

최      중  
보   고   서

## 건강보조식품용 복어 간유구 제조 기술의 개발

(최종보고서)

2003년 9월

주관연구기관   경성대학교

해 양 수 산 부

# 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “건강보조식품용 복어 간유구 제조 기술의 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 9월 일

주관연구기관명 : 경 성 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 동 수(경성대학교 식품공학과)

연 구 원 : 김 철 호(동국대학교 한의과대학)

연 구 원 : 윤 호 동(국립수산진흥원 생물공학단)

연 구 원 : 이 동 호(식품의약품 안전청)

## 요 약 문

### I. 제 목 : 건강보조식품용 복어 간유구 제조 기술의 개발

복어류는 특유의 독성을 지니고 있음에도 불구하고, 단일 어종으로서는 보기 드물게 전국적으로 그 수요가 급신장하고 있어, 어민을 비롯하여 수산관련 산업에 종사하는 이들의 소득 증대에도 큰 비중을 차지하고 있다.

한편, 복어의 간장 부위에는 지질의 함량이 매우 높으며 전처리 직후에는 비교적 선도도 좋기 때문에 주요한 어유 자원으로 이용 가능성이 높지만, 이 부분에 대한 연구는 진행되고 있지 않다. 대구 간유 및 상어 간유는 오래 전부터 기능성 식품 소재로 이용되고 있는데 복어의 간유도 상업적으로 개발된다면 상품성이 매우 클 것으로 기대된다.

그런데, 복어류는 그의 독성으로 인하여 전문도매업자들에 의하여 식용부위와 비식용부위로 분리 전처리 과정을 거쳐 유통되고 있다. 이때 분리 제거되는 복어 간장 부위가 타 어종에 비하여 어체 100g 당 간장부위가 약 18g 정도가 될 만큼 그 양이 많다. 또한 지질의 함량이 다른 부위에 비하여 월등히 많아 간장 100g당 약 35g이나 함유되어 있으며, 그러나 아직 적당한 이용방법이 없다.

어유 중에는 각종 성인병에 효과가 있는 EPA 및 DHA와 같은 고도불포화지방산이 많이 존재하고 있으며, 이러한 지방산의 생리기능은 뇌경색과 심근경색의 예방 및 방지, 식품에 기인한 동맥경화의 예방과 방지 등 심혈관계질환의 예방효과, 항종양 효과, 기억학습능력 저하 예방효과 등이 알려지고 있으며, 동물실험에서도 그 효과가 인정되고 있다. 그 이외에도 눈의 기능향상, 알레르기 체질의 개선, 당뇨병 합병증의 진행방지, 피부를 윤택하게 하는 등 여러 가지 생리효과도 기대되고 있다.

본 과제에서는 현재까지 이용되지 못하고 있는 복어 간장으로부터 부가가치가 높은 건강보조식품용 복어 간유구를 제조, 산업화하는 기술을 개발하기 위하여 복어 간유 중의 잔류독성의 제거, 간유의 추출 및 정제, 안전성 검토, 생리적

특성 및 제품화 등에 관하여 검토하였다.

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

복어 간장에는 높은 함량의 유지(약 30 - 40%)가 함유되어 있으며, 특히 유지 중에는 n-3계 지방산인 EPA 및 DHA의 함량이 많으나 이의 회수 및 이용에 관한 연구는 미흡한 실정이다. EPA 및 DHA는 최근 동맥경화나 고혈압 등의 성인병과 순환기질환의 예방과 치료, 두뇌활동에 대한 효과 등으로 영양생리학적으로 중요성이 강조되고 있는 물질로 이에 관한 이용도 활발히 진행되고 있어 새로운 건강보조식품으로서 이용가능한 복어간유구 제조 기술을 확립하고자 하였다.

현재 국내 건강보조식품 시장은 약 1조원의 시장규모를 가지고 있으며 그 중 정제어유의 생산금액은 약 7백억원으로 약 6.5% 이상을 점하고 있으며 전체 건강식품군중 6위를 차지하였다. 따라서, 이들 유효성분의 이용기술 개발이 미흡한 국내 실정에 비추어 볼 때, 복어 간장으로부터 부가가치 높은 유효성분의 이용기술 개발은 대단히 중요하다.

일반적으로 식용유지는 추출, 탈검, 탈산, 탈색, 탈취공정을 통하여 정제되고 있으나, 복어간유의 경우는 그 산업적 활용에 대한 연구는 없는 실정이다. 복어간장으로부터 독소를 제거하는 공정과 유지를 추출하여 정제하는 기술은 실용화되기 어렵다.

- ▶복어 간유 추출시에 독소 제거 공정 확립
- ▶일반적인 유지 추출, 정제 공정을 응용
- ▶정제 간유 중의 복어독소의 잔류여부 확인
- ▶추출, 탈검, 탈산, 탈색, 탈취공정 확립

건강식품용 정제어유는 원료단가가 EPA/DHA는 14,000원/kg, 스쿠알렌은 35,000원/kg으로 매우 높지만, 복어간유는 가공부산물로부터 얻은 원료를 사용하기

때문에 단가가 매우 저렴하며, 건강기능성 소재로서의 활용이 크게 기대된다. 정제 어유 제품은 최근 연간 14,976kg(약 68억원) 내지 142,010kg(약 632억원) 정도 수입되고 있어 그 소비시장이 매우 크다. 또한 단위 중량기준(1 kg)당 평균 단가도 정제 어유 관련 제품은 68만원대로 고부가가치 제품이며 기능성 소재를 강화한 건강보조식품의 산업적 가치도 더욱더 중요해지고 있다. 따라서 본 과제 성공시 산업적 측면에서 효과를 기대할 수 있다.

따라서 북어 간유구가 개발된다면 수산자원의 효율적 이용은 물론 수입대체 효과가 있다. 북어 간유구 제조 공장이 설립된다면 어촌지역의 중소규모 가공산업 발전에 기여할 수 있다.

- ▶ 어 간유구(fish liver oil capsule)의 제조 기술 축적
- ▶ 수산자원의 효율적 이용, 수입대체 효과
- ▶ 수산물의 고부가가치를 창출, 어촌지역의 산업 발전에 기여
- ▶ 중소규모 수산업자들의 벤처기술로서 활용 가능

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 제 1 절 북어 간유구 제조 기술 확립

##### 1. 북어 간장 및 간유의 신선도 시험

원료 저장 중 간장의 pH 및 VBN 함량을 측정하였으며, 간유의 AV 및 POV 값을 측정하였다.

##### 2. 북어 간유 추출, 제독 및 정제 기술의 확립

북어 간장으로부터 유지의 효율적인 추출, 제독처리 및 정제 조건을 확립하였다.

### 3. 복어 간유구 시제품의 제조 및 제조 공정의 최적화

복어 간유구 시제품을 연질캡슐로 제조할 경우의 적정 배합비율을 결정하였다.

### 4. 복어 간유의 안전성 시험

복어 간유에 대한 안전성을 검증하기 위하여 아래와 같은 방법으로 급성독성 시험(acute toxicity test)을 실시하였다.

## 제 2 절 복어 간유구의 생리활성 시험

### 1. 품질개선 및 안정성 시험

#### 가. 제품의 포장형태 및 유통기간

대량생산을 위한 최적 정제 공정 즉, 조간유 1 kg을 처리기준으로 할 경우의 탈검, 탈산, 탈색 및 탈취 조건을 설정하였다.

#### 나. 품질안정성 시험

복어 간유의 산가, 과산화물가 및 지방산 조성을 조사하였다.

### 2. 생리활성 성분 함량 측정

#### 가. 미량 영양성분의 함량

복어 간유 중의 비타민(A, D, E) 및 미네랄 함량을 측정하였다.

#### 나. 특수 영양성분의 함량

정제 복어 간유 중의 EPA 및 DHA의 함량을 조사하였다.

#### 다. 간유의 생리활성 시험

복어 간유의 콜레스테롤 저하 효능, 항동맥경화 효과를 시험하였다.

### 3. 복어 간유구의 대량생산

#### 가. 소비자 기호도 및 시장조사

복어 간유의 안정성을 조사하였다.

#### 나. 제품생산 및 판로 개척

시제품을 연질 캡슐 형태로 생산하여, 생산에서 판매에 이르기까지 필요한 전과정을 검토하였다.

## IV. 연구개발결과

1. 본 연구를 통하여 얻은 연구성과 및 활용영역은 새로운 건강보조식품 시장의 개척, 수산자원의 고차가공기술 개발, 그리고 관련 어업인들의 새로운 산업 창출 등이라 할 수 있다. 건강보조식품의 제조 및 품목허가는 식품의약품안전청의 업무 영역에 속하는데, 그 절차가 매우 엄격한 실정이다. 즉, 국가가 공인하고 있는 기관으로부터의 안전성 시험 결과, 제품이 지니고 있는 기능성에 대한 정확한 자료를 요구하고 있어 이에 대한 사전 준비 및 행정적인 협력체제를 갖출 필요가 있다. 또한 벤처형 중소기업체의 가장 어려운 점은 새로운 사업의 성공 가능성, 시설 및 운영 경비 각종 국내외 식품 전시회 출품, 홍보 등과 같은 부대 경비들을 감당해야 한다는 점이다. 이러한 점에 대한 행정적, 재정적인 지원책이 마련될 수 있는 방안이 있다면 산업화를 앞당기는데 도움이 될 것으로 생각된다.

2. 본 연구 결과는 현재 특허출원 준비 중이며 기술이전을 검토하고 있다. 앞으로 지역 특산식품으로 육성시키고, 필요한 기술이 이전될 수 있는 방안이 있으면 좋을 것이라 생각된다. 현재 본 연구자가 직접 벤처 사업화할 수 있는 방안도 검토 중이다.

#### IV. 연구개발결과의 활용계획

1. 본 연구내용을 학술회의에 발표한 실적은 아래와 같다.
  - 가. 건강보조식품으로서의 복어 간유구 제조 및 잔류독성, Marine toxin에 관한 한일공동 심포지엄, 동해안해양생물자원연구센터(강릉대학), 2001.10.15.
  - 나. 제독처리한 복어 간유의 생리활성, 한국식품과학회 제 70차 춘계학술발표회, 경주교육문화회관, 2003.
  - 다. 복어 간유의 생리활성, 한국식품영양과학회 논문 투고 중, 2003.
  - 라. 항동맥경화에 대한 복어 간유의 효과, 한국식품영양과학회 논문 투고 중, 2003.

2. 본 연구내용을 메스컴을 통하여 소개된 실적은 아래와 같다.

가. 일간지

- 국제신문(2003년 7월 14일) : 해양생물 금빛가공, 복어 간유구
- Naver 뉴스(2003년 8월 21일) : 국내최초 복어독 분리 정제
- 중앙일보(2003년 8월 22일) : 복어독으로 약을 만든다.
- 경향신문(2003년 8월 22일) : 국내 최초 복어독 분리 정제

3. 본 연구성과 활용에 따른 기대효과는 아래와 같이 예상되고 있다.

가. 경제적, 산업적 측면

본 과제를 통하여 개발된 복어 간유구는 품목 및 제조허가를 받기 위한 준비를 하고 있으며 아래와 같은 매출실적이 기대되고 있다.

< 연차별 예상효과 >

구분	산업적 실용화 후		
	2004년	2005년	2006년
○수출증대 기대효과 (5억/10톤 기준)	5억원	10억원	20억원
○내수용 기대 효과 (5억/10톤 기준)	10억원	20억원	30억원



나. 기술적 측면

- ▷ 제독처리한 복어 간유의 안전성 시험 자료 확보
- ▷ 복어 간유의 추출, 정제 기술의 확립
- ▷ 새로운 해양바이오 산업 영역확대
- ▷ 복어 간유의 생리활성 기능 구명

# SUMMARY

## I . Title

Development of Manufacturing Technology for Pufferfish Liver Oil Capsule As a Health Food

## II. Objectives and Importance

### 1. Goal

Although pufferfish has substances of peculiar toxicant, the demand is increasing on a national scale as of a singular fish species. It therefore takes large importance with the earnings of fishermen and marine industry related workers. In the mean time, the study of pufferfish oil is not taken place often as sources of fish oil even though in the liver part of pufferfishs contain large amount of fatty substances and the freshness is relatively good immediately after pretreatment. The codfish liver oil and the shark oil were used as functional food materials for a long time. It would be a great quality product if the pufferfish liver oil is commercially developed. But because of its toxicity, pufferfishs go through pretreatment process to separate edible and inedible parts by professional wholesalers. At pretreatment process, the amount of separated pufferfish liver part is very large compared to other fishes as 18g per 100g of a fish. Also the lipid content is exceptionally high compared to other parts as 35g per 100g of liver. But there are no proper ways to exploit these sources to this day.

Among fish oils, there exists high unsaturated lipids like EPA and DHA which have good effectiveness in all kinds of diseases of adults. The

physiological ability of these unsaturated lipids are famous for prevention and curing of encephalosclerosis, and hardening of heart muscle, as well as preventing arteriosclerosis that arise from foods, effectiveness in preventing the diseases of heart blood, in anticancer, lowering of memorial learning ability. The effectiveness is acknowledged by animal testing. Other than these effects, improvement in eye functions, allergies and fair skin, prevention from developing a complication of diabetes, and many others are expected.

This project is studied on removing the remaining toxicants, extraction and regularity of liver oil, confirmation of safety, physiological ability and producing liver oils to finished goods. In conclusion, the project is for the development of manufacturing technologies for pufferfish liver oil capsules as a functional food which will produce high value products.

## **2. Objectives**

- 1) Determination of the extracting and purifying treatment for pufferfish liver oil (PLO)
- 2) Development of new technology for using fishery processing wastes
- 3) Establishment of food sanitary safety for PLO products
- 4) Examination of biofunctional activity of PLO
- 5) Development of most suitable processes to manufacture PLO

### III. Contents and Results

#### 1. Contents

- 1) Establishment of manufacturing technology for pufferfish liver oil capsule
  - (1) Examination to preserve freshness of raw pufferfish liver  
Examined pH and volatile base nitrogens(VBN) in raw pufferfish liver
  - (2) Examination of most suitable extraction condition of PLO  
Examined degumming, deacidifying, decolorizing, and deodorizing from crude oil
  - (3) Examination of detoxification during extraction of PLO from raw liver  
Examined alkali-treatment during heating process in hot water vessel  
Examined remaining toxicity in PLO by mouse assay, analyzed pufferfish toxin in the PLO by high performance liquid chromatography(HPLC)
  - (4) Examination of food sanitary safety for PLO  
Examined acute toxicity for PLO in experimental animals
  - (6) Manufacturing final sample products for industrial use  
Set up the optimum manufacturing processes for mass production
  
- 2) Determination of biofunctional activities for pufferfish liver oil capsule
  - (1) Examination of quality improvement for manufacturing products  
Development of suitable additives and nutrients for PLO
  - (2) Stability test for quality during preservation  
Measured acid value(AV) and peroxide value(POV) for stability test
  - (3) Examination of bioactive components in POL  
Determined the contents of vitamin A, D and E, and minerals, as well

as docosahexaenoic acid(DHA) and eicosapentaenoic acid(EPA)

(4) Examination of bioactive function

Examined anti-fatigue, antihepatotoxicity, and lowering hyperlipidemia by PLO

(5) Examination of the other bioactive function

Examined inhibitory effects of vascular smooth muscle cells proliferation and inducing effects of G1 cellcycle arrest by PLO

(6) Mass production for industrial purpose

Estimated total values of PLO as commercial products

## 2. Results

In pufferfish's liver, the lipid content is high and especially in the lipids, there are high content of EPA and DHA which are n-3 fatty acids. But researches on collection and usage of these lipids leave much to be desired. Anyhow, the studies on EPA and DHA are in great advance unlike the studies of lipids in pufferfish liver. EPA and DHA are the substances that has great emphasis in nutritionally and physiologically to prevent and cure circulatory diseases, diseases of adult person such as arteriosclerosis and hypertension, as well as its effect on brain activities.

At present, domestic functional food or health food market has market scale of about a trillion won. Among that, the refined fish oil production value is about 7 million won which takes about 6.5% of total health food market and it is in 6th position of all health foods. Therefore, it is very important to develop the technologies to produce useful and effective ingredients from pufferfish liver which will in outcome bring additional values to the market in the country where effective ingredients are not yet widely used.

Normally, edible oils are treated by extraction, degumming, deoxidation, decolorization, and deodorization. In the case of pufferfish liver oil, there are

no studies done for its commercial production. But the processes which removes toxins and extracting and treating oils from pufferfish liver is in ease to be in practical use.

The unit cost of raw materials of purified fish oils that are used for health foods are very high. For example, the EPA/DHA is 14,000won/kg, and squalene is 35,000won/kg. But pufferfish liver oil gets its raw materials from residual product of industrial processes and therefore the unit cost is low and it is greatly expected to be used for materials of health foods. The purified fish oil products are imported about 14,976kg(about 6.8 billion won) to 142,010kg(about 63.2 billion won) yearly and its consumption market is very big. Also fish oil related products are high value added products that costs around 680,000 won per average unit cost per unit weight(1kg). And health foods that are enriched certain functions to it are gaining more and more importance of its commercial values. Therefore, in the success of this project, there will be a great effects commercially .

In this project, gaining the freshness of raw pufferfish liver, extraction and purification of liver oil, and food hygiene safety of the liver oil were settled to establish the production technologies of pufferfish liver oils as a new health foods.

As dietary life changes, diseases of adults such as overweights and diseases concerned with heart's blood is increasing like in advanced countries. The ways to prevent the diseases concerned with heart's blood are to avoid taking excess calories, to limit lipid intake type and amount and others. But nowadays, it is taken serious view of taking proper natural foods for diseases concerned with heart's blood. In fish oils which is studied in this project, there are high content of highly unsaturated fatty acids including EPA and DHA, and especially in fish liver oils, there are also vitamin A, D and E are in great abundance which has activities such as control functions of living

body. Therefore it is worth to develop as a new health foods.

The physiological activities of highly unsaturated fatty acids are improvement of circulation of blood, preventing and curing of encephaloscclerosis, hardening of heart muscle, arteriosclerosis, and diseases concerned with heart's blood, effect of anticancer, preventing of lowering memorial learning, improvement of eye function and of allergies, preventing progress of diabetes with complication, and giving fairness to skin.

Different from the known functions of codfish and shark, pufferfishes are a kind of fishes which have unique physiological functions to protect its own life as a defense weapon from external hazards. Therefore there are high possibility to exist new functional substances in pufferfishes. Under these circumstances, it was examined thoroughly about the effects of preventing the diseases of adult people from pufferfish liver oils.

Because arteriosclerosis is a serious reason to cause heart diseases and apoplexy, in western countries, it is known that it brings more than 50% to death. Not different from other countries, our country also is known that about 15% of adult population has diseases of blood vessel. It is caused by fast changes followed by industrialization over 20 years and changes in cultures and eating habits. These statistical data are increasing rapidly. Diseases of brain blood vessel and diseases of heart's blood vessel became a large factor to cause deaths in adult population no less than cancers.

A smooth muscle cell which exists large in the middle layer of the main artery preserves quiescent state that does not cause any cell multiplication and keeping the condition of cell cycle of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. But when cell's inner wall is injured, smooth muscle cell moves to the inner layer of the main artery, then cell replication occurs through G<sub>1</sub> phase, to DNA reproduction(S phase), through G<sub>2</sub> phase and cell division(M phase) deriving cell multiplication. In most cells, passing through G<sub>1</sub> checkpoint, DNA reproduction, and through G<sub>2</sub>

checkpoint in order to mitosis, CDK(Cyclin-dependent kinase) protein activities are needed. CDK cannot have activities by itself, and it can only have kinase activities when Cyclin protein is combined. Then Cyclin-CDK complex induces cell division by phosphorylation which is related to cell multiplication.

In pufferfish liver parts, lipid content is high which could mean it could be used as important fish oil sources. But in the case of pufferfish liver oil, the studies are not yet well advanced. Generally in fish oils, there are high content of highly unsaturated fatty acids such as DHA and EPA and therefore various physiological activities are known. But the fundamental studies on the effect of preventing arteriosclerosis by fish oils that is, inhibitory ability of cell and cellular mechanisms like various cell cycle regulations are not very well researched in actual circumstances. In this project, suppression of cell multiplication and change of cell cycle are examined by pufferfish liver oil from constructed each smooth muscle cell's primary cell line in the main artery of young(4 months) mouse.

The followings are results from this research :

1) Establishment of manufacturing technology for pufferfish liver oil capsule

The optimum method to manufacture pufferfish liver oil is like following. About 1200ml crude oil is achieved by taking 3.0kg of pufferfish liver with 2.0 liter of 1% NaOH distilled water, placing it in 60°C water bath and finally compress with filter cloth. The crude oil indicated pH 4.5, AV 15.37. purifying process is done by adding H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> until operate H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> becomes 0.3% of crude oil and mixing it for 20 minutes and degumming. AV value was 21.94. Deoxidation is accomplished by weighing lipids and raise temperature to 40°C,



add 20% NaOH and mix for 20 minutes, add 5% saturated saline solution and mix in 40°C water bath, and separate the supernatant solution after centrifugation(5,000 rpm x 15). Decolorization is done by weighing lipid, raise temperature to 60°C, add 2% of Japanese acid clay and 0.5% of active charcoal, low pressure to 60°C for 20 minutes, and after filtering in vacuum, 800ml of decolorized oil can be obtained. This decolorized oil showed the values of pH 4.5 and AV 0.26. Deodorization process is done as shown in Fig. 6, the equipment was used to remove the peculiar odor of fish oil. Among optimum conditions for each purifying steps, obtain a possible one that could be applied as a pilot scale and choose the best manufacturing process.

## 2) Examination of toxicological safety for PLO products

The purpose of acute toxic testing is to define the chemical's own toxicity, and test on sensitive species, offer proper information about target organ as well as the information on hazards when acute exposure to chemical. Also it is used as preliminary information sources on delayed toxic testing, and it is called to be the test for first defense without any information on delayed toxic testing. These data give useful information to explain safety of working groups in manufacturing factories, government, experimental labs and many others. On the regulatory side point of view, the acute toxicity data is useful on certain chemical's toxicity specification, labeling, transportation and so on. On the scientific sidepoint of view, the acute toxicity testing which is circumspect, gives information on mechanisms of toxicity and certain chemical substance's structure-activation relationships. Therefore medical supplies, agricultural chemicals, cosmetics, detergents, food additives, and others which are manufactured in purpose of chemical products must take Safety Test by law in order to be mass produced and be in contact with humans. The acute

toxicity means the cases which can harm human life such as accidental disaster, use of excess dosage of toxin, and toxins used to attempt suicides. This sample is in liquid form and therefore it is possible to prescribe for experimental animals. The experiment was completed by selecting the highest possible dose for experimental animals which is 10ml per kg. After oral administration, the conditions of experimental animals were recorded everyday for 2 weeks. As the result, there were no changes in exercise activity, convulsions, and counter movement. Any abnormal changes in weight were not observed. After inspection of internal organs, there also was not an abnormal parts by examined with the naked eye.

### 3) Examination of anti-fatigue, antihepatotoxicity, and lowering hyperlipidemia by PLO

The anti-fatigue, antihepatotoxicity and lowering hyperlipidemia were investigated by treating with pufferfish liver oil. There are no toxicities in both raw liver and purified of the puffer liver oil(PLO). The swimming time was extended in the group pretreated with PLO compared to the non-treated group. When rats treated with PLO, the hepatic injuries induced by carbon tetrachloride or DL-galactosamine were reduced. The increased serum triglyceride and total cholesterol by poloxamer P-407 were lowered by treating with PLO remarkably. Also the bleeding time of hyperlipidemic animals was extended and plasma clotting time was delayed by PL oil.

### 4) Examination of inhibitory effects of vascular smooth muscle cells proliferation and inducing effects of G1 cell cycle arrest by PLO

The mechanisms of action of PLO derived from the pufferfish, on VSMC

proliferation was examined. The viability of VSMC was decreased to 40% at 24 h of treatment with PLO. Treatment of PLO showed potent inhibitory effects on the DNA synthesis of cultured VSMC. In addition, PLO induced apoptosis using cell death ELAS assay. These inhibitory effects were associated with G1 cell cycle arrest. Treatment of quercetin, which induced a cell-cycle block in G1-phase, induced down-regulation of cyclins and CDKs and up-regulation of the CDK inhibitor p21 expression, whereas up-regulation of p27 by quercetin was not observed. These findings indicate the efficacy of PLO in inhibiting cell proliferation, G1- to S-phase cell-cycle progress on VSMC.

# CONTENTS

Chapter 1. Establishment of manufacturing technology for pufferfish liver oil capsule-----	32
Section 1. Introduction-----	32
Section 2. Materials and methods-----	33
1. Materials-----	33
1) Materials-----	33
2) Proximate composition, pH and VBN of raw pufferfish liver-----	33
2. Manufacturing technology of pufferfish liver oil(PLO) capsule-----	33
1) Extraction of the liver oil by solvents-----	33
2) Fractionation of lipids-----	34
3) Analysis of fatty acids-----	34
4) Detoxification and extraction of the liver oil by heating with alkali-hot water -----	35
(1) Heating treatment with alkali-hot water and extraction of the liver oil-----	35
(2) Mouse assay-----	35
(3) HPLC-----	35
5) Manufacturing of sample products-----	36
3. Food sanitary safety of pufferfish liver oil-----	35
1) Materials and methods-----	36
(1) Animals-----	36
(2) Breeding room-----	36
(3) Feeds-----	37

(4) Feeding water-----	37
(5) Sample oil-----	37
(6) Feeding method-----	37
(7)Groups of testing animals-----	38
2) Experimental methods-----	38
(1) Observation of general appearance and death-----	38
(2) Changes of body weight-----	38
(3) Inspection of internal organs-----	38
(4) Statistical analysis-----	38
<b>Section 3. Results and discussion-----</b>	<b>39</b>
1. Establishment of the freshness of raw pufferfish liver-----	39
1) Lipid contents of pufferfish liver-----	39
2) Freshness of raw pufferfish liver-----	43
2. Manufacturing technology of PLO capsule-----	43
1) Lipid fractions and main fatty acids composition of puffer liver oil prepared by solvent extraction-----	43
2) Detoxification by treatment with alkali-hot water-----	44
3) Mouse assay-----	45
4) HPLC-----	45
5) Purification of crude liver oil-----	51
6) Optimazation of processing condition-----	59
7) Manufacturing sample products of PLO-----	59
3. Food sanitary safety of PLO-----	60
1) Acute toxicity test of PLO-----	60
(1) Approximate lethal dose-----	60
(2) Lethal rate-----	60
(3) Toxicological symptoms-----	60

(4) Changes of body weight-----	60
(5) Final estimation-----	60
<b>Chapter 2. Determination of bioactive functions for</b>	
<b>pufferfish liver oil capsule-----</b>	<b>66</b>
<b>Section 1. Introduction-----</b>	<b>66</b>
<b>Section 2. Materials and methods-----</b>	<b>69</b>
1. Quality improvement and storage stability-----	69
1) Capsule packaging form of products-----	69
2) Storage stability-----	69
2. Contents of bioactive components-----	69
1) Vitamins-----	69
2) Minerals-----	71
3) Docosahexaenoic acid(DHA) and eicosapentaenoic acid(EPA)-----	71
3. Bioactive functions of pufferfish liver oil(PLO)-----	71
1) Examination of anti-fatigue, antihepatotoxicity, and lowering	
hyperlipidemia by PLO-----	71
(1) Materials-----	71
(2) Sample oil-----	72
(3) Experimental animals-----	72
(4) Swimming test-----	72
(5) Inducing hepatitis-----	72
(6) Determination of bleeding time-----	72
(7) Determination of plasma clotting time-----	73
(8) Determination of enzymatic activity in serum-----	73
(9) Determination of total cholesterol contents-----	73

(10) Statistical analysis-----	73
2) Examination of inhibitory effects of vascular smooth muscle cells proliferation and inducing effects of G1 cell cycle arrest by PLO-----	73
(1) Primary cell line and incubation-----	73
(2) Reagents-----	74
(3) Sample oil-----	74
(4) XTT assay-----	74
(5) [ <sup>3</sup> H]thymidine incorporation-----	74
(6) Apoptosis assay-----	74
(7) Western blot-----	75
(8) Immunoprecipitation-----	75
(9) Immune complex kinase assay-----	75
4. Mass production of pufferfish liver oil capsule-----	75
1) Consumer's preferences and market researches-----	75
2) Mass production and finding of market-----	76
<b>Section 3. Results and discussion-----</b>	<b>76</b>
1. Quality improvement and storage stability-----	76
1) Capsule packaging form of products-----	76
2) Quality stability-----	77
2. Examination of bioactive components in POL-----	80
1) Vitamin A, D and E-----	80
2) Minerals-----	80
3) DHA and EPA-----	85
3. Examination of anti-fatigue, antihepatotoxicity, and lowering hyperlipidemia by PLO-----	85
1) Effects of PLO on anti-fatigue-----	85
2) Effects of PLO on hepatic sufficiency-----	85

3) Effects of PLO on hyperlipidemia induced by Poloxamer P-407 and circulation of blood-----	91
4. Examination of inhibitory effects of vascular smooth muscle cells proliferation and inducing effects of G1 cell cycle arrest by PLO-----	96
1) Effective factors on growth of smooth muscle cell-----	96
2) Induction of apoptosis of smooth muscle cell by PLO treatment-----	100
3) G1 cell cycle arrest on growth of by PLO treatments-----	100
4) Effects of p21 on G1 cell cycle arrest induced by PLO treatments-----	103
5. Manufacturing of products and estimation of economical values of PLO as commercial products-----	106
1) Consumer's preferences and market researches-----	106
2) Manufacturing of products and finding of market-----	106
<b>References</b> -----	<b>112</b>



# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	28
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	30
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	32
제 1 절 복어 간유구 제조 기술의 확립-----	32
1. 서론-----	32
2. 재료 및 방법-----	33
가. 원료 복어의 신선도 확립-----	33
(1) 시험재료-----	33
(2) 복어 간장의 일반성분, pH 및 VBN 함량-----	33
나. 복어 간유구 제조 기술-----	33
(1) 용매추출법에 의한 간유의 추출 및 정제-----	33
(2) 지질 획분의 분리-----	34
(3) 지방산 분석-----	34
(4) 알칼리 열수추출법에 의한 제독처리 및 간유의 추출과 정제-----	35
(가) 제독처리 및 간유의 추출과 정제-----	35
(나) Mouse assay-----	35
(다) HPLC method-----	35
(5) 시제품의 제조-----	36
다. 복어 간유의 안전성-----	36
(1) 재료 및 방법-----	36
(2) 시험방법-----	38
3. 결과 및 고찰-----	39
가. 원료 복어 간장의 신선도 확립-----	39
(1) 복어 간장의 지질 함량-----	39
(2) 복어 간장의 신선도 시험-----	43

나. 복어 간유구 제조 기술 확립-----	43
(1) 용매추출법에 의한 간유의 총지질 조성 및 주요 지방산-----	43
(2) 알칼리 열수추출법에 의한 복어독 제독처리-----	44
(3) Mouse assay-----	44
(4) HPLC-----	45
(5) 복어 간유의 정제 기술 개발-----	51
(6) 제조공정의 최적화-----	59
(7) 시제품의 제조-----	59
다. 복어 간유의 안전성-----	60
제 2 절 복어 간유구의 생리활성 시험-----	66
1. 서론-----	66
2. 재료 및 방법-----	69
가. 품질개선 시험-----	69
(1) 포장형태 및 유통기간-----	69
(2) 제품의 안정성-----	69
나. 생리활성 성분 함량-----	69
(1) 비타민의 정량-----	69
(가) 비타민 A-----	69
(나) 비타민 D-----	70
(다) 비타민 E-----	71
(2) 미네랄-----	71
(3) DHA, EPA 함량-----	71
다. 생리활성 시험-----	71
(1) 간 기능 개선 및 고지혈증 치료 효능-----	71
(가) 재료-----	71
(나) 시료 간유-----	72
(다) 실험동물-----	72
(라) 수영시험-----	72

(마) 간 독성 및 고지혈증 유발	72
(바) Bleeding time 의 측정	72
(사) Plasma clotting time의 측정	73
(아) 혈청중 효소활성의 측정	73
(자) 혈중 지질함량에 미치는 영향	73
(차) 통계처리	73
(2) 평활근세포의 증식에 미치는 영향	73
(가) 세포주 및 배양	73
(나) 시약	74
(다) 복어 간유	74
(라) XXT assay	74
(마) [ <sup>3</sup> H]thymidine incorporation	74
(바) Apoptosis assay	74
(사) Western blot	75
(아) Immunoprecipitation	75
(자) Immune complex kinase assay	75
라. 복어 간유구의 대량생산	75
(1) 소비자 기호도 및 시장조사	75
(2) 제품생산 및 판로개척	76
3. 결과 및 고찰	76
가. 품질개선 및 안정성	76
(1) 제품의 포장형태 및 유통기간	76
(2) 품질의 안정성	77
나. 생리활성성분 함량	80
(1) 비타민류	80
(2) 미네랄	80
(3) DHA 및 EPA 함량	85

다. 생리활성 시험-----	85
(1) 간 기능 개선 및 고지혈증 치료 효능-----	85
(가) 피로회복에 미치는 영향-----	85
(나) 간 기능에 미치는 영향-----	85
(다) Poloxamer P-407 유도 고지혈증 및 혈류개선에 미치는 영향----	91
(2) 평활근 세포의 증식에 대한 복어 간유(PLO)의 효과-----	96
(가) 평활근 세포의 증식 영향-----	96
(나) PLO 처리에 따른 평활근 세포의 apoptosis 유도-----	100
(다) 평활근 세포의 증식에 있어서 PLO 처리에 의한 G I cell cycle arrest-----	100
(라) PLO 에 의하여 유도된 G I cell cycle arrest 에 있어서 p21의 영향-----	103
라. 복어 간유구의 대량생산-----	106
(1) 소비자 기호도 및 시장조사-----	106
(2) 제품생산 및 판로개척 -----	106
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	109
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	110
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	111
제 7 장 참고문헌-----	112

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

복어류는 특유의 독성을 지니고 있음에도 불구하고, 단일 어종으로서는 보기 드물게 전국적으로 그 수요가 급신장하고 있다. 근래 우리의 식생활 패턴이 변화함에 따라 외식 기회가 늘고 또 건강식품에 대한 선호도가 높아지고 있어 복어류는 건강기호 수산식품의 하나로 인기를 차지하고 있을 뿐만 아니라, 어민을 비롯하여 수산관련 산업에 종사하는 이들의 소득 증대에도 큰 비중을 차지하고 있다.

복어의 간장 부위에는 지질의 함량이 매우 많기 때문에 주요한 어유 자원으로 이용 가능성이 높지만, 이 부분에 대한 연구도 진행되고 있지 않다. 대구 간유 및 상어 간유는 오래 전부터 기능성 식품 소재로 이용되고 있는데 복어의 간유도 상업적으로 개발된다면 상품성이 매우 클 것으로 기대된다.

한편, 기능성식품의 국내 시장은 96년 기준으로 이미 1조1천2백억 규모로 크게 성장하였으며, 200여개 제조업소에서 2,250가지 품목을 생산하고 있고 알로에 식품만 해도 283 품목, 정제 어유(EPA, DHA) 함유식품도 257개 품목에 이르는 등 다양한 기능성 식품이 생산되고 있다.

97년 상반기 이후부터는 경기 불황 여파로 국내생산 제품이 급격히 위축되고 수입 제품도 감소세로 돌아서고 있는 있으나, 정제 어유 관련 제품은 460억원 규모로 전체 기능성 식품 시장의 9%를 점유하고 있다.

또한 단위 중량기준(1 kg)당 평균 단가도 정제 어유 관련 제품은 68만원대라고 부가가치 제품이며 기능성 소재를 강화한 건강보조식품의 산업적 가치도 더욱 더 중요해지고 있다.

고도불포화지방산 가운데에서도 최근에 주목받고 있는 DHA의 경우 생리기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 수산물의 소비확대를 기대하고 있는 수산업자와 수산청의 지원하에 1990년에는 세계 처음으로 DHA심포지엄이 일본에서 개최되기도 하였으며, DHA의 고순도제품을 안정적으로 얻기 위한 기술개발은 일본 수산청의 주요한 지원사업으로 되어 있다.

참고로 기능성 식품용 표준 형태인 DHA 25%, EPA 5%의 상품이 키로그램 당 가격이 1만 5천엔 정도이다. 현재 일본에서는 EPA의 건강식품 시장이 17억엔 이고 DHA의 시장은 이보다 훨씬 상회하고 있다. 이러한 지방산의 생리기능은 뇌경색과 심근경색의 예방 및 방지, 식품에 기인한 동맥경화의 예방과 방지 등 심혈관계질환의 예방효과, 항종양 효과, 기억학습능력 저하 예방효과 등이 알려 지고 있으며, 동물실험에서도 그 효과가 인정되고 있다. 그 이외에도 눈의 기능 향상, 알레르기 체질의 개선, 당뇨병 합병증의 진행방지, 피부를 윤택하게 하는 등 여러 가지 생리효과도 기대되고 있다.

이와 같이 어유는 심장질환을 비롯한 각종 성인병에 효과가 있으며, 특히 어 간유에는 생체조절기능을 가진 다양한 미네랄 뿐만이 아니라, 비타민 A, D, 및 E도 풍부하여 건강보조식품으로서 특히 주목받고 있다. 예를 들면 대구 간유구는 시력장애, 야맹증, 백내장, 녹내장에 효과가 있으며, 상어 간유구(스쿠알렌)는 골다공 증, 고혈압, 심장병, 면역성 증가, 노화방지에 효능이 인정되고 있는데, 복어 간유구의 경우에는 이러한 효과와 더불어 인후암, 식도암, 대장암 등에도 효과가 있다고 한다.

본 과제에서는 현재까지 이용되지 못하고 있는 복어 간장으로부터 부가가치가 높은 건강보조식품용 복어 간유구를 제조, 산업화하는 기술을 개발하고 그 생리활성에 대하여 연구 검토하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에서 어유 식용화를 위한 연구로는 이 등<sup>1)</sup>이 말쥐치 내장유의 계절에 따른 지질함량 변화, 정<sup>2)</sup>이 가다랑어 통조림 가공 부산물로부터 추출한 지질에서 DHA의 분리 및 정제방법을 보고한 바 있다. 이외에 가다랑어 통조림 제조시 자숙공정에서의 부산물을 농축한 자숙즙은 조미소재로서 이용되고 있으며, 가다랑어 내장, 두부 등의 부산물을 활용한 액젓이 있다. 국내에서 현재 오징어 간유가 생산되고 있으며 그 생산량은 1991년의 경우 830톤, 1992년에는 1,200톤에 달하였으며, 조지방 상태로 생산되어 사료용으로 시판되거나 수출되고 있으나, 고부가가치 제품은 거의 없다.

특히, 복어 간유에 관한 연구는 저자의 연구를 제외하고는 찾아보기 힘든 실정이다. 수산가공부산물에 관한 연구는 활발하며, 최근에는 부산물로부터 폐기물을 단순히 재활용한다는 차원이 아니라 고부가가치 물질을 생산, 이용하려는 경향이 보편적이다. 그러나, 복어 가공부산물의 이용한 산업화는 되어 있지 않은 실정이다.

국의 기술의 경우, 복어에 주로 분포되어 있는 복어독, 즉 tetrodotoxin은 해양생물 독이지만, 최근에 와서는 복어이외에도 불가사리, 게, 권패류, 편형동물 및 해양미생물에서도 널리 존재하는 것으로 알려지고 있다. 국내에서는 저자이외에는 복어독에 대한 연구보고가 거의 미미하며, 주로 일본에서 많이 연구되고 실정이다.<sup>3~5)</sup>

한편 DHA 및 EPA에 관한 연구는 국내의 연구도 정어리 및 고등어를 원료어로 연구 보고한 이 등<sup>6)</sup>의 연구를 비롯하여 몇 종류 있지만은 거의 단편적인 내용에 그치고 있고, 미국, 유럽 및 일본 등에서는 그 연구가 매우 활발하다.

저자 등은 식물유 특히 들깨기름<sup>7)</sup> 및 고추씨 기름<sup>8)</sup>의 트리글리세라이드 조성에 대하여 보고한 바 있으며, 복어의 간유 중의 DHA 및 EPA의 함량에 대하여 보고한 바 있다.

특히 식품 및 제약산업 분야에서 천연 트리글리세라이드 형태의  $\omega$ -3계 지방산의 상품화가 요구되어 왔다. Ackman 과 Rathnayake<sup>9)</sup>은 분자중류법과 용매

결정화법에 의하여 어유로부터 직접 30%까지의 EPA 와 DHA를 함유하는 트리글리세라이드를 조제하는 것에 대하여 보고하였고, EPA와 DHA의 함량 합계가 30%이상이 되도록 어유농축물을 얻는 것은 어려운데 그 이유는 트리글리세라이드내의 지방산의 조합이 매우 다양하기 때문이라고 한다.

그러나 개별적 지방산 또는 에스테르 분획은 초임계액체 추출법, 크로마토그래피법, 분자증류법 등 여러가지 방법에 의하여 EPA+DHA 수준을 65-80%까지 가능하게 하였으며, HPLC법<sup>10)</sup> 과 Corey의 화학적 수식법<sup>11)</sup>에 의하여 EPA 와 DHA 수준을 90%이상으로 할 수 있었다.

Stout<sup>12)</sup>는 유리지방산 또는 monoesters와 글리세롤과의 화학적 또는 효소적 반응은 일반적으로 mono diglyceride가 혼재되어 있는 트리글리세라이드를 생성한다고 하였다. 그러나 Sonntag<sup>13)</sup>은 트리글리세라이드의 지방산 성분 또는 유리지방산 성분의 혼합트리글리세라이드(acidolysis) 또는 다른 트리글리세라이드 또는 monoesters의 지방산을 교환하는데 그 원리를 둔 interesterification 반응은 훨씬 더 간단한 식물유에 있어서 성공적으로 이용되고 있다고 하였다.

고도불포화지방산과 같은 강력한 생물적 기능을 가진 매우 불안정한 화합물은 효소적 합성이 유리하다. 장쇄  $\omega$ -3 PUFAs 는 매우 불안정하며 극한 pH와 높은 온도를 필요로 하는 공정에서는 산화 또는 cis-trans isomerization에 의하여 천연의 모든 cis  $\omega$ -3 PUFAs를 부분적으로 파괴할 수도 있다. 이 이유 때문에 어유는 매우 열에 민감하며 불안정하며 대부분의 다른 형태의 지질보다 훨씬 산화되기 쉽다고 알려져 있다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 복어 간유구 제조 기술의 확립

#### 1. 서 론

복어 간장에는 높은 함량의 유지가 함유되어 있으며, 특히 유지 중에는 n-3계 지방산인 EPA 및 DHA의 함량이 많으나 이의 회수 및 이용에 관한 연구는 미흡한 실정이다. EPA 및 DHA는 최근 동맥경화나 고혈압 등의 성인병과 순환기 질환의 예방과 치료, 두뇌활동에 대한 효과 등으로 영양생리학적으로 중요성이 강조되고 있는 물질로 이에 관한 이용도 활발히 진행되고 있다.

현재 국내 건강보조식품 시장은 약 1조원의 시장규모를 가지고 있으며 그 중 정제어유의 생산금액은 약 7백억원으로 약 6.5% 이상을 점하고 있으며 전체 건강식품군중 6위를 차지하였다. 따라서, 이들 유효성분의 이용기술 개발이 미흡한 국내 실정에 비추어 볼 때, 복어 간장으로부터 부가가치 높은 유효성분의 이용기술 개발은 대단히 중요하다.

일반적으로 식용유지는 추출, 탈검, 탈산, 탈색, 탈취공정을 통하여 정제되고 있으나, 복어간유의 경우는 그 산업적 활용에 대한 연구는 없는 실정이다. 복어 간장으로부터 독소를 제거하는 공정과 유지를 추출하여 정제하는 기술은 실용화 되기가 용이하다.

건강식품용 정제어유는 원료단가가 EPA/DHA는 14,000원/kg, 스쿠알렌은 35,000원/kg으로 매우 높지만, 복어간유는 가공부산물로부터 얻은 원료를 사용하기 때문에 단가가 매우 저렴하며, 건강기능성 소재로서의 활용이 크게 기대된다. 정제어유 제품은 최근 연간 14,976kg(약 68억원) 내지 142,010kg(약 632억원) 정도 수입되고 있어 그 소비시장이 매우 크다. 또한 단위 중량기준(1 kg)당 평균 단가도 정제 어유 관련 제품은 68만원대로 고부가가치 제품이며 기능성 소재를 강화한 건강보조식품의 산업적 가치도 더욱더 중요해지고 있다.

따라서 본 연구에서는 새로운 건강보조식품으로서 이용 가능한 복어 간유구 제조 기술을 확립하기 위하여 원료 복어간의 신선도 확보, 복어 간유의 추출 및

정제 방법의 확립, 복어 간유의 식품위생학적인 안전성 시험 등에 관하여 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 원료 복어 간장의 신선도 확립

#### (1) 시험재료

복어 전문 가공 공장(동남식품주식회사, 부산시 기장군 소재)에서 복어 처리 공정 중에 복어간장을 별도로 분리한 후, 즉시 급속냉동처리하여 두고 시료로 사용하였다.

#### (2) 복어 간장의 일반성분, pH 및 VBN 함량<sup>14)</sup>

수분함량은 상압가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl 정량법, 조지방은 Soxhlet 추출법 그리고 회분은 직접화법을 이용하여 측정하였다. pH 측정은 시료 5.0 g을 잘게 썰어 혼합한 후 25 ml의 증류수를 넣고 균질한 후 여과하여 시험용액으로 하며, pH meter(DP-135M)를 사용하여 측정하였다. 또한 VBN함량은 Conway unit를 이용한 미량확산법에 의하여 측정하였다.

### 나. 복어 간유구 제조 기술

#### (1) 용매추출법에 의한 지질의 추출 및 정제

검은 밀복 간으로부터 총지질을 Bligh and Dyer법<sup>15)</sup>에 따라 추출하였다. 즉, 시료 50g을 취하여 10ml의 증류수를 첨가한 후 100ml의 메탄올과 50ml의 클로로포름의 혼합용액을 넣어 homogenizer에서 2분간 마쇄하였다. 이 혼합액에 50ml의 클로로포름을 첨가하고 30초간 더 균질화하였다. 이 균질액을 동양여지(No.5)를 사용하여 buchner funnel로 약하게 흡인여과 시킨 후 활성탄(Wako pure chemical)을 사용하여 색소를 제거한 후 그 여액을 분액여두로 옮겨 에테르를 붓고 세게 흔들어 순수 지방질만을 추출한 후 이것을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 통해 수분을 제거시킨 뒤 조지질을 얻었다. 지방질의 추출에 사용된 모든 용매는 질소기

류하에서 vacuum evaporator로 제거하며 지질의 양은 중량법에 의하여 계산하였다.

한편, 정제한 지질은 소량의 에테르에 녹여 질소가스로 충전한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 냉동실에 보관하면서 지질의 분획 및 지방산 분석시료로 사용하였다.

### (2) 지질 획분의 분리

추출 정제된 총지질을 Rouser 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 silicic acid column chromatography(SSC)에 의하여 중성지질, 당지질 및 인지질 획분을 분리하였다. 즉, silicic acid (70~230mesh, Merck社)를 증류수로 씻어서 미립자를 제거하고 메탄올로 다시 씻은 후  $110^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤동안 활성화시켰다. 활성화된 silicic acid 약 15g을 클로로포름으로 slurry를 만든 후 glass wool이 1~2cm 채워진 column (i.d.  $2.5 \times 30\text{cm}$ )에 충전하고 총지질 200mg을 주입한 후 질소 gas를 통과시켜 용매의 유출속도를 1분당 약 3ml되게 조절하면서 관 부피의 10배량의 클로로포름으로 중성지질 획분을 얻은 다음 관 부피의 20배가량의 아세톤과 다시 10배량의 메탄올로 각각 용출시켜 극성지질인 당지질 및 인지질 획분으로 분획하며 용매를 제거한 후 중량법에 의하여 이들의 함량을 계산하였다.

각 용출물 중에 다른 지방질 성분이 혼입되어 용리되었는가를 TLC(thin layer chromatography)에 의해 확인하였다. 또한 정제된 총지질은 TLC plate(silica gel 60F<sub>254</sub> pre-coated glass sheet, layer thickness 0.2mm :  $20 \times 20\text{cm}$ , Merck社)를 사용하여 상승 1차원 법에 의해 전개시키며, 전개용매는 n-hexane - ethylether - formic acid (80:20:2, v/v/v)의 혼합물을 사용하며, 50% sulfuric acid를 발색제로 분무, 탄화시켜 지질 표준품의 Rf값과 일치하는 분리 반점을 확인하였다.

### (3) 지방산 분석

지방산 분석은 14%  $\text{BF}_3$ /methanol용액을 사용하여 methylation시켜 이를 GC(HP 5890 plus II)로 분석하였다. GC분석은 column은 FFAP( $25\text{ m} \times 0.32\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ ), carrier gas는  $\text{N}_2$ (1 ml/min), detector는 FID, detector 온도는

230℃, injector 온도는 220℃, oven의 초기온도는 200℃ 최종온도는 230℃(10℃/min)의 조건에서 시행하였다.

#### (4) 알칼리 열수추출법에 의한 제독처리 및 간유의 추출과 정제

##### (가) 제독처리 및 간유의 추출과 정제

일반적으로 산업체에서는 어유의 대량추출법으로 용매추출법보다 열수추출법을 사용하는 경우가 많다. 따라서 어유를 대량으로 얻기 위하여 열수추출법으로 검은 밀복 간유를 추출하였다. 즉, 검은 밀복 간 3 kg에 수돗물 2 liter를 가하여 1% 농도가 되게 NaOH를 첨가하여 100℃에서 2시간 중탕 가열처리하여 제독처리와 병행하여 복어 간유를 추출한 후, 여포로 압착 여과하여 조간유(crude oil)를 얻었다. 복어 조간유는 냉동실(-25℃)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다. 복어 조간유의 정제는 일반적인 어유 정제 방법인 탈검, 탈산, 탈색 및 탈취과정에 의하여 실시하였다.

##### (나) Mouse assay

독성시험은 식품공전 중의 복어독 검사법<sup>14)</sup>에 의거하여 시행하였다. 즉, 시료 10g에 0.1% 초산완충 용액을 25ml 가하고 열탕 중에서 가열하여 충분히 독소를 추출한 후 동양여지(No.5)로 여과하고 잔사는 0.1% 초산용액으로 다시 세정하여 여액을 합쳐 50ml로 정량하여 공시액으로 하였다. 공시액은 증류수로 알맞게 희석하여 ICR계 쥐(수컷, 19-21g)의 복강에 1ml 주사한 후, 독성치를 TTX(tetrodotoxin)의 치사시간으로부터 계산하여 MU(mouse unit) 단위로 나타내었다. 1MU는 주사한 후 30분 이내에 치사시킬 수 있는 양에 해당하는 TTX를 의미한다.

##### (다) HPLC method

HPLC분석은 YMC-Pack AM-314 ODS column(6mm ID × 300 mm)상에서 2mM sodium 1-heptane sulfonate / 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 용액과 methanol 혼합액(99:1)을 1 ml/min의 속도로 흘려 용출시키고, 3N NaOH로 100℃에서 C<sub>9</sub>-base (2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxy quinazoline)로 변환한 후 형광검출기로 분석하며, 여기파장 380nm, 형광파장

505nm에서 검출하였다.

#### (5) 시제품의 제조

제독처리하여 추출 정제된 복어 간유를 질소 가스로 충전하여 -25 ℃에 저장하여 두고 (주)서흥캡셀과 협의하여 처방전을 만든 후, 복어 간유구 시제품을 제조 의뢰하였다. 이 때 영양강화제, 물성개량제, 캡슐 형태 및 설택, 캡슐당 내용물 중량 등을 결정하였다.

#### 다. 복어 간유의 안전성

제독처리하여 정제한 복어 간유에 대한 안전성을 검증하기 위하여 아래와 같은 방법으로 급성독성시험(acute toxicity test)<sup>17)</sup>을 실시하였다. 복어독은 급성독성이기 때문에 독성시험 가운데 아급성 독성 및 만성독성 시험은 제외하였다.

#### (1) 재료 및 방법

##### (가) 실험동물

- ① 종(계통) ; SPF SD계 랫드(SD rat)
- ② 성별 및 입수시 주령 ; 암·수컷 5주령
- ③ 선택이유 ; 본 시험에 사용된 SD계 랫드는 전 세계적으로 독성시험에 널리 사용되어 왔기 때문에 생리, 해부 및 독성학적 기초자료가 풍부하여 그 결과를 비교하기가 유리하고 또한 실험동물의 구입 및 사용이 편리하여 선택하였다.
- ④ 공급원 ; 샘타코
- ⑤ 검역 및 순화기간 ; 실험실에 순화시키는 기간을 약 1주일 두었으며, 그 기간 중 일반 증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.
- ⑥ 투여시 체중범위 및 주령 ; 수컷 167.1±7.5g, 암컷 144±3.6g의 6주령
- ⑦ 사용동물수 ; 20마리
- ⑧ 군 분리 및 동물식별 ; 실험에 사용된 건강한 동물의 체중을 측정하여 각 군의 평균체중이 거의 일치하도록 군 분리를 하였고, 개체식별은 피

모색소(피크린산) 마킹법과 사육상자별 TAG 표시법을 이용하였다.

(나) 동물실

- ① 온, 습도 범위 ; 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $53\pm 2\%$
- ② 명암 Cycle ; 형광등조명(09:00 점등 ~ 18:00 소등)
- ③ 조 도 ; 150 ~ 300Lux
- ④ 사육상자의 종류 ; 순화, 검역, 투여 및 관찰기관 중 랫드용 polycarbonate 케이지(대중기계제작)
- ⑤ 사육상자당 동물수 ; 순화, 검역기간 - 5마리  
투여기간 - 5마리

(다) 사료

- ① 종 류 ; 실험동물용 고품사료
- ② 공급원 ; (주)퓨리나코리아

(라) 음수

- ① 종 류 ; 여과된 상수도수

(마) 시험물질

- ① 시 료 명 ; “수산가공품(검은 밀복 간유)”
- ② 음성대조 ; Corn oil
- ③ 시험물질제조 ; 시험물질은 공급된 원액을 그대로 사용하였다.

(바) 투여방법

- ① 투여경로 ; 경구
- ② 투여횟수 및 투여기간 ; 1회 투여
- ③ 투여부위 및 투여법 ; 시험물질은 랫드용 위관(Sonde)을 사용하여 실험 동물의 위내에 강제 투여하였다.

④ 투여량 및 투여농도 ; 식품의약품안전청의 “의약품등의 독성시험 기준 해설시(1999.12.)”에 준하여 설정하였다. 본 시험물질은 액상으로 투여 최대용량을 10ml/kg으로 설정하였으며 대조군에는 동량의 corn oil만을 투여하였다.

(사) 시험군의 구성

시험군의 구성, 투여량 및 투여액량은 다음과 같다.

Group	투여물질	성 별	동물수	동물번호	투여액량 (ml/kg B.W)
시험군	수산가공품 (검은 밀복 간유)	M	5	1101-1105	10
		F	5	2101-2105	10
대조군	Corn oil	M	5	1201-1205	10
		F	5	2201-2205	10

M : Male, F : Female

(2) 시험방법

(가) 일반상태 및 폐사의 관찰

투여 당일은 12시간까지 매시간 일반상태를 관찰하고, 투여 다음날부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다.

(나) 체중변화

모든 동물에 대하여 직전과, 투여 7일 후 및 부검 직전인 14일에 3회 체중을 측정하였다.

(다) 부검

시험 종료시 생존동물은 에테르 마취로 방혈 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

(라) 자료의 통계학적 해석방법

체중에 대한 유의성 검정법으로 one-way analysis of variance (ANOVA) 검정을 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 원료 복어 간장의 신선도 확립

##### (1) 복어 간장의 지질 함량

동남식품개발(주)로부터 제공받은 시료어인 냉동 밀복 10개체에 대한 어체 전체 중량에 대한 간장 부위의 중량과 지질의 함량을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 간장 중의 지질은 29.7~37.3%로서 그 함량이 상당히 높아 간장 부위는 지질이 풍부함을 알 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 복어의 간장은 유용한 어유 자원으로 이용될 수 있는 잠재적 가치가 높은 것으로 생각되었다. 한편, 시료로 사용된 밀복의 경우 전장 26.3~31.2cm, 체중이 407~464g의 수컷 10개체로서 비교적 성장이 양호한 어종이었다.

시료로 사용한 복어 간장은 선도가 양호한 동결된 상태의 시료를 20 kg/box 단위로 포장하고 실험실로 운반하여 -45 ℃로 유지되는 냉동고에 저장하여 두면서 실험에 사용하였다. 복어 간장의 일반성분 및 신선도를 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 즉, 수분, 조단백질 및 조지질의 함량이 각각 44.7%, 21.5% 및 31.9%이었으며, VBN의 함량 및 pH은 각각 19.2% 및 6.2로서 선도가 양호한 시료임을 알 수 있었다. 시료로 사용한 복어 간장의 동결상태는 Fig.1 과 같다.



Table 1. The lipid contents in the liver of the puffer, *Lagocephalus wheeleri*(Korean, black milbog)

Specimen No.	Total length (cm)	Body weight (g)	Sex	Liver weight (g)	Lipid (%)
1	27.6	453	M	33.6	35.6
2	28.8	432	M	31.4	32.4
3	28.1	418	M	27.7	31.5
4	30.4	464	M	34.2	37.3
5	26.3	407	M	27.1	29.7
6	28.5	415	M	28.7	30.1
7	27.9	431	M	30.9	32.6
8	31.2	432	M	31.5	32.9
9	29.0	429	M	30.8	31.2
10	29.3	434	M	32.3	32.4

Table 2. Approximate composition of raw puffer liver

	Moisture (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)	VBN (mg/100g)	pH
Raw liver	44.7	21.5	31.9	1.8	19.2	6.2



Fig. 1. Photograph of the frozen puffer liver.

## (2) 복어 간장의 신선도 시험

복어 간장을 시료로 사용하기 위하여 충분한 양을 항상 확보하기 위하여  $-45^{\circ}\text{C}$ 로 유지되는 냉동고에 저장해 둘 필요가 있다. 복어 간장의 시료 확보는 동남 식품개발(주)에서 1일 처리되는 복어의 양으로부터 충분히 확보 가능하지만 작업의 효율성을 높이기 위하여 6주 정도의 원료는 항상 미리 보관해 둘 필요가 있다는 전제 아래 저장 기간 중의 신선도를 검토한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 즉, 복어 간장을  $-45^{\circ}\text{C}$ 에서 6주간 저장하면서 pH의 변화를 조사한 것인데, 저장 초기의 복어 간장의 pH는 6.2이었으며, 저장 2주째까지 6.2를 유지하였고, 저장 6주째에 pH 6.3으로서 6주 정도의 저장 중에는 시료의 품질상태가 양호하게 유지될 수 있음을 알 수 있었다.

또한, 저장 중의 복어 간장의 VBN의 함량 변화를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었는데, 저장초기에는  $18.5 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 이었으며  $-45^{\circ}\text{C}$  저장중 1주째에는  $21.5 \text{ mg}/100\text{g}$  이었고, 6주까지는 VBN의 함량이  $25.8 \text{ mg}/100\text{g}$ 이하로서 신선도가 비교적 잘 유지되었다.

VBN 함량은 일반적으로 극히 신선한 어육에서는  $5\sim 10 \text{ mg}/100\text{g}$ , 보통 선도의 어육에서는  $15\sim 25 \text{ mg}/100\text{g}$ , 초기 부패의 어육에서는  $30\sim 40 \text{ mg}/100\text{g}$ , 부패한 어육에서는  $50 \text{ mg}/100\text{g}$ 이상으로 알려져 있다. VBN 함량은 일반적으로 극히 신선한 어육에서는  $5\sim 10 \text{ mg}/100\text{g}$ , 보통 선도의 어육에서는  $15\sim 25 \text{ mg}/100\text{g}$ , 초기 부패의 어육에서는  $30\sim 40 \text{ mg}/100\text{g}$ , 부패한 어육에서는  $50 \text{ mg}/100\text{g}$ 이상으로 알려져 있다. 따라서 신선도가 양호한 시료를 확보하기 위하여는 동결복어를 반해동하여 어체 분리 처리 작업을 한 직후, 간장을 별도로 수거하고 포장하여 가급적 신속하게 동결고에 저장할 필요가 있음을 알 수 있었다.

## 나. 복어 간유구 제조 기술 확립

### (1) 용매추출법에 의한 간유의 총지질 조성 및 주요 지방산

용매추출법에 의하여 얻은 복어 간유의 총지질은 중성지질, 인지질 및 당지질이 각각 95.46%, 1.45% 및 3.09%로 중성지질이 대부분을 차지하였다. 지방산 조

성은 총지질의 경우 C18:1 23.62%, C16:0 17.38%, C22:6 15.99%로서 이들 3종류의 지방산이 50%이상을 차지하였으며 DHA(C22:6) 및 EPA(C20:5)는 각각 15.99% 및 3.04%로서 총 19.03%를 차지하였다(Table 3). 중성지방산의 경우 C18:1 13.96%, C16:0 20.11%, C22:6 16.62%로서 이들 3종류의 지방산이 역시 50%이상을 차지하였으며 DHA(C22:6) 및 EPA (C20:5)는 각각 16.62% 및 2.41%로서 총 19.03%를 차지하였다. 인지질 및 당지질의 경우에는 그 양이 상대적으로 적어 분석에서 제외하였다.

### (2) 알칼리 열수추출법에 의한 복어독 제독처리

복어 간장으로부터 간유를 추출하는 방법은 열수추출법으로 하는 것이 핵산 등을 사용하는 용매 추출법보다 폐수의 처리문제로 볼 때 산업체에서 채택하는데 유리하다고 생각되어 이 방법을 채택하였으며, 복어 조간유 추출과 동시에 1% NaOH를 병행처리하여 제독처리하였다. 조간유를 정제한 후 정제 간유에 대한 독성 시험 결과는 mouse assay와 HPLC로 분석하였다.

### (3) Mouse assay

복어 간유중의 독성을 조사하기 위하여 mouse assay로 분석한 결과를 Table. 4에 나타내었다. 즉 mouse를 5마리씩 5 그룹으로 분류하여 정제 복어 간유를 하루에 2.0 ml 까지 복강주사하여 그 급성독성 및 1주일 동안의 증상을 관찰하였다. 1일째에는 급성 독성은 나타나지 않아 모두 무독하였다. 그런데, 2.0 ml를 주사한 그룹에서 체모에 5일째까지 기름이 심하게 나타나다가 5일째에는 5마리 모두 사망하였다. 1.0 ml 주사한 그룹도 주사 6일째 5마리 중 2마리가 사망하였으며 그 증상은 비슷하였다. 또한 2일째부터는 mouse의 체중의 변화는 그룹에 따라 차이가 나타났는데, 1회 주사량이 클수록 체중의 증가는 감소하였다. 이러한 이유는 과도한 지질의 주입은 mouse의 대사과정 또는 생체계에 바람직하지 않는 영향을 미쳐 일일 식이 섭취량을 감소시킨 결과라 생각되었다. 그러나 복어독에 의하여 나타나는 전형적인 급성 독성증상은 없었다.

#### (4) HPLC

한편, 간유 중의 독성을 조사하기 위하여 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 즉, 원료 복어 간으로부터 복어독을 정제하여 HPLC로 분석한 결과는 전형적인 tetrodotoxin(TTX)과 anhydro tetrodotoxin(anh TTX)의 peak를 볼 수 있었으나, 복어 간유의 경우에는 복어독의 존재를 확인할 수 없었으며, HPLC chromatogram pattern을 나타내지 않았다. 검은 밀복 간은 mouse assay 결과 무독이었으나, HPLC 분석 결과 독성 peak가 나타났는데, 이것은 mouse assay 결과 검은 밀복 간이 무독하다는 것은 10 MU/g 이하라는 것을 의미하며, 비록 10 MU/g이하의 안전량이지만 미량의 복어독이 검은 밀복 간에 존재한다는 것을 의미한다. 그러나 정제한 복어 간유의 경우에는 HPLC 분석 결과 전혀 복어독 peak는 나타나지 않았다. 이것은 복어 조간유의 추출과정 중 알칼리 열수추출법에 의한 제독처리에 의하여 복어독이 완전히 제거되었다고 생각되며, 또한 복어 간유의 정제과정을 통하여서도 복어독이 충분히 제거된 결과라고 생각된다.

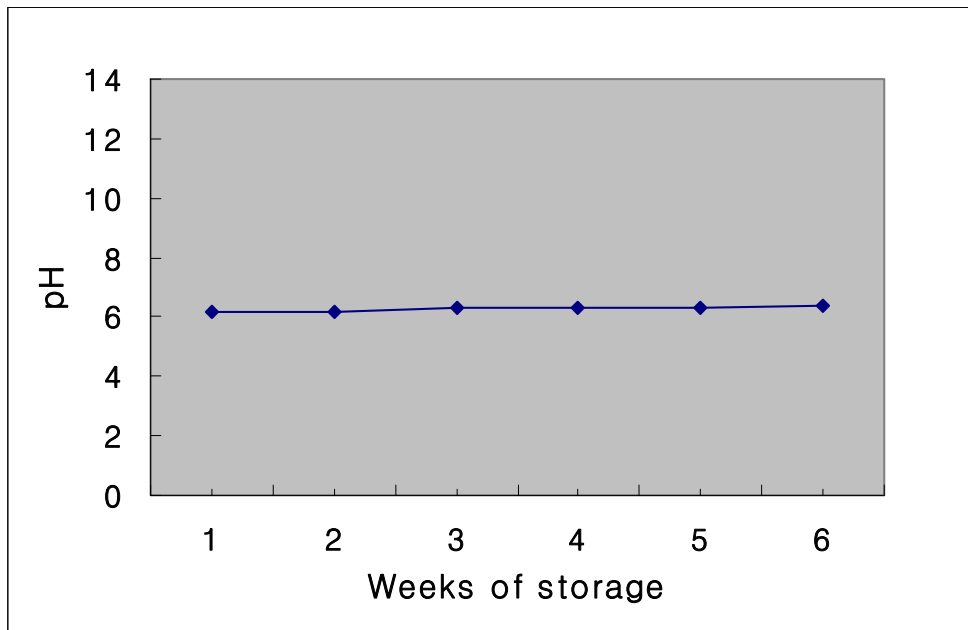


Fig. 2. Change in pH values during storage of puffer liver at  $-45^{\circ}\text{C}$ .

Initial storage : pH 6.2

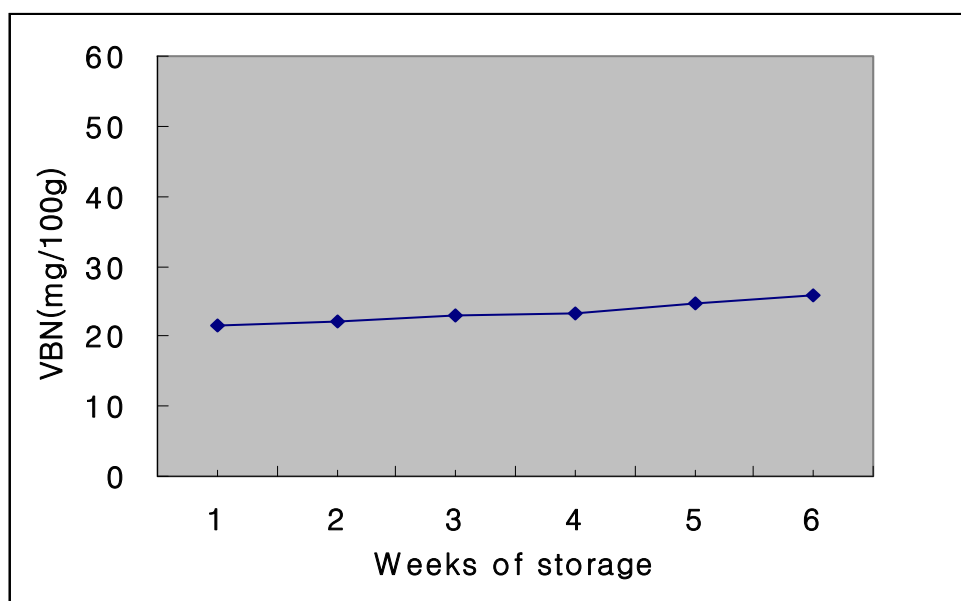


Fig. 3. Change in VBN contents during storage of puffer liver at  $-45^{\circ}\text{C}$ .  
Initial storage : 18.5 mg/100g.



Table 3. Composition of fatty acids in the puffer liver oil, black  
milbog, *Lagocephalus wheeleri*

Fatty acids	Total lipid	Neutral lipid
14 : 0	2.24	3.73
16 : 0	17.38	20.11
16 : 1	8.67	7.24
17 : 0	1.15	2.55
18 : 0	5.82	6.99
18 : 1	23.62	13.96
18 : 2	1.14	1.08
18 : 3	1.08	0.77
20 : 1	2.51	1.90
20 : 4	1.19	1.81
20 : 5	3.04	2.41
22 : 1	6.32	9.11
22 : 6	15.99	16.62
SFA*	26.59	33.38
MUFA**	41.12	32.21
PUFA***	22.44	22.69
PUFA/SFA	0.84	0.68
EPA+DHA	19.03	19.03

\* : Saturated Fatty Acids

\*\* : Mono Unsaturated Fatty Acids

\*\*\* : Poly Unsaturated Fatty Acids

Table 4. Toxicological symptoms of mouse by the different injection of puffer liver oil per day

Day	Control	0.2 ml	0.5 ml	1.0 ml	2.0 ml
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	+(5/5)
6	-	-	-	+(2/5)	+(5/5)
7	-	-	-	+(5/5)	+(5/5)

Mouse : ICR, 18~20 g of male.

Each group is composed of 5 mouse.

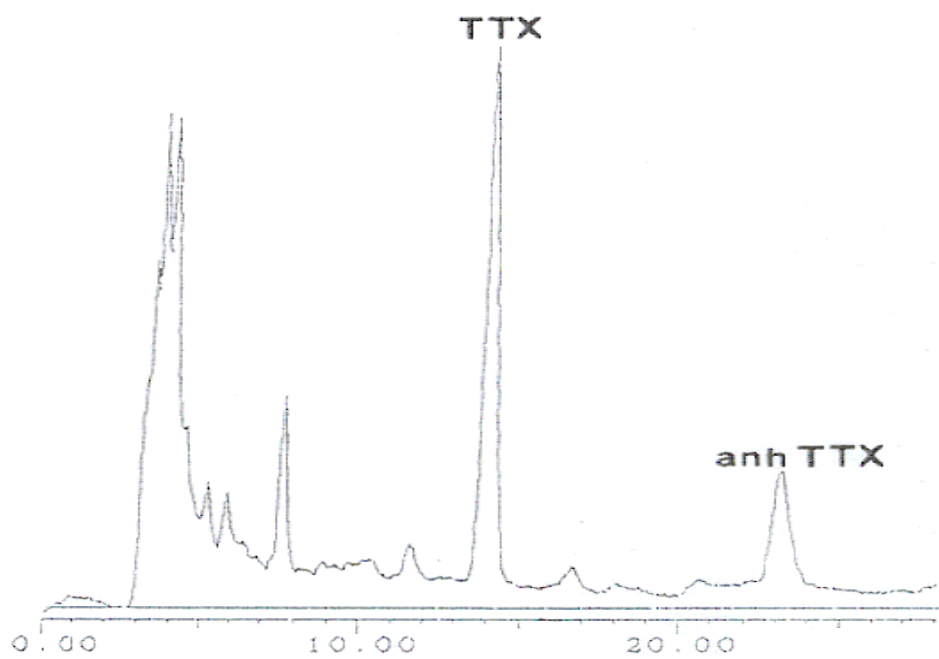


Fig. 4. HPLC chromatogram of tetrodotoxin of raw puffer liver.

#### (5) 복어 간유의 정제 기술

일반적으로 수산동물의 조직으로부터 채유한 원유에는 불용성 불순물, 수분, 인지질 등이 콜로이드상으로 혼재하여 있고, 이들을 적절히 제거하지 않는 경우 탈산공정에서 검화물 등이 분리되지 않아 정제효율 및 정제유의 품질을 저하시킨다. 원유 100ml에 대하여 인산의 첨가량을 0.3ml로 하여 탈검한 결과 AV는 18.8 KOH mg/g 이었다. 탈검유의 수율은 인산량 0.3ml를 첨가한 경우 87.5%이었다. 이것은 복어 간유 중에 존재하는 유리지방산, 모노글리세리드 및 디글리세리드 등이 함께 제거되기 때문인 것으로 알려져 있다. 탈검 복어 간유는 다량의 유리지방산이 함유되어 있어 알칼리처리에 의해 유리지방산을 유지에 난용인 검화물로 형성시켜 분리, 제거하는 공정이 필요하다. 조간유 100ml에 대하여 20% 수산화나트륨용액을 14.5 ml 첨가하고 산가에 의한 계산으로 첨가한 과잉량은 2~3g이었을 경우 복어 간유의 산가, pH 및 수율의 변화는 Table 6와 같다.

탈검처리한 후, 탈색처리는 다음과 같이 실시하였다. 즉, 60℃로 가온한 복어 간유에 인산의 농도가 0.3%가 되도록 가한 후 질소를 주입하면서 30분간 교반, 정치 및 원심분리(2,000×g, 20분)한 후 온수로 수세하고 이어서 탈수하여 탈산유를 얻었다. 수산화나트륨으로써 탈산처리(60℃, 20분)한 복어 간유의 산가 및 pH는 각각 2.5 KOH mg/g 및 6.5로서 탈검유의 산가 및 pH가 각각 21.3 및 4.3인 것에 비하여 산가가 상당히 감소하여 pH가 증가하여 알칼리처리에 의해 대부분의 유리지방산은 제거되기 때문이며, 일반적으로 탈산을 위한 수산화나트륨의 처리량은 실제로 탈검유에 함유되어 있는 착색성분, 금속염 및 미량의 인지질 등으로 인해 유리지방산 함량에 기초로 한 이론치보다 약간의 과잉량을 사용해야 한다.

탈산유 중에는 천연색소, 검화물 및 금속화합물 등이 잔류하고 있어 색이 짙고, 정제 및 저장 중 유지의 품질저하를 야기하기도 하여 일반적으로 탈산공정이 끝나면 흡착제를 이용하여 탈색공정을 실시한다. 그리고, 탈색처리는 다음과 같이 실시하였다. 즉, 탈산처리를 한 복어 간유에 활성백토량을 2~3% 되도록 첨가하고 이와 함께 활성탄을 0.2~0.3% 되도록 첨가하여 100℃에서 20분간 가열 처리하고 감압여과하여 탈색유를 얻었으며, 복어 간유의 탈색효과는 Table 7와

같다. 활성백토량의 첨가에 따른 탈색 복어 간유의 pH는 큰 차이가 없었고, 산가는 감소시킬 수 있었으며, 색조은 일반적인 식물 식용유 정도로 옅은 황색을 띄었으며, 수율의 경우는 탈산유에 대하여 75%까지 얻을 수 있었다. 한편, 원유의 추출을 용매추출법과 열수추출법을 사용하여 산가 및 pH를 비교한 것은 Table 8과 같으며, 열수추출법으로 추출한 조간유를 탈검, 탈산, 탈색 처리한 복어 간유의 사진은 Fig. 5과 같다.

일반적으로 어유의 경우 탈검, 탈산 및 탈색동정을 거쳐도 그 특유의 불쾌한 냄새와 맛을 가지는데, 이는 주로 불포화탄화수소, 저급지방산 및 카르보닐 화합물 등에 의한 것으로 알려져 있다. 탈색 복어 간유의 불쾌한 냄새 및 맛의 개선을 위하여 감압 수증기 가열법에 의한 탈취 공정을 실시하였다. 즉, 탈취공정은 Fig. 5과 같은 장치하에서 실시하였다. 즉, 감압수증기 증류장치하에서 4 torr 이하로 펌프(E)를 이용하여 감압하고 mantle로써 180℃ 부근의 온도까지 가온하여 1시간 동안 탈취공정을 실시하였다. 탈취 후에는 Fig. 6의 B 부분의 상부로부터 질소가스를 주입하여 탈취 후의 시료 유지의 산화를 최소화하여 보관하였다. 탈취 후에도 어유 특유의 냄새는 완전히 제거되지는 않았으며, 최종 단계에서 제품화할 경우에는 캡슐화하여 섭취에 편리하도록 할 필요가 있었다.

Table 5. Effect of adding 0.3 ml of phosphoric acid on acid value and yield in degummed puffer liver oil

Adding volumes (ml/100ml oil)	Acid value (KOH mg/g)	pH	Yields(%)
Crude oil	18.5	4.6	100.0
Degummed	21.3	4.3	87.5

Table 6. Effect of deacidification on acid value(AV), pH and yields in puffer liver oil

	AV (KOH mg/g)	pH	Yields (%)
Degummed	21.3	4.3	100.0
Deacidificated	2.5	6.5	97.0

Table 7. Effect of active clay and charcoal on acid value, pH, yields and color in decolorized puffer liver oil

Oil	AV (KOH mg/g)	pH	Yield(%)	Color
Deacidified	2.5	6.5	100	Dark brown
Decolorized	0.2	6.8	75	Thin yellow



Table 8. Change of acid value(AV) and pH during the purifying stage of puffer liver oil and comparison of two different extraction methods

Oils	Hexane extraction		Hot water extraction	
	AV	pH	AV	pH
Crude	18.2	4	19.9	4.6
Degummed	21.9	3	21.3	4.3
Deacidfied	1.6	7.1	2.5	6.5
Decolorized	0.2	6.8	0.2	6.8

AV : Acid value, KOH mg/g.



(A) (B) (C) (D)

Fig. 5. Photograph of crude liver oil(A), degummed(B), deacidified(C) and decolorized oil(D).

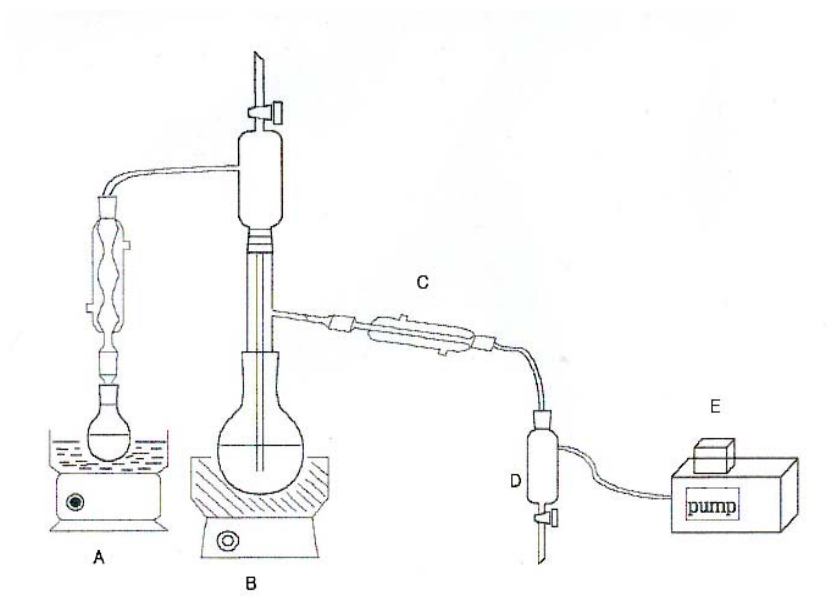


Fig. 6. Deodorizing process by steam distillation under vacuum.

A: Steam generator, B: Oil heater, C: Condenser,  
D: Draft, E: Vacuum pump.

#### (6) 제조 공정의 최적화

정제 복어 간유를 제조하기 위한 최적화 방법을 검토한 결과, 현재까지 얻은 효율성이 높은 방법 중의 하나는 다음과 같다. 즉, crude oil은 복어 간장을 3.0 kg 취하고 1% NaOH/증류수를 2.0 liter 가하여 water bath 상에서 60℃ 부근에서 중탕하여 여포로 압착하면 약 1,200 ml의 crude oil을 얻을 수 있었다. 이 때 crude oil는 pH 4.5, AV 15.37의 값을 나타내었다. 다음에 정제 단계에 들어가는데, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>을 crude oil의 0.3%되게 첨가하여 20분간 혼합하여 탈검하였다. 이 때 crude oil은 AV 21.94의 값을 나타내었다. 탈산과정은 유지의 무게를 측정하여 40 ℃로 가온한 후, 20% NaOH를 첨가하여 20분간 혼합하고 포화식염수를 5% 첨가하여 혼합한 후, 40 ℃ water bath 상에서 30분간 교반한 후, 원심분리 (5,000 rpm x 15분)하여 상층액을 분리하였다. 탈색은 유지 무게를 측정한 후, 60 ℃로 가온하여 산성백토 2%, 활성탄을 0.5% 첨가한 후, 60 ℃ 감압하에서 20분간 처리하여 감압여과하여 약 800 ml의 탈색유를 얻을 수 있었다. 이 탈색유의 pH는 4.5, AV값은 0.26이었다. 탈취 공정은 앞에서 언급한 바와 같이 Fig. 6과 같은 장치에 의하여 어유 특유의 냄새를 제거하여 최적 제조공정을 선정하였다.

#### (7) 시제품의 제조

밀복 간으로부터 알칼리 열수 추출법에 의하여 제독처리된 복어 조간유는 탈검, 탈산, 탈색 및 탈취 공정을 거쳐 정제하였으며, 정제된 복어 간유는 외부에 의뢰하여 연질 캡슐(내용물 500mg/1캡슐)형태로 시제품을 만들었다. 자세한 내용은 제 2절에 다시 기술되어 있다.

다. 복어 간유의 안전성

제품의 안전성을 확립하기 위하여 복어 간유에 대하여 실시한 급성독성시험 결과는 다음과 같았다.

(1) 개략의 치사량 (Table 9)

본 시험물질에 대한 시험에서 사망예가 관찰되지 않아 개략의 치사량의 산정은 불가능하였다.

(2) 사망률 (Table 9)

시험 전기간을 통하여 경구투여에 있어 랫드의 암·수 모두에서 사망예는 전혀 관찰되지 않았다.

(3) 임상증상 (Table 10)

시험물질 투여 후 시험 전기간을 통하여 시험물질을 투여한 암·수 모든 투여군에서 본 시험물질에 의한다고 생각되는 특이한 임상증상은 인정되지 않았다.

(4) 체중변화 (Table 11)

시험 전기간을 통하여 랫드의 암·수 모두에서 각 군간에 유의성 있는 체중 변화는 인정되지 않는다.

(5) 부검소견 (Table 12)

전 생존동물의 부검에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 육안적인 이상소견은 관찰되지 않는다.

(6) 종합 결과

시 험 항 목	단 위	시 험 결 과
급성독성시험 (Rat)	-	투여가능한 최고용량인 10ml/kg에서 사망동물이 발생하지 않아 개략의 치사량의 산출은 불가능하였다.

(7) 고 찰

급성독성시험의 목적은 화학물질의 고유독성을 정의하는 것이고, 민감한 종(種)에 대해 평가하고, 표적기관에 대한 정보를 제공하고, 화학물질에 급성 노출되었을 때의 위험평가에 대한 정보를 제공한다. 또한 지연독성 실험에 대한 예비

자료로써 이용되고, 지연독성에 대한 정보가 없는 상태에서 제일 첫 번째의 방어에 대한 시험이라고 불린다. 이런 자료는 제조회사, 정부 및 연구기관이 연구자들 및 어떤 화학물질의 초기 개발단계에서 작업집단의 안전성 정도를 설명하는데 도움을 주며, 규제하는 입장에서 보면 급성독성데이터는 어떤 화학물질의 독성분류, 라벨링, 수송 등에 필수적인 도움을 준다. 학문적 관점으로 본다면, 용의 주도하게 계획된 급성독성 시험은 때로 독성메카니즘 및 특정분류의 화학물질에 대한 구조-활성관계에 관한 정보를 제공한다. 따라서 의약품, 농약, 화장품, 세제류, 식품첨가제, 기타 화학제품의 목적으로 개발된 물질들도 이들을 산업화하여 인간에게 접촉되기 위해서는 반드시 안전성평가(Safety Test)를 수행하여야 한다고 법률에서 정하고 있다. 급성독성은 우발적인 재앙, 과량 복용 및 자살기도 등의 생명을 위태롭게 하는 경우를 의미하는데, 본 시료는 액상이므로 시험동물에 투여가능한

최대용량인 kg당 10ml을 최고농도로 선정하여 본 시험을 실시하였다. 경구투여 후 2주간 매일 관찰 한 결과 운동활동의 변화, 경련 및 반사활동의 이상 등이 관찰되지 않았으며, 체중변화의 이상현상도 나타나지 않았으며, 부검결과 육안적 병변 소견도 인정되지 않았다.

#### (8) 결 론

시료(검은 밀복 간유)에 대한 랫드의 급성경구독성시험 결과 최고농도인 10ml/kg 투여시 사망동물이 관찰되지 않아 개략의 치사량치의 산출이 불가능하였다.

Table 9. Mortality in SD rats administered orally with TBP-49.

Sex Group		M		F	
		I	II	I	II
Hours after treatment	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	12	0	0	0	0
Days after treatment	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
	9	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	11	0	0	0	0
	12	0	0	0	0
	13	0	0	0	0
	14	0	0	0	0
Mortality		0/5	0/5	0/5	0/5

M : Male, F : Female.

Table 10. Clinical signs in SD rats administered orally with TBP-49

Sex Group		M				F			
		I		II		I		II	
		N	Signs	N	Signs	N	Signs	N	Signs
Hours after treatment	1	5	-	5	-	5	-	5	-
	2	5	-	5	-	5	-	5	-
	3	5	-	5	-	5	-	5	-
	4	5	-	5	-	5	-	5	-
	5	5	-	5	-	5	-	5	-
	6	5	-	5	-	5	-	5	-
Days after treatment	12	5	-	5	-	5	-	5	-
	1	5	-	5	-	5	-	5	-
	2	5	-	5	-	5	-	5	-
	3	5	-	5	-	5	-	5	-
	4	5	-	5	-	5	-	5	-
	5	5	-	5	-	5	-	5	-
	6	5	-	5	-	5	-	5	-
	7	5	-	5	-	5	-	5	-
	8	5	-	5	-	5	-	5	-
	9	5	-	5	-	5	-	5	-
	10	5	-	5	-	5	-	5	-
	11	5	-	5	-	5	-	5	-
	12	5	-	5	-	5	-	5	-
	13	5	-	5	-	5	-	5	-
14	5	-	5	-	5	-	5	-	

M : Male, F : Female, N : NO. of animals examined,

- : NO abnormality detected.



Table 11. Changes of body weight in SD rats administered orally with TBP-49

(Unit : g)

Sex	Group	Day	0	7	14
M	I	MEAN	167.53	241.69	297.90
		S. D.	9.39	15.76	25.54
		N	5	5	5
	II	MEAN	166.73	238.57	293.07
		S. D.	6.23	8.84	14.17
		N	5	5	5
F	I	MEAN	144.59	185.36	206.17
		S. D.	3.54	4.92	6.12
		N	5	5	5
	II	MEAN	143.56	186.46	210.44
		S. D.	3.96	5.76	7.99
		N	5	5	5

M : Male, F : Female, N : No. of animals examined

Values represent Mean  $\pm$  S.D. for 5 rats.

Table 12. Gross findings of necropsy in SD rats administered orally with TBP-49

Organ	Sex	Male		Female	
	Group	I	II	I	II
Brain	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Kidney-L	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Kidney-R	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Heart	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Lung	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Spleen	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Liver	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Stomach	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Intestine	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Pancreas	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Adrenal gland-L	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Adrenal gland-R	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Pituitary gland	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Testis-L/	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Ovary-L	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Testis-R/	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Ovary-R	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5
Other organs	NO. of observations	5	5	5	5
	NO. gross findings	5	5	5	5

I : 10ml/kg, II : Control, L : Left, R : Right.

## 제 2 절 복어 간유구의 생리활성 시험

### 1. 서 론

현대인의 다양한 생활환경과 식생활의 변화로 인하여 질병의 형태에 있어서도 많은 변화를 가져왔으며 특히 순환계 및 맥관계 등의 대사성 질환이 증가되어 있는 실정이다. 우리나라도 국민의 식생활 양상의 변화에 의하여 비만증 및 심혈관계질환 등의 각종 성인병이 선진국 수준으로 증가하고 있는 추세이다. 심혈관계 질환을 예방하는 방법에는 열량의 과다 섭취를 피하고 섭취 지방의 양과 종류를 제한하는 다양한 방법이 제시되고 있으나 근래에 와서는 천연식품의 적절한 섭취가 심혈관계 질환에 있어 중요시되고 있다. 이에 본 연구에서는 어유 중에는 심장질환을 비롯한 각종 성인병에 효과가 있는 EPA 및 DHA를 비롯한 고도불포화지방산이 많이 존재하고 있으며, 특히 어 간유는 이 이외에도 비타민 A, D, 및 E가 풍부하여 생체조절기능을 가진 건강보조식품으로서 개발할 가치가 높다. 고도불포화지방산의 생리기능은 혈류개선, 뇌경색과 심근경색의 예방 및 방지, 동맥경화의 예방과 방지 등 심혈관계질환의 예방, 항종양 효과, 기억학습능력 저하 예방 등에 효과가 있으며<sup>18)</sup>, 그 이외에도 눈의 기능향상, 알레르기 체질의 개선, 당뇨 합병증의 진행방지, 피부 윤택의 향상 등 여러 가지 생리효과도 기대되고 있다.

한편, 복어의 간에는 지질 함량이 매우 많아 주요한 어유 자원으로 이용할 필요성이 있으며, 복어는 자신의 생명을 방어하기 위한 독특한 생리기능을 가진 어류<sup>19)</sup>이기 때문에 새로운 기능 성분이 존재할 가능성이 높다. 본 연구에서는 이러한 배경 하에서 우선 식용복어 간유의 여러 가지 성인병 예방에 대한 효과를 검토하였다.

또한, 동맥경화는 심장병, 뇌졸중 등을 일으키는 주요한 원인으로, 서구사회에서는 이로 인하여 50% 이상이 사망한다고 알려져 있다. 우리나라 역시 20 여 년에 걸친 빠른 산업사회화 및 그에 따른 문화 및 식생활의 변화로 현재 성인 인

구의 약 15%가 혈관질환을 가지는 것으로 조사되고 있으며, 이러한 통계수치는 빠른 속도로 증가하는 추세에 있다. 뇌혈관질환 및 심혈관질환은 성인의 사망원인 중 압 못지않게 높은 비율을 차지한다. 따라서 혈관질환의 치료는 성인건강에 있어서 대단히 중요한 부분으로서, 점차 고령화 사회로 되어 가는 21세기에는 의학 경제의 관점에서도 혈관질환의 치료에 들어가는 비용은 국민 의료혜택을 증시하는 21세기 복지사회에서 국가경제의 중요한 부분을 점유하게 될 것으로 전망된다.

1993년에 미국 워싱턴대학의 Russel Ross는 그의 세포상해론(cellular injury response)에서 평활근 세포 (vascular smooth muscle cell)의 비정상적인 증식이 이러한 동맥경화증(atherosclerosis)의 중요한 원인중의 하나라고 주장하였다<sup>20</sup>. 실제로, 죽상동맥경화의 경우, 초기형태의 atherosclerotic lesion 형성에 평활근 세포, 혈관내피 세포, 섬유질 세포, 탐식세포 그리고 여러 가지 inflammatory cell 등이 복합적으로 어우러져 atheroma를 형성한다. 죽상동맥 경화증에 관련한 이러한 세포의 복합성(heterogeneity) 때문에 어느 한 가지의 세포가 lesion 형성에 중심적인 역할을 한다고 설명되어지는 것은 불가능 하지만, 동물실험에 의한 풍선확장실험(ballon injury)결과, atherosclerotic lesions 부분에서 평활근 세포의 비정상적인 증식이 관찰되었으며<sup>21,22</sup>, 그 이후, 대부분의 심장혈관질환 의사 및 혈관 생물학자들은 이러한 평활근 세포의 비정상적인 증식이 동맥경화증의 중요한 위험인자(risk factor)라고 생각하게 되었다.

대동맥의 중엽층에 많이 존재한다고 알려져 있는 평활근세포는 정상적인 상태에서는 기본적으로 세포증식이 없는 평온한 상태(quiescent)를 유지하면서 세포주기상태를 G0/G1로 유지한다<sup>23</sup>. 그러나, 세포내벽의 상해 후, 평활근 세포는 대동맥의 내엽층으로 이동, 다시 세포분열이 일어나 G1 phase를 거쳐 DNA 복제(S phase), 그리고 G2 phase를 거쳐 세포분열(M phase)을 일으켜 세포증식을 유도한다. 대부분의 세포의 경우, G1 CHECKPOINT를 지나서 DNA 복제, G2 CHECKPOINT를 지나서 유사분열을 하기 위해서는 CDK (Cyclin-dependent kinase) 단백질의 활성이 필요하며, CDK는 단독으로 활성을 가질 수 없고, Cyclin이라는 단백질과 결합되어야 kinase 활성을 갖게 된다. 그리하여

Cyclin-CDK complex는 세포증식에 관련된 단백질들을 인산화시켜서 세포 분열을 유도한다<sup>24)</sup>. Cyclin과 CDK는 많은 종류가 있다. S phase를 유도하는 단백질들은 주로 cyclin D/E, cdk4/6 이고, cdk4/6은 Rb (Retinoblastoma) protein을 인산화시켜서 Transcription factor인 E2F의 전사 활성을 갖게 한다. 세포 주기 조절을 위해 cyclin-cdk complex의 활성을 조절하는 많은 인자들이 존재며, 대표적인 것으로는 G1 checkpoint에서 DNA가 손상되었을 때 작용하는 p21과 p27 단백질이 있다. 이들은 S-phase를 유도하는 cyclin-cdk complex에 결합하여 cdk4/6/2의 kinase활성을 저해함으로써 세포를 G1상태에 머물게 한다.<sup>25)</sup>

일반적으로 어유에는 DHA 및 EPA 등 고도불포화지방산의 함량이 많아 여러가지 생리기능이 밝혀지고 있는데, 그 가운데 뇌경색과 심근경색의 예방 및 방지, 식품에 기인한 동맥경화의 예방효과, 항 종양효과, 기억학습 능력저하 예방효과 등이 알려져 있다.<sup>26-28)</sup> 이와 같은 추세에도 불구하고 어유 대한 동맥경화의 예방효과에 있어서 세포 저해능과 여러 가지 cell cycle regulation 과 같은 cellular mechanism에 대한 기초적인 연구에 대해서는 그다지 연구되어 있지 않은 실정이다.

본 연구에서는 young mouse(4 months)의 대동맥에서 각각 평활근세포 primary cell line을 구축하여 복어 간유에 의한 세포증식능력억제와 세포주기 변화를 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 품질개선 시험

#### (1) 포장형태 및 유통기간

복어 간유구를 녹색의 연질캡슐(내용물 500 mg/1 캡슐)의 형태로 제조하였다. 연질 캡슐의 기재로서는 젤라틴, 글리세린, D-솔비톨, 에틸바닐린, 이산화티타늄, 식용색소 청색 1호 및 식용색소 청색 4호를 일정량 배합하여 사용하였다. 외포장은 방습제로서 실리카겔 팩을 넣은 플라스틱제 약제병으로 하였을 경우 저장 안정성을 검토하였다.

#### (2) 제품의 안정성

##### (가) 산가(AV)의 측정

산가는 식품공전<sup>14)</sup>에 따라 실시하였다. 즉, 시료 5g을 취해 마쇄한 후 ethanol : ether(1 : 2, v/v)용액 100ml를 가하고, phenolphthalein용액 지시약 2~3방울을 떨어뜨린 후 0.1N ethanol성 수산화나트륨용액으로 적정하여 계산하였다.

##### (나) 과산화물가(POV)의 측정

식품공전<sup>14)</sup>에 따라 측정하였다. 즉, 시료 약 5 g을 달아 초산: 클로로포름(3:2) 25 ml에 필요하면 약간 가온하여 녹이고 사용할 때 만든 포화요오드화칼륨용액 1 ml를 가볍게 흔들어 섞은 다음 어두운 곳에 10분간 방치하고 물 30 ml를 가하여 세계 흔들어 섞은 다음 전분시액 1 ml를 지시약으로 하여 0.01N 티오황산나트륨용액으로 적정하여 계산하였다.

### 나. 생리활성 성분 함량

#### (1) 비타민의 정량

㉞ 비타민 A : 비타민 A의 정량은 식품공전<sup>14)</sup>의 HPLC법으로 정량하였다. 즉, 비타민 A 20 ~ 30IU(6~9 $\mu$ g)에 상당하는 시료를 정확히 취하여 환저플라스

크에 넣은 다음 에탄올 30ml 및 피로갈롤에탄올 1ml를 가하여 잘 섞은 뒤 수산화칼륨용액 3ml를 가하여 환류냉각기를 부착하여 비등 수욕중에서 30분간 비누화시켰다. 그런 다음 신속히 실온까지 냉각하여 물 30ml를 가하여 갈색의 분액깔대기에 옮겼다. 플라스크는 물 10ml 및 석유에테르 30ml로 씻은 후 분액깔대기에 합하여 잘 흔들어 혼합한 다음 방치하여 물층을 별도의 분액깔대기로 옮겼다. 물층은 석유에테르 30ml씩 2회 추출하여 앞의 석유에테르층에 합하여 물 10ml 1회, 이어서 50ml씩으로 페놀프탈레인 지시약에 의하여 정색이 되지 않을 때까지 씻었다. 석유 에테르층만을 취하여 무수황산나트륨으로 탈수한 뒤 갈색 플라스크에 옮기고 황산나트륨은 석유에테르 10ml로 2회 수세하여 앞의 것에 합한 다음 40~50℃에서 감압진고한 다음 잔류물을 이소프로판올로 녹여 1.0ml로 정용한 것을 시험용액으로 하여 비타민 A 분석에 이용하였다. HPLC에 의한 정량은 시험용액 및 표준용액을 각각 20 $\mu$ l씩 주입하여 얻은 표준용액의 피크면적 또는 높이에 의해 구한 검량선을 사용하여 검체 중의 비타민 A( $\mu$ g/100g)을 구하였다. HPLC(Waters 510)의 분석조건은 column은 Capcellpak C18(4.6 x 250 mm), mobile phase는 EOH : D.W.(95:5) 혼합용액, detector는 Fluorescence(여기과장 340 nm, 측정과장 460 nm)을 사용하였다.

㉔ 비타민 D : 비타민 D의 정량은 식품공전<sup>14)</sup>의 HPLC법으로 정량하였다. 즉, 시료를 플라스크에 취하여 피로갈롤:에탄올(1:10) 용액 40 ml를 가하여 약하게 진탕혼합하였다. 1N 수산화칼륨 10 ml를 가하여 환류냉각기를 부착하여 비등 수욕 중에서 30분간 가열하여 비누화하였다. 즉시 냉각하여 실온으로 되면 벤젠 100 ml를 가하여 15초간 강하게 진탕혼합하였다. 침전이 생기면 이것이 가라앉을 때까지 방치하였다. 다음에 250-300 ml 분액여두로 옮기고 비누화용 플라스크의 침전물은 남겨두고, 분액여두에 1N 수산화칼륨 100 ml를 가하여 15초간 강하게 진탕혼합하였다. 방치하여 분리하고 혼탁한 물층은 버리고, 벤젠층에 0.5N 수산화칼륨 40 ml를 가하여 진탕혼합한 후 벤젠층을 적어도 물 40 ml를 4회 매회 15초간 격렬하게 진탕혼합하여 세척하였다. 이 벤젠용액 80 ml를 플라스크에 취하여 40℃이하에서 용액을 감압농축하고, 잔류물에 벤젠 5 ml를 가하여 녹이고 이액 4.5 ml를 10 ml의 공전시험관에 취하여 같은 방법으로 감압농축하였다. 잔류

물에 아세토니트릴: 메탄올(1:1) 500  $\mu$ l를 정확하게 녹이고 이를 시험용액으로 하였다. HPLC(Waters 600) 분석에 있어, column은 Zorbax(4.6 x 250 mm), mobile phase는 hexane : isopropanol(98:2), detector는 UV(254 nm)를 사용하여 분석하였다.

㉔ 비타민 E : 시료 약 1 g을 정밀히 달아 n-헥산으로 녹여 50 ml로 한 후, 그 중 일정량을 취하여 희석한 것을 시험용액으로 하였다. HPLC(Shiseido)의 분석에 있어, column은 Silica(4.6 x 250 mm), mobile phase는 hexane : isopropanol(98:2), detector는 Fluorescence(여기파장 298 nm, 측정파장 325 nm)를 사용하여 분석하였다.<sup>14)</sup>

## (2) 미네랄

식품공전에 의하여 시료 약 20 g을 회화용 도가니에 취하여 건조하여 탄화시킨 다음 450 ~500℃에서 회화하는 건식회화법으로 전처리한 다음, 아르곤 플라즈마에 시료용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도를 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 측정하는 ICP법으로 측정하였다.

## (3) DHA 및 EPA 함량

식품공전에 의하여 14% BF<sub>3</sub>/MeOH 로써 methylation하여 GC(Hewlett Packard Series II 5890)로 분석하였다. Column은 HP-FFAP(0.33 $\mu$ m, 0.2 mm x 50), detector는 FID(230℃), flow rate는 1.0 ml/min, carrier gas 는 N<sub>2</sub>, injector 온도는 220 ℃, detector 온도는 230℃의 조건에서 분석하였다.

## 다. 생리활성 시험

### (1) 간기능 개선 및 고지혈증 치료 효능

#### (가) 재료

본 실험에 사용한 원료는 부산시내에 소재하고 있는 복어가공 처리공장(D회



사)에서 매일 처리되어 나오는 검은 밀복(*Lagocephalus gloveri* Abe et Tabeta)의 간을 분리 수집하여  $-35^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

(나) 시료 간유

검은 밀복의 간에 5배량의 증류수를 가하고 NaOH를 첨가하여 1% 농도가 되게 한 뒤 1시간 동안 중탕 가열하여 조간유를 추출한 다음, 정제는 일반적인 유지 정제 방법인 탈검, 탈산, 탈색 및 탈취의 순으로 행한 것을 시료 간유로 사용하였다.

(다) 실험동물

실험동물은 (주)대한바이오 링크로부터 분양 받아 동물사내의 명암(12시간 light/dark cycle), 습도(55~60%) 및 온도( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ )는 자동으로 조절되는 Environmental controlled rearing system(대중기기)을 사용하여 2주 가량 충분히 적응시켜 사육한 체중  $20\pm 2$  g의 ICR계 웅성 생쥐 및 체중  $200\pm 10$  g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 시료의 처치는 oil을 0.0025 ml/g, 0.005 ml/g 및 0.01 ml/g 을 2주일간 경구투여하고 실험에 사용하였다.

(라) 수영실험

동물실험용 수조(70×70×60 cm, 수온  $24\sim 26^{\circ}\text{C}$ )에 물을 70%정도 넣고 Frenkel 등<sup>29)</sup>의 방법에 따라 흰쥐 체중 5%에 해당하는 중량을 쥐의 미근부에 매달아 수영하게 하여 사망하는 시간을 측정하였다.

(마) 간독성 및 고지혈증 유발

간독성과 고지혈증을 유발하기 전 실험동물에 2주간 10% Tween 80에 용해하여 1일 1회 경구 투여하고 시료투여 마지막 날 실험동물에 carbon tetrachloride(이하  $\text{CCl}_4$ ): olive oil(1;1 v/v)을 체중 100 g 당 0.2 ml 씩 복강내에 투여하고 24시간 후에 처치하여 다음 과정을 진행하였다. D-galactosamine 간 독성 유발은 실험동물에 생리식염수로 용해시킨 D-galactosamine · HCl(GaIN)을 400 mg/kg 씩 복강내로 투여하고  $\text{CCl}_4$ 와 같은 방법으로 진행하였다. Poloxamer-P407 로 고지혈증 유도하기 위하여 poloxamer P-407 용액은 시료투여 마지막 날 300 mg/kg 씩 복강내로 투여하고 24시간 후 처치하여 다음 과정을 진행하였다.

(바) Bleeding time의 측정 : Han 등<sup>30)</sup>의 방법에 의하여 마취된 실험동물을

꼬리 끝에서 0.3 cm 자른 후 곧 37.5°C saline 용액에 꼬리를 5 cm 담그고 지혈될 때까지의 시간을 측정하였다.

(사) Plasma clotting time의 측정 : 플라스틱 시험관을 37°C의 수욕상에 담그고 혈장 100  $\mu$ l, saline(0.15 M NaCl) 100  $\mu$ l, 25 mM CaCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ l 를 가하고 섞은 후 가만히 흔들어 주면서 CaCl<sub>2</sub>를 가한 후부터 혈장이 응고하기까지의 시간을 측정하였다.

(아) 혈청 중 효소활성의 측정

Aminotransferase(AST, ALT)와 Sorbitol dehydrogenase(SDH)의 측정 : Aminotransferase (AST, ALT)의 측정은 Reitman과 Frankel의 방법<sup>31)</sup>, Sorbitol dehydrogenase(SDH)의 측정은 Weisner 등의 방법<sup>31)</sup>에 준하여 조제된 kit(아산 제약)를 사용하였다.

(자) 혈중 지질함량에 미치는 영향 : Total cholesterol 함량 측정은 Richmond 등의 효소법<sup>33)</sup>에 의하여 조제된 kit(AM 202-K, Asan)를 사용하여 실험하였고, Triglyceride 함량 측정은 McGowan 등의 방법<sup>34)</sup>에 준하여 조제된 kit(AM 157S-K, Asan)를 사용하여 실험하였다.

(차) 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

(2) 평활근세포의 증식에 미치는 영향

(가) 세포주 및 배양

실험에 사용한 대동맥 유래 평활근세포는 4개월된 mouse의 대동맥에서 primary cell line을 수립하여 사용하였다.<sup>35)</sup> 세포의 증식을 위해서는 조직배양용 플라스크(75cm<sup>2</sup>)에 0.2% sodium bi carbonate, 5% fetal bovine serum과 항생제를 첨가한 DMEM medium을 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 세포단층이 될 때까지 배양하였다.

(나) 시약

Polyclonal 항체 cyclin D1, cyclin E, CDK2, CDK4, p21와 p27는 New England Biolabs 에서 구입하였다. XTT assay kit 와 cell death ELISA kit는 Roche에서 구입하였다.

(다) 북어 간유(Pufferfish liver oil, PLO)

본 실험에 사용한 시료는 검은 밀복(*Lagocephalus gloveri* Abe et Tabeta)의 간에 5배량의 증류수를 가하고 NaOH를 첨가하여 1% 농도가 되게 한 뒤 1시간 동안 중탕 가열하여 조간유를 추출하였다. 간유의 정제는 일반적인 어유 정제 방법인 탈검, 탈산, 탈색 및 탈취의 순으로 행하였다.

(라) MTT assay

적정세포수가 포함된 100ul의 배지를 96well에 첨가하여 배양한 후, PBS로 세척한 후, 하는 농도의 PLO를 첨가한 후 12시간 동안 배양하였다. 그 후 50ul의 MTT labeling mixture를 가하여 12시간 더 배양한 다음 450-500nm 사이의 흡광도에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.<sup>36)</sup>

(마) [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation

24well plates에서 배양된 세포를 적정농도의 PLO를 처리 12시간 후, 1uCi [<sup>3</sup>H]thymidine을 첨가하였다. 12시간 경과한 다음, PBS와 5% trichloroacetic acid로 세척 후, 0.5N NaOH로 가용화 시킨 뒤 liquid scintillation counter로 측정하였다.<sup>37)</sup>

(바) Apoptosis assay

24well plates에서 배양된 세포를 적정농도의 PLO를 처리 24시간 후, 배양된 세포를 lysis하고 원심분리 한 뒤 cytoplasmic histone-associated DNA fragment를 포함하는 상등액을 streptavidin으로 전처리 된 96well plates에 옮긴 후 biotin으로 전처리된 anti-histone 항체 혼합액과 peroxidase와 결합된 anti-DNA항체의 혼합액과 반응시킨다. 그 후 peroxidase의 기질을 첨가한 뒤, 405nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>35)</sup>

(사) Western blot

Cell lysates를 SDS-PAGE로 전기영동시킨 후 nitro cellulose membrane에 전이시키고 nonspecific binding을 줄이기 위해 5% skim milk로 1시간 반응시킨 후, 4°C에서 1차 항체로 overnight시켰다. TBS buffer (10mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.15M NaCl)로 4회 세척후 2차 항체로 1시간 반응시킨 뒤, ECL kit로 band를 검출하였다.<sup>37)</sup>

(아) Immunoprecipitation

Cell lysates (500ug)를 원하는 항체로 4°C 에서 overnight 반응시킨 후, 25ul의 protein A-Sepharose를 첨가한 뒤, 1시간 반응시켰다. 면역침강된 단백질은 95°C에서 Laemmli buffer에서 반응시킴으로 방출되었다.<sup>36)</sup>

(자) Immune complex kinase assay

Cell lysates (500ug)를 원하는 항체로 4°C 에서 overnight 반응시킨 후, 25ul의 protein A-Sepharose를 첨가하고, 면역침강된 단백질에 lysis buffer로 세척후 1 ug glutathione S-transferase (GST) - pRb C-terminal (pRb amino acids 769 to 921) fusion protein (Santa Cruz Biotechnology) or 5 ug histone H<sub>1</sub> (Life Technologies), 20 uM/L ATP, and 5 uCi [(-<sup>32</sup>P)ATP (4500 Ci/mmol; ICN)를 포함하는 kinase buffer에서 30°C에서 20분 반응시킨 후, Laemmli buffer를 첨가하여 95°C에서 반응시킴으로서 반응액을 방출시켰다. 그 후, SDS-PAGE 후 gel dryer에서 건조 후 band를 검출하였다.<sup>37)</sup>

라. 복어 간유구의 대량생산

(1) 소비자 기호도 및 시장조사

복어 간유에 대한 소비자들의 기호도 및 기존의 건강보조식품 업체를 통하여 시장 조사를 하였는데, 제독처리 및 그 생리활성 기능에 대하여 가장 관심이 높았다. 즉, 제독처리에 대한 국가 공인 기관의 검증 자료와 신뢰할 만한 연구기관의 생리활성 기능 시험의 결과가 필요하다고 사료되었다. 따라서 독성검사는 한국화학시험연구소에 분석 의뢰하였고, 생리활성 시험은 경성대학교 약학과와 동국대학교 한의과대학과 공동으로 시험하여 제품의 안전성 및 효능에 대한 신뢰

도를 높였다.

#### (2) 제품생산 및 판로 개척

시제품은 복어간을 3~4 kg/1일 기준으로 처리하고 적정한 공정 단계별 최적 조건을 선정하여 1차로 10,000 캡슐을 생산하여, 생산에서 판매에 이르기까지 필요한 전과정을 사전 점검하고자 하였다. 대량 생산 및 판로개척은 모 기업과 협의 중에 있으며 제품제조 허가를 얻게 되는대로 기술이전을 통하여 제품 생산을 추진할 계획이다.

### 3. 결과 및 고찰

본 과제에서는 현재까지 이용되지 않고 있는 밀복 간장으로부터 복어 간유를 추출하여, 성인병 예방 및 치료 효과가 있는 신기능성 복어 간유구를 제조, 산업화하는 기술을 개발하고자 하였다. 즉, 복어 간유 중의 잔류독성의 제거, 간유의 추출 및 정제 기술 및 포장형태 등을 검토하고, 제독처리된 복어 간유의 생리활성 기능을 구명하여 부가가치가 높은 건강보조식품으로 이용하고자 하였다.

#### 가. 품질개선 및 안정성

##### (1) 제품의 포장형태 및 유통기간

정제된 복어 간유에 존재하는 비타민, 미네랄 및 DHA/EPA를 분석 조사하고, 정제과정 중 다량 소실된 것으로 보이는 비타민을 보충 첨가하였다. 즉, (주)서흥 캡셀 시험실에 의뢰하여 캡슐 제조시에 복어 간유 80.0000%에 대하여 비타민 A(0.0375%), 비타민 D(0.0020%) 및 E(2.0000%)을 첨가하였으며, 소맥배아유 2.0000%, 레시틴 1.0000%, 대두유 14.9605%를 첨가하여 녹색의 연질캡슐(내용물 500 mg/1캡슐당)의 형태로 제조하였다. 연질 캡슐의 기재로서는 젤라틴 68.850%, 글리세린 21.618%, D-솔비톨 8.197%, 에틸바닐린 0.164%, 이산화티타늄 0.689%,

식용색소 청색 1호 0.069% 및 식용색소 청색 4호 0.413%를 배합하였다. 외부 포장용 방습제로서 실리카겔 팩을 넣은 플라스틱제 약제병으로 하였을 경우 유통기간은 6개월까지는 이상이 없었으며, 그 이상의 기간은 일반적인 타 제품과 비슷할 것으로 사료되었다.

## (2) 품질의 안정성

복어 간장으로부터 조간유(crude liver oil)를 열수추출하고 탈검, 탈산 및 탈색하여 정제한 간유를 저장용기에 담아 상부를 질소가스로 치환시켜 냉동고(-45℃)에 저장하여 두고 유지의 품질상태를 조사한 결과를 Fig. 7 및 Fig. 8에 나타내었다. 간유를 대량으로 캡슐 포장하기 위하여 미리 정제간유를 대량으로 조제하여 둘 필요가 있기 때문에 정제 어유의 저장 중 품질 상태를 양호하게 유지하는 것은 중요하다고 생각된다. AV는 저장 초기에 0.2 KOH mg/g이었으며, 저장 1주째에는 0.4 KOH mg/g, 그리고 저장 6주째까지 0.8 KOH mg/g이하를 유지하여 품질이 안정됨을 알 수 있었다.

한편, 저장 기간 중 과산화물가의 변화를 조사한 결과, 저장초기 POV는 5.2 meq/kg, 저장 1주째 5.5 meq/kg이었으며, 저장 4주째까지 서서히 증가하여 8.3 meq/kg의 수준이었으며 저장 6주째에는 15.4 meq/kg로서 6주째까지는 안정한 것을 알 수 있었다.

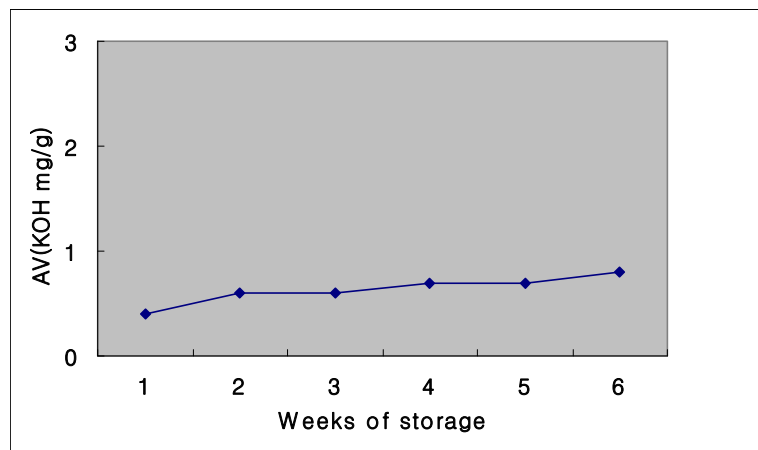


Fig. 7. Change of acid value during storage of purified liver oil at  $-45^{\circ}\text{C}$ . Initial storage : 0.2 KOH mg/g.

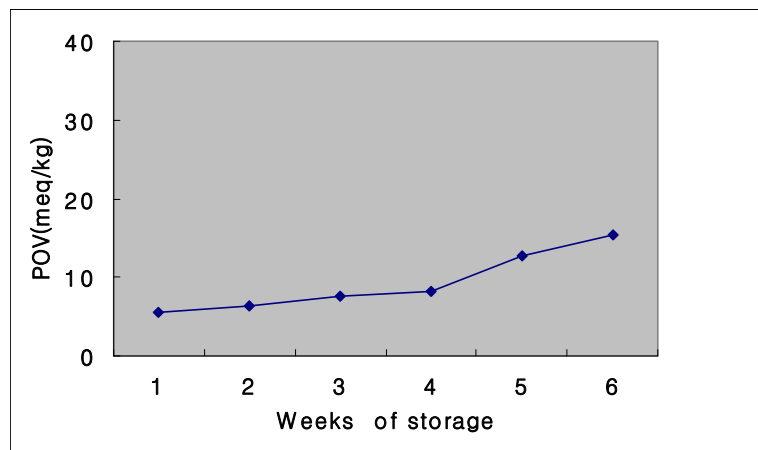


Fig. 8. Change of peroxide value during storage of purified liver oil at  $-45^{\circ}\text{C}$ . Initial storage : 5.2 meq/kg.



## 나. 생리활성성분 함량

### (1) 비타민류

정제어유 중의 비타민 A, D 및 E의 함량을 조사한 것은 Fig. 9~11에 각각 나타내었다. 비타민 A는 그 peak가 5.4분대에 나타났으며, 함량은 retinol로 계산하였을 때에 열수추출법의 경우 114.2 ppm, 헥산 추출법의 경우 169.3 ppm이었다. 비타민 D의 경우 D<sub>3</sub>를 기준으로 그 함량을 계산하였으나, 열수추출법에 의한 경우와 헥산 용매를 사용하여 추출한 경우 모두 ppm 단위이하로 검출되지 않았다. 비타민 E의 경우에는 열수추출법에 의하여 얻은 간유 중에는 검출되지 않을 정도로 극히 미량이었으나, 헥산 용매로써 추출한 간유의 경우에는 32.5 ppm이 검출되었다. 따라서 열수추출법의 경우에는 비타민 D 및 E를 필요에 따라 최종 제품에 첨가할 필요가 있다고 생각되었다.

### (2) 미네랄

무기질의 함량은 고주파 유도결합 플라즈마 방출 분광분석법에 의하여 분석하였으며 그 결과는 Table 13에 나타내었다. 무기질 가운데 나트륨의 함량이 가장 많아 약 253.5 ppm이었으며, 그 다음은 칼륨, 칼슘, 마그네슘이 각각 13.9 ppm, 1.5 ppm, 0.2 ppm 정도이었다. 나머지 무기질은 거의 검출되지 않았다.

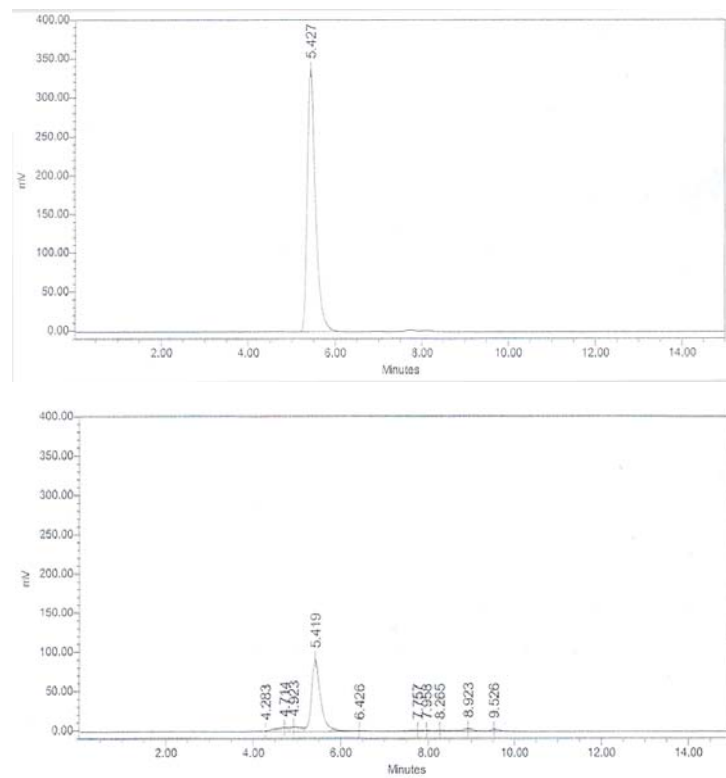


Fig. 9. The contents of vitamin A(retinol) in puffer liver oil.

Above : standard, Below : Puffer liver oil.

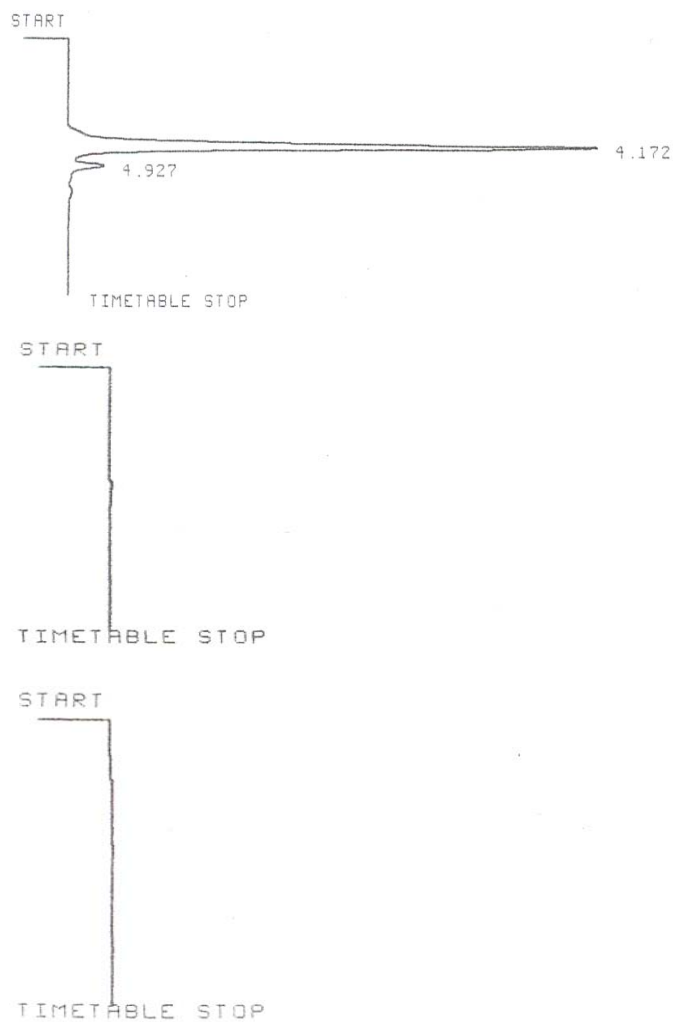


Fig. 10. The contents of vitamin D<sub>3</sub> in puffer liver oil.

Above : standard

Middle : oil extracted by hot water

Below : oil extracted by hexane.

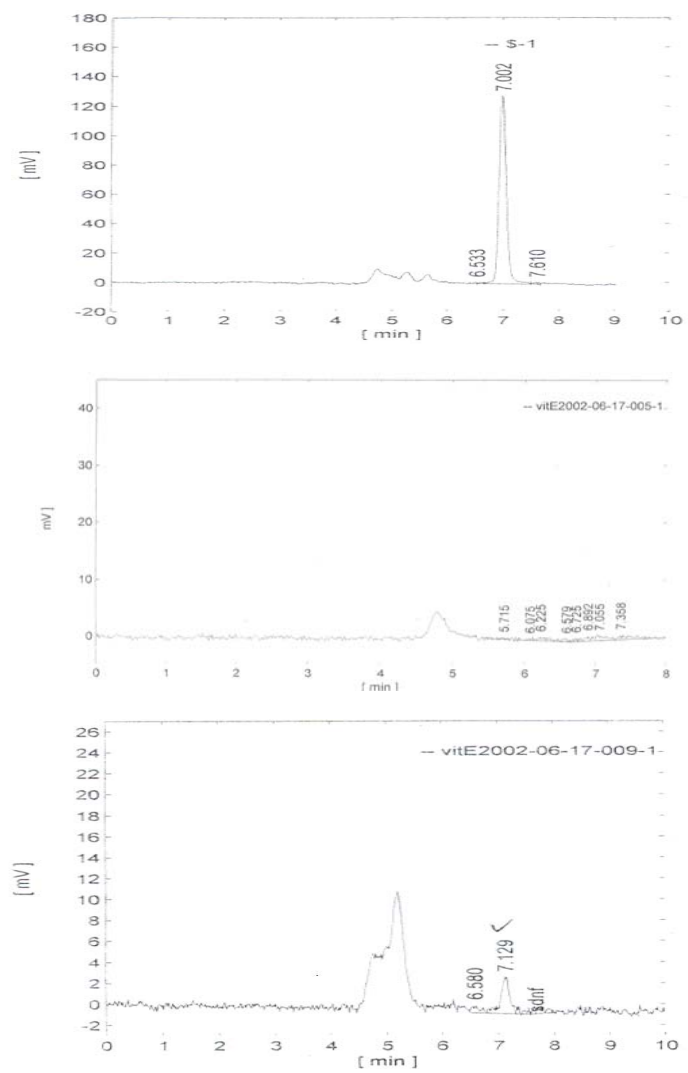


Fig. 11. The contents of vitamin E in puffer liver oil.

Above : standard

Middle : oil extracted by hot water

Below : oil extracted by hexane.

Table 13. The contents of minerals in the puffer liver oil

Mineral	mg/kg	Mineral	mg/kg	Mineral	mg/kg
Al	-	Mn	-	Zn	-
Cd	-	Mo	-	Zr	-
Co	-	Ni	-	Ca	1.562
Cr	-	Pb	-	K	13.992
Cu	-	Ti	-	Mg	0.277
Fe	-	V	-	Na	253.565

- : trace

### (3) DHA 및 EPA 함량

탈취 공정을 마친 정제어유에 대한 지방산의 조성, DHA 및 EPA의 함량을 조사한 결과는 Fig. 12에 나타내었다. 주요 지방산인 linoleic acid, EPA 및 DHA의 함량은 각각 13,732.7 ppm, 8048.4 ppm, 148,158.9 ppm으로서 이 가운데 특히 DHA의 함량이 가장 높다는 것은 복어 간유의 건강보조식품용 소재로서의 잠재적인 가치가 높은 것으로 생각된다. 앞으로 이러한 점을 염두에 두고 관련 질병의 치료 및 예방 기능을 검토할 필요가 있다고 생각되었다. 또한 이러한 정제어유의 특성은 복어 간유 캡슐 제조를 위한 처방전을 작성하는데 기초 자료로 활용하였다.

#### 다. 생리활성 시험

##### (1) 간기능 개선 및 고지혈증 치료 효능

###### (가) 피로회복에 미치는 영향

검은 밀복(*Lagocephalus gloveri* Abe et Tabeta)으로부터 제독처리하여 추출, 정제한 복어간유의 피로회복에 미치는 영향을 관찰할 목적으로 수조에서 복어간유를 2주간 용량별로 경구투여하고 수영하게 하여 사망하는 시간을 측정하여 본 결과(Table 14) 정상 생쥐에서는 사망시간이 3.59분인데 비해 복어간유를 용량별로 2주일간 경구 투여하였을 경우, 수영시 사망 시간은 용량 의존적으로 증가되는 경향을 보였다. 이러한 결과로 미루어 보아 복어 간유 성분 중에는 피로를 억제하는 성분이 함유되어 있는 것으로 생각된다.

###### (나) 간기능에 미치는 영향

간장해의 유발 약물로 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>) 및 D-galactosamine(GaIN)을 사용하여 복어로부터 추출한 복어간유의 간기능에 미치는 영향을 관찰할 목적으로 혈중 간기능의 지표인 ALT, AST 및 SDH의 활성을 측정한 성적이 Fig. 13, 14이다. 복어간유를 용량별로 2주일간 경구투여하고 사염화탄소 및 GaIN을 투여하였을 때

혈중 AST, ALT 및 SDH의 활성이 정상군에 비하여 현저히 증가되던 것이 복어 간유의 전처리로 정상군에는 미치지 못하나 현저히 억제되었다. 사염화탄소의 간 독성 기전은 생체막의 활면소포체에 존재하는 cytochrome P450 system에 의하여 활성 대사물인 trichloromethyl free radical( $\cdot\text{CCl}_3$ )로 대사되거나,  $\cdot\text{CCl}_3$ 가  $\text{O}_2$  분자와 결합하여 trichloromethyl peroxy radical( $\cdot\text{OCCl}_3$ )로 되어 세포막의 불포화지방산을 과산화시킴으로서 막의 구조와 기능을 파괴한다고 하였다. 한편 이러한 반응성이 높은 radical들은 cytochrome P450 자체와도 결합하여 소포체내의 이들 효소들을 파괴시킨다.<sup>38,39)</sup>

Table 14. Swimming time of mice treated with PLO

Group	Dose(ml/g)	Time(min)
Normal		3.59 ± 0.45 <sup>c,1,2)</sup>
PLO	0.0025	4.04 ± 0.43 <sup>c</sup>
	0.005	6.74 ± 0.76 <sup>b</sup>
	0.01	9.86 ± 1.24 <sup>a</sup>

Mice were orally administered with PLO daily for two weeks. The swimming test was performed at 24 hrs after the last feeding of PLO.

<sup>1)</sup>Values are mean ± S.D.(n=8) <sup>2)</sup>Values followed by different superscript are significantly different by Duncan's new multiple range test from normal(p<0.05).



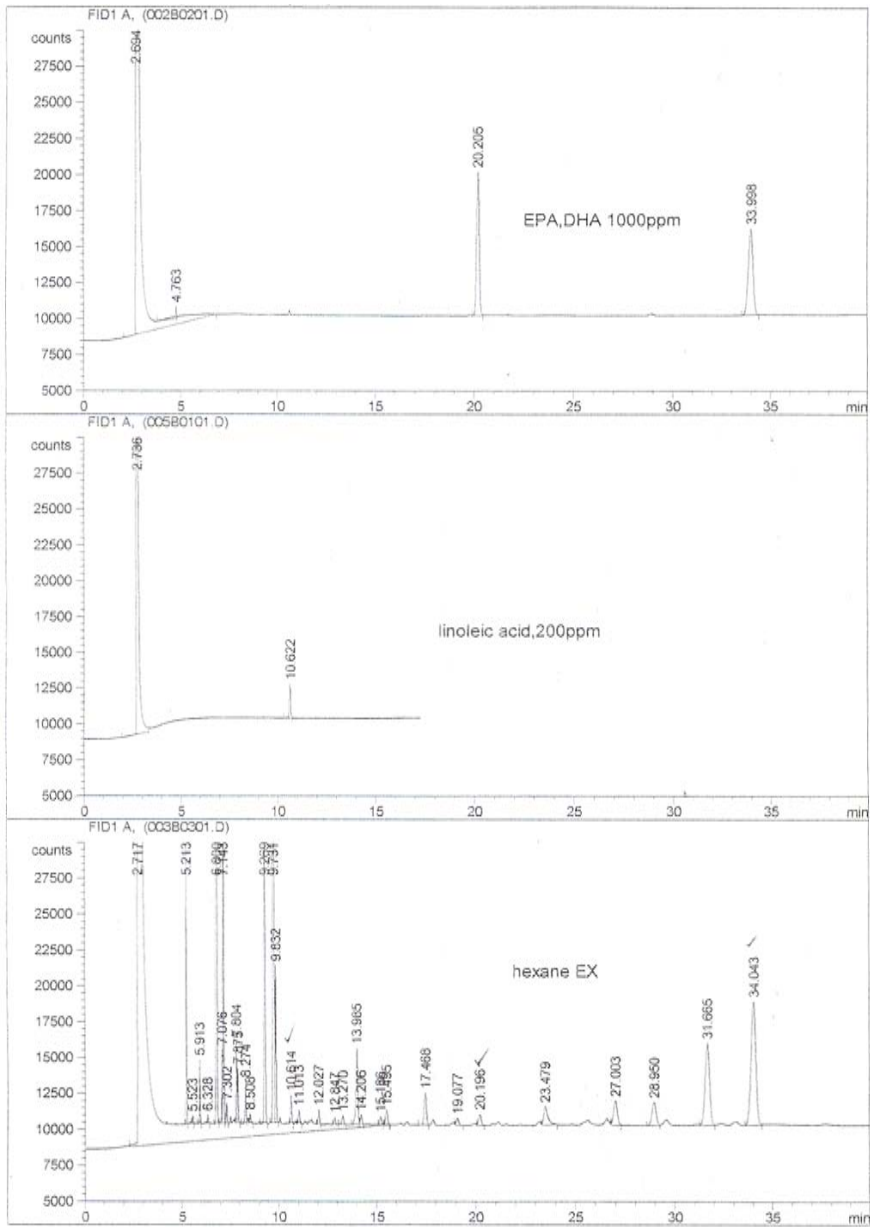


Fig. 12. GC chromatogram for the EPA, DHA and linoleic acid of puffer liver oil.

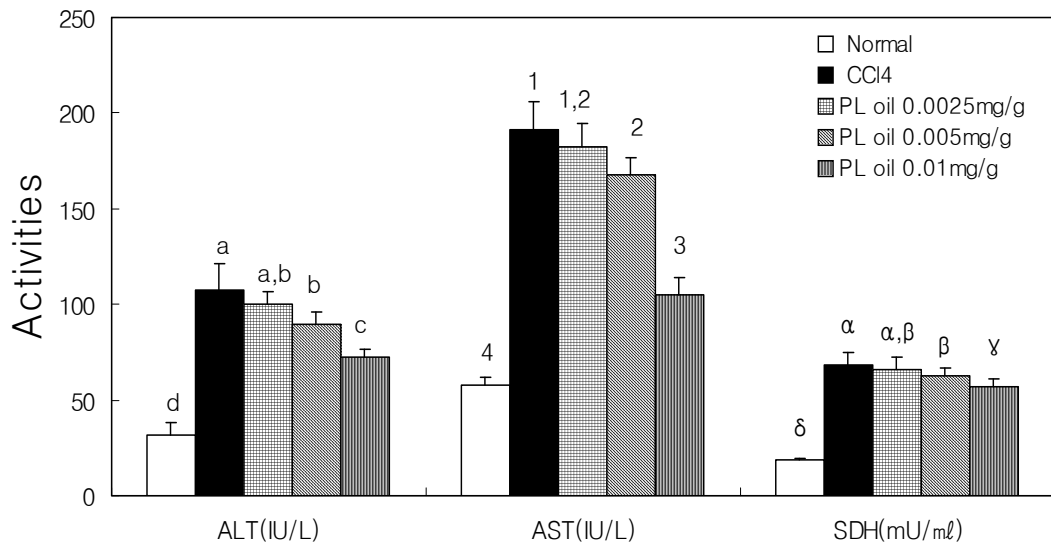


Fig. 13. Effect of pretreatment of pufferfish liver oil(PLO) on the serum aminotransferase(ALT, AST) and sorbitol dehydrogenase (SDH) in CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis rats. Rats were orally administrated with PLO daily for two weeks and then intraperitoneally injected with CCl<sub>4</sub>. Rats were decapitated at 24 hrs after the last injection of CCl<sub>4</sub>. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. for 8 rats. Bars with different superscript letter are significant by Duncan's new multiple range test ( $p < 0.05$ ).

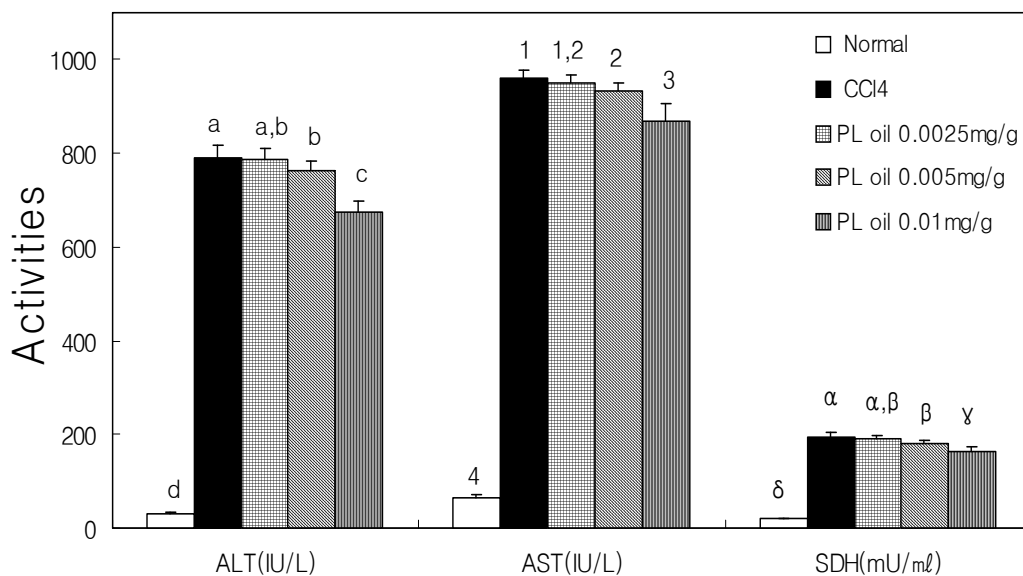


Fig. 14. Effect of pretreatment of pufferfish liver oil(PLO) on the serum aminotransferase(ALT, AST) and sorbitol dehydrogenase (SDH) in D-galactosamine induced hepatitis rats. Rats were orally administrated with PLO for two weeks and then intraperitoneally injected with D-galactosamine (GaIN). Rats were decapitated at 24 hrs after the last injection of D-galactosamine. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. for 8 rats. Bars with different superscript letter are significant by Duncan's new multiple range test ( $p < 0.05$ ).

아미노당인 D-galactosamine은 galactose의 대사 장애를 통한 UTP, UDP 및 UMP 등의 농도 감소로 RNA의 합성이 저해되어 지질의 축적을 유도하고<sup>40,41)</sup>, 또한 세포막 성분인 탄소화물의 조성과 세포내 Ca<sup>++</sup> 농도를 변화시켜 간조직의 손상을 유발한다고 알려져 있다<sup>42,43)</sup>. 그리고 galactosamine의 급성 중독시에는 간괴사, 만성 중독의 경우 간경변과 세포성 종양이 일어나게 된다<sup>44-46)</sup>. 이에 본 실험의 결과 복어 간유의 전처리가 사염화탄소 및 galactosamine에 의한 간독성을 경감시키는 것으로 사료된다.

#### (다) Poloxamer P-407 유도 고지혈증 및 혈류개선 미치는 영향

Poloxamer P-407(Pluronic F-127, M.W.=12,600)은 계면활성제의 하나로 간에서 HMG-Co A reductase 활성을 증진시키며 상피세포 표면에 존재하며 순환하고 있는 혈중 triglyceride의 가수 분해에 관여하는 효소인 lipoprotein lipase를 강력히 억제함으로써 흰쥐에서 고 cholesterol 혈증이나 고지혈증을 야기 시키므로 화학적 증진 효과를 측정하고 새로운 실험 model로서 기존의 방법에 비해 고지혈증 발생기전을 검토하는데 유리한 장점을 가지고 있다. 이에 본 연구에서는 복어 간유를 2주간 용량별로 투여하고서 poloxamer P-407로 고지혈증이 유도된 흰쥐에서 혈중 지질성분 및 혈류개선에 미치는 영향을 관찰한 성적이 Table 15, 16, 17이다. 혈청 중 중성지방의 함량은 정상군에 비하여 poloxamer P-407의 투여로 약 12배정도 증가되었으며 복어간유를 용량별로 투여한 군에서는 용량 의존적으로 현저히 감소되었고, total cholesterol의 함량도 poloxamer P-407의 투여로 현저히 증가되었으며 복어 간유의 전처리로 유의성 있게 감소하였다. 한편 혈류개선에 대한 효과를 검색하였던 바 poloxamer P-407의 처리에 의하여 정상 동물보다 현저히 감소되던 bleeding time이 복어 간유를 용량별로 2주일 동안 투여한 결과 정상수준에는 미치지 못하나 bleeding time이 연장되었으며, poloxamer P-407의 투여군에서는 정상군에 비해 혈장의 지혈시간이 현저히 단축된다.

Table 15. Effect of pufferfish liver oil(PLO) on the serum lipid levels in poloxamer P-407 injected rats

Treatment	Dose (ml/g)	Triglyceride	T-Chloesterol
		(mg/dl)	
Normal		73.8± 7.37 <sup>c,1,2)</sup>	66.9 ± 5.25 <sup>c</sup>
Poloxamer P-407		951.2 ± 51.0 <sup>a</sup>	763.6 ± 48.8 <sup>a,b</sup>
PLO	0.0025	937.9 ± 36.1 <sup>a</sup>	766.4 ± 32.4 <sup>a</sup>
	0.005	792.4 ± 52.7 <sup>b</sup>	720.1 ± 22.0 <sup>a,b</sup>
	0.01	746.3 ± 55.5 <sup>b</sup>	711.7 ± 19.2 <sup>b</sup>

The assay procedure was described in the experimental methods.

<sup>1)</sup>Values represent mean ± S.D.(n=8).

<sup>2)</sup>Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 16. Effect of pufferfish liver oil(PLO) on bleeding time in poloxamer P-407-induced hyperlipidemic rats.

Treatment	Dose (ml/g)	Bleeding time (Sec)
Normal		271.8 ± 17.1 <sup>a,1,2)</sup>
Poloxamer P-407		117.0 ± 14.6 <sup>c</sup>
PLO	0.0025	114.6 ± 12.3 <sup>c</sup>
	0.005	161.7 ± 15.8 <sup>b</sup>
	0.01	178.0 ± 11.7 <sup>b</sup>

The assay procedure was described in the experimental methods.

<sup>1)</sup>Values represent mean ± S.D.(n=8).

<sup>2)</sup>Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 17. Effect of pufferfish liver oil(PLO) on plasma clotting time in poloxamer P-407-induced hyperlipidemic rats

Treatment	Dose	Clotting time
	(ml/g)	(Sec)
Normal		240.0 ± 17.1 <sup>a,1,2)</sup>
Poloxamer P-407		129.4 ± 14.4 <sup>c</sup>
PLO	0.0025	134.3 ± 13.1 <sup>c</sup>
	0.005	175.5 ± 12.2 <sup>b</sup>
	0.01	183.8 ± 7.61 <sup>b</sup>

The assay procedure was described in the experimental methods.

<sup>1)</sup>Values represent mean ± S.D.(n=8).

<sup>2)</sup>Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

던 것이 복어 간유를 용량별로 전처리하고 poloxamer P-407의 투여함으로써 poloxamer P-407의 투여로 현저히 단축되던 plasma clotting time이 복어 간유의 투여로 현저히 증가되었다. 고지혈증은 동맥경화증의 지수로서 소장에서 중성지질의 합성과 chylomicron의 분비증가, 간장에서 중성지방의 합성 증가, VLDL, LDL-Cholesterol 합성 및 분비증가, HDL-Cholesterol의 합성 감소 및 lipase의 활성 감소로 인한 말초조직에서의 중성지방의 제거 감소에 기인한 것으로<sup>47~49)</sup> 본 실험에서는 poloxamer P-407로 고지혈증을 유도된 흰쥐에서 중성지질 및 total cholesterol 혈중 함량이 현저히 증가되던 것이 복어 간유의 전처리로 현저히 감소되었다. 내외인성 요인에 의하여 생성된 친전자성 물질을 포함하는 free radical<sup>51,52)</sup>에 의한 지질의 과산화 반응은 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화 현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리 현상을 초래하는 것으로 알려져 있으며 해독기구의 작용으로 무독화된다<sup>28,29)</sup>고 한다. 최근 콜레스테롤의 과잉섭취로 인해 일어나는 cholesterol-induced endothelial dysfunction의 기전에 대한 연구결과가 활발하게 보고되고 있다. 그 중 특히 LDL의 산화적 변형이 중요한 역할을 하는 것으로 인정되고 있다.<sup>56~60)</sup> LDL이 혈액중에 고농도상태로 체류하게 되면 혈소판의 응집능을 증가시키며 혈관벽을 손상시키는 거품세포(foam cell) 형성을 자극한다. 따라서 LDL의 산화가 활발하게 진행되고 있는 혈관계에서는 동맥경화의 유발 가능성이 아주 높다. 동맥 경화의 초기단계 병변(lesion)에서 보여지는 lipid-laden foam cell은 과잉의 LDL에서부터 유도된 monocyte 또는 macrophage의 변형에 의해 형성된다. 각 조직의 LDL receptor를 통해 조직으로 들어간 LDL은 lysosome효소에 의해 분해된 후 조직의 콜레스테롤 수요를 충족시키는데 이용되기 때문에 거품세포(foam cell)를 형성하지 않지만, 세포내의 콜레스테롤이 일단 충분한 수준으로 충족되면 LDL receptor는 이에 의해 feedback 저해를 받게 된다. 따라서 세포내 LDL receptor 합성이 감소되어 조직세포가 더 이상 LDL을 수용할 수 없게 되며, 그 결과 혈액내 남아 있는 잉여의 LDL들은 화학적 변형을 받아 거품세포(foam cell) 형성에 기여하게 된다. LDL이 산화적 변형을 거치는 과정에서 생물학적 활성을 지닌 많은 분자들이 만들어지는데 lipoperoxides, isoprostanes,



aldehydes와 같은 화합물들이 바로 그러한 분자들이다. LDL의 산화는 lipid peroxide와 oxygen free radical을 증가시키고 이들 분자들은 endothelial cell에 독성을 미치며, 산화된 LDL은 혈관벽에 쉽게 부착되어 혈관세포를 손상시켜 혈관조직을 변형시킴과 동시에 변형된 세포의 분열을 촉진시켜 주변의 산화 LDL, 혈소판 및 macrophage가 혈관벽에 더 쉽게 부착되도록 돕는다고 알려져 있다. 한편 지혈(hemostasis)은 손상된 혈관으로부터 출혈을 막기 위한 일련의 생화학적 반응이다. 과출혈을 극소화시키고, 원하지 않는 혈전생성(thrombosis)를 최소화하기 위해 복잡한 활성화 반응계와 저해 반응계가 서로 어울려 국소적인 지혈이 신속하게 일어난다. 이러한 여러 반응들을 즉각적이며 국부적이고, 순환혈액의 유동성이 유지되면서 진행한다. 혈장응고의 개시반응은 이중표면 또는 활성화표면에 의한 factor XII (Hageman factor)의 활성화로 시작되는 내인계 경로(intrinsic pathway)와 조직인자(Tissue factor, tissue thromboplastin)에 의한 factor VII의 활성화로 시작되는 외인계 경로(extrinsic pathway)로 구성된다. Tissue factor(TF)는 혈관내피세포에 주로 존재하는 lipoprotein으로서 정상적인 상태에서는 세포외막과 혈장 내에 소량 존재하다가 감염이나 다른 병적인 상태에서 세포외막의 TF가 증가되고, 이 때 TF가 혈액에 노출되면 외인계나 내인계의 단계적인 혈액응고반응이 시작되어 혈액이 응고되는데 이 혈액응고 촉진작용은 혈관 손상시의 지혈반응에는 필수적이지만 심근경색, 암, 그 외 기타 혈액응고에 의한 질병시에 그 혈액응고를 촉진시키는 것으로 알려져 있다<sup>61-63</sup>). 이에 본 실험의 결과 복어 간유가 poloxamer P-407로 고지혈증이 유도된 흰쥐에서 혈중 지질성분 및 혈류개선에 효과가 있는 것으로 사료된다.

## (2) 평활근세포의 증식에 대한 복어 간유(PLO)의 효과

### (가) 평활근세포의 증식 영향

먼저 평활근세포의 증식에 있어서 PLO가 세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 실험을 행하였다. 10% FBS (fetal bovine serum)를 포함한 배지에서 증식시킨 평활근 세포에 EPA를 처리한 후, MTT assay, DNA 합성

및 apoptosis assay를 실시하였다. MTT assay는 살아있는 세포내 미토콘드리아 탈수소효소가 MTT를 환원시키며 생성한 formazan의 흡광도를 측정하는 방법으로 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하며, Fig. 15에 나타낸 바와 같이 고농도의 PLO를 처리함에 따라 흡광도의 수치는 감소하였으며, 이는 PLO의 처리에 따라 평활근세포의 증식능력이 저해됨을 나타낸다. 다음으로 평활근세포의 증식능을 측정하는 또 다른 척도로서 DNA 합성능력을 측정하였다. DNA염기서열 중 한 성분인 thymidine을 방사선 동위원소로 labling한 후, PLO를 처리하여 liquid scintillation counter로 방사선함량을 측정, DNA합성량을 정량 하였고, 그 결과 thymidine 함량은 PLO를 처리하지 않은 control군에 비교하여, PLO 처리 후, 50%정도 감소하였다(Fig. 16). 이들 결과는 PLO의 처리가 평활근 세포의 증식을 억제한다는 증거를 제시하고 있으며, 그에 대한 세포생물학적인 작용기작을 다음 실험에서 나타내었다.

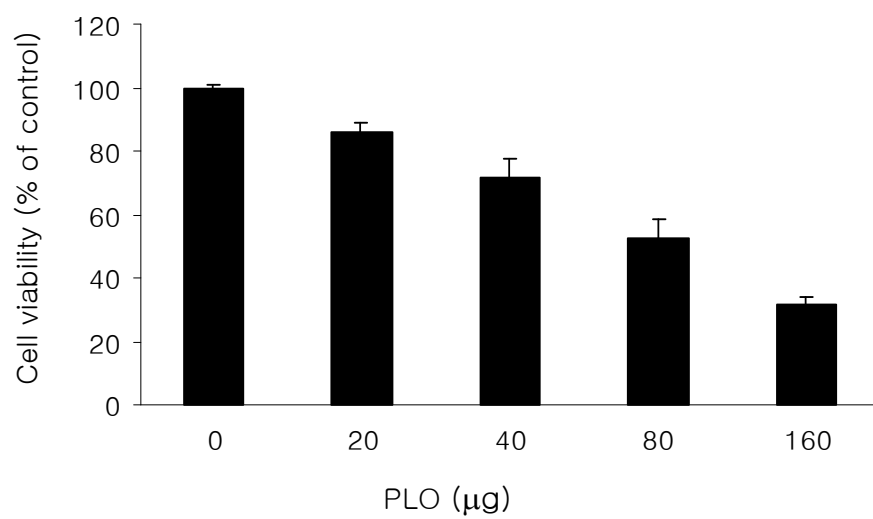


Fig. 15. Viability of VSMC after treatment with PLO. Subconfluent, exponentially growing VSMC in 24-well plates were incubated with PLO for the indicated times. Cell viability was determined by a modified MTT assay.

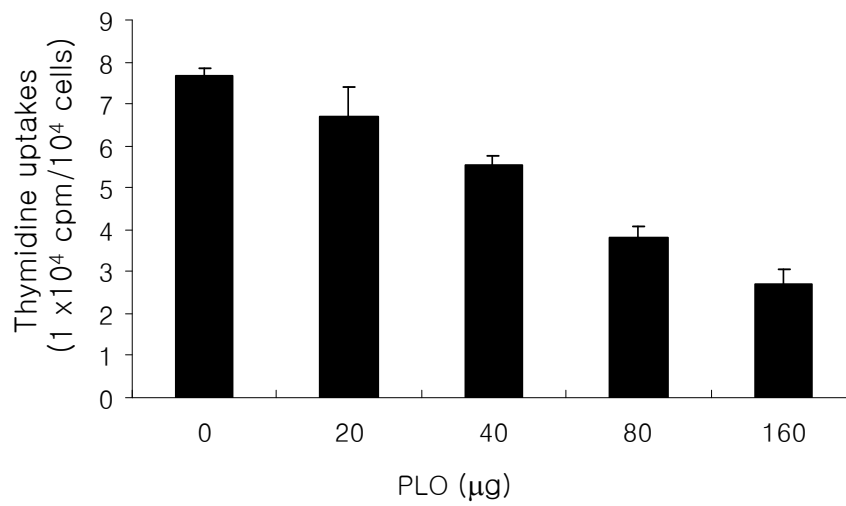


Fig. 16. Effects of PLO on DNA synthesis. Measurement of DNA replication by thymidine uptake as a marker for cell proliferation.

(나) PLO처리에 따른 평활근세포의 apoptosis유도

PLO의 처리가 평활근세포의 apoptosis를 유도하는지를 확인하기 위하여 cytoplasmic histone-associated DNA fragments의 양을 정량적으로 평가하여 apoptosis 생성유무를 나타내는 cell death ELISA kit를 사용하였다. Fig. 17에 나타낸 바와 같이 고농도의 PLO를 처리함에 따라서 cytoplasmic DNA-histone complex의 양은 PLO를 처리하지 않은 control 에 비교하였을 때, 60% 이상 증가되었으며, 이 결과는 PLO가 평활근 세포의 증식에 있어서 명확한 apoptotic 효과를 나타내고 있음을 증명하고 있다.

(다) 평활근세포의 증식에 있어서 PLO처리에 의한 G1 cell cycle arrest

PLO처리에 의한 평활근세포의 증식능력억제 작용기작을 밝히기 위하여, G1 cell cycle의 주요 성분인 cyclinD1, cyclinE, cdk2와 cdk4의 단백질발현정도를 western blot실험으로 평가하였으며, PLO처리 후 24시간 이내에 농도 의존적으로 G1 cell cycle 성분인 cyclinD1, cyclinE, cdk2와 cdk4의 단백질발현은 점차적으로 감소하였다(Fig. 18).

대부분의 세포의 경우, cell cycle 전이를 위해서는 cyclin-cdk 복합체를 형성하여 분열을 행하고, 이들 성분은 인산화 활성이 필요하다. 따라서 PLO 처리에 의해서 cdk-associated 인산화 활성이 억제되는가에 대한 실험을 행하였다. Cell lysates에서 anti-cdk항체를 이용하여, cdk 복합체가 면역침강 되었고, 면역침강된 단백질에 대하여 RB protein과 histone H1을 기질로 사용하여 cdk-associated 인산화활성을 측정하였다. Fig. 19에서 보는 바와 같이, PLO처리는 cyclinD1, cyclinE, cdk2, cdk4에 대한 인산화 활성을 농도 의존적으로 억제시켰다.

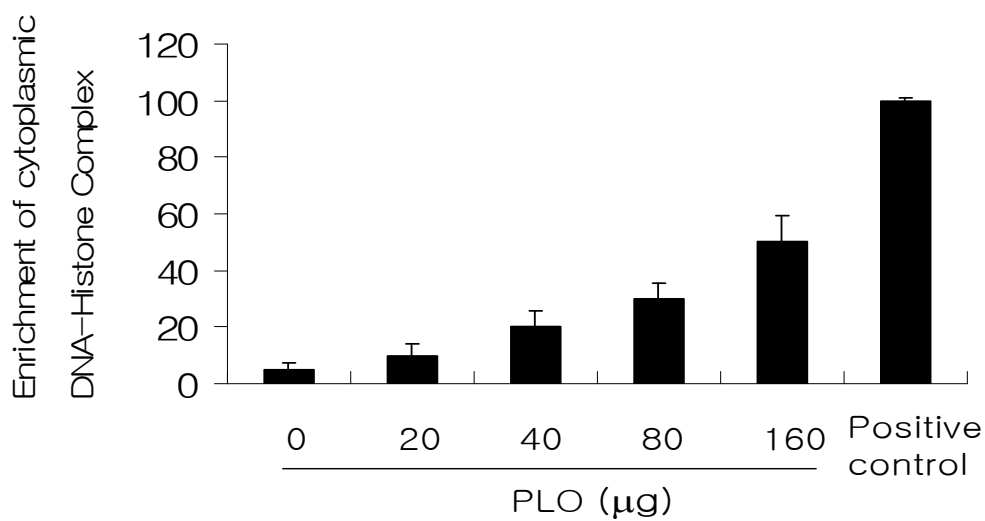


Fig. 17. Detection of apoptosis in VSMC treated with PLO. Subconfluent, exponentially growing VSMC in 24-well plates were incubated with PLO for the indicated times. Apoptosis was determined by cell death ELISA kit. Results from representative experiments were normalized to commercially distributed material as positive control.

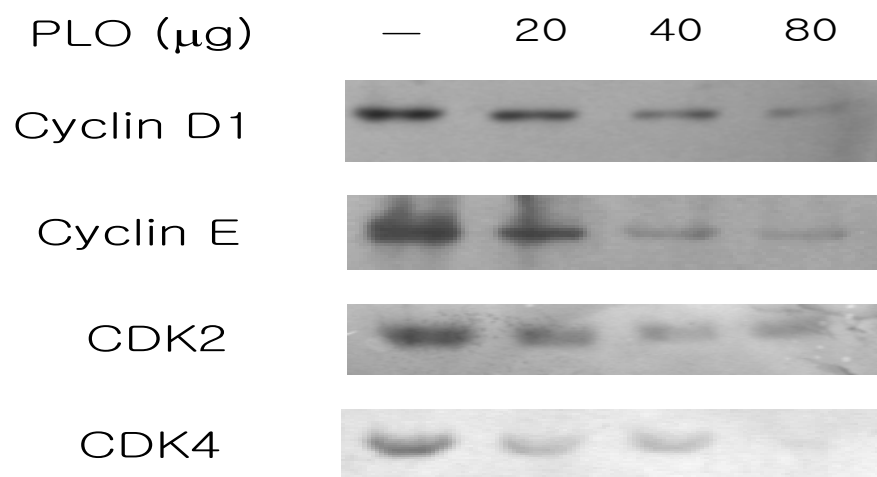


Fig. 18. Effect of PLO on G1 cell-cycle regulator cyclin D1, cyclin E, cdk2, and cdk4. Subconfluent, exponentially growing VSMC in 100mm plates were incubated with PLO and western blot analysis was performed with antibodies specific for cyclin D1, cyclin E, CDK2, and CDK4.

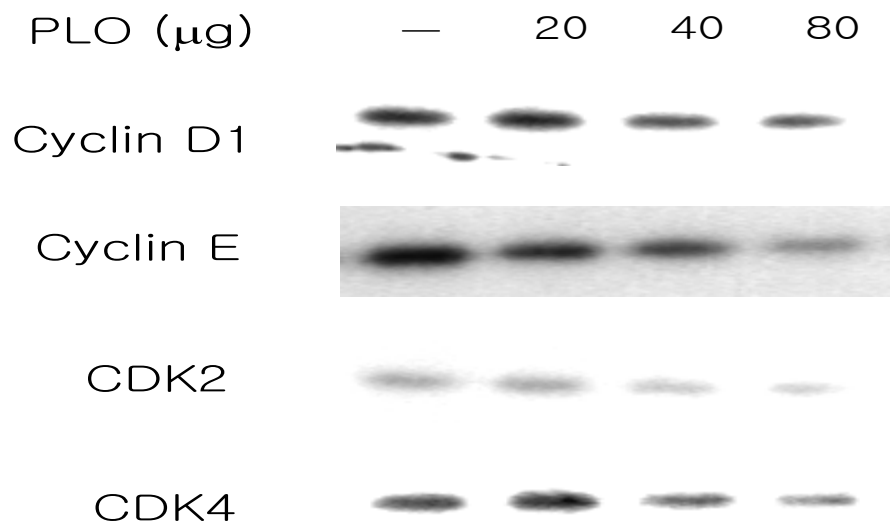


Fig. 19. Effect of PLO on cyclinD1, cyclinE, cdk2 and cdk4 activities. Subconfluent, exponentially growing VSMC in 100mm plates were incubated with PLO at 24 h and then harvested. Total cell lysates were then immunoprecipitated with anti-cyclinD1, anti-cyclinE, anti-CDK2 and anti-CDK4 antibodies. The kinase reaction was performed using histone H1 (for CDK2) or GST-Rb (for CDK4) as substrate.



(라) PLO에 의하여 유도된 G1 cell cycle arrest에 있어서 p21의 영향

p21과 p27은 G1 cell cycle arrest에 관련한다고 알려져 있는 negative regulator이다<sup>25,64</sup>. 위의 실험결과, PLO가 평활근세포의 증식에 있어서 G1 cell cycle arrest를 유도하므로, 우리는 p21과 p27이 PLO에 의해 유도된 G1 cell cycle arrest에 관련이 있는지 조사하였다. Fig. 20에 나타낸 것과 같이, PLO 처리하여 24시간 후의 Western blot 결과는 PLO를 처리하지 않은 control군과 비교하여 명확한 p21단백질의 증가를 나타내었다. 그러나, 같은 실험조건에서 p27의 단백질발현은 증가하지 않았다. 결론적으로, PLO는 평활근세포의 증식을 억제하고, apoptosis를 유도하였으며, 세포주기조절인자 p21이 cyclinD1/cdk4와 cyclinE/cdk2의 복합체에 결합하여 인산화활성을 억제하는 작용기작이 관련되어 있음을 시사하고 있다.

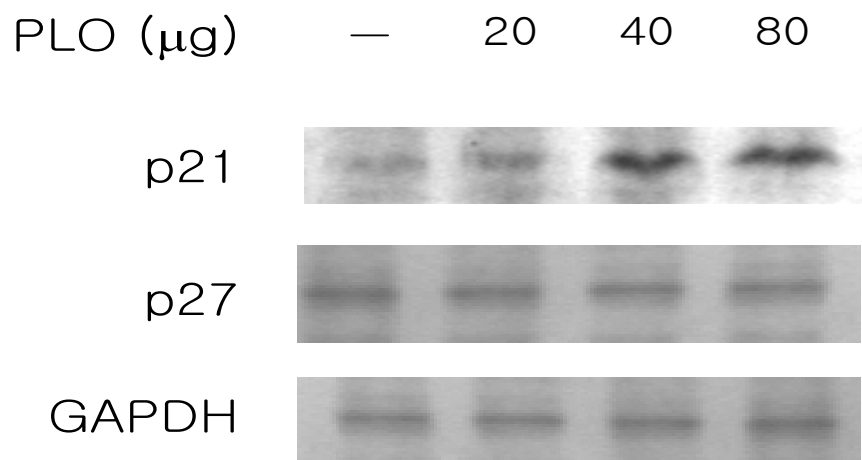


Fig. 20. The p21 induction on treatment of PLO in VSMC. Subconfluent, exponentially growing VSMC in 100mm plates were incubated with PLO at 24 hr and then harvested. The cell lysates were immunoblotted with antibodies specific for p21 and p27. Results from representative experiments were normalized to GAPDH expression.

## 라.복어 간유구의 대량생산

### (1) 소비자 기호도 및 시장조사

소비자 기호도 가운데 가장 염려하고 있는 부분은 복어독이 완전한 제독되었는가 하는 점과 어떤 생리활성을 지니고 있는가 하는 점이였다. 그리고 그러한 결과는 공인된 연구기관에서 수행한 결과인가 하는 점이였다. 따라서 복어 간유의 독성검사는 국가공인기관인 한국화학연구소에 의뢰하여 실시하였으며, 주요한 생리활성 시험은 경성대학교 약학과와 동국대학 한의과대학과 공동으로 수행하였다. 그 결과는 앞에서 이미 서술한 바와 같다.

한편, 시료어로 사용된 검은 밀복의 간장 부위의 독성은 무독이었으며, 제독처리에 대한 안전성을 더욱 확립하기 위하여 알칼리 열수처리에 의하여 제독처리 과정을 거쳤다. 또한 복어 간유의 정제 과정 중에 알칼리 조건인 과잉의 수산화나트륨을 사용하며, 탈취 공정 중에 180℃에서 1시간 감압 수증기 가열법을 시행하여 독소가 충분히 제거되도록 하였다.

### (2) 제품생산 및 판로개척

정제 복어 간유를 제조하기 위한 최적화 방법을 검토한 결과, 현재까지 얻은 효율성이 높은 방법 중의 하나는 다음과 같다. 즉, crude oil은 복어 간장을 3.0 kg 취하고 1% NaOH/증류수를 2.0 liter 가하여 water bath 상에서 60℃ 부근에서 중탕하여 여포로 압착하면 약 1,200 ml의 crude oil을 얻을 수 있었다. 이 때 crude oil는 pH 4.5, AV 15.37의 값을 나타내었다. 다음에 정제 단계에 들어가는데, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>을 crude oil의 0.3%되게 첨가하여 20분간 혼합하여 탈검하였다. 이 때 crude oil은 AV 21.94의 값을 나타내었다. 탈산과정은 유지의 무게를 측정하여 40℃로 가온한 후, 20% NaOH를 첨가하여 20분간 혼합하고 포화식염수를 5% 첨가하여 혼합한 후, 40℃ water bath 상에서 30분간 교반한 후, 원심분리(5,000 rpm x 15분)하여 상층액을 분리하였다. 탈색은 유지 무게를 측정한 후, 60℃로 가온하여 산성백토 2%, 활성탄을 0.5% 첨가한 후, 60℃ 감압하에서 20분간

처리하여 감압여과하여 약 800 ml의 탈색유를 얻을 수 있었다. 이 탈색유의 pH는 4.5, AV값은 0.26이었다. 탈취 공정은 감압수증기증류 장치에 의하여 어유 특유의 냄새를 제거하였다. 정제 단계별로 최적 조건을 구하여 시료량 3~4kg을 처리할 수 있는 소규모의 제조공정 조건을 선정하여 그 회수율을 구하고 생산성을 검토하였다. 그 예로서 복어 간장 3 kg에 물을 2.0 liter 첨가하여 조간유(crude liver oil)를 1168 ml 얻을 수 있었다. 이때 조간유의 AV 및 pH는 각각 15.37 및 4.5이었다. 조간유의 정제과정에 있어 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 전체량의 0.3%되게 첨가하여 20분간 혼합하여 탈검하였다. 탈검후 AV는 21.94이었다. 탈산은 20% NaOH를 AV로부터 산출하여 125.8 ml를 가하고, 여기에 포화식염수를 전체의 5%되게 가하여 혼합한 후, 원심분리하고, 상층액에 다시 열수 250 ml를 첨가하고 포화식염수 100 ml로 수세하여 원심분리하였다. 탈색은 백토 2%(18 g), 활성탄 0.5%(4.5 g)를 첨가한 후 110℃에서 30분간 감압농축하여 여과하였다. 이 때 AV 및 pH는 각각 0.26 및 4.5이었으며, 탈색유 805 ml를 얻을 수 있었다. 조간유로부터 탈색유 생산까지의 회수율은 약 68.9%이었다. 탈취공정은 감압수증기증류장치하에서 4 torr 이하로 펌프(E)를 이용하여 감압하고 mentle로써 180℃ 부근의 온도까지 가온하여 1시간 동안 탈취공정을 실시하였다. 탈취 후에는 질소가스를 주입하여 탈취 후의 간유는 식용 플라스틱 용기에 넣어 -15℃의 냉동고 내에서 보관하여 두고 캡슐 제조용 원료로 사용하였다. 또한 제품(Fig. 21)의 판로개척을 위하여 현재 적당한 기술이전 업체를 물색 중에 있다.



Fig. 21. Photograph of the soft-capsule products of PLO.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 본 과제에서 수행한 연도별 연구개발 목표 및 평가 착안점에 따른 달성도는 아래와 같다.

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 점	달성도(%)
1차년도 (2001년)	원료 신선도 확립	100
	간유 추출 기술성	100
	정제기술의 실효성	100
	건강보조식품의 안전성	100
2차년도 (2002년)	건강 보조식품의 안정성	100
	간유 활용기술의 실효성	100
	제품 안정성 평가	100
최종평가	간유 추출기술의 효율성	100
	정제기술의 실효성	100
	간유 활용기술의 실효성	100

2. 본 과제의 수행을 통한 관련분야 발전에의 기여도는 어유 및 어간유 추출 및 정제 기술을 축적한 점과 다양한 수산자원을 이용하여 새로운 고부가가치성 건강보조식품의 산업적 생산 가능성을 제시하였다는 점이라 할 수 있다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 과제가 완료됨에 따라 예상되는 활용 계획은 다음과 같다.

- 수산자원의 부가가치 증대와 수산가공부산물 자원의 이용 극대화
- 어유정제 산업의 발전 및 어유 수입대체 효과
- 어유정제 산업으로 연안 어민의 고용기회 부여
- 복어 간유의 특수 생의학적인 기능 구명
- 건강보조식품 개발로 국민건강 증진에 기여
- 수산벤처 산업체 설립을 위한 기술 자료로 활용

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근, 해외에서도 어유의 생리활성 기능에 관한 연구는 매우 활발하다. 특히, Lees, R.S. 와 Karel M.이 저술한 “건강과 질병에 관한 Omega-3 지방산, Marcel Dekker, Inc. 1990”과 Lands W.E. 가 저술한 “어류와 인간의 건강, Academic press. Inc. 1986”에는 어유 중의 고도불포화지방산 특히 DHA 및 EPA에 대한 생리활성에 관하여 많은 연구 결과들이 소개되어 있다.

또한, 복어에 주로 분포되어 있는 복어독, 즉 tetrodotoxin은 해양생물 독이며 일본에서 많이 연구되고 실정이다. 최근에 와서는 복어이외에도 불가사리, 게, 권패류, 편형동물 및 해양미생물에서도 널리 존재하는 것으로 알려지고 있다.

한편, DHA 및 EPA에 관한 연구는 미국, 유럽 및 일본 등에서는 그 연구가 매우 활발하다. 특히 식품 및 제약산업 분야에서 천연 트리글리세라이드 형태의  $\omega$ -3계 지방산의 상품화가 요구되어 왔다. 분자증류법과 용매 결정화법에 의하여 어유로부터 직접 30%까지의 EPA 와 DHA를 함유하는 트리글리세라이드를 조제하는 것에 대한 보고가 있으며, 개별적 지방산 또는 에스테르 분획은 초임계 액체 추출법, urea 복합법, 크로마토그래피법, 분자증류법 등 여러가지 방법에 의하여 EPA+DHA 수준을 65-80%까지 가능하게 하였으며, HPLC법과 화학적 수식법에 의하여 EPA 와 DHA 수준을 90%이상으로 할 수 있다는 등, 어유 중의 EPA 및 DHA의 정제와 이용에 관한 많은 연구가 보고되어 있다.



## 제 7 장 참고문헌

1. 이용호 등. 1977. 한국수산학회지, 10(1), 1 - 9.
2. 정보영. 1993 한국수산학회지, 26(6), 529 - 537.
3. Narita H, Matsubara S, Miwa N, Akahane S, Murakami M, Goto T, Nara M, Noguchi T, Saito T, Shida Y, Hashimoto K. 1987, *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 617-621.
4. Narita H, Noguchi T, Maruyama J, Ueda Y, Hashimoto K, Watanabe Y, Hida K. 1981, Occurrence of tetrodotoxin in a trumpet shell, "boshubora" *Charonia sauliae*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47 : 935-941.
5. Noguchi T, Narita H, Maruyama J, Hashimoto K. 1982, Tetrodotoxin in the starfish *Astropecten polyacanthus*, in association with toxification of a trumpet shell, "boshubora" *Charonia sauliae*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48 : 1173-1177.
6. 이강호 등. 1988. 한국수산학회지, 21(4), 225~231.
7. 김동수 등. 1983. 한국식품과학회지, 15(2), 164~169.
8. 김동수 등. 1991. 한국식품영양과학회지, 20(3), 225~232
9. Ackman RG, and Rathnayake WMN. 1987. In "Proc. of Massachusetts Inst. of Technol. , Sea Grant Lecture Series. "Oct. , Marcel Dekker Inc. , New York, NY. In press.
10. Tokiwa. S, Kamazawa A, Teshima, S. 1981. Preparation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by reversed phase high performance liquid chromatography. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47(5) : 675.
11. Wright SW, Kuo EY, Corey EJ. 1987. An effective process for the isolation of docosahexaenoic acid in quantity from cod liver oil. *J. Org. Chem.* 52(19) : 4399.

12. Stout VF, 1988. Synthesis of fish oil triglycerides highly enriched with omega-3 triglycerides. A paper presented at the 79th Annual Meeting of the American oil Chemist's Society, May 8-12, Phoenix, Arizona [abstract: J. Am. Oil Chem. Soc. 65(4) : 499].
13. Sonntag NOV, 1982. Fat splitting, esterification and interesterification. "Bailey's Industrial Oil and Fat Products." (Ed.) Swern, D. , p. 97. Wiley Interscience, New York, NY.
14. 식품공전. 2002. 식품의약품안전청.
15. Bligh EG, Dyer WJ. 1959. Can. J. Biochem. physiol. , 37, 911
16. Rouser G, Kritchevsky, G, Yamamoto A. 1967. Lipid chromatographic analysis, ed. by Marinetti, CV. , Vol. 1, p. 99, Dekker, New York.
17. 의약품등의 독성시험 기준 해설서. 1999. 식품의약품안전청.
18. Hennekens CH, Buring JE, Mayrent SL. 1990. Clinical and epidemiological data on the effects of fish oil in cardiovascular disease. *Omega-3 fatty acids in health and disease*. Marcel Dekker, New York 71-85. .
19. Shimizu CT, Matsui H, Sato H. 1984. Pufferfish toxin. *Mar Sci Mon* 16(10): 560-565.
20. Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.
21. Clowes A, Schwartz S. 1985. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 56: 139-145.
22. Clowes AW, Reidy MA, and Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. *Lab Invest* 49: 327-333, 1983.
23. Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274, pp. 1672-1677.
24. Sherr CJ. 1994 G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, pp. 551-555.
25. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, pp. 701-704.

26. Bang H. O., Dyerberg and H. M. Sinclair. 1980. The composition of the Eskimo food in North western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 2657-2661.
27. Herold P. M. and J. E. Kinsella. 1986. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease; A comparison of finding from animal and human feeding trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 107, 890-894.
28. Kinsella, J. E. 1987. Seafoods and fish oil in human health and disease, Marcel Dekker, *New York*. Pp.175-184.
29. Frenkel R, Byore A, Medszaros J, Szeberenyi S. 1980. A study of enzyme inducing effect of physical exercise in man. *J Sports Med* 20: 371.
30. Han YN, Baik SK, Kim TH, Han BH. 1987. Antithrombotic activities of saponins from *Ilex pubescens*. *Arch Pharm Res* 10: 115.
31. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 58-61.
32. Wiesner IS, Rawnsley HM, Brooks FP, Senior JR. 1965. Sorbitol dehydrogenase in the diagnosis of liver disease. *Am J Dig Dis* 10: 147.
33. Richmond W. 1976. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis. *Clin Chem* 22: 1579-1588.
34. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR. 1985. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 29: 538-542.
35. Moon SK, Thompson LJ, Madamanchi N, Ballinger S, Papaconstantinou J, Horaist C, Runge MS, Patterson C. 2001. Aging, oxidative responses, and proliferative capacity in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jun;280(6):H2779-88.

36. Tsai JC, Jain M, Hsieh CM, Lee WS, Yoshizumi M, Patterson C, Perrella MA, Cooke C, Wang H, Haber E, Schlegel R, Lee ME. 1996. Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* Feb 16;271(7):3667-70.
37. Moon SK, Cho GO, Jung SY, Gal SW, Kwon TK, Lee YC, Madamanchi NR, Kim CH. 2003. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 21;301(4):1069-78.
38. Noll T, Groot H. 1984. The critical steady-state hypoxic conditions in carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Acta* 795: 356-362.
39. Recknagel RO, Glende EA. 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Phar & Ther* 43: 139-154.
40. Decker K, Kepper D. 1973. Galactosamine-induced liver injury. In *"Progress in liver disease"*, Grune & Stratton, New York 14: p 183.
41. Wang J, Wendel A. 1968. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver. *Biochem Pharmacol* 39: 267.
42. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. 1968. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 9: 279-290.
43. Mofty SK, Scrutton MC, Serroni A, Nicolini C, Farber JL. 1975. Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am J Pathol* 79: 579-595.
44. Farber JL, Gill G, Konishi Y. 1973. Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. *Am J Pathol* 72: 53-62.
45. Lesch R, Reutter W, Keppler D, Decker K. 1970. Liver restitution after acute galactosamine hepatitis ; autoradiographic and biochemical studies

- in rats. *Exp Mol Pathol* 12: 58-69.
46. Miller EC, Miller JA. 1972. Hepatocarcinogenesis by chemicals. In *"Progress in liver disease"* Popper, H and Schaffner, F.(eds.), Grune & Stratton, New York 5: 699.
  47. Goldstein JL, Brown MS. 1975. Familial hypercholesterolemia. A genetic regulatory defect in cholesterol metabolism. *Am J Med* 58: 147-150.
  48. Miller NE. 1978. The evidence for the antiatherogenicity of high density lipoprotein in man. *Lipid* 13: 914-919.
  49. Ross R. 1986. The pathogenesis of atherosclerosis, An update. *New Engl J Med* 314: 488-500.
  50. Croci T, Williams GM. 1985. Activities of several phase I and phase II xenobiotics biotransformation enzymes in cultured hepatocytes from male and female rats. *Biochem Pharmacol* 34: 3029-3035.
  51. Beauchamp C, Fridovich I. 1970. A mechanism for the production of ethylene from methional : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 24: 4641-4646.
  52. Simon RH, Scoggin CH, Patterson D. 1981. Hydrogen peroxide causes the fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J Biol Chem* 256: 7181-7186.
  53. Halliwell B. 1978. Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organisms. the key role of superoxide dismutase. *Cell Biol Int Rep* 2: 113-128.
  54. Deneke SM, Fanburg BL. 1980. Normobaric oxygen toxicity of the lung. *New Engl J Med* 303: 76-86.
  55. Freeman BA, Crapo, JD. 1982. Biology of disease : Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
  56. Steinberg D. 1997. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95: 1062-1071.

57. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD. 1990. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 344: 160-162.
58. Earl L, Mangin Jr, Kiyotaka Kugiyama, Judy H. Nguy, Scott A. Kerns, and Philip D. Henry. 1993. Effects of lysolipid and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium-dependent relaxation of rabbit Aorta. *Circulation* 72: 161-166.
59. Bernd C. Simon, Lesile D. Cunningham, and Richard A. Cohen 1990. Oxidized Low Density Lipoproteins Cause Contraction and inhibit Endothelium-dependent Relaxation in the Pig Coronary Artery. *J Clin Invest* 86: 75-79.
60. Sampath Parthasarathy, Stepaen G. Young, Joseph L. Witztum, Ray C. Pittman, and Daniel Steinberg. 1986. Probucol inhibits Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. *J Clin Invest* 77: 641-644.
61. Amlie E, Lyberg T, Kaplun A, Prydz H. 1981. Thromboplastin activity of mouse peritoneal macrophages. *Thrombosis reseach* 24: 61-71.
62. Tanaka H, Andoh K, Narahara N, Uchiyama T, Kubota T, Takada M, Kobayashi N, Maekawa T. 1986. The leukocyte membrane and its contributi on to thrombosis and haemostasis with special reference to tissue factor. *Act a haematol Jap* 49: 1583-1594.
63. Lesnik P, Rouis M, Skarlatos S, Kruth HS, Chapman MJ. 1992. Uptake of exogenous free cholesterol induced upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10370-10374.
64. Toyoshima H, Hunter T. 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity is, related to p21. *Cell* 78, pp. 67-74.