

한국식품영양학회지

THE KOREAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION

Vol. 37, No. 5, October 2024



한국식품영양학회

THE KOREAN SOCIETY OF FOOD AND NUTRITION

<http://ksfn.kr>

한국 식품 영양 학회지

The Korean Journal of Food and Nutrition

2024년도 학회 임원명단

고문	민경찬(전 신한대학교) 김현오(전 장안대학교) 조미자(전 동남보건대학교) 김재근(전 계명문화대학교) 최부돌(전 신구대학교)	이성동(전 고려대학교) 김광호(전 창원문성대학교) 안창순(전 안산대학교) 안용근(전 충청대학교) 이영순(전 계명문화대학교)	오승희(전 포항대학교) 서정숙(전 을지대학교) 소명환(전 부천대학교) 조득문(전 동부산대학교) 이애량(전 숭의여자대학교)
명예회장	윤옥현(김천대학교) 장재선(가천대학교) 이성호(계명문화대학교)	최병범(신한대학교) 이광수(장안대학교) 이수정(부천대학교)	장상문(대구보건대학교) 최향숙(경인여자대학교)
회장	김미옥(대구보건대학교)		
차기회장	류혜숙(상지대학교)		
총괄부회장	노재필(신구대학교)		
부회장	김옥선(장안대학교) 김중희(서일대학교)	서영호(원광보건대학교) 권종숙(신구대학교)	강시연(산해들) 홍승희(신한대학교)
감사	이종경(한양여자대학교)	황보미향(계명문화대학교)	
총무이사	최은영(부천대학교)		
학술이사	정혜연(숭의여자대학교)	김미자(강원대학교)	최현숙(충청대학교)
편집이사	이호진(한국교통대학교) 이연리(대전보건대학교)	백진경(을지대학교)	권수연(신구대학교)
재무이사	박미혜(김천시어린이급식관리지원센터)		
사업이사	정민재(신구대학교)		
홍보이사	최승균(숭의여자대학교)		
지부장	서울·강원지부 최남순(배화여자대학교) 대전·충청지부 김현주(대전보건대학교) 부산·경남지부 최수경(울산과학기술대학교)	경기·제주지부 강민정(연성대학교) 대구·경북지부 방현경(대구보건대학교) 광주·호남지부 송희순(광주보건대학교)	

편집위원회

편집위원장	이연리(대전보건대학교)		
편집위원	이호진(한국교통대학교) 심기현(숙명여자대학교) 김훈(중앙대학교) 김영모(목포과학대학교) 김미숙(단국대학교) 한규호(Obihiro Univ.)	백진경(을지대학교) 문민선(㈜이룸) 김기대(경남대학교) 용해인(충남대학교) 이세호(㈜중앙타프라)	이연리(대전보건대학교) 강민정(연성대학교) 한규상(호남대학교) 조미영(배재대학교) 김현정(제주대학교)

윤리위원회

윤리위원장	김미옥(대구보건대학교)		
윤리위원	이호진(한국교통대학교) 김옥선(장안대학교) 김영모(목포과학대학교)	배윤정(한국교통대학교) 문민선(㈜이룸)	심기현(숙명여자대학교)

Editor: Hojin Lee Ph. D.
61 Daehak-ro, Jeungpyeong-gun, Chungbuk, 27909, Republic of Korea
Tel: +82-43-820-5338 Fax: +82-43-820-5850, E-mail: hojin@ut.ac.kr

학회지 구독이나 회원관리 및 회비관련 문의: 010-8290-8980, E-mail: ksfan88@hanmail.net
논문투고관련 문의: 010-4907-3711, E-mail: foodnutr1@naver.com
주소: 대구광역시 북구 영송로 15 대구보건대학교 식품영양학과 내((우)41453)
전화: 053-320-1366, 팩스: 053-320-1440

Copyright ©2024 by The Korean Society of Food and Nutrition
This work was supported by the Korean Federation of Science and Technology Societies(KOFST) grant funded by the Korean government.

본 사업은 기획재정부의 복권기금 및 과학기술정보통신부의 과학기술진흥기금으로 추진되어 사회적 가치 실현과 국가 과학기술 발전에 기여합니다.

한국식품영양학회지

제 37권 5호 2024년 10월

목 차

<연구논문>

- 227 유색미로 제조한 발효주의 품질 특성 강태수
- 236 C2C12 세포에서 토끼고기 추출물의 근육분화 및 에너지 조절 효과
..... 배인선 · 이정아 · 박원서 · 유자연 · 함준상 · 서강민 · 김기현
- 244 유채 품종 및 생육단계별 식물체의 항산화 성분 및 항산화 특성
..... 유경단 · 황엄지 · 박유진 · 정재희 · 안다희 · 김현주 · 송연상 · 우관식
- 255 흑후추에서 분리한 글루칸형 다당류가 대식세포 자극 활성화에 미치는 영향
..... 김다운 · 신현영 · 정원비 · 김효원 · 문수민 · 신광순 · 유광원
- 266 소금 용액 농도 및 침지 시간에 따른 Textured Vegetable Protein의 품질특성 변화
..... 이경행 · 이재준 · 윤아름 · 이에진 · 장희연 · 김주옥 · 이지연
- 273 방기 뿌리 (*Sinomenium acutum* rhizome) 추출물 및 그 알칼로이드 성분의 항근위축 효과 김경 · 오윤신
- 282 황기 조다당 획분 유래 효소 가수분해물의 면역 자극 활성화 정원비 · 신현영 · 김효원 · 김다운 · 신지영 · 신광순 · 유광원
- 292 충북 지역 대학생의 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 식이 자기효능감 및 영양지수
..... 송유진 · 윤예은 · 강지원 · 조민주 · 배윤정
- 303 한라봉 과피 유래 다당의 면역활성 및 항전이 효과 신광순 · 박혜령
-
- 311 ■ 학회소식
- 313 ■ 저자 체크표
- 314 ■ 저작권 이전 동의서
- 315 ■ 연구윤리서약서
- 316 ■ 한국식품영양학회 회칙
- 322 ■ 한국식품영양학회 연구윤리 규정
- 333 ■ 한국식품영양학회 논문 투고 규정

THE KOREAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION

Vol. 37, No. 5, October 2024

CONTENTS

<Original Articles>

- 227 Quality Characteristics on Traditional Wines Made from Pigmented Rice
..... Tae Su Kang
- 236 Effects of Rabbit Meat Extract on Myogenic Differentiation and Energy Regulation in C2C12 Cells
..... In-Seon Bae, Jeong Ah Lee, Won-Seo Park, Jayeon Yoo, Jun-Sang Ham, Kangmin Seo and Ki Hyun Kim
- 244 Antioxidant Compounds and Antioxidant Activities of Rapeseed Plants according to Cultivar and Growth Stage
..... Gyeong-dan Yu, Eom-ji Hwang, You-jin Park, Jae Hee Jeong, Da Hee An,
Hyun-Joo Kim, Yeon-Sang Song and Koan Sik Woo
- 255 Effects of Glucan-type Polysaccharides from Black Pepper (*Piper nigrum*) on Macrophage Stimulating Activity
..... Da Eun Kim, Hyun Young Shin, Won Bi Jeong, Hyo Won Kim,
Su Min Moon, Kwang-Soon Shin and Kwang-Won Yu
- 266 Changes in Quality Characteristics of Textured Vegetable Protein according to Salt Solution Concentration and Soaking Time
..... Kyung-Haeng Lee, Jae-Jun Lee, Ah-Rum Yoon, Ye-Jin Lee, Hye-Yeon Jang, Ju-Ok Kim and Ji-Yeon Lee
- 273 Protective Effects of *Sinomenium acutum* Rhizome and Its Alkaloids against Dexamethasone-induced Atrophy in C2C12 Myoblasts
..... Kyong Kim and Yoon Sin Oh
- 282 Immunostimulatory Activity of Enzymatic Hydrolysates Derived from Crude Polysaccharides of *Astragalus membranaceus*
..... Won Bi Jeong, Hyun Young Shin, Hyo Won Kim, Da Eun Kim,
Ji-Young Shin, Kwang-Soon Shin and Kwang-Won Yu
- 292 A Study on Dietary Self-efficacy and Nutrition Quotient according to Usage of Food-related Content among University Students in Chungbuk Region
..... Yujin Song, Ye-Eun Yoon, Ji-Won Kang, Min Ju Jo and Yun-Jung Bae
- 303 Immuno-activating and Anti-metastatic Effects of Polysaccharides Isolated from Hallabong Peels
..... Kwang-Soon Shin and Hye-Ryung Park
-
- 311 ■ News of the Korean Society of Food and Nutrition
- 313 ■ Checklist for Original Article
- 314 ■ Copyright Transfer and Statement of Originality Korean Journal of Food and Nutrition
- 315 ■ Declaration of Ethical Conduct in Research
- 316 ■ The Rules of the Korean Society of Food and Nutrition
- 322 ■ Research Ethics Rules of the Korean Society of Food and Nutrition
- 333 ■ Guidelines for Submitting Manuscripts

유색미로 제조한 발효주의 품질 특성

†강 태 수

충북도립대학교 조리제빵과 교수

Quality Characteristics on Traditional Wines Made from Pigmented Rice

†Tae Su Kang

Professor, Dept. of Culinary and Baking, Chungbuk Provincial University, Okcheon 29046, Korea

Abstract

This study compared quality characteristics of traditional wine made with white rice of Samkwang and pigmented rice of heuginmi, joeunheugmi, and heuginju cultivars. After 10 days fermentation period, the pH was in the range of 4.52~4.71. It was higher in pigmented rice than in white rice. Total acidity was 0.50~0.74%. It was also higher in pigmented rice than in white rice. Regarding sugar content, white rice samkwang had the highest sugar content at 17.40 °Brix and pigmented rice had sugar contents in the range of 13.17~14.93 °Brix. Regarding reducing sugar, white rice samkwang had the highest content while heuginmi pigmented rice had the lowest content. Alcohol concentrations of traditional wine were in the range of 15.0~15.6%. White rice samkwang and pigmented rice heuginju cultivars had the highest alcohol concentrations. Traditional wine made from white rice and samkwang had the highest lightness value at 53.40. For wine made from pigmented rice cultivars, lightness values ranged from 31.91 to 38.33. Pigment wine made from Heuginmi had the highest redness value at 8.08 and the highest yellowness value at 6.39. Major aroma components produced in large amounts of fermented liquor were ethyl acetate, isobutyl alcohol, 2,6-dimethyl-4-heptanone, and isoamyl alcohol.

Key words: pigmented rice, white rice, quality characteristic, traditional wine, aroma compound

서 론

우리나라 전통주는 주로 쌀과 밀 등 전분질을 원료로 하고 누룩을 첨가하여 일정기간 동안 발효시켜 제조되는데, 그중에서도 대표 전통주인 막걸리는 많은 양의 단백질과 당질을 함유하고 있으며 비타민 B군과 lysine 및 leucine 등 필수아미노산과 유기산도 함유하고 있어 맛은 물론 영양학적으로도 우수한 주류이다(Jeong 등 2006; Woo 등 2010).

술은 제조방법에 따라 발효주, 증류주, 혼성주로 구분하며 발효주는 다시 단발효주와 복발효주로 나누고 단발효주는 포도주와 같이 원료 내 함유된 당류를 발효시켜 제조되며 복발효주는 전분질 원료가 당화와 발효가 동시에 일어나는 병행복발효주와 당화후 발효가 되는 단행복발효주가 있다(Lee

등 2010). 우리나라 전통주는 대부분 병행복발효주로서 발효가 끝난 술덧을 그대로 또는 여과, 제성하여 음용하는데, 알코올에서 유래되는 쓴맛과 유기산의 신맛, 아미노산의 구수한 맛, 산과 알코올의 esterification 산물인 향기성분과 당류 등이 잘 조화를 이루어 독특한 풍미를 가지게 된다(Ju 등 2009). 전통 발효주의 품질에 영향을 미치는 중요한 요소에는 전분질 원료, 누룩, 용수, 용기 등이 있는데 그중에서 누룩은 발효주의 품질에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 전분질 원료로는 햅쌀과 찰쌀이 가장 많이 사용되고 있다(Han 등 1997a).

유색미는 독특한 향과 색이 있으며 백미에 비해 단백질과 비타민, 미네랄 함량이 높고 영양도 풍부하여 이용 가치도 높으며 품종에 따라 과피가 흑자색, 적갈색, 녹색 등을 나타

† Corresponding author: Tae Su Kang, Professor, Dept. of Culinary and Baking, Chungbuk Provincial University, Okcheon 29046, Korea. Tel: +82-43-730-6352, Fax: +82-43-730-6359, E-mail: tskang@cpu.ac.kr

내는데 흑자색 유색미는 안토시아닌계 색소가 풍부하고, 적색 유색미는 탄닌계 색소 및 catechin 등 다양한 성분이 함유되어 있다(Yoon 등 1997; Kim 등 1999; Park 등 2016; Cho & Jeong 2023). 또 향기성분의 경우 유색미 품종에 따라 다른데 흑미에는 alcohol류, aldehyde류, ketone류 및 terpenoid류 등이 함유되어 있으며 대표적인 성분은 guaiacol, indole과 p-xylene이 알려져 있다(Choi 등 2019). 한편, 유색미를 이용한 전통주와 관련된 연구로는 흑미 첨가 막걸리의 향산화 및 발효 특성(Kim 등 2012a), 흑미를 이용한 무증자 유색주의 제조와 품질(Kim 등 2000) 및 무증자 발아 흑미를 이용한 막걸리 제조 시 온도가 미치는 영향(Kim 등 2012b) 등이 있는데, 이들의 연구는 대부분 유색미를 백미에 일정량 첨가하여 수행한 것으로 유색미만을 이용한 발효주 제조에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 독특한 향과 색을 가진 유색미를 이용한 발효주의 제조방법을 확립하고 품질특성을 살펴보기 위하여 몇 가지 유색미 품종으로 발효주를 제조하고 발효기간에 따른 발효주의 품질 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 유색미 품종은 2019년에 생산된 흑진미(Miryang, Korea), 조은흑미(Cheorwon, Korea) 및 흑진주(Cheorwon, Korea)를 사용하였으며, 대조구로는 백미인 삼광(Gyeongju, Korea)을 농촌진흥청 국립식량과학원에서 제공받아 사용하였다. 누룩은 증자용 개량누룩(Korea Fermentation Co., Hwaseong, Korea)으로 역가가 1,800 sp/g 이상인 것을 구입하였고, 효모는 송천효모(송천효모개발연구소, Cheongyang, Korea)로 효모수가 10^8 cells/g 이상인 것을 사용하였으며 담금 용수는 정수기 물을 사용하였다.

2. 담금 및 발효

유색미 발효주는 Ha 등(2012), Ryu 등(2021)의 원료와 발효제를 혼합하여 한번에 담금하여 완성하는 단양주로 제조하였으며 배합비는 쌀(백미와 유색미) 1,000 g, 누룩 2.5 g, 효모 8 g, 물 1,500 mL로 하여 총 2,533 g의 용량으로 다음과 같이 담금을 진행하였다. 유색미와 백미를 맑은 물이 나올 때까지 5회 이상 충분히 씻어준 뒤 색소의 용출을 최소화하기 위하여 소량의 물을 가하고 12시간 정도 침지시킨 후 roll mill(DK104, Sejungtech Co., Daegu, Korea)로 1회 조분쇄하였다. 분쇄한 쌀은 스팀기(GA Steam Machine, Yuryeon Co., Paju, Korea)로 1시간 증자하여 고두밥을 제조한 뒤 실온에서 충분히 식혀주었다. 누룩 및 효모는 담금 전에 미온수를 이용하

여 미리 활성화시켜 준 다음 식힌 고두밥과 잘 혼합하여 미리 소독한 유리술병에 넣고 25°C에서 10일간 발효를 진행하였으며, 2일 간격으로 시료를 채취하여 원심분리한 다음, 상등액을 취하여 여과한 후 발효주의 품질 특성을 분석하였다.

3. 발효특성 분석

1) pH 및 총산도

발효기간에 따른 발효주의 pH와 총산도는 Woo 등(2010)의 방법에 따라 pH는 pH meter(Orion 4 star, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 총산 함량은 시료 1 mL에 증류수 29 mL를 가하고, 1% 페놀프탈레인 지시약 1~3방울을 넣어 혼합한 후, 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 적자색을 나타내는 시점을 종말점으로 적정량에 상당하는 acetic acid(%)의 함량으로 나타내었다.

2) 당도, 환원당 및 총당

발효기간에 따른 발효주의 당도는 당도계(PAL-1, Atago, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며 °Brix로 나타내었다. 환원당은 시료를 적정 비율로 희석한 뒤 DNS법(Miller GL 1959)으로 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL에 DNS 시약 0.4 mL를 가한 뒤 100°C의 끓는 물속에서 5분간 가열하고, 급냉시킨 다음 증류수 1.8 mL를 첨가한 뒤 spectrophotometer(Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments Inc., Vermont, USA)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 D(+)-glucose를 농도별로 조제한 뒤 DNS법으로 실험한 후 검량선을 작성하여 환산하였다. 한편, 총당 함량은 페놀황산법(Kim 등 2007)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 시료를 적정 비율로 희석한 뒤 희석액 1 mL에 5%의 페놀 용액 0.5 mL 첨가한 후 교반하고 95% 황산 2.5 mL를 가하여 30분간 상온에서 방치한 다음 spectrophotometer(Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments Inc., Vermont, USA)를 사용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로 D(+)-glucose를 농도별로 조제한 다음 검량선을 작성하여 환산하였다.

3) 알코올 농도

발효기간에 따른 발효주의 알코올 농도는 국제청 주류분석규정 주류분석방법(NTS 2009)에 따라 증류법으로 측정하였는데 시료 100 mL와 증류수 100 mL를 500 mL 플라스크에 넣고 증류장치를 이용하여 증류액 70 mL를 받은 후 증류수로 최종 용량을 100 mL로 조정한 다음 주정계로 알코올 농도를 측정하였으며, 최종 알코올 농도는 주정 환산표로 보정하였다.

4) 색도

발효기간에 따른 발효주의 색도는 Kim 등(2007)의 방법에 따라 색차계(CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 사용하여 기기의 영점을 먼저 표준 색판(L=96.28, a= - 5.06, b=+7.14)으로 보정한 다음 시료의 L(lightness), a(redness), b(yellowness) 값을 각각 3회 반복하여 측정 후 평균값으로 환산하였다.

5) 향기성분 분석

발효기간에 따른 발효주의 주요 향기성분은 Park 등(2020)의 방법을 변형하여 분석하였다. 즉, 시료 10 mL에 내부표준 물질 4-methyl-2-pentanol을 첨가하였으며, 향기성분은 direct headspace 방법을 이용하여 GC/MS(Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다. Column은 HP-FFAP(30 m×0.25 mm×0.2 μm, Agilent Technologies)를 사용하였으며, carrier gas는 헬륨을 이용하였고 향기성분의 동정은 GC/MS를 이용하여 얻은 mass spectrum을 NIST data base로 검색하여 일정농도 범위 이상의 성분을 대상으로 동정하였으며, 정량은 내부표준물질의 면적비를 기준으로 환산하였다.

6) 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하고 일원배치 분산 분석(one way ANOVA-test) 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 발효기간에 따른 품종 간 및 요인들 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. pH 및 총산도

발효 10일 동안의 유색미 발효주의 pH와 총산도 변화는 Table 1과 같다. 발효주의 pH는 발효의 진행상황과 알코올 생성정도를 짐작할 수 있는 중요한 지표로 백미와 유색미 발효주의 0일차 pH는 5.10~5.65 범위를 나타내었다. 발효 2일 차에는 유색미와 백미 모두에서 감소하다가 발효 4일차에는 다소 증가하였으며 그 이후부터 발효종료일인 10일까지는 pH가 완만하게 유지되는 경향을 보였는데 전 발효기간을 통하여 백미보다 유색미에서 pH가 높았고 백미와는 유의적인 차이가 있었다. 이와 같은 결과는 Kim 등(2000)의 흑미를 이용한 무증자 유색주의 제조와 품질에 관한 연구에서 흑미의 첨가비율이 높아짐에 따라 pH가 높아지는 경향이 있었다는 보고와는 유사하였으나 Kim 등(2012a)의 흑미 첨가 막걸리의 항산화 및 발효 특성 연구에서 흑미를 첨가하지 않은 대조구의 pH가 가장 높았고 흑미 첨가량이 많을수록 pH가 낮아지는 경향이었던 보고와는 상반된 결과를 보여 이는 유색미의 품종, 발효제, 배합비 및 발효조건 등에 따라 차이가 나타나는 것으로 판단되었다. 일반적으로 막걸리 제조시 발효 초기의 pH는 재료와 발효작용으로 생성된 유기산 등으로 인해 발효 초기 pH가 낮아지다가 발효 후기에 pH가 완만하게 증가하는 결과(Lee 등 2010, Han 등 1997a)를 나타내는데, Lee HS(2012)의 흥국쌀 첨가량과 누룩의 종류를 달리한 흥국 막걸리 제조 연구에서도 초기 pH 5.05~5.35에서 시작하여 발효 5일까지 감소하였으며 그 후 발효 종료까지 소폭 증가하였다고 보고하여, 본 결과와 비교적 잘 일치하였다.

총산도는 막걸리의 풍미와 보존성에 영향을 주는 지표 중

Table 1. Changes in pH and total acidity during fermentation periods of white and pigmented rice wine

	Cultivar	Fermentation periods (days)					
		0	2	4	6	8	10
pH	<i>Samkwang</i>	5.10±0.02 ^{Ad1)2)}	4.19±0.00 ^{Ed}	4.39±0.02 ^{Dc}	4.49±0.01 ^{Cc}	4.51±0.00 ^{Bb}	4.52±0.00 ^{Bb}
	<i>Heuginmi</i>	5.48±0.01 ^{Ab}	4.66±0.00 ^{Ec}	4.73±0.00 ^{Bb}	4.72±0.01 ^{Ca}	4.71±0.00 ^{Da}	4.71±0.00 ^{Da}
	<i>Joehneugmi</i>	5.42±0.00 ^{Ac}	4.67±0.00 ^{Db}	4.72±0.01 ^{Ba}	4.72±0.01 ^{Ba}	4.70±0.00 ^{Ca}	4.70±0.00 ^{Ca}
	<i>Heuginju</i>	5.65±0.00 ^{Aa}	4.69±0.01 ^{Ca}	4.71±0.01 ^{Ba}	4.70±0.01 ^{Bb}	4.71±0.00 ^{Ba}	4.71±0.00 ^{Ba}
Total acidity (acetic acid %)	<i>Samkwang</i>	0.06±0.00 ^{Da}	0.39±0.03 ^{Cb}	0.41±0.06 ^{BCb}	0.47±0.00 ^{ABb}	0.49±0.03 ^{Ab}	0.50±0.03 ^{Ab}
	<i>Heuginmi</i>	0.10±0.03 ^{Da}	0.49±0.03 ^{Ca}	0.54±0.03 ^{BCa}	0.58±0.06 ^{Ba}	0.58±0.06 ^{Ba}	0.72±0.03 ^{Aa}
	<i>Joehneugmi</i>	0.08±0.03 ^{Fa}	0.45±0.03 ^{Ea}	0.50±0.03 ^{Da}	0.56±0.03 ^{Ca}	0.64±0.00 ^{Ba}	0.72±0.03 ^{Aa}
	<i>Heuginju</i>	0.10±0.03 ^{Ea}	0.47±0.00 ^{Da}	0.56±0.03 ^{Ca}	0.58±0.00 ^{BCa}	0.62±0.03 ^{Ba}	0.74±0.03 ^{Aa}

¹⁾ Values are expressed as the mean±S.D. (n=3).

²⁾ Different capital letters (^{A-F}) in the same row indicate a significant difference among fermentation periods and small letters (^{a-d}) in the same column indicate a significant difference among samples by Duncan's range test ($p < 0.05$).

하나로 발효 초기 총산도는 0.06~0.10% 범위를 나타내었고, 발효 2일차에 유색미와 백미 모두 급격히 증가하였으며, 그 이후엔 완만하게 증가하였는데, 특히 유색미는 발효 8일차에 비해 10일차에 총산도가 백미보다 크게 증가하는 경향을 보였다. 이는 Han 등(1997a)의 누룩 종류에 따른 막걸리 제조에서 총산 함량은 담금 직후 주로 원료중의 유기산이 총산 함량에 주로 관여하나 발효가 진행되면서 젖산이나 효모에 의한 유기산 생성으로 총산의 양이 다소 증가하게 된다고 보고하였는데, 본 실험에서는 발효 2일차에 총산이 급격히 증가하여 초기 발효 속도가 빠른 것으로 생각되었으며 그 후에는 생성된 유기산이 향미 성분에 관여하여 완만한 증가세를 보인 것으로 판단된다. 특히 발효 10일차에 유색미의 총산도가 0.72~0.74%로 백미(0.50%)에 비해 증가하였는데 이는 Kim 등(2012a)의 흑미 첨가 막걸리의 항산화 및 발효특성 연구에서 발효 10일차에 흑미를 첨가한 실험군이 대조군에 비해 citric acid, malic acid, succinic acid 및 lactic acid 모두 증가하였다는 결과와 본 연구 결과와는 대체로 잘 일치하였다.

2. 당도, 환원당 및 총당

유색미 발효주의 발효기간별 당도, 환원당 및 총당의 변화는 Table 2와 같다. 먼저 당도는 발효 초기에 삼광이 12.63 °Brix로 가장 높았으며 유색미는 6.70~8.73 °Brix이었다. 2일차에 4종의 발효주 모두에서 당도가 크게 증가한 후 큰 변화 없이 일정한 값을 유지하였는데 발효 종료일인 10일차에도

삼광이 17.40 °Brix로 가장 높은 값을 보였으며 유색미 3종은 13.17~14.93 °Brix 범위이었다. 이와 같이 백미의 당도가 유색미보다 높은 것은 유색미는 현미상태로 도정되어 전분질 성분이 상대적으로 적기 때문인 것으로 알려져 있는데, Ha 등(1999)은 유색미 품종별 호화 특성의 연구에서 일반 메벼품종의 아밀로오스 함량은 16~29% 범위인데 반해 흑미품종은 14.27~16.84%로 낮은 것으로 보고한 바 있다. 환원당 함량은 삼광이 발효 초기에 105.71 mg/mL로 가장 높았고 유색미 발효주는 50.16~87.24 mg/mL이었으며 발효 2일차부터 감소하여 발효 종료일인 10일차에는 삼광이 80.51 mg/mL로 가장 높은 반면, 유색미는 18.88~43.16mg/mL이었다. Kim 등(2000)은 흑미를 이용한 유색주 제조 연구로부터 술덧의 숙성 중 당의 감소는 효모수 및 알코올의 생성과 밀접한 관계를 가지며 특히 복발효 과정 중에는 당의 생성과 알코올로의 전환이 복합적으로 이루어지기 때문에 당의 감소와 비례하여 알코올 농도가 증가하는 것으로 평가할 수는 없으나 흑미의 첨가비율이 높아짐에 따라 당의 감소율이 높다고 보고하여 본 연구 결과와도 비교적 잘 일치하였다. 일반적으로 막걸리는 초기에 곰팡이류에 의한 전분의 분해로 환원당이 증가하며 이와 동시에 효모가 당을 이용하여 알코올로 전환하는 것으로 알려져 있다(Ha 등 2012).

총당은 쌀 품종에 따라 서로 다른 경향을 보였는데 흑진미는 발효 초기 총당이 222.13 mg/mL로 조은흑미(89.99 mg/mL)와 흑진주(60.23 mg/mL)에 비해 크게 높았으나 백미인 삼광

Table 2. Changes in °Brix, reducing sugar and total sugar during fermentation periods of white and pigmented rice wine

Cultivar	Fermentation periods (days)						
	0	2	4	6	8	10	
°Brix	<i>Samkwang</i>	12.63±0.06 ^{Da1)2)}	17.13±0.06 ^{Aa}	17.00±0.00 ^{Ca}	17.17±0.06 ^{Ba}	17.30±0.00 ^{Ea}	17.40±0.00 ^{Ea}
	<i>Heuginmi</i>	8.73±0.06 ^{Db}	13.70±0.17 ^{Ad}	13.37±0.06 ^{Bc}	13.13±0.06 ^{Cd}	13.17±0.06 ^{Cd}	13.17±0.06 ^{Cd}
	<i>Jo Eunheugmi</i>	7.67±0.06 ^{Ec}	14.67±0.06 ^{Db}	15.00±0.00 ^{ABd}	15.07±0.06 ^{Ab}	14.87±0.06 ^{Cb}	14.93±0.06 ^{BCb}
	<i>Heuginju</i>	6.70±0.00 ^{Fd}	14.33±0.06 ^{Cc}	14.57±0.06 ^{Ab}	14.47±0.06 ^{Bc}	14.13±0.06 ^{Ec}	14.23±0.06 ^{Dc}
Reducing sugar (mg/mL)	<i>Samkwang</i>	105.71±0.50 ^{Aa}	93.97±0.30 ^{Ba}	80.71±0.11 ^{Ca}	76.42±0.75 ^{Da}	79.72±0.82 ^{Ca}	80.51±0.41 ^{Ca}
	<i>Heuginmi</i>	87.24±0.50 ^{Ab}	47.45±0.11 ^{Bd}	28.32±0.50 ^{Cd}	20.99±0.11 ^{Dd}	19.41±0.23 ^{Ed}	18.88±0.20 ^{Ed}
	<i>Jo Eunheugmi</i>	68.37±0.40 ^{Ac}	60.39±0.30 ^{Bb}	53.39±0.41 ^{Cb}	47.92±0.50 ^{Db}	42.44±0.20 ^{Fb}	43.16±0.30 ^{Eb}
	<i>Heuginju</i>	50.16±0.34 ^{Bd}	57.28±0.52 ^{Ac}	47.72±0.11 ^{Cc}	41.19±0.30 ^{Dc}	37.62±0.41 ^{Ec}	36.90±0.20 ^{Fc}
Total sugar (mg/mL)	<i>Samkwang</i>	234.85±4.70 ^{Aa}	204.94±2.10 ^{Ea}	165.03±10.41 ^{Da}	86.72±1.08 ^{Ca}	189.79±3.43 ^{Ba}	84.79±0.76 ^{Bb}
	<i>Heuginmi</i>	222.13±4.58 ^{Ab}	67.56±2.02 ^{Cd}	75.21±0.73 ^{Bc}	43.71±0.30 ^{Dd}	32.15±0.77 ^{Ed}	46.11±0.37 ^{Dd}
	<i>Jo Eunheugmi</i>	89.99±1.30 ^{Ac}	86.55±0.72 ^{Bc}	80.43±0.21 ^{Cbc}	68.28±1.61 ^{Db}	80.53±2.16 ^{Cc}	56.54±0.83 ^{Ec}
	<i>Heuginju</i>	60.23±1.41 ^{Ed}	98.16±1.87 ^{Bb}	67.04±1.07 ^{Db}	50.30±1.50 ^{Fc}	86.30±2.72 ^{Cb}	107.50±2.23 ^{Aa}

1) Values are expressed as the mean±S.D. (n=3).

2) Different capital letters (^{A-F}) in the same row indicate a significant difference among fermentation periods and small letters (^{a-d}) in the same column indicate a significant difference among samples by Duncan's range test ($p<0.05$).

의 234.85 mg/mL와는 비슷한 함량을 보였다. 또한 발효가 진행되면서 총당 함량은 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었으나 흑진주의 경우는 8일차부터 10일차까지 총당 함량이 증가하는 특징을 보였다. 이는 발효가 진행되면서 일반적으로 환원당이나 총당이 감소하는 결과와는 차이가 있으나 Kim 등(2007)의 팽화미분 첨가에 따른 탁주의 양조 연구에서 발효 5일에서 6일차에 팽화미분 25%, 50% 75% 첨가군에서 총당이 상승하였다는 결과와 Lee 등(2010)의 효모종류에 따른 탁주의 품질특성 연구에서 *S. coreanus*로 발효시킨 탁주의 총당이 발효 4일차에 비해 발효 6일차에 증가하였다는 보고도 있어 발효기간에 따른 총당의 변화에 관한 확인 규명을 위한 추가 검토의 필요성이 있는 것으로 판단되었다.

따라서 본 유색미 발효주에서의 당류의 함량은 유색미 품종별 성분 함량의 차이와 미생물에 의한 당화 및 알코올 발효 속도, 발효조건 등 복합적인 요인의 영향을 받는 것으로 판단되었다.

3. 알코올 농도

전통 발효주의 에탄올 함량은 술의 품질과 생산수율을 결정하는 중요한 요인중 하나로 백미와 유색미 발효주의 발효기간 및 품종별 알코올 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 발효 2일째에 흑진미가 13.0%로 가장 높았으며 흑진주와 조은흑미는 11.8%이었고 대조구인 삼광은 11.9%를 보여 초기 알코올 발효 속도가 빠른 것으로 나타났다. 흑진미는 발효 4일째에 15.0%이였으며 발효 6일차에 15.7%로 최고값을 보였고 그 이후에는 알코올 농도가 완만하게 유지되는 경향을 보인 반면, 조은흑미와 흑진주는 발효종료 시점인 10일까지도 알코올 농도가 증가하였다. 발효 10일째에 모든 유색미 처리구에서 알코올 농도는 15.0~15.6%를 나타내어 백미인 삼광 15.5%와 큰 차이가 없어 유색미를 활용한 발효주의 생산시 알코올 발효에는 큰 문제가 없는 것으로 판단되었다. 본 연구에서 초기 알코올 함량은 일반적인 탁주 담금에서의

결과 보다 다소 높은 것으로 나타났으나 Kwon 등(2013)의 쌀 품종을 달리한 입국의 제조 및 막걸리의 품질 특성연구에서 발효 3일차에 알코올 함량이 11.5~14.5%이였다는 결과와 Kim 등(2007)의 팽화미분 첨가에 따른 탁주 양조 연구에서 백미 대조군이 발효 2일차에 11.3%이였다는 결과와 비슷한 값을 보여 발효주 제조시 재료의 종류와 배합비, 그리고 발효 조건과 환경에 따라 미생물의 알코올 발효 속도는 차이가 있음을 알 수 있었다.

4. 색도

백미와 유색미 발효주의 발효기간별 색도 변화는 Table 4 및 Fig. 1과 같다. 발효 초기 명도(L)는 흑진미 45.65, 조은흑미 37.19, 흑진주 34.89 순으로 나타났으며 백미인 삼광이 53.71로 가장 높았고 발효 종료일의 명도도 백미가 53.40으로 가장 높았으며 흑진주가 31.91로 가장 낮았다. 백미인 삼광을 제외한 3종의 유색미 발효주의 명도는 발효 초기부터 발효 6일차까지는 감소하다가 그 이후부터는 큰 변화없이 일정한 값을 보였다. 적색도(a)는 발효초기 조은흑미가 9.49로 가장 높았으며 그 다음으로 흑진주 9.22, 흑진미 4.37, 삼광 -0.24 순이었고 발효 종료일에는 흑진미가 8.08로 가장 높았다. Kim 등(1999)은 유색미 식혜의 당화 및 관능적 특성 연구에서 유색미의 경우 당화과정 중에 anthocyanin 색소인 cyanidin-3-glucoside가 용출되어 적색도가 증가하였다고 추정된 바와 같이 본 연구에서도 흑진미의 경우는 발효기간 중 당화가 되면서 적색도가 증가한 것으로 판단되었다. 황색도(b)는 발효 초기 흑진미가 7.17로 가장 높았고, 그 다음으로는 조은흑미 6.89, 흑진주 5.20, 삼광 0.23 순이였으며 발효 종료일에도 흑진미가 6.39로 가장 높았고 흑진주가 1.89로 가장 낮은 황색도를 보였다. 유색미 발효주 3종의 황색도는 발효 초기에 비해 발효종료일에 모두 감소하는 경향을 보였으며 백미인 삼광은 오히려 증가하는 결과를 보였다.

이상에서 유색미 발효주의 발효 기간에 따른 색도의 변화

Table 3. Changes in alcohol concentration during fermentation periods of white and pigmented rice wine (unit: %)

Cultivar	Fermentation periods (days)				
	2	4	6	8	10
<i>Samkwang</i>	11.90±0.40 ^{D^b1)2)}	14.30±0.20 ^{C^b}	15.10±0.20 ^{A^Bb}	14.70±0.10 ^{B^Cb}	15.50±0.20 ^{A^a}
<i>Heugjinmi</i>	13.00±0.20 ^{C^a}	15.00±0.10 ^{B^a}	15.70±0.20 ^{A^a}	15.10±0.10 ^{B^a}	15.00±0.10 ^{B^b}
<i>Joeunheugmi</i>	11.80±0.10 ^{D^b}	12.60±0.20 ^{C^d}	14.03±0.06 ^{B^c}	13.90±0.20 ^{B^c}	15.20±0.10 ^{A^b}
<i>Heugjinju</i>	11.80±0.30 ^{E^b}	13.30±0.10 ^{D^c}	13.80±0.40 ^{C^c}	14.50±0.10 ^{B^d}	15.60±0.10 ^{A^a}

¹⁾ Values are expressed as the mean±S.D. (n=3).

²⁾ Different capital letters (^{A-E}) in the same row indicate a significant difference among fermentation periods and small letters (^{a-d}) in the same column indicate a significant difference among samples by Duncan's range test ($p<0.05$).

Table 4. Changes in color value during fermentation periods of white and pigmented rice wine

Sample	Fermentation time (day)						
	0	2	4	6	8	10	
L	<i>Samkwang</i>	53.71±0.12 ^{Dd1)2)}	55.20±0.10 ^{Aa}	54.11±0.20 ^{Ca}	54.79±0.18 ^{Ba}	53.41±0.16 ^{Da}	53.40±0.07 ^{Ea}
	<i>Heugjinmi</i>	45.65±0.26 ^{Ac}	41.24±0.20 ^{Bb}	36.88±0.16 ^{Eb}	36.74±0.05 ^{Eb}	37.79±0.40 ^{Db}	38.33±0.05 ^{Cb}
	<i>Joeunheugmi</i>	37.19±0.03 ^{Aa}	32.58±0.07 ^{Bc}	32.08±0.13 ^{Cc}	32.07±0.56 ^{Cc}	31.89±0.12 ^{Cc}	32.08±0.05 ^{Cc}
	<i>Heugjinju</i>	34.89±0.03 ^{Ab}	31.73±0.01 ^{BCd}	31.44±0.14 ^{Dd}	31.55±0.22 ^{CDc}	31.64±0.14 ^{CDc}	31.91±0.09 ^{Dd}
a	<i>Samkwang</i>	-0.24±0.01 ^{Ad}	-1.21±0.02 ^{Cd}	-1.03±0.03 ^{Bd}	-1.46±0.02 ^{Ed}	-1.20±0.02 ^{Cd}	-1.28±0.02 ^{Dd}
	<i>Heugjinmi</i>	4.37±0.14 ^{Fa}	6.82±0.14 ^{Eb}	7.53±0.04 ^{Cb}	7.31±0.19 ^{Da}	7.80±0.06 ^{Ba}	8.08±0.04 ^{Aa}
	<i>Joeunheugmi</i>	9.49±0.03 ^{Ab}	7.19±0.04 ^{Ba}	6.12±0.11 ^{Ca}	5.71±0.30 ^{Db}	5.57±0.05 ^{Db}	5.99±0.01 ^{Cb}
	<i>Heugjinju</i>	9.22±0.02 ^{Ac}	5.57±0.03 ^{Bc}	4.58±0.09 ^{Cc}	4.41±0.06 ^{Dc}	4.67±0.05 ^{Cc}	5.60±0.06 ^{Bc}
b	<i>Samkwang</i>	0.23±0.02 ^{Fd}	2.92±0.03 ^{Db}	2.17±0.03 ^{Ec}	3.82±0.03 ^{Ab}	3.27±0.04 ^{Cb}	3.47±0.03 ^{Bb}
	<i>Heugjinmi</i>	7.17±0.26 ^{Ba}	7.57±0.24 ^{Aa}	5.79±0.05 ^{Da}	5.51±0.23 ^{Da}	6.12±0.04 ^{Ca}	6.39±0.01 ^{Ca}
	<i>Joeunheugmi</i>	6.89±0.02 ^{Ab}	2.91±0.02 ^{Bb}	2.33±0.04 ^{Cb}	2.04±0.24 ^{Dc}	2.09±0.04 ^{Dc}	2.21±0.03 ^{CDc}
	<i>Heugjinju</i>	5.20±0.01 ^{Ac}	2.09±0.04 ^{Bb}	1.68±0.05 ^{Dc}	1.52±0.06 ^{Ed}	1.58±0.07 ^{Ed}	1.89±0.08 ^{Cd}

1) Values are expressed as the mean±SD. (n=3).

2) Different capital letters (A-F) in the same row indicate a significant difference among fermentation periods and small letters (a-d) in the same column indicate a significant difference among samples by Duncan's range test ($p<0.05$).

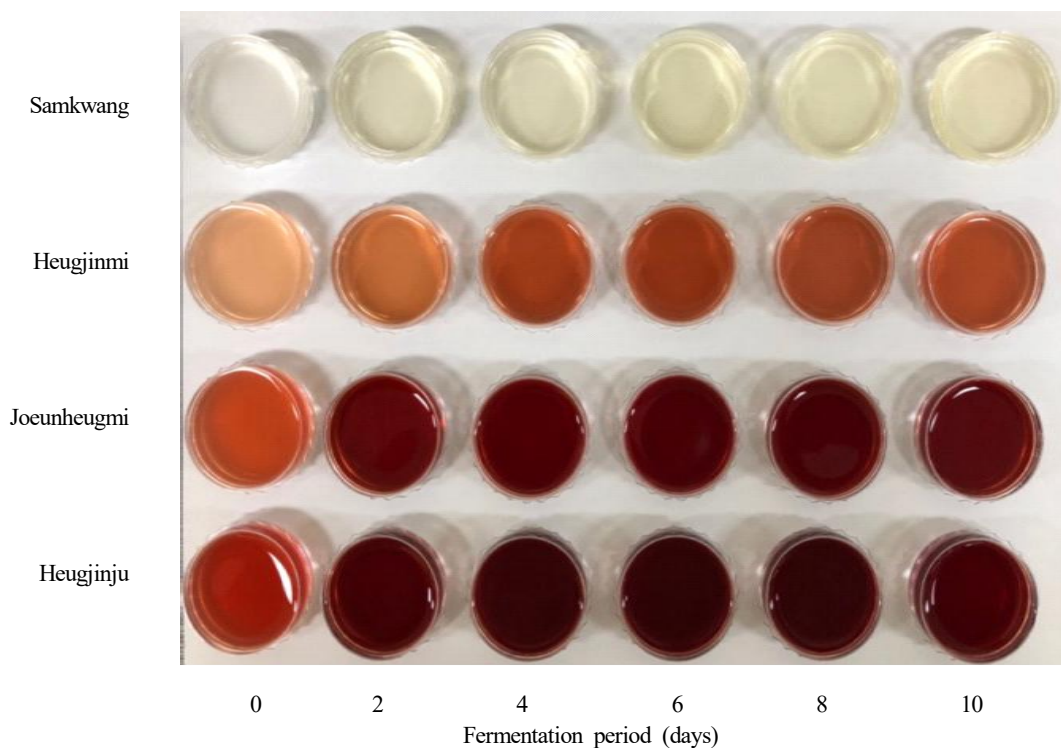


Fig. 1. Color of rice wine with different cultivar according to fermentation periods.

는 유색미 품종과 발효 시간에 따라 차이가 나타났으므로 최적의 색도를 가진 유색미 발효주를 생산하기 위해서는 유색

미 품종별 발효 시간과 조건에 대한 면밀한 검토가 있어야 할 것으로 판단되었다.

Table 5. Changes in volatile compounds during fermentation periods of white and pigmented rice wine (Unit: ppm)

Compound	Cultivar	Fermentation periods (days)				
		2	4	6	8	10
Acetadehyde	<i>Samkwang</i>	84.940	109.485	61.812	48.877	31.880
	<i>Heuginmi</i>	13.839	12.992	13.959	15.329	14.328
	<i>Joeunheugmi</i>	6.587	19.314	9.818	9.557	9.489
	<i>Heuginju</i>	17.655	12.750	13.471	9.014	12.314
Tetrahydrofuran	<i>Samkwang</i>	40.155	40.155	65.294	39.182	17.962
	<i>Heuginmi</i>	17.734	25.781	32.845	22.261	30.836
	<i>Joeunheugmi</i>	12.759	20.482	10.894	14.288	20.167
	<i>Heuginju</i>	56.140	22.617	17.319	16.295	14.819
Ethyl acetate	<i>Samkwang</i>	62.282	91.246	83.190	139.051	102.764
	<i>Heuginmi</i>	47.583	65.702	82.633	87.888	110.786
	<i>Joeunheugmi</i>	35.953	60.771	62.466	64.211	89.434
	<i>Heuginju</i>	58.882	70.267	83.798	83.798	111.897
Methyl isobutyl ketone	<i>Samkwang</i>	66.883	19.675	11.270	24.854	18.908
	<i>Heuginmi</i>	17.139	14.153	17.725	15.704	14.364
	<i>Joeunheugmi</i>	11.859	22.521	12.648	16.033	15.256
	<i>Heuginju</i>	18.843	20.538	16.536	15.514	15.620
1-propanol	<i>Samkwang</i>	67.164	49.394	31.387	54.545	20.088
	<i>Heuginmi</i>	19.730	12.703	-	-	7.032
	<i>Joeunheugmi</i>	14.091	12.259	19.224	17.548	14.595
	<i>Heuginju</i>	14.808	18.039	11.296	13.650	13.688
Isobutyl alcohol	<i>Samkwang</i>	166.502	214.802	195.886	205.886	177.240
	<i>Heuginmi</i>	87.080	88.845	77.749	83.511	76.343
	<i>Joeunheugmi</i>	30.544	69.048	87.122	63.532	86.810
	<i>Heuginju</i>	74.090	74.749	52.951	89.826	75.140
2,6-dimethyl-4-heptanone	<i>Samkwang</i>	164.329	120.303	115.067	153.638	153.972
	<i>Heuginmi</i>	137.821	130.625	149.248	142.296	166.466
	<i>Joeunheugmi</i>	86.657	165.519	98.182	197.200	119.316
	<i>Heuginju</i>	136.064	143.729	151.386	128.537	158.885
Isoamyl alcohol	<i>Samkwang</i>	157.704	208.196	206.483	173.521	172.190
	<i>Heuginmi</i>	179.818	191.244	149.299	170.176	148.914
	<i>Joeunheugmi</i>	203.469	144.529	207.935	230.947	198.813
	<i>Heuginju</i>	177.276	166.851	141.758	181.768	149.255
1-ethyl-2-methyl-benzene	<i>Samkwang</i>	16.582	11.017	7.653	19.215	13.379
	<i>Heuginmi</i>	8.631	10.953	13.273	12.650	17.301
	<i>Joeunheugmi</i>	-	9.039	4.594	2.537	5.735
	<i>Heuginju</i>	11.032	9.984	5.547	12.368	14.030
Acetic acid	<i>Samkwang</i>	-	2.921	14.427	7.145	-
	<i>Heuginmi</i>	18.527	29.495	38.947	13.214	20.944
	<i>Joeunheugmi</i>	22.510	-	10.884	13.744	9.529
	<i>Heuginju</i>	16.673	11.952	34.583	18.074	2.130
2,3-butanediol	<i>Samkwang</i>	-	-	5.786	17.360	3.914
	<i>Heuginmi</i>	16.913	17.750	30.302	14.262	34.682
	<i>Joeunheugmi</i>	9.735	-	-	-	-
	<i>Heuginju</i>	-	-	6.601	8.226	-
Hexadecanoic acid, ethyl ester	<i>Samkwang</i>	-	-	11.965	7.229	-
	<i>Heuginmi</i>	21.143	-	10.589	6.129	5.968
	<i>Joeunheugmi</i>	-	4.987	-	-	-
	<i>Heuginju</i>	-	-	-	3.282	5.431

5. 향기 성분

백미와 유색미 발효주의 발효기간에 따른 주요 향기성분은 Table 5에서와 같이 alcohol류 4종, ester류 2종, aldehyde류 1종, acid류 1종, benzene류 1종, ketone류 1종 및 furan류 1종 등 총 12종이 검출되었으며, 본 자료에서는 에탄올과 극미량의 향기성분은 제외하였다.

총 10일간의 발효를 통하여 얻은 유색미 발효주의 주요 향기성분은 4종으로 ethyl acetate, isobutyl alcohol, 2,6-dimethyl-4-heptanone 및 isoamyl alcohol 이었다. Ethyl acetate의 함량은 유색미와 백미 발효주 4종 모두 발효 초기값에 비해 발효 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였는데 유색미 발효주 3종 중에서 흑진주가 발효 10일차에 111.892 ppm으로 가장 높았으며, 조은흑미가 89.434 ppm으로 가장 낮은 함량을 보였다. Isobutyl alcohol은 백미인 삼광에서 발효 초기 166.502 ppm과 발효 종료시 177.240 ppm으로 가장 높았으며 유색미의 경우는 백미에 비해 함량이 낮았고 발효 종료시 조은흑미가 86.810 ppm으로 유색미중에서 가장 높은 값을 보였다. 2,6-dimethyl-4-heptanone은 유색미 3종 모두 발효가 진행되면서 함량이 증가하는 경향을 보였으며 흑진미가 발효 종료시 166.466 ppm으로 가장 높은 반면, 조은흑미에서 119.316 ppm으로 가장 낮게 검출되었다. Isoamyl alcohol은 발효초기 유색미 3종 모두가 백미에 비해 높은 함량을 보였으며 그중에서도 조은흑미가 203.469 ppm으로 가장 높은 함량을 나타내었고 발효 8일차에도 230.947 ppm으로 가장 높았다. 백미인 삼광의 경우 isoamyl alcohol은 발효 초기 157.704 ppm에서 발효 종료 시 172.190 ppm으로 다소 증가한 반면, 유색미 3종에서는 발효 초기값에 비해 발효 종료일에 모두 감소하는 대조적인 결과를 보였다.

일반적으로 탁주의 alcohol류 중에서 ethanol을 제외하고 isoamyl alcohol과 isobutyl alcohol이 주성분이며(Han 등 1997b) 이들의 함량 및 함량비는 발효주의 향과 맛에 큰 영향을 주는 것으로 평가되고 있는데 isoamyl alcohol은 fusel oil의 일종으로 주로 바나나향인 반면, isobutyl alcohol은 ethanol과 유사한 관능적 특성을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다(Ju 등 2009). 탁주의 향기성분은 누룩이나 주모 및 담금 후 술덧 중에 생육하는 각종 미생물의 발효작용이나 원료로부터 생성되며(Lee 등 1996), 발효 기간에 따라 향기성분의 수와 양은 변하는데 Lee와 Choi(2005)는 *A. kawachii* 누룩으로 담금한 탁주의 발효과정중 술덧의 향기성분은 발효 초기 32종에서 발효 2일차에 45종, 발효 6일차에 63종이 검출되었다고 보고한 바 있다. 또 Lee 등(2007)은 효모 종류를 달리한 탁주 술덧의 발효에서 최대 44종이 검출되었고 모든 시험구에서 공통으로 검출된 향기성분은 총 15종이라고 보고하였으며 Ju 등(2009)도 전분분해 효모융합체를 이용한 전통발효주의

제조와 품질특성에서 검출된 향기성분은 21종이라고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구에서 검출된 주요 향기성분의 수는 총 12종으로 상기 연구 결과와는 다소 차이가 있었는데 이는 본 연구에서는 ethanol과 미량 성분은 제외하여 나타난 결과로 판단되었다.

요약 및 결론

본 연구는 백미품종인 삼광과 유색미인 흑진미, 조은흑미 및 흑진주 품종을 이용하여 발효주를 제조하고 그 품질 특성을 비교하였다. 10일간 발효 후 pH는 4.52~4.71 범위를 보였고 백미보다 유색미에서 높게 나타났다. 총산도는 0.50~0.74% 수준으로 나타났으며 유색미에서 높았다. 당도는 백미 삼광이 17.40 °Brix으로 가장 높았으며 유색미는 13.17~14.93 °Brix 범위를 보였다. 환원당은 백미 삼광이 가장 높았으며 유색미 중 흑진미 품종이 가장 낮았다. 발효주의 알코올 농도는 15.0~15.6%이었으며, 백미 삼광과 유색미 흑진주 품종이 가장 높게 나타났다. 발효주의 명도는 백미 삼광이 53.40으로 가장 높았고, 유색미 품종은 31.91~38.33의 범위를 나타내었으며, 적색도는 흑진미가 8.08로 가장 높았고, 황색도는 흑진미가 6.39로 가장 높게 나타났다. 발효주의 주요 다량 생성 향기성분으로는 ethyl acetate, isobutyl alcohol, 2,6-dimethyl-4-heptanone 및 iso-amyl alcohol로 나타났다. 이상의 결과로부터 유색미는 백미와 유사한 발효율을 보이며, 색상이 아름다워 우수한 품질의 발효주 제조가 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 충북도립대학교 전임교원 연구년제 운영규정에 따라 수행되었으며 일정기간 동안 학술연구 활동을 허가해 주셔서 이에 감사드립니다.

References

- Cho MJ, Jeong HS. 2023. Quality characteristics of fermented rice beverage prepared with green glutinous rice. *Korean J Food Nutr* 36:341-353
- Choi S, Seo HS, Lee KR, Lee S, Lee J, Lee J. 2019. Effect of milling and long-term storage on volatiles of black rice (*Oryza sativa* L.) determined by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem* 276:572-582
- Ha SJ, Yang SK, In YW, Kim YJ, Oh SW. 2012. Changes in

- microbial and physicochemical properties of single-brewed *makgeolli* by high hydrostatic pressure treatment during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:1176-1181
- Ha TY, Park SH, Lee SH, Kim DC. 1999. Gelatinization properties of pigmented rice varieties. *Korean J Food Sci Technol* 31:564-567
- Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. 1997a. Quality characteristics in mash of *takju* prepared by using different *nuruk* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 29:555-562
- Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. 1997b. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using different *nuruks*. *Korean J Food Sci Technol* 29:563-570
- Jeong JW, Park KJ, Kim MH, Kim DS. 2006. Changes in quality of spray-dried and freeze-dried *takju* powder during storage. *Korean J Food Sci Technol* 38:513-520
- Ju MN, Hong SW, Kim KT, Yum SK, Kim GW, Chung KS. 2009. Preparation of Korean traditional alcoholic beverage (*yakju*) by a protoplast fusion yeast strain utilizing starch and its quality characteristics. *Korean J Food Sci Technol* 41:541-546
- Kim DR, Seo BM, Noh MH, Kim YW. 2012a. Comparison of temperature effects on brewing of *makgeolli* using uncooked germinated black rice. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 27:251-256
- Kim JY, Sung KW, Bae HW, Yi YH. 2007. pH, acidity, color, reducing sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice powder added *takju* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 36:266-271
- Kim MS, Hahn TR, Yoon HH. 1999. Saccharification and sensory characteristics of *sikhe* made of pigmented rice. *Korean J Food Sci Technol* 31:672-677
- Kim OS, Park SS, Sung JM. 2012b. Antioxidant activity and fermentation characteristics of traditional black rice wine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:1693-1700
- Kim SD, Kim MH, Ham SS. 2000. Preparation and quality of uncooked-colored wine using black rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29:224-230
- Kwon YH, Lee AR, Kim HR, Kim JH, Ahn BH. 2013. Quality properties of *makgeolli* brewed with various rice and koji. *Korean J Food Sci Technol* 45:70-76
- Lee H, Lee TS, Noh BS. 2007. Volatile flavor components in the mashes of *takju* prepared using different yeasts. *Korean J Food Sci Technol* 39:593-599
- Lee H, Park CS, Choi JY. 2010. Quality characteristics of the mash of *takju* prepared using different yeasts. *Korean J Food Sci Technol* 42:56-62
- Lee HS. 2012. Quality characteristics of red yeast rice *makgeolli* brewed with differently added ratio of red yeast rice and different kinds of *nuruk*. Master's Thesis, Myongji Univ. Seoul. Korea
- Lee JS, Lee TS, Park SO, Noh BS. 1996. Flavor components in mash of *takju* prepared by different raw materials. *Korean J Food Sci Technol* 28:316-323
- Lee TS, Choi JY. 2005. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using *Aspergillus kawachii nuruks*. *Korean J Food Sci Technol* 37:944-950
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428
- National Tax Service [NTS]. 2009. Liquor Analysis Regulations. pp.41-42. National Tax Service
- Park H, Park EK, Choi S, Shin H, Kim MJ, Park JM. 2020. Quality characteristics of *cheongsoo* grape wine by freeze concentration fermented with different yeasts. *Korean J Food Nutr* 33:512-523
- Park JY, Ham H, Han SI, Oh SH, Song YC, Cho JH, Hur YJ, Lee YY, Lee BW, Choi YH. 2016. Comparison of antioxidant components and antioxidant activities of colored rice varieties (*Oryza sativa* L.) cultivated in Southern plain. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45:1214-1220
- Ryu JS, Shin JE, Cho MA, Shin JH, Choi HS. 2021. Physicochemical properties of *danyangju* and *iyangju* prepared using uncooked germinated brown rice. *Korean J Food Sci Technol* 53:648-656
- Woo SM, Shin JS, Seong JH, Yeo SH, Choi JH, Kim TY, Jeong YJ. 2010. Quality characteristics of brown rice *takju* by different *nuruks*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:301-307
- Yoon JM, Cho MH, Hahn TR, Paik YS, Yoon HH. 1997. Physicochemical stability of anthocyanins from a Korean pigmented rice variety as natural food colorants. *Korean J Food Sci Technol* 29:211-217

Received 31 July, 2024

Revised 04 September, 2024

Accepted 23 September, 2024

C2C12 세포에서 토끼고기 추출물의 근육분화 및 에너지 조절 효과

†배인선 · 이정아* · 박원서 · 유자연 · 함준상** · 서강민*** · 김기현****

농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과 농업연구사, * 농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과 박사과정,
농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과 농업연구관, *농촌진흥청 국립축산과학원 동물복지연구팀 연구원,
****농촌진흥청 국립축산과학원 동물복지연구팀 농업연구사

Effects of Rabbit Meat Extract on Myogenic Differentiation and Energy Regulation in C2C12 Cells

†In-Seon Bae, Jeong Ah Lee*, Won-Seo Park, Jayeon Yoo, Jun-Sang Ham**, Kangmin Seo*** and Ki Hyun Kim****

Researcher, Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Doctoral Student, Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

**Senior Researcher, Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

***Researcher Assistant, Animal Welfare Research Team, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

****Researcher, Animal Welfare Research Team, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

Abstract

The present study was conducted to investigate effects of rabbit meat extract on energy metabolism and muscle differentiation in C2C12 myotubes. Water extract of rabbit meat (10, 50, 100, and 200 µg/ml) was used to treat differentiated C2C12 cells. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot analysis were used to determine mRNA or protein levels of energy metabolism-related genes. Total adenosine triphosphate (ATP) content was also measured. Treatment with rabbit meat extract significantly increased expression levels of muscle differentiation markers (myogenin and myosin heavy chain) and mitochondrial biogenesis regulators (PGC1α, NRF1, and TFAM) in C2C12 myotubes compared to non-treated control. Additionally, rabbit meat extract activated phosphorylation of AMPK and acetyl-coA carboxylase (ACC). Rabbit meat extract significantly increased ATP contents in myotubes. These results suggest that rabbit meat extract has the potential to improve energy metabolism in skeletal muscles.

Key words: rabbit meat extract, energy metabolism, C2C12 cells

서론

골격근은 에너지 대사와 열생산의 주요 기관으로서, 미토콘드리아가 가장 풍부하게 존재한다(Kwak HB 2015; Dong & Tsai 2023). 골격근에서 생체에너지 조절과 관련된 미토콘드리아 기능 조절 인자는 다양하다(Ashcroft 등 2020; Lee & Kim 2021). 골격근 내에서 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha(PGC1α)는 세포 에너지 대사의 주요 인자로 작용하여 지방산 산화를 조절하고 미토콘드리아 생합성을 증가시킨다(Kim 등 2022). AMP-activated protein kinase(AMPK)도 세포 내 에너지 항상성을 유지하는

효소로 작용하며, 근육 내에서 AMPK를 활성화하여 PGC1α 발현을 직접적으로 증가시킨다(Irrcher 등 2008; Kim 등 2016). 또한 미토콘드리아 생합성에 관련된 인자로 nuclear respiratory factor 1(NRF-1)과 mitochondrial transcription factor A(TFAM) 등이 있다(Kang 등 2019).

미토콘드리아 생합성 증가는 근육 분화에도 밀접한 관련이 있다(Porter 등 2011). 골격근 세포는 근육분화 과정을 통해 미분화 상태의 근아세포(myoblast)에서 관 형태의 다핵세포인 근관세포(myotube)로 성숙된다(Song MY 2015). 근육분화는 myogenin과 myosin heavy chain(MHC)의 발현량이 증가하는 것으로 알려져 있다(Yoon 등 2013; Kang 등 2019). 따라

† Corresponding author: In-Seon Bae, Researcher, Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea. Tel: +82-63-238-7356, Fax: +82-63-238-7397, E-mail: isbae746@korea.kr

서 이들 유전자들의 발현량 측정을 통해 근육 분화도를 확인할 수 있다. 이로써 골격근은 당 및 지방산 대사를 조절함으로써 비만뿐만 아니라 근육량 감소를 나타내는 근감소증에도 직접적으로 영향을 미쳐 골격근에 대한 연구와 관심이 더욱 증가하고 있다.

토끼는 토끼과에 속하는 가축으로 우리나라에서는 삼국 시대부터 사육하였다. 우리나라의 농림축산식품부 통계자료(MAFRA 2023)에 따르면 토끼 농장 1,540호에서 43,579마리를 사육하고 있으며 매년 감소 추세를 나타내고 있다. 토끼고기 생산량은 중국이 약 60%를 차지하여 가장 많이 생산하고 있으며, 프랑스와 이탈리아 등 일부 유럽 국가들에서 다양한 요리로 널리 사용된다. 토끼고기는 지방 함량이 적고 불포화지방산과 비타민 B12, 미네랄 등이 풍부하다고 알려져 있으며, 피부 미용뿐만 아니라 두뇌 활동 증진과 노년층 치매 예방에 도움을 줄 수 있다(Lee 등 2022). 또한, 예로부터 동의보감이나 민간요법에서는 토끼고기를 고혈압, 당뇨, 동맥경화 등 다양한 질병을 치료하고 예방하는 보양식으로 사용되어왔다.

하지만 토끼고기의 연구는 주로 육질특성, 사양방법에 따른 지방산 조성, 위생 안전성, 영양성분 분석, 육가공품 개발 등이 수행되었으나(Kouba 등 2008; Bianchi 등 2009; Cavani 등 2009; Valenzuela 등 2011; Apatá 등 2012), 토끼고기의 효능에 대한 직접적인 연구는 부족한 실정이다. 본 연구진들은 토끼고기의 소비 활성화를 위해 선행연구에서 3T3-L1 지방세포에서 토끼고기 추출물이 항비만과 인슐린 조절 경로를 활성화시켜 인슐린 저항성을 개선하는 효과를 확인하였다(Bac 등 2023). 이에 본 연구에서는 토끼고기 추출물의 효능 특성이 근육 기능에 미치는 영향을 조사하기 위해 C2C12 골격근 세포 배양 모델을 사용하였다. 이 모델을 통해 토끼고기 추출물의 처리가 근육세포의 분화 및 에너지대사 조절작용에 미치는 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 토끼추출물 제조

토끼고기 추출물은 부직포 주머니에 토끼 200 g을 넣고 정수된 물 200 mL로 120°C에서 12시간 동안 가열하였으며, 압력은 30 psi를 유지하였다. 압력을 뺀 후, 토끼고기가 들어있는 부직포 주머니를 압착시킨 후 토끼고기 추출물을 여과지(Whatman paper filter No.1)로 거르고 동결건조하여 추출물을 제조하였다. 이와 같이 토끼고기 추출물은 진액 추출 과정을 약간 변형하여 제조하였다. 이 과정에서 수율은 36%였다.

2. 세포 배양 및 근육 분화

미분화상태의 근아세포인 C2C12 세포(CRL-1772™, ATCC, Manassas, VA, USA)는 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone, UT, USA) 및 1% penicillin-streptomycin(P/S; Hyclone)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Welgene, Daegu, Korea)으로 배양하였다. 약 85~95%의 세포가 성장하였을 때 2% Horse serum(Hyclone)이 함유된 배지로 매일 1회씩 총 6일간 교체하였다. 이를 통해 미분화상태의 근아세포(myoblasts)를 근관세포(myotubes)로 분화시켜주었으며, 분화 2일부터 토끼고기추출물(10, 50, 100, 200 µg/mL)을 처리하였다. 근관의 너비는 무작위로 선택된 섹션에서 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

3. 세포독성 평가

C2C12 세포에서 토끼고기 추출물 처리에 의한 세포 생존 능력을 측정하기 위해 EZ-CyTox(Daeil Lab Service, Seoul, Korea)를 사용하였다. C2C12 세포(2×10^4 cells/well)를 96-well culture plate에 seeding하고, 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 토끼고기 추출물을 10, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 각 well 당 EZ-Cytox solution을 10 µL씩 넣고 1시간 동안 배양한 후, microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 대조군에서의 100% 생존도를 기준으로 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

4. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

C2C12 세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 TRIzol(Sigma-Aldrich, MO, USA) 용액을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA에 iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 25°C에서 5분, 46°C에서 20분, 95°C에서 1분의 조건으로 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 SsoAdvanced universal SYBR Green supermix(Bio-Rad)를 혼합하여 에너지대사 관련 유전자인 PGC1α, SIRT1, NRF1, TFAM 그리고 근육분화 관련 유전자인 myogenin, MHC의 발현에 대한 토끼고기 추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다.

5. Western blot

C2C12 세포에서 발현되는 근육분화(myogenin, MHC), 에너지대사(PGC-1α, Sirt1, NRF1, TFAM), 에너지 항상성 유지(ACC, AMPK)와 관련된 단백질에 대한 토끼고기 추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 즉, C2C12 세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후

RIPA buffer(50 mM Tri-HCl, 150 mM sodium chloride, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), a protease inhibitor cocktail, 50 mM sodium fluoride, and 0.2M sodium orthovanadate)를 넣고 4°C, 13,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 상등액을 수집하여 Bradford's assay 용액(Bio-Rad)을 사용하여 단백질의 농도를 측정하고, 20 µg 단백질을 10~12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 transfer한 후, 5% skim milk로 blocking하였다. Blocking된 membrane에 각각의 1차 항체를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후, 1X PBST buffer로 세척하고, HRP-conjugated 2차 항체로 실온에서 40분간 반응시켰다. 이후 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액(Advansta Inc., CA, USA)으로 기질 반응을 수행하고 X-ray film에 감광하였다. 각 단백질의 밴드는 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 β-actin의 발현 정도와 비교한 발현 비율로 계산하였다.

6. ATP assay

C2C12 세포에서 ATP colorimetric assay kit(Abcam, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 분화된 C2C12 세포를 수집한 후, 110 µL의 ATP assay buffer를 넣고 원심분리하여 상층액을 96 well plate에 50 µL씩 분주하였다. ATP assay buffer, ATP Probe, ATP converter, Developer를 혼합한 용액을 96 well plate에 각각 50 µL씩 분주하고 상온에서 빛을 차단시킨 상태에서 30분 동안 반응시킨 후 570 nm의 파장으로 측정하였다. ATP의 농도는 ATP standard를 이용하여 계산하였다.

7. 통계 분석

Statistical Package for the Social Science(SPSS V28, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계 분석을 수행하였다.

Student's *t*-test를 사용하였고, 통계적으로 유의한 차이를 확인하기 위해 *p*-value가 0.05 이하인 경우를 인정하였다.

결과 및 고찰

1. 세포독성

C2C12 myoblasts와 myotubes에서 토끼고기 추출물의 독성을 평가하기 위해 cell viability를 측정하였다. 결과적으로, 세포만 배양한 경우의 세포생존율을 100%로 설정하였을 때 토끼고기 추출물의 10, 50, 100, 200 µg/mL 농도 처리에서 myoblasts의 경우 각각 100.47±6.49, 98.74±2.9, 100.29±4.6, 101.99±2.51로 측정되었고(Fig. 1A), myotubes의 경우 각각 100.7±3.06, 100.4±0.13, 100.27±0.26, 100.7±2.9로 측정되었다(Fig. 1B). 따라서 토끼고기 추출물을 처리한 결과 모든 농도에서 유의한 변화가 나타나지 않았음을 확인하였다. 이는 해당 농도 범위에서 토끼고기 추출물이 세포에 미치는 독성이 낮거나 없음을 시사할 수 있다.

2. 근육분화에 대한 효과

C2C12 세포에서 토끼고기 추출물이 근육 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 근육 분화 마커인 myogenin과 MHC의 mRNA와 단백질 발현을 각각 qRT-PCR과 western blot 방법으로 분석하였다. 실험 결과에 따르면 토끼고기 추출물을 처리한 세포에서 myogenin과 MHC mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$)하였다. 또한, 단백질의 발현도 200 µg/mL 토끼고기 추출물을 처리한 세포에서 대조군보다 myogenin 발현은 약 1.9배($p<0.001$), MHC 발현은 약 3.73배($p<0.001$)로 가장 높았다(Fig. 2A). 이러한 결과는 토끼고기 추출물이 근육 분화 단백질의 발현을 증가시킴으로써 근육

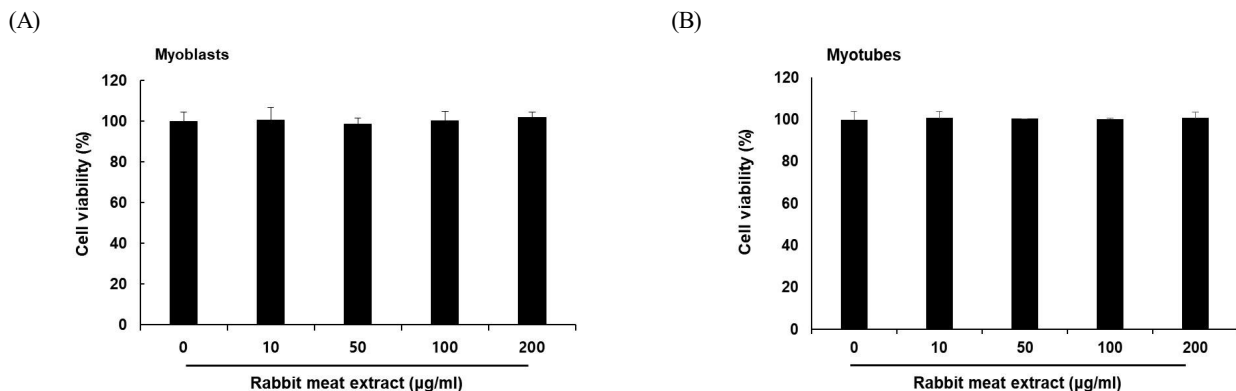


Fig. 1. Effects of rabbit meat extract on cell viability in C2C12 myoblasts (A), and differentiated C2C12 myotubes (B). Cells were treated with rabbit meat extract at 10, 50, 100 and 200 µg/mL for 24 h. Data represents mean±S.D. of three independent experiments.

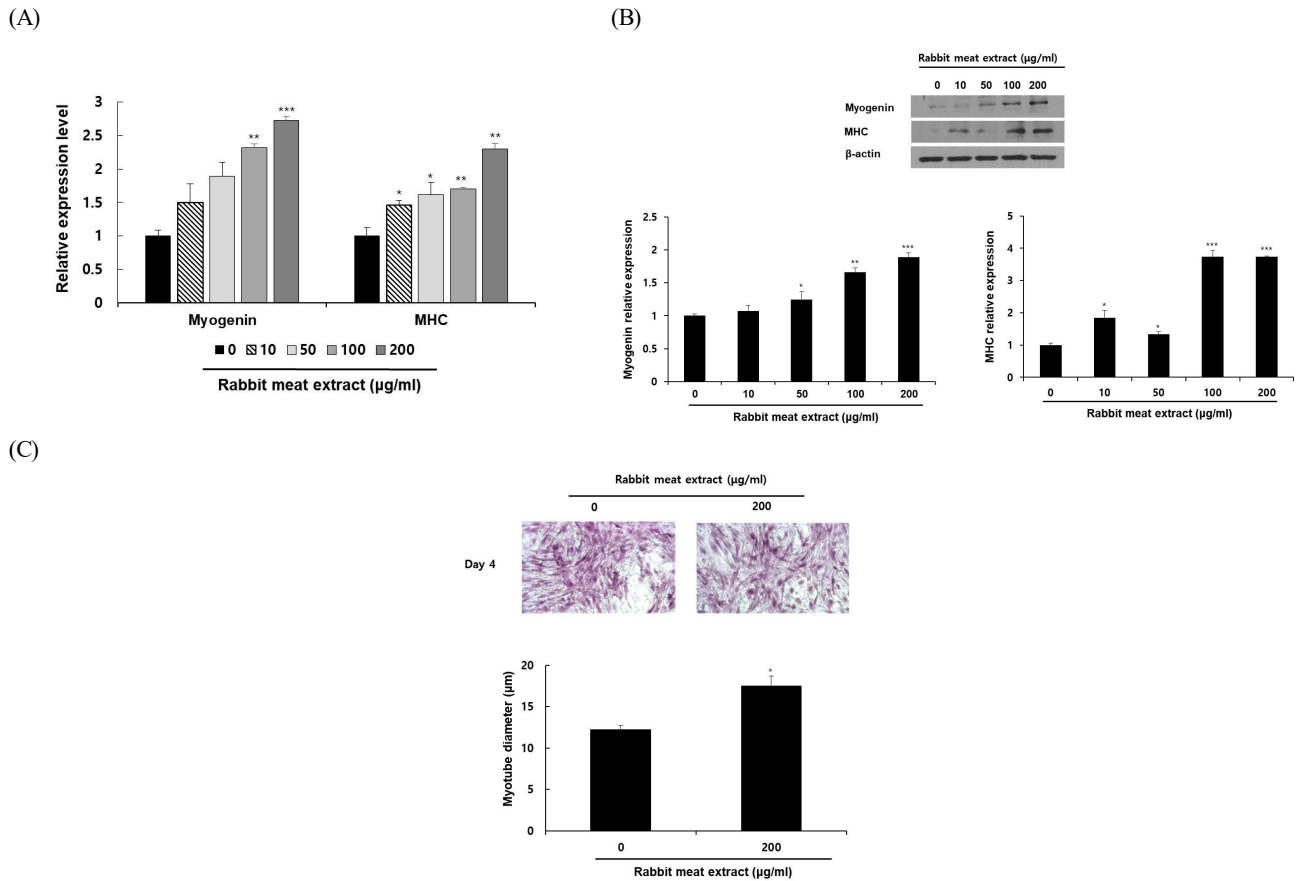


Fig. 2. Effects of rabbit meat extract on myocyte differentiation in C2C12 cells Myogenin and MHC mRNA (A) and protein (B) levels were determined by qRT-PCR and western blotting, respectively. The cells were stained using the May-Grunwald and Giemsa staining methods on day 4. Measurement of myotube widths based on images (C). Data represents mean±S.D. of three independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs. non-treated differentiated cells.

육 분화를 촉진할 수 있는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 C2C12 세포에서 말고기 추출물의 처리 농도를 참고하여 10 µg/mL로 시작하였으며(Lee 등 2024), 추가적으로 500, 1,000 µg/mL를 처리한 결과, 200 µg/mL 처리군과 유사한 수준의 근육 분화 마커 발현이 측정되었다. 따라서 200 µg/mL까지 처리하여 분석을 수행하였다. 본 연구에서는 토끼고기 추출물이 골격근 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 현미경을 통해 형태적인 변화를 관찰하였다. 실험 결과 myotube의 너비가 토끼고기 추출물을 처리하지 않은 세포보다 토끼고기 추출물을 처리한 세포에서 증가($p<0.05$)하는 경향을 보였다(Fig. 2B 및 Fig. 2C). 근육분화는 myogenin, MyoD, MHC 발현량을 증가시켜 근육분화를 증가시킨다고 보고하고 있다(Miller JB 1990; Je 등 2019). 그러므로 본 결과를 통해 토끼고기 추출물은 근육분화 증진과 관련이 있다는 것을 확인할 수 있었다. 농촌진흥청의 제10판 국가표준식품성분표에 따르면 토끼고기는 소고기보다 20배, 돼지고기보다 2.6배 높은 알파-

리놀렌산(alpha-linolenic acid) 함량을 지니고 있다(RDA, 2022). 알파-리놀렌산은 C2C12 세포의 근육 분화 과정에서 근분화 유전자 마커인 myogenin의 발현을 증가시킨다(Zhou 등 2022). 또한 토끼고기는 소고기와 돼지고기보다 더 많은 갈슘과 칼륨을 함유하고 있다(Iseki 등 2021; Sinha 등 2022). 비록 토끼고기 추출물에서 근육 분화를 촉진하는 특정 물질은 아직 밝혀지지 않았으나, 토끼고기는 근육 분화에 유익한 성분들이 많이 포함되어 있다. 따라서 향후 토끼고기의 유효 성분을 탐색하여 근육 분화를 유도할 수 있는 기능성 물질을 발굴할 필요가 있다.

3. 골격근 세포에서 에너지대사에 대한 효과

골격근 세포는 myoblasts에서 myotubes로 분화되는 과정에서 미토콘드리아 활성이 증가하면서 미토콘드리아가 근육 분화의 조절에 기여한다고 알려져 있다(Porter 등 2011). C2C12 세포에 토끼고기 추출물의 에너지대사 조절효과를

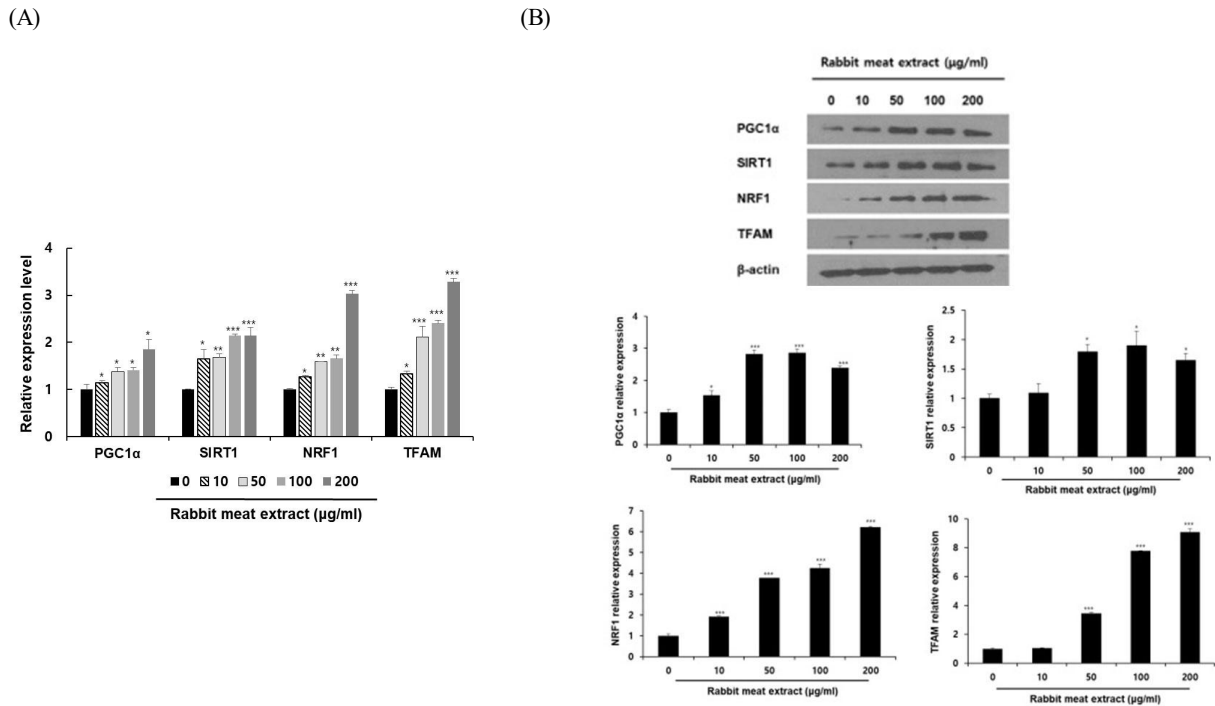


Fig. 3. Effects of rabbit meat extract on the biogenesis-regulating factors in C2C12 myotubes. The expression of PGC1 α , Sirt1, NRF1, and TFAM mRNA (A) and protein (B) were analyzed by qRT-PCR and western blotting, respectively. Data represents mean \pm S.D. of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. non-treated differentiated cells.

확인하기 위해 미토콘드리아 매개 에너지대사 조절인자들인 PGC-1 α , Sirt1, NRF1, TFAM의 mRNA 및 단백질 발현을 qRT-PCR 방법과 western blot 방법으로 조사하였다. 그 결과, PGC1 α , Sirt1, NRF1, TFAM의 mRNA와 단백질 발현이 모두 대조군에 비해 토끼고기 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 증가(p <0.05, p <0.01, p <0.001) 하였다(Fig. 3). PGC-1 α 는 미토콘드리아 생합성을 촉진시키고(Halling & Pilegaard 2020), NRF1은 미토콘드리아에서의 산화적 인산화 과정의 조절인자이며(Kiyama 등 2018), TFAM은 미토콘드리아 복제 및 전사를 조절하는 미토콘드리아 DNA의 프로모터에서 작용하는 전사인자이다(Kang 등 2018). PGC-1 α 는 NRF-1 및 TFAM을 활성화시켜 미토콘드리아 증식과 DNA의 전사를 촉진하여 미토콘드리아 생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Chen 등 2022). 본 연구에서는 토끼고기 추출물에 의해 NRF1과 TFAM의 발현이 증가함을 확인하였는데, 이를 통해 토끼고기 추출물이 골격근 내 미토콘드리아 생합성에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상된다. 기존 문헌에서 지방세포의 미토콘드리아 합성 증가에 대한 긍정적 효과를 보고하고 있지만(Bae 등 2023), 토끼고기 추출물이 골격근 세포에서의 미토콘드리아에 미치는 영향에 대해 직접적으로 연구된 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 토끼고기 추출물이 C2C12 세포

에서 근육분화와 미토콘드리아 합성에 미치는 효과를 확인하였다. 이에 동물 모델을 활용한 추가 연구를 통해 토끼고기 추출물의 항비만 효능, 에너지 대사 조절 및 미토콘드리아 기능 조절 효과를 보다 구체적으로 평가할 필요가 있다.

4. 골격근 세포에서 토끼고기 추출물의 AMPK/ACC signaling pathway에 대한 효과

AMPK는 골격근에서 지방산 대사에 중요한 역할을 하며, 미토콘드리아 내 ATP 생산을 증가시키는 작용을 한다(Das 등 2012). 이에 토끼고기 추출물의 에너지대사 증진 효과에 AMPK의 관련성을 평가하기 위하여 AMPK 및 p-AMPK 단백질 발현량을 측정하였다. 그 결과, AMPK 인산화 단백질(p-AMPK)의 발현은 대조군에 비해 토끼고기 추출물 처리 농도에 따라 증가(p <0.01, p <0.001)하는 경향을 보였다(Fig. 4A). AMPK의 활성화는 지질합성에 관여하는 유전자인 ACC가 인산화 및 불활성화를 유발한다. 이에 phospho-ACC(pACC)의 단백질 발현량을 측정하여 토끼고기 추출물의 AMPK 활성화 경로를 명확히 하고자 하였다. 실험 결과, 토끼고기 추출물 처리로 인해 ACC의 인산화가 증가(p <0.05, p <0.01, p <0.001)하였으며(Fig. 4B), 이는 AMPK의 활성화 결과와도 일치하는 내용이었다. 따라서 토끼고기 추출물이 골격근 내에서

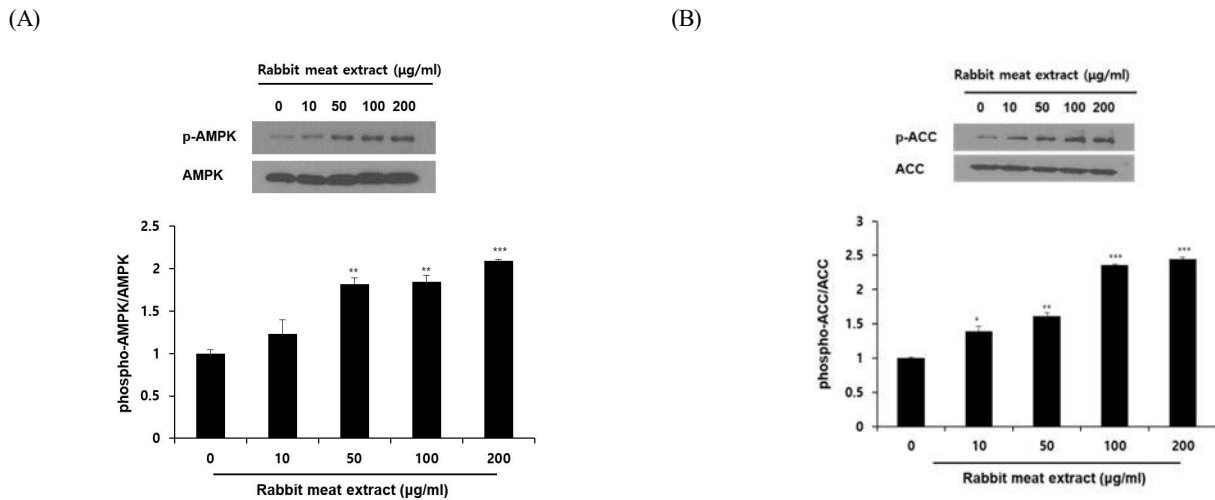


Fig. 4. Effects of rabbit meat extract on the phosphorylation of AMPK and ACC in C2C12 myotubes. The expression of protein level were determined by western blotting. Data represents mean±S.D. of three independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs. non-treated differentiated cells.

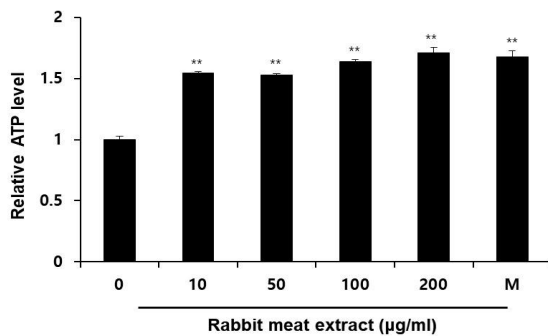


Fig. 5. Effects of rabbit meat extract on the levels of ATP in C2C12 myotubes. Data represents mean±S.D. of three independent experiments. ** $p<0.01$ vs. non-treated differentiated cells. M: metformin treatment (2.5 mM/mL).

AMPK 활성화에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. AMPK는 인산화를 통해 PGC-1 α 활성화에 직접적으로 기여한다. PGC-1 α 의 발현을 통해 미토콘드리아 관련 유전자들의 발현을 증가시키는 것으로 보고된 바, 본 연구 결과와 일치하였다(Halling & Pilegaard 2020; Chen 등 2022).

5. 골격근 세포에서 ATP 생산에 대한 효과

골격근 세포는 미토콘드리아가 풍부하여 ATP 생산에 중요한 역할을 하는 조직이다(Lee & Kim 2021; Akiyama 등 2022). ATP의 원료는 포도당과 지방산이며, 골격근 내 미토콘드리아 기능 이상으로 포도당과 지방산의 대사가 저하되면서 인슐린 저항성이 발생하고, 미토콘드리아의 에너지 발

생이 감소하는 것으로 알려져 있다(Brand 등 2013).

C2C12 myotubes에서 토끼고기 추출물의 에너지 합성 증가를 확인하기 위하여 세포 내 ATP 농도를 측정하였다. 그 결과, 세포 내 ATP의 농도는 토끼고기 추출물 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가($p<0.01$)하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 또한, 양성 대조군으로 AMPK 활성화제로서 미토콘드리아 생합성 조절을 하는 metformin 처리군에서도 대조군에 비해 증가($p<0.01$)하는 것으로 나타났다.

요약 및 결론

본 연구는 토끼고기 추출물이 골격근 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 세포독성을 평가한 결과, 토끼고기 추출물이 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. 또한, 근육분화에 대한 효과로는 myogenin과 MHC의 발현이 증가하였으며, 에너지 대사에 대한 효과로는 AMPK 및 p-AMPK 단백질 발현이 증가하였으며, 에너지 생산에 대한 효과로는 세포 내 ATP 농도가 증가하였다. 이를 통해, 토끼고기 추출물이 세포독성을 유발하지 않으면서 근육 분화와 에너지 대사를 촉진할 수 있음을 확인하였다. 특히, PGC1 α 및 AMPK 신호 경로의 활성화를 통해 미토콘드리아 생합성과 ATP 생산이 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 토끼고기 추출물이 근육 기능 향상 및 에너지 대사 조절에 유용하게 사용될 가능성을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호:RS-2022-RD010371)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Akiyama M, Mizokami T, Miyamoto S, Ikeda Y. 2022. Kaempferol increases intracellular ATP content in C2C12 myotubes under hypoxic conditions by suppressing the HIF-1 α stabilization and/or by enhancing the mitochondrial complex IV activity. *J Nutr Biochem* 103:108949
- Apata ES, Eniolorunda OO, Amao KE, Okubanjo AO. 2012. Quality evaluation of rabbit meat as affected by different stunning methods. *Int J Agric Sci* 2:54-58
- Ashcroft SP, Bass JJ, Kazi AA, Atherton PJ, Philp A. 2020. The vitamin D receptor regulates mitochondrial function in C2C12 myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 318:C536-C541
- Bianchi M, Petracci M, Cavani C. 2009. The influence of linseed on rabbit meat quality. *World Rabbit Sci* 17:97-107
- Bae IS, Lee JA, Cho SH, Kim HW, Kim Y, Seo K, Cho HW, Lee MY, Chun JL, Kim KH. 2023. Rabbit meat extract induces browning in 3T3-L1 adipocytes via the AMP-activated protein kinase pathway. *Foods* 12:3671
- Brand MD, Orr AL, Perevoshchikova IV, Quinlan CL. 2013. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *Br J Dermatol* 169:1-8
- Cavani C, Petracci M, Trocino A, Xiccato G. 2009. Advances in research on poultry and rabbit meat quality. *Ital J Anim Sci* 8:741-750
- Chen L, Qin Y, Liu B, Gao M, Li A, Li X, Gong G. 2022. PGC-1 α -mediated mitochondrial quality control: Molecular mechanisms and implications for heart failure. *Front Cell Dev Biol* 10:871357
- Das AK, Yang QY, Fu X, Liang JF, Duarte MS, Zhu MJ, Trobridge GD, Du M. 2012. AMP-activated protein kinase stimulates myostatin expression in C2C12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 427:36-40
- Dong H, Tsai SY. 2023. Mitochondrial properties in skeletal muscle fiber. *Cells* 12:2183
- Halling JF, Pilegaard H. 2020. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Appl Physiol Nutr Metab* 45:927-936
- Ircher I, Ljubicic V, Kirwan AF, Hood DA. 2008. AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1 α promoter in skeletal muscle cells. *PLOS ONE* 3:e3614
- Iseki Y, Ono Y, Hibi C, Tanaka S, Takeshita S, Maejima Y, Kurokawa J, Murakawa M, Shimomura K, Sakamoto K. 2021. Opening of intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in C2C12 skeletal muscle cells increases the myotube diameter via the Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 376:454-462
- Je HJ, Kim MG, Cho IH, Kwon HJ. 2019. Induction of myogenic differentiation in myoblasts by electrical stimulation. *J Korean Soc Phys Med* 14:63-70
- Kang I, Chu CT, Kaufman BA. 2018. The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: Emerging evidence and mechanisms. *FEBS Lett* 592:793-811
- Kang SY, Hyun SY, Kwon Y, Park YK, Jung HW. 2019. Effects of chaenomelis fructus extract on the regulation of myoblasts differentiation and the expression of biogenetic factors in C2C12 myotubes. *Korean J Herbol* 34:99-107
- Kim I, Park CH, Jung HY, Jeong J, Hong HU, Kim JB. 2016. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract enhances exercise capacity in mouse model. *Korean J Food Nutr* 29:506-512
- Kim K, Sim MS, Kwak MK, Jang SE, Oh YS. 2022. The effects of *Allomyrina dichotoma* larval extract on palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Nutr Health* 55:462-475
- Kiyama T, Chen CK, Wang SW, Pan P, Ju Z, Wang J, Takada S, Klein WH, Mao CA. 2018. Essential roles of mitochondrial biogenesis regulator Nrf1 in retinal development and homeostasis. *Mol Neurodegener* 13:56
- Kouba M, Benatmane F, Blochet JE, Mourot J. 2008. Effect of a linseed diet on lipid oxidation fatty acid composition of muscle, perirenal fat and raw and cooked rabbit meat. *Meat Sci* 80:829-834
- Kwak HB. 2015. Skeletal muscle mitochondria and insulin resistance: The role of exercise. *Korean J Obes* 24:78-86
- Lee JA, Jung SH, Seol KH, Kim HW, Cho S, Kang SM. 2022. Evaluation of the nutritional composition and quality traits of rabbit meat. *J Korean Soc Food Cult* 37:171-177
- Lee HJ, Kim D, Do K, Yang CB, Jeon SW, Jang A. 2024. Effects of horse meat hydrolysate on oxidative stress, proinflammatory cytokines, and the ubiquitin-proteasomal

- system of C2C12 cells. *Food Sci Anim* 44:132-145
- Lee MS, Kim Y. 2021. Effects of isorhamnetin on the regulation of mitochondrial function in C2C12 muscle cells. *J Nutr Health* 54:335-341
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs [MAFRA]. 2023. 2022 Statistics on Other Livestock. p. 20. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs
- Miller JB. 1990. Myogenic programs of mouse muscle cell lines: Expression of myosin heavy chain isoforms, MyoD1, and myogenin. *J Cell Biol* 111:1149-1159
- Porter GA Jr, Hom J, Hoffman DL, Quintanilla RA, de Mesy Bentley KL, Sheu SS. 2011. Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation. *Prog Pediatr Cardiol* 31:75-81
- Rural Development Administration [RDA]. 2022. 10th Revision Korean Food Composition Table. Rural Development Administration
- Sinha S, Elbaz-Alon Y, Avinoam O. 2022. Ca²⁺ as a coordinator of skeletal muscle differentiation, fusion and contraction. *FEBS J* 289:6531-6542
- Song MY. 2015. Effects of root of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi on myogenesis in C2C12 cells. *J Korean Med Obes Res* 15:38-44
- Valenzuela C, de Romaña DL, Schmiede C, Morales MS, Olivares M, Pizarro F. 2011. Total iron, heme iron, zinc, and copper content in rabbit meat and viscera. *Biol Trace Elem Res* 143:1489-1496
- Yoon BR, Kim YH, Lee JS, Hong HD, Rhee YK, Cho CW, Kim YC, Lee OH. 2013. Protective effect of ferments of hot-water extract mixture from *Rhodiola sachalinensis* and red ginseng on oxidative stress-induced C2C12 myoblast. *Korean J Food Nutr* 26:485-491
- Zhou D, Li XH, Lee SH, Heo G, Cui XS. 2022. Effects of alpha-linolenic acid and essential amino acids on the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. *J Anim Reprod Biotechnol* 37:17-26

Received 28 August, 2024
Revised 10 September, 2024
Accepted 07 October, 2024

유채 품종 및 생육단계별 식물체의 항산화 성분 및 항산화 특성

유경단 · 황엄지 · 박유진 · 정재희 · 안다희 · 김현주* · 송연상** · †우관식***

농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소 농업연구사, *농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부 농업연구사, **농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소 농업연구관, ***농촌진흥청 국립식량과학원 기획조정과 농업연구관

Antioxidant Compounds and Antioxidant Activities of Rapeseed Plants according to Cultivar and Growth Stage

Gyeong-dan Yu, Eom-ji Hwang, You-jin Park, Jae Hee Jeong, Da Hee An, Hyun-Joo Kim*, Yeon-Sang Song** and †Koan Sik Woo***

Researcher, Bioenergy Crop Research Institute, National Institute of Crop Science, RDA, Muan 58545, Korea

*Researcher, Dept. of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 16613, Korea

**Senior Researcher, Bioenergy Crop Research Institute, National Institute of Crop Science, RDA, Muan 58545, Korea

***Senior Researcher, Planning and Coordination Div., National Institute of Crop Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Abstract

This study investigated phenolic compounds and radical scavenging activities of rapeseed plants according to cultivar and growth stage. For 1st, 2nd, and 3rd harvested rapeseed plants, total polyphenol contents were 12.56~15.85, 10.28~13.17, and 9.94~16.01 mg gallic acid equivalents/g sample, respectively; total flavonoid contents were 9.86~11.05, 10.41~13.06, and 8.18~16.64 mg catechin equivalents/g sample, respectively; total chlorophyll contents were 17.26~21.66, 19.31~24.95, and 22.16~38.39 mg/g sample, respectively; and total glucosinolates contents were 31.13~46.22, 28.51~34.72, and 22.18~30.58 mg SE/g sample, respectively. DPPH and ABTS radical scavenging activities of rapeseed plants were 3.26~5.91 and 10.69~17.17 mg trolox equivalents/g sample, respectively. FRAP activities of 1st, 2nd, and 3rd harvested rapeseed plants were 142.88~63.93, 37.97~61.24, and 32.93~52.36 mM/g sample, respectively. Phenolic compounds and radical scavenging activities of rapeseed plants were found to be high in Halla, Yuryeo, and Yeongsan cultivars. Overall, phenolic compounds and radical scavenging activities of rapeseed plants tended to decrease as the harvest time was delayed. These results indicate that more research on functional ingredients and physiological activities of rapeseed plants is needed to diversify their fields of use.

Key words: rapeseed (*Brassica napus* L.) plants, cultivars, growth stages, phenolic compound, antioxidant activity

서론

최근 환경변화로 인한 호흡기 질환, 혈액순환 관련 질환 등이 증가하면서, 건강한 삶을 유지하기 위한 천연소재의 효능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Park 등 2018). 이러한 상황에서 유채는 다양한 활성 물질을 함유하고 있으며, 전 식물체가 식품 원료로 인정받고 있어 그 활용성을 증진하기 위해 식물체의 특성 검정이 필요하다. 유채(*Brassica napus*

L.)는 십자화과의 작물 중 하나로 식용유 생산을 목적으로 재배되고 있으며, 우리나라에서는 경관용으로 많이 재배되고 있다(An 등 2023). 국내에서는 재배 목적에 따라 다양한 유채 품종을 개발하고 있다. 중모7001(cv. Jungmo 7001)은 꽃잎이 크기 때문에 경관용으로 적합하며(Kim 등 2014), 중모7002(cv. Jungmo 7002)는 꽃이 일시적으로 개화하는 특성이 있어 개화 균일도가 좋다고 보고되었다(Kim 등 2015). 유려(cv. Yuryeo) 품종은 올레산의 함량이 74%로 높은 것으로 보

† Corresponding author: Koan Sik Woo, Senior Researcher, Planning and Coordination Div., National Institute of Crop Science, RDA, Wanju 55365, Korea. Tel: +82-63-238-5111, Fax: +82-63-238-5118, E-mail: wooks@korea.kr

고되었으며(Jeong 등 2024), 영산(cv. Yeongsan) 품종은 올레산 함량과 수량성이 높은 것으로 보고되었다(Roh 등 2011). 한라(cv. Halla)와 내한(cv. Naehan) 품종은 올레산과 리놀레산이 80% 이상으로 양질의 지방산을 함유하고 있으며, 탐라(cv. Tamra) 품종은 수량성이 높고 제주와 남부지역에 적합한 품종으로 보고되었다(Rural Development Administration 2008). 또한 목포135호(cv. Mokpo 135)는 현재 육성 중인 계통으로 올레산 함량이 약 67%로 높고 수량성도 우수하다. 그러나 유채 연구는 대부분 종자와 식용유 특성에 집중되어 있어, 다양한 유채 품종의 식물체에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

유채 식물체의 주요성분 중 하나인 glucosinolate는 황(sulfur)을 포함하는 β -D-glucoside로 배추, 양배추, 브로콜리, 콜리플라워 등 십자화과 채소에 함유된 물질이며, 다양한 생리활성을 지닌 것으로 보고되었다(Fenwick 등 1983; Shim 등 1992; Hwang ES 2010). Glucosinolate가 들어있는 채소를 섭취하면 조직이 파괴되면서 조직 내의 효소에 의해 isothiocyanate, nitrile, thiocyanate와 같은 물질로 분해되고 이들 물질에 의해 십자화과 채소 특유의 냄새 및 맛을 낸다고 보고되었다(Fenwick 등 1983; Stoewsand GS 1995). 특히 indole-3-carbinol, sulforaphane, phenylisothiocyanate 등은 항암 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Hwang & Lee 2006; Clarke 등 2008; Hayes 등 2008).

본 연구에서는 유채의 활용성 확대를 위하여 국내에서 육성된 품종의 식물체에 대한 주요 항산화 성분 및 활성을 검정하여, 유채의 이용 분야 다양화를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 유채 품종별 식물체 시험재료 제조

본 연구에 사용한 유채는 한라(*Brassica napus* L. cv. Halla; HL), 중모7001(cv. Jungmo 7001; JM1), 중모7002(cv. Jungmo 7002; JM2), 목포135호(cv. Mokpo 135; M135), 내한(cv. Naehan; NH), 탐라(cv. Tamra; TR), 유려(cv. Yuryeo; YR), 영산(cv. Yeongsan; YS) 품종을 사용하였다. 유채 종자를 2023년 11월 20일 전남 무안 소재의 국립식량과학원 바이오에너지작물연구실 온실에 파종(20×20 cm)하였으며, 2023년 12월 7일에 1차 수확(약 10 cm), 2024년 1월 4일 2차 수확(약 20 cm), 2024년 1월 31일에 3차 수확(약 40 cm)하였다. 수확된 시료는 10개 개체에 대해 지상부의 길이를 측정하였으며, 동결건조(FDTA-5050, Operon, Gimpo, Korea) 및 분쇄(Micro Hammer-Cutter Mill, Cullati MFC grinder CZ 13, Culatti AG, Zurich, Switzerland)하여 분석용 시료로 사용하였다. 동결건조 후 분쇄한 1차, 2차 및 3차 수확 시료의 수분함량을 측정

(MA-100, Sartorius, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co., Goettingen, Germany)한 결과 각각 93.82~95.05, 93.50~94.58 및 90.91~92.36 g/100 g으로 조사되었다. 유채 식물체의 항산화 성분 함량과 항산화활성의 계산은 수분함량을 보정하여 산출하였다.

2. 유채 품종별 식물체의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석

유채 품종별 식물체의 페놀성 화합물 함량 분석을 위해 동결건조한 시료에 80% 에탄올(Daejung Chemical & Metals, Siheung, Korea)을 넣고 homogenizer (HG-15A, Daihan Scientific Co., Ltd., Wonju, Korea)로 균질화하였다. 이후 24시간 동안 상온 진탕추출(Wise-Cube WIS-RL010, Daihan Scientific Co., Ltd.)하고, 4°C, 1,500×g에서 10분간 원심분리(Sorvall ST-40R, Thermo Fisher Scientific)하여 상등액을 취하였다. 3회 반복 추출한 후 합친 시료를 -20°C 냉동고에 보관하며 분석용으로 사용하였다. 추출물에 대한 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Hwang 등(2022)의 방법으로 분석하였다. 총 폴리페놀 함량은 추출물 50 μ L에 2% sodium carbonate (Na_2CO_3 ; Sigma-Aldrich) 용액 1 mL를 가한 후 3분간 방치하고 50% Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich) 50 μ L를 가하였다. 30분 후, 반응액의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 735 nm에서 측정하였다. 표준물질로 gallic acid (Sigma-Aldrich)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 건조 시료 g 중의 mg gallic acid equivalents (GAE, dry basis)로 계산하여 표시하였다. 총 플라보노이드 함량은 추출물 250 μ L에 증류수 1 mL와 5% sodium nitrite(NaNO_2 ; Sigma-Aldrich) 75 μ L를 가한 후, 5분 뒤에 10% aluminum chloride hexahydrate($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich) 150 μ L를 가하여 6분 동안 방치하였다. 이후 1 N sodium hydroxide(NaOH ; Sigma-Aldrich) 500 μ L를 첨가하고 11분 후 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로 catechin(Sigma-Aldrich)을 사용하여 검량선을 작성하였으며, 건조 시료 g당 mg catechin equivalents(CE, dry basis)로 계산하여 표시하였다.

3. 유채 품종별 식물체의 총 chlorophyll 및 glucosinolate 함량 분석

유채 품종별 식물체의 총 chlorophyll 함량은 Woo 등(2009)의 방법에 따라 시료 20 mg을 100% DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5 mL에 침지하여 65°C 항온수조에서 6시간 증탕한 후, 665 nm와 648 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 chlorophyll 함량은 Total chlorophyll = $20.29A_{648} + 8.02A_{665}$ 식을 이용하여 계산하였다. 유채 품종별

식물체의 총 glucosinolate 함량은 80% 에탄올 추출물 100 μ L에 증류수 0.3 mL와 2 mM sodium tetrachloropalladate(58.5 mg sodium tetrachloropalladate + 170 μ L concentrated HCl + 100 mL D.W) 3 mL를 가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 425 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 sinigrin(Sigma-Aldrich)을 사용하여 농도별 표준용액에 대한 흡광도로 표준 검량선을 작성하였으며, 건조 시료 g 중의 mg sinigrin equivalents (SE, dry basis)로 계산하여 표시하였다(Hwang ES 2010).

4. 유채 품종별 식물체의 radical 소거활성 및 FRAP 활성 측정

유채 품종별 식물체의 radical 소거활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich) 및 ABTS(2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, Sigma-Aldrich) radical 소거활성을 측정하였다(Hwang 등 2023). DPPH radical 소거활성은 0.2 mM DPPH 용액(99.9% 에탄올에 용해) 0.8 mL에 시료 추출물 0.2 mL를 첨가한 후, 30분 뒤 520 nm에서 흡광도 감소치를 측정하였으며, trolox(Sigma-Aldrich)를 사용하여 검량식을 작성하여, 건조 시료 g당 mg trolox equivalent antioxidant capacity (TE, dry basis)로 계산하여 표시하였다. ABTS radical 소거활성 측정을 위해 ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate (Sigma-Aldrich) 2.6 mM을 혼합하여 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후, 용액의 흡광도 값이 735 nm에서 1.4~1.5가 되도록 에탄올로 희석하여 사용하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 시료 추출물 50 μ L를 가하고 30분 후에 흡광도의 변화를 측정하였으며, trolox(Sigma-Aldrich)를 사용하여 검량식을 작성하여 건조 시료 g당 mg trolox equivalent antioxidant capacity(TE, dry basis)로 계산하여 표시하였다.

Ferric-reducing antioxidant power(FRAP)는 Han 등(2022)의 방법에 따라 FRAP reagent 0.18 mL에 시료 추출물 0.03 mL, 증류수 0.09 mL를 가하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP reagent는 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6) 2.5 mL를 37°C에서 가온한 후 40 mM HCl로 용해한 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine 2.5 mL와 20 mM iron (III) chloride($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 2.5 mL를 가하여 제조하였다. 표준 물질로 FeSO_4 를 사용하여 활성을 환산하였다.

5. 통계분석

모든 데이터는 3회 반복 측정하였으며, 평균 \pm 표준편차로 제시하였다. 얻어진 결과는 통계프로그램(Statistical Analysis System; version 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 사용하여 one-way ANOVA 분석 후, 신뢰수준 $p < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 통해 유의성을 검정하였으며, 각 분석항목 간의 상관관계도 분석하였다(Park 등 2024). 유채 품종별 항산화 성분 및 항산화활성 측정 결과의 정규화 heatmap은 MetaboAnalyst 5.0(<https://www.metaboanalyst.ca>) 프로그램을 이용하여 품종별 조사항목을 정규화한 후, 군집 분류하여 heatmap을 작성하였다. 정규화 값은 -1.86~2.00의 범위였으며, 각 항목의 수치는 파란색(음수)과 빨간색(양수)의 척도로 나타내었다(Han 등 2022).

결과 및 고찰

1. 유채 품종별 식물체 생육 및 페놀성 화합물 함량

유채의 다양한 활용 가능성을 평가하기 위해 식물체를 재배하고 생육상태를 조사한 결과 Fig. 1과 같이 생육단계에 따

Table 1. The length of rapeseed plants according to different cultivars and growth stages

Cultivars	Length according to growth stages (harvesting times, unit: cm)		
	1 st harvest	2 nd harvest	3 rd harvest
Halla (HL)	9.73 \pm 1.27 ^c	19.00 \pm 1.50 ^c	39.25 \pm 3.25 ^{bc}
Jungmo 7001 (JM1)	11.83 \pm 1.13 ^a	22.28 \pm 1.68 ^{bc}	38.90 \pm 3.94 ^{bc}
Jungmo 7002 (JM2)	11.20 \pm 0.97 ^{ab}	21.53 \pm 1.81 ^{cd}	37.13 \pm 2.91 ^c
Mokpo 135 (M135)	10.45 \pm 0.74 ^{bc}	21.28 \pm 1.91 ^{cd}	41.10 \pm 3.79 ^{ab}
Nachan (NH)	11.20 \pm 1.13 ^{ab}	23.85 \pm 1.51 ^a	42.15 \pm 2.54 ^a
Tamra (TR)	10.13 \pm 2.13 ^c	18.98 \pm 1.79 ^c	37.30 \pm 2.63 ^c
Yuryeo (YR)	11.45 \pm 0.84 ^a	23.30 \pm 1.56 ^{ab}	40.85 \pm 4.10 ^{ab}
Yeongsan (YS)	8.68 \pm 0.87 ^d	20.45 \pm 1.22 ^d	42.75 \pm 3.05 ^a

All values are expressed as the mean \pm S.D. of twenty measurements. Means with different letters within a column (^{a-c}) are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range test.

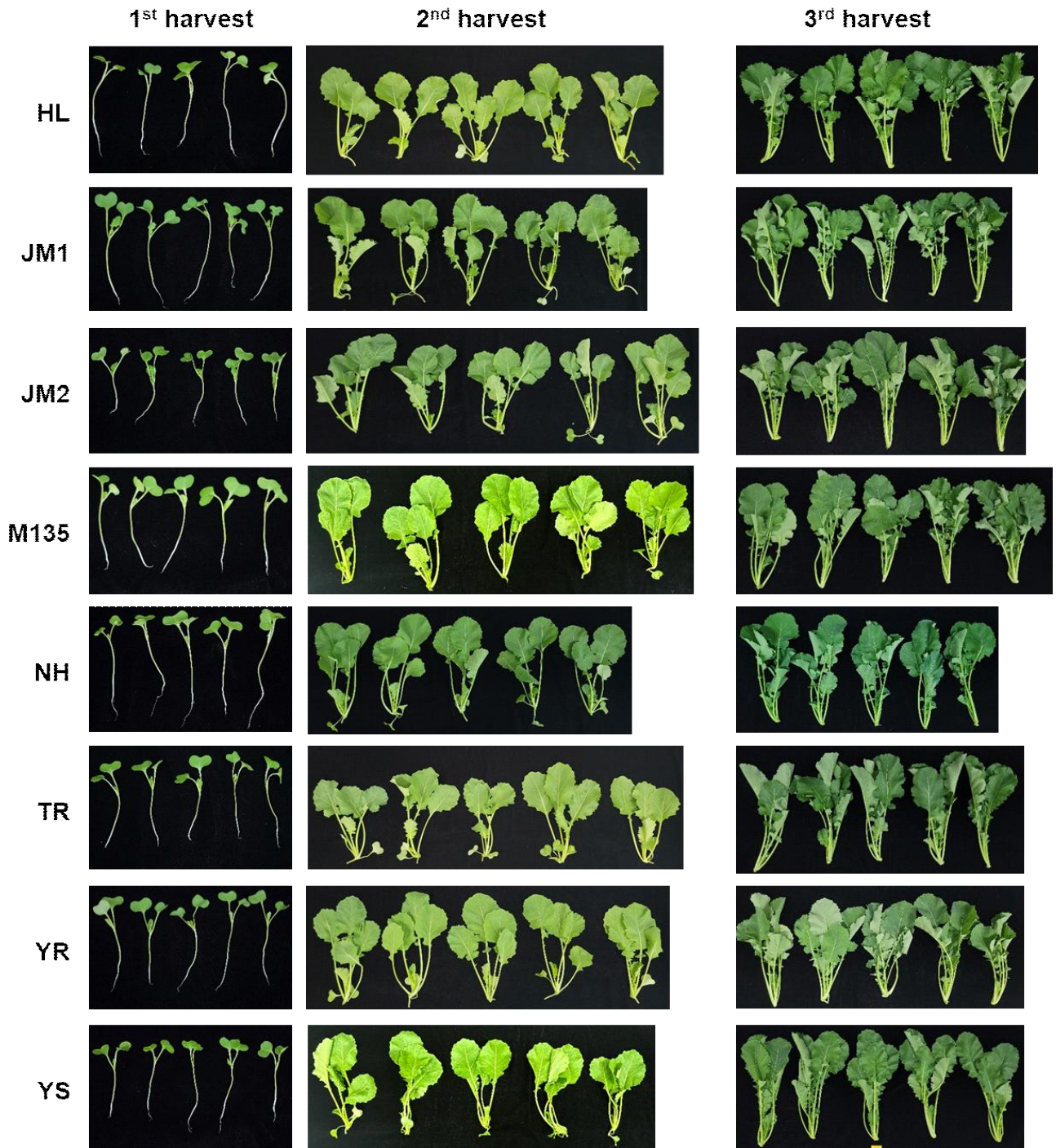


Fig. 1. Photograph of rapeseed plants according to different cultivars and growth stages. HL: *Brassica napus* L. cv. Halla, JM1: cv. Jungmo 7001, JM2: cv. Jungmo 7002, M135: cv. Mokpo 135, NH: cv. Naehan, TR: cv. Tamra, YR: cv. Yuryeo, YS: cv. Yeongsan.

라 품종 간에 생육량의 차이를 보이는 것으로 나타났다. 1차 (약 10 cm), 2차(약 20 cm) 및 3차(약 40 cm) 수확시기에 따른 식물체 크기를 조사한 결과 Table 1과 같이 품종 간에 차이를

보였다. 특히, 식물체 이용성을 고려하여 2차 및 3차 수확한 시료의 생육 정도를 분석한 결과, 내한(NH)과 유려(YR) 품종이 다른 품종에 비해 생육 정도가 유의하게 높은 것을 확인

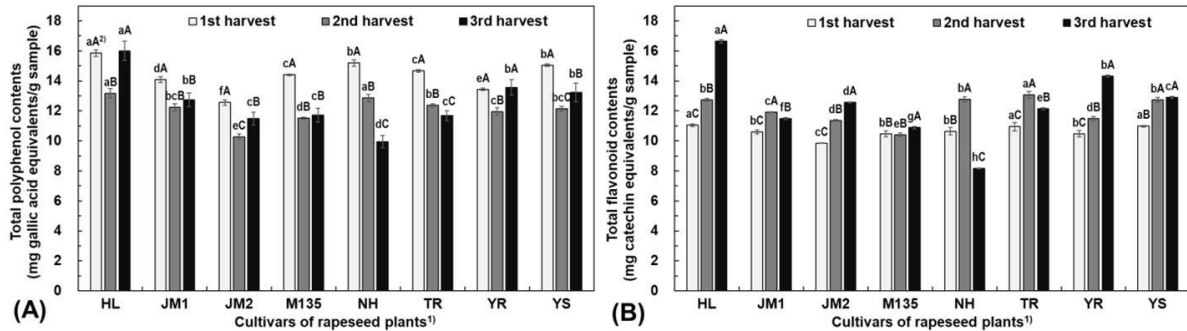


Fig. 2. Total polyphenol (A) and flavonoid (B) contents of rapeseed plants according to different cultivars and growth stages. ¹⁾ HL: *Brassica napus* L. cv. Halla, JM1: cv. Jungmo 7001, JM2: cv. Jungmo 7002, M135: cv. Mokpo 135, NH: cv. Naehan, TR: cv. Tamra, YR: cv. Yuryeo, YS: cv. Yeongsan. ²⁾ All values are expressed as the mean±S.D. of triplicate determinations. Means with different letters within a column (^{a-h} different cultivars or ^{A-C} growth stages) are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range test.

하였다.

유채 품종별로 식물체의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과 Fig. 2에서와 같이 유의한 차이가 나타났다 ($p < 0.05$). 식물성 페놀성 화합물은 phenolic hydroxyl 그룹을 가지고 있어 높은 항산화활성을 나타낸다(Woo 등 2013). 유채 품종 및 생육단계별 총 폴리페놀 함량(Fig. 2A)은 유의한 차이를 보였으며($p < 0.05$), 품종별로 1차, 2차 및 3차 수확한 식물체의 총 폴리페놀 함량은 각각 12.56~15.85, 10.28~13.17 및 9.94~16.01 mg GAE/g sample로 나타났다. 특히 한라(HL) 품종은 각각 15.85, 13.17 및 16.01 mg GAE/g sample로 다른 품종에 비해 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 특히 품종에 따라 차이는 있으나 대부분 1차 수확이 2차 수확보다 유의미하게 높았고, 3차 수확에서 다시 증가하는 경향을 보였다. 식물의 초기 생육단계에서는 외부 스트레스에 대한 방어가 매우 중요하기 때문에 방어 물질로서 폴리페놀이 활발하게 합성된다고 알려져 있다(Rice-Evans 등 1997). 이는 어린 식물이 충분히 발달하지 않은 상태에서 외부 환경으로부터 더 많은 방어가 필요하기 때문으로 생각되며, 본 연구에서 1차 수확이 2차 수확보다 유의미하게 높았던 결과와도 일치한다. 이러한 결과는 유채 식물체의 항산화 성분 함량을 최적화하기 위해서는 품종 및 수확시기의 선택이 중요하다는 것을 시사한다. 다른 십자화과 작물의 연구 결과에 따르면 브로콜리의 경우, 풍부한 황 비료와 더 긴 햇빛 노출이 일반적으로 더 높은 페놀 화합물 농도를 유도한다고 보고되었다(Vallejo 등 2003). Tronchuda 양배추의 경우, 8월 포장에 이식된 후 첫 번째 수확시기인 11월 중순에서 모든 내엽의 개별 페놀 화합물인 3-*p*-coumaroylquinic acid와 4-*p*-coumaroylquinic acid의 농도가 유의미하게 높았지만, 11월 중순, 12월 중순, 1월 중순

의 수확시기에 따라 총 페놀 함량에서는 유의한 차이가 없었다고 보고되었다(Sousa 등 2008). 봄에 파종된 녹양배추의 외엽 부위는 가을 파종된 녹양배추의 외엽 부위보다 페놀산이 유의미하게 더 높은 수준으로 존재했고, 적양배추의 경우 외엽 부위에서 페놀산 함량이 더 높았지만, 계절적 요인은 유의미하지 않아 품종, 재배 환경에 따른 페놀산 함량이 차이가 있는 것으로 보고되었다(Park 등 2014). 또한 배추 4품종을 수확 후 4°C와 20°C에서 6일 동안 저장한 결과, 페놀 함량이 증가하였다고 보고되었다(Harbaum 등 2008).

유채 품종 및 생육단계별 총 플라보노이드 함량(Fig. 2B)은 생육단계가 진행될수록 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며($p < 0.05$), 1차, 2차 및 3차 수확한 시료에서 각각 9.86~11.05, 10.41~13.06 및 8.18~16.64 mg CE/g sample로 나타났다. 특히 3차 수확한 한라(HL)와 유려(YR) 품종이 각각 16.64 및 14.32 mg CE/g sample로 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다. 천연 페놀성 화합물은 항산화 활성뿐만 아니라, 그 구조에 따라 항균성과 같은 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있으며(Middleton E 1994; Woo 등 2021), 그 중 플라보노이드는 식물에서 자외선 차단, 스트레스 보호, 생리적 기능 강화에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Samanta 등 2011). 이번 연구 결과는 식물이 성숙하면서 환경 스트레스에 대한 방어 기작이 강화되어 플라보노이드의 합성이 촉진된다는 점으로 해석될 수 있으며, 십자화과 작물 중 하나인 배추에서 어린잎보다 성숙 잎에서 플라보노이드 함량이 더 높았다는 연구 결과와도 일치한다(Šola 등 2020). 브로콜리와 콜리플라워의 경우, 총 플라보노이드 함량은 꽃 부위보다 잎 부위에서 유의하게 높으며(Bhandari & Kwak 2015), 청경채와 잎겨자에서 hydroxycinnamic acid와 플라보노이드, 결합형 페

놀 화합물은 잎자루보다 잎에 더 많이 존재한다고 보고되었다(Harbaum 등 2008). 또한, 순무의 경우, 페놀화합물 함량이 잎에서 51.71 $\mu\text{mol/g}$ 으로 어린 싹에서의 38.99 $\mu\text{mol/g}$ 보다 더 높았으며, 플라보놀 화합물이 주요성분이라고 보고되었다(Francisco 등 2009). 이러한 결과는 본 연구에서 관찰된 식물체의 생육단계가 진행됨에 따라 플라보노이드 함량이 유의하게 증가하는 경향과 일치하며, 유채의 주요 유용성분에 대한 수확시기와 재배환경의 영향에 관한 추가적인 연구가 필요함을 시사한다.

2. 유채 품종별 식물체의 총 chlorophyll 및 glucosinolate 함량

유채 품종별 식물체의 총 chlorophyll 함량을 측정한 결과 Fig. 3A와 같이 품종 및 생육단계에 따라 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 전체적으로 수확시기가 늦을수록 엽록소 함량이 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며($p < 0.05$), 1차, 2차 및 3차 수확한 시료에서 각각 17.26~21.66, 19.31~24.95 및 22.16~38.39 mg/g sample로 조사되었다. 특히 한라(HL), 중모 7001(JM1), 중모 7002(JM2), 유려(YR), 영산(YS) 품종이 3차 수확 시 높은 함량을 나타내었으며, 3차 수확한 한라 품종의 총 chlorophyll 함량은 38.39 mg/g sample로 가장 높은 값을 보였다. 중모 7002(36.31 mg/g sample)와 유려(34.89 mg/g sample) 품종 또한 높은 함량을 보였다.

유채 품종별 식물체의 총 glucosinolate 함량을 측정한 결과, Fig. 3B와 같이 품종 및 생육단계에 따라 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 전체적으로 수확시기가 늦어짐에 따라 총 glucosinolate 함량은 감소하는 경향을 보였으며, 1차, 2차, 3차 수확 시료에서 각각 31.13~46.22, 28.51~34.72 및 22.18~

30.58 mg SE/g sample로 나타나 1차 수확한 시료에서 높은 함량을 보였다. 십자화과 채소에 함유된 glucosinolate는 섭취 시 조직이 파괴되면 효소에 의해 분해되어, 십자화과 채소 특유의 냄새와 맛을 낸다(Fenwick 등 1983; Stoewsand GS 1995). 품종별로는 1차 수확한 한라(HL) 품종이 46.22 mg SE/g sample로 가장 높았으며, 2차 수확한 중모 7001(JM1)과 한라(HL) 품종이 각각 34.72 및 34.38 mg SE/g sample, 3차 수확한 영산(YS) 품종과 중모 7001(JM1)이 각각 30.58 및 30.28 mg SE/g sample로 조사되었다. 브로콜리와 콜리플라워 6품종의 경우, 잎 부위보다 꽃 부위에서 글루코시놀레이트 함량이 유의하게 높았다고 보고되었다(Bhandari & Kwak 2015). 순무에서는 글루코시놀레이트 함량이 잎에서 26.84 $\mu\text{mol/g}$, 어린 싹에서 29.11 $\mu\text{mol/g}$ 으로 나타났으며, 그중 글루코나핀(gluconapin) 함량이 23.2 $\mu\text{mol/g}$ 으로 주요 글루코시놀레이트로 확인되었다(Francisco 등 2009). 이러한 결과는 본 연구에서 1차 수확 단계인 새싹에서 가장 높은 글루코시놀레이트 함량을 보인 것과 동일한 경향이었다. 이외에도 순무(*Brassica rapa* ssp. *rapa*)의 형질전환체에서는 털부리의 글루코시놀레이트와 페놀화합물의 함량이 증가함에 따라 항산화, 항균 및 항암 활성이 높아졌다고 보고된 바 있다(Chung 등 2016).

3. 유채 품종별 식물체의 radical 소거활성 및 FRAP 활성

식물 유래 천연 추출물은 인체 내 활성 radical에 의한 노화를 억제하여 만성 염증, 암 등 질병과 노화 예방에 도움을 주며(Bystrom 등 2014; Kim 등 2018; Hwang 등 2023), 페놀성 화합물 함량이 높을수록 항산화성이 높다고 보고되었다(Duval & Shetty 2001). 항산화 성분에 의한 전자공여능을 측

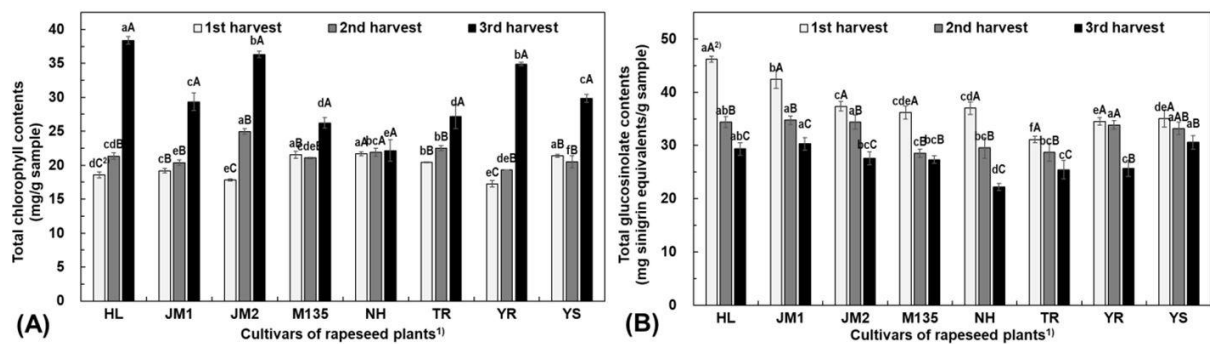


Fig. 3. Total chlorophyll (A) and glucosinolate (B) contents of rapeseed plants according to different cultivars and growth stages. ¹⁾ HL: *Brassica napus* L. cv. Halla, JM1: cv. Jungmo 7001, JM2: cv. Jungmo 7002, M135: cv. Mokpo 135, NH: cv. Naehan, TR: cv. Tamra, YR: cv. Yuryeo, YS: cv. Yeongsan. ²⁾ All values are expressed as the mean \pm S.D. of triplicate determinations. Means with different letters within a column (^{a-f} different cultivars or ^{A-C} growth stages) are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range test.

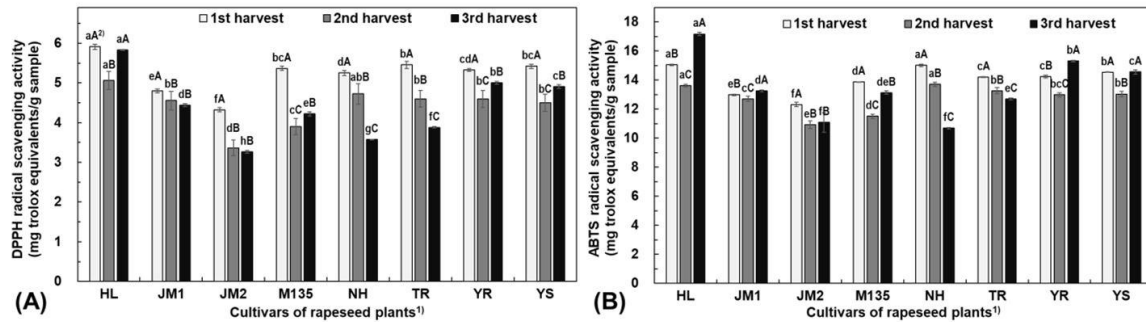


Fig. 4. DPPH radical (A) and ABTS radical scavenging activities of rapeseed plants according to different cultivars and growth stages. ¹⁾ HL: *Brassica napus* L. cv. Halla, JM1: cv. Jungmo 7001, JM2: cv. Jungmo 7002, M135: cv. Mokpo 135, NH: cv. Naehan, TR: cv. Tamra, YR: cv. Yuryeo, YS: cv. Yeongsan. ²⁾ All values are expressed as the mean \pm S.D. of triplicate determinations. Means with different letters within a column (^{a-h} different cultivars or ^{A-C} growth stages) are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range test.

정하는 방법(Moreno 등 2000)으로 유채 품종별 식물체의 DPPH radical 소거활성을 측정된 결과, Fig. 4A와 같이 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 수확시기에 따라 1차, 2차 및 3차 수확한 시료 추출물에서 각각 4.32~5.91, 3.37~5.06 및 3.26~5.83 mg TE/g sample로 나타났으며, 전체적으로 1차 수확한 시료에서 높은 활성을 보였다. 품종에 따라서는 1차, 2차 및 3차 수확한 한라(HL) 품종이 각각 5.91, 5.06 및 5.83 mg TE/g sample로 높은 활성을 나타냈으며, 1차 수확한 탐라(TR), 영산(YS), 목포135호(M135), 유려(YR) 품종도 각각 5.46, 5.42, 5.36 및 5.32 mg TE/g sample로 비교적 높은 활성을 보였다.

항산화성을 가지는 물질에 의해 ABTS radical이 억제되는 성질을 이용한 방법(Kim 등 2009)으로 유채 품종별 식물체 추출물의 radical 소거활성을 측정된 결과 Fig. 4B와 같이 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 1차, 2차 및 3차 수확시기에 따른 추출물의 ABTS radical 소거활성은 각각 12.31~15.04, 10.92~13.70 및 10.69~17.17 mg TE/g sample로 나타났으며, 품종별로 차이는 있었으나 전체적으로 1차와 3차 수확 시료에서 높은 활성을 보였다. 품종에 따라서는 3차 수확한 한라(HL), 영산(YS), 유려(YR) 품종이 각각 17.17, 15.31 및 14.56 mg TE/g sample로 활성이 높게 나타났으며, 1차 수확한 한라, 내한, 영산, 유려, 탐라 품종도 각각 15.04, 15.02, 14.55, 14.23 및 14.21 mg TE/g sample로 비교적 높은 활성을 보였다. 유채 종자를 파종하여 자엽이 확장될 때까지 NaCl 농도에 따라 배양한 결과, 중간 정도의 염분(25~50 mM NaCl) 조건에서 재배한 식물체의 페놀 함량과 항산화 활성이 가장 높았다는 연구 결과(Falcinelli 등 2017)와 양배추의 경우 유기농법으로 생산된 잎이 전통적 재배 방법으로 생산된 잎보다 총 페놀 함

량이 더 높았다는 연구 결과(Ferreres 등 2005)는 적절한 스트레스 조건이 항산화물질의 합성을 촉진할 수 있음을 시사한다. 향후 유채 식물체의 페놀 성분 등을 기능성 소재로 활용하기 위해서는 다양한 환경 요인에 따른 반응을 평가하고, 최적의 재배 환경 조건을 구명하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

FRAP 활성은 낮은 pH 조건에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용하여 활성을 측정하는 방법으로, 혈장의 항산화제 농도 의존적으로 FRAP 값이 증

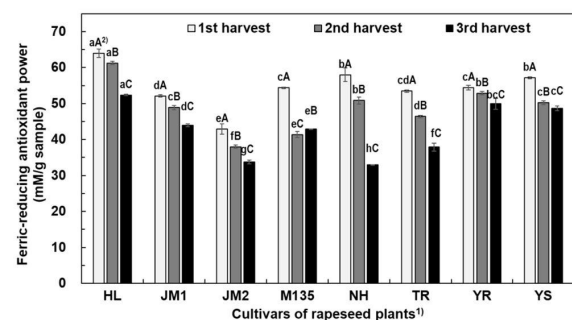


Fig. 5. Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) of rapeseed plants according to different cultivars and growth stages. ¹⁾ HL: *Brassica napus* L. cv. Halla, JM1: cv. Jungmo 7001, JM2: cv. Jungmo 7002, M135: cv. Mokpo 135, NH: cv. Naehan, TR: cv. Tamra, YR: cv. Yuryeo, YS: cv. Yeongsan. ²⁾ All values are expressed as the mean \pm SD of triplicate determinations. Means with different letters within a column (^{a-h} different cultivars or ^{A-C} growth stages) are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range test.

Table 2. Correlation coefficients among antioxidant compounds and antioxidant activities of rapeseed plants according to different cultivars and growth stages

Factor	Flavonoid	Chlorophyll	Glucosinolate	DPPH	ABTS	FRAP
Polyphenol	0.2947	0.0080	0.5358**	0.9292***	0.8804***	0.8162***
Flavonoid	1.0000	0.6809***	-0.2114	0.2701	0.5569**	0.1738
Chlorophyll	-	1.0000	-0.5457**	-0.1469	0.2243	-0.3498
Glucosinolate	-	-	1.0000	0.4964*	0.2383	0.6633***
DPPH	-	-	-	1.0000	0.9025***	0.9058***
ABTS	-	-	-	-	1.0000	0.7404***

Significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

가하는 특징이 있어 총 항산화활성을 직접적으로 측정할 수 있다고 보고되어 있다(Moon 등 2003; Lee 등 2021). 유채 품종별 식물체 추출물의 FRAP 활성을 측정한 결과, Fig. 5와 같이 품종 및 생육단계에 따라 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 수확시기에 따라 1차, 2차 및 3차 수확한 시료 추출물에서 각각 42.88~63.93, 37.97~61.24 및 32.93~52.36 mM/g sample로 나타났으며, 전체적으로 수확시기가 늦어질수록 활성이 감소하는 경향을 보였다. 품종에 따라서는 한라(HL) 품종이 1차, 2차 및 3차 수확에서 각각 63.93, 61.24 및 52.36 mM/g sample로 높은 활성을 나타냈었다. 또한 1차 수확한 내

한(NH), 영산(YS), 유려(YR) 품종도 각각 57.99, 57.13 및 54.46 mM/g sample로 비교적 높은 활성을 보였다.

유채 식물체 추출물의 주요 항산화물질인 폴리페놀 함량과 DPPH와 ABTS radical 소거활성 및 FRAP 활성 간의 상관관계를 분석한 결과, Table 2와 같이 상관계수(r)는 각각 0.9292, 0.8804 및 0.8162로 항산화 활성과 총 폴리페놀 함량 간 높은 양의 상관관계($p < 0.001$)를 보였다. 브로콜리와 콜리플라워 품종의 연구에서도 DPPH radical 소거 활성은 총 페놀($r = 0.698^{**}$) 및 플라보노이드 함량($r = 0.456^{**}$) 함량과 유의한 양의 상관관계를 보이는 것으로 보고하였고(Bhandari & Kwak 2015), 콜리플라워 부산물 추출물에서 페놀 함량과 radical 소거 활성, FRAP 활성이 선형적인 상관관계를 보이는 것으로 보고하였다(Llorach 등 2003). 유채 식물체 추출물의 항산화 활성은 함유된 총 폴리페놀 함량에 비례된 것으로 보인다. 이러한 결과는 10개의 유채(*Brassica napus* L.) 품종의 탈지 박을 대상으로 한 연구에서, 총 페놀 함량이 항산화 활성과 높은 상관관계를 보였다고 보고된 결과와 유사하였다(Zhang 등 2019). 본 연구의 heatmap 분석 결과, 한라(HL) 품종이 높은 총 페놀성 화합물 함량과 항산화 활성으로 특징적으로 분류됨을 확인했으며(Fig. 6), 이를 통해 한라(HL) 품종의 높은 항산화성을 기능성 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

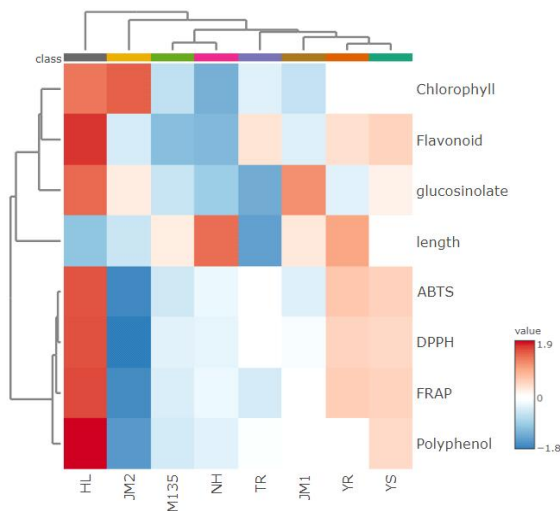


Fig. 6. Normalized response of antioxidant compounds and antioxidant activities from various cultivars of rapeseed plants.

The level of individual parameters corresponds to the color scale. A color gradient from blue (-1.86) to red (2.00) represents a low to high level of the normalized response. HL: *Brassica napus* L. cv. Halla, JM1: cv. Jungmo 7001, JM2: cv. Jungmo 7002, M135: cv. Mokpo 135, NH: cv. Naehan, TR: cv. Tamra, YR: cv. Yuryeo, YS: cv. Yeongsan.

요약 및 결론

유채의 활용성 증진을 위해 국내에서 육성된 품종의 식물체에 대한 주요 항산화 성분 및 활성을 검정하였다. 품종은 한라, 중모7001, 중모7002, 목포135호, 내한, 탐라, 유려, 영산 품종을 사용하였으며, 수확시기는 1차(약 10 cm), 2차(약 20 cm) 및 3차로 수확(약 40 cm)하여 조사하였다. 1차, 2차 및 3차 수확한 식물체의 총 폴리페놀 함량은 각각 12.56~15.85, 10.28~13.17 및 9.94~16.01 mg GAE/g sample이었으며, 총 플

라보노이드 함량은 각각 9.86~11.05, 10.41~13.06 및 8.18~16.64 mg CE/g sample로 나타났다. 총 chlorophyll 함량은 수확시기가 진전됨에 따라 유의적으로 증가하였으며, 1차, 2차 및 3차 수확한 시료에서 각각 17.26~21.66, 19.31~24.95 및 22.16~38.39 mg/g sample로 조사되었다. 총 glucosinolate 함량은 수확시기가 진전됨에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 1차, 2차 및 3차 수확한 시료에서 각각 31.13~46.22, 28.51~34.72 및 22.18~30.58 mg SE/g sample로 나타났다. DPPH radical 소거활성은 1차, 2차 및 3차 수확한 시료에서 각각 4.32~5.91, 3.37~5.06 및 3.26~5.83 mg TE/g sample로 나타났으며, 전체적으로 1차 수확한 시료에서 높은 활성을 보였다. FRAP 활성은 각각 42.88~63.93, 37.97~61.24 및 32.93~52.36 mM/g sample로 나타났으며, 전체적으로 수확시기가 진전됨에 따라 감소하는 경향을 보였다. 전체적으로 한라(HL) 품종이 높은 총 페놀성 화합물 함량과 항산화활성을 가지는 것으로 확인되었으며, 이를 기능성 소재로 활용할 가능성이 있다고 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 시험연구사업(과제번호: PJ017422 042024)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- An DH, Yu GD, Kim KS, Cha YL, Jeong JH, Choi JB, Woo KS, Hwang EJ, Park YJ. 2023. Quality characteristics of rapeseed oils according to different roasting temperatures. *Korean J Food Nutr* 36:479-488
- Bhandari SR, Kwak JH. 2015. Chemical composition and antioxidant activity in different tissues of *Brassica* vegetables. *Molecules* 20:1228-1243
- Bystrom LM, Guzman ML, Rivella S. 2014. Iron and reactive Oxygen species: Friends or foes of cancer cells? *Antioxid Redox Signaling* 20:1917-1924
- Chung IM, Rekha K, Rajakumar G, Thiruvengadam M. 2016. Production of glucosinolates, phenolic compounds and associated gene expression profiles of hairy root cultures in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). *3 Biotech* 6:175
- Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. 2008. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett* 269:291-304
- Duval B, Shetty K. 2001. The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed andise root extract. *J Food Biochem* 25:361-377
- Falcinelli B, Sileoni V, Marconi O, Perretti G, Quinet M, Lutts S, Benincasa P. 2017. Germination under moderate salinity increases phenolic content and antioxidant activity in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera* Del.) sprouts. *Molecules* 22:1377
- Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 18:123-201
- Ferreres F, Valentão P, Llorach R, Pinheiro C, Cardoso L, Pereira JA, Sousa C, Seabra RM, Andrade PB. 2005. Phenolic compounds in external leaves of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *J Agric Food Chem* 53:2901-2907
- Francisco M, Moreno DA, Cartea ME, Ferreres F, García-Viguera C, Velasco P. 2009. Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassica rapa*. *J Chromatogr A* 1216:6611-6619
- Han N, Woo KS, Lee JY, Song SB, Lee YY, Kim M, Kang MS, Kim HJ. 2022. Comparison of physicochemical characteristics, functional compounds, and physiological activities in adzuki bean cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51:428-438
- Harbaum B, Hubbermann EM, Zhu Z, Schwarz K. 2008. Free and bound phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) and Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* Coss). *Food Chem* 110:838-846
- Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM. 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr* 47:73-88
- Hwang EJ, Kim S, Kim HJ, Jeong J, Lee YH, Ha TJ, Woo KS. 2022. Quality and antioxidant characteristics according to different harvest periods and steaming treatment of apios (*Apios americana* Medikus) cultivated in Korea. *Korean J Food Nutr* 35:445-452
- Hwang EJ, Kim TH, Park W, Lee KH, Nam SS, Park YJ, Kim S, Lee HU, Chung MN, Ha TJ, Woo KS. 2023. Antioxidant characteristics of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) according to different plant parts and drying methods. *Korean J Food Nutr* 36:327-333
- Hwang ES. 2010. Changes in myrosinase activity and total glucosinolate levels in Korean Chinese cabbages by salting

- conditions. *Korean J Food Cookery Sci* 26:104-109
- Hwang ES, Lee HJ. 2006. Phenylethyl isothiocyanate and its *N*-acetylcysteine conjugate suppress the metastasis of SK-Hep1 human hepatoma cells. *J Nutr Biochem* 17:837-846
- Jeong J, An DH, Cha YL, Choi JB, Kim SY, Kim KS. 2024. ‘Yuryeo’: A rapeseed with high oleic acid, resistant to Sclerotinia stem rot and lodging. *Korean J Breed Sci* 56:53-61
- Kim HJ, Lee JH, Lee BW, Lee YY, Jeon YH, Lee BK, Woo KS. 2018. Quality and physicochemical characteristics of the Korean cowpea cultivars grown in different seeding periods. *Korean J Food Nutr* 31:502-510
- Kim JE, Joo SI, Seo JH, Lee SP. 2009. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:989-995
- Kim KS, Jang YS, Lee YH, Kim CW, Choi KH, Kang DS, Kim ST, Choi IH. 2014. A rapeseed intermediate parent ‘Jungmo 7001’ with wide adaptable and large flower. *Korean J Breed Sci* 46:302-306
- Kim KS, Jang YS, Lee YH, Seo TC, Choi KH, Kang DS, Kim ST, Lee KB. 2015. A rapeseed intermediate parent ‘Jungmo 7002’ with flowering uniformity and lodging tolerance. *Korean J Breed Sci* 47:276-280
- Lee JY, Woo KS, Seo JH, Lee YY, Lee BW, Kim MH, Kang MS, Kim HJ. 2021. Physicochemical qualities and physiological activities of black soybeans by cultivation area and cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 50:29-35
- Llorach R, Espín JC, Tomás-Barberán FA, Ferreres F. 2003. Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by-products as a source of antioxidant phenolics. *J Agric Food Chem* 51:2181-2187
- Middleton E. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol* 48:115-119
- Moon GS, Kwon TW, Ryu SH. 2003. Comparison of antioxidative activities of soybean components by different assays. *Korean Soybean Dig* 20:28-36
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-savenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71:109-114
- Park BH, Koh KM, Jeon ER. 2018. Quality characteristics of wet noodles added with sword bean powder. *J Korean Soc Food Cult* 33:374-381
- Park S, Arasu MV, Jiang N, Choi SH, Lim YP, Park JT, Al-Dhabi NA, Kim SJ. 2014. Metabolite profiling of phenolics, anthocyanins and flavonols in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Ind Crops Prod* 60:8-14
- Park YJ, Hwang EJ, Yu GD, Woo KS. 2024. Quality characteristics and antioxidant characteristics of sword bean tea distributed in domestic markets. *Korean J Food Nutr* 37:100-109
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2:152-159
- Roh KH, Kwak BK, Kim HU, Lee KR, Kim SH, Suh MC, Kim H, Kim JB. 2011. Production of transgenic plants in *Brassica napus* winter cultivar ‘Youngsan’. *J Appl Biol Chem* 54:26-32
- Rural Development Administration. 2008. Standard Farming Textbook-167. Rapeseed Cultivation. pp.52-69. Rural Development Administration
- Samanta A, Das G, Das SK. 2011. Roles of flavonoids in plants. *Int J Pharm Sci Tech* 6:12-35
- Shim KH, Sung NK, Kang KS, Ahn CW, Seo KI. 1992. Analysis of glucosinolates and the change of contents during processing and storage in *Cruciferous* vegetables. *J Korean Soc Food Nutr* 21:43-48
- Šola I, Vujčić Bok V, Dujmović M, Rusak G. 2020. Developmentally-related changes in phenolic and *L*-ascorbic acid content and antioxidant capacity of Chinese cabbage sprouts. *J Food Sci Technol* 57:702-712
- Sousa C, Pereira DM, Pereira JA, Bento A, Rodrigues MA, Dopico-García S, Valentão P, Lopes G, Ferreres F, Seabra RM, Andrade PB. 2008. Multivariate analysis of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) phenolics: Influence of fertilizers. *J Agric Food Chem* 56:2231-2239
- Stoewsand GS. 1995. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables: A review. *Food Chem Toxicol* 33:537-543
- Vallejo F, Tomás-Barberán FA, García-Viguera C. 2003. Effect of climatic and sulfur fertilisation conditions, on phenolic compounds and vitamin C, in the inflorescences of eight broccoli cultivars. *Eur Food Res Technol* 216:395-401
- Woo KS, Bae HH, Jung GH, Son BY, Kim HJ. 2021. Quality and physicochemical characteristics of Korean maize hybrids according to the seed and pollen parent. *Korean J*

Food Nutr 34:407-414

Woo KS, Ko JY, Kim HY, Lee YH, Jeong HS. 2013. Changes in quality characteristics and chemical components of sweet potatoes cultivated using different methods. *Korean J Food Sci Technol* 45:305-311

Woo KS, Song SB, Oh BG, Seo MC, Ko JY, Lee JS, Kang JR, Nam MH, Jeong HS. 2009. Antioxidant activity of ethanol extraction from horseweed (*Erigeron canadensis* L.) with pretreatment conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr*

38:1279-1283

Zhang M, Zheng C, Yang M, Zhou Q, Li W, Liu C, Huang F. 2019. Primary metabolites and polyphenols in rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars in China. *J Am Oil Chem Soc* 96:303-317

Received 03 September, 2024

Revised 13 September, 2024

Accepted 07 October, 2024

흑후추에서 분리한 글루칸형 다당류가 대식세포 자극 활성화에 미치는 영향

김다은 · 신현영* · 정원비 · 김효원 · 문수민 · 신광순** · †유광원***

국립한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, *고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템 융합전공 대학원생,
경기대학교 식품생물공학과 교수, *국립한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Effects of Glucan-type Polysaccharides from Black Pepper (*Piper nigrum*) on Macrophage Stimulating Activity

Da Eun Kim, Hyun Young Shin*, Won Bi Jeong, Hyo Won Kim,
Su Min Moon, Kwang-Soon Shin** and †Kwang-Won Yu***

Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea
*Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health Systems, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Korea
**Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea
***Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

To utilize pepper (*Piper nigrum*) as an immunostimulatory agent, we isolated macrophage stimulating polysaccharides from pepper and investigated their macrophage activating activities. Hot-water extracts (HW) of black pepper (BP) and white pepper (WP) were prepared, and their macrophage stimulating activities were evaluated using RAW 264.7 cells. BP-HW significantly promoted the secretion of macrophage stimulating factors such as nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, and IL-12 compared to WP-HW. When BP and WP-HW were fractionated into crude polysaccharides (CP) and low molecules (LM) by ethanol precipitation, BP-CP demonstrated significantly more potent activity. Furthermore, BP-CP not only induced mRNA gene expression of macrophage activation factors, but also promoted nuclear localization of p65 and c-Jun. In addition, component sugar analysis revealed that glucan-type polysaccharides in BP-CP played a crucial role in macrophage activation. Taken together, these findings suggest that black pepper has industrial applicability not only as a spice, but also as an immunostimulatory functional material.

Key words: *Piper nigrum*, black and white pepper, macrophage, crude polysaccharide, glucan

서 론

면역은 병원체나 외부 이물질에 대한 생체 내 방어 수단으로, 외부로부터 감염을 방어하는 데 특화된 세포와 분자로 이루어진 복잡한 조직망을 의미한다. 인간의 면역 체계는 주로 선천면역과 후천면역으로 구분되며, 선천면역은 비특이적이고 즉각적인 반응을 통해 인체의 방어 작용의 첫 번째 단계에서 병원체를 인식하고 제거하는 역할을 한다(Turvey

& Broide 2010). 이러한 반응은 호중구(neutrophils) 및 단핵구(monocytes)와 같은 식세포(phagocytes), 보체(complements) 및 사이토카인(cytokines)과 같은 다양한 요소들의 상호작용에 의해 이루어진다(Parkin & Cohen 2001). 이 중 대식세포(macrophages)는 대표적인 식세포로서 병원체를 탐식하여 제거하는 중요한 역할을 한다. 대식세포는 다양한 수용체를 통해 병원체를 인식하고 이에 대해 반응하며, 특히 패턴인식수용체(pattern recognition receptor; PRR)를 통해 병원체 관련 분

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

자 패턴(pathogen-associated molecular pattern; PAMP)을 감지한다(Akira 등 2001). PPR 중 하나인 톨 유사 수용체(toll-like receptor; TLR)에 항원이 결합하면 nuclear factor(NF)- κ B 및 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로가 활성화되어 산화질소(nitric oxide; NO)(Aktan F 2004), tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-6 및 IL-12와 같은 사이토카인의 발현을 촉진하고 다양한 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(Kawai & Akira 2007). 또한, 대식세포는 항원을 처리하고 제시하여 T 세포를 활성화하며(Guerrero JL 2019), 선천 면역과 후천 면역을 연결하는 중요한 매개체 역할을 하여(Navegantes 등 2017) 병원체를 효과적으로 제거하고 면역 체계를 유지한다.

한편, 향신료로 주로 이용되는 후추(*Piper nigrum*)는 인도 케랄라(Kerala)주의 말라바(Malabar) 지역을 원산지로 한 다년생 덩굴식물이다. 후추는 가공 방법에 따라 여러 이름으로 불리며, 후추 열매를 건조하면 흑후추, 후추의 껍질을 제거한 후 건조하면 백후추라 불리는 것으로 알려져 있다. 후추에는 알칼로이드 계열의 차비신(chavicine)과 피페린(piperine)과 같은 다양한 기능성 성분이 포함되어 있으며(Meghwal & Goswami 2013), 그 중 피페린이 가장 널리 알려진 성분 중 하나이다. 피페린은 후추의 매운맛을 내는 성분으로, 여러 연구에서 항염(Bang 등 2009), 항산화(Zarai 등 2013), 항종양(Yoo 등 2019), 항균(Shityakov 등 2019) 및 항바이러스 효과(Singh 등 2021)가 있음이 밝혀졌다. 또한, 피페린은 약물 투여에 대한 흡수율을 높여, 생체 이용률을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Shao 등 2015). 반면, 후추의 주요 성분 중 하나인 다당류(polysaccharides)는 생체 내에서 호흡기 관련 질환, 특히 기침을 완화하는 데 효과적이며, 호흡기 건강에 긍정적인 영향을 미친다고 보고된 바 있다(Khawas 등 2017). 또한, 후추로부터 분리된 다당류는 항당뇨 활성을 통해 당뇨 예방 및 관리에도 기여한다고 알려져 있다(Shamkuwar 등 2012). 최근에는 후추의 새로운 기능성 성분의 발견과 그 건강 증진 효과에 대한 지속적인 연구가 이루어지고 있으며(Jideani 등 2021), 이러한 연구는 후추가 향신료 뿐만 아니라, 다양한 질병 예방 및 생리활성 증대에 중요한 역할을 가질 수 있음을 시사한다. 그러나, 현재까지, 후추를 면역 자극 활성화 소재로 활용한 연구는 상대적으로 매우 부족한 실정이다.

본 연구에서는 후추를 면역 활성화 기능성 소재로서 활용하고자, 흑후추 및 백후추 열수추출물을 제조하고, 활성 성분을 분획하기 위해 조다당 획분과 저분자 획분으로 분리하였다. 이후 대식세포 활성을 평가하기 위하여 대식세포로부터 분리되는 대식세포 활성화인자 NO와 사이토카인 TNF- α , IL-6 및 IL-12의 생성량을 측정하고, 분자적 메커니즘을 확인함으로써 후추에서 분리한 다당류가 대식세포 활성화에 미치

는 영향을 확인하고자 하였다. 또한 구성당과 같은 화학적 조성을 분석하여 대식세포 활성 다당의 잠재적 가능성을 조사함으로써 후추의 면역 기능성 소재로서 개발 가능성을 제시하고, 향후 식품 및 의약품 산업에서의 활용 방안을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 열수추출물의 조제

본 연구의 흑후추(black pepper, BP)와 백후추(white pepper, WP)는 주식회사 오투기(Ottogi, Eumseong, Korea)에서 구입하였다. 흑후추(BP-HW) 및 백후추 열수추출물(WP-HW)은 원물 중량의 20배(w/v)의 증류수를 가하고 decoction 방법을 이용하여 얻었다(Shin 등 2022). 이후, 불용성 침전물을 제거하기 위해 원심분리(9,588 g, 20 min)하여 상등액을 회수하고 여과지(Adventec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과하였다. 여과액은 농축(Eyela, Tokyo, Japan) 및 동결건조(Ishin Biobase, Seoul, Korea)를 진행하여 흑후추 열수추출물(BP-HW; 11.7%)과 백후추 열수추출물(WP-HW; 8.2%)로 조제되었다(Fig. 1).

2. RAW 264.7 세포주의 배양 및 자극 활성화

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)에서 확보하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, MA, USA)과 1% penicillin/streptomycin(GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 대식세포 자극 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포주를 2.0×10⁶ cells/mL로 조정 한 후 96 well plate에 180 μ L씩 분주하여 배양기에서 3시간 배양하고 적당한 농도로 희석한 시료를 20 μ L 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 배양 후, 배양 상등액을 회수하여 대식세포 활성화 인자 NO와 TNF- α (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), IL-6(BD biosciences, San Diego, CA, USA) 및 IL-12(BD biosciences)를 측정하였다. NO의 함량은 Griess assay(Tursun 등 2016)의 방법을 이용하여 측정하였으며, TNF- α , IL-6 및 IL-12 함량은 각각의 제조사의 지침에 따라 sandwich ELISA 방법을 이용하여 분석하였다.

3. 열수추출물로부터 조다당 획분의 분획

흑후추 및 백후추로부터 조다당을 분획하기 위해 각각의 열수추출물을 소량의 증류수에 용해한 후 95% 주정을 첨가하여 최종 80% 농도로 조정 한 후 하루 동안 충분히 교반하였다. 이후 원심분리(9,588 g, 20 min)를 수행하고 침전물과 상등액을 분리하였다. 회수된 침전물은 다시 소량의 증류수에

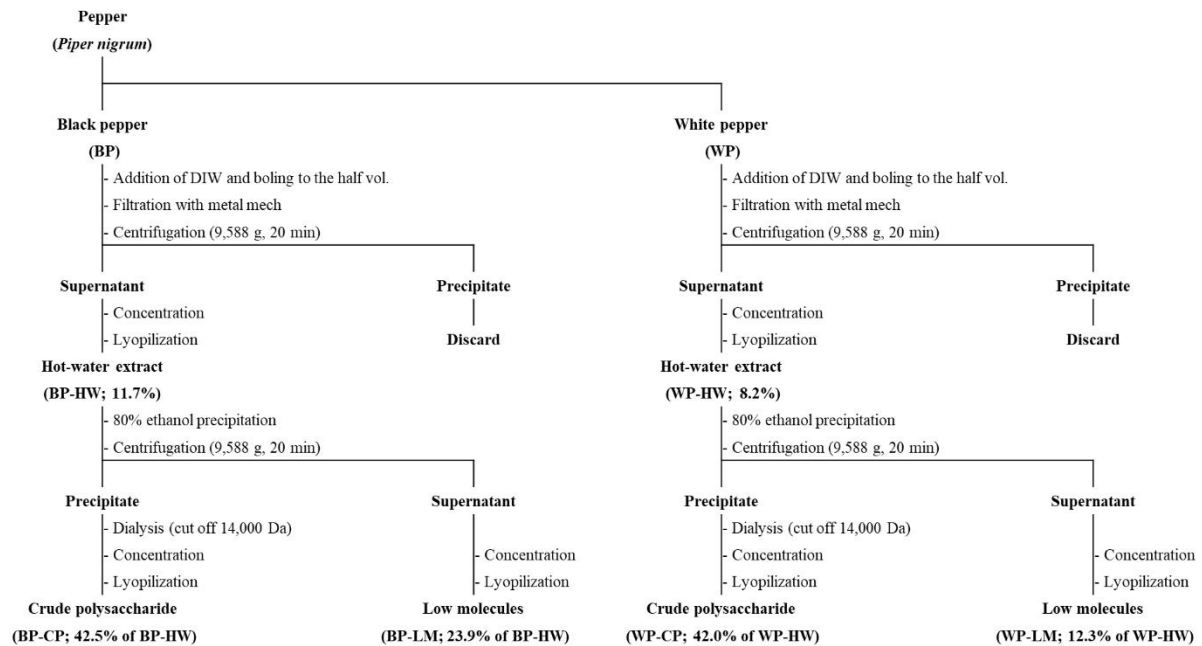


Fig. 1. Fractionation scheme of crude polysaccharides isolated from pepper.

용해하고 투석(molecular cut-off 12-14 kDa)을 거친 후 농축 및 동결건조하여 조다당 획분(crude polysaccharide; CP)으로 분획되었다. 반면, 상등액은 농축 및 동결건조하여 저분자 획분(low molecule; LM)으로 분획되었다. 이들의 수율은 각각 BP-CP(42.5% of BP-HW), BP-LM(23.9% of BP-HW), WP-CP(42.0% of WP-HW) 및 WP-LM(12.3% of WP-HW)로 확인되었다.

4. qRT-PCR을 이용한 mRNA 발현

RAW 264.7 세포주로부터 대식세포 자극 관련 인자의 mRNA 발현량을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 8.0×10^5 cells/mL로 하여 60 π dish에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양 상등액을 제거하고 시료를 적절한 농도로 serum-free DMEM에 희석하고 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 배양 후 상등액을 제거한 다음, phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하여 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 total RNA를 추출하였다. cDNA는 ReverTra AceTM qPCR RT Master Mix Kit(Toyobo, Osaka, Japan)을 사용하여 합성하였다. mRNA 발현 분석은 SYBR Green PCR kit(Toyobo)를 이용하여 Quant Studio 3 real-time PCR system(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)을 통해 진행하였다. 각 유전자의 발현량은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 기준으로 보정하였으며, 각각의 primer 서열은 Table 1에 기재하였다.

5. 면역 형광법을 이용한 전사인자의 관찰

대식세포 내 nuclear factor(NF)- κ B(p65)와 activated protein(AP)-1의 전사인자 c-Jun의 핵 내 이동을 관찰하기 위해 면역형광법을 이용하였다. 12 mm cover slip을 24-well plate에 넣고 각 well에 0.1% gelatin을 500 μ L씩 분주한 후 30분간 방치하였다. 이후 여분의 상등액을 제거하고 RAW 264.7 세포주를 2.2×10^5 cells/mL로 조정하여 각 well에 900 μ L씩 분주하고 3시간 동안 배양하여 안정시켰다. 이후, 시료를 100 μ L씩 첨가하여 3시간 동안 재배양한 후 4% formaldehyde(Sigma Aldrich)를 가해 고정하였다. 각 well에 5% bovine serum albumin(BSA; in 0.1% Trion X-100; Sigma Aldrich/PBS)를 300 μ L씩 처리하여 암실에서 반응시키고, PBS를 이용해 세척 후 1차 항체(p65 및 c-Jun; Cell signaling, Denvers, MA, USA)를 처리하여 12시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체(Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG; Cell signaling)를 처리하여 암소에서 70분 동안 반응시키고 cover slip을 분리한 뒤 핵 염색을 위해 slide glass에 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 처리하고 광학현미경(IX73; Olympus, Waltham, MA, USA)을 이용하여 관찰하였다.

6. RP-HPLC를 이용한 구성당 분석

후추 조다당 획분의 구성당 분석은 reversed phase-high performance liquid chromatography-ultraviolet(RP-HPLC-UV; YL 9100, Young Lin, Gyeonggi, Korea) system을 사용하여

Table 1. Mouse primer sequences for qRT-PCR

Genes	Primer	Primer sequence (5'→3')	Accession number
<i>iNOS</i>	Forward	GGTGAAGGGACTGAGCTGTT	NM_010927.4
	Reverse	ACGTTCTCCGTTCTCTTGCAG	
<i>TNF-α</i>	Forward	CCCACGTCGTAGCAAACCA	NM_013693.3
	Reverse	CTTTGAGATCCATGCCGTTGG	
<i>IL-6</i>	Forward	TCACAGAGGATACCACTCCC	NM_031168.2
	Reverse	GAATTGCCATTGCACAACCTCTT	
<i>IL-12</i>	Forward	GAAGTCCAATGCAAAGGCGG	NM_001303244.1
	Reverse	TCCTAGGATCGGACCCTGC	
<i>GAPDH</i>	Forward	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC	NM_001289726.1
	Reverse	CCAATACGGCCAAATCCGTTC	

Honda 등(1989) 및 Shin 등(2021)의 방법으로 분석하였다. 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA; Sigma Aldrich)로 처리하여 aldose 단위로 분해하고 0.3 M NaOH와 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline(PMP; Sigma Aldrich)을 첨가하여 당당류와 PMP를 결합시켰다. 이후, 0.3 M HCl을 첨가하여 중화시킨 후 증류수와 chloroform으로 분리 및 추출하였고 물 층만 분리하여 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane filter(0.45 μ m, Jaema Trade, Gangwon, Korea)로 여과하였다. 이후 YMC-Triart C18 column(250×4.6 mm, 5 μ m, YMC, Kyoto, Japan)을 장착한 RP-HPLC-UV system으로 분석하였다. HPLC 분석 조건은 Table 2에 기재하였고, 시료 총 500 μ g 중 당당류의 함량은 μ g으로 나타내었으며, mole%는 peak area와 response factor를 이용하여 계산하였다.

7. 통계처리

각 실험은 3회 반복 수행되었으며, 결과는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. RAW 264.7 대식세포의 활성화 및 유전자 발현 분석은 SPSS V26(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 Student's *t*-test로 계산하였으며, 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 흑후추 및 백후추 열수추출물의 대식세포 활성화 비교

본 연구에서 사용된 RAW 264.7 세포는 마우스 유래 대식세포주로 면역 혹은 염증 반응을 매개하여 면역 기전 연구에 널리 이용된다(Mosser & Edwards 2008). 후추로부터 추출된 열수추출물의 대식세포 자극 활성을 평가하기 위하여 흑후추 열수추출물(BP-HW)과 백후추 열수추출물(WP-HW)을 RAW 264.7 세포에 처리 후, 대식세포 활성화 인자인 NO 및

Table 2. HPLC analysis conditions for the determination of component sugar

Analysis	Component sugar
HPLC system	YL 9100 series (YL Instrument, Anyang, Republic of Korea)
Column	YMC-Triart C18 (YMC, Kyoto, Japan)
Column size	250×4.6 mm, 5 μ m
Column temperature	30°C
Flow rate	1.0 mL/min
Eluent	0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.7) : Acetonitrile 82:18
Injection volume	20 μ L
Detector	YL 9120S UV/Vis detector (YL Instrument, Anyang, Republic of Korea)
Integrator	Autochro-3000

TNF- α , IL-6 및 IL-12의 생성능을 비교하였다. 먼저, 면역계에서 NO는 대식세포와 같은 면역 세포의 활성화를 유도하여 병원체를 제거하고, 사이토카인 생성을 촉진하여 면역반응을 조절하는 것으로 알려져 있다(Wink 등 2011). 대식세포에 양성 대조군으로 이용된 LPS와 함께 BP-HW와 WP-HW를 10~100 μ g/mL의 농도로 처리하여 NO의 생성능을 평가한 결과(Fig. 2A), LPS는 음성대조군(NC) 대비 52.8 μ M(약 14.9배 증가)의 생성능을 나타내었고, BP-HW는 10~100 μ g/mL의 농도 범위에서 18.0~48.3 μ M(약 5.1~13.6배 증가)의 생성능을 보인 반면, WP-HW는 50~100 μ g/mL의 농도 범위에서 4.7~19.0 μ M(약 1.3~5.4배 증가)의 NO 생성능을 나타내었다. 이러한 경향은 TNF- α , IL-6 및 IL-12 생성능에서도 확인되었으

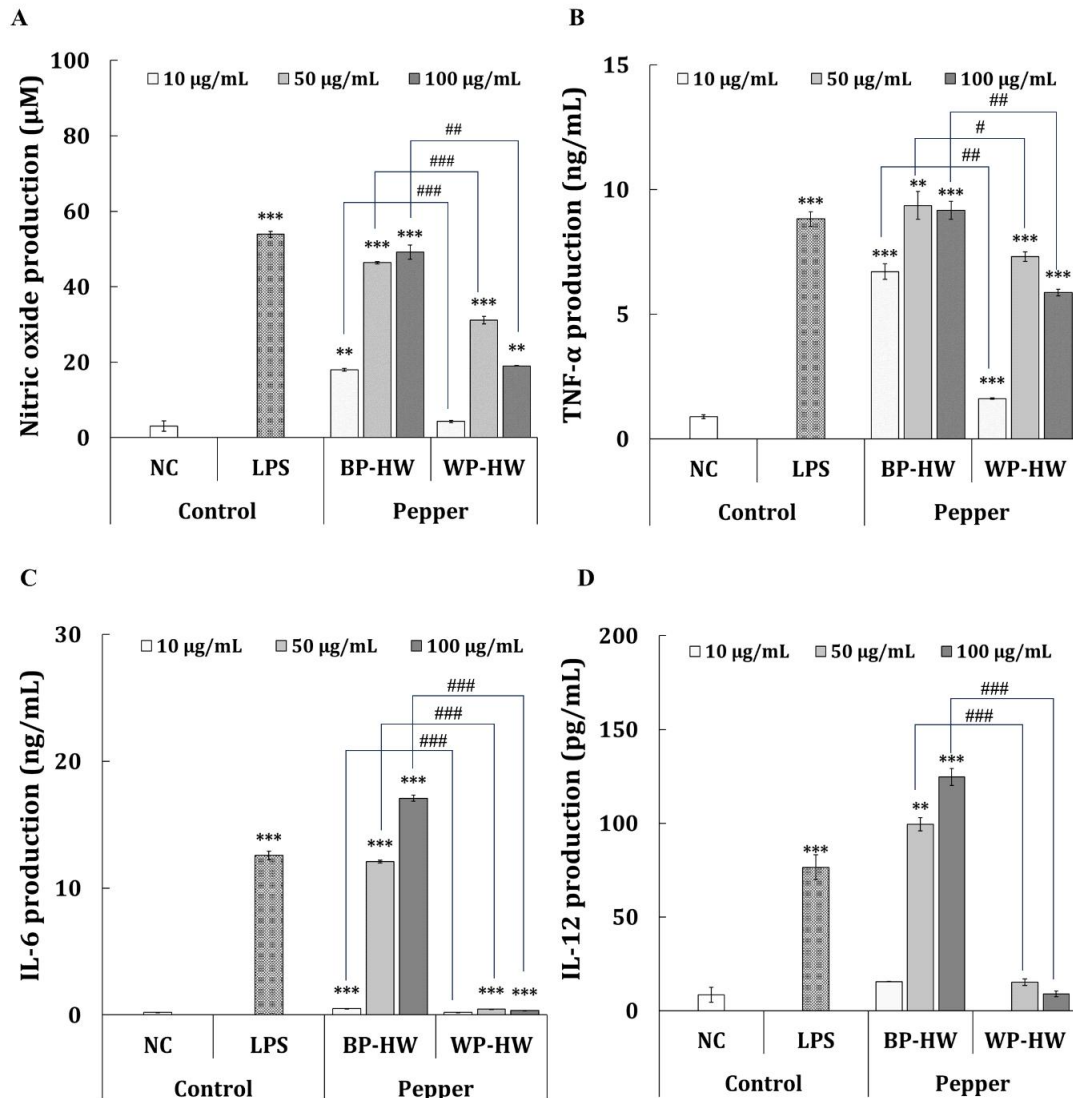


Fig. 2. Macrophage stimulatory activity of hot-water extract prepared from pepper. RAW 264.7 cells were treated with BP-HW and WP-HW for 24 h, and the production of nitric oxide (A), TNF- α (B), IL-6 (C), and IL-12 (D) was evaluated using the Griess assay and ELISA. Results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. The asterisks in the bar indicate significant differences between the negative controls (NC) and each test group, as determined by Student's *t*-test. Crosshatch patterns indicate significant differences between samples at the same concentration. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μ g/mL); BP-HW, hot-water extract of black pepper; WP-HW, hot-water extract of white pepper.

며(Fig. 2B, Fig. 2C 및 Fig. 2D), 모든 농도 범위에서 WP-HW에 비해 BP-HW가 유의하게 증가하였고, 특히 IL-12의 경우 WP-HW는 측정된 모든 농도 범위에서 통계적으로 유의한 생성능을 보이지 않았으나, BP-HW는 50~100 μ g/mL의 농도 범위에서 9.3~142.4 pg/mL(약 1.8~27.7배 증가)의 IL-12 생성능을 보였다. 따라서, 열수추출물의 대식세포 자극 활성 평가 결과, BP-HW(흑후추)는 WP-HW(백후추)보다 우수한 대식세

포 자극 활성을 확인할 수 있었다. 흑후추는 백후추에 비해 껍질을 포함하고 있으며, 후추의 껍질에는 피페린과 같은 생체 활성 물질이 다량 분포하여 면역세포의 기능을 촉진하는 것으로 알려져 있기 때문에(Sunila & Kuttan 2004), 흑후추 열수추출물이 백후추에 비해 대식세포 자극 활성의 증진에도 기여하는 것으로 추정되었다.

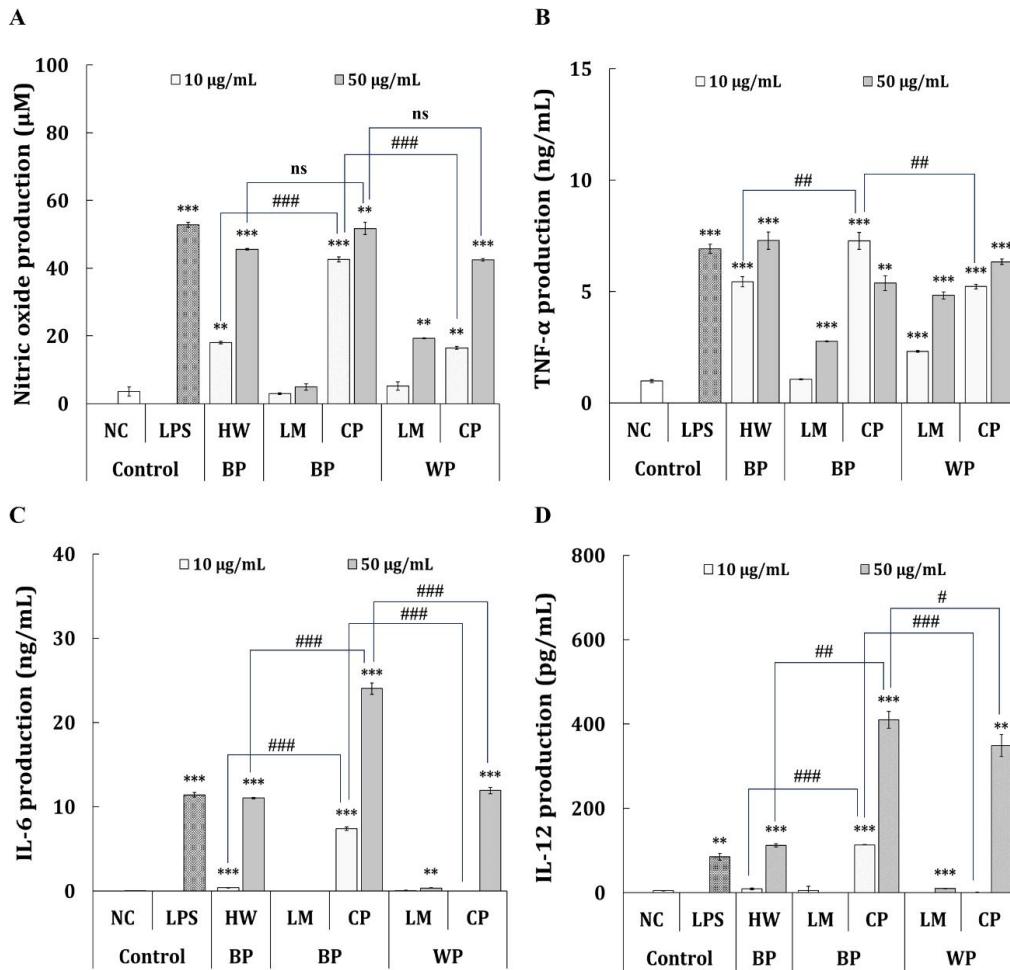


Fig. 3. Macrophage stimulatory activity of subfractions isolated from BP and WP-HW. RAW 264.7 cells were treated with subfractions isolated from BP and WP-HW for 24 h, and the production of nitric oxide (A), TNF- α (B), IL-6 (C), and IL-12 (D) was evaluated using the Griess assay and ELISA. Results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. The asterisks in the bar indicate significant differences between the negative controls (NC) and each test group, as determined by Student's *t*-test. Crosshatch patterns indicate significant differences between samples at the same concentration. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μ g/mL); BP, black pepper; WP, white pepper; HW, hot-water extract; LM, low molecule; CP, crude polysaccharide.

2. 흑후추 및 백후추 열수추출물로부터 분획된 하위 획분의 대식세포 활성 비교

일반적으로, 열수추출물에는 페놀 화합물과 플라보노이드 같은 저분자 물질(low molecule)과 다당류 혹은 단백 다당과 같은 고분자 물질이 혼재되어 있다고 알려져 있다(Kim 등 2024). 따라서, 후추 열수추출물의 대식세포 자극 활성에 관여하는 성분이 저분자 물질인지 혹은 고분자 물질인지를 확인하기 위해 주정 침전법(Shin 등 2021)으로 조다당 획분과 저분자 획분을 분획한 후 대식세포 자극 활성을 평가하였다. 먼저, NO 생성능의 경우(Fig. 3A), BP-CP는 10 및 50 μ g/mL의

농도에서 NC 대조군 대비 각각 42.6 및 51.7 μ M(약 12.0, 14.6 배 증가)의 생성능을 나타내었으며, 특히 10 μ g/mL의 농도에서 BP 및 WP 하위 획분에 비해 통계적으로 우수한 NO 생성능을 보였다. 한편, TNF- α 는 림프구 매개 반응을 통해 세포 사멸(apoptosis)을 유도하고, 면역 세포의 활성화를 촉진하여 면역 반응을 증진시키는 역할을 한다고 알려져 있는데(Li 등 2021), BP-CP는 10 μ g/mL의 농도에서 BP-HW를 포함한 모든 하위 획분(BP-LM, WP-LM 및 WP-CP)에 비해 통계적으로 우수한 TNF- α 생성능을 보였다(Fig. 3B). 또한, 이러한 경향은 Fig. 3C 및 Fig. 3D에 나타난 것처럼 IL-6 및 IL-12 생성능에

서도 확인할 수 있었는데, IL-6는 JAK2/STAT3 신호 전달 경로를 통해 면역 세포를 활성화하여 이들의 증식과 기능을 증진시키고 면역 반응을 조절할 수 있으며(Kang 등 2019), IL-12는 T 세포와 natural killer 세포를 활성화하여 면역반응을 강화할 뿐만 아니라 병원체에 대한 방어 작용을 증진시키는 중요한 역할을 한다(Zundler & Neurath 2015). 결론적으로, BP-HW로부터 분획된 BP-CP는 BP 저분자 및 WP의 모든획분에 비해 대식세포 활성화 관련 지표에서 우수한 활성을 나타내었으며, 이는 주정침전으로 분획된 고분자로서의 조다당획분이 대식세포 활성화에 관여하는 것으로 확인되었다.

3. 흑후추에서 분리된 조다당획분의 대식세포 활성화 인자의 유전자 발현량

흑후추 열수추출물로부터 분획된 조다당획분(BP-CP)에 의한 대식세포 활성화 기전을 분석하기 위해 qRT-PCR을 이용하여 앞서 분석한 대식세포 활성화 인자 NO, TNF- α , IL-6 및 IL-12의 mRNA 발현량을 분석하였다. 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase; iNOS)는 체내에서 NO 생성을 촉진하며, 생성된 NO는 병원체 제거 및 면역 세포가 감염된 세포를 공격하여 파괴하는 것을 돕는 것으로 알려져 있다(Xue 등 2018). 또한, iNOS의 유전자 발현은 면역 반응과 질병 상태에 따라 변화하며, 이는 면역 활성을 평가하는 데 중요한 지표가 된다(Zamora 등 2000). 먼저, BP-CP의 iNOS 유전자 발현량 결과(Fig. 4A) 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 약 132.6~2,246.5배의 mRNA 발현량 증가를 확인할 수 있었다. 또한, 동일 농도 범위에서 TNF- α 의 유전자 발현량 결과(Fig. 4B), BP-CP의 처리는 NC 대비 약 15.0~36.4배의 농도-의존적인 mRNA 발현을 유도하였다. IL-6 및 IL-12의 mRNA 발현량 분석 결과(Fig. 4C 및 Fig. 4D), 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 각각 약 163.2~21,587배 및 1.1~32.1배의 mRNA 유전자 발현량을 유도하였다. 이러한 결과로부터 BP-CP의 처리는 대식세포 활성화 관련 인자의 mRNA 발현을 유의하게 증가시켜, 세포 외로 분비되는 NO, TNF- α , IL-6 및 IL-12의 생성에 관여하는 것으로 확인되었다. 이는 iNOS의 유전자 발현이 NO 생산에 필수적이며, NO가 병원체를 제거하고 감염된 세포를 파괴하는 면역 방어 역할을 한다는 기존 연구들과 일치하며(Connelly 등 2003; Xue 등 2018), 기존 연구에서 확인된 바와 같이(Tanaka 등 2014; El-Tahan 등 2016), BP-CP에 의해 TNF- α , IL-6 및 IL-12의 유전자 발현을 통해 관련 인자의 생성을 촉진하고 면역 활성에 관여할 수 있음을 나타낸다.

4. 흑후추에서 분리된 조다당획분에 의한 p65 및 c-Jun의 핵 내 국소화

BP-CP 처리에 따른 주요 대식세포 활성화 기전을 확인하

기 위해, BP-CP가 NF- κB 및 MAPK 신호전달 경로에 미치는 영향을 조사하였다. NF- κB 와 MAPK 경로는 대식세포 활성화에 중추적인 역할을 하는 메커니즘 중 하나로 알려져 있다(Dev 등 2011). 특히, NF- κB 신호전달 경로는 p65 단백질의 인산화를 유도하여 I $\kappa\text{B}\alpha$ 단백질의 인산화 및 분해를 촉진하며, 이로 인해 인산화된 p65는 핵으로 이동하여 면역 활성화에 관여하는 유전자들의 전사를 촉진한다(Perkins ND 2007). 또한, 대식세포가 자극을 받아 MAPK 경로가 활성화되면 c-Jun이 인산화되어 activator protein(AP)-1 복합체를 형성하고, 이 복합체는 핵으로 이동하여 대식세포 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 바 있다(Casals-Casas 등 2009). 한편, 면역형광법은 특정 단백질이나 구조물에 대한 형광 표지 항체를 사용하여 세포 내 위치를 시각적으로 확인할 수 있어, 세포의 세부적인 기능적 변화를 관찰하고 단백질의 이동 경로를 분석할 수 있는 유용한 방법으로 알려져 있다(Donaldson JG 2015). 이를 활용하여, RAW 264.7 세포에 BP-CP를 처리하고 p65 및 c-Jun의 핵 내 국소화 여부를 관찰하였다(Fig. 5). 먼저, NC 대조군의 경우, FITC로 표지된 p65 및 c-Jun이 핵 내로 국소화가 진행되지 않아, merge 시 붉은색의 형태를 보였으며, LPS 처리군은 p65 및 c-Jun이 핵 내로 국소화되어 세포의 형태가 초록색(merge 시)의 형태를 보이는 것으로 확인되었다. 이와 유사하게, BP-CP 처리에 의해 FITC로 표지된 p65 및 c-Jun의 핵 내 국소화가 진행되어, 세포가 주로 초록색의 형태를 보였다. 이러한 결과는 BP-CP가 NF- κB 및 MAPK 경로의 활성화를 통해 대식세포의 면역 활성화에 관여하는 것으로 확인되었다.

5. 흑후추에서 분리된 조다당획분의 구성당 분포

본 연구에서는 BP-CP의 구성당 분포를 분석하여 대식세포 활성화에 관여하는 활성 성분을 확인하고자 하였다. HPLC 크로마토그램은 Fig. 6에 나타냈으며, 분석 결과는 Table 3에 나타냈다. BP-CP의 주요 구성당은 glucose(Glc)로 확인되었으며, 전체 500 μg 의 성분 중 Glc는 450.9 μg 을 차지하여 95.6%에 해당하는 것으로 확인되었다. 그 외에도 galactose 6.0 μg (1.2%) 및 arabinose 5.1 μg (1.0%)가 검출되어, BP-CP는 주로 Glc로 구성된 glucan-type의 다당류로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. Glucan-type 다당류는 면역계에서 중요한 생리활성을 나타내는 물질로 널리 알려져 있으며(Schepetkin & Quinn 2006), 일반적으로 α 및 β -type의 glucan으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다. α -glucan은 식물체에서 주로 전분과 같은 형태로 흔히 발견되는 저장성 다당류로 α -1,4 글리코사이드 결합으로 이루어진 포도당 중합체를 의미한다(Damager 등 2010). 반면, β -glucan은 버섯, 효모, 곡류 및 세포벽에서 주로 발견되며(Brown & Gordon 2003), 면

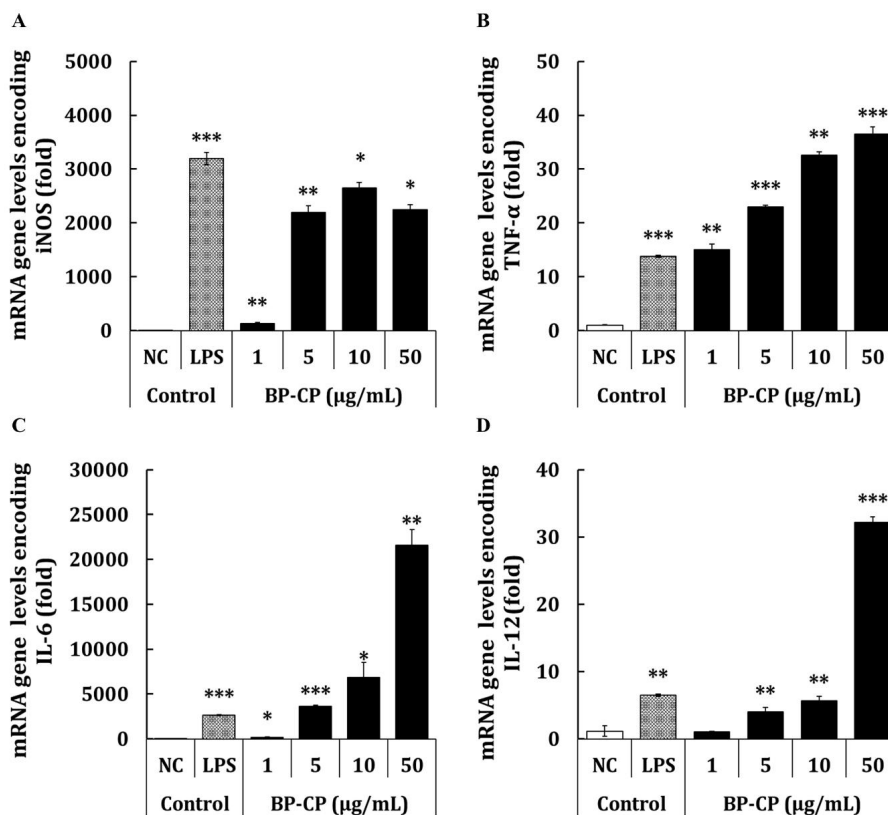


Fig. 4. Effects of BP-CP on the mRNA expression levels of genes encoding macrophage stimulating factors in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with BP-CP for 24 h, and the mRNA expression levels of iNOS (A), TNF- α (B), IL-6 (C), and IL-12 (D) were evaluated using qRT-PCR. Results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. The asterisks in the bar indicate significant differences between the negative controls (NC) and each test group, as determined by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μ g/mL); BP-CP, crude polysaccharide isolated from BP-HW.

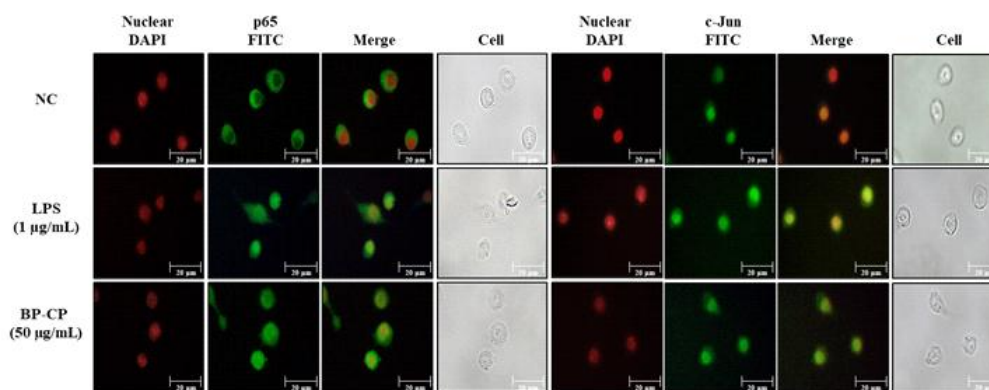


Fig. 5. Effect of BP-CP on the nuclear localization of activated p65 and c-Jun in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were seeded onto 0.1% gelatin-coated coverslips and then treated with BP-CP for 3 h. RAW 264.7 cells were fixed and immunostained with FITC-conjugated anti-p65 and anti-c-Jun antibodies, and the nuclei were counterstained with DAPI. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μ g/mL); BP-CP, crude polysaccharide isolated from BP-HW.

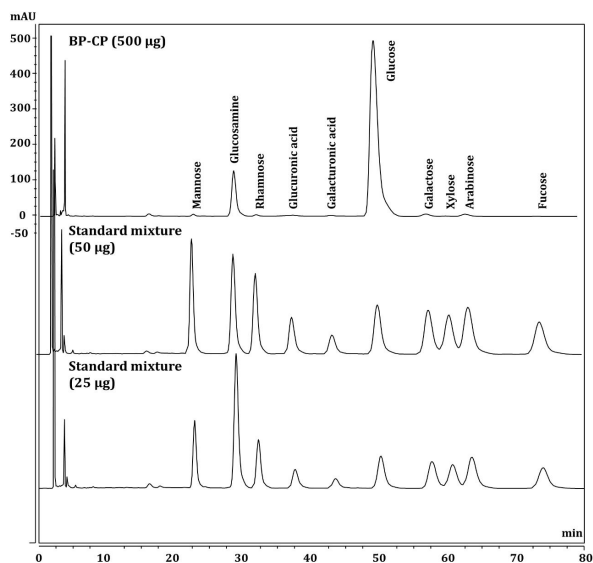


Fig. 6. HPLC chromatogram for measuring the component sugar of BP-CP.

역 조절에 중요한 역할을 가지며, 면역세포의 표면 수용체 (dectin-1 및 complement receptor 3 등)와 결합하여 면역반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Huang 등 2015). 이에 따라, 후속 연구에서는 BP-CP의 추가적인 분리 및 정제 공정을 통해 후추로부터 분리된 활성 다당을 분리하고 여러 화학 분석 기법을 통해 후추 유래 glucan의 정확한 구조를 규명하고자 하며, 대식세포 활성화에 기여하는 구체적인 메커니즘을 제시하고자 한다.

요약 및 결론

본 연구에서는 후추(*Piper nigrum*)를 면역 자극제로 활용하기 위해 후추로부터 대식세포 자극 활성 다당류를 분리하여 대식세포 활성화를 조사했다. 흑후추(BP) 및 백후추(WP)의 열수추출물(HW)을 준비하고, RAW 264.7 세포를 이용하여 대식세포 자극 활성을 평가하였다. BP-HW는 WP-HW에 비해 NO, TNF- α , IL-6 및 IL-12와 같은 대식세포 자극 인자의 분비를 유의적으로 촉진했다. 더 나아가, 주정 침전을 사용하여 BP 및 WP-HW로부터 조다당 획분(CP)과 저분자 획분(LM)으로 분획하였을 때, BP-CP가 유의적으로 우수한 대식세포 자극 활성을 보였다. 또한, BP-CP는 대식세포 활성화 인자의 mRNA 유전자 발현을 유도할 뿐만 아니라 p65 및 c-Jun의 핵 내 국소화를 촉진하였다. 구성당 분석 결과, BP-CP의 글루칸형 다당류가 대식세포 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과를 종합하면, 후추는 향신료 뿐만 아니라 면역 자극 기능성 소재로서의 산업

Table 3. Component sugars of BP-CP isolated from BP-HW

Monosaccharide	BP-CP (500 μ g)	
	Value (μ g)	Mol %
Mannose	2.8 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0
Rhamnose	2.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0
Glucuronic acid	5.0 \pm 0.7	0.7 \pm 0.1
Galacturonic acid	5.9 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0
Glucose	450.9 \pm 0.4	95.6 \pm 0.1
Galactose	6.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0
Xylose	-	-
Arabinose	5.1 \pm 0.2	1.0 \pm 0.0
Fucose	-	-
Total (%)	95.7	100.0

적 활용 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 2024년 국립한국교통대학교 지원을 받아 수행하였음.

References

- Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-680
- Aktan F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75:639-653
- Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, Yang HI, Yoo MC, Hahm DH, Kim KS. 2009. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther* 11:R49
- Brown GD, Gordon S. 2003. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19:311-315
- Casals-Casas C, Álvarez E, Serra M, de la Torre C, Farrera C, Sánchez-Tilló E, Caelles C, Lloberas J, Celada A. 2009. CREB and AP-1 activation regulates MKP-1 induction by LPS or M-CSF and their kinetics correlate with macrophage activation versus proliferation. *Eur J Immunol* 39:1902-1913
- Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. 2003. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase

- autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem* 278:26480-26487
- Damager I, Engelsens SB, Blennow A, Møller BL, Motawia MS. 2010. First principles insight into the α -glucan structures of starch: Their synthesis, conformation, and hydration. *Chem Rev* 110:2049-2080
- Dev A, Iyer S, Razani B, Cheng G. 2011. NF- κ B and innate immunity. In Karin M (Ed.), *NF- κ B in Health and Disease*. pp.115-143. Springer
- Donaldson JG. 2015. Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Cell Biol* 69:4.3.1-4.3.7
- El-Tahan RR, Ghoneim AM, El-Mashad N. 2016. TNF- α gene polymorphisms and expression. *SpringerPlus* 5:1508
- Guerriero JL. 2019. Macrophages: Their untold story in T cell activation and function. *Int Rev Cell Mol Biol* 342:73-93
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Huang JH, Lin CY, Wu SY, Chen WY, Chu CL, Brown GD, Chuu CP, Wu-Hsieh BA. 2015. CR3 and dectin-1 collaborate in macrophage cytokine response through association on lipid rafts and activation of Syk-JNK-AP-1 pathway. *PLOS Pathog* 11:e1004985
- Jideani AI, Silungwe H, Takalani T, Omolola AO, Udeh HO, Anyasi TA. 2021. Antioxidant-rich natural fruit and vegetable products and human health. *Int J Food Prop* 24:41-67
- Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2019. Targeting interleukin-6 signaling in clinic. *Immunity* 50:1007-1023
- Kawai T, Akira S. 2007. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469
- Khawas S, Nosál'ová G, Majee SK, Ghosh K, Raja W, Sivová V, Ray B. 2017. *In vivo* cough suppressive activity of pectic polysaccharide with arabinogalactan type II side chains of *Piper nigrum* fruits and its synergistic effect with piperine. *Int J Biol Macromol* 99:335-342
- Kim YS, Shin HY, Jeong WB, Ha E, Koo JP, Shin JY, Yu KW. 2024. Effect of *Astragalus membranaceus*-postbiotics polysaccharide changed by lactic acid bacteria on macrophage. *Korean J Food Nutr* 37:17-29
- Li K, Qiu H, Yan J, Shen X, Wei X, Duan M, Yang J. 2021. The involvement of TNF- α and TNF- β as proinflammatory cytokines in lymphocyte-mediated adaptive immunity of Nile tilapia by initiating apoptosis. *Dev Comp Immunol* 115:103884
- Meghwal M, Goswami T. 2013. *Piper nigrum* and piperine: an update. *Phytother Res* 27:1121-1130
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969
- Navegantes KC, de Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. 2017. Immune modulation of some autoimmune diseases: The critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *J Transl Med* 15:36
- Parkin J, Cohen B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777-1789
- Perkins ND. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:49-62
- Schepetkin IA, Quinn MT. 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 6:317-333
- Shamkuwar PB, Shahi SR, Jadhav ST. 2012. Evaluation of antidiarrhoeal effect of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Asian J Plant Sci Res* 2:48-53
- Shao B, Cui C, Ji H, Tang J, Wang Z, Liu H, Qin M, Li X, Wu L. 2015. Enhanced oral bioavailability of piperine by self-emulsifying drug delivery systems: *In vitro*, *in vivo* and *in situ* intestinal permeability studies. *Drug Deliv* 22:740-747
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Yu KW. 2022. Macrophage stimulating activity of crude polysaccharide on maca (*Lepidium meyenii*) varieties. *Korean J Food Nutr* 35:7-15
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Sci Technol* 34:36-46
- Shityakov S, Bigdelian E, Hussein AA, Hussain MB, Tripathi YC, Khan MU, Shariati MA. 2019. Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. *Eur J Med Chem* 176:149-161
- Singh NA, Kumar P, Jyoti, Kumar N. 2021. Spices and herbs: Potential antiviral preventives and immunity boosters during COVID-19. *Phytother Res* 35:2745-2757
- Sunila ES, Kuttan G. 2004. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol* 90:339-346

- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016295
- Tursun X, Zhao Y, Talat Z, Xin X, Tursun A, Abdulla R, AkberAisa H. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Biomol Ther* 24:184-190
- Turvey SE, Broide DH. 2010. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125:S24-S32
- Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 89:873-891
- Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. 2018. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. *Int J Mol Sci* 19:3805
- Yoo ES, Choo GS, Kim SH, Woo JS, Kim HJ, Park YS, Kim BS, Kim SK, Park BK, Cho SD, Nam JS, Choi CS, Che JH, Jung JY. 2019. Antitumor and apoptosis-inducing effects of piperine on human melanoma cells. *Anticancer Res* 39:1883-1892
- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6:347-373
- Zarai Z, Boujelbene E, Salem NB, Gargouri Y, Sayari A. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT Food Sci Technol* 50:634-641
- Zundler S, Neurath MF. 2015. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:559-568

Received 14 September, 2024

Revised 02 October, 2024

Accepted 10 October, 2024

소금 용액 농도 및 침지 시간에 따른 Textured Vegetable Protein의 품질특성 변화

†이경행 · 이재준* · 윤아름* · 이예진* · 장희연* · 김주옥** · 이지연***

한국교통대학교 식품영양학전공 교수, *한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, ** (주)시즈너 이사, *** (주)시즈너 차장

Changes in Quality Characteristics of Textured Vegetable Protein according to Salt Solution Concentration and Soaking Time

†Kyung-Haeng Lee, Jae-Jun Lee*, Ah-Rum Yoon*, Ye-Jin Lee*, Hye-Yeon Jang*, Ju-Ok Kim** and Ji-Yeon Lee***

Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

*Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

**Director, Seasoner Co., Koesan 28049, Korea

***Diputy, Seasoner Co., Koesan 28049, Korea

Abstract

To utilize textured vegetable protein (TVP) in food manufacturing, TVP was soaked in salt solutions of different concentrations. Physicochemical quality characteristics of TVP were then measured. When TVP was soaked in a salt solution, the pH tended to increase compared to the control. However, the pH decreased after 18 hours of soaking. The salinity of the control decreased slightly from the initial value depending on the soaking time. The group treated with salt solution showed higher salinity than the control. Water absorption capacity of the control increased as the soaking time increased. However, water absorption capacity of the group treated with salt solution decreased as the concentration of salt solution increased. Lightness of the group treated with salt solution showed less change than the control during soaking. The redness increased as the concentration of salt solution increased. The yellowness increased compared to the control during soaking. Hardness, gumminess, and chewiness of the control decreased during soaking in water. The group treated with salt solution showed significantly higher hardness, gumminess, and chewiness as the concentration of the salt solution increased. However, adhesiveness, elasticity, and cohesiveness generally did not show significant differences among samples.

Key words: textured vegetable protein, salt concentration, texture, physico chemical property

서 론

1980년대에 우리나라의 식생활은 곡류와 채소류 위주의 양적인 식단이 주를 이루었다면 그 이후 식단은 주로 육류, 육가공품을 포함한 육류 기반의 식단이였다(Kim CJ 2005; Shin YM 2014).

인간에게 있어 육류는 중요한 식량자원이긴 하나 가축 생산을 하면서 분뇨 및 비료 분해에서 배출될 수 있는 이산화

질소와 가축 내 소화기관에서의 발효로 인하여 메탄가스 등의 온실가스 배출은 이상기후 및 지구 온난화의 원인이 되고 있다(Bhat & Fayaz 2011). 그뿐만 아니라 사육을 위한 광범위한 토지와 수자원 및 에너지 사용, 그에 따른 토양 및 수질 오염으로 인한 환경오염의 우려가 크다(Bhat 등 2015). 또한 단백질, 비타민, 아연, 철 등이 풍부하나 포화지방 및 콜레스테롤 함량이 많아 지속적으로 많은 양을 섭취 시 심혈관계 질환, 당뇨병 및 대장암 등 만성질환의 원인이 되어 건강상 문

† Corresponding author: Kyung-Haeng Lee, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5334, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: leekh@ut.ac.kr

제가 발생할 수 있다(Ekmekcioglu 등 2018).

지속적인 육류 소비에 대한 문제점이 생김과 동시에 대체육 생산에 대한 필요성이 강조되면서, 식물성 단백질 기반의 대체육에 대한 관심이 증가하였고, 대체육 제품 개발을 위한 연구가 주목받고 있다(Hoek 등 2011). 여러 종류의 대체육 중 식물성 대체육(plant-based meat alternative)은 식물에서 단백질을 추출하여 맛과 형태가 육류와 비슷하도록 제조한 식품을 말하며, 육류에 비해 자원 사용량, 온실가스 배출량 등 환경오염의 원인이 현저히 적으며 동시에 대량 생산이 가능하고 가격이 저렴하다(Jung 등 2021).

식물성 대체육 중 대두 단백을 사용하여 압출기 배럴 내에서 가열, 압력 및 전단력을 받는 압출 공정을 통해 물리적인 변화를 유도하여 육류의 조직감과 유사하도록 만든 조직대두단백(textured vegetable protein, TVP)이 국내에서는 콩고기라는 이름으로 알려져 소비되고 있다(Anderson & Bush 2011).

식물성 단백질 중에서도 대두단백은 유일하게 필수 아미노산을 골고루 가지며 소고기나 달걀 등의 동물성 단백질만큼 우수하다. 대두단백은 동물성 단백질의 문제가 되는 콜레스테롤, 포화지방, 유당 등의 함량이 적어 동물성 단백질의 대체식품으로 적절하며 식이로 섭취하는 콜레스테롤 및 포화지방량이 낮아져 심혈관질환의 위험을 낮출 수 있다(Anderson & Bush 2011)고 알려져 있으나 이를 이용한 식품의 활용 및 이화학적 특성 연구는 많지 않다.

따라서 본 연구에서는 TVP를 다양한 가공식품 제조에 활용하기 위하여 우선 TVP를 농도별 소금 용액에 시간별로 침지하면서 TVP의 이화학적 품질특성 변화를 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 TVP는 2024년도 (주)뜨란(충북, 괴산군)에서 생산된 제품을 구입하여 사용하였다. 육류의 조직감과 유사하도록 만든 TVP는 실제로는 육류와는 조직감이나 맛 등이 다소 다르므로 TVP를 다양한 식품에 활용하기 위한 일환으로 소금 용액을 농도별로 제조한 후 TVP를 담그고 4℃에서 12시간, 15시간 및 18시간 각각 침지 시켜 실험에 사용하였다. 이때 소금 용액의 농도는 대조군(0%), T-1(3%), T-2(6%), T-3(9%)로 하였다.

2. pH 및 염도 측정

농도별로 제조한 소금 용액에 TVP를 시간별로 침지 시키고 꺼내어 겉면의 수분을 제거하고 10배량의 물을 첨가하여 Ultra Turrax(T25, Janken and Kunkel, Germany)로 8,000 rpm에

서 1분간 분쇄시키고 여과한 여과액으로 pH 및 염도를 측정하였다. pH는 pH meter(Orion520A, Thermo Electron Co., MA, USA)를 이용하여 측정하였으며 염도는 염도계(Pal-03S, Atago, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

3. 수분흡수능 측정

농도별 소금 용액에 시간별로 침지 시킨 TVP의 수분흡수능은 Lee 등(2024)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 각 시간별로 침지한 시료를 꺼내어 표면의 물기를 제거하고 시료의 무게를 측정하였으며 수분흡수능은 다음식에 의해 계산하였다.

$$\text{수분흡수능(\%)} = \frac{\text{수분 흡수 후 시료 무게}(g) - \text{시료 무게}(g)}{\text{시료 무게}(g)} \times 100$$

4. 색도

소금 용액에 시간별로 침지한 TVP의 색상차이를 확인하기 위하여 TVP 윗면 부분을 색차계(CR-400 Minolta Chroma Meter, Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 Hunter L, a, b 값을 반복 측정된 뒤 평균값으로 나타내었다. 측정에 사용된 표준 백색판의 L*, a*, b* 값은 각각 95.02, 0.04, 0.26이었다.

5. 조직감

농도별 소금 용액에 시간별로 침지 시킨 조직감을 측정하기 위하여 3×3×0.5 cm의 크기로 절단하여 texture analyzer(TA-XT2/25, Stable Micro System Co. Ltd., Surrey, UK)를 사용하여 전단력과 TPA(Texture Profile Analysis) 분석을 통하여 조직감을 측정하였다. 전단력은 Blade set(Warner Bratzler blade)를 이용하여 1 mm/sec의 속도로 측정하였다(Choi YS 2005). TPA(Texture Profile Analysis) 분석은 Lee 등(2024)의 방법을 참조하여 2회 반복 압착실험(two-bite compression test)으로 stainless steel cylinder probe(2.5 cm)를 이용하여 distance 20 mm, test speed 1 mm/sec로 측정하였다.

6. 통계처리

본 시험에서 얻어진 결과는 SPSS 24.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 사용하여 각 실험구간의 유의성($p < 0.05$)을 ANOVA로 분석한 후 Duncan's multiple range test에 의해 실험군 간의 차이를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. pH 변화

농도를 달리한 소금 용액에 TVP를 시간별로 침지하면서

pH의 변화를 측정된 결과는 Table 1과 같다.

TVP의 초기 pH는 6.96이었으며 대조군의 경우에는 시간별로 각각 7.09, 7.26 및 7.08로 초기의 pH에 비하여 약간 높아지는 경향을 보였다. 소금 용액 처리군의 pH 변화는 12시간에는 소금 용액의 농도에 따라 각각 7.33, 7.75 및 7.80으로 소금 용액의 농도가 높을수록 pH가 증가하는 것을 알 수 있었다. 침지 시간을 15시간으로 하였을 때에도 12시간 침지 시와 비슷한 경향으로 소금 용액의 농도가 높을수록 pH가 높은 것으로 나타났다. 그러나 18시간 침지하였을 때에는 대조군에 비하여 오히려 pH가 낮게 나타나 18시간 침지하는 동안 품질변화가 많이 일어나는 것으로 판단되었으며 이에 침지 시간은 15시간 이내가 적당할 것으로 판단되었다. Seo WD(2003)은 돈육을 고추장 및 간장용액에 염지 시, 염 농도와 시간에 따른 pH 변화를 측정된 결과, 염 농도가 높아짐에 따라 pH는 감소하는 경향이었으나 유의적인 차이는 없다고 하여 본 결과와는 다소 다른 경향을 보였는데 이는 소금 용액의 농도와 원료의 차이 때문인 것으로 사료되었다.

2. 염도 변화

농도를 달리한 소금 용액에 TVP를 시간별로 침지하면서 염도의 변화를 측정된 결과는 Table 2와 같다.

TVP 초기 염도는 0.5%로 TVP 제조 시 염이 함유되어 있

음을 알 수 있었다. 대조군의 경우에는 물속에 침지하는 동안 초기의 염도보다 약간 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 소금 용액 처리군은 대조군에 비하여 염도가 높게 나타났으며 침지 시간에 따른 차이는 T-1과 T-2 처리군은 15시간 침지 시, T-3 처리군은 12시간 침지 시 높은 염도를 나타내었다. 그러나 침지 시간이 18시간 되었을 때에는 최대의 염도에서 감소하는 경향을 보였다. Moon 등(2002)은 식염농도가 다른 염지액에 등심고기를 염지하면서 염도를 측정된 결과, 염지 시간이 증가할수록, 염지농도가 높을수록 높은 식염함량을 보였다고 하여 염지액과 시료는 다르지만 본 결과와 유사한 경향인 것으로 판단되었다.

3. 수분흡수능 변화

농도를 달리한 소금 용액에 TVP를 시간별로 침지하면서 수분흡수능의 변화를 측정된 결과는 Table 3과 같다.

대조군의 경우에는 침지 시간에 따라 각각 22.21, 26.24 및 30.03%로 증가하는 것으로 나타나 침지 시간이 증가하면 수분흡수능도 증가함을 알 수 있었다. 소금 용액 처리군은 소금 농도가 증가할수록 수분흡수능은 감소하는 것으로 나타났다. 이는 소금의 삼투압에 의한 탈수 때문인 것으로 판단되었다. 침지 시간 15시간 및 18시간일때에도 수분흡수능은 달랐지만 염지 농도에 따라 유의적인 차이를 보이는 것으로

Table 1. Changes in pH of textured vegetable protein (TVP) according to salt solution concentration and soaking time

Treatment	Marination time (hr)			
	0	12	15	18
Control ¹⁾	6.96±0.03 ^{C2)}	7.09±0.06 ^{CB}	7.26±0.04 ^{DA}	7.08±0.01 ^{AB}
T-1	6.96±0.03 ^C	7.33±0.01 ^{BB}	7.44±0.01 ^{CA}	5.90±0.02 ^{CD}
T-2	6.96±0.03 ^C	7.75±0.02 ^{AA}	7.56±0.02 ^{BB}	5.16±0.02 ^{BD}
T-3	6.96±0.03 ^B	7.80±0.01 ^{AA}	7.83±0.02 ^{AA}	6.04±0.02 ^{BC}

¹⁾ Control: Water, W1: 3% brine, W2: 6% brine, W3: 9% brine.

²⁾ Values with different superscripts within a column (^{a-d}) and a row (^{A-D}) were significantly different ($p<0.05$).

Table 2. Changes in salinity of textured vegetable protein (TVP) according to salt solution concentration and soaking time (unit: %)

Treatment	Marination time (hr)			
	0	12	15	18
Control ¹⁾	0.50±0.00	0.30±0.00	0.40±0.00 ^{b2)}	0.40±0.00
T-1	0.50±0.00 ^B	0.50±0.00 ^B	0.63±0.06 ^{aA}	0.50±0.00 ^B
T-2	0.50±0.00	0.50±0.00	0.60±0.00 ^a	0.40±0.00
T-3	0.50±0.00	0.70±0.00	0.60±0.00 ^a	0.50±0.00

¹⁾ Control: Water, W1: 3% brine, W2: 6% brine, W3: 9% brine.

²⁾ Values with different superscripts within a column (^{a,b}) and a row (^{A,B}) were significantly different ($p<0.05$).

Table 3. Changes in water absorption capacity of textured vegetable protein (TVP) according to salt solution concentration and soaking time (unit: %)

Treatment	Marination time (hr)		
	12	15	18
Control ¹⁾	22.21±2.20 ^{aC2)}	26.24±2.30 ^{aB}	30.03±2.77 ^{aA}
T-1	9.97±1.12 ^{bB}	11.58±1.35 ^{bB}	13.25±1.47 ^{bA}
T-2	7.85±0.97 ^{bB}	9.20±2.67 ^{bcAB}	11.50±1.71 ^{bcA}
T-3	6.13±0.73 ^{dC}	7.79±1.15 ^{cB}	9.34±1.43 ^{cA}

¹⁾ Control: Water, W1: 3% brine, W2: 6% brine, W3: 9% brine.

²⁾ Values with different superscripts within a column (^{a-c}) and a row (^{A-C}) were significantly different ($p<0.05$).

나타났다. Oh 등(1997)은 멸치육 염지 시 염의 농도가 높을수록 수분함량이 적어지고 이는 염에 의한 탈수현상 때문이라고 하여 본 결과를 뒷받침해 주었다. 저장기간에 따른 변화에서는 Lee 등(2024)은 저장온도에 따른 TVP의 수분 흡수량을 측정한 결과 저장기간이 증가할수록 수분흡수율이 증가한다고 하여 본 결과와 동일하였다.

4. 색도 변화

농도를 달리한 소금 용액에 TVP를 시간별로 침지하면서 색도를 측정한 결과는 Table 4와 같다.

명도의 경우, 원료 TVP에서는 65.74 정도의 명도를 보였는데 침지하는 과정에서 명도는 69.32~71.86으로 약간 증가하는 경향을 보였다. 소금 용액 처리군의 경우 대조군보다는 다소 낮은 명도를 보였으며 소금 용액의 농도가 증가할수록

명도 변화가 적은 것으로 나타났다.

적색도의 경우, 원료 TVP는 3.37이었다. 대조군은 침지하는 동안 약간 감소하는 경향을 보여 저장 18시간에는 2.69로 감소하는 경향이였다. 소금 용액 처리군의 경우, 12시간 침지 시 대조군에 비하여 높은 적색도를 보였고 소금 용액의 농도가 높을수록 적색도는 높았으며 15시간에는 약간 증가하다가 다시 감소하는 경향을 보였다.

TVP의 황색도는 18.21이었으며 대조군은 침지하면서 황색도가 초기보다는 점차 감소하는 경향을 보였다. 소금 용액 처리군의 경우에서는 대조군에 비하여 높은 황색도를 보였고 18시간 침지하는 동안 대조군보다는 유의적으로 높은 값을 보였다.

Seo WD(2003)는 돈육 염지 시 염지 농도가 증가할수록 명도와 황색도는 감소하였다고 하여 본 결과와는 다른 경향을

Table 4. Changes in color value of textured vegetable protein (TVP) according to salt solution concentration and soaking time

Treatment	Marination time (hr)				
	0	12	15	18	
L	Control ¹⁾	65.74±0.01 ^{aD}	71.86±0.01 ^{aA}	69.32±0.01 ^{bC}	70.03±0.01 ^{aB}
	T-1	65.74±0.01 ^{aC}	69.07±0.01 ^{bB}	70.40±0.02 ^{aA}	69.34±0.01 ^{bA}
	T-2	65.74±0.01 ^{aD}	65.83±0.02 ^{cC}	66.16±0.01 ^{cB}	67.08±0.01 ^{cA}
	T-3	65.74±0.01 ^{aA}	64.69±0.02 ^{dC}	63.58±0.01 ^{dD}	64.82±0.01 ^{dB}
a	Control	3.37±0.06 ^{aA}	1.87±0.03 ^{dD}	2.98±0.01 ^{cB}	2.69±0.01 ^{cC}
	T-1	3.37±0.06 ^{aA}	2.38±0.02 ^{cC}	2.65±0.01 ^{dB}	2.16±0.03 ^{dD}
	T-2	3.37±0.06 ^{aA}	2.51±0.05 ^{bD}	3.02±0.04 ^{bB}	2.78±0.03 ^{bC}
	T-3	3.37±0.06 ^{aA}	2.64±0.02 ^{aD}	3.15±0.02 ^{cC}	3.24±0.02 ^{aB}
b	Control	18.21±0.04 ^{aA}	15.09±0.01 ^{dC}	16.48±0.01 ^{dB}	14.86±0.01 ^{dD}
	T-1	18.21±0.04 ^{aA}	17.01±0.02 ^{cC}	17.70±0.01 ^{cB}	16.31±0.02 ^{cD}
	T-2	18.21±0.04 ^{aC}	18.27±0.03 ^{bB}	18.47±0.01 ^{bA}	18.19±0.01 ^{bC}
	T-3	18.21±0.04 ^{aD}	18.79±0.01 ^{aB}	18.64±0.01 ^{aC}	18.88±0.02 ^{aA}

¹⁾ Control: Water, W1: 3% brine, W2: 6% brine, W3: 9% brine.

²⁾ Values with different superscripts within a column (^{a-d}) and a row (^{A-D}) were significantly different ($p<0.05$).

Table 5. Changes in shear force of textured vegetable protein (TVP) according to salt solution concentration and soaking time (unit: g)

Treatment	Marination time (hr)			
	0	12	15	18
Control ¹⁾	4,394.52±1272.91 ^{aA2)}	2,854.49±225.33 ^{bB}	2,961.62±663.59 ^{aB}	3,087.64±412.23 ^{aB}
T-1	4,394.52±1272.91 ^{aA}	3,255.08±112.04 ^{abB}	3,080.63±227.30 ^{aB}	3,194.74±587.41 ^{aB}
T-2	4,394.52±1272.91 ^{aA}	3,412.20±355.39 ^{aAB}	3,180.79±555.78 ^{aB}	3,219.08±368.92 ^{aB}
T-3	4,394.52±1272.91 ^{aA}	3,529.98±368.18 ^{aAB}	3,198.37±220.75 ^{aB}	3,089.53±275.87 ^{aB}

¹⁾ Control: Water, W1: 3% brine, W2: 6% brine, W3: 9% brine.

²⁾ Values with different superscripts within a column (^{a,b}) and a row (^{A,B}) were significantly different ($p < 0.05$).

Table 6. Changes in texture of textured vegetable protein (TVP) according to salt solution concentration and soaking time

Treatment	Treatment time (hr)				
	0	12	15	18	
Hardness (g)	Control ¹⁾	10,537.91±44.19 ^{aA}	8,608.25±82.40 ^{bB}	7,671.87±35.59 ^{cC}	6,712.92±87.02 ^{dD}
	T-1	10,537.91±44.19 ^{aB}	11,587.54±44.54 ^{cA}	10,274.62±24.66 ^{cC}	9,944.12±80.99 ^{dD}
	T-2	10,537.91±44.19 ^{aB}	11,771.19±86.02 ^{bA}	10,558.72±85.79 ^{bB}	10,396.12±98.45 ^{bC}
	T-3	10,537.91±44.19 ^{aD}	12,497.25±20.01 ^{aA}	10,862.84±109.22 ^{aB}	10,750.60±30.98 ^{aC}
Gumminess (g)	Control	8,966.24±95.74 ^{aA}	6,762.42±83.27 ^{cB}	6,323.72±96.89 ^{dC}	5,227.91±50.12 ^{dD}
	T-1	8,966.24±95.74 ^{aB}	9,662.41±91.03 ^{bA}	7,871.54±67.27 ^{cC}	7,735.31±88.84 ^{dD}
	T-2	8,966.24±95.74 ^{aB}	9,691.02±96.50 ^{bA}	8,080.51±67.39 ^{bC}	8,001.91±66.90 ^{bC}
	T-3	8,966.24±95.74 ^{aB}	10,313.89±53.69 ^{aA}	8,729.89±90.11 ^{aC}	8,568.86±89.34 ^{aD}
Chewiness (g)	Control	9,108.33±83.28 ^{aA}	6,092.65±84.40 ^{bB}	5,492.49±95.48 ^{dC}	4,636.66±52.03 ^{dD}
	T-1	9,108.33±83.28 ^{aA}	9,178.74±79.85 ^{cA}	7,315.87±77.68 ^{cB}	7,180.44±94.92 ^{cC}
	T-2	9,108.33±83.28 ^{aB}	9,408.02±48.02 ^{bA}	7,878.53±58.51 ^{bC}	7,741.61±48.56 ^{bD}
	T-3	9,108.33±83.28 ^{aB}	9,907.54±52.54 ^{aA}	8,779.20±23.54 ^{aC}	8,279.75±72.95 ^{aD}
Adhesiveness	Control	-3.92±0.17 ^{aA}	-4.23±1.46 ^{aA}	-5.40±2.94 ^{aA}	-6.22±6.44 ^{aA}
	T-1	-3.92±0.17 ^{aA}	-3.27±2.45 ^{aA}	-4.33±1.12 ^{aA}	-5.67±2.12 ^{aA}
	T-2	-3.92±0.17 ^{aB}	-2.38±1.31 ^{aA}	-3.61±0.07 ^{aB}	-4.54±0.36 ^{aB}
	T-3	-3.92±0.17 ^{aD}	-2.16±0.07 ^{aA}	-2.72±0.23 ^{aB}	-3.21±0.46 ^{aC}
Springiness	Control	0.94±0.02 ^{aA}	0.91±0.05 ^{bA}	0.91±0.00 ^{bA}	0.91±0.03 ^{aA}
	T-1	0.94±0.02 ^{aA}	0.94±0.02 ^{abA}	0.94±0.00 ^{aA}	0.91±0.07 ^{aA}
	T-2	0.94±0.02 ^{aA}	0.95±0.04 ^{abA}	0.95±0.02 ^{aA}	0.95±0.00 ^{aA}
	T-3	0.94±0.02 ^{aA}	0.96±0.02 ^{aA}	0.94±0.01 ^{aA}	0.95±0.02 ^{aA}
Cohesiveness	Control	0.84±0.03 ^{aA}	0.79±0.01 ^{bB}	0.79±0.02 ^{bB}	0.79±0.02 ^{aB}
	T-1	0.84±0.03 ^{aA}	0.81±0.01 ^{abB}	0.81±0.01 ^{abAB}	0.80±0.02 ^{aB}
	T-2	0.84±0.03 ^{aA}	0.81±0.02 ^{abA}	0.81±0.01 ^{abA}	0.81±0.02 ^{aA}
	T-3	0.84±0.03 ^{aA}	0.82±0.01 ^{aA}	0.82±0.00 ^{aA}	0.82±0.01 ^{aA}

¹⁾ Control: Water, W1: 3% brine, W2: 6% brine, W3: 9% brine.

²⁾ Values with different superscripts within a column (^{a-d}) and a row (^{A-D}) were significantly different ($p < 0.05$).

보였는데 이는 시료의 차이 때문인 것으로 사료되었다.

5. 전단력의 변화

농도를 달리한 소금 용액에 TVP를 시간별로 침지하면서 전단력을 측정한 결과는 Table 5와 같다.

초기 TVP의 전단력은 4,394 g으로 가장 높은 값을 보였고 대조군의 경우, 물에 침지하는 동안 전단력이 감소하는 경향을 보였으며 침지 시간이 길어질수록 다시 약간씩 증가하였으나 침지 전과는 유의적인 차이를 보이는 것으로 나타났다. 소금 용액 처리군의 경우, 12시간 침지하였을 때 대조군에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타내었으며 소금 용액의 농도가 높을수록 높은 전단력을 나타내었다. 이와 같은 이유는 소금 용액에의 침지로 Table 3에서와 같이 수분흡수능이 떨어지므로 대조군에 비해 전단력이 약간 증가하는 경향으로 판단되었다. 침지 시간 15시간 및 18시간에서는 대조군은 약간 증가하고 소금 용액 처리군은 12시간 침지 시에 비하여 전단력이 감소하는 경향이였다.

6. 조직감 변화

농도를 달리한 소금 용액에 TVP를 시간별로 침지하면서 전단력을 측정한 결과는 Table 6과 같다.

초기 TVP의 경도는 10,537 g, 검성은 8,966 g, 씹힘성은 9,108 g이었고 대조군의 경우 물에 침지하는 동안 경도, 검성 및 씹힘성은 감소하는 경향을 보였다. 소금 용액 처리군의 경우, 12시간 침지하였을 때 초기보다 약간 증가하였으나 그 이후에는 침지하는 동안 서서히 감소하는 경향을 보였다. 소금 용액의 농도가 높을수록 유의적으로 높은 경도, 검성 및 씹힘성을 나타내었다. 부착성과 탄성 및 응집성은 대조군과 소금 용액 처리군간 큰 차이를 보이지는 않는 것으로 판단되었다.

이와 같은 결과를 종합하여 보면 육류의 조직감과 유사하도록 만든 TVP는 실제로는 육류와는 조직감이나 맛 등이 다소 다르므로 TVP를 다양한 가공식품 제조에 활용하기 위하여 우선 TVP를 소금 용액을 농도별로 제조하여 시간별 침지한 결과, pH의 결과로 보면 침지 시간이 18시간이 되었을 때는 pH 변화가 크게 일어나 15시간 이내의 침지가 적당한 것으로 판단되었으며 TVP를 이용한 식품 제조 가공 시 염도, 수분흡수능, 조직감 등의 결과를 기초자료로 사용하면 좋을 것으로 사료되었다.

요약 및 결론

Textured vegetable protein(TVP)를 식품 제조 시 활용하기 위하여 농도별로 제조한 소금 용액에 시간별로 침지 시키고

TVP의 이화학적 품질 특성을 측정하였다. 소금 용액에 TVP 침지 시 대조군에 비해 pH가 증가하는 경향이였으나 18시간 침지 시에는 오히려 감소하였다. 염도는 침지 시간에 따라 대조군은 초기보다 약간 감소하였으나 소금 용액 처리군은 대조군에 비하여 염도가 높게 나타났다. 수분흡수능은 대조군은 침지 시간이 증가하면 수분흡수능도 증가하였으나 소금 용액 처리군은 소금 용액의 농도가 증가할수록 수분흡수능은 감소하였다. 명도의 경우, 침지하는 동안 소금 용액 처리군은 대조군보다 명도 변화가 적게 나타났다. 적색도는 소금 용액의 농도가 높을수록 적색도는 높았으며 황색도는 침지하는 동안 대조군에 비하여 높은 황색도를 보이는 것으로 나타났다. 경도, 검성 및 씹힘성은 대조군의 경우 물에 침지하는 동안 감소하는 경향을 보였다. 소금 용액 처리군은 소금 용액의 농도가 높을수록 유의적으로 높은 경도, 검성 및 씹힘성을 나타내었다. 부착성과 탄성 및 응집성은 대체적으로 시료 간 큰 차이를 보이지는 않았다.

감사의글

본 과제(결과물)는 2024년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신사업의 결과입니다(2021RIS-001).

References

- Anderson JW, Bush HM. 2011. Soy protein effects on serum lipoproteins: A quality assessment and meta-analysis of randomized, controlled studies. *J Am Coll Nutr* 30:79-91
- Bhat ZF, Fayaz H. 2011. Prospectus of cultured meat-advancing meat alternatives. *J Food Sci Technol* 48:125-140
- Bhat ZF, Kumar S, Fayaz H. 2015. *In vitro* meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *J Integr Agric* 14:241-248
- Choi YS. 2005. Physicochemical and sensory characteristics of boiled pork loin as affected by cooking condition, geometric shape and tumbling treatment. Master's Thesis, Konkuk Univ. Seoul. Korea
- Ekmekcioglu C, Wallner P, Kundi M, Weisz U, Haas W, Hutter HP. 2018. Red meat, diseases, and healthy alternatives: A critical review. *Food Sci Nutr* 58:247-261
- Hoek AC, Luning PA, Weijzen P, Engels W, Kok FJ, de Graaf C. 2011. Replacement of meat by meat substitutes. A survey on person- and product-related factors in consumer acceptance. *Appetite* 56:662-673

- Jung AH, Hwang JH, Park SH. 2021. Production technologies of meat analogue. *Anim Food Sci Ind* 10:54-60
- Kim CJ. 2005. Development of meat substitutes using vegetable protein. In 2005 The East Asian Society of Dietary Life Spring Conference. pp.75-92. The East Asian Society of Dietary Life
- Lee S, Jung SY, Seo MS, Park CS. 2024. Effects of storage temperature on quality characteristics of texturized vegetable protein. *Food Sci Preserv* 31:46-63
- Moon YH, Kim YK, Hyon JS, Lee JH, Jung IC. 2002. Effects of salt concentrations of curing solution on myofibrillar protein extractability, fragmentation, water holding capacity, salt contents and palatability of cured pork loins. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31:999-1004
- Oh SW, Lee NH, Kim YM, Nam EJ, Jo JH. 1997. Salt penetration properties of anchovy (*Engraulis japonica*) muscle immersed in brine. *Korean J Food Sci Technol* 29:1196-1201
- Seo WD. 2003. Effects of tumbling method and salt concentration of soy sauce-*kochugang* on marination on quality characteristics of pork. Master's Thesis, Konkuk Univ. Seoul. Korea
- Shin YM. 2014. Quality characteristics and antioxidant activities in soybean meat made of whole soybean produced from Korea. Master's Thesis, Gyeongnam National Univ Sci Technol. Jinju. Korea
-

Received 23 September, 2024

Revised 02 October, 2024

Accepted 10 October, 2024

방기 뿌리 (*Sinomenium acutum* rhizome) 추출물 및 그 알칼로이드 성분의 항근위축 효과

김 경 · *오 윤 신*

을지대학교 식품영양학과 연구원, *을지대학교 식품영양학과 교수

Protective Effects of *Sinomenium acutum* Rhizome and Its Alkaloids against Dexamethasone-induced Atrophy in C2C12 Myoblasts

Kyong Kim and *Yoon Sin Oh*

Researcher, Dept. of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

*Professor, Dept. of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

Abstract

Skeletal muscle is an organ that regulates biological metabolic energy. Its dysfunction causes decline of body functions and disability, thus deteriorating the overall quality of life. Various materials are being developed with an anti-sarcolytic effect. However, anti-sarcolytic effect of *Sinomenium acutum* rhizomes extract (SAE) remains unclear. Therefore, this study aimed to investigate anti-muscle atrophy effects of SAE and its alkaloids, including sinomenine (SIN), magnoflorine (MF), acutumine (ACU), and *N*-ferulytyramine (NFT) isolated from SAE, on dexamethasone (Dex)-induced myotubules. C2C12 myogenic cells differentiated for 6 days were treated with 1 mM Dex for 24 hours. Induction of muscular atrophy was confirmed by a decrease in myogenin expression. We found that Dex increased expression levels of muscle-specific ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. However, mRNA and protein levels of these muscle-specific ubiquitin ligases were significantly reduced by cotreatment with SIN, MF, and NFT in myotubes. Glucose uptake reduced by Dex in myotubules were also restored by SIN, MF, and NFT treatments. These results suggest that SIN, MF, and NFT can reduce muscle wasting and enhance glucose uptake in Dex-treated myotubes, highlighting their potential as therapeutic agents to prevent muscle atrophy.

Key words: muscular atrophy, *Sinomenium acutum* rhizomes, C2C12, dexamethasone

서 론

포유동물에서 근육 단백질은 단식상태 또는 질병 중에 동원되어 간 포도당 생성과 에너지 생산을 위한 아미노산 공급원으로서 중요한 역할을 한다. 근육 위축(muscle atrophy)은 장기간의 부동, 노화, 기아, glucocorticoid계 약물, 근골격계, 신경계 기능 이상, 제2형 당뇨병과 같은 만성 질환을 포함한 다양한 질환자에게서 발생할 수 있다. 근육 위축은 수축성 단백질 합성 속도와 분해 속도 사이의 음의 균형으로 인해 발생하는데 근육 단백질의 전반적인 분해 속도가 증가하면

서 근육량과 단백질 함량이 급속히 손실되는 특징을 갖는다 (Hasselgren 등 2005). 또한 기초대사량을 감소시켜 비만과 함께 대사증후군을 촉진하는 악순환을 일으킨다. 무엇보다 근육 위축은 일상 생활 활동 수행 능력 상실 등으로 인해 삶의 질을 감소시키며 결과적으로 수명을 단축시킬 수 있다 (Rosenberg IH 1997; Faulkner 등 2007; Jeong 등 2017).

특히, 스트레스 호르몬으로 알려진 내인성 글루코코르티코이드(glucocorticoids, GCs) 자극에 의해 발생된 근육 위축은 유비퀴틴-프로테아좀 의존성 단백질 분해에 의해 발생하며 근육 섬유의 직경 감소와 함께 근육량이 감소하는 것으로

* Corresponding author: Yoon Sin Oh, Professor, Dept. of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam 13135, Korea. Tel: +82-31-740-7287, Fax: +82-31-740-7370, E-mail: ysoh@eulji.ac.kr

알려져 있다(Hasselgren PO 1999; Sartori 등 2021). 대표적으로 합성 GC 성분 중 하나인 덱사메타손(dexamethasone, Dex)은 일반적으로 염증성 질환 및 자가면역 질환자에게 처방되거나 과도한 또는 지속적인 덱사메타손 처리는 인슐린 저항성을 증가시켜 포도당 소비 및 이용을 억제하여 미토콘드리아 기능 장애 및 근육 위축을 유발하는 것으로 보고된다(Kuo 등 2013; Ochi 등 2015). 근육축 기작을 간단히 설명하면, 근육축 신호는 골격근 세포로 유비퀴틴(ubiquitin) 부착을 증가시켜 골격근 단백질 분해와 관련된 여러 신호단백질의 활성화를 유도한다(Bonaldo & Sandri 2013). 이 과정에서 근육축 핵전사인자로 알려진 muscle atrophy F-box(MAFbx/atrogen-1)와 muscle RING-finger protein-1(MuRF1)이 증가한다. MAFbx/atrogen-1은 골격근의 비대(hypertrophy)와 단백질 합성과 관련된 MyoD와 eIF3f와 같은 핵 내 전사인자의 분해를 촉진하여 근육축을 진행시키며, MuRF1은 골격근을 구성하는 troponin I, myosin heavy chain, myosin binding protein C 그리고 myosin light chain의 반감기를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Clarke 등 2007; Cohen 등 2009; Csibi 등 2010). 따라서 MAFbx/atrogen-1과 MuRF-1은 근육축의 가장 중요한 마커로 인식되고 있으며 근감소증의 기전과 약물 효능평가 연구에 있어서 Dex 유도 근육축 동물 모델, 세포모델 등을 이용한 근육 위축의 개선은 임상 적용 확대에 큰 의미를 지닌다고 평가한다(Won HS 1991; Bodine 등 2001; Bodine & Baehr 2014).

방기(*Sinomenium acutum*)는 새모래 덩굴과(*Menispermaceae*)에 속하는 낙엽덩굴식물이며 줄기 및 뿌리를 약전에 사용되는 것으로 보고된다(Lee 등 2013). 방기는 민간요법으로 신경통, 광범위한 관절염(arthritis) 등의 증상으로 나타나는 부종(arthredema), 관절 수종(hydrarthrosis) 등을 치료하는데 사용되어 왔다(Yamasaki H 1976). 동의보감에서는 안면신경마비, 손발통증, 원활한 배변활동, 수종, 풍종, 각기를 낮게 한다고 기재되어 있다. 또한 최근 연구 결과에서는 항과민성 작용 및 항염증 작용(Liu 등 1996; Kim 등 2000) 과 혈당조절 및 고지혈증(Ghee & Lee 2005), 항암 및 면역기능(Kim 등 2004; Lee H 2004) 등의 효과가 보고되었다. 알려진 방기의 주요 성분으로는 sinomenine, magnoflorine, acutumine, sinacutine, N-ferulytyramine 등의 alkaloid와 lignan 성분인 syringaresinol 등이 알려져 있으며(Zhao 등 2005), 최근 방기 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 그 단일 성분 7종의 항근육위축 효과가 보고되었으나(Jung 등 2023) 근관 직경만을 측정된 결과로 기전은 알려지지 않았다. 이처럼 방기는 다양한 약리작용을 가지는 기능성 물질이지만 그 단일 성분에 대한 근육 위축 관련 기전 및 포도당 소비 경로를 조절하여 근육 위축을 억제할 수 있는지 등에 대한 연구는 부족하다. 따라서 본 연구는 근육 위축 세포모델을 이용하여 방기 뿌리 추출물과 언급된 알칼로이드

성분 4종의 근육축 조절 활성을 검증하고 포도당 소비측정을 통해 근육 위축을 예방할 수 있는 치료제로서의 잠재력을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Dexamethasone는Sigma-aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Duchefa(Haarlem, Netherlands) 제품을 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)는 Gibco(Paisley, UK)에서 구입하였고, Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM), horse serum(HS), Penicillin/streptomycin, Trypsin-EDTA와 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)는 WELGENE(Daegu, Korea)으로부터 구입하였다. 항체로 사용된 anti-myogenin, anti- α -tubulin은 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서, anti-MAFbx (F-9)은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서, horseradish peroxidase(HRP)-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit, anti-mouse)는 PeproTech(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2. 방기 추출물 및 그 단일 성분 4종 획득

본 실험에 사용된 방기 추출물(*Sinomenium acutum* rhizome, SAE) 및 이의 분획물로부터 획득한 알칼로이드 성분의 Sinomenine(SIN, $C_{19}H_{23}NO_4$), Magnoflorine(MF, $C_{20}H_{24}NO_4$), Acutumine(ACU, $C_{19}H_{24}ClNO_6$), N-trans-feruloyltyramine(NTF, $C_{18}H_{19}NO_4$)은 한양대학교 약학대학 김철영 교수님 실험실로부터 제공받았다. SAE 시료는 100 mg/mL의 농도로, SIN, MF, ACU, NTF는 1.0 mM 농도로 DMSO에 용해하였으며 시료 처리 시에는 DMSO의 최종 농도가 0.1%(v/v) 미만이 되도록 첨가하였다.

3. 근관세포(myotube)로의 분화와 근육 위축 유도

근육 C2C12 근아세포주(myoblasts)는 American Type Culture Collection(ATCC) (CRL-1772; Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며 10% FBS 및 1% penicillin streptomycin를 함유한 고농도 포도당 DMEM으로 구성된 성장배지(GM)에서 48시간 배양하였다. C2C12 근아세포(myotube) 분화 유도를 위해 2.0×10^5 cell의 농도로 6 well에 분주하고 GM 배지로 24시간 배양 후 2% 말 혈청(horse serum)을 함유하는 DMEM으로 구성된 분화배지(DM)로 24시간마다 배지를 교환하면서 분화 유도(myotube)를 시킨 후 실험에 이용하였다. 분화 과정에서 나타나는 형태 변화는 매일 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였으며 시간별 반응 후 세포내 단백질을 추출하

여 마이오젠으로 분화정도를 확인하였다. 6일간 C2C12 myotube로의 분화과정을 거친 후 근위축 유도를 위하여 Dex를 10 mM 농도로 DMSO에 용해시킨 후 무혈청배지(serum-free media)에 1 μ M의 농도가 되도록 희석하여 넣은 후 24시간 동안 처리하였다. 방기 시료에 대한 항근육 위축(anti-atrophy) 효과를 관찰하기 위하여 제시한 농도의 방기 시료를 1 mM Dex와 함께 동시 처리하였다.

4. 세포독성평가

C2C12 myoblast에 대한 시료의 독성 정도를 확인하기 위하여 96 well plate에 1.0×10^4 cells/well의 농도로 분주한 후 24시간 하였다. SAE은 30, 100, 300, 1,000 mg/mL를 처리하고 4종의 알칼로이드 단일 성분인 SIN, MF, ACU, NFT은 1, 10, 100, 1,000 nM의 농도로 성장배지에 희석한 후 처리하였다. 그리고 Dex의 C2C12 myoblast에서 유발하는 성장억제 정도를 확인하기 위하여 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 mM의 농도로 처리하였다. 24시간 반응 후 배지를 모두 제거하고 1.0 mg/mL MTT 시약을 각 well에 100 μ L씩 처리하여 2시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. MTT 제거한 후 well에 2-propanol을 100 μ L씩 처리하였으며 용출된 formazan을 용해시키기 위해 실온에서 10분간 교반시킨 후 microplate reader(Tecan, San Jose, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

5. 근위축 유전자 발현 분석

근위축이 유도된 C2C12 myotube 세포를 수거한 후 total RNA 추출을 위해 Trizol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 분리하고 정량하였다. 추출된 동일한 양의 RNA는 Primescript™ 1'st strand cDNA synthesis kit(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)로 cDNA를 합성하였으며 SYBR Premix Ex Taq II, ROX plus(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)와 반응시켜 ABI real-time PCR system from applied biosystem Inc.(Foster City, CA)을 이용하여 MURF1, MAFbx 유전자의 발현 패턴을 분석하였다. Real time PCR 수행조건은 90°C에서 10분, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초로 총 40주기로 수행하였다. 각 유전자의 전사 수준은 내부 대조군으로 사용된 cyclophilin의 전사 수준으로 정량 표준화하였다. Oligonucleotide primer sequence는 다음과 같다. MURF1 은 5'-TGTCGGAGGTCGTTCCG-3'(forward)와 5'-GTGCCGGTCCATGATCAC TT-3'(reverse); MAFbx는 5'-ATGCACACTGGTGCAGAGA-3'(forward)와 5'-TGTAAGC ACACAGGCAGGTC-3'(reverse); Cyclophilin은 5'-TGGAGAGC ACCAAGACAGACA-3'(forward)와 5'-TGCCGGAGTCGACAA TGAT-3'(reverse)이다.

6. 포도당 소비 측정

6일간 C2C12 myotube로의 분화과정을 거친 후 근위축 유도를 위하여 Dex를 10 mM 농도로 DMSO에 용해시킨 후 무혈청배지(serum-free media)에 1 μ M의 농도가 되도록 희석하여 넣은 후 24시간 동안 처리하였다. 방기 시료에 대한 항근육 위축(anti-atrophy) 효과는 1 mM Dex와 함께 동시 처리하였다. 근위축 유도된 세포에서 배지 내 소비된 포도당 정도를 확인하기 위해 반응 종료 후 배지를 수거한 후 포도당 분석kit(Asan Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 실험 시료와 포도당 표준용액을 20 mL씩 취하고 효소시약 3.0 mL와 함께 37°C에 5분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 포도당 표준곡선을 이용하여 정량하고 무세포 배지의 포도당 농도에서 처리된 시료의 포도당 농도를 감하여 소비량을 측정하였다.

7. 단백질 발현의 측정

세포를 차가운 DPBS로 3회 수세 후 수거된 세포는 protease inhibitor cocktail(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 phenyl methane sulfonyl fluoride(Sigma)가 첨가된 mammalian protein extraction buffer (Sigma)로 추출한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 추출된 단백질 함량은 Protein assay dye reagent concentrate(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하였으며 동량의 단백질을 SDS-PAGE에 전개하고 nitrocellulose membrane(Amersharm, GE Healthcare Life science, Germany)에 옮긴 후 항원/항체 반응을 실시한 후 ELC(Millipore, USA)로 화학발광을 유도하였으며 ATTO WSE-6200 LuminoGraph II(ATTO Corporation, Japan)으로 감지하고 Image 소프트웨어(C.S. analyzer 4, ATTO Corporation, Japan)를 이용하여 정량분석하였다.

8. 통계처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 mean±standard deviation(SD)로 나타내었다. 통계 분석은 SPSS 20.0 소프트웨어(IBM SPSS ver. 20.0.0 for Windows; IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하였다. 그룹 간 차이의 유의성은 LSD comparisons tests로 분석되었으며 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 근관세포로의 분화 조건 확립 및 텍사메타손(Dex) 처리에 의한 세포 생존율 변화

근육세포는 근아세포(myoblast)에서 근관세포(myotube)로

myogenesis 과정을 통해 분화한다. 근육세포는 MyoD, myogenic regulatory factors(MRFs), MHC 등과 같은 조절인자의 발현량이 증가에 의해 분화되며, 분화 초기에 증가하는 MyoD는 세포 주기 조절하고 세포 증식을 억제하면서 분화를 촉진하고, 분화 후기에 myogenin(MyoG)은 근관의 형성을 유도하고 세포 증기를 중지시키며, 미오신 구성 단백질 중 하나인 MHC와 같은 유도 인자들과 함께 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다(Hasty 등 1993; Ferri 등 2009; Jeong 등 2011; Bentzinger 등 2012). 근위축 세포모델의 구축을 위하여 C2C12 세포를 대상으로 근아세포에서 근관세포로의 최적의 분화조건을 MyoD 전사 인자 계열의 구성원인 MyoG으로 확인하였다. C2C12 근아세포를 대상으로 성장배지(GM)를 이용하여 80~90% confluent한 상태로 배양한 다음 새로운 분화 배지(DM)로 매일 교환한 결과, 분화 유도 1일째부터 MyoG의 유의미한 발현의 증가($p<0.05$)가 나타났으며, 분화 3일째부터 MyoG의 변화는 4.7배 이상($p<0.001$)의 증가를 보였고 분화 8일째까지 MyoG의 발현은 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 근관세포로 분화하는 과정에서 증가하는 MyoG의 발현과 분화조건에 관련된 기존 연구결과 등을 참고하여 분화 6일이 최적의 실험조건임을 확인하였다(He 등 2023; Jung 등 2023). 근위축 유도를 위해 사용한 Dex이 C2C12 근관세포 독성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 성장 억제 정도를 확인하였다. Fig. 1B에 제시된 바와 같이 0.5, 1.0, 5.0, 10, 100 mM의 농도로 Dex를 24시간 처리하였을 경우 $>10 \mu\text{M}$ Dex 농도($p<0.001$)에서 생존율 및 성장 억제가 나타났다. 6일간 분화된 C2C12 근관세포(DM)에

독성이 없는 1 mM Dex로 처리(DM+Dex) 후 MyoG으로 확인한 결과 대조군에 비해 25.5%($p<0.001$ vs. DM)의 발현이 억제되었으며 이를 통해 정상적인 근분화 유도가 저해되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1C). 근 위축 연구에 사용된 Dex같은 약물의 처리는 기본적으로 세포독성이 없는 조건에서 근위축을 유발해야 하는 것으로 보고된다(Park 등 2017). 따라서 우리는 6일간 분화된 세포에 생존율 및 성장에 큰 영향을 미치지 않는 농도인 1 mM Dex의 24시간 처리를 실험 조건으로 설정하여 실험을 진행하였다.

2. 근위축 유도 근관세포에서 방기추출물과 그 단일성분 처리에 의한 세포 생존율 변화

C2C12 myoblasts에 대한 SAE 및 단일 성분 4종 SIN, MF, ACU, NFT의 세포독성을 확인하기 위해 시료를 제시한 농도별로 24시간 동안 처리하고 MTT assay를 통해 세포독성을 평가하였다. Bac 등(1992)의 연구결과에 따르면 생쥐 백혈구 세포인 L1210에 방기 메탄을 추출물을 처리한 결과, 다른 40여개의 한약재 추출물과 비교하여 세포독성이 없거나 미약하다고 발표하였다. 본 실험에서는 SAE를 30, 100, 300, 1,000 mg/mL의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 30, 100 mg/mL의 농도에서는 독성을 보이지 않았으나 300 mg/mL($p<0.001$), 1,000 mg/mL($p<0.001$)에서는 세포독성을 나타냈다. 단일 성분인 SIN($p<0.001$), MF($p<0.001$), ACU($p<0.001$), NFT($p<0.05$)는 1,000 nM 농도에서 모두 독성을 보이며 MF($p<0.001$)의 경우 100 nM에서도 독성을 보였다. 따라서 세포독성이 나타나지 않는 농도를 사용하여 Dex-유도 근위축 세포모델에서 방

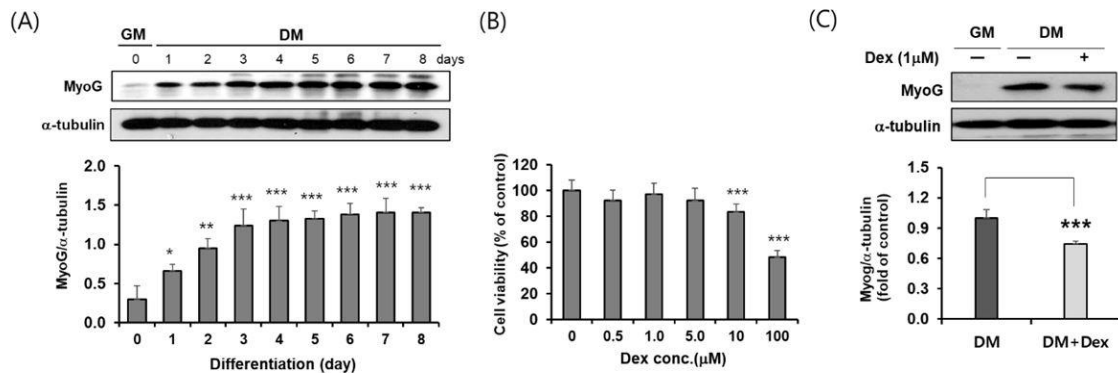


Fig. 1. Establishment of conditions for differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes and induction of muscle atrophy by treatment with dexamethasone. (A) Myogenin (MyoG) protein was compared over time to determine the timing of induction of differentiation. (B) Effects of dexamethasone (Dex) on the cell growth in C2C12 myotubes. (C) C2C12 myotubes were treated with 1 μM Dex for 24h, MyoG levels were examined by Western blot analysis. Alpha-tubulin was used as an internal standard. The results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ vs. the corresponding control group.

기 시료 처리에 따른 C2C12 myotubes의 세포보호효과를 측정하였다(Fig. 2A). 1 mM Dex와 함께 SAE를 처리한 결과 30 mg/mL의 농도에서 미미하지만 8% ($p<0.05$)의 세포 증식효과를 보였으며 4개의 단일 성분 중에 MF는 1 nM과 10 nM의 농도에서 각각 15%($p<0.01$), 17% ($p<0.001$)로 세포생존율을 증가시켰고 NFT는 1 nM, 10 nM, 100 nM의 농도에서 각각 10%($p<0.05$), 20%($p<0.001$), 22% ($p<0.001$)로 Dex 처리된 C2C12 근관 세포의 세포 생존력을 유의하게 증가시켰다(Fig. 2B).

3. 근위축 유도 근관세포에서 방기추출물과 그 단일성분에 의한 근위축 관련 유전자 및 단백질 발현

Bodine 등(2001)은 부동화, 신경 제거, 뒷다리 부하 해제, 텍사메타손 치료 및 Interleukin-1 유도 cachexia 등의 다양한 위축 조건에서 유사하게 변형되는 유전자로 2가지 새로운

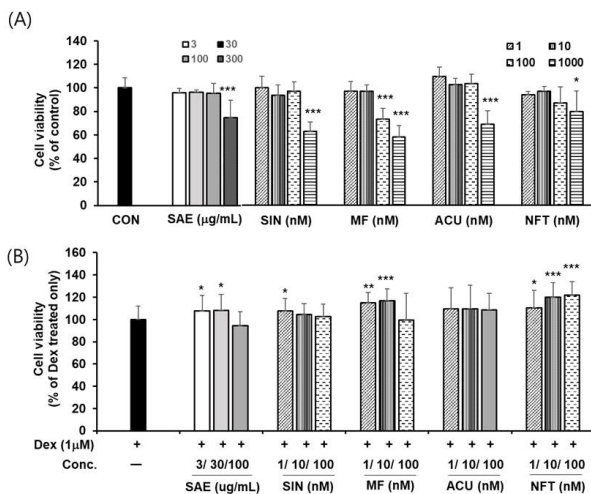


Fig. 2. Cytotoxicity evaluation of *Sinomenium acutum* extract (SAE) and its alkaloid components in C2C12 myoblasts and their cytoprotective effect in Dex-treated C2C12 myotubes. (A) C2C12 myoblasts were treated with 3, 30, 100, and 300 µg/mL SAE and four alkaloid components at concentrations of 1, 10, 100, and 1,000 nM for 24h (B) C2C12 myotubes were co-treated with 1 µM Dex containing 3, 30, and 100 µg/mL SAE or 1, 10, and 100 nM of four alkaloid components for 24h. Cell viability were determined by MTT assay. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ vs. the control (CON) group or 1 mM Dex treated only group. SAE, *Sinomenium acutum* extract; SIN, Sinomenine; MF, Magnoflorine; ACU, Acutumine; NFT, N-trans-feruloyltyramine.

근육 특이적 E3 ubiquitin ligases MuRF1(Trim63)과 MAFbx (FBX032) 유전자를 주목했으며 두 유전자는 모두 휴식 골격 근에서 비교적 낮은 수준으로 발현되어 있다가 근위축 유도 조건에서 증가하는 것으로 보고했다(Gomes 등 2001). MuRF1과 MAFbx에 대한 다양한 위축 조건에서 두 유전자의 mRNA 발현 리가제의 단백질 번역 또는 분해 속도에 대한 이해 및 다른 단백질과 교차 반응하지 않는 선택적 항체의 가용성 등에 대한 데이터 부족의 문제점을 가지고 있지만 두 유전자의 발현 조절이 근위축 관련 약물 개발의 표적이 될 수 있다는 가능성을 열어준 중요한 발견이라 할 수 있다(Bodine 등 2001). 따라서 우리는 Dex를 처리한 근관 세포의 근위축 유전자 발현에 방기추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 MURF1, MAFbx/atrogen-1의 유전자 및 MAFbx 단백질 발현수준을 측정하였다. Fig. 3에 제시된 바와 같이 Dex를 단독으로 처리한 세포는 대조군(CON) 세포에 비해 MuRF1의 mRNA 발현은 2.7배($p<0.001$), MAFbx/atrogen-1의 발현은 3.0배($p<0.001$)로 유의하게 증가함을 확인하였다. 그리고 Dex 처리로 증가한 MuRF1의 mRNA 수준은 30 µg/mL SAE 처리에 의해 41.2%($p<0.01$), 알칼로이드 성분인 SIN, MF, NFT의 10 nM 처리에 의해서는 각각 47.1%($p<0.001$), 41.2%($p<0.01$), 52.9% ($p<0.001$) 감소됨을 알 수 있었다. 또한 MAFbx/ atrogen-1 mRNA의 발현은 SAE 처리에 의해서 40.0%($p<0.01$), SIN과 MF는 50.0%($p<0.001$), NFT는 35.0%($p<0.01$)로 유의미한 감소를 보였다. ACU를 처리시 두 유전자 발현이 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 또한, MAFbx의 단백질 발현 변화를 관찰한 결과(Fig. 4), MAFbx/atrogen-1 mRNA 결과와 동일하게 SAE 처리 군에서 MAFbx의 단백질 발현량은 Dex 처리군과 비교하여 감소($p<0.05$)하였고, SIN($p<0.01$), MF($p<0.01$), NFT($p<0.01$)의 처리군에서도 MAFbx의 단백질 발현은 감소하였다. 이상의 결과를 살펴볼 때 방기 추출물과 그 알칼로이드 성분인 SIN, MF, NFT가 Dex 처리에 의하여 유발된 근위축을 억제한다는 것을 알 수 있으며 유비퀴틴-프로테아좀(ubiquitin-proteasome) 경로의 차단에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

4. 근위축 유도 근관세포에서 방기추출물과 그 단일성분 처리에 의한 포도당 흡수능 변화

Glucocorticoids(GCs) 성분의 약물처리는 다양한 조직과 세포에서 포도당 소비에 매우 복잡한 영향을 미치며 근세포 위축유발과 함께 포도당 소비를 억제하는 것으로 보고된다(Gwag 등 2013; Kuo 등 2013; Jiang 등 2019). 따라서 Dex 처리가 근육 내 포도당 소비를 감소시키는지 확인한 결과, C2C12 근관세포에서 1 mM Dex 처리는 대조군에 비해 포도당 소비를 약 33%($p<0.001$) 감소시켰다. 반면 Dex 처리군과

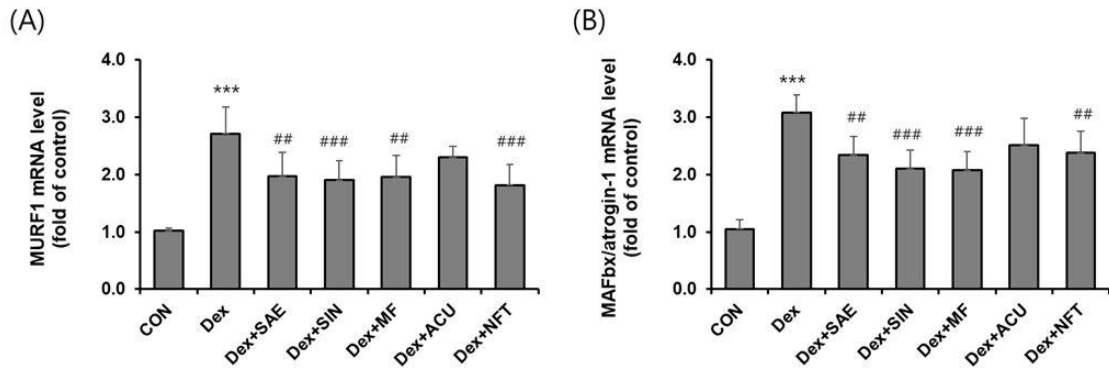


Fig. 3. Effects of SAE and its alkaloids on the expression of atrophy-associated genes in Dex-induced C2C12 myotube. The gene expression of ubiquitin E3 ligases (A) MuRF1 and (B) MAFbx/atrogen-1 were detected using qRT-PCR following co-treatment with 1 μ M Dex and experimental samples. The relative expression of genes was quantified by cyclophilin. The respective concentrations of the samples are as follows. SAE was used at 30 mg/mL, and each of the four alkaloid components was used at 10 nM. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3); ** p <0.01 and *** p <0.001 compared to the CON; ## p <0.01 and ### p <0.001 compared to the Dex treated only. CON, control; Dex, dexamethasone; MAFbx, muscle atrophy F-box; MuRF1, muscle Ring finger 1.

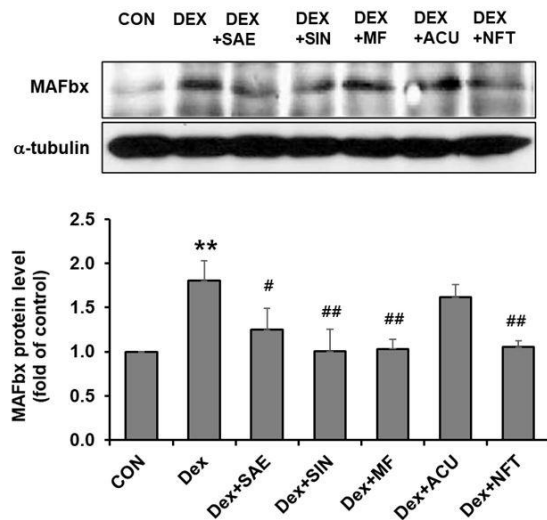


Fig. 4. Effects of SAE and its alkaloids on MAFbx protein expression in Dex-induced C2C12 myotube. The MAFbx protein level in Dex-induced C2C12 myotubes was estimated by western blot analysis using antibodies against MAFbx. α -Tubulin was used as a control for protein loading. The respective concentrations of the samples are as follows. SAE was used at 30 mg/mL, and each of the four alkaloid components was used at 10 nM. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3); ** p <0.01 compared to the CON; # p <0.05 and ## p <0.01 compared to the Dex treated only. CON, control; Dex, dexamethasone; MAFbx, muscle atrophy F-box.

비교시, 30 μ g/mL SAE의 처리는 포도당 소비를 54.5% 증가시켰고 10 nM 농도의 SIN, MF, ACU, NFT 처리 시, 포도당 소비를 유의적으로 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 골격근은 체질량의 40% 이상을 차지하며 대사 항상성에 중추적인 역할을 한다(Defronzo RA 2009). 특히, 근육은 체내 포도당을 80% 소비하는 대표적 기관으로 부동성, 노화, 약물을 포함한 수많은 요인에 의해 근육이 감소하면 몸속 포도당이 온전히 소비되지 않고 남아돌아 당뇨발생 위험을 높이게 된다(Mokdad 등 2001; Fielding 등 2011). 근육 내 포도당 수송은 5'-모노포스페이트 활성화 단백질 키나제(AMPK)에 의해 매개되며 AMP의 활성화는 글루코오스 수송체(GLUT4)의 세포질로부터 세포막으로의 이동을 증가시킴으로써 세포 내 포도당 소비를 조절한다. 그리고 인슐린 수용체 매개 PI3K/Akt 경로도 GLUT4 발현 조절에 참여하는 것으로 보고된다(Kurth-Kraczek 등 1999; Richter & Hargreaves 2013). SIN은 EGF/Nrf2/HO-1 축을 활성화하여 세포사멸을 억제하고 췌장 베타 세포의 염증 상태와 산화 스트레스를 개선하여 제2형 당뇨를 치료할 수 있다고 보고되었으며(Chen 등 2023) 관절염 및 골다공증에 대한 예방 효과가 보고되어 있다(Xu 등 2018; Zhang 등 2019). 근위축 관련 연구에 있어서는 SIN, MF, ACU이 Dex로 유도된 조건에서 근관직경을 각각 9.3%, 13.8%, 11.3% 개선한다는 연구 결과가 있다(Jung 등 2023). 특히 제2형 당뇨 마우스 모델을 이용하여 당뇨병성 근위축에 대한 효과를 연구한 결과, MF가 공복혈당 수치 감소와 함께 근위축과 관련된 요소들인 골격근량, 근관 직경, 혈청 크레아틴 키나아제(CK) 수치, 유비퀴틴-프로테아좀 E3-리가제

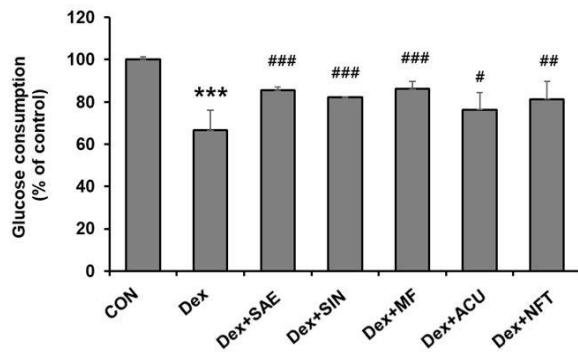


Fig. 5. Effect of SAE and its alkaloids on glucose consumption in Dex-induced C2C12 myotube atrophy. To estimate the glucose content consumed, the medium was measured with a glucose assay kit after the end of the reaction. The respective concentrations of the samples are as follows. SAE was used at 30 mg/mL, and each of the four alkaloid components was used at 10 nM. Data are expressed as the mean±S.D. (n=3); *** p <0.001 compared to the CON; # p <0.05, ## p <0.01, and ### p <0.001 compared to the Dex treated only.

관련 유전자의 발현 등을 조절했으며 무엇보다 양성대조군으로 사용된 메트포르민보다 Akt의 인산화를 더 효율적으로 증가시키는 결과를 보였다(Yadav 등 2021). 이처럼 근위축증과 관련하여 방기의 단일 성분에 대한 구체적 연구는 MF외에는 부족한 상태이다. 본 연구에서는 근단백질 분해에 관여하는 ubiquitin- proteasome pathway와 관련된 대표지표인 MuRF1, MAFbx/ atrogen-1의 유전자 및 단백질 발현량이 Dex를 처리시 증가하였음을 확인하였고 SAE 및 그 알칼로이드 성분인 SIN, MF, NFT 처리에 의해 하향 조절됨으로써 근위축 신호전달체계에 관여하고 있음을 예상할 수 있다. 따라서 근육단백질 분해에 관여하는 ubiquitin E3 ligases 신호전달 경로의 상위 유전자인 *SMAD2/3*, *FOXO1* 유전자에 대한 발현분석이 추가적으로 필요할 것으로 사료된다. 또한 Fig. 3B의 배지 내 포도당 소비 결과를 통해 방기 성분의 항근위축 효과가 포도당 대사 메커니즘과 관련된 AMPK와PI3K/Akt 활성화와의 연관성 또한 확인할 필요가 있다. 본 연구를 통해 논문에서 보고된 MF의 당뇨병성 근위축 억제효과처럼 SIN, NFT 성분도 근위축증 억제효과의 선행연구로서 잠재적 가치가 있음을 시사하는 바이다.

요약 및 결론

우리나라의 경우 65세 이상의 인구가 20% 이상인 초고령

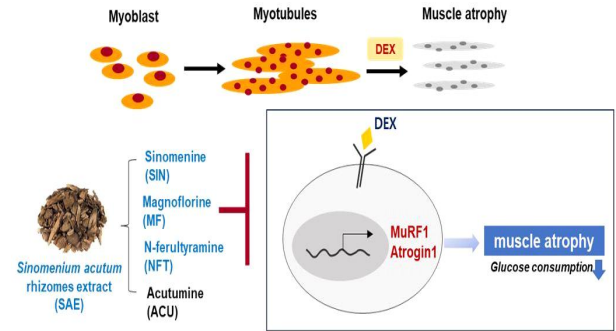


Fig. 6. Scheme of the anti-muscle atrophy effects of SAE and its alkaloids components; sinomenine (SIN), magnoflorine (MF), acutumine (ACU), and N-ferulytyramine (NFT) isolated from SAE on dexamethasone (DEX)-induced myotubules. Red lines indicates that SAE, SIN, MF, and NFT inhibits the pathways induced by DEX.

사회(super-aged society)를 눈앞에 두고 있어 대사성 질환과 함께 근위축에 대해 많은 관심을 기울이고 있다. 골격근 위축증은 복잡한 분자 신호 전달 체계를 가지며 가장 대표적인 신호전달물질로는 E3 ubiquitin ligases인 MuRF1과 MAFbx/atrogen-1이 있다. 따라서 이러한 단백질 분해 경로를 조절하는 효소들의 활성을 억제하는 소재의 발굴은 매우 중요하다. 본 실험은 Dex로 유도된 근위축에 대한 SAE 및 그 알칼로이드 성분인 SIN, MF, ACU, NFT의 항근위축 효과를 확인하고자 하였다. 그 결과 SAE를 포함하여 SIN, MF, NFT는 Dex 처리에 의해 증가된 세포 내 MuRF1과 MAFbx/atrogen-1 유전자 및 단백질 발현의 하향 조절에 기여했으며 근위축으로 감소된 근육 내의 포도당 흡수를 회복시킴으로써 당뇨병성 근위축의 예방 및 치료에 효과적일수 있음을 알 수 있었다(Fig. 6). SAE 및 그 단일 성분인 SIN, MF, NFT의 항위축 관련 메커니즘과 함께 *in vivo*의 검증 등 추가적인 연구를 통해 새로운 기능성 식품 소재로써 검증이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2024년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(NO. RS-2024-00336513)을 받아 수행된 결과의 일부로, 이에 깊은 감사를 드립니다.

References

- Bae KH, Min BS, Do DS, Kim NS, Yang GJ, Ahn BZ. 1992. Screening on cytotoxicity of medicinal plants against L1210

- cell. *Yakhak Hoeji* 36:491-495
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. 2012. Building muscle: Molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a008342
- Bodine SC, Baehr LM. 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 307:E469-E484
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294:1704-1708
- Bonaldo P, Sandri M. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* 6:25-39
- Chen J, Guo P, Han M, Chen K, Qin J, Yang F. 2023. Cognitive protection of sinomenine in type 2 diabetes mellitus through regulating the EGF/Nrf2/HO-1 signaling, the microbiota-gut-brain axis, and hippocampal neuron ferroptosis. *Phytother Res* 37:3323-3341
- Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ. 2007. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 6:376-385
- Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL. 2009. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol* 185:1083-1095
- Csibi A, Cornille K, Leibovitch MP, Poupon A, Tintignac LA, Sanchez AMJ, Leibovitch SA. 2010. The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PLoS ONE* 5:e8994
- DeFronzo RA. 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58:773-795
- Faulkner JA, Larkin LM, Claflin DR, Brooks SV. 2007. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:1091-1096
- Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M, D'Emilio A, Biagiotti L, Del Grande P, De Luca A, Stocchi V, Falcieri E. 2009. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J Cell Biochem* 108:1302-1317
- Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, Bhasin S, Morley JE, Newman AB, Abellan van Kan G, Andrieu S, Bauer J, Breuille D, Cederholm T, Chandler J, De Meynard C, Donini L, Harris T, Kannt A, Guibert FK, Onder G, Papanicolaou D, Rolland Y, Rooks D, Sieber C, Souhami E, Verlaan S, Zamboni M. 2011. Sarcopenia: An undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: Prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* 12:249-256
- Ghee SS, Lee YJ. 2005. The therapeutic effects of *bangkeehwangkee-tang* and *bangkeebokryeong-tang* on the hyperlipidemia in rats. *Korean J Herbology* 20:149-157
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. 2001. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14440-14445
- Gwag T, Park K, Kim E, Son C, Park J, Nikawa T, Choi I. 2013. Inhibition of C2C12 myotube atrophy by a novel HSP70 inducer, celastrol, via activation of Akt1 and ERK1/2 pathways. *Arch Biochem Biophys* 537:21-30
- Hasselgren PO. 1999. Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2:201-205
- Hasselgren PO, Menconi MJ, Fareed MU, Yang H, Wei W, Evenson A. 2005. Novel aspects on the regulation of muscle wasting in sepsis. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2156-2168
- Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364:501-506
- He Y, Yang P, Yuan T, Zhang L, Yang G, Jin J, Yu T. 2023. miR-103-3p regulates the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts by targeting BTG2. *Int J Mol Sci* 24:15318
- Jeong H, Lee JY, Jang EJ, Lee EH, Bae MA, Hong JH, Hwang ES. 2011. Hesperedin promotes MyoD-induced myogenic differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 163:598-608
- Jeong JS, Park CH, Kim IB, Kim JB. 2017. Activation of signaling pathways for protein synthesis by Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract in a mouse model of muscle atrophy. *Korean J Food Nutr* 30:371-377
- Jiang R, Wang M, Shi L, Zhou J, Ma R, Feng K, Chen X, Xu

- X, Li X, Li T, Sun L. 2019. Panax ginseng total protein facilitates recovery from dexamethasone-induced muscle atrophy through the activation of glucose consumption in C2C12 myotubes. *BioMed Res Int* 2019:3719643
- Jung EJ, Kim JH, Kim HM, Guo S, Lee DH, Lim GM, Syed ASH, Kim W, Kim CY. 2023. Isolation of alkaloids from *Sinomenium acutum* by centrifugal partition chromatography and their ameliorating effects on dexamethasone-induced atrophy in C2C12 myotubes. *Separations* 10:470
- Kim HM, Moon PD, Chae HJ, Kim HR, Chung JG, Kim JJ, Lee EJ. 2000. The stem of *Sinomenium acutum* inhibits mast cell-mediated anaphylactic reactions and tumor necrosis factor- α production from rat peritoneal mast cells. *J Ethnopharmacol* 70:135-141
- Kim TH, Kim YI, Hong KE, Yim YK, Lee H, Lee BR. 2004. Influence on the anti-cancer and immune response improvement of herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution into *joksamni* (ST36). *Korean J Meridian Acupoint* 21:79-93
- Kuo T, Harris CA, Wang JC. 2013. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* 380:79-88
- Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 1999. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48:1667-1671
- Lee H. 2004. Influence on the Anti-cancer and immune response improvement of Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution into *chung-wan* (CV12). *J Acupunct Res* 21:85-102
- Lee J, Weon JB, Yun BR, Eom MR, Ma CJ. 2013. Quantitative analysis for the quality evaluation of sinomenine, magnoflorine and syringaresinol in *Sinomenium acutum*. *Yakhak Hoeji* 57:161-166
- Liu L, Buchner E, Beitz D, Schmidt-Weber CB, Kaever V, Emmrich F, Kinne RW. 1996. Amelioration of rat experimental arthritides by treatment with the alkaloid sinomenine. *Int J Immunopharmacol* 18:529-543
- Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. 2001. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 286:1195-1200
- Ochi A, Abe T, Nakao R, Yamamoto Y, Kitahata K, Takagi M, Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S, Gwag T, Choi I, Kawamura T, Nemoto H, Mukai R, Terao J, Nikawa T. 2015. N-myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 570:23-31
- Park HC, Jeong JW, Choi YH. 2017. Induction of muscle atrophy by dexamethasone and hydrogen peroxide in differentiated C2C12 myotubes. *J Life Sci* 27:1479-1485
- Richter EA, Hargreaves M. 2013. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev* 93:993-1017
- Rosenberg IH. 1997. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 127:990S-991S
- Sartori R, Romanello V, Sandri M. 2021. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: Implications in health and disease. *Nat Commun* 12:330
- Won HS. 1991. Age-related changes in body growth, muscle protein content and cellular-mediated immunity and rats fed stock diets. *Korean J Food and Nutr* 4:133-139
- Xu M, Liu S, Wan R, Chen Y. 2018. Combined treatment with sinomenine and acupuncture on collagen induced arthritis through the NF κ B and MAPK signaling pathway. *Oncol Lett* 15:8770-8776
- Yadav A, Singh A, Phogat J, Dahuja A, Dabur R. 2021. Magnoflorine prevent the skeletal muscle atrophy via Akt/mTOR/FoxO signal pathway and increase slow-MyHC production in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 267:113510
- Yamasaki H. 1976. Pharmacology of sinomenine, an anti-rheumatic alkaloid from *Sinomenium acutum*. *Acta Med Okayama* 30:1-20
- Zhang B, Zhang H, Luo H, Yang C, Yuan Y. 2019. Sinomenine can promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by regulating the Akt/Runx2 signaling pathway in MC3T3-E1 cells. *Pharmazie* 74:747-750
- Zhao ZZ, Liang ZT, Zhou H, Jiang ZH, Liu ZQ, Wong YF, Xu HX, Liu L. 2005. Quantification of sinomenine in *Caulis sinomenii* collected from different growing regions and wholesale herbal markets by a modified HPLC method. *Biol Pharm Bull* 28:105-109

Received 30 August, 2024
 Revised 10 October, 2024
 Accepted 16 October, 2024

황기 조다당 획분 유래 효소 가수분해물의 면역 자극 활성

정원비 · 신현영* · 김효원 · 김다은 · 신지영** · 신광순*** · †유광원****

국립한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, *고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템 융합전공 대학원생,
㈜코시스바이오 연구소장, *경기대학교 식품생물공학과 교수, ****국립한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Immunostimulatory Activity of Enzymatic Hydrolysates Derived from Crude Polysaccharides of *Astragalus membranaceus*

Won Bi Jeong, Hyun Young Shin*, Hyo Won Kim, Da Eun Kim,
Ji-Young Shin**, Kwang-Soon Shin*** and †Kwang-Won Yu****

Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

*Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health Systems, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science,
Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Korea

**R&D Director, Cosis-Bio Co., Ltd., Jincheon 27867, Korea

***Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea

****Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

In a previous study, we fractionated crude polysaccharide (AME-CP) with macrophage-stimulating activity from a hot-water extract (AME) of *Astragalus membranaceus*. AME-CP contained glucose (Glc) as a main component sugar, suggesting that it might be rich in starch-like compounds (SLC). To enhance the immunostimulating activity of AME-CP by pruning SLC rarely known to contribute to activity, hydrolysate (AME-SH) was prepared by digesting with starch-related enzymes, including α -amylase and amyloglucosidase. AME-SH was found to contain substances with molecular weights ranging from 3.9 to 84.4 kDa. These substances were primarily composed of galactose, galacturonic acid, Glc, arabinose, rhamnose, and mannose. AME-SH significantly enhanced the production of macrophage-stimulating factors, including nitric oxide (NO), interleukin (IL)-6, and IL-12, in RAW 264.7 cells compared to AME-CP. Treatment of splenocytes isolated from C3H/HeN mice with AME-SH not only promoted IL-6 secretion, but also induced mitogenic activity. In addition, AME-SH promoted the secretion of hematopoietic growth factors including IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in Peyer's patch (PP) cells and stimulated bone marrow cell proliferation through these PP cells. In conclusion, hydrolysate (AME-SH) digested from AME-CP with starch-related enzymes could be used as a potential immunostimulant.

Key words: *Astragalus membranaceus*, crude polysaccharide, enzymatic hydrolysate, immunostimulation

서론

면역계는 외부에서 침입하는 항원이나 조직의 손상을 일으키는 물질들로부터 신체를 보호하는 수단이다. 면역계는 일반적으로 선천 면역계와 적응 면역계로 구분되어 있는데, 선천 면역

계는 신체에 침입하는 병원체와 스트레스를 감지하여 면역 반응을 통해 제거함으로써 인간의 생명 유지에 이바지한다 (Hirayama 등 2018). 대식세포는 대표적인 선천 면역계 세포로 신체에 들어오는 이물질을 삼키는 식세포 작용을 하는 면역 및 조직 항상성에 필수적인 세포로 자극에 노출되면 다양한 사이

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

토카인을 방출한다(Arango Duque & Descoteaux 2014). 사이토카인은 interleukin(IL), interferon(IFN), chemokine 및 lymphokine 계열을 포함하며 세포 간 의사소통을 매개하는 단백질로서 세포의 성장과 분화뿐만 아니라 면역 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 한다(Opdal SH 2018; Zhang 등 2018).

한편, 황기(*Astragalus membranaceus*; AM)는 콩과(Legumiosae)에 속하는 다년생 초본 식물의 뿌리로 아시아 지역과 유럽 및 아프리카의 일부 지역에 분포하며 예로부터 생약으로서 많이 사용된 것으로 알려져 있다(Kim 등 2007a). 황기의 주요 성분은 flavonoid, saponin 및 polysaccharide 등으로(Zhang 등 2009), 항염증(Bae & You 2017), 항고지혈증(Kim & Kim 2008), 항산화(Shahzad 등 2016), 항바이러스(Ghabeshi 등 2023) 및 면역 증진(Song 등 1998) 등의 효능이 있다고 보고되고 있다. 황기의 주요 성분 중 하나인 황기 다당류(*Astragalus polysaccharide*; APS)는 수용성 heteropolysaccharide의 일종으로 독성과 부작용이 적고 항종양, 항노화 및 혈당조절과 같은 약리학적 효능이 있다고 알려져 있다(Zheng 등 2020). 또한, Li 등(2022)에 따르면 APS는 면역세포가 다양한 사이토카인과 케모카인의 생성을 유도하여 면역 반응을 향상할 수 있다고 보고되었다. 이러한 APS는 펙틴 다당류 영역의 rhamnogalacturonan과 α -1,4 결합으로 구성된 glucan으로 주로 구성되어 있다고 보고되고 있다(Sheng 등 2021). 식물체 유래 다당류는 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose), 전분(starch) 및 펙틴(pectin) 등으로 구성되어 있는데 이 중 전분은 대사적으로 불활성인 저장성 다당류 중 하나로 알려져 있다(Smirnova 등 2015; Cho 등 2018).

생물전환기법은 인체에 유익한 미생물이나 효소와 같은 친환경적인 요소들로 생리활성 물질을 증진하는 방법으로 화학적인 처리 방법에 비해 친환경적이고 경제적이어서 최근 산업적으로 많이 사용되고 있다(Lee 등 2010; Sung 등 2013). 탄수화물 가수분해 효소는 탄수화물을 가수분해하여 단순당으로 분해할 수 있는 효소들로 amylase, cellulase, β -glucanase 및 hemicellulase 등이 알려져 있으며, 이를 이용하여 생물 전환을 유도한 옥수수(Cho 등 2018), 인삼(Kim 등 2007b) 및 차가버섯(Kim 등 2022) 등 생물 전환 추출물의 생리활성의 증진과 관련한 연구가 지속적으로 보고되고 있다. 대사적 비활성 다당류인 전분을 단순당으로 전환할 때 전분 분자의 내부 α -1,4-결합을 절단하는 endo-type의 가수분해효소인 α -amylase를 이용하여 텍스트린을 생성하고 텍스트린의 비환원 말단에서 단일 포도당 잔류물을 제거하는 exo-type의 효소인 amyloglucosidase를 이용하여 전분 분해 반응이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Li 등 2019).

한편, Kim 등(2024)은 이전 연구에서 황기로부터 면역 자극 활성을 나타내는 황기 조다당 획분과 황기-포스트바이오틱스를 개발하였다. 본 연구에서는 황기 관련 다양한 소재 개발의 일환으로써, 증진된 면역 자극 활성 소재 탐색을 목적으로 황기 조다당 획분에 다량으로 함유되어 있으나 활성에는 크게 기여하지 않는 것으로 알려진 전분 유사 화합물(starch-like compound;

SLC)를 제거하기 위하여, α -amylase와 amyloglucosidase와 같은 전분 관련 효소를 처리한 황기 조다당 획분의 효소처리물(AME-SH)을 제조하여 다양한 면역 자극 활성과 화학적 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 황기 효소 가수분해물의 제조

본 연구에서 이용된 황기(*A. membranaceus*, AM)는 2023년 한국에서 재배된 것을 이용하였으며, (주)에이치푸드(Pocheon, Republic of Korea)에서 구매하였다. 황기 추출물 및 조다당 획분은 Kim 등(2024)의 방법에 따라 조제하였다. 요약하면, 건조된 황기 중량의 20배(w/v) 물을 가한 후 열수추출을 진행하였으며, 이후 불용성 침전물을 제거하기 위해 원심분리(9,588 g, 4°C, 20 min, Daejeon, Republic of Korea)를 진행하고 농축(Eyela, Tokyo, Japan) 및 동결건조(Ilshin Biobase, Seoul, Republic of Korea)하여 황기 열수추출물(AM extract, AME)을 조제하였다. 이후 AME에 95% 주정을 5배 첨가하여 교반한 뒤 원심분리(9,588 g, 4°C, 20 min)하여 침전물을 투석(MW cut off: 12-14 kDa, Spectra/PorTM, Spectrum Lab, Rancho Dominguez, CA, USA), 농축 및 동결건조하여 조다당 획분(crude polysaccharide, AME-CP)으로 분획하였다. 다음으로 조다당 획분에 α -amylase(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1,000 unit 및 amyloglucosidase(Sigma Aldrich) 100 unit을 넣어, 제조사에서 제공한 최적 조건하에 4일간 반응하였다. 마지막으로, 효소를 불활성화시키기 위해 15분간 가열을 진행하고 원심분리(9,588 g, 4°C, 20 min), 투석, 농축 및 동결건조하여 황기 조다당 획분의 전분 관련 효소 가수분해물(AME-SH)을 조제하였다(Fig. 1).

2. 분자량 분포

분자량 분포는 적절한 농도로 조제한 시료를 polyvinylidene fluoride membrane filter(0.45 μ m, Jaema Trade, Gangwon, Republic of Korea)로 여과하여 Table 1과 같은 조건으로 high performance size exclusion chromatography(HPSEC, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 시스템을 이용하여 분석하였다. 표준물질은 galactose(Gal; Sigma Aldrich) 및 다양한 분자량의 pullulan(Shodex, Tokyo, Japan)을 이용하였고, retention time(RT)을 통해 표준 곡선을 작성한 후 시료 간의 RT를 비교하여 kDa으로 계산하였다.

3. 구성분 및 구성당 분포

황기 효소 가수분해물의 구성분 분포를 분석하기 위해 중성당, 산성당, 단백질, 폴리페놀 및 keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)-유사물질의 함량을 측정하였다. 중성당은 glucose(Glc; Sigma Aldrich)를 표준물질로 이용해 phenol-sulfuric acid 법(DuBois 등 1956)으로 분석하였고, 산성당은 galacturonic

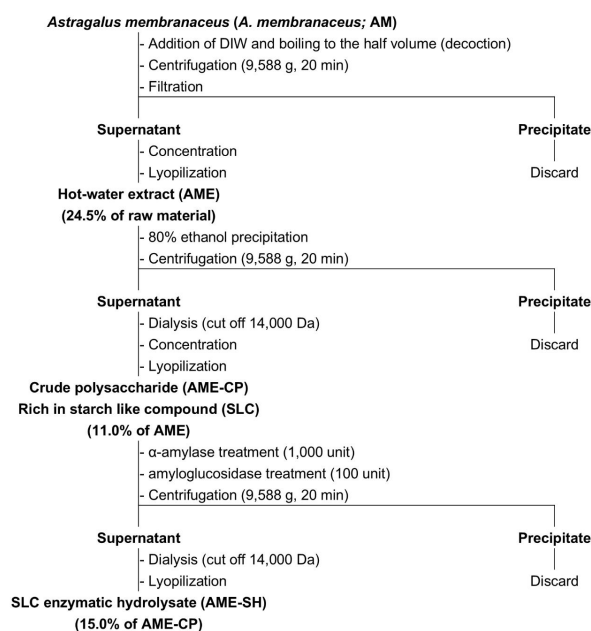


Fig. 1. Preparation scheme for enzymatic hydrolysates (AME-SH) derived from crude polysaccharides (AME-CP) of *Astragalus membranaceus*.

acid(Gal A; Sigma Aldrich)를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl 법(Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973)으로 분석하였다. 단백질은 bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 Bradford MM(1976)의 방법으로 분석하였으며, 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 Kim 등(2021)의 방법을 변형하여 분석하였다. 또한, KDO-유사물질 함량은 KDO를 표준물질로 이용하여 thiobarbituric acid법(Karkhanis 등 1978)으로 분석하였으며, 각 구

성분 함량은 %(w/w)로 나타내었다. 구성당은 Honda 등(1989) 및 Shin 등(2021)의 방법을 참고하여 분석하였다. 시료에 2 M trifluoroacetic acid(TFA; Sigma Aldrich)를 처리해 aldose 단위로 분해한 후 0.3 M NaOH와 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline(PMP; Sigma Aldrich)를 첨가하여 단당류와 PMP를 결합한 유도체로 전환시켰다. 이후 0.3 M HCl을 가해 중화시키고 증류수 및 chloroform(2상 용매계)으로 분리 및 추출하여 물 층만 분리한 뒤 PVDF membrane filter로 여과하였다. 여과한 시료는 HPLC를 이용하여 Table 1의 조건으로 분석하였으며, 분석 결과는 Glc를 기준으로 molar ratio로 나타냈다.

4. 마우스 유래 대식세포 자극 활성

실험에서 사용된 마우스 유래 RAW 264.7 세포주는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Republic of Korea)에서 입수하였으며 배양에 사용된 배지는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltman, MA, USA)과 1% penicillin/streptomycin(GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가하여 37°C 및 5%의 CO₂ 조건에서 배양하였다. 대식세포 자극 활성을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포주를 2.0×10⁶ cells/mL로 96 well plate의 각 well에 180 µL씩 분주하여 일정 시간 배양한 후 일정 농도로 희석한 시료를 각각 20 µL씩 처리한 뒤 24시간 재배양하였다. 시료 처리 후 생성된 산화질소(nitric oxide; NO)의 함량은 sodium nitrate를 표준물질로 하여 griess assay(Tursun 등 2016)를 통해 표준 곡선을 작성한 뒤 µM로 나타냈다. 대식세포 자극 인자인 interleukin(IL)-6 및 IL-12는 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 구입한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit로 분석하였고, 각 제조사에서 제공된 recombinant protein을 통해 표준곡선을 작성한 후 함량을 나타냈다.

Table 1. HPLC analysis conditions for average molecular weight and component sugar analysis

Analysis	Molecular weight distribution	Component sugar
HPLC system	Agilent 1260 Infinity series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)	Dionet Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Germany)
Column	Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, MA, USA) 300×10 mm, 8.6 µm	YMC-Triart C18 (YMC, Kyoto, Japan) 250×4.6 mm, 5 µm
Column temperature	Ambient	30°C
Flow rate	0.5 mL/min	1.0 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate	0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.7) : Acetonitrile 83:17
Injection volume	20 µL	20 µL
Detector	Refractive Index Detector (RID) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)	UV detector at 254 nm (Dionex, Idstein, Germany)
Integrator	Agilent chemstation	Chromeleon 7

5. 실험동물

동물실험은 국립한국교통대 동물실험윤리위원회 심의(KNUT IACUC 2024-01)를 거쳐 진행했으며, 생후 6주령 C3H/HeN 마우스(female)를 두얼바이오텍(Seoul, Republic of Korea)으로부터 구입하였다. 실험동물의 사료 및 물은 자유롭게 섭취할 수 있게 하였고 항온 및 항습 조건(온도 22±1 °C, 40~50%)을 유지했으며 인공조명에서 명암교대를 1일 12시간으로 유지하였다. 실험동물은 1주일간 적응 기간을 거친 후 실험에 이용되었다.

6. 비장세포에서의 마이토젠 및 사이토카인 생성능

1주일간의 적응 기간을 거친 C3H/HeN 마우스를 CO₂ gas로 마취시켜 무균적으로 비장을 적출한 후 적출한 비장은 금속망(100 mesh)에 여과해 세포를 분리시켰다. 이후 0.2% NaCl을 처리하여 적혈구를 제거한 뒤 회수한 세포를 2.5×10⁶ cells/mL로 96 well plate에 160 µL씩 분주한 뒤 무처리군 및 mitogen 처리 그룹으로 나누어 무처리군에는 증류수를 처리하고 mitogen 처리군에는 concanavalin A(Con A) 또는 lipopolysaccharide(LPS)를 20 µL씩 처리하였다. 이후 회석한 시료를 각 well에 20 µL씩 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 이후 배양 상등액을 취하고, Ez-cytox(DoGenBio, Seoul, Republic of Korea)를 30 µL씩 처리하여 시료 무처리군 대비 마이토젠 활성(mitogenic activity; %)을 분석했다. 또한, 비장세포 배양액 내의 IL-6는 BD Bioscience에서 구입한 ELISA kit로 분석하였으며, recombinant protein을 통해 작성한 표준곡선을 통해 pg/mL로 함량을 표현하였다.

7. Peyer's patch 경유 사이토카인 생성 및 골수세포 증식

Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성은 Yang 등(2004)의 방법에 따라 측정하였다. 1주일간 적응 기간을 거친 C3H/HeN 마우스를 CO₂ gas를 이용하여 마취시킨 후 소장에 존재하는 Peyer's patch를 잘라내어 조직을 금속망에 여과하여 세포를 채취하였다. 채취한 세포는 2.0×10⁶ cells/mL로 96 well plate에 180 µL씩 각 well에 분주하고 회석한 시료를 처리하여 5일간 배양한 후 배양 상등액을 회수하였다. 한편, 골수세포 증식능을 분석하

기 위해 동일한 종의 마우스의 대퇴부 뼈에 주사기를 이용해 serum free-RPMI를 주입하여 골수세포를 채취 후 여과한 골수세포에 0.2% NaCl을 처리하여 적혈구를 제거하였다. 골수 세포액은 2.0×10⁵ cells/mL로 96 well plate에 분주한 뒤 Peyer's patch 배양액을 접종하여 6일간 배양한 뒤 Ez-cytox를 처리하여 시료 무처리군 대비 골수세포 증식능(bone marrow cell proliferation; %)을 분석하였다. 회수한 배양 상등액의 IL-6 및 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)는 BD Bioscience에서 구입한 ELISA kit를 이용하여 제공된 recombinant protein에 따라 표준곡선을 작성한 후 pg/mL로 함량을 나타냈다.

8. 통계처리

모든 시험은 3번 반복하였고 분석한 결과는 평균±표준편차(standard deviation; SD)로 나타냈다. 분석 결과는 SPSS V26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Student's *t*-test로 계산해 각 $p<0.05$, $p<0.01$ 및 $p<0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 또한, 성분 간 유의성을 평가하기 위해 분산분석(analysis of variance; ANOVA)을 실시해 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$ 수준으로 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 황기 효소 가수분해물의 분자량 분포

AME-SH의 분자량 분포를 확인하기 위해 HPSEC를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 2에 나타났다. 이전 Kim 등(2024)의 연구에서 황기 조다당 획분(AME-CP)의 분자량은 소량의 106.6 kDa의 물질과 다량의 0.4 kDa의 물질이 혼재되어 있었으나(Fig. 2), 전분 관련 효소로 SLC를 가수분해한 AME-SH의 분자량 분포는 3.9-84.4 kDa의 물질이 혼재되어 있었다. 이러한 결과는 황기 조다당 획분에 함유된 SLC가 효소 처리를 통해 분해되고 제거되었을 뿐만 아니라, SLC 고분자의 구조적인 특성 때문에 내부에 함유되어 있던 저분자량 물질이 SLC 분해와 함께 외부로 배출되어 분자량에 변동이 유발된 것으로 추정할 수 있었다. 이후,

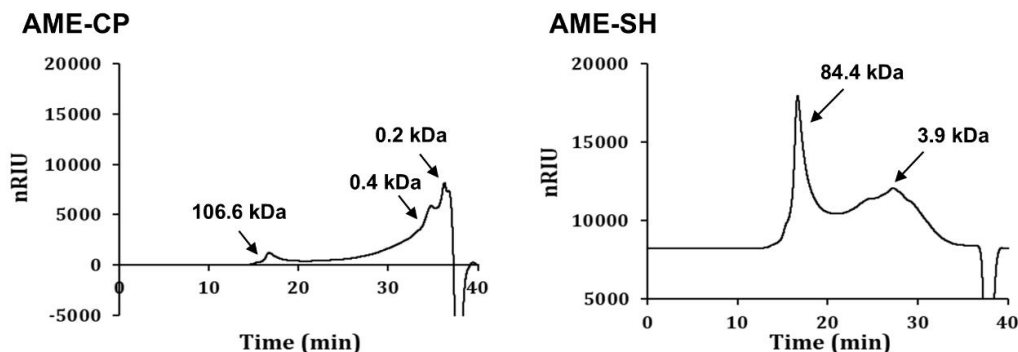


Fig. 2. Average molecular weight distribution of AME-CP and AME-SH.

본 연구에서는 AME-SH의 화학적 특성을 확인하기 위해 구성분 및 구성당 분석을 수행하였다.

2. 황기 효소 가수분해물의 구성분 및 구성당 분포

AME-SH의 구성분 및 구성당 결과는 Table 2에 나타났다. AME-SH는 주로 중성당(55.4%) 및 산성당(42.8%)으로 구성되어 있었고, 단백질(0.4%), 폴리페놀(1.0%) 및 KDO-유사물질(0.4%)은 소량 함유되어 있었다. 중성당과 산성당의 높은 구성분 함량으로부터 AME-SH는 다당류가 풍부한 것을 나타내므로, 이후 구성당 분석을 진행하였다. 구성당 분포 결과, glucose(Glc; 1.00)와 비교했을 때 galactose(Gal; 1.76)가 가장 많은 비중을 차지하였고, 이외에도 galacturonic acid(GalA; 1.10), arabinose(Ara; 0.78), rhamnose(Rha; 0.65), mannose(Man; 0.62) 및 glucuronic acid(GlcA; 0.34)로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. 이전 Kim 등(2024)의 연구에서 황기 조다당 획분은 Glc가 83.1%와 Gal 및 GalA는 각각 3.2 및 7.1%를 보였던 것에 반해 AME-SH는 주요 구성당으로 Gal 및 GalA를 주로 함유하는 것을 보여 glucan-type이었던 주요 다당류가 효소 처리에 의해 제거되며 구성당의 분포 비율이 변화되었음을 알 수 있었다. 또한, Li 등(2009)에 따르면, 황기 다당류는 다량의 전분 유사 화합물 α -1,4-glucan의 연속적인 구조를 가진다고 보고하였는데, 본 연구에서 효소 처리에 의해 높은 Glc 함량이 감소된 점을 보아, α -amylase 및 amyloglucosidase

Table 2. Chemical properties and component sugar of AME-SH

Chemical properties	AME-SH
Neutral sugar (%)	55.4±3.5 ^{a1)}
Uronic acid (%)	42.8±1.8 ^b
Protein (%)	0.4±0.1 ^c
Polyphenol (%)	1.0±0.0 ^c
KDO-like materials (%)	0.4±0.1 ^c
Monosaccharide	Molar ratio
Mannose	0.62
Rhamnose	0.65
Glucuronic acid	0.34
Galacturonic acid	1.10
Glucose	1.00
Galactose	1.76
Xylose	0.12
Arabinose	0.78
Fucose	0.17

The results are presented as the mean±standard deviation (S.D.) from three independent tests.

¹⁾ A superscript of the content value means a significant difference at $p<0.05$.

의 복합 처리를 통해 SLC의 분해가 효과적으로 진행된 것으로 보인다. 또한, GalA, Ara, Rha 및 GlcA의 증가는 펙틴 계열의 rhamnagalacturonan(RG)-I, RG-II 혹은 homogalacturonan의 존재를 추정할 수 있으며(Sheng 등 2021; Shin 등 2024), 여분의 Glc와 Man는 hemicellulose의 존재를 추정할 수 있었다(Wang 등 2024). 추후 연구에서는 ion-exchange 및 size-exclusion chromatography를 통해 AME-SH로부터 활성 본체를 분리하고 다양한 분석기법을 통해 구조적 특성을 규명하고자 한다.

3. 황기 효소 가수분해물의 증진된 대식세포 자극 활성

AME-SH의 면역 기능성 소재로서의 가능성을 확인하고자 이전에 개발한 황기 조다당 획분 AME-CP와 AME-SH의 대식세포 자극 활성을 비교함으로써 활성의 증진 여부를 확인하였다. 첫 번째로, 숙주 면역세포의 조절을 유도하여 면역 반응을 조절할 수 있다고 알려진 NO 생성능을 평가한 결과(Fig. 3A)(Tripathi 등 2007), 양성대조군으로 이용된 LPS는 1 μ g/mL의 농도에서 NC 대조군(10.8 μ M) 대비 90.0 μ M(약 8.3배 증가)의 NO 생성능을 나타냈으며, AME-CP가 0.5~5 μ g/mL의 농도 범위에서 57.3~77.6 μ M(약 5.3~7.2배 증가)의 생성능을 보인 반면, AME-SH는 74.2~95.5 μ M(약 6.9~8.8배 증가)의 AME-CP보다 유의적으로 증진된 NO 생성능을 나타냈다. 또한, B 세포에 작용하여 면역글로불린 생성을 유도하는 것으로 알려진 IL-6의 경우(Fig. 3B)(Hirano T 2021), AME-SH는 0.5~5 μ g/mL의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 24.9~28.4 ng/mL(약 8.1~9.2배 증가)의 IL-6 생성능을 나타냈으며, 이러한 결과는 AME-CP에 비해 우수한 IL-6 생성능을 보이는 것으로 나타났다. 마지막으로, natural killer 세포의 기능과 T 세포 발달에 영향을 미치는 IL-12 생성능의 경우(Fig. 3C)(Watford 등 2003), NC 대조군(7.0 pg/mL) 대비 0.5~5 μ g/mL의 농도 범위에서 262.9~1,184.3 pg/mL(약 20.1~90.7배 증가)로 AME-CP에 비해 우수한 IL-12 생성능을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 종합하면, AME-CP에 함유량이 높은 SLC를 전분 관련 효소로 처낸 AME-SH의 대식세포 자극 활성 촉진, 대식세포 활성화에 크게 기여하고 있지 않는 SLC를 전분 관련 효소 처리로 감소시킴으로써 AME-CP 활성을 효과적으로 증진시킬 수 있음을 확인하였다. Lee & Jeon(2005)에 따르면 황기 유래 APS가 NF- κ B/Rel을 활성화하여 대식세포에서 NO 생성능을 유도한다고 보고되었는데, 이전에 개발한 황기 조다당 획분 AME-CP 뿐만 아니라, 이를 효소 처리한 AME-SH 또한 효과적인 면역 자극 기능성 소재로 활용 가능할 것으로 판단된다.

4. 황기 효소 가수분해물의 마이토젠 및 사이토카인 생성능

다음으로, 본 연구에서는 동물로부터 분리된 세포를 이용하여 AME-CP에서 유래된 효소 가수분해물의 추가적인 면역 활성화 여부를 판단하고자 하였다. 비장은 혈액으로부터 항원을 수집하고 T 및 B 세포의 성숙과 분열 그리고 분화가 이루어지는 주요 기관으로 비장 세포는 T 및 B 세포 혹은 대식세포와 같은

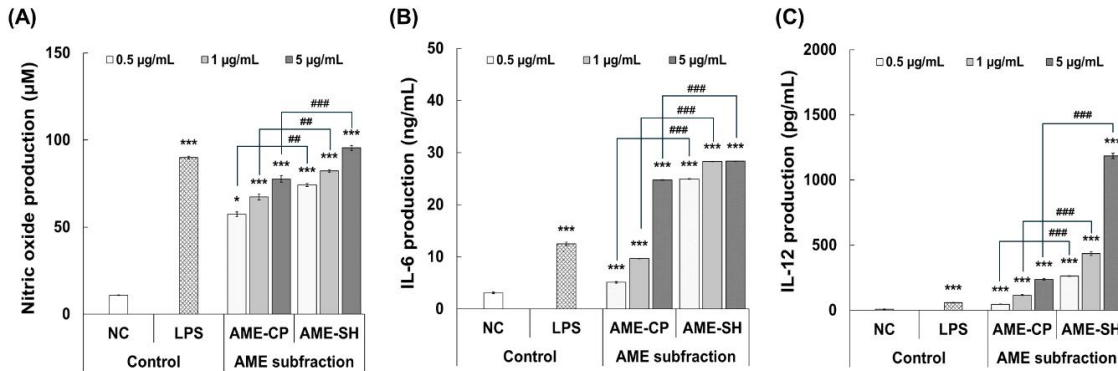


Fig. 3. Effects of AME-CP and AME-SH on macrophage-stimulating factors production. RAW 264.7 cells were treated with AME-SH for 24 h, and then the production of nitric oxide (A), IL-6 (B), and IL-12 (C) was assessed. The results are presented as the mean±standard deviation (S.D.) from three independent tests. Asterisks on the bars indicate significant differences between the negative controls (NC) and each group, as determined by the Student's *t*-test. Crosshatch patterns indicate significant differences between samples at the same concentration. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 µg/mL); AME-CP, crude polysaccharide; AME-SH, enzymatic hydrolysate derived from AME-CP; IL-6, interleukin-6; IL-12, interleukin-12.

다양한 면역세포가 존재해 면역 활성을 관찰하기 위한 지표로 주로 사용된다(Kang 등 2014). 그러므로 AME-SH의 면역 활성을 확인하기 위해 비장 세포의 마이토젠 및 IL-6 생성능을 분석하였다. 세포 배양 시 T 세포를 자극하는 Con A와 B 세포를 자극하는 LPS를 각각 처리하여 세포의 민감성을 증가시켜 세포 활성 여부를 분명하게 판단하고자 하였다. 먼저, mitogen을 처리하지 않은 경우(Fig. 4A), NC 대조군과 비교하여 5~10 µg/mL의 농도 범위에서 236.4~253.2%로 유의적인 mitogen 활성을 보였다. Mitogen으로 Con A를 처리한 경우(Fig. 4B), NC 대조군 대비 유의적인 mitogen 활성이 보이지 않았지만, mitogen으로 LPS를 처리했을 때(Fig. 4C) 10 µg/mL의 농도에서 155.7%로 유의적인 mitogen 활성을 보였다. 다음으로 IL-6의 생성능을 확인했을 때 mitogen을 자극하지 않은 경우(Fig. 4D), NC 대조군(27.5 pg/mL) 대비 0.5~10 µg/mL의 농도 범위에서 501.5~1,287.6 pg/mL(약 18.2~46.8배 증가)의 농도-의존적인 생성능을 보였고 Con A로 자극한 경우(Fig. 4E), NC 대조군(541.4 pg/mL) 대비 1,904.9~2,594.5 pg/mL(약 3.5~4.8배 증가)의 IL-6 생성능을 확인할 수 있었다. 한편, LPS로 자극했을 때 IL-6의 생성능은 NC 대조군(1,135.2 pg/mL) 대비 5~10 µg/mL의 농도 범위에서 1,121.8~2,025.4 pg/mL(약 1~1.8배 증가)의 생성량을 보였다(Fig. 4F). Shao 등(2004)에 의하면 APS가 B 세포와 대식세포를 활성화하지만 T 세포는 활성화하지 않는다고 보고되었는데, AME-SH 또한, 대식세포와 비장 내 B 세포의 활성화를 유도하는 것으로 확인되었다. 또한, AME-SH는 말단 B 세포 분화를 유도하는 B 세포 분화 인자 IL-6(Maeda 등 2010)의 유의적인 생성능을 보여, AME-SH가 B 세포의 mitogen으로서 작용하는 것으로 확인되었다.

5. 황기 효소 가수분해물의 Peyer's patch 경유 사이토카인 생성 및 골수세포 증식

생체 내에서 가장 큰 림프조직인 GALT(gut-associated lymphoid tissues)의 구성요소 중 하나인 Peyer's patch(PP)는 수많은 B 세포와 모낭 수지상 세포 및 T 세포를 포함하는 고도로 특수화된 모낭 세포로서 immunoglobulin A 생산을 위한 inductive site로 알려져 있다(Yoon 등 2010; Suh 등 2013). 한편, 골수는 뼈의 중심과 골단을 구성하는 조직으로 상당한 양의 면역세포가 들어있어 면역에서 핵심적인 역할을 수행하는 림프 기관이라고 보고된 바 있다(Zhao 등 2012). 따라서, AME-SH의 장관면역 활성화를 확인하기 위해 PP 세포로부터 골수세포 증식 인자를 측정하고 PP 세포를 경유한 골수세포 증식능을 분석하였다. PP 세포배양액으로부터 골수세포 증식인자라고 알려져 있는 IL-6와 GM-CSF를 분석한 결과, IL-6의 결과에서는(Fig. 5A) 양성대조군인 LPS가 10 µg/mL의 농도에서 71.9 pg/mL로 NC 대조군(60.3 pg/mL) 대비 약 1.2배 증가하였고, AME-SH는 100~1000 µg/mL의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 74.9~259.5 pg/mL(약 2.9~20.6배 증가)의 IL-6 생성능을 보였다. 또한, 골수세포의 발달과 성숙에 관여하는 사이토카인인 GM-CSF 생성능 또한 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 5B)(Egea 등 2010). 한편, 골수세포 증식능의 경우(Fig. 5C), NC 대조군과 비교했을 때 AME-SH는 100~1,000 µg/mL의 농도 범위에서 108.4~295.6%의 농도-의존적인 골수세포 증식능을 확인할 수 있었다. Zhao 등(2011)에 의하면 황기 유래 APS는 골수세포 증식성 사이토카인의 생성을 유도한다고 보고하였는데, AME-SH를 처리한 PP 세포배양액에서 골수세포 증식인자 IL-6 및 GM-CSF의 생성뿐만 아니라, 이를 통해 골수세포 증식까지 활성화시켜, 체내 면역 기

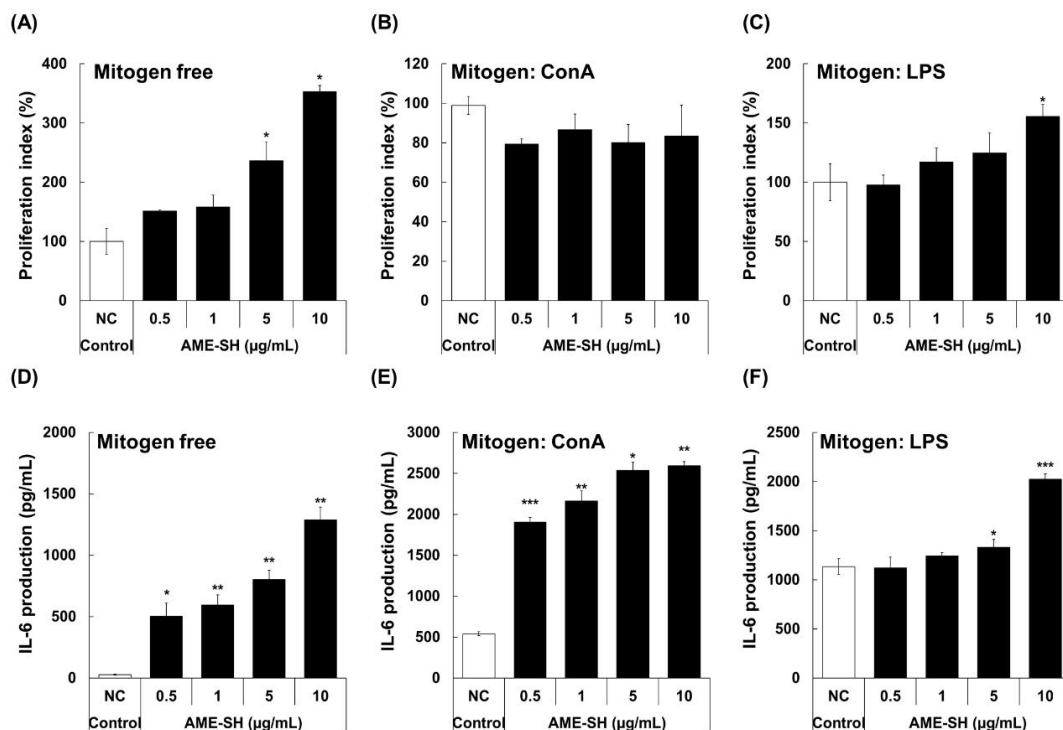


Fig. 4. Immunostimulatory effects of AME-SH on splenocytes isolated from C3H/HeN mice. Splenocytes were treated with AME-SH for 3 days, and mitogenic activity (A-C) and IL-6 production (D-F) were assessed. The results are presented as the mean±standard deviation (S.D.) from three independent tests. Asterisks on the bars indicate significant differences between the negative controls (NC) and each group, as determined by the Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 µg/mL); Con A, concanavalin A (1 µg/mL); AME-SH, enzymatic hydrolysate derived from AME-CP; IL-6, interleukin-6.

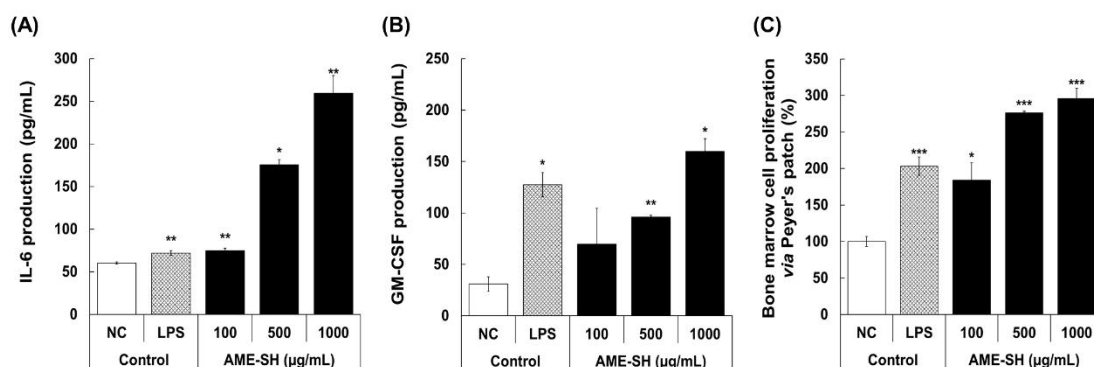


Fig. 5. Effects of AME-SH on intestinal immune system-stimulation *via* Peyer's patch. Peyer's patch (PP) cells were treated with AME-SH for 6 days. IL-6 (A) and GM-CSF (B) production from PP cells, as well as bone marrow cell proliferation *via* PP (C), were assessed. The results are presented as the mean±standard deviation (S.D.) from three independent tests. Asterisks on the bars indicate significant differences between the negative controls (NC) and each group, as determined by the Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (10 µg/mL); AME-SH, enzymatic hydrolysate derived from AME-CP; IL-6, interleukin-6; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

능에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단되었다.

요약 및 결론

이전 연구에서 황기(*Astragalus membranaceus*; AM)의 열수 추출물(AME)로부터 대식세포 자극 활성을 가지는 조다당(AME-CP)을 분획하였다. AME-CP의 주요 구성당은 glucose (Glc)를 함유하고 있어, 전분 유사 화합물(starch-like compounds; SLC)이 풍부한 것으로 확인되었다. 따라서, 생물학적으로 비활성물질인 SLC를 제거하여 AME-CP의 면역 자극 활성을 향상시키기 위해 α -amylase 및 amyloglucosidase를 포함한 전분 관련 효소를 처리하여 효소 가수분해물(AME-SH)을 조제하였다. AME-SH의 분자량 분포는 3.9~84.4 kDa였으며 주로 galactose, galacturonic acid, Glc, arabinose, rhamnose 및 mannose로 구성되어 있었다. AME-SH는 AME-CP에 비해 RAW 264.7 세포에서 NO, IL-6 및 IL-12를 포함한 대식세포 자극 인자의 생성을 크게 향상시켰다. 또한, C3H/HeN 마우스로부터 분리한 비장세포에 AME-SH를 처리하였을 때 IL-6의 분비가 촉진될 뿐만 아니라, 미토젠 활성도 유도하였다. AME-SH는 Peyer's patch(PP) 세포에서 IL-6 및 GM-CSF를 포함한 조절 성장 인자의 분비를 촉진하고 PP 세포를 통한 골수세포 증식을 자극하였다. 결론적으로, 전분 관련 효소로 AME-CP를 가수분해한 효소 가수분해물인 AME-SH는 잠재적인 면역 자극제로 제안되었다.

감사의 글

본 논문은 2024년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(2021RIS-001; 프로젝트랩).

References

- Arango Duque G, Descoteaux A. 2014. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5:491-502
- Bae HK, You SH. 2017. Biological activity study on anti-oxidant, whitening, and anti-inflammatory effects of *Astragalus membranaceus* ethanol extracts and bioconversion extracts. *Asian J Beauty Cosmetol* 15:489-499
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Cho DH, Kim MJ, Sim EY, Jeon YH, Lee CK, Woo KS. 2018. Effect of carbohydrase treatments on phenolics content and antioxidant activity of maize flour. *Korean J Food Sci Technol* 50:132-137
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. 2010. GM-CSF: A role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4:723-731
- Ghabeshi S, Mousavizadeh L, Ghasemi S. 2023. Enhancing the antiviral potential and anti-inflammatory properties of *Astragalus membranaceus*: A comprehensive review. *Anti-Inflamm Anti-Allergy Agents Med Chem* 22:211-219
- Hirano T. 2021. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol* 33:127-148
- Hirayama D, Iida T, Nakase H. 2018. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *Int J Mol Sci* 19:92
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Kang BK, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Park JH, Bae NY, Ahn DH. 2014. Immuno-stimulating activities of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice concentrates on mouse macrophages and spleen cells. *Korean J Fish Aquat Sci* 47:776-784
- Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal Biochem* 85:595-601
- Kim HJ, Kim JB. 2008. Effects of Astragali Radix on the diet-induced hyperlipidemia in rats. *Korean J Orient Physiol Pathol* 22:575-579
- Kim MJ, Lim KR, Jung TK, Yoon KS. 2007a. Anti-aging effect of *Astragalus membranaceus* root extract. *J Soc Cosmet Sci Korea* 33:33-40
- Kim SB, Gam DH, Hong JW, Kim JW. 2022. Enhancement of production of bioactive compound and antioxidant activity in *Inonotus obliquus* by bioconversion process using commercial enzymes. *Korean J Med Crop Sci* 30:12-18
- Kim SZ, Lee SG, Son NY, Lee JU, Baek GG, Kim JE, Han SH, Yuk HG. 2021. Effect of fermentation by *Lactiplantibacillus plantarum* on antioxidant and nutritional characteristics of jujube hot water extract. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics*

- 7:37-44
- Kim YC, Cho CW, Rhee YK, Yoo KM, Rho J. 2007b. Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:1482-1485
- Kim YS, Shin HY, Jeong WB, Ha EJ, Koo JP, Shin JY, Yu KW. 2024. Effect of *Astragalus membranaceus*-postbiotics polysaccharide changed by lactic acid bacteria on macrophage. *Korean J Food Nutr* 37:17-29
- Lee KH, Senevirathne M, Ahn CB, Je JY. 2010. Biological compounds extracted from *Codium fragile* by enzymatic hydrolysis and their biological activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:953-959
- Lee KY, Jeon YJ. 2005. Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus*. *Int Immunopharmacol* 5:1225-1233
- Li CX, Liu Y, Zhang YZ, Li JC, Lai J. 2022. Astragalus polysaccharide: A review of its immunomodulatory effect. *Arch Pharm Res* 45:367-389
- Li R, Chen WC, Wang WP, Tian WY, Zhang XG. 2009. Extraction, characterization of *Astragalus* polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer. *Carbohydr Polym* 78:738-742
- Li Z, Wang D, Shi YC. 2019. High-solids bio-conversion of maize starch to sugars and ethanol. *Starch* 71:1800142
- Maeda K, Mehta H, Drevets DA, Coggeshall KM. 2010. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood* 115:4699-4706
- Opdal SH. 2018. Cytokines, infection, and immunity. In Duncan JR, Byard RW (Eds), SIDS Sudden Infant and Early Childhood Death: The Past, the Present and the Future: The Past, the Present and the Future. pp.689-710. University of Adelaide Press
- Shahzad M, Shabbir A, Wojcikowski K, Wohlmuth H, Gobe GC. 2016. The antioxidant effects of *Radix Astragali* (*Astragalus membranaceus* and related species) in protecting tissues from injury and disease. *Curr Drug Targets* 17:1331-1340
- Shao BM, Xu W, Dai H, Tu P, Li Z, Gao XM. 2004. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb. *Biochem Biophys Res Commun* 320:1103-1111
- Sheng Z, Liu J, Yang B. 2021. Structure differences of water soluble polysaccharides in *Astragalus membranaceus* induced by origin and Their bioactivity. *Foods* 10:1755-1771
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Nutr* 34:36-46
- Shin HY, Kim YS, Shin KS, Han SH, Suh HJ, Yu KW. 2024. Effect of rhamnogalacturonan-I-rich polysaccharides isolated from crabapple hydrolysates on IL-1 β -induced inflammation in intestinal epithelial cells. *Int J Biol Macromol* 277:134240
- Smirnova J, Fernie AR, Steup M. 2015. Starch degradation. In Nakamura Y (Ed.), Starch. pp.239-290. Springer
- Song Bk, Lee EJ, Kim HK, Jin SD, Kim SC, Kim DH. 1998. Effects of *Astragali Radix* on the function of murine immunocytes *in vivo* and *in vitro*. *Korean J Herbol* 13:115-128
- Suh HJ, Yang HS, Ra KS, Noh DO, Kwon KH, Hwang JH, Yu KW. 2013. Peyer's patch-mediated intestinal immune system modulating activity of pectic-type polysaccharide from peel of *Citrus unshiu*. *Food Chem* 138:1079-1086
- Sung SK, Rhee YK, Cho CW, Kim YC, Lee OH, Hong HD. 2013. Physicochemical properties and antioxidative activity of fermented *Rhodiola sachalinensis* and Korean red ginseng mixture by *Lactobacillus acidophilus*. *Korean J Food Nutr* 26:358-365
- Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:443-452
- Tursun X, Zhao Y, Talat Z, Xin X, Tursun A, Abdulla R, AkberAisa H. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Biomol Ther* 24:184-190
- Wang K, Zhou Y, Li M, Chen Z, Wu Z, Ji W, Wang J, Zhang Y. 2024. Structural elucidation and immunomodulatory activities *in vitro* of type I and II arabinogalactans from different origins of *Astragalus membranaceus*. *Carbohydr Polym* 333:121974
- Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. 2003. The biology of IL-12: Coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:361-368
- Yang HS, Yu KW, Choi YM. 2004. Isolation of polysaccharides modulating mouse's intestinal immune system from peels of *Citrus unshiu*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:1476-1485
- Yoon JA, Yu KW, Shin SH, Cho HY. 2010. Activation of intestinal immune system by an orally administered methanol extract from pine needles. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:356-362
- Zhang J, Xie X, Li C, Fu P. 2009. Systematic review of the renal protective effect of *Astragalus membranaceus* (root) on diabetic nephropathy in animal models. *J Ethnopharmacol* 126:189-196
- Zhang K, Shi S, Han W. 2018. Research progress in cytokines with chemokine-like function. *Cell Mol Immunol* 15:660-662
- Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G, Zou W. 2012. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol*

Immunol 9:11-19

Zhao LH, Ma ZX, Zhu J, Yu XH, Weng DP. 2011. Characterization of polysaccharide from *Astragalus radix* as the macrophage stimulator. *Cell Immunol* 271:329-334

Zheng Y, Ren W, Zhang L, Zhang Y, Liu D, Liu Y. 2020. A review of the pharmacological action of *Astragalus* polysaccharide.

Front Pharmacol 11:349-363

Received 25 September, 2024

Revised 10 October, 2024

Accepted 16 October, 2024

충북 지역 대학생의 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 식이 자기효능감 및 영양지수

송유진 · 윤예은 · 강지원 · 조민주 · *배윤정*

국립한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, *국립한국교통대학교 식품영양학전공 교수

A Study on Dietary Self-efficacy and Nutrition Quotient according to Usage of Food-related Content among University Students in Chungbuk Region

Yujin Song, Ye-Eun Yoon, Ji-Won Kang, Min Ju Jo and *Yun-Jung Bae*

Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

*Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

The purpose of this study was to compare and analyze dietary self-efficacy and Nutrition Quotient (NQ) according to the degree of food-related content use in university students. From October to November 2022, a total of 332 college students (140 males and 192 females) attending universities in Chungcheongbuk-do were surveyed to collect data on general information, food-related content use level, dietary self-efficacy, and NQ for adults. The average dietary self-efficacy score of the group that did not use food content was 3.08 points, which was significantly higher than the group that watched it sometimes (2.89 points) and the group that watched it often (2.83 points) ($p=0.0191$). The total NQ score of 48.85 points was the highest among the three groups ($p=0.0270$). For subjects who responded that they had no experience of eating food at all after using food content, their dietary self-efficacy was 3.03, which was significantly higher than the group with occasional or frequent food consumption experience ($p=0.0194$). Results of this study can be used as basic data for clarifying the relationship between the use of food-related content and eating habits in university students and for proper eating habits education for university students.

Key words: dietary self-efficacy, nutrition quotient, food-related content, university students

서 론

음식 콘텐츠는 음식을 주제로 한 내용과 정보 등이 담긴 미디어의 내용을 의미하고, TV 프로그램, 인터넷, 소셜미디어(SNS, social network service), 유튜브(YouTube) 방송 등을 통해 소비자들에게 제공될 수 있다. TV 프로그램에는 음식을 먹거나 요리하는 것을 주된 내용으로 하는 먹방(먹는 방송)과 쿡방(요리하는 방송)이 있으며, 아프리카 TV 등과 같은 디지털 미디어 플랫폼 서비스에서는 1인 미디어가 급성장하면서, 게임, 음악, 패션, 경제, 먹방, 쿡방 등까지 매우 다양한 콘텐츠가 제공되고 있다. SNS에서 가장 대표적인 것은

인스타그램으로 소비자들은 외식, 맛집, 음식, 레스토랑 등 음식과 관련된 인증사진이나 댓글 등을 인스타그램에 게시함으로써 서로의 경험을 공유하고 있다. 또한 유튜브의 채널 구독 현황을 살펴보면, 구독자 100만 명 이상의 채널(골드버튼) 유형에서 음악, 키즈, 푸드·먹방, 엔터테인먼트, vlog·일상의 순으로 채널 수와 구독자 수가 많았고, 푸드/먹방 유형에서는 총 57개 채널이 골드버튼을 수여받았으며, 구독자 수 역시 1억 4,638만 명이라고 하여 음식 콘텐츠가 매우 주요한 미디어 장르임을 알 수 있었다(Choi & Kim 2021).

음식 콘텐츠는 과거에도 존재하였지만, 양방향으로 소통하는 뉴미디어 플랫폼과 함께 급격하게 성장하고 있다(Cho

* Corresponding author: Yun-Jung Bae, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5335, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: byj@ut.ac.kr

EH 2020). 뉴미디어 플랫폼에서의 주요 수익모델은 시청자가 방송인에게 선물하는 아이템 수수료 등이 있는데, 수익과 직결되는 만큼 더 많은 아이템을 선물받기 위하여 인터넷 방송 BJ들은 극단적인 폭식과 엽기적 식사 방식 등 시청자들의 후원을 유도하는 과도한 콘텐츠를 제공하고 있는 상황이다(Cho EH 2020). 또한 선행연구에 따르면 먹방 영상의 83.5%가 과식을 포함하고 있는 것으로 나타났다(Kang 등 2020). 결국 뉴미디어 플랫폼의 음식 콘텐츠에서 다루는 건강하지 않은 식품 및 식생활로 인해(An 등 2020), 먹방과 같은 음식 콘텐츠를 시청하는 것은 잘못된 식습관 및 건강상의 문제로 이어질 수 있다는 우려가 커지게 되었다(Kang 등 2020).

선행연구에 따르면 영양이 부족하거나 열량이 높은 음식에 대한 식품 광고 등 건강에 해로운 음식과 관련된 콘텐츠를 시청하는 것은 음식 섭취를 자극하여 비만을 강력하게 유발할 수 있다고 보고되었다(Boulos 등 2012). 또한 먹방 시청자들은 건강에 해로운 음식을 섭취하고 부적절한 식습관을 가지고 있으며, 심지어 소아비만 중 하나인 섭식장애까지 앓고 있는 것으로 나타난 바 있다(Lister 등 2023). 이런 선행연구들을 종합하여 보면, 시장 성장세가 매우 큰 음식 콘텐츠의 경우 부적절한 콘텐츠 내용으로 인하여 잘못된 식습관 및 건강상의 문제를 야기시킬 우려가 있을 것이며, 따라서 음식 콘텐츠 이용과 관련된 다양한 식사 섭취 양상을 살펴보고, 식사 섭취나 음식 콘텐츠 사용을 개선할 수 있는 요인을 도출하는 것이 필요하다.

식이 자기효능감은 식사와 관련된 특수한 상황에서 얼마나 행동을 잘 조절하고 이행할 수 있는지에 대한 개인적 인식으로(Hevey 등 1998), 성장기의 바람직한 식습관 형성에 긍정적인 영향을 미치는 요인으로 보고된 바 있다(Choi & Kim 2008; Nam YJ 2016; Oh 등 2019). 선행연구 결과 음식 콘텐츠 이용 수준이 식습관에 미치는 영향 분석에서 음식 콘텐츠 이용 수준과 식습관 간의 직접 효과는 없었지만, 식이 자기효능감의 하위요인인 정서적 요인 조절 효능감(불안하거나 긴장했을 때, 우울할 때, 스트레스를 받았을 때 음식 먹는 것을 참을 수 있는 자신감)을 매개로 하여 음식 콘텐츠 이용 수준이 식습관에 영향을 미친다고 하여(Oh 등 2019), 음식 콘텐츠 이용과 식이 자기효능감 간의 관련성을 알 수 있었다.

그러나 지금까지 음식 콘텐츠와 식습관, 식이 자기효능감과의 관련성에 대한 선행연구들은 대부분 성장기 어린이나 청소년 대상 연구가 주를 이루었다(Oh 등 2019; Kim 등 2020a; Park 등 2024). 대학생들은 고등학교 졸업 이후 대학에 진학하게 되면서 수업시간이 불규칙해지고, 학업 외 다양한 과외활동이 생기게 되면서, 아침결식, 야식 및 간편식 섭취 등이 증가하는 등의 부적절한 생활습관을 가지게 된다(Ko

등 2019; Hwang 등 2023; Yoon E 2023; Ryu & Heo 2024). 대학생 대상 음식 콘텐츠 관련 선행 연구를 살펴보면, 먹방, 쿡방, 소셜미디어 등 종류별 음식 콘텐츠 이용 수준에 따른 식습관의 차이를 분석한 연구(Yun 등 2020; Lee & Lee 2022; Bang & Jung 2023)는 존재하지만 아직까지 식이 자기효능감까지 함께 살펴본 연구는 전무하였다. 이에 본 연구에서는 대학생들에서 음식 관련 콘텐츠 이용 실태를 살펴보고, 이용 정도에 따른 식이 자기효능감 및 영양평가를 실시하여 대학생에서 음식 관련 콘텐츠 이용과 관련된 다양한 요인을 살펴보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구에서는 충북 지역 대학생을 대상으로 2022년 10월부터 11월까지 설문조사를 실시하였다. 대학교 내에 부착한 모집공고를 보고 연구 참여를 희망하는 대학생을 대상으로 연구의 목적, 조사 내용 및 진행 과정을 충분히 설명한 후, 연구참여에 자발적으로 동의한 332명을 대상으로 대면 자기 기입식 설문조사를 진행하였다. 본 연구는 한국교통대학교 생명윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다(KNUT-IRB 2022-40).

2. 연구방법 및 내용

본 연구에서 사용한 설문지는 대학생의 식습관 및 고등학생을 대상으로 조사한 식이 자기효능감 관련 선행연구(Oh 등 2019; Kim 등 2020b; Park 등 2021)의 설문 문항을 본 연구의 목적에 맞도록 수정·보완하여 초안을 작성한 후, 본 연구 대상자와 유사한 특성을 가진 대학생 15명을 대상으로 2022년 7월 예비조사를 거쳐 최종 완성하였다. 설문 내용은 크게 일반사항, 음식 콘텐츠 이용 상태, 식이 자기효능감 및 영양지수로 구성하였다.

일반사항에서는 성별, 연령, 신장 및 체중, 주거 형태, 흡연 상태, 음주 여부 및 빈도, 운동 빈도 및 외식 빈도를 조사하였다. 음식 콘텐츠 이용 상태에서는 음식 콘텐츠 이용 정도 및 하루 이용 시간, 주로 이용하는 음식 콘텐츠의 종류 및 이용 이유, 음식 콘텐츠 이용 만족도 및 음식 콘텐츠 이용 후 음식 섭취 경험 정도를 조사하였다. 이 때, 음식 콘텐츠의 전반적인 만족도는 매우 만족한다(5점)에서 전혀 만족하지 않는다(1점)의 Likert 5점 척도로 조사하였다. 설문조사 시 연구대상자들의 이해를 돕기 위하여 설문지 내 음식 콘텐츠는 “음식과 관련된 모든 정보, 맛집, 음식을 만들 수 있게 도와주는 조리법 또는 요리 동영상 등의 정보를 포함한 콘텐츠를 의미하며, TV 먹방(쿡방) 프로그램, 인터넷 먹방 프로그램, SNS 음식 사진 및 동영상, 레시피 영상채널 등으로 보게 되는 콘

텐츠”로 제시하였다. 또한 자가기입식으로 조사한 신장 및 체중으로 체중을 신장의 제곱으로 나누는 체질량지수를 계산하였다.

식이 자기효능감은 선행연구(Oh 등 2019)에서 사용한 생활 통제 효능감(5문항), 음식 선택 효능감(4문항), 주위 환경 자극 조절 효능감(6문항), 정서적 요인 조절 효능감(3문항)의 총 18문항으로 구성하였다. 각 문항에 대한 점수는 전혀 자신없다 1점, 자신없다 2점, 자신있다 3점, 매우 자신있다 4점의 Likert 척도로 평가하였으며, 점수가 높을수록 식이 자기효능감이 높은 것으로 해석하였다. 식이 자기효능감 척도의 신뢰도 계수(Cronbach's α)는 0.83이었다.

영양지수는 개인이나 집단의 식사의 질 및 식행동을 종합적으로 평가할 수 있는 간이 영양판정 도구로 타당도가 검증된 체크리스트이다(Yook 등 2022). 성인 영양지수는 균형 영역 8개 항목(전곡·잡곡류, 생선류, 콩, 견과류, 채소류 반찬, 과일, 우유·유제품, 섭취 및 아침식사 빈도), 절제 영역 6개 항목(적색육, 가공육류, 맵고 짠 국물음식, 패스트푸드, 기름진 빵·과자류 섭취 및 과식·폭식 빈도), 실천 영역 4개 항목(고위험 음주 빈도, 건강한 식생활을 하려는 노력, 영양표시 확인, 손씻기)의 총 18문항으로 구성되어 있다. 각 영역(균형, 절제, 실천)은 항목별 점수와 가중치를 이용하여 각 100점으로 산출되며, 전체 점수 역시 100점 만점으로 산출되고, 점수가 높을수록 식사가 양호한 것으로 평가할 수 있다. 성인 영양지수는 ‘상’, ‘중’, ‘하’ 등급으로 판정할 수 있는데, 균형 영역에서 ‘하’ 등급은 30.9점 미만, ‘중’ 등급은 30.9점 이상 55.8점 미만, ‘상’ 등급은 55.8점 이상, 절제 영역에서 ‘하’ 등급은 66.1점 미만, ‘중’ 등급은 66.1점 이상 85.3점 미만, ‘상’ 등급은 85.3점 이상, 실천 영역에서 ‘하’ 등급은 51.8점 미만, ‘중’ 등급은 51.8점 이상 74.5점 미만, ‘상’ 등급은 74.5점 이상, 총 영양지수에서 ‘하’ 등급은 52.7점 미만, ‘중’ 등급은 52.7점 이상 68.5점 미만, ‘상’ 등급은 68.5점 이상으로 설정되어 있다(Yook 등 2022).

설문조사를 통해 조사된 내용을 바탕으로 연구대상자 총 332명(남자 140명, 여자 192명)을 대상으로 음식 콘텐츠 이용 정도(없음, 가끔, 자주)에 따라 일반사항, 식이 자기효능감 및 영양지수를 비교 분석하였으며, 음식 콘텐츠를 이용하는 298명(남자 118명, 여자 180명)을 대상으로 음식 콘텐츠 이용 상태와 관련된 항목도 분석하였다. 또한 음식 콘텐츠 이용 상태에 따른 영양지수의 차이를 살펴보기 위하여 음식 콘텐츠 이용 후 음식 섭취 경험 정도(자주 있음, 가끔 있음, 전혀 없음)에 따른 식이 자기효능감 및 영양지수를 비교 분석하였다.

3. 통계분석

설문조사로 얻어진 모든 자료는 SAS 9.4 version(SAS

Institute Inc, Cary, NC, USA)을 이용하여 통계분석을 진행하였다. 연속변수는 평균과 표준편차, 범주형 변수는 빈도와 비율을 구하였다. 음식 콘텐츠 이용 정도, 음식 콘텐츠 이용 후 음식 섭취 경험 및 성별)에 따라 연속변수는 Student's *t*-test 또는 ANOVA test를, 범주형 변수는 Chi-square test 또는 Fisher의 정확 검정으로 유의성을 검정하였다. ANOVA test 실시 후 유의적인 차이가 나타난 경우에는 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 진행하였다. 통계적 유의 수준은 $p < 0.05$ 의 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 일반사항

본 연구대상자 전체 332명 중 음식 콘텐츠 이용 정도에 ‘전혀 없음’이라고 응답한 대상자는 34명(10.24%), ‘가끔 있음’은 182명(54.82%), ‘자주 있음’은 116명(34.94%)이었다. 본 연구에서 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 일반사항에 대하여 분석한 결과는 Table 1에 제시하였다. 음식 콘텐츠 이용 정도에 따라 성별의 분포에 유의적인 차이가 있어, 음식 콘텐츠 자주 이용군의 경우 여자의 비율이 68.10%로 다른 두 군에 비해 여자의 비율이 유의적으로 높았다($p = 0.0019$). 연령과 체질량지수는 전체 대상자에서 각각 20.76세, 22.57 kg/m²이었으며, 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 군간 유의한 차이는 보이지 않았다. 주거 형태는 전체 대상자에서 기숙사 주거가 50.00%로 가장 많은 비율을 차지하였으나, 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 군간 차이는 보이지 않았다. 흡연 상태, 음주 여부 및 빈도, 운동 빈도 및 외식 빈도 역시 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 군간 유의한 차이는 나타나지 않았다.

본 연구에서 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 성별에 유의한 차이를 보여, 여학생이 남학생보다 음식 콘텐츠를 더 많이 이용하는 것으로 나타났다. 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 성별의 차이는 음식 콘텐츠의 종류에 따라 결과가 상이하게 나타나고 있는데, 대학생의 쿡방 시청 실태를 살펴본 선행연구에 따르면 쿡방 시청 정도에 따른 성별의 유의한 차이는 나타나지 않았다고 한다(Lee & Choi 2022). 반면 20~30대 성인을 대상으로 소셜미디어 음식 콘텐츠 이용 수준에 따른 식습관을 살펴본 선행연구(Bang & Jung 2023)에서는 여성에서의 이용이 남성에 비해 높다는 결과로 본 연구와 동일한 결과를 보였다. Choi 등(2021)의 연구에서 여자 대학생은 유튜브와 인스타그램을 통해 음식 상품이나 맛집 정보를 더 많이 검색하고 정보를 얻는 것으로 보고한 내용을 볼 때 음식 콘텐츠의 이용 목적, 사용하는 음식 콘텐츠의 종류에 따라 성별의 분포 정도는 다를 수 있을 것으로 보인다.

Table 1. General characteristics among groups according to the usage of food-related content

Variable	Total (n=332)	Level of food-related content usage			χ^2 or F-value	p-value ³⁾	
		No (n=34)	Sometimes (n=182)	Often (n=116)			
Sex	Male	140(42.17) ¹⁾	22(64.71)	81(44.51)	37(31.90)	12.51	0.0019
	Female	192(57.83)	12(35.29)	101(55.49)	79(68.10)		
Age (yrs)	20.76±1.74 ²⁾	21.21±1.95	20.70±1.64	20.72±1.81	1.26	0.2851	
Body mass index (kg/m ²)	22.57±3.76	22.03±3.01	22.74±3.85	22.48±3.83	0.56	0.5697	
Residence type	Home	49(14.76)	6(17.65)	26(14.29)	17(14.66)	0.29	0.9904
	Dormitory	166(50.00)	16(47.06)	92(50.55)	58(50.00)		
	Self-boarding	117(35.24)	12(35.29)	64(35.16)	41(35.34)		
Smoking status	Often smoking	35(10.54)	4(11.76)	18(9.89)	13(11.21)	7.05	0.3608 ⁴⁾
	Sometimes smoking	19(5.72)	1(2.94)	11(6.04)	7(6.03)		
	Past smoking	27(8.13)	1(2.94)	21(11.54)	5(4.31)		
	Non-smoking	251(75.60)	28(82.35)	132(72.53)	91(78.45)		
Drinking	Yes	325(97.89)	32(94.12)	179(98.35)	114(98.28)	2.62	0.2396 ⁴⁾
	No	7(2.11)	2(5.88)	3(1.65)	2(1.72)		
Frequency of drinking	≥4 time/w	2(0.62)	0(0.00)	1(0.56)	1(0.88)	7.52	0.6760 ⁴⁾
	2~3 times/w	58(17.85)	6(18.75)	34(18.99)	18(15.79)		
	2~4 times/m	139(42.77)	10(31.25)	73(40.78)	56(49.12)		
	1 time/m	60(18.46)	8(25.00)	33(18.44)	19(16.67)		
	<1 time/m	54(16.62)	5(15.63)	32(17.88)	17(14.91)		
	No	12(3.69)	3(9.38)	6(3.35)	3(2.63)		
Frequency of exercise	≥1 time/d	9(2.71)	2(5.88)	5(2.75)	2(1.72)	5.08	0.7488 ⁴⁾
	5~6 times/w	21(6.33)	4(11.76)	10(5.49)	7(6.03)		
	3~4 times/w	44(13.25)	4(11.76)	27(14.84)	13(11.21)		
	1~2 times/w	115(34.64)	10(29.41)	65(35.71)	40(34.48)		
	No	143(43.07)	14(41.18)	75(41.21)	54(46.55)		
Frequency of eating-out	≥2 times/d	51(15.36)	1(2.94)	30(16.48)	20(17.24)	17.27	0.1398 ⁴⁾
	1 time/d	18(5.42)	2(5.88)	11(6.04)	5(4.31)		
	5~6 times/w	32(9.64)	3(8.82)	16(8.79)	13(11.21)		
	3~4 times/w	80(24.10)	6(17.65)	38(20.88)	36(31.03)		
	1~2 times/w	114(34.34)	16(47.06)	63(34.62)	35(30.17)		
	1~3 times/m	29(8.73)	4(11.76)	18(9.89)	7(6.03)		
	No	8(2.41)	2(5.88)	6(3.30)	0(0.00)		

¹⁾ n (%).

²⁾ Mean±standard deviation.

³⁾ Calculated from chi-square test or ANOVA test.

⁴⁾ Calculated from Fisher's exact test.

2. 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 음식 콘텐츠 이용 현황

본 연구에서 음식 콘텐츠를 이용한다고 응답한 298명을 대상으로 음식 콘텐츠 이용 정도 및 성별에 따른 음식 콘텐츠 이용 현황을 Table 2에 제시하였다. 전체 대상자에서 음식

콘텐츠 이용 빈도는 주 3~6회가 29.53%로 가장 많았으며, 하루 이용 시간으로는 30분 미만이 62.42%로 가장 많은 비율을 차지하였다. 주로 이용하는 음식 콘텐츠의 종류로는 인터넷 먹방(먹방 BJ 방송)이 53.69%로 가장 많았으며, 그 다음으로

Table 2. The status of food content usage by gender and level of food-related content usage among food content users

Variable	Total (n=298)	Level of food-related content usage				Sex				
		Sometimes (n=182)	Often (n=116)	χ^2 or <i>t</i> -value	<i>p</i> -value ³⁾	Male (n=118)	Female (n=180)	χ^2 or <i>t</i> -value	<i>p</i> -value ³⁾	
Frequency of food content usage	≥1 time/d	58(19.46) ¹⁾	6(3.30)	52(44.83)	145.14	<0.0001	20(16.95)	38(21.11)	4.78	0.1887
	3~6 times/w	88(29.53)	35(19.23)	53(45.69)			40(33.90)	48(26.67)		
	1~2 times/w	76(25.50)	67(36.81)	9(7.76)			34(28.81)	42(23.33)		
	<1 time/w	76(25.50)	74(40.66)	2(1.72)			24(20.34)	52(28.89)		
Time to use food content	<30 min/d	186(62.42)	133(73.08)	53(45.69)	25.78	<0.0001	78(66.10)	108(60.00)	5.19	0.0746
	30 min~<1 hour/d	90(30.20)	43(23.63)	47(40.52)			28(23.73)	62(34.44)		
	≥1 hour/d	22(7.38)	6(3.30)	16(13.79)			12(10.17)	10(5.56)		
Types of food content mainly used	Internet Mukbang (BJ broadcast)	160(53.69)	88(48.35)	72(62.07)	6.04	0.1096	54(45.76)	106(58.89)	10.95	0.0120
	SNS food photos, videos	42(14.09)	28(15.38)	14(12.07)			13(11.02)	29(16.11)		
	TV eating show (cooking show) program	21(7.05)	16(8.79)	5(4.31)			11(9.32)	10(5.56)		
	Recipe video	75(25.17)	50(27.47)	25(21.55)			40(33.90)	35(19.44)		
Reason for food content usage ⁴⁾	Information on how to eat deliciously	45(15.10)	23(12.64)	22(18.97)	2.21	0.1369	20(16.95)	25(13.89)	0.52	0.4706
	Information about delicious restaurants	47(15.77)	29(15.93)	18(15.52)	0.01	0.9233	22(18.64)	25(13.89)	1.21	0.2707
	Information about the recipe	97(32.55)	89(32.42)	38(32.76)	0.00	0.9512	49(41.53)	48(26.67)	7.17	0.0074
	Because it's fun	170(57.05)	97(53.30)	73(62.93)	2.28	0.1014	64(54.24)	106(58.89)	0.63	0.4276
	Because I feel like eating instead	46(15.44)	20(10.99)	26(22.41)	7.08	0.0078	6(5.08)	40(22.22)	16.04	<0.0001
	Because it relieves stress	23(7.72)	10(5.49)	13(11.21)	3.25	0.0716	6(5.08)	17(9.44)	1.90	0.1678
Overall satisfaction	3.89±0.70 ²⁾	3.78±0.62	4.07±0.78	-3.38	0.0009	3.86±0.77	3.92±0.65	-0.71	0.4784	
Experience of eating food after usage	Often	45(15.10)	20(10.99)	25(21.55)	11.28	0.0036	19(16.10)	26(14.44)	0.19	0.9112
	Sometimes	203(68.12)	123(67.58)	80(68.97)			80(67.80)	123(68.33)		
	No	50(16.78)	39(21.43)	11(9.48)			19(16.10)	31(17.22)		

1) n (%).

2) Mean±standard deviation.

3) Calculated from chi-square test or Student's *t*-test.

4) Multiple responses.

레시피 영상채널(25.17%), SNS 음식 사진 및 동영상(14.09%)으로 나타났다. 음식 콘텐츠를 이용하는 이유를 다중응답으로 조사한 결과, 즐거워서가 57.05%로 가장 높은 비율을 차지하였으며, 그 다음으로 조리법 정보(32.55%), 맛집 정보(15.77%), 대신 먹는 기분이 들어서(15.44%)의 순이었다. 음식 콘텐츠에 대한 만족도를 5점 Likert 척도로 조사한 결과 3.89점이었으며, 음식 콘텐츠를 이용 후 콘텐츠의 영향을 받아 음식을 섭취한 경험이 있었는지 문항에 대해서는 전체 대상자의 68.12%가 가끔 있다고 응답하였다.

음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 음식 콘텐츠 이용 현황 분석 결과, 주로 이용하는 음식 콘텐츠의 유형은 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 유의한 차이를 보이지 않았지만, 음식 콘텐츠 자주 이용군의 경우 음식 콘텐츠 가끔 이용군에 비해 하루 1회 이상 이용하는 대상자의 비율($p<0.0001$), 하루 1시간 이상 이용자의 비율($p<0.0001$), 음식 콘텐츠 이용 후 콘텐츠의 영향을 받아 음식을 섭취한 경험이 자주 있다고 응답한 대상자의 비율($p=0.0036$)이 유의적으로 높았다. 만족도 조사 결과 음식 콘텐츠 자주 이용군의 만족도가 5점 만점에 4.07

점으로 가끔 이용군(3.78점)에 비해 유의적으로 높았다($p=0.0009$). 또한 음식 콘텐츠 자주 이용군은 음식 콘텐츠를 이용하는 이유 중 대신 먹는 기분이 들어서라고 응답한 비율(22.41%)이 음식 콘텐츠 가끔 이용군(10.99%)에 비해 유의적으로 높았다($p=0.0078$). 성별에 따른 음식 콘텐츠 이용 현황 분석 결과, 음식 콘텐츠 이용 빈도, 하루 이용 시간, 음식 콘텐츠 이용에 대한 전반적인 만족도 및 이용 후 음식 섭취 경험 항목은 성별에 따른 유의한 차이를 보이지 않았지만 주로 이용하는 음식 콘텐츠의 유형에서는 성별에 따른 유의적인 차이를 보여 여자는 인터넷 먹방(먹방 BJ 방송)을 응답한 비율이 남자에 비해 높았던 반면, 남자는 레시피 영상 채널을 응답한 비율이 여자에 비해 높았다($p=0.0120$). 또한 음식 콘텐츠를 이용하는 이유에 대해 남자는 조리법 정보($p=0.0074$)를, 여자는 대신 먹는 기분이 들어서($p<0.0001$)를 응답한 비율이 유의적으로 높은 결과를 보였다.

20~30대 성인이나 대학생을 대상으로 음식 콘텐츠 이용 정도에 음식 콘텐츠 이용 현황에 대한 연구는 아직 충분히 보고된 바 없으며, 독립변수인 음식 관련 콘텐츠의 분류 형태가 매우 다양하여 일관성 있는 결론을 내리기는 어려운 상황이다. 원주 지역 대학생을 대상으로 한 선행연구에서는 먹방 시청 후 외식, 배달 음식, 인스턴트 음식 섭취의 변화 정도를 조사한 결과, 먹방을 자주 시청하는 군이 보통 시청하는 군에 비해 ‘더 먹게 된다’고 응답한 비율이 유의적으로 높았다(Lee & Lee 2022). 본 연구에서는 먹방보다는 범위가 큰 음식 콘텐츠 이용으로 독립변수를 설정하고, 음식 콘텐츠 이용 후 음식을 섭취한 경험을 조사한 결과 음식 콘텐츠 자주 이용군에서 가끔 이용군에 비해 음식 콘텐츠 이용 후 음식을 섭취한 경우를 ‘자주’라고 응답한 비율이 유의적으로 높아 선행연구와 유사한 결과를 보였다. 이와 관련하여 시청자들은 먹방 유튜브에 깊게 몰입이 되어 먹방에서 소개하는 음식에 많은 관심을 가지게 되고, 먹방에서 소개하는 음식 상품을 구매하게 된다는 선행연구(Kang WC 2021)가 존재하나, 반면 먹방은 일부 시청자들에게 대리만족 효과만 가져오며 식욕에는 유의미한 영향을 미치지 않는다는 선행연구(Kang 등 2019)도 있어 본 연구결과에 대하여 일관성 있는 해석을 하기는 어렵다. 그러나 음식과 관련된 콘텐츠를 이용하는 경우는 다양한 매개요인의 영향을 받아 콘텐츠 이용 이후의 식품 선택에 영향을 미칠 수 있다는 점을 고려하여 볼 때, 음식 콘텐츠 이용이 대학생들의 식품 선택에 미치는 영향에 대하여 음식 콘텐츠의 유형과 함께 사회적, 경제적, 환경적 요인, 개인의 특성을 심도깊게 살펴보는 연구가 필요하다고 생각된다.

20~30대 성인에서 소셜미디어의 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 이용 목적을 조사한 선행연구(Bang & Jung 2023)에 따

르면 전체 대상자에서 주 이용 목적은 정보 획득 및 공유가 가장 많았으며, 음식 콘텐츠 이용 수준이 높은 군에서는 주 이용 목적으로 ‘여가 및 취미’로 응답한 비율이 가장 높았던 반면, 이용 수준이 낮은 군에서는 주 이용 목적으로 ‘정보 획득 및 공유’로 응답한 비율이 가장 높게 나타났다. 본 연구에서도 음식 콘텐츠 자주 이용군에서 가끔 이용군에 비해 이용하는 이유에 대하여 ‘대신 먹는 기분이 들어서’로 응답한 비율이 높아 정보 획득보다는 정서적인 충족감 등이 큰 영향을 미치는 것으로 보인다.

3. 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 식이 자기효능감

본 연구에서 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 구간 식이 자기효능감을 비교분석한 결과는 Table 3에 제시하였다. 전체 대상자에서 식이 자기효능감의 평균 점수는 2.89점이었으며, 식이 자기효능감의 총 평균 점수는 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 구간 유의한 차이를 보여, 4점 만점에 음식 콘텐츠 비이용군이 3.08점으로 음식 콘텐츠 가끔 이용군(2.89점)과 음식 콘텐츠 자주 이용군(2.83점)에 비해 유의적으로 높은 식이 자기효능감 점수를 보였다($p=0.0191$). 또한 일부 항목의 식이 자기효능감에서 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 구간 유의한 차이가 나타났는데, ‘하루 세끼 정해진 시간에 규칙적으로 식사할 수 있다’($p<0.0001$), ‘주위 사람들이 맛있는 음식을 권할 때 거절할 수 있다’($p=0.0115$), ‘맛있는 음식이 눈 앞에 있을 때 먹지 않고 참을 수 있다’($p=0.0141$)에서 음식 콘텐츠 비이용군의 점수가 세군 중 가장 높은 결과를 보였다.

자기효능감은 특수한 상황에서 특정 행동을 수행할 수 있는 개인적 믿음으로, 인간 행동의 자기 조절에 매우 중요하며 건강과 관련된 행동에도 영향을 미쳐 건강행동에 참여할 수 있는 능력을 제공하게 된다. 특히 건강한 식습관을 유지하는데 있어 자기효능감은 건강한 음식 선택, 건강한 식사 섭취를 보장하는데 도움이 될 수 있다(Bandura A 1998). 따라서 높은 자기효능감과 건강한 식습관과의 밀접한 관련성이 계속적으로 보고되고 있는데(Milligan 등 1998; Spence 등 2014), 많은 연구들이 식생활의 적극적인 관리가 필요한 만성질환자를 대상으로 보고되고 있는 상황이다(Kang 등 2022; Wong 등 2024). 아직까지 우리나라에서 건강한 성인기 초반에 있는 대학생을 대상으로 식이 자기효능감에 대한 심도깊은 연구는 보고된 바 없으며, 음식 콘텐츠의 이용이 급증하고 있는 현 상황에서 음식 콘텐츠 이용에 따른 식이 자기효능감의 차이를 살펴본 연구는 전무한 상황이다. 본 연구 분석 결과 성인기 초반에 있는 건강한 대학생에서 음식 콘텐츠의 이용이 많은 군에서 식이 자기효능감이 유의적으로 낮은 결과를 보였으며, 이는 고등학생을 대상으로 식이 자기효능감과 음식 콘텐츠 이용과의 관련성에 대하여 분석한 Oh 등

Table 3. Dietary self-efficacy¹⁾ among groups according to the usage of food-related content

Variable	Total (n=332)	Level of food-related content usage					Sex			
		No (n=34)	Sometimes (n=182)	Often (n=116)	F- value	p- value ³⁾	Male (n=118)	Female (n=180)	t- value	p- value ³⁾
Can you eat three meals a day at scheduled times?	2.52±0.78 ²⁾	3.00±0.78 ^{4a)}	2.55±0.74 ^{b)}	2.32±0.78 ^{b)}	11.14	<0.0001	2.64±0.77	2.43±0.78	2.37	0.0186
Can you lower the pace of your eating to match that of the people around?	3.07±0.71	3.06±0.55	3.08±0.73	3.07±0.72	0.01	0.9888	2.96±0.71	3.16±0.70	2.55	0.0113
Can you refrain from overeating and always eat a moderate amount of food?	2.94±0.66	3.09±0.57	2.97±0.63	2.85±0.71	2.04	0.1317	2.88±0.69	2.98±0.63	-1.45	0.1475
Can you eat foods without salting them?	2.45±0.93	2.65±1.10	2.49±0.91	2.34±0.90	1.80	0.1669	2.46±0.92	2.45±0.94	0.09	0.9290
Can you refrain from eating snacks after supper?	2.78±0.88	2.94±0.78	2.74±0.86	2.79±0.93	0.81	0.4467	2.96±0.90	2.65±0.84	3.23	0.0013
Can you choose baked or steamed foods over fried or roasted foods?	3.02±0.72	3.12±0.64	3.02±0.72	2.97±0.74	0.54	0.5824	2.97±0.79	3.05±0.67	-0.92	0.3582
Can you eat fresh fruits instead of candies or cookies as snacks?	3.33±0.72	3.29±0.72	3.31±0.73	3.36±0.73	0.20	0.8163	3.34±0.71	3.32±0.74	0.31	0.7549
Can you eat milk or yogurt instead of ice cream as snacks?	3.32±0.73	3.21±0.81	3.32±0.70	3.34±0.76	0.48	0.6201	3.29±0.74	3.33±0.72	-0.50	0.6180
Can you drink water instead of soda when you are thirsty?	3.43±0.69	3.50±0.56	3.41±0.69	3.45±0.73	0.32	0.7269	3.43±0.61	3.43±0.74	-0.05	0.9602
Can you watch TV or read a book without eating something?	2.84±0.94	3.06±0.95	2.86±0.91	2.75±0.99	1.48	0.2298	2.90±0.92	2.80±0.96	0.98	0.3260
Can you refuse delicious food when offered?	2.62±0.86	3.03±0.80 ^{a)}	2.58±0.86 ^{b)}	2.55±0.84 ^{b)}	4.53	0.0115	2.69±0.91	2.57±0.82	1.24	0.2152
Can you resist delicious food placed in front of you?	2.64±0.89	3.06±0.78 ^{a)}	2.61±0.88 ^{b)}	2.57±0.91 ^{b)}	4.32	0.0141	2.79±0.93	2.54±0.85	2.54	0.0115
Can you resist your craving for food on coming back home after school?	2.88±0.85	3.18±0.72	2.86±0.83	2.83±0.92	2.35	0.0966	3.06±0.82	2.74±0.86	3.42	0.0007
Can you control your appetite at a birthday party or festival banquet?	2.46±0.92	2.76±0.89	2.47±0.92	2.36±0.92	2.56	0.0791	2.49±0.99	2.44±0.87	0.49	0.6248
Can you control your craving for food when you are bored?	2.92±0.82	3.06±0.78	2.95±0.79	2.82±0.88	1.49	0.2276	3.05±0.81	2.82±0.82	2.56	0.0108
Can you control your craving for food when you are stressed?	2.68±0.95	2.91±0.93	2.72±0.89	2.56±1.02	2.11	0.1229	2.91±0.93	2.52±0.93	3.74	0.0002
Can you control your craving for food when you are anxious or nervous?	3.14±0.82	3.29±0.84	3.10±0.82	3.16±0.81	0.81	0.4444	3.19±0.80	3.11±0.83	0.91	0.3610
Can you control your craving for food when you feel sad or moody?	2.98±0.92	3.18±0.90	2.99±0.88	2.91±0.98	1.09	0.3390	3.11±0.88	2.89±0.94	2.25	0.0249
Mean score of dietary self-efficacy	2.89±0.44	3.08±0.42 ^{a)}	2.89±0.45 ^{b)}	2.83±0.44 ^{b)}	4.00	0.0191	2.95±0.47	2.85±0.42	2.15	0.0324

¹⁾ The scores of the items regarding dietary self-efficacy are assessed on a 4-point Likert scale, whereby the higher the score, the higher the dietary self-efficacy (1=very unlike, 2=unlike, 3=like, 4=very like).

²⁾ Mean±standard deviation.

³⁾ Calculated from ANOVA test or Student's *t*-test.

⁴⁾ Values with different superscripts within a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(2019)의 연구결과와 유사하였다.

4. 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 영양지수

본 연구에서 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 구간 영양지수를 분석한 결과는 Table 4에 제시하였다. 전체 대상자에서 전체 NQ 점수는 46.58점이었으며, 균형, 절제 및 실천 영역의 점수는 각각 25.87점, 56.83점, 53.77점이었다. 균형 영역에서 음식 콘텐츠 비이용군, 가끔 이용군, 자주 이용군에서 평균 점수는 각각 31.66점, 27.45점, 21.70점으로 음식 콘텐츠 비이용군과 가끔 이용군의 점수가 자주 이용군에 비해 유의적으로 높았으며($p=0.0004$), 등급이 '상'인 자의 비율 역시 음식 콘텐츠 비이용군에서 유의적으로 가장 높았다($p=0.0011$). 절제 영역에서 음식 콘텐츠 비이용군의 평균 점수는 59.36점으로 자주 이용군(52.96점)에 비해 유의적으로 높았으며($p=0.0222$), 등급이 '상'인 자의 비율 역시 음식 콘텐츠 비이용군에서 8.82%로 유의적으로 가장 높았다($p=0.0075$). 실천 영역에서는 NQ 점수 및 등급의 비율에서 음식 콘텐츠 이용 정도에 따른 구간 유의한 차이를 보이지 않았다. 전체 NQ 점수에서

는 음식 콘텐츠 비이용군이 48.85점으로 음식 콘텐츠 자주 이용군의 43.82점에 비해 유의적으로 높았으며($p=0.0270$), 등급이 '상'인 자의 비율 역시 음식 콘텐츠 비이용군에서 14.71%로 세 군 중 유의적으로 가장 높았다($p=0.0001$).

성인 영양지수 개정 연구에서 19~64세 성인을 대상으로 2021년 개정된 NQ 지수를 조사한 결과, 영역별 평균 점수가 균형에서 43.6점, 절제에서 75.0점, 실천에서 63.0점으로 보고하였는데(Yook 등 2022), 이를 본 연구대상자의 결과와 비교하면 본 연구대상자의 NQ 점수는 전반적으로 낮은 편이었다. 한편 음식 콘텐츠 이용과 식생활과의 선행연구에 따르면, 고등학생을 대상으로 한 연구에서 음식 콘텐츠 이용을 많이 할수록 식습관 점수가 좋지 않았다는 결과(Oh 등 2019)도 있었고, 음식 콘텐츠를 떡방과 쿡방으로 구분하여 조사했을 때 음식 콘텐츠 시청 유형에 따른 청소년 영양지수에 유의적 차이가 없었다는 연구결과도 존재하였다(Kim & Kim 2023). 또한 대학생들을 대상으로 한 Yun 등(2020)의 연구에 따르면 떡방을 자주 시청하는 군의 경우 식사 상태가 현저히 나빴으며, 떡방 시청을 통해 외식, 간편 배달음식 구입 등 바

Table 4. Nutrition Quotient (NQ) among groups according to the usage of food-related content

Variable	Total (n=332)	Level of food-related content usage						Sex		t- value	p- value ⁴⁾
		No (n=34)	Sometimes (n=182)	Often (n=116)	χ^2 or F-value	p- value ⁴⁾	Male (n=140)	Female (n=192)			
Balance											
Mean score	25.87±15.26 ¹⁾	31.66±21.85 ^{a2)}	27.45±15.36 ^a	21.70±11.43 ^b	8.08	0.0004	26.04±17.46	25.75±13.48	0.16	0.8729	
Grade criterion	High	13(3.92) ³⁾	4(11.76)	9(4.95)	0(0.00)		9(6.43)	4(2.08)			
	Medium	98(26.51)	8(23.53)	58(31.87)	22(18.97)	18.3330	35(25.00)	53(27.60)	4.15	0.1258	
	Low	231(69.58)	22(64.71)	115(63.19)	94(81.03)		96(68.57)	135(70.31)			
Moderation											
Mean score	56.83±17.89	59.36±21.08 ^a	58.46±17.50 ^{ab}	52.96±17.05 ^b	3.85	0.0222	53.18±19.83	59.14±15.93	-2.93	0.0050	
Grade criterion	High	9(2.71)	3(8.82)	4(2.20)	2(1.72)		3(2.14)	6(3.13)			
	Medium	88(26.51)	11(32.35)	57(31.32)	20(17.24)	13.9496	32(22.86)	56(29.17)	2.11	0.3478	
	Low	235(70.78)	20(58.82)	121(66.48)	94(81.03)		105(75.00)	130(67.71)			
Practice											
Mean score	53.77±9.59	54.09±23.20	54.93±18.97	51.86±19.43	0.87	0.4183	50.43±22.48	56.20±16.82	-2.56	0.0110	
Grade criterion	High	47(14.16)	7(20.59)	25(13.74)	15(12.93)		19(13.57)	28(14.58)			
	Medium	146(43.98)	13(38.24)	85(46.70)	48(41.38)	2.5198	54(38.57)	92(47.92)	3.74	0.1541	
	Low	139(41.87)	14(41.18)	72(39.56)	53(45.69)		67(47.86)	72(37.50)			
Total NQ											
Mean score	46.58±3.87	48.85±18.26 ^a	47.92±13.70 ^{ab}	43.82±12.25 ^b	3.65	0.0270	44.02±16.51	48.45±11.25	-2.75	0.0065	
Grade criterion	High	13(3.92)	5(14.71)	6(3.30)	2(1.72)		6(4.29)	7(3.65)			
	Medium	93(28.01)	8(23.53)	64(35.16)	21(18.10)	23.1793	34(24.29)	59(30.73)	1.69	0.4306	
	Low	226(68.07)	21(61.76)	112(61.54)	93(80.17)		100(71.43)	126(65.63)			

¹⁾ Mean±standard deviation.

²⁾ Values with different superscripts within a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

³⁾ n (%).

⁴⁾ Calculated from ANOVA test, Student's *t*-test or Fisher's exact test.

랍직하지 않은 음식을 더 많이 먹게 된다고 하였지만, 반면 쿡방을 시청하는 대상자들의 경우 직접 음식을 요리하고 싶은 마음이 더 커졌다는 연구결과를 보고한 바 있다. 이를 보았을 때 음식 콘텐츠의 종류에 따라 식생활에 미치는 영향은 다를 수 있을 것이나, 본 연구에서는 음식 콘텐츠 유형별 이용 분류에 따라 체계적으로 분석하지 못한 제한점이 있다. 따라서 추후 연구에서는 음식 콘텐츠 유형별 이용 정도에 따른 식생활을 좀 더 심층적으로 조사 분석할 필요가 있을 것이다.

5. 음식 콘텐츠 이용 후 음식 섭취 경험에 따른 식이 자기 효능감 및 영양지수

본 연구에서 음식 콘텐츠를 이용한다고 응답한 298명을 대상으로 음식 콘텐츠 이용 후 음식 섭취 경험에 따른 식이 자기효능감 및 영양지수를 분석한 결과는 Table 5에 제시하

였다. 음식 콘텐츠 이용 후 음식 섭취 경험에 대하여 자주 있음, 가끔 있음, 전혀 없음으로 나누어 식이 자기효능감 및 영양지수를 분석한 결과, 음식 콘텐츠 이용 후 음식을 섭취한 경험이 전혀 없다고 응답한 군에서 식이 자기효능감이 4 점 만점에 3.03점으로, 음식 섭취 경험이 가끔 있는 군(2.83 점)과 자주 있는 군(2.85점)에 비해 유의적으로 높았다 ($p=0.0194$). 또한 음식 콘텐츠 이용 후 음식을 섭취한 경험이 전혀 없다고 응답한 군의 경우 영양지수의 절제 영역 점수 ($p=0.0018$), 실천 영역 점수($p=0.0058$) 및 전체 NQ 점수 ($p=0.0019$)에서도 음식 섭취 경험이 자주 있는 군에 비해 유의적으로 높은 점수를 보였으며, '상' 등급인 자의 비율 역시 유의적으로 높았다(각 $p<0.01$).

먹는 것과 관련된 소셜미디어 콘텐츠, 신체 이미지와 식습 관과의 관련성에 대하여 체계적 문헌고찰을 진행한 연구에 따르면 패스트푸드 광고, 먹는 모습이 나오는 비디오 등의

Table 5. Dietary self-efficacy and Nutrition Quotient(NQ) according to the experience of eating food after food content usage

Variable	Often(n=45)	Sometimes(n=203)	No(n=50)	χ^2 or <i>F</i> -value	<i>p</i> -value ⁴⁾
Score of dietary self-efficacy	2.85±0.56 ^{1)3)b}	2.83±0.40 ^b	3.03±0.45 ^a	4.00	0.0194
Balance					
Mean score	24.24±15.30	24.42±13.43	29.30±15.84	2.51	0.0832
Grade criterion					
High	1(2.22) ²⁾	5(2.46)	3(6.00)		
Medium	15(33.33)	51(25.12)	14(28.00)	3.21	0.5236
Low	29(64.44)	147(72.41)	33(66.00)		
Moderation					
Mean score	50.70±18.89 ^b	55.87±16.07 ^b	63.17±19.90 ^a	6.43	0.0018
Grade criterion					
High	1(2.22)	1(0.49)	4(8.00)		
Medium	6(13.33)	51(25.12)	20(40.00)	21.78	0.0002
Low	38(84.44)	151(74.38)	26(52.00)		
Practice					
Mean score	46.48±24.84 ^b	54.05±16.64 ^a	58.96±21.39 ^a	5.25	0.0058
Grade criterion					
High	7(15.56)	19(9.36)	14(28.00)		
Medium	11(24.44)	103(50.74)	19(38.00)	21.32	0.0003
Low	27(60.00)	81(39.90)	17(34.00)		
Total NQ					
Mean score	42.03±16.71 ^b	46.00±11.31 ^b	51.48±15.73 ^a	6.41	0.0019
Grade criterion					
High	1(2.22)	2(0.99)	5(10.00)		
Medium	13(28.89)	51(25.12)	21(42.00)	20.11	0.0005
Low	31(68.89)	150(73.89)	24(48.00)		

1) Mean±standard deviation.

2) n (%).

3) Values with different superscripts within a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

4) Calculated from ANOVA test or Fisher's exact test.

소셜미디어 내용은 식이장애와 양의 관련성이 있으나, 건강한 식품에 대한 콘텐츠 영상의 경우 그 관련성이 나타나지 않았다고 한다(Wu 등 2024). 이와 같이 먹는 것과 관련된 영상 콘텐츠는 식사 상태와 밀접한 관련성을 가질 수 있는데, 본 연구 결과에 따르면 음식 콘텐츠 이용 후 음식을 섭취한 경험이 없는 군에서 식이 자기효능감이 높았고, 식사의 질을 의미하는 NQ에서의 절제 영역, 실천 영역의 점수 및 총 점수가 유의적으로 높았다. 식이 자기효능감이 높은 사람은 식사와 관련된 상황에서 행동을 잘 조절할 수 있는 능력이 큰데, 음식 콘텐츠 이용 후 음식 섭취 경험이 없다는 것은 음식을 섭취하고 싶은 욕구를 잘 통제한다는 것을 의미한다. 18~30세 젊은 브라질 성인을 대상으로 한 선행연구에서 자기효능감은 dietary guidelines index를 사용한 식사의 질과 유의한 양의 관련성을 가짐을 보고하였으며(Sexton-Dhamu 등 2021), 젊은 성인을 대상으로 한 여러 코호트 연구에서도 높은 자기

효능감은 높은 채소 섭취나 패스트푸드의 낮은 섭취와 밀접한 관련성이 있다고 보고된 바 있다(Larson 등 2008; Larson 등 2012). 따라서 음식 콘텐츠를 이용하고 있는 성인기 초반의 대학생들을 대상으로 식이 자기효능감을 증가시킬 수 있는 다양한 방법의 마련이 필요하다고 생각된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 대학생들에서 음식 관련 콘텐츠 이용 정도에 따른 식이 자기효능감 및 영양평가를 실시하여 대학생에서 음식 관련 콘텐츠 이용과 관련된 다양한 요인을 살펴보고자, 2022년 10월부터 11월까지 충북 지역 소재의 대학에 재학 중인 남녀 대학생 총 332명(남자 140명, 여자 192명)을 대상으로 설문조사를 통하여 일반사항, 음식 관련 콘텐츠 이용 수준(이용 빈도, 1회 이용 시간, 주로 이용하는 콘텐츠의 중

류, 이용 이유, 만족도 등), 식이 자기효능감 및 성인 대상 영양지수 자료를 수집하여 분석하였고 그 결과는 다음과 같다. 먼저 본 연구에서 음식 콘텐츠를 이용한다고 응답한 298명을 대상으로 음식 콘텐츠 이용 정도를 분석한 결과 음식 콘텐츠 자주 이용군(116명)의 경우 음식 콘텐츠 가끔 이용군(182명)에 비해 하루 1회 이상 이용하는 대상자의 비율($p<0.0001$), 하루 1시간 이상 이용자의 비율($p<0.0001$), 음식 콘텐츠 이용 후 콘텐츠의 영향을 받아 음식을 섭취한 경험이 자주 있다고 응답한 대상자의 비율($p=0.0036$)이 유의적으로 높았다. 또한 음식 콘텐츠를 시청하는 정도에 따라 보지 않는 군(34명), 가끔 보는 군(182명), 자주 보는 군(116명)으로 나누어 식이 자기효능감과 영양지수를 분석한 결과, 음식 콘텐츠를 보지 않는 군의 식이 자기효능감의 평균 점수는 4점 만점에 3.08점으로 가끔 보는 군(2.89점)과 자주 보는 군(2.83점)에 비해 유의적으로 높았고($p=0.0191$), 영양지수 중 균형 영역($p=0.0004$), 절제 영역($p=0.0222$)의 점수가 유의적으로 높았으며, 영양지수 총 점수도 48.85점으로 세 군 중 가장 높았다($p=0.0270$). 음식 콘텐츠 이용 후 음식을 섭취한 경험이 전혀 없다고 응답한 대상자의 경우 식이 자기효능감이 4점 만점에 3.03점으로, 음식 섭취 경험이 가끔 있는 군과 자주 있는 군에 비해 유의적으로 높았다($p=0.0194$). 또한 음식 콘텐츠 이용 후 음식을 섭취한 경험이 전혀 없다고 응답한 군의 경우 영양지수의 절제 영역 점수($p=0.0018$), 실천 영역 점수($p=0.0058$) 및 전체 NQ 점수($p=0.0019$)에서도 음식 섭취 경험이 자주 있는 군에 비해 유의적으로 높은 점수를 보였으며, ‘상’ 등급인 자의 비율 역시 유의적으로 높았다(각 $p<0.01$). 본 연구는 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 첫 번째, 연구대상자의 규모가 작고, 충북 일부 지역 대상자에 국한되어 있어 연구결과를 일반화시키기가 어렵다. 두 번째, 음식 콘텐츠의 세부 유형에 따른 식이 자기효능감 및 영양지수의 심층분석이 이루어지지 못한 점이다. 그러나 본 연구는 음식 콘텐츠의 이용이 많을 것으로 예상되는 대학생을 대상으로 식이 자기효능감의 차이를 알아보고, 식사의 질까지 분석한 최초 연구로서의 의미를 가지고 있다. 따라서 본 연구결과는 대학생에서 음식 관련 콘텐츠 이용과 식생활과의 관련성 규명 및 대학생 대상 바른 식생활 교육을 위한 기초자료로 활용될 것이다.

References

- An S, Lim Y, Lee H. 2020. A content analysis of eating show (mukbang) programs on television and online program content in South Korea. *Korean J Broadcast Telecommun Stud* 34:39-79
- Bandura A. 1998. Health promotion from the perspective of social cognitive theory. *Psychol Health* 13:623-649
- Bang SY, Jung BM. 2023. Health behaviors and eating habits in people's 20s and 30s according to food content usage level on social media: A cross-sectional study. *Korean J Community Nutr* 28:392-403
- Boulos R, Vikre EK, Oppenheimer S, Chang H, Kanarek RB. 2012. ObesiTV: How television is influencing the obesity epidemic. *Physiol Behav* 107:146-153
- Cho EH. 2020. A study on the trend and the cultural phenomenon of mukbang. *J Korea Contents Assoc* 20:68-85
- Choi MJ, Kim KH. 2021. Use and Characteristics of YouTube Journalism Content. pp.15-16. Korea Press Foundation
- Choi MY, Kim HY. 2008. Nutrition knowledge, dietary self-efficacy and eating habits according to student's stage of regular breakfast or exercise. *Korean J Community Nutr* 13:653-662
- Choi TH, Lee MC, Kim DS. 2021. Effects of the YouTube and Instagram on eating out behavior intention of college student: Focused on differences between group according to gender and involvement. *Culin Sci Hosp Res* 27:191-199
- Hevey D, Smith M, McGee HM. 1998. Self-efficacy and health behaviour: A review. *Ir J Psychol* 19:248-273
- Hwang DY, Jeong SB, Kang JW, Choi IY, Kim MH, Choi MK, Bae YJ. 2023. Home meal replacement use and dietary quality according to its use frequency among university students in Chungcheong area. *Korean J Food Nutr* 36:253-263
- Kang A, Dulin A, Risica PM. 2022. Relationship between adherence to diet and physical activity guidelines and self-efficacy among black women with high blood pressure. *J Health Psychol* 27:663-673
- Kang E, Lee J, Kim KH, Yun YH. 2020. The popularity of eating broadcast: Content analysis of mukbang YouTube videos, media coverage, and the health impact of "mukbang" on public. *Health Inf J* 26:2237-2248
- Kang MJ, Kim HY, Jang HW, Lee SB. 2019. The effect of TV food program viewers' watching motivation on watching attitude, satisfaction, and behavioral intention. *Int J Tour Hosp Res* 33:55-69
- Kang WC. 2021. The effect of YouTube contents characteristics of mukbang on flow and food product purchase intention. *Culin Sci Hosp Res* 27:87-96
- Kim BM, Kim KH. 2023. Association between food content

- watching and nutrition quotient in adolescents (NQ-A) in Seoul. *J Korean Soc Food Cult* 38:61-72
- Kim N, Kim J, Kye S. 2020b. Food habits, health behaviors related to the personality in Korean college students. *J Nutr Health* 53:13-26
- Kim SK, Kim J, Kim H, An S, Lim Y, Park H. 2020a. Association between food-related media program watching and dietary behaviors in Korean adolescents. *Korean Public Health Res* 46:31-46
- Ko KK, Kim MH, Lee JH. 2019. Intake status and perception of energy drinks according to the gender and obesity of some university students in Chungnam province. *Korean J Food Nutr* 32:167-178
- Larson N, Laska MN, Story M, Neumark-Sztainer D. 2012. Predictors of fruit and vegetable intake in young adulthood. *J Acad Nutr Diet* 112:1216-1222
- Larson NI, Neumark-Sztainer DR, Story MT, Wall MM, Harnack LJ, Eisenberg ME. 2008. Fast food intake: Longitudinal trends during the transition to young adulthood and correlates of intake. *J Adolesc Health* 43:79-86
- Lee SL, Choi YJ. 2022. The current status of cookbang viewing and dietary habit of university students. *J Home Econ Educ Res* 34:131-142
- Lee SL, Lee SH. 2022. Actual status of mukbang viewing and food habits of university students in Wonju area. *Korean J Community Living Sci* 33:631-643
- Lister NB, Baur LA, Felix JF, Hill AJ, Marcus C, Reinehr T, Summerbell C, Wabitsch M. 2023. Child and adolescent obesity. *Nat Rev Dis Primers* 9:24
- Milligan RAK, Burke V, Beilin LJ, Dunbar DL, Spencer MJ, Balde E, Gracey MP. 1998. Influence of gender and socio-economic status on dietary patterns and nutrient intakes in 18-year-old Australians. *Aust N Z J Public Health* 22:485-493
- Nam YJ. 2016. The effect of dietary self-efficacy on stress and dietary behavior among middle school students. Ph.D. Thesis, Kangwon National Univ. Chuncheon. Korea
- Oh MH, Hong K, Kim SE. 2019. Relationship among the use of food-related content, dietary behaviors, and dietary self-efficacy of high school students in Seoul and Gyeonggi areas. *J Nutr Health* 52:297-309
- Park KA, Kim J, Cho O, Song K. 2021. Relationship among health interest, depression and dietary habits of college students according to sex in Seoul and Gyeonggi areas. *J East Asian Soc Diet Life* 31:213-225
- Park SY, Eom J, Choi S, Kim J, Park EC. 2024. Association between watching eating broadcast “mukbang and cookbang” and body mass index status in South Korean adolescents stratified by gender. *Nutr J* 23:43
- Ryu GB, Heo YR. 2024. Differences in nutritional status according to the residence types among university students in Gwangju. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 53:207-213
- Sexton-Dhamu MJ, Livingstone KM, Pendergast FJ, Worsley A, McNaughton SA. 2021. Individual, social-environmental and physical-environmental correlates of diet quality in young adults aged 18-30 years. *Appetite* 162:105175
- Spence AC, Campbell KJ, Crawford DA, McNaughton SA, Hesketh KD. 2014. Mediators of improved child diet quality following a health promotion intervention: The Melbourne InFANT Program. *Int J Behav Nutr Phys Act* 11:137
- Wong SKW, Soon W, Griva K, Smith HE. 2024. Diabetes knowledge, self-efficacy and dietary, psychological and physical health barriers: Comparing young and usual-onset type 2 diabetes. *Diabet Med* 41:e15207
- Wu Y, Kempes E, Prichard I. 2024. Digging into digital buffets: A systematic review of eating-related social media content and its relationship with body image and eating behaviours. *Body Image* 48:101650
- Yook SM, Lim YS, Lee JS, Kim KN, Hwang HJ, Kwon S, Hwang JY, Kim HY. 2022. Revision of nutrition quotient for Korean adults: NQ-2021. *J Nutr Health* 55:278-295
- Yoon E. 2023. Dietary guidelines adherence and changes in eating habits among college students in the post-COVID-19 period: A cross-sectional study. *Korean J Community Nutr* 28:220-234
- Yun S, Kang H, Lee H. 2020. Mukbang- and cookbang-watching status and dietary life of university students who are not food and nutrition majors. *Nutr Res Pract* 14:276-285

Received 22 August, 2024
 Revised 10 October, 2024
 Accepted 17 October, 2024

한라봉 과피 유래 다당의 면역활성 및 항전이 효과

신 광 순 · *박 혜 령*

경기대학교 식품생물공학과 교수, *수원여자대학교 호텔외식조리과 조교수

Immuno-activating and Anti-metastatic Effects of Polysaccharides Isolated from Hallabong Peels

Kwang-Soon Shin and *Hye-Ryung Park*

Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea

*Assistant Professor, Dept. of Hotel Foodservice & Culinary Arts, Suwon Women's University, Hwaseong 18333, Korea

Abstract

This study investigated immunomodulatory and antimetastatic properties of polysaccharides extracted from hallabong (Citrus hybrid) peel, focusing on their effects on macrophage activation. Crude polysaccharides (HPWP) were obtained through hot water extraction and ethanol precipitation from dried hallabong peel powder. Macrophages isolated from mouse peritoneum were used to evaluate cytotoxicity of HPWP against normal cells and Colon 26-M3.1 carcinoma cells. Our findings revealed no cytotoxic effects of HPWP on either normal cells or Colon 26-M3.1 carcinoma cells. Immunoactivity was assessed by measuring cytokine production, specifically IL-6 and IL-12, using ELISA. Results indicated a significant, concentration-dependent increases of cytokine levels. Tumoricidal activity of NK cells was also evaluated, demonstrating enhanced tumor cell killing induced by HPWP, in a concentration-dependent manner. This increased activity was due to HPWP's potent antimetastatic effects, as observed in a mouse model of Colon 26-M3.1 carcinoma. In comparison with a the negative control (NC, 100%), HPWP at concentrations of 10, 100, and 1000 µg/mouse showed antimetastatic effects of 49.4%, 61.3%, and 74.3%, respectively. These effects were attributed to only NK cell activation. These findings suggest that HPWP has potential as a functional ingredient in food products aimed at enhancing immune response and inhibiting cancer metastasis.

Key words: hallabong peel, polysaccharide, macrophage, NK cell, anti-metastasis

서 론

암은 인간의 생명을 위협하는 대표적인 질환으로, 암 환자의 90% 이상이 원발성 종양이 아닌 전이에 의해 사망한다 (Sporn MB 1996). 전이는 악성 종양과 양성 종양을 구분하는 주요 특징 중 하나로(Weiss L 1990), 전이 과정에서 종양 세포는 면역원성, 성장 속도, 세포 표지자 및 항암제에 대한 감수성 등에서 생물학적 다양성을 나타내게 된다(Fidler IJ 1987). 따라서, 전이를 억제하는 것은 암 치료에서 가장 중요한 과제 중 하나로 대두되고 있다. 다수의 실험 연구와 임상 시험에서는 선천적 면역계가 원발성 종양의 전이를 차단하

는 데 중요한 역할을 한다는 사실이 입증되었다(Leyon & Kuttan 2004). 선천성 면역계의 활성화는 종양을 포함한 외부 항원에 대한 방어에 중요한 역할을 하며(Jakóbiak 등 2003), 이 면역 자극의 주요 메커니즘은 대식세포(macrophages) 및 수지상 세포(dendritic cell)와 같은 탐식 세포(phagocytes)의 활성화와 관련이 있다. 또한, 대식세포와 탐식 세포가 분비하는 다양한 사이토카인들(예: interleukin (IL)-6, IL-12, tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-1β)은 자연살해 세포(natural killer cell, NK cell)의 종양 세포에 대한 세포독성을 유발한다고 알려져 있다(Azuma & Seya 2001). 이러한 면역 반응은 NK 세포와 대식세포의 기능적 활성화가 종양의 성장과 전이를 억

* Corresponding author: Hye-Ryung Park, Assistant Professor, Dept. of Hotel Foodservice & Culinary Arts, Suwon Women's University, Hwaseong 18333, Korea. Tel: +82-31-290-8967, Fax: +82-31-290-8967, E-mail: hrpark@swc.ac.kr

제하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

한라봉은 귤(*Citrus reticulata*)과 오렌지(*Citrus sinensis*)를 교배하여 개발된 하이브리드 품종으로, 주로 제주도의 한라산에서 그 이름이 유래되었다(Shin 등 2021). 감귤류의 껍질(진피)은 전통 의학에서 복통, 기침, 피부 염증, 근육통, 백선 감염 치료 및 혈압 강하 등의 효능이 있다고 보고되어 왔다(Li 등 2009). 다른 감귤류와 마찬가지로, 한라봉 껍질에도 pectin, flavonoids, carotenoids, limonoids, coumarins과 같은 인간 건강에 유익한 기능성 성분이 풍부한 것으로 알려져 있다(Tatum & Berry 1979; Hasegawa 등 1986; Horie 등 1986). 그러나 한라봉은 주로 주스 제조에만 활용되고, 껍질과 같은 부산물은 대부분 폐기되는 실정이다. 이러한 가공 농산부산물은 환경 문제를 야기할 수 있으므로, 농산부산물에 새로운 부가가치를 부여하는 것은 환경적 부담을 경감할 뿐만 아니라 자원 활용의 효율성을 높이는 데 기여할 수 있다(Jimenez-Lopez 등 2020). 이전 연구에서는 오렌지 껍질 추출물이 항암 효과를 가지며, 암 발생 위험을 줄일 수 있다는 결과가 보고된 바 있으며(Pal 등 2012), 특히 감귤류 껍질에 많이 함유된 polymethoxyflavones가 인간 폐암 세포의 성장을 억제하고 oncogenic protein을 downregulation하며, 세포 사멸(apoptosis)을 유도하는 효과가 입증된 바 있다(Xiao 등 2009). 그러나 한라봉 껍질의 기능성에 대한 연구는 거의 미미한 실정이다.

최근 천연물 유래 다당류는 식품 및 의약품 산업에서 매우 흥미로운 첨가물로 주목받고 있으며, 이는 넓은 치료적 특성과 함께 낮은 독성, 적은 부작용, 독특한 생물학적, 화학적, 물리적 특성 때문에 면역 조절, 항염증 및 항종양 효과가 생화학 및 의학 분야에서 큰 관심을 받고 있다(Schepetkin & Quinn 2006; Wang 등 2010).

따라서 본 연구에서는 농산부산물로 폐기되는 한라봉 껍질의 미가공 부산물에서 열수 추출을 이용하여 기능성 다당 성분을 분리하고, 이를 대식세포의 활성화를 통한 면역 증강 효과와 NK 세포를 통한 항암 및 항전이 효과를 확인하고자 하였다. 이로써 환경 문제를 해결함과 동시에 농산부산물의 부가가치 창출과 더불어 기능성 소재로서의 활용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 한라봉 과피로부터 다당 추출

본 연구를 진행하기 위해 사용된 한라봉 과피는 2021년에 수확되어 완전건조하였고, 다당 추출을 위해 50~200 mesh의 크기로 분쇄하여 보관하였다. 한라봉 과피로부터 다당을 분리하기 위해 건조된 한라봉 과피 200 g에 20배의 증류수를

가하고, 3시간 열수추출하였다. 이후 거즈를 이용하여 불용성물질을 제거하고 원심분리(4,500×g, 15분, 4℃)하여 상등액을 얻었다. 이후 4배의 에탄올을 첨가하여 12시간 교반한 후 원심분리(4,500×g, 15분, 4℃)를 이용하여 침전물만 회수하였다. 침전물은 다시 소량의 물에 용해하여 투석(Cut-off 12,400, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 4℃에서 3일간 행하였으며, 농축 및 동결건조를 거쳐 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP를 얻었다.

2. 일반 분석

시료의 중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid(Dubois 등 1956)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl(Blumenkarnitz & Asboe-Hansen 1973)으로, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하여 Bradford법(Bradford MM 1976) 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다.

3. 구성당 분석

구성당 분석은 다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid (TFA)로 121℃에 1.5시간 가수분해하여 각각 alditol acetate 유도체(Jones & Albersheim 1972)로 전환시킨 후, gas chromatography (GC)로 분석하였다. GC의 분석은 SP-2380 capillary column (0.2 μm film, 0.25 mm×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC ACME-6100(Young-Lin Co. Ltd., Anyang, Korea)을 이용하였으며, 표준온도조건 60℃(1 min), 60℃→220℃(30℃/min), 220℃(12 min), 220℃→250℃(8℃/min), 250℃(15 min)에서 분석을 실시하였다. 구성당 mole%는 peak의 면적비, flame ionization detector(FID)에 대한 반응계수 및 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

4. 실험동물

생후 5~6주령의 BALB/c를 새론바이오(Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 3일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. Mouse는 사육조에 5~10마리씩 넣어 온도 23±3℃, 습도 55~70%에 사육하였으며, 물과 사료는 자유 급식 형태로 유지하였다. 실험은 경기대학교 동물실험윤리위원회(2022-04)의 규정에 따라 실시하였다.

5. 대식세포 및 Colon26-M3.1 암세포에 대한 독성 측정

대식세포에 대한 독성을 확인하기 위하여 6주령 BALB/c 마우스를 thioglycollate (TG) 처리한 3일 후에 복강에서 대식세포(peritoneal macrophages)를 채취하였다. 수집된 세포(2.5×10⁵/well)는 DMEM 배지에 현탁시켜 96-well plate에 100 μL씩 분주하고, 여러 농도의 HPWP를 각 well에 100 μL씩 첨

가하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 3일간 배양하였다.

암세포에 대한 독성을 평가하기 위해 Colon 26-M3.1 세포주(1×10⁵/well)를 각 well에 현탁시킨 후, 5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 배양한 후, 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 세척하여 비부착 세포를 제거한 뒤, 여러 농도로 조종된 HPWP 시료를 200 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 3일간 배양하였다.

대식세포 및 Colon 26-M3.1 종양세포의 세포독성 효과는 cell counting kit(CCK)-8(Ez-cytox, Dogen, Seoul, Korea)를 5배 희석하여 사용하여 30~60분간 반응시키고, 각 well의 흡광도는 450 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 측정하였다.

6. Cytokine 생산능 측정

이전에 보고된 방법(Shin 등 2016)에 따라 TG로 처리된 마우스 복강에서 대식세포를 수집하였고, 수집된 세포(1×10⁵ cells/well)는 DMEM 배지에 현탁시킨 후 96-well plate에 분주한 후, 2시간 동안 배양하였다. PBS로 세척하여 비부착 세포를 제거하였으며, 부착된 대식세포에 다양한 농도의 HPWP를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양되었다. 배양 상등액 내 다양한 사이토카인(IL-6 및 IL-12) 측정은 제조사의 지침에 따라 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(BD Biosciences)를 사용하여 측정하였다.

7. NK cell 측정

각 그룹당 5마리의 BALB/c 마우스에 HPWP를 정맥주사(*i.v.*)하였고, 주사 후 3일째에 비장세포(splenocytes)를 채취하였다(Shin 등 2012). 수집된 비장세포(effector cell, E)와 NK cell 감수성으로 알려진 종양세포Yac-1(target cell, T)(1×10⁵ cells/mL)을 U자형 96-well plate에 100:1, 50:1, 25:1의 세포 비율을 갖도록 조정하였으며, 6시간 동안 배양을 진행하였다. 배양 후 원심분리하여 상등액을 lactate dehydrogenase(LDH) 용액과 혼합한 뒤, 각 well의 흡광도를 490 nm에서 CytoTox 96 kit(Promega, Madison, WI, USA)로 측정하였다. NK 세포의 세포독성 비율은 다음 공식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{세포독성(\%)} = \frac{[(\text{실험군 OD 값} - \text{대조군 OD 값}) / (\text{무처리군 OD 값} - \text{대조군 OD 값})] \times 100}$$

8. 항전이 효과 측정

시료의 종양전이 억제 효과를 확인하기 위해 BALB/c 마우스에 Colon 26-M3.1 carcinoma 암세포(3×10⁴ cells/mouse)를 정맥 주사(*i.v.*)하여 종양전이 모델로 유도하였다(Son 등

2021). HPWP 시료는 종양 세포 접종 2일 전에 마우스에 10, 100, 1,000 µg/mouse 농도로 1회 정맥 주사하였다. 종양 접종 후 14일째에 마우스를 희생시키고, 종양 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution(Sigma)에 고정시킨 후 종양의 균집수를 현미경을 이용하여 계산하였다. 한편, 시료에 의한 종양 전이 억제 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교하여 %로 산출하였다. 또한, 실험기간 동안 마우스의 일반 증상 및 사망 유무와 체중을 확인하였다.

9. NK cell의 기능이 억제된 마우스에서의 항전이 효과 측정

항전이 효과는 주로 NK cell에 의해 나타나는 것으로 알려져 있어 폐에 대한 높은 전이성을 가진 종양세포주인 Colon 26-M3.1 carcinoma 세포주를 이용한 실험동물 종양전이 모델에 NK cell만을 특이적으로 저해하는 rabbit anti-asialo GM1 antibody(Wako Pure Chemicals industries, Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 정맥 투여 후 실험을 진행하였다(Son 등 2021).

마우스는 종양 세포 접종 1일 및 3일 전에 HPWP 시료 100 µg/mouse 농도로 정맥투여하고, 종양 세포 접종 2일 전에는 제조사의 지침에 따라 50배 희석된 rabbit anti-asialo GM1 antibody(500 µL/마우스, 복강 내 주사, Wako)를 정맥투여하였다. 이후 Colon 26-M3.1 carcinoma 암세포(2×10⁴ cells/mouse)를 정맥 주사(*i.v.*)하였고, 종양 접종 후 14일째에 마우스를 희생시키고, 종양세포의 표적기관인 폐를 Bouin's solution(Sigma)에 고정시킨 후 종양의 균집수를 현미경을 이용하여 계수하였다.

10. 통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS 통계프로그램을 이용하여 일원배치분산분석(one way ANOVA test) 후 Duncan's multiple range test로 대조군과 각 시험군 간의 유의성을 *p*<0.05 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 한라봉 과피 유래 다당의 일반성분

한라봉 과피로부터 열수추출하여 얻은 조다당 HPWP의 일반분석 및 구성당 분석을 진행한 결과(Table 1), 45.6%의 중성당과 54.4%의 산성당으로 구성되어 있었으며, 단백질은 검출되지 않았다. 그 중 galacturonic acid (53.7%), arabinose (26.0%), 및 galactose (10.4%)로 주로 구성되어 있는 것으로 보아 일반적인 시트러스류에 다량 함유되어 있다고 알려진 pectin을 구성하고 있는 단당 성분이 검출된 것으로 확인되었다.

Table 1. Chemical properties and sugar components of hot water extract crude polysaccharide (HPWP) isolated from hallabong peel

	HPWP
Chemical properties (%)	
Neutral sugar	45.6±0.1
Uronic acid	54.4±0.1
Protein	-
Sugar component (Mole %)	
Rhamnose	2.1±0.0
Fucose	0.4±0.0
Arabinose	26.0±0.1
Xylose	1.4±0.1
Mannose	1.8±0.2
Galactose	10.4±0.2
Glucose	3.5±0.1
Galacturonic acid	53.7±0.3
Glucuronic acid	0.7±0.0

2. 한라봉 과피 유래 다당의 정상세포 및 암세포 독성

Mouse 복강으로부터 분리한 일반 세포인 macrophage와 종양세포주 Colon 26-M3.1 carcinoma를 이용하여 한라봉 과피 유래 다당 HPWP에 대한 직접적인 독성 여부를 측정하였다. 1×10^4 cells/mL로 조정된 종양 세포주에 HPWP 1.6~1,000 µg/mL까지 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존 여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 결과에서 제시한 바와 같이 정상세포의 경우 뚜렷한 독성은 나타

나지 않았으며, 오히려 모든 농도에서 약간의 증식능을 보여 주었다. 한편, 각 실험 농도에서 Colon 26-M3.1 carcinoma 세포에 대한 세포 독성은 관찰되지 않았지만, 200 µg/mL 이상의 농도에서 세포가 다소 감소하는 경향을 나타내었으나, 이는 직접적인 세포독성에 의한 것이라는 결론을 내리기에는 어려운 수준이었다. 이상의 결과로 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP는 정상세포 및 암세포에 대한 직접적인 세포 독성은 없음을 확인하였다.

3. 한라봉 과피 유래 다당의 cytokine 생산능

대식세포는 외부에서 침입한 세균이나 이물질을 탐식하고 제거하는 과정에서 다양한 cytokine을 분비해 항원제시 및 비특이적 면역작용에 관여하며 면역체계를 조절하고, 종양 세포에 대한 직접적인 살해능을 나타내고 있는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 toll like receptor(TLR)에 반응하는 LPS와 같은 물질은 macrophage를 활성화함으로써 T cell 및 B cell의 증식, 대식세포의 탐식작용 활성화, 면역반응의 조절에 관여하는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF-α와 같은 다양한 cytokine들을 분비하는 것으로 보고되고 있다(Wang 등 2003). 특히 IL-6는 macrophage가 분비하는 대표적인 multifunctional cytokine으로 염증반응에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 T cell과 B cell를 분화하여 종양세포를 사멸시키는 데 관련이 있다고 알려져 있다(Tanigawa 등 2000; Cheng 등 2008). 또한 IL-12는 NK cell의 활성화 및 TH1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로 종양세포와 같은 감염세포에 대한 반응성을 높이는 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다(Munder 등 1998; Shida 등 2006).

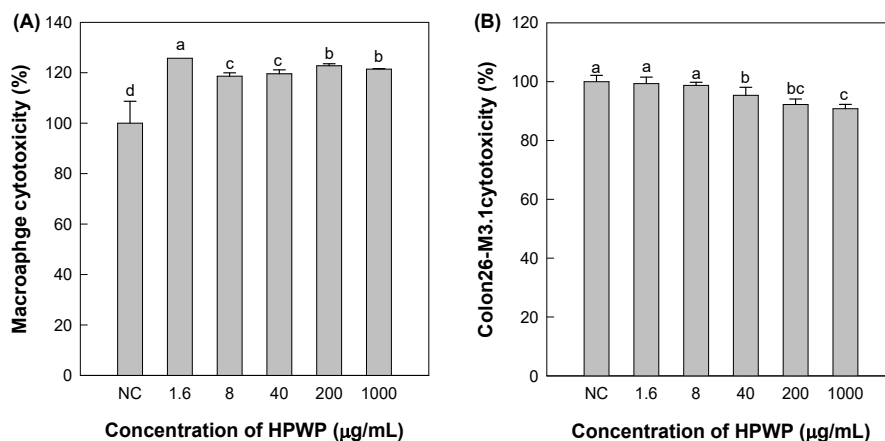


Fig. 1. Cytotoxic effects of crude polysaccharide (HPWP) isolated from hallabong peel on peritoneal macrophages of BALB/c mice (A) and Colon 26-M3.1 carcinoma cells (B). Means with different superscript letters (^{a-d}) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

따라서 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP의 직접 자극에 의한 mouse 복강 유래 macrophage가 분비하는 multifunctional cytokine IL-6 및 면역증강 및 NK cell 활성화에 중요한 역할을 하는 cytokine IL-12를 측정된 결과(Fig. 2), 두 cytokine 모두 농도의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 NC 대비 약 3배 높은 IL-6 및 IL-12 생산능을 보여주었다(Fig. 2). 본 결과를 통해 HPWP는 면역 증진에 효과적인 것으로 사료되었다.

4. 한라봉 과피 유래 다당의 NK cell 활성화

NK cell은 체내 림프구의 약 5~10%를 차지하는 것으로 알려져 있으며 바이러스, 외부 항원과 같은 비자기(non-self) 세포뿐만 아니라 감염세포, 암세포 및 노후세포를 파괴시키는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Funk 등 2003). 또한 NK cell은 세포막에 존재하는 MHC 1형 분자(major histocompatibility complex class I molecule)의 발현이 비정상 세포를 비자기(non-self) 세포로 인식하여 공격하기 때문에 MHC 1형 분자가 제대로 발현되지 않은 상태로 존재하는 종양세포나 감염세포를 제거할 수 있게 된다. 또한, NK cell은 비정상세포일 경우 perforin을 분비해 비정상세포의 세포막에 구멍을 뚫어(Farag 등 2002) granzyme이라는 단백질 분해 효소를 주입해 세포의 내부를 사멸시키는 것으로 알려져 있다. 또한 interferon(IFN)- γ 등의 cytokine을 분비해 macrophage 및 cytotoxic T lymphocyte(CTL)과 같은 적응면역계 또한 활성화시키는 것으로 밝혀져 있다(Kägi 등 1994; Smyth 등 2005).

따라서 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP의 NK cell의 활성능을 측정하기 위해 HPWP를 10, 100 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 농도로 실험 3일 전, 1일 전 총 두 번에 걸쳐 BALB/c(6 weeks, ♀) mouse에 정맥 투여한 후 무균적으로 비

장을 적출하여 NK cell을 분리하였으며 이를 effector cell로 하였다. 그 후 혈액암 세포주인 YAC-1을 target cell로 하여 target cell에 대한 effector cell의 비율(E/T ratio)을 100:1, 50:1, 25:1로 조정 후 6시간 동안 co-culture하여 effector cell의 종양세포 살해능에 의해 target cell로부터 유리되어 나오는 lactate dehydrogenase(LDH)를 측정하였다. 실험 결과 농도의존적인 종양 세포 살해능을 확인할 수 있었으며 NC 대비 10, 100 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 모든 농도에서 농도의존적으로 높은 종양 세포 살해능을 나타냄으로써 HPWP 시료가 우수한 항암효과를 가졌다는 것을 확인하였다(Fig. 3). 특히 100:1 ratio에서 HPWP 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 농도는 약 2.5배에 달하는 가장 높은 종양세포 살해능을 보여주었다.

5. 한라봉 과피 유래 다당의 항전이 효과

앞선 실험에서 NK cell을 활성화시켜 항암 효과에 크게 기여할 것이라 사료된 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP를 이용하여 *in vivo* 상에서 항전이 효과를 평가하고자 하였다. HPWP를 10, 100 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 농도로 종양세포 접종 2일 전에 BALB/c(6 weeks, ♀) mouse에 정맥 투여한 후 Colon26-M3.1 carcinoma 세포를 정맥투여하고 14일 후 표적 장기인 폐(lung)를 적출하여 종양을 계수하여 항전이 효과를 측정하였다. 항전이 실험이 진행되는 실험기간 동안 대조군을 포함하여 모든 시료 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았으며, 이상증상도 관찰되지 않았다. 또한 마우스의 체중 변화를 알아보기 위해 종양세포 접종 1일과 14일에 체중을 측정된 결과(Fig. 4), 대조군과 시료 투여군 모두 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었다.

PBS를 투여한 대조군인 NC의 종양전이 억제효과를 0%로 하여 HPWP의 항전이 활성을 측정된 결과 10, 100 및 1,000

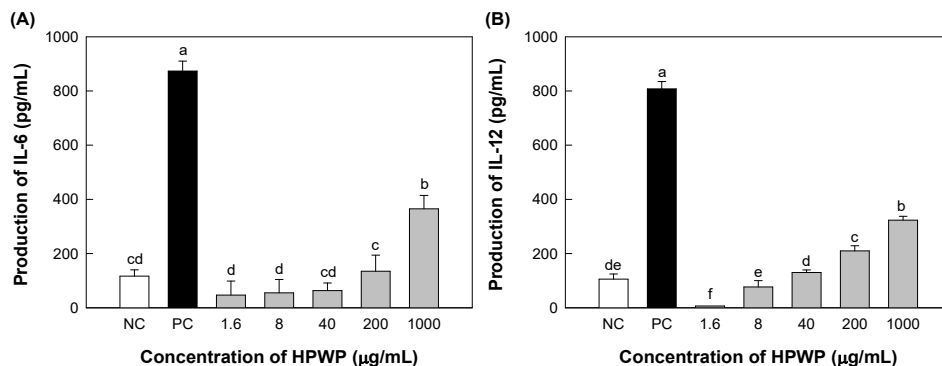


Fig. 2. Effect of HPWP isolated from hallabong peel on cytokine production by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophage (2.5×10^5 cells/well) were treated with various concentrations of HPWP in 96-well plate for 24 hr. The concentrations of cytokine in the medium were determined by ELISA kits. NC (medium) and PC (LPS, 1 $\mu\text{g/mL}$) were used as negative and positive control.

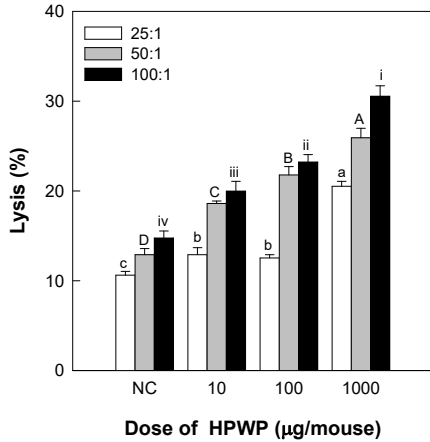


Fig. 3. Effects of *i.v.* administration of HPWP on cytolytic activity of NK cells. NK cell were cultured with Yac-1 target in presence or absence of HPWP for 6 hr at 37°C CO₂ incubator. Means with different superscript letters (A-D,a-c,i-iv) indicate significant differences at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test.

µg/mouse의 농도에서 각각 49.4%, 61.3% 및 74.3%의 높은 항전이 효과를 나타냈다(Fig. 5).

이러한 HPWP의 항전이 효과는 앞선 NK cell 활성화를 보였던 시료의 농도와 일치(Fig. 3)하는 결과로서 HPWP의 정맥 투여에 의한 중앙 억제 효과는 NK cell의 활성화로부터 기인한 것임을 예상할 수 있었다. 또한 복강 유래 macrophage cytokine 분비능을 확인한 실험에서 확인했듯 우수한 IL-12 생성능을 확인한 바 있어(Fig. 2B) IL-12에 의한 NK cell의 활성화가 항전이 효과로 이어진 것이라 사료되었다.

6. NK cell이 억제된 마우스에서 한라봉 과피 유래 다당류의 항전이 효과

앞선 정맥 투여에 따른 항전이 효과가 일부 NK cell에 기인한 것이라 확인되었으나, 이 항전이 효과가 NK cell 단독 활성화에 의한 효과인지, macrophage 또는 세포독성 T 림프구(CTL)와 같은 다른 면역세포의 동시 활성화에 의한 효과인지를 확인하고자 rabbit anti-asialo GM1 antibody(Kasai 등 1981)를 사용해 NK cell의 기능을 억제하고 항전이 효과를 확인하고자 하였다. HPWP를 100 µg/mouse의 농도로 실험 3일 전, 1일 전 총 두 번에 걸쳐 정맥 투여하고 2일 전 rabbit anti-asialo GM1 antibody를 정맥 투여하였다. 그 후 Colon26-M3.1 carcinoma 세포를 정맥투여하고 14일 후 적출한 폐의 종양을 계수하여 항전이 효과를 측정하였다. 그 결과(Fig. 6), PBS만을 정맥 주사한 NC군에서는 암세포가 약 67개 정도 전이된 반면 HPWP를 정맥주사한 실험군에서는 약 25개의 암세포가

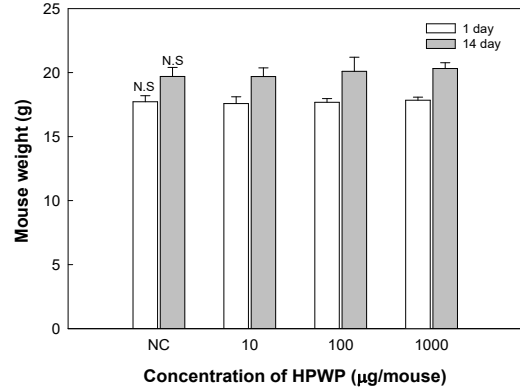


Fig. 4. Effect of HPWP on body weight of BALB/c mouse on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation. N.S. means not significantly.

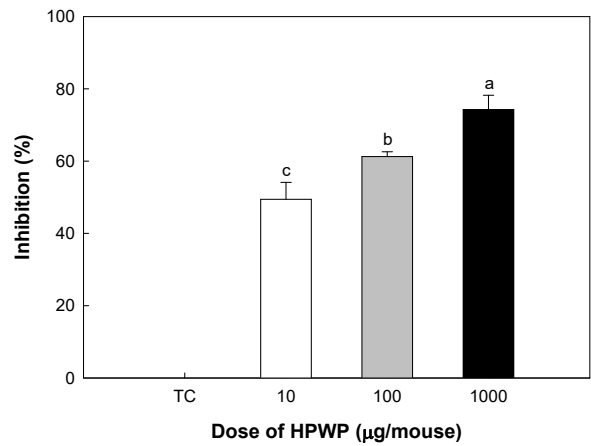


Fig. 5. Inhibitory effect of *i.v.* administration of HPWP on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation of Colon26-M3.1 carcinoma cells *in vivo*. BALB/c mice were *i.v.* administrated with the indicated doses of HPWP and then inoculated *i.v.* with 3 × 10⁴ Colon26-M3.1 carcinoma cells. Mice were killed at 14 days after tumor inoculation for evaluation of tumors. Means with different superscript letters (a-c) indicate significant differences at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test.

전이된 것이 확인되어 HPWP의 항전이 효과를 확인하였다. 또한 PBS와 rabbit anti-asialo GM1 antibody를 함께 투여한 실험군에서는 NK cell의 기능이 억제되어 암세포가 폭발적으로 증가해 300개 이상의 암세포가 전이되었으며, rabbit anti-asialo GM1 antibody와 RWP를 함께 투여한 실험군에서도 300개 이상의 암세포가 전이된 것으로 보아 HPWP의 항전이 효과는 오직 NK cell 활성화에 의한 억제 효과로 최종 확인되었다.

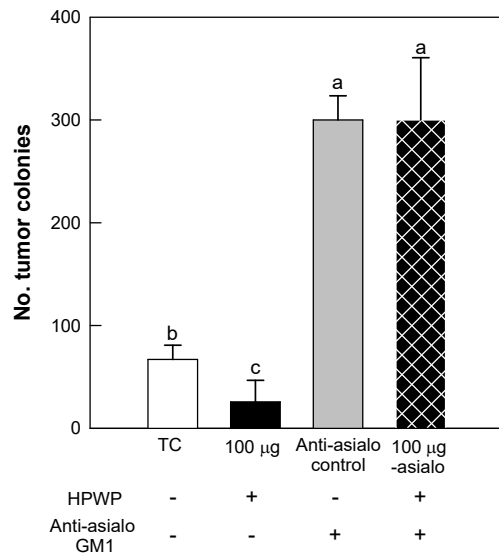
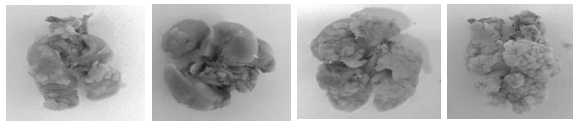


Fig. 6. Effect of NK cell depletion on the anti-metastatic activities of HPWP isolated from hallabong peel at dose of 100 µg/mouse. To deplete NK cells *in vivo*, rabbit anti-asialo GM1 serum was injected into mice at 2 day before inoculation of Colon26-M3.1 carcinoma cells. Mice were administered *i.v.* with sample (100 µg/mouse) 3 day and 1 day before tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation. Means with different superscript letters (^{a-c}) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

요약 및 결론

본 연구에서는 한라봉 과피로부터 분리한 다당의 대식세포에 대한 면역활성 및 항전이 효과를 관찰하기 위하여 세포 독성, cytokine 생산능, NK cell 활성 및 항전이 효과 실험을 진행하였다. 건조 분말된 한라봉 과피로부터 열수추출 및 에탄올 침전을 통해 조다당 HPWP를 얻었다. 마우스 복강으로부터 분리한 macrophage를 이용하여 면역활성 및 항전이 효과를 확인하고자, 정상세포 및 암세포 Colon26-M3.1 carcinoma에 대한 세포 독성을 측정된 결과, 정상세포 및 암세포 모두 직접적인 독성을 나타내지 않았다. 면역활성 및 항암활성과 관련된 cytokine IL-6 및 IL-12 생산능을 ELISA를 통해 측정된 결과 농도 의존적으로 우수한 cytokine 생산능을 보여주었다. 또한, NK cell의 종양 세포 살해능을 측정된 결과 농도 의존적으로 높은 종양세포 살해능이 관찰되었으며, 이를 바탕으로

로 Colon 26-M3.1 carcinoma에 대한 HPWP 시료의 항전이 효과를 확인하였다. 그 결과 10, 100 및 1,000 µg/mouse의 농도에서 각각 49.4%, 61.3% 및 74.3%의 높은 항전이 효과를 확인하였으며 이는 오직 NK cell 활성에 의한 종양전이 억제 효과로 확인되었다. 이 결과로부터 본 연구진은 기능성 식품 소재 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

References

- Azuma I, Seya T. 2001. Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int Immunopharmacol* 1:1249-1259
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Cheng A, Wan F, Wang J, Jin Z, Xu X. 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *Int Immunopharmacol* 8:43-50
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. 2002. Natural killer cell receptors: New biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100:1935-1947
- Fidler IJ. 1987. Review: Biologic heterogeneity of cancer metastases. *Breast Cancer Res Treat* 9:17-26
- Funk J, Bach U, Failing K, Burkhardt E. 2003. Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 110 dogs with tumours. *Res Vet Sci* 74:129-135
- Hasegawa S, Bennett RD, Herman Z. 1986. A limonoid from young calamondin seedlings. *Phytochemistry* 25:1984-1985
- Horie T, Tsukayama M, Yamada T, Miura I, Nakayama M. 1986. Three flavone glycosides from *Citrus sudachi*. *Phytochemistry* 25:2621-2624
- Jakóbiak M, Lasek W, Gołab J. 2003. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* 90:103-122
- Jimenez-Lopez C, Fraga-Corral M, Carpena M, García-Oliveira P, Echave J, Pereira AG, Lourenço-Lopes C, Prieto MA, Simal-Gandara J. 2020. Agriculture waste valorisation as a

- source of antioxidant phenolic compounds within a circular and sustainable bioeconomy. *Food Funct* 11:4853-4877
- Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol* 49:926-936
- Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 368: 31-37
- Kasai M, Yoneda T, Habu S, Maruyama Y, Okumura K, Tokunaga T. 1981. *In vivo* effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature* 291:334-335
- Leyon PV, Kuttan G. 2004. Inhibitory effect of a polysaccharide from *Tinospora cordifolia* on experimental metastasis. *J Ethnopharmacol* 90:233-237
- Li S, Pan MH, Lo CY, Tan D, Wang Y, Shahidi F, Ho CT. 2009. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *J Funct Foods* 1:2-12
- Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. 1998. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin(IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 187:2103-2108
- Pal D, Banerjee S, Ghosh AK. 2012. Dietary-induced cancer prevention: An expanding research arena of emerging diet related to healthcare system. *J Adv Pharm Technol Res* 3:16-24
- Schepetkin IA, Quinn MT. 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 6:317-333
- Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada SI, Nanno M. 2006. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin Vaccine Immunol* 13:997-1003
- Shin KO, Ha SY, Shin SB, Kim JY, Yang M. 2021. Manufacturing and quality characteristics analysis of coffee powder with added hallabong extract. *Korean J Food Nutr* 34:593-603
- Shin MS, Lee H, Hong HD, Shin KS. 2016. Characterization of immunostimulatory pectic polysaccharide isolated from leaves of *Diospyros kaki* Thumb. (Persimmon). *J Funct Foods* 26:319-329
- Shin YA, Park HR, Hong HD, Shin KS. 2012. Immunostimulating activities of polysaccharide fractions isolated from persimmon leaves. *Korean J Food Nutr* 25:941-950.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SLH, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42:501-510
- Son SU, Park HY, Suh HJ, Shin KS. 2021. Evaluation of antitumor metastasis via immunostimulating activities of pectic polysaccharides isolated from radish leaves. *J Funct Foods* 85:104639
- Sporn MB. 1996. The war on cancer. *Lancet* 347:1377-1381
- Tanigawa K, Craig RA, Stoolman LM, Chang AE. 2000. Effects of tumor necrosis factor- α on the *in vitro* maturation of tumor-reactive effector T cells. *J Immunother* 23:528-535.
- Tatum JH, Berry RE. 1979. Coumarins and psoralens in grapefruit peel oil. *Phytochemistry* 18:500-502
- Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 2003. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: An *in vitro* cytokine study using mouse macrophages. *Clin Chim Acta* 327:123-128
- Wang J, Zuo G, Li J, Guan T, Li C, Jiang R, Xie B, Lin X, Li F, Wang Y, Chen D. 2010. Induction of tumoricidal activity in mouse peritoneal macrophages by ginseng polysaccharide. *Int J Biol Macromol* 46:389-395
- Weiss L. 1990. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 54:159-211
- Xiao H, Yang CS, Li S, Jin H, Ho CT, Patel T. 2009. Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis. *Mol Nutr Food Res* 53:398-406

Received 18 September, 2024

Revised 14 October, 2024

Accepted 23 October, 2024

한국식품영양학회 소식

• 일반소식

1. 2024년 09월 05일(목): 한국과학기술단체총연합회 2024년도 학술활동지원사업 국내학술지 최종선정
2. 2024년 9월 06일(금): 과총 2024년도 학술활동지원사업(학술지) e-NEST 청구서 제출 완료
3. 2024년 9월 27일(금): 한국식품영양학회 제6차 이사회
4. 2024년 9월 27일(금): 한국식품영양학회 일동후디스 MOU
5. 2024년 9월 30일(월): 회장후보 대상자 통지 및 출마 권유 안내
6. 2024년 10월 4일(금): 추계학술대회 및 포스터 발표 안내
7. 2024년 9월 27일(금): 한국식품영양학회 제7차 이사회
8. 2024년 10월 24일(목): 한국과학학술지편집인협의회 주최 ‘Scopus 등재를 위한 학술지 관리 워크숍 I’ 교육 참석
9. 2024년 10월 30일(수): 2024년 편집이사 인용정보 관련 비대면 회의
10. 2024년 10월 31일(목): 학술지 제37권 제5호에 연구논문 9편 출판

• 학회 가입 및 회비 납부

1. 회원가입

회원가입 신청서를 작성하신 후 우편 또는 이메일로 총무이사에게 제출하시기 바랍니다. 입회원서 제출 및 회비 납부 완료시 정회원으로 승인됩니다. (홈페이지 <http://ksfn.kr/>)

홍보이사 : 최승균, E-mail : ksfan88@hanmail.net, 010-2637-6330

전화 : 053-320-1366, 팩스 053-320-1440

주소 : (우) 41453, 대구광역시 북구 영송로15(태전동) 대구보건대학교 식품영양학과 내

2. 회원 회비납부

신규회원	정회원	평의원	도서관회원	단체회원	학생회원	종신회비
50,000원 (입회비+가입비)	40,000원 (연회비)	50,000원 (연회비)	50,000원 (연회비)	100,000원 (연회비)	20,000원 (연회비)	400,000원 (평생회비)

송금계좌 : 국민은행 759701-04-000460 한국식품영양학회

재무이사 : 강주희, E-mail: jhkang78@gmail.com, 010-3527-5658

• 논문투고

1. 논문투고 방법

한국식품영양학회지 홈페이지(<http://ksfn.kr/>)에 안내되어 있는 논문투고규정에 따라 논문을 작성한 다음, 로그인(신규회원인 경우 회원가입 필수) 후 논문투고를 진행하시기 바랍니다. 학회지 발간 이전에 게재료를 납부하셔야 하며,

주저자와 교신저자 모두 학회 회원으로 가입하셔야 합니다.

2. 논문심사료 및 게재료

논문심사료 : 50,000원

게재료 면당 : 50,000원

송금계좌 : 국민은행, 378801-01-051596, 한국식품영양학회(편집)

편집재무이사 : 백진경, E-mail : jkpaik@eulji.ac.kr, 010-2743-0402

3. 논문접수 담당

편집이사: 이호진, E-mail : foodnutr1@naver.com, 043-820-5338, 010-4907-3711

주소 : (우) 27909, 충청북도 증평군 증평읍 대학로 61 한국교통대학교 식품영양학과

Checklist for Original Article

Title of the manuscript : _____

Please check below items as ✓ mark before submission of the manuscript.

1. General guideline

- Manuscript contained one original manuscript, checklist, statement of copyright transfer, and introduction for authors and was dispatched viz email (Statement of copyright transfer should be dispatched via PDF file)
- Manuscript should be typed in hangul or other word processor with a space of 30 mm from upper, lower, left and right margin, 10.0 pt in font size, and line space of 200%
- Text consisted of cover page, title page, abstract, main text, references, tables and figures in separate pages.
- Main text consisted of INTRODUCTION, Materials AND METHODS, and RESULTS AND DISCUSSION.

2. Cover page

- Title, name of authors, affiliation was described both in English and in Korean.
- Korean and English abbreviated titles were described (Korean : less than 20 letters, English less than 10 words).
- In lower area of cover page, the name, address, email, telephone, fax of the corresponding author or presentation in the scientific meeting were described.

3. Abstract and Keywords

- Word count was equal to or less than 250.
- A total number of word count was described below abstract.
- Keywords were described from MeSH in Medline if possible.

4. Main text

- The other of the subtitle was described according to the Instruction to Authors.
- Reference in the main text were described according to the Instruction to Authors.

5. References

- Every articles in REFERENCES were cited in the main text.
- Abbreviated title of the journals were those from Medline or Korea Med.
- All references were written in English.
- The reference style was followed by the Instruction to Authors.
- PDF file for the journal reference which is not indexed in KoreaMed or PubMed was included.

6. Tables and figures

- The title and legends of table and figures were written in English.
- Photos were in required format.
- The numbers of table and figures were described according to the Instruction to Authors.

Copyright Transfer and Statement of Originality Korean Journal of Food and Nutrition

Title of Manuscript :

Author(s) :

COPYRIGHT TRANSFER

If or when above cited manuscript is accepted for publication, copyright is hereby transferred to the Korean Society of Food and Nutrition. The undersigned confirm that neither the manuscript nor any part of it has been published elsewhere. The following statements are comprehended by the undersigned.

1. The author(s) has right to reuse the article or parts in a collection of their works, in noncommercial textbook, in lecture notes, press releases, and review articles, with the express agreement that full bibliographic references be given to the original copyrighted source.

2. Whenever the Korean Society of Food and Nutrition is asked for permission by others to use or reprint the article except for classroom use, the undersigned author's permission will be required.

3. No proprietary right other than copyright is claimed by the Korean Society of Food and Nutrition.

This agreement must be signed by a corresponding author who has the consent of all authors.

Authorized Name and Title(print)

Signature(s):

Date: 2024. . .

Declaration of Ethical Conduct in Research

I declare that I have abided by the following Code of Research Ethics while writing this paper.

“First, I have strived to be honest in my conduct, to produce valid and reliable research conforming with the guidance of ethical regulations for the Korean Journal of Food and Nutrition, and I affirm that my paper contains honest, fair and reasonable conclusions based on my own careful research under the guidance of ethical regulations for the Korean Journal of Food and Nutrition.

Second, I have not committed any acts that may discredit or damage the credibility of my research. These include, but are not limited to: falsification, distortion of research findings or plagiarism and false authorship.”

Date _____

Paper Title :

(Corresponding) Author :

(Signature)

Institute :

한국식품영양학회 회칙

제 1장 총 칙

제 1조 (명칭) 본회는 한국식품영양학회(The Korean Society of Food and Nutrition; Korean J Food Nutr)라 칭한다.

제 2조 (목적) 본회는 식품 및 영양분야에 관한 이론과 기술을 연구하고, 이의 응용과 보급을 촉진시켜, 국민 식생활의 향상을 도모함을 목적으로 한다.

제 3조 (사무소의 소재지) 본회의 사무소는 회장이 정하는 곳에 두며, 필요에 따라 지부를 둘 수 있다.

제 4조 (사업) 본회는 제 2조의 목적을 달성하기 위하여 다음의 사업을 행한다.

1. 학회지, 정보지 및 도서의 발간
2. 연구발표, 학술강연회 및 학술토론회의 개최
3. 학술정보의 교환
4. 학술활동의 진흥 및 보조
5. 기타 본 회의 목적 달성에 필요한 사항

제 2장 회 원

제 5조 (구성) 본회의 회원은 정회원, 학생회원, 단체회원, 특별회원 및 명예회원으로 구분한다.

제 6조 (자격)

1. 정회원은 식품학, 영양학 또는 이와 관련된 분야에 종사하는 사람으로서 본 회의 취지에 찬동하여 입회원서를 제출하고, 회비를 납부한 사람으로 한다. 다만, 40세 이상의 정회원으로서 회비의 10배를 일시에 납부한 사람은 종신회원이 된다.
2. 학생회원은 식품학 또는 영양학 분야의 교육기관에 재학 중인 사람으로서 입회원서를 제출하고, 회비를 납부한 사람으로 한다.
3. 단체회원은 입회원서를 제출하고, 회비를 납부한 단체로 한다.
4. 특별회원은 본 회의 발전을 위하여 특별찬조를 한 단체 또는 개인으로 한다.
5. 명예회원은 본회의 발전에 현저히 공헌을 하고, 정년퇴임을 한 정회원으로서 회비를 납부하지 아니한다.

제 7조 (권리와 의무)

1. 본회의 회원은 회비를 납부해야 하며, 평의원은 평의원회비를 납부해야 한다.
2. 회원은 선거권, 피선거권, 기타 회칙이 정하는 권리를 갖는다. 단, 학생회원, 단체회원 및 특별회원은 총회에 참석하여 발언할 수 있으나 선거권 및 피선거권은 갖지 아니한다.

제 3장 임 원

제 8조 (구성) 본회는 다음의 임원을 둔다.

1. 회장 1명
2. 차기회장 1명

3. 부회장은 총괄부회장 외 약간명
4. 총무이사 약간명
5. 학술이사 약간명
6. 편집이사 약간명
7. 사업이사 약간명
8. 재무이사 약간명
9. 홍보이사 약간명
10. 감사 2명
11. 지부장 약간명

제 9조 (임기)

1. 임원의 임기는 회계연도를 기준으로 1년으로 하고, 회장은 중임할 수 있다.
2. 보선된 임원의 임기는 전임자의 잔임 기간으로 한다.

제 10조 (선임)

1. 회장은 차기회장이 승계한다.
2. 차기회장은 다음 각호에 따라 약 1년 이전인 하반기(동계)에 고문회에서 후보를 심의하여 평의원회에서 추천하고 정기총회에서 선출한다.
 - ① 차기회장 후보를 추천할 때는 본회의 현 평의원이고, 최근까지 회비를 납부한 회원 중에서 본회의 임원을 역임하여 학회의 전반적인 흐름을 잘 파악하고 있는 사람으로 하여야 한다.
 - ② 회장은 차기회장 후보 대상자에게 후보신청서를 받아서 고문회에 제출하고, 고문회는 후보를 심의하여 평의원회에서 추천하고 총회에서 선출한다.
3. 부회장은 회장이 임명하고, 부회장 중 1명을 총괄부회장으로 하여 총회의 인준을 받아야 한다.
4. 감사는 총회에서 후보를 추천하고, 총회에서 선출한다. 감사 후보를 추천할 때에는 최근까지 회비를 납부하고 본회의 현 평의원이며, 본회의 임원을 역임한 경력이 있는 사람으로 하여야 한다.
5. 이사 및 지부장은 총괄부회장이 추천하고 회장이 임명한다.
6. 회장의 궐위 시에는 총괄부회장이 회장의 직위를 승계한다. 이 경우 임기는 전임자의 잔임 기간으로 한다.

제 11조(직무) 본회의 임원은 다음의 직무를 수행한다.

1. 회장은 본회를 대표하고, 회무를 총괄하며, 총회, 평의원회, 고문회, 임원회 및 이사회의 의장이 된다.
2. 총괄부회장은 회장의 직무를 보좌하고, 회장의 유고시에 그 직무를 대행한다.
3. 부회장은 학술, 편집, 사업, 재무, 홍보 등 회장이 부여하는 분야를 관장하며 회장을 보좌한다.
4. 감사는 본 회의 모든 재무를 감사하고, 그 결과를 총회에 보고한다.
5. 총무이사는 문서수발, 회의준비 등 회무에 관한 제반사항을 시행하고, 각종 행사 및 회의 내용을 기록 보존한다.
6. 학술이사는 학술발표, 강연, 학술토론 등 학술활동에 관한 업무를 담당한다.
7. 편집이사는 학회지의 편집 및 발간에 관한 업무를 담당한다.
8. 사업이사는 본 회의 발전을 위한 수익사업을 담당한다.
9. 재무이사는 회비, 참가비, 협찬금 등의 수령과 각종 경비의 지출을 담당하고, 그 내용을 기록 보존한다.
10. 홍보이사는 회원수 증대 및 학술대회 참가자수 증대를 위한 홍보업무와 정보화 관련 업무를 담당한다.
11. 지부장은 지역을 대표하고, 지역활동을 주재하며, 본회와 지역간의 연락을 원활하게 한다.

제 12조 (고문)

1. 본회의 발전을 위한 조언과 회칙에서 부여한 임무를 하게 하도록 고문 약간명을 둔다.

2. 고문은 본 학회의 명예회장을 역임한 사람으로 한다.

제 13조 (명예회장)

1. 본회의 발전을 위한 조인과 후원을 하도록 명예회장 약간명을 둔다.
2. 명예회장은 본 학회의 회장을 역임하고 퇴임 때까지로 한다.

제 4장 회 의

제 14조 (회의) 본회의 회의는 총회, 평의원회, 고문회, 임원회, 이사회, 편집위원회 및 윤리위원회로 한다.

제 15조 (총회)

1. 총회는 정회원으로 구성하며, 정기총회와 임시총회로 나눈다.
2. 정기총회는 연 2회 회장이 소집하고, 임시총회는 임원회에서 필요하다고 인정할 때에 회장이 소집한다.
3. 회장은 총회 개최일 7일 이전에 회원들에게 그 소집을 통지하여야 한다.
4. 총회는 출석의원 과반수 찬성으로 의결한다. 가부동수일 경우에는 회장이 결정한다.
5. 총회에서는 다음의 사항을 심의 또는 의결한다.
 - ① 임원선출 및 인준
 - ② 예산 및 결산의 승인
 - ③ 회칙 개정
 - ④ 사업계획의 승인
 - ⑤ 회비의 결정
 - ⑥ 기타 중요한 사항

제 16조 (평의원회)

1. 평의원회는 평의원으로 구성한다.
2. 평의원은 정회원 중 다음의 자격을 갖춘 사람으로 이사회의 추천으로 회장이 위촉한다. 단, 이사회에서 평의원 후보를 추천할 때에는 최근 2년간 학회활동 실적을 참조하고 다음과 같은 사항에 의거하여 추천한다.
 - ① 본 회의 임원을 역임한 회원
 - ② 연구단체 또는 직능단체의 대표성 회원
 - ③ 정회원으로서 장기간 활동한 회원
3. 평의원회는 회장이 필요시 소집하며, 평의원회의 개최일 7일 이전에 그 소집을 통보하여야 한다.
4. 평의원회는 출석의원 과반수 찬성으로 의결한다.
5. 평의원회는 다음의 사항을 심의 또는 의결한다.
 - ① 예산안의 심의
 - ② 사업계획의 심의
 - ③ (삭제) <2016.6.16.>
 - ④ 회장 후보의 추천
 - ⑤ 기타 총회에서 위임받은 사항
6. 부득이한 사유로 평의원회 개최가 어려운 때에는 서신 및 전자우편으로 대체할 수 있다. 이 경우 전체 평의원의 과반수가 응답으로 성립하고, 응답자의 과반수 찬성으로 의결한다.
7. 평의원은 다음과 같은 사항에 의거하여 해임 할 수 있다.
 - ① 회원 탈퇴자
 - ② 학회 설립목적에 위배되는 행위를 한 자에 대하여 이사회의 의결에 의한다.

- ③ 3년 연속 평의원 회비를 납부하지 아니한 자는 평의원 자격이 상실된다.

제 17조 (고문회)

1. 고문회는 회장, 명예회장 및 고문으로 구성하고, 회장이 소집한다.
2. 고문회는 과반수 출석으로 성립하며, 출석회원 과반수 찬성으로 의결한다.
3. 고문회는 다음 사항을 자문 또는 의결한다.
 - ① 학회의 발전을 위한 자문
 - ② 총회 또는 평의원회에서 위임받은 사항
 - ③ 회장후보의 심의

제 18조 (임원회)

1. 임원회는 회장, 차기회장, 부회장, 이사 및 지부장으로 구성하며, 회장이 소집한다.
2. 임원회는 과반수 출석으로 성립하며, 출석 회원 과반수 찬성으로 의결한다.
3. 임원회는 다음의 사항을 심의 또는 의결한다.
 - ① 사업계획에 관한 사항
 - ② 예산 및 결산에 관한 사항
 - ③ 총회에 부의할 안건
 - ④ 시행세칙 및 제 규정의 심의 및 의결
 - ⑤ 임시총회의 소집 여부
 - ⑥ 회칙 개정안 발의
 - ⑦ 각종 회의에서 위임받은 사항
 - ⑧ 윤리규정 위반에 따른 징계 건의에 대한 최종심의 및 의결<신설 2016.6.16.>

제 19조 (이사회)

1. 이사회는 회장, 총괄부회장 및 이사로 구성하며, 회장이 소집한다.
2. 이사회는 과반수 출석으로 성립하며, 출석회원 과반수 찬성으로 의결한다.
3. 이사회는 다음 사항을 심의 또는 집행한다.
 - ① 각종 회의에 제출할 안건 및 보고서의 작성
 - ② 본 회의 제반 사업과 행사의 추진을 위한 세부계획의 수립과 이의 집행
 - ③ 회원가입 신청의 승인
 - ④ 평의원 추천
 - ⑤ 시행세칙 및 제 규정의 입안
 - ⑥ 각종 회의에서 위임받은 사항

제 20조 (편집위원회)

1. 편집위원은 정회원 중에서 편집이사가 추천하고 회장이 위촉하며 임기는 1년이며 중임할 수 있다. 단, 편집이사는 당연직 편집위원으로 한다.
2. 편집위원회 위원장 또는 편집이사가 편집위원회를 소집하며, 과반수 출석과 출석회원 과반수 찬성으로 의결한다.
3. 편집위원회에서는 학회지의 편집에 관한 제반사항을 수행한다.
4. 편집위원회 위원장은 편집위원 중에서 회장이 위촉하고 임기는 1년으로 중임할 수 있다.

제 20조의2 (윤리위원회)

1. 윤리위원회는 본 학회에서 정한 윤리규정을 기초로 연구윤리규정의 위반여부 및 혐의의 진실성 검증을 목적으로 한다.

2. 윤리위원회는 7인 내외로 구성하며 위원장은 학회장으로 하고, 부위원장은 편집이사로 하며, 그 외 인원은 편집이사의 추천을 받아 학회장이 위촉한다.
3. 윤리위원회는 연구윤리 부정행위의 혐의에 대한 보고접수 권한 및 진실성 검증을 위한 조사 권한을 갖는다.[본조신설 2016.6.16.]

제 5장 재 정

제 21조 (재원) 본 회의 재원은 각종 회비, 각종 단체의 보조금, 찬조금, 수익 사업금, 논문 게재료 및 기타 수익금으로 한다.

제 22조 (회비) 본 회의 회비는 임원회의 심의를 거쳐, 총회에서 결정한다.

제 23조 (회계년도) 본 회의 회계연도는 1월 1일에서 12월 31일까지로 한다.

제 24조 (예산 및 결산)

1. 예산안은 재무이사가 편성하고, 임원회 및 평의원회의 심의를 거친 후 총회의 승인을 받아야 한다.
2. 총회에서 예산승인을 받기 전까지는 가예산 상태로 운영하되 임원회 및 평의원회 보고한다.
3. 결산안은 회계연도 종료 즉시 재무이사가 작성하여 임원회의 심의를 거친 후 감사를 받고, 총회의 승인을 받아야 한다.

제 6장 시 상

제 25조 (학회상의 종류) 본 학회에서 시상하는 상의 종류는 다음 각항과 같다.

1. 공로상 : 우리 학회 발전에 현저히 공헌한 사람 또는 단체에 수여한다.
2. 학술상 : 식품영양 분야에서 학술적으로 현저한 연구업적을 남긴 자에게 수여한다.
3. 우수포스터상 : 각 학술대회에서 우수한 포스터 발표를 한 사람(공동발표자 포함)에게 수여한다.

제 26조 (수상자 선정 등) 수상자의 선정기준, 선정방법, 시상 등은 별도의 규정으로 정한다.

제 7장 보 칙

제 27조 (시행세칙) 본 회칙의 시행에 필요한 시행세칙과 제 규정은 이사회에서 입안하고, 임원회의의 심의를 거쳐 평의원회에서 의결한다.

제 28조 (회칙개정) 본 회칙을 개정하고자 할 때에는 임원회 또는 회원 20인 이상이 발의하며, 총회에서 개정한다.

제 29조 (저작권의 귀속)

학회의 업무수행과정에서 발생한 저작권에 대한 저작권법상의 권리는 학회에 귀속됨을 원칙으로 한다. 다만, 위탁저작물의 경우에는 저작권을 원저작자에게 환부할 수 있다. [본조신설 2023. 11. 10.]

제 30조 (정관의 변경)

학회가 정관을 변경하고자 할 때에는 정기총회 또는 임시총회에서 재적 대의원 3분의 2이상의 찬성으로 의결한다. [본조신설 2023. 11. 10.]

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 1988년 7월 18일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 1991년 10월 19일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 1996년 7월 10일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 1997년 1월 9일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 1999년 10월 23일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2008년 6월 23일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2008년 12월 18일부터 시행한다. 다만 제8조는 2005년 1월 1일부터 소급 시행하되 종전의 규정에 의한 간사장은 2008년 12월 31일까지 한시적으로 총괄이사로 한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2011년 6월 16일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2012년 6월 22일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2012년 12월 13일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2013년 12월 12일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2015년 8월 20일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2016년 6월 16일부터 시행한다.

부 칙

제 1조 (시행일) 본 회칙은 2023년 11월 10일부터 시행한다.

한국식품영양학회 연구윤리 규정

2008년 6월 23일 제정 2016년 4월 21일 개정
2016년 12월 03일 개정 2023년 11월 10일 개정

제 1장 총 칙

제 1조(연구윤리 정의) 연구윤리란 연구자가 연구를 수행하는데 있어서 정보를 정직하게 전달하고, 자원을 효율적으로 사용하며, 연구결과를 객관적으로 명확하게 보고하여 책임 있는 연구를 수행하는 것을 말한다.

제 2조(윤리규정의 목적) 본 규정은 학문연구의 윤리성과 진실성을 확보하고 부정행위를 공정하게 검증할 수 있는 기준을 제시하여 한국식품영양학회(이하 학회라 약칭함) 회원들에게 연구의 윤리성을 고양하고 부정행위를 방지하는데 그 목적이 있다.

제 3조(윤리규정의 적용대상) 본 규정은 학회에 등록되어 있는 회원을 비롯하여 학회에서 정기적으로 발행하는 모든 간행물(학회지와 학술대회발표집)에 게재되는 내용과 관련 있는 회원 모두에게 적용한다.

제 2장 연구수행의 윤리규정

제 4조(연구의 진실성) 연구를 수행하고 결과를 발표하는 저자와 연구결과를 평가하는 심사자는 모두 학자로서의 양심에 어긋남이 없이 투명하고 진실하게 연구 활동을 수행해야 한다.

제 5조(데이터 관리)

1. 연구자는 연구에 필요한 데이터를 수집하기 이전에 데이터 소유권이 누구에게 있으며 승인이 필요한지 확인하고, 데이터 수집이나 공개에 따르는 자신의 의무와 권리가 무엇인지 명확하게 이해하고 수행하여야 한다.
2. 데이터는 신뢰할 수 있는 타당하고 적절한 방법으로 수집, 기록하고 일정기간 동안 보관하며 필요시 다른 연구자들이 결과 확인이나 다른 목적으로 사용할 수 있도록 이를 공개하여 데이터를 공유할 수 있도록 해야 한다.

제 6조(연구발표) 모든 연구결과는 완전하고 공정한 설명과 함께 정확하게 보고하여야 하며, 연구의 방법, 연구자가 발견한 결과 및 결과에 대한 연구자의 생각이 적절하게 포함되어 있는지 정직하고 투명한 평가가 이루어져야 한다.

제 7조(저작권의 보유) 저작권은 원칙적으로 연구에 중요한 공헌을 한 저자들에게 주어지나 교육 등 공공의 목적으로 사용될 경우에는 학회지 및 학술대회발표집의 발행인인 학회가 그 사용권을 가진다.

제 8조(저자의 순서와 소속표시)

1. 저자란에 실릴 저자의 순서는 공동저자간의 합의 하에 연구에 대한 기여도에 따라 표기하며 저자들은 저자 기재 순서에 대한 원칙을 설명할 수 있어야 한다.
2. 저자의 소속은 연구를 수행할 당시의 소속으로 표기하는 것을 원칙으로 하지만, 이와 다른 관행이 통용되는 분야에서는 그 관행을 따를 수 있다.

제 9조(교신저자 또는 책임저자의 책임) 교신 또는 책임저자는 동료 연구자들을 대표하여 데이터의 정확성, 저자로 기록된 이름, 모든 저자들의 최종 초안 승인, 모든 교신과 질문에 대한 응답 등에 대하여 책임을 지며, 교신저자의 실수나

누락 부분이 자신뿐 아니라 동료 연구자들의 경력에도 큰 영향을 끼친다는 점을 명심하여야 한다. 저자는 출판하는 논문의 연구에 지적인 공헌을 한 자로서 다음 각 호의 자격을 모두 충족하여야 한다.

1. 연구의 구상이나 설계 또는 자료의 수집이나 분석이나 해석을 하는데 있어서 상당한 공헌을 한 자
2. 논문의 초안을 작성하거나 주요내용을 수정한 자
3. 출간될 원고를 최종 승인한 자
4. 연구의 정확성이나 무결성과 관련된 문제를 적절히 조사하고 해결하는 것에 책임이 있음을 동의한 자

제 10조(참고문헌의 인용원칙)

1. 저자는 타인의 연구 내용의 일부를 자신의 연구논문에 원문 그대로 또는 번역하여 인용할 수 있다.
2. 저자는 참고문헌의 출처 표시와 목록 작성의 정확성을 기하여야 한다. 저자명, 학술지의 권·호수, 페이지, 출간 년도 등 인용의 모든 요소를 2차 출처에 의존하지 말고 원 논문에서 직접 확인해야 하며 불가피한 경우에만 재인용을 밝히고 인용해야 한다.

제 3장 연구 부정행위의 윤리규정

제 11조(연구 부정행위의 정의)

1. 연구 부정행위는 연구계획, 연구수행, 연구보고 및 발표, 연구의 심사 및 평가 등에 있어서 발생하는 위조, 변조, 표절, 중복게재 등의 행위를 말한다.
2. “위조”는 존재하지 않는 데이터 또는 연구결과의 기록을 허위로 만들어 보고하고 제출하는 행위를 말한다.
3. “변조”는 연구 자료나 장비 혹은 과정을 조작 하거나 데이터 또는 결과를 변형·삭제함으로써 연구 기록이 정확하게 표현되지 않도록 하는 행위를 말한다.
4. “표절”은 창시자의 공적을 인정하지 않고 저작권법상 보호되는 다른 사람의 아이디어, 연구과정, 연구결과 혹은 표현에 적절한 출처를 명시하지 않고 전체나 일부분을 유용하는 것을 말한다.
5. “중복게재”는 편집인이나 독자에게 이미 출간된 처음의 연구내용을 공지하지 않은 채 완전히 동일하거나 거의 동일한 연구내용을 다른 학술지에 두 번 이상 발표하여 게재하는 것을 말한다.

제 12조(표절의 유형) 표절의 유형은 “아이디어 표절”과 저자를 밝히지 않고 타인이 저술한 텍스트의 일부를 복사하는 “텍스트 표절”, 텍스트의 일부를 조합하거나 단어의 추가, 삽입 또는 동의어로 대체하는 “모자이크 표절” 등이 있다.

제 13조(참고문헌의 왜곡금지)

1. 참고문헌은 논문의 내용과 직접적으로 관련이 있는 문헌만 포함시켜야 한다. 학술지나 논문의 인용지수를 조작할 목적으로 또는 논문의 게재 가능성을 높일 목적으로 관련성에 의문이 있는 문헌을 의도적으로 참고문헌에 포함시켜서는 안 된다.
2. 자신의 데이터나 이론에 유리한 문헌만을 편파적으로 참고문헌에 포함시켜서는 안 되며, 자신의 관점과 모순되는 문헌도 인용해야 할 윤리적 책무가 있다.

제 14조(지양해야 할 관행) 논문의 발표 시, 논문에 기여한 바가 없어 논문 저자로서의 자격이 없는 사람을 저자로 올리는 “명예” 저자 관행, 단순히 숫자를 늘리기 위해 하나의 연구를 여러 갈래로 쪼개어 작은 연구를 여러 개 만드는 관행, 연구를 검토 없이 조급하게 발표하는 관행 등은 지양해야 한다.

제 14조의2(생명윤리) 인간 대상 연구를 시행한 논문을 투고 할 때에는 생명윤리심의위원회의 승인과 연구대상자의 동

의를 받았음을 논문에 명시하고, 동물실험의 경우 연구기관이나 국가 지침을 준수하며 동물실험윤리위원회의 승인을 받았음을 논문에 명시해야 한다. 생명윤리심의위원회 및 동물실험윤리위원회 승인서 사본을 학회 이메일로 제출하여야 하며, 승인의 필요한 연구와 시행일자는 다음과 같다.

-다음-

연구방법	IRB 승인 기재 의무화 시행일자 (시행일자 이후 투고시 의무화)	비고
인체적용시험	2017년 7월 1일	연구자들의 혼란을 최소화하기 위해 유예기간(6개월~1년)을 둠
동물실험	2017년 7월 1일	
설문조사 (survey, 관능평가 포함)	2018년 1월 1일	

제 4장 논문심사의 윤리규정

제 15조(심사자의 책임과 의무)

1. 심사자는 학회의 편집위원회에서 의뢰하는 논문을 성실하게 심사하고 심사결과를 심사규정이 정한 기일 내에 편집위원회에 보고해야 한다.
2. 심사자는 의뢰된 논문이 자신이 심사하기에 불충분하다고 판단되면 즉시 편집위원회에 논문을 반납하여야 한다.
3. 심사자는 논문의 질, 연구의 실험성, 이론성 및 해석에 관해 엄격한 과학적 기준 및 연구 기준을 적용해 객관적으로 평가해야 하고 자신의 판단에 대하여 적절하게 설명하고 뒷받침할 수 있어야 한다.
4. 심사자는 저자의 지적 독립성을 존중하고 저자가 다른 과학자의 연구를 잘못 인용하는 것을 막아야 하며 이해관계의 상충에 잘 대응해야 한다.
5. 심사자는 논문의 기밀을 유지해야 하고 저자의 동의 없이 아직 검토 중인 미간행 논문에 담긴 정보, 주장, 해석 등을 사용하거나 공개해서는 안 된다.

제 16조(심사자의 비윤리적 행위)

심사자는 공정한 심사와 심사 중 기밀 유지를 위하여 다음과 같은 비윤리적 행위를 삼가 해야 한다.

1. 자신이 맡은 심사를 대학원 학생이나 제 3자에게 부탁하는 행위
2. 심사 중인 논문의 내용을 동료와 논의하는 행위
3. 심사 종료 후 심사 내용의 사본을 반납하거나 분쇄하지 않고 보유하는 행위
4. 논문을 심사하는 과정에서 명예손상이나 인신공격에 해당하는 언어를 쓰는 행위
5. 논문을 읽지 않고 심사 또는 평가하는 행위

제 17조(편집위원회의 책임과 의무) 삭제(2016년 4월 21일)

제 5장 연구윤리규정의 시행 및 윤리위원회

제 18조(윤리규정 준수 의무) 회원은 회원가입과 동시에 자신의 연구 행동을 책임지고 연구 부정행위를 심각하게 받아들여야 하며 본 학회의 연구윤리 규정을 준수할 의무를 갖는다.

제 19조(윤리규정 위반의 보고 및 조사) 회원은 다른 회원이 윤리규정을 위반한 사실이 인지될 경우 그 회원으로 하여금 윤리규정을 환기시키고 위반사항이 바로 잡히지 않을 경우에는 윤리위원회에 즉시 보고한다.

제 20조(윤리위원회의 목적과 구성)

1. 윤리위원회는 본 학회에서 정한 윤리규정을 기초로 연구윤리규정의 위반여부 및 혐의의 진실성 검증을 목적으로 한다.
2. 윤리위원회는 7인 내외로 구성하며 위원장은 학회장으로 하고, 부위원장은 편집이사로서 하며, 그 외 인원은 편집위원장의 추천을 받아 학회장이 위촉한다.

제 21조(윤리위원회의 권한)

1. 윤리위원회는 연구윤리 부정행위의 혐의에 대한 보고접수 권한 및 진실성 검증을 위한 조사 권한을 갖는다.
2. 보고된 사안에 대하여 제보자, 피조사자, 증인, 참고인 및 증거자료 등을 통한 폭 넓은 조사를 실시한 후 윤리규정을 위반한 것이 사실로 판정될 경우 학회 정관에 의거하여 제재조치를 할 수 있다.

제 22조(윤리위원회의 판정 및 제재)

1. 위반행위에 대한 검증절차는 예비조사, 본 조사, 판정의 단계로 진행하여야 하며 모든 조사 일정은 6개월 이내에 종료되어야 한다. 단, 이 기간 내에 조사가 이루어지기 어렵다고 판단될 경우 위원장의 승인을 거쳐 조사기간을 연장할 수 있다.
2. 제보자 또는 피조사자가 판정에 불복할 경우 통보를 받은 날로부터 30일 이내에 서면으로 이의를 제기할 수 있으며, 윤리위원회에서 이를 검토하여 필요한 경우 재조사 할 수 있다.

제 23조(제보자 및 조사대상자의 보호)

1. 윤리위원회는 제보자 및 조사대상자가 위반행위의 신고 및 조사를 이유로 불이익이나 부당한 압력 또는 위해 등을 받지 않도록 보호해야 할 의무를 지니며, 이에 대한 대책을 마련해야 한다.
2. 제보자는 위반행위의 신고 이후에 진행되는 조사절차 및 일정 등에 대하여 알려줄 것을 요구할 수 있으며, 윤리위원회는 이에 성실히 응하여야 한다.
3. 연구윤리 규정 위반으로 보고된 회원에게는 조사대상이 된 사안의 개요를 서면 통지하고 정해진 기간내에 소명서를 제출할 기회를 보장하고 본인이 희망하는 경우 본조사 절차 중 1회 이상 윤리위원회의 회의에 출석하여 구술로 해명할 수 있는 기회를 주는 등 충분한 소명 기회를 주어야 한다.
4. 윤리규정 위반에 대하여 학회의 최종적인 결정이 내려질 때까지 윤리위원회는 해당 회원의 명예나 권리가 침해되지 않도록 신원을 외부에 공개해서는 안 된다.

제 24조(징계의 절차 및 내용)

1. 징계 건의가 있을 경우 위원장은 임원회를 소집하여 징계 여부 및 징계내용을 최종적으로 결정한다.
2. 징계가 판정된 회원의 연구결과는 학회지나 학술 대회발표집, 인터넷 홈페이지에서 삭제하고 향후 5년간 논문투고금지, 회원자격 정지 내지 박탈 등의 징계를 하며 이 조치를 대상자의 소속기관에 알리거나 학회지에 공시할 수 있다.

제 25조(윤리규정의 수정)

1. 윤리규정은 수정이 필요한 경우 간사회에서 수정안을 작성하고 임원회에서 심의한 후 평의회에서 의결한다.
2. 기존의 규정을 준수하기로 서약한 회원은 추가적인 서약 없이 새로운 규정을 준수하기로 서약한 것으로 간주한다.

- 부칙 -

제 1조(효력발효) 본 윤리규정은 2008년 6월 23일부터 효력을 발생한다.

제 2조(효력발효) 본 윤리규정은 2016년 4월 21일부터 효력을 발생한다.

제 3조(효력발효) 본 윤리규정은 2016년 12월 3일부터 효력을 발생한다.

제 4조(효력발효) 본 윤리규정은 2023년 11월 10일부터 효력을 발생한다.

Research Ethics Rules of the Korean Society of Food and Nutrition

Amended on 23/06/2008 Amended on 21/04/2016
Amended on 03/12/2016 Amended on 10/11/2023

Chapter 1 General Provisions

Article 1: Definition of Research Ethics

The term “research ethics” means honestly conveying information in the research conduct, using resources efficiently, and performing responsible study by objectively and accurately reporting study results.

Article 2: Purpose of Ethics Regulations

This regulation aims to enhance research ethics to members of the Korean Society of Food Science and Nutrition (hereinafter referred to as “the Society”) and prevent research misconducts by proposing standards to secure ethics and truth in academic research and fairly verify misconducts.

Article 3: Application Objects of Ethics Regulations

These regulations shall apply to all of the registered members as well as any members related to contents presented in all publications (the journal of the Society and symposium publications) regularly issued in the Society

Chapter 2 Ethics Regulations on Research Conduction

Article 4: Truth in Research

An author who conducts a research and presents its results and a dissertation review committee member who evaluates the research results shall carry out research activity transparent and sincere without doing any act against conscience as scholars

Article 5: Data Management

5.1. A researcher shall confirm the ownership of data and authorization to use the data prior to collecting necessary data. In addition, the researcher must carry out the study with clear understanding on the obligation and right imposed upon the collection or disclosure of data.

5.2. Data shall be collected and recorded through appropriated measures in reliable and valid manner and must be retained for a certain period of time for other researchers to verify results and assessable to be used as other purposes by publicly presenting the findings.

Article 6: Presentation of Research Results

All of the research results shall be accurately reported with a thorough and reasonable explanation. An honest and transparent evaluation must be conducted to examine if research methods and researcher’s opinions are adequately presented in the findings or results of the study.

Article 7: Retention of Copyright

In principle, the copyright is given to the authors who made significant contributions in the research. However, the Society, the publisher of the journal and publications of symposiums, has the right of using the copyright in case the findings are used for the purpose of public interest such as education, and others.

Article 8: Order of Authors and Affiliation

8.1. For the space stating the authors, the order of authors shall be determined pursuant to the contribution made on the research upon the mutual consent among corresponding authors. In addition, the authors shall be able to explain the principles of such orders.

8.2. In principle, the affiliation of the author is stated by the name of the institution at the time of the research conduct. However, when other customary practices are applied in other field, the author may state the affiliation in accordance with custom.

Article 9: Responsibility of the Corresponding Author or Senior Author

The author, as one who makes intellectual contributions to the research published in the paper, must satisfy all of the following qualifications.

9.1. Someone who has made a significant contribution to the conception, design, data collection, analysis, or interpretation of the research

9.2. The individual who has drafted the manuscript or made substantial revisions to its main content

9.3. The person who has given final approval to the version of the manuscript to be published

9.4. Someone who agrees to be accountable for investigating and resolving any issues related to the accuracy or integrity of the research

Article 10: Citation Principles of References

10.1 The author may cite the part of other researchers' study in his/her research paper as the original text or the translated version.

10.2 The author shall take all possible measures to ensure the accuracy in stating sources and making the list of references.

Chapter 3 Ethics Regulations on Misconduct**Article 11: Definition of Research Misconduct**

11.1. The research misconduct is defined as the fabrication, falsification, plagiarism, and other unfair activities generated in the process of designing, carrying out, reporting, and evaluating and assessing the research.

11.2. "Fabrication" means reporting the research data or results, etc. that do not actually exist but have been fabricated.

11.3. "Falsification" means manipulating research data or equipment and process or exhibiting research record inaccurately by deliberately changing or deleting research results.

11.4. "Plagiarism" means using the entire or partial research ideas, processes, results, and etc. protected under copyright law of any other person without citing the appropriate sources and acknowledging the contribution of the founder of such findings.

11.5 "Repeated publication" means publishing an identical or almost similar research in other journals two (2) or more times without stating the initial research contents that have been already presented to publishers or readers.

Article 12: Types of Plagiarism

Types of plagiarism is classified as “idea plagiarism”, “text plagiarism”, copying a part from other persons’ text without citing the source for the ideas of other authors, “mosaic plagiarism”, combining a part of a text with a few words added, inserted, or replaced with synonyms, and others.

Article 13: Prohibition of Distortion in References

13.1. Cited references shall only includes directly related references to the contents of research paper. The author shall not deliberately include irrelevant references for the purpose of intentionally increasing citation index of articles or journals and the probability of publication of the manuscript.

13.2. The author shall not biasedly include only references favorable to data or theories of his/her articles. The author has ethical responsibility to cite references contradicting against his/her point of view.

Article 14: Practices to Avoid

The following practices should be avoided including a practice of “honoring” author by listing unqualified authors who have made no contributions in publishing research papers as one the authors, practice of dividing a research into many studies only to increase the number of published articles, and practice of hastily publishing articles without review process.

Article 14-2 : Bioethics

When submitting a paper that involves research on human subjects, it is necessary to specify in the paper that approval has been obtained from the Institutional Review Board (IRB) for bioethics and consent has been obtained from the research subjects. In the case of animal experiments, compliance with institutional or national guidelines for animal research and approval from the Animal Research Ethics Committee must be stated in the paper. Copies of approval documents from the Bioethics Review Board and the Animal Research Ethics Committee should be submitted to the conference via email. The required approval for research and the date of implementation are as follows.

Research type	Date of enforce (After date of enforce, make indication of submission)	Note
human subject	Jul, 1, 2017	Suspend periods(6 month ~ 1 year) for minimize of researchr's confusion
Animal experiment	Jul, 1, 2017	
Question investigation (survey and sensory evaluation)	Jan, 1, 2018	

Chapter 4 Ethics Regulations for Dissertation Review**Article 15: Responsibilities and Obligations of Dissertation Examiner**

15.1. The dissertation examiner shall report the review results to the Publishing Committee within the period stipulated in the review regulations by sincerely examining the submitted dissertations.

15.2. The examiner shall immediately turn in the research paper to the Publishing Committee once the submitted dissertation is determined to be inadequate for the examiner to review.

15.3. The examiner shall objectively evaluate the dissertation by applying strict scientific and research standards

regarding the quality of dissertation, the experimentability of research, and conceptuality and interpretation, and must be able to adequately explain or support the assessment made upon his/her judgement.

15.4. The examiner shall respect the author's intellectual independence, prevent the author from wrongfully citing other scientists' research, and well coordinate contradictions that arise out of the relationship between interested parties.

15.5. The examiner shall abide by the confidentiality of research paper that is still in the process of reviewing and shall not publicize any information, assertion, interpretation or any other matters of the unpublished manuscript without the consent of the author.

Article 16: Unethical Acts of Examiner

For fair evaluation and confidentiality, examiners shall refrain from performing any of the following unethical acts.

16.1. an act of assigning research paper view that is requested to the examiner to post-graduate students or any third party

16.2. an act of discussing the contents of research paper while the viewing of the dissertation is still in progress.

16.3. an act of turning in the copy of research paper or retaining the paper without shredding it despite the review process is completed

16.4. an act of using abusive words categorized as a form of defamation of character and personal attack in the process of dissertation review

16.5. an act of evaluating the dissertation without reading the paper

Article 17: Responsibilities and Obligations of the Publishing Committee : Delete(21 April 2016)

Chapter 5 Implementation of the Research Ethics Regulations and the Ethics Committee

Article 18 Duty of Obedience

The members of the Society shall take responsibilities on their research activities upon the signing up as the member, accept research misconduct seriously and they are obligated to comply with the research ethics regulations of the Society.

Article 19 Report and Investigation of Violations of the Ethics Regulations

In case where a member of the Society recognizes the ethics violation of another member, the member must remind the ethics regulations to the another member and shall immediately notify the Ethics Committee when the violations are not corrected.

Article 20 Purpose and Composition of the Ethics Committee

20.1. The Committee aims to verify the allegation and truth of research ethics violations in accordance with the ethics regulations stipulated in the Society.

20.2. The Committee shall consist of about seven (7) commissioners. The president of the Society shall serve as the chairman of the Committee and the vice chairman shall serve as the chief of editor. The other members of publishing commissioners shall be appointed by the president of the Society upon the recommendation of the head of the Publishing Committee.

Article 21: Rights of the Ethics Committee

21.1. The Ethics Committee is authorized to receive reports on alligation of the research misconduct and investigate for the verification of truth.

21.2. The Committee may impose sanctions as stipulated in the Society regulations, if violations are verified to be true upon the conduction of extensive investigation with informants, examinees, witnesses, other persons to attend, and submit materials relevant to the case.

Article 22: Judgment and Sanctions of the Ethics Committee

22.1. The verification process of violation shall be conducted in accordance with the phases of preliminary examination, main examination, and judgement and the process must be terminated within six (6) months. Provided, That the investigation period may be extended upon the approval of the chairman of the Committee in case the investigation is deemed difficult to be completed within the stipulated period

22.2. In case an informant or an examinee is dissatisfied with the judgement, those persons may raise an objection in writing within thirty (30) days after they are informed of the notification. In such event, the Ethics Committee may reinvestigate, if necessary, upon the reviewing objection.

Article 23: Protection of Informant and Examinee

23.1. The Committee is responsible for the protection of informant and investigated subject in the event that the informant receives disadvantages or unjust pressure due reporting alleged misconduct and its investigation, the Committee shall take all necessary measures to protect the informant.

23.2. The informant has right to request necessary information on investigation process or schedules after reporting alleged misconduct and the Committee shall faithfully comply with it.

23.3. For members reported for violations of research ethics regulations, a written notification outlining the overview of the case should be provided, ensuring the opportunity to submit a written statement within a specified period. Additionally, the member should be given sufficient opportunity to attend at least one meeting of the ethics committee during the investigation process to provide oral explanations if desired.

23.4. Until the final decision of the society regarding the violation of ethical regulations is reached, the ethics committee should refrain from disclosing the identity of the member to the public to ensure that the member's honor and rights are not infringed upon.

Article 24: Procedures and Contents of Disciplinary Sanctions

24.1. In case where any disciplinary sanctions need to be taken, the chairman of the Committee shall convene the meeting and conclusively determine if disciplinary sanctions will be imposed or not and the forms of sanctions.

24.2. Once the sanction is finalized, the member may be suspended or deprived from research paper submission and member's qualification for the next five (5) years and such measures may be informed or publicized to the subject or his/her affiliated institution and journals.

Article 25: Revision of the Ethics Regulations

25.1. In case where revision of the ethics regulations is required, the amendment shall be prepared by the Board of Directors, deliberated to the Board of Executives, and decided by the resolution of the Advisory Council.

25.2. Members who pledged to comply with the previous regulations shall be deemed to agree to comply with the amended regulations without additional pledge.

Addendum**Article 1: Date of Enforcement**

These regulations shall enter into force on June 23rd, 2008.

Article 2: Date of Enforcement

These regulations shall enter into force on april 21rd, 2016.

Article 3: Date of Enforcement

These regulations shall enter into force on december 3rd, 2016.

Article 4: Date of Enforcement

These regulations shall enter into force on November 10rd, 2023

한국식품영양학회지 논문 투고 규정

1988년	7월	5일	제정	1990년	12월	10일	개정
1996년	8월	16일	개정	1998년	12월	18일	개정
2002년	8월	8일	개정	2003년	3월	8일	개정
2004년	3월	26일	개정	2006년	3월	25일	개정
2009년	3월	25일	개정	2010년	8월	14일	개정
2012년	6월	22일	개정	2013년	6월	20일	개정
2013년	9월	28일	개정	2014년	6월	20일	개정
2015년	12월	17일	개정	2016년	6월	16일	개정
				2023년	11월	10일	개정

1. 한국식품영양학회지는 식품·영양에 관한 연구논문, 연구노트, 연구속보 및 총설 등을 게재한다. 단, 총설은 본 학회에서 위촉하거나, 편집위원회의 심의에 의해 정한 경우로 한다.
2. 투고자 중 주 저자와 교신저자는 본회 회원에 한하는 것을 원칙으로 하되, 초청논문은 예외로 한다.
3. 투고논문은 다른 학술지에 발표되지 않은 것이어야 한다.
4. 논문 투고는 학회 홈페이지(<http://ksfn.kr>)의 온라인 논문 투고시스템으로 한다.
5. 원고 투고 관련 문의는 편집이사에게 한다.
E-mail: foodnutr1@naver.com
6. 논문의 심사, 채택여부, 게재순서, 인쇄순서는 논문 심사규정 및 편집규정에 따른다. 논문의 접수일은 논문이 본 학회 온라인 투고시스템에 도착한 날로 한다.
7. 교신저자는 한국식품영양학회 회원이어야 하며, 회원이 아닌 사람의 논문 게재는 편집위원회의 결의에 따른다.

온라인 투고 (Online Submission)를 원칙으로 한다. 투고방법은 논문 제출서 (Submission Form)를 작성한 후, 논문과 연구 윤리 서약서 및 저작권 이전 동의서 (Authors' Agreement of Ethics Policy & Copyright Transfer)를 제출한다. 인간대상연구와 동물실험 논문은 연구를 수행하기전 기관생명윤리위원회 IRB(Institutional Review Board) 승인서와 동물실험윤리위원회 승인서 사본 (승인번호가 기재된 첫 장만)을 연구 윤리 서약서 및 저작권 이전 동의서 뒷장에 첨부한다.

체계적고찰(Systematic review)과 메타분석(Meta analysis)를 제외한 총설과 초청논문은 편집위원회에서 위촉된 경우에 한하여 게재된다.

위촉에 의해 투고된 원고도 일반 투고 논문과 동일한 심사과정을 거쳐 게재된다.

논문의 심사, 채택여부, 게재순서 등은 편집규정과 심사규정에 의거하여 진행한다. 논문은 3단계 심사절차를 거쳐 게재여부를 결정하며, 3단계 심사절차는 아래와 같다.

1단계 : 편집이사가 간단히 논문 검토 후 1차적인 심사 가부를 결정한다.

2단계 : 편집이사가 정한 2인의 심사위원이 세부심사를 한다.

3단계 : 2단계 심사에서 최종판정이 나지 않은 경우, 1인의 심사위원을 추가로 위촉하여 심사를 한다.

- 심사자 비공개를 원칙으로 하고, 세부 심사절차는 본 학회지 심사 규정에 따른다.

8. 논문은 국문 또는 영문으로 한글 또는 MS워드 파일을 사용하여 컴퓨터로 작성하되, 글씨 크기는 10~12 포인트, 줄 간격은 200%로 한다.

9. 원고 제1면에는 국문과 영문으로 논문제목, 저자 및 소속기관을 나타낸다. 제목 상단에 압축한 소제목 (Running title)을 기재한다. 소제목(Running title)은 논문의 내용을 잘 나타낼 수 있도록 짧게 하며 논문 저자가 두 사람 이상인 경우에는 교신저자 성명 앞에 + 표시를 한다. 소속기관이 다른 경우에는 저자 이름 끝에 위첨자로 *, **, ***을 순서에 따라 붙이고, 해당인의 소속기관 앞에도 같은 부호를 붙인다. 교신저자는 1면 하단에 영문으로 성명, 소속기관, 소속기관 주소, 전화번호, fax 번호, e-mail 주소를 기입한다. 국문 저자명은 저자명 사이에 “”를, 영문은 저자명 사이에 “, ”를 넣는다.

논문 저자 중 소속이 2개 이상일 경우, 여러 기관을 명시하는 것이 가능하다.

모든 저자는 ORCID 등록 시 소속과 직위를 등록해야 하며, 이는 추후 저자신분 확인이 필요할 경우 자료로 활용할 수 있다.

10. 원고 제 2면에는 제목을 국문과 영문으로 표기하고 영문으로 된 Abstract를 첨부한다. 초록은 200단어 내외의 줄 바꿈 없는 단일 문단으로 하되 본문과 분리하여도 논문을 이해할 수 있도록 연구목적, 연구방법, 연구결과가 나타나도록 작성하며, 하단에는 5개 이내의 영문주제어(keywords)를 기입한다(keywords는 모두 소문자 영어로 표기).
11. 논문의 형식은 서론, 재료 및 방법(또는 연구 대상 및 방법), 결과 및 고찰, 요약 및 결론, 이해상충(Conflict of interest), 감사의 글, References의 순서로 함을 표준으로 하며, 쪽 구분 없이 계속 연결하여 작성한다.
12. 연구노트는 어떤 한정된 부분의 발견이나 새로운 실험 방법과 좋은 내용을 정리한 논문으로, 논문형식을 기준으로 작성하되 2,500단어 이내, Table과 Figure 합이 3개 이하를 원칙으로 한다.
13. 모든 표 및 그림의 제목과 설명은 영문으로 한다. 제목은 Table 1, Fig. 1 등의 순서로 표기하며 본문을 참조하지 않아도 내용을 알 수 있을 정도로 간결, 명확하게 기재한다. Table의 제목은 표의 상단에, Fig.의 제목은 그림의 하단에 기재한다. 본문에 인용할 때는 Table 1, Fig. 1 등으로 표시한다. Table이 페이지를 넘어가는 경우에는 제목 끝에 “continued”를 표기해 준다.
14. Table의 밑에 각주(footnote)를 달 때는 Table 내용 중 설명하려는 단어 혹은 문장 아래 아라비아 숫자 1), 2), 3)으로 나타내며 부호들은 사용하지 않는다. *, ** 표시는 통계분석의 유의확률이 $p < 0.05$ 나 $p < 0.01$ 을 나타낼 때만 사용한다. 다중범위 검정에서는 a, b, c, d 등을 사용하고 하단에 그 내용을 표시한다.
15. 모든 표와 그림은 본문 중에 작성하거나, 한 장에 하나씩 작성하여 본문 뒤에 순서대로 첨부한 후 본문 중에 그 위치를 표시하여야 한다. 그림은 사진 또는 컴퓨터로 깨끗이 작성하여 정판원고로 직접 사용될 수 있도록 한다.
16. 본문 중에 인용되는 References는 저자명과 연도별로 인용하며, 영문으로 표기함을 원칙으로 한다. 인용문헌의 기재 예는 다음과 같다.
 - 1) 인용되는 문헌은 해당부위에 영문 성(family name)으로 된 저자명과 연도를 괄호하여 표기한다. **저자가 1인** 일 때는 **저자의 성과 이름 약자를 모두 표시**하고 **저자가 2인** 일 때는 **두 저자의 성만을 표시**하고, **3인 이상일** 때는 **제 1저자 성을 표기**하고 ‘등’을 쓴다. 동일저자의 같은 연도 발표논문인 경우에는 연도 뒤에 a, b, c로 표기한다.

예: 문장 처음에 오는 경우

Kim HJ(2005)는 ...
 Kim & Lee(2007)는 ...
 Kim 등(2008)은 ...
 Park(2007a)은 ...

문장 끝에 오는 경우

(Kim HJ 2005), (Kim & Lee 2007), (Kim 등 2008).

- 2) 본문 중에 인용문헌이 여럿일 경우에는 연도순으로 표기하고, 연도가 같은 경우에는 저자명의 알파벳 순으로 표기한다.

예: (Lee 등 2007; Kim HJ 2008; Park & Kim 2008)

17. 본 학회 학술지에 게재된 논문을 적극적으로 인용(2편 이상)할 것을 권장한다.
18. 저자의 이해상충(Conflict of interest)여부에 대해 기재해야 한다. [본조신설 2023. 11. 10.]

예: There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest. OOO(Author's name) has been an editor since 2023. However, he was not involved in the review process of this manuscript. Otherwise, there was no conflict of interest.

19. **References의 배열은 저자의 영문성의 알파벳 순으로 한다.** 인용문헌에서 게재 학회지의 약어는 국제 약어 기록 관례에 따른다. References의 기재 예는 다음과 같다.

1) 학술잡지

Kim KW, Ko CJ, Park HJ. 2002. Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. *J Food Sci* 67:218-222

2) 단행본

Brock TD, Smith DW, Madigan MT. 1984. *Biology of Microorganisms*. pp.100-105. Prentice-Hall. Inc. AOAC. 1980. *The Association Official Methods of Analysis*. 13th ed. pp.3508-3515

3) Bulletin, 학위논문

Hur YH, Lee SG, Suh JS. 1987. Studies on the change in components of γ -irradiated soybean during fermentation. *Ann Bull Seoul Health Junior College* 7:7-14
 Ciacco CF. 1983. A study on mineral contents in processed foods. Ph.D. Thesis, North Dakota State Univ. Fargo. North Dakota

4) 특허

Bernard S. 1988. Preproofed, frozen and refrigeration and crusty bread and method of making same. US Patent 4,788,067

5) 학회에서 구두 발표된 원고

Huhtanen CN. 1988. Preparation of cold water dispersible cocoa powder. Abstract 21, 42nd Ann Meeting Inst Food Technol Atlanta

6) 인터넷 규정

Korean National Statistical Office. 2007. The statistics of mortality and the cause. Available from <http://www.kostat.go.kr> [cited 20 January 2014]

- 20. 논문 약호는 Chemical Abstracts에 준한다. 학술용어는 가능한 한 한글로 표기한다.
- 21. 수량은 아라비아 숫자로, 단위는 가능한 국제단위(SI unit)로 표기한다. 단위와 술어의 약자는 본 학회가

- 권장하는 방법을 따르되 기타 부득이한 경우에는 본문에 처음 나올 때 설명하여야 한다.
- 22. 교정은 초교에 한하여 저자가 교정하는 것을 원칙으로 하며, 교정 중 내용을 바꾸거나 추가할 수 없다. 단, 논문편집상 필요하다고 인정되는 사항은 편집이사가 이를 교정할 수 있다. 본 학회지에 게재된 논문의 저작권은 본 학회에 귀속된다.
- 23. 투고자는 소정의 게재료를 납부하여야 한다. 또한 칼라사진으로 인쇄할 경우나 별책을 원할 경우에는 투고자가 실비를 부담한다.
- 24. 한 호에 게재되는 논문은 주저자 1명 당 2편으로 제한하며 해당 월의 20일까지 편집완료 된 30편 이내의 논문을 게재한다.
- 25. 본 규정에 명시되지 않은 사항은 편집위원회에서 결정한다.

단 위	표기방법	단 위	표기방법
micrometer	2 μm	part per million	20 ppm
millimeter	4 mm	molarity	0.1 M
centimeter	6 cm	normality	0.05 N
meter	2 m		0.01 N HCl
milligram	2 mg	temperature	60°C
gram	4 g		180°F
kilogram	6 kg	absolute degree	270K
milliliter	2 mL	mega pascal	25 MPa
liter	4 L	kilocalorie	2,000 kcal
second	2 s	gravity	10,000×g
minute	4 min		
hour	6 h	약 어	
milliliter/minute	2 mL/min	optical density	O.D.
meter/second	4 m/s	dextrose equivalent	D.E.
percent	20%	범 위	
%(weight/volume)	20%(w/v)		1.0~2.0 mg
milligram percent	100 mg%		
pH	pH 7.0	수 식	(a+b)/(c+d)

※ 학회지 투고규정이 2023년 11월 10일자로 일부 변경되었습니다.
36권 6호 이후의 논문 투고 시 참고하시기 바랍니다.

Guidelines for Submitting Manuscripts

Amended on 05/07/1988	Amended on 10/12/1990
Amended on 16/08/1996	Amended on 18/12/1998
Amended on 08/08/2002	Amended on 08/03/2003
Amended on 26/03/2004	Amended on 25/03/2006
Amended on 25/03/2009	Amended on 14/08/2010
Amended on 22/06/2012	Amended on 20/06/2013
Amended on 28/09/2013	Amended on 20/06/2014
Amended on 17/12/2015	Amended on 16/06/2016
	Amended on 10/11/2023

1. The Journal of the Korean Society of Food and Nutrition publishes research papers, research notes, research updates, and review articles related to food and nutrition. However, the publication of review articles is limited to those appointed by the society or those approved by the editorial board.
2. In principle, the first author and corresponding author among paper contributors shall be limited to only members of the Society excluding invited research papers.
3. Submitted manuscripts should not have been published before in any other journals.
4. The author should submit the manuscript electronically via online submission at the Society's website (<http://ksfn.kr>).
5. For information of Manuscript submission please contact the editor.
E-mail: foodnutr1@naver.com
6. Research paper review, selection, publishing order, printing order shall comply with review and publishing regulations. The receipt date of manuscript shall be the arrival date of manuscript by online submission to the Society.
7. The corresponding author must be a member of the Korean Society of Food and Nutrition, and the publication of papers by non-members is subject to the resolution of the editorial board.
Online submission is the primary method. Authors

should complete the Submission Form and submit the paper along with the Research Ethics Pledge and the Authors' Agreement of Ethics Policy & Copyright Transfer. For research involving human subjects and animal experiments, a copy of the approval from the Institutional Review Board (IRB) and the Animal Research Ethics Committee (only the first page with the approval number) should be attached to the back of the Authors' Agreement of Ethics Policy & Copyright Transfer.

The review articles and invited papers, excluding systematic review and meta-analysis, will be published only when commissioned by the editorial board. Manuscripts submitted through commission undergo the same review process as regular submissions.

The evaluation, acceptance, and order of publication of papers follow the editorial regulations and review rules. The paper undergoes a three-stage review process to determine its publication status, as outlined below.

Stage 1: The editorial director reviews the paper briefly and determines the preliminary assessment.

Stage 2: Two reviewers designated by the editorial director conduct a detailed examination.

Stage 3: If the final decision is not reached in the second stage, one additional reviewer is appointed to conduct further evaluation.

- The principle is to keep the reviewers' identities confidential, and the detailed review procedures follow the regulations outlined in the journal's review guidelines.

8. The language in the manuscript should be Korean or English in A4-size paper setting, typed using a computer with font size of 10~12 points and the line spacing should be set at 200%.
9. The author should provide the title in Korean and English, the author's (or authors') name(s), and affiliation on the first page of the manuscript. The running title should be provided at the upper part of the title page. If the number of authors is two or more, †mark should be indicated in front of corresponding author. If affiliations of authors are different, superscriptions of *, **, *** should be put at the end of authors name in order. The same marks should be put in front of respective affiliation. The corresponding authors should provide author's name in English, affiliation, affiliation address, telephone, fax, and e-mail. The authors' names in Korean should have “-” in between the name and the author's names in English should have “;” in between the name.

If an author is affiliated with two or more institutions, it is permissible to specify multiple affiliations.

All authors must register their affiliations and positions when registering with ORCID or a similar identifier. This information can be utilized as documentation for identity verification if needed in the future.
10. The English abstract should be provided in case of Korean manuscript on the second page of the manuscript. The abstract must not exceed more than 200 words in one paragraph and it should provide a general view of the manuscript by including the research objectives, methods, and results. At the bottom, include up to 5 keywords in English (all in lowercase).
11. The paper should follow the standard format with the following sections in order: Introduction, Materials and Methods (or Study Subjects and Methods), Results and Discussion, Summary and Conclusions, Conflict of Interest, Acknowledgments, and References. The text should be continuously connected without page breaks.
12. Research Notes are brief reports of limited scope that contribute new knowledge. The formatting is the same as the Research Articles. Research Notes are suggested not exceeding 2500 words. The tables and figures are limited up to 3 in any combination.
13. Titles and descriptions of tables and figures should be all provided in English. Titles should be provided in order of Table 1, Fig. 1, and etc. and in clear and precise manner so they could be understandable without referring to the text. The title of table should be given at the top of the table and the title of figure should be given at the bottom of the figure. Tables and figures should be stated as Table 1, Fig. 1 and etc. when they are quoted from the text body.
14. Footnotes should be expressed as Arabic numerals of 1), 2), 3) at the bottom of tables, and no sign should be used. Moreover, *, ** marks must be used to present significance probability of $p < 0.05$ or $p < 0.01$ in statistical analysis. In multiple range test, alphabets of a, b, c, d, and etc. should be used and the explanations should be stated at the bottom.
15. All of the tables and figures may be presented in the middle of the text body or on separate sheets of paper to be attached at the end of the manuscript in order. The exact locations of tables and figures should be properly stated in the text. Pictures must be neatly produced by photography or a computer to be directly used as original images.
16. All sources cited in the text must provide author's name alphabetically and the year, and, in principle, all references must be provided in English. The examples of cited references are as follows:
 - 1) Cited references should be presented as surname in English and the year in parentheses at the corresponding part. For the citation of a **single author**, his/ her **initial(s) and surname** should be provided. For the citation of **two authors**, only **surnames**

should be provided. For one work by **more than three authors**, citation should include only **the surname of the first author** followed by “**et al.**” For two or more works by the same author by year of publication, the signs such as a, b and c should be provided followed by the year.

e.g. **Citation in the beginning of a sentence**

Kim HJ (2005) is ...

Kim & Lee (2007) is ...

Kim et al. (2008) is ...

Park (2007a) is ...

Citation in the end of a sentence

(Kim HJ 2005), (Kim & Lee 2007), (Kim et al. 2008).

- 2) For several citations in the text, the cited sources should be presented in chronological order or in alphabetical order of authors, in case of the same year.

e.g. (Lee et al. 2007; Kim HJ 2008; Park & Kim 2008)

17. KSFAN actively recommends to cite articles (2 or more) published in the journal of the Society.
18. The author must disclose any conflicts of interest. [Added to the regulation on November 10, 2023.]
Example: There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.OOO(Author's name) has been an editor since 2023. However, he was not involved in the review process of this manuscript. Otherwise, there was no conflict of interest.
19. **The arrangement of references shall be put in alphabetical order of author's last name.** Abbreviation of journal in cited references shall comply with international standards for abbreviation. The examples of cited references are as follows:

1) Academic Journal

Kim KW, Ko CJ, Park HJ. 2002. Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. *J Food Sci* 67:218-222

2) Edited Books

Brock TD, Smith DW, Madigan MT. 1984. Biology of Microorganisms. pp.100-105. Prentice-Hall. Inc.

AOAC. 1980. The Association Official Methods of Analysis. 13th ed. pp.3508-3515.

3) Bulletin, Dissertations

Hur YH, Lee SG, Suh JS. 1987. Studies on the change in components of γ -irradiated soybean during fermentation. *Ann Bull Seoul Health Junior College* 7:7-14.

Ciaccio CF. 1983. A study on mineral contents in processed foods. Ph.D. Thesis, North Dakota State Univ. Fargo. North Dakota

4) Patents

Bernard S. 1988. Preproofed, frozen and refrigeration and crusty bread and method of making same. US Patent 4,788,067

5) Oral Presentation of Manuscript at Symposia

Huhtanen CN. 1988. Preparation of cold water dispersable cocoa powder. Abstract 21, 42nd *Ann Meeting Inst Food Technol* Atlanta

6) Internet Source

Korean National Statistical Office. 2007. The statistics of mortality and the cause. Available from <http://www.kostat.go.kr> [cited 20 January 2014]

20. Article abbreviations should be presented in accordance with Chemical Abstracts. Academic terms, if possible, should be provided in Korean.
21. The quantity always should be express in Arabic numerals and units should be express, if possible, in accordance to the International System of Units (SI). Units and abbreviations of predicate terms shall abide by recommendation provided by the Society. However, in case where there is any unavoidable reason, such exceptions must be clearly explained in the beginning of the text.
22. In principle, revision is accepted during the

proofreading made by only the authors of the manuscript. No changes or insertions shall be made in the contents during the revision. Provided, That matters, in case of deemed necessary, may be revised by an editor. The copyright of all published articles in the journal of KFN shall devolve on the Society.

23. The submitter must pay the specified publication fees. Additionally, if color photographs are to be printed or if separate attachments are requested, the

submitter bears the associated expenses.

24. The number of papers published in one issue is limited to 2 per lead author, and up to 30 papers that have been editorially completed by the 20th of the month are published in the corresponding month.
25. Any matters not explicitly stated in these regulations shall be determined by the Publishing Committee.

※ The submission regulations for the journal have been partially revised as of **November 10, 2023**. Please refer to the updated guidelines when submitting papers for **Volume 36, Issue 6**, and subsequent issues.

THE KOREAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION

Vol. 37, No. 5 October 2024

pISSN : 1225-4339

eISSN : 2287-4992

Homepage : <http://ksfn.kr>

Full-text : www.eksfan.or.kr

President

Mi-Ok Kim(Daegu-Health College)

Vice Presidents

Hye Sook Ryu(Sangji Univ.)

Jae Pil Roh(Shingu Univ.)

Ok-Sun Kim(Jangan Univ.)

Young-Ho Seo(Wonkwang Health Science Univ.)

Si Yeon Kang(Sanhaedeul)

Jong Hee Kim(Seoil Univ.)

Jong-Sook Kwon(Shingu Univ.)

Seung-Hee Hong(Shinhan Univ.)

Editor-in-Cheif

Youn-Ri Lee(Daejeon Health Institute of Technology)

Editors

Hojin Lee(Korea National University of Transportation)

Jean Kyung Paik(Eulji Univ.)

Soo-Youn Kwon(Shingu Univ.)

Manuscript editor

Seo Lin Yang

Secretary General

Jean Kyung Paik(Eulji Univ.)

Editorial Board

Ki Hyun Sim(Sookmyung Woman's Univ.)

Hoon Kim(Chung-Ang Univ.)

Young Mo Kim(Mokpo Science Univ.)

MI Sook Kim(Dankook Univ.)

Kyu-Ho Han(Obihiro Univ.)

Min Sun Moon(Erom Corporation)

Gi Dae Kim(Kyungnam Univ.)

Hae In Yong(Chungnam National Univ.)

Se Ho Lee(Junganatafla)

Min Jeong Kang(Yeonsung Univ.)

Gyu Sang Han(Honam Univ.)

Mee Young Joe(PaiChai Univ.)

Hyun Jung Kim(Jeju National Univ.)

Aims & Scope

The Korean Journal of Food and Nutrition (Korean J. Food Nutr.) is the official journal published quarterly in February, April, June, August, October and December each year. Contributions written in English and Korean are welcomed in the form of review articles, research papers, and research notes. This journal aims to promote and encourage the advancement of the field of food science with nutrition. Topics covered include:

- impact of nutritional science on food product development
- nutritional implications of food processing
- nutritional quality of novel foods
- food-nutrient interactions
- use of fermentation and biotechnology in food science/nutrition
- nutritional and physiological aspects of bioactive compounds in food
- dietary requirements and nutritive value of food

ISO abbreviation of journal title

The official title of the journal is 'The Korean Journal of Food and Nutrition' and the abbreviated title is 'Korean J. Food Nutr.'

Year of launching (history)

The Korean Journal of Food and Nutrition was launched in 1988.

Availability of the full-text in the web

The URL address of the Journal is 'www.eksfan.or.kr' where full text is available.

Indexed in database

Some, or all, of the articles in this journal are indexed in Ksfan, DOI/crossref, Google scholar, the National Research Foundation of Korea(NRF) and Korea Citation Index (KCI).

Fund support

This journal was supported by the Korean Federation of Science and Technology Societies (KOFST) Grant funded by the Korean Government.

Subscription information

Correspondence concerning business matters should be addressed to Secretary Treasurer Hyun Sun Lee, Department of Food and Nutrition, Bucheon Univ. 25, Sinheung-ro 59beon-gil, Bucheon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea.(Cell: 82-10-8786-3449, E-mail: lksj1234@nate.com) The subscription price of this journal is Korean Won, ₩40,000 (US\$ 30.00 or equivalent) annually. Back issues are available.

Contact information

Manuscripts should be submitted via the online Manuscript Central website (<http://ksfn.kr>) Other correspondences can be sent by an e-mail to foodnutr1@naver.com (Editor, Hojin Lee, Major of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, 61 Daehak-ro, Jeungpyeong-gun, Chungbuk, 27909 Korea, Cell: +82-10-4907-3711) The manuscript and other required documents including a completed Copyright Assignment Form and Checklist for original article should be emailed as attachments to the above e-mail address.

Publication fee

A page charge is effective for all manuscripts on original research. A review is exempt from page charges, provided it is approved in advance by the Editor-in-Chief. The actual charge per printed page will be notified to the author along with the manuscript for galley proofs.

Published by

The Korean Society of Food Science and Nutrition
Department of Food and Nutrition, Daegu Health College, 15 Yeongsong St., Buk-gu, Daegu, 41453 Korea
Tel: +82-53-320-1366, Fax: +82-53-320-1440 E-mail: ksfan88@hanmail.net

Editorial office of the Korean Journal of Food Science and Nutrition

Major of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, 61 Daehak-ro, Jeungpyeong-gun, Chungbuk, 27909 Korea
Tel: +82-43-820-5338, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: hojin@ut.ac.kr

Printed by Guhmok Munhwansa

259-1, Euljiro3-ga, Jung-gu, Seoul, 04549, Korea
Phone: +82-2-2277-3324, Fax: +82-2-2277-3390, E-mail: guhmok@guhmok.com

Editor-in-Chief

Professor, Youn-Ri Lee
Department of Food and Nutrition, Daejeon Health Institute of Technology College, 21 Chungjeong St., Dong-gu, Daejeon, 34504 Korea
Cell: +82-10-4400-7863, E-mail: leeyounri@hit.ac.kr

It is printed on acid-free paper.

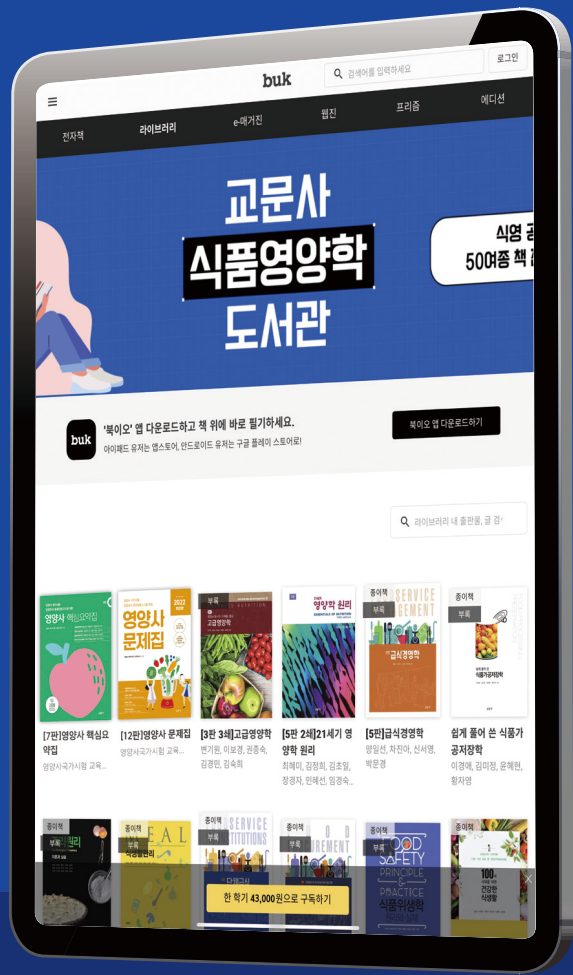
Copyright ©2024 by The Korean Society of Food and Nutrition

This work was supported by the Korean Federation of Science and Technology Societies(KOFST) grant funded by the Korean government.

교문사 식품영양학 E-Book (50여 종) 구독서비스 실시

최신 영양사 문제집, 영양사 요약집 포함

(계속 업데이트 중)



무거운
도서는
이제 그만!

태블릿
하나로
해결!

더 편하고
더 가볍게
공부하세요!

6개월
43,000원
구독료

학습 효율성은 높여주고! 교재는 가볍게!

식품영양학 강의에 필요한 교재를 태블릿과 모바일을 통해 E-Book으로 만날 수 있습니다.

구독서비스란?

일정 금액으로 정해진 기간동안 교문사에서 출간된 식품영양학 모든 교재를 E-Book으로 열람할 수 있는 구독형 라이브러리 서비스

정용섭 부장 010.4216.9636 subi@gyomoon.com
서울 및 수도권, 충남, 충북, 대전, 경남, 부산, 전북

진경민 차장 010.7130.1350 jinkm@gyomoon.com
서울 및 수도권, 대구, 경북, 강원도, 광주, 전남, 제주

한국식품영양관련학과 추천도서 문운당

영양사 시험문제집

개정 제29판 | 2도 인쇄 | 값 43,000원(출간 예정)



문운당 위생사 실기

제11판 | 4도 인쇄 | 값 31,000원(출간 예정)



영양사 요약정리

개정 제25판 | 2도 인쇄 | 값 43,000원(출간 예정)

문운당 위생사 필기

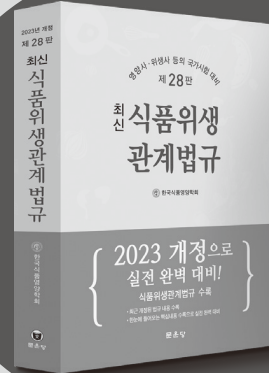
제11판 | 2도 인쇄 | 값 43,000원(출간 예정)

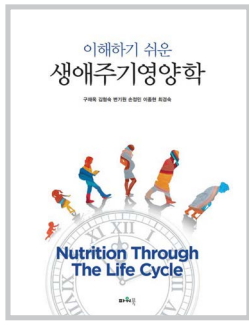
제3판 식품학

2도 인쇄 | 값 24,000원
강의용 보조자료(PPT) 제공

최신 식품위생관계법규

개정 제29판 | 32,000원(출간 예정)





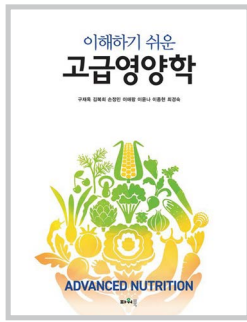
이해하기 쉬운
생애주기영양학

Nutrition Through
The Life Cycle

이해하기 쉬운
생애주기영양학

구재욱 · 김형숙 · 변기원
손정민 · 이종현 · 최경숙

396쪽 | 값 25,000원
978-89-8160-474-5 (93590)



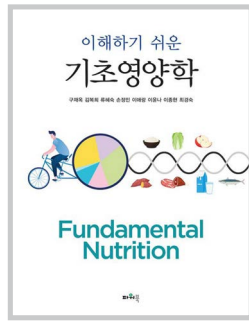
이해하기 쉬운
고급영양학

ADVANCED NUTRITION

이해하기 쉬운
고급영양학

구재욱 · 김복희 · 손정민 · 이애랑
이유나 · 이종현 · 최경숙

456쪽 | 값 26,000원
978-89-8160-477-6 (93590)



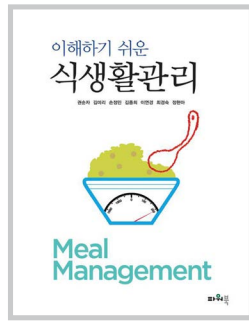
이해하기 쉬운
기초영양학

Fundamental
Nutrition

이해하기 쉬운
기초영양학

구재욱 · 김복희 · 류혜숙 · 손정민
이애랑 · 이유나 · 이종현 · 최경숙

304쪽 | 값 23,000원
978-89-8160-475-2 (93590)



이해하기 쉬운
식생활관리

Meal
Management

이해하기 쉬운
식생활관리

권순자 · 김미리 · 손정민 · 김중희
이연경 · 최경숙 · 정현아

324쪽 | 값 23,000원
978-89-8160-483-7 (93590)



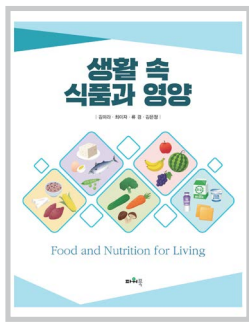
DIET
식사요법 및 실습
THERAPY
PRACTICE

식사요법 및 실습

김미현 · 배운정 · 성미경 · 연지영
이지선 · 임희숙 · 조혜경 · 최미경

500쪽 | 값 27,000원
978-89-8160-480-6 (93590)

개정판



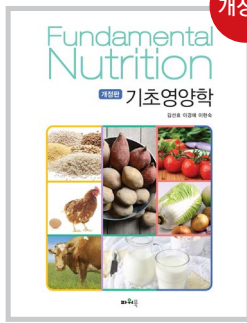
생활 속
식품과 영양

Food and Nutrition for Living

생활 속 식품과 영양

김미라 · 최미자 · 류경 · 김은정

300쪽 | 값 22,000원
978-89-8160-479-0 (93590)



Fundamental
Nutrition
기초영양학

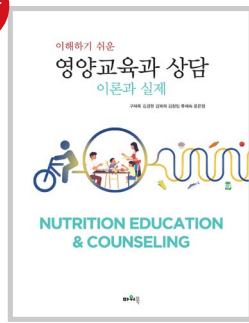
기초영양학

기초영양학

김선호 · 이경애 · 이현숙

376쪽 | 값 24,000원
978-89-8160-471-4 (93590)

개정판



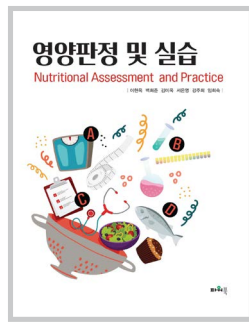
이해하기 쉬운
영양교육과 상담
이론과 실제

NUTRITION EDUCATION
& COUNSELING

이해하기 쉬운 영양교육과 상담
-이론과 실제-

구재욱 · 김경원 · 김복희
김창임 · 류혜숙 · 윤은영

424쪽 | 값 25,000원
978-89-8160-476-9 (93590)



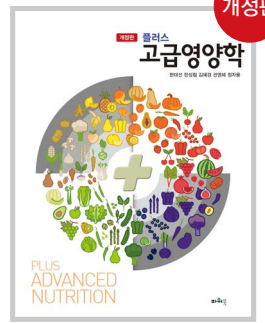
영양판정 및 실습
Nutritional Assessment and Practice

영양판정 및 실습

영양판정 및 실습

이현옥 · 백희준 · 김미옥
서은영 · 강주희 · 임희숙

368쪽 | 값 24,000원
978-89-8160-482-0 (93590)



플러스
고급영양학
PLUS
ADVANCED
NUTRITION

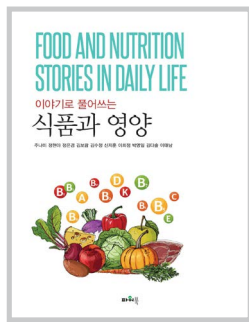
플러스 고급영양학

플러스 고급영양학

현대선 · 한성림 · 김혜경
권영혜 · 정자용

576쪽 | 값 29,000원
978-89-8160-488-2 (93590)

개정판

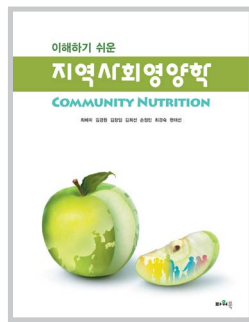


FOOD AND NUTRITION
STORIES IN DAILY LIFE
이야기로 풀어쓰는
식품과 영양

이야기로 풀어쓰는
식품과 영양

주나미 · 정현아 · 정은경 · 김보람
김수정 · 신지훈 · 이희정 · 박영일
김다솔 · 이태남

304쪽 | 값 22,000원
978-89-8160-478-3 (93590)



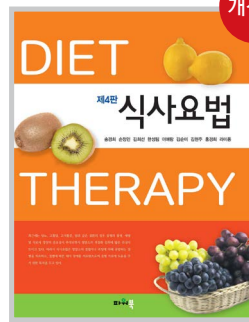
이해하기 쉬운
지역사회영양학
COMMUNITY NUTRITION

이해하기 쉬운
지역사회영양학

이해하기 쉬운
지역사회영양학

최혜미 · 김경원 · 김창임 · 김희선
손정민 · 최경숙 · 현대선

352쪽 | 값 24,000원
978-89-8160-485-1 (93590)



DIET
제4판
식사요법
THERAPY

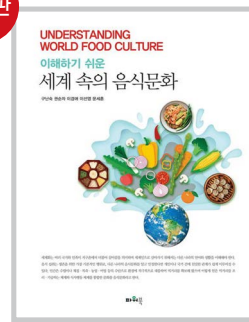
제4판
식사요법

제4판
식사요법

송경희 · 손정민 · 김희선
한성림 · 이애랑 · 김순미
김현주 · 홍경희 · 라미용

448쪽 | 값 26,000원
978-89-8160-484-4 (93590)

개정판



UNDERSTANDING
WORLD FOOD CULTURE
이해하기 쉬운
세계 속의 음식문화

이해하기 쉬운
세계 속의 음식문화

이해하기 쉬운
세계 속의 음식문화

구난숙 · 권순자 · 이경애
이선영 · 문세훈

360쪽 | 값 23,000원
978-89-8160-494-3 (93590)

파워북

www.powerbook.kr

경기도 고양시 일산동구 호수로 358-25 동문타워 2차 529호

TEL 02-730-1412 FAX 031-908-1410