

하고초의 면역조절에 의한 항암효과를 이용한 pharmafood의 개발 및 상품화

(Development of Pharmafood and manufactured using the effects of the *Prunella vulgaris* on the anti-cancer activity by immunomodulation and its mechanisms)

한 국 국 제 대 학 교

농림수산식품자료실



0017688

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “하고초의 면역조절에 의한 항암효과를 이용한 Pharmafood의 개발 및 상품화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009년 4월 일

주관연구기관명 : 한국국제대학교

주관연구책임자 : 서 중 권

세부연구책임자 : 정 영 철

연 구 원 : 강 인 수

연 구 원 : 전 성 식

연 구 원 : 강 신 권

연 구 원 : 전 은 우

연 구 원 : 이 수 정

연 구 원 : 최 준 민

협동연구기관명 : 조선대학교

협동연구책임자 : 정 혜 광

협동연구기관명 : 함양군농업기술센터

협동연구책임자 : 박 경 규

요 약 문

I. 제목

하고초의 면역조절에 의한 항암효과를 이용한 Pharmafood의 개발 및 상품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서는 하고초의 꽃, 전초, 뿌리의 활성성분 연구를 통해 유용물질을 분석하고, 다양한 생리활성(항고지혈증, 항산화활성, 항균활성 등)을 함유하는 천연물소재 및 조성물을 개발한 후 개발소재에 대한 대식세포 활성화 및 임파구 증식능과 각종 cytokines 및 종양발생억제기능을 갖는 유전자의 발현을 연구함.

또한 하고초 천연물소재로부터 조사된 면역조절 활성을 기초로 *in vitro*에서 암세포 전이와 관련한 비특이적 면역반응(자연살해(NK)세포활성)과 인체 암세포주 (HL-60 및 MCF-7)에서 암세포 성장 억제능, *in vivo* 생존 연장을 및 C57BL/6 mouse를 이용한 암전이 억제능을 검증하고, 이러한 연구결과에 기초하여 함양군에서 다량 재배되고 있는 하고초를 이용한 다양한 유형의 약용식품(Pharmafood)을 개발하고, 이를 지역관광 브랜드상품으로 집중 육성코자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

구분	연도	연구개발의 내용	연구개발의 범위
1차 년도	2006	•원료(하고초)의 전처리 방법개발	•전처리 조건별 건조수율, 추출수율 측정 •시료별 동결건조 수율 측정 및 조건선정
		•하고초의 꽃, 전초 및 뿌리의 유효성분 및 지표물질 함량 분석	•용매별 추출물의 유효성분 분석 •메탄올 추출물의 지표물질 함량 분석 •하고초꽃의 당함량 분석
		•하고초 추출용매별, 분획별 생물활성 검증	•하고초 전초추출물의 항산화활성 측정 •유기용매 분획별 항균활성 측정 •하고초 전초 및 뿌리의 항산화활성 비교
		•하고초 추출물의 면역활성 연구	•하고초의 면역조절관련 Cytokines의 생성연구 •암세포 살해 및 성장억제 관련 면역활성 •자연살해세포(NK cell)의 활성 측정 •T 림프구의 증식 및 세포독성 T림프구 활성 측정

구분	연도	연구개발의 내용	연구개발의 범위
2차 년도	2007	<ul style="list-style-type: none"> ●하고초의 최적 배합조건 확립 및 최적조성물 개발(생산공정확립) 	<ul style="list-style-type: none"> ●하고초 함유 최적배합조건 확립 ●최적조성물 개발 및 생산공정 확립
		<ul style="list-style-type: none"> ●개발신소재의 생물활성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ●하고초 부위별 추출물의 항산화활성 연구 ●동물실험을 통한 항고지혈증 효과 연구
		<ul style="list-style-type: none"> ●면역증강물질(지표물질)의 함량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ●열수추출물 및 MeOH 추출물의 지표 물질 함량분석
		<ul style="list-style-type: none"> ●하고초의 대식세포 활성화 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ●면역증강활성 관련 대식세포 활성화검증 <ul style="list-style-type: none"> - 탐식능 측정, 반응성 산소종(ROI) 및 NO 생성 측정 - B, T 임과구 증식반응에 대한 영향연구
3차 년도	2008	<ul style="list-style-type: none"> ●하고초 추출물 및 유효성분의 항암 활성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ●하고초 유용물질을 이용한 면역증강활성 연구 ●하고초 유용물질의 암세포 살해 및 성장억제와 관련된 면역증강활성 연구 ●하고초 유용물질의 in vivo/in vitro 암 전이 억제능에 대한 연구
		<ul style="list-style-type: none"> ●대량생산 공정 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ●하고초 천연물소재의 생산공정 구축 ●개발제품의 생산공정 최적화 연구
		<ul style="list-style-type: none"> ●개발 시제품의 평가(저장성, 품질) 	<ul style="list-style-type: none"> ●개발시제품의 일반성분 및 영양성분 분석 ●개발시제품의 저장성 연구 ●개발시제품의 품질평가
		<ul style="list-style-type: none"> ●개발시제품의 생물활성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ●동물실험을 통한 개발제품의 섭취량에 따른 항고지혈증 활성 연구
		<ul style="list-style-type: none"> ●시제품 생산 및 상품화 ●산업재산권 출원 및 등록 	<ul style="list-style-type: none"> ●유형별 시제품 생산 (분말류, 액상류) ●특허등록 2건, 상표 등록 1건

V. 연구개발결과

1. 하고초(*Prunella vulgaris*, Hagocho)의 전처리 방법 및 최적조성물 개발

하고초 건조조건 선정실험에서는 열풍건조, 동결건조, 태양건조, 음건 순으로 높은 수율을 보였으며, 추출조건은 열수, 에탄올, 메탄올 추출물 순이었으며, 선정된 전처리 조건에 따라 제조된 천연물 신소재를 포함하여 항고지혈증 효과가 우수한 최적조성물 개발을 위해 혈액순환기계질 환 개선에 적합한 부원료 5종을 선정하여 활성검증용 하고초 최적조성물로 사용하였음.

2. 하고초의 유효성분 및 지표물질 분석

하고초의 추출물의 무기질 함량 분석결과, 열수추출물 및 에탄올 추출물 분석에서는 각각 칼륨(K)의 함량이 65.92 μ g/ml로 가장 많이 검출되었으며, 열수추출물에서 Vitamin C와 Vitamin B1이 각각 0.741ppm, 0.281ppm로 분석되었고, Tannic acid는 0.438ppm 검출되었다. 하고초의 지표물질인 ursolic acid는 300ppm 속에 0.516 μ l의 함량을 확인할 수 있었으며, 하고초 꿀의 당은 Xylose가 5,599ppm으로 함량이 가장 높았으며, Glucose는 2,443ppm, Sucrose는 388ppm으로 각각 분석되었음. 또한 하고초 용매별, 부위별(상부,하부) 추출물의 Ursolic acid 함량분석 결과, 메탄올 추출물의 상부에서는 2.02%, 하부에서는 1.02% 측정되었음.

3. 개발시제품 평가

하고초를 이용한 개발시제품의 일반성분을 분석한 결과, 열량 7.3kcal/100g, 탄수화물 1.3g/100g, 조단백 0.3g/100g, 조지방 0.1g/100g으로 조사되었으며, 조회분은 0.4%, 조섬유는 0.02%로 나타났다. 특히 무기질 분석결과에서는 칼륨(K)의 함량이 57.08mg/100g으로 가장 높게 검출되었음. 개발시제품의 영양평가 항목인 당류는 1.2g/100g, 포화지방은 0.1g/100g이었으나, 트랜스지방과 콜레스테롤은 검출되지 않았음.

4. 개발시제품의 저장중 품질평가

제품 저장중 pH, 고형분, 산도는 저장기간이 길어질수록 다소 낮아지는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았음. 또한 미살균 처리된 군에서는 저장기간 동안 72/300 μ l 단위의 일반세균이 검출되었으나, 살균처리 실험군에서는 저장중에는 대장균과 일반세균은 검출되지 않았음. Hunter 색차계를 이용하여 개발제품의 색도를 측정결과, 저장기간이 길어질수록 L값(명도)은 약간의 감소를 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았고, 대체적으로 불투명한 색상을 나타내었으며 a값은 저장기간 중 +19.22~+21.40의 범위, b값은 +16.11~+22.5 범위로 조사되었음. 개발 시제품의 관능평가에 있어서 색상은 전반적으로 보통 수준이었으며, 향미는 약함, 신맛은 다소 강함, 단맛은 좋음으로 평가되었음.

5. 하고초 부위별 MeOH 추출물의 생물활성

하고초를 부위별(전초, 꽃대 및 줄기)로 메탄올 추출하여 항산화 활성을 비교한 결과 총 페놀 화합물은 꽃대에서 77.1 mg/100 g으로 다른 부위에 비해 유의적인 차이를 보였으며, 전초와 줄기는 54.0 mg/100 g 이하였음. 플라보노이드는 줄기에서 36.1 mg/100 g으로 가장 높았음. 전자공여능은 시료의 농도에 의존적으로 증가하는 경향으로 500 µg/mL 첨가 시에는 70% 이상의 전자공여능을 보였으며, 1,000 µg/mL 첨가 시 꽃대에서 92.1%로 유의적으로 높았고. 환원력은 전자공여능과 유사한 경향이었으며, 꽃대에서 100~1,000 µg/mL 첨가 시 0.3~1.9, 전초는 0.2~1.6, 줄기는 0.2~1.5의 범위로 꽃대 > 전초 > 줄기 순서로 높았음. Hydroxyl radical 소거능은 100 µg/mL 첨가 시 80% 이상이었으며, 부위별 유의차가 없었고, β-carotene-linoleic acid계에서 지질과산화 억제능은 1,000 µg/mL 첨가 시 47.5~84.6%로 꽃대에서 항산화능이 가장 높았음. ABTs 라디칼 소거능은 250 µg/mL 첨가 시 50% 이상의 소거능을 보였으며, 500~1,000 µg/mL 첨가 시 85.0~92.3%로 농도간에 유의차가 없었음. 1,000 µg/mL 첨가 시 nitric oxide 소거능은 꽃대에서 19.7%로 전초 및 줄기에 비해 유의적으로 높았고, 아질산염 소거능은 꽃대와 줄기에서 각각 30.7%와 32.5%로 전초에 비해 유의적으로 높았음.

6. 하고초 최적조성물의 항산화활성

개발된 최적조성물의 전자공여능을 측정한 결과, 실험군 모두 시료의 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 높게 나타났으며, 특히 결명자, 산사육, 하고초의 전자공여능이 높게 관찰되었음. 부원료 시료의 농도에 비례적으로 환원력이 증가하였으며, 주원료를 첨가하지 않은 조성물군 보다는 하고초 천연물소재를 첨가했을 경우 더 높은 항산화활성을 확인할 수 있었음. 특히 하고초 신소재의 농도가 1000ppm 이상 첨가된 조성물군에서는 총페놀, 플라보노이드, 전자공여능 및 환원력이 하고초 천연물소재 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었음.

7. 개발 시제품의 항고지혈증 효과 검증

개발시제품을 이용한 동물실험 결과 체중 증가량은 고지혈증 유발군(대조군)과 Hagocho 200, 300 급이군에서는 정상군에 비해 전반적으로 증가하는 경향을 보였으며, Hagocho100 급이군에서 158.57±27.34g로 가장 높은 증가를 나타내었음. 또한 실험동물의 식이량은 정상군에 비해 모든 실험군이 다소 적어지는 경향이었으며, 식이효율(FER)은 정상군에 비해 모든 실험군에서 유의적으로 높은 경향을 보였음. 간과 췌장의 무게는 정상군과 실험군간에 유의적인 차이를 보이면서 감소되는 경향이 있었으며, 심장, 신장, 비장의 무게는 다소 감소되는 경향을 보였으나 전반적으로 유의성 있는 변화는 보이지 않았음. 정상군의 혈당은 136.27mg/dL 였고, 고지혈증 유발군(대조군)의 혈당은 181.34mg/dL로 증가함이 확인되었는데, 하고초 시제품의 농도를 달리하여 급이한 실험군에서는 혈당 감소효과가 정상군 수준에는 미치지 못하였으나, 혈당이 다소 감소되었음. 혈청 중 총 지질은 고지혈증 유발군에

서는 $275.61 \pm 5.23 \text{ mg/dL}$ 로 증가하였으나, 하고초 급이군에서는 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보였고, 총 콜레스테롤은 Hagocho300 급이군에서 정상군 수준의 콜레스테롤 감소효과를 보였음. 고지혈증 유발군의 중성지방은 $58.28 \pm 3.96 \text{ mg/dL}$ 로 매우 높게 나타났으나, 하고초 급이군에서는 유의적으로 낮아지는 경향을 보였으며, 특히 Hagocho300 급이군에서는 정상군과 유사한 수준까지 중성지방 함량이 감소되는 결과를 보였음. 또한 HDL-cholesterol 함량을 측정한 결과, 하고초 시제품 급이군에서는 농도 의존적으로 증가되는 경향을 보였으며, 특히 Hagocho 200과 300 급이군에서는 정상군과 유사한 수준까지 HDL-C이 증가하였고, LDL-C과 동맥경화지수(AI)는 감소되는 경향을 보였음. 혈청 중 단백질 함량은 실험군간 유의적인 차이는 보이지 않았으나, Hagocho300 급이군에서는 다소 증가하는 경향이였으며, GOT 및 GPT 함량은 개발 시제품 급이군에서는 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였음. 특히 Hagocho100 급이군에서는 유의적인 감소효과가 없었으나, Hagocho200 이상 농도의 시제품 급이군에서는 유의성 있는 감소효과가 관찰 되었음. 간장 조직중의 DPPH 소거능은 하고초 시제품 농도에 의존적으로 증가하였으며, TBARS 함량은 Hagocho300 급이군에서 정상군 보다 오히려 우수한 활성을 보였음.

8. 하고초 (*Prunella vulgaris*) 유용물질을 이용한 면역증강 활성 연구

하고초 추출물의 세포독성에 대한 영향 조사: 세포독성이 나타나지 않은 $1 \sim 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 에서 하고초 꽃, 줄기의 열수 추출물과 EtOH 추출물을 실험에 사용함. 면역조절관련 cytokines의 생성에 대한 영향 조사: 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물에서만 TNF- α , IL-6, IL1 β 의 생성량이 증가하였음. 특이적 면역반응 관련 비장 림프구 활성 측정: 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물에서만 전체 비장 림프구, T 림프구, B 림프구 활성이 증가하였음. 종양 발생 억제관련 유전자인 iNOS의 발현에 대한 영향 조사: 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물에서 iNOS의 유전자 및 단백질 발현이 증가하였음.

9. 하고초 유용물질의 암세포 살해 및 성장억제와 관련된 면역증강활성 연구

비특이적 면역반응인 자연살해세포 (NK cell)의 암세포 살해능에 대한 영향 조사 결과, 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물에서 자연살해세포의 암세포 살해능이 증가하였음. *In vitro* 암세포 증식 억제 활성에 대한 영향 조사에서는 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물에 의해 HepG2 (인체 간암 세포주), MCF-7 (인체 유방암 세포주), A549 (인체 폐암 세포주), EL-4 (인체 림프종)의 암세포 증식능에 변화가 없었음.

10. 하고초 유용물질의 *in vivo* / *in vitro* 암 전이 억제능에 대한 연구

In vivo 암 전이 억제능에 대한 영향 조사결과, 하고초 전초에 의해 폐암 전이 및 고형암 생성이 억제되었음. *In vitro* 암전이 억제능에 대한 영향 조사에서는 하고초 전초에 의해 MMP-9의 유전자 발현 및 단백질 활성이 감소하였으며, MMP-9의 조절에 관여하는 전사조절인자가 NF- κ B임을 확인하였음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 실적

생산제품명	실적(건)	성과활용계획
① 하늘빛고운초 진액(하고초 진액)	1	기술이전 (생산 판매중)
② 하고초 건강기능식품신소재	1	건강기능식품 생산전문업체 소재 납품
③ 하고초 음료	1	OEM 생산
④ 일반식품(환, 과립)	2	직접생산

2. 특허등록 실적

특허명	실적(건)	성과활용계획
① 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방, 치료 및 억제용 조성물 (특허 제 10-0749522호, 2007년 8월 8일 등록)	2	기술이전 및 상품생산
② 하고초를 이용한 건강음료의 제조방법 (특허 제10-0849611호, 2008년 7월 25일, 특허등록)		
③ 하고초의 항고지혈증 활성 조성물	1	출원 예정 (2009.5월)
④ 상표등록 (하늘빛고운초)	1	함양군 하고초 특산품 및 패키지 제품에 활용

3. 논문 및 학술발표 실적

구분	논문명	성과활용 계 획
SCI (해외)	① Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Yong Pil Hwang, Hye Jin Park, Chul Yung Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2009) Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> . <i>Food and Chemical Toxicology</i> 47(1): 62-69.	특허등록 및 기술이전용
등재 학술지 (국내)	② 이수정, 성낙주, 정혜광, 신정혜, 정영철, 서종권 (2008) 하고초 메탄올 추출물의 항산화 활성 (Antioxidant activities of methanol extracts from <i>Prunella vulgaris</i>) 한국식품영양과학회지 37(12): 1535-1541	특허등록 및 기술이전용
학술발표 (해외)	③ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2008) Immunomodulatory effect of extracts aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> in RAW 264.7 cells. <i>2008 Annual Conference. Nutraceutical, Functional Foods, Natural Health Products and Dietary Supplements</i> . 2008. November 14-17. Taichung, Taiwan. (2008 International Society for Nutraceuticals and Functional foods. (2008 ISNFF) 국제기능성식품학회)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (해외)	④ Eun Hee Han, Jin Hee Park, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2009) Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> . <i>The 48th Annual Meeting of Society of Toxicology</i> , Baltimore, MA, USA. Mar 15-19. (미국 독성학회)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (해외)	⑤ Jong Kwon Seo, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Hye Gwang Jeong (2009) <i>Prunella vulgaris</i> inhibits tumor cell metastasis and growth by modulating expressions of matrix metalloproteinase-9. <i>The 48th Annual Meeting of Society of Toxicology</i> , Baltimore, MA, USA. Mar 15-19. (미국 독성학회)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑥ Eun Hee Han, Kim Ji Young, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2006) Immunostimulatory Effects of <i>Prunella vulgaris</i> . <i>58th Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea</i> . November 6-7. Seoul (대한약학회)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑦ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) <i>Prunella vulgaris</i> Increases the Lymphocyte Proliferation and Natural Killer Cell Activity. <i>Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea</i> . April 30-May 3. Jeju, Korea (대한약학회-춘계)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑧ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) Effects of flower and stalk from <i>Prunella vulgaris</i> on the macrophage functions. <i>Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea</i> . April 30-May 3. Jeju, Korea (대한약학회-춘계)	제품개발 기반기술로 활용

구분	논문명	성과활용 계획
학술발표 (국내)	⑨ Eun Hee Han, Jin Hee Park, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) Effects of Aqueous Extract Isolated from <i>Prunella Vulgaris</i> on Macrophage activation. <i>Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea</i> . October 23-24. Seoul, Korea (대한약학회-추계)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑩ Seo Jong Kwon, Soo Jung Lee, Jung Hye Shin, Young Chul Chung, Hey Gwang Jeong, Nak Ju Sung. (2008) Antioxidative Activities of Hagocho (<i>Prunella vulgaris</i>) Methanol Extracts. <i>49th International Symposium of Korean Society of Life Science</i> . October 10-11. Taejeon, Korea (한국생명과학회-추계)	제품개발 기반기술로 활용

4. 인력양성실적

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
3	2	1			1	2			3

5. 수상실적

일 자	대회명	수상명	역 할
2008-10	제54회 전국과학전람회	교육과학기술부장관상 (우수상 수상)	과학전람회 참가 지도교수 (하고초 식물분야)

6. 언론홍보실적

구 분	계	비 고
TV (방송) 홍보실적	6건	증빙자료 : 부록 별첨
신문 (기사) 홍보실적	23건	
국내외 전시 (박람회) 참가실적	5건	
합 계	34건	

SUMMARY

The aim of the present study was to investigate their the antioxidant activities of methanol extracts from whole plant, flower stalk and stem of Hagocho(*Prunella vulgaris*). Content of total phenolic compound was the highest in flower stalk (77.1 mg/100g) and those of others below 54.0 mg/100g. Flavonoid contents was the highest in stem (36.1 mg/100 g) than other samples. Electron donating ability of *Prunella vulgaris* was activated over 70% in all sample at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration, especially, the activity was the highest(92.1%) in flower stalk extracts. Reducing power was similar tendency to electron donating ability, which was significantly higher flower stalk(0.3~1.9), whole plant(0.2~1.6) and stem(0.2~1.5). Hydroxyl radical was scavenged over 80% in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration, was not significant between different parts. Antioxidant activity in β -carotene-linoleic acid system, was 47.5~84.6% when 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methanol extracts added to reaction mixtures, and flower stalk showed the highest activity. Ability of ABTs cation decolorization from *Prunella vulgaris* was activated over 50% in all samples when 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of methanol extracts added to reaction mixtures and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were the most suitable concentration for its activation. Nitric oxide scavenging activity was lower under 20%, but its activity was significantly higher in flower stalk than other parts. The results indicate that flower stalk from *Prunella vulgaris* has potent antioxidant activities.

Prunella vulgaris (*P. vulgaris*) has been used as a traditional medicine in the clinical treatment of herpetic keratitis and for its antioxidative and antimicrobial activities. In this study, we examined the immunostimulatory and antitumor activity of *P. vulgaris* in murine macrophage RAW 264.7 cells. Thus, we investigated the effects of an aqueous extract of *P. vulgaris* (PVAE) on macrophage function. We found that PVAE stimulated macrophage phagocytic activity, nitric oxide (NO) production and cytostatic activity. In addition, PVAE induced gene expression and production of macrophage-related cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. Transient transfection revealed that NF- κ B mediated the PVAE-induced increases in macrophage-related cytokine expression levels.

Mitogen-activated protein kinases (MAP Kinase) were also significantly activated by the PVAE-induced NF- κ B activation. Pretreatment with NF- κ B inhibitor and MAP Kinase inhibitors inhibited the NO production and the phagocytic activity induced by PVAE.

This demonstrates that PVAE stimulates macrophage activation via NF- κ B transactivation and MAP kinase activation. In addition to, we investigated the effects of *Prunella vulgaris* on lung metastasis and solid tumor growth in mouse. *Prunella vulgaris* has a strong inhibitory tumor growth effect and anti-metastasis effect. In this current study, the effects of *Prunella vulgaris* on MMP-9 expression and activity were assessed in HT-1080 fibrosarcoma cells. Results indicated that *Prunella vulgaris* were decreased PMA-induced MMP-9 expression and activity in a dose-dependent manner by RT-PCR and gelatin zymography but didn't change TIMP-1 expression by RT-PCR. This demonstrates that PVAE stimulates macrophage activation via NF- κ B transactivation and MAP kinase activation. Moreover, PVAE has anti-cancer effect via NF- κ B transactivation.

Contents

하고초의 면역조절에 의한 항암효과를 이용한 Pharmafood의 개발 및 상품화

I. A object and necessity of study	2
II. The present state of technology and development	7
III. A result of study	13
1. Development of pre-treatment conditions and compounds	13
2. Isolation of chemical composition and main components of Hagocho	21
3. Investigation of biological activity and antioxidant activity	37
4. Study of anti-cancer activity by the immunomodulation of Hagocho	73
5. Study of process	98
6. Development of functional food using Hagocho	102
IV. A plan of application	113
V. Reference	123

Contents

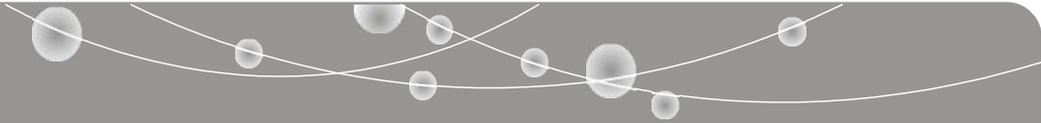
목차

하고초의 면역조절에 의한 항암효과를 이용한 Pharmafood의 개발 및 상품화

제1장 연구개발과제의 개요	2
1. 연구개발의 목적	2
2. 연구개발의 필요성	2
3. 연구개발의 내용 및 범위	4
제2장 국내외 기술개발 현황	7
1. 국내기술개발 현황	7
2. 국외기술개발 현황	8
3. 국내·외의 연구현황	9
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	13
제1절 하고초의 전처리 조건 및 최적조성물 개발	13
1. 하고초(<i>Prunella vulgaris</i>)의 전처리 방법 개발	13
가. 연구재료	13
나. 원료전처리	13
2. 하고초 함유 최적조성물 개발	17
가. 항고지혈증 및 간장질환 개선용 부원료 선정	17
나. 한의학에 의한 고지혈증 개선용 부원료 선정	19
다. 하고초 및 선정생약재의 추출 수율	20
라. 하고초 최적조성물의 배합조건 확립	20
제2절 하고초의 유효성분 및 지표물질 분석	21
1. 유효성분 및 지표물질 분석	21
가. 하고초의 유용물질 분획	21
나. 무기질 함량 분석	22
다. 유용물질 분석	23
라. 지표물질 분석	24
마. 하고초 꿀의 당 함량 분석	25
2. 용매별 추출물의 지표물질(ursolic acid) 함량 분석	26
가. 하고초 추출물의 ursolic acid 함량분석	26
3. 개발시제품 평가	30

가. 개발시제품의 일반성분 분석	30
나. 개발시제품의 영양평가	31
다. 개발시제품의 저장성 연구	32
라. 개발시제품의 품질평가	33
마. 개발시제품의 관능평가	35
제3절 하고초의 생물활성 연구	37
1. 하고초 추출물의 항산화활성 및 항균활성	37
가. 하고초 추출물의 항산화활성	37
나. 하고초 추출물의 항균활성	42
2. 하고초 부위별 MeOH 추출물의 생물활성	43
가. 추출 수율, pH 및 갈색도	43
나. 총페놀 및 플라보노이드 함량	44
다. 전자공여능	45
라. 환원력	45
마. OH 라디칼 소거능	46
바. β -caroten-linoleic acid계에서의 지질과산화 억제능	47
사. ABTs 라디칼 소거능	48
아. 아질산염 소거능	49
3. 하고초 추출물의 항고지혈증 효과	50
가. 재료 및 방법	50
나. 결과 및 고찰	53
4. 하고초 최적조성물의 항산화활성	59
가. 주원료 및 부원료의 항산화활성	59
나. 하고초 조성물의 항산화활성	60
5. 개발 시제품의 항고지혈증 효과 검증	61
가. 실험동물의 사육	61
나. 식이의 조성	61
다. 실험동물의 처리	62
라. 실험동물의 체중, 식이섭취량 및 식이효율 측정	62
마. 장기의 무게	64
바. 실험동물의 혈액성분 분석	65
사. 간장 조직의 분석	70
제4절 하고초의 암세포 살해 및 성장억제 관련 면역증강 활성 연구	73
1. 실험방법	73
2. 하고초 (<i>Prunella vulgaris</i>) 유용물질을 이용한 면역증강 활성 연구	75
가. 하고초 추출물의 세포독성에 대한 영향 조사	75
나. 면역조절관련 cytokines의 생성에 대한 영향 조사	77

다. 특이적 면역반응 관련 비장 림프구 활성화 측정	80
라. 종양발생 억제관련 유전자인 iNOS의 발현에 대한 영향 조사	84
3. 하고초 유용물질의 암세포 살해 및 성장억제와 관련된 면역증강활성 연구	85
가. 비특이적 면역반응인 자연살해세포 (NK cell)의 암세포 살해능에 대한 영향 조사	85
나. In vitro 암세포 증식 억제 활성화에 대한 영향 조사	89
4. 하고초 유용물질의 in vivo / in vitro 암 전이 억제능에 대한 연구	90
가. In vivo 암 전이 억제능에 대한 영향 조사	90
나. In vitro 암전이 억제능에 대한 영향 조사	93
제5절 개발제품의 대량생산공정 개발	98
1. 하고초 신소재 및 조성물 제조공정	98
2. 하고초 제품별 제조방법 및 제조공정	99
가. 원료배합비	99
나. 하고초 액상제품 제조공정	100
다. 하고초 환, 과립제품의 제조공정	100
3. 하고초 완제품 제조시설 배치도 및 공정도	101
제6절 하고초 상품화 연구	102
1. 제품별 포장디자인 개발	102
가. 액상제품 포장디자인	102
나. 분말 및 고형제품 포장디자인	104
2. 상표개발	105
3. 특허출원	106
가. 하고초를 이용한 건강음료의 제조방법	106
나. 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방, 치료 및 억제용 조성물	106
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	109
1. 목표달성도	109
2. 관련분야 기여도	110
제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	113
1. 연구개발 성과 및 활용계획	113
가. 실용화 실적	113
나. 특허등록 실적	113
다. 논문 및 학술발표 실적	114
라. 인력양성실적	115
마. 수상실적	115
바. 언론홍보실적	115
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	119
제7장 참고문헌	123



제1장 연구개발과제의 개요

제1장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

본 연구에서는 예부터 민간약초로 알려진 하고초의 꽃, 전초, 뿌리의 성분연구를 통해 생물활성을 나타내는 유용물질을 분획·분리한 후, 물질의 구조를 구명하고, 분리된 천연신소체에 대한 임파구 증식능과 대식세포 활성화 및 각종 cytokines 및 종양발생억제기능을 갖는 유전자의 발현을 조사함.

또한 천연물의 이러한 면역조절 활성을 기초로 *in vitro*에서 암세포 전이와 관련한 비특이적 면역반응(자연살해(NK)세포활성)과 인체 암세포주 (HL-60 및 MCF-7)에서 암세포 성장 억제능, *in vivo* 생존 연장을 및 C57BL/6 mouse를 이용한 암전이 억제능을 검증함.

이러한 검증 결과에 기초하여 함양군에서 집중육성하고 100여 농가에서 다량 재배되고 있는 하고초를 이용한 다양한 유형의 약용식품(Pharmafood)을 개발하여 이를 지역관광 브랜드상품으로 육성코자 함.

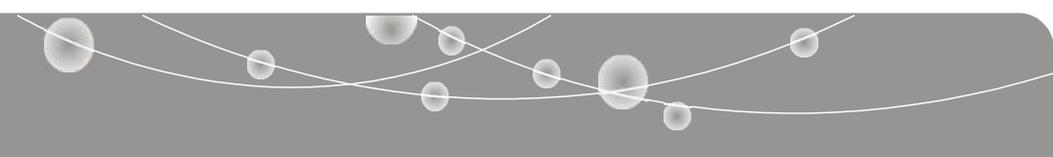
2. 연구개발의 필요성

- 하고초는 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. *lilacina*)에 속하는 여러해살이풀로 꿀풀, 두메꿀풀, 흰꿀풀의 지상부이다. 중국에서 한약으로 이용되고 있는 지식이 우리나라에 전해져서 우리나라에서는 한방과 민간에서 폐결핵, 황달, 고혈압, 자궁염 등에 약재로 많이 이용되고 있음.
- 하고초의 성분으로는 prunellin, ursolic acid, caffeic acid, rutin, hyperoside, 수용성 무기염류(약 3.5%)를 함유하고 그 중의 약 68%는 KCl이라고 보고되어 있고, 수상화서에는 ursolic acid, polyphenol-flavonoid type의 tannin, galactose, glucose, xylose, arabinose, rhamnose 등이 함유되어 있음.
- 약리작용에 관한 연구로는 열수추출물의 rat에 대한 carrageenin 부종 및 adjuvant 유발 관절염의 억제작용과 mouse에 대한 이노작용 및 중추신경계의 체온 하강작용, 하고초 건조중량의 6.1%를 차지하는 rosmarinic acid의 항산화작용 및 ursolic acid의 lymphocytic leukemia cells P388과 L1210뿐만 아니라 human lung carcinoma cell A-549에도 유의성 있는 cytotoxicity를 보고되었음.
- 또한 음성 자발성 고혈압을 유발시킨 백서에서는 하고초 등을 가미한 처방에서 혈압을 유의적으로 감소시키는 것으로 보고 되었으며, 하고초 전초의 열수추출물로부터 human immunodeficiency virus type-1 활성이 억제된다는 보고도 있었다. 또한 하고초의 이노작용, 수렴작용, 지혈작용 등이 보고된 바 있으며, 하고초 약침액이 효과적으로 cytochrome P4501A1 효소의 활성을 저해시키고, 발암물질과 DNA의 결합을 저해시킬 뿐만 아니라 free radical을 소거하고 polyamine의 대사를 저해함으로써 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 암 발생을 억제하였다고 보고하였음.

- 하고초는 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. *lilacina*)에 속하는 여러해살이풀로 꿀풀, 두메꿀풀, 흰꿀풀의 지상부이다. 중국에서 한약으로 이용되고 있는 지식이 우리나라에 전해져서 우리나라에서는 한방과 민간에서 폐결핵, 황달, 고혈압, 자궁염 등에 약재로 많이 이용되고 있음.
- 하고초의 성분으로는 prunellin, ursolic acid, caffeic acid, rutin, hyperoside, 수용성 무기염류(약 3.5%)를 함유하고 그 중의 약 68%는 KCl이라고 보고되어 있고, 수상화서에는 ursolic acid, polyphenol-flavonoid type의 tannin, galactose, glucose, xylose, arabinose, rhamnose 등이 함유되어 있음.
- 약리작용에 관한 연구로는 열수추출물의 rat에 대한 carrageenin 부종 및 adjuvant 유발 관절염의 억제작용과 mouse에 대한 이뇨작용 및 중추신경계의 체온 하강작용, 하고초 건조중량의 6.1%를 차지하는 rosmarinic acid의 항산화작용 및 ursolic acid의 lymphocytic leukemia cells P388과 L1210뿐만 아니라 human lung carcinoma cell A-549에도 유의성 있는 cytotoxicity를 보고되었음.
- 또한 음성 자발성 고혈압을 유발시킨 백서에서는 하고초 등을 가미한 처방에서 혈압을 유의적으로 감소시키는 것으로 보고 되었으며, 하고초 전초의 열수추출물로부터 human immunodeficiency virus type-1 활성이 억제된다는 보고도 있었다. 또한 하고초의 이뇨작용, 수렴작용, 지혈작용 등이 보고된 바 있으며, 하고초 약침액이 효과적으로 cytochrome P4501A1 효소의 활성을 저해시키고, 발암물질과 DNA의 결합을 저해시킬 뿐만 아니라 free radical을 소거하고 polyamine의 대사를 저해함으로써 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 암 발생을 억제하였다고 보고하였음.
- 이러한 하고초에 대한 체계적인 재배관리는 본 사업 참여업체인 하고초꿀영농조합법원에서 2003년부터 재배면적을 확대하여 2006년 현재 약 60,000여평에 달하고 있으며, 재배농가 또한 해마다 증가하여 100여농가 250여명이 농가소득원으로 재배하고 있음.
- 또한 함양군은 지리산덕유산 등 1,000m 이상의 고산지역이 11개소에 이르는 등 다양한 심곡, 뚜렷한 사계절, 심한 일교차로 약초 및 특용작물 재배의 최적환경을 갖춘 지역으로서 그간 약초 재배 및 판매의 1차 산업 위주의 생산구조였으나 약초가공식품개발 및 유통·판매 등 2·3차 산업의 고부가가치 전략산업으로 육성시켜 지역경제발전에 이바지하고자, 재정경제부로부터 “함양지리산약초건강식품특구”로 지정(2005.4) 받아 하고초 등 약초를 이용한 고부가가치 산업화의 기반을 이미 구축한 상태임.
- 하지만 상기와 같이 하고초에 대한 다양한 생물활성 및 항암활성 연구는 in vitro 연구가 대부분이고, 식품소재로서 이용할 수 있도록 동물실험을 통한 현대과학적 근거를 마련할 수 있는 세포독성 및 면역증강활성에 대한 연구는 너무나 부진하기 때문에 하고초의 지역브랜드 상품화를 위해서는 반드시 체계적 연구와 다양한 상품 개발이 절실히 요구되고 있음.

3. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연도	연구개발의 내용	연구개발의 범위
1차 년도	2006	•원료(하고초)의 전처리 방법개발	•전처리 조건별 건조수율, 추출수율 측정 •시료별 동결건조 수율 측정 및 조건선정
		•하고초의 꽃, 전초 및 뿌리의 유효성분 및 지표물질 함량 분석	•용매별 추출물의 유효성분 분석 •메탄올 추출물의 지표물질 함량 분석 •하고초꽃의 당함량 분석
		•하고초 추출용매별, 분획별 생물활성 검증	•하고초 전초추출물의 항산화활성 측정 •유기용매 분획별 항균활성 측정 •하고초 전초 및 뿌리의 항산화활성 비교
		•하고초 추출물의 면역활성 연구	•하고초의 면역조절관련 Cytokines의 생성연구 •암세포 살해 및 성장억제 관련 면역활성 •자연살해세포(NK cell)의 활성 측정 •T 림프구의 증식 및 세포독성 T림프구 활성 측정
2차 년도	2007	•하고초의 최적 배합조건 확립 및 최적조성물 개발(생산공정확립)	•하고초 함유 최적배합조건 확립 •최적조성물 개발 및 생산공정 확립
		•개발신소재의 생물활성 검증	•하고초 부위별 추출물의 항산화활성 연구 •동물실험을 통한 항고지혈증 효과 연구
		•면역증강물질(지표물질)의 함량 분석	•열수추출물 및 MeOH 추출물의 지표 물질 함량 분석
		•하고초의 대식세포 활성화 검증	•면역증강활성 관련 대식세포 활성화검증 - 탐식능 측정, 반응성 산소종(ROI) 및 NO 생성 측정 - B, T 임파구 증식반응에 대한 영향연구
3차 년도	2008	•하고초 추출물 및 유효성분의 항암활성 검증	•하고초 유용물질을 이용한 면역증강활성 연구 •하고초 유용물질의 암세포 살해 및 성장억제와 관련된 면역증강활성 연구 •하고초 유용물질의 in vivo/in vitro 암 전이 억제능에 대한 연구
		•대량생산 공정 구축	•하고초 천연물소재의 생산공정 구축 •개발제품의 생산공정 최적화 연구
		•개발 시제품의 평가(저장성, 품질)	•개발시제품의 일반성분 및 영양성분 분석 •개발시제품의 저장성 연구 •개발시제품의 품질평가
		•개발시제품의 생물활성 검증	•동물실험을 통한 개발제품의 섭취량에따른 항고지혈증 활성 연구
		•시제품 생산 및 상품화 •산업재산권 출원 및 등록	•유형별 시제품 생산 (분말류, 액상류) •특허등록 2건, 상표 등록 1건



제2장 국내외 기술개발 현황

제2장 국내외 기술개발 현황

1. 국내기술개발 현황

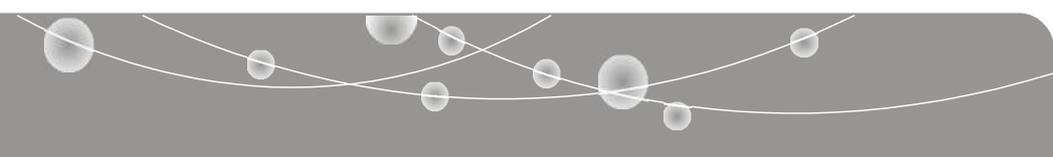
- 현재까지 개발되어 식품소재 및 임상에 이용되는 항암 화학요법제로는 alkyl화제, 대사 길항물질, 항생물질 등이 있다. 그러나 이것들은 골수억제, 소화기장애 및 신장애 등의 부작용을 유발하여 다른 감염증에 대한 저항력까지 더욱 약하게 하는 결과를 초래한다. 즉 항암 화학물질들은 종양세포에만 선택적으로 작용하지 않으며, 또한 암의 종류에 따라서 약물의 종양세포 독성능의 정도도 매우 다르므로 이러한 문제점을 해결하기 위한 수단 중 하나로 새로운 종양세포 성장억제 인자의 개발연구가 계속되고 있는 실정이다. 일반적으로 천연 화합물들은 합성 화합물에 비하여 정상세포에 대한 독성이 적으며 종양세포에 대한 독성은 상대적으로 큰 것으로 되어 있어, 항암 화학요법제의 주요 근원 물질로서는 합성 화합물보다는 천연 화합물의 종양세포 성장억제 인자를 선호하고 있다. 특히 항암제 개발 연구에 있어서는 미국 국립암연구소에서 항암성 screening에 이용된 물질 중 약 47%가 천연물이었다는 사실은 매우 주목되는 점이다.
- 우리나라는 특히 우수한 생약제를 많이 보유하고 있을 뿐만 아니라 이러한 생약제에 대해 고대로부터의 민간요법을 통해 얻은 지식도 많이 축적되어 있다. 따라서 이러한 여건을 충분히 활용하면 경제적으로 비용이 적게 들면서 인체에 대한 부작용이 적고, 또한 기존 항암제보다도 효과적인 항암제를 개발할 가능성이 높다고 할 수 있다.
- 이러한 측면에서 하고초는 한방 및 현대과학적 연구결과를 기초로 볼 때 항암 면역증강용 기능성 소재개발에 매우 유용한 생약재로 사료된다.
- 현재 암치료법에는 외과적수술요법, 화학요법, 방사선요법이 주종을 이루나 전이암 및 재발암에 대한 치료는 대부분 불가능한 상태이다. 이러한 상황에서 암에 대한 면역요법의 중요성이 강조되고 있으며, 암에 대한 면역요법은 암세포 표면에 있는 종양특이항원을 인지한 T세포를 이용하는 방법과 여러종류의 암세포에 공통으로 존재하는 종양 공통 표지자를 인지하여 암세포를 비 특이적으로 살해하는 NK세포(natural killer cell), LAK세포(lymphokine activated killer cell) 및 대식세포를 이용하는 방법이 있다. 비특이적 암세포 살해면역세포는 IL-2, IL-12, INF γ 등과 같은 사이토카인에 의해 활성화되는 것으로 알려져 이들 유전자 재조합 사이토카인을 이용한 항암면역요법 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 그러나 유전자 재조합 사이토카인은 생체내 독성이 심하고 반감기가 매우 짧아 이에 따른 부작용이 심하여 이용에 한계가 있으며, 더욱이 이들 사이토카인은 서로상승적으로 작용하므로 독성이 적은 물질로서 생체내에서 여러종류의 항암성 사이토카인을 지속적으로 생성시킬 수 있는 물질이 발굴된다면 암의 예방 및 치료에 크게 기여할 것으로 기대된다.

2. 국외기술개발현황

- 외국에서는 현재 발굴된 대표적인 비특이적 항암 면역증강제로는 미생물의 건조 균사체인 BOG, CK-432, 미생물의 세포벽 성분인 MDP, 합성 화합물인 polyinosinic cytidic acid(POLY I.C), AS101, 흥선성분인 thymosin, 버섯의 다당체인 lentian, 알칼로이드인 swainsonine, flavonoid가 연구이용중에 있다. 또한 암환자에 대한 화학요법 및 방사선요법시 조혈세포의 사멸에 의한 부작용이 심하여 항암제 및 방사선의 용량을 높이는데 제한이 되고 있다. 현재 조혈세포의 재생을 위하여는 GM-CSF(granulocyte monocyte colony stimulating factor)가 사용되고 있으나, 혈구중 과립구 및 단핵구 수만 편파적으로 증가시키고, 임파구 및 혈소판에 대한 재생효과가 결여되고 있으므로 모든 종류의 혈구세포를 균형있게 증식시킬 수 있는 약제가 요구되고 있다. 또한 대식세포는 세포성 면역에서 virus가 감염된 세포를 사멸하거나 감염된 세포내에서 virus의 복제를 억제함으로써 virus 감염에 대한 중요한 역할을 하며, 다양한 물질에 의해 생체내 투여시 virus에 대한 저항성을 증가시킨다고 보고되었다. 또한 암의 자발적인 퇴보가 활성화된 대식세포의 존재에 기인된다는 보고도 있어 대식세포의 활성화 경로와 작용기전에 대한 연구가 활발하다.
- 따라서 본 연구에서는 하고초의 꽃, 전초, 뿌리의 성분연구를 통해 유용물질을 분획,분리한 후 물질구조를 구명하고, 분리된 신소체에 대한 임파구 증식능과 대식세포 활성화 및 각종 cytokines 및 종양발생 억제기능을 갖는 유전자의 발현을 조사함.
- 또한 천연물로부터 조사된 이러한 면역조절 활성을 기초로 *in vitro*에서 암세포 전이와 관련한 비특이적 면역반응(자연살해(NK)세포활성)과 인체 암세포주 (HL-60 및 MCF-7)에서 암세포 성장 억제능, *in vivo* 생존 연장율 및 C57BL/6 mouse를 이용한 암전이 억제능을 검증하고, 이러한 결과에 기초하여 함양균에서 다량 재배되고 있는 하고초를 이용한 다양한 유형의 약용식품(Pharmafood)을 개발하고, 이를 지역관광 브랜드상품으로 육성코저 함.

3. 국내·외의 연구현황

- 전세계적으로 생활 및 의료 수준의 비약적인 발전에도 불구하고 역기능으로서 환경오염, 스트레스, 식생활의 인스턴트화 및 발암성 물질에 대한 노출로 암으로 인한 사망률은 계속적으로 증가하고 있는 실정이다.
- 외과적 수술요법, 항암약물요법 등을 거쳐 현재 임상적으로 응용되고 있는 각종 항암제들은 50여 종류로 알려져 있지만, 대부분 강한 독성 및 내성을 보여주고 있어 임상응용에 제약을 받고 있다.
- 1980년대 들어서는 면역학의 급진적 발전과 더불어 차세대 암치료법으로서 면역 치료요법과 유전자 치료요법이 대두되기 시작하여 많은 연구가 진행되고 있으나, 기존의 치료요법 만큼 획기적인 성과를 얻는 데는 아직 미흡한 실정이다.
- 전세계적으로 부작용 및 독성이 적으면서 높은 항암효과를 나타내는 새로운 물질을 천연물(생약)로부터 찾고 있지만 아직까지 만족할 만한 치료제는 개발되지 않고 있는 실정이다.
- 전세계적으로 생활 및 의료 수준의 비약적인 발전에도 불구하고 역기능으로서 환경오염, 스트레스, 식생활의 인스턴트화 및 발암성 물질에 대한 노출로 암으로 인한 사망률은 계속적으로 증가하고 있는 실정이다.
- 외과적 수술요법, 항암약물요법 등을 거쳐 현재 임상적으로 응용되고 있는 각종 항암제들은 50여 종류로 알려져 있지만, 대부분 강한 독성 및 내성을 보여주고 있어 임상응용에 제약을 받고 있다.
- 1980년대 들어서는 면역학의 급진적 발전과 더불어 차세대 암치료법으로서 면역 치료요법과 유전자 치료요법이 대두되기 시작하여 많은 연구가 진행되고 있으나, 기존의 치료요법 만큼 획기적인 성과를 얻는 데는 아직 미흡한 실정이다.
- 전세계적으로 부작용 및 독성이 적으면서 높은 항암효과를 나타내는 새로운 물질을 천연물(생약)로부터 찾고 있지만 아직까지 만족할 만한 치료제는 개발되지 않고 있는 실정이다.
- 따라서 면역조절물질의 개발은 많은 연구자들의 관심의 대상이 되어 왔으며, 1997년까지 세계 각국에서는 47종의 새로운 약효의 신약이 발매되었는데, 그중 4종(Zenapax, Copaxone, Aldara, Zadaxin)이 면역조절제이다. 국내에서도 면역조절물질에 대한 관심을 가진 연구자나 기업들이 증가하고 있으나 타 분야에 비해 취약한 상태이어서 면역조절제의 개발은 시급한 것으로 사료된다.
- 현재까지 개발된 면역조절제는 미생물, 합성화합물 및 호르몬 등이며, 천연물로부터 개발된 것은 이끼벌레에서 분리한 Bryostatin이 면역증강제로 사용 중에 있고, 남아공화국에서 서식하는 나무의 껍질에서 분리한 Quil A(saponin)가 면역보조제로서 알려져 있어 식물로부터의 면역조절제 개발 가능성은 매우 크다고 할 수 있다.
- 이러한 관점에서 하고초(꿀풀)은 외부의 물리, 화학 및 생체적 스트레스에 대한 생체저항성을 강화 시키며, 이는 면역조절 기능과 관련이 있고 생체방어 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.



제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 하고초의 전처리 조건 및 최적조성물 개발

1. 하고초(*Prunella vulgaris*, Hagocho)의 전처리 방법 개발

가. 연구재료

하고초는 경남 함양군 백전면 양천마을(지리산 일대)에서 꽃이 지기 시작할 무렵인 7월 말부터 8월초 사이에 전초를 채취하여 건조조건별로 건조한 후 2~3cm로 절단하여 95℃에서 5시간 동안 열수 추출한 후 진공농축 한 다음 동결건조하여 시료로 사용하였다.

나. 원료 전처리

하고초 전초와 뿌리는 태양건조, 음건, 열풍건조, 동결건조 한 후 건조수율을 구하였으며 (Table 3-1), 각각의 건조 시료는 다시 물과 에탄올로 추출한 후 수회 반복 농축한 다음 동결건조하여 추출수율을 확인하였고, 그 중 가장 수율이 높고 산업화에 적합한 조건을 최종 전처리 조건으로 선정하고자 하였다.

그 결과 열풍건조 조건에서 전초와 뿌리의 건조 수율이 각각 80.3%, 80.0%으로 가장 높게 나타났으며(Fig.3-1), 동결건조 조건에서도 상당히 높은 건조 수율을 보였고, 그 다음으로는 태양건조, 음건 순으로 낮은 수율이 관찰 되었다. 이러한 결과에 기초하여 향후 실험 시료의 전처리 조건으로 열풍건조 방법을 선정하였다.

Table 3-1. Conditions of dry method

		Sample(g)	Temperature(℃)	Time
Sun dry	Stalk	50	Room temp.	12-15 hr
	Root	50	Room temp.	13-16 hr
Shade dry	Stalk	50	Room temp.	3days
	Root	50	Room temp.	3days
Heat dry	Stalk	50	70~80℃	7-8 hr
	Root	50	70~80℃	7-9 hr
Freeze dry	Stalk	50	45~48℃	12 hr
	Root	50	45~48℃	12 hr

【건조 조건별 하고초 전초】



【건조 조건별 하고초 뿌리】



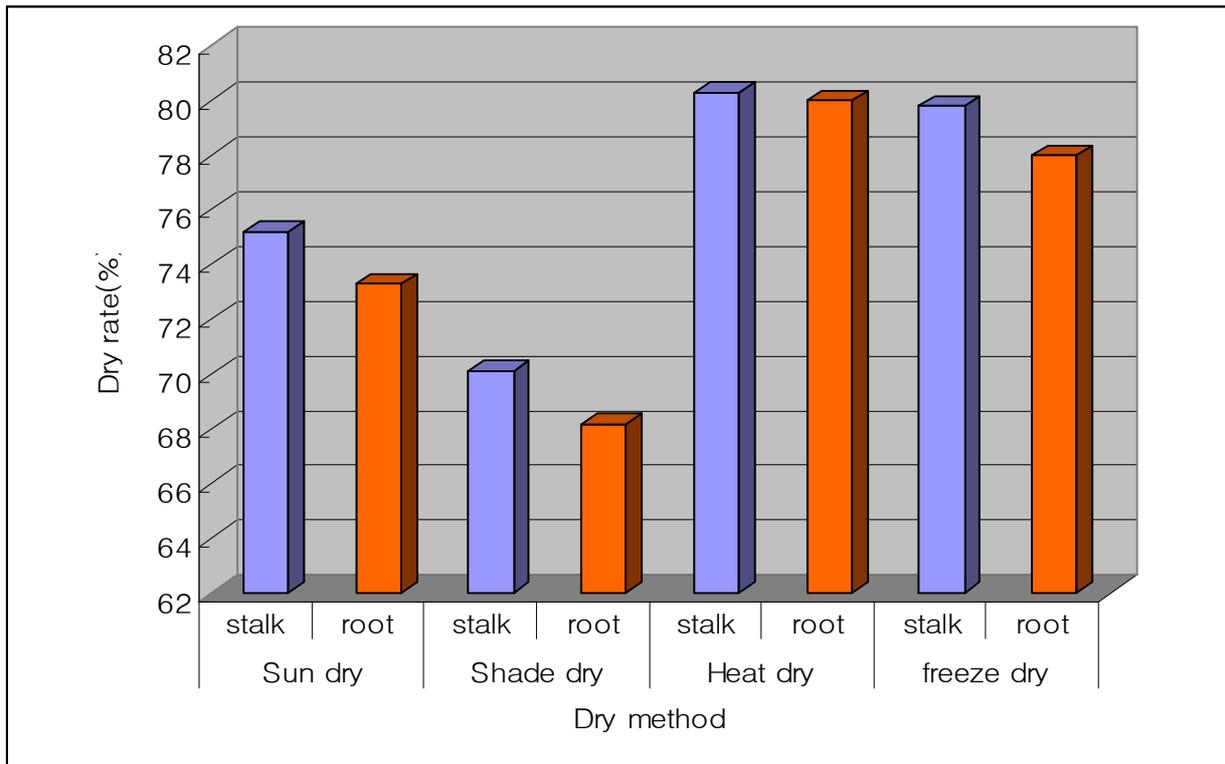


Fig. 3-1. Dry rate of *Prunella vulgaris* on the dry condition.

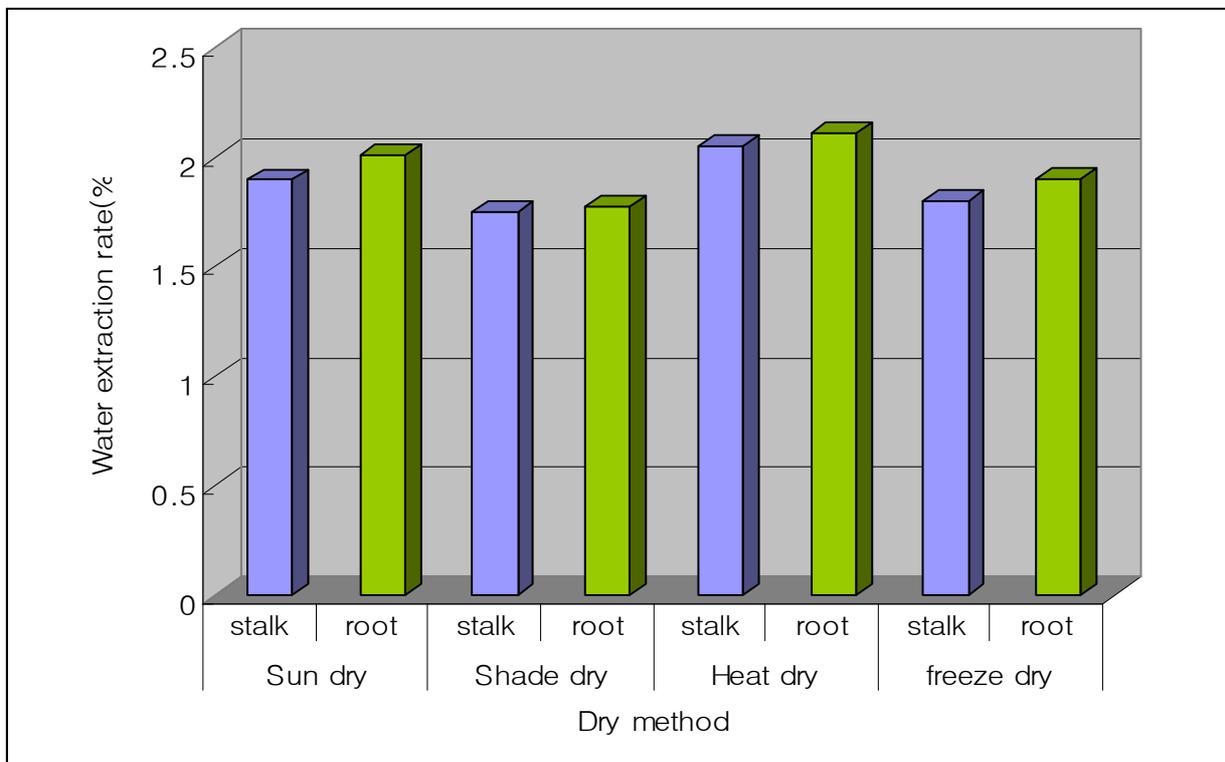


Fig. 3-2. Extraction rate of water extracts on the dry condition.

하고초의 건조방법에 따른 열수추출물의 수율을 조사하기 위하여 양건, 음건, 열풍건조, 동결건조된 시료를 각각 열수추출한 후 추출물의 농도(Brix)를 측정하고, 추출·농축액을 동결건조한 후 건조 수율을 측정한 결과는 Fig.3-2와 같다.

하고초의 열수추출 수율은 열풍건조 시료 중 뿌리에서 2.115%, 전초에서 2.052%로 높게 관찰되었으며, 하고초 뿌리의 태양건조 조건에서도 2.011%로 높은 추출수율이 관찰되었다. 또한 이와 같이 건조조건 실험과 열수추출물의 수율측정 실험에서 모두 열풍건조 조건에서 가장 높은 활성을 보였으며, 부위별 추출 실험에서는 뿌리보다 전초에서 높은 추출수율이 관찰되었다.

또한 물, 에탄올, 메탄올 용매에 따른 하고초 전초의 추출수율을 조사하기 위하여 열풍건조된 시료를 각각 추출·농축하였으며, 농축액은 다시 동결건조하여 건조 수율로 계산하였다. 이 때 에탄올 및 메탄올 추출·농축액은 증류수를 이용하여 5회 이상 반복 증류한 후 농축하였으며, 이 농축액을 동결건조한 결과, Fig.3-3과 같이 물추출물에서의 추출 수율이 2.052%로 가장 높게 관찰되었으며, 에탄올 추출물에서는 1.052%, 메탄올 추출물에서는 1.325%로 관찰되었다. 이와 같은 결과로 볼 때 하고초의 산업화를 위한 전처리 방법으로는 열풍건조 조건으로 건조하여 열수 추출물을 이용하는 것이 보다 효과적인 방법일 것으로 사료되었으며, 또한 뿌리 보다는 하고초 전초의 이용율이 보다 높을 것으로 판단되었다.

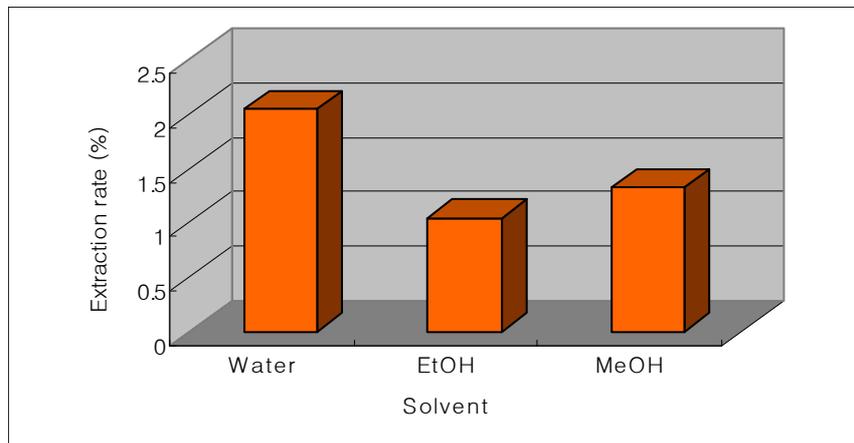


Fig. 3-3. Extraction rate of solvent extracts.

2. 하고초 함유 최적조성물 개발

가. 항고지혈증 및 간장질환 개선용 부원료

선정된 추출방법, 추출조건에 따라 제조된 천연물 신소재를 포함하여 항고지혈증 효과가 우수한 최적조성물 개발을 위해 한방문헌을 통해 처방빈도수가 높은 부원료를 선정한 결과는 표와 같다.

표 3-2. 심장질환 개선용 부원료 선정

처방명	전씨안신환 (錢氏安神丸)	성심산 (醒心散)	사심탕 (瀉心湯)	십미도적산 (十味導赤散)	단 방 (單方)	식품원료 가능여부
효능	심이 허할 때 보호	심의 허열 치료	심열 치료	심장의 실열 등 치료	보혈	
부 원 료 명	맥문동(麥門冬)	맥문동(麥門冬)	-	맥문동(麥門冬)	맥문동(麥門冬)	부
	마아초(馬牙草)	-	-	-	-	불
	백복령(白茯苓)	-	-	-	-	부
	산약(山藥)	-	-	-	-	주
	한수석(寒水石)	-	-	-	-	불
	감초(甘草)	-	-	-	감초(甘草)	주
	-	인삼(人蔘)	-	-	-	주
	-	오미자(五味子)	-	-	오미자(五味子)	주
	-	원지(遠志)	-	-	원지(遠志)	부
	-	복신(茯神)	-	-	복신(茯神)	불
	-	생지황(生地黃)	-	-	생지황(生地黃)	부
	-	석창포(石菖蒲)	-	-	석창포(石菖蒲)	불
	-	-	황련(黃連)	황련(黃連)	-	불
	-	-	-	황금(黃芩)	-	주
	-	-	-	반하(半夏)	-	불
	-	-	-	지골피(地骨皮)	-	불
	-	-	-	복신(茯神)	-	불
	-	-	-	적작약(赤芍藥)	-	부
	-	-	-	목통(木桶)	-	불
	-	-	-	생지황(생지황)	-	부
	-	-	-	-	주사(朱砂)	불
	-	-	-	-	적석지(赤石脂)	불
	-	-	-	-	금박(金箔)과 은박(銀箔)	불
	-	-	-	-	황단(黃丹)	불
	-	-	-	-	귀갑(龜甲)	불
	-	-	-	-	연자(蓮子)	불
	-	-	-	-	행(杏)	불
	-	-	-	-	소맥(小麥)	불
-	-	-	-	서각(犀角)	불	
-	-	-	-	계자(鷄子)	불	
-	-	-	-	초목(椒目)	불	
계(종)	6종	6종	1종	9종	17종	

* 주:주원료로 사용가능, 부:부원료로 사용가능, 불:식품원료로 사용불가

※ 참고문헌:동의보감

표 3-3. 간장질환 개선용 부원료

처방명	청간탕 (淸肝湯)	사청환 (瀉靑丸)	세간산 (洗肝散)	당귀용회환 (當歸龍薈丸)	단 방 (單方)	식품원료 가능여부*
효능	간경 혈허 및 노화 치료	간이 실한 증세 치료	간이 허한 증세 치료	간장실열, 협통 치료	간담의 기를 보익	
부원료명	백작약(白芍藥)	-	-	-	작약(芍藥)	부
	천궁(川芎)	천궁(川芎)	천궁(川芎)	-	-	부
	당귀(當歸)	당귀(當歸)	당귀(當歸)	당귀(當歸)	-	주
	시호(柴胡)	-	-	-	-	불
	산치자(山梔子)	치자(梔子)	치자초(梔子炒)	산치자(山梔子)	-	부
	목단피(木단피)	-	-	-	-	불
	-	초용담(草龍膽)	-	초용담(草龍膽)	-	불
	-	대황외(大黃潁)	대황(大黃)	대황(大黃)	-	불
	-	강활(羌活)	강활(羌活)	-	-	불
	-	방풍(防風)	방풍(防風)	-	-	불
	-	-	박하(薄荷)	-	-	주
	-	-	감초구(甘草灸)	-	-	주
	-	-	-	황련(黃連)	황련(黃連)	불
	-	-	-	황백(黃柏)	-	불
	-	-	-	황금(黃芩)	-	주
	-	-	-	노회(蘆薈)	-	불
	-	-	-	청대(靑黛)	-	불
	-	-	-	목향(木香)	-	불
	-	-	-	사향(麝香)	-	불
	-	-	-	-	세신(細辛)	불
	-	-	-	결명자(決明子)	결명자(決明子)	주
	-	-	-	-	차전자(車前子)	불
	-	-	-	-	제자(鼈子)	불
	-	-	-	-	복분자(覆盆子)	주
	-	-	-	-	청상자(靑箱子)	불
	-	-	-	-	산조인(酸棗仁)	부
	-	-	-	-	산수유(山茱萸)	부
	-	-	-	-	초삼(炒蓼)	불
	-	-	-	-	창이자(蒼耳子)	불
	-	-	-	-	고삼(苦蓼)	불
-	-	-	-	청피(靑皮)	불	
-	-	-	-	모과(木瓜)	불	
-	-	-	-	소맥(小麥)	불	
-	-	-	-	총백(蔥白)	불	
-	-	-	-	구(韭)	불	
-	-	-	-	이(李)	불	
계(중)	6종	7종	8종	12종	19종	

* 주:주원료로 사용가능, 부:부원료로 사용가능, 불:식품원료로 사용불가

※ 참고문헌:동의보감

나. 한의학에 의한 고지혈증 개선용 부원료 선정

한방처방 빈도수가 높은 생약재 선정 결과를 기초로 본 연구사업의 자문가로 참여중인 한의사(5명)에게 혈액순환기질환(항고지혈증, 항콜레스테롤 등) 개선에 적합한 부원료 추천을 의뢰한 결과는 다음 표와 같다.

따라서 최종선정 부원료는 한방처방 빈도수가 높고, 혈액순환기계질환 개선에 적합할 것으로 추천되는 부원료 중 5종을 선정하여 생물활성연구 시료로 사용하였다.

표 3-4. 혈액순환기계질환 개선용 부원료 선정

구 분	처방 1	처방 2	처방 3	처방 4	처방 5	최종 선정
주요 처방	심장과 간 보호	심장 보호 어혈 치료	심의 허혈보호	보혈 및 간담의 기보익	간의 혈허 치료	
부원료명	갈근	-	-	-	-	
	승마	-	-	-	-	
	시호	-	-	-	-	
	-	감초	-	-	-	
	-	음양곽	-	-	-	
	-	구기자	-	-	-	
	-	당귀	-	-	-	
	-	동충하초	-	-	-	
	-	백합	-	-	-	
	-	인삼	-	-	-	
	오미자	오미자	-	오미자	-	선정
	-	영지	영지	영지	-	선정
	-	하수오	하수오	-	하수오	선정
	강황	-	강황	-	-	
	-	-	괴화	-	-	
	-	-	몰약	-	-	
	-	-	소목	-	-	
	-	-	홍화	-	-	
	-	-	결명자	결명자	결명자	선정
	-	-	-	금은화	-	
	-	-	-	대황	-	
	-	-	-	상기생	-	
	-	-	-	목단피	-	
	-	-	-	웅담	-	
	-	-	-	지골피	-	
	-	-	-	황금	-	
	산사	-	-	산사육	산사자	선정
	-	-	-	-	길경	
	-	-	-	-	영지	
	-	-	-	-	해조	
계(총)	6종	10종	8종	11종	6종	

다. 하고초 및 선정생약재의 추출수율

하고초 및 선정된 부원료를 각각 100℃에서 열수 추출하여 감압농축한 후 동결건조 수율을 측정한 결과는 표와 같이 주원료인 하고초는 36.3% 였으며, 부원료는 산사육, 하수오, 오미자, 결명자, 영지 순으로 수율이 높게 나타났다.

표 3-5. 주원료 및 부원료의 추출수율

Sample	하고초 (<i>Prunella vulgaris</i>)	결명자 (<i>Cassia obtusifolia</i> Linne)	하수오 (<i>Polygoni multiflori</i> Radix)	영지 (<i>Ganoderma lucium</i>)	오미자 (<i>Schizandrae fructus</i>)	산사육 (<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge)
Extracts rate (%)	36.3	6.33	14.16	1.5	9.83	17.83

라. 하고초 조성물의 배합조건 확립

최종 개발 대상 하고초 신소재는 건강기능식품업체 납품조건에 적합하도록 하고초 추출농축액에 분말상 Dextrin을 첨가한 후 동결건조시켜 제조하였으며, 제조된 신소재를 주원료로 하여 3차 선정과정을 통해 최종선정된 생약재 5종을 배합하여 항산화 검증용 하고초 최적조성물로 사용하였다.

표 3-6. 하고초 신소재 및 최적조성물의 배합조건

Sample	하고초 (<i>Prunella vulgaris</i>)	결명자 (<i>Cassia obtusifolia</i> Linne)	하수오 (<i>Polygoni multiflori</i> Radix)	영지 (<i>Ganoderma lucium</i>)	오미자 (<i>Schizandrae fructus</i>)	산사육 (<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge)
Comp. 1	0	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm
Comp. 2	500ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm
Comp. 3	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm
Comp. 4	3000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm
Comp. 5	5000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm
Comp. 6	10000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm

제2절 하고초의 유효성분 및 지표물질 분석

1. 하고초의 유효성분 및 지표물질 분석

가. 하고초의 유용물질 분획

하고초 유용물질을 분리함에 있어서 최적 추출조건을 설정하기 위하여 하고초 전초 시료 100g을 15배 용량의 증류수, 메탄올로 각각 환류 추출하였고, 또한 증류수 또는 메탄올을 추출용매로 하여 60℃에서 8시간 추출하여 감압 농축한 증류수 extract를 적정량의 물에 용해시키고 ethyl acetate, ether, chloroform, butanol, isopropanol 등의 용매를 순차적으로 사용하여 분획한 각 추출물을 감압 농축한 후 동결건조하여 분석시료로 사용하였다.

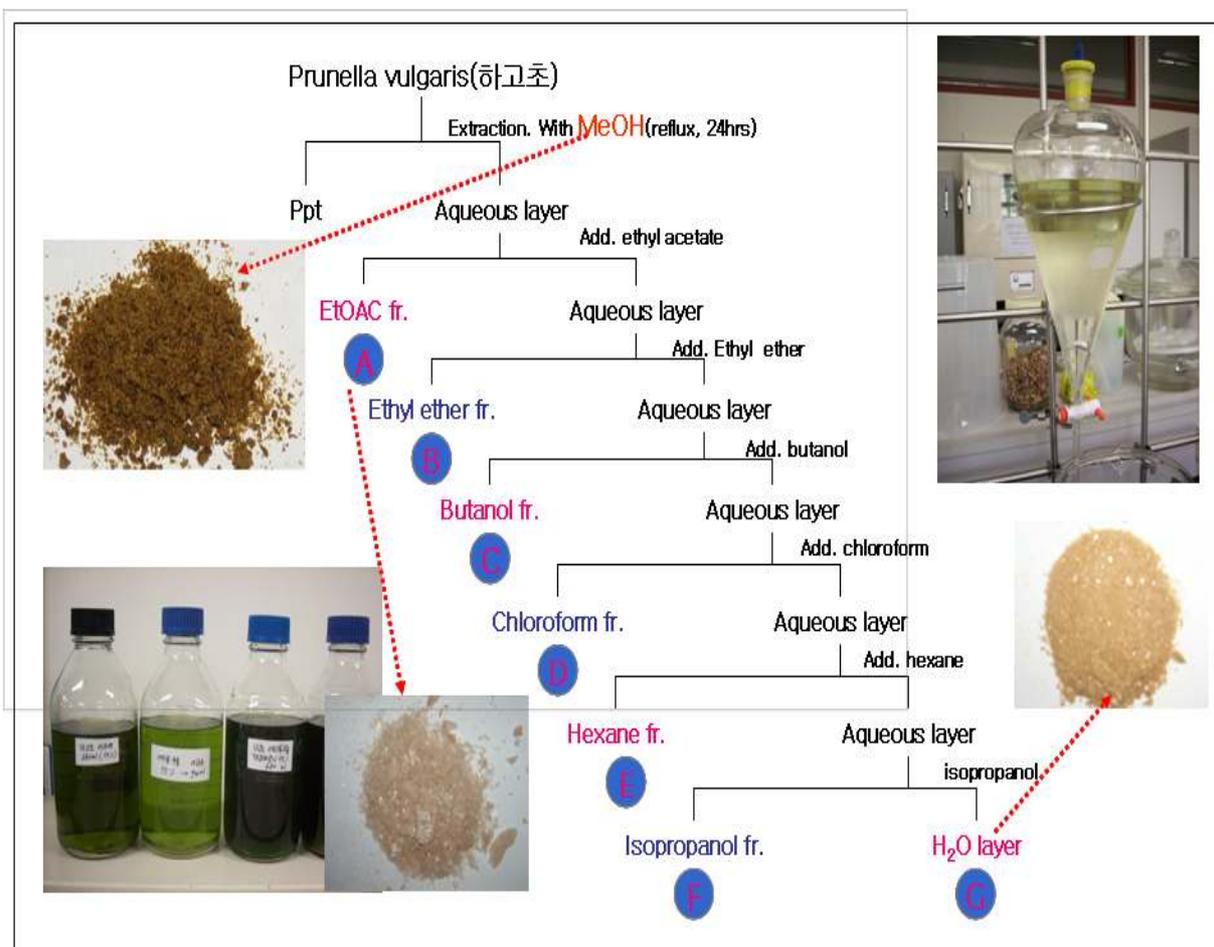


Fig. 3-4. Fractionation of functional material from *Prunella vulgaris*.

나. 무기질 함량 분석

무기성분으로는 하고초의 열수추출물과 에탄올 추출물의 Ca, Cu, K, Mg, Na 및 P의 함량을 분석하였으며, 시료 2ml에 질산 3ml, 황산 1ml(유기물 제거)를 넣고 가압한 후 microwave로 전처리 하였다. 이때 microwave power는 200W:5분, 400W:5분, 600W:5분, 200W:5분으로 처리하였다. microwave로 전처리된 시료는 증류수 50ml로 정용한 후 분석용 시료로 하여 ICP(Optima 3300DV)로 분석하였다.

그 결과 하고초의 열수추출물과 에탄올 추출물의 Ca, Cu, K, Mg, Na 및 P의 함량에 있어서는 Fig. 3-5~3-7과 같이 열수추출물 분석에서는 K이 65.92 μ g/ml로 가장 많이 검출되었으며, 다음으로는 P 5.548 μ g/ml, Mg 4.147 μ g/ml, Ca 1.478 μ g/ml, Na 1.164 μ g/ml, Cu 0.243 μ g/ml 순으로 분석되었다. 또한 에탄올 추출물 분석에서는 열수추출물과 동일하게 K의 함량이 다른 무기질에 비해 4.651 μ g/ml로 가장 많이 검출되었으나 열수추출물에 비해서는 아주 극소량으로 분석되었다. 이와 같이 K의 함량이 높게 분석된 결과는 옛문헌을 통해 알려진 하고초의 potassium염에 의한 이뇨작용을 증빙할 수 있는 좋은 자료로 사료된다.

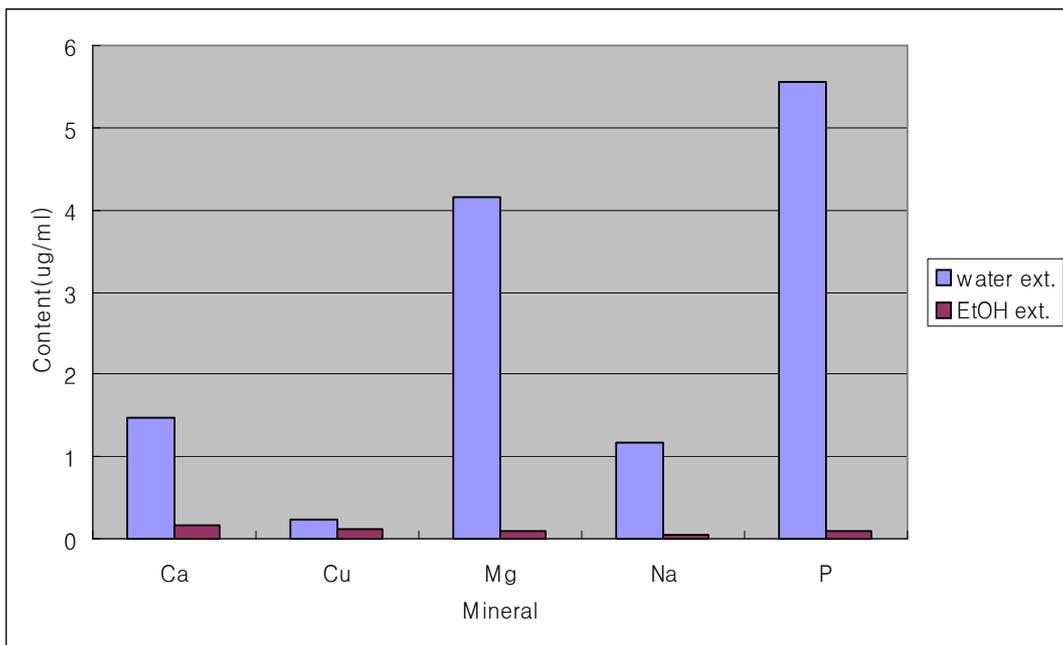


Fig. 3-5. Mineral contents of water extract and EtOH extract from *Prunella vulgaris*.

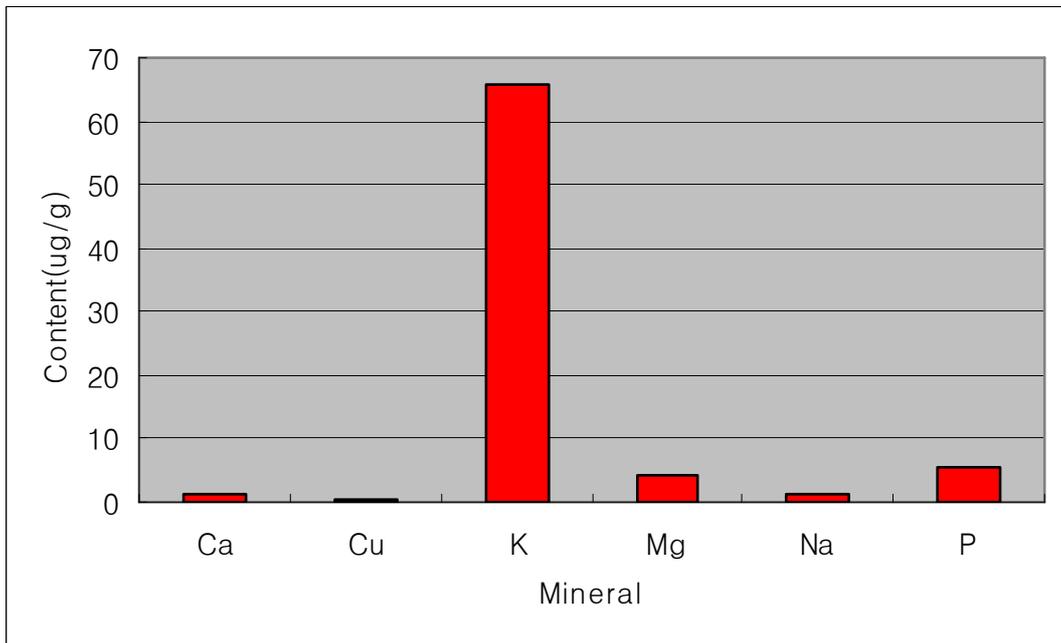


Fig. 3-6. Mineral contents of water extract from *Prunella vulgaris*.

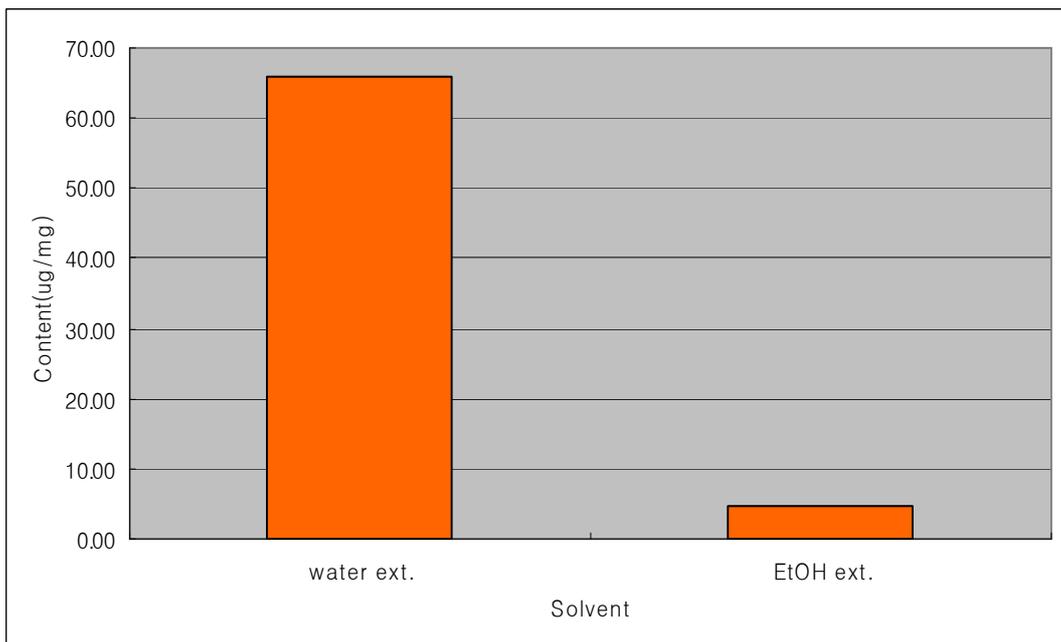


Fig. 3-7. Potassium contents of water extract and EtOH from *Prunella vulgaris*.

다. 유용물질 분석

하고초 열수추출·농축액(고형분 6brix)를 1/6으로 희석하여 시료로 사용하였으며, STD는 1mg/ml 농도로 준비하여 50ppm으로 희석하여 20 μ l씩 주입하였다. 분석기기(HPLC)의 Column은 Bischoff Eurobond C18(250X4.0)mm, runtime은 50min,

Flow rate는 0.6ml/min의 조건하에서 254nm, 상온에서 진행하였다.

그 결과 수용성 Vitamin의 검출시간은 2~3min, Rutine은 25~30min, Kaemferol은 40min, Vitamin K는 약 50min의 시간에서 검출되었으며(Fig3-8), 그 중 열수추출물에서 가장 많이 검출된 유용물질은 Vitamin C와 Vitamin B1이 각각 0.741ppm, 0.281ppm로 나타났으며, 수렴작용이 알려진 Tannic acid 0.438ppm으로 검출되었다. 이러한 결과는 하고초의 종류 중 하나인 꿀풀에 수용성 비타민이 높게 함유된 것으로 알려진 결과와 유사한 결과로 사료된다.

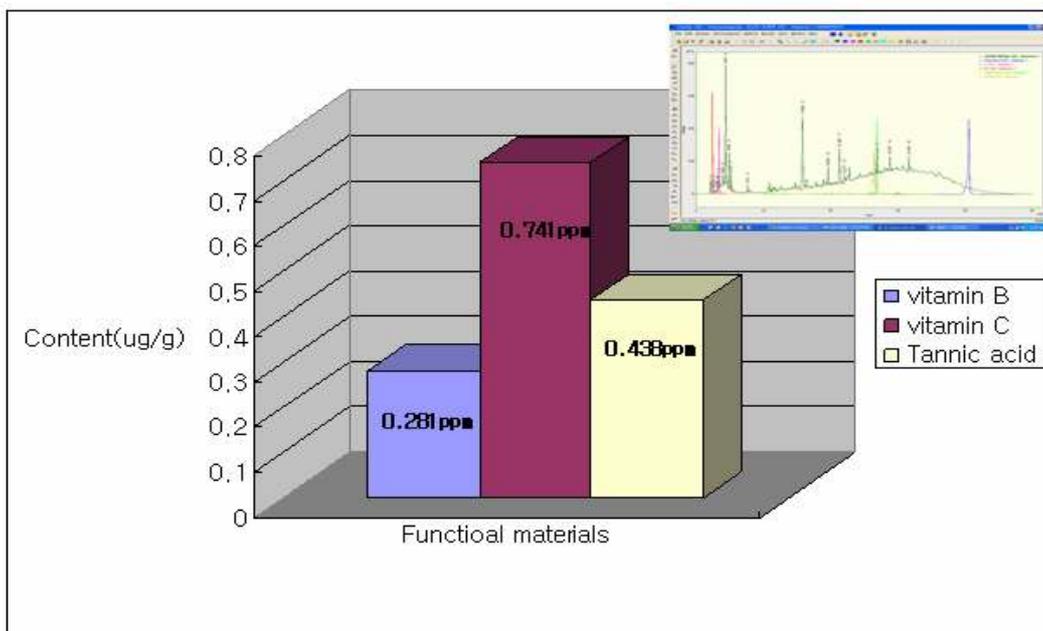


Fig. 3-8. Functional material contents of water extract from *Prunella vulgaris*.

라. 지표물질 분석

하고초 추출·농축 한 후 동결건조한 시료를 MeOH 20ml에 4g 녹인 용액에 증류수를 가하여 CH₂Cl₂로 분획하였다. 농축하여 얻은 CH₂Cl₂ 분획을 hexane-EtOAc (8:2) 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 얻은 ursolic acid의 함량을 분석하였다.

300ppm의 Ursolic acid를 20μl, 40μl, 60μl씩 각각 주입한 standard를 기준으로 하여 검량선을 작성한 후, 하고초 시료를 MeOH에 녹여 Ursolic acid의 함량을 분석한 결과 아래 그림과 같이 300ppm 속에 0.516μl의 Ursolic acid의 함량을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 향후 타 지역의 하고초 뿐만 아니라 수입산 하고초, 여러종으로 구분되어 있는 하고초(꿀풀, 제비꽃 등)의 규격화에 좋은 자료가 될 것으로 사료된다.

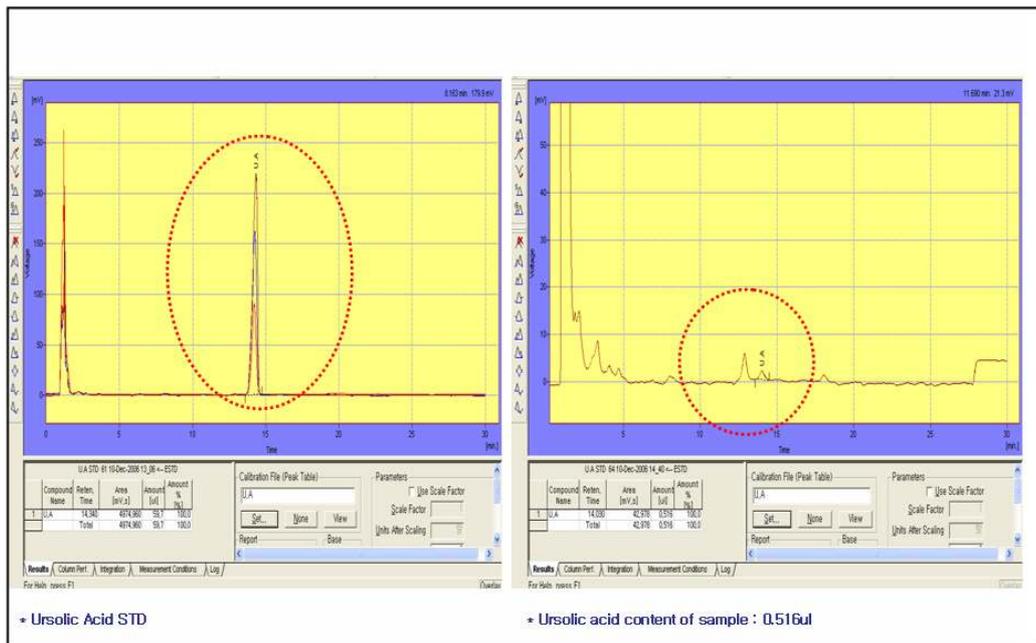


Fig. 3-9. Ursolic acid contents of MeOH extract from *Prunella vulgaris*.

마. 하고초 꿀의 당 함량 분석

하고초 꿀 시료 원액을 13mg/ml 농도로 녹인 후 0.45 μ m PVDF로 여과하였으며, STD 당은 모두 1mg/ml 농도로 준비하여 800ppm과 500ppm으로 희석한 뒤 검량선을 결정하였으며, 분석기기(HPLC)의 Column은 Shodex NH2P 504E, Flow rate 0.3ml /min의 조건에서 RI detector로 분석하였다.

하고초 꿀 시료 원액을 HPLC(Column : Shodex NH2P 504E, Flow rate 0.3ml /min)의 조건에서 RI detector로 분석한 결과는 아래 그림과 같다. 하고초 꿀 속에 들어 있는 당은 Xylose가 5,599ppm으로 가장 많이 함유되어 있었으며, Glucose 2,443ppm, Sucrose 388ppm과 미지의 당이 2개 포함되어 총 5개로 예측되었다.

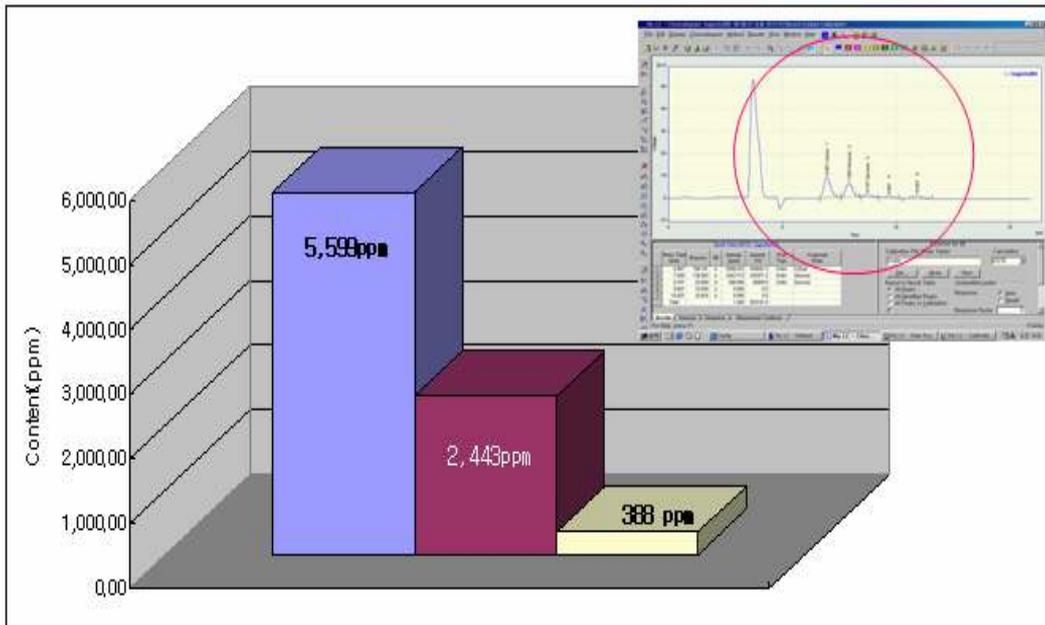


Fig. 3-10. Saccharide contents of from *Prunella vulgaris* honey.

2. 용매별 추출물의 지표물질(ursolic acid) 함량 분석

가. 하고초 추출물의 ursolic acid 함량분석

(1) 분석 조건

① Acetonitril과 water 비율

Acetonitril과 water만 용매로 사용하는 경우 peak가 넓어지고 잘 분리되지 않아 ammonium formate를 용매에 첨가하였다. 먼저 ammonium formate의 농도를 0.05M로 고정하고 acetonitrile:water 비를 75:25, 80:20, 85:15의 세가지 용매를 사용하여 standard ursolic acid의 pick 위치를 조사한 후 하고초 샘플을 분석한 결과 acetonitrile의 양이 많아지면 ursolic acid의 retention time이 각각 18.173min, 13.526min, 8.136min으로 점점 짧아지므로 가장 적합한 조건은 80:20으로 결정하였으며, flow rate는 0.6 mL/min로 하였다.

② Ammonium formate 농도

Ursolic acid와 겹치는 성분이 있어 이 두 성분이 나타내는 peak를 최대한 분리하기 위해 ammonium formate의 농도를 변화시키면서 분리한 결과 0.1M의 농도에서 peak 분리능력이 가장 높게 나타나 분석조건으로 적용하였다.

(2) 분석 및 계산방법

실험에 사용된 standard는 100ppm (100mg/L), sample은 10,000ppm (0.5g의 하고초 추출물을 메탄올 50mL에 용해)으로 하였으며, 농도는 standard peak과 sample peak의 높이 비로부터 sample의 ursolic acid 농도로 구하였다. 또한 ursolic acid 농도에 샘플 부피를 곱하여 샘플에 포함된 ursolic acid 양을 구하였으며, 함량은 하고초 추출물에 포함된 ursolic acid의 조성(고체 비)로 계산한 결과는 표와 같다.

(3) 하고초 추출용매별 ursolic acid 함량

상기 분석방법에 따라 하고초 전초 열수추출물(100℃, 4시간)을 95% MeOH과 물에 각각 용해시켜 분석한 결과 열수추출물은 MeOH 보다 물에 잘 용해 되었으나, 뿌리 추출물은 MeOH이나 물에서 잘 용해되지 않았다. 또한 두 용액에 녹인 샘플을 HPLC로 분석한 결과 물추출물에서는 ursolic acid가 포함되지 않은 것으로 나타났다.

(4) 하고초 부위별 MeOH 추출물의 ursolic acid 함량

하고초 메탄올 추출물의 ursolic acid 함량을 분석한 결과 하고초 상부에는 2.02%, 하부에는 1.02%를 포함하여 하고초 상부의 ursolic acid 함량이 하부에 비해 두 배 정도 높다는 것은 확인할 수 있었다. 그러나 하고초 전체 메탄올 추출물의 ursolic acid 함량이 0.53% 정도로 하고초 하부 농도보다도 오히려 더 낮은 값을 나타내었는데, 이러한 결과는 전초 추출과 상부, 하부 추출 기간의 차이, 추출 농도의 차이 등에 기인하는 것으로 사료되므로, 향후 비교시에는 동일 조건에 의한 전초 전체와 부위별 함량비교가 필요할 것으로 사료되었다.

표 3-7. 하고초 부위별 MeOH 추출물의 ursolic acid 함량 비교

구 분	계 산 방 식	Ursolic acid 함량비(%w/w)
하고초 전초	<ul style="list-style-type: none"> • $\frac{100\text{ mg}}{L} \times \frac{2.16\text{ cm (sample peak height)}}{4.10\text{ cm (std. peak height)}} = 53 \frac{\text{mg}}{L}$ • $53 \frac{\text{mg}}{L} \times 0.05L = 2.65\text{ mg}$ • $\frac{2.65\text{ mg}}{0.5\text{ g} \times \frac{1000\text{ mg}}{\text{g}}} \times 100 = 0.53\%$ 	0.53
하고초 전초 상부	<ul style="list-style-type: none"> • $\frac{100\text{ mg}}{L} \times \frac{8.28\text{ cm (sample peak height)}}{4.10\text{ cm (std. peak height)}} = 202 \frac{\text{mg}}{L}$ • $202 \frac{\text{mg}}{L} \times 0.05L = 10.1\text{ mg}$ • $\frac{10.1\text{ mg}}{0.5\text{ g} \times \frac{1000\text{ mg}}{\text{g}}} \times 100 = 2.02\%$ 	2.02
하고초 전초 하부	<ul style="list-style-type: none"> • $\frac{100\text{ mg}}{L} \times \frac{4.20\text{ cm (sample peak height)}}{4.10\text{ cm (std. peak height)}} = 102 \frac{\text{mg}}{L}$ • $102 \frac{\text{mg}}{L} \times 0.05L = 5.1\text{ mg}$ • $\frac{5.1\text{ mg}}{0.5\text{ g} \times \frac{1000\text{ mg}}{\text{g}}} \times 100 = 1.02\%$ 	1.02
하고초 뿌리	<ul style="list-style-type: none"> • ursolic acid가 없는 것으로 나타남. 	-

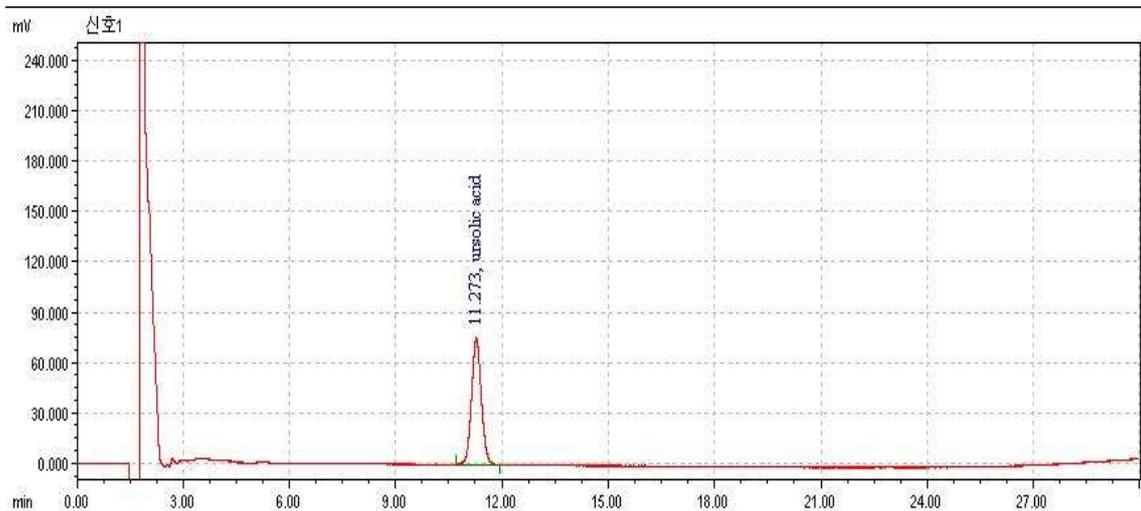


Fig. 3-11. Standard of ursolic acid.

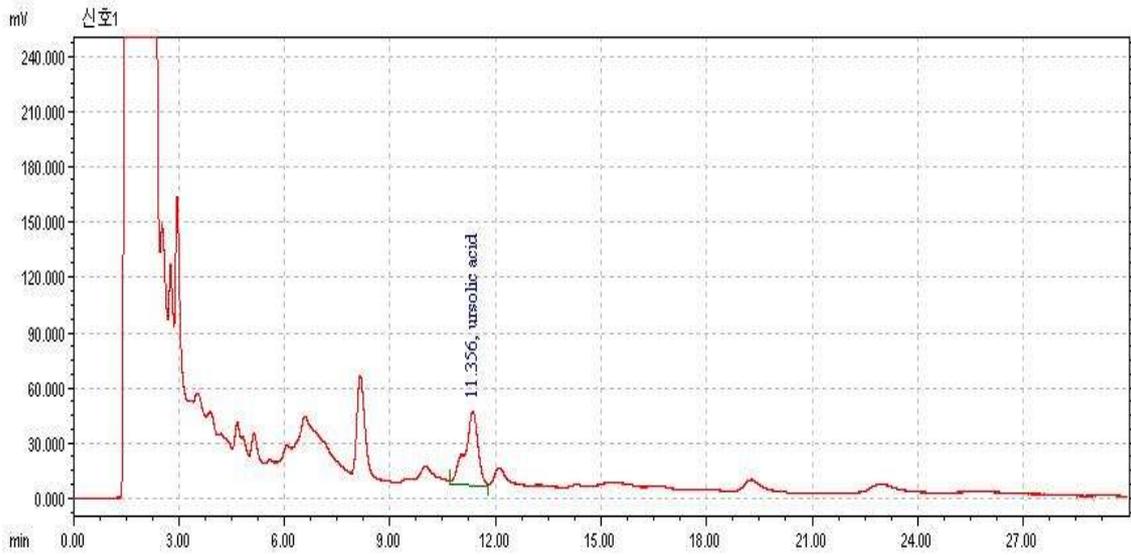


Fig. 3-12. Ursolic acid of Hagocho(total)

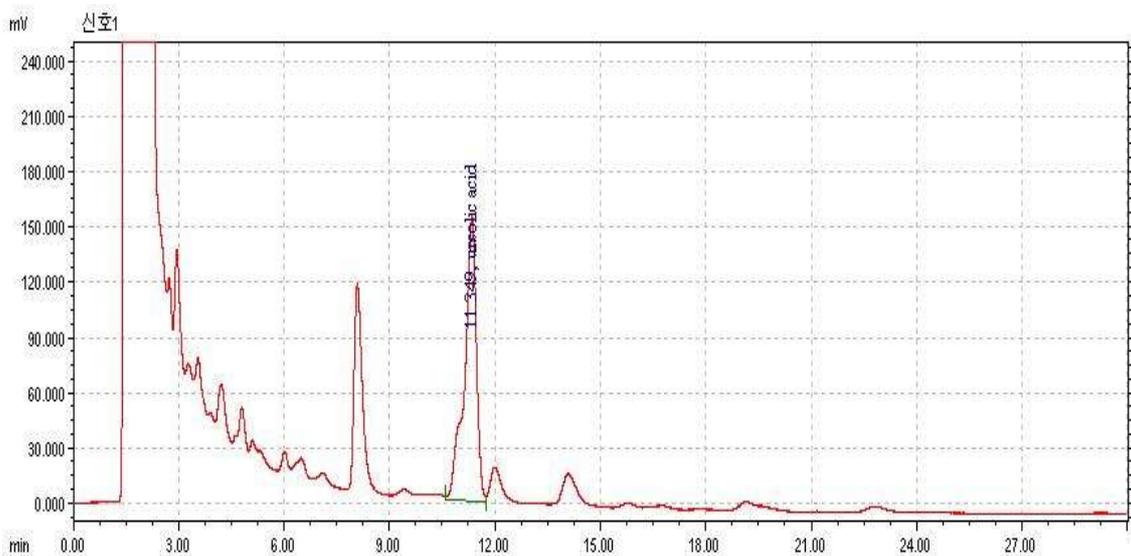


Fig. 3-13. Ursolic acid of Hagocho(upper part)

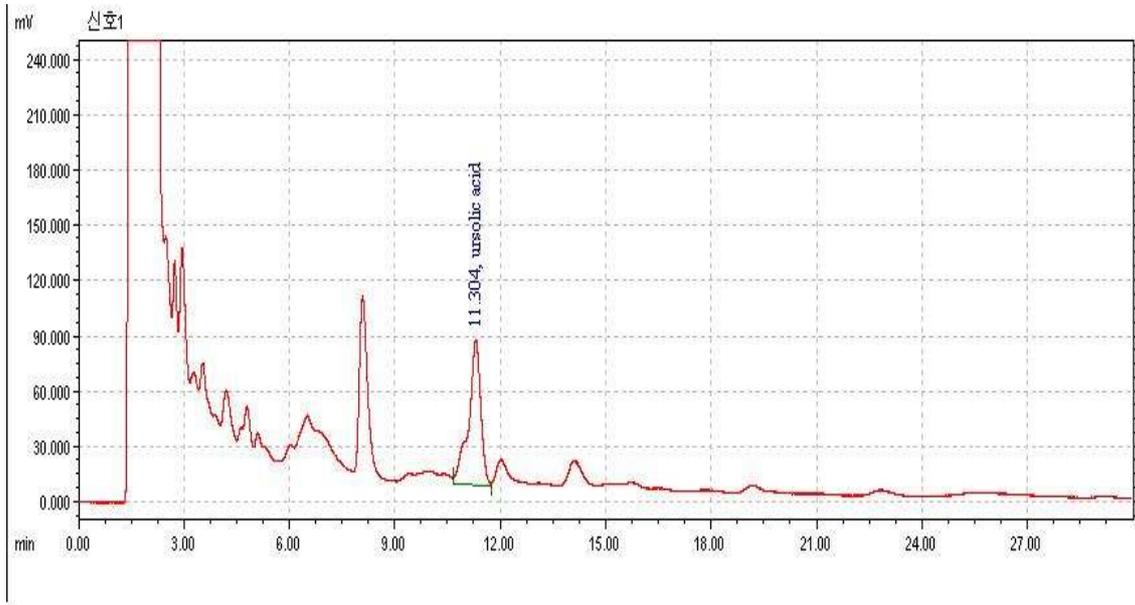


Fig. 3-14. Ursolic acid of Hagocho(lower part)

3. 개발시제품 평가

가. 개발시제품의 일반성분 분석

개발시제품의 일반성분은 AOAC법에 준하여 분석하였다. 탄수화물(g/100g) 함량은 총 중량에서 수분, 단백질, 지방 그리고 회분 함량을 제외한 함량으로 표시하였으며, 조단백질(g/100g)은 micro-Kjeldahl법, 조지방(g/100g)은 Soxhlet법, 조회분(%)은 회화법, 조섬유(%)는 식이섬유 분석용 효소 α -amylase, protease 및 amyloglucosidase를 순차적으로 반응시켰다. 반응 후 ethanaol 침전물은 여과하여 침전 잔사량을 구하고, 잔사 중 회분과 조단백질 함량을 감하여 시료 중 총 섬유소 함량을 산출하였다. 또한 무기질(mg/100g)은 시료 5gdmf 취하여 500°C 회화로에서 2시간 회화시켜 냉각한 후 HPLC용 증류수 0.5mL와 질산용액(HNO₃:H₂O=1:1) 3mL를 가하고 100°C의 열판에서 과량의 질산을 제거한 후 이를 다시 500°C 회화로에서 1시간 동안 회화시킨 다음 염산용액(HCl:H₂O=1:1)으로 50mL가 되게 정용하여 무기질 분석 시료로 사용하였다. 시료의 무기질 분석은 발광 플라즈마 분석기를 이용하였으며, 일반성분을 분석한 결과는 Table 3-8과 같다.

Table 3-8. The proximate composition of Hagocho products

Component	Yield(/100g)
Calorie(kcal/100g)	7.3
Carbohydrate(g/100g)	1.3
Protein(g/100g)	0.3
Lipid(g/100g)	0.1
Ash(%)	0.4
Dietary fiber(%)	0.02

열량은 7.3kcal/100g으로 일반적인 수준이었으며, 탄수화물은 영양소 기준치인 0.4g/100g 보다 3배정도의 함량을 보였고, 조단백은 0.3g/100g, 조지방은 0.1g/100g으로 조사되었으며, 조회분은 0.4%, 조섬유는 0.02%로 나타났다. 특히 무기질 분석결과에서는 칼륨(K)의 함량이 57.08mg/100g으로 가장 높게 검출되었으며(Table 3-9), 칼슘, 마그네슘도 각각 20.57mg/100g, 14.43mg/100g으로 나타났다.

Table 3-9. Mineral contents of Hagocho products

Component	Yield(/100g)
Ca	20.57 mg
Fe	0.03 mg
Mg	14.13 mg
K	57.08 mg
Na	12.4 mg

나. 개발시제품의 영양성분 평가

개발시제품의 영양평가는 식품위생법의 표시기준에 따라 개발대상 제품의 유형인 액상제품을 대상으로 실시하였으며, 영양소 기준치를 기준으로 열량, 탄수화물, 당류, 조단백질, 조지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤 및 나트륨에 대해 총 9종의 영양성분을 분석한 결과는 Table 3-10과 같다.

탄수화물은 영양소 기준치보다 높게 나타났으며, 당류는 1.2g/100g, 조단백, 조지방은 각각 0.3g/100g, 0.1g/100g으로 분석되었다. 또한 포화지방은 0.1g/100g이었으나, 트랜스지방과 콜레스테롤은 검출되지 않았다. 본 영양성분표는 그림과 같이 최종 개발제품의 포장지에 표기하여 사용하였다.

Table 3-10. Nutritional constituent of Hagocho products

Component	Yield(/100g)
Calorie(kcal/100g)	7.3
Total Fat(g/100g)	0.1
Saturated Fat(g/100g)	0.1
Trans Fat(g/100g)	0.0
Cholesterol(mg/100g)	0.0
Sodium(mg/100g)	12.4
Total Carbohydrate(g/100g)	1.3
Dietaty Fiber(%)	0.02
Sugars(g/100g)	1.2
Protein(g/100g)	0.3



다. 개발시제품의 저장성 연구

최종 개발시제품의 저장시험은 100mL/포 기준으로 실험군당 각 3포씩 100℃에서 30분간 증탕살균 처리한 후 살균 미처리군과 함께 37℃ incubator에 저장하면서 각 시료의 pH 변화, 고형분(Brix) 변화, 산도(mg%)를 측정하였으며, 부패 여부를 판단하기 위해서 일반세균 및 대장균의 검출여부를 3M petrifilm을 이용하여 살균전·후, 저장 4일, 10일, 20일, 30일 단위로 조사하였다.

제품 저장중의 일반특성 변화는 Table 3-11과 같이 pH, 고형분, 산도는 저장기간이 길어질수록 다소 낮아지는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다. 또한 미살균 처리된 군에서는 72/300µl 단위의 일반세균이 검출되었으나, 살균처리 후 저장기간에 따른 미생물 검사 결과에서는 대장균군과 일반세균은 검출되지 않았다(Table 3-12, Fig. 15).

Table 3-11. The Changes of pH, Brix and Acidity during storage for 30days at 37℃ after sterilization

	Non.	1 day	5 days	10 days	20 days	30 days
pH	5.47	5.43	5.05	5.03	4.97	4.93
Brix(°)	1.6	1.5	1.3	1.4	1.3	1.1
Acidity(mg%)	1.50	1.30	1.05	1.35	1.50	1.55

* Non. : before sterilization.

Table 3-12. Changes in microbial growth of products during storage for 30days at 37°C after sterilization

	Non.	1 day	5 days	10 days	20 days	30 days
E.coli	-	-	-	-	-	-
Bacteria (/300 μ l)	72	-	-	-	-	-

* Non. : before sterilization.

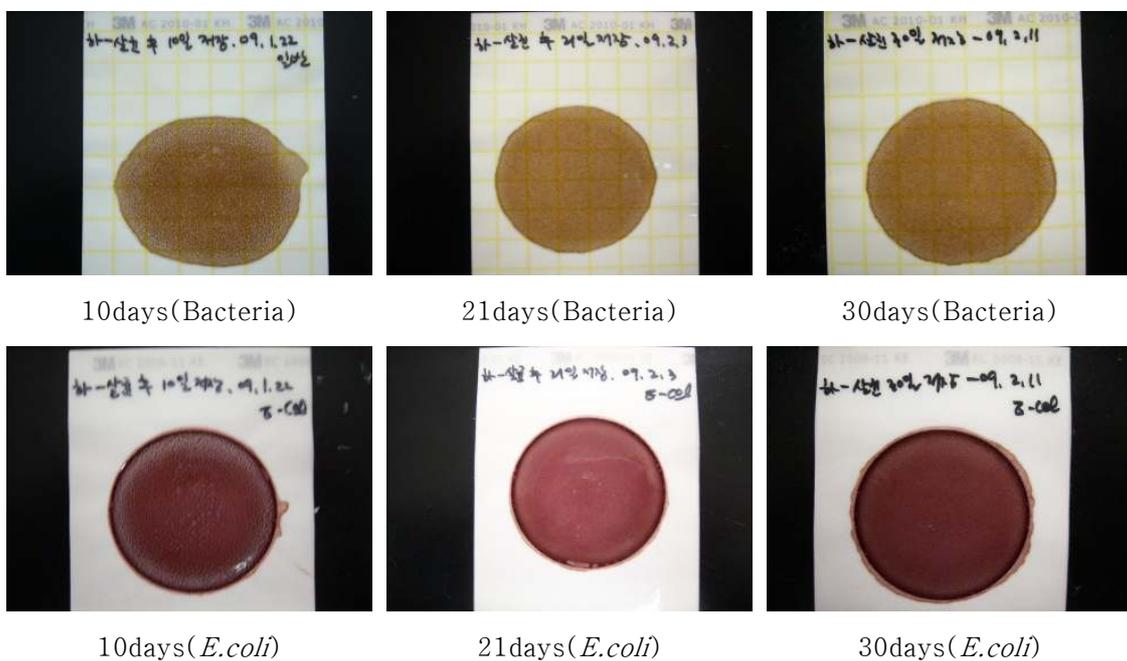


Fig. 3-15. Photomicrographs of microbial growth during storage for 30days at 37°C after sterilization

라. 개발시제품의 품질평가

최종 개발제품의 품질평가는 저장중의 색도변화와 관능평가(색상, 향미, 신맛, 단맛) 항목을 중심으로 연구원 10명이 직접 참여하였으며, 기호성을 중심으로 종합평가를 실시하였다.

CIELAB 균등 색 공간은 Hunter Lab 색 공간을 표준화 한 것으로 밝기를 나타내는 L*를 수직 축으로 하고 색도를 나타내는 a*, b*를 수평 평면으로 하는 공간으로 구성되어 있다. 여기서 a*가 양의 방향으로 큰 값일수록 빨간 기미를 많이 띠고 음의 방향으로 큰 값일수록 녹색 기미를 많이 띤다. 또한 b*가 양의 방향으로 큰 값일수록 노란 기미를 많이 띠고 음의 방향으로 큰 값일수록 파란 기미를 많이 띤다. 중양은 무채색을 나타낸다.

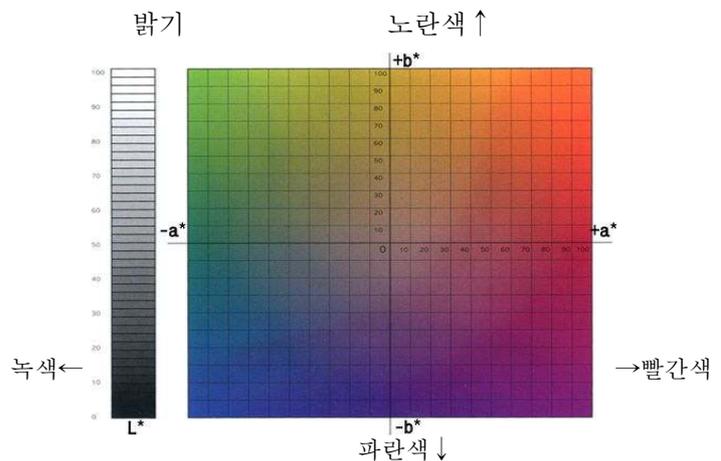
이러한 Hunter 색차계를 이용하여 개발제품의 색도를 측정결과는 Table 3-13과 같이 저장기간이 길어질수록 L값(명도)은 약간의 감소를 보였으나 유의적인 차이는 없었으며,

대체적으로 불투명한 결과를 보였다. 녹색과 빨간색의 정도를 나타내는 a값은 저장기간 중 19.22~21.40의 범위를 보였는데, 이는 제품의 색상이 다소 적녹색을 나타내는 것으로 평가되었으며, b값은 16.11~22.5 범위로 노란색의 불투명한 노란색으로 조사되었다.

Table 3-13. Changes of total color difference during storage for 30days at 37°C after sterilization

	Non.	1 day	5 days	10 days	20 days	30 days
L	15.55	15.67	14.27	14.42	12.42	14.47
a	20.69	20.66	20.36	19.66	19.32	20.10
b	21.58	21.11	19.42	19.44	16.11	18.88

* Non. : before sterilization.



【Hunter Lab 색공간 (CIELAB 균등색공간)】

【관능평가용 추출정제수 조성비】

구 분	시료명 및 배합량(g/100ml)				
	하고초	A-01	B-02	C-03	
하고초	**0	**0 초과	**0-**0	**0 미만	
***	-	6.0 초과	4.0-6.0	4.0 미만	
***	-	2.5 초과	1.5-2.5	1.5 미만	
****등	-	20.0 초과	10.0-20.0	10.0 미만	
****나무	-	6.0 초과	4.0-6.0	4.0 미만	
색상 (육안검사)	짙은 갈색 (연한 흑색)	짙은 갈색	연한 갈색	연한 노란색	
색상 (색차계)	L(명도)	**9	8.04	**98	4.18
	a(+적, -녹)	**74	1.53	-**24	-0.85
	b(+노, -파)	**41	7.46	**30	1.61

다. 개발시제품의 관능평가

개발 시제품의 관능평가를 위해 10명(남 3, 여 7)의 연구원을 대상으로 최종제품에 대한 관능평가를 실시한 결과는 Table 3-14와 같다.

색상은 전반적으로 보통(+) 수준이었으며, 향미는 보통이하, 신맛은 다소 강함, 단맛은 좋은 평가 수준을 보였는데, 전반적으로 생약재의 특성으로 인해 보통 또는 좋음 수준을 나타내었다.

【관능평가표】

구 분	평 가 방 법 및 점수			
	시료명 (A:하고초추출물)	시료명 (A-01)	시료명 (B-02)	시료명 (C-03)
1. 성상의 기호도	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)
2. 색상의 기호도	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)
3. 향미의 기호도	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)
4. 맛의 기호도	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)
5. 종합평가	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)	아주좋다(5), 좋다(4), 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1)

Table 3-14. The organoleptic characteristics of Hagocho products during storage for 30days

	1 day	5 days	10 days	20 days	30 days
Color	+	+	+	+	+
Flavor	-	-	-	+	+
Acidity	+++	+++	+++	+++	+++
Sweet	++	++	++	++	++
Overall acceptability	++	++	++	++	++

* 아주좋음(+++), 좋음(++), 보통(+), 나쁨(+), 아주나쁨(- -).



【생약재 추출물 및 추출정제수의 성상】

제3절 하고초의 생물활성 연구

1. 하고초 추출물의 항산화활성 및 항균활성

가. 하고초 추출물의 항산화활성

(1) DPPH radical 소거능

전자공여능은 1,1-di-phenyl-2-picrylhdrazyl (DPPH)에 대한 전자공여 효과로 시료의 환원력을 측정하였다. 즉 일정농도의 하고초 시료액 1ml에 1×10^4 M DPPH용액 3ml를 가하여 혼합한 다음 30분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가구와 시료무첨가구의 흡광도의 감소율(%)로 나타내었다.

그 결과 하고초 추출물의 DPPH(1,1-di-phenyl-2-picrylhdrazyl) 라디칼 소거능(전자공여능)은 시료의 농도에 따라 전자공여능이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 100ppm 이상의 농도에서는 50% 이상의 전자공여능을 관찰할 수 있었다.

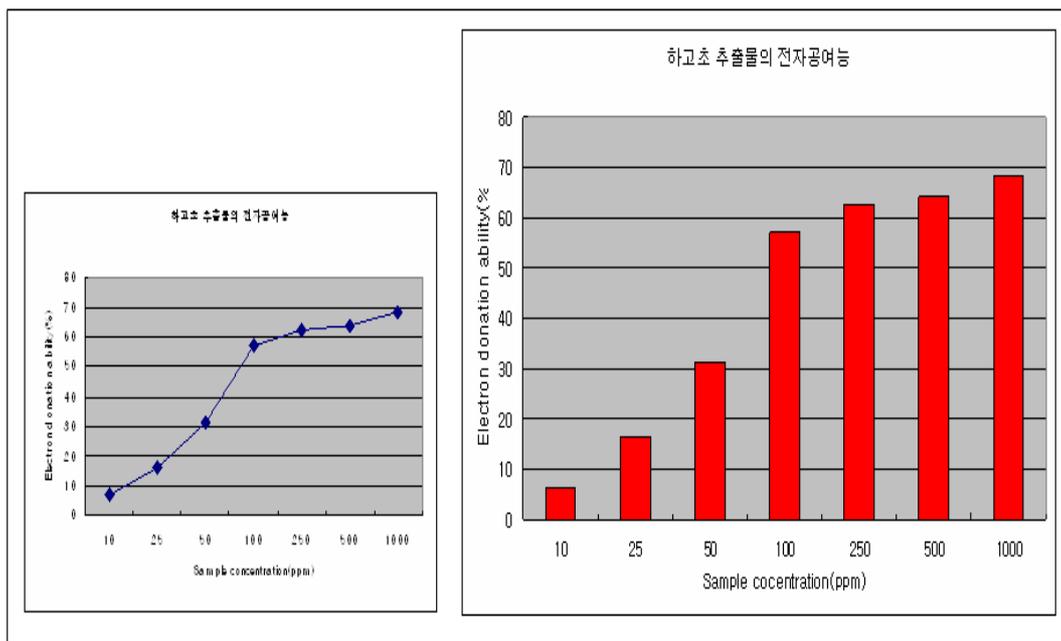


Fig.3-16. Electron donation ability of water extracts from *Prunella vulgaris*.

(2) 환원력

환원력은 농도별(10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000ppm) 하고초 시료 1ml에 200ml phosphate 완충용액(pH 6.6) 1ml 1% potassium ferricyanide 1ml를 가해 충분히 혼합한 다음 50°C에서 20분간 반응시킨 후에 10% TCA 용액 1ml를 첨가하고 4.000rpm에

서 5분간 원심분리하고, 이 상정액 1ml에 증류수 1ml와 ferric chloride 0.1ml를 가해 혼합한 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값을 환원력으로 나타내었다.

그 결과 환원력은 항산화력과 밀접한 관계에 있으며, 일반적으로 reductone의 존재와 관련이 있다고 알려져 있다. 항산화 반응은 reductones가 제공하는 수소원자가 free radical 사슬을 분쇄함으로써 시작되는데, 환원력은 반응조건에 첨가되는 시료의 농도에 따라 달라지며, 대부분이 시료 첨가량의 증가에 따라 환원력이 상승하는 경향이나 추출용매에 따른 환원력의 차이는 시료의 성질에 따라 상이함을 나타내는 것으로 보고 되어있다. 이에 본 실험에서는 추출시료의 농도별(10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000ppm)로 환원력을 측정한 결과 시료농도 100ppm까지는 환원력이 완만하게 증가하다가 100ppm 이후 부터는 급격히 증가하여 시료 농도 1000ppm에서는 OD값이 1.16로 가장 높게 나타났다.

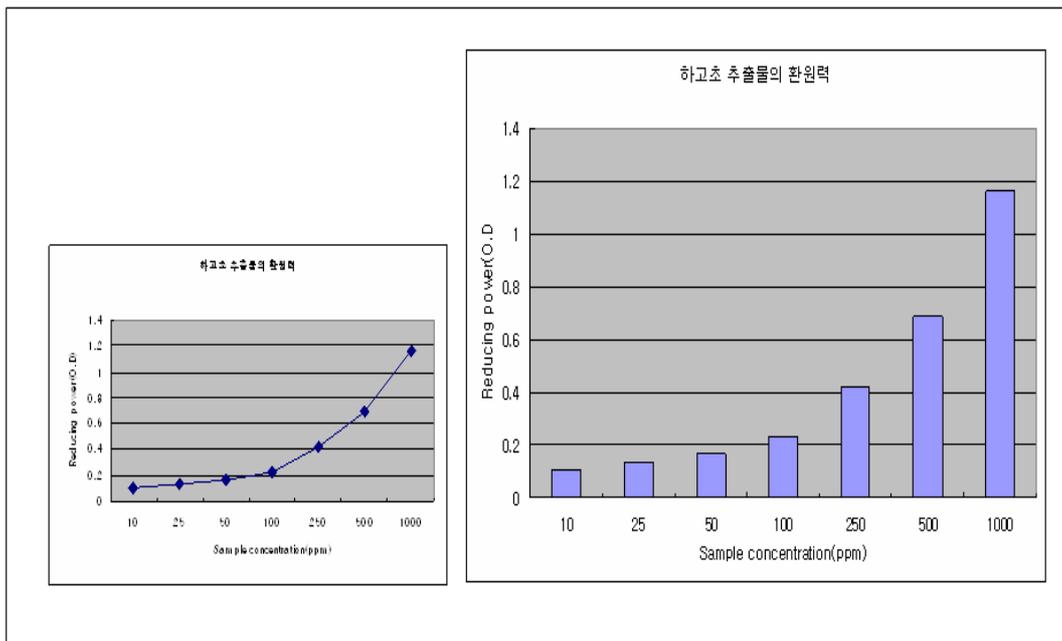


Fig. 3-17. Electron donation ability of water extracts from *Prunella vulgaris*.

(3) Hydroxy radical(OH) 소거능

시험관에 1 mM FeSO₄/EDTA 용액, 10 mM 2-deoxyribose 용액, 하고초 농도별 시료를 각 0.2 ml씩 가하고 0.1 M phosphate 완충액(pH7.4) 1.2ml와 10mM H₂O₂를 가하여 37°C 수욕상에서 1시간 반응시켰다. 여기에 2.8% TCA용액 1ml를 가하여 반응을 중지시킨 다음 1% TBA (Thiobarbituric acid)용액 1ml를 가하여 다시 100°C의 수욕상에서 10분간 가열시킨 후 급냉한 것을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ·OH 소거능(%)은 다음의 식에 의해 구하였다.

$$\bullet \text{ OH 소거능(\%)} = [1 - (A_s - A_o) / (A_c - A_o)] \times 100$$

A_s 와 A_c : 각각 시료를 첨가한 실험구와 대조구의 흡광도

A_o : 37°C에서의 반응이 생략된 시약 혼합액의 흡광도

하고초 시료를 농도별로 가하여 전처리한 후 532nm에서 흡광도를 측정하여 Hydroxy radical 소거능을 관찰한 결과 그림에서와 같이 50ppm의 농도에서 radical 소거능이 급격히 증가하는 경향을 보였는데, 이는 DPPH 라디칼 소거능에서 활성이 높게 관찰된 하고초 시료의 농도에서 보다 더 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

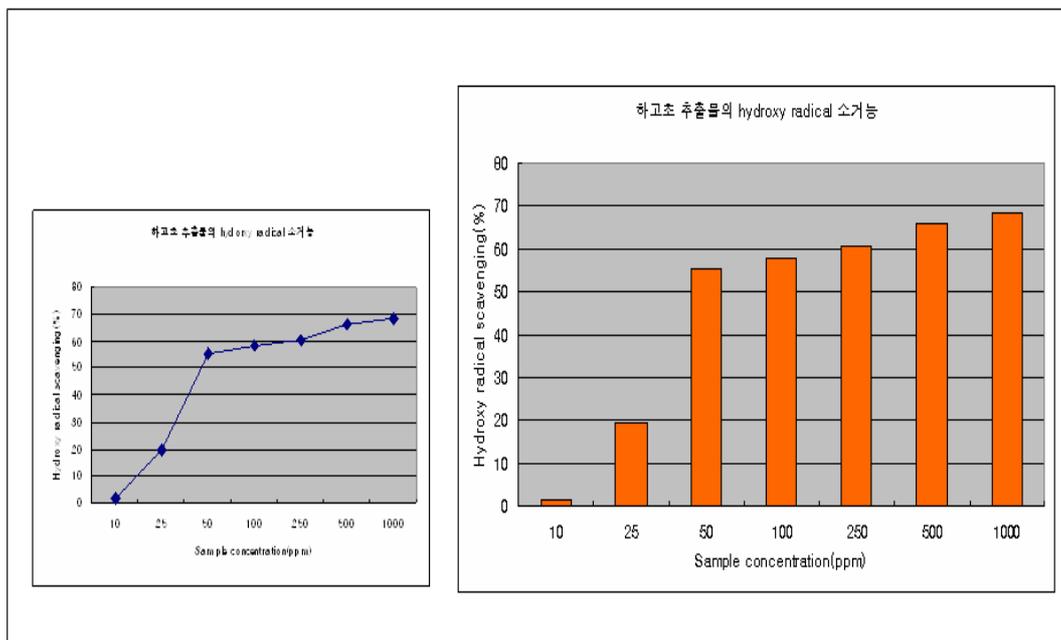


Fig. 3-18. Hydroxy radical scavenging ability of water extracts from *Prunella vulgaris*.

(4) Nitrite 소거능

아질산염 소거작용 측정은 1mM NaNO_2 용액 ml에 각 시료 1ml를 가하고 0.1 N HCl 과 0.2 M 구연산 완충액으로 pH 2.5로 보정한 다음 완충액을 가하여 총 부피를 10ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨후 각 반응액 1ml를 취하여 2% 초산용액 3ml와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent (1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1:1) 0.4ml를 차례로 가한 후 진탕 혼합하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess reagent 대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은 $100 - [(\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100]$

0) 으로 나타내었다.

아질산염의 소거작용은 아질산염이 환원성 물질에 의하여 nitric oxide로 전환되기 때문에 관찰할 수 있는데, ascorbic acid, cysteine, hydroquinone 및 nicotinamide adenine dinucleotide, phenolic compounds 등이 주로 대표적인 환원성 물질로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 하고초의 아질산염 소거능을 관찰하기 위하여 시료 전처리 과정을 거친 후 520nm에서 흡광도를 측정한 결과 다음 그림과 같이 하고초 추출물 시료의 농도가 낮은 경우에는 아질산염 소거능이 아주 낮게 나타났으나, 시료의 농도가 250ppm 이상인 경우에는 아질산염 소거능이 완만하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

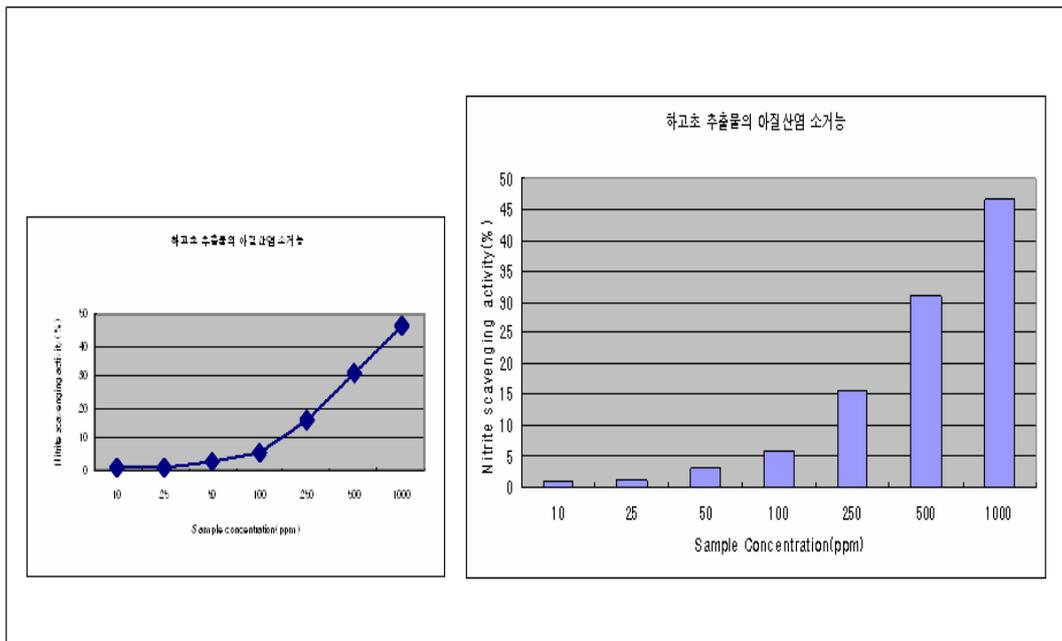


Fig. 3-19. Nitrite scavenging activity of water extracts from *Prunella vulgaris*.

(5) 하고초 전초와 뿌리의 전자공여능

하고초 전초 시료 전처리방법과 동일하게 건조한 후 추출·농축하여 동결건조한 하고초 뿌리 시료의 전자공여능은 상기 실험방법에 의해 하고초 전초와 뿌리의 항산화 활성을 비교하기 위하여 전초 열수추출물 동결건조분과 뿌리 열수추출물 동결건조분을 각각 100, 250, 500, 1000ppm의 농도로 조제한 후 DPPH radical에 대한 전자공여능을 측정한 결과 전초 추출물 시료에서는 100ppm의 농도 이상에서 아주 높은 전자공여능을 보였으나 뿌리 추출물 시료에서는 500ppm 이상의 농도에서도 50% 이하의 전자공여능을 나타나는 것으로 보아 하고초 뿌리 보다는 전초의 항산화활성이 비교적 높은 것으로 사료되었다.

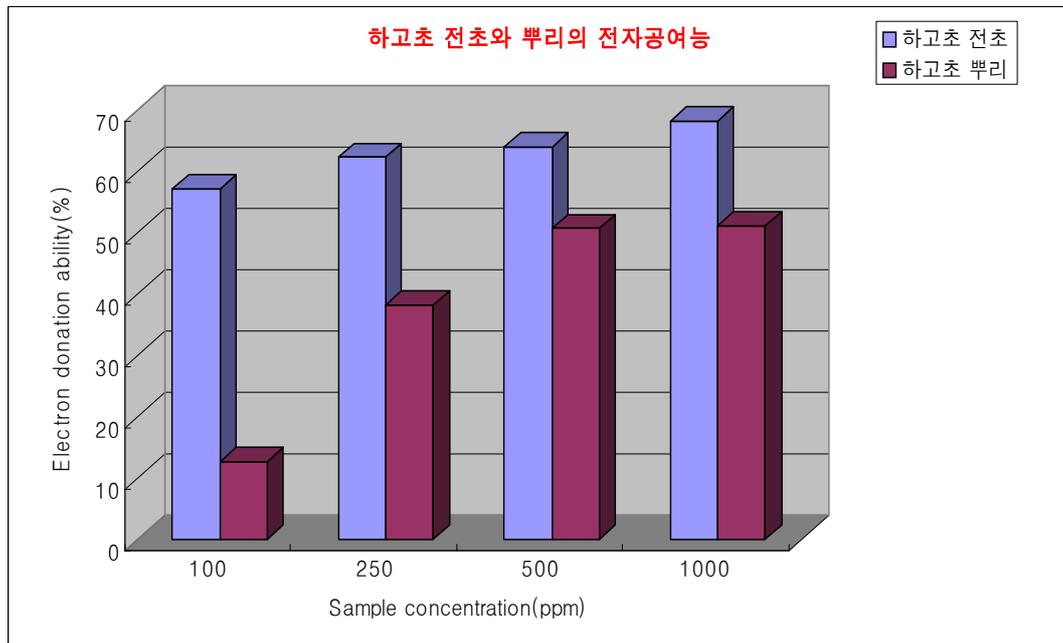


Fig. 3-20. Electron donation ability of water extracts from *Prunella vulgaris* stalk and *Prunella vulgaris* root.

(6) 하고초 전초와 뿌리의 OH radical 소거능

하고초 뿌리 추출물의 OH radical 소거능은 뿌리를 건조한 후 추출·농축하고, 동결건조한 후 농도별(100, 250, 500, 1000ppm) 시료를 조제하여 하고초 전초의 OH radical 소거능과 비교 분석하였다.

하고초 뿌리 열수추출물의 OH radical 소거능과 전초 열수추출물의 OH radical 소거능을 비교 분석하기 위하여 각 시료의 농도별(100, 250, 500, 1000ppm)로 조제하여 분석한 결과 다음 그림과 같이 나타났다. 그림에서와 같이 하고초 뿌리 열수추출물 시료에서는 아주 낮은 Hydroxy radical 소거능이 관찰되었으나, 전초 열수추출물 시료에서는 전자공여능 실험결과와 동일하게 100ppm 이상의 농도에서도 아주 높은 OH radical 소거능을 보였다. 이와 같은 결과로 보아 하고초 뿌리 보다는 하고초 전초의 항산화활성을 이용한 상품화 기술이 개발되는 것이 타당할 것으로 사료된다.

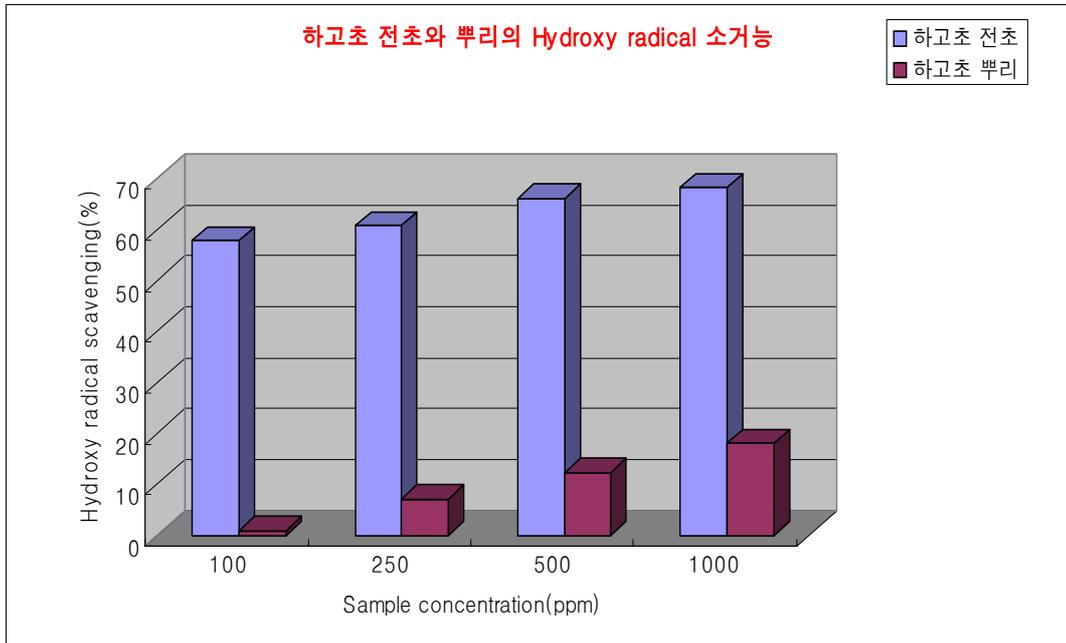


Fig. 3-21. Hydroxy radical scavenging ability of water extracts from *Prunella vulgaris* stalk and *Prunella vulgaris* root.

나. 하고초 추출물의 항균활성

시료 100g을 15배 용량의 증류수, 메탄올로 각각 환류 추출하였고, 또한 증류수 또는 메탄올을 추출용매로 하여 60℃에서 8시간 추출하여 감압 농축한 증류수 extract를 적정량의 물에 용해시키고 ethyl acetate, ether, chloroform, butanol, isopropanol 등의 용매를 순차적으로 사용하여 분획한 각 추출물을 감압 농축한 후 paper disk method에 의해 항균활성을 측정하였다. 본 실험에 사용된 균주는 한국미생물보존센터(KCCM)으로부터 분양 받았으며, 사용된 균주는 *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Escherichia coli* ATCC25922를 사용하였으며, 배지는 Brain Heart Infusion(BHI, Difco. MA., USA) 와 Luria Bertani Broth(LB, Difco)를 각각 사용하였다.

그 결과 충치유발균인 *Streptococcus mutans* 균에 대해서는 분획물 중 isopropanol 분획물에서 가장 높은 항균활성(+++)을 나타내었으며, 하고초 열수추출물에서는 대장균에 대하여 유의적인 항균활성을 관찰할 수 있었다.

향후 isopropanol 및 메탄올 추출물에 대한 대장균 및 *Streptococcus mutans*균에 대한 항균활성을 체계적으로 진행할 계획이며, 이러한 결과는 하고초 소재의 치약소재화 산업화도 가능할 것으로 사료되었다.



Fig. 3-22. Photography showing the antibacterial activity of *Prunella vulgaris* on the *Streptococcus mutans*.

2. 하고초 부위별 MeOH 추출물의 생물활성

가. 추출 수율, pH 및 갈색도

하고초 부위별 메탄올 추출물의 추출 수율, pH 및 갈색도를 측정한 결과는 Table 3-15와 같다. 추출 수율은 전초에서 5.6%, 꽃대 부위에서 4.1%, 줄기에서 5.5%로 메탄올 추출에 따른 하고초 부위별 수율의 차이는 적었다. 시료의 pH는 7.0~7.4의 범위로 시료간에 유의차가 있었으나, 모두 중성 pH 범위였다.

Ju 등은 16종의 한약재를 대상으로 물추출물의 수율을 측정한 결과 씨 > 잎 > 꽃 > 줄기의 순으로 수율이 높아, 식물류의 추출 시 시료의 사용부위에 따라 수율이 상이한 것으로 보고한 바 있다.

280 nm에서의 흡광도 값은 항산화성 물질의 용출정도와 방향족화합물의 함량을 추정하기 위해 이용되는데, 하고초 메탄올 추출물은 부위에 관계없이 모두 0.5로 시료 간에 유의적인 차이가 없었다. 420 nm에서의 흡광도 값은 갈색화 반응생성물의 농도를 나타내는 것으로 흡광도 값이 클수록 항산화성 물질이 많은 것으로 추정하는데, 하고초 부위별 메탄올 추출물의 흡광도 값은 전초 및 줄기에서 1.7이었는데, 꽃대는 0.7로 전초와 줄기에 비해 훨씬 낮은 값을 나타내어 갈색화 물질의 함량이 적은 것으로 추정되었다.

16종의 한약재 물추출물의 흡광도를 측정한 결과 꿀풀에서 2.872로 가장 높았으며, 항산화능도 우수한 것으로 보고되어 있으나, 갈색화 반응물의 함량이 많을수록 오히려 항산화능이 감소되었다는 보고도 있다.

Table 3-15. Extraction yield, pH and absorbance value of *Prunella vulgaris*

Sample	Effective part (plant parts used)	Yield(%)	pH	Absorbance at 280 nm1)	Absorbance at 420 nm2)
Whole*	Total parts	5.6	7.4±0.03 ^C	0.5±0.00 ^{NS}	1.7±0.00 ^B
Flower stalk	Upper part	4.1	7.0±0.02 ^A	0.5±0.01	0.7±0.01 ^A
Stem	layer part	5.5	7.1±0.01 ^B	0.5±0.00	1.7±0.00 ^B

*Whole : Flower stalk + Stem

1) sample concentration is 250 µg/mL

2) sample concentration is 1,000 µg/mL

^{A-C}Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

^{NS}Not significant

나. 총페놀 및 플라보노이드 함량

하고초 전초의 부위(상층부위, 하층부위)별 MeOH 추출물의 총페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Fig. 3-23과 같다.

Phenolic compounds는 하고초 상부에서 77.10±3.73mg/100g으로 가장 높게 나타났으며, flavonoids 함량은 상부와 하부에서 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 하고초 부위별 지표물질 함량 분석결과 상층부위(상부)에서 함량이 가장 높게 관찰된 결과와 관련이 높을 것으로 사료되었다.

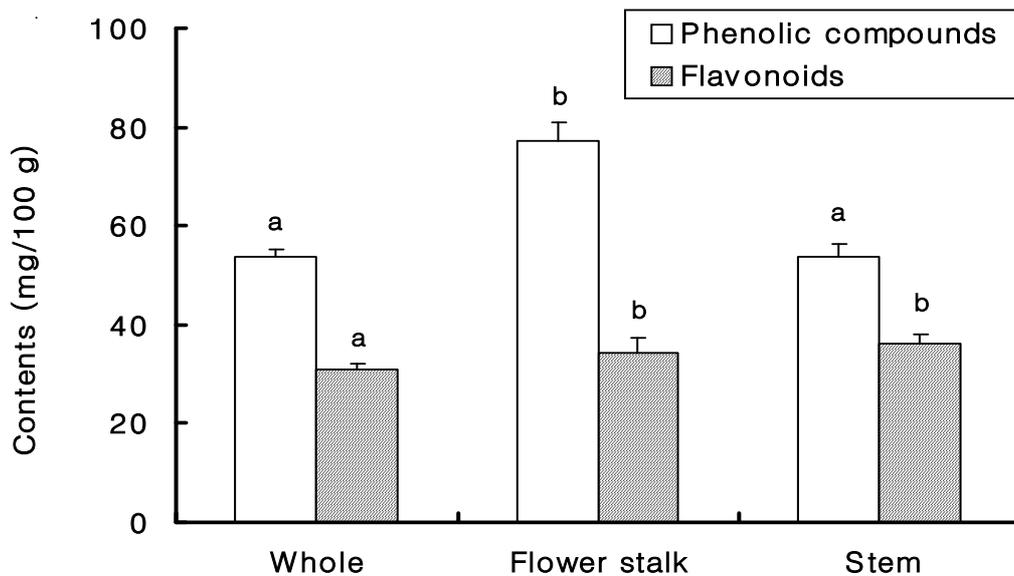


Fig. 3-23. Total phenolic compounds and flavonoids contents of *Prunella vulgaris*.

Whole : Flower stalk + Stem

^{a,b}Means with different superscripts in the same experiment are significantly different at p<0.05.

다. 전자공여능

전자공여능은 일정농도의 하고초를 부위별로 MeOH로 추출한 후 농축하고, 농축액에 물을 5회 가하여 MeOH을 완전히 제거한 다음 동결건조한 추출시료액 1ml에 1×10^4 M DPPH 용액 3ml를 가하여 혼합한 다음 30분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과는 Table 3-16과 같이 시료첨가구와 시료무첨가구의 흡광도의 감소율(%)로 나타내었다.

Table 3-16에서와 같이 하고초 시료 부위 중 전자공여능이 가장 높게 나타난 부위는 하고초 상층부위(상부)였으며, 이러한 결과는 시료의 농도변화에 관계없이 부위별 차이는 뚜렷하게 나타났다. 특히 상층부위와 하층부위에서 가장 큰 차이를 보이는 시료의 농도는 $250 \mu\text{g/ml}$ 로 관찰되었다.

Table 3-16. Electron donating ability of methanol extracts from *Prunella vulgaris* (%)

Samples	Sample concentration($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Whole*	17.4 ± 1.36^{aA}	44.4 ± 0.16^{bB}	80.6 ± 0.57^{cB}	89.9 ± 0.08^{dA}
Flower stalk	21.9 ± 0.96^{aB}	52.9 ± 1.07^{bC}	86.9 ± 0.26^{cC}	92.1 ± 0.17^{dC}
Stem	16.6 ± 1.30^{aA}	37.3 ± 1.86^{bA}	73.1 ± 0.28^{cA}	90.7 ± 0.47^{dB}

*Whole : Flower stalk + Stem

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-C}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

라. 환원력

하고초를 전초, 상층부위 및 하층부위로 구분하여 MeOH로 추출 후 동결건조한 시료의 농도별(100, 250, 500, 1000ppm)로 시료 1ml에 200ml phosphate 완충용액(pH 6.6) 1ml 1% potassium ferricyanide 1ml를 가해 충분히 혼합한 다음 50℃에서 20분간 반응시킨 후에 10% TCA 용액 1ml를 첨가하고 4,000rpm에서 5분간 원심분리한 후, 이 상정액 1ml에 증류수 1ml와 ferric chloride 0.1ml를 가해 혼합한 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값을 환원력으로 나타내었다.

그 결과 전자공여능 측정 결과와 유사하게 모든 실험농도에서 하고초 상층부위의 환원력이 높게 나타났으며, 특히 시료의 농도가 증가할수록 상층부위와 하층부위 시료의 환원력은 비례적인 차이를 보였다.

Table 3-17. Reducing power of methanol extracts from *Prunella vulgaris*

(absorbance value at 700 nm)

Samples	Sample concentration(μg/mL)			
	100	250	500	1000
Whole*	0.2±0.00 ^{aA}	0.5±0.01 ^{bA}	0.9±0.01 ^{cB}	1.6±0.03 ^{dB}
Flower stalk	0.3±0.01 ^{aB}	0.6±0.01 ^{bB}	1.1±0.02 ^{cC}	1.9±0.04 ^{dC}
Stem	0.2±0.00 ^{aA}	0.5±0.01 ^{bA}	0.8±0.01 ^{cA}	1.5±0.02 ^{dA}

마. OH 라디칼 소거능

시험관에 1 mM FeSo₄/EDTA 용액, 10 mM 2-deoxyribose 용액, 하고초 MeOH 추출물 농도별 시료를 각 0.2 ml씩 가하고 0.1 M phosphate 완충액(pH7.4) 1.2ml와 10mM H₂O₂를 가하여 37°C 수욕상에서 1시간 반응시켰다. 여기에 2.8% TCA용액 1ml를 가하여 반응을 중지시킨 다음 1% TBA (Thiobarbituric acid)용액 1ml를 가하여 다시 100°C의 수욕상에서 10분간 가열시킨 후 급냉한 것을 532 nm에서 흡광도를 측정하였고, 시료의 OH 라디칼 소거능(%)은 다음의 식에 의해 구하였다.

- OH 소거능(%) = $[1 - (A_s - A_o) / (A_c - A_o)] \times 100$

A_s와 A_c : 각각 시료를 첨가한 실험구와 대조구의 흡광도

A_o : 37°C에서의 반응이 생략된 시약 혼합액의 흡광도

하고초 MeOH 추출물의 시료 부위별 OH radical 소거능을 측정한 결과는 Table 3-18과 같이 시료 농도에 따라 최대 활성을 나타낸 부위는 각각 다르게 나타났으나, 실험군간 유의적인 차이는 보이지 않았다.

Table 3-18. OH radical scavenging ability of methanol extracts from *Prunella vulgaris* (%)

Samples	Sample concentration($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Whole*	80.3 \pm 1.75 ^{aA}	85.9 \pm 0.36 ^{bA}	87.5 \pm 1.19 ^{bcA}	88.5 \pm 0.85 ^{cA}
Flower stalk	84.9 \pm 0.55 ^{aB}	85.4 \pm 1.02 ^{abA}	86.9 \pm 0.54 ^{bA}	88.8 \pm 1.16 ^{cA}
Stem	84.6 \pm 0.68 ^{aB}	86.2 \pm 0.53 ^{bA}	86.8 \pm 0.24 ^{bcA}	87.4 \pm 0.73 ^{cA}

*Whole : Flower stalk + Stem

^{a-c}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.^AMeans with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

바. β -caroten-linoleic acid계에서의 지질과산화 억제능

β -caroten-linoleic acid system에서 측정된 항산화 활성은 Table 3-19에서와 같이 저농도에서는 하고초 상층부위의 항산화능이 높게 나타났으며, 고 농도에서는 하층부위의 활성이 비교적 높은 것으로 관찰되었다.

이상의 결과로 볼 때 하고초의 면역활성물질인 ursolic acid 함량은 물 추출물보다는 MeOH 추출물에서 높게 검출되었고, 하고초 전초 전체와 상층부위, 하층부위로 분리하여 각각의 ursolic acid의 함량을 분석한 결과 하고초 상층부위에서 가장 높게 검출되었다.

또한 각 부위별 MeOH 추출·농축액에 5회 加水하여 MeOH를 제거한 후 동결건조한 시료의 생물활성 검증을 위해 항산화활성을 측정된 결과 전반적으로 하고초 상층부위의 항산화 활성이 우수하게 관찰되었다.

이러한 결과는 향후 개발 대상인 하고초 기능성식품의 원료를 하고초 전초(건조물) 중 활성이 높은 상층부위만을 사용할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 효과는 하고초 원료의 저장시 발생하는 고 비용을 절감하는데 기여할 것으로 사료된다.

Table 3-19. Lipid peroxidation inhibitory effect of methanol extracts from *Prunella vulgaris* in β -carotene-linoleic acid system (%)

Samples	Sample concentration($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Whole*	20.4 \pm 1.85 ^{aA}	36.4 \pm 1.07 ^{bA}	38.3 \pm 2.83 ^{bA}	47.5 \pm 1.07 ^{cA}
Flower stalk	25.9 \pm 3.21 ^{aB}	45.7 \pm 1.07 ^{bB}	67.3 \pm 5.66 ^{cC}	84.6 \pm 3.86 ^{dC}
Stem	22.2 \pm 1.85 ^{aAB}	45.1 \pm 2.83 ^{bB}	48.2 \pm 0.00 ^{bB}	77.8 \pm 3.71 ^{cB}

*Whole : Flower stalk + Stem

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.^{A-C}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

사. ABTs 라디칼 소거능

하고초 메탄올 추출물의 ABTs 라디칼 소거능은 Table 3-20과 같이 250 µg/mL 첨가 시 50% 이상의 활성을 나타내었으며 500 µg/mL 첨가 시에는 88.1~92.3%로 활성이 유의적으로 증가하였다. 그러나 1,000 µg/mL 첨가 시에도 활성은 85.0~91.4%로 500 µg/mL 첨가 시에 비하여 유의적인 차이가 없었으며, 하고초의 부위별 소거능은 전초 > 꽃대 > 줄기 순이었다.

진달래꽃의 물 및 60% 에탄올 추출물은 ABTs 라디칼 소거능이 90% 이상으로 높았고 보고되어 있다. 또한 제비꽃 용매별 추출물의 ABTs 라디칼 소거능은 1,000 µg/mL 첨가 시 11.26~43.53%로 아세톤 추출물에서 가장 우수하여 시료의 전자공여능 및 환원력과는 다른 경향을 보이는데, 이는 시료의 항산화능 기작이 상이하기 때문이라고 보고된 바 있다. Choi 등은 시판 다류 제품의 열수 추출물에 대한 ABTs 라디칼 소거능 측정결과 시료의 ABTs 라디칼 소거능은 전자공여능과 상관관계가 높으며 그 활성에는 폴리페놀과 비타민 C 이외에 시료 중에 존재하는 다른 항산화성 물질이 기여함을 추정하였는데, 이는 본 실험 결과와도 잘 일치하였다.

Table 3-20. ABTs radical scavenging ability of methanol extracts from *Prunella vulgaris*

(%)

Samples	Sample concentration(µg/mL)			
	100	250	500	1000
Whole*	28.8±0.70 ^{aB}	74.3±0.57 ^{bB}	92.3±0.23 ^{cC}	91.4±0.76 ^{cC}
Flower stalk	36.7±0.39 ^{aC}	75.6±1.62 ^{bB}	90.6±0.36 ^{cB}	89.8±0.59 ^{cB}
Stem	20.0±3.05 ^{aA}	55.1±2.25 ^{bA}	88.1±0.97 ^{cA}	85.0±0.61 ^{cA}

*Whole : Flower stalk + Stem

^{a-c}Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

^{A-C}Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

Nitric oxide(NO·)는 생체 내에서 NO synthase의 촉매작용에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유 라디칼로, 세포독성이 강하며 다량이 생성될 경우 염증 반응, 면역 체계이상 등의 산화반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.

하고초 메탄올 추출물이 nitric oxide 소거능에 미치는 영향을 비교한 결과 Table 3-21

과 같이 전초, 꽃대 및 줄기는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 첨가 시에도 20% 미만의 소거능을 보여 다른 항산화능 측정 결과에 비해 다소 활성이 낮았다. 반면에 꽃대는 19.7%로 전초 및 줄기에서 각각 14.6% 및 14.9%인 것에 비하면 유의적으로 높았는데, 이러한 현상은 다른 항산화능 측정과도 일치하는 결과였다.

함초는 총 페놀 함량이 높은 추출물에서 nitric oxide 소거능이 우수하여 nitric oxide 소거에 페놀 화합물이 관여하는 것으로 보고되어 있는데, 본 실험결과에서도 페놀화합물의 함량이 높은 꽃대에서 nitric oxide 소거활성이 유의적으로 높았다.

Table 3-21. NO radical scavenging activity of methanol extracts from *Prunella vulgaris*

(%)

Samples	Sample concentration($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Whole*	6.3 \pm 1.10 ^{aA}	11.3 \pm 2.12 ^{bAB}	11.8 \pm 1.45 ^{bcA}	14.6 \pm 1.70 ^{cA}
Flower stalk	11.1 \pm 2.33 ^{aB}	14.3 \pm 2.12 ^{aB}	18.3 \pm 0.97 ^{bC}	19.7 \pm 1.32 ^{bB}
Stem	3.5 \pm 1.40 ^{aA}	8.43 \pm 1.19 ^{bA}	14.4 \pm 1.16 ^{cB}	14.9 \pm 1.17 ^{cA}

*Whole : Flower stalk + Stem

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-C}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

아. 아질산염 소거능

하고초 메탄올 추출물의 아질산염 소거능은 Table 3-22와 같다. 전초는 250 $\mu\text{g/mL}$ 이상 첨가 시 19.3~21.7%로 시료 첨가량에 따른 아질산염 소거능에 유의차가 없었으나, 꽃대와 줄기는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 첨가 시 30% 이상으로 전초에 비해서 유의적으로 소거능이 높았다.

한약재의 아질산염 소거능은 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 산조인, 산수유, 감국, 꿀풀, 금물초, 오가피, 단삼, 울금 물추출물에서 50% 이상인 것으로 보고되었는데, 대부분이 페놀 화합물의 함량이 높은 식물들이었다. 차류 및 약용식물류의 아질산염 소거능은 메탄올 추출물이 물추출물보다 높았는데, 이는 메탄올에서 페놀 화합물의 용출이 높았기 때문인 것으로 보고되어 있다.

Table 3-22. Nitrite scavenging activity of methanol extracts from *Prunella vulgaris* in pH 2.5 reaction system

(%)

Samples	Sample concentration(μg/mL)			
	100	250	500	1000
Whole*	15.3±2.76 ^{aa}	19.3±2.52 ^{bb}	20.0±1.45 ^{bAB}	21.7±1.07 ^{ba}
Flower stalk	11.8±1.03 ^{aa}	13.8±2.34 ^{abA}	16.1±1.41 ^{ba}	30.7±1.39 ^{cB}
Stem	14.7±2.42 ^{aa}	20.3±1.24 ^{bb}	21.6±2.85 ^{bb}	32.5±0.99 ^{cB}

*Whole : Flower stalk + Stem

^{a-c}Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

^{A,B}Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

3. 하고초 추출물의 항고지혈증 효과

가. 재료 및 방법

(1) 실험재료

시료는 경남 함양군 백전면 일대에서 대량재배되는 하고초를 채취하여 열수 추출하고 감압농축한 후 동결건조한 시료를 고지혈증 유발 식이와 함께 배합하여 실험동물의 식이로 사용하였다.

(2) 실험동물, 사육조건 및 식이조성

실험동물은 생후 5주된 150±10 g의 Sprague-Dawley계 수컷 성장기 흰쥐를 (주)샘타코(서울, Korea)로부터 분양받아, 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(07:00~19:00)이 자동설정된 동물사육실에서 1주간 시판 고형사료(Rat, chow, 삼양사)로 적응시킨 후 외관상 건강한 190±10 g 흰쥐를 체중에 따른 난괴법으로 10마리씩 3그룹으로 나누어 사육상자에 한 마리씩 넣어 4주간 실험사육하였다. 실험식이군은 기본 식이군(Normal), 시판 고지방식이 사료(Rodent Diet with 45kcal% fat) 첨가군(Control), 고지방식이군에 하고초 추출물 분말 0.2% 첨가군(Hagocho 0.2%), 하고초 추출물 분말

0.5% 첨가군(Hagocho 0.5%)으로 구성하였다. 이때 하고초 분말 대신에 starch에서 동량을 제외시켰다.

(3) 식이섭취량, 식이효율 및 체중측정

실험기간 동안 식이는 매일 오후 5시에 급여하였고 다음날 오전 10경에 식이섭취량을 조사하였다, 식이섭취량의 오차를 최소화하고자 손실량을 보정하였다. 물은 매일 신선한 생수를 공급하였으며 체중은 1주일에 한번씩 일정한 시간에 측정하였고 실험기간 동안의 체중증가량을 같은 기간 동안의 총 식이섭취량으로 나누어 다음의 식에 따라 식이효율을 구하였다.

$$\text{식이효율(FER)} = \frac{\text{4주간 체중 증가량 (g)}}{\text{4주간 식이섭취량 (g)}}$$

(4) 실험동물의 처리

실험 최종일에 실험동물을 16시간 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 심장에서 채혈하였다. 채혈된 혈액은 빙수 중에서 30분간 응고시킨 후 원심분리기(Mega 17R, 한일사, Korea)로 3,000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 혈청을 얻어 -70°C 에 보관해두고 분석용 시료로 사용하였다. 장기(간장, 심장, 신장, 비장, 고환, 폐)는 채혈 후 즉시 분리시켰으며, 생리식염수로 혈액을 씻은 다음 흡수지로 물기를 제거하고 무게를 측정한 후 -70°C 에 보관하였다.

(5) 혈중 지질 함량 분석

혈청의 총 콜레스테롤(total cholesterol) 함량은 총 콜레스테롤 측정용 kit시약(AM 202-k, Asan, Korea)을 사용하여 실험하였다. 즉, 효소시약을 효소시약 용해액에 용해시킨 후 시료 20 μL 에 조제한 효소시약 3 mL를 첨가한 후 37°C 에서 5분간 배양한 후 시료 무첨가구를 대조로 하여 파장 500 nm에서 흡광도(Optizen 2120UV, Mecasys Co. Ltd, Korea)를 측정하였다. 혈중 함량은 표준검량선에 의해 mg/dL로 표시하였다.

혈청의 중성지방(triglyceride)함량은 중성지방 측정용 kit시약(AM 157S-k, Asan, Korea)을 사용하였으며, 효소시약을 효소시약 용해액에 용해시킨 후 시료 20 μL 에 조제한 효소시약 3 mL를 첨가한 후 37°C 에서 10분간 배양한 후 시료 무첨가구를 대조로 하여 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 함량은 표준검량선에 의해 mg/dL로 표시하였다.

High density lipoprotein cholesterol(HDL-C) 함량의 측정은 HDL-C 측정용 kit시

약(AM 203-k, Asan, Korea)을 사용하였다. 즉, 혈청 20 μ L에 침강시약 0.2 mL을 가하고 잘 혼합한 후 실온에서 10분간 정치시킨 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 0.1 mL을 취하여 효소시약 3 mL과 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 배양한 후 시료 무첨가구를 대조로 하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈중 함량은 표준 검량선에 의해 mg/dL로 표시하였다.

총 지질(total lipid)의 함량은 Frings 등의 방법에 따라 혈청 20 μ L에 phospho-vanillin 시약을 첨가한 후 37°C에서 15분간 배양한 후 시료 무첨가구를 대조로 하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Low density lipoprotein cholesterol(LDL-C) 함량 및 Very low density lipoprotein cholesterol(VLDL-C) 함량의 측정은 Friedewald 등의 방법에 따라 다음의 계산식에 의해 산출하였다.

$$\text{LDL-C(mg/dL)} = \text{Total cholesterol} - (\text{HDL-C} + \text{Triglyceride}/5)$$

$$\text{VLDL-C(mg/dL)} = \text{Total cholesterol} - (\text{HDL-C} + \text{LDL-C})$$

(6) 혈중 GOT, GPT 및 LDH 활성 분석

혈청의 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT(glutamic pyruvic transaminase) 활성도 GOT 측정용 kit(PIII 3150, Fugi, Japan) 및 GPT 측정용 kit(PIII 3250, Fugi, Japan)로 혈액분석기(DRI-Chem 3500I, Fugi, Japan)에서 분석하였으며, 혈청 1 mL당 Karmen unit로 표시하였다. 혈청 중 젖산 탈수소 효소(lactate dehydrogenase, LDH)의 활성은 LDH 측정용 kit시약(AM 159-k, Asan, Korea)으로 측정하였으며, 혈청 1 mL당 Wroblewski unit로 표시하였다.

(7) 간장조직의 지질 분석

간장 조직의 지질 함량은 간조직 0.5 g에 chloroform : methanol 혼합액(C:M=2:1, v/v)을 가하여 Potter-Elvehjem tissue grinder(DAIHAN WOS01010, Korea)로 마쇄하여 30 mL로 정용한 다음 냉암소에 하룻밤 정치시켜 지질을 추출하였다. 이를 여과(Watman No. 7)하여 일정량을 취하여 건고시킨 것을 사용하였으며, 간조직의 지질은 총 콜레스테롤, 중성지방 및 총 지질을 상기의 분석방법에 따라 측정하였다.

(8) 항산화 활성 측정

혈청의 항산화 활성은 혈청 100 μ L에 tris-HCl 완충액(100 mM, pH 7.4)을 1 mL 가

하여 혼합한 후 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 1 mL를 가한 다음 37°C의 암실에서 15분간 반응시켰다. 여기에 chloroform 2 mL를 가하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 하층부의 chloroform을 취하여 파장 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 비로 나타내었다. 간조직의 항산화 활성은 간조직 1 g에 1.5% KCl 용액으로 10% 균질액을 제조한 다음 이를 100 μ l 취하여 상기와 동일한 방법에 따라 측정하였다.

(9) 간조직의 지질과산화물 함량 측정

간조직 1 g에 1.5% KCl 용액을 가하여 homogenizer로 마쇄하여 10% 균질액을 만든 다음, 이를 0.5 mL를 취하여 3 mL의 1% phosphoric acid와 1 mL의 0.6% TBA를 넣어 잘 혼합하였다. 이것을 95°C water bath에서 45분간 가열한 뒤 4 mL의 butanol를 가하여 발색물질을 추출한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 butanol층의 흡광도(OD₅₃₅₋₅₂₀)를 측정하였다. 간장조직의 TBARS 함량은 표준용액으로 1,1,3,3-tetraethoxy-propane을 사용한 표준 검량선으로부터 산출하였다.

(10) 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 SPSS package를 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 시행하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 체중증가량

고지방식이와 하고초 열수추출물 동결건조 분말의 첨가 수준을 달리하여 4주간 사육한 결과 실험동물의 체중증가량은 Table 3-23과 같다.

체중증가량은 정상군에 비해 고지방식이 대조군에서는 증가하였으나 하고초 열수추출물 분말시료 0.2% 첨가군에서는 정상군 수준의 체중증가량을 보였으나, 분말시료 0.5% 첨가군에서는 정상군에 비해 12.7g 증가하였으나, 실험군간의 체중변화에 있어서는 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

Table 3-23. Changes in weight gain of SD rats fed high-fat diet containing Hagocho for 4 weeks

Group ¹⁾	Body weight (g)		
	Initial	Final	Gain
Normal	163.7±3.4	287±13.4	123.3±11.8
Control	165.2±3	294.4±20.9	129.2±19.4
0.2%Hagocho	165.6±3	288.4±15.3	122.8±13.4
0.5%Hagocho	167.2±5.2	303.2±23.8	136±20.3

- 1) Control : high-fat diet.
 0.2%Hagocho : high-fat diet+0.2% Hagocho powder.
 0.5%Hagocho : high-fat diet+0.5% Hagocho powder.

(2) 식이섭취량, 물섭취량 및 식이효율

고지방식이에 하고초 열수추출물 분말을 각각 0.2%, 0.5% 첨가하여 급이시킨 후 4주간 실험동물의 식이섭취량, 물섭취량 및 식이효율을 관찰한 결과는 Table 3-24와 같다.

식이섭취량은 고지방식이군에서 정상군에 비해 상당히 낮게 나타났으나, 하고초 열수추출물 분말시료를 첨가한 군에서는 고지방식이군에 비해 분말시료 농도에 비례적으로 식이섭취량이 증가되었다.

또한 정상군의 물섭취량은 50.3±11.5로 가장 높았으나 다른 실험군에서는 유의적인 차이는 보이지 않았고, 식이효율은 정상군, 하고초 열수추출물 분말시료 첨가군, 고지방식이 대조군 순으로 낮게 나타났다.

Table 3-24. Changes in food and water intake, food efficiency ratio(FER) of SD rats fed high-fat diet containing Hagocho for 4 weeks

Group ¹⁾	Body weight (g)		
	Normal	Final	Gain
Normal	163.7±3.4	287±13.4	123.3±11.8
Control	165.2±3	294.4±20.9	129.2±19.4
0.2%Hagocho	165.6±3	288.4±15.3	122.8±13.4
0.5%Hagocho	167.2±5.2	303.2±23.8	136±20.3

- 1) Control : high-fat diet.
 0.2%Hagocho : high-fat diet+0.2% Hagocho powder.
 0.5%Hagocho : high-fat diet+0.5% Hagocho powder.

(3) 장기의 무게

고지방식이로 유도된 고지혈증 유발군에 하고초 열수추출물 분말시료를 각각 0.2%, 0.5% 급이한 후 실험동물의 장기무게 변화를 비교한 결과는 Table 3-25와 같다.

간장의 무게는 정상군에 비해 고지방식이군이 가장 낮은 경향을 보였으나 하고초 열수추출물 분말시료 0.5% 첨가군에서는 정상군과 가장 유사한 무게를 보였다. 또한 심장은 실험군 모두 정상군에 비해 무게가 증가되는 경향을 보였으나 하고초 열수추출물 분말시료 0.5% 첨가군에서는 간장 무게변화에서와 같이 가장 정상군과 유사한 수준을 나타내었다. 실험동물의 신장은 실험군 모두에서 유의적인 수준은 관찰되지 않았으며, 비장 또한 정상군에 비해 다소 증가되었으나 실험군간의 큰 차이는 보이지 않았다. 고환의 무게를 관찰한 결과 정상군에 비해 고지방식이군과 시료 첨가군에서는 다소 증가하였으나 시료 0.5% 첨가군에서는 오히려 감소되는 경향을 보였다. 이와같이 하고초 열수추출물 분말시료 첨가가 실험동물의 간장, 심장에는 어느정도 영향을 미친 것으로 관찰되었고, 신장, 비장 및 고환의 무게에는 영향이 없는 것으로 나타났다.

Table 3-25. Organ weights of SD rats fed high-fat diet containing Hagocho for 4 weeks

Group ¹⁾	Organ weight (g/100g body weight)				
	Liver	Heart	Kidney	Spleen	Testicle
Normal	18.32±2.22	1.06±0.13	2.45±0.29	0.69±0.07	3.11±0.29
Control	15.47±4.58	1.15±0.08	2.45±0.28	0.73±0.09	3.16±0.29
0.2%Hagocho	19.45±0.46	1.23±0.09	2.5±0.09	0.72±0.05	3.19±0.42
0.5%Hagocho	18.76±2.02	1.09±0.13	2.47±0.19	0.72±0.08	2.93±0.31

1) Control : high-fat diet.

0.2%Hagocho : high-fat diet+0.2% Hagocho powder.

0.5%Hagocho : high-fat diet+0.5% Hagocho powder.

(4) 혈청 중 총콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량

하고초 열수추출물 분말시료를 4주간 급이한 실험동물의 혈청 중 총콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤 수준을 측정한 결과는 Table 3-26과 같다.

총콜레스테롤은 정상군에 비해 실험군에서 다소 높게 나타났으나, 하고초 열수추출물 분말을 급이한 군에서는 총콜레스테롤이 72.0±8.9로서 거의 정상군 수준과 유사하였다.

HDL-콜레스테롤(high density lipoproteins cholesterol)은 고지혈증 유발군에서는 다소 감소되었으나, 하고초 시료 첨가군 모두에서는 증가하였는데, 특히 0.2% 첨가군에서는 0.5% 첨가군 보다 HDL이 오히려 높게 나타났다.

이와 같이 하고초 열수추출물 동결건조 분말 급이군에서 콜레스테롤 개선효과가 나타난 것은 향후 하고초 추출물 소재가 다양한 항콜레스테롤 식품개발에 응용 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

Table 3-26. Cholesterol compositions in serum of SD rats fed high-fat diet containing Hagocho for 4 weeks

Group ¹⁾	Serum cholesterol compositions (mg/dl)	
	TCHO	HDL
Normal	72.4±4.3	44.2±14
Control	75.4±17	43±23.8
0.2%Hagocho	78±7.5	52±11.5
0.5%Hagocho	72±8.9	50.3±5

1) Control : high-fat diet.

0.2%Hagocho : high-fat diet+0.2% Hagocho powder.

0.5%Hagocho : high-fat diet+0.5% Hagocho powder.

(5) Triglyceride 함량 및 Lactate dehydrogenase 활성

하고초 열수추출물 동결건조 분말시료의 첨가수준을 달리하여 고지방식으로 유도된 고지혈증 실험동물의 혈청 중성지방 함량을 측정하고 간손상 보호 정도를 알아보기 위해 혈청 중의 LDH(lactate dehydrogenase) 활성도를 측정한 결과는 Table 3-27과 같다.

혈청중 중성지방의 함량은 정상군에 비해 실험군에서 모두 감소되는 경향을 보였으며, 간, 근육, 골격, 뇌, 적혈구, 신장, 심장 등에 분포하면서 L-Lactate를 pyruvate로 산화시키는 효소로 알려져 있으며, 간 등에 염증이 생겼을 경우 혈중 농도가 증가되는 LDH의 혈중 농도를 측정한 결과 고지혈증 유발군에서는 273.8±269.6으로 정상군에 비해 비교적 높게 나타났으나, 하고초 시료 0.5% 첨가군에서는 245±98.4로 거의 정상군 수준과 유사하였으며, 특히 0.5% 첨가군에서는 219.5±74.6으로서 오히려 정상군의 LDH 수준보다 낮게 나타났다.

이러한 결과는 항콜레스테롤 작용과 일치되는 결과로서 향후 고지혈증을 비롯한 혈액순환 기계질환을 예방 및 개선할 수 있는 제품개발을 위한 기초자료로 활용코자 한다.

Table 3-27. GOT, GPT and Lactate dehydrogenase activity in serum of SD rats fed high-fat diet containing *King Oyster mushroom* for 4 weeks

Group ¹⁾	Triglyceride	LDH
		(Wroblewski unit/ml)
Normal	40±7.6	248.8±30.8
Control	34.8±7.7	273.8±269.6
0.2%Hagocho	32.2±9.4	245.0±98.4
0.5%Hagocho	33.5±2.9	219.5±74.6

1) Control : high-fat diet.

0.2%Hagocho : high-fat diet+0.2% Hagocho powder.

0.5%Hagocho : high-fat diet+0.5% Hagocho powder.

(6) 혈청 GOT 및 GPT 활성

하고초 추출물 동결건조 분말의 간손상 보호 정도를 측정하기 위해 혈청 중의 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT(glutamic pyruvic transaminase) 활성도를 측정한 결과는 Table 3-28과 같다.

간 손상의 지표가 될 수 있는 혈액 중의 GOT는 고지혈증 유발군에서는 정상군에 비해 다소 높게 나타났으며, 시료 첨가군에서는 정상군 보다 오히려 감소되는 경향을 보였다. 또한 GPT 수준은 하고초 시료 첨가군에서는 각각 26.8±7.4, 26.0±1.8로서 고지혈증 유발군 및 정상군에 비해 낮게 나타났다.

Table 3-28. GOT and GPT activity in serum of SD rats fed high-fat diet containing Hagocho for 4 weeks

Group ¹⁾	GOT	GPT
	(Karmen unit/mL)	
Normal	97.2±15.4	28.4±2.9
Control	98.4±5.2	32.8±2.6
0.2%Hagocho	93.6±15.2	26.8±7.4
0.5%Hagocho	90±8.6	26±1.8

1) Control : high-fat diet.

(6) 실험동물 간조직의 지질농도 변화

하고초 열수추출물 분말의 첨가 수준을 달리하여 4주 동안 급이한 실험동물의 간 조직 중 총 콜레스테롤 및 중성지질의 농도를 측정된 결과, Table 3-29와 같이 총 콜레스테롤은 고지방식이군에서 유의한 수준으로 증가하였으며 하고초 0.2% 첨가군에서는 유의성이 없는 수준으로 감소하였으나, 하고초 0.5% 첨가군에서는 정상군과 유의한 수준으로 감소되었다. 또한 간조직중의 중성지질은 고지방식이군에서 아주 높게 나타나 정상군과 유의차를 확연히 보였으며, 하고초 시료를 첨가한 실험군에서는 정상군은 수준은 아니지만 유의수준을 관찰할 수 있는 범위까지 감소되었다. 이러한 결과로 볼 때 고지방식이로 고지혈증의 유도 정도를 관찰할 수 있는 범위는 혈청보다는 간조직중의 지질농도 변화에서 보다 뚜렷이 나타남을 알 수 있었으며, 개선효과 또한 조직중의 유의적인 지질변화 관찰로 인해 하고초의 항고지혈증 효과를 확인할 수 있었다.

Table 3-29. Hepatic lipid composition in liver of SD rats fed high-fat diet containing Hagocho for 4 weeks

Groups ¹⁾	Hepatic lipid(mg/g of wet liver)	
	Total cholesterol	Triglyceride
Normal	0.9±0.1a	6.5±2.0a
Control	1.3±0.4b	20.6±5.1c
0.2%Hagocho	1.1±0.2ab	14.1±2.6b
0.5%Hagocho	0.8±0.1a	11.5±4.4ab

1) Control : high-fat diet.

0.2%Hagocho : high-fat diet+0.2% Hagocho powder.

0.5%Hagocho : high-fat diet+0.5% Hagocho powder.

4. 하고초 최적조성물의 항산화활성

가. 주원료 및 부원료의 항산화활성

하고초 천연물소재 및 최적조성물을 제조하기 위해 선정된 부원료의 항산화활성을 측정한 결과는 Table 3-30과 같다.

총페놀 및 플라보노이드 함량은 결명자가 각각 151.01 ± 5.20 mg/100g, 43.69 ± 5.59 mg/100g으로 각각 가장 높은 값을 보였으며, 다음으로는 산사육, 오미자 순으로 높은 값을 보였다.

조성물 원료 각각의 전자공여능을 측정한 결과 Table 3-31~3-32과 같이 실험군 모두 시료의 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 높게 나타났으며, 특히 결명자, 산사육, 하고초의 전자공여능이 높게 관찰되었다.

또한 하고초와 조성물 제조 부원료의 환원력에서도 결명자, 산사육, 하고초의 활성이 가장 높게 나타났으며, 시료의 농도에 비례적으로 환원력이 증가함을 확인 할 수 있었다.

Table 3-30 . Total phenolic compounds and flavonoids of Hagocho and herbs

(mg/100g)

Sample	Phenolic compounds	Flavonoids
Hagocho(<i>Prunella vulgaris</i>)	12.07 ± 0.64	11.12 ± 0.20
Cassia obtusifolia Linne	151.01 ± 5.20	43.69 ± 5.59
Polygoni multiflori Radix	10.62 ± 0.25	4.56 ± 0.17
Ganoderma lucium	54.03 ± 2.23	9.33 ± 0.15
Schizandrae fructus	77.27 ± 2.77	36.13 ± 1.87
Crataegus pinnatifida Bunge	92.75 ± 0.69	6.14 ± 0.23

Table 3-31. Electron donation ability of Hagocho and herbs

Samples	Sample concentration(ug/ml)			
	(단위:%)			
	100	250	500	1000
Hagocho(<i>Prunella vulgaris</i>)	13.35±0.60	27.22±1.98	52.34±0.65	84.96±0.08
<i>Cassia obtusifolia</i> Linne	21.50±1.02	45.97±1.00	75.81±1.48	86.78±0.14
<i>Polygoni multiflori</i> Radix	0.700±0.23	0.77±0.41	1.76±0.38	5.13±0.35
Ganoderma lucium	7.23±0.77	17.00±0.72	32.69±0.72	58.10±1.01
<i>Schizandrae fructus</i>	2.22±0.21	7.53±0.38	13.13±0.25	22.49±0.52
<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	20.56±0.78	41.26±0.90	67.03±1.42	92.03±0.13

Table 3-32. Reducing power of Hagocho and herbs

Samples	Sample concentration(ug/ml)			
	(단위:OD value)			
	100	250	500	1000
Hagocho(<i>Prunella vulgaris</i>)	0.14±0	0.24±0	0.37±0	0.62±0.02
<i>Cassia obtusifolia</i> Linne	0.16±0	0.29±0	0.47±0	0.79±0.02
<i>Polygoni multiflori</i> Radix	0.07±0	0.08±0	0.12±0	0.16±0
Ganoderma lucium	0.10±0	0.17±0	0.26±0	0.44±0
<i>Schizandrae fructus</i>	0.08±0	0.12±0	0.15±0	0.23±0
<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	0.15±0	0.26±0	0.43±0	0.68±0.01

나. 하고초 조성물의 항산화활성

상기 결과에 기초하여 하고초 천연물소재를 주원료로 하고 선정된 부원료의 함량을 일정하게 한 다음 주원료(하고초 천연물소재)의 농도를 달리하면서 제조된 최적조성물의 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 3-33과 같다.

Table 3-33에서와 같이 주원료를 첨가하지 않은 조성물군 보다는 하고초 천연물소재를 첨가했을 경우 더 높은 항산화활성을 확인할 수 있었으며, 특히 하고초 신소재의 농도가 1000ppm 이상 첨가된 조성물군에서는 총페놀, 플라보노이드, 전자공여능 및 환원력이 하고초 천연물소재 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 이러한 시너지 효과의 결과는 향후 하고초 신소재의 상품화를 위해 적용할 수 있는 유용한 기초자료로 사료된다.

Table 3-33. Antioxidant activity of Hagocho compounds

Sample ¹⁾	Phenolic compounds (mg/100 g)	Flavonoids (mg/100 g)	Electron donation ability (%)	Reducing power (OD value)
Comp.1	44.09±0.67	33.15±0.15	40.09±1.48	0.36±0
Comp.2	63.93±2.41	41.49±0.12	46.87±1.70	0.46±0
Comp.3	73.67±1.39	43.41±0.41	53.61±1.11	0.51±0.01
Comp.4	99.55±3.56	50.13±0.20	67.90±0.44	0.66±0.01
Comp.5	124.37±3.04	54.84±0.52	78.33±0.20	0.81±0
Comp.6	191.91±2.60	66.74±1.35	86.25±0.42	1.17±0.01

1) comp.1 : Hagocho 0%+5herbs, comp.2 : Hagocho 16.7%(500ppm)+5herbs,
 comp.3 : Hagocho 16.7%(1000ppm)+5herbs, comp.4 : Hagocho 16.7%(3000ppm) +5herbs,
 comp.5 : Hagocho 16.7%(5000ppm)+5herbs, comp.6 : Hagocho 16.7% (10000ppm)+5herbs.

5. 개발 시제품의 항고지혈증 효과 검증

가. 실험동물의 사육

평균체중이 150±10 g인 Sprague-Dawley계 5주령 수컷 흰쥐를 (주)샘타코(서울, Korea)로부터 분양받아, 동물사육실에서 고형사료로 1주일간 적응시킨 후 7% 대두유를 함유한 기본식이(normal diet)로 다시 1주일간 예비사육하여 체중에 따라 각 군의 체중이 비슷하도록 7마리씩 5군으로 나누어 사육상자에 한 마리씩 넣어 4주간 실험사육하였다. 사육실의 조건으로 온도는 22±2℃, 습도는 50±4%, 명암주기는 12시간(07:00~19:00)으로 조절하였으며, 사육 기간동안 물과 사료는 자유급이하였다.

나. 식이의 조성

하고초 개발 시제품의 고지혈증 개선효과 연구를 위해 사용한 식이는 고지혈증 유발용으로 구입한 60kcal 고지방식이에 하고초 액상 시제품을 성인(60kg) 1일 섭취량 기준, 즉 1일 1포(100ml), 2포(200ml), 3포(300ml)로 구분하여 동결건조 한 후 Table 3-34와 같은 비율로 제조하였다.

Table 3-34. Composition of experimental diet

	High fat diet(g)	Hagocho powder(mg)
ND	-	-
Control	22	
Hagocho100	22	4.8mg
Hagocho200	22	9.6mg
Hagocho300	22	14.4mg

* 하고초 완제품(100ml)의 동결건조 수율 : 1.15%(1.15g)

* 실험동물 250g 기준 급이 : 1포(4.8mg), 2포(9.6mg), 3포(14.4mg)

다. 실험동물의 처리

실험 최종일에 16시간 절식시킨 후 에틸에테르로 가볍게 마취하여 심장으로부터 채혈하여 혈액을 얻었다. 혈액은 약 30분간 빙수 중에서 응고시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 혈청을 분리하여 -70℃에 보관하였다. 각 장기 조직(간장, 심장, 신장, 비장, 고환, 폐)은 채혈 후 즉시 적출하여 냉각된 0.9% 생리식염수로 혈액을 충분히 제거한 다음 흡수지로 물기를 제거하고 무게를 측정하여 다음 -70℃에 보관해 두고 분석에 사용하였다.

라. 실험동물의 체중, 식이섭취량 및 식이효율 측정

체중은 1주일에 1회 오전 10경에 측정하였으며, 실험 사육 4주간동안 4회 실시하였다. 1일 평균체중은 실험사육 4주간의 총 체중증가량(g)을 총 실험기간으로 나누어 산출하였다.

실험기간 동안 식이는 매일 오후 5시에 급이하였고, 다음날 오전 10경에 잔량을 조사하여 식이섭취량을 산출하였다. 물은 수도수를 매일 신선하게 공급하였다. 식이효율(food efficiency ratio, FER)은 체중 증가량(g)을 같은 기간 동안의 식이섭취량(g)으로 나누어 계산하였다. Fig.3-24에서와 같이 체중 증가량은 고지혈증 유발군(대조군)과 Hagocho 200, 300 급이군에서는 정상군에 비해 전반적으로 증가하는 경향을 보였으며, Hagocho100 급이군에서 158.57±27.34g로 가장 높은 증가를 나타내었다.

또한 실험동물의 식이량은 정상군에 비해 모든 실험군이 다소 적어지는 경향이었으며 (Fig.3-25), 식이효율(FER)은 정상군에 비해 모든 실험군에서 유의적으로 높은 경향을 보였다(Fig.3-26).

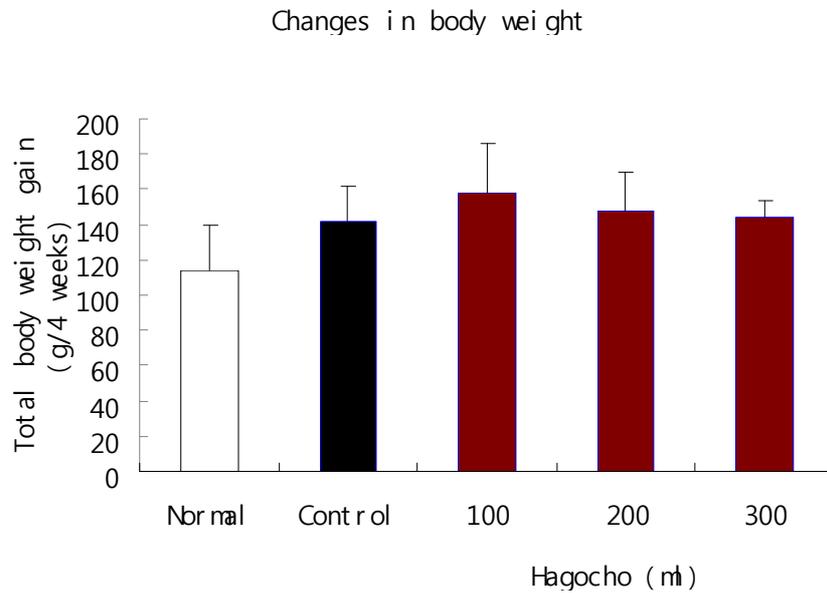


Fig. 3-24. Total body weight gain of hyperlipidemic rats after 4 weeks.

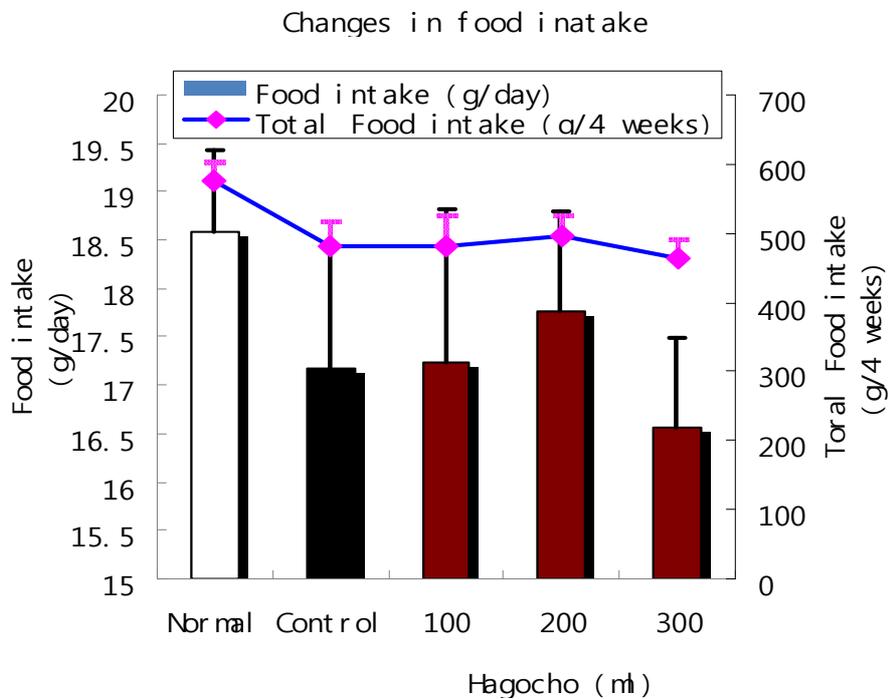


Fig. 3-25. Food intake of hyperlipidemic rats after 4 weeks.

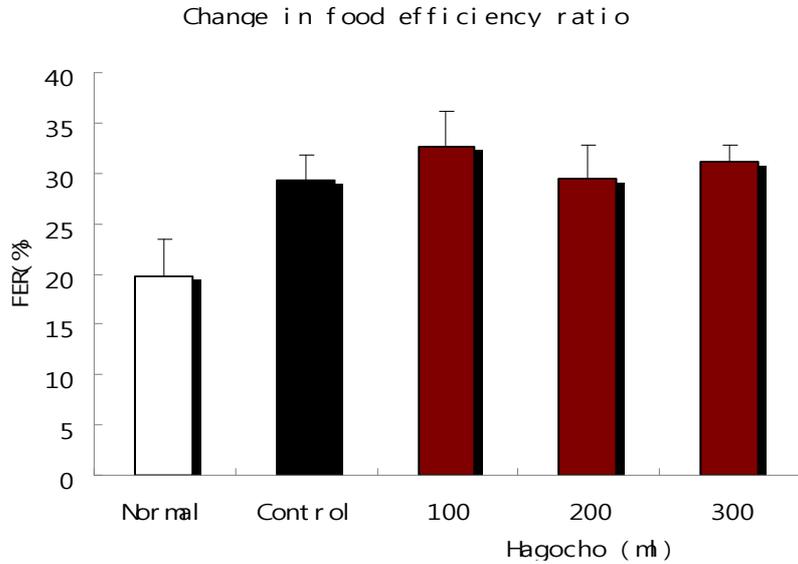


Fig. 3-26. Change in food efficiency ratio(FER) of hyperlipidemic rats after 4 weeks.

마. 장기의 무게

실험사육 4주 후 각 실험군간의 장기의 무게를 비교한 결과는 Table 3-35와 같다. 간과 췌장의 무게는 정상군과 실험군간에 유의적인 차이를 보이면서 감소되는 경향이었으며, 심장, 신장, 비장의 무게는 다소 감소되는 경향을 보였으나 전반적으로 유의성 있는 변화는 보이지 않았다.

Table 3-35. The organ weight of liver, heart, kidney, spleen and testicle (tissue g/100 g body weight)

Group ¹⁾	Liver	Heart	Kidney	Spleen	Testicle
Normal	3.75±0.53b	0.35±0.04ab	0.75±0.07b	0.18±0.02ab	1.02±0.10b
Control	3.22±0.44a	0.33±0.03ab	0.66±0.06a	0.20±0.03b	0.92±0.06a
Hagocho100	3.15±0.35a	0.31±0.03a	0.70±0.05ab	0.17±0.02a	0.88±0.05a
Hagocho200	3.40±0.51ab	0.36±0.04b	0.70±0.03ab	0.17±0.01ab	0.96±0.07ab
Hagocho300	2.94±0.34a	0.34±0.03ab	0.68±0.05a	0.19±0.02ab	0.96±0.10ab
F (p-value)	3.277 (0.024)	1.639 (0.190)	2.202 (0.093)	2.099 (0.106)	3.271 (0.024)

^{a-b}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at p<0.05

1) Refer to the Table 1

2) Values are mean±SD (n=7)

바. 실험동물의 혈액성분 분석

(1) 혈당 분석

혈당은 glucose 측정용 kit시약(AM 201-k, Asan, Korea)으로 측정하였다. 20 μ L의 혈청에 3 mL의 효소시약을 첨가한 후 37°C에서 5분간 incubation한 후 혈청 무첨가구를 대조로 하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈당 함량은 표준검량선에 의해 mg/dL로 표시하였다(Fig.3-27). 정상군의 혈당은 136.27mg/dL 였으며 고지혈증 유발군은 181.34mg/dL로 증가함이 확인되었다. 하고초 시제품의 농도를 달리하여 급이한 실험군에서는 혈당 감소효과가 정상군 수준에는 미치지 못하였으나, 혈당이 감소되는 것으로 관찰되었다.

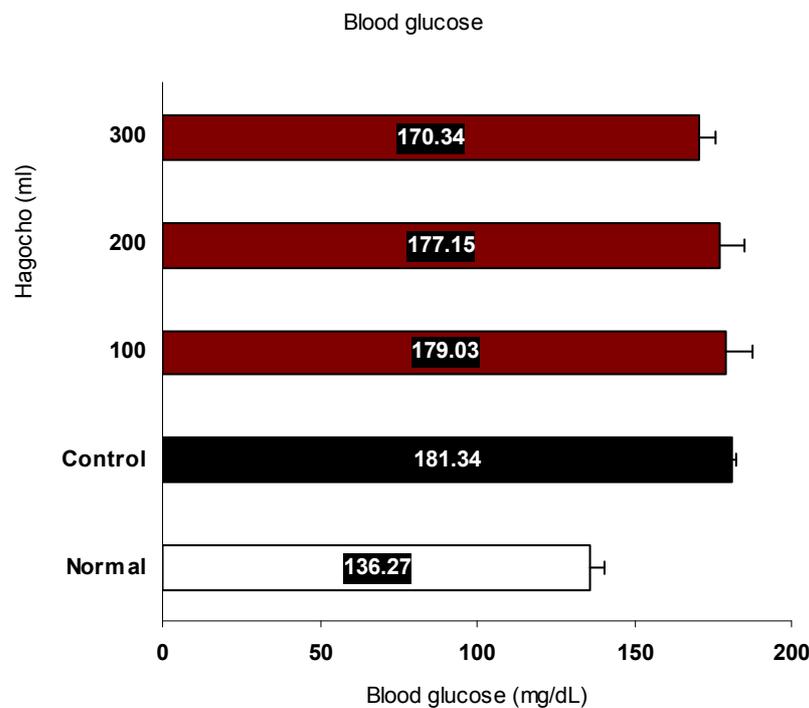


Fig. 3-27. Blood glucose in serum of hyperlipidemic rats.

(2) 총 지질(total lipid) 측정

총 지질은 20 μ L의 혈청에 phospho-vanillin 시약을 첨가한 후 37°C에서 15분간 배양한 후 혈청 무첨가구를 대조로 하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig.3-28와 같이 고지혈증 유발군에서는 275.61 \pm 5.23mg/dL로 증가하였으나, 하고초 급이군에서는 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보였다.

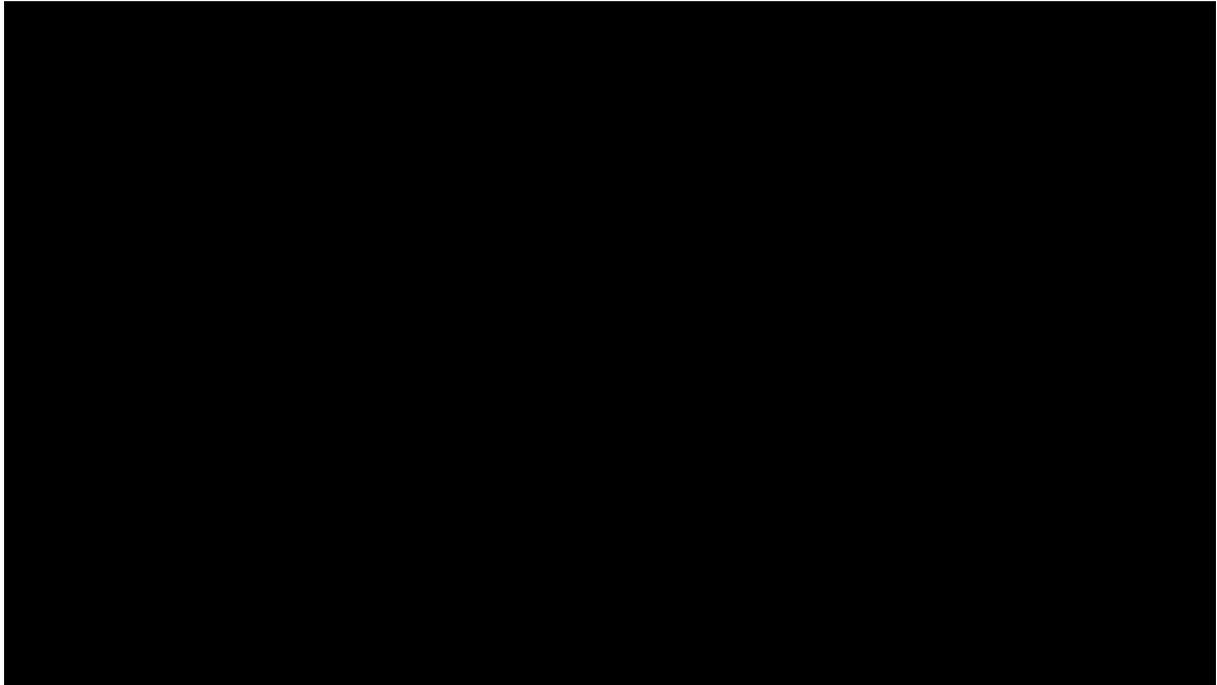


Fig. 3-28. Total lipid, total cholesterol and triglyceride in serum of hyperlipidemic rats.

(3) 총 콜레스테롤(total cholesterol) 측정

총 콜레스테롤은 총 콜레스테롤 측정용 kit시약(AM 202-k, Asan, Korea)으로 측정하였다. 효소시약을 효소시약 용해액에 용해시킨 후 20 μ L의 혈액에 3 mL의 효소시약을 넣고 37°C에서 5분간 incubation한 후 혈청 무침가구를 대조군으로 하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 함량은 표준검량선에 의해 mg/dL로 표시한 결과는 Fig.3-28와 같다.

그림에서와 같이 총콜레스테롤은 Hagocho100, 200 급이군에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, Hagocho300 급이군에서는 정상군 수준의 콜레스테롤 감소효과를 보였다.

(4) 중성지방(triglyceride) 측정

중성지방은 중성지방 측정용 kit시약(AM 157S-k, Asan, Korea)으로 측정하였다. 혈청 20 μ L에 조제한 효소시약 3 mL를 첨가한 후 37°C에서 10분간 incubation한 후 혈청 무침가구를 대조로 하여 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 함량은 표준검량선에 의해 mg/dL로 표시하였다(Fig.3-28). 고지혈증 유발군의 중성지방은 58.28 ± 3.96 mg /dL로 매우 높게 나타났으나, 하고초 급이군에서는 유의적으로 낮아지는 경향을 보였으며, 특히 Hagocho300 급이군에서는 정상군과 유사한 수준까지 중성지방 함량이 감소되는 결과를 보였다. 이러한 결과로 볼 때 콜레스테롤 및 중성지방 감소효과가 있는 Hagocho300 급이군은 향후 고지혈증 개선활성용 시제품의 상품화 적극 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

(5) HDL-C(High density lipoprotein cholesterol) 측정

HDL-cholesterol 함량의 측정은 HDL-C 측정용 kit시약(AM 203-k, Asan, Korea)으로 측정하였다. 혈청 20 μ L에 침강시약 0.2 mL을 가하고 잘 혼합한 후 실온에서 10분간 정치시킨 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 0.1 mL을 취하여 효소시약 3 mL과 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 incubation한 후 혈청 무첨가구를 대조로 하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈중 함량은 표준검량선에 의해 mg/dL로 표시하여 Fig. 3-29에 나타내었다.

고지혈증 유발군은 정상군에 비해 HDL-C이 30.93 ± 1.40 mg/dL로 유의성 있게 감소되었으나, 하고초 시제품 급이군에서는 농도 의존적으로 증가되는 경향을 보였으며, 특히 Hagocho 200과 300 급이군에서는 정상군과 유사한 수준까지 HDL-C이 증가하였다.

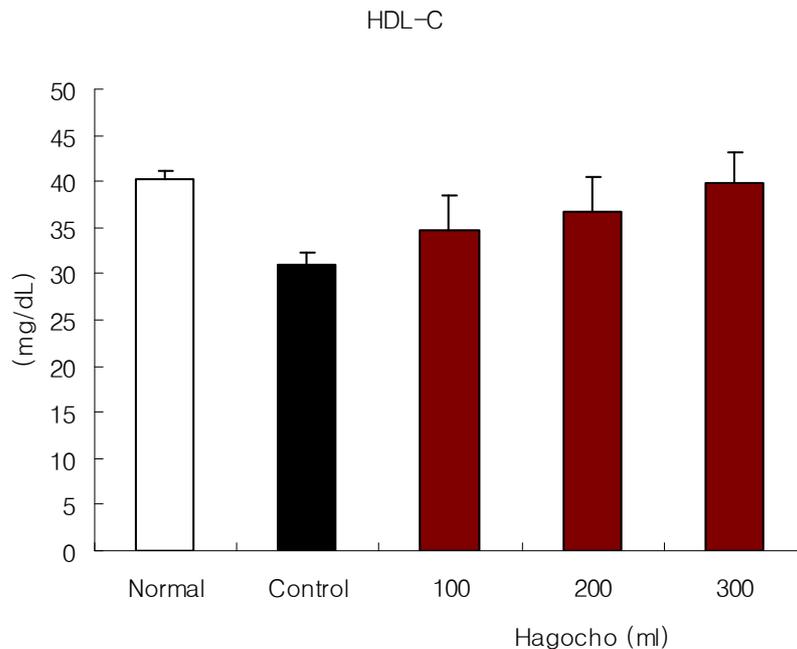


Fig. 3-29. HDL-cholesterol in serum of hyperlipidemic rats.

(6) LDL-C(Low density lipoprotein cholesterol) 및 AI(Atherogenic Index) 측정

LDL-cholesterol 함량의 측정은 혈청 총 콜레스테롤 - (HDL-C+중성지방/5)의 계산식에 의해 산출하여 나타내었으며, 동맥경화지수(atherogenic index, AI)는 Haglund 등의 방법에 따라 계산한 결과 Fig. 3-30와 같이 하고초를 급이한 실험군에서는 전반적으로 LDL-C과 동맥경화지수(AI)가 낮아지는 경향을 보였으며, Hagocho300 급이군에서는 각각 2.80 ± 1.00 mg/dL, 0.25 ± 0.06 mg/dL로서 정상군과 유의적인 수준까지 감소되었다.

$$AI = \frac{[(\text{Total cholesterol}) - (\text{HDL-C})]}{\text{HDL-C}}$$

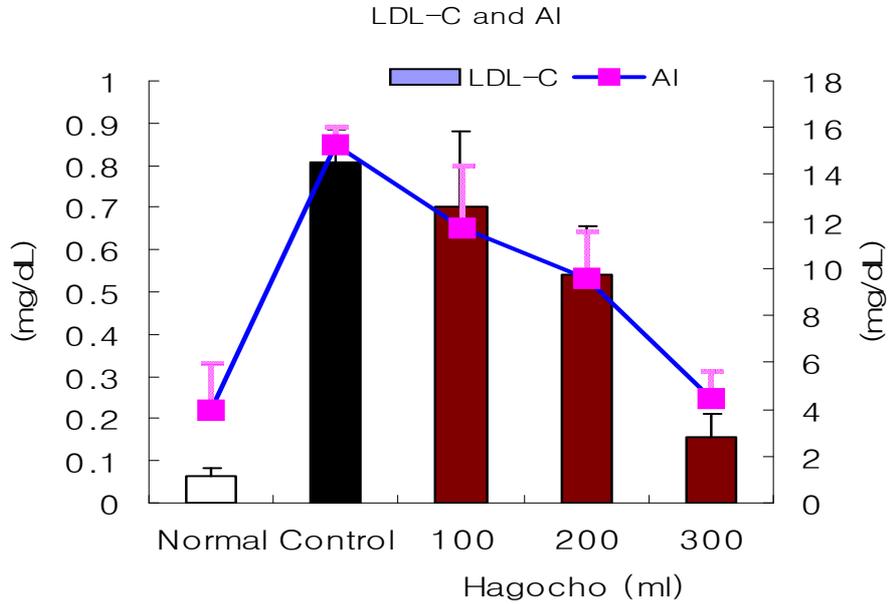


Fig. 3-30. LDL-cholesterol and AI in serum of hyperlipidemic rats.

(7) 혈중 총 단백질 함량 측정

혈청 중 단백질 함량은 Biuret법에 따라 총 단백질 측정용 kit(아산제약, Korea)시약으로 측정하였다. 혈청 50 μ L에 효소시약 5 mL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 배양한 후 시료 무침가구를 대조로 하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 3-31와 같이 실험군간 유의적인 차이는 보이지 않았으나, Hagocho300 급이군에서는 다소 증가하는 경향이였다.

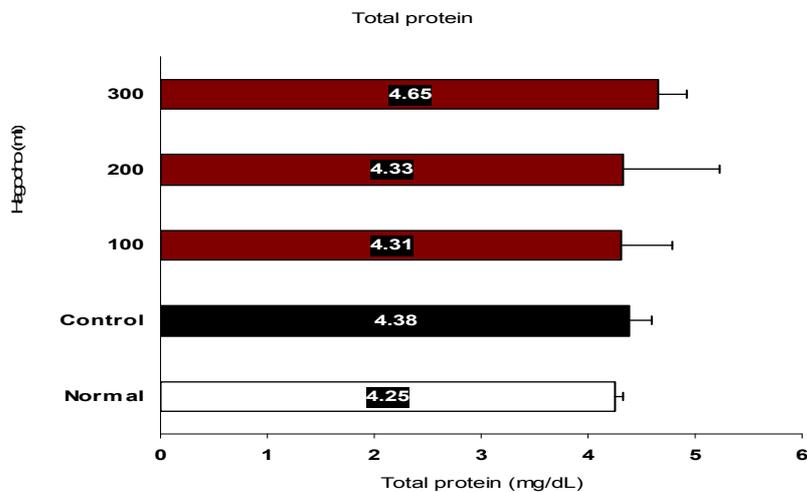


Fig. 3-31. Total protein in serum of hyperlipidemic rats.

(8) GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT(glutamic pyruvic transaminase) 활성 측정
 GOT는 GOT 측정용 kit(아산제약, Korea) 및 GPT는 GPT 측정용 kit(아산제약, Korea)로 분석하였으며, 혈청 1 mL당 Karmen unit로 표시하였다.

고지혈증 유발 대조군(control)은 GOT 86.00 ± 4.58 unit/mL, GPT 16.33 ± 1.53 으로 매우 높게 나타났으나, 하고초 시제품 급이군에서는 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였다. 특히 Hagocho100 급이군에서는 유의적인 감소효과가 없었으나, Hagocho200 이상 농도의 시제품 급이군에서는 유의성 있는 감소효과가 관찰 되었다. 또한 ALT 측정 결과에서도 유사한 결과를 보였다(Fig. 3-32).

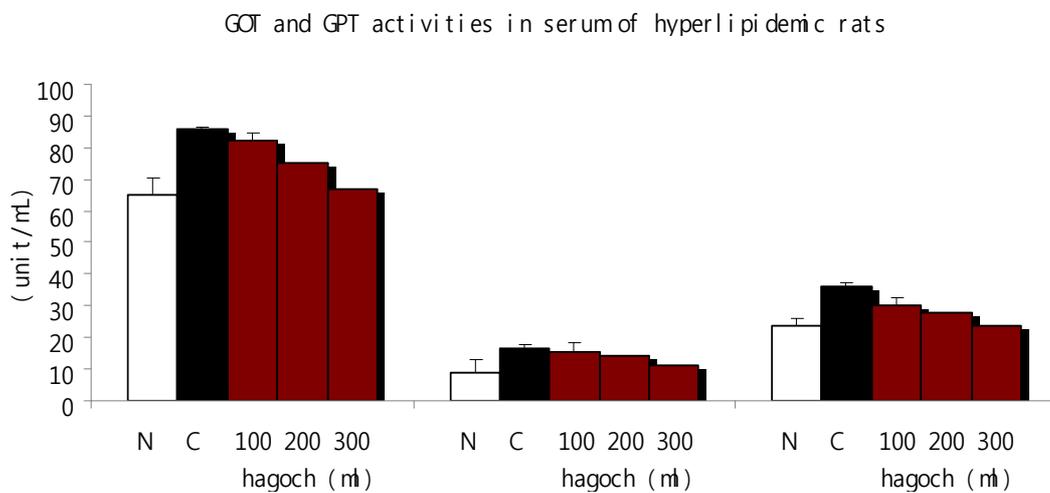


Fig. 3-32. GOT, GPT and ALT activities in serum of hyperlipidemic rats.

(9) 지질과산화물 함량 및 항산화활성 측정

혈청 중 지질과산화물 함량은 혈청 100 μ L에 1/12N 황산용액 4 mL, 10% phosphotungstic acid 0.5 mL를 차례로 가하고 잘 혼합한 후 5분간 반응시킨 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 침전물에 증류수 및 TBA 시약을 1 mL 가하여 95°C water bath에서 60분간 반응시켰으며, 여기에 butanol을 3 mL 가하여 다시 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS 함량은 표준용액으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용한 표준 검량선으로부터 산출하였다(Fig. 3-33). 실험동물 혈청 중 지질과산화물(TBARS)은 Hagocho100 급이군에서 정상군 수준으로 감소되는 경향을 보였는데, 특히 주목할만한 것은 Hagocho200과 300 급이군에서는 지질과산화물이 22.47 ± 1.33 mmol/mL, 18.59 ± 0.63 mmol/mL로 정상군 수준보다 감소되는 결과를 나타내었다.

또한 항산화활성 측정을 위해 DPPH 소거능을 검사한 결과 하고초 시제품 급이군의 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, 지질과산화물 함량 측정결과와 유사하게 Hagocho

200 이상의 농도로 급이한 실험군에서는 정상군 보다 우수한 항산화 활성이 관찰되었다.

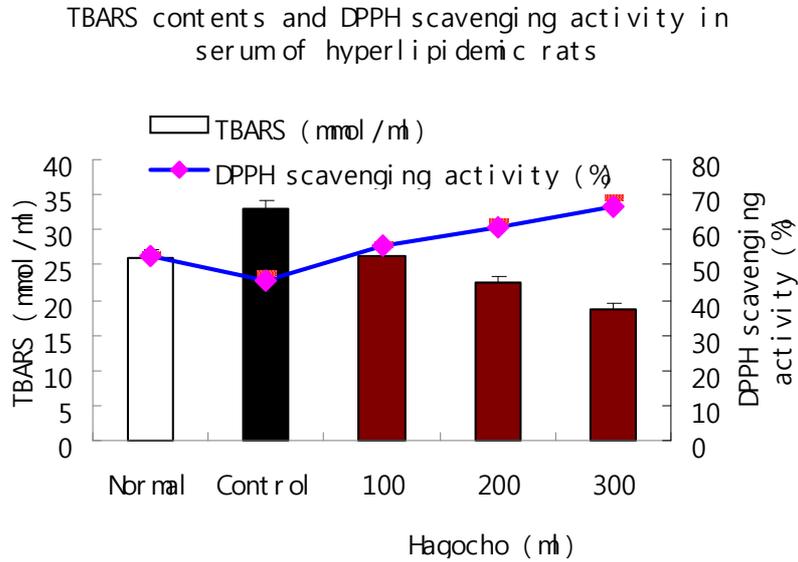


Fig. 3-33. TBARS contents and DPPH scavenging activity in serum of hyperlipidemic rats.

사. 간장 조직의 분석

(1) 간장조직의 지질성분 분석

간장 조직으로부터 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방을 분석한 결과는 Fig. 3-34과 같다. 간장 조직의 지질 추출은 Floch 등의 방법에 따라 간장 조직 0.5 g에 chloroform : methanol 혼합액(C:M=2:1, v/v)을 가하여 tissue grinder (DAIHAN WOS01010, Korea)로 지질을 추출한 후 최종 부피를 30 mL로 하여 냉암소에 하룻밤 정치한 후 여과한 여액을 실험재료로 사용하였다. 이 여액을 일정량씩 취하여 회전식 진공 증발기로 용매를 모두 휘발시킨 다음 총 지질, 총 콜레스테롤, 중성지방을 각각의 측정용 kit 시약을 사용하여 상기의 방법과 동일하게 하였다.

총 지질은 하고초 시제품 급이군의 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였으며, 총콜레스테롤은 Hagocho300 급이군에서 가장 우수한 콜레스테롤 감소효과를 보였으며, 중성지방은 하고초 급이군의 농도에 의존적으로 낮게 나타났다.

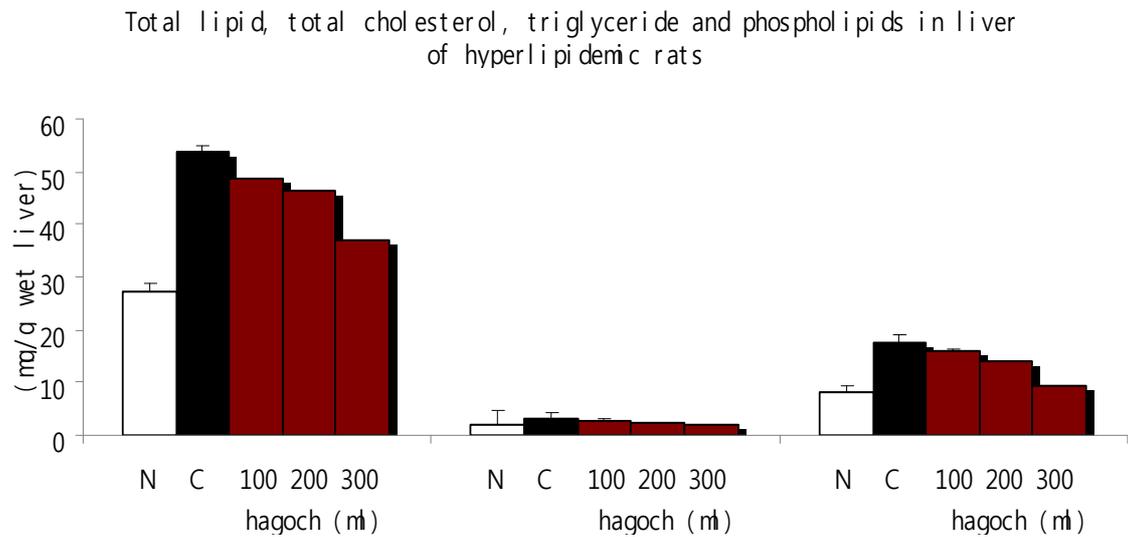


Fig. 3-34. Total lipid, total cholesterol, triglyceride and phospholipids in liver of hyperlipidemic rats

(3) 간장조직의 DPPH 및 과산화물(TBARS) 측정

간장 조직의 항산화 활성은 간장 조직 1 g에 1.5% KCl 용액으로 10% 균질액을 제조한 다음 이를 100 μ L 취하여 tris-HCl 완충액(100 mM, pH 7.4)을 1 mL 가하여 혼합한 후 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA) 용액 1 mL를 가한 다음 37°C의 암실에서 15분간 반응시켰다. 여기에 chloroform 2 mL를 가하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 하층부의 chloroform을 회수하여 파장 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 비(%)로 나타내었다(Fig. 3-35).

Fig.3-33에서와 같이 간장 조직중의 DPPH 소거능은 하고초 시제품 농도에 의존적으로 증가하였으나, 정상군 수준에는 미치지 못하였으나, TBARS 함량은 Hagocho300 급이군에서 정상군 보다 오히려 우수한 활성을 보였다.

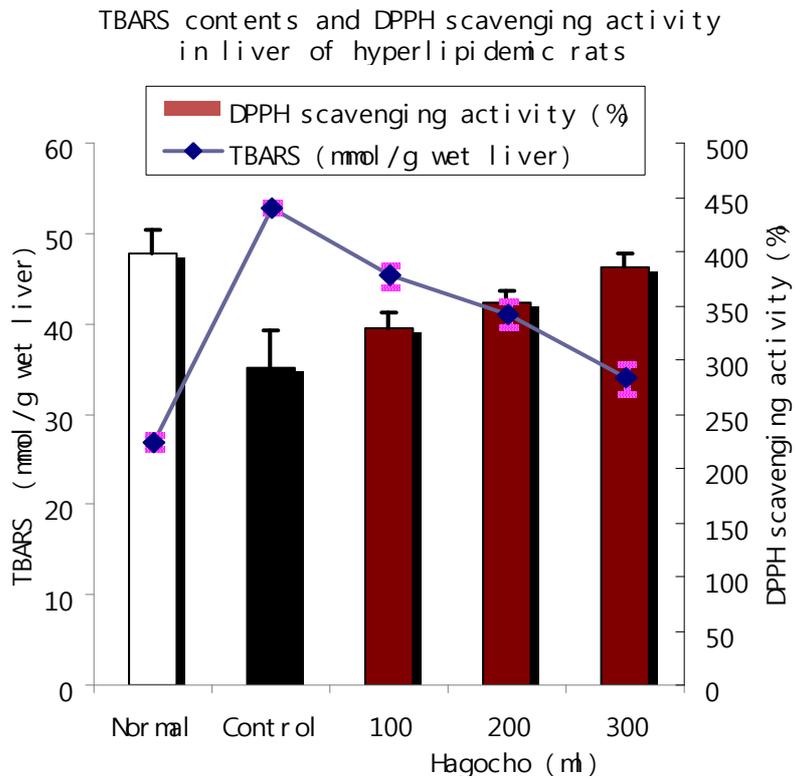


Fig. 3-35. DPPH scavenging activity and TBARS contents in liver of hyperlipidemic rats.

제4절 하고초의 암세포 살해 및 성장억제 관련 면역증강 활성 연구

1. 실험방법

(1) 실험동물

동물은 생후 4 주된 18-20 g의 ICR male mouse를 사용하여 실험하였다. 사료 (purina korea)와 물을 자유롭게 먹도록 유지하며, 사육장의 온도는 21-24°C, 상대습도는 40-80%로 유지. 12 시간마다 낮과 밤이 반복되도록 사육장내 빛을 조절하였다.

(2) 복강거식세포 분리와 일차배양

일정기간 시료를 투여한 후 실험동물을 질식사 시키고 HBSS를 복강주사. 복부 부분을 마사지한 후 거식세포 분리. 세포를 씻어준 후 세포수를 측정하여 phenol red-free RPMI1640 배지로 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양한 다음 부착되지 않은 세포는 PBS로 세척하고 부착된 세포 (거식세포)를 일차 배양하였다.

(3) 비장세포의 분리와 일차배양

Cell culture dish에 complete RPMI media를 넣고 male mouse 비장을 분리하여 조직을 으갠 후 원심분리를 수행하였다. pellet을 media로 한 번 washing 한 후 다시 원심분리를 하고 ACK lysis buffer (0.15 M NH₄Cl, 1 M KHCO₃, 0.01 M Na₂EDTA, pH 7.2-7.4)를 처리하여 적혈구 (Red blood cell ; RBC)를 제거. 다시 원심분리하고 pellet을 5% FBS가 함유된 complete RPMI media를 이용하여 비장세포를 일차 배양하였다.

(4) 임파구 증식능 측정

비장 세포를 96-well plate에 분주하고 T 임파구 유사분열유도물질 (mitogen)인 Con A (concanavaline A) 또는 B 임파구 유사분열유도물질 (mitogen)인 LPS (lipopolysaccharide)와 시료를 농도별로 처리하고, 72시간 후 WST-1 Kit를 이용하여 임파구 증식능을 측정하였다.

(5) cytokine 생성량 측정

TNF- α , IL-4 생성량을 ELISA 방법을 통해 측정하였다.

(6) 자연살해세포 (NK cell)의 활성화 측정

표적세포 (target cell)인 YAC-1 세포를 형광 물질인 calcein-AM을 첨가하여 형광 표지화 (labelling) 시킨 뒤 주효세포 (effector cell)인 자연살해세포와 YAC-1 세포를 일정시간 배양한 후, 상층액을 ex 485nm, em 530nm에서 형광으로 측정하여 자연살해세포의 표적세포인 YAC-1 세포에 대한 세포독성 (cytotoxicity)을 측정하였다.

(7) MTT Assay를 이용한 세포독성 측정

48 well plate에 HT-1080 cells을 seeding 하고, 다음 날 FBS가 없는 배지로 교체한 후 하고초 전초를 24시간 처리하였다. 준비한 MTT labeling mixture를 500 μ l 씩 첨가한 후, 37°C CO₂ incubator에서 반응 후 30분 후에 cell을 lysis 시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

(8) 배양액 내 Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

실험에 이용한 하고초 전초의 암 세포주 손상에 대한 영향을 조사하기 위하여 배지내의 LDH 활성을 측정하였다. LDH 활성은 기질 pyruvate가 lactate로 감소되는 정도를 조사하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 2.7 ml을 cuvette에 넣고 0.1ml culture media를 첨가하고, 0.02 M sodium pyruvate 0.1 ml을 넣은 후, NADH (0.2 mg) 0.1 ml을 첨가하여 잘 섞어준 후 340 nm 흡광도에서 2분 동안 흡광도를 측정하였다.

(9) RT-PCR를 이용한 MMP 유전자의 발현 측정

6 well plate에 HT-1080 cells을 seeding 하고, 다음 날 FBS가 없는 배지로 교체한 후 하고초 전초를 농도별로 1시간 전처리 후, PMA를 24시간 처리하였다. RNAzol 용액을 이용하여 세포내 RNA를 분리한 다음, 분리한 mRNA 0.1 μ g를 0.5 μ g oligo d(T)와 reverse transcriptase을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 이용하여 MMPs 발현에 대한 특이적 primer를 이용하여 증폭하고, 2% agarose gel 상에서 전기영동 한 후 Ethidium Bromide로 염색 및 Image Analyzer System (KODAK)으로 확인하였다.

(10) Gelatin zymography를 이용한 MMP 유전자 활성 측정

6 well plate에 HT-1080 cells을 seeding 하고, 다음 날 FBS가 없는 배지로 교체한 후 하고초 전초를 농도별로 1시간 전처리 후, PMA를 24시간 처리하였다. 하고초 전초와 PMA가 24시간 동안 배양된 media에 들어 있는 단백질을 gelatin zymography gel에서 전기영동한 후 CBB-G250 staining solution으로 30분 동안 염색한 후 destaining (50% MeOH, 40% DW, 10% Glacial acetic acid)하고 이를 스캔하여 MMP-9의 활성을 확인하였다.

(11) Luciferase activity를 이용한 MMP-9의 전사조절인자 활성 측정

48 well plate에 HT-1080 cells을 seeding 하고, 다음 날 세포에 0.2 μ g의 pCMV- β -gal, 0.5 μ g의 각각의 플라스미드, 그리고 LipofectAMINE를 사용 형질전환 시킨다. 하고초 전초를 농도별로 1시간 전처리 후, PMA를 24시간 처리하였다. 24시간 후 세포 추출물을 얻어 MMP-9의 luciferase activity를 측정하였다.

(12) NF-kB inhibitor를 이용한 MMP-9의 발현 및 활성 측정

6 well plate에 HT-1080 cells을 seeding 하고, 다음 날 FBS가 없는 배지로 교체한 후 NF-kB activation inhibitor를 1시간 전처리하고, 하고초 전초를 농도별로 1시간 처리하였다. PMA를 24시간 처리한 후, RNAzol 용액을 이용하여 세포내 RNA를 분리한 다음, 분리한 mRNA 0.1 μ g를 0.5 μ g oligo d(T)와 reverse transcriptase을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 이용하여 MMPs 발현에 대한 특이적 primer를 이용하여 증폭하고, 2% agarose gel 상에서 전기영동 한 후 Ethidium Bromide로 염색 및 Image Analyzer System (KODAK)으로 확인하였다. 배양액은 gelatin zymography gel에서 전기영동한 후 CBB-G250 staining solution으로 30분 동안 염색한 후 destaining (50% MeOH, 40% DW, 10% Glacial acetic acid)하고 이를 스

캔하여 MMP-9의 활성을 확인하였다.

(13) 폐장 전이와 서혜부 종양 성장 동물모델 확립

실험동물은 약 25~30 g의 Specific Pathogenic Free (SPF) male C57BL/6 mice를 주식회사 대한바이오링크로부터 구입하여 실험동물로 사용하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하며, 사육실의 온도는 21~24°C, 상대 습도는 40~60%로 유지하였다. 또한 사육실의 낮과 밤이 12시간마다 반복되도록 조절하고, 동물 사육장치내로 외부 오염물질이 침입하지 않도록 Hepa-filter를 이용하였다.

(14) 폐장 전이 실험

B16F10 melanoma cells를 마우스 꼬리에 정맥주사한 후, 하고초 전초를 생리식염수에 희석한 후 농도별 (50, 200 mg/kg)로 14일 동안 연속해서 경구 투여하였다. 대조군은 생리식염수만을 경구 투여하여 하고초 전초에 대한 효능을 실시하였다. 마지막 날, 폐를 적출한 후, 전이된 흑색종의 수를 측정하였다.

(15) 서혜부 종양 성장 실험

B16F1 melanoma cells를 마우스 서혜부에 피하주사한 후, 하고초 전초를 생리식염수에 희석한 후 농도별 (50, 200 mg/kg)로 28일 동안 연속해서 경구 투여하였다. 대조군은 생리식염수만을 경구 투여하여 하고초 전초에 대한 효능을 실시하였다. 마지막 날, 종양을 적출한 후, 성장한 종양의 무게를 측정하였다.

(16) 통계 방법

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 student' t-test를 이용하였다.

2. 하고초 (*Prunella vulgaris*) 유용물질을 이용한 면역증강 활성 연구

가. 하고초 추출물의 세포독성에 대한 영향 조사

하고초 (*Prunella vulgaris*) 추출물의 면역증강 활성에 대한 영향을 측정하기 위하여 세포독성이 없는 농도를 확인하였다. 마우스 대식세포 (macrophage)주인 Raw 264.7 세포에 하고초 추출물을 처리하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide: MTT 방법을 이용하여 세포 독성을 확인하였다. MTT 방법은 세포의 증식 및 활성을 측정할 수 있는 예민한 방법으로서 미토콘드리아의 탈수소효소 (dehydrogenase)가 노란색의 MTT를 불용성인 formazan으로 전환할 수 있는 능력을 이용한 방법이다. Raw 264.7 세포를 1×10^6 cell/ml로 96-well plate에 분주하고 하고초 꽃 (flower), 줄기 (stalk) 열수 (water), 에탄올 (ethanol) 추출물을 각각 1, 10, 50, 100, 200 μ g/ml로

처리한 다음 24시간 뒤 2 mg/ml의 MTT를 96-well plate에 100 μ l 처리하였다. 4시간 뒤 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO)용액을 well당 100 μ l씩 넣고 균일하게 혼합한 뒤 Thermocycler ELISA Reader에서 흡광 540 nm에서 측정하여 세포의 활성도를 대조군에 대한 실험군의 formazan 결정의 흡광도로 아래와 같이 계산하였다.

세포 독성 (Cell viability) (%)

$$= \frac{\text{Absorbance of experimental wells}}{\text{Absorbance of control wells}} \times 100$$

세포 독성을 측정한 결과 하고초 꽃 추출물의 경우 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 꽃 열수 추출물과 EtOH 추출물 1~100 μ g/ml 처리군에서 세포 독성이 나타나지 않았으므로 1~100 μ g/ml의 농도로 하고초 꽃 열수 추출물과 EtOH 추출물을 세포배양 실험에 사용하였다 (Fig. 3-36A, B). 또한 하고초 줄기 추출물의 경우 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 줄기 열수 추출물과 EtOH 추출물 1~100 μ g/ml 처리군에서 세포 독성이 나타나지 않았으므로 1~100 μ g/ml의 농도로 하고초 줄기 열수 추출물과 EtOH 추출물을 세포배양 실험에 사용하였다 (Fig. 3-36C, D).

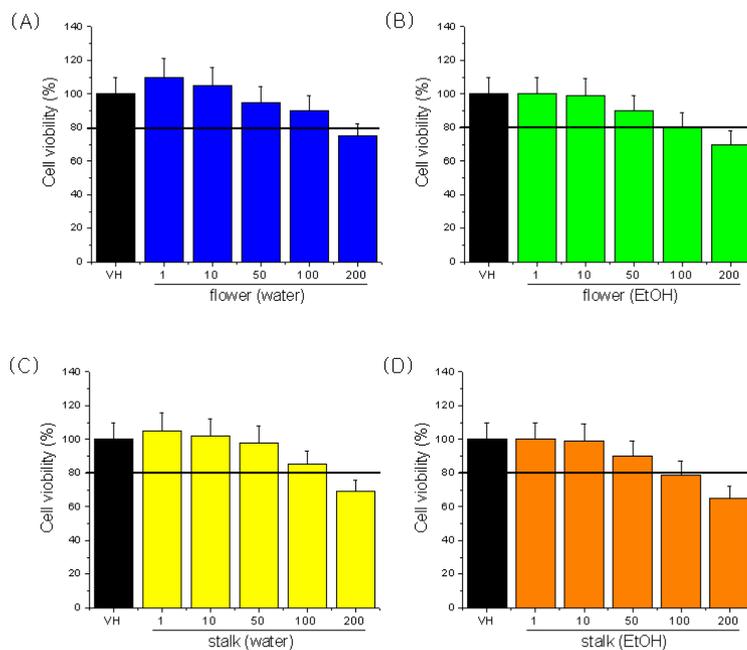


Fig. 3-36. Effects of water or EtOH extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on cell viability in macrophages. RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were cultured for 24 h in the presence of the media alone, with the indicated concentrations of

water or EtOH extract from the flower (A, B) and stalk (C, D) of *Prunella vulgaris* (1–200 $\mu\text{g/ml}$). The cell viability was assessed using a MTT assay. Each bar shows the mean \pm S.D. in triplicate. * $P < 0.01$, significantly different from the control.

나. 면역조절관련 cytokines의 생성에 대한 영향 조사

면역작용의 조절은 암치료, 자가 면역 질환 및 조직이식 등 다양한 질병에 적용할 수 있다. 항암효과의 매개체로서 면역활성화 물질의 투여는 병원체에 대한 방어 기능을 증강시키거나 면역기능의 상승을 통해 항암작용을 증가시킬 수 있다. 또한 면역활성화 물질의 투여는 암세포의 성장과 변형을 감소시키거나 변형된 암세포에 대한 면역기능을 증가시킬 수 있으며, 특히 면역 활성화 물질은 세포독성 치료 (cytotoxic therapy)에 대한 내성능력을 조절하고, 방사물 또는 세포독성 화합물에 대한 감응성을 증가시키고, 암전이를 감소시키며, 간접적으로 면역반응을 일으킬 수 있는 물질로 알려져 왔다. Virus에 감염된 세포나 암세포를 공격하여 상해 효과를 나타내는 대표적인 비특이적 면역세포인 자연살해세포 (Natural killer cell; NK-cell) 와 LAK 세포의 활성화에 관여하고 이러한 자연 살해 세포의 세포 살해능은 종양 세포를 죽이는 숙주 방어기능의 1차적 방어망이다. 이는 여러 바이러스 및 세균에 의한 감염의 면역과 관련이 있으며, 종양세포의 죽음과 관련이 있다. 항종양 면역기능은 선천성 면역반응에 기초한 NK 세포, LAK 세포, 거식세포를 이용한 비특이적 면역반응과 획득 면역반응에 기초한 세포독성 T림프구 (cytotoxic T lymphocytes: CTL) 세포를 이용한 특이적인 면역반응이 있다. 이러한 비특이적 암세포 살해면역세포는 여러 종류의 cytokine에 의해 활성화된다. 사이토카인은 면역반응의 각 단계에서 림프구의 활성을 조절하는 폴리펩타이드로서 면역능을 증가시킬 수 있으며, 면역활성을 증가시키는 것으로 가장 많이 보고된 cytokine은 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β 등이 있다. Raw 264.7 세포에 하고초 꽃 (flower), 줄기 (stalk) 열수 (water), 에탄올 (ethanol) 추출물을 각각 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 다음 상층액을 수거하여 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β 의 특이적인 항체를 이용하여 ELISA를 수행하였다.

$\text{TNF-}\alpha$ 의 생성량을 측정한 결과 하고초 꽃 추출물의 경우 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 꽃 열수 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 약 3.5배정도 $\text{TNF-}\alpha$ 의 생성량이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 $\text{TNF-}\alpha$ 의 생성량의 변화를 확인할 수 없었다 (Fig. 3-37A, B). 또한 하고초 줄기 추출물의 경우 열

수 추출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 줄기 열수 추출물 100 µg/ml 처리군에서 약 2.7배정도 TNF-α의 생성량이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 TNF-α 생성량의 변화가 없었다 (Fig. 3-37C, D).

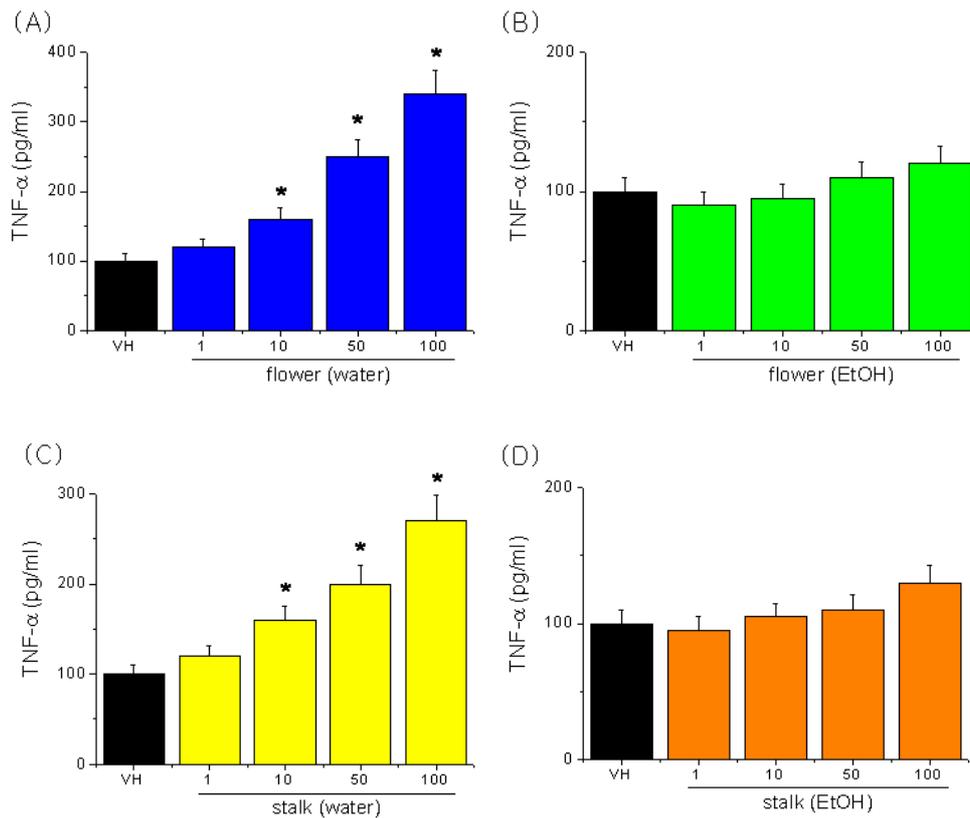


Fig. 3-37. Effects of water or EtOH extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on production of TNF-α. RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/ml) were cultured for 4 h in the presence of the media alone, with the indicated concentrations of water or EtOH extract from the flower (A, B) and stalk (C, D) of *Prunella vulgaris* (1-100 µg/ml). TNF-α production was determined by measuring enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Each bar shows the mean \pm S.D. in triplicate. *P < 0.01, significantly different from the control.

IL-6의 생성량을 측정한 결과, 하고초 꽃 추출물의 경우 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 꽃 열수 추출물 100 µg/ml 처리군에서 약 3.5배정도 IL-6의 생성량이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 IL-6의 생성량의 변화를 확인할 수 없었다 (Fig. 3-38A, B). 또한 하고초 줄기 추출물의 경우 열수 추

출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 줄기 열수 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 약 2.8배정도 IL-6의 생성량이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 IL-6 생성량의 변화가 없었다 (Fig. 3-38C, D).

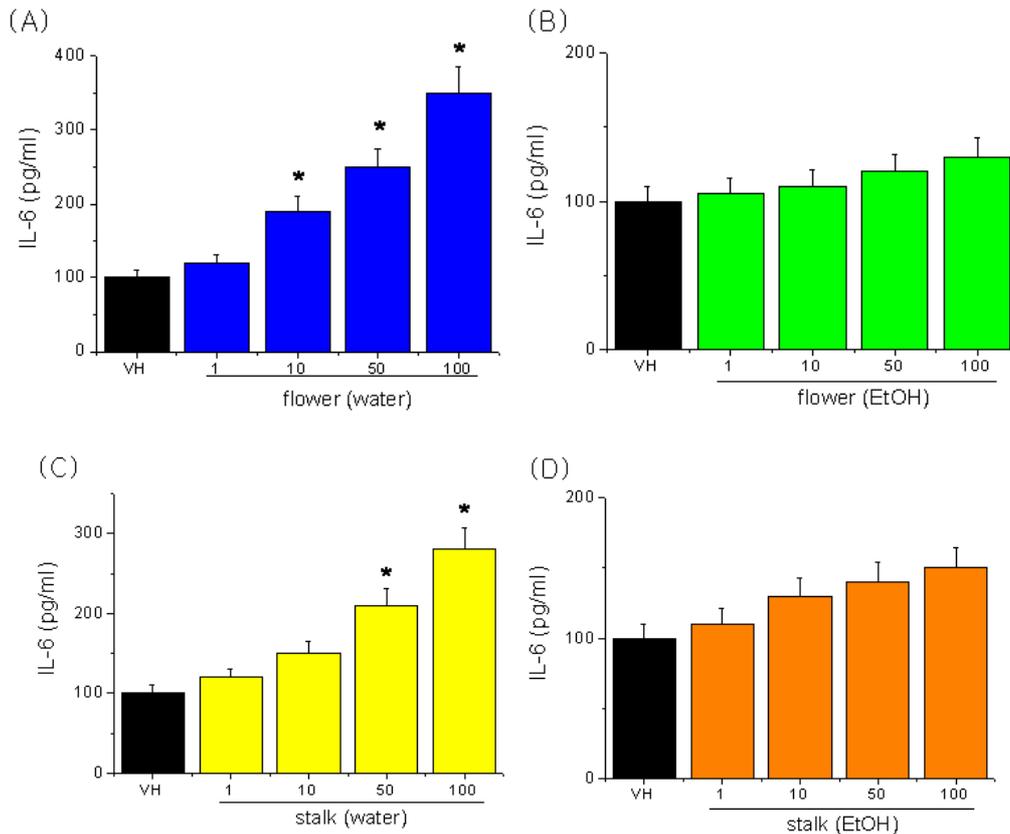


Fig. 3-38. Effects of water or EtOH extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on production of IL-6. RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/ml) were cultured for 6 h in the presence of the media alone, with the indicated concentrations of water or EtOH extract from the flower (A, B) and stalk (C, D) of *Prunella vulgaris* (1-100 $\mu\text{g/ml}$). IL-6 production was determined by measuring enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Each bar shows the mean \pm S.D. in triplicate. * $P < 0.01$, significantly different from the control.

IL-1 β 의 생성량을 측정한 결과로는 하고초 꽃 추출물의 경우 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 꽃 열수 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 약 2배정도 IL-1 β 의 생성량이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 IL-1 β 생성량의 변화가 없었다 (Fig. 3-39A, B). 또한 하고초 줄기 추출물의 경우 열수 추출물과

EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 줄기 열수 추출물 100 μ g/ml 처리군에서 약 2배정도 IL-1 β 의 생성량이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 IL-1 β 생성량의 변화가 없었다 (Fig. 3-39C, D).

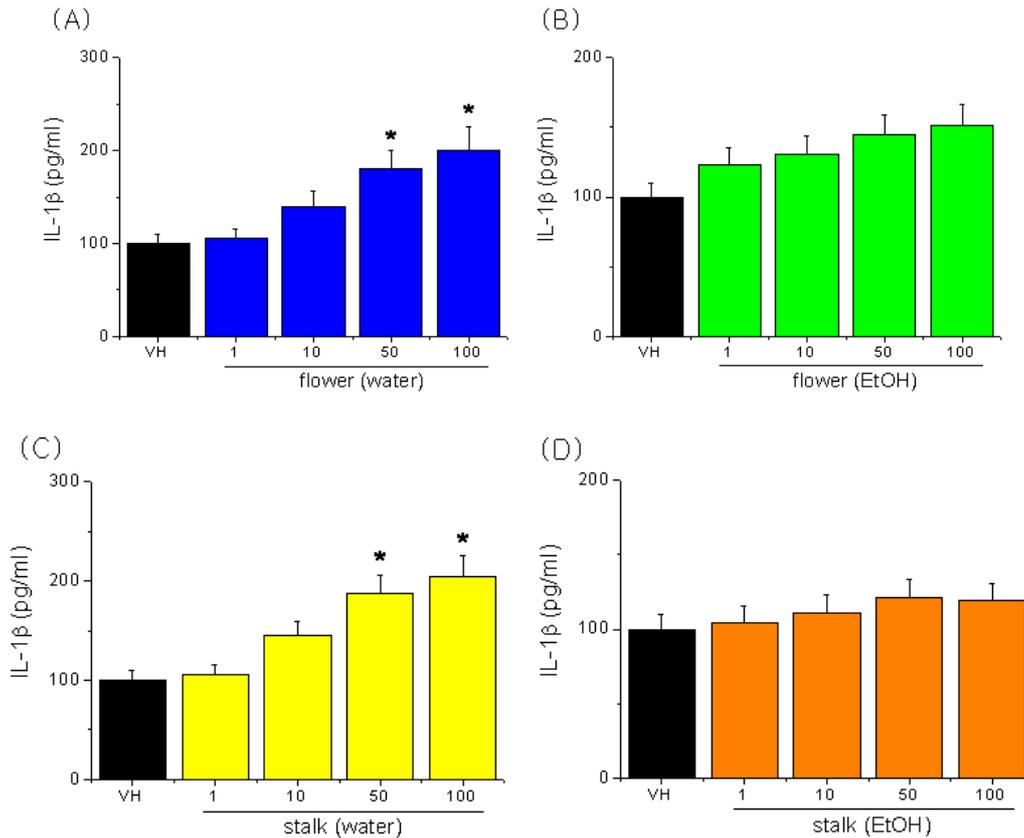


Fig. 3-39. Effects of water or EtOH extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on production of IL-1 β . RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/ml) were cultured for 6 h in the presence of the media alone, with the indicated concentrations of water or EtOH extract from the flower (A, B) and stalk (C, D) of *Prunella vulgaris* (1-100 μ g/ml). IL-1 β production was determined by measuring enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Each bar shows the mean \pm S.D. in triplicate. *P < 0.01, significantly different from the control.

다. 특이적 면역반응 관련 비장 림프구 활성화 측정

비장세포를 분리하기 위하여 Balb/c 마우스를 경추 탈구법으로 희생 시킨 후, 복부를 절개하여 비장을 적출하고 1 ml 주사기 뒷부분을 이용하여 세분 절편하였다. 세포를 HBSS에 부유시킨 후 50 ml 원심용 시험관에 옮겨 1,000 rpm에서 5분간 원심 침전시켰다. 세

포 침전물을 비장 하나 당 ACK lysis buffer (Tris-buffered ammonium chloride: 0.16 M NH_2Cl , 0.17 M Tris, pH 7.2) 5 ml에 현탁하여 1분 방치한 후 HBSS로 2회 세척하여 적혈구를 제거하였다. 세포수를 측정하여 1.5×10^6 cells/ml 농도로 96-well plate에 분주하고, 하고초 꽃 (flower), 줄기 (stalk) 열수 (water), 에탄올 (ethanol) 추출물을 처리하고 72시간 후 WST-1 Kit를 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ 에 넣고 30분 동안 반응시킨 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하여 하고초 꽃 (flower), 줄기 (stalk) 열수 (water), 에탄올 (ethanol) 추출물에 의한 비장 임파구의 증식능을 조사하였다.

비장 임파구의 증식능을 측정한 결과, 하고초 꽃 추출물의 경우 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 꽃 열수 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 약 2배, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 약 2.5배정도 비장 임파구의 증식능이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 비장 임파구의 증식능의 변화를 확인할 수 없었다 (Fig. 3-40A, B). 또한 하고초 줄기 추출물의 경우 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 줄기 열수 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 약 1.6배, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 약 2.2배정도 비장 임파구의 증식능이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 임파구 증식능 변화가 없었다 (Fig. 3-40C, D).

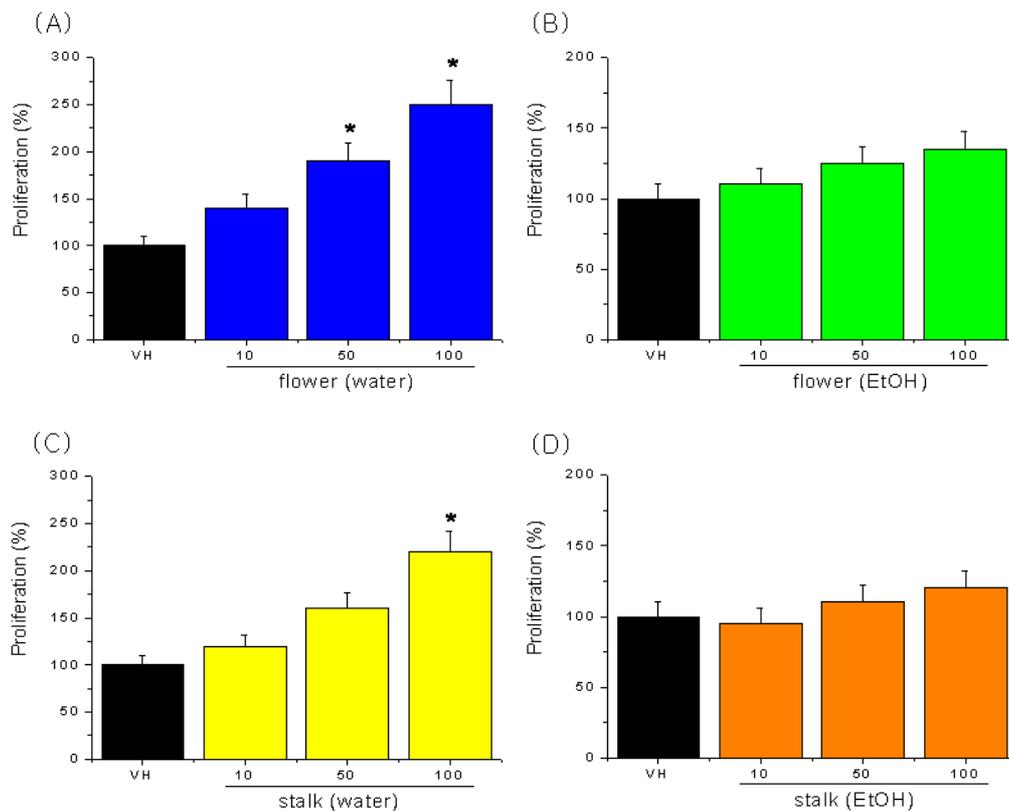
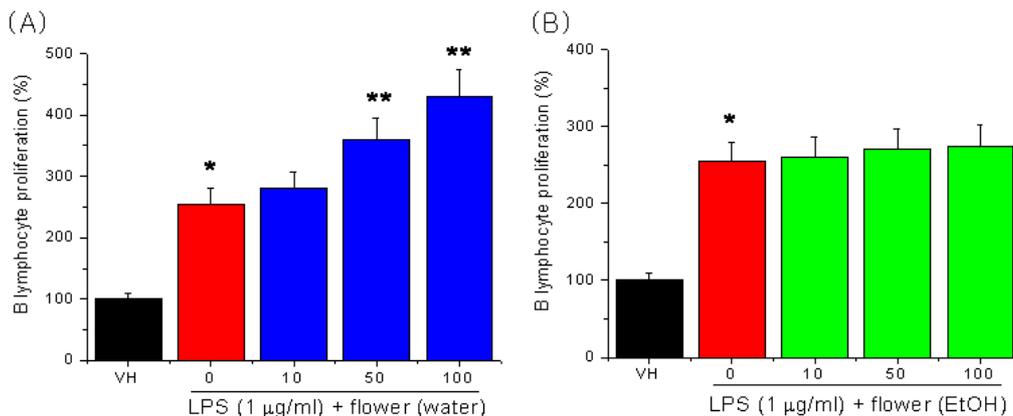


Fig. 3-40. Effects of water or EtOH extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris*

on splenocytes proliferation. Splenocytes were treated with various concentrations for 72 h. Cell proliferations were determined by a MTT assay. Each bar shows the mean \pm S.D. of triplicate. * $P < 0.01$, significantly different from the control.

B 임파구 특이적인 임파구 증식능을 측정하기 위하여 비장 세포를 1.5×10^6 cells/ml 농도로 96-well plate에 분주하고 B 임파구 유사분열유도물질 (mitogen)인 LPS (lipopolysaccharide)와 하고초 꽃 (flower), 줄기 (stalk) 열수 (water), 에탄올 (ethanol) 추출물을 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고 72시간 후 WST-1 Kit를 10 $\mu\text{l/well}$ 에 넣고 30분 동안 반응시킨 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하여 하고초 추출물에 의한 비장 B 임파구 증식능을 측정하였다.

B 임파구 특이적인 임파구 증식능을 측정한 결과, LPS에 의해 2.5배 증가된 B 임파구 증식이 하고초 꽃 추출물의 경우 하고초 꽃 열수 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 약 2배, 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 약 3.5배, 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 약 4.3배정도 B 임파구 증식능이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 B 임파구 특이적인 임파구 증식능 변화가 없었다 (Fig. 3-41A, B). 또한 하고초 줄기 추출물의 경우 LPS에 의해 2.5배 증가된 B 임파구 증식이 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 줄기 열수 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 약 1.6배, 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 약 3.2배, 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 약 3.8배정도 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 변화가 없었다 (Fig. 3-41C, D).



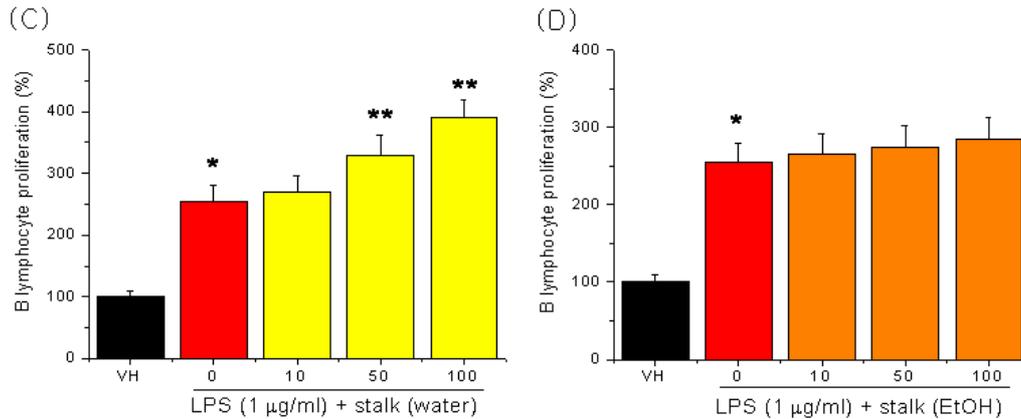


Fig. 3-41. Effects of water or EtOH extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on splenocytes proliferation in the presence of B-cell mitogen lipopolysaccharide (LPS). Splenocytes were treated with various concentrations of *Prunella vulgaris* with LPS for 72 h. Cell proliferations were determined by a MTT assay. Each bar shows the mean \pm S.D. of triplicate. * $P < 0.01$, significantly different from the control.

T 임파구 특이적인 임파구 증식능을 측정하기 위하여 비장 세포를 1.5×10^6 cells/ml 농도로 96-well plate에 분주하고 T 임파구 유사분열유도물질 (mitogen)인 Con A (concanavaline A)와 하고초 꽃 (flower), 줄기 (stalk) 열수 (water), 에탄올 (ethanol) 추출물을 10, 50, 100 µg/ml로 처리하고, 72시간 후 WST-1 Kit를 10 µl/well에 넣고 30분 동안 반응시킨 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하여 하고초 추출물에 의한 비장 T 임파구 증식능을 측정하였다.

T 임파구 특이적인 임파구 증식능을 측정한 결과, Con A에 의해 2.7배 증가된 T 임파구 증식이 하고초 꽃 추출물의 경우 하고초 꽃 열수 추출물 50 µg/ml 처리군에서는 약 2배, 50 µg/ml 처리군에서는 약 3.5배, 100 µg/ml 처리군에서는 약 4.5배정도 T 임파구 증식능이 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 T 임파구 특이적인 임파구 증식능의 변화를 확인할 수 없었다 (Fig. 3-42A, B). 또한 하고초 줄기 추출물의 경우 Con A에 의해 2.7배 증가된 T 임파구 증식이 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 하고초 줄기 열수 추출물 50 µg/ml 처리군에서는 약 1.6배, 50 µg/ml 처리군에서 약 3.2배, 100 µg/ml 처리군에서 약 4.5배정도 증가하였으나, EtOH 추출물 처리군에서는 변화가 없었다 (Fig. 3-42C, D).

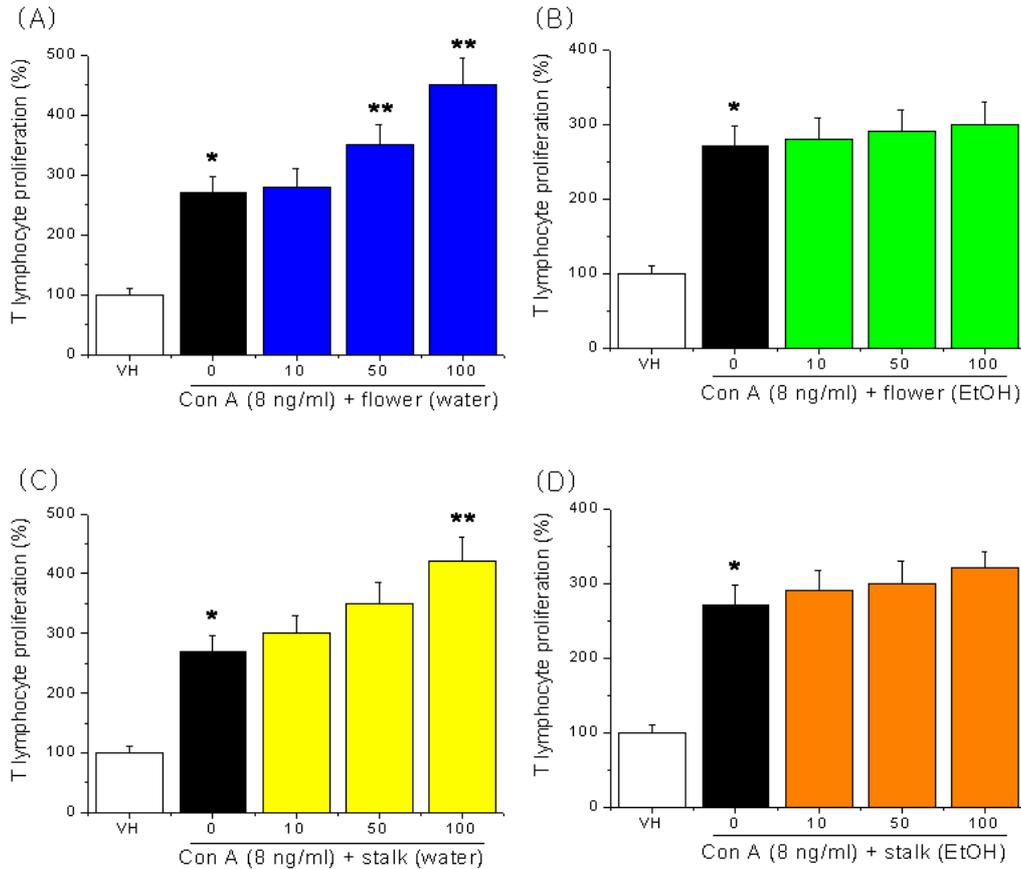


Fig. 3-42. Effects of water or EtOH extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on splenocytes proliferation in the presence of T-cell mitogen concanavalin A (Con A). Splenocytes were treated with various concentrations of *Prunella vulgaris* with Con A for 72 h. Cell proliferations were determined by a MTT assay. Each bar shows the mean \pm S.D. of triplicate. * $P < 0.01$, significantly different from the control.

라. 종양발생 억제 관련 유전자인 iNOS의 발현에 대한 영향 조사

면역활성을 증가시키는 것으로 가장 많이 보고된 cytokine은 TNF- α , IL-6, IL1 β 등이 있으며, 종양발생 억제에 관여하는 유전자로는 iNOS가 알려져 있다. 하고초 유용물질의 iNOS의 발현에 대한 영향을 조사하기 위하여 사이토카인의 생성량을 증가시켰던 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물을 이용하여 실험하였다. 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물을 Raw 264.7 세포에 처리하여 확인한 결과 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물에 의해 iNOS 유전자 (Fig. 3-43) 및 단백질의 발현이 증가하였다 (Fig. 3-44).

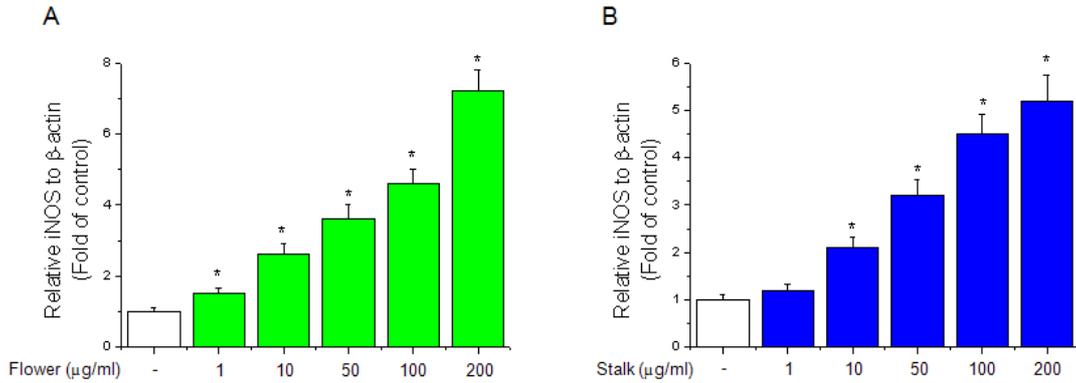


Fig. 3-43. Effects of water extract of the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on iNOS gene expression in Raw 264.7 cells. Cells were treated with various concentrations of *Prunella vulgaris* for 6 h. PCR amplification of the housekeeping gene, β -actin, was performed for each sample by real time PCR.

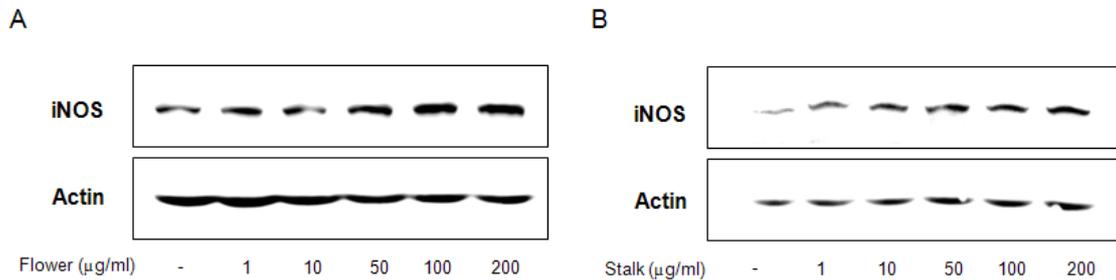


Fig. 3-44. Effects of water extract of the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on iNOS protein expression in Raw 264.7 cells. Cells were treated with various concentrations of *Prunella vulgaris* for 24 h. the cell lysates were blotted with the anti-iNOS or actin antibody.

3. 하고초 유용물질의 암세포 살해 및 성장억제와 관련된 면역증강활성 연구

가. 비특이적 면역반응인 자연살해세포 (NK cell)의 암세포 살해능에 대한 영향 조사
 하고초 추출물에 의한 자연살해세포 (natural killer cell: NK cell)의 암세포 살해능에 대한 영향을 조사하기 위하여, 표적세포 (target cell)로 마우스 임파종 (lymphoma) 세포인 YAC-1 세포를 RPMI 1640 배양액으로 계대 배양하였다. 표적세포 (target cell)인 YAC-1 세포 1×10^6 개를 형광 물질인 calcein-AM을 $15 \mu\text{M}$ 되도록 첨가하여 37°C , CO_2 incubator에서 30분 반응시켜 형광 표지화 (labelling) 시킨 뒤 HBSS로 3회 세척하였

다. 주효세포 (effector cell)인 자연살해세포와 표적세포인 YAC-1 세포 (effector cell/target cell ratio; E/ T ratio)를 10/ 1, 25/ 1, 50/ 1의 세 가지로 되도록 주효세포와 표적세포를 1×10^4 개의 표적세포를 배양액에 넣어 50 μ l씩 96well-plate에 분주하고 하고초를 10, 50, 100 μ g/ml로 4 시간 처리하였다. 96well-plate를 원심분리 후 상층액 50 μ l를 excitation 485nm, emission 530nm에서 형광 (fluorescence spectrophotometer: FL600, Bio-tek)으로 측정하여 자연살해세포의 표적세포인 YAC-1 세포에 대한 세포독성 (cytotoxicity)을 %로 나타내었다.

면역활성 효과가 확인된 하고초 꽃 열수 추출물에 의한 자연살해세포 (natural killer cell: NK cell)의 암세포 살해능을 측정한 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군 (VH)에 비해 주효세포 (effector cell)인 자연살해세포와 표적세포인 YAC-1 세포의 비율이 10/1, 25/1, 50/1에서 자연살해세포 (natural killer cell: NK cell)의 암세포 살해능 증가로 인한 형광이 증가하였으며, 하고초 꽃 열수 추출물 농도 의존적으로 형광을 증가시켜 하고초 꽃 열수 추출물이 자연살해세포의 세포 살해능을 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 3-45).

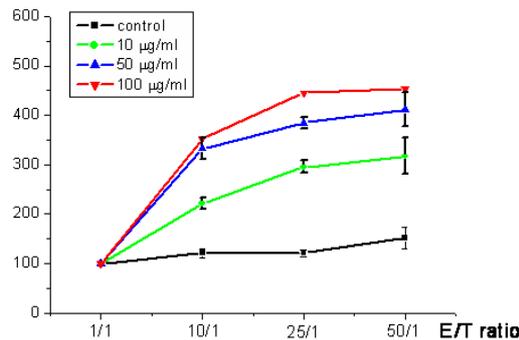


Fig. 3-45. Effects of water extract from the flower of *Prunella vulgaris* on natural killer (NK) cell activity in the splenocytes. As target cells, we used the NK sensitive cell line YAC-1. Each bar shows the mean \pm S.D. of four independent experiments, performed in triplicate.

또한 하고초 줄기 열수 추출물에 의한 자연살해세포 (natural killer cell: NK cell)의 암세포 살해능을 측정한 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군 (VH)에 비해 주효세포 (effector cell)인 자연살해세포와 표적세포인 YAC-1 세포의 비율이 10/1, 25/1, 50/1에서 자연살해세포 (natural killer cell: NK cell)의 암세포 살해능 증가로 인한 형광이 증가하였으며, 하고초 꽃 열수 추출물 농도 의존적으로 형광을 증가시켜 하고초 꽃 열수 추출물이 자연살해세포의 세포 살해능을 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 3-46).

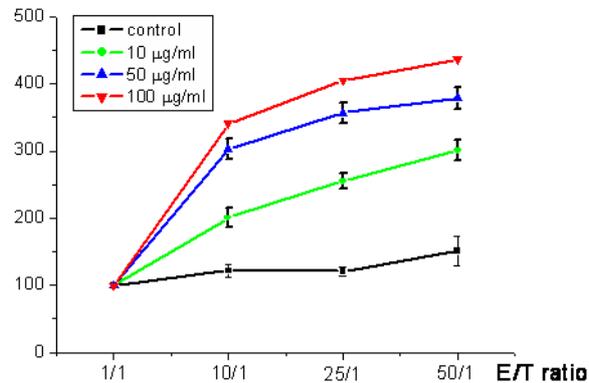


Fig. 3-46. Effects of water extract from the stalk of *Prunella vulgaris* on natural killer (NK) cell activity in the splenocytes. As target cells, we used the NK sensitive cell line YAC-1. Each bar shows the mean \pm S.D. of four independent experiments, performed in triplicate.

하고초 추출물에 의한 자연살해세포 (natural killer cell: NK cell)에 의해 살해되지 않는 암세포에 대한 살해능 효과를 조사하기 위하여 임파구에 IL-2 (Interleukin-2)를 10 U/ml로 처리하여 3일 배양하고 자연살해세포에 의해 살해되지 않는 암세포를 살해할 수 있는 림포카인활성살해세포 (lymphokine activated killer cell; LAK cell)를 생성을 유도하였다. 표적세포 (target cell)인 YAC-1 세포 1×10^6 개를 형광 calcein-AM을 15 μ M 되도록 첨가하여 37°C, CO₂ incubator에서 30분 반응시켜 형광 표지화 (labelling) 시킨 뒤 HBSS로 3회 세척하였다. 주효세포 (effector cell)인 림포카인활성살해세포와 표적세포인 YAC-1 세포 (effector cell/ target cell ratio; E/ T ratio)를 10/ 1, 25/ 1, 50/ 1의 세 가지로 되도록 주효세포와 표적세포를 1×10^4 개의 표적세포를 배양액에 넣어 50 μ l씩 96well-plate에 분주하고 하고초를 10, 50, 100 μ g/ml로 4 시간 처리하였다. 96well-plate를 원심분리 후 상층액 50 μ l를 excitation 485nm, emission 530nm에서 형광 (fluorescence spectrophotometer: FL600, Bio-tek)으로 측정하여 림포카인활성살해세포의 표적세포인 YAC-1 세포에 대한 세포독성 (cytotoxicity)을 %로 나타내었다.

하고초 꽃 열수 추출물에 의한 림포카인활성살해세포의 암세포 살해능을 확인한 결과 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 주효세포 (effector cell)인 림포카인활성살해세포와 표적세포인 YAC-1 세포의 비율이 10/1, 25/1, 50/1에서 형광이 증가하였으며, 하고초 추출물의 농도 의존적으로 형광발생을 증가시켜 하고초 꽃 열수 추출물이 림포카인활성살해세포의 세포 살해능을 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 3-47).

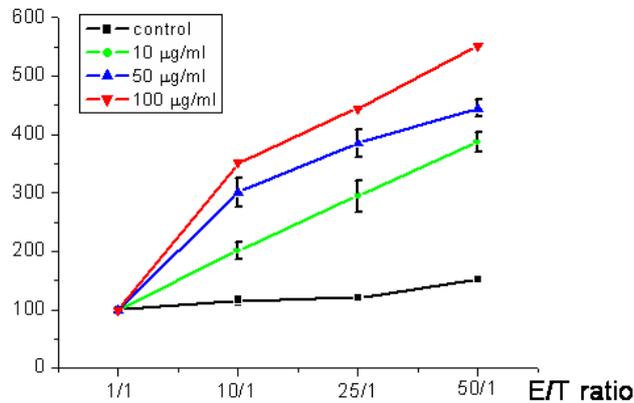


Fig. 3-47. Effects of water extract from the flower of *Prunella vulgaris* on lymphokine activated killer (LAK) cell activity in the splenocytes. As target cells, we used the LAK sensitive cell line YAC-1. Each bar shows the mean \pm S.D. of four independent experiments, performed in triplicate.

하고초 줄기 열수 추출물에 의한 림포카인활성살해세포의 암세포 살해능을 확인한 결과 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 주효세포 (effector cell)인 림포카인활성살해세포와 표적세포인 YAC-1 세포의 비율이 10/1, 25/1, 50/1에서 형광이 증가하였으며, 하고초 추출물의 농도 의존적으로 형광발생을 증가시켜 하고초 줄기 열수 추출물이 림포카인활성살해세포의 세포 살해능을 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 3-48).

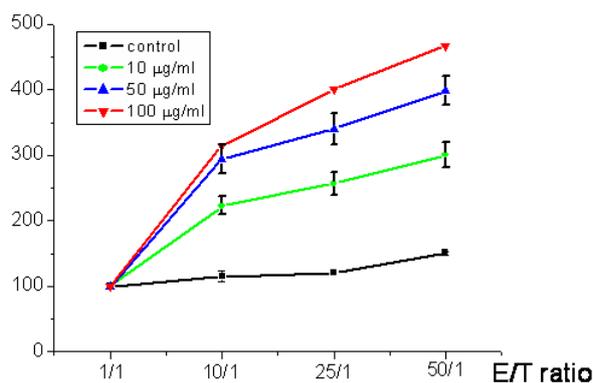


Fig. 3-48. Effects of water extract from the stalk of *Prunella vulgaris* on lymphokine activated killer (LAK) cell activity in the splenocytes. As target cells, we used the LAK sensitive cell line YAC-1. Each bar shows the mean \pm S.D. of four independent experiments, performed in triplicate.

하고초 유용물질에 의한 면역활성을 측정한 결과 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물에 의해 면역조절 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성량이 증가하였고, 비장 임파구 증식능 증가 및 자연살해세포와 림포카인활성살해세포의 암세포 살해능이 증가함을 확인하였다.

나. *In vitro* 암세포 증식 억제 활성에 대한 영향 조사

하고초 유용물질에 의한 *In vitro* 암세포 증식 억제 활성을 확인하기 위하여 대표적인 암세포주인 HepG2 (인체 간암 세포주), MCF-7 (인체 유방암 세포주), A549 (인체 폐암 세포주), EL-4 (인체 림프종)에 대한 위 세포주에 대한 증식능을 조사하였다. 하고초 꽃과 줄기의 열수 추출물에 의해 이들 암세포주의 세포 증식에 대한 변화는 없었다 (Fig. 3-49).

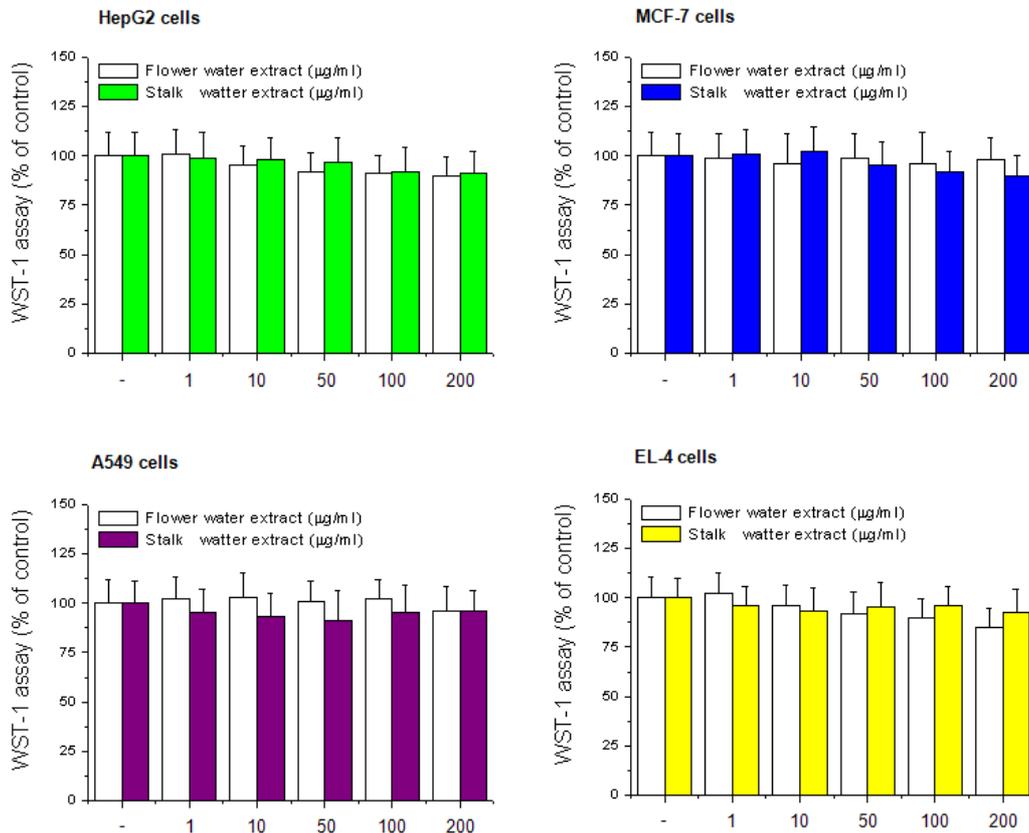


Fig. 3-49. Effects of water extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on proliferation in cancer cells. Cells (5×10^5 cells/ml) were cultured for 24 h in the presence of the media alone, with the indicated concentrations (1–200 μ g/ml) of water extract from the flower and stalk in HepG2 cells (A), MCF-7 cells (B), A549 cells (C), and EL-4 cells (D). Each bar shows the mean \pm S.D. in triplicate. * $P < 0.01$, significantly different from the control.

4. 하고초 유용물질의 in vivo / in vitro 암 전이 억제능에 대한 연구

가. In vivo 암 전이 억제능에 대한 영향 조사

암은 세포가 정상적인 기능을 수행하지 못하게 됨으로써 무분별한 세포의 증식에 의해 일어나는 질병들을 통칭하는 용어이다. 암은 인체의 모든 기관이나 조직에서 발생할 수 있으나 특별히 인체의 특정기관이나 조직에서 빈번히 발생하는데, 가장 흔한 부위는 폐, 간, 유방, 대장 등이다. 초기에 암이 발견되는 경우 외과적 수술을 통해 비교적 쉽게 제거가 이루어질 수 있으나, 암의 전이가 일어난 경우나 외과적 치료에 문제가 있는 부위 등 치료가 어려운 상황이 많이 발생하고 있으며, 발생 기전 등 암에 대한 정확한 이해가 부족한 현 상황에서 암을 효과적으로 치료하기 위한 다양한 노력이 진행 중에 있다. WHO 통계자료에 따르면, 전 세계적으로 매년 악성종양 환자가 대략 천만명 가량 발생하고 있으며, 악성종양으로 인한 사망은 심혈관질환에 이어 두 번째로 많은 사상자를 내고 있는 질병으로 알려져 있다. 암은 크게 정상적인 범위를 벗어나 끊임없이 세포분열을 하고 성장하는 양성종양과 다른 세포가 차지하고 있는 고유 영역을 침범하는 악성종양으로 구분할 수 있다. 암은 세포의 성장과 발육의 기본적인 규칙을 따르지 않는 질병이다. 정상 세포의 성장은 몸 전체에서 필요로 하는 정도로 조심스럽게 조절되지만 암 세포는 자유자재로 또는 계속적으로 성장하여 결국은 정상 세포의 기능을 파괴하거나 억제한다. 정상 세포에서 암 세포로의 형질전환은 정상 세포의 생리를 조절하는 조절계의 생략에 의하여 일어나게 된다. 인체에서 발생하는 암의 종류는 100종 이상이며, 기원에 따라 암은 분류된다. 대부분의 암은 상피성 종양(carcinoma), 육종(sarcoma) 및 백혈병 또는 임파종(leukemia/lymphoma)과 같이 3 집단으로 나누어진다. 인체 암의 약 90%는 상피성 종양이며 외배엽이나 내배엽의 상피세포에서 유래한다. 피부암 세포와 인체 구강 상피 암세포는 상피성 종양의 일종이다. 암의 발생 기원은 위에서 정의한 것처럼 알려져 있어 분류는 가능해졌지만 발생 기전은 아직도 명확하지 않아 난치성 질병의 하나로 알려져 있다. 이에 많은 항암제들이 개발되고 있지만 암의 종류에 따라 다양한 약리작용을 나타내고 (Hersh 등, 1986; Gillman 등, 1991) 또한 항암제의 독성에 의한 부작용도 다양하게 나타나기 때문에 암 치료시 문제점으로 지적되고 있어(Chung 등, 1987; Seo 등, 1992) 항암제의 부작용을 최소화하기 위하여 천연물을 이용한 항암제 개발이 시도되고 있다(Kawamura 등, 1988; Aburada, 1998).

하고초의 in vivo 암 전이 억제능에 대한 영향을 조사하기 위하여 폐암과 고형암에 대한 영향을 조사하였다. 폐암 전이 모델을 확립하기 위하여 B16F10 melanoma cells를 마우스 꼬리에 정맥주사한 후, 하고초 전초를 생리식염수에 희석한 후 농도별 (50, 200 mg/kg)로 14일 동안 연속해서 경구 투여하였다. 대조군은 생리식염수만을 경구 투여하여 하고초 전초에 대한 효능을 실시하였다. 마지막 날, 폐를 적출한 후, 전이된 흑색종의 수를 측정하였다 (Fig. 3-50). B16F10 melanoma cells에 의해 전이된 폐의 흑색종이 하고

초 전초의 투여 농도에 비례하여 감소된 것을 폐의 흑색종 전이 실험을 통하여 확인하였다 (Fig. 3-51).

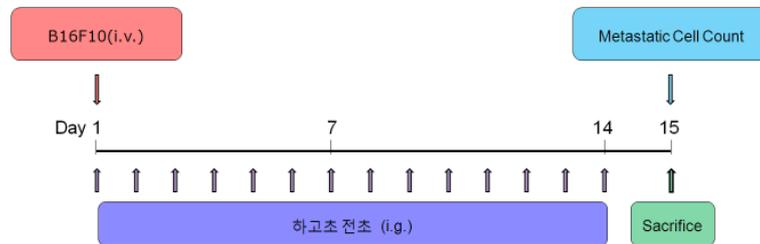
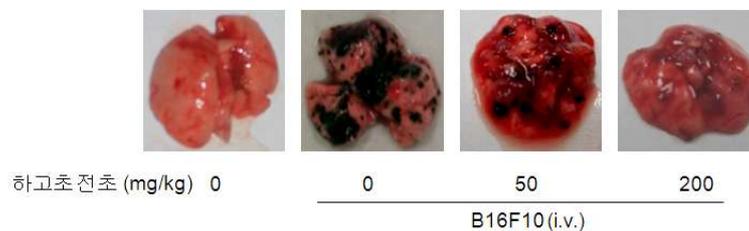


Fig. 3-50. Experimental protocol of in vivo experimental lung metastasis assay. The B16F10 cells were harvested and resuspended to give the appropriate concentrations in HBSS. An amount of 0.2 ml of the resultant B16F10 cell suspension (5×10^5 cells) was injected via the tail vein of the C57BL/6 mice (day 1). The *Prunella vulgaris* was suspended in sterilized saline and administered orally to the mice simultaneously with the inhibition of metastasis. The treatment was continued daily for 14 days. Six mice from each group were sacrificed 14 days after being inoculated with the tumor cells.



Group	Dose	Lung Tumor colony number	Inhibition rate (%)
하고초 전초 (mg/kg)	0	54.5±3.54	0
	50	8.4±0.82 *	84.6 *
	200	2.2±0.28 *	95.9 *

Fig. 3-51. Effect of *Prunella vulgaris* on the experimental metastasis of B16F10 melanoma cells. The lungs were dissected and observed for any metastases on the 14th day after inducing a B16F10 melanoma. The *Prunella vulgaris* was started simultaneously with the tumor cell inoculation through the lateral tail vein (14 times at 24 h interval, i.g.). Values are mean \pm SD. * $P < 0.05$ compared with the control(B16F10).

다음으로 고형암 모델을 확립하기 위하여 B16F1 melanoma cells를 마우스 서혜부에 피하주사한 후, 하고초 전초를 생리식염수에 희석한 후 농도별 (50, 200 mg/kg)로 28일 동안 연속해서 경구 투여하였다. 대조군은 생리식염수만을 경구 투여하여 하고초 전초에 대한 효능을 실시하였다. 마지막 날, 종양을 적출한 후, 성장한 종양의 무게를 측정하였다 (Fig. 3-52). B16F1 melanoma cells에 의해 성장한 서혜부의 고형암이 하고초 전초의 투여 농도에 비례하여 감소된 것을 서혜부 종양 성장 실험을 통하여 확인하였다 (Fig. 3-53).

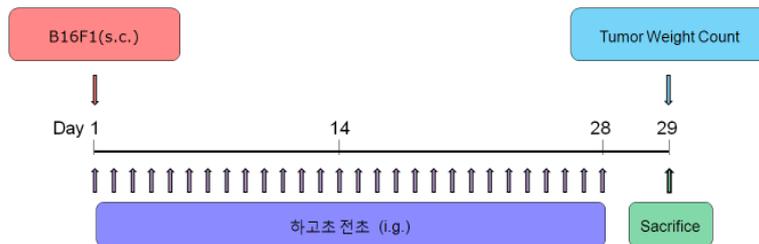
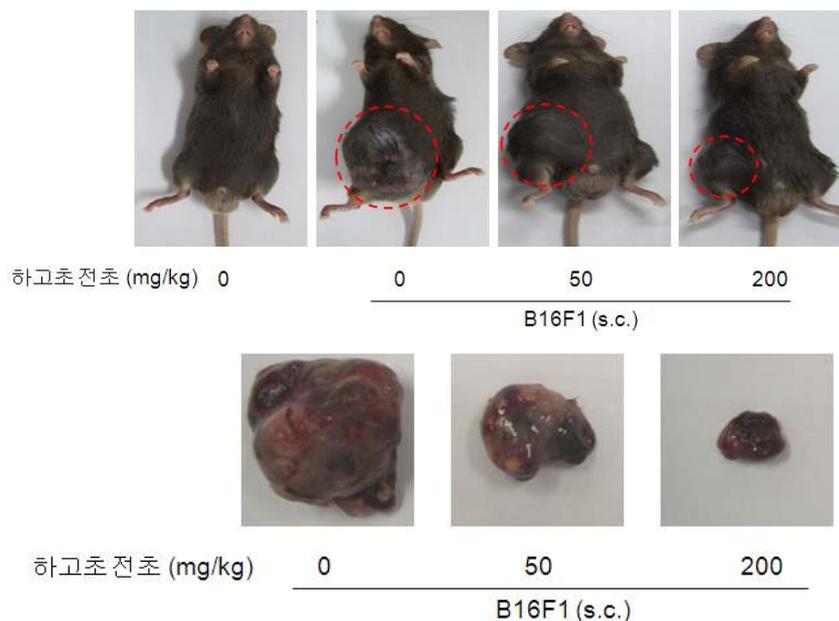


Fig. 3-52. Experimental protocol of in vivo experimental solid tumor growth assay. The B16F1 cells were harvested and resuspended to give the appropriate concentrations in HBSS. An amount of 0.2 ml of the resultant B16F1 cell suspension (5×10^5 cells/ml) was injected via the inguinal area of the C57BL/6 mice (day 1). The *Prunella vulgaris* was suspended in sterilized saline and administered orally to the mice simultaneously with the inhibition of growth. The treatment was continued daily for 28 days. Six mice from each group were sacrificed 28 days after being inoculated with the tumor cells.



Group	Dose	Tumor Weight (g)	Inhibition rate (%)
하고초 전초 (mg/kg)	0	3.99 ± 1.82	0
	50	1.46 ± 0.13 *	63.4 *
	200	0.54 ± 0.06 *	86.5 *

Fig. 3-53. Effect of *Prunella vulgaris* on the experimental solid tumor growth of B16F1 melanoma cells. The inguinal area were dissected and observed for any growth on the 28th day after inducing a B16F1 melanoma. The *Prunella vulgaris* was started simultaneously with the tumor cell inoculation through the lateral inguinal area (28 times at 24 h interval, i.g). Values are mean ± SD. * P < 0.05 compared with the control (B16F1).

나. *In vitro* 암전이 억제능에 대한 영향 조사

하고초의 *in vivo* 암전이 억제에 대한 영향을 측정하고 *in vitro* 세포주를 이용하여 이를 재확인하기 위하여 하고초 전초에 대한 HT-1080 cells의 세포 독성을 조사한 결과, 300 µg/ml 까지 세포 독성이 나타나지 않은 것을 MTT 및 LDH를 통하여 확인하였다 (Fig. 3-54, 3-55).

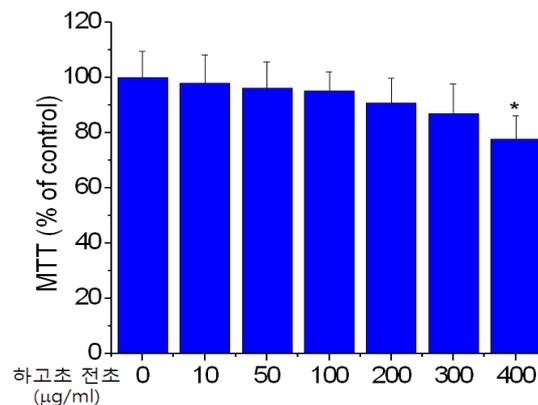


Fig. 3-54. Effect of *Prunella vulgaris* on cytotoxicity by MTT assay. The cells were plated in a 48 well plate and various concentrations of *Prunella vulgaris* were treated for 24 h. Cytotoxicity were estimated by MTT assay. Each bar represents the mean±SD calculated from three independent experiments. *P < 0.05, significantly different from control (NA).

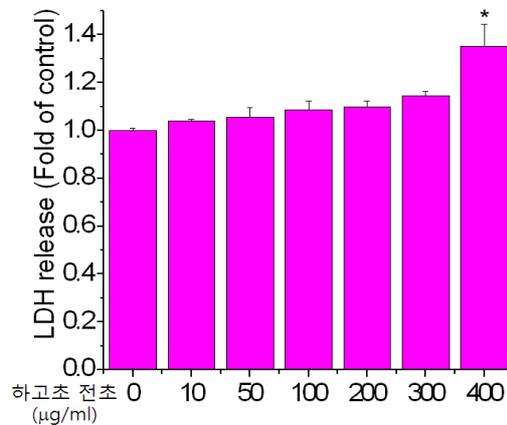


Fig. 3-55. Effect of *Prunella vulgaris* on cytotoxicity by LDH assay. The cells were plated in a 48 well plate and various concentrations of *Prunella vulgaris* were treated for 24 h. Cytotoxicity were estimated by LDH assay. Each bar represents the mean \pm SD calculated from three independent experiments. *P < 0.05, significantly different from control (NA).

종양이 성장하여 전이를 일으키기 위해서는 암 세포 침윤에 일차적인 장벽 역할을 하는 기저막 및 세포외 기질의 분해 과정이 필수적인데, 최근 종양의 단백질 분해 효소 발현의 변화를 연구함으로써 종양 세포의 생물학적 특징 및 예후 추측에 관련된 연구가 시도되고 있다. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 조직의 형성, 암 전이, 염증, 피부노화 및 주름, 화상 및 상처 치료와 같은 병리학적 과정과 각종 질환에 관여하는 것으로 알려져 있으며 구조적 유사성과 기질 특이성을 근거로 하여 MMPs는 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane type-MMPs 그리고 알려지지 않은 MMPs 등으로 분류된다. MMPs는 growth factors, cytokines, tumor promoters 및 ultraviolet (UV) 등과 같은 다양한 외부 자극인자에 의해 과 발현된다. 특히 gelatinase(MMP-2와 9)은 종양 세포의 악성도와 밀접한 연관성이 있다고 알려져 있으며 이러한 MMP-2와 9의 발현 증가를 보이는 경우 주위 조직으로의 침윤과 전이의 빈도가 증가하였다는 보고가 있다. TIMP는 MMP에 의한 기질 분해작용을 조절하는 억제 인자인데, 정상조직에서는 MMP와 TIMP의 분비가 균형을 이룸으로써 기저막의 분해 대사가 적절히 조절되고 있으나 악성종양에서는 이들 간의 불균형으로 인해 암의 침윤과 전이가 증가되는 보고가 있다. 본 연구에서는 하고초에서 분리된 유용물질에 대한 암 세포주를 이용한 in vitro 암전이 모델을 이용한 암전이 억제효과에 대한 연구를 수행하였다.

HT-1080 cells에 하고초 전초를 농도별로 1시간 전 처리한 후, PMA를 24시간 처리한 후 RT-PCR법을 이용하여 mRNA의 발현을 조사한 결과, PMA에 의해 증가된 MMP-9의

발현이 하고초 전초의 처리 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, MMP-9의 억제 유전자로 알려진 TIMP-1의 발현은 하고초 전초의 처리와 상관없이 발현 변화가 없었다 (Fig. 3-56).

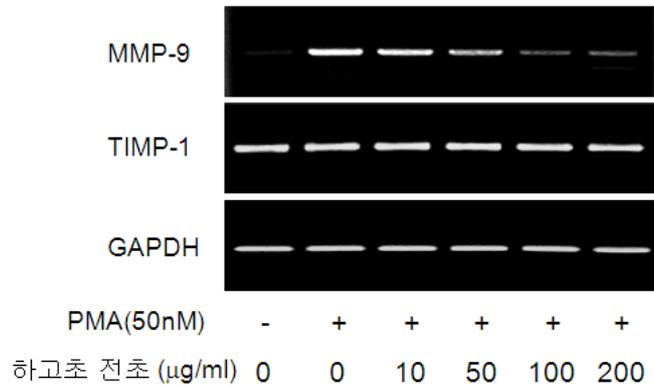


Fig. 3-56. Effect of *Prunella vulgaris* on PMA induced-MMP-9 and TIMP-1 expression. The cells were treated with or without various concentrations of *Prunella vulgaris* in the present of PMA. Total RNA was isolated and then was analyzed for the MMP-9, TIMP-1 and GAPDH expression by RT-PCR.

HT-1080 cells에 하고초 전초를 농도별로 1시간 전 처리한 후, PMA를 24시간 처리한 후 수거한 배양액을 이용하여 gelatinase 활성을 조사한 결과, PMA에 의해 증가된 MMP-9의 활성이 하고초 전초의 처리 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 3-57).

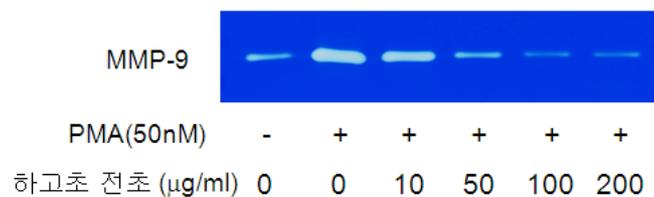


Fig. 3-57. Effect of *Prunella vulgaris* on PMA induced-MMP-9 activity. The cells were treated with or without various concentrations of *Prunella vulgaris* in the present of PMA. Each conditioned media was collected and then was analyzed for the gelatinolytic activities by gelatin zymography.

하고초 전초에 대한 MMP-9의 발현 기전을 규명하기 위해 MMP-9 promoter에 대한 reporter gene assay를 수행한 결과, PMA에 의해 증가된 MMP-9의 활성이 하고초 전초의 처리 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 3-58). 또한, 직접적으로 관여하는 전사 조절 인자를 규명하기 위하여 MMP-9 promoter에 존재하는 NF-κB 및 AP-1의 결합부위를 mutation한 luciferase reporter gene을 이용하여 하고초 전초에 대한 MMP-9의

reporter gene assay를 수행한 결과, NF- κ B 결합부위가 mutation된 reporter gene의 luciferase activity는 하고초 전초에 약간 감소하였으며 AP-1 결합부위가 mutation된 reporter gene에서 luciferase activity는 하고초 전초의 처리 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 3-59). 이상의 결과를 미루어 하고초 전초에 의하여 활성화 된 NF- κ B에 의해서 MMP-9의 발현이 조절되는 것을 확인할 수 있었다.

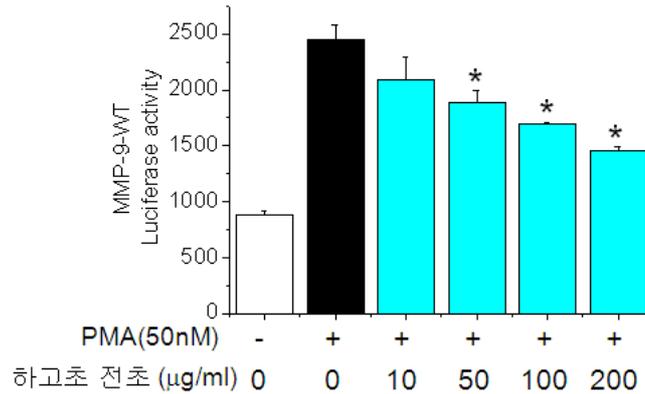


Fig. 3-58. Effects of *Prunella vulgaris* on PMA induced-MMP-9 dependent luciferase activity. The cells were transiently co-transfected with pCMV- β -gal and MMP-9 regulated luciferase reporter gene. After 4 h, cells were treated with or without various *Prunella vulgaris* in PMA for 24 h. Each bar shows the mean \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. *P < 0.05, significantly different from control (PMA).

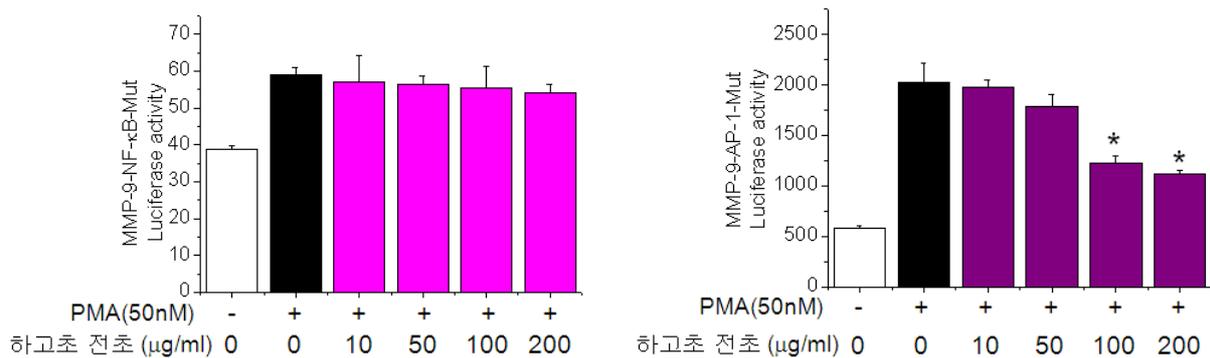


Fig. 3-59. Effects of *Prunella vulgaris* on PMA induced-MMP-9 point mutation promoter constructs luciferase activity. The cells were transiently co-transfected with pCMV- β -gal and MMP-9 point mutation luciferase reporter gene. After 4 h, cells were treated with or without various *Prunella vulgaris* in PMA for 24 h. Each bar shows the mean \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. *P < 0.05, significantly different from control (PMA).

HT-1080 cells에 NF- κ B activation inhibitor를 1시간 전 처리하고 고농도의 하고초 전초 또한 1시간 처리하였다. PMA를 24시간 처리한 후 RT-PCR법을 이용하여 mRNA의 발현을 조사한 결과, PMA에 의해 증가된 MMP-9의 발현이 고농도의 하고초 전초의 처리 농도에 의해 감소하였으며, NF- κ B activation inhibitor의 전 처리에 의해 MMP-9의 발현이 사라지는 것을 확인하였다 (Fig. 3-60). 또한, 수거한 배양액을 이용하여 gelatinase 활성을 조사한 결과, PMA에 의해 증가된 MMP-9의 활성이 고농도의 하고초 전초의 처리 농도에 의해 감소하였으며, NF- κ B activation inhibitor의 전 처리에 의한 MMP-9 활성 또한 유사하게 사라지는 것을 확인하였다 (Fig. 3-61).

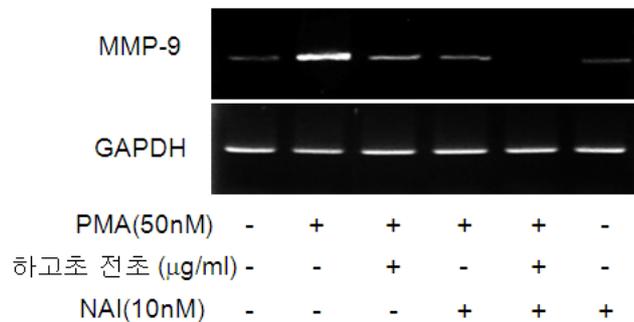


Fig. 3-60. Effect of *Prunella vulgaris* on PMA induced-MMP-9 expression. The cells were treated with 50 nM PMA for 24 h in the absence or presence of 10 nM NF- κ B activation inhibitor. Total RNA was isolated and then was analyzed for the MMP-9 and GAPDH expression by RT-PCR.

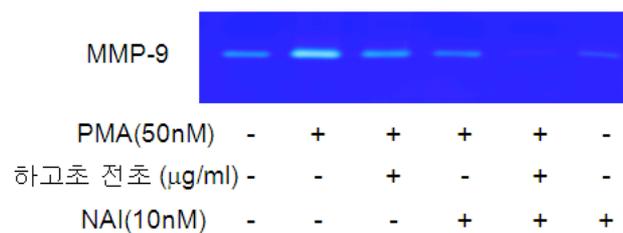
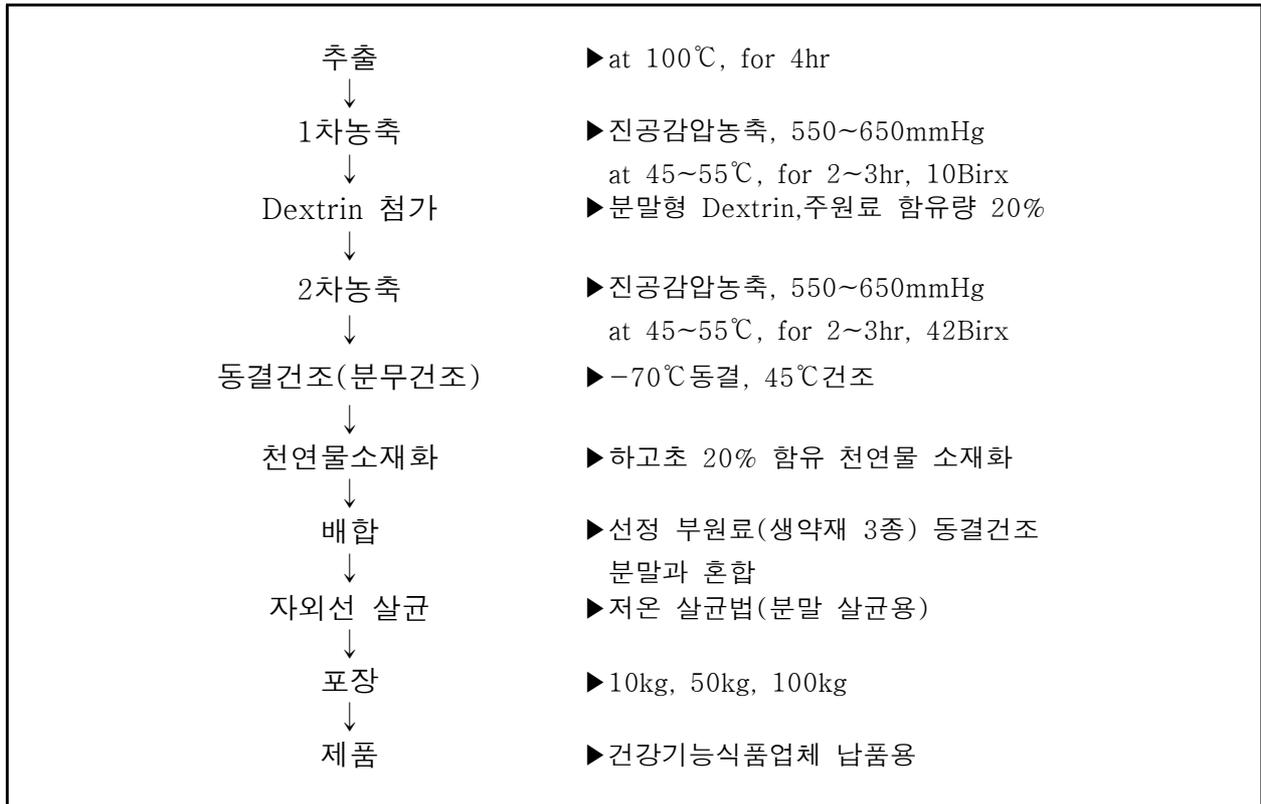


Fig. 3-61. Effect of *Prunella vulgaris* on PMA induced-MMP-9 activity. The cells were treated with 50 nM PMA for 24 h in the absence or presence of 10 nM NF- κ B activation inhibitor. Each conditioned media was collected and then was analyzed for the gelatinolytic activities by gelatin zymography.

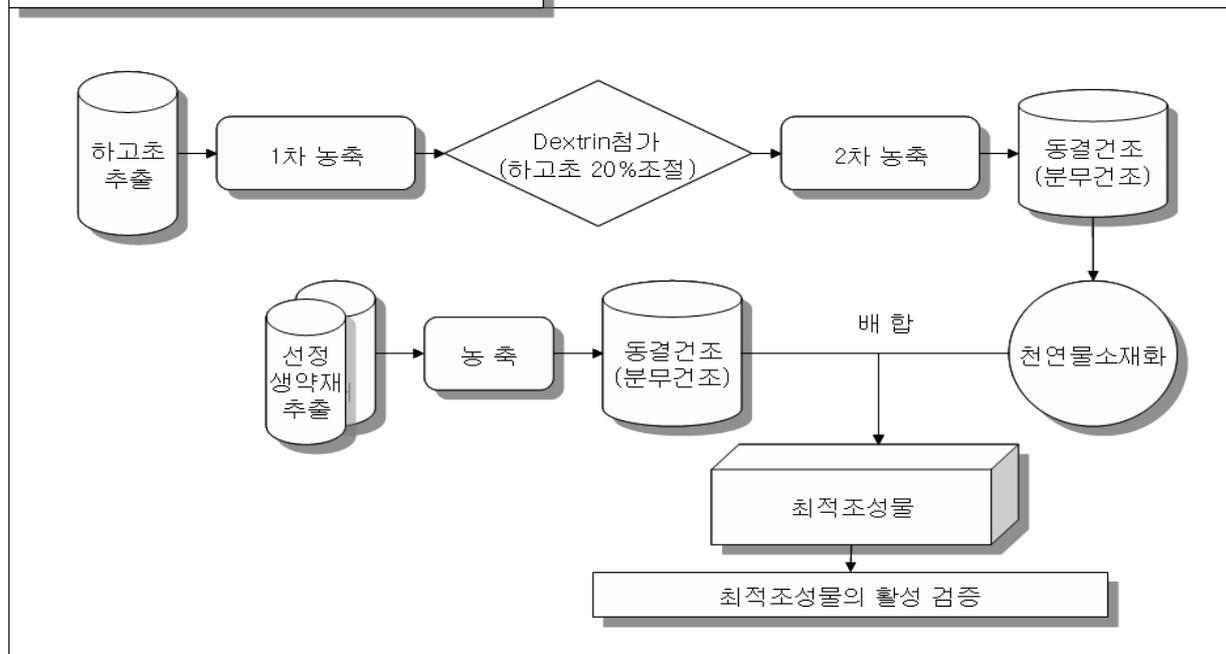
제5절 개발제품의 대량생산공정 개발

1. 하고초 신소재 및 조성물 제조공정

건강기능식품업체 납품용 하고초 천연물소재의 제조공정은 다음과 같다.



천연물신소재 및 최적조성물 개발 공정도



2. 하고초 제품별 제조방법 및 제조공정

가. 원료배합비

하고초를 주원료로 한 항고지혈증 액상제품의 배합비는 다음과 같다. 주원료인 하고초 15%, 부원료로는 대추, 감초, 미후등, 생강나무가 사용되었으며, 선정 생약재 외에 맛, 향, 색상을 위해 기업에서 최종 생산제품에는 첨가하고자 하였으며, 제품의 색상분석은 색차계의 L, a, b 값으로 나타내었다.

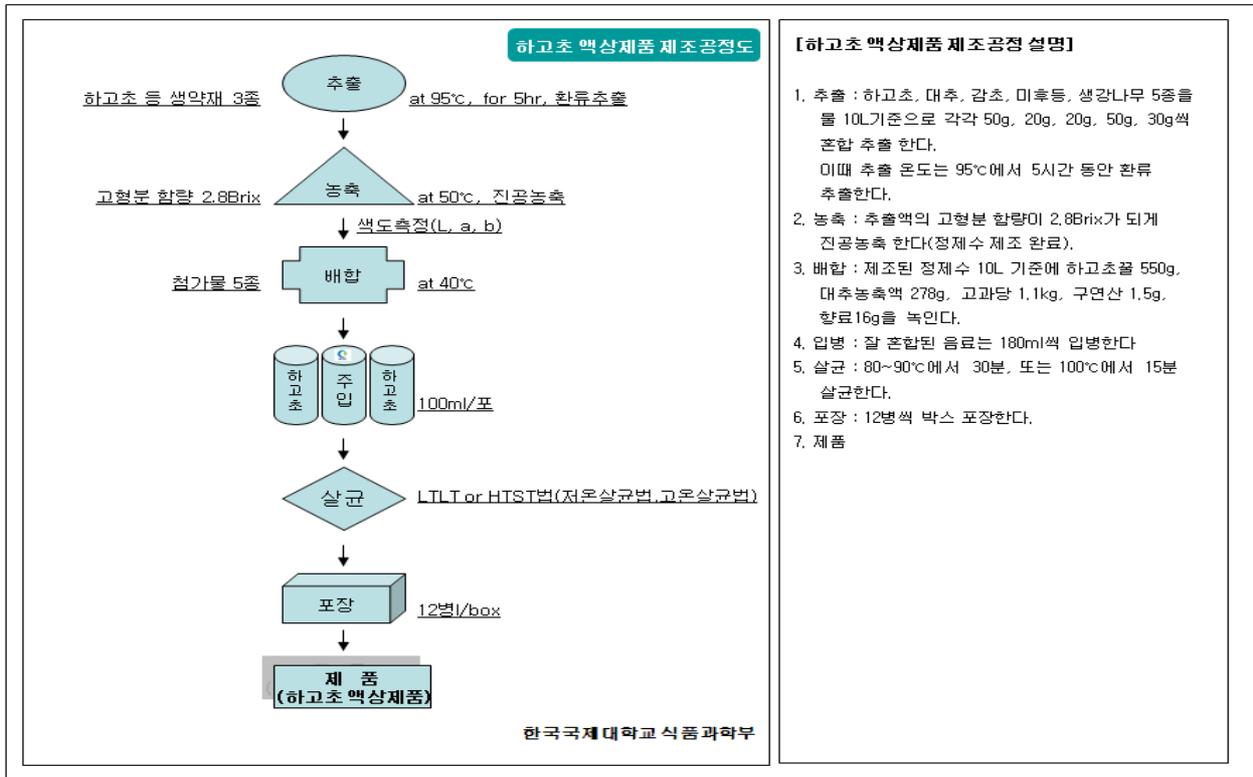
원료의 채취는 경남 함양군 백전면 양천마을(지리산 일대) 하고초 재배지(6만여평)에서 꽃이 지기 시작할 무렵(7월말경, 꽃피는 시기 : 5월 21~7월 21), 건조는 태양건조(양건), 절단은 약 2cm 정도의 크기로 하였으며, 추출은 95~100℃에서 4시간 동안 열수추출 하였다. 또한 농축공정에서는 열수추출액(1~2brix)이 30Brix가 되도록 진공농축(동결건조 효율에 적합한 농도가 되도록 20~30Brix도 가능) 하였으며, 농축된 시료는 동결건조하여 제품화 시료로 사용하였다.

【하고초 액상제품 배합비】

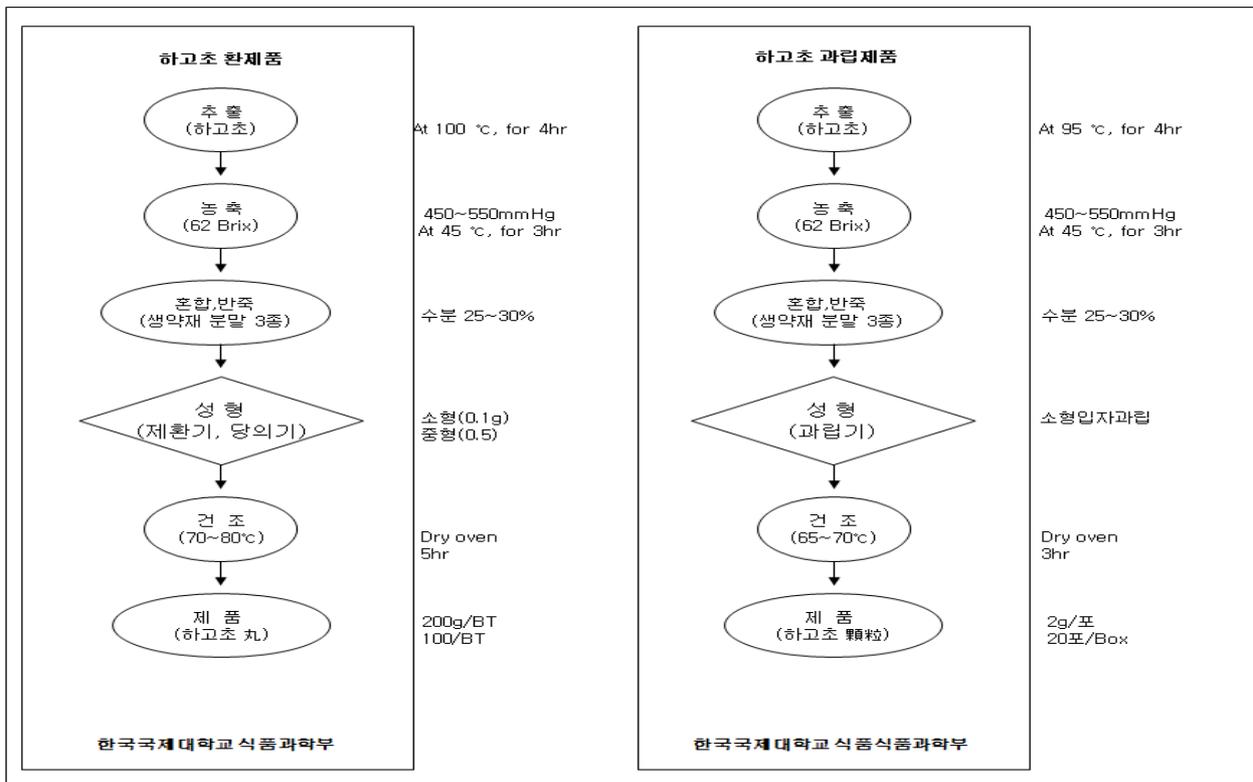
구분		시료명 및 물 1ℓ 당 배합량(g)			
		시료A(하고초추출액)	시료 B	시료 C	시료 D
하고초		15.0	15.0 초과	10~15(15)	10.0미만
대추		-	6.0 초과	4~6(5)	4.0미만
감초		-	2.5 초과	1.5~2.5(2)	1.5미만
미후등		-	20.0 초과	10~20(15)	10.0미만
생강나무		-	6.0 초과	4~6(5)	4.0미만
색상 (육안검사)		짙은 갈색 (연한 흑색)	짙은 갈색	연한 갈색	연한 노란색
색상 (색차계)	L(명도)	71.9	8.04	4.98	4.18
	a(+적, -녹)	0.74	1.53	-1.24	-0.85
	b(+노, -파)	6.41	7.46	3.30	1.61

* 부원료 배합비율 : 미공개.

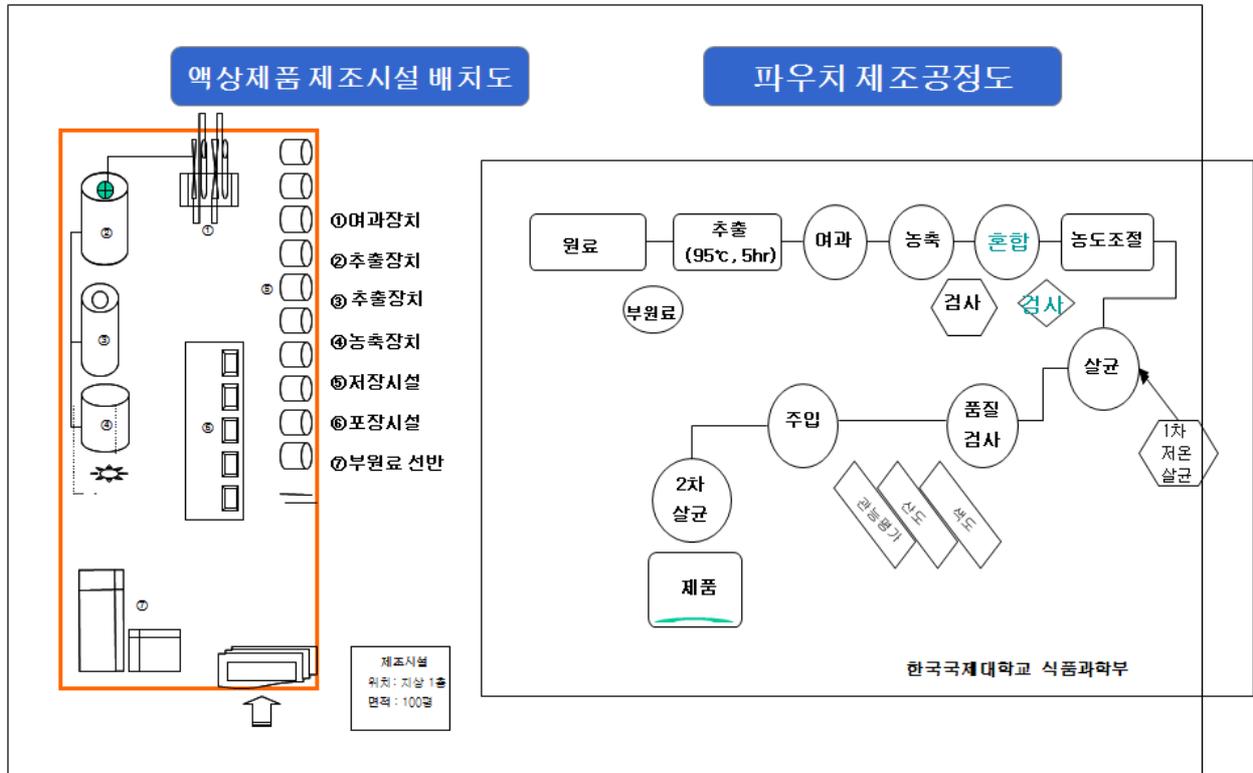
나. 하고초 액상제품 제조공정도



다. 하고초 환, 과립제품의 제조공정



3. 하고초 완제품 제조시설 배치도 및 공정도



—액상제품 생산라인—

제6절 하고초 상품화 연구

1. 제품별 포장디자인 개발

가. 액상제품 포장디자인

하고초를 주원료로 한 액상제품은 100ml씩 10포×3box 포장단위의 레토르트파우치 제품으로 선정하였으며, 포장디자인은 파우치 디자인, 인박스 및 아웃박스 디자인 및 시안제작을 완료하였다. 또한 각 제품은 함양군 지역특화품목으로서의 상품로고인 “물레방아 마크”를 부착하여 지역관광상품 유통시스템과 공동 판매전략을 수립, 시행하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

【A. 파우치 디자인】



【B. 인박스 디자인-새로】



【C. 아웃박스 디자인 I】



【D. 꿀음료 디자인】



나. 분말 및 고형제품 포장디자인

액상제품 외 개발 시제품은 천연물소재류, 과립차, 캡슐제품, 환제품 4종으로 선정하였으며, 각각의 제품포장디자인 개발은 다음과 같다.

【E. 하고초 건강기능식품 소재류】



【F. 하고초 과립차 제품】



【G. 하고초 캡슐 제품】



【H. 하고초 환 제품】



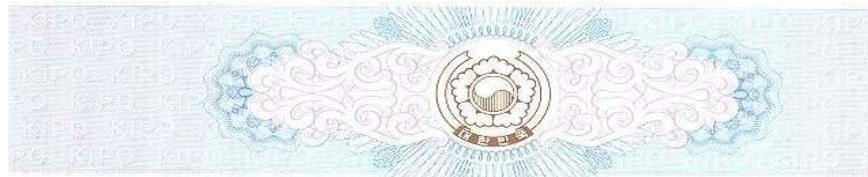
2. 상표개발

상표명 : 하늘빛고운초(하고초)

출원일 : 2006. 12. 20

등록일 : 2007. 07. 10

분 류 : 제 32 류 (음료용 야채주스 등 43건)



상표등록증

CERTIFICATE OF TRADEMARK REGISTRATION

등록 제 40-0716620 호 (REGISTRATION NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2006-0064530 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2006년 12월 20일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2007년 07월 10일

상표권자
(OWNER OF THE TRADEMARK RIGHT)
등록사항란에 기재

상표를 사용할 상품 및 구분
(LIST OF GOODS)

제 32 류
음료용 야채주스등 43건

하늘빛고운초

위의 표장은 「상표법」에 의하여 상표등록원부에 등록
되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE TRADEMARK IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2007년 07월 10일



특 허 청
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



3. 특허출원

가. 하고초를 이용한 건강음료의 제조방법

(Manufacturing Method of Health beverage comprising Prunella Herba extract)

본 발명은 물 1L당 하고초 10~15g, 대추 4~6g, 감초 1.5~2.5g, 미후등 10~20g 및 생강나무 4~6g의 비율로 건강음료재료를 혼합하는 단계; 상기 건강음료재료 혼합물을 열수추출하여 추출음료를 제조하는 단계;로 구성되는 하고초를 이용한 건강음료의 제조방법을 제공한다.

바람직하게는 상기 추출음료에 꿀 및 식품보조첨가제를 포함하는 단계를 더 포함하여 하고초를 이용한 건강음료의 제조방법을 제공할 수 있다. 이때, 더욱 바람직하게는 상기 꿀은 하고초꿀을 사용한다.

또한 식품첨가제로서는 대추농축액, 꿀향료, 고과당, 구연산을 사용하는 것이 바람직하며 이때 상세하게는 상기 하고초꿀 및 식품보조첨가제는 상기 추출음료 100ml당 하고초꿀 4~10g, 대추농축액 1~5g, 꿀향료 0.01~0.02ml, 고과당 5~15g, 구연산 0.01~0.02g의 비율로 포함되도록 한다.

(특허등록 완료 : 제 10-0749522호, 2007년 8월 8일, 특허등록증 별첨)

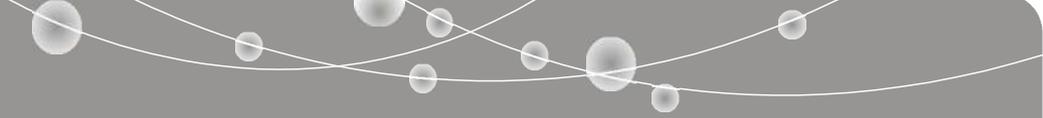
나. 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방, 치료 및 억제용 조성물

본 발명은 하고초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암질환의 예방, 치료 및 억제용 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암질환의 예방, 치료 및 억제용 약학제제 및 암질환의 예방, 개선 및 억제용 기능성 식품을 제공한다.

본 발명에 따른 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 대식세포, 비장 임파구, 자연살해세포 또는 림포카인활성살해세포 등의 면역계 활성화 증강 효과 및 암세포의 생장억제 또는 암 전이 억제 효과를 가지는 것으로 나타난다. 또한 이는 안전하고 독성이 없는 것으로 나타난다.

즉, 본 발명은 천연물 추출물로서 항암효과는 뛰어나고 부작용은 최소화된 암질환의 예방, 치료 및 억제용 조성물을 제공한다.

(특허등록 완료 : 제10-0849611호, 2008년 7월 25일, 특허등록증 별첨)



제4장 목표달성도 및
관련분야에의 기여도

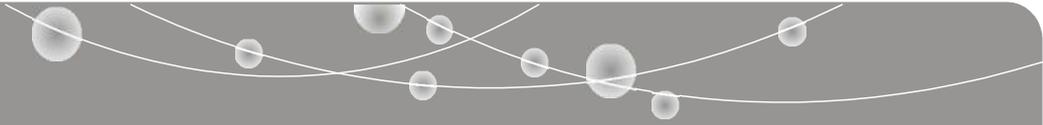
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

구분	연도	연구개발 목표	연구개발 내용	달성도(%)
1차 년도	2006	●원료(하고초)의 전처리 방법개발	●전처리 조건별 건조수율, 추출수율 측정 ●시료별 동결건조 수율 측정 및 조건선정	100
		●하고초의 꽃, 전초 및 뿌리의 유효성분 및 지표물질 함량 분석	●용매별 추출물의 유효성분 분석 ●메탄올 추출물의 지표물질 함량 분석 ●하고초꽃의 당함량 분석	100
		●하고초 추출용매별, 분획별 생물활성 검증	●하고초 전초추출물의 항산화활성 측정 ●유기용매 분획별 항균활성 측정 ●하고초 전초 및 뿌리의 항산화활성 비교	100
		●하고초 추출물의 면역활성 연구	●하고초의 면역조절관련 Cytokines의 생성연구 ●암세포 살해 및 성장억제 관련 면역활성 ●자연살해세포(NK cell)의 활성 측정 ●T 림프구의 증식 및 세포독성 T림프구 활성 측정	100
2차 년도	2007	●하고초의 최적 배합 조건 확립 및 최적 조성물 개발(생산공정확립)	●하고초 함유 최적배합조건 확립 ●최적조성물 개발 및 생산공정 확립	100
		●개발신소재의 생물활성 검증	●하고초 부위별 추출물의 항산화활성 연구 ●동물실험을 통한 항고지혈증 효과 연구	100
		●면역증강물질(지표물질)의 함량 분석	●열수추출물 및 MeOH 추출물의 지표 물질 함량분석	100
		●하고초의 대식세포 활성화 검증	●면역증강활성 관련 대식세포 활성화검증 - 탐식능 측정, 반응성 산소종(ROI) 및 NO 생성 측정 - B, T 임파구 증식반응에 대한 영향연구	100
3차 년도	2008	●하고초 추출물 및 유효성분의 항암 활성 검증	●In vivo 폐암전이, 고형암 억제능 측정 ●하고초 유용물질의 암세포 살해 및 성장 억제와 관련된 면역증강활성 연구 ●하고초 유용물질의 in vivo/in vitro암 전이 억제능 측정	100
		●대량생산 공정 구축	●하고초 천연물소재의 생산공정 구축 ●개발제품의 생산공정 최적화 연구	100
		●개발 시제품의 평가(저장성, 품질)	●개발시제품의 일반성분 및 영양성분 분석 ●개발시제품의 저장성 연구 ●개발시제품의 품질평가	100
		●개발시제품의 생물활성 검증	●동물실험을 통한 개발제품의 섭취량에 따른 항고지혈증 활성 연구	100
		●시제품 생산 및 상품화 ●산업재산권 출원 및 등록	●유형별 시제품 생산 (분말류, 액상류) ●특허등록 2건, 상표등록 1건 완료	100

2. 관련분야 기여도

- 본 연구를 통하여 함양군과 경상남도농업기술원(함양약초시험장)에서 전략 육종품목으로 개발되어 생산되고 있는 하고초(꿀풀)의 유용물질의 함량을 분석하고, 이러한 생리활성물질을 이용하여 항고지혈증 활성, 항산화활성, 항균활성에 대한 전반적인 활성검증을 완료함과 동시에 면역활성 및 암전이 억제와 관련된 유전자 발현을 조절할 수 있는 효능을 지닌 물질을 탐색하고 그 기전을 밝혀냄으로서, 혈액순환기질환 예방 및 개선용 식품과 면역증강용 기능성식품 개발 및 실용화를 위한 기반기술을 제공함.
- 또한 이러한 연구결과는 하고초(꿀풀)가 외부의 물리, 화학 및 생체적 스트레스에 대한 생체저항성을 강화시키며, 면역증강능 및 항암 활성을 가지고 있는 것이 확인되었으므로, 향후 면역조절물질 및 의약품 소재로의 개발이 기대됨.
- 최근 선진국들의 시장 개방 압력과 물질 특허 독점에 따라 국내 산업을 보호하고 국제경쟁력을 확보를 위해서는 우리가 사용해 온 식용식물 등의 천연물로부터 약리 효능을 가진 기능성 물질의 개발과 이들 물질들의 생체영양 및 독성 평가는 매우 시급하면서도 중요한 과제인 것으로 사료됨.
- 현재까지 개발된 면역조절제는 미생물, 합성화합물 및 호르몬 등이며, 천연물로부터 개발된 것은 이끼벌레에서 분리한 Bryostatin이 면역증강제로 사용 중에 있고, 남아공화국에서 서식하는 나무의 껍질에서 분리한 Quil A(*saponin*)가 면역보조제로서 알려져 있어 식물로부터의 면역조절제 개발 가능성은 매우 크다고 할 수 있음.
- 전세계적으로 부작용 및 독성이 적으면서 높은 항암효과를 나타내는 새로운 물질을 천연물(생약)로부터 찾고 있지만 아직까지 만족할 만한 치료제는 개발되지 않고 있는 실정임.
- 따라서 현대 과학적 기술을 활용하여 하고초의 유용성분으로부터 면역활성 증진, 암전이 억제, 항고지혈증 및 항산화활성을 가진 다양한 질환의 예방 효능을 지닌 물질들을 탐색하여 천연물 소재와 관련한 신기능성 소재를 개발한다면 천문학적 규모의 건강기능식품 (영양의학식품, 영양유전체식품) 및 의약품시장에서 수입대체효과는 물론 고부가가치 상품화를 통해 국가경제발전에 크게 기여할 것으로 사료됨.



제5장 연구개발 성과 및
성과활용 계획

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과 및 활용계획

가. 실용화 실적

생산제품명	실적(건)	성과활용계획
① 하늘빛고운초 진액(하고초 진액)	1	기술이전(생산 판매중)
② 하고초 건강기능식품신소재	1	건강기능식품 생산전문업체 소재 납품 예정
③ 하고초 음료	1	OEM 생산 계획
④ 일반식품(환, 과립)	2	직접생산 예정

나. 특허등록 실적

특 허 명	실적(건)	성과활용계획
① 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방, 치료 및 억제용 조성물 (특허 제 10-0749522호, 2007년 8월 8일 등록)	2	기술이전 및 상품생산 예정
② 하고초를 이용한 건강음료의 제조방법 (특허 제10-0849611호, 2008년 7월 25일, 특허등록)		
③ 하고초의 항고지혈증 활성 조성물	1	출원예정(2009.5월)
④ 상표등록 (하늘빛고운초)	1	함양군 하고초 특산품 및 패키지 제품에 활용

다. 논문 및 학술발표 실적

구 분	논 문 명	성과활용 계획
SCI (해외)	① Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Yong Pil Hwang, Hye Jin Park, Chul Yung Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2009) Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> . <i>Food and Chemical Toxicology</i> 47(1): 62-69.	특허등록 및 기술이전
등재 학술지 (국내)	② 이수정, 성낙주, 정혜광, 신정혜, 정영철, 서종권 (2008) 하고초 메탄올 추출물의 항산화 활성 (Antioxidant activities of methanol extracts from <i>Prunella vulgaris</i>) 한국식품영양과학회지 37(12): 1535-1541	특허등록 및 기술이전
학술발표 (해외)	③ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2008) Immunomodulatory effect of extracts aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> in RAW 264.7 cells. <i>2008 Annual Conference. Nutraceutical, Functional Foods, Natural Health Products and Dietary Supplements</i> . 2008. November 14-17. Taichung, Taiwan. (2008 International Society for Nutraceuticals and Functional foods. (2008 ISNFF) 국제기능성식품학회)	제품개발 기반기술
학술발표 (해외)	④ Eun Hee Han, Jin Hee Park, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2009) Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> . <i>The 48th Annual Meeting of Society of Toxicology</i> , Baltimore, MA, USA. Mar 15-19. (미국 독성학회)	제품개발 기반기술
학술발표 (해외)	⑤ Jong Kwon Seo, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Hye Gwang Jeong (2009) <i>Prunella vulgaris</i> inhibits tumor cell metastasis and growth by modulating expressions of matrix metalloproteinase-9. <i>The 48th Annual Meeting of Society of Toxicology</i> , Baltimore, MA, USA. Mar 15-19. (미국 독성학회)	제품개발 기반기술
학술발표 (국내)	⑥ Eun Hee Han, Kim Ji Young, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2006) Immunostimulatory Effects of <i>Prunella vulgaris</i> . <i>58th Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea</i> . November 6-7. Seoul (대한약학회)	제품개발 기반기술
학술발표 (국내)	⑦ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) <i>Prunella vulgaris</i> Increases the Lymphocyte Proliferation and Natural Killer Cell Activity. <i>Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea</i> . April 30-May 3. Jeju, Korea (대한약학회-춘계)	제품개발 기반기술
학술발표 (국내)	⑧ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) Effects of flower and stalk from <i>Prunella vulgaris</i> on the macrophage functions. <i>Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea</i> . April 30-May 3. Jeju, Korea (대한약학회-춘계)	제품개발 기반기술

구 분	논 문 명	성과활용 계획
학술발표 (국내)	⑨ Eun Hee Han, Jin Hee Park, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) Effects of Aqueous Extract Isolated from <i>Prunella Vulgaris</i> on Macrophage activation. <i>Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea</i> . October 23-24. Seoul, Korea (대한약학회-추계)	제품개발 기반기술
학술발표 (국내)	⑩ Seo Jong Kwon, Soo Jung Lee, Jung Hye Shin, Young Chul Chung, Hey Gwang Jeong, Nak Ju Sung. (2008) Antioxidative Activities of Hagocho (<i>Prunella vulgaris</i>) Methanol Extracts. <i>49th International Symposium of Korean Society of Life Science</i> . October 10-11. Taejeon, Korea (한국생명과학회-추계)	제품개발 기반기술

라. 인력양성실적

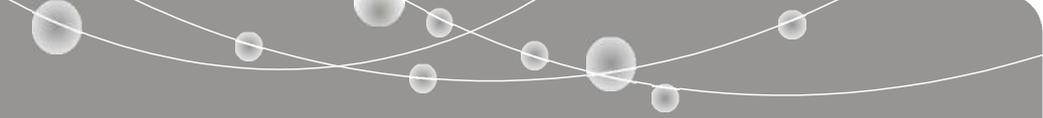
지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
3	2	1			1	2			3

마. 수상실적

일 자	대회명	수상명	역할
2008-10	제54회 전국과학전람회	교육과학기술부장관상 (우수상 수상)	과학전람회 참가 지도교수

바. 언론홍보실적

구 분	계
TV (방송) 홍보실적	6건
신문 (기사) 홍보실적	23건
국내외 전시 (박람회) 참가실적	5건
합 계	34건



제6장 연구개발과정에서 수집한
해외과학기술정보

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 현재 EU에서는 “ The Functional Food Science in Europe (FUFOSE) ” 이란 협력체를 결성해 독일, 영국, 네덜란드, 프랑스, 스페인, 벨기에 6개국이 모여 기능성식품에 대한 과학적인 평가방법과 biomarker (생체표지자)의 개발에 주력하고 있음. FUFOSE 에서 발표한 6가지 생리학 영역 중 첫 번째 항목인 성장.발달.분화와 관련한 분야에는 면역기능조절 과 관련한 부분이 그 하위 항목으로 포함돼 있어, 면역기능 조절 관련 식품 소재개발 및 평가방법 구축을 위해 연구하고 있음 (건강기능식품 실태조사 및 분석, 2004).
- 중국에서는 1996년 보건기능식품법과 보건식품을 위한 일반 위생 규칙을 제정하고 24가지 보건식품의 기능을 정해 각각 그 기능성에 대한 평가를 위한 기본 요구사항, 검사항목, 검사 결과 등 평가절차와 검사방법 및 식품안전성에 관한 독성학적 시험절차를 확립해 실시하고 있음. 24가지 항목 중 그 첫 번째 항목이 바로 면역기능 조절과 관련한 항목임. 여기에는 면역기능 증진기능이 포함돼 있음 (건강식품관리법규총집, 1997).
- 면역기능 조절 관련 식품의 특허가 가장 많은 미국의 경우 면역 증가와 억제효과의 평가는 물론 면역 독성의 평가에 모두 활용되는 미국의 “National Toxicology Programs Guideline for Immunotoxicity Evaluation”을 보면, 면역증가에 대한 평가는 대식세포 (macrophages)의 활성도를 측정하는 방법과 plaque 형성 세포 측정, T 림프구의 활성도 측정, 자연살해세포 (natural killer cell, NK cell)의 활성도 를 측정하는 방법 등이 있음. 그리고 세포 자체의 활성도와 그 형성도 뿐만 아니라 면역세포에서 분비되는 interleukin (IL)이나 tumor necrosis factor (TNF)와 같은 각종 cytokine (세포활성물질)을 분석하는 방법을 활용한 평가방법이 실제로 많이 이뤄지고 있음.
- 제품의 면역력증진 효과 연구 예
 - 키틴-키토산 (Chitin-Chitosan)은 면역글로불린 생성, 보강활성(adjuvant activity), 세포활성물질 생성, 폐 대식세포의 초회 항원 자극 등을 통해 면역능 증진 효과를 조사하였음 (Nishimura et al., 1985).
 - 초유 (colostrum)에 대하여 스테미너 증강효과 및 항피로효과와 면역증진기능과의 관련성을 평가하였음 (Matsumoto et al., 1996).
 - 에키네시아 (Echinacea)는 감기와 독감 그리고 감염증을 예방하고 치료하기 위해 북미대륙의 인디안들에 의해 통상적인 민간약초요법으로써 사용돼 온 북미의 자생 식물임. 이 식물의 면역능 증진 효과를 평가하기위해 대식세포에서 세포활성물질의 발현 증가, 면역관련 세포 수의 증가 등을 조사한 예가 있음 (Burger et al., 1997; Percival, 2000; Tragni et al., 1985; Tubaro et al., 1987, 1988)



제7장 참고문헌

제7장 참고문헌

1. Kim SY, Ryu KS, Lee WC, Ku HO, Lee HS, Lee KR. 1999. Hypoglycemic effect of mulberry leaves with anaerobic treatment in alloxan-induced diabetic mice. *Korean J Pharmacogn* 30: 123-129.
2. Cho YJ, Ju IS, Chun SS, An BJ, Kim JH, Kim MU, Kwon OJ. 2008. Screening of biological activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 276-281.
3. Huang MT, Ho CT, Lee CY. 1992. Phenolic compounds in food. In Phenolic compounds in food and their effects on health II. Maple Press, New York, USA 99, pp2-7.
4. Kim JS, Kang SS, Lee KS, Chang SY, Won DH. 2000. Quantitative determination of ursolic acid from *Prunellae herba*. *Kor J Pharmacogn* 31: 416-420.
5. Sandra J. 1963. Phytochemical studies of *Prunella vulgaris* and *Prunella grandiflora*. - I. Saponin and triterpene compounds. *Dissertationes Pharm* 15: 333-341.
6. Wang ZJ, Zhao YY, Tu GZ, Hong SL, Chen YY. 1999. Studies on the chemical constituents from *Prunella vulgaris*. *Acta Pharm Sin* 34: 679-681.
7. Lam TL, Lam ML, Au TK, Ip DTM, Ng TB, Fong WP, Wan DCC. 2000. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 67: 2889-2896.
8. Ryu SY, Oak MH, Yoon SK, Cho DI, Yoo GS, Kim TS, Kim KM. 2000. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med* 66: 358-360.
9. Liu F, Ng TB. 2000. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci* 66: 725-735.
10. Joung YM, Park SJ, Lee KY, Lee JY, Suh JK, Hwang SY, Park KE, Kang MH. 2007. Antioxidative and antimicrobial activities of *Lilium* species extracts prepared from different aerial parts. *Korean J Food Sci Technol* 39: 452-457.
11. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. 2000. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower(*Carthamus tinctorius* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1127-1132.
12. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
13. Gutfinger T. 1958. Polyphenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.

14. Moreno MIN, Isla MIN, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J Ethnopharmacology* 71: 109–114.
15. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199–1200.
16. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr* 44: 307–315.
17. Gutteridge JM. 1984. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem J* 224: 761–767.
18. Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidant. *J Am Oil Chem Soc* 61: 928–931.
19. Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice–Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTs radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26: 1231–1237.
20. Song HS, Moon KY. 2006. In vitro antioxidant activity profiles of β -glucans isolated from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Food Sci Biotechnol* 15: 437–440.
21. Kim DS, Ahn BW, Yeum DM, Lee DW, Kim ST, Park YH. 1987. Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. *Bull Korean Fish Soc* 20: 463–468.
22. Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 7–14.
23. Kang YH, Oark YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Technol* 27: 978–984.
24. Won JT, Kim DH. 1980. Antioxidant activity of various solvents extracts obtained from maillard-type browning reaction mixture. *Korean J Food Technol* 12: 235–241.
25. Shin MJ, Yoon HH, Ahn MS. 2002. A study on the relations between the color intensity and the antioxidant activity of caramelization products. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 18: 603–612.
26. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Technol* 36: 333–338.
27. Lee YM, Shin HD, Lww JJ, Lee MY. 2007. Antioxidative effect of *Chaenomelis Fructus*

- ethanol extract. *Korean J Food Preserv* 14: 177–182.
28. Moon JS, Kim SJ, Park YM, Hwang IS, Kim EH, Park JW, Park IB, Kim SW, Kang SG, Park YK, Jung ST. 2004. Activities of antioxidation and alcohol dehydrogenase inhibition of methabol extracts from some medicinal herbs. *Korean J Food Preserv* 11: 201–206.
 29. Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 405–409.
 30. Choi CS, Song ES, Kim JS, Kang MH. 2003. Antioxidative activities of *Castanea Crenata Flos.* methanol extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1216–1220.
 31. Choi SI, Lee YM, Heo TR. 2003. Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 282–288.
 32. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723–727.
 33. David AW, Ljubuncic P. 2001. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacol Therape* 89: 295–308.
 34. Ding AH, Nathan CF, Stuhr DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141: 2407–2412.
 35. Song HS, Kim DP, Jung YH, Lee MK. 2007. Antioxidant activities of red Hamcho (*Salicornia herbacea* L.) against lipid peroxidation and the formation of radicals. *Korean J Food & Nutr* 20: 150–157.
 36. Lim SM, Cho YS, Kim EJ, Bae MJ, Han JP, Lee SH, Sung SK. 1998. Effect of hot water extracts of *Salvia miltiorrhiza* Bge., *Prunus persica* Stokes, *Angelica gigas* Nakai and *Pinus strobus* on lipid oxidation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 399–405.
 37. Aljada, A., Ghanim, H., Mohanty, P., Hofmeyer, D., Tripathy. and Dandona, P. (2001) Hydrocortisone suppresses intranuclear activator–protein–1 (AP–1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP–2 and MMP–9). *The journal of clinical endocrinology & metabolism.* 86: 5988–5991.
 38. Banerji, A., Chakrabarti, J., Mitra, A. and Chatterjee, A. (2004) Effect of curcumin on gelatinase A (MMP–2) activity in B16F10 melanoma cells. *Cancer letters.* 211: 235–242.
 39. Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G, Kim, S.H, Kim, J.G. and Kim, C.H. (2004) Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl

- ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB journal*. 18: 1670–1681.
40. Eberhardt, W., Huwiler, A., Beck, K., Walpen, S. and Pfeilschifter, J. (2000) Amplification of IL-1 β -induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF- κ B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *The journal of immunology*. 165: 5788–5797.
41. Kousidou, O.C., Tzanakakis, G.N. and Karamanos, N.K. (2006) Effects of the natural isoflavonoid genistein on growth, signaling pathways and gene expression of matrix macromolecules by breast cancer cells. *Mini-reviews in medicinal chemistry*. 6: 331–337.
42. Nagase, H., Ikeda, K. and Sakai, Y. (2001) Inhibitory effect of magnolol and honokiol from magnolia obovata on human fibrosarcoma Ht-1080 invasiveness in vitro. *Planta Medica*. 67: 705–708.
43. Mook, O.F., Frederiks, W.M. and Noorden C.J. (2004) The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et biophysica acta*. 1705: 69–89.
44. Rose, P., Huang, Q., Ong, C.N. and Whiteman, M. (2005) Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 209: 105–113.
45. Sakaida, I., Hironaka, K., Kimura, T., Terai, S., Yamasaki, T. and Okita, K. (2004) Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. *Life sciences*. 74: 2251–2263.
46. Shim, B.S., Park, K.K. and Choi, S.H. (2003) Anti-metastatic effects of fuzhengfangaitang on human fibrosarcoma cells HT1080. *The american journal of chinese medicine*. 31: 235–246.
47. Visse, R. and Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*. 92: 827–839.
48. Woo, J.H., Park, J.W., Lee, S.H., Kim, Y.H., Lee, I.K., Gabrielson, E., Lee, S.H., Lee, H.J., Kho, Y.H. and Kwon, T.K. (2003) Dykellic acid inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting nuclear factor κ B transcriptional activity. *Cancer research*. 63: 3430–3434.
49. Ryu BH. (1992) Antitumor and immunologic activity of chitosan extracted from shell of

- shrimp. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21, 154–162.
50. Kim SW, Kim ES. (1997) Studies on the immunomodulating effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26, 148–153.
 51. Son EH, Park JH, Kim KR, Kim BO, Rhee DK, Pyo SK. (1998) Effects of the administration of Bezoar Bovis on immune responses of mice. *Kor. J. Pharmacogn.* 29, 48–55.
 52. Kim BK, Chung KS, Choi EC, Kim HR, Park HJ, Cho PH. (1983). Immunological studies on Oriental pharmaceutical preparations. *Kor. J. Pharmacog.* 14, 125–129.
 53. Lee JW, Baek SJ, Bang KW, Kim YS, Kim KS, Chun UH. (2001) Immunomodulatory activities by difference in molecular size of the proteoglycan extracted from *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor. J. Mycol.* 29, 15–21.
 54. Kim KH, Jung IS, Chung HY, Jo SK, Yun YS. (1997) Preclinical evaluation of polysaccharides extracted from Korean Red-ginseng as an antineoplastic immunostimulator. *Korean. J. Ginseng. Sci.* 21, 78–84.
 55. 건강기능식품 실태조사 및 분석. (2001) 한국보건산업진흥원.
 56. 건강식품관리법규총집. (1997) 중화인민공화국 위생부 위생감독국
 57. Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Numata F, Tone Y, Tokura S, Azuma I. (1985) Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea pigs. *Vaccine.* 3, 379–384.
 58. Matsumoto T, Ono Y, Watanabe T, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M, Matahira Y, Sakai K. (1996) Effect of long term oral administration of chitin, partially degraded chitin and N-acetyl chitooligosaccharide on immunological and blood enzyme levels in aged mice. *Chitin Chitosan Research, Proceeding of the 10th Symposium, Japanese Society for Chitin and Chitosan (abstract A3)* 2, 94–95.
 59. Burger RA, Torres AR, Warren RP, Caldwell VD, Hughes BG. (1997) Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. *Int J Immunopharmacol.* 19, 371–379.
 60. Percival SS. (2000) Use of echinacea in medicine. *Biochem Pharmacol.* 15, 155–158.
 61. Tragni E, Tubaro A, Melis S, Galli CL. (1985) Evidence from two classic irritation tests for an anti-inflammatory action of a natural extract, Echinacina B. *Food Chem Toxicol* 23, 317–319.
 62. Tubaro A, Tragni E, Del Negro P, Galli CL, Della Loggia R. (1987) Anti-inflammatory activity of a polysaccharide fraction of *Echinacea angustifolia*. *J Pharm Pharmacol.* 39, 567–569.

63. Tragni E, Galli CL, Tubaro A, Del Negro P, Della Loggia R. (1988) Anti-inflammatory activity of *Echinacea angustifolia* fractions separated on the basis of molecular weight. *Pharmacol Res Commun.* 20, 87-90.

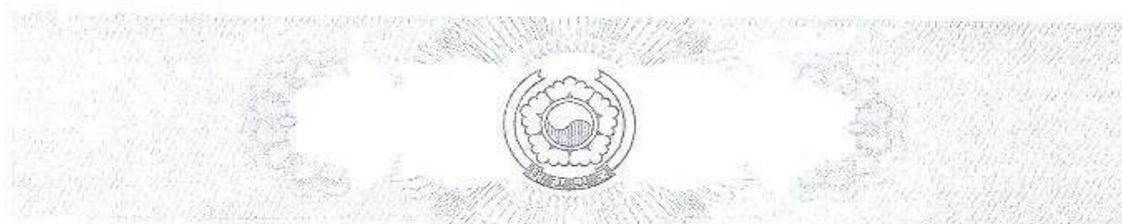


부 록

1. 특허등록증
2. 상표등록증
3. 학술논문(SCI,KCI)
4. 학술발표자료(국내외)
5. 수상실적
6. 홍보자료(방송,신문)
7. 국내외 전시(박람회)자료

【특허 등록자료】

● 특허 1



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-0849611 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2006-0129385 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2006년 12월 18일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2008년 07월 25일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방, 치료
및 억제용 조성물

특허권자 (PATENTEE)

한국국제대학교 산학협력단(191171-0*****)
경남 진주시 문산읍 상문리 산 270

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록
되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2008년 07월 25일



특 허 증
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



발송번호: P-5-2008-032852240
 발송일자: 2009.06.19

수신 서울 서초구 서초동 1451-30 동서빌딩 501호(동양국제특허법률사무소)
 신동인

137-070

YOUR INVENTION PARTNER

특 허 칭
 특허결정서

출원인	영 칭	한국과학기술연구원 (출원번호: 2000-10427508)
주 소	주 소	경남 진주시 문산읍 상운리 산 270
대리인	영 칭	신동인
주 소	주 소	서울 서초구 서초동 1451-30 동서빌딩 501호(동양국제특허법률사무소)
발명자	영 칭	정혜량
주 소	주 소	광주 동구 산수동
발명자	영 칭	정영철
주 소	주 소	경상남도 진주시 하대2동
발명자	영 칭	한은희
주 소	주 소	광주 서구 용유동
발명자	영 칭	최재효
주 소	주 소	광주 북구 양산동
발명자	영 칭	서충관
주 소	주 소	경상남도 진주시 명거동 191-1
출원번호	번 호	10-2006-0129385
발명명의	영 칭	하고초 추출물을 유효성원으로 함유하는 암집합의 예방, 치료 및 억제용 조성물
청 구 항	항	2

이 출원은 특허법 제66조의 규정에 의하여 특허결정합니다.
 (특허법 제87조의 규정에 따라 특허권은 특허원을 납부하여 실정등록함으로써 발생하게
 합니다.) 함.

[참고문헌]

1. 대한한방내과학회지 18(1): 175-90, 1997
2. Int. J. Mol. Med. 16(6): 1109-16

● 특허 2



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-0749522 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2006-0129386 호
	출원일 (FILING DATE: YY/MM/DD)	2006년 12월 18일
	등록일 (REGISTRATION DATE: YY/MM/DD)	2007년 08월 08일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
하고초를 이용한 건강음료의 제조방법

특허권자 (PATENTEE)
등록사항란에 기재

발명자 (INVENTOR)
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록
되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2007년 08월 08일



특 허 칭
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



등록사항

특허등록제 10-0749522 호

(PATENT NUMBER)

특허권자

(PATENTEE)

진주국채대학교 산학협력단(191171-0*****)
경남 진주시 문산읍 삼문리 산 270

합양군

경남 합양군 합양읍 윤림리 31-2

발명자

(INVENTOR)

시종권(701028-1*****)
경상남도 진주시 뽕거동 191-1

정영철(600420-1*****)
경상남도 진주시 하대2동

생낙주(500127-1*****)
경남 진주시 가좌동

박경엽(840903-1*****)
경남 진주시 장재동

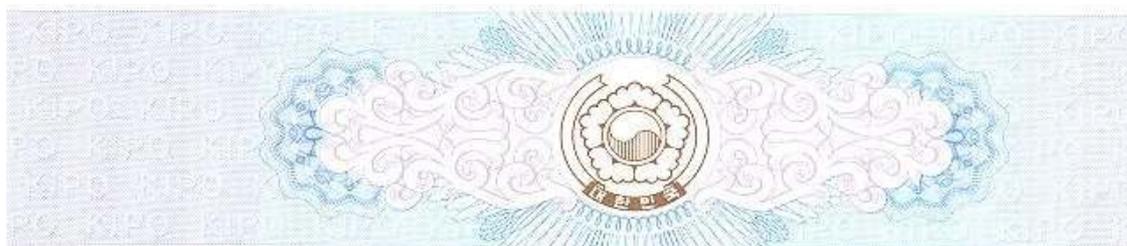
정원철(870206-1*****)
경남 마산시 진동면

김수진(850329-2*****)
경남 진주시 하대동

이소영(870224-2*****)
경남 합양군 빽수면

서민영(860605-2*****)
경남 진주시 신안동

【상표 등록자료】



상표등록증

CERTIFICATE OF TRADEMARK REGISTRATION

등록 제 40-0716620 호 (REGISTRATION NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2006-0064530 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2006년 12월 20일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2007년 07월 10일

상표권자
(OWNER OF THE TRADEMARK RIGHT)
등록사항란에 기재

상표를 사용할 상품 및 구분
(LIST OF GOODS)

제 32 류
음료용 야채주스등 43건

하늘빛고운초

위의 표장은 「상표법」에 의하여 상표등록원부에 등록
되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE TRADEMARK IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2007년 07월 10일



특 허 청

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

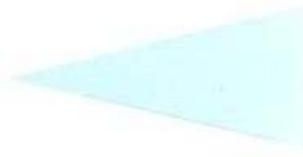


등록 사항

상 표 등록 제 40-0716620 호
(REGISTRATION NUMBER)

상 표 권 자 (OWNER OF THE TRADEMARK RIGHT)
진주국제대학교 산학협력단(191171-0*****)
경남 진주시 문산읍 상문리 산 270

함양군
경남 함양군 함양읍 운림리 31-2



【학술논문 및 학술발표】

구분	논문명	성과활용 계 획
SCI (해외)	① Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Yong Pil Hwang, Hye Jin Park, Chul Yung Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2009) Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> . <i>Food and Chemical Toxicology</i> 47(1): 62-69.	특허등록 및 기술이전용
등재 학술지 (국내)	② 이수정, 성낙주, 정혜광, 신정혜, 정영철, 서종권 (2008) 하고초 메탄올 추출물의 항산화 활성 (Antioxidant activities of methanol extracts from <i>Prunella vulgaris</i>) 한국식품영양과학회지 37(12): 1535-1541	특허등록 및 기술이전용
학술발표 (해외)	③ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2008) Immunomodulatory effect of extracts aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> in RAW 264.7 cells. 2008 Annual Conference. <i>Nutraceutical, Functional Foods, Natural Health Products and Dietary Supplements</i> . 2008. November 14-17. Taichung, Taiwan. (2008 International Society for Nutraceuticals and Functional foods. (2008 ISNFF) 국제기능성식품학회)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (해외)	④ Eun Hee Han, Jin Hee Park, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2009) Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from <i>Prunella vulgaris</i> . <i>The 48th Annual Meeting of Society of Toxicology</i> , Baltimore, MA, USA. Mar 15-19. (미국 독성학회)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (해외)	⑤ Jong Kwon Seo, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Hye Gwang Jeong (2009) <i>Prunella vulgaris</i> inhibits tumor cell metastasis and growth by modulating expressions of matrix metalloproteinase-9. <i>The 48th Annual Meeting of Society of Toxicology</i> , Baltimore, MA, USA. Mar 15-19. (미국 독성학회)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑥ Eun Hee Han, Kim Ji Young, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong (2006) Immunostimulatory Effects of <i>Prunella vulgaris</i> . 58th Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea. November 6-7. Seoul (대한약학회)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑦ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) <i>Prunella vulgaris</i> Increases the Lymphocyte Proliferation and Natural Killer Cell Activity. Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea. April 30-May 3. Jeju, Korea (대한약학회-춘계)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑧ Eun Hee Han, Jae Ho Choi, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) Effects of flower and stalk from <i>Prunella vulgaris</i> on the macrophage functions. Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea. April 30-May 3. Jeju, Korea (대한약학회-춘계)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑨ Eun Hee Han, Jin Hee Park, Young Chul Chung, Jong Kwon Seo, Hye Gwang Jeong. (2008) Effects of Aqueous Extract Isolated from <i>Prunella Vulgaris</i> on Macrophage activation. Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea. October 23-24. Seoul, Korea (대한약학회-추계)	제품개발 기반기술로 활용
학술발표 (국내)	⑩ Seo Jong Kwon, Soo Jung Lee, Jung Hye Shin, Young Chul Chung, Hey Gwang Jeong, Nak Ju Sung. (2008) Antioxidative Activities of Hagocho (<i>Prunella vulgaris</i>) Methanol Extracts. 49th International Symposium of Korean Society of Life Science. October 10-11. Taejeon, Korea (한국생명과학회-추계)	제품개발 기반기술로 활용

①



Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from *Prunella vulgaris*

Eun Hee Han^a, Jae Ho Choi^a, Yong Pil Hwang^a, Hye Jin Park^a, Chul Yung Choi^b, Young Chul Chung^b, Jong Kwun Seo^b, Hye Gwang Jeong^{a*}

^a NCI Project (S004), Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Research Center for Traditional Materials, Chonnam University, 307 Seosuk-dong, Gwangju 501-758, South Korea
^b Division of Cell Science, Korea Occupational Safety and Health Agency, Seoul, Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 July 2008
Accepted 1 October 2008
Available online xxx

Keywords:
Prunella vulgaris
Macrophage
Phagocytosis
NF- κ B
MAPK

ABSTRACT

Prunella vulgaris (*P. vulgaris*) has been used as a traditional medicine in the clinical treatment of herpesic keratitis and for its antioxidative and antimicrobial activities. In this study, we examined the immunostimulatory and anti-tumor activity of *P. vulgaris* in murine macrophage RAW 264.7 cells. Thus, we investigated the effects of an aqueous extract of *P. vulgaris* (PVAE) on macrophage function. We found that PVAE stimulated macrophage phagocytic activity, nitric oxide (NO) production and cytokine activity. In addition, PVAE induced gene expression and production of macrophage-related cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. Transcription transfection revealed that NF- κ B mediated the PVAE-induced increases in macrophage-related cytokine expression levels. Mitogen-activated protein kinases (MAP Kinase) were also significantly activated by the PVAE-induced NF- κ B activation. Pretreatment with NF- κ B inhibitor and MAP Kinase inhibitors inhibited the NO production and the phagocytic activity induced by PVAE. This demonstrates that PVAE stimulates macrophage activation via NF- κ B transactivation and MAP kinase activation.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prunella vulgaris (Korean name: Ha go cho, *P. vulgaris*) is a perennial herb that is widely distributed throughout Korea, Japan, China and Europe. *P. vulgaris* has been used as a traditional medicine to reduce sore throat, alleviate fever and accelerate wound healing (Pitakas et al., 1994; Psotová et al., 2003, 2006; Marčová et al., 1997). The crude aqueous extract of *P. vulgaris* has also been used in the clinical treatment of herpesic keratitis (Zheng, 1990). More recently, the organic fraction of *P. vulgaris* was found to exhibit antioxidative and antimicrobial activities (Psotová et al., 2003). *P. vulgaris* is rich in phenolic acids and its main component is rosmarinic acid (Larivainet al., 1991; Psotová et al., 1998). Rosmarinic acid suppresses lipid peroxidation in various experimental models (Psotová et al., 1998; Laranjinha et al., 1999; Castelluccio et al., 1995) and is thought to scavenge superoxide radical (Osakabe et al., 2002).

Macrophages play a significant role in the immune system as part of the host's defense mechanism. Macrophages are the first cells to recognize invading foreign bodies and are central to cell-mediated and humoral immunity. When activated, they enhance proliferation, phagocytosis, nitric oxide (NO) and cytokine production, and cell morphological changes such as spreading ability, and

they inhibit the growth of a wide variety of tumor cells and microorganisms (Cavaillon, 1994). NO, a free-radical gas, is synthesized by inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Lee, 1973; Kim et al., 1995) and mediates diverse functions, including vasodilatation, neurotransmission, immunoresponses, inhibition of platelet aggregation and of extracellular matrix production (Tada et al., 1975). NO has been identified as the major effector molecule involved in the destruction of tumor cells by activated macrophages (Takagi and Lee, 1972). Moreover, the involvement of NO during non-specific host defense, macrophage-mediated killing, and the inhibition of the proliferation of microorganisms and tumor cells both *in vitro* and *in vivo* has previously been demonstrated (Kubo et al., 1986; Nagao et al., 1986). Such NO mediated tumoricidal activity is induced by DNA damage and leads to apoptotic cell death (Kim et al., 1998). Furthermore, the administration of NOS inhibitors to mice promotes the growth of several transplantable tumors (Nagan et al., 1985) and melanoma cells transfected with iNOS cDNA do not proliferate and metastasize well (Kubo et al., 1986).

TNF- α is a 17 kDa protein consisting of 157 amino acids that is a homotrimer in solution. TNF- α is mainly produced by activated macrophages, T lymphocytes and natural killer (NK) cells (Cavaillon, 1991; Farias-Eisner et al., 1994). Lower expression is known for a variety of other cells, including fibroblasts, smooth muscle cells, and tumor cells. TNF signal transduction pathways are complex and still not fully understood. Regulation of the transcription factor NF- κ B is a key component of TNF signal transduction and a

* Corresponding author. Tel./fax: +82 62 230 6038.
E-mail address: hgyeong@chonnam.ac.kr (H.G. Jeong).

②

J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
39(12): 1535-1541(2010)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2008.37.12.1535

하고초 메탄올 추출물의 항산화 활성

이수정¹ · 정낙주¹ · 정혜광² · 신정혜³ · 정영철⁴ · 서종근⁴

¹경상대학교 식품영양학과 · 농업생명자원연구원, ²조선대학교 약학대학
³경남과학기술대학교 호텔조리학과, ⁴한국국제대학교 식품과학부

Antioxidant Activities of Methanol Extracts from *Prunella vulgaris*

Soo Jung Lee¹, Nak Ju Sung¹, Hey Gwang Jeong², Jung Hye Shin³,
Young Chul Chung⁴, and Jong Kwon Seo⁴

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Gyeongsang 660-701, Korea

²Dept. of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-709, Korea

³Dept. of Hotel Culinary Arts & Bakery, Gyeongsang Provincial Nanhee College, Gyeongsang 668 801, Korea

⁴Division of Food Science, International University of Korea, Gyeongsang 663 759, Korea

Abstract

The aim of the present study was to investigate the antioxidant activities of methanol extracts from whole plant, flower stalk and stem of Hagocho (*Prunella vulgaris*). Content of total phenolic compound was the highest in flower stalk (77.1 mg/100 g) and those of others were below 54.0 mg/100 g. Flavonoid contents was the highest in stem (36.1 mg/100 g) compared to other samples. Electron donating ability of *Prunella vulgaris* was activated at over 70% in all samples at 500 µg/ml concentration, especially, the activity was the highest (92.1%) in flower stalk extracts. Reducing power showed similar tendency to electron donating ability, which was significantly higher flower stalk (0.3-1.9), whole plant (0.2-1.6) and stem (0.2-1.5). Hydroxyl radical was scavenged over 80% in 100 µg/ml concentration and was not significantly different between parts. Antioxidant activity in β-carotene-linoleic acid system was 47.5-84.6% when 1,000 µg/mL methanol extracts was added to reaction mixtures, and flower stalk showed the highest activity. Ability of ABT's cation decolorization from *Prunella vulgaris* was activated over 50% in all samples when 250 µg/mL of methanol extracts was added to reaction mixtures and 500 µg/mL were the most suitable concentration for its activation. Nitric oxide scavenging activity was lower under 20%, but its activity was significantly higher in flower stalk than other parts. The results indicate that flower stalk from *Prunella vulgaris* has potent antioxidant activities.

Key words: Hagocho (*Prunella vulgaris*), antioxidant activities

서 론

생활수준의 향상으로 평균수명이 연장됨에 따라 심혈관 질환의 빈번이 증가되고 있는데, 심혈관은 영양소의 과잉섭취, 스트레스, 흡연 및 음주 등에 의해 점차 대량적인 세포내 사멸에서 발생하는 활성산소 및 유리라디칼이 세포막의 손상을 지칭 산화, 단백질 분해 등을 초래함으로써 질병을 야기한다(1). 활성산소 및 유리라디칼은 노화 촉진기도 관련성이 높으며, 최근에는 세계 내 항산화 효소 체계가 증강시킬 수 있으며 인체에 무해한 항산화제를 천연식물로부터 얻고자 하는 지도가 여러 각도에서 수행되고 있다(2). 이에 있어서 활성 항산화물 물질에는 BHA나 BHT 등의 합성 항산화제와 폴리페놀, 테라페노이드 카로티노이드, 이소코르보산,

토코페롤, 연지질 등의 천연 항산화제가 있으나(3) 보다 안전하고 생체 방어 시스템을 증가시킬 수 있는 강한 항산화제에 대한 요구는 날로 증가되고 있는 상황이다.

하고초(*Prunella vulgaris*)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하며 귀족으로 화관이 달아 있고, 꽃잎질 속에 4분과가 있는 다년생 초본으로 우방에하는 지상부의 선초 말린 것을 히고초라고 부르며, 청간, 이뇨, 소변, 위변 및 혈압강화 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다(4). 하고초 함유하는 ursolic acid (5), caffeic acid, 카로티노이드, 타닌, 유기산 등이 함유되어 있으며(5), 참으로부터 saponin, triterpen, 글리코노이드, stanol 및 지방산 등이 보고되어 있다(6). 생리활성 면에서는 선초의 면역증강효과로 human immunodeficiency virus type 1 억제 활성(7), 항암효과가 활성(8) 및 방선화 활성(9)

Corresponding author: E-mail: sjk015@hanmail.net
Phone: 82-55-751-8280, Fax: 82-55-751-8100

⑧

✓

PA3-5 Effects of Flower and Stalk from *Prunella vulgaris* on the Macrophage Functions

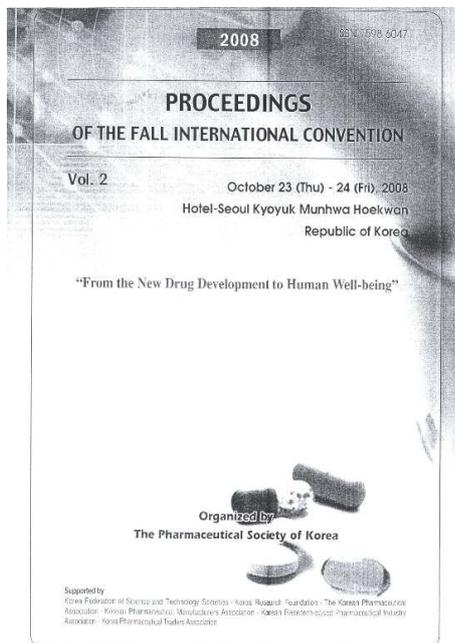
HAN Eun Hee*, CHOI Jae Ho, CHUNG Young Chul¹, SEO Jong Kwon¹, JEONG Hye Gwang

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Research Center for Proteinaceous Materials, Chosun University, Gwangju, Korea. ¹Division of Food Science, Jinju International University, Jinju, Korea.

*Corresponding author: protoplast@hanmail.net

The *Prunella vulgaris* (Korean name: Ha-go-cho) is a perennial herb which is widely distributed throughout Korea, Japan and China. The *Prunella vulgaris* is used primarily as an expectorant, tonic, antidiarrhoeic, against dysentery, for common cold, rheumatoid arthritis and cardiac arrhythmia. In the present study, we investigated the effects of the water extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* on the immunostimulatory activity in macrophages. Water extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* stimulated the production of TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6, as well as several members of the chemokine family within 24 h in macrophages. Furthermore, water extract from the flower and stalk of *Prunella vulgaris* significantly enhanced peritoneal macrophages activities such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production and ability of phagocytosis. These results suggest that *Prunella vulgaris* is a potent enhancer of macrophage function and host resistance.

⑨



✓

PA4-23 Effects of Aqueous Extract Isolated from *Prunella vulgaris* on Macrophage Activation

HAN Eun Hee*, PARK Jin Hee, CHUNG Young Chul¹, SEO Jong Kwon¹, JEONG Hye Gwang

RK 21 Project Team, Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea. ¹Division of Food Science, International University of Korea, Jinju 660-759, Korea.

*Corresponding author: hgeon@chosun.ac.kr

Prunella vulgaris (*P. vulgaris*) has been used as a traditional medicine in the clinical treatment of herpetic keratitis and for its antioxidative and antimicrobial activities. In this study, we examined the immunostimulatory and antitumor activity of *P. vulgaris* in murine macrophage RAW 264.7 cells. We found that PVAE stimulated macrophage phagocytic activity, nitric oxide (NO) production and cytotoxic activity. In addition, PVAE induced gene expression and production of macrophage-related cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. Transient transfection revealed that NF- κ B mediated the PVAE-induced increases in macrophage-related cytokine expression levels. Mitogen-activated protein kinases (MAP Kinase) were also significantly activated by the PVAE-induced NF- κ B activation. Pretreatment with NF- κ B inhibitor and MAP Kinase inhibitors decreased the NO production and the phagocytic activity induced by PVAE. These results demonstrate that PVAE stimulates macrophage activation via NF- κ B transactivation and MAP kinase activation.

【수상실적】

일 자	축제 및 박람회	비 고
2008-10	제54회 전국과학전람회	교육과학기술부장관상 우수상 수상
계	1건	

교육과학기술부장관상 교원 및 일반부 식물



- **작 품 명** : 하고초 부위별 추출물의 천연방부효과에 관한 연구
- **성 명** : nature(한윤정·박진경)
- **소 속** : 경남 창원신월초등학교 교사·진주문산초등학교 교사
- **작 품 내용** : 하고초의 천연방부효과 검증을 위해 대장균, 곰팡이, 부패균에 대한 하고초 부위별 추출물의 항균활성 정도를 알아보고, 총페놀, 총Flavonoid신헌, 전자공여능, 환원력, ABTs 소기 효과 등의 실험을 통한 항산화활성 정도를 알아본 결과 하고초 선초의 에탄올 추출물이 항균, 항산화효과가 가장 높은 것으로 나타났다.

- 우수상 수상 -

【하고초에 대한 언론홍보 실적】

● 총 괄

구 분	계
TV (방송) 보도실적	6건
신문 (기사) 게재실적	23건
국내외 전시 (박람회) 참가실적	5건
합 계	34건

● TV (방송) 홍보실적

일 자	프로그램명	방송사	비고
2006-06-10	광광일요일	KNN(부산방송)	
2008-05-25	뉴스 (보랏빛 잔치의 초대 “하고초”)	KNN	
2008-05-26	생방송 투데이	SBS	1228회
2008-06-08	얼쭈 일요일 고향 애	SBS	44회
2008-06-08	해피 실버 고향은 지금	MBC	970회
2008-06-16	생방송 전국시대	진주 MBC	
계	6건		

● 신문 (기사) 게재실적

일 자	언론사명	면수	보도요약	비고
2007-05-31	뉴시스	2	함양 백전면 양천마을, 하고초 보랏빛 꽃 만발	
2007-06-01	광역일보	1	보랏빛 향기 농가 미소	
2007-06-04	경남매일	1	함양 양천마을서 하고초 꽃잔치	
2007-06-04	경남일보	1	함양 하고초마을 “별천지”	
2007-06-05	부산일보	1	함양 양천마을 쌀농사 포기 “하고초 십자”	
2007-06-08	중앙일보	2	함양 “하고초” 아시나요	
2007-06-11	아시아일보	1	함양 백전면 양천마을 하고초 보랏빛 꽃 “만발”	
2008-04-24	뉴시스	1	농식품부, “경관보전직불제 新 부가가치 창출한다	
2008-04-24	연합뉴스	1	경관보전직불제로 농어촌 부가가치 커져	
2008-04-28	농수축산신문	1	농어촌 경관보전직불제 新 부가가치 창출 기여	
2008-05-21	경남매일	1	함양 양천마을 “하고초 축제”	
2008-05-22	오마이뉴스	3	보라색 “하고초” 꽃이 활짝 피었네!	
2008-05-22	연합뉴스	2	“함양의 익모초를 아시나요”	
2008-05-23	경남연합일보	1	함양 양천마을 보라색 꽃잔치	
2008-05-23	뉴스경남	1	양천마을 다랭이논 보라색 꽃 장관	
2008-05-26	신아일보	1	보라색 “꽃대궐”에 초대합니다	
2008-05-26	환경일보	2	함양군 다랭이논 보라색 꽃물결	
2008-05-26	전국매일	1	함양 양천마을 “보라색 꽃잔치”	
2008-05-27	경남일보	2	함양군 다랭이 “하고초 꽃” 장관	
2008-06-02	경남매일	1	다랭이논과 하고초 축제	
2008-06-02	경남매일	1	하고초 축제	
2008-06-04	경남신문	2	함양 “하고초 꽃마을” 인기 만발	
2008-06-13	경남매일	2	하고초 축제를 자치단체 축제로	
계	23건			

● 전시 (박람회) 참가실적

일 자	축제 및 박람회	비 고
2006-10-13 ~ 2006-10-15	함양물레방아축제 및 함양약초심포지엄	
2007-07-27 ~ 2007-07-29	함양산삼축제	
2008-03-13 ~ 2008-03-15	2008 동경국제식품박람회	
2008-10-02 ~ 2008-10-05	2008 feel 경남특산물박람회	
2008-12-12	2008 한국국제대학교 식품과학부 졸업작품전시회	
계	5건	

【TV (방송) - 1】

KNN 팡팡일요일 방송촬영 (2006.6.3) - 방송 2006.6.10 (하고초 마을 소개)



【TV (방송) - 2】



보라빛 잔치의 초대 '하고초'(경남 리)

기사입력 2008년 05월 25일(일) 14:54

(수퍼)-

(앵커)

계절의 여왕이라 불리는 5월은 축제의 계절이기도 합니다.

경남에서는 오늘 오통 보라빛 천지의 **하고초 축제**와 진주 논개제, 음식축제 등이 열렸습니다.
최광수 기자가 보도합니다.

(리포트)

할머니와 손주 등 일가족이 보라빛 꽃 잔치에 초대를 받았습니다.

(수퍼)-하고초 축제장/오늘, 함양군 백전면 양천마을

여기를 봐도 보라색, 저기를 봐도 보라빛, 보라색 천지입니다.

보라색 산골마을 풍경에 아이들이 가장 신이 났습니다.

어르신들은 옛날 정서를 아이들에게 들려주고 달콤한 꽃잎을 입으로 빨아 봅니다.

(인터뷰)-

(수퍼)-이규연/함양군 함양읍

꽃밭 한가운데는 토종 벌통도 보이고 지게까지 등장했습니다.

꽃의 이름은 하고초.

다른 식물들이 왕성하게 자라는 여름철에 시든다고 해서 **하고초**로 불리기도 합니다.

보통은 벌을 치고 **고혈압, 황달성 간염, 폐결핵에 달여 먹기도 합니다.**

(인터뷰)-

(수퍼)-채연희/진주시 상평동

(StandUp)-

(수퍼)-최광수

하고초 축제는 다음달 8일까지 열리며 꽃은 다음 주 절정을 이룰 것으로 보입니다.

(수퍼)-전통 국악공연/오늘, 진주 축석루

진주 축석루에서는 전통 국악공연이 열렸습니다.

하얀 한복을 차려 입은 어르신들이 우리 국악의 향연에 빠져듭니다.

(수퍼)-영상취재 손명환

이밖에도 오늘 진주 대한민국 음식 기획전, 하동 야생차 축제가 대단원의막을 내렸습니다.

KNN최광수.###

【TV (방송) - 3】



생방송 투데이(구)(1228회) 2008-05-26

[화제 1] 일 년에 딱 한번! 벌을 받는 마을이 있다?

소문을 듣고 찾아온 곳은 **경남 함양의 한 작은 마을!**

마을 입구부터 심상치 않은 어르신들 보이고~ 팔굽혀펴기부터 시작해서 벌 받을 준비 하신다는 데..

이들이 벌을 받는 것은 체벌의 그 벌이 아닌! 꿀벌! 이 마을에 집집마다 눈에 띄는 것은 벌통과 벌 집의 수많은 벌들! 이때만 되면 특히 벌을 받느라 분주하단데...딱 2주간만 나타나는 꿀방망이가 바로 그것? 꿀방망이는 1년에 단 한번! 지금부터 딱 2주간만 꽃이 피었다가 사라진다는 귀한 꽃의 벌 칭! 그 꽃의 이름은 **하고초!** 여름, 하지가 되면 말라 죽는다고 하여 붙여진 이름이라는데. 하지만 하고초 마을 사람들은 '하고초'라는 이름대신, 꿀방망이라 부른다고~ 그 이유인즉슨 생긴 모양이 꿀방망이처럼 생긴 탓도 있지만 이 시골마을에 중요한 소득자원이 되고 있기 때문이라고..**약 6만평이 넘는 마을의 땅마다 보랏빛을 뿜어내며 피어난 꿀풀, 하고초** 때문이라는데. 짧은 기간 반짝 폼다가 사라지는 것을 아쉬워하여 2주 동안 마을에서는 축제가 벌어진다! 입소문타고 찾아오는 사람들로 인해 작은 시골마을은 사람들 발길 끊이지 않고 북적인단데..꽃 먹으러, 꿀 먹으러~ 지금 떠나자! 약 2주간의 보랏빛 달콤한 유혹이 시작된 함양 하고초 마을로 투데이 카메라가 따라가 본다!

【TV (방송) - 4】



일쑤! 일요일 고향 애(44회) 2008-06-08

▶ 위더웰던의 생생 고향 - 달콤한 유혹! 꿀방망이를 찾아서...

두드리면 달콤한 꿀이 나오는 꿀방망이가 실제로 존재한다면?

달콤한 유혹에 넘어간 발라당, 경남 함양으로 떠났다!

꿀방망이가 있다는 마을답게 입구부터 달콤하고 향긋한 향기가 예사롭지 않은데..

꿀방망이를 찾는 웰던에게 마을 어르신들이 알려준 곳은 보라색 꽃밭!

그 꽃을 하나 입에 넣으면 입안에서 퍼지는 꿀의 대 향연!

풀 하나에 꽃이 여러 개 달린 모습을 보고 이곳에서는 꿀방망이라고 부른다고..

그 정식 명칭은 하고초!!!!

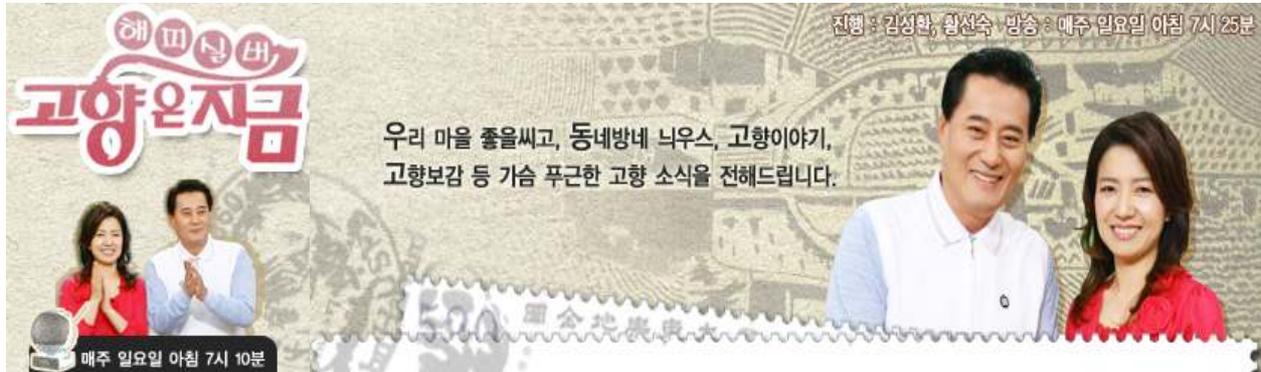
6월 말이 되면 꽃이 지는 모습을 보고, '여름에 죽는 풀'이라 하여 지어진 이름이란다!

6월 중순까지 활짝 핀 보라색 **하고초 꽃밭 4만평**이 일단 눈길을 사로잡고 그 향기가 가던 발길을 사로잡는다는데.. **동의보감에서 4대 약재 중 하나로 쓰였다는 하고초는 꽃과 잎을 식용으로, 대는 약용으로 쓰일 정도로** 하나도 버릴 게 없다~~

보기 좋은 떡이 먹기에도 좋다고, 꽃과 잎을 이용한 화려한 음식들까지!!

경남 함양에서 만난 달콤한 유혹, 꿀방망이 찾으러 웰던과 함께 가자!

【TV (방송) - 5】



하고초 향기로 부자 된 꿀풀 마을 <경남 함양> - 2008. 06. 08



경남 함양 지리산 자락 청정지역에는 6만평의 다랭이논엔 핀 꽃이 있다. 꿀풀로 더 잘 알려져 있는 하고초가 그 주인공. 온 마을 주민들이 함께 가꾸는 하고초는 양천마을을 부자마을로 만들어 준 효자 작물이라고. 꽃잎은 따서 동동주에 띄워 먹기도 하고 비빔밥을 만들어 먹기도 하고, 줄기와 잎은 튀김으로 해 먹으면 그 만이다. 게다가 갑상선과 혈압조절 기능에 효과가 있어 더욱 유용한 꽃이다. 농산물 수입 개방으로 농민들이 대체작물 선정에

어려움을 겪고 있지만 이 마을은 하고초 덕분에 걱정이 없다는데. 하고초 향기 따라 경남 함양으로 가보자.

【TV (방송) - 6】



더위야 물러가라, 하고초 나가신다 - 2008. 06. 16

올 여름 무더위가 걱정되신다고요?

이젠 고민 끝~

더위잡는 하고초를 소개합니다.

----- . 영상.

● 신문 (기사)

일 자	언론사명	면수	보도요약	비고
2007-05-31	뉴시스	2	함양 백전면 양천마을, 하고초 보랏빛 꽃 만발	
2007-06-01	광역일보	1	보랏빛 향기 농가 미소	
2007-06-04	경남매일	1	함양 양천마을서 하고초 꽃잔치	
2007-06-04	경남일보	1	함양 하고초마을 “별천지”	
2007-06-05	부산일보	1	함양 양천마을 쌀농사 포기 “하고초 십자”	
2007-06-08	중앙일보	2	함양 “하고초” 아시나요	
2007-06-11	아시아일보	1	함양 백전면 양천마을 하고초 보랏빛 꽃 “만발”	
2008-04-24	뉴시스	1	농식품부, “경관보전직불제 新 부가가치 창출한다	
2008-04-24	연합뉴스	1	경관보전직불제로 농어촌 부가가치 커져	
2008-04-28	농수축산신문	1	농어촌 경관보전직불제 新 부가가치 창출 기여	
2008-05-21	경남매일	1	함양 양천마을 “하고초 축제”	
2008-05-22	오마이뉴스	3	보라색 “하고초” 꽃이 활짝 피었네!	
2008-05-22	연합뉴스	2	“함양의 익모초를 아시나요”	
2008-05-23	경남연합일보	1	함양 양천마을 보라색 꽃잔치	
2008-05-23	뉴스경남	1	양천마을 다랭이논 보라색 꽃 장관	
2008-05-26	신아일보	1	보라색 “꽃대궐”에 초대합니다	
2008-05-26	환경일보	2	함양군 다랭이논 보라색 꽃물결	
2008-05-26	전국매일	1	함양 양천마을 “보라색 꽃잔치”	
2008-05-27	경남일보	2	함양군 다랭이 “하고초 꽃” 장관	
2008-06-02	경남매일	1	다랭이논과 하고초 축제	
2008-06-02	경남매일	1	하고초 축제	
2008-06-04	경남신문	2	함양 “하고초 꽃마을” 인기 만발	
2008-06-13	경남매일	2	하고초 축제를 자치단체 축제로	
계	23건			

【신문 (기사) - 1】

함양 백전면 양천 마을 , 하고초 보랏빛 꽃 '만발'

[뉴스시스 2007-05-31 14:31]



함양 백전면 양천마을 보랏빛 꽃 만발

【함양=뉴스시스】

경남 함양군 백전면 양천마을 계단식 논밭에 보랏빛 하고초 꽃이 만발, 꿀벌들이 웅웅거리며 시골마을 온 천지가 꽃으로 장관을 이루고 있다.

하고초 꽃이 피어있는 양천마을은 매년 5월에서 6월초까지 외지인들이 몰려와 농촌체험을 하거나 사진작가들이 아름다운 작품사진을 찍기 위해 많이 방문한다.

이 마을은 4년 전에는 쌀농사와 잡곡으로 생활하는 전형적인 산골마을이었으나 함양군의 하고초재배 제의를 받고 정진상 하고초꿀작목반장과 김재원씨 등이 마을주민들과 공동으로 하고초를 심어 하고초꿀마을의 브랜드를 만드는데 성공했다.

이들 농민들의 하고초 밀원을 바탕으로 연간 5천되의 '꿀방아' 벌꿀을 생산해 2.4kg 병당 7만원에 인기리에 판매되고 있다.

특히 하고초는 한방에서 4대 항암약초로 알려져 있으며 항암물질과 함께 혈압조절 기능에 탁월한 효과가 있는 약초로 알려져 있어 양천마을의 벌꿀은 인기가 급상승하고 있다.

한편 진한 보랏빛으로 물든 하고초마을 양천마을은 지난해 11월 '살기 좋은 지역자원 경연대회'에서 전국 100선 중 함양 하고초 꿀방아란 브랜드로 쌀 대체작목으로 벌꿀 생산에 성공한 마을로 뽑혔다.

또 오는 5일 한국생약협회는 80명의 약초기행팀이 약초전문가들과 함께 양천마을을 찾는 등 전국 방방 곳곳에서 농촌체험 관광객들이 찾아 올것으로 예상된다.

이경화기자 khlee@newsis.com

【신문 (기사) - 2】



함양군 백전면 양천마을 들녘이 보랏빛 물결로 밭길을 시로잡고 있다.

보라빛 향기 농가 미소

함양 양천마을 하고초꽃 장관

쌀 대체작목으로 '하고초 꽃'을 생산해 농가소득을 올리는 함양군 백전면 양천마을(하고초 마을) 들녘이 보랏빛 물결을 이루며 점점 더 다다랐다.

농사철이 한창인 5~6월인데도 불구하고 이곳 양천마을은 하고초 향기를 맡는 아녀들과 사진작가들의 발길로 장관을 이루고 있다. 이 마을은 불과 4년 전만해도 쌀농사와 잡곡으로 생計하는 전형적인 산골마을이었으나 하고초 꽃작목반과 마을주민들이 공동으

로 하고초를 심어 '하고초 꽃 마을'의 브랜드를 만드는데 성공했다.

마을 주민들의 주소특원으로 자리잡은 '하고초 꽃'은 현재 연간 5천되를 생산해 2.4kg들이 한 병당 7만원선이 판매되고 있다.

또 양천마을은 작년 11월 '살기 좋은 지역지원 경연대회'에서 전국 100선 마을로 선정되는 등 한국생약협회를 비롯한 전국 각지에서 농촌체험 관광객들이 몰려들고 있다. /함양=이용우기자

【신문 (기사) - 3】

2007년 6월 4일 1면 경남매일



하고초 체험행사 및 먹거리장터가 열리고 있는 함양군 백천면 양천마을.
운동 보랏빛 꽃물이 든 듯하다. <사진제공 = 생태사진가/ 고귀웅>

함양 양천마을서 하고초 꽃잔치

10일까지 체험 행사·먹거리 장터 열려 ...

함양군 백천면 양천마을(이장 박중희)에 꽃잔치가 벌어졌다.

하고초로 유명세를 타고있는 백천면 양천마을에서 지난 1일부터 10일까지 하고초 체험행사 및 먹거리장터가 열리고 있다.

이 마을은 불과 4년 전만해도 쌀농사와 잡곡으로 생활하는 전형적인 산골마을이었으나 군의 하고초 재배 제의를 받고 정진상 하고초꿀작목반장과 김재원씨 등이 마을주민들과 공동으로 하고초를 심어 '하고초꿀마을'의 브랜드를 만드는데 성공했다.

하고초 밀원을 바탕으로 연간 5,000되의 '꿀방아' 벌꿀을 생산해 2.4kg 병당 7만원에 인기리에 판매되고 있다.

<최경인 기자>

【신문 (기사) - 4】

2007년 6월 4일 6면 경남일보



함양군 백전면 양천마을이 하고초꽃이 만개해 보랏빛 물결을 이루고 있다.

‘꿀벌마을’ 명성 함양 하고초마을 ‘별천지’

함양군 백전면 양천마을(이장 박종희)이 벌과 꽃향기로 가득하다. 아름다운 영화의 한 장면처럼 꿀벌들이 왕 쥬기리며 날고 계단식 논밭에는 하고초가 만발해 조용한 시골마을이 별천지가 됐다. 양천 마을은 꽃이 피는 5월 말에서 6월초 사이엔 매년 외국인들이 몰려와 농촌체험을 하거나 사진작가들이 사진을 찍느라 분주하다.

이 마을은 불과 4년 전만해도 쌀농사와 잡곡으로 생활하는 전형적인 산골마을이었으나 함양군의 하고초재배 제의를 받고 정진상(하고초꿀작목반장)과 김재원씨 등이 마을주민들과 공동으로 하고초를 심어 ‘하고초꿀마을’의 브랜드를 만드는데 성공했다. **하고초 밀원을 바탕으로 연간 5000되의 ‘꿀방아’ 벌꿀을 생산**해 2.4kg 병당 7만원에 인기리에 판매되고 있다. **하고초는 한방에서 4대 항암약초로 알려져 있으며 항암물질과 함께 혈압조절 기능에 탁월한 효과가 있는 약초**로 알려져 있어 양천마을의 벌꿀은 인기가 급상승하고 있다.

진한 보랏빛으로 물든 하고초천지 양천마을은 지난해 11월 ‘살기 좋은 지역자원 경연대회’에서 전국 100선 중 함양하고초 꿀방아란 브랜드로 쌀 대체작목으로 벌꿀 생산에 성공한 마을로 뽑혔다. 오는 5일 한국생약협회 80명의 약초기행팀이 약초전문가들과 함께 양천마을을 찾는 등 전국 곳곳에서 농촌체험 관광객들이 몰려오고 있어 FTA를 극복할 수 있는 대안을 찾는데 성공한 마을로 평가받고 있다.

노상봉 기자 ✉ nosa@gnews.co.kr

【신문 (기사) - 5】

2007년 6월 5일 10면 부산일보

[꽃잔치] 함양 양천마을 쌀농사 포기 '하고초' 심자... 5~6월 들판 보랏빛 물들어

경남 함양군 백전면 양천마을은 지금 꽃잔치다.

양천마을은 정부수매 감소와 FTA의 영향에 따라 쌀농사를 포기하고 벌들의 먹이로 하고초식물을 심어 농가 소득을 올리고 있어 주목받고 있다. 이 마을은 불과 4년 전만 해도 쌀과 잡곡 농사로 생활하는 전형적인 산골마을이었다. 하지만 마을주민들이 공동으로 하고초꿀작목반을 만들고 하고초를 심어 '하고초꿀마을' 브랜드를 만드는 데 성공했다.

특히 하고초가 만개하는 5~6월이면 온 들판이 마치 물감을 뿌려놓은 것처럼 보랏빛으로 물든다. 이에 벌, 나비들은 꽃을 보고 꿀 따러 몰려들고, 전국 사진작가들은 작품을 만들기 위해 이 마을을 찾고 있다.

양천마을은 11ha의 하고초 밭원에서 연간 9천L의 '꿀방아' 벌꿀을 생산해 고소득을 올리고 있다. 하고초는 한방에서 항암약초로 알려져 있으며 혈압조절에도 탁월한 효과가 있는 것으로 전해진다.

이 마을 박종희 이장은 "지난해 11월에 열린 '살기 좋은 지역자원 경연대회'에서 벌꿀 생산에 성공한 마을로 뽑혔다"며 "80명의 한국생약협회 약초기행팀이 약초전문가들과 함께 우리 마을을 찾는 등 전국 곳곳에서 농촌체험 관광객들이 몰려오고 있다"고 말했다.

최희수 기자

【신문 (기사) - 6】

2007년 6월 8일 W6면 중앙일보

하고초(夏枯草.사진)란 묘한 이름의 풀이 있다. 직역하면 여름에 말라죽는 풀. 초여름 잠깐 꽃을 피웠다 한여름에 시들어 죽는다 해서 붙은 이름이다. 전국 어디서나 볼 수 있는 토종 식물이지만 향암. 이노 성분이 있는 것으로 알려져 한약재로도 각광받고 있다. 경남 함양 백운산 자락에 가면 이 하고초를 대량 재배하는 마을이 있다. 일명 함양 하고초 마을(함양군 백전면 오천리)이다. 이맘때 그곳에 가면 언덕배기 다랑논 가득 보라색 꽃이 만발한 장관을 볼 수 있다. 약초 기행을 떠난 **한국생약협회 회원들**을 쫓아 하고초 마을에 다녀왔다.

<함양>글·사진=아웃도어 플래너 한형석 hshan8611@naver.com



함양 '하고초' 아시나요

꽃잎 넣은 비빔밥·부침개·동동주 별미
간·신장에 좋은 약초...여드름에도 효과

지방 특산물 축제라면 으레 떠오르는 '그림'이 있다. 요란하게 휘날리는 만국기, 귀 따가운 트로트 음악, 코를 찌르는 번데기 줄이는 냄새... 하지만 하고초 마을은 달랐다. 황순원의 소설 '소나기'에 나오는 소년.소녀 주인공이 뛰어나올 것 같은 조용한 시골 풍경 그대로였다. 마을 전체를 물들인 보라빛 꽃이 더욱 황홀해 보이는 것도 그 때문일 것이었다.

원래 이곳은 다랑(계단식)논에서 벼.잡곡 농사를 짓던 전형적인 산골 마을이었다. 4년 전 함양군의 권유로 쌀 대체작목으로 하고초를 재배하기 시작하면서 모든 게 달라졌다. 짙은 보라색의 하고초 꽃은 낱날일 땐 몰라도 모아놓으면 장관이다. 알음알음 입소문이 나면서 꽃이 필 무렵 전국에서 외지인들이 찾아들었다. 하고초 꽃에서 꿀을 따고 꽃이 진 뒤엔 대와 잎을 말려 약재로 팔았다. 벼농사를 지을 때보다 소득이 커졌고 마을도 활기를 되찾았다.

보라색 꽃밭을 걸어 마을로 들어가니 마을 주민들이 아릅드리 느티나무 아래 한 상 가득 음식을 차려 놓고 손님을 맞는다. 주 메뉴는 일곱 가지 나물과 하고초 꽃으로 맛을 낸 비빔밥(5000원). 하고초 잎이 들어간 전(2000원)과 보라색 꽃잎을 동동 띄운 동동주(1되 3000원)도 있다. 느티나무 그늘 아래서 산바람에 더위를 식혀 가며 먹는 점심 밥맛이 기가 막히다. 밥을 든든히 먹은 뒤엔 본격적으로 꽃밭을 거닐 차례. 마을 뒤편에 본격적으로 펼쳐져 있는 하고초 밭은 대략 4만 평 규모. 처음엔 3000평으로 시작했지만 해를 넘기면서 점점 재배 면적이 늘고 있다. 지척에 있는 백운산과 패관산에 올라가면 하고초 이외의 다른 야생 약초도 구경할 수 있다.

이날 약초 기행을 주관한 한국생약협회(www.koreaherb.or.kr)는 한약재를 재배하는 전국 생약 생산자 단체. 매년 토종 생약 재배지 답사를 하며 생약 살리기 운동을 하고 있다. 답사에 동행한 한국농업대학 장광진 교수는 하고초에 대해 "간이 나쁜 남편, 신장.방광이 좋지 않은 아내, 여드름으로 고생하는 아이들에게 좋은 약재"라고 했다. 하고초 축제는 10일까지 계속된다. 축제가 끝난 뒤에도 10일 정도는 더 꽃을 볼 수 있다.

【신문 (기사) - 7】

2007년 6월 11일 20면 아시아일보

함양 백전면 양천 마을 하고초 보랏빛 꽃 '만발'

경남 함양군 백전면 양천마을 거담식 논밭에 보랏빛 하고초 꽃이 만발. 꽃밭들이 완용거리며 시골마을 문 천지가 꽃으로 장편을 이루고 있다.

하고초 꽃이 피어있는 양천마을은 매년 5월초까지 외국인들이 무려와 농촌체험을 하거나 사진작가들이 아름다운 조경사진을 찍기 위해 많이 방문한다.

이 마을은 4년 전에는 일농사의 잠깐으로 쇠락하는 절망적인 상황이었으나 함양군외 하고초재배 사업을 받고 장전상 하고초꽃차(만발)와 김재원씨 등이 마을주민들과 공동으로 하고초를 심어 하고초꽃마을의 브랜드를 만드는 데 성공했다.



이들 농민들의 하고초 밀원을 바탕으로 연간 5천여의 '만발' 생산을 생산해 2.4kg 평당 7만원이 인거래로 판매되고 있다.

특히 하고초는 한방에서 4대 암암약으로 알려져 있으며 항암물질과 함께 면역조절 기능이 탁월한 효과가 있는 약초로 알려져 있어 양천마을의 변질은 인기가 급상승하고 있다.

한려 진한 보랏빛으로 물든 하고

소마을 양천마을은 지난해 11월 '장기 좋은 지역지원 경영대회'에서 전국 100선 중 함양하고초 꽃밭이란 브랜드로 잘 대처하도록 많은 칭찬을 성공한 마을로 뽑혔다.

또 오는 6월 한국농악협회는 60명의 익호기정민이 익초전문가들과 함께 양천마을을 찾는 등 전국 방방 곳곳에서 농촌체험 관광객들이 찾아올 것으로 예상된다.

김상민기자

【신문 (기사) - 8】

농식품부, “경관보전직불제로 농어촌 新부가가치 창출 한다”

[뉴스시스 2008-04-24 11:12]

【서울=뉴스시스】

경관보전직불제가 농어촌에 아름다운 경관작물의 재배를 확대하고 지역 축제의 농촌관광을 활성화하는 데 큰 기여를 한 것으로 나타났다.

농림수산식품부는 지난 2005년부터 시행한 경관보전직불제 성과평가 결과(2007, 한국농촌경제연구원) 경관작물 식재 후 지역축제가 확대되고 지역별로 1.25~150배까지 도시민 방문객이 증가했다고 24일 밝혔다.

경관보전직불제는 농지에 유채, 메밀, 들꽃 등 경관작물 재배하는 농가에 ha당 100~170만원 지급한 것으로 지난 2005년부터 2007년까지 모두 2620농가, 1740ha의 경관작물을 재배해 총 32억원 직불금 지원했다.

이로써 경남 하동군 북천면 메밀축제, 파주시 돌곶이 꽃마을 축제의 경우 경관보전직불제 시행 전 방문객 수가 200여명 안팎이었으나 시행 후에는 각각 46만명, 50만명으로 대폭 늘어났다.

지역축제를 찾는 관광객이 늘다 보니 숙박과 음식 판매로 인한 소득 파급 효과도 높은 것으로 나타났다. 강원도 평창군 봉평면은 2006년 67만여명이 방문해 약 82억원의 소득파급효과를 거둔 것으로 조사됐다. 또한 각 지역별로 경관작물을 원료로 농특산물과 가공품을 개발하여 지역의 브랜드 이미지를 높이는 효과도 큰 것으로 나타났다.

하고초(꿀풀) 축제를 개최하는 경남 함양군은 하고초 꿀을 브랜드로 개발해 축제기간 중 연간 총 매출액 (2억8000만원)의 25% 이상을 판매했다. 경남 남해의 두모마을의 경우 경관작물로 재배하는 유채와 메밀을 가공·판매하는 등 마을 관광소득이 경관보전직불제 시행 전보다 6배(500만원에서 3000만원으로 증가)이상 증가한 것으로 나타나고 있다.

농림수산식품부 측은 제도의 성과를 확산하기 위해 올해부터 사업면적('07:800ha→'08:3252ha)을 늘리고 지원 대상 작물을 종전 유채, 코스모스 등 8개 종류에서 전체 초화류로 확대하는 한편, 재배지 주변 탐방로 조성 등 농가의 의무도 강화해 나갈 방침이라고 밝혔다.

천금주기자 juju79@newsis.com

【신문 (기사) - 9】

2008년 4월 24일 연합뉴스

경관보전직불제로 농어촌 부가가치 커져

(서울=연합뉴스) 신호경 기자 = 경관보전직불제가 관광 등의 측면에서 농어촌 부가가치 창출에 크게 기여하고 있는 것으로 평가됐다.

24일 농림수산식품부와 농촌경제연구원의 조사, 분석 결과에 따르면 경남 하동군 북천면과 과주시 교하리의 경우 경관보전직불제 지원을 받아 각각 '메밀축제'와 '꽃마을축제'를 연 뒤 한 해 200여명 안팎에 불과하던 방문객이 각각 46만명, 50만명으로 크게 늘었다.

경관보전직불제는 보기에 좋지만 다른 작물에 비해 소득이 적거나 거의 없는 유채.메밀 등의 작물을 재배하면 정부에서 1ha당 100만~170만원 정도의 보조금을 지급해 소득 차액을 메워주는 제도다.

강원도 평창군 봉평면(메밀)의 경우 지난 2006년 약 67만명이 방문, 숙박과 음식 판매를 통해 약 82억원의 소득 파급 효과를 거둔 것으로 추정됐고, 경남 함양군 백전면은 '하고초(꿀풀) 꿀'을 브랜드로 개발해 한 해 꿀 판매에서만 2억8천만원의 매출을 올리고 있다.

농식품부는 경관보전직불제 활성화를 위해 올해 전체 사업면적을 800ha에서 3천252ha로 크게 늘리고 유채.코스모스등 8개 종류였던 지원 대상도 '전체 초화류'로 확대할 계획이다.

신호경 기자 : shk999@yna.co.kr

【신문 (기사) - 10】

2008년 4월 28일 농수축산신문

농어촌 경관보전직불제 新 부가가치 창출 기여

2005년부터 시행된 경관보전직불제가 농어촌의 새로운 부가가치 창출에 기여하고 있는 것으로 나타났다.

경관보전직불제는 농지에 유채, 메밀, 들꽃 등 경관작물을 재배하는 농가에 ha당 100만~170만원을 지급하는 제도로 농림수산식품부는 지난해까지 경관보전직불제 사업을 통해 총 32억원의 직불금을 총 2620농가에 지급, 1740ha의 경관작물을 재배토록 유도한 결과 경관작물과 연계한 지역 축제 확대로 도시민 방문객이 증가하는 효과를 거둔 것으로 조사됐다.

실제 경남 하동 북천면 메밀축제나 파주시 돌곶이 꽃마을 축제의 경우 경관보전직불제 시행 이전 200여명에 불과했던 방문객이 이후 46만~50만명으로 늘었다.

특히 강원 평창군 봉평면의 경우 2006년에만 67만명이 방문해 82억원의 소득 창출효과를 거뒀으며, 경남 함양군은 하고초 꿀 축제를 계기로 하고초 꿀 브랜드를 개발해 연간 2억8000만원의 매출을 올리기도했다.

이 같은 성과에 힘입어 농식품부는 지난해 800ha였던 사업면적을 올해 3252ha로 대폭 늘리고 대상작물도 전체 초화류로 확대해 나가기로 했다.

박유신 기자 (yusinya@afnews.co.kr)

【신문 (기사) - 11】

2008년 5월 21일 경남매일

함양 양천마을 ‘하고초 축제’

23일부터 체험행사·먹거리장터 등

함양군 백전면 양천마을(이장 박중희)에 꽃잔치가 벌어졌다.

하고초로 유명세를 타고 있는 양천마을에서 오는 23일부터 6월 8일까지 하고초 재배지 체험행사 및 먹거리장터가 열린다.

먹거리 행사로 하고초꿀, 하고초 엑기스, 하고초 전·튀김, 하고초동동주, 하고초비빔밥이 있으며 아마추어 사진 찍기와 사진전이 펼쳐진다.

이 마을은 불과 몇 년 전만해도 쌀농사와 잡곡을 생산하는 전형적인 산골마을이었으나 함양군의 하고초 재배 제의를 받고 정진상 하고초작목반장과 김재원씨 등이 마을주민들과 공동으로 하고초를 심어 하고초 꿀마을의 브랜드를 만드는데 성공했다.

함양군은 하고초 밀원을 바탕으로 꿀방아 벌꿀을 생산해 2.4kg 병당 7만원에 인기리에 판매하고 있다.

<최경인 기자>

【신문 (기사) - 12】

2008년 5월 22일 오마이뉴스

[사진] 보라색 '하고초' 꽃이 활짝 피었네!

[오마이뉴스 윤성호 기자]



▲ 함양군 백전면 양천마을 다랭이논에 하고초꽃이 활짝 피어 장관이다.

지리산 자락 산골마을의 10만㎡(3만평) 다랭이논이 보라색 꽃으로 장관이다.

'꿀풀이'로 불리는 하고초(夏枯草)를 재배하고 있는 경남 함양군 백전면 양천마을. 마을 전체에 보라색 하고초꽃이 활짝 피어났다. 약재인 하고초는 한방에서 찾는 4대 약초의 하나다. 30가구의 마을 주민들은 4년 전부터 하고초를 심기 시작했다. 그래서 일명 '하고초 꽃마을'로 불린다.

절반 이상의 마을 사람들은 벌꿀농사도 하는데, 하고초꽃을 밀원으로 삼고 있다. 하고초는 갑상성 고혈압 부인병 폐에도 좋고, 암에도 효험이 있는 것으로 알려지고 있다. 이 마을의 하고초꽃은 없어서 못 팔 정도로 인기를 얻고 있다고 한다. 하고초는 꽃잎을 따서 비빔밥을 해서 먹기도 하고 하고초찌짐이나 하고초엑기스를 만들어 먹을 수도 있다.

양천마을은 22일부터 6월 9일까지 '하고초꽃 축제'를 연다. 하고초 꽃밭 걷기와 사진 찍기, 하고초음식먹기, 산골길 걷기, 하고초꿀 시음회 등 다양한 행사를 연다. 박종화 마을이장은 "산골마을의 풍경을 그리워하는 중년 층이나 그러한 정서를 체험하고자 하는 도시사람들로 인기를 끌고 있다"고 말했다.

【신문 (기사) - 13】

2008년 5월 22일 연합뉴스

<“함양의 익모초를 아시나요”>

(함양=연합뉴스) 지성호 기자 = '옛날 어느 마을에 가난한 모자(母子)가 살았다. 어머니가 소년을 낳은 뒤 계속 배가 아팠지만 형편이 어려워 약을 먹을 수 없었다. 소년은 의원에게 받아 온 약재를 직접 캐 어머니께 달여 드리니 몸이 회복됐다'

그래서 '어머니를 이롭게 한 풀'이라는 뜻에서 '유익하다(益)'와 '어머니(母)'를 합해 '익모초(益母草.일명 하고초)'란 이름을 지었다고 전해진다.

경남 함양군 백전면 양천마을(이장 박중회)에서 이 풀을 주제로 한 축제가 열린다.

오는 23일부터 내달 9일까지 인근 다랑이는 10만여㎡에 활짝 핀 익모초꽃 속에서 열리는 축제에는 꽃밭걷기, 사진찍기, 익모초음식먹기, 산골길 걷기, 익모초꽃 시음회 등 다양한 프로그램이 펼쳐진다.

이 마을은 천수답 다랑이는의 수익성이 떨어지자 4년 전 벼 대신 4대 약초의 하나이며 꿀풀이라고도 불리는 익모초를 심었고 익모초꽃을 생산해 짭짤한 수입을 올리고 있다.

마을에서 생산되는 익모초꽃은 없어서 못 팔 정도로 인기가 높다.

특히 매년 5월 중순부터 6월말까지 귀족빛깔인 연보라색 꽃이 활짝 피 장관을 연출하고 있으며 이 같은 익모초꽃의 인기로 이 마을은 '하고초마을'이라고도 불린다.

'산골마을의 풍경'을 그리워하는 중년층이나 조용하고 은은한 농촌정서를 체험하려는 도시민들에게 보라색 추억을 선사하려 축제를 마련했다는 것이 박 이장의 설명이다.

마을은 축제기간 익모초꽃을 비롯해 시중에서 흔히 볼 수 없는 익모초비빔밥, 익모초진, 익모초초액기스 등을 선보이고 판매한다.

한편 익모초는 무월경, 생리통, 산후 자궁 수축 불량으로 출혈, 복통이 있을 때 어혈(瘀血)을 제거하고 자궁 수축을 돕는것으로 알려져 있다.

또 가벼운 이뇨작용이 있어서 소변 양이 적어지고 잘 나오지 않을 때, 몸이 부었을때 사용하며 습진, 가려움증, 종기 등에 사용한다. 씨앗인 충위자는 생리조절작용, 시력증강 작용이 있다.

이외에 약리작용으로 자궁흥분 작용, 혈전용해 작용, 심장과 관상동맥 혈류량 증가작용, 호흡 흥분 작용, 피부진균 억제 작용 등도 보고돼 있다.

축제에 관한 자세한 내용은 박중회 이장(☎ 011-441-9552)에게 연락하면 알 수 있다.

지성호 기자 : shchi@yna.co.kr

【신문 (기사) - 14】

2008년 5월 23일 경남연합일보

함양, 양천마을 보라색 꽃잔치

천수답 다랭이는 10만m² 하고초 심어 도시민들 초대

함양군 백전면 양천마을(이장 박종희·63세)은 온 마을이 보라색 꽃잔치다.

양천마을은 22일부터 6월 9일까지 하고초꽃 축제를 열어 하고초 꽃밭 걷기, 사진 찍기, 하고초음식먹기, 산골길 걷기, 하고초꿀 시음회 등을 펼친다.

이 마을은 천수답 다랭이는 10만m²(3만평)에 벼 대신 꿀풀이라고도 불리는 하고초꽃을 심어 온 마을이 보라색 하고초꽃이 활짝 피 장관을 이루고 있다.

마을은 때맞춰 '산골마을의 풍경'을 그리워하는 중년층이나 그러한 정서를 체험하고자 하는 도시민들에게 보라색 꽃을 피워놓고 초대를 하고 있다.

하고초는 연보라색 꽃이 피는 약재로 한방에서 찾는 4대 약초의 하나로 평가받는 것에 착안해 4년 전부터 하고초를 심어 '하고초꽃마을'이라는 아름다운 이미지 외에도 이 꽃에 의한 벌꿀농사로 고수입을 얻고 있다.

30가구 주민 중에 절반 이상이 하고초꽃의 밀원으로 벌꿀을 키워 꿀 생산을 하는데, 하고초에는 갑상성, 고혈압, 부인병, 폐에도 좋으며 암 등에도 좋은 약초로 알려지면서 이 마을의 하고초꿀이 없어서 못 팔 정도로 인기를 얻고 있다.

하고초는 꽃잎을 따서 비빔밥을 해서 먹기도 하고 하고초지짐이 등의 음식과 하고초엑기스를 만들어 먹을 수 있는데, 시중에서 먹을 수 없지만 축제 중에 양천마을에서 먹을 수 있다.

김상문기자 ksm@gnynews.co.kr (2008-05-23)

【신문 (기사) - 15】

2008년 5월 23일 뉴스경남



함양군 백전면 양천마을 천수답 다랭이는 10만㎡(3만평) 꿀풀이 온마을이 보라색 하고초꽃이 활짝 피 장관을 이루고 있다.

양천마을 다랭이는 보라색 꽃 장관

함양군 백전면 10만㎡ 꿀풀

다음달 9일까지 초꽃 축제

함양군 백전면 양천마을(이장 박종희·63) 천수답 다랭이는 10만㎡(3만평)에 벼 대신 꿀풀이라고도 불리는 하고초 꽃을 심어 온마을이 보라색 하고초꽃이 활짝 피 장관을 이루고 있다.

이에 따라 양천마을은 22일부터 다음달 9일까지 하고초꽃 축제를 열어 하고초 꽃밭 걷기, 사진찍기, 하고초음식먹기, 산골길 걷기, 하고초굴 시음회 등을 펼친다.

마을은 대맞춰 '산골마을의 풍경'을 그리워하는 중년층과 농촌 정서 체험을 원하는 도시민들에게 보라색 꽃을 피워놓고 초대할 하고 있다.

하고초는 연보라색 꽃이 피는 약재이며, 한방에서 갖는 4대 약초의 하나로 평가받는 것에 착안해 4년 전부터 이 마을은 하고초를 심어 '하고초꽃마을'이라는 아름다운 이미지와 예도 이 꽃에 의한 벌꿀농사로 고수일을 얻고 있다.

30가구 주민 중에 절반 이상이 하고초꽃의 밀원으로 벌꿀을 키워 꿀 생산을 하며, 하고초에는 갑상성, 고혈압, 부인병, 폐, 암 등에도 좋은 약초로 알려지면서 이 마을의 하고초 꿀이 없어서 못 팔 정도로 인기를 얻고 있다.

하고초는 꽃잎을 따서 비빔밥을 해서 먹기도 하고, 초치질 등 음식과 하고초액기스를 만들어 먹을 수 있으며, 시중에서 먹을 수 없지만 축제 중에 양천마을에서 먹을 수 있다.

/주은한기자

【신문 (기사) - 16】

2008년 5월 26일 신아일보

보라색 ‘꽃대궐’에 초대합니다

함양 양천마을, 다랭이는 하고초 꽃 장관

함양군 백전면 양천마을(리장 박종희·63세)은 온 마을이 보라색 꽃잔치다. 양천마을은 22일부터 6월 9일까지 하고초꽃 축제를 열어 하고초 꽃밭 걷기, 사진찍기, 하고초음식먹기, 산골길 걷기, 하고초꿀 시음회 등을 펼친다.

이 마을은 천수답 다랭이는 10만㎡(3만평)에 비 대신 **꿀풀이라고도 불리는 하고초꽃**을 심어 온마을이 보라색 하고초꽃이 활짝 피 장관을 이루고 있다. 마을은 때맞춰 ‘산골마을의 풍경’을 그리워하는 중년층이나 그러한 정서를 체험하고자 하는 도시민들에게 보라색 꽃을 피워놓고 초대를 하고 있다.

하고초는 연보라색 꽃이 피는 약재로 한방에서 찾는 4대 약초의 하나로 평가받는 것에 착안해 4년 전부터 하고초를 심어 ‘하고초꽃마을’이라는 아름다운 이미지 외에도 이 꽃에 의한 벌꿀농사로 고수입을 얻고 있다. 30가구 주민 중에 절반 이상이 하고초꽃의 밀원으로 벌꿀을 키워 꿀 생산을 하는데, **하고초에는 갑상성, 고혈압, 부인병, 폐에도 좋으며 암 등에도 좋은 약초**로 알려지면서 이 마을의 하고초꿀이 없어서 못 팔 정도로 인기를 얻고 있다.

하고초는 꽃잎을 따서 비빔밥을 해서 먹기도 하고 하고초찌짐 등의 음식과 하고초액기스를 만들어 먹을 수 있는데, 시중에서 먹을 수 없지만 축제 중에 양천마을에서 먹을 수 있다.

특히 간담에 화가 울체된 것을 다스리므로 간화로 인하여 눈이 충혈되고 아프면서 눈물이 나고 햇빛을 볼 수 없는 증상과 두통, 어지럼증에 유효하다. 결핵성 림프선염, 종기의 초기에 단방이나 현삼, 모려 등을 배합해서 치료 한다.

신경성 고혈압의 혈압을 내리는데 단방 또는 두충, 조구등을 배합해서 치료하면 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있다.

함양/박우진기자 wjpark@shinailbo.co.kr

【신문 (기사) - 17】

2008년 5월 26일 환경일보

함양군 다랭이논 보라색 꽃 물결

10만㎡에 꿀풀이라고도 불리는 하고초꽃이 활짝

경상남도 함양군 양천마을은 지난 22일부터 6월 9일까지 하고초꽃 축제를 열어 하고초 꽃밭 걷기, 사진찍기, 하고초음식먹기, 산골길 걷기, 하고초꿀 시음회 등을 펼친다.



▲하고초의 물결

양천마을은 천수답 다랭이논 10만㎡(3만평)에 벼 대신 꿀풀이라고도 불리는 하고초꽃을 심어 온마을이 보라색 하고초꽃이 활짝 피 장관을 이루고 있다.

군은 때맞춰 '산골마을의 풍경'을 그리워하는 중년층이나 그런 정서를 체험하고자 하는 도시민들에게 보라색 꽃을 피워놓고 초대하고 있다.

하고초는 연보라색 꽃이 피는 약재로 한방에서 찾는 4대 약초의 하나로 평가받는 것에 착안해 4년 전부터 하고초를 심어 '하고초꽃마을'이라는 아름다운 이미지 외에도 이 꽃에 의한 벌꿀농사로 고수입을 얻고 있다.

이 마을 30가구 주민 중에 절반 이상이 하고초꽃의 밀원으로 벌꿀을 키워 꿀 생산을 하는데 하고초에는 갑상성, 고혈압, 부인병, 폐에도 좋으며 암 등에도 좋은 약초로 알려지면서 이 마을의 하고초꿀이 없어서

못 팔 정도로 인기를 얻고 있다.

하고초는 꽃잎을 따서 비빔밥을 해서 먹기도 하고 하고초찌짐 등의 음식과 하고초액기스를 만들어 먹을 수 있는데 시중에서는 먹을 수 없지만 축제 중에 양천마을에서 먹을 수 있다.

하고초의 약효

간담에 화가 울체된 것을 다스리므로 간화로 인해 눈이 충혈되고 아프면서 눈물이 나고 햇빛을 볼 수 없는 증상과 두통, 어지럼증에 유효하다. 결핵성 림프선염, 중기의 초기에 단방이나 현삼, 모려 등을 배합해 치료한다.

신경성 고혈압의 혈압을 내리는 데 단방 또는 두충, 조구등을 배합해서 치료하면 효능이 뛰어나다.

약리: 물과 알콜 추출액은 혈압을 내리고 달인 물은 혈관 확장 작용을 보인다. 조기 염증반응에 현저한 억제 작용을 나타낸다. 토기의 염증 반응을 억제하며 비 특이성 면역기능 이외에 특이성 면역기능에 강한 억제 작용을 나타낸다.

임상보고: 고혈압에 유효성을 나타낸다. 급성 황달형전염성 간염에 이 약물 60g, 대추 30g에 물 1500mL를 붓고 서서히 끓여서 하루 3회로 나누어 복용해 비교적 좋은 치료 효과를 얻었다. 폐결핵에 매일 60g씩 달여서 마시고 좋은 반응을 얻었다.

제옥레 기자 joy6339@hanmail.net

【신문 (기사) - 18】

2008년 5월 26일 전국매일

함양 양천마을 '보라색 꽃잔치'

하고초 꽃 축제 새달 9일까지 ... 사진찍기 등 체험행사

경남 함양군 백전면 양천마을은 온 마을이 보라색 꽃 잔치로 탈바꿈되면서 새달 9일까지 하고초꽃 축제를 열어 하고초 꽃밭 걷기, 사진찍기, 하고초음식먹기, 산골길 걷기, 하고초꿀 시음회 등을 펼친다.

이 마을은 천수답 다랭이는 10만㎡(3만평)에 벼 대신 꿀풀이라고도 불리는 하고초꽃을 심어 온마을이 보라색 하고초꽃이 활짝 피 장관을 이루고 있다.

마을은 때맞춰 산골마을의 풍경을 그리워하는 중년층이나 그러한 정서를 체험하고자 하는 도시민들에게 보라색 꽃을 피워놓고 초대를 하고 있다.

30가구 주민중에 절반 이상이 하고초꽃의 밀원으로 벌꿀을 키워 꿀 생산을 하는데 하고초에는 갑상성, 고혈압, 부인병, 폐에도 좋으며 암 등에도 좋은 약초로 알려지면서 이 마을의 하고초꿀이 없어서 못 팔 정도로 인기를 얻고 있다.

하고초는 꽃잎을 따서 비빔밥을 해서 먹기도 하고 하고초찌짐 등의 음식과 하고초액기스를 만들어 먹을 수 있는데 시중에서 먹을 수 없지만 축제 중에 양천마을에서 먹을 수 있다.

장 흙 기자 : jh5696@jeonmae.co.kr

【신문 (기사) - 19】

2008년 5월 27일 경남일보



함양 백전면 양천마을 다랭이 논에 보라색 하고초 꽃과 소를 모는 농부의 모습이 한 폭의 그림 같다.

함양군 다랭이 ‘하고초 꽃’ 장관

함양군 백전면 양천마을(이장 박종희)은 온 마을이 보라색 꽃으로 장관을 이루고 있다.

양천마을은 22일부터 내달 9일까지 ‘하고초 꽃’ 축제를 열어 하고초 꽃밭 걷기, 사진 찍기, 하고초음식먹기, 산골길 걷기, 하고초꿀 시음회 등을 펼친다.

이 마을은 천수답 다랭이는 10만㎡(3만평)에 벼 대신 ‘꿀풀’ 이라고도 불리는 하고초 꽃을 심어 온 마을이 보라색 하고초 꽃으로 질게 물들어져있다.

마을 주민들은 이 시기를 맞춰 ‘산골마을의 풍경’ 을 그리워하는 중년층이나 그러한 정서를 체험하고자 하는 도시민들에게 보라색 꽃을 피워놓고 초대를 하고 있다.

하고초는 연보라색 꽃이 피는 약재로 한방에서는 4대 약초중의 하나로 평가받는 것에 착안해 4년 전부터 하고초를 심어 ‘하고초꽃마을’이라는 아름다운 이미지 외에도 이 꽃에 의한 벌꿀농사로 고수입을 올리고 있다.

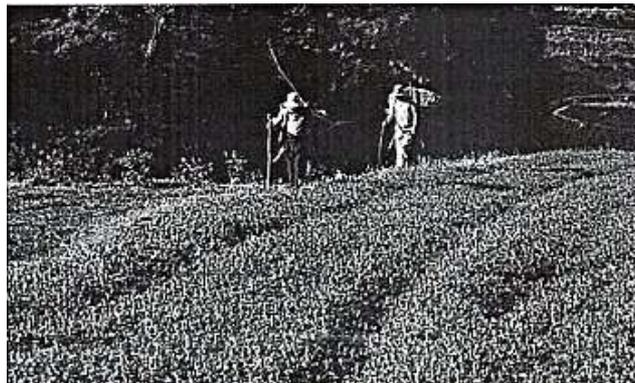
30가구 주민 중에 절반 이상이 하고초꽃의 밀원으로 벌꿀을 키워 꿀 생산을 하는데, 하고초에는 갑상성, 고혈압, 부인병, 폐에도 좋으며 암 등에도 좋은 약초로 알려지면서 이 마을의 하고초꿀은 생산과 동시에 판매가 이루어 질 정도로 대단한 인기를 얻고 있다.

하고초는 꽃잎을 따서 비빔밥을 해 먹기도 하고 하고초찌짐 등의 음식과 하고초 원액을 만들어 먹는데, 시중에서는 구하기 어렵지만 축제 기간 중에 양천마을을 방문하면 누구나 맛 볼 수 있다.

노상봉 기자 ✉ nosa@gnews.co.kr

【신문 (기사) - 20】

2008년 6월 2일 경남매일



남해군 남면 다랭이 마을에서 5월 31일부터 1일까지 제2회 다랭이논 썩레질&모내기 축제가 열렸다. 45도의 비탈에 일군 108개의 층층계단 680여개의 샷갓배미 다랭이논 한배미에는 땀을 흘려가며 억척스럽게 살아온 다랭이 마을 사람들의 굳건한 삶이 묻어 있다. 축제기간 동안 이곳에서는 자연과 삶을 사랑하는 사람들이 모여 썩레질, 모내기, 물 논 달리기 등을 체험했다. (사진위쪽)

지리산 자락 함양군 백전면 양촌 하고초마을 18만여㎡의 하고초 재배지에서 지난 5월23일부터 오는 8일까지 하고초 축제가 열리고 있다. 사진 아래쪽은 관광객들이 하고초 재배지 체험행사를 하고 있다.

【신문 (기사) - 21】

2008년 6월 2일 경남매일

하고초 축제



지리산 자락 함양군 백전면 양촌 하고초 마을 18만여㎡의 하고초 재배지에서 지난 5월23일부터 오는 8일까지 하고초 축제가 열리고 있다. 사진은 관광객들이 하고초 재배지 체험행사를 하고 있다.

<이영환 기자>

【신문 (기사) - 22】

2008년 6월 4일 경남신문



레디 고! 2일 함양 백전면 양천마을에서 SBS '일췌일요일 고향 애' 촬영을 하고 있다.

함양 '하고초 꽃마을' 인기 만발

백전면 양천마을 논 10만㎡ 보라색 장관
방송사들 축제현장서 프로그램 제작 열기

함양군 백전면 양천마을에서는 **방송사들의 취재 경쟁이 치열하게 펼쳐지고 있다.**

양천마을은 지리산 자락의 천수답 다랑이 논 10만㎡에 대체작목으로 하고초를 심어 현재 하고초가 만발해 보라색 꽃이 장관을 이루고 있기 때문이다.

지난 1~2일 **SBS '일췌일요일 고향애' 제작팀**(연출 김소현, 리포터 위더멜든)은 연보라색 꽃이 피는 약재로 한방에서 찾는 4대 약초의 하나로 평가받는 것에 착안해 4년 전부터 하고초를 심어 '하고초 꽃마을'이라는 아름다운 이미지, 그리고 이 꽃에 의한 벌꿀농사로 고수입을 올리는 현장을 취재했다.

지난달 23~24일에는 **KBS '6시 내고향' 촬영팀**(연출 진정수, 작가 박민숙, 리포터 김연주)과 **SBS '생방송 투데이' 촬영팀**(연출 김훈, 작가 이지예)이 하고초 행사장을 찾은 관광객들이 하고초 꽃재배단지 체험현장, 하고초 꿀 채취 장면과 하고초 음식을 나누어 먹는 현장을 생생하게 영상으로 담았다.

지난달 25일 **KNN(지사장 최광숙)뉴스 촬영팀**은 하고초 축제 행사장의 생생한 현장을 뉴스를 통해 방영했으며, 27일에는 방송인 윤문식씨가 **MBC '고향은 지금' 촬영팀**과 함께 양천마을을 방문, 하고초 축제의 생생한 현장을 녹화했다.

또 **진주MBC '생방송 전국시대' 촬영팀**도 하고초 축제 현장을 찾아 취재를 했다.

한국 **사진작가협회**(이사장 윤필수)는 지난 1일 소속 사진작가 50여명이 하고초 축제 행사장을 찾아 사진 촬영을 하기도 했다.

양천마을은 오는 9일까지 꽃밭 걷기, 사진찍기, 하고초음식먹기, 산골길 걷기, 하고초꿀 시음회 등 다양한 행사를 마련했다. 하고초마을 축제기간에 관광객들이 1000여명이 다녀 갔으며, 특판장에는 하고초 꿀 및 하고초원액 판매로 2000여만원의 판매수익을 올렸다.

서회원기자 sehw@knnews.co.kr

【신문 (기사) - 23】

2008년 6월 13일 경남매일

하고초 축제를 자치단체 축제로



5월 26일부터 지난 8일까지 함양군 백전면 양천마을에서는 제4회 하고초 축제가 열렸다. 다랭이논과 어우러진 보랏빛 물결은 지난 보름간 도시민을 유혹하기에 충분했다.

시골마을이 분주하다 못해 주말에는 관광버스까지 대동한 나들이객 때문에 인산인해를 이뤘다.

축제기간 동안 현지를 찾은 내방객들은 1만여명이 넘어 하고초 축제는 함양을 알리는데 큰도움이 됐다는 평가를 받고 있다.

지천에 널린 들풀을 단지화시켜 한봉사육과 연계해 꿀을 생산·판매해 마을을 부농으로 만든다는 기발한 발상이 축제의 성공요인이라 할 수 있다.

축제 기간 동안 5번 이상 행사장을 찾은 기자의 눈에는 아쉬운 점도 많이 보였다.

우선 마을주민이 일심동체가 돼 분주히 행사를 진행했지만 방문객이 너무 많아 이들만으로는 힘이 부쳤다.

부족한 주차공간과 좁은 진입로도 내방객들을 힘들게 했지만 축제의 성공에 힘입어 예산이 확보 돼 현재 공사가 진행 중이라니 반갑다.

마을단위 행사를 산업축제로 자리매김하기까지는 관계 공무원들의 무수한 노고가 있었다는 것은 부정할 수 없다.

하지만 이처럼 성공을 거둔 하고초 축제가 개최 전 동네잔치로 평가 절하 된 것은 행정 착오가 아닌가 싶다.

하고초 축제가 상업축제로 성공하기 위해서는 하고초 마을만의 테마를 다양한 체험행사와 먹을거리로 연계해 나가야 한다.

하지만 마을을 지키고 있는 어르신들로만은 한계가 있다. 이에 마을단위 행사인 이 축제를 면에서 주관하는 축제로 승격시킬 것을 제안한다.

축제는 지속성을 가져야 살아남을 수 있다. 축제에 참여했던 이들이 내년에도 다시 찾고 또 입소문을 통해 축제가 성장해 나가야 한다.

하지만 마을주민들의 힘만으로는 부족함이 많다. 백전면 양천마을(이장 박종희)은 20가구 32명이 거주하는 작은 마을이다. 12가구가 하고초 작목반(반장 정진상)을 구성했고 이들은 축제를 통해 부농을 꿈꾸고 있다.

다랭이 논·밭 11ha에 하고초를 심어 볼거리를 제공하고 꿀을 비롯한 하고초 진액으로 수익을 올린다면 이들의 바람은 꿈에서 끝나지 않을 것이 분명하다.

<최경인 기자>

● 전시 (박람회)

일 자	축제 및 박람회	비 고
2006-10-13 ~ 2006-10-15	함양물레방아축제 및 함양약초심포지엄	
2007-07-27 ~ 2007-07-29	함양산삼축제	
2008-03-13 ~ 2008-03-15	2008 동경국제식품박람회	
2008-10-02 ~ 2008-10-05	2008 feel 경남특산물박람회	
2008-12-12	2008 한국국제대학교 식품과학부 졸업작품전시회	
계	5건	

【전시 (박람회) - 1】

함양물레방아축제 및 함양약초심포지엄 참가(함양군 연계)

- 시간 및 장소 : 2006. 10. 13 ~ 10. 15, 함양군
- 참가자 : 하고초 사업 참여연구원
- 목 적 : 하고초를 이용한 건강기능식품 개발 사업 홍보 및 시제품 전시, 시식회



【전시 (박람회) - 2】

함양산삼축제 참가

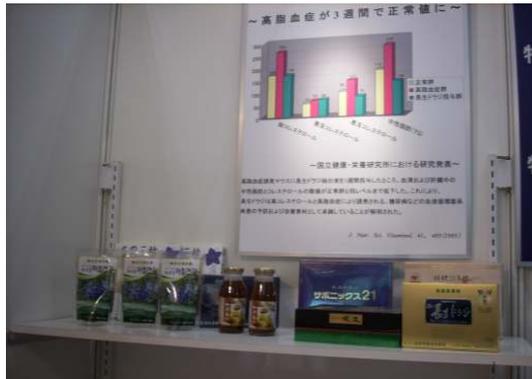
- 시간 및 장소 : 2007. 7. 27 ~ 7. 29, 함양군
- 참 가 자 : 하고초 사업 참여연구원
- 목 적 : 하고초 연구개발 시제품 전시 및 홍보(함양군 연계)



【전시 (박람회) - 3】

2008 동경국제식품박람회

2008. 3. 13 ~ 15



- 하고초 전시 및 홍보, 바이어 상담 -
[(주)경남무역 & 장생도라지 산학협력]

【전시 (박람회) - 5】



하고초 진액

- 주원료 : 하고초(꿀풀)
- 내용량 : 100mL × 30포
- 하고초의 항염증활성, 항산화활성을 이용한 제품

건강기능식품학 전공 이 승 우

2008 한국국제대학교 식품과학부 졸업작품전시회

【전시 (박람회) - 5】

2008 feel 경남특산물박람회 참가결과보고

한국국제대학교 식품사업단

- 참가기관 : 한국국제대학교
- 참가기간 : 2008. 10. 2(목) ~ 5(일) / 4일간
- 장 소 : 창원컨벤션센터(CECO)
- 주 관 : (주)경남무역 / 주최 : 경상남도, 창원시
- 참가목적
 - 지역발전과 실용적 국제화를 선도하는 창조적 인재양성을 목표로 새로운 변화의 길로 도약하는 한국국제대학교 대회 홍보
 - 경남 특산소재 및 한방약초를 이용하여 개발된 기능성식품, 한방제과제빵, 파프리카 요리, 웰빙커피 전시 및 시식회를 통해 산학연관 공동 연구개발 성과물을 경남도민들에게 널리 홍보함은 물론 지역관광상품화에 적극 활용
 - 한국국제대학교 식품사업단/식품과학부의 건강기능식품, 호텔조리, 식품영양 전공 재학생들의 학습활동 소개(무료 비만측정, 무료 시식회, 개발제품 전시 및 시식회 등)
- 참가내용
 - 한국국제대학교 홍보관(천재동 과장 외 예그리나 재학생 2명), 한방제과제빵 작품 전시(성태종교수 외 재학생 20명), 산학협동 연구개발제품 전시(하교초, 파프리카 등, 서종권 교수 외 재학생 25명), 웰빙커피 시식회(이현주 교수 외 재학생 15명), 무료비만측정 및 영양상담 실시(김소영, 최정화 교수 외 재학생 15명), 파프리카 요리 전시 및 시식회(황영정 교수 외 재학생 20명) /총 교수 15명, 학생 95명 참가
- 주요성과
 - 경남도민과 일반관람객 약 5만여명을 대상으로 변화하는 한국국제대학교의 새로운 위상을 적극적으로 홍보할 수 있는 계기가 됨.(영양상담 500건, 무료비만측정 350건, 웰빙커피시식 2,500명, 하교초 연구개발제품, 파프리카아이 스크립 시식 3,500명, 파프리카 요리시식 200명)
 - 참가학생 대표 2명 : (주)경남무역 공로상 수상

