

최 종
연구보고서

양념채소 함유 생체조절성 미량소재의
기능성식품화

Utilization of Bioactive Minor Constituents from
Natural Seasoning Plants

양념채소 함유 항보체 활성물질의 기능성식품 소재화

Utilization of Anti-Complementary Substances from Natural
Seasoning Plants

양념채소 함유 ACE 저해활성물질의 기능성식품 소재화

Utilization of ACE Inhibitory Substances from Natural
Seasoning Plants

양념채소 함유 항혈전 물질의 기능성식품 소재화

Utilization of Anti-Coagulant Substances from Natural
Seasoning Plants

양념채소 함유 미량소재의 기능성식품화

Development of Minor Constituents from Natural Seasoning Plants as
the Functional Food

고 려 대 학 교

(농협대학, (주) 크라운제과)

농 립 부



최종보고서

1999 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 양념채소 함유 생체조질성 미량소개의 기능성식품화에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1999. 10.

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 조 홍 연



주관연구기관장 : 고려대학교 총장

농림부장관 귀하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “양념채소 함유 생체조절성 미량소재의 기능성식품화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10.

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 조 흥 연

연 구 원 : 양 한 철

연 구 원 : 신 등 훈

협동연구기관명 : 농협 대학

협동연구책임자 : 조 원 대

연 구 원 : 홍 성 희

요 약 문

I. 제 목

양념채소 함유 생체조절성 미량소재의 기능성식품화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

농수산물로부터 고부가가치성 물질의 창출은 WTO 체제 출범이후 국내 농수산업을 유지 발전시키는 대안 중의 하나이다. 우리 고유의 자원으로 부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 유기합성에 의한 신규 물질들보다 안전성의 확보가 용이하다. 본 연구그룹이 선정한 양념채소류는 식용작물 중에서 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 많았던 원예작물일 뿐만 아니라 그동안 자주 수요와 공급의 불균형으로 농산물 가격의 등락과 생산 농민의 영농의욕을 떨어뜨림으로써 경제적, 사회적 문제로 대두되기도 하였다. 또한 1차 상품인 양념채소를 고부가가치성 물질로 소재화함으로써 낮은 시장 경쟁성을 높일 수 있고 이는 타 원예작물, 약용작물, 공예작물에도 적용 가능한 모델이기 때문에 농촌경제의 발전을 도모할 수 있다. 따라서 본 연구는 양념채소 함유 미량성분 중 고령화병의 대표적 원인인 면역계와 순환기계에 약리, 생리활성을 갖는 물질을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 기능성식품을 개발함으로써 국내 농림수산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 양념채소 함유 미량성분 중 고령화병의 대표적 원인인 면역계와 순환기계에 악리, 생리활성을 갖는 물질을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 기능성식품을 개발하고자 하였으며 본 연구를 통하여 수행한 연구개발 내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 백리향으로부터 항보체 활성 다당의 추출, 정제, 구조해석 및 소재화를 연구개발 내용으로 하며 항보체 활성다당 핵심구조의 해석이 가능한 수준의 정제와 sarcoma-180을 이용한 *in vivo*계에서의 활성 및 독성검토 등을 연구범위로 함.
- (2) 겨자씨로부터 ACE 저해활성 펩타이드의 분리, 정제펩타이드의 아미노산 서열 결정, 저해양식의 규명 및 소재화에 요구되는 독성실험 등을 연구개발 내용으로 하며 ACE 저해활성 펩타이드의 분리, 펩타이드의 아미노산 서열 결정과 SHR을 사용한 *in vivo*계에서의 활성, 소화기계 효소들에 대한 내성 및 독성의 검토 등을 연구범위로 함.
- (3) 정향으로부터 항응고 활성다당의 분리, 구조규명, 활성양식의 해석 및 소재화 등을 연구개발 내용으로 하며 구조규명 및 활성양식의 해석을 위한 순도 수준의 정제, 구조규명, 구조와 활성간의 상관성 해석 등과 *ex-vivo*, *in vivo*계에서의 활성 확인, 독성검토 등을 연구범위로 함.
- (4) 선정시료 함유 생리활성 성분의 기능성식품화를 연구개발 내용으로 하며 각각의 생리활성물질의 공업적 수준의 추출 및 정제방법 확립, 다양한 형태로의 제품화, 정향소스의 개발 등을 연구범위로 함.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

양념채소 함유 생체조절성 미량성분을 소재화하고 소재의 실용화를 목적으로 수행한 연구개발결과를 요약하면 다음과 같다.

- 전통양념채소 33종, 서양향신료 49종, 건강채소 29종을 극성별 계통적으로 용매 추출 후 총 1,332 획분에 대하여 항보체활성, ACE 저해활성, 항응고 활성을 검색한 결과 각각 백리향, 겨자씨, 정향을 최적시료로 선정하였다.

백리향 함유 항보체 활성다당을 정제하고 구조의 규명과 함께 구조와 활성간의 작용기작을 해석하였으며 실용화를 위한 *in vivo* 실험과 독성검사를 실시한 결과 높은 항암활성 및 무독성 물질임을 확인하였다(특허출원 10-1999-0045065).

겨자씨로부터 추출, 분리한 ACE 저해활성 펩타이드는 Val-Tyr-Tyr-Ala-Leu의 아미노산 서열을 갖는 pentapeptide이었으며 SHR을 사용한 *in vivo* 실험과 장내 소화효소들에 의한 내성 실험에서 각각 높은 활성을 나타내었다(특허출원 10-1999-0045064).

정향 함유 항응고 활성 다당을 정제한 결과 분자량 34 kDa의 rhamnogalacturonan I으로 확인되었고 이 정제다당의 구조와 활성간의 상관성을 규명함과 동시에 *in vivo*와 *ex vivo*의 활성측정계에서 모두 높은 활성을 보였고 독성검사에서도 무독성을 나타내었다(특허출원 10-1999-0045067).

백리향의 항보체활성 다당, 겨자씨의 ACE 저해활성 펩타이드 및 정향의 항응고 활성 다당을 소재화하기 위해 공업적 수준의 추출법과 정제법을 확립하였으며 기능성식품의 대표적 형태로 제품화한 후 각 적성을 검토하였고 정향소스를 개발하였다(특허출원 10-1999-0045066).

SUMMARY

Highly bioactive substances from natural seasoning plants were screened, purified and industrialized as an end-product.

The anti-complementary activities of methanol, and cold- and hot-water extracts from 120 natural seasoning plants were determined. Of those, hot-water extract from thyme (*Thymus vulgaris* L.) exhibited the highest anti-complementary activity (92%). The hot-water extract was fractionated by 35 and 75% ethanol, resulting in its 75%-ethanol precipitate as the high activity fraction (98%). Then, this fraction was ultrafiltered with a more than 300 KDa pore-sized membrane to obtain the active crude material (TV-3). The TV-3 was further purified to TV-3-3-Ib-1 by the order as follows, i) DEAE-Toyopearl 650C, ii) Butyl-Toyopearl 650M, iii) Sepharose CL-6B and iv) HPLC. The molecular weight of the purified polysaccharide was $(1.80 \pm 0.016) \times 10^5$ Da, measured by the size exclusion chromatography-multiple angle light scattering photometry. TV-3-3-Ib-1 showed high anti-complementary activity along with the highest yield. The origin of anti-complementary activity in the purified material appeared to be the moiety of polysaccharide. The structural analysis of TV-3-3-Ib-1 by IR, GC/MS and NMR indicated that it was α -anomeric pectic arabinogalactan which reacted to β -glucosyl Yariv antigen. The amino acids in TV-3-3-Ib-1 might be linked with O-glycosidic linkage to the sugar moiety and the anti-complementary structure was appeared on the side chain arabinogalactan moiety, not on the pectic polysaccharide.

The anti-tumor mechanism of crude polysaccharide from *Thymus vulgaris* L. was also investigated. Neither lethal toxicity nor cytotoxicity was observed in mice and sarcoma-180 with the treatment of TV-3. Moreover, the number of peritoneal cells, PMN and macrophage were significantly increased.

The anti-tumor activity on sarcoma-180 cell was enhanced by TV-3, but the lysosomal phosphatase of macrophage was not activated. Anti-complementary crude fraction, TV-3 showed 50% effective dose (ED_{50}) at the concentration less than 10 mg/kg in the sarcoma-180 solid tumor model. In the complement system, both TV-3 and TV-3-3-Ib-1 activated the complement via alternative pathway as an activator. Based upon these results, the purified polysaccharides appeared to be an immunopotentiator *in vivo*.

To find the angiotensin I - converting enzyme (ACE) inhibitor, total of 285 extracts from 95 natural seasoning plants were screened. Of those, the extract from *Sinapis alba* L. showed the most potent ACE inhibitory activity. Therefore, *Sinapis alba* L was crushed homogeneously and extracted with hexane and water successively. Then, lyophilized water extract was fractionated with H_2O : butanol (1:1). The ACE inhibitory activity was observed in the butanol layer. The purification of the extract was performed by methanol precipitation, Sephadex LH-20 column chromatography, reverse phase HPLC with C18 column, and FPLC with Superdex peptide HQ 10/30 column. The purified compound was shown to be the homogeneity, which was determined by gel filtration using FPLC system. The compound had a molecular weight of approximately 640 Da, with the yield of 0.002%. Also, IC_{50} of the purified ACE inhibitor was 79 μg . ACE inhibitory activity was decreased to 85% after the compound was treated with pronase and the compound competitively inhibited ACE activity, indicating that the purified compound was the peptides. The uterus contraction with the compound suggested that it might be bradykinin agonist. When the toxicity blood pressure was examined with the compound *in vivo*, no toxicity and a decrease in blood pressure were found, which implied this compound as a safe and effective ACE inhibitor.

Anti-coagulant activity was examined in 80 natural seasoning plants. Of those, *Eugenia caryophyllata* Thunb. showed the relatively high anti-coagulant activity. From the bud of *Eugenia caryophyllata* Thunb, EC-2B and EC-2C were obtained in terms of ethanol precipitation, 8% cetyltrimethylammonium bromide and ultrafiltration. Carbohydrate moiety of two fractions seemed to be responsible for the anti-coagulation with a

decrease in the activity by periodate oxidation and no change by pronase digestion. For the further purification, i) DEAE-Toyopearl 650C, Butyl-Toyopearl 650M and Sephadex G-75 were performed with EC-2B and highly anti-coagulant active fraction, EC-2B-IIIa-2, was obtained, and ii) Butyl-Toyopearl 650M, Sephadex G-100 and Sepharose CL-6B were performed with EC-2C and EC-2C-Ia₂ was obtained. According to HPLC and FPLC, EC-2B-IIIa-2 was an anticoagulant polysaccharide (23.2% total sugar, 27.7% uronic acid) with the molecular weight of 34 kDa. Also, it was mainly composed of Rha, GalA, Ara and Gal (mol. %: 21.08, 17.98, 15.92 and 11.87). On the other hand, EC-2C-Ia-2 (91.1% total sugar, 15.3% uronic acid) had the molecular weight of 96 kDa and major constitutional sugars of Ara, Gal, Xyl and Rha (mol. %: 43.31, 23.65, 13.70 and 12.35).

The structural characteristics of two purified anticoagulant polysaccharides were also studied. On IR spectrum, both purified polysaccharides had the adsorption bands at 820 cm⁻¹ and 850 cm⁻¹. The EC-2C-Ia-2, which strongly reacted with β -D-glucosyl-Yariv antigen, prolonged the clotting time for both APTT and TT, while EC-2B-IIIa-2 for APTT. After the acid hydrolysis of both polysaccharides, i) EC-2B-IIIa-2 underwent DEAE-A-25, Bio-gel P-30, endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase and Sephadex G-50 to obtain the anticoagulant active unit (2B-A-IIc-1), and ii) EC-2C-Ia-2 for DEAE-A-25 and Sephadex G-75 to obtain 3 fractions, 2C-A-I-1, 2C-A-I-2 and 2C-A-II. Methylation analysis showed that all 4 fractions were composed mainly of 4-linked GalA, 2-linked Rha, and 2,4-branched Rha, presuming that they might contain the backbone of rhamnogalacturonan-I (RG-I) with the side chain of arabinan and galactan. In addition, arabino-3,6-galactan moiety was observed in only 2C-A-I-1, 2C-A-I-2 and 2C-A-II.

To determine the toxicity of anti-coagulants from *Eugenia caryophyllata* Thunb., EC-2B and EC-2C were orally administered to mice. No significant

changes in body weights, organ weights and blood properties were found compared to the control. However, EC-2C revealed a slight toxicity when it was intravenously injected to mice. Based upon the results of *ex vivo* and *in vivo* tests, both EC-2B and EC-2B appeared to be an anti-thrombosis. In the sensory evaluation, sauces using EC-2B and EC-2C had elevated values.

The bioactive compounds of selected samples, thyme, mustard and clove, were isolated and purified with industrial-level procedure. Namely, extracts of each samples were decolorized with low cost absorbents and purified by ultrafiltration using Millipore masterflex system. Finally, each purified bioactive compounds were formulated as the types of beverage, capsule, granule and tablet. Moreover, anticoagulant polysaccharide from clove was applied to bulgogi sauce for sensory evaluation.

CONTENTS

Presentation

Summary(Korean)

Summary(English)

Contents(English)

Contents(Korean)

Part I. Introduction 1

Chapter 1. The Purpose for Research and Development 1

Chapter 2. The Need for Research and Development : Technical Aspect 1

Chapter 3. The Need for Research and Development : Economic and
Industrial Aspect 5

Chapter 4. The Need for Research and Development : Social and Cultural
Aspect 6

Part II. Utilization of Anti-Complementary Substances from Natural Seasoning
Plants 7

Chapter 1. Introduction 7

Chapter 2. Materials and Methods 9

1. Samples and Reagents 9

2. Experimental Approach 10

A. Extraction of Samples and General Analysis 10

B. Determination of Anti-Complementary Activity 11

C. Fractionation of Anti-Complementary Substance 13

D. Purification of Anti-Complementary Substance 13

E. Determination of Properties in Anti-Complementary Substance 15

G. Structural Analysis 16

H. Toxicity and Anti-Tumorogenesis of Anti-Complementary Substance <i>In vivo</i>	17
Chapter 3. Results and Discussion	19
1. Screening of Anti-Complementary Activities from Natural Seasoning Plants	19
2. Extraction of Crude Polysaccharide from <i>Thymus vulgaris</i> L.	22
3. Purification of Crude Polysaccharide (TV-3)	24
4. Purity of Anti-Complementary Substance and Its Properties	31
5. Structural Characteristics of Purified Polysaccharide	35
6. Toxicity and Anti-cancer effect of Anti-Complementary Substance <i>In vivo</i>	40
7. Anti-cancer effect of Anti-Complementary Substance <i>In vitro</i>	44
Part III. Utilization of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Substances from Natural Seasoning Plants	50
Chapter 1. Introduction	50
Chapter 2. Materials and Methods	54
1. Samples and Reagents	54
2. Experimental Approach	54
3. Determination of ACE Inhibitory Activity	55
4. Determination of Protein Content	59
5. Purification of ACE Inhibitory Substance from <i>Sinapis alba</i> L.	59
6. Determination of ACE Inhibition Pattern	60
7. Uterus Contraction Assay	62
8. Effects of Digestive Enzymes	63
9. Determination of Toxicity in ACE Inhibitory Substance from <i>Sinapis alba</i> L.	63
10. Effects of ACE Inhibitory Substance on Blood Pressure in SHR	63
Chapter 3. Results and Discussion	64
1. Screening of ACE inhibitors	64

2. Extraction conditions of ACE inhibitory materials	64
3. Chemical composition of <i>Sinapis alba</i> L.	64
4. Effect of extraction solvents	64
5. Effect of extraction temperature	71
6. Organic solvent fractionation	71
7. Purification of the active component	75
A. extraction and fractionation of ACE inhibitory materials from <i>Sinapis alba</i> L.	75
B. Methanol precipitation	75
C. Sephadex LH-20 column chromatography	75
D. HPLC	76
E. FPLC	76
8. Identification of the active component	76
A. Pronase digestion of the extract	76
B. Analysis of ACE inhibition pattern	76
C. Molecular weight of the component	80
9. Toxicity of ACE Inhibitory Substance from <i>Sinapis alba</i> L.	84
10. Effects of ACE Inhibitory Substance on Blood Pressure in SHR	87
 Part IV. Utilization of Anti-Coagulating Substances from Natural Seasoning Plants	 89
 Chapter 1. Screening of Anti-Coagulating Substances from Natural Seasoning Plants	 89
1. Introduction	89
2. Materials and Methods	90
A. Samples and Reagents	90
B. General Analysis	90
C. Extraction of Samples	90
D. Determination of Anti-Coagulating Activity	91
E. Preparation of Extracts for 2nd Screening	93
3. Results and Discussion	93
A. Screening of Anti-Coagulants in Intrinsic Pathway	93
B. Screening of Anti-Coagulants in Extrinsic Pathway	94

C. Screening of Anti-Coagulants in Both Pathway	95
D. 2nd Screening	101
Chapter 2. Purification of Anti-Coagulating Substances from <i>Eugenia caryophyllata</i> T.	102
1. Introduction	102
2. Materials and Methods	102
A. Samples and Reagents	103
B. General Analysis and Determination of Sulfur Contents	103
C. Analysis of Constituent Sugar	103
D. Extraction of Anti-Coagulating Substances from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	104
E. Extraction of Anti-Coagulating Substances from <i>Eugenia caryophyllate</i> T. Grown in Holland	105
F. Analysis of Anti-Coagulation Pattern	105
G. Purification of EC-2B	106
E. Purification of EC-2C	107
3. Results and Discussion	109
A. Anti-Coagulating Activity by Grown Area	109
B. Optimization of Alkali-Extraction from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	111
C. Extraction of Anti-Coagulating Substances from <i>Eugenia caryophyllate</i> T. Grown in Holland	111
D. Isolation and Purification of EC-2B	117
E. Properties of Anti-Coagulating Polysaccharide from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	120
Chapter 3. Structural Analysis of Anti-Coagulating Polysaccharide from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	126
1. Introduction	126
2. Materials and Methods	128
A. Materials and Methods	128
B. Single Radial Gel Diffusion Using β -D-Glucosyl-Yariv antigen	128
C. IR Spectrum	128
D. Methylation Analysis	128

E. Structural Analysis of EC-2B-IIIa-2	130
F. Structural Analysis of EC-2C-Ia-2	130
G. β -Elimination of Methylated Resultant	132
E. Determination of Bonding Position with Sulfur	132
3. Results	132
A. Reaction of Anti-Coagulant with Yariv-antigen	132
B. Structural Analysis of EC-2B-IIIa-2	135
C. Structural Analysis of EC-2C-Ia-2	143
 Chapter 4. Activation Mode of Anti-Coagulating Polysaccharide from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	152
1. Introduction	152
2. Materials and Methods	153
A. Determination of Anti-Coagulating Activation Mode	153
B. Platelet Aggregation Test	153
C. Changes of Anti-Coagulating Activity by Chemical Modification	153
D. Determination of Toxicity in Anti-Coagulating Polysaccharide from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	154
E. Determination of Anti-Coagulating Activity <i>ex- vivo</i>	155
F. <i>In vivo</i> Anti-Thrombosis	155
3. Results and Discussion	155
A. Anti-Coagulation Pathway	155
B. Chemical Modification of Anti-Coagulating Polysaccharide from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	156
C. Platelet Aggregation	159
D. Toxicity of Anti-Coagulating Polysaccharide from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	159
E. Effect of Anti-Coagulating Polysaccharide from <i>Eugenia caryophyllate</i> T. <i>ex- vivo</i>	162
F. Anti-Coagulating Activity in Mouse Model	162
 Part V. Development of Minor Constituents from Natural Seasoning Plants as the Functional Food	167

Chapter 1. Introduction	167
Chapter 2. Optimization of Extracting Conditions in the Industrial Point	168
1. Establishment of Extraction Procedure for Industrial Use	168
A. Anti-Complementary Polysaccharide from <i>Thymus vulgaris</i> L.	168
B. ACE Inhibitory Peptide from <i>Sinapis alba</i> L.	169
C. Anti-Coagulating Polysaccharide from <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	169
2. Establishment of Purification Procedure for Industrial Use	174
Chapter 3. Development of Bioactives from <i>Thymus vulgaris</i> L. and <i>Sinapis alba</i> L. as the Functional Food	181
1. Materials and Methods	181
A. Production of Beverage	181
B. Production of Capsule	181
C. Production of Granule	181
D. Production of Tablet	181
2. Results and Discussion	182
A. Production of Beverage	182
B. Production of Capsule	182
C. Production of Granule	182
D. Production of Tablet	182
E. Appearance of End-Product and Contamination of Microorganism	186
Chapter 4. Development of Bioactives from <i>Eugenia caryophyllate</i> T. as the Functional Food	188
1. Materials and Methods	188
A. Samples and Reagents	188
B. Recipe	188
C. Consumer Census of Sliced Pork and Bul-Go-Gi Sauce	189
D. Determination of Tenderization in Meat	191
E. Determination of Anti-Microbial Activity in Sauce Containing the Extract of <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	192
F. Determination of Anti-Bacterial Activity in Sauce Containing the	

Extract of <i>Eugenia caryophyllate</i> T.	192
2. Results and Discussion	193
A. Consumer Survey	193
B. Tenderization of Meat	195
C. Shelf Life of End-Product	196

APPENDIX

1. Publications	201
2. Patents	217

목 차

SUMMARY

제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	1
제 2 절 기술적인 측면에서의 연구개발 필요성	1
제 3 절 경제·산업적 측면에서의 필요성	5
제 4 절 사회·문화적 측면에서의 필요성	6
제 2 장 양념채소 함유 항보체 활성물질의 기능성식품 소재화	7
제 1 절 서 설	7
제 2 절 재료 및 방법	9
제 1 항 재 료	9
제 2 항 실험방법	10
1. 시료 조제 및 일반 분석	10
가. 검색용 시료의 조제	10
나. 시료성분의 일반분석	10
2. 항보체 활성 측정	11
가. 항보체 활성	11
나. 항보체 활성물질의 용혈억제 경로 및 항보체 활성화 경로	13
3. 활성 물질의 분리	13
4. 활성 물질의 정제	13
5. 항보체 활성 물질의 특성 실험	15
가. 활성 본체의 규명	15
나. 활성물질의 정제 순도 확인과 분자량 측정	16
6. 정제 다당류의 구조 분석	16
가. IR spectra를 이용한 분석	16
나. 정제 다당류의 당쇄결합양식 분석	17
다. 정제 다당류의 NMR 분석	17
6. 항보체 활성물질의 <i>in vivo</i> 상의 독성 및 항암효과	17
가. <i>In vivo</i> 상의 독성 실험	17

나. 항암 효과 측정 실험	17
다. Sarcoma-180에 대한 세포독성 실험	18
라. 면역 장기 및 면역 관련 세포수에 대한 영향	19
마. 대식세포 활성화능 측정	19
제 3 절 결 과	19
제 1 항 향신채소로부터의 항보체 활성 검색	19
제 2 항 백리향 열수 추출물로부터 조다당류의 조제	22
제 3 항 조다당류 TV-3의 정제	24
1. 이온교환수지를 이용한 정제	24
2. 소수성 크로마토그래피를 이용한 정제	25
3. 크기배제크로마토그래피를 이용한 정제	28
4. HPLC를 이용한 정제	28
제 4 항 항보체 활성 물질의 정제 확인 및 특성 규명	30
제 5 항 정제 다당류의 구조적 특성	34
제 6 항 <i>In vivo</i> 상에서의 독성 및 항암효과	39
제 7 항 <i>In vitro</i> 상에서의 항암 효과	43
제 3 장 양념채소함유 ACE 저해활성 물질의 소재화	50
제 1 절 서 설	50
제 2 절 재료 및 방법	54
제 1 항 재 료	54
제 2 항 방 법	54
1. 계통추출법에 따른 시료의 조제	54
2. 추출 조건의 확립	55
가. 추출 용매에 따른 검토	55
나. 추출 온도에 따른 검토	55
3. ACE 저해효과 측정	55
가. Buffer 의 조제	55
나. 기질의 조제	56
다. 효소의 조제	56
라. ACE assay	56
4. 단백질 정량	59
5. 겨자씨로부터의 ACE 저해제의 정제	59
가. 겨자씨로부터 ACE 활성저해물질의 분리	59
나. Methanol precipitation	59

다. Size exclusion chromatography	59
라. Reverse phase HPLC	59
6. 활성본체의 규명	60
가. Pronase 처리	60
나. ACE에 대한 저해기작 측정	60
다. 분자량 측정	61
라. 펩타이드의 아미노산 서열 결정	62
7. 흰쥐 uterus contraction assay	62
8. 소화효소의 영향	63
9. 겨자씨로부터 추출한 ACE 저해활성 획분의 독성검사	63
10. 겨자씨로부터 추출한 ACE 저해활성물질의 혈압강하 활성검사	63
제 3 절 결 과	64
제 1 항 ACE 저해물질의 검색	64
제 2 항 ACE 저해물질의 추출조건 확립	64
1. <i>Sinapis alba</i> L.의 화학적 조성	64
2. 추출 용매에 대한 영향	64
3. 추출 온도에 대한 영향	71
4. 유기용매에 의한 분획	71
5. 활성물질의 정제	75
가. 겨자씨로부터 ACE 저해활성물질의 추출 및 분획	75
나. Methanol precipitation	75
다. Sephadex LH-20 column chromatography	75
라. HPLC	76
마. FPLC	76
6. 활성 본체의 규명	76
가. 추출물의 Pronase처리	76
나. ACE에 대한 저해기작 측정	76
다. 분자량 측정	80
라. 활성저해 펩타이드의 아미노산 서열	80
7. 쥐 uterus에서의 Bradykinin agonist 활성	83
8. <i>In vitro</i> 상에서의 소화효소에 대한 ACE 저해활성 검토	83
9. ACE 저해활성물질의 급성독성검사	83
10. ACE 저해활성물질의 혈압강하활성	87
제 4 장 양념채소 함유 항혈전 물질의 기능성식품 소재화	89
제 1 절 양념채소로부터 항혈전 물질의 검색	89

제 1 항 서 설	89
제 2 항 재료 및 방법	90
1. 실험 재료	90
2. 일반 성분 분석	90
3. 식물재료로부터 검색용 시료의 제조	90
4. 항응고 활성 측정	90
가. Platelet poor plasma(PPP)의 제조	90
나. Activated partial thromboplastin time (APTT)	91
다. Prothrombin time (PT)	93
라. Thrombin time (TT)	93
5. 식물재료로부터 2차 검색용 시료의 조제	93
제 3 항 결 과	93
1. 내인성 경로에서 항응고 활성을 나타내는 시료의 검색	93
2. 외인성 경로에서 항응고 활성을 나타내는 시료의 검색	94
3. 공통 경로에서 항응고활성을 나타내는 시료의 검색	95
4. 항응고 활성의 2차 검색	101
제 2 절 정향으로부터 항혈전 물질의 정제	102
제 1 항 서 설	102
제 2 항 재료 및 방법	102
1. 재 료	103
2. 일반 성분 분석 및 황산기 함량 측정	103
3. 구성당 분석	103
4. 정향(<i>Eugenia caryophyllate</i> T.)으로부터 항응고 물질의 추출	104
가. 산지에 따른 항응고 활성	104
나. 추출용매 및 추출시간에 따른 항응고 활성 검토	104
5. 홀랜드산 정향으로부터 항응고물질의 추출	105
가. 시료의 대량추출 및 ethanol 침전	105
나. Cetavlon에 의한 EC-2 획분의 제조	105
다. 한외여과	105
6. 항응고 활성 본체 검토	105
가. Pronase digestion	105
나. Periodate oxidation	106
7. EC-2B 획분으로부터 항응고 물질의 정제	106

가. DEAE-Toyopearl 650C에 의한 이온 교환 크로마토그래피	106
나. Butyl-Toyopearl 650M에 의한 hydrophobic interaction chromatography	106
다. Sephadex G-75에 의한 size exclusion chromatography	107
라. 2B-IIIa-2 획분의 순도확인	107
8. 정향으로부터 추출 분리한 EC-2C 획분의 정제	107
가. Butyl-Toyopearl 650M에 의한 hydrophobic interaction chromatography	107
나. Sephadex G-100에 의한 size exclusion chromatography	108
다. Sepharose CL-6B에 의한 size exclusion chromatography	108
라. 정제 물질의 순도 확인 및 분자량 결정	108
제 3 항 결 과	109
1. 산지에 따른 항응고 활성	109
2. 정향의 알칼리 추출조건의 최적화	111
3. 홀랜드산 정향으로부터 항응고 활성물질의 추출	111
가. 정향으로부터 항응고 물질의 추출	111
나. 양이온 계면활성제에 의한 EC-1 획분의 분획	113
다. 한외여과에 의한 EC-2획분의 분획	114
라. 항응고 활성의 본체 연구	116
4. EC-2B 획분으로부터 항응고 물질의 분리 및 정제	117
가. 이온 교환 크로마토그래피에 의한 EC-2B의 분획	117
나. Butyl-Toyopearl 650M에 의한 EC-2B-III 획분의 정제	117
다. Sephadex G-75에 의한 EC-2B-IIa 획분의 분획 및 정제 확인	119
5. EC-2C 획분으로부터 항응고 물질의 분리 및 정제	120
가. Buyl-Toyopearl 650M에 의한 EC-2C 획분의 정제	120
나. Gel permeation chromatography에 의한 EC-2C-I 획분의 정제	120
6. 정향으로부터 분리한 항응고성 정제 다당의 특성	120
제 3 절 정향으로부터 정제된 항응고성 다당의 구조분석	126
제 1 항 서 설	126
제 2 항 재료 및 방법	128
1. 재 료	128
2. β -D-Glucosyl-Yariv antigen을 이용한 single radial gel diffusion	128
3. IR spectrum	128

4. Methylation analysis	128
가. Methylsulphinyl methyl sodium preparation	128
나. Methylation	129
5. EC-2B-IIIa-2획분의 구조분석	130
가. 산가수분해	130
나. Bio-gel P-30을 이용한 2B-A-II 획분의 분획	130
다. Endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase digestion	130
6. EC-2C-Ia-2 획분의 구조분석	130
가. 산가수분해	130
나. Sephadex G-75를 이용한 분획	130
7. β -Elimination of methylated product	132
8. 황산기의 결합 위치 분석	132
제 3 항 결 과	132
1. 정제된 시료의 Yariv-antigen 반응	132
2. EC-2B-IIIa-2 획분의 구조분석	135
가. EC-2B-IIIa-2의 methylation analysis	135
나. EC-2B-IIIa-2의 산가수분해	135
다. Bio-gel P-30을 이용한 2B-A-II 획분의 분획	135
라. 2B-A-IIc 획분의 endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase digestion	135
마. β -Elimination	136
3. EC-2C-Ia-2 획분의 구조분석	143
가. EC-2C-Ia-2의 methylation analysis	143
나. EC-2C-Ia-2의 산가수분해	143
다. 부분 가수분해물의 β -elimination	144
제 4 절 정향추출물의 활성 양식	152
제 1 항 서 설	152
제 2 항 재료 및 방법	153
1. 항응고 활성 양식의 측정	153
2. 혈소판 응집 억제능 검사(Platelet aggregation test)	153
가. Platelet rich plasma(PRP)와 platelet pool plasma(PPP)의 조제	153
나. Base line 설정	153
다. 혈소판 응집능 검사	153
3. 화학적 수식 변화에 따른 항응고 활성의 변화	153

4. 정향으로부터 추출한 항응고 활성획분의 독성검사	154
나. 경구투여에 의한 급성 독성 실험	154
다. 경구투여에 의한 아만성 독성 검사	154
라. 꼬리정맥 투여에 의한 급성 독성 실험	154
5. 정향추출물의 <i>ex-vivo</i> 에서의 항응고 효과	155
6. Thrombosis에 대한 <i>in-vivo</i> 에서의 항치사성 효과	155
제 3 항 결 과	155
1. 혈액응고계에서의 활성 경로 검색	155
2. 정향으로부터 추출한 항응고성 다당의 화학적 구조 수식	156
3. 혈소판응집효과	159
4. 독성검사	159
가. 경구 독성	159
나. 경구 아만성 독성	161
다. 꼬리정맥 투여시 독성실험	162
5. <i>Ex-vivo</i> 상에서의 항응고 활성 측정	162
6. 마우스 모델에서의 항응고 활성 측정	162
제 5 장 양념채소 함유 미량소재의 기능성식품화	167
제 1 절 서 설	167
제 2 절 선정시료들로부터 생리활성물질 추출조건의 최적화 및 공업적 수준의 정제방법 확립	168
제 1 항 선정 양념채소의 공업적 이용을 위한 추출방법의 확립	168
1. 백리향으로부터 항보체활성 성분의 공업적 추출방법	168
2. 겨자씨로부터 ACE 저해활성 성분의 공업적 추출방법	169
3. 정향으로부터 항혈전활성 성분의 공업적 추출방법	169
제 2 항 생리활성물질의 공업적 수준의 정제법 확립	174
1. 선정 양념채소의 공업적 순도수준의 대량 정제법 확립	174
2. 한외여과를 이용한 공업적 수준에서의 정제법 확립	175
제 3 항 각 생리활성 성분의 추출 및 공업적 순도의 정제 공정	176
1. 백리향 함유 항보체활성 물질의 추출 및 공업적 순도의 정제 공정	176
2. 겨자씨 함유 ACE 저해제의 추출 및 공업적 순도의 정제 공정	178
3. 정향 함유 항응고 물질의 추출 및 공업적 순도의 정제 공정	179
제 3 절 백리향 및 겨자씨 함유 생리활성물질의	181

제 1 항 재료 및 방법	181
1. 드링크제 제조	181
2. 연질캡셀 제조	181
3. 과립제 제조	181
4. 타정제 제조	181
제 2 항 결 과	182
1. 드링크제 제조	182
2. 연질캡셀 제조	182
3. 과립제 제조	182
4. 타정제 제조	182
5. 제품의 외관, 미생물 검사	186
제 4 절 정향 함유 항응고활성 다당의 기능성 식품화	188
제 1 항 재료 및 방법	188
1. 재 료	188
2. 시료의 첨가량 및 조리량	188
3. 편육 및 불고기 소스를 이용한 소비자 기호도 조사	189
가. 편육의 제조	189
나. 불고기 소스의 제조	189
다. 시료의 제공	189
라. 관능 검사	190
4. 연육 효과 측정	191
가. 시료의 제조	191
나. 조직감	191
5. 정향 추출물이 첨가된 소스의 천연 항균성 검사	192
가. 항균성 검사의 시료	192
나. 항균성 검사방법	192
다. 보존성 검사	192
6. 정향추출물이 첨가된 소스의 병원성 미생물에 대한 살균효과	192
가. Disc 확산법	192
나. 액상 MIC 시험법(시험관 희석법)	193
제 3 항 결 과	193
1. 소비자 기호도 검사	193
가. 편육에 대한 기호도	194
나. 소스의 기호도	194
2. 정향의 연육 효과 측정 실험 결과	195
3. 보존성 향상 효과	196
가. 편육의 보존성 향상 효과	196

나. 소스의 보존성 향상 효과	196
다. 정향시료 미생물 살균효과 실험	197

부 록

1. 발표논문	201
2. 특허출원	217

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

WTO 체제의 출범으로 인한 농산물 시장개방 하에서 농업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 농산물을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 우리나라는 전통발효식품을 비롯하여 식물성 식용·약용 자원의 수가 많고 전래 되어 오고 있는 민간식이요법이 다양하여 기술 선진국과의 특허문제를 야기시키지 않고 경쟁력 있는 의약품, 식품용 신소재의 창출이 가능하기 때문이다.

본 연구그룹이 선정한 양념채소류는 식용작물 중에서 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 많았던 원예작물일 뿐만 아니라 그동안 자주 수요와 공급의 불균형으로 농산물 가격의 등락과 생산 농민의 영농의욕을 떨어뜨림으로써 경제적, 사회적 문제로 대두되기도 하였다. 양념 채소류의 가격 안정을 통한 생산량 증대와 경쟁력을 갖는 하나의 산업종으로 육성하기 위해서는 이들로부터 고부가가치성 물질의 개발과 제품화가 전제되어야 한다. 최근에 이르러 식품에 도입되고 있는 3차 기능은 질병을 발병의 전단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품의 수요가 의약품을 상회할 것으로 예측되고 있다.

본 연구는 양념채소 함유 미량성분 중 고령화병의 대표적 원인인 면역계와 순환기계에 약리, 생리활성을 갖는 물질을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 기능성식품을 개발함으로써 국내 농림수산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 하였다.

제 2 절 기술적인 측면에서의 연구개발 필요성

보체계는 감염방어 염증방어, 알러지 반응 등에 작용할 뿐만 아니라, 면역

응답에도 관련하고 있을 가능성이 높으며 따라서 보체계에 대한 이해는 감염, 알러지성 질환 및 자기면역 질환을 진단 치료하는데 있어 잠재적인 중요성을 가지며 인체의 면역활성에 직접 관여한다는 면에 있어서 주목하지 않을 수 없다. 최근 들어 과학적 입증 없이 경험적으로만 처방, 사용되어 왔던 생약제제들이 면역계, 내분비계, 순환계 등에 중요한 영향을 미치고 있음이 점차 알려지고 있으며 특정 생약재의 경우 만성간염, 류마티즘 등과 같이 현대 의약으로도 그 완전 치유가 어려운 자기면역질환(auto-immune disease)에 대해서도 임상적으로 그 효과가 인정되고 있어 이들이 면역계에 대해 중요한 역할(immune modulating activity)을 담당하는 것으로 보고되고 있다. 이들은 주로 저분자 획분보다 고분자 획분에서 그 활성을 나타내며 특히 천연 고분자 물질 중에는 interferon 유도 활성, 항종양 활성, 항보체 활성, 항염증 활성, 식작용 증강 활성 및 B 림파구의 활성 작용 등이 밝혀지고 있으며 특히 그 활성성분들이 다당으로 확인되고 있다. Okuda 등은 polysaccharide가 생체내의 보체계(complement system)에 관여하여 macrophage의 활성화, target cell에 대한 cytolysis와 opsonization 기능을 항진시킴으로써 항종양 효과를 나타낸다고 하였으며, polysaccharide에 의한 complement system의 활성화와 항종양 효과의 상관관계를 밝혔다. 항보체 활성이란 이들 보체계를 활성화시킬 수 있는 활성을 의미하는 것으로 천연 물질 중에서 보체계 활성화 다당들이 발견되어지고 있다. 보체계를 활성화할 수 있는 다당 혹은 당화합물로는 세균 기원의 endotoxic lipopolysaccharide, inulin과 균류 유래의 난용성 β -1,3 glucan 및 *Streptococcus mutans* OMZ176이 생산하는 난용성 glucan 등이 기보고된 바 있다. 최근에는 천연물, 특히 식물체 중의 항보체활성에 대한 연구들이 주로 일본의 Yamada 그룹과 Tomoda 그룹에 의해 활발히 보고되고 있다. Yamada 그룹에 의해 보고된 대표적 항보체 활성 다당으로는 한방처방에 넓게 사용되는 생약의 하나인 당귀(*Angelica acutiloba*)를 들 수 있다. 이는 전통적으로 증혈 및 순환개선에 의해 제장기를 회복 개선하는 약물로 부인병, 관절염 치료 등에도 사용어 왔으며 최근 이 당귀의 뿌리로부터 열수 추출한 다당 중에 항보체 활성 뿐만 아니라 B 림파구 mitogen 활성, interferone 유도 활성, 항종양 활성 등을 가지고 있음이 발견되었다. 현재 다당성분들에 의한 항종양 활성은 이들이 숙주대개 면역반응(host-mediated immune response)에 관여하여 종양발생에 의해 손상된 면역기능을 회복 또는 증강시켜 줌으로써 효과를 발휘하는 것으로 알려지고 있으므로 면역체계 중의 보체계를 활성화하는 물질을 안전성이 확보된 식품에서 검색할 필요성이

대두되고 있다.

성인병의 하나인 고혈압은 그 여러 기작에 의해 기인되지만 크게 발생 원인에 따라 일차성(본태성) 고혈압과 이차성 고혈압으로 분류할 수 있다. 특별한 원인과 질병없이 고혈압이 생긴 경우 일차성 또는 본태성 고혈압이라고 하며 전체 고혈압 환자의 약 90% 이상이 여기에 속한다. 현재까지 일차성 고혈압의 발생기작은 크게 네가지로 나타내어진다. 첫째로 교감신경계의 활성화로 catecholamine에 의해 renin 분비가 변화하는 것에 기인된다. 둘째로 압-Na 이노현상, Na 배설 호르몬 및 Na 운반 기전으로서 catecholamine이나 angiotensin II의 농도가 증가하여 신장의 effect arterole이 수축하기 때문에 생기는 것으로 Na의 재흡수가 증가함으로써 혈장량이 증가하게 되어 일정한 동맥압에 대한 체액의 양이 고혈압 환자에게 증가하게 된다. 셋째로 세포내 Ca, Na의 증가로서 이는 어떠한 기작에 의해서던 본태성 고혈압에서 세포내 Na는 증가되고 있고 증가된 Na는 Na-Ca 교환을 억제하여 세포내 Ca이 증가하게 된다. 넷째로 renin-angiotensin system으로 renin은 신장의 사구체 세포에서 합성되어 angiotensinogen을 angiotensin I으로 분해하는 역할을 하며 angiotensin I은 변환효소(converting enzyme)에 의해 강력한 혈관수축 호르몬인 angiotensin II로 변하게 된다. Angiotensin II는 동맥혈관을 수축하며 혈압을 상승시키는 작용과 부신에서의 aldosterone의 분비를 촉진해서 신장의 Na 및 수분의 재흡수를 증가시키는 두가지 역할을 한다. Angiotensin converting enzyme(Kininase II, peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.1.5, 이하 ACE라 약함)은 불활성인 angiotensin I의 COOH 말단 dipeptide(His-Leu)을 절단해서 강력한 혈관수축을 일으키는 angiotensin II로 전환시킨다. 또한 혈액 중에 bradykinin은 혈관확장, 장의 운동성 증대 등의 효과를 보여 주는데 ACE에 의해 dipeptide(Pro-Arg)가 끊어져서 bradykinin은 inactive heptapeptide가 된다. ACE 저해물질로는 뱀(*Bothrops jararaca*, *Agkistrodon balys blomhoffii*)의 독에서 추출하거나 합성에 의한 ACE 저해제(Captopril, Enalapril 등)를 사용하고 있으나 사람에 따른 투여량, 합성제제에 의한 부작용과 안전성이 문제가 되고 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 이미 안전성이 확보된 식품으로부터 ACE 저해활성을 가진 물질의 검색이 요구되고 있다.

혈액응고는 혈전의 주성분인 불용성의 섬유소를 형성하는 과정으로 12단계 이상의 단백질 분해 과정이 cascade식으로 일어나는 복잡한 생화학적 반응이다. 혈액에는 응고반응을 일으키는 항응고 요소(procoagulant factor)와 그에 길항하는 항응

고 요소(anticoagulant factor)가 있어 혈액응고과정이 균형적으로 조절된다. 현재까지 확인된 항응고 요소로는 6개의 thrombin 길항 인자들, factor IX, X, XI 및 heparin 등이 알려져 있다. 이중에서 antithrombin I의 기전은 일단 형성된 fibrin의 thrombin과의 재흡착에 의한 거대분자로 응집되는것을 방지하며, antithrombin II는 heparin활성에 필요한 heparin-cofactor II(HC-II)로 밝혀졌으며 antithrombin III는 직접적으로 thrombin활성을 저해하는 인자이다. 한편 생체 내에서 TF(tissue factor)저해제로서 반응이 인정되는 lipoprotein이 서로 다른 연구자들에 의해 발견되어 각각 다른 명칭으로 보고되었는데 예를 들면 LACI(lipoprotein-associate coagulation inhibitor)나 EPI(extrinsic pathway inhibitor), TFI(tissue factor inhibitor)라고 알려져 있다. 혈전은 불용성의 피브린망에 혈구성분이 포함된 혈관 내 응괴로서 혈전의 생성은 혈류부전, 혈관상해, 고혈압, 지질침착 등의 이유로 혈관 내에서 유발되어 혈장 응고계 혈소판과 혈관 내피세포 및 하부 결체조직, 피브린 용해계 등의 복잡한 생화학 반응을 통해 일어나며 생성된 혈전은 정맥 또는 동맥에서 혈액의 순환을 방해하여 조직으로의 영양분 및 산소공급을 차단함으로써 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화증 등과 같은 성인병을 유발시킨다. 따라서 혈전의 형성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 제제는 혈전에 의한 성인병의 중요한 치료제로 지난 20여년 동안 활발한 연구가 진행되어 왔다. 최근에는 암과 혈액응고사이에 밀접한 관계가 있다는 보고에서 종양세포와 그 주변의 혈액응고는 TF에 어느 정도 기인한다고 한다. 즉 TF가 solid tumor의 stroma 형성에 중요한 역할을 할 것이라 생각되고 이 stroma가 암세포 증식에 필요하므로 최근에는 항응고제로서 암세포의 전이가 방지될 가능성에 대해 주목하고 있다. 따라서 TF에 대한 저해제의 중요성이 대두되게 되었다. 항응고제로서 현재 임상적으로 광범위하게 사용되는 heparin의 경우 장기적으로 사용할 때 혈소판의 감소, 출혈, 골다공증의 부작용을 초래하고 체내 반감기가 매우 짧을 뿐 아니라 분자량이 크고 극성이어서 세포벽 통과가 용이하지 않아 경구투여가 불가능하여 정맥주사나 피하주사로만 효력을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 또한 heparin은 thrombin에 직접 작용하지 않고 단지 antithrombin III의 thrombin 저해활성만 증폭시키므로 heparin의 항응고활성은 혈액 내 antithrombin III의 농도에 결정되는 결점이 있다.

기능성식품에 대한 정의는 후생성 생활위생국과 일본건강식품간담회가 제시한 바 있다. 후생성은 기능성식품이란 식품의 품질변환조작에 의해 얻어진 기능성 성

분을 활용하여 생체에 대해 기대되는 효과를 충분히 발현할 수 있도록 설계된 일상적으로 섭취하는 식품으로 특히 신장병, 심장병, 고지혈증, 당뇨병 등의 성인병과 노인병의 병태에 대응하는 기능을 가지는 식품을 지칭하고 있으며 건식간담회는 기능성식품이란 사람의 건강에 직접 관여하는 생체 체계통의 특정한 조절에 유효하게 작용하도록 설계 가공되어 건강의 유지, 증진, 질병의 방지 등을 목적으로 하고 식품으로서 일상적으로 섭취되는 형태를 가지며 영양기능과 감각기능을 함께 가지는 식품으로 정의하고 있다. 후자가 보다 타당한 정의를 짓고 있지만 양자 모두 생체조절기능과 식품이라는 공통분모를 가지고 있다.

제 3 절 경제·산업적 측면에서의 필요성

농수산물로부터 고부가가치성 물질의 창출은 WTO 체제 출범이후 국내 농수산업에 유지 발전시키는 대안 중의 하나임을 앞서 전제한 바 있다. 국내 농산물 중 양념채소는 가격의 등락이 심했던 원예작물로 양념채소의 생산과 관련된 원예농업과 가공제조업을 연계시킴으로써, 생산농가의 영농의욕을 고취시키고 소득을 높이면서 농산물 가격의 안정화를 기할 수 있기 때문에 전체적인 소비자물가의 안정에 기여도가 클 것으로 예상할 수 있다. 또한 1차 상품인 양념채소를 고부가가치성 물질로 소재화함으로써 낮은 시장 경쟁성을 높일 수 있고 이는 타 원예작물, 약용작물, 공예작물에도 적용 가능한 모델이기 때문에 농촌경제의 발전을 획기적으로 도모할 수 있다.

한편 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 무공해산업종으로 향후 국내산업의 재편과정에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것이다. 특히 제조공정상 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 지니는 중소기업형 산업으로 분류할 수 있다.

우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 유기합성에 의한 신규물질들보다 안전성의 확보가 용이하다. 따라서 의약과 식품용 leading compound의 연구개발과 실용화에 있어 기술선진국보다 비교우위에 있다고 볼 수 있다. 물질에 따라서는 현재 수입되고 있는 유사소

재를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 고령화 사회에서 질병예방용 식품과 의약품의 수요증가와 함께 거대 수출품목이 될 것으로 예측된다. 최근에 이르러 의약품의 판매량 감소와 식품산업의 물류비 증가로 수익악화에 처한 국내 제약과 식품업체들이 식품과 의약품의 특성을 공유하는 새로운 영역의 제품들을 도입하게 됨으로써 다시 경쟁력을 갖게 될 것이며 이는 국내 생물산업 육성이라는 국가정책에 부응하는 계기가 될 것이다.

제 4 절 사회·문화적 측면에서의 필요성

현재 우리나라는 고령화 지수면에서 선진국에 비해 아직 낮은 수준에 있지만 평균수명은 74세에 이르렀으며 2,000년에는 고령화인구 비율이 전 인구의 6.8%로 317만명에 달할 것으로 전망되고 있다. 사망원인 또한 감염형 질환의 비율이 감소하면서 대표적인 성인병인 순환기계 질환과 암에 의한 사망비율이 전체의 절반에 가까워지고 있다. 이에 따라 국민들도 고령화 사회를 인식하게 되었고, 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 “고령화병은 현대의 의료기술로 완치할 수 없다”는 불안감을 갖게 됨과 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다. 일본의 경우 정부의 의료비 부담이 1993년에는 전년도보다 6.4%가 증가되었고 증가요인의 대부분이 고령화 환자의 의료비에서 기인하였음을 밝힌 바 있다. 후생성이 특정보건용 식품제도를 도입하게 된 배경에는 식품소재를 통하여 고령화병을 예방함으로써 정부의료비 부담을 경감시키고 활동력을 갖는 고령화 노동인력을 확보하자는 데 두고 있음을 주목할 필요가 있다.

본 연구과제의 최종목표인 성인병 치료 또는 예방용 소재의 개발과 이를 주성분으로 한 기능성식품화는 거시적으로는 국민 개개인의 건강장수 욕구를, 거시적으로는 정부의 의료보건정책을 충족시킬 수 있는 하나의 대안임이 분명하다.

한편 양념채소의 가격 안정화를 통한 농가소득이 보장될 때 이농현상이 감소됨으로써 농촌의 공동화와 인구의 도시집중화로부터 기인하는 사회적 문제를 완화시킬 수 있을 뿐만 아니라 양념채소 부산물의 폐기로 인해 발생하고 있는 농촌의 환경오염문제의 해결에도 일익을 담당하게 될 것으로 예상되고 있다.

제 2 장 양념채소 함유 항보체 활성물질의 기능성식품 소재화

제 1 절 서 설

인체는 외부에서 유입되는 pathogen에 대해서 면역체계를 통해서 방어한다. 이러한 면역계는 체액성 면역(humoral immunity)과 세포성 면역(cellular immunity)으로 분류되는데 체액성 면역은 B cell에서 생성되는 항체에 의한 항원 항체 반응으로 대표되며 여기에 보체계 활성화의 고전적 경로(classical pathway)가 관여한다. 세포성 면역은 Tc(cytotoxic T cell)와 TH1(helper T cell)에 PMN, NK cell과 macrophage 등의 항원 제시 세포(antigen presenting cell)가 항원을 제시하면서 일어나는 생체 내의 면역 반응이다. 이와 같이 보체계와 PMN, NK cell과 대식세포 등은 면역계의 주요 인자로 보체계 활성화 과정에서 생긴 분해산물의 receptor들이 존재하여 상호간에 관여하고 있으며 보체계의 주요역할은 pathogen의 opsonization, 염증세포의 염증부위로의 집적, pathogen에 대한 용혈(cytolysis)의 세 가지로 대별된다. 이러한 보체계는 고전경로(classical pathway)와 부경로(alternative pathway), lectin 경로(lectin pathway)로 구분되며 복합 체계를 가지는 20여종의 혈청 단백질로 구성되어 있고 고전경로에서는 항원 항체 복합체 의해서 활성화되며 이중 5개 이상의 단백질(C5-C9)은 막상해 복합체(MAC, membrane attack complex)를 형성하여 항체에 둘러 쌓인 세포를 파괴시키고 부경로에서는 직접적으로 C3가 활성화되고 lectin 경로에서는 C1 복합체가 lectin으로 대체되어 활성화 된다. 보체 성분들은 혈청내에 proenzymes의 형태로 존재하며 cascade에 의해 활성화되며 이 과정에서 유리되는 보체분자에 의해서 자가면역질환, anaphylaxis 등의 부작용이 나타나기도 한다. 이러한 보체의 활성을 검정하는 데는 면역 글로불린에 의해서 감작된 면양적혈구의 용혈 억제능을 보체 고정화 정도에 따라 확인하는 방법이 사용되고 있다. 한편, 항보체 활성화 물질은 보체계를 활성화 시킬 수 있는 물질을 말한다. 천연 물질 중에서 항보체 활성 물질들에 대해서 연구가 활발히 진행되고 있으며 이들은 주로 저분자 보다는 고분자 획분에서 그 활성을 나타내는 것으로 밝혀지고 있다. 고분자 항보체 활성 물질 중

에는 항암효과를 나타내는 다당류들이 많이 보고되고 있는 데 다당류에 의한 보체계 활성화와 항종양 활성의 상관 관계는 숙주 매개 면역 반응에 관여하여 종양 발생에 의해 손상된 면역 기능을 회복 또는 증강시킴으로써 나타나는 현상으로 이해되고 있다. 그 예로써 표고버섯(*Lentinus deodes*)으로부터 분리한 lentinan과 구름버섯(*Coliolum versicolor*)의 PSK(Krestin)의 경우 현재 일본에서 항암제로 시판되고 있으며 화학요법제가 암세포에 대한 특이성이 낮아 숙주에 대해서 부작용을 나타내는 반면 이들 다당류들은 종양치료에 있어서 부작용이 나타나지 않는 것으로 보고되고 있다. 천연 다당류 중 arabinogalacturonan, 3,6-arabinogalactan, neutral β -glucan, rhamnogalacturonan 등은 보체계를 활성화하는 것으로 알려져 있으며 보체계 활성화 다당의 구조와 활성간의 상관성, 그리고 작용기작에 관한 여러 가설들이 제시되어 왔다. 보체계 활성화 다당의 polyhydroxyl 기들은 삼중 나선구조의 바깥쪽에 배열되어 이들이 수소결합과 같은 상호작용을 통하여 보체계 활성화에 영향을 미치는 것으로 추측되었다. 그리고 다당류에 존재하는 O-acetyl 기들은 고전적 경로에 의한 보체 활성화를 억제하고 polyhydroxy기들은 부경로에 의한 보체 활성화에 중요한 역할을 한다는 가설이 제안되기도 하였다. 보체계의 부경로를 활성화시키는 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 β -1,3 glucan과 Streptococcus mutants OMZ 176의 α -1,6 glucan의 분지를 가지는 α -1,3 glucan과 같은 불용성 항종양 다당에서는 이들의 self-aggregation이 항보체 활성의 발현에 중요하다고 알려져 있고 4-methylglucuronic acid와 galacturonic acid를 높은 비율로 가지고 있는 paniculatan에서는 산성당 잔기의 음전하가 직접적으로 고전적 경로를 활성화시키는지의 여부는 분명치 않은 것 같다. 한편, 단백다당으로 알려진 zymosan은 IgG 항체가 유동상태로부터 zymosan의 표면으로의 C3의 부착속도를 증가시키고 부경로의 C3 전환효소의 형성을 증가시킴으로써 zymosan이 부경로의 작용에 기여한다고 보고되었다. 이와 같이 다당류 분자들의 물리적 상태에 의한 입체적 요인들이 항보체 활성에서 중요한 역할을 할 수 있음이 일반적으로 인정되고 있다. 이밖에 최근 보고된 보체계 활성화 다당으로는 당귀(*Angelica acutiloba*)의 pectic arabinogalactan, 시호(*Bupleurum falcatum*)의 arabinan, arabinoglucan, glucan, 대복피(*Arcae pericarpium*)의 heterogalactan, 인삼(*Panax ginseng*)의 acidic heteroglucan과 고사리(*Pteridium aquilinum*)의 α -1,2-glucuronomannan back bone 등이 알려져 있다. 그러나, 보체계 활성화 다당류들의 활성기작은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 이러한 다당의 구조와 활

성간의 상관관계에 관한 연구들은 항보체 활성을 포함하여 약리학적으로 다른 활성을 갖는 다당류의 작용 양식을 밝히는데 있어서 중요하다.

본 연구에서 사용된 백리향(*Thymus vulgaris* L.)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 상록성 식물로써 목화된 줄기를 갖고 있으며 원산지는 남부 유럽의 지중해 연안으로 서아시아, 북아프리카 등에 분포하며 우리나라에서도 자생하고 있으나 지금까지 상용한 증거는 없다. 일반적으로 잎을 건조시켜 고기 요리에서 냄새를 없애주는데 사용하고 프랑스 요리에서는 수프, 샐러드, 소스 등에서 이용하며, 주요 향기성분으로 thymol, carbachol, linalool, α -pinene, cymene, borneol 등의 정유성분들이 이용되고 있다. 백리향의 약리작용은 progesteron과 유사한 phytoestrogen의 유방암에 대한 억제효과, *Staphylococcus aureus* sp.에 대한 항균작용과 *Helicobacter pylori* sp.에 대한 생육억제 따른 위궤양 치료 효과, 메탄올 추출물의 protein glycation inhibitor, 항산화 효과, 곰팡이에서의 aflatoxin 생산 억제 효과, 혈액내에서의 leucocyte와 thrombocyte 생산증가 효과에 따른 항암활성 등의 연구가 보고되어져 왔다. 본 연구에서는 향신채소 추출물에 대하여 항보체 활성의 검색과정에서 가장 높은 활성을 보인 백리향 열수추출물로부터 보체계 활성화 물질을 단리하여 보체계 활성의 작용 양식과 항암효과 및 구조적 특징을 조사하여 산업화하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

제 1 항 재 료

본 실험에 사용한 향신채소류는 서울 경동시장, 향원스파이스, 남대문 수입상가 등지에서 구입하였다. 항보체 활성 측정 시약으로 양의 감작 적혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 Biotest사, 혈청(normal human serum, NHS)은 실험실의 건강한 성인의 혈액으로부터 제조하였으며, Giemsa powder, α -naphthyl acetate, fast red TR salt(4-chloro-o-toluidine diazoate), MTT(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma사 제품을 RPMI-1640, DMEM medium과

FBS(fetal bovine serum)는 Gibco사 제품을 사용하였고 resin으로 DEAE-Toyopearl 650C과 Butyl-Toyopearl 650M는 Tosoh사 제품을, Sepharose CL-6B는 Pharmacia사 제품을 사용하였으며 그 외의 시약은 시약 일급 또는 특급을 사용하였다.

본 실험에 상용한 실험동물은 ICR계 mouse(♂, 5-6 weeks)를 국립보건원에서 분양받아 실험실 환경에 적응시킨후 실험에 사용하였다. 식이는 제한하지 않았으며 환경은 항온, 항습조건(온도 $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$)을 유지하며 명암은 12시간 단위로 교대하여 유지하였다.

제 2 항 실험방법

1. 시료 조제 및 일반 분석

가. 검색용 시료의 조제

구입한 시료를 Fig. 2-1의 방법에 따라 100°C 에서 5분간 끓여서 효소 활성을 실효시키고 7,000 rpm에서 20분간 homogenizer(IKA Labotechnik Co. Ultra-turrax T50)로 분쇄한 후, $5,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 Fr. I을 조제하였다. 침전물은 동결건조 후 연속적으로 hexane, acetone, methanol, 증류수의 순으로 2시간 동안 환류추출한 후 각각의 상등액을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV, V를 얻었다.

나. 시료성분의 일반분석

전당은 glucose를 표준 물질로 하여 phenol-sulfuric acid법으로, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준 물질로 하여 m-hydroxydiphenyl법으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법으로 각각 정량하였으며 구성당 분석은 시료(2 mg)를 2.0 M TFA로 121°C 에서 1.5시간 동안 가수분해하여 Jones 등의 방법으로 alditol acetate유도체를 만들어 GC로 구성당을 분석하였다. GC의 분석 조건은 Table 2-1과 같으며 표준 단당의 retention time을 비교하여 시료중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 mol %는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

구성 아미노산 분석은 시료 1.0 mg을 $200 \mu\text{L}$ 의 증류수에 녹인 후 $20 \mu\text{L}$ 의 상등액을 취하여 완전히 건조시킨 후 $200 \mu\text{L}$ 의 6 N HCl로 110°C 에서 24시간 가수분해하여 phenylisothiocyanate로 유도체를 만든 후 아미노산 분석을 실시하였다.

아미노산 분석조건은 Table 1과 같으며 표준 아미노산과의 retention time과 비교하여 분석하였다.

Table 2-1. Analytical condition of GLC and HPLC

A) Analytical condition for sugar composition by GLC	
Apparatus	: Young Lin M600D
Detector	: Flame ionization detector (FID)
Column	: SP-2380 (30 m × 0.25 mm × 0.2 μm)
Column temp.	: 230°C (10 min) → 250°C (2.5°C/min) → 250°C (10 min)
Injector temp.	: 250°C
Detector temp.	: 250°C
Carrier gas	: N ₂ (1.0 mL/min)
B) Analytical condition for amino acid composition by HPLC	
Apparatus	: Waters HPLC
Column	: Waters PicoTag (8.5 × 300 mm)
Column temp.	: 45°C
Detector	: Photodiode array detector (254 nm)
Mobile phase	: Eluent A: 1.4mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH ₃ CN, pH 6.3 Eluent B: 60% CH ₃ CN A (100%) → B (100%) : 25 min
Injection vol.	: 10 μL

2. 항보체 활성 측정

가. 항보체 활성

Mayer법을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption)후 남은 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였으며. 항보체 활성은 NHS와 buffer, 시료 대신 DIW(deionized water)만을 반응시킨 대조군의 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH50)에 대한 저지율 (inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH50 (%))로서 나타내었다.

$$\text{ITCH}_{50} (\%) = \frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} - \text{TCH}_{50} \text{ of sample}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}} \times 100$$

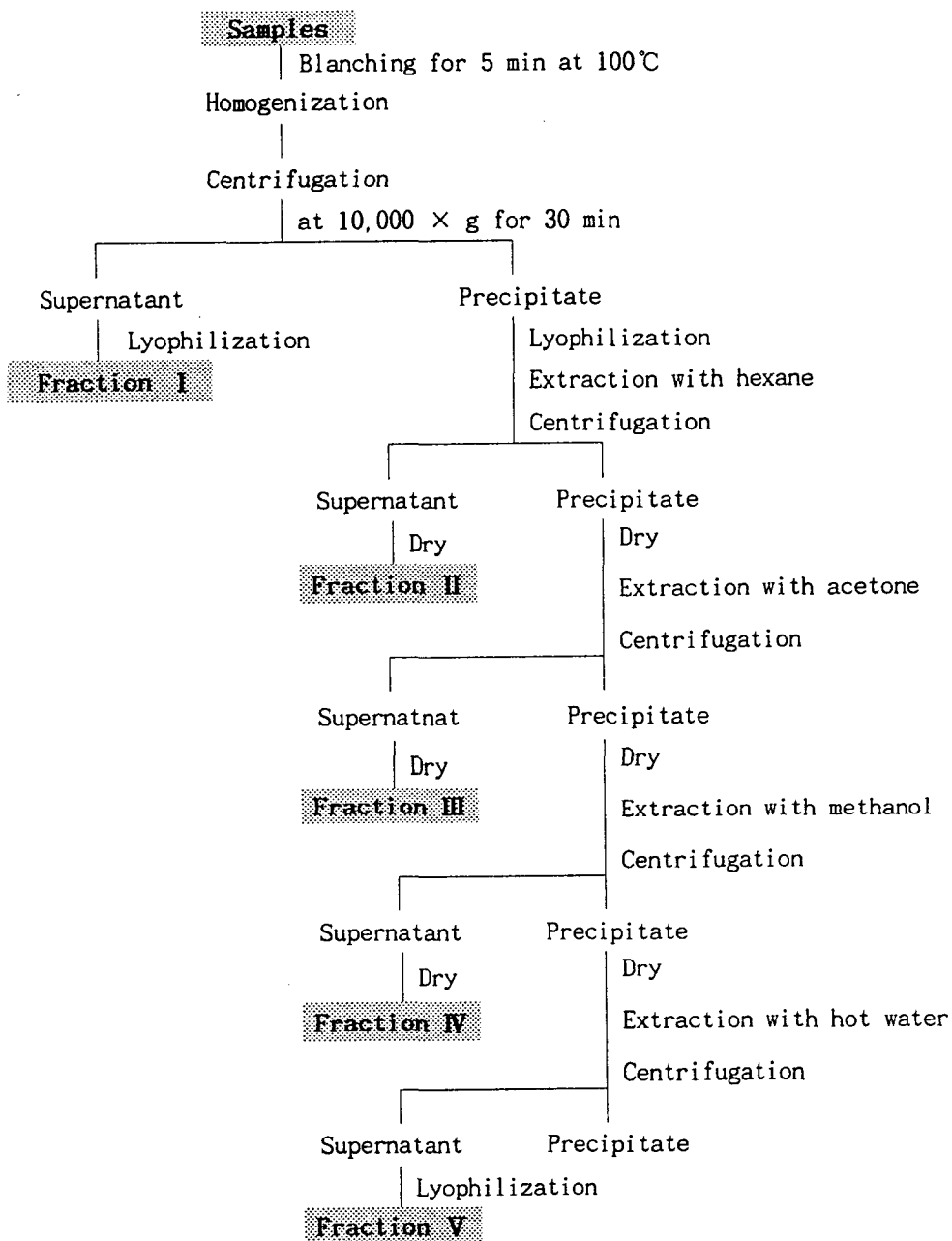


Fig. 2-1. Scheme for preparation of the samples from various edible plants

나. 항보체 활성물질의 용혈억제 경로 및 항보체 활성화 경로

용혈 억제가 반응시간에 비례한다는 결과를 바탕으로 전반응시간을 달리하여 활성을 측정하여 용혈억제 양식을 확인하였다. 보체계 활성화 경로를 알아보기 위하여 Yamada 등의 방법에 따라 시료와 NHS, GVB²⁺를 혼합하여 1차 반응시키는 단계에서 GVB²⁺대신 Ca²⁺이온을 선택적으로 제거한 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁺와 Ca²⁺이온과 Mg²⁺이온을 모두 제거한 10 mM EDTA-GVB²⁺를 사용한 경우의 항보체 활성을 비교하였다.

3. 활성 물질의 분리

동결건조하여 분쇄한 백리향 500 g을 methanol 20배 부피로 환류 추출하여 methanol 가용 획분인 TV-M(32.93 g)을 분리하였고, methanol 비가용 획분인 침전물은 감압농축하여 100℃에서 3시간 동안 환류 추출한 후 원심분리(5,000 × g, 30분) 및 동결건조하여 얻은 TV-0(45.97 g)를 적당량의 증류수에 녹인 후 ethanol을 단계적으로 가하여 그 농도(% v/v)를 각각 30%, 75%가 되도록 한 후 4℃에서 24시간 정치하고 원심분리(5,000 × g, 30분)하여 얻어진 각각의 침전물은 소량의 물에 재용해시켜 투석한 후 비투석 획분을 농축, 동결건조하였다. 이와 같은 방법으로 30% ethanol 용액에서의 침전 획분 TV-30(6.22 g), 75% ethanol 용액에서의 침전 획분 TV-75(15.55 g), 75% ethanol 용액에서의 비침전 획분 TV-E(24.40 g)의 3개의 획분을 제조하였다. Ethanol 농도별 침전획분 중에서 가장 높은 항보체 활성을 보인 TV-75획분을 증류수에 재용해하여 분자량이 100 KDa, 300 KDa의 여과막을 사용하여 분자량이 100 KDa이하의 TV-1(2.78 g), 100 KDa이상 300 KDa이하의 TV-2(1.54 g), 300 KDa이상의 TV-3(11.23 g)로 분획하여 시료를 제조하였다.

4. 활성 물질의 정제

한외여과에 의한 분획에서 항보체 활성이 가장 높았던 TV-3을 증류수에 녹여 2.0 M NaCl로 평형화시킨 DEAE-Toyopearl 650C column(Cl⁻ form, 4.0 × 33 cm)에 흡착시킨 후 증류수, 0.15, 0.3, 0.45, 1.0, 2.0 M NaCl 용액으로 차례로 용출시켜 각 획분을 투석, 감압농축, 동결건조하여 6개의 획분(TV-3-1, -2, -3, -4, -5, -6)을 얻었다. DEAE-Toyopearl 650C에 의하여 얻어진 획분 중에서 항보체 활성이 높은 TV-3-3을 각각 1.0 M (NH₄)₂SO₄ 용액에 녹여 1.0 M (NH₄)₂SO₄ 용액으로 평형화 된 Butyl-Toyopearl 650M column(2.4 × 10 cm)에서 3.0 mL/min의 유속으로 상온

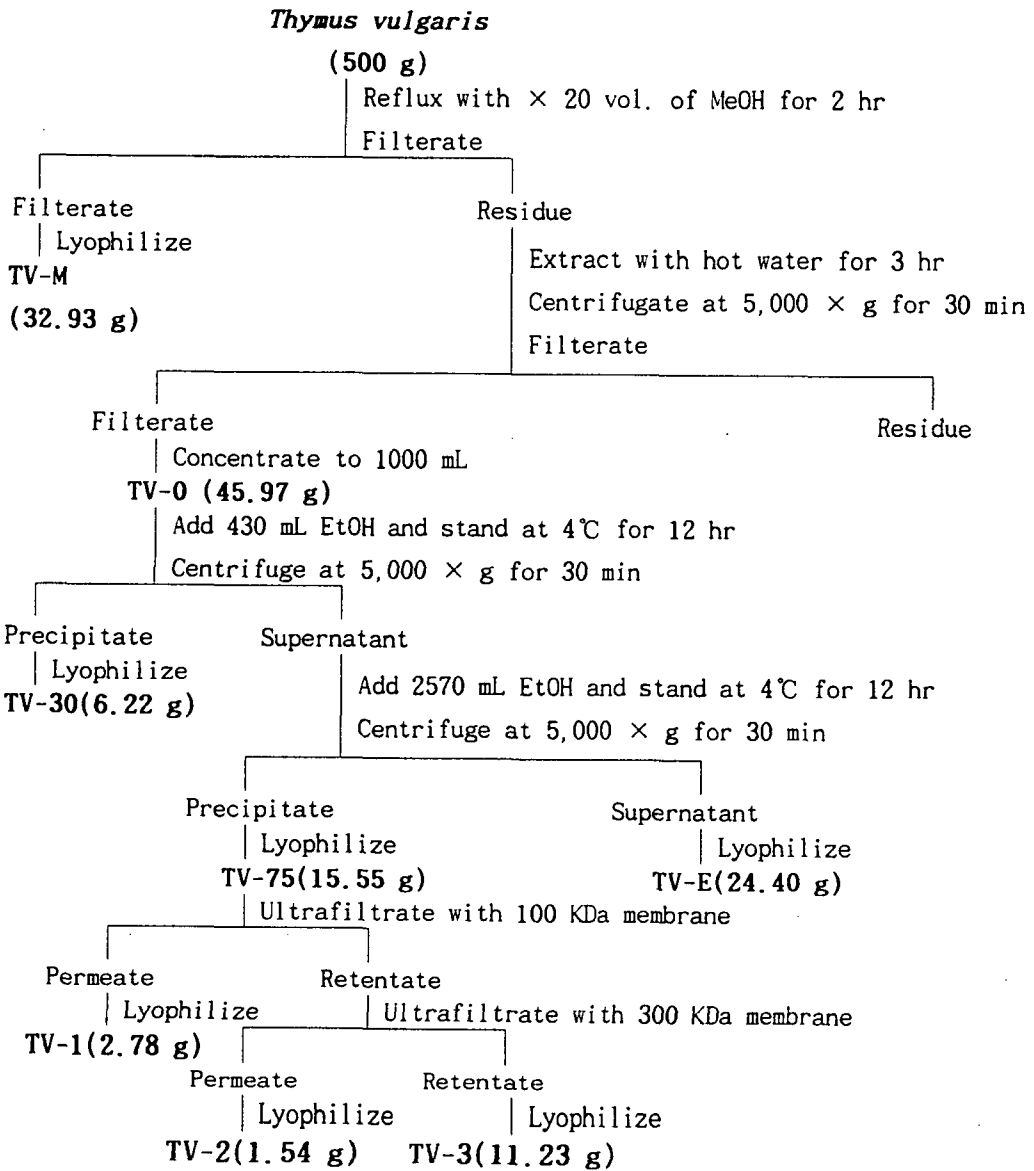


Fig. 2. Preparation of anti-complementary compounds from *Thymus vulgaris* L.

에서 hydrophobic interaction chromatography를 1.0 M (NH₄)₂SO₄ 용액에서 증류수로 역상 농도구배를 행하여 TV-3-3-I, -II의 획분을 얻은 후 투석, 감압농축, 동결건조하였다. Butyl-Toyopearl 650M column에서 얻어진 획분 중에서 주요 활성 획분인 TV-3-3-I를 0.2 M NaCl 용액에 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sepharose CL-6B column(2.5×85 cm)에서 0.2 mL/min의 유속으로 4°C에서 size exclusion

chromatography를 행하여 TV-3-3-Ia, Ib, -Ic, -Id의 획분을 얻은 후 투석, 감압 농축, 동결건조하였다. SEC상에서의 활성 획분인 TV-3-3-Ib를 Table 2A의 조건으로 HPLC를 행하여 정제하였다.

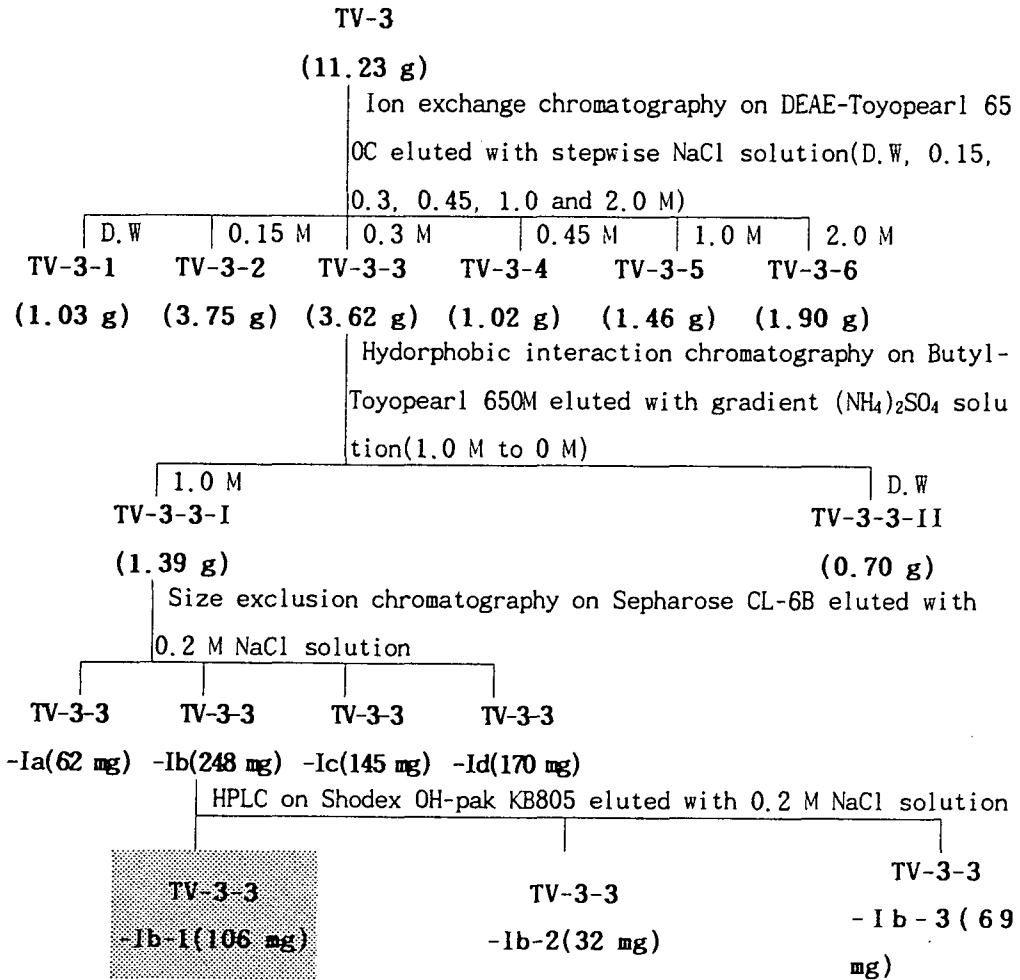


Fig. 2-3. Purification procedure of anti-complementary substances.

5. 항보체 활성 물질의 특성 실험

가. 활성 본체의 규명

각각의 시료(30 mg)를 Yamada 등의 방법에 따라서 protease를 가하여 제조한 protease 소화물과 sodium periodate(NaIO₄)를 반응시켜 얻은 periodate 산화물을 얻어 활성을 측정하였다.

Table 2-2. Analytical condition for HPLC and size exclusion chromatography-multiple angle laser light scattering (SEC-MALLS) photometer

A) Analytical condition for HPLC	
Apparatus	: Waters 2690
Detector	: Waters 410 (Refractive Index : RI) Photodiarray detector
Column	: Shodex OH-pak KB805(SEC type, 8 × 300 mm)
Column temp.	: 40°C
Flow rate	: 1.0 mL/min
Mobile phase	: 0.2 M NaCl solution
B) Analytical condition for SEC-MALLS	
Apparatus	: SP Thermo separation products Spectra SYSTEM P2000
Detector	: Wyatt technology Dawn-DSP laser photometer Shodex RI-71(Refractive Index : RI)
Column	: Tosohaas TSK-G5000PW(SEC type, 7.5 × 600mm)
Column temp.	: 60°C
Flow rate	: 0.4 mL/min
Mobile phase	: 0.2 M NaNO ₃ solution

나. 활성물질의 정제 순도 확인과 분자량 측정

정제 물질 TV-3-3-Ib-1의 순도를 확인하기 위하여 HPLC를 Table 2-2A와 같은 조건으로 행하였다. 정제물질의 분자량은 Table 2-2B의 분석 조건에서 SEC-MALLS photometer system을 사용하여 유속 0.4 mL/min으로 분석하였으며 dn/dc값은 pullulan(0.147 mL/g)을 기준으로 하여 평균분자량으로 나타내었다.

6. 정제 다당류의 구조 분석

가. IR spectra를 이용한 분석

정제 다당류 TV-3-3-Ib-1의 구조 분석을 위하여 정제된 시료를 KBr 200 mg(200 mesh)과 혼합하여 KBr pellet를 만들어 FT-IR spectrophotometer (BOMEM Michelson series MB 102-C15)를 사용하여 transmittance % 를 측정하였다.

나. 정제 다당류의 당쇄결합양식 분석

정제 다당류의 당쇄결합양식의 분석을 위하여 Pyrex tube 에 TV-3-3-Ib-1을 0.5 mg을 Hakomori방법에 의해 메틸화한 후 이 메틸화, 가수분해, 환원된 시료를 아세틸화시켜 methylated alditol acetate 유도체를 제조하였다. 메틸화 시료의 GC/MS와 GC의 분석 조건은 Table 2-3과 같다.

다. 정제 다당류의 NMR 분석

TV-3-3-Ib-1을 0.5 mL D₂O에 녹인 후 내부 기준 물질로 TSP(sodium-trimethylsilyl propionate d₄)를 사용하여 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR(Bruker co. AMX-500, 1D)을 측정하였다.

라. Arabinogalactan의 존재 확인 실험

β -Glucosyl-Yariv antigen을 이용한 single radial gel diffusion 법을 사용하여 Holst 등의 방법에 따라서 TV-3-3-Ib-1(1.0 mg/mL)을 1% agarose gel의 well 에 가해서 확산에 의해서 나타나는 β -glucosyl-Yariv antigen과의 침강선을 확인 하였다.

7. 항보체 활성물질의 *In vivo* 상의 독성 및 항암효과

가. *In vivo* 상의 독성 실험

실험실에서 적용된 ICR mouse(♂, 4-6 weeks)에 TV-3을 100, 500, 1,000, 2,000 mg/kg농도로 saline에 용해시켜 제조한 시료용액을 경구투여 후 2주간 독성유무를 관찰하였고, 비경구투여에 의한 독성실험은 시료를 10, 50, 100, 300, 500, 800, 1,000 mg/kg의 농도로 꼬리정맥에 투여하고 1주간 독성유무를 관찰하였다. 이때 대조군은 saline을 사용하여 같은 방법으로 경구 및 비경구투여하였다.

나. 항암 효과 측정 실험

항종양 활성 측정을 위하여 항보체 활성화 물질 TV-3을 5, 10, 50, 100 mg/kg 의 농도로 saline에 용해하였으며, 종양 세포는 ICR계 mouse 복강에서 2주일 간격으로 이식하여 보존하고 있는 sarcoma-180 세포를 이용하였으며 mouse 복강 내에서 2주일 간 배양한 sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하여 분리해 낸 후 빙냉하에서 주사용 생리 식염수로 수회 세척하여 적혈구를 분리 제거한 후 세포수가 2.5

$\times 10^6$ cells/mL가 되도록 조정하여 임 등의 방법에 따라서 마리 당 0.1 mL씩 오른쪽 서혜부에 피하 이식하고 24시간 후부터 시료를 1일 1회씩 10일간 복강 투여하여 측정하였다. 증식 저지율은 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 고행암 증식 저지 백분율(percent of inhibition ratio : I.R, %)로 계산하였다.

C_w : 대조군의 종양 무게

T_w : 시료 처치군의 종양 무게

$$I.R. (\%) = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

Table 2-3. Analytical conditions of GC/MS spectrometry and GLC for glycosidic linkage

A) Analytical condition of GC/MS	
Apparatus	: Hewlett Packard 6890 II GC/MS
Column	: SP-2380 (30 m \times 0.25 mm \times 0.2 μ m)
Column temp.	: 60 $^{\circ}$ C(1 min, 30 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 150 $^{\circ}$ C(1.5 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 250 $^{\circ}$ C
Injector temp.	: 280 $^{\circ}$ C
Detector temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	: He (0.5 mL/min)
B) Analytical condition of GLC	
Apparatus	: Young Lin M600D
Detector	: Flame ionization detector (FID)
Column	: SP-2380 (30 m \times 0.25 mm \times 0.2 μ m)
Column temp.	: 60 $^{\circ}$ C(1 min) \rightarrow 150 $^{\circ}$ C(30 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 231 $^{\circ}$ C(1.5 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 250 $^{\circ}$ C(30 $^{\circ}$ C/min, 5 min)
Injector temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Detector temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	: N ₂ (1.0 mL/min)

다. Sarcoma-180에 대한 세포독성 실험

항보체 활성화 물질 TV-3의 항종양 활성이 세포독성에 기인하는 것인지 여부를 파악하기 위하여 MTT법을 사용하여 sarcoma-180 cell의 생존율을 조사하였으며 대조군은 PBS를 사용하였다.

C_A : A₅₇₀ of control

T_A : A₅₇₀ of sample treated

$$\text{Cell viability } (\%) = \left[1 - \frac{C_A - T_A}{C_A} \right] \times 100$$

라. 면역 장기 및 면역 관련 세포수에 대한 영향

항보체 활성화 물질 TV-3의 *in vivo*상에서의 영향을 면역장기 무게 및 면역세포수의 변화를 측정하여 규명하고자 하였다. TV-3를 30 mg/kg의 농도로 saline에 용해하여 복강 주사하였으며, 대조군은 saline을 사용하여 박 등의 방법에 따라서 5-6주령 웅성 ICR mouse 복강에 시료를 투여하고 투여 후 1일, 2일, 3일, 5일, 7일 후에 마우스를 치사시킨 후 즉시 해부하여 비장과 흉선을 적출하고 무게를 측정하였으며 복강으로부터 복강세포를 얻어 총 복강 세포는 hemocytometer로 PMN은 Giemsa staining으로 대식세포는 NSE staining을 이용하여 1,000배로 관찰하였다.

마. 대식세포 활성화능 측정

면역세포수의 변화에서 크게 증가한 대식세포에 대해서 시료가 활성화상의 증가도 유발하는지 여부를 sarcoma-180 cell에 대한 대식세포의 탐식능을 측정하여 확인하였다. 5-6주령 웅성 ICR mouse의 복강내에 1.0 mL의 thioglycollate medium을 주입한 후 72시간 내에 대식세포를 mouse의 복강내에서 회수하였다. 회수된 대식세포를 DMEM 세포수가 2×10^4 cells/mL이 되도록 조정하였다. 대식세포 : sarcoma-180 cell의 비율을 1 : 1로 하여 MTT법을 이용하여 sarcoma-180 cell의 세포 생존율을 측정하였고 항보체 활성화 물질이 대식세포의 lysosome 내의 효소계에 미치는 영향을 측정하기 위하여 복강에서 회수한 대식세포를 시료와 함께 반응시켜 lysosomal phosphatase 활성을 측정하였다.

제 3 절 결 과

제 1 항 향신채소로부터의 항보체 활성화 검색

향신채소로부터의 항보체 활성을 검색한 결과(Table 2-4) 백리향 열수 추출물 (*Thymus vulgaris* L.), 산초 냉수 추출물(*Zantho xylum piperitum*), 바실 methanol 추출물(*Ocimum basilicum* L.) 및 흑후추 냉수 추출물(*Pipper nigrum* L.)에서 각각 72.7, 73.2, 85.6, 77.4%의 높은 활성을 나타내었다. 이들 시료에 대해

서 추출 용매별 활성을 재검토한 결과(Fig. 2-4) 저분자의 phytosterol 계열의 물질들이 존재할 것으로 추정되는 유기용매 추출획분에서도 항보체 활성이 관찰되기도 하였고 이들 획분들도 활성은 높았으나 그 중 백리향 열수 추출물이 재현성과 활성에서 우수하였으므로 연구 시료로 선정하였다.

Table 2-4. Anti-complementary activity of the extracts from various edible plant

Samples		*ITC ₅₀ (%)		
Scientific name	Common name	Fr. I	Fr. IV	Fr. V
<i>Achyranthes ascendens</i>	Amaranth	47.4	68.7	66.0
<i>Allium cepa</i> L.	Onion	2.8	9.5	27.1
<i>Allium fistulosum</i> L.	Scallion(thick)	53.7	66.5	21.3
<i>Allium fistulosum</i> L.	Scallion(thin)	6.5	22.3	5.4
<i>Allium monanthum</i> MAX	Wild rocambole	4.8	42.2	0.5
<i>Allium odorum</i> L.	Scallion	13.2	8.9	11.9
<i>Allium odorum</i> L.	Scallion(young)	17.1	17.2	9.7
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic(young)	16.1	15.0	21.4
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic(leaf)	23.5	22.4	18.7
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic(trunk)	22.0	26.2	21.3
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic	0.2	22.3	2.0
<i>Allium schoenoprasum</i>	Chives	14.5	44.9	44.0
<i>Allium tuberosum</i> L.	Leek	65.5	59.8	33.8
<i>Allium tuberosum</i> L.	Leek (from China)	17.4	2.00	22.3
<i>Anethum graveolens</i> L.	Dill seed	20.9	16.7	29.8
<i>Apium graveolens</i> L.	Celery	25.8	9.40	30.7
<i>Apium graveolens</i> L.	Celery(seed)	25.9	53.5	59.1
<i>Aralia elata seemann</i>	Japanese anelica tree	0.7	22.9	29.2
<i>Armoracia rusticana</i>	Horseradish	28.0	0.6	19.4
<i>Artemisia draccucculus</i>	Tarragon	6.4	29.7	30.8
<i>Artemisia vulgaris</i>	Mugwort	38.3	30.5	26.0
<i>Astar scaber</i>	Chwi	19.9	25.3	27.3
<i>Beta vulgaris</i>	Beet	63.8	28.7	65.3
<i>Beta vulgaris var.</i>	Swiss chard	0.5	9.4	4.8
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf	51.2	58.9	53.5
<i>Brassica juncea</i>	mustard leaf (wild type)	64.5	6.5	25.8
<i>Brassica oleracea</i> L. capitata	Cabbage	43.0	5.5	20.8

(to be continued)

Samples		ITCH ₅₀ (%)		
Scientific name	Common name	Fr. I	Fr. IV	Fr. V
<i>Brassica oleracea</i> L. italica	Broccoli	4.1	23.8	1.9
<i>Brassica oleracea</i> L. acephala	Kale	32.0	50.8	46.3
<i>Brassica rapa</i>	Green vitamin	29.0	38.1	43.9
<i>Chilicon carne</i>	Pepper(Hot)	61.0	65.1	61.0
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Crown daisy	14.5	33.6	24.2
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Pickpurse	24.3	36.8	56.2
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper (young)	9.6	27.4	48.5
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper (green)	19.6	17.3	31.7
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper (Red)	18.5	23.2	46.3
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper (leaf)	26.6	26.6	4.7
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper (seed)	15.8	9.6	38.4
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper (trunk)	12.3	28.9	13.6
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pimento (Sweet pepper)	0.2	30.2	3.8
<i>Carum carvi</i>	Caraway	24.3	35.3	48.4
<i>Cichorium endivia</i>	Endive	43.3	45.7	37.3
<i>Cicorium intybus</i>	Chichory	70.8	65.4	44.3
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamon	18.8	4.5	32.7
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriander	44.5	56.7	53.3
<i>Crocus sativus</i>	Saffron	44.8	67.9	41.3
<i>Cuminum cyminum</i>	Cummin	38.0	24.7	57.1
<i>Cymbopogon citrus</i>	Lemon	50.0	67.8	49.5
<i>Curcuma longa</i> L.	Turmeric	6.9	12.8	18.8
<i>Cucurbita moschate</i>	Pumpkin leaf	61.4	67.1	50.0
<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamon	33.0	38.6	46.0
<i>Eugenia caryophyllate</i>	Clove	20.0	3.6	34.2
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fennel	0.2	0.8	15.8
<i>Illicium verum</i> Hooker	Star anis	43.0	40.9	38.0
<i>Ixeris dentata</i>	Lettus(green)	0.5	1.5	25.8
<i>Laurus nobilis</i>	Bay laurel	14.1	2.9	11.6
<i>Medicago sativus</i>	Alfalfa	63.4	46.2	57.4
<i>Mentha</i> spp.	Mint	19.7	52.8	25.4
<i>Myristica fragrans</i> Houtt	Nutmeg	24.3	25.3	12.7
<i>Myristica fragrans</i> Houtt	Mace	60.7	68.7	50.3
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Basil	26.4	85.6	24.5
<i>Oenanthe javanica</i>	Drop wort	18.8	23.8	0.2
<i>Origanum hortensis</i>	Marjoram	13.2	28.0	28.6
<i>Origanum vulgare</i> L.	Oregano	22.0	12.8	18.8
<i>Papaver somniferum</i>	Poppy seed	64.6	45.0	42.1
<i>Perilla frutescens</i>	Perillae folium	35.8	51.7	52.3
<i>Petasites japonicus</i>	Butterbur	38.7	18.9	40.0
<i>Petroselinum crispum</i>	Parslry	0.7	13.2	6.7

(to be continued)

Samples		ITCH ₅₀ (%)		
Scientific name	Common name	Fr. I	Fr. IV	Fr. V
<i>Pimenta dioicalis</i>	Allspice	19.3	0.9	39.6
<i>Pimpinella anisum</i>	Anise	26.9	7.3	36.2
<i>Pipiper nigrum</i> L.	Pepper(Black)	77.4	24.7	52.6
<i>Pipiper nigrum</i> L.	Pepper(White)	55.6	0.7	20.4
<i>Raphanus sativus</i>	Radish	16.8	0.70	32.2
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	31.7	26.3	25.9
<i>Salvia officinalis</i>	Sage	32.5	47.7	47.8
<i>Satureja hortensis</i>	Savory	42.5	65.8	40.9
<i>Sedum sarmentosum</i>	Stringy stone crop	13.8	27.8	36.8
<i>Sinapis alba</i> L.	Mustard	9.4	58.6	16.2
<i>Taraxacum officinale</i> L.	Dandelion	51.9	69.6	47.0
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	73.7	44.4	72.7
<i>Valerianella locusta</i>	Corn salad	30.3	45.1	35.4
<i>Wasabia japonica</i>	Wasabia	21.3	13.8	43.7
<i>Zantho xylum piperitum</i>	Japanese pepper	73.2	53.5	63.7
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	21.0	30.9	34.4

제 2 항 백리향 열수 추출물로부터 조다당류의 조제

동결건조하여 분쇄한 백리향 500 g을 methanol로 환류추출하여 methanol 가용 성분인 TV-M(32.93 g)을 분리하였고 methanol 비가용 성분인 침전물은 동결건조한 후 100℃에서 3시간 동안 열수 추출하여 TV-0(45.97 g)을 얻었다. 이중 항보체 활성 획득인 TV-0의 화학적 조성은 전당이 25.4%이고 단백질은 71.8%로 구성되어 있었으며(Table 2-5), 이것을 ethanol 농도에 따른 유기용매 침전 분획 방법으로

Table 2-5. Chemical composition and yield of the isolates obtained during the preparation of anti-complementary compounds

	Total sugar	Uronic acid	Protein	Yield(%)
TV-0	25.4	46.7	71.8	9.2
TV-M	15.2	19.7	85.4	6.6
TV-30	32.9	42.5	65.1	13.5
TV-75	27.8	47.2	69.2	33.8
TV-E	23.7	28.3	70.8	53.1
TV-1	24.6	59.3	72.2	17.9
TV-2	26.7	40.9	65.7	9.9
TV-3	30.5	40.6	68.9	72.2

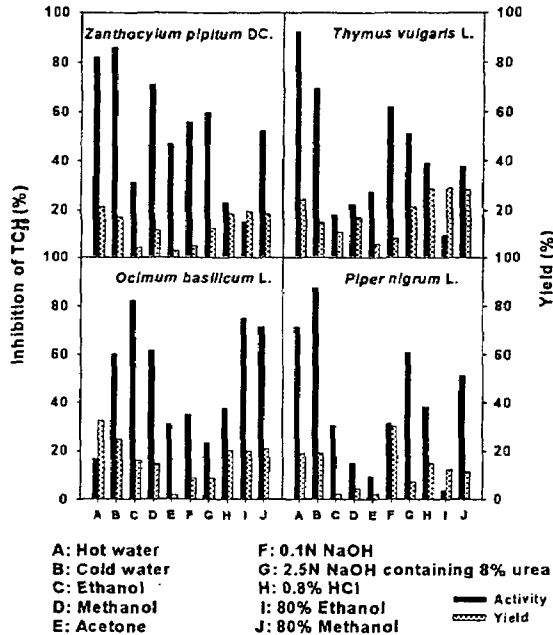


Fig. 2-4. Comparison of anti-complementary activity and yields of different solvent extracts from *Thymus vulgaris* L. The concentration of each extract was 1.0 mg/mL

분자량과 비극성 정도에 따라 TV-30, TV-75, TV-E의 3개의 획분으로 분리하였다 (Fig. 2-2). 각 획분의 1.0 mg/mL에서의 항보체 활성을 측정한 결과(Fig. 2-5A), TV-75(92.1%) > TV-30(18.7%) > TV-E(64.5%)순으로 나타났으며, 가장 높은 활성의 TV-75는 33.8%의 수율을 보였다. Ethanol 농도에 따른 침전 분획에서 가장 높은 활성을 보인 TV-75에 대해서 한외여과를 실시한 결과(Fig. 2-5B) 300 kDa 이상의 획분인 TV-3에서 1.0 mg/mL의 농도에서 95.0%로 가장 높은 활성을 나타내어 300 kDa 이상의 고분자 물질로 추정되었으며 수율이 72.2% (Table 2-5), 화학적 조성에서 TV-3은 전당이 30.5%이고 단백질이 68.9%로 복합 단백 다당획분으로 추정되었다.

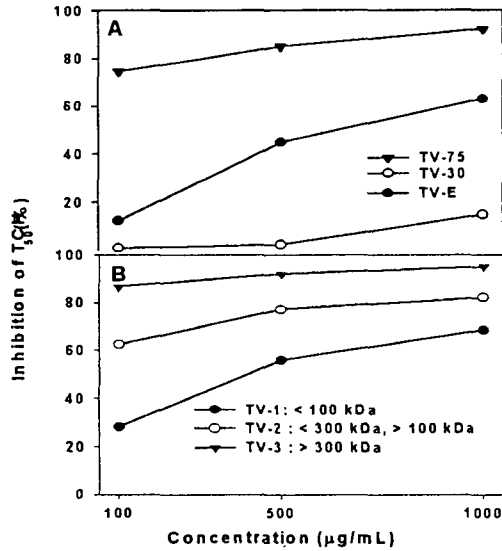


Fig. 2-5. Anti-complementary activity of subfractions from TV-0 separated by ethanol precipitation(A) and TV-75 by ultrafiltration(B)
The ultrafiltration was performed with Millipore Masterflex system and the size of membrane filter was 1 ft²

제 3 항 조다당류 TV-3의 정제

1. 이온교환수지를 이용한 정제

한외여과에 의해서 분획한 조다당류 TV-3을 DEAE-Toyopearl 650C(Cl⁻ form)를

이용하여 용출액을 NaCl 이온 강도에 따라 6개의 획분으로 분획하였다. 항보체 활성은 0.3 M NaCl로 용출된 TV-3-3이 1.0 mg/mL의 농도에서 95.6%의 가장 높은 활성을 나타내었으며(Fig. 2-6) 수율도 22.2%로 비교적 높았다(Table 2-6). 각 획분의 화학적 조성과 구성당을 확인한 결과(Table 2-6) 용출액의 이온강도가 증가함에 따라 시료중의 전당은 감소한 반면에 단백질 함량이 증가하였으며 TV-3-3은 각각 전당이 47.3%이고 단백질이 24.6%로 나타났으며 구성당은 galacturonic acid와 arabinose가 각각 40.80, 23.18 mol%로 높게 함유되어 있는 산성 다당류로 추정되었다.

2. 소수성 크로마토그래피를 이용한 정제

DEAE-Toyopearl 650C에서 분리한 TV-3-3을 Butyl-Toyopearl 650M에서 ammonium sulfate 농도구배에 따른 소수성 크로마토그래피를 행한 결과(Fig. 2-7) 1.0 M ammonium sulfate에서 용출된 획분과 D.W에서 용출된 획분으로 분리되었다. 이들 획분은 각각 유사한 활성을 나타내어 TV-3-3-I와 TV-3-3-II는 1.0 mg/mL의 농도에서 95%이상의 활성을 보였으나 활성이 높은 TV-3-3-I을 주 활성 획분으로 하여 정제하였다. 화학적 조성과 구성당을 확인한 결과(Table 2-7), TV-3-3-I은 전당

Table 2-6. Chemical composition and yield of TV-3 subfractions separated by DEAE-Toyopearl 650C

	TV-3-1	TV-3-2	TV-3-3	TV-3-4	TV-3-5	TV-3-6
A) Chemical composition (%)						
Total sugar	56.5	46.3	47.3	22.8	7.0	8.4
Protein	30.2	45.7	42.3	67.5	79.1	74.3
Acid sugar	5.5	48.7	42.5	9.8	3.5	3.1
Yield	9.2	23.4	22.2	10.0	12.8	16.8
B) Structural sugar composition (mol %)						
Rhamnose	-	6.41	9.97	4.64	2.74	2.10
Fucose	-	0.18	2.05	1.57	5.94	-
Arabinose	15.88	27.88	23.18	42.15	45.73	23.48
Xylose	13.18	3.07	2.08	6.75	3.66	9.87
Mannose	22.71	1.67	4.81	4.21	2.29	17.85
Galactose	19.22	10.03	9.97	23.61	21.49	26.54
Glucose	23.50	2.03	3.48	8.84	14.64	19.25
Galacturonic acid	-	37.13	40.8	6.65	2.63	-
Glucuronic acid	5.50	11.57	5.72	3.15	0.87	-

함량이 87.6%이고 단백질 함량은 12.5%를 나타내어 항보체 활성 본체가 다당류일 것으로 추정되었고, 구성당에서는 TV-3-3-I은 galacturonic acid, glucuronic acid, arabinose, rhamnose가 각각 55.37, 30.35, 5.64, 5.02 mol%로 TV-3-3보다 산성당 함량이 증가되어 86% 이상의 산성당으로 구성되어 있었다. 한편, TV-3-3-II는 화학적 조성에서 전당 함량이 20.2%이고 단백질 함량이 72.5%로 단백질 획분이 분리된 것으로 보여지며 이는 소수성 흡착 칼럼 내에서 단백질 부분이 resin과 소수성 결합을 하여 chromatogram 상에서 후반부에 나타나는 것으로 추정 되었다

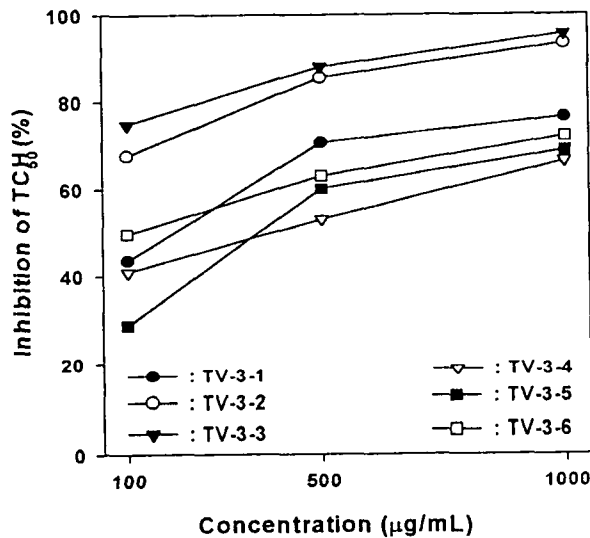


Fig. 2-6. Anti-complementary activity of TV-3 subfractions separated by DEAE-Toyopearl 650C (Cl⁻ form)

The column(3.5 x 40 cm) of DEAE-Toyopearl 650C was eluted with D.W, 0.15, 0.3, 0.45, 1.0, 2.0 M NaCl at flow rate of 1.5 mL/min

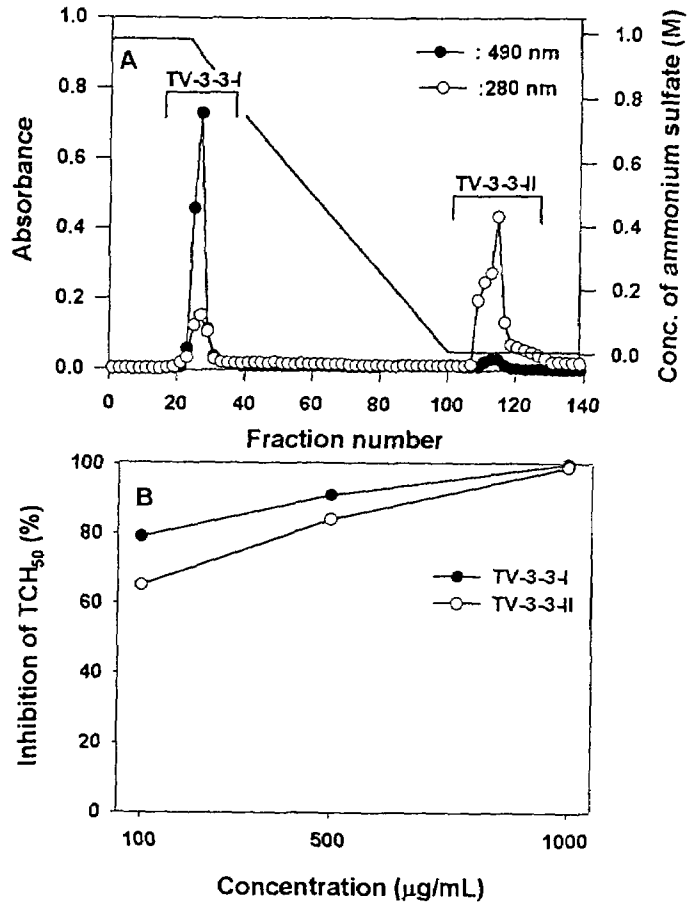


Fig. 2-7. Hydrophobic interaction chromatography(A) of TV-3-3 using Butyl-Toyopearl 650M and anti-complementary activity of the two isolates(B)

The column(2.4 x 10 cm) of Butyl-Toyopearl 650M was eluted with gradient of 1 M (NH₄)₂SO₄ to 0 M (NH₄)₂SO₄ at flow rate of 3 mL/min and the fraction size was 5 mL/tube.

Table 2-7. Chemical composition of TV-3-3 subfractions separated by Butyl-Toyopearl 650M

	TV-3-3-I	TV-3-3-II
A) Chemical composition (%)		
Total sugar	87.6	20.2
Protein	12.5	72.5
Acid sugar	86.5	0.0
Yields	19.0	56.8
B) Structural sugar composition (mol %)		
Rhamnose	5.02	Trace*
Fucose	0.28	Trace*
Arabinose	5.64	49.02
Xylose	0.24	3.92
Mannose	1.46	2.45
Galactose	1.52	40.20
Glucose	0.39	4.41
Galacturonic acid	55.27	-
Glucuronic acid	30.85	-

*Detected less than 0.10 mol%

3. 크기배제크로마토그래피를 이용한 정제

활성 획분 TV-3-3-I을 Sepharose CL-6B에 의한 size exclusion chromatography (SEC)를 행하였다. TV-3-3-I은 TV-3-3-Ia, -Ib, -Ic, -Id의 획분으로 분획되었고 (Fig. 2-8A) 이들 각각의 활성은 1.0 mg/mL의 농도에서 87.5, 98.0, 79.2, 72.7%를 나타내었으며 활성과 수율이 높은 TV-3-3-Ib를 활성 획분으로 정제하였다(Fig. 2-8B).

4. HPLC를 이용한 정제

TV-3-3-Ib를 SEC column을 이용한 HPLC를 행한 결과 TV-3-3-Ib는 TV-3-3-Ib-1, -Ib-2, -Ib-3의 3개의 peak로 분리되었다(Fig. 2-9A). 이들 획분 중 수율이 70%이고 활성이 1.0 mg/mL에서 98.4%로 가장 높은 TV-3-3-Ib-1을 활성 획분으로 정제하였다 (Fig. 2-9B). 일반적으로 SEC column 상에서는 분자량이 작을수록 retention time 이 길어지는 경향을 나타내는데 분리된 3개의 peak의 경우 분자량이 작을수록 대체로 항보체 활성이 낮다는 보고에서와 같이 peak의 순서가 뒤에 나타나는 저분자 획분에서 활성이 낮게 나타났다.

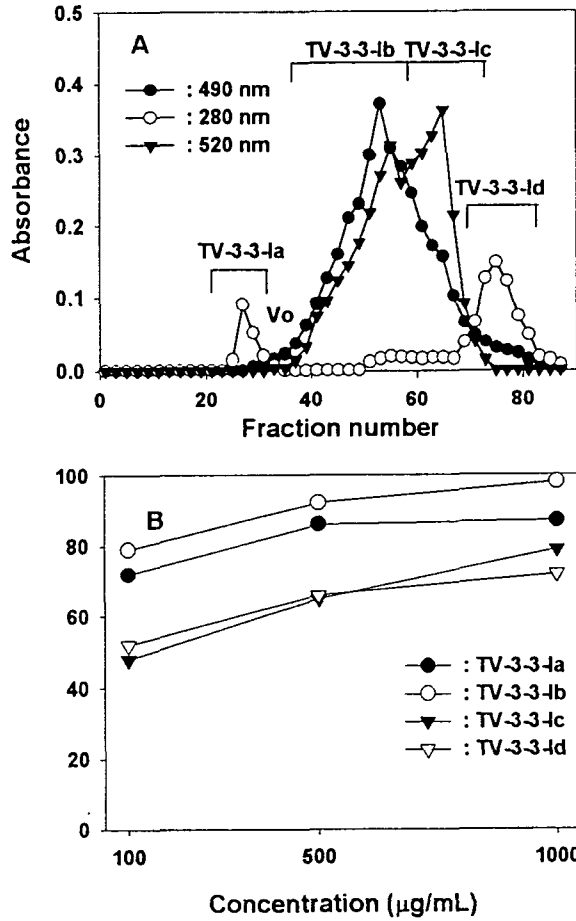


Fig. 2-8. Gel filtration chromatography(A) and Anti-complementary activities(B) of subfractions from TV-3-3-I using Sepharose CL-6B

제 4 항 항보체 활성 물질의 정제 확인 및 특성 규명

HPLC상에서 단일 핵분으로 분리한 TV-3-3-Ib-1의 순도 확인을 위하여 SEC column을 이용한 HPLC을 행한 결과, 단일 peak로 나타나 순수하게 정제되었음이 확인되었다(Fig. 2-10A). TV-3-3-Ib-1은 SEC-MALLS photometer을 이용하여 분자량을 측정한 결과 Fig. 2-10B에서 나타난 바와 같이 dn/dc 값이 0.147 mL/g인 pullulan과 dextran을 기준으로 평균 분자량이 $(1.800 \pm 0.016) \times 10^5$ Da이고 polydiversity가 1.34인 다당으로 확인되어 분자량 분포의 다양성이 보여졌으며

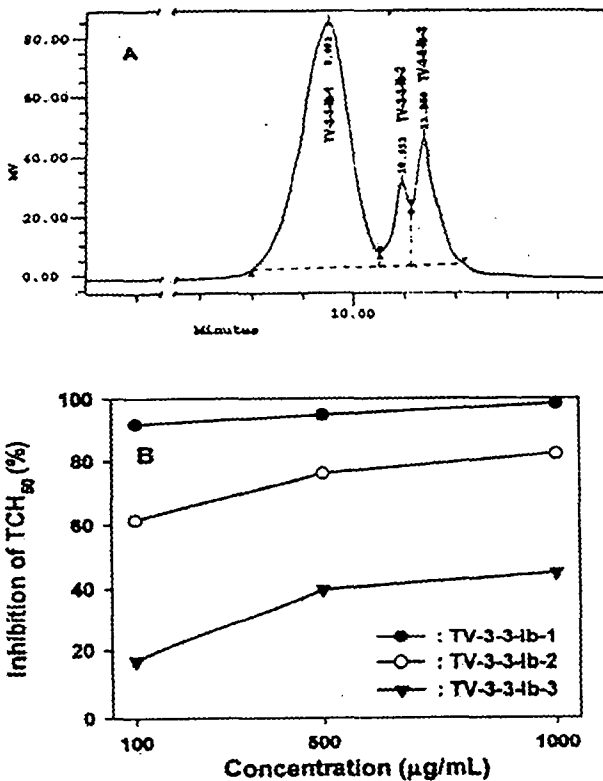


Fig. 2-9. HPLC profile of TV-3-3-Ib(A) and anti-complementar activity of the three isolates(B)

The column(SEC type, 8 x 300 mm) of Shodex OH-pak KB805

이는 3차 구조상의 차이에서 기인하는 것으로 추정되었다. 이러한 활성 다당의 분자량은 기존에 보고된 산성 다당인 *Panax notoginseng*에서의 37 kDa에서 760 kDa

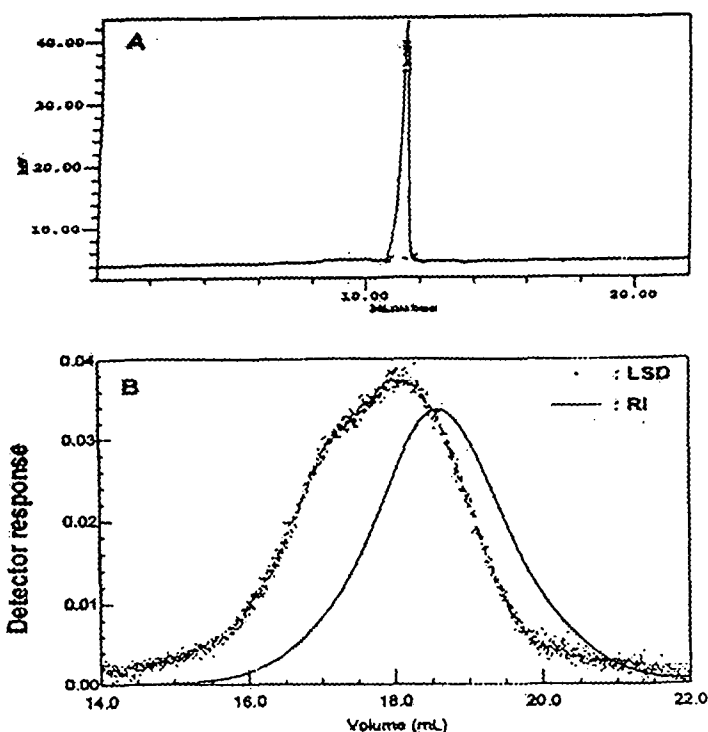


Fig. 2-10. HPLC profile(A) and molecular weight determination using SEC-MALLS photometer(B) of the purified TV-3-3-Ib-1

HPLC was performed with SEC typed Shodex OH-pak KB805(8 x 300 nm) using isocratic solvent system of 0.2 M NaCl

SEC-MALLS photometry was performed with SEC typed TSK G5000PW (7.5 x 600 mm) using isocratic solvent system of 0.2 M NaNO₃

사이의 다당류와 *Plantago major* L. 에서 분리된 PMIA의 77-80 kDa의 다당류 등 활성을 나타내는 다당류의 분자량 범위는 수 십에서 수 백만 까지 폭넓게 분포한다. 정제 다당 TV-3-3-Ib-1은 이들 분자량의 중간 정도인 180 kDa을 나타내는 다당으로 확인되었다. 정제 다당류의 화학적 조성은 구성당을 GC를 통해서 아미노산은 HPLC를 통해 확인한 결과(Table 2-8, 9) 구성당에서는 galacturonic acid > glucuronic acid > arabinose > galactose > rhamnose 순으로 각각 62.57, 21.93, 4.79, 3.94, 2.67 mol%로 존재하였으며 glycine > serine > glutamine 등이 각각 20.13, 17.21, 12.27 mol%로 비교적 많이 함유되어 있었다. 이러한 결과는 pectin에서와 같이 galacturonic acid의 함량이 높은 특징을 나타내어 정제 다당 TV-3-3-Ib-1은 pectin성 다당류로 추정되었다. TV-3-3-I는 당과 단백질이 각각 87.6%, 12.5% 존재하므로 항보체 활성 본체를 확인하기 위하여 pronase에 의한 단백질 가수분해와 periodate를 이용하여 다당류의 free hydroxyl 간의 탄소고리 산화에 의한 활성의 변화를 관찰하였다. TV-3-3-I은 periodate 산화 상태에서 44%의

활성 감소를 나타냈으나 pronase 소화 상태에서는 8% 정도의 미미한 활성의 감소가 일어났으므로 기존에 식물체에서 보고된 항보체 활성 물질이 주로 다당류로 나타난 것과 일치하는 결과로서 활성 본체는 다당류로 확인되었다(Fig. 2-11).

Table 2-8. Chemical composition of purified anti-complementary polysaccharide TV-3-3-1b-1

(A) Chemical composition	(%)
Total sugar	92.1
Protein	8.4
Acid sugar	84.5
(B) Structural sugar composition	mol%
Rhamnose	2.67
Fucose	0.48
Arabinose	4.79
Xylose	1.28
Mannose	1.02
Galactose	3.94
Glucose	1.30
Galacturonic acid	62.57
Glucuronic acid	21.93

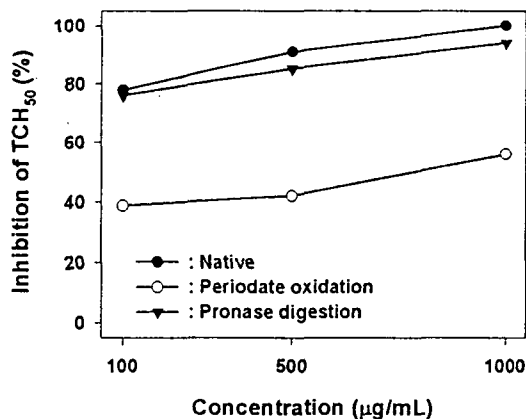


Fig. 2-11. Anti-complementary activity of pronase digested or periodate oxidized TV-3-3-I

Table 2-9. Amino acid composition of the purified anti-complementary polysaccharide

Component amino acid (mol %)			
Cya*	0.00	PRO	4.30
ASX*	5.67	TYR	0.78
GLX*	12.27	VAL	4.95
SER	17.21	MET	0.34
GLY	20.13	ILE	3.42
HIS	2.71	LEU	4.24
ARG	0.92	PHE	1.71
THR	4.93	TRP	0.01
ALA	13.97	LYS	2.45

* Sum of the cysteine and cystine ; asparagine and aspartate ; glutamine and glutamate

제 5 항 정제 다당류의 구조적 특성

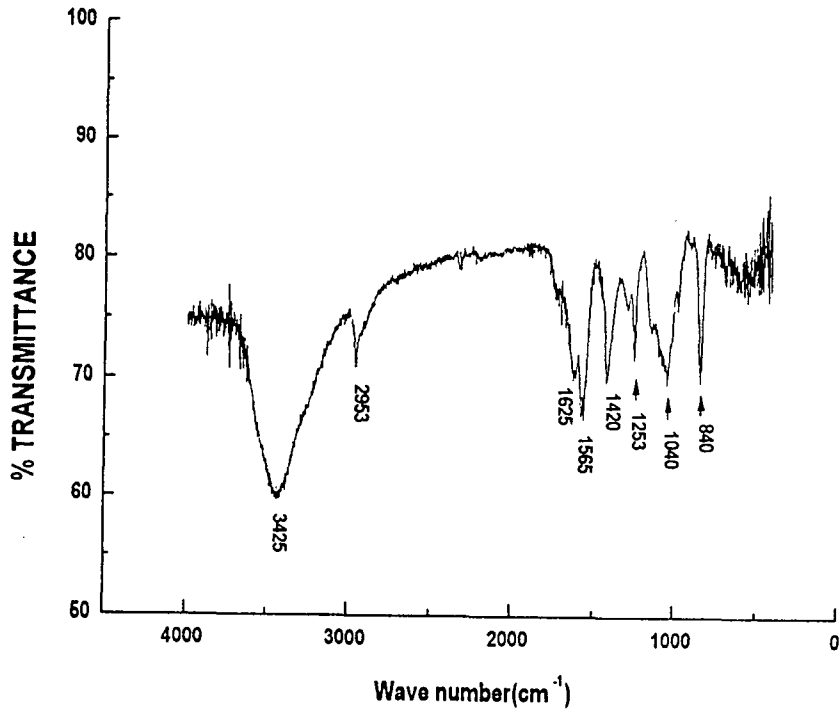
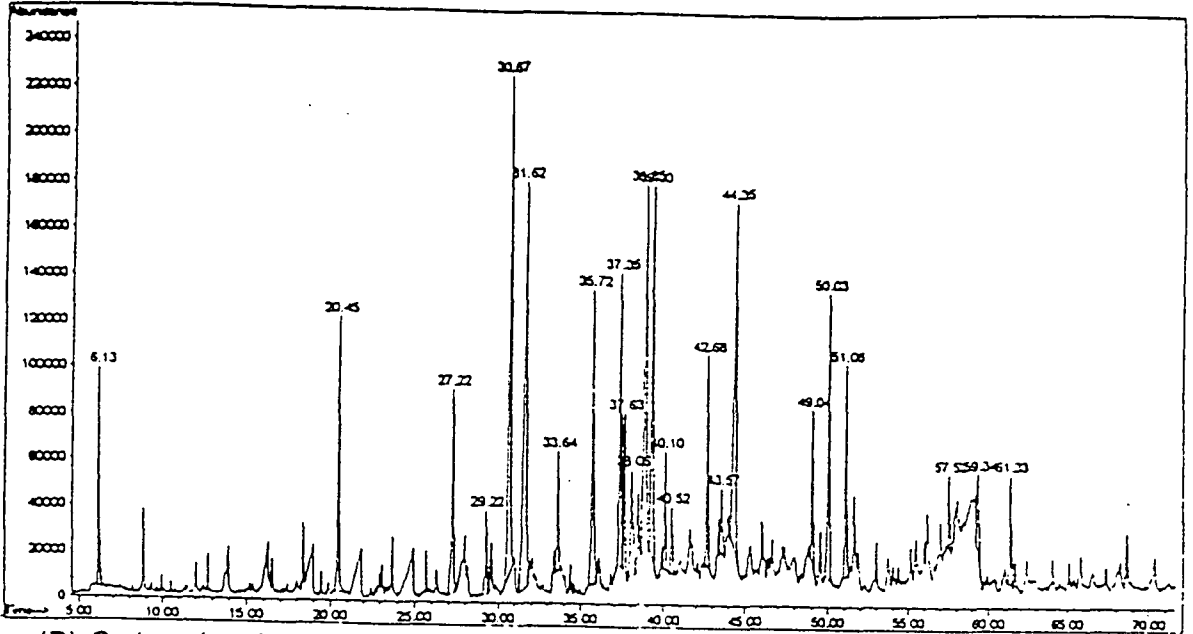


Fig. 2-12. IR spectrum of the purified anti-complementary polysaccharide, TV-3-3-Ib-1. The whole IR spectrum (4000 - 500 cm^{-1}) were recorded on FT-IR spectrophotometer (BOMEM Michelson series MB 102-C15) using KBr pellet.

정제 다당류의 기능기는 IR spectrum (Fig. 2-12)에서 산성의 heteroglycan에서 보여지는 O-H 신축진동($3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$), C-H 신축진동($3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$), carbonyl 기($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$)의 흡수대가 나타났다. 특징적인 흡수대로는 1253 과 1040 cm^{-1} 에서의 O-glycosidic 결합과 840 cm^{-1} 에서의 α -anomer 배위의 수소의 흡수대를 보였고 2953 cm^{-1} 에서의 -CH_3 기를 확인할 수 있었다. GC/MS에 의한 당쇄결합 양식 분석 결과(Table 2-10, Fig. 2-13). 산성당을 환원시키지 않은 경우 말단에 galactose와 arabinose가 각각 16.98, 8.67 mol%로 높게 존재하였고 2,4-linked rhamnose, 3-linked glucose, 4,6-linked galactose, 4-linked glucose의 함량이 각각 $11.29 > 9.50 > 8.47 > 6.50\text{ mol}\%$ 순으로 많이 존재하였다. 산성당을 환원시

(A) Neutral polysacchride



(B) Carboxyl reduced polysaccharide

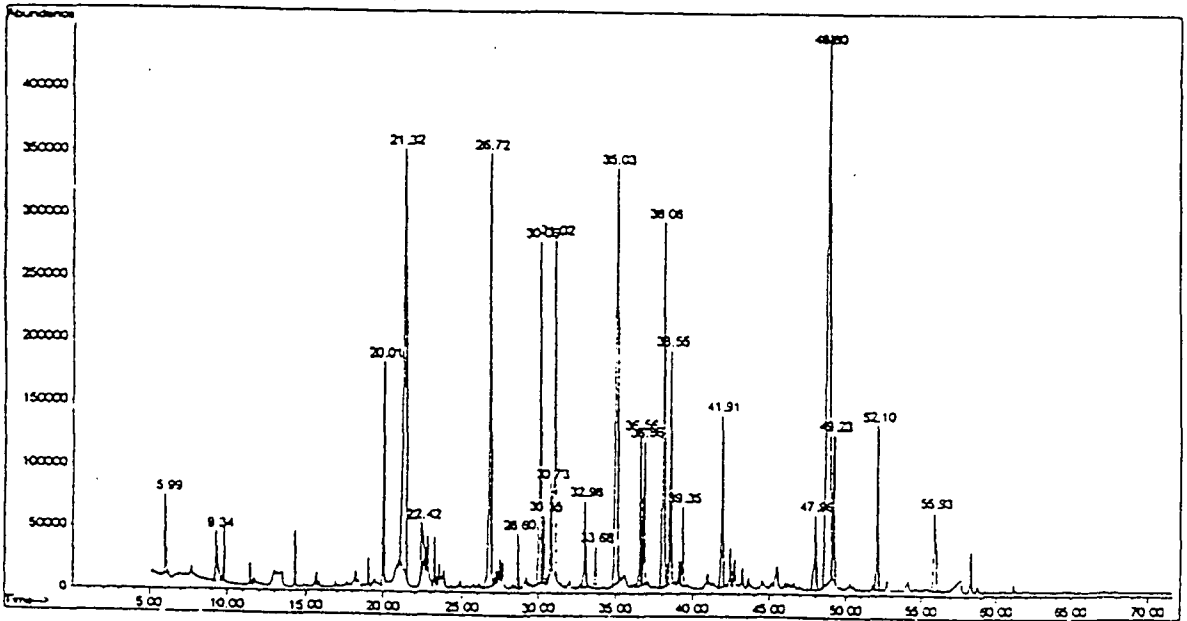


Fig. 2-13. Total ion chromatograms of partially methylated alditol acetates derived from TV-3-3-b-1

킨 후 methylation을 하였을 때 4-linked galacturonic acid와 3-linked galacturonic acid가 각각 25.84, 16.03 mol%이었으며 말단에는 galactose와 arabinose가 각각 16.86, 6.61 mol%, 측쇄 결합으로는 3,5-linked arabinose가

Table 2-10. Glycosidic linkage composition of purified anti-complementary polysaccharide

Glycosidic linkage		Carboxyl non-reduced derivative	Carboxyl reduced derivative
			mol%*
Rha	2,4Rha	11.29	3.13
Fuc	3Fuc	7.38	-
Ara	TAra**	8.67	6.61
	3,5Ara	3.10	10.84
Xyl	5Xyl	4.94	16.86
Man	2,6Man	2.78	-
Gal	TGal**	16.98	16.86
	3Gal	2.76	-
	4Gal	4.11	4.89
	6Gal	3.48	-
	3,6Gal	5.42	-
	4,6Gal	8.47	-
Glc	3Glc	9.50	0.26
	4Glc	6.50	-
	3,6Glc	4.62	-
GalA	3GalA	-	16.03
	4GalA	-	25.84
GlcA	4GlcA	-	1.95

Calculated from abundance of the each sugar derivative obtained from GLC, ** Non-reducing terminal residues are indicated by T

10.84 mol%로 주로 존재할 것으로 추정되었다. 산성당 함량이 84.5%로 대부분을 차지하고 있는 TV-3-3-Ib-1의 당쇄결합 분석시 당구성비와 완전히 일치하지는 않았다. 이는 alditol acetate로 전환하는 과정에서 각 구성당의 전환율의 차이에서 기인하는 것으로 보여지며 결합 조성비를 바탕으로 주요 당쇄결합은 4-linked alacturonic acid와 3-linked galacturonic acid로 이루어져 있을 것으로 판단되며 3,5-linked arabinose, 2,4-linked rhamnose, 3,6-linked galactose, 4,6-linked galactose가 측쇄 결합에, 말단에는 arabinose와 galactose가 존재하는 것으로 사료되었다. 이러한 당쇄결합 양식의 분석 결과는 Kiyohara 등이 보고한 *Angelica acutiloba* KITAGAWA의 pectic arabinogalactan인 AGIIa의 당쇄 함량과 유사한 분포를 나타내었고 활성의 구조는 측쇄에 결합된 중성 다당류가 중요한 역할을 할 것으로 추정되었다. 정제 다당류의 anomer 배위와 당쇄결합 양식, 치환

기 등을 밝히기 위해서 TSP(sodium trimethylsilyl propionate d_4)를 내부 기준

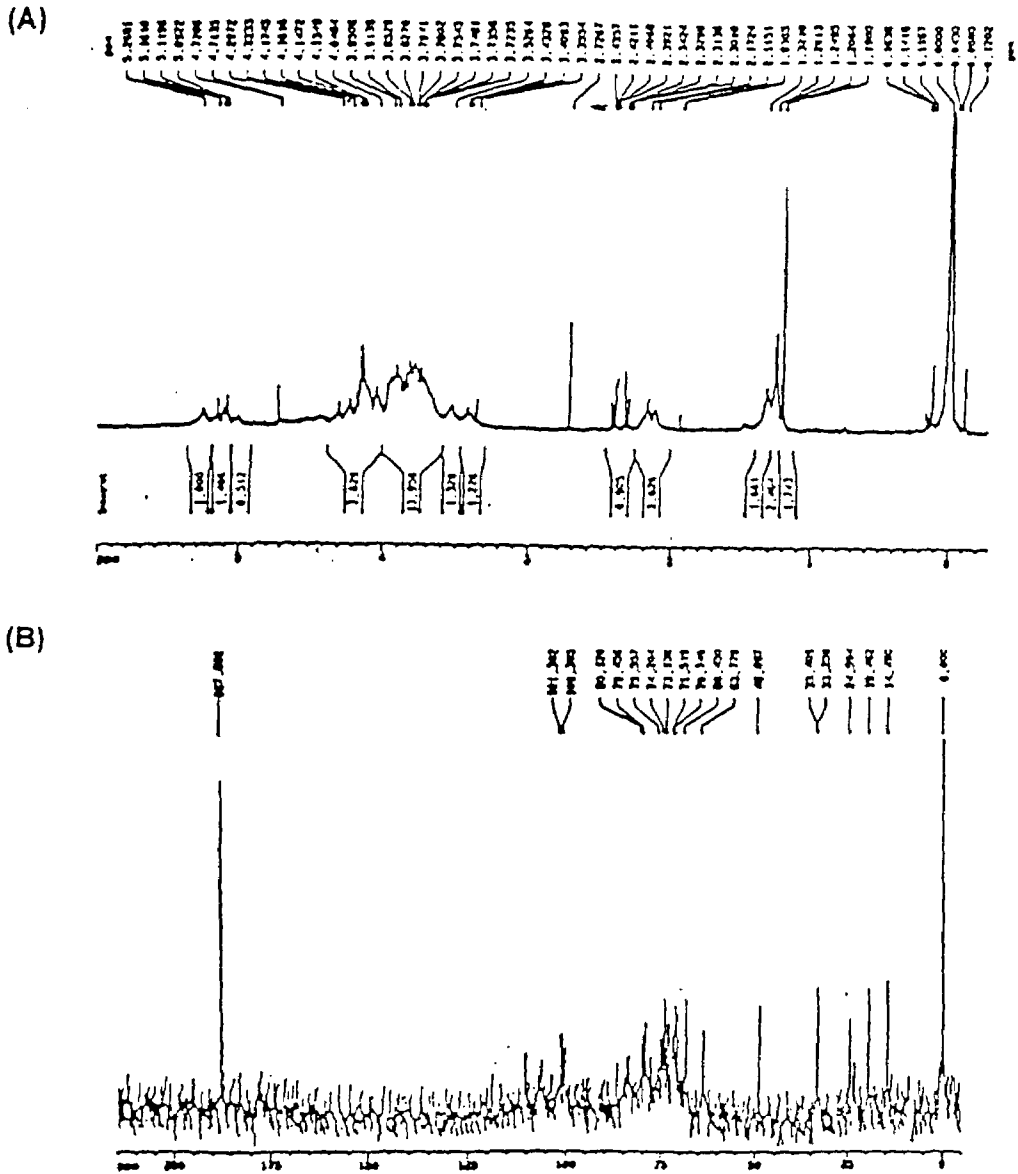


Fig. 2-14. $^1\text{H-NMR}$ (A) and $^{13}\text{C-NMR}$ (B) spectra of purified anti-complementary polysaccharide TV-3-3-Ib-1
Chemical shifts (δ , p.p.m.) were expressed relative to that of an internal standard, sodium trimethylsilyl propionate d_4 (TSP)

Table 2-11. ¹H-Chemical shift and ¹³C-Chemical shift of structural reporter groups in the purified anti-complementary polysaccharide TV-3-3-Ib-1

Chemical shift, δ (p.p.m.) [*]						
¹ H-Chemical shift						
H-1(eq) ^{**}	CH ₃ O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ C	H-2 to H-6		
5.27	3.53	2.17	1.94	4.30	4.05	3.78
5.16	3.43	2.12	1.32	4.22	3.95	3.76
5.09	3.41		1.26	4.17	3.91	3.75
	3.36		1.25	4.16	3.85	3.74
			1.21	4.15	3.83	3.72
			1.20	4.13	3.79	
¹³ C-Chemical shift						
CH ₃ C	CH ₃ CO ₂	CH ₃ O	C-2 to C-5	C-1(ax-0, glyc) ^{***}	COOH	
14.49	24.59	63.78	74.20	101.30	187.70	
	19.46		73.14	100.31		
			71.52			
			70.75			
			68.45			

* Relative to that of sodium-trimethylsilyl propionate-*d*₄(TSP) as the internal standard, ** eq : equatorial, *** ax, glyc : axial, glycosidic

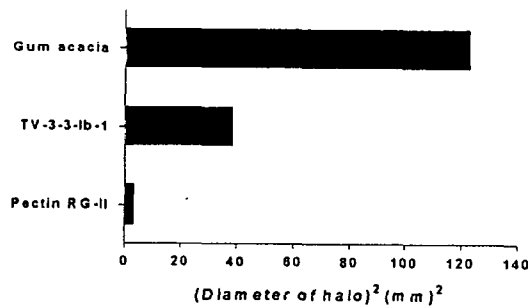


Fig. 2-15. Reactivity to the β -glucosyl-Yariv antigen of TV-3-3-Ib-1
Gum acacia was arabinogalactan (positive control)
Pectin RG-II was pectin without arabinogalactan (negative control)

물질로 사용하여 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 분석하였다. 분석 결과(Table 2-11, Fig. 2-14) 주로 α -anomer H-1 signal(¹H: δ 5.09-5.27 ppm, ¹³C: δ 100.31-101.30

ppm)영역에서 multiple signal들이 확인되어 상당히 가지가 많은 복잡한 다당류로 추정되었다. O-methyl 기의 signal (^1H : δ 3.36-3.53 ppm, ^{13}C : δ 63.78 ppm)이 존재함으로써 구성당에서 메틸화된 당이 존재할 것으로 추정되며 methyl esters($\text{CH}_3\text{COO-}$)의 signal(^1H : δ 2.12-2.17 ppm, ^{13}C : δ 19.46-24.59 ppm)이 존재하여 galacturonic acid와 glucuronic acid에서 methyl ester화가 이루어져 있음을 암시하며 또한 methyl carbon(CH_3C) 기의 signal(^1H : δ 1.20-1.94 ppm, ^{13}C : δ 14.49 ppm)이 존재하여 deoxy-sugar들(Rha, Fuc)의 C-6의 signal로 추정되었으며 carboxyl 기의 signal(^{13}C : δ 187.70 ppm)이 강하게 존재하여 화학 조성에서 나타난 바와 같이 산성당의 함량이 높은 것을 알 수 있었으며 이러한 NMR spectra 상에서의 결과들은 앞서 언급한 IR 분석과 GC/MS 분석 결과와 종합하면 정제 다당의 전체적인 anomer 배위는 IR과 NMR spectra 상에서 일치하는 α -anomer로 확인되었다. TV-3-3-Ib-1의 당쇄결합 분석에서 식물의 잎, 줄기 등의 1차 세포벽에 존재하며 식물의 분화, 발달에서 중요한 역할을 하는 arabinogalactan의 일종으로 추정되며 pectin에 arabinogalactan이 결합된 형태인 pectic arabinogalactan에서 보여지는 2,4-linked rhamnose, 3,6-linked galactose, 4-linked galactose가 많이 존재하고 말단에 arabinose와 galactose가 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 산성당으로서 1,3-linked galacturonic acid와 1,4-linked galacturonic acid의 함량이 높았다. 따라서 3,6-linked galactose에 특이성이 높은 β -glucosyl-Yariv antigen과 반응시키고 gum acacia를 양성 표준 물질로 하여 비교한 결과(Fig. 2-15) arabinogalactan으로 보여지는 침강선을 확인할 수 있었으므로 Kiyohara 등의 보고에서와 같은 pectic arabinogalactan 형태가 존재할 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 전체적인 anomer 배위상에서는 정제 다당이 α -anomer를 나타내지만 부분적으로 β -anomer를 가지는 arabinogalactan으로 구성되어있음을 암시하는 것으로 IR과 NMR 상에서 β -anomer의 peak이 상대적으로 작아서 검출되지 않은 것으로 사료되었다. 한편, IR spectrum 상에서의 O-glycosidic bond($1253, 1040 \text{ cm}^{-1}$)의 존재를 확인하였고 arabinogalactan에서 주로 다당류와 serine과 hydroxyproline 잔기 사이에서 이루어진다고 보고되었으며 아미노산 조성에서 serine의 함량이 17.21 mol%로 높게 나타나 serine이 O-glycosidic bond를 통해서 당쇄와 결합하고 있는 것으로 추정되었다.

제 6 항 *In vivo* 상에서의 독성 및 항암효과

항보체 활성 물질 TV-3의 급성 독성을 조사하기 위하여 경구투여에 의한 경우 시료량 0~2,000 mg/kg의 모든 시험군에서 TV-3 경구투여에 의한 독성은 나타나지 않았으며 LD₅₀이 2,000 mg/kg이상에 존재할 것으로 추정되었다(Table 2-12A). 비경구투여에 의한 독성에서는 시료량 0~1,000 mg/kg을 mouse에 꼬리정맥주사를 한 후 1주간 독성여부를 관찰한 결과(Table 2-12B) 시료량 1,000 mg/kg의 투여군에서도 90%의 생존율을 나타내어 본 시료가 독성을 나타내지 않는 복합 다당일 것으로 추정되었다. 또한 항보체 활성 다당들에 의한 항종양 활성이 알려지고 있는데 이들이 숙주 매개 면역반응에 관여하여 종양 발생에 의해 손상된 면역 기능을 회복 또는 증강시켜 줌으로써 효과를 나타내는 것으로 생체내의 보체계의 활성화에 따라 보체 분해 산물이 대식세포 등의 식세포의 활성화를 유도하고 대상 세포에 대한 직접적인 용혈, opsonization 기능을 항진시켜 줌으로써 항종양 효과를 나타낸다고 보고되어 있으므로 항보체 활성 물질 TV-3의 항종양 활성을 측정하기 위해서 sarcoma-180 고형암을 마우스에서 유발시켜 측정한 결과 10 mg/kg의 시료 투여군

Table 2-12. Acute toxicity of anti-complementary fraction TV-3 into mice

A) Oral administration					
Group	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No. of mice survived	Survival rate (%)
Saline	12	29.20±1.34	33.52±2.21	12	100
100 mg/kg	10	29.12±2.01	33.00±1.93	10	100
500 mg/kg	10	28.95±1.89	32.92±2.32	10	100
1000 mg/kg	10	29.60±2.72	32.87±1.97	10	100
2000 mg/kg	10	29.31±2.36	32.96±2.18	10	100
B) Intravenous injection					
Saline	12	29.21±1.27	33.90±1.68	12	100
10 mg/kg	10	29.49±1.98	33.21±1.23	10	100
50 mg/kg	10	29.20±1.55	33.26±1.13	10	100
100 mg/kg	10	30.65±2.20	30.24±0.64	10	100
300 mg/kg	10	29.60±1.73	30.85±2.02	10	100
500 mg/kg	10	29.05±1.48	30.90±1.35	10	100
800 mg/kg	10	29.70±1.83	29.33±2.78	10	100
1000 mg/kg	10	29.05±2.18	29.35±1.93	9	90

The sample was orally or intravenously injected into mice by 0.2 mL.

에서 64.15%의 저해율($p < 0.05$)을 나타내었고 50 mg/kg의 시료 투여군에서는 86.08%의 강한 저해율($p < 0.005$)과 100 mg/kg의 시료 투여군에서는 95.13%의 강한 저해율($p < 0.005$)을 나타내어 항종양 활성이 있는 것으로 추정되었다. 또한 ED_{50} 은 10 mg/kg 이하의 농도에서 나타나는 것으로 추정되었다(Fig. 2-16, 17). 이러한 결과는 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)과 들버섯(*Agaricus campestris*)에서 보고된 종양 저지 효과보다 높은 저지 효과를 나타내고 있다. 본 연구에서 항종양 효과가 mouse의 식욕감퇴에 따라서 종양의 무게 증가에 영향을 주는지 여부를 확인하기 위해 mouse의 체중을 점검한 결과(Table 2-13) 대조군에 대한 시료 투여군

Table 2-13. Changes of body weight treated with anti-complementary fraction TV-3 on sarcoma-180 in mice

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Relative body weight(%)
Saline	25.40±2.76	39.85±3.64	156.89
5 mg/kg	25.05±1.78	40.44±3.92	161.44
10 mg/kg	24.9±1.31	37.97±3.10	152.49
50 mg/kg	24.87±2.00	37.81±2.46	152.03
100 mg/kg	24.85±1.95	37.76±2.22	152.26

$$\text{Relative body weight (\%)} = \frac{Fw}{Iw} \times 100$$

Fw : Final body weight
Iw : Initial body weight

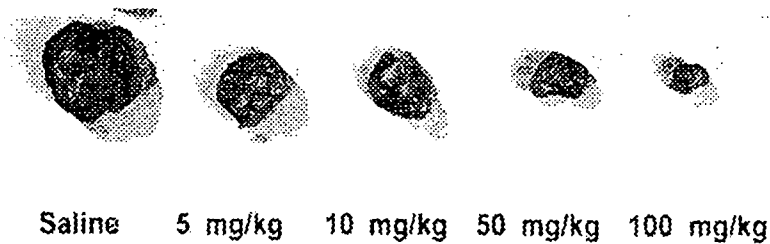


Fig. 2-16. Photograph showing comparison of size of solid tumor.

Control: saline injection group; Test group: TV-3 injection group

Sarcoma-180 ascites cells(1×10^6 cells) were transplanted subcutaneously into the groin of ICR mice. After 24 hr transplantation, the sample was injected intraperitoneally at various concentration for 10 days. After final injection the mice were sacrificed and the tumors were excised.

의 체중변화는 유의성이 나타나지 않았으므로 시료에 의한 항종양 활성으로 사료되었다. 이상의 결과로 항보체 활성을 나타내는 복합 다당이 항종양 활성을 나타낸다는 보고와 일치하는 결과를 얻었으며 항종양 활성에 항보체 활성이 관여하는 것으로 추정되었다. 면역계 내에서의 항보체 활성물질의 영향을 확인하기 위하여 TV-3을 항암 효과가 나타나는 농도인 30 mg/kg의 농도로 복강에 투여하고 복강에서의 면역 세포 수의 변화를 Giemsa stain과 NSE stain, 총복강 세포 수의 계수를 통해서 관찰하였다(Fig. 2-19). 총복강 세포는 유의적으로 증가되었고 PMN은 시료 투여 후 2일째에 유의적인 증가($p < 0.05$)를 보인 후 3일 이후로는 감소하여 정상적인 수치를 나타내었으며 대식세포 수는 시료 투여 후 2일째에 증가하여($p < 0.005$) 7일째까지 높게 유지 후 2일째에 증가($p < 0.01$)한 후 감소하여 대식세포에서와는 달리 초기 세포수를 유지하는 것으로 나타났다. 이러한 유의적인 변화는 복강내에서 시료가 화학 주화성을 나타내어 복강 세포를 유도한 것으로 판단되었다. 한편, 항보체 활성 시료 TV-3이 면역 장기의 무게에 영향을 주는지 여부를 확인하기 위해서 시료 투여 후 1주간 각 장기의 무게 변화를 측정하였다(Fig. 2-20). 그 결과 비장과 흉선에서는 유의적인 변화가 없고 면역 장기에 대한 자극은 미약한 것으로 추정되었다.

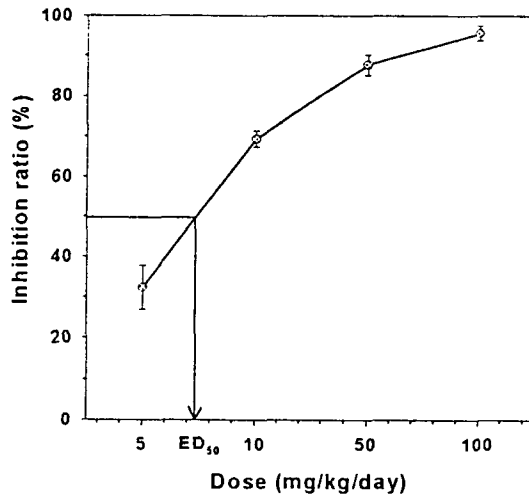


Fig. 2-17. Anti-tumor activity of anti-complementary fraction TV-3 on sarcoma-180 in mice

제 7 항 *In vitro* 상에서의 항암 효과

Sarcoma-180에 대한 고형암의 저지율을 실험한 결과(Fig. 2-17) 30 mg/kg 이상의 투여량에서 강한 저지율을 나타내었다. 이러한 저지율은 마우스의 체내에 존

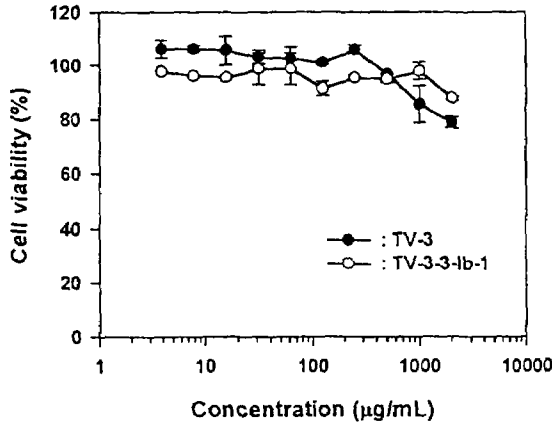


Fig. 2-18. Changes in viability of sarcoma 180 cells treated with anti-complementary fractions

재하는 면역계의 부활에 의한 것일 수 있지만 세포에 대한 직접적인 독성을 나타내는 경우에도 같은 작용을 하게 된다. 따라서 sarcoma-180 cell에 대한 세포독성을 확인한 결과(Fig. 2-18) 독성을 나타내지 않았다. 이는 임 등의 백화사설초 열수 추출물이 농도가 높아짐에 따라서 독성을 나타내는 것과는 다른 양상을 보여 고농도에서도 세포 독성이 나타나지 않는 것으로 백리향 시료가 암세포에 직접 세포독성을 나타내기보다는 숙주 면역체계의 기능을 개선시켜 항암활성을 나타내는 것으로 추정되었다. 시료의 복강 투여에 따른 대식세포 수의 증가가 일어남에 따라 본 시료가 대식세포 수의 증가 뿐 아니라 활성에서도 변화를 주는지 여부를 대식세포와 sarcoma-180 cell을 동일계 내에서 배양하여 MTT법을 사용하여 sarcoma-180 cell의 생존율에 미치는 영향과 대식세포 lysosomal phosphatase 활성 변화를 검토하였다.

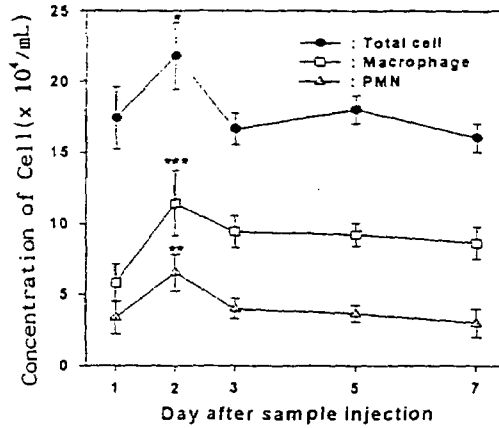


Fig. 2-19. Effects of the anti-tumor fraction TV-3 on peritoneal cell population of ICR mice. The dose of sample was 30 mg/kg
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

Sarcoma-180 cell의 생존율에 미치는 영향은 대식세포와 sarcoma-180 cell의 세포수 비율이 1 : 1일 때 확인이 용이하였으며 대식세포의 sarcoma-180 cell에 대한세포독성의 증가에 영향을 미쳐(Fig. 2-21A) 대조군에 비해서 TV-3는 약 30%, 정제 다당 TV-3-3-Ib-1은 약 45%로 sarcoma-180 cell의 생존율을 감소시켰다. 한편, 대식세포 lysosomal phosphatase 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 2-21B) 항보체 활성화 물질 TV-3와 정제 다당 TV-3-3-Ib-1은 약 150%의 활성을 나타내어 LPS 0.1 mg/mL에서의 활성화(200%)을 기준으로 할 때 두 시료 모두 유효활성(200%)에 미치지 못하였다. 따라서 항보체 활성화 물질 TV-3와 정제 다당 TV-3-3-Ib-1은 lysosomal phosphatase 활성화에는 영향을 주지 못하였으나 다당체나

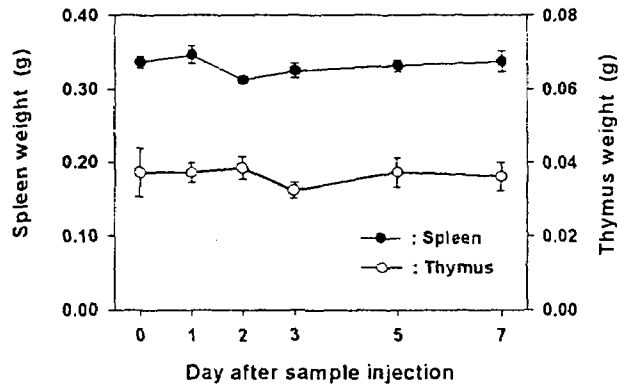


Fig. 2-20. Effects of anti-tumor fraction TV-3 on Spleen and Thymus weight of ICR mice. The dose of sample was 30 mg/kg

단백다당이 대식세포 활성화에 관여한다는 보고들에서와 같이 대식세포의 sarcoma-180 cell에 대한 세포독성은 증가시켰다. 이러한 결과로부터 대식세포의 sarcoma-180 cell에 대한 세포독성의 증가는 lysosomal phosphatase 활성의 증가가 아닌 다른 기작에 의해서 발현되는 것으로 판단되었다. 보체계 내에서의 용혈 억제 양식을 측정하기 위하여 1차 반응 단계에서 반응시간을 달리하여 측정한 결과(Fig. 2-22) TV-3와 TV-3-3-Ib-1 모두 활성화 물질인 zymosan와 유사한 경향을 반응시간에 따라서 나타내었고, 저해제로 보고된 *Rhosmainus officinalis* 등에서

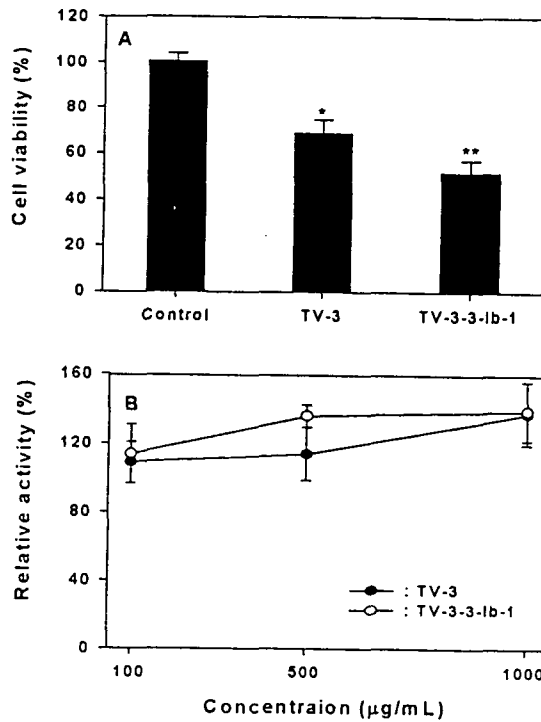


Fig. 2-21. Cytotoxicity on sarcoma-180(A) and lysosomal phosphatase activity(B) of macrophage treated with anti-complementary fractions. Control : PBS(A), Saline(B)
 *p < 0.005, **p < 0.0001, Saline showed 100% relative activity in lysosomal phosphatase

분리된 C3 전환효소 및 C5 전환효소의 저해제로 알려진 rosmarinic acid와 같이 반응초기부터 용혈억제를 보이지는 않았으므로 이들 물질이 보체계를 저해하지 않고 활성화시키는 양식을 보이는 것으로 판단하였다. 보체계 활성화 경로는 GVB⁺⁺ buffer에서 Ca²⁺이온을 선택적으로 제거한 Mg²⁺-EGTA-GVB⁺⁺계와 Ca²⁺와 Mg²⁺이온을 모두 제거한 계에서 실험한 결과(Fig. 2-23) 정제 다당 TV-3-3-Ib-1은 부경로 활성화

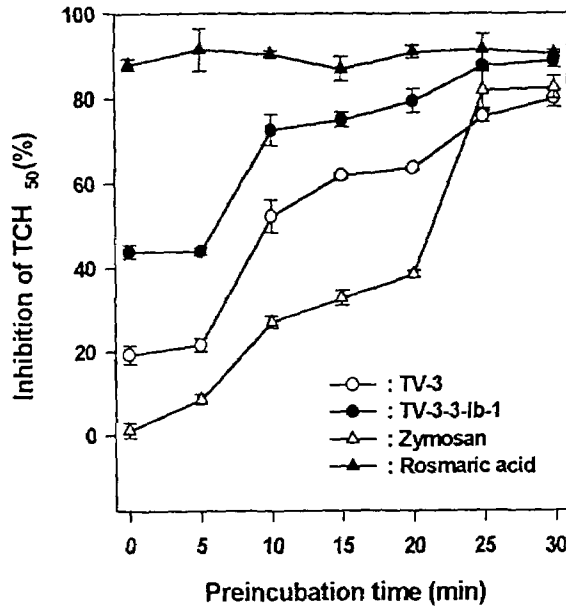


Fig. 2-22. Patterns of anti-complementary activity in active fractions during preincubation time. Rosmaric acid(inhibitor) and zymosan(activator)

화 물질들로 보고된 complestatin, zymosan, pachyman 등과 같이 부경로 활성화에 관여하는 것으로 나타났으며 한약재 및 산채류 등에서 보고된 다당류들과는 다른 양상을 나타내었다. 한편, Dey 등은 산성 다당류의 carboxyl 기가 보체계의 Ca^{2+} 와 킬레이트를 형성하여 "egg" 형태의 3차 구조를 형성하며 이러한 구조가 저해활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 그러나 정제 다당류 TV-3-3-Ib-1은 Ca^{2+} 를 선택적으로 제거한 부경로에서 활성을 주로 나타내었으므로 활성을 나타내는

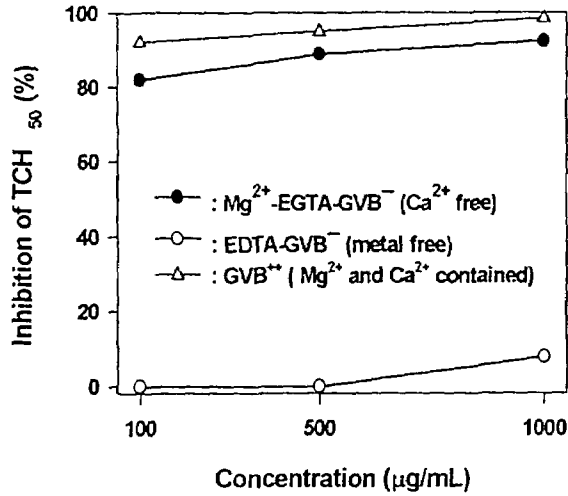


Fig. 2-23. Anti-complementary activity of TV-3-3-Ib-1 in alternative complement pathway(Ca²⁺ free) and metal ion free condition

구조는 산성당으로 구성된 pectin성 구조에 존재하지 않고 일부 arabinogalactan 을 형성하는 중성당 부분이 활성을 나타내는 구조일 것으로 추정되었다.

제 3 장 양념채소함유 ACE 저해활성 물질의 기능성 식품화

제 1 절 서 설

식품은 인간의 생존에 가장 중요한 요소의 하나로서, 인체의 항상성 유지, 그 균형의 변화로부터 유발되는 질병, 또는 질병으로부터의 회복에 이르기까지 크고 작게 식품이 관여되고 있다. 최근 이러한 식품의 기능과 관련된 연구가 활발히 진행되고 있으며 식품 중에는 인체의 생리적 기능을 조절하는 인자가 존재하며 인체 내에서 여러 활성을 발현하게 됨이 밝혀지게 되었다. 이러한 인자들은 면역 내분비선, 신경계, 소화계, 세포분화 및 증식계 계통과 같은 인간의 생리적 체계를 조절하는데 직·간접적으로 관여하며 다양한 생리활성을 갖게되어 체내에서 흡수된 후 질병의 방지, 회복, 노화억제 등의 생체조절 기능성을 나타내게 된다. 이러한 식품은 의약품과는 달리 반복해서 섭취하기 때문에 생리기능을 발휘하는 화합물이 체내에 미량 도입되거나, 그 활성이 매우 작은 경우에도 생체로서는 중요한 영향을 받게되어 질병들을 예방하는데 큰 효과를 기대할 수 있다. 따라서 근래 노인인구의 증가와 여러 성인병 및 노인성 질환의 예방과 치료에 대한 관심과 함께 매일 섭취하는 식품의 3차 기능들에 대한 과학적 연구가 활발히 진행되게 되었다.

식품 기원의 생체조절 기능성 인자 중에서 식품단백질 유래의 펩타이드는 특히 다양한 생리활성을 나타내는데 그 종류는 비교적 고분자상의 호르몬류 및 효소저해제가 해당되는 현재적(顯在的) 펩타이드와 식품 단백질이나 혈액 단백질 등으로부터 파생되어 나오는 잠재적(潛在的) 펩타이드로 나눌 수 있으며 특징은 다음과 같다. 첫째, 구조 및 활성이 다양하고, 둘째, protease류에 의해 분해된다. 셋

재, 흡수되기 어렵고 넷째, 유전자조작에 의하여 생산 및 개조가 가능하다. 다섯째, 활성 부위 전후에 protease 절단 부위가 필요하며 여섯째, 활성에 관계없이 안전성이 기대된다. 이 밖에 식품소재의 기능성인자 중 식이섬유, 올리고당, 다불포화지방산, CPP, polyphenol류, 단백질다당류 및 다당류가 외국뿐만 아니라 국내에도 알려져 활용되어 연구되고 있다.

현대 성인병은 심장순환기계의 질환들이 주류를 이루는데 고혈압, 부정맥, 심부전증, 동맥경화, 혈전증, 뇌혈관질환 등이 그 예이다. 이 중 고혈압은 특히, 심장순환기계 질환 중 중요한 위치를 차지하고 있다. 그것은 고혈압증상은 심부전증, 신장기능 저하, 뇌졸중 등 치명적인 심장순환기계질환의 직접원인이 되기 때문이다. 고혈압은 그 발생 원인에 따라 여러 가지로 나눌 수 있는데 고혈압의 90% 이상을 차지하는 본태성 고혈압은 정확한 원인이 규명되어 있지 않지만 다양한 유전적 요소와 술, 담배, 스트레스, 염분섭취, 비만, 피임약복용, 나이 등을 원인으로 들 수 있다. 그 밖에 몇 가지 기작에 의해 발병하는 것으로 추측하고 있는데 첫째, Na와 Ca농도증가에 따른 수분증가로 동맥압이 상승되는 기작을 들 수 있고 둘째로 교감 신경계의 활성화로 catecholamine에 의해 renin분비가 변화하는 것, 셋째로, catecholamine이나, Angiotensin II의 농도가 증가하여 신장의 원심세동맥을 수축함으로써 발생하는 경우, 넷째로 renin angiotensin system을 들 수 있다.

Renin angiotensin system 은 고혈압의 원인과 결과에 밀접하게 관여하는 혈압조절 체계이다. 즉 aspartic protease인 renin이 신장의 사구체 세포에서 합성되어 glycoprotein인 angiotensinogen을 angiotensin I으로 분해하는 역할을 하며 decapeptide인 angiotensin I은 그 자체로는 특별한 생리활성을 가지고 있지 않으나, metalloenzyme의 일종인 ACE(Angiotensin Converting Enzyme)에 의해 강력한 혈관 수축호르몬인 angiotensin II로 변하게 된다. 이 angiotensin II는 angiotensin II에 specific한 receptor와 결합하여 동맥 혈관을 수축해서 혈압을 상승시키는 작용과 부신에서의 aldosterone의 분비를 촉진해서 신장의 Na 및 수분

의 재흡수를 증가시키는 역할을 한다. 또한 ACE는 혈액 중에서 혈관확장, 장의 운동성 증대 등의 효과를 보이는 bradykinine의 dipeptide(Pro-Arg)를 끊어서 inactive한 heptapeptide로 만듦으로써 고혈압의 원인이 되고 있다.

Renin angiotensin system에서 renine과 더불어 주요한 역할을 하는 ACE (kinase II, peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3,4,1,15 이하 ACE라 함)에 대한 저해제는 혈압강하 작용을 가지므로 고혈압 치료제로써 그 기능성이 기대되고 있다. 또한 인체내 ACE 저해작용효과는 고혈압 예방뿐만 아니라 심장의 기능과 대사를 개선시키며 고혈압의 진행을 억제시킨다. Cushman등은 ACE의 C 말단 dipeptide를 그리고 carboxypeptidase가 1개의 아미노산을 떼어주는 작용 유사점을 감안하여 이들 효소활성부위와 유사하여 결합되리라 생각되는 일련의 ACE 저해제를 합성한바 있다. 그러나 이는 환자와 투여량에 따라 여러 부작용과 안전성이 문제시되고 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 고혈압 예방과 관련하여 식품소재의 ACE 저해효과에 대해 상당한 관심이 증대되고 있다. 그래서 우리 인간이 항상 섭취하는 식품으로부터 이들 물질을 찾는다면 안전성 확보와 시간적 경제적 이용도가 높을 것으로 보인다.

식품소재로부터 ACE 저해제에대한 보고는 많으며 지금까지 보고된 ACE 저해제들을 보면 정어리 과육의 *Bacillus licheniformis* alkaline protease에 의한 가수분해물, 멸치 젓갈 중의 peptide, 간장에서 분리한 peptide, *Nocardia orientalis*가 생산하는 muramyl peptide의 저해효과, 차류의 유기용매 추출물에서 얻은 polyphenol류, 기호음료성분의 저해효과, 쌀·보리·대두·코오지 추출액의 저해효과, casein 가수분해물의 저해효과, 여러 한약재의 ACE 저해효과, 감잎의 저해효과, 무화과 유액과 청주 및 그 부산물의 ACE 저해작용 등이 보고되고 있다.

일반적으로 겨자(*Sinapis alba* L.)는 겨자과의 1년 또는 2년초로, 잎은 무 잎과 비슷하나 주글주글하며, 봄에 수판화가 누렇게 핀다. 특히, 상기 겨자씨는

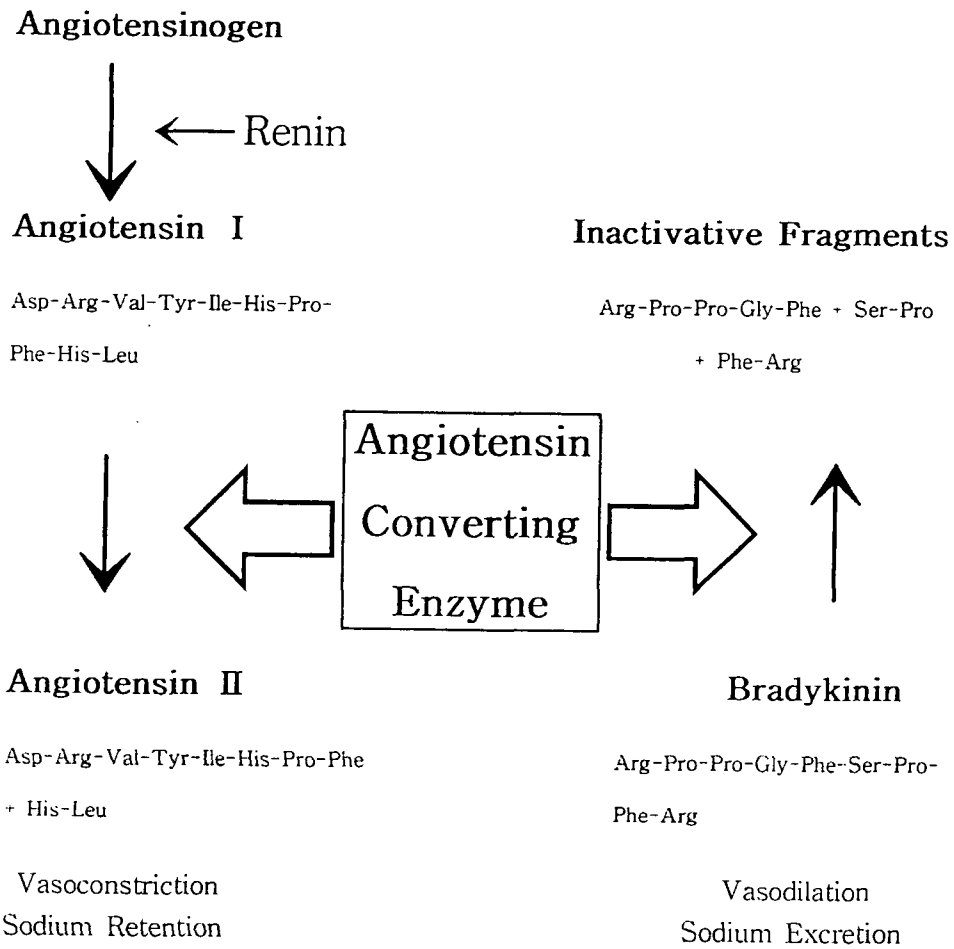


Fig. 3-1. Renin-Angiotensin system in human body

크기가 작으며 황갈색으로 맵고 향기로워 양념과 약재로 알려져 있다. 일반적으로, 겨자씨는 7.2% 수분, 27.6% 단백질, 29.7% 조지방, 20.8% 탄수화물, 10.3% 섬유질 및 4.5% 회분을 함유한다.

본 연구에서는 향신 채소로부터 ACE 저해활성이 높은 물질을 분리, 정제하고 이를 소재화하는 것을 목적으로 하였다. 또한, 정제된 ACE 활성저해물질의 본체의 규명 및 작용기작을 조사하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

제 1 항 재 료

본 실험에 사용한 재료는 경동시장 및 향신료 전문 판매점에서 구입하였다. Sephadex LH-20 resin, Superdex peptide HQ 10/30 column은 Phamacia Co. 제품을 사용하였고, μ Bondapak C₁₈ column은 Hiber Co. 제품을 사용하였다. Dynamax column은 Rainin Co.에서 구입하였다. ACE(rabbit lung acetone powder)와 Hippuric acid-Histidine-Leucine(Hip-His-Leu), Bradykinin(BK), Epigalldcatechine gallate(EGCG)는 Sigma Co.에서 구입하였다. Enalapril은 종근당에서 구입하였다. 그 외의 분석시약은 일급 이상의 시약을 사용하였다.

제 2 항 방 법

1. 계통추출법에 따른 시료의 조제

식용식물, 향신료, 허브 등의 시료로부터 ACE 저해제를 검색하기 위해서 각

시료는 Fig. 2.에 따라 준비하였다. 먼저, 각 시료는 시료에 함유된 효소를 불활성화시키기 위해 5분 동안 100℃에서 가열처리하였다. 그후 증류수 100 ml에 각 시료(건조중량 5 g)를 넣고 완전히 분쇄한 후 10,000 x g에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 Fraction I을 조제하였다. 침전물은 동결건조 후 연속적으로 hexane, acetone, methanol, 증류수의 순으로 2시간 동안 환류추출한 후 각각의 상등액을 농축, 동결건조하여 Fraction II, III, IV 및 V를 얻었다. 이 추출물 중에서 Fraction I, IV 및 V를 ACE 저해제를 검색하기 위한 시료로 사용하였다.

2. 추출 조건의 확립

가. 추출 용매에 따른 검토

분쇄한 겨자씨를 methanol로 환류 추출하여 methanol 가용 획분을 추출하였고 침전물은 동결건조 후 연속적으로 70 % acetone, 70 % methanol, 및 증류수의 순으로 2시간 동안 환류 추출 하였다.

나. 추출 온도에 따른 검토

최적 추출 온도를 확립하기 위하여 각각 20℃, 60℃, 및 100℃로 조절한 후 가용획분을 얻었다

3. ACE 저해효과 측정

가. Buffer 의 조제

Lieberman의 방법을 변형한 modified method을 이용해서 실험하였다. 1/5 M의 H_3BO_3 와 1/20 M의 $Na_2B_4O_7$ 을 삼차 증류수를 이용하여 제조 후 5.5:4.5의 비율로 섞어서 pH를 8.3으로 맞춘 다음 분석시 최종 농도가 0.4M 이 되게 NaCl을 가하였다.

나. 기질의 조제

위의 방법에 의해 제조된 Borate-NaCl buffer에 Hip-His-leu기질을 12.5 mM 되게 용해시켰다.

다. 효소의 조제

Borate-NaCl buffer에 rabbit lung acetone powder를 g당 10 mL로 녹여 4°C에서 24시간 교반시킨 후 12,000 rpm에서 30분간 원심 분리시킨 다음 상등액을 취해서 냉동 보관하며 사용하였다.

라. ACE assay

Cushman, D.W. 등의 방법을 이용하여 실험하였다. 시료 0.05 mL에 Hip-His-Leu을 0.1 mL 가한 후 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 ACE 효소액을 0.15 mL 가하고 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5 N HCl을 0.25 mL가하여 반응을 정지시켰다. 공실험은 시료용액 대신 증류수 50 μ L를 사용하였으며 대조구는 HCl을 가한 후 효소액을 가하였다. 여기에 ethylacetate 1.5 mL을 가하여 15초간 섞어준 후 2,800 rpm에서 7분간 원심 분리시켜 상정액 0.5 mL을 취하였다. 이 상등액을 oil bath 140°C에서 15분간 건조 후 1 M NaCl 3 mL을 가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 ACE 저해율을 측정하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = (E_c - E_e) / (E_c - E_b) \times 100$$

E_c : 시료대신 증류수 첨가시의 흡광도

E_s : 시료첨가시의 흡광도

E_b : 반응정지후 시료 첨가시의 흡광도

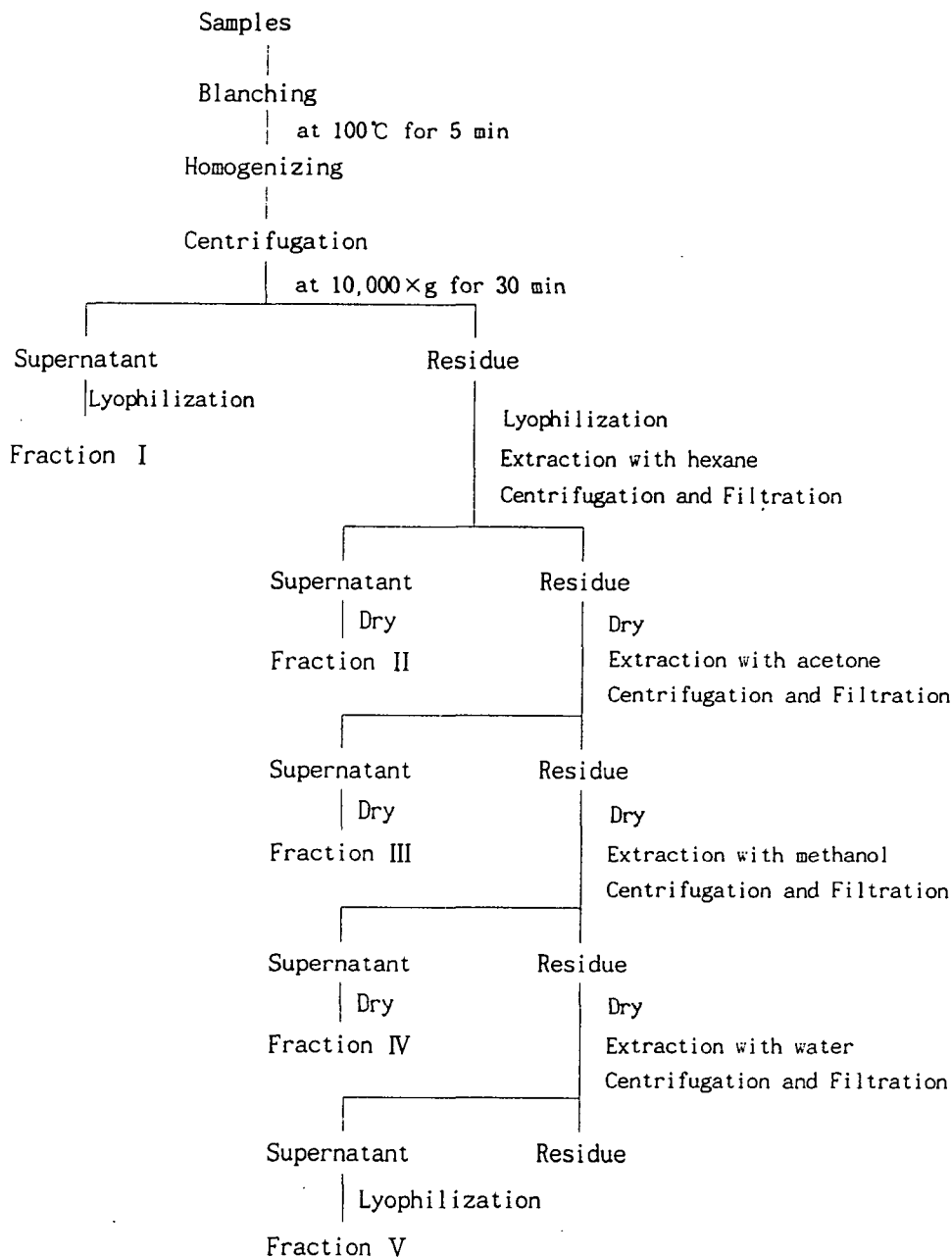


Fig. 3-2. Scheme for preparation of the samples from various plants, spices, and herbs

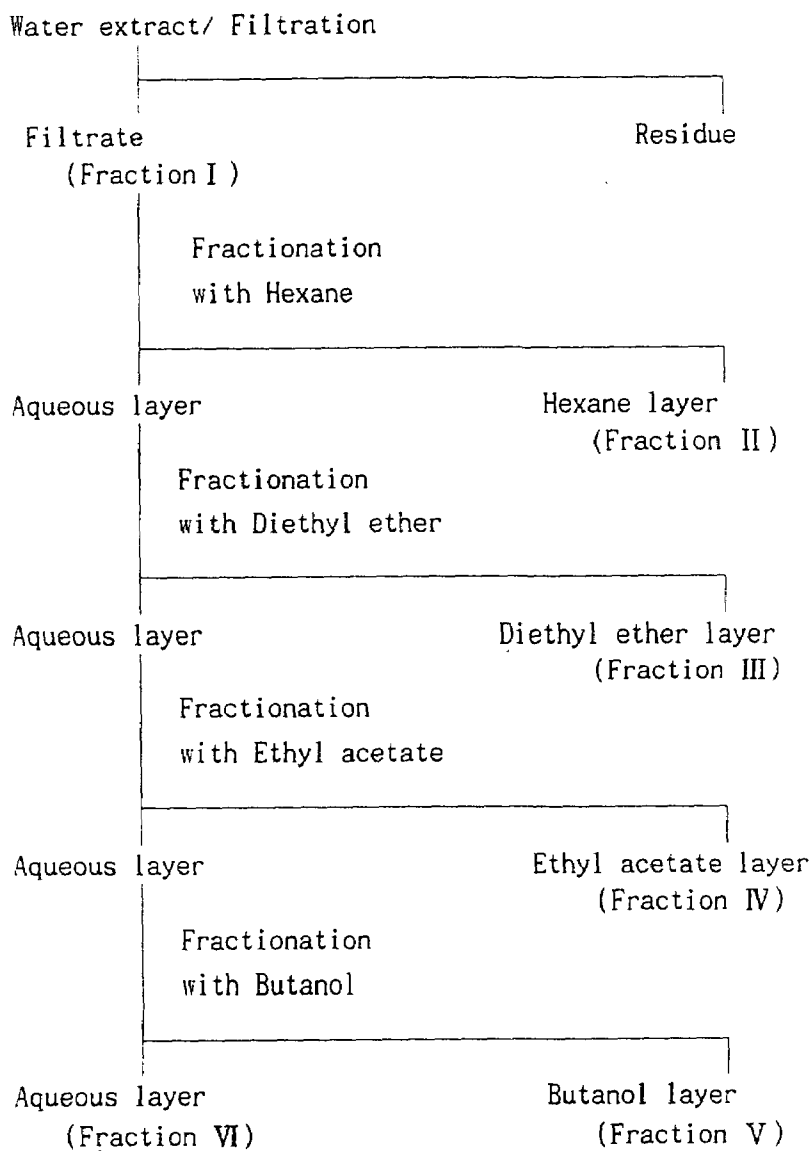


Fig. 3-3. Organic solvent fractionation

4. 단백질 정량

Lowry 등의 방법에 의해 BSA(Bovine serum albumine)을 표준물질로 환산 측정하였다.

5. 겨자씨로부터의 ACE 저해제의 정제

가. 겨자씨로부터 ACE 활성저해물질의 분리

곱게 분쇄한 겨자씨를 먼저 hexane으로 환류추출하여 지질을 제거한 후 그 잔사를 건조하여 증류수로 환류추출하였다. 이 추출물을 동결건조한 후 증류수와 butanol(1:1)을 이용하여 분획하였다.

나. Methanol precipitation

상기에서 얻어진 butanol층을 ice bath상에 위치시킨 후 서서히 stirring하면서 -20°C 에서 냉각시킨 methanol을 소량씩 첨가하여 methanol침전을 실시한 후 원심분리(8,000 rpm, 30분)에 의해 회수하였다.

다. Size exclusion chromatography

Methanol 침전물로부터 ACE 저해물질을 정제하기 위하여 50% methanol로 평형화된 Sephadex LH-20 column(2.3×41 cm)에 주입한 후 동일 용액으로 용출시켜 3가지 획분으로 분리하였다. 얻어진 물질들을 모아 농추, 동결건조하여 ACE 활성을 측정하였다.

라. Reverse phase HPLC

상기에서 ACE저해활성이 가장 높은 획분을 증류수로 평형화된 reverse phase HPLC(μ bondapak C18, 4×250 mm column)에 주입하여 용출하였다. 분석조건은 Table 3-1과 같다. Acetonitrile을 농도 0 ~ 80%까지 증가시키면서 Linear

gradient를 실시하였다. reverse phase HPLC에서 얻어진 Peak중 활성 분획을 모아 농축한 후 silica column(Dynamax, 4.6×150 mm)에 주입하고 hexane/isopropanol(9:1)의 전개용매로 1 mL/min의 유속으로 용출하였다(Table 3-2).

6. 활성본체의 규명

가. Pronase 처리

Pronase 소화물을 얻기 위하여 냉수추출물을 10 mM CaCl₂가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 50 mL에 용해시킨 후 37℃에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응정지를 위해 100℃에서 가열한 후 원심분리하여 불용성 침전을 제거한 다음 동결건조하여 pronase 소화물을 얻었다.

나. ACE에 대한 저해기작 측정

ACE에 대한 저해양상을 알아보기 위해 기질의 농도를 변화시키며 저해제를 각각 10 μL, 20 μL 첨가하여 효소의 활성을 측정하고 Lineweaver-Burk식에 의한 plot으로 저해제를 첨가하지 않은 대조구를 이용해서 비교하였다.

Table 3-1. Reverse phase HPLC conditions for purification of ACE inhibitor from *Sinapis alba* L.

Instrument	Pump	GASTORR GT-103, Gilson Co.		
	Detector	UV/VIS detector 118, Gilson Co.		
Column		μ bondapak C ₁₈ (4× 250mm), Hiber Co.		
Mobile phase	Solvent A	Water		
	Solvent B	Acetonitrile		
Gradient table of solvent A & B				
	Time(min)	Flow rate(mL/min)	%A	%B
	0	1.0	100	0
	55	1.0	20	80
Flow rate		1.0 mL/min		
Injection volume		30 μ L		

Table 3-2. Normal phase HPLC conditions for purification of ACE inhibitor from *Sinapis alba* L.

Instrument	Pump	GASTORR GT-103, Gilson Co.		
Detector		UV/VIS detector 118, Gilson Co.		
Column		Microsorb(4.6×150 mm), Silica type Rainin Co.		
Mobile phase		Hexane : Isopropanol(90 : 10)		
Flow rate		1.0 mL/min		
Injection volume		30 μ L		

다. 분자량 측정

HPLC의 활성 분획을 0.02 M phosphate buffer(pH 7.2)로 평형화시킨 Superdex Peptide HR 10/30 column(Pharmacia Biotech, 10×300 mm)에 주입한 후 0.25 mL/min의 유속으로 용출하였다(Table 3-3).

Table 3-3. FPLC conditions for purification of ACE inhibitor from *Sinapis alba* L.

Instrument	Pump	Pump P-500, Pharmacia Biotech Co.
	Detector	UV-MII, Pharmacia Biotech Co.
	Controller	LCC - 501 plus, Pharmacia Biotech Co.
	Recorder	REC 102, Pharmacia Biotech Co.
Column		Superdex Peptide HR 10/30(10×300 mm), Pharmacia Biotech Co.
Mobile phase		0.02 M phosphate buffer containing 0.25 M NaCl pH 7.2
Flow rate		0.25 mL/min
Injection volume		10 μ L

라. 펩타이드의 아미노산서열 결정

정제된 펩타이드 약 0.1 nmol을 중류수에 녹인 후 gas-liquid phase protein sequencer(Applied Biosystems 470A)에 도입하였다. PTH 아미노산 유도체들은 PTH analyzer model 120A (Applied Biosystem)에 부착한 PTH-C18 column에 의해 분석되었으며 이때 Edman분해의 초기 수율은 65%이었다.

7. 흰쥐 uterus contraction assay

Uterine은 실험실시 24시간 전, diethyl stilbesterol(0.1mg/mL ethanol/kg)을 처리한 쥐(Sprague-Dowley, 150~200 g)를 사용하였다. 이 uterine strip을 31℃로 보정된 organ bath 상에서 10 mL의 modified De Jalon's용액(NaCl 9.0, KCl 0.42, CaCl₂ 0.045, NaHCO₃ 0.5, MgCl₂ 0.005, glucose 1.98 g/L)에 현탁 30~60분 정도 방치 후, 0.1 mL 시료를 첨가하여 isotonic contraction을 유발시킨 후 그 정도를 physiograph상에서 측정하였다. Bradykinin에 의하여 유발된 contraction을 대조군으로 사용하여 비교, 분석함으로써 판명되었다.

8. 소화효소의 영향

Peptides의 섭취시, 인체내 소화효소들에 대한 영향을 조사하기 위하여, *in vitro*상에서 정제된 peptides를 pepsin, trypsin 및 pancreatin에 반응시켰다. 시료 90 μL 를 eppendorf tube에 취한 후 각 10 μL 의 소화효소액을 가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 정지시킨 후 10,000 x g로 원심 분리한 상등액에 대하여 ACE 저해효과를 측정하였다.

9. 겨자씨로부터 추출한 ACE저해활성 획분의 독성검사

국립보건원에서 ICR 마우스(웅성, 5주령)를 24마리를 분양받아 물(정제수)과 extruder pallet형의 사료(실험동물 I, 삼양사료)를 자유로이 급식시키면서 1주일간 사육환경(온도 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 명암교대 1일 12시간씩)에 적응시킨 후 사용하였다. 각각 6 마리씩을 실험군으로 하여 겨자씨의 열수 추출물로부터 butanol획분을 실시한 조단백 시료를 생리식염수에 녹여 100, 500, 1,000 mg/kg 농도로 각각 제조한 후, 단회 경구투여를 하였다. 대조군은 시료 대신 생리식염수를 투여하여 2주 후, 생존 마리 수와 몸무게 변화를 측정하여 백분율로 표시하였다.

10. 겨자씨로부터 추출한 ACE 저해활성물질의 혈압강하 활성검사

몸무게 300 ~ 320 g인 SHR (Spontaneously hypertensive rat, male, 14 weeks)에 겨자씨 열수 추출물의 butanol획분을 증류수에 잘 용해시켜 300 mg/kg의 농도로 조제한 다음 시료를 단회 경구투여한 후, tail-cuff method로 BP-98A(Softron Co.)를 기기를 이용하여 0, 3, 5, 8, 24시간 동안의 혈압변화를 측정하였다. 대조군은 시료대신 증류수를 사용하였다.

제 3 절 결 과

제 1 항 ACE 저해물질의 검색

ACE 저해물질을 검색하기 위하여 95종의 식용식물, 향신료 및 허브로부터 Fig. 3-2의 추출방법에 따라 285개의 추출물을 얻었다. 본 실험에서는 3개의 획분 (I, IV 및 V)을 사용하여 ACE저해물질을 검색하였으며 그 결과는 Table 3-4와 같다. 전반적으로 methanol 및 냉수획분층의 ACE 저해능이 homogenization 후 여과된 수용액에 비하여 상대적으로 높은 결과를 나타냄으로써 ACE 저해활성물질은 저분자물질 또는 수용성이 높은 물질로 추정되었다. 본실험에서 사용된 추출물 중, 겨자씨에서의 ACE저해활성이 가장 높게 나타난 바 이후 실험의 시료로 선택하였으며 현재까지 겨자씨에 대한 ACE 저해활성은 보고된 바 없다.

제 2 항 ACE 저해물질의 추출조건 확립

1. *Sinapis alba* L.의 화학적 조성

ACE 저해활성 본체의 규명과 용이한 정제를 수행하기 위한 제반실험으로서 겨자씨의 화학적 조성을 검토하였다. 일반성분을 측정된 결과(Table 3-5), 수분의 함량은 5.0%, 조단백질은 26.4%, 조지질은 36.3%, 조회분은 4.1%이며 탄수화물은 28.2%를 나타내었으며 지질과 단백질의 함량이 높은 전형적인 종자의 성분과 일치하는 결과를 나타내었다.

2. 추출 용매에 대한 영향

증류수 100 mL에 시료를 넣고 완전히 분쇄한 후 10,000 x g에서 30분 동안

Table 3-4. ACE inhibitory effects of the extracts from various edible plants, herbs, and spices

Samples		Inhibition Ratio(%)		
Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 4	Fr. 5
<i>Achyranthes ascendens</i>	Amaranth	4.1	8.9	5.0
<i>Allium cepa</i> L.	Onion	4.0	6.0	0.0
<i>Allium fistulosum</i> L.	Scallion(thick)	0.0	13.0	8.0
<i>Allium fistulosum</i> L.	Scallion(thin)	3.0	19.0	1.0
<i>Allium monanthum</i> MAX	Wild rocambole	8.0	30.0	18.0
<i>Allium odorum</i> L.	Scallion	13.2	8.9	11.9
<i>Allium odorum</i> L.	Scallion(young)	17.1	17.2	9.7
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic(young)	10.0	28.0	1.0
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic(leaf)	11.9	0.0	14.8
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic(trunk)	4.0	0.0	4.9
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic	4.0	19.0	0.0
<i>Allium schoenoprasum</i>	Chives	8.0	36.0	26.0
<i>Allium tuberosum</i> L.	Leek	14.0	29.0	7.0
<i>Allium tuberosum</i> L.	Leek(from China)	5.0	20.0	13.0
<i>Angelica keiskei</i>		6.8	8.7	3.3
<i>Anethum graveolens</i> L.	Dill seed	13.9	10.4	0.0

(continued)

Samples		Inhibition Ratio(%)		
Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 4	Fr. 5
<i>Apium graveolens</i> L.	Celery	0.0	10.0	0.0
<i>Apium graveolens</i> L.	Celery(seed)	4.7	12.1	1.4
<i>Aralia elata seemann</i>	Japanese anelica tree	10.2	0.0	14.8
<i>Armoracia rusticana</i>	Horseradish	2.0	3.6	4.8
<i>Artemisia draccucculus</i>	Tarragon	2.0	9.0	6.0
<i>Artemisia vulgaris</i>	Mugwort	3.0	15.0	2.0
<i>Astar scaber</i>	Chwi	10.0	9.0	3.0
<i>Beta vulgaris</i>	Beet	6.7	6.0	6.2
<i>Beta vulgaris</i> var.	Swiss chard	4.0	9.0	6.0
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf	10.0	18.0	13.0
<i>Brassica juncea</i>	mustard leaf (wild type)	5.0	14.0	10.0
<i>Brassica oleracea</i> L. botrytis	Cauliflower	5.0	14.0	8.0
<i>Brassica oleracea</i> L. capitata	Cabbage	1.7	13.9	7.5
<i>Brassica oleracea</i> L. var. italica	Broccoli	4.0	20.0	10.0
<i>Brassica oleracea</i> L. var. acephala	Kale	7.5	3.4	7.8
<i>Brassica rapa</i>	Green vitamin	7.0	21.0	14.0

(continued)

Samples		Inhibition Ratio(%)		
Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 4	Fr. 5
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Pickpurse	6.0	30.0	7.0
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper(young)	21.8	27.2	9.4
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper(green)	7.3	26.0	5.0
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper(Red)	28.5	30.8	7.3
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper(leaf)	9.0	18.0	16.0
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper(seed)	7.8	33.8	20.1
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper(trunk)	10.6	28.9	12.3
<i>Capsicum</i>		11.3	6.0	4.9
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pimento (Sweet pepper)	5.0	14.0	0.0
<i>Carum carvi</i>	Caraway	18.0	25.0	9.0
<i>Chilicon carne</i>	Pepper(Hot)	3.0	6.9	4.8
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Crown daisy	1.0	10.0	0.0
<i>Cichorium endivia</i>	Endive	6.0	13.0	6.0
<i>Cicorium intybus</i>	Chichory	3.6	17.8	0.0
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamon	0.0	0.0	1.7
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriander	13.0	30.0	1.0

(continued)

Samples		Inhibition Ratio(%)		
Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 4	Fr. 5
<i>Crocus sativus</i>	Saffron	0.0	19.1	1.9
<i>Cuminum cyminum</i>	Cummin	9.0	23.0	9.0
<i>Cymbopogon citrus</i>	Lemon	5.7	0.0	2.1
<i>Curcuma longa</i> L.	Turmeric	13.0	11.0	9.0
<i>Cucurbita moschate</i>	Pumpkin leaf	4.9	4.6	3.0
<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamon	2.0	9.0	8.0
<i>Eugenia caryophyllate</i>	Clove	0.0	4.0	0.0
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fennel	9.0	32.0	20.0
<i>Hemerocallis fulva</i>		18.0	13.0	4.0
<i>Illicium verum</i> Hooker	Star anis	5.0	16.0	6.0
<i>Isodon japonicus</i> Hara		2.3	14.0	0.0
<i>Isodon japonicus</i> Hara		6.2	0.0	10.6
<i>Ixeris dentata</i>	Lettus(green)	5.0	18.0	0.0
<i>Laurus nobilis</i>	Bay laurel	0.9	6.0	4.3
<i>Malva verticillata</i> L.		13.0	12.0	9.0
<i>Medicago sativus</i>	Alfalfa	10.0	20.0	2.0

(continued)

Samples		Inhibition Ratio(%)		
Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 4	Fr. 5
<i>Mentha</i> spp.	Mint	8.0	5.0	2.0
<i>Myristica fragrans</i> Houtt	Nutmeg	0.0	14.0	1.3
<i>Myristica fragrans</i> Houtt	Mace	4.0	7.0	2.0
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Basil	0.0	13.2	0.0
<i>Oenanthe javanica</i>	Drop wort	12.0	15.0	0.0
<i>Origanum hortensis</i>	Marjoram	18.0	24.0	24.0
<i>Origanum vulgare</i> L.	Oregano	3.4	8.0	4.0
<i>Papaver somniferum</i>	Poppy seed	4.0	13.0	3.0
<i>Perilla frutescens</i>	Perillae folium	6.2	0.0	13.8
<i>Petasites japonicus</i>	Butterbur	0.0	27.0	2.0
<i>Petroselinum crispum</i>	Parslry	5.4	10.0	12.1
<i>Pimenta dioicalis</i>	Allspice	0.9	7.8	0.0
<i>Pimpinella anisum</i>	Anise	14.0	19.4	11.0
<i>Pimpinella brachycarpa</i> Nakai	Chamnamul	7.0	9.0	3.0
<i>Piper nigrum</i> L.	Pepper(Black)	12.2	7.8	5.2
<i>Piper nigrum</i> L.	Pepper(White)	5.0	26.7	2.4

(continued)

Samples		Inhibition Ratio(%)		
Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 4	Fr. 5
<i>Raphanus sativus</i>	Radish	1.0	11.0	9.0
<i>Raphanus sativus var.</i>	Radish(leaf)	5.0	18.0	14.0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	0.0	0.0	5.2
<i>Salvia officinalis</i>	Sage	3.0	12.0	0.0
<i>Satureja hortensis</i>	Savory	1.0	0.0	0.0
<i>Sedum sarmentosum</i>	Stringy stone crop	9.0	7.7	10.7
<i>Sinapis alba L.</i>	Mustard	11.4	47.0	47.7
<i>Symphytum officinale</i>		18.0	0.0	1.4
<i>Taraxacum officinale L.</i>	Dandelion	9.0	6.0	0.0
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	9.0	17.0	1.0
<i>Trigonella foenun-graecum</i>	Fenugreek	3.0	4.4	2.4
<i>Valerianella locusta</i>	Corn salad	12.0	24.0	8.0
<i>Wasabia japonica</i>	Wasabia	0.0	0.0	1.4
<i>Zantho xylum piperitum</i>	Japanese pepper	7.3	6.6	1.8
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	11.0	22.0	2.0

Table 3-5. Chemical composition of *Sinapis alba* L. Unit (%)

Moisture	Protein	Fat	Carbohydrate	Fiber	Ash
5.0	26.4	36.3	28.2	5.2	4.1

원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 가용획분을 조제하였다. 침전물은 동결건조 후 연속적으로 70% acetone, 70% methanol 및 열수의 순으로 2시간 동안 환류추출한 후 활성을 검색한 결과 열수 추출 획분에서 최대활성을 나타냈다. 이 결과로부터 ACE 저해활성물질은 극성임을 알 수 있었다(Fig. 3-4).

3. 추출 온도에 대한 영향

최적 추출 온도를 확립하기 위해서 각각 20℃, 60℃, 100℃에서 2시간 추출하였다. Fig. 3-5에서 보는 바와 같이 가장 높은 저해활성은 60℃에서 얻어진 추출물이었다. 상대적으로 높은 온도에서 최대 ACE 저해활성을 나타내는 것으로 보아 활성물질은 열에 안정함을 알 수 있었으며 이 안정성은 정제 중 또는 실용화에 있어 매우 유용한 특징으로 판단되었다.

4. 유기용매에 의한 분획

겨자씨로부터의 최대 ACE 저해활성물질 추출을 위한 최적 유기용매 선택실험을 실시 할 목적으로 열수추출물을 20분동안 원심분리(10,000 x g)하여 얻어진 상등액을 사용하여 다양한 유기용매로 각각 분획한 결과(Fig. 3-6) butanol 획분에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

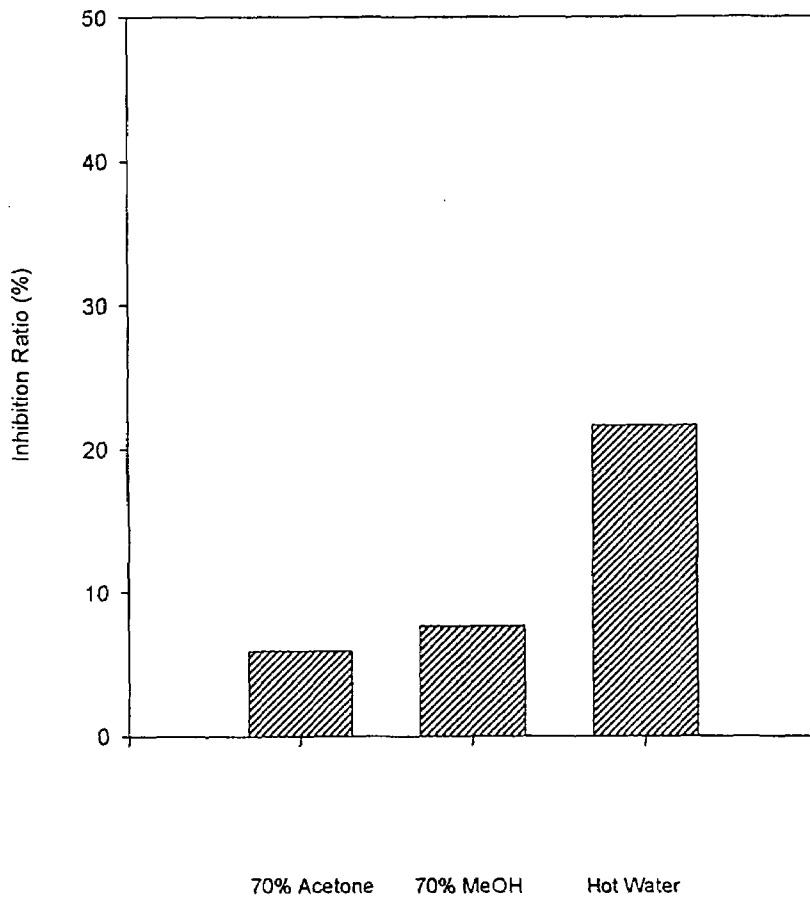


Fig. 3-4. Effect of various solvents on the extraction

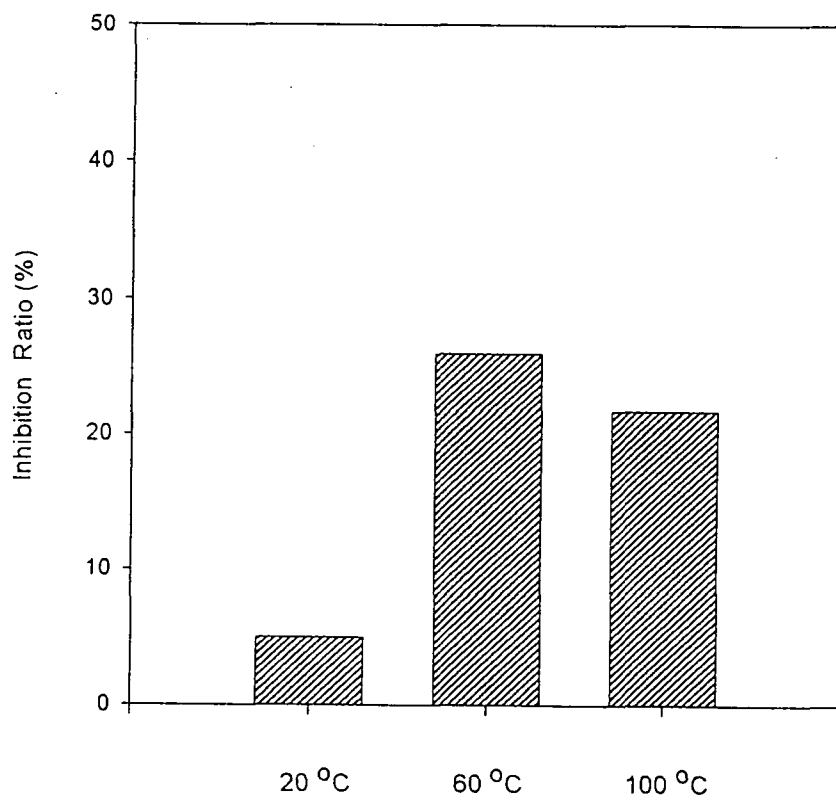


Fig. 3-5. Effect of temperature on the water extraction

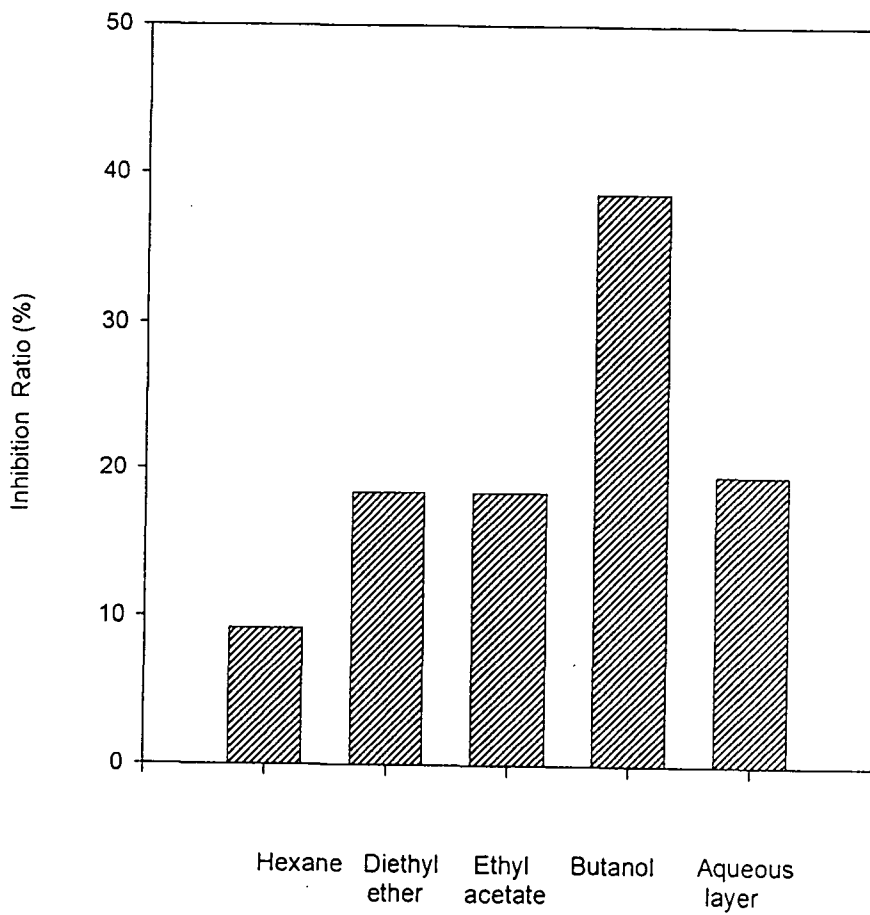


Fig. 3-6. Effect of organic solvent fractionation

5. 활성물질의 정제

가. 겨자씨로부터 ACE 저해활성물질의 추출 및 분획

겨자씨를 곱게 분쇄한 후 hexane을 이용하여 hexane 가용획분을 제거한 다음 증류수로 3시간 동안 환류추출을 실시하였다. 추출액은 원심분리(7,000 x g, 30 min)하여 상등액과 침전물로 분리한 다음 침전물을 증류수로 2회 더 추출하여 열수 추출물을 제조하였다. 열수 추출물은 hexane, diethyl ether, ethyl acetate, butanol로 극성을 순상으로 증가시키면서 분액깔대기를 실시하였다. 열수 추출물을 증류수와 hexane의 1:1로 혼합하여 충분히 진탕한 다음 정치하여 물층과 hexane층(Fraction II)을 분리하였다. 물층에 다시 1:1 비율로 diethyl ether을 첨가한 후 상기의 방법에 따라 diethyl ether층(Fraction III)을 분리하였다. 이어 Fig. 3-3의 방법에 따라 ethyl acetate층(Fraction IV) 및 butanol층(Fraction V) 분액하였다. 이때 최종적으로 남아있는 물층을 Fraction VI로 하였다. 각 획분을 동일한 농도로 제조후 ACE 저해효과를 측정된 결과 butanol층의 활성이 가장 높았다.

나. Methanol precipitation

겨자씨에 함유된 ACE 저해활성 성분을 추출하고 물질을 정제하기 위해 앞서 검토한 추출조건에 따라 겨자씨를 추출하였다. Butanol 획분을 ice bath상에 위치시킨 후 서서히 stirring하면서 -20℃에서 냉각시킨 methanol을 소량씩 첨가하였으며 얻어진 침전물을 원심분리(8,000 rpm, 30분)에 의해 회수하였다.

다. Sephadex LH-20 column chromatography

상기의 methanol 침전물을 모아서 감압농축한 후 50% methanol로 평형화시킨 Sephadex LH-20 column에 주입하고 동일 용액으로 용출한 결과(Fig 3-7) 28-32번 fraction에서 높은 ACE 저해활성이 관찰되었고 단백질 peak와 어느 정도 일치함을

보였다.

라. HPLC

Sephadex LH-20 column chromatography로부터 용출된 활성획분을 모아서 감압 농축한 후 reverse phase HPLC(μ bondapak C18, 4×250 mm column)를 행하였다 (Fig. 3-8). 여기에서 얻어진 peak중 ACE 저해활성이 가장 높은 peak를 재농축하여 normal phase HPLC를 행한 결과, 용출시간 5분에서 ACE 저해효과를 보이는 단일 peak를 얻었다(Fig. 3-9).

마. FPLC

HPLC상에서 얻어진 정제물질의 순도를 확인하기 위하여 Superdex peptide HQ 10/30 column을 이용한 FPLC를 행한 결과 단일 peak를 얻었다. 이 결과로부터 활성획분은 순수물질로 추정되었으며 정제된 활성물질의 수율은 0.002%였다.

6. 활성 본체의 규명

가. 추출물의 Pronase처리

천연물에서 ACE 저해물질은 펩타이드와 플라보노이드로 대별된다. 따라서 활성 물질이 펩타이드인지 아닌지를 확인하기 위하여 활성분획을 pronase로 처리하였다. Pronase처리를 행한 시료는 처리하지 않은 시료를 기준으로 85%의 감소효과를 보임으로써 겨자씨로부터 추출한 ACE 저해물질이 peptide임을 암시하였다(Fig. 3-10).

나. ACE에 대한 저해기작 측정

Peptide성 및 플라보노이드성 ACE 저해물질은 각각 상이한 저해기작을 보이는 것으로 알려져 있다. 펩타이드성 물질은 ACE에 대해 경쟁적으로 활성을 저해하는 경향을 보이나 플라보노이드성 물질은 비경쟁적으로 활성을 저해한다. 겨자씨로부

터 정제된 활성물질에 대하여 Lineweaver-Burk식에 의한 plot으로 저해기작을 검토한 결과 경쟁적 저해양상을 보임으로써 활성물질이 펩타이드성 물질임을 재확인하였다(Fig. 3-11). 정제 활성물질이 ACE 활성을 50% 저해시킬 수 있는 양 (IC_{50})은 $79 \mu\text{g}$ 임을 나타냄으로써 enalapril($0.024 \mu\text{g}$), bradykinin($6.54 \mu\text{g}$)보다 높았으나 EGCG($182 \mu\text{g}$)보다는 낮음을 알 수 있었다(Table 3-6).

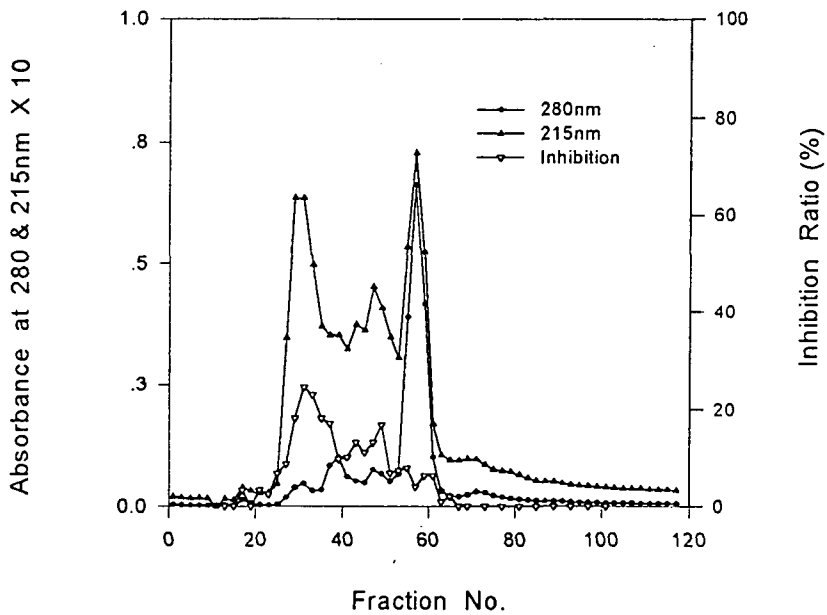


Fig. 3-7. Sephadex LH-20 column chromatography of precipitate with methanol.

Column size : 2.3 cm X 41.0 cm
 Fraction volume : 3.0 ml
 Eluent : 50% methanol
 Flow rate : 0.4 ml / min
 Loading Vol. : 3ml

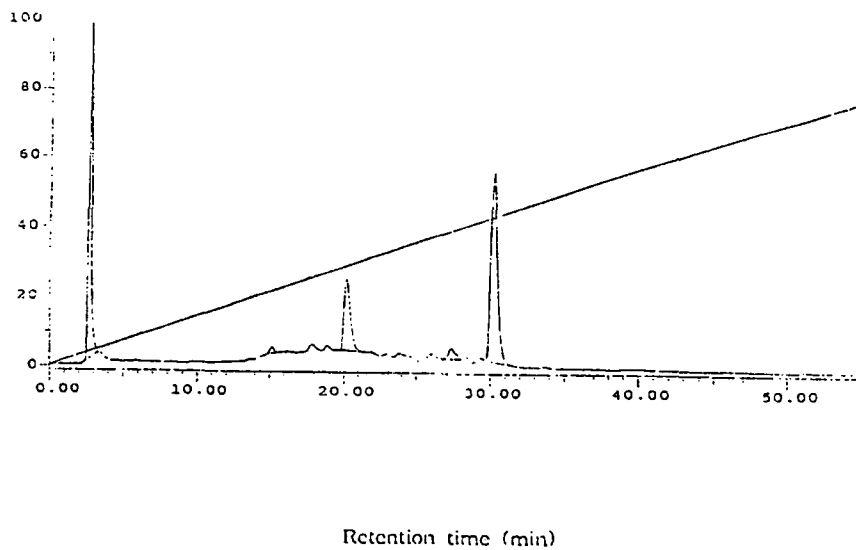


Fig. 3-8. Reverse phase HPLC of the active fractions.

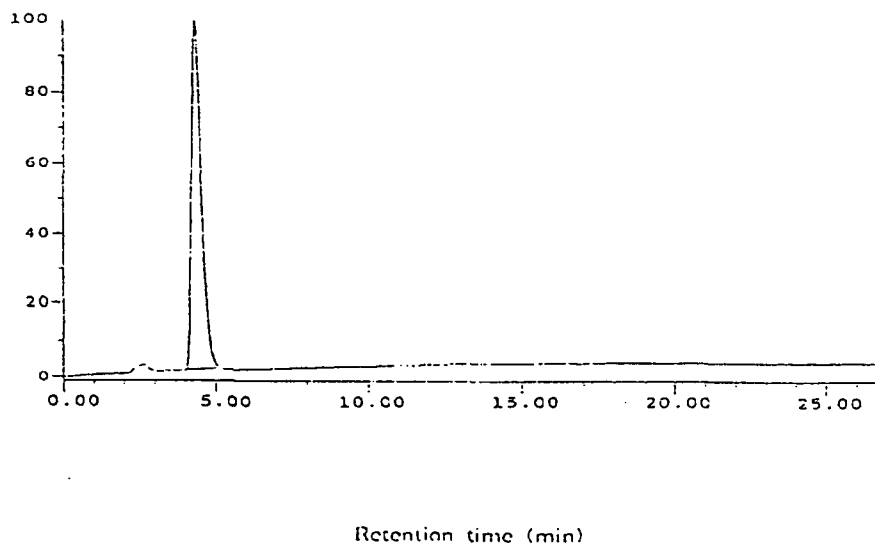


Fig. 3-9. Normal phase HPLC of the active fractions.

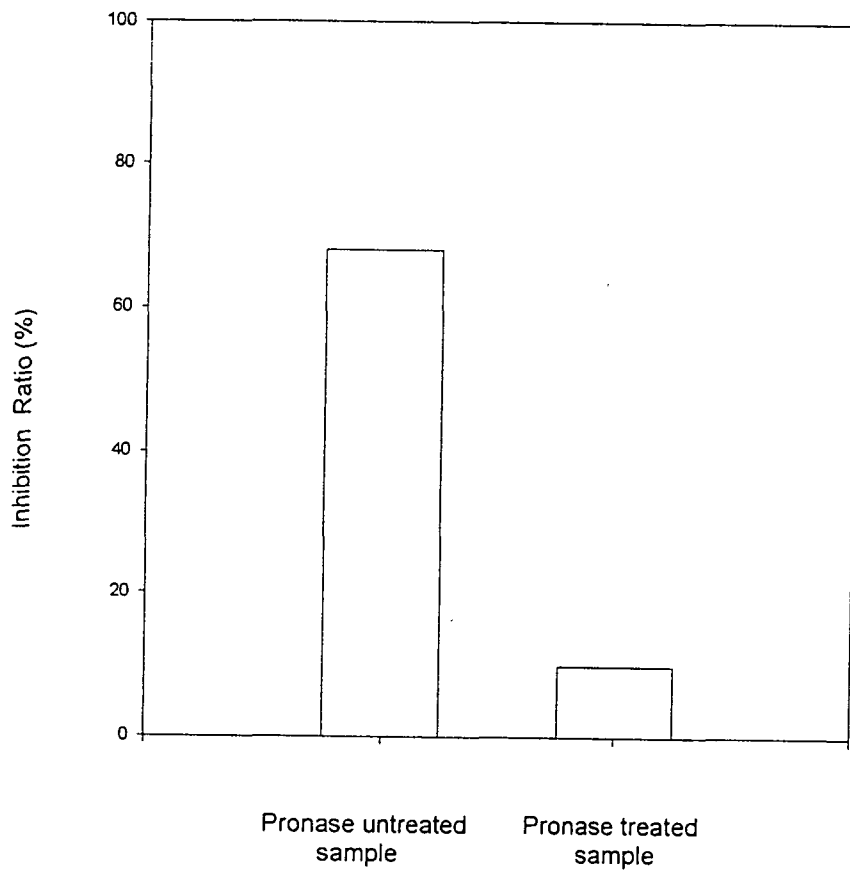


Fig. 3-10. ACE inhibitory effect of the active fraction digested with pronase.

Table 6. The effect of ACE inhibitors on ACE activity

Compound	IC ₅₀ * (μg)
Enalapril	0.024
Bradykinin	6.54
EGCG	181.61
Purified compound	79.59

* IC₅₀ : the concentration required for the 50% inhibition of ACE activity

다. 분자량 측정

Fig. 3-12는 FPLC를 이용하여 거자씨로부터 얻어진 ACE 저해물질의 분자량을 측정한 결과, 분자량은 약 640이었으며 이 결과로부터 ACE 저해물질은 약 5개의 아미노산으로 구성된 짧은 펩타이드임을 알 수 있었다.

라. 활성저해 펩타이드의 아미노산 서열

상기에서 정제한 펩타이드의 아미노산 서열을 Edman 분해에 의해 분석한 결과 Val¹-Tyr-Tyr-Ala-Leu⁵로 결정되었으며 각 cycle에서 아미노산의 PTH유도체는 각각 1개씩의 주아미노산이 관찰됨에 따라 비교적 순도가 높은 펩타이드 정제물임이 판명되었다. 5개의 아미노산 중 Ala를 제외한 아미노산이 소수성 아미노산으로 이루어져 있음을 알 수 있었으며 이는 현재까지 보고된 ACE 저해 펩타이드들의 구성 아미노산이 소수성 아미노산의 분포가 높다는 경향과 유사하였다. 아미노산서열로부터 환산한 분자량은 627.89이었으며 이 결과는 앞서의 HPLC에 의해 결정한 크기와 일치함을 나타내었다.

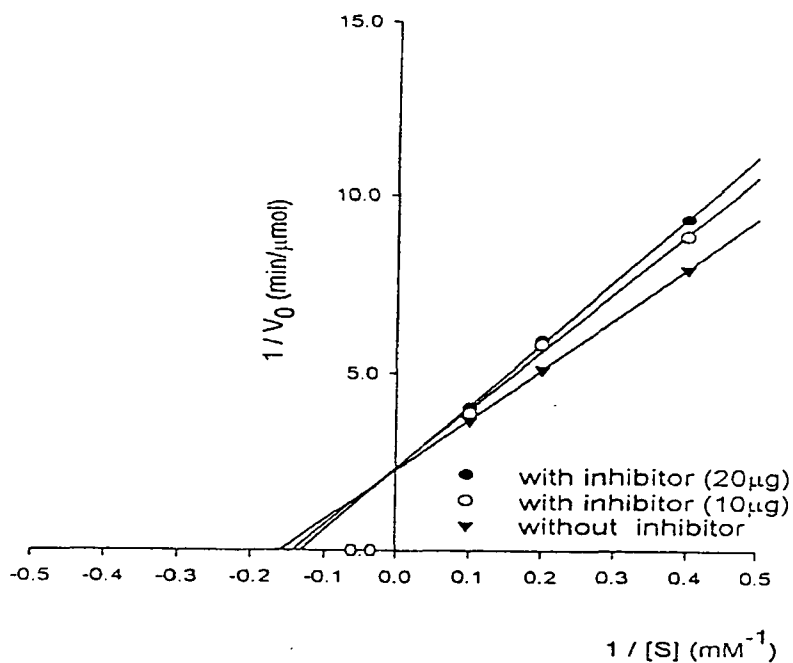


Fig. 3-11. Determination of ACE inhibition pattern

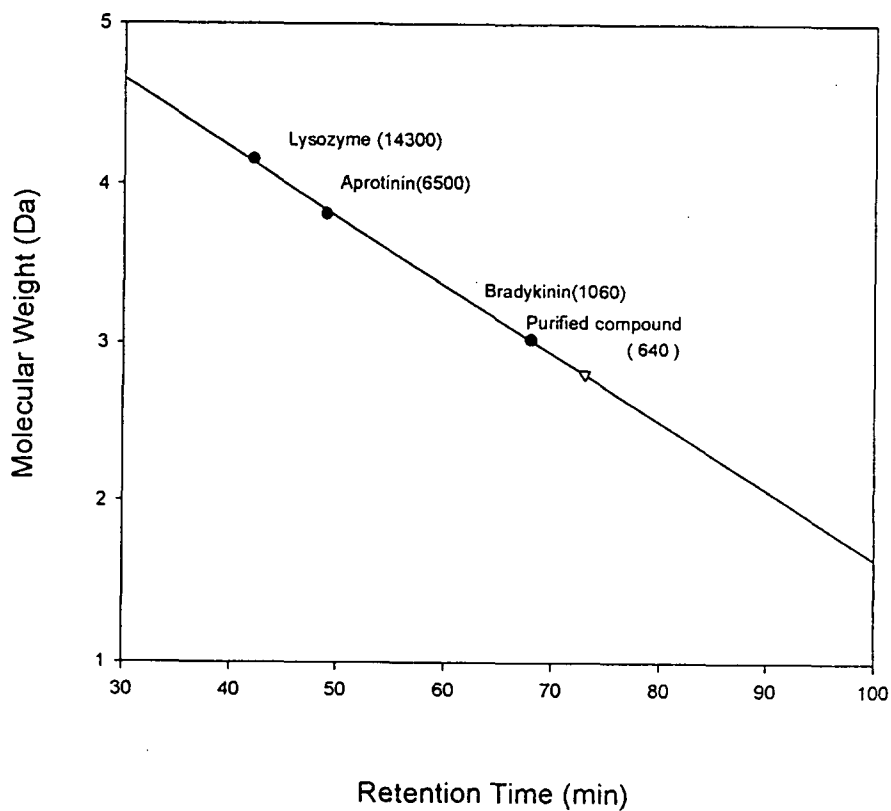


Fig. 3-12. Gel filtration of the purified component by FPLC.

7. 쥐 uterus에서의 Bradykinin agonist 활성

본 실험은 활성물질이 bradykinin agonist, antagonist 또는 potentiator로서 작용하는지의 여부를 확인하기 위하여 부분정제된 시료를 사용하여 앞서 기술한 재료 및 방법에 따라 수행한 결과 부분정제된 획분은 쥐의 uterus에서 contraction activity를 보임으로써 활성 성분이 bradykinin agonist임을 알 수 있었다(Fig. 3-13).

8. *In vitro*상에서의 소화효소에 대한 ACE 저해활성 검토

본 연구에서 분리한 ACE 저해 peptide에 대해서 장내 단백분해효소인 pepsin, trypsin, pancreatin에 의해 가수분해한 후 활성을 검토함으로써 이 peptide의 경구 투여 후 장관에서 흡수될 때까지의 저해효과 유지 여부를 *in vitro*상에서 검토하였다. 정제된 peptide를 대상효소들과 37°C에서 1시간 반응시킨 후 10,000 x g에서 5분간 원심 분리하여 상등액의 ACE 저해효과를 측정된 결과(Fig. 3-14) 효소 처리를 행하지 않은 대조구와 비교해서 trypsin, pepsin 및 pancreatin처리시 거의 변화가 없었다. 따라서 분리 peptide들이 가수분해에 의해 절단된 경우에도 ACE 저해효과를 갖는 것으로 추정되어진다. 이는 ACE 저해 펩타이드를 경구투여 시에도 장관내에서 불활성화되지 않고 저해활성을 나타낼 수 있음을 시사한 것으로 실용화 가능성이 높음을 나타내고 있다.

9. ACE 저해활성물질의 급성독성검사

정제된 ACE 저해활성물질의 급성독성을 조사하기 위하여 100, 500, 1000 mg/kg 농도로 경구투여를 실시한 결과, 각 군당 몸무게가 점차 증가하고 생존율도 100%로 경구투여에 의한 독성은 전혀 나타나지 않았다(Table 3-6).

Table 3-6. Acute toxicity of ACE inhibitor from *Sinapis alba L.* in mice

Sample Concentration	Sample Size	Initial Weight (g)	Final Weight (g)	Survival Rate (%)
0 mg/kg	6	30.4 ± 2.95	36.6 ± 3.3	100
100 mg/kg	6	28.7 ± 1.43	35.5 ± 1.35	100
500 mg/kg	6	30.2 ± 2.75	37 ± 5.95	100
1000 mg/kg	6	30.3 ± 2.31	37.7 ± 1.75	100

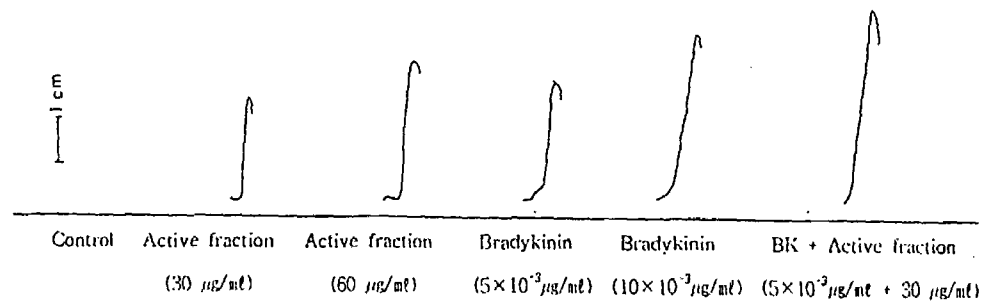


Fig. 3-13. Bradykinin agonist activity in the isolated rat uterus

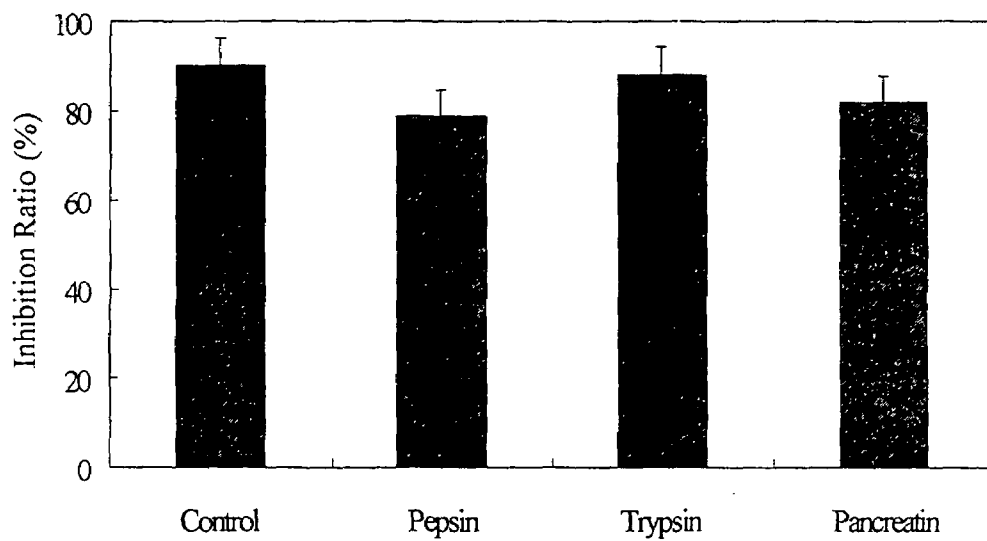


Fig 3-14. Effects of purified peptides from *Sinapis alba* L. treated with trypsin, pepsin, and pancreatin on ACE inhibitory activity

10. ACE 저해활성물질의 혈압강하활성

몸무게 300~320 g인 SHR(Spontaneously hypertensive rat, male, 14 weeks)에 겨자씨 열수 추출물의 butanol 획분을 증류수에 잘 용해시켜 300 mg /kg의 농도로 제조하여 0, 3, 5, 8, 24시간 동안의 혈압변화를 측정하였다. 대조군은 시료대신 증류수를 투여하였다. 그 결과 시료투여 3시간 후에 수축기 혈압, 평균혈압, 확장기 혈압이 각각 20, 18, 17 mmHg씩 감소하였다(Table 2-3). 통계처리결과, 대조군과 실험군에서 $p < 0.05$ 이하로 농도별 유의적 차이를 보였다.

Table 3-7. Blood-lowering effect of *Sinapis alba* L. in Spontaneously Hypertensive Rat (SHR).

	Before oral administration				3 h After oral administration			
	HR (beat/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	HR (beat/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)
Control	393.3	200	158.2	139.3	394.1	205	161.7	135.6
(DW)	±5.0	±8.5	±12.9	±9.7	±6.2	±2.1	±8.9	±3.4
Sample	386.0	201.0	168.5	152.3	380.4	181.9**	150.1**	135.4**
(300 mg/kg)	±22.9	±0.7	±9.8	±14.7	±20.5	±2.3	±9.5	±14.5

* HR : Heart rate, SBP : Systolic blood pressure, MBP : Mean blood pressure, DBP : Diastolic blood pressure.

** significantly different from control, $p < 0.05$.

10. ACE 저해활성물질의 혈압강하활성

몸무게 300~320 g인 SHR(Spontaneously hypertensive rat, male, 14 weeks)에 겨자씨 열수 추출물의 butanol 획분을 증류수에 잘 용해시켜 300 mg /kg의 농도로 제조하여 0, 3, 5, 8, 24시간 동안의 혈압변화를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 증류수를 투여하였다. 그 결과 시료투여 3시간 후에 수축기 혈압, 평균혈압, 확장기 혈압이 각각 20, 18, 17 mmHg씩 감소하였다(Table 3-7). 통계처리결과, 대조군과 실험군에서 $p < 0.05$ 이하로 농도별 유의적 차이를 보였다.

Table 3-7. Blood-lowering effect of *Sinapis alba* L. in Spontaneously Hypertensive Rat(SHR).

	Before oral administration				3 h After oral administration			
	HR (beat/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)	HR (beat/min)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	DBP (mmHg)
Control	393.3	200	158.2	139.3	394.1	205	161.7	135.6
(DW)	±5.0	±8.5	±12.9	±9.7	±6.2	±2.1	±8.9	±3.4
Sample	386.0	201.0	168.5	152.3	380.4	181.9**	150.1**	135.4**
(300 mg/kg)	±22.9	±0.7	±9.8	±14.7	±20.5	±2.3	±9.5	±14.5

* HR : Heart rate, SBP : Systolic blood pressure, MBP : Mean blood pressure,
DBP : Diastolic blood pressure.

** significantly different from control, $p < 0.05$.

이상의 결과들 즉, *in vitro* 상에서 소화효소에 대해 ACE 저해활성을 유지하고 있는 점, 급성독성검사에 있어 1,000mg/kg의 경구투여에 의해서도 전혀 독성을 나타

내지 않고 있는 점 및 SHR를 사용한 *in vivo* 실험에서의 혈압강하활성 등은 본 연구과제의 최종 목표인 겨자씨 함유 ACE 저해활성 펩타이드의 기능성 식품소재화가 가능함을 시사해 주었다.

제 4 장 양념채소 함유 항혈전 물질의 기능성식품 소재화

제 1 절 양념채소로부터 항혈전 물질의 검색

제 1 항 서 설

최근 조사된 현대인들의 사망률 추세 보고에 의하면 혈관 내 장애에 의한 사망자 수가 전체의 약 40%로 제 1위를 차지함에 따라 혈관 장애에 대한 기초 및 임상분야에서의 활발한 연구가 진행되고 있다. 혈전 생성은 혈류부전, 혈관상해, 고혈압, 지질침착 등의 원인으로 혈관 내에서 유발되어 혈장응고계, 혈소판, 혈관 내피 세포 및 하부 결체조직, fibrin 용해계의 총괄적이고도 복잡한 생화학적 반응을 통해 일어나며 생성된 혈전은 정맥 및 동맥에서 혈관의 순환을 방해하여 조직으로의 영양공급 및 산소공급을 차단함으로써 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화 등의 중대한 성인병을 일으킨다.

향신채소란 음식의 맛과 향기를 내는 조미료 식물이라는 의미가 있어 조미채소(租米菜蔬)라고도 부른다. 우리나라와 일본에서는 통상적으로 고추, 양파, 생강, 잎파와 같은 채소를 양념채소 또는 조미료식물(spice plant)라고 칭하지만 외국에서는 허브(herbs)라 하여 '생약 또는 요리에서 이용을 목적으로 어떤 정유를 추출하기 위한 전체식물 또는 식물의 일부분' 이라고 표기하고 있다. 향신채소는 영양가가 일반 채소보다 높을 뿐만 아니라 독특한 맛과 향이 있어 식욕을 증진시키며 방부작용, 항균작용, 산화방지, 미용효과 등의 약리·생리적 활성이 보고되고 있으나 양념채소로부터 항응고물질에 대한 연구는 아직 미미한 실정에 있다. 따라서 본 연구는 항응고 활성물질을 소재로 기능성 식품 소재화를 목적으로 1차적으로 항응고활성을 검색하고자 하였다.

제 2 항 재료 및 방법

1. 실험 재료

양념채소 및 향신채소(건강채소)는 산지가 표시된 것을 서울시내 백화점 및 경동시장에서 구입하였으며 수입향신료는 McCormick & Co. Inc. (USA)사 제품을 국내 수입상을 통해 구입하였다.

2. 일반 성분 분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법으로, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법으로 각각을 정량하였다.

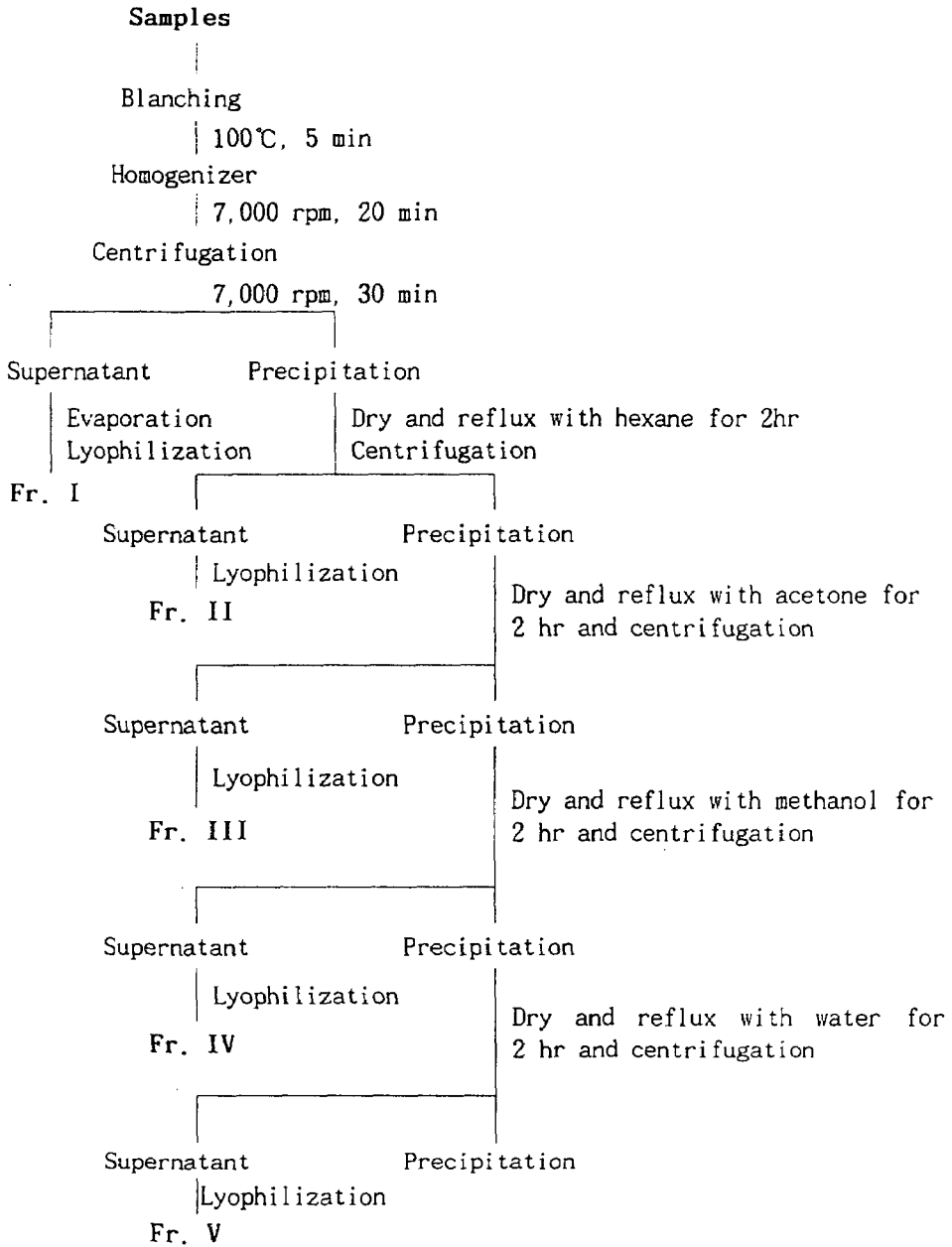
3. 식물재료로부터 검색용 시료의 제조

구입한 시료를 건조시키지 않고 Scheme 4-1의 방법에 따라서 autoclave에서 5분간 blanching하여 효소의 활성을 제거한 후 homogenizer(7,000 rpm 20 min)로 파쇄하고 원심분리한 후 얻은 상등액을 동결건조하여 Fr. I을 얻었다. 침전물은 연속적으로 hexane, acetone, methanol 및 물로 2시간동안 환류추출하여 얻은 각각의 추출액을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV 및 V를 얻었다. 시료는 검색 전까지 -30°C 냉동고에 보관하였으며 항응고 활성 측정시 1 mg/mL의 농도로 제조하여 사용하였다.

4. 항응고 활성 측정

가. Platelet poor plasma(PPP)의 제조

건강한 성인 남녀 10인 이상으로부터 각각 3.8% sodium citrate 처리된 혈액을 취해 4°C , 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 1 mL씩 분주하여 -30°C 에서 보관하였으며 항응고 활성 측정시 용해하여 사용하였다.



Scheme 4-1. Extraction procedure of plant materials.

나. Activated partial thromboplastin time (APTT)

내인성 혈액응고 및 전반적인 항응고의 활성은 activated partial thromboplastin time으로 측정하였다. 시료를 1 mg/mL의 농도로 혈장 (platelet poor plasma)에 용해한 후 시료를 포함한 혈장 100 μ L를 APTT 진단시약 100 μ L

와 혼합한 후 37°C에서 3분간 예열한 다음 37°C에서 미리 예열된 20 mM CaCl₂ 100 μL를 가한 후 blood coagulation analyzer(Clots 1A, Hospitex Diagnostics, Italy)를 이용하여 응고가 될 때까지의 시간을 측정하였다.

다. Prothrombin time (PT)

외인성 경로에 기인하는 항응고 활성은 prothrombin time으로 측정하였다. 시료를 각각의 추출 용매에 10 mg/mL의 농도로 용해한 후 10 μL를 취하여 혈장 100 μL과 혼합 후 37°C에서 3분간 예열한 다음, 37°C에서 미리 예열된 prothrombin time 진단시약을 100 μL 가한 후 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 측정하였다.

라. Thrombin time (TT)

응고과정 제 3단계의 항응고 활성은 thrombin time으로 측정하였다. 시료를 각각의 추출 용매에 10 mg/mL의 농도로 용해한 후 10 μL를 취하여 혈장 100 μL와 혼합 후 37°C에서 3분간 예열한 다음, 37°C에서 미리 예열된 prothrombin time 진단시약을 100 μL 가한 후 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 측정하였다.

5. 식물재료로부터 2차 검색용 시료의 조제

1차 검색결과 높은 활성을 보인 시료 1 g에 각각 증류수, 0.1 N NaOH 및 0.1 N HCl 용매로 2시간 동안 환류추출 후 산과 알칼리 추출물은 중화한 후 원심분리(6,500 rpm, 20 min)하고 상등액을 투석, 농축, 동결건조하여 APTT 법으로 항응고 활성을 측정하였다.

제 3 항 결 과

1. 내인성 경로에서 항응고 활성을 나타내는 시료의 검색

혈액의 초기 활성화 경로에 따라 내인성 경로(intrinsic pathway)와 외인성 경로(extrinsic pathway)로 대별되는데 내인성 경로는 혈장 단독으로 진행되는 응고 과정으로, 주로 상처에 의해 노출된 collagen, elastin 등이 factor XII를 활성화하여 다시 factor XI, IX, VIII의 관여로 factor X이 factor Xa로 활성화되는

반면, 외인성 경로는 혈장외의 조직괴사, 악성종양, 백혈병, 자기 면역 질환, 간염, 췌장염 등의 외부인자에 의해 factor III(tissue thromboplastin)가 활성화되면서 tissue factor인 factor VII과 Ca^{++} 의 존재 하에서 factor X을 factor Xa로 변환시키는 과정이다. 활성화된 factor Xa는 [Factor Xa - Factor V - Ca^{++} -phospholipid]의 complex를 형성하여 prothrombin을 thrombin으로 전환시키고 이 thrombin에 의해서 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 불용성의 입체적 구조를 가진 3차원의 격자 중합체를 형성함으로써 혈전이 생성된다. 이와같이 혈액에는 응고반응을 일으키는 요소와 그에 길항하는 소위 항응고 요소가 있어 응고 과정을 균형적으로 조절하지만 이 균형이 여러 가지 원인에 의해 깨지면서 신체에는 불필요한 혈전이 형성된다.

내인성 경로에 작용하는 항응고 활성물질인 heparin은 황산기 함량이 높은 다당류인 점을 고려하여 양념채소로부터 항응고 물질의 검색은 Fr. I과 Fr. V를 대상으로 activated partial thromboplastin time(APTT)으로 검색하였으며 그 결과 대조구보다 높은 활성을 나타내는 양념채소는 양파, 마늘, 계피, 쑥, 정향, 호로파, 사보리, 백리향, 세이지 등이었다(Table 4-1~4). 마늘(*Allium sativum*), 차이브(*Allium schoenoprasum*), 동양부추(*Allium tuberosum* L), 양파(*Allium cepa* L.), 파(*Allium fistulosum*) 등과 같은 *Allium* 속(屬) 식물의 함황성분은 adenosin diphosphate(ADP)의 작용을 억제함으로써 혈액의 혈소판 응집 억제 작용을 가지고 있다고 이미 보고된 바 있다. 혈소판은 직경 2~4 μ L의 원판형 혈구세포로서 상처부위의 조직액이나 적혈구 혈소판들이 가지고 있는 ADP에 의해서 혈소판이 응집된다. 따라서 양파와 마늘의 APTT가 증가된 것은 응집과정 중 내인성 경로에 기인된 것이라기 보다는 혈소판 응집 억제능에 의한 것으로 추정된다. 계피(*Cinnamomum zeylanicum*)와 쑥(*Artemisia vulgaris*)의 항응고 활성 또한 이미 연구 보고된 바 있다. 양념채소 중 내인성 경로에 대한 항응고 활성은 Fr. I 보다는 Fr. V가 항응고 활성이 높았다.

2. 외인성 경로에서 항응고 활성을 나타내는 시료의 검색

Factor III(tissue thromboplastin, TF)가 활성화되면서 혈전이 생성되는 외인성 경로(extrinsic pathway)에 있어 항혈전물질의 작용기작은 주로 혈액내에 존재하는 TF 활성화 저해물질을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 최근 국내에서 모동청에서 분리한 pubscenolic acid, prosapogen A, 지유에서 분리한 pomolic

acid, ziyuglycoside II 그리고 은행잎 추출물이 TF 저해작용을 가지고 있음이 보고되었다. 외인성 경로에서 항응고 활성을 나타내는 대부분의 물질이 저분자 물질로 보고됨에 따라 본 연구에서도 시료의 냉수 추출물 획분과 메탄올 추출물 획분을 대상으로 PT(prothrombin time)을 측정하였다. 그 결과 외인성 경로에 항응고 활성을 나타내는 시료는 관찰되지 않았다(Table 4-1~4).

3. 공통 경로에서 항응고활성을 나타내는 시료의 검색

내인성 경로와 외인성 경로에 의해 활성화된 factor Xa는 [Factor Xa - Factor V - Ca²⁺- phospholipid] 의 complex를 형성하여 prothrombin을 thrombin으로 전환시키고 이 thrombin에 의해서 fibrinogen이 fibrin으로 전환되며 fibrin이 중합체를 형성하면서 최종적으로 혈전이 생성되는 경로를 공통경로(common pathway)라고 한다. 시료의 냉수 추출물과 메탄올 추출물의 TT를 측정한 결과 민트(*Mentha spp.*), 이탈리아안 시즈닝(*Petroselinum crispum*), 로즈매리(*Rosmarinus officinalis*), 타라곤(*Artemisia dracuculu*), 울금, 백리향, 와사비(*Wasabia japonica*)의 냉수추출물에서 대조구보다 높은 활성을 나타냄으로써 내인성 경로에서 활성을 나타낸 시료들이 열수추출물이었던 것과 달리 공통경로에 활성을 나타내는 시료는 냉수추출물임을 알 수 있었다(Table 4-1~4).

Hirudin은 heparin과 달리 직접적으로 thrombin에만 작용하여 항응고 활성을 나타내는 65~66개의 아미노산으로 이루어진 물질로 최근 국내에서도 거머리 등에서 추출하여 그 구조와 항응고 활성 양식에 대하여 활발히 연구되고 있다. Table 4-1~4의 결과에서 울금이나 백리향처럼 내인성 경로와 공통경로에 모두 활성을 나타내는 시료가 있는 반면 민트, 이탈리아안 시즈닝은 공통경로에서만 항응고 활성을 나타내는 것으로 보아 이러한 시료는 hirudin처럼 thrombin에만 작용하는 항응고 물질임을 알 수 있었다.

Table 4-1. Anticoagulant activities of Korean herbs

Common name	Relative activity (Tr.*)					
	APTT		PT		TT	
	Fr. I	Fr. III	Fr. I	Fr. II	Fr. I	Fr. II
Gniger	1.29	1.12	0.86	1.05	1.02	0.99
Onion	1.56	1.60	0.94	1.00	1.25	1.25
Blacker pepper	1.16	0.96	0.95	0.99	1.25	0.96
White pepper	1.53	1.03	0.88	0.98	1.16	0.92
Green garlic	1.32	1.16	0.91	1.30	1.09	0.92
Garlic, leaf	0.89	1.03	0.98	0.96	0.97	1.01
Garlic, stalk	0.96	0.92	1.07	1.23	0.90	1.09
Garlic	1.65	1.49	0.90	1.12	0.95	0.90
Welsh onion	1.32	1.32	0.5	0.92	0.92	0.93
Crown daisy	1.37	0.92	1.00	0.88	0.99	0.94
Mustard leaf	1.21	0.92	0.84	0.99	1.01	1.05
Zanthoxyli fructus	1.24	1.05	0.97	0.85	1.01	0.99
Leek	1.16	1.12	0.94	1.00	1.07	1.01
Chinese leek	1.28	1.30	1.02	0.91	1.09	1.08
Red pepper	1.01	1.02	1.00	1.11	0.99	0.97
Green pepper	0.93	0.89	0.98	0.98	1.09	0.98
Perilla, leaf	1.17	1.00	0.87	1.20	1.06	1.08
Perilla, stalk	1.23	0.92	1.21	1.18	1.06	0.98

Anticoagulant activity of each sample(1 mg/mL) was determined by activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT). Each control time was 30 sec, 15 sec and 12sec, respectively. *Tr. = clotting time of plasma in sample / clotting time of plasma

Table 4-2. Anticoagulant activities of Western herbs

Common name	Relative activity (Tr*)					
	APTT		PT		TT	
	Fr. I	Fr. III	Fr. I	Fr. II	Fr. I	Fr. II
Allspice	0.99	1.39	0.82	0.68	1.02	1.00
Anise	1.06	1.06	0.92	0.93	0.97	0.90
Basil	1.02	1.38	0.79	1.00	1.40	0.96
Bay laurel	1.10	1.32	0.94	0.92	0.92	0.82
Caraway	1.07	1.12	0.88	0.92	0.93	0.90
Cardamon	1.19	1.40	0.94	0.95	0.98	0.92
Celery	1.02	1.03	0.97	1.00	0.98	0.94
Chive	0.98	1.08	1.21	0.95	0.89	0.92
Cinnamon	1.48	1.10	0.81	0.95	0.90	0.63
Clove	2.26	4.07	0.91	0.94	0.90	0.77
Coriander	0.95	1.22	0.84	1.01	1.06	0.93
Cummin	1.39	1.09	0.90	0.93	0.95	1.01
Dill seed	1.10	1.05	0.91	0.95	1.13	1.00
Fennel	1.27	1.00	0.87	0.88	1.07	1.00
Fenugreek	1.74	1.62	0.92	0.81	1.02	1.09
Horseradish	0.97	0.92	0.96	0.93	1.08	1.03
Mace	1.02	1.05	0.94	0.93	0.87	0.90
Lemon	1.14	0.89	0.86	0.81	0.78	0.87
Mustard	0.92	0.98	0.95	0.98	1.01	1.01
Marjoram	0.88	0.96	0.87	0.94	1.01	0.99
Mint	1.17	0.95	0.74	0.98	2.03	1.01

Anticoagulant activity of each sample (1 mg/mL) was determined by activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT). Each control time was 30 sec, 15 sec and 12sec, respectively. *Tr. = clotting time of plasma in sample / clotting time of plasma (continued)

Common name	Relative activity (Tr [*])					
	APTT		PT		TT	
	Fr. I	Fr. III	Fr. I	Fr. II	Fr. I	Fr. II
Mugwort	2.00	1.68	0.94	1.10	1.49	1.03
Mustard, leaf	1.14	1.02	0.88	1.03	1.01	1.01
Nutmeg	1.24	1.24	0.93	0.97	1.09	1.05
Oregano	1.20	1.24	0.95	0.94	1.10	0.93
Paprika	0.91	0.91	1.03	1.06	1.00	0.95
Parslry	1.00	1.20	0.93	0.90	1.03	0.84
Italian seasoning	1.34	1.37	1.66	0.88	2.89	0.87
Celery seed	0.88	1.20	0.98	0.93	0.95	0.93
Chili	1.23	1.13	0.91	0.94	0.95	0.92
Pimento	1.41	1.05	0.91	0.90	1.07	1.00
Poppy seed	1.10	1.32	0.97	0.93	1.03	1.05
Rosemary	0.90	1.31	1.44	0.92	1.73	0.92
Sage	1.22	1.92	0.95	0.95	1.23	0.98
Saffron	0.91	0.91	0.99	0.96	0.95	0.94
Savory	1.26	1.92	0.84	0.90	1.15	0.93
Star anis	1.28	1.03	1.56	1.39	1.53	0.91
Tarragon	1.35	1.54	1.37	1.75	1.71	1.35
Turmeric	1.51	1.53	1.69	1.73	2.11	1.33
Thyme	1.44	1.85	1.55	1.70	1.93	1.29
Wasabia	1.01	0.91	1.01	0.82	1.69	1.44

Anticoagulant activity of each sample(1 mg/mL) was determined by activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT). Each control time was 30 sec, 15 sec and 12sec, respectively. *Tr. = clotting time of plasma in sample / clotting time of plasma

Table 4-3. Anticoagulant activities of health vegetables

Common name	Relative activity (Tr [*])					
	APTT		PT		TT	
	Fr. I	Fr. III	Fr. I	Fr. II	Fr. I	Fr. II
Cauliflower	1.23	1.20	0.92	0.94	0.96	0.90
Corn salad	1.10	1.03	1.06	1.21	0.78	0.96
Endive	1.16	0.99	0.94	1.00	0.98	1.01
Alpapa	1.38	1.16	0.95	0.97	1.07	1.00
Redish, sprout	1.04	1.11	0.97	1.03	0.98	1.03
Radish	1.34	1.09	0.91	0.97	0.88	1.03
Broccoli	1.36	1.11	0.94	0.93	1.14	1.01
Kuansh	1.22	1.23	1.19	0.86	0.90	0.94
kale	0.86	0.90	0.97	1.35	0.86	1.09
Cabbage	1.00	0.93	1.00	0.83	1.79	0.85
Dandelion	1.22	1.00	0.93	0.97	1.03	1.01
Dandelion leaves	0.93	0.95	1.35	0.86	0.94	1.02
Banga a, leaf	0.82	0.84	0.94	1.43	0.98	0.99
Bang a, flower	0.94	1.26	1.01	1.01	0.89	0.95
Summer salad	0.99	0.89	1.10	0.98	1.02	1.07
kale	1.15	1.20	1.05	1.00	0.93	0.82
Coriander, leaf	1.47	1.20	0.90	1.29	1.03	0.99
Beet	1.01	1.09	1.05	1.19	1.03	0.96
Red chicory	1.34	1.62	1.04	1.34	1.20	0.99

Anticoagulant activity of each sample(1 mg/mL) was determined by activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT). Each control time was 30 sec, 15 sec and 12sec, respectively. *Tr. = clotting time of plasma in sample / clotting time of plasma

Table 4-4. Anticoagulant activities of edible plant

Common name	Relative activity (Tr [*])					
	APTT		PT		TT	
	Fr. I	Fr. III	Fr. I	Fr. II	Fr. I	Fr. II
Shepherd' s purse	0.78	0.57	1.15	1.16	1.12	0.93
Water dropwort	1.10	1.22	0.86	0.91	1.02	1.00
Sumbagui	1.33	1.12	0.99	1.12	0.98	0.94
Wild garlic	1.49	0.96	0.97	1.00	0.95	1.18
Chyi na mul	1.38	1.32	0.85	0.92	1.08	0.93
Butterbur	1.22	1.07	0.98	1.19	0.99	0.97
Chard	1.34	1.24	0.90	1.03	0.98	0.94
Sedum	1.09	0.89	0.87	1.00	0.92	0.97
Bud of aralia	1.23	0.98	1.06	1.28	1.00	1.00
Green young pepper	1.04	1.15	0.93	0.96	1.12	0.99
Sweet potato, stalk	1.09	1.17	0.89	1.07	0.88	0.88
Pumpkin young leaves	1.14	1.10	0.90	0.84	1.00	0.82
Amaranth	1.01	1.10	0.82	1.09	0.97	0.90
Cham na mul	1.02	1.15	0.98	1.09	0.94	0.94
Mallow	1.41	1.02	0.85	1.23	1.05	0.87

Anticoagulant activity of each sample(1 mg/mL) was determined by activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT). Each control time was 30 sec, 15 sec and 12sec, respectively. *Tr. = clotting time of plasma in sample / clotting time of plasma

4. 항응고 활성의 2차 검색

1차 검색 결과 (Table 4-1~4) 높은 항응고활성을 보이는 정향, 쑥, 오레가노, 세이지, 타임을 열수, 0.1 N NaOH, 0.1 N HCl 추출물을 조제하여 항응고 활성을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 재검색한 결과 정향 알칼리 추출물이 149초로 가장 높았으며 세이지 알칼리 추출물이 106초, 정향 산 추출물이 111초, 오레가노 알칼리 추출물이 99.6초, 쑥 알칼리 추출물이 96초의 높은 항응고 활성을 나타내었다 (Fig. 4-1). 추출 용매별 활성은 알칼리 추출물, 산 추출물, 물 추출물 순으로 높았으며 이는 활성물질이 고분자 다당류 또는 그 유도체로 열수보다는 산이나 알칼리에 의해 더 쉽게 용출되고 산추출시에는 활성물질이 분해되어 알칼리 추출보다 활성이 감소되는 것으로 추정된다.

이상의 1,2차 검색 결과 가장 높은 활성을 보인 정향(*Eugenia caryophyllata* T, clove)은 유럽에서는 기원전부터, 중국에서는 한나라 때부터 식용으로 사용하였으며 국내에서는 남부지방에서 자생하며 국내에서도 육류요리에 상용되고 있는 향신료이다.

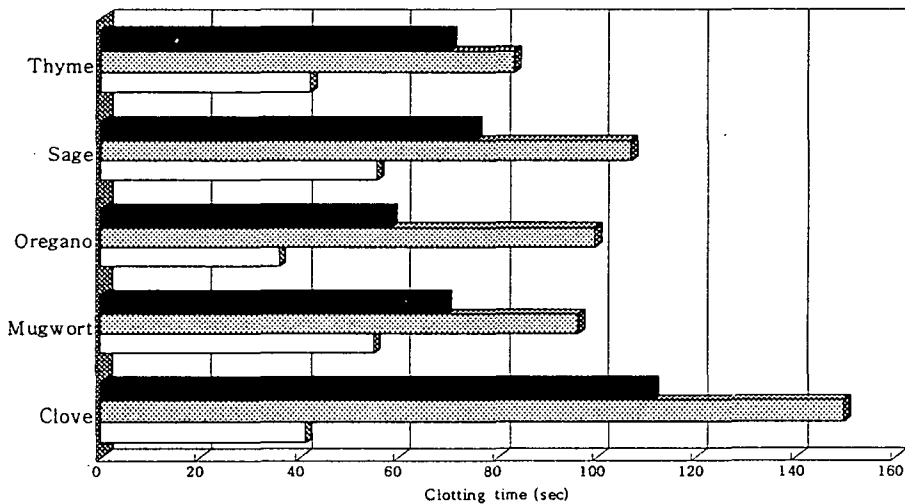


Fig. 4-1. Anticoagulant activities of selected herbs.

□ Hot water ▨ 0.1N NaOH ■ 0.1N HCl

제 2 절 정향으로부터 항응고 물질의 정제

제 1 항 서 설

자연계에 존재하는 많은 천연물질 중에는 인체의 생리작용을 조절하는 인자가 존재하고 이들은 일반적으로 저농도로 생리활성을 발현하기 때문에 영양소와 구분되고 있다. 면역을 비롯한 생체방어의 활성화 등 다양한 생리작용을 갖고 있으며 체내에서 흡수된 후 질병의 방지, 회복, 노화억제 등의 생체조절 기능을 나타내게 된다. 생체조절기능의 인체적 발현 기작은 식품내 함유되어 있는 생리 기능성 물질이 직접 흡수되거나 소화된 후 흡수되어 체내 내인성 생체 조절 인자들과 상호작용(협동작용, 상승작용, 길항작용)하는 형태와 내인성 인자들의 생산 또는 분비를 촉진하는 간접적인 형태로 나눌 수 있다. 한편 이들 식품은 다량으로 반복 섭취되므로 생리활성을 규명할 수 있다면 질병예방성 또는 치료성 식품의 창출이 가능하게 된다.

정향은 학명이 유게니아 카리오필레타 (*Eugenia caryophyllata*)이고, 생약명은 카니오피리 플로스 (*Caryophylli flos*)이며, 정향나무의 피지 않은 꽃봉오리를 말린 것이다. 정향은 어두운 갈색이나 어두운 적색을 나타내고 길이가 2 cm 정도의 상륜주상의 화상과 그 위쪽으로 두꺼운 꽃받침 4개 및 막질화면이 있는데 특히 향이 강하고 맛도 강렬하여 혀를 약간 마비시킨다.



▲ 정향나무 및 정향

이러한 정향의 대표적인 주성분은 유게놀(70 내지 85%)이며, 그 외에도 아세토게놀, 갈로타닉 엑시드, β -카리오필렌, 2-하이드록시 4,6-다이메톡시 5-메틸아세토페논 등이 함유되어 있다. 상기 유게놀은 무색이나 유황색의 맑은 기름으로 비중이 1.035 내지 1.1055인데, 이는 다른 정유의 비중과는 다른 것이다. 유럽에서는 기원전부터 사용했고 중국에서는 한나라 때부터 사용한 것으로 기록되고 있다. 정

향은 중국 5대 향신료 중에 하나이며 국내에서는 육류에 많이 첨가되고 식품 이외 담배제조에 향원료로 쓰이며 기타 훈증향료, 방충제, 곰팡이 방제 등의 목적으로 쓰이고 있다. 현재까지 정향의 약리작용은 산화방지제로서의 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 바 있으나, 항응고 활성화제로 효과가 있음이 보고되어진 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 정향으로부터 항응고 활성물질을 추출 정제하여 그 활성의 본체를 파악하고자 한다.

제 2 향 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 홀랜드산 정향 (*Eugenia caryophyllata* T., clove)은 향원 스파이스사로부터 구입하여 사용하였으며 DEAE-Toyopearl 650C는 Tosoh사, Butyl-650M은 SUPELCO사, Sephadex G-75, Sephadex G-100 및 Sepharose CL-6B는 Pharmacia사 제품을, 당의 각 표준품과 TFA(trifluoroacetic acid)는 Aldrich사에서 구입하였다. 그 외 기타 시약은 시판 일급 혹은 특급 시약을 사용하였다.

2. 일반 성분 분석 및 황산기 함량 측정

총당 함량은 arabinose와 galactose의 2:1 혼합물을 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법으로, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법으로, 단백질 함량은 bovine-serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법으로 정량하였다. 황산기 함량은 Dodgson의 방법을 변형하여 3.5 N HCl로 105~110°C에서 2시간 동안 가수분해한 시료 0.2 mL에 4% TCA 용액 3.8 mL과 BaCl₂-gelatin reagent 1 mL을 첨가하여 20분간 방치한 후 360 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 K₂SO₄를 이용하여 작성하였다.

3. 구성당 분석

Jones 등의 방법에 따라 시료를 2 M TFA로 121°C에서 1.5시간 동안 가수분해한 후 NaBH₄를 사용하여 중성당을 alditol로 환원시킨 후 acetic anhydride ((CH₃CO)₂O)를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography로 구성당을 분석하였으며 산성당은 NaBD₄를 이용하여 alditol로 3

회 환원시킨 후 acetic anhydride를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography로 구성당을 분석하였다. GLC의 분석조건은 Table 4-5와 같으며 내부표준물질(myo-inositol)과 표준 구성당들의 retention time 및 response factor를 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 mol %는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

Table 4-5. Analytical conditions of gas liquid chromatography for sugar

Apparatus	: Young Lin M600D
Detector	: Flame ionization detector (FID)
Column	: SP-2380 (30 m × 0.25 mm × 0.2 μm)
Column temp.	: 60 °C (1min) → 220 °C (30 °C/ min)→ 220°C (10 min) → 250°C (8 °C/min) → 250 °C (10 min)
Inj / Dec. temp.	: 250 °C / 250 °C
Carrier gas	: N ₂ (1.0 mL/min)

4. 정향(*Eugenia caryophyllate* T.)으로부터 향응고 물질의 추출

가. 산지에 따른 향응고 활성

산지를 달리한 시료 1 g에 각각 증류수, 0.1 N NaOH 및 0.1 N HCl 용매로 2시간 동안 환류추출 후 산과 알칼리 추출물은 중화한 후 원심분리 (6,500 rpm, 20 min)하여 상등액을 투석, 농축, 동결건조하여 APTT 법으로 향응고 활성을 측정하였다.

나. 추출용매 및 추출시간에 따른 향응고 활성 검토

분쇄한 홀랜드산 정향 1 g에 알칼리 농도를 0.1 N, 1.0 N, 2.5 N로 농도를 달리하여 25°C, 70°C, 100°C 및 121°C에서의 추출물을 제조하고 투석, 동결건조하여

APTT 법으로 항응고 활성을 측정하였다.

5. 홉랜드산 정향으로부터 항응고물질의 추출

가. 시료의 대량추출 및 ethanol 침전

홉랜드산 정향 1,600 g을 상온에서 메탄올로 5회 교반하여 메탄올 가용획분인 EC-M 획분을 얻은 후 비 가용획분은 잔존하는 메탄올을 제거한 다음 1.0 N NaOH로 70℃에서 추출하였다. 1차와 2차 추출물을 모아 EC-0으로 제조하였으며 이 획분을 3배의 에탄올 침전을 실시하여 고분자 획분인 crude extract(EC-1)와 저분자 획분인 EC-M으로 분획하였다.

나. Cetavlon에 의한 EC-2 획분의 제조

조획분 EC-1을 이온강도에 따라 분획하기 위하여 양이온 계면 활성제인 cetavlon(cetyltrimethyl ammonium bromide)을 처리하여 4개의 획분으로 분리하였다. EC-1(208 g)에 동량의 8% cetavlon 용액을 혼합하여 20℃에서 24시간 교반, 정치하였다. 원심분리(7,000 rpm, 30분)하여 얻은 침전물을 10% NaCl에 2회 용해하여 얻은 상등액을 EC-2로 하고 불용성 획분을 EC-5로 하였다. 8% cetavlon 상등액은 1% boric acid(H_3BO_3)를 동량 첨가하고 2 M NaOH를 이용하여 pH를 8.8로 맞춘 후 24시간 동안 교반하여 침전물을 형성시키고 원심분리하여 그 침전물은 2% acetic acid로 용해시킨 후 EC-3을 제조하였다. 이 때 상등액은 2 M의 NaOH를 이용하여 pH를 9.5로 조정하고 침전물을 얻은 후 위와 동일 조건으로 처리하여 EC-4를 얻었다. 각 획분은 투석, 동결건조하여 시료로 이용하였다.

다. 한외여과

Cetavlon 처리결과 얻은 항응고활성 획분 EC-2는 Prep/Scale-TFF Cartridges (Millipore™, Germany) 및 10 K와 100k regenerated cellulose cartridge를 이용하여 한외여과를 실시하여 분자량별로 분자량 10 K이하인 획분 EC-2A와 10~100 K인 EC-2B 및 100 K 이상인 EC-2C 획분으로 분획한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

6. 항응고 활성 본체 검토

가. Pronase digestion

활성의 본체를 파악하기 위하여 한외여과 결과 높은 항응고 활성을 나타낸 EC-2B와 EC-2C 획분을 각각 10 mM CaCl₂가 함유된 Tris-HCl buffer(pH 7.9)에 용해시킨 후, pronase(Sigma, USA)를 가하여 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 5분간 끓여 정치시킨 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 3일 동안 투석하고, 비투석획분을 동결건조하여 pronase 소화물을 조제하였다.

나. Periodate oxidation

활성의 본체를 파악하기 위하여 한외여과 결과 높은 항응고 활성을 나타낸 EC-2B와 EC-2C 획분을 각각 50 mM acetate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 후, 50 mM NaIO₄를 5 mL 가하여 4°C의 암실에서 48시간 동안 산화시켰다. 과량의 NaIO₄를 제거하기 위하여 반응액에 ethylene glycol을 5 mL 가해 1시간 동안 실온에 방치한 후, 3일간 투석한 다음 비투석 획분을 20 mL로 농축시켰다. 이 농축액에 NaBH₄ 20 mg을 가하여 실온에서 1시간 교반시키고 0.1 M acetic acid로 중화, 투석, 동결건조하여 periodate 산화물을 조제하였다.

7. EC-2B 획분으로부터 항응고 물질의 정제

가. DEAE-Toyopearl 650C에 의한 이온 교환 크로마토그래피

EC-2B 획분을 증류수로 평형화된 DEAE-Toyopearl 650C column (4.6×45 cm)에 주입하고 증류수로 용출시키면서 비 흡착획분을 얻은 후 NaCl의 농도를 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M로 분당 3.0 mL의 유속으로 상온에서 이온 교환 크로마토그래피를 실시하여 EC-2B-I→V로 분획한 후 분획물을 투석, 농축, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

나. Butyl-Toyopearl 650M에 의한 hydrophobic interaction chromatography

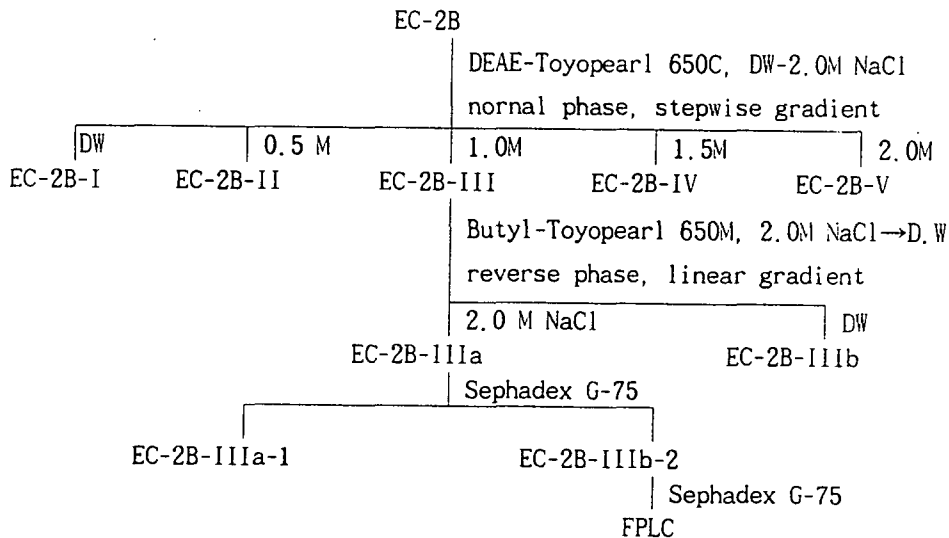
이온 교환수지에서 가장 활성이 높았던 획분인 EC-2B-III 획분을 2.0 M NaCl에 용해시킨 후 2.0 M NaCl 용액으로 평형화된 Butyl-Toyopearl 650M column (2.4 × 45 cm)에서 분당 3.0 mL의 유속으로 상온에서 hydrophobic interaction chromatography를 역상 농도구배 방식으로 행하여 비 흡착 획분인 2B-IIIa을 얻은 후 증류수로 용출시키면서 흡착획분인 2B-IIIb 획분을 얻어 투석, 감압농축, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

다. Sephadex G-75에 의한 size exclusion chromatography

Butyl-Toyopearl 650M column으로부터 얻어진 획분 중에서 주요 활성 획분인 2B-IIIa 획분을 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sephadex G-75 column(2.5×85 cm)에서 0.2 mL/min의 유속으로 4°C에서 size exclusion chromatography를 행하여 EC-2B-IIIa-1, EC-2B-IIIa-2 획분을 얻어 투석, 감압농축, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

라. 2B-IIIa-2 획분의 순도확인

Sephadex G-75에서 용출된 항응고 활성획분인 EC-2B-IIIa-2를 Sephadex G-75 column(1.6×92 cm)에 재용출시킨 후 정제도는 FPLC용 Superdex G-75 column을 이용하여 확인하였다.



Scheme 4-2. Procedure of purification of EC-2B from *Eugenia cryophyllata* T.

8. 정향으로부터 추출 분리한 EC-2C 획분의 정제

가. Butyl-Toyopearl 650M에 의한 hydrophobic interaction chromatography

EC-2C 획분을 2.0 M NaCl에 용해시킨 후 2.0 M NaCl 용액으로 평형화된 Butyl

-Toyopearl 650M column(2.4 × 10 cm)에서 3.0 mL/min의 유속으로 상온에서 hydrophobic interaction chromatography를 역상 농도구배를 행하여 EC-2C-I과 EC-2C-II 획분을 얻어 투석, 감압농축, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

나. Sephadex G-100에 의한 size exclusion chromatography

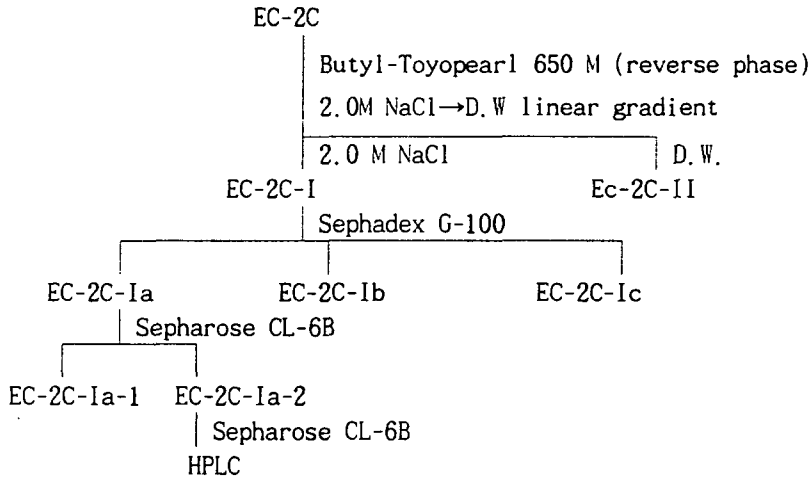
Butyl-Toyopearl 650M column에서 얻어진 획분 중에서 주요 활성 획분인 EC-2C-I 획분을 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sephadex G-100 column(2.5×85 cm)에서 0.2 mL/min의 유속으로 4℃에서 size exclusion chromatography를 행하여 EC-2C-Ia, -Ib, -Ic 획분을 얻어 투석, 감압농축, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

다. Sepharose CL-6B에 의한 size exclusion chromatography

Sephadex G-100에서 얻어진 획분이 Sephadex G-100의 void volume이었으므로 이보다 분획범위가 큰 Sepharose CL-6B column을 이용하여 size exclusion chromatography를 실시하였다. Sepharose CL-6B column(2.5×85 cm)에서 0.2 mL/min의 유속으로 4℃에서 size exclusion chromatography를 행하여 EC-2C-I-Ia, -Ib, -Ic의 획분을 얻어 투석, 감압농축, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

라. 정제 물질의 순도 확인 및 분자량 결정

정제 물질 EC-2C-Ia-2의 순도를 확인하기 위하여 Shodex KB-805/ HPLC를 사용하여 순도 확인을 실시하였으며 분자량은 Dextran T-500 (M.W. : 5×10^5), T-70 (M.W. : 7×10^4), T-40 (M.W. : 4×10^4), T-10 (M.W. : 1×10^4) , 그리고 glucose를 표준 물질로 사용하여 HPLC에서 구한 표준곡선과 K_{av} 값을 비교하여 결정하였다.



Scheme 4-3. Procedure of purification of EC-2B from *Eugenia cryophyllata* T.

제 3 항 결 과

1. 산지에 따른 항응고 활성

국내에서 유통되고 있는 싱가포르산, 마다카스카라산, 홀랜드산, 중국산의 정향을 구입하여 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl로 추출 후 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 항응고활성을 측정한 결과 홀랜드산의 알칼리 추출물이 191초, 산추출물이 137초로 가장 높았으며 마다카스카라산의 알칼리 추출물이 131초, 산추출물이 98초를 나타내었다 (Fig. 4-2). 또한 산지에 관계없이 알칼리 추출물이 산추출물에 비해 활성이 높음을 재확인할 수 있었다. 각 산지에 따른 추출물의 화학적 조성을 조사한 결과 단백질 함량이 67~80%로 마다카스카라산의 산추출물이 79.8 %로 가장 높았으며 중국산 산추출물이 67.6%로 가장 낮았다. 구성당 조성은 산지에 따라 구성당의 차이는 컸으며 특히 arabinose의 함량은 산지에 관계없이 산추출물이 알칼리 추출물에 비해 매우 낮음을 알 수 있었다.

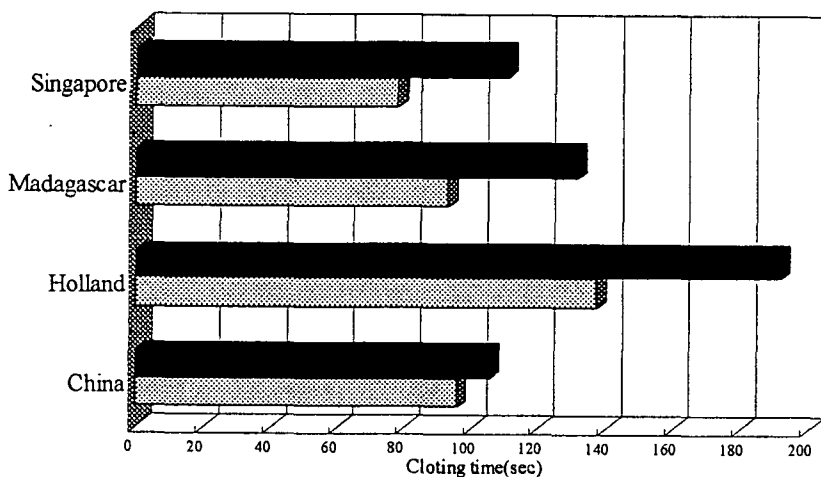


Fig. 4-2. Anticoagulant activities of clove from various regions.

▨ 0.1N HCl ■ 0.1N NaOH

Table 4-6. Chemical composition of *Eugenia caryophyllata* T. from various regions

	Singapore		Madagascar		Holland		China	
	HCl	NaOH	HCl	NaOH	HCl	NaOH	HCl	NaOH
Protein	67.6	70.1	79.8	78.0	75.0	77.0	75.8	78.0
Total sugar	27.4	26.5	21.0	17.0	21.6	21.7	18.9	17.3
Uronic acid	30.3	25.3	18.5	15.2	27.8	25.3	15.2	14.8
Sugar composition (molar ratio)								
Fucose	0.48	0.49	0.81	2.20	0.91	2.20	0.52	0.71
Arabinose	0.04	4.25	0.27	15.10	0.08	27.1	0.11	5.02
Xylose	0.32	0.36	0.35	0.88	0.16	1.17	0.31	0.29
Mannose	0.10	0.12	0.08	0.28	0.15	0.32	0.07	0.19
Galactose	1.07	1.23	0.48	4.97	0.47	6.60	1.33	2.93
Glucose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

2. 정향의 알칼리 추출조건의 최적화

최종적으로 선정된 홀랜드산 정향으로부터 향응고 활성물질의 추출조건을 최적화하기 위하여 추출용매는 증류수, 0.1 N NaOH, 1.0 N NaOH, 2.5 N NaOH를 사용하여 25℃, 70℃, 100℃, 121℃의 추출온도에서 각각의 추출물을 제조한 후 500 μg/mL의 농도로 향응고 활성을 측정하였다. Fig. 4-3에서와 같이 1.0 N NaOH, 70℃의 추출물의 활성이 290초로 가장 높았으며 1.0 N NaOH, 100℃ 추출물이 274초 높은 활성을 나타내었다. 추출용매와 추출온도에 따른 활성은 1.0 N NaOH > 2.5 N NaOH > 0.1 N NaOH > 증류수 순과 70℃ > 100℃ > 25℃ > 121℃ 순으로 높았다. 이는 순수한 물보다는 알칼리에 의한 추출이 3~6배 높은 추출효과를 나타내지만 지나치게 높은 알칼리에서는 오히려 활성이 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 4-3).

3. 홀랜드산 정향으로부터 향응고 활성물질의 추출

가. 정향으로부터 향응고 물질의 추출

홀랜드산 정향으로부터 향응고물질의 최적 추출조건을 검색한 결과 1.0 N NaOH 용액에서 70℃ 추출시 활성이 가장 높았으므로 분쇄한 정향 (*Eugenia caryophyllata* T.) 1,600 g으로부터 대량추출을 실시하였다. 향신료로 이용되는 정향은 정향나무의 꽃봉오리로 정유성분을 17%정도 함유하고 있으므로 대량추출에 앞서 메탄올을 이용하여 메탄올 가용획분 (EC-M)을 추출한 후 1.0 N NaOH, 70℃에서 추출하였다. 1차 추출물을 추출하고 남은 잔사를 2,3차 추출의 향응고 활성을 측정한 결과(Fig. 4-4), 2차 추출물의 향응고 활성은 1차 추출물의 39%, 3차 추출물은 21.5%였으므로 1,2차 추출물만을 모아 시료로 EC-0로 사용하였으며 이때의 수율은 1차 추출물 12.0%, 2차 추출물 10.3%이었다. EC-0획분의 활성은 500 μg/mL의 농도에서 274초임을 알 수 있었다.

EC-0를 3배의 에탄올 침전을 실시하여 EC-E와 EC-1으로 분획하였으며 고분자 획분인 EC-1의 향응고 활성은 448.7초로 EC-0 획분보다 높음을 알 수 있었다.

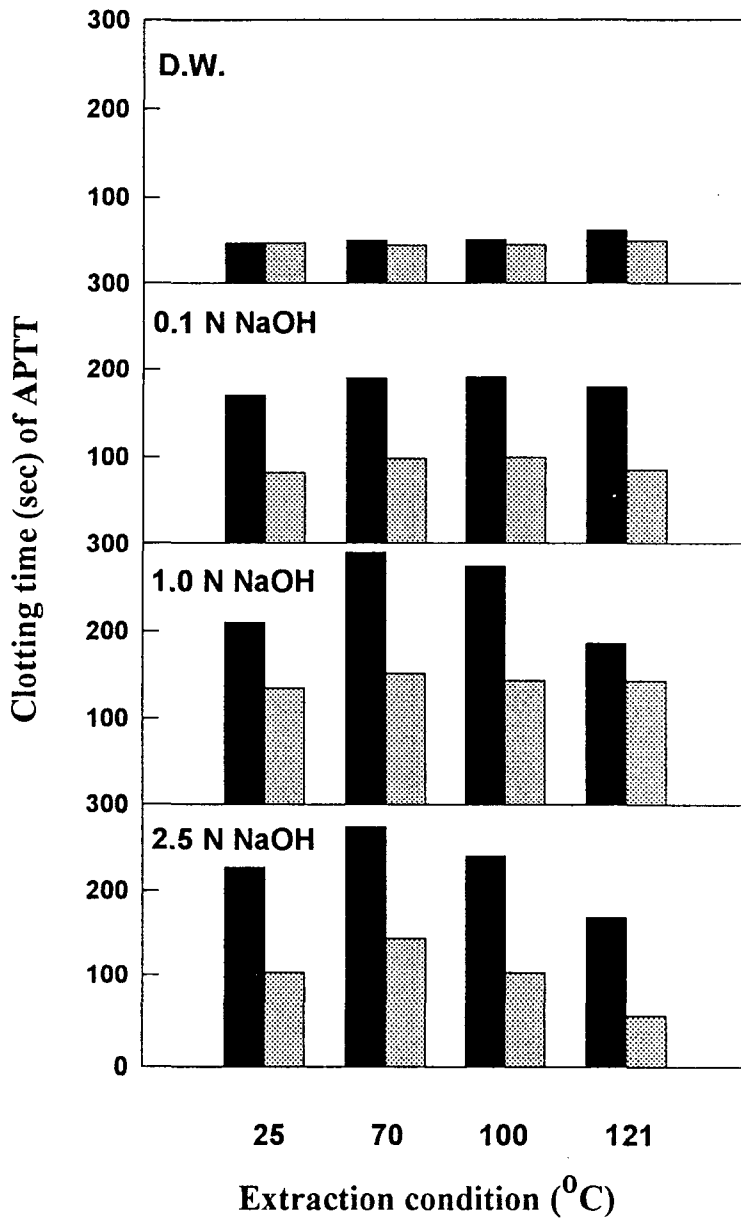


Fig. 4-3. Anticoagulant activities of various extraction condition

■ : 500 ug/mL ▨ : 250 ug/mL

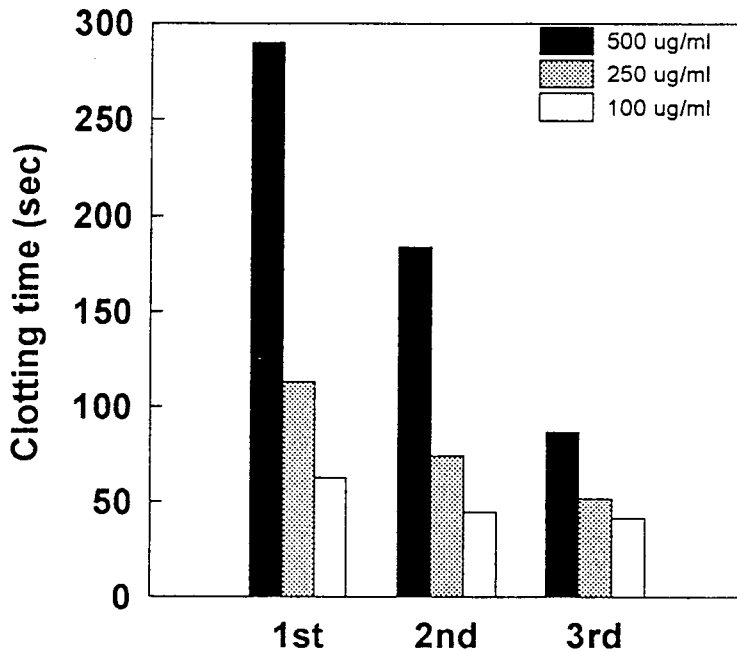


Fig. 4-4. Anticoagulant activities of 1st-3rd extractions from *Eugenia caryophyllata* T.

나. 양이온 계면활성제에 의한 EC-1 획분의 분획

EC-1 획분을 양이온 계면활성제인 cetavlon(cethyltrimethyl ammonium bromide)을 이용하여 이온강도에 따라 4개의 획분으로 분획하였다. EC-2획분은 8% cetavlon 용액에 침전하는 획분으로 비교적 강한 음이온으로 이루어진 획분이다. EC-3 획분은 8% cetavlon에는 침전하지 않았으나 1% boric acid에는 침전하는 획분이며 EC-4 획분은 1% boric acid에서도 침전하지 않는 획분이다. Fig. 4-5의 결과 비교적 음이온성이 강한 EC-2 획분의 항응고 활성이 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 600초 이상으로 가장 높았으며 활성은 EC-2 > EC-3 > EC-4 순으로 높았다.

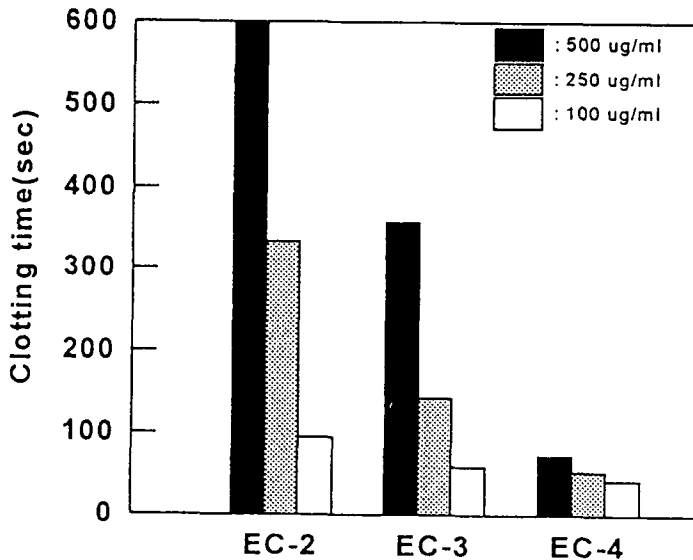


Fig. 4-5. Anticoagulant activities of subfraction obtained by CTAB treatment of EC-1.

다. 한외여과에 의한 EC-2획분의 분획

Cetavlon 처리 결과 가장 활성이 높았던 EC-2 획분을 prep-scale ultrafiltration을 이용하여 분자량으로 분획을 실시한 후 APTT (activated partial thromboplastin time)와 TT (thrombin time)를 이용하여 항응고 활성을 측정하였다. 10만 이상의 분자량으로 추정되는 EC-2C 획분은 APTT와 TT에서 모두 항응고 활성을 가지고 있었으나 EC-2B 획분은 APTT 만을 증가시킬 뿐 TT는 증가하지 않았다. 대표적인 항응고 물질로 알려져 있는 heparin 자체는 thrombin과 factor Xa 모두에 항응고 활성을 가지고 있으나 가수분해 된 low molecular weight heparin은 thrombin에 대한 항응고 활성이 없는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 정향으로부터 추출된 EC-2C는 thrombin과 factor Xa에 모두 항응고 활성을 가지고 있으나 이보다 분자량이 작은 EC-2B 획분은 thrombin에 대한 활성이 없음을 알 수 있었다.

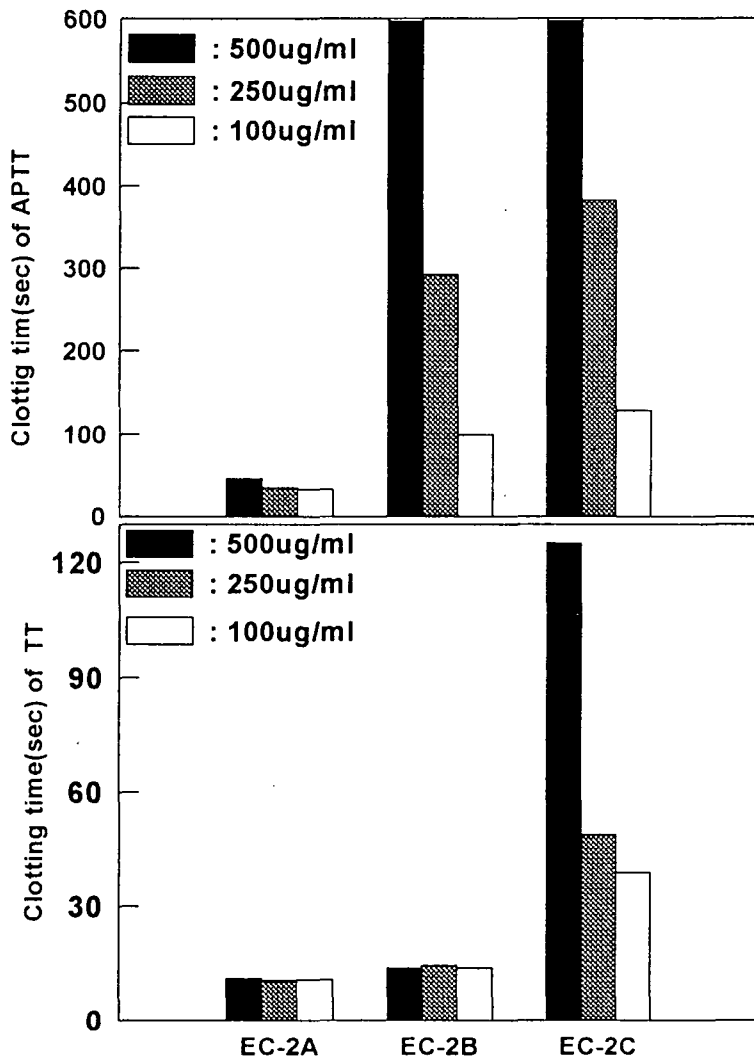


Fig. 4-6. Anticoagulant activities of subfractions by prep-scale ultrafiltration

라. 항응고 활성의 본체 연구

한외여과 결과 얻은 두 획분에서 항응고 활성을 나타내는 것이 다당에 의한 것인지 단백질에 의한 것인지를 확인하기 위해 pronase 처리와 periodate oxidation을 행한 후 시료를 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 활성을 측정하였다. 그 결과 pronase 처리시와 두획분 모두 활성의 변화는 없었으나 periodate 산화시 항응고 활성이 낮아짐으로써 정향으로부터 분리한 혈액 항응고성 물질의 항응고 활성 본체는 다당이 관여함을 알 수 있었다.

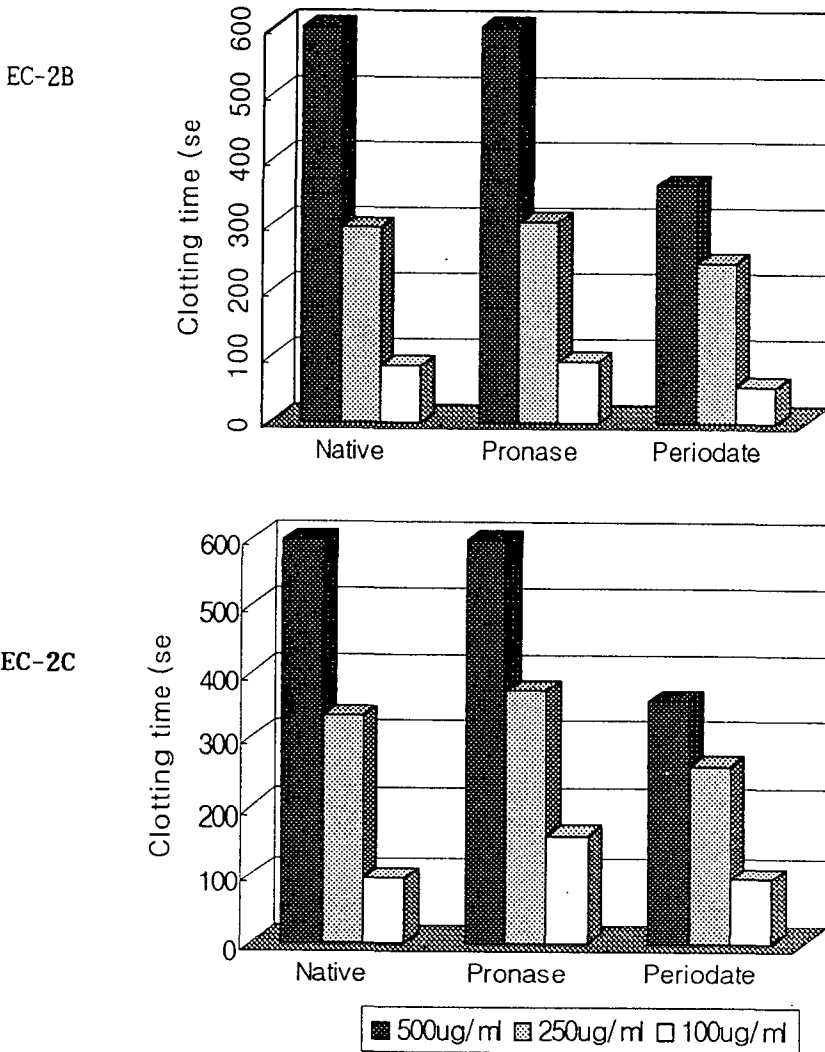


Fig. 4-7. Change of anticoagulant activities of pronase and periodate digestion.

4. EC-2B 획분으로부터 항응고 물질의 분리 및 정제

가. 이온 교환 크로마토그래피에 의한 EC-2B의 분획

한외여과를 이용한 분획으로 얻어진 3개의 획분 중 활성이 높았던 EC-2B 획분은 분자량이 10만 이하로 추정되는 획분으로 음이온 교환 수지인 DEAE-Toyopearl 650C column(Cl⁻ form)을 이용하여 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. EC-2B 획분 500 mg을 증류수에 용해시킨 후 column에 주입하여 흡착 및 비흡착 획분을 용출시킨 다음 NaCl을 0.5~2.0 M까지 stepwise로 각각 농도를 달리하여 5개의 획분으로 분획하였다(Fig. 4-8). 각각의 획분에 대하여 항응고 활성을 측정한 결과 1.0 M NaCl에서 용출된 EC-2B-III 획분이 250 μ g/mL의 농도에서 APTT 242초로 가장 활성이 높았으며 그외의 획분에서는 250 μ g/mL에서 대조구와 유사한 활성을 나타내었다. 수율은 0.5 M에서 용출된 획분이 가장 높았다.

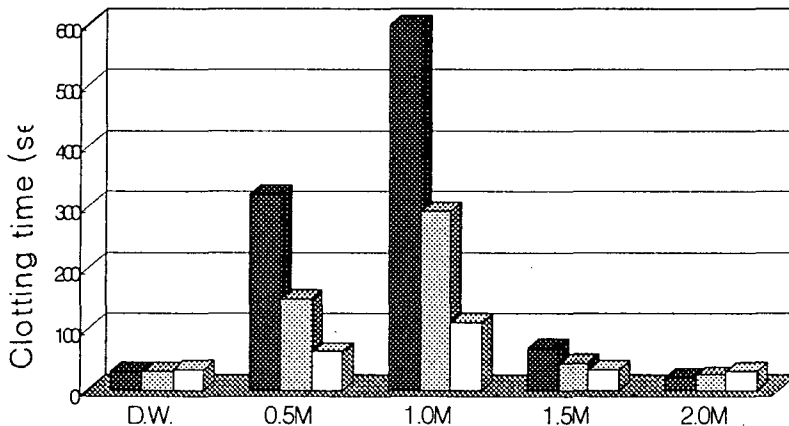


Fig 4-8. Anicoagulant activities of subfraction from EC-2B by DEAE-Toyopearl 650C.

■ 500 μ g/ml ■ 250 μ g/ml □ 100 μ g/ml

나. Butyl-Toyopearl 650M에 의한 EC-2B-III 획분의 정제

Butyl-Toyopearl 650M은 소수성 정도로 물질을 분리하는 컬럼으로 일반적으로 ammonium sulfate를 역상으로 용출시키면서 사용한다. 그러나 정향은 ammonium sulfate 용액에 용해시 침전이 형성되어 크로마토그래피를 실시할 수 없었으므로 2.0 M NaCl를 역상으로 용출시키면서 분획을 실시하였다. DEAE-Toyopearl 650C에서 활성이 가장 높았던 EC-2B-III 획분을 분획한 결과(Fig. 4-9), 컬럼에 비흡착 획분인 EC-2B-IIIa 획분의 활성이 높았다.

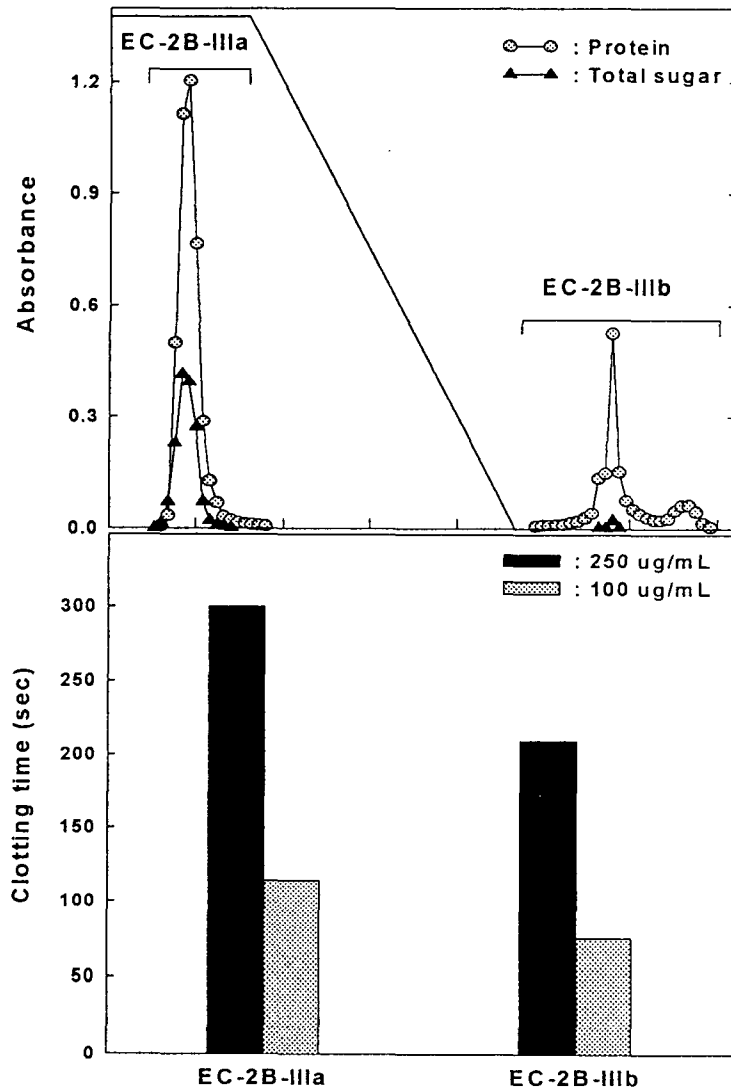


Fig. 4-9. Butyl-Toyopearl 650M chromatogram and anticoagulant activity of subfraction from EC-2B-III

다. Sephadex G-75에 의한 EC-2B-IIa 획분의 분획 및 정제 확인

EC-2B 획분이 한외여과에서 100 K cellulose cartridge의 permeate 부분이었으므로 Butyl-Toyopearl 650M에서 얻은 획분 중 가장 활성이 높았던 EC-2B-IIIa 획분을 Sephadex G-75 column에서 분획하여 EC-2B-IIIa-1과 EC-2B-IIIa-2의 2개의 획분으로 나누었으며 동일 농도에서 항응고활성을 측정한 결과(Fig. 4-10) 2개의 획분중 EC-2B-IIIa-2 획분이 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 118.35초로 높은 활성을 보였다. 이 획분을 FPLC용 Superdex G-75 column을 이용하여 순도를 확인한 결과(Fig. 4-15) 단일한 물질임을 알 수 있었다.

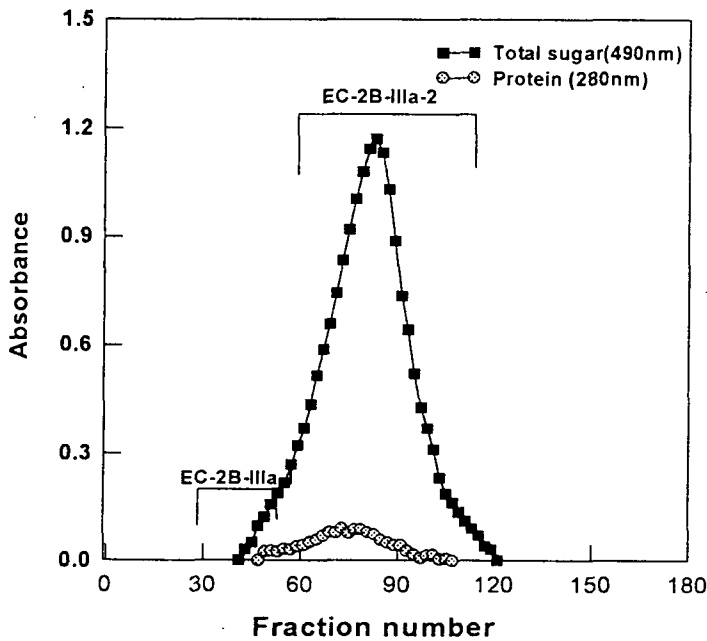


Fig. 4-10. Sephadex G -75 chromatogram(A) and again eluted chromatogram(B) of EC-2B-IIIa.

Sephadex G-75(2.8 i.d. X 91cm) eluted 0.2M NaCl at 0.25ml / min and collected 4.2ml / tube

5. EC-2C 획분으로부터 항응고 물질의 분리 및 정제

가. Butyl-Toyopearl 650M에 의한 EC-2C 획분의 정제

Butyl-Toyopearl 650M 컬럼을 2.0 M NaCl 용액을 역상으로 용출시키면서 분획을 실시하였다. EC-2C 획분을 분획한 결과(Fig. 4-11) 컬럼에 비흡착 획분인 EC-2C-I과 흡착획분인 EC-2C-II 획분으로 분획하였으며 비흡착 획분인 EC-2C-I은 주로 다당이 많이 함유된 획분이었고 흡착획분인 EC-2C-II 획분은 주로 단백질로 구성된 획분이었다. 이 두 획분의 항응고활성은 250. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 300초로 항응고 활성이 유지되었다

나. Gel permeation chromatography에 의한 EC-2C-I 획분의 정제

EC-2C 획분은 100 K cellulose cartridge의 retent 획분이었으므로 Butyl-Toyopearl 650M을 이용한 분획물 중 가장 활성이 높았던 EC-2C-I 획분을 분획 범위가 10만까지인 Sephadex G-100 column을 이용하여 분획하여(Fig. 4-12), 이 column의 void volume에서 용출된 EC-2C-Ia 획분 만을 모아 분획 범위가 100만까지인 Sepharose CL-6B를 이용하여 EC-2C-Ia-1, EC-2C-Ia-2 및 C-2C-Ia-3으로 분획하였다(Fig. 4-13). 이 획분을 동일 농도에서 항응고 활성을 측정된 결과 EC-2C-Ia-1 획분이 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 118.35초로 높은 활성을 보였다. EC-2C-Ia-2 획분을 Sepharose CL-6B를 이용하여 재분획하였으며(Fig. 4-14), 이 획분을 HPLC를 이용하여 순도를 측정된 결과(Fig. 4-15) 비교적 단일한 물질임을 알 수 있었다.

6. 정향으로부터 분리한 항응고성 정제 다당의 특성

정향 알칼리 추출물로부터 크로마토그피를 거쳐 항응고성 정제 다당인 EC-2B-IIIa-2 획분과 EC-2C-Ia-2 획분의 수율은 각각 0.6% 및 1.85%로 EC-2C-Ia-2 획분의 수율이 높았다. 이 두 물질의 분자량은 각각 34,000과 96,000으로 한외여과 결과와 유사함을 알 수 있었으며 구성당 분석을 실시한 결과 EC-2B-IIIa-2는 주로 rhamnose와 galacturonic acid로 구성된 산성 다당이었으며 EC-2C-Ia-2는 주로 arabinose, galactose, rhamnose 및 galacturonic acid로 구성된 산성 다당으로 밝혀졌다(Table 4-7).

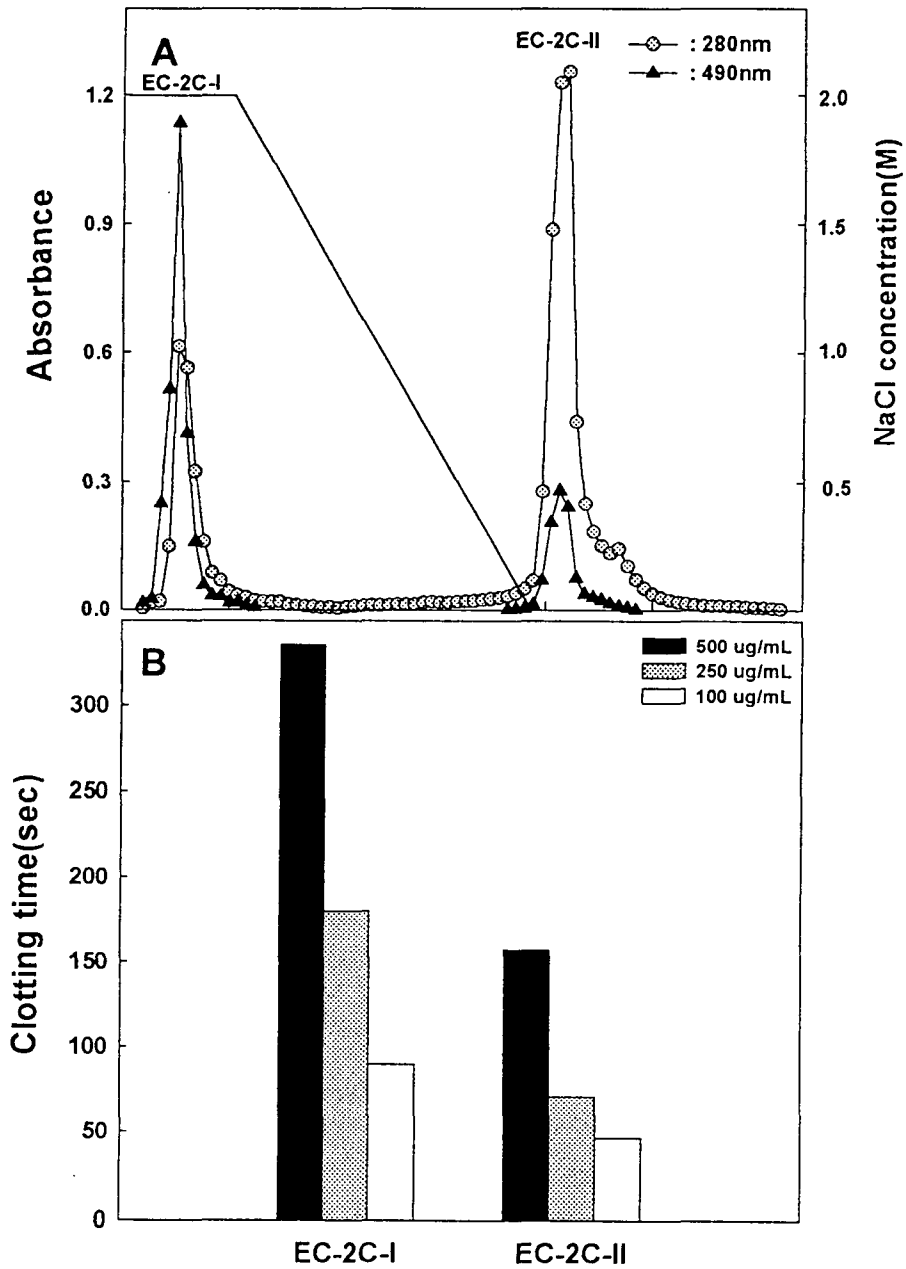


Fig. 4-11. Butyl-Toyopearl 650M chromatogram(A) and anticoagulant activity(B) of subfraction from EC-2C.

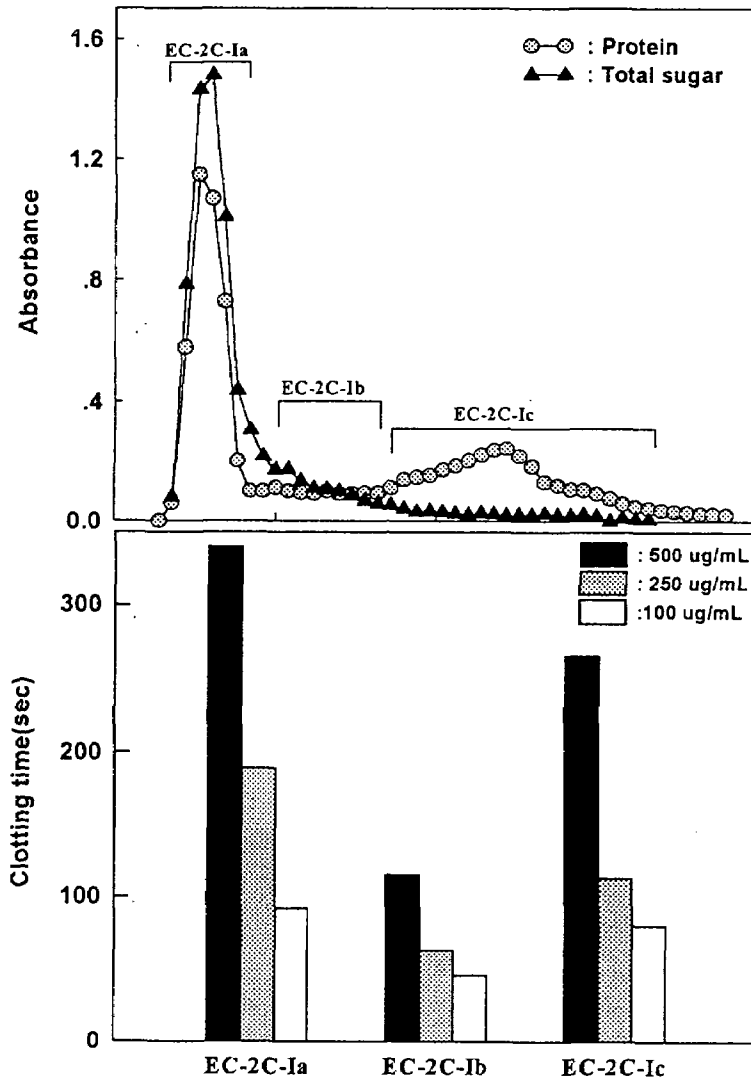


Fig. 4-12 Sephadex G-100 chromatogram(A) and anticoagulant activity(B) of subfraction from EC-2C-I.

The column(2.8X93cm) of Sephadex G-100 was eluted with 0.2M NaCl at flow rate of 0.3 mL/min and collected 5 mL/tude

The anticoagulant activity examined through aPTT and the control time was 35sec.

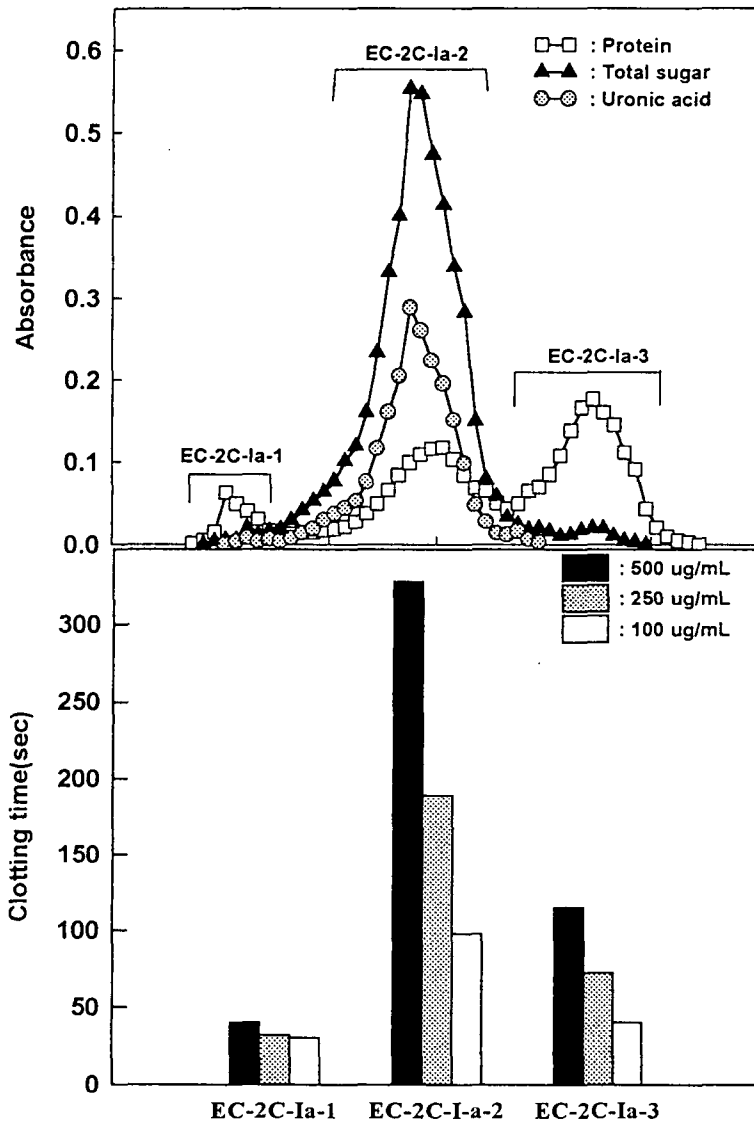


Fig. 4-13. Sepharose CL-6B chromatogram(A) and anticoagulant activity(B) of subfraction from EC-2C-Ia.

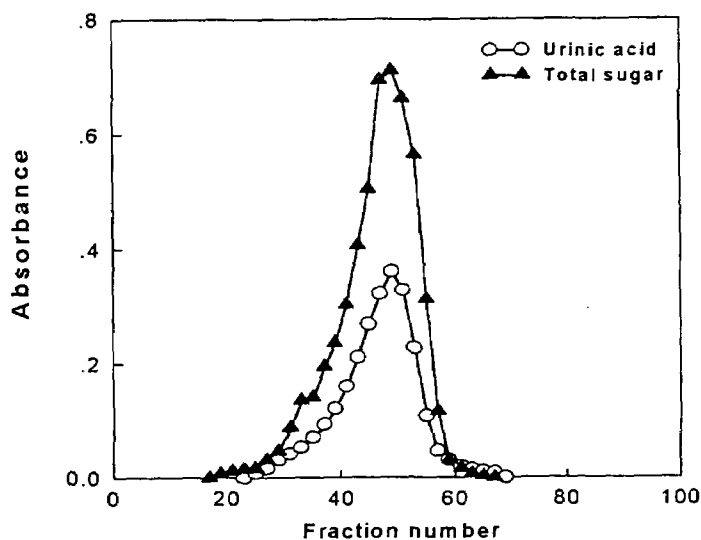
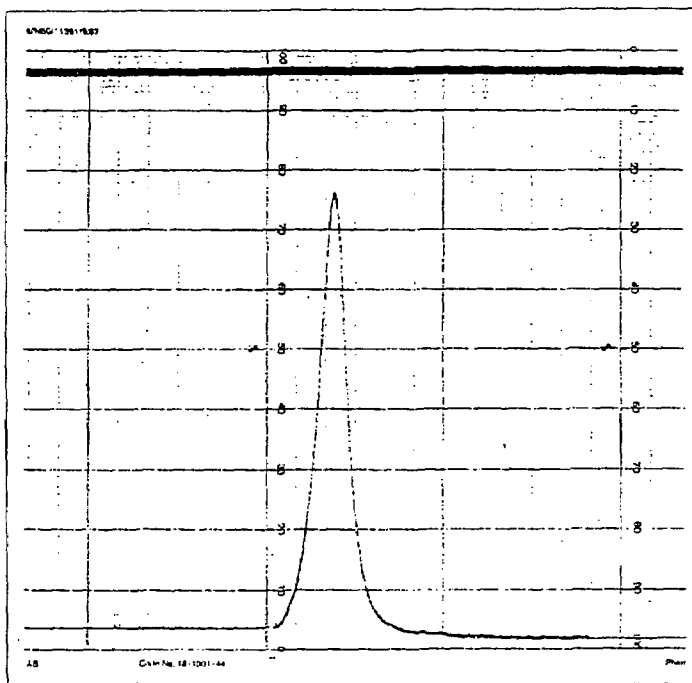


Fig. 4-14. Sepharose CL-6B chromarogram of EC-2C-1a-2.

Table 4-7. Physicochemical properties of purified anticoagulant from *Eugenia caryophyllata*

	EC-2B-111a-2	EC-2C-1a-2
Yield (%)	0.6	1.85
Total sugar (%)	23.2	91
Uronic acid (%)	27.7	15.3
Molecular weight	34,000	96,000
Component sugar (Mol %)		
Rha	21.08	12.35
Ara	15.92	43.31
Xyl	14.33	13.70
Man	3.54	-
Gal	11.87	23.65
Glc	8.05	2.07
GalA	17.98	10.8
GlcA	7.28	4.98

A



B

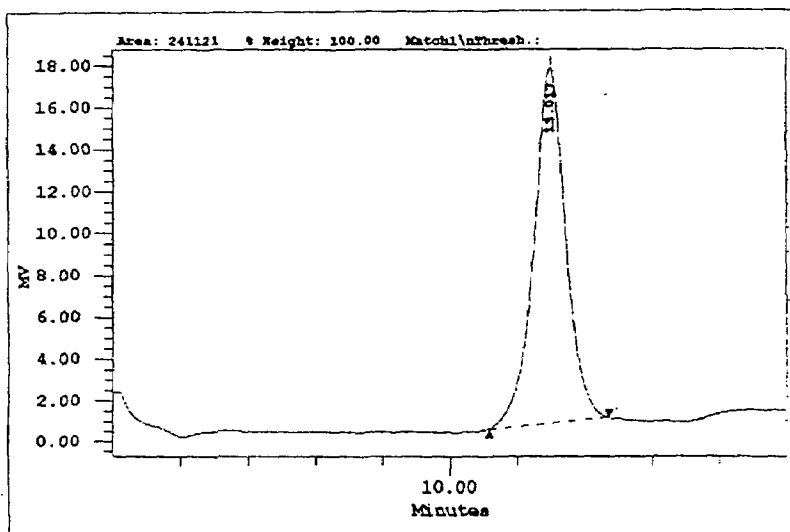


Fig. 4-15. FPLC profile of EC-2B-IIIa-2(A) and HPLC profile of EC-2C-Ia-2(B)

제 3 절 정향으로부터 정제된 항응고성 다당의 구조분석

제 1 항 서 설

많은 식물 성분들이 의학적으로 효과가 있다고 알려져 있고, 현재 전세계 인구의 약 75%가 식물 혹은 식물 추출물을 건강 보조용으로 사용하고 있다. 고등식물의 세포벽은 주로 cellulose(51~47%), hemicellulose(17~23%), lignin(28~22)등으로 구성되어 있으며 현재까지 보고된 heteropolysaccharide로는 xyloglucan, galactomannan, arabinogalactan, galacturonan 등이다. Pectin을 포함한 펙틴물질(pectic substances)은 고등식물의 primary cell wall과 middle lamella에 주로 존재하는 다당으로 식물 세포벽의 구성 다당류 중 가장 복잡한 형태로 존재하고 있음에도 불구하고 높은 생리활성을 가지고 있어 그 구조에 대한 연구는 활발히 진행되고 있다. 펙틴은 과거 D-galacturonic acid가 α -D-(1→4) 결합으로 연결된 고분자로만 여겨졌으나 endo- α -D-(1,4)-polygalacturonase 처리에 의하여 분리된 rhamnogalacturonan I(RG-I) 및 rhamnogalacturonan II(RG-II)가 보고되면서 펙틴의 구조는 대부분 homogalacturonan으로 구성되어 있지만 RG-I과 RG-II가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 보고되고 있다. RG-I은 세포벽에 약 7% 함유되어 있으며 분자량은 200,000 이하의 polymer로 arabinan과 linear 4-linked galactan, arabinogalactan 등 20종이 넘는 glycosidic linkage를 side chain으로 가지고 있다. Pectin에서 관찰되는 대부분의 생리활성은 RG-I과 RG-II의 미세한 구조적 차이에 기인하는 것으로 알려져 있다. Table 4-8은 현재까지 연구 보고된 pectin의 약리활성을 도식화한 것으로 시호(*Bupleurum falcarum*)의 경우 arabinooligosaccharide, galactooligosaccharide 및 arabinogalactan를 side chain으로 갖는 펙틴은 자기면역 치유활성이 보고된 반면 3,5-arabinan과 4-galactan을 side chain으로 갖을 경우는 항종양활성 및 C6에 methyl기를 갖는 polygalacturonan은 항궤양 활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 여러 면역계에 활성을 갖는 물질이 다양한 약리 활성이 보고되고 있지만 앞서 기술한 바와 같이 pectin의 RG-I과 RG-II의 미세한 구조적 차이에 의해 약리 활성의 유무가 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 앞서 정향으로부터 얻은 항응고성 정제 다당인 EC-2B-IIIa-2와 EC-2C-Ia-2의 구조분석을 실시하여 활성과 구조와의 상관성을 분석하고자 하였다.

Table 4-8. Pharmacological activities of structural unit on pectin

Pharmacological activity	Sources	RG-I	RG-II	PG	Structural unit
항전이활성 (Anti-metastasis activity)	Citrus pectin	●			Galactose-rich RG-I
자기면역치유활성 (Auto-immun disease curing activity)	leaves of <i>Panax ginseng</i> (GL-4IIb2)		●		RG-II 단독으로 존재
	roots of <i>Bupleurum falcarum</i> (Bulpleuran 2IIb)	●			Arabinooligosaccharide, galactooligosaccharide, arabinopyran 및 AG을 side chain으로 갖는 RG-I
보체계 활성화능 (Complement system activating activity)	<i>Angelica acutiloba</i> roots of <i>Panax ginseng</i> <i>Bupleurum falcarum</i> <i>Glycyrrhize uralensis</i>	●			<i>Angelica acutiloba</i> (AR-2IIa-2IIId) : arabinan, galactan을 side로 갖는 RG-I AGIIa, AGIIb-1: AGII를 side chain으로 갖는 RG-I
Macrophage phagocytosis	leaves of <i>Panax ginseng</i> (GL-RIII)		●		RG-II 2분자가 boron을 경유하여 dimer로 존재
IL-6 production			●		
항위궤양 활성 (Anti-ulcer activity)	leaves of <i>Panax ginseng</i> (GL-BIII)	●			
	<i>Bupleurum falcarum</i> (Bulpleuran 2IIc)	●	●	●	Arabino-, galactooligosaccharide-RG-I C6에 methyl를 가지는 polygalacturonan
항종양 활성 (Anti-tumor activity)	<i>Bupleurum falcarum</i> (AR-4E-2)	●			3,5-arabinan과 4-galactan을 side로 갖는 RG-I
장티프스 백신 (Vaccine for typhoid fever)				●	C3에 acetyl화된 polygalacturonan
간질환 약제운반체 (Hepatic drug carrier)	<i>Larix occidentalis</i>	●			AG를 side chain으로 갖는 RG-I

제 2 항 재료 및 방법

1. 재 료

구조분석에 사용된 시료는 모두 특급시약을 사용하였으며, β -Glucosyl-Yariv antigen은 Biosupplies(Australia)로부터 구입하여 사용하였고, iodomethane은 Sigma Aldrich사 제품을, iodoethane는 Sigma사 제품을 사용 CD₃I는 Sigma Aldrich사 제품하였으며 그외의 시약도 특급시약을 사용하였다.

2. β -D-Glucosyl-Yariv antigen을 이용한 single radial gel diffusion

다당의 β -D-glucosyl-Yariv antigen을 이용하여 single radial gel diffusion법을 Holst 등의 방법에 따라 EC-2B-IIIa-2와 EC-2C-Ia-2를 각각 1.0 mg/mL의 농도로 제조한 후 1% agarose gel의 well에 가해서 확산에 의해서 나타나는 β -D-glucosyl-Yariv antigen과의 침강선을 확인하고 그 넓이를 측정하여 환산하였으며 positive control은 acacia AG를 negative control은 pectin을 사용하였다.

3. IR spectrum

정제된 시료를 KBr 200 mg(200 mesh)과 혼합하여 KBr pellet를 만들어 FT-IR spectrophotometer (BOMEM Michelson series MB 102-C15)를 사용하여 transmittance %를 측정하였다.

4. Methylation analysis

가. Methylsulphinyl methyl sodium preparation

2개의 가지달린 flask에 mineral oil이 함유된 sodium hydride(Wako, Japan) 2 g과 diethyl ether 20 mL을 혼합하여 3회 교반하여 mineral oil을 제거한 후 질소를 채우면서 90°C 이하의 온도에서 증류된 무수 DMSO(dimethylsulfoxide) 20 mL을 가하였다. Flask는 80~90°C oil bath 상에서 30분 이내로 교반하여 투명한 녹색이 될 때까지 반응시켜 methylsulphinyl methyl sodium의 생성을 확인하였다. 반응액은 원심분리하여 상등액을 1 mL씩 tube에 분주, 질소 충전하여 밀봉한 후 냉동보관하면서 메틸화 분석에 carbanoin으로 사용하였다.

나. Methylation

시료 0.5 mg을 capped tube에 넣고 감압상에서 완전히 건조시킨 후 Hakomori 방법에 의해 메틸화한 후 이 메틸화, 가수분해, 환원된 시료를 아세틸화시켜 methylated alditol acetate 유도체를 제조하였다. 산성당 분석은 methylated product를 superdeutride로 환원시킨 후 가수분해하고 acetylation을 실시하였다. Methylated alditol acetate 유도체는 GC/MS와 GC를 이용하여 분석하였으며 분석 조건은 다음과 같다 (Table 4-9).

Table 4-9. Analytical conditions of GC/MS spectrometry and GC for glycosidic linkage

A) Analytical conditions of GC/MS spectrometry	
Apparatus	: Hewlett Packard 6890 II GC/MS
Column	: SP-2380 (30 m × 0.25 mm × 0.2 μm)
Column temp.	: 60°C(1 min, 30°C/min) → 150°C(1.5°C/min) → 250°C(5 min)
Injector temp.	: 250°C
Detector temp.	: 250°C
Carrier gas	: He (0.5 mL/min)
B) Analytical condition of GC spectroscopy for glycosidic linkage	
Apparatus	: Young Lin M600D
Detector	: Flame ionization detector (FID)
Column	: SP-2380 (30 m × 0.25 mm × 0.2 μm)
Column temp.	: 60°C(1 min) → 150°C(30°C/min) → 230°C (1.5°C/min) → 250°C(30°C/min, 5 min)
Injector temp.	: 250°C
Detector temp.	: 250°C
Carrier gas	: N ₂ (0.9 mL/min)

5. EC-2B-IIIa-2획분의 구조분석

가. 산가수분해

EC-2B-IIIa-2(70 mg)을 100 mM TFA(trifluoroacetic acid) 용액으로 100℃에서 10분 동안 산 가수분해를 실시하였다. 가수분해 직후 감압하여 TFA를 제거한 후 증류수로 평형화된 DEAE-Sephadex A-25 column(HCOO⁻ form)에 주입하여 증류수, 2 M HCOOH 및 2 M NaCl를 차례로 용출시켜 각각 2B-N, 2B-A-I 및 2B-A-II로 분획하여 투석 및 동결건조하여 시료로 사용하였다.

나. Bio-gel P-30을 이용한 2B-A-II 획분의 분획

산가수분해 후 활성이 유지되는 2B-A-II 획분을 acetate buffer(pH 5.2)로 평형화된 Bio-gel P-30에 용출시켜 2B-A-IIa~f까지 크기별로 분획한 후 분획물을 투석, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

다. Endo- α -(1→4)-polygalacturonase digestion

Bio-gel P-30에서 용출된 획분 중 2B-A-IIc 획분을 endo- α -(1→4)-polygalacturonase를 이용하여 37℃에서 72시간 동안 가수분해를 실시하였다. 이때 사용한 buffer는 200 mM acetate buffer(pH 5.2)였으며 72시간 이후 반응액을 증화하여 반응을 종료시킨 후 증류수로 평형화된 Sephadex G-50에 용출시켜 분획하였다. Endo- α -(1→4)-polygalacturonase digestion에 앞서 de-esterified를 위하여 시료를 0.1 M NaOH 용액에서 상온에서 2 시간 교반 후 acetic acid로 증화시킨 후 enzyme digestion을 실시하였다.

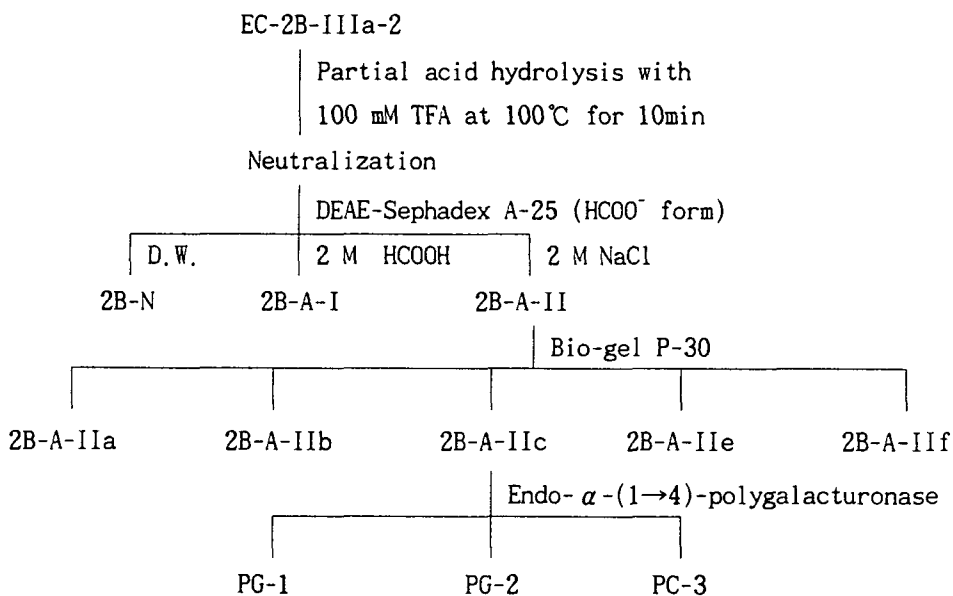
6. EC-2C-Ia-2 획분의 구조분석

가. 산가수분해

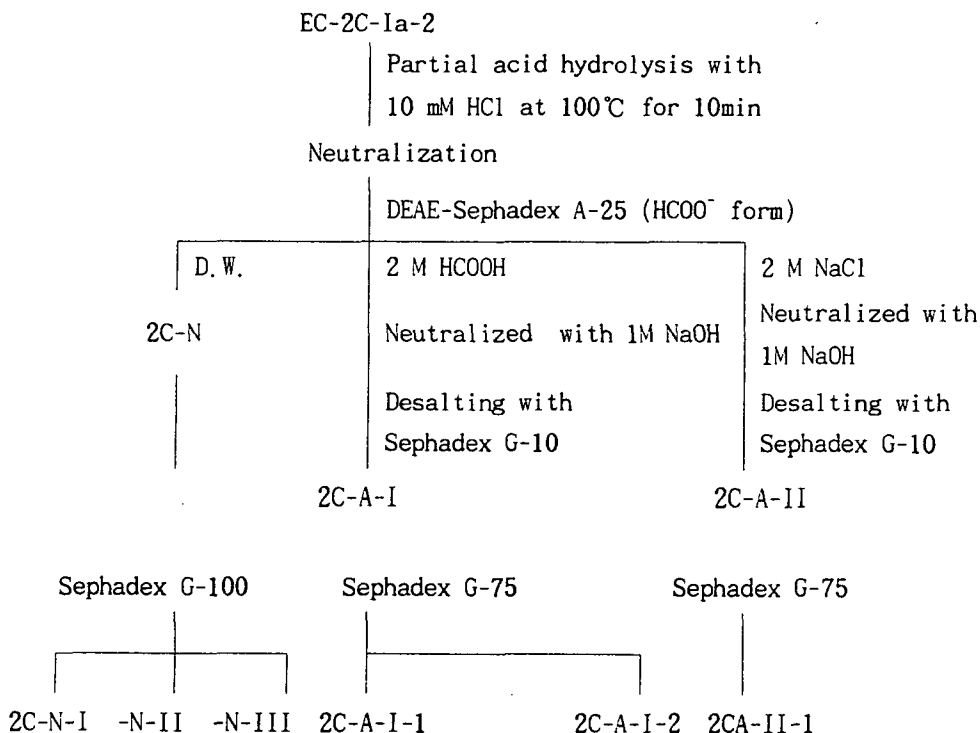
EC-2C-Ia-2(100 mg)을 10 mM HCl 용액으로 100℃에서 10분 동안 산 가수분해를 실시하였다. 가수분해 직후 감압하여 HCl를 제거한 후 증류수로 평형화된 DEAE-Sephadex A-25 column(HCOO⁻ form)에 주입하여 증류수, 2 M HCOOH 및 2 M NaCl를 차례로 용출시켜 각각 2C-N, 2C-A-I 및 2C-A-II로 분획하고 투석 및 동결건조하여 시료로 사용하였다.

나. Sephadex G-75를 이용한 분획

산 가수분해 처리후 DEAE-Sephadex A-25 column에서 용출된 2C-N 획분은 Sephadex G-100 column에 2C-A-I과 2C-A-II 획분은 Sephadex G-75 column에 각각 용출시켜 분획하였다.



Scheme 4-4. Structure analysis of EC-2B-IIIa-2.



Scheme 4-5. Structure analysis of EC-2C-Ia-2

7. β -Elimination of methylated product

Methylation이 완전히 일어난 시료를 dry DMSO에서 β -elimination을 실시하였다. DMSO에 의해 β -elimination이 일어난 시료를 R₁으로 uronic acid가 결합되었던 부분에 iodoethane으로 치환한 시료를 R₂로 하여 제조한 후 시료를 methylated alditol acetate 유도체로 만든 후 GC-MS를 이용해 분석을 실시하였다.

8. 황산기의 결합 위치 분석

Hakomori 방법으로 methylated 된 시료를 triphenylmethane을 이용하여 alkoxide의 형성을 확인한 후 Sep-Pak C₁₈ cartridge을 이용하여 메틸화된 시료를 얻었다. Methylated polysaccharide를 91 mM HCl in MeOH을 사용하여 상온에서 24 시간 동안 methanolysis를 실시하였다. 이후 HCl-MeOH를 제거한 후 methanolysate를 50% DMSO에 용해한 후 Sep-Pak C₁₈ cartridge을 이용하여 유리된 황산기를 제거하였다. Methylated된 시료는 CD₃I를 사용하여 remethylation을 실시한 후 1 M TFA를 사용하여 가수분해와 acetic anhydride를 이용하여 acetylation을 시킨 후 GC-MS를 이용하여 분석하였으며 분석조건은 Table 4-9와 같다.

제 3 항 결 과

1. 정제된 시료의 Yariv-antigen 반응

Arabinogalactan(AG)을 일반적으로 type I(arabino-4-galactan), type II(arabino-3,6-galactan)로 분류하며 자연계에는 일반적으로 type II의 형태로 많이 존재한다. AG type II는 특징적으로 β -D-glucosyl-Yariv antigen(Fig. 4-17)과 결합하여 붉은 ring을 형성하며 환의 면적은 AG의 양에 비례한다. 또한 대부분 단백질과 결합하여 AGP(arabinogalactan-protein)의 형태로 존재한다(Fig. 4-16).

정향으로부터 추출한 항응고성 정제 다당의 β -D-glucosyl-Yariv-antigen과의 반응성을 측정한 결과(Fig. 4-18) EC-2B-IIIa-2는 반응하지 않았으나 EC-2C-1a-2는 β -D-Glucosyl-Yariv-antigen과 반응하여 붉은 ring을 형성하였다. Fig. 4-17, 18의 결과로부터 EC-2C-1a-2의 구조에는 Fig. 4-16과 같은 arabino-3,6-galactan의 구조가 있음을 알 수 있었다.

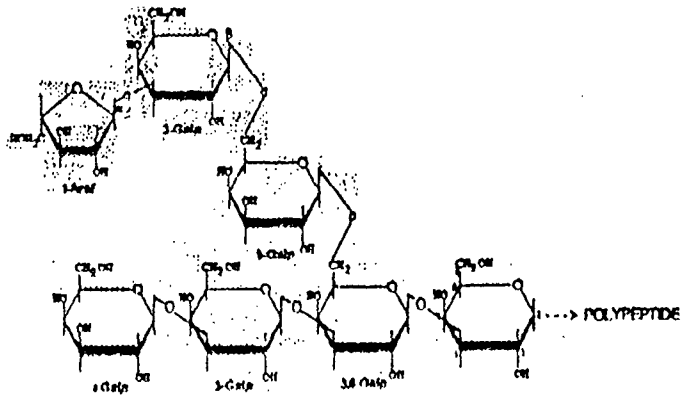


Fig. 4-16. Arabinogalactan Protein.

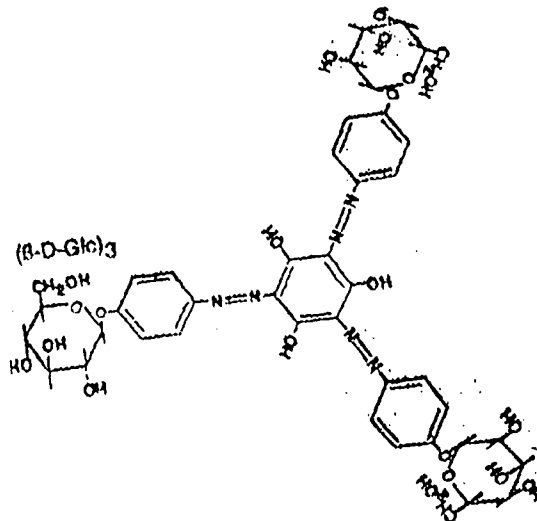


Fig. 4-17. β -D-glucosyl Yariv antigen.

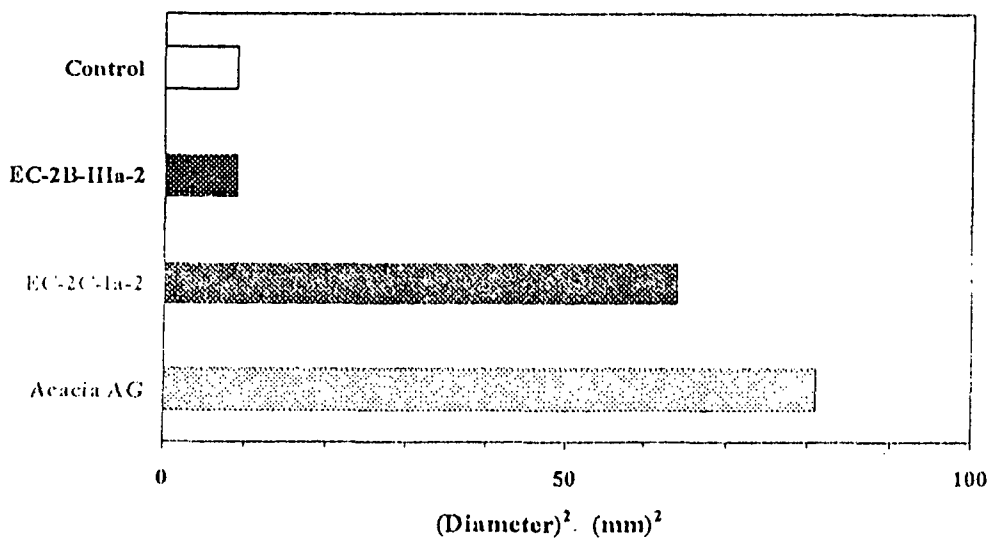


Fig. 4-18. Reactivity of purified antcoagulant (EC-2B-IIIa-2 and EC-2C-Ia-2) to β -D-glucosyl Yariv antigen.

2. EC-2B-IIIa-2 획분의 구조분석

가. EC-2B-IIIa-2의 methylation analysis

EC-2B-IIIa-2를 Hakomori 방법에 의하여 methylation을 실시한 후 GC-MS를 이용하여 그 구조를 추정한 결과(Table 4-10) 주 당쇄구조는 4-linked GalA가 12.66%, 2-linked Rha가 10.59%, 2,4-branched Rha가 9.72% 이며 그외에 arabinan와 galactan의 구조를 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

나. EC-2B-IIIa-2의 산가수분해

EC-2B-IIIa-2 (70 mg)을 100 mM TFA 용액으로 100°C에서 10분 동안 산 가수분해 후 증류수로 평형화된 DEAE-Sephadex A-25 column(HCOO⁻ form)에 주입하여 증류수, 2 M HCOOH 및 2 M NaCl 순으로 용출시켜 2B-N, 2B-A-I 및 2B-A-II로 분획후 항응고 활성을 측정된 결과 항응고 활성은 2.0 M NaCl에서 용출된 획분인 2B-A-II의 활성에서 활성이 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 앞서 기술한 바와 같이 항응고 활성은 charge를 강하게 가지고 있는 다당이라는 보고와 같은 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4-19).

다. Bio-gel P-30을 이용한 2B-A-II 획분의 분획

2B-A-II 획분을 acetate buffer(pH 5.2)로 평형화된 Bio-gel P-30에 용출시켜 2B-A-IIa~e까지 분획한 후 분획물의 항응고 활성을 측정된 결과 (Fig. 4-20) 2B-A-IIc의 활성이 가장 높았고 2B-A-IIe 획분 또한 항응고 활성을 가지고는 있었으나 수율이 매우 낮았으며 이 획분은 Bio-gel P-30 resin의 특성상 분자량의 크기에 따라 분리된 것이 아니라 이 resin의 음이온성 때문에 늦게 용출된 것으로 추정된다(Fig. 4-20).

라. 2B-A-IIc 획분의 endo- α -(1→4)-polygalacturonase digestion

EC-2B-IIIa-2 획분을 methylation 분석 결과 주 당쇄 결합이 4-linked GalA, 2-linked Rha, 2,4-branched Rha로 rhamnagalacturonan의 구조로 추정되므로 2B-A-IIc 획분을 endo- α -(1→4)-polygalacturonase를 이용하여 37°C에서 72시간 동안 가수분해를 실시하였다. Fig. 4-21의 결과 2B-A-IIc-1은 이 효소에 의해 분해가 이루어지지 않는 획분이며 2B-A-IIc-3은 가수분해된 획분으로 항응고 활성을 측정된 결과 endo- α -(1→4)-polygalacturonase에 의해 분해되지 않는 부분에 활

성이 존재함을 알 수 있었다. Table 4-11 의 결과와 같이 분획물들의 주 당쇄결합은 4-linked GalA, 2-linked Rha, 2,4-branched Rha임을 알 수 있었다(Fig. 4-21).

마. β -Elimination

정향추출물로부터 정제한 항응고성 정제 다당의 구조분석 중 얻은 획분인 2B-A-IIc-2는 methylation 분석결과(Table 4-10,11) rhamnogalacturonan(RG)의 구조로 추정되었다. RG는 GalA와 Rha가 $[\rightarrow 2\text{Rha}\rightarrow 4\text{GalA}2\rightarrow]$ 의 반복구조로 이루어진 RG-I과 KDO(3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid), DHA(3-deoxy-D-lyxo-heptulosinic acid), 2-Me-Fuc, 2-Me-Xyl 및 apiose 등의 특수당을 가지고 있는 RG-II로 분류되는데 정향으로부터 추출한 항응고 활성물질인 2B-A-IIc-2의 구성당 분석 결과 특수당이 측정되지 않았으므로 이 물질을 β -elimination을 실시하여 GalA와 Rha와의 구조를 확인하였다. Fig. 4-22에서와 같이 dry DMSO를 이용하여 β -elimination을 실시하면 4-linked GalA에 결합되었던 Rha는(R_1) 측정이 되지 않으며 GalA가 결합되어있던 Rha(R_2)의 결합부위에는 ethanol을 결합시킨 후 그 부분을 GC-MS를 이용하여 확인할 수 있기 때문에 RG-I의 구조를 해석하는데 많이 이용되고 있는 방법이다. Table 4-12로부터 2-linked Rha는 GalA의 C4 위치에 결합되어 있으며 2,4-branched Rha의 일부와 terminal Gal의 일부는 GalA의 C4 위치에 결합되어 있으며 Gal A는 2,4-branched Rha의 C2에 결합되어 있음을 알 수 있었다.

Table 4-10. Methylation analysis of EC-2B-IIIa-2

Glycosyl residue	Position of O-Me group	Deduced glycosidic linkage	Mol %
Rhamnosyl	2, 3, 4	Terminal	1.35
	3, 4	2-Rha	10.59
	3	2, 4-Rha	9.72
	4	2, 3-Rha	2.38
Arabinosyl	2, 3, 4	Terminal(p)	2.17
	2, 3, 5	Terminal(f)	4.30
	2, 3	4 or 5-Ara	2.20
	2, 4	3-Ara(p)	1.28
	3, 5	2-Ara(p)	1.64
Xylosyl	2, 3, 4	Terminal(f)	1.02
	2, 3	4 or 5-Man	3.53
Mannosyl	2, 3	4, 6-Man	2.03
	3, 6	2, 4-Man	1.49
Galactosyl	2, 3, 4, 6	Terminal	3.99
	2, 3, 4	6-Gal	3.64
	2, 3, 6	4-Gal	4.36
	2, 3	4, 6-Gal	2.03
	2, 4	3, 6-Gal	2.38
Glucosyl	2, 3, 4, 6	Terminal	1.37
	2, 3, 6	4-Glc	1.31
	2, 4, 6	3-Glc	2.64
	6	2, 3, 4-Glc	2.20
Galacturonosyl	2, 3	4-Gal A	12.66
	2	3, 4-Gal A	3.56
Glucuronosyl	2, 3, 4	Terminal	4.43
	2, 3	4-Glc A	2.82

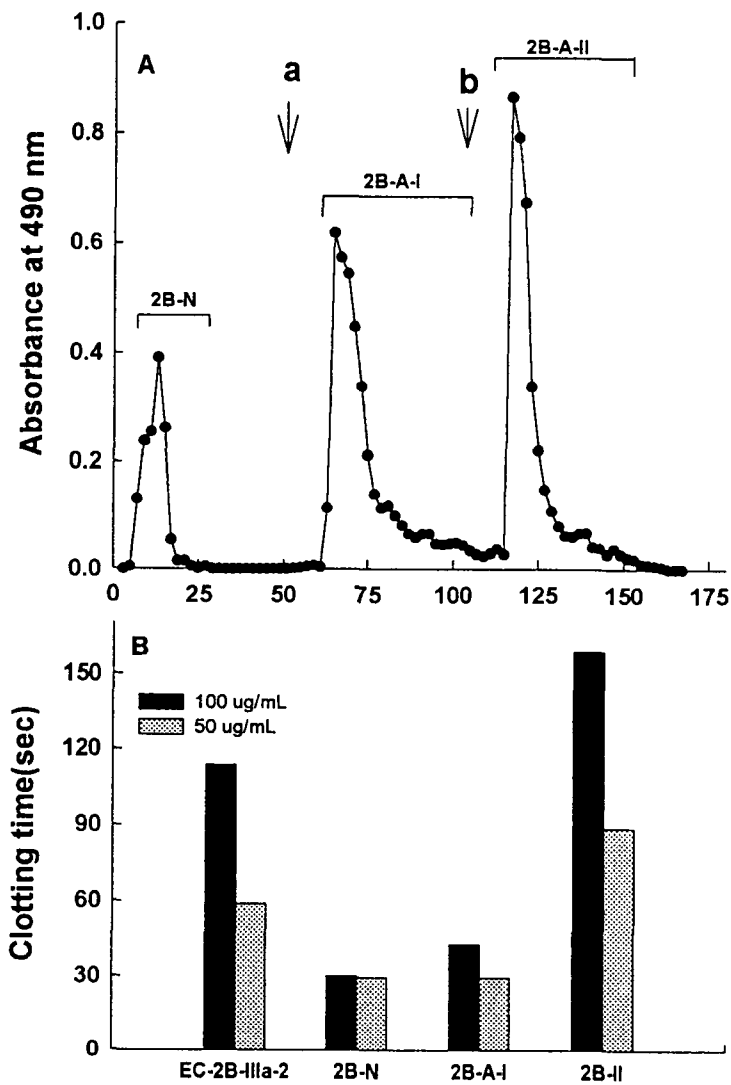


Fig. 4-19. A: Chromatography on DEAE-Sephadex A-25 of the products obtained on treatment of EC-2B-IIIa-2 (2B) with 100nM TFA at 100⁰C for 10 min. (Stepwise elution with water and then (a) 2M HCOOH, (b) 2M NaCl)
B: Anticoagulant activities of subfraction.

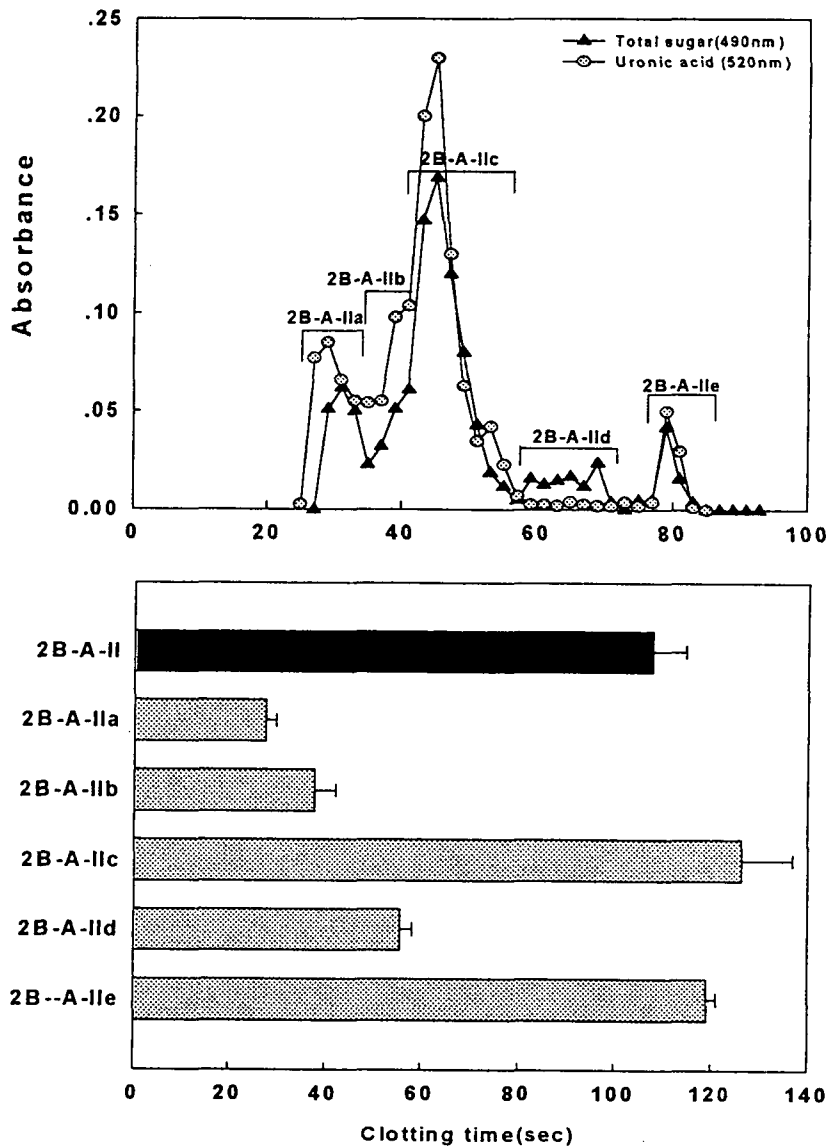


Fig. 4-20. Chromatography and anticoagulant activities on Bio-gel P-30 of 2B-A-II.

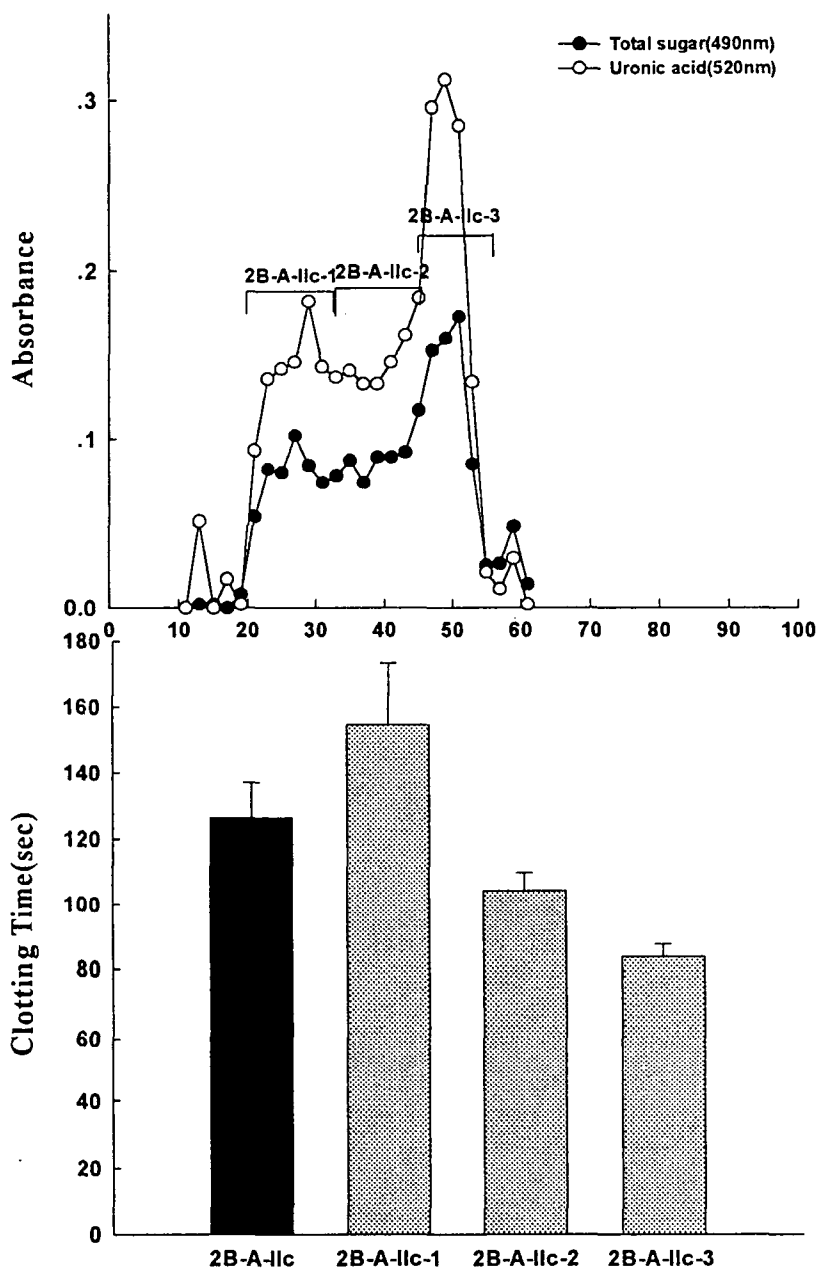


Fig. 4-21. Sephadex G-50 chromatography of products from 2B-IIIc by the digestion of endo- α -(1-4)-polygalacturonase

Table 4-11. Methylation analysis of products from 2B-A-IIc by digestion of endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase

Glycosyl residue	Position of O-Me group	Deduced glycosidic linkage	2B-A-IIc		
			-1	-2	-3
Rhamnosyl	3,4	2-Rha	13.92	7.77	3.28
	3	2,4-Rha	9.98	7.58	5.75
	4	2,3-Rha	1.87	0.99	1.74
Arabinosyl	2,3	4 or 5-Ara	9.13	8.03	-
Galactosyl	2,3,4,6	Terminal	5.56	5.29	4.14
	2,4,6	3-Glc	-	2.61	-
	2,3,4	6-Gal	-	-	4.78
	2,3,6	4-Gal	5.17	-	-
	2,3	4,6-Gal			
	2,4	6-Sulphate-3-Gal	3.02	4.83	3.86
	2	3,4-Gal	1.57	0.95	-
Glucosyl	2,3,4	6-Glc	8.12	11.33	12.06
	2,4,6	3-Glc	1.77	1.31	1.05
	2,3	4,6-Glc	0.60	1.66	-
	6	2,3,4-Glc	3.80	5.87	-
Galacturonosyl	2,3,4	Terminal	-	-	7.1
	2,3	4-Gal A	30.67	35.06	31.06
	2	3,4-Gal A	4.80	6.71	-

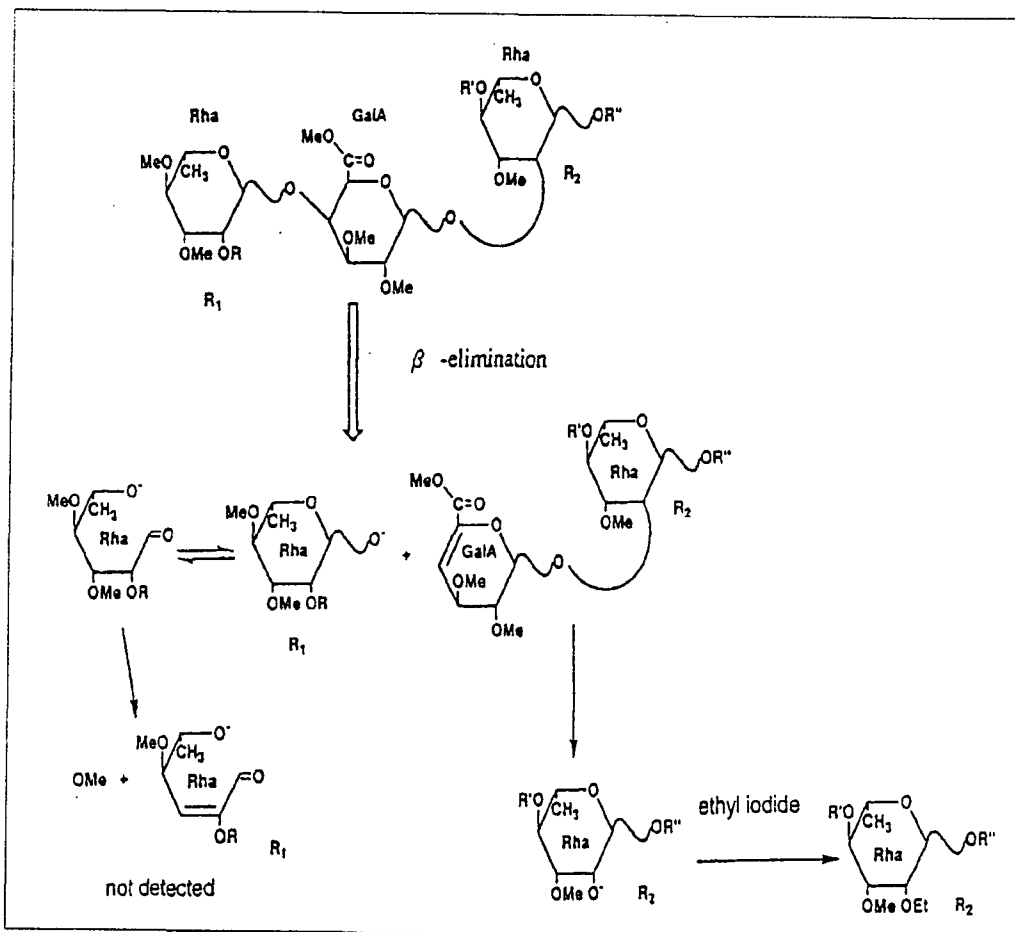


Fig. 22. β -Elimination

Table 4-12. Methylation analysis of β -eliminated 2B-A-IIC-2

Glycosyl residue	Position of O-methyl group	Position of O-ethyl group	Deduced glycosidic linkage	2B-A-IIC-2 (mol %)	
				Before	After
Rhamnosyl	3, 4		2-Rha	60.65	-
	3	2	2, 4-Rha	46.02	15.36
	5		2, 3-Rha	8.61	1.9
Galactosyl	2, 3, 4, 6		(T)-Gal	22.07	9.0
	2, 3, 4		6-Gal	22.64	76.3

3. EC-2C-Ia-2 획분의 구조분석

가. EC-2C-Ia-2의 methylation analysis

EC-2C-Ia-2를 Hakomori 방법에 의하여 methylation을 실시한 후 GC-MS를 이용하여 그 구조를 추정된 결과(Table 4-13) 주 당쇄구조는 terminal Ara가 17.61%, 4-linked GalA가 12.91%, 2, 4-branched Rha가 9.06%, 4 or 5-linked Ara가 8.29%, 2, 3-branched Ara가 6.05% 및 2-linked Rha가 5.68% 함유되어 있으며 β -D-glucosyl-Yariv-antigen 반응의 결과와 유사하게 3-linked Gal와 3, 6-branched Gal결합이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

나. EC-2C-Ia-2의 산가수분해

EC-2B-IIIa-2(70 mg)을 10 mM HCl 용액으로 100°C에서 10분 동안 산 가수분해 후 증류수로 평형화된 DEAE-Sephadex A-25 column(HCOO⁻ form)에 주입하여 증류수, 2 M HCOOH 및 2 M NaCl를 차례로 용출시켜 2C-N, 2C-A-I 및 2C-A-II로 분획하였으며 2C-N 획분을 증류수로 평형화된 Sephadex G-100에 용출시켜 3개의 획분으로 분획하였으며 2C-A-I 과 2C-A-II 는 증류수로 평형화된 Sephadex G-75를 이용하여 재분획하였다(Fig. 4-23). 각각의 분획물의 항응고 활성을 측정한 결과(Fig. 4-24) 2 M formic acid와 2 M NaCl에서 용출되어 분획된 2C-A-Ia, 2C-A-Ib 와 2C-A-II에서 항응고 활성이 유지되었으며 이 분획물을 β -D-glucosyl

Yariv-antigen과 반응을 실시한 결과(Fig. 4-25) 증류수에서 용출된 2C-N의 ring을 형성하지 않았으나 2C-A-Ia, 2C-A-Ib와 2C-A-II는 ring을 형성하는 것으로 보아 arabino-3,6-galactan의 구조를 가지고 있는 것을 알 수 있었다. Table 4-14와 Table 4-15의 분석 결과 2C-6B-N-I, -N-II, -N-III 획분의 당쇄결합은 C4에 결합을 가진 glucose의 함량이 각 획분별로 25.67%, 19.42% 31.28%로 가장 많았으며 C3과 C4에 결합을 가진 glucose의 함량 또한 5.65%, 3.07%, 6.78%이었으며 C4 또는 C5에 결합을 가진 arabinose나 C3에 결합을 가진 arabinose 또한 10% 이상의 함유되어 있었다. 2C-A-Ia, 2C-A-Ib와 2C-A-II의 구조 분석 결과(Table 4-16) 2B-A-IIc-1의 구조와 유사한 RG-1의 구조이며 2B-A-IIc-1과 구조적인 차이는 side chain으로 AG type II를 가지고 있는 것이다.

다. 부분 가수분해물의 β -elimination

EC-2C-Ia-2의 부분 가수분해물 중 2C-A-I-1, C-A-I-2 및 2C-A-II 획분의 메틸화 분석결과 4-linked GalA와 2-linked Rha, 2,4 branched Rha의 함량이 높았으므로 이 부분의 당쇄결합을 파악하고자 β -elimination을 실시하였다. 그 결과(Table 4-17) 2-linked Rha, 2,4-branched Rha의 함량이 분석 후 감소하는 것으로 보아 이 부분이 4-linked GalA의 C4에 결합되어 있는 것으로 추정되며 2,4-branched Rha의 C2와 6-linked Gal의 C6에 ethanol이 결합되어 있는 것으로 보아 이 부분에 4-linked GalA가 결합된 것으로 추정된다.

Table 4-13. Methylation analysis of EC-2C-1a-2

Glycosyl residue	Position of O-methyl group	Deduced glycosidic linkage	Mol %
Rhamnosyl	2, 3, 4	Terminal	0.87
	3, 4	2-Rha	5.68
	3	2, 4-Rha	9.06
Arabinosyl	2, 3, 5	Terminal(f)	17.61
	2, 3	4 or 5-Ara	8.29
	5	2, 3-Ara(f)	6.08
Xylosyl	2, 3, 4	Terminal(p)	1.36
	2, 3	4 or 5-Xyl	3.20
	3	2, 4 or 2, 5-Xyl	2.85
	5	2, 3-Xyl(f)	4.13
Galactosyl	2, 3, 4, 6	Terminal	4.24
	2, 3, 4	6-Gal	2.35
	2, 3, 6	4-Gal	5.22
	2, 4, 6	3-Gal	3.33
	2, 4	3, 6-Gal	4.34
	2	3, 4, 6-Gal	2.55
Glucosyl	2, 3, 4	6-Glc	1.78
	2, 3	4, 6-Glc	1.17
Galacturonosyl	2, 3	4	12.91

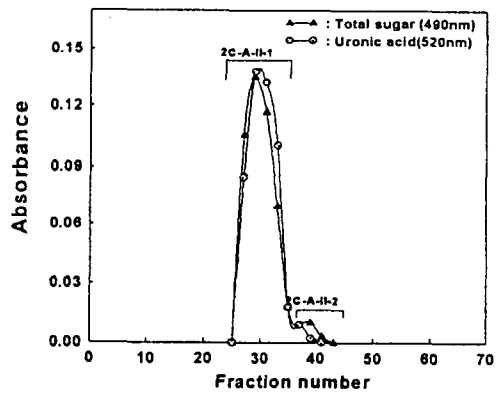
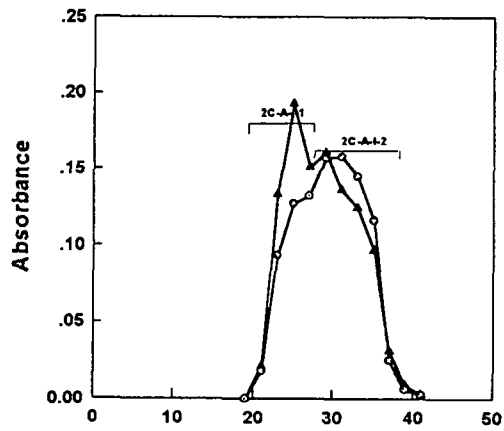
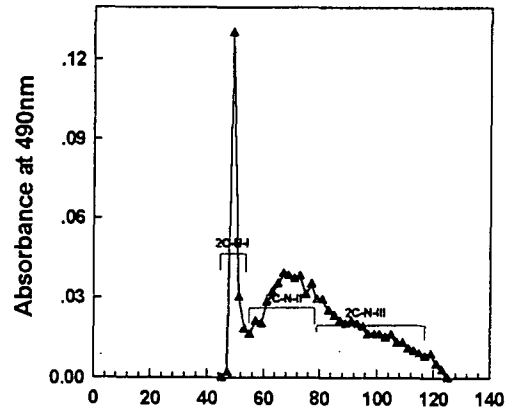


Fig. 4-23. Each chromatogram of products obtained from EC-2C-Ia-2 with 10mM HCl at 100°C for 10 min

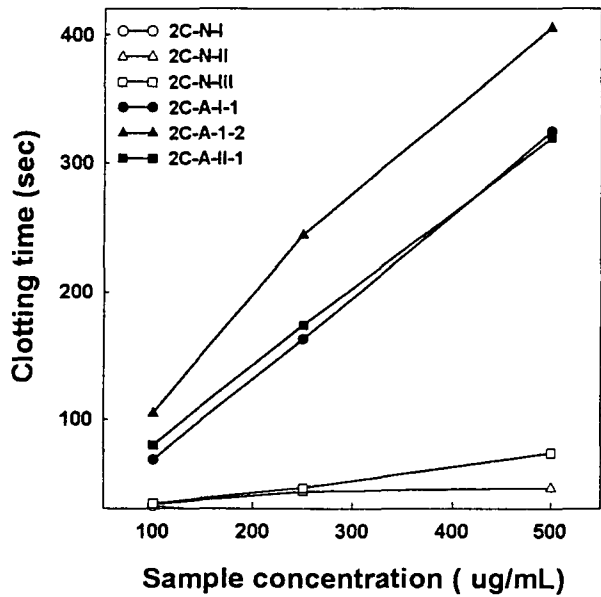


Fig. 4-24. Anticoagulant activities of subfraction from hydrolyzed EC-2C-Ia-2 with 10mM HCl.

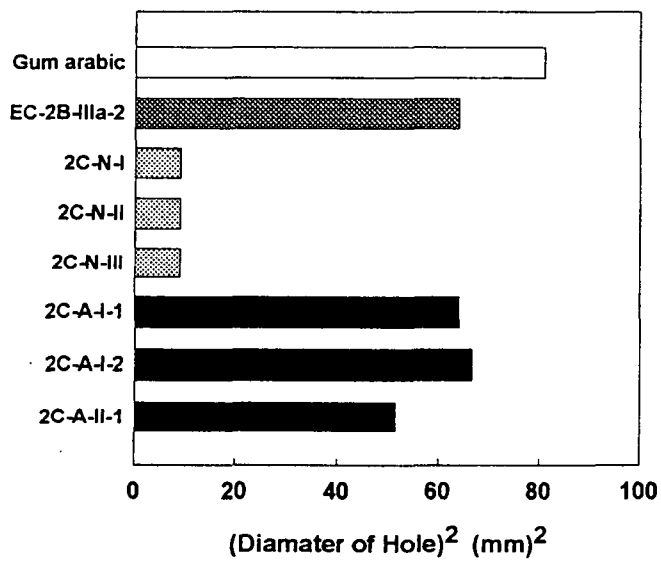


Fig. 4-25. Reactivity of subfraction from EC-2c-Ia-2 to b-D-glucosyl-Yariv antigen.

Table 4-14. Yield and sugar composition of subfraction from hydrolyzed EC-2C-1a-2

	2C-N			2C-A-I		2C-A-II
	iI	-II	-III	-1	-2	
Yield(%)	7.6	10.4	19.0	8.6	8.8	16.0
Uronic acid	-	-	-	8.26	13.49	9.31
Sugar composition (mol %)						
Rha	-	-	-	21.25	25.78	25.51
Ara	16.77	61.07	55.28	41.40	42.60	41.62
Xyl	-	-	-	9.71	8.26	5.17
Man	4.78	-	0.66	8.48	0.42	1.11
Gal	8.45	9.51	5.75	24.04	20.63	24.31
Glc	70.0	29.42	38.31	3.12	2.32	2.83

Table 4-15. Methylation analysis of subfraction from hydrolyzed EC-2C-1a-2

Glycosyl residue	Position of O-methyl group	Deduced glycosidic linkage	N-I (Mol %)	N-II (Mol %)	N-III (Mol %)
Arabinosyl	2, 3, 5	(T)-Ara(f)	4.76	16.84	13.51
	2, 3	4 or 5-Ara	1.27	11.22	8.83
	2, 4	3-Ara(p)	2.41	14.40	10.88
	3	2, 4 or 2, 5-Ara		6.03	4.46
	5	2, 3-Ara	0.77		3.47
Mannosyl	3, 6	2, 4-Man	1.30	1.07	1.39
Galactosyl	2, 3, 4, 6	(T)-Gal		0.7	
	2, 3, 4	6-Gal	0.93	5.52	
	2, 3, 6	4-Gal	8.75	2.09	1.97
	2, 4, 6	3-Gal	1.62	0.70	
	2	3, 4, 6-Gal	1.15		
Glucosyl	2, 3, 4, 6	(T)-Glc	3.13	2.04	2.45
	2, 3, 4	6-Glc		6.32	4.26
	2, 3, 6	4-Glc	25.67	19.42	31.28
	2, 4, 6	3-Glc	3.95	1.28	1.03
	2, 3	4, 6-Glc	6.11	3.17	3.93
	2, 4	3, 6-Glc	2.01	0.66	
	2, 6	3, 4-Glc	5.65	3.07	6.78
	2	3, 4, 6-Glc	2.74		

Table 4-16. Methylation analysis of subfraction from EC-2C-Ia-2

Glycosyl residue	Position of O-Methyl group	Deduced glycosidic linkage	2C-A-I-1 (Mol %)	2C-A-I-2 (Mol %)	2C-A-II (Mol %)
Rhamnosyl	2, 3, 4	(T)-Rha	1.88	1.20	1.97
	3, 4	2-Rha	6.47	10.93	10.0
	3	2, 4-Rha	7.23	8.81	7.13
Arabinosyl	2, 3, 5	(T)-Ara(<i>f</i>)	12.03	8.93	10.61
	2, 3	4 or 5-Ara	6.78	6.42	7.09
	2, 4	3-Ara(<i>p</i>)	7.39	6.84	7.43
	3	2, 4 or 2, 5-Ara	3.03	2.95	3.09
	5	2, 3-Ara	3.05	2.96	3.52
Xylosyl	2, 3	4 or 5-Xyl	3.16	2.68	0.28
	3	2, 4 or 2, 5-Xyl	2.85	2.15	0.94
	5	2, 3-Xyl	4.30	2.64	3.02
Galactosyl	2, 3, 4, 6	(T)-Gal	4.29	5.33	3.96
	2, 3, 4	6-Gal	2.62	2.45	2.57
	2, 3, 6	4-Gal	4.6	4.92	3.55
	2, 4, 6	3-Gal	3.19	3.2	7.07
	2, 4	3, 6-Gal	5.46	3.34	4.64
	3	2, 4, 6-Gal	1.45	1.09	1.57
Glucosyl	2, 3, 4	6-Glc	-	-	3.18
	2, 3, 6	4-Glc	4.61	4.18	3.03
	2, 3	4, 6-Glc	2.44	1.68	-
	2,	3, 4, 6-Glc	2.02	0.96	2.44
	6	2, 3, 4-Glc	0.91	0.89	1.07
Gal A	2, 3, 4	Terminal	0.55		
	2, 3	4-GalA	7.71	12.75	9.0
	2	3, 4-GalA		0.74	0.31

Table 4-17. Methylation analysis of β -eliminated fraction from hydrolyzed EC-2C-Ia-2

Glycosyl residue	Position of O-methyl group	Position of O-ethyl group	Deduced glycosidic linkage	2C-A-I-1		2C-A-I-2		2C-A-II	
				(Mol %)		(Mol %)		(Mol %)	
				Before	After	Before	After	Before	After
Rhamnosyl	2, 3, 4		(T)-Rha	1.8	-	1.7	-	1.7	-
	3, 4		2-Rha	3.8	0.42	7.6	-	6.3	-
	3	2	2, 4-Rha	5.2	2.15	6.4	2.94	5.8	2.30
Galactosyl	2, 3, 4, 6		(T)-Gal	5.8	2.64	7.8	3.27	5.7	2.16
	2, 3, 4	6	6-Gal	2.8	2.49	2.3	2.13	2.5	1.98
	2, 3, 6		4-Gal	6.5	7.05	7.3	9.76	5.7	5.95
	2, 4, 6		3-Gal	4.2	4.26	5.1	3.51	11.3	13.49
	2, 4		3, 6-Gal	7.3	9.16	5.2	4.54	6.3	7.74
	3		2, 4, 6-Gal	1.2	0.81	0.7	1.9	1.1	1.15

제 4 절 정향추출물의 활성 양식

제 1 항 서 설

혈전의 생성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 제제는 혈전에 의한 성인병의 중요한 치료제로서 지난 20여년 동안 활발한 연구가 진행되어 왔다. 현재 임상적으로 사용되고 있는 대표적인 외래성 항응고제로는 coumarin과 thrombin의 활성을 저해하는 heparin이 있다. Coumarin계는 구조적으로 4-hydroxycoumarin이 중심핵을 이루며 가장 중요한 약리작용은 prothrombin을 위시하여 vitamin K 의존성 혈액인자 즉 proconvertin, christmas factor 및 stuart factor의 간장내 합성을 억제하여 응고효소의 결핍에 따른 항응고 효과를 나타낸다. 응고 인자의 간장내 합성 억제를 위한 작용기전은 응고인자의 구성 단백질에 함유되어 있는 glutamic acid가 carboxylation되는데 필요한 vitamin K의 재순환 과정인 환원반응을 방해함으로써 이루어 진다고 알려져 있다. Coumarin은 그 작용기전으로 인해 생체 투입 8~12 시간이 지난 후 항응고 활성을 나타내며 소화관에서 쉽게 흡수되므로 내복용 항응고제로 이용되고 있다.

임상적인 측면에서 헤파린의 응용은 출산 후나 개복수술시 나타나는 대퇴부 정맥의 혈전증, 관상동맥의 혈전증에 주로 사용되고 있으며, 기타 신장투석, 혈중 지방질 저하 등의 목적으로 사용되어지고 있다. 이러한 광범위한 응용에도 불구하고 장기적으로 사용할 경우 혈소판 감소, 출혈, 골다공증의 부작용이 나타나고 있다. 또한 반감기가 1~2 시간으로 짧으며 분자량이 크고 극성이어서 세포막 투과가 불량하여 소화관에서 흡수되지 않으므로 주로 정맥내 주사나 피하주사로 투입되고 있다.

본 연구는 정향 추출물의 항응고 활성 양식을 밝히며 *in-vivo*상에서 독성 및 항응고 활성을 재확인함으로써 실용화 가능성을 높이고자 한다.

제 2 항 재료 및 방법

1. 항응고 활성 양식의 측정

정향으로부터 추출 정제한 항응고물질을 각각의 농도에서 activated partial thromboplastin time(APTT), prothrombin time(PT), thrombin time(TT)를 측정 후 대조구의 % baseline으로 표시하여 각각의 경로에 대한 시료의 항응고 활성을 활성 경로에 따라 측정하였다.

2. 혈소판 응집 억제능 검사(Platelet aggregation test)

가. Platelet rich plasma(PRP)와 platelet pool plasma(PPP)의 조제

3.8% sodium citrate로 처리한 정맥혈을 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 PRP를 제조 후 automatic hematology를 이용하여 혈소판수를 측정하여 혈소판수가 150,000~250,000/ μ L가 되도록 PRP를 제조하였다. PPP는 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 혈소판수를 50,000/ μ L 이하가 되도록 제조하였다.

나. Base line 설정

PPP를 100% 응집한 base line으로 정향으로부터 추출한 추출물(EC-2B, EC-2C)을 PRP에 100 μ g/ml의 농도로 용해시킨 PRP를 0% 응집된 base line으로 하였다.

다. 혈소판 응집능 검사

정향에서 추출한 항응고물질을 함유한 PRP 450 μ L를 silicon 처리된 glass cuvette에 magnetic bar와 함께 넣은 후 ADP(2.0 μ M), collagen(0.19 mg/ml), epinephrin(1.0 μ g/ml), ristocetin(1.2 mg/mL)의 응집원을 각각 50 μ L씩 첨가한 후 platelet aggregator(BIO/DATA coporation(Model PAP-4C, U.S.A.)를 이용하여 혈소판 응집억제능을 측정하였다.

3. 화학적 수식 변화에 따른 항응고 활성의 변화

부분 정제시료(EC-2B, EC-2C) 50 mg을 10 mL의 distilled pyridine으로 3회 탈수하여 100 mL의 pyridine에 분산시킨 후, chlorosulfonic acid-pyridine (100 mL의 distilled pyridine에 15 mL의 ClSO_3H)을 가해 교반하면서 90분 동안 가열 환류 후 원심분리(5,000 rpm 20분)하여 얻은 잔사를 냉각수에 분산하고 0.1 N

NaOH를 이용, pH 9로 조정한 후 3배의 ethanol를 첨가하여 침전시켰다. 침전물을 증류수에 투석, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

4. 정향으로부터 추출한 항응고 활성획분의 독성검사

가. 실험동물

국립보건원에서 4주령 ICR계 mouse(웅성)를 분양받아 1일 11시간씩 (오전 9시~오후 8시) 점등하에서 물(정제수)과 extruder pallet형의 사료(실험동물 I, 삼양사료)를 자유로이 급식시키면서 1주 적응시킨 후 사용하였다.

나. 경구투여에 의한 급성 독성 실험

각각의 시료(EC-2B, EC-2C)를 멸균된 식염수에 용해시킨 후 농도를 달리하여 10마리를 1군으로 하여 7일간 매일 일정시간에 0.1 mL을 경구 투여한 후에 2주 동안 육안으로 관찰하면서 외관상의 변화와 생존한 마리수를 측정하여 백분율로 표시하였다.

다. 경구투여에 의한 아만성 독성 검사

1) 군분리 및 투여용량의 결정

순화기간 중 건강하다고 판단된 동물에 대하여 체중을 측정하고 체중이 25 g \pm 1 g에 개체를 선택하여 무작위로 이용, 군 분리를 실시하였다. 동물의 개체식별은 ear tag 표시법을 이용하였다. 투여시료는 EC-2B, EC-2C, sulfated EC-2B, sulfated EC-2C 및 식염수로 하고 투여기간은 30일로 하였으며 투여용량은 급성독성 검사의 결과를 토대로 50 mg/kg의 농도로 제조하여 멸균, 밀봉 후 냉장 보관하며 투여하였다.

2) 독성검사

최종 투여를 완료한 2시간 이후에 주요 장기를 적출하여 장기 중량을 체중대비 백분율로 표시하였으며 혈액과 혈청을 심장 채혈하여 혈액학적 임상실험을 실시하였다.

라. 꼬리정맥 투여에 의한 급성 독성 실험

각각의 시료(EC-2B, EC-2C)를 멸균된 식염수에 용해시킨 후 농도를 달리하여

10마리를 1군으로 하여 농도별로 꼬리정맥에 주입한 후 48시간 동안 관찰하여 생존한 마리수를 측정, 백분율로 표시하였다.

5. 정향추출물의 *ex-vivo*에서의 항응고 효과

각각의 시료(EC-2B, EC-2C)를 멸균된 식염수에 용해시킨 후 농도를 달리하여 꼬리정맥으로 투여하고 30분 경과 후 심장채혈법으로 0.9 mL의 혈액을 취한 후 3.8% sodium citrate 용액 0.1 mL과 혼합하여 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 혈장을 APTT법으로 응고시간을 측정하였다.

6. Thrombosis에 대한 *in-vivo*에서의 항치사성 효과

Mouse를 2시간 절식시킨 후 식염수에 용해된 시료(EC-2B, EC-2C)를 꼬리정맥에 주입한 15분 후 veronal buffer로 100 NIH unit/mL의 농도로 희석된 thrombin 0.12 mL을 꼬리정맥에 주입한 다음 30분 동안 사망, 전신마비, 회복되는 마리수를 측정하였다.

제 3 항 결 과

1. 혈액응고계에서의 활성 경로 검색

앞서 기술한 바와 같이 정향으로부터 추출한 항응고 활성획분 EC-2B는 APTT에서 응고 시간만 지연시키지만 EC-2C 획분은 APTT와 TT 모두 응고시간이 지연되었다. 대표적인 항응고 활성 물질인 heparin은 factor Xa와 thrombin과 결합하여 항응고활성을 나타내며 이러한 활성 양식은 최소 18개 이상의 다당을 활성 분자로 요구하지만 factor Xa만의 활성을 억제하기 위해서는 단지 6개의 다당이 요구되며 이러한 특징을 갖는 heparin을 low molecular heparin이라고 통칭한다. EC-2B와 EC-2C로부터 추출 정제된 항응고성 활성 다당 2B-IIIa-2와 2C-Ia-2의 분자량은 각각 34,000과 96,000으로 구조적으로는 rhamnagalacturonan I을 backbone으로 하며 arabinan과 galactan을 side chain으로 가지고 있으며 2C-Ia-2는 arabinogalactan을 side chain으로 가진다. 따라서 두 물질은 분자 크기와 구조적인 차이로 EC-2C-Ia-2는 heparin type의 항응고 활성양식을 EC-2B-IIIa-2는 low molecular weight heparin type의 항응고 활성 양식을 가지고 있음을 알 수 있었다.

2. 정향으로부터 추출한 항응고성 다당의 화학적 구조 수식

항응고 활성을 가지는 합황 다당의 경우 황산기의 함량이 항응고 활성에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다. Heparin은 heparin의 4번째 당에 위치한 3-O-sulfate기와 antithrombin III와의 정전기적 상호결합(electrostatic interaction)에 의해 항응고 활성을 증폭시킨다고 보고되어 있다. 따라서 heparin 계통의 항응고성 물질에 있어서 황산기는 필수적인 부분이며 그 함량에 따라 활성이 좌우되므로 정향으로부터 정제된 항응고성 다당의 황산기의 존재유무를 IR를 이용하여 확인하였다(Fig. 4-26). IR spectrum에 의하면 820cm^{-1} 부근과 857cm^{-1} 부근에 강한 흡수 band가 나타났는데 이는 C-O-S 결합의 황산기가 존재함을 알 수 있었다. 특히 857cm^{-1} 은 C-O-S가 axial 1 position에 결합되어 있음을 나타내며 822cm^{-1} 부근에서의 흡수 band가 equatorial position에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 정향으로부터 추출한 항응고성 정제다당의 황산기는 heparin의 경우 대부분의 황산기가 822cm^{-1} 부근 즉 C-2 위치에 결합되어 있고 일부 황산기가 C4 위치에 결합되어 있는 것으로 사료된다.

항응고 활성과 황산기 함량과의 상관 관계를 항응고성 부분 정제다당을 sulfation시킨 후에 IR를 이용하여 그 정도를 확인하였다(Fig. 27, 28). 820 과 859cm^{-1} 부근의 C-O-S의 흡수 band는 거의 변하지 않았으나 1257.0cm^{-1} 부근의 S=O에서는 sulfation을 확인 할 수 있었다.

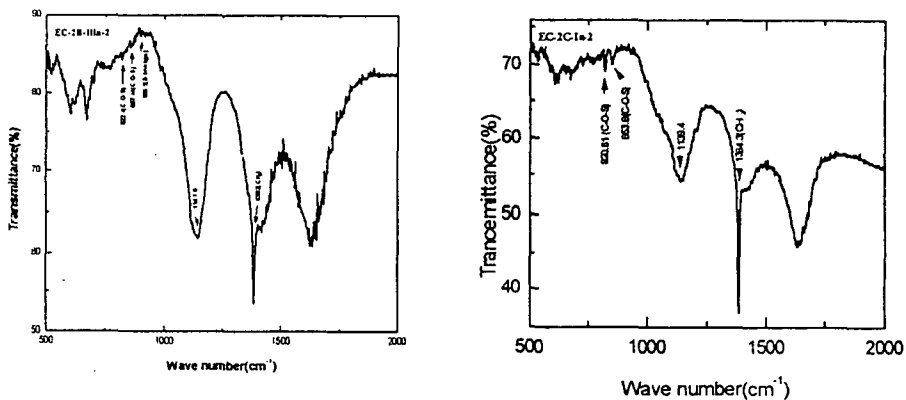


Fig. 4-26. IR spectrum of EC-2B-IIIa-2 and EC-2C-1a-2.

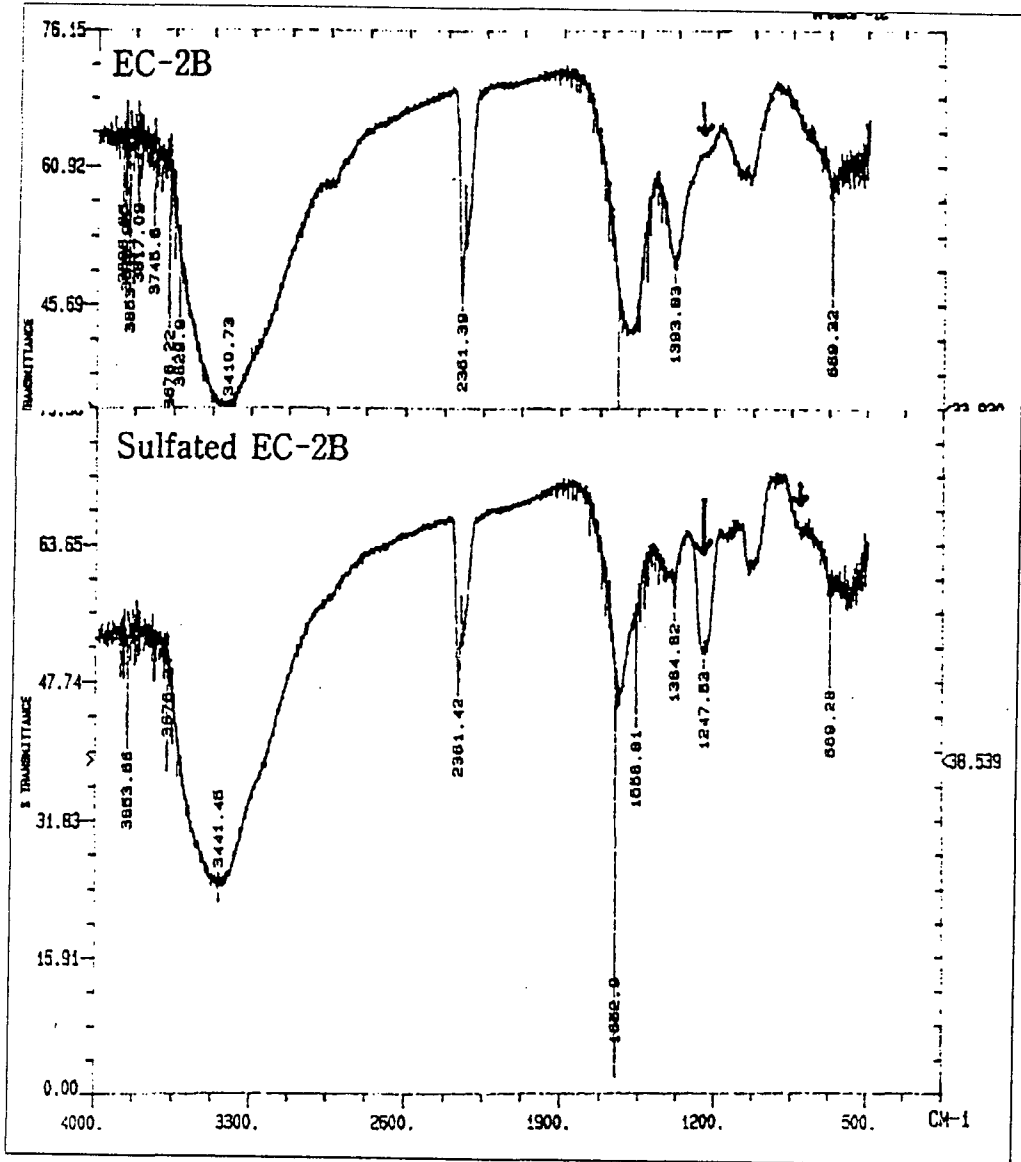


Fig. 4-27. IR spectrum of EC-2B and sulfated EC-2B.

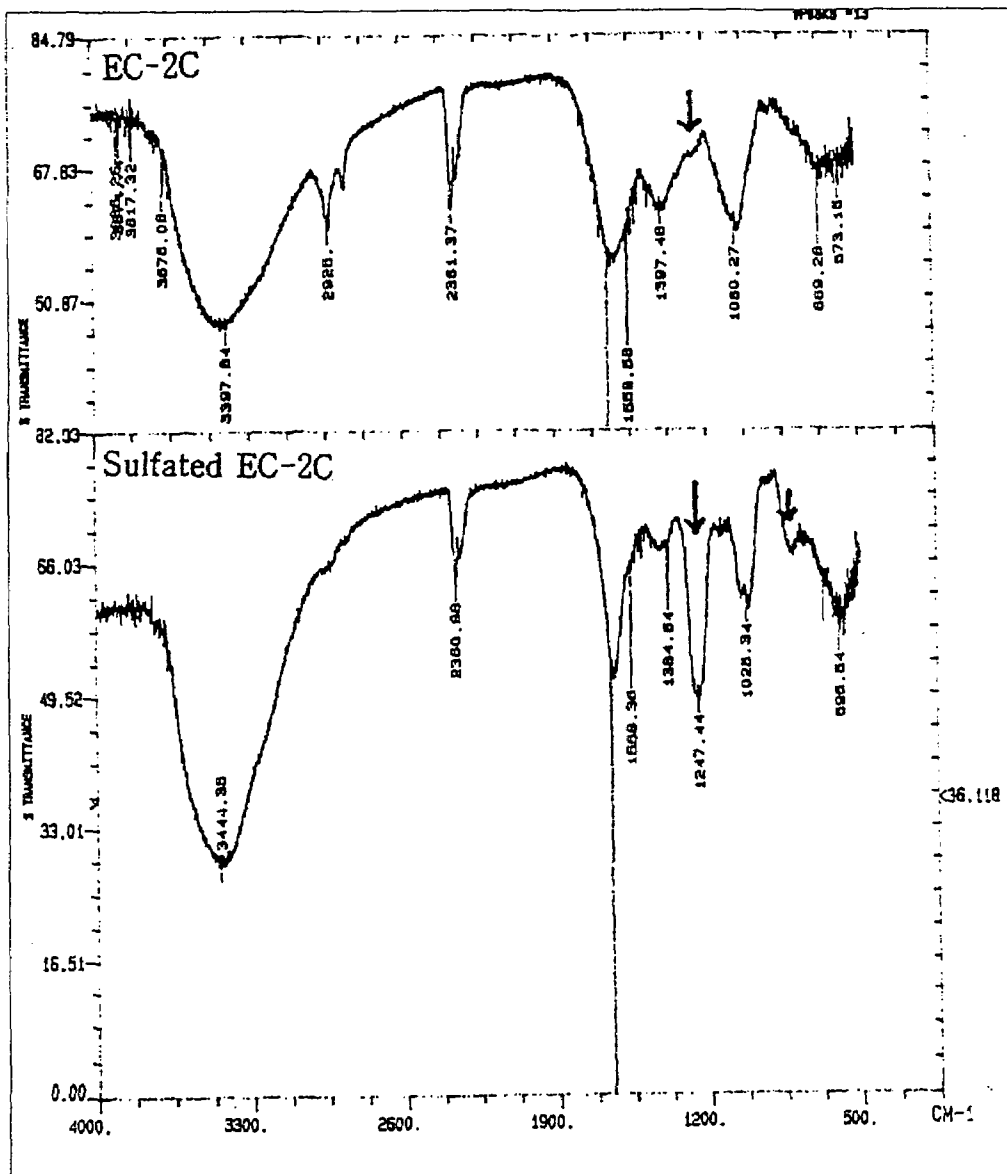


Fig. 4-28. IR spectrum of EC-2C and sulfated EC-2C.

3. 혈소판응집효과

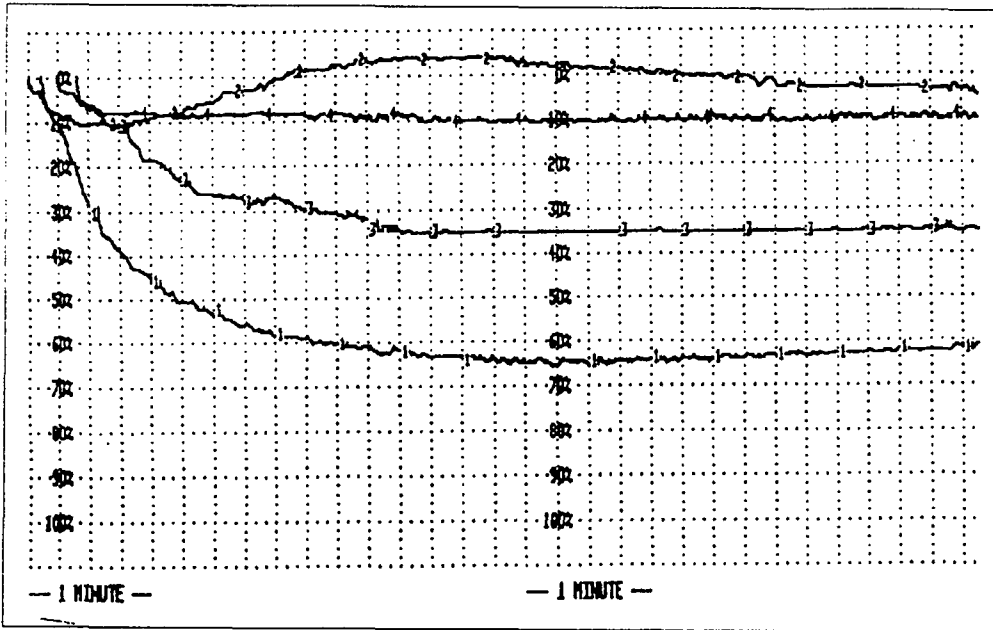
혈소판은 복잡한 내부 구조를 갖는 미세한 혈중 세포로 여러 자극에 의해 손상된 내피에 부착(adhesiveness) 또는 혈소판 자체끼리의 응집(aggregation)을 일으키면서 platelet plug를 형성한다. 따라서 비정상적인 혈소판의 활성화는 혈소판 응괴 및 혈전 생성을 초래하며 특히 심근경색 및 뇌혈전증에서는 혈소판 응괴가 직접적인 원인이 되어 혈전 생성을 초래하게 된다. 정향에서 추출한 항응고성 활성다당(EC-2B, EC-2C)의 혈소판 응집능을 측정한 결과(Fig. 4-29) EC-2B와 EC-2C에서 모두 혈소판 응집억제능을 관찰할 수 있었으며 특히 EC-2B가 EC-2C보다 혈소판 응집억제능이 높음을 알 수 있었다. 정상적인 혈액은 측정 30초 이내에 응집 유도물(ADP, collagen, epinephrin 및 ristocetin)에 의해 50% 이상의 응집이 일어나지만 EC-2B획분은 측정 1분이 지나도록 collagen과 ristocetin에 대한 응집이 10% 미만으로 높은 항혈소판 활성이 있음을 확인할 수 있었다. EC-2B는 collagen, epinephrin 및 ristocetin에 대하여 응집억제능을 관찰할 수 있었으며 EC-2C는 collagen과 ristocetin에서 응집 억제능을 관찰할 수 있었다. 이것을 두 물질의 항응고 활성 양식과 비교해 보면 기존에 보고된 heparin의 특징은 factor Xa과 thrombin에 대하여 항응고 활성을 가지는 반면 산이나 효소 처리에 의해 저분자 heparin으로 되면 thrombin에 대한 항응고 활성은 상실하지만 혈소판에 대한 응집억제능을 가지게 된다고 보고되고 있다. 이와 같은 기존의 연구와 비교시 두 물질의 항응고 양식과 항혈소판 양식이 일치함을 알 수 있었다.

4. 독성검사

가. 경구독성

최근 안전성의 개념은 “위험하지만 그 위험이 무시될 수 있거나 또는 이득이 더 크기 때문에 받아들일 수 있는 위험(acceptable risk)”을 의미한다. 본 연구는 항응고 활성이 *in-vitro* 상에서 확인되었으며 활성의 본체를 파악된 정향 추출물 EC-2B와 EC-2C 획분의 독성을 확인하기 위하여 정향추출물을 농도별로 제조한 후 7일간 측정한 결과 50~1,000 mg/kg의 투여량 범위에서는 독성이 없음을 확인할 수 있었다.

A) EC-2B



B) EC-2C

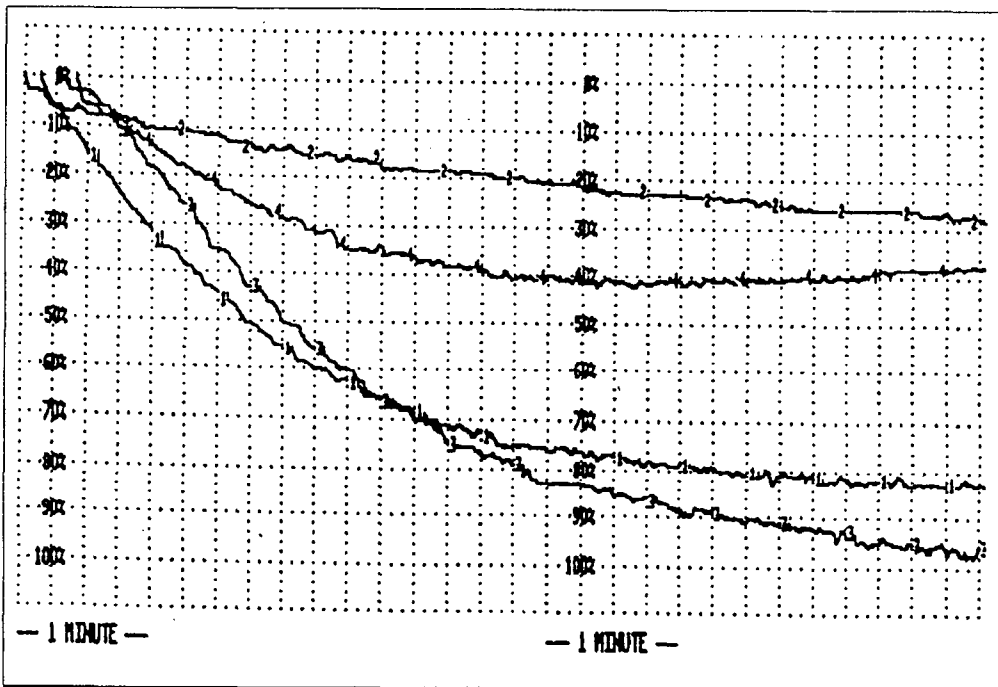


Fig. 4-29 Platelet aggregation test.

1: ADP 2: collagen 3: epinephrin 4: ristocetin

나. 경구 아만성 독성

급성 독성검사를 실시한 결과 생존율 100%로 독성이 없었으므로 50 mg/kg의 제조물을 30일간 투여한 후 체중의 변화를 측정하였다. 독성검사에서는 대조구에 비해 최종 체중이 증가하였으며 독성과 관계되는 특정장기의 중량을 측정한 결과와 특정장기 및 혈액 검사 결과에서도 독성이 없음을 확인하였다(Table 18~20).

Table 4-18. Body weight change in mouse orally administrated with EC-2B and EC-2C for 30 day

Group	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Survival ratio (%)
Control	10	25 ± 1	33.2 ± 1.8	100
EC-2B	10	25 ± 1	39 ± 1.0	100
EC-2C	10	25 ± 1	35.8 ± 2.3	100

Table 4-19. Organ weight change in mouse orally administrated with EC-2B and EC-2C for 30 day

	Kidney	liver	lung	spleen
Control	0.28 ± 0.02	2.30 ± 0.31	0.23 ± 0.05	0.24 ± 0.01
EC-2B	0.25 ± 0.03	2.30 ± 0.13	0.23 ± 0.02	0.35 ± 0.02
EC-2C	0.22 ± 0.03	1.72 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.20 ± 0.04

Table 4-20. Hematological parameters in mouse orally administrated with EC-2B and EC-2C for 30 day

	EC-2B	EC-2C	control
RBC count	6.73 ± 0.19	7.35 ± 0.22	7.44 ± 0.59
WBC count	8.70 ± 5.00	8.4 ± 0.8	4.16 ± 1.2
Hemoglobin	11.55 ± 0.45	13.75 ± 0.52	12.13 ± 0.63
Hematocrit	37.1 ± 2.9	38.97 ± 2.25	35.5 ± 2.9
Platelet count	73.5 ± 23.5	75 ± 7.35	81 ± 8.0
MCV	44.8 ± 0.06	51.1 ± 5.1	48.1 ± 0.5
MCH	17.15 ± 0.15	17.8 ± 2.52	16.3 ± 0.43
MCHC	38.4 ± 3.4	34.9 ± 0.6	3.43 ± 1.0

다. 꼬리정맥 투여시 독성실험

한외여과에서 나누어진 두 획분(EC-2b, EC-2c)이 마우스에 미치는 독성을 측정한 결과(Fig. 4-30) EC-2B는 750 mg/kg에서도 독성이 전혀 없는 반면 EC-2c 획분은 125 mg/kg에서부터 독성을 나타내었다. 특히 350 mg/kg에서는 투여 1시간 안에 90%의 사망율로 매우 강한 독성을 나타내었다. 항응고 활성물질로 알려진 chitosan의 LD₅₀이 237 mg/kg과 유사한 독성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

5. Ex-vivo 상에서의 항응고 활성 측정

EC-2 획분을 분자량에 따라 3개의 획분으로 분획한 결과 분자량이 10만 이상인 획분(EC-2C)이 APTT에서 383초(250 μ g/mL)로 높았다. 분자량이 1만에서 10만 사이인 획분(EC-2B)은 APTT(activated partial thromboplastin time)에서는 동일 농도에서 292초로 EC-2C에 비해 낮았다. TT(thrombin time)에서는 EC-2C획분이 125초(500 μ g/mL)인데 비해 EC-2B획분은 14초로 활성이 없었다. EC-2B, EC-2C, sulfated EC-2B 및 sulfated EC-2C를 각각 꼬리 정맥에 주입한 다음 심장채혈법으로 혈액을 취하여 ex-vivo 상에서 항응고 활성을 측정한 결과 EC-2B와 EC-2C는 in-vitro상에서보다 활성 차이가 큼을 알 수 있었다(Fig. 4-31). 그러나 두 획분을 각각 sulfation 후 활성을 측정한 결과(Fig. 4-32) 두 물질 모두 활성이 증가하였으며 또한 sulfated된 EC-2B와 EC-2C 획분간의 활성 차이도 미미하였다. 따라서 이 결과들은 정향으로부터 추출한 항응고 활성 물질인 EC-2B와 EC-2C는 antithrombin III의 활성을 증폭시켜 항응고 활성을 발현하며 황산기 함량이 증가하면 활성이 증가함을 알 수 있었다. 또한 EC-2B 획분이 EC-2C 획분보다 antithrombin III에 친화성이 낮아 ex-vivo 상에서 활성이 낮게 측정되었으나 sulfation시킨 후 친화성이 높아짐을 알 수 있었다.

6. 마우스 모델에서의 항응고 활성 측정

EC-2B와 EC-2C 두 획분의 in-vivo 상에서의 항응고 활성을 60% 생존율을 갖는 dose로 표시한 결과 EC-2B는 125 mg/kg인데 비해 EC-2C는 74 mg/kg로 활성의 차이가 in vitro에서 보다 크게 나타났다. 이것은 EC-2B 획분은 내인성 경로에서만 항응고 활성을 나타내는데 비해 EC-2C 획분은 내인성과 공통경로에서 모두 항응고 활성을 나타내어 결과적으로는 더 강력한 항응고 활성을 갖는 물질로 추정된다(Fig. 4-33).

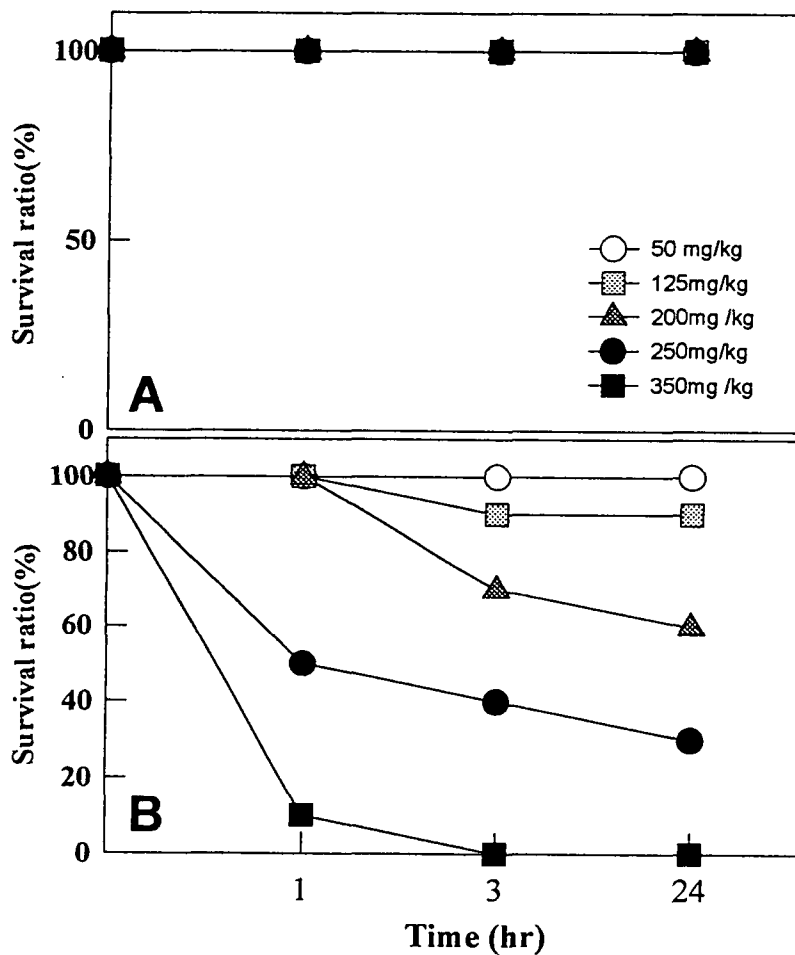


Fig. 4-30. Lethal toxicity of EC-2B(A) and EC-2C(B) in mice

Sample dissolved in saline was injected intravenously into mice.
Survival ratio(%) was the No. of alive / the No. of all tested mice.

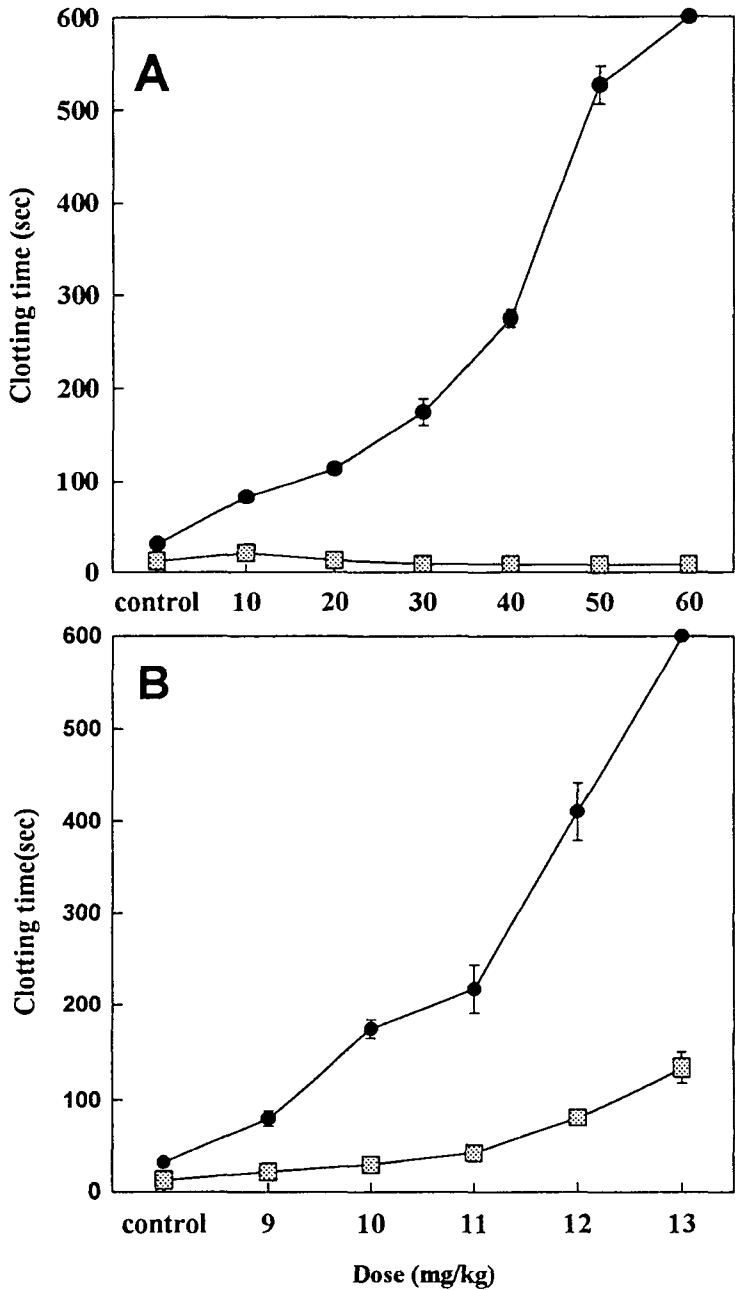


Fig. 4-31. Dose effect of intravenous injection with EC-2B(A) and EC-2C(B) on *ex-vivo* activity in mice

● : APTT □ : TT

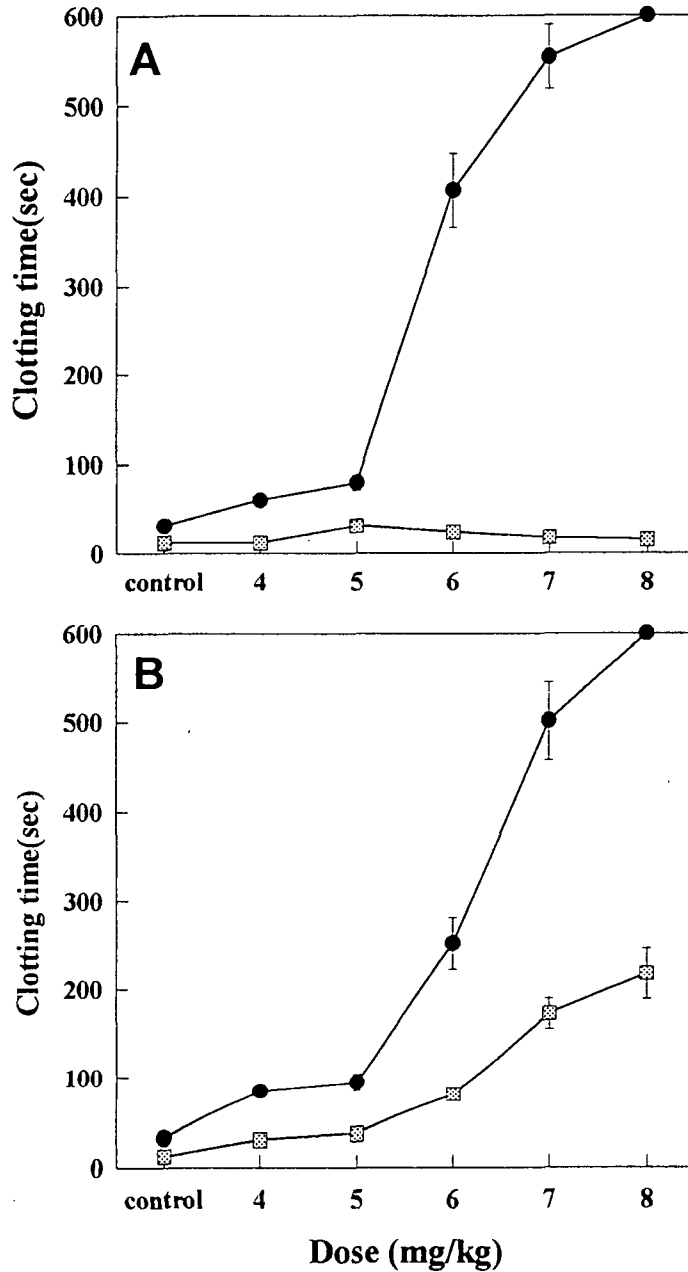


Fig. 4-32. Dose effect of intravenous injection with sulfated EC-2B(A) and sulfated EC-2C(B) on *ex-vivo* activity in mice

—●— : APTT —□— : TT

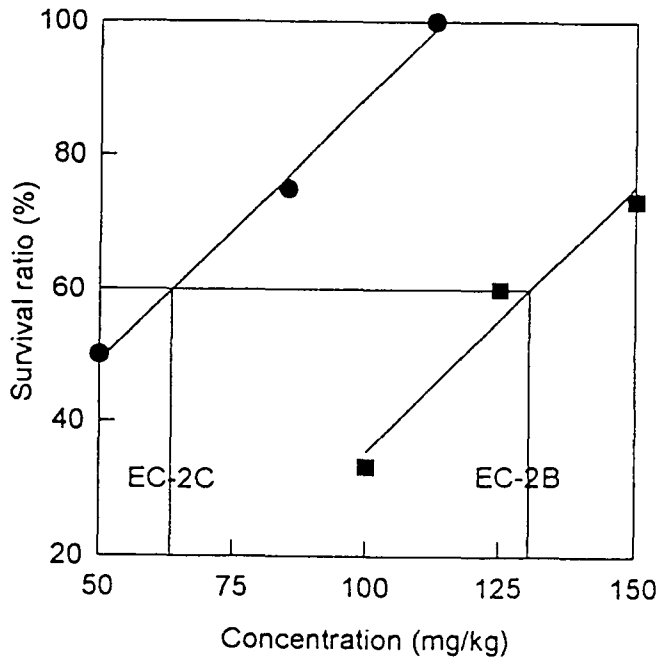


Fig. 4-33. Effects on the thrombin-induced thrombosis in mice of EC-2B and EC-2C.

제 5 장 양념채소 함유 미량소제의 기능성식품화

제 1 절 서 설

식품 중에는 이미 알고 있는 영양소 이외의 각종 생체조절 기능을 갖는 인자가 존재한다는 것이 판명되고 있다. 최근 질병의 치료를 목적으로 하는 현대 의료만으로는 고혈압, 동맥경화, 심근경색, 류마티스성 관절염, 노인성 치매 등 다종다양한 성인병과 각종 암에 의해 효과적으로 대응할 수 없다는 판단에 따라 일상생활에서 질병을 예방하는 예방의학에 대한 관심이 높아져가고 있다. 특히 식품에 대한 질병의 예방은 식품이 갖고 있는 기능성 해명의 연구에 대한 중요성을 더욱 크게 하고 있다.

일반적으로 3차 기능성 인자는 식품 중에 미량 함유되어 있기 때문에 효과를 충분히 발휘할 수 없다. 따라서 이것을 증강시킬 필요가 있고 질적으로 증강된 식품을 만들고 이 3차 기능이 효과적으로 발현될 수 있도록 설계해야 한다. 가장 간단한 방법은 식품 중에 함유된 3차 기능성인자의 양을 높은 순도로 분리, 정제하는 것이다. 이 경우 저해제, 호르몬, phytochemicals 등의 물질은 의약품화 할 수도 있고 명백하게 식품성분으로 인정되는 지질, peptide, polysaccharide, oligo 당 등은 기능성 식품소재로서 사용할 수 있다. 다른 방법으로는 농축으로 타성분을 제거시킴으로써 식품이라는 형태 속에 3차 기능인자의 양을 증가시키거나 3차 기능인자를 식품에 첨가하여 기능성이 강화된 식품을 설계할 수 있다. 또한 이들 설계에 못지 않게 중요한 것은 3차 기능인자를 공업적으로 대량생산하고자 할 때 원료 원의 탐색과 확보로서 미이용 식용자원들의 이용 가능성에 대해 적극적인 검토가 요구된다.

Kellogg사가 “ 고섬유 , 저지방의 식품이 암예방에 유효하다 ” 라는 미국 NCI의 연구결과를 Cereal제품에 표시한 것이 계기가 되어 1990년 10월 미의회가 “Nutrition Labeling and Education Act” 을 작성, 1993년 1월에 법안을 공포한 바 있다. 1993년에 7개 항목(지방식품과 심장혈관질환, 저지방식품과 암, 칼슘 고함유식품과 골다공증, 저염식품과 고혈압, 식이섬유를 함유한 곡류제품, 과일, 야채와 암, 식이섬유 특히 수용성 식이섬유를 함유한 곡류제품, 과일, 야채와 암, 식이섬유 특히 수용성 식이섬유 함유한 과일 , 야채, 곡류제품과 심장관상동맥질환)에 대하여 식품의 건강 강조표시를 인가하였다. 기능성식품 및 건강식품에 가까운 식품의 영양학적 정의에 관한 “ 특정영양목적의 사용에 관한 EC 일반지령 89/398” 이 현재 작성 중에

있다. 여기에는 9개항의 식품군(유아식, 유아용 우유관련 유제품 및 식품, Baby food, 체중조절용 저칼로리 및 칼로리를 저하시킨 식품, 특정의료목적 식사요법용 식품, 저나트륨 식품, 나트륨성분이 적은 염 또는 나트륨을 함유하지 않은 염, gluten 을 함유하지 않은 식품, 격한 운동의 요구에 부합하는 식품 특히 스포츠용 식품, 당뇨병 환자용 식품)에 대해 식품마다 각각의 규칙이 작성되고 있다. EC 소비자들은 기능성 식품에 대해 식사의 일부로 천연 물질에서 유래하는 식품을 섭취함으로써 질병의 예방과 치료, 기타 의학상 건강상에 이익을 가져 온다는 개념으로 정제, 캡슐제의 사용보다는 식품이나 음료 등의 형태로 된 제품을 선호하고 있다. Probiotic 요구르트를 비롯하여 어유를 함유한 빵, 영양드링크, 정신활성드링크, 섬유분이 풍부한 우유, 칼슘강화 오렌지 주스나 요구르트 등이 대표적인 상품이다.

국내 기능성식품에 대한 연구는 식품 및 천연물 중 생체 조절기능성분에 대한 활성검정관계로서 지금까지 보고된 활성물질들은 ACE 활성저해제, 항보체활성 다당류, SOD 성 활성물질 및 각종 항암활성물질들이다. 반면 기능성식품에 대한 시장도입이 아직 되어 있지 않으며 이를 위한 행정당국의 제도적 장치가 마련되어 있지 못하다. 현재 “건강보조식품”의 형태로 각종 생리활성이 표시된 제품들이 시판되고 있으나 기능성 식품에 따라 개념이 정립되어 있지 못한 상태이다.

본 연구에서는 이미 오랫동안 식용 또는 약용으로 사용하여 그 안전성이 검증된 양념채소류에 대해 각종 생리활성을 분석하고, 유효성분들을 분리하여 기능성 식품의 소재로 개발하고자 한다.

제 2 절 선정시료들로부터 생리활성물질 추출조건의 최적화 및 공업적 수준의 정제방법 확립

제 1 항 선정 양념채소의 공업적 이용을 위한 추출방법의 확립

1. 백리향으로부터 항보체활성 성분의 공업적 추출방법

백리향(*Thyme, Thymus vulgaris*) 5 kg으로부터 항보체활성 성분을 공업적으로 대량 추출하기 위해 10 L용 steam jacket이 부착된 추출기를 사용하여 20배의 methanol로 2시간 동안 추출한 후 methanol을 제거한 잔사를 동일 추출기를 사용하여

20배의 물로 온도별로 추출하였다. 그 결과 끓는 물에서 가장 높은 추출율을 나타내었다(Table 5-1). 한편 시간별로 추출된 획분의 항보체 활성을 실험실적 추출조건과 비교검토한 결과 추출초기에는 공업적 추출시기가 다소 높은 반면 2시간 이후에는 유사한 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Table 5-2).

2. 겨자씨로부터 ACE 저해활성 성분의 공업적 추출방법

겨자씨(mustard seed, *Brasica alba*)로부터 ACE 저해활성물질의 공업적 추출조건을 다음과 같이 검토하였다. 시료 5 kg을 ball mill로 미세하게 분쇄한 후 상기의 추출기를 사용하여 hexane으로 유지를 추출제거하여 얻은 약 2.4 kg의 잔사를 동일 추출기에서 60℃ 온수로 2시간 동안 6차 추출하였다. 추출한 액에 butanol을 동일부피로 넣고 vibratory seperator를 사용하여 6회 반복 분획하면서 실험실적 추출조건과 비교 검토하였다. 그 결과 60℃ 온수추출에서는 유의적인 차를 보이지 않았으나 분획 시에는 공업적 추출의 경우가 높은 저해활성을 보임으로써 seperator의 분획능이 공업적 추출에 있어 중요한 인자임을 나타내었다. 한편 butanol 분획에 미치는 pH의 효과를 검토한 결과 산성과 중성영역에서는 큰 차이를 보이지 않는 반면 알카리영역에서는 활성이 크게 감소함을 알 수 있었다(Fig. 5-1, 5-2, 5-3).

3. 정향으로부터 항혈전활성 성분의 공업적 추출방법

정향(clove, *Eugenia caryphyllate*) 5 kg을 상기 제 1세부과제와 동일하게 methanol 추출을 5회 실시, methanol 가용성분을 제거한 후 잔사를 감압증발기에 넣고 잔류 methanol을 제거하였다. 이 잔사를 동일 추출기에서 0.1 N NaOH로 온도별, 추출횟수별로 추출한 후 항응고활성에 미치는 추출조건을 검토한 후 실험실적 방법과 비교하였다. 그 결과 추출횟수의 영향은 관찰되지 않았으나 온도의 영향은 고온으로 갈수록 공업적 추출의 경우가 다소 낮은 활성을 나타내었다. 이는 추출기 내의 온도 조절이 균일하지 않은 결과로 판단되었으며 타 세부과제에 있어서도 대량추출의 경우에는 추출기 내의 stirring 또는 agitating 용 장치의 부착이 요구됨을 알 수 있었다(Fig. 5-4, 5-5).

Table 5-1. Effects of water extraction temperature on anti-complementary activity from Thyme

	50°C	70°C	90°C	Hot water
Lab-scale	54.5	60.1	76.7	81.4
Bench scale	62.8	68.8	82.5	87.7

Lab-scale : 100 g sample, Bench scale : 5 kg sample

Table 5-2. Effects of water extraction time on anti-complementary activity from Thyme

	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
Lab-scale	74.8	82.7	86.5	94.7	96.2
Bench scale	83.2	88.7	94.1	96.8	98.1

Lab-scale : 100 g sample, Bench scale : 5 kg sample

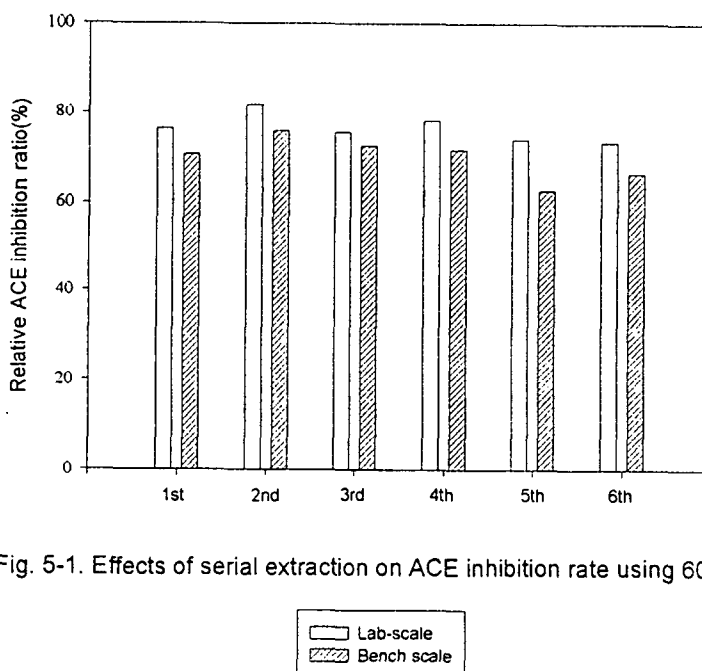


Fig. 5-1. Effects of serial extraction on ACE inhibition rate using 60°C water.

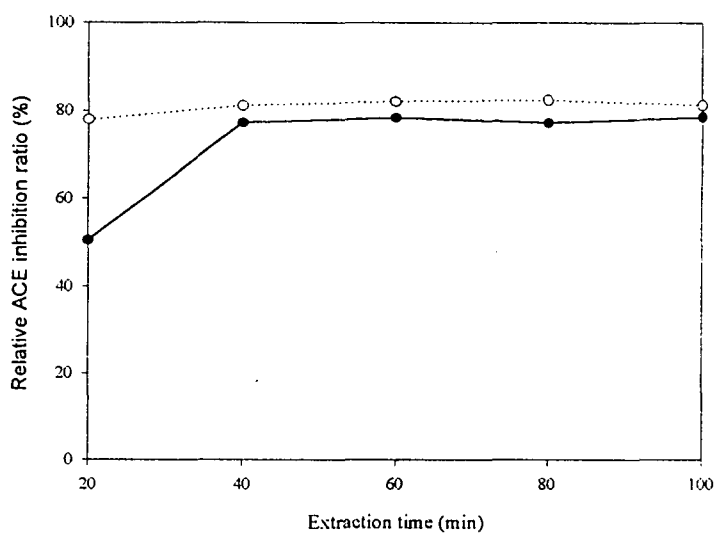
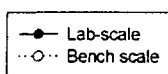


Fig. 5-2. Effects of extraction on ACE inhibition rate using butano



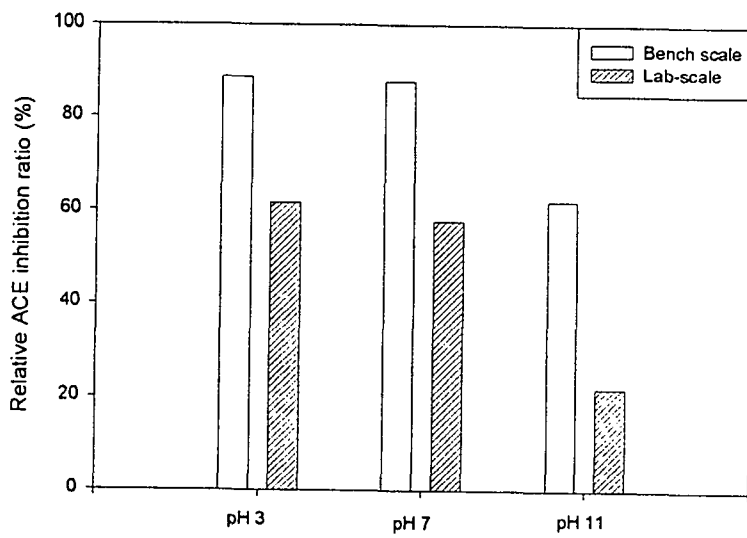


Fig. 5-3. Effects of pH on ACE inhibition rate of butanol fraction

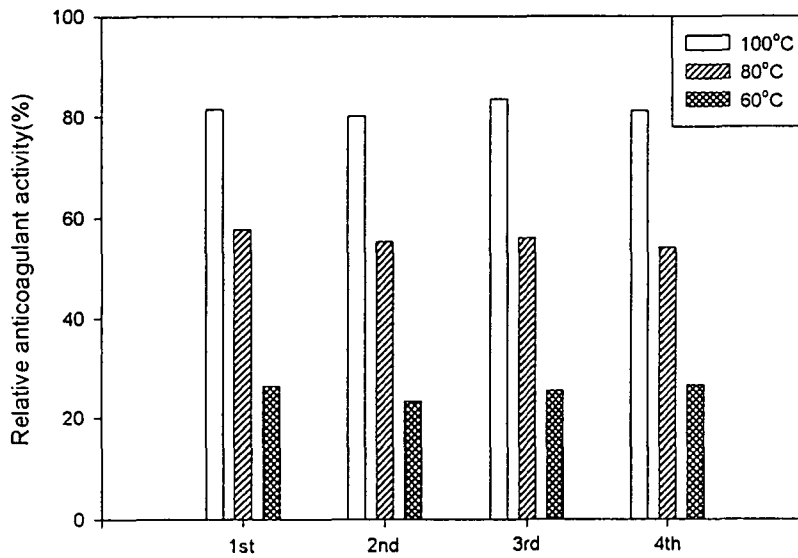


Fig. 5-4. Effects of extraction temperature and serial extraction on anticoagulant activity using 0.1 N NaOH in Lab-scale.

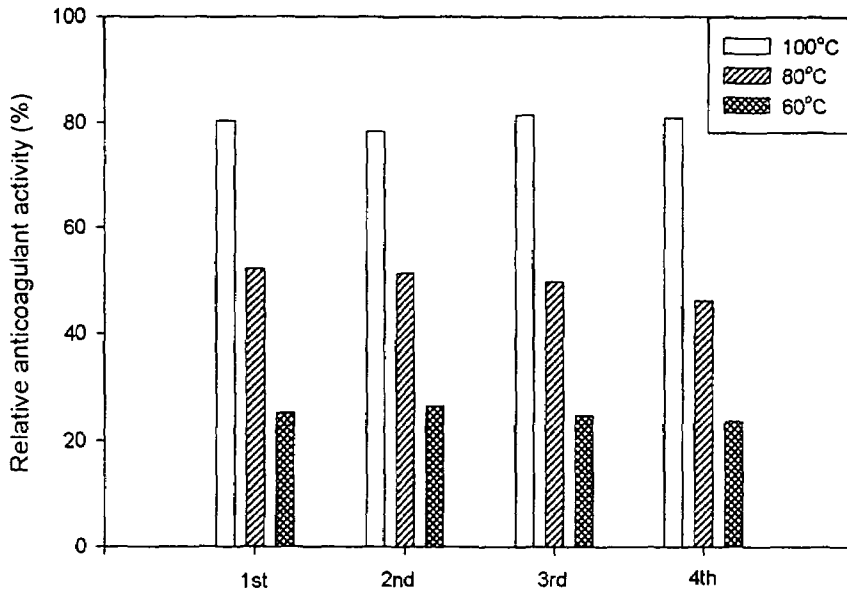


Fig. 5-5. Effects of extraction temperature and serial extraction on anticoagulant activity using 0.1 N NaOH in bench scale.

제 2 항 생리활성물질의 공업적 수준의 정제법 확립

1. 선정된 양념채소 추출물의 공업적 수준에서의 탈색방법

백리향, 겨자씨 및 정향 등의 대량추출물에 대한 탈색방법을 활성탄, Diaion HP-20, Diaion HP-21 등 비교적 저가의 흡착제를 사용하여 batch와 open column에서 검토하였다. 그 결과 1,000 mg/L의 농도에서 Diaion HP-21 > Diaion HP-20 > 활성탄의 순서로 뚜렷한 탈색효과를 나타내었으며 이들 처리에 의한 활성감소는 ACE 저해 활성에서 미미할 뿐 영향을 보이지 않았다(Table 5-3, 5-4).

2. 한외여과를 이용한 공업적 수준에서의 정제법 확립

탈색시킨 각 시료들을 대상으로 한외여과를 실시하였다. 한외여과장치는 Millipore masterflex를 사용하였고 여과막으로는 1만, 10 만, 30만, 100만, 300만 등의 MW-cut off column형의 막을 사용하여 각 시료별로 실시하였다. 그 결과 백리향의 항보체활성은 300만 이상, 겨자씨의 ACE 저해활성은 1만 이하, 정향의 항응고 활성은 100만~300만에서 높은 활성을 나타내었다. 또한 이들의 수율 및 정제도를 증가시키기 위해 분자량이 다른 column들을 조합시키면서 공업적 정제조건을 검토하였다 (Table 5-5).

Table 5-3. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in batch type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Thyme	63.45	72.89	51.19
Mustard seed	64.26	74.42	53.83
Clove	61.38	75.56	51.74

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

Table 5-4. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in open column type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Thyme	73.51	83.62	61.15
Mustard seed	72.44	86.13	64.92
Clove	69.26	86.48	60.59

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

Table 5-5. Changes of physiological activities of crude samples treated with ultrafiltration

Physiological activities	MW cut-off			
	10,000	100,000	1,000,000	3,000,000
Anti-complementary activity (%)	0	7.29	40.8	85
ACE inhibition rate (%)	74.2	18.9	2.54	0
Anticoagulant activity (%)	0	73.3	211	286

Concentration of samples was 100 mg/L in each assay system.

제 3 항 각 생리활성 성분의 추출 및 공업적 순도의 정제 공정

1. 백리향 함유 항보체 활성 물질의 추출 및 공업적 순도의 정제 공정

동결건조하여 분쇄한 백리향을 methanol 20배 부피로 환류 추출하여 methanol 가용 획분인 TV-M을 분리하고, methanol 비가용 획분인 침전물은 감압농축하여 100℃에서 3시간 동안 환류 추출한 후 원심분리(5,000 × g, 30분) 및 동결건조하여 얻은 TV-0를 적당량의 증류수에 녹인 후 ethanol을 단계적으로 가하여 그 농도(% v/v)를

각각 30%, 75%가 되도록 한 후 4°C에서 24시간 정치하고 원심분리(5,000 × g, 30분) 하여 얻어진 75% ethanol 침전물을 소량의 물에 재용해시켜 투석한 후 비투석 획분을 농축, 동결건조하였다. 75% ethanol 침전물(TV-75)을 증류수에 재용해하여 분자량이 100 KDa, 300 KDa의 여과막을 사용하여 단계적으로 여과하여 분자량이 300 KDa이상의 TV-3를 제조하였다.

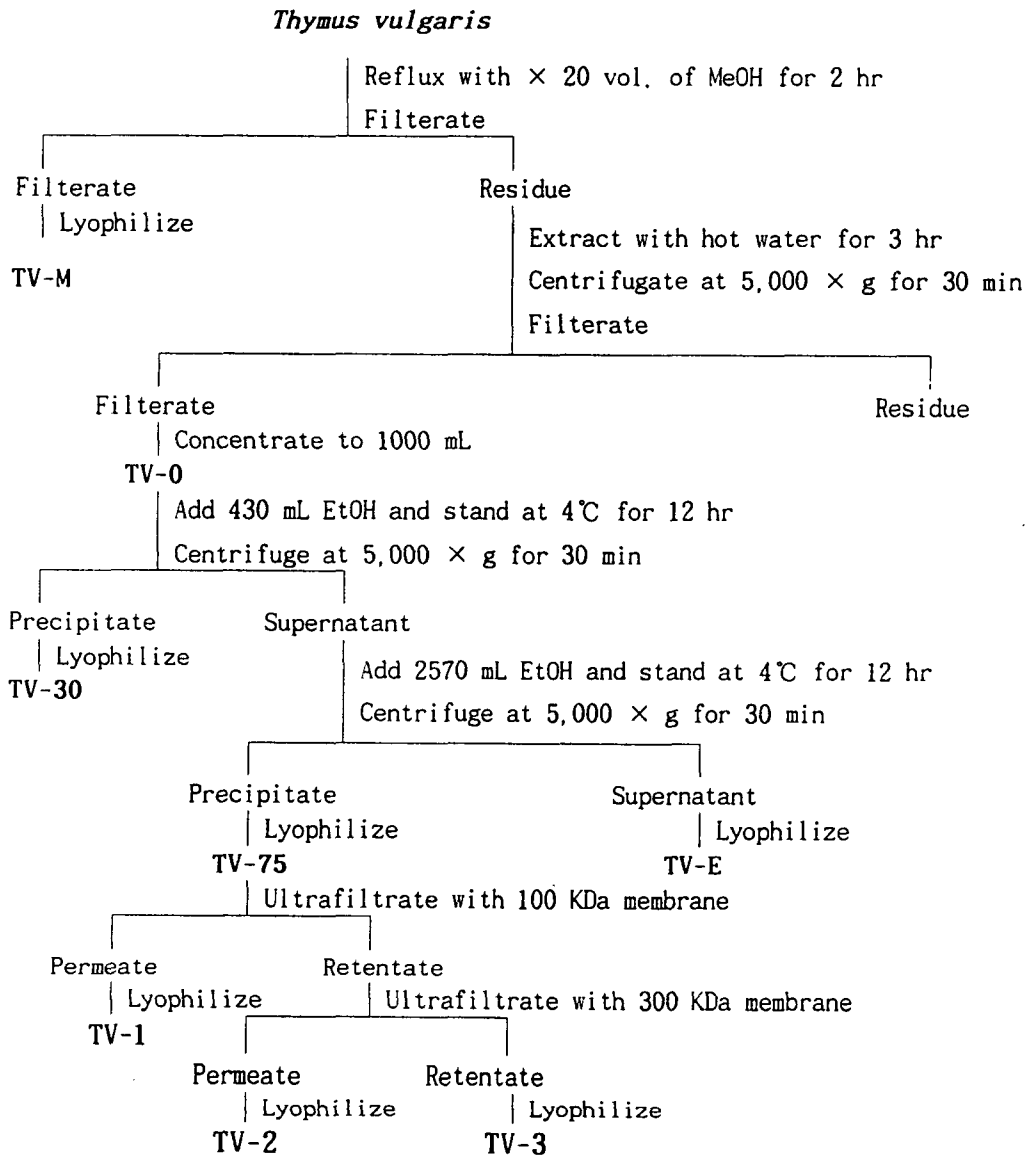


Fig. 5-6. Purification procedure of anti-complementary compounds for industrial purity from *Thymus vulgaris* L.

2. 겨자씨 함유 ACE 저해제의 추출 및 공업적 순도의 정제 공정

곱게 분쇄한 겨자씨를 hexane으로 환류추출하여 지질을 제거한 후 그 잔사를 건조하여 증류수로 환류추출하였다. 이 추출물을 동결건조한 후 증류수와 butanol(1:1)을 이용하여 분획한 후 butanol층을 ice bath상에 위치시킨 후 서서히 stirring하면서 -20°C 에서 냉각시킨 methanol을 소량씩 첨가하여 methanol침전을 실시한 후 원심분리(8,000 rpm, 30분)에 의해 회수하였다.

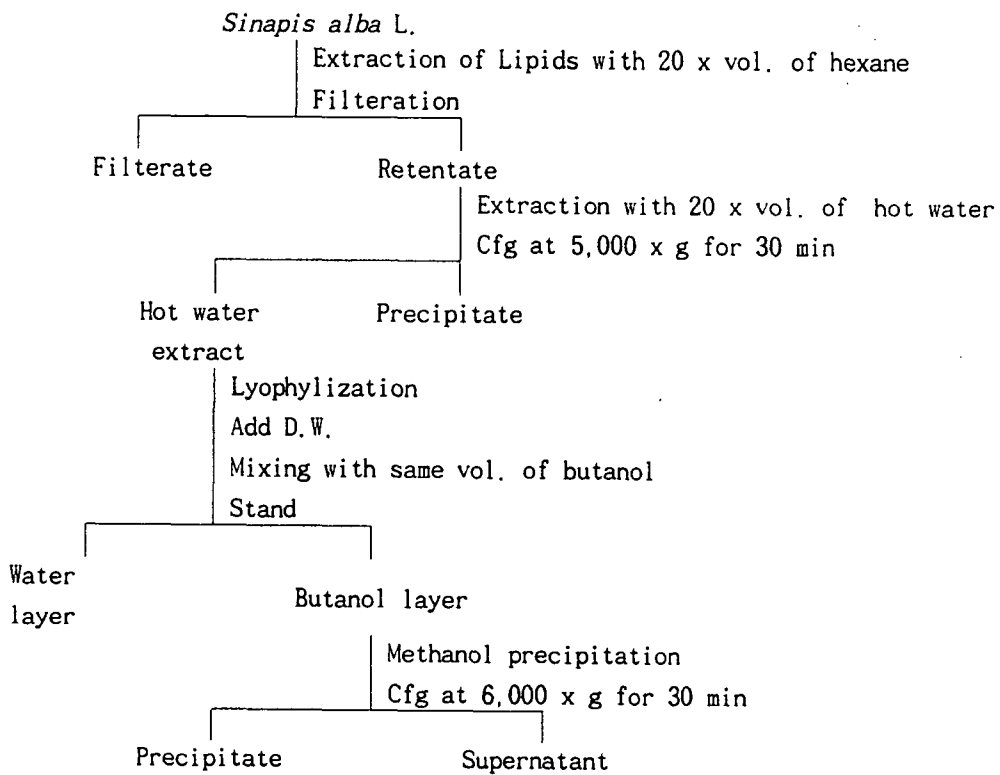


Fig. 5-7. Purification procedure of ACE inhibitory compounds for industrial purity from *Sinapis alba* L.

3. 정향 함유 항응고물질의 추출 및 공업적 순도의 정제과정

정향을 상온에서 20 배 부피의 메탄올로 5회 교반하여 메탄올 가용획분인 EC-M 획분을 얻은 후 비가용획분은 1.0 N NaOH로 70℃에서 추출하였다. 1차와 2차 추출물을 모아 EC-0으로 제조하였으며 이 획분을 3배의 에탄올 침전을 실시하여 고분자 획분인 crude extract(EC-1)와 저분자 획분인 EC-E으로 분획하였다. 조획분 EC-1을 이온강도에 따라 분획하기 위하여 양이온 계면 활성제인 cetavlon(cetyltrimethyl ammonium bromide)을 처리하여 4개의 획분으로 분리하였다. EC-1에 동량의 8% cetavlon 용액을 혼합하여 20℃에서 24시간 교반, 정치하였다. 원심분리(7,000 rpm, 30분)하여 얻은 침전물을 10% NaCl에 2회 용해하여 얻은 상등액을 EC-2로 하고 불용성 획분을 EC-5로 하였다. 8% cetavlon 상등액은 1% boric acid(H_3BO_3)를 동량 첨가하고 2 M NaOH를 이용하여 pH를 8.8로 맞춘 후 24시간 동안 교반하여 침전물을 형성시키고 원심분리하여 그 침전물은 2% acetic acid로 용해시킨 후 EC-3을 제조하였다. 이 때 상등액은 2 M의 NaOH를 이용하여 pH를 9.5로 조정하고 침전물을 얻은 후 위와 동일 조건으로 처리하여 EC-4를 얻었다. 각 획분은 투석, 동결건조하여 시료로 이용하였다. Cetavlon 처리결과 얻은 항응고활성 획분 EC-2는 Prep/Scale-TFF Cartridges (MilliporeTM, Germany) 및 10 K와 100k regenerated cellulose cartridge를 이용하여 한외여과를 실시하여 분자량별로 분자량 10~100 K인 EC-2B 및 100 K 이상인 EC-2C 획분으로 분획한 후 동결건조하였다.

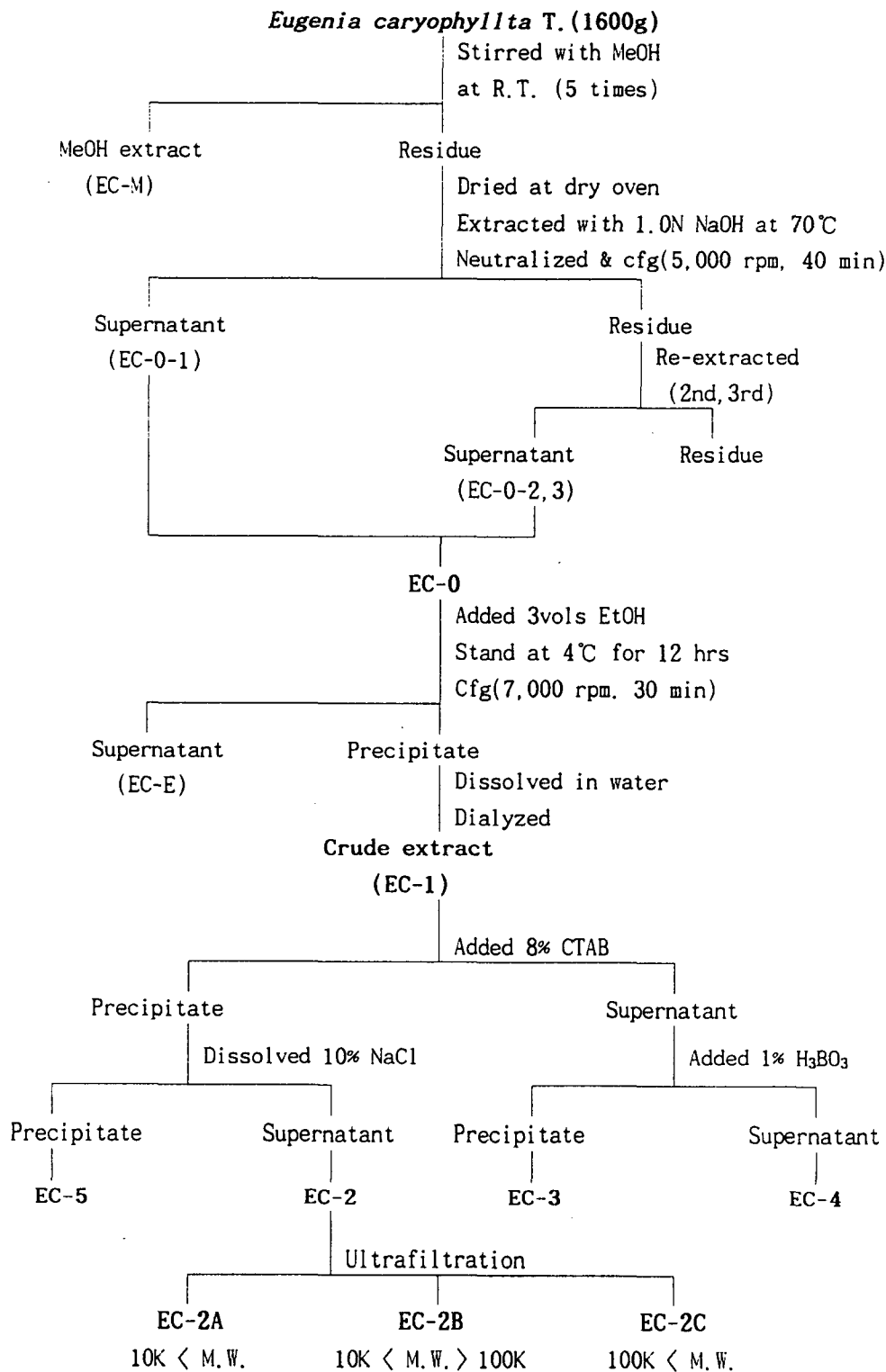


Fig. 5-8. Isolation and preparation procedure of anticoagulant fractions from *Eugenia caryophyllata*.

제 3 절 백리향 및 겨자씨 함유 생리활성물질의 기능성 식품화

제 1 항 재료 및 방법

1. 드링크제 제조

백리향, 겨자씨 등의 추출 분말을 이용하여 100 mL용 내용액제제를 만들었다. 제품의 향, 맛 안정성 등을 고려하여 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상과당, 올리고당, 벌꿀 등을 이용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨을 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 향산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였고 그의 제품의 식미를 향상시키기 위해 사과과즙, 배과즙, 대추즙 등을 혼합한 3 가지 배합예를 작성했다. 주성분의 배합은 100 mg으로 하여 조제하였다.

2. 연질캡셀 제조

백리향, 겨자씨 추출분말 100 mg에 소맥배아유를 50%-30%, 미강추출물 10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토코페롤 1% 등을 부형제로 이용하였으며 생강추출물, 계피분 등도 관능효과를 위하여 미량 첨가하였다.

3. 과립제 제조

백리향, 겨자씨 추출분말 300 mg에 부형제로서 유당 700 mg, 옥수수 전분 3.5 mg, 감미제로서 백당 500 mg, 산미제로서 구연산 5 mg을 혼합하고 spray dry 후 제조하였으며 함습도를 시험 후 정립하고 최종 혼합하였다.

4. 타정제 제조

백리향, 겨자씨 추출분말 100 mg에 부형제로서 무수유당 200 mg, 저치환도 히드록시 프로필 셀룰로스 40 mg을 첨가하고 활택제로서 스테아린산 마그네슘 1 mg을 혼합하였다.

제 2 항 결 과

1. 드링크제 제조

백리향, 겨자씨 등의 추출 분말을 이용하여 100 mL 용 내용액제제를 제작하였다. 제품의 향, 맛, 안정성 등을 고려하여 3가지 정도의 배합을 만들었다. 재료 및 방법에서와 같이 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상과당, 올리고당, 벌꿀 등을 이용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨을 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 항산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였고 식미의 향상을 위해 사과과즙, 배과즙, 대추즙 등도 혼합하였다. 주성분의 배합은 100 mg으로 조제하였다(Table 5-6).

2. 연질캡셀 제조

백리향, 겨자씨 추출분말 100 mg을 이용하여 연질캡셀을 제작하였으며 제품의 향, 맛 등을 고려하여 2가지 정도의 배합을 만들었다. 부형제로서 소맥배아유를 50%-30%, 미강추출물 10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토코페롤 1% 등을 이용하였으며 생강추출물, 계피분 등도 식미효과를 위하여 미량 첨가하였다(Table 5-7).

3. 과립제 제조

백리향, 겨자씨 추출분말 300 mg에 배합예(Table 5-8)와 같이 부형제로서 유당 700 mg, 옥수수 전분 3.5 g, 감미제로서 백당 500 mg, 산미제로서 구연산 5 mg을 혼합하여 제작하였으며 함습도를 시험 후 정립하고 최종 혼합하였다.

4. 타정제 제조

백리향, 겨자씨 추출분말 100 mg을 배합예(Table 5-9)와 같이 부형제로서 무수유당 200 mg, 저치환도 히드록시 프로필 셀룰로스 40 mg을 첨가하고 활택제로서 스테아린산 마그네슘 1 mg을 혼합하였다.

Table 5-6. 백리향 및 겨자씨 함유 기능성 드링크 제제의 배합에

배합예 1.

용량: 100 mL
제품유형: 희석과즙 음료
성분:
백리향 추출 조시료(TV-3) 100 mg
사과과즙 10%
대추즙 1%
배과즙 3%
별꽃 0.5%
구연산 0.05%
비타민 C 0.05%
비타민 B6 염산염 0.01%
L-글루타민산나트륨 0.01%
니코틴산아미드 0.01%
액상과당 0.01%

배합예 2.

용량: 100 mL
제품유형: 착향탄산음료
성분:
겨자씨 추출 조시료 100 mg
계피분 10 mg
서양배농축과즙 3%
구연산 50 mg
비타민 C 50 mg
젖산칼슘 50 mg
액상과당 10 mg
리보플라빈 10 mg
나트륨 10 mg
올리고당 5 mg
이산화탄소

배합예 3.

용량: 100 mL
제품유형: 내용액제제
성분:
백리향 추출 조시료(TV-3) 100 mg
겨자씨 조추출물 100 mg
백당 8.8%
포도당 5.8%
식염 0.05%
호박산이나트륨 0.05%
구연산 0.08%
CH-20 0.5%
안식향산나트륨 0.01%
에탄올 0.001%
니코틴산아미드 0.01%

Table 5-7. 백리향 및 겨자씨 함유 기능성 연질캡셀 제제의 배합예

배합예 1.

<p>단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품(연질캡셀)</p> <p>성분:</p> <ul style="list-style-type: none"> · 백리향 추출 조시료(TV-3) 100 mg · 소맥배아유 50% · 미강추출물 10% · 베타카로틴 3% · 레시틴 2% · 비타민 C 1% · 생강추출물, 계피분 기타. <p>권장섭취량 및 섭취방법</p> <ul style="list-style-type: none"> · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능
--

배합예 2.

<p>단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품(연질캡셀)</p> <p>성분:</p> <ul style="list-style-type: none"> · 겨자씨 추출 조시료 100 mg · 소맥배아유 30% · 미강유 20% · 대두박 추출물 3% · D-α-토코페롤 1% · 베타카로틴 3% · 레시틴 1% · 마늘, 생강추출물 기타. <p>권장섭취량 및 섭취방법</p> <ul style="list-style-type: none"> · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능
--

* 효능표시

- 공해와 스트레스에 지친 현대인, 노약자, 수험생, 병약자들의 면역증강과 건강유지

* 보존 및 유통기준

- 본 제품의 효능성분인 백리향 단백질은 공기접촉, 온도, 물리적 충격 등에 안정한 화합물로서 물질변화에 대한 위험이 전혀 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통상 바람직함.

Table 5-8. 백리향 함유 기능성 과립제제의 배합예

단위: 1포(5 g) 제품유형: 건강보조식품(과립제제)
성분: · 백리향 추출 조시료(TV-3) 300 mg · 옥수수 전분(부형제) : 3.5 g · 유당(부형제) : 0.65 g · 백당(감미제) : 0.5 g · 구연산(산미제) : 5 mg
권장섭취량 및 섭취방법 · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능

* 효능표시

- 공해와 스트레스에 지친 현대인, 노약자, 수험생, 병약자들의 면역증강과 건강유지

* 보존 및 유통기준

- 본 제품의 효능성분인 백리향 단백질은 공기접촉, 온도, 물리적 충격 등에 안정한 화합물로서 물질변화에 대한 위험이 전혀 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통상 바람직함.

Table 5-9. 백리향 함유 기능성 타정제제의 배합에

단위: 1정
제품유형: 건강보조식품(타정제)
성분:
· 백리향 추출 조시료(TV-3) 100 mg
· 무수유당(부형제) : 210 mg
· L-H.P.C.(부형제) : 38 mg
· 스테아린산 마그네슘(활택제) : 1 mg
권장섭취량 및 섭취방법
· 1일 3회, 1회 1-2 캡슐씩 식전 또는 식후에 섭취
· 필요에 따라 증감 가능

* 효능표시

- 공해와 스트레스에 지친 현대인, 노약자, 수험생, 병약자들의 면역증강과 건강유지

* 보존 및 유통기준

- 본 제품의 효능성분인 백리향 단백다당체는 공기접촉, 온도, 물리적 충격 등에 안정한 화합물로서 물질변화에 대한 위험이 전혀 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통상 바람직함.

5. 제품의 외관, 미생물 검사

본 제품들은 일종의 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속하므로 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가혹실험(고온, 고압)을 실시하여 제품의 안정성과 미생물검사를 실시하였다(Table 5-10, 11)

Table 5-10. 제품의 미생물검사

드링크제품 저장조건: 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
백리향 제품	1×10 ³ 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출
겨자씨 제품	1×10 ³ 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출

과립제품 저장조건 : 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
백리향 제품	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출
겨자씨 제품	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출

타정제품 저장조건: 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
백리향 제품	1×10 ² 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출
겨자씨 제품	1×10 ² 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출

Table 5-11. 제품들의 미생물검사

드링크제품 저장조건: 50℃, 1주일

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
백리향 제품	1×10 ³ 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출
겨자씨 제품	1×10 ³ 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출

과립제품 저장조건 : 50℃, 1주일

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
백리향 제품	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출
겨자씨 제품	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출

타정제품 저장조건: 50℃, 1주일

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
백리향 제품	1×10 ² 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출
겨자씨 제품	1×10 ² 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출

Table 5-12. 드링크제품들의 외관검사

드링크제품 저장조건 : 37℃, 1개월			
	침전물	이취	이미
백리향 제품	없음	없음	없음
겨자씨 제품	없음	없음	없음
드링크제품 저장조건: 50℃, 1주일			
	침전물	이취	이미
백리향 제품	없음	없음	없음
겨자씨 제품	없음	없음	없음

제 4 절 정향 함유 향응고활성 다당의 기능성 식품화

제 1 항 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 정향 원물은 향원 스파이스(Hyang Won spice co. LTD)사를 통해 구입한 홀랜드산 정향을 저온에서 보관하였으며 정향 추출물 2B와 2C는 Fig. 5-8의 방법에 의해 제조하여 사용하였다. 편육 제조를 위한 돼지고기는 최상급 국내산 등심으로 사당동 축협에서 당일 구입하였고 불고기 양념장 소스(이하 소스) 관능검사를 위한 동반 시료로서 쇠고기를 선정하여 불고기를 만들어 제공하였으며, 이때 사용된 쇠고기는 국내산 쇠고기로 우둔살 부위를 사당동 축협에서 당일 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 첨가량 및 조리량

정향 원물의 첨가량은 식품 조리시 첨가되는 수준인 0.2%로 정하였으며 정향 추출물의 첨가량은 정향 원물로부터 추출물의 수율을 감안하여 0.04%로 첨가하였다. 조리량은 25명의 패널이 2회 검사할 수 있는 양으로 각 군마다 1,000 g으로 정하였다.

Table 5-13. Amount of added clove and clove extract to boiled pork and Bulgogi sause

Sample names	Additives content(%)
Control	no additives
Clove	0.2% clove raw material
2B	0.04% clove extract
2C	0.04% clove extract

3. 편육 및 불고기 소스를 이용한 소비자 기호도 조사

가. 편육의 제조

편육용 돼지고기는 1,000 g은 이등분하고 찬물로 씻어 핏물을 제거하였다. 편육의 제조는 물 2,000 mL을 조리용 냄비에 넣고 끓기 시작하면 핏물이 제거된 돼지고기와 각각의 시료를 넣고 가스불에서 처음에는 센불에서 끓이다가 중불에서 50분간 조리하였다.

나. 불고기 소스의 제조

정향 추출물 및 정향 원물의 첨가 수준은 Table 5-13에서 명시한 것과 동일하게 첨가하였다. 끓인 양념장 소스는 물 1,000 mL에 대파 50 g, 마늘 50g, 생강 15g, 양파 50g, 통후추 8 g을 대조구로 하고 정향원물, 정향 추출물 EC-2B와 EC-2C를 각각 첨가하여 처음에는 센불에서 시작하여 끓으면 중불에서 40분 정도 끓였다. 이렇게 제조된 조제물 1컵을 계량한 후 간장 1컵과 혼합하여 끓인 양념소스를 조제하였다. 상기에 기술한 방법으로 조제된 끓인 양념소스 60 g에 다진파 1티스푼, 다진 마늘 1/2 티스푼, 설탕 15 cc를 넣어 양념한 불고기 양념장소스로 만들어 소고기 400g에 넣어 혼합하여 10분간 실온에서 방치한 후 밀면이 코팅된 후라이팬에 넣어 타지 않도록 잘 저어주면서 가열하였다.

다. 시료의 제공

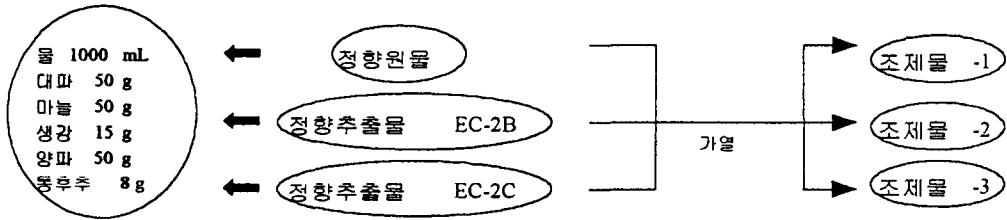
편육시료의 제공은 3자리 난수표에 의해 번호가 표시된 흰색 용기에 담아 4 cm × 5 cm, 두께 0.3 cm의 편육으로 절편 후 3쪽을 제시하였으며, 불고기 소스용 시료는 20 g씩 무작위로 추출된 3자리 번호가 표시된 흰색 접시에 담아 동시에 제공하였다.

라. 관능 검사

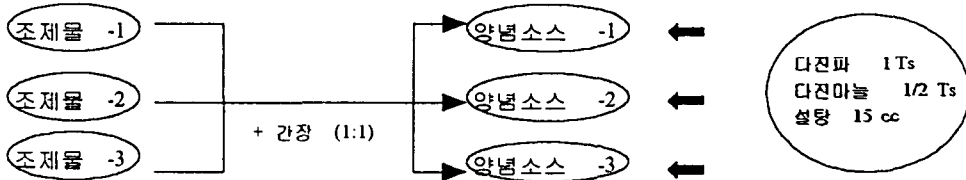
관능 검사에 참여한 25명의 패널은 수도요리학원 수강생 중 20대 후반의 여성집단을 선정하여 실시하였다. 소비자 패널은 검사 1시간 전 검사 방법에 대하여 설명한 후 제시된 검사물을 9점 기호도 척도법(최고 9점, 최저 1점)에 따라 좋아하는 정도를 표시하도록 지시하였으며 line scaling method를 이용해 순간적으로 느끼는 맛을 망각하기 전에 바로 질문지에 표현할 수 있도록 하였다. 시료의 번호에서 선입관을 없애기 위해 세자리 숫자의 난수표 번호 방식을 이용하였다. 검사항목은 향, 조직감, 전체적인 풍미, 전반적인 기호도로 하였다. 검사방법은 1회에 4종의 시료(대조군, 정향원물, 정향추출물 EC-2B, 정향추출물 EC-2C)를 전부 평가하였으며, 시료 사이 사이에는 무색, 무미, 무취의 물을 제공하여 입을 헹구도록 하였다. 소스의 짠맛을 고려하여 사이 사이의 짠맛을 가질 수 있도록 가장자리를 잘라낸 부드러운 식빵을 제공하였으며 한번 시료는 다시 맛볼 수 있도록 허용하였다. 검사의 결과에 대한 통계적인 유의성 검정은 SAS package의 분산분석법을 실시한 후, Duncan's multiple range test에 의해 검사물의 평균 점수를 비교하였다.

Schime 5-2 불고기 소스의 제조

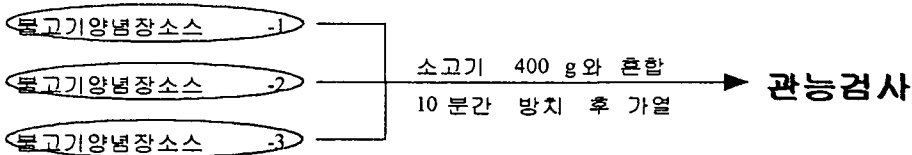
1. 조제물의 제조



2. 양념소스의 제조



3. 불고기의 제조



4. 연육 효과 측정

가. 시료의 제조

돼지고기에 대한 연육효과는 관능검사시 제공된 편육을 냉각하여 25 mm × 25 mm × 25 mm의 크기의 정육면체로 잘라 측정하였으며 쇠고기에 대한 연육 효과를 관찰하기 위해서는 불고기용으로는 얇게 썰은 소고기 400 g에 대해 불고기 양념소스를 각각 60 g씩 투입하여 손으로 버무려 2시간을 방치한 후 20 g 씩을 취하여 최대한 얇게 펴서 측정하였다.

나. 조직감

Texture Analyzer (TA, XT21 Stable Micro Systems Ltd., UK)를 사용하여 TPA (texture profile analysis) test를 실시하였다. 분석조건은 prespeed 5.00 mm/sec, test speed 0.5 mm/sec, post speed 10.0 mm/sec, time 2.00 sec에서 실시하였으며

strain은 40%였다. 사용된 cell은 15 mm의 원통모양이었다. 시료의 수분손실을 방지하면서 18℃에서 온도가 평형에 도달할 정도로 방치한 다음 측정에 사용하였다. 시료의 경도(hardness)는 첫 번째 bite에서 최고 값을 g으로 나타냈으며 탄성(springiness)는 두 번째 bite에서 최고 값에 이르는 시간을 첫 번째 bite에서 최고의 값에 이르는 시간으로 나눈 값으로 무차원 값이다. 측정은 각 시료별로 5회씩 평균을 구하였다.

5. 정향 추출물이 첨가된 소스의 천연 항균성 검사

가. 항균성 검사의 시료

검사시료는 기호도 검사시 불고기 양념소스를 이용하여 정향 추출물 첨가시의 보존성 향상 효과를 확인하였다.

나. 항균성 검사방법

항균성 검사는 식품공전에 준하여 실시하였으며 일반세균은 standard methods agar(Plate Count Agar) 배지에서 35±1℃에서 48시간 배양하여 생균수를 측정하였으며 대장균군 검사는 deoxycholate lactose agar 배지에서 35±1℃에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

다. 보존성 검사

불고기 소스의 정향 추출물 첨가시 저장기간의 연장효과를 확인하기 위하여 14일간 10℃와 37℃에서 각각 시료를 보관하면서 보존성 검사를 실시하였다.

6. 정향추출물이 첨가된 소스의 병원성 미생물에 대한 살균효과

가. Disc 확산법

Plate count agar 배지에 시험균주를 도말하고 멸균된 paper disc에 정향추출물을 1~0.001% 시료로 조제한 후 50 µL 접종하여 24시간 배양하였다. 시험균주를 영양배지(Nutrient Broth)에 접종하고 37℃에서 1~2일간 생육시킨 후 다시, 영양배지에 옮겨 18시간 배양하여 균주를 활성화시켜 사용하였으며 영양한천배지(Nutrien Agar)를 멸균하여 미리 조제한다. 시험시료를 6 mm disc에 0.5 mL씩 떨어뜨린 후 액이 충분히 흡수되도록 한 다음 조제한 영양한천배지에 활성화된 시험균주를 도말봉으로 도말하였다. 시험균주가 도말되어 준비된 배지에 시험시료를 떨어뜨린 disc를 올려 놓고 잘

누른 후 평판을 뒤집어서 37℃에서 1일간 배양한 다음 배양된 평판에서 disc 주위의 저해환의 생성 및 크기를 확인하였다.

나. 액상 MIC 시험법(시험관 희석법)

1) 시 료

시료는 정향 추출물 EC-2B와 EC-2C를 사용하였으며 시료는 농도는 1~0.001%에서 실시하였다.

2) 시험균주

그람음성균으로는 대장균(*E. coli* KCCM 11234), 녹농균(*P. aeruginosa* KCCM 11802), 살모넬라균(*S. typhimurium* KCCM 11806)를 사용하였으며 그람양성균으로는 황색포도구균(*S. aureus* KCCM 11812), 고초균(*B. subtilis* KCCM 11316)을 사용하였다. 상기 시험균주는 미리 멸균처리된 영양배지(Nutrient Broth)에 접종하고 37℃에서 1~2일간 생육시킨 다음 다시, 영양배지에 옮겨 18시간 배양하여 균주를 활성화시켜 사용하였다.

3) 실험 방법

멸균된 영양배지에 처리농도의 10배로 만들어진 시험시료를 무균적으로 여과하여 주입하였으며 처리농도별로 준비된 영양배지에 활성화된 시험균주액을 0.1 mL씩 접종하고 37℃에서 1일간 배양한다. 배양된 시험관 중에서 생육이 일어나지 않은 시험관의 최소농도를 MIC로 하였다.

제 2 항 결 과

1. 소비자 기호도 검사

정향의 이용은 유럽에서는 기원전부터 사용했고 중국에서는 한나라 때부터 사용한 것으로 기록되고 있다. 정향은 중국에서는 5대 향신료 중 하나이며 식품 이외 담배제조의 향 원료로 쓰이며 화장품 산업에서도 사용되고 있다. 식품에서 정향의 이용은 그 특유의 향을 이용하여 육류요리의 누린내 제거용으로 가장 많이 이용되고 있으므로 정향 추출물의 관능검사는 정향의 사용이 가장 많은 편육과 불고기 양념장 소스를 이용하여 실시하였다.

가. 편육에 대한 기호도

편육에 대한 소비자 기호도를 실시한 결과는 Table 5-14와 같았다. 색과 조직감에서는 시료간에 유의적 차이가 적었으나 향과 전반적인 기호도에서는 유의적인 차이가 나타났다. 향에서는 정향 원물 보다도 2B 군의 기호도가 높았으며 대조군과 EC-2C 군은 기호도가 매우 낮았다. 전반적인 기호도에서도 정향원물과 2B군에서는 유의적 차이가 없었으며 대조군은 누린내가 심하게 감지되었으며, EC-2C군은 약한 화학취가 감지되므로 낮은 기호도를 알 수 있었다. 정향은 정향 고유의 향으로 누린내 제거 효과 및 풍미 증진 효과를 가져와 기호도를 향상시키는 것을 알 수 있으며 정향으로부터 향응고 활성 핵분으로 분리된 EC-2B군은 정향과 동일하게 소비자 기호도를 증진시키는 것을 알 수 있었으며 EC-2C 핵분은 향응고 활성을 가지나 추출조작 중 생긴 화학적 이취로 인해 기호도가 저하됨을 알 수 있었다.

나. 소스의 기호도

소스에 대한 소비자 기호도를 실시한 결과는 Table 5-15과 같았다. 불고기 양념장 소스에서는 정향 원물의 기호도가 가장 높았으며 편육 기호도의 조사와 달리, 불고기에서는 control의 기호가 높았는데 이는 처리한 고기의 종류와 소스 제조시 첨가되는 부재료에 의해 정향 원료의 기능인 향미 증진효과가 감소된 것으로 추정된다. 정향 추출물 중 EC-2B는 그대로 편육에 적용할 때보다 소스에 적용하여 사용하면 기호도가 크게 감소하는데 이는 소스의 기타 첨가물과 우육과 돈육의 향 차이 등의 영향을 받기 때문이라고 생각된다.

Table 5-14. Scores of sensory properties of boiled pork by hedonic scale

Sample	2B	2C	Raw material	Control
Color	5	5.08	5.52	4.08
Flavor	5.04a	3.96a	4.88b	3.4a
Texture	5.04	5.2	5.64	4.32
Taste	5	4.6	5	3.64
Overall acceptability	5b	4.44ab	5.16b	3.52a

Table 5-15. Scores of sensory properties of *Bulgogi* sauce by hedonic scale

Sample	2B	2C	Raw material	Control
Flavor	4.80ab	4.52a	6.32c	5.44b
Texture	5.2	5.52	6.36	6
Taste	5.4	4.72	6.12	5.4
Overall acceptability	4.80a	4.48a	6.60c	5.64b

¹⁾Each value represented the mean of 25 observations using hedonic scale of 1(dislike extremely) to 9(like extremely).

²⁾Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$)

2. 정향의 연육 효과 측정 실험 결과

본 실험은 정향 원물 및 정향으로부터 EC-2B와 EC-2C 획분의 육류에 대한 연육 효과를 기계적인 수준에서 관찰할 목적으로 Texture Analyzer를 이용하여 경도와 탄성을 측정하였다.

돼지고기 편육의 경도와 탄성을 측정한 결과(Table 5-16) 대조구와 처리구 간의 일정한 경향을 발견할 수가 없었다. 경도의 경우 정향을 처리한 것이 가장 높게 나타났으며 EC-2B를 처리한 것이 가장 낮게 나타났다. 탄성의 경우 EC-2C를 처리한 것이 가장 높게 나타났으며 EC-2B를 처리한 것이 가장 낮게 나타났으나 유의적 차이는 보이지 않았다. 이 결과로 볼 때 편육의 물성은 정향 등의 첨가물의 유무보다는 염처리 온도 및 시간 등의 제조 조건에 더욱 영향을 받는 것으로 사료된다.

얇게 자른 소불고기에 대한 경도와 탄성을 측정한 결과(Table 5-17) 정향 원물, EC-2B, EC-2C의 연육효과에 대한 일정한 경향이 나타나지 않았다. 각각의 첨가구는 대조구와 다소 높은 경도를 나타냈다. 이와 같은 결과로 볼 때 표준 조리법에 따른 연육 및 불고기 조리시 연육 효과는 미미한 것으로 사료되며 정향 및 정향 분획물의 연육효과를 관찰하기 위해서는 가량의 변화 등의 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

Table 5-16. Evaluation of boiled pork to hardness and springiness

Parameters	Control	Clove	EC-2B	EC-2C
Hardness	8496.2	10387.1	7776.3	11626.6
Springiness	0.76	0.75	0.72	0.78

Table 5-17. Evaluation of Bulgogi to hardness and springiness

Parameters	Control	Clove	Ec-2B	EC-2C
Hardness	534.5	567.7	558.6	586.5
Springiness	0.71	0.74	0.67	0.74

3. 보존성 향상 효과

가. 편육의 보존성 향상 효과

편육은 제조된 직후 혹은 1~2일 이내에 소비되므로 정향 첨가 편육의 보존성 향상효과의 측정은 편육을 제조하여 상온에 4일 동안 보관하면서 일반세균과 대장균의 증식정도를 확인하였다. Fig. 5-9(A)의 결과로부터 정향 첨가에 의한 일반세균의 억제효과는 관찰할 수 없었으나 대장균에 대해서는 대조군(정향 무첨가)에 대하여 대장균의 증식이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 또한 정향으로부터 추출된 항응고 활성획분에서도 대장균의 증식이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이것은 편육제조시 정향 대신 추출물(EC-2B, EC-2C) 첨가시 항응고 활성과 동시에 대장균 억제효과도 기대할 수 있음을 알 수 있었다.

나. 소스의 보존성 향상 효과

불고기 양념장 소스는 현재 상업적으로 유통되는 장류의 일종으로 유통기간 중의 미생물에 의해 변질되는 경우가 많다. 따라서 소스 제조시 유통과정중의 변질을 억제하기 위하여 여러 가지 항균제가 첨가된다. 또한 소스 제조시 첨가되는 여러 가지 재료들(마늘, 양파등)에 의해서도 미생물의 생장이 억제된다. 따라서 본 실험은 불고기 양념장 소스 4종(대조구, 정향원물, 정향추출물 (EC-2B 및 EC-2C)을 제조하여 14일간 10℃ 냉장온도와 상온에서 보관하면서 대장균의 증식을 관찰하였다. Fig. 5-10의 결과에서 냉장온도에서 보관한 소스의 경우 정향을 첨가하지 않은 대조구에 비교

해 정향 첨가지 미생물수가 감소함을 알 수 있었으며 정향 추출물 EC-2B와 EC-2C 또한 미생물의 수가 감소함을 알 수 있었다. 또한 상온에서 보관하여도 시간 경과에 따라 미생물수가 감소하는 것을 알 수 있었다. 이것은 정향을 첨가하지 않은 대조구에서도 미생물의 증식은 억제되나 정향 첨가시 보존성이 증가하며 항응고 활성획분으로 추출된 정향추출물에서 또한 보존성 증가를 기대할 수 있어 저장기간이 경과함에 따라 제품의 안전성이 향상되는 것을 알 수 있었다.

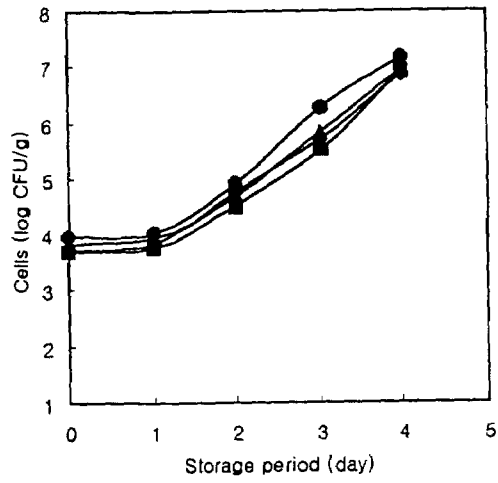
다. 정향시료 미생물 살균효과 실험

정향 및 정향추출물의 미생물에 대한 항균효과가 있음을 Fig.5-7에 의해 알 수 있었으므로 육류에서 쉽게 발견되는 병원성 미생물을 대상으로 항균효과를 확인하기 위하여 disc 확산법과 액상 MIC 시험법을 실시하였다.

Disc 확산법을 이용한 시험결과(Table 5-17, 18)에서와 같이 정향 추출물인 EC-2B와 EC-2C 모두 1% 이상에서 살균효과를 나타냄으로써 보다 정밀한 분석을 위하여 액상 MIC 시험을 실시하였다. 정향추출물 EC-2C의 경우 용해성 문제로 인하여 0.25%가 최고농도로 실험을 실시하였으며 음영으로 표시된 부분은 시험균주의 배양동안 생육을 1/2이하로 저해한 구간을 표시하였으며 정향시료 B의 경우 대장균과 녹농균은 0.25%, 살모넬라균은 1% 황색포도구균은 0.016% 이상에서 미생물의 생육을 저해하는 것으로 확인할 수 있었다.

정향시료 EC-2C의 경우 대장균과 녹농균은 0.004%에서도 생육 저해효과가 나타났고, 녹농균은 정향시료 B와 같이 0.25%이상에서 생육 저해효과를 확인할 수 있었다.

A



B

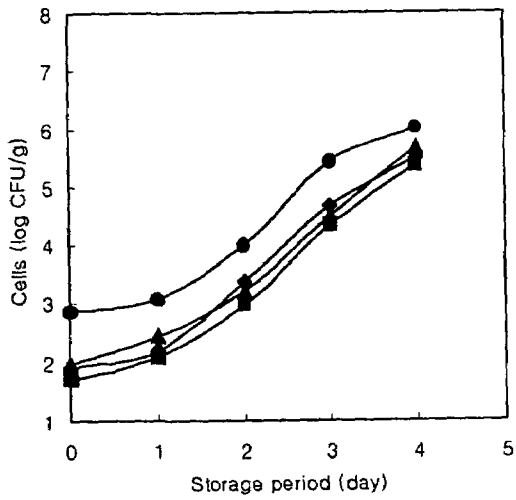
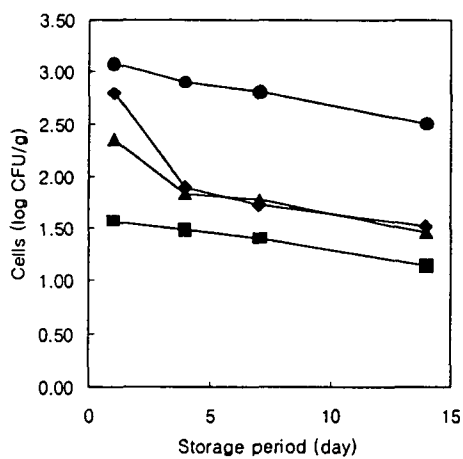


Fig. 5-9. Effects of clove on preservation of boiled pork

● : Control, ■ : Raw clove, ◆ : EC-2B, ▲ : EC-2C

A: Bacteria, B: *E. coli*

A



B

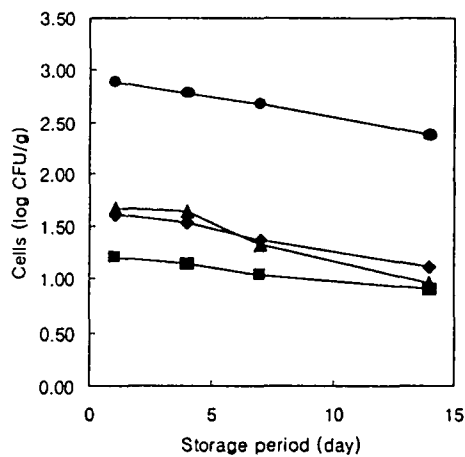


Fig. 5-10. Effects of clove on preservation of boiled pork

● : Control, ■ : Raw clove, ◆ : EC-2B, ▲ : EC-2C

A: Bacteria, B: *E. coli*

Table. 5-17. Anti-microbial effect of clove extract under MIC test

(Δ OD: 660nm)

		<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>	<i>St. aureus</i>
Control		0.577	0.749	1.095	0.497
EC-2B	0.004%	0.600	0.702	1.112	0.412
	0.016%	0.543	0.542	0.923	0.142
	0.06%	0.421	0.422	0.910	0.054
	0.25%	0.300	0.305	0.760	0.020
	1%	0.010	0.195	0.015	0.050
EC-2C	0.004%	0.280	0.658	1.008	0.047
	0.016%	0.131	0.558	0.890	0.053
	0.06%	0.075	0.483	0.771	0.035
	0.25%	0.076	0.375	0.755	0.030

Table. 5-18. Anti-microbial activity of clove extract by Disc diffusion method

(Unit: mm)

		<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
EC-2B	0.001%	-	-	-	-	-
	0.01%	-	-	-	-	-
	0.1%	-	-	-	-	-
	1%	8	10	8	8	8
EC-2C	0.001%	-	-	-	-	-
	0.01%	-	-	-	-	-
	0.1%	-	-	-	-	-
	1%	9	9	8	8	10

따라서 본 연구는 항응고 및 항균성이 있는 정향을 이용하여 혈전생성을 억제함과 동시에 정향의 독특하고 고유한 향으로 육류 및 생선의 좋지 못한 냄새를 제거하고 음식의 맛을 돋우고, 풍미를 줄 수 있는 소스를 제조하였다. 제조한 소스는 소비자 기호도 검사 및 기타 항균활성을 측정한 결과 우수한 성적을 보였을 뿐만 아니라 혈전생성 억제능을 가지고 있음을 확인하였다.

부 록

1. 발표논문

1997년 추계 학술발표 초록집

1997년 10월 18일 (트)
서울대학교 농업생명과학대학
(대형강의등)

■주 최 : 한국방화학회
■후 원 : 한국과학기술진흥협회
한국학술진흥재단

P-063

향신료 및 건강 채소로부터 항응고활성의 검색

이관순¹, 김미향¹, 이종민¹, 신바라², 김학민¹, 양원관¹

¹진주포스트 생애화학연구소, ²보통농촌진흥청연구소, 진주포스트 생애화학연구소

향신료란 사람의 취신감을 자극하고 특유의 방향을 느끼게 함으로써 식욕을 증진 시키거나 첨가할 때 감미효과를 나타내거나 식미효과를 나타내며 일부 인공적인 맛을 내는 목적으로 조리할 때 쓴다. 최근까지 향신료에 대한 소비자들의 인식은 미미하였으나 최근들의 관심과 수요 증가로 인해 새로운 식재료의 개발과 함께 향신료에 대한 관심이 급증하고 있다. 용도 개발의 초기에는 보편적인 이용되었으며 특유의 향으로 식욕증진 및 소화기장 향진제로, 최근에는 향산화제로 주목하고 심인병 예방 및 치료제를 대상으로 활발히 연구하고 있다. 본 연구는 5종의 주요 향신료인 43종의 서양 향신료 및 33종의 건강채소들을 대상으로 용매 추출법 적용 추출물의 항응고활성을 검색한 결과 정향, 즉, thyme, sage, oregano의 필수추출물이 높은 활성을 보였다. 이 5종의 향신료를 산, 알칼리 용액으로 추출한 결과 정향의 추출물이 가장 높은 활성을 나타냈으며 전체 과육에 수입되는 정향의 산지별 활성을 검색한 결과 네덜란드산 알칼리 추출물이 500 μg/ml의 용도에서 191초를 나타내며 항응고활성을 나타내었다. 네덜란드산 정향의 알칼리 용도와 추출농도별 활성의 항응고활성을 검색한 결과 1 N NaOH 용액으로 70℃에서 추출한 추출물의 항응고활성이 500 μg/ml의 용도에서 290초이었다.

P-064

쌀밥의 텍스처와 고형분 손실에 미치는 세미의 영향

김두은¹, 이종우¹
진주포스트 생애화학연구소

동진백미를 시프로 하고 세미과정이 쌀밥의 텍스처와 영양분 손실에 미치는 영향을 분석하였다. 시프 150g에 증류수 300ml를 가하고 수으로 가열계 5원프(2회/sec) 저어 이를 세미횟수 1회로 하고 5회까지 세미한 후 1.6배의 물을 넣고 취반한 후 Texture analyser를 사용하여 취반한 밥의 텍스처를 측정하였다. 세미횟수에 따른 hardness(H)는 유의적인 차이($\alpha=0.01$)를 보이면서 감소하는 경향을 나타내는데, 대조구의 hardness는 3.83kg이었으나, 5회 세미후 취반시에는 2.13kg으로 감소하였다. 한편, 대조구의 adhesiveness(-H)는 0.31kg이었으나 5회 세미후 취반시에는 0.44kg으로 증가하는 경향을 보였다. 세미후 곡역중의 총보형분 손실은 5회 세미시 2.66%로 나타났다. 5회의 세미과정중 sucrose의 양은 19% 감소하였고 glucose와 fructose는 각각 35%, 12% 감소하였다.

1997년도 한국식품과학회

정기총회 및 제59차 학술발표회
진행표 및 발표논문 초록집

일 시 : 1997년 11월 1일(토)

장 소 : 덕성여자대학교 학생회관 및 대강의동



한 국 식 품 과 학 회

PB108 일부 식물체로부터 aldose reductase저해활성의 탐색

김혜영*, 권미라, 오종환¹
한국식품개발연구원 이화학연구부, ¹임업연구원 임산화학과

당뇨병으로 인한 합병증을 예방하거나 조절할 수 있는 의약품 혹은 식품 소재를 탐색하기 위하여, 50종의 국내산 식물체로부터 polyol pathway의 rate-limiting enzyme인 aldose reductase 저해활성을 검색하였다. 식물체 ethanol 추출물을 0.025-0.001mg/ml의 농도(0.389mL) 취 수정체 aldose reductase, 100mM lithium sulfate, 0.03mM NADPH, 0.05mM DL-glyceraldehyde, 135mM Na, K-phosphate buffer(pH 7.0)의 반응계에 첨가하여, 저해활성을 측정하였다. 그 결과 AR-081 ethanol 추출물이 IC₅₀ 1.06µg/ml로 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 이는 기존의 알려진 의약품인 tolrestat의 IC₅₀ 9.79 µg/ml과 비교할 때, crude extract로서는 높은 저해활성이라고 평가된다. AR-081은 aldose reductase에 대하여 가역적이며 비경쟁적인(noncompetitive) 저해제로 작용하였다.

PB109 향신채소 함유 항산화활성물질의 검색

권희*, 권미향¹, 신동준, 조충연, 양한철
고려대학교 생명공학과, ¹고려대학교 생명공학연구소

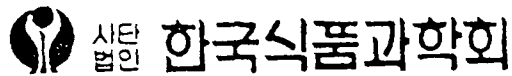
브체리는 인체의 면역계에서 체액성 면역을 담당하는 일련의 단백질로서 옴소닌작용, 항염작용, 면역세포 활성화 등의 중요한 역할을 하고 있다. 항산화활성물질은 이들 브체리를 활성화시켜 면역 관련 질환에 이환가능성을 가지고 있다. 으래 진부터 향신채소는 민간요법제로서 소화촉진, 살균, 진해, 구충, 강장, 이뇨 등에 사용되어 왔으며 음식의 맛과 향을 들구는데 이용되었다. 구미에서는 휘발성분과 정유성분의 여러 약리작용에 대해서 연구가 이루어져 왔지만 면역계 증강물질로서의 항산화활성물질에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 본 연구는 향신채소 중 항산화활성을 검색하기 위해 용매의 극성도에 따른 계층추출 후, 각획분에 대한 활성을 검색한 결과 후추(후), 산초, 백리향, 박살이 1차 검색되었고 이들 시료에 대해서 추출조건별 활성을 2차 검색하였다. 2차 검색 결과 백리향의 열수추출액은 1 µg/ml에서 92%의 ITC₅₀ 값을 나타내 활성이 가장 높았다.

1998년도 한국식품과학회

창립 30주년 기념 심포지움,
제 61차 학술발표회 및 정기총회

1998년 11월 6일(금)~7일(토)

이화여자대학교 이화·삼성교육문화관



후 원 : 한국과학기술단체총연합회, 한국학술진흥재단

P7-23

백리향(*Thymus vulgaris* L.)에서의 항산화 활성물질의 검색

전택*, 권미향¹, 신동준, 조종연, 양한철
고려대학교 생명공학원, 고려대학교 생명공학연구소

항산화활성물질로 향신채소류에서 검색한 백리향(*Thymus vulgaris* L.) 열수추출물을 ethanol 침전과 한외여과를 통해서 분리하여 조단백다당인 TV-3을 DEAE-Toyopearl에서 정제한 결과 0.3M NaCl에서 용출되는 TV-3-3이 활성이 가장 높았고 이를 다시 Butyl-Toyopearl로 정제한 결과 1.0 M Ammonium sulfate에서 용출되는 TV-3-3-I과 0 M에서 용출되는 TV-3-3-II가 활성을 나타내었으며 Sepharose CL-6B를 통해서 분획한 결과 TV-3-3-I은 4개의 펩톤(-1a, -1b, -1c, -1d)으로 나뉘어졌으며 이중 다당인 TV-3-3-1b가 활성이 높았다. TV-3-3-II는 2개의 펩톤(-IIa, -IIb)으로 분리되어 당단백인 TV-3-3-IIa가 활성을 나타내었다. 이들 각각을 HPLC를 통해서 확인한 결과 TV-3-3-1b는 3개의 펩톤으로 나타났으며 주펩톤인 TV-3-3-1b-1의 분자량은 8,000정도의 다당으로 확인되었고 TV-3-3-IIa는 분자량 15,000정도의 당단백으로 확인되었다. TV-3-3-1b-1은 GC-MS, NMR, IR을 통해서 TV-3-3-IIa는 아미노산 분석기로 분석하였다.

P7-24

로즈마리(*Rosemarinus officinalis* L.)추출물의 항산화 효과에 관한 연구

장영삼*, 이서우¹, 노창식²
충부대학교 식품생명공학과, ¹국립기술품질원, ²향원스파이스(주)

Rosemary 중 몇가지 향신료로부터 항산화성 물질을 추출하여 정제한 후 수용성, 수용성 및 분말상 항산화물질(ANTOX)을 제조하였다. 제조한 ANTOX를 식품유지 및 유지함유 식품에 첨가하여 이화학적특성,가열안정성 및 저장안정성 등 향신료효과를 비교검토한 결과, rosemary추출물이 rancimat에 의한 유도기간이 16.9로 AI(Antioxidant Index)값이 가장높게 나타났으며, 탈취정제과정에 따라 Refined Rosemary Extract (RRE)을 제조할 때 200℃에 정제하는 것이 AV, POV, AI, Flavor에서 가장바람직한 결과를 얻었다. 제조한 RRE를 가공식품에 적용력을 높이기 위하여 액상형의 지용성 항산화물(ANTOX-D),액상형의 수용성 항산화물(ANTOX-DF),분말형의 수용성 항산화물(ANTOX-PD)을 각각 개발하였다. Palm oil의 가열 안정성은 ANTOX500ppm을 첨가하여 180℃ 30시간 frying시, POV값은 ANTOX>tocopherol>BHT의 순으로 항산화력이 우수하였다. ANTOX에 ascorbyl palmitate(AP), phosphoric acid(PA), citric acid(CA) 등 chelating agent를 첨가하여 synergist효과를 보았을 때, ANTOX 300 및 500ppm + PA 30ppm 첨가할에서 항산화력이 상승되었다. 라면에 대한 항산화효과는 frying time 경과시 AV값의 상승은 물론 유도기간의 감소현상을 볼 수 있었으며 그 중 ANTOX 첨가시 tocopherol, BHT보다 가열 안정성을 기대할 수 있었다.

1998년도 한국식품과학회 · 한국식품영양과학회

춘계 공동 학술발표회 및 총회

1998년 5월30일(토)

부산대학교 본관



사단 한국 식품 과학 회
법인

KFN 사단 한국 식품 영양 과학 회
법인

후 원 : 한국 과학 기술 단 계 증 연 합 회

P11-39

향신채소로부터 angiotensin converting enzyme 저해성분의 분획

육진수* · 임영희 · 신동훈 · 조홍연 · 양한철
고려대학교 생명공학원

Angiotensin converting enzyme (ACE)은 angiotensin I을 가수분해하여 활성형 혈압상승 물질인 angiotensin II를 생성시킴으로써 혈압을 상승시키는 역할을 한다. 발표자들은 활성이 높은 ACE 저해물질을 식용식물로부터 분리하고 이를 소재화하기 위해 총 120여종의 향신채소를 중심으로 저해활성을 검색하였다. 각 시료를 hexane, acetone, methanol, 물의 순서로 용매 계통추출을 행한 후 추출물의 저해활성을 1차 검색한 결과 높은 저해효과를 나타낸 7종의 시료(고추, 냉이, 달래, 부추, 패설, 차이브스, 및 겨자씨)를 선정하였다. 이들을 대상으로 2차 검색한 결과 겨자씨(*Sinapis alba* L.) 추출물이 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내었다. 균일하게 파쇄한 겨자씨 분말을 hexane, 물로 순차적으로 추출하여 동결건조시킨 추출물을 H₂O : butanol(1:1) 용액으로 분획한 결과 butanol 획득의 저해활성이 약 3배 증가함을 보였다. 상동화된 ACE 저해제인 epigallocatechin gallate (EGCG) 및 enalapril를 동일 assay계를 이용하여 ACE 활성을 50% 저해시킬 수 있는 양을 측정, 비교한 결과 겨자씨의 butanol 획득 20 µg/ml, EGCG 182 µg/ml, enalapril 0.024 µg/ml을 나타냄으로써 겨자씨 butanol 획득은 시판 EGCG 보다 약 9배 높은 저해활성을 나타내었다.

P11-40

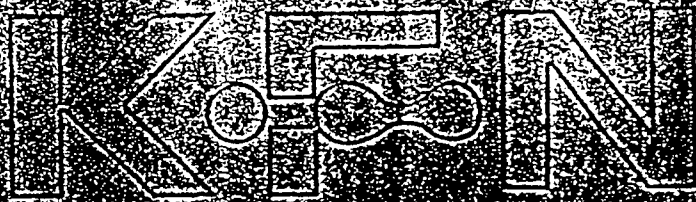
대두 saponin이 정상대장세포와 대장암세포 성장에 미치는 영향에 관한 연구

김성은 · 성미경*
숙명여자대학교 식품영양학과

여러 역학연구에 의하면 두류의 소비가 많은 극동 아시아 지역에서는 서구 지역에 비해 대장암의 발병률이 낮은 것으로 보고되고 있고, 이는 두류에 함유된 각종 성분의 항암작용에 기인한 것으로 보인다. 이에 본 연구에서 대두에 함유되어 있는 비영양화합물 중 saponin이 지니고 있는 항암효과 기전 및 정상세포에 대한 독성여부를 알아보기 위해 인체 대장암세포(HT-29)를 대두 saponin과 3일 동안 배양하여 세포성장을 측정하였다. 그 결과 200, 400, 800 µg/plate의 농도에서 48시간 후 20.4, 45.6, 90.4%의 성장저해 효과를($p < 0.001$), 또한 72시간 후에는 각각 84.1, 90.4, 92.9%의 성장저해 효과를 나타내었다($p < 0.0001$). ODC 활성은 대장암세포를 48시간 동안 배양시킨 후 200, 400, 800 µg/plate의 saponin 농도에서 대조군에 비해 각각 23.8, 47.8, 93.9%로 감소하였고($p < 0.05$), 72시간 동안 배양시킨 후에는 각각 87.4, 91.4, 96.0%로 감소하였다($p < 0.0001$). 반면 정상대장세포(CCD-18Co)는 배양시간과 saponin 농도에 따른 세포성장이나 ODC 활성의 변화에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 한편 대장암세포의 성장저해 효과가 ODC 활성감소에 의한 것인지를 검증한 결과 두 변인 간에 높은 상관관계($r^2 = 0.79$, $p < 0.0001$)가 나타났다. 본 연구결과 대두 saponin은 암세포에 대한 선택적 성장저해효과를 보임으로써 우수한 자연항암물질임이 입증되었다.

1998년 한국식품영양과학회
제44차 주계 학술발표회 및 정기총회

당뇨와 영양



- 일시 : 1998년 11월 21일 (토) 09:30 ~ 16:30
- 장소 : 목포대학교 교수회관
- 주최 : 한국식품영양과학회
- 후원 : 한국화물진흥재단, 한국과학기술단체총연합회, 목포대학교 식품산업기술연구소
- 협찬 : 목포대학교, 보해양조(주)

K-F-N 대한 한국식품영양과학회 발간 년 월 일

KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION

P11-39

아출(*Curcuma zedoaria*)추출물의 면역세포활성화에 관한 연구

김정임^{*} · 신광순¹ · 홍남식 · 양한철
고려대학교 생명공학원, ¹경기대학교 식품생명공학과

생체내 면역반응 중 항체가 생성되기 이전에 비특이적으로 즉각 반응할 수 있으며 생체방어 기구 초기단계에 작용하는 세포단으로 알려진 대식세포(macrophage)는 강한 탐식능과 운동성을 소유한 단핵세포이다. 이러한 대식세포의 활성능을 mouse peritoneal macrophage 실험계를 이용하여 천연물중에서 검색한 결과 가장 높은 활성을 보인 아출(*Curcuma zedoaria*)을 선별하였다. 아출의 열수추출 후 조다량 희분인 CZ-1의 마우스에 미치는 독성을 측정된 결과 꼬리장력 및 구강투여시 각각 최대량도인 1000 mg/kg BW의 농도와 2000 mg/kg BW의 농도에서도 전혀 독성을 나타내지 않았다. 또한 CZ-1에 대하여 Ion chromatography를 행한 결과 CZ-1-III, CZ-1-IV의 두 활성분자를 얻었다. CZ-1-III와 CZ-1-IV를 각각 소수성 이온교환수지와 gel permeation을 실시하여 활성분자인 CZ-1-IIIb, CZ-1-IV-1b를 얻었으며 계속해서 HPLC를 실시한 결과 이들이 단일 물질로 정제되었음을 확인하였다.

P11-40

항보체 활성물질의 항암기전에 관한 연구

전 혁^{*} · 권미향¹ · 신동훈 · 조충연 · 양한철
고려대학교 생명공학원, ¹고려대학교 생명공학연구소

항신채소로부터 항보체 활성을 검색한 결과 백리향(*Thymus vulgaris* L.) 열수 추출물에서 활성이 가장 높게 나타나 정제하였다. 항보체 활성의 면역 부활 작용을 확인하기 위해서 Sarcoma-180에 의해서 고형암을 유발한 마우스를 대상으로 부분 정제물(TV-3)을 복강 투여하여 고형암 저지율을 조사한 결과 10 mg/kg/BW의 투여량 이하에서 ED₅₀이 나타났고 항암 활성 기전을 조사하기 위해서 단기독성을 경구와 비경구 투여를 통해서 조사한 결과 1000 mg/kg/BW이상에서 LD50이 존재할 것으로 사료되었고 MTT법을 사용하여 세포독성을 측정된 결과 세포독성은 400 ppm의 농도에서도 나타나지 않아 시료에 의한 독성이 없는 것을 확인하였고 시료의 투여에 의한 복강내 면역세포수의 변화를 총복강 세포수, macrophage 수, PMN 수를 대상으로 실험한 결과 시료 투여 후 2일째에 가장 높은 수를 유지하였고 특히 macrophage는 7일째 까지 높은 수로 유지가 되었다. Macrophage의 sarcoma-180 cell에 대한 탐식능을 측정된 결과 정제도가 증가됨에 따라서 50% 정도의 탐식능 증가를 보였으며 macrophage의 lysosomal phosphatase 활성과 브체계 내에서의 활성화 경로를 실험한 결과 백리향 열수 추출물은 면역 부활 작용을 갖는 것으로 판단되었다.

1998년 한국식품영양과학회
제44차 주계 학술발표회 및 정기총회

당뇨와 영양

KFSN

- 일시: 1998년 11월 21일(토) 09:30 ~ 16:30
- 장소: 목포대학교 교수회관
- 주최: 한국식품영양과학회
- 후원: 한국학술진흥재단, 한국과학기술단체총연합회,
목포대학교 식품산업기술연구센터
- 협찬: 목포대학교, 보해양조(주)

KFSN 사단 한국식품영양과학회
법인 한국식품영양학회

KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION

P11-37

정향추출물의 항응고 활성에 관한 연구

이현순¹, 이종일¹, 신동찬¹, 조충연¹, 양한철¹
고려대학교 생명공학연구소, ¹고려대학교 생명공학원

근래 개인의 식문화가 다양화 되고 있어 지금까지 상소했던 많은 의류 향신채소에 대한 관심이 증가되고 있다. 향신채소로부터 항응고 활성의 검색 결과 가장 높은 활성을 보인 정향(*Eugenia caryophyllate* : clove)의 부분 정제 추출물(EC-2B, EC-2C)을 혈소판 응집억제능과 항응고 활성을 측정하였다. EC-2C는 EC-2B 보다 낮은 혈소판 응집억제능을 가지고 있었으며 EC-2C는 *in vitro*에서 내인성 경로와 공통경로에 모두 항응고 활성을 갖고있는 반면 EC-2B는 공통 경로에서만 항응고 활성을 나타내었다. 마우스에 미치는 독성을 측정할 EC-2C는 꼬리정맥 투여시 125 mg/kg에서부터 독성을 나타내었다. 이 두 화분의 *ex-vivo*에서의 항응고활성을 측정할 후 마우스 모델에서의 항응고 활성을 *in vivo*로 측정할 결과 50% 이상의 생존율을 갖는 dose(mg/kg)가 EC-2B 화분은 125 mg/kg인데 비해 EC-2C는 74 mg/kg로 활성의 차이가 *in vitro*에서 보다 크게 나타났으며 항응고 활성은 생체내에서 24시간 이내의 반감기를 가지고 있었다. 이 두 화분을 sulfation후 항응고 활성을 측정할 결과 혈소판 응집억제능은 감소한 반면 항응고 활성은 증가함을 알 수 있었다.

P11-38

참도박 추출물로부터의 항응고 활성 *in vitro* · *in vivo*상에서의 검색

윤진아¹, 권미향¹, 조충연¹, 양한철¹
고려대학교 자연자원대학원, ¹고려대학교 생명공학원

국내산 해조류 50여종류를 구입 · 채취하여 cold water, hexane, acetone, hot water로 계통 추출 후 항응고 활성을 검색할결과 가장 높은 활성을 나타낸 속초산 참도박을 대상으로 대량 추출 하였다. 참도박을 용매별 검색 결과 100℃에서 3시간 열수추출하여 ethanol 70%침전물(PE-2)을 가지고 ICR계 5주령 mouse 수컷을 1주일간 adaptation시킨 후 *in vivo* 실험을 실시 하였다. 참도박 열수 추출물(PE-2)로 급성 독성 실험 결과 구강투여시는 독성을 보이는 실험 수가 없었으며 꼬리정맥 주사시에는 500mg/kg 투여시 40%의 생존율을 보였다. 또한 아만성 경구투여시에도 독성을 보이지 않았다. 꼬리 정맥주사로 80%의 사망률을 보이는 thrombin 투여량을 대조구로 하여 실시한 항 치사성 실험 결과 PE-2 250mg/kg 투여시 100%의 생존율을 보였다. 항응고 활성을 *in vivo* 에서 측정할 결과 예서는 정맥 주사에 의한 투여시 시료량에 비례하여 mouse의 혈액응고 시간이 지연됨을 나타냈다.


1999년도 식품관련학회

춘계 연합학술대회 논문초록집

1999년 6월 4일(금)~5일(토)

고려대학교 과학도서관 및 이공관

주최 : 한국산업식품공학회, 한국식품과학회
한국식품영양과학회, 한국식품위생·안전성학회
한국조리과학회

주관 :  한국식품과학회

후원 : 한국과학기술단체총연합회

P11-47s

참도박에서 분리한 보체계 활성화 다당류의 정제

이선화*, 신동환*, 조충연*, 양한철*
고려대학교 자연자원대학원 식품공학부, *고려대학교 생명공학원

보체계는 체액성 면역에 속하며 고전적 경로와 부경로를 통해 활성화된다. 본 연구에서는 보체계를 활성화시키는 항보체활성을 72종의 해조류를 대상으로 검색하였으며 그 결과 참도박 열수 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 선정된 참도박으로부터 항보체 활성 물질을 분리하기 위하여 참도박 100 g을 100°C에서 3회 열수 추출후 ethanol 침전을 통해 고분자 물질을 분리하고 재 용해하여 한외여과를 실시한 결과 분자량 300 KDa이상의 분획에서 71%의 높은 활성을 보였다. 한외여과에서 분리된 조단백다당류를 DEAE-Toyopearl ion exchange chromatography와 Sepharose CL-6B gel permeation chromatography, HPLC를 이용하여 순차적으로 정제를 수행하였다. 조단백다당류획분의 항보체 활성분체를 pronase 소화와 periodate 산화를 통하여 확인한 결과 활성 분체는 다당류로 확인되었고 투성실험과 sarcoma-180에 대한 항종양 활성을 검토하였다.

P11-48s

정향추출물의 항응고 활성물질에 관한 연구

이현순*, 이종임*, 신동환*, 조충연*, 양한철*
고려대학교 생명공학연구소, *고려대학교 생명공학원

항신채소중 가장 높은 항응고 활성을 보인 정향(clove)으로부터 알칼리 추출(EC-0)후 에탄올 침전(EC-1), cetavlon(EC-2), 한외여과(EC-2C) 처리를 거쳐 부분 정제물 EC-2C를 얻었다. EC-2C 획분을 Butyl-Toyopearl 650M(EC-2C-I), Sephadex G-100 (EC-2C-I-I), 및 Sepharose CL-6B를 사용하여 단일 물질로 추정되는 EC-2C-I-I-II를 얻었으며 이 물질의 정제도를 HPLC로 재확인하였다. EC-2C-I-I-II 물질의 수율은 1.85%, 항응고활성은 100 μ g/ml의 농도에서 83.6초였으며, 8%의 단백질을 함유한 다당체로 주 구성당은 arabinose와 galactose이었고 분자량은 약 90kDa으로 추정되었다. EC-2C-I-I-II 획분의 당쇄결합을 GC-MS로 분석하였으며 Yariv reagent에 침전하는 것으로 보아 구조 중에 arabinogalactan type II의 구조가 있음을 추정할 수 있었다. EC-2C-I-I-II 획분을 산 가수분해하여 6개의 획분으로 분획한 후 각 획분의 당쇄구조분석, Yariv antigen precipitation, β -elimination을 실시하여 EC-2C-I-I-I 물질의 부분 구조분석을 실시하였다.

1999년도 한국식품과학회

제63차 정기총회 및 학술발표회

1999년 10월 30일(토)

경희대학교 수원캠퍼스 멀티미디어교육관



사단
법인

한국식품과학회

- P7-36 Antioxidative activity of polyphenolic compounds isolated from *Paeonia lactiflora* seeds
 Hyo-Jin Kim*, Eun-Ju Chang, Shin-Kyo Chung¹ and Sang-Won Choi
 (Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Taegu-Hyosung
¹Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University)
- P7-37 Antioxidative activity of polyphenolic compounds isolated from roasted Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds
 Ga-Hwa Kang*, Eun-Ju Chang, Jun-Young Lee and Sang-Won Choi
 (Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Taegu-Hyosung
¹Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University)
- P7-38 정향으로부터 분리한 펙틴성 다당의 항응고 활성에 관한 연구
 이현순*, 이종임¹, 신동훈¹, 조홍연¹, 양한철¹
 (*고려대학교 생명공학연구소, ¹고려대학교 생경공학원)
- P7-39 Iron 관련 지방산화에 미치는 천연추출물과 항산화제의 복합처리효과
 김수민*, 조영식¹, 성삼경¹(경산대학교 생명자원공학부, ¹영남대학교 식품가공학과)
- P7-40 Chitosan 첨가식이 수은에 노출된 흰쥐체내의 수은축적 완화 효과
 장문익*, 이시경¹, 김성조², 백승화¹
 (식품의약품안전청 유해중금속과, ¹건국대학교 농화학과, ²원광대학교 농화학과,
³충북도립옥천대학 식품공업과)
- P7-41 *Yersinia enterocolitica*의 선택적 배양생리 특성
 신지영*, 구영조¹, 김창민², 박중현
 (경원대학교, ¹한국식품개발연구원, ²식품의약품안전청)
- P7-42 Hypolipidemic Effects of Amaranth (*Amaranthus esculantus*) in Rats Fed High Cholesterol Diet
 Y.J.Chang*, H.J.Heo, Y.K.Chung, S.C.Hong, H.Y.Cho, H.K.Kim¹, D.H.Shin, H.C.Yang
 (*Graduate school of biotechnology, Korea University, Seoul, 136-701, Korea
¹Dept. of Food Biotechnology, Hanseo University, Choongnam, 356-820, Korea)
- P7-43 고삼으로부터 분리한 천연보존물질에 관한 연구
 김희연*, 이영자, 홍기형, 이주연, 하상철¹, 조홍연², 이철원, 김길성
 (식품의약품안전청 식품첨가물평가부 천연첨가물과, ¹대구미래대학 호텔조리과,
²고려대학교 생명공학원)
- P7-44 청각으로부터 분리한 혈액 응고억제성 다당류
 심운영*, 조홍연¹, 양한철¹(*고려대학교 자연자원대학원, ¹고려대학교 생명공학원)