

어젠다코드	2 - 6 - 3		구분	완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S02	작목구분코드	FC-04-0401
과제종류	기관고유		과제번호	LP0043362020	
과제명	강원 농특산물을 이용한 건강 기능성 소재 개발				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	이재희		농업연구사	강원도원 농식품연구소	
연구기간	2019 ~ 2020		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 강원 농특산물 추출물 은행 구축			농식품연구소	이재희	'19~'20
2) 대사질환 개선 소재 스크리닝			농식품연구소	이재희	'19~'20
3) 면역기능 개선 소재 스크리닝			농식품연구소	박아름	'19~'20
색인용어	기능성, 추출물 은행, 항비만, 식이섬유, 면역				

ABSTRACT

We collected native plants in Gangwon-do of Korea. The native plants were extracted by water and ethanol and registered plant extract bank. Pancreatic lipase (triacylglycerol acylhydrolase) is a key enzyme for the absorption of dietary triglycerides. Interference with fat hydrolysis results in the reduced utilization of ingested lipids, therefore inhibition of lipases decreases fat absorption. Antioxidative activity of plant extracts were determined DPPH radical scavenging activity and SOD-like activity. Anti-inflammatory activity of plant extracts have been evaluated on lipopolysaccharide (LPS) induced release of nitric oxide (NO) by the macrophage RAW 264.7 cells. The selected extracts could be potentially used as a resource of bioactive materials for health functional foods.

1 연구목표

강원도는 DMZ 일원이나 백두대간 등 고산지역이 다수 분포하고 있어 전국 대비 다양한 식물이 자생하고 있으며, 그 고유성 또한 높다. 강원도 자원식물의 종수는 총 1,796종이며, 화천군, 양양군, 철원군 등 강원 북부지역에 많은 종이 분포한다. 이러한 강원도 유용자원의 다양성을 보존하고 천연물 산업의 탄탄한 기반을 다지기 위해 강원 농특산물 추출물 은행을 운영하여 그 유용한 자원 및 성분을 연구자들에게 시기에 관계없이 제공하고자 하였다. 또한, 대사질환 및 면역기능 개선 소재 스크리닝을 통해 소재 탐색의 기초자료 활용하고자 한다.

2 재료 및 방법

〈제1세부과제: 강원 농특산물 추출물 은행 구축〉

강원도 내 자생 또는 재배되는 농특산물을 채집하여 수집하였다. 수집된 시료는 냉풍건조 후 분쇄하여 열수 및 에탄올 추출하였다. 열수 추출물은 동결 건조하였으며, 에탄올 추출물은 감압농축 후 동결 건조하였다. 조제된 추출물은 25 mL vial에 넣고 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이하의 저온냉동고에 보존하였다.

〈제2세부과제: 대사질환 개선 소재 스크리닝〉

제 1 세부과제에서 제조된 에탄올 추출물을 시료(sample)로 사용하였다. 3T3-L1 세포를 DMEM에 1% penicillin-streptomycin과 10% CS를 첨가하여 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 세포는 70% 정도 배양한 후 주기적으로 계대하였으며 세포계대 수는 10 이하의 것으로 실험하였다. 분화시키기 위하여 세포를 CS가 10%로 첨가된 DMEM에서 세포가 confluence상태가 될 때까지 배양하였다. Confluence (day 0) 상태가 된지 2일 후, 25 mM glucose, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μM dexametasone, 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin(MDI), 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 48 시간 동안 분화 유도하였다. 48 시간이 지난 후(day 2), 10% FBS, 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin이 포함된 DMEM과 다양한 농도의 시료와 함께 48 시간 동안 배양하였다. 4일째 되는 날, 10% FBS, 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin이 첨가된 DMEM으로 원하는 분화 정도까지 2일에 한 번씩 배지를 교체하였다. 세포 생존률 측정을 위해 3T3-L1 세포 (5×10^3 개)를 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 96-well plate에 24 시간 동안 안정화시켰다. 세포를 다양한 농도의 시료로 48 시간 동안 처리한 후, 세포 생존률은 Cell Proliferation MTS Kit(Promega Corporation, Madison, USA)를 사용설명서의 방법으로 측정하였다. 20 μl MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]시약을 각 well에 첨가한 뒤, 4 시간 동안 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 그 후 생성된 formazan의 양을 VERSA max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡수되는 양으로 측정하였다. 세포 내 지방생성량은 Oil Red O 시약을 사용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포를 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 2번 washing 한 뒤, 10% formaldehyde로 1 시간 동안 고정하였다. 1 시간 후, 60% isopropanol로 washing 하였다. 세포는 0.5% Oil Red O로 30분 동안 실온에서 30분 동안 유지시켰다. 30분 후, 지방 이외에 묻어있는 Oil Red O 시약을 씻어내기 위해 D.W로 4번 washing하였다. 염색된 세포는 현미경으로 관찰 후, 100% isopropanol (3 ml/well)을 사용하여 지방에 염색된 Oil Red O 시약을 녹였다. 그 후, 각 well의 100% isopropanol을 96-well plate에 옮긴 뒤 VERSA max microplate reader를 사용하여 500 nm에서 흡수되는 양으로 지방 생성량을 비교하였다.

〈제3세부과제: 면역기능 개선 소재 스크리닝〉

용매별 추출물을 농도별로 조제하여 항산화 활성을 검정하였다. DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, 환원력(Reducing power), Frap 활성 측정을 통해 항산화 활성을 비교하였다. NO 소거 활성은 ATCC에서 구매한 마우스의 대식세포 세포주인 Raw264.7 세포를 지시세포로 이용하여 측정하였다. Raw264.7 세포는 10%의 FBS가 함유된 DMEM media에서 계대 배양하였다. NO 소거활성을

측정하기 위하여 Raw264.7 세포를 24 well에 well당 2×10^5 cells을 분주한 후, 37 °C, 5% CO₂ Incubator에서 24시간 배양하였다. final 농도를 1 µg/mL로 한 추출물을 세포배양 well에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 24시간 배양하였다. 시료에 대한 대조구로는 1 µg/mL의 lipopolysaccharide (LPS)를 20 µL처리하여 활성화된 세포를 사용하였다. 배양 후 상정액 100 µL를 회수하고 여기에 2-naphthylamine이 포함된 Griess solution(Fluka)을 첨가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 상정액의 발색도를 ELISA reader(ASYS UVM-340)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포가 생산한 NO는 sodium nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 NO를 정량하였다.

면역기능 증강 효과는 24 well plate에 면역 세포를 1.0×10^4 cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 배양한 후 well의 세포수를 측정하여 생육도를 측정하였다. 면역관련 마커인 IL-2, 6, 12 및 TNF- α 의 발현량을 정량 kit를 사용하여 각각의 cytokine을 정량하였다. 세포의 농도를 $1.0 \sim 2.0 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900µl 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37 °C, 5%, CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 100µl 씩 첨가하여 다시 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 배양배지의 상층액을 취한 다음 450nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D.값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

3 결과 및 고찰

<제1세부과제: 강원 농특산물 추출물 은행 구축>

총 126종의 시료를 수집하여 열수 및 에탄올 추출물을 제조하였다. 수집한 자원은 표 1과 같다.

표. 1. 수집시료 목록

시료명	부위	과명	속명	학명
가시영경귀	잎,줄기	국화과	영경귀속	<i>Cirsium japonicum</i>
가시오가피	줄기	두릅나무과	오갈피나무속	<i>Acanthopanax senticosus</i>
강활	뿌리	산형과	뿔미나리속	<i>Ostericum praeritum</i>
개똥쑥	잎,줄기	국화과	쑥속	<i>Artemisia annua</i>
개복숭아나무	열매	장미과	벗나무속	<i>Prunus davidiana</i>
갯기름나무	잎,줄기	산형과	기름나무속	<i>Peucedanum japonicum</i>
갯방풍	잎,줄기	산형과	갯방풍속	<i>Glehnia littoralis</i>
결명자	종자	콩과	senna속	<i>Senna tora</i>
고려영경귀	잎	국화과	영경귀속	<i>Cirsium setidens</i>
고본	뿌리	산형과	당귀속	<i>Angelica tenuissima</i>
고향찰	종실	벼과	벼속	<i>Oryza sativa var. glutinosa Blanco</i>
곰취	잎	국화과	곰취속	<i>Ligularia fischeri</i>
구기자나무	열매	가지과	구기자속	<i>Lycium chinense</i>
구릿대	뿌리	산형과	당귀속	<i>Angelica dahurica</i>
국화	꽃	국화과	바위구절초속	<i>Dendranthema indicum</i>
꾸지뽕나무	잎	뽕나무과	꾸지뽕나무속	<i>Cudrania tricuspidata</i>

시료명	부위	과명	속명	학명
꾸지뽕나무	열매	뽕나무과	꾸지뽕나무속	<i>Cudrania tricuspidata</i>
너삼	뿌리	콩과	고삼속	<i>Sophora flavescens</i>
눈개승마	잎, 줄기	장미과	개승마속	<i>Aruncus dioicus</i>
느릅나무	껍질	느릅나무과	느릅나무속	<i>Ulmus davidiana</i>
다래나무	열매	다래나무과	다래나무속	<i>Actinidia arguta</i>
도라지	뿌리	초롱꽃과	도라지속	<i>Platycodon grandiflorum</i>
독활	뿌리	두릅나무과	두릅나무속	<i>Aralia cordata</i>
돌배나무	열매	장미과	배나무속	<i>Pyrus pyrifolia</i>
맥문동	덩이뿌리	백합과	맥문동속	<i>Liriope platyphylla</i>
머루(블랙아이)	열매	포도과	포도속	<i>Vitis amurensis</i>
머루(청산)	열매	포도과	포도속	<i>Vitis amurensis</i>
머루(청풍)	열매	포도과	포도속	<i>Vitis amurensis</i>
민들레	뿌리	국화과	민들레속	<i>Taraxacum platycarpum</i>
박하	지상부	꿀풀과	박하속	<i>Mentha piperascens</i>
배초향	전초	꿀풀과	괏향속	<i>Agastache rugosa</i>
뱀도랏	열매	산형과	사상자속	<i>Torilis japonica</i>
번행초	잎	번행초과	번행초속	<i>Demidovia tetragonoides</i>
복분자딸기	열매	장미과	산딸기속	<i>Rubus coreanus</i>
붉나무	층영	욱나무과	붉나무속	<i>Rhus chinensis</i>
산마늘	잎, 줄기	백합과	부추속	<i>Allium microdictyon</i>
산사나무	열매	장미과	산사나무속	<i>Crataegus pinnatifida</i>
산수유나무	열매	층층나무과	층층나무속	<i>Cornus officinalis</i>
삼백초	줄기, 잎	삼백초과	삼백초속	<i>Saururus chinensis</i>
삼백초	뿌리	삼백초과	삼백초속	<i>Saururus chinensis</i>
삼지구엽초	잎, 줄기	매자나무과	삼지구엽초속	<i>Epimedium koreanum</i>
삼주	뿌리	국화과	삼주속	<i>Atractylodes ovata</i>
생강나무	줄기	녹나무과	생강나무속	<i>Lindera obtusiloba</i>
설향찰	종실	벼과	벼속	<i>Oryza sativa var. glutinosa Blanco</i>
속씨은풀	뿌리	꿀풀과	꿀무꽃속	<i>Scutellaria baicalensis</i>
쇠비름	전초	쇠비름과	쇠비름속	<i>Portulaca oleracea</i>
쇠비름	잎, 줄기	쇠비름과	쇠비름속	<i>Portulaca oleracea</i>
수리취	잎	국화과	수리취속	<i>Synurus deltoides</i>
시래기무	잎	십자화과	무속	<i>Raphanus sativus</i>
시래기무	뿌리	십자화과	무속	<i>Raphanus sativus</i>
쑥	잎	국화과	쑥속	<i>Artemisia asiatica</i>
약모밀	잎	삼백초과	약모밀속	<i>Houttuynia cordata</i>
영경귀	뿌리	국화과	영경귀속	<i>Cirsium japonicum</i>
오대	종실	벼과	벼속	<i>Oryza sativa L.</i>
오륜	종실	벼과	벼속	<i>Oryza sativa L.</i>
오미자	열매	오미자과	오미자속	<i>Schizandra chinensis</i>
왜우산풀	잎, 줄기	산형과	누룩치속	<i>Pleurospermum camtschaticum</i>

시료명	부위	과명	속명	학명
율무	종자	벼과	의이속	<i>Coix lacryma-jobi</i>
인진쑈	잎, 줄기	국화과	쑈속	<i>Artemisia capillaris</i>
인진쑈	잎, 줄기	국화과	쑈속	<i>Artemisia capillaris</i>
잔대	새순	초롱꽃과	잔대속	<i>Adenophora triphylla</i>
적작약	뿌리	미나리아재비과	작약속	<i>Paeonia lactiflora</i>
정향나무	꽃봉오리	정향나무과	Syzygium속	<i>Syzygium aromaticum</i>
지황	뿌리	현삼과	지황속	<i>Rehmannia glutinosa</i>
질경이(1년)	잎	질경이과	질경이속	<i>Plantago asiatica</i>
질경이(2년)	잎	질경이과	질경이속	<i>Plantago asiatica</i>
참당귀	뿌리	산형과	당귀속	<i>Angelica gigas</i>
참취	잎	국화과	참취속	<i>Aster scaber</i>
천궁	뿌리줄기	산형과	기름당귀속	<i>Ligusticum wallichii</i>
초피나무	열매	운향과	초피나무속	<i>Zanthoxylum piperitum</i>
치자나무	열매	꼭두서니과	Gardenia 속	<i>Gardenia jasminoides</i>
췌	뿌리	콩과	췌속	<i>Pueraria lobata</i>
토종자두나무	열매	장미과	벚나무속	<i>Prunus domestica</i>
파프리카	잎	가지과	고추속	<i>Capsicum annuum</i>
팔각	열매	붓순나무과	붓순나무속	<i>Illicium verum</i>
화선찰	종실	벼과	벼속	<i>Oryza sativa var. glutinosa Blanco</i>
흑자두나무	열매	장미과	벚나무속	<i>Prunus pauciflora Bunge</i>
흑향찰	종실	벼과	벼속	<i>Oryza sativa var. glutinosa Blanco</i>
약선콩	종실	콩과	여우콩속	<i>Rhynchosia Nulubilis</i>
콩('청아')	종실	콩과	콩속	<i>Glycine max</i>
서리태	종실	콩과	콩속	<i>Glycine max Merr.</i>
쥐눈이콩	종실	콩과	여우콩속	<i>Rhynchosia Nulubilis</i>
땅콩	종실	콩과	땅콩속	<i>Arachis hypogaea</i>
팥	종실	콩과	동부속	<i>Vigna angularis</i>
율무	종실	벼과	의주자속	<i>Coix mayuen Roman</i>
청차조	종실	벼과	강아지풀속	<i>Setaria italica</i>
황차조	종실	벼과	강아지풀속	<i>Setaria italica</i>
찰기장	종실	벼과	기장속	<i>Panicum miliaceum L</i>
단메밀	종실	여뀌과	메밀속	<i>⇒Fagopyrum esculentum</i>
쓴메밀	종실	여뀌과	메밀속	<i>Fagopyrum esculentum</i>
녹두	종실	콩과	동부속	<i>Vigna radiata</i>
찰보리	종실	벼과	보리속	<i>Hordeum vulgare var. hexastichon</i>
겉보리	종실	뽕나무과	무화과속	<i>Elaeagnus umbellata</i>
밀	종실	벼과	밀속	<i>Triticum durum</i>
통밀	종실	벼과	밀속	<i>Triticum durum</i>
쌀눈	종실	벼과	벼속	<i>Oryza glutinosa L.</i>
찰흑미	종실	벼과	벼속	<i>Oryza glutinosa L.</i>
미강	종실	벼과	벼속	<i>Oryza glutinosa L.</i>

시료명	부위	과명	속명	학명
퀴노아	종실	명아주과	명아주속	<i>Chenopodium quinoa</i>
참깨	종실	참깨과	참깨속	<i>Sesamum indicum L.</i>
들깨	종실	꿀풀과	들깨속	<i>Perilla frutescens var. japonica HARA</i>
찰수수	종실	벼과	수수새속	<i>Sorghum bicolor MOENCH</i>
아마란스	종실	비름과	비름속	<i>Amaranthus</i>
색소1호	종실	벼과	옥수수속	<i>Zea mays L.</i>
색소2호	종실	벼과	옥수수속	<i>Zea mays L.</i>
색소2호 알곡껍질	종실	벼과	옥수수속	<i>Zea mays L.</i>
강일옥	종실	벼과	옥수수속	<i>Zea mays L.</i>
강일옥 알곡껍질	종실	벼과	옥수수속	<i>Zea mays L.</i>
콩(대원)	종실	콩과	콩속	<i>Glycine max</i>
콩(소청자)	종실	콩과	콩속	<i>Glycine max</i>
콩(청자3호)	종실	콩과	콩속	<i>Glycine max</i>
콩(대왕2호)	종실	콩과	콩속	<i>Glycine max</i>
팥(아라리)	종실	콩과	동부속	<i>Vigna angularis(Wild.)</i>
팥(강안)	종실	콩과	동부속	<i>Vigna angularis(Wild.)</i>
수수(남풍찰)	종실	벼과	수속	<i>Sorghum bicolor MOENCH</i>
수수(동안매)	종실	벼과	수수속	<i>Sorghum bicolor MOENCH</i>
느타리(영산)	균계	느타리과	표고속	<i>Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.</i>
산느타리(자산)	균계	느타리과	느타리속	<i>Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quel.</i>
느타리(솔타리)	균계	느타리과	느타리속	<i>Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.</i>
잎새(태미)	균계	왕잎새버섯과	잎새버섯속	<i>Grifola frondosa</i>
느타리(화성6호)	균계	느타리과	느타리속	<i>Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.</i>
느타리(곤지7호)	균계	느타리과	느타리속	<i>Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.</i>
표고(산조701호)	균계	느타리과	표고속	<i>Lentinula edodes</i>
배초향(지상부)	잎	꿀풀과	배초향속	<i>Agastache rugosa</i>
배초향(꽃)	꽃	꿀풀과	배초향속	<i>Agastache rugosa</i>

총 126종 추출물을 조제하여 각 시료별 추출수율을 분석하였다(표 2). 대체로 물 추출 수율이 좋았으며 쌀, 느릅나무, 엉겅퀴는 열수 및 에탄올 추출 모두 수율이 낮았다. 맥문동, 도라지, 왜우산폴도 열수 추출의 수율이 높고, 열수와 에탄올 추출의 수율간 차이가 컸다. 콩 및 팥의 경우 타 잡곡류 대비 수율이 높은 경향을 보였다. 추출물 은행의 시료 중 60% 이상의 수율을 보인 것은 돌배나무, 맥문동, 산수유나무(열매), 시래기무(잎), 느타리(‘영산’, ‘솔타리’), 잎새(‘태미’)의 열수 추출물로서, 이 중 맥문동 열수 추출물은 82.7%의 수율이었다.

표 2. 수집시료 용매별 추출 수율

시료명	열수 추출			에탄올 추출		
	시료량(g)	동결건조량(g)	수율(%)	시료량(g)	동결건조량(g)	수율(%)
가시엉겅퀴	20	7.61	38.1	20	1.24	6.2
가시오가피	20	2.55	12.8	20	0.76	3.8

시료명	열수 추출			에탄올 추출		
	시료량(g)	동결건조량(g)	수율(%)	시료량(g)	동결건조량(g)	수율(%)
강활	20	9.09	45.5	20	2.37	11.9
개똥쑥	20	7.96	39.8	20	2.01	10.1
개복숭아나무	20	8.07	40.4	20	2.58	12.9
갯기름나무	20	8.98	44.9	20	1.67	8.4
갯방풍	20	7.98	39.9	20	1.41	7.1
결명자	20	4.58	22.9	20	2.29	11.5
고려엉겅퀴	20	7.14	35.7	20	1.86	9.3
고본	20	8.85	44.3	20	3.45	17.3
고향찰	20	1.48	7.4	20	1.65	8.3
곰취	20	7.69	38.45	20	3.11	15.6
구기자나무	20	5.33	26.7	20	4.27	21.4
구릿대	20	9.41	47.1	20	2.65	13.3
국화	20	7.19	36	20	4.17	20.9
꾸지뽕나무(열매)	20	10.44	52.2	20	5.79	29
꾸지뽕나무(잎)	20	9.02	45.1	20	1.14	5.7
너삼	20	4.79	24.0	20	1.82	9.1
눈개승마	20	6.54	32.7	20	3.41	17.1
느릅나무	20	0.55	2.8	20	1.7	8.5
다래나무	20	12.08	60.4	20	6.07	30.35
도라지	20	12	60	20	1.69	8.5
독활	20	3.88	19.4	20	1.13	5.7
돌배나무	20	12.12	60.6	20	8.11	40.6
맥문동	20	16.54	82.7	20	0.46	2.3
머루('블랙아이')	20	7.19	36	20	9.48	47.4
머루('청산')	20	5.49	27.5	20	9.01	45.1
머루('칭풍')	20	6.55	32.8	20	10.77	53.9
민들레	20	11.38	56.9	20	1.5	7.5
박하	20	4.82	24.1	20	1.53	7.7
배초향	20	2.3	11.5	20	1.04	5.2
뱀도랏	20	3.47	17.4	20	1.67	8.4
번행초	20	7.63	38.2	20	2.26	11.3
복분자딸기	20	4.69	23.5	20	1.45	7.3
붉나무('충영')	20	10.8	54.0	20	12.53	62.7
산마늘	20	11.01	55.1	20	2.63	13.2
산사나무(열매)	20	4.93	24.7	20	3.84	19.2
산수유나무(열매)	20	13.54	67.7	20	8.2	41
삼백초(뿌리)	20	5.25	26.3	20	2.2	11
삼백초(줄기, 잎)	20	4.16	20.8	20	1.67	8.4
삼지구엽초	20	4.68	23.4	20	1.99	10
삼주	20	12.38	61.9	20	1.4	7
생강나무	20	2.05	10.3	20	0.91	4.6

시료명	열수 추출			에탄올 추출		
	시료량(g)	동결건조량(g)	수율(%)	시료량(g)	동결건조량(g)	수율(%)
설향찰	20	1.95	9.8	20	1.6	8
속썩은품	20	9.43	20.0	20	1.65	8.3
쇠비름(전초)	20	5.76	28.8	20	1.0	5
쇠비름(잎)	20	6.46	32.3	20	2.66	13.3
수리취	20	7.33	36.65	20	2.19	7.3
시래기 무(뿌리)	20	10.99	54.95	20	2.04	10.2
시래기 무(잎)	20	13.12	65.6	20	3.36	16.8
썩	20	5	25.0	20	1.71	8.55
약모밀	20	2.28	11.4	20	3.7	24.6
영경귀	20	1.93	9.65	20	1.24	6.2
오대	20	1.27	6.35	20	1.49	7.45
맵쌀(‘오류’)	20	1.42	7.1	20	1.69	8.45
오미자	20	11.77	58.85	20	12.94	43.13
왜우산품	20	1.27	20.0	20	10.1	28.5
울무	20	2.11	10.55	20	1.38	6.9
인진쑈	20	5.39	26.95	20	2.15	10.75
일천궁	20	7.41	37.05	20	3.07	15.35
잔대	20	9.47	47.35	20	1.79	8.95
적작약	20	5.76	28.8	20	2.62	13.1
정향나무	20	6.58	32.9	20	4	20
지황	20	9.47	58.9	20	5.7	11.3
질경이 1년	20	8.16	40.8	20	2.14	10.7
질경이 2년	20	8.46	42.3	20	2.31	11.55
참당귀	20	11.31	56.55	20	4.05	20.25
참취	20	7.16	35.8	20	6.6	33
천궁	20	2.47	12.35	20	4.91	24.55
초피나무	20	8.33	41.65	20	5.7	28.5
치자나무	20	7.16	20.0	20	28.5	40.6
침(뿌리)	20	7.41	27.0	20	3.92	19.6
토종자두나무	20	2.47	20.0	20	43.6	29.0
파프리카(잎)	20	8.33	47.4	20	4.22	8.44
팔각	20	7.06	35.3	20	2.47	12.35
화선찰	20	4.67	23.35	20	1.64	8.2
흑자두나무	20	7.06	20	20	3.88	19.4
흑향찰	20	1.99	9.95	20	1.32	6.6
약선콩	20	8.98	44.9	20	3.14	15.7
콩(‘청아’)	20	10.51	52.55	20	3.55	17.75
서리태	20	9.27	46.35	20	3.62	18.1
쥐눈이콩	20	9.68	48.4	20	3.09	15.45
땅콩	20	11.84	59.2	20	2.27	11.35
팥	20	3.5	17.5	20	1.88	9.4

시료명	열수 추출			에탄올 추출		
	시료량(g)	동결건조량(g)	수율(%)	시료량(g)	동결건조량(g)	수율(%)
옻무	20	1.95	9.75	20	0.68	3.4
청차조	20	1.94	9.7	20	0.89	4.45
황차조	20	1.47	7.35	20	1.05	5.25
찰기장	20	1.39	6.95	20	0.8	4.0
단메밀	20	1.78	8.9	20	1.01	5.05
쓴메밀	20	1.11	5.55	20	0.76	3.8
녹두	20	5.69	28.45	20	2.18	10.9
찰보리	20	1.96	9.8	20	1.07	5.35
겉보리	20	1.89	9.45	20	1.03	5.15
밀	20	1.94	9.7	20	1.28	6.4
통밀	20	1.97	9.85	20	1.17	5.85
쌀눈	20	9.54	47.7	20	5.15	25.75
찰흑미	20	2.15	10.75	20	0.7	3.5
미강	10	3.8	38	20	3.51	17.55
귀노아	10	3.08	30.8	20	1.71	8.55
참깨	10	2.56	25.6	20	1.54	7.7
들깨	10	0.28	2.8	20	1.68	8.4
찰수수	10	0.57	5.7	20	0.66	3.3
아마란스	10	0.89	8.9	20	0.75	3.75
색소1호	10	0.76	7.6	20	0.91	4.55
색소2호	10	0.94	9.4	20	0.77	3.85
색소2호 알곡껍질	10	2.2	22	20	2.66	13.3
강일옥	10	0.86	8.6	20	1.1	5.5
강일옥 알곡껍질	10	2.26	22.6	20	2.63	13.15
콩('대원')	10	4.64	46.4	20	2.9	14.5
콩('소칭자')	10	5.07	50.7	20	3.46	17.3
콩('청자3호')	10	5.66	56.6	20	2.61	13.05
콩('대왕2호')	10	5.39	53.9	20	2.96	14.8
팥('아라리')	10	2.68	26.8	20	1.88	9.4
팥('강안')	10	2.58	25.8	20	1.87	9.35
수수('남풍찰')	10	0.75	7.5	20	0.84	4.2
수수('동안메')	10	0.86	8.6	20	0.87	4.35
느타리('영산')	10	6.6	66	20	6.37	31.85
산느타리('자산')	10	5.64	56.4	20	6.17	30.85
느타리('솔타리')	10	6.61	66.1	20	6.64	33.2
앞새('태미')	10	6.11	61.1	20	5.97	29.85
느타리('화성6호')	10	3.98	39.8	20	7.96	39.8
느타리('곤지7호')	10	3.48	34.85	20	6.97	34.85
표고('산조701호')	10	3.09	30.95	20	6.19	30.95
배초향(지상부)	10	3.09	30.9	20	1.62	8.1
배초향(꽃)	10	1.93	19.3	20	1.52	7.6

〈제2세부과제: 대사질환 개선 소재 스크리닝〉

52종 추출물을 대상으로 췌장 지방분해효소 저해능과 지방세포 억제활성 분석을 하였다. 잡곡류 중 메밀의 저해활성도가 가장 우수하였다(표 3). 쓴메밀 추출물 10 mg/mL는 81.9%, 단메밀 추출물 10 mg/mL는 56.00%의 저해활성을 보였다.

표 3. 잡곡류 에탄올 추출물의 Pancreatic lipase 저해활성(%)

시료명	농도(mg/mL)		
	1	5	10
칭차조	- ¹⁾	13.39±3.29	31.41±2.98
황차조	-	-	-
찰기장	-	-	23.73±3.64
단메밀	11.82±2.21	2676±6.06	56.00±2.72
쓴메밀	14.87±2.21	55.43±1.37	81.90±0.44
귀노아	17.92±5.57	20.47±1.59	22.07±2.82
율무	27.37±5.07	43.35±2.06	68.79±2.39
아마란스	22.12±3.23	-	-
옥수수(‘색소1호’)	15.83±3.05	11.04±0.29	8.30±6.23
옥수수(‘색소2호’)	22.43±2.01	15.21±1.05	21.00±2.93
옥수수(‘강일옥’)	25.30±3.14	21.17±2.91	12.54±2.47

1) -: Pancreatic lipase 저해활성 없음

두류 중 췌장 지방분해효소 저해활성도가 우수한 것은 ‘아라리’, ‘강안’ 팥 추출물로서, 10 mg/mL에서 53~54%의 저해활성 값을 보였다(그림 1). 저해활성 값을 나타내지 않은 것은 땅콩이었다.

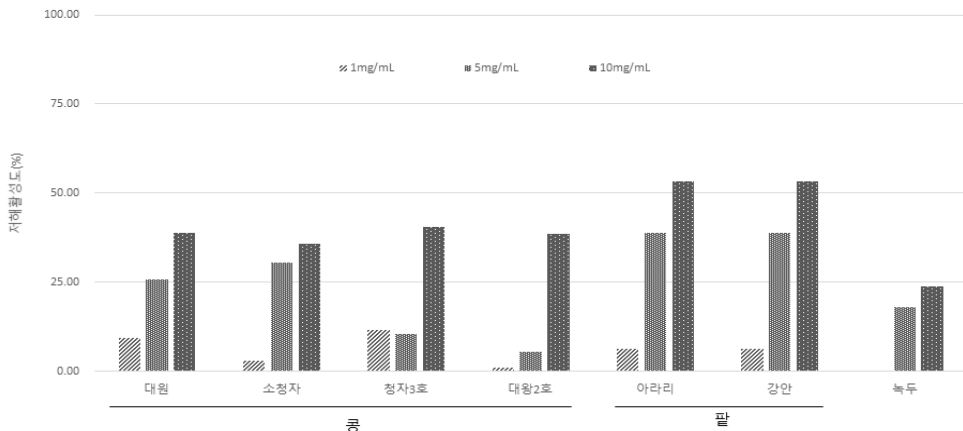


그림 1. 두류 에탄올 추출물의 Pancreatic lipase 저해활성(%)

맥류를 대상으로 비교한 결과 찰보리 추출물 10 mg/mL는 69.70 %로 가장 저해활성이 높았다(표 4).

표 4. 맥류 에탄올 추출물의 Pancreatic lipase 저해활성(%)

시료명	농도(mg/mL)		
	1	5	10
찰보리	21.09±4.79	46.38±4.98	69.70±0.62
겉보리	23.28±1.85	43.65±2.62	66.96±3.73
밀	24.49±8.82	30.78±1.58	28.91±4.31
통밀	25.12±4.88	25.17±3.96	22.60±2.72

앞새, 느타리 등 6종 버섯에 대한 췌장 지방분해효소 활성을 본 결과, 느타리 3품종(‘영산’, ‘화성6호’, ‘곤지7호’) 및 산느타리(‘자산’)에서 50 % 이상의 저해활성을 보였다(그림 2).

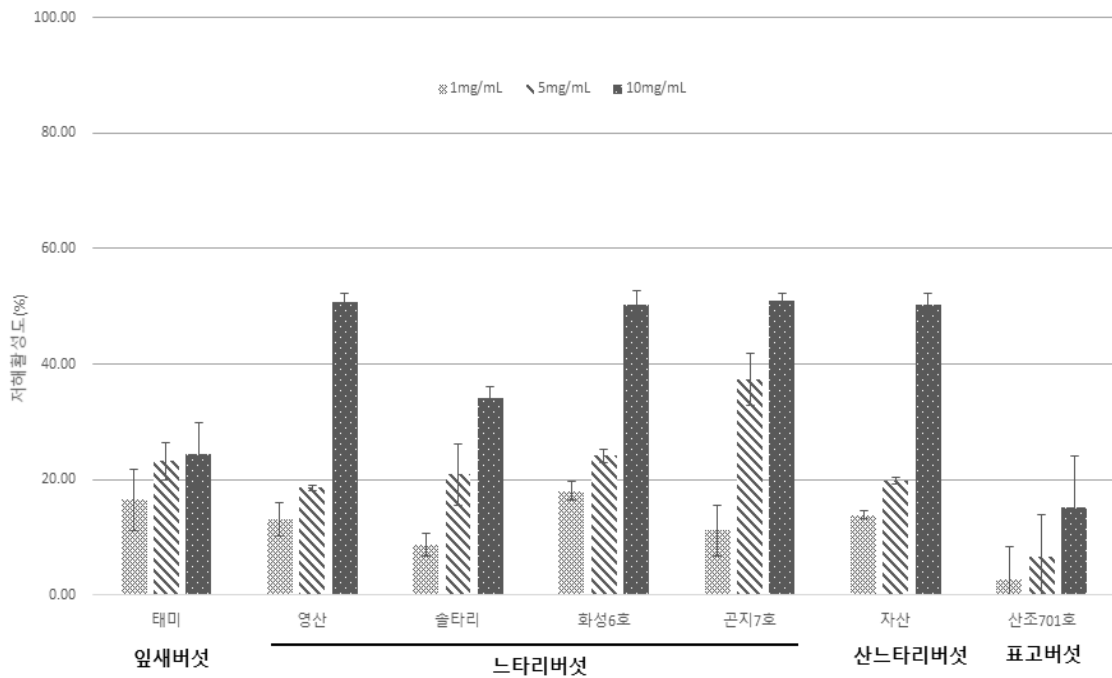


그림 2. 버섯류 에탄올 추출물의 Pancreatic lipase 저해활성(%)

MTT assay를 통해 3T3-L1 cell의 생존률 비교를 하였다(그림 3). 200~5,000 $\mu\text{g/mL}$ 내에서 세포 생존률 검정을 진행했으며, ‘아라리’, ‘강안’, 쓴메밀, 단메밀은 농도 400 $\mu\text{g/mL}$ 이하에서는 세포 생존률 80 % 이상을 보였다. 버섯류는 모든 농도에서 80 % 이상의 생존률을 나타냈다. 수수는 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 처리했을 때, ‘남풍찰’, ‘동안메’ 각각 45.1, 41.4 %의 생존률을 보여 농도를 더 낮추어 세포 생존률 검정을 진행하였다(그림 4). 2시료 모두 농도 50 $\mu\text{g/mL}$ 미만에서 80 % 이상의 세포 생존률을 보임.

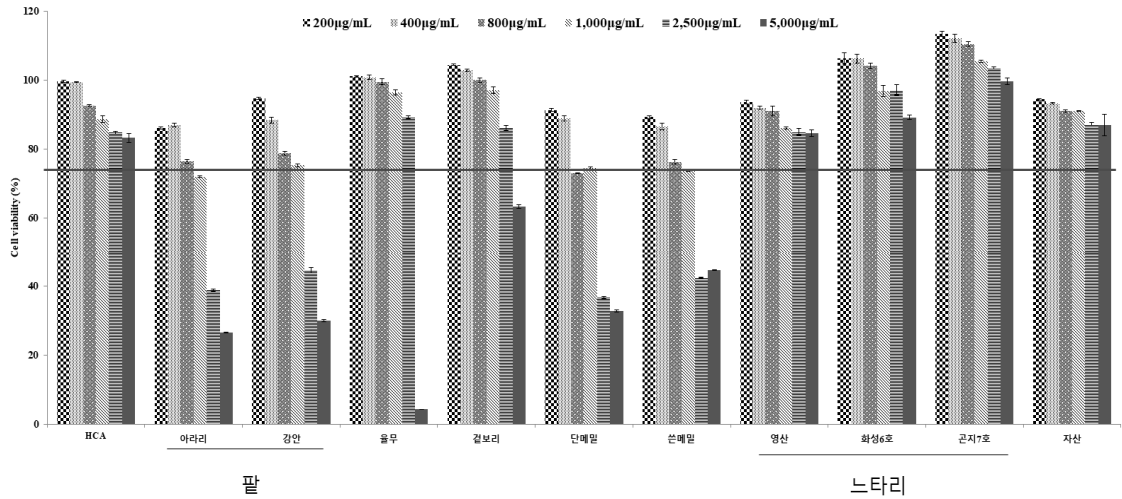


그림 3. 분석시료에 대한 3T3-L1 지방세포의 생존률(cell viability, %)

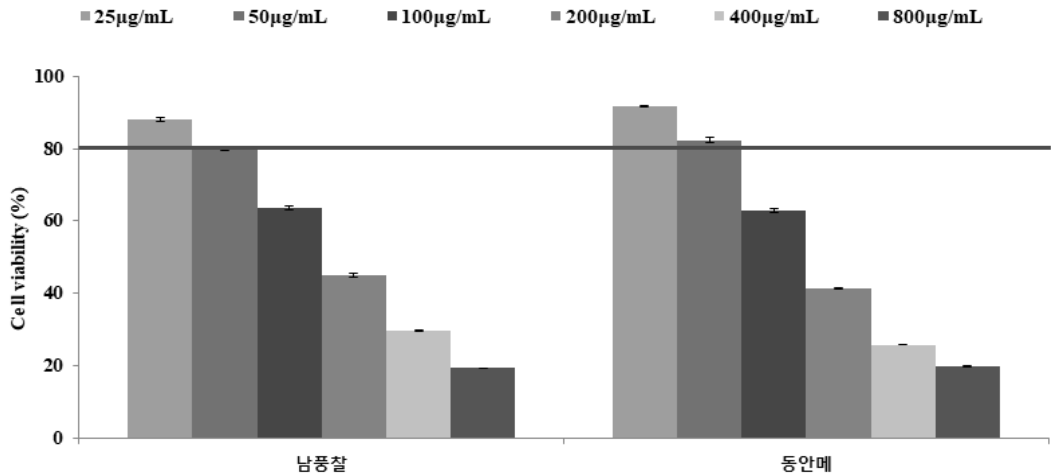


그림 4. 분석시료 수수에 대한 3T3-L1 지방세포의 생존률(cell viability, %)

3T3-L1 지방세포 생존률 80 % 이상인 농도별 시료를 대상으로 진행하였다. 양성대조군인 가르시니아 캄보지아 추출물(HCA) 100, 400 µg/mL의 지질 축적 억제 효과보다 우수한 시료는 없었다. 무처리군의 지질 축적율을 100% 기준 시, 모든 시료가 100% 이상의 지방 축적이 되는 결과를 보여 지질 축적 억제효과는 거의 없는 것으로 보인다.

〈제3세부과제: 면역기능 개선 소재 스크리닝〉

곡류 35종, 버섯류 7종의 에탄올 추출물을 이용하여 RAW264.7 세포생존율 측정결과 울무, 청차조, 황차조, 보리쌀, 참깨, 수수(남풍찰, 동안매), 미강은 모든 농도(100, 1,000 µg/mL)에서 세포독성이 나타

났다(그림 5). 찰기장, 찰보리, 통밀, 쌀눈, 찰흑미, 귀노아, 찰수수, 색소1호 알곡껍질은 1,000 μ g/mL 농도에서만 세포독성이 나타났으며, 그 외의 21종의 곡류 시료에서는 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. 버섯류 7종은 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.

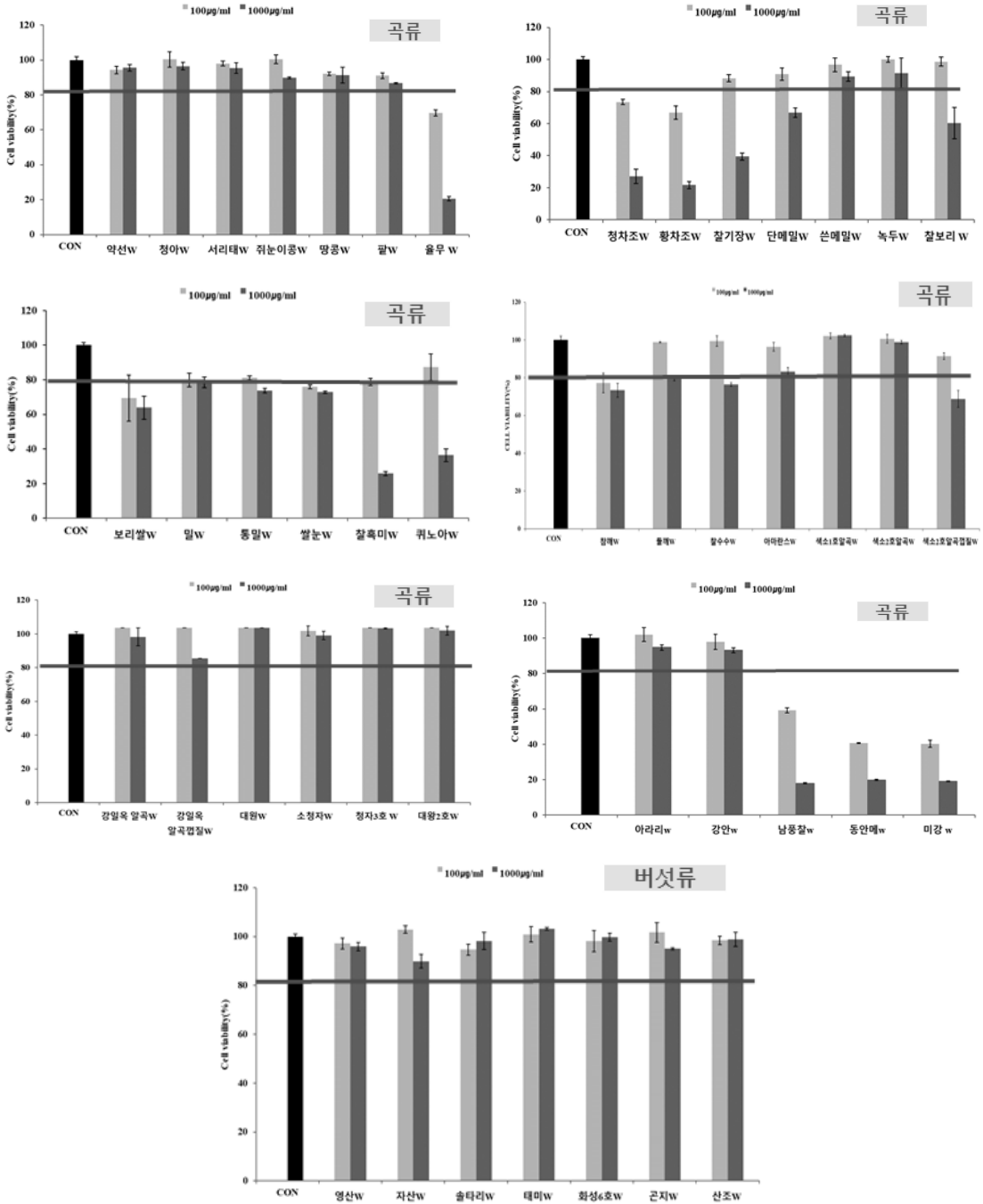


그림 5. 열수 추출물 세포생존율(곡류 35종, 버섯류 7종)

곡류 35종, 버섯류 7종의 에탄올 추출물을 이용하여 RAW264.7 세포생존을 측정결과 수수(남풍찰, 동안메) 1,000 μ g/mL를 제외하곤 모든 시료에서 세포독성이 없었다(그림 6).

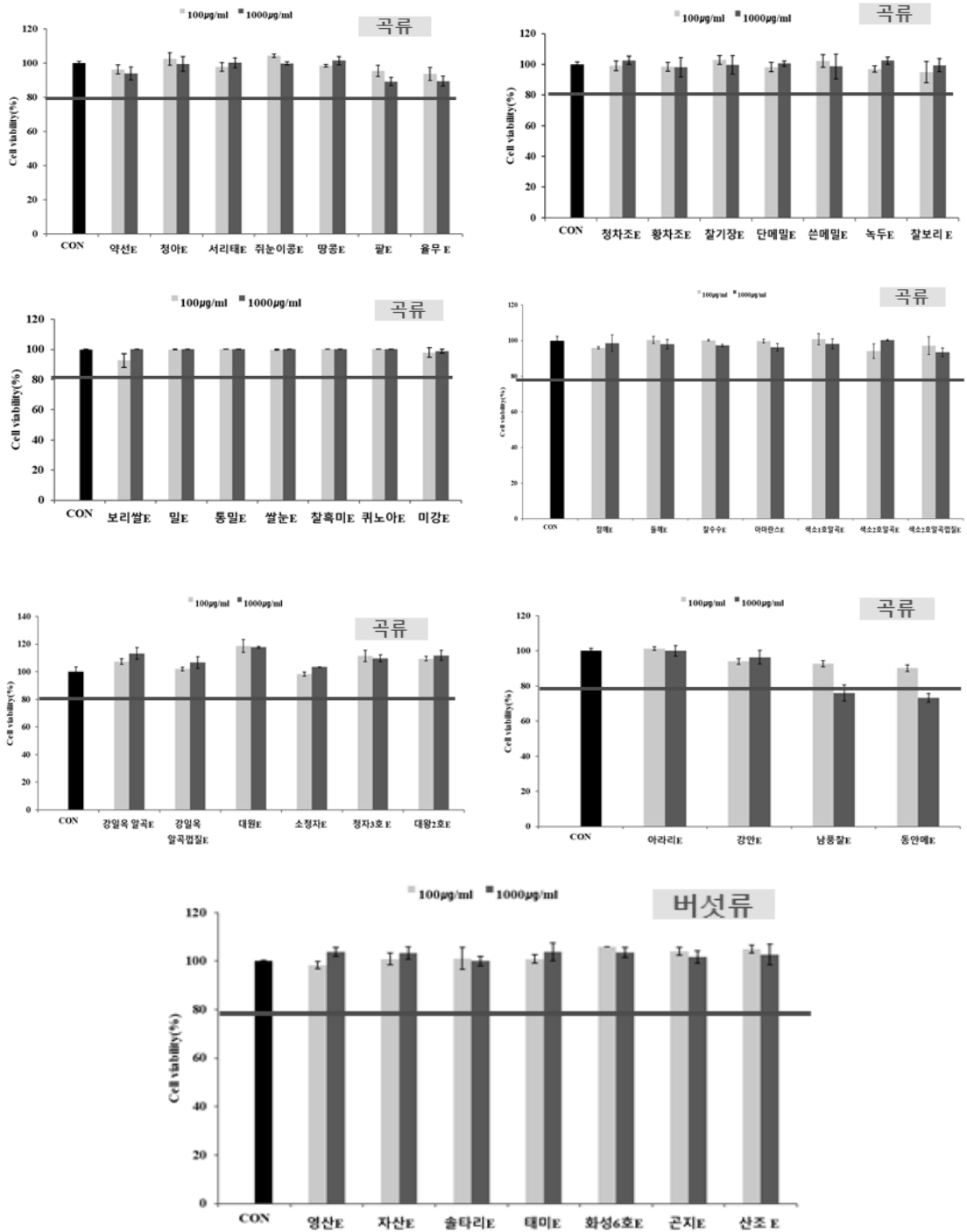


그림 6. 에탄올 추출물 세포생존율(곡류 35종, 버섯류 7종)

세포생존을 측정하여 80% 이상으로 확인된 곡류 20종, 버섯 7종의 물 추출물을 선발하여 NO 생성량을 측정하였다(표 5). 곡류 중 통밀이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 81.00%로 나타나 NO 생성 저해율이 가장 높게 나타났고, 버섯류 중 느타리버섯(자산)이 44.65%로 나타나 NO 생성 저해율이 높게 나타나 항염 효능이 좋게 나타났다.

표 5. 물 추출물 NO 생성 저해율

시료명	NO 생성 저해율(%)	
	100($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1000($\mu\text{g}/\text{mL}$)
콩(약선)	34.01	53.26
콩(청아콩)	43.17	81.37
콩(서리태)	40.68	62.27
콩(쥐눈이)	38.66	21.43
땅콩	38.66	28.73
팥	38.66	18.48
찰기장	40.83	-
단메밀	40.34	-
쓴메밀	34.96	51.59
녹두	44.01	28.12
찰보리	35.70	-
밀	79.76	78.38
통밀	81.00	-
찰흑미	78.74	-
귀노아	76.02	-
들깨	49.50	38.00
찰수수	37.25	-
아마란스	38.00	-
색소1호알곡	45.00	46.75
색소2호알곡	46.50	51.25
색소2호알곡껍질	37.50	-
강일옥알곡	24.75	5.05
강일옥알곡껍질	21.03	-
콩(대원)	30.30	1.66
콩(소청자)	24.34	-5.55
콩(청자3호)	34.44	8.61
콩(대왕2호)	27.32	1.24
팥(아라리)	24.89	17.45
팥(강안)	27.92	15.02
느타리버섯(영산)	34.56	50.15
산느타리버섯(자산)	44.65	50.15
느타리버섯(솔타리)	38.84	51.68
잎새버섯(태미)	34.56	53.52
느타리버섯(화성6호)	40.98	44.65
느타리버섯(곤지)	15.90	20.18
표고버섯(산조)	25.99	80.12

세포생존율 80% 이하로 측정된 수수(남풍찰, 동안메) 1000 μ g/mL 농도의 시료를 제외하고, 곡류 33종, 곡류 버섯 7종 에탄올 추출물을 선별하여 NO 생성량을 측정하였다(그림 7). 곡류 7종이(참깨, 들깨, 찰수수, 아마란스, 색소1호알곡, 색소2호알곡, 색소2호알곡껍질) 항염활성 효능이 좋게 나타났다. NO 생성 저해율 75% 이상인 위 시료를 선별하여 추후 시험에 활용하였다(표 6).

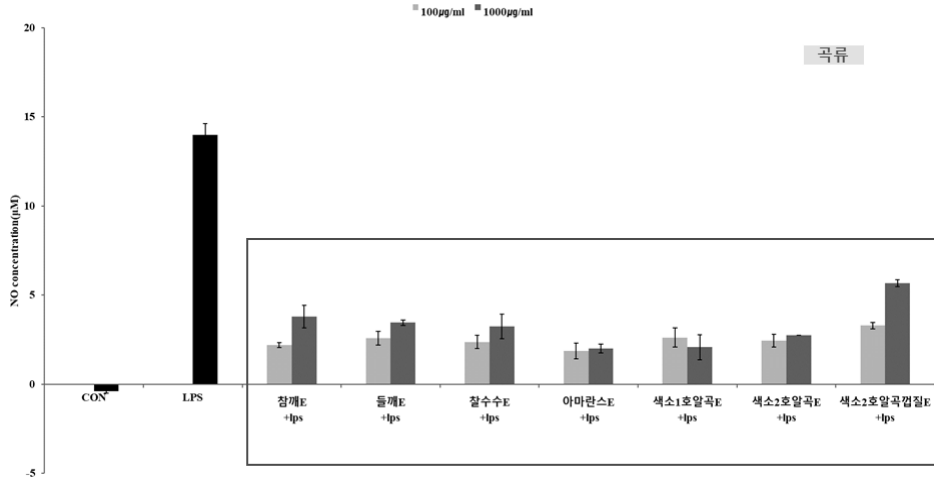


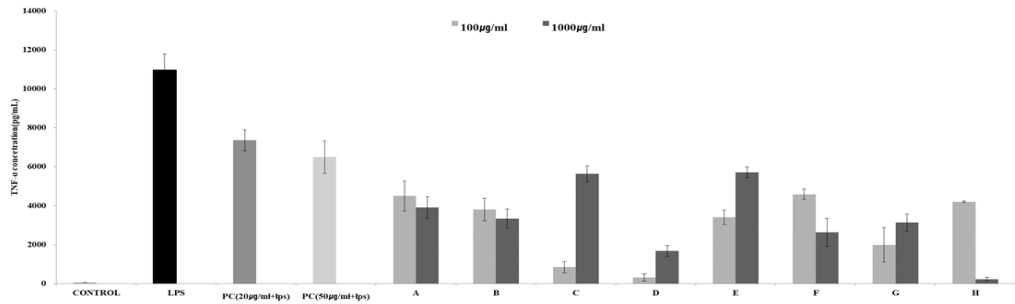
그림 7. 에탄올 추출물의 NO 생성량

표 6. 에탄올 추출물 NO 생성 저해율

시료명	NO 생성 저해율(%)	
	100(μ g/mL)	1000(μ g/mL)
콩(약선)	61.57	29.63
콩(청아콩)	66.67	34.31
콩(서리태)	70.06	48.46
콩(쥐눈이)	66.20	49.23
땅콩	67.28	42.13
팥	67.90	41.36
율무	64.81	47.38
청차조	63.08	-4.65
황차조	63.08	36.19
찰기장	26.89	55.01
단메밀	60.15	20.54
쓴메밀	57.46	21.27
녹두	62.10	16.87
찰보리	62.10	48.41
보리쌀	71.90	57.47

시료명	NO 생성 저해율(%)	
	100($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1000($\mu\text{g}/\text{mL}$)
밀	68.10	64.30
통밀	68.61	68.10
쌀눈	64.05	4.05
찰흑미	70.38	67.59
귀노아	68.86	54.68
미강	62.03	10.89
참깨	84.23	72.92
들깨	81.55	75.30
찰수수	83.04	76.79
아마란스	86.61	85.71
색소1호알곡	81.25	85.12
색소2호알곡	82.44	80.36
색소2호알곡껍질	76.49	59.52
강일옥알곡	49.10	50.54
강일옥알곡껍질	34.65	10.23
콩(대원)	48.92	36.71
콩(소청자)	46.68	25.22
콩(청자3호)	52.51	33.93
콩(대왕2호)	45.87	34.65
팥(아라리)	57.01	34.87
팥(강안)	59.39	28.03
수수(남풍찰)	74.20	-
수수(동안메)	79.78	-
느타리버섯(영산)	57.41	37.79
산느타리버섯(자산)	62.21	33.19
느타리버섯(솔타리)	53.24	23.80
앞새버섯(태미)	56.37	23.38
느타리버섯(화성6호)	60.54	38.20
느타리버섯(곤지)	55.95	37.37
표고버섯(산조)	59.29	29.44

항염활성에서 효능이 좋은 곡류 7종(참깨, 들깨, 찰수수, 아마란스, 색소1호알곡, 색소2호알곡, 색소2호알곡껍질)을 선발하였다. 곡류 7종의 에탄올 추출물에 대한 TNF- α 생성량을 측정된 결과, 모든 시료에서 양성대조구보다 TNF- α 생성 억제 효과가 있었으며, 특히 색소2호 알곡껍질 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 가장 효과가 우수했다(그림 8).



PC: 양성대조구, A: 찰흑미, B: 참깨, C: 들깨, D: 찰수수, E: 아마란스, F: 색소1호알곡
G: 색소2호알곡, H: 색소2호알곡껍질

그림 8. 에탄올 추출물의 TNF- α 생성량

곡류 38종, 버섯류 7종을 대상으로 혈전용해능을 검정한 결과 표 7과 같다.

표 7. 혈전용해활성

No.	시 료	혈전용해 반응	No.	시 료	혈전용해 반응
1	약선콩	-	24	찰수수	-
2	청아콩	-	25	아마란스	-
3	서리태콩	-	26	옥수수(색소1호)	-
4	쥐눈이콩	-	27	옥수수(색소2호)	-
5	땅콩	-	28	옥수수(색소2호알곡껍질)	-
6	팥	-	29	옥수수(강일옥)	-
7	율무	-	30	옥수수(강일옥알곡껍질)	-
8	청차조	-	31	콩(대원)	-
9	황차조	-	32	콩(소청자)	-
10	찰기장	-	33	콩(청자3호)	-
11	단메밀	-	34	콩(대왕2호)	-
12	쓴메밀	-	35	팥(아라리)	-
13	찰보리	-	36	팥(강안)	-
14	보리	-	37	수수(남풍찰)	-
15	밀	-	38	수수(동안메)	-
16	통밀	-	39	느타리버섯(영산)	+
17	쌀눈	-	40	산느타리버섯(자산)	+
18	찰흑미	-	41	느타리버섯(솔타리)	+
19	미강	-	42	느타리버섯(화성6호)	+
20	퀴노아	-	43	느타리버섯(곤지7호)	+
21	참깨	-	44	표고버섯(산조701호)	-
22	들깨	-	45	잎새버섯(태미)	+
23	녹두	-			

총 45종의 시료를 각각 D.W 10배, 50배, 100배 희석한 것과 plasmin(1 unit)을 같이 점적한 결과 총 6종의 시료에서 혈전 용해 활성이 나타났다(그림 9). 잎새버섯(태미)가 가장 높게 나타났다(그림 10).

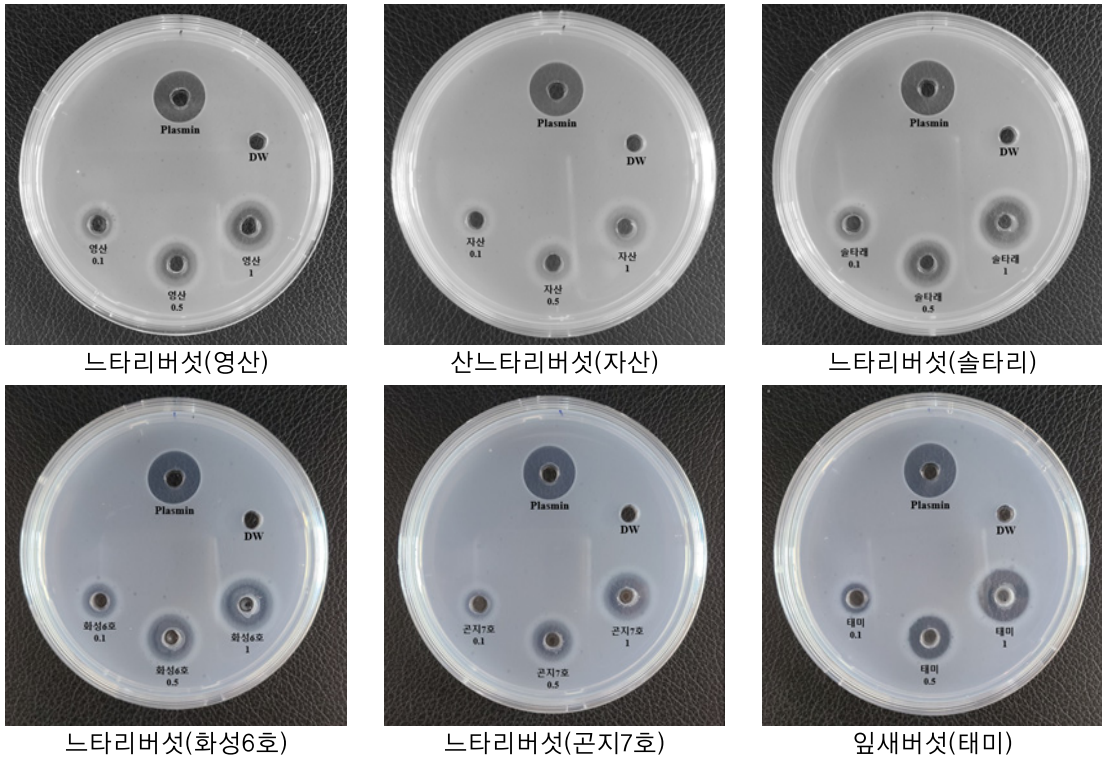
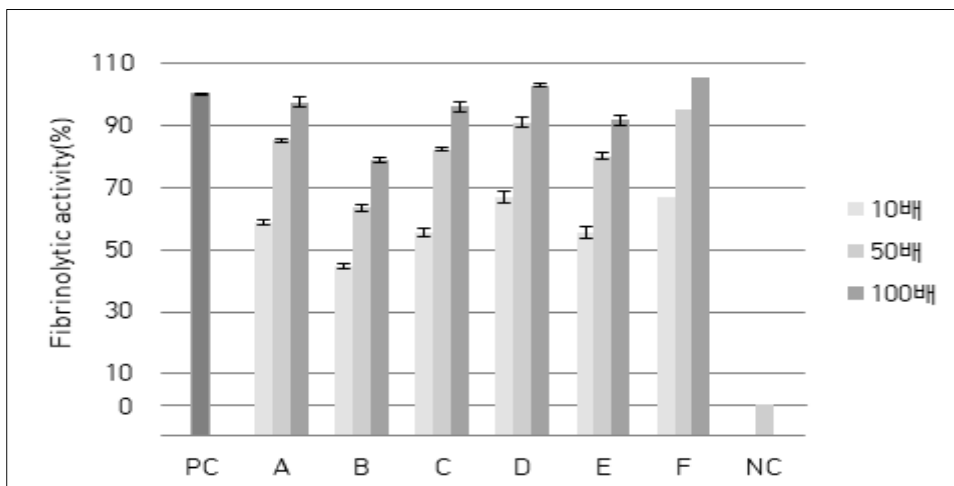


그림 9. 버섯류 6종 혈전용해 반응



PC: Plasmin, A: 느타리버섯(영산), B: 산느타리버섯(자산) C: 느타리버섯(솔타리)
D: 느타리버섯(화성6호), E: 느타리버섯(곤지7호), F: 잎새버섯(태미), NC: D.W

그림 6. 버섯류 6종 혈전용해 반응

4 적 요

- 가. 강원도의 농특산물 수집 및 추출하여 천연물 추출물 은행을 구축함
- 나. 대사질환 개선 소재를 스크리닝한 결과 췌장 지방분해효소 저해능이 가장 우수한 것은 쓴메밀이었으며, 10 mg/mL의 농도에서 81.9% 저해활성을 보였음.
- 다. 3T3-L1 세포의 생존률은 쓴메밀, 단메밀 농도 400 $\mu\text{g/mL}$ 이하에서는 세포 생존률 80 % 이상을 보였으며, 버섯류는 모든 농도에서 독성이 없었음. 하지만, 수수의 경우 타시료에 비해 세포생존률이 매우 낮아 비교적 높은 세포독성을 보였음.
- 라. 3T3-L1 세포생존률 80% 이상이 되는 시료 농도에서 지질 축적 억제 효과 검정을 진행하였으며, 모든 시료에서 지질 축적 억제 효과는 보이지 않았음.
- 마. 곡류 35종 및 버섯류 7종에 대해 RAW264.7 세포생존율을 측정한 결과, 울무, 청차조, 황차조, 보리쌀, 참깨, 수수, 미강의 모든 농도에서는 세포독성이 나타남. 반면, 서리태 등 곡류 21종 및 버섯류 7종에서는 세포독성이 나타나지 않았음.
- 바. 곡류 중 통밀이 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 81.00%로 나타나 NO 생성 저해율이 가장 높게 나타났고, 버섯류 중 느타리버섯(자산)이 44.65%로 나타나 NO 생성 저해율이 높게 나타나 항염 효능이 좋게 나타났음.
- 사. 참깨 등 곡류 7종은 양성대조구 대비 TNF- α 생성 억제 효과가 있어 항염활성이 우수함. 특히, 색소2호 알곡껍질 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 가장 효과가 우수했음.
- 아. 버섯류 모두에서 혈전 용해 활성이 나타났으며, 이 중 잎새버섯이 혈전용해율이 가장 높은 값을 보였음

5 인용문헌

- 박자영, 허진철, 안상미, 윤은영, 한상미, 황재삼, 강석우, 윤치영, 이상한. (2005). 약용근충추출물 라이브리리를 이용한 항산화 활성의 초고속 검색. 한국식품저장유통학회지, 12(5), 482-488.
- 문성희, 손주리, 신성진, 오승한, 김성환, 배지명. (2020). 치주질환 예방 및 개선제로서 숲개밀 추출물의 효능. 대한치과재료학회지, 47(4), 235-244.

6 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2019(1년)	학술발표	건강 기능성 소재 개발을 위한 산채 추출물의 리파아제 저해활성 및 3T3-L1 세포에서의 지방분화 억제효과
	학술발표	갯기름나물, 가시영경귀, 파프리카 잎의 일반성분 및 항비만 효과
	학술발표	국내 자생식물 추출물에서의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 항산화 활성 비교
	영농활용	산채 추출물의 리파아제 저해활성 및 지방분화억제 효과
	영농활용	자생식물 추출물의 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량과 항산화 효과 정보제공
	기타	80종 시료 수집, 160점 추출물 제조

연도(연차)	활용방안	제 목
2020(2년)	학술발표	Inhibitory effect of cereal grains and legumes extracts on pancreatic lipase in vitro
	학술발표	Comparison of Anti-inflammatory Activities of Mushrooms Produced in Gangwon
	영농정보	맥류 및 메밀 추출물의 췌장 지방분해효소 저해활성 효과
	영농정보	도내 생산 버섯류의 혈행 개선 효능 정보제공
	홍보	강원 농특산물 추출물 은행 구축과 항비만 기능성 소재 탐색(월간 새농사)
	기타	46종 시료 수집, 92점 추출물 제조

성과지표명		연 도		1년차(2019)		2년차(2020)		계	
		목표	실적	목표	실적	목표	실적		
학술 발표	국제								
	국내	2	3	2	2	4	5		
영농 활용	기술								
	정보	2	2	2	2	4	4		
DB구축		1	1	1	1	2	2		
홍 보					1		1		
계		5	6	5	6	10	12		

7 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도	
					'20	'21
과제책임자	농식품연구소	농업연구사	이재희	과제 총괄	○	○
1세부책임자	농식품연구소	농업연구사	이재희	세부주관 수행	○	○
2세부책임자	농식품연구소	농업연구사	이재희	세부주관 수행	○	○
3세부책임자	농식품연구소	농업연구사	박아름	세부주관 수행	○	○
공동연구자	농식품연구소	농업연구사	이기연	시험수행 및 평가	○	○
	농식품연구소	농업연구관	최성진	품질조사 지원	○	○
	농식품연구소	공무직	안혜원	평가분석 지원	○	○
	농식품연구소	공무직	신경신	평가분석 지원	○	○
	농식품연구소	공무직	정은경	평가분석 지원	○	○
	농식품연구소	공무직	김민정	평가분석 지원	○	○