

어젠다코드	2 - 6 - 3		구분	세부완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	H03	작목구분코드	FC-04-0401
과제종류	공동연구		세부사업(약어)	경제협력권산업육성	
과제명	자색옥수수 추출물을 이용한 간기능성 건강기능식품 개발				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	박상재		대표	(주)메디언스	
연구기간	2016.10. ~ 2019.09.		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 자색옥수수포엽 추출물의 생산공정 개발			(주)메디언스	박상재	'16~'19
2) 자색옥수수 추출물의 간보호 효능 검증			농식품연구소	김희연	'16~'19
색인용어	자색옥수수, 간보호효과, 건강기능식품				

## ABSTRACT

Seakso 1, a maize hybrid, was developed in 2008 by Gangwon Agricultural Research and Extension Services in Korea and registered in 2011. It is single-cross hybrid, semi-flint, deep-purple variety of corn, variety of are yellow, while the husks and cobs are purple. Due to the sensitivity of Seakso 1 to excess moisture after seeding, water supply should be carefully managed, and it should be harvested at a suitable time to obtain the highest anthocyanin content. The objective of this study was to investigate worth of extracts husk and cob of Seakso 1(EHCS) for functional foods. We aimed to investigate proximate composition, fatty acid, amino acid, antioxidant active substance contents, antioxidant activity, inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. Proximate composition of EHCS have represented 6.90% moisture, 7.31% crude ash, 0.52% crude fat, 7.07% crude protein. In 17 kinds of amino acids were analyzed in EHCS, glutamic acid was the highest 736.08 mg/100g. The fatty acids detected in EHCS were palmitic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid. The proportion of unsaturated fatty acids was 83.33%. We determined the contents of antioxidant active substance by total polyphenol and total flavonoid. The total polyphenol and total flavonoid contents were 99.87mg/g and 25.02 mg/g, respectively. The antioxidative activity of EHCS determined using DPPH and ABTS assay. In the antioxidative activity determination DPPH and ABTS radical scavenging activities were 95.62% (1,000 $\mu$ g/mL) and 92.00% (10,000 $\mu$ g/mL), respectively. And the inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase (10mg/mL) were 95.86%, 76.92%, respectively. These results suggest that EHCS could be potentially used as a resource of bioactive materials for health functional foods. In this study, we aimed to investigate the

lipid metabolic enzyme activity and inhibitory effect on the adipocyte differentiation, in 3T3-L1 cells of the identified Saekso 1 corn husk and cob extracts (EHCS). We investigated the pancreatic lipase inhibitory effect and anti-adipogenic effect of EHCS. The lipid accumulation and adipocyte differentiation were measured by the procedure of Oil Red O staining, Real-time PCR and the Western blot analysis. The pancreatic lipase inhibitory activity of EHCS was measured at higher levels than those of the positive control (orlistat) at 100, 500, and 1,000 $\mu$ g/mL. In particular, EHCS was noted as being significantly inhibited and including a measured adipocyte differentiation and lipid accumulation, when treated during the adipocyte differentiation process in 3T3-L1 cells. Based on the Oil Red O staining, EHCS inhibited lipid accumulation at 19.19%, 33.30% at 1000 $\mu$ g/mL, 2000 $\mu$ g/mL, respectively. The real-time PCR and Western blot analysis showed that EHCS significantly decreased in the mRNA expression and protein level of obesity-related factors, such as peroxisome-proliferators-activated-receptor $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and CCAAT enhancer-binding-proteins  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ). This study potentially suggests that the Saekso 1 corn husk and cob extracts may improve lipid metabolism and reduce lipid accumulation. This study investigated the hepatoprotective effect of Saekso 1 corn husk and cob extracts (EHCS) in oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in HepG2 cells. EHCS showed a high level of lipid accumulation inhibiting effect. EHCS also suppressed triglyceride accumulation and inhibited expression of lipid marker genes, such as sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and sterol regulatory element binding protein-1a (SREBP-1a). Analysis by western blot of the expression of p-AMPK, p-SREBP1, PPAR $\alpha$ , and FAS proteins showed that the incidence of SREBP1 protein, a major factor involved in lipid metabolism in the liver, has decreased significantly after treatment with the extracts. Moreover, the protein-induced expression of FAS, a major enzyme involved in the biosynthetic pathways of fatty acids, was decreased significantly in all concentrations. These results suggest that EHCS is a potent agent for the treatment of NAFLD.

## 1. 연구목표

한국인의 알콜 소비량은 전세계 20위 이내로 상위권을 지속적으로 유지하고 있으며, 간암의 발병으로 인한 간암환자의 비율은 남성의 경우 항상 5위 이내를 차지할 정도로 높은 수준이다. 따라서 간건강 및 간기능의 회복은 주요한 관심사가 되고 있으며, 새로운 소재를 활용한 건강기능식품의 개발이 지속적으로 절실히 필요한 실정이다. 국내 회식문화는 잔을 권하는 음주 습관 등으로 간 관련 질환의 지속적인 전파 가능성이 있어 이에 대비한 간 관련 질병의 예방, 간 건강 회복 및 유지관련

제품의 필요성 증대되고 있으며 차별화된 원료를 이용한 신규의 소재로 알콜성 간 건강 및 간 기능 개선을 위한 건강기능식품 소재의 개발이 요구되고 있다. 자색옥수수 추출물에 함유된 안토시아닌의 높은 함량은 뛰어난 항산화 효과를 지니며 이러한 항산화에 기인하는 기능성 소재의 개발 가능성이 매우 높을 것이라 판단된다. 본 연구는 강원도 옥성 신품종인 자색옥수수의 표준재배법 확립과 자색 옥수수 포엽과 속대 함유된 안토시아닌을 추출물로 제조하여, 비알콜성 간기능 효능을 검증 개별 인정형 건강기능식품으로 개발하고자 연구를 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### (제2세부과제: 자색옥수수 추출물의 간보호 효능 검증)

#### (시험 1) 자색옥수수의 표준재배법 확립

##### 가. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 시비량 구명

자색옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 시비량 및 시비방법 구명을 위해 색소 1호 품종을 이용하여 2017년부터 2019년까지 3년간 강원도 홍천 옥수수연구소에서 시험을 수행하였다. 파종기는 4월 하순, 질소시비량은 옥수수 표준시비량(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O: 14.7-3-6kg/10a)을 기준으로 질소량을 기비/추비(%)의 0/0, 50/0, 50/50, 50/150 4처리로 수행하였고, 추비는 옥수수 6~7엽기 처리하였다. 질소 시비량이 안토시아닌 색소함량에 미치는 영향을 조사하였다. 재식밀도는 70×25cm로 수행하였고 옥수수 포엽 및 속대를 출사 후 27일에 수확하여 60℃ 건조기로 24시간 건조 후 포엽 및 속대 생산량과 안토시아닌 함량을 조사하였다. Cyanidin 3-O-glucoside 분석은 옥수수 포엽 건조분말시료 0.1g, 속대는 0.2g을 1% citric acid가 함유된 60% 에탄올을 10mL씩 첨가하고 3시간씩 상온 교반하여 2회 반복 추출하였다. 추출액을 0.45µm membrane filter에 통과시킨 후 HPLC를 사용하여 측정하였다. 표준 물질로 cyanidin 3-O-glucoside chloride(Sigma Chemical Co., St, Louis, MO, USA)를 사용하여 정량곡선을 작성하고 함량을 정량하였다.

##### 나. 옥수수 포엽 및 속대 수확시기 구명

안토시아닌 색소 함량 차이를 구명하기 위해 색소 1호 품종을 이용하여 2017년부터 2019년까지 3년간 강원도 홍천 옥수수연구소에서 옥수수 포엽 및 속대의 1차 이삭 적정 수확시기 구명을 위해 시험을 수행하였고, 옥수수 포엽 및 속대 생산 최대화를 위해 2차 이삭 수확시기를 2017년 1년간 수행하였다. 질소시비량은 기비로 옥수수 표준시비량(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O: 14.7-3-6kg/10a)의 50%, 추비로 옥수수 6~7엽기에 50% 시비하여 수행하였고, 재식밀도는 70×25cm로 수행하여 옥수수 포엽 및 속대 수량과 색소함량을 조사하였다. 수확시기 시험은 옥수수 수염 출현 후 20일부터 3일 간격으로 5회를 수확하였고, 2차 이삭은 출사 후 27일경 1차 이삭 수확 후 0, 2, 4, 6일에 수확하여 안토시아닌 함량을 측정하였다. 건조는 60℃로 24시간 건조 후 사용하였다. Cyanidin 3-O-glucoside 함량 측정방법은 (시험 1)과 동일하게 수행하였다.

#### 다. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 파종기 구명

안토시아닌 색소 함량 차이를 구명하기 위해 색소 1호 품종을 이용하여 2018년부터 2019년까지 2년간 강원도 홍천 옥수수연구소에서 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 적정 파종기 구명을 위해 시험을 수행하였다. 파종기는 4월하순, 5월중순, 6월상순 3처리로 수행하였고, 질소시비량은 기비로 옥수수 표준시비량(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O: 14.7-3-6kg/10a)의 50%, 추비로 옥수수 6~7엽기에 50% 시비하여 수행하였다. 옥수수 포엽 및 속대를 출사 후 27일에 수확하여 60℃ 건조기로 24시간 건조 후 포엽 및 속대 생산량과 안토시아닌 함량을 조사하였다. Cyanidin 3-O-glucoside 함량 측정방법은 (시험 1)과 동일하게 수행하였다.

#### 라. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 재식밀도 구명

2017년 1년간 강원도 홍천 옥수수연구소 시험포장에서 색소 1호 품종을 이용하여 자색옥수수 포엽의 생산량 최대를 위해 재식밀도 시험을 수행하였다. 파종기는 4월 하순, 질소시비량은 기비로 옥수수 표준시비량(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O: 14.7-3-6kg/10a)의 50%, 추비로 옥수수 6~7엽기에 50% 시비하여 수행하였고, 재식밀도는 2년간 70×15, 20, 25, 30cm 등 4처리로 수행하였다. 옥수수 포엽을 출사 후 27일에 수확하여 포엽 및 속대 생산량과 안토시아닌 함량을 조사하였다. Cyanidin 3-O-glucoside 함량 측정방법은 (시험 1)과 동일하게 수행하였다.

#### 마. 옥수수 포엽 및 속대 원료 공급

자색옥수수 포엽 및 속대 공급을 위해 2017년부터 2019년까지 3년간 매년 색소 1호 품종을 이용하여 파종은 4월 하순하였고, 기타 옥수수 표준재배법에 준하여 원료를 생산하였다. 수확시기는 옥수수 출사 후 27일경에 수확하여 건조기를 이용하여 60℃에서 약 24시간 건조 후 주관과제 연구 수행에 공급하였다.

#### 바. 차년도 생산을 위한 원종 및 보급종 생산

옥수수는 매년 종자를 생산해서 공급을 하여야 하는 작물이기 때문에 차년도 원료 생산을 위해서는 전년도에 종자를 생산하여야 한다. 따라서 색소 1호 보급종 생산을 위한 원종(HA1, HA2) 2계통을 인공교배를 통하여 오염을 방지하여 생산을 하였고, 옥수수 포엽 및 속대 원료 생산을 위한 보급종 생산은 필요한 종자량에 따라 인공교배와 격리 채종을 이용하여 보급종을 생산하였다. 생산된 종자는 차년도 단계별 종자생산에 이용하여 종자를 생산하였다.

### (시험 2) 간기능성 효능검정

#### 가. 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물의 영양성분 및 생리활성 평가

##### (1) 실험재료

자색옥수수인 색소 1호 품종은 2016년도에 강원도농업기술원 옥수수연구소에서 표준재배법에

준하여 재배되었다. 재배된 색소 1호를 수확하여 수염과 외피를 제거하고 건조하여 포엽과 속대를 분리한 다음 분쇄하여 추출시료로 사용하였다. 옥수수 포엽과 속대 건조분말시료 10kg에 0.1% citric acid가 함유된 30% 에탄올을 250 L씩 첨가하고 12시간 동안 상온 교반하여 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과하여 감압농축하고 부형제로 30% dextrin을 첨가한 다음 분무건조하여 일반성분 분석 및 생리활성 검정용 시료로 사용하였다.

## (2) 일반성분 분석

색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 일반성분 분석은 식품공전법에 따라 분석하였다. 수분 함량은 수분 건조기(MA 40, Sartorius, Gottingen, Germany)를 사용하여 측정하였으며 조회분은 600°C 회화로에서 직접 회화시켜 회화되기 전 시료의 무게와 회화된 후의 시료의 무게의 차이로 함량을 산출하였다. 조단백질은 Kjeldahl 법에 의해 분석시료에 분해촉매제와 황산 10 mL를 첨가하여 420°C에서 50분간 가열하여 분해시키고 Kjeltac 장치(Kjeltac auto sampler system 1035 Analyzer, FOSS TECATOR, FOSS, Hoganas, Sweden)를 이용하여 조단백질의 함량을 측정하였다. 조지방 함량은 soxhlet 추출법을 사용하여 분석하였다. 지방 자동추출장치인 Soxtec (2050 SOXTEC, FOSS TECATOR, Hoganas, Sweden)을 이용해 측정하였다. 조지방 분석통을 1시간 건조시킨 후 무게를 측정한 후 원통형 여과지에 분석시료를 넣고 솜으로 위를 덮은 다음 ethyl ether 80mL를 넣고 Soxtec에 장착하였다. 추출장치의 수기를 130°C에서 20분간 끓이고 40분간 세척, 20분간 회수, 20분간 건조되도록 조절하였다. 분석이 완료되면 분석통을 분리하여 흡후드에서 남아있는 ether를 휘발시키고 100°C의 건조기에서 1시간 건조한 후 30분간 진공방냉하여 무게를 측정하였다. 조섬유는 AOAC법에 의해 조섬유 분석장치인 Fibertec (FOSS TECATOR, Hoganas, Sweden)을 이용하여 분석하였다. 1.25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 과 1.25% KOH를 사용하여 시료 내 섬유질만을 남긴 후, 회화를 통해 조섬유 함량을 측정하였다.

## (3) 지방산 분석

추출 및 전처리 과정에 사용한 유기용매와 기타시약들은 모두 GR등급을 사용하였다. 표준품은 Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich Co. st Louis, MO, USA), 내부표준물질은 triundecanoin (Nu-Chek-prep, INC Elysian, MN, USA)을 사용하였다. 색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 지방산 조성 및 함량은 시료 내 지방을 산분해하여 ether로 추출하고 BF<sub>3</sub>-Methanol 용액으로 methyl-ether화하여 gas chromatography (Agilent GC, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. 분석 시료 0.1g을 마조니어관에 넣고 내부 표준물질 2mL과 8.3M 염산용액 10mL를 첨가하고 산화방지를 위하여 pyrogallol (50mg/mL in ethanol) 용액 2 mL을 첨가하여 혼합 후 밀봉하였다. 밀봉된 마조니어관의 용액을 70~80°C 항온수조에서 40분간 분해시킨 후 실온 냉각하여 에탄올을 첨가하고 petroleum ether와 diethyl ether를 각각 25mL씩 첨가하여 5분간 진탕 추출하였다. 분해된 용액을 1시간 이상 실온 방치한 후 분리된 상층액을 filter paper로 여과하여 40°C에서 감압 농축하였다. 용매가 제거된 농축물에 chloroform 2mL과 diethyl ether 3mL를 첨가하여 재용해하고 질소로 농축한 다음 7% BF<sub>3</sub>-Methanol 2mL과 toluene 1mL 첨가 후 밀봉 하여 100°C

진조기에서 45분간 반응시켰다. 반응이 끝난 용액을 실온에서 완전히 냉각 시키고 증류수 5mL과 n-hexane 1mL을 첨가하여 충분히 혼합한 뒤 정치시켰다. 수층으로부터 분리된 상등액에 sodium sulfate anhydrous를 첨가하여 탈수하고 0.45 $\mu$ m membrane filter에 통과시켜 분석시료로 사용하였다. 지방산 분석을 위한 column은 SP-2560(100 m  $\times$  0.25mm, 0.2  $\mu$ m, Supelco, USA)을 사용하였다. 시료주입기와 검출기(Flame Ionization Detector, FID) 온도는 각각 225 $^{\circ}$ C, 285 $^{\circ}$ C, split ratio는 200:1이었다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였으며, flow rate 0.75mL/min으로 컬럼 온도는 100 $^{\circ}$ C에서 4분간 유지 후, 244 $^{\circ}$ C까지 1분당 3 $^{\circ}$ C씩 승온시켜 15분간 유지하였다(표 1).

표 1. GC analytical condition of fatty acid

Classification	Condition
Instrument	GC (Agilent GC, Santa Clara, CA, USA)
Detector	FID
Carrier gas	He
Column	SPTM-2560 (100 m $\times$ 0.25 mm, 0.20 $\mu$ m)
Column flow	0.75 mL/min
Injection volume	1.00 $\mu$ L
split ratio	200: 1
Injection temperature	225 $^{\circ}$ C
Detector temperature	285 $^{\circ}$ C
Oven temperature	100 $^{\circ}$ C (4 min), 208 $^{\circ}$ C (3 $^{\circ}$ C/min), 244 $^{\circ}$ C (15 min)

#### (4) 아미노산 분석

색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 아미노산 조성 및 함량은 시료 내 단백질을 가수분해하고 유도체화(ZORBAX Eclipse AAA, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)하여 HPLC (Agilent LC system, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. 아미노산 분석을 위한 전처리는 건강식품공전을 참고하여 수행하였다. 분석 시료 0.1g에 0.05% 2-mercaptoethanol (w/v) 을 함유한 6N HCl 10mL를 첨가하고 드라이 아이스와 에탄올로 동결한 다음 탈기장치에 장착하였다. 탈기장치에서 용해, 동결을 반복하여 충분히 탈기시킨 다음 밀봉하여 110  $\pm$  1 $^{\circ}$ C에서 22 ~ 24시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해 된 시료를 40 $^{\circ}$ C에서 감압, 농축 건조를 반복하여 HCl을 최대한 제거하였다. 농축된 시료에 0.2N sodium citrate 완충액(pH 2.2) 또는 0.02N HCl용액을 가하여 재용해하고 0.45 $\mu$ m membrane filter에 통과시킨 다음 아미노산 분석을 위한 유도체화용 시료로 사용하였다. 색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 아미노산 조성 및 함량 분석을 위한 유도체화 조건은 표 2와 같다.

표 2. HPLC analytical condition of amino acid

Classification	Condition
Instrument	Agilent LC system (Agilent GC, Santa Clara, CA, USA )
Injector	Auto-sampler
Detector	PDA (338 nm, 262 nm)
Column	Capcellpack UG120 C <sub>18</sub> (Shiseido, Japan)(250 × 4.6 mm, 5 μm)
Column temp	40℃
Injection volume	Injector program
Flow rate	1.5 mL/min
Run time	38 min
Mobile phase	A: 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.8) B: ACN: MeOH: d-water (45: 45: 10, v/v/v)

Gradient table

Time (min)	Flow rate (mL)	%A	%B
initial	1.5	95	5
31	1.5	44	56
33	1.5	44	56
34	1.5	0	100
38	1.5	0	100

Derivatization injector program table

1	DRAW 5.0 μ L from Borate buffer
2	DRAW 1.0 μ L from sample
3	MIX 6.0 μ L in air, max. speed, 2 times
4	WAIT 0.5 min
5	DRAW 0.0 μ L from d-water (washing)
6	DRAW 1.0 μ L from Borate buffer
7	MIX 7.0 μ L in air, max. speed, 6 times
8	DRAW 0.0 μ L from d-water (washing)
9	DRAW 1.0 μ L from FMOc reagent
10	MIX 8.0 μ L in air, max. speed, 6 times
11	DRAW 16.0 μ L from d-water
12	MIX 24.0 μ L in air, max. speed, 6 times
13	INJECT

#### (5) 항산화활성 측정

##### ○ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical 소거활성

색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법에 따라 수행하였다. 시료 용액 0.2mL에 0.2mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 0.8mL를 첨가하여 혼합한 뒤 상온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 소거능은 시료 용액 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도차이를 백분율로 나타내었으며 대조구로 ascorbic acid(Sigma, Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

○ 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) radical 소거활성

색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 ABTS radical에 대한 소거활성은 Pellegrin 등의 방법에 따라 수행되었다. 반응에 사용된 ABTS 시약은 7.4mM ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) 용액과 2.6mM potassium persulfate를 혼합하여 실온·암소에서 15시간 방치하여 radical을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액의 흡광도가 734nm에서  $0.70 \pm 0.03$ 이 되도록 에탄올로 희석하여 조제하였다. 시료 용액 20 $\mu$ L에 희석된 ABTS 용액 300 $\mu$ L를 첨가하여 혼합하고 20분간 실온 방치한 다음 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 사용하여 734nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 시료 용액 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도차이를 백분율로 나타내었으며 대조구로 ascorbic acid (Sigma, Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

(6) 항산화물질 함량 분석

○ 총 폴리페놀 함량 측정

색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 총 폴리페놀 함량은 시료 내 폴리페놀성 화합물에 의하여 Folin-ciocalteu reagent가 환원되어 폴리브렌 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 측정하였다. 시료 용액 0.2mL에 증류수 1.8mL를 첨가하고 Folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)시약을 0.2mL 첨가하여 3분간 반응시키고, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 0.4mL와 증류수 1.4mL를 첨가하고 혼합하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 분광광도계(Evolution 201, Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 반응액의 흡광도를 760nm에서 측정하였다. 표준물질로 tannic acid(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 검량선을 작성하고 색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 총 폴리페놀 함량을 정량하였다.

○ 총 플라보노이드 함량 측정

색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Ja 등의 방법을 참고하여 측정하였다. 시료 용액 1 mL에 증류수 4 mL 첨가하고 5% NaNO<sub>2</sub> 0.3mL 첨가, 혼합하여 5분간 실온방치한 다음, 10% AlCl<sub>3</sub> 0.3mL 첨가하고 혼합하여 5분간 실온방치 하였다. 반응 후 1M NaOH 2mL를 첨가하여 분광광도계(Evolution 201, Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 반응액의 흡광도를 510nm에서 측정하였다. 표준물질로 rutin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 검량선을 작성하고 색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 총 플라보노이드 함량을 정량하였다.

(6) 항당뇨 활성 특성

○  $\alpha$ -Amylase 저해활성

색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의  $\alpha$ -amylase에 대한 저해활성은 starch를 기질로 하여 측정하였다. 시료 0.5 $\mu$ L에 pancreatin 기원의 12unit/ml  $\alpha$ -amylase (Sigma, Co., St. Louis, MO,

USA) 50 $\mu$ L와 0.2M KPB (potassium phosphate buffer, pH 6.8) 50 $\mu$ L를 첨가하여 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1% 전분용액 100 $\mu$ L을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고 DNS 발색시약(3,5-dinitrosalicylic acid and 30% sodium potassium tartarate in 0.5M NaOH)을 250 $\mu$ L 첨가한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 10분 간 가열하여 발색시켰다. 발색이 된 반응액을 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 냉각하고 이 반응액의 3배의 증류수를 가하여 교반한 후 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다. 대조구로는 경구용 혈당강하제로 쓰이는 acarbose (Sigma, Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

$$\alpha\text{-Amylase inhibitory activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### ○ $\alpha$ -Glucosidase 저해활성

색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성은 Lee 등의 방법에 따라 측정하였다. 시료 100 $\mu$ L에 yeast baker 기원의 0.15unit/mL  $\alpha$ -glucosidase (Sigma, Co., St. Louis, MO, USA) 200 $\mu$ L와 0.2M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 1mL를 첨가하여 ELISA reader (UVM-340, ASYS, Engendorf, Austria)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하고 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 다음, 5mM pNPG (4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) 200 $\mu$ L를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 더 반응시켰다. 최종 반응 후 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다. 대조구로는 경구용 혈당강하제로 쓰이는 acarbose (Sigma, Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase inhibitory activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 나. 리파아제 저해활성 및 3T3-L1 지방전구세포에서의 지방분화 억제효과

#### (1) Pancreatic lipase 저해활성

리파아제 저해 활성은 Kim 등의 방법에 따라 측정하였으며 각 well에 porcine pancreatic lipase 0.3mg과 10mM MOPS을 첨가하였다. 1mM EDTA 100mM Tris-HCl/5mM CaCl<sub>2</sub> (pH 6.8) 700 $\mu$ L를 첨가 하여 enzyme buffer로 사용하였으며 enzyme buffer에 색소 1호 포엽 및 속대 추출물과 orlistat (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 농도별로 100  $\mu$ L씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 기질로 10mM p-Nitrophenyl butyrate (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 20 $\mu$ L씩 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 뒤 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 사용하여 400nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식을 이용하여 저해활성을 계산하였다.

$$\text{Lipase 저해활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료를 처리한 구의 흡광도} - \text{효소를 처리하지 않은 구의 흡광도}}{\text{시료를 처리하지 않은 구의 흡광도}}\right) \times 100$$

## (2) 3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화유도

3T3-L1 (CL-173) 세포는 미국 세포주 은행인 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포에 10% fetal bovine serum(FBS)과 penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone®, Logan, UT, USA)를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에서 배양하였다. 배양된 3T3-L1 세포가 confluent 상태가 되면 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 수확하고 6 well plate에 5 × 10<sup>6</sup>/well의 농도로 분주한 다음 100% confluency 상태에서 48시간 방치하였다. 추출물이 지방세포분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10% FBS와 MDI(0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma, St. Louis, MO, USA), 1μM dexamethasone (Calbiochem, Darmstadt, Germany), 1μg/mL insulin(Sigma, St. Louis, MO, USA))가 첨가된 DMEM배지를 처리하여 분화를 유도하였다. MDI 배지 처리 2일 후에 1μg/mL insulin (Sigma, St. Louis, MO, USA)만 첨가된 10% FBS-DMEM으로 배지를 교체하여 2일 동안 배양하였고, 2일 마다 10% FBS DMEM 배양액으로 교체하여 4일 동안 분화를 유도하였다. 지방세포 분화를 유도하는 동안 각 배양액에 추출물을 100, 250, 500, 1000, 2000μg/mL의 농도로 처리하였다.

## (3) 세포 독성 분석

추출물의 세포독성은 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 tetrazolium salts (WST-1)을 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하여 간접적으로 세포생존율을 측정하는 WST-1 cell proliferation assay (Cayman Chemical, MI, USA)를 통하여 측정하였다. 3T3-L1 세포를 96 well plate에 1 × 10<sup>4</sup>/well의 농도로 분주하고 24시간 후 추출물을 농도별로 처리하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 WST-1 시약을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

## (4) Oil Red O 염색

색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 3T3-L1 지방전구세포의 분화억제 활성을 검증하기 위하여 Oil Red O 염색을 수행하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 분화가 완료된 시점에서 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 다음 10% formaldehyde 용액을 30분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 상온에서 고정한 뒤 용액을 제거하고 PBS와 70% ethanol로 각각 2번씩 세척한 다음 Oil Red O 용액을 이용하여 염색을 실시하였다. 지방세포로 분화를 유도하지 않는 지방전구 세포를 음성대조군 (Negative control, NC), 지방세포로 분화를 유도하고 추출물을 처리하지 않은 지방세포를 양성대조군 (Positive control, PC)으로 사용하였다. 각각 염색된 세포를 광학현미경 (AG AXIO OBSERVER D1 INVERTED MICROSCOPE, CARL ZEISS, German)을 사용하여 400배 배율로 이미지를 관찰하고, 염색된 lipid droplet는 isopropyl alcohol 용액으로 추출한 다음 510nm에서 흡광도 (xMark™ microplate absorbance spectrophotometer, BIO-RAD, JAPAN)를 측정하여 시료 처리군의 흡광도 값을 시료 무처리군 (양성대조군)의 흡광도 값으로 나누어 세포의 지방 함량을 백분율로 나타내었다.

### (5) Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정은 지방세포 분화 억제활성 측정방법과 동일한 방법으로 세포를 배양하고 분화된 3T3-L1 세포를 TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고 total RNA를 정량하였다. 추출된 RNA를 DNase가 포함되어 있는 High capacity cDNA Reverse Transcription Kits (applied biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하고 SYBR green과 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  primer를 이용하여 Real-time PCR (StepOne Real-time PCR system, Applied Biosystems, Singapore)을 수행하였다. 대조군 유전자로는 GAPDH를 사용하였다. 또한 Real-time PCR system을 이용하여 형광신호를 정량하였다. 주요 유전자의 primer 및 sequence는 표 3과 같다.

표 3. Primer sequence used in Real-time PCR.

Primers	Sequence		Size (bp)
	Forward	Reverse	
GAPDH	CACTCACGGCAAATTCACGGCAC	GACTCCACGACATACTCAGCAC	149
PPAR $\gamma$	AGTCGGTGGACAAAGAACAGC	ACTCCAGCACCTTCTGTTGC	101
C/EBP $\alpha$	TTGACCCAGAGCATGGTGC	GAAGTTGGTGGGCCAGAATG	124

### (6) Western blot을 통한 단백질 발현 측정

지방세포 분화가 완료된 3T3-L1 세포는 PBS로 2번 세척한 후 protease inhibitor가 포함된 RIPA buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 30분간 ice에서 용해시킨 뒤 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻어진 상층액은 10% SDS polyacrylamide gel로 전기영동을 통해 단백질을 분리한 뒤 nitro cellulose membranes (#1620112, BIO-RAD, Germany)으로 transfer하였다. 1차 항체는 anti-PPAR $\gamma$  (#2435, Cell signaling, USA), anti-C/EBP $\alpha$  (#2295, Cell signaling, USA)와 anti-GAPDH (#3683, Cell signaling, USA)를 사용하였고 2차 항체로는 HRP-conjugated anti-rabbit (1:5000)을 사용하였다. 각각의 단백질 발현양은 Chemidoc XRS+ with Image Lab software(BIO-RAD, USA)를 이용하여 분석하였다.

### (7) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였고 결과는 평균(mean)과 표준편차(SD)로 나타내었으며, 통계 처리는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 다. 올레산 유도 비알콜성 지방간세포에서 지질 축적 억제 효과

### (1) 세포배양 및 추출물 처리

본 실험에 사용된 HepG2(HB-8065)는 인체 유래 간암 세포주이며, 세포는 미국 세포 은행인 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. HepG2

세포에 10% fetal bovine serum과 trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)를 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에서 배양하였다. HepG2 세포를 6 well plate에 5 × 10<sup>6</sup> cell/well의 농도로 분주하고 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 색소 1호 포염 및 속대 추출물을 0, 100, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 처리한 후, 세포 내 지질 축적을 유도하기 위하여 0.2mM 농도의 oleic acid (Sigma-aldrich, Saint Luis, USA)를 처리하고 24시간 동안 배양하였다.

## (2) Nile Red 염색

추출물 및 oleic acid 처리하고 24시간 후 배지를 제거한 뒤 10% formaldehyde 용액을 30분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 상온에서 고정한 뒤 용액을 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2번 세척하고 70% 알코올로 2번 세척한 후 Nile Red (Sigma-aldrich, Saint Luis, USA)용액을 이용하여 염색을 실시하였다. 염색된 세포는 형광현미경을 통해 200배 배율로 이미지를 관찰하였다.

## (3) Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정은 24시간 배양된 세포에서 TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고 total RNA를 정량하였다. 추출된 RNA를 DNase가 포함되어 있는 High capacity cDNA Reverse Transcription Kits (applied biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 정량하여 cDNA로 합성하고, SYBR green과 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), carnitine palmitoyltransferase 1A(CPT-1), peroxisome proliferator activated receptor α(PPARα), peroxisome proliferator activated receptor γ(PPARγ), acetyl-CoA carboxylase alpha(ACC), stearoyl-CoA desaturase(SCD), fatty acid synthase(FAS), microsomal triglyceride transfer protein(MTTP), CD36 molecule(CD36), sterol regulatory element-binding protein-1a(SREBP-1a), sterol regulatory element-binding protein-1c(SREBP-1c), CCAAT/enhancer-binding protein α(C/EBPα) primer를 이용하여 real-time PCR (StepOne Real-time PCR system, Applied Biosystems, Singapore)을 수행하였다. 대조군 유전자로는 GAPDH를 사용하였으며 해당 유전자의 primer 및 sequence는 표 4와 같다.

## (4) Western blot을 통한 단백질 발현 측정

배양된 HepG2 세포에 추출물 처리 후 30분, 24시간 후 각각 PBS로 2번씩 세척한 후 protease inhibitor가 포함된 RIPA buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 30분간 ice에서 용해시킨 뒤 4°C에서 13,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻어진 상층액은 10% SDS polyacrylamide gel로 전기영동을 통해 단백질을 분리한 뒤 nitro cellulose membranes (#1620112, BIO-RAD, Germany)으로 transfer하였다. 1차 항체는 GAPDH(#14C10, Cell signaling, USA), p-AMPK (#T172, Cell signaling, USA), p-SREBP1 (#Ser372, Cell signaling, USA), PPARα (ab8934, abcam, UK), FAS (ab82419, abcam, UK)를 사용하였고 2차 항체로는 HRP-conjugated anti-rabbit (1:10000)을 사용하였다. 각각의 단백질 발현량은 Chemidoc XRS+ with Image Lab software (BIO-RAD, USA)를 이용하여 분석하였다.

표 4. Primer sequence used in Real-time PCR.

Target gene	sence	Sequence (5'-3')
GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (NM 001289746,1)	F	CCACTCCTCCACCTTTGAC
	R	ACCCTGTTGCTGTAGCCA
CPT1 carnitine palmitoyltransferase 1A (NM 001876,3)	F	TTCAGTTCACGGTCACTCCG
	R	TGACCACGTTCTTCGTCTGG
PPAR $\alpha$ peroxisome proliferator activated receptor $\alpha$ (NM 001001928,2)	F	TCACCACAGTAGCTTGGAGC
	R	GTGAAAGCGTGTCCGTGATG
PPAR $\gamma$ peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ (NM 005037,5)	F	GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC
	R	AACTCAAACCTTGGGCTCCATAAAG
C/EBP $\alpha$ CCAAT/enhancer-binding protein $\alpha$ (NM 004364,4)	F	CCAGAAAAGCTAGGTCGTGGG
	R	ACAAAACAAGGCTGAGGGTCC
FAS fatty acid synthase (NM 004104,4)	F	CAGAGCAGCCATGGAGGAG
	R	AATCTGGGTTGATGCCTCCG
SCD stearoyl-CoA desaturase (NM 005063,4)	F	CCCTGCTTACTTGGTGAGGG
	R	TGCCCTAGGCTGTAGGGAAT
MTTP microsomal triglyceride transfer protein (NM 001300785,1)	F	CATATATTCTTGTACACAACTGGT
	R	CCACATCCACGTTGGAGGAA
CD36 CD36 molecule (NM 001289909,1)	F	TGGCTGTGGCATAACAATACT
	R	TGGAAATGAGGCTGCATCTGT
SREBP-1c sterol regulatory element-binding protein-1c	F	TCAGCGAGGCGGCTTTGGAGCAG
	R	CATGTCTTCGATGTCGGTCAG
SREBP-1a sterol regulatory element-binding protein-1a	F	GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT
	R	CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC
ACC acetyl-CoA carboxylase alpha	F	TGATGTCAATCTCCCGCAGC
	R	TTGCTTCTTCTGTTTTCTCCCC

## 라. 동물실험

### (1) 실험동물 및 사육환경

실험동물은 Sprague Dawley(SD)계 웅성 흰쥐를 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있게 공급하였고, 사육실의 온도는  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도는  $50 \pm 5\%$ 로 유지하였다. 모든 동물실험은 강원도농업기술원 농식품연구소 동물실험윤리위원회의 승인을 거쳐 진행하였다.

### (2) 체중 및 식이섭취량의 변화

실험동물의 체중, 음수 및 사료 섭취량은 시험 개시일과 개시 후 매주 1회 간격으로 측정하였다. 최종 체중에서 실험개시일의 체중을 감하여 실험기간으로 나누어 체중증가율을 산출하였고, 실험기간

동안 증가한 체중량을 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율을 산출하였다.

### (3) 혈액 채취 및 혈액생화학적 검사

실험종료 후 실험동물을 12시간 절식시킨 다음 흡입마취기(Rodent Circuit Controller, RC2, VetEQUIP, Livermore, CA, USA)를 통해 산소와 isofluane을 흡입시키고 마취가스 농도를 1.5~2.5%로 조절하며 마취를 유지시키고 복대정맥에서 2mL을 채혈하여 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상등액을 취하여 혈청을 분리하고 자동혈청분석기(BT1000, Bio-technical Instrument, Rome, Italy)를 이용하여 혈청 중 총 콜레스테롤(Total cholesterol, CHO), 중성지방(Triglycerise, TG), HDL(High density lipoprotein)-콜레스테롤(HDL), LDL(Low density lipoprotein)-콜레스테롤(LDL)을 측정하였다.

### (4) 장기무게 측정 및 간 조직 적출

실험동물의 복대정맥에서 채혈한 후 방혈을 실시하였으며 간과 신장을 적출하여 생리식염수에 세척한 다음 흡수지에 체액 및 혈액을 제거하고 각각의 무게를 측정하였다. 적출된 간 조직 중 중간엽을 채취하여 간 조직 내 항산화 효소 활성 및 지질과산화물 측정 시료로 사용하였다.

### (5) 간 조직 내 지질과산화물 측정

간 조직 내 지질과산화물 함량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(1,1,3,3-tetraethoxypropane, MDA)의 농도를 측정하여 확인하였다. 간 조직에 10배에 해당하는 1.15% KCl을 첨가하여 조직분쇄기(TissueLyser II, Hilden, Germany)를 사용하여 균질화하고, 간 조직 균질화액 500  $\mu$ L에 1% phosphoric acid 3mL와 0.6% TBA 용액 1mL을 첨가하여 95 $^{\circ}$ C 항온수조에서 45분간 반응시켰다. 반응액을 차갑게 식힌 다음 n-Butanol 4mL을 첨가하고 5000rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리된 상등액을 취하여 분광광도계(Evolution 201, Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 1,1,3,3-tetraethoxypropane(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 정량곡선을 작성하고 간 조직 내 생성된 MDA 함량을 정량하였다.

### (6) 간 조직 내 항산화 효소 활성 측정

분리된 간 조직에 냉각된 10mM EDTA를 함유한 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4)을 첨가한 후 조직 분쇄기(TissueLyser II, Hilden, Germany)를 사용하여 균질화시키고 10,000rpm에서 20분간 원심 분리 한 후, 분리된 상등액으로 catalase 효소 활성 측정에 사용하였다. Catalase 활성도는 Aebi 방법을 참고하여 측정하였다. 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.89mL에 10mM 과산화수소 용액 100 $\mu$ L를 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 방치 한 후, 균질화 시킨 간 조직 상등액 10 $\mu$ L를 첨가한 다음 분광광도계(Evolution 201, Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 240nm에서 3분 동안 변화 되는 흡광도를 측정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 흡광도 변화와 몰흡광계수로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 구하여 시료액이 반응하여 1분 동안 분해시킨 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를  $\mu$ mol로 나타내었다.

### (7) 간 조직 병리 검사

헤마톡실린과 에오신염색된 간장조직을 광학현미경(Olympus CX41, Japan)하에서 검사하여 지

지방침착(steatosis)과 염증소(inflammatory foci) 정도를 반정량적 분석방법으로 각각 평가하였다. 지방침착의 경우 전체 간조직절편의 20%이하는 grade 1(minimal, 1+), 20~40% 범위는 grade 2(mild, 2+), 40~60%범위는 grade 3(moderate, 3+), 60%이상은 grade 4(severe, 4+)로 구별하였으며, 염증소의 경우 역시 아주 미미함(minimal, 1+), 미미함(mild, 2+), 중등도심함(moderate, 3+), 심함(severe, 4+)으로 각각 구별하여 표시하였다. 현미경을 이용한 조직검경은 두 번에 걸쳐 반복하여 이루어졌으며, 1회차와 2회간에 차이가 있는 경우 추가적인 반복관찰을 통해 최종 grading score를 결정하여 결과값으로 정하였다. 지방침착과 염증소에 대한 개체별 grading score로부터 그룹의 평균값과 표준편차를 구하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 〈제2세부과제: 자색옥수수 추출물의 간보호 효능 검증〉

##### (시험 1) 자색옥수수의 표준재배법 확립

##### 가. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 시비량 구명

자색옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 질소시비량과 시비방법에 따른 생산량 및 C3G 색소 함량은 표 5와 같다. 질소시비량 처리에 따른 연도별 포장 생육상황은 그림 1, 2, 3에 나타내었다. 질소시비량 증가에 따른 옥수수 포엽 및 속대의 생산량은 조금 증가하는 경향을 보였다. 포엽의 C3G 함량도 질소 시비 증가에 따라 증가하였고, 속대의 C3G 함량은 질소시비량에 따른 차이가 없었다. 표준물질인 C3G 함량을 고려할 때 질소 시비량을 증시하는 것이 유리 할 것으로 사료된다.

표 5. 질소시비량에 따른 포엽 및 속대 생산량 및 색소함량

연도	파종기 (월,일)	질소시비 기비/추비(%)	출사 일수(일)	간장 (cm)	착수고 (cm)	도복 (1-9)	포엽건조중 지수 (kg/10a)	포엽 C3G(%)	속대건조중 지수 (kg/10a)	속대 C3G(%)		
2017	4. 27	0/0	82	251	142	1	50	82	0.57	86	96	0.15
		50/0	75	266	156	1	60	98	0.63	87	97	0.19
		50/50	75	264	159	1	61	100	0.61	89	100	0.18
		50/150	74	249	134	1	63	102	0.70	92	103	0.19
2018	4. 27	0/0	84	228	113	1	62	86	0.34	64	81	0.13
		50/0	81	222	111	1	63	88	0.37	82	103	0.12
		50/50	80	225	123	1	72	100	0.43	79	100	0.13
		50/150	80	210	110	1	79	109	0.54	87	110	0.14
2019	4. 25	0/0	82	260	161	1	45	82	0.63	85	93	0.23
		50/0	82	265	162	1	52	95	0.60	95	104	0.23
		50/50	82	253	156	1	55	100	0.62	91	100	0.25
		50/150	82	240	147	1	59	107	0.65	96	105	0.22
평 균		0/0	-	-	-	-	52	83	0.51	78	90	0.17
		50/0	-	-	-	-	58	94	0.53	88	101	0.18
		50/50	-	-	-	-	63	100	0.55	86	100	0.19
		50/150	-	-	-	-	67	106	0.63	92	106	0.18

※ 추비시기: 6~7엽



기비/추비(%): 0/0

기비/추비(%): 50/0

기비/추비(%): 50/50

기비/추비(%): 50/150

그림 1. 질소시비량에 따른 처리구 사진(2017년)



기비/추비(%): 0/0

기비/추비(%): 50/0

기비/추비(%): 50/50

기비/추비(%): 50/150

그림 2. 질소시비량에 따른 처리구 사진(2018년)



기비/추비(%): 0/0

기비/추비(%): 50/0

기비/추비(%): 50/50

기비/추비(%): 50/150

그림 3. 질소시비량에 따른 처리구 사진(2019년)

#### 나. 옥수수 포엽 및 속대 수확시기 구명

3년간 수행한 자색옥수수 색소 1호, 1차 이상 포엽 및 속대 수확시기에 따른 생산량과 안토시아닌 색소 함량은 표 6과 같다. 2017년 1년간 수행한 2차 이상 수량 및 색소함량은 표 7과 같다. 3년간

1차 이삭 수확시기 시험결과를 자색옥수수 포엽과 속대 생산량은 수확시기에 따른 차이를 보이지 않았다. 그리고 포엽과 속대의 C3G 함량은 뚜렷한 차이는 없었으나, 포엽은 29일경, 속대는 32일 이후로 나타났다. 이것은 겉으로 노출 된 옥수수 포엽은 자외선에 의한 색소 파괴가 일어났으나, 속대는 그렇지 않은 결과인 것으로 판단되었다. 포엽과 속대의 C3G함량을 동시에 고려한 수확시기는 출사 후 29일 전후 인 것으로 생각되었다. 그리고 2차 이삭 수확시기는 포엽과 속대의 C3G함량을 고려한 수확시기는 1차 이삭 수확 후 4일경으로 나타났다.

표 6. 수확시기에 따른 옥수수 1차 이삭 포엽 및 속대 생산량 및 색소함량

년 도	파종기 (월,일)	수확기 (출사 후)	포엽건조중 (kg/10a)	지수 (%)	포엽 C3G (%)	속대건조중 (kg/10a)	지수 (%)	속대 C3G (%)
2017	4, 27	20일	66	94	0.82	55	115	0.26
		23일	72	103	0.82	43	90	0.29
		26일	70	100	0.85	48	100	0.28
		29일	61	87	0.83	52	108	0.28
		32일	67	96	0.83	55	115	0.36
2018	4, 27	20일	60	89	0.53	69	97	0.12
		23일	73	108	0.47	74	103	0.15
		26일	67	100	0.48	71	100	0.17
		29일	75	111	0.46	68	96	0.16
		32일	71	106	0.40	69	97	0.15
2019	4, 25	20일	56	100	0.47	87	90	0.11
		23일	55	98	0.51	91	94	0.15
		26일	56	100	0.57	97	100	0.23
		29일	55	98	0.63	97	100	0.25
		32일	66	118	0.64	107	110	0.23
평균		20일	61	94	0.61	70	101	0.16
		23일	67	103	0.60	69	96	0.20
		26일	64	100	0.63	72	100	0.23
		29일	64	99	0.64	72	101	0.23
		32일	68	107	0.62	77	107	0.25

표 7. 수확시기에 따른 옥수수 2차 이삭 포엽 및 속대 생산량 및 색소함량

년 도	파종기 (월,일)	수확기 (1차이삭 수확 후)	포엽건조중 (kg/10a)	지수 (%)	포엽 C3G (%)	속대건조중 (kg/10a)	지수 (%)	속대 C3G (%)
2017	4, 27	0일	31	100	0.96	27	100	0.32
		2일	27	87	0.91	25	93	0.31
		4일	30	97	1.00	27	100	0.34
		6일	34	110	0.89	28	104	0.34

#### 다. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 파종기 구명

2년간 수행한 파종기에 따른 자색옥수수 포엽, 속대 생산량 및 안토시아닌 색소 함량은 표 8에 나타내었다. 파종기에 따른 연도별 포장 생육상황은 (그림 4, 5)에 나타내었다. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 2017년 예비시험결과 6월 하순 파종은 수량이 많이 떨어지는 경향이였기 때문에 6월 상순까지 옥수수 포엽 및 속대 생산이 가능하나, 안정성을 고려한 파종 적기는 강원 지역에서 4~5월 파종이 안정적인 것으로 판단되었으며, 포엽과 속대의 C3G함량은 파종기간 뚜렷한 차이는 없었다.

표 8. 파종기에 따른 옥수수 포엽, 속대 생산량 및 색소함량

년 도	파종기 (월.일)	출사 일수 (일)	간장 (cm)	착수고 (cm)	도복 (1-9)	포엽 건조중 (kg/10a)	지수 (%)	포엽 C3G (%)	속대 건조중 (kg/10a)	지수 (%)	속대 C3G (%)
2018	4. 27	80	225	122	1	82	100	0.45	85	100	0.11
	5. 15	69	203	116	1	89	109	0.57	87	103	0.11
	6. 7	65	165	74	1	85	104	0.45	86	102	0.15
2019	4. 25	82	265	162	1	54	100	0.67	95	100	0.27
	5. 14	70	245	139	1	54	100	0.66	96	101	0.16
	6. 4	60	245	154	1	55	102	0.67	98	103	0.18
평균	4월하순	-	-	-	-	68	100	0.56	90	100	0.19
	5월중순	-	-	-	-	72	105	0.62	92	102	0.14
	6월상순	-	-	-	-	70	103	0.56	92	103	0.17



4월 하순 파종

5월 중순 파종

6월 상순 파종

그림 4. 파종기에 따른 처리구 사진(2018년)



4월 하순 파종

5월 중순 파종

6월 상순 파종

그림 5. 파종기에 따른 처리구 사진(2019년)

### 라. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 재식밀도 구명

색소옥수수 포엽 및 속대 생산량 최대화를 수행한 재식밀도 시험결과는 표 9와 같다. 재식밀도에 따른 포장 생육상황은 그림 6과 같이 나타 났으며 재식밀도 시험에서는 밀식이 포엽 및 속대 생산량이 높은 경향을 보였으나, 밀식에서는 도복의 위험이 있기 때문에 5,700~7,000주/10a 정도의 재식밀도가 적당 할 것으로 판단된다. 재식밀도에 따른 포엽과 속대의 C3G함량은 처리간 뚜렷한 경향을 보이지 않았다.

표 9. 재식밀도 따른 옥수수 포엽 생산량 및 색소함량

년 도	파종기 (월.일)	재식밀도 (cm)	출사일수 (일)	간장 (cm)	착수고 (cm)	도복 (1-9)	포엽 건조중 (kg/10a)	지수 (%)	포엽 C3G (%)	속대 건조중 (kg/10a)	지수 (%)	속대 C3G (%)
2017	4. 27	70×15	75	249	141	2	76	120	0.70	112	129	0.21
		70×20	75	250	136	1	67	106	0.71	92	106	0.28
		70×25	75	246	137	1	63	100	0.71	87	100	0.26
		70×30	74	248	134	1	60	95	0.75	81	93	0.20

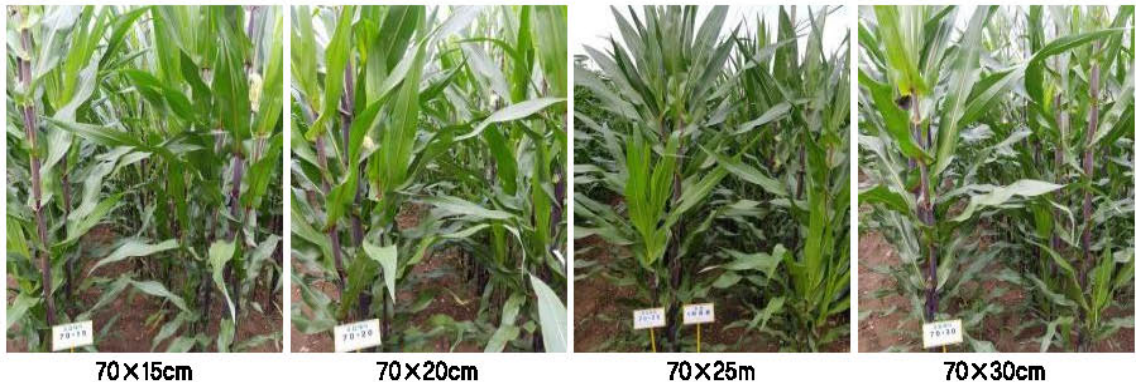


그림 6. 재식밀도에 따른 처리구 사진(2017년)

### 마. 옥수수 포엽 및 속대 원료 공급

본 과제 연구수행을 위해서는 자색옥수수 포엽 및 속대를 2017년 300kg(포엽 150, 속대 150), 2018년 300kg(포엽 150, 속대 150), 2019년 1,500kg(포엽 700, 속대 800)를 공급하였다.

### 바. 차년도 원료 생산을 위한 원종 및 보급종 생산

본 연구가 완료 된 이후에도 지속적인 사업 추진을 위해 종자 생산 및 공급이 필요하며 2017년과 2018년에는 색소 1호 원종 2계통을 매년 10kg씩 생산하여 다음연도 보급종 생산에 이용하였고, 보급종 생산은 매년 100kg씩 생산하여 옥수수 포엽 및 속대 원료 생산에 사용하였다. 또한 2019년 이후에도 지속적 원료생산을 위한 종자가 필요 원종 각각 10kg, 보급종 100kg을 생산 2020년 공동

연구 기관이 필요한 종자를 공급 할 계획이다. 2020년 이후 에도 공급된 종자를 활용한 원료생산 단지 조성과 포엽 및 속대 원료를 생산 할 계획이다.

## (시험 2) 간기능성 효능검정

### 가. 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물의 영양성분 및 생리활성 평가

#### (1) 일반성분 분석

색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 일반성분 분석 결과는 표 10과 같다. 추출물의 수분은 6.90%, 조회분은 7.31%, 조지방은 0.52%, 조단백질은 7.07%인 것으로 나타났다. 추출물의 조회분 함량은 색소 1호 포엽과 속대 건조시료에 비하여 조회분 함량이 약 2배~2.8배 정도 높았으며 조지방의 함량은 건조 포엽 시료의 함량과 유사하였고 건조 속대 시료에 비하여 약 1.7배 낮은 것으로 나타났다. 색소 2호 종실의 일반 성분과 비교하였을 때, 색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 조단백질과 조지방은 함량은 색소 2호 종실의 함량보다 낮았으며 조지방의 함량은 약 10배 정도 낮게 측정되었다.

표 10. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 일반성분

General components (%)	EHCS <sup>1)</sup>	Dried samples		
		Husk	Cob	Kernel
Carbohydrate	78.20 ± 0.30 <sup>2)</sup>	84.52 ± 0.15	81.39 ± 0.44	73.95 ± 0.73
Moisture	6.90 ± 0.03	7.26 ± 0.03	7.97 ± 0.01	8.84 ± 0.03
Crude ash	7.31 ± 0.11	2.60 ± 0.03	3.54 ± 0.04	1.44 ± 0.21
Crude fat	0.52 ± 0.08	0.55 ± 0.10	0.90 ± 0.16	5.46 ± 0.35
Crude protein	7.07 ± 0.09	5.07 ± 0.03	6.20 ± 0.27	10.31 ± 0.14

<sup>1)</sup> Extracts husk and cob of Saekso 1

<sup>2)</sup> Mean ± standard deviation (n=3)

#### (2) 지방산 분석

색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 지방산 조성을 분석한 결과는 표 11과 같다. 추출물에 함유되어 있는 지방산은 palmitic acid(C16:0), oleic acid(C18:1), linoleic acid(C18:2n-6), linolenic acid(C18:3n-3)이었으며 포화 지방산과 불포화 지방산의 비율은 16.67: 83.33로 oleic acid와 linoleic acid가 각각 33.33%로 가장 높게 나타났다. 색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물에 함유되어 있는 지방산의 종류는 옥수수 종실에 함유되어 있는 지방산의 종류수와 다소 차이가 있었지만 포화 지방산과 불포화 지방산의 비율 및 주요 지방산이 oleic acid와 linoleic acid로 검출된 것은 유사한 경향을 보였다. 옥수수에 함유되어 있는 oleic acid와 linoleic acid는 체내 합성되지 않는 필수 지방산으로 옥수수 종실뿐만 아니라 옥수수의 포엽 및 속대에도 필수 불포화 지방산이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

표 11. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 지방산 함량

Fatty acids		% of sum all fatty acids
Saturated	Lauric acid (C12:0)	-
	Myristic acid (C14:0)	-
	Palmitic acid (C16:0)	16.67 ± 0.01 <sup>1)</sup>
	Stearic acid (C18:0)	-
	Arachidic acid (C20:0)	-
	cis-11-Eicosenoic acid (C20:1)	-
Monounsaturate	Palmitoleic acid (C16:1)	-
	Oleic acid (C18:1n-9 cis)	33.33 ± 0.02
Poly-unsaturated	Linoleic acid (C18:2n-6 cis)	33.33 ± 0.02
	Linolenic acid (C18:3n-3)	16.67 ± 0.01

<sup>1)</sup> Mean ± standard deviation (n=3)

### (3) 아미노산 분석

색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 아미노산 조성을 분석한 결과는 표 12과 같다. 총 17종의 아미노산이 분석되었고 glutamic acid가 전체 아미노산의 29.09%로 가장 높았으며 그 다음으로 aspartic acid(22.11%), alanine(8.93%), lysine(4.77%), valine(4.41%)의 순으로 조성비가 높았다. 색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물 중 필수 아미노산은 tryptophan을 제외한 8종이 검출되었으며 전체의 23.08%를 차지하였고 준필수 아미노산은 전체의 6.74%를 차지하였다. Glutamic acid는 체내 알코올 분해과정에서 요구도가 높은 비타민 B1의 흡수를 돕고 간의 해독작용을 강화시켜 알코올에 의한 간 손상을 예방하고, aspartic acid는 알코올 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있으며 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 전체 아미노산 중 51.21%를 차지하는 아미노산으로 glutamic acid와 aspartic acid인 것으로 나타났다.

### (4) 항산화 활성

색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 항산화 활성을 DPPH와 ABTS radical 소거능 측정을 통하여 검정한 결과, 색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 DPPH radical 소거능은 1,000µg/mL에서 95.62%, ABTS radical 소거능은 10,000µg/mL에서 92.00%로 각각의 radical에 대하여 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 같은 추출물을 대상으로 2종류의 radical 소거능을 측정한 결과, 각 radical에 대한 소거능이 모두 우수하였으나 추출물의 같은 농도처리에서 ABTS 양이온 radical보다 DPPH free radical의 소거능이 우수하게 나타났는데 이는 DPPH 및 ABTS radical과 반응하는 항산화 성분의 차이로 색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물에 함유되어 있는 hydroxyl기를 가진 화합물이 free radical과 더 효과적으로 반응하는 것이라 추론된다. 본 연구에 사용된 색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 높은 항산화 활성은 시료 내 함유되어 있는 주요 안토시아닌 색소인 C3G의 항산화력에 기인한 결과라 판단된다.

표 12. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 아미노산 함량

Amino acids <sup>1)</sup>	Contents	
	mg/100g	% of sum all amino acids
Glu	736.08 ± 2.14 <sup>3)</sup>	29.09
Asp	559.61 ± 3.15	22.11
Ala	226.00 ± 1.54	8.93
Lys (EAA)	120.62 ± 1.05	4.77
Val (EAA)	111.49 ± 2.48	4.41
Gly	87.66 ± 0.98	3.46
Pro	85.61 ± 0.74	3.38
Leu (EAA)	82.02 ± 1.07	3.24
Ser	80.87 ± 2.06	3.20
Arg	70.96 ± 0.96	2.80
Thr (EAA)	69.30 ± 0.85	2.74
Tyr	66.01 ± 1.65	2.61
Ile (EAA)	65.37 ± 0.85	2.58
Phe (EAA)	54.18 ± 1.09	2.14
His (EAA)	51.37 ± 1.24	2.03
Cys	33.71 ± 0.99	1.33
Met (EAA)	29.85 ± 0.87	1.18
Sum of all amino acids	2497.00	100.00
Sum of EAA <sup>2)</sup>	548.20	23.08

<sup>1)</sup> Amino acids abbreviations follow IUPAC standard

<sup>2)</sup> Sum of essential amino acids

<sup>3)</sup> Mean ± standard deviation (n=3)

#### (5) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 각각 99.87mg/g, 25.02mg/g이었다(표 13). Chung(2012)의 연구에서 안토시아닌 색소가 함유되어 있는 블랙 초크베리와 블루베리 70% 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 117.20mg/g, 42.26mg/g이었고, 총 플라보노이드의 함량은 각각 32.50mg/g, 26.39mg/g인 것으로 보고되었다. 블랙 초크베리의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 함량보다 다소 높은 것으로 나타났고, 블루베리의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 본 연구 결과와 유사한 함량을 나타내었다. Park 등의 연구에서 안토시아닌 색소를 함유하고 항산화 효과 및 다양한 생리활성을 가진 오미자의 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량은 각각 9.53 mg/g, 3.97 mg/g인 것으로 보고되었으며, 색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량은 오미자에 비하여 매우 높은 수치로 추출물 내 풍부한 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물을 함유하고 있다고 판단된다.

표 13. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드

Contents	Total polyphenol		Total flavonoid	
	mg/g			
EHCS <sup>1)</sup>	99.87 ± 0.57 <sup>2)</sup>		25.02 ± 0.28	

<sup>1)</sup> Extracts husk and cob of Saekso 1

<sup>2)</sup> Mean ± standard deviation (n=3)

#### (6) 항당뇨 활성

색소 1호 포엽 및 속대 혼합 추출물의 항당뇨 활성을  $\alpha$ -amylase과  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 측정을 통하여 검증한 결과는 표 14와 같다. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성은 추출물 10mg/mL의 처리농도에서 각각 95.86%, 75.45%이었으며 양성 대조구로 사용된 acarbose의 저해활성과 유사한 값으로 우수한 저해율을 나타내었다. 천연물질 중 항당뇨 활성이 있는 화합물의 대부분은 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며 본 연구결과, 색소 1호 포엽 및 속대 추출물은 높은 항산화 활성과 항당뇨 활성을 가진 기능성 식품으로서의 활용가치가 높다고 판단된다.

표 14. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성

Contents (mg/mL)	$\alpha$ -Amylase (%)		$\alpha$ -Glucosidase (%)	
	1	10	1	10
Acarbose	61.10 ± 3.60 <sup>1)</sup>	95.37 ± 0.36	25.47 ± 1.97	75.45 ± 0.85
EHCS <sup>2)</sup>	58.28 ± 5.17	95.86 ± 0.34	30.30 ± 1.25	76.92 ± 2.59

<sup>1)</sup> Mean ± standard deviation (n=3)

<sup>2)</sup> Extracts husk and cob of Saekso 1

### 나. 리파아제 저해활성 및 3T3-L1 지방전구세포에서의 지방분화 억제효과

#### (1) 리파아제 저해활성

색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 lipase저해 활성에 미치는 영향은 추출물의 농도에 따라 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(표 15). 추출물의 100, 500, 1,000 $\mu$ g/mL 농도처리구에서 양성대조군인 orlistat 보다 높은 저해 활성을 보였으며, 추출물과 orlistat의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 320, 880 $\mu$ g/mL로 orlistat과 비교하였을 때 높은 저해활성을 나타내었다. Pancreatic lipase는 triacylglycerol을 2-monoacylglycerol과 fatty acid로 분해하는 효소로 이 효소의 활성이 저해되면 triacylglycerol의 분해가 감소되고 지방질의 흡수가 감소되어 비만 예방 및 완화 효과를 기대할 수 있으며 최근 비만 치료를 위한 방법으로서 pancreatic lipase inhibitor가 사용되고 있다.

표 15. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 lipase저해 활성

Samples ( $\mu$ g/mL)	Pancreatic lipase inhibition (%)					IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup>
	100	250	500	1000	2500	
Orlistat	11.52 ± 2.33 <sup>2)a3)</sup>	-	40.38 ± 1.16 <sup>b</sup>	67.81 ± 0.77 <sup>c</sup>	100.00 ± 0.08 <sup>d</sup>	880
Extracts	36.84 ± 2.54 <sup>a</sup>	45.48 ± 3.48 <sup>b</sup>	77.37 ± 4.69 <sup>a</sup>	90.14 ± 9.02 <sup>a</sup>	-	320

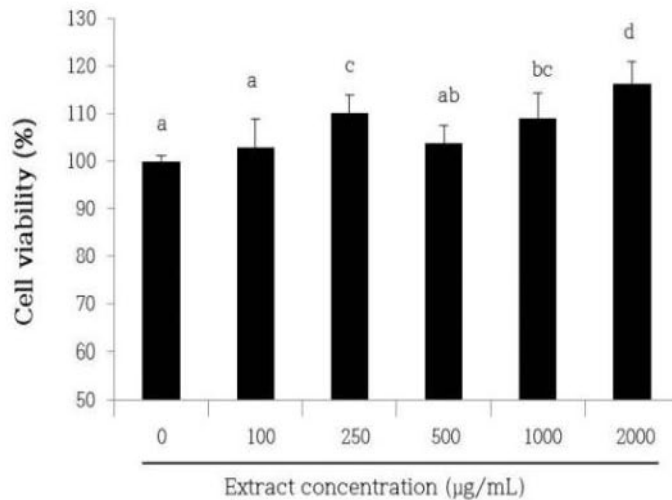
<sup>1)</sup> IC<sub>50</sub>: The half maximal inhibitory concentration.

<sup>2)</sup> Value are mean ± SD (n=3).

<sup>3)</sup> Values with different superscripts within a column indicate significant difference (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

### (2) 추출물의 세포 독성 평가

색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 세포독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 WST-1 assay를 수행하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 96 well plate에 1×10<sup>4</sup>/well 세포수로 분주하여 배양한 후 추출물을 각각 농도별 (0, 100, 250, 500, 1000, 2000 $\mu$ g/mL)로 24시간 동안 처리하여 세포독성을 평가한 결과, 추출물의 모든 처리농도에서 3T3-L1 지방전구세포의 세포 생존율에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(그림 7).



(Each bar represents the mean ± SD (n=3). Bars with different letters in the same time are significantly different at p<0.05.)

그림 7. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 지방전구세포에서의 세포독성

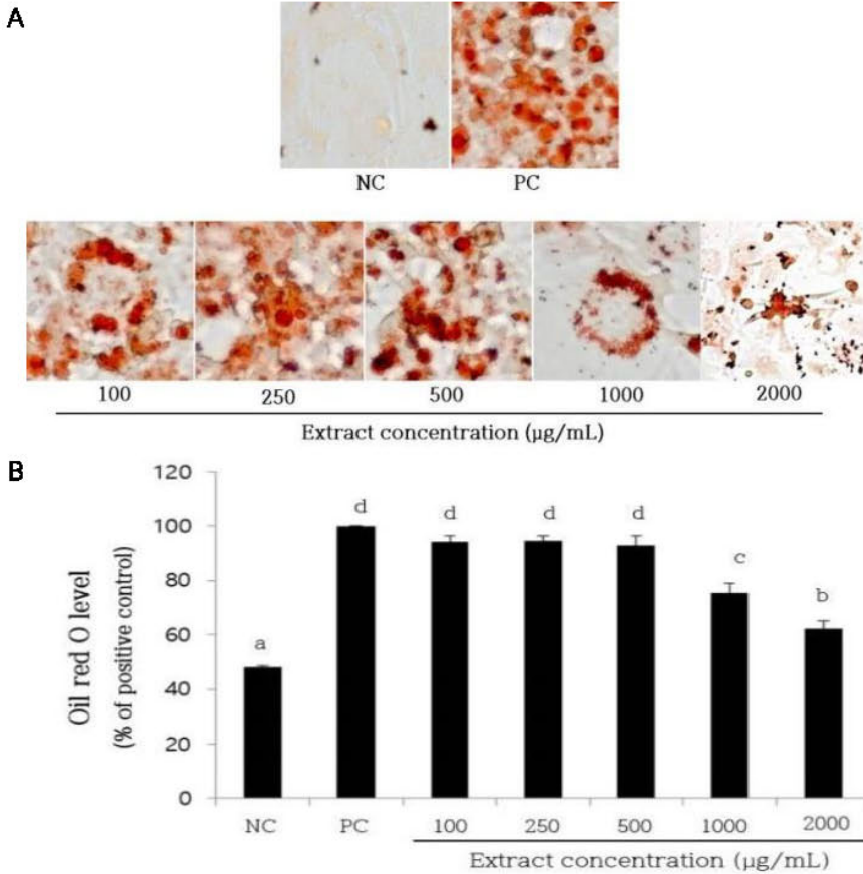
### (3) 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 3T3-L1 지방전구세포 분화에 미치는 영향

분화된 3T3-L1 지방전구세포를 Oil Red O로 염색하고 광학현미경을 통해 관찰한 결과는 그림 8(A)와 같다. 3T3-L1 지방전구세포에서 축적된 lipid droplet은 phospholipid monolayer에 의해

들러싸인 중성지방으로 이 중성지방과 cholesterol ester만 Oil red O로 염색이 되고 그 외의 유리 지방산과 인지질은 염색이 되지 않는다. 따라서 Oil red O염색을 통해 세포 내 중성지방을 확인하고 축적된 lipid droplet을 관찰할 수 있다. 또한, 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정에서 생성되는 lipid droplet는 PPAR $\gamma$ 와 같은 중요한 adipogenic transcription factor들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 색소 1호 포엽과 속대 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 양성대조군은 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되었으나 색소1호 포엽 및 속대 추출물의 처리에 의해 농도 의존적으로 lipid droplet의 형성이 억제되는 것으로 나타났다. 염색된 lipid droplet을 isopropyl alcohol 용액으로 용해하고 510nm에서 흡광도를 측정하여 양성대조군에 대비한 지방 축적 정도를 분석한 결과, 추출물의 처리로 인하여 지방세포 분화 및 지방생성이 억제되는 것을 확인하였고, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 양성대조군에 대비하여 추출물의 1,000 $\mu$ g/mL와 2,000 $\mu$ g/mL 농도에서 각각 19.19  $\pm$  3.70%, 33.30  $\pm$  3.23%로 세포 내 중성지방이 유의하게 감소된 것으로 나타났다 (그림 8(B)). 본 실험결과를 통하여 추출물이 농도 의존적으로 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 및 지방생성을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

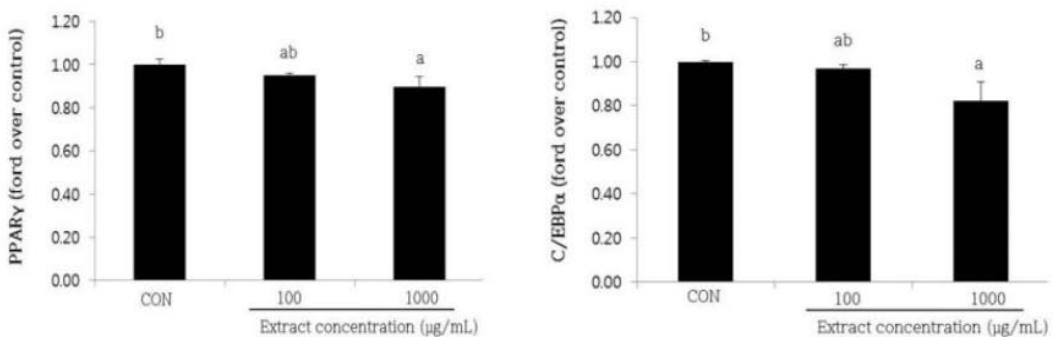
#### (4) 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 유전자 발현에 미치는 영향

색소 1호 포엽 및 속대 추출물에 의한 지방세포형성 억제 효과를 확인하기 위해 지방세포 분화 억제활성 측정방법과 동일한 방법으로 세포를 배양하고 추출물을 농도별로 처리한 후, 분화를 유도하고 추출물을 처리하지 않는 대조군과 추출물을 처리한 실험군의 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 유전자 발현량을 측정하였다. Adipogenesis는 지방전구세포가 분화되는 과정을 거쳐 지방세포로 성숙되는 과정을 의미한다. 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정에는 여러 종류의 adipogenic factor들이 관여하고 지방세포 특이적 유전자들의 발현이 유도된다고 알려져 있다. Adipogenesis가 유도되는 과정에서 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 는 중추적인 역할을 하는 전사인자로 지방세포가 분화된 상태를 유지하는 필수 인자인 PPAR $\gamma$ 는 adipogenesis를 총괄적으로 조절하는 역할을 하며, C/EBP $\alpha$ 는 PPAR $\gamma$ 의 활성화 및 지속적인 유지작용을 통하여 지방세포의 말기 분화과정을 촉진하고 성숙한 지방세포 생성을 위한 인슐린 감수성에 중요한 역할을 한다. C/EBP $\alpha$ 가 제거된 돌연변이 동물모델의 간과 지방 세포에서 지질을 축적하지 못하는 것으로 보고되었다. 따라서 지방세포가 분화하는 과정에 관여하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  등과 같은 전사인자들의 활성 억제는 효과적인 비만억제 및 비만 관련 대사질환의 치료와 예방에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Real-time PCR를 실시하여 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  유전자 발현량을 측정한 결과, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군에서는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 유전자 발현이 증가하였으며, 추출물 처리에 의해 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 유전자 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 9). 이는 Oil red O 염색을 통하여 확인된 중성지방 생성 감소와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic factor인 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  유전자 발현을 억제시킴으로써 세포 내 lipid droplet와 중성지방의 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킨 것으로 판단된다.



(Intracellular lipids were stained with Oil Red O and the cells were observed by the microscope (400 ×)(A), Oil Red O dye was dissolved in isopropanol and detected at 510nm(B). Each bar represents the mean ± SD (n=3). Bars with different letters in the same time are significantly different at p<0.05.)

그림 8. 섶소 1호 포엽 및 속대 추출물의 3T3-L1 지방 세포에서 지질 축적 억제효과

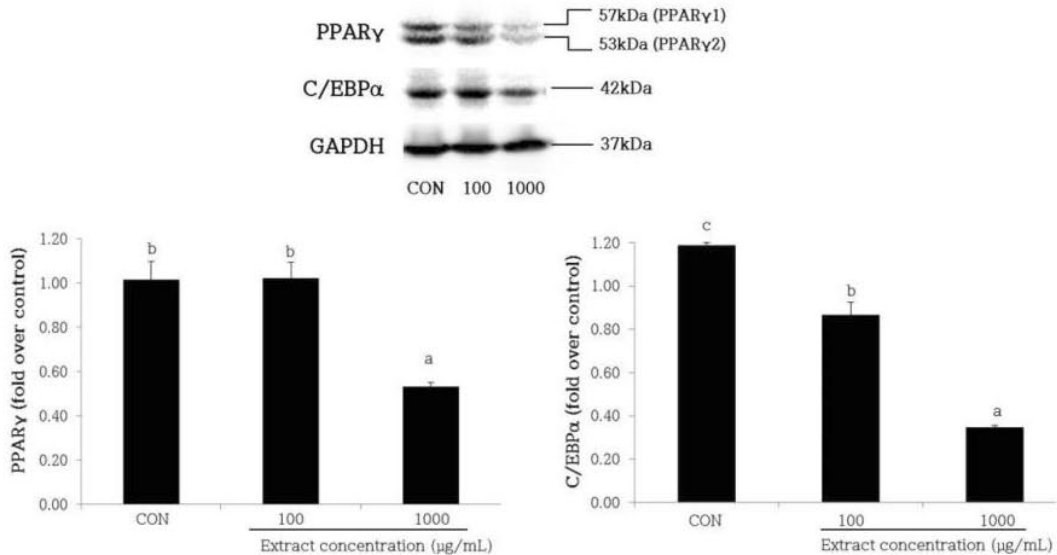


(CON: differentiated adipocyte, Each bar represents the mean ± SD (n=3). Bars with different letters in the same time are significantly different at p<0.05.)

그림 9. 섶소 1호 포엽 및 속대추출물의 3T3-L1 지방 세포에서 PPAR $\gamma$  와 C/EBP $\alpha$  유전자 발현량

(5) 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  단백질 발현에 미치는 영향

색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하여 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  단백질 발현량을 측정된 결과, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군에서는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 단백질 발현이 증가하였으며, 추출물 처리에 의해 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 단백질 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 10). 지방세포의 분화가 시작되면 인슐린과 같은 호르몬에 의해 분화 초기에 C/EBP $\beta$ 가 발현되는데 이는 retinoid X receptor와 heterodimer의 형성과 관련된 표적 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 를 활성화 시켜 다양한 지방 특이적 유전자의 발현을 유도한다. 이러한 전사인자들의 활성화를 통해 지방세포의 분화가 진행되고 중성지방 내 lipid droplet의 수와 크기가 증가하여 지방세포의 분화가 완료된다. 현재 지방세포 분화 관련 전사인자를 제어하여 비만을 예방하고 조절하는 연구가 진행되고 있으며 본 연구에서 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic factor인 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 유전자 및 단백질 발현을 억제시킴으로써 항비만 효과를 가진 기능성 식품으로서의 활용 가치가 높을 것이라 판단된다.



(CON: differentiated adipocyte, Each bar represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

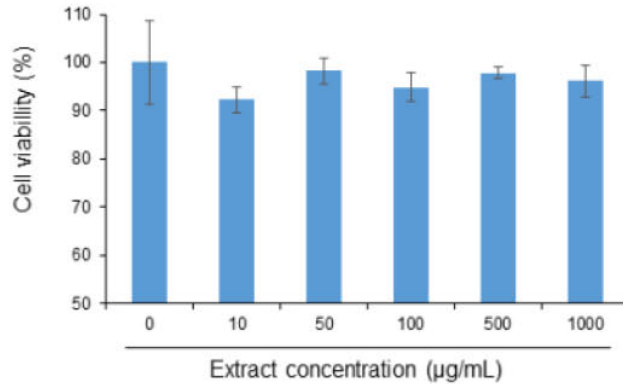
Bars with different letters in the same time are significantly different at  $p < 0.05$ .)

그림 10. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 3T3-L1 지방 세포에서 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  단백질 발현량

다. 올레산 유도 비알콜성 지방간세포에서 지질 축적 억제 효과

(1) 세포독성 측정

색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 HepG2 간암세포에 대한 세포독성 검정을 위해 EZ-CYTOX assay를 수행하였다. HepG2 세포를 96well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well의 농도로 분주하여 배양한 한 후 농도별 추출물을 24시간 동안 처리하여 세포독성을 평가한 결과, 1,000 $\mu$ g/mL이하의 농도에서 HepG2 간암세포의 세포 생존율에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(그림 11).

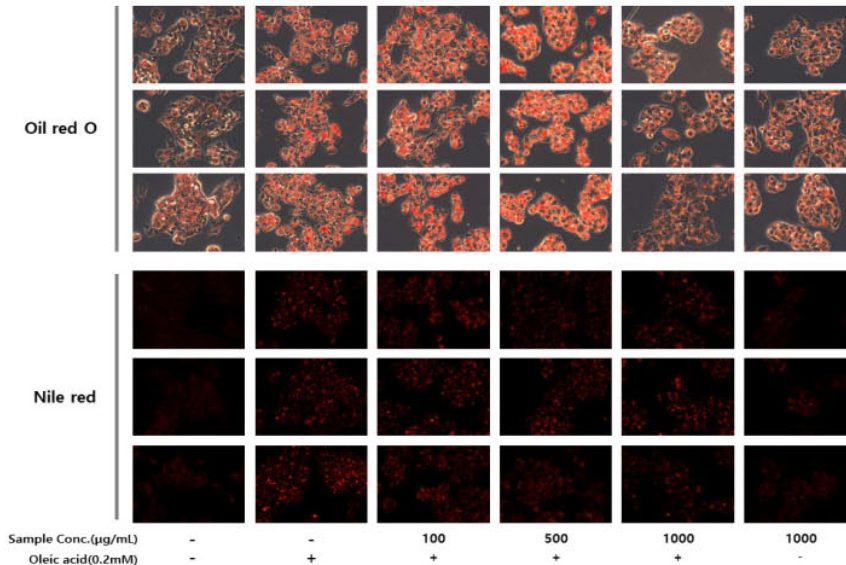


(Each bar represents the mean  $\pm$  SD (n=3).)

그림 11. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 HepG2에서의 세포독성

## (2) 중성지방 축적 억제 효과

HepG2 세포에 oleic acid와 색소 1호 포엽 및 속대 추출물 100, 500, 1,000µg/mL을 처리하였으며, Oil Red O와 Nile Red 시약으로 지방을 염색하고 광학 및 형광현미경을 이용하여 지방의 축적을 관찰하였다. 실험 결과, Oil Red O 염색을 통하여 oleic acid 처리에 의한 지방생성이 증가된 것을 확인하였으며 추출물 1,000µg/mL 농도에서 지방생성이 21.85% 감소된 것으로 나타났다(그림 12, 13). Nile Red 염색을 통해 염색된 HepG2 세포내 생성된 지방구는 형광현미경 관찰을 통해 확인 되었으며, oleic acid 처리로 인하여 지방이 형성된 HepG2 세포에서 추출물 500, 1,000µg/mL 처리에 의하여 증가된 지방이 감소된 것으로 나타났다(그림 12).



(Cells were stained with Oil Red O and Nile Red reagent.)

그림 12. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 처리에 의한 HepG2 세포에서 지질 축적 억제

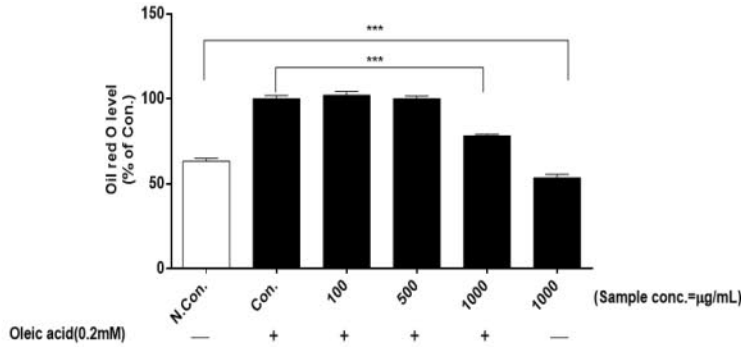


그림 13. 색소 1호 포염 및 속대 추출물의 처리에 의한 HepG2 세포에서 Oil red O levels

### (3) Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정

색소 1호 포염 및 속대 추출물에 의한 HepG2 세포 내 지질 축적의 변화를 확인하기 위하여 배양된 세포에 oleic acid로 지질 축적을 유도하고 추출물을 처리하지 않는 대조군과 추출물을 처리한 실험군의 지방합성 및 축적에 관련된 유전자 발현량을 측정하였다(그림 14). 본 연구에서 색소 1호 포염 및 속대 추출물이 지방대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Real-time PCR를 실시하여 각각의 유전자 발현량을 측정된 결과, oleic acid에 의하여 지질 축적이 유도된 대조군에 비하여 모든 추출물 처리군의 SREBP-1c와 SREBP-1a 유전자 발현량이 유의적으로 감소되었다. 간 조직 내 지방 합성과 관련된 효소들의 유전자 발현량을 측정된 결과, ACC는 추출물의 500μg/mL 농도에서 대조군에 비하여 유의적인 감소를 나타내었으며, FAS는 추출물의 처리 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났으나 control과 농도별 처리군 간의 유의적인 차이는 없었다. SCD는 추출물 처리군에서 증가하는 경향을 보였고, 간세포 내로 지방산을 이동시키는 지방산 특이 수송체인 CD36은 지질 축적이 유도된 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며 추출물 처리군 별로 실험적 오차가 큰 것으로 나타났다. 색소 1호 포염 속대 추출물의 처리로 SREBP-1c와 SREBP-1a의 발현량의 억제와 이에 따른 지방 합성 관련 효소들과의 상관관계에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. 간에서 지질대사에 관여하며 지방산 산화와 관련된 유전자 전사의 주된 조절 인자로 작용하는 PPARα는 주로 간세포에 분포하는 전사인자로서 CPT-1의 발현을 증가시켜 지방산의 β-oxidation을 촉진시킨다. CPT-1는 PPARα의 표적유전자로 미토콘드리아 내부로의 지방산 이동에 관여하며 PPARα에 의해 발현량이 증가되어 세포 내 지방 축적을 억제하는 역할을 한다.

간에서의 PPARα의 활성화로 인한 CPT-1의 증가는 지방산의 β-oxidation를 촉진시킴으로써 중성 지방의 분해를 증가시키고 혈중 중성지방 농도의 개선의 효과를 나타낸다. Oleic acid에 의하여 지질 축적이 된 HepG2 세포에서 색소 1호 포염 및 속대 추출물의 처리로 인하여 PPARα 유전자의 발현은 추출물의 처리 농도별로 증가하는 경향을 나타내었으나 시료를 처리하지 않은 대조군과의 유의적인 차이는 없었다. CPT-1 유전자의 발현은 추출물의 100 μg/mL 처리군에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였으나 처리농도별로 발현량이 감소하는 경향을 보였다. 색소 1호 포염 및 속대 추출물의 처리로 인한 PPARα와 CPT-1 유전자 발현량 증가 효과는 다소 미비한 것으로 판단된다. PPARγ와 C/EBPα는 지방세포 분화과정의 중추적인 역할을 하는 전사인자로서 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되어 세포 내 중성지방을 축적시키는 역할을 한다. 지방세포가 분화하는 과정에 관여하는

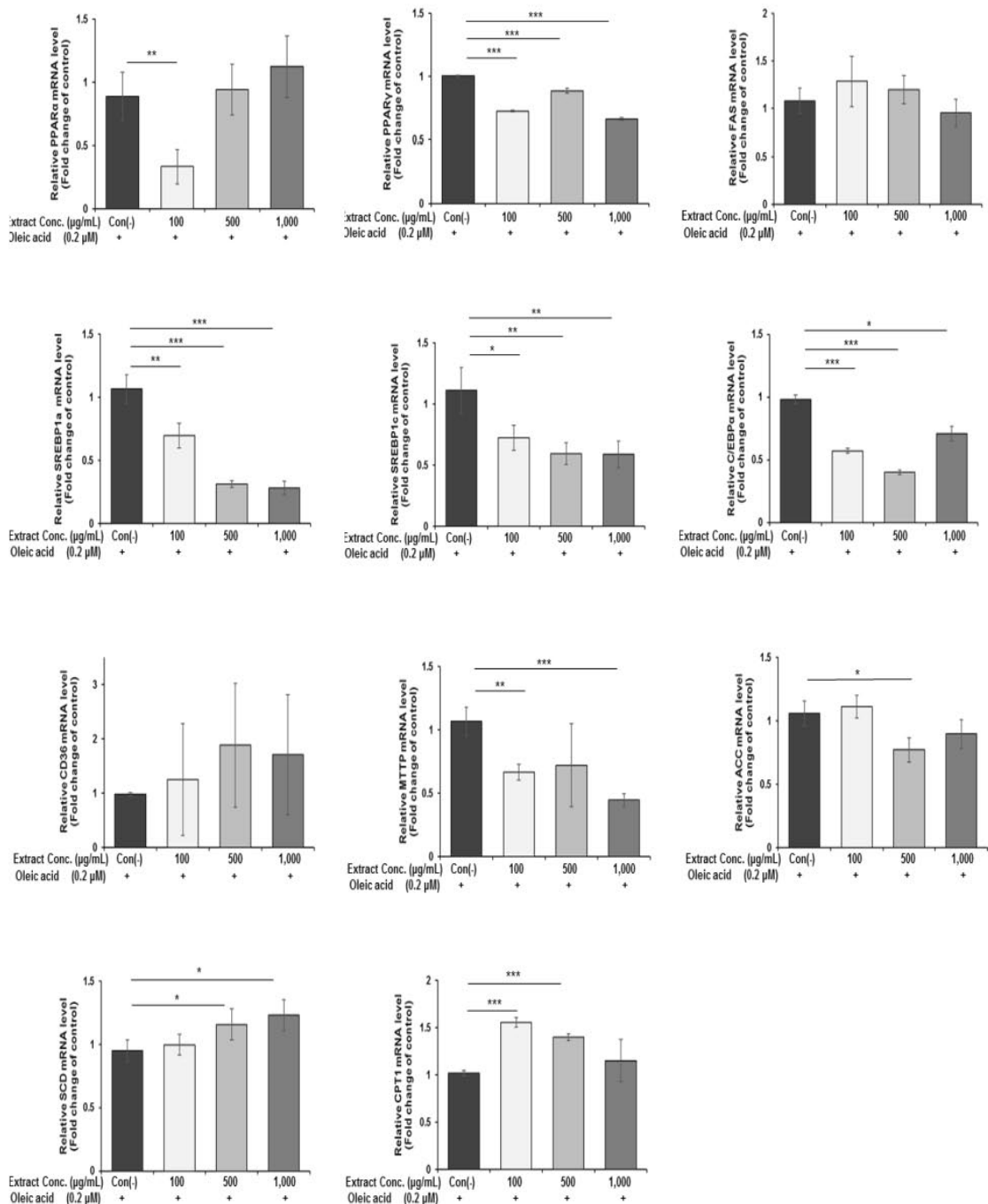
PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  등과 같은 전사인자들의 활성 억제는 세포 내 지방 축적을 억제하는 역할을 하는 것으로 판단된다. 앞서 연구에서 색소 1호 포엽 및 속대 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군에 비하여 추출물 처리군의 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 유전자 발현을 유의적으로 감소시킨 것으로 나타났다. 본 연구에서 지질 축적이 유도된 HepG2 세포에서 추출물 처리로 인하여 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  유전자 발현량이 추출물 처리 농도에 의존적으로 감소하는 경향은 없었지만 모든 추출물 처리군에서 대조군에 비하여 유의적으로 감소된 것을 확인하였다. 따라서, 색소 1호 포엽 및 속대 추출물은 지방분화세포에서 뿐만 아니라 간 조직 세포 내에서도 지방 대사에 관여하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  유전자의 활성을 억제하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

#### (4) Western blot을 통한 단백질 발현 측정

색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 간 조직 내에서 지방의 합성 및 축적 등 지질대사와 관련된 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하여 p-AMPK, p-SREBP1, PPAR $\alpha$ , FAS의 단백질 발현량을 측정하였다(그림 15). 색소 1호 포엽 및 속대 추출물 처리 30분 후 HepG2 세포에서 단백질을 추출하여 p-AMPK, p-SREBP1 단백질 발현량을 측정한 결과, p-AMPK는 감소하는 경향을 나타내었으나 지질 축적이 유도된 NC와의 유의적인 차이는 없었으며, p-SREBP1은 추출물의 농도가 증가함에 따라 NC에 비하여 단백질 발현량이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다. 또한 색소 1호 포엽 및 속대 추출물 처리 24시간 후 HepG2 세포에서 단백질을 추출하여 PPAR $\alpha$ , FAS 단백질 발현량을 측정한 결과, PPAR $\alpha$ 와 FAS의 발현량은 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. RT-PCR을 통한 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 HepG2 세포에서의 PPAR $\alpha$  유전자 활성 효과는 미비한 것으로 조사되었으며 PPAR $\alpha$  단백질 발현량에서도 농도에 따라 오히려 감소하는 경향을 나타내어 추출물로 인한 간 세포에서의 PPAR $\alpha$  활성 효과는 낮은 것으로 판단된다.

인산화된 AMP-activated protein kinase(AMPK)가 활성화되면 SREBP-1c의 발현을 감소시킨다. AMPK는 간과 골격근을 포함한 전신 지질 대사를 조절하는 역할을 하며 이와 관련하여 에너지 균형을 유지시키는 역할을 하는데, 활성화된 AMPK는 지방산의 산화를 촉진시켜 포도당이 세포 내로 유입을 유도하여 에너지원으로 사용할 수 있게 한다. AMPK의 활성화는 간에서 지질 대사에 관여하는 주요 인자인 SREBP-1c의 발현을 억제하고 FAS 또는 ACC와 같은 지방합성 효소를 불활성화 시킴으로써 지방산의  $\beta$ -oxidation을 촉진시킨다. FAS의 불활성화는 지방산 및 중성지방합성의 억제와 관련이 있으며 이로 인하여 세포 내 중성지방의 분해가 촉진되고 혈중 중성지방 농도의 개선 효과를 기대할 수 있다.

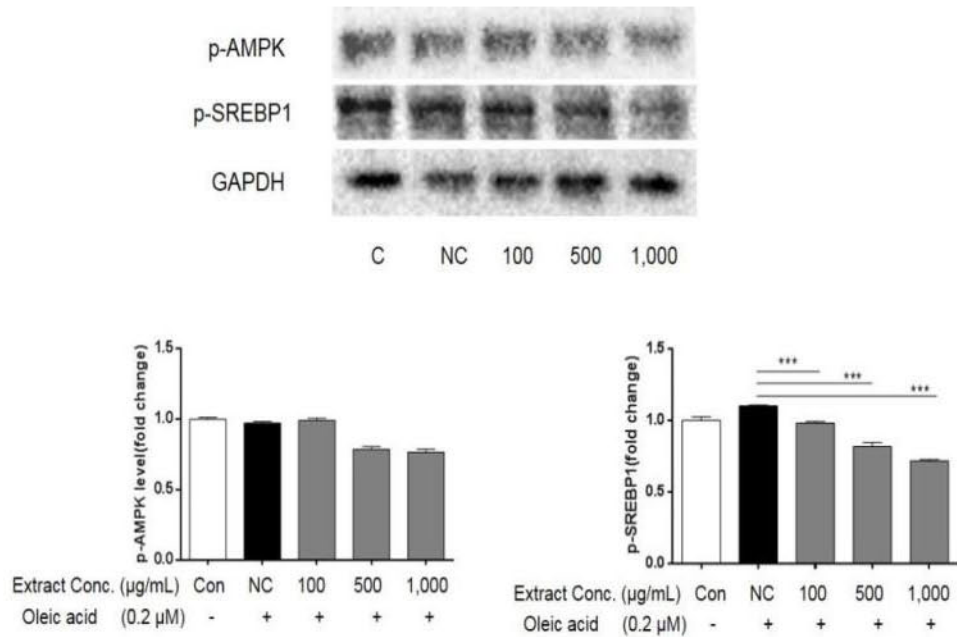
본 연구 결과 색소 1호 포엽 및 속대 추출물 처리에 의한 HepG2 세포 내에서의 AMPK 단백질 활성에 대한 연관성은 낮은 것으로 나타났으나 주로 간에서 지방산 및 중성지방의 합성에 관여하는 SREBP1의 단백질 발현은 지질 축적이 유도된 NC에 비하여 추출물의 처리 농도에 따라 유의하게 감소되었음이 확인되었다. 또한, 지방산의 생합성 경로에 관여하는 주요 효소인 FAS의 단백질 발현량은 지질 축적이 유도된 NC에 비하여 모든 처리 농도에서 현저하게 감소된 것이 확인되었다. 따라서 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 oleic acid로 지질 축적이 유도된 HepG2 세포에서 SREBP1 단백질 발현을 억제시키고 이에 따라 지방합성에 관여하는 효소인 FAS 단백질 발현을 억제시켜 세포 내 지질 축적을 감소시킨 것으로 판단된다.



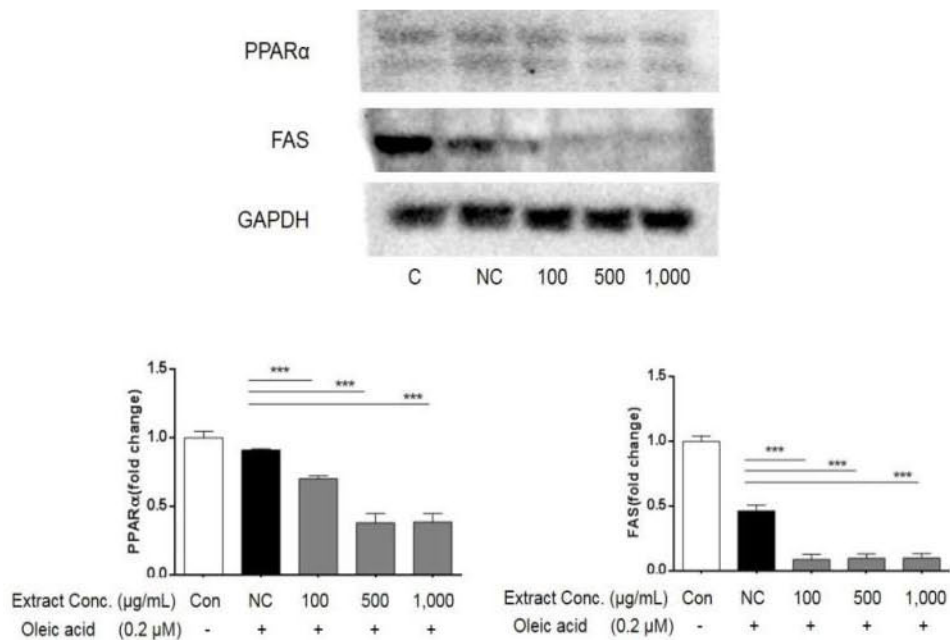
(CON: oleic acid treatment group. Each bar represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical significance was determined as \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 compared to oleic acid treated cells.)

그림 14. HepG2 세포에서 mRNA 발현에 대한 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 효과

A



B



(CON: normal cell group, NC: oleic acid treatment group. Each bar represents the mean ± SD (n = 3).

Statistical significance was determined as

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 compared to oleic acid treated cells.)

그림 15. HepG2 세포에서 단백질 발현에 대한 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 효과

라. 자색옥수수 포엽과 속대 추출물의 급성 간독성 보호효과 구명

SD-rat 6주령 대상으로 4일간 추출물을 경구투여하고, 아세트아미노펜으로 급성간독성유발 후, 혈청 및 조직을 분석하였다.

표 16. 시험군 분류와 투여량

Experimental groups	Composition of experimental
Normal (N)	1% tween 80
Control (C)	1% tween 80 + APAP <sup>1)</sup> 1.2 g/kg
Positive control (PC)	Sylimarin + APAP 1.2 g/kg
Treatment 1 (T1)	EHCP 0.1 mg/kg + APAP 1.2 g/kg
Treatment 2 (T2)	EHCP 1 mg/kg + APAP 1.2 g/kg
Treatment 3 (T3)	EHCP 10 mg/kg + APAP 1.2 g/kg
Treatment 4 (T4)	EHCP 100 mg/kg + APAP 1.2 g/kg

\* APAP: 아세트아미노펜. EHCP: 자색옥수수 포엽, 속대추출물

SD-rat의 체중 측정결과, 정상군이 가장 높았으며, 나머지 처리군은 비슷한 수준이었다. 간의 무게의 경우, 정상군이 가장 낮았으며, 추출물 처리약량이 증가할수록 간의 무게는 감소하는 것으로 나타났다(표 17).

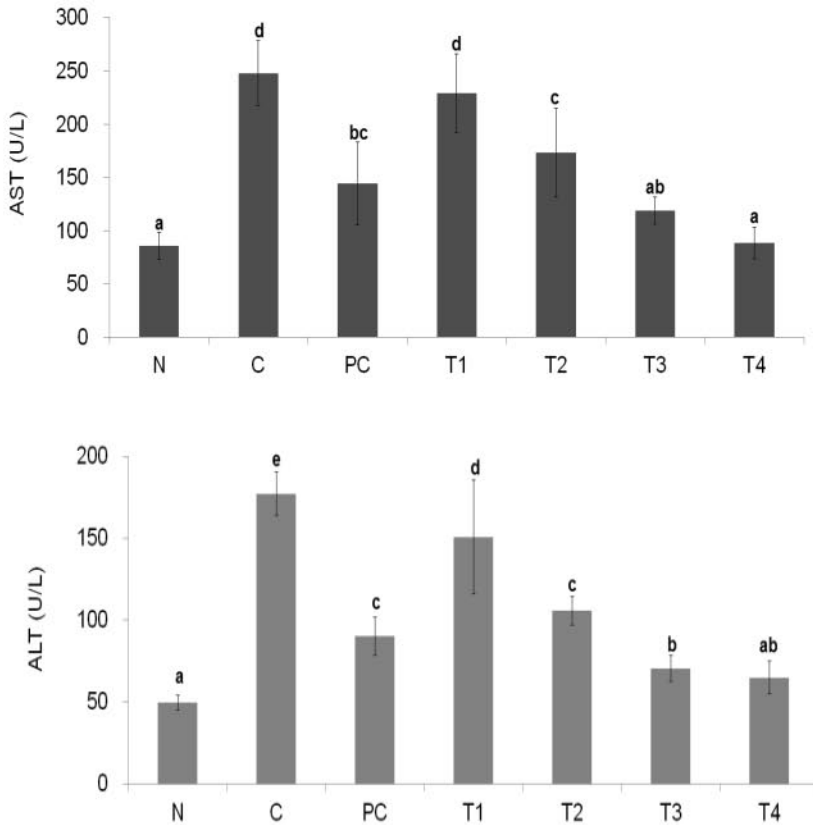
표 17. 체중, 간과 신장 무게 변화

Group	Body weight gain (g/day)	Liver (g)	Kidney (g)
N	22.44 ± 4.25 <sup>1) b2)</sup>	7.77 ± 0.49 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.14
C	21.33 ± 2.74 <sup>ab</sup>	8.46 ± 0.65 <sup>ab</sup>	1.89 ± 0.14
PC	17.40 ± 3.60 <sup>a</sup>	8.77 ± 1.00 <sup>bc</sup>	2.01 ± 0.18
T1	20.90 ± 7.26 <sup>ab</sup>	9.58 ± 1.11 <sup>c</sup>	2.05 ± 0.21
T2	18.30 ± 2.63 <sup>a</sup>	8.69 ± 0.90 <sup>ab</sup>	1.95 ± 0.18
T3	21.00 ± 2.94 <sup>ab</sup>	8.60 ± 0.97 <sup>ab</sup>	1.94 ± 0.10
T4	18.70 ± 2.16 <sup>ab</sup>	7.99 ± 0.91 <sup>ab</sup>	1.95 ± 0.25

<sup>1)</sup> Values are mean ± SD of 10 rats per each group.

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within a column indicate significant difference (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

시험종료 후, 복대정맥으로부터 채취한 혈청을 간독성지표인 AST와 ALT를 분석한 결과, 대조군에서 모두 통계적으로 가장 높은 함량이 측정되었으며, 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 처리량이 증가할수록 AST와 ALT의 함량은 낮아지는 경향을 보였다. AST함량의 경우 T4 처리군이 정상군과 비슷한 수치를, ALT의 경우 T3와 T4의 함량이 정상군과 비슷한 수치를 나타내었다(그림 16).



(Each bar represents the mean  $\pm$  SD of 10 rats. Bars with different letters in the same time are significantly different at  $p < 0.05$ .)

그림 16. 자색옥수수 추출물 투여에 의한 혈중 AST 및 ALT농도 변화

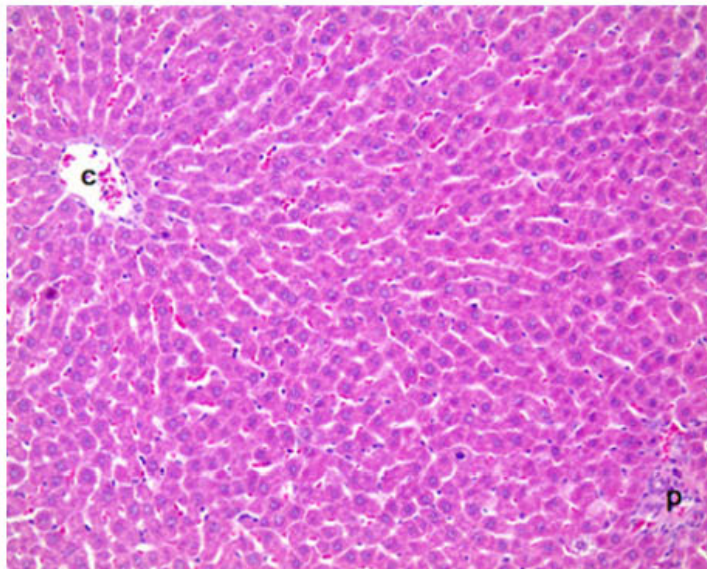
아세트아미노펜을 투여한 랫드의 경우 간에서 주요 병변으로는 간문맥주변부 간세포의 괴사와 단핵구 염증세포 침윤이 관찰되었다(그림 16~17). 부형제투여군(C군)의 경우 4/5예에서 중심정맥주변 간세포의 괴사와 염증이 확인되었으며, 이 중 3/4예에서는 아주 미약한 정도로, 1/4예에서는 미약한 정도로 관찰되었다.

자색옥수수 추출물 투여군(T1~T4)의 경우 0.1mg/kg투여군(T1군)과 1.0mg/kg투여군(T2군)에서는 검사한 5마리 모두에서 중심정맥주변에 괴사와 염증소견이 관찰되었으며, 그 정도는 아주 미약에서 미약한 수준으로 부형제투여군의 결과와 비교하였을 때 아세트아미노펜 투여에 의한 염증에

대하여 빈도와 정도에 있어 완화하는 효과는 나타나지 않았다(표 19). 하지만 10mg/kg (T3 군)과 100mg/kg 투여군 (T4 군)에서는 자색옥수수 추출물이 아세트아미노펜에 의해 유도된 염증이 현저히 완화되었음을 확인하였다. 10mg/kg 투여군의 경우 1/5에에서만 아주 미약한 정도의 염증이 관찰되었으며, 100mg/kg 투여군에서는 염증소견이 검사한 모든 개체에서 확인되지 않았다(표 18).

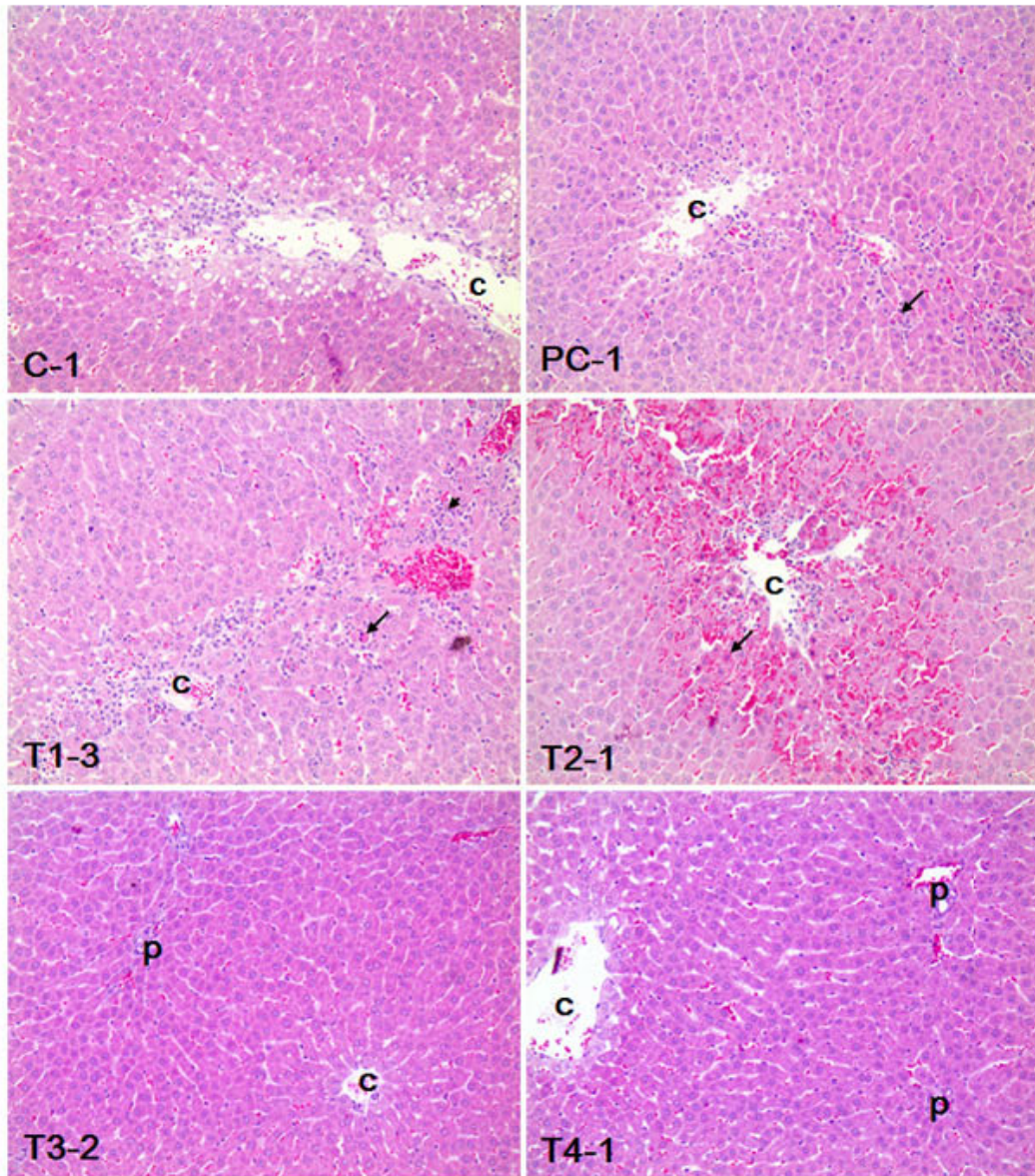
표 18. 각 실험군의 간 조직병리학적 결과 요약

CLASS No treatment			Acetoaminophen treated groups					
GROUPS		N	Vehicle	Purple corn extract treatment			Sillmarin	
DOSE	TREATED	Normal	C	T1	T2	T3	T4	PC
No.	examined	5	5	5	5	5	5	5
No specific lesion		4(80.0)	1(20.0)	0(0.00)	0(0.00)	4(80.0)	5(100.0)	0(0.00)
Cell necrosis and inflammation, paracentral		1(20.0)	4(80.0)	5(100.0)	5(100.0)	1(20.0)	0(0.00)	5(100.0)
Grades: minimal (1+)		1	3	2	0	1	0	2
mild (2+)		0	1	3	5	0	0	3
Hemorrhage, centrilobular		0(0.00)	0(0.00)	1(20.0)	3(60.0)	1(20.0)	0(0.00)	0(0.00)
Grades: minimal (1+)		0	0	0	1	0	0	0
mild (2+)		0	0	0	1	1	0	0
moderate (3+)		0	0	1	1	0	0	0



Note the hepatic plates arranging from portal triad (p) to central vein (c). Acetoaminophen targets the hepatocytes around the central veins, resulting cell necrosis and inflammation. H&E, Mag. =X200.

그림 16. 정상군의 간 조직 (N-3)



(C-1: 아세트아미노펜 처리군, PC-1: 양성대조군, T1~T4: 자색옥수수 추출물 투여군)

Note the hepatocytic necrosis (arrows) and inflammatory cell infiltration (the cells with a small dark nucleus) around the central veins (c). In cases, centrilobular hemorrhage was also observed (T2-1). In the livers with treatment of 10 mg/kg PCE (T3 group) and 100 mg/kg PCE (T4 group), the hepatocytic injury was considerably attenuated. H&E, Mag. = 200 for all.

그림 17. 아세트아미노펜 처리군의 간조직 변화

#### 마. 자색옥수수 포엽과 속대 추출물의 에탄올 투여 간독성 보호효과 구명

SD-rat 5주령 대상으로 6주간 추출물과 에탄올을 같이 경구투여하고, 시험종료 후, 혈청 및 간 조직을 분석하였다.

표 19. 시험군 분류 및 투여량

Experimental groups	Composition of experimental
Normal (N)	water
Control (C)	25% Ethanol
Positive control (PC)	UDCA <sup>1)</sup> + 25% Ethanol
Treatment 1 (T1)	EHCP 10 mg/kg + 25% Ethanol
Treatment 2 (T2)	EHCP 50 mg/kg + 25% Ethanol
Treatment 3 (T3)	EHCP 100 mg/kg + 25% Ethanol
Treatment 4 (T4)	EHCP 200 mg/kg + 25% Ethanol

<sup>1)</sup> UDCA: ursodeoxycholic acid

각 처리별로 체중을 매주 측정된 결과, 대조군은 통계적으로 감소하였으며, T2 처리군을 제외하고는 정상군과 비슷한 수준을 나타내었다. 간의 무게는 정상군이 가장 높았으며, 대조군과 PC, T1 처리군은 통계적으로 낮은 것으로 나타났다.

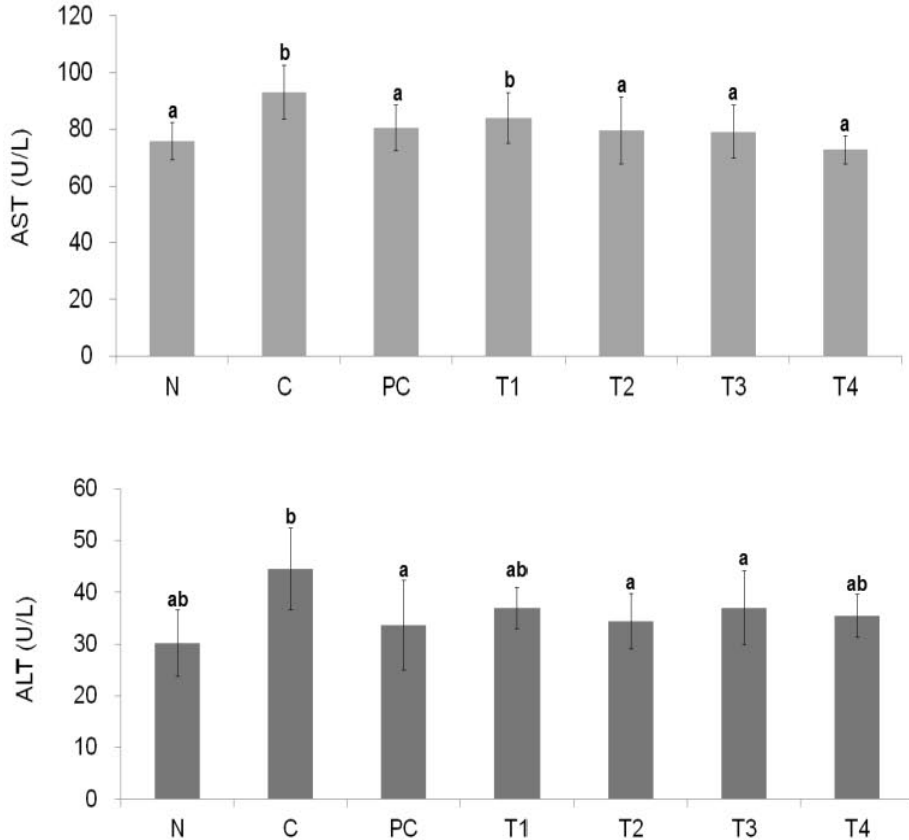
표 20. 시험군별 체중, 간, 신장 무게

Group	Body weight gain (g/day)	Liver (g)	Kidney (g)
N	5.63 ± 0.93 <sup>1)ab)</sup>	2.81 ± 0.21 <sup>b)</sup>	2.53 ± 0.28 <sup>b)</sup>
C	5.01 ± 0.49 <sup>a)</sup>	2.50 ± 0.07 <sup>a)</sup>	2.30 ± 0.14 <sup>a)</sup>
PC	5.46 ± 0.77 <sup>ab)</sup>	2.54 ± 0.07 <sup>a)</sup>	2.44 ± 0.23 <sup>a)</sup>
T1	5.16 ± 0.67 <sup>ab)</sup>	2.56 ± 0.14 <sup>a)</sup>	2.23 ± 0.16 <sup>a)</sup>
T2	5.84 ± 0.38 <sup>b)</sup>	2.79 ± 0.20 <sup>b)</sup>	2.45 ± 0.23 <sup>ab)</sup>
T3	5.37 ± 0.37 <sup>ab)</sup>	2.62 ± 0.12 <sup>ab)</sup>	2.39 ± 0.11 <sup>a)</sup>
T4	5.26 ± 0.38 <sup>ab)</sup>	2.67 ± 0.17 <sup>ab)</sup>	2.41 ± 0.21 <sup>ab)</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean ± SD of 10 rats per each group.

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within a column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

시험 종료 후, 복대정맥으로부터 채취한 혈청의 간독성지표인 AST와 ALT를 분석한 결과, 대조군에서 모두 통계적으로 가장 높은 함량이 측정되었으며, 처리군 모두 대조군보다는 낮고 정상군과 비슷한 수준으로 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 투여로 인해 알코올유발 간독성 보호 효과를 확인하였다.



Each bar represents the mean  $\pm$  SD of 10 rats. Bars with different letters in the same time are significantly different at  $p < 0.05$ .

그림 18. 자색옥수수 추출물 투여에 의한 혈중 AST 및 ALT 변화

#### 바. 지표성분 cyanidin 3-O-glucoside의 급성 간독성 보호효과

아세트아미노펜 간독성 유발 후 cyanidin 3-O-glucoside 처리에 따른 급성간독성 효과를 검증하였다. 지표성분의 경구투여 약량은 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물의 함유량(1.6%)를 계산하여 결정하였다. 체중과 간의 무게는 처리군별 차이가 없었으나, 신장의 경우 아세트아미노펜 유발 대조군 및 처리군에서 정상군 대비 유의적으로 증가하였다. 혈청분석결과, 간독성 지표로 측정되는 AST, ALT의 결과 대조군 대비 감소효과가 유의적으로 나타남을 확인하였고, 이러한 결과는 양성 대조군인 실리마린 결과와 유사하였다.

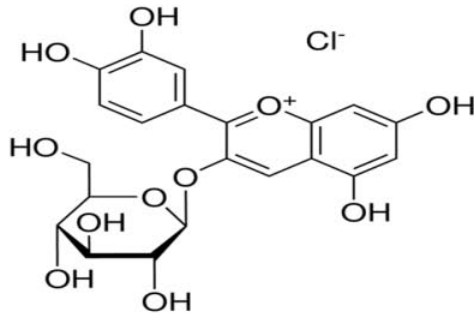


그림 20. Cyanidin-3-O-glucoside

표 21. 급성 간독성 보호효과 동물 실험 그룹의 구성

그룹	약량(mg/kg)	동물수
정상군(N)	0	8
대조군(C)	0	8
cyanidin 3-O-glucoside(PC)	1,6 mg/kg	8
양성대조군 Syllimarin(T1)	80 mg/kg	8

표 22. 시험군별 체중, 간, 신장 무게

Group	Body weight gain (g/day)	Liver (g)	Kidney (g)
N	6.89±0.49 <sup>1)a2)</sup>	7.76±0.46 <sup>a</sup>	2.03±0.17 <sup>a</sup>
C	6.86±0.75 <sup>a</sup>	8.64±0.14 <sup>a</sup>	2.48±0.35 <sup>b</sup>
PC	6.65±0.55 <sup>a</sup>	7.60±2.40 <sup>a</sup>	2.37±0.31 <sup>b</sup>
T1	7.14±0.78 <sup>a</sup>	8.83±0.35 <sup>a</sup>	2.34±0.20 <sup>b</sup>

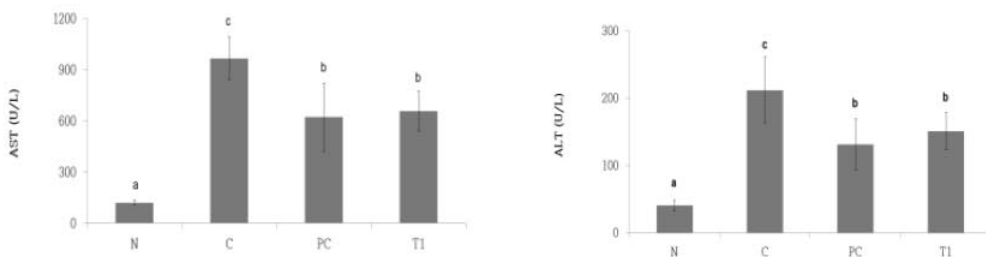


그림 21. 급성간독성유발 후 혈청분석 결과

아세트아미노펜 간독성 유발 후 cyanidin 3-O-glucoside 처리에 따른 SD-rat의 간조직을 H&E 염색 후 관찰한 결과, 양성대조군인 실리마린 투여군의 경우 5/6에서 중심정맥성 간세포의 변성과 2/6에서 국소성 간세포괴사가 관찰되었으며, vehicle 투여군과 비교하였을 때 병변의 정도와 수에 있어 다소 완화된 경향을 나타냈으나, 투여군에서는 중심정맥성 간세포변성소견이 군과 구별 없이

거의 대부분의 개체에서 관찰되었다. 아세트아미노펜을 투여한 vehicle 대조군에 비하여 자색옥수수 추출물 투여군의 경우 중심정맥주변의 간세포변성은 다소 완화된 듯하나, 간세포괴사소의 경우 오히려 심한 경우도 있고, 투여농도와의 상관성이 없어 아세트아미노펜 투여에 의해 유발된 간독성에 대한 완화효과는 정의하기 어려웠다.

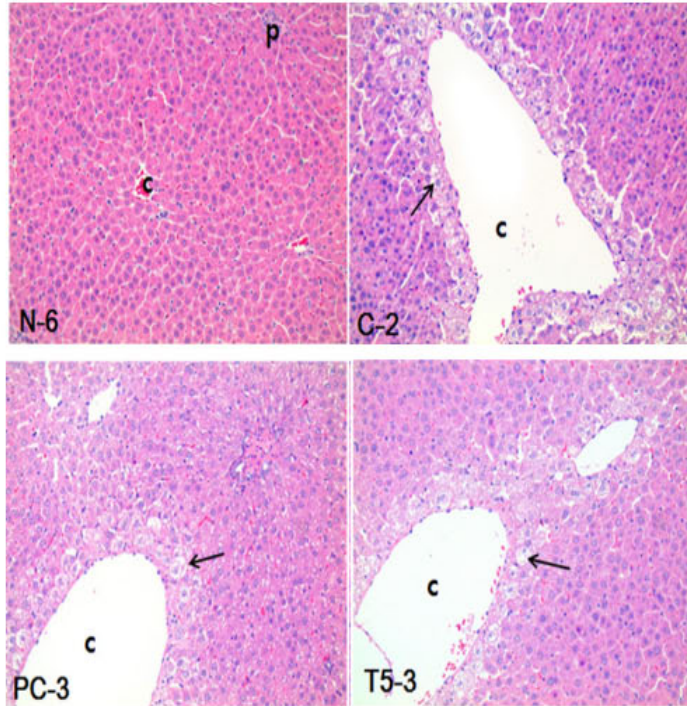


그림 22. 급성간독성유발 후 흰쥐의 간조직 관찰 결과

#### 사. 자색옥수수 추출물의 비알콜성 지방간증 개선효과

고지방고콜레스테롤 식이로 지방간증을 유도한 흰쥐에서의 간보호 효과를 확인한 결과, 대조군 대비 추출물 처리군의 간 및 부고환지방의 무게가 감소되었고, 혈청의 간독성지표인 AST 및 ALT 수치가 감소되었다. 또한 adiponectin 증가, 간조직의 catalase 효소활성 증가, leptin의 감소를 확인하였다.

표 23. 지방간증에 따른 간보호효과 동물실험 그룹의 구성

그룹	식이 및 약량(mg/kg)	동물수
정상군(N)	기본식이	8
대조군(C)	고지방고콜레스테롤 식이	8
자색옥수수포엽+속대 추출물(T1)	고지방고콜레스테롤 식이 + 5mg/kg	8
자색옥수수포엽+속대 추출물(T2)	고지방고콜레스테롤 식이 + 25mg/kg	8
자색옥수수포엽+속대 추출물(T3)	고지방고콜레스테롤 식이 + 125mg/kg	8
자색옥수수포엽+속대 추출물(T4)	고지방고콜레스테롤 식이 + 250mg/kg	8

표 24. 지방간증에 따른 간보호효과 동물 조직의 무게

Group	Kidney (g)	Liver (g)	Epididymal fat (g)
N	2.93 ± 0.25	10.75±1.36 <sup>(1)a2)</sup>	7.36±2.68 <sup>a</sup>
C	3.26±0.27	15.35±2.31 <sup>c</sup>	18.47±4.91 <sup>c</sup>
T1	3.22 ± 0.23	13.96±0.92 <sup>bc</sup>	12.28±2.79 <sup>b</sup>
T2	3.23 ± 0.25	13.76±1.08 <sup>bc</sup>	10.29±2.14 <sup>ab</sup>
T3	3.02 ± 0.30	12.57±1.76 <sup>ab</sup>	11.06±3.48 <sup>ab</sup>
T4	3.08 ± 0.26	12.61±2.06 <sup>ab</sup>	12.92±4.18 <sup>b</sup>

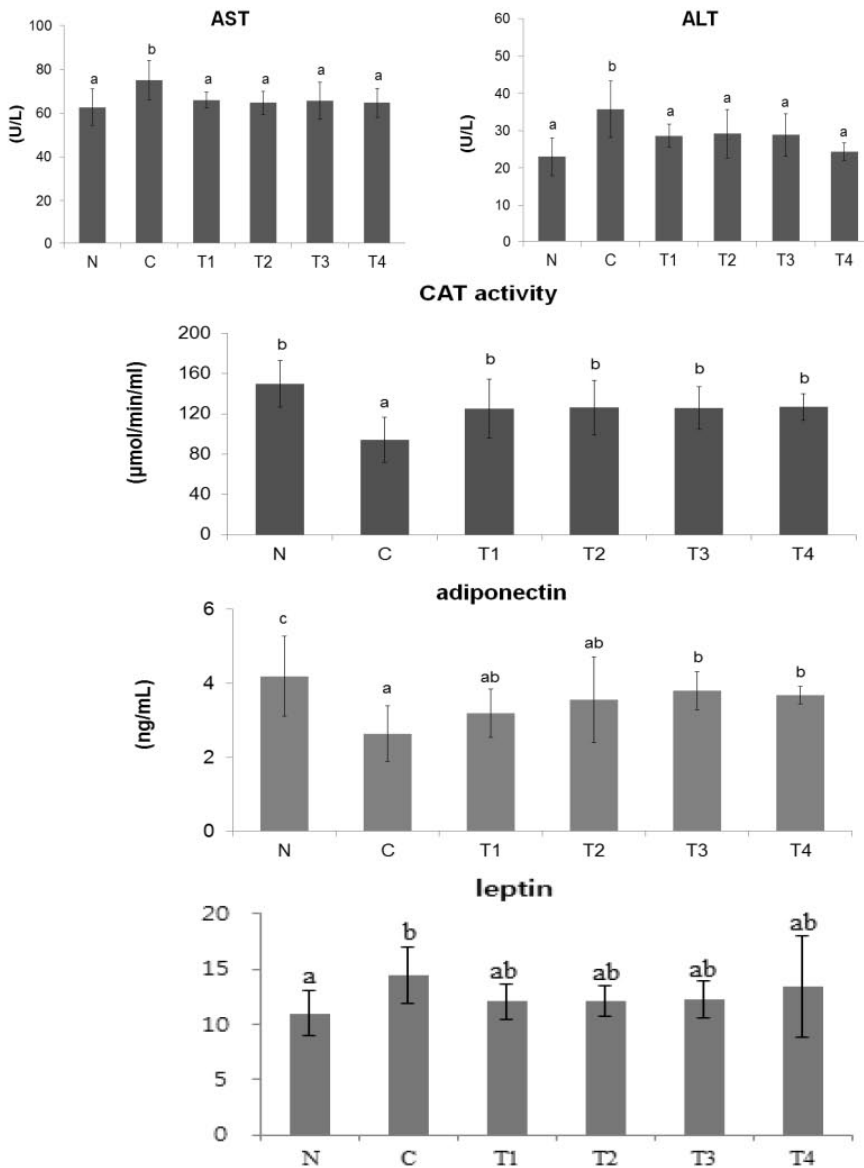


그림 23. 지방간증에 따른 간보호효과 동물실험 혈청 및 간 분석결과

고지방고콜레스테롤 식이로 지방간증을 유도한 흰쥐에서의 간조직 관찰결과, 정상 범위를 다소 넘어선 것으로 판단되는 10~20%(1.0)에 해당되는 예가 "N"군의 경우 2/6에서 관찰되었을 뿐 나머지 4/6에는 정상 범위에 있었다. 반면 "C"군의 경우 지방침착이 40% 이상을 차지하는 심한 지방침착이 4/6에 (66.7%)에서 관찰되어, 군 평균지방침착점수는  $2.17 \pm 0.69$ 를 나타내었으며, 이는 정상대조군 (Group N)의  $0.5 \pm 0.41$ 에 비하여 유의하게 증가한 것이었다 ( $p < 0.05$ ; 그림 6). T1과 T2군의 경우 지방침착이 심하게 나타난 예가 각각 1/6예, 2/6예로 부정제투여군 (Group C)에 비하여 다소 완화된 듯 보였다. 그러나, 중등도로 심한 20~40%의 지방침착을 보인 예가 각각 3/6예씩으로 군간 평균지방침착지수는 각각  $1.75 \pm 0.69$ 와  $1.92 \pm 0.67$ 로 "C"군에 비하여 눈에 띄는 유의한 차이는 나타나지 않았다. 한편 "T3"군과 "T4"군은 "C"군에 비하여 눈에 띄게 지방침착정도가 완화되었는데, "T3"군의 경우 20~30%가 2/6예였으며, 나머지는 정상 또는 정상보다 약간 넘어서는 범위에 있었다. "T4"군의 경우 비록 1/6예에서 40% 이상의 심한 지방침착소견을 보였지만, 역시 대부분 정상 또는 약간 정상을 넘어서는 정도의 지방침착을 나타내었다. "T3"와 "T4"군의 평균지방침착점수는 각각  $0.83 \pm 0.55$ 와  $1.00 \pm 0.82$ 으로 정상대조군(Group N)의  $0.5 \pm 0.41$ 에 비하여는 다소 높지만 "C"군의  $2.17 \pm 0.69$ 와 비교할 때 각각 38.1%와 46.1%로 상당한 정도로 지방침착이 완화된 것으로 평가되었다. 헤마톡실린과 에오신 염색에서 평가된 지방침착정도는 Oil red O염색에 의한 결과와 유사하였으며, 결과에 있어서 대조군 "C"군과 비교하여 "T3"와 "T4"군에서 지방침착정도가 완화된 것으로 평가되었다(그림 25).

염증세포소의 평가에 있어서도 지방침착의 결과와 유사한 양상으로 나타났으나, "T1"과 "T2"군에서도 어느 정도 완화효과가 나타난 것으로 판단된다. 음성대조군(Group N)의 범위를 넘어서는 미약한 정도(2+) 이상의 염증소가 "C"군에서는 3/6예, "T1"과 "T2"군에서는 각각 2/6예씩이었으나, "T3"와 "T4"군에서는 각각 1/6예에서만 관찰되었으며, 염증소에 대한 평균점수는 "C"군이  $2.0 \pm 1.16$ 인데 비하여 "T1", "T2", "T3", "T4"군이 각각  $1.17 \pm 0.69$ ,  $1.50 \pm 1.26$ ,  $1.00 \pm 0.58$ ,  $0.83 \pm 1.07$ 로 "C"군에 비하여 각각 58.5%, 75.0%, 50%, 41.5% 정도로 모든 투여군에서 완화효과가 있는 것으로 판단되었다 (그림 24).

이상의 결과를 종합할 때 지방간 및 염증모델에서 "T1"과 "T2"군은 미약한 정도로, "T3"와 "T4"군은 상당한 정도로 지방간과 염증을 완화하는 것으로 평가되었다.

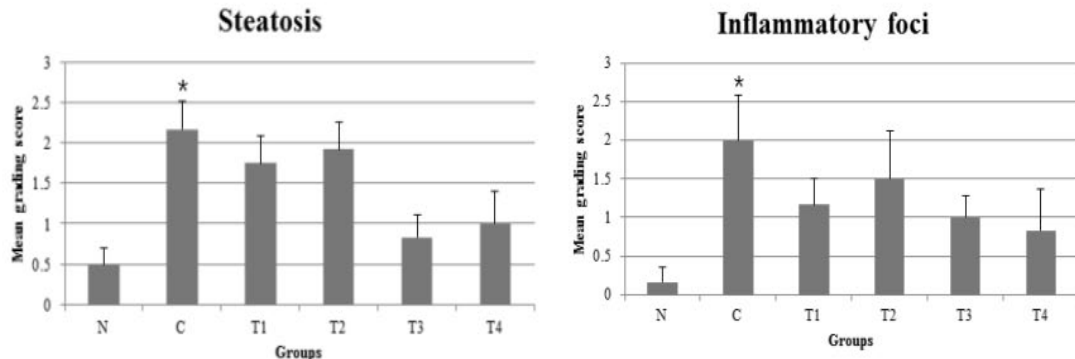


그림 24. SD-rat 간조직 지방침착(steatosis), 염증소(inflammatory foci) 관찰결과

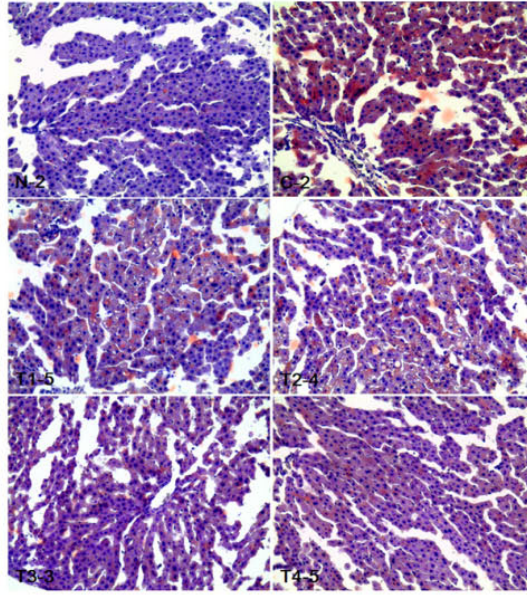


그림 25. SD-rat 간조직 관찰결과(H&E 염색)

#### 아. 급성 고지혈증 유발 모델에서의 간지질 형성에 미치는 영향 평가

SD-rat 대상으로 약물로 인한 급성 고지혈증 유발 모델에서의 자색옥수수 포엽 및 속대추출물의 간지질 형성 영향평가를 실시하였다.

표 25. 실험동물계획서

	군 구성	투여물질	용 량	개체수
실험군	정상군(N)	생리식염수	-	12
	대조군(C)	생리식염수	-	12
	양성대조군(PC)	Cholestyramine resin	10 mg/kg	12
	실험군1(T1)		5 mg/kg/d	12
	실험군2(T2)	자색옥수수포엽/속대 추출물	25 mg/kg/d	12
	실험군3(T3)		125 mg/kg/d	12
	실험군4(T4)		250 mg/kg/d	12
실험기간	순화기간: 1주    약물 투여기간 7일			
유발방법	6주령의 Sprague-Dawley계 (수컷)			
투여기간 및 투여방법	7일 간 경구투여			
고지혈증 유발방법	경구투여 종료일에 Triton-WR 1339 복강투여로 고지혈증 유발 후 18시~20시간 경과 후 부검			
채혈부위 및 채혈량	복대정맥 1.5ml			
분석항목	체 중	: 주 1회 측정		
	음수 및 사료 섭취량	: 주 1회 측정		
	혈액생화학적 검사	: ALT, AST, T-CHO, TG, LDL, HDL, LDH		
	장기 중량 측정	: 간, 신장(시험 종료 시 1회)		
	간지질 검사	: GSH, GPx, CAT, SOD, TBARS, MDA(시험 종료 시 1회)		
	간조직학적 검사(시험 종료 시 1회)			

AST는 정상군을 제외하고 대조군, 양성대조군, 처리군별 수준이 같았고, ALT는 자색옥수수 추출물 125mg/kg/d 처리군과 250mg/kg/d 처리군이 통계적으로 양성대조군과 같은 수준으로 측정되었다. 간조직내 catalase 활성을 분석한 결과, 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 25, 125, 250mg/kg/d 처리군이 양성대조군과 통계적으로 유의적인 수준으로 측정되었다. 간조직내 MDA양을 분석한 결과, 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 모든 처리군이 양성대조군과 통계적으로 유의적인 수준으로 측정되었다. 그 외, 간조직내 Gpx, GSH, SDD 함량을 분석하였으나, 처리군별 차이는 없었음

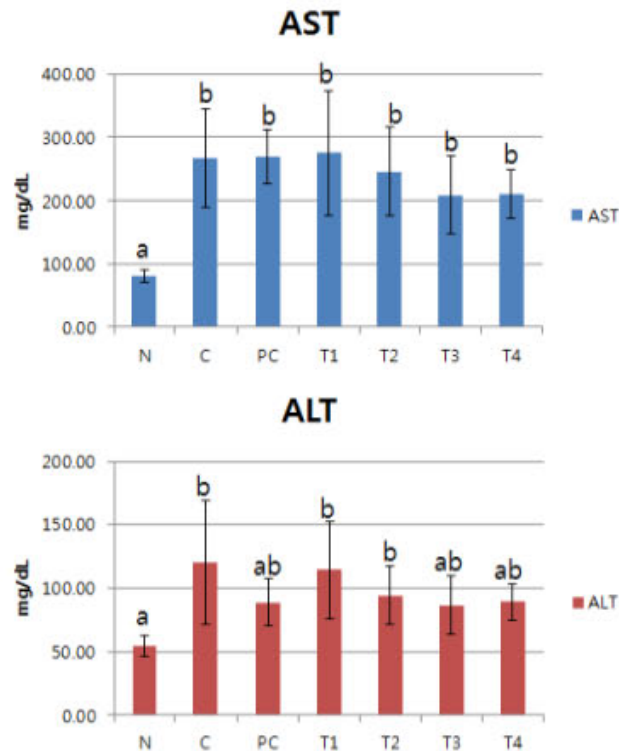


그림 26. 급성 고지혈증 유발 후 혈액분석 결과

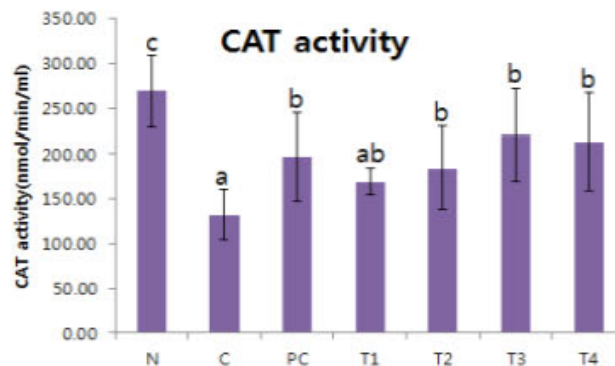


그림 27. 급성 고지혈증 유발 후 간 조직의 catalase 활성 결과

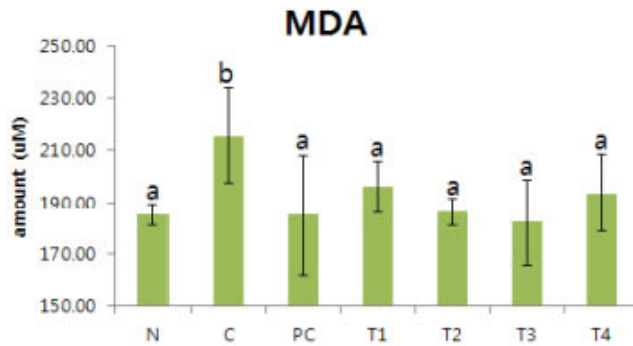


그림 28. 급성 고지혈증 유발 후 간 조직의 MDA 함량 결과

#### 자. 자색옥수수 추출물을 이용한 간기능성 개별인정

인체적용시험은 2018년 7월 28일 IRB 승인을 시작으로 수행중임

시험내용	간기능 개선에 대한 옥수수 포엽 및 속대 혼합추출물(PCE)의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주간, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험	
목적	옥수수 포엽 및 속대 혼합추출물(PCE) 또는 플라세보를 1일 3회 섭취할 때 나타나는 다음의 생체표지자의 변화를 관찰함으로써 그 유효성과 안전성을 비교 평가한다. - 1차 목적: 혈중 ALT, AST 수치 변화 - 2차 목적: GGT, ALP, AST/ALT ratio, fatty liver index 점수 변화, 혈중 지질 지표, 항산화지표(TAS, MDA) 및 피로 지표	
시험 기관	전북대학교병원, 우석대학교병원	
모니터/CRO	(주) 바이오푸드스토리	
연구대상자 수	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PCE 섭취군 40명</li> <li>- 플라세보 섭취군 40명</li> </ul>	

그림 29. 인체적용시험용 캡슐

## 4. 적 요

(제2세부과제: 자색옥수수 추출물의 간보호 효능 검증)

(시험 1) 자색옥수수의 표준제배법 확립

가. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 시비량 구명

- 옥수수 포엽 및 속대 CSG 함량 최대화를 위해서는 표준보다 질소 시비량을 증시하여 제배하는 것이 유리하다.

나. 옥수수 포엽 및 속대 수확시기 구명

- 옥수수 1차 이삭 수확시기는 포엽과 속대의 C3G 함량을 고려할 때 출사 후 29일 경이 좋으며 2차 이삭 수확시는 1차 이삭 수확 후 4일경이 좋았다.

다. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 파종기 구명

- 포엽 및 속대 안정적 생산을 위한 파종기는 강원지역에서 4~5월 파종이 유리하고 파종기에 따른 포엽 및 속대의 C3G 함량은 차이를 보이지 않았다.

라. 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 재식밀도 구명

- 옥수수 포엽 및 속대 재배 시 밀식 재배가 수량증대에 유리하나, 도복을 고려한 적정 재식 밀도는 5,700~7,000주/10a로 판단된다. 재식밀도에 따른 포엽 및 속대의 C3G 함량은 처리 간 경향을 보이지 않았다.

마. 옥수수 포엽 및 속대 원료 공급

- 공동연구기관에 필요한 포엽 및 속대를 2017년 300kg(포엽 150, 속대 150), 2018년 300kg(포엽 150, 속대 150), 2019년 1,500kg(포엽 700, 속대 800)를 공급하였음.

바. 차년도 원료 생산을 위한 원종 및 보급종 생산

- 차년도 연구과제 수행에 필요한 색소 1호 원종 2계통 각 10kg와 보급종 100kg를 생산하였으며 사용 후 잔량은 2020년 이후 원료생산 단지 조성을 위한 종자로 사용할 계획이다.

## (시험 2) 간 기능성 효능검정

가. 본 연구는 색소 1호 포엽과 속대 추출물의 영양성분을 분석하고 항산화 및 항당뇨 활성을 검정하여 향후 기능성 식품으로서의 활용을 위한 기초자료로 제공하고자 수행되었다. 색소 1호 포엽과 속대 추출물의 일반성분 분석결과, 수분, 조회분, 조지방, 조단백질은 각각 6.90%, 7.31%, 0.52%, 7.07%이었다. 색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 지방산은 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid인 것으로 나타났으며 불포화 지방산의 비율은 83.33%이었다. 색소 1호 포엽 및 속대 혼합추출물의 구성 아미노산 함량을 분석한 결과 glutamic acid, aspartic acid 등을 포함한 총 17종의 아미노산이 검출되었으며 이 중 glutamic acid의 함량이 736.08 mg/100 g으로 가장 높았다. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 DPPH 및 ABTS radical 소거활성은 각각 95.62% (1,000 $\mu$ g/mL), 92.00%(10,000 $\mu$ g/mL)이었으며 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 99.87mg/g, 25.02mg/g이었다. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 추출물 10 mg/mL의 처리농도에서 각각 95.86%, 76.92%인 것으로 나타났다.

나. 본 연구는 자색옥수수 색소 1호 포엽과 속대 추출물의 항비만 활성을 검정하고자 지방분해효소 저해활성을 평가하고 3T3-L1 지방전구세포에서 지방분해억제 효과를 검정하고자 수행되었다. Pancreatic lipase 저해 활성 결과, 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 100, 500, 1,000 $\mu$ g/mL 농도처리구에서 양성대조군인 orlistat 보다 높은 저해 활성을 나타내었다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양하여 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 세포독성 평가를 수행한 결과, 추출물은 모든 처리농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다. 분화된 3T3-L1 지방전구세포에서 색소 1호 포엽과 속대 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군은 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되었으나 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 처리에 의해 농도 의존적으로 lipid droplet의 형성이 억제되는 것으로 나타났다. Real-time PCR과 Western

blot을 실시하여 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  유전자 및 단백질 발현량을 측정된 결과, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군에서는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 유전자 및 단백질 발현이 증가하였으며, 추출물 처리에 의해 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 유전자 및 단백질 발현이 유의적으로 감소하였다. 본 연구 결과는 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 pancreatic lipase 활성 및 지방전구세포의 분화를 억제시킴으로써 항비만 활성 기능성 물질로의 활용 가능성이 높음을 시사한다.

다. 본 연구의 목적은 oleic acid으로 지방생성이 유도된 HepG2 세포에서 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 간세포 내 지방생성에 미치는 영향을 구명하는 것이다. 색소 1호 포엽 및 속대 추출물에 의한 HepG2 세포 내 지방 축적의 변화를 확인하기 위하여 배양된 세포에 oleic acid로 지방 축적을 유도하고 추출물에 의한 중성지방생성 억제 효과를 측정하였으며 추출물을 처리하지 않은 대조군과 추출물을 처리한 실험군의 지방합성 및 축적에 관련된 유전자와 단백질 발현량을 RT-PCR과 Western blot을 통하여 측정하였다. Oil Red O와 Nile Red 염색을 통하여 추출물의 처리로 HepG2 세포 내 중성지방 축적이 억제된 것을 확인하였다. RT-PCR에 의하여 mRNA 발현량을 측정된 결과, oleic acid에 의하여 지방 생성이 유도된 대조군에 비하여 모든 추출물 처리군의 SREBP-1c와 SREBP-1a 유전자 발현량이 유의적으로 감소되었다. Western blot을 실시하여 p-AMPK, p-SREBP1, PPAR $\alpha$ , FAS 단백질의 발현량을 측정된 결과, 간에서 지질대사에 관여하는 주요 인자인 SREBP1 단백질의 발현은 추출물의 처리 농도에 따라 유의하게 감소하였으며 지방산의 생합성 경로에 관여하는 주요 효소인 FAS의 단백질 발현량은 모든 처리 농도에서 현저하게 감소된 것이 확인되었다. 본 연구 결과는 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 간세포 내에서 중성지방의 축적을 억제시키고 지질 합성에 관련된 유전자 및 단백질의 발현을 억제시킴으로써 간 세포내 지질 축적을 완화할 수 있는 기능성 소재로의 활용가치가 높다고 판단된다.

## 5. 인용문헌

- Kopelman P. G.: Obesity as a medical problem, *Nature*, 404(6778), 635-643 (2000).
- Kang W. Y., Kim M. Y., Jin J. Y., Yang H. K., Hong H. J., Kim D. G., Han C. H., Lee Y. J.: Anti-obesity effects of onion juice in high fat diet-induced obese rats *Korean J. Vet Res.*, 50(1), 1-10 (2010).
- Kissebah A. H., Vydellingum N., Murray R., Evans D. J., Hartz A. J., Kalkhoff R. K., Adams P. W.: Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity, *J Clin Endocrinol Metab.*, 54, 254-260(1982).
- Jeon S. M., Bok S. H., Jang M. K., Lee M. K., Nam K. T., Park Y. B., Rhee S. J., Choi M. S.: Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits, *Life Sci.*, 69, 2855-2866 (2001).
- Davidson M. H., Hauptman J., DiGirolamo M., Foreyt J. P., Halsted C. H., Heber D., Heimbarger D. C., Lucas C. P., Robbins D. C., Chung J., Heymsfield S. B.: Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial, *J. Am. Med. Assoc.*, 281, 235-242 (1999).

- Lee M. R., Oh D. S., Wee A. J., Yun B. S., Jang S. A., Sung C. K.: Anti-obesity effects of *Lentinus edodes* on obese mice induced by high fat diet. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 43(2), 194~199 (2014).
- Lee K. Y., Kim T. H., Lim S. H., Park J. Y., Kim K. H., Ahn M. S., Kim H. Y.: Proximate, free sugar, fatty acids composition and anthocyanins of Saekso 2 corn kernels *J. Food Hyg. Saf.*, 31(5), 335-341(2016).
- Kim S. L., Hwang J. J., Song J., Song J. C., Jung K. H.: Extraction, purification and quantification of anthocyanins in colored rice, black soy bean and black xaxy corn. *Korean J. Breed*, 32, 146-152(2000).
- Chung M. G., Lim J. D.: Antioxidant, Anticancer and Immune Activation of Anthocyanin Fraction from *Rubus coreanus* Miquel fruits(Bokbunja). *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 20, 259-269 (2012).
- Lee K. E., Song J. L., Jeong B. J., Jeong J. S., Huh T. G., Park K. Y.: Anti-Lipogenic Effect of Functional Cereal Samples on High Sucrose Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 45(6), 789-796(2016).
- Kim C. S., Cho E. H., Choe S. Y., Kang M. S., Yu R.: Inhibitory Effect of Isorhamnetin on Lipid Accumulation in Free Fatty Acid-Induced Steatotic Hepatocytes through the PPAR $\alpha$  Pathway. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 47(7), 703-709(2018).
- Choi H. Y., Kim G. H.: Inhibitory Effects of *Allium senescens* L. methanol extracts on reactive oxygen species production and lipid accumulation during differentiation in 3T3-L1 cells. *Korea J. Food Sci. Technol.*, 46(4), 498-504 (2014).

## 6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2017(1년)	학술발표	자색옥수수 포엽 추출물의 항산화 활성
	학술발표	급성 간독성모델에서 자색옥수수 포엽 추출물의 간보호 효과
2018(2년)	학술발표	아세트아미노펜에 의해 유도된 간독성 모델에서 cyanidin 3-O-glucoside의 간보호 효과
	학술발표	Improvement effects of purple corn husk and cob extracts on non-alcoholic fatty liver in high fat diet induced obese rats
	논문게재	자색옥수수 포엽과 속대 혼합 추출물의 일반성분 분석 및 생리활성 평가
2019(3년)	논문게재	자색옥수수 포엽과 속대 추출물의 리파아제 저해활성 및 3T3-L1 지방전구세포에서의 지방분화 억제효과
	학술발표	Effect of Extract Composed of Husks and Cobs from Purple Corn on the Triton WR 1339 induced Hyperlipidemia in Rats.
	영농정보	안토시아닌 색소함량 증진을 위한 옥수수 색소1호 품종의 재배방법
	논문게재	올레산 유도 비알콜성 지방간세포에서 자색옥수수 색소 1호 포엽과 속대 추출물의 지질 축적 억제 효과

성과지표명	연 도	1년차(2017)		2년차(2018)		3년차(2019)		계	
		목 표	실 적	목 표	실 적	목 표	실 적	목 표	실 적
논문 게재	SCI								
	비SCI			1	2	1	1	2	3
학술 발표	국제								
	국내	2	2	1	2	1	1	4	5
영농 활용	기술								
	정보								
기술이전									
정책제안									
농자재 등록 홍보									
계		2	2	2	4	2	2	6	8

## 7. 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도		
					'17	'18	'19
과제책임자	(주)메디언스	대표	박상재	과제 총괄	○	○	○
	농식품연구소	농업연구사	김희연	세부주관 수행	○	○	○
	농식품연구소	농업연구사	안문섭	자료 검토 및 평가	○	○	-
	옥수수연구소	농업연구사	박종열	현장조사 지원	○	○	○
2세부책임자	옥수수연구소	공업주사보	용우식	현장조사 지원	○	-	-
	농식품연구소	공업서기	최병철	현장조사 지원	○	○	○
	농식품연구소	공무직	이기연	품질분석 지원	○	○	○
	농식품연구소	공무직	홍수영	품질분석 지원	○	-	-
공동연구자	농식품연구소	공무직	김태희	품질조사 지원	○	○	○
	농식품연구소	연구원	박은영	품질조사 지원	○	○	○
	강원도청	농업연구관	김경희	품질조사 지원	○	-	-
	농식품연구소	공무직	김재은	품질분석 지원	-	-	○
	농식품연구소	연구원	백문구	현장조사 지원	○	○	-