

수용성 fructan 생산기술 및 이를 이용한 새로운
기능성 식품 및 사료첨가제 개발에 관한 연구

Studies on the Development of Functional Foods
and Feed Additives by the Production of the
Soluble Fructan

(주)리얼바이오텍

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “수용성 fructan 생산기술 및 이를 이용한 새로운 기능성 식품 및 사료첨가제 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8 월 9 일

주관연구기관명 : (주)리얼바이오텍

총괄연구책임자 : 장 병 일

세부연구책임자 : 장 병 일

연 구 원 : 장 은 경

연 구 원 : 김 효 원

연 구 원 : 김 인 환

연 구 원 : 방 승 용

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 강 순 아

요 약 문

I. 제 목

수용성 fructan 생산기술 및 이를 이용한 새로운 기능성 식품 및 사료첨가제 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

본 연구는 식품소재중 육질개선 및 설사방지 효과가 뛰어나 새로운 기능성 사료 및 식품첨가물로 유망한 수용성 fructan의 대량생산 및 응용기술을 개발하는 목적으로서 축산 및 양식업의 소득증대와 양질의 축산물 수출에 기여함을 목적으로 하고 있다.

2. 필요성

최근 천연물 및 바이오 제품으로 대변되는 신소재를 이용한 식품, 의약품, 화장품 등의 개발이 하나의 추세로 이어지고 있다. 이러한 추세에 부응하여 미생물 효소를 이용한 청정 효소반응공정으로 식품, 의약품, 화장품 등에 널리 이용할 수 있는 새로운 기능성 생물소재의 개발을 목적으로 신규효소를 분리하여 합성하는 원천기술을 확보는 매우 중요한 일이다. 이러한 목적에 적합한 소재에는 수용성의 고분자량의 다당류가 포함된다. 천연물에서 추출되는 많은 수용성 식이섬유가 보고되고 있으나, 대부분의 경우, 원료의 확보가 제한적이고, 천연물내의 낮은 함량과, 복잡한 정제과정등이 상업화를 가로막는 이유가 된다. 따라서, 기능성 바이오폴리머의 상업적인 대량생산을 위해서는 이를 고수율, 고순도로 대량생산할 수 있는 새로운 생물공정기술의 개발이 요구된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 수용성 fructan 합성 효소의 대량생산기술 개발

수용성 fructan 대량 생산을 위하여 수용성 fructan 합성 효소 유전자의 클로닝, fructan 합성효소의 세포의 생산, 효소의 대량생산 및 정제기술 개발, 효소특성 조사 및 효소반응공정을 개발하였다. 저비용의 효소생산을 위하여, 효소의 정제과정을 단순화 시키기 위한 배양조건(glycine 첨가 등) 최적화와 발효방법(permeabilized whole-cells에 의한 batch 및 semi-batch 배양)에 따른 효소생산 최적화 방법을 설정하였다.

2. 수용성 fructan 대량생산기술 개발 및 상업화

생산된 수용성 fructan의 물리화학적 특성연구를 조사하고, Pilot scale에서의 수용성 fructan의 생산, Fructan의 정제 및 분말화 기술을 개발하여 시제품을 생산하였다. 생산된 제품의 식품소재로 이용하기 위하여, 검에 첨가한 후, 제품 특성을 조사하였다.

3. 수용성 fructan의 식품첨가물 및 보조사료로 사용

수용성 fructan의 상업화를 위하여 실험동물을 이용하여 고지방 섭취에 의한 비만 모델, 난소절제수술과 저칼슘식이로 골다공증 유발 모델, 장내 미생물 환경 개선 동물 모델, 간독성 검사를 위한 시험관 실험 등 장내 발효성 테스트, 생체소화율 시험, 영양학적인 허용량 분석등 효능, 독성 및 안전성에 관련된 시험을 통하여 수용성 fructan의 체지방감소효과, 콜레스테롤 조절, 정장작용, 장내 유익균 생육촉진 효과등을 확인하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

당사에서는 본연구를 통하여 획득된 미생물 효소법으로 수용성 fructan을 생산하고, 이를 식품, 의약품, 화장품 등에 널리 이용할 수 있는 새로운 기능성 생물소재의 개발을 목적으로 신규기능성을 확인하여 고부가가치의 새로운 식품 개발을 진행중임. 구체적인 결과는 아래와 같다.

1. 연구개발결과

가. 수용성 fructan 합성 효소 고발현 균주 및 효소 생산 발효공정 개발

수용성 fructan 합성 효소 생산을 위하여, *Escherichia coli*에서 *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas aurantiaca* 유래 수용성 fructan 합성 효소를 활성형으로 발현하고, 생산된 효소를 균체밖으로 분비시키는 발효조건을 개발 완료하였다. *Rahnella aquatilis* 유래의 수용성 fructan 합성 효소는 *E. coli*에서 47%의 효소활성이 periplasm에 존재하는 것으로 확인되었으며, 성장배지에 glycine 0.5%를 첨가시에 효소활성이 30% 증가하고, 균체내의 효소가 균체외 배지로 완전히 분비되었다. Glycine 농도 0, 0.5, 1, 2%에서 균체를 배양하였을 때, 0-0.5% glycine 농도에서는 균체는 성장이 거의 저해를 받지 않았으나, 2%에서는 균체의 성장이 심각하게 저해되어, 균체의 lag phase가 길어지고 비증식속도가 90% 이상 감소하였다. Glycine 농도를 달리하면서, 배양시간에 따른 배양액을 SDS-PAGE로 분석한 결과는 glycine 농도 0.5-1%가 효소활성에 최적임을 보였다.

회분식 발효법은 효소반응이 단순하다는 장점이 있지만, 시간과 장비를 요하는 효소추출과정을 고려할 때, 효소원의 재사용은 반드시 고려하여야 하는 중요한 공정이다. 본 연구에서는 효소원을 재사용하기 위하여, 효소를 포함한 균체에 인위적으로 구멍을 내어 효소반응을 위한 기질의 균체내 출입은 원활히 하면서, 비교적 분자량이 큰 균체내 효소의 유출을 막을 수 있는 조건을 확립하였다. 균체의 투과성을 증가 시키기 위한 방법으로 균체에 톨루엔 1%를 처리시에 효소의 유출과 불활성 정도가 낮게 유지되었으며, 저분자량의 수용성 fructan을 생산하였다. 효소반응을 300 L 반응기에서 실시하였을 때, 서당을 이용한 효소반응에서 원료대비 전환수율 (conversion efficiency)는 65% 달성하였으며, 0.1 µl membrane을 장착한 막 분리장치를 이용하여 99% 이상의 고순도 수용성 fructan을 생산하였다.

- SCI 논문 2편:

Molecular characterization of the levansucrase gene from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 and its expression in *Escherichia coli*. Journal of Microbiology and Biotechnology. (2002) 12: 603-609.

Secretory Production of *Rahnella aquatilis* ATCC 33071 levansucrase expressed in *Escherichia coli*. (2004.12 예정, In press) Journal of Microbiology and Biotechnology.

나. 수용성 fructan 대량생산기술 개발 및 상업화

생산된 수용성 fructan의 물리화학적 특성연구를 조사한 결과, 백색의 파우더의 형상을 가지고, 냉수에서 7% (w/v)의 농도까지 용해되며 온도의 상승에 따라 용해도가 상승하였다. 한편, 70% 에탄올에서 침전하였으며, 점성과 가지구조가 *Zymomonas mobilis* 유래의 수용성 fructan과는 판이하게 다른 결과를 나타냈다. 수용액에서의 수용성 fructan의 점성은 *Z. mobilis*, *R. aquatilis*, *P. aurantiaca* 순으로 높아지며, 가지구조 정도는 반대로 감소하였다. 미생물 유래의 수용성 fructan은 가지구조의 함량이 6-12%로 알려져 있으며, 본 연구에서 확인된 *P. aurantiaca* 유래의 수용성 fructan의 가지구조는 약 6%를 나타내어 가장 가지구조가 낮은 수용성 fructan으로 확인되었다. 수용성 fructan은 중성과 알칼리성에서 높은 안정성을 나타내며, 산성에서는 분해되는 특성을 보였다.

다. 동물실험을 통한 저농도의 수용성 fructan을 이용한 기능성 분석

본 연구는 수용성 fructan의 지질 감소 효과와 비만 유전자인 UCP를 통한 에너지 대사에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 성장기 6주간 AIN-76A diet로 사육한 흰쥐에게 수용성 fructan을 식이 섭취량의 1%, 2%로 5주간 경구투여하여, 혈중 지질 수준과 체지방 형성 및 혈중 인슐린, 렙틴 농도와 갈색지방 조직, 백색 지방 조직, 골격 근육, 시상하부에서의 UCP mRNA 발현량 변화를 관찰하였다. 연구 결과를 종합해 보면 다음과 같다. 1) 수용성 fructan군에서 혈청 중성지방과 총 콜레스테롤은 감소하고 HDL 콜레스테롤 수준은 영향을 미치지 않아 1%와 2% 수용성 fructan 공급이 지질 대사를 개선시킬 수 있음을 보여주었다. 2) 1%와 2% 수용성 fructan군에서 내장 지방 무게가 감소하여 적은 양의 수용성 fructan 공급으로 체지방 축적이 억제될 수 있음을 보여주었다. 3) 갈색 지방 조직과 부고환 지방, 복막 지방 무게는 그룹간 차이가 나타나지 않았다. 4) 혈청 인슐린 농도는 1% 수용성 fructan군에서, 혈청 렙틴 농도는 1% 수용성 fructan군, 2% 수용성 fructan군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 5) 1%와 2% 수용성 fructan 공급에 의하여 갈색 지방 조직과 골격근육, 시상하부에서의 UCP mRNA 발현량에는 변화가 없었다. 6) 백색 지방 조직의 UCP 2 mRNA 발현량이 수용성 fructan 공급에 의해 증가하여 1%와 2% 수용성 fructan 공급에 의해 에너지 소비율이 증가할 수 있음이 나타났다. 결론적으로 저농도의 1%와 2% 수용성 fructan 공급은 총 식이의 3%~5% 수용성 fructan 공급과 비교하여 혈중 총 콜레스테롤과 중성 지방 감소 효과에는 차이가 있으나 UCP 발현 증가에 미치는 영향은 적은 것으로 보인다. 그러나 저농도의 1~2% 수용성 fructan공

급으로 지질 대사를 개선하고 체지방 축적을 어느 정도 억제하는 효과를 나타냄을 알 수 있으며 이에 관한 임상 연구로 수용성 fructan의 고지혈증과 비만을 조절하는 기능성 식품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

SCI 논문 1편:

Anti-obesity and hypolipidemic effects of dietary levan in high fat diet-induced obese rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. (2004. 8 In press). *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003-0348.

국내전문학술지 A급 논문 1편:

저농도 레반공급이 혈중지질 및 체지방형성과 UCP 발현에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*. (2002) 31: 788-795.

라. 수용성 fructan을 이용한 기능성 식품제조

생산된 제품의 식품소재로 이용하기 위하여, 검에 첨가한 후, 수용성 fructan의 용출정도를 분석한 실험에서는 제품 특성을 조사하였다. 검 성분중에 5% 농도로 수용성 fructan을 제조한 후, 20-30대 성인을 대상으로 용출시험 결과는 씹힘성과 탄성이 그대로 유지되어 검 성분으로 적합하였으며, 대상자 전원에게서 5분 이내에 수용성 fructan 성분이 용출됨을 확인하여, 검 또는 다른 식품의 형태로 인체내로 흡수시에, 빠른 시간내에 용출되므로 기능성을 발휘할 것으로 예상된다.

2. 활용에 대한 건의

본 과제를 통하여 본 업체에서는 수용성 fructan를 생산할 공장과 설비를 완비하고 자체시설로 시험생산중이며, 식품회사에 수용성 fructan를 공급하고 있다. 본 과제를 통하여 획득된 결과들은 2002년도에 한국식품영양과학회지에 저농도 수용성 fructan 공급이 혈중 지질 및 체지방 형성과 UCP 발현에 영향을 준다는 것을 발표하였으며, SCI 저널인 *Journal of Microbiology and Biotechnology*에 혈액지질 개선효과를 발표하였으며, 수용성 fructan 합성효소 생성에 대한 내용으로 *Journal of Microbiology and Biotechnology*에 게재예정이다. 앞으로도 계속적인 홍보를 통하여 수용성 fructan 우수성을 널리 알려, 식품과 사료부문에서 기능성을 첨가한 제품으로 활용하고자 한다.

SUMMARY

I. Title

Studies on the Development of Functional Foods and Feed Additives by
the Production of the Soluble Fructan

II. Purpose of the study

1. Strain selection for the production of the soluble fructan
2. Development of the process of the mass production of the soluble fructan using *E. coli* recombinant strain
3. Development of the fermentation process including extracellular excretion conditions of the enzyme in *E. coli* recombinant strain
4. Validation of soluble fructan produced as ingredient of functional foods
5. Elucidation of soluble fructan using animal and human system

III. Contents and scope of the study

1. Screening and selection of soluble fructan-producing strain

For screening and selection of soluble fructan-producing strain, soil samples were collected and examined their growth and polymer forming ability using the solid media containing sucrose. Sequence of the gene responsible for the soluble fructan was analyzed and expressed in *E. coli* as active form. Optimun cultivation condition and excretion of enzyme to the culture fluids were finally selected.

2. Validation of soluble fructan as ingredient of the functional food.

Application of soluble fructan for food and related area were studied. Firstly, we undertook to evaluate the in vivo effects of fructan on the intestinal conditions in animal and human being. Secondly, the present study was undertaken to test the hypothesis that soluble fructan are able to decrease adiposity and post-prandial lipemina in rats, thus clarifying whether

supplementation of fructan has hypolipidemic effects. Thirdly, the current work evaluated whether intakes of fructan can be used as a prebiotic for stimulating the growth of lactic acid-producing bacteria.

IV. Results and recommendation

Bacterial strains, *Pseudomonas aurantiaca* S-4830 and *R. aquatilis*, were identified as the strain producing soluble fructan. The levansucrase gene from *P. aurantiaca* was composed of 1,275 bp and 424 amino acids, giving an estimated molecular weight of 47 kDa. The bacterial levansucrase gene was expressed in *E. coli* DH5 by both its own promoter and lac promoter. The recombinant levansucrase was produced as soluble form in *E. coli*, 3.2 U of levansucrase activity was found from 1-ml culture broth. The expressed enzyme from the clone showed similar biochemical properties (size of active levansucrase, degree of branching, optimum temperature) to *P. aurantiaca* S-4830 levansucrase.

To investigate the production and characteristics of thermostable levansucrase from *R. aquatilis*, the levansucrase gene from *R. aquatilis* was cloned and expressed in *E. coli* without induction system. Expression of levansucrase gene in *E. coli* had no notable or detrimental effect on the growth of host strain, and the recombinant levansucrase exhibited levan synthesis activity. Levansucrase was secreted to the periplasm in *E. coli*, and addition of 0.5% glycine yielded further secretion of levansucrase to the growth medium and resulted in an increase of total levansucrase activity. Furthermore, the cellular levansucrase was evaluated for the production of fructan by using toluene-permeabilized whole-cells. The levansucrase was thermostable at 37°C. The molecular size of fructan was 1×10^6 Da, as determined by HPLC, and the degree of polymerization of fructan varied with incubation temperatures: Low incubation temperature was preferable for the production of high-molecular size fructan. The present study demonstrated that the mass production of fructan and its oligosaccharides can be achieved by glycine supplementation to the growth medium or by toluene-permeabilized whole-cells.

Oligosaccharides and low molecular weight fructan were produced from fructan by acid hydrolysis and following column chromatography.

Fructan hydrolysis was progressed proportionally as increased incubation time. Optimum hydrolysis conditions for the formation of oligosaccharides were, 0.3-0.4M H₂SO₄; and incubation at ~100°C for 3-5 min. The purified products were determined as the mixture of oligosaccharides (degree of polymerization (DP) of 3-6).

This study investigated the effects of fructan diet on the body fat accumulation and serum lipid composition over a period of up to 12 weeks (n=13 for the control group). The subjects had gum (3 g) twice a day. The body weight and age of the subjects at the outset were 45-70 kg and 26-42 years, respectively. The intaking of fructan was influenced on serum Fe, leptin, lipoprotein lipase, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, and triglyceride. Serum glucose level was within the normal range during the experimental period. The current study demonstrates that levan diet are effective for controlling weight, body fat, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, and triglyceride.

CONTENTS

SUMMARY

Chapter 1. Outline of the interest

- I. Aims of the research
- II. Necessity of the research
 - 1. Technical aspect
 - 2. Economical and Industrial aspect
 - 3. Social and Cultural aspect
- III. Scope of the research

Chapter 2. The state of the art in the country and abroad

Chapter 3. Contents and results of the research

- I. Materials and Methods
- II. Results and Discussion

Chapter 4. Objective achievement and contribution to the related area

Chapter 5. Application plan of the results

Chapter 6. Science technology information collected from overseas during the current study

Chapter 7. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
 - 제 1 절 연구개발의 목적
 - 제 2 절 연구개발의 필요성
 - 1. 기술적 측면
 - 2. 경제.산업적 측면
 - 3. 사회.문화적 측면
 - 제 3 절 연구개발의 범위

- 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
 - 제 1 절 실험재료 및 방법
 - 제 2 절 연구개발 수행 결과

- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 식품소재중 육질개선 및 설사방지 효과가 뛰어나 새로운 기능성 사료 및 식품첨가물로 유망한 수용성 fructan의 대량생산 및 응용기술을 개발하는 목적으로서 축산 및 양식업의 소득증대와 양질의 축산물 수출에 기여함을 목적으로 하고 있다.

본 연구에서는 수용성 fructan의 대량생산기술을 개발하고 이를 활용한 생리활성 효능 검색의 연구로서 비만을 개선할 수 있는 체지방 감소를 유도할 수 있는 수용성 fructan의 체지방 감소 효과를 검사하며 신소재 효능검사를 하고자 하였다. 지구상에서 발견되는 다당류 중에서 레반과 이눌린은 유일한 프럭토스 폴리머로서 항암 효과를 가진다. 동물의 체내 지방성분농도에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 수용성 fructan은 건강식품 첨가제나 식품 품질 향상제로 이용할 수 있는 새로운 생물소재로 지속적인 용도 개발에 따라 신규식품 또는 의약품소재로 적용이 가능한 신물질이다.

따라서 본 연구에서는 고지방 식이로 유도된 비만쥐에서 식이로 공급한 수용성 fructan이 지방세포 형성 및 체지방 분포에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 본 실험에 사용할 당유도체의 기본물질인 레반에 대한 생산능력은 현재 세계적인 수준보다 우위에 도달해 있으므로, 빈혈 및 골다공증치료제 개발에 있어서 한층 유리한 입장에 있다. 장내 환경 및 금속이온의 흡수촉진 효과 검증에 의하여 골다공증과 빈혈증의 예방 및 치료와 설사방지제 등으로 수용성 fructan이 기능성 생물소재임을 밝히고자한다.

현재 산업적으로 생산이 이루어지고 있는 올리고당이나 cyclodextrin의 경우 일본에서 개발되어 국내에서 소극적으로 전수된 기술을 이용하고 있는 상태로 기술의 예측화를 피할 수 없는 실정이다. 본 실험에서 사용한 당유도체의 기본물질인 레반에 대한 생산능력은 현재 세계적인 수준보다 우위에 도달해 있으므로, 빈혈 및 골다공증치료제 개발에 있어서 한층 유리한 입장에 있다. 장내 환경 및 금속이온의 흡수촉진 효과 검증에 의하여 골다공증과 빈혈증의 예방 및 치료와 설사방지제 등으로 수용성 fructan이 기능성 소재임을 밝히고자한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

현대의 급속한 산업화 진행에 따른 과도한 화학합성물질 및 항생제의 남용이 인류의 건강과 생태계에 적신호를 보내기 시작하면서 새로운 생합성 물질을 이용한 기능성 식품 및 사료첨가제의 개발이 새로운 추세가 되고 있다. 수용성 fructan은 수만개의 fructose 분자가 β -2,6구조로 연결된 단순 중합체로 주로 식물체에서 발견되는 불용성 fructan인 inulin(β -2,1구조)과는 화학적, 생물학적 특성이 상이하다. 수용성 fructan은 미생물 또는 식물체에서 발견되고 있으나 그 함량이 미미하여 이들로부터 추출방법으로 생산하기에는 부적합하였다(1-5). 즉, 수용성 fructan은 용도가 다양한 생물소재임에도 불구하고 현재까지 상업적 생산이 이루어지지 않고 있는 가장 큰 이유는 아직 이를 산업적으로 대량생산할 수 있는 경제적인 생산기술이 개발되어 있지 않았기 때문이다.

당사에서는 선행연구를 통하여 미생물 효소를 이용한 청정 효소반응공정으로 식품 및 사료첨가제로 이용할 수 있는 새로운 기능성 생물소재의 개발을 목적으로 신규효소인 fructosyl transferase를 분리하였으며 이를 이용하여 설탕으로부터 수용성 프락탄을 합성할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이러한 수용성 프락탄은 그람 음성세균에 대한 생육억제로 정장효과가 뛰어나고 면역증진작용이 있는 새로운 식품 및 사료첨가제로 개발하기에 적당한 특성을 갖고 있다.

수용성 fructan은 섭취시에 소장에서 흡수되지 않고, 대장에서 발효되는 발효성 당으로 분류된다. 수용성 fructan의 정확한 열량계산은 매우 어려운 문제로, 프락탄의 종류와 연결된 과당의 수와 연결구조 등에 의하여 다르게 나타나므로 혼동되는 면도 있는 것이 사실이다. 수용성 fructan의 열량기준은 연구자에 따라 다소의 차이는 있으나, 치커리 유래의 이눌린의 경우에는 1.5-2 kcal/g 의 열량으로 보고되었다(2). 레반의 경우도 유사하게 대장에서 장내미생물에 의하여 발효된다. 따라서 레반의 경우에 4 kcal/g 보다는 낮은 열량을 나타낼 것으로 추정되나 실험적인 결과는 부족한 실정이다(6-7).

고지혈증은 콜레스테롤, 중성지방등이 혈중에 고농도로 존재하는 상태로, 중풍, 고혈압, 심장질환 등과 밀접한 관계가 있다. 이눌린은 혈중 중성지방을 감소시키고, HDL 콜레스테롤 수치를 증가시켜 지질 대사를 개선시키는 효과가 있다(8-10). 이눌린과 이눌린 올리고당은 대표적인 prebiotics으로, 체내로 흡수시에 대장에서 유산균을 포함한 제한된 종류의 미생물에서 발효되어, 유해한 미생

물이 생존하기 어려운 환경을 제공하여 장내환경을 개선하는 효능이 있다(10). 최근에는 레반 타입의 수용성 fructan에서도 유사한 효능이 동물실험으로 확인되었다(12). 이외에도, 이눌린은 타액에서의 효소적 분해나 구강 미생물에 의한 발효가 일어나지 않으며, 섭취시에 포만감을 부여한다. 또한, 저분자인 이눌린 올리고당은 어는점을 낮추는 효과가 있으므로, 일본에서는 이를 이용한 수산물 유통에 응용된다(11).

2. 경제..산업적 측면

대부분의 천연 수용성 식이섬유들은 자연에서의 생산량이 한정적이고 복잡한 정제과정을 거쳐야 하는 단점이 있으며 또한 천연 수용성 식이섬유들은 생체내에서 복잡한 생합성 기작에 의하여 생성되므로 최근의 유전공학적인 기법이나 첨단기술을 이용하여도 고순도의 천연 수용성 식이섬유를 대량으로 제조하는 데는 한계가 있으나 본 연구에서 개발하고자 하는 수용성 fructan의 합성은 단일 효소에 의하여 간단한 효소반응으로 생합성되는 biopolymer로 손쉽게 효소반응계를 구성할 수 있다는 장점이 있다. 국내에서는 현재 산업적 생산이 이루어지고 있는 올리고당이나 cyclodextrin의 경우 일본에서 개발되어 국내에 전수된 기술을 이용하고 있는 상태로 기술적 예측화를 피할 수 없는 형편이나 수용성 fructan 합성효소의 특성연구나 생산수율등의 경우 국내의 기술수준이 현재 일본과 비슷한 수준에 도달해 있으며 개발 정도에 따라 기술적 우위를 선점할 수 있는 상태에 있다.

수용성 fructan 생산에 필수적인 기술은 크게 과당전이효소의 분리, 유전자의 클로닝, 효소의 대량생산, 반응 시스템 확립, fructan의 대량생산 및 결정화 기술개발 등이며 이중에서도 핵심이 되는 기술은 과당전이효소(fructosyl transferase)의 대량생산 기술이나 기존의 *E. coli* 발현계를 이용할 경우 생성된 재조합 효소 단백질이 *E. coli* 균체내에서 활성이 없는 불용성 형태(inclusion body)로 생성되기 쉽고 효소의 정제가 어려운 단점이 있어 (12)이를 해결하기 위해서는 재조합 과당전이효소의 세포외 분비기술의 개발이 필수적이다.

과당전이효소는 10℃이하의 비교적 저온에서 수용성 fructan을 생성하는 것으로 알려져 있으며 이러한 효소학적 특성은 저온설비로 인한 생산비 증가 요인이 될 수 있어 생산원가를 낮추기 위해서는 상온에서 fructan을 합성하는 효소의 개발이 필요하다(13-14). 또한 생성된 수용성 fructan의 정제법도 전통적인 유기용매를 이용한 침강법만이 밝혀져 있을 정도로 매우 제한적이며 새로운 대량 분리나 정제방법에 관한 연구가 이루어지지 않고 있어 수용성 fructan의 특성규

명과 아울러 filtration과 같은 효과적인 분리정제기술이 개발되고 있다.

3. 사회.문화적 측면

국내의 경제 및 산업이 급격히 향상됨과 더불어 우리나라도 선진국과 비슷한 인간의 수명이 크게 증가되고 있으며, 사회적으로 노령화가 가속화되고 있다. 또한, 생활수준의 향상에 따른 국민의 건강한 생활이 요구되고 있으며, 질병을 예방할 수 있는 기능성 소재에 대한 요구는 증가하고 있다. 따라서, 본 과제에서 획득된 일련의 기술개발을 통하여 새로운 효소 유전자의 발굴, fructan 생산 공정과 새로운 용도에 확대등은 사회의 요구에 부응하는 일이다. 국내에서 수용성 프락탄 생산관련 기술은 세계적으로도 당사의 기술이 독보적이며 뒤를 이어 일본 돗토리 대학과 라트비아의 라트비아대학 Baker 박사팀이 연구를 하고 있는 정도이고 회사차원에서 이를 연구하고 있는 곳은 알려져 있지 않은 실정이다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 수용성 fructan 합성 효소의 대량생산기술 개발

수용성 fructan 대량 생산을 위하여 수용성 fructan 합성 효소 유전자의 클로닝, fructan 합성효소의 세포외 생산, 효소의 대량생산 및 정제기술 개발, 효소특성 조사 및 효소반응공정을 개발하였다. 저비용의 효소생산을 위하여, 효소의 정제과정을 단순화 시키기 위한 배양조건 (glycine 첨가 등) 최적화와 발효방법(permeabilized whole-cells에 의한 batch 및 semi-batch 배양)에 따른 효소생산 최적화 방법을 설정하였다.

2. 수용성 fructan 대량생산기술 개발 및 상업화

생산된 수용성 fructan의 물리화학적 특성연구를 조사하고, Pilot scale에서의 수용성 fructan의 생산, fructan의 정제 및 분말화 기술을 개발하여 시제품을 생산하였다. 생산된 제품의 식품소재로 이용하기 위하여, 껌에 첨가한 후, 제품 특성을 조사하였다.

3. 수용성 fructan의 식품첨가물 및 보조사료로 사용

수용성 fructan의 상업화를 위하여 실험동물을 이용하여 장내 발효성 테스트, 생체소화를 시험, 영양학적인 허용량 분석등 효능, 독성 및 안전성에 관련된 시험을 통하여 수용성 fructan의 체지방감소효과, 콜레스테롤 조절, 정장작용, 장내유익균 생육촉진 효과등을 확인하였다.

1차년도의 결과 수용성 플러ktan의 체지방 감소효과, 중성지방의 감소 효과, 지방세포의 크기를 감소할 수 있는 효능을 검증하였다. 2차년도의 결과 금속이온(칼슘, 철 등) 흡수촉진 효과를 검증함으로써 골다공증과 빈혈증의 예방 및 치료제 등으로 개발할 수 있는 기능성 생물소재 임을 밝혔다. 3차년도에서는 독성, 안전성 시험을 수행하여 식품 및 사료첨가제로 인증을 받아 상품화하는데 기여하고자 하였고 fructan이 함유된 식품 첨가물의 영양소 함량을 분석하여 식품 및 사료 첨가제로의 자료를 제공하고자 하였다. 수용성 fructan을 이용한 기능성 식품 및 사료첨가제 개발과제에서 수용성 fructan의 안전성의 결과를 활용하고 영양소의 함량 분석 결과를 첨가하면 국내에서 산업화로 연결할 수 있는 나름대로 독창성 있는 연구였다. 수용성 fructan의 안전성 시험단계로 fructan의 축산 사료 첨가제, 식품첨가물로서의 안전성을 검사하여 생리적 활성의 역할을 하는 신물질로의 가능성을 검증하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

수용성 fructan은 지금으로부터 약 68년 전인 1935년에 Copper에 의해 처음으로 발견되었다(1,2). 그 후, 60년 동안 수용성 fructan은 단순한 식물과 미생물의 구성성분으로 알려져 활용에 대한 연구가 없으며, 1990 년대에 접어들어 미생물을 이용한 발효법에 의한 수용성 fructan의 대량생산 방법이 개발되었다(1,2). 수용성 fructan은 여러 식물(목초, 양과 등)과 미생물에서 생산된다. 수용성 fructan을 생산하는 미생물에는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus species*, *Zymomonas mobilis*, *Serratia species* 등이 포함되며, 이외에도 효모나 곰팡이에서도 수용성 fructan 생성균이 보고되었다(2). 이와 같이 많은 미생물에서 수용성 fructan의 존재가 보고되었지만, 수용성 fructan을 산업적으로 생산할 수 있는 미생물은 *Z. mobilis* 등으로 제한되었다. 한편, 식품에서는 수용성 fructan은 청국장 또는 Natto 등의 콩 발효식품에서 존재하며, 유제품에서도 수용성 fructan을 생성하는 *Lactobacillus species* 균주가 확인되었다(1,12). 일본에서는 1990년대 중반부터 수용성 fructan의 효능에 대한 연구를 수행하여, 최근에는 수용성 fructan을 첨가한 기능성식품을 판매하고 있다. 국내에서는 2002년도에 당사에서 본격적으로 생산을 시작하였다. 산업적으로 이용되는 액상과 분말상의 수용성 fructan 생산공정을 간략히 설명하면, 수용성 fructan은 주원료인 설탕을 물에 용해시킨 후, 여기에 수용성 fructan 생성효소인 levansucrase을 포함하는 균체를 반응시켜 생성된다(14-19). 반응후, 생성물인 수용성 fructan은 부산물로 생성되는 글루코즈, 레반 올리고당 등은 에탄올 침전 또는 막투과공정에 의하여 쉽게 제거할 수 있다. 이때 생성된 분말 수용성 fructan은 고분자량으로, 이를 다시 열 처리 공정 또는 산가수 분해공정에 의하여 저분자량 수용성 fructan 또는 올리고당을 생성한다.

수용성 fructan은 맛 또는 향을 포함하지 않으며, 일본에서는 식품첨가물로, 한국에는 식품원료로 허가된 식품소재로 제과, 식품, 수산물, 화장품 공업에서 광범위하게 효능을 나타낸다. 제과나 식품등에 적용할 경우, 열과 중성 및 알칼리성 pH에 대한 안정성이 뛰어나며, 광택이 나게 하는 등의 잇점을 보유하고 있다(4-6, 20-24). 가열에 따른 수용성 fructan의 melting 온도는 약 165도이며, 상온에서 pH 4-10의 범위에서는 수용성 fructan의 가수분해는 거의 진행되지 않는다. 하지만, pH 2 이하에서는 가수분해는 빠르게 진행된다. 일본에서는 수용성 fructan을 수산물 저장에 응용하여, 생선에 수용성 fructan을 뿌려주어 빙점강하에 따른 생선의 신선도 향상에 응용하고 있다. 최근에는 정장효능, 혈중지질개

선, 체지방 감소효능 등 인체에 대한 영향에 대한 연구가 진행되고 있다. 동물실험과 임상실험을 통하여 확인된 수용성 fructan의 효능들이 밝혀지고 있다(7, 8).

프리바이오틱스(prebiotics) 효과를 가지는 수용성 fructan은 난 소화성 수용성 다당류로 뛰어난 식이섬유기능을 가지고 있으며, 수용성 fructan은 유산균과 함께 혼합 사용시에 유산균은 영양소원으로 이용하지 못하나, 인체의 생리적인 조건에서는(위액에서의 산가수분해, 소장에서의 효소적 작용, 대장에서의 미생물에 의한 발효) 분해되어, 식품으로 공급된 유산균의 위액에서의 사멸률을 낮추고 수용성 fructan은 대장에서 유산균 생육의 탄소원으로 이용된다(1,6,13). 이외에도 확인된 수용성 fructan의 생리적 기능에는 비피더스균등의 증식으로 인한 단쇄지방산의 생성과 장내 pH 저하효과등이다. 따라서, 수용성 fructan을 섭취할 경우, 수용성 fructan은 장내에서 저분자량으로 분해되고 장내미생물에 의하여 발효되어, 장내 유산균 성장을 촉진하고, 장관내의 발암원을 제공하는 유해효소의 활성을 억제하는 생리적 기능을 가지는 것으로 평가된다. 효능적인 측면에서 돼지, 닭등의 가축에서 빈번히 나타나는 설사와 이로 인한 증체량 감소등에 대한 효과를 보고되었다.

동물실험에서 *Zymomonas mobilis* 유래의 수용성 fructan은 지방세포의 크기를 감소시켜 지방세포의 지방축적을 억제함으로써 체지방 형성을 억제하는 효과가 있다(8,12). 이외에도, 내장지방무게, 복막지방 무게를 특이하게 감소시키는 효과가 있으며, 지방조직에서 발열반응을 통하여 에너지의 소비에 관여하는 갈색 지방조직의 미토콘드리아의 내막에 존재하는 탈공역단백질(uncoupling protein, UCP)와 근육의 UCP3 mRNA 발현량을 증가시킨다(8). *Zymomonas mobilis* 유래의 수용성 fructan은 2가 금속이온 (철, 칼슘, 아연 등)의 체내흡수를 촉진하는 기능을 가지고 있다고 제시되고 있으나, 학회에 논문으로 보고된 예는 없다. 이들 미네랄들은 부족시에 빈혈, 골다공증 등의 질환에 관련이 있다. 한국인 영양권장량 (제 7차 2000년도)에서는 한국인의 철분과 칼슘섭취량에 대하여 성인기준으로 각각 12-16 mg/day와 700-800 mg/day를 권장하고 있는데 반하여, 실제 섭취량은 권장량의 50-65%으로 매우 낮게 나타난다. 노년층에서는 이들 미네랄에 대한 흡수 능력의 감소로 실제 이용률은 더욱 낮아지게 된다. 이들 미네랄들은 섭취시에 대부분 소장에서 흡수되나, 흡수되지 않은 미네랄은 대장에서 흡수된다. 소장과 달리 대장에서의 미네랄 흡수는 장내 환경이 중요하며, 산성인 조건에서 미네랄의 흡수가 촉진된다고 보고되었다 (1).

현재 플라탄의 국내시장 현황은 시장규모가 미미하지만 최근 다양한 효능의 개발에 따른 빠른 성장이 예상된다. 분말보다는 다소 저가로 공급되는 액상은 저온에서 장시간 보관시에 결정이 석출되지 않는 특성을 보인다. 최근 비우식성 소재로 xylitol 이 널리 이용되면서 기존의 껌 시장은 급격한 성장세를 보이고 있다. 수용성 fructan은 껌의 구성성분으로 사용시에 물성에 미치는 영향이 미비하고 구강내에서 쉽게 용출되는 특성이 있다는 것이 본 과제를 통하여 확인되었으며, 껌을 포함한 기존 식품에 첨가할 수 있을 것으로 예상된다. 일본에서는 수용성 fructan을 프리바이오틱 식품소재로 이용하여 유산균과 함께 혼합한 형태로 사용되고 있다 (주)美裕貴(MIYUKI), (주) 아도반스 (Advance)). 따라서, 관련 업체들에서는 새로운 용도의 개발에 지대한 노력과 연구 투자를 다하고 있는 것으로 보인다.

따라서 본 연구에서는 미생물에서 분리한 새로운 fructan 생산 효소 유전자를 클로닝하여 이를 대량으로 생산하기 위한 재조합 효소 발현기술을 개발하고 이를 이용하여 설탕으로부터 fructan 생산을 위한 효소반응공정 및 생산된 fructan의 정제기술을 개발하며 동물실험을 통한 효능검증 및 독성, 안전성 시험을 수행하여 식품 및 사료첨가제로 인증을 받을 수 있는 소재를 개발하고자 하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 실험재료 및 방법

1. 수용성 fructan 합성 효소의 대량생산기술 개발

가. 사용균주, plasmids 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 국내 토양에서 채취한 토양에서 분리한 균주를 사용하였다. 설탕이 함유된 배지에서 설탕을 분해하여 콜로니 주위에 fructan을 형성하는 미생물을 일차적으로 fructan 생성 활성이 있는 균주로 선별하였다. 선별된 250 여 균주중에서 안정적으로 fructan을 생성하는 균주를 획득하였으며, 16S rRNA의 서열을 분석한 결과, *P. aurantiaca*으로 동정되었다. 또한, *Z. mobilis*, *R. aquatilis* 유래의 fructan 생성 효소 유전자를 사용하였으며, 대량생산을 위해서는 *E. coli* DH5a와 BL21을 사용하였다. *P. aurantiaca* 유래 levansucrase 구조유전자 (*lscA*)를 포함하고 있는 재조합 *E. coli* 는 자체 유전자의 promoter 부위에 의하여 조절되어 지도록 개발되었다. *R. aquatilis* 유래의 효소 또한, 자체 levansucrase 유전자의 promoter에 의하여 조절되었다. 재조합 대장균은 30℃ 또는 37℃, pH 7에서, 교반속도 150 rpm, 배양하였으며, 이때 배지로는 LB 액체배지 (1% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 mg/l ampicillin) 혹은 LB 고체배지 (LB 액체배지 + agar 15 g/l)가 사용되었다. 글라이신 첨가에 의한 균체내 levansucrase의 균체외부로 분비효과를 조사한 실험에서는 20% (w/v) 글라이신을 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 균체를 접종한 직후의 흡광도는 OD600 = 0.1 - 0.2 였다.

나. Fractionation 방법

대장균 세포는 LB 액체배지에서 10-14시간 동안 배양한 후에 10 ml의 배양액을 원심분리법으로 (10,000 rpm, 4℃, 10분) 농축후, 동량의 50 mM sodium phosphate buffer (Kpi buffer, pH7)으로 세척한후에 분획하였다. 현탁액 1 ml의 균체를 취한 후에, 원심분리법에 의하여 균체를 회수한후, 동량의 lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.9; 25% 서당; 200 ug lysozyme)에 현탁한 후, 25℃에서 1시간 반응하였다. 반응후, 균체를 원심분리법에 의하여 회수하였으며, 상등액

은 periplasmic located enzyme source로 사용하였다. 남은 균체는 다시 동량의 buffer를 가하여 현탁한 후에 초음파 파쇄기로 초음파 파쇄하였으며, 원심분리하여 상등액과(cytoplasmic located enzyme source)와 침전물을 (cytoplasmic membrane bound enzyme)으로 분리하였다.

다. Fructan 합성효소 활성측정

고체배지에서는 LB-ampicillin 고형배지에 서당을 첨가하여 관찰하였으며, 액체 배지에서의 효소활성은 서당 가수분해능을 분석하였다. 구체적으로는, 10 μ l cell-free lysate를 50 mM 기질용액과 혼합후, 유리된 포도당 농도를 효소법(Sigma사 제품)으로 분석하였다. 효소활성 1 unit은 1분동안 1 μ mol의 포도당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

라. Fructan 과 올리고당의 분석

Fructan 과 올리고당의 조성 분석은 반응액을 0.45 μ m 여과막으로 여과한 다음, 여액 50 μ l를 고속액체크로마토그래피 (HPLC, Waters, USA)에 주입하여 정량하였다. HPLC 분석조건은 50 $^{\circ}$ C로 유지시킨 칼럼(Ionpak KS-802, Shodex사 제품)을 이용하여 증류수를 0.4 ml/min의 속도로 흘려주었고, 굴절률(refractive index)에 의해 검출하였다(16). 필요에 따라서, Sugar Pak I(6.5 \times 300mm) 칼럼을 사용하여 이동상을 물로 유속을 0.2 ml/min으로 하여 실온에서 굴절률에 의해 시료를 분석하였다. 과당, 포도당, 서당, 프락토-올리고당 등 각 표준당을 각 농도별로 20 μ l loop에 주입하여 검출하였으며, 각 농도별에 따른 peak 면적을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. TLC분석은 시료 1 μ l 취하여 Silica gel 60 F254(Merck) TLC plate에 집적하여 전개 용매(1-propanol: ethyl acetate : water = 45 : 35 : 20)로 두 번 전개하고 건조한 후 urea-phosphoric acid 발색 시약으로 프락토 올리고당의 성분을 확인 하였다.

마. Solvent-permeabilized whole-cell preparation

대장균 세포는 LB 액체배지에서 10-14시간 동안 배양한 후에 10 ml의 배양액을 원심분리법으로 (10,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분) 농축후, 동량의 50 mM sodium phosphate buffer (Kpi buffer, pH7)으로 세척한후에 원심분리법에 의하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체에 50 mM 초산용액 (pH6)을 첨가하여 최종적으로 20배 농축하였다. 여기에 톨루엔 혹은 아세톤 용액 0.1-1 ml 원액을 농축된 균체 (5 ml)에 가한 후, 상온에서 5분동안 강하게 교반하였다. 이들 혼합액을 원심분리법으로 분리후, 유기용매를 제거 후, 2 차례의 세척작업으로 solvent-permeabilized whole-cell를 얻었다.

바. NADH oxidase 활성측정

NADH oxidase는 *E. coli*에서 cytoplasmic-membrane에 존재하는 단백질로 알려져 있으며, 본 실험에서는 cell fractionation 실험에서 cytoplasmic-membrane 시료의 참고 효소로 사용되었다. 효소활성 측정은 Osborn (15)등에 의하여 알려진 방법에 따라 실행되었으며, 반응액(50 mM Tris.Cl, pH 7.5; 0.28 mM NADH; 0.2 mM dithiothreitol; 균체 파쇄액)속에 포함된 균체 파쇄액에 의한 NADH의 분해되는 속도를 흡광도 340 nm, 25°C에서 측정하였다.

사. beta-lactamase

Beta-lactamase는 *E. coli*에서 periplasmic-membrane protein 으로 알려져 있으며, 본 실험에서는 cell fractionation 실험에서 periplasmic-membrane 시료의 참고 효소로 사용되었다. 효소활성 측정은 Chalmers 등 (17)이 사용한 방법에 따라 실행되었으며, 반응액 속에 (100 mM Kpi, pH 7.0; 0.5 mg/ml sodium penicillin G; 균체 파쇄액) 포함된 균체 파쇄액에 의한 penicillin G의 분해되는 속도를 흡광도 240 nm, 25°C에서 측정하였다. 단백질의 정량은 ovalbumin을 표준시료로 하여 시판중인 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, USA)로 정량하였다. 효소의 발현량을 측정하기 위해 SDS-PAGE를 Laemmli 방법에 의하여 행하였다(18).

2. 수용성 fructan 대량생산기술 개발 및 상업화

가. 레반슈크라제의 분리 및 정제

레반슈크라제의 발현을 위하여 재조합 *E. coli*를 mid-exponential stage에 ($A_{600} = 0.8-0.9$) 첨가되고 IPTG (1mM)에 의하여 inducible하게 레반슈크라제 유전자를 발현하였다. 특히, 이 plasmid는 효소 정제시 금속친화성 크로마토그래피를 사용하여 간편하게 정제할 수 있도록 C말단에 6x His tag을 갖도록 설계하였다. 재조합 균주는 30°C, pH7에서 2,000 ml 플라스크를 사용하여 배양되었으며, 이때 배지에는 M9ZB배지 (0.7g NH₄Cl, 2g KH₂PO₄, 4g Na₂HPO₄, 27g glucose, 17g tryptone, 3.3g NaCl, 2ml of 1M MgSO₄, per litre)가 사용되었다.

나. HPLC법

효소 반응액을 0.45 μ l 여과막으로 여과한 다음, 여액 20 μ l를 HPLC(System Gold, 백크만사 제품)에 주입하였다. 분자량 측정을 위하여, GPC column 2개 (4,000, 1,000; Polymer Laboratories, USA)를 직렬로 연결하여, 증류수를 0.4 ml/분의 속도로 흘려주었고, 굴절율(refractive index)에 의해 검출하였다(19). 분자량 결정을 위한 standards로써, dextran standards (1,800K, 750K, 170K, 40K)와 Polyethylene oxide standards (8,000K, 5,000K)를 1% 농도로 물에 녹인후 사용하였다.

다. 분석방법

균체추출액 (cell free extract)을 준비하기 위하여 배양액을 원심분리하여 침전된 균체를 다시 50 mM Kpi (pH7.0) 300 ml을 사용하여 2회 씻은 후 동일 완충용액에 현탁하였다. 균체 현탁액은 초음파 (sonication)에 의하여 파쇄되고 원심분리 (10,000g, 30분, 4°C)로 상등액과 침전물로 나누어졌다. 각 분획들은 Laemmi 방법(18)에 따라 SDS-PAGE (10%)로 분석되었다. 단백질농도는 BSA를 표준물질로 사용하여 Bradford 방법으로 분석되었다. 균체 성장은 600 nm에서 흡광도를 측정하여 결정되었다.

라. Fructan 대량생산

재조합 *E. coli* 를 50 mg/L ampicillin을 함유한 LB배지에서 37°C, 150 rpm 조건으로 진탕배양기에서 10시간 전 배양을 하였다. 전 배양액을 500 mL baffled flask의 배양액 150 ml에 2%(v/v) 접종한 후 33°C, 150 rpm조건으로 배양하였다. 발효조 배양은 5 리터 발효조(KF-5L, 한국발효기)를 사용하였고, 조업용량 3 리터에, 전 배양액 2% 접종하였으며 공기는 1 vvm으로 공급하였다. 교반속도는 300 rpm, pH는 2N HCl과 28% NH₄OH로 6.9~7.0범위로 유지시켰다. Antiform(Sigma, USA)을 초기에 약 50 µl/l로 첨가하여 거품발생을 억제시켰으며, 필요에 따라 배양 중 glycine을 첨가하였다.

마. 수용성 fructan 함유 껌이 체지방 및 혈중 지질 변화에 미치는 영향에 관한 연구 (협동과제 연구 : 건국대학교)

1) 연구조사 대상자 및 기간

본 실험에 사용한 수용성 fructan 껌에는 수용성 fructan (5%)와 gum base, syrup, xylitol, isomalt, flavors 등으로 (95%) 구성되었다. 각각의 원료는 수분, 성상, 중금속, 대장균 검사 등의 규격에 적합한지 검사한 후 적합한 원료만을 엄선하여 칭량하여 배합 제조되었다. 한편, 대조군에 사용한 껌에는 위에서 언급한 조성에서 수용성 fructan (식이섬유 100%) 성분을 maltodextrin (식이섬유 100%)으로 대체한 제품을 제조하여 사용하였다.

본 연구에서는 정상식이를 하는 서울, 경기 지역에 거주하는 남녀 20명을 대상으로 하여 하루에 수차례에 걸쳐 총 10알을 사용하도록 교육 후 실험을 실시하였으며 2개월간 보충 시켰다. 실험참여자는 1주일에 한번씩 문진을 통하여 관리하였으며, 혈액채취와 신체계측을 위하여 해당하는 전날 저녁식사 후에는 섭식을 금하여 최소한 12시간 이상 공복상태를 유지하였으며, 채혈한 시료는 1000 g 에서 10분간 원심분리한 후 혈청을 분리하여 분석할 때까지 80°C 에서 보관하였다.

2) 신체조성 측정 및 설문조사

비만도 평가는 BMI (body mass index; BMI=체중(kg)/신장 (m)²)를 이용하였고, 비만도 평가를 위하여 허리둘레, 허리둔부의 비(waist hip ratio, WHR), 삼두박근 (triceps skinfold)의 피하지방 두께를 측정하였으며, 상완둘레 (mid-arm circumference, MAC)를 caliper를 이용하여 3회 반복하여 측정하여 평

균값으로 사용하였다. 식이섭취 조사는 24시간 회상법을 이용하였으며, 본인들이 직접 설문지를 기록하도록 하였다. 구체적으로, 음식명과 그에 포함된 식품재료명과 섭취량을 기록하도록 하여 개인별 1일 식품 및 영양소 섭취량을 영양평가 프로그램(Can-Pro, Computer Aided Nutritional Analysis Program for Professionals, 한국영양학회 부설 영양정보센터)으로 분석하여 산출하였다. 체지방, 체지방, 체내 수분량은 생체 전기 저항 (Bioelectrical impedance analysis: BIA법)을 이용한 체지방 분석기인 MESMED (MESMED system Co. Ltd.)를 사용하여 측정하였다.

3) 혈중 지질 분석

12 시간 정도의 공복을 유지하게 한 후 정맥에서 5 ml을 채혈하였다. 혈액내에서 serum을 분리하여 glucose를 측정하였다. Serum 내의 총 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤, 중성지방의 함량을 Sigma Chemical 사 (St. Louis, MO)의 Kit을 이용하여 측정하였다. 혈청 leptin 농도는 Linco Leptin Assay Kit (Linco research Immunoassay, St. Charles, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였다. 혈중 lipoprotein lipase 활성측정은 아래와 같이 측정하였다. 기질을 triolein에 lecithin과 glycerol을 가하여 homogenization 하여 만들었으며, 여기에 20% albumin solution (pH 8.1)과 0.7M Tris.Hcl buferr (pH 8.1)을 가하여 assay mixture를 만들었다. 효소반응은 assay mixture와 혈액을 섞어 37°C 에서 1시간 반응후에 kit를 이용하여 ACS-ACOD 법으로 free fatty acid 활성을 측정하였다.

4) 통계처리

모든 자료의 분석 결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, Statistical Analysis System (SAS) program을 이용하여 analysis of variance (ANOVA) 분석을 통해 각 실험 군간의 차이를 $p = 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였고, 통계적으로 유의성이 있는 결과는 다시 Duncan's multiple range test를 실시하여 평균값의 차이를 검증하였다.

3. 수용성 fructan 대량생산기술 개발 및 상업화 (협동과제 연구 :건국대학교)

수용성 fructan의 상업화를 위하여 실험동물을 이용하여 장내 발효성 테스트, 생체소화율 시험, 영양학적인 허용량 분석등 효능, 독성 및 안전성에 관련된 시험을 통하여 수용성 fructan의 체지방감소효과, 콜레스테롤 조절, 정장작용, 장내유익균 생육촉진 효과등을 확인하였다.

가. 1차년도:Fructan의 체지방감소효능시험

본 연구에서는 3주령 Sprague-Dawley 종 숫컷 흰쥐를 두 군으로 나누어 정상 식이군과 고지방 식이군을 두었다. 실험 식이는 정상 식이군은 AIN 76A 식이로 식이 총 열량의 11.7%를 지방으로 공급하였고, 고지방 식이군은 지방 공급원으로 beef tallow를 사용하여 총 열량의 40%를 지방으로 공급하여 사육하였다. (Table 1)

실험 동물 4주령 부터 10주령까지 6주간 정상 식이와 고지방 식이를 각각 공급하였고, 10주령부터 4주간 정상 식이와 고지방 식이에 수용성 fructan을 각각 식이 무게의 0%, 1%, 5%, 10% 를 함유한 식이를 공급하여 수용성 fructan의 효과를 관찰하였다. 수용성 fructan을 함유하지 않은 식이를 공급받은 군을 대조군으로 하였고, 수용성 fructan 함유 식이를 공급받은 군은 수용성 fructan 함량에 따라 각각 1% 수용성 fructan군, 5% 수용성 fructan군, 10% 수용성 fructan군으로 명명하였다.

1) 시료수집

실험동물을 16주령에 희생하여 혈액과 장기를 채취하였다. 갈색지방 조직(interscapular brown adipose tissue), 부고환 지방(epididymal fat), 내장 지방(visceral fat), 복막 지방(peritoneal fat)을 분리하여 중량을 측정하였고, 추출 즉시 액체 질소로 동결하였다. 혈액은 희생 시 heart puncture 방법으로 채취한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 이들 시료는 분석 시까지 -70℃에서 보관하였다.

2) 지방 세포 크기 측정

16 주령의 실험 동물의 내장지방 조직을 채취하여 지방 세포의 크기를 측정하였다. 내장지방 조직 0.5g을 취하여 3% Bovine serum albumin(BSA)을 함유한 145mmol/L NaCl-buffer로 세척한 후, 작은 조각으로 쪼갠 후 collagenase(Sigma C-2139) 1.5mg을 함유한 NaCl-buffer 1.0ml을 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 방

치하였다. 그 후 450 μ m nylon mesh로 여과하여 조직으로부터 분리된 지방 세포를 얻고 5mM 포도당을 함유한 NaCl-buffer로 2번씩 세척하였다. 세척 후 NaCl-buffer 1.0ml을 첨가하여 눈금이 표시된 전자현미경(Olympus CK2)으로 지방 세포의 크기를 관찰하였다. 각 조직마다 30개 세포의 직경을 측정하여 평균을 구하였다.

3) 혈청 지질 분석

혈청 총 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤, 중성지방의 농도를 Sigma Chemical 사 (St. Louis, MO)의 kit을 이용하여 측정하였다.

4) 혈청 leptin 및 insulin 농도 분석

혈청 leptin 농도는 Linco Leptin Assay Kit (Linco research Immunoassay, St. Charles, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였고, insulin 농도는 rat insulin standard (Linco, St. Louis, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였다.

5) Uncoupling protein m-RNA 분석

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)을 이용하여 Uncoupling protein (UCP)의 발현량을 측정하였다. 갈색지방조직에서 UCP1, 2 mRNA 발현량을 측정하였고, 백색지방조직의 분석을 위해 부고환 지방조직에서 UCP2 mRNA 발현량을 측정하였다.

실험동물에서 분리한 조직으로부터 Trizol reagent (Gibco 15596-026)를 이용하여 RNA를 분리하고 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. 분리된 총 RNA로부터의 cDNA를 합성을 위하여 2 μ g의 RNA를 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 열처리한 후 4 $^{\circ}$ C에서 5분동안 방치하고 여기에 M-MLV(Promega M1705) 200 U, dNTP(each 2.5 mM) mix 2 μ l, RNasin(Promega N2111) 40 U, oligo (dT) primer (Promega C1101) 1 μ l 를 혼합한 후 DEPC-water로 25 μ l를 맞추어 42 $^{\circ}$ C 1시간, 75 $^{\circ}$ C 30분 조건하에서 cDNA를 합성하였다.

합성된 cDNA로부터 UCP의 발현량을 측정하기 위하여 primer를 제작하였고 house keeping gene으로는 β -actin을 이용하였다. 실험에 사용한 primer와 product size는 다음과 같다. UCP1 sense 5'-TAC CCA CAT CAG GCA ACA G-3', antisense 5'-TCA TTG CAC AGC TGG GTA C-3', (product size 842 bp), UCP2 sense 5'-ACA GCA GCC TGT ATT GCA G-3', antisense 5'-TTG TAG GCT TCG ACA GTG C-3', (product size 428 bp).

유전자 발현량을 측정하기 위한 PCR 조건은 다음과 같다. Tag polymerase

(TaKaRa *Taq* R001A) 0.125 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, dNTP mix 2 μ l, primer, sample, 증류수로 25 μ l를 맞춘 후 94 $^{\circ}$ C 3분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초, 30회 반복한 후 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 10분, 1회 PCR을 하였다. PCR 산물은 1.5% agarose에서 80 V 하에서 전기 영동하여 분리한 후 10 μ g/ml의 EtBr에서 30분 동안 염색하고 증류수에서 15분 동안 탈색하여 transilluminator에서 관찰하였다.

6) 통계분석

모든 통계분석은 SAS program을 이용하여 평균(mean) \pm 표준오차(standard error, SE)로 표시하였다. 각 실험 군간의 차이는 one-way ANOVA에 의하여 검정하고, Duncan's multiple range test를 실시하여 $\alpha=0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

나. 2차년도: Fructan의 금속이온 흡수 촉진 효능 시험

1) 실험동물의 사육 및 식이

Sprague-Dawley 종 암컷 흰쥐를 일반사료를 공급하면서 실험실 환경에 적응시킨 후, 체중 250-300g이 되었을 때 난소적출(ovariectomy)을 시행하여 각각 Sham군, OVX군, OVX-levan군으로 분류하고 levan은 전체 식이량의 10%를 혼합하여 식이를 공급하였다.

2) 골다공증 유발

골다공증을 유발하기 위하여 동물을 마취한 후 등쪽의 털을 삭모한 후 절개한 후 난소를 노출시켜 난관을 실로 결찰한 후 난소를 절제하고 남은 실을 사용하여 막과 근육을 봉합한 다음 피부를 동물용 스템플러로 봉합하였다. 반대측에 대해서도 동일한 방법으로 접근하여 난소를 적출하고 위와 동일한 방법으로 수술을 하되 난소는 적출하지 않은 채로 봉합하는 가장수술(sham operation)을 시행하였음. 난소적출 후 6주 동안 저칼슘식이와 레반을 10% 첨가한 저칼슘식이를 공급하였다.

3) 시료수집 및 분석방법

(1) 체중측정

난소적출 직전과 난소적출 후 실험종료시까지 1주일에 전자저울을 사용하여 체중측정.

(2) 혈액채취 및 장기무게 측정

사육기간이 끝난 실험동물을 마취시킨 후 회복하여 혈액을 채취하고 각종 장기(small intestine, cecum, large intestine)와 경골, 대퇴골을 채취하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 정도 방치한 다음 3000rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻은 후 -70°C 에서 냉동보관 하였고, 혈액 채취 직후 간, 신장, 비장을 분리하여 생리 식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 뒤 무게를 잰 후 -70°C 에 냉동보관 하였다.

(3) pH 측정

장내의 pH를 Fisher Scientific Accumet 1001 pH meter를 이용하여 측정하였다.

(4) Short chain fatty acids 농도 측정

cecal과 colonic 내의 SCFA를 Hewlett-Packard (Wilmington, DE, USA) 5890A series II gas chromatography (GC)를 이용하여 측정하였다.

(5) 혈청 중 대사산물 측정

혈청중alkaline phosphatase(ALP)의 활성도 측정을 위한 시약으로는 자동 분석기용 ALP 측정용 시액 (Bio clinical system corporation),혈청 중 무기인 측정은 Phosphorus Kit (Bio clinical system corporation), 혈청 중 칼슘 측정은 Calcium Kit (Bio clinical system corporation)를 사용하였고 기기는 BECKMEN DU530을 사용하였음.

(6) 골밀도 측정

골밀도 측정에 이용된 Bone mineral densitometer는 pQCT 방식인 XCT Research SA (German)이다. 조직표본을 제작하기 위해 경골부분을 절취하여 고정액(Bouin's solution)으로 약 2시간 고정한 후 Decalcification을 거쳐 Trichrome 염색을 시행한 후 광학현미경(OLYMPUS BX 60)으로 검경 및 촬영을 실시하였다.

4) 통계분석

모든 통계분석은 SAS program을 이용하여 평균(mean) \pm 표준오차(standard error, SE)로 표시하였다. 각 실험 군간의 차이는 one-way ANOVA에 의하여 검정하고, Duncan's multiple range test를 실시하여 $\alpha=0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

다. 3차년도 : Fructan의 안정성시험

1) 실험동물의 사육 및 식이

도드람 양돈 연수원에서 나이가 19-61 일령이 되는 자돈을 사용하여 처음 체중은 평균 8kg되는 자돈 40마리를 사육하였다. 자돈 배합사료에 수용성 프럭탄을 첨가하여 체중증가율과 식이섭취량의 변화를 관찰하여 사료 요구율을 계산하였다.

2) HepG2 세포 배양

HepG2 세포를 10% FBS, 0.1 mg/mL penicillin-G, 0.01 mg/mL streptomycin을 함유한 DMEM 기본배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂, 95% 공기의 조건하에서 3cm falcon dish로 실험에 제공될 세포수가 되기까지 약 1주일간 배양하고 이때 배지는 2-3일에 한번씩 교환해주었다. 실험개시 전 세포를 90X15 mm petridish에 2x10⁶ 개씩 접종하여 세포성장기 배양기 표면의 70-80%정도되었을 때 DMEM으로 세포를 2-3회 씻어준 다음 실험배지를 첨가하여 실험을 하였다.

3) Cytotoxicity

세포에 대한 cytotoxicity를 측정하기 위하여 MTT assay를 하였다. 배양된 세포에서 배지를 제거한 후 PBS를 첨가하여 가볍게 섞은 후 PBS를 제거 한 후 0.25% trypsin-EDTA를 첨가하여 37°C 에서 5분간 배양하여 세포가 culture dish에서 완전하게 분리하였는지 관찰한 후 culture 배지를 첨가하여 잘 섞은 후 세포수를 1X10⁶ cells/mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 레반을 적당한 농도로 식염수에 녹여서 membrane filter로 여과한 후 사용하였다. 96well microtiter plate에 준비된 세포를 분주한 후 24시간 배양한 후 각 농도 별로 시료를 2ul씩 well에 첨가한 후 37°C, 5% CO₂, 95% 공기의 조건하에서 48시간 배양한다. 배양 후 MTT[(3-4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetra zolium bromide (0.5 mg/mL)] 용액을 20ul씩 각 well에 가해주고 다시 4시간 더 배양한다. 배양종료시 조심스럽게 aspirator로 상등액을 제거한 다음 DMSO 200ul를 첨가하여 생성된 dark blue formazan 결정을 용해시켜 microplate reader (Bio Rad Co., Hercules, CA, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정한 후 cytotoxicity %를 구하여 세포성장 억제 효과의 지표로 하였다.

대조군의 흡광도-시료처리군의 흡광도

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

4) 세포의 Triglyceride 농도 측정

실험용 시용한 배지는 최종농도 1mM oleate, 0.2% BSA, glucose 4.5 mg/mL를 함유한 배지로 레반을 최종농도 1, 10, 50, 100ug/mL 되도록 배지에 첨가하여 6시간 및 24시간 배양한 간세포의 현탁액을 회수하여 세포 현탁액의 총지질의 함량을 시판 효소법(Wako Junyaku, Osaka, Japan)으로 측정하였다.

5) 레반 사료와 레반의 영양소 함량 분석

(1) 수분

감압가열건조법(Vacuum oven method)을 이용하여 감압상태를 유지하여 수분을 휘발시키는데 고온을 필요로 하지않고 시료의 공기에 의한 산화나 열분해를 막을 수 있는 방법이다. 105로 항량을 구한 칭량병에 시료를 담아서 진공기의 뚜껑을 닫고 진공펌프로 감압, 방냉, 칭량, 감압건조, 방냉, 칭량을 되풀이하여 항량을 구하였다.

(2)지방

에테르 추출법으로 미세한 분말인 레반과 레반 사료 2~10g을 달아 원통여과지에넣고 검체 위에 탈지면을 가볍게 충전하여 이를 적당한 용기에 담아 100~105의 건조기에서 2~3시간 건조한 후, dessicator에서 식히고 Soxhlet 추출관에서 8시간 후, 냉각기를 떼고 추출관 속의 원통여과지를 핀셋으로 꺼내고 다시 냉각기를 모두 추출관에 연결하여 수욕 중에서 ether를 완전히 증발시킨 후 98~100의 건조기에 넣어 약 1시간 항량이 될 때까지 건조한 다음 dessicator에서 식히고 칭량하였다. 조지방의 양은 다음 식에 따라 산출하였다.

$$\text{조지방(\%)} = \frac{W1 - W0}{S} \times 100$$

W0 : 받는 그릇의 무게(g)

W1 : 조지방을 추출하여 건조시킨 받는 그릇의 무게(g)

S : 검체의 채취량(g)

(3)조단백질(crude protein)

조단백질은 Kjeldahl 분해장치를 이용하여 시료에 진한 황산 및산화제를 가하여 가열 분해하고 생산된 황산암모늄에 과잉의 알칼리를 가하여 ammonia를 발생시켜 이것을 가열 증류해서 일정량의 산 표준액에 의하여 정량을 하는데 산은 암모니아 양에 의하여 중화되므로 과잉의 산을 알칼리표준액으로 역적정하여 전 질소량을 구하였다.

(4)탄수화물

검체중의 당량에 따라 그 일정량(1~5g)을 취하여 50% 에탄올20~50 ml를 가하여 섞어서 균등한 시럽상으로 한 후 원심분리하고 여과하여 검액으로 한다. 검액 중의 당량은 1~4% 정도가 적당하다. 검액 및 대조의 당액 2%를 마이크로피펫 또는 유리모세관을 사용하여 여과지에 찍고 전개용매를 사용하여 전개를 한다. 발색액은 암모니아성질산은용액을 분무한 다음에 100~105에서 5~10분간 가열하여 발색시킨 후 대조의 당류 Rf값 색조와 비교하여 정성한다.

(5)조섬유

시험용액 각각에 60의 95% 에탄올 225ml를 가하고 에탄올과 시험용액의 용량비율은 4 : 1로 한 후 실온에서 1시간 방치하여 침전시킨다. 하나의 여과기 잔사에 대하여 질소량을 측정하고 이에 6.25를 곱하여 단백질량으로 하고, 또 다른 하나의 여과기 잔사를 525에서 5시간 회화시킨 후 회분량을 구한다. 검체를 제외한 공시험을 하여 다음 식에 의하여 식이섬유의 함량을 구한다.

$$\text{공시험값B(mg)} = \text{공시험평균잔사무게(mg)} - \text{PB} - \text{AB}$$

PB : 공시험 단백질량(mg)

AB : 공시험 회분량(mg)

$$\text{식이섬유함량(\%)} = \frac{(\text{검체의 평균잔사 무게(mg)} - \text{P} - \text{A} - \text{B})}{\text{검체의 평균 무게(mg)}} \times 100$$

P : 단백질량(mg)

A : 회분량(mg)

B : 공시험값(mg)

(6) 열량의 계산

식품의 에너지는 Atwater계수를 사용하여 검체 100g중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 4, 지방 9, 당질 4의 계수를 곱하여 각각의 에너지를 Kcal 단위로 산출하고 그 총계로 나타낸다. 단위는 KJ로도 하는데 환산은 $1\text{Kcal} = 4.184\text{KJ}$ 에 따른다.

(7) 아미노산 및 무기질 분석

레반 및 레반사료에 함유된 아미노산 함량과 무기질의 정량을 식품공전에 나온 방법에 의하여 정량을 하였다. 아미노산은 HPLC(AccQ-Tag) analysis에 의하여 분석하였다. 무기질은 Na, Ca, Fe, P, Zn, K를 미량성분분석법에 의하여 Spectrophotometer로 정량하였고 비타민 C, E, 베타카로틴은 비타민시험법에 의하여 정량하였다.

제 2절. 연구개발 수행 결과

1. 수용성 fructan 합성 효소의 대량생산기술 개발

수용성 fructan 대량 생산을 위하여 수용성 fructan 합성 효소 유전자의 클로닝, fructan 합성효소의 세포의 생산, 효소의 대량생산 및 정제기술 개발, 효소특성 조사 및 효소반응공정을 개발하였다. 저비용의 효소생산을 위하여, 효소의 정제과정을 단순화 시키기 위한 배양조건의 (glycine 첨가 등) 최적화와 발효방법(permeabilized whole-cells에 의한 batch 및 semi-batch ,배양)에 따른 효소생산 최적화 방법을 설정하였다.

가. 수용성 fructan 유전자의 클로닝

기질인 서당을 수용성 fructan으로 전환시키는 높은 기질특이성을 가지는 levansucrase 유전자를 아래와 같은 방법으로 확보하였고, 제한효소를 이용하여 수용성 fructan 유전자가 삽입된 발현백터를 제작하였다. 수용성 fructan 유전자와 한쌍의 primer를 이용하여, PCR법에 의하여 증폭된 DNA를 얻었다. Agarose gel에서 회수된 DNA 단편을 pT7 벡터로 클로닝과 형질전환 과정을 통하여, hybrid plasmid를 얻었다. 재조합 플라스미드를 제한효소인 *AflIII*와 *MluI*으로 절단하였을 때, 원하는 크기의 DNA 절편들이 확인되었으며, 위의 두 제한효소로 처리된 DNA를 insert DNA로, *NcoI/MluI*으로 처리한 DNA는 vector DNA로 사용하여 hybrid plasmid DNA를 얻었다 (Fig. 1). 재조합 대장균에 클로닝된 *levU* 유전자를 확인하기 위하여 플라스미드를 추출한 후, 제한효소로 처리후 DNA agarose gel 상에서 예상되는 DNA 절편을 확인하였다. 발현된 단백질을 확인하기 위하여 SDS-PAGE상에서 단백질 밴드를 분석한 결과, 예상한 크기와 동일한 분자량을 가진 단백질 밴드가 나타났다. 또한, sucrose를 기질로 이용한 sucrose hydrolysis 분석을 수행한 결과, 발현된 단백질들의 활성을 확인하였으며, 효소활성을 비교하여 Table 1에 나타내었다. 균체의 성장이 mid-log phase에 도달하기 까지는 거의 발현이 되지 않다가, late log phase에서 early stationary phase에 이르는 기간동안에 발현이 되었다. 발현된 단백질은 배양시간 10-16 시간에서 대부분 active한 형태로 남아있었다 (Fig. 2). 발현된 levansucrase는 전체 단백질의 ~50% 이상으로 추측된다.

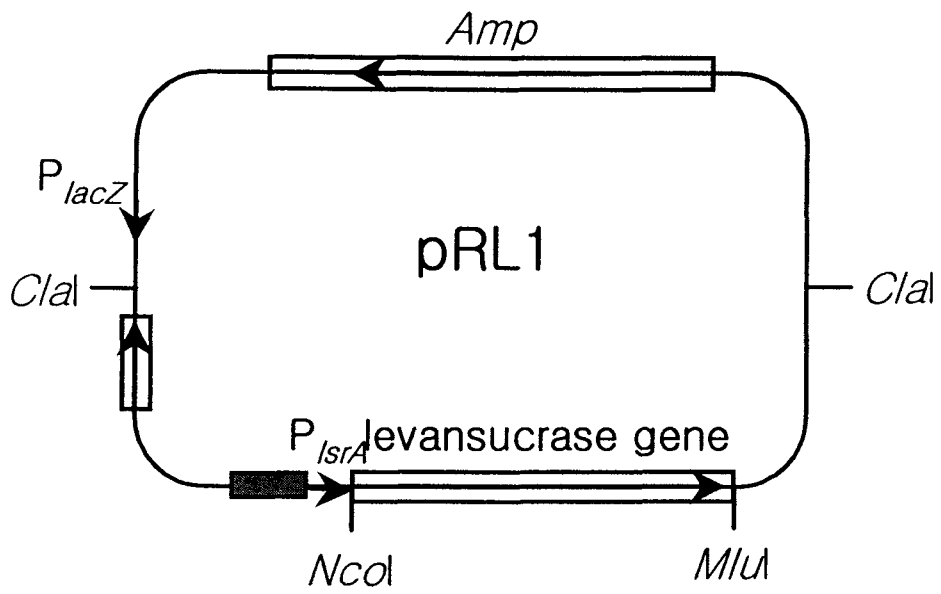


Fig. 1. Expression vector used for fructan production

Table 1. Comparison of fructan production activity in various expression systems

Strains and vectors	gene source	Tem (°C)	Enzyme activity (U/ml of broth)
<i>E. coli</i> /pBluescripKS	without levansucrase gene	37	0
<i>E. coli</i> /pRZA	<i>Z. mobilis</i>	37	8
<i>E. coli</i> /pRL1CP	<i>R. aquatilis</i>	37	75
<i>E. coli</i> /pLK1	<i>P. aurantiaca</i>	37	110

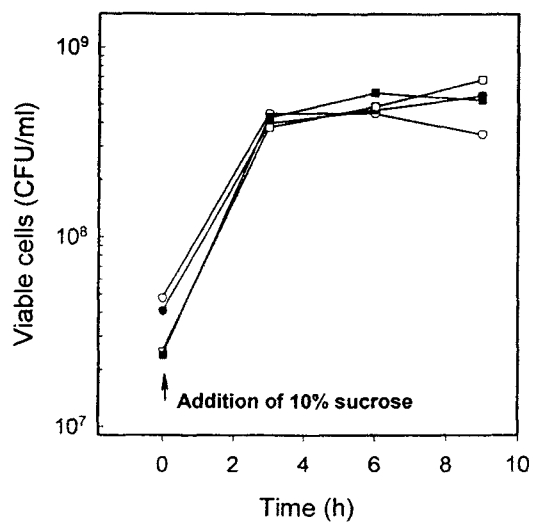


Fig. 2. Effect of *lsrA* expression in *E. coli* on the viability of cells. 10% (w/v) sucrose was added to the cultures at the exponential phase of growth (indicated by arrow sign). Symbols: circle, *E. coli*/pBluescript II KS(+); square, *E. coli*/pRL1CP; open symbols, no sucrose addition; closed symbols, sucrose addition.

2. 생성된 levansucrase 활성의 localization 규명 및 분비, 정제 기술개발

대장균은 세포질의 외부를 둘러싼 두가지의 막에(inner membrane, outer membrane) 의하여 구분되어 있으므로, 대장균의 단백질은 아래와 같이 5가지의 extracellular-, outermembrane-associated-, periplasmic-located-, inner membrane -associated-, cytoplasmic-located protein으로 구분되어 진다(20). 일반적인 통설로 균체내에서 생성된 대장균의 단백질은 분비기작의 도움이 없이는 innermembrane을 통과할 수 없다고 알려져 있다. *E. coli* (pRL1CP)를 배양 후, 파쇄하지 않은 균체를 이용하여 효소활성을 측정 한 결과, 약 35%의 레반슈크라제의 활성이 관찰되었으며, 이러한 조건에서는 β -lactamase와 NADH oxidase의 활성은 발견이 되지 않았다 (Table 2). 즉, 이러한 결과는 발견된 레반슈크라제의 효소활성이 균체의 파괴에 의해서 나타난 것이 아니라, 균체의 외부 세포막에 결합된 효소활성에 의해서 나타났으리라 사려된다.

Table 2. Detection of cell surface-located levansucrase activities by using whole-cells of *E. coli*/pBluescriptKS and *E. coli*/pRL1CP.

Strain	Levansucrase activity	
	Whole-cell (U/ml)	Total (U/ml)
<i>E. coli</i> /pBluescripKS	N.D.	N.D.
<i>E. coli</i> /pRL1CP	25	78

ND: not detected; Total: sum of extra- and intracellular levansucrase activities. Cells were harvested after 16 h of cultivation.

가) 발현된 레반슈크라제의 *E. coli*에서의 localization

레반슈크라제의 좀더 명확한 localization을 알기위하여 균체를 fractionation을 하였다 (실험방법 참조). 균체를 mid-stationary phase까지 (본 실험에서 사용한 배양조건에서는 약 24시간의 배양시간에 해당한다) 배양시킨 경우에는 약 98% 이상의 레반슈크라제 활성이 균체에 존재하는 것으로 확인되었다. 이는 대장균에서 발현된 *R. aquatilis* 레반슈크라제가 균체밖으로 완전히 발현이 되지는 않는다는 것을 보여준 것이다 (21). 이에 반하여, 대부분의 효소 활성은 세포질 (약 49%)과 페리플라스믹 스페이스 (48%)에서 발견되었다 (Table 3, Fig. 3). 이러한 결과는, 아마도 과량의 효소가 짧은 시간에 발현되므로, 분비에 관련된 시스템이 충분하게 작용하지 못함에서 기인한다고 추측된다.

Table 3. Localization of three enzymes expressed in *E. coli* DH5 α /pRL1CP and *E. coli* DH5 α /pBluescript II KS(+) ^a

	% Protein concentration	% Levansucrase activity	% β -lactamase activity	% NADH oxidase activity
<i>E. coli</i> DH5 α /pRL1CP				
CB	7.1 \pm 0.8	2.0 \pm 1.4	19.8 \pm 0.8	0
Periplasm	32.2 \pm 2.1	47.7 \pm 3.7	65.6 \pm 3.5	0.6 \pm 0.3
Cytoplasm	50.6 \pm 2.7	48.6 \pm 6.6	11.0 \pm 10.2	27.0 \pm 14.5
CM/OM	9.0 \pm 2.4	6.9 \pm 6.6	2.9 \pm 1.1	72.5 \pm 14.7
<i>E. coli</i> DH5 α /pBluescript II KS(+)				
CB	8.6 \pm 1.9	0	9.1 \pm 4.0	0
Periplasm	9.9 \pm 0.5	0	90.1 \pm 3.1	0
Cytoplasm	72.9 \pm 0.5	0	0.3 \pm 0.3	7.9 \pm 2.6
CM/OM	9.0 \pm 1.2	0	0.3 \pm 0.3	92.1 \pm 2.6

^aNumbers given in Table represent the relative percentage values of each sample and are the mean \pm SE.

Abbreviations: CB, culture broth; CM/OM, mixture of outmembrane- and cytoplasmic membrane-bound fraction.

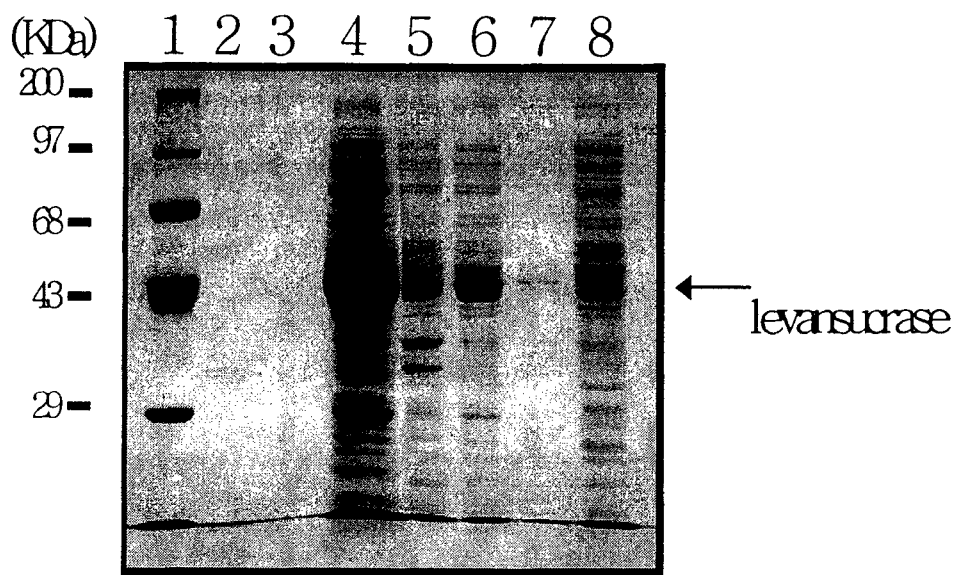


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of levansucrase produced in *E. coli/pRL1CP*. Protein standards are indicated on the left. Lane 2, extracellular culture fluids; lane 3, extracellular culture fluids after washing with buffer A and following centrifugation; lane 4, total cell fraction from *E. coli/pRL1CP*; lane 5, periplasm fraction; lane 6, cytoplasm fraction; lane 7, cytoplasmic membrane-bound fraction; lane 8, total cell fraction from *E. coli/pBluescript II KS(+)*

나) Glycine 첨가에 따른 균체의 성장과 레반슈크라제 생성

재조합 대장균에서 발현된 레반슈크라제 *E. coli*(pRL1CP)가 최소한 페리플라스믹 스페이스까지로 분비가 된다는 것을 보여주었다. 아미노산인 글라이신을 균체의 배지에 첨가하여, 레반슈크라제의 생성과 분비에 미치는 영향을 분석하였다. 글라이신을 배지로 첨가시 세포내 단백질의 분비를 증가시키고, 글라이신 농도를 조절하게 되면 페리플라스믹 스페이스에 존재하는 단백질을 선택적으로 분비시킨다 (22-24). 이러한 방법이 레반슈크라제의 분비에 이용되었다. 보고된 연구결과로는, 배지에 첨가된 글라이신 농도에 따라서 페리플라스믹 스페이스에 존재하는 단백질의 분비량이 증가하나, 상대적으로 균체의 성장 또한 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서, 글라이신 농도를 2%(w/v) 까지 달리 한 배지에서 배양된 균체에서 배양시간에 따라 시료를 채취하여서 재조합 균체의 성장, 레반슈크라제의 생성과 분비에 대하여 분석하였다. 글라이신 농도 0, 0.5, 1, 2%에서 균체를 배양하였다 (Table 4). 0.5% 글라이신 농도에서는 균체의 성장이 거의 저해를 받지 않았다. 하지만, 글라이신 농도 2%에서는 균체의 성장이 심각하게 저해되어서, lag-phase가 길어졌으며, 세포의 비증식속도도 역시 감소되어 글라이신이 없는 배지와 비교시, 약 90% 정도의 성장속도가 감소되었다. 이러한 글라이신에 의한 균체성장의 감소는 세포내의 단백질 생성에서도 영향을 주었다.

균체에서 생성되는 levansucrase와 beta-lactamase의 함량 또한 낮은 농도의 글라이신 (0-1%)에서는 큰 변화가 없었으나, 2% 글라이신 농도에서는 90% 이상 감소하였다. 이러한 결과는 2%의 글라이신 농도에서는 균체가 충분히 자라지 못함에서 기인된다고 사료된다. 이상의 결과에서 볼 때, 글라이신 첨가에 의한 효과적인 결과를 얻기 위하여서는, 글라이신의 농도를 1%이하로 낮추어야 한다는 것을 알 수 있었다 (Table 5, 6). 글라이신이 없는 배지에서 성장한 균체에서는 12시간의 배양 후에, 74.5 U/ml of broth의 레반슈크라제 활성을 정점으로 감소하다가, 15시간 후에는 급격하게 불용성인 aggregate (inclusion body)를 형성하였다. 이에 반하여, 글라이신의 농도 0.5%에서 성장한 균체에서는 효소활성이 15시간 이후에도 활성이 장시간 유지되었다. 따라서 글라이신 첨가에 따른 또 다른 효과는, 재조합 대장균에서 발현되는 levansucrase의 inclusion body 형성시기를 늦추어 준다는 것을 보여준다.

Table 4. Effect of glycine supplement on cell growth of *E. coli/pRL1CP*^a

Optical density at 600 nm				
% of glycine	6 h	9 h	12 h	24 h
0	2.0	2.9	4.0	5.1
0.5	1.9	2.8	3.8	4.5
1.0	1.2	2.3	2.4	2.4
2.0	0.2	0.2	0.2	0.5

^aNumbers given in Table represent the optical density values of each sample at 600 nm in incubation.

Table 5. Effect of glycine supplement on β -lactamase production and secretion in *E. coli/pRL1CP*.

% of glycine	Total β -lactamase (U/ml of culture broth) ^a				Extracellular β -lactamase (U/ml of culture broth)			
	6 h	9 h	12 h	24 h	6 h	9 h	12 h	24 h
0	2.3	8.1	14.2	14.4	0.7	0.6	2.5	0.8
0.5	2.0	5.2	11.5	14.2	N.D. ^b	1.5	4.9	8.0
1.0	1.3	4.8	11.3	12.8	N.D.	3.3	9.9	10.7
2.0	2.9	4.3	8.8	5.2	N.D.	0.8	0.5	0.7

^aTotal: sum of extra- and intracellular β -lactamase activities.

^bN.D.: not detected.

Table 6. Effect of glycine supplement on levansucrase production and secretion in *E. coli*/pRLICP.

% of glycine	Total levansucrase (U/ml of culture broth) ^a				Extracellular levansucrase (U/ml of culture broth)			
	6 h	9 h	12 h	24 h	6 h	9 h	12 h	24 h
0	9.3	40.5	74.5	66.6	0.8	2.5	1.8	1.1
0.5	7.3	38.8	68.4	115.3	N.D. ^b	0.3	1.7	21.3
1.0	11.7	45.8	89.7	62.0	0.8	2.7	1.8	3.0
2.0	7.6	9.3	11.2	25.1	2.0	2.6	4.1	10.6

^aTotal: sum of extra- and intracellular levansucrase activities.

^bN.D.: not detected.

다). 글라이신 첨가가 레반슈크라제의 분비에 미치는 영향

대장균에서 발현되는 외래유전자의 단백질은 거의 대부분이 cytoplasm에 머무르는 것이 일반적인 현상이다. 본 실험에서는 발현된 레반슈크라제가 periplasm으로 다량 분비되었는데, 이를 균체밖으로 완전히 excretion하기 위하여 배지에 글라이신을 첨가하였다 (Table 6). 글라이신이 제거된 배지에서 성장한 균체에서는, 균체외 배양액에서는 레반슈크라제의 활성이 미비하였다. 글라이신이 첨가된 배지에서 성장한 균체에서는 글라이신 농도의 증가에 따라서 분비되는 효소활성은 증가하였는데, 글라이신 농도 0.5%에서 전체효소활성의 20%가 분비되었다. 이러한 글라이신 농도에서는 cytoplasmic membrane에 주로 존재하는 NADH oxidase의 활성이 거의 발견되지 않았으므로, 분비된 효소가 균체의 파괴에서 기인되는 것이 아니라, periplasm에 존재하는 효소의 분비에서 기인한다고 사료된다. 글라이신의 농도를 2%로 증가시키게 되면, 대부분의 levansucrase 활성이 균체밖에서 발견되었으나, NADH oxidase의 활성 또한 발견되었으며, SDS-PAGE로 분석된 결과에 따르면, excretion된 단백질의 profile이 균체내에서 존재하는 단백질의 profile과 거의 유사하였다. 글라이신의 첨가는 그람음성균의 peptidoglycan 생합성에 영향을 주어서 세포벽 구조의 변화를 야기하게 되는데, 높은 글라이신 농도 (예를 들면 2%)에서는 세포벽의 구조가 지나치게 손상되어 cytoplasmic membrane까지 변형되고 따라서 cytoplasm에 존재하는 단백질 들이 유출되는 것으로 사료된다. 결론적으로 대장균 균체의 세포벽이 효과적으로 변형하여 발현된 levansucrase의 균체외로 분비하기 위해서, 0.5-1%의 글라이신을 배지에 첨가하는 것이 생산된 레반슈크라제의 분비를 촉진시키는 역할을 하였다.

라) 톨루엔 처리된 균체를 이용한 수용성 플라탄의 생성

레반슈크라제는 균체의 외막으로 분비가 되는 반하여, 동일한 유전자를 대장균에서 발현시키면, 약 35%의 효소활성이 균체표면에서 그리고 나머지 효소활성은 균체내부에서 나타난다. 따라서 균체를 효소원으로 그대로 이용하기에는 효율이 낮으므로 균체에 톨루엔 혹은 아세톤으로 처리하여 균체의 세포막 투과성을 향상시켰다(25). 동일한 농도에서는, 아세톤과 비교시 톨루엔 처리시에 보다 높은 결과가 나타났다 (Table 7). 톨루엔 농도 1-10% (vol/vol)에서 유사한 결과를 보였으므로, 톨루엔 농도 1%를 선택하였다.

Table 7. Optimization of the permeabilization of whole-cells of *E. coli* using permeabilizing agents.

Methods	Relative levan formation activity (%)
Untreated cell	35
Toluene-permeabilized cell (toluene: cell = 1:100, vol/vol)	87
Toluene-permeabilized cell (toluene: cell = 1:10, vol/vol)	100
Acetone-permeabilized cell (toluene: cell = 1:10, vol/vol)	29

톨루엔 처리된 균체의 수용성 플라크탄 생성에 대한 온도의 영향을 조사한 결과 유리 효소와 매우 유사하게 37°C에서 최대활성을 보였다. 효소 반응이 끝나는 최종 시간 (3 일)에서는 톨루엔 처리된 균체에 의한 반응은 20-37°C 에서도 안정하게 진행되었다.

기질로 사용하는 서당농도 10%에서 48시간의 반응 후에 대부분의 서당이 분해되어 수용성 플라크탄으로 전환되었으며, 수용성 플라크탄으로 전환되는 수율은 35%를 나타내었다. 낮은 온도에서는 전환율은 낮았으나 분자량이 큰 수용성 플라크탄을 생성한 반면에, 효소 반응 온도가 상승할 수록 전환율이 증가하였으나, 분자량이 줄어든 수용성 플라크탄을 생성하였다 (Table 4, 5).

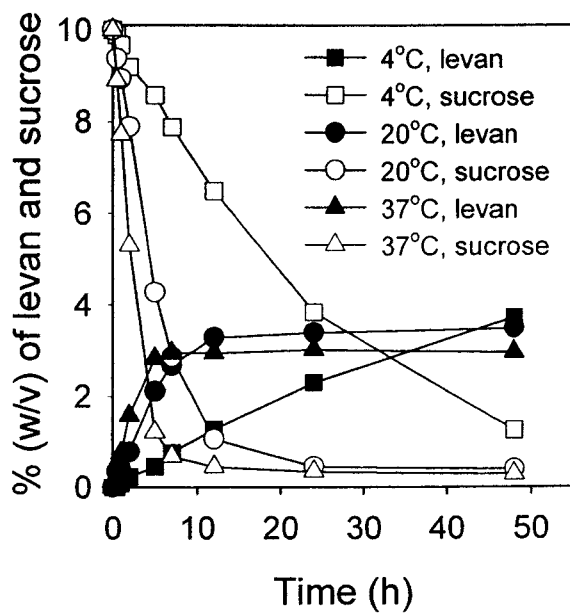


Fig. 4. Time profiles of sugar consumption of toluene-permeabilized whole-cells of *E. coli*/pRL1CP in a batch fermentation at various temperatures. For the reaction, 100 μ l of permeabilized cells were added to 1 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6) containing 10% sucrose.

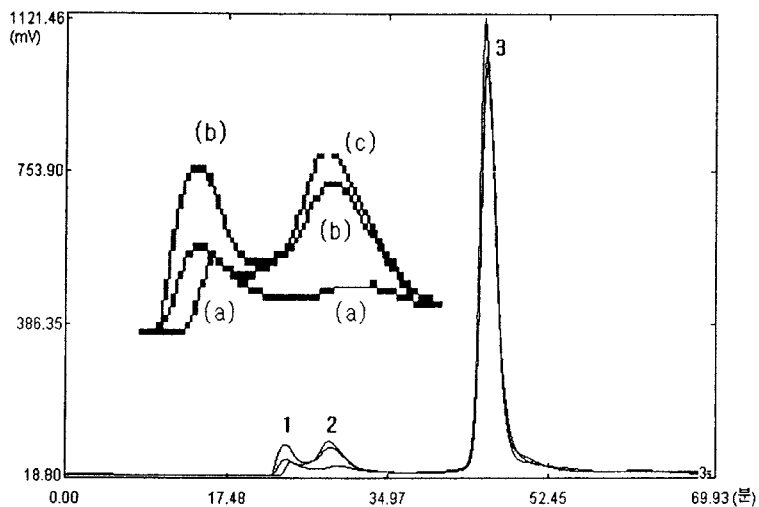


Fig. 5. Typical HPLC chromatograms of enzymatic products using toluene-permeabilized whole cells incubated with 10% sucrose in 1 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6), at 4°C (a), 20°C (b), 37°C (c). HPLC analyses were performed using two successive GPC columns with water as a mobile phase at 0.4 ml/min. 1, high molecular weight levan; 2, low molecular weight levan; 3, mixture of sucrose, glucose and fructose.

마. 수용성 플라کت란의 생산공정개발과 특성규명

1) 수용성 플라کت란의 생산공정개발

수용성프락탄의 생산을 위하여 효소반응 또는 균체자체를 이용한 생산공정을 개발하였다 (Fig. 6, 7). 기질로 10% 서당을 첨가시에 효소반응에 의하여 포도당과 과당으로 분해하면서 분해시에 생성되는 분해에너지를 사용하여 과당은 연속적으로 중합반응이 진행되어 수용성 플라کت란을 생성하였다 (Fig. 8). 기질전환율은 66%(과당기준시)였으나, 기질의 농도가 증가할수록 감소하였다. (Table 8). 효소반응이 종료된 반응액은 고농도의 포도당과 올리고당으로 건조가 어려웠으며, 순도를 올리기 위하여 ultrafiltration system을 통하여 저분자량 당류를 제거하였으며 스프레이 드라이어를 사용하여 수분함량을 3% 이하의 백색건조 제품을 얻었다 (Fig. 8).

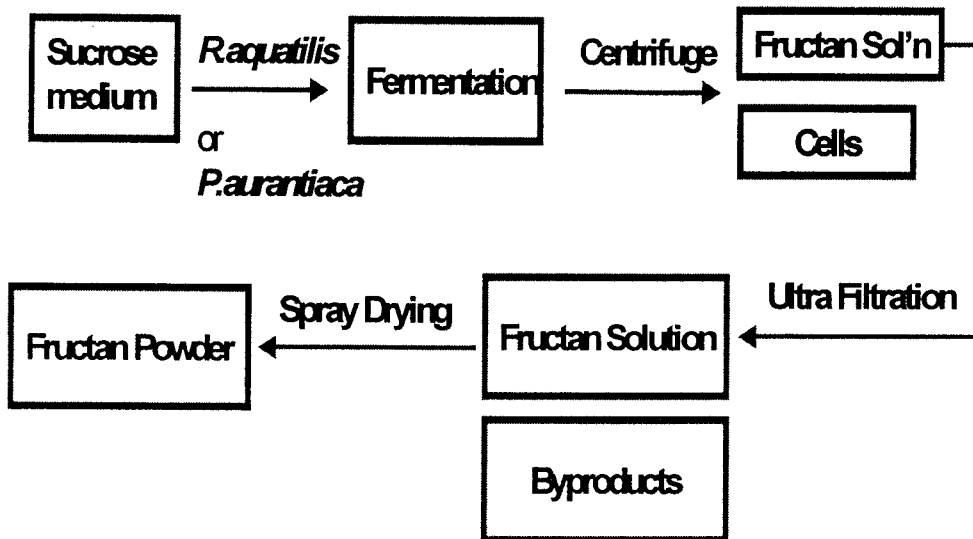


Fig. 6. Fermentation process for the production of soluble fructan

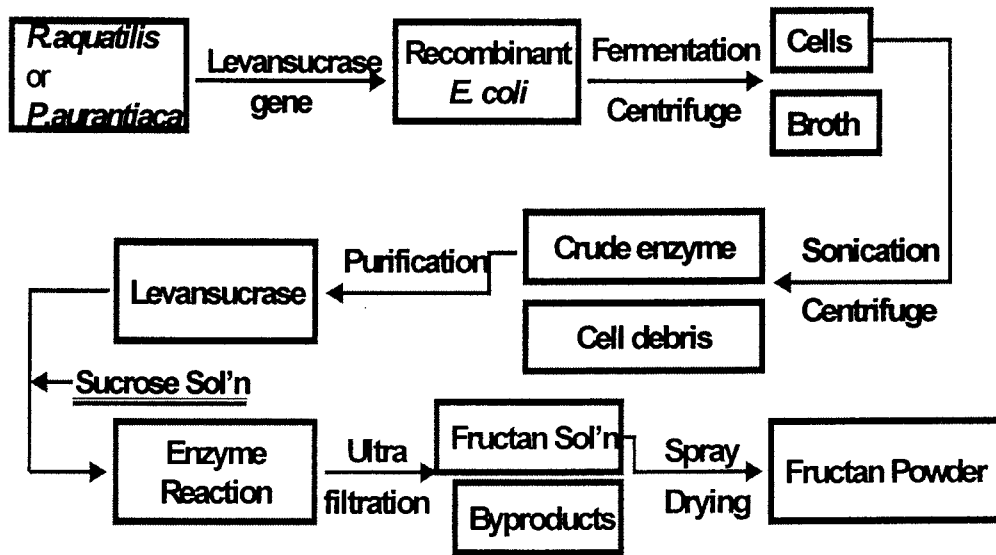


Fig. 7. Enzymatic process for the production of soluble fructan

Table 8. Production of soluble fructan from 10% sucrose solution by the enzymatic process

Conversion efficiency (fructose basis)	65%
--	-----

Glucose (%)	40
Fructose (%)	15
Sucrose (%)	4
Oligomers (%)	9
Fructan (%)	32



Fig. 8. Soluble fructan powder produced by the enzymatic process

2) 수용성 플라탄의 열 및 산가수분해 특성

총당 함량이 1%인 시료를 무기산과 유기산에 0.5%로 조정하여 시간별로 autoclave에서 가압 가열 방법으로 가수분해 시켰다. 가수분해에 사용한 산 종류에 따라 시간별 환원당 및 총당의 함량을 DNS법 및 anthrone 방법으로 측정하였다. 산의 종류에 따라서 수용성플라탄의 가수분해 효과가 달라졌으며, oxalic acid, HCl에 의한 가수분해 효과는 작았으나, H₂SO₄에 의한 가수분해 효과가 높았다 (Fig. 9). 121℃에서 10분 이상 가열시에는 플라탄은 가수분해되어 모두 fructose로 되었음을 알 수 있었다 (Fig. 10). 0.5M 황산을 95℃에서 3-4 분간 처리한 후 알코올로 침전 시켜 상층액과 침전물 그리고 원액을 비교한 바 상층액에서 가장 높은 환원당이 나와 가수분해가 가장 많이 된 것으로 나타났다. 따라서 본 실험 결과는 수용성플라탄에 산가수분해조건을 적용하면 분자량이 조절된 저분자량의 플라탄과 올리고당을 형성할 수 있을 것으로 판단된다.

수용성 플라탄은 본 회사에서 10톤 효소반응기, ultrafiltration system과 스프레이 드라이어등을 이용하여 월 6톤 규모의 생산설비를 구비하였으며, 이를 이용하여 시제품을 생산하였다.

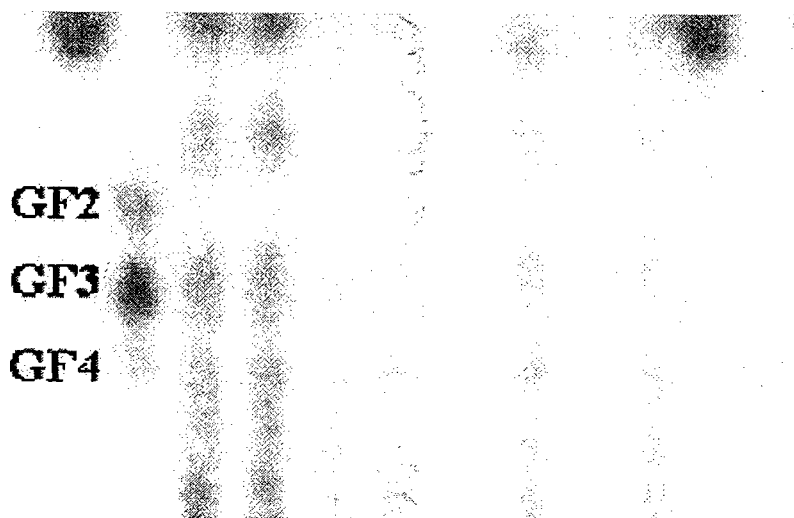


Fig. 9. Thin-layer chromatogram of acid hydrolysis of soluble fructan with various acid. (lane 2,3: with sulfuric acid: lane 8, with oxalic acid: lane 10, with HCl)

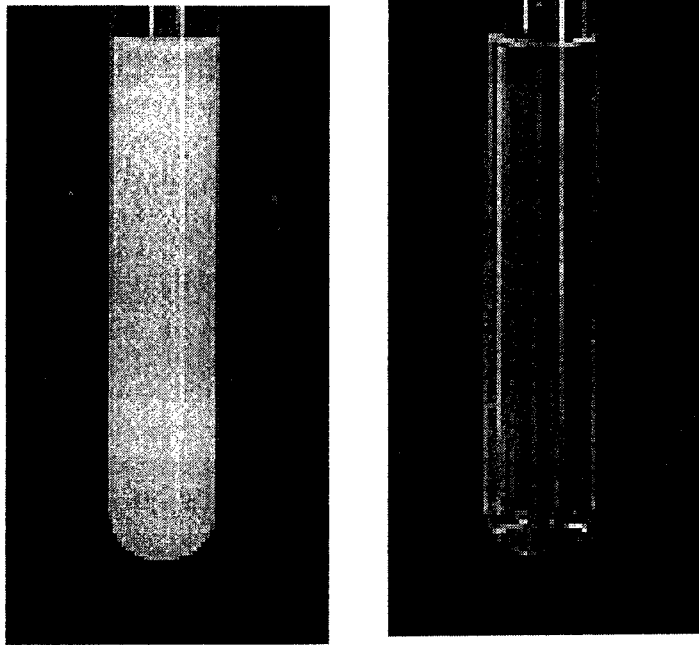


Fig. 10. Acid hydrolysis of 5% fructan levan. Left; without acid treatment
Right; with acid treatment.

3. 수용성 플라кт란을 적용한 새로운 기능성 식품 개발

가. 수용성 플라кт란을 첨가한 자일리톨 겔의 수용성 플라кт란 용출 시험 결과

관능검사 : 수용성 플라кт란을 15% 첨가한 gum의 경우 수용성 플라кт란의 점성때문에 gum 고유의 탄성이 급격히 감소하여 gum으로서의 기능을 상실하여 겔으로서 적합하지 않았으나, 5%를 첨가한 경우 씹힘성 및 탄성이 그대로 유지되었다.

고분자 수용성 플라кт란의 경우 점성이 상대적으로 높아서 겔 제조시 함량을 높이는 것은 무리가 있으므로, 점성이 낮은 저분자 수용성 플라кт란을 이용하여 수용성 플라кт란의 함량이 높은(기능성 증가) 겔을 제조하였다. 본 실험방법에서 언급한 분석조건에서는 수용성 플라кт란은 retention time 6.4분대에서 peak가 형성되었다. 개인별 차이는 있으나, 5분에서 수용성 플라кт란 용출률이 급격히 증가하였으며, 10분내에 겔 속에 존재하는 수용성 플라кт란이 대부분 용출되었다 (Fig. 11).

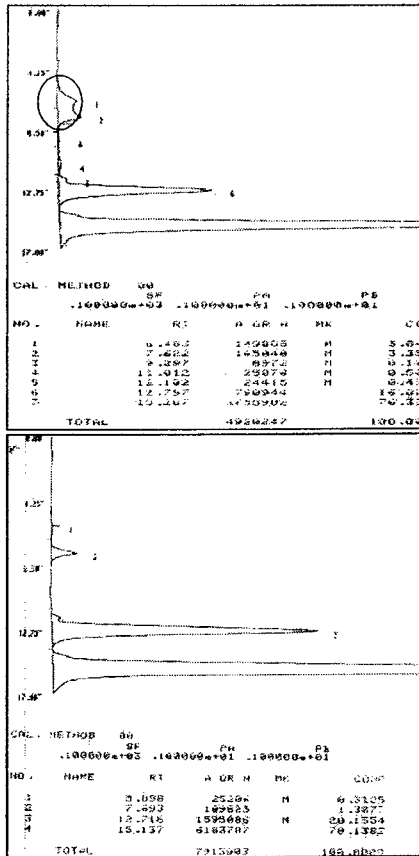


Fig. 11. Typical HPLC chromatogram for elution of soluble fructan from gum
 Top panel: 5 min, Bottom panel: 10 min.

나. 수용성 플라크탄을 첨가한 자일리톨 검의 혈중 지질 개선효과

실험대상으로 선정된 사람들은 26-42세, 평균 체중은 45-70 Kg으로 당뇨병의 과거력이 없고 간 질환이 없는 사람들을 대상으로 하였다. 신체계측 결과, MAC와 Tricep skinfold에서, 수용성 플라크탄검 투여에 의하여 감소되는 경향을 나타내었다. 체중변화량과 BMI 변화량에서도 유사한 결과를 나타내어(Table 9), 섭취기간이 증가할수록 체중과 BMI변화량이 수용성 플라크탄검 섭취군에서 높게 나타났다.

혈중 총 콜레스테롤 함량은 실험군간 차이가 없었으나 HDL 콜레스테롤은 수용성 플라크탄검군이(12.8%) 정상 대조군보다(-12.9%) 유의적으로 증가하였다 (Fig. 12). 혈중 중성지방(TG)은 수용성 플라크탄검군이 12.5%로 정상 대조군의 9.0%에 비해 상당히 감소된 값을 보였다. 한편, 본인의 동물실험에서는 수용성 플라크탄의 섭취에 의해, 쥐의 비만세포 (피하지방, 내장지방, 복부지방, 부고환지방)의 크기가 감소하여 체지방 축적이 억제되는 것을 확인하였다(8). 또한, 수용성 플라크탄은 HDL콜레스테롤 수준과 중성지질 (TG)의 형성과 축적을 억제함으로써, 항 비만 효과가 있음을 보고하였다. 본 실험에서도, 검 속에 포함된 수용성 플라크탄의 양만으로도 동물실험에서 확인된 효능이 일어남을 확인하였으며, 특히 수용성 플라크탄검의 임상실험에서는 혈중중성지질을 개선하는 경향을 확인하였다. 하지만, 본 연구에서는 다수의 비만측정인자 (혈중 free fatty acids, insulin, leptin 등)가 누락되어 있으며, 본 실험에서 확인된 효능이 장시간 수용성 플라크탄검을 투여하였을 때에도 나타나는지를 확인하는 후속 연구가 절대적으로 필요하다.

실험 결과, 수용성 플라크탄검군에서 체지방 축적이 억제되고, 혈중 중성지방이 감소하는 효과를 확인하였다. 수용성 플라크탄검군에서는 혈중 총 콜레스테롤에는 영향을 미치지 않았으나 HDL 콜레스테롤의증가를 가져왔고, 또한 혈중 중성지방은 수용성 플라크탄 공급에 의해 큰 폭으로 감소하여 정상군보다 더 감소하였는데, 이는 수용성 플라크탄검의 혈중 지질 개선 효과가 있음을 보여준다 (Fig. 12).

이러한 수용성 플라크탄검의 지질 대사 변화는 장내 미생물에 의한 수용성 플라크탄의 발효로 나타나는 단쇄 지방산 생성 변화와 식후 혈중 포도당 증가 및 인슐린의 분비 억제에 기인한 것으로 생각된다. 이들은 지방 합성 효소의 유전자 발현을 억제하여 지방산 합성과 지방 생성 능력을 감소시키고 중성 지방을 다량 함유한 지단백질의 형성과 분해에 영향을 주어 혈중 지질을 감소시키는 것으로 생각된다.

Table 9. Anthropometric and general characteristics of subjects

	Years	Height (cm)	Weight (Kg)
Levan group	36.4	159.1	58.3
Control group	35.3	158.5	56.2

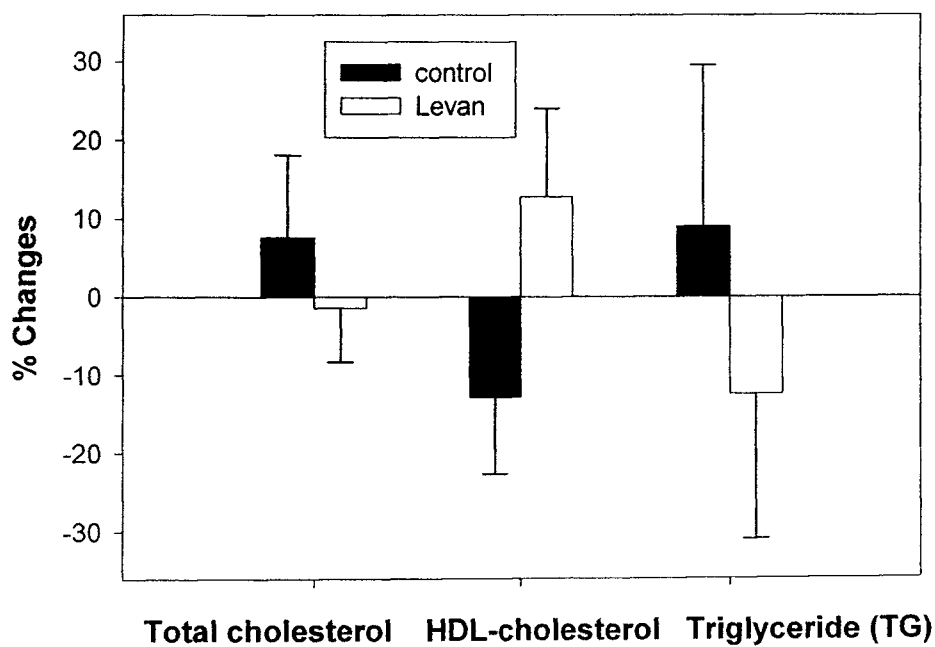


Fig. 12. Effect of soluble fructan containing gum on serum total cholesterol, HDL-cholesterol, total glyceride.

다. Fructan의 체지방 감소효능 시험 결과

1) 식이 섭취 및 체중 증가량

식이 섭취량은 고지방식이군이 정상식이군보다 낮았고 식이 수용성 fructan 수준에 의한 영향을 나타나지 않았다. 체중 증가량은 식이 수용성 fructan 수준의 영향을 받아 정상 식이군에서는 10% 수용성 fructan군이 유의적으로 낮았고 ($p < 0.05$) 고지방 식이군에서는 5% 수용성 fructan군 ($1.94 \pm 0.16 \text{g/day}$)과 10% 수용성 fructan군 (1.61g/day)이 대조군($2.58 \pm 0.29 \text{g/day}$)에 비해 낮았다. (Table 10)

2) 지방 조직의 무게

지방조직의 무게는 단위 체중 100g 당 g 무게로 환산하여 각 지방조직의 체지방율로 나타내었다. 발열반응을 담당하는 지방 조직인 갈색지방조직(brown adipose tissue, BAT)의 무게는 정상 식이군들 간에는 차이가 없었으나 고지방 식이군에서는 1% 수용성 fructan군과 5% 수용성 fructan군이 대조군보다 높은 결과를 보여 식이 수용성 fructan이 발열 반응 담당 조직의 증가를 가져올 수 있음을 시사하였다. 잉여 에너지가 축적되는 지방 조직인 백색지방 조직에서는 정상 대조군보다 고지방 대조군의 체지방량이 높았으나 수용성 fructan 함유 고지방 식이를 공급받은 실험동물의 경우 식이 수용성 fructan의 함량이 증가할수록 체지방 축적이 적어 정상 식이군의 체지방량 수준까지 감소하였다.

Epididymal fat 무게는 고지방 식이군의 경우 epididymal fat 무게가 수용성 fructan 함량에 따라 농도 의존적으로 감소하여 대조군, 1% 수용성 fructan군, 5% 수용성 fructan군, 10% 수용성 fructan군의 순으로 감소하였다. (Fig. 13)

Visceral fat 무게는 레반 식이군의 fat 무게를 대조군과 비교하였을 때 1% 수용성 fructan군의 fat 무게는 대조군의 91%, 5% 수용성 fructan군은 67%, 10% 수용성 fructan군은 43%로 나타나 10% 수용성 fructan군은 대조군에 비해 50% 이하로 visceral fat 무게가 감소하는 것을 보였다.

Peritoneal fat 무게는 정상 식이군과 고지방 식이군 모두 1% 수용성 fructan군이 대조군보다 적었고, 5%, 10% 수용성 fructan군에서 더 낮은 값을 보였으며 5% 수용성 fructan군과 10% 수용성 fructan군과의 차이는 보이지 않았다.

Table 10. Daily food intake, and weight gain in rats fed experimental diets for 4 wk.

	N	HF	HF-L1	HF-L5	HF-L10
Food intake	28.99±0.49 ^a	21.98±0.56 ^d _z	27.20±0.52 ^{bx}	24.24±0.60 ^{cy}	23.95±0.49 ^{cy}
Weight gain	2.48±0.21 ^{ab}	2.58±0.29 ^{ax}	2.77±0.17 ^{ax}	1.94±0.16 ^{bcy}	1.61±0.21 ^{cy}

Each value is the mean S.E. for 9 rats.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values with different superscript letters are significantly different from each other at $p < 0.05$.

^{a,b,c,d}significance between N, HF, HF-L1, HF-L5 and HF-L10.

^{x,y,z}significance between HF, HF-L1, HF-L5 and HF-L10.

N; normal diet, HF; high fat diet, HF-L1; high fat with 1% levan diet, HF-L5; high fat with 5% levan diet, HF-L10; high fat with 10% levan diet group. ^b AIN-76 Mineral mix; Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA

^c AIN-76 Vitamin mix; Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA

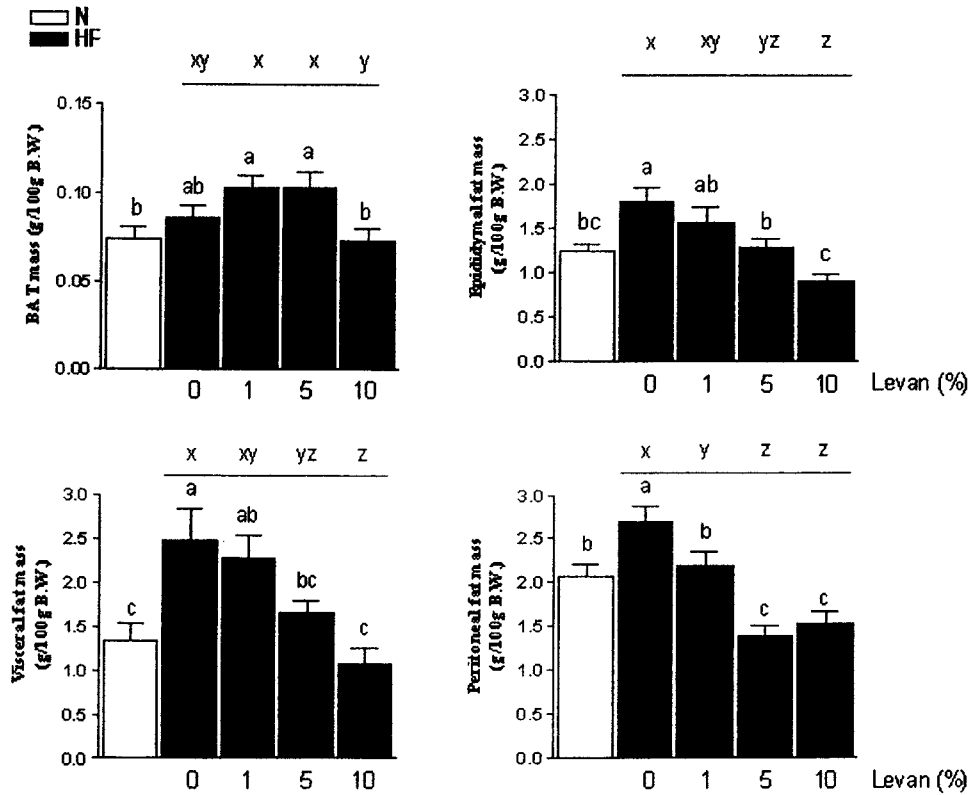


Fig. 13. Adipose tissue mass(BAT, epididymal fat, visceral fat, peritoneal fat) in rats fed experimental diets for 4 wk. Levels of tissue mass were calculated as a weight per unit body weight. Values are meanSE. n=9. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test. a,b,c; significance between N, HF and levan supplemented HF groups. x,y,z; significance between HF and levan supplemented HF groups. N; normal diet, HF; high fat diet group.

3) 지방 분포 및 지방 세포의 크기

MRI로 체지방의 분포를 관찰한 그림도 고지방 식이에 의하여 체지방의 과다 분포를 볼 수 있었고 레반의 첨가에 의하여 감소하는 것을 볼 수 있었다. (Fig. 14)

Visceral fat에서 지방 세포를 분리하여 크기를 측정하였을 때 평균 직경이 정상 식이군 ($10.73 \pm 3.03 \mu\text{m}$)에 비해 고지방 식이군 ($18.72 \pm 4.11 \mu\text{m}$)이 1.7배 큰 값을 보이며 유의적인 차이를 나타내어 ($P < 0.01$), 고지방 섭취에 의하여 지방 세포의 크기가 증가하는 것이 관찰되었다. (Fig 3) 수용성 fructan 식이에 의한 영향은 정상 식이군의 경우 10% 수용성 fructan군에서 대조군에 비해 약간 낮은 값을 보였고, 고지방 식이군의 경우 체지방양 변화와 같은 경향을 보여 레반 농도 증가에 따라 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). (Fig. 15)

4) 혈중 지질 함량

혈중 중성지방은 고지방 대조군이 $82.50 \pm 8.65 \text{mg/dl}$ 로 정상대조군의 $63.00 \pm 6.59 \text{mg/dl}$ 에 비해 유의적으로 증가한 반면, 수용성 fructan군을 공급한 군에서는 큰 폭으로 감소하여 5% 보다 10% 수용성 fructan군이 유의적으로 낮았다 ($61.33 \pm 6.97 \text{mg/dl}$, $42.66 \pm 6.59 \text{mg/dl}$). 10% 수용성 fructan군의 중성지방의 함량은 고지방 대조군의 49% 수준이며 오히려 정상 대조군보다 더 낮은 값을 보였다. 혈중 총 콜레스테롤 함량은 실험군간 차이가 없었으나 HDL 콜레스테롤은 고지방 대조군이 정상 대조군보다 낮았고, 수용성 fructan군 고지방 대조군 보다 유의적으로 증가하였다 ($P < 0.05$). (Table 11)

5) 혈중 렙틴 및 인슐린 함량

혈중 렙틴 함량은 고지방 대조군($5.74 \pm 2.46 \text{mg/dl}$)에 비해 5%($1.67 \pm 0.77 \text{mg/dl}$)와 10% 수용성 fructan($1.04 \pm 0.50 \text{mg/dl}$)군에서 유의적으로 낮은 값을 보여, 거의 정상 대조군 수준으로 감소함을 나타냈다. 혈중 인슐린 함량도 수용성 fructan군 식이에 의해 감소하였는데 10% 수용성 fructan군에서 고지방 대조군보다 감소하였고, 1%와 5% 수용성 fructan군은 정상 대조군 수준으로 감소하였다.

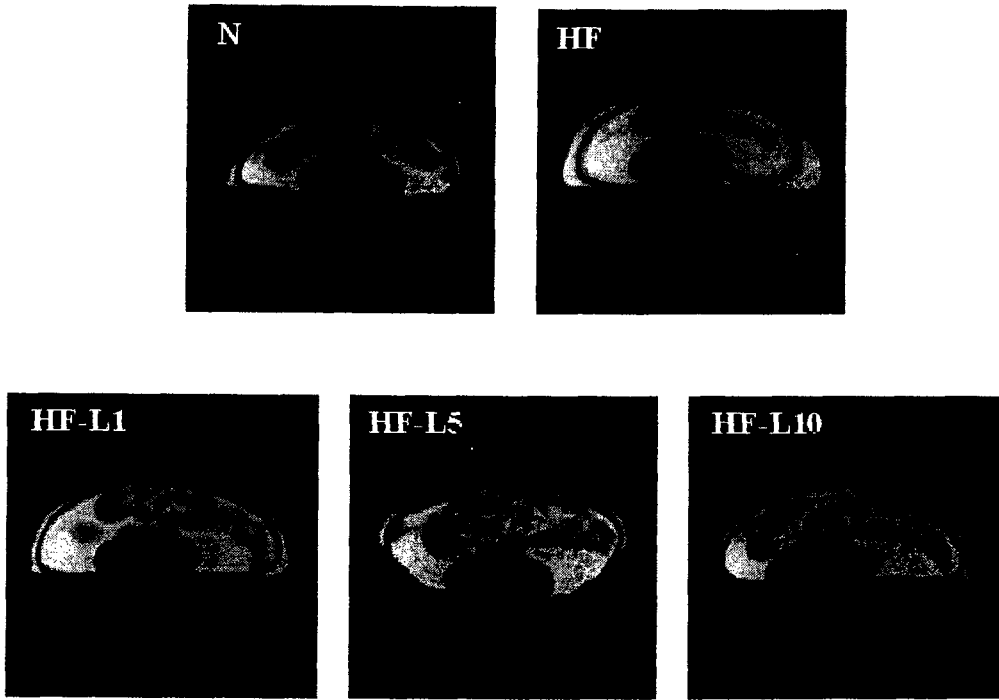


Fig. 14. Magnetic resonance images of abdominal fat distribution in rats fed experimental diets for 4 wk. The white area is the fat deposition in images. N; normal diet, HF; high fat diet, HF-L1; high fat with 1% levan diet, HF-L5; high fat with 5% levan diet, HF-L10; high fat with 10% levan diet group.

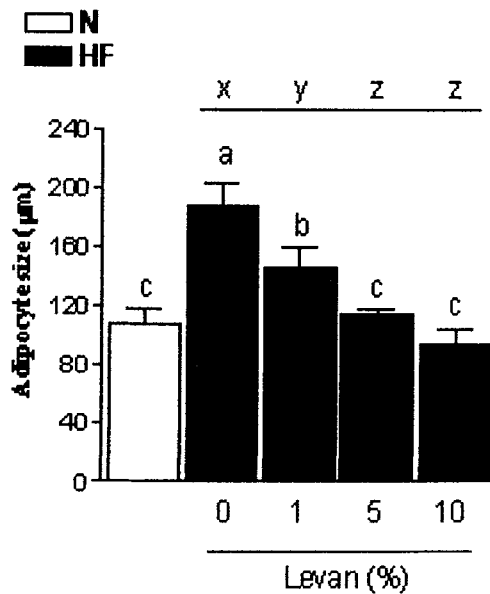


Fig. 15. The level of adipocyte size in rats fed experimental diets for 4 wk. Adipocyte was isolated by collagenase-treatment from visceral fat pad. Each value is the meanSE. for 9 rats. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (B). a,b,c; significance between N, HF and levan supplemented HF groups. x,y,z; significance between HF and levan supplemented HF groups. N; normal diet, HF; high fat diet group.

Table 11. Serum triglyceride, total cholesterol, HDL cholesterol, HTR and free fatty acid level in rats fed experimental diets for 4 wk.¹

	N ²	HF	HF-L1	HF-L5	HF-L10
Triglyceride (mg/dl)	63.00±6.59 ^{ab}	82.50±8.65 ^{ax}	75.40±8.45 ^{ax}	61.33±6.97 ^{abxy}	42.66±6.59 ^{by}
Total cholesterol	60.71±3.62 ^c	73.10±4.18 ^{abxy}	74.00±2.18 ^{ax}	64.44±4.40 ^{abcvy}	61.55±3.62 ^{bcy}
HDL cholesterol	45.57±2.80 ^{ab}	44.60±2.81 ^{by}	53.80±1.65 ^{ax}	54.33±3.89 ^{ax}	53.77±2.80 ^{ax}
HTR ³	0.77±0.06 ^{abc}	0.62±0.05 ^{cz}	0.73±0.01 ^{bcyz}	0.85±0.05 ^{abxy}	0.90±0.07 ^{ax}

¹Each value is the meanSE. for 9 rats. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values with different superscript letters are significantly different from each other at $p < 0.05$. a,b,c; significance between N, HF, HF-L1, HF-L5 and HF-L10. x,y,z; significance between HF, HF-L1, HF-L5 and HF-L10.

²N; normal diet, HF; high fat diet, HF-L1; high fat with 1% levan diet, HF-L5; high fat with 5% levan diet, HF-L10; high fat with 10% levan diet group.

³HTR = HDL cholesterol/Total cholesterol ratio

6) WAT와 Skeletal Muscle의 UCP 발현

White adipose tissue와 skeletal muscle에서 UCP 발현을 본 결과는 발열반응에 참여하는 UCP는 조직마다 이성질체가 다르게 발현되는데 WAT에서 UCP 2의 발현은 레반 섭취에 의하여 크게 반응을 보이지 않았으나 skeletal muscle에서의 UCP 3의 발현이 레반의 첨가식이 1, 5, 10%에 따라 상승 발현되며 특히 10% 첨가식에 의하여 유의하게 증가함은 레반 식이에 의하여 발열반응의 증가를 가져옴으로써 에너지 발산에 도움으로 줌으로써 체지방의 소모를 초래할 수 있었다. (Fig. 16)

7) 요약

본 결과, 수용성 fructan 함유 식이는 지방 세포 형성 및 체지방 축적을 줄여줄 수 있고 혈중 중성지방의 함량의 감소, HDL-콜레스테롤의 증가, 혈중 leptin의 감소를 유도하여 식욕조절 호르몬의 조절에 의하여 축적지방의 감소를 유도하여 체중 조절의 역할을 할 수 있을 것으로 본다. 이에 수용성 fructan의 비만 개선 물질로의 가능성을 보여준다고 하겠다.

라. Fructan의 금속이온 흡수촉진 효능시험 결과

1) 체중 변화량 및 장기의 무게

체중 변화량은 sham군, OVX군, OVX-levan군 간에 차이가 없었다. Tibia 무게는 정상군에 비하여 OVX군에서 유의하게 감소하였고 그 감소는 levan에 의하여 증가하지는 못했다. Femur 무게는 군간에 차이가 없었다. 그러나 Cecal contents는 Sham 군이 $1.3 \pm 0.6g$, OVX군이 $1.3 \pm 0.5g$, OVX-levan군이 $4.6 \pm 0.9g$ 으로 levan을 섭취한 군에서 유의하게 증가하는 것을 관찰하였고 colonic content도 levan을 섭취한 군에서 유의하게 증가하는 것을 보였다. Cecum wall weight은 Sham군이 $0.5 \pm 0.1g$, OVX군이 $0.5 \pm 0.2g$, OVX-levan군이 $0.9 \pm 0.2g$ 으로 levan을 섭취한 군에서 유의하게 증가하는 것을 관찰하였고 colonic wall weight도 levan을 섭취한 군에서 유의하게 증가하는 것을 보였다. (Table 12)

Table 12. Food intake, body weight, tibial and femoral weight, and intestinal content and wall weight in rats fed experimental diets

	Sham (n=7)	OVX (n=7)	OVX-Levan (n=7)
Body weight (g)	283.3±14.3	291.7±15.3	294.9±18.1
Tibia Weight (g/100gbody weight)	0.66±0.08 ^a	0.54±0.03 ^b	0.55±0.05 ^b
Femur Weight (g/100gbody weight)	0.72±0.11	0.70±0.17	0.69±0.07
Intestinal contents weight (g)			
Cecal	1.3±0.6 ^b	1.3±0.5 ^b	4.6±0.9 ^a
Colonic	0.7±0.4 ^b	0.8±0.5 ^b	1.8±0.8 ^a
Intestinal wall weight(g)			
Cecal	0.5±0.1 ^b	0.5±0.2 ^b	0.9±0.2 ^a
Colonic	0.9±0.2 ^b	0.8±0.1 ^b	1.4±0.3 ^a

1) All values are mean ± SD.

2) Letters with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test.

2) pH of the cecal and colonic contents

장내 pH는 Table 13에 보여주듯이 cecal 내용물의 pH는 Sham군이 7.11 ± 0.05 , OVX군이 7.41 ± 0.11 , OVX-levan군이 5.19 ± 0.27 으로 levan을 섭취한 군에서 유의하게 감소하여 장내 조건의 산성화를 가져왔다. Colonic pH도 Sham군이 7.55 ± 0.24 , OVX군이 7.88 ± 0.21 , OVX-levan군이 6.92 ± 0.25 로 levan을 섭취한 군에서 장내 조건의 산성화를 가져왔다. (Table 13)

3) Short-chain fatty acid(SCFA), lactate concentrations in the cecal and colonic contents

장내 단쇄지방산 함량은 acetate, propionate, butyrate에서 levan섭취에 의하여 함량이 유의하게 증가하였으며, lactate 함량은 cecum에서는 유의한 차이가 없었으나 colon에서 levan 섭취에 의하여 함량의 증가를 보였다. Cecum 내 Acetate 함량은 Sham군이 55.82 ± 13.32 , OVX군이 57.51 ± 17.27 , OVX-levan군이 153.19 ± 26.23 mol/total content 로 levan을 섭취한 군에서 유의하게 증가하는 것을 관찰하였고, Butyrate함량은 Sham군이 6.17 ± 2.13 , OVX군이 5.85 ± 1.94 , OVX-levan군이 9.29 ± 2.72 mol/total content 로 levan을 섭취한 군에서 유의하게 증가하는 것을 관찰하였다. Colon내Acetate, Butyrate 함량은 OVX-levan군이 유의하게 증가하는 것을 관찰하였다. (Table 14)

4) Serum concentration of calcium and phosphorus

혈청 내 칼슘의 농도는 Sham군이 7.84 ± 1.68 , OVX군이 6.99 ± 1.79 , OVX-levan군이 6.36 ± 1.52 mg/dl로 levan을 섭취한 군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하는 것을 관찰하였고, 인의 함량은 군간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 Ca/P의 비율도 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. (Table 15)

Table 13. pH of cecal and colonic contents in rats fed experimental diets

	Sham (n=7)	OVX (n=7)	OVX-Levan (n=7)
pH			
Cecal	7.11±0.05 ^a	7.41±0.11 ^a	5.19±0.27 ^b
Colonic	7.55±0.24 ^a	7.88±0.21 ^a	6.92±0.25 ^b

1) All values are mean ± SD.

2) Letters with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test.

Table 14. The cecal and colonic concentration of short-chain fatty acid (SCFA) and lactate in rats fed experimental diets

	Sham (n=7)	OVX (n=7)	OVX-Levan (n=7)
Cecum (mol / total content)			
Acetate	55.82±13.32b	57.51±17.27b	153.19±26.23a
Propionate	11.12±3.66a	9.13±2.14a	25.57±4.57b
Butyrate	6.17±2.13b	5.85±1.94b	9.29±2.72a
Colon (umol / total content)			
Acetate	23.24±5.45b	18.73±6.11b	47.43±8.43a
Propionate	4.00±0.98b	3.23±0.24b	9.53±2.18a
Butyrate	0.61±0.02	1.59±0.08	3.47±0.41
Lactate	0.06±0.01	0.07±0.02	0.10±0.05

1) All values are mean ± SD.

2) Letters with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test.

Table 15. Concentration of serum calcium (Ca) and phosphorus (P) and Ca/P ratio in rats fed experimental diets

	Sham (n=7)	OVX (n=7)	OVX-Levan (n=7)
Calcium (mg/dl)	7.84±1.68 ^a	6.99±1.79 ^{ab}	6.36±1.52 ^b
Phosphorus (mg/dl)	6.48±0.96	6.0±11.02	5.95±0.64
Ca/P ratio	1.21±0.11	1.16±0.30	1.07±0.21

1) All values are mean ± SD.

2) Letters with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test.

5) Mineral apparent absorption

칼슘, 인, 철분 이온의 흡수율은 칼슘 이온의 흡수율은 Sham군이 51.84.8, OVX군이 50.8±6.7, OVX-levan군이 54.6±4.3 %로 levan을 섭취한 군에서 대조군에 비하여 높아지는 경향성을 보였다. 철분의 섭취율도 levan을 섭취한 군에서 대조군에 비하여 흡수율의 향상성을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. (Table 16)

6) Bone mineral density

골밀도는 Bone Mineral Densitometer XCT Research SA (STRATC, German)로 측정하는데 trabecular density와 cortical density는 대조군에 비하여 levan의 섭취에 의하여 골밀도의 유의적인 증가를 가져왔고, total bone density는 대조군에 비하여 유의적인 아니지만 골밀도의 증가 경향성을 보였다. (Fig. 1)

7) 골조직의 변화

경골조직의 표본 염색에 의하여 정상쥐와 골다공증 쥐의 골형성의 차이를 볼 수 있었다. 골다공증 쥐의 골형성이 많이 파괴되어있는 것을 볼 수 있었고 levan 섭취에 의하여 약간의 골형성이 이루어졌음을 보여주었다. (Fig. 2)

8) 결 론

- 난소절제 후 저 칼슘식이에 의하여 폐경기 이후의 골다공증 모델을 확립하였음. 골밀도 감소, 경골 및 대퇴골의 무게 감소, 혈중 칼슘농도 감소, 골밀도 감소하였음.
- Levan 투여에 의하여 체중변화가 유의적이지는 않지만 감소하였으며 cecum의 무게는 난소절제군에 비하여 레반군에서 유의적으로 높았고, 경골과 대퇴골의 무게에서는 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았음.
- 레반을 투여한 군에서 혈중 칼슘의 농도가 유의적으로 감소하였으며 혈중 인의 농도는 유의적인 차이가 없었음.
- 레반의 칼슘, 철분 이온흡수를 증진하는 효과는 유의적이지는 않지만 레반군에서 장내의 pH가 산성조건화가 되면서 유익균의 성장을 도와주는 장내 환경 개선제로서의 역할이 강조되므로 골다공증, 빈혈을 예방개선할 수 있는 후보물질로의 검증을 통하여 새로운 폐경기 골다공증 예방용 특수 영양식품 개발에 이바지할 수 있으리라 기대함 .

Table 6. Apparent absorption of calcium and phosphorus in rats fed experimental diets

	Sham (n=7)	OVX (n=7)	OVX-Levan (n=7)
Calcium (%)	51.8±4.8	50.8±6.7	54.6±4.3
Phosphorus (%)	67.2±5.9	66.0±7.4	68.9±4.2
Fe (%)	55.2±3.6	56.1±6.6	57.7±6.1

1) All values are mean ± SD.

2) Letters with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test.

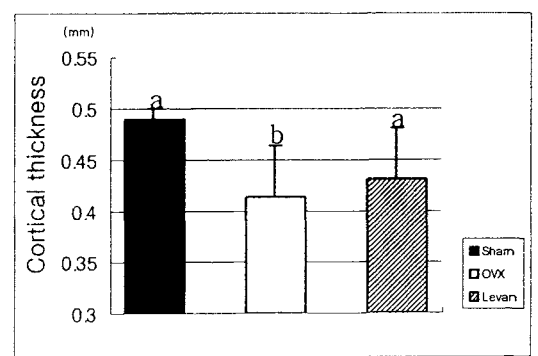
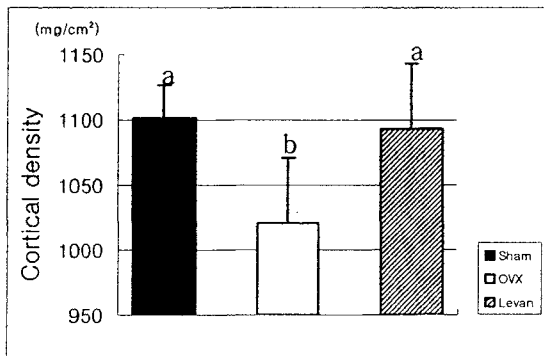
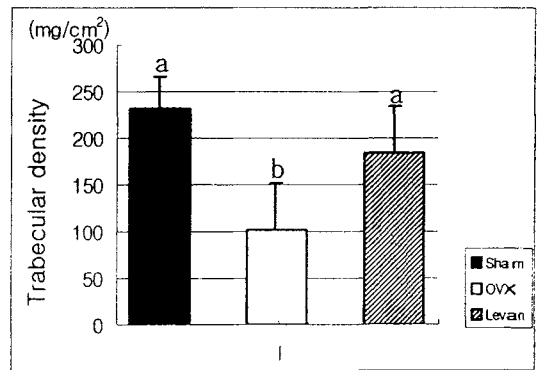
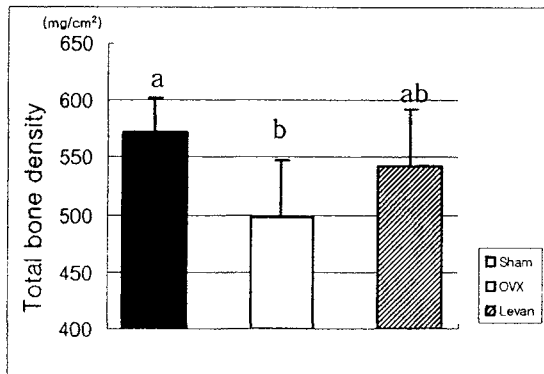


Fig. 17. The trabecular bone density in the osteoporotic model rats by ovariectomy and low calcium diet

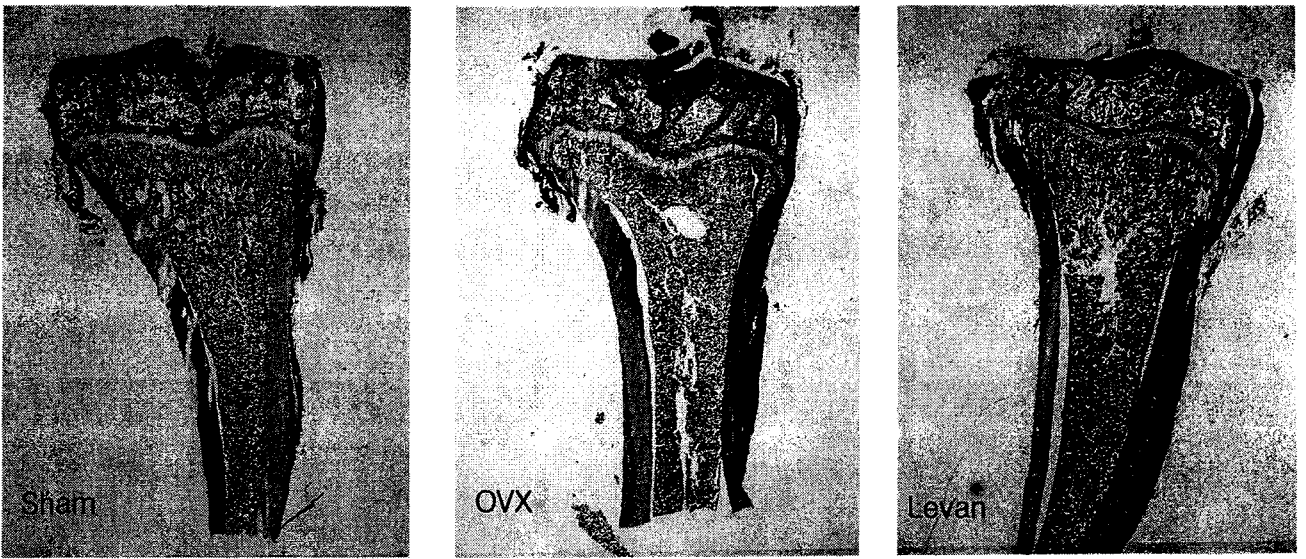


Fig. 18. Photomicrographs of tibia section of Sham-operated rats, OVX rats, and OVX rats treated with levan by Gomori staining

마. Fructan의 안정성 시험 결과

1) 체중 변화량 및 식이섭취량, 식이효율의 변화

자돈 배합사료에 레반을 0.1%와 0.3%를 섞은 후 항생제를 투여한 실험 결과 ADG(Average daily growth) 즉 평균성장율은 대조구에 비하여 체중 변화량은 0.1% 첨가군은 유의하게 체중의 증가를 볼 수 있었고 0.3% 첨가군은 체중의 변화가 약간은 감소하는 경향성을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 식이섭취량은 군간의 유의한 차이를 보이지 않았으며 식이효율로 환산하여 계산 한 결과 군간의 유의한 차이를 보이지 않았다. (Table 17)

2) 돈육의 색도변화

레반을 농도별로 투여하여 사육한 돈육 등심의 색변화를 알아본 결과 돈육 표면의 명도(L*)는 정상군과 레반 투여군을 비교시 차이가 없었으며, 적색도(a*)는 레반을 투여전의 적색에 비하여 투여 후 적색의 선명도가 수치가 높아지면서 안정성을 보였다. 황색도(b*)는 레반 투여 군에서 정상군보다 낮았으나 색의 선명도는 유지를 하고 있었다. 식육의 선택시 색의 신선도 및 관능적 결과는 밀접한 관계가 있고 품질 평가에도 중요한 요인이 되므로 레반의 투여에 의하여 색의 안정성을 유지하는데 도움이 되는 결과를 보였다. (Table 18)

3) 혈중 중성지방의 농도변화

돼지의 혈액 중 중성지방과 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤의 함량을 분석한 결과 total-cholesterol의 함량은 군간에 차이가 없었으며, HDL-cholesterol의 함량은 0.3% 레반을 투여한 군에서 유의하게($p < 0.05$) 증가함을 보였고, triglyceride의 함량은 0.1%, 0.3% 투여 군에서 유의하게($p < 0.05$) 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 돈육의 육질에 중성지방의 함량을 감소시킬 수 있는 좋은 첨가제로 사료된다. (Table 19)

4) 암세포 증식 저해 효과

레반의 간암세포인 HepG2 세포의 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 세포 증식과 세포 독성을 in vitro 에서 분석하는데 유용한 MTT assay로 분석한 결과 Fig. 19 과 같았다. 레반은 증류수를 사용하여 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 준비하였다. 레반 농도 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 983, 727, 5913, 5317%의 성장 저해 효과를 보였다. 레반 농도 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 는 대조군에 비하여 유의하게($P < 0.05$) 세포증식을 억제하는 것으로 나타났다.

Table 17. Daily food intake, weight gain and food efficiency ratio (FER)

	Food intake(g/day)	Weight gain(g/day)	FER
Control	542.9±22.8	342.5±11.4 ^b	1.55±0.47
0.1% Levan	569.3±12.3	388.6±22.7 ^a	1.53±0.29
0.3% Levan	523.6±20.6	354.8±20.9 ^{ab}	1.47±0.33

1) Values are Mean±S.D.

2) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test.

Table 18. External color of the pork treated with 0.1% and 0.3% levan

	L*		a*		b*	
	0days	30days	0days	30days	0days	30days
Control	68.3±0.4	70.4±0.5	2.85±0.23	0.46±1.00	6.98±0.32	7.44±0.31
0.1% Levan	68.3±0.4	65.7±0.2	2.85±0.23	1.87±0.77	6.98±0.32	7.01±0.07
0.3% Levan	68.3±0.4	68.8±0.3	2.85±0.23	2.92±0.65	6.98±0.32	7.04±0.15

1) Values are Mean±S.D.

2) L* : Lightness (0 - 100)

a* : Redness (-60 - +60)

b* : Yellowness (-60 - +60)

Table 19. Effect of dietary levan on serum total cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride level ¹⁾

	Total cholesterol (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Control	88.7±20.3	42.5±5.4 ^b	76.4±10.4 ^a
0.1% Levan	82.2±12.9	47.2±11.0 ^{ab}	58.2±11.3 ^b
0.3% Levan	86.3±11.2	50.3±9.3 ^a	59.4±8.8 ^b

1) Values are Mean±S.D.

2) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test.

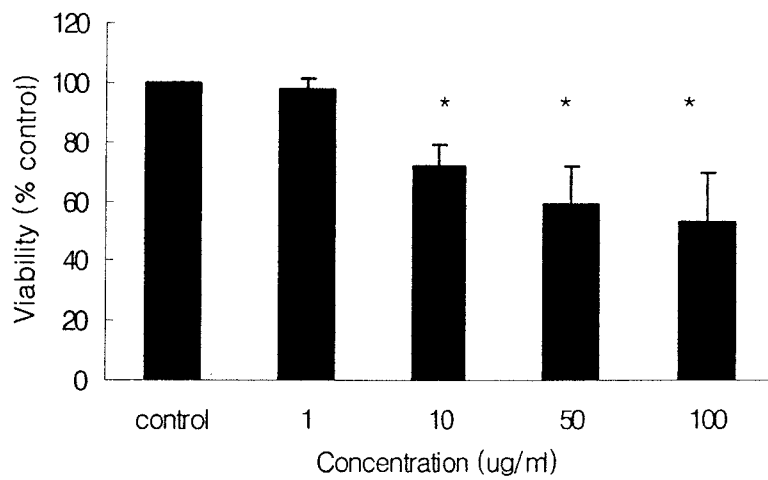


Fig. 19. Cytotoxic effects of *levan* on viability of HepG2 cells. Viability was determined with MTT assay. Results are presented as mean SEM. * represents $P < 0.05$ compared to the control group.

레반을 SNUC4 cell에 100 ug/ml 농도로 처리하였을 때 control 암세포의 증식을 억제하면서 응집이 일어나는 세포의 변형을 볼 수 있었다. (Fig. 20)

5) 세포 내 단백질 및 중성지질 농도 변화

세포 내 단백질과 중성지질의 농도 변화를 본 결과 레반 투여에 의하여 세포 내 단백질 농도의 변화는 차이가 나지 않았으나 중성지질의 함량은 유의하게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 3T3-L1 세포의 분화단계에 레반의 농도별 처리에 의하여 50, 100 ug/ml 농도로 처리 한 경우 유의하게 ($P < 0.05$) Triglyceride 농도의 감소, GPDH activity의 감소 현상을 볼 수 있었다. (Fig. 21, 22) 레반 농도 50, 100ug/mL 에서 0.101 ± 0.011 , 0.093 ± 0.009 로 대조군의 0.132 ± 0.002 수치에 비하여 유의하게 ($P < 0.05$) 감소하였다.

6) 레반과 레반 사료의 영양소와 아미노산 분석

레반의 영양소 함량을 분석 한 결과 수분이 3.4% 식이섬유 94.3%를 함유하고 있음으로써 식품의약품 안정청의 식품공전에 식이섬유로 등재되는 자료로 충분하다고 본다. 무기질의 함량에서 나트륨과 칼슘, 칼륨의 함유량이 철분, 인, 아연에 비하여 높게 나타났다. 사료에도 식이섬유의 함량이 높기는 하지만 레반에 비하여 낮은 함유량을 가졌다. 사료의 무기질 함량도 레반에 비하여 낮게 함유하고 있었다. 사료는 레반을 농도별로 첨가를 하는 것이므로 함량의 차이가 있었다. (Table 20)

레반에 함유된 아미노산의 조성은 아스파르산과 글루타민산의 함량이 약간 높게 나왔고 방향족 아미노산인 티로신의 함량이 높아서 신경전달물질이나 생리적 작용의 잇점을 가지고 있으며 BCAA인 리신, 이소류이신, 로이신의 함량도 사료와 비슷하였으나 약간 높게 나타났다. (Table 21)

7) 결 론

- 자돈 배합사료에 레반을 0.1%와 0.3%를 섞은 후 항생제를 투여한 결과 ADG(Average daily growth) 즉 평균성장율은 대조구에 비하여 체중 변화량은 0.1% 첨가군은 유의하게 체중의 증가를 볼 수 있었고 0.3% 첨가군은 체중의 변화가 약간은 감소하는 경향성을 보였으나 유의한 차이는 없었다.
- 레반을 농도별로 투여하여 사육한 돈육 등심의 색변화를 알아본 결과 돈육 표면의 명도(L*)는 정상군과 레반 투여군을 비교시 차이가 없었으며, 적색도

(a*)는 레반을 투여전의 적색에 비하여 투여 후 적색의 선명도가 수치가 높아지면서 안정성을 보였다.

돼지의 혈액total-cholesterol의 함량은 군간에 차이가 없었으며, HDL-cholesterol의 함량은 0.3% 레반을 투여한 군에서 유의하게($p < 0.05$) 증가함을 보였고, triglyceride의 함량은 0.1%, 0.3% 투여 군에서 유의하게($p < 0.05$) 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 돈육의 육질에 중성지방의 함량을 감소시킬 수 있는 좋은 첨가제로 사료된다.

간암세포인 HepG2 세포의 증식과 세포 독성을 MTT assay로 분석한 결과 레반 농도 50 ug/ml 와 100 ug/ml는 대조군에 비하여 유의하게($P < 0.05$) 세포증식을 억제하는 것으로 나타났다.

레반을 SNUC4 cell에 100 ug/ml 농도로 처리하였을 때 control 암세포의 증식을 억제하면서 응집이 일어나는 세포의 변형을 볼 수 있었다.

3T3-L1 세포의 분화단계에 레반의 농도별 처리에 의하여 50, 100 ug/ml 농도에서 유의하게 ($P < 0.05$) Triglyceride 농도의 감소, GPDH activity의 감소 현상을 볼 수 있었다.

레반의 영양소 함량을 분석 한 결과 수분이 3.4% 식이섬유 94.3%를 함유하고 있음으로써 식품의약품 안정청의 식품공전에 식이섬유로 등재되는 자료로 충분하다고 본다. 무기질의 함량에서 나트륨과 칼슘, 칼륨의 함유량이 철분, 인, 아연에 비하여 높게 나타났다.

본 연구의 결과를 토대로 레반의 암세포 독성 효과를 저해함을 관찰하였고 지방 세포의 지질 농도를 감소하는 효과를 가져왔으며 식품공전에 식이섬유로서의 등재에 충분한 영양소의 분석 함량을 조사하였다. 이는 생리활성의 효과를 전체적으로 종합하여 비만과 골질환 개선에 중요한 생리적 역할을 하는 물질로서 식품의 첨가제로 특수 영양식품 개발에 이바지 할 수 있으리라 기대함 .

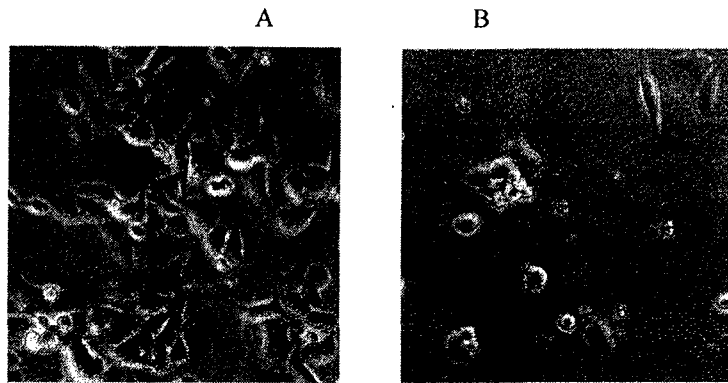


Fig. 20. Characterization of levan -induced cell death in SNU-C4 cells. Cells were cultured without levan (A) or with 100 g/ml levan (B). Morphology : phase-contrast microscopy shows cell shrinkage, irregularity in shape and cellular detachment in levan -treated cultures (B).

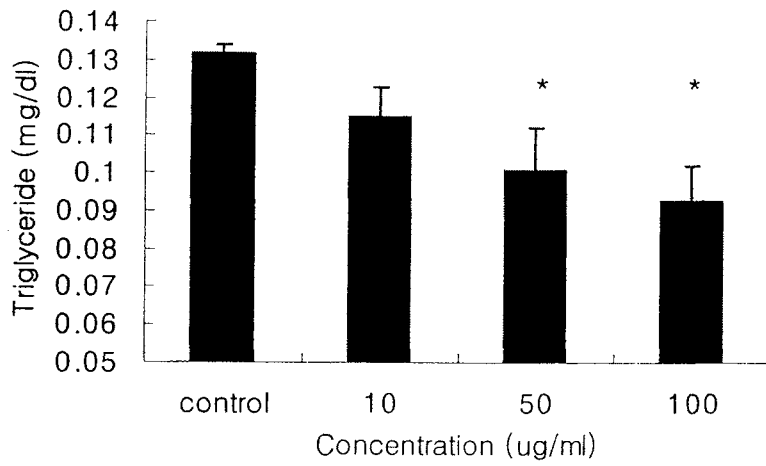


Fig. 21. Triglyceride concentration of 3T3-L1 cells treated with various concentration of levan. Results are presented as mean \pm SEM.

* represents $P < 0.05$ compared to the control group.

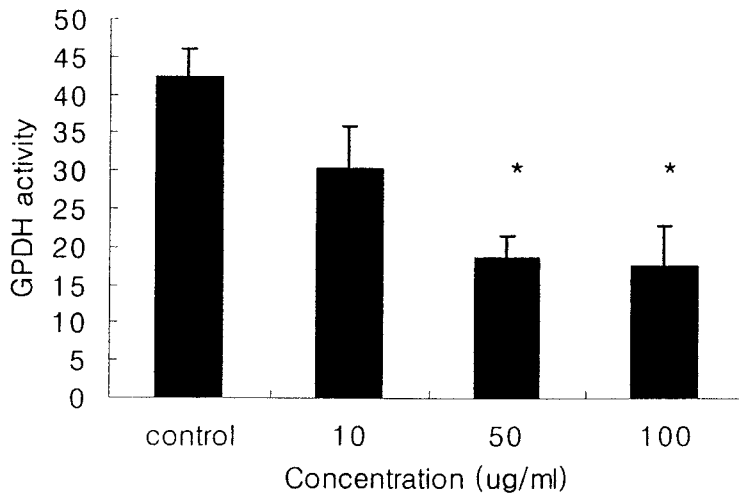


Fig. 22. GPDH activity of 3T3-L1 cells treated with various concentration of levan. Results are presented as mean±SEM.

* represents $P < 0.05$ compared to the control group.

Table 20. Nutrients concentration of levan

	Levan	Levan-feed for pig
수분 (g/100g)	3.4	5.1
지방 (g/100g)	0.0	0.0
단백질 (g/100g)	0.2	0.1
회분 (g/100g)	0.6	0.2
식이섬유 (g/100g)	94.3	20.6
비타민 E (ug/100g)	0.0	0.0
비타민 C (mg/100g)	0.0	0.0
베타카로틴 (mg/100g)	0.0	0.0
Na (mg/100g)	89.1	34.6
Ca (mg/100g)	85.2	39.8
Fe (mg/100g)	0.2	0.3
P (mg/100g)	0.1	0.4
Zn (mg/100g)	0.1	0.1
K (mg/100g)	45.2	17.8

Table 5. Amino acids concentration of levan

	Levan	Levan-feed for pig
Aspartic acid	8.0	0.0
Serine	8.3	8.7
Glutamic acid	18.3	10.8
Glycine	12.7	8.4
Histidine	0.0	0.0
Threonine	5.2	4.2
Arginine	10.2	7.7
Alanine	5.7	3.4
Proline	1.1	1.3
Cysteine	0.0	0.0
Tyrosine	17.6	5.6
Valine	5.4	2.7
Methionine	0.0	0.0
Lysine	8.2	1.9
Isoleucine	4.1	5.7
Leucine	7.0	3.3
Phenylalanine	7.4	5.1

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

미생물소재중 기능성 식품소재 및 사료첨가제의 국산화에 기여하기 위하여 미생물의 수용성 fructan 생성능을 탐색 비교하고, fructan 생성능 우수균주를 선정한 후 이를 이용하여 기능성 식품 소재로 개발하기 위하여 본 연구과제 계획서에 계획한 내용에 충실하고자 하였다.

Fructan 생성능 우수균주를 screening 하기 위하여 미생물을 수집, 분리하고 분리균주의 생육도, fructan 생성능, 물성, 분자량 등에 의해 균주를 선정하고, 균체생산 최적화방법을 설정하였다. 선정한 균주의 유전자를 대장균에 형질 전환후에 재조합균주가 생산하는 fructan의 조직과 물리화학적 특성을 규명하고 기능성과 영양학적 특성을 분석하였다. 제조한 fructan 함유 기능성 식품의 혈액 지질개선효과를 시험하기 위하여 임상실험을 통하여 분석하였으며, 식품가공소재 중 매우 까다로운 겹에 적용하여 성공적으로 효능이 나타남을 확인하였다.

Fructan 생성능 우수균주에서 생성된 소재를 이용하여, 현재 고가의 베타글루칸을 대체할 수 있어 기능성 식품소재 및 사료첨가제의 국산화에 기여하여 수입대체효과 뿐만 아니라 해외시장의 개척도 기대된다. 선진국에서는 축산 및 양식사료에 항생제의 남용을 금지하는 추세로 앞으로 국내에서도 이와 같은 방향으로 정책기조를 바꾸어갈 것으로 예상되고 있어 정장작용 및 면역증강 작용으로 동물의 설사방지 효과와 증체효과가 있는 fructan을 축산사료에 첨가하면 항생제를 대체 할 수 있어 축산업의 경쟁력 제고에 크게 기여 할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

미생물소재중 기능성 식품소재 및 사료첨가제의 국산화에 기여하기 위하여 미생물의 수용성 fructan 생성능을 탐색 비교하고, fructan 생성능 우수균주를 선정한 후 이를 이용하여 개발된 수용성 fructan은 아래와 같이 활용하고자 한다. 본 연구과제는 소재의 개발과 영양학적인 효능검증 및 임상실험과 식품소재 적용등으로 일련의 실험이 완료됨으로써 추가적인 실험은 필요치 않다.

- ▶ 수용성 fructan은 장내세균의 거동과 장내의 소화활동에 이로운 작용을 하고 혈중 콜레스테롤치의 상승을 억제하고, 포만감 지속효과와 아울러 유해물질 흡착 배설작용이 있는 것으로 알려져 관련 소재분야의 기술축적과 제품의 국산화에 기여함.
- ▶ 수용성 fructan은 인체내의 알파-글루코시다이스에 의하여 전혀 분해되지 않는 난소화성 다당류로 유해 장내세균(대장균, 웰치균등)에 의하여 전혀 이용되지 못하고 충치에도 관계가 없는 다당류로 합성식이섬유를 대체할 새로운 천연 식이섬유 소재로 이용이 가능할 것으로 기대됨.
- ▶ 수용성 fructan의 유산균 생육촉진효과에 따른 가축 장질환의 예방과 치료효과에 의한 증체효과기대.
- ▶ 수출증대에 따른 세계적인 식품으로서의 기반을 구축하고 국민보건 향상을 기대함.
- ▶ 레반의 생리적 효능 검사의 세포실험, 동물실험이 뒷받침되면서 체지방의 감소를 가져올수 있는 항비만, 항고지혈증의 효능을 보였고 골질환의 개선제로서 칼슘이온의 흡수를 도와줄 수 있는 골밀도의 증가현상을 보임으로써 인체 실험의 보장에 의하여 기능성 식품으로의 개발에 도움이 될 수 있는 실험의 보완과 생리적 현상의 기전을 분자생물학적 연구로서 향후 요구되어진다.

본 과제는 기술의 독창성과 실용성이 높아 국내식품회사에 소재 판매를 추진중에 있으며, 검, 음료, 스낵류등에 적용가능성을 실험하고 있다. 본 과제를 통하여 발표된 연구논문과 학회발표는 다음과 같다.

SCI 논문게재 : 3편
국내학술지 게재 : 1편
외국서적 : 1편
국제학술대회 발표: 6편
국내학술대회 발표: 3편
특허출원 : 1편
기타 : 3편

[SCI 논문]

Kang, S.A., Lee, J.C., Park, Y.M., Lee, C., Kim, S.W., Chang, B.I., Kim, C.H., Seo, J.O., Rhee, S.K., Jung, S.J., Kim, S.M., Jang, K.H., Secretory production of *Rahnella aquatilis* ATCC 33071 levansucrase expressed in *Escherichia coli*. Journal of Microbiology and Biotechnology. (2004) 14: In press.

Kang, S.A., Hong, K.H., Jang, K.H., Kim, S.H., Lee, K.H., Chang, B.I., Kim, C.H., Choue, R.W. Anti-obesity and hypolipidemic effects of dietary levan in high fat diet-induced obese rats. Journal of Microbiology and Biotechnology. (2004) 14(4): 796-804.

Jang, E.K., Jang, K.H., Koh, I., Kim, I.W., Kim, S.H., Kang, S.A., Kim, C.H., Ha, S.D., Rhee, S.K., Molecular characterization of the levansucrase gene from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 and its expression in *Escherichia coli*. Journal of Microbiology and Biotechnology. (2002) 12: 603-609.

[국내학술지]

장순아, 홍경희, 장기효, 김소혜, 장은경, 김철호, 조여원. 저농도 레반공급이 혈중 지질 및 체지방형성과 UCP 발현에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. (2002) 31: 788-795.

[외국서적]

Rhee, S.K., Song, K.B., Kim, C.H., Park, B.S., Jang, E.K. Jang, K.H. Biopolymers. PolysaccharidesI. "Levan". chapter #15 for vol 5. volume editors: Erick Vandamme, Sophie De Baets and Alexander Steinbuche. 2002.2. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany.

[학회발표]

Kang, S.A., Jang, K.H., Lee J.H., Chang, B.I, Lim, Y.A. Effects of fructose polymer, levan, on the body fat contents and serum lipid profiles in Korean Women. Experimental Biology 2004. Washington, DC, USA. April 17-21, 2004. 117.5

Kang, S.A., Hong, K.H., Jang, K.H., Lee J.H., Chang, B.I, Park, S.K., Ahn, D.K., Shin, J.S. Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR alpha in rats fed dietary levan. Experimental Biology 2004. Washington, DC, USA. April 17-21, 2004. 577.13

강순아, 김승현, 장기효, 장병일, 임용호. 서목태의 식물성 에스트로겐과 프럭토스 레반의 보충에 의한 폐경후 여성의 골질환 개선효과. 대한지역사회 2004년도 춘계학술대회. 서울여자대학교 바롬교육관 국제회의실. 2004년 5월 29일 P4-7. p179

장기효, 이은영, 정성제, 김상무, 이재철, 강순아. 플럭탄의 효소적 및 산가수 분해 특성 비교. 한국식품과학회 초록집 2004;6-34,p138

Kim, Y.Y., Jang, K.H., Kang, S.A., Cho, Y., Lee, E.Y, Suh J.H., Kim, C.H., Choue, R.W. Intakes of levan modified the human physiology and increased the trabecular bone density in osteoporotic model rats. 2003. FASEB, San Diego CA April 11-15, A299(188.12)

Kang, S.A., Hong, K.H., Jang, K.H., Jang, E.K., Kim, C.H., Choue, R.W. Hypolipidemic effect of dietary levan: altered expression of NPY in hypothalamus and UCP3 in skeletal muscle. 2003. FASEB, San Diego CA April 11-15, A1140(706.6)

홍경희, 강순아, 김소혜, 장기효, 장은경, 조여원. Dietary levan reduce lipids level accompanying the inhibition of lipogenic enzyme gene expression in liver. 2003 연합학술대회(한국운동영양학회, 한국영양학회, 한국식품영양과학회). 이화여대 이화삼성교육문화관 및 SK-Telecom관 컨벤션홀. 서울. 2003년 5월 24 일. p1-24. p130.

Jang, K.H., Jang, E.K., Koh, I.S., Kang, S.A., Kim, I.H., Kim, C.H. Production and structural characterization of low-branched levan produced from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380. The 9th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Gyeongju. July 1-5 (2002). p24-12.

Hong, K.H., Kim, K.H., Jang, K.H., Song, K.B., Kim, C.H., Rhee, S.K., Choue, R.W., Kang, S.A. Effect of fructose-polymer on serum leptin and UCP expression in obese rats induced by highfat diet. FASEB "Experimental Biology", New Orleans, Louisiana, USA. March 22 (2002). Abstracts 740.4

[특허출원]

레반을 포함하는 장내유산균 생육촉진 조성물 (10-2002-0006644) 2002.2.6 출원

[기타]

리얼바이오텍. 당류추출 '레반' 'DFA' 대량생산 길터. 탄수화물 소재전문기업을 향해. 식품저널 2003;11:60-61

클로렐라-레반다이어트 '대박' 기능성식품신문 2004. 8. 9

삼립식품 '레반 다이어트' 홈쇼핑 인기몰이. 기능성식품신문 2004. 9. 13

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 수행하면서 해외과학기술정보의 수집은 주로 문헌 및 특허를 중심으로 행하였으며, 해외에서 지금까지의 연구결과는 일본을 중심으로 진행되었다. 일본에서는 수용성 fructan을 프리바이오틱 식품소재로 이용하여 유산균과 함께 혼합한 형태로 사용되고 있다 (美裕貴(MIYUKI), 아도반스(Advance)). 이러한 제품화사례는 수용성 fructan의 인체에서의 안전성을 보여주는 좋은 예이다. 또한, 수용성 fructan의 저온에서의 얼지않은 특성을 이용한 단백질 냉동변성제 개발사례에 대한 예가 보고되었다. 따라서, 본 연구진은 이와 관련된 논문과 특허를 수집하였으며, 관련된 수집한 문헌과 특허등은 참고문헌에 기록하였거나 본 연구진이 사본등을 소장하고 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Rhee, S. K., K. B. Song, C. H. Kim, B. S. Park, E. K. Jang, and K. H. Jang (2002), Levan. In Biopolymers. Vol 5. eds Erick. V., Sophie, D. B., and Alexander, S. Wiley-VCH, Germany.
2. Han, Y. W. (1990), Microbial levan, Adv. Appl. Microbiol. 35. 171-194.
3. Song, K. B., and S. K. Rhee (1994), Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*, Biotechnol. Lett. 16, 1305-1310.
4. Chung, B. H., W. K. Kim, K. B. Song, C. H. Kim, and S. K. Rhee (1997), Novel polyethylene glycol/levan aqueous two-phase system for protein partitioning, Biotech. Techniq. 11, 327-329.
5. Cheong, T. K., T. J. Kim, M. J. Kim, Y. D. Choi, I. C. Kim, J. W. Kim, and K. H. Park (1996), Modulation of *Bacillus amylolytic* enzymes and production of branched oligosaccharides. In Enzymes for Carbohydrate Engineering, eds Park, K. H., Robyt, J., Choi, Y. D. Elsevier, Amsterdam.
6. Topping, D., and P. M. Clifton (2001), Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides, Physiological Reviews. 81, 1031-1064
7. Kang, S. K., S. J. Park, J. D. Lee, and T. H. Lee (2000), Physiological effects of levan oligosaccharide on growth of intestinal microflora, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29, 35-40
8. SA Kang S. A., K. H. Hong, K. H. Jang, S. H. Kim, K. H. Lee, B. I. Chang, C. H. Kim, R. W. Choue.(2004) Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of Dietary Levan in High Fat Diet- Induced Obese Rats . J. Microbiol. Biotechol. 14(4): 796-804
9. Campbell, J. M., G. C. Fashey, and B. W. Wolf (1997), Selected indigestible oligosaccharides affect large bowle mass, cecal and fecal short chain fatty acids pH and microflora in rat. J. Nutr. 127, 130-136.
10. Calazans, C. M. T., R. C. Lima, F. P. de Franca, and C. E. Lopes (2000), Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans, International J. of Biological Marcromolecules. 27, 245-247
11. Hendry, G. A. F., and R. K. Wallace (1993), The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In M. Suzuki, and N. J. Chatterton

- (ed.), Science and Technology of Fructans. CRC Press.
12. Blight, M. A., C. Chervaux, and I. B. Holland (1994), Protein secretion pathways in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* 5, 468-474.
 13. Leibovici, J., and Y. Stark (1985), Increase in cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan, *Cell Mol. Biol.* 31, 337-341.
 14. Marx, S. P., S. Winkler, and W. Hartmeier (2000), Metabolization of α -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 163-169.
 15. Jang, K. H., J. W. Seo, K. B. Song, C. H. Kim, and S. K. Rhee (1999), Extracellular secretion of levansucrase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*, *Bioprocess Eng.* 21, 453-458.
 16. Osborn, M. J., J. E. Gander, E. Parisi, and J. Carson (1972), Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*; isolation and characterization of cytoplasmic and outer membranes, *J. Biol. Chem.* 247: 3962-3972.
 17. Chalmers, J. J., E. Kim, J. N. Telford, E. Y. Wong, W. C. Tacon, M. L. Shuler, and D. B. Wilson (1990), Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor, *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 104-111.
 18. Laemmli, U. K (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
 19. Jang, K. H., K. B. Song, C. H. Kim, B. H. Chung, S. A. Kang, U. H. Chun, R. W. Choue, and S. K. Rhee (2001), Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*, *Biotechnol. Lett.* 23, 339-344.
 20. Blight, M. A., C. Chervaux, and I. B. Holland (1994), Protein secretion pathways in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5, 468-474.
 21. Seo, J. W., K. B. Song, K. H. Jang, C. H. Kim, B. H. Jung, and S. K. Rhee. 2000. Molecular cloning of a gene encoding the thermoactive levansucrase from *Rahnella aquatilis* and its growth phase-dependent expression in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 81: 63-72.
 22. Hammes, W., K. H. Scheifer, and O. Kandler (1973), Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan, *J. Bacteriol.* 116, 1029-1053.
 23. Ikura, Y. (1986) Effect of glycine and its derivatives on production and release beta-galactosidase by *Escherichia coli*, *Agric. Biol. Chem.* 50,

2747-2753.

24. Kim, S. H., E. K. Jang, I. H. Kim, K. H. Jang, S. A. Kang, and B. I. Chang (2003) Effect of glycine supplement on extracellular secretion of levansucrase from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 in recombinant *Escherichia coli*, Korean J. Biotechnol. Bioeng. 18, 312-317.
25. Chun U. H., and P. L. Rogers (1988), The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*, App. Microbiol. Biotechnol. 29, 19-24.



한국미생물·생명공학회

KMB

The Korean Society for
Microbiology and Biotechnology

서울시 강남구 역삼동 636-4

한국과학기술회관 본관 507호 (우)136-703

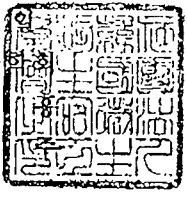
The Korea Science and Technology Center #507, 636-4

Yeogseam-Dong, Kangnam-Gu, Seoul 136-703, Korea

phone: 82-2-562-4731, 4767

fax: 82-2-552-4732

제 2004-87호

논문 게재 예정 증명서	
접수번호	JMB 2004-0045
논문제목	Secretory Production of Rahnella aquatilis ATCC 33071 Levansucrase Expressed in Escherichia coli
저자	KANG, SOON AH ¹ , JAE CHUL LEE ² , YOUNG MIN PARK ³ , CHAN LEE ⁴ , SEUNG-HWAN KIM ⁵ , BYUNG-IL CHANG ⁵ , CHUL HO KIM ⁶ , JEONG-WOO SEO ⁶ , SANG-KI RHEE ⁶ , SUNG JE JUNG ⁷ , AND KI-HYO JANG ^{2,*}
소속	¹ Department of Molecular Biotechnology, Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, ² Department of Food and Nutrition, Samcheok National University, Gangwon 245-711, Korea ³ Department of Dental Hygiene, YeoJoo Institute of Technology, Kyonggi-do 469-800, Korea ⁴ Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Haemi-myun, Seosan-Si, Chungnam 356-820, Korea ⁵ RealBiotech Co. Ltd., Yeongi-gun, Chungnam 339-820, Korea ⁶ Biotechnology Research Division, KRIBB, Taejon 305-333, Korea ⁷ Department of Food Science and Technology, Kyung Hee University, Youngin 449-701, Korea
<p>위 논문은 본 학회가 정한 심사규정에 따라 심사에 통과되어 <i>Journal of Microbiology and Biotechnology</i> 에 게재 예정된 논문임을 증명합니다.</p>	
<p>2004 년 10 월 12 일 (사) 한국미생물·생명공학회 회 장 김 병 학술지편집위원장 이 령</p> 	

**Secretary Production of *Rahnella aquatilis* ATCC 33071 Levansucrase
Expressed in *Escherichia coli***

**KANG, SOON AH¹, JAE CHUL LEE², YOUNG MIN PARK³, CHAN LEE⁴, SEUNG-
HWAN KIM⁵, BYUNG-IL CHANG⁵, CHUL HO KIM⁶, JEONG-WOO SEO⁶, SANG-KI
RHEE⁶, SUNG JE JUNG⁷, AND KI-HYO JANG^{2,*}**

¹*Department of Molecular Biotechnology, Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea,*

²*Department of Food and Nutrition, Samcheok National University, Gangwon 245-711, Korea*

³*Department of Dental Hygiene, YeoJoo Institute of Technology, Kyonggi-do 469-800, Korea*

⁴*Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Haemi-myun, Seosan-Si, Chungnam 356-820, Korea*

⁵*RealBiotech Co. Ltd., Yeongi-gun, Chungnam 339-820, Korea*

⁶*Biotechnology Research Division, KRIBB, Taejon 305-333, Korea*

⁷*Department of Food Science and Technology, Kyung Hee University, Youngin 449-701, Korea*

Running title: *R. aquatilis* levansucrase

**Corresponding author*

Phone: 82-33-570-6882.; Fax: 82-33-570-6880;

E-mail: kihyojang@samcheok.ac.kr

Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of Dietary Levan in High Fat Diet-Induced Obese Rats

KANG, SOON AH¹, KYUNGHEE HONG², KI-HYO JANG³, SOHYE KIM⁴, KYUNG HEE LEE⁵,
BYUNG-IL CHANG⁶, CHUL-HO KIM⁷, AND RYOWON CHOUE^{8*}

¹Department of Molecular Biotechnology, Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

²Asan Institute for Life Science, ³Department of Food & Nutrition, Samcheok National University, Gangwon

⁴Health Medical Center, Seoul National University Bundang Hospital, Bundang, Korea

⁵Department of Food Management, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

⁶RealBio Tech Co. Ltd., Taejon 305-333, Korea

⁷Biotechnology Research Division, KRIBB, 52 Oun-dong, Yusong, Taejon 305-333, Korea

⁸Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Received: December 29, 2003

Accepted: April 13, 2004

Abstract We found previously that dietary high fat caused obesity, and levan supplementation to the regular diet reduced adiposity and serum lipids. In the present study, we examined the effects of levan [high-molecular-mass β -(2,6)-linked fructose polymer] supplement on the development of obesity and lipid metabolism in rats fed with high-fat diet. Thus, to determine whether the dietary levan may have the anti-obesity and hypolipidemic effects, 4-wk-old Sprague Dawley male rats were fed with high-fat diet for 6 wk to induce obesity, and subsequently fed with 0, 1, 5, or 10% levan supplemented high-fat diets (w/w) for another 4 wk. For the comparison, a normal control group was fed with AIN-76A diet. Supplementation with levan resulted in a significant reduction of high-fat-induced body weight gain, white fat (i.e., epididymal, visceral, and peritoneal fat) development, adipocyte hypertrophy, and the development of hyperinsulinemia and hyperlipidemia in a dose-dependent manner. Serum triglyceride and free fatty acid levels were greatly reduced by levan supplementation. Serum total cholesterol level was reduced, whereas the HDL cholesterol level was increased by dietary levan. The expression of uncoupling protein (UCP) was increased by dietary high fat, and was further induced by levan supplementation. The mRNA level of UCP1, 2, and 3 in brown adipose tissue (BAT) and UCP3 in skeletal muscle was upregulated in rats fed with dietary levan. In conclusion, upregulated UCP mRNA expression may contribute to suppression of development of obesity through increased energy expenditure. The present results suggest that levan

supplementation to the diet is beneficial in suppressing diet-induced obesity and hyperlipidemia.

Key words: Obesity, hypolipidemic effects, levan, UCP, high-fat diet, rat

Obesity is the most prevalent nutritional disorder that results from imbalance between energy intake and expenditure [25]. It is often associated with hyperlipidemia, type 2 diabetes mellitus, hypertension, and increased risk of coronary heart disease. The optimal treatment for obesity would be the one that both suppresses food intake and increases energy expenditure. Food intake is regulated by leptin and other neurotransmitters, affecting appetite [36], and diet modulation can affect energy expenditure. An important component of energy expenditure is adaptive thermogenesis, which is based on the functionality of uncoupling protein (UCP). UCP is a member of the inner mitochondrial membrane transporters, which induces heat production by uncoupling respiration from ATP synthesis. It has been reported that the expression of UCP is related to energy expenditure and it plays a role in the development of obesity [9].

Interestingly, nondigestible carbohydrates such as fructan has been shown to exert systemic effects by modifying energy and lipid metabolism. Indeed, consumption of nondigestible oligosaccharides suppresses weight gain and fat accumulation [31], and reduces serum triglyceride and cholesterol concentrations [21]. The mechanism of these effects on serum lipids remains incompletely elucidated. Fructan stimulates the growth of bifidobacteria [6] and

*Corresponding author
Phone: 82-2-961-0769; Fax: 82-2-965-8904;
E-mail: sakang@khu.ac.kr

improves the intestinal microflora production of short-chain fatty acids, which are expected to have physiologic roles in human health [35]. Animal studies demonstrated that short-chain fatty acids produced by bacterial fermentation and absorbed into the portal blood flow may have an inhibitory effect on hepatic fatty acid and cholesterol synthesis [8, 27].

In contrast to the extensive studies on the effects of β -(2,1) fructan, such as oligofructose and inulin, few investigations of levan which belongs to a class of fructan composed of β -(2,6)-linked fructose have been carried out. Although oligofructose and inulin are available as natural oligomers and polymers of the sugar fructose found in many plants and microbial products, it has not been possible to obtain sufficient quantities of β -(2,6) fructan levan from natural sources. Microbial levans are produced from bacteria, yeasts, and fungi [10, 18–20, 34]. The production and utilization of levan at an industrial level are not well developed, and only a few papers have reported on the production of levan using fermentation techniques [17, 32]. We used synthesized high molecular weight (ca. 6,000,000) levan from sucrose by using bacterial levansucrase (sucrose-6-fructosyltransferase, EC 2.4.1.10) which was isolated from *Zymomonas mobilis* [34]. Levan is soluble in water and not hydrolyzed by human digestive enzymes, and the fermentability and the bifidogenic effect of levan have been confirmed *in vivo* [12]. Also, levan can be used as a prebiotic for stimulating the growth of lactic acid-producing bacteria in an animal model [11].

Previous work in our laboratory showed that dietary high-fat diet (40% of calories as fat) caused obesity in rats with increased body weight and fat accumulation [13], and that the oral administration of 2% levan reduced the adiposity and serum lipids [14]. Recently, exobiopolymers produced from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* and mushrooms have been shown to have hypolipidemic effect [43, 44]. On the basis of these earlier studies, the present study was undertaken to test the hypothesis that nondigestible carbohydrates, namely levan, are able to decrease adiposity and post-prandial lipemia in obese rats induced by high-fat diet, thus clarifying whether supplementation of levan has anti-obesity and hypolipidemic effects. The gene expression of UCP was investigated in order to find a potential effect of levan on energy intake and expenditure.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Diets

Three-weeks-old Sprague-Dawley male rats were purchased from Central Experimental Animals (Samtaco, Seoul Korea) and housed individually. After adaptation for 1 week, rats were weighed, randomly assigned, and fed normal or high-

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet).^a

	N	HF	HF-L1	HF-L5	HF-L10
Casein	200	200	200	200	200
DL-Methionine	3	3	3	3	3
Corn starch	150	150	140	100	50
Sucrose	500	345	345	345	345
Cellulose	50	50	50	50	50
Corn oil	50	-	-	-	-
Beef tallow	-	205	205	205	205
Mineral mixture ^b	35	35	35	35	35
Vitamin mixture ^c	10	10	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2	2	2
Levan	-	-	10	50	100
Fat % (Calories)	11.7	40.0	40.0	40.0	40.0

^aN: Normal diet, AIN-76A diet #100000. HF: high-fat diet, AIN-76 diet #100496 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, U.S.A.). HF-L1: high fat with 1% levan. HF-L5: high fat with 5% levan. HF-L10: high fat with 10% levan diet.

^bAIN-76 Mineral mix; Dyets Inc., Bethlehem, PA, U.S.A.

^cAIN-76 Vitamin mix; Dyets Inc., Bethlehem, PA, U.S.A.

fat diet. Six weeks later, high-fat fed rats were randomly assigned to four groups and allowed to one of the four diets; high fat with 0, 1, 5, or 10% (wt/wt) levan diets for 4 weeks. The composition of experimental diets is shown in Table 1. Water and food were *ad libitum*. The food intake and body weight were weighed twice a week and food efficiency ratio (FER) was calculated.

Sample Collection

After 4 weeks of feeding normal, high fat, or levan supplemented high-fat diets, blood was collected from the portal vein under anesthesia with diethyl ether, and serum was separated by centrifugation (3,000 \times g, for 15 min at 4°C). After collecting blood samples, soleus muscle, interscapular brown adipose tissue (BAT), epididymal fat pad, visceral fat, and peritoneal fat pad were immediately excised, weighed, and frozen in liquid N₂. All serum and tissue samples were stored at -70°C until analysis.

Abdominal Fat Distribution

Abdominal fat distribution of rats was examined one day before sacrifice, using MRI (Magnetic Resonance Imaging System).

Adipocyte Size Determination

Adipose tissue samples (0.5 g) were taken from visceral fat depots and adipocytes were isolated using collagenase [24]. Adipose tissue was immediately washed in 145 mmol/l NaCl-buffer containing 3% BSA, cut into small pieces, and added to 1 ml of NaCl-buffer containing 1.5 mg collagenase (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.), and the mixture was incubated in a shaking water bath at

80 cycles/min for 1 h at 37°C. After incubation, the cells was filtered through 450 µm nylon mesh, and adipocytes were allowed to float for 3 min. The adipocytes were washed twice with 3 ml of NaCl-buffer containing 5 mM glucose and 3% BSA. Between each washing, the adipocytes were centrifuged at 470 ×g for 1 min. Then, the cells were resuspended in 1–2 ml of NaCl-buffer with glucose and BSA. The adipocytes were evaluated by a microscope, using a calibrated grid, and the mean diameter of 30 cells from each cells preparation was calculated.

Blood Analyses

Serum cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride (TG), and free fatty acid were measured using commercial kits (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.).

Quantitative RT-PCR for Gene Expression Analyses

Total RNA from BAT, epididymal fat, and soleus muscle was extracted with the Trizol reagent (Gibco). The yield and quality of the extracted RNA were assessed by the 260/280 nm optical density ratio and by electrophoresis on 1% agarose gels under denaturing conditions. Reverse transcription (RT) reactions consisted of 2 µg of total RNA denatured for 10 min at 72°C for cDNA synthesis. The final composition of the reaction mixture was as follow: M-MLV (Promega) 200 units, dNTP (each 2.5 mM) mix 2 µl, RNasin (Promega) 40 units, oligo (dT) primer (Invitrogen) 1 µl. Reverse transcriptase reaction was then performed in a final volume of 25 µl for 60 min at 42°C and stopped after 30 min at 75°C. UCP primers were: UCP1 sense 5'-TAC CCA CAT CAG GCA ACA G-3', antisense 5'-TCA TTG CAC AGC TGG GTA C-3' (product size 842 bp), UCP2 sense 5'-ACA GCA GCC TGT ATT GCA G-3', antisense 5'-TTG TAG GCT TCG ACA GTG C-3' (product size 428 bp), UCP3 sense 5'-ACC ATG GTT GGA CTT CAG C-3', antisense 5'-AGT TCC CAG CGT ATC CAT G-3' (product size 450 bp).

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in 25 µl final volume containing Taq polymerase (Takara) 0.125 µl, 10×PCR buffer 2.5 µl, dNTP (each 2.5 mM) mix 2 µl, 10 pmol each of the gene specific primers, and 10 pmol each of the primers and β-actin. The PCR cycle

was 94°C for 30 s, 58°C or 60°C for 60 s, and 72°C for 90 s, repeated for 27, 32, and 30 cycles for UCP1, UCP2, and UCP3, respectively. A final elongation step was 10 min at 72°C. The PCR products (10 µl) were resolved in 1.5% agarose gel, and the DNA was visualized by ethidium bromide using an U.V. transilluminator and then photographed. The level of gene expression was determined as the ratio of integrated peak area for each individual gene PCR product relative to that of the coamplified α-actin internal standard. Values are presented as mean±SE of 4 individual determinations.

Statistical Analyses

Results are expressed as means±SE. The significance of difference between the normal and the high-fat diet groups before levan supplementation was determined by Student's t-test. ANOVA and Duncan's multiple range test were used to determine the significance of differences after 4 weeks of levan supplementation. Statistical analyses were carried out with the SAS program (SAS 8.0, SAS institute, Cary, NC, U.S.A.) and statistical significance of difference was defined at P<0.05.

RESULTS

Food Intake, Body Weight, Weight Gain, and FER After Levan Supplementation

Food intake was lower in the high-fat diet fed rats, compared to normal diet fed rats, and higher in the levan supplemented diet fed rats than the high-fat diet fed rats. Body weight gain was markedly lower in the rats fed diets containing 5% and 10% levan, compared to the rats fed with high-fat diet alone. At the end of the study, body weight gain was 38% lower in the rats fed 10% levan diet, compared to the high-fat diet fed rats, and 35% lower compared to the normal diet fed rats. Thus, food efficiency ratio (FER) was significantly lowered by dietary levan in a dose-dependent manner. FER of the high-fat diet fed rats was higher than the normal diet fed rats, and lowered by 15%, 34%, and 43% in 1%, 5%, and 10% levan supplemented diet fed rats, respectively (Table 2).

Table 2. Daily food intake, weight gain, and food efficiency ratio in rats fed with experimental diets for 4 wk.

	N	HF	HF-L1	HF-L5	HF-L10
Food intake (g/day)	28.99±0.49 ^a	21.98±0.56 ^c	27.20±0.52 ^b	24.24±0.60 ^c	23.95±0.49 ^c
Weight gain (g/day)	2.48±0.21 ^{ab}	2.58±0.29 ^c	2.77±0.17 ^c	1.94±0.16 ^{xy}	1.61±0.21 ^z
FER	0.087±0.007 ^c	0.121±0.013 ^c	0.103±0.006 ^{xy}	0.080±0.007 ^{yz}	0.069±0.007 ^z

Each value is the mean±S.E. for 9 rats.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values with different superscript letters are significantly different from each other at p<0.05. a, b, c, d; significance between N, HF, HF-L1, HF-L5, and HF-L10. x, y, z; significance between HF, HF-L1, HF-L5, and HF-L10.

FER: Food efficiency ratio=body weight gain (g/day)/food intake (g/day).

N: normal diet, HF: high fat diet, HF-L1: high fat with 1% levan diet, HF-L5: high fat with 5% levan diet, HF-L10: high fat with 10% levan diet group.

Adipose Tissue Mass and Adipocyte Size

BAT mass was higher in the rats fed 1% and 5% levan containing diet, and lower in the 10% levan diet fed rats than that of the rats fed high-fat diet alone. Compared with the normal diet, the epididymal and visceral fat masses in the rats fed 10% levan supplemented high-fat diet were nearly identical. Moreover, the peritoneal fat mass of 5% (1.40±0.11 g/100 g B.W.) and 10% (1.52±0.15 g/100 g B.W.) levan supplement to diet was lower than that of the normal diet group (2.06±0.15 g/100 g B.W.). Supplementation with levan significantly suppressed the relative white adipose tissue mass in a dose-dependent manner; i.e., epididymal, visceral, and peritoneal fat accumulation, in comparison with that in the high-fat diet group. Epididymal, visceral, and peritoneal fat mass was remarkably lower than the high-fat diet fed rats by 45%, 57%, and 44%, respectively (Fig. 1).

MRI, which visualizes the fat accumulation in the intra-abdomen, revealed great fat in the visceral and subcutaneous areas in the high-fat diet fed rats, and the body fat accumulation was lowered by levan supplementation in a dose-dependent manner (Fig. 2).

The adipocyte size was measured from collagenase treated visceral fat pad (Fig. 3). The cell size was bigger (187.2±16.8 μm) in the high-fat diet fed rats than the normal diet fed rats (107.3±11.4 μm), and became smaller dose dependently by levan supplement, which is consistent with the fat mass. The size of adipocytes in the rats fed 5% (114.3±3.3 μm) and 10% (93.4±11.4 μm) levan-containing diet was nearly identical with that of the normal diet fed rats.

Serum Triglyceride, Total Cholesterol, HDL Cholesterol, and Free Fatty Acid

The levan supplementation in the high-fat diet markedly lowered the serum triglyceride concentration, as compared to the rats fed the high-fat diet alone. The triglyceride level in the 10% levan diet fed rats was significantly lower than the high-fat fed rats and normal diet fed rats by 48% and 32%, respectively (P<0.05) (Table 3). Total cholesterol level was higher in the rats fed high-fat diet than the normal diet fed rats. This increase in total cholesterol was suppressed by 5% or 10% levan supplementation to the

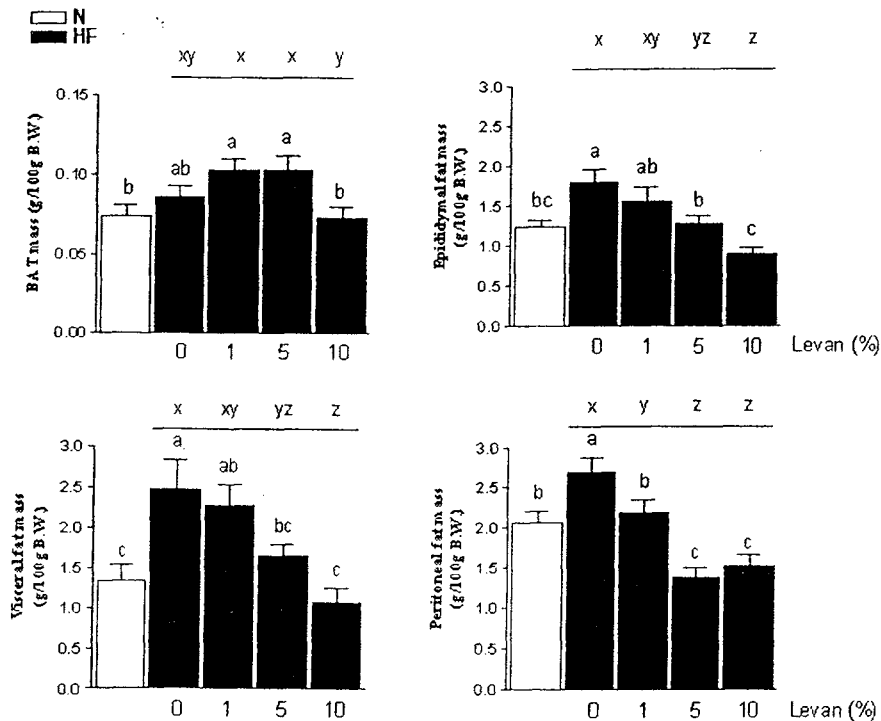


Fig. 1. Adipose tissue mass (BAT, epididymal fat, visceral fat, peritoneal fat) in rats fed with experimental diets for 4 wk. Levels of tissue mass were calculated as a weight per unit body weight. Values are mean±SE n=9. Different letters indicate significant difference (p<0.05) by Duncan's Multiple Range Test. a, b, c; significance between N, HF, and levan supplemented HF groups. x, y, z; significance between HF and levan supplemented HF groups. N; normal diet. HF; high-fat diet group.

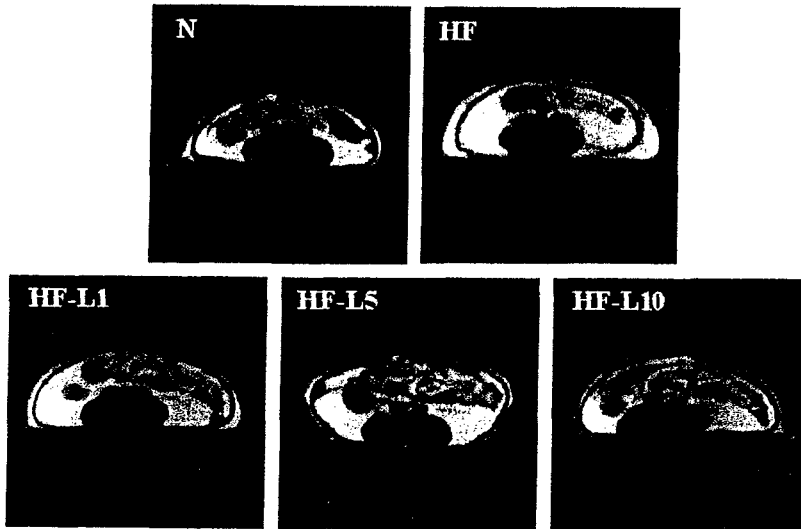


Fig. 2. Magnetic resonance images of abdominal fat distribution in rats fed with experimental diets for 4 wk. The white area is the fat deposition in images. N; normal diet. HF; high-fat diet. HF-L1; high-fat with 1% levan diet. HF-L5; high fat with 5% levan diet. HF-L10; high-fat with 10% levan diet group.

high-fat diet and lowered to the value of the normal diet fed rats. On the other hand, HDL cholesterol level in the

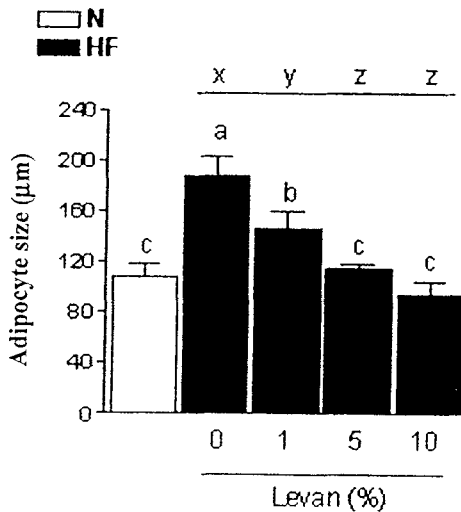


Fig. 3. The level of adipocyte size in rats fed with experimental diets for 4 wk. Adipocyte was isolated by collagenase treatment from visceral fat pad.

Each value is mean±SE for 9 rats. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's Multiple Range Test (B). a, b, c; significance between N, HF, and levan supplemented HF groups. x, y, z; significance between HF and levan supplemented HF groups. N; normal diet. HF; high-fat diet group.

levan fed rats was significantly higher than in the high-fat or normal diet fed rats ($P < 0.05$). The ratio of HDL/total cholesterol (HTR) in the rats fed levan-containing high-fat diet was significantly higher than in the high-fat diet or normal diet fed rats. Serum free fatty acid level in the high-fat fed rats was higher than the normal diet fed rats. The levan supplementation to the high-fat diet resulted in significant reduction in the serum free fatty acid level: 21%, 35%, and 29% reduction in 1%, 5%, and 10% levan supplemented rats, compared to the rats fed with high-fat diet alone.

Expression of UCP mRNA in BAT, Skeletal Muscle, and WAT

The effects of dietary levan on mRNA levels of UCPs, which may influence metabolic efficiency, were examined. BAT mRNA levels of UCP 1, 2, and 3 in 10% levan-containing high-fat fed rats were 121%, 42%, and 22% higher than the high-fat diet fed rats, respectively. BAT UCP2 mRNA expression was higher in HF-L1, HF-L5, and HF-L10 compared to HF group alone by 32, 67, and 52%, respectively. UCP1, 2, and 3 mRNA expressions in BAT were upregulated by the high-fat diet and further induced by levan supplementation (Fig. 4A). UCP2 mRNA expressions in skeletal muscle and WAT were upregulated by the high-fat diet by 25%, but were not affected by levan supplementation (Figs. 4B, 4C). In contrast to the UCP2 gene, UCP3 gene expression in skeletal muscle exhibited a pattern similar to the UCP3 gene in BAT. Skeletal muscle UCP3 mRNA expression was also affected by the

Table 3. Serum triglyceride, total cholesterol, HDL cholesterol, HTR, and free fatty acid levels in rats fed with experimental diets for 4 wk.¹

	N ²	HF	HF-L1	HF-L5	HF-L10
Triglyceride (mg/dl)	63.00±6.59 ^{ab}	82.50±8.65 ^c	75.40±8.45 ^c	61.33±6.97 ^{ab}	42.66±6.59 ^a
Total cholesterol (mg/dl)	60.71±3.62 ^c	73.10±4.18 ^{cd}	74.00±2.18 ^c	64.44±4.40 ^{bc}	61.55±3.62 ^b
HDL cholesterol (mg/dl)	45.57±2.80 ^{ab}	44.60±2.81 ^b	53.80±1.65 ^c	54.33±3.89 ^c	53.77±2.80 ^c
HTR ³	0.77±0.06 ^{abc}	0.62±0.05 ^b	0.73±0.01 ^{bc}	0.85±0.05 ^d	0.90±0.07 ^d
Free fatty acid (UEq/l)	678.9±56.1 ^{bc}	853.8±75.5 ^c	762.2±43.3 ^{ab}	557.8±46.3 ^b	610.4±29.2 ^b

¹Each value is the mean±SE for 9 rats.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values with different superscript letters are significantly different from each other at p<0.05. a, b, c; significance between N, HF, HF-L1, HF-L5, and HF-L10. x, y, z; significance between HF, HF-L1, HF-L5, and HF-L10.

²N; normal diet. HF; high-fat diet. HF-L1; high-fat with 1% levan diet. HF-L5; high-fat with 5% levan diet. HF-L10; high-fat with 10% levan diet group.

³HTR=HDL cholesterol/Total cholesterol ratio.

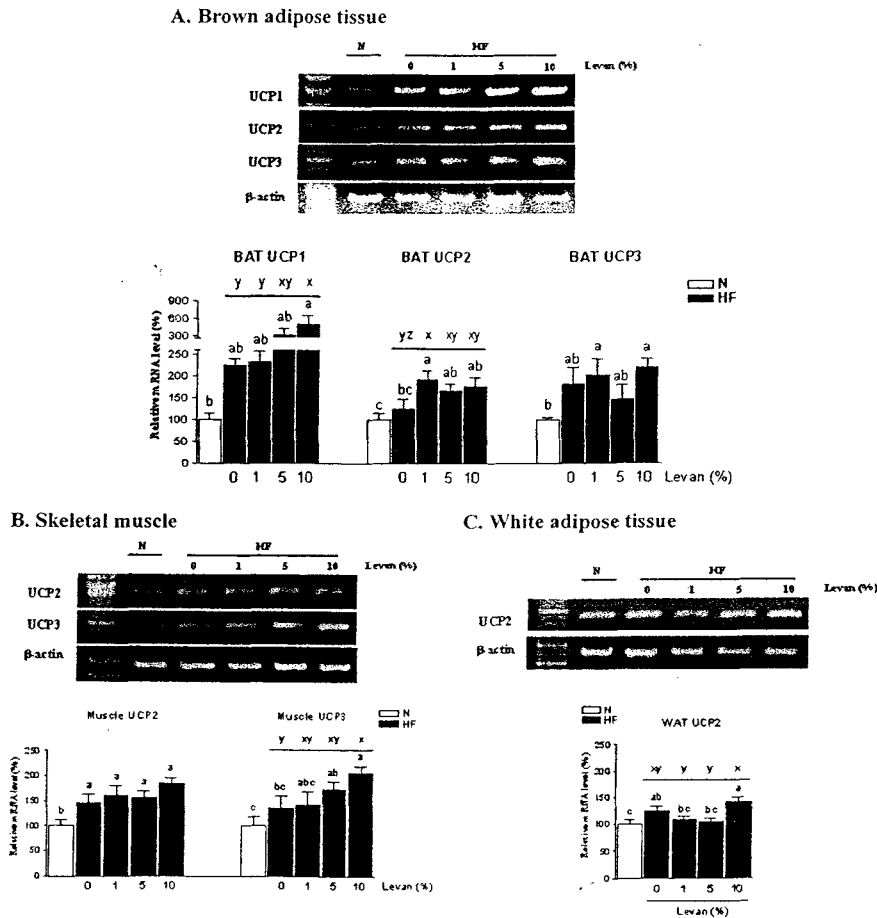


Fig. 4. Changes of UCP mRNA expression in BAT, skeletal muscle, and WAT. mRNA levels of UCP1, 2, and 3 in BAT (A), mRNA levels of UCP 2 and 3 of skeletal muscle or soleus (B), and mRNA levels of UCP2 of WAT or epididymal fat pad (C) in rats fed with control or levan supplemented diets for 4 wk. Quantitative RT-PCR was used for the mRNA determination. Levels of mRNA were calculated as a percentage of the values of the normal diet group. Each value is mean±SE for 9 rats. Different letters indicate significant difference (p<0.05) by Duncan's Multiple Range Test. a, b, c; significance between N, HF, and levan supplemented HF groups. x, y, z; significance between HF and levan supplemented HF groups. N; normal diet. HF; high-fat diet group.

up to 40% of the total body weight and is endowed with substantial mitochondrial capacity. Therefore, the uncoupling of skeletal muscle mitochondria may play an important role in the utilization of fatty acids [45]. In the present study, because of the increased energy expenditure, the increased expression of UCP mRNA in BAT and skeletal muscle might explain the suppression of body fat development in levan supplemented rats, compared with rats fed with high-fat diet alone.

Acknowledgments

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea. The authors gratefully acknowledge RealBioTech. Co. Ltd. for generously providing the levan sample.

REFERENCES

- Casey, J. L., J. M. Feirgat, D. D. Gallaher, B. C. Tunland, and J. L. Slavin. 2000. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutr. Res.* 20: 191–200.
- Cha, S. H., A. Fukushima, K. Sakuma, and Y. Kagawa. 2001. Chronic docosahexaenoic acid intake enhances expression of the gene for uncoupling protein 3 and affects pleiotropic mRNA levels in skeletal muscle in aged C57BL/6NJel mice. *J. Nutr.* 131: 2636–2642.
- Chen, W. J. L., J. W. Anderson, and D. Jenings. 1984. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175: 215–218.
- Cho, S., H. Jujii, and A. Shiraiishi. 1985. Effect of polysaccharide produced by *Bacillus natto* of alcohol extract of yeast on the lipid metabolism of rats. *Fukuoka Joshi Daikaku Kaseigakuby Kiyo* 16: 65–69.
- Clapham, J. C., J. R. Arch, H. Chapman, A. Haynes, C. Lister, G. B. Moore, V. Piercy, S. A. Carter, I. Lehner, and S. A. Smith. 2000. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406: 415–418.
- Cummings, J. H. and M. B. Roberfroid. 1997. A new look at dietary carbohydrate: Chemistry, physiology and health. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 417–423.
- Delzenne, N. M. and N. N. Kok. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J. Nutr.* 129: 1467s–1470s.
- Delzenne, N. M. and M. B. Roberfroid. 1994. Physiological effects of nondigestible oligosaccharides. *Lebensm. Wiss. Technol.* 27: 1–6.
- Gong, D. W., S. Monemdjou, O. Gavrilova, L. R. Leon, B. Marcus-Samuels, C. J. Chou, C. Everett, L. P. Kozak, C. Li, and C. Deng. 2000. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem.* 275: 16251–16257.
- Jang, E. K., K. H. Jang, I. Koh, I. H. Kim, S. A. Kang, C. H. Kim, S. D. Ha, and S. K. Rhee. 2002. Molecular characterization of levansucrase gene from *Pseudomonas aurantiaca* S-4830 and its expression in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 603–609.
- Jang, K. H., S. A. Kang, Y. Cho, Y. Y. Kim, Y. J. Lee, K. Hong, K. W. Seong, S. H. Kim, C. H. Kim, S. K. Rhee, S. D. Ha, and R. W. Choue. 2003. Prebiotics properties of levan in rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 348–353.
- Jang, K. H., S. A. Kang, Y. Cho, Y. Y. Kim, Y. J. Lee, K. Hong, E. K. Jang, C. H. Kim, and R. W. Choue. 2002. The effects of levan and inulin on the growth of lactic acid-producing bacteria and intestinal conditions in rats. *Korean J. Nutr.* 35: 912–918.
- Hong, K. H., S. A. Kang, S. H. Kim, and R. W. Choue. Effects of high fat diet on serum leptin and insulin level and brown adipose tissue UCP1 expression in rats. *Korean J. Nutr.* 34: 865–871.
- Kang, S. A., K. H. Hong, K. H. Jang, S. H. Kim, E. K. Jang, C. H. Kim, and R. W. Choue. 2002. Effects of low level of levan feeding on serum lipids, adiposity and UCP expression in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 788–795.
- Kang, S. A., K. H. Hong, S. H. Kim, K. H. Jang, C. H. Kim, and R. W. Choue. 2002. Effects of dietary levan on adiposity, serum leptin and UCP expression in obese rats fed high fat. *Korean J. Nutr.* 35: 903–911.
- Kay, R. M. 1982. Dietary fiber. *J. Lipid Res.* 23: 221–242.
- Keith, K., B. Wiely, D. Ball, S. Arcidiacono, D. Zorfass, J. Mayer, and D. Kaplan. 1991. Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia herbicola*. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 557–560.
- Kim, H. J., H. E. Park, M. J. Kim, H. G. Lee, J. Y. Yang, and J. H. Cha. 2003. Enzymatic characterization of a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis* ATCC 15552. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 230–235.
- Kim, I. S., K. D. Barrow, and P. L. Rogers. 2003. ³¹P nuclear magnetic resonance studies of acetic acid inhibition of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 90–98.
- Kim, H. J., J. Y. Yang, H. G. Lee, and J. H. Cha. 2001. Cloning and sequence analysis of a levansucrase gene from *Rahnella aquatilis* ATCC15552. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 693–699.
- Kok, N. N., M. Roberfroid, and N. Delzenne. 1996. Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism* 45: 1547–1550.
- Kok, N. N., H. S. Taper, and N. M. Delzenne. 1998. Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats. *J. Appl. Toxicol.* 18: 47–53.
- Lairon, D. 1996. Dietary fibres: Effects on lipid metabolism and mechanisms of action. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50: 125–133.
- Lavau, M., C. Susin, J. Knittle, H. S. Blanchet, and M. R. C. Greenwood. 1977. A reliable photomicrographic method for determining fat cell size and number: Application to dietary obesity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 156: 251–256.

25. Leonhardt, M., B. Hrupka, and W. Langhans. New approaches in the pharmacological treatment of obesity. *Eur. J. Nutr.* **38**: 1–13.
26. Li, B., L. A. Nolte, J. S. Ju, D. H. Han, T. Coleman, J. O. Holloszy, and C. F. Semenkovich. 2000. Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nature Med.* **6**: 1115–1120.
27. Lin, Y., R. J. Vonk, M. J. Sloof, F. Kuipers, and M. J. Smit. 1995. Differences in propionate induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *Br. J. Nutr.* **74**: 197–207.
28. Llado, I., A. Pons, and A. Palou. 1997. Fatty acid composition of brown adipose tissue in dietary obese rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**: 1129–1136.
29. Mazur, A., C. Remesy, E. Gueux, M. A. Levrat, and C. Demigne. 1990. Effects of diets rich in fermentable carbohydrates on plasma lipoprotein levels and on lipoprotein catabolism in rats. *J. Nutr.* **120**: 1037–1045.
30. Mistry, A. M., A. G. Swick, and D. R. Romsos. 1997. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and obese mice. *J. Nutr.* **127**: 2065–2072.
31. Mortensen, A., M. Poulsen, and H. Frandsen. 2002. Effect of a long-chain fructan Raftline HP on blood lipids and spontaneous atherosclerosis in low density receptor knockout mice. *Nutr. Res.* **22**: 473–480.
32. Ohtsuka, K., S. Hino, T. Fukushima, O. Ozawa, T. Kanematsu, and T. Uchida. 1992. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1638. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1373–1377.
33. Park, J. K., H. J. Cho, Y. Lim, Y. H. Cho, and C. H. Lee. 2002. Hypocholesterolemic effect of CJ90002 in hamsters: A potent inhibitor for aqualene synthase from *Paeonia moutan*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 222–227.
34. Rhee, S. K., K. B. Song, C. H. Kim, B. S. Park, E. K. Jang, and K. H. Jang. 2002. Levan, pp. 351–377. In Erick Vandamme, Sophie De Baets, and Alexander Steinbuechel (eds.), *Biopolymers. Vol. 5. Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany.
35. Rippe, C., K. Berger, C. Boeirs, D. Ricquier, and A. C. Erlanson. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**: E293–E300.
36. Rombeau, J. L. and S. A. Kripke. 1990. Metabolic and intestinal effects of short-chain fatty acids. *J. Parent. Enteral. Nutr.* **14**: S181–S185.
37. Schwartz, M. W., S. C. Woods, Jr., D. Porte, R. J. Seeley, and D. G. Baskin. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**: 661–671.
38. Trautwein, E. A., D. Rieckhoff, and H. F. Erbersdobler. 1998. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters. *J. Nutr.* **128**: 1937–1943.
39. Williams, C. M. 1999. Effects of inulin on lipid parameters in humans. *J. Nutr.* **129**: 1471S–1473S.
40. Wolever, T., P. Spadafora, S. Cunnane, and P. Pencharz. 1995. Propionate inhibits incorporation of colonic [1,2-¹³C]acetate into plasma lipids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**: 1241–1247.
41. Wright, R. S., J. W. Anderson, and S. R. Briges. 1990. Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **195**: 26–29.
42. Yamamoto, Y., Y. Takahashi, M. Kawano, M. Iizuka, T. Matsumoto, S. Saeki, and H. Yamaguchi. 1999. *In vitro* digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J. Nutr. Biochem.* **10**: 13–18.
43. Yang, B. K., S. C. Jeong, and C. H. Song. 2002. Hypolipidemic effects of exo- and endo-biopolymers produced from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* in rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 872–881.
44. Yang, B. K., J. B. Park, and C. H. Song. 2002. Hypolipidemic effect of exo-polymer produced in submerged mycelial culture of five different mushrooms. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 957–961.
45. Young, M. E., S. Patil, J. Ying, C. DePre, H. S. Ahuja, G. L. Shipley, S. M. Stepkowski, P. J. A. Davies, and H. Taegtmeier. 2001. Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α in the adult heart. *FASEB J.* **15**: 833–845.

Molecular Characterization of the Levansucrase Gene from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 and Its Expression in *Escherichia coli*

JANG, EUN-KYUNG¹, KI-HYO JANG², ISAAC KOH³, IN-HWAN KIM¹, SEUNG-HWAN KIM¹, SOON AH KANG², CHUL HO KIM^{1,3*}, SANG-DO HA⁴, AND SANG-KI RHEE³

¹RealBioTech Co. Ltd., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Yusong, Taejeon 305-333, Korea

²Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

³Biotechnology Research Division, KRIBB, Yusong, Taejeon 305-333, Korea

⁴Department of Industry and Technology, Korea Health Industry Development Institute, Seoul 156-800, Korea

Received: February 19, 2002

Accepted: May 31, 2002

Abstract DFA IV is di-D-fructose-2,6':6,2'-dianhydride, consisting of two fructose residues. It can be enzymatically synthesized from levan by levan fructotransferase, and can be used for mineral absorption. Understanding of the structure and composition of levan is important to obtain high-level production of DFA IV. A bacterial strain, *Pseudomonas aurantiaca* S-4380, was identified to produce low-branched levan, and the levansucrase gene (*lscA*) from this bacterium was found to be composed of 1,275 bp coding for a protein of 424 amino acids, with an estimated molecular weight of 47 kDa. The bacterial levansucrase gene was expressed in *Escherichia coli* DH5 α by its own promoter and *lac* promoter. The recombinant levansucrase was produced in soluble form with 170U of levansucrase activity from 1-ml *E. coli* culture broth. The expressed enzyme from the clone showed similar biochemical properties, such as size of active levansucrase, degree of branching, and optimum temperature, with *P. aurantiaca* S-4380 levansucrase.

Key words: Levansucrase, low-branched levan, *Pseudomonas aurantiaca*

DFA IV (di-D-fructose-2,6':6,2'-dianhydride IV) is a non-reducing and indigestible disaccharide consisting of two fructose residues, and expected to have novel physiological functions based on its unique structure [18, 20, 21, 25]. Baik *et al.* (1997) [2] demonstrated that DFA I and III were effective by promoting the iron uptake by the brush-border membrane of mucosal cells from the intestinal lumen of rats, when the mixture (iron:DFA=1:1, w/w) was used. In

1999, Saito *et al.* [19] reported that the apparent calcium absorption in rats fed with 3% (w/v) DFA IV was about 20% higher than the control rats. Therefore, DFA IV has been proposed as one of the candidates for mineral absorption. The Recommended Dietary Allowance (RDA) for calcium is 700 mg/day in Korea, requiring intake of large quantities (700 mg of DFA IV for daily intake) of pure and biologically active DFA IV.

During chemical synthesis, DFA IV is obtained as complex mixtures of isomers of DFAs [20]. Therefore, it is desirable to produce DFA IV by an enzymatic process for the production of a regio-specific DFA IV. The enzyme levan fructotransferase is capable of producing DFA IV from levan as a substrate [20]. In a previous study, we observed that the levan fructotransferase from *Arthrobacter ureafaciens* K2032 formed DFA IV from bacterial levan in a significant quantity [25, 29]. The drawback of this process, however, was its low product yield due to the structure of levan used.

Bacterial levansucrase (E.C. 2.4.1.10) is an extracellular protein found in Gram-negative and Gram-positive bacteria [6, 8, 10, 15, 24]. Levansucrase catalyzes synthesis of levan from sucrose. The catalysis is mediated by a coupled reaction of the enzyme through a ping-pong mechanism, including sucrose hydrolysis and polymerizing transfer of the fructose residues produced [5]. Levan is a homopolysaccharide composed of D-fructofuranosyl residues joined by β -(2,6) and β -(2,1) linkages. In some plants, levan is produced as a prevalent storage carbohydrate, and it was recently found that a recombinant levansucrase gene expressed in tobacco gave rise to increased tolerance to drought stress [16]. Plant levans, graminants, and phleins have shorter residues (ranging from 10 to ~200 fructose residues) than microbial levans, of which molecular weights are up to several

*Corresponding author

Phone: 82-42-863-4381; Fax: 82-42-863-4382;
E-mail: kim3641@mail.krribb.re.kr

million daltons with multiple branches [10]. Since the efficiency of final conversion of levan to DFA IV by levan fructotransferase is significantly affected by the degree of branching of the repeating unit, a low degree of branching levan is preferable for DFA IV production [18, 20, 21]. Saito *et al.* [18, 20, 21] proposed that levan from *Serratia levanicum* is the most suitable substrate for DFA IV production since the levan from this bacterium shows a 6% degree of branch. Recently, a levan-producing strain (*Pseudomonas aurantiaca* S-4380) was isolated from soil. The levan from this bacterium had a 6% degree of branch. Using various levans derived from *P. aurantiaca* S-4380, *Z. mobilis*, and *S. levanicum*, the highest conversion efficiency of 59% was obtained with *P. aurantiaca* S-4380 levan, whilst that from *S. levanicum* was 53% (unpublished data). In this paper, the cloning, sequencing, and expression of the *lscA* gene from *P. aurantiaca* S-4380 in *E. coli* are described.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DFA IV and levan fructotransferase were prepared using the method previously described [25]. A silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate purchased from Merck (Darmstadt, Germany) was used for sugar analysis. Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma. Restriction enzymes, calf intestinal alkaline phosphatase, Klenow fragment, T4 polynucleotide kinase, T4 DNA ligase, and dNTP mix were from Boehringer Mannheim or Takara.

Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *P. aurantiaca* S-4380 (KCTC 0943BP)

was grown aerobically in YPS broth (yeast extract 1%, peptone 2%, sucrose 5%) at 30°C. *E. coli* DH5 α was used as a host in the cloning and heterologous levansucrase expression studies, and pET-21a(+) as a cloning vector. Recombinant *E. coli* cells were grown at 37°C in LB broth without the addition of carbohydrate. When necessary, ampicillin was added to a final concentration of 100 μ g/ml.

DNA Manipulations and Reagents

Plasmid DNA from *E. coli* was obtained by alkaline lysis and purified on Qiagen (Hilden, Germany) columns. Chromosomal DNA isolation, restriction enzyme digestion, agarose gel electrophoresis, ligation, transformation, restriction endonuclease mapping, and PCR were all performed as described elsewhere [17, 22]. After purification of the DNA product, direct sequencing was performed with an ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer), as specified by the manufacturer [23]. The DNA fragments were analyzed on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer). The homology search and construction of a phylogenetic tree were performed using the DNADIST program (Mac-molly, Mackintosh) and NEIGHBOR program of PHYLIP 3.5 package [7].

Cloning of *lscA*

Chromosomal DNA prepared from the isolated strain was partially digested with the restriction endonuclease *Sau*3A1, and DNA fragments of 2–4 kb were purified from agarose gel. The fragments were ligated to the *Bam*HI-cleaved, dephosphorylated vector pBluescript II KS+ and the plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α , which does not have T7 RNA polymerase. White colonies were transferred onto M9 minimal medium [22] supplemented

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristics or genotype	Reference or source
<i>P. aurantiaca</i> S-4380	Wild-type, Lev ^{**}	Unpublished data
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (p80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	BRL
Plasmids		
pBluescript II KS(+)	Ap ^r	Stratagene
pBluescript II SK(+)	Ap ^r	Stratagene
pET-21a(+)	Ap ^r , a 5.4-kb vector containing an N-terminal T7 promoter sequence plus a C-terminal His-tag sequence.	Novagen
pLK1	Ap ^r ; 2.4-kb fragment containing the <i>lscA</i> gene from <i>P. aurantiaca</i> S-4380 cloned into pBluescript II KS(+). The gene in this plasmid has the same orientation as <i>lacZ</i> α .	This study
pLKR1	Ap ^r ; 2.4-kb fragment containing the <i>lscA</i> gene from <i>P. aurantiaca</i> S-4380 cloned into pBluescript II KS(+). The gene is oriented opposite to the <i>lacZ</i> α .	This study
pELK1	Ap ^r ; 2.5-kb <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI fragment from pLK1 inserted into pBluescript II SK(+). The <i>lscA</i> gene in this plasmid has the same orientation as <i>lacZ</i> α .	This study

*Producing levansucrase.

with 5% sucrose and 100 µg/ml ampicillin. One colony, with a mucous morphology to indicate the presence of polymer formation activity in the cell, was obtained out of 4,000 colony libraries. This *lscA*-inserted plasmid was named pLK1. Subsequently, the orientation of *lscA* in pLK1 was reversed to produce pLKR1. Consequently, the *lscA* in pLK1 had the same orientation as *P_{lac}*, while that in pLKR1 was oriented oppositely.

DNA Sequencing and Analysis

Sequencing was performed using pLK1 as the template. A series of nested deletions of the entire 2.4-kb DNA insert were constructed using an Exo Mung Bean Deletion Kit (Stratagene). DNA sequencing and analysis were performed as described above.

Enzyme Reaction

The levansucrase activity in the cell-free extracts and culture supernatant was assayed using 50-ml Falcon tubes in a temperature-controlled water bath. The reactions were initiated by adding levansucrase solution (1 or 3 U/ml) to 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.6), containing 10% (w/v) sucrose. One hundred µl aliquot was taken at regular

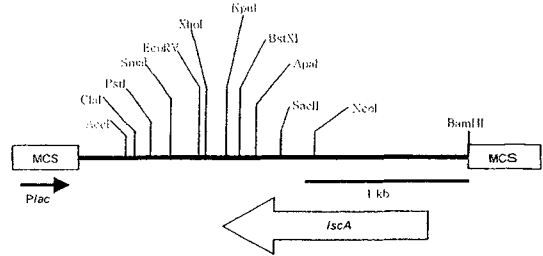


Fig. 1. Restriction map of pLKR1. pLKR1 has a 2,397 kb insert located in the *Bam*HI-restricted site of pBluescript II KS(+). The position and size of levansucrase gene, oriented in opposite direction to the *lacZα* gene, are indicated by the arrows below the map.

time intervals to check the levan formation. The enzyme reaction was terminated by the addition of 100 µl of 50 mM NaOH. Levansucrase activity represented sucrose-hydrolyzing activity. One unit of levansucrase activity was defined as the amount of the enzyme releasing one mmol of glucose per minute. The levan-degrading reaction was carried out using 50 ml sodium phosphate buffer (pH 5.8) containing 5% (w/vol) levan and 10 U of levan

```

1  GATCGGCTGCCCTCTTCCCTTCCTTGTCCCTCGAACCCAGCGSSTCCAAAGCGCGATTTTGCTGGCATCGTGGTGTATCAGGCGGAAACAAAC
-35 -10
101 TTCTGGAAACATPACTAGCTGAAAGCGTATCAGCTCCAGCAAAACCGGCRATPAGCATAAATGCAAAATTTACCCITGACCCCGAFAAATCGCTCGCTTAA
201 GGTGAATAACTGTATGCACATACAGTATTTTTGTAAACGAATCCATTCAGGGCGGGTATTACCTATGAAGACACACTGAAATATTCGCCAAGGC
RBS N K S N T E K F G K R
301 ACCCCATCAACCCGAGCTCTGGACTCGGGCCGATCGGCTGAAAGTCCACGGGACGATCCCCACAGCCAGCCATTGGTTCAGTCCGAGCTCCCGGTA
P H Q V L W T R A D A L K V H A D D P T T T Q P L V S A D F P V
401 TTGAGCAACGAGGTGTTCATCTGGGACACCATCGCCCTCGCGACCTGGAGGAAACATAACCTCCGTCGATGGTGGTGGTGATCTTCCCTGACTS
L S N E V F I W D T M F L R D L D G N I T S V D G W S V I T A C T T G
501 CGGATCGTCATCGAAGCAGCCCGAGTACATCGACGAAACCGGCACTACGACATCACCCGCGACTGGAAACAGCCGTCACGGCCGGGCAAGAGTACTA
A D R H P N D F E Y I E E H G D Y D I T R D W N D R H G R A K H Y Y
601 CTGGTTTTCCCGCACCGGCAAGCACTGGAAGCTGGGTGGCCGGTAAATGGCCGAAAGCGCTTTCGCCAACCCGCTCGCGAATGGCCCGCACGGCATCTG
W F S R T G K D W K L G G R V M A E G V S P T A R E W A G T P I L
701 TTGACGACAGCGGTTGAGTGGACTGTATTACACCCGGCTCACTCCGGCCGACCATCGCTCAAGTGGTGGTGGCGGGTGGTACGACCGAGCAGTCCG
L N E Q G D V D L Y T A V T P G A T I V K V P G R V V T T E H G
801 TGACGATGGTCCGCTCGAAGGTTCAAGCGCTTTCAGGCGGACGGCAAGTGTACAGACGGAAGCGGAGAACCCCTTCTGGGGCTTCCGCGATCC
V S H V Y G F E K V K P L F E A D G K H Y Q T E R Q N P F W G F R D P
901 ATGCGGCTTCCCGCACCCACAGCGGCAAGCTGTACATGCTGTTTGAAGGCAAGTGGCCGCAAGCCGGTTCGCACAAGTCCGGAAAGCGGAAATC
W P F R D P N D G K L Y M L F E G N V A G E R G S H K V G K A E I
1001 GGCATGTGCGCCAGGTTATGAAGAGCTCGGCAACTCCGCTTCCAGACTGCTGTGTGGTATCGCCGTGGCCCGGACGAAAGCCGCGACACTGGG
G D V P P G Y E D V G N S R F Q T A C V G I A V A R D E D G D D W E
1101 AAATGCTGCCCGGCTCTGACCCGCGTTCGGCTCAACGACACAGCCGAAACCCGCACTTGGTGTTCAGGACGCAAGTACTACTTGTCCACCATCAG
M L P P L L T A V G V N D Q T E R P H F V F Q D G K Y Y L F T I S
1201 CCACACCTTCACCTATCCCGACGGTGTGACCGGGCCGACCGGGTGTACGGTTTTGTCGCGGATTCGCTGTTCCGGCCCTACGTGCCCTGTACACGGTTC
H T F T Y A D G V T G P D G V Y G F V A D S L F G P Y V P L N G S
1301 GGCCTGTGCTGGCCAGCCGCTTCCGACCGCTTCCAGGCTATTGGACTGTGTGATGCCAACGGCCCTGCTGACCTTCTCATCGACAGCTACCGA
G L V L G G N P S S O P F Q T Y S H C V H E H G L V T S F I D S V P T
1401 CCGACGAAAGGCGACGCGATTCGATCGGGCTGCGAAGCCCGAGGCTTGAATCAGATCGAAGCGACGACATTCCTGTGCTCCGAGTACGA
T E S G T Q I F I G S F E A P T T E I K I K S Q U T F V V A E Y D
1501 CTAGGTTACATCCCGCCGATGCTCGATGTAACGCTCAAGTAATAGCSACACAGGGCGCTCAGGACCGGGCTCAGGTTGATGAAGAACCGGTTGTGG
Y G Y I P P H M L D V T L K *
1601 TATGATCGAGATATCCCGCTGGCTCACTGGGACTTTGCTCAGGAGCTTCATTAAGCAATCGGTAGTACCGGCCCTTCGCAACTGCTACCGGATGAG
1701 CCGATTCTGCTCTGTTGCCGAAATCGCAGCAGCACCTCCTCTCTCCGGCAGCAATGGCTTCCGAGGGTCAAGCTCCGACTTTCGACCTTGCCTCCAC
1801 ACCCGGTTACGGCCCGCTTCCACTTTCAGCGGACCGGCTCCAGCGGGAACCGGCTGGCCATCACTTCTGCAACGGATAGACCCAGGGTGTGCGCGA
1901 TCTTTTGGGCCACAAGCGCCGTGGCATCGCGTTGGGCTTGGGGTACCCAGGTAGTCGGAGACTGGCCATCACTTGGCGGCCAGCAGGTAATCGAT
2001 GAACITCAGCCCGTCTCGGATGCGGGCATCCTTCCAGCAGCACAGSSTTTCCACCCAGCAGCCGGCCGCTTCCGGGGATGCTGAGACAGATGGA
2101 GCGCCATTATGCGCTTCTGSCAGAGCCGCTGGGCTCGMATACCCCTCCGCTCCAGCCAGCACACACAGATGTGCGGGTGGCTGAGTCAAGTATGA
2201 ATTTGACGAGTCAAGTACGCAATATGCGCCGACCTTGAACCAACAGCCCTCGGCTCTCTGTAGTCTCGGGTTCGCGTGTGATAGGACAGCC
2301 CAGGTAATGCAAGGCGATGGGATGATTTTCCTCGGACATCGAGCATGGCGACACCACTGGCTGGAGCTTGGCCAGGTTCTCTTCTTGAAGATC
    
```

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *lscA* gene from *P. aurantiaca* S-4380. Nucleotides and amino acid residues are numbered on the left and right, respectively. Putative promoter sequence and ribosome-binding site are marked. Two termination codons are indicated with a “★” mark.

fructotransferase at 37°C for 60 h with gentle shaking. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme releasing one mmol of sugar equivalent to glucose per min. The reaction products were analyzed by TLC, as described previously [31].

Analytical Methods

During batch cultivation, cell growth was monitored by measuring the OD₆₀₀. Protein samples were analyzed by electrophoresis on SDS-PAGE gels containing 10% (w/v) polyacrylamide, as described by Laemmli [14]. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad). The protein bands on the SDS-PAGE gels were densitometrically quantified (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.). The amount of protein was determined with a protein assay kit (Bio-Rad), using bovine serum albumin as the standard [4].

RESULTS AND DISCUSSION

Selection and Identification of Bacteria

About 250 isolates showed sucrose-hydrolyzing activity on sucrose-containing agar medium. Based on the migration rates and sugar compositions of the products on TLC analysis, 8 colonies from the above isolates were isolated as producers of levan from sucrose. Strain no. S-4380, which showed relatively high activity and produced the enzyme in a stable manner, was selected for further experiments. Phylogenetic analysis with the 16S rRNA sequence showed that the microorganism shared a 99.7% sequence homology with *P. aurantiaca* ATCC 33663T (data not shown). This strain was named as *P. aurantiaca* S-4380 and registered in the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) (reference number 0943BP).

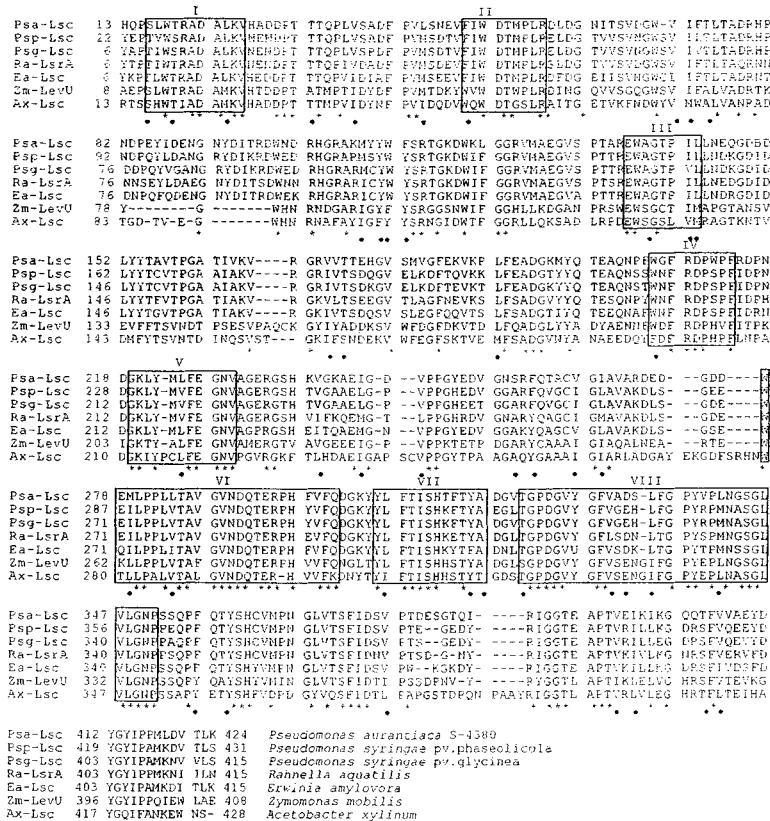


Fig. 3. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of Gram-negative bacterial levansucrases. Origins of levansucrases are indicated at the ends of the sequences. Asterisks indicate identity and dots indicate conservative changes (S-T-A, L-V-I-M, K-R, D-E, Q-N, F-Y-W). Key amino acids for the enzyme activity are put in the box and numbered from I to VIII. Conserved acidic residues in bacterial fructosyltransferases are shown in bold letters.

Sequence Analysis of the *lscA* Gene

The entire nucleotide sequence of the inserted 2,397-bp *Bam*HI DNA of *P. aurantiaca* S-4830 on pLK1 was determined, using plasmids produced by the unidirectional deletion reactions on both strands. A large open reading frame (named as *lscA*; GenBank accession number AF306513) was found in the sequenced region (Figs. 1 and 2). The *lscA* gene was composed of 1,275 bp encoding a protein of 424 amino acid residues with an estimated molecular mass of 47 kDa. This was in agreement with the molecular mass measured by SDS-PAGE analysis. The *lscA* gene was preceded by a potential ribosomal binding site, GAGG, at 9 bp upstream from the start codon. In comparison with the consensus promoter sequences of *E. coli*, a potential promoter (-35,TTGACC and -10,TAAGGT) was identified upstream of the initiation codon. The coding region of the *lscA* gene ended with two adjacent termination codons, TAA and TAG.

The deduced amino acid sequence of *P. aurantiaca* S-4380 was aligned with those reported for other Gram-negative bacterial levansucrases (Fig. 3). The LscA protein was found to be highly identical with levansucrases from other Gram-negative bacteria, including *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (73%), *P. syringae* pv. glycinea (72%) [11], *Rahnella aquatilis* (72%) [30], *Erwinia amylovora* (71%) [9], *Z. mobilis* [28], *Acetobacter xylinum* (39%) [32], and *Acetobacter diazotrophicus* (25%) [1]. On the other hand, the LscA protein was only 17–19% identical with levansucrases from Gram-positive bacteria such as *Bacillus amyloliquefaciens* (19%) [33], *Bacillus subtilis* (18%) [8], and *Bacillus stearothermophilus* (17%) [15]. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences showed that there are eight conserved regions in the *lscA* from *P. aurantiaca* S-4380 [24, 28]. The conserved regions are thought to be important for their enzymatic activities, i.e. sucrose hydrolysis and subsequent transfer of fructose to the proper acceptor molecule. On the other hand, the cloned *lscA* showed two gaps in the alignment, which suggests a different property.

The acidic residues, Asp and Glu, have been found to be responsible for catalysis in the majority of the fructotransferase and levansucrases studied to date, acting either as proton donors or as nucleophiles [3, 27]. Five well-conserved motifs containing acidic residues were found on aligning levansucrases from Gram-negative bacteria [3] (which are shown as bold letters in Fig. 3). Among these, it was considered that the Asp residue in the RDP motif in the fourth conserved regions was a putative catalytic residue and may be responsible for the formation of a covalent fructosyl-enzyme intermediate with sucrose [3]. The Glu residue (bold) in the sixth conserved region, which is invariant in levansucrases and glycosylhydrolases, was suggested to be a component of the active center in enzymes of the glycosylhydrolases families [12].

Expression of *lscA* in *E. coli*

The *lscA* expression in *E. coli* was monitored through enzyme assay and SDS-PAGE analysis over the time course (Fig. 4). Thus, the *E. coli* DH5 α containing pLK1 was cultured as described in Materials and Methods and harvested at various growth phases. A dense protein band that was absent in the *E. coli* control (pBluescript KS or pBluescript SK) was detected in the position corresponding to about 47 kDa (data not shown). Although no signal sequence was found in the deduced amino acid sequence of *P. aurantiaca* levansucrase (Fig. 3), a large quantity of enzyme was found in both the periplasm and cytoplasmic space of the recombinant *E. coli* DH5 α (pLK1), indicating that the levansucrase might possess another secretion system (data not shown). Since the bacterial levansucrases are known to be extracellular proteins, the possible secretion mechanism of *P. aurantiaca* levansucrase might be independent

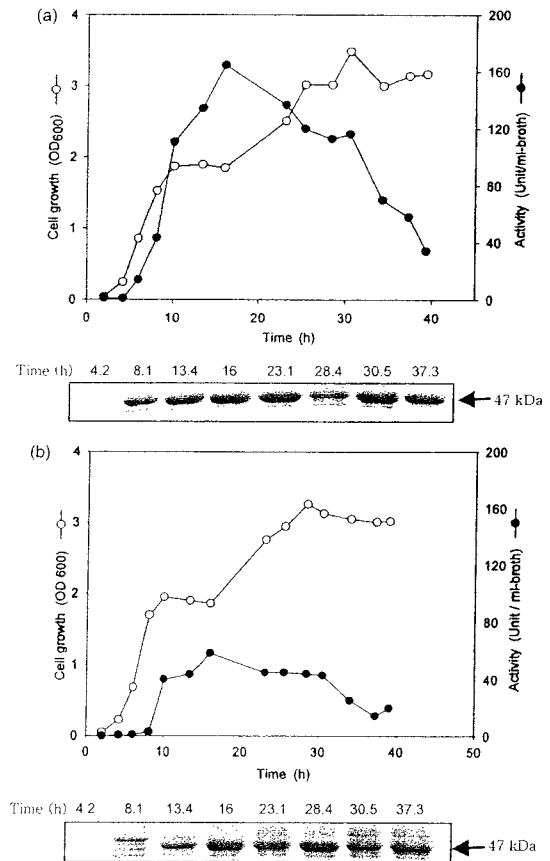


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of levansucrase overexpressed in *E. coli* DH5 α (pLK1) (a) and *E. coli* DH5 α (pLKR1) (b). Legends: (○) cell growth; (●) levansucrase activity.

of a signal peptide. However, further investigation is needed.

The gene on pLK1 has the same orientation as on the *lacZ α* and was constitutively expressed in *E. coli* without any IPTG addition (Fig. 4A). The production of levansucrase in *E. coli* containing pLK1 progressively increased as the cultivation time increased, reached to 170 U/ml of culture broth after 16 h of cultivation, and began to decrease thereafter. By SDS-PAGE analysis, it was revealed that prolonged cultivation of *E. coli* containing pLK1 for more than 16 h increased the ratio of insoluble aggregate (inclusion body) over the soluble fraction, as described by Song and Rhee [29]. To determine whether the expression of the levansucrase-coding *lscA* gene was led by its own promoter or not, the plasmid pLK1, in which the *lscA* gene was orientated in the opposite direction on the plasmid pBluescript II KS⁺, was constructed as a counterpart of pLK1 (Fig. 4b). The gene on pLK1 had the direction opposite to the *lacZ α* and was expressed in a growth phase-dependent way (Fig. 4B). Interestingly, the *lscA* expression was repressed during the early-phase of cell growth (0–8.1 h), initiated at the mid-log phase (8.1–10.0 h), and significantly increased during the late-phase, suggesting that its natural promoter exists in the upstream region and works on the recombinant plasmid in the *E. coli* strain (Fig. 4B). This growth-related expression pattern by its own promoter is different from the general constitutive expression of Gram-negative bacterial levansucrases [24].

To identify the recombinant levansucrase activity, a cell-free lysate of *E. coli* harboring pLK1 was analyzed by enzymatic reaction, as described in Materials and Methods. The levan produced in the present work was used as a substrate for enzymatic production of DFA IV by levan

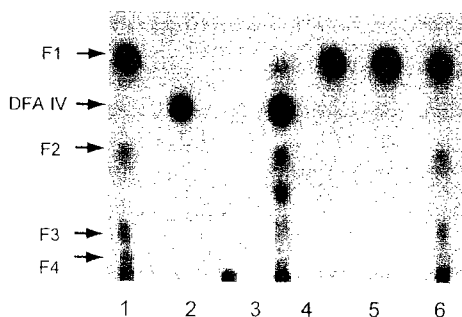


Fig. 5. TLC analysis of reaction products from levan produced from cell-free extracts of *E. coli* DH5 α (pLK1) and levan fructotransferase.

Lanes 1 and 7, levan-oligosaccharides standard generated by partial acid hydrolysis of levan. The numbers on the left indicate the number of fructose; Lane 2, authentic DFA IV; Lane 3, the levan produced from *E. coli* DH5 α (pLK1); Lane 4, the reaction products of levan fructotransferase with levan (lane 3); Lanes 5 and 6, acid hydrolysis products from levan (lane 3) and DFA IV (lane 4).

fructotransferase (Fig. 5). A product corresponding to DFA IV (lane 4 in Fig. 5) was detected as a main product when the levan fructotransferase and levan derived from the cell-free lysate of *E. coli* harboring pLK1 were reacted (lane 3 in Fig. 5). The sugar compositions of the products (lanes 3 and 4 in Fig. 5) were analyzed after acid hydrolysis for 1 h at 100°C with 1% oxalic acid; fructose was the only sugar detected by the reaction of the two products (lanes 3 and 4 in Fig. 5). The identity of DFA IV was confirmed by ¹³C-NMR analysis, as described previously [25]. From these results, it could be concluded that the recombinant levansucrase obtained in this work had a potency equivalent to the potency of material produced by *P. aurantiaca* S-4380. According to Saito and Tomita [20], levan produced by *S. levanicum* was the most suitable substrate for DFA IV production [13]. In a previous report, it was found that the conversion yield from levan to DFA IV by levan fructotransferase was similar (53% in *S. levanicum* and 59% in *P. aurantiaca* S-4380) (unpublished data). Therefore, the recombinant levansucrase from this work can be used for large-scale DFA IV production. In addition, since *E. coli* DH5 α containing pLK1 produced active levansucrase, it was concluded that the promoter and ribosome-binding site of the *P. aurantiaca* S-4380 levansucrase gene were recognized in *E. coli*. A study on the details of the upstream region of the *lscA* gene is in progress. Also, a way to secrete the recombinant levansucrase by genetically modified *lscA* or by modification of the cell surface structure of *E. coli* is currently being explored. This will be useful for industrial production of DFA IV.

Acknowledgments

This work was supported by the Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea. The authors deeply appreciate its financial assistance.

REFERENCES

- Arrieta, J., L. Hernandez, A. Coego, V. Suarez, E. Balmori, C. Menendez, M. F. Petit-Glatron, R. Chambert, and G. Selman-Housein. 1996. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* **142**: 1077–1085.
- Baik, B. H., Y. W. Lee, and Y. B. Lee. 1997. Antianemic agent containing iron and difructose. *US Patent 5,700,832*.
- Batista, F. R., L. Hernandez, J. R. Fernandez, J. Arrieta, C. Menendez, R. Gomez, Y. Tambara, and T. Pons. 1999. Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *Biochem. J.* **337**: 503–506.

4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
5. Chambert, R., G. Treboul, and R. Dedonder. 1974. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **41**: 285–300.
6. Choi, S. H., C. Sung, and W. Y. Choi. 2001. Levan-producing *Bacillus subtilis* BS 62 and its phylogeny based on its 16S rDNA sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 428–434.
7. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, U.S.A.
8. Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, and J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: Expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**: 1424–1431.
9. Geier, G. and K. Geider. 1993. Characterization and influence on virulence of levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **42**: 387–404.
10. Han, Y. W. and M. A. Clarke. 1990. Production and characterization of microbial levan. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 393–396.
11. Hettwer, U., F. R. Jaeckel, J. Boch, M. Meyer, K. Rudolph, and M. S. Ullrich. 1998. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. glycinea and *P. syringae* pv. phaseolicola. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3180–3187.
12. Kim, H. J., J. Y. Yang, H. G. Lee, and J. H. Cha. 2001. Cloning and sequence analysis of a levansucrase gene from *Rahnella aquatilis* ATCC15552. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 693–699.
13. Kojima, I., T. Saito, M. Iizuka, N. Minamiura, and A. Ono. 1993. Characterization of levan produced by *Serratia* sp. *J. Ferm. Bioeng.* **75**: 9–12.
14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
15. Li, Y., J. A. Triccas, and T. Ferenci. 1997. A novel levansucrase-levanase gene cluster in *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980. *Biochim. Biophys. Acta* **1353**: 203–208.
16. Park, J. M., S. Y. Kwon, K. B. Song, J. W. Kwak, S. B. Lee, Y. W. Nam, J. S. Shin, Y. I. Park, S. K. Rhee, and K. H. Paek. 1999. Transgenic tobacco plants expressing the bacterial levansucrase gene show enhanced tolerance to osmotic stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 213–218.
17. Rochelle, P. A., J. C. Fry, R. J. Parkes, and A. J. Weightman. 1992. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 59–66.
18. Saito, K., H. Goto, A. Yokota, and F. Tomita. 1997. Purification of levan fructotransferase gene from *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 and production of DFA IV from levan by the enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 1705–1709.
19. Saito, K., T. Hira, T. Suzuki, H. Hara, A. Yokota, and F. Tomita. 1999. Effects of DFA IV in rats: Calcium absorption and metabolism of DFA IV by intestinal microorganisms. *Biosci. Biotech. Biochem.* **63**: 655–661.
20. Saito, K. and F. Tomita. 2000. Diffructose anhydrides: Their mass-production & physiological functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1321–1327.
21. Saito, K., A. Yokota, and F. Tomita. 1997. Molecular cloning of levan fructotransferase gene from *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 2076–2079.
22. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
23. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463–5467.
24. Seo, J. W., K. B. Song, K. H. Jang, C. H. Kim, B. H. Jung, and S. K. Rhee. 2000. Molecular cloning of a gene encoding the thermoactive levansucrase from *Rahnella aquatilis* and its growth phase-dependent expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **81**: 63–72.
25. Song, K. B., K. S. Bae, Y. B. Lee, K. Y. Lee, and S. K. Rhee. 2000. Characteristics of levan fructotransferase from *Arthrobacter ureafaciens* K2032 and diffructose anhydride IV formation from levan. *Enzyme. Microb. Technol.* **27**: 212–218.
26. Song, K. B., H. Belghith, and S. K. Rhee. 1996. Production of levan, a fructose polymer, using an overexpressed recombinant levansucrase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **799**: 601–607.
27. Song, D. D. and N. A. Jacques. 1999. Mutation of aspartic acid residues in the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J.* **344**: 259–264.
28. Song, K. B., H. K. Joo, and S. K. Rhee. 1993. Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). *Biochim. Biophys. Acta* **1173**: 320–324.
29. Song, K. B. and S. K. Rhee. 1994. Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **16**: 1305–1310.
30. Song, K. B., J. W. Seo, M. G. Kim, and S. K. Rhee. 1998. Levansucrase of *Rahnella aquatilis* ATCC33071. Gene cloning, expression, and levan formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **864**: 506–511.
31. Stahl, E. 1969. *Thin-layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
32. Tajima, K., T. Tanio, Y. Kobayashi, H. Kohno, M. Fujiwara, T. Shiba, T. Erata, M. Munekata, and M. Takai. 2000. Cloning and sequencing of the levansucrase gene from *Acetobacter xylinum* NCI 1005. *DNA Res.* **7**: 237–242.
33. Tang, L. B., R. Lenstra, T. V. Borchert, and V. Nagarajan. Isolation and characterization of levansucrase-encoding gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene* **96**: 89–93.

저농도 레반 공급이 혈중 지질 및 체지방 형성과 UCP 발현에 미치는 영향

강순아[†] · 홍경희 · 장기효 · 김소혜 · 장은경* · 김철호* · 조여원**

경희대학교 동서의학대학원 임상영양전공

* (주)리얼바이오텍

** 경희대학교 임상영양연구소

Effects of Low Level of Levan Feeding on Serum Lipids, Adiposity and UCP Expression in Rats

Soon-Ah Kang[†], Kyung-Hee Hong, Ki-Hyo Jang, So-hye Kim, Eun-Kyung Jang,*
Chul-Ho Kim* and Ryowon Choue**

Dept. of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science,
Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

*RealBiotech Co. Ltd., KRIBB, Taejon 305-333, Korea

**Research Institute of Clinical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract

This study described the effect of levan (β -2,6-linked fructose polymer) feeding on serum lipids, adiposity and uncoupling protein (UCP) expression in growing rats. Levan was synthesized from sucrose using bacterial levansucrase. UCP is a mitochondrial protein that uncouples the respiratory chain from oxidative phosphorylation and generates heat instead of ATP, thereby increase energy expenditure. We observed that 3% or 5% levan containing diet reduced serum triglyceride levels, visceral and peritoneal fat mass and induced the UCP expression in rats fed high fat diet in previous study. To determine whether the intake of low level of levan may have the hypolipidemic and anti-obesity effect, 4 wk old Sprague Dawley male rats were fed AIN-76A diet for 6 wk, and sub-sequently fed 1% or 2% levan solution for further 5 wk. Intake of 1% levan in liquid form reduced serum triglyceride and serum total cholesterol levels to 50% and 66% of control group, respectively. Although epididymal and peritoneal fat masses were not affected by levan feeding, visceral fat mass was lower in 1% levan group compared to control group. The expression of UCP2 mRNA in brown adipose tissue, skeletal muscle and hypothalamus and UCP3 mRNA in skeletal muscle were not changed by levan feeding, while the UCP2 mRNA in white adipose tissue was up-regulated by levan feeding. In conclusions, intake of low level of levan solution reduced serum triglyceride and total cholesterol, restrained the visceral fat accumulation and increased UCP expression in white adipose tissue in rats. This study suggests that hypolipidemic and anti-obesity effect of levan attributed to anti-lipogenesis and inefficent energy utilization by up-regulation of UCPs.

Key words: levan, serum lipids, fat mass, UCP expression

서 론

식이 섬유소, 특히 수용성 식이 섬유소의 혈중 콜레스테롤과 중성지방 강하 효과에 대한 관심이 높아져 가는 가운데, 최근 혈중 지질 대사 개선 효과의 가능성을 보여주는 기능성 식품 소재 중 하나가 난소화성의 프락탄(fructan)이다(1). 프락탄은 자연계에 널리 존재하는 프락토스의 중합체(fructose polymer)로 섭취하였을 경우 장내 미생물에 의해 이용되어 장내 비피더스균의 성장을 촉진시키고 장내 미생물에 의한 발효로 단쇄 지방산(short-chain fatty acids, SCFA) 생성을 증진시킴으로써 혈중 콜레스테롤 및 중성 지방농도를 낮추는 것이

밝혀졌다(1,2). 또한 변비, 설사, 골다공증, 심혈관계 질환, 비만, 당뇨병 등의 질환 위험률을 낮추고 항암 효과를 갖는 등 건강에 유익한 여러 생리적인 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(1).

프락탄은 프락토스가 β -(2,1) 결합으로 연결된 이눌린형(inulin-type) 프락탄과 프락토스가 β -(2,6) 결합으로 연결된 레반형(levan-type) 프락탄으로 분류될 수 있다(3). 이눌린은 중합도가 20~60으로 치커리나 돼지감자, 양파, 다알리아 등의 식물의 뿌리에서 추출되며 중합도가 20 이하인 이눌린은 프락토올리고당(fructooligosaccharide)로 정의된다(4). 이눌린과 프락토올리고당 모두 장내 비피더스균 등의 미생물에 의해 발효

[†]Corresponding author. E-mail: sakang@khu.ac.kr
Phone: 82-2-961-9224, Fax: 82-2-961-9214

되어 혈중 지질을 낮추는 효과를 나타낸다고 보고되었다(5,6). 또한, 이눌린형 프락탄을 섭취하였을 때 쥐에서 체지방 형성 및 체중 증가를 억제하고(7,8) 임상 연구에서 체중 감량을 촉진하는 것으로 보고되어(9) 프락탄의 항 비만 효과 가능성이 제시되었다.

이눌린과 결합 방식이 다른 프락탄인 레반(Fig. 1)은 식물에도 존재하나 설탕으로부터 미생물의 levansucrase에 의해 합성되며(10), 불용성인 이눌린과 달리 그 분자량에 비해 점도가 낮고 수용성 성질을 가지고 있어 기능성 식품 소재로서의 가능성을 보여주고 있다(11).

이눌린의 생리적 효과에 대한 연구들은 많이 보고되어 왔으나 레반의 효과에 관한 연구는 아직 미비하다. 선행 연구(12)에서 고지방 식이로 비만이 유도된 흰쥐에게 레반을 식이 무게의 3% 또는 5%로 섭취시켰을 때, 대조군의 50% 수준으로 혈청 중성 지방이 감소하는 결과가 나타났고, 레반을 식이 중 5%로 섭취시켰을 때, 체지방과 혈청 렙틴 농도가 감소하는 결과를 보였다.

지방조직에서 분비되는 호르몬인 렙틴은 식욕을 감소시키고 에너지 소비율을 증가시켜 에너지 대사 및 체중 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(13). 또한, 미토콘드리아 내막에 존재하는 단백질인 UCP(uncoupling protein)는 미토콘드리아에서 산화적 인산화 과정에 의해 발생된 proton을 ATP 대신 열로 발생시켜 에너지 소비율을 증가시키고 이에 의해 비만 예방에 효과를 가지는 것으로 보인다(14,15). 발열 반응의 주요 담당기관인 갈색지방 조직에서 발견되는 UCP1 외에 기타 조직에서도 UCP가 발견되었는데, 백색지방 조직, 근육, 뇌, 간 등 체내에 광범위하게 분포되어 있는 UCP2와 근육에서 주로 발견되는 UCP3가 UCP1과 함께 에너지 대사를 조절하는 것으로 보고되었다(16,17).

선행 연구에서 고농도의 레반을 공급한 쥐에서 갈색 지방 조직과 근육의 UCP mRNA 발현량 증가와 함께 체지방 축적이 억제되고 지방 세포 크기가 감소하는 결과는 레반 섭취가 UCP 발현량 증가를 매개로 하여 에너지 소비를 증가시키고 항 비만 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 선행 연구(12)의 3% 레반보다 더 낮은 1%,

2% 레반 용액을 경구로 투여시에 나타나는 효과를 알아보고자 레반을 식이로 공급하는 대신 정상 식이를 공급하면서 레반을 경구로 투여하였을 때 혈중 지질과 체지방 형성, 렙틴 농도, UCP 발현에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육 및 식이

본 연구에서는 3주령 Sprague-Dawley 중 수컷 흰쥐를 중앙 실험동물사에서 구입하여 1주일간 적응시킨 후 실험 동물 4주령부터 10주령까지 6주간 AIN-76A 식이(AIN-76A diet #100000(Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)로 사육하였다(Table 1). 10주령부터 5주간 같은 식이로 사육하면서 레반을 각각 0%, 1%, 2%(W/V) 농도로 증류수에 녹여 실험동물 개체당 2 mL씩 경구투여하여 대조군(C), 1% 레반군(C+L1), 2% 레반군(C+L2)으로 하였다. 레반을 수용액으로 만들어 2 mL를 하루에 투여했으므로 하루 식이 섭취량 20 g을 기준으로 할 때 실제 레반 투여량은 각각 20 mg/day, 40 mg/day가 되며 레반을 식이에 혼합하여 만든 시료와는 달리 레반용액은 극도로 적은 양의 레반을 공급한 것이다. 레반 공급 전 10주령의 실험동물을 기준선(baseline)으로 하였다. 실험에 사용한 레반은 (주) 리얼바이오텍(한국생명공학원내 소재, 대전)에서 미생물 *Zymomonas mobilis*를 이용하여 생산한 제품을 공급받

Table 1. Composition of experimental diets¹⁾ (g/kg diet)

Ingredients	AIN-76A diet
Casein	200
DL-Methionine	3
Corn starch	150
Sucrose	500
Cellulose	50
Corn oil	50
Salt mixture	35
Vitamin mixture	10
Choline bitartrate	2

¹⁾Normal diet: AIN-76A diet #100000 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA).

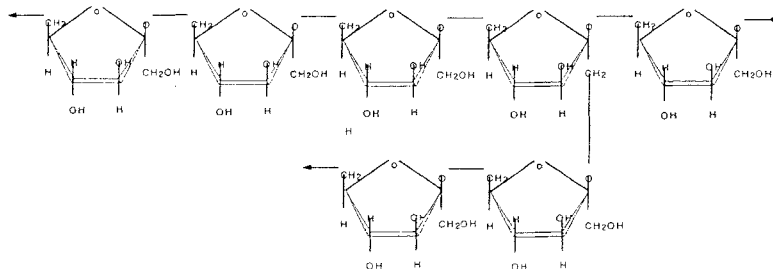


Fig. 1. Chemical structure of levan.

Levan consists of β-D-fructofuranosyl residues linked predominantly through β-(2,6) linkage and the branch is connected to the main chain by a β-(2,1) linkage: the branch then continues with β-(2,6) linkage.

았다.

실험동물은 한 마리씩 분리하여 사육하였고, 물과 식이는 제한없이 공급하였다. 액상 레반은 매일 오전 10시에 1회 경구 투여하였고 대조군은 같은 양의 증류수를 경구 투여하였다. 실험 기간 동안 식이 섭취량과 체중은 일주일에 2회 측정하였다. 식이 효율(food efficiency ratio: FER)은 실험 식이 공급일로부터 희생일까지를 총 실험기간으로 하여 실험 기간 동안의 체중 증가량을 실험 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.

시료수집

레반을 공급하기 전 10주령을 기준시점으로 시료를 채취하고 5주간 레반 공급 후 즉, 15주령이 된 시기에 실험동물을 희생하여 혈액과 장기를 채취하였다. 갈색지방 조직(intercapular brown adipose tissue), 부고환 지방(epididymal fat), 내장 지방(visceral fat), 복막 지방(peritoneal fat), soleus 근육, 뇌를 분리하여 중량을 측정하였고, 추출 즉시 액체 질소로 동결하였다. 혈액은 희생 시 heart puncture 방법으로 채취한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 이들 시료는 분석시까지 -70°C 에서 보관하였다.

혈중 지질 및 포도당, GOT, GPT 분석

혈청의 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 포도당, GOT, GPT 함량을 Sigma Chemical사(St. Louis, MO)의 kit을 이용하여 측정하였다.

혈중 leptin 및 insulin 함량 분석

혈청 중 leptin 함량은 Linco leptin assay kit(Linco research Immunoassay, St. Charles, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였고, insulin 함량은 rat insulin standards(Linco, St. Louis, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였다.

Uncoupling protein mRNA 분석

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)을 이용하여 Uncoupling protein(UCP)의 발현량을 측정하였다. 갈색지방조직에서 UCP 1, 2, 3 mRNA 발현량을 측정하였고, 백색지방조직의 분석을 위해 부고환 지방조직에서 UCP 2 mRNA 발현량을 측정하였으며, 근육의 UCP mRNA 함량 측정을 위해 soleus 근육에서 UCP 2, 3 mRNA 함량을 측정하였다. 또한, 식욕 중추가 존재하는 뇌의 시상하부에서의 UCP 2 mRNA 함량을 측정하였다(18).

실험동물에서 분리한 조직으로부터 Trizol reagent(Gibco)를 이용하여 RNA를 분리하고 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. 분리된 총 RNA로부터의 cDNA를 합성을 위하여 2 μg 의 RNA를 70°C 에서 5분간 열처리한 후 4°C 에서 5분 동안 방치하고 여기에 M-MLV(Promega) 200 U, dNTP (each 2.5 mM) mix 2 μL , RNasin(Promega) 40 U, oligo(dT) primer(Promega C1101) 1 μL 를 혼합한 후 DEPC-water로 25 μL 를 맞추어 42°C 1시간, 75°C 15분 조건하에서 cDNA를

합성하였다.

합성된 cDNA로부터 UCP의 발현량을 측정하기 위하여 primer를 제작하였고 house keeping gene으로는 β -actin을 이용하였다. 실험에 사용한 primer와 product size는 다음과 같다. UCP1 sense 5'-TAC CCA CAT CAG GCA ACA G-3', antisense 5'-TCA TTG CAC AGC TGG GTA C-3', (product size 842 bp), UCP2 sense 5'-ACA GCA GCC TGT ATT GCA G-3', antisense 5'-TTG TAG GCT TCG ACA GTG C-3', (product size 428 bp), UCP3 sense 5'-ACC ATG GTT GGA CTT CAG C-3', antisense 5'-AGT TCC CAG CGT ATC CAT G-3' (product size 450 bp).

유전자 발현량을 측정하기 위한 PCR 조건은 다음과 같다. Taq polymerase(TaKaRa) 0.125 μL , $10\times$ PCR buffer 2.5 μL , dNTP mix 2 μL , primer, sample, 증류수로 25 μL 를 맞추어 후 94°C 3분, 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분 30초, 30회 반복한 후 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 10분, 1회 PCR을 하였다. PCR 산물은 1.5% agarose에서 100 V 하에서 전기 영동하여 분리한 후 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EtBr에서 30분동안 염색하고 증류수에서 15분 동안 탈색하여 transilluminator에서 관찰하였다.

자료의 처리

각 실험군간의 차이를 one-way ANOVA에 의하여 검정하고 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 검정하였고, 모든 통계 분석은 SAS program을 이용하여 처리하였다. 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다.

결 과

식이 섭취, 체중 증가량 및 식이효율

실험동물의 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이효율의 결과는 Table 2와 같다. 식이 섭취량은 레반군이 대조군보다 유의적으로 적었고 1% 레반군과 2% 레반군간에는 차이가 없었다. 체중 증가량은 대조군에 비해 레반군이 약간 적은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았고, 식이효율은 실험군간에

Table 2. Daily food intake, weight gain and food efficiency ratio (FER) of experimental animals

	Food intake (g/day)	Weight gain (g/day)	FER
10 wks baseline	23.37 \pm 3.77 ¹⁾	6.01 \pm 1.03	0.264 \pm 0.048
Control	24.96 \pm 5.13 ²⁾	3.13 \pm 0.76	0.125 \pm 0.026
1% levan	20.68 \pm 1.16 ^{b)}	2.96 \pm 0.29	0.130 \pm 0.021
2% levan	20.09 \pm 2.13 ^{b)}	2.95 \pm 0.84	0.136 \pm 0.027

¹⁾Values are mean \pm SD.

²⁾Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at $p<0.05$ by Duncan's Multiple Range Test.

차이가 없었다.

혈청 지질 및 포도당 농도

혈청 지질 및 포도당 농도의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 혈청 중성지방은 대조군에 비해 레반군에서 크게 감소하여 통계적으로 낮은 값을 보여, 1% 레반군(81.75 ± 37.98 mg/dL)과 2% 레반군(80.80 ± 37.98 mg/dL)은 각각 대조군(161.20 ± 31.33 mg/dL)의 51%, 50% 수준으로 낮았다. 또한, 1% 레반군과 2% 레반군간에는 혈청 중성 지방 농도에 차이가 없었다. 혈청 총 콜레스테롤 농도도 대조군(100.22 ± 21.35 mg/dL)에 비해 1% 레반군(66.25 ± 13.23 mg/dL)과 2% 레반군(75.60 ± 13.33 mg/dL)에서 유의적으로 감소하여 대조군의 66~75% 수준이었다. 반면, 혈청 HDL 콜레스테롤 농도는 그룹간 차이를 보이지 않았고, 혈청 포도당 농도도 실험군간에 차이가 없었다.

지방 조직의 무게

각 실험군의 갈색지방조직, 부고환지방, 복막 지방, 내장 지방 무게를 비교한 결과는 Table 3과 같으며 각 지방 조직 모두 단위 체중에 대한 조직무게로 환산하여 표시하였다. 갈색 지방 조직과 부고환지방, 복막 지방 무게는 실험군간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 내장 지방 무게는 1% 레반군(21.02 ± 4.01 mg/g BW)과 2% 레반군(22.24 ± 5.32 mg/g BW)이 대조군(31.11 ± 8.94 mg/g BW)보다 유의적으로 낮았다.

혈청 인슐린, 렘틴, GOT, GPT 농도

혈청 인슐린 농도는 1% 레반군에서 다른 실험군에 비해 낮은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았고, 혈청 렘틴 농도도 레반군에 대조군보다 낮은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Table 4). 혈청 GOT 농도와 혈청 GPT

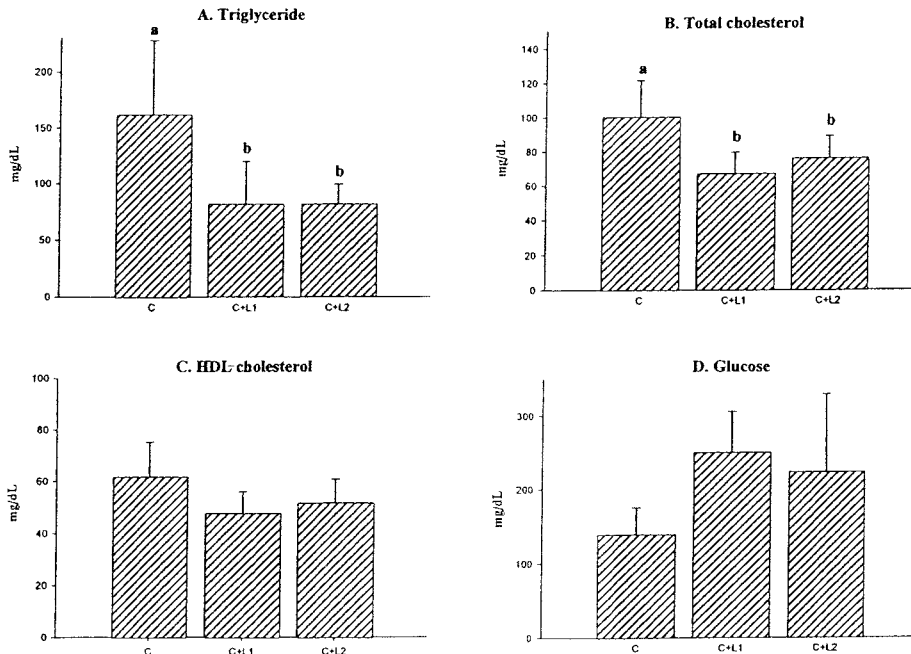


Fig. 2 Effect of levan feeding on serum glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride levels. Values are mean \pm SD. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among groups by Duncan's Multiple Range Test. C: Control diet. C+L1: Control diet+1% levan, C+L2: Control diet+2% levan.

Table 3. Effect of levan feeding on adipose tissue mass (mg organ/g BW)

	Brown adipose tissue	Epididymal fat	Peritoneal fat	Visceral fat
10 wks baseline	$0.742 \pm 0.236^{1)}$	8.98 ± 1.57	10.08 ± 2.27	10.07 ± 5.57
Control	0.781 ± 0.167	19.37 ± 5.42	24.21 ± 8.32	$35.21 \pm 8.94^{a2)}$
1% levan	0.727 ± 0.139	16.54 ± 4.34	21.02 ± 5.61	21.02 ± 4.01^b
2% levan	0.781 ± 0.107	19.79 ± 5.59	25.32 ± 3.80	22.24 ± 5.32^b

¹⁾ Values are mean \pm SD.

²⁾ Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test.

농도는 실험군간에 차이가 나타나지 않았다(Table 4).

UCP mRNA 발현

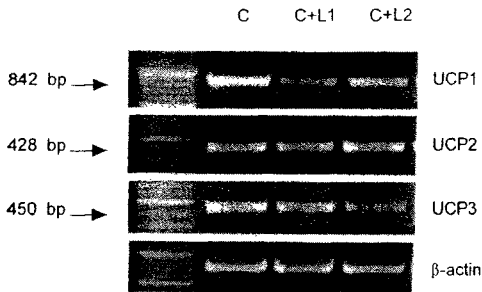
실험동물에서 분리한 갈색지방 조직, 백색 지방 조직, soleus 근육, 뇌의 시상하부에서의 UCP mRNA 발현량을 RT-PCR을 이용하여 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 갈색지방 조직의 UCP1과 UCP3 발현은 대조군에 비해 레반군에서 약간 감소하는 경향을 보였고, UCP1은 1% 레반군에서, UCP3는 2% 레반군에서 발현이 더욱 감소하였다. 갈색지방 조직의 UCP2 발현은 실험군간 차이를 보이지 않았다. 골격 근육의 UCP 발현량 측정을 위하여 soleus 근육의 UCP 2와 UCP 3를 측정된 결과 mRNA 발현량은 실험군 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 부고환지방의 UCP2 mRNA 함량은 대조군에 비해 1% 레반군과 2% 레반군 모두에서 증가하는 경향을 보였다. 뇌의 시상하부에서의 UCP2 발현은 실험군간에 차이를 보이지 않았다.

Table 4. Effect of levan feeding on serum insulin, leptin, GOT and GPT levels

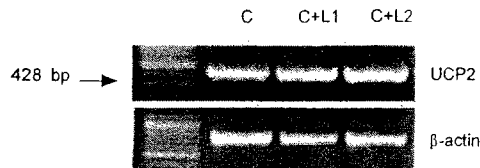
	Insulin (ng/mL)	Leptin (ng/mL)	GOT (units/mL)	GPT (units/mL)
10 wks baseline	-	1.09±0.32	137.0 ±52.67	32.8 ±9.26
Control	0.66±0.71 ¹⁾	8.10±5.97	196.67±29.70	52.78±5.38
1% levan	0.32±0.30	3.70±1.90	111.25±29.24	33.25±5.91
2% levan	0.35±0.26	6.22±2.07	130.20±75.57	32.80±2.28

¹⁾Values are mean±SD.

A. BAT



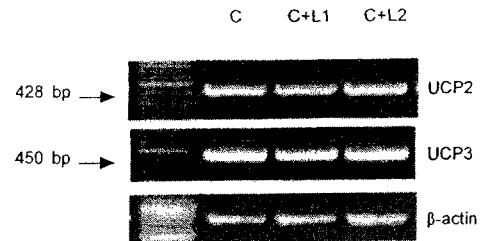
C. WAT



고찰

선행연구에서는 고지방식으로 유도된 비만 쥐에서 식이로 레반을 3, 5% 투여 시에 체지방 형성을 감소시켜주며 혈청 렙틴의 형성이 줄면서 조직에서의 UCP 발현성이 높으면서 항비만의 효과를 보여주었다. 이에 본 연구에서는 1%, 2% 농도의 액상의 레반을 경구 투여하였을 때 지질 감소 효과와 체지방 형성에 미치는 효과를 알아보고자 하였다. 따라서, 본 실험에 사용한 1% 레반 액상의 경우에는 선행연구에서 사용한 3% 식이 레반과 비교시 실제 레반 공급량은 약 30배 감소한 농도이다. 프락탄이 혈중 지질을 낮추는 효과에 대해서 여러 연구들에서 보고되어 왔다. 프락토올리고당을 공급하였을 경우 쥐에서 혈중 중성지방과 콜레스테롤, VLDL의 감소를 가져왔고 (6,19) 고지방 식이를 먹인 쥐에서도 혈중 중성지방과 콜레스테롤 증가를 억제하였다고 보고되었다(2). 또한, 이눌린 공급시 쥐에서 혈중 총 콜레스테롤과 LDL, VLDL이 감소하였고 (8) 임상 연구에서도 이눌린 섭취가 혈중 지질 감소 효과를 나타내어. 고콜레스테롤혈증을 가진 경우 이눌린을 공급받았을 때 혈중 중성지방과 콜레스테롤이 감소하였고(20), 정상인의 경우도 식이 중 이눌린 공급으로 중성지방이 감소했다고 보고되었다(21). 반면, 고지방으로 유도된 비만 쥐에서 1%의 이눌린은 혈중 중성지방 감소에 효과가 없었고(22), 정상인에게 이눌린을 섭취시켰을 때 혈중 총 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤은 감소하였으나 중성지방에는 변화가 없다는 보고도 있

B. Skeletal muscle



D. Brain

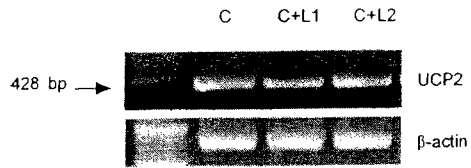


Fig. 3 Changes in UCP mRNA expression in brown adipose tissue(BAT), skeletal muscle and white adipose tissue(WAT) by dietary levan.

A, mRNA levels of UCP1, 2, and 3 in BAT; B, mRNA levels of UCP2 and 3 in skeletal muscle or soleus; C, mRNA levels of UCP2 in WAT or epididymal fat pad; D, mRNA levels of UCP2 in brain (hypothalamus). Quantitative RT-PCR was used for the mRNA determination. C: Control diet, C+L1: Control diet+1% levan, C+L2: Control diet+2% levan.

다(23).

본 실험 결과 1% 레반과 2% 레반 공급시 모두 레반을 공급하지 않은 경우보다 혈중 중성지방과 콜레스테롤이 유의적으로 감소하여 적은 양을 섭취하였을 경우에도 혈중 지질을 낮추는 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한, 레반 공급은 혈중 총 콜레스테롤은 낮추는 동시에 혈중 HDL 콜레스테롤에는 영향을 미치지 않아 지질 대사에 유익한 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이는 이눌린형 프락탄 뿐 아니라 레반형 프락탄도 혈중 지질 대사를 개선하며 이런 효과가 낮은 농도에서도 나타난다는 것을 보여준다. Yamamoto 등(24)은 흰쥐에게 식이 중 1%와 5%로 레반을 공급하였을 때 혈중 중성지방에는 차이가 없었고 콜레스테롤이 감소했다고 보고하였는데, 본 실험 결과 식이 섭취량의 1%로 레반을 경구 투여하였을 때 혈중 중성지방이 감소한 것과 다른 결과를 보였다. 이는 Yamamoto 등(24)의 연구에서는 식이로 레반을 공급하였고 본 연구에서는 경구 투여로 직접 위장까지 레반을 투여하였기 때문에 나타날 수 있는 차이로 보인다.

프락탄에 의한 지질 대사 변화는 장내 미생물에 의한 프락탄 발효로 나타나는 단쇄 지방산 생성 변화(20)와 식후 인슐린의 분비 억제(2,7,21)에 기인한 것으로 생각된다. 이들은 지방 합성 효소의 유전자 발현을 억제하여 지방산 합성과 지방 생성 능력을 감소시키고(2,7,19) 중성 지방을 다량 함유한 지단백질의 형성과 분해에 영향을 주어(21,25) 혈중 지질을 감소시키는 것으로 생각된다.

지질 대사는 비만 발생과 연관되어 있으므로 이러한 레반 발효 산물에 의한 지방 생성 억제 효과는 체지방 축적 억제에도 영향을 미쳤으리라 생각된다. 실제로, 프락탄은 비만과 관련하여 지질 합성에 관계된 유전자 발현을 조절함으로써 비만 관련 대사 장애에 역할을 하는 것으로 보고되었다(7,8). 비만 Zucker rat에 프락토올리고당을 식이의 10%로 공급하였을 때 4주 후부터 체중 증가량과 부고된 지방 무게가 감소하였고(7) LDL receptor knockout 생쥐에게 이눌린 공급시 식이 섭취량의 변화 없이 체중이 감소함을 볼 수 있었다(8). 또한 임상 연구에서도 이눌린을 포함한 보충제를 체중감량 프로그램에 적용했을 때 체지방 감소를 촉진하였다(9).

Yamamoto 등(24)은 1% 또는 5% 레반 공급으로 체중 변화가 없었다고 보고하였고, 본 실험 결과에서도 실험기간 체중 증가에는 통계적 유의성이 없었으나 레반을 공급 받은 쥐의 내장 지방 무게가 레반을 공급받지 않은 쥐에 비해 낮은 결과를 보여 레반 공급이 체지방 축적을 억제하는 효과가 있음을 나타내었다(Table 3). 내장 지방 축적이 만성 퇴행성 질병의 유발을 높이는데 있어서 큰 위해 요인임을 고려할 때 레반 투여에 의한 내장 지방 형성 억제는 레반의 항 비만효과의 가능성을 제시하고 있다.

앞에서 언급된 이눌린형 프락탄의 인슐린 분비 억제와 비교하여 볼 때, 본 연구 결과 혈중 인슐린 농도는 통계적 유의성은 나타나지 않았으나 1% 레반 공급시 약간 낮아지는 경향을 보

였다(Table 4). 또한 내장 지방 축적은 인슐린 저항성 증가를 가져오는데(26), 본 실험 결과 1% 레반 공급에 의해서 내장 지방 감소와 함께 혈중 인슐린 농도가 감소하는 경향을 보였다.

혈중 렙틴은 레반 공급에 의해서 통계적 유의성을 나타내지 않았으나 감소하는 경향을 보였다. 렙틴 생성은 체지방 비율 및 지방 세포 증가와 양의 상관성을 가지는 것으로 알려져 있으며(27), 본 실험 결과 레반 공급으로 내장 지방 축적이 억제되고 그 결과 렙틴 생성이 감소한 것으로 추정해 볼 수 있다.

UCP는 발열 반응에 의해 에너지 소비율을 증가시키는 요인으로, UCP 유전자 발현은 체지방 생성을 억제하고 비만을 조절하는 역할이 있는 것으로 보고되고 있고(15,28) 선행 연구(12)에서도 고지방 식이에 의해 유도된 비만쥐에서 UCP 발현이 증가함을 볼 수 있었다(29). 이러한 UCP의 발현은 주로 추위와 영양 요인에 의해 조절되는 것으로 보여지며(14,30), 식이 요인으로 UCP 유전자 발현을 조절하여 비만을 개선하려는 연구들이 진행되어 왔다(31,32). 선행 연구에서도 레반을 식이의 3% 또는 5%로 공급하였을 때 갈색 지방 조직의 UCP2, UCP2, UCP3와 골격 근육의 UCP3 발현량이 증가하였으며 3%보다 5% 공급이 더욱 발현을 유도함을 볼 수 있었다. 본 연구에서는 1% 또는 2% 레반 투여로 갈색 지방 조직과 골격 근육, 뇌의 UCP 발현량 증가가 나타나지 않아 3%보다 적은 양으로는 갈색 지방 조직과 근육, 뇌의 시상하부에서의 UCP 발현을 유도하지 못함을 알 수 있었다. 그러나 백색 지방 조직의 UCP2 발현이 레반을 공급한 쥐에서 증가하였고 발현량 증가가 1% 레반 공급보다 2% 레반 공급으로 더욱 커지는 경향을 보여 1~2% 정도의 레반 공급으로 지방조직의 UCP 발현을 유도함으로써 체지방 축적을 억제할 수 있음을 시사하였다. 갈색 지방 조직이 발열 반응의 주요 담당 조직이지만 체중에서 차지하는 비율이 매우 적고(33), 오히려 백색 지방 조직이 체중에서 차지하는 비율이 더 크므로 본 실험 결과 갈색 지방 조직에서의 UCP1, UCP3 발현은 감소하였으나 백색 지방 조직에서의 UCP2 발현이 증가한 것이 에너지 대사에 더 큰 영향을 주어 내장 지방 축적 억제 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 프락토스 중합체인 레반의 지질 감소 효과와 비만 유전자인 UCP를 통한 에너지 대사에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 성장기 6주간 AIN-76A diet로 사육한 흰쥐에게 레반을 식이 섭취량의 1%, 2%로 5주간 경구투여하여, 혈중 지질 수준과 체지방 형성 및 혈중 인슐린, 렙틴 농도와 갈색 지방 조직, 백색지방 조직, 골격 근육, 시상하부에서의 UCP mRNA 발현량 변화를 관찰하였다. 연구 결과를 종합해 보면 다음과 같다. 1) 레반군에서 혈청 중성지방과 총 콜레스테롤은 감소하고 HDL 콜레스테롤 수준은 영향을 미치지 않아 1%와 2% 레반 공급이 지질 대사를 개선시킬 수 있음을 보여주었다. 2) 1%와 2% 레반군에서 내장 지방 무게가 감소하여 적은 양의

레반 공급으로 체지방 축적이 억제될 수 있음을 보여주었다. 3) 갈색 지방 조직과 부교한 지방, 복막 지방 무게는 그룹간 차이가 나타나지 않았다. 4) 혈청 인슐린 농도는 1% 레반군에서, 혈청 렙틴 농도는 1% 레반군, 2% 레반군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 5) 1%와 2% 레반 공급에 의하여 갈색 지방 조직과 골격근육, 시상하부에서의 UCP mRNA 발현량에는 변화가 없었다. 6) 백색 지방 조직의 UCP 2 mRNA 발현량이 레반 공급에 의해 증가하여 1%와 2% 레반 공급에 의해 에너지 소비율이 증가할 수 있음이 나타났다. 결론적으로 저농도의 1%와 2% 액상 레반 공급은 총 식이의 3%~5% 레반 공급과 비교하여 혈중 총 콜레스테롤과 중성 지방 감소 효과에는 차이가 있으나 UCP 발현 증가에 미치는 영향은 적은 것으로 보인다. 그러나 저농도의 1~2% 액상 레반 공급으로 지질 대사를 개선하고 체지방 축적을 어느 정도 억제하는 효과를 나타냄을 알 수 있으며 이에 관한 임상 연구로 레반의 고지혈증과 비만을 조절하는 기능성 식품 소재로서의 가능성 검색이 요망된다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어졌으며 그 지원에 감사드립니다.

본 연구에 사용한 미생물 유래의 레반은 (주)리얼바이오텍(대전)에서 공급받았으며 저자들은 이에 감사드립니다.

문헌

- Roverfroid MB, Delzenne NM. 1998. Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* 18:117-143.
- Delzenne NM, Kok NN. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J Nutr* 129 (7 suppl): 1467s-1470s.
- Rhee SK, Song KB, Kim CH, Park BS, Jang EK, Jang KH. 2002. Levan. In *Biopolymers*. Vandamme E, Baets S, Steinbuechel A, eds. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany. Vol 5, p 351-377.
- Loo JV, Coussement P, Leenheer LD, Hoebregs H, Smits G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural in the western diet. *Crit Rev in Food Scid and Nutr* 35: 525-552.
- Mortensen A, Poulsen M, Frandsen H. 2002. Effect of a long-chain fructan Raftline HP on blood lipids and spontaneous atherosclerosis in low density receptor knockout mice. *Nutr Res* 22: 473-480.
- Flordaliso M, Kok N, Desager JP, Goethals F, Deboysier D, Roberfroid M, Delzenne N. 1995. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids* 30: 163-167.
- Daubioul CA, Taper HS, Wispelaere LD, Delzenne NM. 2000. Dietary oligo-fructose lessens hepatic steatosis, but does not prevent hypertriglyceridemia in obese Zucker rats. *J Nutr* 130: 1314-1319.
- Delzenne N, Ferre P, Beylot M, Daubioul C, Declercq B, Diraison F, Dugali I, Fougelle F, Foretz M, Mace K, Reimer R, Plamer G, Rutter G, Tavara J, Van Loo J, Vidal H. 2001. Study of the regulation by nutrients of the expression genes involved in lipogenesis and obesity in humans and animals. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11 (4 Suppl): 118s-121s.
- Hoeger WW, Harris C, Long EM, Hopking DR. 1998. Four week supplementation with a natural dietary compound produces favorable changes in body composition. *Adv Ther* 15: 305-314.
- Han YW. 1990. Microbial levan. *Adv Appl Microbiol* 35: 171-194.
- Kasapis S, Morris ER, Gross M, Rudolph K. 1994. Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. *Carbohydr Polym* 23: 55-64.
- Kang SA, Hong KH, Kim SH, Jang KH, Kim CH, Choue RW. 2002. Effects of fructose-polymer on serum leptin and UCP expression in obese rats induced by high fat diet. *FASEB J*. A 1013.
- Havel PJ. 2000. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc* 59: 359-371.
- Keith DG, Martin J, Pet J. 1998. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett* 438: 10-14.
- Rippe C, Berger K, Boeirs C, Ricquier D, Erlanson AC. 2000. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E293-E300.
- Matsuda J, Hosoda K, Itoh H, Son C, Doi K, Tanaka T, Fukunaga T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Yamori Y, Nakao K. 1997. Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed a high fat diet. *FEBS Lett* 418: 200-204.
- Boss O, Samec S, Giacchino AP, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacchino JP. 1997. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408: 39-42.
- Javier M, Amelia MJ, Alfredo M. 2001. Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPAR γ . *J Nutr Biochem* 12: 130-137.
- Kok N, Roverfroid M, Delzenne N. 1996. Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism* 45: 1547-1550.
- Causesy JL, Feirgat JM, Gallaher DD, Tungland BC, Slavin JL. 2000. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutr Res* 20: 191-200.
- Jackson KG, Taylor GR, Clohessy AM, Williams CM. 1999. The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentration in middle-aged men and women. *Br J Nutr* 82: 23-30.
- Han LK, Xu BJ, Kimura Y, Zheng Y, Okuda H. 2000. Platycodi radix affects lipid metabolism in mice with high fat diet-induced obesity. *J Nutr* 130: 2760-2764.
- Davidson MH, Maki KC. 1999. Effects of dietary inulin on serum lipids. *J Nutr* 129 (suppl): 1474S-1477S.
- Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi H. 1999. *In vitro* digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem* 10: 13-18.
- Kok NN, Taper HS, Delzenne NM. 1998. Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced-by a fat-rich in rats. *J Appl Toxicol* 18: 47-53.
- Abate N. 1996. Insulin resistance and obesity: the role of fat distribution. *Diabetes Care* 19: 292-294.

27. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Eng J Med* 334: 292-295.
28. Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Hell E, Krempler F, Patsch W. 1997. Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38: 2125-2133.
29. Hong KH, Kang SA, Kim SH, Choue RW. 2001. Effects of high fat diet on serum leptin and insulin level and brown adipose tissue UCP 1 expression in rats. *Korean J Nutrition* 34: 865-871.
30. Boss O, Samec S, Khune F, Bijlenga P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Giacobino JP, Muzzin P. 1998. Uncoupling protein 3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Bio Chem* 273: 5-8.
31. Oi Y, Kawada T, Shishido C, Wada K, Kominato Y, Nishimura S, Ariga T, Iwai K. 1999. Allyl-containing sulfide in garlic increase uncoupling protein content in brown adipose tissue, and noradrenaline and adrenaline secretion in rats. *J Nutr* 129: 336-342.
32. Cha SH, Fukushima A, Sakuma K, Kagawa Y. 2001. Chronic docosahexaenoic acid intake enhances expression of the gene for uncoupling protein 3 and affects pleiotropic mRNA levels in skeletal muscle in aged C57BL/6N]cl mice. *J Nutr* 131: 2636-2642.
33. Himms-Hagen J, Ricquier D. 1997. Brown adipose tissue. In *Hand Book of Obesity*. Bray GA, Brouhard C, James WPT, eds. Marcel Dekker, New York. p 415-442.

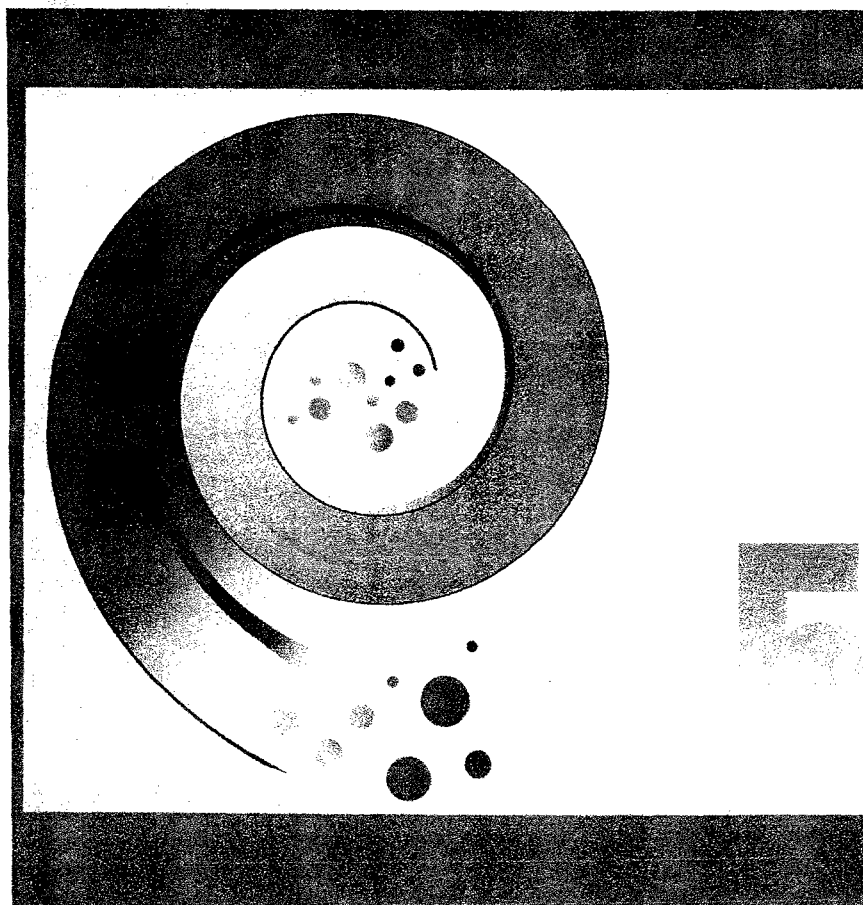
(2002년 8월 2일 접수; 2002년 10월 8일 채택)

Biopolymers

Biology • Chemistry • Biotechnology • Applications

Polysaccharides I

Polysaccharides from Prokaryotes



Volume Editors:
E. J. Vandamme
S. De Baets
A. Steinbüchel

Contents

1 Polysaccharides from Microorganisms, Plants and Animals <i>Ian W. Sutherland</i>	1
2 Glycogen Synthesis and its Regulation in Bacteria <i>Jack Preiss</i>	21
3 Bacterial Cellulose <i>Stanisław Bielecki, Alina Krystynowicz, Marianna Turkiewicz, Halina Kalinowska</i>	37
4 Bioemulsans: Surface-active Polysaccharide-containing Complexes <i>Eugene Rosenberg, Eliora Z. Ron</i>	91
5 Other Bacterial Glycolipids <i>Jitendra D. Desai, Anjana J. Desai</i>	113
6 Curdlan <i>In-Young Lee</i>	135
7 Succinoglycan <i>Miroslav Stredansky</i>	159
8 Alginates from Bacteria <i>Bernd H. A. Rehm</i>	179
9 Poly-(1 → 4)-β-D-glucuronan <i>Josiane Courtois, Bernard Courtois</i>	213
10 Sphingan Group of Exopolysaccharides (EPS) <i>Thomas J. Pollock</i>	239
11 Xanthan <i>Karin Born, Virginie Langendorff, Patrick Boulenguer</i>	259
12 Dextran <i>Timothy D. Leathers</i>	299
13 Alternan <i>Gregory L. Côté</i>	323

X	Contents	
14	Levan <i>Sang-Ki Rhee, Ki-Bang Song, Chul-Ho Kim, Buem-Seek Park, Eun-Kyung Jang, Ki-Hyo Jang</i>	351
15	Hyaluronan <i>Peter Prehm</i>	379
16	Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria <i>Isabel Hallemeersch, Sophie De Baets, Erick J. Vandamme</i>	407
17	Murein (Peptidoglycan) <i>Christoph Heidrich, Waldemar Vollmer</i>	431
18	Teichoic and Teichuronic Acids from Gram-Positive Bacteria <i>Vladimir Lazarevic, Harold M. Pooley, Catherine Mauël, Dimitri Karamata</i>	465
19	Polysaccharide-containing Cell-wall Polymers of Archaea <i>Helmut König</i>	493
20	Index	511

THE FASEB JOURNAL

A MULTIDISCIPLINARY RESOURCE FOR THE LIFE SCIENCES

Experimental Biology 2004[®]

Washington, DC

April 17–21, 2004

ABSTRACTS

PART II

Abstracts 480.1–860.14

Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology
Volume 18, Number 5, March 24, 2004

An Annual Meeting of Professional Research Scientists

Experimental Biology 2004[®]
Washington, DC

April 17 – April 21, 2004

ABSTRACTS 480.1 – 860.14

PART II

Participating and Guest Societies

American Association of Anatomists
The American Association of Immunologists
The American Physiological Society
American Society for Investigative Pathology
American Society for Nutritional Sciences
American Society for Pharmacology and
Experimental Therapeutics

American Association of Veterinary
Immunologists
American Federation for Medical Research
The American Society for Clinical Nutrition
American Society for Matrix Biology
American Society for Tropical Medicine and
Hygiene
American Society of Transplantation
Association for Pathology Informatics
Association of Latin American Physiological
Societies
Association of Medical Laboratory
Immunologists

Behavioral Pharmacology Society
The Biomedical Engineering Society
Canadian Society for Immunology
Clinical Immunology Society
International Society for Analytical and
Molecular Morphology
International Society for Biological and
Environmental Repositories
International Society for Developmental and
Comparative Immunology
International Society for Interferon and Cytokine
Research
The Microcirculatory Society
North American Vascular Biology Organization
PsychoNeuroImmunology Research Society
Society for Experimental Biology and Medicine
Society for International Nutrition Research
Society for Leukocyte Biology
Society for Mucosal Immunology
Society for Natural Immunity

mitochondria. We isolated subsarcolemmal (SSM) and interfibrillar (IFM) mitochondria from rat hearts and incubated them with substrates and cofactors of ACC2 (acetyl-CoA, ATP, HCO₃⁻, and citrate). The formation of malonyl-CoA by isolated mitochondria was assessed by a) quantitating malonyl-CoA using a newly developed HPLC-ESI/MS/MS method, and b) determining the activity of CPT-1.

Our data show: a) both SSM and IFM readily catalyze the formation of malonyl-CoA; b) malonyl-CoA formation is absolutely dependent on acetyl-CoA, but independent of citrate; c) malonyl-CoA formation is to a variable degree dependent of exogenous ATP; and d) the produced malonyl-CoA strongly inhibits CPT-1.

In summary, rat heart mitochondria readily synthesize malonyl-CoA from exogenous acetyl-CoA and the CPT-1 activity of such mitochondria is dramatically reduced. These data suggest a possible channeling of malonyl-CoA between ACC2 and CPT-1.

NIH Grant PO1 AG15885 and VA Medical Research Service.

577.9

Role of peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) in adaptation to fasting in a pig model

Yewon Cheon¹, Matthew A. Wallig¹, Mark R. Band², Jonathan E. Beever³, Manabu T. Nakamura¹. ¹Nutritional Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, 905 S. Goodwin Ave., Urbana, IL 61801. ²Biotechnology Center, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL. ³Animal Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL

PPAR α , a key regulator of fatty acid oxidation (FAO), is essential for adaptation to fasting in rodents. However, the role of PPAR α in non-rodents, including humans, is controversial because PPAR α ligands cause peroxisome proliferation and tumor development in rodent liver, but not in other species. To elucidate the role of PPAR α in non-rodents, we compared the effects of fasting and clofibrate (a PPAR α ligand) on gene expression in pig liver. Microarrays were performed for FA (weaned pigs fed control diet for 1 wk, killed after 24hr fasting) and CA (0.5% clofibrate for 1 wk, killed in fed state) compared against FE (control diet for 1 wk, killed in fed state). As in rodents, FA induced genes involved in mitochondrial FAO (HADHA, ACADM, CPT1A) and ketogenesis (HMGCS2) in pigs. Those genes were also induced in CA, indicating PPAR α mediates the induction. Neither FA nor CA affected genes related with peroxisomal FAO (ACOX, EHHADH), microsomal FAO (CYP4A11) or peroxisomal proliferation markers (ABCD3, CAT). Histology confirmed no significant peroxisome proliferation nor hepatomegaly in CA. PPAR α mRNA levels were similar between pigs and rodents, suggesting PPAR α protein is similarly expressed in both species. In conclusion, PPAR α is likely to play a central role in adaptation to fasting in pigs by inducing mitochondrial FAO and ketogenesis, while peroxisomal response, seen only in rodents by PPAR α ligands, may be a pathological response unrelated to the adaptation to fasting.

577.10

Regulation of highly unsaturated fatty acids (HUFA) synthesis: a new physiological role of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)

Yue Li, Takayuki T Nara, Manabu T Nakamura. Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign, 905 S. Goodwin Avenue, Urbana, IL 61801

Δ 6 Desaturase (D6D), the rate-limiting enzyme for HUFA synthesis, is induced by sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c, a key activator of lipogenic genes) when HUFA is low. Paradoxically, PPAR α ligands that trans-activate fatty acid β -oxidation enzymes also induce the D6D gene. The objective of this study was to investigate the role of PPAR α in D6D regulation under essential fat deficiency (EFD). Wild type (+/+) and PPAR α null (-/-) mice were fed control (7% soybean oil) or EFD (7% triolein or fat-free) diets for 1 week. Liver mRNA and protein were analyzed. Compared to the control diet, D6D mRNA was induced in (+/+) under EFD, while this induction was abolished in (-/-), indicating that PPAR α is required for D6D expression under EFD. Next, we tested if SREBP-1c was lower in (-/-) than (+/+) under EFD. Western blot analysis revealed that SREBP-1c nuclear protein increased equally under EFD regardless of the genotypes, indicating that increased SREBP-1c alone was not sufficient, and PPAR α must be present, to induce D6D under EFD. We then examined

expression of PPAR α responsive genes. Acyl-CoA oxidase, L bifunctional protein and CYP4A10 mRNA were all induced in (+/+) under EFD, suggesting that EFD generates endogenous PPAR α ligand(s), which induced these PPAR α responsive genes. Our study suggests that PPAR α , together with SREBP-1c, acts as a sensor of HUFA status and mediates feedback induction of D6D when HUFA is low. Supported by American Heart Association.

577.11

CD28 Activation Does Not Down-regulate Cbl-b Expression in Aged Rat T-lymphocytes

Zhun Xu¹, Christopher A Jolly². ¹University of Texas at Austin, university station, A2700, Austin, Texas 78712, ²Human Ecology, The University of Texas at Austin, 1 University Station - A2700, Austin Texas 78712

It is well known that T-lymphocyte proliferation declines *ex vivo* with age, and is associated with decreased expression and/or activity of stimulatory intracellular signaling proteins. However, the role of inhibitory intracellular signaling molecules like the ubiquitin ligase Cbl-b in regulating T-lymphocyte function in aging is largely unknown. Therefore, we tested the hypothesis that T-lymphocyte proliferation declines with age, in part, due to increased expression of Cbl-b. We show that young splenic T-lymphocytes reduced Cbl-b expression when stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, while in aged T-lymphocytes the CD28-dependent Cbl-b down-regulation did not occur. This effect did not appear to be due to reduced CD28 receptor expression on aged T-lymphocyte. The mechanism for lack of Cbl-b down-regulation may involve the proteasome since blocking proteasomal activity in young T-lymphocytes prevented Cbl-b down regulation while there was no effect in aged T-lymphocytes on Cbl-b expression. These data provide evidence for a novel mechanism by which aging reduces T-lymphocyte function. This work was supported by NIH RO1 20651 (CAJ).

577.12

Mitochondrial GPAT Activity is Reduced in Aged T-lymphocytes

Lauren E West¹, Jens Knudsen², Christopher A Jolly³. ¹Human Ecology, University of Texas at Austin, 1 University Station A2700, Austin, Tx 78759, ²Biochemistry, Odense University, Odense, Denmark, ³Human Ecology, The University of Texas at Austin, 1 University Station - A2700, Austin, Texas 78712

Decreased T-lymphocyte proliferation is correlated with decreased membrane fluidity, however the mechanism(s) are relatively unexplored. Acyl-CoA binding protein (ACBP) binds acyl CoAs and regulates cellular functions such as adipocyte differentiation, proliferation and phospholipid metabolism *in vitro*. Recently, we have shown that aging results in a decreased glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) activity in T-lymphocyte whole membrane fractions and liver mitochondria. Therefore, we wanted to determine if the age-dependent loss of T-lymphocyte GPAT activity is due to changes in mitochondrial or microsomal GPAT activity. Male, 6 month old (young) and 18-20 month old (old) Sprague Dawley rats were sacrificed and their spleens aseptically removed. Splenic T-cells were stimulated with anti-CD3 antibody, and mitochondrial and microsomal fractions were isolated. Phosphatidic acid (PA) biosynthesis was measured with and without ACBP. We found that in young T-lymphocytes, stimulation and ACBP treatment increased mitochondrial, but not microsomal GPAT activity. Furthermore, aging blunts the effect of stimulation and reduces mitochondrial GPAT activity, while aging has no effect on microsomal GPAT activity. Our results indicate that the age-dependent loss of T-lymphocyte proliferation may be due, in part, to reduced mitochondrial GPAT activity. This work was supported by NIH RO1 20651 (CAJ).

577.13

Altered mRNA Expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan

Soon Ah Kang¹, Kyunghye Hong², Ki-Hyo Jang³, Jae-Cheol Lee³, Byung-il Chang¹, Seong Kyu Park¹, Duk-Kyun Ahn⁴, Joon Sik Shin¹. ¹Dept. of Molecular Biotechnology, Konkuk University, Hwayang-dong, Gwangjin-gu 143-701 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul, 143-701 Korea, Republic of, ²Asan Institute of Life Science, Seoul, Korea, Republic of, ³Dept. of Food & Nutrition, Samcheok National University, Gangwon, Korea, Republic of, ⁴RealBioTech Co. Ltd, Taejeon, ⁵Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,

Seoul, ⁶Jaseng Research Institute of Biotechnology & Bioscience, Seoul, ⁷Hospital of Jaseng Oriental Medicine, Seoul, Korea, Republic of

The peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) are a transcriptional factor that participate in aspects of lipid catabolism such as fatty acid uptake through membranes, fatty acid binding in cells, fatty acid oxidation and lipoprotein assembly and transport. Levan, or high molecular-mass β -2,6-linked fructose polymer is produced extracellularly from sucrose-based substrates by bacterial levansucrase. 4 wk Sprague Dawley male rats were fed high fat diet (beef tallow, 40% of calories as fat) and 6 wk later, rats were fed 0%, 1%, 5% or 10% levan supplemented diets for 4 wk. The mRNA expression of hepatic fatty acid synthase and acetyl CoA carboxylase, which are the key enzymes in fatty acid synthesis, was down-regulated by dietary levan. However, dietary levan not affected the malic enzyme, phosphatidate phosphohydrolase, HMG CoA reductase gene expression in liver. In addition, hepatic PPAR α mRNA expression was up-regulated by dietary levan, dose dependently. This suggests that, in vivo, the hypolipidemic effect of dietary levan may result from the inhibition of lipogenesis and stimulation of lipolysis accompanied with gene expression regulation of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α . Anti-obesity and lipid-lowering effect of levan may involve the transcriptional regulation via activation of PPAR system.

577.14

Potential Role for Protein Kinase C theta in Regulating GPAT Activity

Christopher A Jolly, Craig Leach. Human Ecology, The University of Texas at Austin, 1 University Station - A2700, Austin, Texas 78712

We have recently found that stimulating Jurkat T-lymphocytes with anti-CD3 significantly increases glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) activity. This is important because GPAT is the rate-limiting enzyme in de novo phospholipid synthesis. To determine if GPAT activity is regulated by phosphorylation as has been suggested in liver mitochondria, we performed western immunoblotting for protein kinase C (PKC) theta and in vitro kinase assays with exogenous PKC theta in Jurkat mitochondrial fractions. PKC theta showed a marked decrease in the cytosolic fraction and a concomitant increase in the mitochondrial fraction following stimulation of Jurkat T-lymphocytes with plate bound anti-CD3 antibody. Furthermore, we show that in vitro exogenous PKC theta could phosphorylate an 85 kD protein from intact mitochondria which may represent the 85 kD GPAT enzyme. This data suggests that PKC theta may be a novel mechanism for regulating phospholipid metabolism in T-lymphocytes. This work was supported by NIH RO1 20651 (CA).

577.15

Using RT-PCR in a real time mode to determine expression of lipogenic genes in broilers

Robert Williams Rosebrough, Beverly A. Russell, Steven M. Poch, Mark P. Richards. ARS-USDA, GBL/ANRI, 10300 Baltimore Ave., Beltsville, MD 20705

Chickens growing from 7 to 28 days of age were fed 12 or 30% protein diets and then switched to the opposite protein level. Birds were killed on days 28, 29, 30 and 31. In Experiment 2, birds were sampled, 0, 3, 6, 9 and 24 hr following the switch in protein levels. Measurements taken included in vitro lipogenesis (IVL; Exp 1), malic enzyme activity (ME) the expression of the genes for ME, fatty acid synthase and acetyl coenzyme carboxylase. Gene expression was determined with a combined RT-PCR using SYBR green as a fluorescent probe monitored in a real time mode. IVL and ME activity were inversely related to dietary protein levels (12 to 30%) and to acute changes in either level. Lipogenic gene expression was inversely related to protein level. PCR amplification was monitored during its early phases of reaction and may be potentially more sensitive due to greater dynamic range (6-8 logs). The big disadvantage of combined system (RT-PCR) was that a large pool of cDNA was not produced as in a system that to steps. Real time RT-PCR is acceptable for assaying gene expression in birds. Further work will focus on primer sizes that optimize RT-PCR as an instrument for studying the regulation of avian lipid metabolism. Results of the present study demonstrate a continued role for protein in the regulation of broiler metabolism. It should be pointed out; however, that metabolic regulation at the gene level only occurs when feeding very high levels of dietary protein.

577.16

The effects of Conjugated Linoleic Acid and Conjugated Nonadecadienoic Acid on Uncoupling Protein (Ucp) Genes during Differentiation of 3T3-L1 Preadipocyte

KEUMJEE KANG¹, Soyoung Kwon¹, YeongLae Ha², Yunhee Hwang¹. ¹Food and Nutrition, Duksung Women's University, Ssangmun 419, Dobong-Ku, Seoul, 132-714 Korea, Republic of, ²Division of Applied Life Science, GyeongSang National University, Jinju, KyungSangBukDo Korea, Republic of

It has been reported that conjugated linoleic acids (CLAs) and less well-known conjugated nonadecadienoic acid (CNA) decrease fat deposition in mammals. Uncoupling protein (Ucp) genes are proposed as targets for anti-obesity probably due to their actions in metabolic regulation. To examine whether CLAs and CNA influence Ucp gene expressions, we used a well-established preadipocyte differentiation model in the presence of isomers of CLAs in vitro. 50 μ M of (c9, t11) or (t10, c12) CLAs, CNA, and 20 μ M linoleic acid as a control were added into 3T3-L1 preadipocyte differentiation medium for 3, 6, 9 and 12 days. Cytochemical analyses for lipid accumulation, cell proliferation and cell death were carried out to compare lipidogenesis and cellular activity. There were remarkable differences between control and treatment groups at day 6 and 9 of cell differentiation. Lipid accumulation indicated by Oil-Red O staining was less significantly different among the experimental groups. BrdU incorporation also showed its significant increase in cells fed with CLA and CNA groups at days 6 and 9. Significant cell death was found in both (t10, c12) CLA group at day 6 and in CNA group at day 6 and 9, respectively. RT-PCR of LPL, Ucp-2 and Ucp-3 at day 6 and 9 demonstrated that significant upregulations of Ucps occurs in the treatment group while a slight increase in LA group. Supported by KOSEF (R04-2002-000-20039-0)

577.17

Use of ¹³C labeled fatty acids to study milk fat synthesis in dairy cows

Erin Elizabeth Mosley, Mark A McGuire. Animal and Veterinary Sciences, University of Idaho, PO Box 442330, Moscow, Idaho 83844-2330

Incorporation of ¹³C labeled fatty acids into milk lipids was determined through infusion of potassium salts of 5 g myristic-1-¹³C acid (14:0), 40 g palmitic-1-¹³C acid (16:0), or 50 g stearic-1-¹³C acid (18:0) into the abomasums of separate cows either as a bolus over 20 min or continuously over 24 h. Milk fat was extracted using chloroform:methanol. Fatty acids were methylated and converted to dimethyl disulfide derivatives before analysis by gas chromatography mass spectrometry. The ¹³C enrichments from bolus infusion were 4.9, 2.5, and 2.4% for 14:0, 16:0, and 18:0, respectively, at 4 h post infusion and peaked at 8 h (5.7, 9.2, and 5.4%, respectively). Enrichments for continuous infusion were 1.1% for 14:0, 1.3% for 16:0 at 4 h and 0.92% for 18:0 at 8 h, and peaked at 16 h for 14:0 (2.8%) and 18:0 (2.0%), and at 24 h for 16:0 (3.9%). Enrichment was also detected in delta-9 desaturase products for both bolus and continuous infusions. Bolus infusion enrichments of 5.4, 1.2, and 1.9% were detected at 4 h for 14:1, 16:1, and 18:1, respectively, and peaked at 8 h for 16:1 (3.1%) and 18:1 (3.7%), and at 4 h for 14:1 (5.4%). Continuous infusion enrichments were 1.8% for 14:1 and 1.0% for 16:1 at 8 h, and 0.76% for 18:1 at 12 h, and peaked at 16 h for 14:1 (2.3%), and at 20 h for 16:1 (2.4%) and 18:1 (1.1%). Fatty acid synthesis and desaturase activity in the mammary gland can be studied using ¹³C labeled fatty acids. Funded by the United Dairywomen of Idaho.

577.18

Lipid Uptake by the Small Intestine of Mice is Independent of the Intestinal Fatty Acid Binding Protein Status

Laurie A. Drozdowski¹, Ji Hyeon Kim², Claudiu Iordache¹, Matthew J. Toth³, Richard E. Uwiera⁴, M. Tom Clandinin¹, Luis B. Agellon², Alan B.R. Thomson¹. ¹Medicine, University of Alberta, 5146 Dentistry Pharmacy, Edmonton, AB T6G 2N8 Canada, ²Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, AB Canada, ³Medicine, Novartis Institute for Biomedical Research, Summit, NJ, ⁴Health Sciences Laboratory Animal Services, University of Alberta, Edmonton, AB Canada

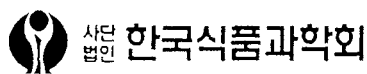
We tested the hypothesis that small intestinal lipid uptake in mice is independent of I-FABP status by assessing the in vitro uptake of palmitic, stearic, oleic, and linoleic acids, cholesterol, as well as cholic

2004년 한국식품과학회 제71차 학술대회

FUSION TECHNOLOGY in FOOD SCIENCE

기간 : 2004년 6월 23일(수)~25일(금)

장소 : 강원도 용평리조트



후원 : 강원도청, 한국학술진흥재단
한국과학기술단체총연합회

of prepared kimchi was 5.9, it was decreased and titratable acidity content of kimchi was increased continuously according to increasing fermentation period. The total microbes of initial period were 10^5 - 10^6 , it was increased 10^8 - 10^9 cfu/mL at the pH 4.0 and then decreased 10^7 - 10^8 cfu/mL with increasing fermentation period. Lactic acid bacteria were showed same pattern of total microbes on the kimchi. On the other hand, genomic DNA of kimchi was isolated by phenol method and PCR-amplified 16S rDNA fragments were analyzed by DGGE. Even if samples were a little difference patterns between fermentation periods, generally, it showed similar microbial pattern.

P6-032

Identification of Lactic Acid Bacteria in Chinese Cabbage by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Sung Je Jung^{*}, Gum-Ran Kim, and Hae Yeong Kim
Department of Food Sciences and Technology, Kyung Hee University

The DGGE method is sensitive and able to determine the number of species in a sample as well as the taxonomic identity of each species, and is particularly useful in detecting differences between species of the same genus. An amplicon is analyzed on DGGE gel, after which the band positions are compared with a previously constructed database of reference strains. In this study, the identification the lactic acid bacteria of Chinese cabbage was investigated by the use of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Thirty-three of lactic acid bacteria species from standard type cultures were used to determine the experimental conditions for the PCR amplification and DGGE differentiation. Three strains of lactic acid bacteria were isolated and identified from samples of fifteen different Chinese cabbage cultivars in Korea. As a result, we identified *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc citreum* and *Pediococcus acidilactici* as major lactic acid bacteria in Chinese cabbage

P6-033

Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Activities of *Lactobacillus brevis* HY7401

Young-Tae Ahn^{*}, Yong-Hee Kim, Jin-Sung Bae, Kwang-Sei Lim, Chul-Sung Huh, Woo-Young Yang¹, Hyung-Su Kim¹, and Young-Jin Baik
R & D left, Korea Yakult Co., Ltd., ¹Culture System, Inc., USA

Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) oxidize ethanol to acetaldehyde or acetaldehyde to acetic acid by intestinal bacteria. However, little is known about ADH and ALDH activities of lactic acid bacteria. The aim of this study was to test the possibility that *Lactobacillus* strains originated from human are able to metabolize ethanol and acetaldehyde *in vitro* and *in vivo*. In regard to ADH and ALDH activities, *L. brevis* strains had higher activity than that of other lactic acid bacteria strains. In particular, ADH and ALDH activities of *L. brevis* HY7401 were the highest by $2,140 \pm 24$ nmol of NADH and 12.53 ± 0.06 nmol of NADPH produced /min/mg of protein, respectively. *In vivo* experiment, 1 mL of *L. brevis* HY7401 (10^9 cfu/mL) was given orally to SD rats for 2 weeks and ethanol (4 g/kg BW) was administered orally at the end of the experiment. *L. brevis* HY7401 cells intake decreased significantly the serum ethanol level in the rats comparing to control groups. In addition, the ethanol

concentration in the small intestine on feeding *L. brevis* HY7401 groups was about half of the control and its acetic acid concentration was two times higher than the control. Therefore, this study suggests that *L. brevis* HY7401, isolated from human, possess a remarkable ADH and ALDH activities that are capable of metabolizing ethanol and acetaldehyde. Also *L. brevis* HY7401 cells intake decreases the serum ethanol concentration in rat.

P6-034

폴락탄의 효소적 및 산가수 분해 특성 비교

장기효^{*}, 이은영¹, 정성제², 김상무³, 이재철, 강순아⁴
삼척대학교 식품영양학과, ¹경희대학교 동서의학대학원, ²생명공학원, ³강릉대학교 해양생명공학부, ⁴건국대학교 분자생명공학과

과당 중합체인 폴락탄에는 레반과 이눌린이 포함되는데, 폴락탄과 이들의 올리고당은 저감미, 보습성, 유산균 생육촉진, 비만 예방 효과 등으로 활발히 연구되고 있다. 최근에는 이들을 이용한 단백질 냉동 및 건조 변성 방지제에 대한 효과가 밝혀져 이를 이용한 수산물의 유통기간을 연장하는 응용이 기대된다. 본 연구에서는 신규물질인 레반과 레반올리고당, 이눌린과 이눌린 올리고당의 물리적, 효소적 안정성을 분석하였다. 레반은 과당이 수만-수십만 연결된 분자량(MW·10⁷) 매우 큰 폴리머로 이눌린과는(MW·10⁴) 매우 다른 물성을 갖는다. 1.25% 폴락탄을 30도, 16시간 반응시킨 후 생성된 과당의 양으로 가수분해 정도를 판단하였다. 네 종류의 폴락탄은 중성과 알칼리 pH 에서는 비교적 높은 안정성을 보여, pH 14인 조건에서 레반과 이눌린은 2% 이하, 이눌린 올리고당은 10%, 레반 올리고당은 14% 가수 분해 되었다. pH 5의 조건에서는 거의 분해되지 않았으나, 산성 조건에서는(인공위액; pH 1.4), 시간에 따른 폴락탄의 분해가 진행되었다. 생성된 과당의 양은 가수분해시간에 비례하여 나타났으며, 이눌린보다 레반이, 이눌린올리고당보다 레반 올리고당이 빨리 가수분해 되어 레반을 형성하는 beta-2,6 결합이 이눌린을 형성하는 beta-2,1-결합보다 산가수분해에 약한 것으로 사료된다. 본 연구결과는 폴락탄을 이용한 식품가공과 보관 공정에서 폴락탄의 분해속도를 예측하는데 도움을 주리라 생각된다. 효소적 가수분해정도를 비교한 실험에서는 레반과 이눌린은 inulinase에 의하여 분해되었으나, invertase에서는 분해되지 않는 특성을 보였다. 이눌린 올리고당은 inulinase와 invertase 모두에서 분해되는 특성을 보였다.

P6-035

Enhanced Production of GABA in *Bifidobacterium* Strain by Expressing a Rice Glutamate Decarboxylase Gene

Suk-Heung Oh^{*}, Ki-Bum, Myung-Soo Park, and Geun-Eog Ji^{1,2}
Department of Biotechnology, Woosuk University, ¹Research Center Bifido Co., ²Department of Food Science and Nutrition, Seoul National Univ.

Glutamate decarboxylase (GAD) catalyzes the α -decarboxylation of L-glutamate forming CO₂ and γ -aminobutyric acid (GABA). In animals, GABA is a major transmitter in central nervous system but it also exerts functions in peripheral organs. The important roles of GABA in animals have directed a keen attention to GAD. To develop *Bifidobacterium* strains with enhanced ability of GABA production, we cloned a GAD gene derived from rice cDNA libraries into *Bifidobacterium-E. coli* shuttle vector pBES2 (pBES2GAD) and

대한지역사회영양학회

2004년도 준계학술대회

암 정복에 도전하는 예방영양

Preventive Nutrition :
Striving to Conquer Cancer



- 일 시 : 2004년 5월 29일(토) 오전 9시
- 장 소 : 서울여자대학교 바롬교육관 국제회의실
- 주 최 : (사)대한지역사회영양학회
- 후 원 : 한국학술진흥재단, 서울여자대학교, 교문사
- 협 찬 : 정식품, 일동후디스, 서울우유, (주)썬스워트코리아

【대한영양사협회 전문영양사 보수교육 평점 2점 인정】

[P4-7]

서목태의 식물성 에스트로겐과 프럭토스폴리머 레반의 보충에 의한

폐경 후 여성의 골질환 개선 효과

강순아*, 김승현, 장기효, 장병일, 임용호.

전국대학교 분자생명공학과 생명분자정보학센터

Synergistic effects of blackbean (Yak-kong; *Rhynchosia Molubilis*) and levan on the prevention of bone loss in Korean postmenopausal women

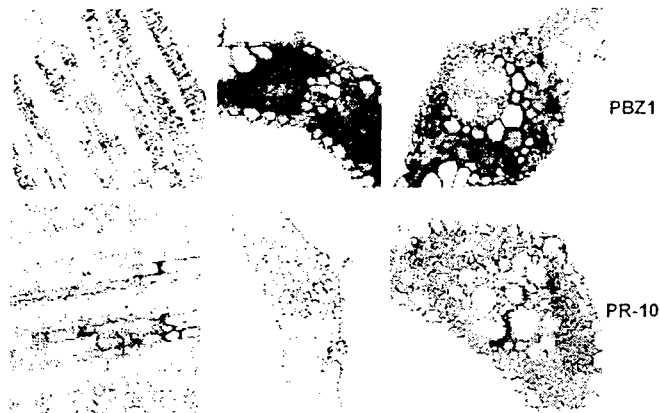
Soon Ah Kang*, Seunghyn Kim, Ki-Hyo Jang, Byungil Chang, Yoongho Lim.

Department of Molecular Biotechnology, Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul, Korea.

폐경기성 골다공증의 치료 방법인 에스트로겐 투여에 의한 위험성을 보완하기 위해 한약재 및 식품 등 천연물의 활성 성분을 이용한 대체 요법에 대한 연구가 진행되면서, 이소플라본(isoflavone)계 식물성 에스트로겐을 함유한 기능성식품의 개발이 진행되고 있다. 특히 콩과식물 중 isoflavone 함량뿐 아니라 배당체와 결합되지 않은 aglycone 함량이 높은 서목태(쥐눈이콩: 약콩)와 무기질 흡수 증진 효과를 지닌 프럭토스폴리머(levan: beta-2,6 linked fructose polymer, ~6,000,000 Da)를 폐경 후 여성들에게 공급하여 골형성 지표와 골 흡수 지표의 변화, 혈중 칼슘 농도, 골대사를 살펴보고 골밀도의 변화를 살펴봄으로써 골다공증 예방제로서의 기능성물질의 효능을 살펴보고 신물질의 개발에 기여하고자 하였다. 서울지역에서, 60세 전후의 폐경 후 여성을 연구대상으로 하며 갑상선질환이나 당뇨병 등 골밀도에 영향을 미치는 질환이 없는 자로서 골절 경험이 없으며, 현재 호르몬 대체요법을 받지 않으며, 칼슘이나 fiber의 보충을 받지 않고 있는 여성 30명을 최종 대상으로 정하고 double blind placebo controlled study로 실험 1군은 50mg isoflavone 함유 서목태/day 식이를, 실험 2군은 50mg isoflavone 서목태 - 프럭토스폴리머 (6g)/day 식이를, 대조군에게 placebo/day 정제를 매일 12주 동안 복용시키며 레반 식이와 control 식이는 (주)리얼바이오텍에서 공급받아 사용하였다. 실험식이를 제공하기전의 연구대상자의 평균 연령은 61.4세로 군 간에 차이가 없게 무작위로 군을 구분하여 체중, 신장, 체질량지수, 체지방 함량에 차이가 없었다. 실험식이를 12주 제공 한 후 체중, 신장, 체질량 지수에는 유의적인 차이를 볼 수 없었으나 체지방 함량은 서목태와 프럭토스 폴리머인 레반을 제공한 군에서 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 폐경기 한국여성에서 서목태와 레반을 공급함에 따라 골대사에 미치는 영향을 살펴본 결과 골밀도의 변화는 없었으나 혈중 칼슘의 농도 증가($P < 0.05$)를 보임으로써 레반의 공급에 의하여 혈중 칼슘 농도에 영향을 미치는 것으로 보였다. 또한 서목태군과 서목태+레반군에서 뇨로 배설되는 칼슘과 인의 농도는 감소하는 경향성을 보였으나 유의성을 보이지 않았고 변으로 배출되는 칼슘의 농도는 서목태+레반군에서 유의하게 감소하는 것을 보였다. ($P < 0.05$) 또한 골교체율의 지표인 osteocalcin은 서목태와 레반을 섭취한 군에서 유의적으로 낮게 나타남으로써 서목태의 골대사 효과에 프럭토스 폴리머인 레반의 칼슘 흡수성 효과가 상승효과를 가져온 것으로 본다. 이는 서목태와 프럭토스 폴리머인 레반이 새로운 폐경기 골다공증 예방용 특수 영양식품 개발에 이바지할 수 있으리라 기대한다.

2003 International Symposium and Annual Meeting of the KSACB

Functional Genomics for Agro-Biotechnology



October 23~24, 2003

Jisan Forest Resort, Icheon, KOREA

- Organized by
The Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology (KSACB)
- Supported by
Crop Functional Genomics Center (CFGC)
Korean Federation of Science and Technology Societies (KOFST)
Korea Research Foundation (KRF)

Date	Time	Program		Place & Chair		
10/23 (Thu)	13:00-13:30	Registration		Lobby		
	13:30-13:40	Opening Ceremony		Forest Room		
	13:40-14:40	Plenary Lecture	Dr. Pal Maliga (Univ. of Rutgers)	Forest	김민균 (서울대)	
	14:40-14:50	Coffee Break		Lobby		
	14:50-15:50	Invited Lecture	IL-A1 Dr. Park, Zee Yong (K-JIST)	IL-B1 Dr. Kazuya Akimitsu (Kagawa Univ.)	Maple	White
			IL-A2 Dr. K. Hun Mok (Oxford Univ.)	IL-B2 Dr. Han, Jaehong (Ewha Womans Univ.)	Maple	White
	15:50-16:50			조운재 (제주대)	김우연 (중앙대)	
	16:50-17:20	Poster Session		1st & 2nd Floor		
	17:20-18:20	Invited Lecture	IL-A3 Dr. Koji Ichinose (Univ. of Tokyo)	IL-B3 Dr. George Phillips (Univ. of Wisconsin)	Maple	White
					박상규 (대구대)	김경현 (고려대)
18:30-19:30	Welcome Reception		restaurant			
20:00-	Session Meeting	General Board Member Meeting		Green		

Date	Time	Program		Place & Chair		
10/24 (Fri)	09:00-09:30	R & D Roadmap of ARPC		Forest	박노동 (전남대)	
	09:30-10:00	General Assembly Meeting		Forest		
	10:00-10:30	KSACB Lecture	I. Research Award	Dr. Kyu Young Kang (Gyeongsang Nat'l Univ)	Forest	한태룡 (경희대)
	10:30-11:00		II. Technology Award	Dr. Hyun Pal Ha (Kyongju Beobjoo Co., Ltd)		이인구 (경북대)
	11:00-11:10	Coffee Break		Lobby		
	11:10-11:40	Special Lecture	SL A1 Yong Chool Boo	SL B1 Young Deuk Lee	SL C1 Sung Eun Lee	Maple White Green
			SL A2 Jae-Yean Kim	SL B2 Soon Ah Kang	SL C2 Yang-Bin Ihm	최용락 (동이대) 조운재 (영남대) 성낙도 (충남대)
	12:10-13:10	Lunch		restaurant		
	13:10-13:40	Poster Session		1st & 2nd Floor		
	13:40-14:20	Oral Presentation	1. Kun-Jae Lee	1. Chan Hyeok Kwon	Maple	White
			2. Bo-Ra Kim	2. Jin Surk Choi	김주곤 (영지대)	김정호 (서원대)
			3. Byung Yeoup Chung	3. Jeoung-Eun Hoe	김학결 (경북대)	강훈 (순천대)
			4. Byung Yeoup Chung	4. Jong-Pyung Kim		
	15:00-15:10	Coffee Break		Lobby		
15:10-15:40	Closing Ceremony		Forest			
15:40-18:00	On-site Tour		Sempio Foods Co.,Ltd			

※ White Room(1F), Green Room(1F), Forest Room(1B), Maple Room(1B)

개회식 및 기조 초청수상강연 안내

Special Lecture

SL-A

- ▶ 10/24(㉓) 09:30-10:00 Chair : Choi, Yong-Lark
SL-A1 Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase Role of protein kinase A-dependent phosphorylation at Ser635 / Yong Chool Boo¹ and Hanjoong Jo / ¹Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, 1, Ara-dong, jeju, jeju-do, Korea 690-756 and ²Wallace H. Coulter Department of Biomedical Engineering at Georgia Tech and Emory, 308D WMB, Atlanta, GA 30322
- ▶ 10/24(㉓) 10:00-10:30 Chair : Choi, Yong-Lark
SL-A2 Intercellular protein trafficking in *Arabidopsis*. / Jae-Yean Kim / Department of Molecular Biology, Gyeongsang National University, Korea

SL-B

- ▶ 10/24(㉓) 09:30-10:00 Chair : Jo, Youl-Lae
SL-B1 Simultaneous Determination of Sinigrin and Allylisoithiocyanate in Wasabi (*Wasabia japonica*) Using Ion-Pair Liquid Chromatography / Young Deuk Lee / Chan Hyeok Kwon, Moon Soo Cho¹, Jong Bae Chung, Shin Park, and Byeong Ryong Jeong² / Division of Life and Environmental Science, 1)Division of Horticulture and Landscape Architecture, and 2)Division of Life Resources, Daegu University, Kyungbuk 712-714, Korea
- ▶ 10/24(㉓) 10:00-10:30 Chair : Jo, Youl-Lae
SL-B2 Hypolipidemic action of fructosepolymer : Altered lipid profiles and expression of UCP in obese rats by high fat diet / Soon Ah Kang / Department of Applied Biology & Chemistry, Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Hwayang-dong Gwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea

SL-C

- ▶ 10/24(㉓) 09:30-10:00 Chair : Sung, Nack-Do
SL-C1 Proteomics approach to identify salinity-repsponse related proteins from the earthworm, *Eisenia fetida* / Sung-Eun Lee, Byeoung-Soo Park, Joon-Kwan Moon and Jeong-Han Kim* / School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 156-741, Korea
- ▶ 10/24(㉓) 10:00-10:30 Chair : Sung, Nack-Do
SL-C2 Fate of the Insecticide Imidacloprid in the Environment / Yang-Bin Ihm*, Kee-Sung Kyung, Byung-Moo Lee, Soo-Myung Hong, Gab-Hee Ryu, Jae-Koo Lee¹ / National Institute of Agricultural Science & Technology, 441-707, Suwon, Korea, ¹Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Chongju, Korea

Special Lecture / SL-B2

Hypolipidemic Action of Fructosepolymer ; Altered Lipid Profiles and Expression of UCP in Obese Rats by High Fat Diet

Soon Ah Kang

Department of Applied Biology & Chemistry, Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Hwayang-dong Gwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea
E-mail: sakang@khu.ac.kr

Obesity is a worldwide health problem that results of imbalance between energy intake and expenditure. It is often associated with hyperlipidemia, hypertension and type 2 diabetes mellitus and with increased risk of coronary heart disease. It has been suggested that high fat diet increase body weight and adiposity and numerous studies have been conducted on dietary modification to regulation of energy homeostasis and lipid metabolism in obesity. The optimal treatment for obesity would be one that both suppresses food intake and increases energy expenditure. Food intake is regulated by leptin and other neurotransmitters, which affecting appetite.¹⁾ Diet modulation could affect energy expenditure, also. An important component of energy expenditure is adaptive thermogenesis, which based on the functionality of uncoupling protein (UCP).²⁾ UCP is a mitochondrial protein that uncouples the respiratory chain from oxidative phosphorylation and generates heat instead of ATP generation, thereby increase energy expenditure.

Interestingly, nondigestible carbohydrate such as fructan have been shown to exert systemic effects by modifying energy and lipid metabolism. Indeed, consumption of nondigestible oligosaccharides suppressed the weight gain and fat accumulation, and reduced serum triglyceride and cholesterol concentrations.³⁾ The mechanism of these effect on serum lipids remains incompletely elucidated. The decrease in serum triglyceride has been ascribed in animals from reduction in VLDL-triglyceride secretion and to the inhibition of hepatic lipogenesis through a reduction of the activities and gene expression of lipogenic enzymes.⁴⁾ Fructan stimulates the growth of bifidobacteria and improves the intestinal microflora production of short-chain fatty acids, which are expected to have physiologic roles on human health. Animal studies demonstrated that short chain fatty acids produced by bacterial fermentation and absorbed into the portal blood flow may have an inhibitory effect on hepatic fatty acid and cholesterol synthesis.⁵⁾



San Diego

PROGRAM

*Experimental
Biology*

2000

April 11-15
San Diego, CA

Annual Meetings of:

American Association
of Anatomists (AAA)

The American
Physiological Society
(APS)

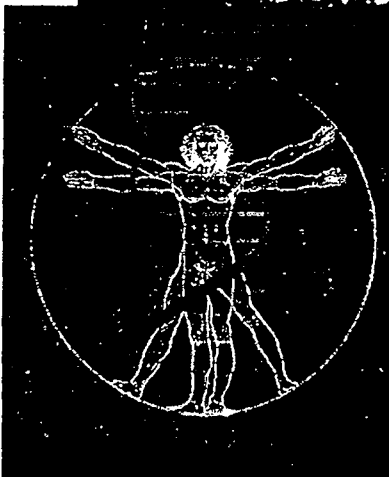
American Society for
Biochemistry and Molecular
Biology (ASBMB)

American Society for
Investigative
Pathology (ASIP)

American Society for
Nutritional Sciences
(ASNS)

American Society for
Pharmacology and Experimental
Therapeutics (ASPET)

Guest Societies



Translating the Genome

trace (-IF) or high (+IF) (0.04 and 3.98 mg/g protein respectively), and two levels of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bone conservation in 2-month-old sexually mature ovariectomized (OVX) Sprague-Dawley rats. All dietary treatments provided 110.4 g/kg of fat from either safflower oil (N6) or a blend of n-3 PUFA and safflower oil (N3). OVX rats were randomly assigned to N6-IF (Control), N6+IF, N3-IF or N3+IF groups and euthanized after 84 d of feeding. Data for sequential femur and tibia bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) measurements were collected every 28 d. Whole hindlimb bones and trabecular subregions revealed a trend towards a positive bone conserving effect related to (+IF) at each level of n-3 PUFA. Rats fed N3+IF had a significantly higher distal femur BMD ($P < 0.0001$) and BMC ($P < 0.0001$) and an increased tibia BMC ($P = 0.02$). Concentration of serum pyridinoline crosslinks (PYD) was also significantly lower in the N3+IF group ($P = 0.01$), demonstrating a positive effect of this dietary combination on bone conservation in OVX rats.

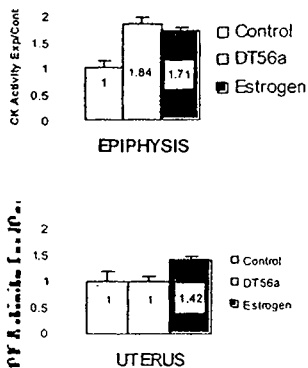
188.9

DT56a (Tofupill®), a new phyto-SERM, exerts a positive effect on female rat skeletal tissues with no effect on the uterus
 Israel Yoles¹, Dalia Somjen². ¹Ob/Gyn Dep., Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Ramat Gan, 52620 Israel, ²Institute of Endocrinology, Metabolism and Hypertension, Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel

Objective: DT56a (Tofupill®) a natural product derived from soybean, has been shown in previous clinical studies to alleviate menopausal symptoms and increase bone mineral density with no effect on sex steroid hormone levels or endometrial thickness. We studied the mechanism of action of DT56a compared to estradiol-17β (E₂) on skeletal tissues and uterus of female rats.

Methods: Immature or ovariectomized female rats were injected or fed with DT56a or E₂. The effect was evaluated, by measuring the specific activity of the BB isozyme of creatine kinase (CK) in skeletal tissues and uterus. CK specific activity has been shown to be a response marker for estrogenic activity.

Results: Single short-term injection of high doses of DT56a induced estrogenic activity in bones and uterus similar to that of E₂. When administered in multiple oral doses, DT56a stimulated skeletal tissues similarly to E₂, but whereas E₂ significantly increased CK specific activity in the uterus, DT56a did not. The selective estrogen receptor modulator (SERM) Raloxifene blocked the stimulation of CK by either DT56a or E₂ in all tissues tested.



Conclusions: Our findings suggest that DT56a acts as a natural phyto-SERM, stimulating skeletal tissues, without affecting the uterus. The blockage by Raloxifene indicates a possible common receptor(s) for E₂ and DT56a.

This study was supported by Se-cure Pharmaceuticals, Israel.

188.10

Dietary docosahexaenoic acid (DHA) supplementation helps maintain bone mass in ovariectomized rats

Yong Li¹, Susan Reinwald¹, Mark F Seifert², Bruce A Watkins¹. ¹Department of Food Science, Purdue University, 745 Agriculture Mall Dr., West Lafayette, IN 47907-2009, ²Department of Anatomy & Cell Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN

The effect of dietary n-3 fatty acids on bone remodeling in ovariectomized (OVX) rats was evaluated using 60 2-mon-old female SD rats (50 OVX + 10 sham) in this study. The dietary treatments were formulated based on the AIN-93G diet with added fat to simulate a human diet containing 25% fat energy. The sham and 10 OVX rats were used as the controls and fed a diet with safflower oil. The other four groups were given diets containing the combinations of two sources of n-3 PUFA (DHA or fish oil, n-6/n-3 = 5) and two levels of CLA. Rat bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were monitored by DEXA for 84 d. The DHA treatment demonstrated a positive effect in maintaining BMC in the tibia of OVX rats after 21 d of feeding and was sustained throughout the study. The same response was observed on excised bones at the end of the study. The DHA treatment was superior to fish oil in conserving bone mass in both tibia and vertebrae in OVX rats. Concentrations of serum pyridinoline crosslinks were lower in all the fatty acid treatment groups compared to that of OVX control indicating a positive effect of the n-3 diets on inhibiting bone resorption. These results suggest that dietary n-3 fatty acids could modulate the bone remodeling process by inhibiting bone resorption and/or stimulating bone formation to conserve bone mass during rapid bone turnover under the influence of estrogen deficiency.

188.11

Inhibition of bone loss by n-3 fatty acids in 12 mo-old OVX mice as an animal model for menopause

Gabriel Fernandes, Arunabh Bhattacharya, Dongxu Sun, Khaliq Zaman, Richard Lawrence, Aparna Krishnan, Department of Medicine, University of Texas Health Science Center, 7703 Floyd Curl Dr., San Antonio, TX 78229-3900

It is well established that post-menopausal osteoporosis occurs soon after natural or surgical menopause and leads to increased fractures and a rise in morbidity and mortality. A recent HRT trial was stopped due to increased adverse side effects. Thus alternative approaches are being tested to treat bone loss without side effects. Several previous studies indicated a beneficial effect of n-3 fatty acid supplementation on bone loss in animals and humans. We repeated earlier studies showing decreased bone loss in young 2 mo-old OVX mice fed n-3 fatty acids and found decreased osteoclastogenesis. The present study was done in 12 mo-old female OVX mice fed diets containing either corn oil (10%) or n-3 fatty acids from fish oil with EPA/DHA ratios of 18/12, 30/20, 50/5, or 5/50 (gift from Ocean Nutrition, Canada) for 3 months. DEXA scans to measure bone mineral density (BMD) were done in several bone regions. Corn oil-fed mice had significantly decreased BMD in the distal end of the femur, the proximal end of the tibia, and the lumbar region of the spine. All of the fish oil preparations except the 50/5 EPA/DHA prevented nearly 50% of the BMD loss. It appears that a proper ratio of EPA/DHA may provide protection from bone loss. Studies are underway to measure changes in proinflammatory cytokines (IL-1α, IL-6 and TNF-α) which are involved in activation of osteoclasts in the absence of adequate levels of estrogen. Supported by NIH grant AG14541.

188.12

Intakes of fructan modified the lumen physiology and increased the trabecular bone density in osteoporotic model rats

Yun Young Kim¹, Ki-Hyo Jang¹, Soon-Ah Kang¹, Yunhi Cho¹, Eun Young Lee¹, Ji Hae Suh¹, Chul Ho Kim², Ryowon Chou¹. ¹Medical Nutrition, Kyung Hee University, Haegi-Dong, Dongdaemoon-Gu, Seoul, 130-701 Korea, Republic of, ²Biotechnology Research Division, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon, Korea, Republic of

The effects of ovariectomy (OVX) and fructan substitution on food intake, weight gain, and lumen pH, short-chain fatty acid production, mineral absorption, and osteoporosis were studied in four groups of rats:

(1) Sham-operated rats ($N = 6$), (2) ovariectomized rats (OVX - E) ($N = 6$), (3) estrogen-treated OVX rats (OVX + E) ($N = 6$), and (4) OVX rats supplemented with fructan (OVX + fructan) ($N = 6$). All of four groups were fed the low level of Ca (0.24%) and sacrificed at 6- and 12-week study periods. OVX was associated with an increase in body weight gain during a 12 weeks compared to sham-operated rats, whilst the estrogen-substituted rats had a significantly lower weight gain. In the cecum, fructan group showed higher wall and contents weight and lower pH than those of other groups, whereas organs (liver, spleen, kidney) weight did not differ in all groups. The level of serum alkaline phosphatase (ALP) activity in the fructan group was lower at 6 weeks in comparison with OVX-group, but slightly higher at 12 weeks. The levels of serum calcium and phosphorus in all groups were similar. The trabecular content and density were reduced by the ovariectomy and intake of low calcium diet. In fructan and sham groups, the trabecular content and density were higher than those of OVX-group, indicating that fructan might be the putative candidate for the prevention of bone loss.

188.13

Swimming versus running exercise on bone calcium content and femur breaking strength in ovariectomized retired breeder rats

Shelly A. Duhe¹, Anne R. Francis¹, Carol E. O'Neil¹, Michael J. Keenan¹, Yan Chen¹, Sheri S. Melton², Maren Hegsted¹. ¹Human Ecology, Louisiana State University AgCenter, HUEC Bldg., Baton Rouge, LA 70803, ²Kinesiology, West Chester University, West Chester, PA

Physical activity may increase Ca content to preserve bone strength in postmenopausal women. This study determined the effect of compulsory swimming and voluntary running exercise on bone Ca content and femur strength in ovariectomized (OVX) retired breeder rats, as a model for postmenopausal women. Thirty-seven 9-month old Sprague Dawley rats were assigned randomly into 4 treatment groups for the 9-week study: OVX + running (R; $n=9$); OVX + swimming (S; $n=10$); OVX + no exercise (C; $n=9$); sham-surgery + no exercise (SH; $n=9$). R rats had free access to running wheels; S rats were trained over 1 week to swim for one hour, 5 days a week. At sacrifice, femurs, tibias, and humeri bones were removed. Bone Ca content was analyzed using atomic absorption spectrometry, and femur strength was determined by a compression tester (*Q-tester*). Mean grams (g) of Ca per dry femur weight for S rats ($0.1462g \pm 0.0153$) was higher than C rats ($0.1322g \pm 0.0177$, $p<0.05$). S femurs had the highest mean peak load, peak stress, and break load values (NS). These results suggest that swimming exercise is more effective than voluntary running in preserving Ca content and improving breaking strength in the femur bone of OVX rats. (Supported by Hatch 3297.)

188.14

Bone mineral content is reduced in small for gestational age piglets compared to those appropriate for gestational age

June Kohut, Rebecca Mollard, Hope Weiler. Human Nutritional Sciences, University of Manitoba, 190 Dysart Road, Winnipeg, Manitoba R3T 2N2 Canada

Intrauterine growth restriction is associated with low bone mass in the small for gestational age (SGA) infant. This study compares growth and bone mass between SGA and appropriate for gestational age (AGA) piglets. 10 SGA pigs (birthweight ≤ 1.2 kg) and 8 AGA pigs (birthweight ≥ 1.4 kg) received artificial liquid diets between days 5 and 21 of life. Bone mineral content (BMC) of whole body (WB) and L1-L4 spine (LS) was measured using dual energy x-ray absorptiometry (DXA). Differences between groups were detected by t-test. Relationships between variables were measured by Pearson correlation analysis. Birthweight and final weight were significantly higher in the AGA group ($P<0.0001$ and $P=0.0456$ respectively). SGA pigs, however, showed more rapid weight gain ($P<0.002$) (76 ± 3 g/kg/d) than their AGA counterparts (70 ± 4 g/kg/d). WB BMC was significantly lower ($P=0.0102$) in the SGA ($95.68 \pm 5.77g$) compared to AGA group ($120.80 \pm 6.42g$). Similarly, LS BMC means were $1.79 \pm 0.09g$ for SGA pigs and $2.35 \pm 0.17g$ for AGA pigs ($P=0.0065$). Birthweight correlated closely with WB BMC ($r=0.7428$ $P=0.0004$) and LS BMC ($r=0.5215$ $P=0.0265$). Final weight was strongly associated with WB BMC ($r=0.9415$ $P<0.0001$) and LS BMC ($r=0.95227$ $P=0.0260$). These data

demonstrate a relationship between piglet bone mass and perinatal growth and underscore the value of the SGA piglet model for investigation of neonatal bone mineralization. (NSERC)

188.15

Frozen storage in saline and hydration under vacuum alter the biomechanical behavior of the rat femoral neck

Michael W Reeves, Michael J Keenan, Maren Hegsted, Yan Chen. School of Human Ecology, Louisiana State University AgCenter, Human Ecology Building, Baton Rouge, Louisiana 70803

To determine if femoral neck biomechanical behavior is affected by frozen storage in saline or hydration under vacuum, Sprague-Dawley femurs were frozen in 0.9% saline at -16 degrees C. for periods of 34 and 122 days. Thawed femurs were hydrated at 360mm Hg negative pressure for one to three hours. Femoral neck breaking values were obtained using an Instron 4301 testing machine and analyzed using independent and paired t-test ($p=0.05$). Compared to non-frozen femurs, frozen storage for 34 days significantly lowered plastic strain ($p=0.0453$). Compared to non-frozen femurs, freezing for 122 days significantly lowered plastic strain ($p<0.0001$), yield strain ($p<0.0001$) and strain to failure ($p<0.0001$), and significantly raised Young's modulus ($p=0.0018$). Hydration values were not determined for the 34-day freezing period. Following hydration, femurs frozen 122 days showed significantly lower strain to failure ($p=0.0214$) and yield strain ($p=0.0100$), compared to non-frozen femurs. Compared to non-hydrated frozen femurs, significant post-hydration values for femurs frozen for 122 days were higher for plastic strain ($p=0.0474$) and strain to failure ($p=0.0016$), and lower for Young's modulus ($p=0.0291$). These results show that freezing in saline and hydration under vacuum both can alter femoral neck biomechanical behavior and may interfere with the ability to detect treatment effects (Supported by Hatch 3296).

188.16

Rat femurs stored frozen in saline do not require hydration for density measurements

Michael W Reeves, Michael J Keenan, Maren Hegsted, Yan Chen. School of Human Ecology, Louisiana State University AgCenter, Human Ecology Building, Baton Rouge, Louisiana 70803

Previous studies have demonstrated that femurs frozen in a dry state require vacuum hydration before density measurement. To determine if bones stored frozen in saline need to be hydrated, femurs from Sprague-Dawley rats were frozen in 0.9% saline at -16 degrees C. for periods of 15 and 122 days. Femurs were hydrated at a negative pressure of 360mm Hg for periods of one to three hours. Density measurements were obtained using the Archimedeal Principle and analyzed using independent and paired t-tests ($p=0.05$). Frozen storage in saline for 15 or 122 days did not significantly alter femoral density compared to pre-freeze values. Post-hydration density of femurs frozen for 15 days was significantly lower compared to pre-hydration density of non-frozen and ($p=0.0407$) and frozen-stored ($p=0.0008$) specimens. Post-hydration density of femurs frozen for 122 days was significantly lower compared to non-frozen ($p=0.0002$) and frozen-stored ($p=0.0059$ & $p=0.0270$) pre-hydration densities. These results show that freezing rat femurs in 0.9% saline for up to 122 days preserves bone density and post-thaw hydration under vacuum significantly reduces bone density for femurs frozen in saline for 15 or 122 days. Therefore, hydration of femurs frozen in saline for up to 122 days is not required and may interfere with density measurements (Supported by Hatch 3296).

188.17

Effects of Black Bean (*Yak-Kong; Rhynchosia Molubilis*) and Soy Bean on the Prevention of Obesity in an Ovariectomized Rat Model

Soon-Ah Kang, Ki-Hyo Jang, Yunhi Cho, Ji-Hae Suh, Jin-A Han, Jin Young Kim, Kyung Lan Kang, Ryowon Choue. Medical Nutrition, Kyung Hee University, Hoegi-Dong, Dongdaemoon-Ku, Seoul, 130-701 Korea, Republic of

The purpose of this study is to examine the effects of water extracts of black bean and soy bean on lipid metabolism in the osteoporotic model rats by ovariectomy and low Ca diet. The experimental animal were divided into sham operation (SH) or ovariectomy (OVX) groups and then OVX group divided into black bean(OB), soybean(OS) and

706.3

Alcohol, obesity, hypertension and endothelial irritation

Ruth-Maria Korth. Praxis für Allgemeinmedizin, Forschung in der Allgemeinen Medizin F.I.D.A., Palearstr. 7A, Munich, D-80639 Germany

Men confirmed alcohol use during medical examinations (n=78). Urological infections were excluded (Combur 9, Roche). Obese men drank more (11% from 46 with BMI <25 kg/m²; 47% from 19 with BMI 25-29.9; 61% from 13 with BMI >29). Middle class men with alcohol misuse were obese (29±4 kg/m², n=22), had elevated systolic and diastolic blood pressure (145±20, 100±11 mmHg, ±1S.D.), intolerance to glucose and normal fasting glucose. Nocturnal systolic and diastolic blood pressure increased nighttime to daytime ratio (0.93±0.02, 0.88±0.1) as compared to normal fall during sleep (0.88±0.04, 0.85). Alcohol and hypertriglyceridemia impaired protection of endothelial barriers by serum albumin as ratio of albumin to triglycerides decreased from 74±50 to 26±10 (AHA1-syndrome). Morning urines showed irritation of renal endothelial barriers (35%) with 58±38 mg proteins/dl and 17±10 erythrocytes/μl confirmed with microscopy. Chlamydia infection was tested with urine polymerase chain reaction (PCR). Self control (www.fida-aha.com) and ginkgolides in Ginkgo biloba extracts (US Patent 5,895,780) protect endothelial barriers against alcohol, obesity and/or the onset of hypertension.

706.4

The Effects Of Ephedrine And Caffeine Diet Used For The Treatment Of Obesity On The Liver Of Rats Fed Ethanol Intragastrically

Jun Li, Barbara French, Paul Fu, Samuel W French. Pathology, Harbor-UCLA REI, 1000 w Carson st, Torrance, CA 90502

Goal: To determine the effects of catecholamine supplemented diet on the ethanol-induced urinary alcohol cycle (UAL) and on liver damage. Hypothesis: Catecholamine supplemented diet will prevent the UAL cycle and increase the ethanol elimination rate. It will also enhance hypoxic liver injury caused by ethanol similar to that of thyroid supplements by increasing the metabolic rate. Method: Rats receiving diet and ethanol are compared to rats fed ethanol, ephedrine and caffeine in their diet intragastrically at a constant rate. Results: Rats fed ethanol, ephedrine and caffeine did not develop UAL cycling, tolerated higher doses of ethanol and developed centrilobular ischemic necrosis similar to rats fed thyroxine and ethanol. Conclusions: Rats fed a diet used to treat obesity along with ethanol have increased weight loss, liver hypoxic injury, and ethanol elimination rate. The elimination of the UAL cycle due to an increased metabolic rate also occurred. Supported by Grants NIAAA 08116 and P50-011999 Alcohol Center Grant on the liver and pancreas.

706.5

The effectiveness of medicinal herb rich supplements on weight loss, body composition and anthropometric measure in young adults

Bog-Hieu Lee, Kyong-Dong Cho. Food and Nutrition, Chung-Ang University, Daeduck, Ansong, Kyonggi 456-756 Korea, Republic of

The study was aimed to explore the effectiveness of herb rich supplements mainly made of psyllium, glucomannan, and onion powder with other plant extracts on weight loss, fat composition and anthropometric measure in young adults. Twenty-two healthy, free-living volunteers were employed. Subjects required to take diet pills twice daily 30 min. before meals. Before the study, the subjects needed to submit 24 hr. recall diet record and the questionnaire including general information. Anthropometric measure like height, weight, waist and hip circumferences, triceps and abdomen skinfold thickness were taken before and after the study. Body composition was measured by Bioelectrical Impedance Analysis. The subjects submitted 3 day dietary records weekly. After diet trial, body weights, BMI, PIBW were reduced mean of 0.9 kg, 0.3, 10.1%, respectively compared to the beginning. Percent body fat, % abdomen fat, and waist and hip circumferences were all reduced, but % body muscle mass tended to increase. Frequency of bowel movement and gas formation tended to increase compared to the beginning of the study. In conclusion, the medicinal herb diet supplements led to a significant weight loss and fat mass and several

anthropometric indices in young, normal-weight subjects. The study suggest that herb-rich supplements might help to manage weight problem. (Supported by Chongkundang Health Care, Korea)

706.6

Hypolipidemic Effect of Dietary Levan : Altered Expression of NPY in Hypothalamus and UCP3 in Skeletal Muscle

Soon-Ah Kang¹, Kyunghee Hong¹, Ki-Hyo Jang¹, Eun-Kyung Jang², Chul-Ho Kim¹, Ryo-Won Choue¹. ¹Medical Nutrition, Kyung Hee University, Hoegi-Dong, Dongdaemoon-Ku, Seoul, 130-701 Korea, Republic of, ²Applied Microbiology Research Division, KRIBB, Taejeon, Korea Korea, Republic of

We studied the effect of levan (high-molecular-mass α -D-G-linked fructose polymer) feeding on NPY and UCP expression in high fat diet induced obese rats. To determine whether the 1% or 2% levan feeding may have the hypolipidemic and anti-obesity effect, 4 wk old SD male rats fed AIN-76 high fat diet for 6 wk, and subsequently fed 1% or 2% levan (w/w of food intake) for further 5 wk. Serum TG level was significantly reduced in 1%, 2% levan group by 74%, 78%, respectively, while the serum HDL cholesterol/TC ratio increased by levan feeding. Epididymal, peritoneal and visceral fat masses were not affected, while serum insulin and leptin reduced by levan feeding, as a result, 1% levan feeding reduced serum insulin by 41% and serum leptin by 35%. The NPY expression in hypothalamus decreased by levan feeding accompanied by reduced food intake in 2% levan group. The expression of UCP2 mRNA in brown adipose tissue, white adipose tissue and hypothalamus were not changed by levan feeding, while the UCP3 mRNA in skeletal muscle was up-regulated by levan feeding. In conclusions, in vivo, 1% or 2% levan feeding reduced serum triglyceride, insulin and leptin, decreased hypothalamic NPY expression and increased the skeletal muscle UCP3 mRNA expression in high fat induced obese rats. This study suggest that 1-2% levan have hypolipidemic effect and reduced the intake by suppresses the NPY expression, while insufficient to have anti-obesity effect by up-regulation of UCP.

706.7

Anti-obesity effects of oriental herbal medicines : in vitro and in vivo analyses

Sung Ok Kim, Su-Jin Yun, Chang Yong Lim, Dae-Hyun Hahn, Insoo Shim, Hye-jung Lee, Eunjoon H. Lee. Graduate school of East-West Medical Science, Kyunghee University, 1 Seochun, Yong-In, Kyung-gi 449-701 Korea, Republic of

Overweight carries an increased risk of health problems such as cardiovascular disease, diabetes mellitus, hypertension and breast cancer and is mostly related to an increased intra-abdominal fat mass. The purpose of this study was to screen anti-obesity effects of the extracts of various oriental herbal medicines, such as Coix lachrymajobi var. mayuen (Clm), a steamed root of Rehmannia glutinosa (Rg), Ephedra sinica (Es). For in vitro study, 3T3-L1 adipocytes were treated in differentiation medium with water extracts of the oriental medicines. After treatment for 12 days, the levels of mRNAs for adipocyte marker genes were examined using RT-PCR. Treatment of cells with 100 μg/ml of the extracts influenced mRNA expression of leptin, lipoprotein lipase, and resistin. For in vivo study, diet-induced obese rats were injected with the extracts (50mg/kg body weight/day) or saline for 4 weeks. The groups injected with the extracts showed significant reduction in food intake and body weight gain compared to the control group. The weight of peritoneal fat and epididymal fat was dramatically increased in the control group whereas significantly decreased in treated groups in the order of Es<Rg<Clm. The sizes of peritoneal fat cells under microscope were markedly larger in the control while reduced in treated groups. In conclusion, the extracts of ES, Rg and Clm may be considered for anti-obesity treatment.

건강기능식품의 발전 및 연구 방향

- 일시 / 2003년 5월 24일 (토) 09:00
- 장소 / 이화여대 이화삼성교육문화관 및 SK-Telecom관 컨벤션홀

주 최 / 한국운동영양학회
한국영양학회
한국식품영양과학회

후 원 / 한국학술진흥재단
한국과학기술단체총연합회

협찬단체 / 미국대두협회(ASA)

협 찬 사 /	단일SMC	동아오츠카(주)	바디플래너
	(주)이롭라이프	(주)이에스그룹	(주)정 · 식품
	(주)한국애보트	썬스위트 코리아-맥스	(주)풀무원
	(주)해찬들	(주)한성식품	(주)농심
	(주)동양제과	혜성과학	

연합학술대회일정

이화상성교육문화관 103호

09 : 00-09 : 30 등 록
 09 : 30-09 : 50 개회식

사회 : 황한준 교수 (고 려 대)

심 포 지 움

09 : 50-10 : 30 건강기능식품의 현황과 연구
 10 : 30-11 : 10 건강기능식품의 발전적 평가 방안
 11 : 10-11 : 30 휴식
 11 : 30-12 : 30 패널토의

좌장 : 백영호 교수 (부 산 대)
 이형주 교수 (서 울 대)
 좌장 : 서병철 박사 (생표식품 중앙연구소)
 최명숙 교수 (경 북 대)

사회 : 박태선 교수 (연 세 대)
 토의자 : 이형주 (서 울 대)
 최명숙 (경 북 대)
 정해랑 (보건산업진흥원)
 조홍연 (고 려 대)
 이명천 (스포츠과학연구소)
 허석현 (건식협회)
 김대병 (식 약 청)
 조태형 (주, 남양)

12 : 30-13 : 30 점심
 12 : 30-13 : 00 총회
 13 : 00-14 : 00 오전 포스터 발표자 대기

한국식품영양과학회 A 발표장
 한국운동영양학회 C 발표장

특 별 강 연

■ A 발표장

14 : 00-14 : 30 녹차 Catechin의 생리활성
 14 : 30-15 : 00 대두 및 대두가공식품의 최근 연구동향
 15 : 00-15 : 20 휴식
 15 : 00-16 : 00 오후 포스터 발표자 대기
 16 : 00-16 : 30 프로바이오틱스 유산균을 이용한
 건강기능식품 개발

이화상성교육문화관 103호

사회 : 박종현 교수 (경 원 대)
 좌장 : 성미경 교수 (숙 명 여 대)
 이순재 교수 (대구가톨릭대)
 손현수 박사 (정식품 주식회사)

좌장 : 박건영 교수 (부 산 대)
 지근익 교수 (서 울 대)

- 16 : 30-17 : 00 기능성 식품소재로의 식이섬유
연구현황 및 활용방안
- 17 : 00-17 : 20 휴식
- 17 : 20-18 : 00 리셉션 및 시상식

강순아 교수 (경 회 대)

■ B 발표장

- 14 : 00-14 : 30 건강기능식품에서 인체시험의
필요성 및 방법
- 14 : 30-15 : 00 건강기능식품의 인체시험 평가 사례
- 15 : 00-15 : 20 휴식
- 15 : 00-16 : 00 오후 포스터 발표자 대기
- 16 : 00-16 : 30 건강기능식품의 기능성 평가
-의약품과의 비교를 중심으로
- 16 : 30-17 : 00 건강기능식품과 식품표시
- 17 : 00-17 : 20 휴식
- 17 : 20-18 : 00 리셉션 및 시상식

이화SK텔레콤관 컨벤션홀(B01)

- 사회 : 강명희 교수 (한 남 대)
- 좌장 : 지규만 교수 (고 려 대)
- 이종호 교수 (연 세 대)
- 조여원 교수 (경 회 대)
- 좌장 : 박순옥 이사 (한국에보트주식회사)
- 강재현 교수 (인체의과대학)
- 정해랑 박사 (한국보건산업진흥원)

■ C 발표장

- 14 : 00-14 : 30 운동과 항산화제의 활용에 대한
연구 대상물질과 방법
- 14 : 30-15 : 00 운동 중 대사적 피로개선을 위한
Ergogenic Aids의 역할
- 15 : 00-15 : 20 휴식
- 15 : 00-16 : 00 오후 포스터 발표자 대기
- 16 : 00-16 : 30 운동수행능력 향상을 위한 카르니틴의
보강효과 및 체내대사
- 16 : 30-17 : 00 지구력 향상 식품의 평가방법에
관한 연구
- 17 : 00-17 : 20 휴식
- 17 : 20-18 : 00 리셉션 및 시상식

이화상성교육문화관 101호

- 사회 : 권태동 교수 (상 주 대)
- 좌장 : 최석준 교수 (원 광 보 건 대)
- 박 현 교수 (경 회 대)
- 김완수 교수 (건 양 대)
- 좌장 : 이근일 교수 (용 인 대)
- 차연수 교수 (전 북 대)
- 임기원 교수 (건 국 대)

강 순 아

경희대학교 동서의학대학원 임상영양학과

식생활의 서구화, 영양섭취의 과다, 정제된 곡류를 이용한 가공식품 이용, 육류 섭취량 증가에 의하여 식이섬유의 섭취량이 감소하여 우리가 한번에 섭취하는 곡류, 과일, 그리고 채소로부터 섭취하는 식이섬유의 함량은 1~3 g에 불과하다. 하루 식이섬유의 섭취량은 15~20 g/일 수준으로 1일 권장량인 20~30 g에 미치지 못하는 것으로 보고되고 있다. 두류나 고식이섬유 cereal 제품의 경우 더 많은 식이 섬유를 함유하고 있으나 섭취 빈도가 낮은 것이 문제이다. 이러한 식이의 변화는 과체중과 함께 각종 성인병의 원인이 되어 결과적으로는 국민건강 및 복지에 심각한 위협요인으로 작용하고 있다. 이러한 변화에 따라 최근에는 식이섬유의 기능성을 감안하여 식이섬유를 이용한 기능성식품, 식이섬유를 가공식품에 첨가한 보강식품 등의 개발이 증가하고 있다. 제품개발에 영양학적면이 고려되어 영양섭취의 균형을 이룰 수 있고 다른 영양소와의 대사 이상과 같은 불균형을 초래하지 않는 제품의 개발이 요구되고 있다.

식이섬유는 인체의 소화효소에 의하여 분해되지 않는 난분해성의 복합 다당류로 분변량을 증가시키고 통변을 원활하게 하며, 장내미생물의 활성화나 영양흡수도의 조절 등을 통하여 상피세포의 기능을 조절하는 등의 생리적 효과를 나타냄으로써 대장암 발현 위험을 감소시킬 수 있다고 알려져 있다. 또한 식이섬유의 섭취는 물이나 각종 이온의 흡수 및 대사, 담즙산염 대사, 지방대사, 암모니아의 흡수 등에도 영향을 줌으로써 최종적으로는 체중조절, 혈중 콜레스테롤 함량의 저하, 혈당 조절 등의 효과를 기대할 수 있으므로 기능성 식품소재로서 식이섬유 연구현황과 활용방안을 검토해보고자 한다.

식이섬유의 활용현황

기능성식품과 식이섬유 보강식품에 첨가되는 식이섬유는 대부분 곡류의 호분층, 구근작물 등의 식물성 원료와 해조류에서 추출, 정제되고 있다. 그러나 식물 원료로부터의 식이섬유 추출은 수득율이 낮고 공정비용이 많이 소요되는 단점이 있으며, 호분층 등을 첨가한 식이섬유 보강식품은 질감, 맛 등의 관능적 품질이 저하되는 단점이 있다(Yook 2000). 최근에는 수산폐기물로부터 섬유소를 분리 정제하고 이를 제빵 및 잼 제조에 이용하여 관능 및 물성이 우수한 식품을 제조하였다고 보고한 바 있다(Yook 2000, Byun 1999, 2000). 또한 미생물공정에 의하여 대량생산 가능한 폴리탄의 이용이 보고(Kang 2002, Jang 2002)되고 있다.

최근 식이 섬유소로 알려진 비소화성 다당류가 생리적 또는 영양적 측면에서 중요하게 인식되면서 체중감량에 많이 이용되고 있는데 식이섬유소는 팽창하는 성질로 인해 정장작용과 연동 운동을 촉진하여 변비나 대장암 등의 예방에 도움이 된다고 하며(Englyst & Cummings 1985, Schneeman 1987), cholesterol의 흡수를 저해시켜 비만, 고지혈증, 동맥경화 등을 예방할 수 있는 물질로 작용할 수 있다고 한다(Van 1978, Castelli1990).

Prune은 식이 섬유 함량이 100 g 당 6.1 g을 포함하고 있으며, 다량 함유된 sorbitol (14.7 g/100 g)로 인하여 천연 소재의 하제 효과가 있으며, phenol compounds (184 mg/100 g)의 함유로 인하여 당 흡수 지연 효과, LDL 산화 저해 효과, potassium (745 mg/100 g) 함유로 심혈관계 건강 유지 효과 및 boron 함유로 골다공증 예방 효과가 있다(Stacewicz 2001). 또한 prune 메탄을 추출물은 4-amino-4-carboxychroman-2-one, p-coumaric acid, vanillic acid beta-glucoside, protocatechuic acid, caffeic acid 등의 영향으로 인하여 강한 항산화력을 지닌다(Nakatani 2000, Kayano 2002)고 하였다.

Recommended fiber intakes

성인들의 식이섬유 권장량은 일반적으로 20~35 g/day 혹은 1,000 kcal 당 10~13 g으로 되어있다. 미국의

Nutrition Facts labels에 의하면 2,000 kcal 당 25 g 혹은 2,500 kcal 당 30 g/day을 권장하고 있다. 1998년도 국민영양조사의 식품섭취조사에서 조사된 전국규모의 자료를 중심으로 식이섬유소의 섭취량은 전국이 14.5 g, 대도시가 15.0 g, 중소도시가 14.3 g, 읍면이 13.9 g으로 나타났으며, 이중 95% 정도를 식물성 식품으로부터 섭취하고 있었다. 이러한 수치는 1989년 영양조사의 결과보다 적게 섭취하였다. 우리보다 야채류의 섭취가 많은 미국인의 경우 평균 하루 14~15 g의 식이섬유를 섭취하는 것으로 보고되고 있다. 우리나라도 식단이 서구화되고 fast food와 가공식품의 범람으로 식이섬유의 섭취량이 과거에 비해 더욱 낮아지고 있는 현실이다.

최근에는, 세계적으로 성장기 어린이와 사춘기 학생들의 식이섬유 권장량을 set-up하려는 노력이 선진국을 중심으로 시도되고 있다. 2살 이전의 영아에 대한 권장량은 보고된 바가 없으며 2살 이상의 어린이의 경우 나이에 5 g을 추가한 양보다 많은 양의 식이섬유를 권장하고 있으며 20세가 될 때까지 일일 약 25~35 g의 식이섬유섭취를 유도하고 있다. 노인들에 관한 권장량도 특별히 연구된 보고가 없지만 일반적으로 1,000 kcal 당 10~13 g의 식이섬유섭취가 권장된다. 이상의 모든 경우, 적절한 수분섭취가 병행되어야 하며 변비와 위장관 질환의 소견이 있는 경우 식이섬유 권장에 주의를 기울여야 한다.

Physiological function of dietary fiber and their health effects

Effect of food carbohydrates on cardiovascular risk factors

	Body fatness	Lipoproteins, triglycerides	Blood pressure	Glycemic status	Thrombosis	Antioxidant status	CV events
Cereal	?↓	→	?	↓	?	?	↓
fruits (not fruit juice)	?↓	→↑		↑→↓	?	↓	
Vegetable	↓	↓	↓	↑→↓		↓	↓
	?↓	↓		↓	?	?	↓
	→↑	↓	?		?	↓	↓
Combination	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

The combined effects of these foods is best judged by indices of total plant food intake or variety

Hypolipidemic effect of dietary fiber

비만치료와 식이섬유 섭취와의 상관관계에 대한 명백한 증거는 없지만 적절한 양의 식이섬유를 함유한 식품은 일반식이보다 에너지 밀도가 낮으며 포만감을 유발하는데 효과가 있으므로 간접적인 효과로 혈중 지질의 함량을 감소시키는 효과를 기대할 수 있다. 동물실험을 통하여 rice bran, oat bran (Einat 2002) hydroxypropyl methylcellulose (Thimothy 2003), prune (Edrilan 2000) 첨가한 식이에 의하여 혈중 콜레스테롤의 감소효과를 볼 수 있었고, 동맥 벽내의 지방 축적을 막을 수 있었다. 또한 인간실험을 통하여 oat 함유한 저칼로리식(Saltzman 2001), β-glucan과 psyllium(David 2000), oat 혹은 wheat cereal (Branda 2002), avocado pulp (Einat Naveh 2002) 공급시에 혈중 지질의 감소, 혈청 butyrate 함량 증가, systolic blood pressure 감소 등의 현상을 관찰할 수 있었다. .

국내 연구로는 식이섬유소원으로 pectin을 공급시 간 소포체막의 유동성을 증진시켰으며, 변으로 더 많은 neutral sterol을 배설시켰으며, 혈중 cholesterol을 더욱 효과적으로 낮추어 주는 효과가 있었다.

Gastrointestinal function

식이섬유의 인체 내 주작용은 주로 위장관(gastrointestinal tract)에서 일어난다. 식이섬유는 원료물질, 제조 및 추출방법, 분자량 등에 따라 종류가 다양하며 물리적 특성이나 생체 내에서의 생리적 효과, 산업적 이용도 다르다고 알려져 있다. 일반적으로 식이섬유는 수용성(soluble dietary fiber, SDF)과 불용성(insoluble dietary

fiber, IDF)으로 구분하는데 수용성 식이섬유는 위와 장의 통과시간을 지연시켜 장내에서의 영양소 흡수속도 조절과 지질대사에 관여하여 혈청 콜레스테롤의 조절 역할을 하며 불용성 식이섬유는 장관 박테리아에 의해 분해되지 않거나 비교적 천천히 분해되어 변통작용, 분변량의 증가, 분변의 장내통과시간 촉진, 대장암의 예방 등에 유용한 것으로 보고되고 있다.

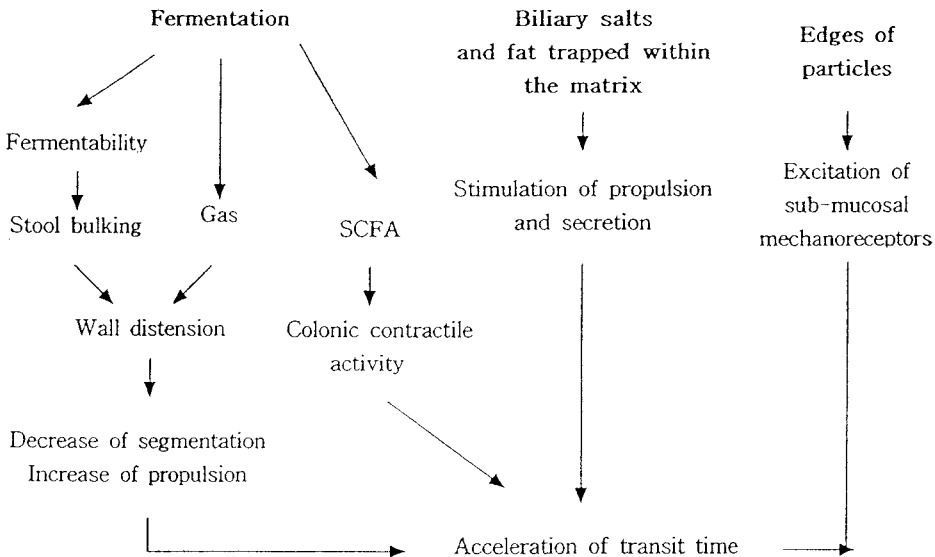
Colonic fermentability of dietary fibers in humans

Dietary fiber	Fermentability (%)
Cellulose	20-80
Hemicelluloses	60-90
Pectins	100
Guar gum	100
Ispaghula	55
Wheat bran	50
Resistant starch	100
Inulin, oligosaccharides	100 (if they are not in excess)

일상 식이로 섭취되는 식이섬유의 70~80% 이상은 대장에서 박테리아에 의해 분해되어 carbon dioxide, hydrogen, methane, short-chain fatty acids (SCFA: butyrate, propionate, acetate)를 생성하며, SCFA의 대부분인 60~65%가 acetate이며 10~20%는 butyrate이다. SCFA는 점막의 형성과 치유에 효능을 보이며, isolated human colonocytes를 이용한 연구 결과에 의하면 butyrate는 대장 점막의 중요한 에너지원으로 역할을 하며, acetate와 propionate는 portal circulation으로 유입된다고 주장하였다.

Mechanisms of action of dietary fiber on colonic transit time

위장관은 식이섬유에 매우 민감한 반응을 보이는 기관으로 변비치료, 통변에 관한 효과는 잘 알려져 있으나 특히 불용성 식이섬유의通便효과가 우수한 것으로 알려져 있다. 특히 밀과 귀리의 겨에 함유되어 있는 식이



섬유는 변의 무게에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이 두식이섬유원은 채소, 과일, 혹은 정제된 cellulose로부터의 동일량의 섬유질보다 변 무게 증가에 효과가 탁월한 것으로 알려져 있다. Long-term animal feeding study에 의하면, 저식이섬유 섭취는 결장의 게실(diverticular disease)을 유발한다고 보고하였다. 게실 환자에 있어서 고식이섬유를 섭취할 경우 해부학적으로 게실은 존재하더라도 게실의 악화는 막아주는 것으로 알려져 있다.

Cancer

식이섬유의 섭취와 직장/결장암 유발 및 사망률을 조사한 Correlation study에 의하면 식이섬유 섭취가 직장암에 protective한 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 또한 식이패턴과 직장/결장암과의 상관관계를 연구한 case-control study 결과에 의하면 fiber-rich food 섭취와 직장/결장암 유발 비율이 반비례한다고 보고하였다. 미국의 한 보고에 의하면, 식이 중의 식이섬유 함량을 하루 약 13g 정도로 증가시키면 직장/결장암의 위험을 약 31%정도 경감시킬 수 있다고 주장하였다.

Review of 52 studies of diet and colorectal cancer risk

	Number of papers	Effect on colorectal cancer risk		
		Protection	No effect	Promotion
Cereal intake	36	23	9	4
Cereal fiber	16	13	3	0

대장 박테리아에 의하여 분해되어 생성되는 SCFA는 대장암세포에서 apoptosis를 유도하는 cell cycle-regulating protein 발현을 조절함으로써 항암효과를 보인다고 하였다(Kei 2003). 또한 colonocyte의 substrate가 되어 손상된 대장점막세포의 회복에 관여를 한다. 이는 TNF α 나 NO와 같은 proinflammatory mediator의 형성을 억제한다고 하였다. 섬유소 강화식에 의하여 점막세포의 견고성을 증진시킴으로서 자외선 조사에 의한 피부손상으로부터 장점막을 보호하는 보고가 있었다(Murat 2003).

인체에 있어 유방암과 식이섬유 섭취에 관한 병리역학적 근거는 미약하지만 국가별 비교 데이터에 의하면 고식이섬유 섭취와 유방암 사망률과 상관 관계가 있는 것으로 밝혀진 바 있다. 식이요소와 유방암 위험도를 조사한 case-control study에 의하면 고식이섬유의 섭취가 유방암의 발생 위험도를 낮춰 주는 것으로 보고하였다. 물론 진행된 모든 '식이섬유 섭취와 유방암과의 상관관계' 연구가 positive한 결과를 보여준 것은 아니지만 식이 섬유 함유 식품 즉 채소, 과일, 그리고 전곡류의 섭취는 유방암 뿐 아니라 다른 종류의 암에도 효능이 있다는 연구결과 보고는 상당수 발표된 바 있다.

Diabetes

수용성 식이섬유는 점성(viscosity)을 가지고 있으므로 혈당강하 효능을 나타낸다. Viscosity가 upper gastrointestinal tract에서 음식의 통과시간을 지연시킴으로 인해 단위 시간내 당의 흡수율을 떨어뜨려 혈당이 낮아지면서 인슐린의 반응을 지연시키는 효과를 보이게 된다. 이러한 수용성 식이섬유의 점성은 혈중 콜레스테롤 강하에도 영향을 미친다. 그러나 대부분의 이러한 임상결과는 fiber concentrates를 이용한 실험 결과이다. 일반식에 함유된 수용성 식이섬유가 upper gastrointestinal tract에서 식이섬유 농축물과 동일한 physiological effect를 가지는지는 아직 확실하지 않다.

저식이섬유와 당뇨병발과의 상관관계도 보고된 바 있다. 저식이섬유 식사패턴은 에너지 밀도가 높아 당뇨병발의 위험도가 증가하며 비만의 위험도도 증가된다. 식이섬유의 당뇨에 대한 효능은 장에서의 당 흡수 지연으로 설명될 수 있다. 식후혈당의 급속한 상승은 수용성 식이섬유 섭취로 비정상적인 glucose spike를 최소화할 수 있다.

전곡과 곡류 섬유소의 섭취, rice bran 섭취는 제 2형 당뇨병의 위험율을 낮추는 효과를 보였다.

Atherosclerosis

식이섬유와 관상동맥 질환의 예방과 치유는 식이섬유의 혈중 콜레스테롤 강하작용과 연계성을 가진다. 수용성 식이섬유의 섭취는 혈중 콜레스테롤을 약 5% 이상 강하시키는 효과가 있는 것으로 보고된 바, 초기 혈중 콜레스테롤이 높을 경우에는 이보다 더 큰 감소를 기대할 수 있다. 여러 연구를 종합해보면, 수용성 식이섬유의 체내 콜레스테롤 감소효과는 식이중의 콜레스테롤의 흡수저해에 의한 효과보다는 담즙산의 재흡수 방지 효과에 기전이 있는 것으로 알려져 있다. 식이섬유를 함유한 식품에 존재하는 다른 물질들 즉 phytochemical 에 의한 간접 효과도 있는 것으로 보고되었는데, 예를 들어 귀리, 보리 그리고 쌀겨에 함유되어 있는 tocotrienol의 gamma 이성체의 일부들이 가지고 있는 endogenous cholesterol biosynthesis의 저해효과에 의해 혈중 콜레스테롤이 저하된다는 보고도 있다. 또한 식이섬유의 총 섭취량과 myocardial infarction과의 역의 관계에 대한 연구결과도 다수 존재한다.

Mineral absorption

phytate 같은 식이섬유소는 칼슘, 철분, 아연 같은 무기질 흡수를 방해하지만 이눌린, 레반 등은 2가 금속이온(철, 칼슘, 아연 등)의 체내흡수를 촉진하는 기능을 가지고 있다. 이들 미네랄들은 부족시에 빈혈, 골다공증 등의 질환에 관련이 있다. 한국인 영양권장량(제 7차 2000년도)에서는 한국인의 철분과 칼슘섭취량에 대하여 성인기준으로 각각 12~16 mg/day와 700~800 mg/day를 권장하고 있는데 반하여, 실제 섭취량은 권장량의 50~65%으로 매우 낮게 나타난다. 노년층에서는 이들 미네랄에 대한 흡수율 능력의 감소로 실제 이용률은 더욱 낮아지게 된다. 이들 미네랄들은 섭취시에 소장에서 대부분 흡수되나, 흡수되지 않은 미네랄은 대장에서 다시 흡수된다. 소장과 달리 대장에서의 미네랄 흡수 촉진인자에는 장내 환경이 중요하며, 산성인 조건에서 미네랄의 흡수가 촉진된다. 일반적으로 대장의 pH는 7임에 반하여, 레반의 섭취에 따른 대장내 산성도는 5~5.5로 감소하여, 대장에서의 미네랄 흡수를 도와주는 환경을 제공한다(Jang 2003).

플락탄의 현황 및 일반적 기능

플락탄류(이눌린(inulin), 레반(levan), phlein, 이눌린올리고당, 레반올리고당, di-D-fructofuranose dianhydrides (DFAs))는 섭취시에 소장에서 흡수되지 않고, 대장에서 발효되는 발효성 당으로 인체에 완전하게 흡수되지 않으며 흡수되지 않은 부분은 장내세균총에 의해 발효되어 이때 생산된 단쇄지방산은(acetate, butyrate, propionate, lactate) 체내로 흡수되거나 배설되는 것으로 알려졌다. 이눌린은 혈중 중성지방을 감소시키고, HDL 콜레스테롤 수준을 증가시켜 지질 대사를 개선시키는 효과가 있다(Brighenti 1999). 이눌린 타입의 플락탄은 대표적인 prebiotics의 하나로, 체내로 흡수시에 대장에서 유산균을 포함한 제한된 종류의 미생물에서 발효되어, 유해한 미생물이 생존하기 어려운 환경을 제공하여 장내환경을 개선하는 효능이 있다(Ohta 1998, Campbell 1997). 최근에는 레반 타입의 플락탄에서도 유사한 효능이 동물실험으로 확인되었다(Jang 2003). 이외에도, 이눌린은 구강에서 충만감을 부여하고, 타액에서 효소적 발효가 되지않아, 구강내의 미생물에 의한 발효가 일어나지 않는다. 또한, 저분자인 이눌린 올리고당은 어느점을 낮추는 효과가 있으므로, 일본에서는 이를 이용한 수산물 유통에 응용된다(Yamamoto 1999).

레반의 기능 및 연구동향

1990년대에 접어들어 미생물(*Z. mobilis* 등)을 이용한 발효법에 의한 레반의 대량생산이 개발되었다(13). 일본에서는 1990년대 중반부터 레반의 실험적 연구가 수행되었고, 레반을 이용한 기능성식품 식품을 생산하고 있다. 국내에서는 2002년도에 ㈜리얼바이오텍에서 본격적으로 생산을 시작하였다. 특히 ㈜리얼바이오텍의 경우 한국생명공학연구원에서 개발된 기술을 적용함으로써 성과있는 산·연협동의 결과물로 평가된다.

레반은 일본과 한국에서 허가된 식품첨가물로 제과, 식품, 수산물, 화장품 공업에서 광범위하게 효능을 나타낸다. 제과나 식품등에 적용할 경우, 열 안정성이 뛰어나며, 광택이 나게 하는 등의 잇점을 보유하고 있다. 최근에는 정상효능, 혈중지질개선, 체지방 감소효능 등 인체에 대한 영향에 대한 연구가 진행되고 있다. 동물실험과 임상실험을 통하여 확인된 레반의 효능은 프리바이오틱효과, 비만 예방, 금속이온 흡수 촉진 작용, 보습 작용, 항암 및 면역 증진 효과 등(Kang 2002, Jang 2002, Kang 2003)이 있다.

상업용 경구용 식이섬유

상업화되고 있는 경구용 식이섬유 제품은 크게 두 가지 타입으로 나눌 수 있으며 고식이섬유를 함유한 식물성 원료를 파우더화 한 제품과 정제된 고농도 식이섬유를 첨가한 제품이 있다. 정제 식이섬유원은 주로 콩귀리, 완두콩, 사탕수수, 차전자 피 등이며 guar gum 그리고 감자전분 등을 효소처리하여 난소화성 전분으로 만들어 사용하기도 한다. 건강한 사람의 경우에도 식이섬유 섭취는 장 운동을 정상화하며 설사와 변비 환자의 경우에도 식이섬유 함유 드링크만으로도 가시적인 생리학적 효능이 나타나는 경우도 많다. Tube-feeding 환자에게 흔히 나타나는 설사의 경우 실험의 제약적인 요소 때문에 만족할 만한 결과를 얻은 연구보고는 없다. 장관 장애에 의하여 enteral feeding을 하는 환자의 경우 constipation, diarrhea 그리고 diverticular disease의 예방과 치료를 위하여 식이섬유의 식이처방을 권장하고 있다.

향후동향 및 방안

현재 플락탄의 국내시장 현황은 시장규모가 미미하지만 최근 다양한 효능의 개발에 따른 빠른 성장이 예상된다. 일본과 유럽에서는 발효식품 등에서 발견되는 레반을 현재에 이르러 자연계 분포, 생리적 기능에 대한 연구를 활발하게 진행시키고 있음을 주목해야한다. 따라서, 레반에 대한 연구가 진행될수록 식품산업, 화장품 공업 및 제약산업으로의 범위는 더욱 더 확장할 것으로 기대된다. 일본에서는 레반을 프리바이오틱 식품소재로 이용하여 유산균과 함께 혼합한 형태로 사용되고 있다. 따라서, 관련 업체들에서는 새로운 용도의 개발에 지대한 노력과 연구 투자를 다하고 있는 것으로 보인다. 국내에서도 최근 (주)리얼바이오텍이 레반의 생산에 참가하여 일본 및 관련업체들 간의 레반 제품의 질과 용도 개발에 대한 선의의 경쟁이 시작될 것으로 보인다.

향후의 레반 시장은 국내 다이어트관련 시장이 호황국면으로 진입하고 있는 상황으로 볼 때 큰 폭으로 신장이 예상되며 다른 기능성소재(xylitol, 갈슘, 철분, 유산균)와의 혼합 이용도 크게 늘어날 것으로 전망된다. 또한, 환원기를 갖고 있지 않기 때문에 제품의 사용중에 갈변화 현상이 나타나지 않아, 환원당 대체효과가 기대된다. 이눌린이 경장영양식에 이용되고 있는 점을 볼 때 레반도 병원에서 환자식으로 적용가능성이 높은 것으로 사료된다. 레반의 섭취시에 나타나는 특성중 대장암 관련 장내 유해효소활성을 억제하는 효능이 뛰어나므로, 이를 이용한 대장암 억제 등의 특수용도 식품에 적용가능성이 높은 것으로 사료된다.

최근에는 식이섬유의 기능성(체중조절, 혈중 콜레스테롤 함량의 저하, 혈당 조절, 변비 완화, 장내미생물도 활성화나 영양흡수도 조절)을 감안하여 식이섬유를 이용한 기능성식품, 식이섬유를 가공식품에 첨가한 보강식품 등의 개발이 증가하고 있다. 제품개발에 영양학적 면이 고려되어 영양섭취의 균형을 이룰 수 있고 다른 영양소와의 대사 이상과 같은 불균형을 초래하지 않는 제품의 개발이 요구되고 있다.

감사의 글

본 연구의 일부는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 이루어졌으며 그 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 대한민국특허출원. 출원번호. 2002-49818.
Brenda M Davy, et al. 2002. AJCN 76(2): 351-358.

- Brighenti F, et al. 1999. Eur J Clin Res 53: 726-733.
- Byun MW, et al. 1999. Patent pending 99-0043469.
- Byun MW, et al. 2000. J Korean Soc Food Sci Nutr 29: 64-67.
- Campbell JM, et al. 1997. J Nutr 127: 130-136.
- David JA Jenkins, et al. 2001. AJCN 75(5): 834-839.
- Edralin A Lucas, et al. 2002. J Nutr Biochem 11(5): 255-259.
- Einat Naveh, et al. 2002. Nutr Res 22: 1319-1332.
- Einat Naveh, et al. 2002. J Nutr 132: 2015-2018.
- Jang KH, Kang SA, et al. 2003. J Microbiol Biotechnol 13(3): In press.
- Jang KH, et al. 2003. J Agric Food Chem 51: 2632-2636.
- Jang KH, et al. 2002. Korean J of Nutr 35: 912-918.
- Kang SA, et al. 2002. Korean J of Nutr 35: 903-917.
- Kang SA, et al. 2002. J Korean Soc Food Sci Nutr 31: 788-795.
- Ohta A, et al. 1998. Nutr Res 18: 109-120.
- Saltzman E et al. 2001. J Nutr 131: 1465-1470.
- Song KB, et al. 1996. Ann NY Acad Sci 799: 601-607.
- Thomas MS et al. 2003. Nutr Res 23: 15-26.
- Thomas MS Wolever, et al. 2002. AJCN 75(6): 1023-1030.
- Timothy P. Carr, et al. 2003. Nutr Res 23: 91-102.
- Yamamoto Y, et al. 1999. J Nutr Biochem 10: 13-18.
- Yook HS, et al. 2000. Korean J Food Sci Technol 32: 387-395.

■ 영양소대사/생리 분야

- P1-01 Anti-obesity Effects of Oriental Herbal Medicine, *Ephedra sinica* : *in vitro* & *in vivo* Analyses Won Kyung Choe
- P1-02 Astaxanthin 투여에 따른 산란계 난황 중 Carotenoids 조성과 축적 김홍출, 최진상, 남상해, 박찬훈, 주옥수, 심기환 하 영래
- P1-03 난각분 강화라면의 칼슘 생체이용성에 관한 연구 장순옥
- P1-04 A Study on the Role of Campus Activities to Reduce College Students' Body Fat Young Hwan Seo, Seung Doo Wee, Oh Nam Yoon and Hye Yun Jung
- P1-05 당뇨유발 흰쥐의 항산화효소계에 미치는 느릅 열수추출물의 영향 신경희, 조수열, 김명주
- P1-06 오가피추출물이 당뇨유발 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향 신경희, 조수열, 김명주, 박은미, 이미경, 장주연, 박지은
- P1-07 식이지방산 P/S비와 항산화영양소의 보충이 연령이 다른 흰쥐의 혈청지질대사 및 간조직에 미치는 영향 강민정, 이은경, 이상선
- P1-08 고이소플라본 콩나물이 알코올 투여 흰쥐의 혈중지질과 간손상에 미치는 효과 김광욱, 이혜성
- P1-09 Gene Expression in Liver of Mouse by High-fat Diet Kyung-Seon Kim, Min-Ho Cha, Soo-Won Lee and Yoo-Sik Yoon
- P1-10 Gene Expression in Hypothalamus of Mouse by High-fat Diet Kyung-Seon Kim, Min-Ho Cha, Soo-Won Lee and Yoo-Sik Yoon
- P1-11 Measuring *in vivo* Rate of Bone Collagen Synthesis in Growing Rats Yoo Kyeong Kim
- P1-12 Measurement of Age-related Changes in Bone Collagen Synthesis Rate in Mice Using Stable Isotope-mass Spectrometric Technique Jeong-ae Lee, Won-il Jeong, Dong-Hyung Noh, Kyu-Shik Jeong and Yoo Kyeong Kim
- P1-13 Protective Effect of Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) on Hepatotoxicity Rats Induced by Carbon Tetrachloride Young-Ja Cho, Hyeon-A Kim, Mi-Ae Bang, Yong-Bee Oh, Byeong-Choon Jeong, Youn-Ho Moon and Woo-Jin Jeong
- P1-14 Effect of Dietary Mushroom and Onion on Blood Glucose, Lipid Concentrations and Creatine in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Young-Ja Cho, Hyeon-A Kim and Mi-Ae Bang
- P1-15 Hypoglycemic and Antioxidant Effect of Dietary Extracted from Sea-Tangle on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Young-Ja Cho and Mi-Ae Bang
- P1-16 Oral Supplementation of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Water Extract and Splenocyte Proliferation in Mice Hea-sook Ryu and Hyun-sook Kim
- P1-17 번데기동충하초 열수추출물의 투여가 마우스의 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향 이해미, 박태선
- P1-18 정신지체아와 정상아의 혈장 유리아미노산 농도 및 소변내 배설량에 관한 비교 연구 김수연, 박태선, 김은경
- P1-19 생식침가식이 영양불균형이 유도된 흰쥐의 체내 지질농도 및 항산화능에 미치는 영향 이여진, 이해미, 박태선
- P1-20 흰쥐식이내 첨가지방 및 지방산의 이용을 이은석, 강환구, 박태준, 박병성
- P1-21 위암환자 점막조직의 인지질 종류에 따른 지방산 조성에 관한 연구 김정희, 심유진, 이병무, 이양자
- P1-22 Vitamin C의 대장암 세포의 Proliferation 및 Apoptosis에 미치는 영향 이진민, 홍태경, 이양자
- P1-23 고호모시스테인혈증에 대한 엽산 보충 효과 김지명, 장남수
- ✓ P1-24 Dietary Levan Reduce Serum Lipids Level Accompanying the Inhibition of Lipogenic Enzyme Gene Expression in Liver Kyunghee Hong, Soon Ah Kang, Sohye Kim, Ki-Hyo Jang, Eun-Kyung Jang and Ryo-Won Choue
- P1-25 Modulatory Effects of Conjugated Linoleic Acid on Expressions of Lipid Metabolic Genes during Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Cells So Young Kwon and Keum Jee Kang
- P1-26 농촌지역 중·노년기 여성의 식습관 및 영양섭취량 비교 연구 왕수경, 이나영
- P1-27 Gene Expression by Zinc Deficiency under Homocysteine Level in EA.hy926 Cell Using cDNA Microarrays John H. Beattie and In-Sook Kwun

P1-23

고호모시스테인혈증에 대한 엽산 보충 효과

김지명¹, 장남수. 이화여자대학교 생활환경대학 식품영양학과

본 연구는 호모시스틴 식이로 유발한 고호모시스테인혈증 동물모델에서 호모시스틴을 식이로 공급하였을 때 나타나는 영양상태와 혈중 호모시스테인 수준의 변화 및 엽산 보충이 체내 엽산 대사에 미치는 영향을 조사하였다. 8주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 5군으로 나누어 10주간 실험식이를 공급하였다. 실험 식이는 AIN-93 diet의 영양가를 기준으로 엽산함량을 실험설계에 따라 조절하였으며, 0.3% 호모시스틴을 추가로 첨가하였다. 실험식이군에게 호모시스틴 함유 식이를 2주간 먹인 후, 호모시스틴 함유식이 유무(0g and 3g/kg diet), 엽산 보충 유무(0mg and 8mg/kg diet)에 따른 식이로 바꾸어 각각 공급하였다. 실험동물은 0, 2, 4, 10주에 각각 6마리씩 희생하여 실험에 필요한 혈장과 조직을 얻었다. 혈중 엽산, 비타민 B-12 수준은 radioimmunoassay 방법으로 분석하였다. 혈중 호모시스테인 수준은 HPLC-fluorescence detection 방법을 이용하였으며, 간의 SAM, SAH, SAH 수준은 HPLC-UV detection 방법으로 분석하였다. 호모시스틴 식이를 2주간 섭취한 경우 혈중 호모시스테인 수준은 대조군보다 2.6배 증가하였으며($18.7 \pm 2.4 \mu\text{mol/L}$ vs. $7.1 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$), 호모시스틴 식이를 10주까지 지속적으로 섭취시켰을 때 $28.0 \pm 4.8 \mu\text{mol/L}$ 까지 증가하였다(3.5배). 엽산결핍식이에서 호모시스틴을 제거하였을 경우 2주에 비해 4주에는 혈중 호모시스테인 수준이 약간 감소 경향을 보이다가, 10주에는 다시 유의적으로 증가하였다(각각, 18.7 ± 2.4^b , 14.7 ± 0.7^b , $25.7 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}^a$). 호모시스틴 식이에 의해 증가되었던 혈중 호모시스테인 농도가 8주간 엽산보충시 호모시스틴군($10.0 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$), 호모시스틴 제거군($8.1 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$) 모두에서 감소하여 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 혈장 엽산 수준은 호모시스틴 식이를 섭취하더라도 엽산을 보충할 경우 대조군과 차이를 보이지 않았다. 혈중 비타민 B-12 수준은 군간에 차이를 보이지 않았다. 간의 SAM, SAH, SAM/SAH ratio는 2, 4주에는 군간에 차이를 보이지 않았으나, 10주에는 SAM 수준이 엽산을 보충할 경우 호모시스틴 식이군보다 호모시스틴을 제거한 군에서 유의적으로 낮게 나타났고($p < 0.05$), SAM/SAH ratio에서는 호모시스틴 식이군에서 엽산을 보충한 군이 엽산이 결핍된 군보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 본 실험 결과 동맥경화증, 허혈성 심장질환, 순환계질환 등의 혈관성 질환의 위험인자인 고호모시스테인혈증의 예방 및 치료에 있어서 엽산을 장기간 보충함으로써 이러한 위험요인을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구는 보건복지부 2002년도 보건과학기술연구개발사업연구비(02-PJ1-PG10-22003-0002)에 의해 일부 진행되었음.

P1-24

Dietary Levan Reduce Serum Lipids Level Accompanying the Inhibition of Lipogenic Enzyme Gene Expression in Liver

Kyunghee Hong¹, Soon Ah Kang¹, Sohye Kim¹, Ki-Hyo Jang¹, Eun-Kyung Jang² and Ryo-Won Choue¹.

¹Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University,

²Real Bio Tech Co. Ltd.

We studied the effect of dietary levan on serum lipid metabolism. Levan, or high molecular-mass β -2,6-linked fructose polymer is produced extracellularly from sucrose-based substrates by bacterial levansucrase. The peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) are a transcriptional factor that participate in aspects of lipid catabolism such as fatty acid uptake through membranes, fatty acid binding in cells, fatty acid oxidation and lipoprotein assembly and transport. 4 wk Sprague Dawley male rats were fed high fat diet (beef tallow, 40% of calories as fat) and 6 wk later, rats were fed 0%, 1%, 5% or 10% levan supplemented diets for 4 wk. Normal control group were fed AIN 76A diet during experiment. Body weight gain and food efficiency ratio was lower in levan supplemented diet fed rats compared to high fat diet fed rats. Serum triglyceride and total cholesterol level was dose dependently reduced in levan supplemented diet fed rats, while the HDL cholesterol level was increased by levan supplemented diet. The mRNA expression of hepatic fatty acid synthase and acetyl CoA carboxylase, which are the key enzymes in fatty acid synthesis, was down-regulated by dietary levan. However, dietary levan not affected the malic enzyme, phosphatidate phosphohydrolase, HMG CoA reductase gene expression in liver. In addition, hepatic PPAR α mRNA expression was up-regulated by dietary levan, dose dependently. This suggests that, *in vivo*, the hypolipidemic effect of dietary levan may result from the inhibition of lipogenesis and stimulation of lipolysis accompanied with gene expression regulation of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α .

9th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms

Abstract Book

July 1 - 5, 2002
Gyeongju, Korea

Organized by

Organizing Committee for GIM-2002

Under the auspices of

International Commission for the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM-IC)

The Korean Society for Microbiology and Biotechnology (KMB)

The Microbiological Society of Korea (MSK)



P24-07

DETERMINATION OF BIOCHEMICAL POTENTIALS OF LIPASES FROM G⁺VE BACTERIA BACILLUS AND STAPH.

N. Jamil¹, F. Aziz
University of Karachi

Out of 124 different G⁺ve isolate including Bacilli and Staph, 30 strong lipases were categorized into 7 groups based on nutritional requirements by the help of dendrogram derived from hierarchical agglomerative clustering. Initially different edible oils were used as substrate for plate assay, TLC and GC/MS analysis of lipase activity. On the basis of the results of TLC of reaction mixtures, 18 isolates (from 7 nutritional groups) were classified into four subgroups depending upon biochemical potentials including enzyme activity & substrate specificity. Variety of catalytic activities were i.e. hydrolysis, esterification, substrate specificity (including type of fatty acids, glyceride Sn specificity) and biotransforming abilities of lipase were examined successfully by using standard substrates. Highly versatile lipases have been ransacked from spore forming Bacilli (Sva), clinical isolates (C1.6 & C.1.16) and environmental isolates (Rc.9) of Staphs. Sva lipase is active at 41°C and can tolerate alkaline pH 9. It can transform different substrates into products like alcohol e.g. Cyclohexanol and dicarboxylic acid e.g. adipic acid. Cyclization and lactonization were also found to be the characteristic features for organic synthesis of cyclopropane ring containing compounds and oxiranes. Furthermore phospholipids were also hydrolyzed. Lipases from Staph seem to have the potential for the synthesis of arachidic acids and cyclopentyle ring containing compounds. These lipases have shown broad substrate specificity. Our studies have indicated that such lipases can be used as valuable tool for drug designing and in oleochemical industry.

P24-08

PREBIOTIC PROPERTIES OF LEVAN FROM ZYMOMONAS MOBILIS

Ki-Hyo Jang¹, Soon Ah Kang¹, Yunhi Cho¹, Yun-Young Kim¹, Kyung-Hwa Seong¹, Sang-Ki Rhee², Chul Ho Kim³, Eun-Kyung Jang³, Sang-Doo Ha⁴, Ryowon Choue¹

¹Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-333, Korea

³RealBioTech Co. Ltd., KRIBB, Taejeon 305-333, Korea

⁴Korea Health Industry Development Institute, Seoul 156-800, Korea

Effects of high-molecular-mass β-(2,6)-linked fructose-polymer (levan) on cecal bowel mass, cecal and colon short-chain fatty acids, pH, and microflora in rats were investigated. To determine whether the levan in diet may be used as the prebiotics, male Sprague-Dawley rats were fed with one of two treatments for 3 wks: 1) basal diet plus sucrose; 2) basal diet plus 10% (wt/wt) levan. The cecal wall weight and the weight of the cecal contents of the rats fed on the levan-containing diet were significantly higher ($P < 0.0001$) than those of the rats fed on the control diet. The results of analyses of short-chain fatty acids and organic acids in the cecal and colonic contents showed that levan ($P < 0.05$) was converted to acetate, butyrate and lactate, which resulted in the acidic conditions ($P < 0.001$). Levan diet significantly increased the number of total microorganism by 5-fold and lactic acid-producing bacteria (LAB) by 30-fold, when compared to those of control diet. Thus, the present work shows that levan can be used as the growth stimulator for LAB in animal model. (This work was supported by the Brain Korea 21 Project in 2001)

P24-09

PROBING THE PATHOGENIC ROLE OF THE EXTRACELLULAR ENZYMES SECRETED FROM VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

In Jun Jeon¹, Yun Hee Kim¹, Min Jeong Kim¹, Jae Ho C
Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

The extracellular enzymes along with hemolysin are supposed to be the critical virulence factor for *Vibrio parahaemolyticus* infection. Two extracellular enzymes, collagenase and mucinase, were isolated and purified from *Vibrio parahaemolyticus*. The purity and the activity of the enzymes were examined and detected by SDS-PAGE and zymography, respectively. In vitro MTT assay and mouse infection experiment were conducted to examine the toxicity of the extracellular enzymes against the host. Mice were infected by injecting the purified enzyme into the mouse abdominal cavity. A jejunum, ileum and large intestine of the enzyme-treated mice were isolated and examined to observe any changes in the number and the size of the goblet cells in each intestinal tissue. The remarkable decrease of goblet cells was apparent in the large intestinal tissue. The shrinkage of the goblet cells were also observed. This phenomenon can be explained as the apoptotic cell death of the enzyme-treated mice. Therefore, the extracellular enzymes may play critical roles in the adhesion and the invasion of *Vibrio parahaemolyticus* into the host intestinal tract.

P24-10

CHANGES IN DRUG RESISTANCE OF BACTERIA IN MOLDAVIA COUNTY, ROMANIA

Maria Juverdeanu Vrinceanu¹, Gabriel Costachescu², Octavita Ailiesei¹, Gina Vrinceanu³

¹Al. I. Cuza University of Iassy, 6600, Romania

²Cuza Voda Hospital of Iassy, 6600, Romania

³Sf Spiridon Hospital of Iassy, 6600, Romania

Our research study is focused on the changes in drug resistance of bacteria in Moldavia County, Romania. In 3 years of the project drug activity against 1822 strains of 12 species of bacteria was tested and the resistant, intermediate and susceptible rates of each species to antimicrobial agents were ascertained. For *Streptococcus pneumoniae* the resistance rate to penicillin and oxacillin has increased from 6.8% to 28.7% and from 21.3% to 54.1% respectively. The penicillin resistance rate of *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* were 76.4% and 58.3% respectively. Methicillin resistant *S. aureus* and *S. epidermidis* were 28.3% and 12.1% respectively. No resistance was observed to vancomycin. For *E. coli* the resistance rate to ofloxacin has increased from 6.3% to 15.6% and to pefloxacin from 4.8% to 12.1%. The resistance rate to quinolones is much higher than in other countries. *Pseudomonas aeruginosa* had a resistance rate to ciprofloxacin and norfloxacin of about 13%. Susceptibility rate to ceftazidime, ceftinaxone, ceftazepalone it is 82%. *Enterobacter aerogenes* has a resistance rate of 85.6% to ampicillin. Susceptibility rate of about 70-80% for the third generation cephalosporins and 75% for quinolones has been maintained within 3 years. The results from 3 years of our study have examined resistance rates from 12 organisms. The results showed that the multidrug resistance problem in Moldavia is serious, particularly with respect to the resistance rates of commonly used antimicrobial drugs

P21-12

PRODUCTION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF LOW-BRANCHED LEVAN PRODUCED FROM *PSEUDOMONAS AURANTIACA* S-4380

Ki-Hyo Jang¹, Eun-Kyung Jang², Issac Koh³, Soon Ah Kang¹, In-Hwan Kim², Seung-Hwan Kim², Sang-Do Ha⁴, Chul Ho Kim²

¹Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²RealBioTech Co. Ltd., KRIBB, Taejon 305-333, Korea

³Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333, Korea

⁴Korea Health Industry Development Institute, Seoul 156-800, Korea

A low degree of branching levan-forming enzyme, levansucrase (E.C. 2.4.1.10), was isolated from a *Pseudomonas aurantiaca* S-4380, which was screened in Korean soil. The polymer produced from this strain characterized by 16S rRNA sequence analysis and confirmed as a levan-type fructan. Methylation studies showed that the presence of 3,4-di-O-methyl-D-fructose, 1,3,4-tri-O-methyl-D-fructose, 1,3,4,6-tetra-O-methyl-D-fructose in the molar ratio 4.8:89.3:5.9, respectively. These results indicate that the fructan polymer is branched: main linkage C-2,6; branched linkage C-2,1; degree of polymerization 6%. The fructan was produced in mass quantity using the recombinant *Escherichia coli*. Three bacterial levans were incubated with a levan fructotransferase which produced di-β-D-fructofuranose dianhydride IV (DFA IV). Final conversion yields from levan to DFA IV were 39% *Zymomonas mobilis*, 53% in *Serratia levanicum*, and 59% in *P. aurantiaca* S-4380, implying that the latter strain produces a low degree of branch levan.

P21-13

CONVERSION OF XYLOSE TO XYLITOL BY A COUPLING REACTION USING FORMATE DEHYDROGENASE AND XYLOSE REDUCTASE

SUNG HWAN JANG¹, Jin-Ho Seo², Yeon-Woo Ryu¹

¹Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

²Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Xylitol, a five-carbon sugar alcohol, occurs widely in nature as ingredients of fruits, vegetables, mushrooms and microorganisms. It is also a normal intermediate in human carbohydrate metabolism. Xylitol is used as an alternative sweetener in food industry because of sweetening power as high as sucrose. It is also recommended for diabetics and preventing dental caries. In yeast cell, xylose metabolism is composed of a successive step that mediated the converting D-xylose to D-xylulose. First, D-xylose is reduced to xylitol by NAD(P)H-dependent xylose reductase (XR, E.C. 1.1.1.21). Next, xylitol is oxidized to D-xylulose by NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase (XDH, E.C. 1.1.1.9) that mainly uses NAD⁺ as a cofactor. D-Xylulose is further converted to xylulose-5-phosphate by xylulokinase (E.C. 2.7.1.17) and then transports to pentose phosphate pathway. In this context, there is an important factor for xylitol production in which the high catalytic activity and cofactor regeneration, considering a cofactor specificity, of XR to overcome the limited yield. In a previous study, we developed xylitol dehydrogenase(XDH) defective mutant of *Pichia stipitis*, resulting a theoretical yield (100%) of xylitol conversion. The productivity, however, was severely affected by lowering the regeneration of cofactor by employing a formate dehydrogenase (FDH, E.C. 1.2.1.2) from *Candida boidinii*. The FDH in this yeast oxidized formate into carbon dioxide, also concomitantly reducing NAD⁺ into NADH. We, thus, anticipated that the problem in the cofactor regeneration would be solved by combining the activity of XR with that of FDH. We described here the coupling reaction between two enzyme, in terms of optimum conditions, such as activity ratio and cofactor concentration. Further study was focused on the reusability and maintenance of activity by enzyme immobilization.

P21-14

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM *STREPTOMYCES* SP. AD001

Jeong Ho Jeon¹, Yun Jon Han, Tae Gu Kang, Byeong-Chul Jeong
¹Myoungji University Biological Science, Korea

An extracellular peroxidase (EC 1.11.1.7) was purified 46-fold from the culture broth of *Streptomyces* sp. AD001 by using a combination of ammonium sulfate fractionation, Q-sepharose, Concanavalin A. Bio-gel HTP column chromatography. The purified enzyme has an estimated molecular mass of 49 kDa and the highest level of enzyme activity was observed at pH 6.5, and 40 °C. The purified peroxidase catalyzed oxidation of 2,4-dichlorophenol (DCP) was examined to understand its kinetic behavior. Initial rate data of the oxidation of DCP were obtained by a spectrophotometric peroxidase assay, and the kinetics were best modeled with a random-binding bireactant system. The N-terminal amino acid sequence of the purified enzyme was G-E-P-E-E-G-N-V-D-G-T-L.

P21-15

FUNCTIONAL ROLE OF CONSERVED S64 IN ERMSF METHYLTRANSFERASE ACTIVITY TO 23S RRNA

Hyung Jong Jin¹, Hak Jin Lee

¹Dept. of Genetic Engineering, The University of Suwon, Kyunggi-Do 445-743, Korea

ErmSF is one of the four gene products synthesized by *Streptomyces fradiae* to avoid the suicide from autogenous antibiotic, tylosin. This protein performs the dimethylation reaction of the specific adenine residue (A2058, *E. coli* coordinate) of 23S rRNA, whereby MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic cannot bind to the peptidyltransferase circle. Ser 64 is one of the well conserved amino acid among the erm proteins known to date. To investigate its role in methylation reaction, site-directed mutagenesis of Ser 64 to Ala, Cys, Gly, Phe, Thr, and Tyr were carried out. Among these mutants, S64A, C, G still exhibited the activity to confer the resistance to erythromycin on *E. coli*, but S64F, T, and Y lost their activities *in vivo*. All of the mutant proteins could be overexpressed to the level of wild type protein (126 mg/ liter of culture : Protein Express. Purif. in press) and were presumed to retain the natural conformation as judged by circular dichroism spectroscopy and behaviours in chromatography. When *in vitro* activities of S64A, G and C mutants were compared with those wild type protein using domain V as a substrate, they showed 20%, 68%, and 21% activity of wild type protein, respectively. In the proposed RNA adenine binding pocket with adenine, Ser 64 was located close to methylatable adenine. Therefore, amino acids with larger side chain could disrupt the stable positioning of methylatable adenine, causing the proteins to lose their activities. But large decrease in activity of S64C mutant also suggested that hydroxyl oxygen of Ser 64 played a certain role in methylation reaction. These facts will be discussed.

THE
FASEB
JOURNAL
A MULTIDISCIPLINARY RESOURCE FOR THE LIFE SCIENCES

Experimental Biology 2002®
New Orleans, Louisiana
April 20–24, 2002

ABSTRACTS
PART II

Abstracts 524.1–940.2

Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology
Volume 16, Number 5, March 22, 2002

- C11 I 726.5 Arginine supplementation enhances *in vitro* but not *in vivo* immune responses in mice. M.F. Suarez, K.A. Herrlinger-Garcia, B.S. Bender, C. Nieves, Jr. and B. Langkamp-Henken. Col. of Med., Univ. of Florida and VA Med. Ctr.
- C12 II 726.6 Aging alters acyl-CoA binding protein expression and function in rat T cell membranes. C.A. Jolly and L. Kannan. Univ. of Texas at Austin.
- C13 I 726.7 Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress primary immunity, but not the memory response against *Listeria monocytogenes*. R.D. Irons, M. Anderson, M. Zhang, L. Pompos and K. Fritsche. Univ. of Missouri-Columbia.
- C14 II 726.8 A novel nutritional formula enhances aspects of cell-mediated immunity pre- and postinfluenza challenge in mice. K.A. Herrlinger-Garcia, M.F. Suarez, B.S. Bender, R. Cotter and B. Langkamp-Henken. Univ. of Florida.
- C15 I 726.9 CLA modulates immune-induced cachexia after immunization with arthritogenic collagen type II. D.E. Butz and M.E. Cook. Univ. of Wisconsin-Madison.
- C16 II 726.10 The effect of α -tocopherol on apoptosis of naive and memory T cells from young and old mice. O. Adolfsson, B.T. Huber and S.N. Meydani. USDA at Tufts Univ. and Tufts Univ., Boston.
- C17 I 726.11 Dietary nucleotides enhance calf immune function. C. Oliver, M.L. Bauer, J.W. Schroeder, W.L. Keller and C.S. Park. North Dakota State Univ.
- C18 II 726.12 Inosine protects mice from multiple-low-dose streptozotocin-induced diabetes. J.G. Mabley, P. Pacher, G. Hasko, A. Salzman and C. Szabo. Inotek Corp., Beverly, MA.
- C19 I 726.13 Inosine protects against both the primary disease and rejection of syngeneic islet grafts in NOD mice. J.G. Mabley, W.L. Suarez-Pinzon, P. Pacher, G. Hasko, A. Rabinovitch and C. Szabo. Inotek Corp., Beverly, MA, Univ. of Alberta and UMDNJ-New Jersey Med. Sch.
- C20 II 726.14 Interferon gamma changes *in vivo* with retinoic acid feeding in rats. R. Baybutt, B. Herndon, S. Latcham, M. Lopez and A. Molteni. Kansas State Univ. and Univ. of Missouri-Kansas City, Sch. of Med.
- C21 I 726.15 Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids selectively promote activation-induced cell death in Th1 cells. K.C. Switzer, D.N. McMurray and R.S. Chapkin. Texas A&M Univ.
- C22 II 726.16 Mice lacking the Gpx2 gene experience more severe heart damage during the acute phase of viral-induced myocarditis. C.C. Matthews, M.A. Beck, F-F. Chu and D.A. Sidberry. Univ. of North Carolina and City of Hope Natl. Med. Ctr.
- C26 II 727.4 Fecal fat and calcium excretion in male golden Syrian hamsters fed a modified milk fat diet with varying levels of calcium. M. Pellizzon, J. Martin, E. Buisson, A. Buisson and K-L. Jen. Wayne State Univ.
- C27 I 727.5 Energy balance and substrate oxidation in systemic lupus erythematosus. S. DeSantiago, A. Villa, A. Fernández, T. Palazuelos, A. Halhali, I. Lerman, C. Sanchez-Castillo and D. Alarcon. Univ. Iberoamericana and Salvador Zubirán Natl. Inst. of Med. Sci. and Nutr., Mexico City.
- C28 II 727.6 Amprenavir in combination with a low fat diet ameliorates the adverse lipid abnormalities associated with HIV protease inhibitor therapy. N.M. Schildmeyer, T.M. Riddle and D.Y. Hui. Univ. of Cincinnati
- C29 I 727.7 Independent effects of leptin and caloric intake on adipose metabolism in the ob/ob mouse. S.M. Turner, W. Samady, A. Castuciano, E. Murphy and M. Hellerstein. Univ. of California, Berkeley.
- C30 II 727.8 Correspondence between long-chain polyunsaturate concentrations in plasma and red blood cell versus neural and related tissues. E. Sarkadi Nagy, V. Wijendran, G.Y. Diau, A. Hsieh, A.C. Chao, A. Turpeinen, P.W. Nathanielsz and J.T. Brenna. Cornell Univ.
- C31 I 727.9 Effects of sesame feeding in rats on plasma and liver lipids. H.S. Sitren, L. Fish, G.M. Sumainah, J.J. Bagnall and R.P. Bates. Univ. of Florida.
- C32 II 727.10 *trans*-linoleic acid and its metabolic comparisons in an adult group of omnivores and vegans. R.W. Hubbard, J. Westengard and A. Sanchez. Loma Linda Univ.
- C33 I 727.11 Effect of low and high *trans*-fatty acid intake on plasma lipoprotein metabolism. S.Y. Ryu, H. Flax and J.T. Snook. Ohio State Univ.
- C34 II 727.12 *Plantago ovata* seeds lower plasma lipids by affecting bile acid and hepatic cholesterol metabolism. T.L. Zern, L. Romero, K.L. West and M-L. Fernandez. Univ. of Connecticut and Univ. of Sonora, Mexico.
- C35 I 727.13 Promotion of fatty acid catabolism by carnitine and choline supplementation in humans. D.S. Sachan and N. Hongu. Univ. of Tennessee, Knoxville.
- C36 II 727.14 Effect of constant darkness on plasma leptin and insulin levels in rats. K. Cho, K. Hong, S. Kim, R-W. Choue and S. Kang. Grad. Sch. of East-West Med. Sci., Kyung Hee Univ., Republic of Korea.
- C37 I 727.15 Feedback in the inhibition of cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome demonstrated by reduced urinary mevalonate excretion. A.S. Pappu, R.D. Steiner and W.E. Connor. Oregon Hlth. & Sci. Univ.

728. VITAMIN E, MOLECULAR EFFECTS AND METABOLISM II

Poster

TUE. 7:30 AM - 5:00 PM—CONVENTION CENTER, EXHIBIT HALL

Presentation times: 12:45 PM-1:45 PM (I); 1:45 PM-2:45 PM (II)

- C23 I 727.1 Further studies on the effects of dietary protein reversals on metabolism in the broiler. R. Rosebrough, M. Richards and J. McMurtry. USDA, Beltsville, MD.
- C24 II 727.2 Modified milk fats with different high melting points alter fecal fat content and composition in guinea pigs. H. Jacques, G. Asselin, C. Lavigne, J. Arul and P. Angers. Laval Univ., Canada
- C25 I 727.3 Dietary fat and cholesterol change laying hen VLDL diameter distributions. M.L. Wallowitz and R.L. Walzem. Texas A&M Univ.
- C38 I 728.1 AT supplementation reverses the increased LDL oxidative susceptibility with n-3 PUFA supplementation. A. Harris, S. Devaraj, T. Yang, N. Kaul and I. Jialal. Univ. of Texas Southwestern Med. Ctr.
- C39 II 728.2 The effect of high dose alpha tocopherol therapy on oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. S. Devaraj and I. Jialal. Univ. of Texas Southwestern Med. Ctr.
- C40 I 728.3 Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage of lymphocytes in Chinese children. A. Ma, M. Zhang, H. Liang, X. Zhang, X. Wang and J. Li. Qingdao Med. Col., Qingdao Univ., China.

- C147 I 737.9 Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. **Q. Zhu, R. Holt, S. Lazarus, T. Orozco and C. Keen.** Univ. of California, Davis.
- C148 II 737.10 Food and pH effects on the absorption of cocoa flavanols and dimers. **R.R. Holt, D.D. Schramm, J.A. Polagruto, S.A. Lazarus and C.L. Keen.** Univ. of California, Davis and Mars Inc., Hackettstown, NJ.
- C149 I 737.11 Effect of dietary flavonoid antioxidants on vitamin E and selenium deficiency in rats. **J.E. Andrade and J.R. Burgess.** Purdue Univ.
- C150 II 737.12 Oral administration of cranberry juice cocktail inhibits *E. coli* 1677 colonization of the bladder in a mouse model of urinary tract infection. **N.K. Edens and W. Hopkins.** Ross Prod. Div. Abbott Labs. and Univ. of Wisconsin-Madison.
- C151 I 737.13 Absorption/metabolism of anthocyanins in human subjects following consumption of blueberry or elderberry. **X. Wu, L. Gu and R.L. Prior.** USDA, Little Rock.
- C152 II 737.14 Urinary excretion of metabolites of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in human subjects. **R.L. Prior, G. Cao, H. Hoang, X. Wu and L. Gu.** USDA, Little Rock and USDA at Tufts Univ.
- C153 I 737.15 *in vivo* antioxidant capacity in human subjects following consumption of prune juice, prunes or blueberries. **R.L. Prior, G. Cao, H. Hoang, X. Wu and L. Gu.** USDA, Little Rock and USDA at Tufts Univ.
- C154 II 737.16 Evaluation of the ferric reducing antioxidant power assay for muscadine grape products. **P. Musami, P. Greenspan, E.W. Taylor, J.L. Hargrove and D.K. Hartle.** Univ. of Georgia.
- C155 I 737.17 Effect of phytochemicals, ascorbate, and plasma urate values on exercise-induced oxidative stress. **G.L. George, L. McAnulty, S.R. McAnulty, S. Swick, J.D. Morrow, C. Dumke, B. Proulx, A. Utter and D.C. Nieman.** Appalachian State Univ. and Vanderbilt Univ.
- C156 II 737.18 Serum ORAC as a potential screening tool to predict individuals at risk for oxidative stress. **M.C. Schmidt, J.L. Nelson, P.S. Bernstein and E.W. Askew.** Univ. of Utah.
- C157 I 737.19 Antioxidant effects of squalene on corn oil fed mice. **S.Y. Oh and S. Chang.** SUNY at Buffalo.
- C158 II 737.20 Effects of nephrite jade water by Ok-San Ga in Chuncheon on sperm qualities and histopathological changes in bisphenol A-administered rats. **H. Chan-Kyu, S. Ki-sung and L. Bog-Hee.** Korea Food Res. Inst. and Chung-Ang Univ., Republic of Korea.
- C159 I 737.21 Effects of defatted safflower seed extracts on plasma and liver lipid in ovariectomized female rats fed high cholesterol diets. **S-H. Cho, S-W. Choi, W-J. Lee and Y. Choi.** Catholic Univ. of Daegu, Kyungpook Natl. Univ. and Taegu Univ., Republic of Korea.
- C161 II 738.2 Goat milk as a source of complex, lactose-derived oligosaccharides. **A. Martínez-Férez, C. Henke, G. Pohlentz, S. Rudloff, E. Guadix Escobar and C. Kunz.** Univ. of Granada Fac. of Sci., Spain and Justus Liebig Univ. Giessen Germany.
- C162 I 738.3 Characterization of phytochemical constituents in rice protein isolate using LC/MS/MS. **N. Fan, S. Yu, Z. Nehus and T.M. Badger.** Univ. of Arkansas for Med. Sci. and Riceland Foods Inc., Stuttgart, AR.

739. CNS EFFECTS OF NUTRIENTS II

Poster

TUE. 7:30 AM - 5:00 PM—CONVENTION CENTER, EXHIBIT HALL

Presentation times: 12:45 PM-1:45 PM (I); 1:45 PM-2:45 PM (II)

- C163 I 739.1 Effect of a glyconutritional supplement on brain potentials associated with language processing. **Wang, R.T. Pivik and R.A. Dykman.** Arkansas Children's Nutr. Ctr., Little Rock.
- C164 II 739.2 Effects of a glyconutritional supplement on resting brain activity. **C. Wang, R.T. Pivik and R. Dykman.** Arkansas Children's Nutr. Ctr., Little Rock.
- C165 I 739.3 Circadian effects on glucose enhancement of cognition in elderly humans. **N. Grinberg, C. Greenwood, A. Evidar and L. Hasher.** Univ. of Toronto.
- C166 II 739.4 Amygdala and hippocampus are primary brain targets for accumulation of naturally occurring radon daughters in Alzheimer's disease. **B. Momcilovic, C. Lykken, H.A. Alkahtib, J.A. Duerre and M. Cooley.** Univ. North Dakota.
- C167 I 739.5 Borage oil increases hippocampal iron concentration in aged rats. **K.E. Burleigh, J.A. Wiesing and R.J. Tomsho, J.L. Beard and R.L. Corwin.** Penn State Univ.

740. OBESITY, NUTRITIONAL CONSIDERATIONS II

Poster

TUE. 7:30 AM - 5:00 PM—CONVENTION CENTER, EXHIBIT HALL

Presentation times: 12:45 PM-1:45 PM (I); 1:45 PM-2:45 PM (II)

738. BIOACTIVE COMPOUNDS IN FOOD

Poster

TUE. 7:30 AM - 5:00 PM—CONVENTION CENTER, EXHIBIT HALL

Presentation times: 12:45 PM-1:45 PM (I); 1:45 PM-2:45 PM (II)

- C160 I 738.1 Monomeric, oligomeric and polymeric proanthocyanidins in selected foods: quality and quantity. **L. Gu, M. Kelm, J. Hammerstone and R.L. Prior.** USDA and Arkansas Children's Nutr. Ctr., Little Rock, and MARS Inc., Hackettstown, NJ.
- C168 I 740.1 Low dietary protein attenuates the ability of leptin to inhibit body fat accumulation. **B.D. Whitham, M.J. Lehmkuhl, J. Wang, D.P. Melvin and C-Y. Lin.** Auburn Univ.
- C169 II 740.2 Increased dietary calcium and dietary protein lowers plasma vitamin D and reduces adiposity part by inhibiting lipid absorption. **E. Papakonstantinou, F. Huth, W.P. Flatt and R.B.S. Harris.** Univ. of Georgia and Kikkoman Foods Inc.
- C170 I 740.3 Effects of isoflavone aglycone on the prevention of obesity in a diet-induced obese mouse model. **W. Pan, M. Takebe, G.L. Blackburn and J-R. Zhou.** Beth Israel Deaconess Med. Ctr. and Nichimo Co. Ltd., Tokyo.
- C171 II 740.4 Effects of fructose-polymer on serotonergic leptin and UCP expression in obese rats induced by high diet. **K. Hong, S. Kim, K-H. Jang, K. Song, C. Kim, S. Rhee, W. Choue and S. Kang.** Grad. Sch. of East-West Med. Science, Kyung Hee Univ., Republic of Korea and Korea Res. Inst. Biosci. and Biotechnol., Taejeon.

OBESITY, NUTRITIONAL CONSIDERATIONS II. 740.1-740.14)

40.1

Low dietary protein attenuates the ability of leptin to inhibit body fat accumulation.

Douglas White, Mark J. Lehmkuhl, Jinpin Wang, Deena P. Melvin, Xia-Yu Lin. Nutrition and Food Science, Auburn University, 328 Spidle Hall, Auburn, AL 36849

Moderately low protein diets result in an increase in food intake and body fat, as well as an increase in serum leptin concentrations. This suggests that low dietary protein may lead to leptin resistance. We chronically administered leptin peripherally to determine whether low dietary protein could attenuate the ability of leptin to reduce the accumulation of body fat. Initially, 6 rats were killed in order to estimate the initial body composition of the experimental animals. Twenty-six Sprague-Dawley rats were fed either a low-protein diet (10% casein) or a control diet (20% casein). After three days, osmotic pumps were implanted to deliver one of several doses of leptin (0, 75, 100, or 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) for 2 weeks. Rats were killed and body composition analyses performed. Food intake was 20% greater ($p < 0.05$) in rats fed the low protein diets. No differences in food intake were found due to leptin administration. The gain in body weight was greater ($p < 0.05$) in rats fed the low-protein diet. In the 20% casein group, the highest dose of leptin (150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) significantly reduced the gain in body fat compared to the other rats fed the 20% casein diet, while leptin differences were found in the rats fed the 10% casein diet. These results suggest that low dietary protein can attenuate the ability of leptin to reduce body fat accumulation, supporting the contention that these rats are leptin resistant. (Supported by the American Heart Assoc. # 0060235B)

1.2

Increased dietary calcium and dairy protein lowers plasma vitamin D and reduces adiposity in part by inhibiting lipid absorption.

Ilia Papakonstantinou¹, Peter J. Huth², William P. Flatt¹, Ruth B. Strissel³. ¹Foods and Nutrition, University of Georgia, Dawson Hall, Athens, GA 30602. ²Kraft Foods, Inc., Glenview, IL. ³University of Georgia, Athens, GA

Diets high in dairy protein and calcium reduce body fat and core temperature in Agouti mice. Zemel et al (2000) propose that the diets process Vitamin D which increases adipocyte calcium uptake. This inhibits lipogenesis and stimulates lipolysis. The present study used Wistar rats to determine whether reduced fat digestibility contributed to fat loss. Eight matched groups were fed equal caloric, 11% fat diets containing (1) 0% calcium and 14% protein as casein or (2) 2.4% calcium and 14% protein, 50% from casein and 50% from non-fat dry milk. After 12 weeks there were no differences in food intake, core temperature, RQ or lipogenesis. Serum Vitamin D was greatly reduced, body weights were different but epididymal, retroperitoneal, inguinal, mesenteric and renal fat pads and liver were significantly reduced by the high calcium diet.

This diet increased fecal fat 2-fold and fecal ash 5-fold. Fat stibility fell from 93 to 84% and digestible energy intake decreased by 250 kcal rat/12 wk. Therefore, weight loss induced by high calcium is due in part to reduced fat absorption and is associated with lower serum Vitamin D concentrations.

Supported by Kraft Foods North America.

3

Effects of Isoflavone Aglycone on the Prevention of Obesity in a Diet-Induced Obese Mouse Model

Jun Pan¹, Minoru Takebe², George L. Blackburn¹, Jin-Rong Zhou¹. ¹Jersey, Beth Israel Deaconess Medical Center, 21-27 Burlington Avenue, Boston, MA 02215. ²Nichimo Co. Ltd., Shinagawa, Tokyo Japan

Determined the effect of an isoflavone aglycone-rich fermented soybean extract (AglyMax) on changes of body weight and white adipose tissue (WAT) in a diet-induced obese mouse model. Female C57BL/6 mice were ovariectomized, randomized and consumed one of the following diets using high-fat diet (20% protein, 35% carbohydrates, 45% fat) as the control with the additions of 0.12% AglyMax (b) and 0.6% AglyMax (c), and pair-feeding (d) to group (e). At eight weeks, mice treated with AglyMax at 0.12% and 0.6% of the diets had reduced body weight gains by 15% ($P < 0.05$) and 64% ($P < 0.0001$) respectively, compared with the control. Mice treated with 0.6% AglyMax further reduced body weight gain 20% ($P < 0.05$), compared with the pair-fed animals. The changes of body weight were associated with reductions in WAT (15% by 0.12% AglyMax, $P = 0.20$, and 44% by 0.6% AglyMax, $P < 0.001$). Mice treated

with 0.6% AglyMax further reduced WAT by 37% ($P < 0.01$), compared with the pair-fed mice. AglyMax at 0.6% of the diets resulted in reduced food intake by 18.2% ($P < 0.001$). Our studies suggest that dietary supplementation with isoflavone aglycones may be effective in preventing obesity in a dose-dependent manner.

740.4

EFFECTS OF FRUCTOSE-POLYMER ON SERUM LEPTIN AND UCP EXPRESSION IN OBESE RATS INDUCED BY HIGH FAT DIET

Kyunghee Hong¹, Sohye Kim¹, Ki-Hyo Jang¹, Kibang Song², Chulho Kim², Sangki Rhee², Ryo-Won Choue², Soon Ah Kang¹. ¹Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Hoeki-Dong, Dongdaemoon-Gu, Seoul, Seoul 130-701 Korea, Republic of. ²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon, Seoul Korea

Uncoupling protein (UCP) is a mitochondrial protein that uncouples the respiratory chain from oxidative phosphorylation and generates heat instead of ATP, thereby increase energy expenditure. Levan, high molecular-mass [β]-2,6-linked fructose polymer is found in microorganism and plants, and to be unlike with inulin especially its high solubility. After high fat diet for 6 weeks induced obesity, fed 0% (high fat control group), 3%, and 5% levan containing diet for 6 weeks. Brown adipose tissue (BAT) mass was lower in rats fed levan groups than high fat control group. Adipocyte size was significantly reduced in levan 5% group and 3% levan group than high fat group. Serum leptin level was low in levan groups than high fat group, and lower in 5% levan group than 3% levan group ($P < 0.001$). Serum insulin and triglyceride levels show positive correlation with serum leptin level. UCPs expression in BAT, WAT, and skeletal muscle increased in levan diet groups than normal or high fat control group. Also, 5% levan showed high expression of UCP than 3% levan. The UCP expression by levan containing diet was significantly increased in BAT UCP1 and UCP3, and muscle UCP3. In conclusions, levan containing diet reduced adipocyte size and serum leptin level, and increased UCP expression in high fat induced obese rats. This study suggest that anti-obesity effect of levan attributed to up-regulation of UCPs and inefficient energy utilization.

740.5

Effects of Dietary Soybean and Flaxseed Meal on Metabolic Parameters in a Genetic Model of Obesity and Diabetes.

Sam J Bhathena¹, Ali A Ali², Ali A Mohamed³, Carl T Hansen⁴, Manuel T Velasquez². ¹Phytonutrients Laboratory, U. S. Department of Agriculture, 10300 Baltimore Avenue, Beltsville, Maryland 20705, ²Food Science Department, Ain Shams University, Cairo, Egypt, ³Virginia State University, Petersburg, Virginia, ⁴Veterinary Resources Branch, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, ⁵Department of Medicine, George Washington University, Washington, DC, Washington DC

Soybean (S) and flax meal (F) have been reported to have beneficial effects on chronic diseases, including cancer, cardiovascular disorders, and renal disease. We tested the hypothesis that S and F also have beneficial effect in obesity and diabetes. Lean and obese SHR/N-cp rats were fed diets containing either 20% casein, or 20% S or 20% F for 26 weeks. Lean rats are hypertensive while obese rats show symptoms of type II diabetes. Obese rats had significantly higher plasma glucose (G), triglyceride (TG), total cholesterol (C), HDL cholesterol (HDL-C) and LDL cholesterol (LDL-C). S significantly decreased C and LDL-C in both lean and obese rats. It had no significant effect on G. F decreased C and TG in both lean and obese rats, but it decreased HDL-C and LDL-C only in obese rats. It also decreased G in lean but not in obese rats. S and F had varying effects on tissue weights in lean and obese rats. Obese rats compared to lean rats, had significantly lower plasma creatine but higher total bilirubin (BIT), blood urea nitrogen, alanine aminotransferase (AT) and lactate dehydrogenase (LDH). Both, S and F decreased BIT, AT, protein and uric acid in lean rats, but the effects in obese rats were mixed. The data show that S and F affect plasma lipids and many enzymes. F also lowered G. F has greater effect on various parameters than S. In conclusion both S and F have beneficial effects on metabolic and enzymatic parameters and may play a role in reducing complications of obesity.

관인생략

출원번호통지서



받는사람
(대리인)
주소

허영준 (1992-020801-5)

서울 강남구 역삼동 12-1 화천빌딩 13층

출원일자 2002. 02. 26

상사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2002-0006644

접수번호 1-1-02-0008435-02

출원인 주영회사 대표자 (1991-026884-3) R: 2

특 허 청 장

【발명의 명칭】

레반을 포함하는 장내유산균 생육촉진 조성물(Composition including levan as growth stimulator for intestinal lactic acid-producing bacteria)

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

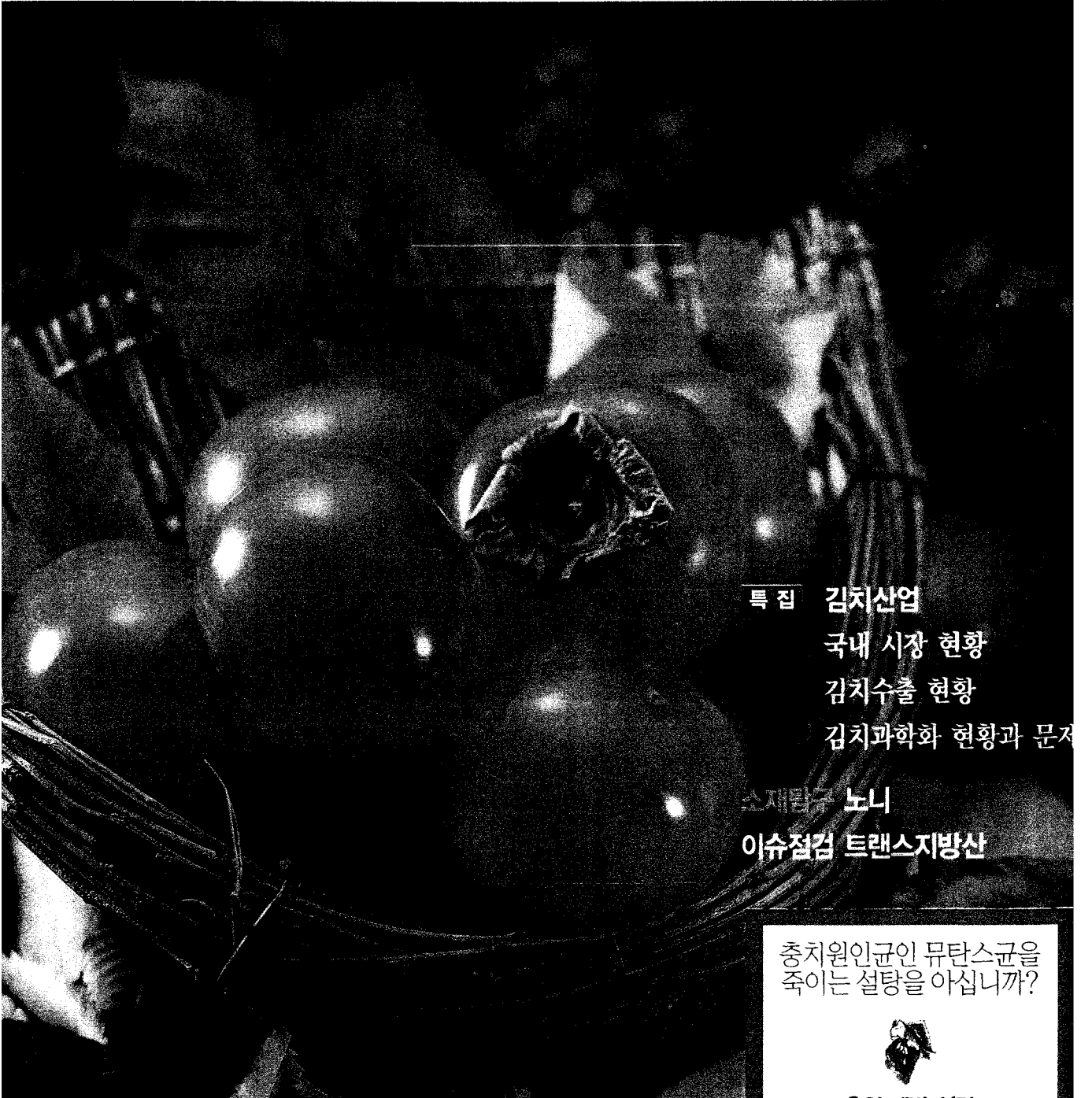
본 발명은 레반을 포함하는 장내유산균 생육촉진 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 미생물 유래의 레반을 분말 또는 수용액 상태로 유산균과 혼용하여 장내에서 비피더스균을 포함한 장내유산균의 생육을 촉진시킴으로써 장내 pH를 감소시키고 젖산과 초산의 생성을 촉진시키는 등의 정상효과가 뛰어난 장내유산균 생육촉진 조성물에 관한 것이다.

사람의 장내에 서식하는 장내세균은 숙주의 건강을 지켜주는 유용균과 숙주의 건강에 나쁜 영향을 주는 유해균이 있으며 이들 양자의 균형에 의하여 건강상태가 조절되어진다. 장내유용균으로는 비피도박테리아(bifidobacteria)와 락토바실리(lactobacilli) 등이 있으며, 이러한 균들은 사람의 건강에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 그러나, 대장균, 식중독균, 포도상구균 등으로 대표되는 유해균은 장내의 부패를 촉진하여 노화가 빨리 일어나게 하고 발암물질을 생산하며 장내 pH에 민감하게 영향을 받는다. 즉, 많은 유해균들은 산성조건에서는 생육이 크게 저하되며, 유산균들은 비교적 산성조건에서도 강한 생존력을 나타낸다. 유산균은 탄수화물을 이용하여 젖산을 많이 생성시키는 박테리아로서 단백질을 분해하

시포지너 가 FOOD JOURNAL 리

2003 11

www.foodnews.co.kr



특 집 김치산업
국내 시장 현황
김치수출 현황
김치과학화 현황과 문제

소재탈수 노니
이슈점검 트랜스지방산

총치원인균인 무탄수화물을
죽이는 설탕을 아십니까?



유한상업사

당류 추출 ‘레반’ ‘DFA’ 대량생산 길터

탄수화물 소재전문기업을 향해

(주)리얼바이오텍은 한국생명공학연구원 생물공정연구소에서 수년간에 걸쳐 개발한 고유의 원천기술인 바이오폴리머 ‘레반(LEVAN)’과 레반 유도체 ‘DFA(Difuctose dianhydride)’ 생산 기술을 기반으로 설립된 기업이다.

‘레반(LEVAN)’은 녹초와 같은 단자엽 식물 및 미생물에 존재하고 있는 과당의 일종이다. 예를들어 청국장을 끈적거리게 하는 성분은 콩을 발효시키는 미생물에 의해 부산물로 생산된 레반이다.

레반은 사람 몸에서 수용성 식이섬유와 같은 기능으로 작용, 다이어트 효과와 콜레스테롤의 상승을 억제하는 작용이 있어 다양한 용도로 활용이 기대되는 소재다.

레반을 직접발효로 생산할 경우에는 최종제품에 배지성분 및 미생물 발효시

생성되는 여러 가지 불순물들이 포함될 수 있으나 리얼바이오텍은 효소공정기술을 활용해 고순도 청정제품을 생산해내고 있다.

‘DFA’는 마늘과 식물에 존재하며 레반으로부터 효소반응에 의해 생성되는 물질이다.

리얼바이오텍은 우선 보습력 및 정장기능과 콜레스테롤 및 체지방 감소기능, 식이섬유 기능 등이 탁월한 레반을 기능성식품원료, 보조사료 및 유기질 비료, 화장품 보습제로 허가받아 국내외 시장을 중심으로 마케팅을 벌이고 있다.

충치예방 껌 원료 공급

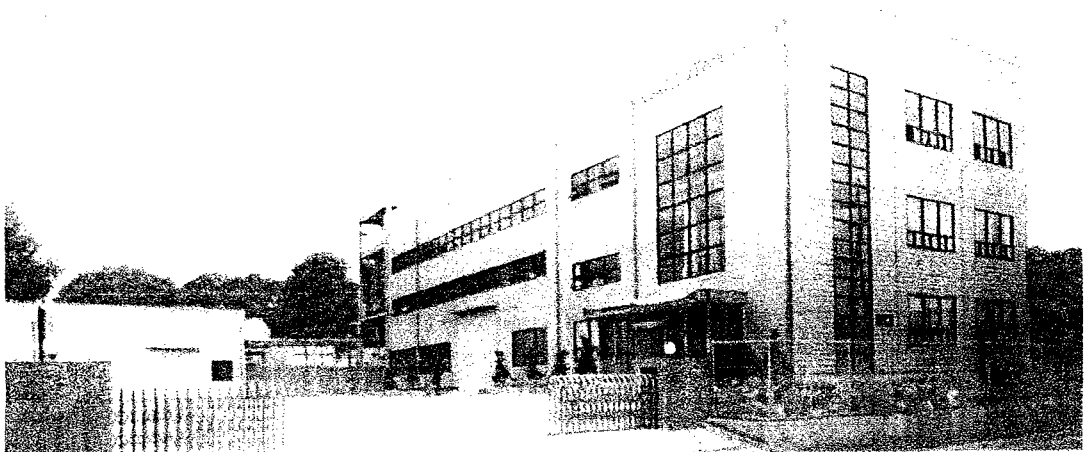
이차적으로는 철·칼슘 등의 체내 흡수효과가 탁월하고 충치예방 기능이 있는 저칼로리 감미료인 DFA

를 첨분 및 갈습이온 흡수촉진을 위한 식품첨가물로 개발, 식품은 물론 의약품 시장 진출까지 꾀하고 있다.

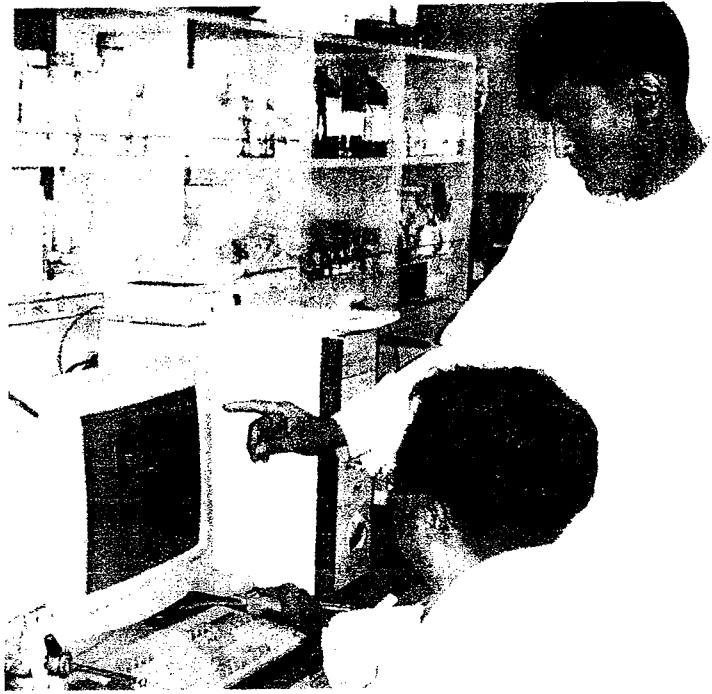
특히 DFA를 변형과 고평가공 중 치료제로 개발해 국내외 제약사와 전략적 제휴, 공동으로 시장에 진출하고, 탄수화물 관련 효소와 기능성 소재개발에 특화된 기업으로 성장해 나간다는 전략이다.

이를 위해 기술연구소는 이미 10년여의 연구결과를 토대로 레반 및 DFA IV 생산기술을 개발, 다수의 특허를 획득해 놓은 상태다.

특히 축적된 미생물 개량기술과 발효 기술, 유전자재조합 단백질 및 다당류 생산기술 등을 바탕으로 다양한 기능성을 갖고 있는 탄수화물에 초점을 두고 생분진소재 개발을 위한 연구를 수행 중 에 있다.



리얼바이오텍은 ‘레반(LEVAN)’ 생산기술을 보유한 바이오 벤처기업이다



리얼바이오텍은 탄수화물 소재 전문기업으로 나아가기 위해 단·다당류 관련 효소개발에 주력하고 있다. (오른쪽이 장병일 연구소장)

리얼바이오텍의 가장 큰 강점은 레반 및 DFA 생산기술과 관련된 원천특허·용도특허를 바탕으로 한 레반 및 DFA 대량생산기술을 꼽을 수 있다.

현재 '레반'을 활용해 '레반 다이어트'를 시판 중에 있으며, '락토헤반'을 생산하고 있는 고려한백(주)에 원료를 공급하고 있다.

또다른 주력품인 'DFA IV'는 국내 식품대기업과 기능성 껌의 원료로 레반 공급계약을 맺은 상태며 조만간 제품이 출시될 예정이다.

삼립식품이 시판중인 다이어트 껌도 리얼바이오텍이 공급한 'DFA IV'가 원료다. 또한 보령메디앙스에 보습용 화장품의 원료로 공급되고 있다.

단·다당류 관련 효소 지속 개발

리얼바이오텍은 앞으로 식품 전반에 소재가 활용될 수 있도록 다양한 응용기술을 개발해 나갈 계획이다. 특히 장기적으로는 미생물 개량 연구를 통해 기능성 식품, 의약품, 화장품 등과 관련된 신규 단·다당류와 관련효소를 지속적으로 개발해 탄수화물 관련 특화기업으로 도약한다는 전략이다.

장병일 기술연구소장은 "리얼바이오텍은 레반 및 DFA 생산기술과 관련된 원천특허와 용도특허를 확보, 이를 기반으로 대량생산기술을 갖춘 기업"이라며 "현재의 기능성 식품이나 소비자의 욕구를 놓고 판단할 때 독점적 기술로 새로운 시장에 진출할 때 오는 위험보다는 독점적 지위로써 얻는 기대이익

<특허등록 현황>

- 철과 디프락토스를 함유하는 빈혈 치료 제레반슈크라제를 이용한 레반의 제조방법
- 신규의 레반슈크라제 유전자
- 신규의 슈크라제 유전자
- 라벨라 아쿠아틸리스로부터 유래된 레반슈크라제의 염기서열 및 이미노산 서열

<특허출원 현황>

- 폴리에틸렌글리콜과 레반의 수상이상분계 시스템
- 아스로박터 유레아워션스로부터 분리된 레반 프록토 트랜스퍼라제 및 이를 이용해 레반으로부터 디프락토스 디엔하이드라이드 4를 생산하는 방법
- 단순다당을 포함하는 동물사료
- 고정화도미 레반슈크라제 또는 유기용매 처리된 균체를 이용한 저분자량 레반의 제
- 조빙법신규 레반슈크라제를 이용한 레반의 생산방법

<특허출원 준비>

- 레반을 이용한 장내환경 및 장내 미생물 생육 촉진제 제조방법세포증식 및 피부 보습에 의한 탄력 증강 효능을 갖는 레반 추출물을 함유한 화장품 조성물 레반의 정제방법
- 디프락토스 디엔하이드라이드의 정제방법
- 신규의 텍스트린슈크라제를 이용한 텍스트린의 생산방법
- 신규의 얼터닌슈크라제를 이용한 얼터닌의 생산방법

이 앞으로 훨씬 높을 것으로 예상된다"고 말했다.

그는 또 "리얼바이오텍은 스프레이 드라이어 전문업체인 일본의 오키와라사의 기기를 도입, 제품생산에서 품질

관리까지 일괄 처리가 가능한 임가공 사업도 적극적으로 벌이고 있다"고 설명했다. ☎

김정배 기자 ks1268@codnews.co.kr

클로렐라·레반다이어트 '대박'

상반기 흡소핑 매출 상위 분석 전파타고 효자상품 입지 굳혀

'흡소핑에서 뜨야 진짜 인기 제품.'

다이어트 제품 등 최근 일부 건기식 제품이 '대박'을 내면서 흡소핑이 소위 뜨는(?) 제품의 시험대로 자리하고 있다. 흡소핑에서 팔리는 제품이 타 시장에서도 인기있는 제품이라는 것. 실제로 업계 내에서는 한두 번 방송이 나간 후 반응이 오지 않는 제품의 경우 곧바로 '퇴출' 되는 경우가 보통이다. 반면 인기가 있는 제품들은 연장방송에 통련까지 가는 것이 일반적이다.

그렇다면 올 상반기 흡소핑을 누빈 건기식 제품에는 어떤 것들이 있을까? 상위 매출주요 제품들을 짚어봤다.

△클로렐라-클로렐라는 올 상반기 흡소핑 방송의 최다 출연 제품. 전문가들은 상반기 전체 클로렐라 매출이 50%가 흡소핑을 통해 판매된 것으로 보고 있다. 특히 클로렐라 제품의 간판기업인 대상의 경우 LG흡소핑 등에 평균 주 2회 이상 방송돼 150억원 대의 매출을 올린 것으로 알려졌다.

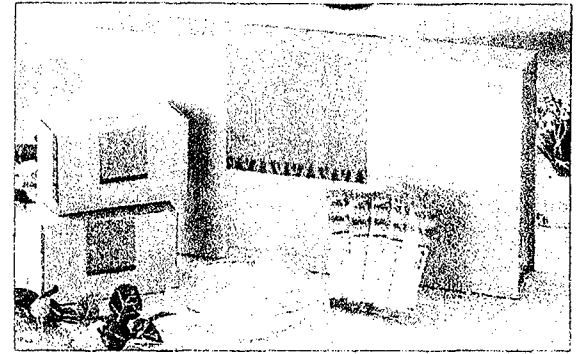
△정관장 인삼-정관장 인삼제품은 흡소핑 방송내에서도 스테디 셀러 제품으로 손꼽힌다. 별다른 설명이

필요 없는 대표 인삼 브랜드라는 것이 이 같은 이유. 덕분에 정관장 인삼 엑기스 제품은 올 상반기동안에도 180억원~200억원의 매출을 올렸다.

△비타민-비타민은 흡소핑 시장에서 여전한 인기를 누렸다. 비타민하우스, CJ뉴트라, GMP 등이 연이어 방송을 탔으며 특히 비타민 하우스의 경우 상반기 회사 전체 매출의 20%를 흡소핑에서 올렸다는 회사측의 설명.

△석류즙-석류즙도 올 상반기 꾸준히 전파를 탔던 제품. LG이룸 석류즙, 이룸 내추럴, 우리(석류미소, 안국약품식품사업부), CJ(페르시아클레오, 동일산업), 현대(버몬트 석류, 경북대학식품공장) 등 대부분의 흡소핑들이 관련 제품을 다뤘다. 이 중 대표 제품은 이룸 석류즙으로 4월~7월 3개월간 총 11회 방송에 3만 7000박스가 판매돼 16억원의 매출을 올렸다.

△다이어트 제품-다이어트 제품이 흡소핑 내 '효자상품'이라는 것은 익히 알려진 사실. 이러한 추세는 올 들어서도 크게 달라지지 않아 '김소형 다이어트순·청정식'(LG, CJ) '화인 프로니아 다이어트 세트'(농수산)를 비롯해 다양한 다이어트 제품들이 인기몰이를 계속



◇ 클로렐라와 인삼, 비타민, 다이어트제품, 석류 등이 올 상반기 흡소핑 인기상품으로 등장했다.

했다. 특히 삼립식품 건식브랜드인 허브택의 '레반 다이어트'는 지난 6월 LG 흡소핑에서 첫 방송을 탄 이후 회당 1000세트 이상 팔리는 '빅 히트'를 기록중이다.

| 김인숙기자 insukk@hfoodnews.com

삼립식품 '레반 다이어트' 홈쇼핑 인기몰이

국내 연구진이 개발한 천연신소재 레반을 원료로 한 다이어트 제품이 홈쇼핑에서 인기몰이를 계속하고 있다.

삼립식품은 회사 건식브랜드인 허브텍의 '레반 다이어트' 제품이 지난 달 초 LG 홈쇼핑에서 첫 방송을 탄 이후 회당 1000세트 이상, 지금까지 총 12000세트 이상 팔려나가는 '빅 히트'를 기록했다고 13일 밝혔다.

레반은 설탕성분 가운데 과당만 300만 개정도 결합해 놓은 천연물질로 유산균 생

육촉진과 유해 미생물의 생육 억제, 면역증강력 등이 뛰어나다. 삼립 허브텍의 레반다이어

트는 이처럼 다양한 기능성을 가진 레반을 비롯해 가르시니아 캄보지아와 진피, 상업 추출물 등을 주원료로 지난해 회사측이 리얼바이오텍과 공동 개발, 제품화했다.

