를 억제하며 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시키고 간중 TBARS 함량도 억제시키는 효과가 있다고 보고하여 탈지 참깨박의 lignan 성분 뿐만 아니라 whole 상태에서도 식품소재로서의 이용가능성을 제시하였으며, 탈지 들깨박의 알콜 추출물에는 유지의 산패를 억제하는 강한 항산화 작용이 있으며 김 등(1981)은 참깨 및 들깨의 에탄올 추출물의 항산화력은 0.02% BHT의 항산화력보다 훨씬 우수하였음을 보고하였으며 탈지들깨박에서 분리한 페놀화합물의 항산화효과를 일반 시판용 합성항산화제들과 비교한 이(1993)의 연구에 의하면 총 페놀산 중 유리페놀산이 차지한 비율이 87.5%였으며 유리페놀산 형태의 추출물에서는 대부분의 페놀화합물이 chlorogenic acid와 일치하였다. 또한 들깨박 에탄올 추출물의 항산화효과를 검토한 윤 등(1993)의 연구에 의하면 탈지들깨박 중 95% 에탄올에 가용성인 물질은 7.69%였으며 탈지들깨박 에탄올 추출물은 원 들깨에 존재하는 양은 1/20배량(0.028g)으로도 0.02%의 BHT나 BHA 및 토코페롤 보다 들기름에 있어서 효과적인 항산화성을 나타내었다. 김 등은 홍화로부터 물추출물과 메탄올 추출물을 이용하여 항산화 활성을 측정할 결과 뇌 microsome을 이용한 생체막지질 과산화를 억제하였고 linoleic acid의 산화실험계에서도 강한 항산화 활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 백 등은 홍화씨로부터 N-feruloylserotonin을 분리하였고 강한 항산화 작용이 있음을 보고하였으며 최 등, 조 등은 홍화박이 흰쥐체내 지질대사에 미치는 영향을 검토한 결과 홍화박의 급여는 체내 지질함량, 특히 콜레스테롤 함량을 감소시키고 HMG-CoA reductase 활성을 저해하였다고 보고하였다.

2. 국외 기술개발 현황

○ 유지박의 이용도 및 유효성분에 대한 연구

탈지박에 관한 국외의 연구는 특히 일본을 중심으로 하여 탈지 참깨박의 성분, 항산화 효과, 콜레스테롤 저하효과 및 동맥경화 억제효과 등을 중심으로 연구되어 왔다. 또한 일본은 우리나라와는 달리 참깨를 볶지 않고 착유하며 착유방법도 우리나라는 볶음 처리후 압착법으로 착유하는 데 비하여 일본에서는

부지 않고 용매로 착유하고 있으며 연구의 중심이 종자에서 기름을 짜고 난 후, 부산물의 이용보다는 종실유에 대한 연구가 대부분을 차지하였다. 그러나 들깨박과 홍화박에 관해서는 거의 연구가 되지 않고 있는 실정이며 현재까지 보고된 연구 개발내용을 요약하면 다음과 같다.

외국에서의 이들 탈지박의 이용도에 관해서는 탈지참깨박을 제빵에 이용한 Serna-Saldivar의 연구와 fermented salami에 탈지 참깨박을 이용한 Cruz의 연구등 탈지참깨박의 단백질원으로서의 시도가 있을 뿐이며 우리나라에서 많이 섭취하고 있는 들깨박과 홍화박의 이용도에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다. Osawa등, Katsuzaki등, Kang등, Mervat등은 참깨의 lignan 성분인 sesamin, sesaminol, sesamolol등은 식품에서는 물론 biological system에서도 강한 항산화 작용이 있다고 보고하였으며 특히 sesamin과 sesaminol은 생체막을 이용한 모델에서 다양한 산화적 stress(AAPH, AMVN, ADP-Fe₃/NADPH)에 대한 과산화 지질생성억제 효과가 있다고 보고하였다. 또한 sesamin은 동맥경화의 주요인중의 하나로 알려져 있는 LDL-cholesterol의 산화를 억제하는 효과가 있으며 sesaminol은 사염화 탄소로 유도된 산화적 stress에 대한 생체내 노화억제 효과가 있으며 Shimma 등도 노화 cell에 sesaminol을 처리하였을 때 노화cell의 과산화 지질 생성을 억제하였다고 보고하였다. Shimizu등, Hirose등, Sawada등, Hirata등은 참깨의 sesamin이 지질대사에 미치는 영향을 검토한 결과 5-desaturase, HMG-CoA reductase 억제활성, 소장에서의 콜레스테롤 흡수억제, 분변중으로의 bile acid 배설증가등의 작용으로 체내 콜레스테롤 함량을 저하시키는 것으로 보고하고 있다. Wei-Hou 등(2004)은 hypoxia 환경에서 유도한 세포사멸에서 sesamin, sesamolol이 BV-2 microglia를 보호하는 효과를 가지고 있음을 보고하였으며 이는 sesame lignan의 항산화 효과에 기인한 것으로 농도의존적으로 LDH release와 ROS 형성을 감소시켰고, 대표적 항산화 효소인 SOD와 catalase의 활성이 hypoxia에 의한 활성저하를 방어하였음을 보고하였다. Hsu 등(2004)은 산화적 스트레스로 간 손상을 시킨 쥐에게 참깨유를 섭취시킨 결과, 지질과산화, nitrite level이 감소하였음을 보고하였고 Ide등(2004)은 sesame에 함유되어 있는 lignan 중의 하나인 sesamin를 실험식이에 0.2%로 조합하여 공급한 후, hepatic fatty acid oxidation 및 gene expression 정도를 살펴본데, 이에 관여하는 효소인 peroxisomal palmitoyl Co A oxidation rate

와 acyl Co A oxidase 활성이 팥유와 홍화씨유를 먹인 그룹보다 높았으며 유전자 발현도 증가하였다. 또한 Suja 등(2004)은 sesame extract에서부터 얻은 항산화 물질들은 free radical scavenging하는 효과를 갖고 있다고 보고하였으며 Yamashita와 Ikeda(2004) 등 역시 sesame이 혈장 및 조직에서 지질과산화물 저하효과를 제시하였으며 이는 비타민 E보다 그 효과가 크다고 주장하였다. 이외에 sesamol은 cancer cell, 심장혈관세포의 apoptosis를 유도하며 세포성장을 저해한다고 Jacklin(2003)에 의해 보고되었다.

○ 치매의 예방 및 치료에 대한 연구

치매의 원인은 다양하지만 노인성 치매는 주로 뇌혈관성 치매와 알츠하이머병이며, 뇌혈관성 치매는 주로 혈류개선에 중점을 두고 있으나 알츠하이머는 senile plague와 신경세포의 손실과 관련하여 점진적인 인지기능 및 기억능력의 상실을 특징으로 가지고 있는 신경퇴행성 질환으로 Noel(2002), McGeer(1996), Roger's(1996) 등은 inflammation의 가설을 주장하였으며 Bondy(1993) 및 Puttfarcken(1993)등은 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 지속적인 파괴에 대한 β -amyloid protein 가설을 설명하였다. β -amyloid protein는 senile plague의 주된 구성요소로서 세포내 ROS를 증가시키며, 생성된 ROS는 neuronal cell death를 초래한다고 제시한 몇가지 보고들의 예를 살펴보면 a) 여러 신경세포들은 β -amyloid protein에 노출되었을 때 세포내 ROS 수준이 증가하였고 b) 알츠하이머 질환의 동물모델로 유전자를 변형시킨 쥐 및 노화촉진쥐 (senescence-accelerated mouse)에서 산화적 스트레스의 지표들이 발견되었으며, c) β -amyloid protein의 신경독성이 여러 항산화제(비타민 E, spin-trap compound PBN, phenolic compound, free radical scavengers)에 의해 완화되었다는 보고 등이 있다. 또한 알츠하이머병의 주요 증상인 기억력 감퇴현상은 콜린성 신경계의 손실과 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있는데 Yan(2001)등의 연구에서는 ICR mouse의 대뇌피질에 β -amyloid를 주사한 후 인지기능의 저하가 초래되었으며, cortex에서 신경전달 물질인 cetylchloindml 합량이 유의적으로 낮았다. Pederson(1996) 등은 β -amyloid protein은 뇌세포에 있어서 acetylcholin의 합성을 저해시키며, Talesa(2001)는 뇌 중 acetylcholinesterase의 농도가 증가할수록 신경세포의 콜린성 신경전달물

질이 결핍되어 대뇌의 기억 및 인지기능 장애를 유발하고 뇌 속의 치매를 일으키는 물질의 침착이 용이하고 이로 인해 치매가 유발될 수 있다고 보고하였다. Coyle(1983) 역시 알츠하이머병 환자에게서 보이는 치매증상은 콜린성 신경계의 선택적인 퇴행변성과 관련이 있을 것이라고 주장하여 현재까지 일치되고 있는 치매에 대한 의견이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 탈지박으로부터 치매예방소재의 탐색 및 효능평가 (*in vitro*)

본 절에서는 acetylcholine esterase(AChE) 억제활성을 평가하는 *in vitro* assay system 확립 및 활성을 평가함과 동시에 brain microsome을 이용한 산화적 stress 억제활성을 검토하였으며 PC 12 cell line을 이용하여 탈지박의 신경세포 손상 억제능을 검토하였다.

제 1 항 재료 및 방법

1. 시료추출

가. 탈지박 메탄올 추출물 및 분획물 조제

본 실험에 사용한 참깨, 들깨 및 홍화박은 정선, 세정하여 건조, 볶음 처리한 다음 착유법으로 탈지하여 시료로 사용하였다. 탈지박은 분쇄하여 10배의 80% 메탄올을 첨가하여 실온에서 150rpm으로 16시간 shaking하여 추출한 뒤 여과지 (Toyo No. 2)로 여과하였고 다시 80% 메탄올 용액을 시료중량의 5배를 가하여 3시간 shaking 한 다음 여과하였다. 여액은 모아서 40℃ 이하의 감압농축기를 사용하여 농축한 뒤 잔존하는 물은 동결건조하여 메탄올 추출물로 사용하였다. 또한 메탄올 추출액을 silica gel (Merk)을 충전한 open column에 loading하여 극성이 다른 각 용매(hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, methanol)로 순차적으로 분획하여 감압 농축하여 hexane 획분, chloroform 획분, ethyl acetate 획분, n-butanol 획분, methanol 획분을 각각 조제하였다. 추출물과 각 분획물은 dimethylsulfoxide (DMSO)로 일정농도가 되게 녹인 후 assay에 사용하였다.

나. 들깨의 유효획분(PG)의 추출

들깨의 유효획분인 PG를 추출하기 위하여 들기름을 제조한 후 얻어진 들깨박은 -20℃ 냉동실에 보관하고, 시료로 사용하였다. 들깨박의 일정량을 취하여

1시간동안 열수추출 하고 여과한 후 30분간 6,000 rpm에서 원심분리 (Dupont Sorvall RC-5C, SORVALL, USA)하여 상층액을 다시 여과하였다. 여과액을 다시 농축하여 얻은 추출물을 diaion HP20 column에 loading하여 overnight 하였다. 그 후 60% 에탄올로 2회 반복 추출한 후 60% 에탄올 추출액을 모아 감압 농축 (Rotary vacuum evaporator R-114, Swiss)후 동결건조하여 들깨박 유효획분(PG)로 이용하였다.

다. 참깨박, 들깨박, 홍화박의 생박 및 볶은박의 효소, 산 및 알칼리 처리법

탈지박들을 Fig. 3과 같이 acetate buffer 90ml에 효소 0.1%를 첨가하여 각각 반응시켜 filtering 후 ethyl acetate를 이용하여 각각의 aglycon을 얻었다. 이것을 농축하여 효소처리 sample을 얻었으며, 각각의 탈지박에 KOH와 HCl을 첨가하여 산처리 알칼리 처리 sample을 얻었다(Fig. 1-1). Sample의 수율(%)을 측정하였으며, 총 페놀함량, 전자공여능, SOD-liked, 항산화 효과 측정 실험을 하였다.

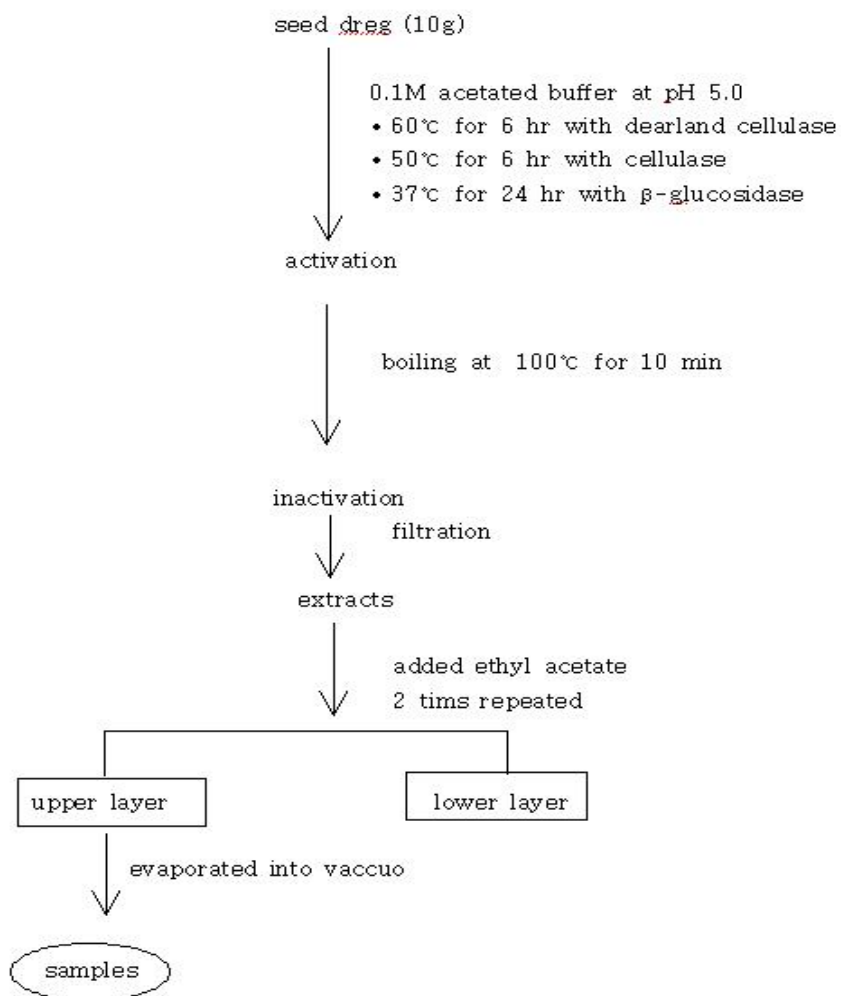


Fig. 1-1. Schematic procedure of enzyme treatment in seed dreg.

2. Acetylcholinesterase 억제활성 평가

Acetylcholinesterase (AChE)의 활성은 George L. Ellman의 방법을 응용하였다. 즉, 3 mL용 cuvette에 37°C로 보온한 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) 3.0 mL 가하고, 기질용액 0.075 M acetylcholin iodide 20 μ L, 0.01 M dithiobisnitrobenzonic acid (DTNB)/phosphate buffer (pH 7.0) 100 μ L를 각각 가하여 잘 혼합한 다음 적정농도의 시료를 첨가하고 acetylcholinesterase (Sigma, USA)를 첨가하여 효소반응을 시작하였다. 412 nm에서 효소반응초기부터 5분간의 흡광도 변화를 측정하여 효소활성도를 산출하였다. 시료의 AChE 억제활성도는 시료를 가하지 않은 상태의 효소활성도에 대한 시료 첨가후의 효소활성도로부터 환산하였다.

3. 세포독성 보호효과 평가

가. 세포배양

본 실험에서 사용한 세포주는 rat pheochromocytoma PC12로써 ATCC에서 분양받아 사용하였다. 분양받은 세포는 10%의 horse serum (Gibco, USA)과 5%의 FBS (Gibco, USA), 100 unit/mL penicillin, 100 unit/mL streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco, USA)배지를 사용하여 5% CO₂가 공급되는 포화습도 상의 37°C의 배양기에서 2~3일 마다 medium change를 하고 1주일마다 계대배양을 통하여 실험 사용 시까지 배양하였다.

나. 세포독성 보호능 측정

배양 세포들을 96 well plate에 2.5×10^4 cell/well 및 1.0×10^4 cell/well 수준으로 접종하여 24시간 후 각각 20 mM의 L-glutamate와 25 μ M의 A β 25-35를 첨가하여 세포독성을 유발시켰고 각 실험시료를 농도별로 첨가하여 48시간 배양을 시켰다. 배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT assay에 의하여 측정하였다. MTT assay는 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 등의 tetrazolium계 물질이 생존세포의 효소작용에 의해 환원되어 formazan으로 침전되는 정도를 흡광도로 측정하는 방법으로 각 well에 0.1 mg의 MTT를 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan을 DMSO를 이용하여 용해시킨 후 microplate reader (Molecular

devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Glutamate 또는 Aβ25-35 유래 세포독성에 대한 각 시료의 세포독성 보호능은 대조군의 생존율에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

4. 산화적 스트레스 억제효과 평가

가. Brain 조직의 산화적 스트레스 억제활성

Rat (Sprague-Dawley)의 whole brain을 적출하여 균질화한 후에 FeSO₄-H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발시켰다. 산화적 스트레스를 유발시킨 뇌조직에 각 시료를 농도별로 첨가한 후에 37°C에서 20분 incubation하고, 20% acetic acid 1.5 mL과 8.1% SDS 0.2 mL 그리고 0.8% TBA 1.5 mL을 첨가한 후 100°C에서 20분간 가열하였다. 냉각후 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 535 nm에서 흡광도를 측정하여 산화적 스트레스 억제활성을 환산하였다.

나. 전자 공여능 측정

각 추출물에 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 용액을 가하고 30초간 잘 섞은 다음 517 nm에서 50분 간 흡광도의 변화를 측정하는 방법을 이용하여 전자 공여능 (electron donating ability)을 측정하였다.

다. SOD 유사활성 측정

각 시료를 0.2에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer 3 mL와 0.2 mM pyrogallol을 가하여 25°C에서 10분간 방치 하고 1 N-HCl로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 $100 - [(시료첨가구의\ 흡광도/시료무첨가군의\ 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다.

라. Lecithin oxidation system

일정량의 egg yolk lecithin을 chloroform에 녹인 후 질소 가스로 용매를 완전히 날리고 일정한 농도의 추출물, 2mM FeSO₄, 2mM ascorbic acid를 첨가하여 잘 섞은 후 37 °C에서 30 분간 incubation 한 후 과산화 지질생성량을 2-thiobarbituric acid reactive-substance(TBARS)법에 의하여 측정하였다. 각 추출물의 항산화 효과는 시료대신 샘플을 녹인 용매로 첨가하여(Control) 비교

하였고 계산은 다음과 같이 하였다.

마. hydrogen peroxide 소거능 측정

H₂O₂는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, Hydrogen radical 소거활성은 SOD에 의해 생성되는 과산화수소를 peroxidase를 첨가하여 물과 산소분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시켜주는 능력을 측정하는 것이다. 시험관에 PBS buffer, ethanol 또는 시료를 가한 후 1.0 mM의 H₂O₂을 가하여 5분 동안 방치한 후 1.25 mM ABTS[2,2' azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]과 peroxidase를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. 2-deoxyribose oxidation 법

Hydroxyl radical은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. EDTA에 FeSO₄를 첨가한 후 deoxylibose와 H₂O₂로 반응시키는데 sample이 hydroxyl radical 생성 억제능을 관찰하는 것으로 532nm에서 비색정량을 통해 측정하였다.

제 2 항 결과 및 고찰

1. Acetylcholinesterase 억제활성

가. AChE 저해활성 검색계의 확립

1) 효소반응계 및 농도에 따른 활성변화 조사

본 효소반응계에 있어서 효소 또는 기질을 첨가하지 않았을 때는 효소반응이 전혀 일어나지 않았고 효소농도에 따른 효소활성을 측정한 결과 효소농도가 증가함에 따라 거의 비례적으로 효소활성은 증가하였다(Table 1-1).

Table 1-1. Effect of enzyme concentration on AChE response

Complete	(-) Enzyme	(-) Substrate	enzyme 12.5µl	enzyme 25µl	enzyme 50µl
0.5889	0.0002	0.0007	0.1202	0.2354	0.5889

2) AChE 활성에 미치는 용매의 검토

효소활성에 미치는 사용용매의 영향을 살펴보기 위하여 에탄올, 메탄올, DMSO를 농도별로 가하여 효소활성을 측정한 결과 효소반응계에 메탄올과 에탄올을 첨가하였을 때는 용매첨가에 의한 영향이 전혀 없었고 DMSO첨가시는 용매첨가량이 증가함에 따라 활성이 감소하였으나 10ul 첨가시는 그 감소폭이 거의 미미하였다(Fig. 1-2). 따라서 본 실험에서는 시료의 용해성과 효소활성에 미치는 영향등을 고려하여 시료를 DMSO에 희석하여 사용하였다.

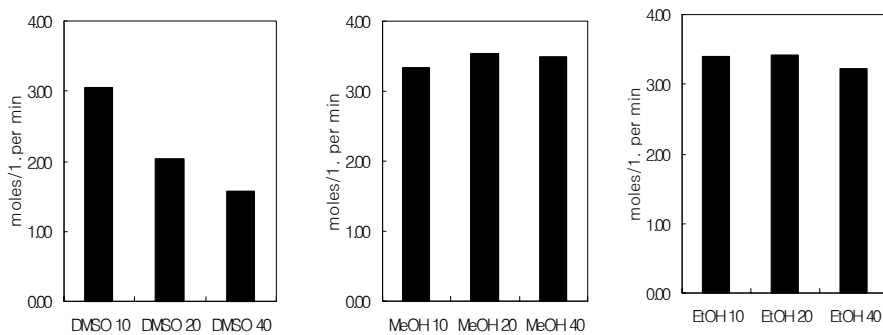


Fig. 1-2. Effect of various solvent on AChE activity

나. 메탄올 추출물의 AChE 저해활성

참깨박, 들깨박, 홍화박 및 각 볶음 처리한 탈지박들은 농도가 높을수록 AChE의 활성이 저해되는 것으로 나타났다. 참깨박과 볶은 참깨박은 시료농도에 따른 큰 차이를 보지 않았으나, 볶은홍화박의 경우 2.0mg을 첨가했을 때 시료를 첨가하지 않은 처리구의 효소활성 100%에 대하여 67.8%로 약32.2%의 활성이 저해되었다($p < 0.001$). 또한 볶은홍화박은 볶지 않은 홍화박에 비해 활성억제효과가 다소 큰 것으로 나타났다(Fig. 1-3).

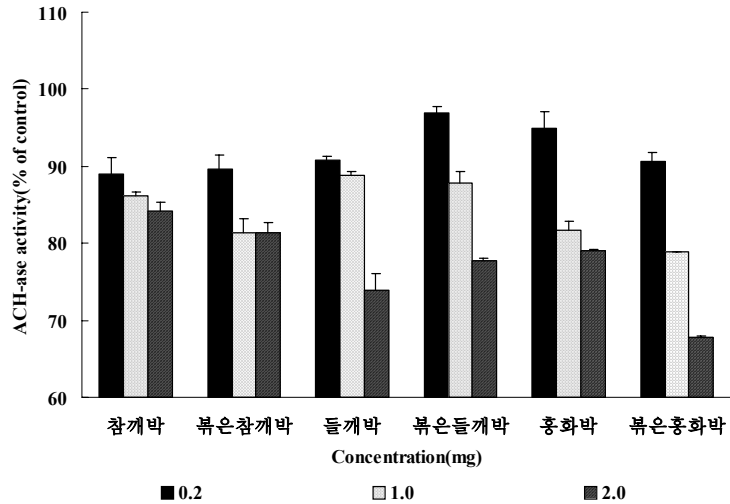


Fig. 1-3. Effect of defatted oil seeds on AChE inhibition activity

다. 용매분획물의 AChE 저해활성

각각의 탈지박 메탄올 추출물의 chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 methanol 분획물에 대하여 AChE 활성에 미치는 영향을 조사하였다, 각 분획물 1mg을 첨가하여 AChE의 활성을 검색해본 결과, 참깨박과 들깨박의 각 분획물들은 대체로 볶음처리한 것이 효소의 활성을 억제하는 것으로 나타났으며 ($p < 0.001$) 특히 볶은참깨박과 볶은들깨박의 경우 chloroform 분획물과 butanol 분획물의 억제활성이 높은 것으로 나타났다($p < 0.001$). 그러나 들깨박의 methanol 분획물은 억제활성이 전혀 나타나지 않았으며, 전체적으로 methanol 분획물은 가장 억제효과가 낮은 결과를 보였다. 볶은들깨박의 chloroform과 butanol 분획물은 control 100%에 대하여 효소의 활성이 각각 50% 및 60%가 억제되는 높은 효과를 보였다(Fig. 1-4).

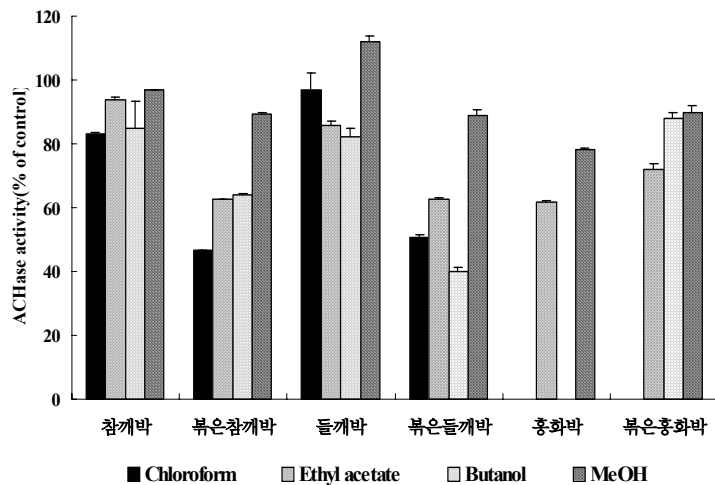


Fig. 1-4. Effect of defatted oil seeds fractions on AChE inhibition activity

라. 탈지박효소분해 산물의 AChE 저해활성

각종 효소 (β -glucosidase, cellulase, deer-land)를 이용하여 탈지박 추출물을 가수분해 함으로써 얻어진 fraction의 AChE 억제활성을 측정 한 결과(Fig. 1-5) 샘플 1mg에 대한 효소 억제활성은 볶은 참깨박을 효소처리한 경우가 억제활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 특히 참깨박, 들깨박, 볶은 홍화박의 경우 deer-land로 가수분해 처리했을 때 비교적 다른 효소처리한 것에 비하여 높은 억제율을 나타내었다. 볶은 참깨박 가수분해산물을 농도별로 처리하여 AChE 억제활성을 조사한 결과(Fig. 1-6), 효소억제활성은 농도의존적으로 나타났으며 cellulase 처리의 경우 1mg에 대하여 약 57%, 0.5mg에 대하여 약 35%, 0.25%에 대하여는 약 20%의 억제효과를 나타내었다.

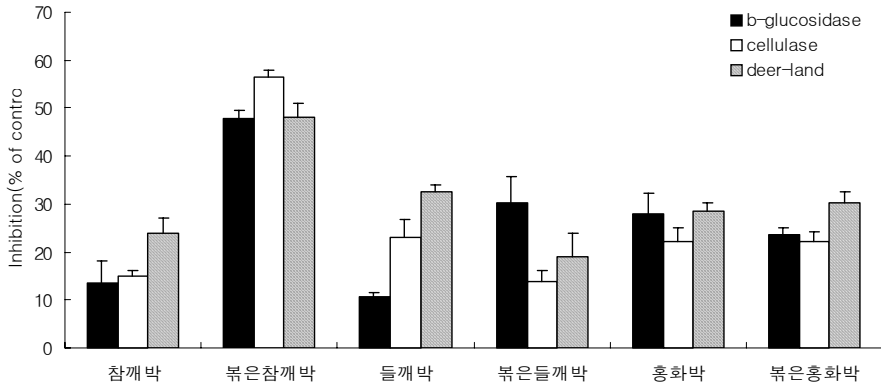


Fig. 1-5. Effect of defatted oil seeds fractions hydrolyzed with various enzyme on AChE inhibition activity

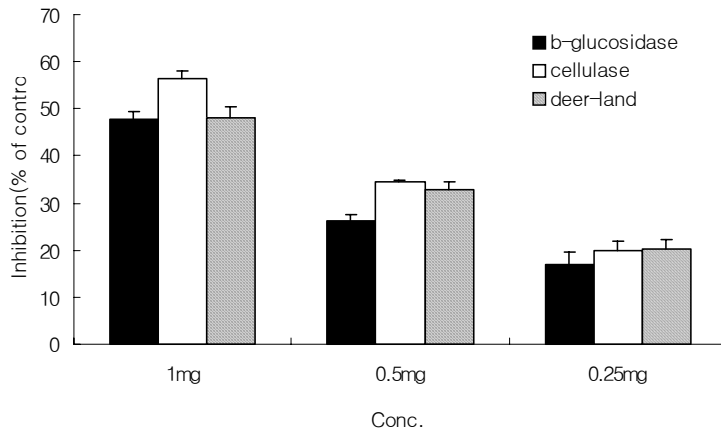


Fig. 1-6. Effect of roasted and defatted sesame seeds fractions hydrolyzed with various enzyme on AChE inhibition activity

마. PG의 AChE 저해활성

들깨박 추출물 PG는 농도가 높을수록 AChE의 활성이 저해되는 것으로 나타났으며 특히 1mg을 첨가했을때는 시료를 첨가하지 않은 처리구의 효소활성을 100%로 하였을 때 20% 이상의 활성이 저해됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1-7). 들깨박 추출물 PG는 농도가 높을수록 AChE의 활성이 저해되는 것으로 나타났으며 특히 1mg을 첨가했을때는 시료를 첨가하지 않은 처리구의 효소활성을 100%로 하였을 때 20% 이상의 활성이 저해됨을 관찰할 수 있었다.

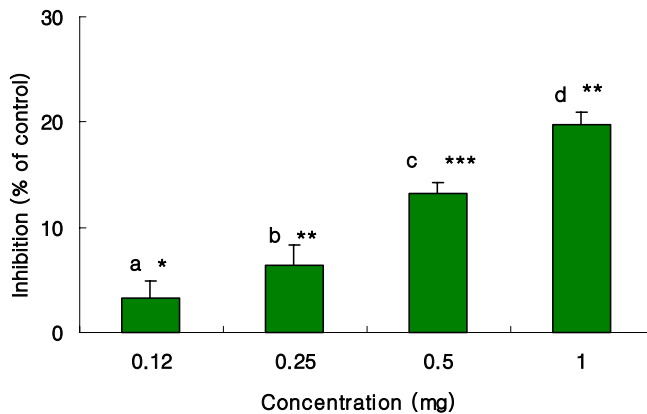


Fig. 1-7. Effect of PG on AChE inhibition activity

2. 세포독성 보호효과

가. 탈지박 메탄올 추출물의 L-glutamate에 유도된 PC12 세포 독성 억제 효과

각각의 탈지박 메탄올 추출물 자체가 PC 12 세포에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 1-2). 각 추출물을 첨가하지 않은 control에 비하여 추출물을 첨가하였을 경우 MTT redox activity가 증가하여, 생존율이 높아짐을 알 수 있었으며, 500 μ g/ml의 높은 농도에서도 전 시료에서 생존율이 줄어들지 않았다. 즉, 탈지박 메탄올추출물 자체는 PC12 cell의 성장에 negative effect의 요소로 작용하지 않음을 알 수 있었다.

Glutamate의 PC 12 cell에 대한 독성을 알아보기 위하여 0, 10, 15, 20, 25 및 30mM glutamate의 농도로 PC12 cell에 처리하여, MTT의 방법으로 생존율을 구하였다(Fig.1-8). 무처리구의 세포생존율을 100으로 간주하였을 때, 세포의 생존율은 glutamate의 유의하게 농도가 높아질수록 낮아졌으며, 세포의 50% 사멸을 나타내는 EC₅₀ value는 glutamate 20mM로 나타났다.

Table 1-2. Effect of defatted oil seeds on the growth of PC12 cells

		(단위:%)				
탈지박 농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	참깨박	볶은참깨박	들깨박	볶은들깨박	홍화박	볶은홍화박
0	100	100	100	100	100	100
50	109.8	102.2	104.7	102.3	109.6	105.3
100	111.3	107.5	104.6	124.5	111.9	107.4
250	107	108.9	115.6	120.5	115.7	106.2
500	100.2	104.3	102	122.7	117.8	104.2

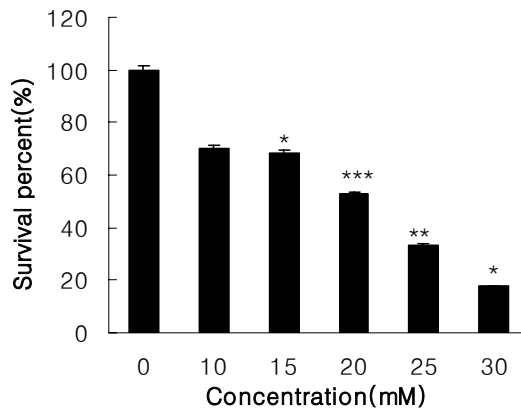


Fig. 1-8. Cytotoxicity of L-glutamate to PC12 cell(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 : compared with normal untreated group)

탈지박 메탄올 추출물의 Glutamate 유발 PC 12 세포 독성에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 20mM의 glutamate로 PC 12 세포에 독성을 유발하였다. 탈지박 메탄올 추출물을 첨가하지 않고 glutamate만 처리했을 때 normal 세포의 생존율 100%에 대하여 약 50%의 생존율을 보였다(Fig. 1-9). 20mM의 glutamate로 독성을 유발하고 탈지박 메탄올 추출물을 각 농도별로 첨가한 결과, 500 μ g/ml의 농도까지는 glutamate 단독으로 처리했을때의 생존율보다 더 높은 생존율을 나타내어, glutamate에 의해 독성이 유발되어도 샘플 자체의 독성은 없는 것으로 조사되었다. 대부분의 추출물은 첨가농도가 높아질수록 생존율이 높아지는 경향을 나타내어, PC 12 세포의 생존율은 농도의존적임을 알 수 있었다. 그러나 참깨박, 홍화박, 볶은 홍화박의 경우, 500 μ g/ml의 농도에서는 250 μ g/ml에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 나타내어, 이러한 추출물의 PC12 세포에 대한 최대 생존율을 나타내는 최고의 농도는 250 μ g/ml이었으며, 500 μ g/ml 이상의 높은 농도에서는 독성이 예상되었다.

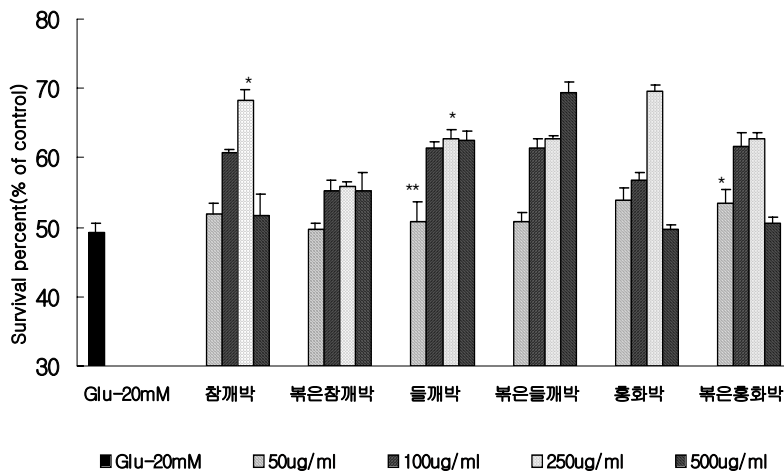


Fig. 1-9. Effect of defatted oil seeds on glutamate induced toxicity of PC 12 cells(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 : compared with normal untreated group)

나. 용매별 분획물의 L-glutamate에 유도된 PC12 세포 독성 억제효과

탈지박 메탄올 추출물을 각 용매로 분획하여 얻은 분획물의 glutamate 유발 PC12 세포 독성에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 20mM의 glutamate로 PC 12 세포에 독성을 유발하였다. 각 추출물의 분획물을 첨가하지 않고 glutamate 만 처리했을 경우, normal 세포의 생존율 100%에 대하여 약 54%의 생존율을 보였다(Fig. 1-10). 20mM의 glutamate로 독성을 유발하고 탈지박 메탄올 추출물의 분획물을 100 μ g/ml의 농도로 첨가한 결과, 각 분획물간에 큰 차이를 나타 내지는 않았으나, 전체적으로 glutamate만 첨가했을 경우의 생존율보다는 높은 생존율을 나타내어 신경세포의 독성효과를 나타내었다. 그러나 들깨박 추출물의 chloroform 분획물은 대조군보다도 오히려 독성을 증가시키는 것으로 나타났다.

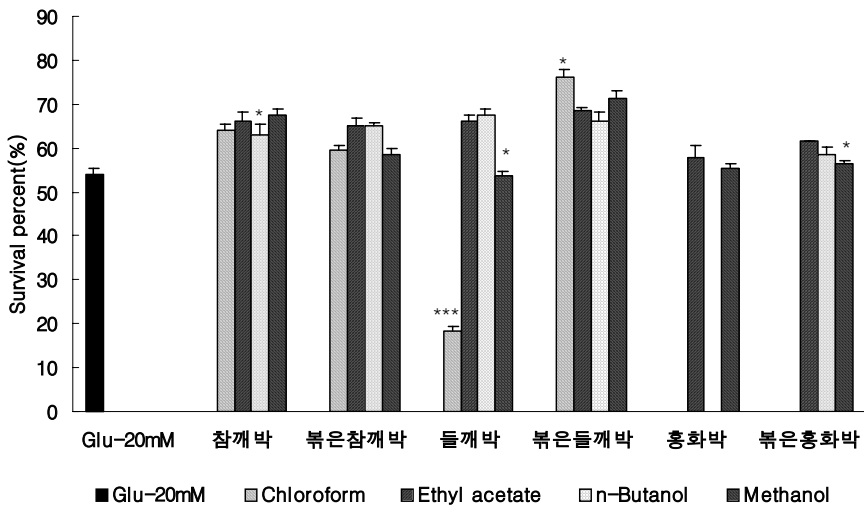


Fig. 1-10. Effect of defatted oil seeds fractions on glutamate induced toxicity of PC 12 cells(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 : compared with normal untreated group)

다. 탈지박 효소분해 산물의 β -amyloid protein에 유도된 PC12 cell에 대한 독성 억제효과

β -amyloid protein의 PC 12 cell에 대한 독성을 알아보기 위하여 fragment 25-35는 0, 25, 50, 100 및 125 μ M의 농도로 하고 또한 fragment 1-42는 0, 1, 5,

10 및 20 μ M의 농도로 조제하여 PC12 cell에 처리한 후, MTT의 방법으로 생존율을 구하였다. β -amyloid를 첨가하지 않은 세포생존율을 100으로 간주하였을 때, fragment 25-35의 β -amyloid는 25, 50, 100, 125 μ M의 농도에서 각각 64.1, 55.1, 50.6 및 26.2%의 생존율을 나타내었으며, fragment 1-41의 β -amyloid는 1, 5, 10, 20 μ M의 농도에서 각각 67.4, 61.9, 59.4 및 47.7%의 생존율을 보였다(Fig. 1-11).

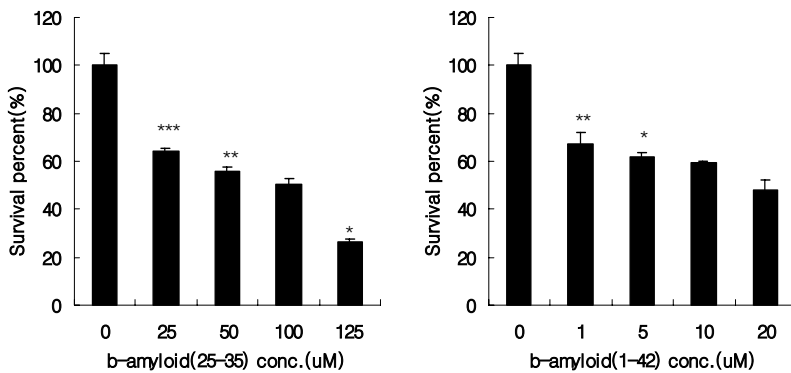


Fig. 1-11. Cytotoxicity of β -amyloid protein(fragment 25-35, 1-42) to PC 12 cells(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: compared with normal untreated group)

탈지박을 각 종 효소로 가수분해한 후 얻어진 추출물의 β -amyloid유래 세포 독성에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 25 μ M농도의 β -amyloid를 처리하여 세포독성을 유발한 결과(Table 1-3) 25 μ M이 β -amyloid를 처리함으로 약 약 51~55%의 생존율을 보였다. β -glucosidase 가수분해 처리후 각종 샘플의 농도 별 세포생존율은 비교적 125 μ g/ml의 농도 이하에서 약간씩 상승하는 경향을 보였으나 홍화박 및 붉은 홍화박은 62.5 μ g/ml의 농도에서도 세포독성을 나타내었다. Cellulase 처리시에는 비교적 붉은 들깨박에서 높은 활성을 나타내었으나, 역시 홍화박 및 붉은 홍화박의 경우에는 전혀 β -amyloid에 유래된 세포독성을 억제하는 효과를 관찰하지 못하였다. Deer-land 처리시에는 비교적 붉은 참깨박에서 β -amyloid에 유래된 세포독성을 억제하는 효과를 나타내었다.

Table 1-3. Effect of defatted oil seeds fraction hydrolyzed with various enzyme on β -amyloid protein(25-35) induced cytotoxicity of PC12 cell (survival percent(% of normal))

	참깨박 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			볶은참깨박 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			들깨박 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			볶은들깨박 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			홍화박 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			볶은홍화박 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	62.5	125	250	62.5	125	250	62.5	125	250	62.5	125	250	62.5	125	250	62.5	125	250
bA(25uM)	51.8			55.4			55.0			53.7			55.4			58.2		
β -glucosidase	57.0	48.0	48.0	57.1	57.7	54.5	53.8	52.3	49.6	55.6	50.1	48.9	38.2	37.4	39.4	44.1	42.3	34.5
Cellulase	54.3	51.8	55.5	57.7	56.5	51.8	49.6	52.5	47.9	60.5	62.3	50.0	40.4	39.3	35.2	40.4	39.3	35.2
Deer-land	53.7	50.3	22.4	60.6	57.7	51.7	60.4	58.7	18.5	57.0	57.0	53.9	38.0	37.2	41.7	38.4	29.3	14.2

라. PG의 β -amyloid protein에 유도된 PC12 cell에 대한 독성 억제효과

들깨박 추출물 PG의 β -amyloid유래 세포독성에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 25uM농도의 β -amyloid를 처리하여 세포독성을 유발한 결과(Fig. 1-12) 세포독성 유발결과 25uM이 β -amyloid를 처리함으로 약 55%의 생존율을 보였으며 이렇게 유발된 세포독성은 PG를 첨가할수록 그 독성이 완화되는 것을 확인할 수 있었다. 즉 β -amyloid로 유발된 세포독성은 PG 0.25mg/ml의 농도에서는 약 72%, 0.5mg/ml의 농도에서는 약 82%가 또한 1mg/ml의 농도에서는 80%의 세포생존율을 나타내어 본 실험에서 사용한 들깨박 추출물 PG는 β -amyloid유래 세포독성을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다.

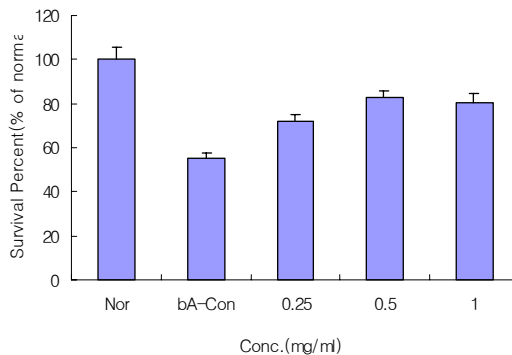


Fig. 1-12. Effect of PG on β -amyloid protein induced cytotoxicity of PC12 cell

3. 산화적 스트레스 억제효과

가. Brain 조직의 산화적 스트레스 억제활성

탈지박 각 추출물의 산화적 스트레스의 억제활성은 첨가농도가 증가할수록 유의하게 증가하는 경향을 보였으며, 특히, 들깨박과 볶은들깨박의 산화적 스트레스 억제활성이 높은 것으로 나타났으며, 들깨박의 경우 1.5 mg의 농도에서는 75.16%가 억제되었다(Fig. 1-13).

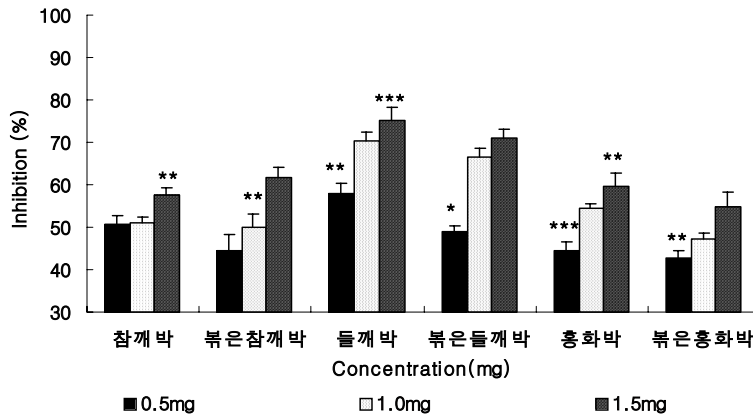


Fig. 1-13. Inhibitory effect of defatted oil seeds on the lipid peroxidation(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 : compared with normal untreated group)

탈지박 메탄올 추출물을 각 용매로 분획하여 얻은 분획물의 산화적 stress 억제활성을 조사해 본 결과(Fig. 1-14), 비교적 chloroform 분획물은 산화적 stress 억제활성이 가장 낮은 것으로 조사되었다. 참깨박과 들깨박의 경우 chloroform 분획물은 각각 3.8% 및 1% 만의 억제활성을 나타낸 것으로 그 효과가 매우 미비한 것으로 생각되었다. 대체적으로 볶은 참깨박과 볶은 들깨박을 제외하고 ethyl acetate와 methanol 분획물의 산화적 stress 억제활성이 높은 것으로 나타났으며 이러한 분획물들의 억제활성은 볶은 참깨박을 제외하고 모든 탈지박에서 50% 이상의 억제활성을 보였다

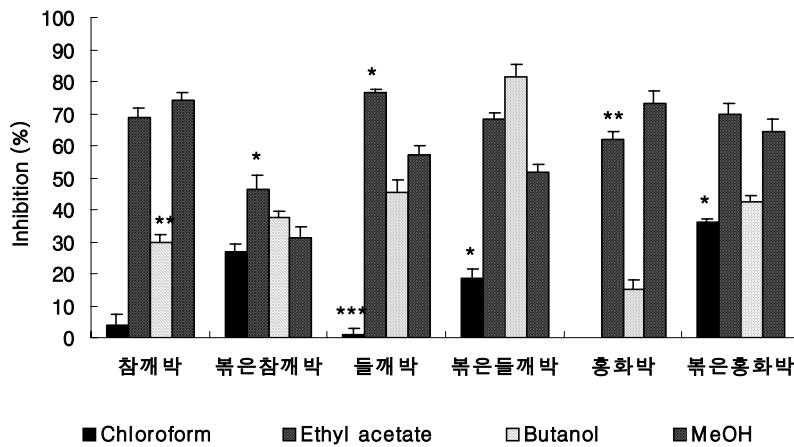


Fig. 1-14. Inhibitory effect of defatted oil seeds fractions on the lipid peroxidation(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 : compared with normal untreated group)

들깨박 추출물 PG는 농도 1mg까지는 농도의존적으로 brain의 과산화를 억제하는 것으로 나타났으나 그 이상의 농도에서는 억제효과가 증가하지 않았다. 즉 0.25mg, 0.5mg, 1mg, 1.5mg 및 2mg의 각 농도별 과산화물 형성 억제정도를 관찰한 결과 각각 25%, 43%, 63%, 66% 및 70%의 억제효과를 나타내어 들깨박 추출물 PG는 산화적 스트레스의 억제활성은 우수한 것으로 나타났다(그림 1-15).

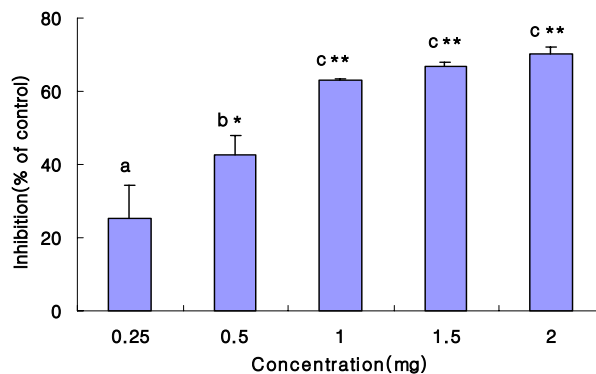


Fig. 1-15. Effect of PG on the lipid peroxidation

나. 전자공여능 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazil) radical 소거법으로 인한 전자 공여능을 측정하였다. DPPH 분자 내에는 radical을 함유하고 있는 radical은 토코페롤, 아스코르빈산, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원, 소거되어 처음에 띄던 짙은 자색과는 달리 탈색됨을 나타냈다. 이 탈색되며, 그 탈색 정도를 항산화물질의 수소 공여능으로 측정하는 방법이다. 이때의 DPPH의 거동은 hydroxy radical과 유사하여 free radical 소거 실험에 사용된다.

본 연구의 결과, 다른 용매를 이용한 실험군보다 MeOH, ethyl-acetate를 용매로 분획한 추출물에서 높은 전자 공여능을 나타냈다(Fig. 1-16).

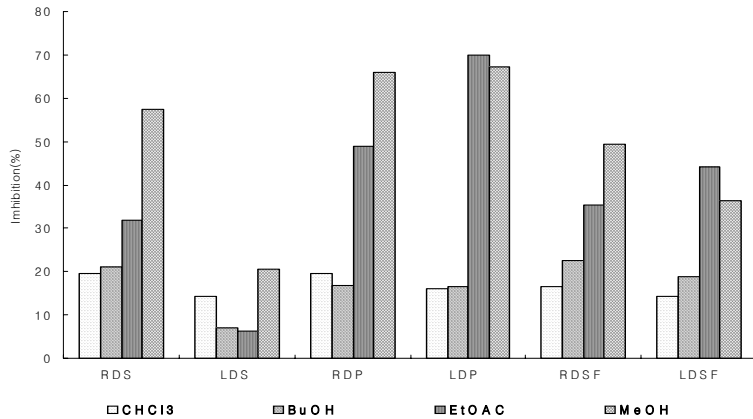


Fig. 1-16. Electron donating ability of defatted perilla extracts fractionated by each solvent.

(Each value is mean±SD of experimental group. ▨ : CHCl3 , ▩ : BuOH , ▪ : Ethyl acetate , ▫ : MeOH)

RDS : Roasting defatted sesame, LDS : Law defatted sesame,

RDP : Roasting defatted perilla, LDP : Law defatted perilla,

RDSF : Roasting defatted safflower, LDSF : Law defatted safflower

MeOH을 분획물은 들깨 생박>볶은 들깨박> 볶은 참깨박 > 볶은 홍화박 > 홍화 생박> 참깨 생박 순으로 높은 전자 공여능을 나타냈고, 모든 시료가 생박

에서 보다 붉은 박에서 높은 활성을 보였다.

또한 Ethyl-acetate을 이용한 분획물에서는 들깨 생박 > 붉은 들깨박 > 홍화생박 > 붉은 홍화박 > 붉은 들깨박 > 참깨 생박 순으로 높은 활성을 보였고, 들깨박류에서 높은 활성을, 생것 보다는 붉은 박에서 높은 활성을 나타냈다.

따라서 MeOH과 ethyl-acetate추출물에서, 생박 보다는 붉은 박에서 항산화 성이 높은 물질이 존재할 것으로 생각되어져, high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 항산화성 물질을 정량 할 것이다.

다. SOD-Liked

생체 내 항산화 효소 중의 하나인 superoxide dismutase(SOD)는 세포내 활성산소를 과산화 수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이며, SOD 에 의해 생성된 과산화수소는 catalase 또는 peroxidase에 의해 물분자와 산소 분자로 전환되는 중요한 효소 중 하나이다. ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). superoxide dismutase(SOD)의 활성을 직접 측정할 수 없으나, superoxide anion의 활성을 억제시키는 반응 전개시켜 SOD 유사활성을 측정할 수 있다.

본 실험에서 각 시료를 이용하여 SOD 유사활성을 측정한 결과는 Fig. 1-17과 같다. $CHCl_3$ 에서는 참깨 생박 > 홍화 생박 > 붉은 참깨박 > 참깨 생박, 붉은 홍화박 > 붉은 들깨박 순의 활성을 보였고, BuOH 분획물은 참깨 생박 > 참깨 들깨박 > 붉은 홍화박 > 붉은 참깨박 > 홍화 생박 > 붉은 들깨박 순으로 활성을 나타냈으며, ethyl-acetate을 이용한 분획물에서는 들깨 생박 > 참깨 생박 > 붉은 홍화박 > 홍화 생박 > 붉은 참깨박 > 붉은 들깨박순으로 높은 SOD 유사 활성을 나타냈다. 또한 MeOH 분획물에서는 들깨 생박 > 붉은 홍화박 > 붉은 들깨박 > 홍화생박 > 붉은 참깨박 > 참깨 생박 순으로 높은 활성을 나타냈다.

시료 추출에 사용된 용매별 SOD 유사활성은 다음과 같다.

붉은 참깨박은 $CHCl_3 < ethyl-acetate < MeOH < BuOH$ 순으로 높은 활성을 나타냈고, 참깨 생박 $BuOH < CHCl_3 < ethyl-acetate < MeOH$ 순으로 나타났으며, 붉은 들깨박 $MeOH < BuOH < ethyl-acetate < CHCl_3$ 순의 높은 활성

을 보였다. 또한 들깨 생박은 ethyl-acetate < MeOH < BuOH < CHCl₃, 볶은
 홍화박은 CHCl₃를 제외하고 다른 용매에서는 유사한 활성을 나타냈으며, 홍화
 생박은 BuOH < MeOH < CHCl₃ < ethyl-acetate순으로 활성을 보였다.
 이 결과, 종자의 생박을 시료로 사용한 군에 비해 볶은 박이 높은 활성을 보였
 고, CHCl₃를 제외하고 ethyl-acetate, MeOH을 용매로 사용한 분획 층에서 각
 시료별 높은 활성을 나타내었다.

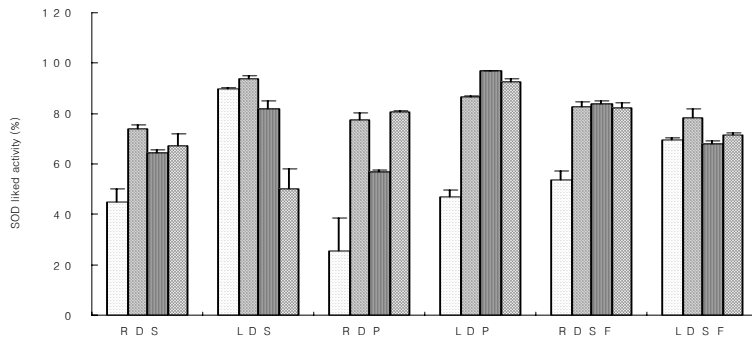


Fig. 1-17. SOD-Liked of defatted perilla extracts fractionated by each solvent.

라. Lecithin oxidation system

Lecithin 에 의한 과산화물가 측정 결과, 볶은 들깨박 및 들깨 생박에서 높
 은 경향을 보였으며, MeOH과 Ethyl acetate를 용매로 분획한 추출물에서 높은
 수준을 나타냈다(Fig. 1-18).

SOD 유사활성도에서 높은 수준을 보였던 들깨박에서 과산화물가가 낮게 측정
 되었고, 들깨박은 다른 군에 비해 총 페놀 함량 또한 높게 나타났다. 뿐만 아니
 라, 과산화물가가 낮게 나타난 MeOH, Ethyl acetate을 용매로 분획한 추출물
 층은 총 페놀함량이 높은 것으로 나타났다. 페놀성 화합물이 radical 생성 촉진
 물질인 metal ion(Fe, Cu)과 쉽게 결합하여 macrophage 나 free radical의 형성
 을 감소시킨다고 알려져 있다. 이로 미루어 페놀성 화합물이 지방산 산화의 초

기 성분인 hydroperoxide와 반응하여 과산화물을 억제 시킨 것으로 보여진다.

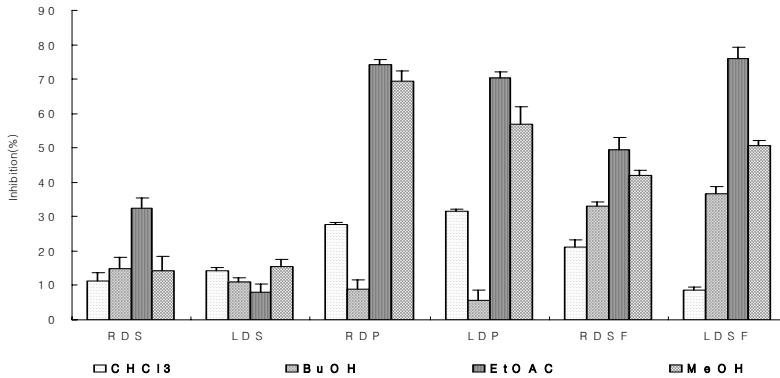


Fig. 1-18. Antioxidative effects of defatted perilla extracts fractionated by each solvent in oxidation of lecithin in FeSO₄/Ascorbic acids system

마. Hydrogen radical 소거능 측정

과산화수소는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 우리 몸에서 생성된 과산화지질은 동맥경화, 뇌졸중 등과 같은 성인병의 원인이 되며, 간장의 세포막에 과산화지질을 생성을 촉진시켜 세포의 기능을 저하시킬 뿐 아니라 염증을 유발한다. 이로 인한 결과 간경화, 간염 등 성인병을 초래한다고 보고하고 있다. Hydrogen radical 소거능은 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 peroxidase를 첨가하여 물과 산소분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시켜 주는 능력을 측정한 것으로, 볶은 들깨박, 들깨 생박의 MeOH, ethyl acetate을 이용한 분획 추출물에서 아주 높은 소거능을 나타냈다(Fig. 1-19). 본 실험에서 여러 항산화 효과를 측정한 결과, 페놀함량, 전자공여능 및 SOD 유사활성, 과산화지질 억제능이 높은 물질이 거의 유사하게 나타났으며, Hydrogen radical 소거능 또한 그러하였다. 이로 보아, 들깨박에는 높은 항산화성을 띄고 있는 물질이 다량 함유하고 있음을 유추할 수 있다.

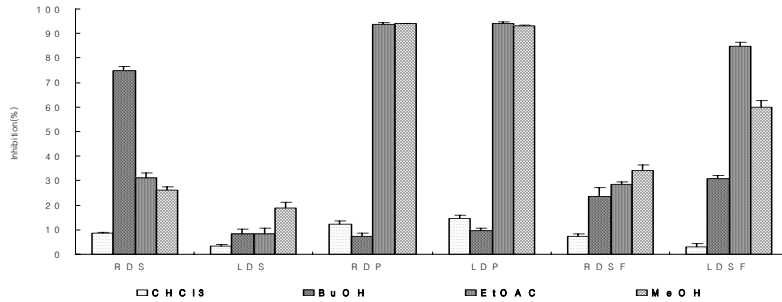


Fig. 1-19. Hydrogen radical scavenging activities of extracts separated from sesame, perilla and safflower dreg.

바. Hydroxy radical 소거활성

Hydroxy radical($\cdot\text{OH}$) 소거능은 2-deoxyribose oxidation method 에 의해 측정되었다. Hydroxy radical은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 한다. 참깨박, 들깨박, 홍화박을 생박 또는 볶은 후 탈지한 탈지박을 시료로 하여 hydroxy radical 소거능을 측정한 결과(Fig. 1-20), 다른 항산화 실험과 달리 높은 항산화능을 보였던 들깨박보다 참깨박에서 더 높은 hydroxy radical 소거능 보였으나, ethyl-acetate 층과 MeOH, BuOH 층에서 CHCl₃을 용매로 하여 분획 추출한 층에 비해 높은 hydroxy radical 소거능을 보여, 기존의 실험에서처럼, MeOH, ethyl-acetate가 항산화 물질 분리에 있어 최적 조건의 용매라고 할 수 있겠다.

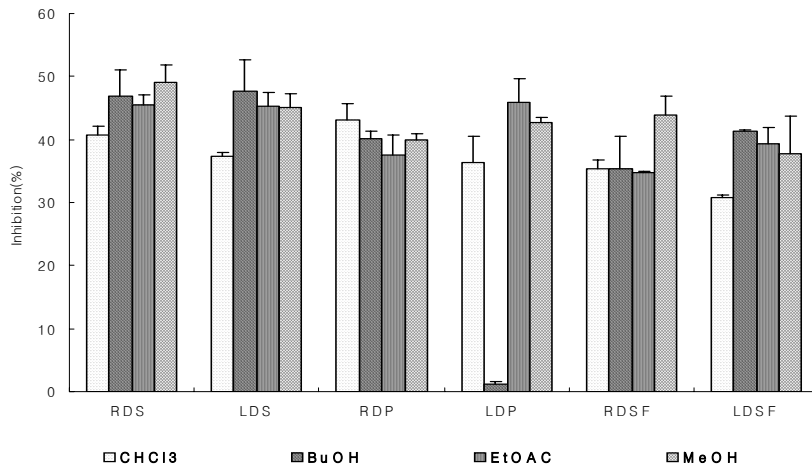


Fig. 1-20. Hydroxy radical scavenging activity of extracts separated from sesame, perolla and safflower dreg.

제 2 절 *in vivo* 계에서의 탈지박의 치매예방 활성 검색

제 1 항 치매예방 효능검토를 위한 모델 검토

I. ICR mouse를 이용한 치매의 유도 및 효능검토를 위한 모델검토

1. 재료 및 방법

가. 실험동물

본 실험에서는 ICR mouse(웅성, 4주령)를 Bio genomics. Inc에서 분양받아 일반 교형사료로 자육급여하였으며, 1주일간 환경에 적응시킨 후 치매를 유발하여 치매예방 동물모델계 확립을 위한 예비실험에 이용하였다.

나. 치매의 유발

β -amyloid (25-35)를 $10\mu\text{g}/10\mu\text{l}/\text{mouse}$ ($5\mu\text{l}$ 씩 2회 주사)의 농도로 뇌실내(i,c,v) 주사하여 치매를 유발하였으며 한 그룹에는 β -amyloid 대신에 동량의 PBS를 주사하였다.

다. 수미로를 이용한 인지기능 평가

β -amyloid (25-35)를 주사하는 날 실험쥐들에게 복합 수미로를 이용하여 예비 연습을 시켰으며, β -amyloid 주사 후 5일간 하루 2회씩 수미로를 찾아가게 함으로써 출발지점을 출발하여 도착시까지의 유영시간(step through latency)과 시행오차(error frequency)를 측정하여 기록하였다. 시행오차는 쥐가 방향을 잡지 못하고 벽면에 부딪히거나 진행방향을 바꾸는 횟수를 측정하였다.

라. Passive avoidance test

β -amyloid (25-35)를 주사한 다음날 mouse를 흰색 방에 넣고 빛을 주어 어두운 방으로 가게 한 후 0.3mA의 전류를 3초간 통하게 하여 mouse에게 이를 기억하게 하였다. 이와 같이 β -amyloid (25-35)를 주사하고 하루 훈련을 시킨 후 다음날 다시 mouse를 흰색 방에 넣어 어두운 곳으로 회피하는데 걸리는 시

간(step through latency)을 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. water maze test

β -amyloid 주사 직전과 주사 1일 후 복합수미로를 이용하여 목적지까지 찾아가는 훈련을 3회씩 시키고 2일 후부터 수미로를 찾아 목적지까지 찾아가는데 걸리는 시간(step through latency)과 시행오차(error frequency)을 측정하여 Fig. 2-1, 2-2에 나타내었다. β -amyloid 주사 직전과 1일 후에는 수미로를 찾아 목적지까지 찾아가는데 걸리는 시간과 시행오차는 처리구들 간에 차이를 나타내지 않았으나, β -amyloid 주사 2일째부터 처리구들 간에 차이가 나타나 약 5일간 지속되었다. 정상군은 훈련시간이 경과할수록 목적지까지 찾아가는데 걸리는 시간과 시행오차가 줄어들어 학습 효과가 매우 높게 나타났다. 그러나 β -amyloid protein을 주사하여 치매를 유발시킨 군은 주사직전의 훈련과 주사 후 1일 후의 결과에 비하여 2일 째에는 목적지까지 찾아가는데 걸리는 시간과 시행오차가 오히려 증가하였고 훈련시간이 경과되어도 시간과 오차에 변화가 없어 학습효과가 전혀 나타나지 않았다.

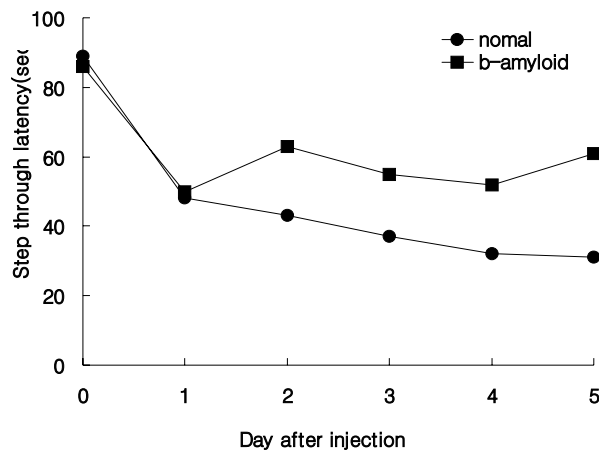


Fig. 2-1. Normal and β -amyloid (25-35) injected mice were measured for step through latency using a water maze test

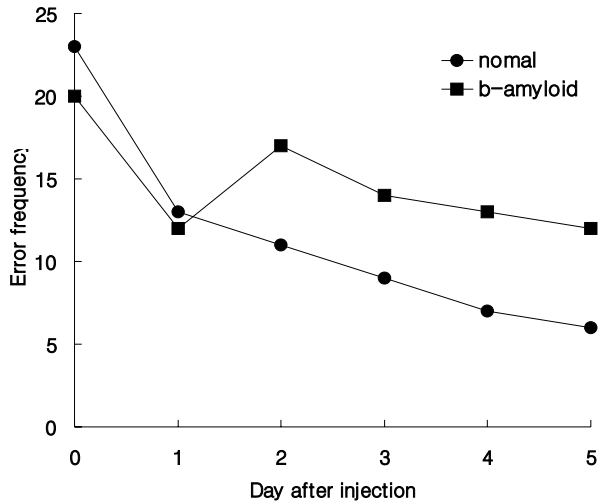


Fig. 2-2. Normal and β -amyloid (25-35) injected mice were measured for error frequency using a water maze test

나. Passive avoidance test

β -amyloid 주사 다음날 passive avoidance chamber에서 기억 훈련시킨 뒤 1일 후 기억력 test를 실시하여 step through latency를 측정된 결과는 Fig. 2-3과 같다. β -amyloid 주사 1일 후에는 전 처리구의 mouse들이 30초 이내에 어두운 방으로 회피하여 처리구들 간에 차이를 보이지 않았으나, β -amyloid 주사 후 전기충격 기억훈련을 시킨 2일째에는 정상군(normal)의 step through latency는 약 300초이상 인데 비하여 치매유발군(Con-BA)에서 100초 이하로 step through latency가 유의적으로 감소하였다. 즉 치매유발군은 어두운 방의 전류 충격에 대한 1차 훈련 이후에 이를 기억하는 능력이 정상군에 비해 유의하게 감소하였음을 나타내고 있다. 또한 normal군간의 차이 즉, 뇌실내 PBS만을 주사한 군과 어떠한 주사처리도 하지 않은 normal-ori 처리군간의 step through latency는 다른 유의차가 인정되지 않아, 치매유발군에서의 step through latency의 감소는 β -amyloid injection시에 유발된 상처 또는 stress에 의한 것이 아니라 치매원인 물질로 알려진 β -amyloid protein이 뇌실에 축적됨

에 따라 기억력이 손상되었음을 나타내고 있다. Yan과 Song에 의하면, 마우스의 뇌실내 β -amyloid 및 β -amyloid protein precursor(APP)의 carboxyl-terminal fragment(CT) 100-105를 주사하여 passive avoidance 실험으로 behavior test를 실시한 결과 치매유발물질의 주사군에서 대조군에 비해 step through latency가 유의적으로 감소되었다고 보고하였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 β -amyloid protein을 뇌실내 주사한 본 동물시험 모델은 치매예방 모델로서 향후 in vivo 효능 검정을 위한 실험 모델로 유용할 것으로 판단되었다.

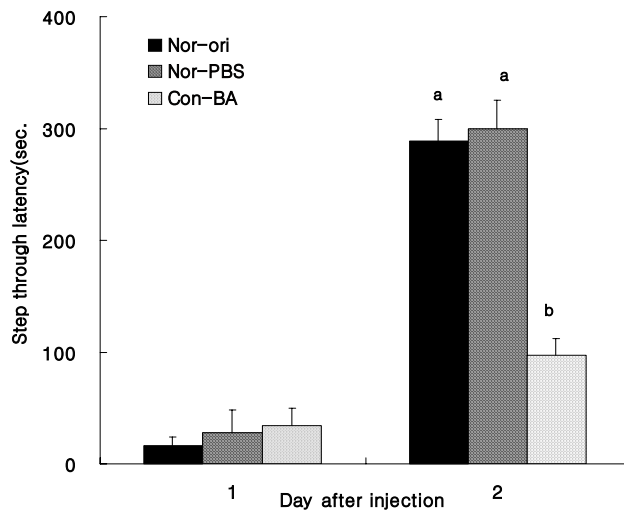


Fig. 2-3. Normal and β -amyloid (25-35) injected mice were measured for step through latency using a passive avoidance

II. SAMP8 mouse를 이용한 치매의 유도 및 효능검토를 위한 모델검토

1. 재료 및 방법

가. 실험동물

노화촉진마우스 (senescence-accelerated mouse : SAMP8, senescence-resistant mouse : SAMR1, 수컷, 암컷, 12주령)를 한국화학연구소에서 분양받아 6개월 간 고형배합사료로 적응시켜 완전한 노령기에 접어들도록 하였다.

나. Water maze test

완전한 노령기에 접어들도록 한 SAMP8 및 SAMR1의 실험쥐들에게 복합 수미로를 이용하여 예비 연습을 시켰으며, 수미로를 찾아가게 함으로써 출발지점을 출발하여 도착시까지의 유영시간(step through latency)과 시행오차(error frequency)를 측정하여 기록하였다. 시행오차는 쥐가 방향을 잡지 못하고 벽면에 부딪히거나 진행방향을 바꾸는 횟수를 측정하였다.

다. Passive avoidance test

완전한 노령기에 접어들도록 한 SAMP8 및 SAMR1의 실험쥐들을 흰색 방에 넣고 빛을 주어 어두운 방으로 가게 한 후 0.3mA의 전류를 3초간 통하게 하여 mouse에게 이를 기억하게 하였다. 이와 같이 하루 훈련을 시킨 후 다음날 다시 mouse를 흰색 방에 넣어 어두운 곳으로 회피하는데 걸리는 시간(step through latency)을 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. Water maze test

SAMP8 mouse와 SAMR1 mouse를 6개월 간 사육하여 완전한 노령기에 접어들게 한 후 기억력 test를 실시하여 step through latency 및 error frequency를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 2-4와 같다. 노화가 촉진되지 않은 SAMR1군은 미로의 목적지까지 찾아가는데 걸리는 시간 즉, step through latency는 52.8초였으나, 노화가 촉진된 SAMP8 mouse 즉, control군은 95초로 정상군에 비하여 step through latency가 길어져 확실히 치매가 유도됨을 알 수 있었다. 그러나 error frequency의 관찰에서는 SAMP8 mouse 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 실험결과로 미루어 볼 때 기억력 손상 및 행동변화의 시점은 7개월령으로 생각되며, 이 때 적절한 시료의 섭취는 치매치료에 기여할 것으로 사료된다.

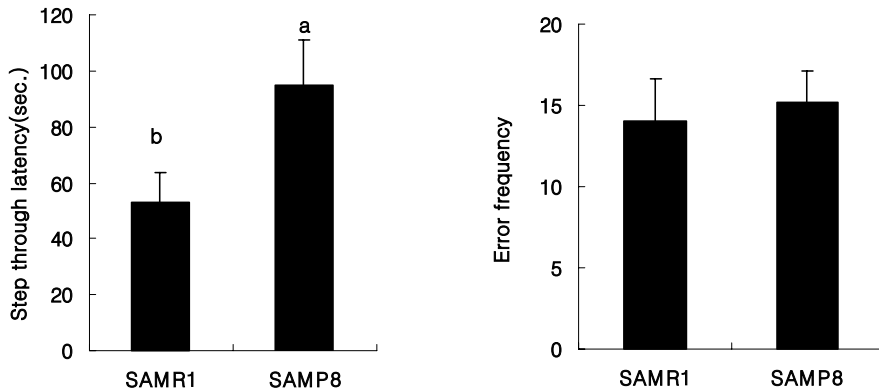


Fig. 2-4. SAMR1 and SAMP8 mice were measured for step through latency and error frequency using water maze

나. Passive avoidance test

본 연구에서는 senescence-accelerated mouse (SAMP8)와 senescence-resistanted mouse (SAMR1)를 6개월 간 고형배합사료로 적응시켜 완전한 노령기에 접어들어 치매를 유도한 후 월령에 따라 step through latency를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 2-5와 같다. 노화촉진쥐가 6월령이 되었을 때, passive avoidance를 실시하여 step through latency를 측정한 결과를 살펴보면 SAMP8과 SAMR1 사이에 차이가 나타나지 않음을 관찰할 수 있었다. 그러나 6개월령에서 전기쇼크를 주어 기억하게 하여 1달 (7개월) 후에 기억력을 측정하였을 시에는 step through latency가 각각 106초, 48초를 나타내어 SAMR1이 SAMP8 보다 잘 기억하는 것으로 사료된다. 이 시기부터 SAMP8과 SAMR1간의 차이나 나타나기 시작하여 월령 9개월에서는 극적인 차이를 나타내어 월령 증가에 따라 기억력이 더 손상됨을 알 수 있었다. 또한 SAMR1과 SAMP8간의 학습능력의 차이를 관찰할 수 있었다.

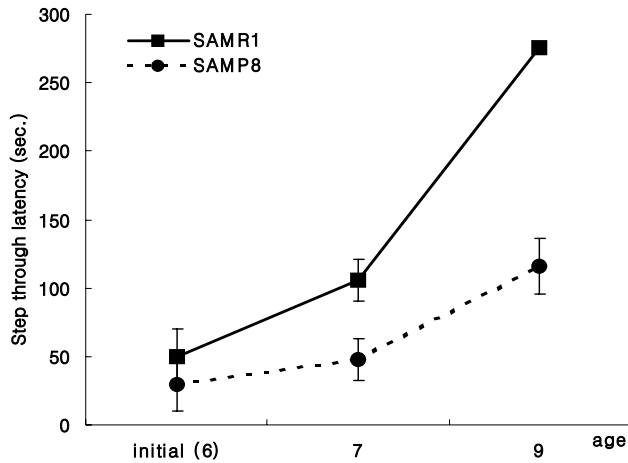


Fig. 2-5. SAMR1 and SAMP8 mice were measured for step through latency using passive avoidance.

제 2 항 탈지박 메탄올 추출물의 *in vivo* 효능 검토

1. 재료 및 방법

가. 유효성분의 추출

본 실험에 사용한 참깨 및 들깨는 경상남도 산청군으로부터 구입하여 정선, 세척, 건조시켜 200℃에서 볶음 처리 한 후 착유하였다. 기름을 제조한 후 얻어진 참깨박과 들깨박은 40 mesh를 통과할 수 있도록 분쇄하여 -20℃ 냉동실에 보관하고 추출물 제조에 사용하였다. 참깨박과 들깨박은 분쇄 후, 5배의 80% 메탄올을 첨가하여 실온에서 150 rpm으로 3시간동안 shaking하여 추출하였으며 이를 3회 반복하여 메탄올층을 얻었다. 이를 여과한 후 40℃ 이하에서 감압농축 (Rotary vacuum evaporator R-114, Swiss)하고 동결건조 한 다음 동물실험에 사용하였다.

나. 실험동물의 사육

본 연구에서는 senescence-accelerated prone mouse (SAMP8)와 senescence-resistant mouse (SAMR1)를 한국화학연구소에서 분양 받아 6개월

간 고형배합사료 (삼육 SAM #31 실험용 쥐사료, 성분명 : 조단백질 22.0%, 조지방 4.5% 이상, 조섬유 6% 이하, 조회분 8% 이하, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상, (주)삼육 실험동물연구소)로 사육하였다. 연령이 6개월 된 SAMP8은 난괴법에 의하여 무첨가 대조군, 탈지 참깨 메탄올 추출물 첨가군 (S), 탈지 들깨 메탄올 추출물 첨가군 (P)으로 나누었다. 실험식은 AIN-76 diet 조성을 기본으로 탈지 참깨와 탈지 들깨 메탄올 추출물을 식이의 0.3% 첨가하여 12주간 공급하였으며, 실험기간 동안 물과 식이는 자유롭게 공급하였다. 본 연구에서 사용한 식이 구성 성분은 table 2-1에 제시하였다. 식이 섭취량은 1주일에 3회 일정한 시각에 측정하였으며, 체중은 매주 측정하였다. 실험동물은 식이 기간이 종료되는 시점에서 passive avoidance test 및 수미로를 통하여 인지기능의 행동변화를 측정하였다.

Table 2-1. Composition of experimental diet (unit:g/kg diet)

Ingredients	Group ³⁾	SAMP8			
		SAMR1	Con	S	P
Corn starch		529.5	529.5	526.5	526.5
Casein		200	200	200	200
Sucrose		100	100	100	100
Soybean oil		70	70	70	70
Cellulose		50	50	50	50
Mineral mixture ¹⁾		35	35	35	35
Vitamin mixture ²⁾		10	10	10	10
DL-methionine		3	3	3	3
Choline chloride		2.5	2.5	2.5	2.5
Defatted sesame extract		0	0	3	0
Defatted perilla extract		0	0	0	3
Total		1,000	1,000	1,000	1,000

1) AIN-76 mineral mixture

2) AIN-76 vitamin mixture

3) SAMR1 : Extract-free diet

Con : Extract-free diet

S : Experimental diet containing defatted sesame methanol extract

P : Experimental diet containing defatted perilla methanol extract

다. Water maze test

완전한 노령기에 접어들도록 한 SAMP8 및 SAMR1의 실험쥐들에게 복합 수미로를 이용하여 예비 연습을 시켰으며, 수미로를 찾아가게 함으로써 출발지점을 출발하여 도착시까지의 유영시간(step through latency)과 시행오차(error frequency)를 측정하여 기록하였다. 시행오차는 쥐가 방향을 잡지 못하고 벽면에 부딪히거나 진행방향을 바꾸는 횟수를 측정하였다.

라. Passive avoidance test

Passive avoidance (256000-series, TSE-System, German)는 마우스의 어둠을 좋아하는 습성을 이용하여 설계된 장치로서 암실과 명실로 구분되어 있으며, 그 사이에 작은 문으로 연결되어있다. 실험동물을 명실에 넣고 빛을 주면 곧 암실로 들어가는데, 이때 문을 닫고 0.3 mA의 전류를 3초간 주어 이를 기억하게 하였다. 이를 반복하여 연습시킨 다음 다시 명실에 실험동물을 두어, 빛을 회피하여 암실로 들어가는데 까지 걸리는 시간 (step through latency)을 측정하였다.

마. 시료의 채취

식이기간이 종료되는 시점에서 passive avoidance test 및 수미로를 통하여 인지기능의 행동변화를 측정한 후에 12시간 절식시키고 diethyl ether로 마취시켜 복부대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 3,000 rpm, 10분간 원심분리 (BRUSHLESS D.C MOTOR CENTRIFUCE, VS-5000, VISION SCIENTIFIC CO., LTD., KOREA)하여 적혈구와 혈청으로 분리하였다. 혈청은 분석 시까지 -70°C deep freezer에 보관하였으며, 뇌는 ice cold saline 용액에 세척한 다음 여지로 물기를 제거하여 무게를 측정하고, 바로 -70°C deep freezer에 보관하여 acetylcholinesterase 활성, 항산화 효소활성 및 지질 과산화물 측정에 사용하였다.

바. 생화학적 분석

1) Acetylcholinesterase activity 측정

혈청중의 acetylcholinesterase 활성도를 cholinesterase activity kit (Sigma,

USA)를 이용하여 분석하였다. 혈청 0.2 mL과 sodium chloride solution 0.2 mL을 혼합한 후 water 3.0 mL, nitrophenol solution 2 mL, acetylcholin chloride solution 0.2 mL을 첨가하여 25°C water bath에서 30분간 배양시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 뇌조직의 acetylcholinesterase 활성은 Elman 법(15)에 근거하여 측정하였다. 조직 균질액 일정량을 cuvette에 담고, 2.6 mL phosphate buffer (pH 8.0)와 3-carboxy-4-nitrophenyl disulfide (DTNB)를 넣어 반응시켜 412 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였다.

2) Thiobarbituric Acid Reactive Substance 함량 측정

뇌조직의 지질 과산화물 함량은 조직의 일정량을 Teflon Potter-Elvehjem homogenizer로 마쇄하여 얻은 균질액을 과산화지질 분석을 위한 시료로 사용하였다. 지질 과산화물 분석은 Ohkawa 등의 방법에 따라 분석하였으며, 표준물질로서는 1,1,3,3,-tetraethoxypropane을 사용하였다.

3) Antioxidant enzymes activities 측정

항산화제 효소 중 catalase, superoxide dismutase (SOD) 및 glutathione peroxidase (GPx) 활성을 뇌에서 측정하였다. 뇌 조직 무게 10배 volume의 0.25 M sucrose/0.5 M EDTA buffer를 가하여 병냉하에 homogenizer로 분쇄하였으며, 이때 얻은 균질액을 1000×g에서 5분간 원심분리 (Rotary vacuum evaporator R-114, Swiss)하여 상층액을 catalase 효소원으로 사용하였다. 이 상층액을 다시 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 SOD와 GPx 활성 측정에 사용하였으며, 조제된 시료는 분석 시까지 -70°C에서 냉동 보관하였다. Catalase는 hydroperoxide가 분해 되는 정도를 측정하는 Aebi의 방법에 준하였으며, SOD 활성은 Marklund의 방법, GPx는 Lawrence와 Burk의 방법을 사용하였다.

4) 단백질 정량

각 효소원의 단백질량은 Lowry법에 의하여 정량하였고 표준검량선 작성을 위해서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

5) 통계처리

실험결과는 SAS는 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 나타내었으며 각 군의 유의차 검정은 분산분석을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 duncan's multiple range test를 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

가. Water maze test

SAMP8 mouse와 SAMR1 mouse를 6개월 간 사육하여 완전한 노령기에 접어들어 치매를 유도한 후 각각의 유지박 시료 공급군으로 나누어 12주간 계속 사육하였다. 그 후 수미로를 이용하여 1차 훈련시켰으며 다음날 기억력 test를 실시하여 step through latency 및 error frequency를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 2-6과 같다. Passive avoidance의 결과와 마찬가지로 노화가 촉진되지 않은 SAMR1 즉 normal군은 미로의 목적지까지 찾아가는데 걸리는 시간 즉, step through latency는 52.8초였으나, 노화가 촉진된 SAMP8 mouse 즉, control군은 95초로 정상군에 비하여 step through latency가 길어져 확실히 치매가 유도됨을 알 수 있었다. 그러나 앞선 실험 즉 passive avoidance의 결과와는 상반되게 시료의 처리구들 즉, 참깨박과 들깨박을 급여한 처리구들간에는 유의차가 인정되지는 않았지만 노화가 촉진된 control군에 비하여도 step through latency가 길어졌으며, error frequency의 관찰 또한 들깨박을 급여한 처리구에서 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 처리구들 간에 유의차를 보이지 않아 수미로를 통한 치매 치료의 효과는 확인하지 못하였다.

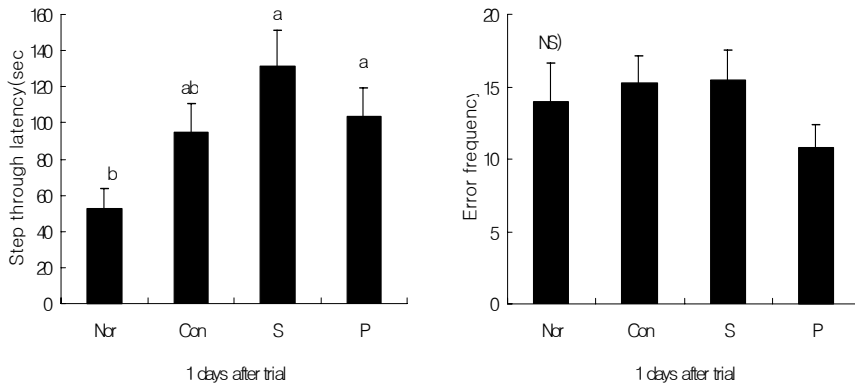


Fig. 2-6. Effect of defatted seed extracts on impairment in learning and memory in senescence accelerated mouse(SAMP8) through water maze.

나. Passive avoidance test

Fig. 2-7에는 각각의 실험 식이를 공급하여 12주간 사육한 후 passive avoidance chamber로 훈련시킨 후 step through latency변화를 나타내었다.

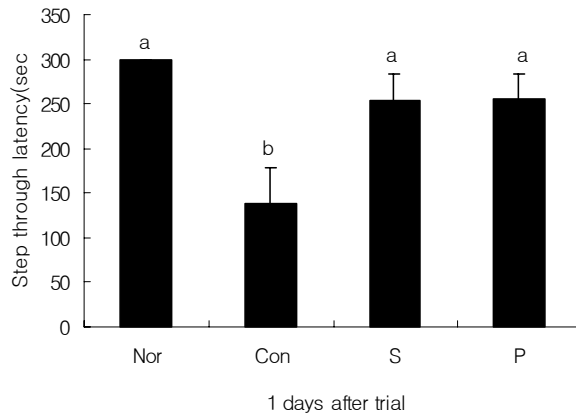


Fig. 2-7. Effect of defatted seed extracts on impairment in learning and memory in senescence accelerated mouse(SAMP8) through passive avoidance.

SAMR1군의 step through latency는 300초였으나, 노화가 촉진된 대조군은 138초로 유의적으로 감소하여 ($p < 0.05$) 인지기능이 유의적으로 손상되었음을 알 수 있었다. 그러나 탈지 참깨 메탄올 추출물과 탈지 들깨 메탄올 추출물을 공급한 군에서는 step through latency가 각각 252초와 256초로 SAMP8 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였고 SAMR1군도 거의 유사한 수준을 나타내었다. Umezawa 등은 α -linolenate/linoleate 조성이 다른 해바라기씨 기름과 들기름을 노화촉진마우스에게 공급한 결과, α -linolenate가 풍부한 들기름 공급군의 학습능력이 개선되었음을 보고하였으며, 이는 식이가 뇌 인지질의 n-3/n-6 불포화 지방산 비율에 영향을 미치는 것으로 제시하였다. 또한 비타민 C와 E 같은 항산화 비타민은 흰쥐에 있어서 손상된 인지기능을 개선시킨다고 보고되고 있으며, 실제로 비타민 E는 노인성치매환자 치료에 다각도로 이용되고 있다. Suganuma 등의 보고에서는 토마토에서 추출한 lycopene를 식이에 섞여 SAMP8에게 장기간 섭취 시 passive avoidance test에서 step through latency가 유의적으로 증가됨을 보고하여 본 연구와도 유사한 경향을 나타내었다. 이상의 실험 결과로 살펴볼 때 탈지 참깨와 들깨메탄올 추출물은 노화로 인한 인지기능 저하에 영향을 미쳐 기억과 학습장애를 개선시킬 수 있는 것으로 기대된다.

다. 생화학적 분석

1) 식이섭취량 및 체중변화

노화촉진 mouse를 이용하여 6개월간 일반고형사료로 사육하여 노화를 촉진시킨 후 참깨박 및 들깨박 추출물을 사료로 12주간 계속 급여한 후 mouse의 체중증가량 및 식이섭취율을 계산하였다(Table 2-2). 처리군들 간에 체중증가량의 유의차는 인정되지 않았으나 비교적 노화가 촉진되지 않은 정상군(Nor, SAMR1)의 체중증가량이 가장 적었으며, 반면에 노화가 촉진된 대조군(Con, SAMP8)에서 체중증가량이 가장 높은 것으로 나타났다. 식이섭취량 또한 정상군의 경우에서 비교적 유의적으로 낮게 나타나, 정상군의 낮은 체중증가량은 낮은 식이섭취량에 의한 것으로 사료되었다.

Table 2-2. Body weight gain and food intake of experimental mice fed experimental for 12 weeks¹⁾

	Nor	Con	S	P
Weight gain(g)	2.11±0.95 ^{NS2)}	7.52±1.27	5.00±2.02	6.52±2.03
Food intake (g/day)	3.51±0.21 ^{b,3)}	4.03±0.06 ^{ab}	4.81±0.25 ^a	4.30±0.30 ^{ab}

1) Values are mean ± standard error (n=9)

2) NS : Not Significant

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) 장기무게

Mouse 들의 장기무게를 측정한 결과(Table 2-3) 뇌, 신장 및 비장의 중량은 전 처리구에서 유의차가 나타나지 않았다. 그러나 노화가 촉진되지 않은 정상군(Nor, SAMR1)의 간의 경우, 다른 처리군들에 비해 유의적으로 낮은 무게를 나타내었다.

Table 2-3. Organ weight of experimental mice fed experimental for 12 weeks^{1)v}

	Nor	Con	S	P
Brain	0.44±0.02 ^{NS,2)}	0.41±0.02	0.39±0.01	0.39±0.01
Liver	1.28±0.06 ^{b,3)}	1.77±0.09 ^a	1.78±0.11 ^a	1.80±0.02 ^a
Kidney	0.52±0.02 ^{NS}	0.48±0.02	0.49±0.02	0.50±0.01
Spleen	0.13±0.01 ^{NS}	0.19±0.03	0.13±0.01	0.11±0.01

1) Values are mean ± standard error (n=9)

2) NS : Not Significant

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) Acetylcholin esterase(AChE) 활성

Mouse 혈액중 혈청을 분리하여 혈청중의 AChE의 활성도를 측정하기 위하여 cholinesterase activity kit(Sigma, USA)를 이용하여 분석하였으며 결과는 Table 2-4와 같다. 전체적으로 노화가 촉진된 mouse (Con, SAMP8)에서 가장 높은 효소의 활성을 보였으며, 다른 처리구들은 비슷한 수치를 나타내었으나, 유의차는 나타나지 않았다.

Table 2-4.. Acetylcholin esterase activity in serum of experimental mice¹⁾

	Nor	Con	S	P
Achase activity (rappaport units/ml) ²⁾	113.3±5.7 ^{NS,3}	124.1±5.3	104.0±0.2	119.6±7.18

1) Values are mean ± standard error (n=9)

2) One Rappaport unit is that amount of cholinesterase which will liberate I micromole of acetic acid from acetylcholine in 30 minutes at 25°C at pH 7.8 under conditions of this test.

3) NS : Not significant

4) 혈중 지질 함량

혈장내의 총 콜레스테롤, 중성지방 및 HDL-콜레스테롤 분석결과 및 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율은 Table 2-5와 같다. 혈장의 총 콜레스테롤 농도는 참깨박 및 들깨박을 첨가하여 급여한 군의 경우가 normal 및 control 처리구에 비하여 유의적으로 낮았다(P<0.05). 또한 노화가 촉진되지 않은 정상군들(Nor, SAMR1)과 노화가 촉진된 대조군(Con, SAMP8)간에는 유의차가 인정되지는 않았으나 대조군에서의 혈중 총 콜레스테롤 함량이 상대적으로 높았다. 중성지방의 경우는 노화가 촉진된 대조군에서의 수치가 다른 처리군들에 비해 유의적으로 높았으며(P<0.05), 사료에 들깨박을 첨가하여 급여한 경우 정상군들의 수치보다는 높았지만 대조군보다는 중성지방의 함량이 많이 낮아짐을 관찰하였다. 혈장의 HDL-콜레스테롤 농도 및 그 비율을 측정한 결과, 정상군에 비해 노화가 촉진된 대조군에서의 경우가 그 함량 및 비율이 유의적으로 낮은 경향을 나타내었고 참깨박 및 들깨박 추출물을 첨가하여 급여한 처리구에서 HDL-콜레스테롤의 비율은 정상군보다는 낮았지만 대조군에 비해서

높아짐을 관찰할 수 있었다. 결론적으로 마우스의 노화가 촉진되면서 혈장내 중성지방의 농도는 상대적으로 증가하며, HDL-콜레스테롤의 함량 및 비율도 이에 따라 낮아짐을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서 사용한 유지박 추출물은 생체의 지방대사를 개선시키는 것으로 나타났다.

Table 2-5. Contents of total cholesterol, triglyceride and HDL-cholesterol in serum of experimental mice¹⁾

	Nor	Con	S	P
Total cholesterol (mg/dl)	139.8±5.8 ^a	163.1±10.6 ^a	117.5±5.3 ^b	140.43±4.4 ^b
Triglyceride (mg/dl)	84.7±5.8 ^c	175.1±30.6 ^a	143.2±13.9 ^{ab}	136.97±6.2 ^b
HDL-cholesterol (mg/dl)	98.8±3.6 ^a	76.5±3.9 ^b	71.5±4.4 ^b	85.26±3.3 ^b
HDL:total cholesterol ratio	0.71±0.02 ^a	0.46±0.01 ^b	0.60±0.07 ^{ab}	0.60±0.02 ^{ab}

1) Values are mean ± standard error (n=9)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) 혈액, 간 및 신장의 지질과산화 함량

혈액과 간 및 신장에서의 지질 과산화 정도를 알아보기 위해 지질과산화물 함량을 측정된 결과 Table 2-6과 같다. 전체적으로 간에서의 경우를 제외하고 혈장 및 신장에서의 지질과산화물은 정상군에 비하여 노화가 촉진된 control군에서 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 이와같이 증가된 지질과산화물의 함량은 유지박을 사료에 첨가하여 급여함으로써 지질과산화물의 함량의 증가를 억제할 수 있었으며, 특히 들깨박 추출물을 급여한 처리군에서는 혈장내 지질과산화물의 형성이 효과적으로 억제되는 경향을 나타내었다.

Table 2-6. Contents of thiobarbituric acid reactive substances in serum, liver and kidney of experimental mice¹⁾

Group	Serum (nmole/ml)	Liver (nmole/g)	Kidney (nmole/g)
Nor	8.12±1.47 ^{ab}	18.76±1.02 ^{NS}	34.48±6.42 ^b
Con	16.24±7.97 ^a	17.88±1.32	64.16±1.74 ^a
S	6.19±1.06 ^{ab}	18.08±0.74	46.14±8.96 ^{ab}
P	4.57±0.67 ^b	17.74±1.24	49.97±4.59 ^{ab}

1) Values are mean ± standard error (n=9)

2) NS : Not significant

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) 간중 항산화 효소의 활성변화

간중 효소의 활성변화를 측정된 결과 Table 2-7과 같다. Catalase의 활성은 노화가 촉진되지 않은 정상군(Nor, SAMR1)의 경우가 82.57로 가장 높았으나, 노화가 촉진된 대조군(Con, SAMP8)에서는 64.97로 정상군에 비해 유의적으로 낮아짐을 확인할 수 있었다. 이렇게 낮아진 활성은 참깨박 추출물을 첨가하여 급여한 처리군에서 다시 활성이 높아지는 경향을 보였으나, 들깨박 추출물을 급여한 처리구는 대조군과 비슷한 수치를 나타내어 활성이 증가하지 않았다. SOD의 경우 전 처리군에서 비슷한 수치를 나타내어 처리군간 유의차를 나타내지 않았으나 GPx와 GSH의 경우는 catalase의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 즉 정상군에 비해 대조군의 활성이 유의적으로 낮아졌으며, 특히 참깨박 추출물을 첨가한 처리군에서 활성이 많이 증가하여 정상군의 수준 이상을 나타내었다.

Table 2-7. Changes of liver catalase, superperoxidase dismutase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activity of experimental mice¹⁾

Group	Catalase (unit/min mg protein)	SOD (unit/min mg protein)	GPx (nmole/min mg protein)	GSH (unit/min mg protein)
Nor	82.57±4.86 ^a	8.14±0.31 ^{NS)}	398.09±8.56 ^a	1.81±0.07 ^a
Con	64.97±1.41 ^b	8.97±0.49	365.62±5.94 ^b	1.59±0.03 ^b
S	79.47±4.83 ^a	8.80±0.37	411.43±13.35 ^a	1.92±0.06 ^a
P	64.99±2.66 ^b	8.74±0.58	370.54±6.47 ^b	1.89±0.08 ^a

1) Values are mean ± standard error (n=9)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) NS : Not significant

제 3 항 탈지박 유효성분의 *in vivo* 효능 검토

1. 재료 및 방법

가. 유효성분의 추출

본 실험에 사용한 들깨는 경상남도 산청군으로부터 2001년도 산을 구입하여 정선, 세척 한 후 건조시켜 착유하였다. 들기름을 제조한 후 얻어진 들깨박은 -20℃ 냉동실에 보관하고, 시료로 사용하였다. 들깨박 추출물은 일정량을 취하여 1시간동안 열수추출하여 여과한 후 30분간 6,000 rpm에서 원심분리(Dupont Sorvall RC-5C, SORVALL, USA)하여 상층액을 다시 여과하였다. 여과액을 다시 농축하여 얻은 추출물을 diaion column에 충전시켜 overnight 하였다. 그 후 60% 에탄올로 2회 반복 추출한 후 60% 에탄올 추출액을 모아 감압농축(Rotary vacuum evaporator R-114, Swiss)하여 동결건조 하였다. 동결건조 한 다음 분말화 하여 시험과 실험과 동물실험에 사용하였다

나. 실험동물의 사육

본 실험에서 사용한 ICR mouse(수컷, 4주령)를 Bio genomics. Inc에서 분

양받아 1주일간 기본식이(삼육 SAM #31 실험용 쥐사료, 성분명 : 조단백질 22.0%, 조지방 4.5% 이상, 조섬유 6% 이하, 조회분 8% 이하, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상, (주)삼육실험동물연구소)로 적응시켰다. 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의하여 정상군, β -amyloid 투여 대조군, 0.25% 들깨박 추출물, 0.5% 들깨박 추출물 공급군으로 나누어 6주간 사육하였으며 본 연구에서 사용한 식이 구성 성분은 Table 2-8에 제시하였다. 실험개시 시점에서 β -amyloid (25-35)를 $10\mu\text{g}/10\mu\text{l}/\text{mouse}(5\mu\text{l}$ 씩 2회 주사)의 농도로 뇌 실내(i,c,v) 주사하여 치매를 유발하였고, 정상그룹에는 β -amyloid 대신에 동량의 PBS를 주사하여 수미로와 passive avoidance를 이용하여 인지기능을 관찰하였다. 또한 본실험에서 사용한 senescence -accelerated prone mouse (SAMP8)와 senescence-resistant mouse (SAMR1)를 한국화학연구소에서 분양 받아 6개월 간 고형배합사료 (삼육 SAM #31 실험용 쥐사료, 성분명 : 조단백질 22.0%, 조지방 4.5% 이상, 조섬유 6% 이하, 조회분 8% 이하, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상, (주)삼육실험동물연구소)로 사육하였다. 그 후 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의하여 SAMP8를 대조군(con), 들깨박 추출물 (PG) 첨가군으로 나누어 들깨박 추출물의 효과를 관찰하였으며, SAMP8(con)의 노화 정도는 어린 SAMP8(Y)을 이용하여 확인하였다. 실험식은 Table 2-9와 같이 AIN-76 diet 조성을 기본으로 하여 들깨박추출물을 각각 0.25% 및 0.5% 첨가하여 3개월간 공급하였으며, 수미로와 passive avoidance를 이용하여 인지기능을 측정하였다.

Table 2-8. Composition of experimental diet (unit:g/kg diet)

Ingredients	Group	Normal	Normal	Control	0.25% PG	0.5% PG
			-PBS	-bA	-bA	-bA
Corn starch		529.5	529.5	529.5	527	524.5
Casein		200	200	200	200	200
Sucrose		100	100	100	100	100
Soybean oil		70	70	70	70	70
Cellulose		50	50	50	50	50
Mineral mixture		35	35	35	35	35
Vitamin mixture		10	10	10	10	10
Methionine		3	3	3	3	3
Choline chloride		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Perilla seed glucoside(PG)		0	0	0	2.5	5
Total		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Table 2-9. Composition of experimental diet (unit:g/kg diet)

Ingredients	Group	Y ¹⁾	Con	0.25% PG	0.5% PG
	Corn starch		529.5	529.5	527
Casein		200	200	200	200
Sucrose		100	100	100	100
Soybean oil		70	70	70	70
Cellulose		50	50	50	50
Mineral mixture		35	35	35	35
Vitamin mixture		10	10	10	10
Methionine		3	3	3	3
Choline chloride		2.5	2.5	2.5	2.5
Perilla seed glucosides(PG)		0	0	2.5	5
Total		1,000	1,000	1,000	1,000

1) AIN-76 mineral mixture

2) AIN-76 vitamin mixture

3) Y:young senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) with base diet

Con:old senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) with base diet

0.25% *:old senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) with 0.25% PG

0.5% *:old senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) with 0.5% PG

다. Water maze test

실험쥐들에게 복합 수미로를 이용하여 예비 연습을 시켰으며, 수미로를 찾아가게 함으로써 출발지점을 출발하여 도착시까지의 유영시간(step through latency)과 시행오차(error frequency)를 측정하여 기록하였다. 시행오차는 쥐가 방향을 잡지 못하고 벽면에 부딪히거나 진행방향을 바꾸는 횟수를 측정하였다.

라. Passive avoidance test

실험동물을 명실에 넣고 빛을 주면 곧 암실로 들어가는데, 이때 문을 닫고 0.3 mA의 전류를 3초간 주어 이를 기억하게 하였다. 이를 반복하여 연습시킨 다음 다시 명실에 실험동물을 두어, 빛을 회피하여 암실로 들어가는데 까지 걸리는 시간 (step through latency)을 측정하였다.

마. 시료의 채취

식이기간이 종료되는 시점에서 passive avoidance test 및 수미로를 통하여 인지기능의 행동변화를 측정된 후에 12시간 절식시키고 diethyl ether로 마취시켜 복부대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 3,000 rpm, 10분간 원심분리 (BRUSHLESS D.C MOTOR CENTRIFUGE, VS-5000, VISION SCIENTIFIC CO., LTD., KOREA)하여 적혈구와 혈청으로 분리하였다. 혈청은 분석 시까지 -70°C deep freezer에 보관하였으며, 뇌는 ice cold saline 용액에 세척한 다음 여지로 물기를 제거하여 무게를 측정하고, 바로 -70°C deep freezer에 보관하여 acetylcholinesterase 활성, 항산화 효소활성 및 지질 과산화물 측정에 사용하였다.

바. 생화학적 분석

1) Acetylcholinesterase(AChE) activity 측정

혈청중의 acetylcholinesterase 활성도를 cholinesterase activity kit (Sigma, USA)를 이용하여 분석하였다. 혈청 0.2 mL과 sodium chloride solution 0.2 mL을 혼합한 후 water 3.0 mL, nitrophenol solution 2 mL, acetylcholin chloride

solution 0.2 mL을 첨가하여 25°C water bath에서 30분간 배양시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 뇌조직의 acetylcholinesterase 활성은 Elman 법에 근거하여 측정하였다. 조직 균질액 일정량을 cuvette에 담고, 2.6 mL phosphate buffer (pH 8.0)와 3-carboxy-4-nitrophenyl disulfide (DTNB)를 넣어 반응시켜 412 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였다.

2) Thiobarbituric Acid Reactive Substance 함량 측정

뇌조직의 지질 과산화물 함량은 조직의 일정량을 Teflon Potter-Elvehjem homogenizer로 마쇄하여 얻은 균질액을 과산화지질 분석을 위한 시료로 사용하였다. 지질 과산화물 분석은 Ohkawa 등의 방법에 따라 분석하였으며, 표준물질로서는 1,1,3,3,-tetraethoxypropane을 사용하였다.

3) Antioxidant enzymes activities 측정

항산화계 효소 중 catalase, superoxide dismutase (SOD) 및 glutathione peroxidase (GPx) 활성을 뇌에서 측정하였다. 뇌 조직 무게 10배 volume의 0.25 M sucrose/0.5 M EDTA buffer를 가하여 빙냉하에 homogenizer로 분쇄하였으며, 이때 얻은 균질액을 1000×g에서 5분간 원심분리 (Rotary vacuum evaporator R-114, Swiss)하여 상층액을 catalase 효소원으로 사용하였다. 이 상층액을 다시 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 SOD와 GPx 활성 측정에 사용하였으며, 조제된 시료는 분석 시까지 -70°C에서 냉동 보관하였다. Catalase는 hydroperoxide가 분해 되는 정도를 측정하는 Aebi의 방법에 준하였으며, SOD 활성은 Marklund의 방법, GPx는 Lawrence와 Burk의 방법을 사용하였다.

4) 단백질 정량

각 효소원의 단백질량은 Lowry법에 의하여 정량하였고 표준검량선 작성을 위해서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

5) 통계처리

실험결과는 SAS는 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 나타내었으며 각 군

의 유의차 검정은 분산분석을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 duncan's multiple range test를 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

I. 탈지박 유효획분의 ICR 마우스에 대한 기억력 개선 효과

가. Water maze test

β -amyloid 주사 후 다음날 수미로를 이용하여 3회 훈련시켰으며 다음날 수미로를 찾아 목적지까지 찾아가는데 걸리는 시간(escape latency) 및 시행오차(error frequency)를 측정된 결과는 Fig. 2-8과 같다. 수미로를 찾아가는데 걸리는 시간 및 시행오차는 치매가 유발되지 않은 normal 처리군의 쥐의 경우 각각 31.7초와 6회였으나, 치매가 유발된 bA-control 군의 쥐는 73초와 13.7회로 미로를 찾아가는데 확연하게 오랜 시간이 소요되고 시행오차가 발생하였다. 그러나 0.25% PG 및 0.5%의 PG를 급여한 처리구의 쥐들은 정상쥐에 비하여는 약간 더 소요되었으나, bA-control 처리군에 비하여 소요시간이 유의적으로 감소하여($p<0.05$), 0.5%의 PG 급여의 경우 normal 수준으로 회복되었다. β -amyloid 투여에 대한 비교구로 뇌실내 PBS를 투여한 normal-PBS 군의 결과는 normal군의 결과와 비슷하게 나타나 β -amyloid 투여에 대한 인지기능의 손상은 주사에 따른 물리적인 손상에 의한 결과가 아님으로 나타났다.

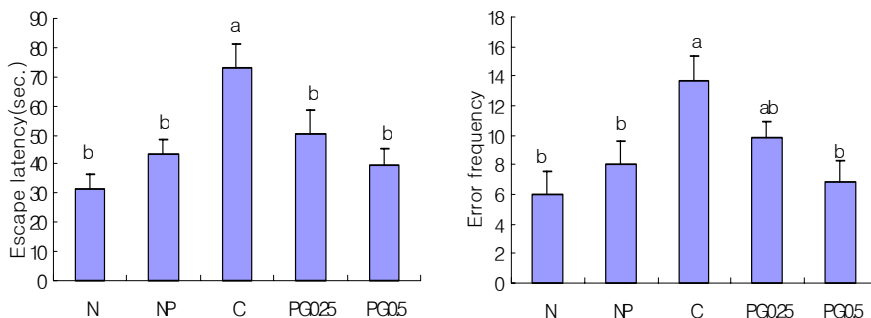


Fig. 2-8. Protective effect of PG on β -amyloid(25-35) induced impairment in learning and memory in mice through water maze

나. Passive avoidance test

β -amyloid 주사 후 다음날 passive avoidance chamber로 1차 훈련시켰으며 다음날 기억력 test를 실시하여 step through latency를 조사하였다(Fig.2-9). Mouse를 하얀 방에 넣은 후 빛을 주어 어두운 방으로 가게 한 후 0.3mA의 전류를 3초간 통하게 하여 mouse에게 이를 기억하게 하였다. 기억시킨 다음날, 다시 mouse를 하얀방에 넣어 어두운 곳으로 회피하는데 걸리는 시간을 측정한 것으로 치매가 유발되지 않은 정상쥐(normal)들은 어두운 곳으로 회피하는데 232.8초가 걸린 반면에 β -amyloid로 치매를 유발시킨 bA-control 그룹에서는 35.6초 만에 어두운 곳으로 옮겨가 확실히 치매가 유발되어 인지기능 및 학습능이 저하됨을 확인하였다($p < 0.05$). 그러나 β -amyloid로 치매가 유발되기전 0.25%의 PG 1달간 식이를 급여한 처리군의 쥐들은 113.8초가 소요되었으며, 0.5%의 PG를 급여한 경우에는 119.1초가 소요되어 농도간 유의차는 인정되지 않았으나 β -amyloid로 유도된 인지기능의 손상은 상당부분 회복된 것으로 보여졌다($p < 0.05$). 실험 결과 본 연구에서 이용한 들깨박 추출물에 함유된 불포화 지방산 조성이나 항산화 영양소함량은 정확히 알 수 없으나 위의 실험결과로 살펴볼 때 들깨박추출물의 공급은 두뇌의 인지기능에 영향을 미쳐 기억과 학습장애를 개선시킬 수 있는 것으로 기대된다.

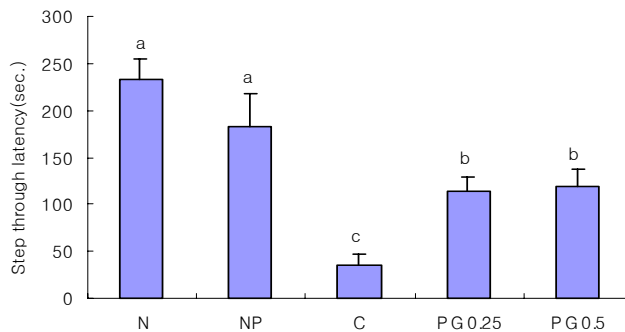


Fig. 2-9. Protective effect of PG on β -amyloid(25-35) induced impairment in learning and memory in mice through passive avoidance

다. 생화학적 분석

1) Acetylcholinesterase activity

신경전달물질 중의 하나인 아세틸콜린은 시냅스와 시냅스 사이의 신경전달에 관계하는 가장 중요한 물질로 알려져 있으며, 그에 반해 acetylcholinesterase는 아세틸콜린을 acetate와 choline으로 가수분해 분해시키는 매우 중요한 효소로써 알츠하이머 질환과 다른 치매질환의 치료에서 인지 기능 개선제로 사용되는 약품들의 target으로 되어지고 있다. 이에 본 연구에서는 인지기능과 긴밀한 연관성을 가지고 있는 acetylcholinesterase (AChE) 활성을 혈청과 뇌 조직 중에서 측정하여 Table 2-10에 제시하였다. 뇌 및 혈청 중 AChE의 활성을 살펴보면 유의차는 인정되지 않았지만 β -amyloid 투여로 AChE의 활성이 증가되는 경향을 보였으며, PG의 급여는 뇌중 AChE의 활성에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

Table 2-10. Effect of PG on on β -amyloid(25-35) induced decrease AChE activity¹⁾

Group	Serum (nmole/min/mg.protein)	Brain (uM/min/ mg protein)
Nor	23.2± 1.95 ^{NS)}	47.54±3.19 ^{NS)}
Nor-PBS	24.7±1.61	47.93±4.13
Con	25.8±1.29	49.21±1.41
0.25% PG	26.6±2.45	47.17±1.47
0.5% PG	25.2±1.63	48.11±3.57

1) Values are mean \pm standard error

NS : Not significant

2) 지질 과산화물과 항산화효소 활성

지질 과산화는 생체외적인 요인뿐만 아니라 내적인 요인에 의해 생성된 oxygen free radical이 관여함으로써 야기되며 생체에는 free radical들을 조절할 수 있는 다양한 항산화효소가 존재한다. 뇌는 산화적 반응이 쉬운 다중 불포화 지방산의 함량이 높고, 체내산소 소모량이 다른 장기에 비하여 많아 산화적 손상을 받기 쉬운 것으로 보고되고 있으며, 이로 인한 지질 과산화물의 축적은 세

포기능이상과 중추신경계의 기능을 퇴화시키는 것으로 알려져 있다. 체내에서 free radical의 방어기전으로는 효소계와 비효소계로 나뉘어 있는데 효소계의 경우, 대표적으로 Catalase, SOD, GPx를 들 수 있다. 이러한 항산화 효소 들은 이들은 체내에 생성된 지질 과산화물을 단계별로 소거시키는 중요한 역할을 한다. 이에 본 연구는 간 및 뇌조직 중의 지질과산화물 함량과 항산화효소 활성 변화를 Table 2-11, 12, 13에 제시하였다. 결과, 간, 신장 및 뇌중 TBARS는 β -amyloid 투여군에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 특히 β -amyloid 투여군의 간과 뇌에서는 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 아울러 PG의 급여는 TBARS의 생성을 억제하였으며, 특히 뇌중에는 PG의 농도가 높아질 수록 유의적으로 TBARS의 생성을 억제하였다($p < 0.05$). 간과 뇌중 항산화효소의 활성은 β -amyloid의 투여로 활성이 억제되었으나, PG의 급여는 β -amyloid로 인하여 억제된 활성이 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 간에서는 GPx가, 뇌중에서는 SOD와 Catalase의 효소의 활성이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 결론적으로 β -amyloid 투여는 지질과산화물의 축적을 유도하는데 이러한 축적은 항산화효소의 활성의 저하로 인하며, 식이로 첨가된 PG는 항산화효소를 활성화시킴으로써 지질과산화물이 축적되는 것을 억제하는 것으로 사료된다.

Table 2-11. Contents of thiobarbituric acid reactive substances in serum and organ tissues¹⁾

Group	Liver (nmole/g liver)	Kidney (nmole/g kidney)	brain (nmole/g brain)
Nor	54.53±3.99 ^{b2)}	189.65±3.11 ^{bc}	39.79±0.51 ^b
Nor-PBS	55.81±11.03 ^b	181.29±1.80 ^{bc}	37.72±1.15 ^b
Con	71.09±5.46 ^a	199.53±2.04 ^{ab}	43.98±0.80 ^a
0.25% PG	61.64±2.23 ^{ab}	208.92±8.48 ^a	38.22±1.83 ^b
0.5% PG	63.16±1.87 ^{ab}	177.85±6.27 ^c	32.53±0.95 ^c

1) Values are mean ± standard error (n=9)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 2-12. Antioxidative enzyme activities in liver ¹⁾

Group	Catalase (unit/min mg protein)	SOD (unit/min mg protein)	GPx (nmol/min mg protein)	GST (unit/min mg protein)
Nor	63.71±2.19 ^{NS)}	6.73±0.15 ^{NS)}	323.2±7.08 ^{ab2)}	2.62±0.24 ^{NS)}
Nor-PBS	60.44±4.00	6.75±0.61	320.0±10.85 ^{ab}	2.35±0.15
Con	62.00±1.37	6.51±0.30	303.3±6.93 ^b	2.50±0.31
0.25% PG	60.95±2.56	6.55±0.15	345.2±8.78 ^a	2.51±0.22
0.5% PG	63.03±2.58	6.96±0.30	348.2±12.62 ^a	2.79±0.15

Table 2-13. Antioxidative enzyme activities in brain¹⁾

Group	Catalase (unit/min mg protein)	SOD (unit/min mg protein)	GPx (nmol/min mg protein)
Nor	1.99±0.07 ^{ab2)}	1.90±0.09 ^b	14.57±0.49 ^{NS)}
Nor-PBS	2.10±0.06 ^a	1.84±0.02 ^b	15.50±0.72
Con	1.74±0.06 ^{dc}	1.67±0.13 ^b	13.00±0.83
0.25% PG	1.63±0.04 ^d	1.77±0.08 ^b	14.06±0.67
0.5% PG	1.82±0.04 ^{bc}	2.23±0.07 ^a	14.78±0.81

1) Values are mean ± standard error (n=9)

2) Values with different alphabet within the row are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) NS : Not significant

II. 탈지박 유효획분의 SAMP8 마우스에 대한 기억력 개선 효과

가. Water maze test

들깨박 추출물 시료를 식이로 공급하여 3개월간 사육한 후 수미로를 통한 기억력 test결과, 수미로를 찾아가는데 걸리는 시간 및 시행오차는 Young SAMP8(Y)군의 경우 57.38초와 7.25회였으나, 노화가 촉진된 대조군(con)은

150.08초와 19.17회로 미로를 찾아가는데 확연하게 오랜 시간이 소요되고 시행오차가 발생하였다. 그러나 0.25% PG 및 0.5%의 PG를 급여한 처리구의 쥐들은 소요시간이 유의적으로 감소하여($p < 0.05$), 0.5%의 PG 급여의 경우 63.11초 및 시행오차는 9.11회로 인지기능이 회복되었음을 알 수 있었다(Fig. 2-10).

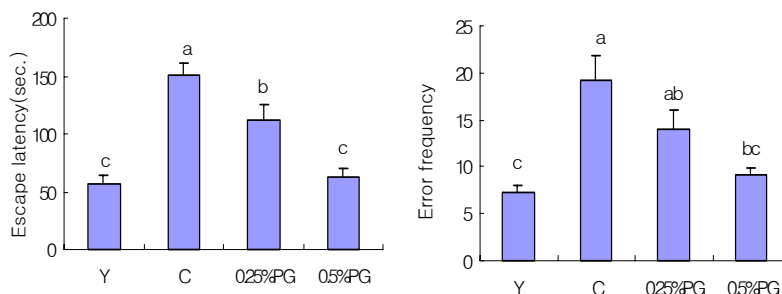


Fig. 2-10. Effect of PG on impairment in learning and memory in SAM through water maze.

나. Passive avoidance test

들깨박 추출물 시료를 식이로 공급하여 3개월간 사육한 후 passive avoidance chamber로 훈련시켰으며 이를 후 기억력을 test하여 step through latency를 조사하였다(Fig. 2-11). Young SAMP8(Y)군의 step through latency는 151초였으나, 노화가 촉진된 대조군(con)은 23.29초로 유의적으로 짧아져 ($p < 0.05$) 기억력 및 인지기능이 손상되었음을 알 수 있었다. 이에 반하여 들깨박추출물 (PG)을 0.25% 및 0.5% 첨가한 군에서 step through latency가 각각 102.5초와 180.94초를 보여 시료처리에 따른 통계적 유의차를 보였으며, 특히 0.5% 첨가하는 Y군을 능가하는 수준을 나타내었다. Umezawa 등은 α -linolenate/linoleate 조성이 다른 해바라기씨유와 들깨유를 노화촉진마우스에게 공급한 후 행동실험 측정시 α -linolenate가 풍부한 들깨유 공급군의 학습능력이 개선되었음을 보고하였으며, 이는 식이가 뇌 인지질의 n-3/n-6 불포화 지방산 비율에 영향을 미치는 것으로 제시하였다. 또한 scopolamine에 의해 인지능력이 감퇴한 쥐에게 비타민 C와 비타민 E 공급 시 도파민의 산화를 억제하고 인지능력이 개선되는 것을 보고하였으며 실제로 비타민 E는 노인성치매환

자 치료에 다각도로 이용되고 있다. Suganuma 등의 보고에서는 토마토에서 추출한 lycopene를 식이에 섞여 SAMP8에게 장기간 섭취 시 passive avoidance 에서 avoidance time이 유의적으로 증가됨을 보고하여 본 연구와도 같은 경향을 나타내었다. 이러한 인지기능의 개선효과는 lycopene이 두뇌에 축적되어 인지기능에 영향을 미치거나 다른 항산화 메카니즘을 통하여 이루어진 것으로 추론하였다. 본 연구에서 이용한 들깨박 추출물에 함유된 불포화 지방산 조성이나 항산화 영양소함량은 정확히 알 수 없으나 이상의 실험결과로 살펴볼 때 들깨박 메탄올 추출물의 공급은 두뇌의 기능에 영향을 미쳐 기억과 학습장애를 개선시킬 수 있는 것으로 기대된다.

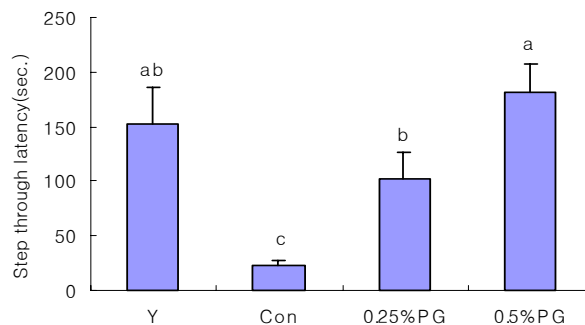


Fig. 2-11. Effect of PG on impairment in learning and memory in SAM through passive avoidance.

다. 생화학적 분석

1) Acetylcholinesterase(AChE) activity

신경전달물질 중의 하나인 아세틸콜린은 시냅스와 시냅스 사이의 신경전달에 관계하는 가장 중요한 물질로 알려져 있으며 그에 반해 AChE는 아세틸콜린을 acetate와 choline으로 가수분해 분해시키는 매우 중요한 효소로써 알츠하이머 질환과 다른 치매질환의 치료에서 인지기능 개선제로 사용되는 약품들의 target으로 되어지고 있다으며, 최근에는 알츠하이머 질환자의 뇌에서 이 효소의 수준이 감소되는 것으로 보고되고 있다.

이에 본 연구에서는 인지기능과 긴밀한 연관성을 가지고 있는 AChE 활성을 혈청과 뇌 조직 중에서 측정하여 Table 2-14에 제시하였다. 혈중 AChE의 활성을 살펴본 결과 뇌중 AChE의 활성을 살펴보면 young SAMP8(Y)에 비하여 노화가 촉진된 SAMP8(C)군은 유의차가 인정되지 않았지만 활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 들깨박 추출물을 급여함으로써 유의적으로 활성이 감소하였다. 뇌중 AChE의 활성 역시 young SAMP8(Y)에 비하여 노화가 촉진된 SAMP8(C)군은 유의차가 인정되지는 않았지만 약간 증가하는 경향을 보였으며, 이러한 증가는 들깨박 추출물을 급여함으로써 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. Das 등은 연령이 다른 SD rat에서 뇌 조직의 부위에 따라 AChE의 활성을 측정하여 보고하였는데, old male rat (18-22 month)이 young male rat (3-4 month)보다 낮은 효소활성을 나타내었으며 특히 인지기능의 핵심이라 볼 수 있는 hippocampus에서 더 감소되었다. 또한 최 등은 SAMP8에서 DHA와 갈대뿌리추출물에 의하여 AChE 효소 활성이 증가한다는 연구결과는 보고하였다. 흥미로운 점은 종전의 연구결과들과 다른 경향을 보이는 것으로 이는 아세틸콜린 함량과의 상관성에 기인하여 정확한 비교가 필요하다고 생각되어진다.

Table 2-14. Acetylcholinesterase activity in serum and brain of SAMP8¹⁾

	Y	C	0.25% PG	0.5% PG
Serum (nmole/min/mg protein)	24.6±2.82 ^{ab2)}	31.3±2.86 ^a	21.3±1.06 ^b	18.8±1.38 ^{b)}
Brain (uM/min/mg protein)	33.35±0.05 ^{ab}	33.49±0.03 ^a	33.30±0.03 ^b	33.32±0.12 ^{ab}

1) Values are mean ± standard error (n=10)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

NS: Not significant

2) 지질 과산화물과 항산화효소 활성

지질 과산화는 생체외적인 요인뿐만 아니라 내적인 요인에 의해 생성된 oxygen free radical이 관여함으로써 야기되며 생체에는 free radical들을 조절

할 수 있는 다양한 항산화효소가 존재한다. 뇌는 산화적 반응이 쉬운 다중 불포화지방산의 함량이 높고, 체내산소 소모량이 다른 장기에 비하여 많아 산화적 손상을 받기 쉬운 것으로 보고되고 있으며, 이로 인한 지질 과산화물의 축적은 세포기능이상과 중추신경계의 기능을 퇴화시키는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 체내에서 free radical의 방어기전으로는 효소계와 비효소계로 나뉘어 있는데 효소계의 경우, 대표적으로 Catalase, SOD, GPx를 들 수 있다. 이러한 항산화 효소들은 이들은 체내에 생성된 지질 과산화물을 단계별로 소거시키는 중요한 역할을 한다. 이에 본 연구는 간 및 뇌조직 중의 지질과산화물 함량과 항산화효소 활성 변화를 Table 2-15, 16, 17에 제시하였다. 결과, 신장 중 지질과산화물의 함량은 어린 SAMP8(Y)에 비하여 노화가 촉진된 SAMP8군에서 유의적으로 증가하였으며, 이러한 증가는 들깨박 추출물을 공급함으로 유의적으로 억제되었다. 또한 뇌중 지질과산화물의 함량은 유의차는 인정되지 않았으나 어린 SAMP8(Y)에 비하여 노화가 촉진된 SAMP8군에서 증가하는 경향을 나타내었으며 역시 추출물 공급군에서 감소하는 경향을 나타내었다. 간중 catalase, SOD 및 GPx등 항산화효소의 활성은 어린 SAMP8(Y)에 비하여 노화가 촉진된 SAMP8군에서 증가하는 경향을 나타내었으나 추출물 공급군에서는 활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 뇌중 catalase와 GPx는 어린 SAMP8(Y)에 비하여 노화가 촉진된 SAMP8군에서 감소하였다가 추출물의 급여로 다시 활성이 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 2-15. Contents of lipid peroxides in liver and brain of SAMP8¹⁾

	Y	C	0.25% PG	0.5% PG
Liver (MDA nmole/g liver)	188.33±9.82 ^{a2)}	129.24±6.77 ^b	141.45±8.70 ^b	92.02±1.38 ^c
Kidney (MDA nmole/g liver)	66.71±19.99 ^{ab}	104.19±5.63 ^a	76.88±7.49 ^{ab}	51.29±4.49 ^c
Brain (MDA nmole/g brain)	61.6±4.12 ^{NS)}	68.89±15.81	55.27±2.28	52.48±2.12

1) Values are mean ± standard error (n=10)

2) Values with different alphabet within the row are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) ns: not significant

Table 2-16. The activities of antioxidative enzymes in liver of SAMP8¹⁾

Group	Catalase (unit/min/mg protein)	SOD (unit/min/mg protein)	GPx (nmol/min/mg protein)	GST (unit/min/mg protein)
Y	58.75±3.21 ^{b2)}	2.77±0.31 ^b	142.60±12.99 ^b	2.37±0.72 ^{NS)}
C	77.18±2.71 ^a	3.43±0.10 ^a	182.76±8.18 ^a	1.61±0.10
0.25% PG	72.05±3.34 ^a	3.13±0.19 ^{ab}	183.40±9.64 ^a	1.64±0.11
0.5%PG	69.33±6.15 ^{ab}	3.22±0.21 ^{ab}	179.07±7.42 ^a	2.05±0.23

1) Values are mean ± standard error (n=10)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at α=0.05 by Duncan's multiple range test.

Ns: Not significant

Table 2-17. The activities of antioxidative enzymes in brain of SAMP8¹⁾

Group	Catalase (unit/min/mg protein)	SOD (unit/min/mg protein)	GPx (nmol/min/mg protein)
Y	4.79±0.14 ^{a2)}	4.04±0.21 ^{NS)}	39.88±4.92 ^{ab}
C	3.68±0.17 ^b	3.81±0.24	30.90±2.49 ^b
0.25% PG	3.00±0.19 ^c	3.69±0.14	41.89±2.23 ^a
0.5%PG	3.87±0.12 ^b	3.49±0.13	48.80±2.92 ^a

1) Values are mean ± standard error (n=10)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at α=0.05 by Duncan's multiple range test.

NS : Not significant

제 3 절 탈지박 소재의 이화학적 특성 및 이를 활용한 노인식 개발

제 1 항 탈지박 소재의 이화학적 특성조사

1. 재료 및 방법

가. 색도 변화

탈지박시료의 색도는 색도계(Chroma-meter CR-200, Minolta, Japan)을 이용하여 L, a, b값을 3회 반복 측정하였으며, 이때 표준백판의 L, a, b값은 각각 96.86, -0.07, 2.02이었다.

나. 이화학적 특성 분석

탈지 참깨박, 들깨박, 홍화박은 시료를 분쇄한 후 헥산으로 탈지하여 시료로 사용하였고 볶음 탈지 참깨박, 들깨박, 홍화박은 200℃에서 10분간 볶음처리 후 압착법으로 탈지한 후 시료로 사용하였다. 탈지박의 일반성분은 AOAC법에 따라 분석하였고 환원당은 Somogi-Nelson법, 식이섬유는 dietary fiber 측정용 kit(Sigma사)를 이용하여 분석하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 색도의 변화

각 탈지박의 색도를 보면 각시료 모두 볶음처리 하지 않은 것이 볶음처리한 것보다 L값과 b값이 높은 반면 a값은 낮았다. 각 시료별로 비교해보면 볶음처리하지 않은 경우는 참깨박이 가장 L값이 높고 다음은 홍화였으나 볶음처리한 것은 참깨박이 가장 낮은 L값을 나타내었다(Table 3-1).

Table 3-1. The colors of defatted oil seeds

탈지박 Color	색차		
	L	a	b
탈지참깨박	96.42	-0.11	+2.13
볶음탈지참깨박	63.79	+7.44	+21.95
탈지들깨박	84.37	-0.12	+2.76
볶음탈지들깨박	72.07	+1.01	+11.45
탈지홍화박	87.02	-0.24	+6.48
볶음탈지들깨박	75.51	+1.60	+14.93

나. 일반성분

탈지박의 일반성분은 Table 3-2와 같다. 참깨박을 제외하고 볶음처리한 탈지박에서 수분의 함량이 낮았으며 단백질의 경우에는 홍화박을 제외한 탈지박은 볶음처리에 의해 증가하는 것으로 관찰되었다.

Table 3-2. The components of defatted oil seeds. (단위:%)

	참깨박	볶은참깨박	들깨박	볶은들깨박	홍화박	볶은홍화박
수분	7.73	8.27	8.03	2.07	5.77	2.63
지방	22.68	15.12	12.55	12.26	2.79	9.05
단백질	16.65±5.75 ^a	23.97±1.51 ^a	17.76±0.03 ^a	20.16±0.64 ^a	6.29±1.05 ^b	4.22±3.46 ^b
회분	12.56±0.32 ^a	13.35±1.37 ^a	9.87±0.94 ^b	9.28±0.02 ^b	4.24±0.04 ^c	3.93±0.469 ^c

다. 환원당

탈지박 메탄올 추출물의 환원당 함량은 들깨박이 44.03mg/ml로 가장 높았으며, 참깨박, 홍화박의 수준이었다. 또한 각 시료 공히 볶음처리한 탈지박의 환원당 함량이 현저히 적음을 알 수 있었다(Table 3-3).

Table 3-3. The contents of reducing sugar in defatted oil seeds (단위:mg/ml)

참깨박	볶은참깨박	들깨박	볶은들깨박	홍화박	볶은홍화박
23.12±2.94 ^b	1.40±0.23 ^d	44.03±0.68 ^a	2.20±0.23 ^d	10.42±1.47 ^c	2.68±0.00 ^d

라. 식이섬유

탈지박 메탄올 추출물의 식이섬유함량은 홍화박과 볶은 홍화박이 각각 72.94 및 71.85%로 가장 높았으며, 볶음처리의 여부는 식이섬유의 함량에 큰 영향을 미치지 못하였다(Table 3-4).

Table 3-4. The contents of dietary fiber in defatted oil seeds (단위:%)

참깨박	볶은참깨박	들깨박	볶은들깨박	홍화박	볶은홍화박
38.08	41.55	49.09	58.57	72.94	71.85

제 2 항 노인용 유동식

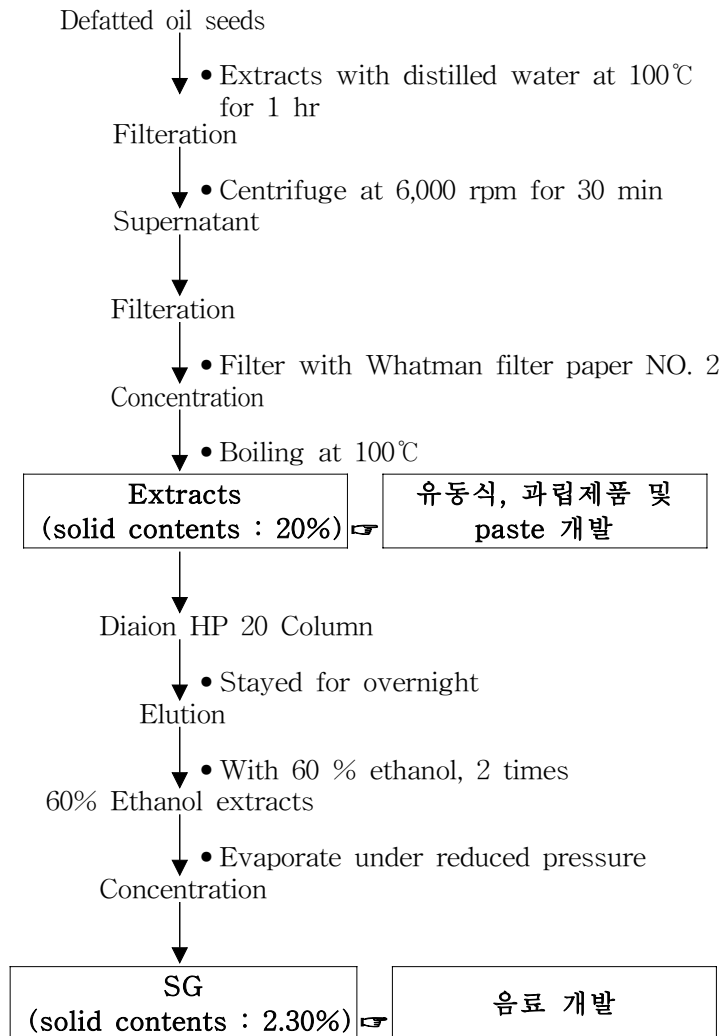


그림3-1. 탈지박 추출물을 이용한 노인식 및 가공식품의 개발을 위한 diagram

1. 재료 및 방법

가. 재료

노인식의 개발을 위해 첨가되는 부재료로는 알과 활곡, 알과 찹쌀가루 및 알과 팽화미를 사용하였으며, 또한 현미농축액(13.4 Brix)과 쌀 농축액(32 Brix)을 향미 증진제로 첨가하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 추출물의 적정 첨가수준 결정

탈지박 추출물을 함유한 노인용 식사대용 유동식을 제조시 탈지박 추출물의 적정 농도를 설정하기 위하여 추출물의 함량을 총 200ml 에 대하여 각각 10(5%), 15(7.5%), 20(10%), 25(12.5%)ml씩 첨가하여 표 3-5의 비율에 따라 유동식을 제조하여 관능검사를 실시하였다.

표 3-5. 추출물의 적정 첨가수준을 결정하기 위한 배합비

	A	B	C	D
추출물	10.0	15.0	20.0	25.0
활곡	5.0	5.0	5.0	5.0
프림	5.0	5.0	5.0	5.0
설탕	15.0	15.0	15.0	15.0
산탄검	0.7	0.7	0.7	0.7
물	164.3	159.3	154.3	149.3
합	200.0	200.0	200.0	200.0

관능검사결과, 추출물의 농도는 20ml을 첨가한 경우가 구수한 느낌이 강하고 가장 풍미가 좋은 것으로 나타났으며 25ml을 첨가했을 때에는 탄맛이 너무 강하였고 반면에 10 및 15ml을 첨가했을 경우에는 탈지박 추출물을 함유한 유동식이라기 보다는 오히려 미숫가루와 같은 느낌이 강하여서 관능적으로 좋지 못한 것으로 나타났다. 또한 아래의 제조비율로 제조한 유동식은 전체적으로 너무 달고 첨가된 활곡의 양이 너무 많아 제품 제조후 침전되는 양이 너무 많았다.

그러므로 이후의 실험에서는 활곡의 양과 설탕의 양을 줄이는 등의 기본 재료 비율의 양을 조절해야 할 것으로 판단되었다.

나. 부재료의 혼합비에 따른 유동식의 제조

유동식에 첨가되는 부재료중 팽화미는 물과 결합하여 gel을 형성하는 특성을 갖고 있다. 또한 유동식에 첨가되어 더욱 구수한 풍미를 주는 것으로 나타났다. 그러므로 표 3-6과 같이 잔탄검 대신에 팽화미를 비율대로 첨가하여 잔탄검을 대체할 수 있는 가능성을 검토해 보았다. 관능검사 결과 잔탄검을 첨가했을 경우보다 팽화미를 첨가한 경우가 유동식의 풍미가 월등히 우수하였으며 특히 팽화미를 15g 첨가했을 경우 유동식의 질감이나 점도가 가장 적당한 것으로 나타났다(표 3-7).

표 3-6. 팽화미와 잔탄검이 함유된 노인용 유동식의 제조를 위한 배합비

	A	B	C	D
추출물	20.0	20.0	20.0	20.0
활곡	2.0	2.0	2.0	2.0
팽화미		10.0	15.0	20.0
잔탄검	0.7			
프림	5.0	5.0	5.0	5.0
설탕	10.0	10.0	10.0	10.0
물	162.3	153	148	143
합	200.0	200.0	200.0	200.0

표 3-7 . 팽화미와 잔탄검이 함유된 노인용 유동식의 관능검사 결과

	A	B	C	D
Viscosity	6.7 ^a	6.5 ^a	7.8 ^a	3.9 ^b
Texture	4.6 ^b	7.9 ^a	8.4 ^a	5.7 ^{ab}
Flavor	6.7 ^a	7.4 ^a	7.6 ^a	4.9 ^b
Taste	5.9 ^b	6.2 ^a	6.7 ^a	5.1 ^b
Acceptability	5.2 ^b	7.0 ^{ab}	7.5 ^a	4.8 ^b

또한 알파화시킨 찹쌀가루 역시 팽화미와 같이 물과 결합하여 gel을 형성하는 특성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 그래서 행화미와 마찬가지로 찹쌀가루를 표 3-8과 같은 배합으로 혼합하여 유동식의 적정 질감을 나타내보고자 하였다. 찹쌀가루를 함유한 유동식은 제품에 적정 질감을 나타내기에 충분한 것으로 관능검사 결과 나타났다(표 3-9). 즉, 잔탄검만으로 질감을 나타낸 경우(A)에 비해서 8~10g(B,C)의 찹쌀가루를 첨가한 경우가 모든 항목에서 우수하였으며, 특히 입에서 느끼는 조직감(음용감)은 월등한 것으로 조사되었다. 그러나 13g 첨가한 경우는 점도가 너무 강하고 모든 항목에서 잔탄검을 사용한 경우보다 못한 점수를 나타내었다.

표 3-8. 찹쌀가루와 잔탄검이 함유된 노인용 유동식의 제조를 위한 배합비

	A	B	C	D
추출물	20.0	20.0	20.0	20.0
활곡	2.0	2.0	2.0	2.0
찹쌀가루		8.0	10.0	13.0
잔탄검	0.7			
프림	5.0	5.0	5.0	5.0
설탕	10.0	10.0	10.0	10.0
물	162.3	155	153	150
합	200.0	200.0	200.0	200.0

표 3-9. 찹쌀가루와 잔탄검이 함유된 노인용 유동식의 관능검사 결과

	A	B	C	D
Viscosity	7.0 ^a	7.4 ^a	7.3 ^a	2.5 ^b
Texture	5.4 ^b	7.4 ^a	7.6 ^a	3.9 ^b
Flavor	6.7 ^{ab}	7.9 ^a	7.2 ^a	6.4 ^{ab}
Taste	6.2 ^{ab}	6.8 ^a	7.0 ^a	5.7 ^b
Acceptability	6.1 ^{ab}	7.2 ^a	7.3 ^a	3.7 ^b

선행된 실험의 결과를 토대로 하여 유동식의 적정 질감을 나타내는 데에 잔탄검, 팽화미 및 찹쌀가루가 혼합된 유동식을 제조하여 가장 좋은 결과를 나타내는 재료를 선택하고자 다음 표 3-10의 혼합비대로 제조하여 관능검사를 실시하였다. 표 3-10의 혼합비는 선행된 실험의 결과와 잔탄검과 찹쌀가루, 팽화미의 혼합비율중 가장 우수한 비율로 평가되어진 혼합비를 참고하여 나타낸 것이다. 표로 나타내지는 않았지만 혼합비율 B의 경우, 탈지박 추출물이 팽화미와 잔탄검과 함께 혼합되어지면 유동식의 질감이 많이 떨어져서 다른 혼합비와는 달리 탈지박 추출물을 10 ml로 줄여서 유동식을 제조하였다. 관능검사 결과(표 3-11)의 혼합여부는 전체적인 맛, 향, 질감 등 기타의 항목에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나 팽화미를 첨가했을 경우보다 찹쌀가루를 첨가한 배합비가 월등하게 높은 관능적 평가를 나타냈다. 관능검사 결과, color는 추출물의 함량이 가장 높은 A가 가장 강했으며, 함량이 낮은 B가 가장 낮게 나타났으나 기호도 평가에서는 A와 B에 유의적 차이는 나타나지 않았으며, 추출물의 함량이 20ml이 첨가된 C와 D의 배합비가 비교적 기호도가 높은 것으로 나타났다. Flavor역시 추출물이 가장 많이 함유된 A 배합비가 가장 높고 B가 가장 낮았으며 기호도의 평가에서는 유의적 차이가 나타나지 않았다. 역시 20ml C와 D의 배합비에서 가장 높은 기호도를 나타내었다. Sweetness는 설탕이 12g 첨가된 B의 배합비에서 가장 강하게 느꼈으나 기호도적인 평가에서는 다른 처리구들간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. Viscosity는 B의 배합비가 가장 낮은 것으로 평가되었으나 기호도적인 면에서는 유의적 차이를 보이지 않았다. Taste의 경우에는 팽화미로 질감을 나타낸 A와 B에 비해서 알과화시킨 찹쌀가루를 첨가한 C와 D의 배합비가 더욱 우수한 것으로 나타났으며, 전체적인 평가에서 역시 C와 D의 배합비가 매우 우수한 것으로 평가되었다. C와 D의 배합비의 차이는 찹쌀가루의 함량과 잔탄검의 첨가유무로써 이후 진행할 저장실험은 C와 D의 배합비로 진행할 것으로 결정하였다.

표 3-10 노인용 유동식 제조를 위한 혼합비

	A	B	C	D
추출물	23.0	10.0	20.0	20.0
활곡	2.0	2.0	2.0	2.0
팽화미	13.0	5.0		
찹쌀가루		8.0	8.0	6.0
산탄검		0.1		0.2
현미농축액	13.4	13.4	13.4	13.4
쌀농축액	4.2	4.2	4.2	4.2
프림	5.0	5.0	5.0	5.0
설탕	10.0	12.0	10.0	10.0
물	129.4	140.3	137.4	139.2
합	200.0	200.0	200.0	200.0

표 3-11. 노인용 유동식의 관능평가

강도>>

	A	B	C	D
Color	6.50±0.52 ^a	3.33±0.42 ^c	5.17±0.31 ^b	5.33±0.21 ^{ab}
Flavor	5.67±0.42 ^a	3.67±0.49 ^b	4.67±0.42 ^{ab}	5.00±0.00 ^{ab}
Sweetness	4.83±0.40 ^{ab}	5.67±0.80 ^a	5.50±0.22 ^{ab}	4.00±0.36 ^b
Viscosity	5.17±0.65 ^{ab}	3.83±0.60 ^b	5.17±0.65 ^{ab}	5.83±0.40 ^a

기호도>>

	A	B	C	D
Color	4.50±0.72	4.17±0.66	6.00±0.37	5.83±0.54
Flavor	4.17±0.31 ^b	4.50±0.43 ^b	6.50±0.43 ^a	7.17±0.48 ^a
Sweetness	5.67±0.61	5.00±0.68	6.00±0.68	6.67±0.76
Viscosity	5.83±0.91	5.33±0.88	7.17±0.54	6.50±0.62
Taste	4.33±0.67 ^b	4.67±0.88 ^{ab}	6.50±0.85 ^{ab}	7.00±0.73 ^a
Overall	4.33±0.71 ^b	4.33±0.70 ^b	7.50±0.43 ^a	7.33±0.42 ^a

다. 저장실험

앞서 선행된 실험에 따라 선택된 C와 D의 배합비대로 유동식을 제조 한 후 121℃에서 15분간 가열살균하여 냉각시킨 후 37℃에서 가온, 가속 실험을 실시하였다(표 3-12). 저장실험중의 측정 항목은 pH, 당도, 색깔, 외관 및 관능적 특성의 변화등을 가열살균하여 냉각직후 및 저장기간 중 1주일 단위로 측정하였다. 측정된 결과 C의 배합비는 저장 중 a값과 b값이 점차 증가하는 경향을 나타내었으며 저장 2주까지는 저장 중 안정하였으나 저장 3주 이후부터는 층의 분리가 나타나기 시작하여 저장 4주째에는 층 분리가 더욱 심하여 상품의 가치가 저하되었다. 그러나 외관을 제외한 다른 항목들은 저장 중 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 D의 배합비 역시 저장 중 a값과 b값이 점차 증가하는 경향을 나타내었으나 C의 배합비와는 달리 저장 중 층의 분리등 외형의 변화는 저장 3주까지 안정하였으며 4주째에 약간의 층의 분리가 관찰되어, 저장 중의 안정성을 고려할 때 D의 배합비가 더욱 우수한 것으로 판단되었다.

표 3-12. 노인용 유동식의 저장중 변화

Formular C>

	Storage (weeks)					
	0	1	2	3	4	
pH	5.93	5.88	5.86	5.79	5.80	
당도(Brix)	16.2	16.0	16.2	16.3	16.2	
L	0.93	1.56	1.48	1.35	1.30	
Color	a	2.11	2.43	2.68	2.78	2.88
	b	0.62	0.81	0.97	1.24	1.36
외관	7.52	7.35	7.25	5.55	2.85	
향	6.85	6.58	6.55	6.20	6.00	
맛	7.15	7.10	6.50	6.00	6.00	

Formular D>

	Storage (weeks)				
	0	1	2	3	4
pH	5.92	5.89	5.88	5.80	5.78
당도(Brix)	15.6	15.2	15.5	15.8	15.7
L	1.09	1.57	1.38	1.54	1.40
Color a	2.33	2.32	2.54	2.75	2.80
b	0.73	0.67	0.81	0.97	1.15
외관	7.50	7.45	7.20	7.00	6.50
향	7.25	7.00	6.76	6.55	6.50
맛	7.55	7.35	6.80	6.55	6.40



그림 3-2. 노인용 유동식

제 3 항 과립화 제품

탈지박의 유효획분을 이용하여 과립화 제품을 개발하였으며 과립의 조성은 탈지박 물추출물(고형분함량 20%), maltodextrin, corn starch로 하였다. 즉, maltodextrin 40, corn starch 60의 비율로 계량하여 mixer로 혼합한 후, 에탄올과 추출물을 각각 30, 10의 비율로 섞어준다. 혼합된 시료를 20 mesh의 체로 내려 35℃의 열풍건조기에서 건조시켰다. 이렇게 1차 건조된 과립에 다시 에탄올과 추출물을 각각 30 및 10을 섞어준 후에 위의 방법으로 과립을 성형하여 최종 과립화 제품을 생산하였다. 최종 과립화 제품에 포함된 탈지박 물 추출물의 고형분 함량은 4%로 조정하였다. 완성된 과립은 그림 3-3과 같다.



그림3-4. 탈지박 추출물 함유 과립제품

제 4 항 머핀

1. 실험재료 및 방법

가. 머핀의 제조

머핀은 일반 머핀 제조방법을 적용하여 박력분 100g, 설탕 70g, 버터 75g, 베이킹 파우더 7.5g, 우유 25g, 계란 50g을 사용하여 제조하였다. 즉, 밀가루와 베이킹 파우더는 체에 2번을 쳐서 두고, 버터에 설탕, 계란을 넣어 Kitchen Aid Mixer(Kitchen Aid Inc. Model 'K5SS, St, Joseph, Michigan, USA)를 이용하여 크림상으로 반죽한 뒤 체에 친 재료들을 넣어 20초간 더 반죽하여 유산지를 깐 머핀컵에 정확히 22g씩 취하여 baking oven에 넣고 온도 180°C에서 20분간 baking하였다. 위와 같은 방법으로 만든 머핀을 control로 하여 밀가루 중량에 대하여 SG의 첨가농도를 2.5, 5, 10%까지 달리하여 치매예방용 노인식 머핀을 제조하였다.

나. 머핀의 부피, 무게

머핀의 부피와 무게는 baking한 다음 1시간 동안 실온에 방치한 후에 측정하였으며, 부피는 종자치환법으로 측정하였다.

다. 머핀의 색도 및 조직감 측정

머핀의 색도는 머핀의 내부를 취하여 CR-200 Chroma meter(Minolta Inc., Japan)을 사용하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 3회 반복 측정하였으며, 이때 백판의 표준값은 L, a, b 각각 96.86, -0.07, 2.02이었다. 머핀의 조직감은 baking 1시간 후 머핀의 내부를 일정한 크기로 잘라(4×4×2.5cm)로 잘라 TA-XT2 Texture analyzer(Texture technologies Corp., Scardale, NY)를 사용하여 측정하였으며, force-time 곡선의 Texture profile analysis(TPA) parameter로부터 springness, cohesiveness, gumminess, hardness, chewness등을 산출하였다. 이 때 모든 측정조건은 pre-test speed 5.0 mm/sec, test speed 0.5mm/sec, post test speed 10mm/sec, distance 10mm. trigger force 20g 이었으며 지름 25.4mm의 원통 probe를 사용하여 측정하였다.

라. 머핀의 관능검사

제조한 머핀에 대한 관능검사는 훈련된 패널 20명을 대상으로 실시하였다. 즉 각각의 처리구별로 머핀을 제조한 후 색깔, 향, 외관, 맛, 조직감 전반적인 기호도에 대하여 1(대단히 나쁘다)에서 9(대단히 좋아)까지의 점수를 사용하여 평가하였으며, 그 결과는 SAS(Statistical Analysis System) 통계 프로그램을 사용하여 분산분석 및 Duncan의 다범위 검증을 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

가. SG의 적정첨가농도 결정

치매예방용 노인식 머핀을 제조함에 있어서 SG 첨가량의 적정농도를 결정하기 위하여 SG 첨가량을 밀가루 중량에 대해 0(control), 5%, 10% 수준으로 하여 머핀을 제조하였다. 머핀 제조시 밀가루 중량에 대한 5% SG의 첨가는 전체적인 기호도를 비롯하여 머핀의 색, 향, 외관, 맛 등에 영향을 미치지 않는 것으로 평가되었으며 유의차는 인정되지 않았으나 오히려 색과 향에 대한 기호도가 상승하는 경향임을 알 수 있었다. 그러나 10%의 SG를 첨가했을 경우는 향과 맛, 조직감등에서 유의적으로 기호도가 떨어짐을 알 수 있었다(표 3-13). 이러한 현상은 SG 추출물 자체의 탄냄새에 기인하여 향과 맛에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 조직감 역시 SG의 첨가농도가 높을수록 그 기호도가 낮아지는 경향으로 나타났다. 즉, 머핀 제조 시 SG의 적정 첨가농도는 약 5% 이내의 수준이 적당할 것으로 판단되었다.

표 3-13. SG 첨가농도에 따른 머핀의 관능검사

	Color	Flavor	Appearance	Taste	Texture	Overall
Control	6.92 ^a	7.08 ^a	7.42 ^a	7.58 ^a	7.33 ^a	7.50 ^a
SG 5%	7.00 ^a	7.17 ^a	7.08 ^a	6.75 ^a	6.33 ^{ab}	6.67 ^a
SG 10%	5.58 ^a	5.42 ^b	6.75 ^a	4.67 ^b	5.83 ^b	5.08 ^b

1) Mean value scores with same alphabet in each column are not significantly different (p<0.05)

나. 머핀의 색도 및 외형

선행된 실험의 결과(SG 적정 첨가농도 결정시험)에 의하여 SG의 첨가량을 2.5%와 5%로 조정하고 제품의 관능적 특성을 높이고자 머핀 제조시에 커피를 럼주에 녹여 첨가함으로써 커피향을 갖는 머핀을 제조하여 이에 따른 머핀의 제조특성을 조사하였다. 제품의 밝기를 나타내는 L value는 SG의 첨가농도가 높을수록, 또한 커피를 첨가할수록 유의적으로 감소하여 어두운 색을 나타내었다. 반면 적색도를 나타내는 a value는 SG의 첨가농도가 높을수록, 또한 커피를 첨가할수록 유의적으로 증가하여 붉은 색을 띠었으며, 황색도를 나타내는 b value는 SG의 첨가농도가 높을수록 황색도가 유의적으로 증가하는 경향을 보였으나, 동일 농도의 SG를 첨가한 경우와 커피를 첨가한 경우를 비교하였을 때는 황색도가 감소하는 경향을 나타내었다(표 3-14). 머핀을 제조한 후의 제품의 부피 및 무게를 측정하였다(표 3-15). 머핀반죽 22g을 머핀 컵에 정확히 취하여 180°C에서 20분간 구운 후의 무게는 전체적으로 약 20g 내외로 각 처리구당 유의차는 없었으며 머핀제조시 SG의 첨가유무 혹은 커피의 첨가유무는 최종무게에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 또한 머핀의 부피는 SG를 첨가할수록, 커피를 첨가할수록 그 부피가 증가하는 경향을 나타내었지만 유의차는 나타나지 않았다.

표 3-14. SG를 첨가한 머핀의 Color values

	L value	a value	b value
Control	82.05 ± 0.21 ^{al)}	-4.29 ± 0.07 ^c	32.92 ± 1.01 ^c
SG 2.5%	74.06 ± 1.01 ^b	0.70 ± 0.05 ^d	35.99 ± 0.68 ^b
SG 5%	70.50 ± 0.91 ^c	2.68 ± 0.19 ^c	38.06 ± 1.42 ^a
SG 2.5% + Coffee	57.71 ± 1.03 ^d	7.02 ± 0.13 ^b	34.44 ± 0.99 ^{bc}
SG 5% + Coffee	52.47 ± 1.42 ^e	8.65 ± 0.26 ^a	35.43 ± 2.94 ^b

1) Mean value scores with same alphabet in each column are not significantly different (p<0.05)

표 3-15. SG를 첨가한 머핀의 baking properties.

	Voume(cc)	Weight(g)
Control	52.73 ± 2.04 ^{NS)}	20.44 ± 0.24 ^{NS)}
SG 2.5%	52.93 ± 0.68	20.12 ± 0.18
SG 5%	53.11 ± 1.42	21.38 ± 0.39
SG 2.5% + Coffee	53.63 ± 0.99	19.97 ± 0.49
SG 5% + Coffee	54.06 ± 2.94	20.09 ± 0.27

NS) : Not Significant

다. 머핀의 조직감

SG의 첨가농도 및 커피를 첨가하여 제조한 머핀의 조직감은 springnes, gummines, cohesivene, hardness, chewiness 등을 texture analyser로 측정하여 표 3-16에 나타내었다.

표 3-16. SG를 첨가한 머핀의 조직감

	Springness	Gumminess	Cohesiveness	Hardness	Chewiness
Control	0.602 ^{a1)}	73.72 ^a	0.392 ^{bc}	197.83 ^a	44.39 ^a
SG 2.5%	0.432 ^b	77.55 ^a	0.381 ^c	204.90 ^a	35.33 ^a
SG 5%	0.622 ^a	56.55 ^b	0.388 ^{bc}	145.45 ^b	35.44 ^a
SG 2.5% + Coffee	0.614 ^a	50.05 ^b	0.417 ^{ab}	119.60 ^b	31.20 ^a
SG 5% + Coffee	0.653 ^a	52.21 ^b	0.443 ^a	121.05 ^b	35.33 ^a

1) Mean value scores with same alphabet in each column are not significantly different (p<0.05)

제품의 복원력을 나타내는 springness는 2.5%의 SG를 첨가한 경우만 유의적으로 낮고 다른 제품간에는 유의차가 나타나지 않았다. 반면에 부착성을 나타내는 gumminess는 다른 첨가제를 넣지 않고 만든 control군과 2.5%의 SG를 첨가한 머핀의 경우가 비교적 높은 수치를 나타내었다. 응집성을 나타내는 cohesiveness는 커피를 첨가한 처리구에서 비교적 높게 나타났으며, 경도를 나

타내는 hardness는 비교적 SG와 커피를 첨가할수록 낮은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 앞선 머핀의 부피측정시 유의차는 인정되지 않았지만 SG와 커피를 첨가할수록 부피가 증가하는 경향으로 나타난 결과와 관련지을 때, 머핀 제조시 SG 및 커피를 첨가하는 것은 머핀의 부피를 상승시킴으로 경도를 낮추어 주는 결과를 초래하였다고 설명할 수 있겠다.

라. 머핀의 기호도

선행된 실험에 의하여 5% 이내의 SG 첨가 비율 즉, SG 2.5%와 5%를 첨가하여 머핀을 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 아울러 SG를 첨가한 머핀의 향 및 맛의 개선을 위하여 머핀 제조시 커피가루를 첨가하여 머핀을 제조한 후 동시에 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과를 표 3-17에 나타내었다.

표 3-17. SG를 첨가한 머핀의 관능검사

	Color	Flavor	Appearance	Taste	Texture	Overall
Control	6.62 ^{a1)}	4.94 ^b	6.31 ^{ab}	7.06 ^a	7.00 ^a	6.31 ^{ab}
SG 2.5%	7.19 ^a	6.06 ^{ab}	7.06 ^a	6.94 ^a	6.43 ^a	6.56 ^a
SG 5%	6.19 ^{ab}	6.75 ^a	6.00 ^{ab}	6.25 ^{ab}	6.69 ^a	6.31 ^{ab}
SG 2.5% + Coffee	5.44 ^{bc}	6.13 ^{ab}	5.19 ^{bc}	6.31 ^{ab}	6.37 ^a	6.43 ^{ab}
SG 5% + Coffee	4.44 ^c	5.34 ^b	4.38 ^c	5.88 ^b	6.13 ^a	5.31 ^b

1) Mean value scores with same alphabet in each column are not significantly different (p<0.05)

머핀의 전체적인 기호도는 SG 2.5% > SG 2.5% + Coffee > Control, SG 5% > SG 5% + Coffee의 순으로 나타나 SG 2.5%를 첨가한 머핀이 control 보다 더욱 기호도가 좋았으며, coffee의 첨가는 머핀의 기호도를 상승시키지 못하였다. 이러한 SG 2.5%를 첨가한 머핀이 색깔, 향, 외관 등에서 가장 높은 기호도를 나타낸 결과에 의한 것으로 판단되며 SG 특유의 색깔과 향은 첨가농도 2.5%의 수준에서 머핀의 개선효과를 나타낸 것으로 사료되었다. 그러나 5%의 SG를 첨가할 때에는 향의 항목에서 약간의 기호도가 상승하였으나 색깔 및 외

관 등의 항목에서 그 기호도가 크게 떨어짐을 알 수 있었다. 또한 SG를 첨가한 머핀에 coffee를 첨가한 경우는 거의 모든 항목에서 낮은 기호도를 나타내었으며, 특히 색깔의 항목에서 비교적 가장 낮은 기호도를 보였는데, 이는 SG 첨가와 커피의 첨가에 의해서 머핀의 색이 너무 강한 갈색을 나타내게 된 결과로 판단되었다. 즉 전체적으로 치매예방용 기능성 특성을 가진 SG를 첨가하여 머핀을 제조함으로써 SG를 첨가하지 않은 control군의 머핀보다 그 기호도가 더욱 향상된 머핀을 제조할 수 있었다.

제 5 항 음료

1. 실험재료 및 방법

가. 주재료의 특성

탈지박 물추출물의 유효획분인 SG를 사용하였으며 물리적 특징중 당도는 4.0 Brix이고 고형분 함량은 2.30%이었다.

나. 부재료의 특성

본 실험에서 사용한 부재료의 특징은 다음과 같다.

감초추출물 : 29.0 Brix(고형분 함량 : 27.9%)

대추추출물 : 9.0 Brix(고형분 함량 : 7.37%)

복분자추출물 : 25.3 Brix(고형분 함량 : 22.2%)

사과농축액 : Brix (고형분 함량 : 25.52%)

구기자추출물 : 23.0 Brix (고형분 함량 : 38.03%)

배농축액 : 40.0 Brix (고형분 함량 : 17.32%)

2. 결과 및 고찰

가. 추출물의 적정 첨가농도 결정

음료제조를 위하여 sesaminol glucosides(SG)를 주 재료로 첨가하였다. 추출물을 적정음용농도로 희석하여 관능요원들에게 관능특성에 대하여 묘사하도록 하여 탈지박 추출물에 대한 관능적 특성을 조사해 본 결과, 쓴 맛이 매우 강해 음료소재로 사용하기 위해서는 쓴맛을 완화시키기 위한 필요하다고 생각되었다. 표 3-18에 나타낸 배합비에 의하여 탈지박 추출물의 희석배율별로 관능검사를 실시한 결과, 탈지박 추출물의 농도 2% 미만으로 설정해야 할 것으로 나타났다. 3% 이상은 그 쓴 맛이 너무 강해서 부재료의 첨가만으로는 쓴 맛을 완화시킬 수 없으며 2%의 경우에도 쓴 맛이 강하였으나, 쓴 맛을 완화시킬 수 있는 부재료를 배합함으로써 음료의 개발이 가능할 것으로 생각되었다. 그러므로 적정 음용농도 결정의 관능적 평가 결과 1%의 수준에서 탈지박 추출물의 함량을 설정해야 할 것으로 사료되었다.

표 3-18. 탈지박 추출물의 적정 음용농도 결정을 위한 배합비

구 분	참깨박 추출물의 함량				
	1%	2%	3%	4%	5%
SG	1.0(0.023)	2.0(0.046)	3.0(0.069)	4.0(0.092)	5.0(0.115)
설탕	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
구연산	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
증류수	90	89	88	87	86
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

() : 최종고형분농도

나. 부재료의 선정 및 배합비 결정 시험

탈지박추출물(SG)은 그 자체의 쓴맛이 매우 강하여, 관능적으로 쓴맛을 완화시킬 수 있는 방향으로 부재료의 선정 및 첨가농도를 설정하였다.

1) 1차 배합

쓴맛을 제거하고, 추출물과의 어울림을 평가하기 위한 예비실험으로 탈지박 추출물(SG)의 농도를 1%로 고정시키고 부재료로 감초추출액 3%, 대추추출액 3%, 구기자추출액 3%, 복분자추출액1% 및 배즙 농축액 3%를 각각 첨가하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사를 실시한 결과, 음료의 색깔은 구기자 추출물의 첨가가 가장 좋았으나, 오히려 쓴맛이 강하게 느껴졌다. 복분자의 경우 신 맛이 강하기 때문에 다른 첨가물의 첨가 농도에 대해 낮은 농도인 1%만을 첨가하였는데, 오히려 음료에 상큼한 느낌을 더해주는 것으로 나타났다. 감초추출물의 첨가는 쓴맛을 가장 효과적으로 완화시키는 것으로 나타났으나 음료가 뿌옇게 되는 것이 단점으로 나타났으며, 대추 및 배즙 농축액의 경우 단맛을 내는 것 이외에는 다른 영향을 주지 못하는 것으로 나타나, 부재료의 배합비를 위한 2차 실험을 위하여 감초, 복분자, 대추를 선정하였다. 또한 선정된 탈지박 추출물(SG) 1%의 농도가 쓴 맛이 너무 강한 것으로 평가되어 추출물의 농도를 0.5%로 조정해야 할 것으로 사료되었다.

2) 2차 배합

0.5%로 첨가된 탈지박 추출물의 쓴 맛을 줄이고 부재료들간의 어울림을 평가하기 위하여 선정된 부재료 : 감초, 복분자 및 사과농축액을 각 농도별로

첨가하여 표 3-19와 같이 제조하여 관능검사를 실시하였다.

표 3-19. 2차 배합비

구분	A	B	C	D	E	F
SG	0.5 (0.0115)	0.5 (0.0115)	0.5 (0.0115)	0.5 (0.0115)	0.5 (0.0115)	0.5 (0.0115)
감초농축액	1.0 (0.0737)	1.0 (0.0737)	2.0 (0.1474)	2.0 (0.1474)	3.0 (0.2211)	3.0 (0.2211)
복분자농축액	2.0 (0.444)	3.0 (0.666)	2.0 (0.444)	3.0 (0.666)	2.0 (0.444)	3.0 (0.666)
사과농축액	2.0 (0.5104)	2.0 (0.5104)	2.0 (0.5104)	3.0 (0.7656)	3.0 (0.7656)	3.0 (0.7656)
설탕	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
구연산	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
증류수	85.5	84.5	84.5	82.5	82.5	81.5
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

관능적 평가결과, A와 B는 쓴맛이 가장 강하고, E와 F는 너무 신맛이 강한 것으로 평가되었다. 즉 감초농축액을 1% 첨가했을 때에 쓴맛이 가장 강하게 느껴, 쓴맛 완화에 영향을 미치지 못한 것으로 생각되었으며, 사과 농축액을 3% 첨가했을 때 신맛이 가장 강하게 느껴진 것으로 첨가되었다. 또한 복분자도 신맛을 강하게 나타내어, 복분자와 사과농축액이 3% 첨가된 E와 F에서 가장 신맛이 강하게 느껴졌다. 전체적으로 쓴맛이 가장 약하면서 신맛의 정도가 적당한 배합비는 3%의 감초농축액, 2%의 복분자농축액 그리고 3%의 사과농축액을 첨가한 E의 배합비가 가장 우수한 것으로 나타났다. 또한 감초가 쓴맛을 효과적으로 억제하는 것으로 미루어 감초의 농도를 달리하여 부재료의 배합비를 결정해야 할 것으로 사료되었다.

3) 3차 배합

2차 배합에서 관능적 평가가 가장 우수한 E의 배합비를 기준으로 설정하고, 쓴맛의 완화를 위해 감초의 배합비를 표 3-20과 같이 달리하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과, 감초 농축액이 5%이상 첨가될

경우에는 감초의 향이 너무 강하게 느껴져 관능적으로 바람직 하지 못하였다. 대체로 3%와 4%의 농도가 적합하게 느껴졌으나 쓴맛에 대한 정도는 서로 비슷하여 감초의 농도를 3%로 결정하였다.

표 3-20. 감초추출액 농도 결정을 위한 배합비

구분	감초농축액 함량비			
	3.0%	4.0%	5.0%	6.0%
SG	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)
감초농축액	3.0(0.2211)	4.0(0.2948)	5.0(0.3685)	6.0(0.4422)
복분자농축액	2.0(0.444)	2.0(0.444)	2.0(0.444)	2.0(0.444)
사과농축액	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)
설탕	9.0	9.0	9.0	9.0
구연산	0.07	0.07	0.07	0.07
증류수	82	81	80	79
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0

4) 4차 배합(당함량의 결정)

3차 배합까지에서 결정된 배합비를 기준으로 당의 함량을 결정하기 위하여 표 3-21와 같이 당함량을 달리하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 올리고당을 제외한 당은 가장 관능적 특성이 좋았던 당의 비율 즉, 설탕과 고과당을 1 : 1의 비율로 혼합한 당을 사용당으로 사용하였다. 관능검사 결과, D의 배합비는 단맛이 너무 강해 다른 재료의 향을 저해하였으며, A와 B의 배합비는 단맛이 덜하여 오히려 신맛이 두드러졌다. 관능검사요원의 의견을 고려하여 재 실험 결과, 설탕은 6%로 하고 올리고 당을 5%로 결정하였다.

표 3-21. 당함량 결정을 위한 배합비

구분	A	B	C	D
SG	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)
감초농축액	3.0(0.2211)	3.0(0.2211)	3.0(0.2211)	3.0(0.2211)
복분자농축액	2.0(0.444)	2.0(0.444)	2.0(0.444)	2.0(0.444)
사과농축액	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)
당(설탕:고과당=1:1)	4.0	5.0	6.0	7.0
올리고당	2.0	3.0	4.0	5.0
구연산	0.07	0.07	0.07	0.07
증류수	84.5	82.5	80.5	78.5
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0

5) 5차 배합(구연산 함량의 결정)

4차 배합에서 결정된 배합비를 기준으로 구연산의 첨가량을 달리하여 표 3-22와 같이 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. pH의 조절하여 저장성을 증가시킬 목적으로 구연산을 농도별로 첨가하였다. 구연산을 첨가할수록 pH가 낮아짐을 알 수 있었으며 신맛이 점점 강하게 느껴졌다. 관능검사를 실시한 결과 구연산 함량을 0.08% 이상 첨가할 경우 신맛이 너무 강하여 좋지 못한 결과를 나타내었으며, 대체로 0.04%나 0.06%를 첨가한 경우가 관능적 평가가 높게 나타나 구연산 함량 0.04%로 결정하였다. 이상의 배합비로 음료를 제조하였을 경우 pH 3.41이므로 음료제조시 95℃에서 15분 열수살균과정을 거치면 될 것으로 판단되었다.

표 3-22. 구연산 함량결정을 위한 배합비

구분	구연산 함량			
	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%
SG	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)	0.5(0.0115)
감초농축액	3.0(0.2211)	3.0(0.2211)	3.0(0.2211)	3.0(0.2211)
복분자농축액	2.0(0.444)	2.0(0.444)	2.0(0.444)	2.0(0.444)
사과농축액	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)	3.0(0.7656)
당(설탕:고과당=1:1)	6.0	6.0	6.0	6.0
올리고당	5.0	5.0	5.0	5.0
구연산	0.04	0.06	0.08	0.10
증류수	80.5	80.5	80.5	80.5
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0
pH	3.41	3.31	3.15	2.97

다. 탈지박 추출물 음료의 최적 배합비 설정

탈지박추출물(SG) 음료의 최종 배합비

단위 : %

재 료	함량(고형분)
SG	0.5(0.0115)
감초농축액	3.0(0.2211)
복분자농축액	2.0(0.444)
사과농축액	3.0(0.7656)
당(설탕:고과당=1:1)	6.0(설탕 3.0, 고과당 3.0)
올리고당	5.0
구연산	0.04
증류수	80.5
합(구연산제외)	100.0
pH	3.41
당도(Brix)	12.0

라. 탈지박 추출물 음료의 제조공정

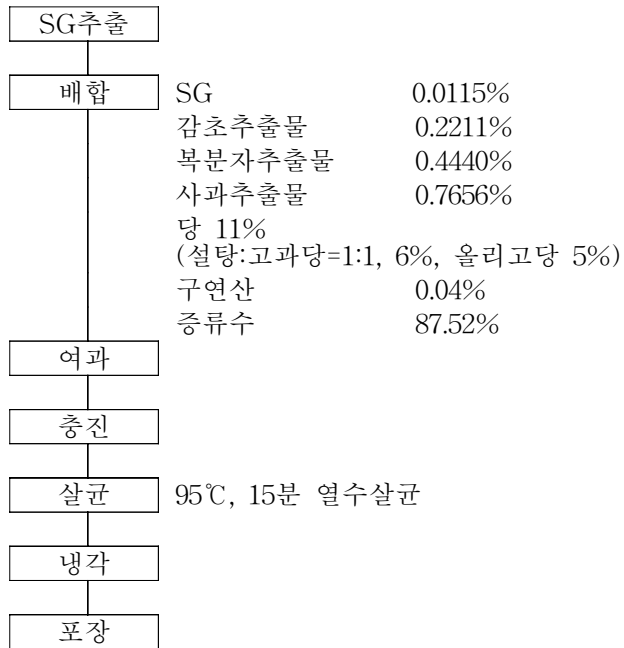


그림 3-5. 탈지박 추출물 음료의 제조공정도



그림 3-6. 탈지박 추출물 음료

제 6 항 Paste

1. 실험재료 및 방법

가. 부재료의 특성

탈지박 추출물 함유 paste의 제조시 첨가되는 부재료는 팔을 선택하였으며 팔은 5배의 물을 가하여 95℃에서 10분간 1차 가열하여 윗물을 거둬내었으며, 다시 동량의 물을 가하여 95℃에서 30분 이상 가열하여 팔이 푹 무르도록 삶아 체에 내려 앙금을 가라 앉혔다. 다시 윗물은 버리고 가라앉은 앙금을 paste의 부재료로 사용하였으며 이때 앙금의 고형분 함량은 20.4%였다.

2. 결과 및 고찰

가. 주재료 및 부재료의 적정 혼합비율결정

주재료인 탈지박 물추출물과 팔 앙금의 적정 혼합비율을 결정하기 위하여 표 3-23과 같이 일정 팔 앙금에 대해 각각 0.5, 1, 1.5 및 2배에 해당하는 추출물과 재료의 혼합양에 10%에 해당하는 설당을 첨가하여 섞은 후 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과, 팔앙금의 0.5배에 해당하는 추출물을 섞었을 경우에는 추출물의 향에 비해 팔향이 너무 강하여 탈지박 추출물을 함유한 paste로 나타내기에 문제가 있을 것으로 생각이 되었다. 반면 팔앙금의 1.5배 이상의 추출물을 첨가했을 경우에는 추출물 특유의 탄맛이 두드러져서 적당하지 못한 것으로 나타났다. 그러나 팔앙금과 동량의 추출물을 첨가했을 경우에는 서로의 맛이 가장 잘 어울리는 것으로 나타나 주재료인 탈지박 추출물과 팔앙금의 적정 혼합비율을 1 : 1으로 나타났다.

표 3-23. 추출물의 적정 첨가비율

	추출물 : 팔앙금의 비율			
	0.5 : 1	1 : 1	1.5 : 1	2 : 1
추출물	10	20	30	40
팔앙금	20	20	20	20
설당	3	4	5	6

추출물 : 20 Brix(고형분 20%)

팔앙금 : 고형분 20.4%

나. 당함량 결정-1

탈지박 추출물 paste의 적정 당 농도를 결정하기 위하여 추출물 20%, 팔앙금 20% 이외에 설탕의 함량을 10, 15, 20, 25%로 첨가하여 관능검사를 실시하였다. 실시한 결과 설탕을 20% 이상 첨가했을 경우에는 단맛이 너무 강하게 느껴졌고 약 10% 첨가했을 경우가 단맛에 대한 기호도는 가장 높았으나, 당도를 60 Brix 이상으로 조절하여 저장성을 향상시키기 위하여는 설탕의 양과 설탕을 대체할 다른 첨가제가 필요할 것으로 관찰되어 설탕의 첨가량을 15%로 고정하고 설탕의 부분 대체제로써 말토덱스트린을 농도별로 첨가하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과 말토덱스트린의 첨가량은 관능적 특성에 큰 영향을 미치지 않았으나, 당도에 있어서 차이를 나타내, 25% 첨가시 가장 높은 당도(65 Brix)를 나타내, 저장성이 가장 좋을 것으로 판단되어 말토덱스트린의 함량은 25%로 결정하였다(표 3-24)

표 3-24. 당함량 결정을 위한 배합비-1

	A	B	C	D
추출물	20	20	20	20
팔앙금	20	20	20	20
설탕	10	15	20	25
물	50	45	40	35

표 3-24. 당함량 결정을 위한 배합비-2

	A	B	C	D
추출물	20	20	20	20
팔앙금	20	20	20	20
설탕	15	15	15	15
Maltodextrin	10	15	20	25
물	30	25	20	15
당도(Brix)	51.7	55.6	62.4	65.4

다. 적정 점도의 결정

탈지박 paste의 적정 점도는 gellatin으로 조정하였다. 적정 농도는 잼과 같은 농도로 빵이나 비스킷에 잘 발라지고 속으로 스미는 현상이 없는 물성을 중

점으로 나타내고자 하였다. gellatin은 첨가하는 물에 먼저 용해시킨 후 표 3-25의 배합비대로 나머지의 재료와 혼합하여 90℃에 2분간 가열하였다. 가열한 후 10℃에서 18시간 이상 냉각시켜 겔을 굳힌 후 관능검사를 실시하였다. Gellatin을 1.6%로 첨가했을 경우 냉각시킨 후에도 너무 묽은 것으로 나타났다. 즉, 빵과 비스킷에 발랐을 때 너무 묽어 잘 발라지지 않았고, 또한 속으로 스며들어 관능적으로 좋지 못한 결과를 초래하였으며 대체로 1.8%이상 첨가시 적정 굳기를 갖는 것으로 나타났다. 특히 2.0%를 첨가했을 경우가 빵에 발림성이 가장 좋았으며, 재료에 스며드는 현상이 적은 것으로 나타났으며, 2% 이상으로 첨가했을 경우에는 gell이 너무 단단해서 적당하지 못한 것으로 평가되었다.

표 3-25. 적정 점도의 결정을 위한 배합비

	A	B	C	D
추출물	20	20	20	20
팥앙금	20	20	20	20
설탕	15	15	15	15
Maltodextrin	25	25	25	25
물	20	20	20	20
Gellatin	1.6	1.8	2.0	2.2

라. 탈지박 추출물 함유 paste의 최종 배합비

탈지박물추출물 함유 paste의 최종 배합비

단위 : %

재 료	함량(고형분)
탈지박 물추출물	20(4.0g)
팥앙금	20(4.08)
설탕	15
Maltodextrin	25
Gellatin	2.0
물	20
합(gellatin제외)	100.0
pH	
당도(Brix)	65.4

마. 탈지박물추출물 함유 Paste의 제조공정도

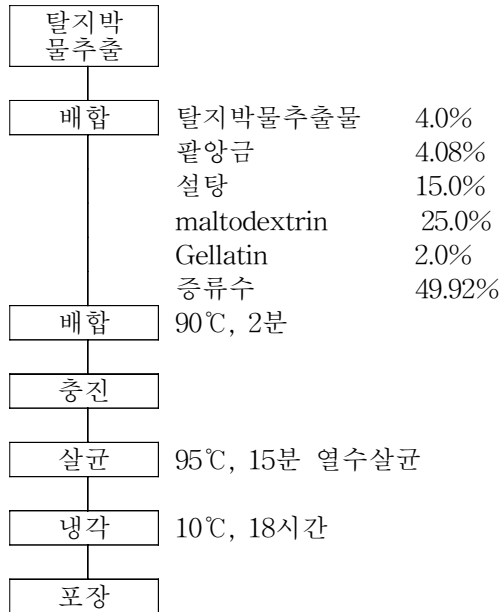


그림 3-7. 탈지박물추출물 함유 Paste의 제조공정도



그림 3-8. 탈지박물추출물함유 Paste

제 4 절 탈지박 유효성분의 구조특성 및 분리

제 1 항 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 공시재료

참깨와 들깨 및 홍화는 경상남도 산청군으로부터 수집하여 -20℃에서 보관하면서 각종 분석에 사용하였다.

나. 시약

실험에 사용한 추출 및 분획용 시약은 Sigma Co.,에서 구입하여 사용하였고, molecular sieve column chromatography용 packing material 은 XAD-2 (Sigma Co.), Diaion HP-20을 사용하였다. TCL plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Art. 1.05554, Merck)를 사용하였으며, 발색시약은 5% H₂SO₄ (in EtOH)을 사용하였다. 그밖에 DPPH, xanthine oxidase, 2-deoxy ribose, AAPH(2-2'-Azobis Dihydrochloride), (+)-catechin 등 항산화효과 측정에 사용된 시약은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다.

다. 실험기기

Rotary vacuum evaporator(N-N series, EYELA Co., Japan), Aspirator(A-3S, EYELA Co., Japan), Circulator(MCH-031D, Monotec ENG, Korea), Shaking water bath(JS SWS 375S, Johnsam, Korea), Spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu Co., Japan) pH meter(Model 1671, Jenco Co., China), Centrifuge(MF-550, Hanil Sci. Ind. Co., Korea)를 사용하여 측정하였다.

2. 유효성분의 추출방법

가. 참깨, 들깨 및 홍화의 추출물 조제 및 분리

참깨, 들깨박과 홍화 종실 300g을 n-Hexane에 넣고 곱게 갈아 MeOH 700 mL를 첨가 상온에서 추출하는 방법을 3회 반복하였고, 여과 후 40℃ 이하에서 감압 농축하였다. 농축한 MeOH 추출액을 Silica gel column(Merck Co.)에 충전하여 CHCl₃, BuOH, Ethyl-acetate, MeOH로 분획하였고, 각 분획물은 감압농축한 후 건조시켜 수율(%)을 계산하였다.

$$\text{수율 (\%)} = \frac{\text{건조 후 시료 양 (g)}}{\text{추출에 사용된 시료 양 (g)}} \times 100$$

또한, 분석에 사용할 시 DMSO를 용매로 사용하여 1 mg/mL 의 농도로 희석, 각종 분석에 이용하였다.

나. 붉은 들깨박과 참깨박의 층진제(XAD-2, DiaionHP-20)에 따른 추출방법

각각의 붉은 들깨박과 참깨박 500g을 1500ml의 증류수로 1일 동안 추출한 후 추출물을 XAD-2와 HP에 각각 흡착 시켜 column chromatography를 실시하여 0~100%ethanol를 이용하여 추출하였다. 추출물의 수율(%)을 측정하였으며, 총페놀함량, 전자공여능, SOD-liked, 항산화 실험을 하였다.

다. 참깨 함유 항산화 성분의 추출·분리·동정 및 확인

참깨 및 탈지박의 분리 및 정제는 katsuzaki 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 참깨를 곱게 갈아서 n-hexane으로 3회 반복 추출한 후 sesamin과 sesamol인을 정량 하였다. 또한 종피중의 세사미놀 배당체 (Sesaminol-triglucoside) 함량 측정은 탈지된 탈지박에 80% ethanol로 3회 반복 추출한 후 Sep-pac 처리 후 분석에 사용하였다. lignan 함량은 Table 4-1의 조건으로 high performance liquid chromatography(HPLC)를 실시하였고 각 lignan은 ¹H-NMR 및 FAB-MS에 의해 물질의 분자량 및 구조를 확인한 후 각 실험에 사용하였다.

Table 4-1. Operating conditions of HPLC for analysis of lignan compounds.

Requester	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	ODS-5(250mm x 4.6 ϕ)
Mobile phase	MeOH : H ₂ O = 6/4
Detector	UV 290 nm
Flow rate	0.8 mL/min

라. 홍화박으로부터 유효 성분 분리 및 분석조건 확립

홍화의 생 혹은 볶은 후 hexane으로 기름을 탈지한 탈지박을 methanol 추출한 추출물의 성분을 알아보기 위해 Table 4-2 의 HPLC 조건으로 UV 254 nm 와 UV 290 nm로 패턴을 살펴보았다.

Table 4-2. Operating conditions of HPLC for analysis of defatted safflower flour.

Requester	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	ODS-5(250mm x 8 ϕ)
Mobile phase	MeOH : H ₂ O = 65 : 35
Detector	UV 290 nm
Flow rate	2.0 mL/min

마. 들깨박으로부터 유효 성분 분리 및 분석조건 확립

들깨박의 생 혹은 볶은 후 hexane으로 탈지한 후 methanol로 추출한 각 추출물을 UV 254와 280, 290 nm에서 HPLC 패턴을 살펴 본 결과 290nm에서 peak가 다수 검출됨을 알 수 있었다. 이들 peak를 HPLC chromatogram에 나타난 면적의 %로 나타난 결과 Table 4-3과 같은데 특히 peak 5와 peak 6사이에 peak는 retention time이 일치하지 않아 성분이 볶는 과정에서 변화했을 것으로 추정되는바 이들 성분을 대량 분리하여 물질의 동정과 성분 함량의 정량

이 필요하겠다.

Table 4-3. Operating conditions of HPLC for analysis of defatted perilla seed.

Requester	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	ODS-5(250mm x 4.6 μ m)
Mobile phase	MeOH : H ₂ O = 65 : 35
Detector	UV 290 nm
Flow rate	0.8 mL/min

바.참깨박, 들깨박, 홍화박의 생박 및 볶은박의 효소, 산 및 알칼리 처리법

탈지박들을 Fig. 4-1과 같이 acetate buffer 90ml에 효소 0.1%를 첨가하여 각각 반응시켜 filtering 후 ethyl acetate를 이용하여 각각의 aglycon을 얻었다. 이 것을 농축하여 효소처리 sample을 얻었으며, 각각의 탈지박에 KOH와 HCl을 첨가하여 산처리 알칼리 처리 sample을 얻었다(Fig 4-2.). sample의 수율(%)을 측정하였으며, 총 페놀함량, 전자공여능, SOD-liked, 항산화 효과 측정 실험을 하였다.

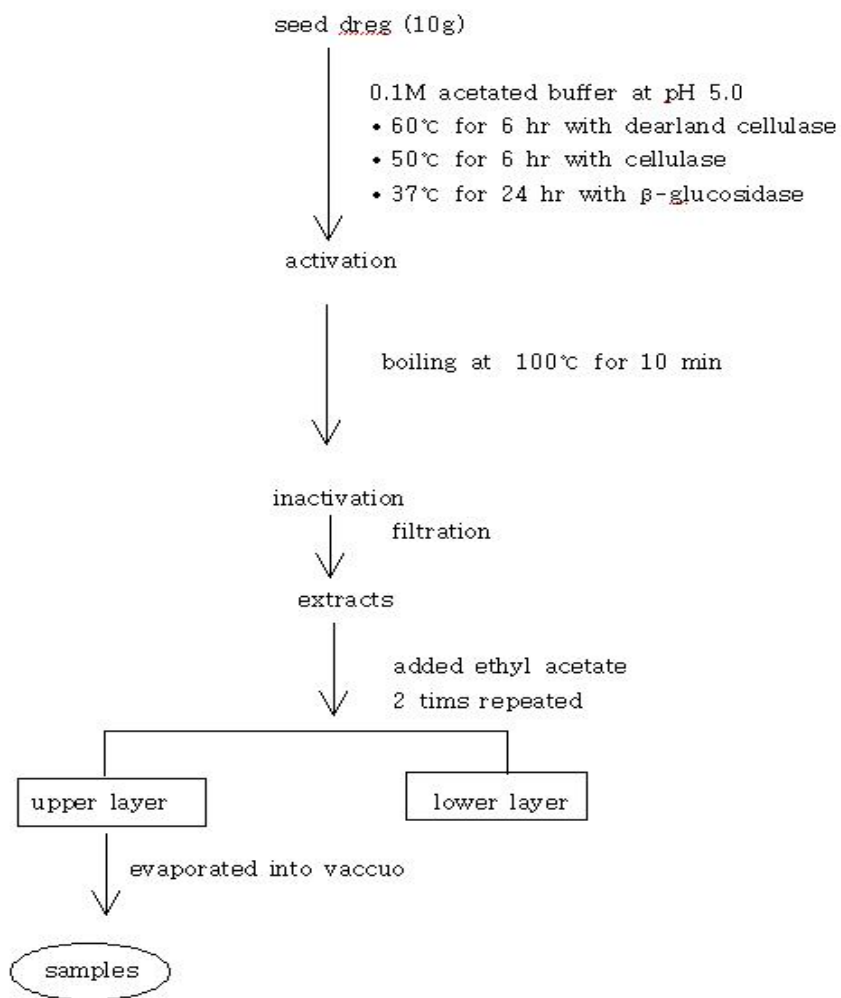


Fig. 4-1. Schematic procedure of enzyme treatment in seed dreg.

(A) alkali treatment

(B) acidify treatment

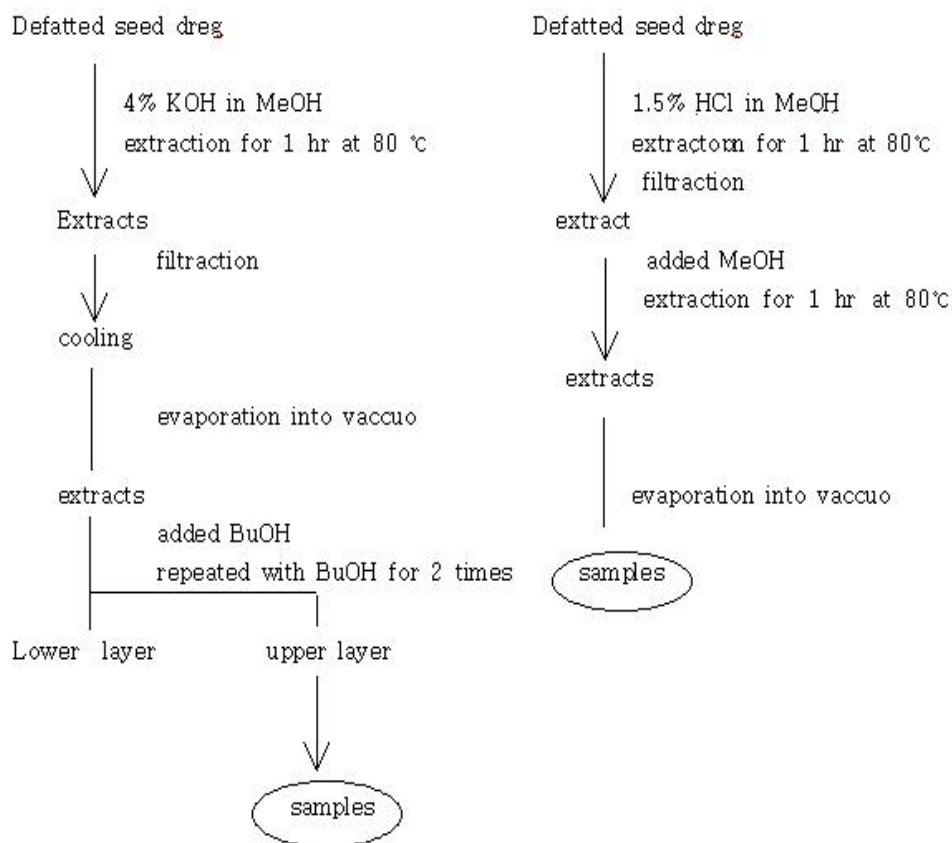


Fig. 4-2. Schematic procedure for alkali(A) and acid(B) treatment in defatted seed dreg.

사. SG(sesaminol-glucosidase)의 효소처리

SG는 볶은 참깨박 500g에 물 1500ml를 첨가한 후 하루동안 90℃에서 추출한 후 XAD-2나 HP에 흡착하여 EtOH을 통과시킴으로 해서 얻을 수 있다. 이 SG에 Fig. 4-1과 같이효소를 첨가하여 추출한 후 Table 4-1.의 조건에서 HPLC를 통해 SG 성분의 변화를 확인 하였다.

아. sesaminol-triglucosidase 의 대량분리 방법 확립

볶은 참깨박을 Fig. 4-3과 같이 뜨거운 물로 추출한 후 깨끗하게 여과하여 XAD-2 resine과 함께 교반하여 흡착 시켜 준다. 그 후 20% ethanol과 60% ethanol로 충분히 washing 하여 crude SG를 얻을 수 있다.

또한 Table 4-4. 의 조건과 같이 Prep-HPLC를 이용하여 대량으로 sesamin과 sesamol인를 얻을 수 있다.

Table 4-4. Conditions of Preparative-HPLC for large scale.

Requester	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	ODS-5(250 mm x 20 mm)
Mobile phase	MeOH : Water (6/4=v/v)
Detector	UV 290 nm
Flow rate	5.0 mL/min

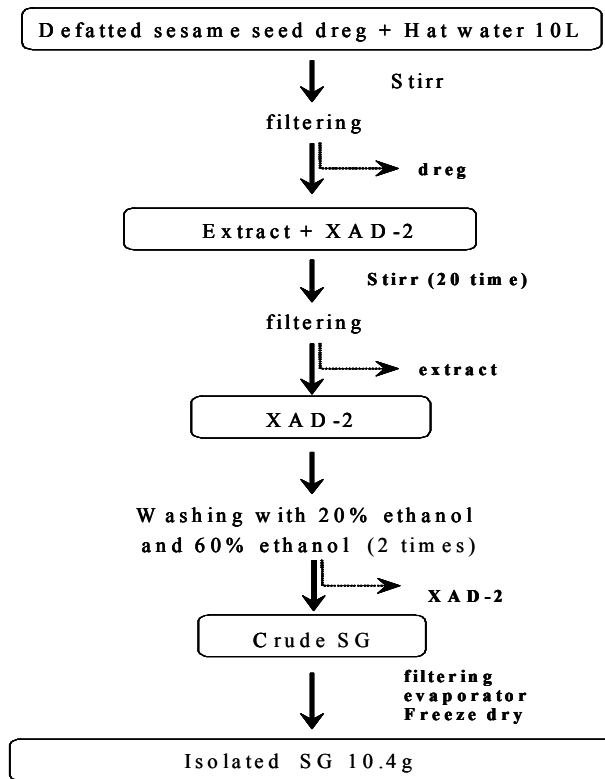


Fig. 4-3. Purification of water extracts from defatted sesame seed.

자. 들깨박으로부터 항산화 활성 성분 분획

Fig. 4-4와 같이 볶은 들깨박을 60%EtOH로 추출한 후, BuOH에 녹이고 다시 Acetone처리 하여 acetone 분획물을 open column chromatography로 분리하여, Glass column에 silica gel을 31.4 × 100 cm 까지 충전시키고, acetone 분획물 중 20 g을 loading하였으며, 전개 용매는 CHCl₃ : EtOH (100 : 0 - 0 : 100)을 사용하여 용출하였다. 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 흡수파장을 확인하였으며, 같은 파장의 분획물은 합쳐서 감압 농축 후, Chloroform : MeOH (9:1,(v/v)), Chloroform : MeOH : Formic acid (35 : 63 : 2 (v/v/v))의 전개용매로 TLC를 실시하였으며, 각각의 실험에 사용하였다.

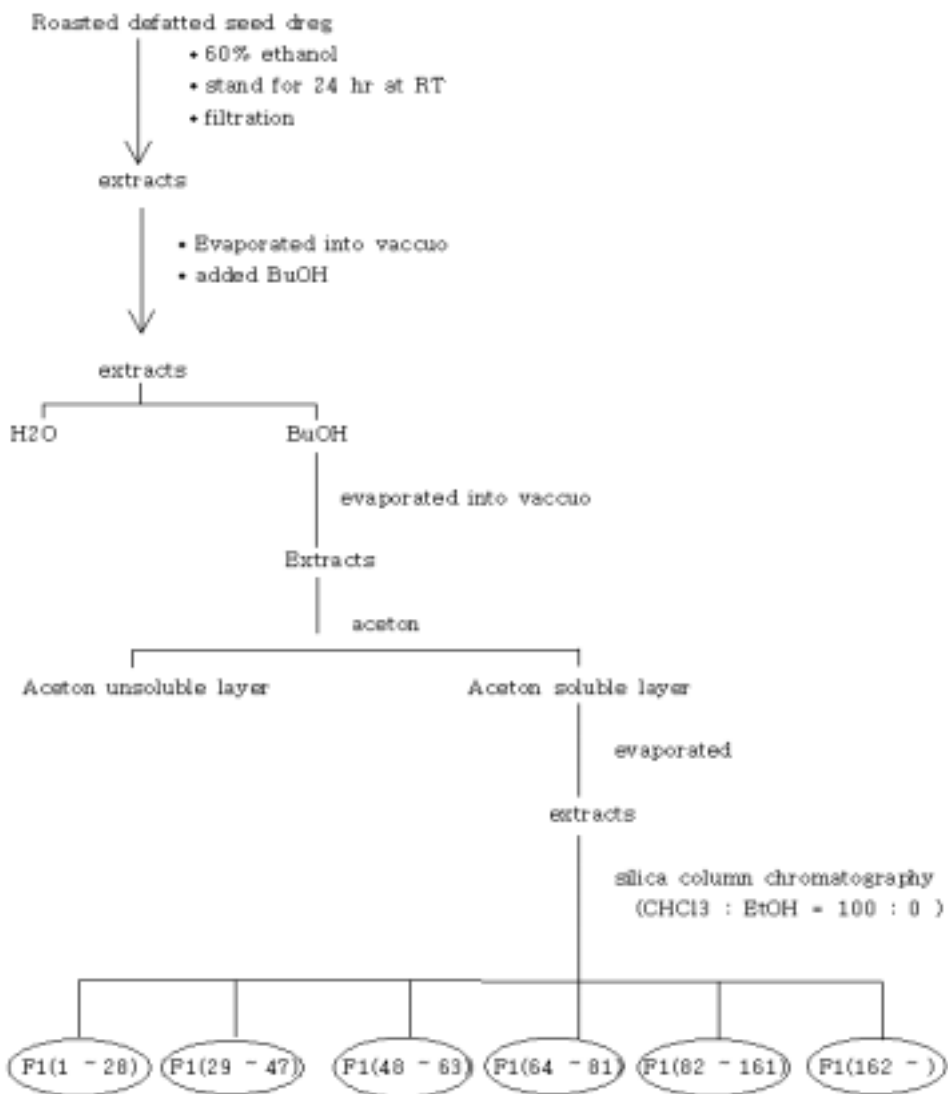


Fig. 4-4. Schematic procedure of extracts isolated by using column chromatography

3. 항산화효과 측정

가. 페놀성 화합물 정량

총 페놀 함량은 AOAC의 Folin-Denis법을 이용하여 비색정량 하였으며, 시료에 Na₂CO₃를 가하고 2분간 실온에 방치한 후 50 % Folin-Denis 시약을 가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 0-1.0 mg/mL 농도를 조제하여 표준 곡선을 작성하여 계산하였다.

나. 2-deoxyribose oxidation 법

Hydroxyl radical은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. EDTA에 FeSO₄를 첨가한 후 deoxyribose와 H₂O₂로 반응시키는데 sample이 hydroxyl radical 생성 억제능을 관찰하는 것으로 532nm에서 비색정량을 통해 측정하였다.

$$\text{Hydrogen radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A : 시료 무첨가군의 흡광도

B : 시료 첨가군의 흡광도

다. 항산화능

전자공여능, SOD 유사활성 측정, lecithin oxidation system, hydrogen peroxide 소거능 측정 등의 항목은 제 3 장 1절 4. 산화적 스트레스 억제효과 검색의 내용에 의한 실험방법에 의하여 측정하였음.

4. 박으로부터 지표 성분 및 성분 평가 기준 확립

가. ¹H-NMR(Nuclear Magnetic Resonance) spectrometry

항산화 활성이 강한 lignans의 ¹H-NMR spectra 는 AMX-500 spectrometer(500MHz, Bruker, Germany)를 사용하여 측정하였다. 이때, TMS를 내부 표준 물질로 사용하여 시료의 화학적 이동값(δ)과 coupling constant(J)를 측정하였으며, 시료용매는 TFA-DMSO-d₆(1:9) 혼합용액을 사용하여 측정하였다.

나. FAB-MS(fast atom bombardment mass) spectrometry

항산화 활성이 강한 lignans의 FAB-MS spectra 는 JEOL JMS-AX-505 WA(japan Electron and Optics, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

3. 들깨박의 분획별 항산화 활성 물질은 HPLC를 이용하여 지표 물질이 되는 것을 Table 4-5와 Table 4-6을 이용 하여 측정하였다.

Table 4-5. Operating conditions of HPLC for analysis of defatted perilla seeds.

Requester	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	ODS-5(250mm x 8 ϕ)
Mobile phase	CHCl ₃ : EtOH : Formic acid = 80 : 20 : 1
Detector	UV 375 nm
Flow rate	0.8 mL/min

Table 4-6. Operating conditions of HPLC for analysis of defatted perilla seeds.

Requester	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	Econosphere Silica 5u(250mm x 4.6 ϕ)
Mobile phase	CHCl ₃ : EtOH : Formic acid = 80 : 20 : 1
Detector	UV 375 nm
Flow rate	0.8 mL/min

제 2 항 실험결과 및 고찰

1. 탈지박 함유 천연 항산화 물질의 추출

가. 최적 추출 및 분리 조건 검토

1) 수율

참깨, 들깨, 및 홍화의 생박 및 탈지박을 CHCl₃, BuOH, Ethyl acetate, MeOH을 사용하여 분획별 추출한 수율은 Table 4-7과 같다. 모든 시료는 BuOH 층 다른 층에 비해 수율이 높았고(LDP : 2.21%, RDP : 2.162%, LDS : 1.919%, RDS : 0.879%, LDSF : 2.650%, RDSF : 3.351%), 그 중 들깨박 층 (생박, 탈지박)에서 다른 시료에 비해 높았으며, 들깨박은 CHCl₃, MeOH 층에서도 높은 경향을 보였다.

Table 4-7. Yields(%) of each solvent extracts from law or defatted flour by glass column chromatography

(%)

	CHCl ₃	BuOH	Ethyl acetate	MeOH
RDS ¹⁾	0.422	0.879	0.117	0.479
LDS ²⁾	0.682	1.919	0.339	0.175
RDP ³⁾	1.234	2.162	0.058	0.527
LDP ⁴⁾	0.77	2.21	0.198	2.614
RDSF ⁵⁾	0.054	3.351	0.314	1.603
LDSF ⁶⁾	0.385	2.650	0.89	0.858

1) RDS : Roasting defatted sesame, 2) LDS : Law defatted sesame

3) RDP : Roasting defatted perilla, 4) LDP : Law defatted perilla

5) RDSF : Roasting defatted safflower, 6) LDSF : Law defatted safflower

2) 총 페놀함량 측정

유지 자원으로 사용되는 식물의 종자에 함유되어 있는 항산화성 물질은 대부분이 페놀성 화합물이며, 그 성분의 종류로 대두 및 chia 종자에는 isoflavone, pentoside, flavonol, glycosides, chlorogenic acid 및 caffeic acid, 귀리에는 caffeic acid, ferulic acid 등이 있다. 뿐만 아니라, 합성항산화제와 천연항산화제의 대부분이 페놀성 화합물이라고 알려져 있다. 또한 페놀성 화합물은 지방산 산화의 초기 생성 물질인 hydroperoxide 와 기타 반응 물질과 반응하여 산

화를 억제시키는 것으로 보고 되어 있다. 참깨, 들깨 및 홍화 탈지박의 각종 용매에 의한 추출물의 총 페놀함량 측정 결과는 Fig. 4-5와 같다. 본 연구의 결과 참깨, 들깨 및 홍화의 생박과 탈지박 중 들깨박류(생 들깨박, 볶은 후 탈지한 들깨박)에서 페놀함량이 높게 나타났고, 특히, 볶은 후 탈지한 들깨박을 시료로 사용한 군과 MeOH, BuOH을 용매로 분획한 추출물에서 높은 함량을 보였으며, 이 외에 모든 시료는 MeOH을 이용하여 분획한 추출물에서 다른 용매를 사용한 추출물보다 페놀함량이 높은 경향을 나타냈다. 이로 보아, 3가지 종자 중 들깨의 항산화성이 높음을 알 수 있으며, MeOH을 사용하였을 때 들깨 안에 있는 항산화 성분이 가장 많이 추출됨을 알 수 있었다. Fukuda 등(1981)은 참깨와 그들의 압착박에 있는 폴리페놀화합물의 존재 유무에 대해보고 하였고, Lee (1993)는 들깨 종자의 페놀화합물을 동정하여 항산화성을 살펴 본 결과 0.02%(w/w) BHT 와 유사한 항산화성을 띤다고 보고 하여 본 실험과 유사한 결과를 나타냈다.

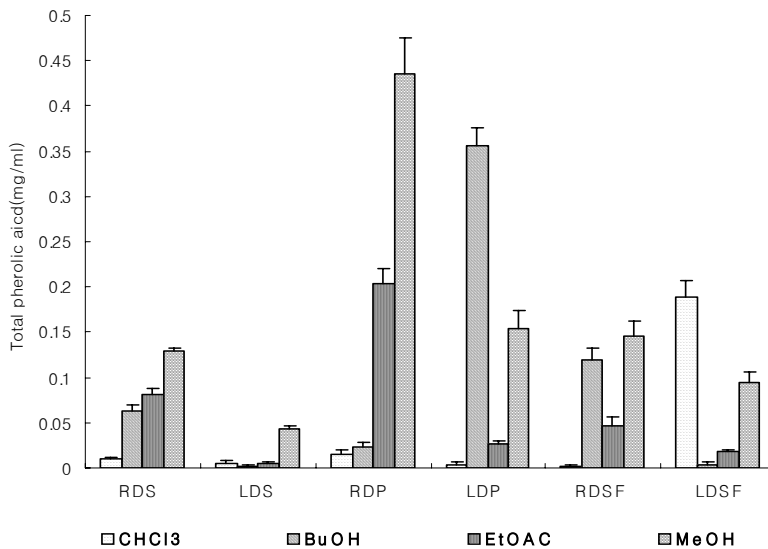


Fig. 4-5. Total phenolic contents of defatted perilla extracts fractionated by each solvent. (Each value is mean±SD of experimental group.)

▨ : CHCl₃ , ▩ : BuOH , ▪ : Ethyl acetate , ▧ : MeOH

RDS : Roasting defatted sesame, LDS : Law defatted sesame

RDP : Roasting defatted perilla, LDP : Law defatted perilla

RDSF : Roasting defatted safflower, LDSF : Law defatted safflower

나. Column chromatography 에 의한 분리

1) 수율

들깨박과 참깨박을 XAD-2와 HP에 흡착시켜 추출한 추출물의 수율을 (Table 4-8.)과 같다. 들깨에 비해서 참깨의 수율이 충전제의 종류를 달리했을 경우 모두 높게 나왔고, XAD-2 로 충전했을 때 보다 HP로 충전했을 때 더 높은 수율을 보였다. 참깨는 40%, 60% EtOH을 용매로 사용했을 때 높은 수율을 나타냈다. 들깨 또한 XAD-2로 충전 했을 때 높은 수율을 보였고, 20%, 40% EtOH에서 농도의 용매에서 높은 수율을 나타냈다.

Table 4-8. Yield (%) of extracts

	XAD-2		HP	
	perilla	sesame	perilla	sesame
H ₂ O	0.1672	0.5147	0.0966	0.6735
20%E*	0.2902	0.4891	0.3412	0.6478
40%E	0.3032	0.7986	0.1794	0.9246
60%E	0.0626	0.8713	0.0362	1.0598
80%E	0.0222	0.1571	0.0118	0.2891
100%E	0.0176	0.0987	0.0176	0.1921

* Ethanol percent

2) 항산화 효과 측정

가) 충전제를 달리 했을 경우 들깨박의 총 페놀 함량

HP와 XAD-2에 흡착시켜 추출한 추출물의 총 페놀함량을 비교하여 보았다.(Fig. 4-6) 충전제에 따른 페놀함량에는 차이점이 없었고, 용매의 농도와 무관한 결과를 보였다. 수율이 높게 나타났던 20% , 40% EtOH에서 높은 경향을 보였으며, 20% EtOH에서 XAD-2는 0.359 mg/mL, HP는 0.392 mg/mL의 페놀 함량을, 40% EtOH에서 XAD-2, HP 각각 0.376mg/mL, 0.421mg/mL의 함량을 나타냈다. 결과, 충전제와는 무관한 결과를 보였으며, 페놀 함량에 미치는 영향은 용매의 농도라는 것을 알 수 있다.

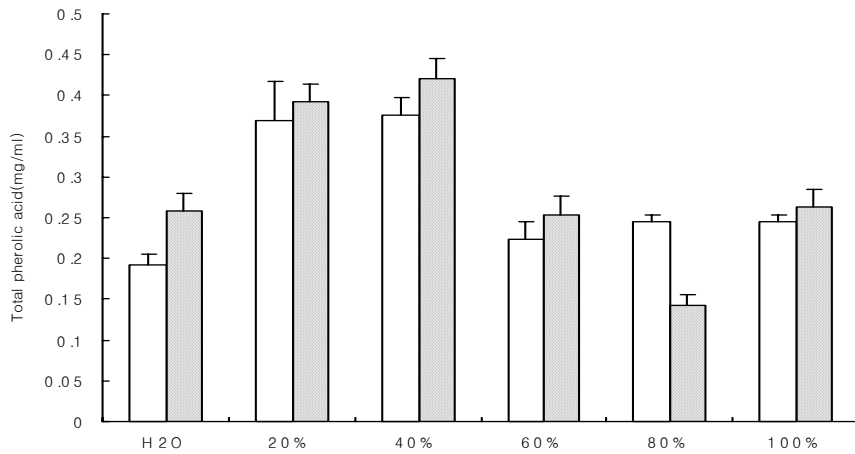


Fig. 4-6. Total phenolic acids contents of defatted perilla seed by ethanol layer (□ : XAD-2 , ▨ : HP)

나) 들깨박 추출물에 XAD-2, HP 충전제에 따른 전자공여능

각 충전제별로 비슷한 경향의 전자공여능을 나타냈으며, 항산화제인 BHT와 Quercetin에 비해 낮은 전자 공여능을 나타냈다. 들깨박의 용매 농도별로 전자공여능을 살펴 본 결과 BHT와 Quercetin이 각각 36.64%, 44.31%의 전자공여능을 갖는데 반해 20% EtOH에서 XAD-2는 16.84%, HP는 13.53%를, 40% EtOH에서 XAD-2는 13.73%, HP는 15.12%의 낮은 전자 공여능을 보였다 (Fig. 4-7). 그러나 윤 등은 탈지 들깨박 EtOH 농도를 달리한 용매로 추출물의 항산화성을 본 결과, BHA, BHT, tocopherol에 비해 높은 활성을 나타냈다는 상반된 결과를 보고하였다.

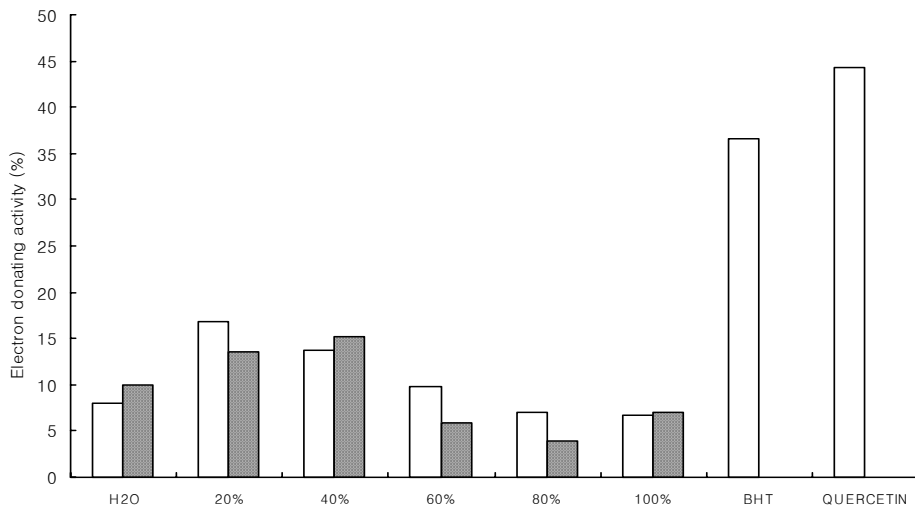


Fig 4-7. Electron donating ability of perilla extracts fraction from HP or XAD-2 resine (□ : XAD-2 , ▨ : HP)

다) 들깨박 추출물에 XAD-2, HP 충전제에 따른 SOD 유사활성

SOD 유사활성 또한 충전제에 따른 차이 없이 용매의 농도별로 유사한 경향을 나타냈으며, 20%와 40% EtOH 추출물에서 비교적 높은 저해율을 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 4-8). BHT와 Quercetin이 각각 87.26%, 93.24%의 저해율을 보인데 반해 들깨 추출물은 그에 대비 높은 경향은 아니었으나, 전자공여능과 비교하여 볼 때, 비교적 높은 산화 억제능을 갖는다고 할 수 있다. 20% EtOH에서 XAD-2는 72.95%, HP는 70.24%, 40% EtOH에서는 XAD-2는 70.53%, 73.367%를 나타내, 70% 이하의 SOD 유사활성을 갖는 다른 농도의 추출물에 비해 높은 경향을 보였다.

들깨는 20%, 40% EtOH에서 높은 수율을 나타냈고, 총 페놀 함량 및 전자공여능 또한 높게 나타났으며, SOD 유사활성 또한 같은 경향을 보였다. 따라서 들깨박의 20%, 40% EtOH에서의 항산화성을 기대해 볼 수 있겠다.

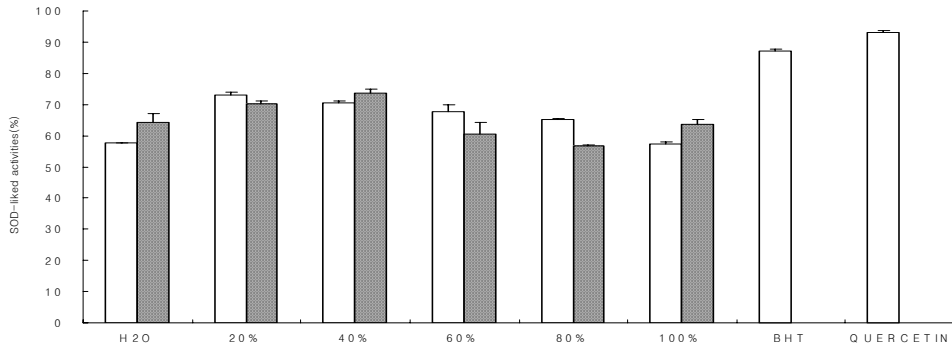


Fig 4-8. SOD-like activities of defatted perilla seed by ethanol layer.

라) 들깨박 추출물에 XAD-2, HP 충전제에 따른 Hydrogen radical 소거능
Lecithin을 이용하여 과산화 물가를 살펴본 결과는 Fig. 4-9와 같다.

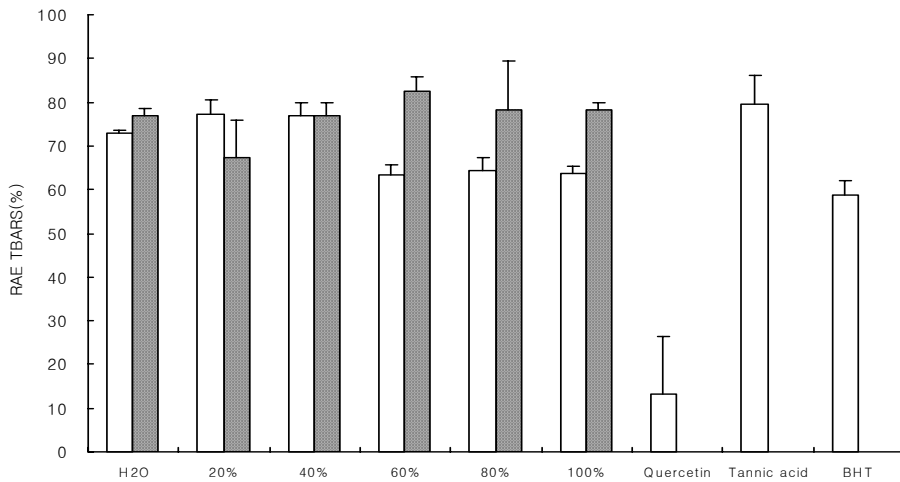


Fig. 4-9. Hydrogen radical scavenging activities of eperilla extract on the peroxidation of egg yolk lecithin.

마) 들깨박 추출물에 XAD-2, HP 충전제에 따른 Hydroxyl radical 소거능 생체 산화에 중요한 역할을 하는 Hydroxyl radical 의 소거능을 살펴본 결과 Fig. 4-10과 같다. 20% EtOH에서 XAD-2는 98.00%, HP는 89.70%의 소거능을 보였고, 40% EtOH에서는 92.15%, 89.45%의 radical 소거능을 나타냈으며, 이 밖에 다른 농도의 용매에서 각각이 90%에 가까운 활성도를 보였다. 항산화성이 강한 Quercetin, tannic acid, BHT 이 갖는 78.42%, 83.81%, 91.78%의 소거능과 비교해 볼 때 들깨박은 충전제의 종류와 무관하게 매우 강한 Hydroxyl radical 소거능을 갖는다고 보여진다.

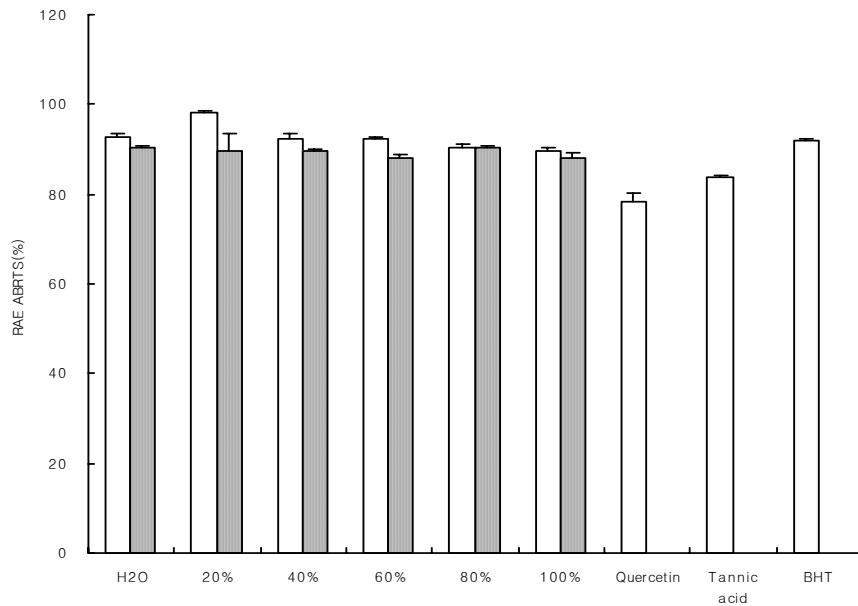


Fig. 4-10. Hydroxy radical scavenging activity of extracts separated from sesame, perilla and safflower dreg

바) 참깨박 추출물의 XAD-2, HP 충진제에 따른 총 페놀 함량

참깨박의 수율은 충진제의 종류와 무관했으며, 들깨박과 마찬가지로 용매의 농도에 따라 다르게 나타났고, 40% , 60% EtOH에서 높게 나타났다. 본험에서 충진제의 종류를 달리하여 총 페놀함량을 측정한 결과는 Fig. 4-11과 같다. 40% EtOH에서 XAD-2 0.249%, HP 0.412%를, 60% EtOH에서는 XAD-2 0.310%, HP는 0.429%를 나타내었으며, 다른 농도의 용매를 사용하여 추출한 군에 비해서 높은 함량을 나타냈다. 앞의 실험에서 충진제의 종류와 용매의 농도를 달리하여 들깨박을 추출하였을 때 수율이 높았던 층에서 높은 페놀함량을 보였던 결과와 유사하다.

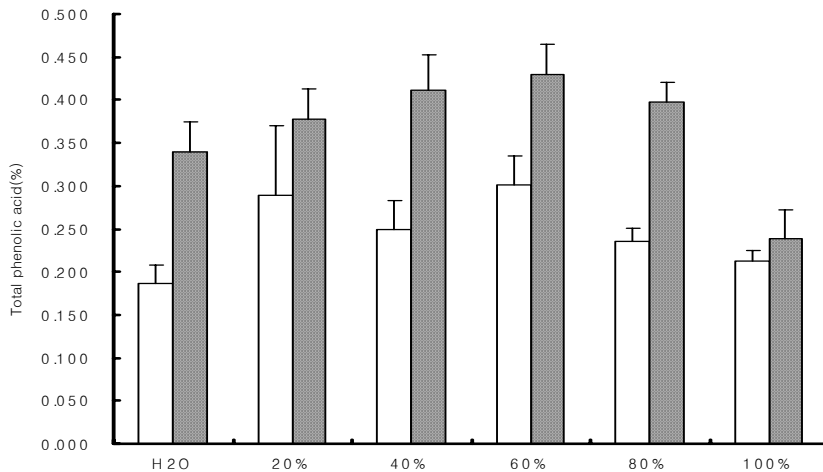


Fig. 4-11. Total phenolic acids contents of defatted seame seed by ethanol layer.

사) 참깨박 추출물의 XAD-2, HP 충진제에 따른 전자 공여능

충진제와 용매를 달리하여 추출한 참깨박의 전자 공여능은 수율이 높은 군에서 높은 전자 공여능을 나타내었으며, 60% EtOH를 제외하고는 충진제의 종류와 무관한 결과를 보였다. 60% EtOH에서 XAD-2는 31.05%, HP는 56.47%의 전자 공여능을 보였고, 36.34%, 44.31%의 공여능을 갖는 BHT, quercetin과 비교해 60% EtOH이 높은 전자 공여능을 갖음을 알 수 있다(Fig. 4-12).

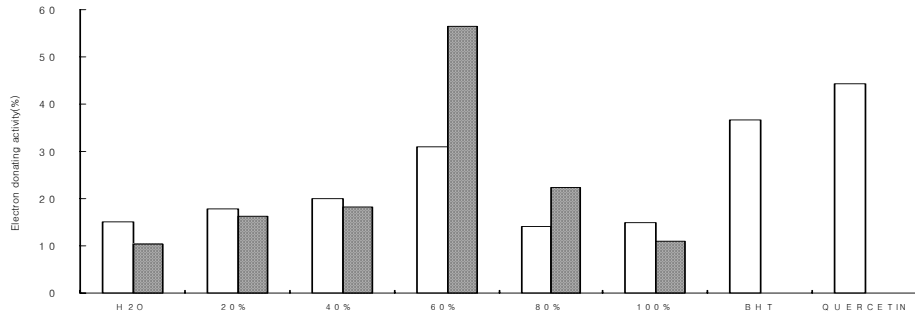


Fig. 4-12. Electron donating ability of sesame extracts fraction from HP or XAD-2 resine

아) 참깨박 추출물에 XAD-2, HP 충전제에 따른 SOD 유사활성

참깨박의 SOD 유사활성을 측정한 결과는 Fig 4-13과 같다. 수율이 높았던 40%, 60% EtOH에서 높은 활성을 보였으며, 40% EtOH용매에서는 XAD-2 73.31%, HP는 77.23%의 활성을, 60% EtOH는 XAD-2에서 78.26%, HP에서는 82.58%의 활성을 나타냈다. BHT는 87.27%의 활성을 보여, HP를 충전하여 60% EtOH로 추출한 용매에서 강한 항산화성을 기대해 볼 수 있다.

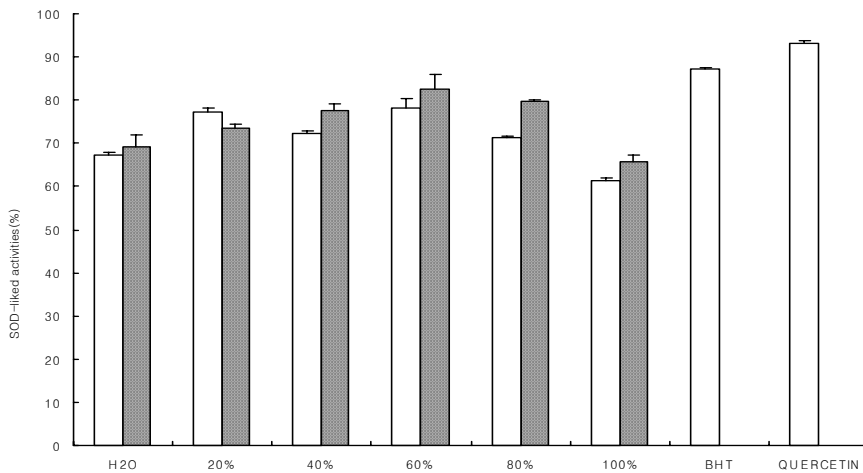


Fig. 4-13. SOD-liked activities of defatted sesame seed by ethanol layer.

자) 충전제를 달리한 참깨박 추출물의 과산화지질 억제능 및 hydroxyl radical 소거능

Lecithin을 이용하여 과산화지질 억제능을 살펴 본 결과(Fig. 4-14), ascorbic acid와 citric acid에 비해 모든군에서 높은 과산화억제능을 나타냈으며, HP로 충전한 20% EtOH에서 79.26%, 60% EtOH에서 86.80% , 80% EtOH에서는 84.95%를 나타내어 79.63%의 과산화 지질 억제능을 보인 BHT에 비해 그 활성이 높았다. 충전제를 달리한 참깨박 추출물의 hydroxly radical 소거능을 살펴본 결과(Fig. 4-15), 항산화성이 강한 BHT, quercetin, tannic acid 와 비교하여 모든 추출물에서 높은 활성을 나타내었다.

이 결과, 참깨박의 항산화성은 충전제의 종류와 무관하며, 각 실험의 성격에 따라 용매 농도별로 항산화성이 다르게 나타났으나, 대체적으로 높은 항산화능을 나타냈음을 알 수 있다.

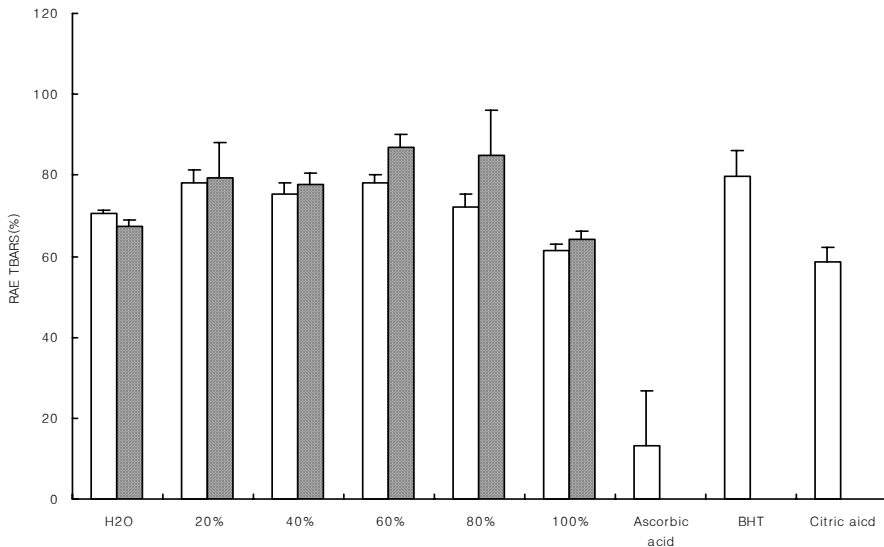


Fig. 4-14. Reactive antioxidative effect of seame extract on the peroxidation of egg yolk lecithin.

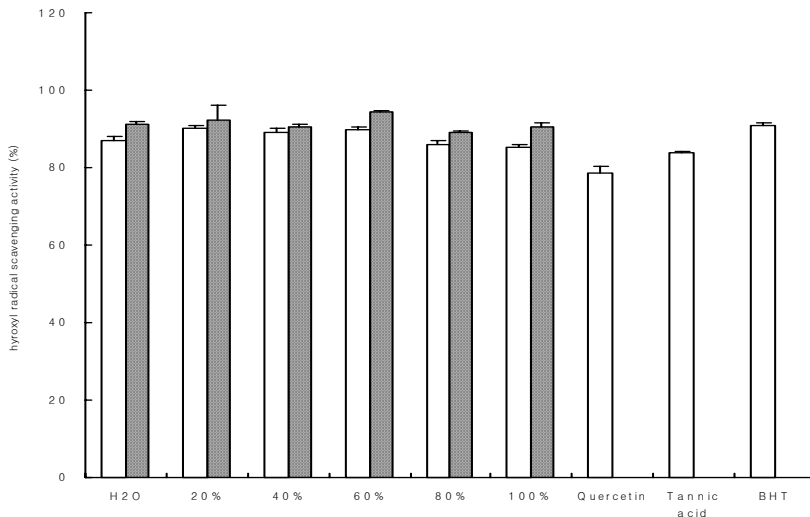


Fig. 4-15. Reactive antioxidative effect of sesame extract on the hydroxyl radical scavenging activity of deoxy ribose.

다. HPLC를 이용한 항산화물질의 정량 및 정성 분석

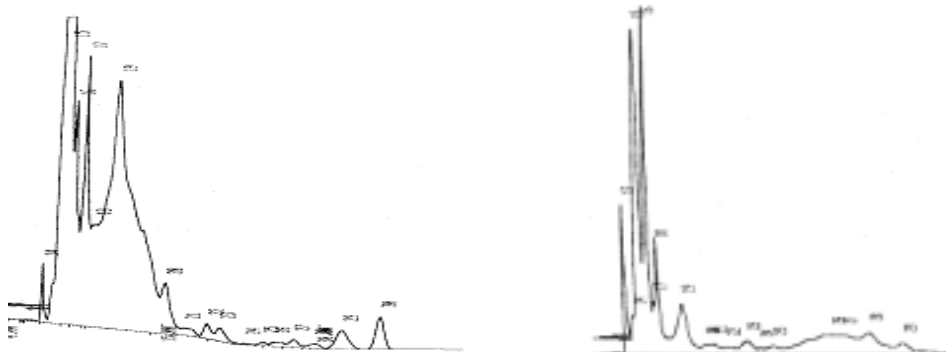
1) 참깨박으로부터 유효 성분 분리 및 분석조건 확립

가) 참깨박의 methanol 추출물의 HPLC 분석

참깨 생종자 혹은 볶은 후 탈지한 추출박을 methanol 추출한 후 추출물의 high performance liquid chromatography(HPLC) 분석 결과 이는 대량 분리 system을 위하여 8파이 column에 적용한 chromatogram이다(Fig. 4-16).

(A)가 볶은 후의 패턴이고 (B)가 생 탈지박으로 두 peak 사이에 패턴에는 차이가 나타나지 않았으나 sesamin 과 sesamol의 함량에는 차이를 나타내었다.

Table 4-9에 나타난 바와 같이 생박중에 sesamin 과 sesamol 약간 높게 나타났다. 한편 Table 4-10에서와 같이 sesaminol은 생박 및 볶은 후 탈지박에서 검출되지 않았지만 세사미놀 배당체(sesaminol-glucosidase)가 탈지박에서 유의적으로 높게 존재하는 것으로 나타났다($p < 0.001$). 이는 볶은 탈지박을 이용하여 효소 또는 산 및 알칼리 처리에 의해 sesaminol 함량을 높일 수 있는 가능성을 나타내고 있다.



(A) Roasting defatted sesame flour

(B) Law defatted sesame flour

Fig 4-16. HPLC chromatograms of sesame lignans extracted from roasting(A) or law (B) defatted sesame flour

Table 4-9. Sesamin and sesamolin content of law or roasting defatted sesame flour prepared with *n*-hexane extracts by HPLC.

	Sesamin (mg/100g)	Sesamolin (mg/100g)
Law defatted flour	165.01±29.17	53.48±8.48
Roasting defatted flour	111.67±8.33	45.39±1.06

Table 4-10. Sesaminol and sesaminol-glucosides(mono+di+tri) content of law or roasting defatted sesame flour prepared with 80% ethanol extracts by HPLC.

	sesaminol (mg/100g)	sesaminol-glucosides (Mono+di+tri) (mg/100g)
Law defatted flour	ND	417.0±18.38
Roasting defatted flour	ND	1465.67±57.71**

ND is not detected

나) 참깨 박 추출물에 XAD-2, HP 충전제에 의해서 분리된 추출물의 HPLC 분석

HP와 XAD-2 glass column를 사용하였을 경우 SG, sesaminol, sesamin 함량은 Table 4-11과 같이 나타 났는데 sesamin과 sesaminol의 경우 매우 소량 검출되는 것이 나타 났으며 sesamol의 경우는 검출되지 않았다. 하지만 SG의 경우는 최대 20% 정도의 함량을 나타냄을 확인 할수 있으며, 특히 HP 60%에서 대량으로 분리됨을 확인할수 있었다. SG(sesaminol-glucoside)는 sesaminol의 전구체로서 glucoside의 결합이 mono-, di-, tri- 에 따라 나뉠수 있으며 SG는 이 세가지를 모두 통칭한다. 여기서 glucoside가 떨어지므로해서 sesaminol이 될 수 있는데 이는 항산화성이 매우 우수한 천연 항산화제 이다.

Table 4-11. SG, sesaminol, sesamin and sesamol content of defatted sesame flour extracts by HP and XAD-2

		SG (mg/ml)	Sesaminol (mg/ml)	Sesamin (mg/ml)	Sesamol (mg/ml)
HP	H ₂ O	5.873	0.038	0.102	ND
	20%	15.58	0.656	0.06	ND
	40%	18.363	0.553	0.049	ND
	60%	28.65	0.700	0.15	ND
	80%	1.156	0.117	0.081	ND
	100%	0.706	0.021	0.137	ND
XAD-2	H ₂ O	3.953	ND	0.066	ND
	20%	10.378	0.533	0.091	ND
	40%	9.113	0.338	0.103	ND
	60%	9.316	0.362	0.158	ND
	80%	0.531	0.106	0.108	ND
	100%	0.469	0.017	0.096	ND

다) SG의 LC mass 결과

Fig . 4-17에서 보듯이 FAB-MS를 확인한결과 XAD-2를 통해 분리된 SG에는 참깨의 lignans 의 수용성 lignan 인 sesaminol 전구체인 sesaminol-monoglucoside(SMG), sesaminol -diglucoside(SDG),sesaminol -triglucoside (STG) 가 모두 포함 되어 있었다. sesaminol 전구체들은 미약한 항산화 성을 가지고 있으나 식품으로 섭취하면 장내 가수분해 효소인 glucosidase의 작용으

로 당이 분리 되어져 sesaminol의 형태로 혈액을 타고 각 조직으로 이동하여 강한 항산화 효과를 나타낸다.

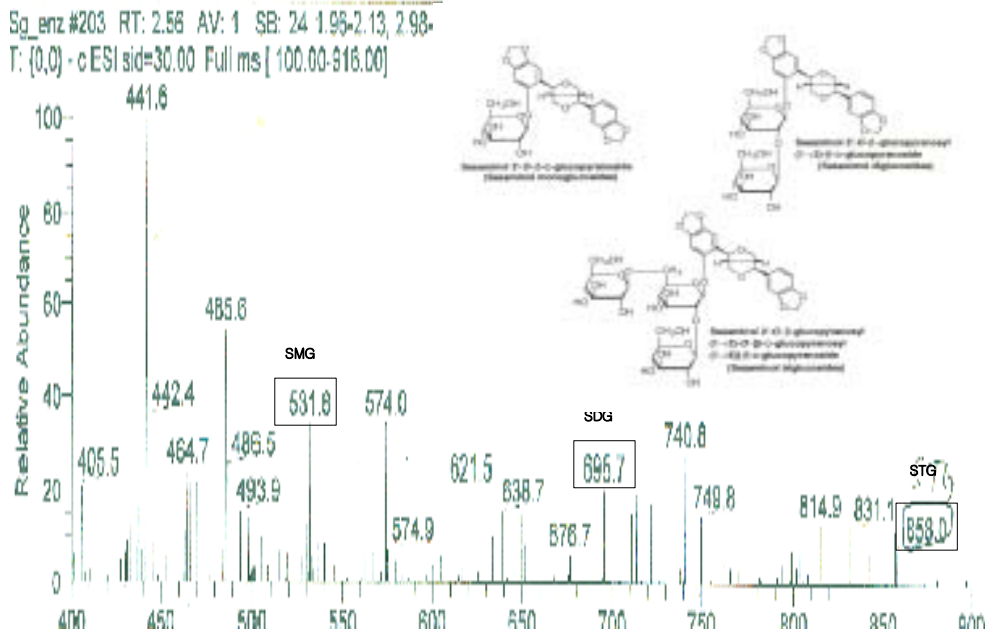


Fig . 4-17. LC-mass of SG extracts

2) 홍화박으로 부터 유효 성분 분리 및 분석조건 확립

HPLC 패턴에 나타나 있듯이 peak의 구성에 차이를 나타내는 것으로 판단되었다. 볶은 박의 경우 Peak 1, 2, 3, 4의 면적이 높은 반면 생박의 경우 peak 5, 6의 면적이 높은 것(Fig.4-18, Table 4-12)으로 나타나 볶음 처리에 의해 성분의 변화가 생기는 것으로 사료된다.

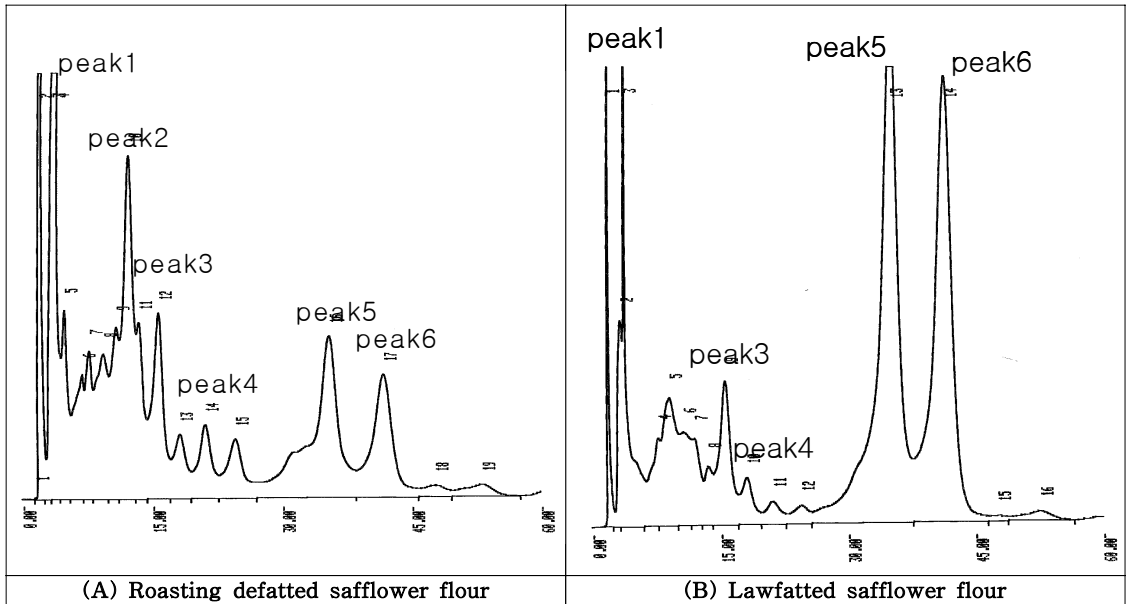


Fig 4-18. HPLC chromatograms of methanol extract prepared from roasting(A) or law (B) defatted safflower flour

Table 4-12. Area percent of HPLC chromatograms of methanol extract prepared from roasting or law defatted safflower flour

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6
RDSF	9.73	4.35	2.78	1.53	44.92	36.69
LDSF	19.01	20.39	12.37	6.09	27.07	15.06

RDSF : roasting defatted safflower flour

LDSF : law defatted safflower flour

3) 들깨박으로부터 유효 성분 분리 및 분석조건 확립

가) 들깨박 methanol 추출물의 HPLC 분석

들깨박의 생 혹은 볶은 후 hexane으로 탈지한 후 methanol로 추출한 각 추출물을 UV 254와 280, 290 nm에서 HPLC 패턴을 살펴 본 결과 290nm에서 peak가 다수 검출됨을 알 수 있었다. 특히 생박과 볶은 후 탈지박에 함유된 성

분에는 유의한 차이를 나타내었다 (Fig. 4-19) 이들 peak를 HPLC chromatogram에 나타난 면적의 %로 나타난 결과 Table 4-13과 같은데 특히 peak 5와 peak 6사이에 peak는 retention time이 일치하지 않아 성분이 볶는 과정에서 변화했을 것으로 추정되는바 이들 성분을 대량 분리하여 물질의 동정과 성분 함량의 정량이 필요하겠다.

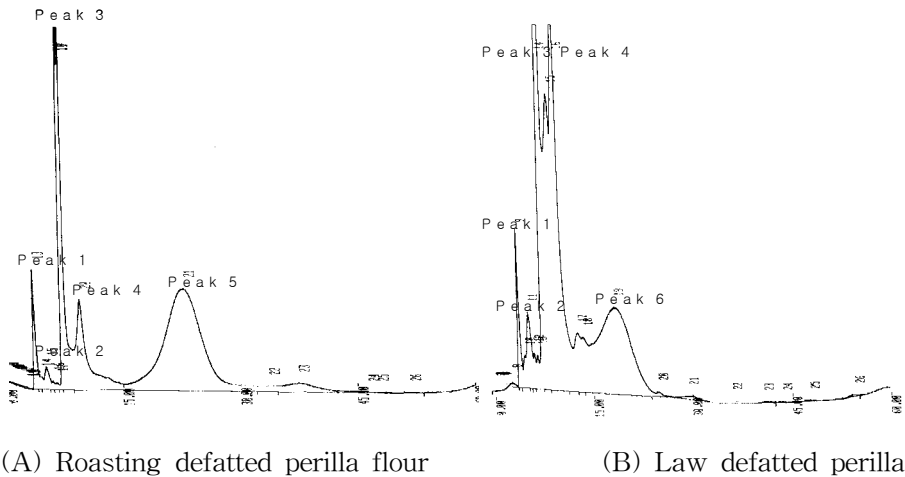


Fig 4-19. HPLC chromatograms of methanol extract prepared from roasting(A) or law (B) defatted safflower flour

Table 4-13. Area percent of law or roasting defatted perillia flour by HPLC

	Peak 1 (RT 3.871 min)	Peak 2 (5.475)	Peak 3 (7.581)	Peak 4 (10.098)	Peak 5 (18.545)	Peak 6 (23.105)
RDP	4.88	0.53	1.67	28.84	ND	64.08
LDP	2.29	2.44	56.08	18.84	20.36	ND

Not detected is expressed as ND, RT is retention time in HPLC

RDP : roasting defatted perilla, LDP : law defatted perilla

나) 들깨박 추출물에 XAD-2, HP 충전제에 HPLC 분석

H₂O부터 100%ethanol 까지 경향을 보면 Fig. 과 같이 나왔다 앞의 실험
 에서와 같이 항산화효과가 좋았던 20%ethanol과 40%ethanol이 높게 나왔는데
 이는 Fig 4-20에 표시한 부분에 항산화 성이 높은 물질이 있을 것으로 생각되
 어 지며, 이물질에 대한 동정이 필요할 것으로 사료된다.

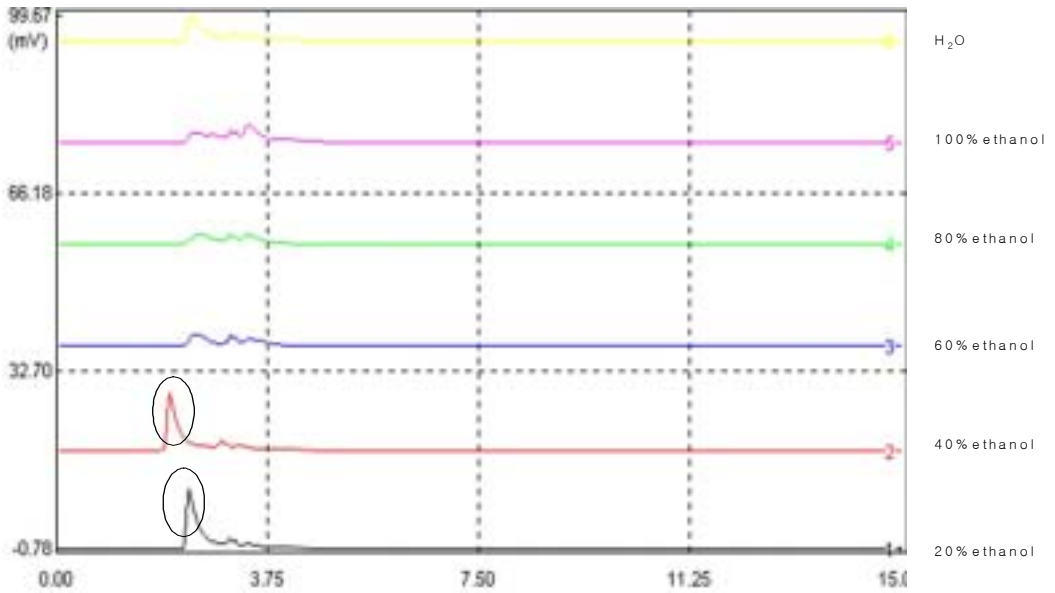


Fig. 4-20. HPLC chromatogram of extract fraction by HP resine

2. 유효획분의 대량추출조건검토

가. 효소처리및산·알칼리처리에 의한 들깨박의 항산화능

1) 수율

들깨, 참깨, 홍화의 생박 및 볶은 후 탈지한 박에 Deerland Cellulase 4000, Cellulase, β -glucosidase 의 효소를 처리 하여 수율을 측정한 결과는 다음과 같

다(Table 4-14). β -glucosidase를 처리한 홍화 생박과 Cellulase 처리를 한 볶은 홍화박이 다른 군에 비해 수율이 높게 나타났으며, 홍화의 생박, 볶은 박을 사용한 군이 다른 군에 비해 높은 수율을 나타냈고, 들깨의 수율은 매우 낮았다. 또한 각 종자박별로 β -glucosidase처리를 했을 때 높은 수율을 나타내는 경향을 보였다.

Table 4-14. Yield after enzyme treatments. (%)

	RDP ¹⁾	LDP ²⁾	RDS ³⁾	LDS ⁴⁾	RDSF ⁵⁾	LDSF ⁶⁾
Deerland Cellulase 4000	0.011	0.012	0.016	0.013	0.013	0.019
Cellulase	0.017	0.005	0.014	0.011	0.012	0.033
β -glucosidase	0.004	0.016	0.014	0.028	0.032	0.016

¹⁾ RDP : Roasting defatted perilla, ²⁾ LDP : Law defatted perilla

³⁾ RDS : Roasting defatted sesame, ⁴⁾ LDS : Law defatted sesame

⁵⁾ RDSF : Roasting defatted safflower, ⁶⁾ LDSF : Law defatted safflower

2) 효소, 산·알칼리처리에 의한 들깨박 추출물의 총 페놀함량

효소, 산·알칼리 처리를 한 들깨박 추출물의 총 페놀 함량은 다음과 같다(Fig. 4-21). Control을 제외한 모든 군에서 들깨 생박이 높은 페놀함량을 보였다. 볶은 들깨박은 β -glucosidase 0.429% > cellulase 0.389 % > deerland cellulase 0.355% > acid 0.11%를 나타내었고, 들깨 생박은 deerland cellulase 0.454% > cellulase 0.426%, > β -glucosidase 0.413% > acid 0.10%의 함량을 보였으며, 알칼리 처리를 한 군에서는 '0'에 가까운 결과를 보였다. 이로 보아, 무처리 군에서는 볶은 박이 높은 페놀함량을 보이거나, 효소처리를 할 경우 (생박 : deerland cellulase, β -glucosidase, 볶은 박 : β -glucosidase) β -glucosidase로 처리하였을 때 더 높은 페놀 함량을 나타냄을 알 수 있다.

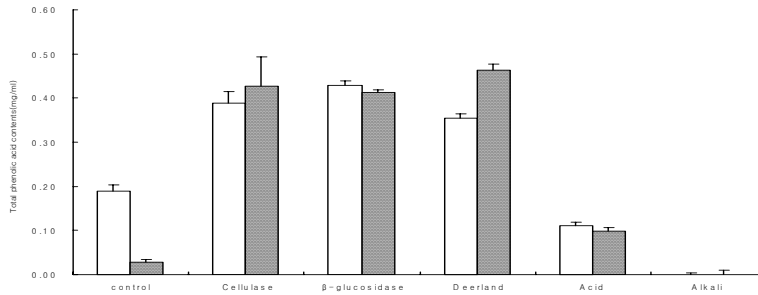


Fig 4-21. Total phenolic acids contents of extracts after enzyme treatment (Each value is mean±SD of experimental group, □ RDP : roasted defatted perilla, ▨ LDP : law defatted perilla)

3) 효소, 산·알칼리처리에 의한 들깨박 추출물의 전자공여능

여러 처리를 하였을 경우, 들깨박 추출물의 전자공여능은 효소처리를 하지 않은 군에 비해 효소처리를 한 군의 전자공여능이 더 높게 나타났다(Fig. 4-22). 생박의 경우, β-glucosidase 33.32 % > cellulase 22.21 % > deerland cellulase 19.50 % , 볶은 박의 경우 β-glucosidase 23.85 % > cellulase 19.73 % > deerland cellulase 17.51 % 의 순으로 높은 전자 공여능을 보였다. 같은 조건에서 측정된 BHT, quercetin, tannic acid는 59.49%, 64.70%, 66.14%의 전자공여능을 보이며, 이와 비교해 볼 때 β-glucosidase로 처리 하였을 때 처리를 하지 않았을때보다 높은 전자 공여능을 보였으나, 각 물질들이 갖은 활성은 그리 크지 않은 것으로 나타났다.

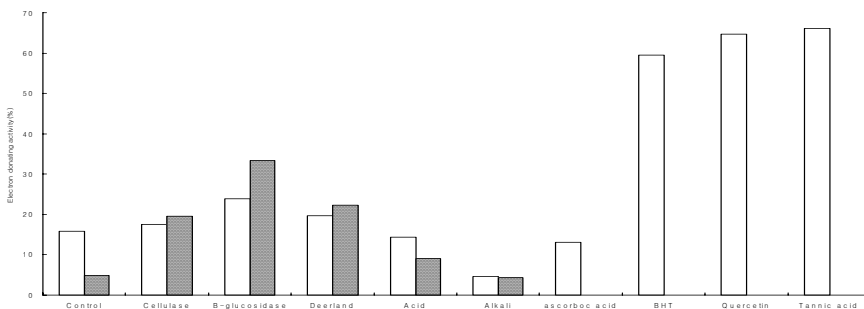


Fig. 4-22. Electron donating ability of extracts after enzyme treatment

4) 효소, 산·알칼리처리에 의한 들깨박 추출물의 SOD 유사활성

여러 처리를 한 들깨박 추출물의 SOD 유사활성을 측정한 결과는 Fig. 29와 같다. 산·알칼리 처리를 한 군에서는 다른 항산화 테스트에서와 마찬가지로 다른 처리를 한 군에 비해 낮은 활성도를 보였다. 산처리를 한 볶은 들깨박은 0%의 활성을 보인 반면, 생박은 51.33%를 보였다. 무처리한 군은 볶은 들깨박이 71.09%, 생박은 85.63%으로 quercetin, chlorogenic (80.30%, 81.60%)와 비슷한 SOD 유사 활성을 보였다.

5) 효소, 산·알칼리처리에 의한 들깨박 추출물의 과산화 지질 억제능 및 hydroxyl radical 소거능

Lecithin을 이용하여 과산화지질 억제능을 살펴 본 결과(Fig. 4-23), 알칼리 처리군과 β -glucosidase을 제외하고, 볶은 들깨박에 비해 들깨 생박이 더 높은 억제능을 나타냈으며, 또한 실험군 대부분이 50%이상의 과산화지질 억제능을 나타냈다. Hydroxyl radical 소거능을 살펴본 결과(Fig. 4-24), 항산화성이 강한 BHT는 45.92%의 활성을 나타냈으나, 알칼리 처리 한 군을 제외하고 모든 군에서 80% 이상의 높은 활성을 나타냈다. 이 결과, 효소, 산, 알칼리 처리를 한 들깨박의 항산화활성은 산과 알칼리에 의한 처리보다 효소처리 한 군 특히 β -glucosidase 처리 한 군에서 높은 활성도를 보였으며, 효소처리를 하지 않은 군과 달리, 들깨 생박에서 볶은박 보다 높은 활성을 나타냈다.

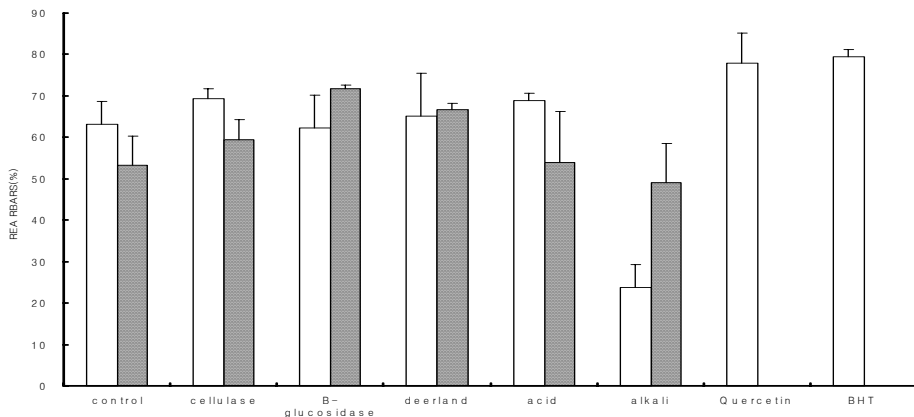


Fig. 4-23. Reactive antioxidative effect of LDP and RDP on the peroxidation of egg yolk lecithin (\square RDP : roasted defatted perilla, \square LDP : law defatted perilla)

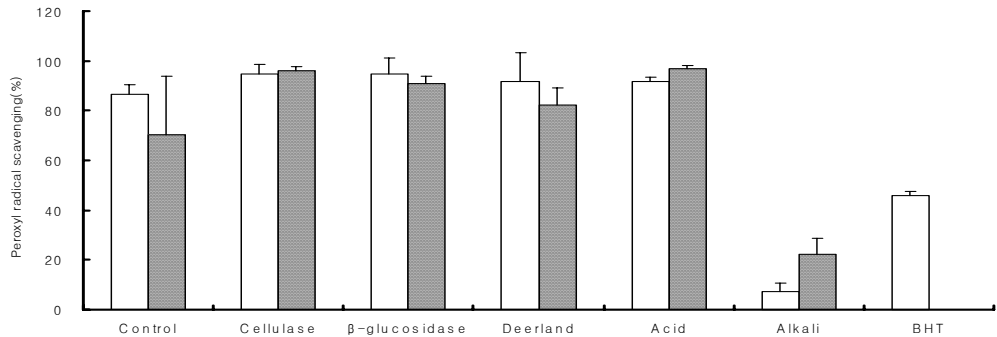


Fig 4-24. Reactive antioxidative effect of LDP and RDP on the peroxidation by ABTS method.

나. 효소처리 및 산·알칼리처리에 의한 참깨박의 항산화능

1) 효소처리, 산·알칼리 처리를 한 참깨박의 총 페놀함량

참깨박에 효소를 처리 하였을 경우, 처리하지 않은 군에 비해서 높은 페놀 함량을 나타냈고, 볶은 참깨박에 비해 참깨 생박에 페놀성 화합물의 양이 높게 나타났다. 들깨에서 β-glucosidase 처리 군의 페놀 함량이 높게 나타났던 것과는 달리, deerland cellulase를 첨가한 군에서 페놀성 화합물의 양이 증가한 것으로 나타났다. 또 산이나 알카리를 처리했을 경우에는 페놀함량이 0 mg/mL에 가깝게 나타났다(Fig 4-25).

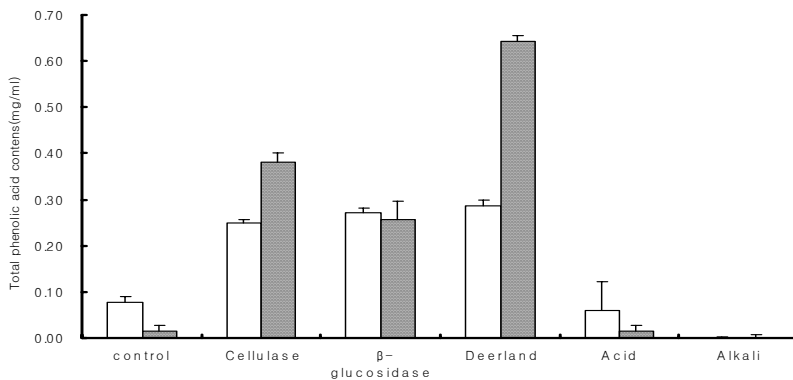


Fig. 4-25. Total phenolic acids contents of defatted sesame seed by enzymatic treatment.

2) 효소처리, 산·알칼리 처리를 한 참깨박의 전자공여능

참깨박에 여러 가지 처리를 하여 전자공여능을 살펴본 결과 모든 군에서 낮은 전자공여능을 나타냈다. 그 중 deerland cellulase 로 처리한 군이 높은 경향을 보였으나, 30% 이하의 활성을 보였다. (Fig. 4-26)

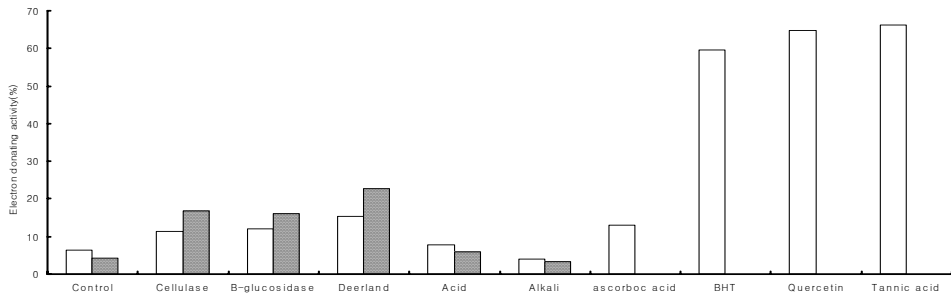


Fig. 4-26. Electron donating ability of defatted sesame seed by enzymatic treatment.

3) 효소처리, 산·알칼리 처리를 한 참깨박의 SOD 유사활성

효소처리, 산·알칼리 처리를 한 참깨박의 SOD 유사활성은 Fig 4-27과 같다. 다른 항산화실험과는 달리 볶은 참깨박은 산에서 47.66%, 알칼리에서 62.42%의 활성을 나타냈으며, 참깨 생박의 무처리 군에서 44.91%의 SOD 유사활성을 나타내, 효소처리를 한 군에 비해 무처리군이, 알칼리, 산으로 처리한 군의 SOD 유사활성이 높음을 보여준다.

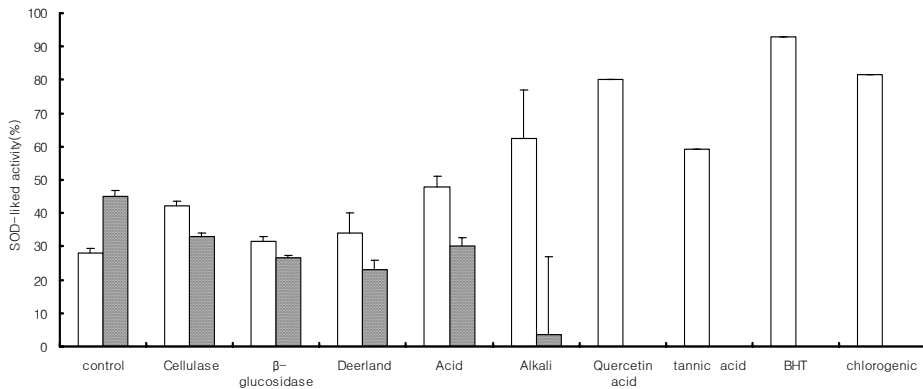


Fig. 4-27. SOD-liked activity of defatted sesame seed by enzymatic treatment.

4) 효소, 산·알칼리처리에 의한 참깨박 추출물의 과산화 지질 억제능 및 hydroxyl radical 소거능

Lecithin을 이용하여 과산화지질 억제능을 살펴 본 결과(Fig. 4-28), 참깨 생박의 산처리 군에서 76.27%의 높은 과산화지질 억제능을 나타냈고, deerland cellulase 처리 군에서 또한 참깨 생박에서 62.12%의 억제능을 보였고 강한 항산화능을 갖는 quercetin은 77.96%, BHT는 79.33%의 억제능을 보였으며, 볶은 참깨박의 무처리 군에서 63.04%의 활성을 보였다. 또한 참깨의 생박은 무처리 군을 제외하고 50%이상의 과산화지질 억제능을 나타냈다.

Hydroxly radical 소거능을 살펴본 결과(Fig.4-29), 항산화성이 강한 BHT는 45.92%의 활성을 나타냈으나, 알칼리 처리군은 BHT와 비슷한 소거능을 보였으며, 산 처리 한 군은 50%의 소거능을 기타 다른 군들은 90%에 가까운 활성산소 소거능을 나타내, 효소의 작용으로 인한 hydroxly radical 소거능이 증가되었다고 할 수 있다.

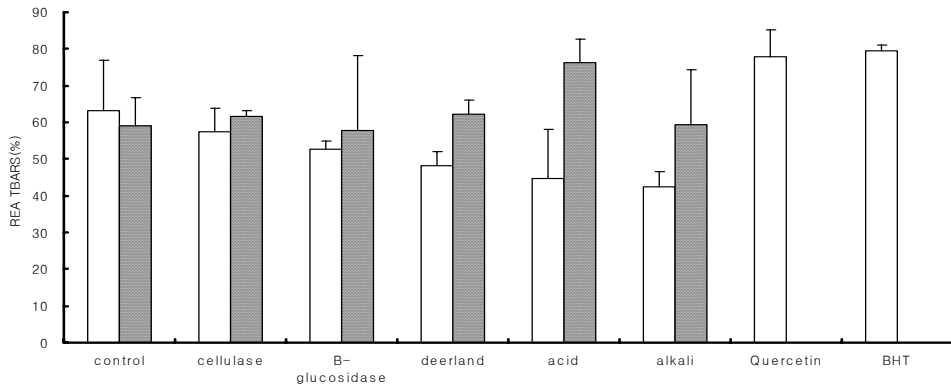


Fig. 4-28. Reactive antioxidant effect of RDS and LDS on the peroxidation of egg yolk lecithin.

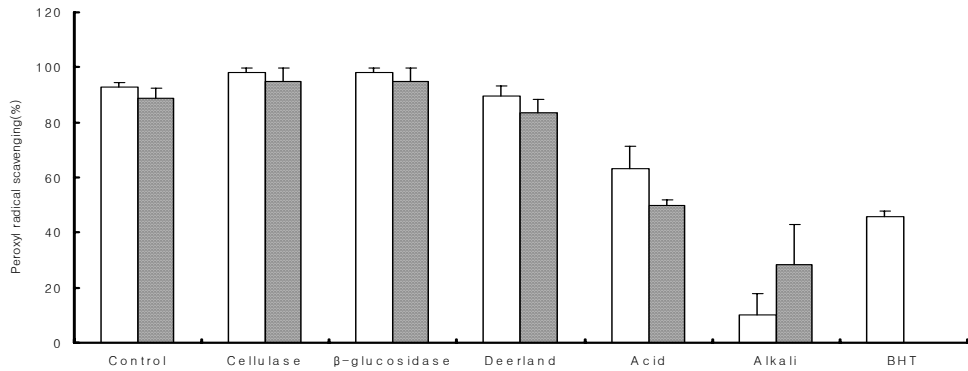


Fig. 4-29. Reactive antioxidative effect of RDS and LDS on the peroxidation by ABTS method.

다. 들깨박추출물로부터 항산화활성성분분획.

1) 각 분획별 총 페놀함량.

들깨박 추출물로부터 항산화 활성이 높은 정제된 분획을 동정하기 위해 silica gel을 이용하여 CHCl₃ : EtOH (100 : 0 - 0 : 100) 로 fraction 1부터 fraction 6 까지의 물질을 얻어 각 분획별 페놀 함량을 측정 한 결과는 Fig. 4-30 과 같다.

페놀성 화합물은 BHT(0.814mg/mL) > acetone(0.452mg/mL) > Fraction 3 (0.373mg/mL) > Fraction 1 (0.268mg/mL) > tocopherol (0.26mg/mL) > Fraction 4 (0.173mg/mL) > Fraction 2 (0.144mg/mL) > BuOH (0.14mg/mL) > H₂O (0.067mg/mL) > Fraction 5 (0.065mg/mL) > Fraction 6 (0.036mg/mL) 순으로 높은 함량을 나타냈다.

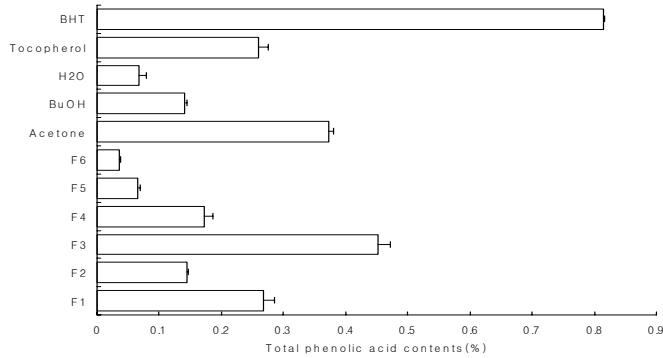


Fig . 4-30. Total phenolic acids contents of extracts purified from mult column chromatogram in perilla dreg.

2) 각 분획별 전자공여능

각 분획별 전자공여능을 다른 항산화제(BHT, tocopherol)을 대조군으로 하여 살펴본 결과는 Fig. 4-31와 같다. 전자공여능은 Fraction 3 (49.58 %) > BHT (33.56%) > acetone (33.60%) > Fraction 4 (30.42%) > Fraction 2 (28.36%) > Fraction 1 (27.45%) > tocopherol (27.56%) > BuOH (21.05%) > H₂O (20.00%) > Fraction 6 (14.10%) > Fraction 5 (10.60%) 순으로 높게 나타났다으며, 페놀함량이 높았던 Fraction 3에서 높게 측정 되었다.

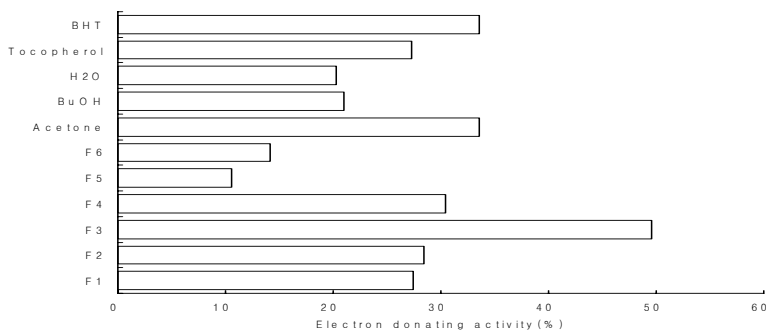


Fig. 4-31. Electron donating ability of extracts purified from mult column chromatogram in perilla dreg.

3) 각 분획별 SOD 유사 활성

Tocopherol (93.30%) > BHT (90.91%) > Fraction 3 (81.25%) > Fraction 1 (80.58%) > acetone (77.34%) > Fraction 4 (76.83%) > Fraction 2 (60.86%) > BuOH (53.47%) > Fraction 5 (47.22%) > Fraction 6 (37.71%) > H₂O (32.14%) 순으로 높은 SOD 유사활성을 나타냈다(Fig. 4-32). 총 페놀 함량이 높고, 전자 공여능이 높았던 Fraction 3과 Fraction 1에서 높은 SOD 유사활성을 갖는다는 것을 확인 할 수 있었다.

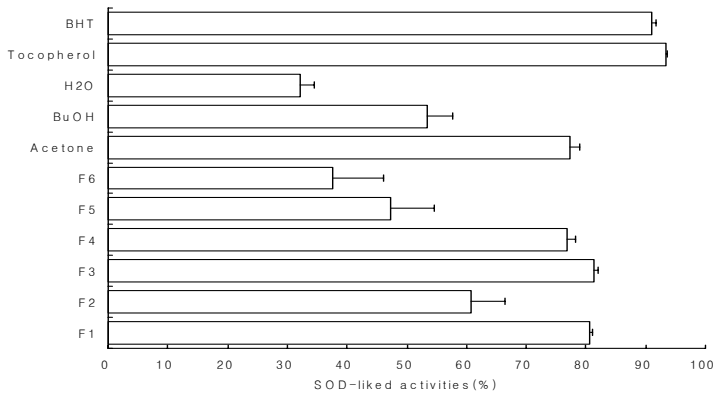


Fig. 4-32. SOD-like activities of extracts purified from multi column chromatogram in perilla dreg.

4) 각 분획별 과산화지질 생성 억제능 및 hydroxyl radical 소거능

Lecithin를 이용한 과산화지질 생성 억제능을 살펴본 결과(Fig. 4-33) BHT (90.72%) > acetone (80.93%) > Tocopherol (80.71%) > Fraction 3 (79.34%) > Fraction 4 (71.30%) > BuOH (59.75%) > H₂O (59.79%) > Fraction 1 (59.72%) > Fraction 2 (45.11%) > Fraction 6 (43.43%) > Fraction 5 (37.81%) 과산화 지질 억제능을 나타냈다. Fraction 3에서는 tocopherol과 유사한 억제능을 보였고, 페놀성 화합물의 함량이 높고, SOD 유사활성이 높았던 Fraction 4에서 또한 높은 억제능을 나타냈다.

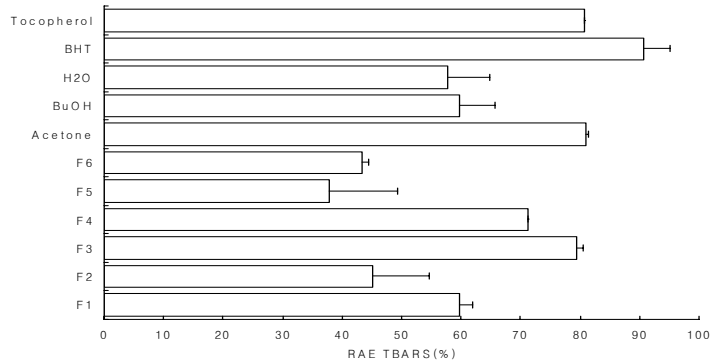


Fig. 4-33. Reactive antioxidative effect of ethanol fraction on the peroxidation of egg yolk lecithin.

3. 유효획분의 대량 분리

가. 효소처리추출물의 HPLC 분석

HPLC로 분석하였을 경우 효소를 처리 하지 않은 것에서는 sesaminol이 검출되지 않았으나 효소 중 β -glucosidase를 이용하였을 경우 sesaminol-glucosidase가 소량 감소하며 sesaminol이 소량 생성되어 짐을 확인 할 수 있었다(Table 4-15). 그 이외에 cellulase 와 deerland cellulase 4000 또한 sesaminol의 분해 능력은 없는 것으로 생각되어 지며 deerland cellulase의 경우 SG의 함량이 증가하는 것을 확인하였으며 cellulase의 경우에는 SG가 줄어 들에도 sesaminol이 생기지 않았다. 이는 우리가 모르거나 sesamol과 같이 RT가 비슷한 물질로 변했을 수도 있을 것이다.

Table 4-15. Sesaminol tri-glucosidase content of extract enzymatic and acid and alkali treatment.

	sesaminol-glucosidase(Mono+di+tri) (mg/100g)		sesaminol (mg/100g)	
	LDS	RDS	LDS	RDS
control	312.69	414.228	ND	ND
cellulase	197.09	231.378	ND	ND
deerland	340.732	466.805	ND	ND
B-glucosidase	292.93	360.73	7.612	24.369

나. HPLC분석

Fig 4-34와 35를 보면 효소를 사용한 물질에서 SG 부분에서 glucoside 부분이 떨어져 나가 SG에 없었던 새로운 피크가 생성되었음을 확인 할 수 있었으며, β -glucosidase를 사용하였을때 SG 부분이 줄어들고 sesaminol이 생성되는 것을 확인 할 수 있었다. 이로서 SG 물질을 대량 분리 할 경우 체내에서 항산화 활성이 높은 sesaminol 로의 전환 방법으로 β -glucosidase 사용이 바람 직할것이다.

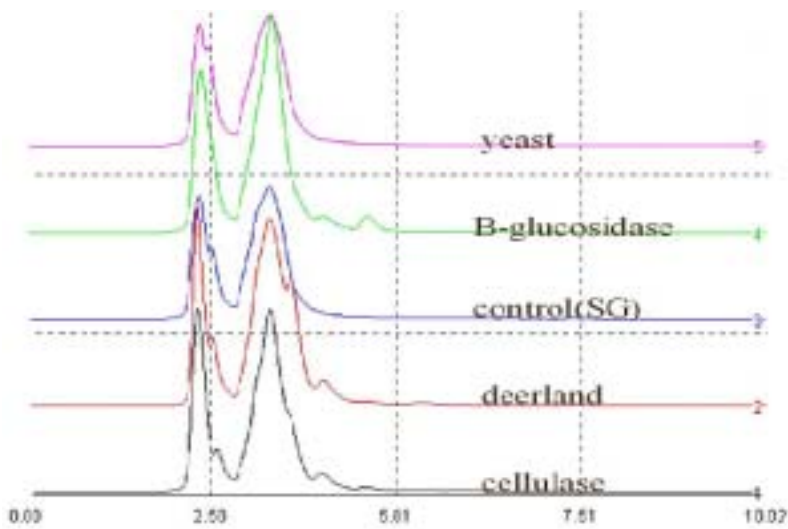


Fig. 4-34. HPLC chromatogram of extract enzymatic treatment.

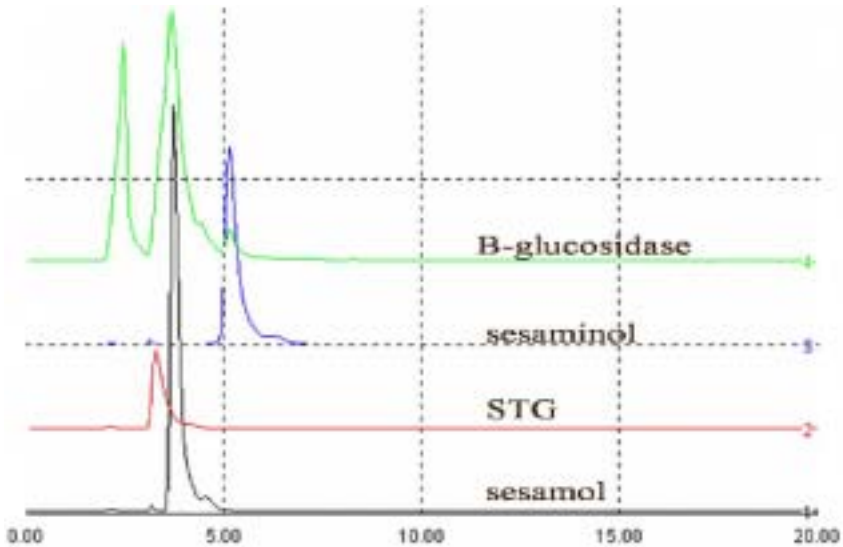


Fig.4-35. HPLC chromatogram of extracts after each enzyme treatment.

다. Sesamin과 sesamol의 대량분리 방법 확립

lignans 은 파라히드록시페닐프로판(p -Hydroxyphenylpropane)이 결합된 구조를 갖는 저분자 천연물의 총칭으로 지용성과 수용성 리그난으로 나뉘어진다. sesamin과 sesamol은 지용성 리그난으로 당류와 결합하여 배당체로 존재한다.

참깨의 주요 lignans으로 알려진 sesamin 과 sesamol의 대량분리를 위하여 20파이의 column의 적용에 의해 preparative-HPLC를 실시한 결과 Fig. 4-36에 서와 같이 peak1 이 sesamin 이며 peak2 가 sesamol 이며 두 물질 모두 20분 안쪽에서 나오기 때문에 HPLC를 통한 대량 분취가 가능할것으로 생각되어진다. 참깨 탈지박으로부터 hexane으로 용매를 달리하여 추출하고 각 hexane 추출물을 column에 적용한 결과 Fig 41과 같이 2개의 주요 peak를 분리하였다.

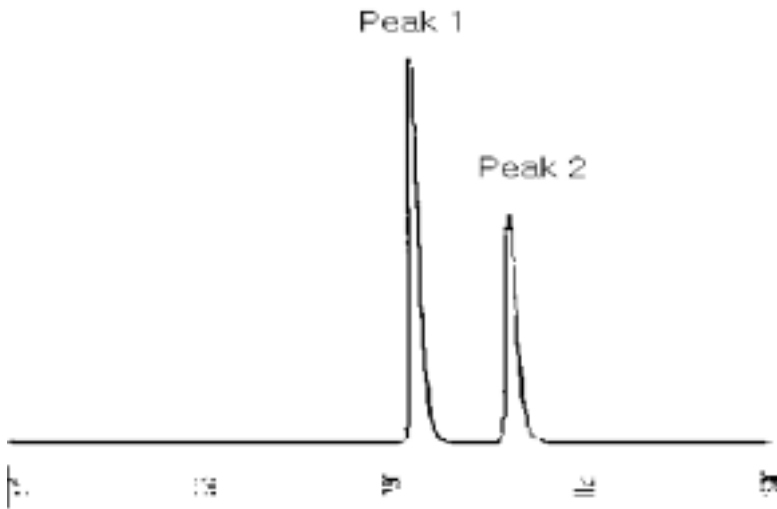


Fig. 4-36. Purification of methanol extracts from defatted sesame flour

4. 참깨박, 들깨박 함유 미지 물질 화학구조 동정 및 지표물질 설정

가. 참깨의 기기분석

항산화 활성이 높은 lignans의 구조를 $^1\text{H-NMR}$ 과 FAB-Mass로 각각의 기기분석을 한 결과는 Fig. 4-37, 38, 39, 40에 나타난 바와 같이 각각의 peak는 $^1\text{H-NMR}$ 및 FAB-MS를 측정된 결과 다음과 같이 판명되었다. (A)은 분자량이 358로 sesamin으로 (B)는 370으로 sesamol인으로 (C)은 858로서 sesaminol triglucoside, (D)는 분자량 369로서 sesaminol 로 판명 되었다.

(A)

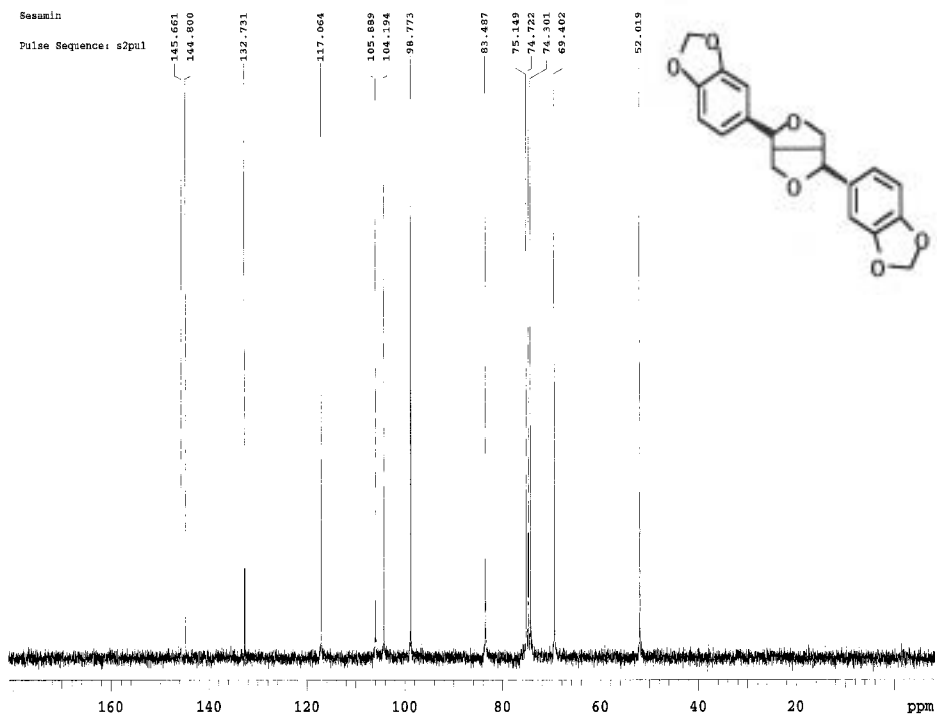


Fig. 4-37. ^1H -NMR spectrum of (A) isolated from the defatted sesame flour (in TFA-DMSO; 1:9 at 25°C)

(B)

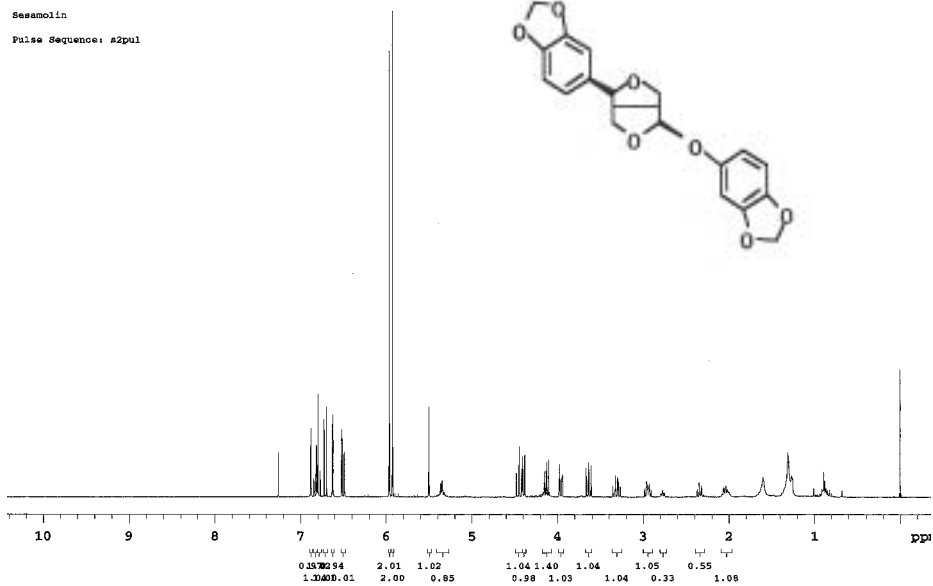


Fig. 4-38. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of (B) isolated from the defatted sesame flour (in TFA-DMSO; 1:9 at 25°C)

(C)

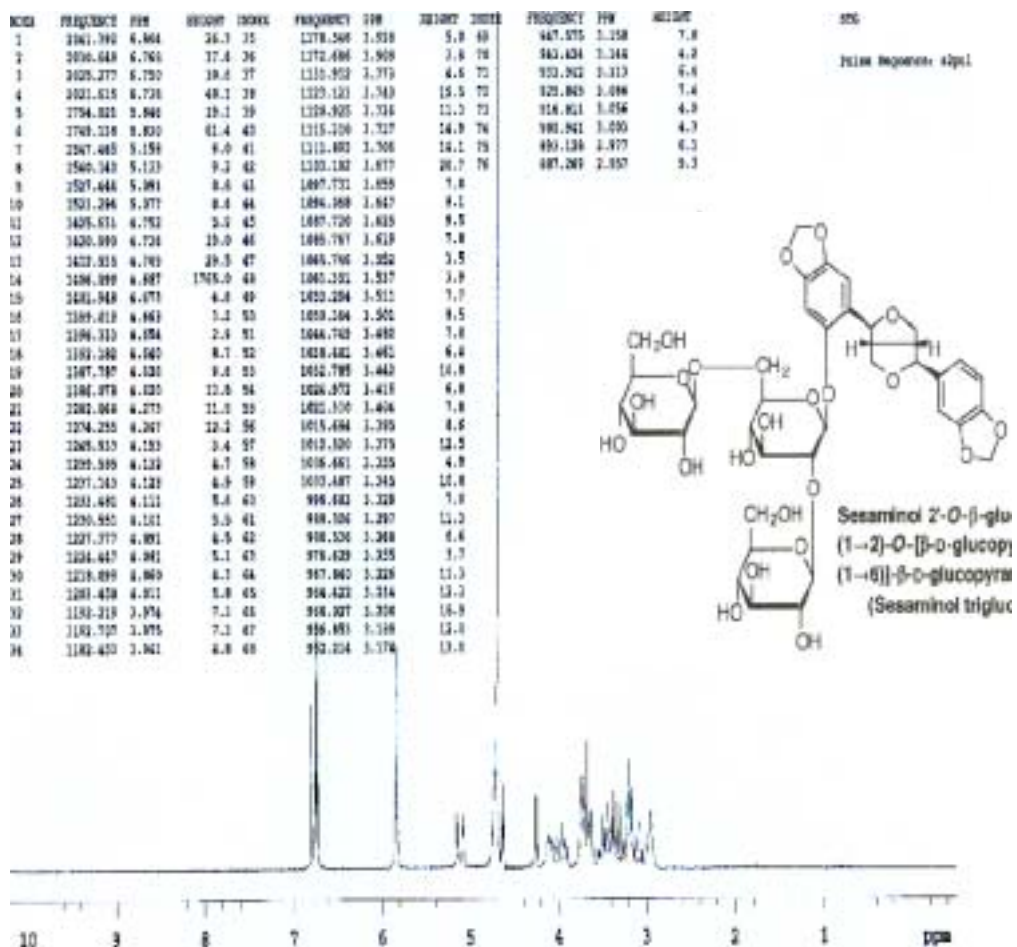


Fig. 4-39. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of (C) isolated from the defatted sesame flour (in TFA-DMSO; 1:9 at 25°C)

(D)

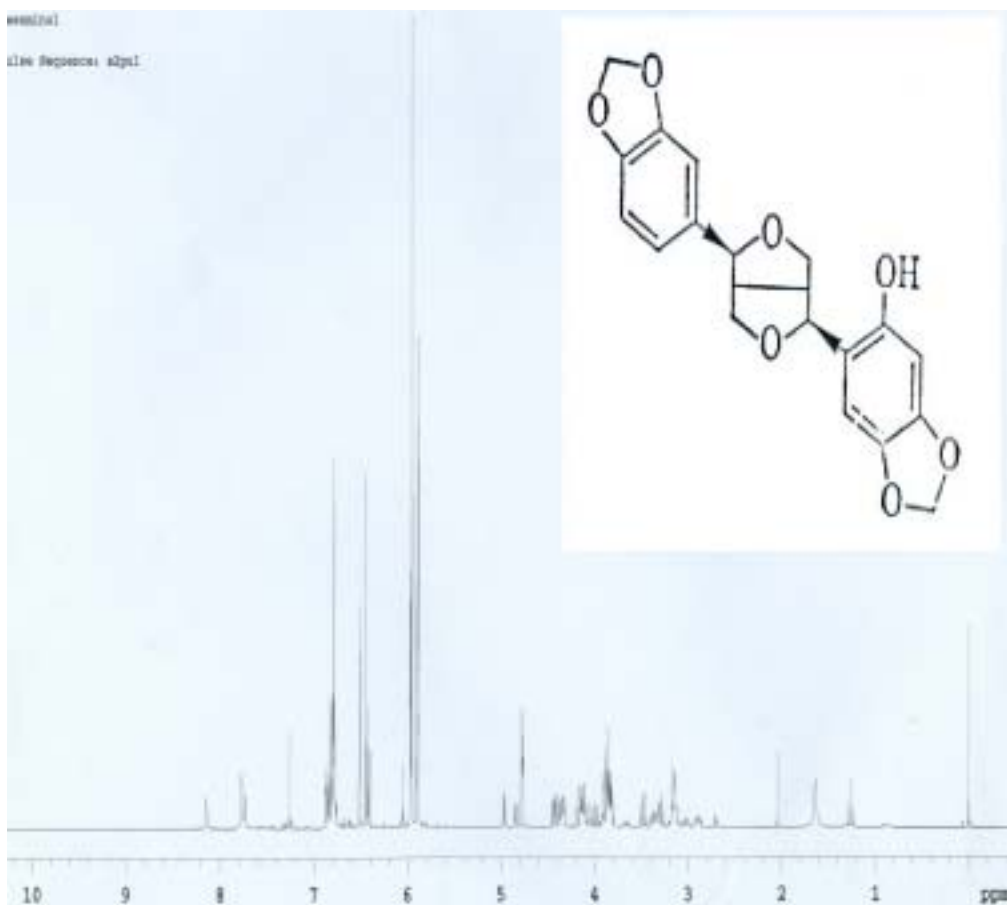


Fig . 4-40. ¹H-NMR spectrum of (D) isolated from the defatted sesame flour (in TFA-DMSO; 1:9 at 25°C)

나. 들깨박의 HPLC 분석

Fig 4-41은 역상 컬럼을 이용한 결과이고 Fig. 4-42는 순상 컬럼을 이용한 결과이다. 순상 컬럼을 이용하였을때 좀더 분리가 좋게 되었으며, TLC 결과에서 보듯이 여러 가지 물질들이 보임을 확인하였다.

또한 겹쳐 나오는 부분 이외에 여러 가지 물질이 있는 것으로 예상 되고, 이중 동그라미 친 부분은 항산화성이 가장 좋은 부분이며, 이 물질에 대한 자세한 실험은 현재 진행중이다.

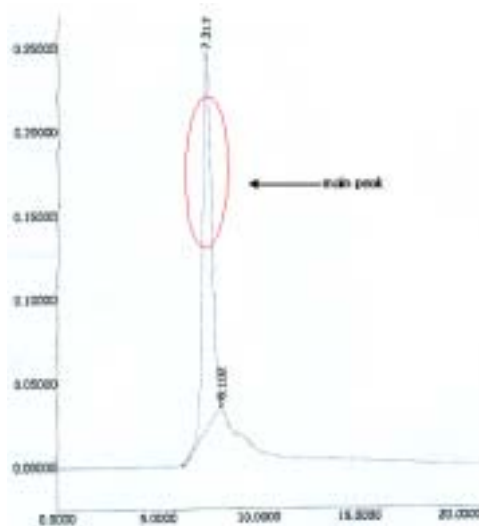


Fig. 4-41. HPLC chromatograms of isolated fraction by F3

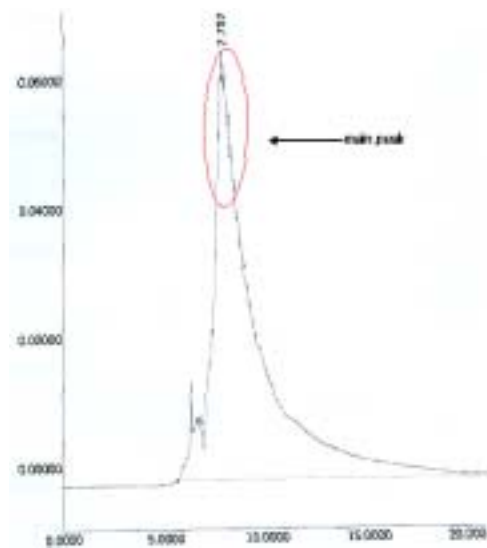


Fig. 4-42. HPLC chromatograms of isolated fraction by F3

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

<목표 달성도>

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 사 항	달성도 (전체에 대한 %)
1차년도(2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ in vitro계에서 치매예방활성 검색계 확립 ○ 각 탈지박의 치매예방활성 검색 여부 ○ 치매예방 동물실험 모델검토 여부 ○ 각 탈지박의 이화학적 특성 분석여부 ○ 탈지박으로부터 치매예방 물질의 추출조건확립 및 함량분석 	<ul style="list-style-type: none"> 10점 20점 15점 30점 25점
2차년도(2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 참깨박 성분의 in vivo 효능 검토여부 ○ 소재의 노인용유동식 개발여부 ○ 소재의 노인용빵 개발여부 ○ 고효성 미지물질의 화학구조 동정여부 	<ul style="list-style-type: none"> 50점 15점 15점 20점
3차년도(2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물실험의 수행여부 ○ 소재의 이용도 증진시험 ○ 노인용 음료 개발여부 ○ 치매예방소재의 대량추출공정 확립여부 ○ 학술지 논문발표 실적 	<ul style="list-style-type: none"> 35점 15점 15점 25점 10점
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 치매예방성 식품소재의 개발 여부 ○ 효능을 과학적으로 입증했는지의 여부 ○ 노인식개발여부 ○ 경제성 및 실용화 가능성 	<ul style="list-style-type: none"> 30점 30점 30점 10점

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

1. 연구개발 결과

본 연구과제의 수행결과 주요성과물로서는 5편의 학술발표와 3편의 논문을 투고, 게재하였고 1편의 특허를 출원하여 국내 기술력을 확보하였으며 5종의 노인용 식품을 개발하였다. 그 자세한 내용은 다음과 같다.

가. 학술발표

1) 엄민영, 최원희, 안지윤, 김성란, 강명화, 하태열, 노화촉진마우스(SAM)의 체내 지질 과산화물과 항산화 효소 활성화에 미치는 sesaminol glucosides의 영향
2003년 한국식품과학회 제70차 학술대회

2) Sung Ran Kim, Min Young Um, Ji Yun Ahn, Jin Tae Hong and Tae Youl Ha, the protective effects of sesaminol glycosides against cognitive deficits and oxidative stress induced by beta-amyloid protein in mice. 3rd ICoFF 2003.

3) 이주철, 강명화, 하태열, 생·볶은 참깨박의 효소, 산 및 알카리처리 추출물의 항산화 효과, 2003년 한국식품과학회 제70차 학술대회 p124

4) 이주철, 강명화, 하태열, 생·볶은 들깨박의 효소, 산 및 알카리처리 추출물의 항산화 효과, 2003년 한국식품과학회 제70차 학술대회 p124

5) 이주철, 이지혜, 하태열, 강명화, 볶은 들깨박으로부터 항산화 활성성분의 분획, 2004년 한국식품과학회 제 71차 학술대회 p292

나. 논문 게재 및 투고

1) Myung-Hwa Kang, Jea-Seong Choi and Tae-Youl HA: Chemical Properties of Sesame Seed Cultivated in Korea and ChinaFood Sci. Biotechnol. Vol. 12. No. 6. pp. 621~624 (2003)

2) 엄민영, 최원희, 안지윤, 김성란, 하태열: 노화촉진마우스에 있어서 참깨박 및 들깨박의 메탄올 추출물이 인지기능 및 항산화능에 미치는 영향, 한국식품과학회지, 36(4), (2004)

3) 엄민영, 최원희, 안지윤, 김성란, 하태열: 노화촉진마우스에 있어서 참깨박 및 들깨박의 메탄올 추출물이 인지기능 및 항산화능에 미치는 영향, 한국식품과학회지, (2004)- 심사중

다. 특허출원

- 들깨박 추출물을 유효성분으로 하는 인지기능 장애 예방 및 개선용 조성물
출원일자: 2004년 8월 5일
출원번호: 10-2004-0061781

2. 활용 계획

- 본 연구결과 축적된 치매예방 또는 개선능을 평가하는 기술은 향후 관련 연구의 도출 및 연구수행에 크게 활용 될 것으로 보인다.
- 탈지박으로 치매예방 또는 개선능을 확인함으로써 탈지박의 부가가치가 증대 될 뿐만 아니라 우리나라 유지자원의 식품학적 기초자료로서도 활용될 것이다
- 또한 본 연구 결과 얻어진 유동식을 비롯한 노인용 식품개발 기술은 관련업체에 기술이전을 통하여 제품의 생산 및 산업화에 적극 활용할 계획이다.

제 6 장 수집된 해외과학기술정보

본 장에서는 본 연구 결과인 노인식의 향후 산업화에 도움이 되고자, 세계 장수국의 하나인 일본, 일본 중에서도 가장 장수지역으로 알려져 있는 오키나와를 방문하여 그들의 식생활 특징 및 특유의 식품소재를 조사하였으며 그 일부를 소개하면 다음과 같다.

오키나와는 일본 본토와 대만 사이에 약 800마일에 걸쳐 뻗어있는 군도로서 161개의 크고 작은 섬들로 구성되어 있는 세계적으로 유명한 장수지역이다. 이 지역의 사망률을 세계 다른 지역과 비교한 결과, 서양의 3대 질병-관상동맥 심장병, 뇌졸중, 암-에 대한 사망률이 세계에서 가장 낮은 것으로 조사되었다.

[표1-1] 인구 10만명당 사망률

등급	위치	기대수명	식습관	관상동맥심장병	암	뇌졸중	모든원인
1	오키나와	81.2	동-서양 혼합식	18	97	35	335
2	일본	79.9	아시아식	22	106	45	364
3	홍콩	79.1	아시아식	40	126	40	393
4	스웨덴	79.0	북유럽식	102	108	38	435
8	이탈리아	78.3	지중해식	55	135	49	459
10	그리스	78.1	지중해식	55	109	70	449
18	미국	76.8	미국식	100	132	28	520

* 기대수명 : 평균 기대 수명 세계 등급 (Average life expectancy world rank)

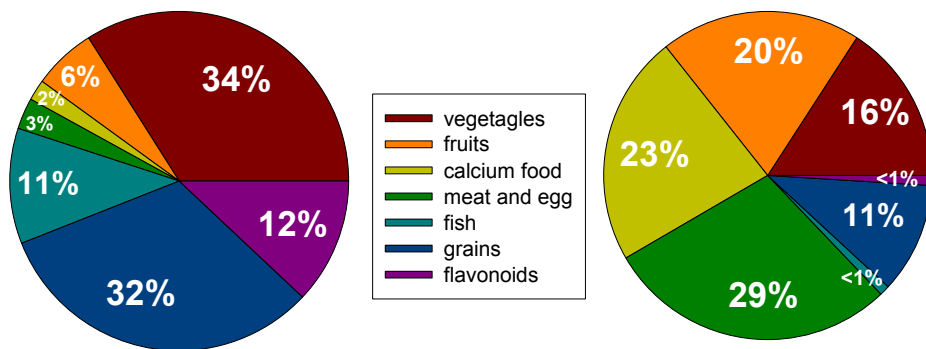
자료 : WHO 1996, 일본 후생성 1996

이러한 오키나와의 장수 원인에 대한 연구 조사 결과, 식생활, 운동습관, 스트레스를 줄이는 정신심리학적 관점 및 생활관습의 결합이 노화진행을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과를 바탕으로 수세기 동안 내려오는 전통과 지혜에 기초를 둔 건강과 생명에 대한 독특한 접근 방식으로 오키나와 주민들의 일상 음식, 운동습관, 생활관습 등을 오키나와 프로그램으로 제안되었다. 본 프로그램은 25년간에 걸친 '100세 이상 노인 연구'의 수행 결과를 종합하여 오키나와의 식생활 및 운동습관을 현대인에게 적용키 위한 것이다. 여기서는 단지 오키

나와의 식생활의 적용만으로도 장수에 큰 효과가 기대된다고 보고하고 있다.. 정제되지 않은 탄수화물에 들어 있는 저칼로리 야채 중심의 식단은 미국 국립 암 연구소와 여러 의학 관련 단체들의 추천 기준을 채우고도 남으며 관상동맥 심장병, 암, 뇌졸중을 포함한 노화와 관련된 대부분의 질병을 예방할 수 있다. 운동 측면에 있어서도 미국인의 경우 40% 이하의 인구만이 운동을 하는 것에 비해 오키나와 사람은 운동들은 운동이 삶의 방식이며 무술, 전통춤 및 걷기를 통해 건강의 요소를 채우고 있다.

오키나와 프로그램의 또 다른 장점은 고대 동양의 전통과 서양의 현대 치료법을 결합시킨 데 있다. 그것은 질병 통제와 위험 감소를 위해 현대 서양의 전략을 사용함과 동시에 약초 요법과 정신적 치료 같은 동양의 고대 치료 전통을 결합하고 있다.

1. 오키나와 식단의 특징



Okinawa seniles

American seniles

❖ Okinawa dietary data from Okinawa Centenarian Study database; U. S. dietary data from the U.S. cohort of the Seven Countries Study from Keys, A. 1980. Seven Countries: A Commonwealth Fund Book. Boston: Harvard University Press.

1) '야채'위주의 다양한 음식

오키나와의 100세 이상 노인들은 약초를 포함하여 총 206종류의 음식을 먹는 것으로 조사되었다. 정기적으로 38종류의 각각 다른 음식이 소비되었으며, 하루

에 평균 18종류의 음식을 먹었다. 음식의 78%는 ‘야채’이었다. 그 양도 많을뿐더러 종류 또한 다양하다.

2) 최소한 하루에 5 serving 이상의 야채와 과일을 섭취

오키나와의 노인들은 적어도 매일 7종류 이상의 야채와 과일, 2종 이상의 콩류를 섭취한다.야채, 감자, 콩류는 가장 즐겨 먹는 음식이다.

3) 곡물 섭취

하루에 적어도 3 serving의 쌀밥을 먹고, 메밀국수와 우동을 즐긴다.

4) 복합탄수화물을 식단의 기초로 삼고 저당식

전통적으로 80% 이상의 칼로리를 주로 고구마를 통해 탄수화물 형태로 섭취했다. 단당은 거의 먹지 않고 설탕을 사용할 때도 사탕수수에서 추출한 가공하지 않은 것을 사용한다.

5) 저지방 섭취

오키나와에서는 전체 칼로리의 24% 가량을 지방으로 섭취하며 모노 불포화지방은 12%, 폴리불포화지방은 5%, 포화지방은 전체 칼로리의 7%를 차지한다.

6) 저염식

오키나와는 일일 6g의 식염 섭취로 12g 이상을 먹는 본토 일본인들 보다 훨씬 적은 양이다.

2. Okinawa's healing herbs and foods

오키나와의 natural herb와 약물의 건강 및 장수에 대한 효능이 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만, 이러한 것들이 유용한 작용을 하였다는 것은 확실하다. 또 최근 오키나와에서 섭취되는 허브와 약초들이 강한 항산화력과 phytoestrogen의 효능을 지닌다는 것이 증명되고 있다. WHO의 보고에 의하면 세계 인구의 85% 이상이 식물을 약초로 사용하고 중국, 타일랜드, 멕시코, 나이지리아, 일본, 독일 및 프랑스에서는 자신들의 전통의학을 주요보건의료수단으로 채택하고 있

다. 열대 다운림 지역의 매우 다양한 식물들에 대한 연구가 여러 제약 회사와



NIH와 같은 국가 기관에서 이루어지고 있으며 몇몇 흥미로운 결과들이 이미 보고되었다. Havard Univ.의 식물학 연구팀은 말레이시아의 열대 우림지역인 Sarawak에서 Calophyllum lanigerum의 잎, 수피, 가지를 채취하여 연구한 결과 나무의 calanolide A라는 신물질이 AIDS에 효과가 있는 것을 밝혀내 현재 임상 연구가 진행중에 있다.

오키나와는 세계 다른지역에서는 찾을 수 없는 여러 종의 식물의 보고로 이 때문에 동방의 갈라파고스라 불리운다. 오키나와의 160개 섬은 일본 본토의 같은 땅의 45배나 되는 식물들이 생육하고 있다. 이 섬들에는 고온다습한 아열대 기후에서만 번성하는 특이한 식물군이 밀집해 있기 때문에 '동양의 갈라파고스'라고도 불린다. 섭씨 38도의 온화한 기후와 풍부한 강우량은 동식물에게 완벽한 생육지를 제공한다. 이러 사실은 오키나와에서 풀을 신체의 주요한 식품 공급원으로 삼았던 중요한 근거가 된다.

오키나와에서의 연구는 전통적으로 사용되었던 많은 약용식물과 음식들이 그들의 치유력을 극대화시킨것을 보여준다. 다음은 오키나와 사람들의 장수에 중요한 작용을 한 식품의약과 치료약초이다. 수십년간에 걸쳐 섭취된 많은 약초와 식품이 오키나와의 장수에 큰 기여를 하였으며 연구결과 공통적으로 가지고 있는 성분들이 이러한 효과에 관련이 있는 것으로 사료되었다. 높은 flavonoid content는 강력한 항산화력과 phytoestrogen 효능을 지니며 비타민과 미네랄 수치가 높은 것이 특징이다.

1. 강황 (*Curcuma longa*, Tumeric)



강황은 오키나와에서 가장 즐겨 이용되는 허브로 여러 생리활성 작용이 있음이 보고되고 있다. 오키나와에서는 이 강황을 음식, 상처 치유제, 차 또는 건강식품으로 이용한다.

강황은 생강과로 식물의 줄기 부분이 식품과 약에 주로 사용되는 부분으로 특유의 누런색을 띤다. 강황은 수세기전 인도로부터 류큐왕조로 전해진 것으로 보인다. 서양에서 강황은 면역 강화 작용, 관절염 같은 염증 완화, 소화 증진, 구충 작용, 여성 생식작용 개선, 담석 해리 등

의 약리 활성등이 알려져 있다. 강황은 주요 생리활성 성분인 curcumin은 tumerone, atlantone, zingiberone 및 heptanoid 등으로 구성되며 이 외에도 단백질, 당, 레진, 비타민, 미네랄이 풍부하다.

강황은 강력한 항산화력에 의한 암의 1, 2, 3 단계 모두에 억제 작용이 있으며 이는 시험관내 및 임상실험 결과 증명되었다. 미국 암연구협회에 의하면 강황은 구강암, 식도암, 위암, 대장암 등 소화기계 관련 암에 탁월한 효과가 있으며 유방암과 피부암에도 효능이 있다. 암외에도 담석의 예방과 치료에도 좋은 것으로 보인다. 강황은 담석 생성의 한 원인인 콜레스테롤 흡수를 억제하며 담낭의 염증과 관련된 세균의 번식을 막는다. 이러한 항균 작용은 바이러스에까지 확대된다. HIV 바이러스에 대한 강력한 억제작용이 하버드 대학 연구팀에 의해 보고되었다. 놀랍게도 강황은 AIDS 환자에 있어서 CD4 치를 증가시켜 HIV 바이러스에 대한 강력한 억제작용을 보이며 간염 바이러스도 강황에 약한 것으로 나타났다. 강황의 구충 작용은 수세기동안 상처치유에 적용된 이유 중 하나가 될 수 있다. 또한 항통증과 항염 작용도 보고되었다. 강황은 비스테로이드성 항염제 (NSAIDs)정도의 항염 작용을 가진 것으로 연구결과 나타나 류마티스 관절염, 골관절염, 수술후 통증 등을 치료하는데 유용하다.

이외에도 염증을 억제하는 부신피질호르몬의 체내 배출 속도를 억제하며 NSAID 투여시 나타나는 위장 출혈에 대해 보호작용을 지닌다. 강황은 또한 COX-2 inhibitor인 신약과도 관련이 있다. COX-2 inhibitor 류 약들은 NSAID와 같은 정도의 항염작용이 있으나 위장출혈이 훨씬 적다. 강황은 이러한 COX-2 inhibitor들을 대신할 수 있을 것으로 예상된다.

2. 고야 (Momordica charantia, 곱어)

고야는 북미에는 쓴맛의 메론 (bitter melon)으로 알려져 있으며 실제로도 쓴맛을 가지고 있고 'Momordica' 라틴어도 '쓰다'는 뜻을 지니고 있다. 그러나 이 고야로 오키나와 전통요리인 '고야 찬폴'을 만들면 그 맛은 일품이다.

메론과인 고야는 류큐왕조와 중국 명 만주 제국과의 무역교류로 중국에서 들어온 것으로 여겨지며 처음 문헌에 언급된것은 1713년 이지만, 실제 식품원료로서 사용하게 된 것은 600년 정도 전으로 사료된다. 중국에도 친리치, 구파, 쿠구아



등의 이름으로 불리우는 것이 있으나 오키나와의 고야보다 덜 쓴맛을 가지고 있다. 고야는 캐비어 처럼 먹으면 먹을수록 맛이 좋아지는 특징을 지니고 있다. 고야는 두부, 계란, 케놀라유와 함께 볶음요리로 이용되며 이러한 조합은 고야 특유의 쓴맛을 없애는 경향이 있다. 전통적으로 인도와 스리랑카에서는 고야가 류마티스, 당뇨병 뿐 아니라 강장제, 최토제, 하제로 사용되었다. 중앙 및 남아메리카에서는 과육이나 차 형태로 감기, 열, 복통, 변비와 당뇨병을 치료하는데 이용되었다. 중국과 오키나와에서는 과육, 씨, 덩굴, 줄기, 잎이 위장관질환을 치료하는데 사용되었고 그 밖에 열, 바이러스 감염 및 치통에도 이용되었다. 당뇨병, 암, 류마티즘, 통풍과 비장 및 간장장애와 같은 만성질환에도 고야가 사용되었다.

고야의 쓴맛은 triterpine류인 curcubitacin 때문이며 항암 작용이 있는 phytochemical이다. 임상연구결과 고야는 당뇨병 환자에서 혈당을 낮추는 효과가 있음이 증명되었다. 또한 다양한 생리활성이 보고되었는데, 시험관내 시험결과 AIDS 바이러스에 대해 유용한 효능이 있음이 보고되었다. 고야씨에 존재하는 단백질이 허피스와 폴리오 바이러스의 생육을 억제하는 것이 밝혀졌다. 뿌리와 잎의 추출물은 여성의 비뇨기계 감염의 주요 원인인 E.coli 성장을 억제하는 것도 알려졌다. 항암 작용 또한 고야에 존재하는 항암 단백질에 의한 것임이 밝혀졌다. 또 녹내장과 치질에도 효능이 있음이 보고되었다. 또 다른 연구는 고야가 식용자극 효과가 있음을 보고하였다.

고야는 다른 녹색 채소와 같이 비타민 C가 풍부하고 특히하게 강한불에 조리 시에도 비타민의 손실이 크지 않으며 이러한 고야를 비롯한 다양한 녹색 채소를 많이 섭취하는 것이 오키나와 사람들이 다른 일본인에 비해 비타민C의 섭취가 많다는 연구결과의 한 원인이 될 수 있을 것이다.

3. Hechima (Luffa cylindrica, ナーペラー or vegetable sponge)



오кина와의 음식에서 많이 사용되고 있는 나베라는 고야와 달리 쓰지 않고 서양 호박처럼 단맛을 내고 입에서 살살 녹는 조직감을 가지고 있는 채소이다. 오кина와에서는 미소사케 소스의 두부와 같이 먹는다. 또 칼로리가 적어 한 컵의 잘게 썬 분량의 나베라는 20칼로리 정도이며 12mg의 비타민 C, 28mg의 엽산과 많은 carotenoid 및 생리활성을 나타내는 단백질 등을 포함하고 있다. 나베라는 오кина와에 350년전에 소개되었다. 본토 일본인들은 나베라를 많이 섭취하지 않으며 식용보다는 수세미로서 더 많이 사용한다. 항암작용과 면역증강작용이 있다고 알려져 있다. 추출물에는 8종 이상의 단백질이 포함되어 있으며 이들은 항암, 항균, 항-AIDS 외에 면역증강작용이 있음이 보고되었다.

4. Huchiba (*Artemisia vulgaris*)

위경련시 오кина와에서는 쑥으로 통증을 완화시켜 왔다. 전통적으로 오кина와에서 위장 질환을 치료하는 데 사용되어왔다. 이 외에도 간장작용 또한 보고되었다. 전통적으로 쑥은 천식, 기관지염, 감기, 발열, 두통, 생리통, 통풍, 간질, 담석, 위염, 결핵, 피부암, 상처 치유 등에 사용되었다. 쑥의 뿌리는 중국에서 신경증, 우울, 과민, 기민, 불면증, 불안 등을 치료하는데 사용되었다. 최근 많은 연구가 행해져 왔으며 이는 전통적 사용이 옳았음을 어느정도 증명하였다. 쑥은 쥐에서 알콜 투여로 인한 위장 손상을 억제하였고 말라리아 치료에도 효과를 나타내었다. 성분 중 terpene과 flavonoid류가 생리활성을 나타내는 것으로 보인다.

5. 두부

오кина와 사람들은 세계 다른 어떤 지역의 사람들보다 두부를 많이 섭취하여 하루 콩관련 제품 섭취량은 일인당 3 온스 정도이다. 오кина와 사람들은 자신들만의 특이한 두부 요리를 만들어 먹는데, 두부 땅콩 요리, 치즈 두부 등이 그 예로 류큐왕조 때 왕족만 먹을 수 있는 특별한 음식이었다. 오кина와의 두부는 본토 두부보다 단백질과 지방 함량이 높고 이는 더 풍부한 맛과 단단한 조직감

을 주며 flavonoid 함량이 높다. 두부는 심장관련 질환을 예방하며 콩의 phytoestrogen은 유방암과 전립선암에 대해 강력한 효과가 있다.

6. 적색 고구마 (Ipomoea batatas, Imo)



기록에 따르면 1605년에 오키나와 사람 소칸 노구니란 사람이 중국 옆에 위치한 후지안이란 곳에서 고구마 씨를 가져와 자신의 정원에 키우기 시작한것이 그 시초라고 한다. 당시 매년 4차례의 강력한 폭풍이 와 쌀농사를 망쳐서 기근이 심했는데, 표면이 단단하고 땅의 깊숙이 묻힌 고구마는 폭풍에도 견뎌서 오키나와인들의 생명을 지탱해줬다. 그 당시 탄수화물원의 대부분이 고구마였으므로 사람들은 노구니를 소칸왕, 고구마왕 등으로 불렀다고 한다. 전통적으로 높은 고구마 섭취량이 2차 세계대전 후 채소, 콩, 생선, 육류, 유제품 등의 섭취가 늘어남으로써 감소하였으나 아직도 오키나와인들은 적고구마를 좋아한다.

고구마와 얇은 HIV, 천식, 혈관질환, 폐경, 담석, 근육경련 등에 치료효과가 있다. 또한 관절염, 류마티스 질환에도 효능이 있다.

얇과 고구마는 다른 과지만 유사점이 많다. 둘다 카로티노이드, 사포닌, 플라보노이드, 비타민 E 등이 풍부하다. 얇은 성호르몬, 부신피질호르몬, 스테로이드 등을 조절할 수 있으며 항염작용을 지닌 호르몬양 성분 dioscin이 있다. 적고구마는 비타민 C, α -carotene이 풍부하며 특유의 붉은 색소로 인해 강력한 항산화제이며 전립선암에도 효과가 좋은 lycopene이 풍부해 오키나와인들의 혈중 lycopene 수치가 높은 것에 대한 하나의 원인이 된다.

7. 자스민차 (산빙차)



오키나와인들의 식생활 연구결과 발견한 아주 특이한 사항 중 하나는 산빙차의 섭취가 많다는 것이다. 특히 노인들은 산빙차를 주로 먹으며 일반 녹차는 거의 마시지 않는다. 산빙차는 녹차의 장점을 모두 가지면서 그 이상의 효능을 지녔다. 산빙차는 녹차잎과 자스민꽃을 섞어 만든 것으로 향이 매우 좋은 것이 그 특징

이다. ‘산빙’이란 뜻은 ‘향기를 가진 차’란 뜻으로 7-8월이 되면 오키나와와 중국 남부지방에 자스민꽃이 만발한다.

항산화제인 EGCG 는 녹차의 항산화계 중 가장 중요한 성분이다. EGCG 수치는 산화가 덜 진행될수록 높게 나타나며 녹차, 우롱차 홍차, 산빙차 모두 동백나무과인 녹차나무 (Camellia sinensis)로 만들어 졌으나 가장 산화가 덜 이루어진 산빙차의 효능은 녹차나 홍차를 능가한다. 산빙차의 flavonoid 수치는 녹차와 유사하나 lignan은 더 높다. 또 콜레스테롤 수치를 낮추며 초파리를 이용한 실험 결과 초파리의 생존기간을 증가시키는 것으로 나타났다. 차의 flavonoid는 암예방 효과가 있으며 항균작용을 통해 충치예방 효과도 있다.

8. 해조류

갈색의 해조류로 한류가 있는 홋카이도의 북쪽에서 많이 난다. 19세기 이후 오키나와에서 많이 섭취해 왔으며 중국에 수출도 되었다. 오키나와 사람들은 본토 사람의 3배 이상의 다시마를 섭취한다. 이외에도 김, 툇, 미역의 섭취량도 매우 높으며 특히 오키나와 특유의 “Umibudou”라고 하는 해산물을 많이 섭취한다.

제 7 장 참고문헌

Aebi H. Catalase. In "Methods of enzymatic analysis" Bergmeyer, H.U.(ed), Academic press, NY. 2:673-679, 1974

Ahn HS, Kang SA, Lee IH. Effects of vitamin E and vitamin C supplementation on the decrease in cognitive function induced by scopolamine. Kor. J Nutr. 32(3):239-247. 1999

Akimoto K, Kitagawa Y, Akamatsu T, Hirose N, Sugano M, Shimizu S, Yamada H. 1993. Protective effects of sesamin against liver damage caused by alcohol or carbon tetrachloride in rodents. Ann. Nutr. Metab. 37: 218-224.

Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Samamuri K, Lieberburg I, Robakis NK : Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC 12 cell. Neurosci Lett 128:126-128. 1991

AOAC : Official Methods of Analysis. 14th ed., Washington, D.C., (1980)

Arribas J, Massague J. Transforming growth factor- α and β -amyloid precursor protein share a secretory mechanism. J Cell Biol 128:433-441. 1995

Behl, C., Hoyer, L. III, Krajewski, S., Schubert, D., Reed, J.C., 1993. Bcl-2 prevents killing of neuronal cells by glutamate but not by amyloid beta protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 197, 949-956. 1993

Blois MS. 1958 Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1201.

Bondy, SC. and Lee DK., Oxidative stress induced by glutamate receptor agonist, Brain Res., 610, 229-233. 1993

Cho KH, Yang SD, Yang KS, Yoo JK, Lee PS, Song CW, Han SS. The grading scores of aging, reproductive performance, hematology, serum biochemistry and urine biochemistry of senescence-accelerated mouse (SAM) with age in KRICT colony. Kor. J. of the Lab. Anim. Sci. 15(3):315-324, 1999

Choi JH, Kim DW, Choi JS, Han YS, Baek YH. Effect of reed root extract(RRE) on learning and memory impairment animal model SAMP8 strain - Feeding effects of RRE on neurotransmitters and their metabolites in SAMP8 brain. Korean J gerontology. 7(3):29-36. 1997

Choi JH, Kim DW, Han YS, Ryu JK, Han SS. Effect of docosahexaenoic

acid (DHA) on learning and memory impairment animal model SAMP8 - Feeding effect of DHA on neurotransmitters and their metabolites in SAMP8 brain. *Koeran J gerontology* 6(3):25-30. 1996

Colom, L.V., Diaz, M.E., Beers D.R., Neely, A, Xie, W.J., Appel, S.H., Role of potassium channels in amyloid induced cell death. *J. Neurochem.* 70. 1924-1934. 1998.

Coyle J. T., Price D.L. and DeLong M.R., Alzheimer's disease : a disorder of cholinergic innervation, *Science* 219 : 1184-1190. 1983

Das A, Dikshit M, Nath C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 68:1545-1555. 2001

Doğru-Abbasoğlu S, Tamer-Toptani S, Uğunal B, Koçak-Toker N, Aykaç-Toker G, Uysal M. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats. *Mech . Aging Dev.* 98:177-180, 1997

Ellman G.L, Courtney K.D, Andres V.J, Featherstone R.M. A new and rapid colormetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95. 1961

Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z., Ramones, E., Garcia H., Forster, C.F. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysis. *J. biore*

Fujiyama-Fujiwara Y, Umeda R and Igarashi O. Effects of sesamin and sursumin on Δ^5 -desaturation and chain elongation of polyunsaturation fatty acid metabolism in primary cultured rat hepatocytes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 38 : 353-363 (1992)

Fukuda Y, Osawa T, Namiki M. Ozaaki T. 1985. Studies on antioxidative substances in sesame seed. *Agric. Bio.l Chem.* 49: 301-306.

Giacobini, E., Cholinesterase inhibitors: from the calabar bean to Alzheimer therapy. In: Giacobini, E.(Ed.), *Cholinesterase and Cholinesterase Inhibitors.* Martin Dunitz, Thonex-Geneva, pp.181-226

Goodman, Y., Mattson, M.P., 1994. Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.* 128, 1-12. 1994

Hanma A, Irino M, Toda K, Matsumura A. Grading score system : a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Aging Dev.* 26:91-102, 1981

Harman D, The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7124-7128, 1981

Hirata F, Fujita K, Ishikura Y, Hosoda K, Ishikawa T, Nakamura H. 1996. Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atherosclerosis* 122: 135-136.

Hirose, N., Inoue, T., Nishikura, K., Sugano, M., Akomoto, K., Shimizu, S. & Yamada, H. 1991. Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats sesamin. *J. Lipid Res.* 32:629-638

Jenike M.A, Albeit M.S and Baer L., Oral physostigmine as treatment for dementia of the Alzheimer's type : a long term outpatient trial. *Alzheimer's Dis. Assoc. Disod.* 4(4) : 226-231. 1990

Karp, F., Mihaliak, C. A., and Harris, J. L. and Croteau, R. : Monoterpene biosynthesis specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint(*Menta pipertia*), spearmint(*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Arch Biochem. Biophys.*, 276, 219. 1990

Kang MH , Lee JC . 2000. 오뚜기 최종보고서. Studies on antioxidant effects and inhibitory of tyrosinase activity of browning degree related products fractionated from sesame oil.

Kang MH , Min KS , Ryu SN , Bang JK and Lee BH. 1999. Effects of defatted sesame flour on oxidative stress induced by ethanol-feeding in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28(4), 907-911

Kang MH , Naito M , Sakai K , Uchida K , and Osawa T. 2000. Mode of action of sesame lignans in protectiog lowdensity lipoprotein against oxidative damage in vitro. *Life Science* 66(2), 161-171.

Kang MH , Ryu SN , Bang JK , Bang KS and Lee BH. 1999. Physiological functions of sesamin and sesamol in sesame. *Kor. J. Intl. Agri.* 11(1) : 126-137 .

Kang MH, Naito M, Kawai Y, Osawa T. 1999. Antioxidative effects of dietary defatted sesame flour; In hypercholesterolemia rabbits. *J. Nutr.* 129:

1111-1119.

Kang MH, Naitom M, Tsujihara N, Osawa T. 1998. Sesamol inhibits lipid peroxidation in rat liver and kidney. *J. Nutr.* 128: 1018-1022.

Kang MH, Oh MK, Bang JK, Kim DH, Kang CH, Lee BH. 2000b. Varietal Difference of Lignan Contents and Fatty Acids Composition in Korean Sesame Cultivars. *Kor. J. Crop Sci.* 45: 203-206.

Kang MH, Park SJ . 2000. 오뚜기 최종보고서. Studies on the platelet aggregation activity of some pyrazines in sesame oil.

Kang MH, Ryu SN, Bang JK, Kang CH, Kim DH, Lee BH. 2000c. Physicochemical properties of introduced and domestic sesame seeds. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 188-192.

Kang MH, Song ES, Chung HK, Chim KB, Kang CH, Ryu YH. And Lee JB. 2001. Comparison of oxidation stability in sesame, corn and safflower oils. *Kor. J. Intl. Agri.* 13(2) 115-120.

Kang MH. 1999. Positive role of sesame lignans against oxidative stress. Laboratory food and biodynamics Nagoya University Graduate School of Bioagricultural Sciences.

Kang HJ, Kim JS. Physiological activity of Perilla. *Food Industry And Nutrition* 3(2): 65-72. 1998

Kang MH , Naito M, Sakai K, Uchida K, Osawa T. Mode of action of sesame lignans in protecting low-density lipoprotein against oxidative damage in vitro. *Life Sci.* 66(2):161-71, 2000

Kang MH, Min KS, Ryu SN, Bang JK, Lee BH. Effects of defatted sesame flour on oxidative stress induced by ethanol-feeding in rats. *J Korean Soc. Food Sci. Nut.* 25(4):907-911, 1999

Katsuzaki ishi, S. & Osawa, T. 1994. Sesaminol glucoside in sesame seeds. *Phytochem.* 35 : 773-776

Kim JH, Ryu JD, Lee HG, Park JH, Moon GS, Choi HS, Song YO. Effect of Kimchi on production of free radicals and anti-oxidative enzyme activities in the brain of SAM. *J Korean Soc. Food Sci. Nut.* 31(1):109-116, 2002

- Kim, S.H., Kim, I.H., Kim, J.O., Lee, G.D. Comparison of components of sesame oil extracted from sesame flour and whole sesame. *Korean J Food preservation*. 9(1): 67-73(2002)
- Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaró EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52(4):691-699. 1999
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 71:952-961, 1976
- Lee HK, Shin CS. 1993. Dietary Polyunsaturated Fatty Acid and Diseases. *Kor. J. Nutr.* 26: 471-486.
- Lee JI, Kang CH, Bang JK, Kim KJ. 1991. Sesame breeding for oil quality improvement. IV. Variety differences of oil content and fatty acid composition. *Kor. J. Crop Sci. Quality Research* 3: 20-32.
- Lee KY . Antioxidant Effects of phenolic compounds Isolated from deffated perilla seed flour. *Korean J Food Sci Technol.* 25(1):9-14. 1993
- Lee SU, Kang CW, Kang DH, Yasumoto S, Kasuta M (1999) Varietal variation of sesamin, sesamolin and oil contents according to seed-coat colors in sesame. 27. Shyu YS, Hwang LS (2002) Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Research International* 35: 357-365.
- Lowry OH. Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275. 1993
- Marklund S, Marklund C.T. Involvement of superoxide anion radical in the auto oxidantion of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47:469-473, 1974
- Matterson, M.P., Barger, S.W., Cheng, B., Lieberburg, I., Smith-Swintosky, V.L., Rydel , R.E., β -amylois precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16, 409-414. 1993
- Matsugo S, Kitagawa T, Minami S, Esashi Y, Oomura Y, Tokumaru S, Kojo S, Matsushima K, Sasaki K. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neurosci. Lett.* 278:105-108, 2000

- McGeer PL., Schulzer M. McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease. A review of 17 epidemiologic studies. *neurology*, 47:425-432. 1996
- Muller, He. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene*. 259: 151-155(1985)
- Naito M., Umegaki H. and Iguchi A., Protective effect of probucol against glutamate induced cytotoxicity in neuronal cell line PC12, *Neurosci. lett.*, 186 : 211-213. 1995
- Nagatsu, A., Tenmaru, K., Matsuura, H., Murakami, N., Kobayashi, T., Okuyama, H. and Sakakibara, J. : Novel antioxidants from roasted perilla seeds. *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 887. 1995
- Nakai M, Harada M, Nakahara K, Akimoto K, Shibata H, Miki W, Kiso Y. 2003. Novel antioxidative metabolites in rat liver ingested sesamin. *J. Agric. Food Chem.* 12: 1666-1770.
- Namiki, M. The chemistry and physiological functions of sesame. *Food Rev. Internat.* 11:281-329, 1995
- Noel Y. Calingsan, Holly A. Erdely, C. Anthony Altar, Identification of CD40 ligand on Alzheimer's disease and in animal models of Alzheimer's disease and brain injury. *Neurobiol. Aging*. 23:31-39. 2002
- Ohkawa H. Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:35-41, 1979
- Ohta A, Hirano T, Yagi H, Tanaka S, Hosokawa M, Takeda T. Behavioral characteristics of the SAM-P/8 strain in Sidman active avoidance task. *Brain Res.* 498:195-198, 1989
- Okuma Y, Murayama T, Tha KK, Yamada C, Hosokawa M, Ishikawa A, Watanabe R, Maekawa M, Nomura Y. Learning deficiency and alterations in acetylcholine receptors and protein kinase C in the brain of senescence-accelerated mouse. *Mech. Aging Dev.* 114:191-199, 2000
- Osawa T, Namiki M, Kawakishi S. 1990. Role of dietary antioxidants in protection against oxidative damage. *Basic Life Sci.* 139-153.

Paradis, E., Douillard, H., Koutroumanis, M., Goodyer, C., LeBlanc, A. Amyloid β peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulate Bax expression in human neurons. *J. Neurosci.* 16, 7533-7539. 1996

Pederson, W.A., Kloczewiak M.A., Bluszajin, J.K., Amyloid beta-protein reduces acetylcholin synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 23:93(15)8068-8071. 1996
Puttfarcken PS., Getz RL and Coyle J T., Kainic acid-induced lipid peroxidation : protection with butylated hydroxytoluen and U78517F in primary cultures of cerebella granule cells. *Brain Res.*, 624, 223-232. 1993

Roger's J., Weber S., Leu LF., Brachova L., Civin WH., Emmerling M., Scivers B., Walker D. and McGeer P., Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobil. Aging*, 17:681-686. 1996

Ryu SN, Kim KS and Lee EJ . 2002. Current status and prospects of quality evaluation in sesame. *Korean J. Crop Sci.* 47(S) : 140-149.

Ryu SN, Kim KS and Kang SS. 2003. Growth inhibitory effects of sesamol from sesame seeds on human leukemia HL-60 Cells. *Kor. J. Pharmacogn.* 34(3) 237-241

Ryu, S.N., Kim, K.S., Lee, E.J. Current status and prospects of quality evaluation in sesame. *Koeran J. Crop. Sci.* 47(s): 140-1479(2002)

Sirato-Yasumoto S, Katsuta M, Okuyama Y, Takahashi Y, Ide T. 2001. Effects of sesame seeds rich in sesamin and sesamol on fatty acids oxidation in rat. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2647-2651.

Sclar D.A. and Skaer T.L., Current concepts in the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* 14(1) : 2-10. 1992

Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol* 57:199-208. 1999

Stirpe. F., Corte, E.D. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 244: 3855-3863(1969)

Sugano M, Inoue T, Koba K, Yoshida K, Hirose N, Shinmen Y, Akimoto K and Amachi T. Influences of sesame lignans on various lipid parameters in rats. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 266-2673 (1990)

Suganuma H, Hirano T, Kaburagi S, Hayakawa K, Inakuma T. Ameliorative effects of dietary carotenoids on memory deficits in senescence-accelerated mice (SAMP8). *International Congress Series* 1260:129-135. 2004

Tada, M., Matsumoto, R., Yamaguchi, H. and Chiba, K. : Novel antioxidants isolated from perilla frutescens britton var. crispa(Tunb). *Biosci. Biotech. Biochemi.*, 60, 1093. 1996

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Aging Dev.* 17:183-194, 1981

Talesa, V.N., Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease, *Mech Aging Dev.*, 122(16) : 1961-1969. 2001

Umezawa M, Ohta A, Tojo H, Yagi H, Hosokawa M, Takeda T. Dietary α -linolenate/linoleate balance influences learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Res.* 669(2):225-233. 1995

Whitehouse P. J., Price D. L., Struble R. G., Clark R. W., Coyle J. T., and DeLong M.R Alzheimer's disease and senile dementia : loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215, 1237-1239. 1982

Yamamoto, H., Sakakibara J., Nagatsu A. and Sekiya K., Inhibitors of Arachidonate lipoxigenase from perilla seed. *J. Agric. Food Chem.*, 46 : 862-865

Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW, Kim YH, Song DK. Protective effects against β -amyloid peptide toxicity in vivo with long term administration of ferulic acid. *Bri. J. Pharm.* 133:89-96. 2001

Yobimoto K, Matsumoto K, Huong N, Kasai R, Yamasaki K, Watanabe H. Suppressive effects of vietnamese sinseng saponin and major component majonoside-R2 on psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation in the mouse. *Pharmacol Biochem Behavior* 66(3):661-665. 2000

농촌진흥청. 2001. 유료 작물 재배. p54.

윤서석 외 2000. 뽕 · 잡곡 · 참깨 전파의 길. 신광출판사. p249-336

이시진. 1980. 圖解 本草綱目. 고문사. p. 827.

催春彦. 1994. 한국의 참깨 식문화, 식품과학과 산업. 27(3) : 37-43