



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

항산화성 천연화합물이  
neuraminidase 및 superoxide  
dismutase와 catalase의 활성에  
미치는 영향

濟州大學校 大學院

食品工學科

李 海 遠

2011年 2月

항산화성 천연화합물이 neuraminidase 및  
superoxide dismutase와 catalase의 활성에  
미치는 영향

指導教授 高 榮 煥

李 海 遠

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

李海遠의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 河 璉 桓

委 員 朴 恩 珍

委 員 高 榮 煥

濟州大學校 大學院

2011 年 2月

# Effects of natural antioxidant compounds on the activities of neuraminidase, superoxide dismutase and catalase

Hae-Won Lee  
(Supervised by professor Young-Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the  
degree of Master of Engineering

2011. 02.

This thesis has been examined and approved.

Jin-Hwan Ha, Thesis director, Prof of Food Science and Engineering

Eun-Jin Park, Prof. of Food Science and Engineering

Young-Hwan Ko, Prof. of Food Science and Engineering

February 2011

Department of Food Science and Engineering

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

Abstract .....	1
I. 향산화성 flavonoid의 neuraminidase 저해 능력 .....	3
1. 서 론 .....	3
2. 재료 및 방법 .....	4
2.1. Bacterial neuraminidase inhibition assay .....	4
2.1.1. 실험 재료 .....	5
2.1.2. 분석 방법 .....	7
2.2. 파슬리 추출 .....	9
2.3. 총 폴리페놀 함량 분석 .....	9
2.4. 총 플라보노이드 분석 .....	9
2.5. Viral neuraminidase inhibition assay .....	10
2.5.1. 실험 재료 .....	10
2.5.2. 분석 방법 .....	11
2.6. apigenin 함량 분석 .....	12
2.7. Apigenin 추정 peak의 질량분석 .....	12
2.8. 통계처리 .....	14
3. 결과 및 고찰 .....	14
3.1. Bacterial neuraminidase 활성 저해 .....	14
3.2. 추출 시간에 따른 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 변화 .....	18
3.3. Viral neuraminidase 활성 저해 .....	22
3.4. 파슬리의 apigenin 함량 .....	26
3.5. Apigenin 추정 peak의 질량 확인 .....	30

II. 항산화성 천연화합물의 superoxide dismutase, catalase 촉진 능력 .....	33
1. 서 론 .....	33
2. 재료 및 방법 .....	35
2.1. ascorbic acid와 $\alpha$ -tocopherol의 SOD와 CAT 생성에 미치는 영향 .....	35
2.1.1. 실험동물 사육 및 식이 .....	35
2.1.2. 스트레스 유발 및 항산화제의 처리 .....	35
2.1.3. SOD와 CAT의 효소활성 측정 .....	36
2.2. 식물성 항산화 물질의 SOD와 CAT 생성에 미치는 영향 .....	36
2.2.1. 식물 추출물 시료의 제조 .....	36
2.2.2. 스트레스 유발 및 시료의 투여 .....	37
2.2.3. 체중과 장기 무게 측정 .....	37
2.2.4. 장기적출 및 채혈 .....	38
2.2.5. 혈청과 liver homogenate 제조 .....	38
2.2.6. SOD 활성 측정 .....	38
2.2.7. CAT 활성 측정 .....	39
2.2.8. 혈청 화학 검사 .....	39
2.2.9. 통계처리 .....	39
3. 결과 및 고찰 .....	40
3.1. ascorbic acid와 $\alpha$ -tocopherol의 SOD와 CAT 생성에 미치는 영향 .....	40
3.2. 체중의 변화 .....	41
3.3. 간, 비장, 신장의 무게 .....	44
3.4. SOD 활성 .....	48
3.5. CAT 활성 .....	51
3.6. 혈당량 .....	55
3.7. glutamic oxaloacetic transaminase 활성 .....	56

3.8. glutamic pyruvic transaminase 활성 .....57

III. 요약 .....60

IV. 참고문헌 .....62



## Abstract

Effects of flavonoid compounds and 70% ethanol extract of a parsley (*Petroselinum crispum*), known have rich with apigenin, on viral and bacterial neuraminidase activity were investigated.

Most of polyphenolic and flavonoid compounds from a parsley were extracted within 1 hour of extraction with 70% ethanol.

Flavonoid compounds inhibited bacterial neuraminidase, but interpretation of the data needs caution due to the experimental standard errors. Among those apigenin and zanamivir showed relatively higher enzyme inhibition ratio.

Apigenin showed higher inhibition activity against viral neuraminidase than zanamivir, a flu medicine. Ethanol extract of a parsley also inhibited viral neuraminidase as zanamivir did.

Apigenin was suggested to exist as apigenin, a glycoside form, in parsley. Its ethanol extract was hydrolyzed by acid, and the hydrolysate was analyzed by high pressure liquid chromatography(HPLC). The ethanol extract was found to contain apigenin 55  $\mu\text{g}/\text{mg}$  based on HPLC chromatogram. Mass spectra of the acid hydrolysate showed peaks at 270.9 and 272.1  $m/z$  corresponding to apigenin.

High pressure-solvent extracts of such plants as *Rhus chinensis*, *Malus sieboldii* and *Ostrya japonica*, containing antioxidative polyphenol compounds were examined for their in vivo effects on superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) level using 6-week old Sprague-Dawley(SD) rat.

Body and organ weights of rats, fed with AAPH[2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride] alone or with AAPH and plant extracts, decreased being compared with those of rats fed with normal diet.

SOD levels in blood serum and liver increased when AAPH was administered, and these increases were not reversed by feeding any of the plant extracts. On the contrary, plant extracts showed tendency of increasing SOD level.

CAT levels in blood serum and liver were higher in rats fed with AAPH than in rats fed with normal diet. These increases were reversed by feeding the plant extracts of *Rhus chinensis* or *Ostrya japonica*.

Even though CAT levels in blood serum increased, when rats were fed with ethanol, administration of an antioxidant, ascorbic acid or tocopherol, made the CAT levels drop.

# I. 항산화성 천연화합물의 neuraminidase 저해 능력

## 1. 서 론

Orthomyxoviridae 계통인 influenza virus는 10년에서 40년 주기로 세계적으로 유행을 일으키는 급성 호흡기 질환을 유발하고 숙주 세포 침투 시 neuraminidase를 활용하는 고 전염성 virus로 잠복기간을 1~5일 간의 가진 후 고열과 근육통, 두통, 오한, 마른기침을 발생시키고 면역 결핍 환자, 노인과 소아에서는 인플루엔자 감염으로 여러 심각한 합병증이 발생할 수 있다(1, 2).

Influenza virus는 주 표면 단백질인 hemagglutinin과 neuraminidase 유전자의 변화로 기존 항원 형에서 항원 대변이(antigenic shift)또는 항원 소변이(antigenic drift)를 일으켜 유전적으로 새로운 항원 형을 만들어 낼 정도로 변이가 심하다(1). 또한 중간 장벽을 넘어 다양한 형태의 influenza virus(특히 Avian influenza)는 인간에게 치명적이며 1918년 스페인 독감(5000만 명 이상 사망), 1957년 아시아 독감(100만 명 이상 사망), 1968년 홍콩 독감(50만 명 사망)처럼 세계적 유행병이 될 가능성이 상당하고(3, 5) 최근 돼지 독감(swine flu) 사건으로 그 가능성을 국내 및 전 세계에 보여주었다(4). 뿐만 아니라 항원 중 neuraminidase는 myxovirus나 paramyxovirus의 표면항원으로서 숙주 세포막의 sialyl glycoside를 sialic acid와 aglycone으로 분해하여 새로 합성된 virion을 세포 밖으로 방출하는 역할을 하기 때문에 항 virus 약제의 표적으로 주목받고 있다(6). Virus 증식에 필수적인 neuraminidase는 orthomyxovirus 외에도 다른 여러 종류의 생명체에 존재하는 효소로 사람의 경우에는 이 효소 결핍으로 sialidosis라는 당단백질대사 장애 질병이 유발되기도 한다(22).

따라서 influenza virus의 발병을 막기 위해 neuraminidase를 억제할 수 있다면 neuraminidase를 활용하는 모든 orthomyxovirus나 paramyxovirus는 숙주 세포 내에서 복제가 정상적으로 진행되어 다수의 virion이 생성되어도 세포 밖으로 방출되는 것을 막을 수 있어 바이러스의 증식을 억제할 수 있다(7).

Neuraminidase를 억제하여 항 인플루엔자 효과를 내는 치료제로 oseltamivir와 zanamivir가 상용화되어 있으며 그 이외에 peramivir, ribabirin,  $\alpha$ -interferon 등이 개발되어 임상시험 중에 있다. 그러나 주로 사용되는 치료제인 oseltamivir와 zanamivir의 경우 neuraminidase 억제에 대한 교차내성이 문제점으로 대두되고 있다. 현재까지 내성의 빈도도 낮고 내성을 획득한 바이러스는 전염력이나 생존력이 아직은 떨어지고 있지만 내성 비율은 점점 더 높아지고 있어 1999년에서 2002년 사이에 전 세계적으로 수집된 2,287 종의 바이러스 중에는 8종(0.33%)만이 oseltamivir에 10배 이상의 감수성 저하로 내성을 가졌지만 2004년부터 2008년 사이에는 내성을 가진 비율이 8.6%로 증가하여(3) 새로운 치료제를 계속해서 개발 또는 탐색해야할 필요성이 제기되고 있다(5).

세계적으로 수 천 여종의 식물 자원으로부터 새로운 항바이러스 소제를 탐색하기 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있지만 대부분의 항바이러스 활성을 지닌 약용식물 활성물질의 연구는 시작단계에 불과하다(10). 천연화합물 중에서도 polyphenol 화합물인 flavonoid는 식용하기 쉬운 식물에 많이 함유되어 있고(11) neuraminidase 활성을 저해할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(12). 본 연구에서는 새로운 항 인플루엔자 또는 neuraminidase inhibitor로 작용하는 천연화합물을 탐색하여 기능성 식품의 제조를 위한 기반소재를 얻고자 다양한 기능성을 지닌 apigenin이 glycoside 형태로 풍부하게 포함되어 있는 것으로 알려진 파슬리(Parsley, *Petroselinum crispum*)를 대상으로 neuraminidase inhibitor로의 가능성에 대하여 조사하였다(8, 9).

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. Bacterial neuraminidase inhibition assay

Viral neuraminidase는 고가의 제품으로 모든 실험에 이 효소를 사용하는 것은 비경제적이다. 따라서 viral neuraminidase를 사용하기 전에 예비실험으로서 상대적으로 저렴한 bacterial neuraminidase를 분석에 이용하였다.

### 2.1.1. 실험 재료

Neuraminidase inhibitor로 사용한 flavonoid 화합물로 apigenin(98%, Cayman, USA), amentoflavone(99%, Extrasynthese, France), scutellarein(99%, Extrasynthese, France) 그리고 kaempferol(96%, Sigma-aldrich, USA), myricetin(96%, Sigma-aldrich, USA)을 선정하였으며 이들 화합물은 retrovirus의 reverse transcriptase 또는 protease에 대해서 비교적 높은 저해활성을 나타낸다(13). 이들 화합물을 ethanol(99.9%, ACS grade, Fisher, UK)에 용해시켜서 사용하였다. 실험 초기에는 methanol을 극성에서 비극성 범위가 넓고 flavonoid를 더 잘 용해시킬 것이라 추정이 되어 사용하였지만 효소측정시 methanol에 의해 효소활성이 약 40% 정도 저해되는 단점이 있어 이후 ethanol로 대체하여 사용하였다.

양성대조군(positive control)으로 zanamivir hydrate(99.3%, Moravek, USA)를 사용하였으며 zanamivir의 경우 인체 내에서 체액에 용해된 후 약효를 발휘하므로 이와 유사한 조건을 만들어주기 위해 용매로 증류수(distilled water)를 사용하였다.

Bacterial neuraminidase(5.43 U/mg, Worthington, USA)는 상대적으로 저렴하고 구입이 용이한 *Clostridium perfringens* 유래의 neuraminidase를 사용하였고 효소활성을 측정(assay)하기 위하여 0.1M acetate buffer(pH 5.0)에 용해한 후 1 U/ml 농도로 1ml씩 분주하여 분석에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였으며 사용 직전에 해동시키고 0.5 U/ml로 희석하여 사용하였다. 효소 활성측정 시에 효소농도가 1 U/ml이면 흡광도(absorbance)가 너무 높게 측정되어 Lambert-Beer's law에 벗어날 수 있으므로 0.5 U/ml 농도로 사용하였다(Fig. 1).

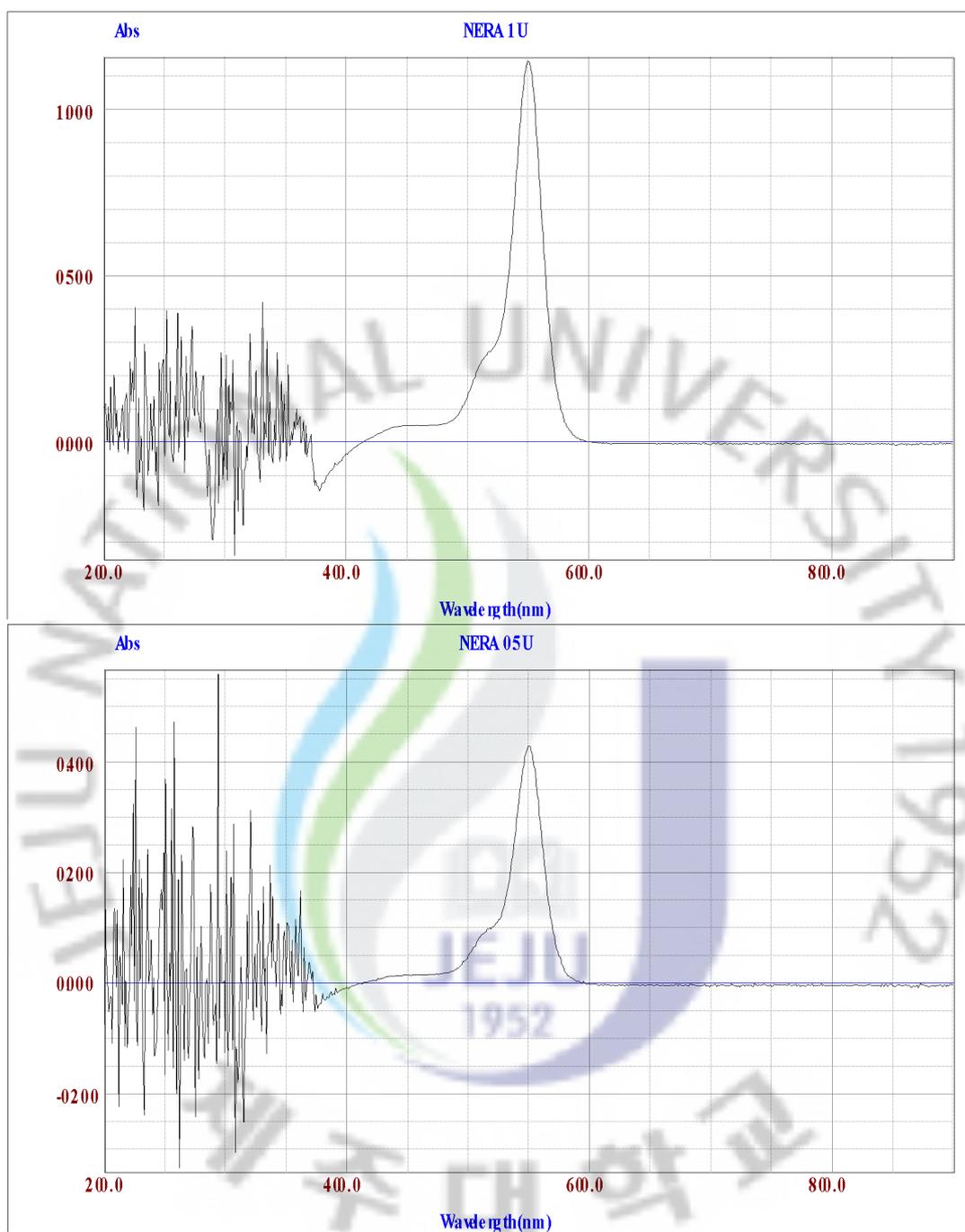


Fig. 1. Absorbance spectra of bacterial neuraminidase at enzyme concentration 0.5 U/ml(bottom) and 1 U/ml(top).

Neuraminidase가 분해시킬 수 있는 기질로는 Bovine submaxillary gland 유래의 mucin(Worthington, USA)을 0.1M acetate buffer(pH 5.0)에 용해시켜 1%(w/v) 농도로 사용하였다.

효소반응정지를 위해 5%(w/v) phosphotungstic acid(reagent grade, Sigma-aldrich, USA)는 2.5 N hydrochloric acid(35%, extra pure, 동양, Korea)에 용해하여 사용하였고 0.2 M sodium meta periodate(99%, Sigma-aldrich, USA)는 9 M phosphoric acid(98%, reagent grade, Sigma-aldrich, USA)에 용해하여 사용하였으며 0.755 M sodium arsenite(96%, Sigma-aldrich, USA)는 0.5M sodium sulfate(99%, Katayama, Japan)에 용해시키고 0.1 N sulfuric acid(95%, extra pure, 동양, Korea)를 첨가하여 사용하였다. 그리고 0.6%(w/v) thiobarbituric acid(98%, Sigma-aldrich, USA)도 0.5 M sodium sulfate(99%, Katayama, Japan)에 용해시켜 사용하였다. 95%(v/v) butanol(99%, Junsei, Japan)은 hydrochloric acid(35%, extra pure, 동양)를 5%(v/v) 첨가하여 만들었다.

### 2.1.2. 분석 방법

Neuraminidase assay 방법(14)을 일부 변형한 protocol을 사용하였는데 0.1 M acetate buffer와 1% mucin solution을 4:5 비율로 혼합하여 기질용액을 만들고 반응 단계의 tube 각각에 90  $\mu$ l씩 넣었다. 그리고 다양한 농도의 flavonoid solution을 experiment tube에 20  $\mu$ l씩 넣고 reference tube에는 0.1 M acetate buffer를 20  $\mu$ l씩 넣었다(Table 1).

Table 1. Test tube composition for neuraminidase assay at reaction stage

Reagent	Control, experiment tube	Reference tube
0.1 M Acetate buffer + 1% mucin (4:5)	90 $\mu$ l	90 $\mu$ l
0.5 U/ml Neuraminidase	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
5% Phosphotungstic acid	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Flavonoids or zanamivir hydrate	20 $\mu$ l	
0.1 M Acetate buffer		20 $\mu$ l

이 후 모든 tube에 neuraminidase solution(0.5 U/ml)을 10  $\mu$ l씩 넣고

vortex 또는 pipetting하여 잘 섞어준 후 1~3초간 짧게 원심분리하여 37°C로 맞춰놓은 항온수조(water bath)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 모든 tube에 5% phosphotungstic acid를 넣어 반응을 정지시키고 control tube에 알맞은 농도의 flavonoid solution을 20  $\mu$ l씩 분주한 후 원심분리(10,000rpm, 10min)를 실시하였다. 원심분리 후 각각의 tube에서 80  $\mu$ l의 상정액을 발색 단계의 tube로 옮겨놓았다(Table 2).

Table 2. Test tube composition for neuraminidase assay at colorimetric stage

Reagent	Control, experiment, reference tube
Each supernatant solution	80 $\mu$ l
0.5 U/mL Neuraminidase	16 $\mu$ l
5% Phosphotungstic acid	160 $\mu$ l
Flavonoids or zanamivir hydrate	480 $\mu$ l
0.1 M Acetate buffer	736 $\mu$ l

옮긴 tube 각각에 0.2 M sodium periodate를 16  $\mu$ l씩 넣고(15) vortex 또는 pipetting하여 잘 섞어주고 1~3초간 짧게 원심분리 후 20분간 상온에서 반응시켰다. 그리고 0.755 M sodium arsenite를 160  $\mu$ l씩 첨가하여 혼합하고 0.6% thiobarbituric acid를 480  $\mu$ l씩 첨가하여(16) 100°C 항온수조(water bath)에서 15분간 반응시킨 후 ice bath에서 5분간 식혔다. 다음 단계로 butanol 736  $\mu$ l를 넣고 vortex하여 butanol층으로 색을 전이시키고 10,000rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 그리고 butanol층에서 200  $\mu$ l를 취하여 96well plate(SPL, Korea)에 넣어 DTX800 microplate reader(Beckman Coulter, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같은 과정을 4~5회 반복, 실험하여 아래 공식으로 저해율을 산출하였다.

$$\frac{(\text{Absorbance of control tube} - \text{Absorbance of experiment tube})}{(\text{Absorbance of control tube})} \times 100$$

## 2.2. 파슬리 추출

파슬리(parsley, 수분함량 6.1%, 인그린, Israel)는 80 mesh 크기의 분말 형태로 되어 있는 것을 인그린에서 구입하여 사용하였으며 50g의 parsley 분말을 1 L의 70% ethanol에 넣어 24시간 동안 추출한 것을 filter paper(No 2, Advantec, Japan)로 진공펌프(Gast, USA)를 이용하여 감압여과 하였다. 감압여과 후 회전증발 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 54~57℃에서 감압농축 하였으며 감압농축 후 진공동결건조기(Ilsin, Korea)를 사용하여 4일 간 건조시켜 14.85 g(추출수율: 29.7%)의 건조분말을 얻었다.

## 2.3. 총 폴리페놀 함량 분석

파슬리분말을 70% ethanol로 추출할 때 추출시간에 따른 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해서 Prussian blue법(17)을 이용하여 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 후에 각각의 시료를 채취하고 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose acetate syringe filter (DISMIC-13CP, Advantec, Japan)로 추출 여액을 만들었다. 추출 여액 100  $\mu\text{l}$ 에 증류수 3 ml, 0.016 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1 ml, 0.02 M  $\text{FeCl}_3$ (in 0.1 N HCl) 1 ml를 혼합하여 강하게 진탕한 후 실온에서 15분간 방치하고 stabilizer(water: 1% gum arabic: 85% phosphoric acid를 3:1:1 용량비로 혼합한 것) 5 ml를 첨가하여 분광광도계 (UV/visible, Biochrom, England)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량의 검량곡선은 gallic acid( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 이용하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  기준으로 작성하였다.

## 2.4. 총 플라보노이드 분석

파슬리(parsley)를 70% ethanol로 추출할 때 추출물 중의 총 플라보노이드(total flavonoid) 함량을 측정하기 위하여 Nakabayashi가 개량한 Davis 변법(18)을 이용하여 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 후에 각각의 시료를 채취하고 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose acetate syringe filter (DISMIC-13CP, Advantec, Japan)로 추출 여액을 만들었다. 추출 여액 1 ml에 diethylene glycol 10ml, 1N NaOH 1 ml를 섞고 강하게 진탕하고 37℃ 항온기(incubator)에서 1시간 정치시킨 후 분광광도계를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보

노이드 함량의 검량곡선은 naringin( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 이용하여  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  기준으로 작성하였다.

## 2.5. Viral neuraminidase inhibition assay

Bacterial neuraminidase inhibition assay의 결과를 토대로 하여 유전자재조합법으로 생산된 influenza A H1N1 neuraminidase를 효소로 사용하였고 Hurt의 방법(19)에 따라 viral neuraminidase 활성을 측정하였다.

### 2.5.1. 실험 재료

Bacterial neuraminidase inhibition assay의 결과 flavonoid중에서는 apigenin(98%, Cayman)이 비교적 저해율이 높음을 확인하여 neuraminidase inhibitor로 사용하였다. Apigenin은 dimethyl sulfoxide(DMSO, 99.9%, Bio basic Inc., Canada)에 용해시켜 사용하였고 천연식물 중 apigenin을 비교적 많이 함유한다고 알려진 파슬리의(27) 70% ethanol 추출물 또한 DMSO에 용해시켜 사용하였다. 그리고 양성대조구(positive control)로는 viral neuraminidase inhibitor로 상품화되어있는 zanamivir hydrate(99.3%, Moravek)를 사용하였다.

Viral neuraminidase(80%, R&D systems)로는 재조합체 유전자를 이용하여 숙주 *Spodoptera frugiperda*에서 생산된 Influenza A virus H1N1 neuraminidase를 사용하였으며 효소는 assay buffer(50 mM Tris, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 200 mM NaCl)에 용해시켜  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 1 ml씩 분주하여  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였으며 사용직전에 해동 후  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 사용하였다.

기질로는 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate(96.5%, HPLC, BioReagent)을 사용하였으며 이를 DMSO에 1 mM로 용해시켜 상온에서 보관하면서 실험직전에  $10\mu\text{M}$ 로 희석하여 기질이 효소 neuraminidase에 의하여 가수분해 될 때 생성되는 4-methylumbelliferone의 형광성을 fluorometer로 측정하였다.

효소활성 측정용 완충액(assay buffer)은 50 mM Tris base(99.8%, ACS reagent, Sigma-Adrich), 5 mM calcium chloride dihydrate(99%, ACS

reagent, Sigma-Adrich) 그리고 200 mM sodium chloride(99%, Tedia)를 증류수에 녹여서 사용하였다. 완충액은 HCl(35%, Extra Pure, DC chemical)으로 pH 7.4로 보정하였다.

### 2.5.2. 분석 방법

96-well black plate(SPL, Korea)를 experiment, positive control, negative control, blank well로 영역을 나누어서 experiment와 positive control well에는 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  neuraminidase 50  $\mu\text{l}$ 를 넣었고 negative control과 blank well에는 효소대신에 완충액 50  $\mu\text{l}$ 를 넣었다. 넣은 후엔 experiment와 negative control well에 inhibitor를 20  $\mu\text{l}$ 씩 넣었고 positive control과 blank well에는 DMSO를 20  $\mu\text{l}$ 씩 넣었다. 그리고 나서 experiment, positive control, negative control, blank well 전부에 DMSO로 희석한 10 $\mu\text{M}$  2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate 기질을 50  $\mu\text{l}$ 씩 넣어(Table 3)

Table 3. Composition in 96-well black plate assaying viral neuraminidase inhibition

Well label	Experiment	Positive control	Negative control	Blank
Enzyme or buffer	enzyme	enzyme	buffer	buffer
Inhibitor or solvent	inhibitor	solvent	inhibitor	solvent
Substrate	substrate	substrate	substrate	substrate
Enzyme reaction expected	inhibition	normal reaction	no reaction	no reaction
Fluorence expected	low	high	inhibitor effect	solvent effect

multi channel pipette 등으로 잘 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$  진탕항온기에서 10분 간 반응시키고 DTX800 plate reader(Backman coulter, USA)로 excitation 365 nm, emission 465 nm에서 RFU(Relative Fluorescent Unit) 값을 측정하였다. 효소 활성 저해율 계산식은 다음과 같다.

$$\frac{(P \text{ absorbance} - B \text{ absorbance}) - (E \text{ absorbance} - N \text{ absorbance})}{(P \text{ absorbance} - B \text{ absorbance})} \times 100$$

E absorbance: Absorbance of experiment well

P absorbance: Absorbance of positive control well

N absorbance: Absorbance of negative control well

B absorbance: Absorbance of blank well

## 2.6. Apigenin 함량 분석

파슬리 70% ethanol 추출물의 viral neuraminidase에 대한 효소활성 저해율을 측정하고 파슬리의 활용가능성을 높이기 위해 high pressure liquid chromatography(Waters 1515 HPLC system, Waters, USA)를 사용하여 apigenin의 함량을 측정하였다. 분석용 칼럼으로 reverse phase ODS column(5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm, Symmetry)을 사용하였다. 최적의 이동상을 찾기 위하여 에탄올과 물의 혼합액(ethanol : water)을 10:0에서 0:10까지 혼합비율을 조정하면서 사용한 결과, 에탄올 농도 30%에서 chromatogram 상에 분리된 peak가 가장 많이 관찰되어 이동상으로 사용하였다가 검량곡선을 작성하기 위해 apigenin을 주입하였더니 체류시간(RT, retention time)이 너무 길고 peak의 해상도가 낮았다. 그래서 체류시간을 단축시키고 화합물들의 peak 해상도를 높이기 위해서 최종적인 이동상으로 ethanol과 water의 혼합용매(ethanol 33: water 67)을 탈기시키고 0.45  $\mu$ m cellulose acetate membrane filter로 여과하여 유속 1ml/min 으로 분석하였다. Apigenin의 DMSO에 대한 용해도는 100 mg/ml 이상이다(20). 따라서 apigenin을 DMSO에 용해시켜 Waters 2487 UV-detector(Waters, USA)로 최대흡광도를 나타내는 269 nm에서(21) 정량곡선을 작성하였다. 파슬리의 70% ethanol 추출물은 혼합용매(ethanol 7: water 3)에 1 mg/ml 농도로 용해시킨 것과 산성혼합용매(ethanol 7: 5N HCl 3)에 1 mg/ml 농도로 녹여서 가수분해 한 것을 각각 HPLC에 주입하여 얻은 chromatogram을 apigenin 정량곡선과 비교하여 파슬리 시료에 함유된 apigenin 함량을 계산하였다.

## 2.7. Apigenin 추정 peak의 질량 분석

파슬리 산 가수분해물의 추정된 apigenin peak가 apigenin이라는 것을 검증하기 위해 Prep-LC(Waters 2545 binary gradient module, Waters 2998 photodiode array detector, Waters 2767 sample manager, Waters, USA)를 이용하였다. Apigenin 추정 peak만을 따로 분획하기 위해 이동상으로 ethanol과 물의 혼합용매(ethanol 33: water 67)를 탈기시키고 0.45  $\mu$ m cellulose

acetate membrane filter로 여과하여 유속 10ml/min 으로 reverse phase ODS column(5 $\mu$ m, 19 X 50mm, Sunfire™)을 통과시켜 9~11분에서 fraction을 분획하였다(Fig. 2).

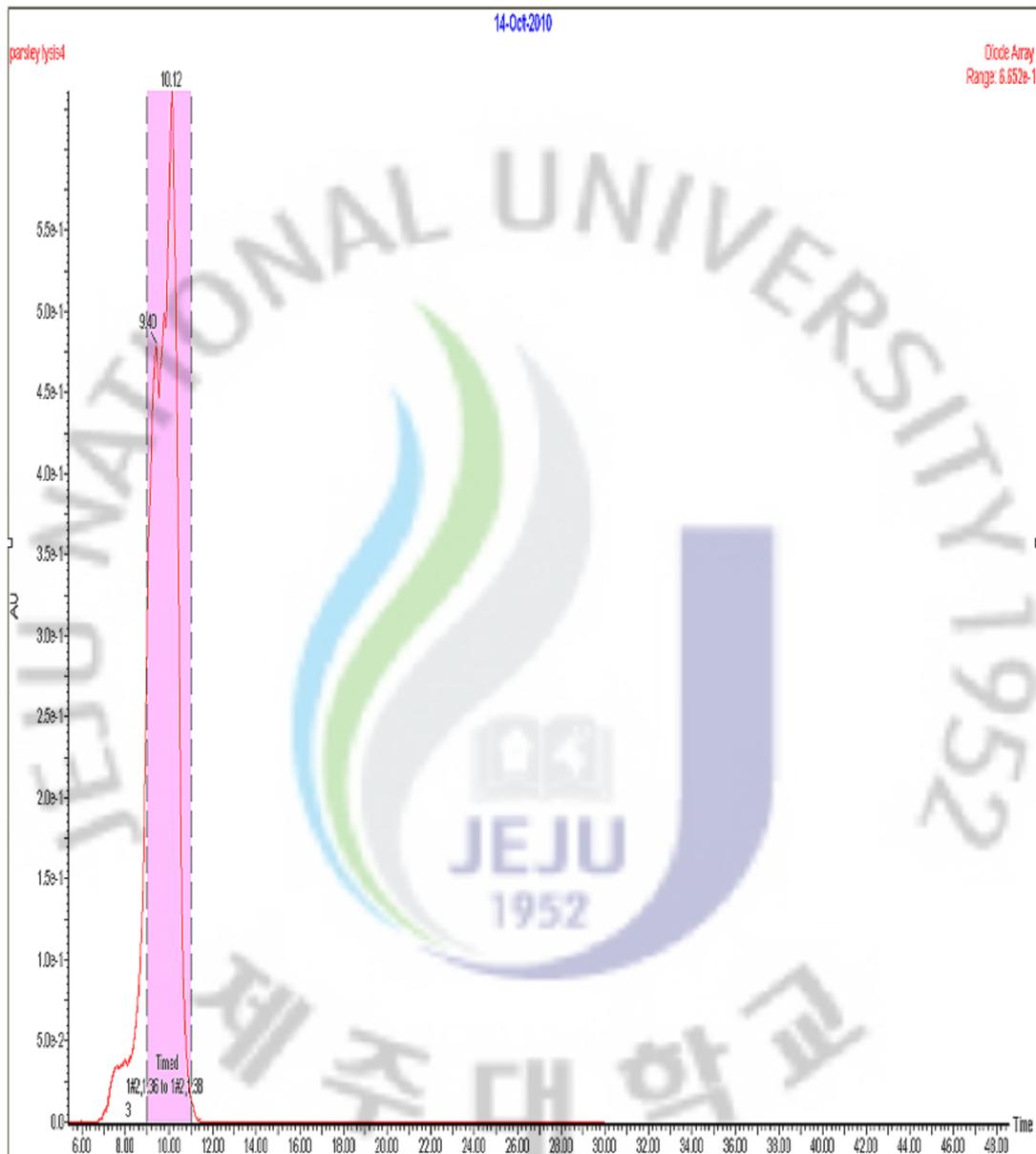


Fig. 2. Determination of apigenin peak by preparative-LC.

수집한 fraction이 apigenin이라는 것을 확인하기 위해 질량분석기(Waters micromass ZQ, Waters, USA)를 사용하여 질량을 분석하였다. 전자 분무 (Electrospray) 형태로 이온화를 시키기 위해 capillary에는 4.2 kV를 걸어주고 cone에는 20 V, extractor 2V 그리고 RF Lens 0.2 V를 걸어주었다. 사중극자(quadrupole)를 이용한 질량의 분석은 250~300(m/z)사이로 실행하였다.

## 2.8. 통계처리

반복실험에 대한 표준편차와 직선회귀방정식은 OriginPro 7.5를 이용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Bacterial neuraminidase 활성 저해

Neuraminidase의 활성을 저해하여 독감 치료 효과를 나타내는 zanamivir는 influenza A, B의 neuraminidase에 선택적인 길항제로 작용을 하며 보통 유당과 혼화하여 디스크할러(Diskhaler)로 흡입하여 사용된다(23, 24). 본 실험에서 양성 대조구(positive control)로 사용된 zanamivir는 sialic acid의 유도체로 4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid라고도 한다. Flavonoid는 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>의 골격을 가지는 polyphenol계 화합물의 총칭으로서 항암, 항산화와 항돌연변이의 활성을 나타내며, 거의 모든 식물체에 널리 분포하고 있다(25). 그 중에서 retrovirus의 reverse transcriptase와 protease에 대하여 비교적 높은 저해활성을 나타내는 apigenin, myricetin, amentoflavone, keampferol 그리고 scutellarein을 대상으로 bacterial neuraminidase에 대한 효소활성 저해정도를 조사하였다(Fig. 13). 특히 apigenin은 독성이 없으며 여러 가지 암 세포의 성장 저해 및 세포사를 유도한다(26).

Bacterial neuraminidase의 효소 활성을 측정한 결과 효소 활성 저해율에 대한 표준편차가 크게 나왔다.(Fig. 3) 저해제(inhibitor)의 농도를 달리하여 저해율을 측정하였는데 zanamivir의 경우 0.5 mg/ml일 때 저해율이 24.45%로 1 mg/ml와 1.5 mg/ml 일 때보다 더 높게 나왔으며 apigenin의 경우에도 0.5 mg/ml일 때가 18.23%로 13.6%의 저해율을 보인 1 mg/ml 일 때보다 높게 나왔다.

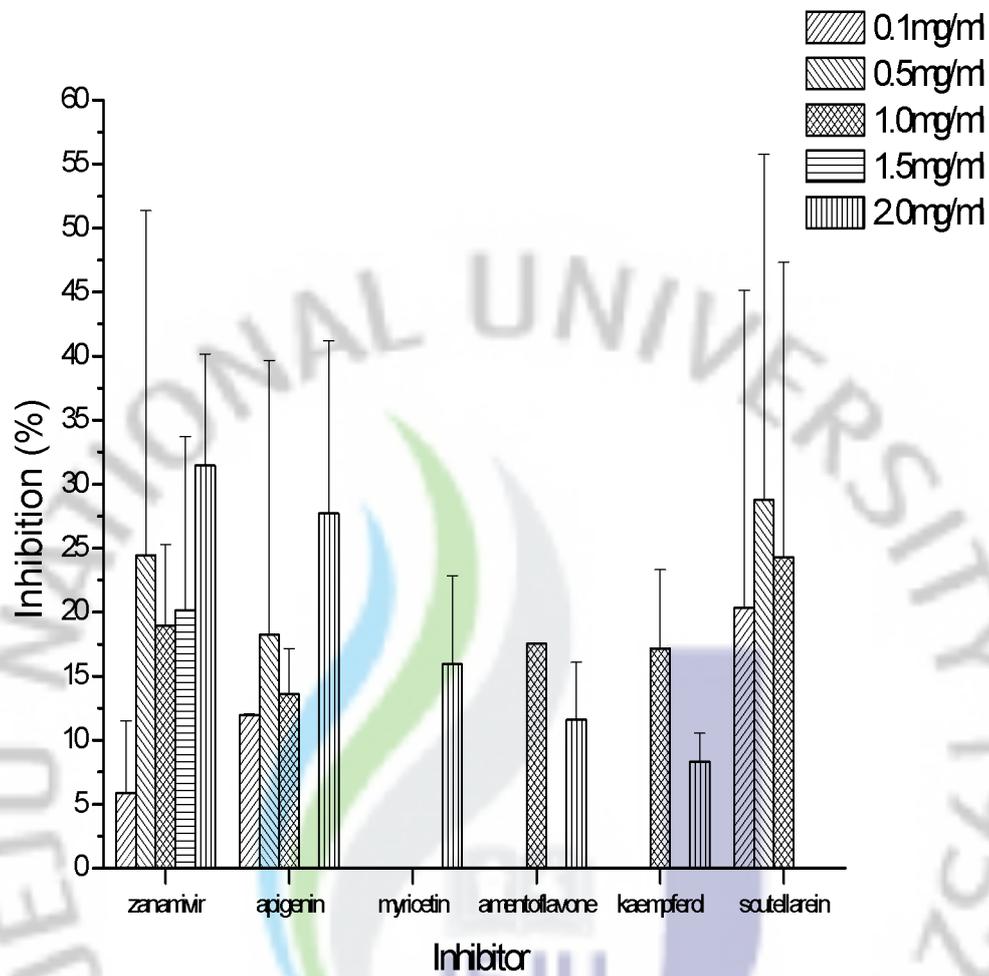


Fig. 3. Inhibition of bacterial neuraminidase by some flavonoids.

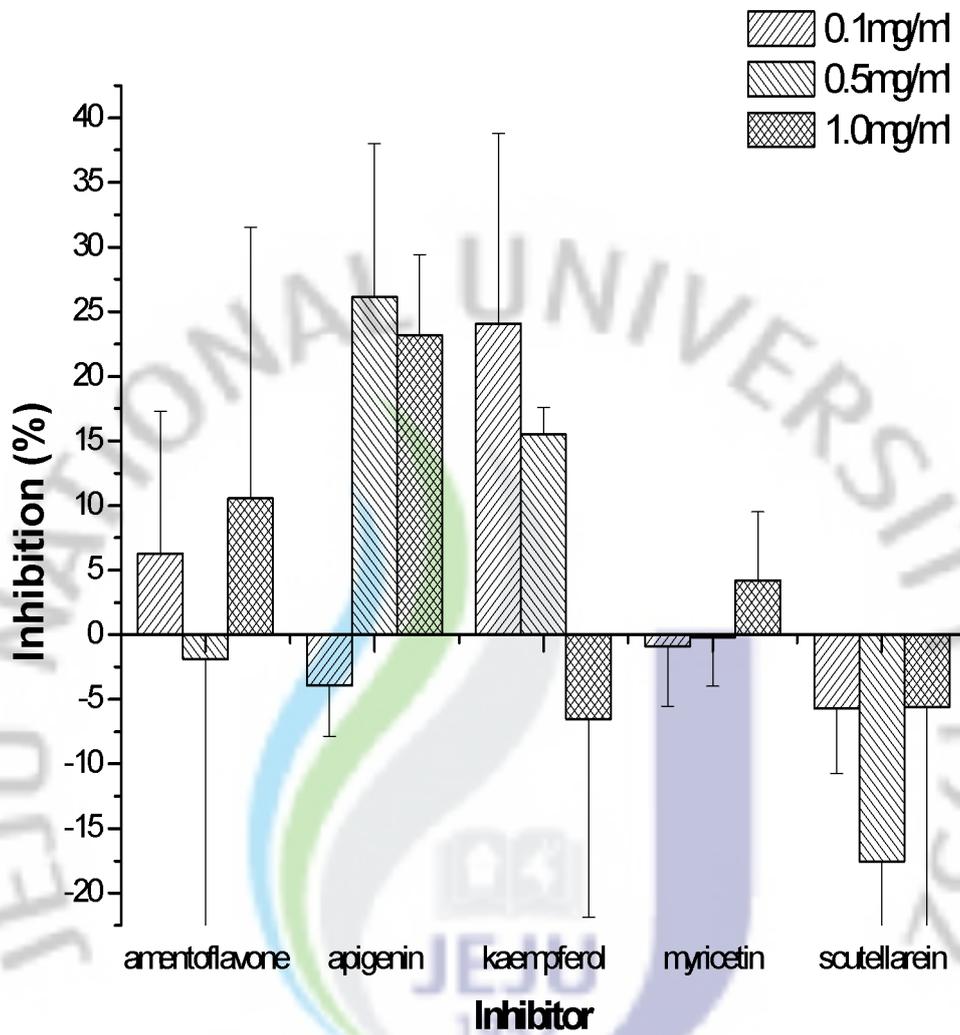


Fig. 4. Inhibition of bacterial neuraminidase used 5N HCl by some flavonoids.

Myricetin의 경우에는 2 mg/ml의 농도에서만 저해율을 분석하였는데 apigenin보다 낮은 저해율을 보였고 amentoflavone의 경우에는 1 mg/ml일 때가 2 mg/ml일 때에 비해서 더 높은 저해율을 보였다. Kaempferol의 경우도 마찬가지로 1 mg/ml일 때가 2 mg/ml일 때에 비해서 더 높은 저해율을 보였다. Scutellarein의 경우 ethanol에 용해되는 것에 한계가 있어 1 mg/ml의 농도 이상으론 하지 못했는데 apigenin보다 평균 저해율이 높은 것으로 나타났다.

그러나 나머지 flavonoid의 저해율의 편차가 심하여 효소 반응 정지제로 사용한 5% phosphotungstic acid 대신에 5N HCl을 사용하여 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml 농도에서 추가 실험을 진행하였다(Fig. 4). Apigenin만 0.5, 1.0 mg/ml 농도에서 각각 26.14, 23.16%의 저해율을 보였고 나머지 flavonoid의 경우 keampferol을 제외하고 거의 나오지 않거나 마이너스의 저해율을 보였다. Keampferol의 경우에는 농도가 높아질수록 저해율이 떨어졌다.

Bacterial neuraminidase에 대한 저해활성을 측정함에 있어 저해제로 사용한 flavonoid의 저해효과에 대한 넓은 표준편차가 관측되었다. Thiobarbituric acid로 발색을 유도하는 과정에서 시험관 내의 용액이 뿌옇게 흐려지면서 정상적인 흡광도가 측정되지 않을 때가 있어서 이에 대한 원인을 고찰해보았다. 50~450  $\mu$ l의 ethanol을 증류수 243  $\mu$ l와 thiobarbituric acid 480  $\mu$ l가 들어 있는 시험관에 첨가하고 섞어서 현탁물질의 생성여부를 관찰하였더니 ethanol을 150  $\mu$ l 이상 넣을 때부터 흰색의 부유물질이 생겼다가 사라졌다. 나중에는 phosphotungstic acid와 관련이 있다고 생각되어 효소 반응 정지제로 phosphotungstic acid 대신에 5N HCl을 사용하였지만 큰 차이는 없었다. 따라서 효소 활성의 정상적인 측정을 방해하는 흰색의 침전물 생성은 시료를 녹이는데 사용한 용매 ethanol과 thiobarbituric acid와 관계가 있거나 thiobarbituric acid의 자체의 문제일 것이라고 추정되었다. 더구나 기질로 사용했던 mucin은 용액 상태에서 높은 점도를 나타내었고 기질용액 제조 후 하루 이상 지나면 침전이 발생하는 경우가 있었다. 실험과정에서도 그나마 apigenin의 bacterial neuraminidase 효소에 대한 저해활성이 균일하게 나타났기에 apigenin을 시료로 사용하여 viral neuraminidase에 대한 저해활성을 조사하였

다.

### 3.2. 추출 시간에 따른 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 변화

파슬리는 독특한 향을 지니고 있으며 식용되고 있다. 파슬리에는 glycoside의 일종인 apiin 형태로 apigenin이 많이 함유되어 있다고 보고되어 본 연구에서 중요 시료로 선택되었다. 파슬리에 함유된 apigenin의 함량을 측정 위해서 70% ethanol로 추출하였다(27).

총 폴리페놀 함량을 계산하기 위해서 gallic acid를 표준물질로 사용하였으며 농도별로 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/ml}$ 을 700 nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선을 작성하였다(Fig. 5).

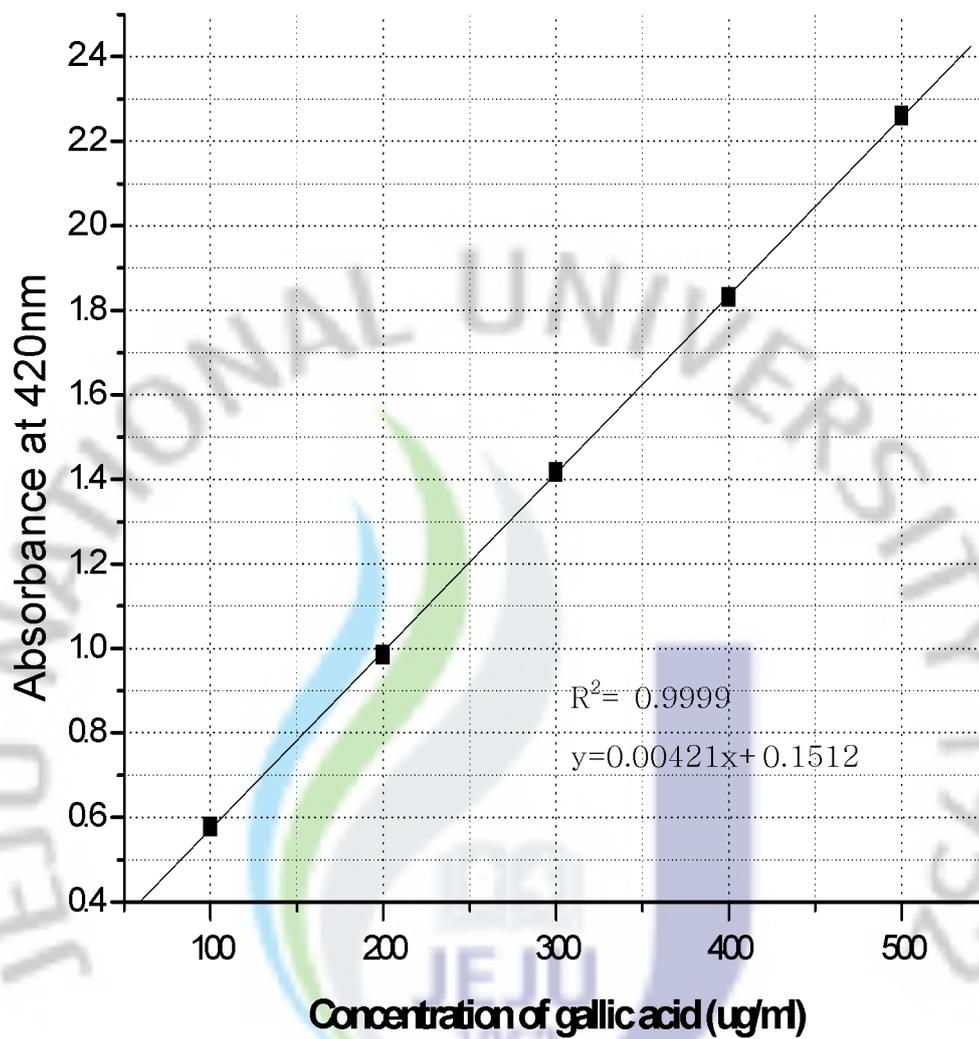


Fig. 5. Calibration curve using gallic acid as a standard for total polyphenol determination.

검량선을 토대로 파슬리의 70% ethanol 추출물을 시간대 별로 비교한 결과, 추출시간에 따른 총 폴리페놀 함량은 차이가 크지 않아 추출 1시간 이후부터는 추출 효율이 비슷한 것으로 보인다(Table 4).

Table 4. Total polyphenol content in 70% ethanol extract of parsley by extraction time

Extraction time(hr)	Total polyphenol content( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
1	251
2	257
3	266
4	269
5	263

총 플라보노이드 함량은 naringin을 표준물질로 하여 계산하였고 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  부터 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도별로 700 nm에서의 흡광도를 측정하여 검량곡선을 작성하였다(Fig.6).

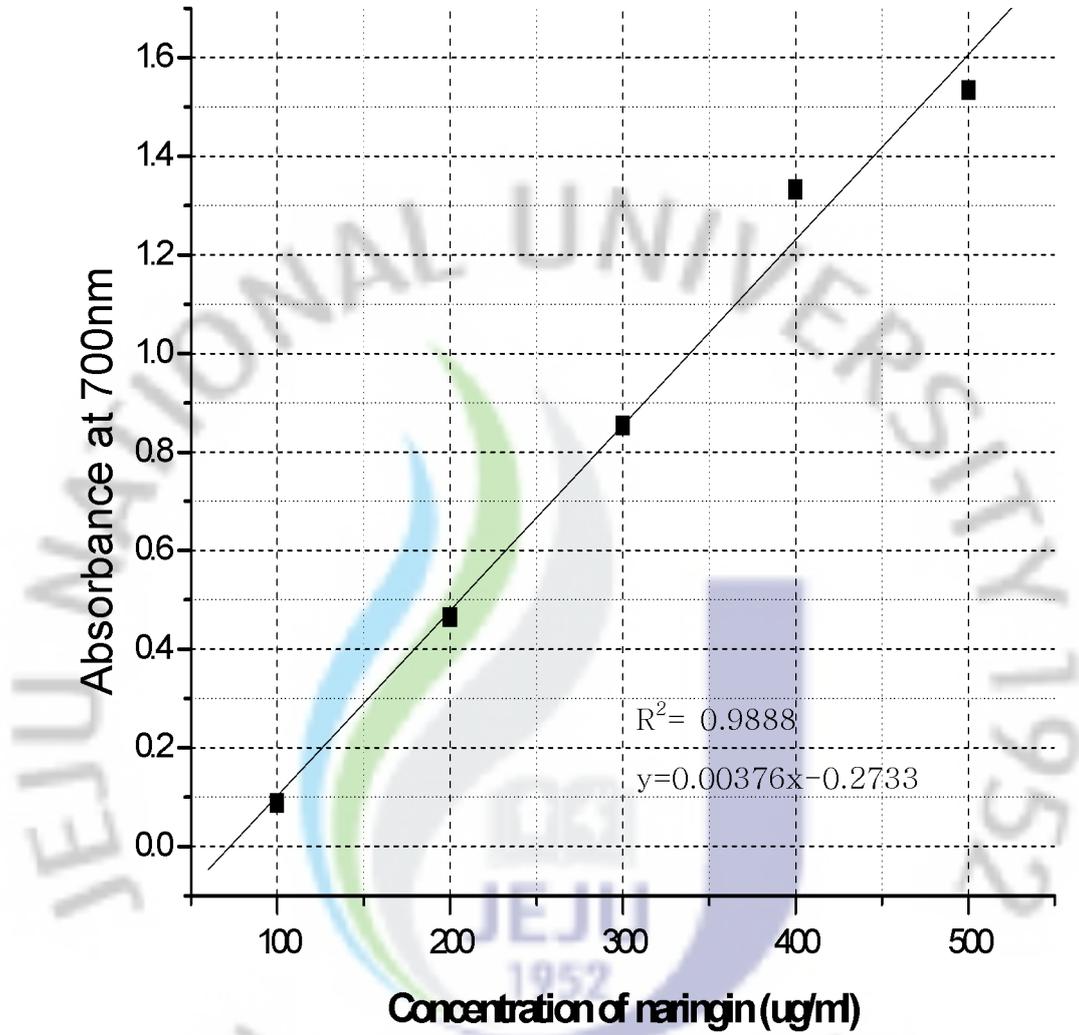


Fig. 6. Calibration curve using naringin as a standard for total flavonoid determination.

검량선을 토대로 파슬리의 70% ethanol추출물을 시간대 별로 비교한 결과, 흡광도가 검량곡선의 한계농도 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하여 시료를 5배 희석하여 사용하였다. 추출시간에 따른 추출 수율은 1시간 일 때가 1505  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이었는데 나머지 시간에 따른 추출수율과의 차이가 미미하였다.(Table 5).

Table 5. Total flavonoid content in 70% ethanol extract of parsley by extraction time

Extraction time(hr)	Total flavonoid content( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
1	1505
2	1480
3	1570
4	1480
5	1425

추출시간에 따른 추출물 중의 총 페놀(total polyphenol)과 총 플라보노이드(total flavonoid) 함량은 추출 1시간 이후부터 큰 차이가 없음을 확인하였다. 그러나 total polyphenol함량보다 total flavonoid함량이 더 높게 나왔는데 total flavonoid분석법에서 standard로 사용한 naringin보다 발색력이 우수한 flavonoid 유사 물질이 많이 존재하기 때문인 것으로 추측된다.

### 3.3. Viral neuraminidase 활성 저해

Viral neuraminidase의 활성을 저해하는 물질을 찾기 위하여 bacterial neuraminidase 저해 활성이 높다고 확인된 apigenin과 zanamivir 그리고 파슬리의 70% ethanol 추출물을 저해제(inhibitor)로 사용하였다(Fig. 7).

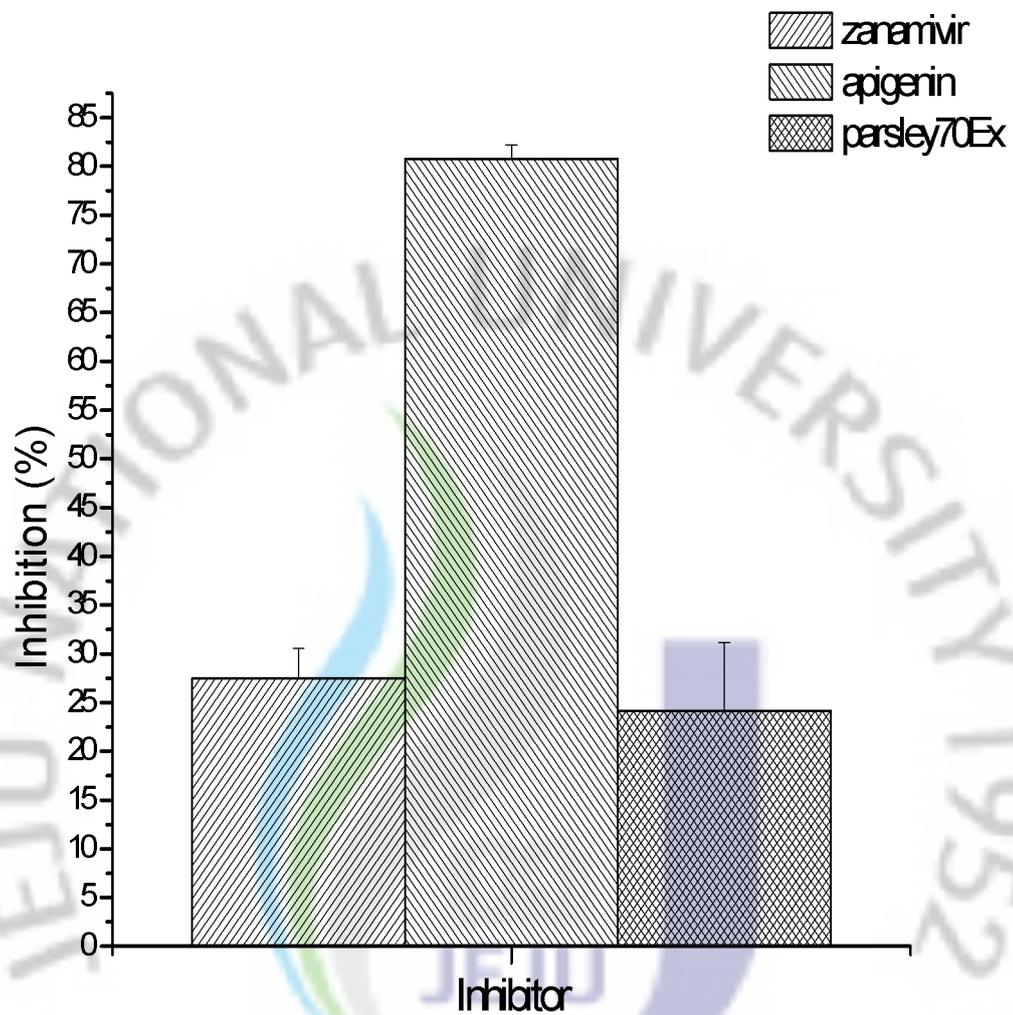


Fig. 7. Inhibition of viral neuraminidase by inhibitor candidates for 1 mg/ml concentration.

Zanamivir는 influenza A virus 감염에 의한 독감의 치료제로 사용되는데 viral neuraminidase에 대한 저해율이 27.49%이었다. 이에 비해서 플라보노이드 apigenin은 80.79%의 저해율을 나타내었다. 그리고 apigenin이 함유되어 있다고 알려진 파슬리의 70% ethanol 추출물은 24.19%의 저해율을 보여 zanamivir와 apigenin에 비해서 낮은 저해율을 보였다.

Viral neuraminidase의 효소활성에 대한 저해실험은 순수화합물 apigenin과 식용이 가능하며 다량의 apigenin을 함유하고 있다고 알려진 파슬리의 70% ethanol 추출물 그리고 양성대조구로서 zanamivir hydrate를 저해제(inhibitor)로 사용하여 실시하였다. 형광반응으로 측정하였기 때문에 bacterial neuraminidase를 사용한 실험방법에 비해서 측정 감도도 우수하고 소요시간도 단축되었다. 기질이 비교적 고가이고 구하기 용이하지 않지만 bacterial neuraminidase 활성 측정에도 형광기질을 사용하면 실험관측치의 진폭을 줄일 수 있을 것이다. Apigenin의 경우 양성 대조구(positive control)로 사용했던 zanamivir보다 저해 활성이 높게 나왔는데 구조상관계적으로 보았을 때, apigenin의 4'-OH, 7-OH, 그리고 C<sub>4</sub>=O의 구조가 neuraminidase의 arg371, Glu277같은 active site에 작용하여서(12) 촉매활성을 저해하기 때문인 것으로 추측된다(Fig. 14).

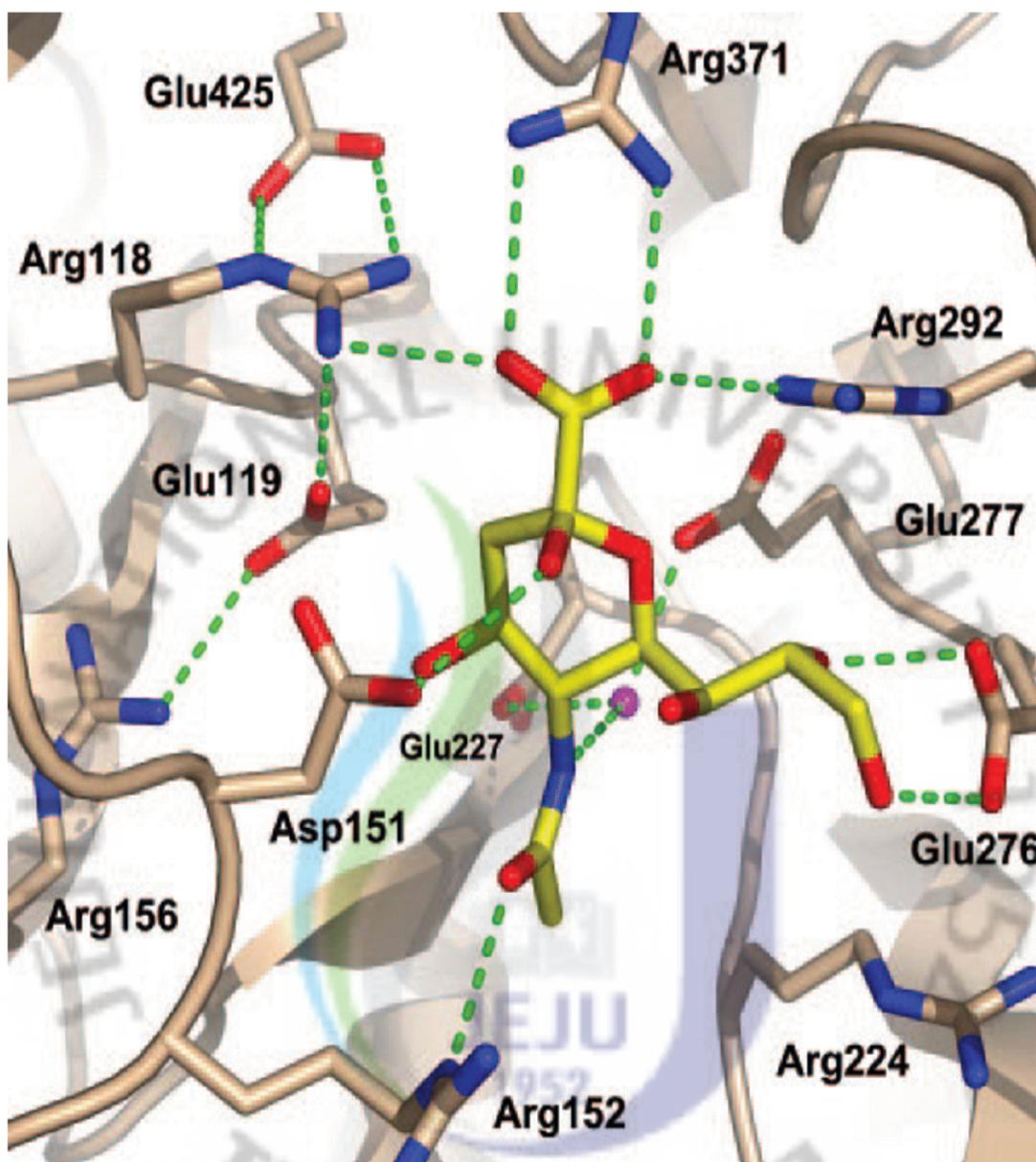


Fig. 14. Structure of the complex between A/Tokyo/3/67 (H2N2) influenza virus NA and sialic acid(28).

### 3.4. 파슬리의 apigenin 함량

파슬리의 70% ethanol 추출물에 함유된 apigenin의 농도를 HPLC로 분석하였다. 30% ethanol을 이동상으로 사용하였을 때 1 mg/ml apigenin의 peak는 검출되었으나 1 mg/ml 파슬리의 70% ethanol추출물에선 apigenin peak가 검출되지 않았다(Fig. 8).

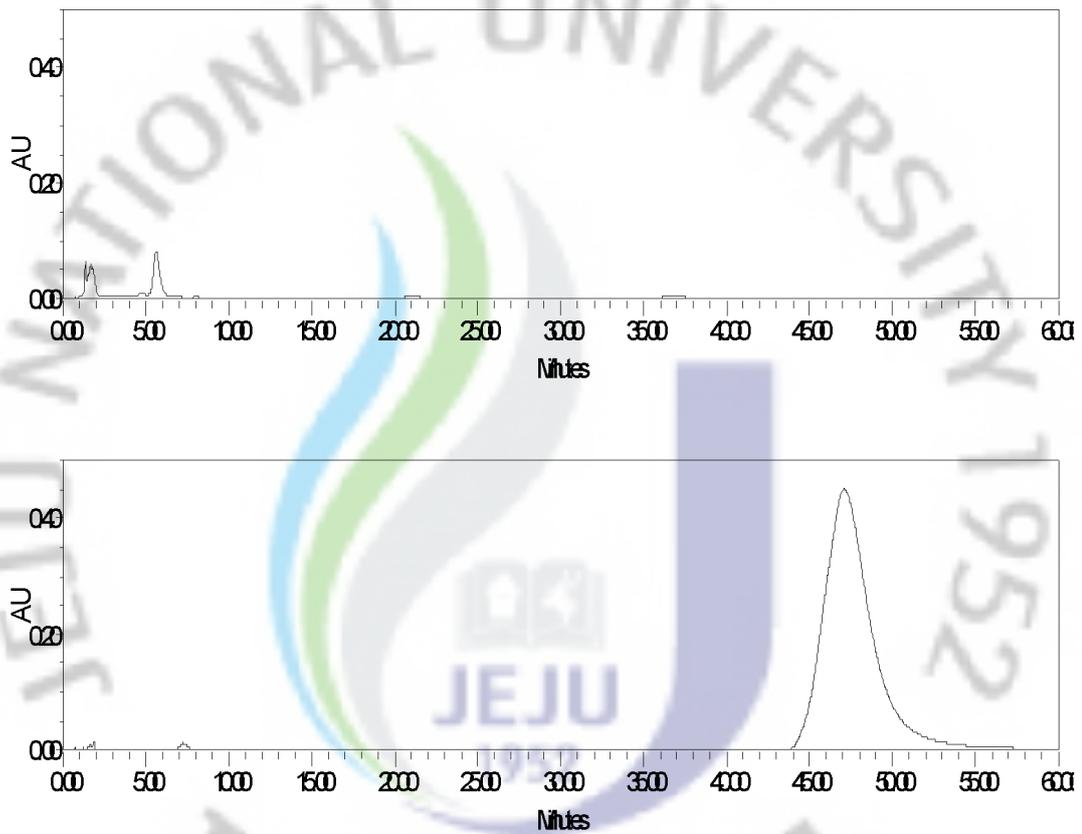


Fig. 8. Ethanol(70%) extract of parsley 1 mg/ml(top) and HPLC chromatograms of apigenin 1 mg/ml(bottom) with 30% ethanol as mobile phase.

30% ethanol 대신 33% ethanol을 이동상으로 사용하여 apigenin의 농도 (0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1 mg/ml)에 따라 검량곡선을 작성하였다(Fig. 9). 그리고 apigenin이 배당체 상태로 존재할 가능성이 높아서 파슬리의 70% ethanol 추출물에 산 용액(5N hydrochloric acid : ethanol, 3 : 7, HCl 최종농도: 1.5N)을 넣어 용해시키고 2시간 동안 100℃에서 가열하여 가수분해한 후 이 산가수분해물을 apigenin의 표준품과 같은 조건에서 HPLC로 분석한 결과 apigenin에 해당하는 peak가 관찰됨을 확인하였다(Fig. 10). 이를 이용하여 파슬리의 70% ethanol 추출물에 함유된 apigenin의 함량을 구한 결과 실험에 사용된 파슬리 분말 중의 apigenin 함량은 55 $\mu$ g/mg으로 추정되었다.

파슬리의 70% ethanol 추출물을 HPLC에 주입하여 분석한 결과 apigenin에 해당하는 peak가 처음에는 확인되지 않았는데 이는 아마도 파슬리에는 대부분의 apigenin이 glycoside형태인 apiin의 형태로 존재하기 때문이라고 생각된다. 따라서 파슬리의 70% ethanol 추출물에 염산 용액을 가하여 산의 최종 농도를 1.5 N HCl로 맞추고 100℃에서 2시간 동안 산 가수분해 시켜서 분석을 한 결과 HPLC chromatogram 상에 apigenin에 해당하는 peak가 확인되었다. 파슬리에 함유된 apigenin의 함량은 검량곡선을 이용한 계산 결과 55 $\mu$ g/mg(5.5%)으로 비교적 높게 측정되었다. 그리고 파슬리에 존재하는 apiin은 인체 내에서 분해되어 apigenin이 유리되기 때문에(27) 파슬리 추출물을 굳이 가수분해 시키고 나서 식용으로 사용해야할 필요성은 없는 것으로 판단된다.

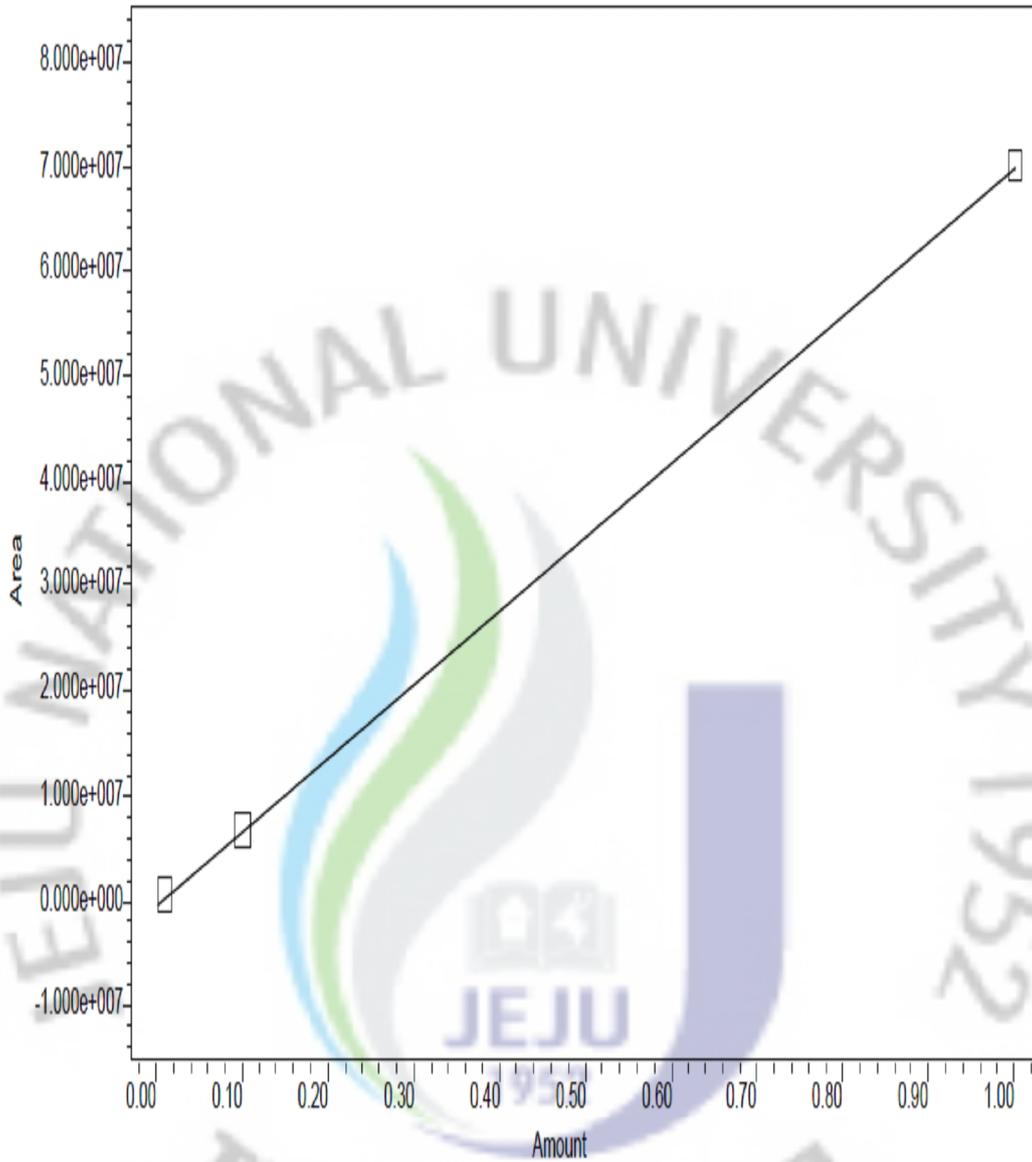


Fig. 9. Calibration curve for apigenin.

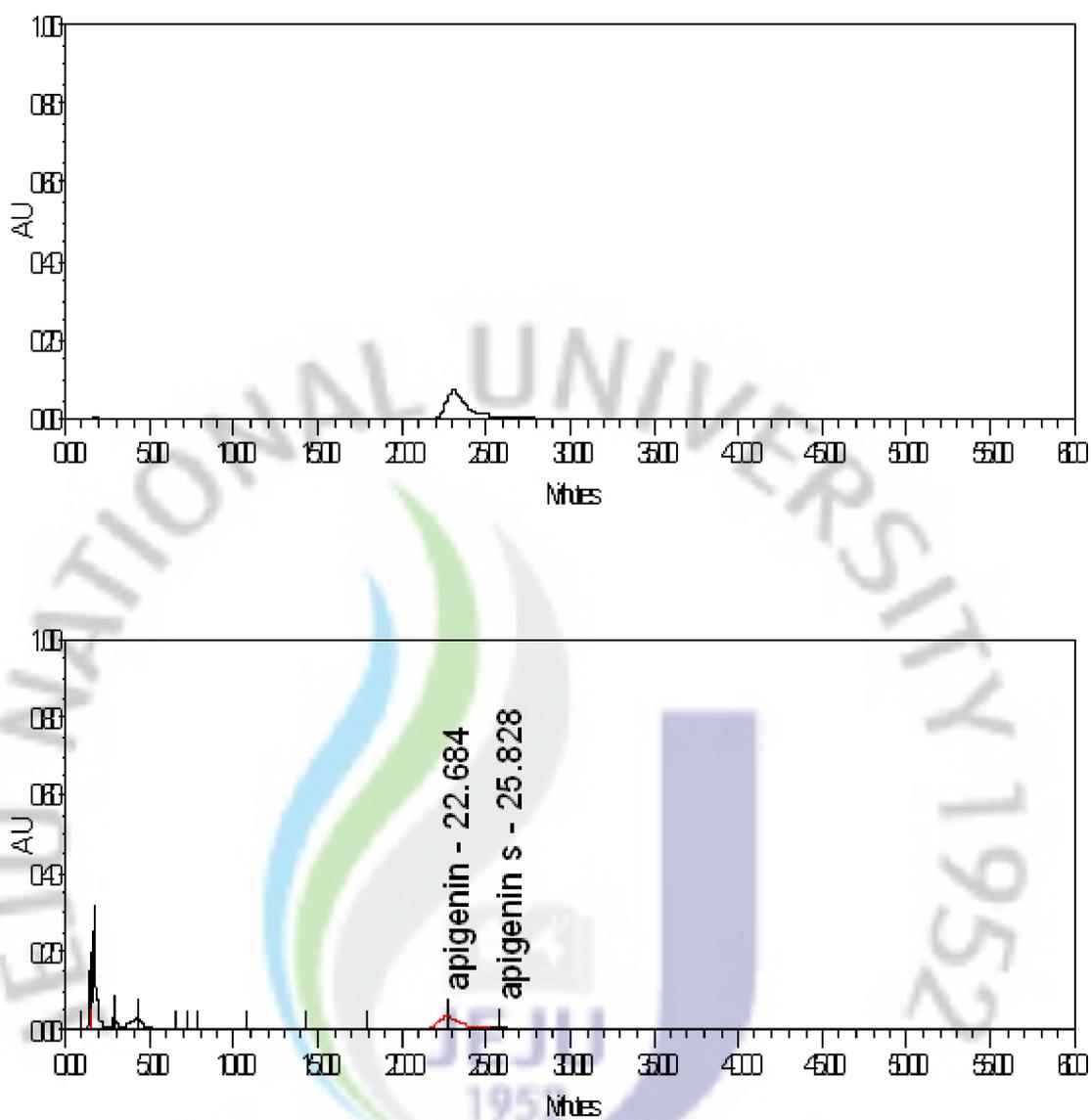


Fig. 10. HPLC chromatograms of apigenin 0.1 mg/ml(top) and hydrolyzed 70% ethanol extract of parsley 1 mg/ml(bottom) with 33% ethanol as mobile phase.

### 3.5. Apigenin 추정 peak의 질량 확인

DMSO에 100ppm으로 용해한 apigenin 표준품과 파슬리 가수분해 분획물이 같은 apigenin 인지 확인하기 위하여 질량분석기에서 전자분무 형태로 이온화시켜 질량을 측정된 결과 270.9 (m/z) peak와 272.1 (m/z) peak가 동일하게 검출되었다(Fig. 11, 12).

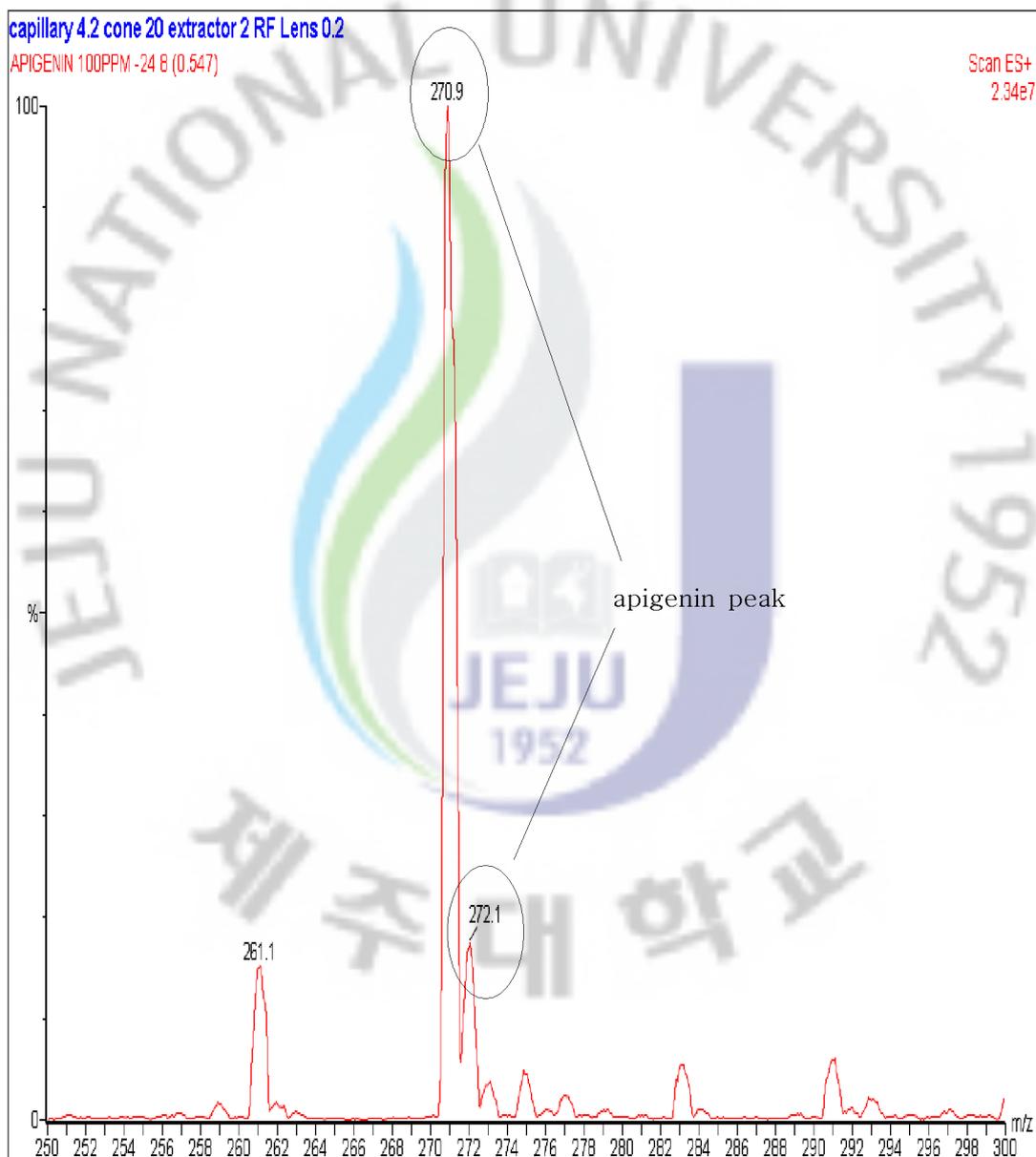


Fig. 11. Mass spectrum of the apigenin dissolved in DMSO(100ppm).

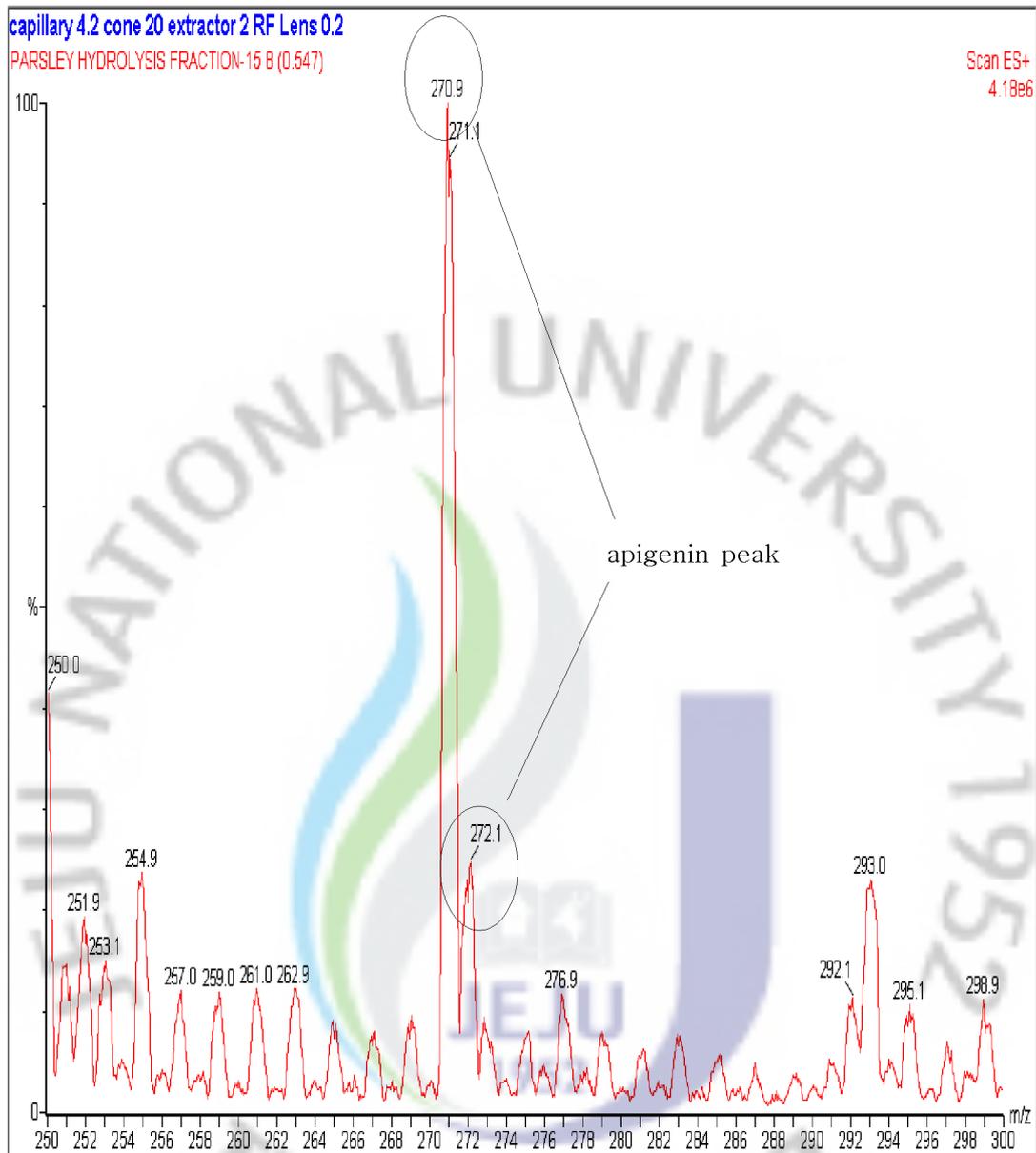


Fig. 12. Mass spectrum of the parsley hydrolysed fraction.

Apigenin인지 확실하게 검증하기 위하여 질량분석을 실시한 결과 다른 분자량 peak가 여러 부분에서 나와 질량분석기의 probe부분이 오염된 것으로 판단되어 검출 질량을 250~300(m/z) 으로 선택하여 검출하였다. Apigenin의 분자량은 270.24로 알려져 있는데 mass spectrum에서는 standard apigenin과 파슬리 가수분해 분획물의 분자량이 270.9와 272.1의 동일한 2개의 peak로 변형되어 검출이 되어 거의 동일한 물질임을 알 수 있었다. Peak가 2개로 나온 것은 아마도 동위원소에 의한 peak 분리 인 것으로 추측된다(29).

본 연구 결과는 잠재적으로 항 influenza의 중요한 표적인 neuraminidase에 대한 정보를 제공하며 apigenin과 파슬리의 활용을 더 촉진하고 부가가치를 높이는데 활용될 수 있을 것이다.



## II. 항산화성 천연화합물의 superoxide dismutase, catalase 촉진 능력

### 1. 서 론

산소 분자를 전자수용체로 이용하여 생명을 유지하는 세포는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하는데 이와 같은 ROS는 안정된 상태의 산소분자인 삼중항산소(triple let oxygen)에 비하여 반응성이 크기 때문에 유기물의 생합성이나 분해, 식세포에 의한 살균 작용 등 생체 내에서 여러 가지 반응에 쓰인다. 반면에 세포막 지질의 과산화 반응 촉진, 핵산과 단백질의 변성, 심혈관계 질환을 일으키는 등 세포에 유해한 작용을 한다(30, 31). ROS 중에서 자유라디칼(free radical)로는 superoxide anion( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical( $HO\cdot$ ), peroxy radical( $ROO\cdot$ ) 등이 있으며 내생적 자유라디칼(endogenous free radicals), 즉 인체 내에서 형성되는 라디칼은 세포가 영양물질을 소화하는 동안 정상적인 대사과정을 통하여 필연적으로 생성된다. 반면, 외생적 자유라디칼(exogenous free radicals), 즉 생체 외에서 생성되는 라디칼은 환경적 요인에 의해서 생성된다. 이와 같이 생성된 자유라디칼은 불안정한 물질로서 정상세포를 공격하여 노화와 관련된 각종 퇴행성 질환과 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병, 순환기 장애, 관절염, 암 등의 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(30). 따라서 사람을 비롯한 호기적 생물체는 ROS에 의한 피해를 방지하기 위하여 superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT)와 glutathione peroxidase(GPx) 같은 항산화 효소 또는 ascorbic acid(vitamin C), tocopherol(vitamin E) 같은 항산화 물질을 갖고 있거나 외부에서 얻어 활용한다(32). 뿐만 아니라 polyphenol과 같은 항산화 물질은 자유라디칼을 소거하는 성질이 있어서 ROS에 의한 피해를 막아줄 수 있다. SOD는 superoxide anion( $O_2^{\cdot-}$ )에 양성자(proton)를 주어 과산화수소(hydrogen peroxide)와 산소분자로 분해하여 제거하는 매우 중요한 항산화효소이며 CAT는 과산화수소(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )를 효소

중심의 철 분자를 이용하여 물과 산소로 분해시키는 반응을 촉진한다. 본 실험에서는 인위적으로 활성산소종을 생성하기 위해 AAPH (2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride)를 사용하였는데 급성적 산화 스트레스를 유발시켜 자유라디칼(free radical)을 생성하는데 쥐(rat)에게 복강투여를 하게 되면 수분 내에 혈류를 타고 전신을 순환하며 산소분자와 반응하여 peroxy radical을 형성하여 여러 형태의 생물구성 물질과 결합 반응을 일으켜 생체막의 구조를 파괴하는 것으로 알려져 있다(33). 그래서 이런 인위적인 활성산소종을 막기 위해 제주자생천연식물추출물인 붉나무, 아그배나무, 새우나무를 이용하였다.

붉나무(*Rhus javanica*)는 속나무과에 속한 낙엽소교목으로 주로 수렴제나 해독제로서의 기능을 나타내고 설사, 각혈, 토혈, 요혈 및 구강염 등에 약제로 쓰이기도 하며 항산화 및 항균효과 등을 가진다고 보고되었다(42, 43). 아그배나무(*Malus sieboldii*)는 사과모양의 작은 빨간 열매를 맺는 장미목 장미과의 낙엽소교목으로 항산화능이 뛰어나다고 알려져 있다(43). 새우나무(*Ostrya japonica*)는 우리나라 남부 산 중턱 이하의 산골짜기에 나는 낙엽 교목으로 메탄올 추출물의 생리활성을 측정한 결과 높은 수준의 폴리페놀에서 유래하는 항산화 능력이 강한 것으로 보고되었다(43, 44).

본 연구에서는 쥐(rat)에 ethanol을 투여하여 산화적 스트레스를 유발시켰을 때 ascorbic acid 또는  $\alpha$ -tocopherol 섭취로 SOD와 CAT 생성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 이러한 실험을 바탕으로 하여 쥐의 체내에 인위적으로 ROS를 발생시키기 위해서 ethanol대신 AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, 97%, Sigma-Aldrich)의 복강 투여로 인위적인 ROS를 유발시켰고(33) 총 폴리페놀 함량이 많고 항산화 효과가 높은 것으로 보고된 붉나무(*Rhus javanica*), 아그배나무(*Malus sieboldii*) 그리고 새우나무(*Ostrya japonica*)등 3종의 제주자생식물의 고압용매추출물을 경구 투여하여 SOD와 CAT 생성에 미치는 영향을 조사하였다(44).

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. Ascorbic acid와 $\alpha$ -tocopherol의 SOD와 CAT 생성에 미치는 영향

#### 2.1.1. 실험동물 사육 및 식이

실험동물은 (주)대한바이오링크에서 분양 받은 6주령 Sprague-Dawley종 rat 수컷을 사용하였으며 시료를 투여하기 전에 구입 후 1주일의 순치기간을 두었다. 펠릿(pellet) 형태의 실험동물용 사료(제IIB420001호, 제일사료주식회사)를 급여하였으며 그 성분은 Table 6과 같다.

Table 6. Nutritional composition of basal diet of rats

Ingredient	Composition(%)
Crude protein	>22.5
Crude fat	>3.5
Crude fiber	<7.0
Crude ash	<10.0
Calcium	>0.7
Phosphorus	<1.0

식수는 멸균된(121°C, 15min) 수돗물을 사용하여 사료와 마찬가지로 자의적으로 먹고 마실 수 있게 자유 급식하였으며 대조군과 실험군은 각 처리별로 5마리 씩 나누었고 온도는 22±2°C, 습도 50~60%, 명암주기는 12시간 간격으로 조절하였다(34).

#### 2.1.2. 스트레스 유발 및 항산화제의 처리

비타민 C(ascorbic acid, 99.6%, Junsei, Japan)는 10 mg/ml로 증류수에 용해한 용액으로 하루에 3ml씩, 비타민 E( $\alpha$ -tocopherol, 96%, Sigma-Aldrich)는 10 mg/ml로 대두유(soybean oil)에 용해한 용액을 하루에 1ml씩, 그리고 ethanol(10%)은 하루에 3ml씩 5~9일간 경구 투여하였다.

### 2.1.3. SOD와 CAT의 효소활성 측정

시료 투여 5~9일 후 꼬리정맥으로부터 1ml씩 채혈하였고 채혈하여 얻은 혈액은 30분간 정치시킨 후 2,000Xg, 4℃에서 원심분리하여 혈청을 얻었다. Superoxide dismutase(SOD) assay kit(Dojindo, Japan)와 catalase(CAT) assay kit(Cayman, USA)를 이용하여 혈청내의 SOD와 CAT의 활성을 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하였다. SOD활성 측정은 superoxide anion이 water-soluble tetrazolium salt(WST-1) 즉, (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 환원시켜서 그로부터 수용성 formazan dye가 생성되는 원리를 이용한다. WST-1 formazan의 양은 450nm에서 흡광도를 측정하여 계산할 수 있다. 따라서 superoxide anion이 많을수록 흡광도가 높고 SOD 활성이 높을수록 흡광도는 감소한다.

CAT은 과산화효소활성이 있어서 저분자량의 알코올을 전자공여체로 사용할 수 있다. 효소활성의 측정은 hydrogen peroxide에 의해서 methanol이 산화되어 생성된 formaldehyde가 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole(Purpald, 발색제)와 반응하여 Purpald가 산화되면서 무색에서 purple color로 발색되는 원리를 이용한다. 발색 정도는 540nm에서의 흡광도로 측정하였다.

## 2.2. 식물성 항산화 물질의 SOD와 CAT 생성에 미치는 영향

### 2.2.1. 식물 추출물 시료의 제조

붉나무(*Rhus javanica*), 아그배나무(*Malus sieboldii*)를 고압 용매 추출장치(SFX 3560, Isco Inc., USA)를 이용하여 추출한 것과 새우나무(*Ostrya japonica*)를 같은 장치로 고압 용매 추출한 후 Sephadex LH-20을 사용하여 280nm peak 기준으로 분획한 것을 제주대학교 식품생명공학과 분리공정 실험실로부터 제공받았다. 이들 추출물에는 항산화성 폴리페놀화합물이 다량 함유되어 있는 것으로 보고 되어있다(43, 44). 각 추출물 시료는 증류수를 가하여 10,000ppm으로 조제한 후 사용하였다.

### 2.2.2. 스트레스 유발 및 시료의 투여

SD rat를 Table 7과 같이 7개 실험군(group)으로 나누어 8일 동안 매일 체중 측정 후 각종 시료를 복강 또는 경구투여 하였다. 복강투여 시 control group(정상식이군)에는 0.9% saline을 체중 당 1 mL/kg의 부피로 투여하였고 나머지 negative group과 식물시료 투여 group에는 AAPH(2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride)를 0.9% saline에 용해하여 50 mg/kg의 농도로 투여하였다(36). 경구투여 시 control group과 negative group에는 0.9% saline을 체중 당 10 mL/kg의 농도로 투여 하였고 식물시료 투여 group에는 각 시료를 100 mg/kg으로 투여하였다(Table 7).

Table 7. Description of experimental rat group

Each group	Intraperitoneal injection	Per oral
Control	0.9% saline, 1,000 uL/kg	0.9% saline, 10 mL/kg
Negative	50 mg/mL AAPH in 0.9% saline, 50 mg/kg	0.9% saline, 10 mL/kg
Bugnamu	50 mg/mL AAPH in 0.9% saline, 50 mg/kg	extract, 100 mg/kg
Agubaenamum	50 mg/mL AAPH in 0.9% saline, 50 mg/kg	extract, 100 mg/kg
Saeunamu EXT	50 mg/mL AAPH in 0.9% saline, 50 mg/kg	extract, 100 mg/kg
Saeunamu F4-F6	50 mg/mL AAPH in 0.9% saline, 50 mg/kg	fraction, 100 mg/kg
Saeunamu F7-F8	50 mg/mL AAPH in 0.9% saline, 50 mg/kg	fraction, 100 mg/kg

### 2.2.3. 체중과 장기 무게 측정

체중 측정은 동물용 저울(Ohaus, USA)로 장기무게는 분석용 전자저울(Scaltec, Germany)로 측정하였다. 체중은 매일 측정하였으며 장기무게는 적출 후 즉시 측정하였다.

#### 2.2.4. 장기적출 및 채혈

8일간의 시료 투여기간이 지난 후에 해부를 실시하여 장기를 적출하고 채혈하였다. 쥐는 해부하기 12시간 전부터 절식시켰다. Diethyl ether(99.7%, Merck)를 탈지면에 적서 쥐를 마취시켰고 간, 비장 그리고 신장을 적출하여 PBS용액(0.01M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.00176M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.137M sodium chloride, 0.0027M potassium chloride, pH 7.4)에 담아 혈액을 제거하였다. 그 후에 남은 PBS를 제거하여 장기 무게를 측정 한 후  $-70^\circ\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다. 혈액은 심장을 통하여 약 3~10 ml의 전혈을 얻었다.

#### 2.2.5. 혈청과 liver homogenate 제조

심장에서 채혈한 전혈을 30분간 실온에서 정치시킨 후에  $4^\circ\text{C}$ 에서  $2,000\times\text{g}$ 로 15분간 원심분리하여 상정액(혈청, serum)을 얻었다. Liver homogenate는 용도에 따라 두 가지 방법으로 얻었다. CAT 측정용 시료는 kit sample buffer를 간 조직의 5배로 넣고 tissue grinder로 잘 분쇄한 후에  $4^\circ\text{C}$ 에서  $10,000 \times\text{g}$ 로 15분간 원심분리하여 상정액을 얻었다. SOD 측정용 시료는 sucrose buffer(0.25M sucrose, 0.01M HEPES, 0.001M EDTA, pH7.4)를 간 조직의 5배로 넣고 tissue grinder로 분쇄한 후에  $4^\circ\text{C}$ 에서  $10,000\times\text{g}$ 로 60분간 원심분리하여 상정액을 분리하였다.

#### 2.2.6. SOD 활성 측정

쥐의 liver homogenate와 심장에서 채혈하여 분리한 혈청의 SOD 활성을 Dojindo사의 SOD assay kit로 측정하였다. 다만 kit 사용 시 liver homogenate에 존재하는 xanthine oxidase의 영향을 고려하여(37) 제시된 manual protocol을 기준으로 blank 2 well에  $200 \mu\text{l}$ 의 WST working solution 대신에  $200 \mu\text{l}$ 의 dilution buffer나 증류수를 사용하였다. 흡광도는 microplate reader(Biotek, USA)로 450 nm에서 측정하였고 시료처리군 간의 효소 활성 비교는 아래 계산을 이용하였다.

$$\frac{(\text{Blank1 absorbance} - \text{Blank3 absorbance}) - (\text{Sample absorbance} - \text{Blank2 absorbance})}{(\text{Blank1 absorbance} - \text{Blank3 absorbance})} \times 100$$

#### SOD activity in serum

Sample absorbance: sample solution(20 $\mu$ l)+WST working solution(200 $\mu$ l)+enzyme solution(20 $\mu$ l)

Blank1 absorbance: distilled water(20 $\mu$ l)+WST working solution(200 $\mu$ l)+enzyme solution(20 $\mu$ l)

Blank2 absorbance: sample solution(20 $\mu$ l)+WST working solution(200 $\mu$ l)+dilution buffer(20 $\mu$ l)

Blank3 absorbance: distilled water(20 $\mu$ l)+WST working solution(200 $\mu$ l)+dilution buffer(20 $\mu$ l)

#### SOD activity in liver

Sample absorbance: sample solution(20 $\mu$ l)+WST working solution(200 $\mu$ l)+enzyme solution(20 $\mu$ l)

Blank1 absorbance: distilled water(20 $\mu$ l)+WST working solution(200 $\mu$ l)+enzyme solution(20 $\mu$ l)

Blank2 absorbance: sample solution(20 $\mu$ l)+dilution buffer(200 $\mu$ l)+dilution buffer(20 $\mu$ l)

Blank3 absorbance: distilled water(20 $\mu$ l)+WST working solution(200 $\mu$ l)+dilution buffer(20 $\mu$ l)

#### 2.2.7. CAT 활성 측정

쥐의 liver homogenate와 심장에서 채혈하여 분리한 혈청의 CAT 활성을 Cayman사의 CAT assay kit로 측정하였다. 흡광도는 microplate reader(Biotek, USA)로 540 nm에서 측정하였다. 시료가 흡광도에 미치는 영향을 제거하기 위하여 효소반응이 끝난 후에 시료를 넣은 것을 대조구(blank)로 사용하여 흡광도를 계산하였다.

#### 2.2.8. 혈청 화학 검사

심장으로부터 채혈하여 분리한 혈청을 제주대학교 RIC(Regional innovation center)에 의뢰하여 Clinical Chemistry Analyzer(BPC BioSed, Italy)로 검사하였다.

#### 2.2.9. 통계처리

각 group간의 통계학적 유의성은 SPSS 12.0K for windows를 이용하여 독립표본 T-검정을 실시하였고 모든 자료의 통계적 유의수준은  $\alpha=0.05$ 로 설정하였다(38).

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Ascorbic acid와 $\alpha$ -tocopherol의 SOD와 CAT 생성에 미치는 영향

SOD와 CAT는 생체 내에서 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)에 의해서 세포기능이 손상되는 것을 방어해주는 중요한 기능을 수행하는데 동물은 이들 효소를 대량으로 보유하고 있다. 이들 효소는 산화적 스트레스가 주어졌을 때 ROS로부터 세포를 보호하고 세포 기능을 정상으로 유지할 수 있도록 ROS의 일종인 superoxide anion을 SOD가 산소분자와 과산화수소(hydrogen peroxide)로 분해시키면 CAT는 hydrogen peroxide를 물과 산소로 분해시킴으로써 산화적인 손상으로부터 세포를 보호한다(39, 40, 41).

에탄올(ethanol)과 ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol은 혈중 SOD 농도에 거의 영향을 끼치지 않았다(Table 8). 이는 쥐에게 ethanol을 투여해도 superoxide anion의 생성에는 영향을 끼치지 못함을 시사한다. 그와 반면에 에탄올(ethanol)의 투여는 혈중 catalase 농도를 30%가량 증가시켰으며 ascorbic acid는 혈중 catalase 농도를 20% 정도 감소시켰다(Table 9). 따라서 tocopherol과 ascorbic acid는 에탄올 투여로 증가된 혈중 과산화수소( $H_2O_2$ ) 농도를 낮추는데 기여했다고 추측할 수 있다. 이러한 결과로 볼 때 ethanol이 과량으로 체내에 유입되었을 때 ethanol dehydrogenase 이외의 경로를 통하여 ethanol이 직접 산화되는 것으로 추정된다(34).

Table 8. Changes in SOD levels of rats fed on ascorbic acid, tocopherol and ethanol

Relative SOD levels in serum(%)				
Fed on normal diet (control)	Fed on ascorbic acid	Fed on ethanol	Fed on both ascorbic acid and ethanol	Fed on both tocopherol and ethanol
100	98	97	100	99

Table 9. Changes in CAT levels of rats fed on ascorbic acid, tocopherol and ethanol

Relative CAT levels in serum(%)				
Fed on normal diet (control)	Fed on ascorbic acid	Fed on ethanol	Fed on both ascorbic acid and ethanol	Fed on both tocopherol and ethanol
100	79	129	100	108

에탄올(ethanol)과 항산화제인 ascorbic acid와 a-tocopherol은 쥐의 혈중 SOD 농도에 별다른 영향을 끼치지 않았다. 반면에 에탄올(ethanol)은 혈중 CAT 농도를 30%가량 증가시켰으나 ascorbic acid는 혈중 CAT 농도를 20% 정도 감소시켰다. 따라서 tocopherol과 ascorbic acid는 에탄올 투여로 증가된 혈중 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 농도를 낮추는데 기여했다고 추정할 수 있다(47).

### 3.1. 체중의 변화

체중은 시료 투여 첫 날 모든 실험군이 246 ~ 248g을 유지하였으나 투여 2일째부터 대조구(control group, 정상식이군)에서만 증가하였고 나머지 실험군에서는 체중이 감소하기 시작하였다. 8일 째에는 격차가 더 벌어져서 대조구에서 평균 체중이 294.2±14g임에 비하여 SOD 유발제인 AAPH를 투여한 음성대조구(negative group)에서는 202.4±28.2g이었다. 그리고 AAPH와 식물추출물을 동시에 투여한 불나무 group의 평균 체중이 197±11.8g, 아그배나무 group은 187.4±13.9g, 새우나무 추출물 group은 207.8±8.6g, 새우나무 분획물 F4-F6 group은 211.4±16.5g, 새우나무 분획물 F7-F8 group은 207.7±13.9g으로 모두 대조구(control group)에 비해서 체중이 감소하였다(Table 10, Fig. 15). 이러한 체중감소는 모두 AAPH의 투여로 유발된 것으로 AAPH 투여 group에 속하는 불나무, 아그배나무, 새우나무 추출물, 새우나무 분획물 F4-F6 그리고 새우나무 분획물 F7-F8 group의 평균 체중 감소에 대하여 독립표본 T-검정을 실시한 결과 모두  $p > 0.05$  수준에서 유의성은 없었다.

Table 10. Changes in body weight of rats during feeding of plant extracts and fractions

Breeding Time	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day
Control	246.5±1	253.4±1	260.1±1	263.1±2	275.5±1	281.0±1	288.3±1	294.2±1
Negative	4.9	2.5	0.1	2.4	1.8	3.9	4.7	4.0
Bugnamu	246.8±8.	240.6±1	234.6±1	233.0±2	226.7±2	216.5±2	207.9±2	202.4±2
Agubaena	5	5.6	9.1	1.7	2.0	2.9	4.6	8.2
mu	246.4±6.	241.5±6.	236.2±5.	229.6±1	220.7±1	213.0±1	204.3±1	197.0±1
Saeunamu	7	7	5	0.2	2.0	3.1	4.1	1.8
Ext	248.3±5.	240.5±9.	226.9±1	220.4±9.	218.3±1	208.2±1	199.0±1	187.4±1
Saeunamu	8	0	0.2	2	4.8	4.1	2.7	3.9
F4-F6	250.8±3.	247.6±4.	238.1±1	229.1±6.	223.8±6.	216.7±6.	212.1±8.	207.8±8.
Saeunamu	4	3	1.6	5	1	4	7	6
F7-F8	246.2±3.	241.1±7.	237.4±7.	234.6±6.	228.9±1	222.1±1	217.1±1	211.4±1
	3	7	5	7	1.4	3.7	5.8	6.5
	246.7±7.	233.9±9.	231.1±1	225.7±1	222.3±1	217.6±1	212.6±1	207.7±1
	9	8	1.2	2.2	3.2	5.3	3.9	3.9

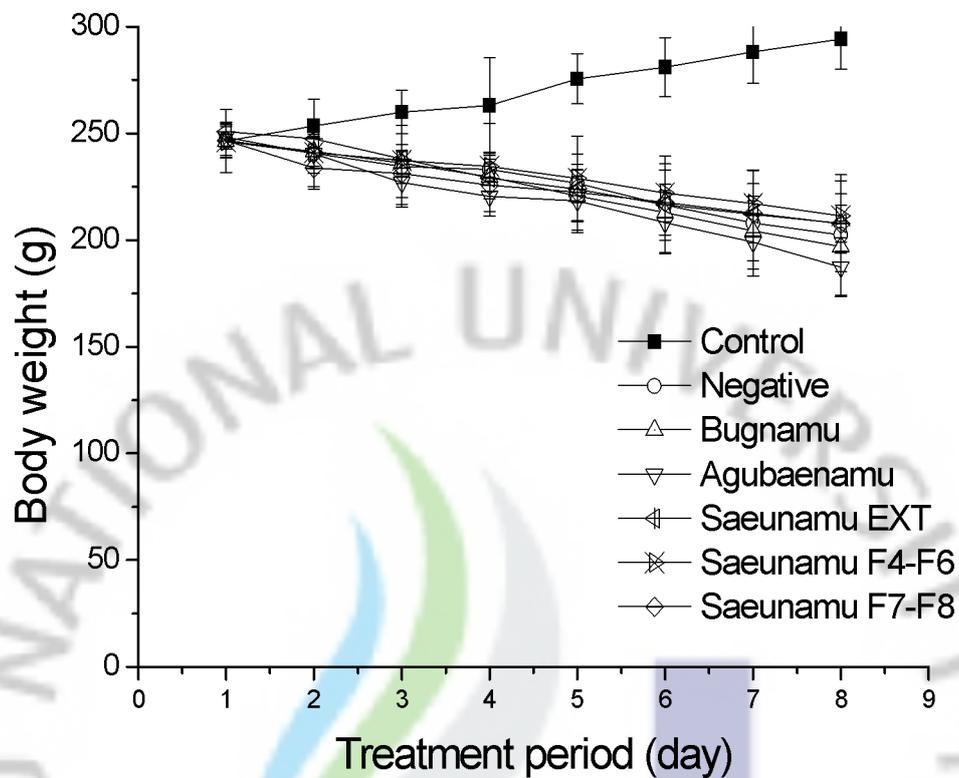


Fig. 15. Changes in body weight of rats during feeding of plant extracts and fractions.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's body weight was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamum: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamum EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamum F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamum F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

취의 체중은 대조구(정상식이군, control group)에서만 증가하고 나머지 실험군에서는 감소하였다. 이는 AAPH에 의한 산화적 세포 손상 때문으로 소화기가 손상을 받아 사료 섭취에 대한 욕구를 낮추고 사료를 섭취하여도 대사되지 않았기 때문이라고 추측된다.

### 3.2. 간, 비장, 신장의 무게

시료를 8일간 투여한 후에 간, 비장 그리고 신장을 적출하여 무게를 측정하고 결과 대조구(control group)에 비하여 나머지 실험군(group)들은 모두 감소하였다(Table 11). 독립표본 T-검정으로 통계학적인 유의성을 검정한 결과 AAPH를 투여하지 않은 control group과 AAPH를 투여한 음성대조구(negative group)간에는 유의적 차이가 인정되었으나 negative group와 AAPH와 식물추출물 시료를 동시에 투여한 모든 실험군(group)간에는  $p > 0.05$  수준에서 유의성이 없었다(Fig. 16-18). 따라서 장기의 무게 차이는 AAPH 투여로 유발된 것이며 이는 체중의 변화와 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

Table 11. Changes in organ weight after breeding

	Liver	Spleen	Kidney
Control	10.807±1.225	0.702±0.069	2.663±0.118
Negative	7.277±1.074	0.377±0.129	2.167±0.253
Bugnamu	6.737±0.626	0.358±0.045	2.130±0.138
Agubaenam	7.044±1.353	0.265±0.039	2.087±0.052
Saeunamu Ext	6.913±0.636	0.432±0.077	2.138±0.132
Saeunamu F4-F6	6.885±0.512	0.415±0.042	2.139±0.221
Saeunamu F7-F8	7.553±0.621	0.411±0.054	2.155±0.148

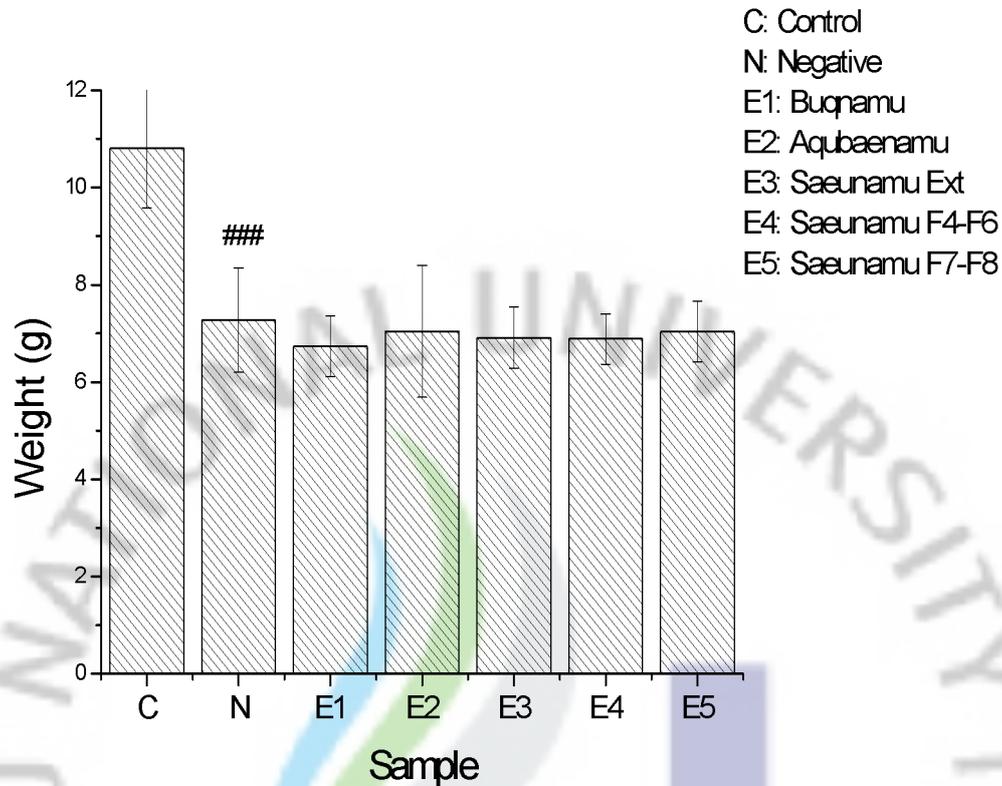


Fig. 16. Changes in liver weight of rats during feeding of plant extracts and fractions.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's liver weight was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamumu: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

###: Significant at  $p < 0.05$  compared with control group

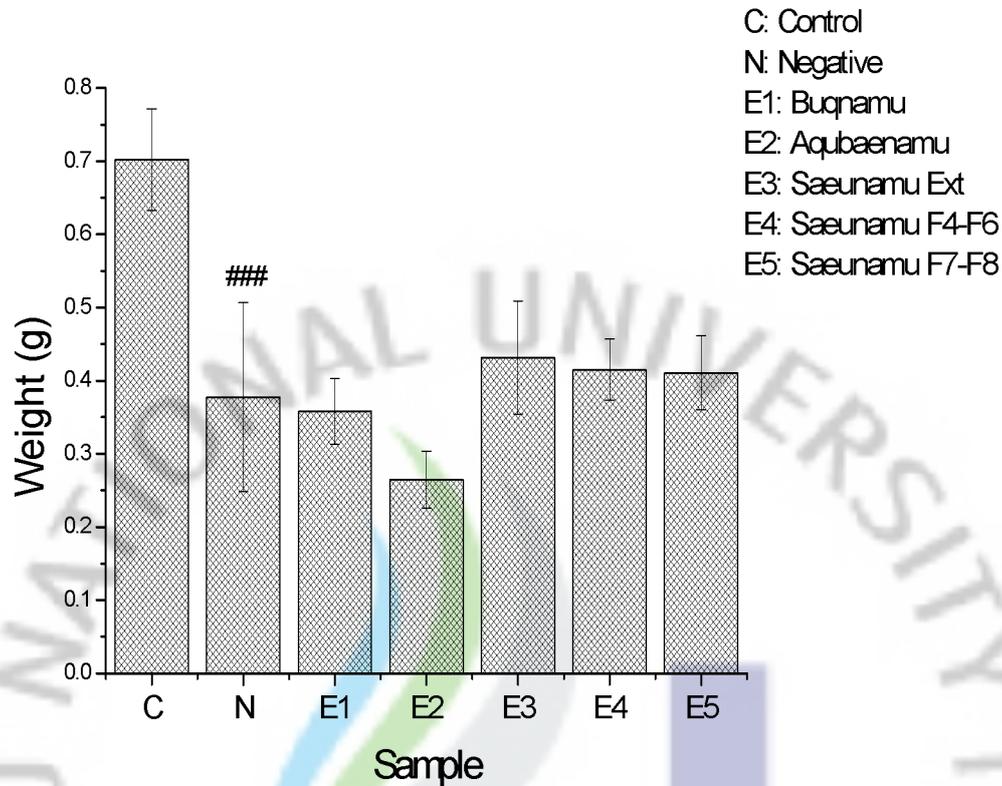


Fig. 17. Changes in spleen weight of rats during feeding of plant extracts and fractions.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's spleen weight was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamum: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

###: Significant at  $p < 0.05$  compared with control group

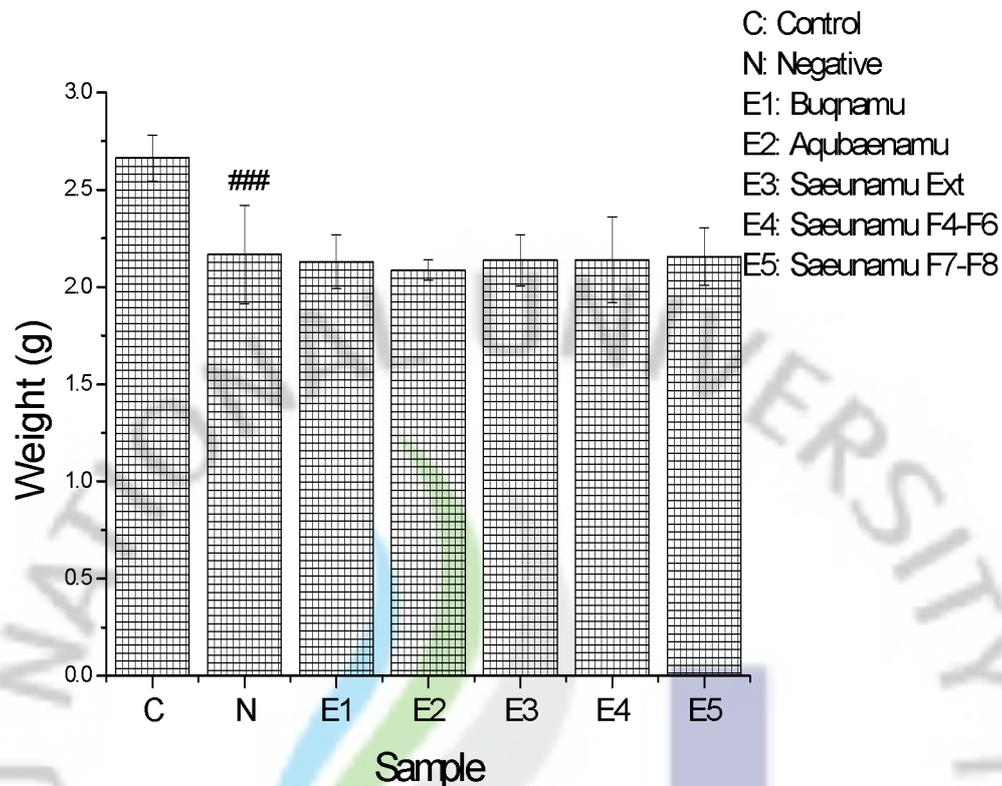


Fig. 18. Changes in kidney weight of rats during feeding of plant extracts and fractions.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's kidney weight was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamumu: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

###: Significant at  $p < 0.05$  compared with control group

### 3.4. SOD 활성

혈청 내의 SOD 활성은 대조구(control group)에 비하여 AAPH를 투여한 음성대조구(negative group)에서 평균 약 10% 가량 증가하였고 식물추출물을 처리한 모든 실험군(group)에서는 거의 평균 40% 이상 증가하였다. Control group과 negative group 간에는 유의성이 인정되지 않았으나 negative group에 비하여 아그배나무를 제외한 붉나무, 새우나무 추출물, 새우나무 분획물 F4-F6, 새우나무 분획물 F7-F8을 처리한 모든 실험군(group)에서 T-검정결과 유의적인 차이가 인정되었다(Fig. 19).

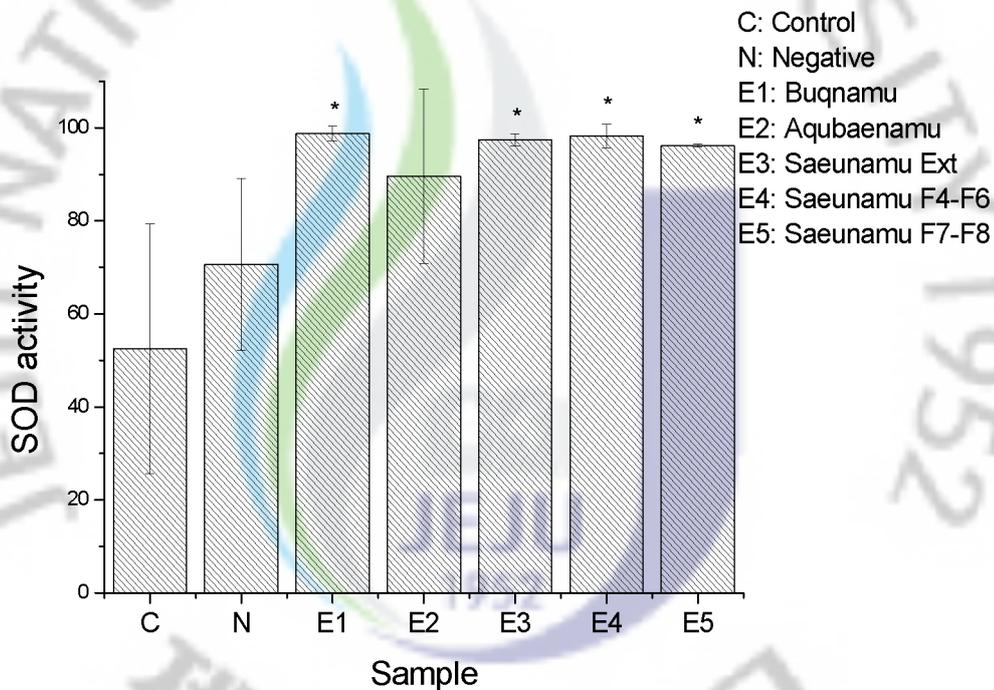


Fig. 19. Changes of SOD activity in blood serum.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's serum SOD activity was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Buqnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Aqubaenamum: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

\*: Significant at  $p < 0.05$  compared with negative group

혈청 SOD의 경우 대조구에 비하여 AAPH를 처리한 음성대조구(negative group)에서 SOD 활성이 상승하였지만 유의성은 없었으며 음성대조구에 비해 붉나무 처리구의 경우 유의성 있게 증가하였다. 아그배나무 처리구의 경우 증가하였으나 유의성은 없었다. 새우나무 처리구에서는 모두 유의성 있게 증가하였다( $p>0.05$ ).

그리고 간에서의 SOD 활성은 control group에 비하여 AAPH를 투여한 negative group은 유의적인 증가를 나타냈고 negative group에 비하여 새우나무 추출물 group, 새우나무 분획물 F4-F6, F7-F8 group 간에도 T-검정결과 유의성 차이를 나타내었다(Fig. 20).



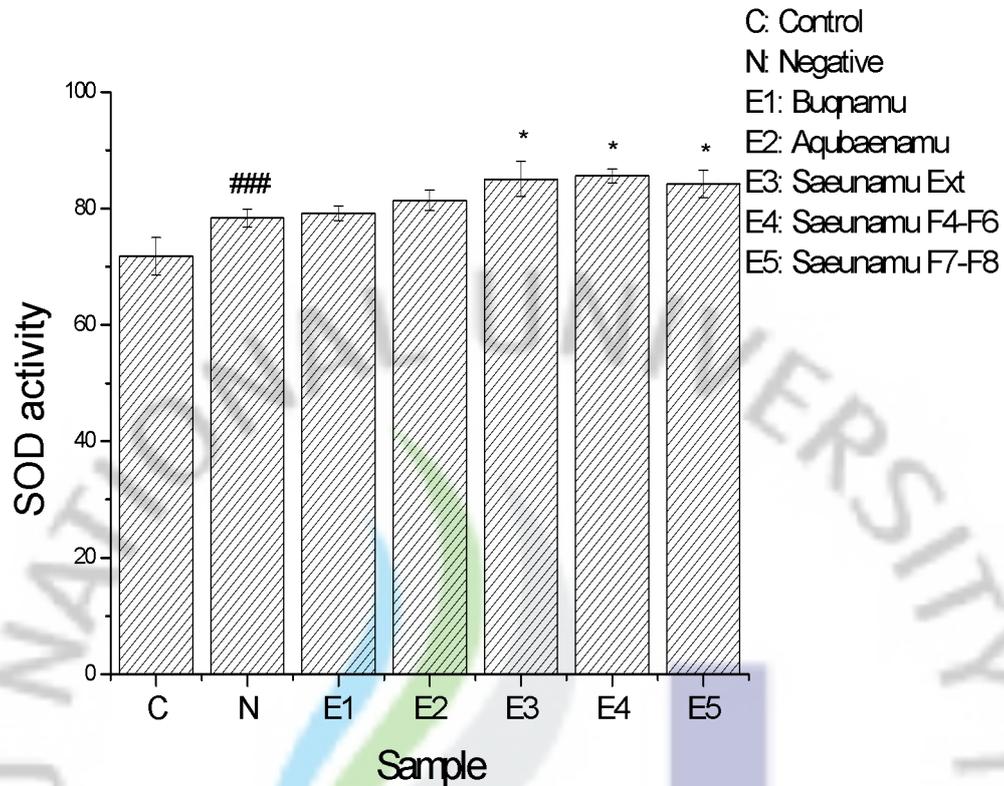


Fig. 20. Changes of SOD activity in liver.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's liver SOD activity was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamu: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

###: Significant at  $p < 0.05$  compared with control group

\*: Significant at  $p < 0.05$  compared with negative group

간 SOD의 경우 대조구에 비해 유의성 있게 음성대조구에서 SOD 활성이 증가하였고 붉나무와 아그배나무 처리구에서 조금 더 상승하였지만 유의성은 없었다. 새우나무, 새우나무M1과 새우나무M2 처리구에서는 유의성 있게 증가하였다( $p>0.05$ ). 이는 AAPH의 투여뿐만 아니라 식물추출물의 투여 또한 SOD 활성을 증가시킴을 시사한다.

### 3.5. CAT 활성

혈청 내의 CAT 활성을 조사한 결과(Fig. 21) 대조구(control group)에 비해 AAPH를 투여한 음성대조구(negative group)에서 상승하였다. AAPH로 유발된 CAT 활성의 증가는 붉나무 추출물의 투여로 상쇄되었다. 아그배나무 group과 새우나무 추출물 group, 새우나무 분획물 F4-F6 group에서도 negative group에 비하여 CAT 활성이 감소하였지만 유의성은 없었다.

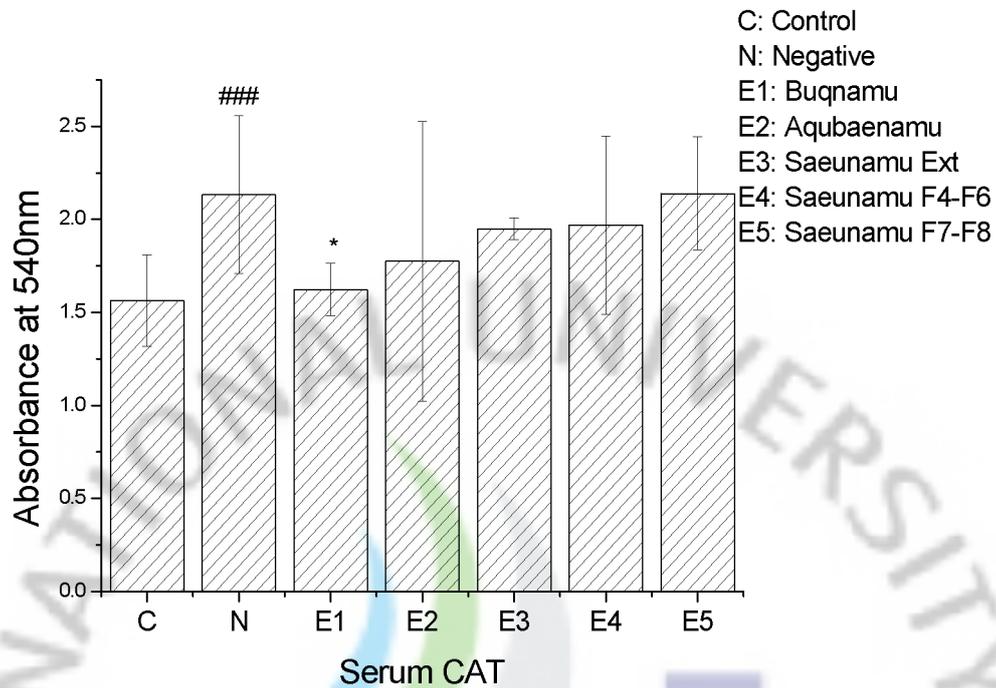


Fig. 21. Changes of CAT activity in serum.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's serum CAT activity was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenam: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

###: Significant at  $p < 0.05$  compared with control group

\*: Significant at  $p < 0.05$  compared with negative group

간 조직의 CAT 활성은 대조구(control group)에 비하여 AAPH를 투여한 음성대조구(negative group)에서 상승하였다. 불나무 추출물과 새우나무 분획물 F4-F6를 투여한 실험군(group)에서는 AAPH로 유발된 CAT 활성이 상쇄되었다. 또한 나머지 아그배나무 group, 새우나무 추출물 group 그리고 새우나무 분획물 F7-F8 group에서도 CAT 활성이 감소하였지만 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 22).

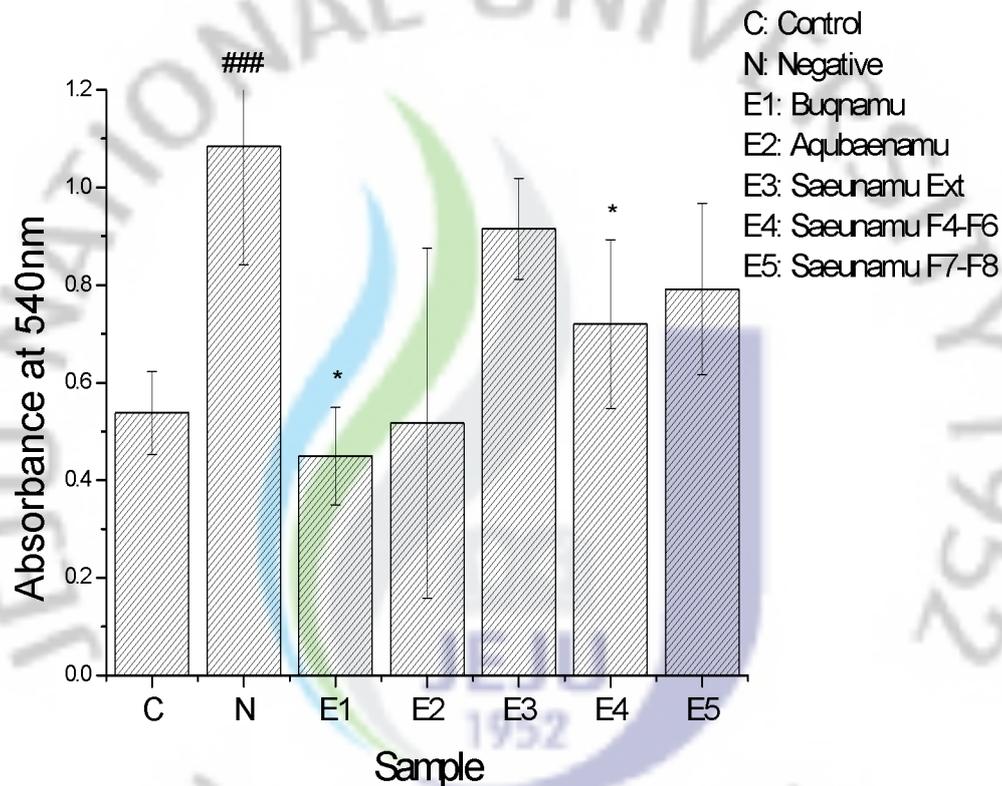


Fig. 22. Changes of CAT activity in liver.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's liver CAT activity was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamum: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

###: Significant at  $p < 0.05$  compared with control group

\*: Significant at  $p < 0.05$  compared with negative group

혈청과 간에서 비슷한 양상을 보이는 이러한 실험결과로 볼 때 AAPH는 CAT 활성을 증가시키나 식물 추출물은 CAT 활성을 감소시키는 기능을 나타내고 있어 이는 항산화제인 tocopherol과 ascorbic acid처럼 식물추출물도 과산화수소를 제거하는데 기여하기 때문이라고 유추할 수 있다.

CAT 활성은 혈청이나 간에서 대조구(control group)에 비하여 AAPH를 투여한 negative group에서 증가하였다. 이러한 현상은 AAPH에 의해서 유발된 ROS의 생성에 대항하기 위해 SOD가 평소보다 더 많이 생산되면서 superoxide anion의 부산물인 과산화수소(hydrogen peroxide)가 증가하기 때문으로 해석된다. 과산화수소를 분해하기 위해서는 CAT도 자연히 더 증가한다(Hann 등, 1995). 따라서 CAT와 SOD 둘 다 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 AAPH 투여로 간에서의 CAT 활성이 증가하였다가 식물추출물(붉나무와 야그배나무 fraction 4-6)의 투여로 CAT 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 쥐에 이는 알코올을 투여했을 때 혈청 CAT 활성이 증가하였다가 항산화제(ascorbic acid와 tocopherol)투여로 CAT 활성이 감소하는 실험 결과와 그 경향이 유사하였다.

### 3.6. 혈당량

혈청 중의 포도당 농도(blood serum glucose)는 대조구(control)에 비하여 AAPH를 투여한 negative group에서 감소하였고 AAPH와 식물추출물을 투여한 모든 실험군에서 전반적으로 감소하였다(Fig. 23).

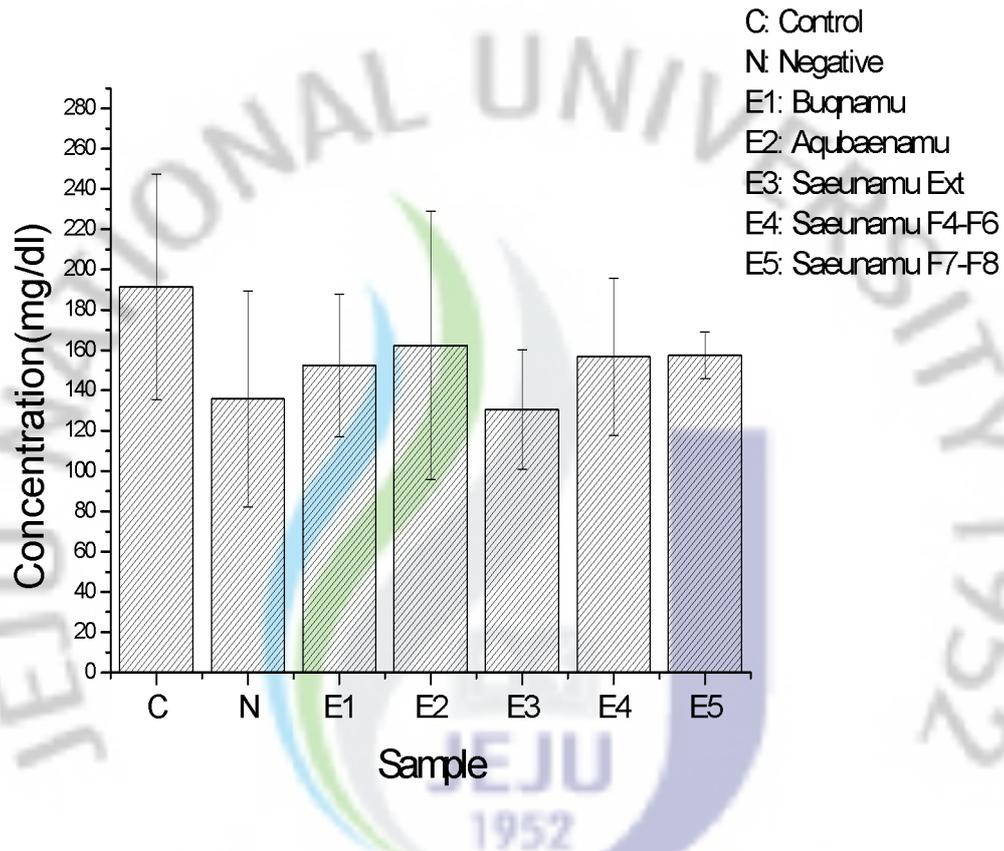


Fig. 23. Changes of glucose level in blood serum.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's serum glucose level was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamum: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

혈청 중의 포도당 농도(blood serum glucose)는 AAPH를 투여한 모든 실험군에서 전반적으로 감소하였다. 이러한 현상에 대해서 과산화수소(hydrogen peroxide)가 insulin처럼 작용하여 세포 내 지방산 합성을 촉진하기 때문에 혈당량이 감소한다는 해석이 있다(46).

### 3.7. Glutamic oxaloacetic transaminase 활성

혈청내의 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)는 대조구(control group)에 비하여 AAPH를 투여한 negative group에서 증가하였고 식물추출물을 투여한 실험군에서도 야그배나무를 제외한 나머지 추출물들은 증가하는 경향이였다(Fig. 24).



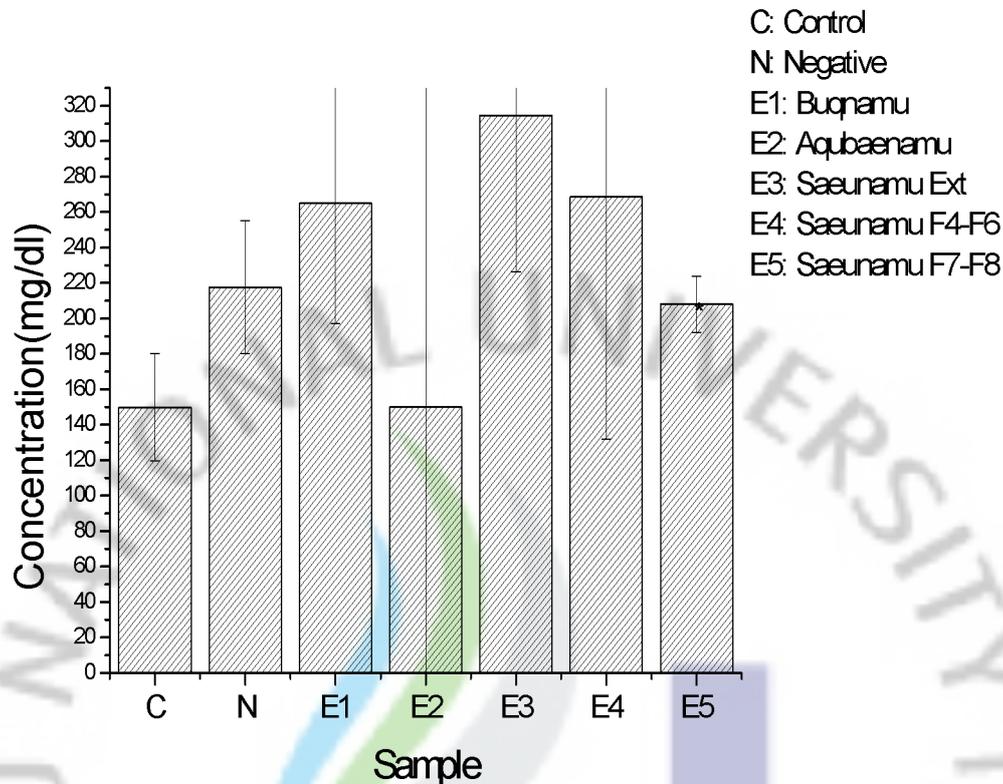


Fig. 24. Changes of GOT level in blood serum.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's serum GOT level was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamum: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

### 3.8. glutamic pyruvic transaminase 활성

혈청내의 glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성은 대조구(control group)에 비하여 AAPH를 투여한 negative group에서 떨어졌고 negative group에 비하여 붉나무와 아그배나무 group은 조금 상승하고 새우나무 추출물 과 새우나무 분획물 F4-F6, F7-F8 group 모두 거의 변화가 없었다. 그러나

실험군(group)들 사이에는 유의성이 없었다(Fig. 25).

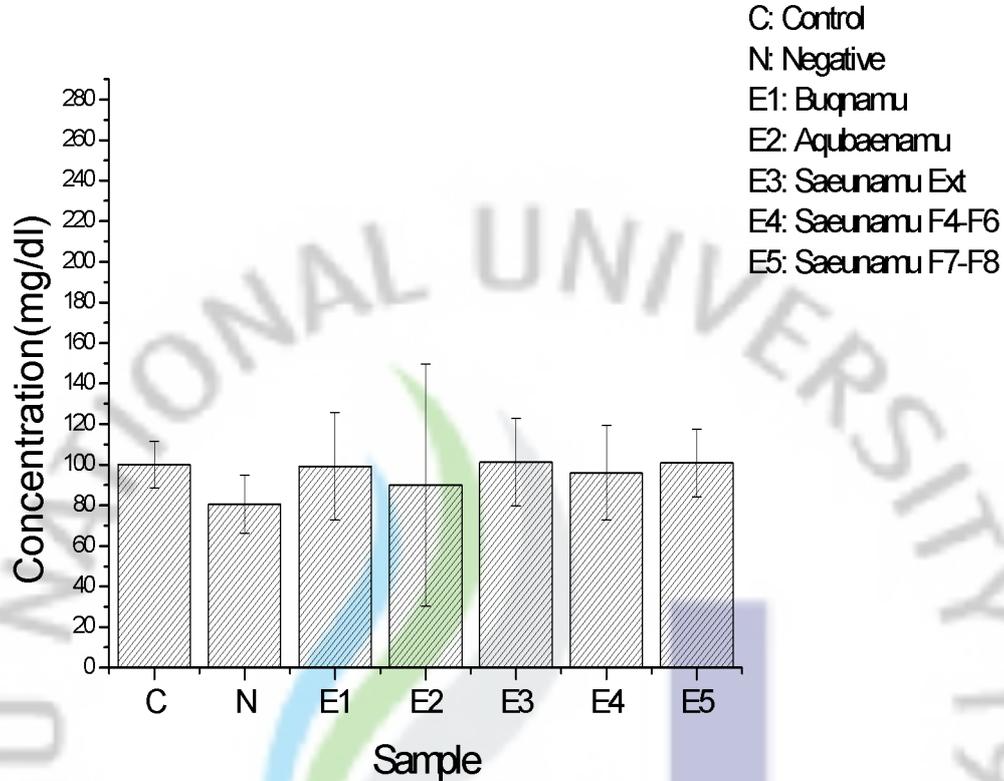


Fig. 25. Changes of GPT level in blood serum.

Rats were injected intraperitoneally with AAPH and fed orally with plant sample extract for 8 days and rat's serum GPT level was measured.

Control: Normal diet group

Negative: AAPH injection group

Bugnamu: fed *Rhus chinensis* extract after AAPH injection group

Agubaenamum: fed *Malus sieboldii* extract after AAPH injection group

Saeunamu EXT: Fed *Ostrya japonica* extract after AAPH injection group

Saeunamu F4-F6: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 4 to 6 after AAPH injection group

Saeunamu F7-F8: Fed *Ostrya japonica* extract fraction 7 to 8 after AAPH injection group

GOT와 GPT의 경우는 간 손상 지표로 쓰이는 효소로 간세포가 손상되면 이들 효소가 혈액 내로 용출되어 혈청 내 수치가 높아진다. 비록 GOT의 수치가 AAPH나 식물추출물의 과도한 투여가 간조직의 손상을 일으킬 수 있음을 시사하고 있지만 이 수치는 간의 손상 정도를 1:1로 정확히 반영해 주지 않는 데다가 T-검정 시에도 유의성 없게 나왔음을 고려해야 한다.

붉나무, 아그배나무 추출물과 새우나무 추출물, 새우나무M1, M2 분획물을 쥐에게 경구 투여했을 때 AAPH에 의해 유발된 ROS를 SOD의 경우엔 추출물의 polyphenol들이 효소분비를 유도하여 superoxide를 제거하려고 하기 때문에 negative group보다 상승하는 것이고 CAT의 경우에는 추출물의 polyphenol 자체가 CAT를 대체하는 것이기 때문에 CAT의 수치가 떨어지는 것이라고 추측된다(48, 49, 50). 기존 보고된 연구결과와 일치 하지 않는 경우가 있는데 positive, negative reagent를 어떤 것을 사용했느냐에 따라 다를 수도 있고 실험기간(47)과 실험동물의 구입시기와 주령 등의 요소도 연구결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단된다. 폴리페놀(polyphenol)과 같은 천연 항산화제는 인체에 대한 안전성이 있고 다른 부가적 기능들도 갖추고 있으면서 항산화 효소를 보조해주기 때문에 붉나무, 아그배나무, 새우나무는 천연 항산화제의 소재로 개발 가능하다.

### Ⅲ. 요약

항산화성 천연화합물 flavonoid와 apigenin이 많이 함유되어 있다고 알려져 있는 파슬리(*Petroselinum crispum*)의 70% ethanol 추출물이 influenza virus의 항원 중 하나인 neuraminidase 효소활성에 미치는 영향과 항산화성 폴리페놀화합물을 다량으로 함유하고 있는 불나무(*Rhus chinensis*), 아그배나무(*Malus sieboldii*), 새우 나무(*Ostrya japonica*)의 고압용매 추출물을 6주된 수컷 Sprague-Dawley(SD) rat에 투여하여 생체 내 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase(CAT)의 양적 변화에 대해서 조사하였다.

추출시간에 따른 70% ethanol 추출물 중의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 추출시작 1시간 이후부터는 비슷하여 초기 1시간 동안에 거의 대부분이 추출되는 것으로 나타났다. Flavonoid 화합물들이 세균성 neuraminidase의 효소활성을 저해하였는데 양성 대조구로 사용한 zanamivir와 apigenin에 의한 저해율이 비교적 높았다. 하지만 표준편차가 커서 실험 결과를 해석하는데 신중할 필요가 있었다. 양성대조구인 zanamivir에 비해서 apigenin의 viral neuraminidase 효소활성 저해율이 높았고 파슬리 70% ethanol 추출물은 zanamivir와 비슷한 저해효과를 나타내었다. 파슬리 중에는 apigenin이 glycoside인 apiin의 형태로 존재하는 것으로 추정되었다. 그래서 ethanol 추출물을 산으로 가수분해 시킨 후에 apigenin 함량을 HPLC로 분석한 결과, 추출물 1 mg 당 55  $\mu$ g이 존재하였다. 또한 ethanol 추출물의 질량을 분석한 결과 apigenin에 해당하는 270.9와 272.1 m/z에서 동일한 peak가 나타나 거의 같은 물질임을 확인하였다.

체중과 장기 무게는 대조구(정상식이군, control group)에 비해서 식물추출물을 투여한 실험구와 자유라디칼 유기체인 AAPH[2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride]를 투여한 음성 대조구(negative group)에서는 감소하였다. SOD 활성은 혈청이나 간에서 모두 AAPH를 처리하면 증가하였고 이러한

증가는 식물추출물을 투여해도 감소하지 않았다. 그와 반대로 식물추출물이 SO D 활성을 보다 더 증가시키는 경향이였다. 혈청과 간에 있는 CAT의 활성은 대 조구에 비해 음성 대조구에서 증가하였고 붉나무 처리구와 새우나무 처리구에서 는 감소하였다. 이는 알코올 투여 시 혈청 CAT 활성이 증가하였다가 항산화제 (ascorbic acid와 tocopherol)투여로 CAT 활성이 감소하는 실험 결과와 유사하 였다.



#### IV. 참고문헌

1. Kim TW, Kim YK, Kim SK, Kim CH, Kwon HH, Min BH, Bang YJ, Yang BS, Lee GS, Jong KS, Hong SN. 2001. Diagnosis Virology. Go-ryeo Medicine. 210-211p.
2. Seo ES, Park GH, Kim SM, Kim SW, Jung WS, Cho KS, Park YG, Lee CK, Kang C, Lee JY, Choi WY. 2010. Oseltamivir efficacy, side effects, and safety in children with influenza. Korean Journal of Pediatrics 42(1): 56-66
3. Chang MS, Woo JH. 2008. Clinical Use of Tamiflu (Oseltamivir). J Korean Med Assoc 51(8): 757-763
4. Kim WJ. 2009. Epidemiology, clinical manifestations, and management of pandemic novel Influenza A (H1N1). The Korean Journal of internal medicine 77(2): 157-164
5. Salomon R, Webster RG. 2009. The Influenza Virus Enigma. Cell 136(6): 402-410
6. Kim YY, Lee JY, Hwang JH, Kim KA, Jang SW, Park MS, Kim WJ, Cho HW, Lee HH, Kang C. 2005. Characterization of Hemagglutinin and Neuraminidase Genes and Oseltamivir Resistance of Influenza Viruses Isolated in Korea. Journal of Bacteriology and Virology 35(2): 149-155
7. Kim KA, Lee JY, Kim WK, Kim Y, Park YK, Kang C. 2008. Amantadine

and Zanamivir Resistance of Influenza A/H3N2 Viruses Isolated in Korea, 2002/03~2003/04. *Journal of Bacteriology and Virology* 38(3): 127-137

8. Nielsen SE, Young HF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandstrom B, Dragsted LO. 1999. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *British Journal of Nutrition* 81(6): 447-455
9. Gupta SR, Seshadri TR, Sc FA. 1952. A study of apigenin from the parsley seeds and plant. *Proceedings Mathematical Sciences* 35(5): 242-248
10. Kwon SB. Research trend of antiviral material exploration as natural substance from plants. 2005. Biological Research Information Center BioWave 7(23)
11. Woo WS. 1999. natural substance chemistry Research. of publishing department Seoul National University. 99p
12. Liu AL, Wang HD, Lee SMY, Wang YT, Du GH. 2008. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(15): 7141-7147
13. Ko YJ, Oh HJ, Ahn HM, Kang HJ, Kim JH, Ko YH. 2009. Flavonoids as Potential Inhibitors of Retroviral Enzymes. *Journal of Korean Society Applied Biological Chemistry* 52(4): 321-326

14. Ziegler DW, Hutchinson HD. 1972. Coupled-Enzyme System for Measuring Viral Neuraminidase Activity. *Applied Microbiology* 23(6): 1060-1066
15. Jourdian GW, Dean L, Roseman S. 1970. The Sialic Acids XI. A Periodate-Resorcinol Method for The Quantitative Estimation of Free Siallic Acids and Their Glycosides. *The Journal of Biological Chemistry* 246(2): 430-435
16. Warren L. 1959. The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids. *The Journal of Biological Chemistry* 234(8): 1971-1975
17. Graham HD. 1992. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(5): 801-805
18. Davis WB. 1947. Determination of flavanones in citrus fruits. *Analytical Chemistry* 19(7): 476-478
19. Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG. 2009. Zanamivir-Resistant Influenza Viruses with a Novel Neuraminidase Mutation. *Journal of Virology* 83(20): 10366-10373
20. Li B, Robinson DH, Birt DF. 1997. Evaluation of Properties of Apigenin and [ $G-^3H$ ]Apigenin and Analytic Method Development. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86(6): 721-725
21. Merck & Co Inc. 1999. *The Merck index* 12th CD

22. Lowden JA, O'Brien JS. 1979. Sialidosis: A Review of Human Neuraminidase Deficiency. *Am J Hum Genet* 31(1): 1-18
23. Monto AS, Fleming DM, Henry D, Groot RD, Makela M, Klein T, Elliott M, Keene ON, Man CY. 1999. Efficacy and Safety of the Neuraminidase Inhibitor Zanamivir in the Treatment of Influenza A and B Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 180(2): 254-261
24. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. 2000. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 355(9206): 827-835
25. Decker EA. 1995. The Role of Phenolics, Conjugated Linoleic Acid, Carnosine, and Pyrroloquinoline Quinone as Nonessential Dietary Antioxidants. *Nutrition Reviews* 53(3): 49-58
26. Wang W, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. 2000. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Molecular Carcinogenesis* 28(2): 102-110
27. Meyer H, Bolarinwa A, Wolfram G, Linseisen. 2006. Bioavailability of apigenin from apigenin-rich parsley in humans. *Annals of Nutrition and Metabolism* 50(3): 167-172
28. Yen HL, Hoffmann E, Taylor G, Scholtissek C, Monto AS, Webster RG, Govokova EA. 2006. Importance of Neuraminidase Active-Site Residues to the Neuraminidase Inhibitor Resistance of Influenza Viruses. *Journal of Virology* 80(17): 8787-8795

29. Nam GC, Moon SS, Sim WB, Lee HW, Hong IS. 2008. Spectroscopy of organic compounds 7th . Free academy. 14p
30. Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Jeju Native Citrus Peel during Maturation. *Journal of the Korean Society Food Science and Nutrition* 38(4): 462-469
31. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1): 44-84
32. MatEs JM, Perez-Gomez C, Castro IND. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32(8): 595-603
33. Kang CB, Son HS, Kim CH. 1998. Effects of Administration of 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride(AAPH) on Liver Function in Rats 1. Clinical Signs and Blood Chemical Values. *The Korean Society of Veterinary Clinics Bimonthly* 15(1): 75-78
34. Handler JA, Bradford BU, Glassman EB, Forman DT, Thurman RG. 1987. Inhibition of catalase-dependent ethanol metabolism in alcohol dehydrogenase-deficient deermice by fructose. *Biochemical Journal* 248(2): 415-421
35. Jung J, Henke W. 1996. Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radical Biology & Medicine* 20(4): 613-617

36. Choi JK, Han HS, Lee YJ. 2009. Study on Antioxidant Effect of Hoveniae Semen cum Fructus and Hoveniae Ramulus on Liver Cells Isolated from Oxidatively Stressed Rat. The Korean Journal of Herbology 24 (3): 129-138
37. Lee SH, Jeon TW, Yoon CG. 1998. Effect of Ethanol-pretreatment on the Liver Xanthine Oxidase Activity in Xylene-treated Rats. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 27(4): 739-744
38. Kwak YS, Yoo BI, Park CH, Hwang HJ. 2003. The effect of swimming training on MDA, HR and anti-oxidant in the Sprague-Dawley Rats. Korean Journal of Sport Science 14(4) 21-27
39. Wuerges J, Lee JW, Yim YI, Yim HS, Kang SO, Carugo KD. 2004. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(23): 8569-8574
40. Kono Y, Fridovich I. 1982. Superoxide Radical Inhibits Catalase. The Journal of Biological Chemistry 257(10): 5751-5745
41. Lee CH. 1989. Design and Synthesis of New Catalase Models. Journal of Basic Science 6: 28-39
42. Oh JY, Choi U, Kim YS, Shin DH. 2003. Isolation and Identification of Antioxidative Components from Bark of *Rhus javanica* Linne. Korean Journal of Food Science and Technology 35(4): 726-732

43. Kim MB, Hyun SH, Park JS, Kang MA, Ko YH, Lim SB. 2008. Integral Antioxidative Capacity of Extracts by Pressurized Organic Solvent from Plants in Jeju. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 37(11): 1491-1496
44. Park JS. 2009. Integral Antioxidant Capacity of Fraction from *Ostrya Japonica*. Master's thesis. Graduate school of jeju national university. The department of food engineering
45. Hann JB, Cristiano F, Lannello RC, Kola I. 1995. Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochemistry & Molecular Biology International* 35(6): 1281-1297
46. Choi BG, Jong SY, Park GS, Jo JH. 2005. Reactive oxygen and disease. Sin-il trading company. 189-190pp, 265p
47. Kwon TD, Choi SW, Lee SJ, Chung KW, Lee SC. 2001. Effect of polyphenol or vitamin C ingestion on antioxidative activity during exercise in rats. *The Korean Journal of Physical Education* 40(3): 891-899
48. Higdon JV, Frei B. 2003. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(1): 89-143
49. Kim OK. 2009. Antioxidant Effect of *Polygoni radix* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *The Korean Society of Pharmacognosy* 40(3): 213-217
50. Ko MS, Shin KM, Lee MY. 2002. Effects of *Hijikia fusiforme* Ethanol

Extract on Antioxidantive Enzymes in Ethanol-induced Hepatotoxicity of Rat Liver. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 31(1): 87-91



## 감사의 글

처음 대학교에 입학했을 때 대학원 과정이 있는지도 몰랐고 실험에 대해 막연히 상상만 했을 뿐 식품과 관련된 실험은 어떤 것들인지 알지 못 하였습니다. 하지만 3학년부터 실험실 생활을 시작한 뒤, 본격적으로 실험을 배웠으며 식품이라는 학문이 결코 단순하지 않은 여러 학문의 집합체라는 것을 김수현 교수님, 송대진 교수님을 통하여 깨달았습니다. 김수현 교수님. 송대진 교수님. 감사드립니다.

깨달음 속에 실험실 생활을 계속하니 어느덧 졸업해야 되는 시간이 찾아왔습니다. 그러나 이대로는 부족하다고 생각되어 식품과 관련된 진리를 찾고자 대학원 석사과정에 진학하게 되었고 하진환 교수님에게 다양한 실험적, 공학적 지식과 세상을 살아가는 지혜를 배웠으며 강영주 교수님에게는 식품에 관한 가공학적, 원론적 지식과 제대로 된 프레젠테이션 기술을 전수받았습니다. 하진환 교수님. 강영주 교수님. 감사드립니다.

학부과정과는 틀린 다양한 경험을 쌓으며 임상빈 교수님에게서는 분리공정과 추출에 관한 이론들을 얻고 여러 알고리즘을 통한 공정과정을 배웠으며 박은진 교수님에게는 폭넓은 식품위생학적 이론과 진로에 관한 조언을 얻었습니다. 임상빈 교수님. 박은진 교수님. 감사드립니다.

그리고 많이 모자랐던 저를 지도해주시고 스스로 실험설계를 할 수 있도록 조언과 격려를 해주셨으며 이 논문이 나오기까지 처음부터 끝까지 지켜봐주신 고영환 교수님에게 감사드립니다.

제게 실험실생활에 대한 계기를 만들어 주신 강호정 선생님과 실험 기초에 대한 발판을 만들어 주신 전경용 선생님, 오현정 선생님, 안효민 선생님, 이도승 선생님, 부정환 선생님에게도 감사드립니다.

그리고 동물실험 동안 많은 지도와 격려를 해주신 김용환 선생님, 황준호 선생님에게도 감사드리며 신재혁 군, 고용택 군, 이경민 양, 조은빛 양에게도 고마움을 전합니다.

제 전공은 아니지만 전공과 관련된 지식을 얻기 위해 도와주신 예비(?) 박사님

이자 선배이신 강관석 형님과 백윤정 양에게 감사드리며 통계학적 지식을 전수 해주신 양근탁 형님에게도 감사드립니다. 그리고 여러모로 실험과 생활에 도움을 주신 송진영 형님과 김영호 형님, 문승일 형님, 수영이에게 감사드립니다.

생소한 실험으로 인해 별별 부탁을 다 해도 싫은 내색하지 않고 웃으며 도와주신 진용대 형님에게도 감사드립니다.

대학원 생활 내내 조교선생님으로 신경써주신 신우석 형님과 이현정 양에게 감사드리며 같이 대학원 생활을 한 고원준 선생님, 강진아 선생님, 박경자 선생님에게도 감사드리며 대학원 생활 중 여러모로 도와주신 이충우 형님, 김경민 형님, 박경진 형님, 김지현 누님에게도 감사드립니다.

그리고 몇 안 되는 동기인 동명이, 슬기, 재표, 미보, 혜영이, 지운이에게도 고맙고 대학원 생활 내내 격려해주시고 앞서 진로를 잡으신 안용석 형님, 추승완 형님, 양정환 형님, 홍정수 형님, 김정택 형님, 박재성 형님, 오병돈 형님에게도 감사드립니다.

지금은 전부 전국 각지에 떨어져서 생활하지만 의지할 수 있는 동네 친구들인 화수, 지수, 호영, 이섭이에게도 고마움을 전합니다.

마지막으로 주위 사람들에 비해 많이 모자라 보이는 저를 믿어주시고 지원해주신 부모님과 형, 친지 분들에게 감사드립니다. 앞으로 더 훌륭한 인격과 폭넓고 깊은 지식을 가진 사람이 되겠습니다. 감사합니다.