

동충하초 엑스의 고콜레스테롤혈증 대사효소 활성 변동에 관한 효과

김한수 · 김민아 · 장성호^{1)*} · 강진순²⁾ · 이원기³⁾ · 류재용⁴⁾

부산대학교 식품공학과, ¹⁾부산대학교 바이오환경에너지학과, ²⁾한국국제대학교 식품과학부,
³⁾부경대학교 고분자공학과, ⁴⁾한국원자력연구원 공업환경연구부
(2012년 6월 18일 접수; 2012년 7월 3일 수정; 2012년 7월 18일 채택)

Studies of the *Cordyceps militaris* Extract Administration on the Metabolic Enzyme Activities in Hypercholesterolemia

Han-Soo Kim, Min-A Kim, Seong-Ho Jang^{1)*}, Jin-Soon Kang²⁾,
Won-Ki Lee³⁾, Jae-Young Ryu⁴⁾

Department of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

¹⁾Department of Bioenvironmental Energy, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

²⁾School of Food Science, International University of Korea, Gyeongnam 660-759, Korea

³⁾Department of Polymer Engineering, Pukyong National University, Busan 608-739, Korea

⁴⁾Division for Industrial & Environmental Research, Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI),
Jeollabuk-do 580-185, Korea

(Manuscript received 18 June, 2012; revised 3 July, 2012; accepted 18 July, 2012)

Abstract

The objective of this study was to investigate the effects of the feeding *Cordyceps militaris* extract on the improvement of the free fatty acid, lipid peroxide, creatinine and enzyme (creatine phosphokinase; CPK, lactate dehydrogenase; LDH, alkaline phosphatase; ALP, lecithin cholesterol acyltransferase; LCAT) activities in the sera of dietary hypercholesterolemic rats (SD strain, male) fed the experimental diets for 5 weeks. Concentrations of free fatty acid, lipid peroxide and CPK, LDH, ALP activities in sera were fairly reduced in the *Cordyceps militaris* extract administration group (CHE) than in the hypercholesterolemic diet group (CHD). However, no significance was found in the effect of an creatinine concentration among the groups. The LCAT activity in serum was increased in the *Cordyceps militaris* extract administration (CHE) than in the hypercholesterolemic diet group (CHD). From these results, *Cordyceps militaris* extracts were effective on the improvement of the lipid components and metabolic enzyme activities in sera of dietary hypercholesterolemic rats.

Key Words : *Cordyceps militaris*, Hypercholesterolemia, Lipid peroxide, Metabolic enzyme activities

1. 서론

동충하초는 나비목(*Lepidoptera*)의 번데기에 기생하는 자실체와 번데기의 복합체로 자낭균류(*Ascomycetes*)의 맥각균과(*Clavicipitaceae*)에 속하는 *Cordyceps* 속이 대표적인 동충하초로 알려져 있다(Cho 등, 1999;

*Corresponding author : Seong-Ho Jang, Department of Bioenvironmental Energy, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea
Phone: +82-55-350-5435
E-mail: jangsh@pusan.ac.kr

Kwon 등, 2001; Seong 등, 1999). *Cordyceps militaris*의 균사체와 자실체 추출물은 항암 및 항세균, 항바이러스, 항산화, 콜레스테롤, 중성지방 등의 저하, 간기능 개선 효과 등이 보고되어 있다(Han 등, 1999; Kim 등, 2001; Koh와 Choi, 2001; Shim 등, 2000). 한편, 고콜레스테롤혈증은 혈청 중 지질 성분이 증가된 상태로 임상적으로 중요시 되고, 유전적인 요인을 비롯하여 간 질환, 신장 질환, 당뇨병 및 내분비 질환 등으로 인한 2차적 발병 요인, 운동부족, 식생활 습관, 노화와 환경 인자로 인한 요인 등이 있다(Dietschy와 Wilson, 1970; Kim, 2004; Kim과 Chung, 1992; Kim 등, 1993). 이에, 본 연구는 고콜레스테롤혈증 모델에서 동충하초(*Cordyceps militaris*) 엑스를 투여함으로써 체내 지질대사 이상 등에서 오는 대사 효소의 변화에 미치는 영향을 비교 검토하기 위하여 실험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료의 조제

실험에 사용된 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 경남 밀양 소재 한약재 시장에서 구입한 후, 깨끗한 물로 세척하여 말린 다음 진공동결건조(EYELA, FDU-2000, Tokyo, Japan)시켜, Kim (Kim, 2006)의 방법에 따라 실험 재료로 사용하였다. 동충하초 200 g을 플라스크에 취해 증류수 700 mL를 넣은 다음 450 mL가 될 때까지 가열한 후 추출액을 다른 용기에 옮기고 다시 증류수 500 mL를 가하여 350 mL가 될 때까지 가열 처리 하였다. 추출한 후의 잔사에 증류수 400 mL를 넣고 200 mL가 될 때까지 가열한 후, 이들을 합하여 열수추출물을 조제하였다.

2.2. 실험동물의 식이 조성 및 처리

평균 체중이 60 ± 5 g인 Sprague Dawley계 숫 흰쥐를 대한 Biolink에서 구입하여 고품사료로 1주일간 예비 사육하여 사육실 환경에 적응시킨 후 metabolic cage (JD-C-71)에 6마리씩 3군으로 나누어 5주간 실험 사육하였다. 식이 조성 및 실험군은 Table 1과 같이, 기본식이를 섭취시킨 대조군인 정상군(CED군), 콜레스테롤로 유발시킨 고콜레스테롤혈증 질환 모델

대조군(CHD군) 및 고콜레스테롤혈증 질환실험군에 동충하초 엑스를 급여시킨군(CHE군)으로 분군하였다. 식이 조성은 AIN-76TM 설치류 정제 사료 조제법에 따라 제조하였으며, 사육실의 온도($20 \pm 1^\circ\text{C}$), 습도($50 \pm 10\%$)와 명암(07:00~19:00)은 12시간 주기로 최적의 상태를 유지하였다. 실험 사육 최종일에는 7시간 절식시킨 후 에테르 마취하에 심장채혈법으로 혈액을 취하여 4°C 에서 약 1시간 정도 방치한 후, 분당 3,000 cycle로 15분간 원심 분리하여 혈청을 취하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Compositions of the experimental diet and groups (g/kg diet)

Ingredient	Basal diet	Cholesterol diet
Casein	200	200
DL-methionine	3	3
Corn starch	150	150
Sucrose	500	490
Cellulose powder	50	50
Mineral mixture*	35	35
Vitamin mixture**	10	10
Choline bitartrate	2	2
Corn oil	50	-
Lard	-	50
Cholesterol	-	7.5
Sodium cholate	-	2.5

Group CED; control experimental diet, CHD; cholesterolic diet, CHE; cholesterolic diet +*Cordyceps militaris* extract

*AIN-76TM mineral mixture contained (in g/kg mixture) calcium phosphate, dibasic, 500.0 ; sodium chloride, 74.0 ; potassium citrate, monohydrate, 220.0 ; potassium sulfate, 52.0 ; magnesium oxide, 24.0 ; maganous carbonate, 3.5 ; ferric citrate, 6.0 ; zinc carbonate, 1.6 ; cupric carbonate, 0.3 ; potassium iodate, 0.01 ; sodium selenite, 0.01 ; chromium potassium sulfate, 0.55 ; sucrose, 118.03.

**AIN-76TM vitamin mixture contained (in g/kg mixture) thiamine Hcl, 0.6 ; riboflavin, 0.6 ; pyridoxine Hcl, 0.7 ; niacin, 3.0 ; D-calcium pantothenate, 1.6 ; folic acid, 0.2 ; biotin, 0.02 ; vitamin B₁₂, 1.0 ; vitamin A palmitate, 0.8 ; vitamin E acetate, 10.0 ; vitamin D₃, 0.25 ; menadione sodium bisulfite, 0.15 ; sucrose, 981.08.

2.3. 유리지방산 및 과산화지질, creatinine 농도의 측정

5주간 실험 사육한 후 심장채혈법으로 채혈한 혈액에서 혈청을 분리한 후, 유리지방산 농도는 효소법에

의해 조제된 유리지방산 측정용 시약(Eiken, Tokyo, Japan)으로 생화학 분석기(Hitachi 7150, Japan)를 사용하여 분석하였으며, 혈청 중의 과산화지질 농도는 Hb-Methylene blue법에 의해 조제된 시약(デタミナ-LPO, 協和, Japan)을 사용하여 자동분석장치(JCA-BM 12, 日本電子, Japan)에 의하여 측정하였다. 또한 creatinine 농도는 Jaffe reaction 법에 따라 조제된 시약(Eiken, Tokyo, Japan)으로 혈액자동분석기(Hitachi 7150, Japan)에 의하여 정량하였다.

2.4. 효소 활성의 측정

혈청 중의 creatine phosphokinase (CPK) 활성 측정은 효소비색법에 의해 조제된 creatine phosphokinase 측정용 시약(Eiken, Tokyo, Japan)으로 혈액자동분석기(Hitachi 7150, Japan)를 사용하여, lactate dehydrogenase (LDH) 활성은 혈청 LDH 측정용 kit 시약(LDH, Neo D, Eiken, Tokyo, Japan)으로 측정하였고, alkaline phosphokinase (ALP) 활성은 혈청 ALP 측정용 kit 시약(NEW-K-PHOS, Eiken, Tokyo, Japan)을 사용하여 혈청 1 mL당 unit로 표시하였다. lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) 활성은 효소비색법(ribosome 기질법)에 의해 조제된 LCAT 측정용 시약(第一化學藥品, Japan)으로 분광광도계 (CL-770, Japan)에 의해서 측정을 하였다.

2.5. 통계처리

분석 결과의 통계 처리는 실험군 당 평균치와 표준편차를 계산하였고 군간의 차이는 one-way ANOVA (ver. 12.0) 분석 후 α=.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유리 지방산 농도

동충하초(*Cordyceps militaris*) 생리활성물질 추출액의 고콜레스테롤혈증 유발 흰쥐에 대한 혈청 중의 유리 지방산 농도는 Fig. 1에서와 같다. 유리 지방산 농도는 기본식을 급여한 정상군인 대조군(CED군)의 271.5±6.2 μEq/L에 비하여 다른 실험군에서 높게 나타났지만, 고콜레스테롤과 sodium cholate로 유발된 고콜레스테롤혈증 실험군인 CHD군의 307.6±5.9

μEq/L에 비해 고콜레스테롤혈증 군에 동충하초 추출물을 급여한 CHE군에서 291.2±6.1 μEq/L로 혈청 중의 유리 지방산의 농도가 대조군인 CED군의 수준에는 미치지 못하였으나 유의적으로 감소되었다. 고콜레스테롤혈증, 간경변 등 심장순환기계 질환에서 유리 지방산 농도가 증가하고 부정맥, 심근경색 등을 발병하는데 관여하는 인자로 간에서 지방 합성이 증가되어 혈중의 VLDL 형으로 분비된다고 한다(Kim, 2005; Pickart, 1983; Prakash 등, 1972). 또한 유리 지방산 농도의 상승은 간장에서 triglyceride 합성과 lipoprotein의 분비를 촉진시켜 중성지방과 콜레스테롤이 증가되어 고콜레스테롤혈증이나 고유리지방산혈증을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Yi와 Rhee, 1996).

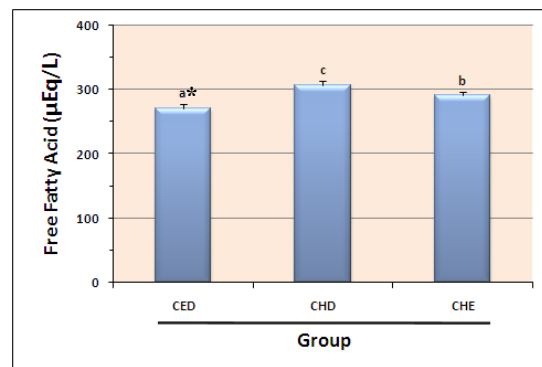


Fig. 1. Free fatty acid concentrations in serum of hypercholesterolemic rats.

*Values are the means of 6 replicates±SD, Means with different letters are significantly different at α=.05 as determined by Duncan's multiple range test.

3.2. 과산화지질 농도

혈청 중의 과산화지질 농도는 Fig. 2와 같이, 대조군인 CED군의 3.46±0.09 nmol/mL보다 여타 실험군에서 높게 나타났으나, CHD군의 5.82±0.11 nmol/mL에 비해 동충하초 추출액 급여(CHE군)로 인하여 4.75±0.13 nmol/mL로 유의적으로 감소되었다. 과산화지질은 생체막 등의 손상과 세포 기능을 저하시켜 혈관벽의 퇴행 변성이나 혈관 손상, 간 질환, Vit. E 결핍, 동맥경화증, 노화 등에서 혈청 과산화지질 농도가 증가된다고 한다(Kim, 2005; Reiter, 1995; Takanami 등, 2000).

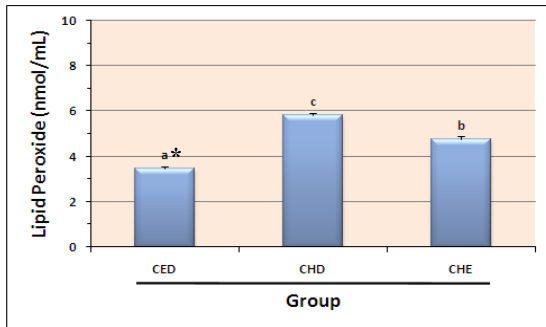


Fig. 2. Concentrations of lipid peroxide in serum of hypercholesterolemic rats.

*Values are the means of 6 replicates \pm SD, Means with different letters are significantly different at $\alpha = .05$ as determined by Duncan's multiple range test.

3.3. Creatinine 농도

동충하초 생리활성물질 추출액의 고콜레스테롤혈증 유발 흰쥐에 대한 혈청 중의 creatinine 농도는 Fig. 3에 나타낸 것으로 대조군(CED군, 0.62 ± 0.03 mg/dL)에 비하여 고콜레스테롤혈증 질환 모델군인 CHD군이 0.65 ± 0.02 mg/dL, 고콜레스테롤혈증 실험군에 동충하초 추출물을 급여한 CHE군이 0.65 ± 0.02 mg/dL로 전 실험군 간에 유의적인 차이는 보이지 않는 것으로 확인되었다. 혈청 creatinine 농도는 신장 기능의 지표로서 신 사구체로 여과되어 세뇨관에서 재흡수되지 않고 체외로 배설되며, 신 혈류량 감소, 신 사구체 여과치의 감소 및 간기능 장애 등에서 증가되는 것으로 보고되어 있다(Kim, 2005; Kim 등, 1984).

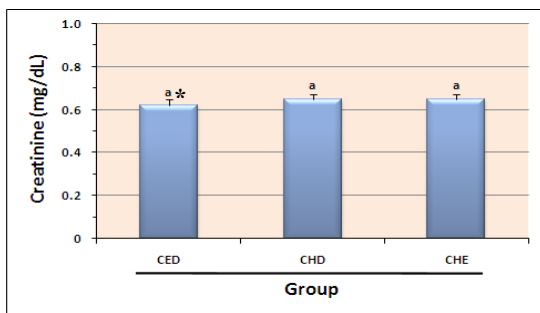


Fig. 3. Creatinine concentrations in serum of hypercholesterolemic rats.

*Values are the means of 6 replicates \pm SD, Means with different letters are significantly different at $\alpha = .05$ as determined by Duncan's multiple range test.

3.4. 효소 활성의 변동

동충하초 추출액이 고콜레스테롤 식이에 의한 혈청 중 creatine phosphokinase (CPK) 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Fig. 4와 같이, creatine phosphokinase 활성은 CHD군(38.4 ± 1.0 IU/L)과 CHE군(35.9 ± 1.3 IU/L)이 대조군인 기본식이만 섭취시킨 CED군(32.1 ± 1.2 IU/L)에 비하여 높게 나타났으나, 동충하초 추출액 급여(CHE군)로 인해 대조군의 수준에는 미치지 못하였지만 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. 혈청 creatine phosphokinase 활성은 세포막 투과성 변성, 세포괴사, 심근경색, 뇌혈관 장애 및 심장질환 등의 질환시 증가하는 것으로 알려져 있다(Do 등, 1991; Kim, 2005; Yi와 Rhee, 1996).

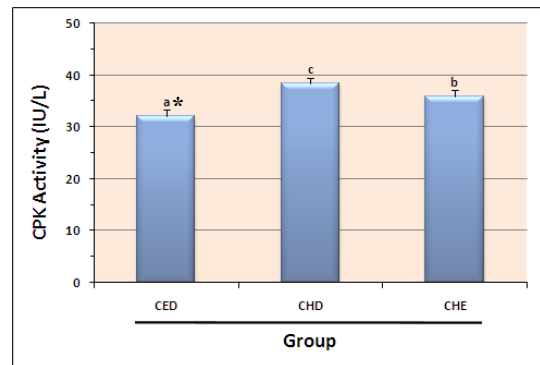


Fig. 4. Creatine Phosphokinase (CPK) activity in serum of hypercholesterolemic rats.

*Values are the means of 6 replicates \pm SD, Means with different letters are significantly different at $\alpha = .05$ as determined by Duncan's multiple range test.

혈청 중 lactate dehydrogenase (LDH) 활성은 Fig. 5와 같다. 대조군인 CED군(807.8 ± 16.2 unit/mL)에 비해 여타 실험군에서 높게 나타났으나, CHD군(1029 ± 21.4 unit/mL)보다는 CHE군(996.5 ± 19.3 unit/mL)이 감소하였으나 유의적인 차이는 발견하지 못하였다. LDH 활성은 고콜레스테롤혈증이나 지방간으로 인한 담즙 분비 장애에 기인된 것으로 사료된다(Kim, 2004; Kim, 1980).

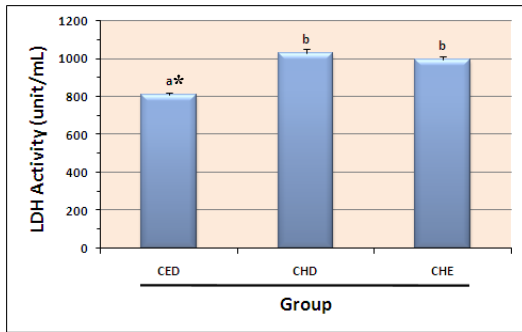


Fig. 5. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in serum of hypercholesterolemic rats.

*Values are the means of 6 replicates±SD, Means with different letters are significantly different at $\alpha = .05$ as determined by Duncan's multiple range test.

혈청 중의 alkaline phosphatase (ALP) 활성 변동은 Fig. 6에 나타내었다. 기본식이를 급여한 정상군인 대조군(CED군)의 22.4±1.3 unit/mL에 비하여 다른 실험군에서 유의하게 높게 나타났으나, 고콜레스테롤혈증군인 CHD군의 31.8±1.5 unit/mL에 비해 동충하초의 추출액을 급여한 CHE군(28.6±2.0 unit/mL)에서 ALP의 활성이 감소되는 것으로 확인 되었지만, 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. ALP 활성의 증가는 담도 폐쇄나 고콜레스테롤혈증, 간질환 등에 의하여 나타나는 것으로 알려져 있다(Kim, 2004; Kim, 1980).

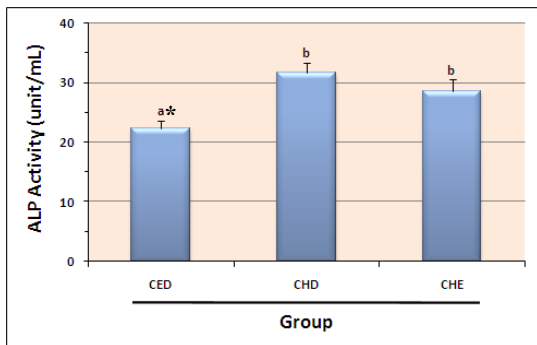


Fig. 6. Alkaline phosphatase (ALP) activity in serum of hypercholesterolemic rats.

*Values are the means of 6 replicates±SD, Means with different letters are significantly different at $\alpha = .05$ as determined by Duncan's multiple range test.

혈청 중 lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT)의 활성은 Fig. 7과 같이, CED군(121.5±2.4 U/L)보다 고콜레스테롤혈증 질환 모델 실험군인 CHD군(106.3±1.9 U/L) 및 CHE군(112.7±2.2 U/L)이 낮게 나타났으나, CHD군에 비해 CHE군이 동충하초 생리활성물질 추출액 급여로 인하여 LCAT 활성이 증가되는 것으로 나타났다. 혈액 중 LCAT 활성의 감소는 LDL-콜레스테롤 및 VLDL-콜레스테롤을 증가시키고, HDL-콜레스테롤 농도를 감소시킨다고 알려져 있다(Kim, 2005; Lee 등, 1993).

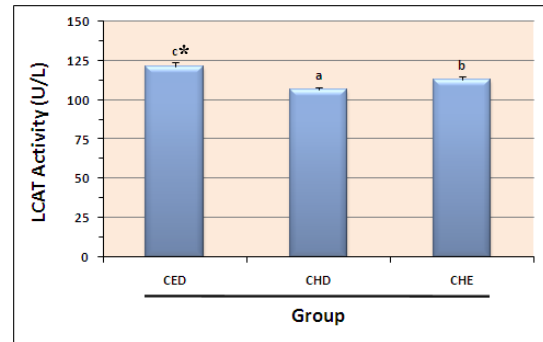


Fig. 7. Activity of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in serum of hypercholesterolemic rats.

*Values are the means of 6 replicates±SD, Means with different letters are significantly different at $\alpha = .05$ as determined by Duncan's multiple range test.

4. 결론

고콜레스테롤혈증 유발 질환 모델에 있어서 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하여 동충하초(*Cordyceps militaris*) 생리활성물질 추출액을 섭취함으로써, 혈청 유리 지방산, 과산화지질, creatinine 농도 및 효소 활성(creatine phosphokinase; CPK, lactate dehydrogenase; LDH, alkaline phosphatase; ALP, lecithin cholesterol acyltransferase; LCAT) 등 지질대사 장애와 혈청 지질 개선 효과를 검토하기 위하여 실험을 수행하였다. 기본식이를 급여한 대조군(CED군)과 고콜레스테롤혈증 질환 모델군인 CHD군 및 고콜레스테롤혈증 유발 식이에 동충하초 추출액을 급여한 CHE군을 5주간 실험사육 하였다. 혈청 중 유리 지방산 및 과산화지질 농도와 CPK, LDH, ALP 활성은 동충하초 추출액을

급여함으로써 저하되는 경향을 보였지만, creatinine 농도의 감소 효과는 유의적인 차이는 확인되지 않았다. 반면, LCAT 활성은 동충하초 추출액 급여에 의해 증가되는 것 등으로 미루어 보아, 동충하초 중의 생리 활성물질이 고콜레스테롤혈증의 대사 효소 활성을 조절하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년) 지원에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Cho, S. Y., Ji, S. D., Lim, S. H., Jung, Y. Y., Nam, S. H., Lee, S. Y., Bang, G. H., Song, B. K., Woo, G. H., Lee, H. S., 1999, Collection of useful entomopathogenic fungi (*Cordyceps*) and mass production of *Cordyceps* using the silkworm, *Bombox mori*, Rural Development Administration, Korea, 3-67.
- Dietschy, J. M., Wilson, J. D., 1970, Regulation of cholesterol metabolism, *New Engl. J. Med.*, 282, 1128-1241.
- Do, S. H., Kwack, K. J., Ko, H., Han, B. M., 1991, A study on the perioperative changes of creatine kinase and lactic dehydrogenase, *J. Kor. Soc. Anesth.*, 24, 56-99.
- Han, D. S., Song, H. N., Kim, Y. E., 1999, State, problem and research direction of *Cordyceps* sp. *Food Sci. & Industry*, 32, 67-82.
- Kim, H. S., 2004, Effects of the *Prunus persica* Batsch var. *davidiana* Max. extract on the lipid compositions and enzyme activities in hyperlipidemic rats, *Korean J. Food & Nutr.*, 17, 328-336.
- Kim, H. S., 2005, Effect of *Prunus persica* Batsch var. *davidiana* Max. extract on the free fatty acid, creatine phosphokinase and LCAT activities in hypercholesterolemic rats, *Korean J. Food & Nutr.*, 18, 265-271.
- Kim, H. S., 2006, Effect of the *Saururus chinensis* Baill hot-water extract intake on the lipid components and metabolic enzyme activities in hyperlipidemic rats, *Kor. J. Exercise Nutr.*, 10, 99-106.
- Kim, H. S., Chung S. Y., 1992, Effects of feeding mixed oils of butter, sardine and safflower on the lipid components in serum and activities of hepatic functional enzyme in rats, *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 21, 608-616.
- Kim, H. S., Kim, S. H., Kim, G. J., Choi, W. J., Chung, S. Y., 1993, Effects of the feeding mixed oils with various level of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid on the lipid components of liver, brain, testis and kidney in dietary hyperlipidemic rats, *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 22, 685-691.
- Kim, J. I., Cho, S. J., Lee, Y. I., Bae, D. S., Lee, S. J., Kim, J. S., 1984, The serum NPN, BUN and creatinine values in the patient with congestive heart failure, *Kor. J. Inter. Med.*, 27, 145-149.
- Kim, K. H., 1980, The clinical application of the results of the test, Ko Moon Sa, Seoul, Korea, 164-176.
- Kim, M. N., Oh, S. W., Lee, D. S., Ham, S. S., 2001, Antioxidative and antimutagenic effect of the ethanol extract from *Cordyceps militaris*, *Korean J. Postharv. Sci. Technol.*, 8, 109-117.
- Koh, J. B., Choi, M. A., 2001, Effect of *Cordyceps militaris* on lipid metabolism in rats fed cholesterol diet, *J. Food Sci. Nutr.*, 34, 265-270.
- Kwon, S. H., Jong, W. H., Han, D. S., Kim, M. K., 2001, Effect of dried powders and water extracts of *paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, antioxidative capacity and immune status in rats, *Korean J. Nutr.*, 34, 271-284.
- Lee, J. J., Han, I. K., Choi, Y. J., Kang, J. S., Chang, Y. S., 1993, Effects of dietary lipid sources and levels on lecithin cholesterol acyltransferase activity and cholesterol metabolism in rats, *Kor. J. Nutr.*, 26, 131-144.
- Pickart, L., 1983, Increased ratio of plasma free fatty acids to albumin during normal aging and in patients with coronary heart disease, *Atherosclerosis*, 46, 21-28.
- Prakash, R., Parmley, W. W., Horvat, M., 1972, Serum cortisol, plasma free fatty acids and urinary catecholamines as indicators if complications in acute myocardial infarction, *Circulation*, 45, 736-746.
- Reiter, R. J., 1995, The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage, *Neurochem. Inter.*, 27, 453-460.

- Seong, J. M., Kim, S. H., Lee, H. J., 1999, Classification and identification of entomopathogenic fungi species, Rural Development Administration, Korea, 215-234.
- Shim, J. Y., Lee, Y. S., Lim, S. S., Shin, K. H., Hyun, J. E., Kim, S. Y., Lee, E. B., 2000, Pharmacological activities of *Paecilomyces japonica*, A new type *Cordyceps* sp. *Kor. J. Pharmacogn.*, 31, 163-168.
- Takanami, Y., Iwane, H., Kawai, T., Shimonitsu, T., 2000, Vitamin E supplementation and endurance exercise, *Sports Med.*, 29, 73-83.
- Yi, K. N., Rhee, C. S., 1996, Clinical pathology File, Euihak Munwhasa Co., Seoul, Korea, 128-131.
- Yi, K. N., Rhee, C. S., 1996, Clinical pathology file, Euihak Munwhasa Co., Seoul, Korea, 245-250.