GOVP1200812839

최 종
연구보고서

T6023706

만성질환 억제 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 생리활성 규명 및 응용제품 개발

목포대학교

해양수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 "만성질환 억제 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 생리활성 규명 및 응용제품 개발" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 10월 일

주관연구기관명 : 목포대학교

주관연구책임자 : 김 현 아

세부연구책임자 : 김 현 아

김 경 희

연 구 원 : 박 복 희

연 구 원 : 조 희 숙

연 구 원 : 김 민 숙

연 구 원 : 김 은

여 백

요 약 문

Ⅰ. 제 목

만성질환 억제 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 생리활성 규명 및 응용제품 개발

Ⅱ.연구개발의 목적 및 필요성

○ 전국 해조류생산량의 80%를 생산하는 대표적인 해조류 생산지역인 전라남도는 과잉생산과 재고물량 누적, 가격하락과 중국산의 저가 물량공세 등으로 수출시장마저 잠식당하는 등 극심한 타격을 입고 있는 실정임

○ 이에 따라 수출 증대 및 소비확대를 위한 가공제품의 기술이 시급하므로 본 연구개발과제의 최종 목표를 「만성질환 억제 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 생리활성 규명 및 응용제품 개발」에 두었음

○ 이러한 목적을 달성하기 위하여 다시마를 이용하여 당뇨나 암 등의 만성퇴행성 질환에 대한 예방효과를 동물 모델을 통하여 과학적이고 체계적으로 증명하고 다시 in vitro 세포실험을 통하여 그 기전을 규명하므로써 다시마의 역할을 규명하고, 다시마의 기능성을 이용하여 만성질환을 예방할 수 있는 선도적 기능성 식품을 개발하는 것을 목적으로 하였음. 또한 본 연구를 바탕으로 부작용이 없는 치료 보조제 개발을 위한 기본 자료를 제공하고자 함

Ⅲ.연구개발 내용 및 범위

1. 다시마분말 및 물 추출물의 항당뇨 효과 규명

○ 당뇨 쥐의 혈청 인슐린수준에 미치는 영향

○ 당뇨 쥐의 혈당조절 효과

○ 당뇨 쥐의 지질대사에 미치는 영향

- 당뇨 쥐의 혈청 지질수준 측정
- 변의 지질 함량 측정
- 간의 지질함량 측정

○ 당뇨 쥐 신장의 산화적 스트레스에 미치는 영향

- 신장 조직의 병리학적 변화 관찰
- 혈청 creatinine 농도측정
- 신장 microsome의 지질과산화물(TBARS)함량 측정
- 신장 cytosol의 glutathione 의존성 항산화 효소계 활성 측정

2. 다시마의 간암 및 간암세포주의 전이능 억제 효과 규명

○ 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간의 암화과정 억제 효과

- GST-P 양성 병소 형성 정도 측정
- 간의 지질과산화물 함량 측정
- 간의 약물대사효소(phase II) 활성도 측정
- 간의 조직학적 변화 관찰

○ 다시마 물 추출물 및 fucoidan의 인간 간암 세포주 성장 및 전이능 억제효과 규명

- HepG2 세포주의 성장에 미치는 영향
- HepG2 세포주의 전이 능에 미치는 영향

3. 다시마의 유방암 및 유방암세포주의 성장 및 전이능 억제 효과 규명

○ DMBA로 암화과정을 유도한 쥐에서 다시마 및 푸코이단의 유방 암화과정 억제 효과

- DMBA로 유도한 유방암의 생성 및 성장측정
- DMBA를 투여한 쥐의 종양 및 유선조직의 조직학적 변화 관찰
- DMBA를 투여한 쥐의 종양 및 유선 조직의 세포 분열 정도 측정
- DMBA를 투여한 쥐의 종양에서 α-smooth muscle actin의 발현 관찰

○ 다시마 및 푸코이단이 DMBA로 암화과정을 유도한 쥐간의 phase II 효소 활성 및 지질과산화도에 미치는 영향

- DMBA를 투여한 쥐간 microsome에서 TBARS 함량 측정
- DMBA를 투여한 쥐간 cytosol에서 GST, GPx, GR 활성도 측정

○ DMBA로 암화과정을 유도한 쥐 혈액 효소 및 BUN, albumin 농도에 미치는 영향

○ 다시마 물 추출물 및 fucoidan의 인간 유방암 세포주 성장 및 전이능 억제효과

- MCF-7 및 MDA-MB-231의 성장에 미치는 영향
- MCF-7 및 MDA-MB-231의 전이능에 미치는 영향

4. 다시마를 이용한 응용제품의 개발

○ 다시마 쿠키의 제조 및 다시마 쿠키의 항산화력 측정

○ 다시마 매작과의 제조 및 다시마 매작과의 항산화력 측정

Ⅳ.연구개발 결과

1. 다시마분말 및 물 추출물의 항당뇨 효과 규명

○ 당뇨 쥐의 혈청 인슐린, 혈당 및 지질대사에 미치는 영향에 미치는 영향 상승효과 규명

다시마 첨가 식이는 첨가 형태에 관계없이 당뇨 쥐의 혈당을 유의적으로 저하시켰다. 고혈당은 산화적 스트레스를 유도하여 당뇨로 인한 대부분의 합병증의 원인이 되므로 다시마 섭취에 의한 혈당강하 효과는 고혈당으로 인한 산화적 스트레스를 억제하여 항당뇨 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 당뇨 쥐에 다시마 보충식이를 섭취시킨 결과 혈액중의 총 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤 양을 저하시켰고 특히 물 추출물의 형태로 보충하였을 때는 유의적으로 감소되었을 뿐 아니라 중성지방도 감소되는 경향을 보였다. 이렇게 당뇨로 인한 혈청지질 상승효과의 억제는 당뇨 합병증인 혈관계통 질환의 예방에 기여하리라 사료된다. 일반적으로 insulin 양이나 작용에 문제가 있는 당뇨병의 경우 포도당을 세포내로 수송하지 못하여 혈당이 증가되고 lipoprotein lipase(LPL) 작용의 부족으로 VLDL의 전환대사가 감소되어 혈중 TG의 농도가 증가하게 된다. 또한 말초조직의 인슐린 수용체의 활성도가 저해되어 혈중 LDL 분해가 감소함에 따라 혈중 콜레스테롤이 증가하게 된다. 본 연구에서 다시마 첨가 식이의 섭취는 혈중 인슐린 농도를 증가시켰으며 증가된 인슐린이 혈당 및 혈청지질의 조절에 기여하였을 것으로 사료된다. 당뇨 쥐에서 다시마의 섭취는 총 지질, 중성지질, 콜레스테롤의 배설을 증가시켰으며 다시마 섭취에 의한 지질배설의 증가 또한 당뇨 쥐에서 혈청지질의 개선에 기여하였을 것으로 사료된다.

○ 당뇨 쥐 신장의 산화적 스트레스에 미치는 영향규명

다시마 첨가식이가 당뇨 쥐 신장의 산화적 스트레스에 미치는 영향을 규명하기위하여 혈청 creatinine 농도와 TBARS 함량 및 항산화 효소활성을 측정한 결과 다시마의 섭취가 신장의 당뇨성 변화에 미치는 영향을 관찰할 수 없었다. 또한 다시마 첨가식이가 당뇨 쥐의 신장조직과 TGF-β의 발현 및 사구체 경화 등에도 유의적인 영양을 미치지 못했다.

따라서 다시마 첨가식이는 혈청 인슐린의 수준을 증가시킴으로써 혈당과 지질대사를 개선시키고 당뇨로 인해 발생하기 쉬운 혈관계질환의 합병증을 예방하는데 기여하였을 것으로 사료되나 신장의 산화적 스트레스를 억제하는 데는 기여하지 못하며 따라서 본 연구 결과에 의하면 당뇨성 신부전의 억제를 위해서는 혈당 강하효과와 별개로 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

2. 다시마의 간암 및 간암세포주의 전이능 억제 효과 규명

○ 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간의 암화과정 억제 효과 규명

본 연구에서 Ito의 중기 모델을 이용하여 (Initiator :DEN, Promoter : partial hepatectomy) GST-P 양성 병소를 유도하고 다시마분말, 물 추출물 및 푸코이단의 억제 효과를 살펴본 결과 다시마의 섭취는 화학적 발암원으로 유도한 쥐간에서 전암성 병변의 형성을 억제하였음을 관찰할 수 있었다. 일반적으로 GST-P 양성병소의 수는 개시정도를 면적은 촉진정도로 해석이 되므로 본 연구에서 다시마나 푸코이단의 섭취가 GST-P 양성 병소의 크기와 염색강도를 모두 감소시킨 것은 간세포 암화과정의 개시과정과 촉진과정을 모두 억제시킨다고 생각할 수 있다. 특히 GST-P 양성병소의 수는 다시마 분말과 물 추출물은 푸코이단보다 더 효과적으로 GST-P 양성병소의 수를 감소시켰으며 이는 다시마의 개시과정 억제효과는 단순히 푸코이단의 단독 작용 아니라 푸코이단 이외의 다른 물질이 억제효과를 상승시킨다고 볼 수 있다.

또한 GST 활성도를 측정한 결과 정상군(SSC)에 비해 발암원 처리군(DPC)이 유의적으로 증가하였다. 이때 증가된 GST는 투여된 발암원 및 발암원의 대사물을 해독화하기 위하여 유도되었으리라 생각된다. 발암원 처리 시에는 대조 식이군에 비해 다시마를 섭취한 군의 활성이 낮았고 그 효과는 다시마 분말<물 추출물<푸코이단의 순이었다. 쥐에서 화학적으로 간 세포암을 유도했을 때 CDNB에 대한 GST의 활성은 GGT 양성병소와 증식성 결절이 증가함에 따라 증가하였고 전암성 단계 이후 많이 발현되며 암화과정이 진행 될수록 발현이 증가되어 변형된 세포가 저항성을 갖게 함으로써 종양형성에 기여한다. 따라서 본 연구에서는 GST의 활성이 큰 DPC 군보다 상대적으로 활성이 낮은 DPS, DPW, DPF 군에서 암화과정의 진행이 억제된 것으로 보인다. 즉 다시마의 섭취는 암화과정의 진행을 억제시켰으며 그 효과는 푸코이단이 가장 컸다. 또한 GPx 활성도를 cytosol 분획에서 측정한 결과 정상군(SSC)에 비해 발암원 처리군(DPC)이 유의적으로 증가하였으며 발암원 처리 시 다시마를 섭취시키면 그 활성이 감소하였고 그 효과는 다시마 분말<물 추출물<푸코이단의 순으로 GST의 활성과 같은 경향이었다 쥐의 간세포 암화과정에서 전암성 병변이 생성됨에 따라 GPx의 활성은 증가한다하였으므로 본 연구에서 다시마의 섭취가 암화과정에서 발생하는 산화적 스트레스를 감소시켜 전암성 병변 내에서 유기 과산화물을 형성을 저하시키고 따라서 GPx의 활성을 감소시킨 것으로 사료된다. GR의 활성도는 실험군간 유의적인 차이를 보이지 않았으나 GST나 GPx와 비슷한 경향을 보였다. 간 microsome에 막 지질과산화정도를 측정하는 방법인 TBARS 함량을 측정한 결과, 지질과산화물이 발암원을 처리하여 암화과정을 유도하였을 때 증가하는 경향을 보였고 암화과정을 유도하면서 다시마를 섭취시킨 결과 유의적으로 감소하였다.

본 연구에서 TBARS 값을 2단계 약물 대사 효소 활성과 비교해 보면 암화과정동안 다시마의 섭취는 전암성 병변 내에서 지질과산화물의 생성을 억제하여 과산화물을 제거하기위한 2단계 약물 대사 효소의 활성 증가를 억제

시킨 것으로 사료된다.

○ 다시마 물 추출물 및 푸코이단의 인간 간암 세포주 성장 및 전이능 억제효과 규명

다시마 물 추출물 및 푸코이단은 모두 인간 간암세포주인 HepG2의 성장을 억제시켰으며 이는 투여용량에 의존적(dose-dependant)이었다. 또한 HepG2 세포주의 전이능에 미치는 영향을 살펴 본 결과 다시마 물 추출물과 푸코이단은 adhesion을 감소시켰으나 암세포의 침윤과 전이단계에서 중요한 역할을 하는 MMP2 및 MMP9의 발현을 억제시키지는 못했다.

3. 다시마의 유방암 및 유방암세포주의 성장 및 전이능 억제 효과규명

○ DMBA로 암화과정을 유도한 쥐에서 다시마 및 푸코이단의 유방 암화 과정 억제 효과 규명

종양은 DMBA 투여한 실험군 48마리 중에서 21마리에서 발생되었으나, 대조군에서는 발생되지 않았다. 총 발생 종양 수는 114개 발생했으며, 종양의 평균무게는 18.6±7.98g이었다. DMBA 투여 후 기간별 종양 생성여부 및 종양 수를 관찰한 결과 8주부터 종양이 생기기 시작하였다. 11주부터 DC군의 종양 발생률이 빠르게 증가하여 희생 직전인 14주에는 10마리 중에서 9마리(90%)가 발생되어 가장 높은 종양 발생률을 보였다. DF군도 꾸준히 증가하여 14주에는 11마리 중에서 9마리에서 (81.8%) 유방 종양이 발생되었고, DW군은 10마리 중에서 7마리에서 발생되었고(70%), DS군은 11마리 중에서 6마리(54.5%)로 가장 낮은 종양 발생률을 보였다. 최종적으로 희생 직전의 마리당 평균 종양 수는 DF군은 3.55±0.72개로 가장 높았고, DC군은 3.1±0.61개, DW군은 2.5±0.56개, DS군은 1.73±0.54개로 가장 낮게 나타났으나 통계적으로 유

의한 차이는 없었다.

유선 상피세포의 증식 정도를 살펴보면, 암화과정을 유도하지 않은 정상군(NC군)의 경우 정상적인 세포의 구조를 유지하고 있었으나, NC군과 비교 시 DC군의 유선과 도관의 상피세포는 증식이 증가되어 multilayer(다층 구조) 구조를 보였다. 반면, DC군과 비교 시 DS, DW, DF군의 상피세포는 증식이 감소되었다. 따라서 다시마는 유선 상피세포의 증식을 감소시켜 암 발생을 억제시킨 것으로 사료된다. 또한 유선의 분열 여부를 알아보기 위하여 분열하는 세포의 DNA 증식 과정 중 S-phase에서 thymidine을 대신하여 결합하는 BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine)를 이용하여 세포의 증식을 측정하는 지표인 BrdU 면역조직화학 검사를 하여 다시마가 유선세포 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. NC, DW, DF군의 유선에서는 BrdU 양성세포가 나타나지 않았고, DS군은 단지 작은 수의 BrdU 양성세포를 관찰하였다. 그러나 DC군의 유선은 분열중인 상피세포에서 BrdU 양성세포가 관찰되었다. 따라서 다시마는 유선 상피세포의 증식을 감소시키는데 작용하여 암 발생을 억제할 수 있다고 사료된다.

한편 각 군의 종양조직에서 유선과 도관 상피세포의 분화 정도와 tumor cell 증식 형태의 조직학적 차이를 관찰한 결과 DC군의 유선암은 주로 solid carcinoma를 보여 다른 군과 비교 시 유선암 형태가 다르고, 암화과정이 진행된 형태를 보여주는 neoplastic tumor cells의 수가 높게 관찰되었다. 반면, DC군과 비교시 DS, DW, DF군의 유선암은 주로 cystic adenocarcinoma 혹은 papillary adenocarcinoma 형태를 보였고, neoplastic cell의 수가 작게 관찰되었다. 각 군의 종양조직에서 BrdU 결합에 관한 면역조직학적 관찰 결과 DS, DW, DF,군의 종양조직에서는 solid mass에서 많은 BrdU 양성세포들을 보인 DC군에 비해 BrdU 양성 세포들의 개체수가 감소된 것으로 관찰되었다.

다시마가 종양조직의 근육상피세포(myoepithelial cell) 분화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 α-smooth muscle actin의 발현을 살펴본 결과, DS, DW, DF군은 DC군과 비교시 α-smooth muscle actin 발현이 증가되어 더 분화되고 조직화된 선의 구조를 보이는 근육상피세포를 유지하고 있음을 알 수 있었다. 대조적으로, DC군 종양에서 α-smooth muscle actin 발현은 강도와 빈도에서 감소되었을 뿐 아니라 종양 내 근육상피세포로 구성된 조직의 분괴 형태가 많이 관찰되었다.

○ 다시마 및 푸코이단이 DMBA로 암화과정을 유도한 쥐간의 phase II 효소 활성도 및 지질과산화도에 미치는 영향

많은 발암물질의 대사에서 glutathione S-transferase(GST)는 해독화 과정으로 생각되고 있다. 본 연구에서 GST활성도를 측정한 결과 정상군에 비해 DS군이 증가하였고, DF군에서는 가장 낮게 나타났다. 이때 증가된 GST는 투여된 발암원 및 발암원의 대사물을 해독화하기 위하여 유도되었으리라 생각된다. Glutathione peroxidase(GPx) 활성도를 비교해 보면 정상군(NG)에 비해 발암원 처리군인 DC군에서 증가하였으며, DF군< DS군 < DW군 순으로 증가하였지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. Glutathione reductase(GR)의 활성도 또한 실험군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

○ 다시마 및 푸코이단이 DMBA로 암화과정을 유도한 쥐의 혈청 효소에 미치는 영향

다시마 및 푸코이단의 섭취는 혈청 GOT, GPT, LDH(lactate dehydrogenase)의 활성 및 BUN(blood urea nitrogen), albumin의 농도에 유의적인 영향을 주지 않았다.

○ 다시마 물v추출물 및 fucoidan의 인간 유방암 세포주 성장 및 전이능 억제효과 규명

세포별로 보면, 유방암 세포 MCF-7, MDA-MB-231 세포주 모두 50㎍/㎖ 농도의 다시마 물 추출물이나 푸코이단에 의해 유의적으로 성장이 억제되었으며 100㎍/㎖ 농도에서는 억제 효과가 더 컸다.

다시마 물 추출물과 푸코이단이 두 유방암 세포주의 전이능에 미치는 영향을 살펴보고자 adhesion assay와 Cell motility assay를 실시한 결과 두 세포주 모두 다시마 물 추출물과 푸코이단에 의해 adhesion이 감소되었다. MCF-7 세포의 경우 물 추출물과 푸코이단 모두100㎍/㎖의 농도로 처리했을 때만 adhesion이 유의적으로 감소되었으나 MDA-MB-231 세포는 50㎍/㎖로 처리하였을 때도 대조군에 비해 유의적으로 감소되었으며 100㎍/㎖농도로 처리 시는 더 감소되었다. 그러나 다시마 물 추출물이나 푸코이단 모두 암세포의 증식, 침윤, 전이 및 종양 등을 활성화시키는데 기여하는 MMP 발현에는 영향을 주지 못한 것으로 나타났다.

4. 다시마를 이용한 응용제품의 개발

○ 다시마 쿠키의 제조 및 다시마 쿠키의 항산화력 측정

다시마 쿠키의 퍼짐성 지수는 다시마 분말 첨가량이 많을수록 적은 것으로 나타났다. 쿠키의 수분함량은 다시마 분말 첨가량이 많을수록 높았으며, 대조군은 3.31로 유의적으로 가장 낮은 수분함량을 보였다. 다시마 쿠키의 부피는 대조군에 비해 다시마 분말을 첨가한 쿠키의 부피가 더 많이 증가되는 것으로 나타났다. 쿠키의 밝은 정도를 나타내는 L값은 대조군이 유의적으로 가장 밝게 평가되었으나 다시마 분말 3% 첨가군과는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 시료의 붉은 정도를 나타내는 a값은 다시마 분말 9% 첨가군이 유의적으로 특성이 강한 경향을 나타내었고 나머지 시료들은 유의차를 보이지 않았

다. 쿠키의 노랑정도를 나타내는 b값에서는 다시마 분말을 3% 첨가한 쿠키가 유의적으로 가장 높은 수치를 나타내었다. 다시마 분말을 다양한 수준으로 대체한 쿠키의 경도를 rheometer로 측정한 결과, 다시마 분말을 첨가한 시료군이 대조군에 비하여 높은 경향을 나타냈으나 다시마 분말 3%와 6% 첨가군 간에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 관능검사를 실시한 결과 쿠키의 색은 대조군이 가장 높게 나타났으며 9% 첨가군은 가장 낮은 점수를 보였다. 쿠키의 맛, 풍미, 조직감에 있어서도 3% 첨가군이 가장 높은 점수를 보여 전반적인 기호도 또한 3% 첨가 쿠키가 가장 높았다. 다시마 분말 쿠키의 기호도 검사 결과, 쿠키의 외관, 고소한 향미, 조직감 등에서 3% 첨가군이 가장 높아 전반적인 기호도 또한 가장 높았다.

지질의 산가는 3%와 6% 첨가 쿠키에서 가장 낮게 나타나 지질의 산화 억제에 효과적이었다. 다시마 분말 첨가 쿠키의 저장 중 과산화물가를 측정한 결과 저장기간 동안 증가를 보인 대조군에 비해 다시마 분말 3%와 6% 첨가 쿠키는 상당히 안정한 효과를 보였으며, 9% 첨가 쿠키에서는 대조군보다 낮았다. 다시마 분말 쿠키의 저장에 따른 TBA가의 변화는 모든 실험군에서 저장 전 기간을 통하여 증가하였다. 다시마 분말 쿠키의 TBA가는 전반적으로 대조군에 비해 낮은 값을 나타내 지방의 산화를 지연시켰음을 알 수 있었다. 다시마 분말 첨가량에서는 3%와 6% 첨가 쿠키가 9% 첨가쿠키보다 낮은 TBA가를 나타내어 산가와 유사한 결과를 보였으며, 대조군이 가장 높게 나타났다.

O 다시마 매작과의 제조 및 다시마 매작과의 항산화력 측정

다시마 추출물을 기질 대두유에 첨가한 뒤 50℃에서 30일간 저장하면서 산가, 과산화물가 및 TBS가를 측정한 결과, 각 용매별 추출물은 대조군에 비해 항산화 효과는 높으며 과산화물가와 TBA가는 낮은 값을 보였다. Rancimat 방법에 의해 다시마 용매추출물의 대두유에 대한 항산화력을 측정

한 결과 MeOH 추출군은 BHT군에 비해 항산화 효과가 높게 나타났으며, EtOH추출군은 BHT군보다는 낮았으나 다른 시료 군과 비교했을 때 높은 항산화력을 보였다.

다시마 분말을 첨가한 매작과의 저장에 따른 지질의 산가 변화를 나타낸 것으로 저장 10일까지는 완만히 증가하다가 그 후로 급격히 증가하였다. 다시마 분말 첨가량에 따른 변화를 살펴보면 대조구보다 첨가군 에서 훨씬 낮게 나타나 다시마 추출물이 매작과의 저장 동안 중성지방의 ester결합의 가수분해로 인한 유리 지방산의 생성을 억제하는데 효과적임을 보여 주었다. 반면 다시마 분말 첨가량이 많은 15%에서는 저장 30일 이후부터 저장 40일까지 대조군과 큰 차이가 없이 거의 비슷하게 산가가 높게 나타나 지방의 산패를 억제하는데 효과가 떨어지는 것으로 나타났다. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 저장 중 과산화물가를 측정한 결과 대조군의 경우 저장 30일 경에 38 meq/kg 로 가장 높은 과산화물가를 나타내다가 그 후에는 감소하였다. 한편 다시마 분말 3% 와 9% 첨가군은 대조군에 비해 안정한 효과를 보여 지방의 산화를 억제함을 알 수 있었으며, 모든 시료에서 30일 이후부터는 감소하는 경향을 보였다 다시마 분말을 첨가한 매작과의 저장에 따른 TBA가의 변화를 측정한 결과 모든 실험군에서 저장기간이 증가함에 따라 TBA가는 점차로 증가하였으나, 다시마 분말을 첨가한 매작과의 TBA가가 전반적으로 대조군에 비해 낮은 값을 나타내 지방의 산화를 지연시켰음을 알 수 있었다. 다시마 분말 첨가군에서는 3%와 9% 첨가군이 대조군보다 낮은 값을 나타내 지방의 산화를 지연시켰음을 알 수 있었지만, 15% 첨가군은 저장 30일 이후에는 대조군보과 거의 비슷하게 나타나 오히려 지방의 산화를 촉진시키는 것으로 나타났다.

V.연구개발 결과의 활용계획

본 연구결과를 이미 2005년에는 11월 한국영양학회 학술대회 논문발표(1편) 하였으며, 또한 2006년에는 5월에 한국영양학회 학술대회 논문발표(2편), 10월에 한국식품영양과학회 학술대회 논문발표(2편)를 하였으며, 2007년에는 대만아시아 영양학회 학술대회 논문발표(1편)를 하였고 한국영양학회 학술대회 논문발표(2편), 학술지에는 2006년에 1편, 2007년에 1편을 게재하였으며, 2005년 10월에 열린 목포해양문화축제에 다시마 쿠키를 직접 제작하여 웰빙 먹거리로 홍보활동을 하였으며, 2007년 8월에는 다시마를 이용한 기능성 식품개발 전시 및 시식회(웰빙시대에 걸맞는 신비한 건강여행)를 JS Cuisine에서 선보여 광주시민에게 웰빙 먹거리인 다시마 쿠키, 다시마 매작과 등의 다시마를 이용한 요리를 직접 맛볼 수 있는 기회를 제공함으로써 다시마를 널리 홍보하였고, 2007년 10월 다시마 추출물을 추출하는 방법을 제시하고, 상기 다시마로부터 추출물을 추출하여 간암과 유방암 억제 및 유방암 억제 및 생리활성을 증가시킬 수 있는 건강식품 등의 용도로 사용가능한 "다시마 추출물을 추출하는 방법 및 다시마 추출물"에 관한 특허 출원하였다.

여 백

SUMMARY

I. Title

Anti-diabetic and Anti-cancer effect of sea tangle and development of food product with sea tangle

II Purpose of Research

1. Examination of the effect of sea tangle on the diabetes mellitus
2. Examination of the effect of sea tangle and fucoidan on the liver cancer
3. Examination of the effect of sea tangle and fucoidan on the breast cancer
4. Development of food product made by sea tangle and examination of antioxidative effect and quality characteristics

III Content of research

1. Examination of anti-diabetic effect of sea tangle

1) Effect of sea tangle on the insulin level in diabetic rats
2) Effect of sea tangle on the blood glucose in diabetic rats
3) Effect of sea tangle on the lipid metabolism in diabetic rats
4) Effect of sea tangle on the renal oxidative stress in diabetic rats

2. Examination of protective effect of sea tangle and fucoidan on the liver cancer

1) Effect of sea tangle and fucoidan on the hepatocellular carcinogenesis in the rats
2) Inhibitory effect of sea tangle and fucoidan on the proliferation of HepG2 cell
3) Effect of sea tangle and fucoidan on the metastasis of HepG2 cells

3. Examination of protective effect of sea tangle and fucoidan on the breast cancer

1) Effect of sea tangle and fucoidan on the carcinogenesis of mammary gland in the rats
2) Inhibitory effect of sea tangle and fucoidan on the proliferation of human breast carcinoma cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231)
3) Effect of sea tangle and fucoidan on the metastasis of human breast carcinoma cell lines

4. Development of food product using sea tangle

1) Development of food product(cookie and *Maejakgwa*) made by sea tangle
2) Antioxidative effect of sea tangle and quality characteristics
3) Antioxidative effects of sea tangle solvent extracts

Ⅳ Result of research

1. Anti-diabetic effect of sea tangle

Serum insulin was increased by dietary supplementation of sea tangle in the diabetic rats. Blood glucose levels of diabetic rats supplemented with dietary sea tangle powder or water extract were lower than that of diabetic rats fed control diet. Dietary sea tangle also reduced serum total cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride in diabetic rats. Hepatic lipids were reduced and fecal excretion of lipids was increased in the diabetic rats supplemented with dietary sea tangle. These results indicate that dietary sea tangle decreased blood glucose and improved the lipid metabolism in STZ-induced diabetic rats and this effect might be exerted by increases in serum insulin and fecal excretion of lipids.

We investigated the effect of dietary supplementation of sea tangle on the pathological scoring of diabetic kidneys in streptozotocin(STZ) induced diabetic rats. However, dietary supplementation of sea tangle did not play a role in pathology of diabetic kidneys. We also investigated the effect of supplementation of dietary sea tangle on antioxidant enzyme activity as indices of oxidative stress in diabetic rats. Sea tangle supplementation had no effect on plasma creatinine level. Dietary supplementation with sea tangle powder significantly increased activity of glutathione S-transferase. However there was no significant difference among the experimental groups in renal malondialdehyde levels, a marker of lipid peroxidation, and the activity of antioxidant enzyme(GPx and GR) in renal tissue. These results indicate that decreased blood glucose by increased insulin is not linked with protection against diabetic kidneys in the diabetic rats

supplemented with sea tangle.

2. Protective effect of sea tangle and fucoidan on the liver cancer

We examined the anti-cancer effect of sea tangle and fucoidan, in vivo and in vitro. First, in vivo anticarcinogenic effect was examined to show the preventive effect of sea tangle (powder, water extract) and fucoidan on the hepatocellular- carcinogenesis. Food efficacy and liver weight/body weight were not significantly different among the groups. GST-P+ foci were expressed in the liver induced carcinogenesis by DEN and PH. Dietary sea tangle decreased the frequency of GST-P+ foci, TBARS content, and activities of GST and GPx in the rat liver induced hepatocellular carcinogenesis. Water extract of sea tangle was most effective in decreasing the frequency of GST-P+ foci. Fucoidan also decreased the frequency of GST-P+ foci, TBARS content, and activities of GST and GPx in the rat liver induced hepatocellular carcinogenesis. This result suggests that dietary sea tangle and fucoidan suppress the chemically induced hepatocellular carcinogenesis in the rats.

We also determined the effect of water extract of sea tangle and fucoidan on the proliferation of HepG2 cells. Both of water extract and fucoidan inhibited proliferation of HepG2 cells dose dependently.

Finally, We analyzed the adhesion and the activities of MMP2 and 9 of HpeG2 cells to determine the effect of water extract of sea tangle and fucoidan on the metastasis of HepG2cells. Both of water extract and fucoidan didn't inhibit adhesion of HepG2 cells at the concentration of 50$\mu g/m\ell$ and 100$\mu g/m\ell$. MMP2 and 9 activities were not affected by both of water extract and fucoidan treatment.

3. Protective effect of sea tangle and fucoidan on the breast cancer

The purpose of this study is to examine the effect of sea tangle and fucoidan on the carcinogenesis of breast in the rats treated with DMBA.

Intake of diet and weight were not significantly different among groups. We found no tumor in normal rats which were administered just carrier instead of DMBA. The rats treated with DMBA had tumors regardless of diet. After 14 weeks after DMBA treatment, the tumor incidence of rats fed control diet was highest among the DMBA treated groups. Sea tangle powder, water extract and fucoidan lowered tumor incidence.

Histological feature in mammary gland of each group showed differences in the degree of proliferation of glandular and ductular epithelial cells. The mammary gland of DC (DMBA+control diet) group revealed increased level in proliferation of glandular and ductular epithelial cells compared with the NC(Normal+control diet) group. DS(DMBA+sea tangle powder), DW(DMBA+water extract), DF(DMBA +fucoidan) groups revealed decreased level of epithelial cell proliferation compared with DC group. NC, DW, DF group showed no BrdU positive cells in mammary gland and DS group revealed only small number of BrdU positive cells. However, DC group showed a few BrdU positive cells in proliferative epithelium of mammary gland. Histological feature in mammary gland tumor of each group showed differences in the degree of differentiation of glandular and ductular epithelial cells and pattern of tumor cell proliferation. According to immunohistochemical findings for BrdU incorporation in mammary gland tumor of each group, DS, DW, DF group showed decreased population of BrdU positive cells in mammary

gland tumor compared with DC group. Immunohistochemical findings for expression of alpha smooth muscle actin in mammary gland tumor of each group . DS, DW, DF groups reveal increased alpah smooth muscle expression level in myoepithelial cells indicating more differentiated histological appearance and more organized glandular structure compared with DC group. In contrast, the expression for alpha smooth muscle actin in DC group tumors is not only decreased in intensity and frequency, but also shows a more randomly disorganized pattern showing undifferentiated status of mammary gland tumor

There were no significant differences in TBARS content, and activities of GST, Gpx and GR among groups. This result suggest that sea tangle and fucoidan didn't have protective role on the oxidative stress by DMBA treatment. We determined the activities of serum ALT, AST and BUN content but we found no differences among groups.

We also determined the effect of water extract of sea tangle and fucoidan on the proliferation of human breast carcinoma cell lines. We chose as a model two human breast carcinoma cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. Both of water extract and fucoidan inhibited proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells dose dependently.

We analyzed the adhesion and the activities of MMP2 and 9 to determine the effect of water extract of sea tangle and fucoidan on the metastasis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Both of water extract and fucoidan inhibited adhesion of MCF-7 and MDA-MB-231 cells at the concentration of 50$\mu g/m\ell$ and 100$\mu g/m\ell$. MMP2 and 9 activities were not affected by both of water extract and fucoidan treatment in MDA-MB-231 cells. However, MMP2 and 9 activities were reduced by treatment of

water extract and 100㎍/㎖ of fucoidan in MCF-7 cells. To summarize theses results, sea tangle inhibited the tumorigenesis of mammary gland in vivo, and the growth of human breast carcinoma cell lines but not effectively inhibited the activities of MMP.

Development of food product with sea tangle

We developed cookies and *Maejakgwa* Made with sea tangle powder and determined antioixdative effect of sea tangle and quality characteristics.

The cookies were stored at 30℃ for 45 days. The 3% sea tangle powder(STP) had higher pH value compared to the other groups and control. As more STP was added, the L-value and b-value decreased, and the a-value increased for the color values. The results of sensory evaluation and acceptance test showed that the cookies with 3% STP was significantly more preferable in overall acceptability than the others. The acid value, peroxide value, and thiobarbituric acid value were lower in cookies with 3% and 6% STP than in those cookies made 9% STP and the control cookies.

Acid value of *Maejakgwa* was increased during the storage time, but it was lower in *Maejakgwa* made with STP than in the control group. Peroxide value was increased rapidly for 30 days and then decreased. TBA value was lower in *Maejakgwa* made with 3, 9% STP power than in those made with 15% STP and the control.

We also determined the antioxidative effects of STP solvent extracts and *Maejakgwa* made with STP. The solvent extracts of STP were added to soybean oil in the quantity of 0.05%. The solvents used were methanol, ethanol, ethyl acetate and petroleum ether. Soybean oil without the

addition of STP was used as a negative control. Soybean oil with 0.02% butylated hydroxytolune(BHT) and α-tocopherol were used as positive controls. Each sample was stored at 50℃ for 30 days. The oxidation level of these samples was determined by measuring the acid value, peroxide value and thiobarbituric acid(TBA) value. The oxidation level of solvent extracts of 0.05% STP was lower than both the negative control and α -tocopherol. Especially, methanol extract of 0.05% STP was the lowest. The methanol extract (316 min) and ethanol extract (309 min) demonstrated longer induction periods, compared to the control (255 min), α -tocopherol(281min) and EA (256 min) by Rancimat method.

We can conclude, on the basis of the results, that sea tangle has antidiabetic and anticancer effect. Sea tangle also has an antioxidative effect during the storage of food products made with sea tangle and quality characteristics including preference of the producted is increased.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ---------- 39

Chapter 2. Present condition of domestic and foreign technical development & information in science and technology ----------41

1. Status of related researches and controversial point----------41

Chapter 3. Content and results of research ----------43

Verse 1. Examination of anti-diabetic effect of sea tangle --------43

(1) Methods ----------43

1. Production of water extracts of sea tangle powder----------43
2. Animal and diet ----------43
3. Methods ----------44
   1) Induction of diabetes
   2) Body weigh and, intake of diet and water
   3) Preparation of samples
   4) Analysis of samples
      ① Serum insulin
      ② Blood glucose
      ③ Collection of feces
      ④ Serum, hepatic and fecal lipid
      ⑤ Histological examination of kidney

(2) Results ----------47

1. Body weight and Intake of diet and water ----------47
2. Effect of sea tangle on serum insulin ----------49
3. Effect of sea tangle on blood glucose ----------50
4. Effect of sea tangle on serum lipids ----------51
5. Effect of sea tangle on the hepatic and fecal lipids ----------53
6. Effect of sea tangle on the pathology of diabetic kidney---------56
7. Effect of sea tangle on the renal oxidative stress ----------59
   1) Serum creatinine
   2) Renal content of microsomal TBARS
   3) Renal glutathione dependant antioxidative enzyme activities

Verse 2. Examination of protective effect of sea tangle and fucoidan on the liver cancer ----------65

(1) Methods ----------65

1. Effect of sea tangle and fucoidan on the hepatocellular carcinogenesis in the rats ----------65
   A. Production of water extracts of sea tangle powder
   B. Animals
   C. Diet and Induction of carcinogenesis
   D. Samples and preparation
   E. Immunohistochemical examination
      (placental glutathione S-transferase)
   F. Biochemical examination
      ① Content of thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS)

② Activity of glutathione S-transferase(GST)
③ Activity of glutathione peroxidase(GPx)
④ Activity of glutathione reductase(GR)
⑤ Content of protein

2. Inhibitory effect of sea tangle and fucoidan on the proliferation and metastasis of HepG2 cell ----------69
A. Cell lines and culture
B. Cell Proliferation Assay
C. Cell Adhesion Assay
D. Gelatin zymography
E. Statistical analysis

(2) Results ----------71
1. Effect of sea tangle and fucoidan on the hepatocellular carcinogenesis in the rats ----------71
A. Diet efficacy, body weight and liver weight ----------71
B. Effect of sea tangle and fucoidan on the serum GOT and GPT ----------72
C. Effect of sea tangle and fucoidan on the hepatic preneoplastic lesions ----------73
D. Effect of sea tangle and fucoidan on the TBARS content and activities of phase II enzyme ----------77
E. Effect of sea tangle and fucoidan on the hepatic histology --81

2. Inhibitory effect of sea tangle and fucoidan on the proliferation and metastasis of HepG2 cells ----------83

A. Effect on the cell Proliferation of HepG2 cells

B. Effect on the adhesion of HepG2 cells

C. Gelatin zymography of HepG2 cells

Verse 3. Examination of protective effect of sea tangle and fucoidan on the breast cancer ----------87

(1) Methods ----------87

1. Effect of sea tangle and fucoidan on the carcinogenesis of mammary gland in the rats ----------87

A. Production of water extracts of sea tangle powder

B. Animals and administration of DMBA

C. Tumor incidence, number and weight

D. Histopathological examination

E. Immunohistochemical examination

2. Effect of sea tangle and fucoidan on the hepatic antioxidative enzyme and serum enzyme activities in the rats treated DMBA ----------89

A. Content of thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS)

B. Activity of glutathione S-transferase(GST)

C. Activity of glutathione peroxidase(GPx)

D. Activity of glutathione reductase(GR)

E. Content of protein

F. Serum enzyme activities and BUN content

3. Inhibitory effect of sea tangle and fucoidan on the proliferation and metastasis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells ----------90

A. Cell lines and culture

B. Cell Proliferation Assay

C. Cell Adhesion Assay

D. Gelatin zymography

E. Statistical analysis

(2) Results ----------92

1. Effect of sea tangle and fucoidan on the carcinogenesis of mammary gland in the rats ----------92

A. Diet efficacy, body weight

B. Tumor incidence, number and weight

C. Histological examination of mammary glands and tumors

D. Immunohistochemical examination of mammary glands and tumors with BrdU and α-SMA antibodies

2. Effect of sea tangle and fucoidan on the content of TBARS and activities of phase II enzyme ----------102

3. Inhibitory effect of sea tangle and fucoidan on the proliferation and metastasis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells ----------103

A. Effect on the cell Proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells

B. Effect on the adhesion of MCF-7 and MDA-MB-231 cells

C. Gelatin zymography of MCF-7 and MDA-MB-231 cells

Verse 4. Development of food product with sea tangle

- Sea tangle Cooky ----------111

(1) Methods ----------111

1. Experimental material and method ----------111

A. Experimental material

B. Mix proportion of Cooky

C. Production method of cooky

D. pH and density of dough

E. Water content and spread of cooky

F. Volume of cooky

G. Color parameter of cooky

H. Texture properties of cooky by Rheometer

J. **Sensory properties** of cooky

K. Acceptance test of cooky

L. Lipid extration and **antioxidative effect of cooky**

M. Statistical analysis

(2) Results ----------116

1. pH and density of dough ----------116

2. Water content, spread and volume of cooky ----------117

3. Color parameter of cooky ----------118

4. Texture properties of cooky ----------119

5. Sensory properties ----------120

6. Acceptance test ----------121

7. Antioxidative effect of cooky ----------122
A. Changes of acid value in lipid extracted from cooky
B. Changes of peroxide value in lipid extracted from cooky
C. Changes of TBA value in lipid extracted from cooky

Verse 5. Development of food product with sea tangle
- Sea tangle Maejakgwa ----------127
(1) Methods ----------127
1. Experimental material and reagent ----------127
2. Production of extracts of sea tangle powder ----------127
3. Production of soybean oil added extracts of sea tangle powder and antioxidative effect of soybean oil ----------128
4. Production of maejakgwa added sea tangle powder ---------128
5. Antioxidative effect of maejakgwa added sea tangle powder-129

(2) Results ----------131
1. Oxidative stability of solvent extracts of sea tangle powder by oven method ----------131
2. Oxidative stability of solvent extracts of sea tangle powder by rancimat method ----------133
3. Changes of acid value of maejakgwa added sea tangle powder ----------134
4. Changes of peroxide value of maejakgwa added sea tangle powder ----------136

5. Changes of TBA value of maejakgwa added sea tangle powder ----------137

Chaper 4. Standard of goal-attainment in research and development & standard of contribution to the related fields ----------139

Verse 1. Annual Aims and Contents of Research and Development----------139

Verse 2. Check points of evaluation ----------143

Verse 3. Standard of contribution to the technical development of the related fields ----------145

Chapter 5. A plan for practical application of the results of research and development ----------149

Chapter 6. References----------153

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요 ----------39

제 2 장. 국내·외 기술개발 현황 및 과학기술정보 ----------41

1. 국내·외 관련연구의 현황과 문제점 ----------41

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과 ----------43

제1절 . 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 항 당뇨 효과 규명 ----------43

(1) 연구방법 ----------43

1. 다시마 물 추출물 제조----------43
2. 실험동물 및 식이 ----------43
3. 실험 방법 ----------44

가. 당뇨유도

나. 체중, 식이 섭취량 및 수분 섭취량

다. 시료 수집 및 전 처리

라. 시료 분석

① 혈청 지질 혈중 인슐린 농도 측정

② 혈당

③ 변 수집

④ 지질 혈중 인슐린 농도 측정

⑤ 신장의 조직학적 검사

(2) 연구결과 ----------47
1. 식이 섭취량 및 수분 섭취량, 체중 ----------47
2. 인슐린 농도 저하 억제 효과 ----------49
3. 다시마 식이의 혈당상승 억제 효과----------50
4. 혈청지질 농도 상승 억제 효과 ----------51
5. 다시마의 섭취가 당뇨 쥐에서 간 및 변의 지질 함량에 미치는 영향 ----------53
6. 신장의 병리학적 변화에 미치는 영향 ----------56
7. 다시마의 섭취가 당뇨 쥐에서 신장의 산화적 스트레스 억제에 미치는 영향 ----------59
가. 혈청 크레아티닌(creatinine) 농도에 미치는 영향
나. 신장 microsome 의 지질과산화물(TBARS)의 형성에 미치는 영향
다. 신장의 glutathione 의존성 항산화 효소계에 미치는 영향

제 2절. 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 간암 억제 효과 규명 ----------65
(1) 연구방법 ----------65
1. 다시마의 간세포 암화과정 억제효과 규명 ----------65
가. 다시마 물 추출물 제조
나. 실험동물의 사육
다. 실험식이 및 발암물질의 투여
라. 시료 수집 및 전처리
마. 면역조직화학적 검사 (태반형 glutathione S-transferase)
바. 생화학적 검사

① Thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS) 함량측정
② Glutathione S-transferase(GST)의 활성도
③ Glutathione peroxidase(GPx)의 활성도
④ Glutathione reductase(GR)의 활성도
⑤ 단백질 함량의 측정
2. 간암 세포주의 성장 및 전이능에 미치는 영향 ----------69
가. 세포주 및 배양 조건
나. Cell Proliferation Assay
다. Cell Adhesion Assay
라. Gelatin zymography
마. 통계학적 처리

(2) 연구결과 ----------71
1. 다시마의 간세포 암화과정 억제효과 규명 ----------71
가. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐의 식이효율, 체중, 간무게에 미치는 영향 ----------71
나. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐에서 혈청 GOT 및 GPT에 미치는 영향 ----------72
다. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐간의 전암성 병변 형성에 미치는 영향 ----------73
라. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐간의 phase II 효소 활성도 및 지질과산화도에 미치는 영향 ----------77
마. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐간의 조직학적 변화에 미치는 영향 ----------81
2. 간암 세포주의 성장 및 전이능에 미치는 영향 ----------83

제 3절. 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 유방암 억제 효과 규명 ----------87
(1) 연구방법 ----------87
1. In vivo에서 DMBA로 유도한 유방 암화과정에 미치는 영향 ----87
가. 다시마 물 추출물 제조
나. 실험동물 및 실험설계
다. 유방 종양 보유율과 종양개수 및 종양 무게 측정
라. 조직병리학적 검사
마. 면역 조직화학적 검사
2. DMBA를 처리한 쥐간의 항산화 효소 및 혈액 효소 활성에 미치는 영향 ----------89
가. Thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS) 함량측정
나. Glutathione S-transferase(GST)의 활성도
다. Glutathione peroxidase(GPx)의 활성도
라. Glutathione reductase(GR)의 활성도
마. 단백질 함량의 측정
바. 혈청의 효소 활성 및 BUN, albumin 함량 측정
3. 유방암 세포주의 성장에 미치는 영향----------90
가. 세포주 및 배양 조건
나. Cell Proliferation Assay
다. Cell Adhesion Assay
라. Gelatin zymography
마. 통계학적 처리

(2) 연구결과 ----------92

1. 다시마가 화학적으로 유도한 유방의 암화과정 억제효과 ----------92

가. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐의 식이효율과 체중에 미치는 영향 ----------92

나. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐에서 유방종양 보유율과 종양개수 및 종양무게에 미치는 영향 ----------93

다. 다시마가 유방암을 유도했을 때 유방조직 및 종양의 조직학적 변화에 미치는 영향 규명 ----------95

2. 다시마 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐간의 phase II 효소 활성도 및 지질과산화도에 미치는 영향 ----------102

3. 다시마가 암세포의 성장 및 전이능에 미치는 영향 규명 --------107

제 4절 다시마를 이용한 응용제품 개발 - 다시마 쿠키 -111

(1) 연구방법 ----------111

1. 실험재료 및 제조방법 ----------111

가. 실험재료

나. 쿠키의 재료 배합비

다. 쿠키의 제조방법

라. 반죽의 pH와 밀도 측정

마. 쿠키의 수분함량 및 퍼짐성 측정

바. 쿠키의 부피측정

사. 쿠키의 색도 측정

아. Rheometer에 의한 Texture 특성

자. 쿠키의 관능검사

차. 쿠키의 기호도 검사

카. 저장기간에 따른 쿠키의 유지 추출과 항산화 효과 측정
타. 통계처리
(2) 연구결과 ----------116
1. 반죽의 밀도 및 pH ----------116
2. 쿠키의 퍼짐성, 수분함량 및 부피 ----------117
3. 쿠키의 색도 ----------118
4. Rheometer에 의한 Texture 특성 ----------119
5. 관능검사 ----------120
6. 기호도 검사 ----------121
7. 저장 중 쿠키의 항산화 효과 ----------122
가. 산가의 변화
나. 과산화물가의 변화
다. TBA가의 변화

제 5절. 다시마를 이용한 응용제품 개발-다시마 매작과---127
(1) 연구방법 ----------127
1. 실험재료 및 시약 ----------127
2. 다시마 추출물의 제조 ----------127
3. 다시마 추출물을 첨가한 식용대두유의 제조와 항산화력 측정 -128
4. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 제조 ----------128
5. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 항산화력 측정 ----------129
(2) 연구결과 ----------131
1. Oven법에 의한 다시마 용매추출물의 산화 안정성 ----------131
2. Rancimat 방법에 의한 다시마 용매추출물의 산화 안전성 ------133
3. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 산가 ----------134

4. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 과산화물가 ----------136
5. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 TBA가 ----------137

제 4 장. 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도----139

제 1 절. 연차별 연구개발목표와 내용 ----------139

제 2 절. 평가의 착안점 ----------143

제 3 절. 관련분야에의 기술발전에의 기여도 ----------145

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획 ----------149

제 6 장. 참고문헌 ----------153

여 백

제 1 장. 연구개발과제의 개요

다시마는 갈조류에 속하는 다시마 과의 한속으로서 한국 일본 및 중국 등의 극동 아시아 지역에 서식하며 독특한 맛과 향을 지녀 기호성이 양호하다. 실제로 다시마는 자원 확보의 용이성으로 인해 우리나라, 일본 등의 몇몇 국가에서 연구되고 있는바, 다시마에 대한 기능성 연구 결과와 기술 축적은 우리나라가 전 세계적으로 경쟁력을 가질 수 있는 좋은 조건을 확보하고 있다고 사료되며 이는 어업인의 소득 증대 효과에 직접적으로 이바지 할 것으로 생각된다. 국내 연안에서 생산되는 해조류 총 생산량은 777천 톤에 달하고 이중 김, 미역, 다시마는 총 해조류 생산량의 92.3%(총생산가액의 88.0%)를 차지하는 양식 어민의 주요 소득원이고, 이들 해조류는 70년대 이후 양식기술의 도입으로 생산량은 꾸준히 증가하고 있으나 소비는 정체되고 재고는 누적되어 해조 산업에서 큰 장해 요인이 되고 있는 실정이다. 따라서 양식 어민의 소득 증가를 위해서는 다른 어떤 분야 보다 해조류의 소비를 촉진시킬 근거를 제시할 수 있는 과학적인 연구가 필요한 실정이다.

다시마에는 여러 가지 영양성분과 정미성분이 함유되어 있으며 생리활성물질로 각광 받고 있는 porphyran, fucoidan, alginic acid 등의 산성 다당류 뿐 아니라 유아의 준 필수 아미노산으로 알려진 타우린이 다량 함유되어 있어 기능성 식품으로서 활용 가능성이 매우 높고, 다시마는 신체의 저항성을 높여주고 노폐물의 배설을 촉진하며, 고혈압, 동맥경화, 갑상선종, 신장염에 효과가 있을 뿐 아니라 암세포의 증식을 억제하고, 노화를 예방하는 건강장수식품으로 알려져 있다. 다시마의 생리적 효능을 이용하여 국내 소비자에게 다시마 소비촉진을 위한 개발 제품으로 다시마 케이크, 다시마 식빵, 다시마 젤리, 다시마 차, 다시마환, 조미 다시마 등이 개발되었으나, 기능성 식품의 현재 상태는 대부분 식품 기호성이 결여되어 있으므로 이를 증진시키는 기술이 개발되어야 한다. 또한 함유성분의 조성과 분리에 관한 연구 및 약리학적 연구가 이루어져있지

만, 식품으로서 활용도를 높이기 위한 조리 과학적 연구와 전통식품의 산업화가 미흡한 실정이다. 따라서 다시마를 항암작용을 갖는 기능성 식품으로 규명하고 다시마를 이용한 기능성 식품 및 응용제품을 개발하기 위하여 소비자의 관심을 유도할 만한 과학적이고 실증적인 연구 및 이를 통한 기술 축적이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 다시마를 이용하여 당뇨나 암 등의 만성퇴행성 질환에 대한 예방효과를 동물 모델을 통하여 과학적이고 체계적으로 증명하여 다시마의 역할을 규명하고, 다시마의 기능성을 이용하여 만성질환을 예방하고 치료 보조제로 쓰일 수 있는 선도적 기능성 식품을 개발하는 것을 목적으로 한다.

제 2 장. 국내·외 기술개발 현황 및 과학기술정보.

1. 국내·외 관련연구의 현황과 문제점

- 경제 성장과 함께 식사 양식이 서구화됨에 따라 각종 암의 발생율이 높아지고 있음. 암은 그 발생 기전과 치료에 대한 연구가 광범위하게 행해지고 있는 분야로 여러 가지 외부 요인과 유전적인 요인이 합쳐진 결과이고 암 발생의 80-90%는 외부적인 요인에 의한 것으로 생각되고 있음.
- 최근 식품의 기능성 문제가 대두되면서 식품내의 여러 미량성분들과 암에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라에서는 해조류의 섭취량이 다른 지역에 비해 높아 많은 연구자들이 해조류에 관심을 가지고 해조류의 생리활성에 관한 연구들을 꾸준히 해오고 있음
- 해조류 중의 탄수화물은 일반 야채류에 함유된 섬유소와는 달리 장의 활동을 원활하게 하고 식염, 중금속등의 배출 콜레스테롤의 혈관내의 침착 방지 등의 효과가 매우 높다는 것이 밝혀졌고 최근에는 해조류의 당류성분에 항암작용이 있다는 사실이 연구자들에 의해 밝혀지고 있음.
- 그러나 다시마에 대한 대부분의 연구는 성분 분석이나 특정 성분의 추출 조건, 구성 성분의 물리 화학적 및 생물학적 특성에 관한 연구임.
- 다시마의 항암작용에 대한 연구 또한 혈관 내피세포를 이용한 angiogenesis에 대한 연구와 폐암, 흑색종, 위암에 대한 세포실험이 대부분으로 본 연구에서 관심을 가지고 있는 유방암에 대한 연구는 없으며 특히 암화과정 억

제 및 치료에 관한 연구도 부족함.

- 건강식품의 기능성은 한 가지 생리활성물질 단독의 기능이라기보다 여러 가지 영양소나 생리활성물질의 상호 작용의 결과이므로 다시마의 기능성 성분의 생리활성연구와 더불어 식품으로서의 다시마의 기능성 규명이 필요함.
- 암 환자의 경제적 손실과 죽음에 대한 정신적 고통을 고려할 때 치료과정과 더불어 암화과정(암의 생성과정)을 억제하여 암을 예방할 수 있는 기능성에 대한 규명이 필요함.

제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 . 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 항당뇨 효과규명

(1) 연구방법

1.다시마 물 추출물 제조.

. 180ml의 다시마 가루를 1.8L의 증류수에 녹인 후, 삼각플라스크에 넣고, 상온에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간 후 9000rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 분리, 이 분리액을 감압여과 하여농축하였다. 이때 Water bath온도는 40℃에서 하며, 농축bottle의 회전속도는 6~7로 하여 원래용량의 20%로 농축하였다. 농축한 용액을 동결건조 bottle에 넣어 -71℃ freezer에서 24시간 동안 방치하여, 동결건조 시켜 동결건조가 끝난 추출물은 powder로 만들어 냉동보관하며 사용하였다.

2. 실험동물 및 식이

생후 3주령의 Sprague-Dawley종 숫쥐 30마리를 고형사료를 먹이면서 사육환경에 적응시킨 후, 250g 정도 되었을 때 4개의 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다. 실험식이는 모든 영양소를 고루 함유한 실험 식이를 대조식이, 다시마 분말가루를 대조식이에 첨가한 식이를 다시마 분말 식이(15%, w/w)로 각각 사용하였다. 또한, 다시마 물 추출물 식이(4%, w/w)로 사용하였다. 실험군은 당뇨를 유도하지 않고 대조 식이를 섭취시킨 정상 대조식이군(Normal, control diet: NC), 당뇨를 유도한 후 각각 대조 식이를 먹인 당뇨 대조 식이군(Diabetic, control diet: DC), 15% 다시마 분말식이를 먹인 당뇨

다시마 분말 식이군(Diabetic, sea tangle powder: DP), 4% 물 추출물 식이를 먹인 당뇨 물 추출물 식이군(Diabetic sea tangle water extract: DW)으로 하였다. 식이와 물은 자유롭게 먹이고 매일 신선한 것으로 공급하였다. 동물 사육실은 온도, 습도, 채광을 일정하게 유지하여 13 주간 사육하였다.

3. 실험 방법

가. 당뇨유도

실험동물을 16시간 절식시키고 당뇨군은 streptozotocin(STZ)(60㎎/kg B.W.)을 0.01 M citric acid buffer(pH 4.5)에 용해하여 1회 복강 주사하여 당뇨를 유도하였고 정상군은 동량의 citric acid buffer 용액을 주사하였다. 당뇨 유발 여부의 확인은 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당계로 혈당을 측정하여 공복 혈당(fasting blood sugar)이 250㎎/dℓ이상인 동물을 당뇨 군으로 판정하고 당뇨군의 분리는 각 군의 평균 혈당이 비슷하도록 하였다.

나. 체중, 식이 섭취량 및 수분 섭취량

매주 체중을 측정하고 매일 식이 섭취량과 수분 섭취량을 급여량과 잔여량의 차이로 측정하였다.

다. 시료 수집 및 전 처리

당뇨 유발 13주 후 실험동물을 18시간 절식시킨 후 단두하여 희생시키고 경동맥에서 혈액을 모아 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 분석 전까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다. 간과 신장조직을 ice cold homogenizing media(154 mM KCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA buffer, pH 7.4)에 넣고 4℃에서 glass teflon homogenizer로 균질화 한 다음 4℃, 12,000×g에서 20분간 고속원심분리기로 원심분리 하였다. 이 중 상층액을 취해 다시 4℃, 105,000×g에서 초고속 원심분리기로 60분간 다시 원심분

리 한 후 cytosol 분획과 microsome 분획으로 각각 분리하여 사용하였다. 대변은 마지막 13주에 3일 동안의 변을 수거하여 bile acid를 측정하기 위하여 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

라. 시료 분석

① 혈중 인슐린 농도 측정

혈청의 인슐린 농도를 효소 면역법(Enzyme immunoassay(EIA))을 이용한 Rat insulin kit로 측정한 후 450 nm에서 Elizer reader로 각 well의 흡광도를 측정하였다.

② 혈당

실험 시작 일주 후부터 꼬리 정맥에서 채혈한 후 혈당은 혈당계로 매주 측정하였다

③ 변 수집

당뇨군의 3일간 변을 채취하여 무게를 측정한 후 bile acid의 측정을 위해 보관하였다.

④ 혈청 지질

혈청 총지질농도, 혈청 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤은 효소법에 의한 kit(아산제약)로 각각 측정하였고, 중성지방은 Bucolo 방법에 준한 효소 kit(아산제약), 이들 측정치로 부터 HDL-cholesterol/Total cholesterol ratio (HTR)과 Athergenic index (AI):

(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol)

을 구하였다.

⑤ 신장의 조직학적 검사

PAS 염색 후 신장의 Bowman's capsule thickening, degeneration of tubular epithelium, glomerulosclerosis, inflammatory cell infiltraion, microcalcification, proteinous material in tubules, tubular interstitial fibrosis, vacuolar degeneration 등을 관찰하였다.

(2) 연구결과

1. 식이 섭취량 및 수분 섭취량, 체중

전 실험기간동안 당뇨 쥐의 식이섭취량이 정상쥐에 비해 많은 경향을 보였으며 특히 다시마 분말을 섭취시킨 당뇨 쥐 (DP)의 식이섭취량이 가장 많았다(Fig 2). 물의 섭취는 정상쥐에 비해 당뇨 쥐의 섭취량이 유의적으로 높았으며 당뇨 쥐에서 식이군간의 차이는 없었다(Fig 3). 정상 쥐의 체중은 실험기간동안 꾸준히 증가한 반면 당뇨 쥐의 체중은 증가하지 않아 실험 종료시에는 정상 쥐의 50% 수준이었다(Fig 4). 실험 기간동안 각 실험군의 식이효율을 계산 한 결과 정상군 (NC)의 식이효율이 가장 높아 당뇨균과 유의적인 차이를 모였고 당뇨 쥐에서는 DC군의 식이효율이 가장 좋지 않은 경향을 보였고 다시마 분발과 물 추출물이 식이효율을 증가시키는 경향을 보였다.

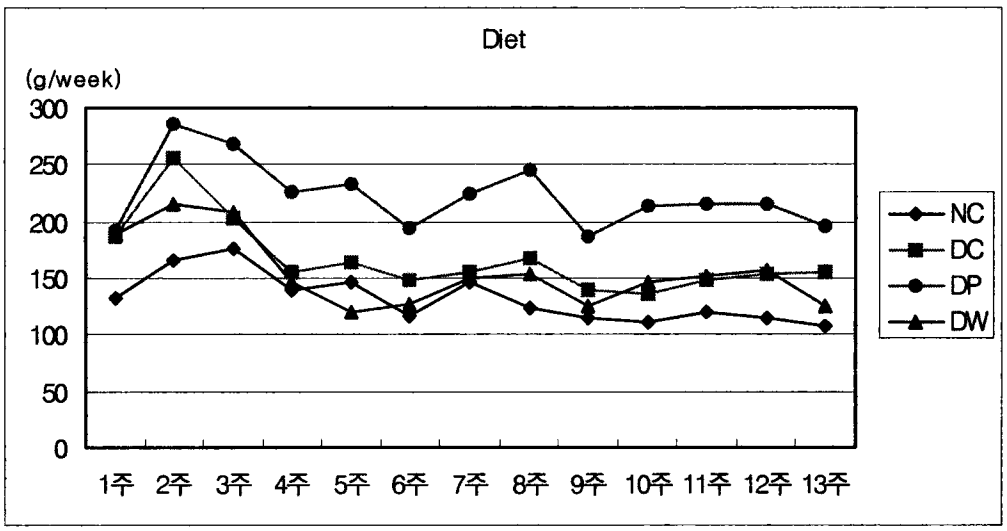


Figure2. Effect of dietary sea tangle on the food intake in diabetic rats.

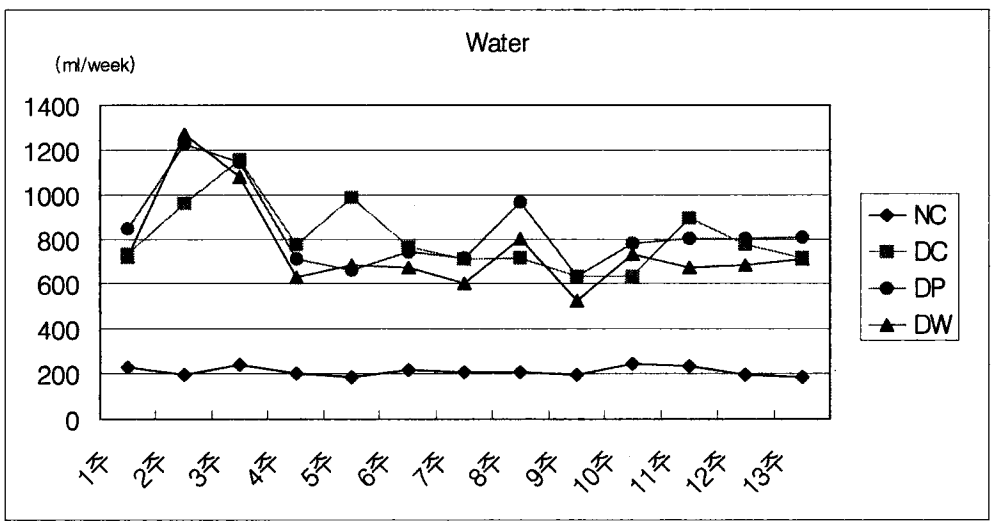


Figure3. Effect of dietary sea tangle on the water intake in diabetic rats.

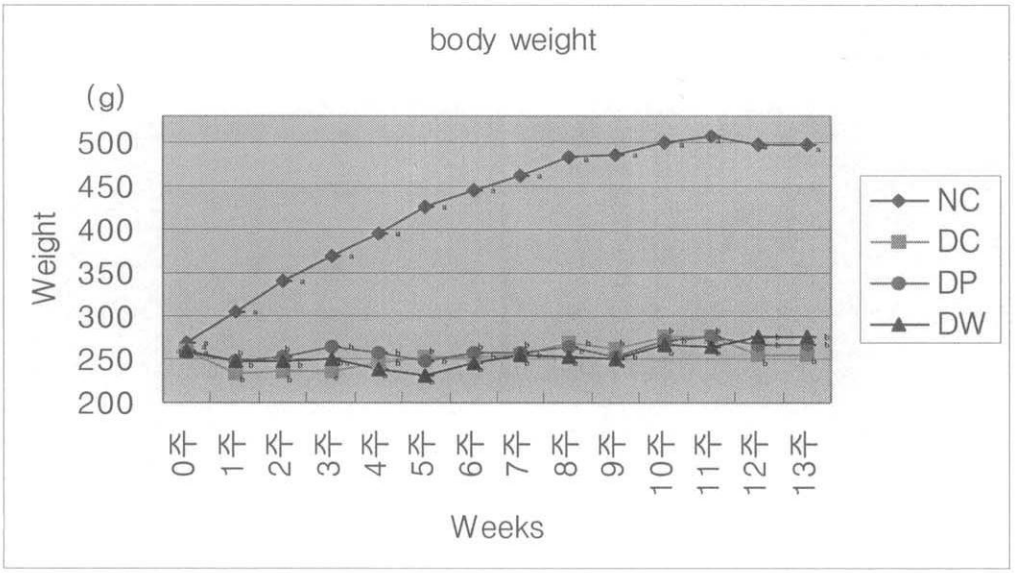


Figure4. Effect of dietary sea tangle on the body weight in diabetic rats.

2. 인슐린 농도 저하 억제 효과

Streptozotocin(STZ)은 췌장의 β 세포를 파괴하여 인슐린 농도를 저하시키는 제 1형 당뇨를 유도한다. 인슐린 분비 저하는 당의 이용을 저해하여 고혈당을 유도하며 이로 인한 여러 가지 합병증을 유발시킨다. 본 연구에서 STZ로 당뇨를 유도하여 다시마 첨가 식이를 섭취시킨 결과 인슐린의 저하를 억제할 수 있었다. 이러한 경향은 혈당 및 혈청 지질과도 같은 경향을 보였다(Fig . 6)

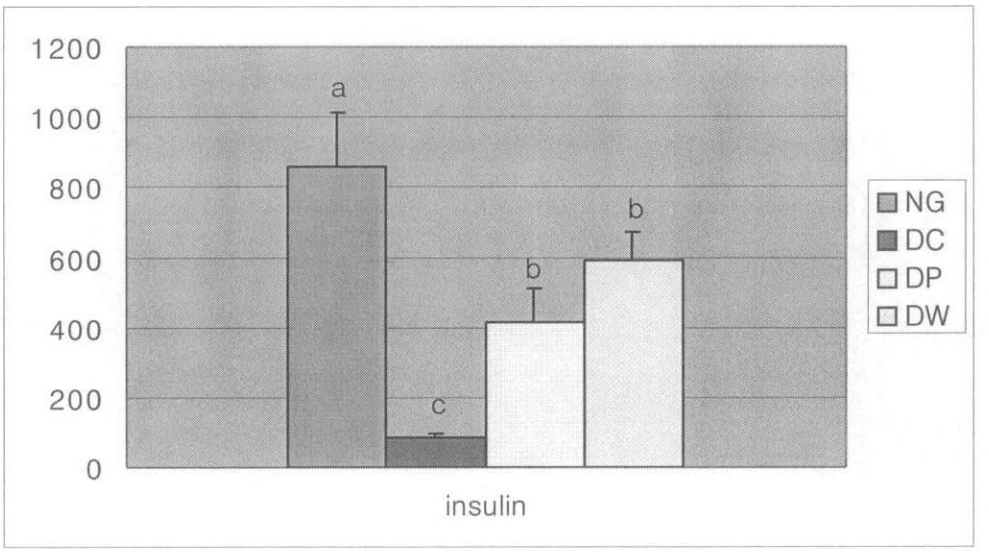


Figure6. Effect of dietary sea tangle on the insulin in diabetic rats.

3. 다시마 식이의 혈당상승 억제 효과

다시마 첨가식이는 형태에 관계없이 당뇨 쥐의 혈당을 저하시켰다(Figure 4). 당뇨의 고혈당은 지질과산화반응을 유도하여 동맥경화증을 유발할 수 있으며 혈당의 조절상태가 불량 할수록 고지혈증이 심해지는 것으로 보고되고 있다. 따라서 혈당의 조절은 혈관계통의 질환을 비롯한 당뇨 합병증 발생 방지를 위해 필수적이라고 할 수 있다. 따라서 다시마 섭취에 의한 혈당강하효과는 당뇨로 인한 고혈당을 억제시킴으로써 항당뇨 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

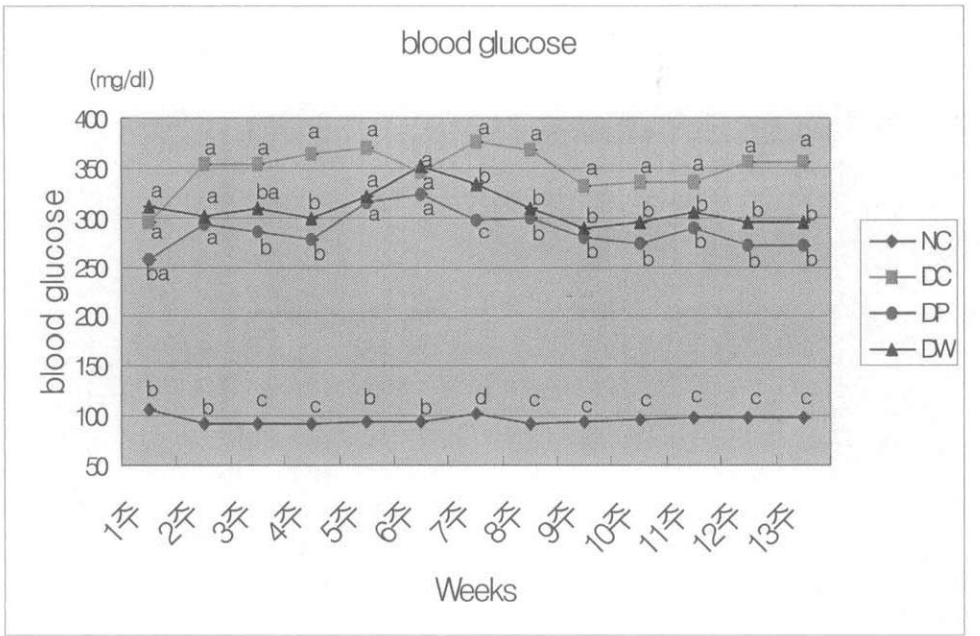


Figure5. Effect of dietary sea tangle on the fasting blood glucose in diabetic rats.

4. 혈청지질 농도 상승 억제 효과

일반적으로 insulin 작용에 문제가 있는 당뇨병의 경우 lipiprotein lipase(LPL) 작용의 부족으로 VLDL의 전환대사가 감소되어 혈중 TG의 농도가 증가하게 된다. 또한 당뇨병 환자는 당 이용능의 저하로 지방조직 분해에 따른 혈중 유리지방산이 많아지고 유리지방산의 증가는 근육 등 말초조직에서의 포도당 이용율을 감소시킬 뿐 아니라 인슐린 저항성을 유발할 수 있다. 증가된 지방산의 산화에 의한 비정상적인 대사로 인해 적혈구 막의 지방산 구성이 변화되어 혈액의 점도가 증가되고 내피세포에 적혈구 부착이 증가되어 만성혈관 합병증을 야기하기도 하며 말초조직의 인슐린 수용체의 활성도가 저해되어 혈중 LDL 분해가 감소함에 따라 혈중 콜레스테롤이 증가하게 된다. 본 연구에서 당뇨 쥐에 다시마 보충식이를 섭취시킨 결과 혈액중의 총 콜레스테롤과 LDL

콜레스테롤 양을 저하시켰고 특히 물 추출물의 형태로 보충하였을 때는 유의적으로 감소되었을 뿐 아니라 중성지방도 감소되는 경향을 보였다(Figure 5). 이렇게 당뇨로 인한 혈청지질 상승효과의 억제는 당뇨 합병증인 혈관계통 질환의 예방에 기여하리라 사료된다.

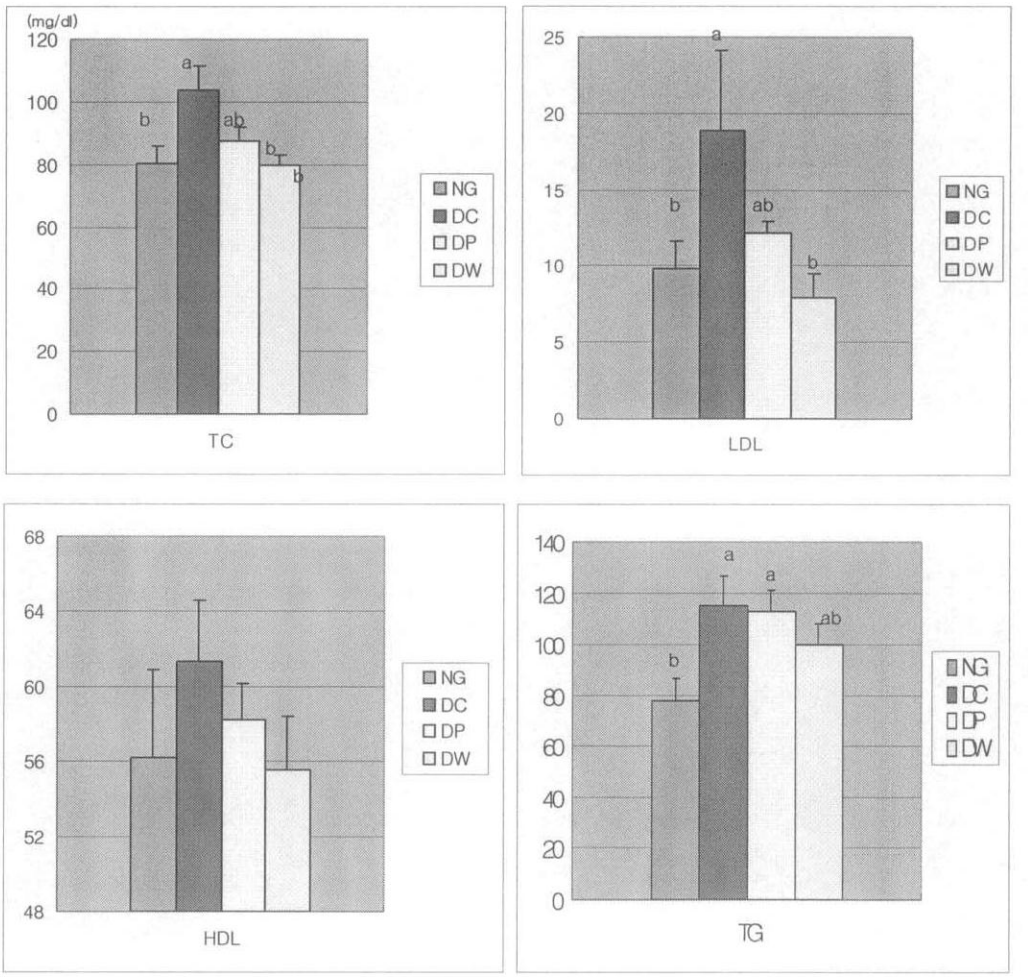


Figure5. Effect of dietary sea tangle on the serum lipids in diabetic rats.

5. 다시마의 섭취가 당뇨 쥐에서 간 및 변의 지질 함량에 미치는 영향

지질대사와 관련된 당뇨합병증으로 동맥경화, 고지혈증, 고혈압, 심혈관계 질환 등이 야기될 수 있으며 이는 산화적 스트레스의 증가, 인슐린 분비 부족 등으로 인한 지질대사이상 그 원인이다. 따라서 본 연구에는 당뇨를 유발한 쥐에서 다시마 보충식이가 지질대사 개선에 효과가 있는지 살펴보기 위해 간과 변의 지질 농도를 측정하였다. 당뇨의 유도로 간의 총 지질, 중성지질의 함량은 낮아졌으며 총 콜레스테롤의 함량에는 유의적인 차이가 없었다. 당뇨 쥐에 다시마 보충식이를 섭취시킨 결과 간의 총 지질은 대조식이를 섭취시킨 군(DC)에 비해 물 추출물 섭취군(DW)에서 유의적으로 낮았고, 간의 중성 지질은 다시마 분말 섭취군(DP)과 다시마 물 추출물 섭취군(DW) 모두 당뇨 대조식이군(DC)에 비해 유의적으로 낮았다 (Figure 5).

실험동물의 분변 량은 정상군에 비해 당뇨를 유도했을 때 유의적으로 증가하였으며 당뇨 쥐에서는 식이군 간의 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 당뇨 쥐에서 다시마의 섭취는 총 지질, 중성지질, 콜레스테롤의 배설을 증가시켰다. 특히 다시마 분말을 섭취했을 때 당뇨 대조군에 비해 분변으로 배설되는 총 지질, 중성지질, 콜레스테롤이 유의적으로 증가하였다 (Figure 6).

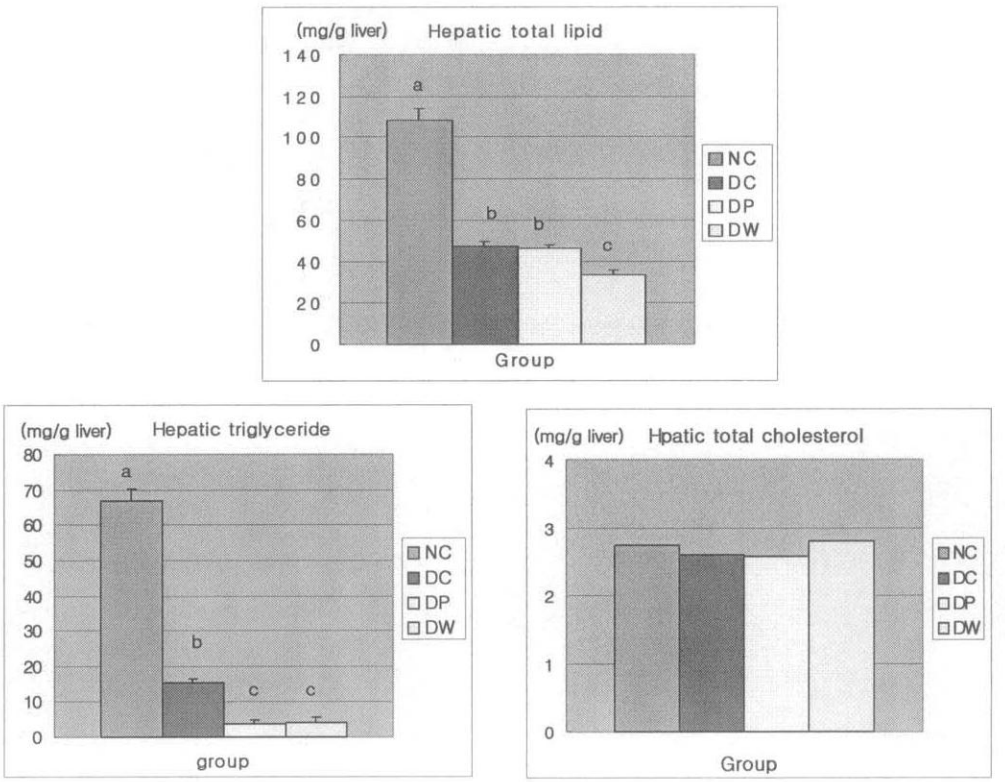


Figure 5. Effect of dietary sea tangle on the hepatic lipids in diabetic rats

Experimental conditions are same as figure 2.

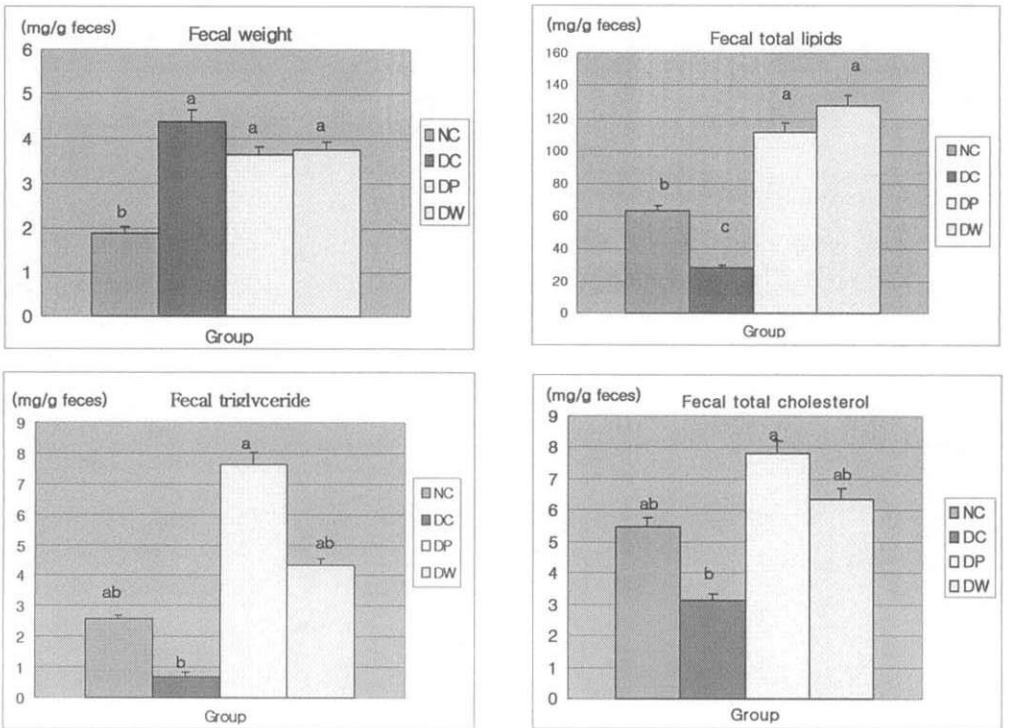


Figure 6. Effect of dietary sea tangle on the fecal lipids in diabe

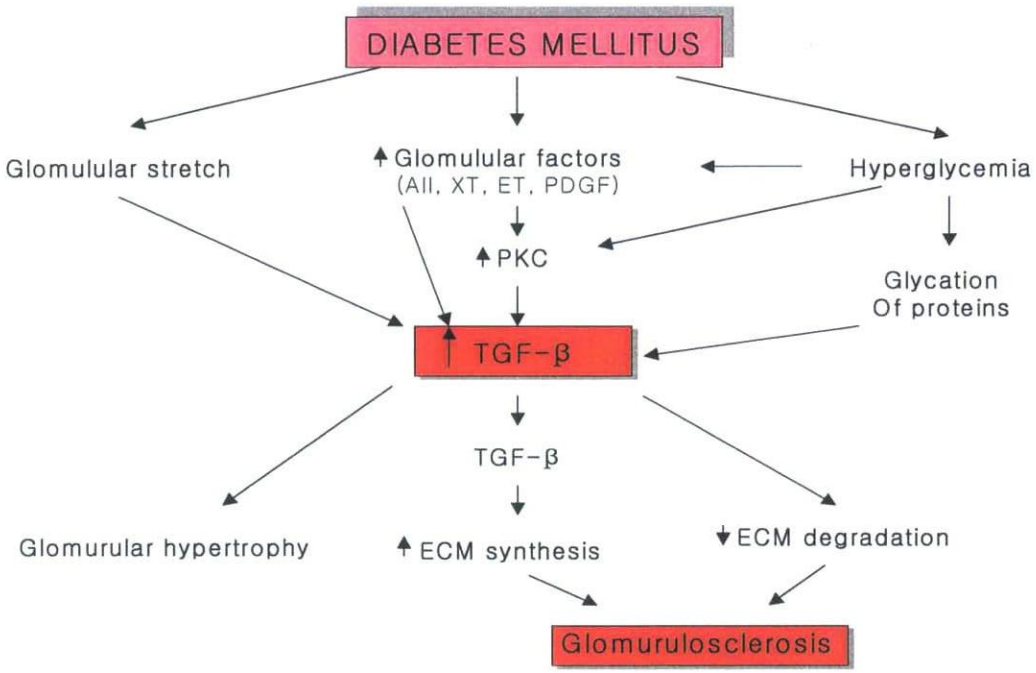
Experimental conditions are same as figure 2.

다시마에 많이 함유된 수용성 식이섬유는 불용성 식이섬유에 비해 보수력이 커서 겔 형성으로 점도가 높아지므로 포만감을 주고 영양소의 소화, 흡수를 지연시켜 당뇨병 환자에게 당내성을 증진시키고, 장내에서 콜레스테롤 및 담즙산을 흡착하여 대변으로 배설시키고 지단백질대사에 변화를 주어 혈청 콜레스테롤과 중성지방의 수준을 저하시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, 식이섬유는 콜레스테롤의 체내 흡수나 재흡수를 방해하거나 장관에서 담즙산과 직접 결합하여 대변으로 배설되는 양을 증가시킴으로써 체내 콜레스테롤이 담즙산 합성에 많이 사용되도록 해서 체내 각 조직에 존재하는 전체 콜레스테롤의

함량을 감소시킨다고 보고되었다. 본 연구에서도 당뇨 쥐에 다시마 보충식이를 섭취시킨 결과 다시마의 분말과 물 추출물을 섭취한 군에서 당뇨대조군에 비해 변으로 총 지질, 중성지질과 콜레스테롤의 배설량이 증가되었고, 이는 체내 지질대사를 개선시킴으로써 당뇨 합병증인 혈관계통 질환의 예방에 기여하리라 사료된다.

6. 신장의 병리학적 변화에 미치는 영향

당뇨로 인한 신부전은 당뇨병의 가장 심각한 합병증으로 미국의 경우 말기 신부전 환자의 약 40%정도가 당뇨로 인한 것임이 밝혀졌다. 최근 ACE inhibitor를 이용하여 혈당과 고혈압을 비교적 강하게 조절할 수 있음에도 불구하고 당뇨로 인한 신부전은 계속 증가하고 있는 추세이다. 따라서 당뇨 합병증으로 발생하는 신부전의 예방과 치료를 위해서는 혈당저하효과나 혈압강하 효과에 기본을 두지 않은 새로운 방법의 therapy가 개발되어야한다. Glomerulosclerosis, tubulointestinal fibrosis, arteriolar hyalinosis등은 발전된 신부전증의 대표적인 증상이며 mesangial matrix의 증대가 당뇨로 인한 신부전의 정도와 상관관계가 있음이 밝혀졌다. 실제로 mesangial cell을 배양 했을 때 high glucose concentration에 의해 TGF-β의 전사과정이 촉진되며 이렇게 증가된 TGF-β는 ECM degradation을 감소시키고 synthesis를 증가시켜 glomerulosclerosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구서 다시마 분말 및 물 추출물이 당뇨를 유도한 쥐의 신장조직과 TGF-β의 발현 및 glomerulosclerosis등에 미치는 영향을 살펴본 결과, Bowman's capsule thickening, degeneration of tubular epithelium, glomerulosclerosis, inflammatory cell infiltration, microcalcification, proteinous material in tubules, tubular interstitial fibrosis, vacuolar degeneration등의 유의적인 변화를 관찰하지 못했다. 따라서 당뇨성 신부전의 억제를 위해서는 혈당 및 혈청지질 강하효과와 별개의 기전으로 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.



Central of TGF B in the pathogenesis of diabetic kidney disease.

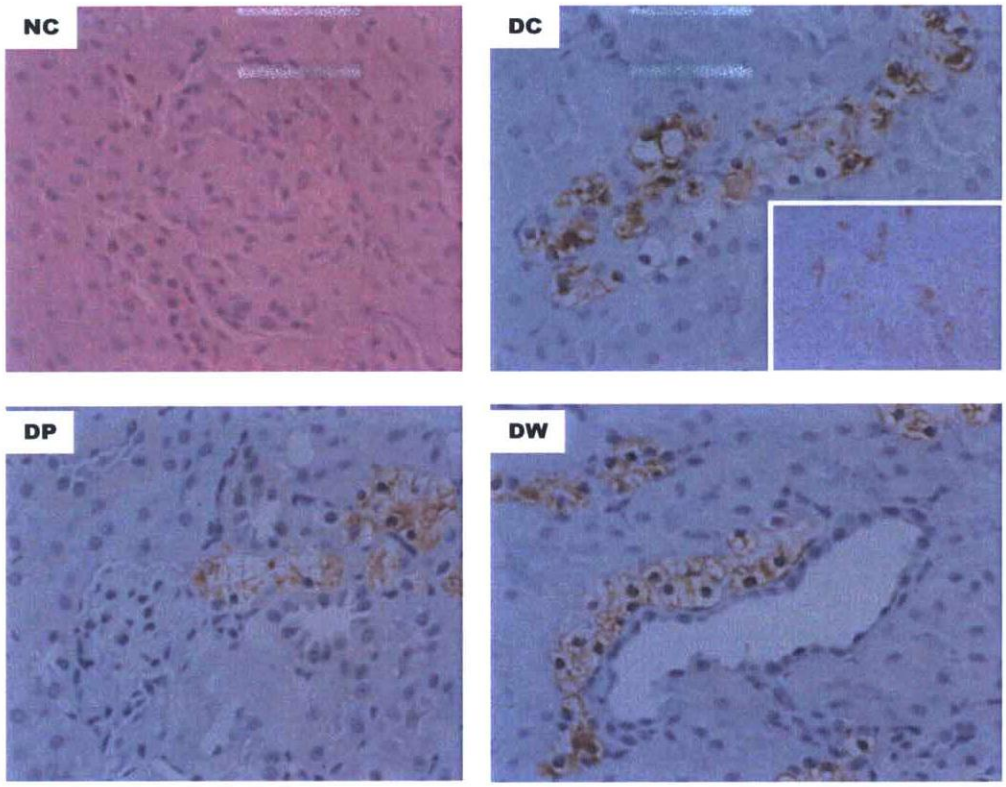


Figure7. Effect of dietary sea tangle on the TGF- β**1** expression in the kidney of diabetic rats.

Table 2. Pathological scoring of the diabetic kidney in comparison with control group(NG)

	NC	DC	DP	DW	DF
H&E	GS (-~+) MC (-~+) IF	GS (+~2+) MC (2+) IF VD (2+~3+) DTE & PT BT (2+)	GS (2+~) MC (3+) IF VD (3+) DTE & PT BT (2+)	GS (2+~) MC (3+) IF (2+) VD (2+) DTE & PT BT (2+)	GS (+~2+) MC (2+) IF (2+) VD (2+) DTE & PT BT (2+)
Azan	TF - GS +	TF + ~ 2+ GS + ~ 2+	TF 2+ GS 2+ ~	TF 2+ GS 2+ ~	TF 2+ ~ GS 1+ ~ 2+
TGF-β	-	2+ ~ 3+	3+	3+	- ~ +
α-SMA	- ~ +	+	2+	2+	+ ~ 2+
collagen I	-	-	-	-	-
collagen III	-	-			

BT : Bowman's capsule thickening, DTE : degeneration of tubular epithelium, GS : glomerulosclerosis, IF : inflammatory cell infilatraion, MC : microcalcification, PT : proteinous material in tubules, TF : tubular interstitial fibrosis, VD : vacuolar degeneration

7. 다시마의 섭취가 당뇨 쥐에서 신장의 산화적 스트레스 억제에 미치는 영향.

가. 혈청 크레아티닌(creatinine) 농도에 미치는 영향

크레아티닌은 요소질소와 같이 체내에서 에너지로 사용된 단백질의 질소 노폐물이다. 근육내의 크레아틴은 인산화 되었다가 에너지로 사용된 후 크레아티닌으로 전화된다. 크레아티닌은 혈액으로 방출된 후 신장을 통해 배설된다. 따라서 신장의 기능이 떨어지면 신장을 통한 크레아티닌의 배설이 감소하여 혈중 크레아티닌의 농도가 증가한다. 따라서 실험동물의 혈장 중 크레아티닌의 함량을 측정함으로써 STZ에 의한 직접적인 신장기능의 저하와 STZ에 의해 유발된 당뇨로 인한 이차적인 신장 기능의 손상을 간접적으로 측정할 수 있다.

본 연구 결과 혈액의 크레아티닌의 농도는 당뇨의 유도에 의해 유의적으

로 증가하였다(NC vs DC). 또한 당뇨 쥐에 다시마를 먹인 결과 혈중 크레아티닌의 농도가 오히려 증가하는 경향을 보였으며 특히 다시마 분말을 섭취시킨 경우(DP) 대조식이를 먹인 당뇨군(DC)에 비해 유의적으로 증가하였다(Figure 2). 그러나 모든 실험동물의 크레아티닌의 농도는 흰쥐의 정상 범위인 0.4-1.5㎎/㎗를 넘지 않았다. 본 연구에서 당뇨 유도 13주 후 동물을 희생시켰으므로 STZ에 의한 신장의 직접적인 손상을 회복 되었으리라 사료되며 실험군 간의 혈중 크레아티닌의 농도 차이는 STZ에 의해 유도된 당뇨에 의한 것으로 생각된다. 즉 혈중 크레아티닌의 측정 결과 다시마의 섭취는 당뇨 쥐에서 신장을 보호하는 효과가 없었으며 이는 전년도에 실시한 신장의 병리학적 소견과도 일치한다.

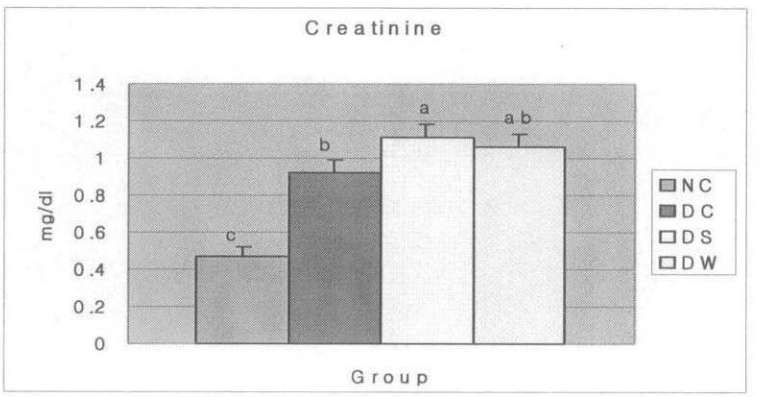


Figure 2. Effect of dietary sea tangle on the serum creatinine in diabetic rats

NC : Normal rat + Control diet

DC : Diabetic rat + Control diet

DP : Diabetic rat + Sea tangle powder diet

DW : Diabetic rat + Sea tangle water extract diet

나. 신장 microsome 의 지질과산화물(TBARS)의 형성에 미치는 영향

지질과산화반응은 자유래디칼(free radical)에 의해 생체 조직막의 불포화 지방산이 산화적 분해를 일으키는 것으로 MDA(malondialdehyde) 함량이 지질과산화의 지표로 널리 이용되고 있다. 이러한 자유래디칼은 당뇨병의 유발인자로서 중요한 역할을 하며, STZ로 당뇨를 유도한 쥐에서 지질과산화물이 증가하였다고 보고하였다. 자유 래디칼은 정상적인 체내 대사과정 중에서도 생성되지만, 당뇨 쥐에서는 자유 래디칼 생성계가 정상인에 비해 더욱 촉진됨으로서 지질과산화도가 가속화되고, 따라서 조직의 과산화적 손상이 쉽게 초래된다. 그리고 합병증이 없는 당뇨환자에게서 혈장의 ·OH의 증가는 성별, 나이, 흡연 등 다른 요인에 의해서 나타나지 않았으므로 당뇨병 그 자체와 관련이 있고, 산화적 스트레스는 당뇨발병 초기에 진행된다는 보고도 있다. 그러나 본 연구에서는 당뇨 쥐에 다시마 보충식이를 섭취시켰을 때 신장 microsome 내 MDA 량에 유의적 차이를 관찰할 수 없었으며 이는 다른 연구와는 달리 당뇨 유도 13 후 동물을 희생시킨 것도 하나의 이유가 되리라 사료된다.(Figure 3)

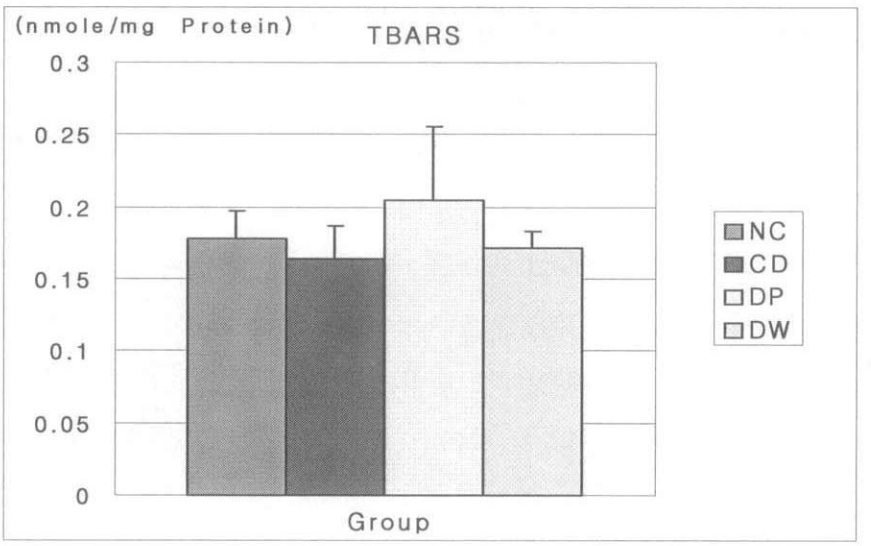


Figure 3. Effect of dietary sea tangle on the renal microsomal thiobatbituric acid-reactive substance in diabetic rats

Experimental conditions are same as figure 2.

다. 신장의 glutahione 의존성 항산화 효소계에 미치는 영향

임상적인 당뇨병이나 STZ-로 유도한 당뇨 쥐에서 자유래디컬이 증가하는 것은 잘 알려진 사실이다 당뇨병에서 산화적 스트레스를 증가시키는 기전으로는 비효소적 당화(non-enzymatic glycation)와 자기 산화적 당화(autoxidative glyccsyltion)의 증가, 에너지 대사의 변화에 기인한 대사적 스트레스의 증가, 항산화계의 저하를 들 수 있다.

당뇨의 유도결과 정상군에 비해 GST 활성이 증가하는 경향을 보였으며 다시마를 첨가한 식이를 섭취한 결과 GST활성이 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다(Figure 4). GST는 활성형의 대사물 환원형의 glutathione(GSH)과 결합시켜 배설시킴으로써 체내에서 제거하는 역할을 한다. 따라서 증가된 GST는 지질과산화물과 같은 활성화된 대사물을 GSH와 결합시켜 배설시키는데 기여하였을 것으로 사료된다. Glutathione peroxidase(GPx)는 과산화수소

(H_2O_2)나 유기 과산화물(organic hydroperoxide)을 GSH를 이용하여 환원시키는 역할을 한다. 본 연구에서 당뇨에 의해 GPx의 활성이 증가되었으며 다시마 분말이나 물 추출물의 섭취에 의한 차이는 관찰할 수 없었다. GPx에 의해 생성된 산화 glutathione(GSSG)는 glutathione reductase(GR)에 의해 GSH로 다시 환원된다. 따라서 GR은 GST나 GPx의 작용에 쓰이는 GSH를 계속적으로 공급하는 역할을 한다. 본 연구에서 당뇨의 유도에 의해 GR의 활성의 차이가 관찰할 수 없었으며 다시마의 섭취도 당뇨 쥐의 GR 활성에 영향을 주지 않았다.

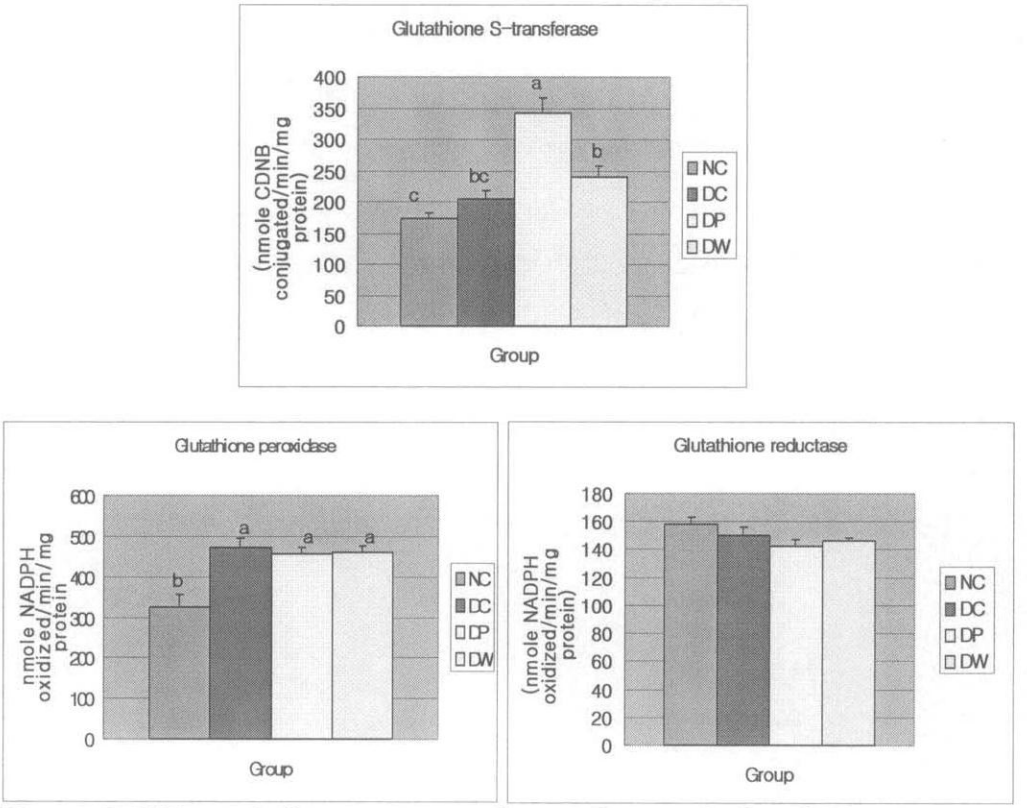


Figure 4. Effect of dietary sea tangle on the renal glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in diabetic rats

Experimental conditions are same as figure 2.

이상의 혈액 크레아티닌의 농도, 신장 지질과산화도, 항산화효소 활성 및 전년도에 실시한 신장 조직 검사 등을 종합해보면 다시마의 섭취는 당뇨 쥐에서 GST 활성의 증가로 활성형 대사물을 제거하는데 일부 기여할 수 있으나 전체적으로 신장의 산화적 스트레스을 억제하는 데는 크게 기여하지 못하는 것으로 사료된다.

제 2 절. 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 간암 억제 효과 규명

(1) 연구방법

1. 다시마의 간세포 암화과정 억제효과 규명

가. 다시마 물 추출물 제조.

180ml의 다시마 가루를 1.8L의 증류수에 녹인 후, 삼각플라스크에 넣고, 상온에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간 후 9000rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 분리, 이 분리액을 감압여과 하여농축하였다. 이때 Water bath온도는 40℃에서 하며, 농축bottle의 회전속도는 6~7로 하여 원래용량의 20%로 농축하였다. 농축한 용액을 동결건조 bottle에 넣어 -71℃ freezer에서 24시간 동안 방치하여, 동결건조 시켜 동결건조가 끝난 추출물은 powder로 만들어 냉동보관하며 사용하였다.

나. 실험동물의 사육

생후 3주령의 Sprague-Dawley종 숫쥐를 공급받아 고형사료를 먹이면서 사육환경에 적응시킨 후 5군으로 나누어 실험을 실시하였다. 실험시작부터 대조 식이와 다시마 가루, 물 추출물, 푸코이단을 첨가한 식이를 자유롭게 먹이고 물은 상수도수를 자유롭게 섭취시켰다. 온도, 습도, 채광을 일정하게 하고 실험기간동안 쥐의 체중의 변화를 측정하여 사육하였다.

다. 실험식이 및 발암물질의 투여

식이군은 실험식이에 따라 다시마 가루, 물 추출물, 푸코이단 보충군과 대조 식이군으로 하여 다시마 첨가군은 기본식이에 각각 다시마가루, 물 추출

물을 첨가하여 제공하고 푸코이단은 식수에 녹여 제공하면서 사육하였다. 간의 암화과정의 유도는 각 실험식이를 2주간 섭취 시킨 후 Ito 등의 발암 유도모델을 사용하여 강력한 개시제인 Diethylnitrosamine(DEN)을 생리식염수에 녹여 체중 kg당 200mg 수준으로 1회 복강주사하고 다시 3주 후에 ketamine hydrochloride로 마취시켜 간의 좌우 중앙엽과 좌측엽을 각각 절제하는 2/3 부분간 절제술(partial hepatectomy)을 실시하였다. 대조군에는 DEN대신 생리식염수를 같은 수준으로 복강주사하고 2/3 부분 간 절제술대신 가장 수술(sham operation)을 실시하였다. DEN주사 11주후 동물을 희생시켰다.

라. 시료 수집 및 전처리

실험동물을 단두하여 희생시키고 즉시 개복하여 간을 적출한 후 차가운 생리식염수로 세척하고 간의 무게를 측정하였다. H&E, 면역조직화학적인 검사를 위해 간 조직을 2-3㎜ 두께로 잘라 고정시킨 후 검사에 사용하였다. 약 7g의 간을 잘라 25㎖의 차가운 Tris 완충용액에서 균질화하여 microsome과 cytosol 분획을 얻었다. Microsome과 cytosol은 -70℃에서 보관하였다가 분석에 사용하였다.

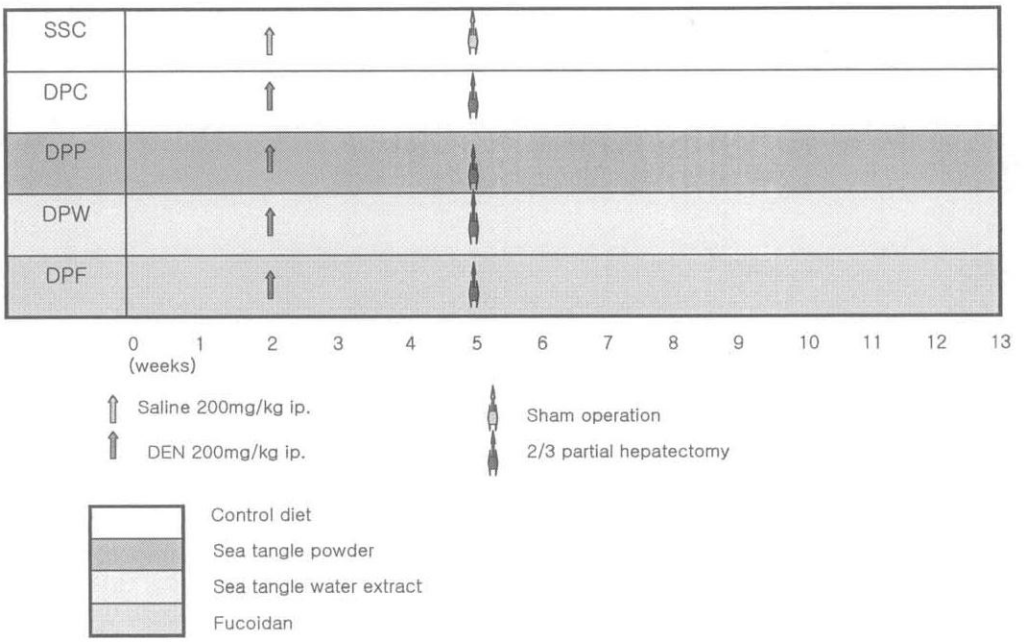


Figure 1. Experimental design

마. 면역조직화학적 검사 (태반형 glutathione S-transferase)

간 조직내의 태반형 glutathione S-transferase(GST-P)의 양성병소의 분포를 확인하기 위하여 avidine-biotin-peroxidase-complex(ABC)법으로 면역조직화학적 염색을 하였다. 냉 아세톤에 고정시킨 시료를 xylene으로 투명화(clearing)하고 파라핀으로 포매하여 5um 두께로 절편 하였다. Xylene으로 파라핀을 녹여내고 농도 하강 순의 단계적 알코올 수화과정을 거쳐 조직을 수화시킨 다음 증류수와 0.01M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 비특이적 반응을 줄이기 위해 moisture chamber에서 0.01M PBS에 1:5로 희석한 정상 산양 혈청으로 처리한 다음 과잉의 수분을 제거하였다. 0.01M PBS에 1:5,000으로 희석한 1차 항체인 rabbit anti-GST P 항체(Medical and Biological Laboratories Co.)를 반응시키고, H_2O_2 methanol 혼합액을 처리하여 내재성 과산화수소의 활성을 제거하고 0.01M PBS로 세척하

였다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG 와 avidin-biotin-peroxidase complex(Vectastain Elite ABC kit, Vecta Lab. Inc.)를 순서대로 moisture chamber에서 반응 시키고 diaminobenzidine(DAB) 방법에 따라 반응을 일으킨 다음 Mayers hematoxylin 용액으로 대조 염색 하였다.

바. 생화학적 검사

①Thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS) 함량측정

Buege 와 Aust(1978)의 방법으로 간의 microsome 분획에서 지질과산화물의 함량을 측정하였다.

② Glutathione S-transferase(GST)의 활성도

1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)과 환원형 glutathione(GSH)을 기질로 사용하는 Habig등의 방법에 따라 간 세포질에서 측정 하였다.

③ Glutathione peroxidase(GPx)의 활성도.

Tapple의 방법으로 기질은 cumene hydroperoxide를 사용 glutathione reducgtase 가 GSH를 환원시킬 때 NADPH 가 NADP+ 로 산화되는 정도를 측정 하였다

④ Glutathione reductase(GR)의 활성도.

간 세포질의 GR 활성도는 Carlberg 와 Mannervick의 방법[33]을 이용하여 측정하였다.

⑤ 단백질 함량의 측정.

Lowry의 방법에 의해 측정 하였다.

2. 간암 세포주의 성장 및 전이능에 미치는 영향

가. 세포주 및 배양 조건

사람의 간암세포인 HepG2세포를 ATCC(Rickville, MD)에서 구입하였다. 모든 세포는 10% FBS를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco, Gaithersberg) 으로 배양한다. 이들 배양액에는 10U/L의 penicillin G, 10 mg/㎖의 streptomycin sulfate, 25㎍/㎖의 amphotericin B를 포함하는 antibiotic antimycotic용액(ABAM, GibcoBRL)를 첨가하여 사용하였고, 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다.

또 계대배양을 위해서 세 세포주 모두 배양접시 바닥에 붙어서 자라는 세포(attached cell line)로 배양접시에 약 80%정도 자랐을 때 배지를 버리고 세포를 PBS 완충용액으로 2번 세척하고, 배양접시 바닥에 붙어있는 세포에 Trypsin-EDTA 용액(0.05% trypsin, 0.53mM EDTA in HBSS, JBI)을 가하고 1분 정도 후에 세포가 바닥으로부터 떨어지면 혈청을 포함하는 배양배지를 동량을 넣어 원심분리 하였다(1,000rpm, 5min). 원심 분리하여 모은 세포는 뭉치지 않게 잘 풀어준 후 새 배지에 희석하여 계대배양 하였다.

나. Cell Proliferation Assay

인간 간암 세포주 HepG2에 대한 다시마 물추추물 및 푸코이단의 생장 억제 효과를 관찰하였다. 세가지 세포를 6 well culture plate에 6×10^5 개의 세포를 seeding 한 후 다음날부터 물 추출물과 푸코이단을 각각 50㎍/㎖, 100㎍/㎖씩 처리하면서 5일간 더 배양하였다. 이때 배양액은 날마다 교환하면서 매일 물 추출물과 푸코이단처리를 하였고 대조군은 PBS를 처리하였다.

처리 5일째 되는 날 trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 Coulter particle count(Coulter Corp, Miami, Florida)를 이용하여 세포수를 counting 하였다. 세 반복하여 실시한 후 평균값을 계산하였다.

다 Cell Adhesion Assay

12-well plate를 30㎍의 Matrigel로 코팅한 후 비특이적 결합 부위를 없애기 위하여 Matrigel 코팅한 plate를 0.1% BSA를 함유한 serum free DMEM으로 37℃에서 90분간 재수화(re-hydration)시킨 후 같은 배양액으로 washing하였다. HepG2 세포를 trypsin으로 분리하여 0.1% BSA를 함유한 serum free DMEM 배양액으로 재 부유한 후. 각 well에 2×10^5개의 세포를 seeding 하고 물 추출물과 푸코이단을 각각 50㎍/㎖, 100㎍/㎖씩 처리하면서 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 90분간 배양하였다. 90분이 지난 후 배양액을 제거하고 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 PBS로 washing 한 후 trypsin으로 부착된 세포를 분리하여 재 부유시킨 후 세포수를 count한다. 세 반복 한 값을 평균하여 관찰 값으로 하였다.

라. Gelatin zymography

기질금속단백분해효소(Matrix metalloproteinase, MMP) 2와 9의 활성을 알아보기 위하여 gelatin zymography를 실시하였다. HepG2 세포를 culture plate에 분주하고 80%정도 자랐을 때 물 추출물과 푸코이단을 각각 50㎍/㎖, 100㎍/㎖씩 처리하면서 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 24시간 배양하였다. 상층액을 취하여 0.1% (w/v) gelatin이 포함된 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 전기 영동하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% Triton X-100용액에서 1시간 동안 씻어낸 다음 developing buffer에서 37℃로 24시간 배양하였다. Coomassie 염색과 탈색을 통하여 MMP2와 9의 활성 정도를 확인하였다.

마. 통계학적 처리

모든 실험 결과는 평균 ±표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 AVOVA test 후 사후 검정은 $p<0.05$수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

(2) 연구결과

1. 다시마의 간세포 암화과정 억제효과 규명

가. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐의 식이효율, 체중, 간 무게에 미치는 영향

화학적 발암원으로 암화과정을 유도 한 쥐의 식이 섭취량과 체중을 매주 섭취한 결과 실험군당 유의적인 차이를 관찰 할 수 없었다. 또한 실험 기간 동안 식이효율도 실험군간 유의차를 관찰할 수 없었으며, 간무게나 체중당 간무게도 유의적인 차이가 없었다.

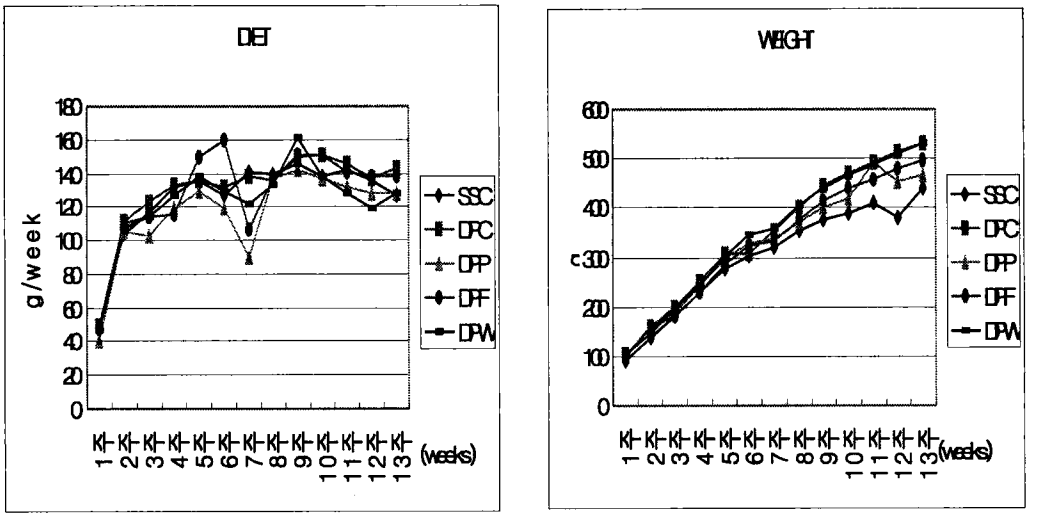


Figure 7. Effect of dietary sea tangle on the diet intake and body weight in the carcinogenesis induced rats

SSC : Saline + Sham operation + Control diet

DPC : DEN + Partial hepatectomy + Control diet

DPP : DEN + Partial hepatectomy + Sea tangle powder diet

DPW : DEN + Partial hepatectomy + Sea tangle water extract diet

DPF : DEN + Partial hepatectomy + Fucoidan

Table 3. Effect of dietary sea tangle on the food efficacy, liver weight and liver weight/body weight in the carcinogenesis induced rats

	GROUP	Food efficacy	Liver Weight(g)	Liver wt. / body wt(%)
Normal	SSC	4.3754±0.25^{NS}	12.3906±0.58^{NS}	0.0266±0.001^{NS}
Carcinogenesis induced	DPC	4.1610±0.15	13.1234±0.73	0.0259±0.001
	DPP	4.4396±0.30	12.3925±0.59	0.0265±0.001
	DPF	4.1643±0.14	12.4825±0.60	0.0250±0.001
	DPW	4.3492±0.13	12.7158±0.52	0.0272±0.001

Values are mean± SD

2) Experimental conditions are same as figure 7.

나. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐에서 혈청 GOT 및 GPT에 미치는 영향

간 기능의 척도로 쓰이는 혈청 GOT, GPT를 측정한 결과 GOT GPT 모두 DEN으로 암화과정을 유도한 발암원 처리군이 정상군에 비해 증가하였으며, 이는 간의 암화과정 유도로 정상쥐에 비해 간 기능이 손상되었음을 의미한다. 발암원 처리군 간을 비교 하였을 때 GPT의 경우 식이에 의한 유의적인 영향이 없었으나 GOT는 다시마 물 추출물 또는 푸코이단을 섭취시켰을 때 유의적으로 감소하여 물 추출물이나 푸코이단의 섭취가 발암원 처리 동물의 간 기능을 보호했음을 확인할 수 있었다. 이는 지질과산화물의 생성이나 2단계 약물대사 효소의 활성과 연관 지어 생각했을 때 물 추출물이나 푸코이단의 섭취에 의해 지질과산화 반응이 억제되고 이로 인해 간 기능의 손상이 억제되었으리라 사료된다. 우리나라의 간 질환 유병율이 높음을 고려한다면, 간암에서뿐 아니라 간염이나 간경화와 같은 간 질환에서 다시마 물 추출물이나 푸코이단이 간 기능 보호 효과가 있는지 검증해 보는 것도 의미 있으리라 사료된다.

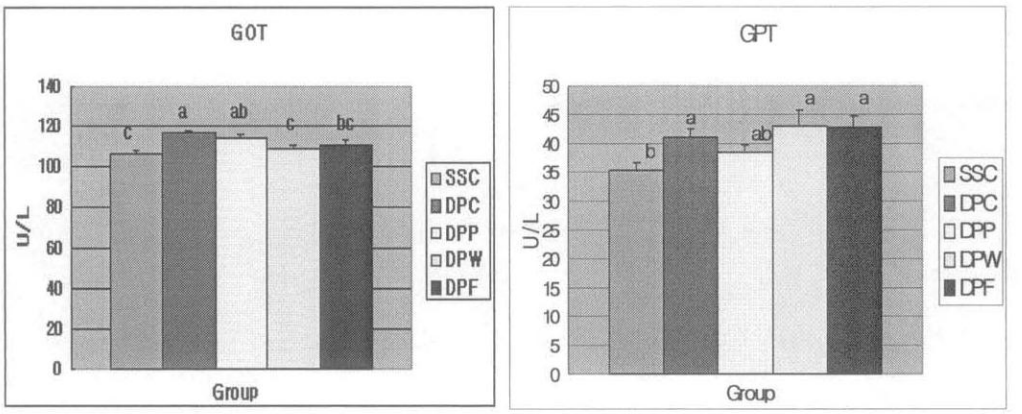


Figure 8. Effect of dietary sea tangle on the s-GOT and s-GPT in the carcinogenesis induced rats

Experimental conditions are same as figure 7.

다. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간의 전암성 병변 형성에 미치는 영향

생체를 이용하여 간암을 연구하는 방법으로 간암을 앓고 있거나 간염 바이러스를 가지고 있는 환자 군을 대상으로 한 인체 연구 뿐 만아니라 동물 실험 모델이 개발되어 왔다. 특히 단기 실험 모델은 세포 수준으로 생체 내에서의 효과와 정확히 일치한다고 보기 어렵고 장기 실험 모델은 2년가량의 소요시간과 비용, 노력 등이 많이 요구되는 단점을 가지고 있어 8주간의 실험기간을 갖는 중기 실험 모델이 개발되었다. Solt등은 간암을 유도하는 것으로 알려진 발암 물질의 특성을 연구하였으며 이중 diethylnitrosamine(DEN)으로 암화를 개시시키고 간 부분 절제 수술과 식이 중 첨가 시킨 2-acetylaminofluorene으로 촉진하여 실험적으로 과증식결절(hyperplastic nodules)과 암종(carcinoma)을 얻었다. Stout와 Becker는 DEN으로 유도한 간암과 자발적으로 진행된 간암에서 여러 효소의 활성 변화가 유사하였다고 보고 하였다. Ito등은 여러 개시 물질을 비교하고 특정 물질의 암화 촉진 가능성 확인을 위한 8주 중기 모델을 개발하여 glutathione-S-transferase(GST-P)

양성병소를 전암성 병변에 대한 최종적인 표지 안자로 제안하였다. 또한, 간 부분 절제술을 시행한 이후 GST-P 양성 병소의 변화 추이를 관찰한 자료도 보고되었으며 DEN 투여 8주 후 간조직에서 측정한 GST-P양성 병소와 52주 후 생성된 결절의 수나 크기 간에 높은 양의 상관성이 확인되었다. 이러한 일련의 연구로 간세암화과정을 연구하기위한 중기 실험동물 모델이 개발되고 여러 실험을 통해 실효성이 확인이 되었으며 전암성 병변의 효과적이고 특이적인 지표로서 GST-P 양성 병소가 주로 이용되고 있다.

본 연구에서 Ito의 중기 모델을 이용하여 (Initiator :DEN, Promoter : partial hepatectomy) GST-P 양성 병소를 유도하고 다시마분말, 물 추출물 및 푸코이단의 억제 효과를 살펴본 결과 다시마의 섭취는 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간에서 전암성 병변의 형성을 억제하였음을 관찰할 수 있었다 (Figure 9, 10). 즉 DEN대신 saline을, 간 부분절제술대신(PH) sham operation을 실시하여 암화과정을 유도하지 않은 대조군인 SSC군에서는 GST-P 양성병소가 전혀 유도되지 않았고 DEN과 PH로 암화과정을 유도하고 대조 식이를 먹인 DPC군은 큰 GST-P 양성병소가 상당히 강하게 염색됨이 관찰되었다. 암과 과정을 유도하면서 각각 다시마 분말, 물 추출물, 푸코이단을 섭취시킨 결과 GST-P 양성병소의 수와 크기 및 염색정도가 모두 감소하였다. 일반적으로 GST-P 양성병소의 수는 개시정도를 면적은 촉진정도로 해석이 되므로 다시마와 푸코이단의 섭취는 간세포 암화과정의 개시과정과 촉진과정을 모두 억제시킨다. 특히 GST-P 양성병소의 수는 다시마 분말과 물 추출물은 $p<0.01$수준에서 유의적으로 감소하여 $p<0.05$수준에서 유의적으로 감소한 푸코이단보다 더 효과적으로 GST-P 양성병소의 수를 감소시킴을 알 수 있었다. 즉 다시마의 간 세포암의 개시과정 억제효과는 단순히 푸코이단의 단독 작용으로 볼 수 없으며 푸코이단 이외의 다른 물질이 억제효과를 상승시킨다고 볼 수 있다.

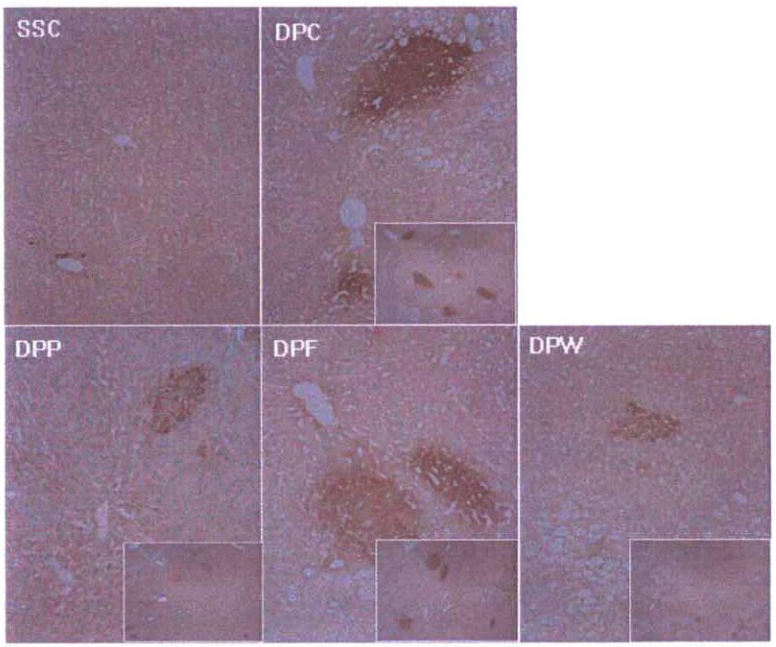


Figure 9. Changes in GST-P(+) staining in treatment with DEN.

SSC: There was not GST-P(+) focin in the section of the sham operated rat liver. DPC: DEN alone treatment on PH rat liver showed large GST-P(+) nodules are noted showing homogeneous and stain densely. DPP: Section of PH rats treated with DEN+sea tangle showed marked changes in GST-P immunoactivity compared with DPC characterizing decrease of GST-P(+) nodules, degree of staining and diameter of the nodules compared with DPC. DPF: GST-P(+) nodules were also noted in the PH rats treated with DEN+fucoidan. DPF has the similar size of nodules that of DPC, but more weak immunoactivity for GST-P. DPW: Section of PH rats treated with DEN+water extract showed the similar expression of GST-P with DPP.

-Experimental conditions are same as figure 7.

-Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test

Table. Frequency of GST-P(+) hyperplastic nodule during DEN-induced hepatocarcinogenesis.

Group	PH (+)	PH(-)
SSC	0	0
DPC	48	24
DPP	26	8
DPF	37	20
DPW	21	15

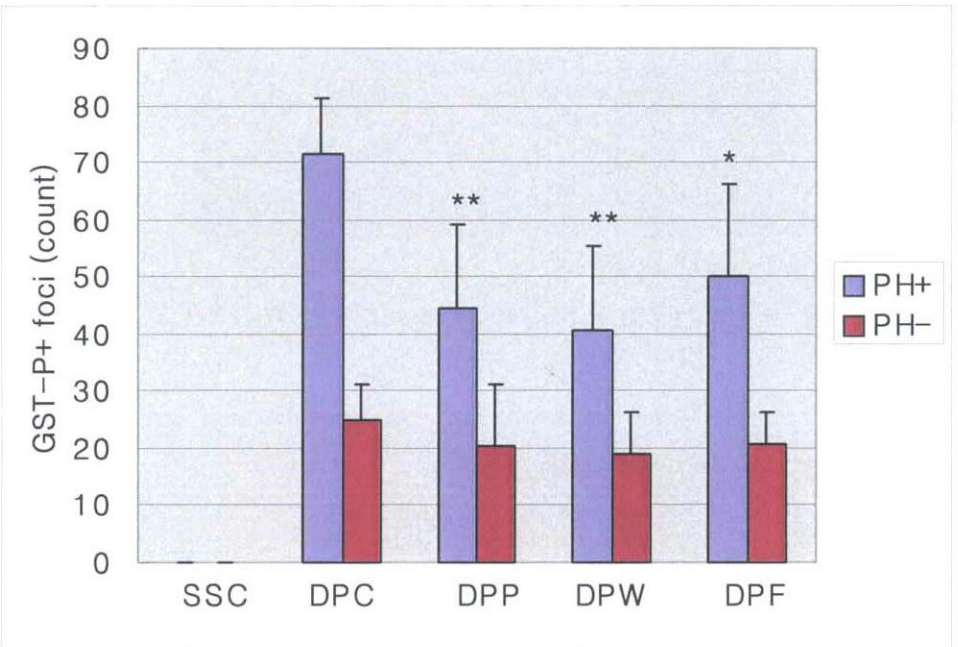


Figure 10. Frequency of GST-P(+) hyperplastic foci during DEN induced hepatocellular carcinogenesis

Experimental conditions are same as figure 7.

Significantly different compared to DPC at P<0.05* and p<0.01**

라. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간의 phase II 효소 활성도 및 지질과산화도에 미치는 영향

2단계(phase II) 약물 대사 효소인 glutathione S-transferase는 다양한 isoenzyme으로 구성되어 있으며 여러 내인성 물질과 외인성 약물 및 발암원이 1단계 약물대사를 거쳐 생성된 친전자성 물질들을 glutathione 과 conjugation시켜 최종적으로 독성이 적고 극성이 큰 물질로 전환되게 함으로써 체외로의 배출을 용이하게 한다. 이러한 현상은 신체에서 친전자성 물질을 제거함으로써 종양성성과정을 방지하는 효과를 나타낸다. 많은 발암물질의 대사에서 GST는 해독화 과정으로 생각되고 있다. 본 실험에서 측정한 GST 활성도를 측정한 결과 정상군(SSC)에 비해 발암원 처리군(DPC)이 유의적으로 증가하였다. 이때 증가된 GST는 투여된 발암원 및 발암원의 대사물을 해독화하기 위하여 유도되었으리라 생각된다. 발암원 처리 시에는 대조식이군에 비해 다시마를 섭취한 군의 활성이 낮았고 그 효과는 다시마 분말<물 추출물<푸코이단의 순이었다(Figure 10). 쥐에서 화학적으로 간 세포암을 유도했을 때 CDNB에 대한 GST의 활성은 GGT 양성병소와 증식성 결절이 증가함에 따라 증가하였고 전암성 단계 이후 많이 발현되며 암화과정이 진행될수록 발현이 증가되어 변형된 세포가 저항성을 갖게 함으로써 종양형성에 기여한다. 따라서 본 연구에서는 GST의 활성이 큰 DPC 군보다 상대적으로 활성이 낮은 DPS, DPW, DPF 군에서 암화과정의 진행이 억제된 것으로 보인다. 즉 다시마의 섭취는 암화과정의 진행을 억제시켰으며 그 효과는 푸코이단이 가장 컸다.

Glutathione peroxidase(GPx)는 모든 포유동물의 조직에서 발견되며 GSH를 사용하여 H_2O_2와 유기 과산화물(organic hydroperoxides)를 제거시키고 이때 생성된 GSSG는 glutathione reductase(GR)에 의해 다시 GSH에 의존하는 산화환원반응을 통해 세포막을 보호한다. 암화과정 초기에는 GPx활성이 감소하다가 전암성 병변 단계에서 형성되는 결절(nodules)과 병소(foci)가 유

기 과산화물을 형성하여 이를 제거하기 위해 GPx 활성이 증가한다. GPx 활성도를 cytosol 분획에서 측정한 결과 정상군(SSC)에 비해 발암원 처리군(DPC)이 유의적으로 증가하였으며 발암원 처리 시 다시마를 섭취시키면 그 활성이 감소하였고 그 효과는 다시마 분말<물 추출물<푸코이단의 순으로 GST의 활성과 같은 경향이었다(Figure 7). 쥐의 간세포 암화과정에서 전암성 병변이 생성됨에 따라 GPx의 활성은 증가한다하였으므로 본 연구에서 다시마의 섭취가 암화과정에서 발생하는 산화적 스트레스를 감소시켜 전암성 병변 내에서 유기 과산화물을 형성을 저하시키고 따라서 GPx의 활성을 감소시킨 것으로 사료된다.

Glutathione reductase(GR)는 모든 포유동물의 조직에서 발견되는 flavoprotein으로 cytosol에 존재하고 산화환원 반응을 통해 세포내 glutathione pool을 환원상태로 유지함으로써 간접적으로 세포 보호 및 항상성 유지에 기여한다. 본 연구에서 GR의 활성도는 실험군간 유의적인 차이를 보이지 않았으나 GST나 GPx와 비슷한 경향을 보였다(Figure 10).

소포체 막의 다가불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid)은 지질 과산화반응의 기질이 되며 발암원이나 외인성 약물의 투여는 자유래디칼 생성을 증가시키거나 과산화에 대한 세포의 방어능력을 저하시켜 지질과산화반응을 촉진시킨다고 알려져 있다. 또한 지질과산화물은 막 부착 리보솜(ribosome)의 분리를 가져와 전반적인 간세포 손상을 유발하며 암화과정의 촉진과도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 암화과정동안 생성된 지질과산화물은 발암물질의 활성화에 관여하는 효소에 의해 생성되거나 개시단계나 촉진단계에서 생성된다. 간 microsome에 막 지질과산화정도를 측정하는 방법인 TBARS 함량을 척정한 결과, 지질과산화물이 발암원을 처리하여 암화과정을 유도하였을 때 증가하는 경향을 보였고 암화과정을 유도하면서 다시마를 섭취시킨 결과 유의적으로 감소하였다(figure 11).

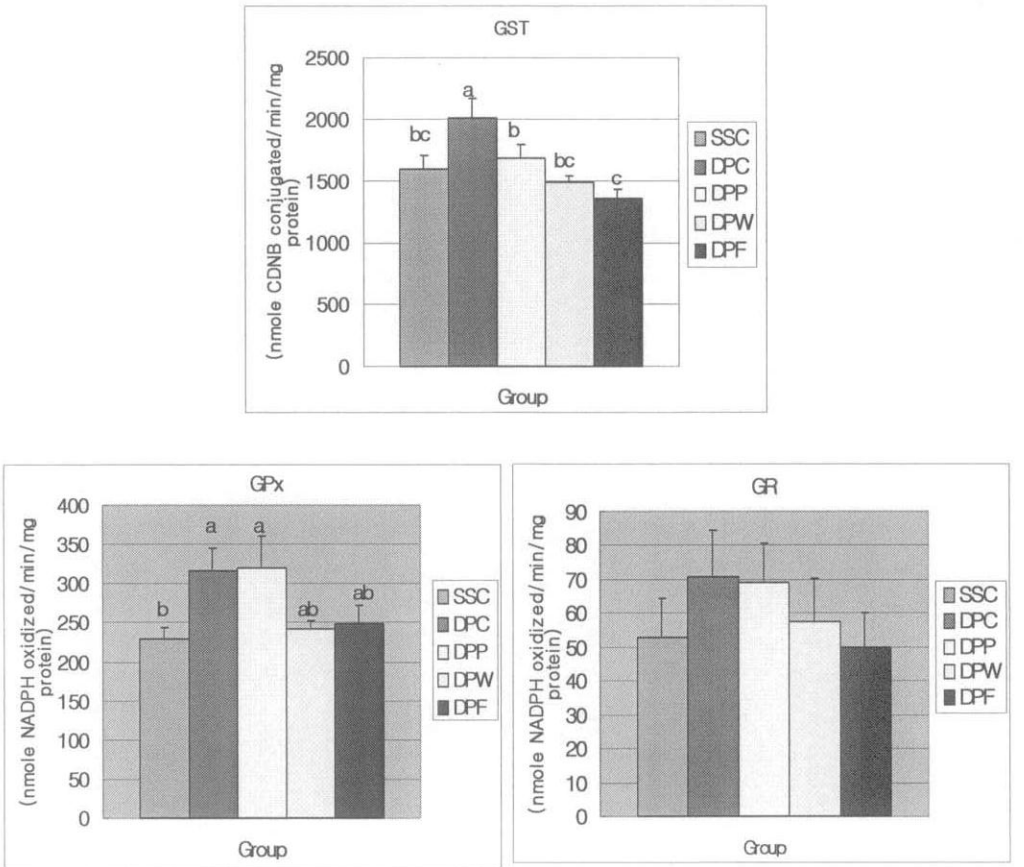


Figure 10. Effect of dietary sea tangle on the hepatic glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activities in the carcinogenesis induced rats

Experimental conditions are same as figure 7.

Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test

본 연구에서 TBARS 값을 2단계 약물 대사 효소 활성과 비교해 보면 암화 과정동안 다시마의 섭취는 전암성 병변 내에서 지질과산화물의 생성을 억제하여 과산화물을 제거하기위한 2단계 약물 대사 효소의 활성 증가를 억제 시킨 것으로 사료된다.

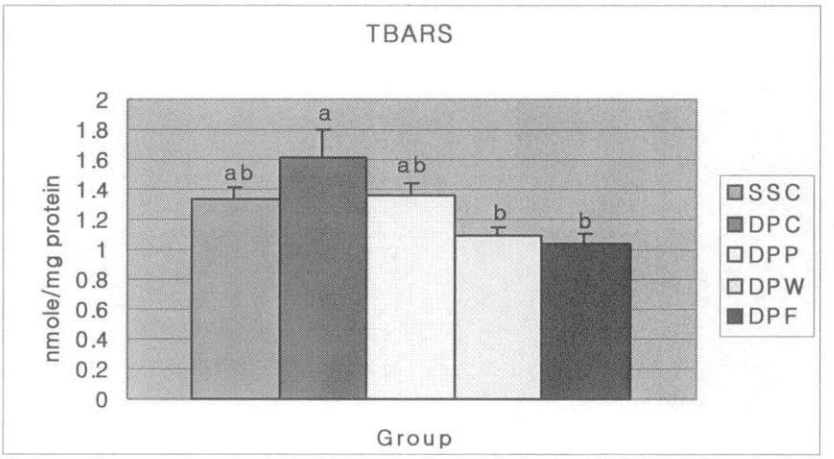


Figure 11. Effect of dietary sea tangle on the hepatic TBARS content in the carcinogenesis induced rats

Experimental conditions are same as figure 7.

Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test

마. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간의 조직학적 변화에 미치는 영향

다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간의 조직학적 변화를 억제함이 관찰되었다.

암화과정을 유도하지 않은 정상군(SSC)의 경우 정상적인 간세포의 구조를 유지하고 있었으나 DEN과 PH로 암화과정을 유도하면서 대조 식이를 섭취한 DPC군은 fatty change 및 eosinophilic cell, clear cell등이 관찰되었으며 apoptic figure를 보였다. 그러나 암화과정을 유도하면 다시마 분말을 섭취시킨 DPP군은 거의 정상적인 구조를 보였고 물 추출물을 섭취시킨 경우에는 fatty change를 관찰할 수 있었다. 다시마 분말을 섭취시킨 DPP군이 발암대조군(DPC)이나 푸코이단을 섭취시킨 경우보다 간세포의 퇴화정도가 경미한 것으로 관찰되었다.

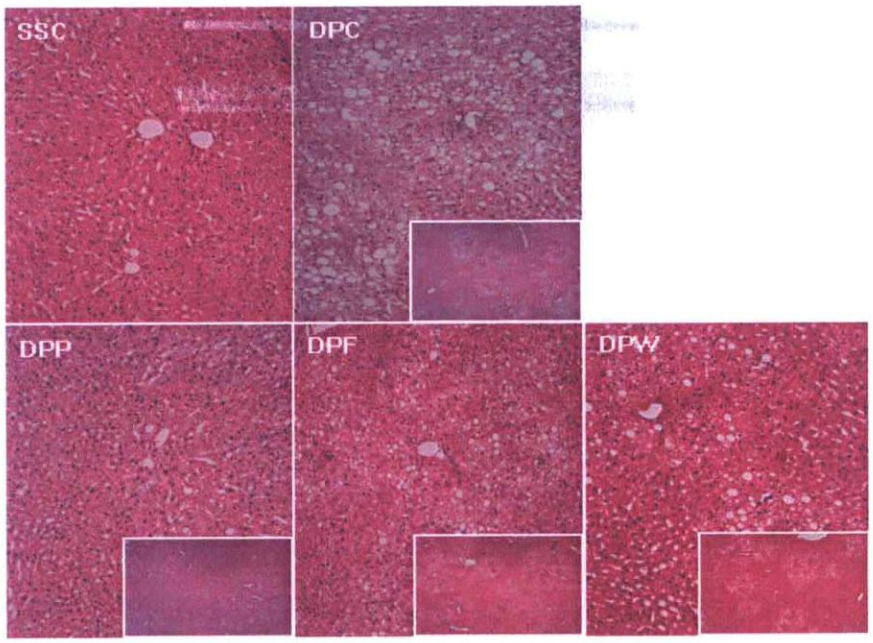


Figure 12. H&E staining of the rat liver during DEN-induced carcinogenesis in partial hepatectomized rats.

SSC: Section of the sham operated rat liver showing normal hepatocellular architecture. DPC: Section of the partial hepatectomized (PH) rats treated with DEN showing abnormal architecture characterizing pericentral fatty change accompanying eosinophilic and clear cells and apoptotic figures. DPP: Section of the PH rats treated with DEN+sea tangle showing almost normal architecture. DPF: Section of the PH rats treated with DEN+fucoidan showing diffuse pericentral fatty change accompanying not only eosinophilic, mixed and clear cells but also apoptotic cells. DPW: Section of the PH rats treated with DEN+ water extract showing diffuse pericentral fatty change. DPP of the degree of the hepatocellular degeneration was mild compared with DPC and DPF.

Experimental conditions are same as figure 7.

Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test

2. 간암 세포주의 성장 및 전이능에 미치는 영향

간암세포 HepG-2에서는 다시마 물 추출물과 푸코이단 모두 50㎍/㎖ 농도로 처리했을 때 유의적으로 성장을 억제하였으며 100㎍/㎖ 농도로 처리했을 때는 더 강하게 억제하였다. 성장억제효과는 물 추출물과 푸코이단 간에 유의적인 차이는 없었으나 물 추출물이 더 효과적이었다(fig 13). 이러한 결과는 다시마가 HepG2 세포의 성장을 억제함에 있어 푸코이단 외에 다른 수용성 물질이 물 추출물에 존재하여 더 많은 억제효과를 낼 수 있음을 의미한다.

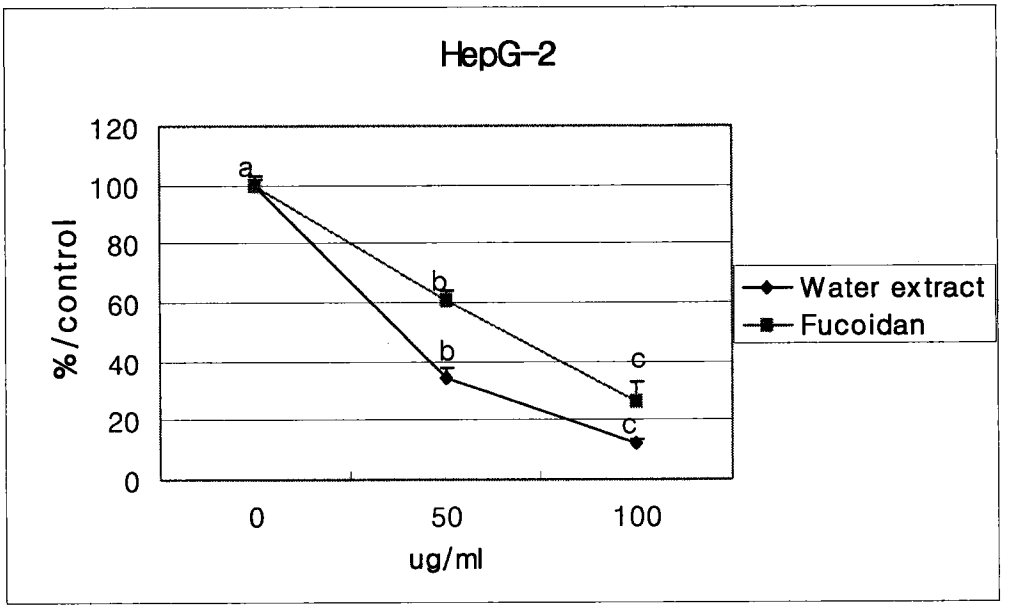


Figure 13. Effects of water extract of sea tangle and fucoidan on the proliferation of HepG2 cells.

Means with the same letter are not significantly different in the same treated group by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

암의 치료에 있어서 가장 큰 장벽이고 암환자의 주된 사망요인은 암세포의 전이(metastasis)에 의한 것이다. 따라서 암치료를 위한 전이 억제제의 개발을 위해 암세포의 침윤(invasion)과 전이의 분자적인 기전에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다.

암세포가 전이하기 위한 기전으로 일차적으로 기저막(basement membrane)의 침윤이 일어난다. 이러한 기저막의 침윤과정은 먼저 암세포의 기질 부착(adhesion), 단백질 분해효소(protease)에 의한 기저막 분해(proteolysis), 암세포의 기질내로 이동(migration) 단계들을 거치게 되며 이러한 과정이 반복되어 암세포 침윤이 발생한다. 따라서 본 연구에서는 HepG2 세포의 전이능에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 adhesion assay를 실시한 결과 대조군에 비해 물 추출물 처리군과 푸코이단 처리군 모두 adhesion 정도가 약간 감소하였으나 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다(fig 14). 또한 gelatin zymography를 통하여 MMP2와 MMP9의 활성을 측정한 결과 adhesion assay에서와 마찬가지로 다시마 물 추출물 및 푸코이단의 효과를 관찰할 수 없었다(fig 15). 따라서 다시마 물 추출물과 푸코이단은 HepG2 세포의 성장을 억제하는 효과는 있으나 전이능을 억제에 대하여는 가시적인 효과가 없는 것으로 나타났다.

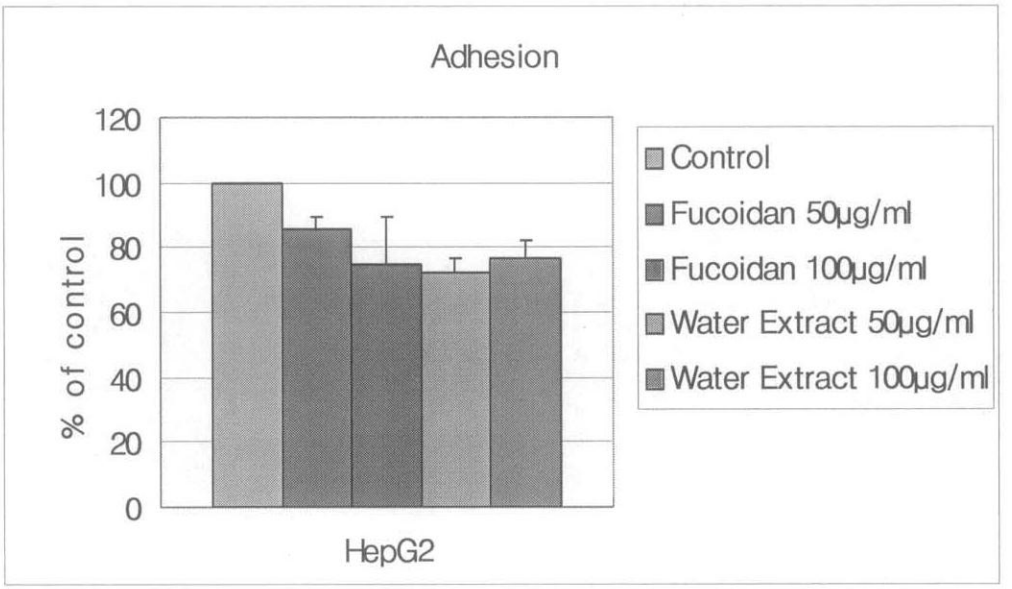
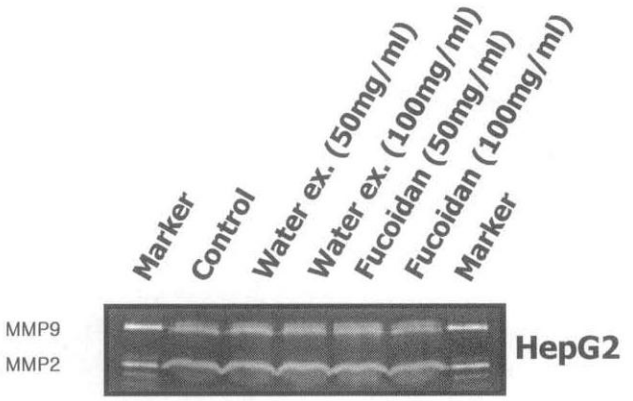


Figure 14. Effect of water extract of sea tangle and fucoidan on the adhesion of HepG2 cells



여 백

제 3 절. 기능성 식품 개발을 위한 다시마의 유방암 억제 효과 규명

(1) 연구방법

1. In vivo에서 DMBA로 유도한 유방 암화과정에 미치는 영향

가. 다시마 물 추출물 제조.

180ml의 다시마 가루를 1.8L의 증류수에 녹인 후, 삼각플라스크에 넣고, 상온에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간 후 9000rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 분리, 이 분리액을 감압여과 하여농축하였다. 이때 Water bath온도는 40℃에서 하며, 농축bottle의 회전속도는 6~7로 하여 원래용량의 20%로 농축하였다. 농축한 용액을 동결건조 bottle에 넣어 -71℃ freezer에서 24시간 동안 방치하여, 동결건조 시켜 동결건조가 끝난 추출물은 powder로 만들어 냉동보관하며 사용하였다.

나. 실험동물 및 실험설계

이유한 Sprague-Dawley계 흰쥐 암컷을 다섯 군으로 분류하여 (Experimental design). 생후 3주째부터 대조식이인 AIN 식이와 AIN 식이에 다시마 분말, 물 추출물, 푸코이단을 각각 첨가한 식이를 먹여 사육하였다. 생후 50일째 DMBA를 체중 50mg/kg 수준으로 존데를 이용하여 위로 주입하여 유방암을 유도하고 DMBA 투여 후 14까지 사육한 후 동물을 희생시켰다.

다. 유방 종양 보유율과 종양개수 및 종양 무게 측정

DMBA 투여 후 14주까지 매주 체중을 측정하였으며, 주 2회 동물들을 한

마리씩 잘 살펴보고 또 손으로 만져 보아 종양 발생 여부 및 종양개수를 기록하였고 이로부터 군별 종양보유율과 마리당 평균 종양 수를 계산하여 그 추이를 비교하였다. 또한 희생시킨 직 후 혈액을 채혈한 후 혈청을 얻고, 종양을 모두 떼어내어 털과 피부를 제거한 후 마리당 총 종양무게를 측정하였다.

라. 조직병리학적 검사

피부를 박피한 후 유선과 종양조직을 절제하여 10% 중성 포르말린용액에 고정하고, 통상적인 paraffin format을 거쳐 4㎛크기로 조직절편을 만든 다음 hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색한다. 염색 후 슬라이드를 알코올 시리즈와 톨루엔으로 탈수 하여 광학 현미경(100, 400×magnification)을 이용하여 조직 병리학적 분석을 실시하였다.

마. 면역 조직화학적 검사

면역 조직 화학적 검사는 α-smooth muscle 항체(α-SMA at dilution of 1:1800, Sigma, USA)와 BrdU IHC kit(CHEMICON International, Inc., USA)를 이용하여 실시하였다. 적출된 우선과 종양을 10% 중성 포르말린 용액에 고정하고 통상적인 paraffin format을 거쳐 4㎛크기로 조직절편을 만든 다음 탈파라핀, 재수화(re-hydration)과정을 거친 후 3%과산화수소/메탄올 용액에서 30분간 incubate 한 후 10mmol/L citrate buffer(pH6.0) 담가 10분간 microwave한다. 조직절편을 PBS로 씻어낸 후 1차 항체(primary antibody: anti-BrdU antibody, anti-α-SMA antibody)로 면역 염색하였다. 항원-항체 복합체를 ABC kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 이용하여 avidin-biotin peroxidase complex solution으로 visualize하였다. 절편을 증류수로 헹구고 Mayers hematoxylin으로 대조 염색하였다. Negative control의 경우 1차항체 대신 phosphate buffered saline을 사용하였다.

2. DMBA를 처리한 쥐 간의 항산화 효소 및 혈액 효소 활성에 미치는 영향.

가. Thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS) 함량측정

Buege와Aust(1978)의 방법으로 간의 microsome 분획에서 지질과산화물의 함량을 측정한다.

나. Glutathione S-transferase(GST)의 활성도

1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)과 환원형 glutathione(GSH)을 기질로 사용하는 Habig등 의 방법에 따라 간 세포질에서 측정한다.

다. Glutathione peroxidase(GPx)의 활성도

Tapple의 방법으로 기질은 cumene hydroperoxide를 사용 glutathione reductase 가 GSH를 환원시킬 때 NADPH 가 NADP+ 로 산화되는 정도를 측정한다.

라. Glutathione reductase(GR)의 활성도

간 세포질의 GR 활성도는 Carlberg 와 Mannervick의 방법을 이용하여 측정한다.

마. 단백질 함량의 측정

Lowry의 방법에 의해 측정한다.

바. 혈청의 효소 활성 및 BUN, albumin 함량 측정

혈청에서 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), lactate dehydrogenase(LDH) 활성 및 albumin, blood urea nitrogen(BUN), 농도를 측정한다.

3. 유방암 세포주의 성장에 미치는 영향

가. 세포주 및 배양 조건

사람의 유방암세포인 MCF-7세포, MDA-MB-231세포와 간암세포인 HepG2 세포를 ATCC(Rickville, MD)에서 구입하였다. 모든 세포는 10% FBS를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco, Gaithersberg) 으로 배양한다. 이들 배양액에는 10U/L의 penicillin G, 10 mg/㎖의 streptomycin sulfate, 25㎍/㎖의 amphotericin B를 포함하는 antibiotic antimycotic용액(ABAM, GibcoBRL)를 첨가하여 사용하였고, 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다.

또 계대배양을 위해서 세 세포주 모두 배양접시 바닥에 붙어서 자라는 세포(attached cell line)로 배양접시에 약 80%정도 자랐을 때 배지를 버리고 세포를 PBS 완충용액으로 2번 세척하고, 배양접시 바닥에 붙어있는 세포에 Trypsin-EDTA dyddor(0.05% trypsin, 0.53mM EDTA in HBSS, JBI)을 가하고 1분 정도 후에 세포가 바닥으로부터 떨어지면 혈청을 포함하는 배양배지를 동량을 넣어 원심분리 하였다(1,000rpm, 5min). 원심 분리해 모은 세포는 뭉치지 않게 풀어준 후 새 배지에 희석하여 계대배양 하였다.

나. Cell Proliferation Assay

인간 유방암 세포주 MCF-7, MDA-MB231와 간암 세포주 HepG2에 대한 다시마 물 추출물 및 푸코이단의 생장억제 효과를 관찰하였다. 세 가지세포를 6 well culture plate에 6×10^5개의 세포를 seeding 한 후 다음날부터 물 추출물과 푸코이단을 각각 50㎍/㎖, 100㎍/㎖씩 처리하면서 5일간 더 배양하였다. 이때 배양액은 날마다 교환하면서 매일 물 추출물과 푸코이단처리를 하였고 대조군은 PBS를 처리하였다. 처리 5일째 되는 날 trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 Coulter particle count(Coulter Corp, Miami, Florida)를 이용하여 세포수를 counting 하였다. 세 반복하여 실시한 후 평균값을 계산하였다.

다. Cell Adhesion Assay

12-well plate를 30㎍의 Matrigel로 코팅한 후 비특이적 결합 부위를 없애기 위하여 Matrigel 코팅한 plate를 0.1% BSA를 함유한 serum free DMEM으로 37℃에서 90분간 재수화(re-hydration)시킨 후 같은 배양액으로 washing하였다. MCF-7, MDA-MB-231세포를 trypsin으로 분리하여 0.1% BSA를 함유한 serum free DMEM 배양액으로 재 부유한 후. 각 well에 2×10^5개의 세포를 seeding 하고 물 추출물과 푸코이단을 각각 50㎍/㎖, 100㎍/㎖씩 처리하면서 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 90분간 배양하였다. 90분이 지난 후 배양액을 제거하고 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 PBS로 washing 한 후 trypsin으로 부착된 세포를 분리하여 재 부유시킨 후 세포수를 count한다. 세 반복 한 값을 평균하여 관찰 값으로 하였다.

라. Gelatin zymography

기질금속단백분해효소(Matrix metalloproteinase, MMP) 2와 9의 활성을 알아보기 위하여 gelatin zymography를 실시하였다. HepG2 세포를 culture plate에 분주하고 80%정도 자랐을 때 물 추출물과 푸코이단을 각각 50㎍/㎖, 100㎍/㎖씩 처리하면서 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 24시간 배양하였다. 상층액을 취하여 0.1% (w/v) gelatin이 포함된 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 전기 영동하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% Triton X-100용액에서 1시간 동안 씻어낸 다음 developing buffer에서 37℃로 24시간 배양하였다. Coomassie 염색과 탈색을 통하여 MMP2와 9의 활성 정도를 확인하였다.

마. 통계학적 처리

모든 실험 결과는 평균 ±표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 AVOVA test 후 사후 검정은 $p<0.05$수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다

(2) 연구결과

1. 다시마가 화학적으로 유도한 유방의 암화과정 억제효과

가. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐의 식이효율과 체중에 미치는 영향

화학적 발암원으로 암화과정을 유도한 쥐의 식이 섭취량과 체중을 매주 측정한 결과 실험군당 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 유방 종양이 생기기 시작한 8주부터의 체중은 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

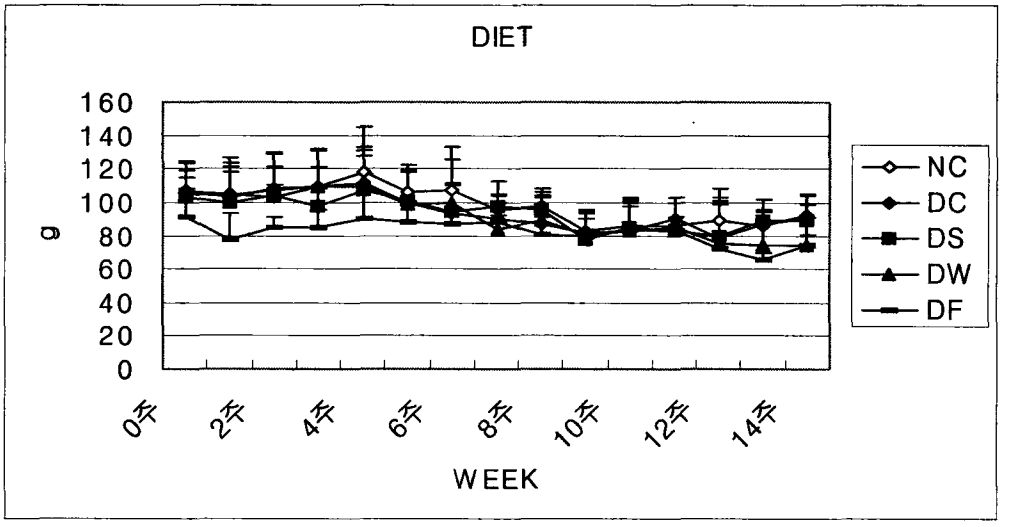


Figure 1. Effect of dietary sea tangle on the body weight DMBA treated **rats.**

NG: Normal Group, DC: DMBA Control, DS: DMBA Sea tangle
DW: DMBA Water extract, DF: DMBA Fucoidan

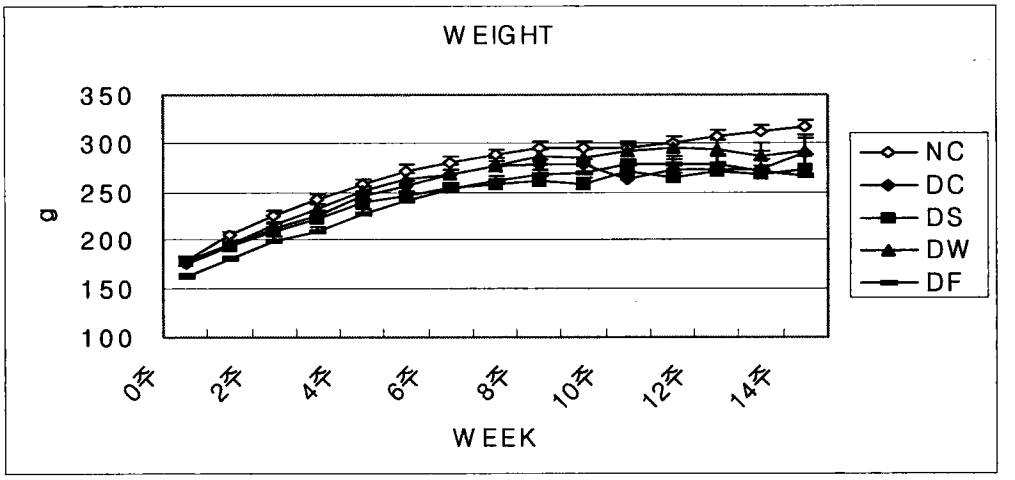


Figure 2. Effect of dietary sea tangle on the body weight in DMBA treated rats.

Experimental conditions are same as figure 1

나. 다시마의 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐에서 유방종양 보유율과 종양개수 및 종양무게에 미치는 영향

종양은 DMBA 투여한 실험군 48마리 중에서 21마리에서 발생되었으나, 대조군에서는 발생되지 않았다. 총 발생 종양 수는 114개 발생했으며, 종양의 평균무게는 18.6±7.98g이었다. DMBA 투여 후 기간별 종양 생성여부 및 종양수를 관찰한 결과 8주부터 종양이 생기기 시작하였고, 각 군 간에 실험기간에 따른 종양발생율의 추이는 Figure 3과 같다. DMBA투여 후 8주부터 10주까지 종양 발생률을 살펴보면 DF군이 가장 높게 나타났다. DF군은 12마리 중에서 5마리에서 발생되었고(58.3%), DW군은 10마리 중에서 5마리(50%), DC군은 11마리 중에서 5마리 발생되었고(45.5%), DS군이 12마리 중에 3마리가(25.5%) 종양이 발생되어 DS군에서 가장 낮은 종양 발생률을 보였다. 11주부터 14주까지 유방 발생률을 보면, 11주부터 DC군의 발생률이 빠르게 증가하여 희생 직전인 14주에는 10마리 중에서 9마리(90%)가 발생되어 가장 높

은 종양 발생률을 보였다. DF군은 11주에도 꾸준히 증가하여 14주에는 11마리 중에서 9마리에서 (81.8%) 유방 종양이 발생되었고, DW군은 10마리 중에서 7마리에서 발생되었고(70%), DS군은 11마리 중에서 6마리(54.5%)로 가장 낮은 종양 발생률을 보였다(Figure 3).

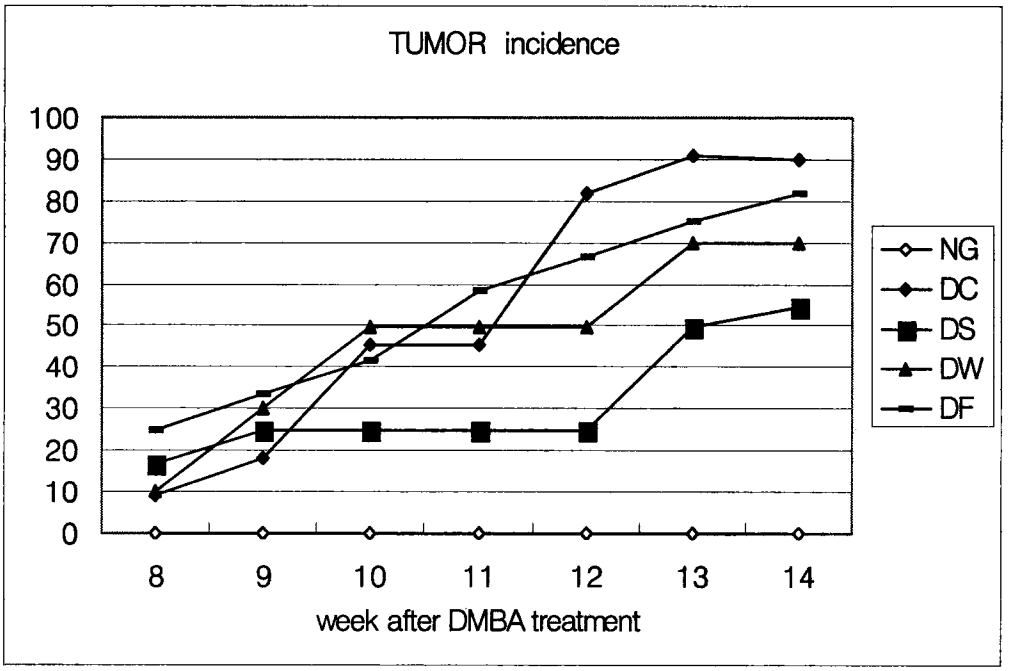


Figure 3. The effects of sea tangle intake on tumor incidence.

Experimental conditions are same as figure 1

마리 당 평균 유방 종양 수는 Figure 4에서 볼 수 있다. 최종적으로 희생 직전의 마리당 평균 종양 수는 DF군은 3.55±0.72개로 가장 높았고, DC군 3.1±0.61개, DW군 2.5±0.56개, DS군 1.73±0.54개로 가장 낮게 나타났으나 통계적 유의차는 없었다(Figure 4).

암 발생은 정상세포가 외부의 발암물질원에 이해 다단계로 진행되며 크게 개시(initiation), 촉진(promotion) 그리고 진행(progression)의 세 과정으로 진행

된다. 이러한 다단계 과정으로 일어나는 암 발생과정은 여러 가지 천연물 또는 화학적 화합물에 의해 억제되거나 지연될 수 있다. 본 연구의 결과를 살펴보면 다시마 섭취는 유방종양의 크기는 줄이지 못하였으나, initiation의 진행과정을 지연시켜 유방종양 발생율을 억제한 것으로 사료된다.

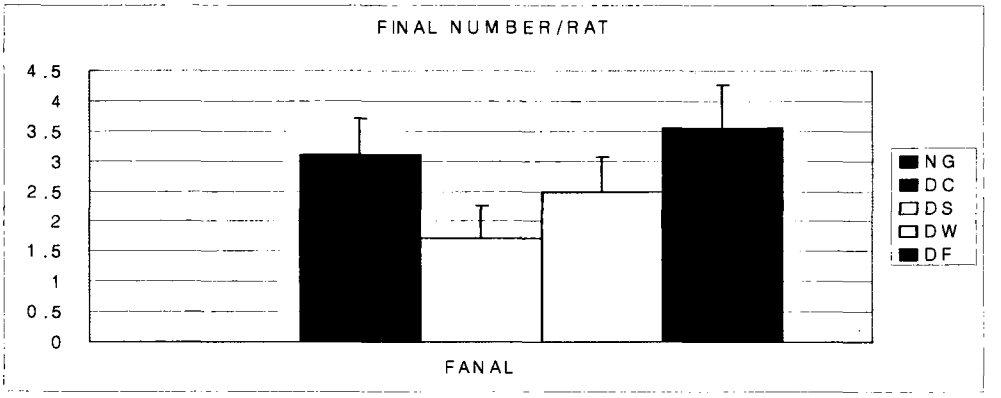


Figure 4. The effects of sea tangle intake on average tumor number a rat.

Experimental conditions are same as figure 1

다. 다시마가 유방암을 유도했을 때 유방조직 및 종양의 조직학적 변화에 미치는 영향 규명

유선은 피부의 특수한 선(gland) 구조의 하나로 복합관포상선이며 피막, 간질성 결합조직, 선포 및 배출도관계로 구성되어 있고, 선조직은 결합조직에 의해 소엽으로 구획된다. 선조직은 선포와 분비도관으로 구성되어 있으며, 내강상피세포와 근 상피세포(myoepithelial cell) 두 종류의 세포층으로 피복되어 있고 후자는 기저막(basement membrane)과 접하여 있다. 정상적인 유선 상피 조직 내에는 유선 조직의 지속적인 성장에 관여하는 유선 간세포(mammary stem cell)들이 존재한다. 이들 세포들의 분화 및 성장에는 여러 종류의 성장인자들, 호르몬, 무기이온, 세포외 기질 단백질 등이 영향을 미치는 것으로 생각되고 있다. 이러한 유선 간세포들은 유선암 발생 시 발암물질

들의 표적이 되며 간세포의 변이에 의한 암세포 변환으로 생각되고 있다. 일반적으로 발암 과정 및 종양의 유지과정에는 세포의 증식과 성장을 도와주는 유전자와 세포의 성장과 증식을 억제하는 종양억제유전자 그리고 apoptosis를 조절하는 유전자 등이 관여한다. 본 연구에서는 다시마가 유선 상피세포 및 유방암세포들의 증식과 분화에 미치는 영향을 살펴보았다.

유선 상피세포의 증식 정도를 살펴보면, 암화과정을 유도하지 않은 정상군(NC군)의 경우 정상적인 세포의 구조를 유지하고 있었으나, NC군과 비교 시 DC군의 유선과 도관의 상피세포(glandular and ductular epithelial cells)는 증식이 증가되어 multilayer(다층 구조) 구조를 보였다(Figure 5). 반면, DC군과 비교 시 DS, DW, DF군의 상피세포는 증식이 감소되었다. 따라서 다시마는 유선 상피세포의 증식을 감소시켜 암 발생을 억제시킨 것으로 사료된다.

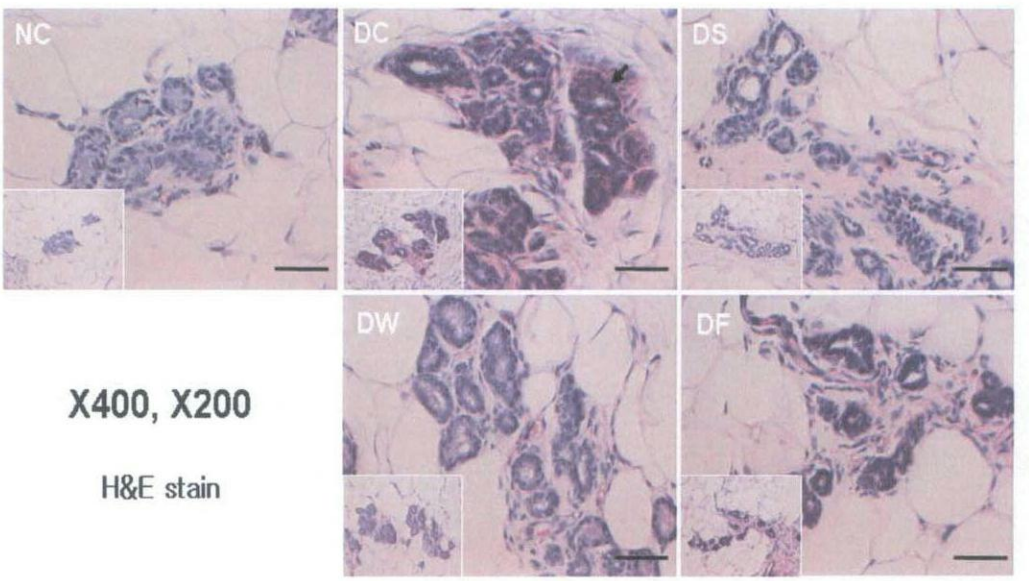


Figure 5. Histological feature in mammary gland of each group showed differences in the degree of proliferation of glandular and ductular epithelial cells.

HE staining, bars = 100㎛, original magnification(확대) ×200 and ×400.

BrdU는 thymidine analogue로서 세포의 증식을 측정하는 지표로 thymidine uptake의 대안으로 이용되고 있으며, 단클론 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 하여 BrdU labelling index로 세포의 증식 정도를 평가할 수 있다.

유선의 분열 여부를 알아보기 위하여 분열하는 세포의 DNA 증식 과정 중 S-phase에서 thymidine을 대신하여 결합하는 BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine)를 이용하여 세포의 증식을 측정하는 지표인 BrdU 면역조직화학 검사를 하여 다시마가 유선세포 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. NC, DW, DF군의 유선에서는 BrdU 양성세포가 나타나지 않았고, DS군은 단지 작은 수의 BrdU 양성세포를 관찰하였다(Figure 6). 그러나 DC군의 유선 상피세포에서 BrdU 양성세포가 관찰되었다. 본 연구에서 BrdU 면역조직화학 검사의 결과를 종합해 보면, 발암원인 DMBA를 처리하고, 다시마를 첨가하지 않은 식이를 먹인 DC군에서는 BrdU 양성 세포가 관찰되었고, DW군과 DF군은 DMBA 처리를 하지 않은 정상군인 NC군과 같은 양상을 보였으므로 다시마는 유선 상피세포의 증식을 감소시키는데 작용하여 암 발생을 억제할 수 있다고 사료된다.

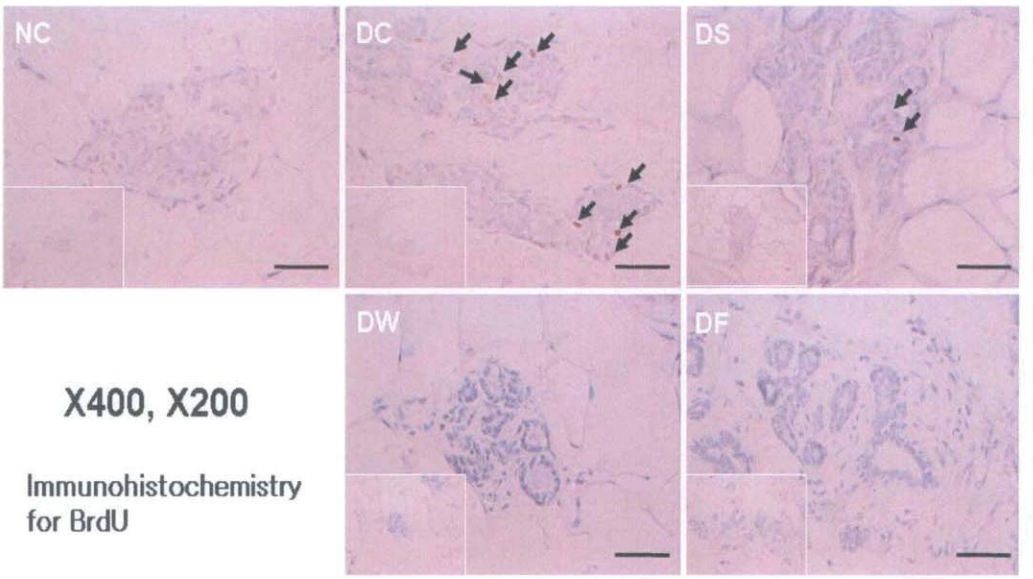


Figure 6. Immunohistochemical findings for BrdU incorporation in mammary gland of each group.

bars = 100㎛, original magnification ×200 and ×400.

각 군의 종양조직에서 유선과 도관 상피세포의 분화 정도와 종양세포(tumor cell) 증식 형태의 조직학적 차이를 관찰하였다(Figure 7). DC군의 종양은 주로 solid carcinoma를 보였고, 다른 군과 비교 시 종양의 형태가 다르고, 암화과정이 진행된 형태를 보여주는 neoplastic tumor cells의 수가 높게 관찰되었다. 반면, DC군과 비교 시 DS, DW, DF군의 종양은 주로 cystic adenocarcinoma 혹은 papillary adenocarcinoma 형태를 보였고, neoplastic cell의 수가 작게 관찰되었다.

암 발생은 정상세포가 외부의 발암물질원에 이해 다단계로 진행되며 크게 개시(initiation), 촉진(promotion) 그리고 진행(progression)의 세 과정으로 진행된다. 본 연구에서 DC군의 종양 형태가 다르고 암화과정이 더 진행된 것으로 관찰되었다. 따라서 다시마는 다단계 과정으로 일어나는 암 발생과정을 억제

혹은 지연시킨 것으로 사료된다.

각 군의 유선암에서 BrdU 결합에 관한 면역조직학적 결과는 Figure 8과 같다. DC군과 비교 시 DS, DW, DF,군의 유선암에서는 BrdU 양성 세포들의 개체수가 감소된 것으로 관찰되었다. 그러나 DC군의 유선암은 solid mass에서 많은 BrdU 양성 세포들을 보였다.

HE stain X200

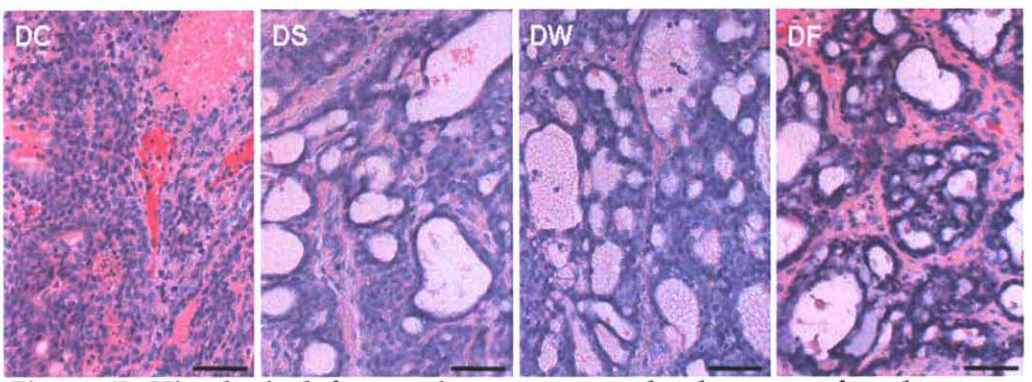


Figure 7. Histological feature in mammary gland tumor of each group showed differences in the degree of differentiation of glandular and ductular epithelial cells and pattern of tumor cell proliferation.

HE staining, bars = 100㎛, original magnification ×200.

Immunohistochemistry for BrdU X200

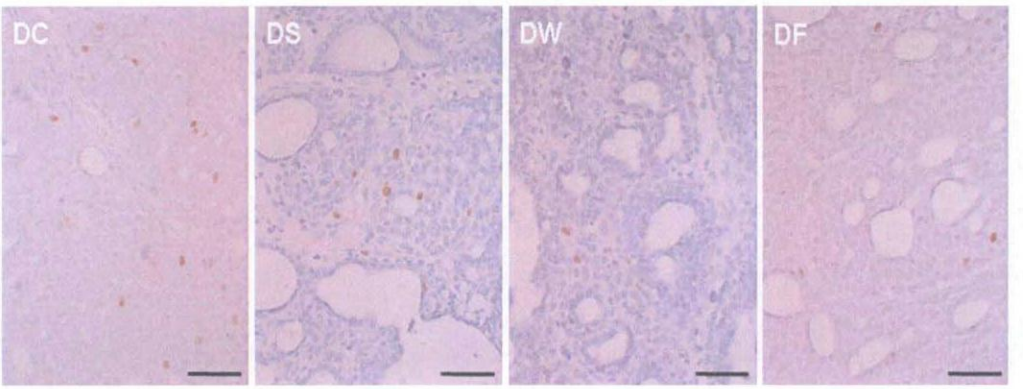


Figure 8. Immunohistochemical findings for BrdU incorporation in mammary gland tumor of each group.

bars = 100㎛, original magnification ×200.

종양억제 유전자(tumor suppressor gene)인 p53은 다수의 표적 유전자의 발현을 조절하는데 이들 표적 유전자들은 세포의 성장(cell growth)과 사멸(apoptosis)에 중요한 영향을 미친다. 이중 α-smooth muscle actin은 미세필라멘트(microfilament)의 주요 구성성분이며 세포의 형태유지와 운동성에 중요한 역할을 한다. 또한 유선의 근상피세포(myoepithelial cell)의 표식자(marker)로서 p53-/- 유전자 이식 암컷 생쥐 (transgenic female mouse)의 형질 변환된(transformed)세포에서는 발현이 저하되며 세포 분열과 α-smooth muscle actin 발현 간에는 역의 상관관계를 보인다. 반면 종양억제유전자를 유지하고 있는 p53+/+ 종양조직에서는 α-smooth muscle actin이 강하게 발현되었다. 또한 인간의 유방 신생물(neoplasms)의 양성부분(benign lesion)에서는 근상피세포의 형태가 유지되어 α-smooth muscle actin이 발현되나 침윤

성 종양(invasive carcinoma)에서는 거의 소실되어 α-smooth muscle actin의 발현을 관찰할 수 없다.

본 연구에서 다시마가 유선암의 근상피세포 분화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 α-smooth muscle actin의 발현을 살펴본 결과, 대조식이를 섭취시킨 DC군은 α-smooth muscle actin 발현이 그 정도와 빈도에서 감소되어 종양 내 미분화된 근상피세포가 증가하였고 이로 인해 조직 분괴가 많이 발생하였으며 상대적으로 침윤성이 강한 악성부위(malignant lesion)가 많음을 알 수 있었다(Figure 9). 그러나 다시마나(DS, DW군) 푸코이단(DF군)을 섭취시킨 경우 대조군과 비교 시 α-smooth muscle actin 발현이 증가되어 분화된 조직학적 선의 구조를 나타내는 근상피세포가 더 잘 유지되어 있음을 알 수 있었고 이는 다시마나 푸코이단의 첨가 시 생성된 종양은 크기에 상관없이 대조군과 비교하여 양성 부위가 많음을 시사한다(Figure 9).

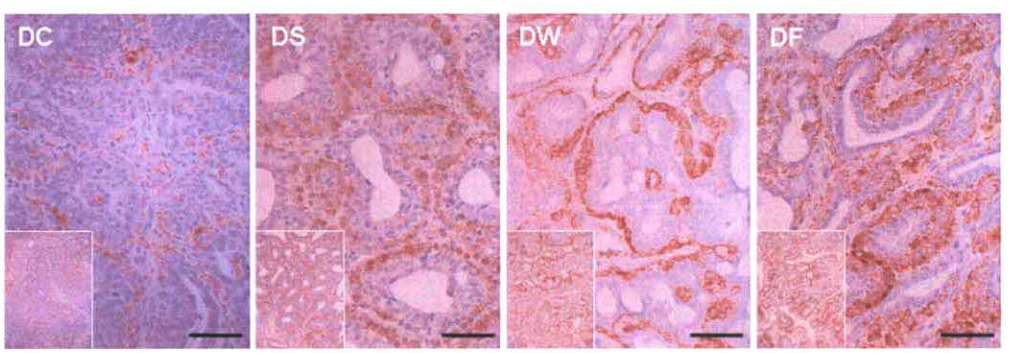


Figure 9. Immunohistochemical findings for expression of alpha smooth muscle actin in mammary gland tumor of each group.

2. 다시마 섭취가 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간의 phase II 효소 활성도 및 지질과산화도에 미치는 영향

최근 식품 및 천연물을 이용한 생리활성 물질의 검색 및 그 작용기작에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 암을 예방하거나 치료할 수 있는 화학적 암예방법에 관한 연구가 계속적으로 진행되고 있다. 그 항암 기작 중 대표적인 것으로 체내 독성물질이나 발암물질을 무독화시키는 NADP(H):quinone reductase(QR)와 glutathione S-transferase(GST) UDP-glucuronosyltransferase 등의 phase II 효소계의 활성효소와 phase I 효소계인 cytochrome p450 효소활성 억제, glutathione생성, transformed cell에서 그 함량이 증가되는 polyamine 생성억제 등을 들 수 있다. 2단계(phase II) 약물 대사 효소인 glutathione S-transferase는 다양한 isoenzyme으로 구성되어 있으며 여러 내인성 물질과 외인성 약물 및 발암원이 1단계 약물대사를 거쳐 생성된 친전자성 물질들을 glutathione과 conjugation시켜 최종적으로 독성이 적고 극성이 큰 물질로 전환되게 함으로써 체외로의 배출을 용이하게 한다. 이러한 현상은 신체에서 친전자성 물질을 제거함으로써 종양성성과정을 방지하는 효과를 나타내므로 암예방 물질을 검색하는 데 있어서 GST는 phase 효소 중의 하나로서 initiation 단계의 생화학적 표식자로 이용되고 있다. 많은 발암물질의 대사에서 GST는 해독화 과정으로 생각되고 있다. 본 연구에서 GST활성도를 측정한 결과 정상군에 비해 DS군이 증가하였고, DF군에서는 가장 낮게 나타났다(Figure 10). 이때 증가된 GST는 투여된 발암원 및 발암원의 대사물을 해독화하기 위하여 유도되었으리라 생각된다. 본 연구의 결과 다시마 분말 섭취군인 DS군은 phase II 생체 해독 효소인 GST의 활성도를 증가시켰다. 다시마 분말은 phase II 생체해독효소의 활성도를 증가시킴으로써 생체내의 glutathione을 기질로 사용하여 free radical을 파괴하여 반응성이 높은 산소들로부터 세포를 보호함으로써 발암물질의 활성을 억제하여 유방암 발생의 개시(initiation)단계를 억제시킨 것으로 사료된다.

Selenium-cysteine의 활성부분을 갖고 있는 glutathione peroxidase(GSH-Px)는 모든 포유동물의 조직에서 발견되며 GSH를 사용하여 H_2O_2와 유기 과산화물 (organic hydropeoxides)를 제거시키고 이때 생성된 GSSG는 glutathione reductase(GR)에 의해 다시 GSH에 의존하는 산화환원 반응을 통해 세포막을 보호한다. 생체 내에서 생성된 superoxide radical(O_2)과 같은 자유 라디칼은 superoixde dismutase(SOD)에 의해 과산화수소로 catalase와 glutathione peroxidase(GSH-Px)에 의해서 무독한 H_2O로 전환되며, 이 과정에서 세포는 정상적인 상태를 유지하고 한다. 본 연구에서 GSH-Px 활성도를 비교해 보면 정상군(NG군)에 비해 발암원 처리군인 DC군에서 증가하였으며, DF군< DS군 < DW군 순으로 증가하였지만 유의적인 차이는 보이지 않았다(Figure 10). 따라서 다시마 섭취는 통계적으로 유의적이지는 않지만 간조직의 GSH-Px활성을 증가시키는 경향을 보였으므로 활성산소 중 과산화수소를 어느 정도 분해시켜 생체내의 축적을 억제하고 있다고 생각된다.

Glutathione reductase(GR)는 모든 포유동물의 조직에서 발견되는 flavoprotein으로 cytosol에 존재하고 산화환원 반응을 통해 세포내 glutathione pool을 환원상태로 유지함으로써 간접적으로 세포 보호 및 항상성 유지에 기여한다. 본 연구에서 GR의 활성도는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Figure 10).

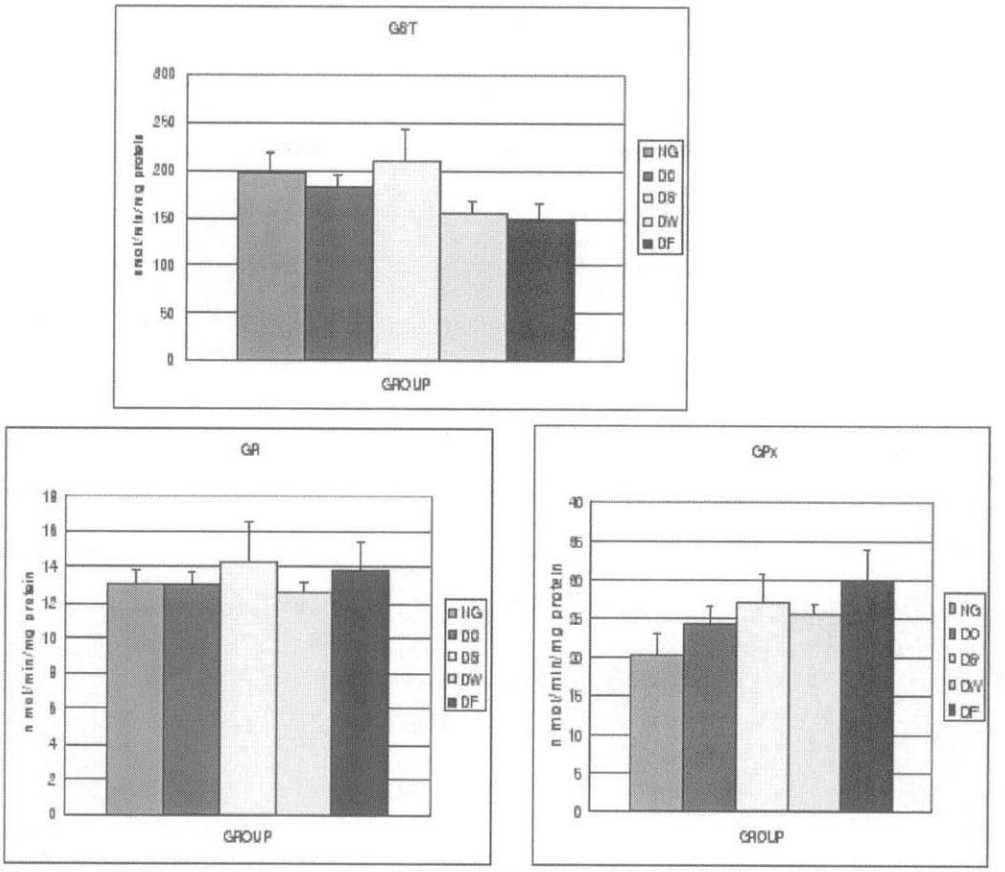


Figure 10. Effect of dietary sea tangle on the hepatic glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activities after DMBA treatment.

통계적으로 유의적이지는 않았지만, 다시마가 DMBA의 대사에 관련이 있는 효소(GST, GSH-Px, GR)의 활성을 증가시키는 경향을 보였으므로 활성화 형태인 친전자화합물 형성을 억제하거나 또는 형성된 물질의 배설을 촉진시켜 유방암 암화과정에 영향을 준다고 사료된다.

소포체 막의 다가불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid)은 지질 과산화반응의 기질이 되며 발암원이나 외인성 약물의 투여는 자유래디칼 생성을 증가시키거나 과산화에 대한세포의 방어능력을 저하시켜 지질과산화반응을

촉진시킨다고 알려져 있다. 또한 지질과산화물은 막 부착 리보솜(ribosome)의 분리를 가져와 전반적인 간세포 손상을 유발하며 암화과정의 촉진과도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 암화과정동안 생성된 지질과산화물은 발암물질의 활성화에 관여하는 효소에 의해 생성되거나 개시단계나 촉진단계에서 생성된다. 간 microsome에 막 지질과산화정도를 측정하는 방법인 TBARS 함량을 측정한 결과, 지질과산화물이 발암원인 DMBA를 처리하여 암화과정을 유도하였을 때 증가하는 경향을 보였고 암화과정을 유도하면서 다시마를 섭취시킨 결과 유의적으로 감소하는 경향을 보였다(Figure 11).

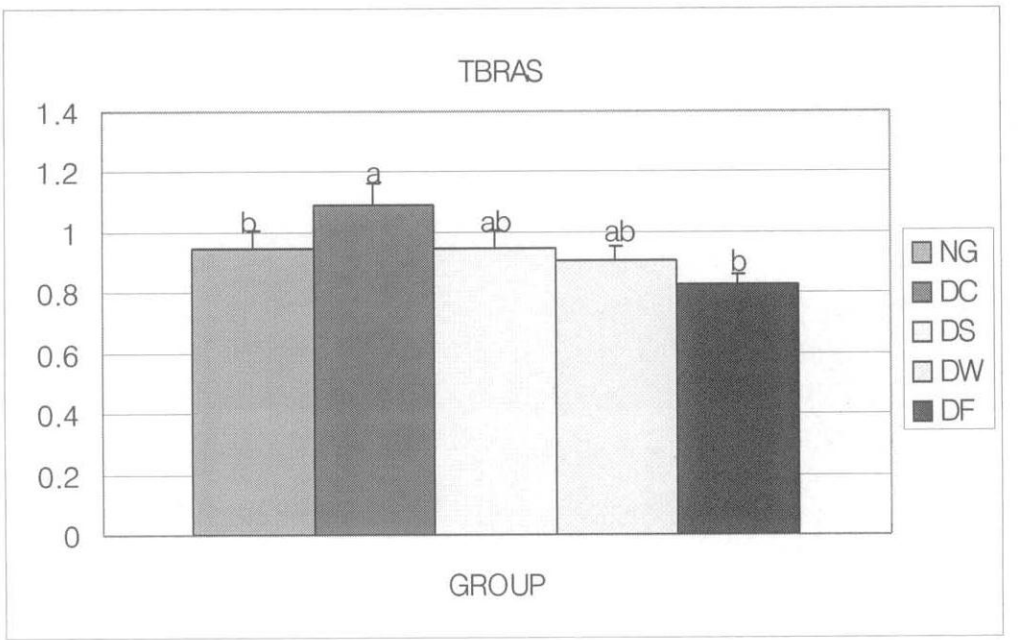


Figure 11. Effect of dietary sea tangle on the hepatic TBARS after DMBA treatment.

Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

Table 1. Effect of dietary sea tangle on the serum enzyme activities

	NG	DC	DS	DW	DF
BUN (㎎/㎗)	17.05±0.63^{NS}	17.23±1.31	16.99±2.27	15.59±1.3	19.62±2.25
GOT(IU)	135.47±4.02^{NS}	131.51±4.57	137.56±9.78	143.75±9.98	140.50±5.9
GPT(IU)	114.98±9.43^{ab}	114.94±12.27^{ab}	131.40±9.81^{a}	126.95±16.12^{a}	89.38±8.32^{b}

Values are represented with mean±SE

NG: Normal Group DC: DMBA Control

DS: DMBA Sea tangle DW: DMBA Water extract DF: DMBA Fucoidan

a,b,ab: Means with a different alphabet superscript is not significantly different among groups determined by Duncan ′ s multiple range test at $p < 0.05$

NS: not significantly different among groups at $p < 0.05$

3. 다시마가 암세포의 성장 및 전이능에 미치는 영향 규명

다시마로부터 얻은 분획별 추출물에 의한 암세포 생장억제효과를 검색하기 위하여 유방암세포(MCF-7, MDA-MB-231), 간암세포(HepG-2)를 이용하여 측정하였으며, 결과는 Figure 7,8,9와 같다.

세포별로 보면, 유방암 세포 MCF-7, MDA-MB-231 세포주 모두 50㎍/㎖ 농도의 다시마 물 추출물이나 푸코이단에 의해 유의적으로 성장이 억제되었으며 100㎍/㎖ 농도에서는 억제 효과가 더 컸다.

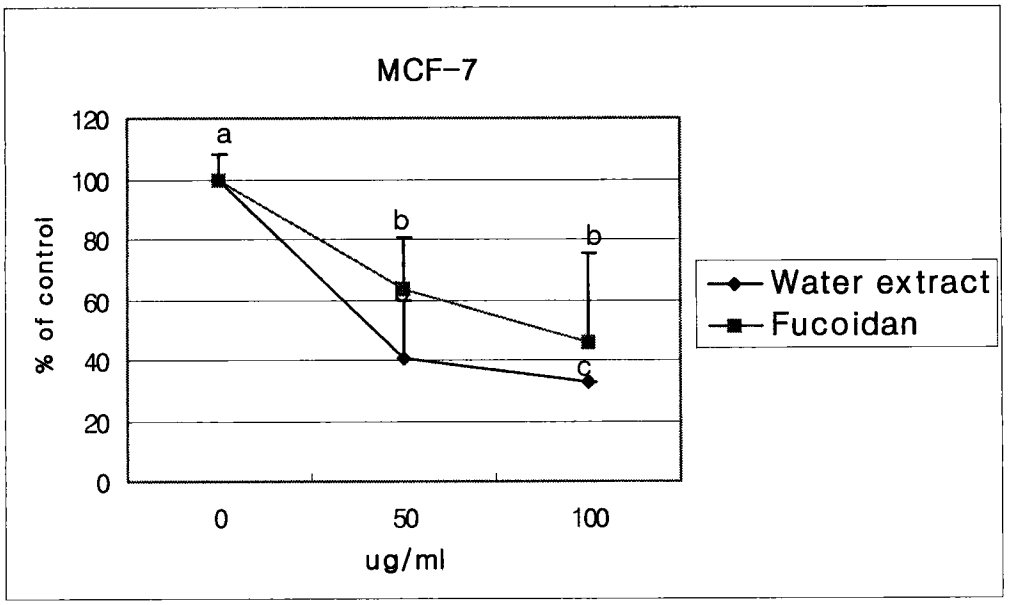


Figure 12. Effects of water extract of sea tangle and fucoidan on the proliferation of MCF-7 cells.

Means with the same letter are not significantly different in the same treated group by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

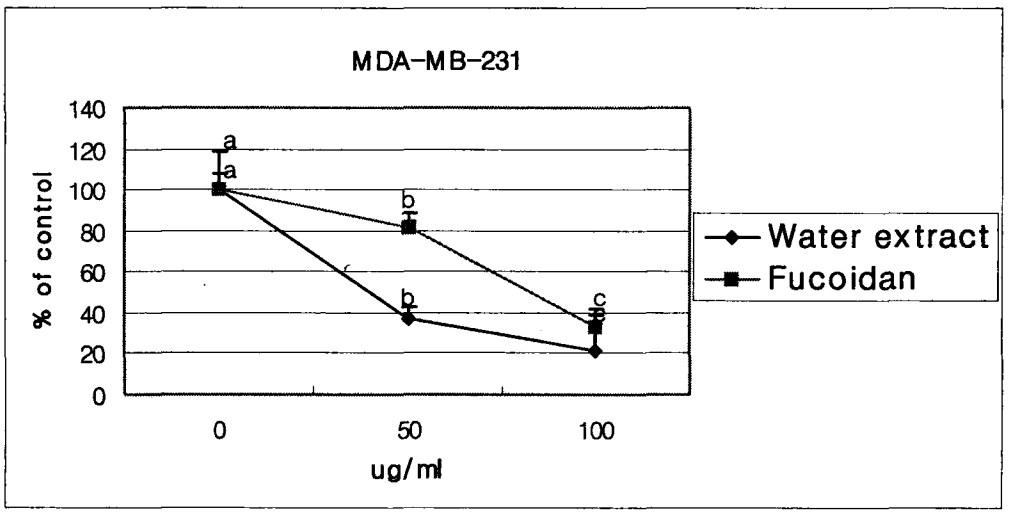


Figure 13. Effects of water extract of sea tangle and fucoidan on the proliferation of MDA-MB-231 cells.

Means with the same letter are not significantly different in the same treated group by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

다시마 물 추출물과 푸코이단이 유방암 세포주의 전이능에 미치는 영향을 살펴보고자 adhesion assay를 실시하였다(Figure 14). MCF-7세포의 경우 물 추출물과 푸코이단 모두 50㎍/㎖의 농도로 처리 시에는 adhesion을 감소시키는 경향이 있으나 유의적이진 않았고 100㎍/㎖농도로 처리했을 때는 모두 유의적으로 감소시켰다. MDA-MB-231 세포의 경우는 50, 100㎍/㎖농도 모두 24시간 처리 시 adhesion을 감소시켰다.

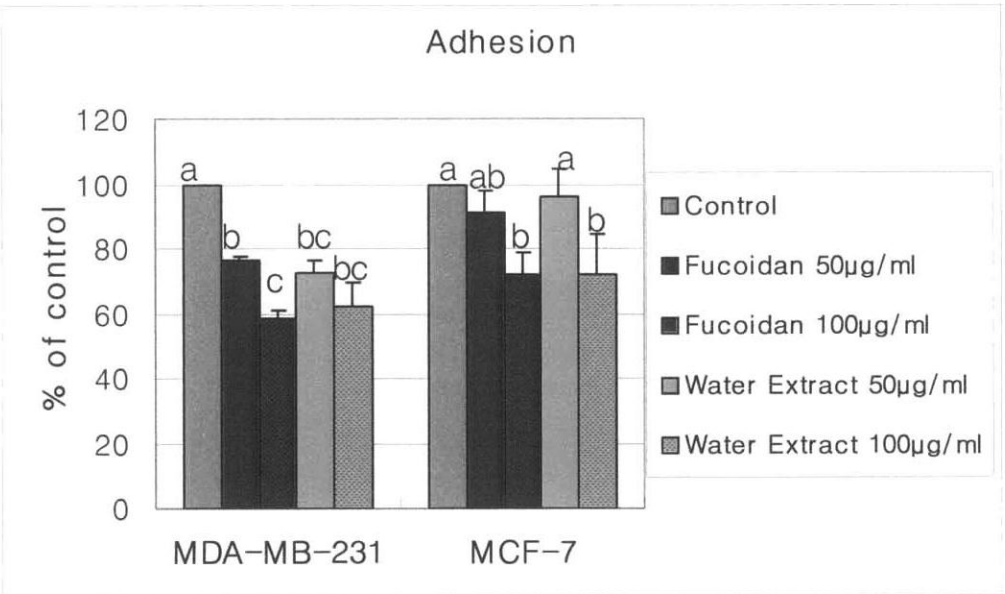


Figure 14. Effect of water extract of sea tangle and fucoidan on the adhesion of MCF-7 and MDA-MB-231 cells

Means with the same letter are not significantly different in the same cell line by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

또한 암세포의 침윤성을 나타내는 MMP의 활성에 미치는 물 추출물과 푸코이단의 영향을 살펴보기 위하여 gelatin zymography를 실시하였다(Figure 15). MCF-7 세포에서는 물 추출물과 푸코이단 처리모두 각 농도에서 MMP-2의 활성을 감소시킨 것으로 나타났으나 MMP-9은 푸코이단 100㎍/㎖농도로 처리시만 미미한 감소 효과가 관찰되었다. MDA-MB-231세포는 물 추출물과 푸코이단의 처리에 의해 MMP2, 9모두 영향을 받지 않았다.

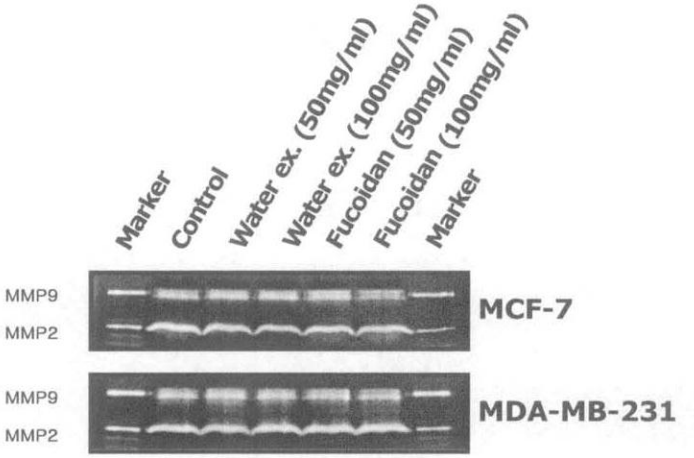


Figure 15. Effect of water extract of sea tangle and fucoidan on the activities of MMP2 and MMP-9 in MCF-7 and MDA-MB cells.

제 4 절. 다시마를 이용한 응용제품 개발
- 다시마 쿠키

(1) 연구방법

1. 실험재료 및 제조방법

가. 실험재료

사용한 재료는 밀가루는 CJ주식회사(서울시 구로구)에서 2005년에 생산된 박력 1등급, 버터는 서울우유(경기도 용인시), 설탕은 (주)삼양사(울산시 남구), 베이킹파우더는 (주)삼진식품, 달걀은 (주)풀무원(강원도 춘천시)이었으며, 다시마 분말은 2005년 생산된 건조품(해마루 마을: 전남 완도군)을 구입하여 시료로 사용하였다.

나. 쿠키의 재료 배합비

본 실험에서 쿠키 재료 배합비는 Table 1과 같다. 밀가루 300g, 버터 150g, 설탕 150g, 달걀 1개, 베이킹파우더 8g을 배합하여 대조군을 제조하였고, 실험군은 대조군의 재료에서 밀가루를 제외한 나머지 재료의 조건은 모두 고정한 후 다시마 분말의 첨가량만 달리하여 배합하였다.

다. 쿠키의 제조방법

다시마 분말을 첨가한 쿠키의 반죽 제조방법은 생산 공장에서 가장 보편적으로 사용하는 크림법(creaming method)을 사용하였다. 버터를 볼에 넣고 부드럽게 한 후 설탕을 넣어 어느 정도 녹으면 달걀을 조금씩 혼합하여 부드러운 크림으로 만들고, 여기에 팽창제를 넣어 혼합한 후 크림을 완성하였다. 완성된 크림에 밀가루와 다시마 분말을 넣어 반죽을 하고, 완성된 반죽을 냉

장고에서 2시간 숙성시킨 후 적당량을 밀판에 얹은 후 밀대를 사용하여 0.5cm 두께로 균일하게 폈다. 이것을 가로 2㎝, 세로 5㎝로 잘라 일정형태의 모양을 만든 후 윗불 220℃, 밑불 160℃로 온도가 고정된 오븐(Dae Yung Bakery, Machinery Co.,)에 성형된 반죽이 올려진 철판을 넣고 10분간 구운 후 실온에서 1시간 냉각한 후 실험에 사용하였다.

<Table 1> Formula for cookies made with Sea Tangle powder(%)

Ingredients	Samples[1)]			
	Control	S-3%	S-6%	S-9%
Flour(g)	300	291	282	273
Sea Tangle powder(g)	0	9	18	27
Sugar(g)	150	150	150	150
Butter(g)	150	150	150	150
Egg(no.)	1	1	1	1
Baking powder(g)	8	8	8	8

[1)]Control : no Sea Tangle powder
S-3% : 3% Sea Tangle powder added
S-6% : 6% Sea Tangle powder added
S-9% : 9% Sea Tangle powder added

라. 반죽의 pH와 밀도 측정

쿠키 반죽의 특성을 알아보기 위해 pH 및 밀도를 측정하였다. pH는 비이커에 반죽 5g과 증류수 45mL을 넣고 충분히 교반 시킨 후 pH meter로 상온에서 측정하였다. 밀도는 50mL 메스실린더에 증류수 30mL을 넣은 후 5g의 반죽을 넣었을 때 늘어난 높이, 즉 부피와 반죽의 무게로 구하였다(g/mL).

마. 쿠키의 수분함량 및 퍼짐성 측정

다시마 쿠키의 수분함량(water content)은 AOAC법에 의하여 수분람량은 105℃에서 상압 건조하여 측정하였다.

쿠키의 퍼짐성(spread ratio)은 넓이에 대한 두께의 비로 나타낸 것으로 AACC Method 10-52의 방법을 사용하여 5회 반복 측정 후 평균값을 이용하였다.

퍼짐성(spread ratio) = cookie 1개에 대한 평균 넓이(mm/개) /

cookie 1개에 대한 평균 두께(mm/개)

바. 쿠키의 부피측정

쿠키의 부피측정은 종자치환법으로 각 시료의 부피를 5회 반복 측정한 후 대조군을 기준으로 각 시료의 부피를 비율로 계산하였다.

사. 쿠키의 색도 측정

쿠키의 색도 측정은 색차계(Chromater CR-200, Minolta, Japan)로 측정하여 밝기(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)값을 5회 반복 측정하고 그 평균값으로 나타내었다. 이때 사용되는 표준백판(standard plate)은 L값 96.95, a값 -0.03, b값 1.42이었다.

아. Rheometer에 의한 Texture 특성

제조한 쿠키의 조직감은 Rheometer(Sun compact 100, Sun scientific, Japan)를 사용하여 경도(hardness)를 5회 반복 측정하여 평균값을 구하였고, Rheometer의 측정조건은 Table 2와 같다.

<Table 2> Operating conditions for rheometer

Max wt :	10kg
Distnce :	50%
Table speed :	120mm/min
rubture :	1bite
probe :	number 4 needle type

자. 쿠키의 관능검사

관능검사의 경험이 있는 목포대학교 식품영양학 전공 재학생을 선정하여 관능검사를 실시하기 전 각각의 항목에 대해 잘 인지하도록 충분히 설명하고 훈련 한 후 패널들이 공복을 느끼는 정오시간을 피해 오전 10시부터 11시까지 관능검사를 실시하였다. 이렇게 훈련된 학부생 10명을 선정하여 제조한 쿠키를 일정한 크기(2×5×1㎝)로 관능검사요원들에게 제공하였다. 이때 모든 시료들은 난수표에 의해 3자리 숫자로 매겨졌다. 평가내용은 쿠키의 품질특성에 영향을 미치는 색(color), 맛(taste), 향기(flavor), 질감(texture), 종합적 평가(overall acceptability)이며 최고 7점, 최하 1점으로 표시하도록 하였다. 관능검사 결과 시료간의 유의성 검증은 SPSS통계 package를 이용한 ANOVA test를 실시한 후 사후검증으로 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

차. 쿠키의 기호도 검사

기호도 검사는 남녀 일반 성인 및 대학생 36명을 대상으로 실시하였다. 기호검사는 9점 척도(hedonic scale)를 이용하여 표시하도록 하였으며 1점으로 갈수록 '아주 싫다'에서 9점으로 갈수록 '아주 좋다'를 표시하도록 하였다. 평가된 특성은 외관(appearance), 고소한 맛(savory flavor), 조직감(texture), 전반적인 기호도(acceptibility) 순서대로 진행되었다.

카. 저장기간에 따른 쿠키의 유지 추출과 항산화 효과 측정

30℃ 항온기에서 45일간 저장한 쿠키를 Folch법에 의하여 유지를 추출하였다. 즉, 쿠키 100g에 chloroform : methanol (2:1) 혼합 용액 250㎖을 넣고 homogenizer로 마쇄한 후 여과하였다. 여과액과 잔사를 분리하고 잔사에 다시 250㎖의 용매를 가하여 추출하였다. 이와 같은 조작을 3회 반복하여 얻은 여과액을 모두 합하여 분액 깔대기에 넣고 1/4가량의 증류수를 가하여 격렬히 흔들어 혼합하고 냉장온도에서 하룻밤 방치한 후 chloroform 층을 분리하여 sodium sulfate anhydrous로 탈수시킨 후 여과하였다. 여과액은 rotary vacuum evaporator로 40℃에서 감압 농축한 후 잔류하는 용매는 질소가스로 완전히 휘발시켜 총 지질을 얻었다. 시료유의 산가(acid value, AV)는 표준유지시험분석법에 의해 측정하였고, 과산화물가(peroxide value, POV)는 AOCS Official Method 8-53으로 측정하였으며 meq/kg oil로 표시하였다. TBA가(thiobarbituric acid value, TBA)는 Tarladgis 등의 수증기 증류법에 따라 마쇄한 시료 2g을 100㎖로 정용한 후, 20㎖를 취하여 Kjeldahl flask에 넣고 50% 염산용액 0.5㎖를 가하여 수증기 증류시켜 50㎖를 얻은 증류액 중 5㎖에 TBA시약(0.02M 2-thiobarbituric acid in 90% glacial acetic acid) 5㎖를 마개 있는 시험관에 넣어 잘 혼합한 후 끓는 수욕 중에서 30분간 가열하였다. 이를 실온에서 20분간 냉각시킨 후 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 530nm에서 흡광도를 측정하였다.

타. 통계처리

분석실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 기호도 검사는 기호도 검사요원 36명의 평균치와 표준편차로 나타내었다. 유의성 검증은 SPSS통계 package를 이용한 ANOVA test를 실시한 후 사후검증으로 Duncan's multiple range test를 실시하였다

(2) 연구결과

1. 반죽의 밀도 및 pH

다시마 분말을 첨가한 쿠키 반죽의 밀도 및 pH의 결과는 Table 4와 같다. 밀도는 팽창 정도를 나타내므로 쿠키의 품질 관리에 있어 중요한 품질 평가 지표 항목의 하나이다. 밀도가 낮게 되면 견고성이 높아져 기호성이 떨어지며, 지나치게 커지게 되면 쉽게 부스러지는 성질을 나타내어 상품성이 떨어지게 되는데 이러한 특성은 밀가루의 종류, 흡수율, 지방의 종류와 사용량, 반죽의 혼합 방법과 시간, 팽창제의 종류와 사용량, 굽는 온도와 시간 등이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 반죽의 밀도는 다시마 분말을 3% 첨가한 시료가 1.29g/mL로 유의적으로 높은 수치를 보였고 1.27g/mL을 나타낸 대조군과 6% 첨가시료와는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 다시마 분말을 9% 첨가한 시료가 1.18g/mL로 3% 첨가 시료보다 유의적으로 낮은 밀도를 나타내어 다시마 분말이 반죽의 밀도에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 반죽의 pH는 다시마 분말 3% 첨가 쿠키가 pH 6.78로 대조군의 pH 6.66보다 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 반죽의 pH는 완성된 쿠키의 향과 외관의 색도에 영향을 미칠 수 있으며 본 실험에서 다시마 분말을 6%와 9% 첨가한 시료군의 pH는 각각 pH 6.75와 pH 6.65의 수치를 보이며 대조군과는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

<Table 4> Density and pH values of cookie batter using sea tangle powder

Properties	Samples[1)]			
	Control	S-3%	S-6%	S-9%
Density (g/mL)	1.27±0.01^{ab}	1.29±0.03^{a}	1.27±0.02^{ab}	1.18±0.03^{b}
pH	6.66±0.02^{b}	6.78±0.05^{a}	6.75±0.04^{ab}	6.65±0.03^{ab}

[1)]Samples are same as in Table 1.

^{a}~^{c} : Values with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$)

2. 쿠키의 퍼짐성, 수분함량 및 부피

퍼짐성은 반죽이 중력적인 유동성에 의해 팽창하기 시작하여 반죽 내 단백질인 gluten의 유리 전이(glass transition)로 연속적 상태가 되어 반죽의 유동이 중단될 때까지 일어나는데 중력은 일정하므로 반죽 점성에 의해 조절된다. 따라서 당이 반죽 내 물에 용해되어 어느 정도의 점성을 가짐으로써 가능한데, 당의 용해성과 보습성이 매우 낮아서 반죽의 건조도가 매우 높아짐에 따라 유동에 필요한 일정한 점도를 가지지 못할 때 퍼짐성이 작아지게 된다. 다시마 쿠키의 퍼짐성 지수는 Table 5와 같이 다시마 분말 첨가량이 많을수록 적은 것으로 나타났다. 대조군과 다시마 분말 3% 첨가쿠키가 퍼짐성이 각각 9.44, 9.42로 비슷하였고, 6% 첨가 8.09, 9% 첨가는 7.86으로 나타나 이들은 대조군보다 더 적게 나타났다. 쿠키의 수분함량은 다시마 분말 첨가량이 많을수록 높았으며, 대조군은 3.31로 유의적으로 가장 낮은 수분함량을 보였다. 다시마 쿠키의 부피는 대조군 18.31, 다시마 3% 첨가 19.21, 6% 첨가 19.43, 9% 첨가 19.54로 나타나 대조군에 비해 다시마 분말을 첨가한 쿠키의 부피가 더 많이 증가되는 것으로 나타났다. 이는 다른 쿠키에 관한 연구에서도 대조군보다 첨가군의 경우 쿠키의 부피가 더 많이 증가되었다고 보고

되어 본 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 다시마 분말 첨가에 따른 부피의 증가는 밀가루가 다시마 분말에 의해 대체됨에 따른 글루텐의 희석효과에 의한 영향이라고 사료된다.

<Table 5> Spread ratio, water content and volume of cookies made sea tangle powder

Properties	Samples[1)]			
	Control	S-3%	S-6%	S-9%
widthness (mm)	71.90±0.04	71.71±0.04	68.11±0.12	67.01±0.08
thickness (mm)	76.11±0.06	76.55±0.05	84.12.11	85.23±0.14
spread factor	9.44±0.01^{a}	9.42±0.05^{a}	8.09±0.06^{b}	7.86±0.05^{bc}
water content (%)	3.31^{c}	4.52^{b}	5.25^{ab}	5.95^{a}
Volume(cm^3)	18.31	19.21	19.43	19.54

[1)]Samples are same as in Table 1.

^{a}~^{c} : Values with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$)

3. 쿠키의 색도

다시마 쿠키의 색도 측정 결과는 Table 6과 같다. 쿠키의 색은 일정한 조건 하에서 주로 당에 의한 영향이 크고, 환원당에 의한 비효소적 갈변인 Maillard 반응, 열에 불안정한 당에 의한 카라멜화 반응에 의해 가장 큰 영향을 받는다. 이 반응들은 매우 높은 온도가 필요하므로 오븐 내에서 표면색만 크게 변하게 된다. 쿠키의 밝은 정도를 나타내는 L값은 대조군이 75.95로 유의적으로 가장 밝게 평가되었으나 72.91을 나타낸 다시마 분말 3% 첨가군과는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 시료의 붉은 정도를 나타내는 a값은 다

시마 분말 9% 첨가군이 유의적으로 특성이 강한 경향을 나타내었고 나머지 시료들은 유의차를 보이지 않았다. 쿠키의 노랑정도를 나타내는 b값에서는 다시마 분말을 3% 첨가한 쿠키가 27.60으로 유의적으로 가장 높은 수치를 나타내었고 그 다음으로 대조군 25.84, 6% 첨가군 25.41의 값을 보였다.

<Table 6> Color parameters of cookies made with sea tangle powder

Samples[1)]	Color values		
	L	a	b
Control	75.95±1.01[a]	1.37±1.01[b]	25.84±1.02[b]
S-3%	72.91±0.21[a]	1.35±1.21[b]	27.60±1.02[a]
S-6%	68.38±1.02[b]	1.37±0.55[b]	25.41±0.25[b]
S-9%	65.55±0.45[bc]	1.63±20.63[a]	24.51±0.01[c]

[1)]Samples are same as in Table 1.

[a]~[c] : Values with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$)

4. Rheometer에 의한 Texture 특성

다시마 분말을 다양한 수준으로 대체한 쿠키의 경도를 rheometer로 측정한 결과는 Table 7과 같다. 다시마 분말을 첨가한 시료군이 대조군에 비하여 높은 경향을 나타냈으나 다시마 분말 3%와 6% 첨가군 간에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 구기자 분말을 쿠키에 첨가했을 때 첨가량이 증가함에 따라 경도가 높아졌다는 연구 결과와 일치하며, 난소화성 전분을 쿠키에 첨가시켰을 때 그 양이 증가할수록 경도가 증가하였다는 보고와도 일치하는 결과를 나타내었다.

<Table 7> Rheometer properties of the cookies made with sea tangle powder

proterties	Samples[1)]			
	Control	S-3%	S-6%	S-9%
hardness (g/cm^2)	11,000±4.42[c]	22,000±2.63[b]	26,000±3.42[b]	39,000±4.12[a]

[1)]Samples are same as in Table 1.

[a]~[c] : Values with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$)

5. 관능검사

다시마 분말을 밀가루 무게에 대하여 0%, 3%, 6% 및 9%를 각각 첨가한 쿠키를 제조하여 바람직한 다시마 분말의 첨가량을 알고자 관능검사를 실시한 결과는 Table 8과 같다. 쿠키의 색은 대조군이 5.33으로 가장 높게 나타났으며 그 다음으로는 3% 첨가 쿠키가 5.25점으로 높은 반면, 9% 첨가군은 가장 낮은 점수를 보였다. 쿠키의 맛에 있어서도 3% 첨가군이 5.22점으로 가장 높은 점수를 보였으며, 그 다음 순으로는 대조군에서 4.90점을 나타냈고, 6% 첨가군은 대조군보다 더 낮아 4.21점을 나타내었다. 풍미에 있어서도 3% 첨가 쿠키에서 가장 높은 점수를 나타냈고 9% 첨가군은 가장 낮은 점수를 보였으며, 첨가량에 따라 유의적인 차이가 있었다. 조직감은 3% 첨가 쿠키가 4.47점으로 높게 나타났으며, 전반적인 기호도는 3%, 대조군, 6% 및 9% 순으로 3% 첨가 쿠키가 가장 높은 결과를 나타내어 유의적인 차이($P<0.05$)가 있었다.

<Table 8> Sensory properties of cookies made with sea tangle powder

Samples[1)]	Sensory attributes				
	Color	Taste	Flavor	Texture	Overall acceptability
Control	5.33±1.09[a]	4.90±0.73[b]	4.62±1.14[a]	4.13±1.07[b]	4.68±0.86[b]
S-3%	5.25±1.12[a]	5.22±1.22[a]	4.63±1.28[a]	4.47±1.13[a]	5.05±1.17[a]
S-6%	4.15±1.01[b]	4.21±1.09[b]	3.94±0.88[b]	4.30±1.02[b]	4.52±0.65[b]
S-9%	3.15±1.34[c]	2.92±1.08[c]	3.23±0.94[c]	3.58±1.33[c]	3.33±0.97[c]

[1)]Samples are same as in Table 1.

Means±S.D.(n=10). Values with same letter at the column are not significantly different($p<0.05$)

6. 기호도 검사

다시마 분말 쿠키의 기호도 검사결과는 Table 9와 같다. 외관은 모든 시료가 3.71에서 5.39의 수치를 보이며 3% 첨가군의 외관이 5.04의 값으로 6% 및 9% 첨가군보다 더 높은 기호도의 경향을 보였다. 쿠키의 고소한 향미는 3.73에서 4.86의 값으로 3% 첨가군의 쿠키를 가장 좋아하는 것으로 나타났으며, 대조군과 6% 첨가군은 같은 기호도를 나타내었다. 쿠키의 조직감은 3% 첨가군에서 5.01로 가장 높게 나타났으나 대조군과는 유의차를 보이지 않으며 9% 첨가군의 조직감은 4.16의 값으로 다른 시료들보다 낮은 점수를 보였다. 전반적인 기호도에서는 3% 첨가군이 5.33의 수치로 유의적으로 가장 높은 기호도를 나타내었고 대조군과는 유의차를 보이지 않았으므로 비슷한 수준의 높은 기호도를 나타냈으나 6% 첨가군과 9% 첨가군 보다는 더 높은 기호도를 보였다.

<Table 9> Acceptance test of cookies made with sea tangle powder

Characteristics	Samples[1)]			
	Control	S-3%	S-6%	S-9%
appearance	5.39±1.02[a]	5.04±1.23[a]	4.47±1.42[b]	3.71±1.32[c]
savory flavor	4.75±0.98[a]	4.86±0.86[a]	4.75±0.65[a]	3.73±0.88[b]
texture	4.68±1.23[ab]	5.01±1.32[a]	4.66±1.33[ab]	4.16±1.56[b]
overall acceptability	5.08±1.03[ab]	5.33±1.23[a]	4.64±1.32[b]	3.71±1.41[c]

[1)]Samples are same as in Table 1.

Means±S.D.(n=40). Values with same letter at the column are not significantly different($p<0.05$)

7. 저장 중 쿠키의 항산화 효과

가. 산가의 변화

산가는 유지분자들의 가수분해에 의해서 형성된 유리지방산 함량의 척도이다. 유리지방산은 자동산화를 촉진하여 품질 저하를 일으키는 원인이 된다. 다시마 분말을 첨가한 쿠키의 저장에 따른 지질의 산가는 Figure 13과 같이 저장 0일에 0.49~0.50이었으며 저장기간이 경과함에 따라 모든 실험군에서 산가가 유의적으로 증가하였다. 다시마 분말 첨가량에 따른 변화를 살펴보면 대조군보다 첨가군에서 훨씬 낮았으며, 특히 3%와 6% 첨가 쿠키에서 가장 낮게 나타나 지질의 산화 억제에 효과적이었다. 대조군과 다시마 분말 9% 첨가군은 저장 15일 이후부터 계속 증가하는 경향을 보였다.

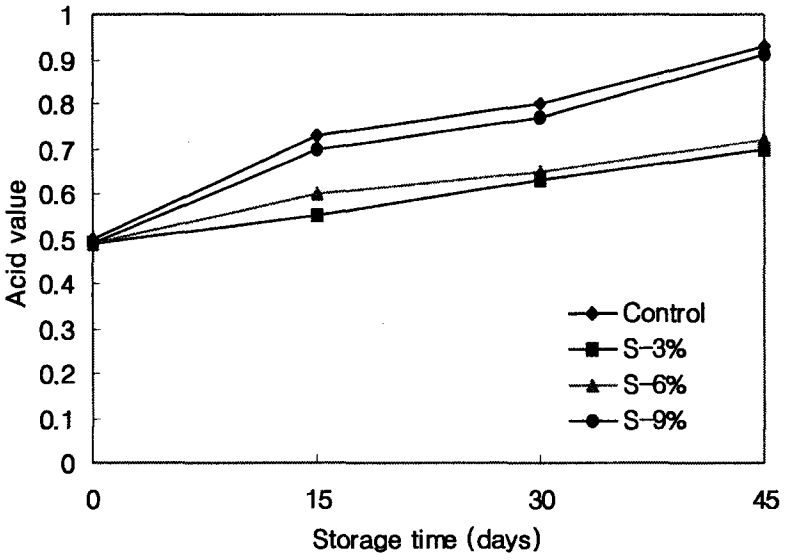


Figure 13. Changes of acid value in lipid extracted from cookies during the storage at 30℃

나. 과산화물가의 변화

다시마 분말 첨가 쿠키의 저장 중 과산화물가는 Figure 14와 같이 저장 0일에 과산화물가는 2.21~2.61 meq/kg이었으나 저장기간이 경과함에 따라 모든 실험군의 과산화물가가 유의적으로 증가하였다. 과산화물가의 증가 경향은 저장 15일까지는 약간 증가하다가 30일까지 급격히 증가하였고, 그 후 감소하는 경향을 보였다. 저장기간에도 대조군은 지속적으로 증가하여, 저장 30일 경에는 10.21 meq/kg로 가장 높은 과산화물가를 나타내다가 그 후에는 감소하였다. 한편, 다시마 분말 3%와 6% 첨가 쿠키는 대조군에 비해 상당히 안정한 효과를 보였으며, 9% 첨가 쿠키에서는 대조군보다는 낮은 과산화물가를 나타냈으나 다시마 분말 3%와 6% 첨가 쿠키와 비교해볼 때 산화를 촉

진하는 것으로 나타났다. 또한 모든 시료에서 30일 이후부터는 감소하는 경향을 보였다. 저장 중 과산화물가의 변화 경향은 지방의 산화로 인하여 생성된 과산화물이 2차 산화물로 분해되었기 때문이라는 보고와 같은 이유로 해석될 수 있다. 저장기간이 길어짐에 따라 과산화물가가 저하됨은 과산화물의 생성속도보다는 분해속도가 빨라진다는 사실에 기인하거나 또는 과산화물가의 감소가 peroxide 분해나 단백질과의 상호 작용에 기인할 수도 있는 것으로 볼 수 있다.

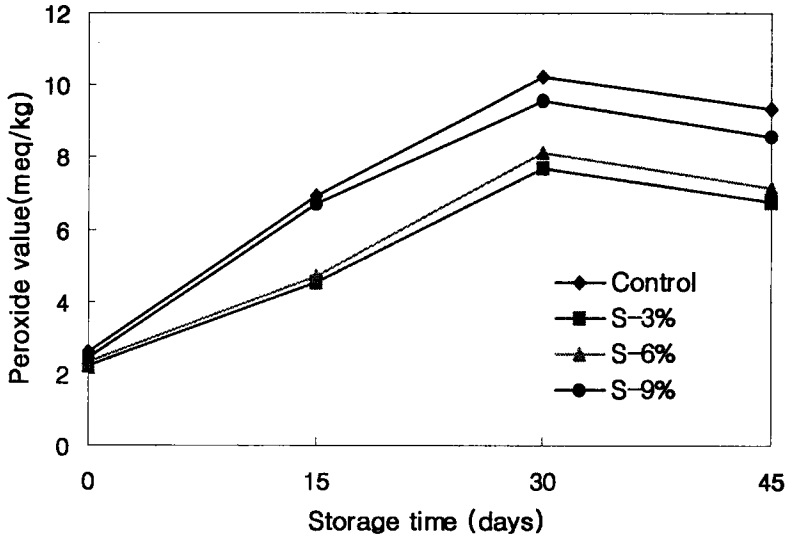


Figure14. Changes of peroxide value in lipid extracted from cookies during the storage at 30℃

다. TBA가의 변화

식품 중에 함유된 지방질 특히 불포화지방산은 산패가 진행됨에 따라 과산화물과 carbonyl 화합물을 생성하며, TBA가는 이때 생성된 malonaldehyde와 2-thiobarbituric acid와의 적색복합체를 생성하는 정색반응으로 지방질의 산패도를 알아보는 방법이다. 다시마 분말 쿠키의 저장에 따른 TBA가의 변화

는 Figure15와 같이 모든 실험군에서 저장 전 기간을 통하여 증가하였다. 다시마 분말 쿠키의 TBA가는 전반적으로 대조군에 비해 낮은값을 나타내 지방의 산화를 지연시켰음을 알 수 있었다. 다시마 분말 첨가량에서는 3%와 6% 첨가 쿠키가 9% 첨가쿠키보다 낮은 TBA가를 나타내어 산가와 유사한 결과를 보였으며, 대조군이 가장 높게 나타났다.

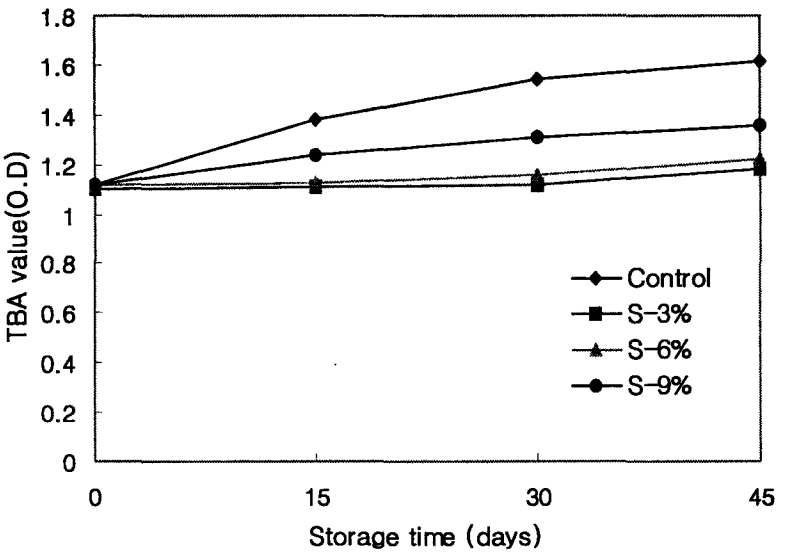


Figure 15. Changes of TBA value in lipid extracted from cookies during the storage at 30℃

여 백

제 5 절. 다시마를 이용한 응용제품 개발
-다시마 매작과

(1) 연구방법

1. 실험재료 및 시약

다시마 분말은 2005년 생산된 건조품(해마루 마을: 전남 완도군)을 구입하여 사용한다. 실험용 유지는 항산화제가 첨가되지 않은 순수 정제 대두유(동방유량제품)를 냉장 보관하여 사용하며, 항산화제로 BHT(Sigma사 제품)와 천연항산화제인 alpha-Tocopherol(α-Toc : Sigma사 제품)을 사용하고, 추출용매인 methanol(MeOH), ethanol(EtOH), ethyl acetate(EA) 및 petroleum ether(PE)는 모두 1급 시약을 사용한다.

2. 다시마 추출물의 제조

분쇄한 시료 100g을 MeOH, EtOH, EA 및 PE와 1:10(w/v)이 되게 하여 상온에서 약 20시간 정도 교반한 후 10℃에서 9,000 rpm으로 30분간 원심 분리한다. 상등액과 잔사를 분리한 후 잔사에 다시 5배의 용매를 가하여 4시간 교반하고 같은 조건으로 원심 분리하여 상등액을 처음의 상등액과 합한다. 이것을 Whatman (No.44) 여과지로 여과한 후 여과액을 40℃에서 감압 농축하여 처음의 약 1/5 정도만 남게 한 뒤 sodium sulfate로 탈수시켜 다시 여과하여 완전 농축시킨 것을 추출물로 한다.

3. 다시마 추출물을 첨가한 식용대두유의 제조와 항산화력 측정

대조군는 기질인 대두유만을 사용하고, 실험군으로 MeOH, EtOH, EA 및 PE 다시마 추출물을 기질인 대두유 200mL에 0.05% 농도로 첨가한다. BHT와 α-Toc은 각각 0.02 %(w/w) 첨가하여 제조한다. 추출물의 첨가농도는 식용상 문제가 없고 예비실험 결과 그 이하의 낮은 농도에서는 항산화 효과가 뚜렷하지 않아 0.05% 이상으로 한다.

대조군와 실험군을 각각 5분간 magnetic stirrer로 교반한 뒤, 이들 시료를 50±1℃항온기에서 저장하면서 Oven법과 Rancimat방법으로 항산화효과를 측정한다. Oven법은 각 시료를 200mL 비이커에 마개 없이 100mL 넣어 50±1℃ 항온기에서 30일간 저장하면서 산가, 과산화물가 및 TBA가를 측정한다. 산가는 표준유지분석 시험법으로 측정하고, 과산화물가는 AOAC 방법으로 측정하며 meq/kg oil로 표시한다. TBA가는 Sidwell의 방법으로 측정한다. Rancimat 방법은 다시마 추출물 및 BHT, α-Toc을 대두유에 첨가한 후 Rancimat(743, Metrohm, Switzerland)를 사용하여 공기유속 20 L/hr, 온도 120℃에서 conductivity를 측정함으로써 유도기간을 계산하여 항산화성을 비교 검토한다.

4. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 제조

매작과의 제조는 협력 업체인 (주) 궁전제과에서 제조한다. Table 1과 같은 비율로 밀가루, 다시마 분말과 소금을 물로 반죽한다. 밀가루와 다시마 분말을 혼합하여 체로 친 후, 소금을 녹인 물을 넣고 수분이 고루 섞이게 하기 위하여 손으로 한 덩어리로 뭉친 후, 반죽기(TR-200, 한영기업)에서 2단으로 2분 그리고 3단으로 2분 반죽한다. 국수 기계(Aryuk Co., Korea)를 이용하여 롤 간격을 6mm에서 2번 밀어 펴기 한 후에 2mm에서 다시 한번 밀어 펴기 한 후 일정한 크기(50mm× 20mm)로 잘라서 중앙에 칼집을 세로로 30mm 한 번 넣는다. 성형된 반죽은 튀김기(HEDF-3040, 대영산업)를 이용하여 시료를

튀긴 후 종이를 깐 체에 꺼내어 10분간 방치하여 기름을 뺀 후 30분간 실온에서 식히고 밀폐된 용기(Tupperware)에 넣어 밀봉하여 실험의 시료로 이용될 때까지 냉동고에(-20±3℃) 저장한다.

Table 1. Formula for *Maejakgwa* made with *Sea tangle* powder(%)

Ingredients	Sample[1)]			
	Control	L-3%	L-9%	L-15%
Wheat flour(g)	100	97	91	85
Salt(g)	1	1	1	1
Sea tangle powder(g)	0	3	9	15
Water(%)[2)]	45	45	45	45

[1)]Control : no *Sea tangle* powder
L- 3% : 3% *Sea tangle* powder
L- 9% : 9% *Sea tangle* powder
L-15% : 15% *Sea tangle* powder
[2)]Basis on the total weight of wheat flour and *Sea tangle* powder

5. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 항산화력 측정

50±1℃ 항온기에서 40일간 저장한 매작과를 Folch법에 의하여 유지를 추출한다. 즉, 매작과 100 g에 chloroform : methanol (2:1) 혼합 용액 250mL 넣고 homogenizer로 마쇄한 후 여과하며, 여과액과 잔사를 분리하고 잔사에 다시 250mL 용매를 가하여 추출한다. 이와 같은 조작을 3회 반복하여 얻은 여과액을 모두 합하여 분액 깔대기에 넣고 1/4 가량의 증류수를 가하여 격렬히 흔들어 혼합하고 냉장온도에서 하룻밤 방치한 후 chloroform 층을 분리하여 sodium sulfate anhydrous로 탈수시킨 후 여과한다. 여과액은 rotary vacuum evaporator로 40℃에서 감압 농축한 후 잔류하는 용매는 질소가스로 완전히 휘발시켜 총 지질을 얻는다. 시료유의 산가(acid value, AV)는 유지시

험분석법에 의해 측정하고, 과산화물가(peroxide value, POV)는 AOAC 방법으로 측정하며 meq/kg oil로 표시한다. TBA가(thiobarbituric acid value, TBA)는 Tarladgis 등의 수증기 증류법에 따라 마쇄한 시료 2g을 100mL 정용한 후, 20 mL 취하여 kjeldahl flask에 넣고 50% 염산용액 0.5 mL 가하여 수증기 증류시켜 50mL 얻은 증류액 중 5mL에 TBA시약(0.02M 2-thiobarbituric acid in 90% glacial acetic acid) 5mL 마개 있는 시험관에 넣어 잘 혼합한 후 끓는 수욕 중에서 30분간 가열한다. 이를 실온에서 20분간 냉각시킨 후 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 530nm에서 흡광도를 측정한다.

(2) 연구결과

1. Oven법에 의한 다시마 용매추출물의 산화 안정성

다시마 추출물을 기질 대두유에 첨가한 뒤 50℃에서 30일간 저장하면서 산가를 측정한 결과를 살펴보면 Fig. 1과 같다. 저장기간이 경과함에 따라 산가가 증가하였으나 저장일수가 길어질수록 대부분의 시료가 대조구보다 높은 항산화효과를 보였으며, 특히 MeOH 추출물은 다른 용매에 비해 큰 변화를 나타내지 않았으며, 항산화 효과가 높은 것으로 비교되었다. 용매별 다시마 추출물의 항온저장 시 대두유에 대한 항산화효과는 MeOH이 BHT와 비슷하였고, α-Toc.을 비롯한 다른 추출물보다 더 높은 항산화 효과를 보였고, PE추출물은 대조군에 비해 그다지 두드러지지 않았다. 전체적으로 각 용매별 다시마 추출물이 대조군에 비하여 낮은 산가를 나타내 유리지방산 생성을 억제함으로써 항산화 효과가 있는 것으로 관찰되었다. 과산화물가는 Fig. 2와 같이 저장 5일 이후부터 증가하기 시작하여 그 후 25일까지 급격히 증가한 후 감소하는 경향을 보였다. 각 용매별 추출물은 대조구보다 낮은 과산화물가를 나타내었으며, MeOH 추출물은 BHT와 비슷한 수준을 보여 항산화 효과가 매우 높은 것으로 비교되었다. 각 용매별 추출물의 TBA가는 Fig. 3과 같다. 모든 처리군에서 저장 전 기간을 통하여 증가하였는데, 다시마 용매 추출물의 TBA가가 전반적으로 대조구와 α-Toc에 비해 낮은값을 나타냈으며, 특히 MeOH 추출물은 낮은 TBA가를 나타내 지방의 산화를 효과적으로 지연시켰음을 알 수 있었다.

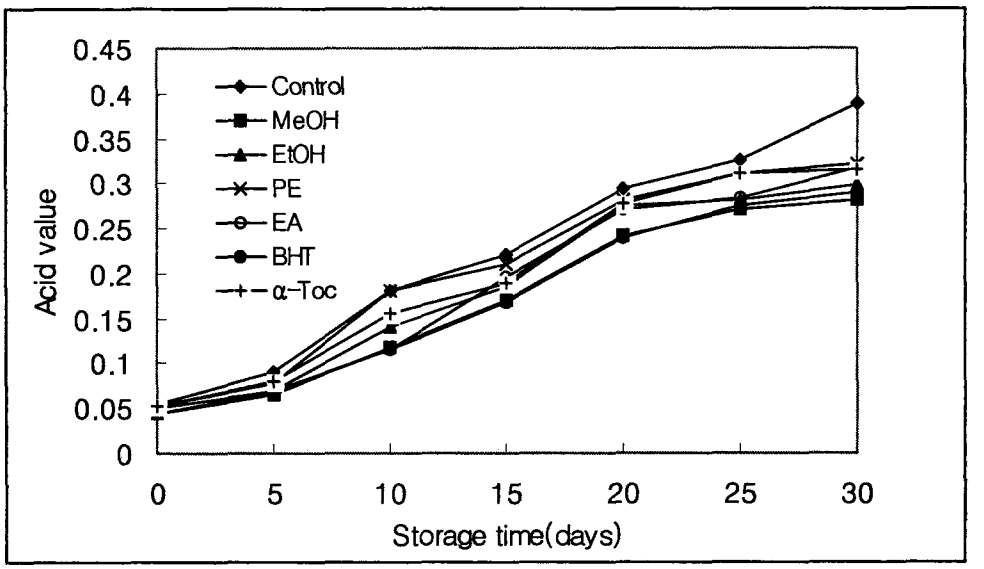


Figure 1. Changes in acid value of the soybean oil added with solvent extraction of *sea tangle* power.

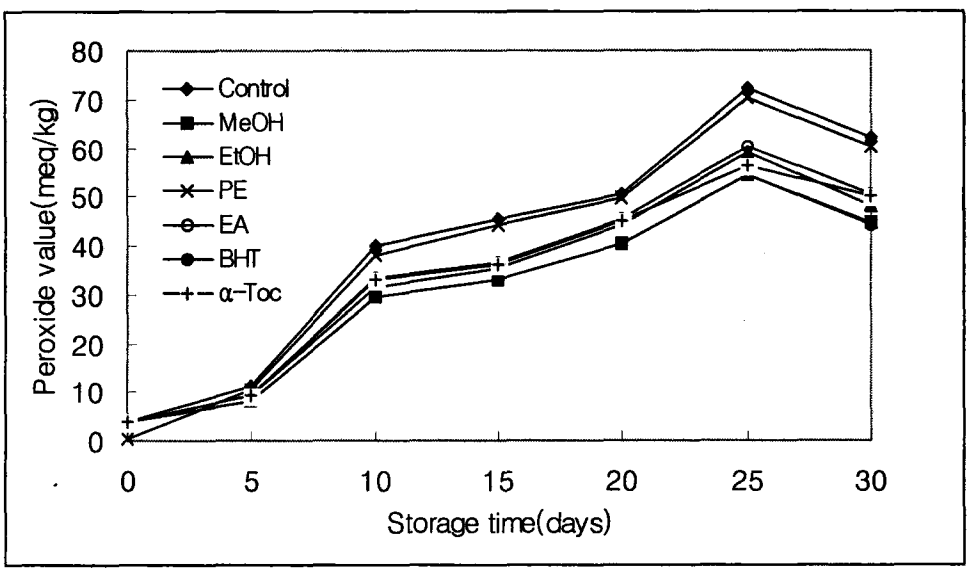


Figure 2. Changes in peroxide value of the soybean oil added with solvent extraction of *sea tangle* power.

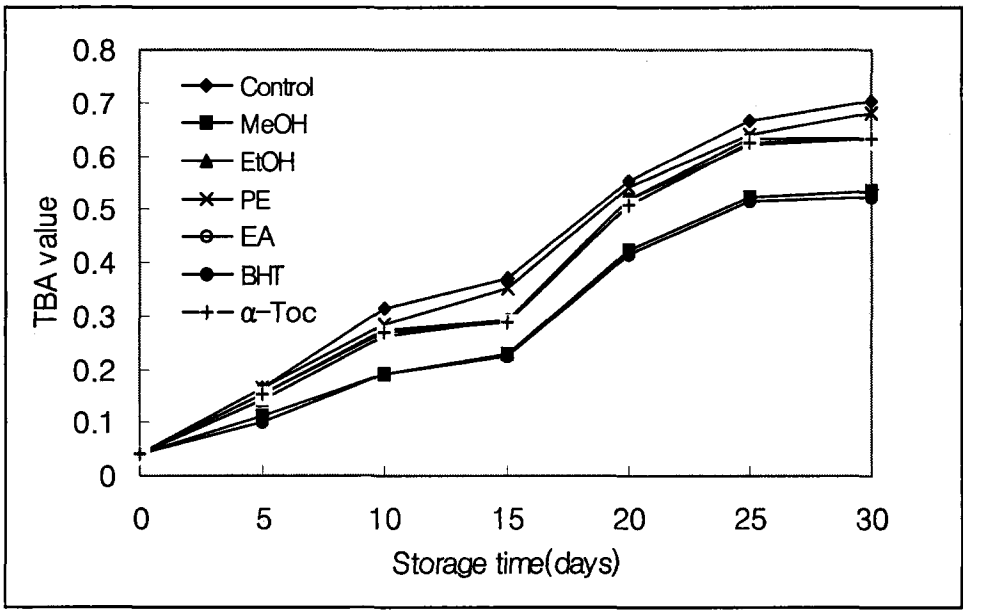


Figure 3. Changes in TBA of the soybean oil added with solvent extraction of *sea tangle* power.

2. Rancimat 방법에 의한 다시마 용매추출물의 산화 안전성

Rancimat 방법에 의한 다시마 용매추출물의 대두유에 대한 항산화력은 Table 2를 보면 대조구의 경우 유도기간이 255±0.03분으로 나타났고, BHT군은 312±0.05분, α-Toc군은 281±0.17분, EA군은 293±0.16분, EtOH군은 309±0.01분, PE군은 256±0.18분, MeOH군은 317±0.05분으로 나타나, MeOH군은 BHT군에 비해 항산화 효과가 높게 나타났으며, EtOH군은 BHT군보다는 낮았으나 다른 시료군과 비교했을 때 높은 항산화력을 보였다. 이 같은 결과는 Kim 등(1995)과 Choi 등(1992)의 생약추출물과 식물성 천연항산화제에 대한 연구에서 MeOH과 EtOH 추출물의 첨가시료가 가장 항산화효과가 높게 나타난 것으로 보고한 것과 Park 등(2005)의 구기자 추출물 연구에서 MeOH와 EtOH 추출물의 항산화 효과가 가장 우수하였다

는 보고와 비슷하였다. 또한 Jang 등(1996)등은 오미자 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과 MeOH, EA, EtOH 추출액의 순으로 항산화력이 높게 나타났다고 보고하여 본 연구 결과가 비슷하였다.

Table 2. Induction period and antioxidant index of soybean oil added with sea tangle powder

Group[1)]	Induction Period (IP, min)	Antioxidant Index (AI)
Control	255±0.03[2)]	1.00
BHT	312±0.05	1.23
α-Tocopherol	281±0.17	1.10
EA	293±0.16	1.15
EtOH	309±0.01	1.21
PE	256±0.18	1.02
MeOH	317±0.05	1.27

[1)]Groups are the same as in Fig. 1.

[2)]Mean value±SD (n=10).

3. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 산가

산가는 유지분자들의 가수분해에 의해서 형성된 유리지방산 함량의 척도로써, 유리지방산은 자동산화를 촉진하여 품질을 저하시키는 원인이 된다(Cho와 Park 2000). Figure 4는 다시마 분말을 첨가한 매작과의 저장에 따른 지질의 산가 변화를 나타낸 것으로 저장 10일까지는 완만히 증가하다가 그 후로 급격히 증가하였다. 다시마 분말 첨가량에 따른 변화를 살펴보면 대조구보다 첨가군 에서 훨씬 낮게 나타나 다시마 추출물이 매작과의 저장 동안 중성지방의 ester결합의 가수분해로 인한 유리 지방산의 생

성을 억제하는데 효과적임을 보여 주었다. Ra 등(1997)은 양파껍질의 메탄올 추출물을 linoleic acid를 기질로 한 실험에서 추출물의 첨가 농도가 증가됨에 따라 항산화농도가 증가하였고, 산가를 측정한 결과 대조군에 비해 유도기간이 3.51배 연장되었음을 보고하였으며, Shin 등(2004)은 양파껍질 추출물을 첨가한 굴비의 항산화 효과에서 양파추출물을 첨가한 것이 지방의 산가를 낮추는데 효과가 있는 것으로 보고한 바 있다. 본 연구 결과에서도 다시마 분말 3% 첨가군에서 지방의 산가를 낮추는데 가장 효과가 있음을 알 수 있었고, 그 다음 다시마 분말 9% 첨가군이 지방의 산가를 낮추는데 효과적이었다. 반면 다시마 분말 첨가량이 많은 15%에서는 저장 30일 이후부터 저장 40일 까지 대조구와 큰 차이가 없이 거의 비슷하게 산가가 높게 나타나 지방의 산패를 억제하는데 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

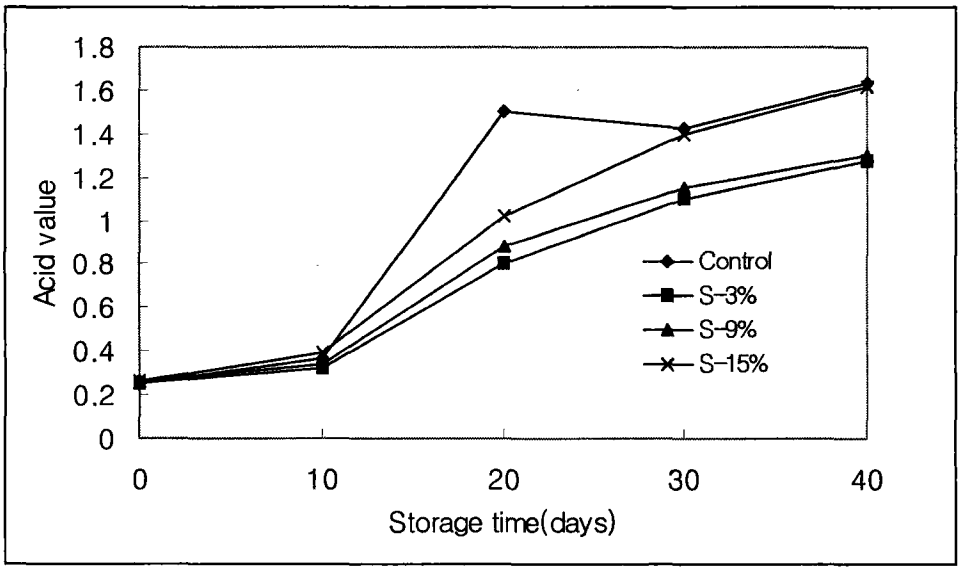


Figure 4. Changes of acid value in lipid extracted from *Maejakgwa* made with *sea tangle* power during the storage at 50℃.

Sample are the same as in Table 1.

4. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 과산화물가

다시마 분말을 첨가한 매작과의 저장 중 과산화물가는 Figure 5와 같이 저장 0일에 3.5 ~4.0meq/kg 이었으나 저장기간이 경과함에 따라 모든 실험군의 과산화물가가 유의적으로 증가하였다. 과산화물가의 증가 경향은 저장 20일까지는 약간 증가하다가 그 후 30일까지 급격히 증가하였고 그 후 감소하는 경향을 보였다. 대조군의 경우 저장 30일 경에 38meq/kg 로 가장 높은 과산화물가를 나타내다가 그 후에는 감소하였다. 한편 다시마 분말 3%와 9% 첨가군은 대조군에 비해 안정한 효과를 보여 지방의 산화를 억제함을 알 수 있었으며, 모든 시료에서 30일 이후부터는 감소하는 경향을 보였다. Cho 등(2006)은 다시마 분말을 첨가한 쿠키의 경우 저장기간이 경과함에 따라 과산화물가의 증가 경향은 저장 15일까지는 약간 증가하다가 저장 30일까지 급격히 증가하였고, 그 후 감소하는 경향을 나타내 본 연구의 결과와 비슷하였다. 저장 중 과산화물가의 변화 경향은 지방의 산화로 인하여 생성된 과산화물이 2차 산화물로 분해되었기 때문이라는 보고(Gustone과 Norris 1983)와 같은 이유로 해석될 수 있을 것으로 보인다. 저장기간이 길어짐에 따라 과산화물가가 저하됨은 과산화물의 생성속도보다는 분해속도가 빨라진다는 사실에 기인하거나(Min & Lee 1985) 과산화물가의 감소가 peroxide분해나 단백질과의 상호 작용에 기인할 수도 있는 것(Awad 등 1958)으로 볼 수 있다. 구기자 분말을 첨가한 매작과의 항산화 효과(Park 등 2005)에서 과산화물가의 경우 저장 20일까지 서서히 증가하다가 그 후 저장 30일에 최대치를 나타낸 후 감소하였다고 보고한 바 있어서, 본 결과와 비슷하였다.

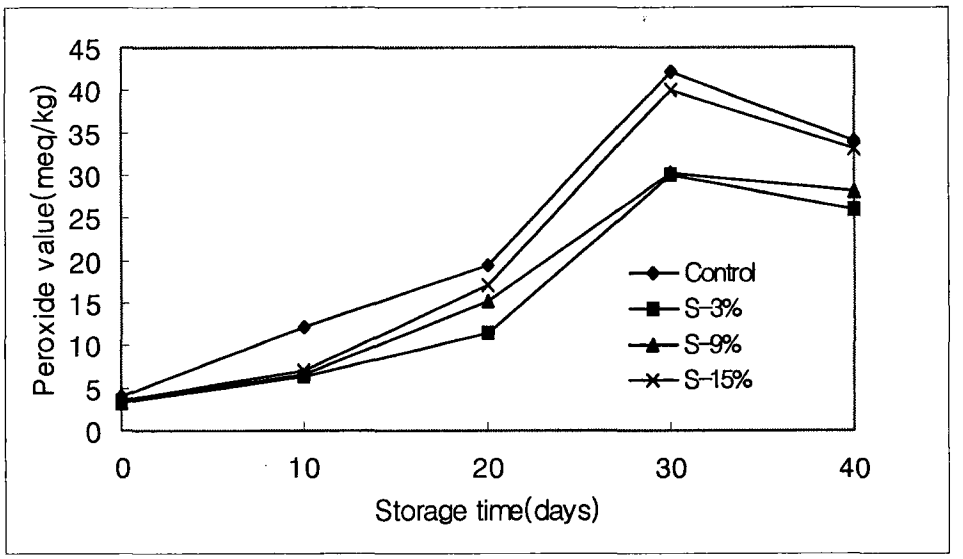


Figure 5. Changes of peroxide value in lipid extracted from *Maejakgwa* made with *sea tangle* power during the storage at 50℃.

Sample are the same as in Table 1.

5. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 TBA가

식품 중에 함유된 지방질 특히 불포화지방산은 산패가 진행됨에 따라 과산화물과 carbonyl 화합물을 생성하며, TBA가는 이때 생성된 malonaldehyde와 2-thiobar bituric acid 와의 적색복합체를 생성하는 정색반응으로 지방질의 산패도를 알아보는 방법이다. 다시마 분말을 첨가한 매작과의 저장에 따른 TBA가의 변화는 Figure 6과 같았다. 모든 실험군에서 저장기간이 증가함에 따라 TBA가는 점차로 증가하였으나, 다시마 분말을 첨가한 매작과의 TBA가가 전반적으로 대조군에 비해 낮은 값을 나타내 지방의 산화를 지연시켰음을 알 수 있었다. 다시마 분말 첨가군에서는 3%와 9% 첨가군이 대조군보다 낮은 값을 나타내 지방의 산화를 지연시켰음을 알 수 있었지만, 15% 첨가군은 저장 30일 이후에는 대조군보과 거의

비슷하게 나타나 오히려 지방의 산화를 촉진시키는 것으로 나타났다. Cho 등(2006)의 보고에 의하면 다시마 분말을 첨가한 쿠키의 저장과정 중 대조군에 비해서 다시마 첨가군의 TBA가가 전반적으로 낮은 수치를 보였으며, 특히 다시마 분말 3% 첨가 쿠키가 낮은 TBA가를 나타내 본 연구 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

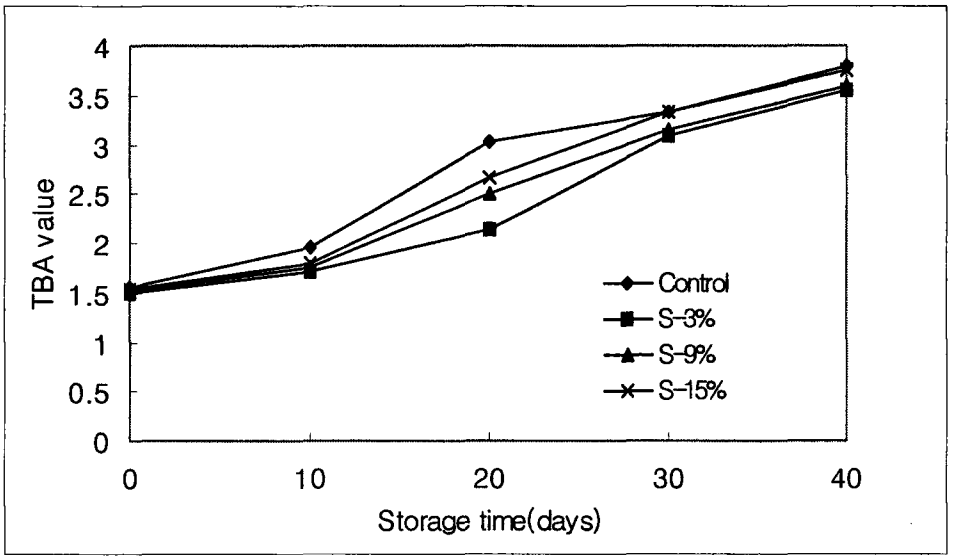


Figure 6. Changes of TBA value in lipid extracted from *Maejakgwa* made with *sea tangle* power during the storage at 50℃.

Sample are the same as in Table 1.

제 4 장. 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	목 표	내 용 및 범 위
1차년도 (2004~ 2005년)	다시마 분말 및 물 추출물의 항당뇨 효과 규명	○ 당뇨 쥐의 혈청 인슐린수준에 미치는 영향 ○ 당뇨 쥐의 혈당조절 효과 ○ 당뇨 쥐의 지질대사에 미치는 영향 - 당뇨 쥐의 혈청 지질수준 측정 - 변의 지질 함량 측정 - 간의 지질함량 측정
	다시마의 간암 및 간암세포주의 전이능 억제 효과 규명	○ 자료수집 ○ 예비실험

구 분	목 표	내 용 및 범 위
2차년도 (2005~ 2006년)	다시마 분말 및 물 추출물의 항당뇨 효과 규명	○ 당뇨 쥐 신장의 산화적 스트레스에 미치는 영향 -신장 조직의 병리학적 변화 관찰 -혈청 creatinine 농도 측정 -신장 microsome의 지질과산화물 함량 측정 -신장 cytosol의 glutathione 의존 성 항산화 효소계 활성 측정
	다시마의 간암 및 간암세포주의 전이능 억제 효과 규명	○ 화학적 발암원으로 유도한 쥐 간의 암화과정 억제 효과 - GST-P 양성 병소 형성 정도 측정 - 간의 지질과산화물 함량 측정 - 간의 약물대사효소(phase II) 활성도 측정 - 간의 조직학적 변화 관찰 ○ 다시마 물 추출물 및 fucoidan의 인간 간암 세포주 성장 및 전이능 억제효과 규명 - HepG2 세포주의 성장에 미치는 영향 - HepG2 세포주의 전이 능에 미치는 영향
	다시마를 이용한 응용제품의 개발	○ 다시마 쿠키의 제조 및 다시마 쿠키의 항산화력 측정

구 분	목 표	내 용 및 범 위
3차년도 (2006~ 2007년)	다시마의 유방암 및 유방암세포주의 성장 및 전이능 억제 효과 규명	○ DMBA로 암화과정을 유도한 쥐에서 다시마 및 푸코이단의 유방 암화과정 억제 효과 - DMBA로 유도한 유방암의 생성 및 성장측정 - DMBA를 투여한 쥐의 종양 및 유선조직의 조직학적 변화 관찰 - DMBA를 투여한 쥐의 종양 및 유선 조직의 세포 분열 정도 측정 - DMBA를 투여한 쥐의 종양에서 α-smooth muscle actin의 발현 관찰 ○ 다시마 및 푸코이단이 DMBA로 암화과정을 유도한 쥐간의 phase II 효소 활성 및 지질과산화도에 미치는 영향 - DMBA를 투여한 쥐간 microsome에서 TBARS 함량 측정 - DMBA를 투여한 쥐간 cytosol에서 GST, GPx, GR 활성도 측정 ○ DMBA로 암화과정을 유도한 쥐 혈액 효소 및 BUN, albumin 농도에 미치는 영향 ○ 다시마 물 추출물 및 fucoidan의 인간 유방암 세포주 성장 및 전이능 억제효과 - MCF-7 및 MDA-MB-231의 성장에 미치는 영향 - MCF-7 및 MDA-MB-231의 전이능에 미치는 영향
	다시마를 이용한 응용제품의 개발	○ 다시마 매작과의 제조 및 다시마 매작과의 항산화력 측정

여 백

제 2 절. 평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	평가
1차년도 (2004~ 2005년)	○ 동물실험의 조건 확립 및 다시마 이용형태에 대한 사전 조사 완료	40	40
	○당뇨 쥐에서 다시마의 혈당강하효과가 규명되었는가?	30	30
	○당뇨 쥐에서 다시마의 혈청지질 강하효과가 규명되었는가?	30	30
2차년도 (2005~ 2006년)	○ 다시마가 당뇨 쥐의 신장에서 산화적스트레스에 미치는 영향이 규명되었는가?	25	25
	○ 화학적으로 간세포암을 유도한 쥐에서 전암성 병변의 억제에 대한 다시마의 효과가 규명되었는가?	30	30
	○ 화학적으로 간세포암을 유도한 쥐간에서 다시마의 phase II 약물대사 효소에 대한 효과가 규명되었는가?	15	15
	○ 화학적으로 간세포암을 유도한 쥐간의 조직학적 변화에 미치는 다시마의 효과가 규명되었는가?	20	20
	○ 응용제품 개발을 위한 실험재료 선정 및 재료 배합비가 결정되었는가?	10	10

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	평가
3차년도 (2006~ 2007년)	○ 푸코이단이 인간 유방암세포의 생장억제에 미치는 영향이 규명되었는가?	15	15
	○ 다시마가 화학적으로 유도한 유방암의 생성과 성장에 미치는 영향이 규명되었는가?	20	20
	○ 다시마가 유방암을 유도했을 때 유방조직의 조직학적 변화에 미치는 영향이 규명되었는가?	10	10
	○ 다시마가 유방암을 유도했을 때 암세포의 세포 사멸에 미치는 영향이 규명 되었는가 (본 연구에서는 α-SMA 측정으로 대치함)	10	10
	○다시마가 유방암을 유도했을때 간의 phase II 효소활성도에 미치는 효과가 규명되었는가	15	15
	○ 다시마 추출물을 첨가한 식용대두유의 제조와 항산화력 측정이 완료되었는가?	15	15
	○ 다시마 분말을 첨가한 매작과의 항산화력 측정이 완료되었는가?	15	15

제 3 절. 관련분야의 기술발전에의 기여도

다시마에는 여러 가지 영양성분과 정미성분이 함유되어 있으며 생리활성물질로 각광 받고 있는 porphyran, fucoidan, alginic acid 등의 산성 다당류 뿐 아니라 유아의 준 필수 아미노산으로 알려진 타우린이 다량 함유되어 있어 기능성 식품으로서 활용 가능성이 매우 높은 고부가가치 식품으로 이용될 수 있다고 사료되므로, 본 연구에서는 이미 구축된 동물 모델을 통하여 다시마의 당뇨나 암 등의 만성퇴행성 질환에 대한 예방효과를 과학적이고 체계적으로 증명함으로써 기능성 식품으로서 다시마의 생리활성 역할을 규명하여 만성질환 억제 기능성 응용제품을 개발하고자 하였다.

본 연구에서 다시마를 이용하여 암 억제효과를 과학적이고 체계적으로 규명함으로써 만성질환을 예방하고 치료 보조제로 쓰일 수 있는 기능성 제품을 개발하여 지금까지 다시마를 직접 사용하거나 염장으로 사용하는 등 제한적으로만 이용했던 문제점을 해결하여 다시마를 다양하게 이용할 수 있는 방법을 제공함으로써 해조류의 소비를 증가시키는데 기여할 수 있으리라 사료된다.

몇 년 사이 우리사회는 산업분야에서 생활영역에 이르기까지 빠르게 well-being이 확산되고 있다. 웰빙 바람은 먹거리 문화를 변화시켜 기업들도 원가가 싼 제품을 만드는 것보다 가격은 비싸도 웰빙을 강화한 제품을 잇따라 출시하고 있어 웰빙트렌드는 기업에게는 새로운 시장과 산업의 창출기회와 함께 소비자에게는 건전하고 건강한 삶을 위한 소비생활양식을 조성하는 계기가 되고 있다. 식생활관련 웰빙은 건강하고 균형 잡힌 삶이 사람들의 먹거리와 직접적이고 밀접한 관련이 이기 때문에 모든 연령층에서 관심을 가지는 분야로 그 결과 친환경 농산물의 매출액이 2000년도 1,500억에서 2003년도에는 3,900억으로 놀라운 성장을 하였다. 뿐만 아니라, 농림부(2006)는 유기농산물을 원재료로 하여 음

료나 분말 등 가공하여 만든 유기가공식품 시장규모가 2005년도에 1,106억원으로 나타나 지속적으로 성장할 것으로 예측하였다. 이러한 웰빙바람은 여러 식품의 생리활성을 이용한 기능성 응용제품에 대한 소비자의 요구도를 증가시키고 있으며 본 연구에서는 이러한 시대적 요구에 발맞추어 해조류의 우수한 생리활성을 규명하여, 웰빙 식품을 추구하는 소비자의 욕구를 충족시킬 수 있는 응용제품을 개발하였다. 본 연구에서 다시마 분말과 물 추출물은 당뇨병의 치료 와 유방암 및 간암의 예방효과를 가진 것으로 밝혀져 건강하고 균형 잡힌 삶을 추구하는 소비자의 웰빙트랜드를 충족시킬 수 있을 것이다. 다시마 물 추출물이 상품화되면 첫째, 요리를 할 때 물대신 이용함으로써 물을 이용한 반죽에 비해 영양적 가치가 높아져 국민의 건강한 식탁에 기여할 수 있을 뿐 아니라 다시마의 식품 내 기능성으로 인해 보관기간동안 산패를 방지하고 특히 응용제품의 전분 노화를 방지할 수 있어 다시마 인절미 개발 등 여러 가지 응용제품의 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 둘째로는 높은 인건비로 인한 식사 원가 상승으로 어려움을 겪고 있는 단체급식소에 보급하여 작업공정의 간소화를 통해 인력운영의 효율성을 높임으로써 노동 생산성을 증가시키는 것이다. 단체급식소에서는 국물이 있는 음식에는 모두 다시국물을 만든 후, 다른 식재료를 넣어 음식을 만들게 되므로, 효율적인 반조리 식재료를 구매함으로써 작업 단계를 간소화시키는 것이 필요하다. 다시마 물 추출물이 상품화될 경우 이를 구매하여 사용하면, 다시국물을 만드는 과정을 생략할 수 있어 작업공정을 간소화시켜 생산활동의 단계가 축소되고, 인력운영의 효율성을 높일 수 있다. 뿐만 아니라, 인공조미료의 사용을 줄일 수 있고 식자재의 전처리 과정에서 발생할 수 있는 비위생적 요소들을 제거할 수 있어 위생적이며 균일하고 표준화된 웰빙 음식을 만들 수 있다. 학교급식, 산업체 급식, 병원급식 등 단체급식 분야의 시장성을 생각할 때 조리용 다시국물의 개발은 다시마의 소비증가에도 크게 기여할 것으로 사료되어 경제적 가치 또한 크다 할 수 있다.

또한 본 연구에서는 다시마 쿠키와 매작과를 개발하여 식품 내에서 다시마의

항산화작용을 입증하고 이들 기능성 응용제품의 조리과학적 특성, 관능평가 및 기호도 평가를 실시하였다. 다시마 분말을 이용하여 다시마 쿠키를 제조하여 항산화 효과와 소비자의 기호성을 평가하기 위해 관능평가를 실시한 결과 다시마 분말을 첨가한 쿠키에서 지질의 산화를 억제시키는데 효과적으로 나타났다. 뿐 만 아니라 기능성 다시마 쿠키의 제품화를 위한 기초를 제공하고자 관능 평가를 실시한 결과 다시마 분말을 넣지 않은 대조군보다 다시마 분말을 첨가한 쿠키의 기호도가 높게 나타나 본 연구는 염분 및 이취제거를 하지 않은 다시마 분말로 소비자의 기호도에 적합한 쿠키의 제조법을 개발하였다할 수 있다. 이러한 응용제품의 개발은 소비자의 기호에 적합한 기능성 쿠키를 개발해 국민건강에 이바지 할 수 있을 뿐 아니라 다시마의 수요 증가로 이어져 다시마의 가격이 높아지고, 이로 인해 어민들의 소득 증대에 큰 역할을 할 수 있다고 사료된다.

신체의 육체적, 생리적 측면의 유용성을 기대하며 섭취할 목적으로 식품소재에 함유된 특정 성분을 분리, 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공하여 제품화 되었을 경우 최종 제품 내에 식품소재에 함유된 성분이 그대로 유지되거나, 인체 내에서 동일한 기능성을 나타내는 지는 연구가 되어야 한다. 최근 생리활성물질, 바이오물질 등과 같이 식품인지, 의약품인지 판단하기 어려운 원료 또는 물질이 식품에서 사용되어 소비자에게 남용되는 경우가 많은데, 실제로 약리작용이 강한 의약품소재들 중에는 식품과 교란 작용을 일으켜서 강한 독성을 나타내기도 한다. 또한, 무엇이든 과잉 섭취하면 바람직하지 않은 결과를 가져오듯이 기능성 성분이라 하더라도 장기간, 다량으로 섭취될 경우에는 독성을 초래할 수 있는 문제점이 있다고 보고되었다. 영양 보충제의 경우도 카로티노이드 섭취량과 암발생 간에 역의 관계가 성립하는 것으로 알려져 있으나 실제로 베타카로틴을 식품이 아닌 보충제 형태로 남자 흡연자에게 5년간 투여한 핀란드의 최근 연구 결과에 의하면 폐암 발생률이 대조군에 비해 투여군에서 오히려 18%나 증가했다. 이러한 기대에 어긋나는 결과에 대해 베타카로틴 투여시기

가 적절치 못했거나 베타카로틴이 다른 항산화제 대사를 저해했거나 또는 카로티노이드 함량이 높은 식품에 들어있는 다른 카로티노이드나 식이섬유, 술포라판 같은 항암물질, 또는 아직까지 발견되지 않은 요인 등에 의해 역학 조사에서와 같은 결과가 나타났을 가능성을 제시하고 있다. 이러한 현상은 건강한 식이의 효과를 어느 특정 성분과 연관시키는 것이 얼마나 불합리한가를 단적으로 보여준다. 본 연구에서도 물 추출물이 다시마의 푸코이단 성분에 비해 항암효과가 낮지 않은 것으로 나타났다. 이를 바탕으로 본 연구에서 밝혀낸 당뇨, 유방암, 간암 등에 유용한 효과를 가진 다시마 물 추출물은 그대로 건강보조 식품이나 조리용 다시국물의 형태로 사용하는 것이 어떤 특정한 화합물을 분리 정제하여 사용하는 것보다 안정성이 있으며 경제성에 있어서도 분리 정제 과정을 거치지 않아도 되므로 자체를 상품화하는 것이 더 효율적인 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획.

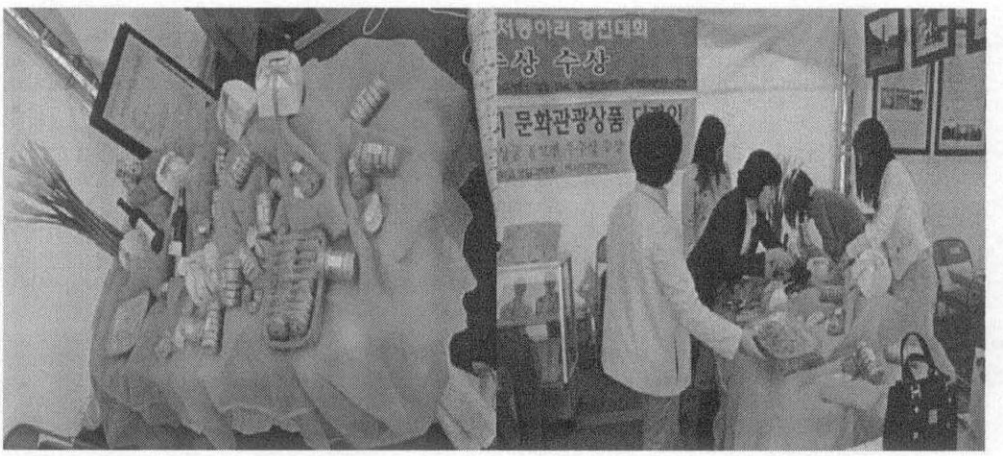
항 목	연구성과 활용실태	
	내용	시기
교육· 지도활용	O 다시마를 이용한 건강 쿠키 만들기	O 2005년 12월
산업 재산권	O 특허 출원	O 2007년 10월 29일
학술지 게재	O 논문 투고(2편)	O 2006년 10월 31일 O 2007년 2월 28일
학술대회 개최	O 한국영양학회 학술대회 논문 발표 (3편)	O 2005년 11월 3일 (1편) O 2006년 5월 26일 (2편)
	O 한국식품영양과학회 학술대회 논문 발표(2편)	O 2006년 10월 19일 (2편)
	O 대만아시아 영양학회 학술대회 논문 발표 (1편)	O 2007년 9월(1편)
	O 한국영양학회 학술대회 논문 발표 (2편)	O 2007년 11월(2편)
전시회 참가	O 목포해양문화축제 O 다시마를 이용한 기능성 식품개발 전시 및 시식회	O 2005년 10월 5일 O 2007년 8월 23일

가. 목포해양문화축제

목포해양 문화 축제에 다시마쿠키를 직접 제작하여 웰빙먹거리로 홍보활동

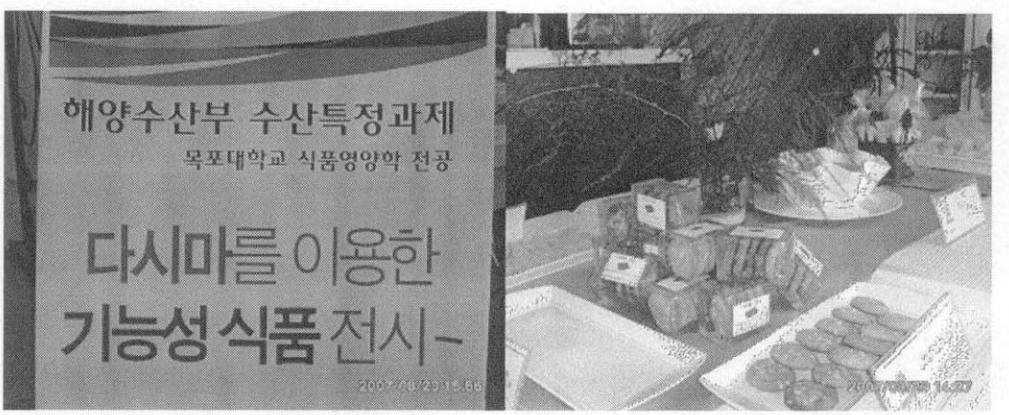
- 목포해양 문화 축제 전시

: 다시마 쿠키



나. 다시마를 이용한 기능성 식품개발 전시 및 시식회

다시마를 이용한 기능성 식품개발 전시 및 시식회(웰빙시대에 걸맞는 신비한 건강여행)를 JS Cuisine에서 선보여 광주시민에게 웰빙 먹거리인 다시마 쿠키, 다시마 매작과, 다시마 식빵 및 다시마를 이용한 요리를 직접 맛볼 수 있는 기회를 제공함으로써 다시마를 널리 홍보하는데 기여함.



다시마를 이용한
가능성 식품 전시-
해양수산부 수산특정과제
2007/08/23 16:02

여 백

제 6 장. 참고문헌

1. Ramon Rodrigo and Gonzalo Rivera. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine, Free Radical Biology & Medicine, Vol.33, No.3, pp.409-422, 2002.
2. Rainer Lehmann, Erwin D. Schleicher. Molecular mecanism of diabetic nephropathy. Clinica Chimica Acta 297: 135-144, 2000.
3. Hideki Matsui, Masami Suzuki, Ryoichi Tsukuda, Kyoko Iida,Masayuki Miyasaka, Hitoshi Ikeda. Expression of ICAM-1 on glomeruli is associated with progression of diabetic nephropathy in a genetically obese diabetic rat, Wistar fatty. Diabetes Research and Clinical Practice. 32: 1-9, 1996.
4. Semiramis J. Hadad, YaraM. Michelacci, Nestor Schor. Proteoglycans and glycosaminoglycans synthesized in vitro by mesangial cells from normal and diabetic rats. Biochimica et Biophysica Acta 1290, 18-28, 1996
5. Kim YS, Kim BC, Song CY, Hong HK, Moon KC, Lee HS. Advanced glycosylation end products stimulate collagen mRNA synyhesis in mesangial cells mediated by protein kinase C and transforming growth factor-beta. J Lab Clin Med. Vol.138, No.1. 2001
6. Lutz Buschhausen, Stefan Seibold, Oliver Gross, Tilman Matthaeus, Manfews Weber, Eckhard Schulze-Lohoff. Regulation of mesangial cell function by vasodilatory signaling molecules. Cardiovascular Reasearch 51. 463-469. 2001

7. Kumar Sharma, Tracy A. McGowan. TGF-β in daibetic kidney disease : role of novel signaling pathways. Cytokine & Growth Factor Reviews 11. 115-123. 2000
8. Motohide Isono, Sheldon Chen, Soon Won Hong, M.Carmen Iglesias-de la Cruz, and Fuad N. Ziyadeh. Samd pathway is activated in the diabetic mouse idney and Smad3 mediates TGF-β-induced fibronectin in mesangial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 296. 1356-1365. 2002
9. Akira Onozaki, Sanae Midorikawa, Hironobu Sanada, Yoshimitsu Hayashi, Tsuneharu Baba, Tetsuo Katoh, and Tsuyoshi Watanabe. Rapid change of glucose concentration promotes mesangial cell proliferation via VEGF:inhibitory effects of thiazolidinedione. Biochemical and Biophysical Reasearch Communications. 317, 24-29. 2004
10. Tatyana L. Vasyl'eva, Xiaoyan Chen, Robert J, Ferry Jr. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates cytokine-induced mesangial cell apoptosis. Growth Hormone & IGF Research. 2005
11. Michael Zeiberg, Mark B. Ericksen, Yuki Hamano, Eric G,. Neilson, Fuad Ziyadeh, Raghu Kalluri. Differential expression of type Ⅳ collagen isoforms in rat glomerular endothelial and mesangial cells. Biochemical and Biophysical Reaearch Communications 295. 401-407. 2002
12. Kayoko Ikehara, Hisaya Tada, Koji Kubuki, Toshiki Inokuchi. Role of protein kinase C-angiotensin II pathway for extracellular matrix production in cultured human mesangial cells exposed to high glucose levels. Diabetes reaearch and Clinical Practice. 59. 25-30. 2003

13. Klaus Heese, Karl-Friedrich Beck, Meik Helmut Behrens, Katharina Pluss, Wolfgang Fierlbeck, Andrea Huwiler, Heiko Muhl, Helmut Geiger, Uwe Otten, Josef Pfeilschifter. Effects of high glucose on cytokine-induced nerve growth factor(NGF) expression in rat renal mesangial cells. Biochemical Pharmacology 65. 293-301. 2003
14. Cui CB, Lee EY, Lee DS, Ham SS. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from Korean traditional Doenjang added sea tangle. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 3(2): 322, 2002
15. 박현서, 권필수, 윤정한, 하영래. 식이에 첨가한 CLA isomer가 쥐에서 대장점막의 세포사멸과 세포증식에 미치는 영향 한국영양학회지 36(7): 661, 2003
16. Lahaye M. Marine algae as sources of fibers : determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. J Sci Food Agric 54: 587, 1991
17. Kim SH, Park HS, Park WK. Determination and physical properties of dietary fiber in seaweed products. J Korean Soc Food Nutr. 17(4): 320, 1988
18. Koo JG, Jo KS, Do JR, Woo SJ. Isolation and purification of fucoidans from Laminaria religiosa and Undaria pinnatifida in Korea. J. Korean Fish Soc. 28(2): 227, 1995
19. Do JR, Kim EM, Koo JG, Jo KS. Dietary fiber contents of marine algae and extraction condition of the fiber. J. Korean Fish Soc. 30(2): 291, 1997
20. Kim YY, Lee KW, Kim GB, Cho YJ. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, Laminaria japonicus by heating hydrolysis.

J. Korean Fish Soc. 33(5): 393, 2000

21. Koo JG, Jo KS, Park JH. Rheological properties of fucoidans from Laminaria religiosa, Sporophylls of Undaria pinnatifida, Hizikia fusiforme and Sagassum fulvellum in Korea. J. Korean Fish Soc. 30(3): 329, 1997
22. Kimura Y, Watanabe K, Okuda H. Effects of soluble sodium alginate on cholesterol execretion and glucose tolerance in rats. J of Ethnopharmacology 54: 47-54, 1996
23. Jang MA, Lee KS, Seo JS, Choi YS. Effects of dietary supplementation of sea tangle extracts on the execretion of neutral steroids and bile acid in diabetic rats. J. Korean Soc Food Sci Nutr 31(5): 819-825, 2002
24. Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Kim CM, Koo JG. Effects of sea tangle(Laminaria japonica) extract and fucoidan components on lipid metabolism of stressed mouse. J Korean Fish Soc 33(2): 124-128, 2000
25. Giraux JL, Tapon-Bretaudiere J, Matou S, Fischer AM. Fucoidan, as heparin, induces tissue factor pathway inhibitor release from cultured human endothelial cells. Thromb Haemost. 80(4): 692, 1998
26. Soeda S, Shibata Y, Shimeno H. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular endothelial cells. Biol Pharm Bull. 20(11): 1131, 1997.
27. Choi CB, Lee EY, Lee DS, Ham SS. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from Korean traditional Doenjang added sea tangle. J Korean Soc Food Sci Nutr 31(2): 322-328, 2002
28. 최혜미. 21세기 영양학(개정판)
29. Baginski ES, Foa PP, Zak B. Glucose 6-phosphatase. In Methods of Enzymematic Analysis Academic Press, New York 2: 876, 1993

30. Buege JA, Aust SD, Sidney F, Lester P. Methods in Enzymology. Academic Press, New York, pp. 302, 1978
31. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. J Biol Chem 249: 130, 1974
32. Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. In: Methods in Enzymology 52: 506, 1978
33. Carlberg I, Mannervick B. Glutathione reductase. In: Methods in Enzymology 113: 484, 1985
34. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RT. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265, 1951
35. Chai Toung-M, Lim Ba-Kug, Lee Jong-Yoon, Kim Toung Hee, Rhee Soon Jae. Preparation of soluble dietary fiber form Oak Wood(*Quercus Mongolica*) and Its physiolobical function in rat fed hihg cholesterol diets. Kor, J, Nutri,.36(1) : 9-17. 2003
36. Kye SH, Ha MF, Lee HS, Tun JS, Kim CI. Study on food intake and food consumption pattern of adults as a part of total diet study. Kor, J, Nutri,.30(1) : 61-74. 1997
37. 강명희. 2002년 영양권장량과 영양섭취실태, 어떻게 달라졌나?. *한국영양학회지*, 01춘계연합학술대회 초록 , pp.66-75 , 2001
38. 2001 annual report on the Cause of Death statistics. *Nutritional statistical office*. 2002.
39. Korea Ministry of Health and Welfare. 2001. *National Health and Nutrition Survey Report*. 2002.
40. 장남수. 제2차 정책토론회-건강한 미래를위한 국민영양정책방안. 한국영양학회. 2005
41. Ido Wolf, Siegal Sadetzki, Raphael Catane, Avraham Karasik, Bella

Kaufman. Diabetes mellitus and Breast cancer. *oncology. thelancetcom.com* Vol 6 2. 2005.

42. George Jerums, Sianna Panagiotopoulos, Josephine Forbes, Tanya Osicka, and Mark Cooper. Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. Archives of Biochemistry and Biophysics 419, 2003, 55-62
43. Chapman, V.J.; Chapma, D.J. *Sea weeds and Their Uses*. Chapman and Hall: London, 1980
44. Indergaard, M.; Minsaas, J. Animal and human nutrition. *In Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*; Guiry, M.D., Blunden, G., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1991;pp 21-64
45. Burkitt,D,P, Trowell HC, Refined carbohydrate foods and disease, The implication of dietary fiber. Academic press, 1975, 23-41
46. Grodon, D.T, The importance of total dietary fiber in human nutrition and health. Kor, J, Nutri,. 25,75, 1992
47. Bennett, W. G. and Cerda, J.J. Benefits of dietary fiber. Postgraduated Medcine. 99, 153-175, 1996
48. Yoshiyuki Kimura, Kazuhiro Watanabe and Hiromichi Okuda. Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. *Journal of Ethnopharmacology, Volume 54, Issue 1, October 1996, Pages*
49. Kuda T, Fujii Saheki T, Hasegawa A, Okuzumi. Effects of brown algae on faecal flora of rats. Nippon Nogeikagaku kaishi. 58, 307-314, 1992
50. Rhu BH, Kim DS, Cho KJ, Sim DB. Antitumor activity of seaweeds toward Sarcoma-180. Kor J Food Sci Technol 21, 595-600, 1989
51. 동의보감. Hur J. 1999. Dong-ui-bo-gam, Bupin Publishing Co, Seoul.

52. 이건순. 웰빙 식생활과 건강. 라이프사이언스

53. Zhang.Q, Ki,Z., Xu,Z., Niu,Z, Zhang, Effect of fucoidan on chronic renal failure in rat. Planta Media 69, 537-541, 2003

54. Hunjoo Ha, Kyung Hwan Kim, Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxdative stress and protein kinase C. Diabetes Research and Clinical Practice 45, 147-151, 1999

55. H. Sies, Oxidative stress: Intoducion, in: H. Sies(Ed.), Oxidative Stress; Oxidants and Antioxidants, Academic Press, London, 1991, pp. xv-xii

56. Broxnlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glucosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med 318, 1315-1321, 1988

57. Rakesh Kakkar, Subrahmanyam V. Mantha, Jasim Radhi, Kailash Prasad and Jawahar Kalra, Antioxidant defense system in diabetic kidney: A time course study. Life science. Vol. 60, No.9 667-679, 1997

58. George Jerums, Sianna Panagiotopoulos, Josephine Forbes, Tanya Osicka, and Mark Cooper. Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. Archives of Biochemistry and Biophysics 419, 55-62, 2003

59. 장민아, 이경숙, 서정숙, 최영선. 다시마 추출물의 급여가 당뇨 쥐의 중성 스테로이드와 담즙산 배설에 미치는 영향. J. Korean Soc. Food sci. Nutr. 31(5) 819-825. 2002

60. Haffmer, S. M. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. Diabetes Care, 21, 160-178, 1998

61. Siperstein, M. E. Studies on the relationship between glucose oxidation and intermediary metabolism. The influence of glycolysis on synthesis of cholesterol and fatty acid in normal liver. J. Cli Invest,

37, 1185-1195, 1958

62. Siperstein, M. E. Studies on the relationship between glucose oxidation and intermediary metabolism. The influence of glycolysis on synthesis of cholesterol and fatty acid in normal liver. J. Cli Invest, 37, 1185-1195, 1958

63. Chun-sen Hsu, Wan-chun Chiu, Sung-ling Yeh. Effects of soy isoflavone supplementation on plasma glucose, lipids and antioxidant enzyme activities in streptozotocin- induced diabetic rats. Nutrition Research. 23. 67-75. 2003

64. Tue-Levin KM, Chung WS, Leung Alvert WN, Christopher H, Cheng K, Redox. Changes precede the occurrence of oxdative stress in eyes and arota, but not in kidneys of diabetic rats. Life sci. 73, 2557-2570, 2003

65. Garg, M. C., Ojha, S. and Bansal, D. D. Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. Indian J. Exp. Biol., 34, 264-266, 1996

66. T. Soulis, S. Sastra, V. Thallas, S.B. Mortensen, M. Wilken, J.T. Clausen, O.J. Bjerrum, H. Petersen, J. Lau, G. Jerums E. Boel, M.E. Cooper. A novel inhibitor of advanced glycation end-product formation inhibits mesenteric vascular hypertrophy in experimental diabetes. Diabetologia 42, 472-479, 1999

67. Kim SG, Jo NJ, Kim YH. Technology of Bread and Cake. B&C World Publishing Co Ltd, Seoul. p 157-169, 1999

68. Lee YK, Kim MJ, Lee SB, Kim SD. Quality characteristics of kipfel cookies prepared with Chitosan-*Chungkukjang*. J East Asian Soc Dietary Life 15(4): 437-443, 2005

69. Kang NE, Kim HY. Quality characteristics of health concerned

funtional cookies using ingredients. Korean J Food Culture 20(3):331-336, 2005

70. Park BH, Cho HS, Park SY. A Study on the antioxidative effect and quality characteristics of cookies made with *Lycii fructus* powder. Korean J Food Cookery Sci 21(1):94-102, 2005
71. Han JS, Kim JA, Han GP, Kim DS, Kee KR. Quality characteristics of functional cookies with potato peel. Korean J Soc Food Cookery Sci 20(6):607-613, 2004
72. Lee JA, Park GS, Ahn SH. Comparative of physicochemical and sensory quality characteristics of cookies added with barleys and oatmeals. Korean J Soc Food Sci 18(2):238-246, 2002
73. Kim HY, Lee IS, Kang JY, Kim GY. Quality characteristics of cookies with various levels of functional rice flour. Korean J Food Sci Technol 34(4): 642-646, 2002
74. Kim HY, Jeong SJ, Heo MY, Kim KS. Quality characteristics of cookies prepared with varied levels of shredded garlics. Korean J. Food Sci. Technol. 34(4):637-641, 2002
75. Park SM, Kim YS, Yoon IC, Seo EH, Ko BS, Choi SB. Development and hypoglycemic effect of low-fat and sugar-free cookies. Korean J Food Sci Technol 34(3):487-492, 2002
76. Ministry of Maritime Affairs & Fisheries. Trend of seaweed Cultivation and Production. Vol 13, p 118, 2002
77. Hur J. Dong-ui-bo-gam. Bupin Publishing Co, Seoul, 1999
78. Choi JH, Rhim CH, Kim JY, Yang JS, Choi JS, Byun DS. Basic studies in the development of alginic acid as a diet for the treatment of obesity. 1. The inhibitory Effect of alginic acid as a deitary fiber on

obesity.Bull Kor Fish Soc 19(3)303-311, 1986

79. Kwak CS, Kim MY, Kim AE, Lee MS. Cytotoxicity on Human cercer cell and antitumorigenesis of chungkookjang, a fermented soybeanproduct, in DMBA-Treated rats. J Korean Nutr Soc 39(4) : 347-356, 2006

80. Day JK, Besch-williford C, McMann TR, Hufford MG, Luvahn DB, MacDonald RS. Dietary genistein increased DMBA-induced mammary adenocarcinoma in wild-type in wild-type, but not ER-α KP mice. Nutr cancer 39: 226-232, 2001

81. Giri AK, Lu LJ. Genetic damage and inhibition of 7,12-dimethylbenz [α] anthracene-induced genetic damage by the phytoestrogenes, genistein and diazein, in female ICR mice. Cancer Lett 95: 125-133,1995

82. Murrill WB, Brown NM, Zhang JX, Manzolillo PA, Bames S, Lamartiniere CA. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. Carcinogenesis 17:1451-1457, 1996

83. Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. carcinogenesis 19(12) : 2151-2158, 1998

84. Cotroneo MS. Wang J, Fritz WA, Eltoum IE, Lamarticiere CA. Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model. Carcinogenesis 23(9): 1467-1474, 2002

85. Malejka-Giganti D, Niehanst GA, Post-initiation treatment of rats with indole-3-carbinol or β-naphthoflavone does not suppress 7,12-dimethylbenz [α] anthracene-induced mammary gland

carcinogenesis. Cancer Letters 160: 209-218, 2000

86. Lamarticiere CA, Wang J, Sith-johnson M, Eltoum IE. Bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. Toxicol sciences 65:228-238, 2002

87. Hirose M, Mixoguchi Y, Yaono M, Tanaka H, Yamaguchi T, Shirai T. Effects of green tea catechins on the progression or late promotion stage of mammary fland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7,12-dimethylbenz [a] anthracene. Cancer letters 112: 141-147, 1997

88. Lai H, Singh NP. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz [a] anthracene(DMBA)-induced breast cancer in the rat. Cancer letters 231:43-48, 2006

89. Anbuselvam C, Vijayavel K, Balasubramanian M.P. Protective effect of Operculina turpethum against 7,12-dimethylbenz [a] anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in experimental rats. Chemico-Billogical Interactions 168: 229-236, 2007

90. Jung KJ, Wallig MA, Singletary KW. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz [a] anthracene(DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. Cancer Letters 233: 279-288, 2006

91. Indada K. Tominaga T, Toi M, Yamamoto Y, Abe M, Yamashita JI, Ogawa M. Protective effects of leuprolide acetate on 7,12-dimethylbenz [a] anthracene(DMBA)-induced mammary carcinogenesis in rats. J European Surgical oncology 22: 538-587, 1996

92. Samy RP, Ponnampalam Gopalakrishnakone, Savraimuthu Ignacimuthu. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz

[α] anthracene-induced mammary tumors in rats. Chemico-Biological interactions 164: 1-14, 2006

93. Kang JS, Ahn BW, Nam KT, Choi MN, Kim JY, Kim DJ, Jang DD, Yang KH. Pre-initiation treatment of indole-3-carbinol(I3C) inhibits 7,12-dimethylbenz [α] anthracene(DMBA)-induced rat mammary carcinogenesis. J Korean Vet res 41(4):549-555, 2001
94. Kang MJ, SHin MS, Park JN, Lee SS. Effects of dietary peroxidizability enzyme activity in 7,12-dimethylbenz [α] anthracene-treated rats. Nutritional sciences 9(1):14-19, 2006
95. Padmavathi R, Senthilnathan P, Sakthisekaran D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in 7,12-dimethylbenz [α] anthracene-induced breast cancer in female rats. Compartive bioche physi part C 143:349-345, 2006
96. Liu JM, Ferial HB, Catherine BV. Analysis of the In Vitro inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulphated polysaccharides. Anticancer research 20: 3265-3272, 2000
97. Liu JM, Bignon J, Ferial HB, Bittom P, Vassy J, Fermandjian S, Johana WB, Catherine BV. Inhibitory effect of fucoidan on the adhesion of adenocarcinoma cells to fibronectin. Anticancer research 252129-2134, 2005
98. Rajkapoor B, Murugesh N, Chodon D, Sakthisekaran D. Chemoprevention of N-nitrosodiethylamine induced phenobarbitol promoted liver tumors in rat by extract of *Indigofera aspalathoides*. Biol Pharm Bull 28: 346-336, 2006
99. Vaclavikova R, Horsky S, Simerk P, Gut I. Paclitaxel metabolism in

rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. Arch Phamacol 368:200-209, 2003

100. Tanaka H, Ogawa K, Kurata Y, Shibara MA, Shirai T, Hara Y, Hirose M. Inhibitory effect of green tea catechins on DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. J Proc Cancer Assoc 52:124, 1994