



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](#)

理學碩士 學位論文

Inhibitory Effects of Natural Plant Extracts on Porcine Pancreatic Lipase Activity

指 導 教 授 權 炫 住

2013 年 2 月

東 義 大 學 校 大 學 院

生 命 應 用 學 科

金 玟 志

理學碩士 學位論文

Inhibitory Effects of Natural Plant Extracts on Porcine Pancreatic Lipase Activity

指導教授 權炫住

이 論文을 理學 碩士學位論文으로 提出함

2012 年 12 月

東義大學校 大學院

生命應用學科

金玟志

金 玟 志의 理學碩士 學位論文을 認准함

主審 김 병 우 ⑩

委員 이 은 우 ⑩

委員 권 현 주 ⑩

2012 年 12 月

東 義 大 學 校 大 學 院

천연 추출물의 Porcine Pancreatic Lipase 저해활성에 관한 연구

김 민 지

동의대학교 대학원 생명응용학과

초 록

비만은 당뇨병, 고혈압, 심장질환, 암, 관절질환 등 각종 성인병 및 만성질환의 원인일 뿐 아니라 사망의 직접적인 원인이 될 수 있으므로 치료를 요하는 질병으로 분류된다. 전 세계적으로 비만인구가 폭발적으로 증가되고 있어 심각성이 더욱 고조되고 있다. 이러한 비만을 치료하기 위해 천연물 유래의 비만치료제의 연구가 필요하다. 현재 사용되는 비만치료제는 대부분 합성 비만치료제로 구토, 지방변, 위장장애 등의 부작용이 많아, 부작용이 비교적 적은 천연물 유래의 비만치료제에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 천연물 유래 비만치료제를 개발하기 위해, 지방대사에 필수적인 lipase의 활성을 저해하는 물질을 식용작물, 해조류, 한약재 등의 다양한 천연 추출물에서 탐색하였고, 60% 미만의 lipase 활성을 보이는 천연 추출물 9종과 저분자 alginate를 후보군으로 선정하였으며 후보군의 lipase 활성 저해 형식을 검토하였다. 그 결과, 선정된 후보군들은 모두 높은 lipase 저해활성을 보였고, 대부분 혼합성 저해형식을 보였다. 후보군 중에서 경쟁적 저해제로 나타난 fucoxanthin을 최종 선정하여 최적 추출조건 및 다른 항비만 활성을 확인하였다.

Fucoxanthin은 상온에서 70% ethanol로 30분간 sonication을 통해 가장 높은 추출 효율을 보였다. 또한 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로의 분화에 fucoxanthin이 미치는 영향을 확인한 결과, 62.5 mg/ml 농도의 fucoxanthin

처리 시 약 40%의 triglyceride 축적 억제 효과를 나타내었다. 이러한 효과가 생체 내에서도 유지되는지 확인하기 위해 C57BL/6J mouse에 fucoxanthin을 투여 결과, 체중 감소 효과 및 복부지방 감소 현상을 확인할 수 있었다.

따라서 fucoxanthin은 비만 예방 위한 약물 및 기능성 식품 소재로 활용 가능할 것으로 판단되며, 다른 천연물 후보군에 대한 추가 연구가 필요하다. 본 연구를 바탕으로 fucoxanthin이 지방 흡수와 축적을 억제하는 기능성 식품의 소재로 이용되어질 수 있을 것으로 보아지며, 다른 후보 천연 추출물에 대한 추가 연구 및 fucoxanthin과 다른 후보물질과의 복합물 연구를 통해 부작용이 낮은 항비만 치료제 및 기능성 식품소재의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

목 차

| | |
|---|--------|
| 1. 초록----- | i |
| 2. 목차----- | iii |
| 3. 그림 목차----- | vi |
| 4. Table 목차----- | viii |
| I. 서론----- | 1 |
| II. Pancreatic lipase 활성저해물질의 탐색 및 후보물질 선정----- | 9 |
| 1. 서론----- | 9 |
| 2. 재료 및 방법----- | 10 |
| 1) 재료----- | 10 |
| 2) Pancreatic lipase 활성 저해물질의 탐색----- | 10 |
| 3. 결과 및 고찰----- | 13 |
| III. 후보물질의 pancreatic lipase 활성 저해농도와 효소반응속도 및 저해 양상 확인----- | 16 |
| 1. 서론----- | 16 |
| 2. 재료 및 방법----- | 19 |
| 1) 재료 및 시약----- | 19 |
| 2) 효소의 활성 측정방법----- | 19 |
| 3) 후보물질의 lipase 활성 저해 농도----- | 21 |
| 4) 후보물질의 lipase 활성 저해 반응 속도 확인----- | 21 |
| 5) 저분자 alginate의 제조----- | 21 |
| 3. 결과 및 고찰----- | 23 |

| | |
|--|----|
| IV. Fucoxanthin의 최적 추출조건 | 34 |
| 1. 서론 | 34 |
| 2. 재료 및 방법 | 36 |
| 1) 재료 | 36 |
| 2) HPLC 분석 | 36 |
| 3) Fucoxanthin 추출 용매 선정 | 38 |
| (1) 열수추출 | 38 |
| (2) Ethanol 추출 | 38 |
| 4) Ethanol 비율 선정 | 38 |
| 5) 돌미역귀에서 fucoxanthin 대량 추출조건 확립 | 38 |
| 3. 결과 및 고찰 | 39 |
| 1) Fucoxanthin 추출 용매 선정 | 39 |
| 2) Ethanol 비율 선정 | 41 |
| V. 3T3-L1 지방세포에서 fucoxanthin의 항비만 활성 효과 | 44 |
| 1. 서론 | 44 |
| 2. 재료 및 방법 | 45 |
| 1) 3T3-L1 세포 배양 | 45 |
| 2) 지방세포의 분화유도 | 45 |
| 3) Fucoxanthin의 지방세포 분화억제효과 확인 | 46 |
| 4) 지방세포 내 중성지방 분해효과 측정 | 48 |
| 3. 결과 및 고찰 | 49 |
| 1) Fucoxanthin의 triglyceride 축적 억제 효과 | 49 |
| 2) Fucoxanthin의 lipolysis 효과 확인 | 51 |
| VI. C57BL/6J mouse에서 fucoxanthin의 항비만 효과 | 53 |
| 1. 서론 | 53 |
| 2. 재료 및 방법 | 54 |
| 1) 실험동물 및 실험군의 설정 | 54 |
| 2) 식이 및 경구투여 용량 | 55 |

| | |
|---|--------|
| 3) 혈장 분석 및 장기적출 ----- | 56 |
| 3. 결과 및 고찰 ----- | 57 |
| 1) 체중, 사료섭취량 및 식이효율 측정 ----- | 57 |
| 2) 혈액생화학분석 ----- | 60 |
| (1) 혈중 alanine aminotransferase (ALT) 농도와 혈중 aspartate aminotransferase (AST) 농도 ----- | 60 |
| (2) 혈중 triglyceride, cholesterol, HDL, LDL 농도 ----- | 63 |
| 3) 장기조직 중량 및 복부지방 무게 ----- | 67 |
| VII. 결론 ----- | 72 |
| VIII. 참고문헌 ----- | 74 |
| IX. Abstract ----- | 79 |
| X. 감사의 글 ----- | 81 |

그림 목차

| | | |
|----------|--|----|
| Fig. 1. | Physiological role of pancreatic lipase in lipid absorption | 3 |
| Fig. 2. | Lipase inhibition system | 4 |
| Fig. 3. | Effect of substrate concentration on the rate of enzyme - catalyzed reaction | 5 |
| Fig. 4. | Lineweaver-Burk plot | 6 |
| Fig. 5. | Method for the detection of lipase activity using olive oil as a substrate | 12 |
| Fig. 6. | Pancreatic lipase inhibiting activity of natural product candidates | 14 |
| Fig. 7. | Selected 9 kinds of candidates as lipase inhibitor | 15 |
| Fig. 8. | Different forms of inhibited enzyme kinetics | 18 |
| Fig. 9. | Calibration curve for p-nitrophenol dodecanate (PNPD) | 20 |
| Fig. 10. | Method for the detection of lipase activity using p-nitrophenol dodecanate as a substrate | 20 |
| Fig. 11. | Production procedure of low molecular weight alginate | 22 |
| Fig. 12. | Pancreatic lipase inhibiting activity of <i>Lycium chinense</i> Mill. (A) and <i>Allium scorodorpasum</i> var. (B) | 23 |
| Fig. 13. | Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of Black soybeans | 24 |
| Fig. 14. | Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of <i>Oenanthe javanica</i> (BL.) DC. | 25 |
| Fig. 15. | Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of <i>Allium cepa</i> L. Skin | 26 |
| Fig. 16. | Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of <i>Camellia sinensis</i> L. | 27 |
| Fig. 17. | Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of <i>Polygala tenuifolia</i> Willd. | 28 |

| | |
|---|----|
| Fig. 18. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of <i>Salix</i> <i>babylonica</i> L. Root Bark ----- | 29 |
| Fig. 19. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of low molecular weight alginate ----- | 30 |
| Fig. 20. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of fucoxanthin ----- | 31 |
| Fig. 21. Structure of fucoxanthin ----- | 35 |
| Fig. 22. Fucoxanthin concentration according to the extraction solvent ----- | 40 |
| Fig. 23. Fucoxanthin concentration according to the ethanol concentration ----- | 41 |
| Fig. 24. Extraction procedure of fucoxanthin from the <i>Undaria pinnatifida</i> Sprophyll powder ----- | 43 |
| Fig. 25. Fucoxanthin treatment of during the process of adipocyte differentiation ----- | 47 |
| Fig. 26. Oil Red O staining and triglyceride contents of fucoxanthin --- | 50 |
| Fig. 27. Stimulatory effect of fucoxanthin on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes ----- | 52 |
| Fig. 28. Body weight gain and feeding efficiency ratio in high fat diet-feed obese mice ----- | 59 |
| Fig. 29. Plasma ALT, AST levels in high fat diet-fed obese mice ----- | 62 |
| Fig. 30. Plasma triglyceride, total cholesterol levels in high fat diet-fed obese mice ----- | 65 |
| Fig. 31. Plasma HDL-cholesterol, LDL-cholesterol levels in high fat diet -fed obese mice ----- | 66 |
| Fig. 32. Organ weights in high fat diet-fed obese mice ----- | 69 |
| Fig. 33. Adipose tissue in high fat diet-fed obese mice ----- | 70 |

Table 목차

| | |
|--|----|
| Table 1. List of natural product candidates ----- | 11 |
| Table 2. Selected natural products candidates ----- | 33 |
| Table 3. Fucoxanthin contents in sea mustard ----- | 35 |
| Table 4. The operating conditions of HPLC ----- | 37 |
| Table 5. Experimental groups for in vivo antiobesity activity of fucoxanthin ----- | 54 |
| Table 6. Composition of experimental diets (g/kg diet) ----- | 55 |
| Table 7. Body weight gain and feeding efficiency ratio in high fat diet-feed obese mice ----- | 58 |
| Table 8. Plasma ALT, AST levels in high fat diet-fed obese mice ----- | 61 |
| Table 9. Plasma HDL-cholesterol, LDL-cholesterol levels in high fat diet-fed obese mice ----- | 64 |
| Table 10. Organ weights in high fat diet-fed obese mice ----- | 68 |

I. 서론

서구화된 식생활에 의해 고열량의 식품 섭취가 늘고 소득의 향상으로 생활이 편리해지면서 비만인구가 날로 증가해가고 있다. 비만은 지나친 칼로리 섭취와 부적절한 칼로리 소모로 인해 일어나는 에너지 불균형 상태로 환경, 감정, 유전적 요인들이 통합되어 나타나는 질병이다. 현대에는 잘못된 식생활과 운동부족 등의 환경적인 요인이 크게 관여된다고 한다. 비만은 심리적, 사회적으로 개인을 위축시킬 뿐 아니라 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심장 질환, 관절염, 호흡기 질환, 성기능 장애, 암 발생 등 각종 성인병 및 만성 질환의 원인일 뿐 아니라 사망의 직접적인 원인이 될 수 있으므로, 세계보건기구(WHO)에서는 1996년 비만을 치료가 필요한 질병으로 분류하였다. 이에 따라 비만 치료와 예방에 관한 관심과 연구가 점점 증가되고 있다(28, 21). 비만을 치료하기 위해서는 외과적 치료 외에 식사요법(식사제한 치료, 저에너지식요법, 초저에너지식요법, 단식요법), 운동요법, 정신요법(행동수정요법, 인지행동요법), 약물요법, 수술요법 등이 현재 알려져 있으며, 식사요법과 운동요법이 비만치료의 기본이 되고 있다(38). 최근에는 ‘비만치료제’를 사용하는 약물 치료방법이 활성화 되고 있다. 비만 치료제는 작용기전에 따라서 소화조절, 식욕조절, 체지방 합성 억제, 지방 흡수 억제로 분류되어지는데, 이 중 체지방 합성 억제와 지방 흡수 억제의 연구들이 많이 진행되고 있다.

지방 흡수 억제 및 축적 억제는 지방분해효소인 lipase의 활성을 억제함으로써 기대할 수 있다. 체내 lipase는 lingual lipase, gastric lipase, pancreatic lipase로 나뉘며 섭취된 지방의 50~70%가 pancreatic lipase에 의해 분해된다(4). 따라서 pancreatic lipase의 활성억제를 통해 지방의 분해를 억제하고자 하는 연구가 보고되어 왔다(1). 음식물 내부의 지방은 triglyceride의 형태로 존재하는데 섭취된 지방은 췌장에서 분비되는 pancreatic lipase의 작용으로 triglyceride의 ester 결합이 가수분해 되어 지방산과 글리세롤이 형성된다. 생성된 지방산과 글리세롤은 소장점막 세포에서 흡수되어 에너지원으로 사용되고, 사용이후 남은 지방산과 글리세롤은 monoacylglycerol

에서 triglycerol이 합성되는 경로를 통해 다시 triglycerol로 합성되어 체내에 축적된다(Fig. 1). 이때 지방대사의 key enzyme으로 작용하는 pancreatic lipase의 활성을 저해하면 triglyceride가 분해되지 못하고 배설되어 체내의 지방축적을 예방할 수 있고, 비만을 예방할 수 있다(Fig. 2, 39). 따라서 lipase 활성 저해제를 개발하면 비만을 예방할 수 있는 약물로 사용 가능하다. lipase 활성 저해제에 관한 연구는 1980년대부터 꾸준히 진행되어 왔으며, 포도씨(9), 녹차 추출물(16), 굴껍질(5) 등 다양한 천연물에서도 lipase 활성 저해 물질이 확인되었다. lipase 활성 저해 효능이 확인된 orlistat는 약품으로 인정되어 현재 비만 치료제로 사용되고 있다(1, 2, 24). 그러나 이 약물은 비만저해 활성이 높은 반면 지방변, 구토, 불명증 등의 부작용을 가지는 것으로 알려져 있다.

최근에는 비만예방 관련 약물의 부작용으로 인해 의약품과 달리 일상적으로 섭취할 수 있는 기능성 식품소재를 이용한 비만 예방 및 치료제의 개발도 가속화되고 있다. 노령화 인구의 증가와 건강 수명 연장으로 기능성 식품의 소비가 지속적으로 증가되고 시장규모도 급속히 확대되고 있는 실정이다. 따라서 부작용이 없는 신규 lipase 활성 저해제를 개발하면 비만치료제로 사용 가능하며 의약품 외에 일상적으로 섭취할 수 있는 기능성 식품소재로도 개발 가능하다.

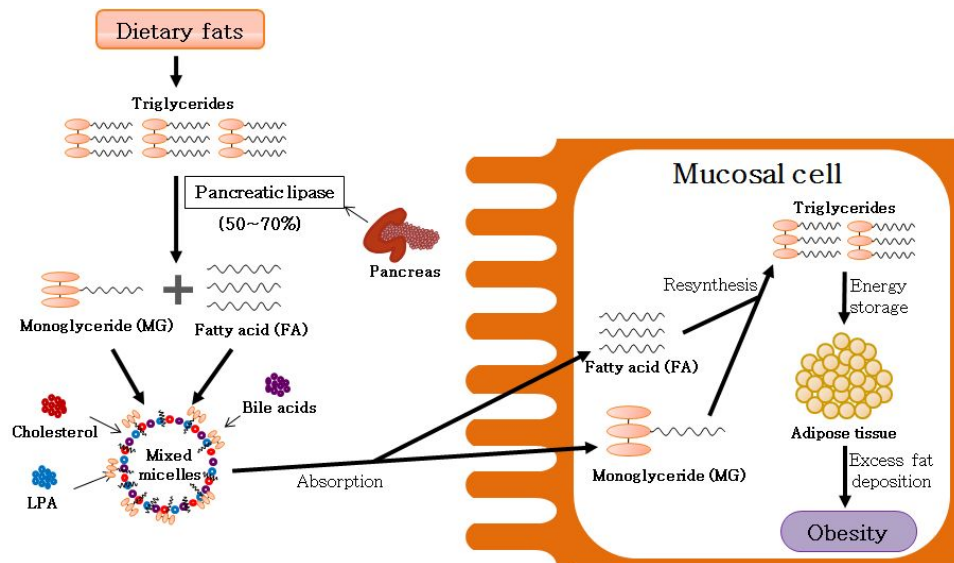


Fig. 1. Physiological role of pancreatic lipase in lipid absorption

Dietary fats are mainly (90%) comprised mixed triglycerides (TGs) and are required to be hydrolyzed for their absorption. Of the various lipases, PL is the principle lipolytic enzyme accounting for the hydrolysis of 50~70% of dietary fats to their respective fatty acids (FA) and monoglycerides (MGs). The MGs and free FAs, released by lipid hydrolysis from mixed micelles with bile salts, cholesterol and lysophosphatidic acid (LPA) are absorbed into enterocytes where resynthesis of TGs takes place. TGs are stored in adipocytes as their main energy source (3).

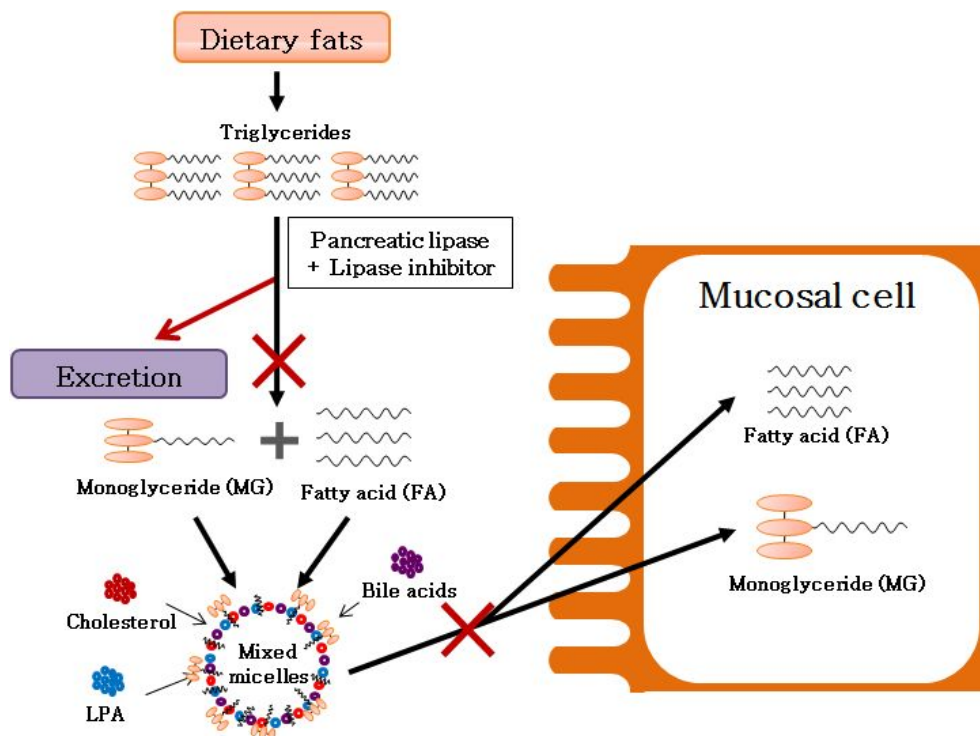


Fig. 2. Lipase inhibition system

효소촉매반응은 효소 내 활성부위와 기질이 결합하여 생성물질을 만들어 낸다. 효소촉매반응의 속도론은 보통 Michaelis - Menten 속도론을 말하고 효소용액 중 기질과 결합할 수 있는 활성부위의 숫자가 일정하므로 높은 기질농도에서는 활성부위모두가 기질과 결합하여 포화되는 상태가 되어 포화 속도론으로도 일컫는다(Fig. 3).

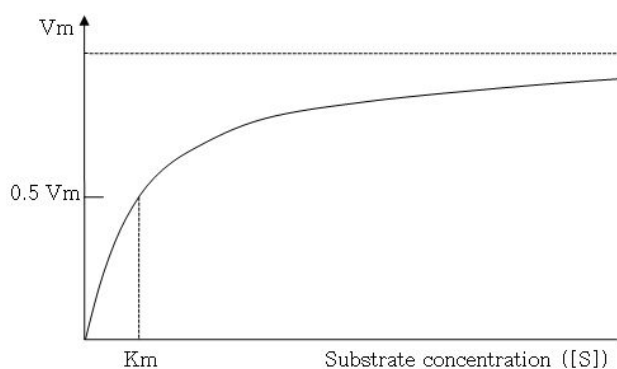


Fig. 3. Effect of substrate concentration on the rate of enzyme - catalyzed reaction.

효소반응속도는 효소기질의 복합체 형성단계와 ES복합체의 해리단계의 두 가지 단순한 반응 단계로부터 구할 수 있는데 여기서 ES복합체가 다소 빠른 속도로 형성되고 해리단계의 역반응 속도는 무시한다는 가정을 전제로 한다.



이 와 같은 가정으로 평형상수를 이용하여 $[ES]$ 를 $[S]$ 함수로 표시 할 수 있다. 평형상수는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$K'_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

효소의 활성이 보존된다면 $[E] = [E_0] - [ES]$ 이므로

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]}$$

이를 기질의 소모 속도식에 대입하면 다음과 같다.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]} = \frac{V_m[S]}{K'_m + [S]}$$

위 식에서 최대 정반응 속도 V_m 은 효소가 더 첨가되면 변화하지만 기질의 첨가에 의해서 영향을 받지 않는다. K'_m 을 흔히 Michaelis-Menten 상수라 하며 ‘ ’을 사용한 이유는 초기단계에서 빠른 평형을 가정하여 얻었기 때문이다. K'_m 의 값이 작다는 것은 효소의 기질에 대한 친화도가 높다는 것을 의미한다. 또한 K'_m 은 최대반응속도의 1/2의 속도에 해당하는 기질의 농도이다. V_m 과 K'_m 의 값을 정확하게 결정하는 것은 어렵다. 일반적으로 초기 속도실험으로 실험결과를 얻는다. 회분식반응기에서 이미 알고 있는 양의 기질 $[S_0]$ 과 효소 $[E_0]$ 를 첨가한다. 시간에 따른 생성물의 농도를 도식화하면 초기기율기를 구할 수 있다. 이렇게 구한 v 값을 회분식반응기에 처음 넣어준 $[S_0]$ 와 $[E_0]$ 값으로 나타낼 수 있다. 이와 같은 실험을 반복하여 값을 구하고 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 $1/[S]$ 에 대해 $1/v$ 를 도식화하면 직선의 절편으로부터 상수의 값을 예상 할 수 있다(Fig. 4).

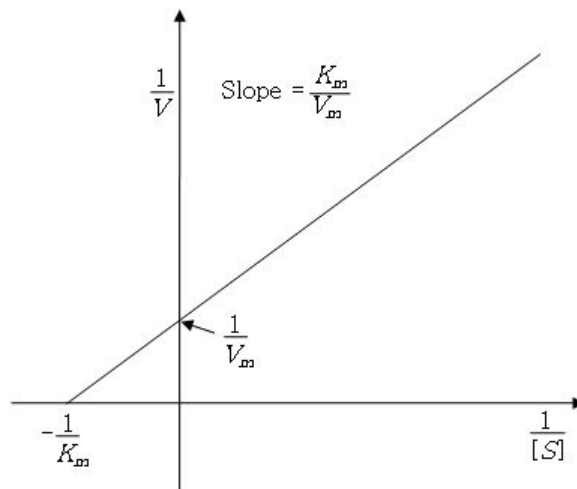


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot

해조류는 미네랄, 비타민, 식이섬유 등의 높은 영양적 가치를 지니고 있으며 항산화제로서의 역할을 담당할 수 있는 물질이 다량 함유되어 있다. 항산화제는 세포를 공격하는 위험한 활성산소 라디칼을 중화시켜주고, 심장병, 암 발생의 예방에 기여한다(17).

미역(*Undaria pinnatifida*)은 갈조류(Brown algae)의 곤포과에 속하는 1년생 해조류로서 칼슘, 칼륨, 철분, 요오드 등의 무기질 성분, 각종 비타민 등의 영양성분과 정미성분이 함유되어 있고(7, 20), 최근 생리활성 물질로서 각광을 받고 있는 항암효과가 있는 것으로 밝혀진 fucoidan과, 미역의 세포막 구성성분으로 다량 존재하는 alginic acid 등의 산성 다당류가 대량으로 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 또한 fucoxanthin이라는 carotenoid 색소가 함유되어 있는데 일반적으로 carotenoids는 지용성이고 공액 이중 결합수가 많을수록 황색에서 적색으로 이행하는 것으로 알려져 있으며 불포화도가 매우 높기 때문에 열, 산, 광조사, 금속이온, 과산화물, peroxidase 및 화학약품 등에 의해서 쉽게 산화되어 파괴되며, 300~500 nm의 파장에서 특정의 흡수대를 가지는 특성이 있다(10). 그러나 carotenoids는 광선에 의해서 유발되는 광 감광 산화반응에 있어서 활성화된 일중항 산소와 반응하여 전체적인 반응의 진행을 억제하고(31), free radical 반응의 억제기작에 의해 발생하는 활성산소로부터 세포와 조직을 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(12). 한편 활성산소는 핵산, 단백질, 지질 등에 산화적 장애를 일으켜 염증, 노화, 암 등 다양한 질병을 유발시키는데(14), 이러한 작용도 carotenoids의 산화억제 작용에 의해 저지되어 생물학적으로 매우 중요한 의미를 가지며, 생물체의 항산화효소, 토코페롤 등의 항산화제와 더불어 생체방어 역할을 하고 있다.

본 연구에서는 지방 분해 효소에 작용하여 음식물로 섭취된 지방의 흡수를 선택적으로 제한함으로써 비만의 한 가지 원인으로 지적되는 지방의 과잉흡수를 방지하고자 한다. 최근 천연물의 섭취나 그 추출물의 섭취로 pancreatic lipase의 활성을 저해하는 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 전통 한약재로 사용되고 있는 인삼, 녹각, 황기, 음양곽 등의 생약과 곡류, 버섯, 호박, 해조 등의 야채류, 녹차, 우롱차 등으로 대표되는 차류의 항비만 효과는 많이 연구되고 있다. 본 연구에서는 한약재, 식용작물, 해조류 등에서

lipase 활성을 저해시키는 천연 추출물을 후보군으로 선정하여 lipase 활성 저해 효과와 효소 반응속도 및 저해양상을 확인하였다. 또한 식품으로 섭취할 수 있도록 추출한 fucoxanthin으로 in vitro, in vivo 에서의 항비만 활성을 확인하여 향후 항비만 기능성식품소재 개발을 위한 과학적 근거를 제시하고자 한다.

II. Pancreatic lipase 활성저해물질의 탐색 및 후보물질 선정

1. 서론

성인의 일일 지방 섭취량은 90~120 g으로 이 중 95%가 위, 소장, 이차에서의 분해 작용을 통해 흡수된다. 지방의 분해과정은 유화, 가수분해, 입자화, 흡수로 나눌 수 있다. 지방의 유화는 위에서 시작되고 물리적, 효소적 작용에 의해 부분적으로 가수분해가 이루어진다(4). 지방은 lipase (EC 3.1.1.3, triacylglycerol acylhydrolase)에 의해 monoglyceride와 2개의 유리지방산으로 가수분해되어 담즙산에 의해 미셀화 된 후 체내로 흡수된다. 지방분해 및 흡수에 중요한 역할을 하는 lipase를 저해함으로써 체내 지방의 축적을 억제할 수 있다.

본 연구에서는 pancreatic lipase의 활성을 저해하는 물질을 탐색하기 위해 민간요법 중 항비만에 효과가 있다고 알려져 있는 식용작물, 해조류, 한약재 등 36종의 천연물을 대상으로 pancreatic lipase 활성에 대한 저해효과를 확인하여 10종의 후보군을 선정하였다.

2. 재료 및 방법

1) 재료

본 실험에서 사용한 시료는 Table 1과 같으며 유기용매 및 열수를 첨가하여 75℃에서 3시간동안 추출하여 동결건조 한 후 사용하였다. Porcine pancreatic lipase (Type II, L3126), Olive oil (O1514)은 Sigma Chemical (St, Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다.

2) Pancreatic lipase 활성 저해물질의 탐색

Pancreatic lipase 활성을 확인하기 위해 olive oil를 반응 기질로 사용하였다. 효소의 활성측정은 olive oil에서 분리되어 나오는 free fatty acid의 농도를 측정하여 확인하였다(Fig. 5). 50 ml conical tube에 25 mM Tris-HCl (pH 7.7) 1 ml, 500 mM CaCl₂ 25 ul, olive oil 100 ul, 효소와 sample까지 넣었을 때 반응 총액이 1.5 ml이 되도록 distilled water를 넣은 후 37℃ shaking incubator (150~160 rpm)에서 5분간 예열하였다. Pancreatic lipase (0.25 g/ml, 25 mM Tris-HCl, pH 7.7) 40 ul와 sample (0.1 g/ml) 50 ul을 넣고 37℃ shaking incubator (150~160 rpm)에서 0분과 30분 반응하였다. 이때 반응 시 sample의 최종 농도는 3.3 mg/ml이다. 효소-기질반응을 정지시키기 위해 acetone/ethanol (1:1, v/v) 3 ml과 지시약 1% phenolphthalein 2~3방울 넣은 후 0.01 N NaOH로 중화 적정하였으며, 이 때 사용되어진 NaOH 양을 측정하였다.

Table 1. List of natural product candidates

| 식용작물 유기용매 추출물 | |
|---------------|--|
| 흑마늘 | Black Garlic |
| 유근피 | <i>Salix babylonica</i> L. Root Bark |
| 토란줄기 | <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott Stem |
| 울무 | <i>Coix lacrymajobi</i> var. mayuen (Rom. Caill.) Stapf |
| 쌀겨 | Rice Bran |
| 돌미나리씨 | <i>Oenanthe javanica</i> Seed |
| 메밀 | <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench |
| 무화과 | <i>Ficus carica</i> L. |
| 금은화 | <i>Lonicera japonica</i> Thunberg |
| 마늘 | <i>Allium scorodorpasum</i> var. |
| 해조류 유기용매 추출물 | |
| 모자반 | <i>Sargassum fulvellum</i> |
| Fucoxanthin | |
| 청각 | <i>Codium fragile</i> |
| 지충이 | <i>Sargassum thunbergil</i> |
| 파래 | <i>Ulva pertusa</i> |
| 한약재 유기용매 추출물 | |
| 산사자 | <i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge Fruit |
| 위령선 | <i>Clematis florida</i> Thunb. |
| 구절초 | <i>Dendranthema zawadskii</i> var. latilobum (Maxim.) Kitam. |
| 우슬 | <i>Achyranthes japonica</i> (Miq.) Nakai |
| 원지 | <i>Polygala tenuifolia</i> Willd. |
| 구기자 | <i>Lycium chinense</i> Mill. |
| 맥문동 | <i>Liriope platyphylla</i> F.T.Wang & T.Tang |
| 고삼 | <i>Sophora flavescens</i> Solander ex Aiton |
| 당귀 | <i>Angelica gigas</i> Nakai |
| 견을 | <i>Castanea creata</i> siebold et zuccarini |
| 울피 | <i>Castanea crenata</i> Siebold & Zucc. |
| 식용작물 열수 추출물 | |
| 녹차 | <i>Camellia sinensis</i> L. |
| 미나리 | <i>Oenanthe javanica</i> (Blume) DC. |
| 검정콩 | Black soybeans |
| 연근 | <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn |
| 파 | <i>Allium fistulosum</i> L. |
| 고추 | <i>Capsicum annuum</i> L. |
| 양파껍질 | <i>Allium cepa</i> L. Skin |
| 양파 | <i>Allium cepa</i> L. |
| 정구지 | <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Spreng. |
| 마늘 | <i>Allium scorodorpasum</i> var. |

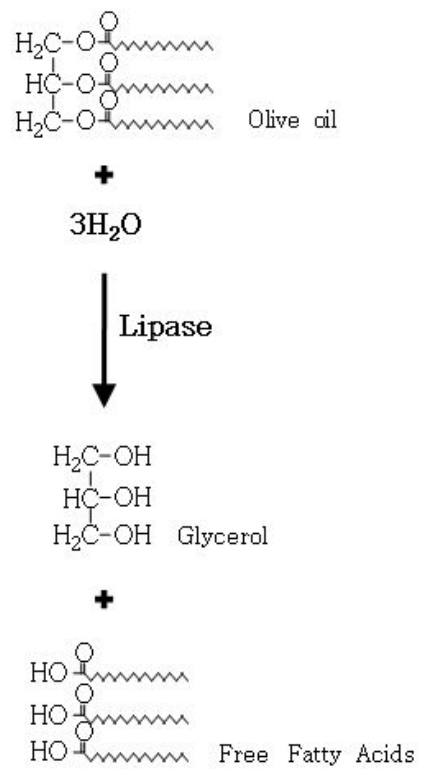


Fig. 5. Method for the detection of lipase activity using olive oil as a substrate

3. 결과 및 고찰

Pancreatic lipase 활성 저해물질을 탐색하기 위해 천연 추출물을 식용작물 유기용매 추출물 10종, 해조류 유기용매 추출물 5종, 한약재 유기용매 추출물 11종 그리고 식용작물 열수 추출물 10종으로 구분하여 pancreatic lipase 활성 저해물질을 탐색하기 위해 각각의 시료와 pancreatic lipase를 반응시켰다. 그 후 아래의 식을 이용하여 pancreatic lipase 활성을 구하였으며, 시료를 넣지 않고 반응한 control을 100%로 하여 각각의 시료에 대한 pancreatic lipase 활성을 나타내었다(Fig. 6). pancreatic lipase 활성을 확인하여 60% 미만으로 lipase 활성을 유근피(31.76%), Fucoxanthin(54.77%), 원지(50.56%), 구기자(49.83%), 마늘(51.23%), 검정콩(47.65%), 미나리(41.08%), 양파껍질(2%), 녹차(35.92%)를 pancreatic lipase 활성 저해 후보군으로 선정하였다(Fig. 7).

umol fatty acid / ml subsample =

$$\frac{(\text{ml NaOH for 30 min} - \text{ml NaOH for 0 min}) \times 0.01 \text{ N NaOH} \times 1000}{\text{Total volume (4.5 ml)}}$$

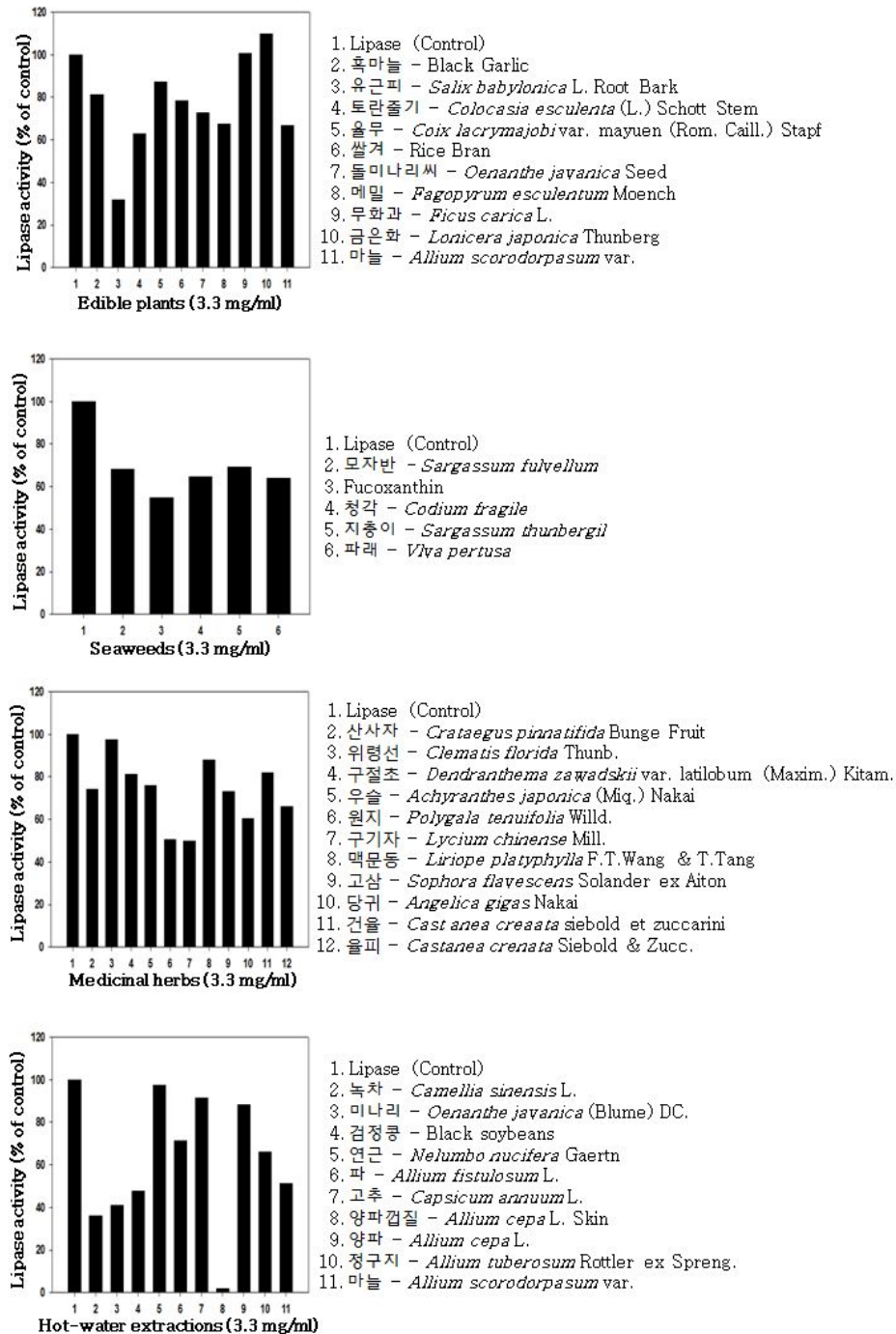


Fig. 6. Pancreatic lipase inhibiting activity of natural product candidates

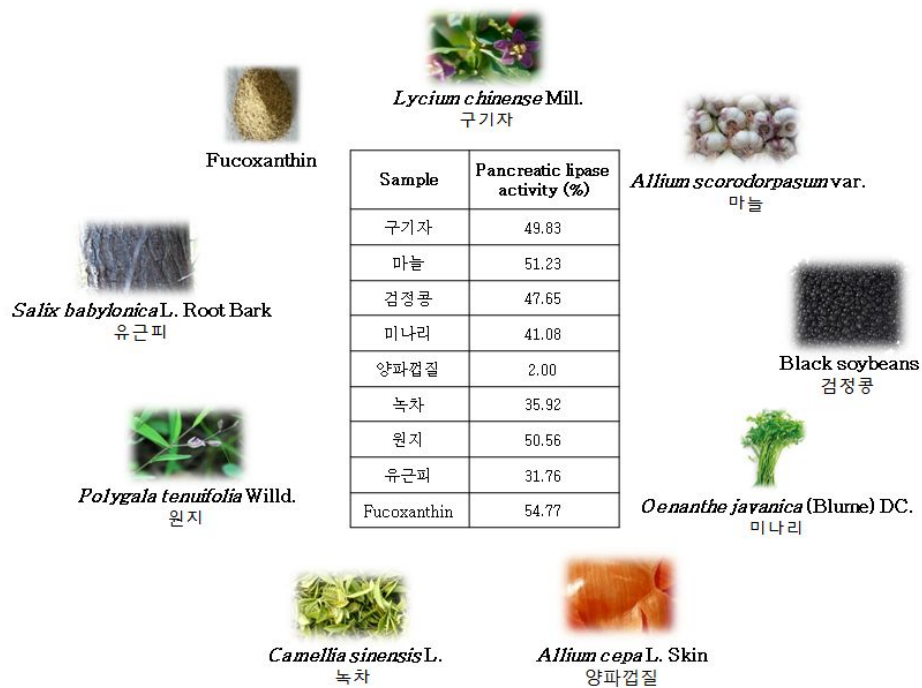


Fig. 7. Selected 9 kinds of candidates as lipase inhibitor

Ⅲ. 후보물질의 pancreatic lipase 활성 저해농도와 효소반응속도 및 저해양상 확인

1. 서론

현재 사용되는 비만치료제 중 orlistat는 lipase 활성을 저해하여 지방 흡수를 억제하는 대표적인 약물이다. Orlistat는 *Streptomyces toxytricini*의 자연생성물인 lipstatin의 가수분해 산물로부터 화학적으로 합성된 것으로, lipase의 활성을 억제하여 지방의 가수분해를 저해함으로써 비만인의 체중 감소를 유도한다고 보고되었다(29). 그러나 합성약물은 지방변, 구토, 불면증 등 여러 가지 부작용을 가지고 있어 부작용이 없는 신규 비만치료제의 개발이 시급한 실정이다. 최근에는 비교적 부작용이 적고 유효성이 입증되어 있는 천연물로부터 비만치료제나 비만억제 기능성 물질에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

효소반응속도는 효소가 단위시간당 기질과 반응하여 분해시키는 속도를 측정한 것으로 이 때 효소저해제가 존재하면 효소와 결합하여 효소의 활성도를 감소시키게 된다. 효소활성저해반응은 경쟁적(competitive), 비경쟁적(noncompetitive), 무경쟁적(uncompetitive), 혼합형(mixed type) 저해반응으로 구분되어진다. 경쟁적 저해는 보통 기질 유사체로 효소의 활성부위에 기질과 경쟁적으로 결합하여 활성을 저해시키는 기작으로, 기질의 농도를 높임으로 방지 할 수 있다. 이때 V_m 는 동일한 상에 존재하며 K'_m 은 증가하기 때문에 저해가 없는 경우의 직선과 종축상의 한 점에서 일치하게 되는데 이로 인해 경쟁적 저해이라는 것이 판정되어진다. 비경쟁적 저해는 기질과의 유사성이 없고 효소의 활성부위가 아닌 다른 부위에 결합하여 기질의 효소에 대한 친화성을 약화시켜 활성을 저해하며 V_m 은 감소하고 K'_m 은 동일한 상에 존재하여 저해가 없는 경우의 직선과 횡축상의 한 점에서 교차하며, 무경쟁적 저해는 ES복합체에 결합하고 효소에 대한 친화력이 없는 저해로 V_m 과 K'_m 모두 감소시켜(26) 저해가 없는 경우의 직선과 비교하여 기울기는 변화지 않으며, 종축상의 절편이 증가하는 것을 보아 저해형식을 판정한다. 혼합형 저해는 경쟁형 저해와 비경쟁형 저해의 반응이 일어나

활성을 저해하기 때문에 V_m 는 감소하며 K'_m 는 감소하거나 증가하므로 저해가 없는 경우의 직선과는 양축상이 아닌 한 점에서 교차하게 된다. Lineweaver-Burk plot을 이용하여 $1/[S]$ 에 대해 $1/v$ 를 도식화하면 효소활성 저해 방식을 찾을 수 있다(Fig. 8).

본 연구에서는 앞서 선정된 9종의 천연물 후보군과 저분자 alginate을 사용하여 lipase 활성 저해 농도를 확인하고 동시에 효소반응속도 및 저해양상을 확인하였다.

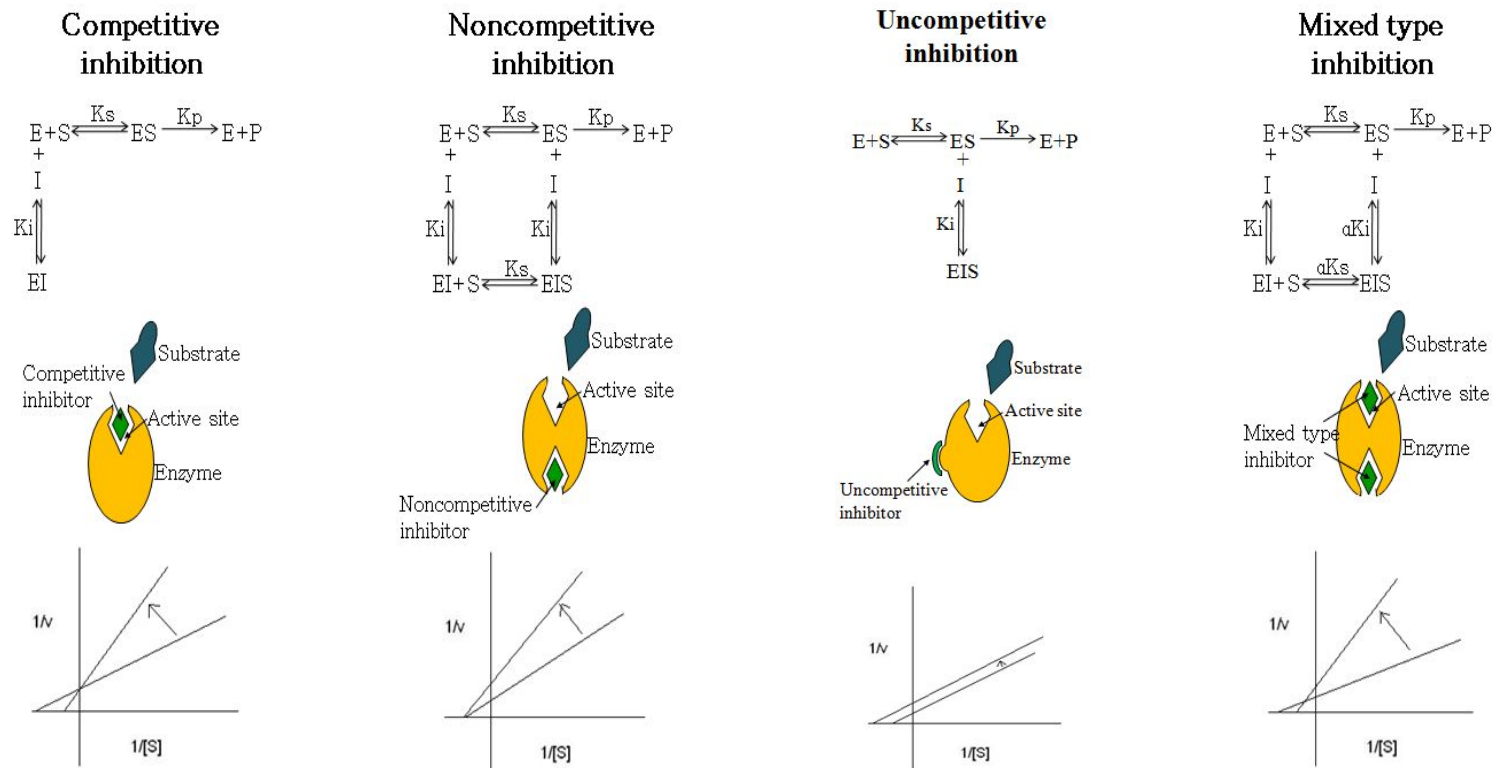


Fig. 8. Different forms of inhibited enzyme kinetics

2. 재료 및 방법

1) 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 시료는 pancreatic lipase 활성 저해물질 탐색에서 선정되어진 총 9종의 천연 추출물과 저분자 alginate이며, porcine pancreatic lipase (Type II, L3126), p-nitrophenyl dodecanate ($C_{18}H_{27}NO_4$, 321.41 g/mol, 61716), Orlistat ($C_{29}H_{53}NO_5$, 495.73 g/mol, O4139)는 Sigma Chemical (St, Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다.

2) 효소의 활성 측정방법

후보물질의 pancreatic lipase 활성 저해농도와 효소반응속도를 확인하기 위해 p-nitrophenyl dodecanate (PNPD)를 반응 기질로 사용하였다. 효소의 활성은 PNPD가 PNP와 dodecanate acid로 분해되는 반응에서 PNP의 양을 측정하여 확인하였다. 효소 1 unit는 1분 동안 1 μ mol의 PNPD를 유리시키는 lipase의 양으로 정의하였다. 1.5 ml eppendorf tube에 0.25 M Tris-HCl (pH 7.7) 10 μ l, 250 mM $CaCl_2$ 4 μ l, 5 mM PNPD (MeOH), 효소와 sample 까지 넣었을 때 반응 총액이 200 μ l 되도록 distilled water를 넣은 후 37°C heating block에서 5분간 예열하였다. Pancreatic lipase (10 mg/ml, 0.25 M Tris-HCl, pH 7.7) 20 μ l와 sample을 넣고 37°C heating block에서 0분과 10분 반응하였다. 20% SDS 3 μ l을 넣어 반응을 정지시킨 후 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 distilled water 160 μ l에 상등액 40 μ l을 넣어 5배 희석한 뒤 UV spectrophotometer를 이용하여 412 nm의 파장에서 측정하였다. 각각의 실험은 3회 반복하였으며, 10분에서 0분 값을 빼고 5배 희석 값을 곱한 후에 나온 값을 데이터 값으로 사용하였다(Fig. 9).

$$* \text{ Inhibition rate of lipase (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : Sample absorbance data

B : Control absorbance data

$$* \text{ Absorbance data} = (\text{absorbance for 10 min} - \text{absorbance for 0 min}) \times 5$$

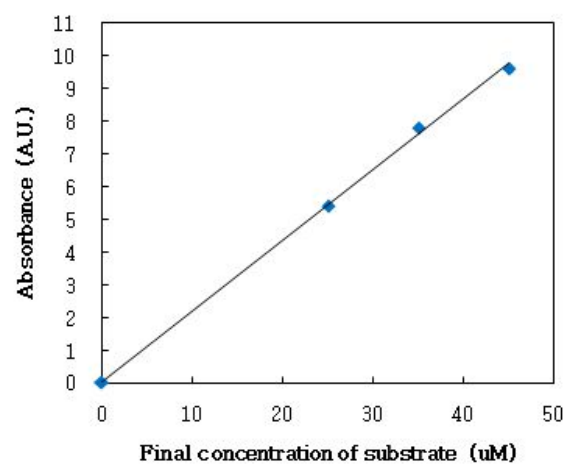


Fig. 9. Calibration curve for p-nitrophenol dodecanate (PNPD)

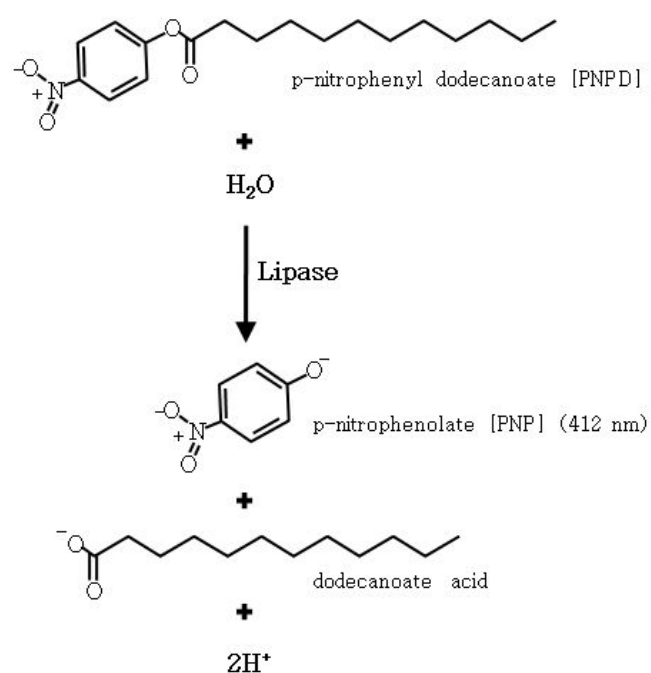


Fig. 10. Method for the detection of lipase activity using p-nitrophenol dodecanate as a substrate

3) 후보물질의 lipase 활성 저해 농도 확인

후보물질의 lipase 활성 저해 농도는 20 uM의 기질에 후보물질을 농도별 (0.3, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 mg/ml)로 첨가하여 위의 효소의 활성 측정방법을 사용하여 확인하였다.

4) 후보물질의 lipase 활성 저해 반응 속도 확인

Lipase 저해 활성에 대한 반응속도는 후보물질의 농도를 달리하여 서로 다른 농도의 기질에서 lipase의 활성을 측정하여 확인하였다. 이렇게 측정한 저해 활성을 Lineweaver-Burk plot ($1/S$ vs $1/V$)으로 나타내어 저해 활성의 반응속도를 알아보았다.

5) 저분자 alginate의 제조

저분자 alginate으로 생명공학과에서 받아 사용하였다.

저분자 alginate는 분말 돌미역귀를 0.5% Sulfuric acid 4시간, 1% Na_2CO_3 4시간 처리한 후 10% HCl로 침전시켜 얻어진 sodium alginate에, alginate lyase 10 unit를 넣고 37°C, 100 rpm에서 교반시켜 제조되었다(Fig. 11).

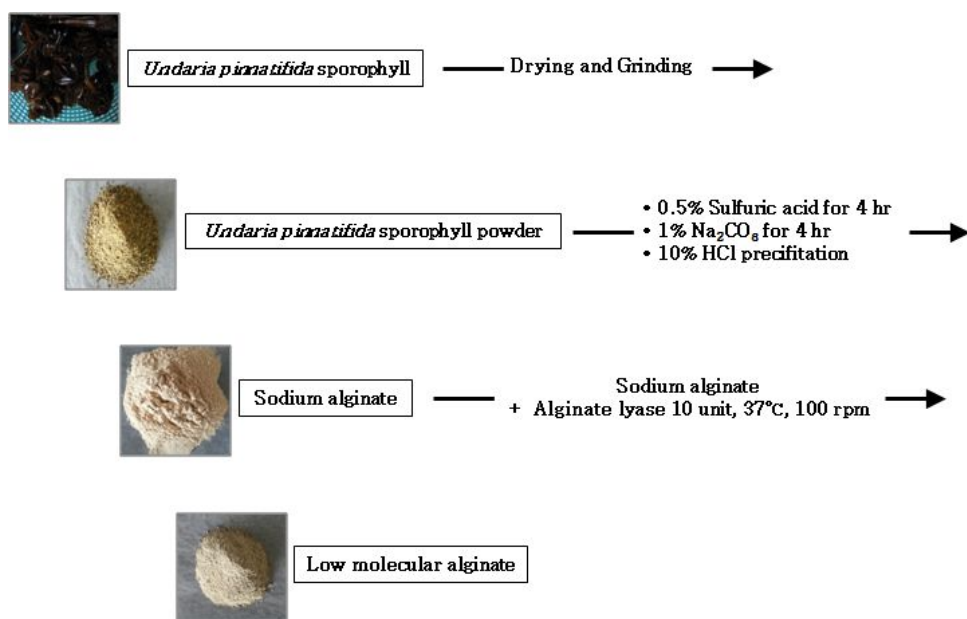


Fig. 11. Production procedure of low molecular weight alginate

3. 결과 및 고찰

1) 구기자, 마늘

구기자와 마늘 열수추출물의 pancreatic lipase 활성 저해 농도를 확인하였다. 그 결과(Fig. 12) 구기자 2.4 mg/ml, 마늘 3 mg/ml에서 약간의 저해활성을 나타내고 있으나 그 정도가 미비한 수준이며 효소반응속도를 확인하지 않았다.

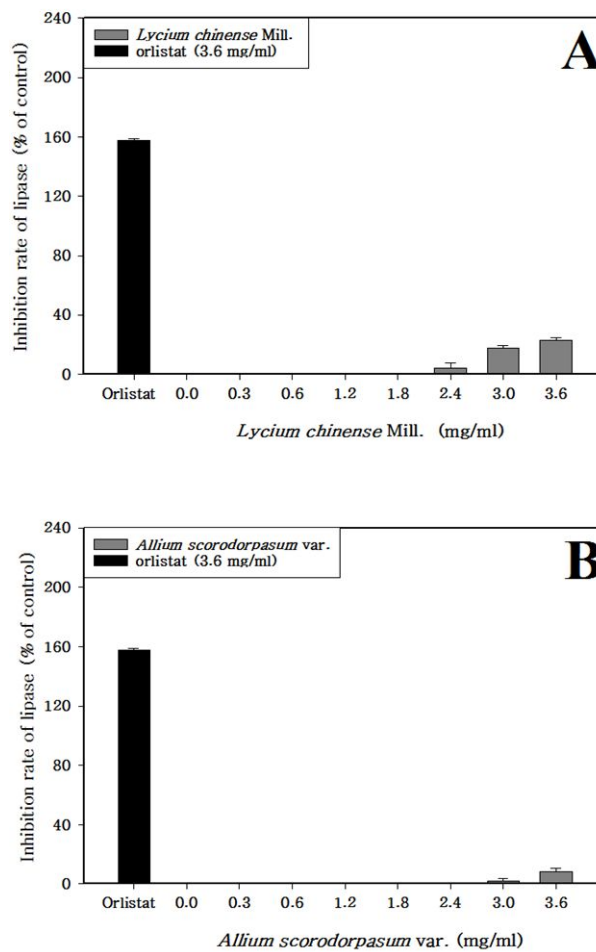


Fig. 12. Pancreatic lipase inhibiting activity of *Lycium chinense* Mill. (A) and *Allium scorodorpasum* var. (B)

2) 검정콩

검정콩 열수추출물의 pancreatic lipase 활성 저해 농도와 저해양상을 확인하였다. 그 결과(Fig. 13) 1.2 mg/ml에서 저해활성이 나타나기 시작하였으며, 2.09 mg/ml에서 50% 저해활성을 나타내고 있다. 또한 0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 2.4 mg/ml, 3.6 mg/ml의 추출물 농도로 효소반응속도를 확인한 결과 혼합형 경쟁양상을 나타내었다.

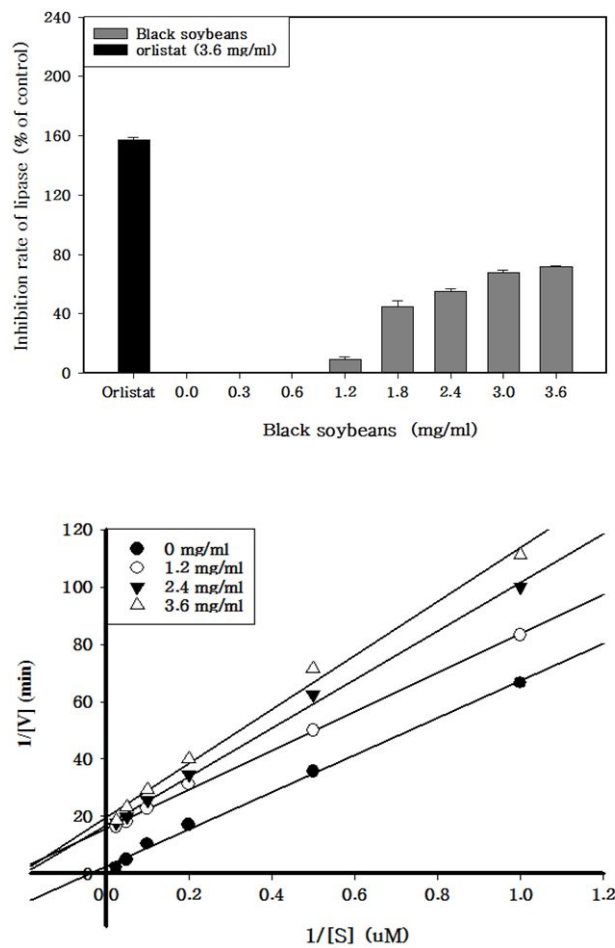


Fig. 13. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of Black soybeans

3) 미나리

미나리 열수추출물의 pancreatic lipase 활성 저해 농도와 저해양상을 확인하였다. 그 결과(Fig. 14) 1.2 mg/ml에서 저해활성이 나타나기 시작하였으며, 2.32 mg/ml에서 50% 저해활성을 나타내고 있다. 또한 0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 2.4 mg/ml, 3.6 mg/ml의 추출물 농도로 효소반응속도를 확인한 결과 혼합형 경쟁양상을 나타내었다.

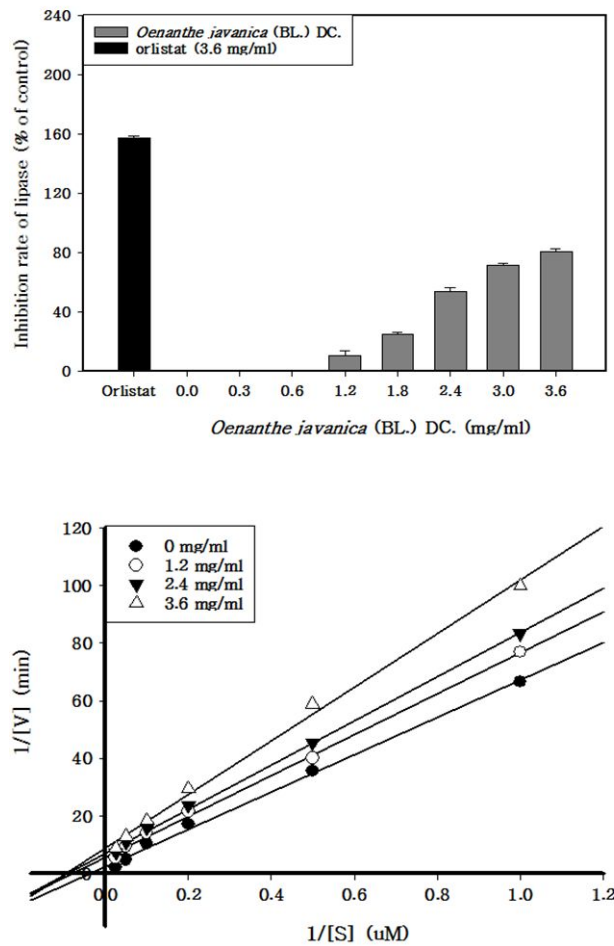


Fig. 14. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of *Oenanthe javanica* (BL.) DC.

4) 양과겹질

양과겹질 열수추출물의 pancreatic lipase 활성 저해 농도와 저해양상을 확인하였다. 그 결과(Fig. 15) 0.6 mg/ml에서 저해활성이 나타나기 시작하였으며, 0.89 mg/ml에서 50% 저해활성을 나타내고 있다. 또한 0 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.2 mg/ml의 추출물 농도로 효소반응속도를 확인한 결과 혼합형 경쟁양상을 나타내었다.

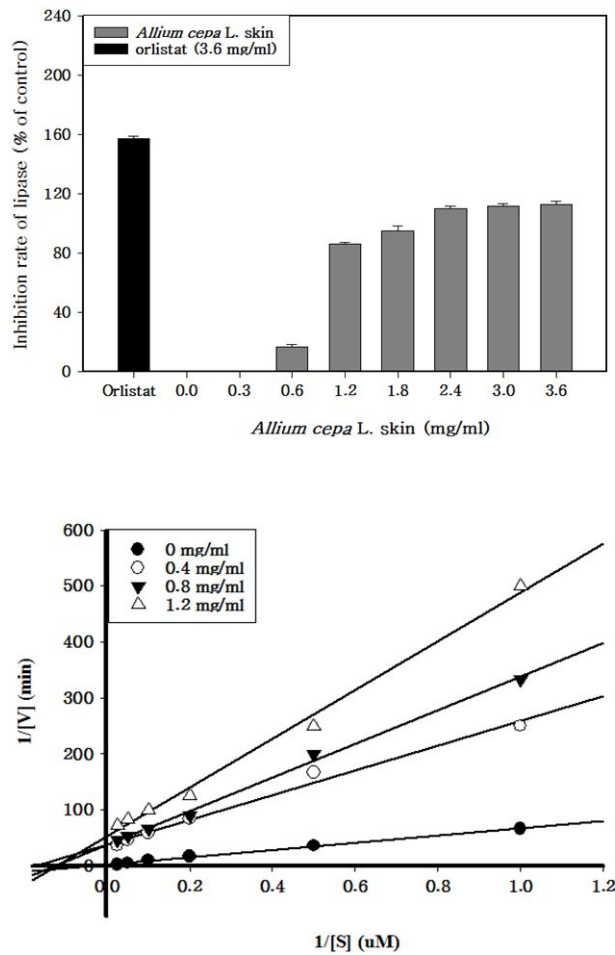


Fig. 15. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of *Allium cepa* L. Skin

5) 녹차

녹차 열수추출물의 pancreatic lipase 활성 저해 농도와 저해양상을 확인하였다. 그 결과(Fig. 16) 0.3 mg/ml에서 저해활성이 나타나기 시작하였으며, 0.54 mg/ml에서 50% 저해활성을 나타내고 있다. 또한 0 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.2 mg/ml의 추출물 농도로 효소반응속도를 확인한 결과 혼합형 경쟁양상을 나타내었다.

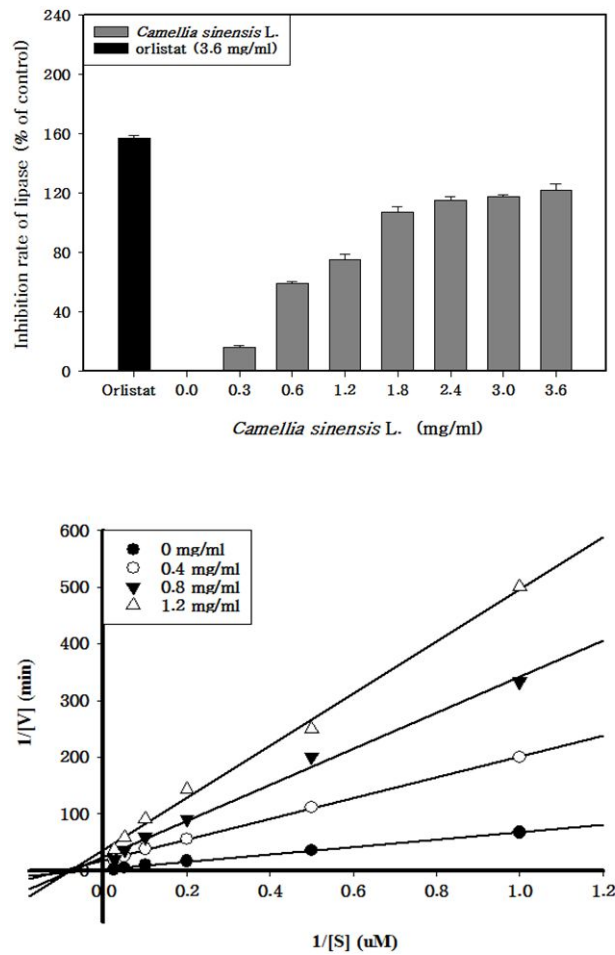


Fig. 16. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of *Camellia sinensis* L.

6) 원지

원지의 pancreatic lipase 활성 저해 농도와 저해양상을 확인하였다. 그 결과(Fig. 17) 1.2 mg/ml에서 저해활성이 나타나기 시작하였으며, 1.88 mg/ml에서 50% 저해활성을 나타내고 있다. 또한 0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 2.4 mg/ml, 3.6 mg/ml의 추출물 농도로 효소반응속도를 확인한 결과 무경쟁적 저해제인 것으로 확인되었다.

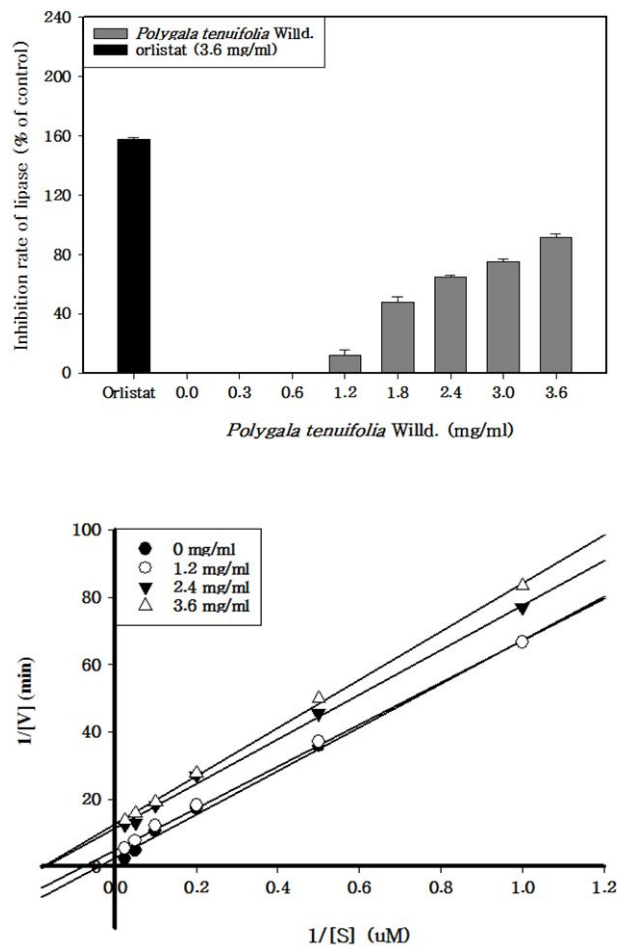


Fig. 17. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of *Polygala tenuifolia* Willd.

7) 유근피

유근피의 pancreatic lipase 활성 저해 농도와 저해양상을 확인하였다. 그 결과(Fig. 18) 0.3 mg/ml에서 저해활성이 나타나기 시작하였으며, 1.04 mg/ml에서 50% 저해활성을 나타내고 있다. 또한 3 mg/ml에서 orlistat와 비슷한 저해활성을 나타내고 있어 orlistat를 대신할 물질로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 2.4 mg/ml, 3.6 mg/ml의 추출물 농도로 효소 반응속도를 확인한 결과 혼합형 경쟁양상을 나타내었다.

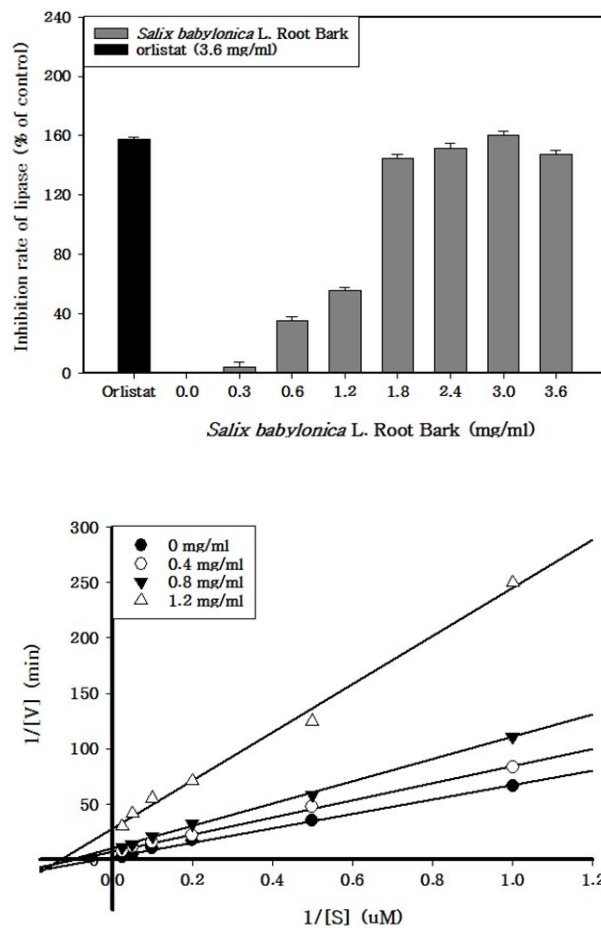


Fig. 18. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of *Salix babylonica* L. Root Bark

8) 저분자 alginate

저분자 alginate의 pancreatic lipase 활성 저해 농도와 저해양상을 확인한 결과(Fig. 19) 0.6 mg/ml에서 저해활성이 나타나기 시작하였으며, 2.03 mg/ml에서 50% 저해활성을 나타내고 있다. 또한 0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 2.4 mg/ml, 3.6 mg/ml의 추출물 농도로 효소반응속도를 확인한 결과 혼합형 경쟁양상을 나타내었다.

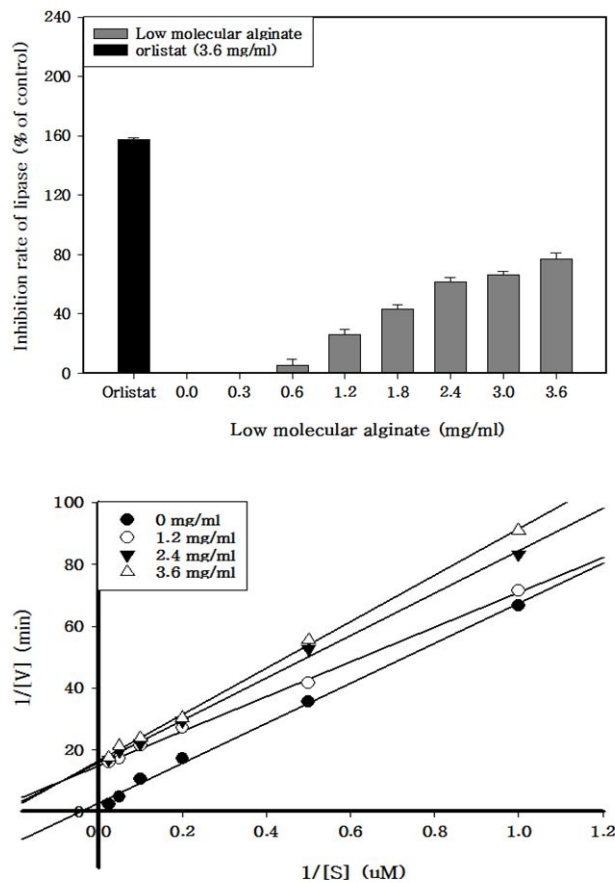


Fig. 19. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of low molecular weight alginate

9) Fucoxanthin

Fucoxanthin의 pancreatic lipase 활성 저해 농도와 저해양상을 확인하였다. 그 결과(Fig. 20) 0.3 mg/ml에서 저해활성이 나타나기 시작하였으며, 2.36 mg/ml에서 50% 저해활성을 나타내고 있다. 또한 0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 2.4 mg/ml, 3.6 mg/ml의 추출물 농도로 효소반응속도를 확인한 결과 경쟁적 저해 양상을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

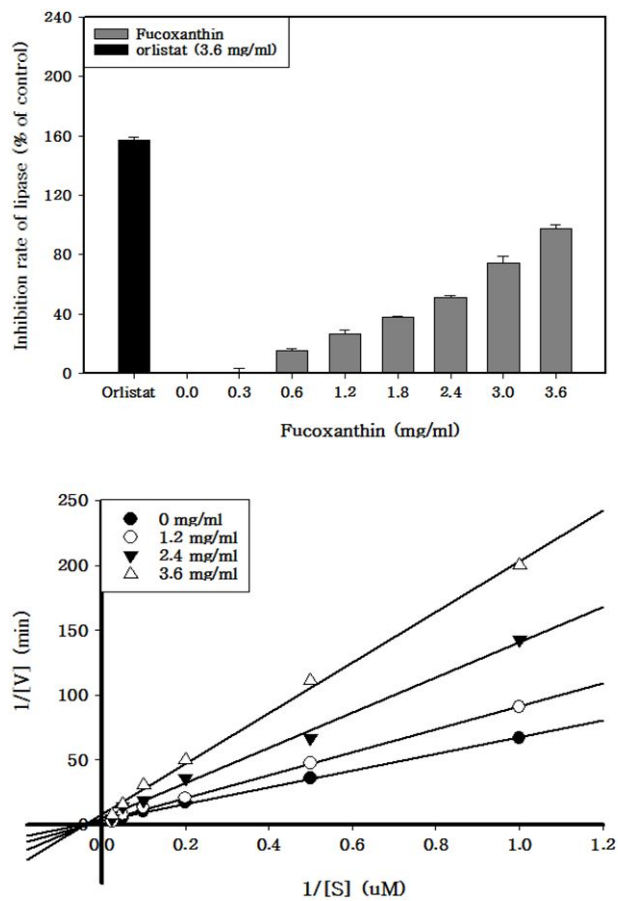


Fig. 20. Pancreatic lipase inhibiting activity and kinetics of fucoxanthin

이상의 9가지 천연 추출물과 저분자 alginate에 대한 pancreatic lipase 활성 저해효과와 효소반응속도를 확인한 결과 Table 2와 같이 구기자과 마늘 외의 후보군이 높은 lipase 저해활성을 나타내었다. 그 중 녹차 열수 추출물의 경우 50%의 저해농도가 0.54 mg/ml로 가장 높은 lipase 저해활성을 나타내었고 그 다음이 양파껍질(0.89 mg/ml), 유근피(1.04 mg/ml), 원지(1.88 mg/ml), 저분자 alginate(2.03 mg/ml), 검정콩(2.09 mg/ml), 미나리(2.32 mg/ml), fucoxanthin(2.36 mg/ml)의 순이었다. 이들의 저해양상을 확인한 결과, 원지는 무경쟁적 저해양상을, fucoxanthin은 경쟁적 저해양상을 보였고, 검정콩, 미나리, 양파껍질, 녹차, 유근피, 저분자 alginate는 모두 혼합형 저해양상을 보였다. 따라서 이후의 연구에서는 경쟁적 저해양상을 보인 fucoxanthin을 최종 후보군으로 선정하였고, fucoxanthin의 항비만 효과에 대해 검토하였다.

Table 2. Selected natural products candidates

| Selected natural products | IC ₅₀ (mg/ml) | Inhibition type |
|---|--------------------------|-----------------|
| 구기자 <i>Lycium chinense</i> Mill. | – | – |
| 마늘 <i>Allium scorodorpasum</i> var. | – | – |
| 검정콩 Black soybeans | 2.09 | Mixed-type |
| 미나리 <i>Oenanthe javanica</i> (Blume) DC. | 2.32 | Mixed-type |
| 양파껍질 <i>Allium cepa</i> L. Skin | 0.89 | Mixed-type |
| 녹차 <i>Camellia sinensis</i> L. | 0.54 | Mixed-type |
| 원지 <i>Polygala tenuifolia</i> Willd. | 1.88 | Uncompetitive |
| 유근피 <i>Salix babylonica</i> L. Root Bark | 1.04 | Mixed-type |
| Low molecular weight alginate | 2.03 | Mixed-type |
| Fucoxanthin | 2.36 | Competitive |

IV. Fucoxanthin의 최적 추출조건

1. 서론

Fucoxanthin은 주로 동아시아 해양에서 자생하는 미역(*Undaria pinnatifida*), 툇(*Hizikia fusiforme*), 다시마(*Laminaria japonica*), 모자반(*Sargassum fulvellum*) 등의 갈조류에 갈색을 띄게 하며 통상적으로 약 0.05~1.0%(w/w)의 양으로 존재하는 일종의 carotenoid계 화합물이다(13). 미역 각 부위의 fucoxanthin 함량은 미역귀, 미역잎, 미역줄기 중 미역귀에 가장 많이 함유되어 있는데, 미역귀에 함유되어 있는 fucoxanthin 함량이 미역잎에 비해 1.4배, 미역줄기에 비해 2.0배 더 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Table 3, 15). 대부분의 갈조류는 크기가 대단히 크고 구조가 어느 해조류보다 잘 분화되어 있으며, 갈색을 띄는 것은 fucoxanthin이라는 갈조류의 고유한 광합성색소가 엽록소에 비해 상대적으로 많기 때문이다. 갈조류인 fucoxanthin의 분자구조(13)는 allenic bode에 5, 6-monoepoxide를 포함하고 있는 독특한 분자구조를 취하고 있다(Fig. 21). 최근 fucoxanthin의 생리활성에 대한 연구가 많아지고 있는데(23), 특히 fucoxanthin이 암세포의 apoptosis 유발 효과에 대한 보고가 있고, fucoxanthin이 지방 연소를 촉진시킨다는 보고도 있다(25).

본 연구에서는 lipase 활성 저해효과를 나타내는 fucoxanthin의 항비만 활성 효과를 검토하기 위해, 돌미역귀에서 fucoxanthin을 직접 추출하였으며, fucoxanthin의 추출 효율을 높이기 위해 다양한 용매를 사용하여 추출방법을 검토하였기에 보고하고자 한다.

Table 3. Fucoxanthin contents in sea mustard (19)

| <i>Undaria pinnatifida</i> | Fucoxanthin content (mg/100 g, dry basis) |
|----------------------------|--|
| Blade | 87.6±3.3 |
| Stem | 62.4±1.3 |
| Sporophyll | 127.7±6.3 |

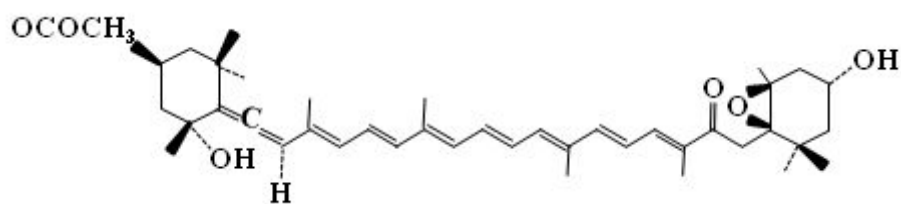


Fig. 21. Structure of fucoxanthin

2. 재료 및 방법

1) 재료

본 실험에서 사용한 돌미역귀는 기장물산에서 구입하여 사용하였다.

2) HPLC 분석

돌미역귀부터 추출된 fucoxanthin의 함량은 HPLC로 분석하여 확인하였다. C18 column (Interstil ODS-3, 150×4.6 mm, gel size 4 μm, GL Sciences Inc.)을 사용하였으며 유속은 1.0 ml/min, 검출기 파장은 450 nm의 조건으로 하였으며 용출용매로는 acetonitrile : distilled water을 75:25(v/v) 20분, 100:0(v/v) 20분, 75:25(v/v) 10분 용출하였다.

$$\text{함량 (mg/kg)} = C \times V / S$$

C : 검량선에서 구한 fucoxanthin의 농도 (ug/ml)

V : 시험용액의 최종 부피 (ml)

S : 시료 채취량 (g)

Table 4. The operating conditions of HPLC

| | |
|-------------------------|---|
| Column | C18 Column (Interstil OD-3, 150x4.6 mm, 4 μ m, GL Sciences Inc.) |
| Wave length | 450 nm |
| Flow rate | 1.0 ml/min |
| Injection volume | 20 μ l |
| Mobile phase | Acetonitrile : distilled water 75/25, 20 min \rightarrow 100/0, 20 min \rightarrow 75/25, 10 min |
| Run time | 50 min |

3) Fucoxanthin 추출 용매 선정

(1) 열수추출

분말 돌미역귀 30 g에 distilled water 900 ml을 넣어 35℃, 65℃, 85℃, 100℃에서 각각 3시간 열수추출과 상온에서 30분간 sonication을 각각 실행한 후 동결건조하였다. 동결건조 한 시료 0.5 g을 acetonitrile 10 ml에 녹여 10분간 sonication 한 후 3,000 rpm에서 10분간(4℃) 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 위와 같은 과정을 2회 실행하였으며 total 25 ml로 맞춘 후 1 ml vial에 넣어 HPLC로 분석하였다.

(2) Ethanol 추출

분말 돌미역귀 0.5 g에 ethanol을 각 10 ml 넣고 85℃에서 3시간동안 추출한 후 3,000 rpm에서 10분간(4℃) 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 위와 같은 과정을 2회 실행하였으며 total 25 ml로 맞춘 후 1 ml vial에 넣어 HPLC로 분석하였다.

4) Ethanol 비율 선정

분말 돌미역귀 0.5 g에 50% ethanol, 70% ethanol, 100% ethanol을 각각 10 ml씩 넣고 상온에서 30분간 sonication하거나 85℃에서 3시간동안 추출을 각각 실행하였다. 추출액을 3,000 rpm에서 10분간(4℃) 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 위와 같은 과정을 2회 실행하였으며 total 25 ml로 맞춘 후 1 ml vial에 넣어 HPLC 분석하였다.

5) 돌미역귀에서 fucoxanthin 대량 추출조건 확립

실험에 사용된 fucoxanthin은 기장 물산에서 구입한 돌미역귀를 이용하여 추출하였다. 분말 돌미역귀 30 g에 70% ethanol 900 ml을 넣고 상온에서 30분간 sonication 하였다. 추출된 70% ethanol을 걸러내고 새로운 70% ethanol 900 ml을 넣은 후 다시 상온에서 30분간 sonication 하였다. 이 추출액들은 Whatman No.2 (Whatman international Ltd., England) paper에 여과한 후 45℃에서 감압 농축하여 11.07 g의 fucoxanthin을 얻었다.

3. 결과 및 고찰

1) Fucoxanthin 추출 용매 선정

식용으로 섭취할 수 있는 fucoxanthin을 얻기 위해 돌미역귀 분말을 각기 다른 온도에서 열수추출과, 상온에서 sonication을 하여 HPLC 분석을 통해 fucoxanthin 함량을 확인하였다. 그 결과 85℃ 열수추출에서만 fucoxanthin이 확인되었으며 29.05 ppm으로 낮은 농도로 fucoxanthin이 검출되었다(Fig. 22-A). 이 조건에서는 fucoxanthin 함량이 너무 낮아 추출 용매를 ethanol로 바꾸어 85℃에서 추출하여 HPLC 분석한 결과 138.62 ppm의 fucoxanthin이 검출되었다. 따라서 돌미역귀에서 fucoxanthin의 추출은 ethanol을 용매로 사용하는 것으로 결정하였다(Fig. 22-B). 본 연구에서는 식용으로 섭취할 수 있는 fucoxanthin을 얻고자 하였기 때문에 다른 용매로 추출하였을 때의 fucoxanthin 함량은 확인하지 않았다.

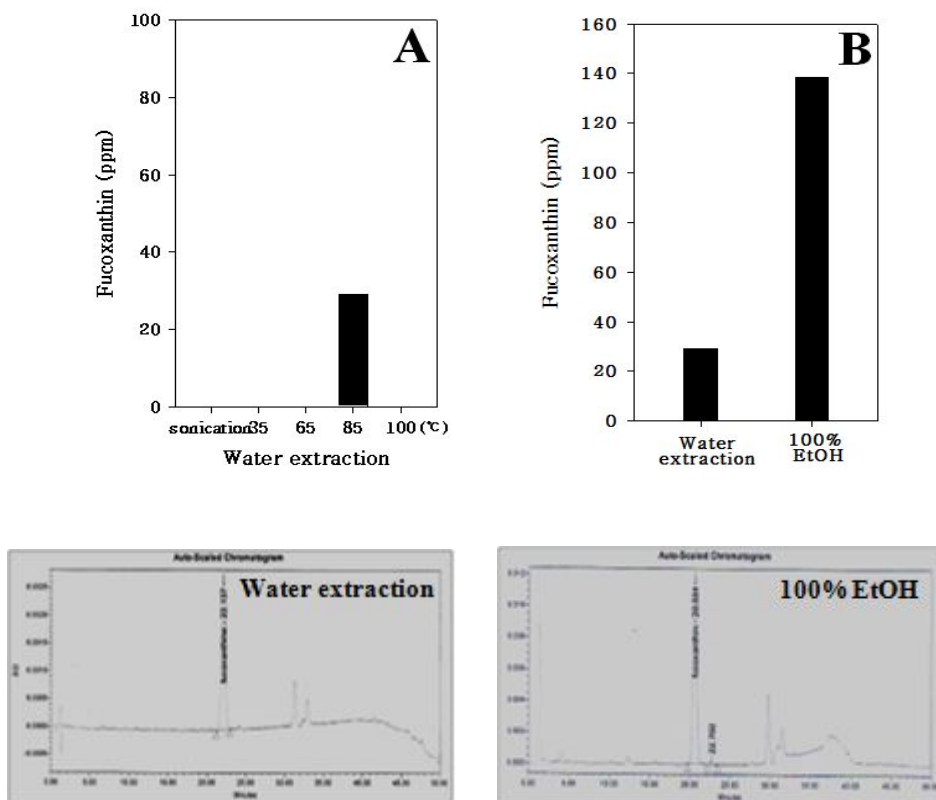


Fig. 22. Fucoxanthin concentration according to the extraction solvent

2) Ethanol 비율 선정

돌미역귀에서 fucoxanthin의 추출 용매로 ethanol을 선정하였으나, 좀 더 많은 fucoxanthin을 얻고자 ethanol 비율을 바꾸어 추출해보았다.

50% ethanol, 70% ethanol, 100% ethanol을 용매로 하여 85℃에서 3시간 추출과 상온에서 30분간 sonication한 후 HPLC 분석을 통해 fucoxanthin 함량을 확인하였다. 그 결과 85℃에서 3시간동안 추출한 것보다 상온에서 30분간 sonication하였을 때 더 높은 fucoxanthin 함량이 나왔으며, ethanol 비율별로 확인하였을 때는 50% ethanol 75 ppm, 70% ethanol 204.55 ppm, 100% ethanol 145.35 ppm로 70% ethanol을 사용하였을 때 높은 fucoxanthin 함량을 나타내고 있었다(Fig. 23).

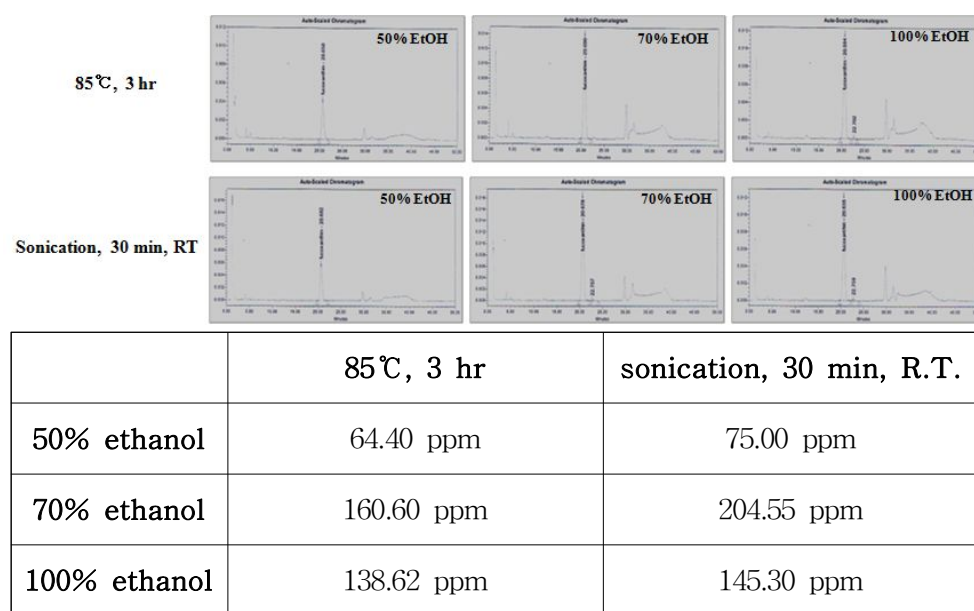


Fig. 23. Fucoxanthin concentration according to the ethanol concentration

따라서 fucoxanthin은 돌미역귀 분말 30 g을 70% ethanol에 넣어 상온에서 30분 동안 sonication하고, 이 추출액을 Whatman No.2 (Whatman international Ltd., England)paper에 여과하여 불순물을 제거한 후 여과액을 45℃에서 감압 농축하여 11.07 g의 fucoxanthin을 얻었다. 이후 사용되는 fucoxanthin은 Fig. 24와 같은 방법으로 추출하여 사용하였다.

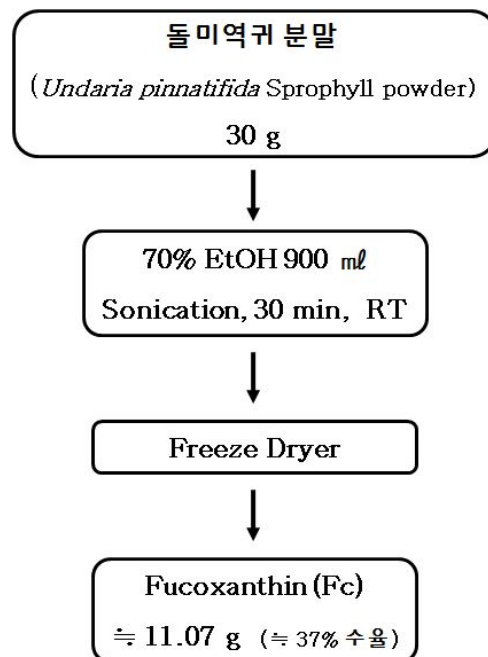


Fig. 24. Extraction procedure of fucoxanthin from the *Undaria pinnatifida* Sprophyll powder

V. 3T3-L1 지방세포에서 fucoxanthin의 항비만 활성 효과

1. 서론

비만은 지방의 축적과 에너지 저장을 위한 조절 과정에서 주로 발생하게 된다(35). 지방세포 내에 과도한 지방이 축적되어진 비만은 당뇨병, 고혈압, 심혈관질환을 포함한 만성질환을 유발하게 되는 원인으로 알려져 있다(21, 36). 따라서 세포내 지방의 축적을 예방하거나 축적된 지방을 분해하도록 자극하는 방안에 대한 연구가 최근 많은 관심을 끌고 있다(6). 지방세포 내의 지방구(lipid droplet)는 지질의 대사 및 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 지방구 내에 주로 존재하고 있는 triglyceride의 분해와 이로 인한 glycerol의 유출은 세포 내 지방의 축적을 조절하는 중요한 기전으로 여겨져 왔다(11).

지방전구세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포내 지방을 축적한다. 이러한 과정을 지방세포 분화 또는 지방세포 형성과정(adipogenesis)이라 하며 이 과정에 관여하는 중요한 인자로는 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ)와 CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α)가 있다(8, 32). 이들 두 인자는 분화 초기에 발현되는 각종 유전자들의 발현을 증가시키고 지방세포가 분화되는 동안 leptin과 adiponectin, glucose transporter 4와 같은 adipogenic gene들의 발현을 조절한다(27, 33). 따라서, 지방세포의 분화과정을 억제하는 물질이나 adipogenic gene들의 발현을 조절하는 물질은 비만 치료제로 개발 가능하다.

본 연구에서는 pancreatic lipase 저해제로 작용하여 지방 흡수 억제효과를 나타내고 있는 fucoxanthin이 세포 내에서는 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 3T3-L1 세포를 사용하여 지방축적억제 효능과 lipolysis 효과를 확인하였다.

1. 재료 및 방법

1) 3T3-L1 세포 배양

3T3-L1 (mouse embryonic fibroblast cell line) 지방전구세포는 ATCC (American type culture collection)에서 구입하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% calf serum, antibiotics (penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 units/ml)를 첨가하고 37℃, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다.

2) 지방세포의 분화유도

3T3-L1 지방전구세포를 DMEM에 10% calf serum, antibiotics (penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 units/ml)를 첨가하고 37℃, 5% CO₂ 세포 배양기에서 confluence 상태가 되도록 배양하였다. 2일 더 배양한 후(day 0), 10 ug/ml insulin, 0.25 uM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine [IBMX (SIGMA) : MDI]이 포함된 DMEM으로 교환하여 2일간 배양하였다(day 2). 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 10 ug/ml insulin이 포함된 DMEM으로 교환하여 4일간 배양하였다(day 6). 이 후 지방세포의 완전 분화를 위해 DMEM에 10% FBS, antibiotics를 첨가하여 2일간 더 배양하였다(day 8).

3) Fucoxanthin의 지방세포 분화억제효과 확인

Fucoxanthin의 지방세포 분화억제 효과를 검토하기 위하여 Oil Red O staining을 시행하였다. Oil Red O staining은 중성지방을 염색하는 방법으로 지방세포 내 중성지방 축적 정도를 시각화할 수 있다. 3T3-L1 지방전구세포를 35 mm petri dish에 dish 당 5×10^4 cells 농도로 seeding 하여 배양한 뒤 confluence상태에서 2일 더 배양하였다. 그 후 10 ug/ml insulin, 0.25 uM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine [IBMX (SIGMA) : MDI]이 포함된 DMEM으로 교환하였다. 이 때, fucoxanthin을 농도별로(62.5, 125, 250, 500 ug/ml) 같이 처리하고 2일간 배양하여 fucoxanthin이 지방세포 분화에 미치는 영향을 관찰하였다. 2일 배양 후 10 ug/ml insulin, fucoxanthin (62.5, 125, 250, 500 ug/ml)이 포함된 DMEM으로 교환하여 4일간 더 배양하였고, 지방세포의 완전 분화를 위해 DMEM에 10% FBS, antibiotics를 첨가하여 2일간 더 배양하였다. 이때에도 fucoxanthin을 동일 농도로 처리하였다. 대조군으로(fucoxanthin 처리하지 않음) 배양한 3T3-L1 지방전구세포가 완전한 지방세포로의 분화가 이루어진 시점에 모든 dish의 배지를 제거하고 차가운 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 세척 한 후, 10% formalin을 처리하여 37℃에서 반응, 1시간 고정시켰다. Formalin을 완전히 제거한 다음 60% isopropanol을 넣고 상온에서 5분간 반응 시킨 후 완전히 제거하였다. 현미경으로 세포의 상태를 확인한 후 Oil Red O working solution (Sigma)를 넣고 37℃에서 10분간 염색 하였다. 이 때 Oil Red O working solution은 Oil Red O powder 0.375 g을 isopropanol 100 ml에 녹인 뒤 증류수에 6 : 4의 비율로 희석한 다음 여과하여 사용하였다. 세포를 염색한 뒤 Oil Red O working solution을 완전히 제거하기 위해 distilled water로 4번 세척하고 현미경으로 세포의 염색 상태를 확인하였다. 염색되어진 dish에 100% isopropanol을 넣고 37℃에서 10분 반응시켜 염색된 지방구를 용출시켜 spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 25).

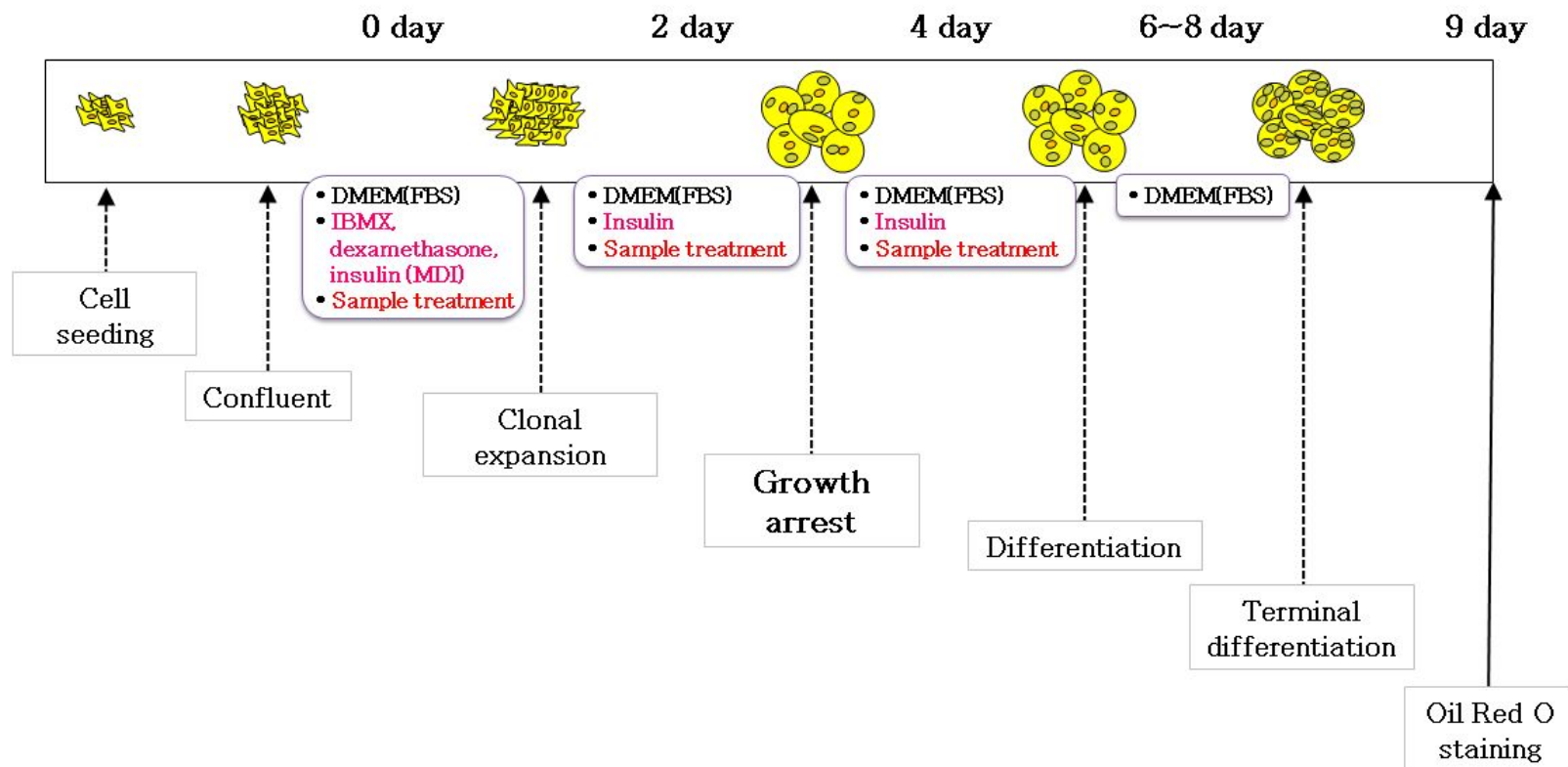


Fig. 25. Fucoxanthin treatment of during the process of adipocyte differentiation

4) 지방세포 내 중성지방 분해효과 측정

Confluence 상태의 3T3-L1 지방전구세포를 2일간 더 배양한 다음 DMEM (MDI)를 처리하고 2일 배양하였다(day 2). 그 후 10 ug/ml의 농도로 DMEM에 insulin을 첨가하여 4일간 더 배양하였다(day 6). 완전 분화를 위해 DMEM에 10% FBS, antibiotics를 첨가하여 2일간 더 배양하였다(day 8). 100% 분화가 되었을 때 fucoxanthin을 농도별(50, 100, 150, 200, 250, 300 ug/ml)로 처리한 다음 48시간 더 배양하였다. 그리고 enzymatic reagent를 사용하여 배지에 방출되는 glycerol량을 측정하였다. Glycerol 방출량은 glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) kit (Sigma)를 사용하였다. Fucoxanthin을 처리한 배양액 10 ul와 Free Glycerol Reagent 800 ul를 조심스럽게 혼합하고 37℃에서 5분간 반응시켰다. 반응 시킨 후 판독기 (ELISA, Enzyme linked immunosolvent assay)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

1) Fucoxanthin의 triglyceride 축적 억제 효과

Fucoxanthin이 지방세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는지 검토하였다. 3T3-L1 지방전구세포와 지방세포로 분화할 때 각 day 별로 분화유도제 (MDI, insulin)을 첨가할 때마다 fucoxanthin을 농도별(62.5, 125, 250, 500 ug/ml)로 처리하였다(Fig. 26-A). 그 결과 분화유도제만 처리한 세포의 중성지방 축적을 100%로 하였을 때, 고농도의 fucoxanthin (500 ug/ml)을 같이 처리한 세포에서는 효과가 나타나지 않았으나 fucoxanthin 농도가 낮아질수록 triglyceride 축적이 저해되어, 62.5 ug/ml 농도 처리 시 control 세포에 비해 약 40%가 저해됨을 확인하였다(Fig. 26-B). 따라서, fucoxanthin은 지방세포의 분화억제 효능은 있으나 fucoxanthin의 농도 의존적이지는 않았다.

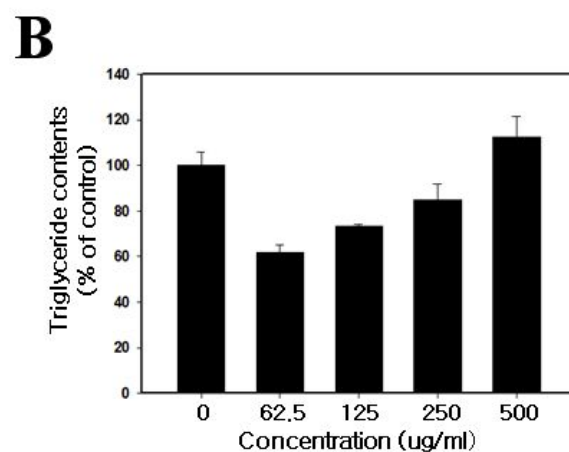
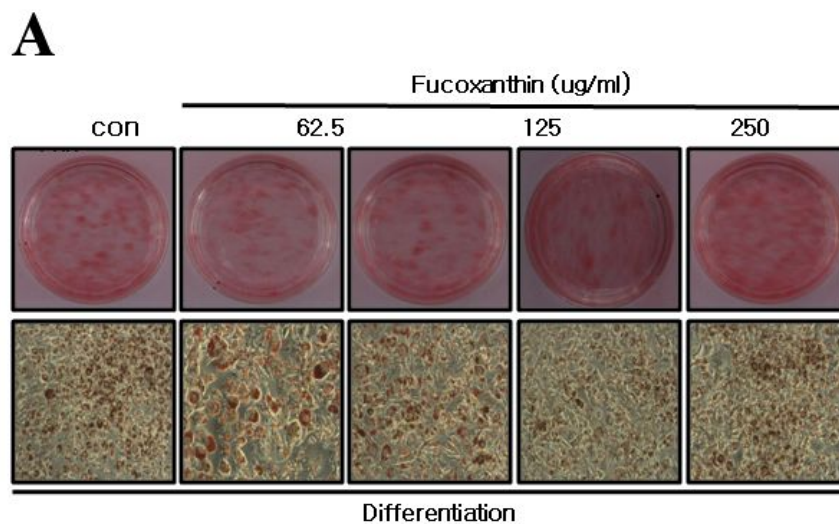


Fig. 26. Oil Red O staining and triglyceride contents of fucoxanthin

(A) The morphological changes associated with adipogenesis were photographed after Oil Red O staining. (B) The stained triglyceride content was quantified by measuring absorbance.

2) Fucoxanthin의 lipolysis 효과 확인

상기의 결과로 fucoxanthin이 triglyceride의 축적을 억제한다는 것을 확인하였다. 완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에 fucoxanthin을 처리하여 지방구들의 lipolysis 활성이 있는지 검토하였다. Lipolysis가 유도되면 triglyceride가 분해되어 세포질에서 glycerol과 fatty acid가 생성되고 계속적으로 lipolysis가 일어나면 glycerol은 세포 외로 방출된다(37). 3T3-L1 지방전구 세포를 100% 분화시킨 다음 fucoxanthin을 농도별(50, 100, 150, 200, 250, 300 ug/ml)로 48시간 처리한 후에 배지로 방출된 glycerol의 양을 측정하였다. Fig. 27에서 보이듯이 control 세포에서 방출된 glycerol의 양과 fucoxanthin을 처리한 세포에서의 glycerol 방출량이 비슷한 수치로 측정되었던 것이 확인되었다. 따라서, fucoxanthin은 지방세포 내 지질을 분해하는 효과를 가지지 않는 것으로 판단된다.

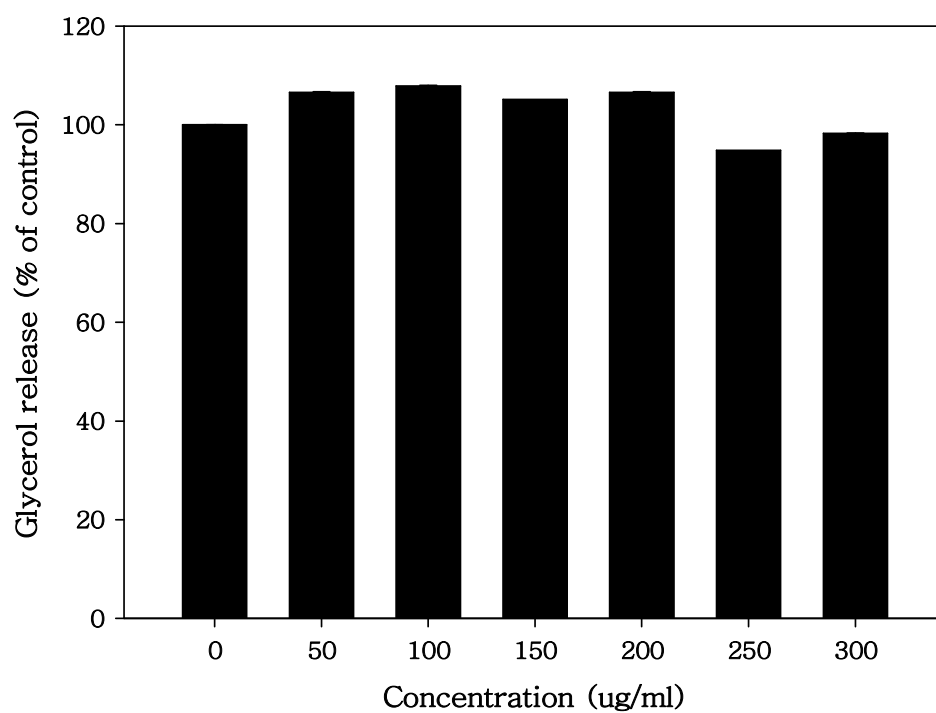


Fig. 27. Stimulatory effect of fucoxanthin on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes

VI. C57BL/6J mouse에서 fucoxanthin의 항비만 효과

1. 서론

비만의 생리학적 기전은 일반적으로 섭취하는 에너지보다 소비하는 에너지가 부족한 에너지 불균형에 의해서 초래되며, 하루 500 kcal의 에너지가 남게 되면 한 달에 2 kg의 체중 증가를 보인다고 알려져 있다(34, 18, 30). 2005년 국민건강영양조사 결과 남자 35.2%, 여자 28.3%, 전체 31.8%가 비만으로 나타나 우리나라의 비만 인구가 점점 증가하고 있고(22), 이에 따르는 합병증의 유병률도 증가하고 있는 상태이다. 따라서 비만의 문제를 해결할 수 있는 방안을 모색하는 일은 꼭 필요하다고 생각되어진다.

본 연구에서는 pancreatic lipase 활성 저해효과와 지방축적억제 효과를 가지고 있는 fucoxanthin이 생체 내에서도 비만억제효과를 가지고 있는지 알아보기로 하였다. 6주령의 수컷 C57BL/6J mouse 고지방식이 비만모델을 이용하여 fucoxanthin을 경구 투여하였으며, 체중증가량, 식이효율, 혈중 비만조절관련 지표와 독성지표에는 어떠한 영향을 주는지, 실험종료 후 부검하였을 때 장기, 복부지방무게는 어떠한 차이가 있는지 조사하였다.

2. 재료 및 방법

1) 실험동물 및 실험군의 설정

중앙실험 동물에서 공급받은 5주령의 C57BL mouse 수컷을 공급받아 1주간 적응시기를 거친 후에 실험을 하였으며, 사육환경은 온도 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$, 조도 150~300 lux, 그리고 조명은 12시간(08:00~20:00)명암으로 조정하여 실험 기간 동안 일정한 상태로 유지하였다.

실험군의 설정은 일반 식이만을 섭취하는 정상식이군(normal diet, ND), 고지방식을 섭취하는 고지방식이군(high fat diet, HFD), 고지방식을 섭취하면서 'C'사 'F'제품을 경구 투여군, fucoxanthin을 경구 투여군으로 나누어 각 군당 6마리씩 배정하여(Table 5) 8주 동안 실험하였으며, 주 2회 체중측정과 주 1회 사료섭취량을 측정하였다.

Table 5. Experimental groups for in vivo antiobesity activity of fucoxanthin

| Group | Number | Sex | Dose (mg/kg BW) |
|-----------------|--------|------|-----------------|
| Normal | 6 | male | |
| High fat diet | 6 | male | |
| High fat diet | 6 | male | 1,000 mg/kg |
| + | 6 | male | 2,000 mg/kg |
| 'C' compagnie's | 6 | male | 4,000 mg/kg |
| 'F' product | 6 | male | |
| High fat diet | 6 | male | 80 mg/kg |
| + | 6 | male | 160 mg/kg |
| Fucoxanthin | 6 | male | 320 mg/kg |

2) 식이 및 경구 투여 용량

고지방 식이(40% 이상 지방 함량)군과 일반 식이(10% 지방 함량)군 모두 실험 기간 동안 자유급식과 급수를 시켰다(Table 6). 실험군의 경구 투여 용량은 1,000 mg/kg, 2,000 mg/kg, 4,000 mg/kg 'C'사 'F'제품과 80 mg/kg 160 mg/kg, 320 mg/kg의 fucoxanthin을 1일 1회(주 5회) 매일 동일한 시간에 경구 투여 하였다.

Table 6. Composition of experimental diets (g/kg diet)

| Ingredient | Normal Diet | | High fat Diet | |
|------------------|-------------|------|---------------|------|
| | g | kcal | g | kcal |
| Casein, 80 Mesh | 200 | 800 | 200 | 800 |
| L-Cystine | 3 | 12 | 12 | 12 |
| Corn Starch | 315 | 1260 | 72.8 | 291 |
| Maltodextrin 10 | 35 | 140 | 100 | 400 |
| Sucrose | 350 | 1400 | 172.8 | 691 |
| Cellulose, BW200 | 50 | 0 | 50 | 0 |
| Soybean Oil | 25 | 225 | 25 | 225 |
| Lard | 20 | 180 | 177.5 | 1598 |
| ETC | 57.05 | 40 | 57.05 | 40 |
| Total | 1055.05 | 4057 | 858.15 | 4057 |

3) 혈장 분석 및 장기적출

희생 전 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복하였다. 혈액은 개복 직후 복대정맥에서 채혈하였으며 실온에서 1시간 정도 방치하였다가 15,000 rpm에서 5분간(4℃) 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 혈액생화학분석기를 사용하여 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol)의 혈중 농도를 각각 측정하였다. 간 및 심장, 신장, 비장, 복부지방의 장기를 적출하여 PBS에 세척하고 여과지로 수분을 완전히 제거한 다음 무게를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 체중, 사료섭취량 및 식이효율 측정

실험동물의 체중은 주 2회 측정, 사료 섭취량은 주 1회 측정하였으며, 이를 근거로 식이효율을 계산하였다. 식이효율은 아래 식에 대입시켜 최종 체중 증가량을 총 사용량으로 나누어 산출하고 통계 분석하였다.

식이효율은 공식에서 의미하는 바와 같이 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 비만조절효과가 있다는 것을 의미한다. Fig. 28-A와 같이 고지방식이군(HFD)이 일반식이군(ND)과 비교해 체중이 높게 측정되어 비만의 유발을 확인할 수 있었다. 실험 마지막 날 fucoxanthin 투여군과 고지방식이군의 체중증가량이 15.5% 차이가 생긴 것을 보아 fucoxanthin이 체중증가를 억제하는 효과가 나타나는 것으로 사료된다. 또한 식이효율은 Fig. 28-B에서 보이듯이 fucoxanthin 섭취 군은 고지방식이군에 비해 체중 증가가 감소하였으나 식이효율은 큰 차이가 없어 식이조절을 통한 체중감량 효과를 보았다고 판단할 수는 없는 것으로 보인다.

Feeding efficiency ratio (FER%) = 체중증가량 (g) / 사료섭취량 (g) x 100

Table 7. Body weight gain and feeding efficiency ratio in
high fat diet-feed obese mice

| | | Body weight gain (days) | FER (%) |
|--------------------------------|------------|----------------------------|-------------|
| Normal fat diet | | 0.38±0.67 | 20.23±2.26 |
| High fat diet | | 14.78±4.57 | 84.31±33.70 |
| 'C' compagnie's 'F' product | 1000 mg/kg | 12.48±3.44 | 80.27±23.71 |
| | 2000 mg/kg | 12.73±3.82 | 73.91±21.59 |
| | 4000 mg/kg | 12.90±3.87 | 69.15±25.15 |
| Fucoxanthin | 80 mg/kg | 14.60±1.46 | 80.23±21.98 |
| | 160 mg/kg | 13.33±0.46 | 74.33±5.69 |
| | 320 mg/kg | 12.45±4.08 | 70.61±27.15 |

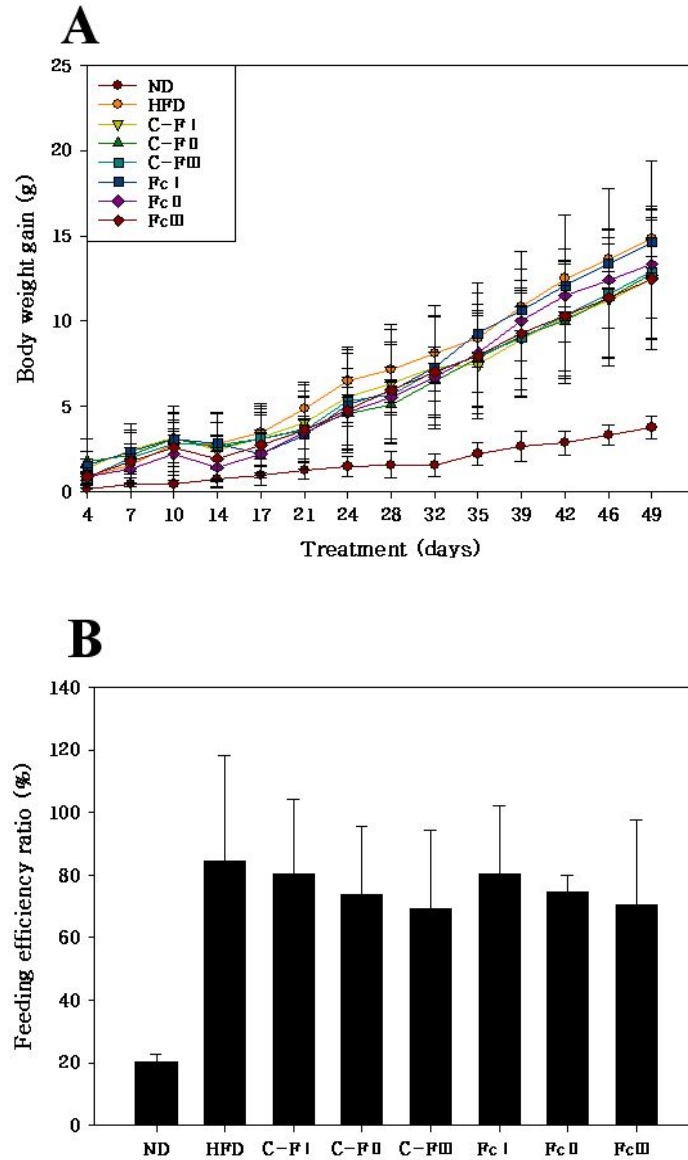


Fig. 28. Body weight gain and feeding efficiency ratio in high fat diet-feed obese mice

ND; normal fat diet, HFD; high fat diet, C-F I; 'C' companie's 'F' product 1000 mg/kg, C-F II; 'C' companie's 'F' product 2000 mg/kg, C-F III; 'C' companie's 'F' product 4000 mg/kg, Fc I; Fucoxanthin 80 mg/kg, Fc II; Fucoxanthin 160 mg/kg, Fc III; Fucoxanthin 320 mg/kg

2) 혈액생화학분석

(1) 혈중 alanine aminotransferase (ALT) 농도와

혈중 asparate aminotransferase (AST) 농도

실험 종료 후 mouse에서 혈액을 채취하여 혈액생화학 분석기로 ALT, AST의 농도를 측정된 결과는 Table 8과 같으며, 그 값이 고지방식이군보다 낮은 수치로 나타났다. ALT, AST는 혈중 간독성지표로 사용되고 있는 물질들이나 고지방식이군보다 낮게 나온 것으로 보아 fucoxanthin에 의한 간독성은 거의 없는 것으로 사료되어진다(Fig. 29).

Table 8. Plasma ALT, AST levels in high fat diet-fed obese mice

| | | ALT (U/L) | AST (U/L) |
|--|-------------------|------------------|------------------|
| Normal fat diet | | 22.00±13.51 | 70.00±45.28 |
| High fat diet | | 123.33±40.21 | 106.67±43.55 |
| 'C' compagnie's 'F' product | 1000 mg/kg | 53.33±21.37 | 64.17±15.63 |
| | 2000 mg/kg | 59.00±51.28 | 67.00±24.90 |
| | 4000 mg/kg | 85.00±23.72 | 79.00±23.82 |
| Fucoxanthin | 80 mg/kg | 74.17±22.68 | 95.00±38.21 |
| | 160 mg/kg | 37.00±18.23 | 53.00±5.70 |
| | 320 mg/kg | 61.00±43.50 | 83.00±57.73 |

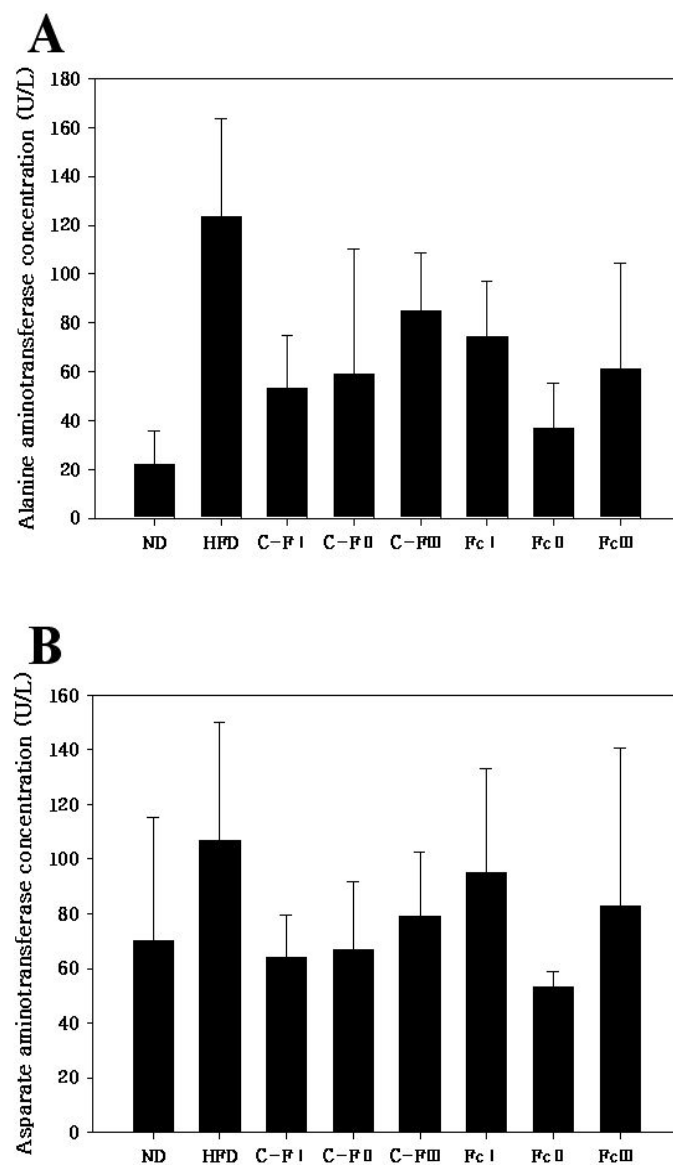


Fig. 29. Plasma ALT, AST levels in high fat diet-fed obese mice
 ND; normal fat diet, HFD; high fat diet, C-F I; 'C' companie's 'F' product 1000 mg/kg, C-F II; 'C' companie's 'F' product 2000 mg/kg, C-F III; 'C' companie's 'F' product 4000 mg/kg, Fc I; Fucoxanthin 80 mg/kg, Fc II; Fucoxanthin 160 mg/kg, Fc III; Fucoxanthin 320 mg/kg

(2) 혈중 triglyceride, cholesterol, HDL, LDL 농도

혈장 내 triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol 그리고 LDL-cholesterol의 양을 측정한 결과는 Table 9과 같다. Triglyceride, total cholesterol에서는 fucoxanthin 경구 투여군이 고지방식이군보다 낮게 측정되었으며, 'F'제품과는 비슷한 수치로 측정되었다(Fig. 30). HDL-cholesterol, LDL-cholesterol에서는 fucoxanthin 경구 투여군과 고지방식이군의 수치가 비슷하게 측정되었다(Fig. 31).

Table 9. Plasma HDL-cholesterol, LDL-cholesterol levels in high fat diet-fed obese mice

| | | triglyceride (mg/dL) | total cholesterol (mg/dL) | HDL cholesterol (mg/dL) | LDL cholesterol (mg/dL) |
|-------------------------------|------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Normal fat diet | | 103.00±7.58 | 100.00±6.12 | 59.00±4.18 | 7.00±2.74 |
| High fat diet | | 169.17±14.63 | 175.83±17.15 | 73.33±8.17 | 15.00±4.47 |
| 'C' companie's 'F' product | 1000 mg/kg | 127.50±36.43 | 168.33±8.17 | 68.33±2.58 | 13.33±4.08 |
| | 2000 mg/kg | 128.00±39.15 | 167.00±9.08 | 10.00±3.54 | 12.00±5.70 |
| | 4000 mg/kg | 117.00±25.88 | 162.00±7.58 | 67.00±5.70 | 11.25±4.79 |
| Fucoxanthin | 80 mg/kg | 134.17±17.44 | 178.33±17.44 | 73.33±6.06 | 15.83±3.76 |
| | 160 mg/kg | 107.00±32.52 | 153.00±32.52 | 69.00±15.57 | 15.00±6.12 |
| | 320 mg/kg | 138.00±21.39 | 163.00±21.39 | 73.00±4.47 | 15.00±5.00 |

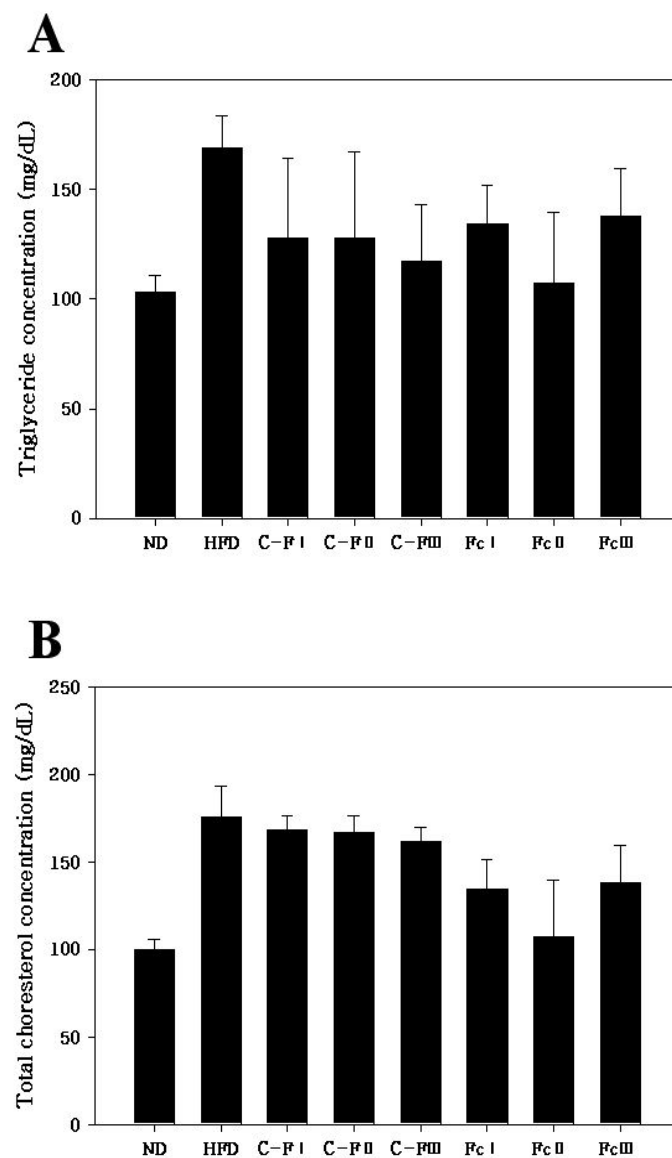


Fig. 30. Plasma triglyceride, total cholesterol levels in high fat diet-fed obese mice

ND; normal fat diet, HFD; high fat diet, C-F I; 'C' companie's 'F' product 1000 mg/kg, C-F II; 'C' companie's 'F' product 2000 mg/kg, C-F III; 'C' companie's 'F' product 4000 mg/kg, Fc I; Fucoxanthin 80 mg/kg, Fc II; Fucoxanthin 160 mg/kg, Fc III; Fucoxanthin 320 mg/kg

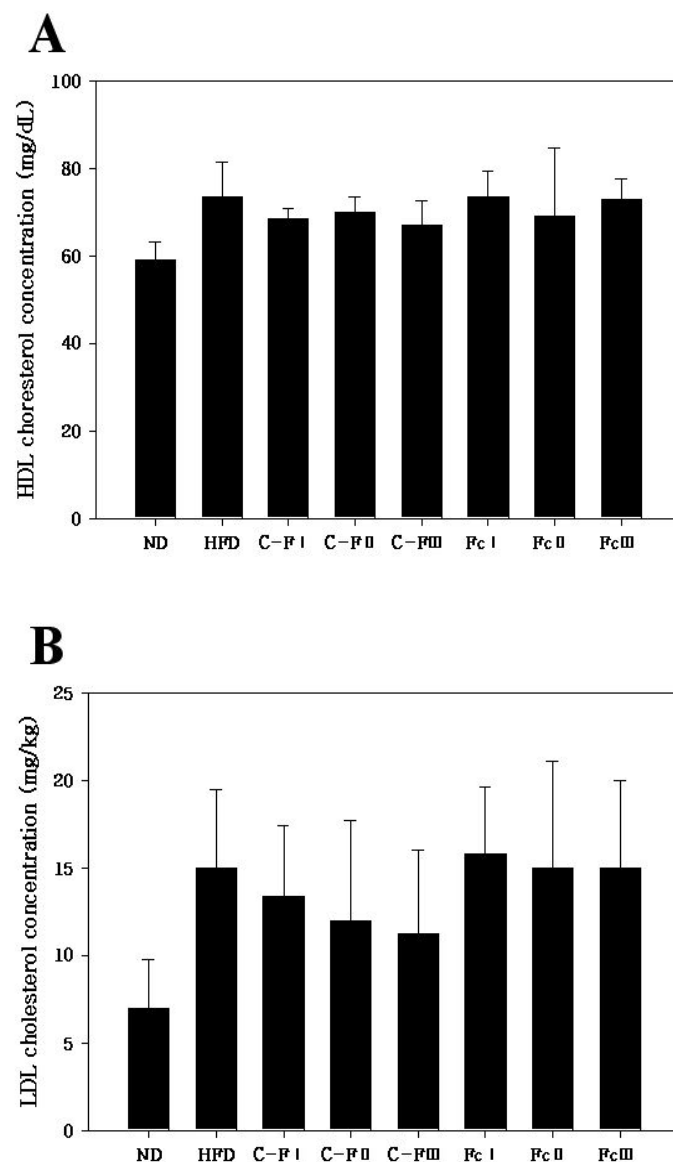


Fig. 31. Plasma HDL-cholesterol, LDL-cholesterol levels in high fat diet-fed obese mice

ND; normal fat diet, HFD; high fat diet, C-F I; 'C' companie's 'F' product 1000 mg/kg, C-F II; 'C' companie's 'F' product 2000 mg/kg, C-F III; 'C' companie's 'F' product 4000 mg/kg, Fc I; Fucoxanthin 80 mg/kg, Fc II; Fucoxanthin 160 mg/kg, Fc III; Fucoxanthin 320 mg/kg

3) 장기조직 중량 및 복부지방 무게

실험시작 8주 후 mouse를 부검하여 측정된 각각의 장기조직 무게는 Table 10과 같았다. 간, 신장, 비장, 심장의 조직 무게는 fucoxanthin 경구 투여군, 고지방식이군, 'F'제품 경구 투여군과 비슷한 수치로 측정되었다. 복부지방 무게는 fucoxanthin 경구 투여군이 고지방식이군보다 낮게 측정되었으며, 'F'제품과는 비슷한 수치로 측정되었다(Fig. 32). Fucoxanthin 경구 투여군과 고지방식이군의 복부지방 사진을 보면 fucoxanthin 경구 투여군의 복부지방이 고지방식이군의 복부지방과 'F'제품 복부지방보다 작은 것을 확인 할 수 있다(Fig. 33). 따라서, fucoxanthin 경구 투여군은 체중 증가량의 결과와 유사하게 복부지방이 감소하는 것으로 사료된다.

Table 10. Organ weights in high fat diet-fed obese mice

| | | Liver (g) | Kidney (g) | Spleen (g) | Heart (g) | Adipose issue (g) |
|-------------------------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|-------------------|
| Normal fat diet | | 0.85±0.05 | 0.26±0.01 | 0.06±0.01 | 0.10±0.01 | 0.68±0.09 |
| High fat diet | | 1.16±0.18 | 0.28±0.03 | 0.07±0.01 | 0.12±0.02 | 3.86±0.41 |
| 'C' companie's 'F' product | 1000 mg/kg | 102±0.16 | 0.29±0.02 | 0.07±0.01 | 0.12±0.01 | 3.71±0.35 |
| | 2000 mg/kg | 1.18±0.09 | 0.30±0.01 | 0.07±0.01 | 0.12±0.01 | 3.74±0.38 |
| | 4000 mg/kg | 1.12±0.13 | 0.29±0.02 | 0.06±0.01 | 0.10±0.01 | 3.76±0.95 |
| Fucoxanthin | 80 mg/kg | 1.25±0.24 | 0.28±0.01 | 0.07±0.01 | 0.10±0.01 | 3.72±0.33 |
| | 160 mg/kg | 1.28±0.13 | 0.29±0.01 | 0.06±0.01 | 0.11±0.01 | 3.72±0.51 |
| | 320 mg/kg | 1.19±0.16 | 0.28±0.03 | 0.07±0.01 | 0.10±0.01 | 3.53±0.30 |

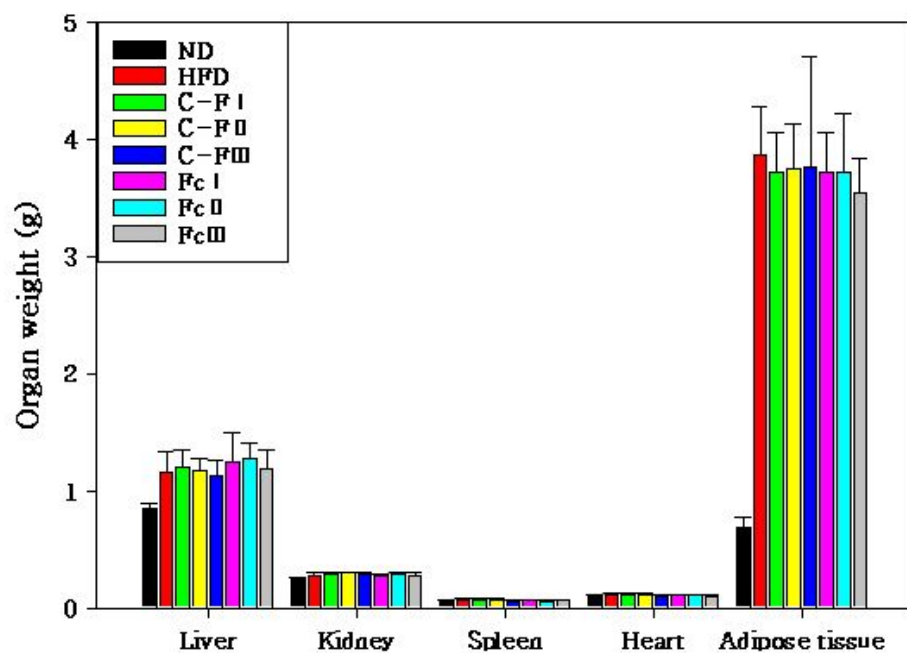
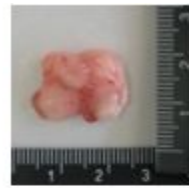
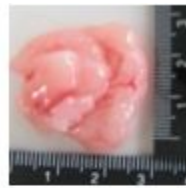


Fig. 32. Organ weights in high fat diet-fed obese mice

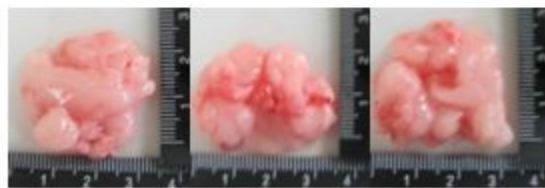
ND; normal fat diet, HFD; high fat diet, C-F I; 'C' companie's 'F' product 1000 mg/kg, C-F II; 'C' companie's 'F' product 2000 mg/kg, C-F III; 'C' companie's 'F' product 4000 mg/kg, Fc I; Fucoxanthin 80 mg/kg, Fc II; Fucoxanthin 160 mg/kg, Fc III; Fucoxanthin 320 mg/kg



Normal diet

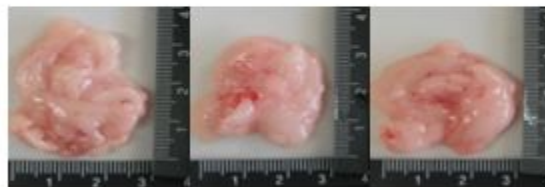


High fat diet



1000 mg/kg 2000 mg/kg 4000 mg/kg

'C' company's 'F' product



80 mg/kg 160 mg/kg 320 mg/kg

Fucoxanthin

Fig. 33. Adipose tissue in high fat diet-fed obese mice

C57BL/6J mouse를 이용하여 fucoxanthin 경구 투여가 체중증가량, 식이효율과 체지방의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 1주일간의 적응시기를 거친 후 정상식이군, 고지방식이군, 고지방식이를 섭취하면서 'C'사 'F'제품 경구 투여군, fucoxanthin 경구 투여군으로 나누어 8주간 실험하였다. 주 2회 체중측정과 주 1회 식이섭취량을 측정하여 체중증가량과 식이섭취량을 확인한 결과 fucoxanthin은 고지방식이군에 비해 체중 증가량은 감소하지만 이는 식이조절을 통한 체중감량 효과는 아니었다. 혈중 triglyceride, total cholesterol은 고지방식이군보다 낮은 수치로 나왔으며, 다이어트 제품으로 알려져 있는 'F'제품과 유사한 수치로 측정되었으며, 고지방식이군과 비슷한 수치로 HDL-cholesterol, LDL-cholesterol이 측정되었다. 간독성지표인 AST, ALT이 고지방식이군보다 낮은 수치로 측정되어진 것으로 보아 간독성은 거의 없는 것으로 사료되어진다. 복부지방 무게를 측정하였더니 고지방식이군보다 낮게 측정되어진 것을 확인되었으며, 사진 상에서 고지방식이군의 지방보다 fucoxanthin을 경구 투여군의 지방이 작은 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과의 근거로 fucoxanthin은 체중감소 효과를 가지고 있으며, 복부지방의 축적을 억제시키는 효과를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

VII. 결론

본 연구에서는 지방 대사에 직접적으로 관여하는 지방분해 효소인 pancreatic lipase의 활성 저해를 통해 체내에서 지방의 분해 및 축적을 억제할 수 있는데, 부작용이 심한 합성물 대신 비교적 부작용이 적으면서 유효성이 입증되어진 천연물에서 pancreatic lipase 저해제를 찾고자 하였다.

다양한 천연 추출물을 식용작물 유기용매 추출물, 해조류 유기용매 추출물, 한약재 유기용매 추출과 식용작물 열수추출물로 구분하여 pancreatic lipase 활성을 확인하였으며, 60% 미만의 lipase 활성을 보이는 천연 추출물을 후보군으로 선정하였다. 후보군은 식용작물에서 유근피, 해조류에서 fucoxanthin, 한약재에서 원지, 구기자 그리고 열수추출물에서 검정콩, 미나리, 녹차, 마늘, 양파껍질로 총 9종으로 선정되었으며, 저분자 alginate를 포함한 10종의 후보군에 대해 pancreatic lipase 활성저해능도와 효소반응속도를 확인하였다. 대부분의 후보군이 높은 lipase 저해활성을 가지고 있었으며, 혼합성 저해양상을 나타내었으나, 원지 추출물은 무경쟁적 저해, fucoxanthin은 경쟁적 저해제로 확인되었다. 이 중 경쟁적 저해로 확인되어진 fucoxanthin을 최종 선택하였으며, fucoxanthin의 다른 항비만 활성에 대해 추가 연구하였다.

Fucoxanthin은 대부분 추출한 후 정제과정을 거쳐 얻어지고 있는데, 이렇게 얻어진 fucoxanthin은 식품으로서 섭취할 수가 없는 상태이다. 본 연구에서는 기능성식품으로 섭취할 수 있는 fucoxanthin을 추출하여 항비만 활성을 확인하기 위해 fucoxanthin의 최적 추출조건을 탐색하였다. 그 결과 70% ethanol에 돌미역귀 분말 30 g을 넣어 상온에서 30분간 sonication과정을 2회한 후 감압농축과 동결건조 과정을 거쳐 11.07 g의 fucoxanthin을 얻었다.

Fucoxanthin이 지방세포 분화과정에 주는 영향을 확인하기 위해 3T3-L1을 사용하여 지방축적 억제결과를 확인하였다. Fucoxanthin을 500 mg/ml로 처리한 세포에서는 triglyceride 축적이 억제되어지지 않았으나 fucoxanthin 농도가 낮아질수록 triglyceride 축적이 억제되어 62.5 mg/ml로 처리하였을 때는 fucoxanthin을 처리하지 않았을 때보다 40%의 triglyceride 축적 억제 효과를 확인하였다. 완전히 분화된 3T3-L1은 triglyceride를 분해시켜 세포 외로

glycerol을 방출하게 되는데, fucoxanthin이 지방세포 내 지방을 분해하는 효과가 있는지 확인한 결과 control 세포와 비슷한 수치로 측정되어져 triglyceride 분해 효과는 없는 것으로 사료된다.

Fucoxanthin이 생체 내에서는 어떠한 효과를 나타내는지 확인하기 위해 C57BL/6J mouse 고지방식이 비만모델을 사용하였다. Fucoxanthin은 고지방식이군에 비해서 체중증가를 감소시키는 효과를 가지고 있었다. 혈중 비만조절관련지표인 triglyceride, total cholesterol은 고지방식이군보다 낮은 수치로 측정되었고, 다이어트 제품으로 알려진 'F' 제품과 비슷한 수치로 측정되었으며, 간독성은 없는 것으로 사료되어진다. 복부지방의 무게가 고지방식이군과 'F'제품보다 낮게 측정되어졌으며, 고지방식이군의 복부지방보다 fucoxanthin을 경구 투여군의 복부지방이 적은 것으로 확인되었다.

본 연구를 바탕으로 fucoxanthin이 지방 흡수와 축적을 억제하는 기능성 식품의 소재로 이용되어질 수 있을 것으로 사료되며, 다른 후보 천연 추출물에 대한 추가 연구가 필요하다. 또한 다른 후보물질과 fucoxanthin을 혼합하여 사용할 경우 다양한 항비만 효능이 있을 것으로 기대되어져 지속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

VIII. 참고문헌

1. Ballinger, A., Peikin, S. R. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol.* 440(2-3), pp. 109-117(2002).
2. Beermann, B., Melander, H., Säwe, J., Ulleryd, C., Dahlqvist R. Incorrect use and limited weight reduction of orlistat (Xenical) in clinical practice. *Eur J Clin Pharmacol.* 57(4), pp. 309-311(2001).
3. Birari, R. B., Bhutani, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today.* 12(19-20), pp. 879-889(2007).
4. Carey, M. C., Small, D. M., Bliss C. M. Lipid digestion and absorption. *Annual Review of Physiology*, 45, pp. 651-677(1983).
5. Chai, H. Y., Sin, J. S., Kwon, W., Choi, E. K., Cho, Y. M., Zhang, H. S. Hwang, S. Y., Bok, S. H., Kim, Y. B., Kang, J. K. Effect of BNs-3 and BNs-7, extracts of citrous orange peel, on the obesity induced by ad libitum feeding a cholesterol-containing diet in rats. *J. Toxicol. Pub. Health.* 19(3), pp. 189-195(2003).
6. Cha, S. Y., Jang, J. Y., Lee, Y. H., Lee, G. O., Lee, H. J., Hwang, K. T., Kim, Y. J., Jun, W. J., Lee, J. M. Lipolytic effect of methanol extracts from *Luffa cylindrica* in mature 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 39(6), pp. 813-819(2010).
7. Choi, H. S., Kim, S. S., Kim, J. G., Kim, W. J. Effect of temperature on some quality characteristics of aqueous extracts of sea mustard.

Korean J Food Sci Technol. 24(4), pp. 382-386(1992).

8. Darlington, G. J., Ross, S. E., MacDougald, O. A. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 273(46), pp. 30057-30060(1998).
9. Diego, A. Moreno, Nebojsa Ilic, Alexander Poulev, Dawn, L. Brasaemle, Susan, K. Fried, Ilya Raskin. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition.* 19(10), pp. 876-879(2003).
10. Di, Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys.* 274(2), pp. 532-538(1989).
11. Frayn, K. N., Karpe, F., Fielding, B. A., Macdonald, I. A., Coppack, S. W. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27(8), pp. 875-888(2003).
12. Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst.* 91(4), pp. 317-331(1999).
13. Haugan, J. A., Aakermann, T., Liaaen-Jensen, S. Isolation of fucoxanthin and peridinin. *Methods in Enzymology.* 213, pp. 231-245(1992).
14. Hu, X., White, K. M., Jacobsen, N. E., Mangelsdorf, D. J., Canfield, L. M. Inhibition of growth and cholesterol synthesis in breast cancer cells by oxidation products of β -carotene. *J Nutr Biochem.* 9(10), pp. 567-574(1988).

15. Kang, JooYeon. The lipolytic effects of fucoxanthin extract from *Undaria pinnatifida* in 3T3-L1 cell and clinical efficacy test of anti-obesity with topical treatment. Graduate school, Kyungpook National University(2010).
16. Kao, Y. H., Hiipakka, R. A. Liao, S. Modulation of obesity by a green tea catechin. *Am J Clin Nutr.* 72(5), pp. 1232-1234(2000).
17. Kehrer, J. P. Free radicals as mediations of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23(1), pp. 21-48(1993).
18. Kim, D. K., Park, H. W. Relationship between resting metabolic rate and VO2 max in obese women. *J Kor Sports Med.* 23(2), pp. 131-136(2005).
19. Kim, S. J., Kim, H. J., Moon, J. S., Kim, J. M., Kang, S. G., Jung, S. T. Characteristic and extraction of fucoxanthin pigment in *Undaria pinnatifida*. *J Koeran Soc Food Sci Nutr.* 33(5), pp. 847-851(2004).
20. Kim, W. J., Choi, H. S. Development of combined methods for effective extraction of sea mustard. *Korean J Food Sci Technol.* 26(1), pp. 44-50(1994).
21. Kopelman, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature.* 404(6778), pp. 635-643(2000).
22. Korean Ministry of Health and Welfare. The Third Korea National Health and Nutrition Examination Survey(2005).
23. Kotake-Nara, E., Asai, A., Nagao, A. Neoxanthin and fucoxanthin

- induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Letters*. 220(1), pp. 75-84(2005).
24. Kridel, S. J., Axelrod F., Rozenkrantz, N., Smith, J. W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer res.* 64(6), pp. 2070-2075(2004).
 25. Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., Miyashita, K. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria Pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 332(2), pp. 392-397(2005).
 26. Michael, L., Shuler, Fikret Kargi. second edition. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River. NJ. Bioprocess Engineering(2002).
 27. Morrison, R. F., Farmer, S. R. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr.* 130(12), pp. 3116-3121(2000).
 28. Must, A., Spandano, J., Coakley, E. H., Field, A. E., Colditz, G., Dietz, W. H. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* 282(16), pp. 1523-1529(1999).
 29. Padwal, R., Li, S. K., Lau, D. C. W. Long-term pharmacotherapy for obesity and overweight. *Cochrane Database Syst Rev.* (3), CD004094(2004)
 30. Park, H. S. Pathophysiology of obesity and energy control for obesity treatment. *J Korean Acad Fam Med.* 22(8), pp. 1287-1296(2001).
 31. Rao, A. V., Agarwal, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in

- the prevention of chronic disease: A review. *Nutr Res.* 19(2), pp. 305-323(1999).
32. Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., Spiegelman, B. M. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev.* 16(1), pp. 22-26(2002).
 33. Rosen, E. D., MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(12), pp. 885-896(2006).
 34. Speakman, J. R., Selman, C. Physical activity and resting metabolic rate. *Proc Nutr Soc.* 62(3), pp. 621-634(2003).
 35. Spiegelman, B. M., Flier, J. S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell.* 87(3), pp. 377-389(1996).
 36. Visscher, T. L., Seidell J. C. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health.* 22, pp. 355-375(2001).
 37. Wang, S., Soni, K. G., Semache, M., Caxavant, S., Fortier, M., Pan, L., Mitchell, G. A. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol Genet Metab.* 95(3), pp. 117-126(2008).
 38. Yoshio Kozai. Obesity and Related Diseases. Koonja Publishing Inc. pp. 613-712(2004).
 39. 신종화, 김의용, 조대행, 한승욱. A study on the extraction and properties of pancreatic lipase inhibitor form *Cassia tora Linne.* *Theories and Applications of Chem. Eng.* 13(2) (2007).

Inhibitory Effects of Natural Plant Extracts on Porcine Pancreatic Lipase Activity

Min-Ji, Kim

Department of Life Science and Biotechnology,
Graduate School, Dong-eui University

Abstract

Obesity is classified as a disease that requires treatment, because it may be the cause of various adult disease such as diabetes, hypertension, heart disease, cancer and joint diseases, as well as the direct cause of death. The worldwide prevalence of obesity has been increasing explosively, its severity has been heightened. Currently the most of used in antiobesity drug is synthetic drug, it has a lot of side effects such as fatty stool, vomit, gastroenteric trouble. So research of antiobesity drug derived from natural product, that has relatively few side effect, is needed.

In this study, for the development of obesity drug derived from natural products, a substance having lipase inhibitor activity was screened from a variety of natural product, among them 10 species of candidates is selected, and lipase inhibitor activity and kinetics of selected candidates have been examined. Selected 10 candidates were all high lipase inhibitory activity, and showed a mixed inhibition type. Fucoxanthin, is competitive inhibition type, was selected finally. And its optimal extraction condition and other antiobesity activity was investigated. Fucoxanthin inhibits accumulation of triglyceride approximately 40% during 3T3-L1 pre adipocyte differentiation at 62.5 mg/ml. To ensure these effects maintained

in vivo, fucoxanthin administered orally to C57BL/6J mouse. As a result, weight loss and abdominal fat reduction in C57BL/6J mouse administered fucoxanthin was showed.

Therefore fucoxanthin will be considered for the prevention of obesity drug and may be useful as a functional food material. And antiobesity drugs and functional foods without side effect are considered to be development through research in other candidates and mixture of several candidates.

감사의 글

고3! 대학교를 선정할 때에는 ‘내가 좋아하는 부분을 더 배워 사회에 나가게 되면 남에게 도움이 되는 일을 하고 싶다.’ 라는 막연한 생각으로 무작정 대학교 홈페이지에 들어가서 이것저것을 보기 시작하였습니다. 그러나 그 전까지 대학교에 대한 아무런 정보를 가지고 있지 않은 상태이고, ‘이 과야! 여기 가고 싶어!’ 라고 할 만 한 과도 보이지 않아서 너무 쉽게 생각했다고 후회하던 중 동의대학교 홈페이지를 보고 있다 권현주 교수님 것을 보고는 ‘무조건 여기야!’ 하며 무작정 넣었습니다. 그 후 실험실에서 학부생을 받아주는 것을 알게 2학년 때 들어가게 된 실험실에서 하나하나 기초를 배우며 여러 실험을 하다 보니 점점 흥미가 생겼고, 앞으로 이 길을 나아가고 싶었습니다. 학부를 졸업하고 직장생활을 하면서 계속 이 길로 나가기 위해서는 좀 더 공부를 해야 되겠다는 생각을 하게 되었고, 그렇게 시작되어진 식사 생활, 힘든 적도 많았지만, 늘 옆에서 격려해주시고 여러분들의 도움으로 마무리하게 되었습니다.

많은 가르침을 주시고, 저를 이끌어 주신 김병우 교수님과 권현주 교수님 정말 감사합니다.

결에서 지켜봐주신 김광현 교수님, 김영희 교수님, 이은우 교수님, 이현태 교수님 그리고 추출할 때 도움을 주신 현숙경 교수님 감사합니다.

지난 세월 함께 실험 생활을 해온 계놈제어학실험실, 유전공학실험실 식구들 고맙습니다.

실험실 식구 중에서 가장 오랫동안 함께 있었어기에 많은 짜증을 부렸지만 다 받아주신 현영 오빠, 실험실의 정신적 지주이시며 저에게 모범이 되시는 희정 언니 정말 감사합니다. 미영, 승근, 태희, 만두(민지) 그리고 영주, 은정, 경민, 선미 고마워~

먼저 졸업하였지만 언제나 걱정해주고 격려해주고 바쁠 텐데도 내 애기를 들어준 혜지 정말 고마워~

그리고 15년 지기 친구 지영이. 너도 힘들 텐데 나의 모든 짜증을 받아주고

격려해주며 지켜봐줘서 정말 고맙다. 지금까지처럼 언제나 함께 지내자.
제가 하고 싶은 것을 할 수 있도록 곁에서 묵묵히 지켜봐주시고 격려해주신
할아버지, 할머니, 부모님 감사합니다.

말하는 것 보다 글로 쓰는 것이 부족하여 제대로 감사의 인사가 전달되지 못
하겠지만, 지금까지 저를 지켜봐주신 여러분들에게 감사드리며, 앞으로도
초심을 잊지 않고 열심히 하겠습니다. 정말 감사합니다.