

최 종
연구보고서

돌나물의 건강 기능성 구명과 유전자원 보존 및
산업적 이용기술 개발

Studies on health-benefit function, genetic
resources conservation, and industrial utilized
techniques for *Sedum sarmentosum*

연구기관

원광대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돌나물의 건강 기능성 구명과 유전자원 보존 및 산업적 이용기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 원광대학교

총괄연구책임자 : 이 승 엽

세부과제책임자 : 이 승 엽

연 구 원 : 김 효 진

안 보 라 미

연 구 보 조 원 : 전신영, 김종수, 박정희,

김형순, 김양희, 김민수,

최경희, 김진영, 양권승

협동연구기관명 : (주)대덕바이오

협동연구책임자 : 김 혜 영

연 구 원 : 이정현, 서인현, 백승영,

임소용, 가소근, 임득균,

이미라

위탁연구기관명 : CNU바이오텍

위탁연구책임자 : 모 은 경

연 구 원 : 이청하, 양선아, 김현호

고리주안

요 약 문

I. 제 목

돌나물의 건강 기능성 구명과 유전자원 보존 및 산업적 이용기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

21세기에 인류의 복지를 위한 유전자원의 중요성은 생명공학 기술의 눈부신 발전과 함께 더욱 그 중요성이 부각되고 있으며, 선진국을 비롯한 개발도상국들이 자국의 유전자원 뿐 만아니라, 새로운 유전자원의 탐색에 많은 인력과 경비를 투자하고 있다. 우리나라의 자생식물들 중에는 의약품, 화장품, 건강보조 기능성 식품원료 등으로 고부가가치를 가지고 있는 식물종들이 많은데, 이러한 자생식물을 멸종위기에서 보존하고, 성인병 예방과 치료를 위한 의약품 및 식품원료 등으로 자원화 하는 것이 시급하다.

돌나물은 봄나물 중에서 영양이 풍부하고 독특한 향미를 갖고 있으며, 민간에서는 생즙을 간염, 대하증, 화상 등에 이용하고 있으며, 최근 약리작용이 과학적으로 구명되고 있어 건강식품으로의 개발이 가능하다. 그러나 우리나라의 산야에서 흔히 보아왔던 돌나물은 최근의 개발과 제초제 남용 등으로 대부분 사라져 가고 있는 실정이다. 특히 식·의약적으로 중요한 식물들을 보존하는 일은 자원전쟁의 시대에 국가적으로도 아주 중요하다. 영양번식 식물의 유전자원을 포장에서 보존할 경우, 많은 시간과 숙련된 인력 및 시설이 필요하고, 병리적·생리적 퇴화 가능성, 기상재해에 의한 소실이나 유전적 침식 등의 위험에 노출되어 있다. 이에 따라 기내 활성보존(in vitro conservation)이나 초저온 동결보존(cryopreservation)을 이용하여 보존하면, 좁은 공간에서 다수의 유전자원을 보존할 수 있어 경제적이므로 돌나물에서도 이와 관련된 연구가 시급하다. 또한 돌나물은 다육식물로서 유통 및 저장시에 수분증발로 시들은 상태로 전시판매되는 경우가 많아 시장성이 낮은 한 원인이 되고 있어, 소포장 및 저온유통이 시급하지만 관련연구가 미흡한 실정이다.

돌나물은 비타민 C의 함량이 높고, 칼슘, 철분, 아연 등의 무기물 함량도 높을 뿐만 아니라, 민간에서는 생즙을 간염, 대하증, 화상 등에 이용하고 있으며, 최근 약리작용이 과학적으로 구명되고 있어 건강식품으로의 개발이 가능하다. 최근 돌나물은 골다공증에 유효하고, 간기능 개선능이 있는 것으로 보고되고 있으나, 저장성이 낮고 이를 이용한 가공 식품이 없어 부가가치가 매우 낮다. 그러나 유효지표성분이 분리·동정이 되지

않고 있으며, 체내에서의 기능성 발현 기전 또는 대사관련 연구가 미흡한 실정이다.

최근 기능성 식품에 대한 관심이 높아지고 있는데, 이들 식품에는 비타민 A, C, E, flavonoids, anthocyanins, carotenoids, tanic acid 등의 항산화물질이 풍부하게 들어 있어 활성산소가 생기는 것을 막고 노화를 억제시키거나, 각종 암 및 질병을 예방하는데 도움이 된다. 이러한 기능성 물질이 많이 함유된 식품재료를 이용하여 기능성 식품으로 개발하여 산업화하려는 연구가 많이 이루어지고 있는데, 돌나물은 우리나라에서는 어느 지역에서나 생산이 가능한 건강채소로서 건강식품 재료로 적합하지만, 이를 산업화하려는 적극적 연구는 미흡한 실정이다. 이에 따라 돌나물의 무기성분, 기능성 영양 성분 및 향기성분 분석과 항산화 활성 및 생리활성 등을 다각도로 검정하여 기능성 식품으로 개발할 필요가 있다.

따라서 본 연구의 목적은 첫째, 식·의약적으로 중요한 돌나물 유전자원의 유연관계 분석과 기내 활성보존 및 초저온 동결보존법을 개발하고, 출하 돌나물의 시장성을 높이기 위한 소포장용 저온저장 온도를 구명하며, 둘째, 수요가 한정되어 있는 돌나물의 이용성과 부가가치를 높이기 위하여, 체내에서의 기능성 발현 기전과 대사관련 연구를 통한 건강 기능성 식품을 개발하고, 셋째, 돌나물의 기능성 식품화에 영향을 미치는 무기·영양성분 및 향기성분을 분석하고, 개발 제품의 급성 및 아급성 독성과 유전독성, 세포독성 등의 안전성과 제품보존을 위한 안정성을 연구하여, 부가가치가 높은 건강식품으로서의 안전성과 안정성을 구명하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 돌나물 유전자원 보존 및 저장성 향상기술개발

- 식·의약적으로 중요한 돌나물 유전자원의 유연관계 분석과 기내 활성보존 및 초저온 동결보존법을 개발
 - 31개 돌나물 지역종의 영양생장기 및 개화기 형태적 특성 조사하여, Ward의 방법(SAS Institute)으로 제곱 유클리디안 거리 측도를 Z정수로 변수 변환하여 군집분석한 결과를 dendrogram으로 작성하여 비교
 - RAPD를 이용한 돌나물의 유연관계 분석을 위하여 31개 지역종의 DNA 추출 및 다형성을 가진 primer 탐색과, NTSYS program으로 dendrogram 작성
 - 돌나물 유전자원의 기내활성보존을 위한 기내 영양체 최적 번식법 개발하고, 영양체의 기내활성보존에 의한 저온(0-4℃) 및 단기(1-2년) 보존법 확립

- 돌나물 유전자원의 초저온 동결 보존을 위하여 동아 및 기내신초의 초저온 동결 보존법을 확립
- 출하 돌나물의 시장성을 높이기 위한 소포장용 저온저장 온도를 구명과 돌나물 지역종들의 항산화 활성 및 비타민 C 함량을 분석하여 제품개발을 위한 우량 돌나물 계통선발
 - 돌나물 유통을 위한 수확 후 적정 저장온도를 구명하여 저장성 향상
 - 지역 수집종들의 항산화 활성 및 비타민 C 함량을 분석

2. 돌나물의 건강 기능성 구명 및 고부가가치 상품의 개발

- 돌나물의 간기능 개선 및 간암억제 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발
 - 돌나물의 간기능 개선 및 간암억제효과 탐색
 - 돌나물로부터 간암억제 물질의 분리 및 동정
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 백서의 간 기능에 미치는 영향
 - 간기능 관련 단백질의 탐색
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 간암세포의 분화에 미치는 영향 탐색
 - 간기능 개선 및 간암억제 작용이 강화된 제품의 개발
- 돌나물의 항산화 및 면역활성 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발
 - 돌나물의 항산화 및 면역활성 탐색
 - 돌나물로부터 항산화 및 면역활성 물질의 분리 및 동정
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 백서에서의 항산화 관련효소 활성 구명
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 면역활성에 미치는 영향
 - 항산화 및 면역활성 관련단백질의 탐색
 - 항산화 및 면역활성이 강화된 제품의 개발
- 지질대사 및 혈행개선 물질의 분리·동정 및 제품개발
 - 돌나물의 지질대사 및 혈행 개선 연구
 - 돌나물로부터 지질대사 및 혈행개선 물질의 분리 및 동정
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 비만에 미치는 영향
 - 지질대사 및 혈행개선 지표단백질의 동정
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 지질대사 및 혈행개선에 미치는 효과 구명
 - 지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 제품의 개발

3. 돌나물의 성분분석 및 건강기능성 돌나물제품의 안전성 및 안정성 평가

- 돌나물의 일반성분, 영양성분, 향기 및 향미성분 분석
 - 돌나물의 우량 지역종에 대한 수분함량, 회분, 환원당, 비타민 A, C, 조지방, 조단백 등의 함량 측정하고, 향기 및 향미성분 등을 GC/MS 분석

- 돌나물성분분석 및 건강기능성 돌나물제품(간기능 개선 및 간암억제효과)의 안전성 및 안정성 평가
 - 돌나물 숙취해소 음료에 대한 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 통하여 안전성 평가
 - 실온에 저장시 3개월간 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 조사

- 항산화 및 면역활성이 강화된 돌나물 제품(돌나물 젤리)의 안전성 및 안정성 평가
 - 돌나물 젤리에 대한 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 통하여 안전성 평가
 - 저온에 저장시 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 조사

- 지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 돌나물 제품(돌나물 차)의 안전성 및 안정성 평가
 - 돌나물 차에 대한 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 통하여 안전성 평가
 - 실온에 6개월간 저장시 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 돌나물 유전자원보존 및 저장성 향상기술 개발

- 돌나물의 31 지역종에 대한 개화전 생육특성과 개화기 화기특성을 토대로 군집 분석을 실시한 결과 크게 2군으로 나눌 수 있었으며, I 군에는 29 지역종이 속하였고, II 군에는 꽃이 피지 않는 완주 및 군산 지역종 등이 속하였다. I 군은 다시 두개의 소그룹으로 나눌 수 있었는데, I-1 군은 개화특성이 양호한 금산, 부천, 포천, 용인 등 4개 지역종이 속하였고, 특성이 비슷한 25 지역종들은 I-2 군에 속하였다. RAPD를 이용한 유연관계를 분석한 결과, 크게 2군으로 분류할 수 있었으며, I 군에는 완주 및 군산 지역종을 포함한 27개 지역종이 속하였고, II 군에는 줄기와 잎이 가늘고 꽃이 잘 피는 금산, 부천, 포천, 용인 등 4 지역종이 속하였다.
- 돌나물의 기내 배양묘 육성은 0.2 mg/L BA를 첨가한 MS 배지에서 80-90 일 배양시 초장의 신장이 적당하고, 마디가 짧으며 줄기가 굵은 다아체를 얻을 수 있었다. 돌나물의 기내 저온 활성화조건은 0.2mg/L BA와 50mg/L sucrose, 1.2% agar를 기본으로 한 배지에 10-20mg/L ABA 또는 6-9% sucrose를 첨가하는 것이 유전자원의 생육 및 활성이 양호하였다. 돌나물 기내신초의 초저온 동결보존 실험결과, 0.4-0.6M sucrose 용액에서 1일 동안 전배양 후 냉동보존한 기내신초의 재생율은 11.1-16.7%였다.
- 돌나물의 수확후 생체중은 저장온도에 따라 8.7-25.3%의 감소를 보였으며, 저장온도가 높을수록 생체중 감소율도 높았다. 생체중 감소는 포항 지역종이 가장 컸으며, 완주 지역종의 변화가 비교적 적었다. 외관상 품질은 완주 지역종의 저장성이 양호하였으며, 군산, 완도, 포항 순으로 부패율이 높았다. 따라서 돌나물을 스치로폼 접시에 랩포장 할 경우, 5℃에서는 수확 후 8일까지 상품성을 유지한 상태로 저장이 가능하였다.
- 생육특성이 양호한 13 지역종의 항산화활성을 비교한 결과, 광양, 순천, 완도 지역종에서 항산화 활성이 높았으며, 제주, 부천, 용인, 완주 지역종이 낮은 활성을 보였다. 돌나물의 비타민 C 함량은 완주, 군산, 부안, 금산, 부천, 포천 지역종에서 비교적 높았으나, 대체로 비슷한 수준을 나타내었다.

나. 돌나물의 건강기능성 규명 및 고부가가치 제품의 개발

- Ethyl acetate 추출물로부터 간기능 개선 및 간암억제 화합물은 tetrahydroxyflavonol (quercetin)로 동정되었다. 사염화탄소에 의한 급성 간독성을 유발한 백서에서 돌나물 추출물은 silymarin(대조구)보다 체중 당 간중량의 증가폭이 유의하게 낮았으며, GOT, GPT 활성에서도 hexane, ethyl acetate, butanol 추출물이 silymarin 투여군보다 간 보호효과가 높았다.
- 돌나물 추출물은 사염화탄소로 인한 간 손상을 재생시키는데 효과적이었으며, 특히 methanol 추출물을 투여한 백서의 간조직에서는 세포의 괴사가 관찰되지 않을 만큼 세포 재생이 빨라져 silymarin(대조구)보다 우수하였다. 돌나물 추출물은 ethionine 및 ethanol에 의한 지방간 유도를 유의적으로 억제하였고, 특히 hexane과 ethyl acetate 추출물에서 지방간 억제효과가 매우 우수하였다.
- 간암 세포주 HepG2의 성장에 미치는 ethyl acetate 추출물의 IC₅₀은 155.8 µg/mL로 세포 성장 억제 효과가 가장 우수하였다. HepG2 세포에 돌나물의 ethyl acetate 추출물을 처리한 후, 72시간 배양시에는 92.8%가 apoptosis를 거쳐 괴사되었거나 necrosis 과정으로 이행되었다.
- 돌나물 즙과 ethanol을 백서에 경구투여한 후 2시간이 지났을 때 혈중 ethanol 농도는 대조구보다 약 2.3배 낮게 나타나 돌나물 즙의 ethanol을 분해 효과가 우수하였다. Ethanol을 투여한 백서에서 돌나물의 methanol 및 butanol 추출물은 ADH 및 ALDH 효소활성을 유의적으로 증가시켰다.
- 백서에 ethanol 경구투여 전에 돌나물 추출물 투여구에서는 1시간 경과시 혈중 acetaldehyde의 농도가 대조구의 약 50% 였으며, 시간이 경과하면서 빠르게 감소하였다. 인체에서도 알코올 섭취 전에 돌나물 즙과 추출물의 섭취는 혈중 ethanol 및 acetaldehyde의 농도를 유의적으로 감소시켰다.
- 이에 따라 돌나물 추출물을 주원료로 하여 숙취 해소 효과가 있는 것으로 알려진 청피, 홍삼박, 당귀 및 상황쌀을 첨가하여 돌나물 숙취해소 음료를 제조하였으며, 특허출원 중에 있다.

- 돌나물의 DPPH radical scavenging 효과를 측정한 결과, ethyl acetate 추출물의 subfraction E4의 항산화활성이 가장 우수하였으며, 항산화 활성이 가장 높은 물질은 quercetin으로 동정되었다. ethyl acetate 추출물 subfraction 5의 면역활성이 가장 우수하였다. 돌나물의 면역활성은 ethyl acetate 추출물 subfraction E5에서 가장 우수하였으며, 이 물질은 coumarin 계의 esculetin 인 것으로 확인되었다.
- 백서에 돌나물 추출물을 4주간 섭취시킨 간조직 및 혈액에서의 효소활성은 양성대조구인 tocopherol 또는 ascorbic acid와 유사하거나 우수한 항산화능을 나타내었다. 특히 돌나물 methanol 및 ethyl acetate 추출물에서 polyphenol 함량이 높게 나타났으며, 이는 methanol 추출물 투여구가 전반적으로 높은 항산화능을 나타낸 것과 일치하였다.
- 대식세포인 RAW 264.7 cell lines에 LPS(lipopolysaccharide) 또는 돌나물 용매 추출 분획을 첨가하고 2일간 배양한 후에 생성된 nitric oxide의 양은 LPS 농도가 0.1 µg/mL일 때, methanol, hexane 및 ethyl acetate 추출물에 의해 생성되는 nitric oxide의 양이 감소되었다. 또한 LPS 처리에 의해 발현되는 iNOS 단백질은 돌나물 추출물에 의해 그 생성량이 감소하였다.
- 백서에 고지방식을 급여한 후 돌나물 추출물 처리에 의해 변화된 단백질의 발현 양상은 항산화와 관련된 glutathione peroxidase, glutathione reductase의 발현이 증가되었고, 면역기능과 관련된 단백질 중에서는 COX2의 발현이 증가되었다.
- 돌나물 즙(juice)에 당과 겔화제를 혼합하여 농축, 성형하여 젤리를 제조하였으며, 돌나물 젤리에는 돌나물 즙(juice)의 참가농도에 따라 칼슘, 철분, 칼륨, ascorbic acid 및 유기산 등의 함량이 증가되었다.
- 돌나물 추출물의 지방세포의 성장을 억제하는 효과는 ethyl acetate subfraction E1의 효과가 가장 우수하였으며, 지방 세포 성장을 억제하는 물질을 순수분리한 결과, caffeic acid인 것으로 동정되었다.

- 돌나물의 ethyl acetate 추출물을 첨가하여 지방전구세포 MC3T3-L1이 지방 세포로 분화되는 것을 50% 억제시키는 농도 (IC₅₀)는 66.98 µg/mL이었다. 유전자들의 발현양을 측정한 결과, PPAR-γ는 ethyl acetate 추출물을 첨가시 거의 발현되지 않았다.
- 백서의 콜레스테롤 식이에서 돌나물의 동결건조한 분말 1.5~4.5% 첨가할 경우, 분말 급여량이 많을수록 식이섭취량이 대조구보다 많았음에도 체중 증가는 크게 감소하였다. 돌나물 분말 투여구에서 total cholesterol, TG 및 LDL 농도 및 동맥경화지수 (AI)가 대조구보다 유의하게 감소하였고, 간조직에 축적된 지방양 및 혈청의 ALP 농도도 대조구보다 상대적으로 낮았다.
- 돌나물 분말이 고지방식으로 유도된 비만, 고지혈증, 비알코올성지방간질환에 대한 효과가 우수하였으므로 돌나물 분말을 이용하여 돌나물 차를 개발하였다.

다. 돌나물의 성분분석 및 건강기능성 돌나물제품의 안전성 및 안정성 평가

- 돌나물의 수분함량은 개화기보다 영양생장기에 높았다. 조희분, 조지방, 조단백질은 지역종간에 유의한 차이가 없었다. 금산, 완도, 군산 지역종이 칼륨, 칼슘, 철분의 함량이 높아 우수하였다. Ascorbic acid와 beta-carotene 함량은 군산 지역종에서 가장 높았다. 돌나물의 향기성분은 총 16종이 분리되었는데, pyrazine 및 이들 유도체가 주성분이었다.
- 돌나물을 이용한 숙취해소 음료, 항산화 및 면역활성 강화 젤리, 지질대사 및 혈행개선 차 제품의 안전성 평가에서 반복독성 시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성 시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성 유발 시험에서 안전한 것으로 확인되었고, 동물 실험 종료 후의 조직검사에서도 정상조직과 다른 점을 발견할 수 없었다. 따라서 돌나물을 이용한 제품은 인체에 독성을 유발하지 않는 안전한 제품으로 판단되었다.
- 돌나물 음료, 젤리, 차 제품의 안정성 평가에서 돌나물 음료는 실온에서 3개월, 돌나물 젤리는 4℃ 냉장 저장할 경우 10일 동안 제품의 품질이 변하지 않았으며, 돌나물 차 제품은 실온에서 6개월 동안 품질이 변하지 않았다.

2. 연구개발 결과의 활용실적

○ 산업재산권 출원 및 등록

구 분	명 칭	국 명	출원일	비 고 (등록/출원번호)
발명특허	돌나물 추출물로부터 분리한 플라보노이드 화합물들을 포함하는 고혈압의 예방 및 치료용 약학조성물	대한민국	2006. 10. 27	10-0642151-0000
특허출원	돌나물 즙을 첨가한 젤라틴 젤리 제조 및 품질 특성	대한민국	2008. 4. 15	10-2008-0034532

○ 산업체 기술이전

기 술 내 용	산 업 체	기 술 이 전 일
간기능 보호능이 강화된 돌나물 음료의 제조에 관한기술	(주)대덕바이오	자체활용 예정
돌나물 즙을 첨가한 젤리의 제조에 관한 기술	(주)대덕바이오	자체활용 예정
돌나물 분말차 제조에 관한 기술	(주)대덕바이오	자체활용 예정

○ 전시회

전시품목	전시회 명칭	일시	장소
돌나물 효능 홍보 판넬 및 우량 계통 증식 포장	2006 돌나물 연구회 현장 간담회	2006. 9. 21	원광대학교
돌나물 기내배양 유전자원 및 돌나물 음료 및 젤리 시제품	자생식물 산업화 기술 발표 및 전시회	2006. 11. 16	경상대학교
돌나물 기능 설명 판넬 및 유전자원 포장	2007 돌나물 연구회 현장 간담회	2007. 8. 29	원광대학교

○ 교 육

교 육 내 용	대상 및 참석인원(장 소)	교육일시
지피식물로서 돌나물을 비롯한 몇가지 약용식물의 이용	전북 진안군 농가/50명 (원광대학교 식물원)	2005. 12. 28 ~ 12. 29
돌나물 우량계통 선발 및 주요 특성	돌나물 연구회원 및 재배농가/25명 (원광대학교 생자대 시청각실)	2006. 8. 30
돌나물 주년생산을 위한 재배 기술	돌나물 연구회원 및 재배농가/28명 (원광대학교 생자대 시청각실)	2007. 8. 29

○ 학술발표

No.	논문제목	학술대회명	발표년월일
1	형태적 특성을 이용한 들나물 유연관계 분석	'06 한국자원식물학회 춘계 학술발표회	2006. 05. 11-12
2	CCl ₄ 급성 간독성에 대한 들나물 추출물의 간 보호 효과	'06 한국식품과학회 춘계 학술발표회	2006. 06. 14
3	들나물의 캘러스 형성 및 식물체 분화에 미치는 절편부위 및 배지첨가물의 영향	'06 한국자원식물학회 추계 국제 심포지움	2006. 11. 20
4	RAPD 방법을 이용한 들나물의 유연관계 분석	'07 한국약용작물학회 춘계 학술발표회	2007. 05. 18-19
5	들나물 수집종의 비타민 C 함량 및 항산화 활성 비교	'07 한국자원식물학회 춘계 학술발표회	2007. 05. 29-30
6	Effect of medium supplements and basal medium on plant regeneration of <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국육종학회 춘계 학술발표회	2007. 7. 05-06
7	Detoxification effect of <i>Sedum sarmentosum</i> on acute alcohol liver injury	The 10th Asian Congress of Nutrition	2007. 09. 09-13
8	<i>Sedum sarmentosum</i> prevent ethanol induce liver injury in rats	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
9	Preparation and Quality of Jelly with <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
10	Antiobese and hypolipidemic effects of <i>Sedum sarmentosum</i> on high fat diet	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
11	Effect of <i>Sedum sarmentosum</i> extract on cell death in cultured liver cancer cell	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
12	Hepatic Detoxification Activity and Reduction of Ethanol and Acetaldehyde Concentrations of <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
13	Comparion of Growth and Quality among local strains in Hydroponic Culture of <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국원예학회 추계 학술대회	2007. 10. 26-27
14	Effects of Cutting date and bedsoil on root and shoot growth in cutting of <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국식물과학협의회 공동 국제심포지움	2007. 11. 01-02

○ 논문게재

논문 제목	게재학술지명	권 및 쪽수 (년도)	구 분
돌나물삼목번식과 기내마디배양에서 신초 형성 및 발근에 미치는 영향	한국원예과학기술지	24(1):43-47 (2006)	국내
국내 자생 돌나물의 형태적 특성에 의한 유연관계 분석	한국원예과학기술지	25(2):103-109 (2007)	국내
돌나물 수집계통의 수확후 저장온도에 따른 품질변이	한국생물환경조절학회지	16(3):240-246 (2007)	국내
차광재배가 돌나물의 수량 및 품질에 미치는 영향	한국생물환경조절학회지	16(4):388-394 (2007)	국내
돌나물 즙을 첨가한 젤라틴 젤리의 제조 및 품질특성	한국식품과학회지	39(6):619-624 (2007)	국내
한국산 돌나물 수집종의 RAPD에 의한 유연관계분석	한국원예과학기술지	25(1):68-74 (2008)	국내
돌나물의 가을노지삼목에서 삼수부위 및 삼식방법에 따른 생육특성	한국생물환경조절학회지	17(1):60-65 (2008)	국내
Optimization of productive composition for beverage adding <i>Sedum sarmentosum</i> extract using response surface methodology	Food Sci. Biotechnol.	투고중	SCIE
Hepatoprotective effect of <i>Sedum sarmentosum</i> extract on CCl ₄ induced liver damage	Life Sci.	투고중	SCI
Hepatoprotective effect of <i>Sedum sarmentosum</i> extract on ethanol induced liver damage of rat	Life Sci.	투고중	SCI

○ 연구 인력 양성

구 분	소 속	인 원	비 고
학 사	원광대학교	4	
	충남대학교	6	
석 사	원광대학교	3	
	충남대학교	2	
계	학 사	10 명	총 15명
	석 사	5 명	

3. 연구개발 결과활용에 대한 건의

- 돌나물의 31 지역종에 대한 개화진 생육특성과 개화기 화기특성을 토대로 한 군집 분석 결과와 RAPD를 이용한 유연관계 분석 결과는 일부 지역종을 제외하고는 일치하였으며, 이는 타 작물의 유전자원이나 근연종간 유연관계 분석 및 유전 육종재료로의 이용을 위한 자료로 활용 기능하였음.
- 기내 배양묘를 육성은 0.2 mg/L BA를 첨가한 MS 배지에서 배양 후 80-90일 경에 양호하였고, 기내활성 보존을 위한 agar 농도는 1.6-2.0% agar 첨가할 경우, 상온에서도 년1회의 계대배양으로도 유전자원을 유지·보존 할 수 있었으며, ABA는 20 mg/L 첨가배지에서만 1년 후 까지도 적절한 활성을 유지할 수 있었음. 또한 2℃ 저온항온기에서 agar 및 ABA 첨가에 따른 생육은 농도가 높을수록 억제되는 경향을 보였으며, 1년 후에도 계대배양 없이 100% 생존할 수 있어 타 영양번식 작물의 기내보존에 활용할 수 있으므로 타 작물의 유전자원 보존 활용에 이용할 수 있을 것으로 기대되었음.
- 돌나물을 스티로폼 접시에 랩포장 할 경우, 5℃에서는 수확 후 8일까지 상품성을 유지한 상태로 저장이 가능하므로, 돌나물 수확 후 저온 유통이 바람직하였으며, 이는 돌나물 유통기한을 늘릴 수 있을 뿐 만 아니라, 상품가치도 높일 수 있을 것으로 기대되었음.
- 본 연구 결과, 돌나물 추출물을 주원료로 하는 “숙취예방/해소 음료”, 돌나물 즙을 함유하는 “돌나물 젤리” 및 지질대사 개선 효과가 있는 “돌나물차”를 개발하였으며, 이들 제품에 대해서 특허를 출원 중에 있으며, 향후 상업화를 통하여 농가 수익증대에 기여할 수 있을 것으로 기대되며, 돌나물은 다음과 같은 효능을 가지고 있어 국민건강에도 크게 기여할 것으로 기대되었음.
 - 돌나물은 고지방식으로 인한 비알코올성 지방간 질환을 예방하고, 과량의 알코올 섭취로 유발되는 간 손상을 예방 또는 회복시키는 효과를 지니고 있는 것으로 확인되었으며, 인간 간암세포의 성장을 억제하는 효과가 있음.
 - 돌나물은 자체 내에 함유된 다량의 polyphenol 화합물들에 의해 항산화능을 갖고 있었고, *in vitro/in vivo* 실험에서 항산화와 관련된 단백질들의 활성을 증가시키며, 장관면역 촉진 효과가 우수함.

- 돌나물은 고지방식으로 유도할 수 있는 고지혈증 및 비만증을 예방하는 효과가 있으며, 혈액의 흐름을 방해하는 혈관 내부의 접합인자들의 활성을 억제하고 이와 관련된 효소 활성을 억제함으로써 지질대사 및 혈행을 개선시키는 효과가 있음.

○ 돌나물 지역종의 일반성분과 영양성분을 분석한 결과, 일반성분에서는 산지별로 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 영양성분 분석결과에서는 “군산” 지역종이 가장 우수하였으며, 꽃이 피지 않아 주년생산이 가능하고, 형태적 특성도 양호하므로, 이를 우량품종으로 등록할 예정임.

○ 돌나물 및 추출물을 이용한 신규 제품에 대하여 반복독성시험, 항돌연변이원성 시험, 세포막 용혈시험, 소화관 세포 독성시험 및 동물실험 후의 조직검사 등을 시행한 결과, 돌나물을 이용한 제품은 모두 안전한 것으로 판단되어 향후 상업적 생산이 가능하다고 판단되었음.

○ 신규 시제품에 대한 안정성 검사에서 돌나물 음료는 실온에서 3개월, 젤리는 냉장보관시 10일, 돌나물차는 실온에서 6개월간 제품의 안정성을 유지하는 것으로 판단되어 비교적 보존기간이 양호하였으므로 상업화에 바람직하였음.

따라서 본 연구에서 개발된 제품은 특허 출원/심사 중에 있으며, 특허 진행이 완료되면 참여기업인 (주)대덕바이오에서 상품화되어 시판될 것이다. 또한 본 연구에서는 돌나물의 건강기능성을 방대하게 연구하였으나, 앞으로도 돌나물이 나타내는 건강기능성 기전에 대한 연구는 계속 진행되어야 할 것으로 사료되었다. 한국인의 식품소비 트렌드가 점차 건강지향성으로 전환되고 있음을 고려할 때, 돌나물이 지닌 새롭고 다양한 건강기능성을 파악할 필요성이 있으며, 이와 관련된 기술 및 지식의 축적은 국가경쟁력의 향상에도 기여할 것으로 기대되며 이에 대한 후속적인 연구가 필요한 것으로 보인다.

SUMMARY

Studies on health-benefit function, genetic resources conservation, and industrial utilized techniques for *Sedum sarmentosum*

One of the genus *Sedum* of Crassulaceae, *S. sarmentosum* Bunge is widely distributed in North-East Asia. *S. sarmentosum* is one of the favorite fresh-vegetables in Korea. The whole plant of *S. sarmentosum* has been traditionally used as a folk medicine for clinic of chronic viral hepatitis, skin burn, and cancer in Korea. The plant has several alkaloids and terpens as major constituents, and its anti-hepatotoxic property was also strong. Recently, *S. sarmentosum* was known as a source of herbal estrogen. In China, it is also used as a general gastric and renal regulator using various extracts or powders. However, *S. sarmentosum* has a low storage potential, and any healthy-food is not developed in Korea. Accordingly, there is an urgent need to work related to functional mechanisms and metabolism for producing health-benefit function food with high additive value in *S. sarmentosum*.

This work was conducted with the following objectives;

i) To study genetic relationship and *in vitro* conservation or cryopreservation for genetic resources and the storage temperature of shoot products for marketing of *S. sarmentosum*; ii) To develop the health-benefit function food based on the works related to functional mechanisms and metabolism for increasing the utilization and additive value of *S. sarmentosum*; iii) To investigate safety and stability of products for commercializing health-benefit function food using *S. sarmentosum*.

1. Anaysis of genetic relationship, *in vitro* conservation of genetic resources and development of shoot storage technique in *S. sarmentosum*

○ Thirty-one strains were classified into two groups by cluster analysis based on the morphological characteristics, and Group I included most of local strains with flowering characteristic, and Group II included non-flowering, Wanju and Gunsan strains. Wanju and Gunsan local strains with good growth and non-flowering characteristics were favorable as edible resources. In

analysis of genetic relationship among 31 strains by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) with fifteen 10-mers and twelve 20-mers random primers, the result analyzed by 20-mers primers was matched well with morphological characteristics compared to 10-mers primer. Thirty-one strains were clustered into 2 groups. Group I included twenty-seven local strains, and Group II included Keumsan, Bucheon, Pocheon and Yongin strains with long hight, slender stem, narrow leaf, and abundant flowering characteristics.

- *In vitro* multi-shoots were produced on MS medium with 0.2 mg/L BA in 80–90 days after node culture. For *In vitro* conservation of genetic resources, when shoot tips were cultured on MS media containing 5% sucrose and 1.2% agar, 0.2mg/L BA, and 10–20 mg/L ABA at 4°C, or MS media containing 1.2% agar, 0.2 mg/L BA, and 6–9% sucrose, they could be conserved over one year without subculture. *In vitro* shoot-tips were successfully cryopreserved in PVS 2 solution with the preculture vitrification technique using 0.4–0.6M sucrose. The range of 11.1–16.7% post-thaw regeneration was obtained. The result showed a low viability, and *S. sarmentosum* was one of recalcitrant species for cryopreservation. Accordingly, the conservation of genetic resources of *S. sarmentosum* was more efficiency *in vitro* conservation using hard agar medium or ABA.
- The weight loss of fresh shoots showed significant difference (8.7–25.3%) between just before storage and 10 days after storage. Wanju local strain showed the lowest weight loss, and the most severe case was Pohang local strain. The freshness of shoot after storage was maintained in order of Wanju, Gunsan, Wando and Pohang local strain. When the fresh shoot was stored with wrap film-packaged condition, the freshness of shoots was maintained for 8 days after 5°C storage.
- Vitamine C content and antioxidant activity of 13 local strains were analysed. Vitamin C contents of 13 local strains were ranged from 407.8 to 434.4 mg/kg, and it was high in Gunsan, Gwangyang, Buan, Wanju, Keumsan, Pocheon, and Bucheon strains. Gwangyang, Suncheon, Wando strains showed high EDA compared to the others. Vitamine C content and antioxidant activity were highest in Gwangyang strain.

2. Investigation of health–benefit function and development of healthy–food with high additive value

A. Improvement of hepatoprotective effect, isolation and identification of cancer inhibitory substance, and development of functional beverage using *S. sarmentosum* extracts

- Hepatic protective and cancer inhibitory substance was identified as tetrahydroxyflavonol (quercetin). Hepatoprotective effect to the liver injury induced by carbon tetrachloride in rats was higher in hexane, ethyl acetate, butanol extracts than in silymarin (control).
- Methanol, hexane, ethyl acetate and butanol extracts was significantly inhibited the induction of fatty liver by ethionine and ethanol, and hexane and ethyl acetate extracts were excellent inhibited effect compared to the others. Inhibitory effect of solvent extracts on human hepatoma HepG2 cell growth was highest in ethyl acetate extract ($IC_{50} = 155.8 \mu\text{g/mL}$).
- After oral administration of ethanol and aqueous or solvent extracts of *S. sarmentosum* in rats, blood ethanol level in aqueous extract was lower 2.3 times than the control, and ethanol oxidation in aqueous extract was more enhanced compared to the solvent extracts. Methanol and butanol extracts were significantly enhanced ADH and ALDH activities of ethanol administered rat.
- When aqueous or solvent extracts fermented before oral administration of ethanol in rats, blood acetaldehyde level in solvent extracts was decreased about 50% after one hour compared to the control, that in aqueous extract was hardly detected after four hour. Blood ethanol and acetaldehyde levels in human were significantly decreased by fermentation of aqueous or solvent extracts before oral administration of ethanol. Accordingly, a alcohol detoxification beverage contained *S. sarmentosum* extracts was prepared, and it is applying the patent.

B. Isolation and identification of antioxidant– and immune–activity substances, mechanisms of antioxidant and immune activities, and development of functional jelly using *S. sarmentosum* extracts

○ DPPH radical scavenging activity was most superior in subfraction E4 from ethyl acetate among solvent extracts, and the substance was identified as quercetin. Immune activity was most superior in subfraction E5 from ethyl acetate among them, the substance was identified as esculetin of coumarin group.

○ After oral administration of *S. sarmentosum* solvent extracts for 4 weeks in rats, antioxidant activity was similar or high compared to the tocopherol or ascorbic acid (controls). Polyphenol concentration was high in methanol and ethyl acetate extracts, and it accorded that antioxidant activity was high in oral administration of methanol extract.

○ When the RAW 264.7, murin macrophage cell line, was cultured in medium adding solvent extracts or LPS (lipopolysaccharide) for 2 days, nitric oxide (NO) production was decreased by methanol, hexane and ethyl acetate extracts in 0.1 µg/mL LPS level. Levels of iNOS protein with LPS treatment was decreased in solvent extract treatments.

○ In rats fed with high fat diet and *S. sarmentosum* extracts, an aspect of protein expression increased glutathione peroxidase and glutathione reductase related to the antioxidant activity, and COX2 related to the immune activity.

○ Accordingly, the Sedum jelly was prepared using *S. sarmentosum* juice supplemented with sugar and gelling agent, and contents of Ca, Fe, K, ascorbic acid and organic acids were increased to high levels of *S. sarmentosum* juice. Feeding preference was highest in jelly contained *S. sarmentosum* juice than solvent extracts.

C. Isolation and identification of substances related to lipid metabolism and blood flow and immune activities, mechanisms of *S. sarmentosum* extracts and powder on lipid metabolism and blood flow, and development of functional tea using *S. sarmentosum* powder

- Inhibition of *S. sarmentosum* extracts in rat adipocytes proliferation was highest in ethyl acetate subfraction E1, the substance was identified as caffeic acid.
- IC₅₀ of ethyl acetate extract on inhibition of MC3T3-L1 differentiation was 66.98 µg/mL, and PPAR-γ gene expression was hardly detected in adding ethyl acetate extract.
- When *S. sarmentosum* powder (1.5–4.5%) was added in hypercholesterol feed of rat, the level of weight gain in more increased *S. sarmentosum* powder was low in spite of higher feed intake. In feeding *S. sarmentosum* powder, total cholesterol, TG and LDL levels, and atherogenic indices were significantly decreased, and liver lipid and serum ALP levels were low compared to the control. Diet intake of *S. sarmentosum* could be prevented obesity, non-alcoholic fatty liver disease and hyperlipidemias induced by high fat diet, and it, inhibited hypertension, atherosclerosis and diabetes etc. Accordingly, the Sedum tea was prepared using *S. sarmentosum* powder.

3. Analysis of inorganic, nutritive and volatile contents and estimation of safety and stability for products of healthy-food

- Water content was higher at vegetative stage than flowering stage, and the range was 92.8–98.9%. K, Ca and Fe contents were high in Keumsan, Wando, Gunsan strains. Ascorbic acid and beta-carotene was highest in Gunsan strain. Sixteen volatile compounds were analyzed from shoot, and main compound was pyrazine and its derivatives.
- Beverage, jelly or tea adding solvent extracts, aqueous extract or powder of *S. sarmentosum* were safe in repeated toxicity test, antimutagenic test, cytotoxicity test, inhibition effect of cancer cell, and hepatotoxicity test. Beverage with hepato-protective activity was stable for 3 months at room temperature, and powder tea was stable after 6 months at room temperature. Jelly adding aqueous extract was stable for 10 days at 4°C.

CONTENTS

Preface	1
Summary (in Korean)	6
Summary (in English)	15
Content (in English)	20
Content (in Korean)	22
Chapter 1. Introduction of the Project	24
Section 1. Objective of the Project	24
Section 2. Necessity of the Project	25
Section 3. Contents and Scope of the Project	27
Chapter 2. Recent Development of Internal and External Technology	30
Section 1. Recent Research of <i>S. sarmentosum</i> in Korea	30
Section 2. Recent Research of <i>S. sarmentosum</i> in Foreign Countries	32
Chapter 3. Research Results	33
Section 1. Analysis of genetic relationship, <i>in vitro</i> conservation of genetic resources and development of shoot storage technique in <i>S. sarmentosum</i>	33
1. Introduction	33
2. Materials and Methods	34
3. Results and Discussion	40
1) Genetic relationship of <i>S. sarmentosum</i> genetic resources	40
2) <i>In vitro</i> active collection and cryopreservation of <i>S. sarmentosum</i>	55
3) Variation of shoot quality by storage temperature after harvesting	61
4) Antioxidative activity and vitamin C content of <i>S. sarmentosum</i>	68
4. Conclusions	71

Section 2. Investigation of health–benefit function and development of healthy–food with high additive value 73

- 1. Introduction 73
- 2. Materials and Methods 74
- 3. Results and Discussion 77
 - 1) Improvement of hepatoprotective effect, isolation and identification of cancer inhibitory substance, and development of functional beverage using *S. sarmentosum* extracts 77
 - 2) Isolation and identification of antioxidant– and immune–activity substances, mechanisms of antioxidant and immune activities, and development of functional jelly using *S. sarmentosum* extracts 118
 - 3) Isolation and identification of substances related to lipid metabolism and blood flow and immune activities, mechanisms of *S. sarmentosum* extracts and powder on lipid metabolism and blood flow, and development of functional tea using *S. sarmentosum* power 144
- 4. Conclusions 165

Section 3. Analysis of inorganic, nutritive and volatile contents and estimation of safety and stability for products of healthy–food 168

- 1. Introduction 168
- 2. Materials and Methods 169
- 3. Results and Discussion 172
 - 1) Water contents and inorganic, nutrient, volatile components of *S. sarmentosum* .. 172
 - 2) Estimation of safety and stability for functional beverage using extracts 176
 - 3) Estimation of safety and stability for functional jelly using juice 186
 - 4) Estimation of safety and stability for functional tea using power 194
- 4. Conclusions 200

Chapter 4. Attainment of Research Purpose and Contribution 202

Chapter 5. Application of Research Results 208

Chapter 6. Information of Foreign Science and Technology Related to Project .. 210

Chapter 7. References 213

목 차

제 출 문	1
요 약 문	6
Summary(영문)	15
Content(영문)	20
제 1 장 연구개발과제의 개요	24
제 1 절 연구개발의 목적	24
제 2 절 연구개발의 필요성	25
제 3 절 연구개발의 내용 및 범위	27
제 2 장 국내외 기술개발 현황	30
제 1 절 국내 연구 현황	30
제 2 절 국외 연구 현황	32
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	33
제 1 절 돌나물 유전자원 유연관계 분석, 기내보존 및 저장성 향상 기술 개발	33
1. 서 언	33
2. 연구 방법	34
3. 결과 및 고찰	40
가. 돌나물 유전자원의 유연관계	40
나. 돌나물 유전자원 기내 활성보존 및 초저온 동결보존	55
다. 수확후 저장온도에 따른 품질변이	61
라. 지역 수집종들의 항산화 활성 및 비타민 C 함량	68
4. 결 론	71

제 2 절	돌나물의 건강기능성 규명 및 고부가가치 상품의 개발	73
1. 서	언	73
2. 연구	방법	74
3. 결과	및 고찰	77
가.	간기능 개선 및 간암억제 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발	77
나.	항산화 및 면역활성 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발	118
다.	지질대사 및 혈행개선 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발	144
4. 결	론	165
제 3 절	돌나물의 성분분석 및 건강기능성 돌나물 제품의 안전성 및 안정성 평가	168
1. 서	언	168
2. 연구	방법	169
3. 결과	및 고찰	172
가.	돌나물의 주요 성분	172
나.	간기능 개선 및 간암 억제작용이 강화된 돌나물 제품의 안전성 및 안정성 평가	176
다.	항산화 및 면역활성이 강화된 돌나물 제품의 안전성 및 안정성 평가	186
라.	지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 돌나물 제품의 안전성 및 안정성 평가	194
4. 결	론	200
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	202
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	208
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	210
제 7 장	참고문헌	213

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge)은 돌나물과에 속하는 다년생 초본으로 예로부터 봄철에 어린 싹을 초고추장 무침이나 물김치 등의 식용으로 이용하여 왔으나, 최근 우리나라의 산야에서 흔히 보아왔던 돌나물은 난개발과 제초제 남용 등으로 대부분 사라져 가고 있는 실정이다. 특히 식·의약적으로 중요한 식물들을 보존하는 일은 자원전쟁의 시대에 국가적으로도 아주 중요하다. 돌나물은 봄나물 중에서 영양이 풍부하고 독특한 향미를 갖고 있으며, 다육질의 잎과 줄기를 가진 여러해살이 초본 식물로서 두텁고 윤기 있는 잎이 줄기의 마디를 따라 3장씩 운생한다. 5월 중하순에 15cm 내외의 화경이 발달하여 5매의 꽃잎을 가진 연황색 소화가 여러 개 피는데, 개화기간이 비교적 길어 관상용으로도 가치가 있는 중요한 자생식물의 하나이다.

돌나물은 비타민 C의 함량이 높고, 칼슘, 철분, 아연 등의 무기물 함량도 높을 뿐만 아니라, 민간에서는 생즙을 간염, 대하증, 화상 등에 이용하고 있으며, 최근 약리작용이 과학적으로 구명되고 있어 건강식품으로의 개발이 가능하다. 최근 돌나물은 골다공증에 유효하고, 간기능 개선능이 있는 것으로 보고되고 있으나, 저장성이 낮고 이를 이용한 가공 식품이 없어 부가가치가 매우 낮은 식품이다. 그러나 유효지표성분이 분리·동정이 되지 않고 있으며, 체내에서의 기능성 발현 기전 또는 대사관련 연구가 미흡한 실정이다. 또한 아직까지 국내외적으로 돌나물을 이용한 기능성 식품은 개발되지 않고 있어, 새로운 식품소재로서도 매력이 크다고 할 수 있다.

따라서 본 연구의 목적은 다음과 같다.

첫째, 식·의약적으로 중요한 돌나물 유전자원의 유연관계 분석과 기내 활성보존 및 초저온 동결보존법을 개발하고, 출하 돌나물의 시장성을 높이기 위한 소포장용 저온저장 온도를 구명하여 돌나물 유통을 활성화시키기 위한 기본기술을 확립하고자 한다.

둘째, 수요가 한정되어 있는 돌나물의 이용성과 부가가치를 높이기 위하여, 체내에서의 기능성 발현 기전과 대사관련 연구를 통한 건강 기능성 식품을 개발하여, 생산 농가의 소득증대와 국민건강에 기여하고자 한다.

셋째, 돌나물의 기능성 식품화에 영향을 미치는 무기·영양성분 및 향기성분을 분석하고, 개발 제품의 급성 및 아급성 독성과 유전독성, 세포독성 등의 안전성과 제품보존을 위한 안정성을 연구하여, 부가가치가 높은 건강식품으로 개발하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

21세기에 인류의 복지를 위한 유전자원의 중요성은 생명공학 기술의 눈부신 발전과 함께 더욱 그 중요성이 부각되고 있으며, 선진국을 비롯한 개발도상국들이 자국의 유전자원 뿐 만아니라, 새로운 유전자원의 탐색에 많은 인력과 경비를 투자하고 있다. 우리나라의 자생식물들 중에는 의약품, 화장품, 건강보조 기능성 식품원료 등으로 고부가가치를 가지고 있는 식물종들이 많은데, 이러한 자생식물을 멸종위기에 처 보존하고, 성인병 예방과 치료를 위한 의약품 및 식품원료 등으로 자원화 하는 것이 시급하다.

1. 기술적 측면

영양번식 식물의 유전자원을 포장에서 보존할 경우, 많은 시간과 숙련된 인력 및 시설이 필요하고, 병리적·생리적 퇴화 가능성, 기상재해에 의한 소실이나 유전적 침식 등의 위험에 노출되어 있다. 이에 따라 기내 활성보존(in vitro conservation)이나 초저온 동결보존(cryopreservation)을 이용하여 보존하면, 좁은 공간에서 다수의 유전자원을 보존할 수 있어 경제적이므로 들나물에서도 이와 관련된 연구가 시급하다. 또한 들나물은 다육식물로서 유통 및 저장시에 수분증발로 시들은 상태로 전시판매되는 경우가 많아 시장성이 낮은 한 원인이 되고 있어, 소포장 및 저온유통이 시급하지만 관련연구가 미흡한 실정이다.

들나물의 소비량을 증대시키기 위해서는 주년생산을 해야 하며, 계절에 알맞은 계통 선발도 필요하다. 농가에서는 주로 겨울철부터 봄철출하를 목적으로 들나물을 재배하고 있으며, 개화 후에는 줄기가 붉어지고 질기며, 쓴맛이 증가하여 식용에 부적합하여 생산을 기피하고 있다. 농가에서 주로하고 있는 동계 무가운 하우스 재배는 저온하에서 생육이 양호한 계통을 선발하여 재배하는 것이 좋고, 여름철 재배를 위해서는 차광하에서 내음성이 높은 계통을 선발할 필요가 있다.

최근 기능성 식품에 대한 관심이 높아지고 있는데, 이들 식품에는 비타민 A, C, E, flavonoids, anthocyanins, carotenoids, tanic acid 등의 항산화물질이 풍부하게 들어 있어 활성산소가 생기는 것을 막고 노화를 억제시키거나, 각종 암 및 질병을 예방하는데 도움이 된다. 이러한 기능성 물질이 많이 함유된 식품재료를 이용하여 기능성 식품으로 개발하여 산업화하려는 연구가 많이 이루어지고 있는데, 들나물은 우

리나라에서는 어느 지역에서나 생산이 가능한 건강채소로서 건강식품 재료로 적합하지만, 이를 산업화하려는 적극적 연구는 미흡한 실정이다. 이에 따라 돌나물의 무기성분, 기능성 영양 성분 및 향기성분 분석을 통하여 돌나물 제품개발을 위한 정보를 확충하고, 돌나물의 기능성에 대한 소비자의 이해를 증진시키며, 항산화 활성 및 생리활성 등을 다각도로 검정하여, 녹즙, 음료, 젤리, 차 등과 같은 다양한 기능성 식품으로 개발할 필요가 있다.

돌나물을 재료로 음료, 젤리, 차 등의 건강기능성 식품으로 개발하였을 경우, 돌나물 제품에서 급성 및 아급성 독성과 유전독성, 세포독성시험과 세포막 안정화시험 및 간독성 지표 효소의 활성도, 아급성 독성 시험 후의 조직 검사 등을 통하여 안전성을 검정할 필요가 있다. 또한 생산된 제품의 색상, 중량(용량)편차, 확인시험, 함량시험, 보존제 시험, 미생물오염시험, 중금속시험 및 pH, 알코올 도수 등의 분석을 통한 안정성 검정도 필수적으로 이루어져야 한다.

2. 경제·산업적 측면

돌나물의 재배는 일부 농가에서 겨울철에서 봄철 생산을 위하여 무가운 비닐 하우스에서 주로 이루어지고 있는데, 수요가 많지 않아 주년생산이 이루어지지 않고, 한정적으로 생산되고 있다. 이에 따라 고부가가치 돌나물 제품을 개발하여 수요를 창출함으로써, 농가의 지속적인 재배생산과 농가 수익을 증대시킬 수 있을 것이다.

신선채소로 비타민 C와 칼슘 함량이 높아 식품재료로서의 가치가 높을 뿐 만 아니라, 김치, 샐러드, 초무침 등의 신선채소로서 재배전망이 높은 돌나물의 형태적 특성과 RAPD에 의한 유연관계분석을 통하여 우량계통 선발 및 신품종 육성의 기초정보를 얻을 수 있으며, 앞으로 이를 토대로 농가에 새로이 육성된 우량품종을 공급할 수 있다.

돌나물을 대량으로 소비할 수 있는 효능효과가 규명된 기능성 제품의 개발로 판매량을 증가시킨다면 농가에서 대량생산 할 수 있는 기반이 조성될 것이다. 돌나물의 효능효과 물질을 분석한 결과, 다양한 건강기능성 돌나물제품을 개발가능하며, 이를 통하여 돌나물 소비량도 크게 늘어 날 수 있고, 지적재산권을 확보가 가능하다. 또한 가공·유통기술을 높여 기존의 채소류와 차별화된 소비 시장을 개척할 수 있으며, 국내 건강기능성 채소(산야채류)류 시장의 규모에 비해 크게 낙후된 돌나물 유통체계 확립을 통하여 돌나물의 소비증가에 따른 재배농가의 규모화와 수익성 제고할 수 있을 것이다.

3. 사회·문화적 측면

오랫동안 민간에서 김치, 샐러드, 초무침 등의 신선채소로서 이용되어 왔던 돌나물 유전자원을 보존하므로서, 유전자원으로서의 가치 뿐 만아니라 바위틈에서도 잘 자라는 강인한 생태적 특성을 이용하여, 옥상정원이나 공원의 지피식물로써의 이용이 가능하여, 국민들의 휴식과 향토음식 소재로서 활용할 수 있다.

우리나라는 알코올 섭취량이 높아 국가·사회적으로 많은 문제를 야기하고 있는데, 돌나물 음료의 개발은 과량의 알코올 섭취로 유발되는 간 손상을 예방 또는 회복시키며, 인간 간암세포의 성장을 억제하는 특성이 있어 국민건강향상에 크게 이바지 할 수 있다.

또한 전 세계적으로 비만이 국가적 과제로 인식되는 가운데, 돌나물은 고지방식으로 유도되는 비알코올성 지방간을 예방하는 효과가 있고, 고지혈증 및 이와 관련된 고혈압, 동맥경화증, 당뇨병 등의 발생을 억제시킬 수 있을 것으로 기대되어 국민 건강 향상에 크게 기여할 것으로 보인다.

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 돌나물 유전자원 보존 및 저장성 향상기술개발

- 식·의약적으로 중요한 돌나물 유전자원의 유연관계 분석과 기내 활성보존 및 초저온 동결보존법을 개발
 - 31개 돌나물 지역종의 영양생장기 및 개화기 형태적 특성 조사하여, Ward의 방법(SAS Institute)으로 제곱 유클리디안 거리 측도를 Z정수로 변수 변환하여 군집분석한 결과를 dendrogram으로 작성하여 비교
 - RAPD를 이용한 돌나물의 유연관계 분석을 위하여 31개 돌나물 지역종의 DNA 추출 및 다형성을 가진 primer 탐색과, NTSYS program을 이용한 dendrogram 작성
 - 돌나물 유전자원의 기내활성보존을 위한 기내 영양체 최적 번식법 개발하고, 영양체의 기내활성보존에 의한 저온(0-4℃) 및 단기(1-2년) 보존법 확립
 - 돌나물 유전자원의 초저온 동결 보존을 위하여 동아 및 기내신초의 초저온 동결 보존법을 확립

- 출하 돌나물의 시장성을 높이기 위한 소포장용 저온저장 온도를 구명과 돌나물 지역종들의 항산화 활성 및 비타민 C 함량을 분석하여 제품개발을 위한 우량 돌나물 계통선발
 - 돌나물 유통을 위한 수확 후 적정 저장온도를 구명하여 저장성 향상
 - 지역 수집종들의 항산화 활성 및 비타민 C 함량을 분석

2. 돌나물의 건강 기능성 구명 및 고부가가치 상품의 개발

- 돌나물의 간기능 개선 및 간암억제 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발
 - 돌나물의 간기능 개선 및 간암억제효과 탐색
 - 돌나물로부터 간암억제 물질의 분리 및 동정
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 백서의 간 기능에 미치는 영향
 - 간기능 관련 단백질의 탐색
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 간암세포의 분화에 미치는 영향 탐색
 - 간기능 개선 및 간암억제 작용이 강화된 제품의 개발
- 돌나물의 항산화 및 면역활성 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발
 - 돌나물의 항산화 및 면역활성 탐색
 - 돌나물로부터 항산화 및 면역활성 물질의 분리 및 동정
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 백서에서의 항산화 관련효소 활성 구명
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 면역활성에 미치는 영향
 - 항산화 및 면역활성 관련단백질의 탐색
 - 항산화 및 면역활성이 강화된 제품의 개발
- 지질대사 및 혈행개선 물질의 분리·동정 및 제품개발
 - 돌나물의 지질대사 및 혈행 개선 연구
 - 돌나물로부터 지질대사 및 혈행개선 물질의 분리 및 동정
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 비만에 미치는 영향
 - 지질대사 및 혈행개선 지표단백질의 동정
 - 돌나물 및 돌나물추출물이 지질대사 및 혈행개선에 미치는 효과 구명
 - 지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 제품의 개발

3. 돌나물의 성분분석 및 건강기능성 돌나물제품의 안전성 및 안정성 평가

- 돌나물의 일반성분, 영양성분, 향기 및 향미성분 분석
 - 돌나물의 우량 지역종에 대한 수분함량, 회분, 환원당, 비타민 A, C, 조지방, 조단백 등의 함량 측정하고, 향기 및 향미성분 등을 GC/MS 분석
- 돌나물성분분석 및 건강기능성 돌나물제품(간기능 개선 및 간암억제효과)의 안전성 및 안정성 평가
 - 돌나물 숙취해소 음료에 대한 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 통하여 안전성 평가
 - 실온에 저장시 3개월간 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 조사
- 항산화 및 면역활성이 강화된 돌나물 제품(돌나물 젤리)의 안전성 및 안정성 평가
 - 돌나물 젤리에 대한 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 통하여 안전성 평가
 - 저온에 저장시 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 조사
- 지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 돌나물 제품(돌나물 차)의 안전성 및 안정성 평가
 - 돌나물 차에 대한 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 통하여 안전성 평가
 - 실온에 6개월간 저장시 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 돌나물 연구 현황

- 1976년 고려 대학교에서 처음으로 돌나물의 지역 수집종에 대한 연구를 수행하였으며, 국내 13개소의 지역종간에는 형태적으로 차이가 있는 생태형이나 변종은 없고, 잎의 형태나 절간장의 차이는 환경변이에서 오는 것으로서 유전적 변이는 아닌 것으로 추정하였음(곽, 1976).
- 1990년 농촌진흥청에서 지도용 교재로 돌나물의 번식 및 재배법에 관한 내용을 다루고 있으며, 우량 지역종 선발이나 품종개발은 아직 보고된 바 없음(농촌진흥청, 1990).
- 1996년 고려대학교에서 돌나물의 담액 수경재배에 관한 연구에서, 수경 배양액은 Yamazaki-상추 배양액에서 생체중, 근장, 엽장이 좋은 생육을 보였으며, 수경재배 돌나물의 비타민 C함량은 낮은 경향이었음. 수경재배용 배양묘는 반음지에서 생육한 것이 양호하여, 차광재배가 필요하다고 하였음(김, 고려대학교 석사학위논문, 1996)
- 1996년 제주도 농업기술원은 항암효과가 있는 자생식물로 천문동과 함께 돌나물을 유망 약초로 선발한 바 있음(제주농업시험연구보고 315-325, 1996)
- 1996년 강원대학교에서 돌나물의 항돌연변이 효과가 있다고 보고하였음(한국식품영양과학회지 27:1177-1182, 1998).
- 1997년 보건환경연구원에서 돌나물을 비롯한 국내 자생 산채류에 대한 영양성분을 분석한 결과, 돌나물의 비티민 C함량이 시금치보다 2-3배 많이 함유되어 있으며, 많은 미량요소 및 비타민의 보고로서 영양학적으로 가치가 높다고 하였음(보건환경연구원보 8:27-32, 1997).
- 1997년 경상북도 농업기술원에서 유망 자생 지피식물 개발에 관한 비교연구에서 돌나물은 식재장소에 관계없이 식재면적당 피복면적의 증가율이 215배

로 가장 높아 지피식물로 유망하다고 보고하였음(경상북도 농업기술원, 1997).

- 1998년 안동대학교 돌나물 자생지의 서식환경과 생장특성에 관하여 조사한 결과, 생육적온은 25℃ 내외이고, 15℃에서도 생장이 이루어지며, 50% 차광 조건에서 개화는 지연되었으나, 생체중은 증가하는 것으로 나타나 여름철 재배가능성이 높았음.(이, 안동대학교 석사학위논문, 1998).
- 2000년 원광대학교 의과대학의 연구결과 돌나물 추출물은 간암세포에 대한 증식을 억제하는 기능이 있어, 항암효과가 있는 식물로서 유망한 것으로 보고하였음(J. Ethnopharmacol. IRELAND 70:177-182, 2000).
- 2002년 돌나물이 난소 절제한 흰쥐의 혈중 지질 함량을 낮추며, 도라지 추출물 첨가에 의한 돌나물의 항발암 상승효과가 있다고 하였음(김 등, 한국식품영양과학회지 31(1):136-142; 31(2):290-294)
- 2002년 순천 청암대학교에서 야채건강음료 재료로서의 돌나물에 관한 성분분석 결과, 음료개발 적성이 높다고 하였음(정 등, 한국조리과학회지 8(1):55-69, 2002)
- 2003년 진주산업대에서 저토심 옥상녹화 시스템에서 돌나물의 생육에 대한 인공배지 종류, 토심, 그리고 배수 형태의 효과를 보고하였음(강, 한국조경학회지 31(2): 102-112, 2003).
- 2004년 초임계이산화탄소를 이용한 돌나물 추출물이 사염화탄소로 유발된 흰쥐의 간 지질대사, 지질과산화를 조절하여 지방간을 억제하며, 항산화 관련효소의 발현이 높다고 하였음(김 등, 한국유화학회 21(3): 204-213, 2004)
- 이상과 같이 돌나물에 관한 연구는 최근 연구보고가 많이 이루어지고 있으나, 유전자원 관련 연구가 미흡하여 식용, 관상 및 지피식물로서의 가치가 우수함에도 불구하고, 신제품 개발이 이루어지지 않고 있으며, 간 보호 및 항암관련 유용물질의 분리·동정을 통한 부가가치가 높은 건강식품으로 개발된 예는 아직 없으며, 타식물에 비하여 관련연구는 미흡한 실정임.

제 2 절 국외 돌나물 연구현황

- 우리나라에서만 신선채소로 애용되는 돌나물은 식용으로 하는 국가가 없어 외국의 식용관련 연구는 거의 없으며, 중국을 중심으로 간 보호관련 추출물의 효과와 성분분석을 중심으로 연구되고 있는 실정임.
- 중국의 상해 의과대학에서는 돌나물에서 간세포 보호기능을 가진 sarmentolin이란 물질을 분리동정한 바 있으며, 동 연구진은 한국에서 수집한 돌나물에서 인간면역결핍 바이러스(HIV)에 대한 억제효과가 있음을 밝혔는데, 중국에서는 홍경천을 비롯한 돌나물과 식물들이 약용식물로서 연구개발되고 있는 추세임 (J. Ethnopharmacol. IRELAND 70:177- 182, 2000; Phytochemistry 49:2607-2610, 1998; Phytomedicine 4:53-58, 1997).
- 미국에서는 돌나물이 번식이 용이하고, 생장이 빨라 지피식물(groundcover)로서 이용할 수 있다고 하였으며, 스페인에서는 돌나물을 비롯한 sedum 속 식물들이 옥상정원(roof garden)을 위한 식물로 적합한데, 그 이유는 sedum 속 식물들이 뿌리가 깊지 않아 낮은 토층에서 생육이 가능하며, 건조와 서리에 강할 뿐 아니라 생육이 빨라 지표를 단기간에 회복할 수 있기 때문이라고 하였음 (Plant propagator, USA. 28:9, 1982; Agricultura Revista Agropecuaria, Spain 65:1029-1031, 1996).
- 네덜란드에서 아시아 *Sedum* 속 식물의 알카로이드 분석을 보고하였음 (Phytochemistry 41(5):1319-1324, 1996).
- 중국에서 돌나물의 플라보노이드와 Sterol의 성분분석을 실시하였음(Chinese Traditional and Herbal drugs, 28(5):522-524, 1997; Journal of China Pharmaceutical University, 28(5):270-274, 1997).
- 돌나물 추출물로부터 간 보호 활성이 높은 성분을 추출하였음(Chinese Pharmaceutical Affairs 16(6):360-366, 2002)
- 따라서 이러한 국내외 추세에 따라, 1인당 알코올 소비량이 가장 많은 우리나라에서 돌나물의 간 보호관련 유효지표성분의 분리·동정과 건강기능성 연구에 따른 체내에서의 기능성 발현 기전 또는 대사 연구를 시급히 선점할 필요가 있음.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 돌나물 유전자원 유연관계 분석, 기내 보존 및 저장성 향상 기술 개발

1. 서 언

우리나라의 자생 식물은 약 4,500여종으로 이 중 640종이 식용 및 약용으로 이용 가능하다(Kang 등, 1997). 예로부터 취나물류, 고사리, 두릅, 더덕, 도라지, 잔대 등의 산에서 자라는 것들과 냉이, 달래, 쑥, 씀바귀, 고들빼기, 질경이, 민들레 등의 들에서 자라는 산채들이 식품이나 구황식물로 이용하여 왔는데, 최근 자원식물의 중요성이 인식되면서 관련 연구가 급증하고 있다. 돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge)은 돌나물과의 여러해살이 초본 식물로서 예로부터 봄철에 자란 어린 싹을 식용으로 이용하여 왔다. 다육질의 잎과 줄기에는 비타민 C와 칼슘 함량이 높고, 음료적성도 높으며(Kim 등, 2002), 항산화 활성, HIV 및 간염 바이러스 억제효과 및 항암활성도 높다(He 등, 1998; Park 등, 2002; Woo 등, 1997). 농가에서는 주로 겨울철부터 봄철출하를 목적으로 돌나물을 재배하고 있으며, 개화 후에는 줄기가 붉어지고 질기며, 쓴맛이 증가하여 식용에 부적합하다. 따라서 돌나물의 주년생산을 위해서는 계절에 알맞은 계통 선발이 필요한데, 동계 무가운 하우스 재배에서는 저온하에서 생육이 양호한 계통을 선발하여 재배하는 것이 좋고, 여름철 재배를 위해서는 차광하에서 내음성이 높은 계통을 선발할 필요가 있다.

최근 산업화에 따른 환경파괴와 오염은 멸종위기 식물의 증가를 가속화하고 있다. 특히 식·의약적으로 중요한 식물들을 보존하는 일은 자원전쟁의 시대에 국가적으로도 아주 중요하다. 영양번식 식물의 유전자원을 포장에서 보존할 경우, 많은 시간과 숙련된 인력 및 시설이 필요하고, 병리적·생리적 퇴화 가능성, 기상재해에 의한 소실이나 유전적 침식 등의 위험에 노출되어 있다. 이에 따라 조직배양 산물을 기내 활성보존(in vitro conservation)이나 초저온 동결보존(cryopreservation)을 이용하여 보존하면, 좁은 공간에서 다수의 유전자원을 보존할 수 있어 경제적이므로 돌나물에서도 이와 관련된 연구가 필요하다. 한편 돌나물은 다육식물로서 유통 및 저장시에 수분증발로 시들은 상태로 전시판매되는 경우가 많아 시장성이 낮은 한 원인이 되고 있어, 소포장 및 저온유통이 시급한 실정이다.

본 연구는 식·의약적으로 중요한 돌나물 유전자원의 유연관계 분석과 기내 활성보존 및 초저온 동결보존법을 개발하고, 출하 돌나물의 시장성을 높이기 위한 소포장용 저온저장 온도를 구명하고자 실시하였다.

2. 연구 방법

가. 돌나물 유전자원의 유연관계 분석

1) 형태적 특성에 의한 유연관계 분석

시험에 사용한 재료는 여러 지역에서 수집한 31개 돌나물 지역종을 원광대학교 포장에 재식하여 9월중순에 약 10cm 자란 줄기를 채취하여, 마디사이가 5mm이하인 정단부 3마디를 50 mm 길이로 잘라 계통당 1 m² 시험구에 1010 cm 간격으로 3반복 삼목한 다음, 월동후 신초의 생육을 조사하였다. 시비량은 삼목 2일전에 인산(10 kg/10a)은 전량 기비로 칼리(15 kg/10a)와 질소(15 kg/10a)는 기비 70%, 이듬해 봄 4월 5일에 추비 30%로 시비하였다.

생육조사는 화경 출현전에 지상부 생육과 개화특성을 반복당 10개체씩 조사하였다. 초장은 가장 긴 줄기의 기부에서 줄기 선단의 잎까지 측정하였고, 잎의 장폭은 가장 길고 넓은 부위를 측정하였으며, 줄기두께는 다이엘게이지로 줄기의 중앙부위를 측정하였다. 개화특성은 개화시, 개화성기, 화경수 등을 조사하였고, 화기특성은 화경당 소화수, 화판장의 폭, 꽃받침의 장폭, 약, 화사, 주두 및 자방장 등을 조사하였다. 조사결과는 SAS(version 8.2)를 이용한 계층적 군집분석에서 Ward의 방법(SAS Institute)으로 제공 유클리디안 거리 측도를 Z정수로 변수 변환하여 분석한 결과를 dendrogram으로 작성하여 비교하였다.

2) RAPD에 의한 유연관계 분석

가) 공시재료 및 DNA 추출

전국 31개 지역에서 수집한 돌나물 지역종의 어린 잎을 계통당 0.2 g씩 유발에 넣어 액체질소로 급냉시켜 마쇄한 다음, Eppendorf tube로 옮겨 600 µl DNAzol ES(Molecular Research Center, Inc., USA; 6 µl 2-mercaptanol, 60 µl 10% polyvinylpyrrolidone, 534 µl DNAzol ES)를 혼합하여 잘 섞어준 뒤 20 rpm으로 1 시간동안 교반하였다. 600 µl chloroform을 첨가하여 5분간 둔 다음, 원심분리(12,000 g, 4°C, 4 min)하여 상등액을 새로운 tube에 옮겨 0.75배의 에탄올을 첨가하고 잘 섞어 5분간 방치한 뒤 원심분리(5,000 g, 4°C, 4 min.)하였다. 상등액을 버리고 80 µl (초순수 75 µl, RNase 5 µl)의 RNase로 잘 녹인 후 37°C에서 30분 간 배양한 뒤 460 µl DNAzol과 340 µl 에탄올을 첨가하여 잘 섞은 후 5분간 상온에 방치하여 원심분리(5,000 g, 4°C, 4 min)후 상등액을 제거하였다. 1 ml 75% 에탄올을 첨가하고 5분 동안 간헐적으로 약하게 섞어 준 뒤 원심분리(5,000 g, 4°C, 4 min.)하여 상등액을 버리고 에탄올을 완전히 제거한 후 멸균한 3차증류수로 DNA를 녹였다. 추출된 DNA는 1.2% agarose gel에서 약 10분간 전기 영동하여 genomic DNA 관찰하였으

며, fluorometer(TD-360, Turner Designs Sunnyvale, CA, USA)로 DNA양을 확인하고 추출한 DNA의 농도를 계산하여 최종농도가 20 ng/μl가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다.

나) Polymerase chain reaction

RAPD 분석을 위한 primer는 15종의 10-mers Operon primer (Operon Technologies Inc., USA)와 12종의 20-mers SRILS Uniprimer (SeouLin Bioscience Inc., Korea)를 이용하였다(Table 1). PCR(T-gradient 96, Biometra Co.) 반응액은 20 μl당 250 μM dNTP, 1 unit *Taq* DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl 및 1.5 mM MgCl₂를 함유한 Accupower PCR Premix(Bioneer Co.)를 이용하여 20ng gDNA를 첨가하였다. PCR 과정은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 38°C(10-mers Operon primer) 및 55°C(20-mers SRILS Uniprimer)에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 과정을 45 cycle 수행한 다음, 72°C에서 7분간 last extension을 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 50 V에서 1시간 20분 동안 전기영동(Mupid-2, Cosmo Bio. Co.)하여 자외선 하에서 증폭된 DNA를 관찰하고 사진으로 기록하였다. DNA 다형성을 보이는 primer를 선발한 다음, 2회 반복하여 재현성 있는 band를 유연관계 분석에 이용하였다.

다) 유연관계 분석

수집한 돌나물의 지역종간 유연관계분석은 NTSYS(Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) computer program의 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic average method; Rohlf, 1989)방법으로 31개의 지역종에 대하여 출현한 밴드를 1로 하고, 분명하지 않거나 나타나지 않는 밴드를 0으로 code화하여 분석한 결과를 토대로 dendrogram을 작성하였다.

Table 1. Nucleotide sequence of primers used for RAPD analysis of *S. sarmentosum*.

10-mers primer ^y	Nucleotide sequences (5'to 3')	20-mers primer ^z	Nucleotide sequences (5'to 3')
OPA 01	5'-CAGGCCCTTC-3'	SRILS 1	5'-ATCCAAGGTCCGAGACAACC-3'
OPA 02	5'-TGCCGAGCTG-3'	SRILS 2	5'-CCCAGCAACTGATCGCACAC-3'
OPA 03	5'-AGTCAGCCAC-3'	SRILS 3	5'-GTGTGCGATCAGTTGCTGGG-3'
OPA 10	5'-GTGATCGCAG-3'	SRILS 4	5'-AGGACTCGATAACAGGCTCC-3'
OPA 11	5'-CAATCGCCGT-3'	SRILS 5	5'-GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC-3'
OPA 13	5'-CAGCACCCAC-3'	SRILS 6	5'-ATGTGTGCGATCAGTTGCTG-3'
OPC-01	5'-TTCGAGCCAG-3'	SRILS 7	5'-GGTGAACAGTGAGATGAACC-3'
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'	SRILS 8	5'-TACATCGCAAGTGACACAGG-3'
OPC-20	5'-ACTTCGCCAC-3'	SRILS 9	5'-AATGTGTGGCAAGCTGGTGG-3'
OPD-02	5'-GGACCCAACC-3'	SRILS 10	5'-GATGTGTTCTTGGAGCCTGT-3'
OPD-07	5'-TTGGCACGGG-3'	SRILS 11	5'-GGACAAGAAGAGGATGTGGA-3'
OPJ-18	5'-TGGTGCAG-3'	SRILS 12	5'-GGTTGTAGGCCGATATTGTC-3'
OPN-11	5'-TCGCCGAAA-3'		
OPQ-01	5'-GGGACGATGG-3'		
OPR-13	5'-GGACGACAAG-3'		

^yOperon random primer (Operon Technologies Inc.) ^zSRILS uniprimer (SeouLin Bioscience Inc.)

나. 유전자원의 기내 활성보존 및 초저온 동결보존

1) 마디배양을 위한 다아체(multi-shoot) 형성

돌나물 유전자원의 기내활성 보존 및 초저온 동결보존을 위한 재료를 육성하기 위하여 군산, 포항, 용인, 금산 지역종의 마디배양을 하였다. 7-8cm 크기의 신탄초로부터 상부줄기를 채취하여, 70% 30초간, 0.5% sodium hypochlorite에 15분간 살균하여 멸균수로 5회 수세하였다. 잎을 제거한 상부마디를 10 mm 크기로 잘라서 0.2 mg/L BA(benzyl amino purine)를 첨가한 MS 배지에 설탕 10개체씩 치상하였다. 배양조건은 25±2℃에서 27 μmol/m²(18/6 h, day/night) 하에서 명배양하였으며, 30일 간격으로 계대배양하여 줄기수를 조사하였다.

2) 기내 활성보존

돌나물의 기내활성 보존에 미치는 ABA, sucrose, 한천(agar), Gelrite의 영향을 조사하기 위하여, 첨가농도를 각각 달리한 배지를 직경 10×20 mm 샐레에 25mL 씩 분주하였다. ABA 영향은 0.2 mg/L BA와 sucrose 50 g/L, agar 1.2%를 기본으로 넣은 MS배지에 ABA 0, 5, 10, 20 mg/L를 첨가하였다. 삼투조절제로서 sucrose 영향은 0.2 mg/L BA와 agar 1.2%를 기본으로 넣은 MS배지에 2, 3, 6, 9% g/L sucrose를 첨가하였다. 수분 스트레스로 성장을 조절하기 위하여 한천과 Gelrite를 0.2 mg/L BA와 50 g/L sucrose를 기본으로 넣은 MS배지에 한천은 0.8, 1.2, 1.6, 2.0%, Gelrite는 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%를 첨가하였다. 균산과 용인 지역종의 기내 증식된 10 mm 크기의 3개체로 된 기내신초를 샐레당 5포기씩 치상하였다. 치상이 끝난 샐레는 랩 3겹과 파라필름(Parafilm M, USA)으로 싸서 25°C, 20°C, 15°C, 10°C에서 각각 5일씩 순화시켜 4±1°C 저온항온기에 보존하면서 생육상태를 관찰하였다. 1년 후의 생육 및 생존율을 조사하였다. 생존율은 25°C 배양실에서, 7일간 회복시킨 후, 새로운 배지로 계대배양하여 조사하였다.

3) 초저온 동결보존

돌나물의 기내신초 및 동아를 이용한 초저온 보존을 위하여, 포항 지역종의 기내신초 상부 10 mm를 잘라내어 0, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 1.0 M sucrose 용액에서 1일 동안 전배양한 다음, 5 mL cryogenic vial에 5개체씩 6반복으로 넣고, 2 mL PSV 2(Sakai 등, 1990) 동결보호제를 첨가하여 -40°C까지는 programed cell freezer로 -0.5°C/min 동결시킨 후, 액체질소로 최종 동결하였다. PSV 2 동결보호제의 조성은 30% glycerol(3.26 M), 15% ethylene glycol (EG, 2.42 M)과 15% DMSO(1.9 M)를 첨가하였다. 동결 3일후에 꺼내어 35°C 수조에서 2분간 신속해동시켜 멸균수로 4회 수세한 다음, 0.2 mg/L BA를 첨가한 MS배지를 20 mL 씩 분주한 8.7×15 mm 샐레에서 배양하여 생존율을 조사하였다. 또한 같은 방법으로 휴면기 동아와 동아가 2-3개 붙은 줄기를 5 cm 길이로 채취하여 각각 70% EtOH에 표면살균 후 1% sodium hypochlorite 용액에 20분간 살균한 다음, 멸균수로 5회 수세하였다. 무균작업대에서 1시간 건조 또는 0.5 M sucrose 용액에서 4시간 전배양 한 것을 기내신초와 같은 방법으로 액체질소에 동결하였다가 해동시켜, 동아는 0.2 mg/L BA를 첨가한 MS배지에서 배양하였고, 동아가 붙은 줄기는 멸균한 버미큐라이트에 심은 후, 25°C에서 순화관리하면서 생존율을 조사하였다.

다. 수확후 저장온도에 따른 품질변이

돌나물의 수확후 저장성을 증진시키기 위하여, 수집한 돌나물 지역종들 중 생식용으로 유망한 완주, 군산, 포항, 완도 등 4개 지역종을 재료로 선발하여 원광대학교 실습포에서 9월 10에 노지에 삽목재배하였다. 시비량은 질소-인산-칼리를 15-10-15 kg/10a으로 인산은 전량 기비로 질소와 칼리는 기비 70%와 추비 30%로 관리하였다. 추비는 이듬해 4월1일 실시하였다.

실험에 사용한 돌나물은 5월 10일 개화전 초장이 최대에 달하였을 때, 10cm 길이로 줄기를 채취하였다. 25×10cm 사각 스티로폼 접시에 40개의 돌나물 줄기를 20개씩 두줄로 놓은 다음, 랩(linear LDPE)으로 포장하여 20, 10, 5℃에 각각 저장하였다. 저장후 생체중, 수분함량, 엽록소 함량, 색도 등의 변화를 2일 간격으로 조사하였고, 측정이 끝난 시료는 새로운 랩으로 재포장하여 같은 조건으로 저장하였다. 마지막 10일째에는 줄기에 있는 잎의 50% 이상 변색하거나 부패한 개체수의 비율을 조사하였다. 생체중은 전자저울을 이용하여 mg 단위까지 조사하였고, 수분함량은 동결건조기에 건조하여 건물중을 측정한 후, 생체중에서 건물중을 뺀 값을 구하였다. 엽록소 함량은 완전 전개된 중간부위의 잎에서 SPAD 값(Model MINOLTA SPAD-502, Minolta camera co., Ltd)을 측정하여 비교하였고, 엽색은 Chroma meter(Model CR 2000, Minolta camera Co., Ltd)로 Hunter L(lightness: black=0, white=100), a(redness to greeness:red=+100, green=-80), b(yellowness to blueness: yellow=+70, blue=-70)값을 측정하였다.

실험은 4반복으로 실시하였으며, 데이터 분석은 SAS 통계프로그램(V 9.12, SAS Institute Inc.)을 이용하여 ANOVA 분석으로 변량간 유의차를 구하였고, 평균값에 대한 유의차는 $P \leq 0.05$ 에서 DMRT를 이용하여 비교하였다.

라. 지역 수집종들의 항산화 활성 및 비타민 C 함량 분석

1) 돌나물 우량계통의 항산화능

생육특성이 양호한 13 지역종으로부터 3반복 채취한 생체시료 20g을 MeOH 200mL로 3일씩 2회 추출하고, 남은 조직은 비이커에 취하여 MeOH 100mL를 넣고 호모게나이저로 마쇄하여 뷔흐너 깔때기로 감압여과하였다. 총 500mL의 MeOH 추출액을 rotary evaporator에서 농축후 동결건조시켜 50,000ppm 농도가 되도록 MeOH을 가하여 가용성 성분을 녹이고 고상으로 남아있는 부분을 분산시키기 위해 sonication하였다. 이중 175μL를 취해 MeOH 325μL를 가하여 17,500ppm이 되도록 희석하여, 20μL를 DPPH free radical scavenging assay에 활용하였다. 동결건조 시료는 1g당 증류수 5 mL을 가하여 2시간 방치한여 MeOH 30mL로 24시간×4회

gyratory shaker상에서 진탕추출(100 rpm)하여 원심분리(8,000rpm, 1min)하고 각 상등액을 모아 약 150 mL의 MeOH 추출액을 rotary evaporator에서 농축하여 MeOH (약5-10 mL)에 녹여 20mL glass vial에서 Air gas로 농축후 동결건조한 다음, 14,000ppm(14 mg/mL) 농도가 되도록 MeOH을 가하여 가용성 성분을 녹이고 고상으로 남아있는 부분을 분산시키기 위해 sonication하였다. 시료를 고르게 진탕분산시킨 후 100μL를 취해 MeOH 9.9 mL를 가하여 140ppm(350μg/2.5mL) 이 되도록 희석하고 그 중 2.5 mL 씩을 DPPH free radical scavenging assay에 활용하였다. 항산화성 검정은 이와 이(2004)의 방법에 따라 300μM DPPH에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 계산하여 비교하였다.

$$\text{○ 항산화 활성 (\%)} = 1 - \frac{(\text{Sample+DPPH용액의 흡광도}) - (\text{Sample+MeOH의 흡광도})}{(\text{MeOH+DPPH용액의 흡광도}) - (\text{MeOH의 흡광도})} \times 100$$

2) 돌나물 우량계통의 비타민 C 함량

개화전 식물체를 채취하여 40℃에서 5일간 건조시킨 다음, 20 mesh 스크린을 통과하도록 분쇄하여 비타민 C 분석 시료로 사용하였다. 분쇄한 시료 10g을 취하여 10% metaphosphoric acid 40mL를 가하여 10분간 추출한 후 3,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 취하는 추출과정을 2회 반복하여 합한 상등액을 100 ml로 정용하여 HPLC(Waters 2695 Alliance system)로 분석하였다. Column은 capcellpack UG-120 C18(3.0×250, 5 μm)을 사용하였고, flow rate은 0.5 ml/min., detector는 UV 254 nm 조건으로 측정하였다. 표준용액은 ascorbic acid(A 5960, Sigma Com. Ltd.)를 5% metaphosphoric acid에 녹여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 돌나물 유전자원의 유연관계

1) 형태적 특성에 의한 유연관계

가) 지역 수집종의 형태적 특성

우리나라에서 자생하는 31개 지역의 돌나물 지역종들을 샅샅이 조사하여 동일한 재배조건에서 개화전과 개화기의 생육특성을 조사한 결과, 개화전 생육특성은 초장, 엽수, 엽크기, 엽형, 등의 특성은 큰 차이를 보이지 않았다. 울산 지역종은 엽장이 짧은 타원형 잎이었으며, 포천, 용인, 부천, 금산의 지역종들은 다른 지역종들에 비하여 마디 길이가 길고, 줄기직경이 가늘며, 엽폭이 좁은 타원형 잎을 가졌다. 초장은 용인 지역종이 36.1 cm로 가장 컸으며, 엽장과 엽폭이 각각 2.0, 0.6 mm로 좁은 타원형에 가깝고, 줄기직경도 2.0 mm로 가장 가는 특성을 보였다(Table 2). 개화특성에서 개화시는 5월 14일~5월 18일이었고, 개화기는 5월 24일~6월 1일로 개화가 가장 빠른 계통은 포천, 용인, 금산, 완도 지역종이었고, 개화가 가장 늦은 계통은 부산, 논산, 무안, 김천, 여주, 천안 지역종들이었다(Table 3). 개화기간은 약 1개월 정도 지속되었으며, 용인, 금산, 부안 목포 지역종들은, 꽃이 크고, 화경수, 소화수 등이 많아 관상 가치가 높았다. 특히 용인 및 금산 지역종의 화경장은 53.1과 50.1 mm로 가장 커서 관상용으로 기대되었다. 그리고 완주 및 군산 지역종은 생육이 왕성하고, 꽃이 피지 않아서 돌나물 주년 생산에 적합한 계통으로 보였으며, 또한 개화하는 포항, 완도, 용인 지역종은 28.7~36.1 cm로 왕성한 초신장을 보였고, 특히 완도 포항의 지역종은 줄기 직경이 굵고 마디수도 많다. 따라서 용인, 금산, 지역종들의 엽의 형태는 장폭비가 큰 장타원형이었고, 줄기직경이 2.0~2.2 mm로 가늘고, 개화특성이 양호하여 관상용으로 유망하였다. 완주, 군산 지역종은 꽃이 피지 않고 생육이 왕성하여 식용으로 유망하였으며, 그 외에 포항, 완도, 지역종들은 생육 및 개화특성 모두 양호하여 다양한 용도로 활용 가능할 것으로 기대되었다.

나) 생육 및 개화특성에 따른 군집분석

31개 돌나물 지역종들에 대한 개화전 생육특성과 개화특성에 대한 군집분석 결과를 토대로 dendrogram을 작성한 결과, 개화전 생육특성에 따른 군집분석에서는 SPRSQ(SemiPartial R-Square)값 0.168을 기준으로 크게 2군으로 나눌 수 있었다(Table 4). 부산, 서천, 울산, 부안 등 27개 지역종들이 I군에 속하였으며, 포천, 용인, 부천, 금산 등 4개 지역종은 II군에 속하였다. I군은 다시 두개의 그룹으로 나눌 수 있었다. I-2군내에서도 두개의 소그룹으로 나뉘어졌는데, 꽃이 피지 않는 완

주와 군산 지역종은 여주, 봉평, 구례 지역종과 같은 그룹으로 분류되었다. 다른 지역종들에 비하여 초장이 다소 길고, 잎의 장폭비가 긴 타원형으로 줄기직경이 가는 특성을 가진 포천, 용인, 부천, 금산 등 4개 지역종은 II군에 속하여 개화전 형태적 특성으로도 군집이 잘 이루어졌다. 한편 개화기의 개화특성에 따른 군집분석에서는 SPRSQ값 0.042를 기준으로 하여 2군으로 나눌 수 있었는데(Table 4), I군에는 꽃이 피지 않는 두 지역종을 제외한 29개의 지역종들이 속하였으며, II군에는 꽃이 피지 않아 확연히 구분되는 군산 및 완주 지역종들이 속하였다. 그러나 개화전 형태적 특성과 개화기의 화기특성을 구분하여 분류한 경우, 품종군이 일치하지 않았는데, 초장이 크고 잎과 줄기가 가는 특성을 가지며, 소화수와 꽃이 약간 큰 것으로 나타난 4개의 지역종 중 포천 지역종은 부천, 용인, 금산과 다르게 분류되며, 형태적 특성과는 약간 다르게 분류되어 개화특성만으로 군집 분석하는 것은 바람직하지 않은 것으로 생각되었다. 따라서 생육특성 및 개화특성을 모두 이용하여 군집 분석한 결과(Fig. 1), SPRSQ값 0.153를 기준으로 크게 2군으로 나눌 수 있었는데, I군에는 꽃이 피는 29 지역종이 속하였다. I군은 다시 두개의 소그룹으로 나눌 수 있었는데, I-1군은 초장이 크고 잎과 줄기가 가늘며 개화특성이 양호한 포천, 용인, 부천, 금산 등 4개 지역종이 속하였고, 형태적 특성 및 개화특성이 명확하지 않은 25지역종들은 I-2군에 속하였다. II군에는 꽃이 피지 않아 다른 지역종과 확연히 구분되는 군산 및 완주 지역종들이 속하였다. 또한 SPRSQ값 0.051를 기준으로 하면 3 그룹으로 나눌 수 있는데, 개화특성이 양호한 포천, 용인, 부천, 금산 등 4개 지역종을 I군, 개화 및 생육특성이 비슷한 25지역종들은 II군으로, 개화가 되지 않는 군산, 완주 지역종은 III군으로 나누는 것도 좋은 군집분석이 될 수 있지만, 여기서는 개화특성을 중심으로 크게 2군으로 나누고, 포천, 용인, 부천, 금산 등 4개 지역종을 I군내 소그룹으로 나누어지는 것이 가장 이상적이라고 보았다. 따라서 개화전 생육특성이나 개화특성만으로 군집분석을 하는 것보다는 개화전 생육특성과 개화특성을 모두 이용하는 것이 형태적 특성에 따른 분류와 가장 일치하였다.

Table 2. Morphological characteristics of Korean native *S. sarmentosum*.

Local strain	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Internode /length (cm)	No. of node /stem	No. of Leaf /stem	Leaf (mm)		
						Length	Width	L/W
Wanju	19.6±1.6	2.6±0.3	1.7±0.2	11.6±1.3	34.9±4.0	2.7±0.3	0.8±0.1	3.5±0.3
Gunsan	21.8±1.4	2.5±0.2	1.7±0.2	12.6±1.4	37.7±4.1	2.6±0.2	0.7±0.1	3.6±0.5
Gwangyang	26.4±4.2	3.1±0.4	1.9±0.3	13.9±1.5	41.8±4.5	2.4±0.3	0.7±0.1	3.3±0.4
Jeju	24.4±2.6	3.1±0.5	1.9±0.2	12.9±1.1	38.8±3.4	2.8±0.1	0.8±0.1	3.5±0.4
Mokpo	28.2±2.6	2.9±0.4	2.0±0.2	14.0±1.9	42.1±5.7	2.8±0.3	0.9±0.2	3.3±0.6
Suncheon	30.7±2.4	2.7±0.3	2.0±0.4	14.5±1.7	43.4±5.0	2.9±0.3	0.8±0.1	3.7±0.5
Buan	30.7±3.2	2.9±0.3	2.2±0.2	13.6±1.1	40.8±3.2	2.9±0.3	0.9±0.1	3.3±0.4
Wando	30.7±2.2	3.0±0.4	2.3±0.1	15.4±0.8	46.2±2.5	2.7±0.2	0.8±0.0	3.3±0.2
Pohang	28.7±2.6	3.0±0.4	2.0±0.3	14.3±2.2	42.8±6.5	2.7±0.1	0.8±0.1	3.4±0.4
Gangnung	28.2±2.9	2.8±0.4	2.1±0.2	13.3±1.1	40.0±3.2	2.7±0.3	0.8±0.1	3.4±0.4
Kimcheon	26.3±2.0	2.8±0.4	1.9±0.3	13.7±1.4	41.4±4.3	2.8±0.2	0.8±0.1	3.7±0.4
Gurye	26.8±2.1	2.6±0.3	2.1±0.1	12.6±1.0	37.8±2.9	2.3±0.2	0.7±0.1	3.3±0.4
Gumi	27.2±2.7	2.9±0.5	2.0±0.2	13.5±1.7	40.5±5.2	2.7±0.2	0.8±0.1	3.4±0.6
Nonsan	29.0±2.4	2.8±0.4	2.1±0.3	13.7±1.2	41.1±3.5	2.6±0.3	0.8±0.1	3.4±0.4
Muan	26.6±2.1	2.7±0.5	1.9±0.3	14.0±1.4	42.1±4.2	2.7±0.2	0.8±0.1	3.6±0.3
Busan	27.2±1.8	2.9±0.3	1.9±0.2	14.7±1.5	44.1±4.5	2.5±0.1	0.8±0.1	3.1±0.4
Boseong	26.9±1.8	2.9±0.2	2.0±0.2	13.4±1.0	40.2±2.9	2.8±0.3	0.8±0.1	3.4±0.4
Bongpyeong	24.9±4.4	2.6±0.3	2.0±0.4	12.9±2.0	38.8±6.1	2.6±0.3	0.7±0.1	3.6±0.8
Seosan	27.6±1.7	2.5±0.3	2.2±0.3	12.8±2.0	38.3±6.1	2.8±0.2	0.8±0.1	3.7±0.5
Taeon	26.2±2.0	2.9±0.2	2.0±0.2	12.9±1.3	38.7±3.9	2.8±0.2	0.9±0.1	3.3±0.3
Yeoju	26.1±2.0	2.6±0.1	2.0±0.2	12.9±1.4	38.8±4.3	2.7±0.3	0.7±0.1	3.8±0.6
Yeosu	28.2±1.8	2.9±0.6	2.0±0.2	14.0±1.3	42.1±4.0	2.5±0.3	0.7±0.1	3.5±0.6
Iksan	28.2±3.5	2.8±0.4	1.9±0.2	15.1±2.1	45.4±6.2	2.7±0.2	0.8±0.1	3.4±0.3
Ulsan	29.7±3.3	2.9±0.4	2.1±0.2	13.9±1.8	41.8±5.5	2.2±0.2	0.8±0.1	2.9±0.6
Jangsu	28.8±2.6	3.0±0.4	2.2±0.2	13.3±1.3	40.0±4.0	2.8±0.2	0.8±0.1	3.5±0.4
Chonan	30.0±2.8	2.9±0.4	2.1±0.2	14.4±2.0	43.1±5.9	2.7±0.2	0.8±0.1	3.5±0.4
Hongseon	27.6±3.3	2.9±0.4	2.3±0.7	12.7±1.9	38.0±5.6	2.8±0.3	0.8±0.1	3.7±0.5
Pochun	31.0±1.6	2.2±0.4	2.2±0.3	14.5±1.6	43.4±4.7	2.1±0.2	0.5±0.1	4.4±0.9
Yongin	36.1±2.5	2.0±0.3	2.5±0.2	14.3±1.3	42.8±4.0	2.0±0.1	0.6±0.1	3.9±0.6
Bucheon	32.2±2.2	2.1±0.3	2.4±0.3	13.7±1.9	41.1±5.7	2.5±0.2	0.6±0.1	4.2±0.8
Geumsan	31.1±4.0	2.2±0.3	2.1±0.3	14.7±1.2	44.1±3.6	2.8±0.4	0.6±0.1	4.7±0.9

Table 3. Flowering characteristics of Korean native *S. sarmentosum*.

Local strain	First flowering	Flowering time	Flower stock length (cm)	No. of flower/stock	Flower diameter (mm)	Petal (mm)	
						Length	Width
Wanju			– No flowering –				
Gunsan			– No flowering –				
Gwangyang	May16	May29	36.1±0.0	36.3±4.8	12.7±0.3	5.4±0.7	1.2±0.3
Jeju	May15	May30	37.5±1.8	36.8±3.0	14.9±0.4	7.7±0.4	1.9±0.2
Mokpo	May16	May27	36.4±9.4	39.4±4.5	15.2±0.5	6.5±0.2	1.5±0.0
Suncheon	May16	May29	37.5±3.6	36.3±1.3	12.6±0.3	5.2±0.3	1.3±0.0
Buan	May16	May29	38.3±1.9	40.8±0.9	14.9±0.5	6.4±0.2	1.5±0.1
Wando	May14	May28	26.5±1.1	23.3±2.1	12.9±1.2	5.9±0.4	1.3±0.0
Pohang	May16	May30	37.0±4.8	22.2±2.2	12.9±0.3	6.2±0.2	1.5±0.2
Gangnung	May16	May30	33.4±0.5	27.5±2.7	14.2±0.6	6.0±0.2	1.4±0.0
Kimcheon	May17	May26	34.9±1.1	24.9±1.8	12.9±0.3	6.0±0.3	1.3±0.1
Gurye	May16	May26	35.1±2.2	20.7±1.2	13.9±1.0	6.1±0.1	1.6±0.1
Gumi	May16	May30	36.8±1.2	28.3±2.5	12.6±0.3	6.4±0.1	1.5±0.2
Nonsan	May16	May30	36.4±5.8	28.3±2.7	12.7±0.3	5.7±1.2	1.7±0.0
Muan	May17	May28	30.5±3.1	25.5±2.2	14.7±1.3	6.1±0.7	1.4±0.2
Busan	May18	June01	32.2±3.5	27.8±2.7	13.4±0.5	5.9±0.1	1.4±0.0
Boseong	May16	May26	28.6±2.2	22.2±1.8	14.6±0.2	6.3±0.0	1.6±0.1
Bongpyeong	May16	May27	26.8±1.3	24.9±1.8	13.3±0.2	7.0±0.2	1.6±0.1
Seosan	May16	May28	33.9±2.0	21.5±4.2	14.3±0.3	6.1±0.2	1.4±0.1
Taeon	May16	May26	26.5±2.1	27.6±1.2	12.9±0.6	5.6±0.4	1.5±0.1
Yeoju	May17	May28	31.3±2.5	26.1±0.5	14.6±0.3	6.0±0.2	1.4±0.1
Yeosu	May16	May29	33.6±6.6	23.5±1.3	12.9±1.2	6.6±0.6	1.5±0.1
Iksan	May17	May27	34.4±1.1	28.1±3.1	14.1±1.2	7.1±0.7	1.6±0.0
Ulsan	May16	May29	35.8±1.8	29.5±1.8	12.4±0.2	5.9±0.3	1.3±0.0
Jangsu	May15	May29	30.6±3.7	21.8±3.2	12.2±0.2	5.4±0.2	1.3±0.0
Chonan	May17	May30	31.9±2.2	24.9±6.0	13.2±0.4	6.8±0.0	1.6±0.1
Hongseon	May16	May30	31.5±2.7	21.5±2.6	14.1±0.3	6.1±0.2	1.5±0.1
Pochun	May14	May28	44.5±2.1	36.6±2.9	12.6±0.5	5.4±0.2	1.4±0.1
Yongin	May14	May26	53.1±1.9	35.1±2.6	11.5±0.3	5.6±0.2	1.5±0.1
Bucheon	May15	May28	48.0±3.4	39.4±2.6	13.3±0.7	5.8±0.3	1.3±0.0
Geumsan	May14	May25	50.0±0.7	37.1±1.3	12.1±0.6	5.7±0.1	1.5±0.1

Table 3. Continuous data.

Local strain	Sepal (mm)		Filament Length (mm)		Anther length (mm)		Style length (mm)	Ovary length (mm)
	Length	Width	Long	Short	Long	Short		
Wanju	–	–	–	–	–	–	–	–
Gunsan	–	–	–	–	–	–	–	–
Gwangyang	5.6±0.9	1.5±0.3	3.8±0.3	2.7±0.1	0.6±0.1	0.4±0.0	1.1±0.2	2.6±0.5
Jeju	7.4±0.3	1.9±0.2	4.3±0.3	2.7±0.2	0.8±0.0	0.5±0.0	1.1±0.2	3.2±0.5
Mokpo	4.8±0.3	1.4±0.1	4.5±0.1	3.0±0.0	0.8±0.1	0.5±0.1	1.3±0.0	3.0±0.1
Suncheon	3.9±0.2	1.2±0.0	3.9±0.8	2.9±0.0	0.7±0.0	0.5±0.0	1.2±0.0	2.6±0.2
Buan	4.8±0.1	1.4±0.1	4.2±0.1	2.9±0.0	0.7±0.0	0.5±0.0	1.3±0.0	2.8±0.1
Wando	4.0±0.4	1.2±0.1	3.7±0.1	2.7±0.3	0.8±0.0	0.5±0.1	1.3±0.0	2.7±0.2
Pohang	5.8±0.8	1.6±0.1	3.9±0.1	2.9±0.2	0.6±0.1	0.6±0.1	1.3±0.0	2.9±0.1
Gangnung	5.0±0.0	1.3±0.0	4.3±0.1	2.9±0.0	0.9±0.0	0.6±0.0	1.4±0.1	3.0±0.1
Kimcheon	5.9±0.7	1.7±0.1	3.8±0.1	2.7±0.1	0.6±0.1	0.4±0.0	1.3±0.1	2.4±0.2
Gurye	5.8±0.7	1.5±0.1	4.4±0.0	2.8±0.1	0.8±0.0	0.6±0.1	1.3±0.0	2.8±0.0
Gumi	6.2±0.1	1.8±0.1	4.0±0.2	2.7±0.0	0.7±0.1	0.4±0.0	1.1±0.1	3.2±0.2
Nonsan	5.3±0.8	1.3±0.2	3.8±0.2	2.7±0.2	0.9±0.4	0.4±0.0	1.3±0.1	3.0±0.1
Muan	5.6±1.1	1.4±0.1	4.6±0.2	3.1±0.4	0.8±0.1	0.5±0.1	1.5±0.2	3.0±0.1
Busan	4.7±0.1	1.3±0.0	3.9±0.0	2.7±0.0	0.8±0.0	0.6±0.0	1.3±0.0	2.7±0.1
Boseong	6.3±0.6	1.8±0.2	4.6±0.3	2.9±0.1	0.7±0.1	0.6±0.0	1.3±0.0	2.8±0.1
Bongpyeong	7.0±0.5	2.2±0.1	4.7±0.3	3.1±0.2	0.9±0.0	0.6±0.1	1.4±0.1	3.4±0.4
Seosan	4.6±0.3	1.3±0.1	4.3±0.1	2.9±0.1	0.7±0.0	0.5±0.1	1.5±0.0	2.8±0.1
Taeon	6.3±0.0	1.4±0.0	4.4±0.3	3.3±0.1	0.8±0.0	0.6±0.0	1.4±0.0	2.9±0.1
Yeoju	4.5±0.3	1.3±0.1	4.2±0.2	3.0±0.2	0.8±0.1	0.5±0.1	1.3±0.0	2.9±0.1
Yeosu	6.1±0.4	1.5±0.3	4.3±0.5	2.9±0.5	0.8±0.2	0.5±0.0	1.4±0.2	2.9±0.1
Iksan	6.8±0.5	1.7±0.0	4.6±0.3	2.6±0.2	0.8±0.1	0.5±0.0	1.3±0.1	3.2±0.1
Ulsan	4.1±0.0	1.2±0.0	3.9±0.1	2.8±0.1	0.8±0.0	0.5±0.0	1.2±0.0	2.7±0.1
Jangsu	3.3±0.3	1.2±0.1	3.7±0.0	2.7±0.0	0.6±0.0	0.4±0.0	1.0±0.0	2.3±0.3
Chonan	6.5±0.7	1.7±0.2	3.9±0.1	2.6±0.6	0.7±0.1	0.5±0.1	1.3±0.2	3.1±0.3
Hongseon	4.8±0.2	1.4±0.1	4.3±0.2	2.8±0.2	0.8±0.0	0.6±0.1	1.4±0.1	2.9±0.2
Pochun	4.8±0.1	1.3±0.1	3.5±0.0	2.7±0.0	0.7±0.1	0.5±0.0	1.3±0.0	3.0±0.1
Yongin	5.3±0.3	1.5±0.1	3.5±0.1	2.6±0.0	0.7±0.0	0.5±0.0	1.4±0.1	2.8±0.2
Bucheon	4.9±0.1	1.3±0.0	3.6±0.1	2.7±0.1	0.9±0.0	0.5±0.1	1.3±0.1	2.8±0.1
Geumsan	6.3±0.6	1.7±0.2	3.9±0.1	2.8±0.0	0.8±0.0	0.5±0.1	1.3±0.1	3.3±0.3

Table 4. Classification of Korean native *S. sarmentosum* based on growth and flowering characteristics.

Growth stage	Grouping	Local strains	No.
Growth before flowering	Group I-1	Busan, Iksan, Wando, Suncheon, Chonan, Pohang, Mokpo, Ulsan, Yeosu, Gwangyang	10
	Group I-2	Hongseong, Jangsu, Seosan, Buan, Muan, Kimcheon, Boseong, Gumi, Nonsan, Gangnung, Taean, Jeju, Yeojoo, Bongpyeong, Gurye, Gunsan, Wanju	17
	Group II	Geumsan, Yongin, Bucheon, Pocheon	4
Flower structure at flowering stage	Group I-1	Taean, Yeosu, Muan, Hongseong, Gurye, Busan, Gangnung, Yeojoo, Seosan, Wando, Iksan, Chonan, Gumi, Boseong, Pohang, Bongpyeong, Jeju	17
	Group I-2	Bucheon, Geumsan, Yongin, Nonsan, Pocheon, Ulsan, Suncheon, Buan, Mokpo, Jangsu, Kimcheon, Gwangyang	12
	Group II	Gunsan, Wanju	2

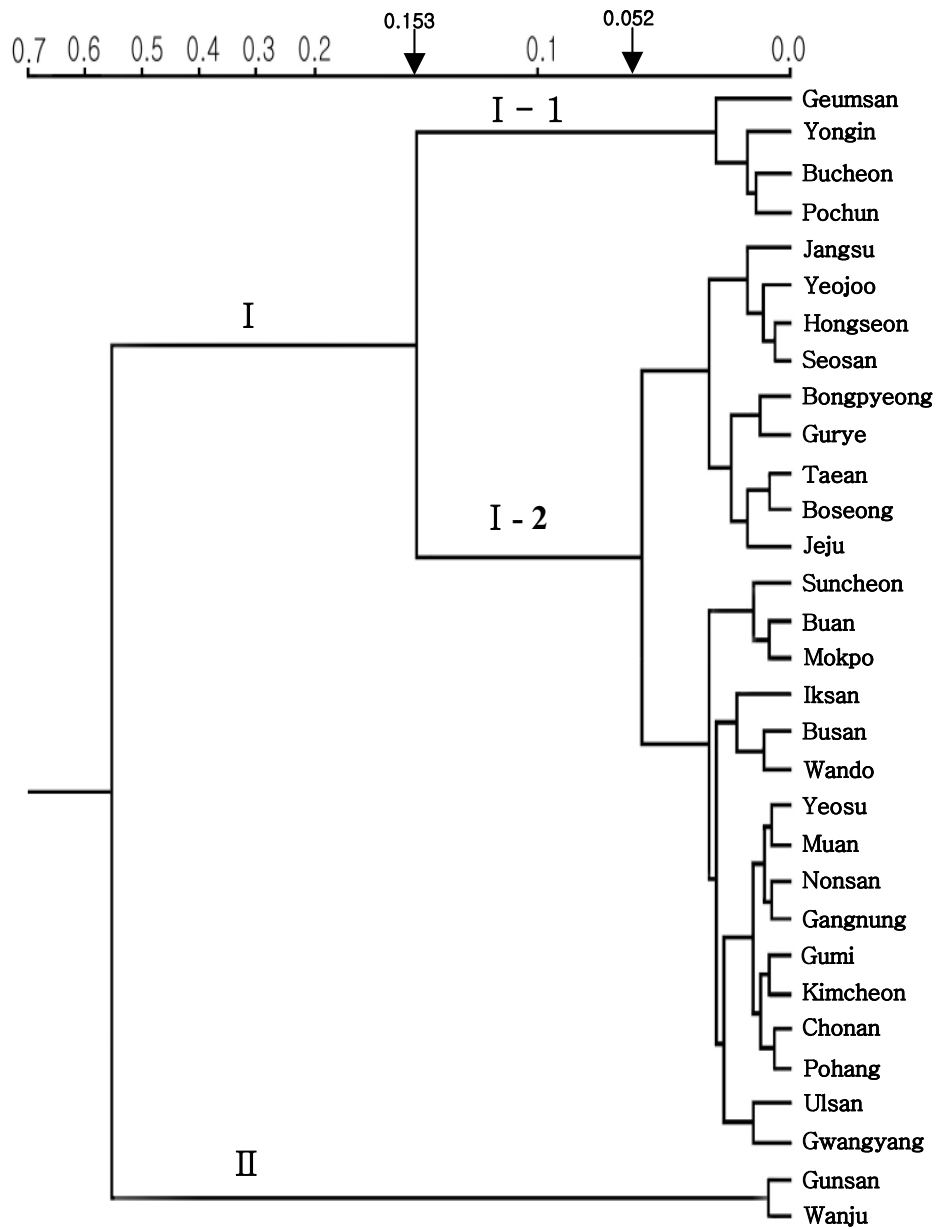


Fig. 1. Classification of *S. sarmentosum* based on growth and flowering characteristics.

최근 들나물은 항산화 및 항바이러스성 약리효과가 뛰어나(Park 등, 2002; He 등, 1998; Woo 등, 1997). 신선채소로서 뿐만이 아니라, 자생화훼로서의 가치가 높아 지피식물, 분화용, 실내 및 옥상정원 등에도 널리 이용되고 있으며, 들나물을 비롯한 *Sedum* 속 식물들에 대한 연구가 최근 활발하게 이루어지고 있다(Jeong, 1999; Kim, 1994; Kim & Huh, 2003). 들나물과의 *Sedum* 속에는 애기기린초(*Sedum middendorffianum*), 태백기린초(*Sedum latiovalifolium*), 땅채송화(*Sedum oryzifolium*), 꿩의비름(*Sedum drythrostichum* Miq.), 둥근잎꿩의 비름(*Sedum ortundifolium*), 세잎 들나물(*Sedum sieboldii*) 등이 있다(Kwon & Jeong, 1999).

Sedum 속 식물에 대한 종 분류는 Nakai(1909)에 의해 처음 이루어졌으며, 그 후 식물분류학적인 연구가 석엽표본이나 재배실험에 의한 생체표본 조사 등이 지속적으로 이루어져 왔다(Clausen, 1975; Paterson 등, 1988). 한국산 *Sedum* 속 식물은 한 분류군내 종간 및 종내에서도 잎이나 외형의 변이가 심하며, 영양기관뿐만 아니라 생식기관인 꽃에서도 크기나 수의 변이가 흔히 나타난다(Chung과 Kim, 1989; Kim, 1989). 오(1985)는 한국산 들나물과 식물들을 5속, 34종, 7변종으로 나누어 분류학적 체계를 세웠으며, Park 등(2003)은 한국산 들나무속 가는기린초아속 식물의 형태적 유연관계 분석을 통하여 한국 특산종인 속리기린초, 섬기린초와 태백기린초는 기린초 집단에 포함된다고 하였다. *Sedum*속 식물은 같은 종내 에서도 잎이나 줄기 같은 외형의 변이가 크고, 생식기관인 꽃의 크기나 수의 변이도 흔히 나타나지만, 이러한 형태적 특성이 군집분석 결과와 일치하지 않는 경우가 많으며(Chung과 Kim, 1989; Kim, 1989), 쌀보리(Cho 등, 2002), 들깨(Kim 등, 2003), 미나리(Kim 등, 2000)등 다른 식물들의 군집분석에서도 형태적 특성과 분류학적 기준이 일치하지 않는 경우가 많다. 본 연구에서는 형태적 특성 및 개화특성에 따라 품종군 분류가 뚜렷하게 나타났으며, 이러한 결과들은 품종구분이나 육종을 위한 기초 자료로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

이와 같이 자원식물의 개발에 있어서 유전자원의 다양성에 대한 정보는 매우 중요하며, 종이나 집단간의 유전적 연관성에 대한 평가는 새로운 유전적 조합을 위한 유전자 도입의 선택에 큰 역할을 제공하는데(Sneath와 Sokal, 1973), 지역 재래종의 경우 한정된 조건에서 다년간 재배 적응되어 왔으므로 육종재로 활용하는데 변이가 적은 것이 결점이다(Kwack, 1976). 식물의 유전적 유연관계를 평가하는 방법으로 주로 식물의 형태적 특징이나 생화학적인 동위효소 분석 그리고 DNA분석 등을 통하여 이루어지고 있다. 식물의 유연관계 분석에서 본 연구에서와 같이 형태적 특성을 이용한 방법은 경제적이면서 일반적인 방법이지만, 환경의 영향에 민감하여 때때로 품종 구별을 하는데 어려움이 있어, RAPD 분석에 의한 유연관계와 비교하였다.

2) RAPD에 의한 유연관계

가) Primer에 따른 PCR products

우리나라에서 자생하는 31개 지역의 들나물 지역종들을 샅망하여 동일한 재배조건에서 재배하여 genomic DNA를 추출하여, 15개의 10-mers random primer와 12개의 20-mers random primer를 이용하여 RAPD 분석을 실시한 결과, polymorphism을 보인 10-mers random primer는 14개, 20-mers primer는 6개로, 이들 primer의 GC 함량, 증폭산물의 수, polymorphic band 수, polymorphism은 Table 5와 같다. 10-mers primer는 총 band수 143개 중에서 polymorphic한 band수는 47개, primer당 평균 band수는 3.4개로 나타났다. 또한 20-mers primer는 총 band수 116개 중에서 polymorphic한 band수는 90개, primer당 평균 band수는 15개였다. 본 연구에서 polymorphic band 수는 카네이션(Lee 등, 2002), 자생붓꽃(Hong과 Koh, 2004), 제비꽃 속(Yoo 등, 2004)에서 보고된 것과 비교하여 적은 결과를 얻었으나, SRILS UniPrimer 1, 7, 8, 11은 primer당 15개 이상의 polymorphic band를 나타냈다. OPC-20(10-mers)에서의 band pattern은 15개 band중 4개의 polymorphic band를 보였는데, 포천, 용인, 부천, 금산 지역종에서만 나타나거나, 또는 용인, 부천 지역종에서만 나타났다. SRILS Uniprimer(20-mers) 5는 14개 band중 7개의 polymorphic band가 나타났으며, 논산 지역종에서만 나타나거나, 또는 포천, 용인, 부천, 금산 지역종에서는 나타나지 않았다. 또한 SRILS Uniprimer(20-mers) 7에서는 20개 band중 18개의 polymorphic band를 보여 들나물 지역 지역종간 분류에 유용하였다(Fig. 2). 이와 같이 primer당 band수는 20-mers SRILS Uniprimer에서 높게 나타났는데, Um 등(2001)도 20-mers SRILS Uniprimer를 이용한 인삼의 RAPD 분석에서 본 실험과 같은 조건으로 증폭한 결과, 5개의 primer에서 평균 11.4개의 polymorphic band를 얻었다고 하였다. RAPD를 이용한 유연관계 분석에는 종특이적 밴드의 탐색이 중요한데, 포인세티아에서는 polymorphic band pattern을 보인 두개의 primer만을 이용하여 집단분류가 가능하였으며(Ling 등, 1997), 마늘에서는 화분임성을 구분할 수 있었고(Choe 등, 2003), 카네이션에서도 종특이적 밴드를 보여 RAPD 분석에 의한 유연관계 분석이 효율적이었다고 하였다(Lee 등, 2002). 그러나 RAPD를 이용한 DNA의 polymorphism은 식물 종에 따라 다르며(Welsh 등, 1991), template DNA내의 GC 함량(Innis 등, 1990), primer의 염기구성의 GC함량(Heo 등, 2004; Williams 등, 1993) 및 PCR에 조건 등에 따라 달라질 수 있어 식물 종별 유전변이 분석에 중요한 요인으로 작용하기 때문에 보다 정확한 검토가 필요하다. 또한 primer 길이에 따라서도 polymorphism에 차이가 나타나는데, 장미(Debener와 Mattiesch, 1999; Kim 등, 2006)와 아시아계 백합(Yamagishi, 2002) 등에서는 10-mers primer보다 12-mers 또

는 15-mers 이상의 긴 primer에서 primer당 밴드수도 많고 다양한 크기의 밴드가 나타나며, polymorphism이 높게 나타난다. 그러나 17-mers 이상의 primer간에는 유의한 차이가 없다(Ye 등, 1996). 다만 10-mers의 짧은 primer를 이용하는 경우에도 primer의 GC함량 및 염기구성이 알맞고 DNA 정제가 잘되어 있으면 재현성에 전혀 문제가 없다(Patwary 등, 1994; van Oppen 등, 1996). 본 연구에서도 얻어진 polymorphic band들은 명확하고 재현성 있는 band로 분석되었으며, 20-mers SRILS Uniprimer는 10-mers primer보다 primer당 polymorphism이 높게 나타났다.

Table 5. Primers selected for RAPD analysis of *S. sarmentosum*.

Primer	GC content (%)	No. of amplification products	No. of polymorphic products
OPA-01	70	5	4
02	70	12	6
03	60	15	2
10	60	8	2
11	60	9	3
13	60	10	4
OPC-06	60	9	5
20	60	15	4
OPD-02	70	12	3
07	70	13	6
OPJ-18	60	6	1
OPN-11	60	7	1
OPQ-01	70	14	4
OPR-13	60	8	2
Total (Mean)		143	47(3.4)
SRILS 2	60	28	24
5	65	14	7
6	45	15	7
7	50	20	18
8	50	21	19
11	50	18	15
Total (Mean)		116	90(15.0)

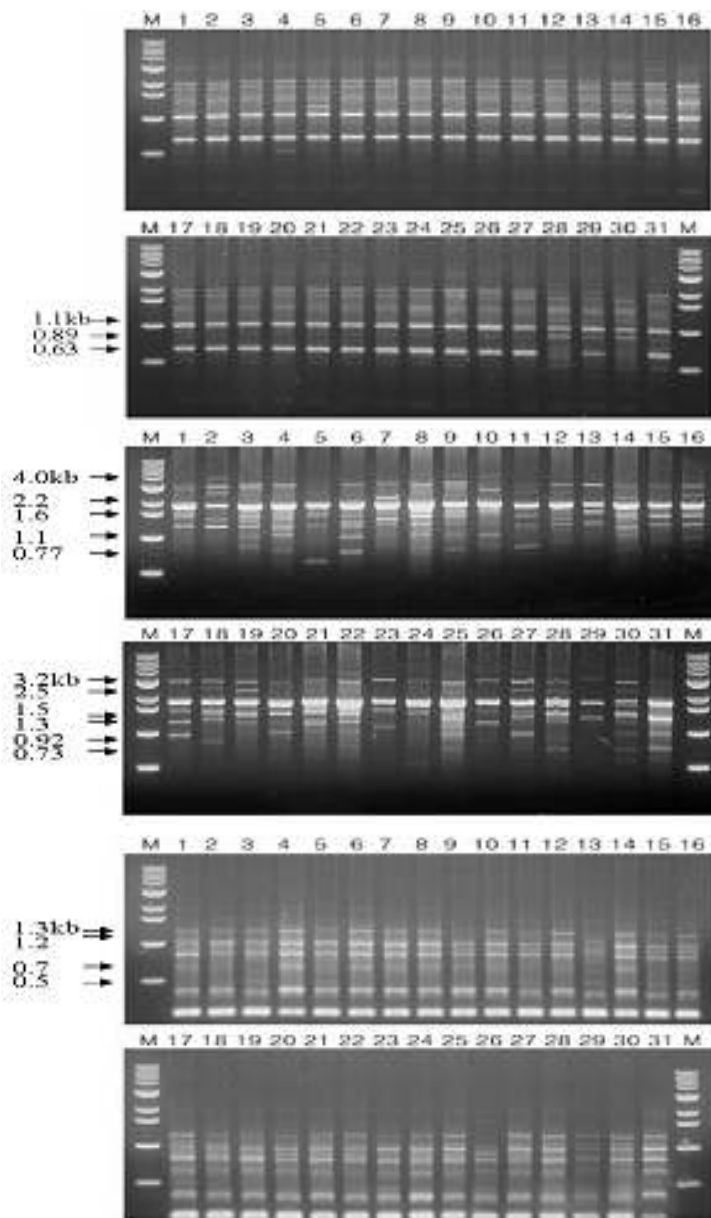


Fig. 2. RAPD products generated with OPC-20 (upper), SRILS Uniprimer 5 (middle), and SRILS Uniprimer 7 (below) among 31 *S. sarmentosum*. (→ polymorphic band)

나) 유연관계

Operon primer 14개와 SRILS Uniprimer 6개를 이용하여 돌나물 RAPD-PCR에 의해 얻어진 polymorphic band를 각각 하나의 형질로 보아 기초자료 행렬을 작성하고 이를 NTSTS-PC program으로 분석하여 dendrogram을 작성하였다(Fig. 3, 4). Operon primer(10-mers)에서는 유연계수 0.76을 기준으로 하여 크게 2군으로 나눌 수 있었는데, I 군은 금산 지역종을 포함하여 28 지역종이 속하였으며, II 군은 포천, 부천, 용인 등 3 지역종이 속하였다. I 군은 다시 두개의 소그룹으로 나누어졌는데, 형태적 특성이 포천, 부천, 용인과 비슷한 금산 지역종은 따로 분류되었으며, 완주와 군산 등 2 지역종, 광양, 구례, 무안, 장수 등 4 지역종, 포항, 김천, 봉평, 천안 익산, 여산, 태안 등 7 지역종, 구미와 홍천 등 2 지역종, 순천, 완도, 논산 등 3 지역종 간에는 각각 낮은 유연계수 수준에서 유집되어 유연관계가 밀접한 것으로 나타났다(Fig. 3). 10-mers Operon primer를 이용한 국내 자생식물의 유연관계분석에서 수집계통간 유연관계가 밀접하게 나타나는 경우가 미나리(Kim 등, 2000)와 반하(Tae 등, 2005)에서도 보고된 바 있다. 한편 SRILS Uniprimer(20-mers)를 이용한 분석 결과에서는 유연계수 0.64를 기준으로 하여 크게 2군으로 분류할 수 있었는데, I 군에는 완주 및 군산 지역종을 포함하여 27 지역종들이 속하였으며, II 군은 포천, 용인, 부천, 금산 등 4 지역종들이 속하였다(Fig. 4). 특히 II 군에 속한 포천, 용인, 부천, 금산 지역종들은 초장이 길며(31.0-36.1 cm), 줄기가 가늘고(2.0-2.2 mm) 잎 모양 또한 장폭비가 큰 긴 타원형(3.9-4.7)으로 다른 지역종들과 형태적 특성에서 차이를 보였는데(Table 6), RAPD 분석결과에서도 같은 그룹으로 분류되었다. 이러한 결과는 저자 등(Kim과 Lee, 2007)이 이에 앞서 보고한 지역종들의 형태적 특성에 따른 군집분석 결과와도 잘 일치하였다. 그러나 10-mers와 20-mers primer에서 나타난 polymorphic band를 종합하여 작성한 dendrogram은 형태적 특성과의 분류 연관성이 낮았다(data not shown). 따라서 10-mers Operon primer에서보다 20-mers SRILS Uniprimer를 이용한 RAPD 분석에서 지역종간 유연계수 차이가 뚜렷하였고, 형태적 특성과의 일치하였는데, 이는 10-mers primer보다 20-mers SRILS Uniprimer에서 primer당 밴드수가 많고, 종 특이적 polymorphism이 높게 나타났기 때문으로 보인다(Debener와 Mattiesch, 1999; Kim 등, 2006; Yamagishi, 2002; Ye 등, 1996).

Table 6. Morphological characteristics of *S. sarmentosum* in Korea.

Local strain	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Leaf length/width	Flowering time
Wanju	19.6±1.6	2.6±0.3	3.5±0.3	no-flowering
Gunsan	21.8±1.4	2.5±0.2	3.6±0.5	no-flowering
Gwangyang	26.4±4.2	3.1±0.4	3.3±0.4	May 29
Jeju	24.4±2.6	3.1±0.5	3.5±0.4	May 30
Mokpo	28.2±2.6	2.9±0.4	3.3±0.6	May 27
Suncheon	30.7±2.4	2.7±0.3	3.7±0.5	May 29
Buan	30.7±3.2	2.9±0.3	3.3±0.4	May 29
Wando	30.7±2.2	3.0±0.4	3.3±0.2	May 28
Pohang	28.7±2.6	3.0±0.4	3.4±0.4	May 30
Gangnung	28.2±2.9	2.8±0.4	3.4±0.4	May 30
Kimcheon	26.3±2.0	2.8±0.4	3.7±0.4	May 26
Gurye	26.8±2.1	2.6±0.3	3.3±0.4	May 26
Gumi	27.2±2.7	2.9±0.5	3.4±0.6	May 30
Nonsan	29.0±2.4	2.8±0.4	3.4±0.4	May 30
Muan	26.6±2.1	2.7±0.5	3.6±0.3	May 28
Busan	27.2±1.8	2.9±0.3	3.1±0.4	June 01
Boseong	26.9±1.8	2.9±0.2	3.4±0.4	May 26
Bongpyeong	24.9±4.4	2.6±0.3	3.6±0.8	May 27
Seosan	27.6±1.7	2.5±0.3	3.7±0.5	May 28
Taeon	26.2±2.0	2.9±0.2	3.3±0.3	May 26
Yeojoo	26.1±2.0	2.6±0.1	3.8±0.6	May 28
Yeosu	28.2±1.8	2.9±0.6	3.5±0.6	May 29
Iksan	28.2±3.5	2.8±0.4	3.4±0.3	May 27
Ulsan	29.7±3.3	2.9±0.4	2.9±0.6	May 29
Jangsu	28.8±2.6	3.0±0.4	3.5±0.4	May 29
Chonan	30.0±2.8	2.9±0.4	3.5±0.4	May 30
Hongseon	27.6±3.3	2.9±0.4	3.7±0.5	May 30
Pochun	31.0±1.6	2.2±0.4	4.4±0.9	May 28
Yongin	36.1±2.5	2.0±0.3	3.9±0.6	May 26
Bucheon	32.2±2.2	2.1±0.3	4.2±0.8	May 28
Geumsan	31.1±4.0	2.2±0.3	4.7±0.9	May 25

이와 같이 RAPD 분석기법은 여러 식물종에서 유전자원의 변이탐색과 종속간 유연관계를 분석하는데 널리 이용되어 왔다. Yoo 등(2004)도 RAPD 분석방법이 ISSR이나 PCR-RFLP 분석보다 한국산 제비꽃속의 종간 유연관계를 밝히는데 유용하다고 하였다. RAPD를 이용한 유연관계 분석결과와 종 또는 형태적 특성 간에는 식물종 및 연구자에 따라 일치하는 경우도 있지만, 그렇지 않은 경우도 많다. *Sedum*속 식물(Kwon과 Jeong, 1999), 카네이션(Lee 등, 2002), 자생붓꽃(Hong과 Koh, 2004),

등굴레속(Jang 등, 2004) 및 제비꽃속(Yoo 등, 2004)에서는 RAPD 분석결과와 형태적 특성 또는 종속간 분류가 일치하기도 하지만, 들깨(Kim 등, 2003), 천남성속(Lee와 Kim, 2005) 및 고추냉이(Heo 등, 2004) 등에서는 일부계통에서 형태적 특성과 RAPD 분석 결과와 상이하게 나타나기도 한다. 본 연구에서 6종의 20-mers SRILS Uniprimer를 이용한 RAPD 분석 결과, 밴드의 polymorphism이 비교적 잘 나타났으며, 형태적 특성에 따른 분류(Kim과 Lee, 2007)와도 잘 일치하여 짧은 시간 내에 변이탐색 및 품종군 분류와 교배모본 선정 등에 이용될 수 있을 것으로 보인다.

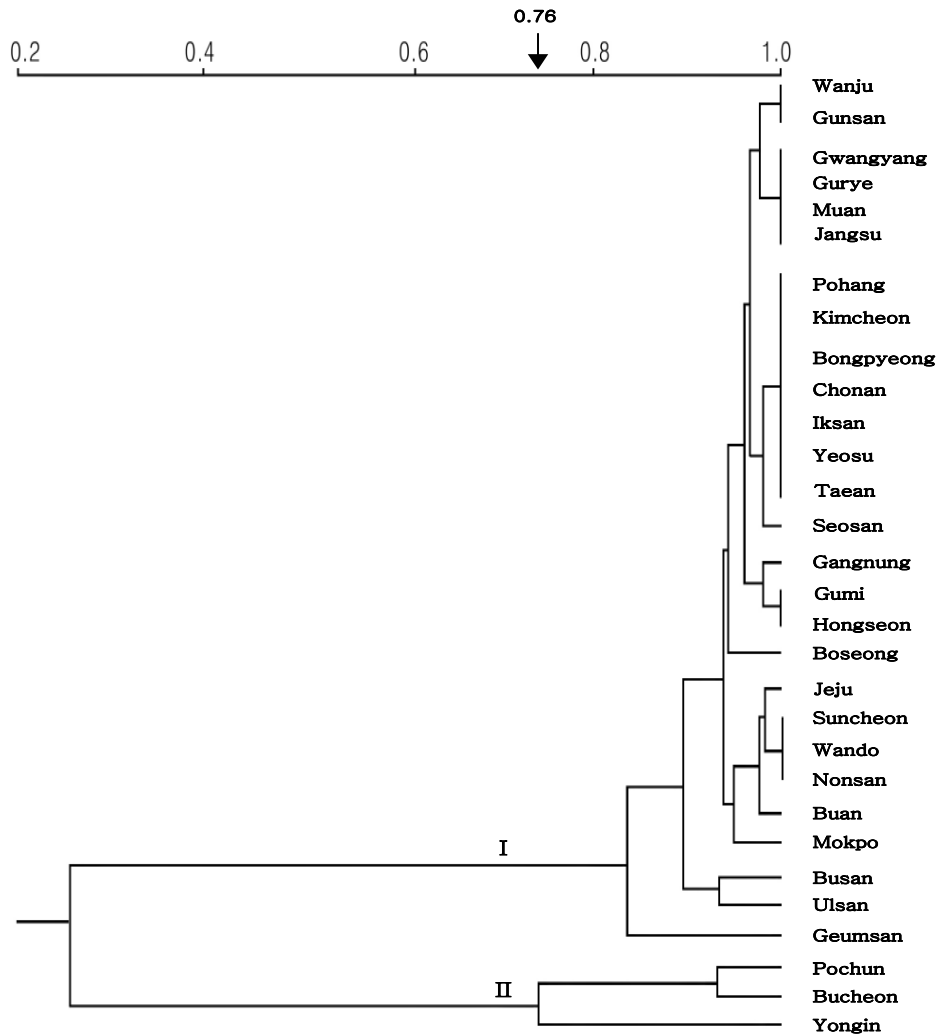


Fig. 3. Genetic relationships among 31 local strains of *S. sarmentosum* based on RAPD markers with 10-mers primer (Operon random primer, Operon Technologies Inc.).

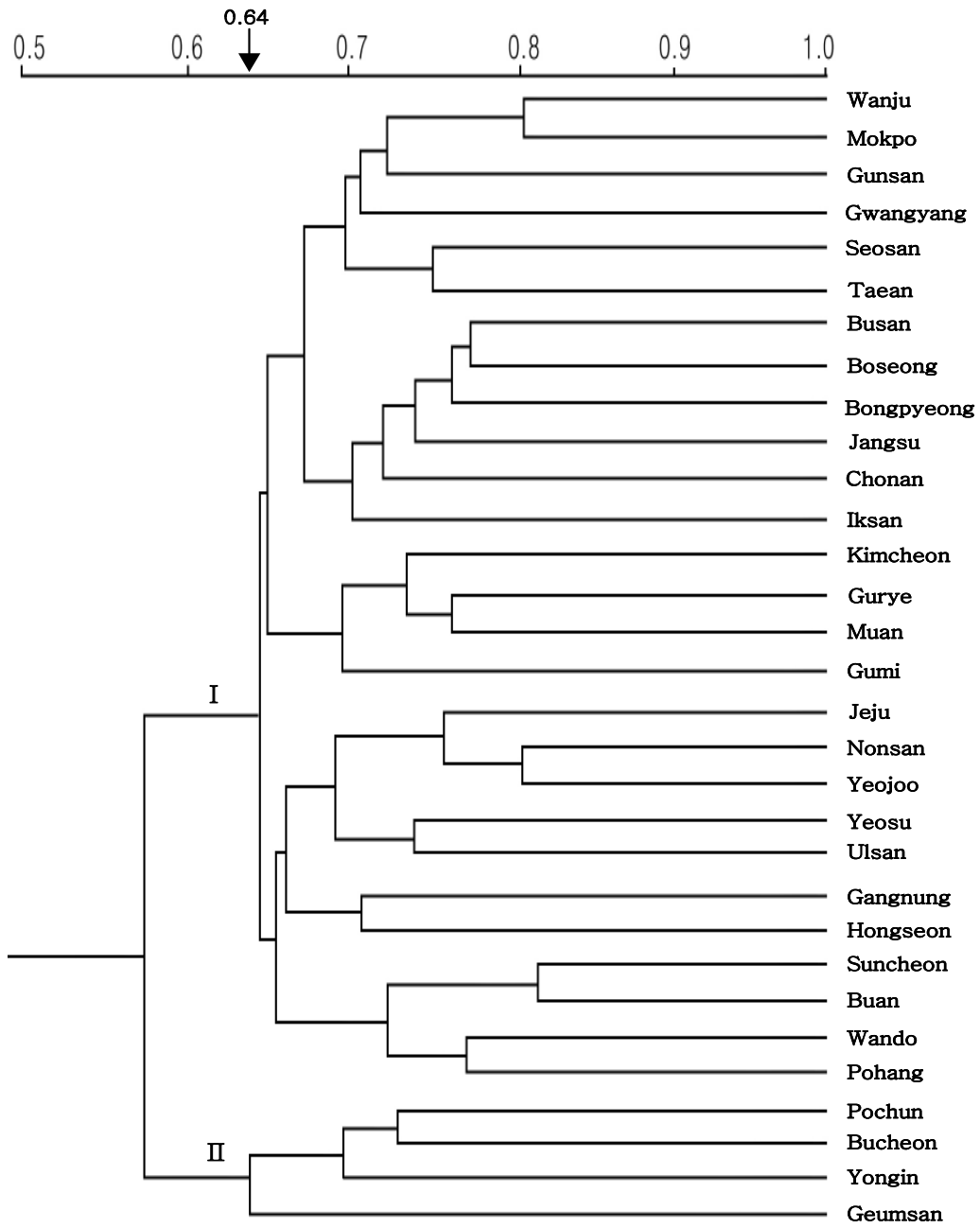


Fig. 4. Genetic relationships among 31 local strains of *S. sarmentosum* based on RAPD markers with 20-mers primer (SRILS UniPrimer, SeouLin Bioscience Inc.).

나. 돌나물 유전자원 기내 활성화보존 및 초저온 동결보존

영양번식 작물의 유전자원 관리에서 가장 큰 문제는 포장보존에 따른 포장 관리, 시간 및 노력 등 유지비용이 과다하고, 타식에 의한 유전적 퇴화 및 병리적·생리적 퇴화로 인한 특성유지가 어려우며, 예기치 않은 기상재해로 인한 유전자원 소실의 위험이 크다. 이에 따라 최근 영양번식 작물의 유전자원을 효과적으로 보존하기 위하여 기내보존 및 초저온 보존을 통하여 유전자원의 유실 및 퇴화방지를 위한 장기저장 방법의 연구가 이루어지고 있다.

1) 마디배양을 위한 다아체(multi-shoot) 형성

돌나물 유전자원의 기내 저온보존을 위한 기내 배양묘를 육성하기 위하여 0.2 mg/L BA를 첨가한 MS 배지에서 군산, 포항, 용인, 금산 지역종을 마디배양하여 30일 간격으로 계대배양을 하였다. 증식된 줄기수를 조사한 결과(Table 7), 초대배양 30일 경에는 7.5개의 신초가 형성되었고, 60일경에는 21.6개, 21.6개, 90일 경에는 49.8개의 신초가 발달하였다. 120일 경에는 100개 이상의 신초를 가진 다아체(multi-shoot)를 형성하였다(Fig. 5). 이들 다아체는 초대배양 후 80-90일 경에 초장의 신장이 적당하고, 마디가 짧으며 줄기가 굵어 기내활성보존 및 초저온 동결보존 재료로 편리하게 사용할 수 있었다. 기내활성보존 및 초저온 동결보존은 새로운 배지로 계대배양하여 약 2주후 발근이 되고, 초세가 안정화 된 후에 사용하는 것이 바람직하였다. 또한 이렇게 증식된 돌나물 다아체는 여러 종류의 기내배양 재료로도 편리하게 이용할 수 있을 것으로 기대되었다.

Table 7. Variation of multi-shoot according to the days after culture *in vitro* propagation of *S. sarmentosum*.

Number of subculture ^z	No. of multi-shoot by local strain			
	Wanju	Pohang	Geumsan	Mean
30	6.8	7.4	8.2	7.5
60	19.6	23.0	22.2	21.6
90	44.4	55.2	49.8	49.8
120	98.8	103.6	102.8	101.7
150	124.8	127.4	132.2	128.1

^zExplants were subcultured in the interval of 30 days on MS medium supplemented with 0.2mg/L BA.



Fig. 5. Multi-shoot derived from *in vitro* node culture of *S. sarmentosum* at 120 days after culture. Culture medium was MS medium supplemented with 0.2mg/L BA.

2) 기내 활성화 보존

종자와 마찬가지로 기내에서 배양된 세포, 기관, 조직, 유식물체 등은 0–5℃ 저온하에서 기내 활성화 보존(*in vitro* conservation)이 가능하다. 삼투압, 배지 지지물, 성장조절제 등의 배지조성이나 산소, 광 등을 조절하여 생장을 억제시키면 기내에서도 년1회의 계대배양으로 유전자원을 장기간 보존할 수 있다. 이에 따라 돌나물 유전자원을 ABA, sucrose, 한천 및 Gelrite 농도를 조절하여 4±1℃ 저온항온기에서 배양하여 1년 후의 생존율을 조사하였다(Table 8, 9). ABA 첨가 영향은 첨가농도가 높을수록 생육이 억제되었으며, 대조구에서만 이듬해 여름철 웃자라는 현상이 나타났으나, 1년 후에도 양호한 활성을 보여 100% 생존율을 보였다(Fig. 6A, Table 8). Sucrose 농도의 영향은 2%, 3%에서는 웃자라는 경향을 보였으며, 6%와 9%에서는 기부에서 캘러스화하는 경향이 있었으나, 1년 후에도 양호한 활성을 보였다(Fig. 6B, Table 9). 한천과 Gelrite 첨가농도의 영향은 생존에는 문제가 없었으나, 첨가농도에 관계없이 10개월 경부터 웃자라는 현상이 나타나 부적합 하였다. 따라서 돌나물의 기내 저온 활성화 보존은 0.2mg/L BA와 50mg/L sucrose, 1.2% agar를 기본으로 한 배지에 10–20mg/L ABA 또는 6–9% sucrose를 첨가하는 것이 유전자원의 생육 및 활성이 양호하였다.

Table 8. Effect of ABA concentration on growth of *S. sarmentosum* (Yongin strain) in one year after *in vitro* conservation at 4°C.

ABA (mg/L)	Plant height (cm)	No. of shoot	Fresh weight (mg/explant)	survival rate (%)
0	3.2	9.2	72.7	100
5	2.1	5.2	42.2	100
10	1.6	4.6	30.6	100
20	1.4	4.4	25.1	100

Table 9. Effect of sucrose concentration on growth of *S. sarmentosum* (Yongin strain) in one year after *in vitro* conservation at 4°C.

Sucrose (%)	Plant height (cm)	No. of shoot	Fresh weight (mg/explant)	survival rate (%)
2	3.8	8.4	84.9	100
3	4.5	9.2	135.7	100
6	2.6	9.4	627.2	100
9	1.8	6.2	466.2	100

3) 초저온 동결보존

식물의 세포나 조직, 유식물체 등의 조직배양 산물을 액체질소(-196°C)에 보존하는 초저온 동결보존(cryopreservation)은 유전자원을 반영구적으로 저장할 수 있으며, 필요에 따라 수시로 꺼내어 사용할 수도 있어 편리하다. 식물세포는 초저온에 저항성이 없으므로 동결전 전처리로 탈수시킨 다음, 동결 보호제에 넣어 동결시켜야 생존 할 수 있다. 최근에는 고농도의 동결 보호제에 짧은 시간동안 탈수시켜 직접 액체 질소에 넣는 급속 동결법은 동결 및 해동과정에서 세포 내 자유수와 동결보호제가 얼음결정을 형성하지 않기 때문에 세포 내외가 유리처럼 고체(glass-like solidification) 또는 비결정의 겔상태(amorphous phase)로 유리화(vitrification) 되기 때문에 '유리화 동결보존(vitrification cryopreservation)'으로 불리며, 세포손상을 최소화 할 수 있기 때문에 널리 이용되고 있다(Fahy et al., 1984). 돌나물 기내신초를 삼투조절제 농도를 달리하여 전배양한 후 액체질소에 동결하였다가, 0.2 mg/L BA 첨가배지에 배양한 결과, 기내묘의 초저온 동결시험결과, 재료의 탈수를 위하여 sucrose 용액

에서 1일 동안 전배양 후 냉동보존한 기내신초의 재생율은 0.4–0.6M sucrose 처리시
에만 11.1–16.7% 정도의 생존율을 보였다(Table 10). 생존 shoot는 조직의 일부가 비
대하다가 캘러스화 하여 정상 shoot로 재생되기까지는 50일정도 소요되었다. 그러나
생존율이 너무 낮아 실용화하기는 어렵고, 앞으로 좀 더 연구가 필요하다고 본다.

또한 휴면기 돌나물의 동아에 대한 액체질소 초저온 동결보존 시험 결과,
모든 개체에서 오염이 심하여 식물체 재생결과를 볼 수 없었다(Fig. 7). 2차 시험에
서 오염방지를 위하여 동아를 줄기에 붙여 초저온 동결후 버미큐라이트를 멸균하여
재생시험을 한 결과에서도 자체적인 부패를 초래하여 마찬가지로 식물체 재생결과를
볼 수 없었다. 이러한 원인은 중첩된 소엽사이에 있는 병원균의 원인으로 재료의 구
조상 살균이 제대로 이루어지지 않거나, 체내 공생균의 오염 때문으로 생각되었다.
돌나물의 경우 다육식물로서 과도한 탈수에 따른 생존율 저하로 동결보존에는 부적
합하였다.

Table 10. Survival rate of *in vitro* shoot tip cryopreserved by preculture with
different sucrose concentration in *S. sarmentosum*.

Preculture ^y (sucrose, M)	No. of treated shoot tip ^z	Survival rate (% of regenerated plant)
0.3	30	0
0.4	30	11.1±8.6
0.6	30	13.9±12.5
0.8	30	2.8±6.8
1.0	30	0

^yshoot tips were precultured in MS media containing 0.2 mg/L BA for 1 day.

^zCryoprotectant was contained 30% glycerol, 15% ethylene glycol and 15%
DMSO.

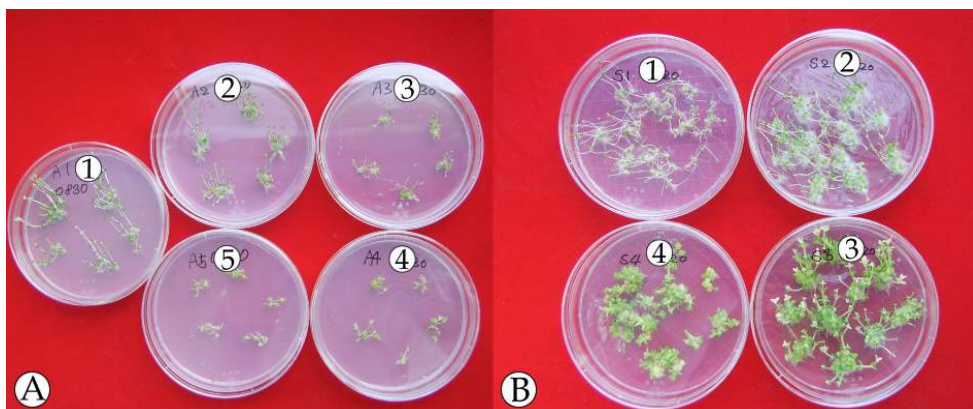


Fig. 6. Growth of *S. sarmentosum* by different ABA and sucrose concentration in one year after *in vitro* conservation at 4°C. A1, MS medium containing 3% sucrose and 0.8% agar without 0.2mg/L BA; A2–5, MS medium containing 5% sucrose and 1.2% agar and 0.2mg/L BA in order of 0, 5, 10, and 20 mg/L ABA. B1–4, MS medium containing 5% sucrose and 1.2% agar and 0.2mg/L BA in order of 2, 3, 6, 9% sucrose.

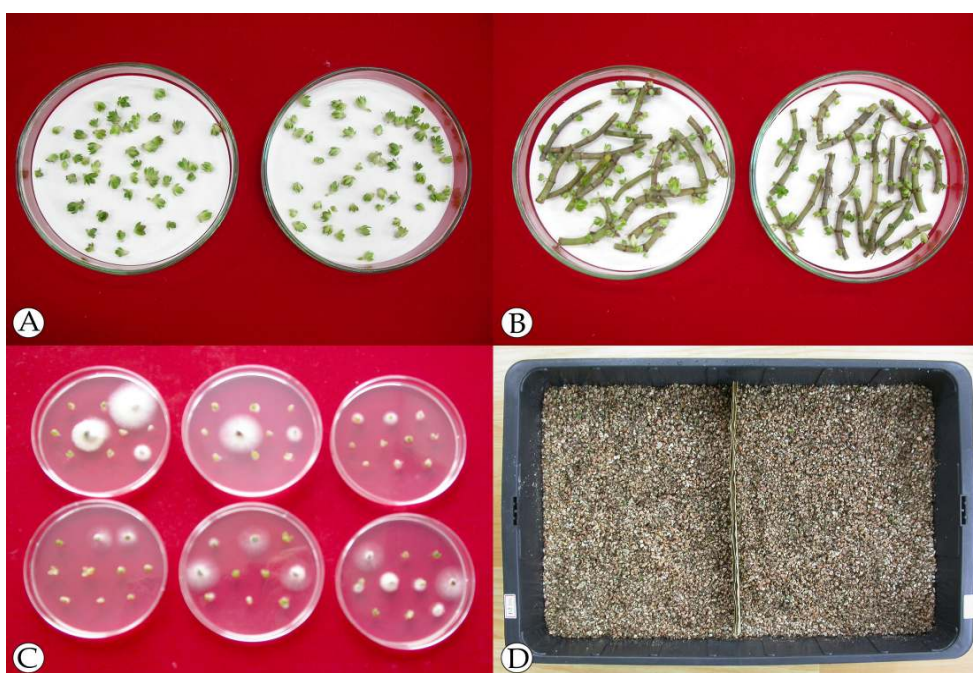


Fig. 7. Contamination and necrosis of winter buds cryopreserved in liquid nitrogen. A, winter buds after sterilizing; B, stem with winter buds; C, survival test of winter buds on MS medium with 0.2 mg/L BA; D, survival test of stem with winter buds on sterilized vermiculite.

이와 같이 식물에 따라서는 동결에 따른 손상으로 인하여 재분화가 어려운 경우가 있는데, 돌나물의 경우에도 재분화가 어려운 것으로 보였다. 앞으로 여러 가지 문제점을 검토하여 적정 전처리 농도 및 기간과 동결보호제 선발을 위한 다각적 검토가 필요하다. 영양체의 초저온 동결보존의 핵심은 유리화(세포탈수) 과정을 거쳐, 동결보호제(cryoprotectants)에 넣은 후 -40°C 까지 예비냉동후 액체질소에 보관하는 것이 일반적이다. 돌나물은 기내 multi-shoot 및 동아를 이용한 초저온 보존은 섬유질이 적고, 수분함량이 많은 다즙식물로서 탈수처리만으로는 동결처리시 세포손상을 회피하기 어렵기 때문에 생존율이 낮아 초저온 동결보존에 어려움이 있었다. 특히 기내 shoot는 오염문제를 해결할 수 있었지만, 조직이 연약한 단점이 있기 때문에 생존율이 너무 낮아 실용화하기에는 위험부담이 클 것으로 보였다. 또한 동아의 초저온 동결보존은 오염문제가 선결되어야 할 것으로 생각되었다.

특히 초저온 동결보존은 기내의 장기배양 과정에서 나타나는 후생 유전적 변이(epigenetic variation)와 오염발생을 감소시키고, 빈번한 계대배양에 필요한 인력과 시간을 절약할 수 있는 장점이 있다. 특히 식물 유전자원은 자연적 또는 인위적 선택에 의한 우량 유전자의 집적체로 농산업 및 의약산업 분야에 매우 중요하다. 최근 생물공학의 발전에 따라 기초 연구 및 응용 분야에서 활용도가 더욱 높아지고 있다. 특히 종자가 아닌 영양번식을 하는 식물들은 환경파괴, 기상재해 및 여러 가지 원인에 의하여 형질변이와 멸종의 위험이 항상 존재한다. 따라서 영양번식 식물을 비롯한 우량 F_1 개체, 종속간 교잡 및 세포융합에 의해 육성된 식물, 과수 및 임목류의 배양세포, 성장점, 경정 등을 기내 활성보존 및 초저온 동결보존을 하면 좁은 공간에 많은 생식질을 보관할 수 있어 유전자 은행(gene bank)의 관리 및 유지에 경제적이므로, 금후 식물 조직배양 산물의 초저온 동결보존은 종자보존 기술과 마찬가지로 유전자원의 장기보존에 중요한 수단이 될 것이다.

따라서 돌나물 영양체의 초저온 동결보존은 효율적 측면과 경제적 측면에서 유전자원의 안전한 보존에 실패할 위험성이 크므로, 조직배양 shoot의 기내 저온보존법이 효과적일 것으로 판단되었다.

다. 수확후 저장온도에 따른 품질변이

돌나물의 수확 후 신선도를 장기간 유지하여 돌나물 유통기간을 증대시키는 것은 생산자와 소비자 모두에게 중요하다. 돌나물의 적정 저장온도를 구명하기 위하여, 당일 채취한 신선 돌나물을 20, 10, 5℃에 저장후 생체중의 변화를 2일 간격으로 조사한 결과(Table 11), 생체중은 저장온도에 따라 8.7-25.3%의 감소를 보였으며, 저장온도가 낮을수록 생체중 감소가 적었다. 20℃ 저장에서는 수확후 4일경까지 생체중 감소가 컸으며, 특히 6일경부터 급격히 감소하여 10일째에는 19.2-25.3%까지 감소하였다. 외관상 품질은 20℃ 저장에서 4일경부터 하위 잎에서부터 잎의 변색과 함께 부패하기 시작하여 5일경에는 상품성이 크게 훼손되었다. 이러한 결과는 온도가 높을 경우 랩포장으로 인한 수분과다로 인하여 부패가 빨리 시작될 가능성 높다는 것을 보여주었다. 10℃ 저장에서는 생체중은 완만하게 변화하였으나, 외관상 품질은 6일경부터 하위 잎에 변색이 나타나면서, 서서히 부패하기 시작하였다. 5℃ 저장에서 생체중은 큰 변화없이 서서히 감소하여 10일째에는 8.7-10.2%까지 감소하였다(Table 12). 5℃에서의 외관상 품질은 8일 이후부터 하위 잎에서 변색과 함께 짓무르는 현상이 나타나기 시작하였다. 계통에 따른 생체중 감소는 포항지역종이 가장 컸으며, 완주 지역종의 변화가 비교적 적었다. 따라서 생체중의 변화에 따른 돌나물의 신선도는 랩포장의 경우, 20℃에서는 4일 이내, 10℃에서는 6일 이내, 5℃에서는 수확후 8일까지가 상품성을 유지한 상태로 유통이 가능할 것으로 판단되었다. 특히 상온유통에서는 포장을 얇는 것이 오히려 과습에 의한 하위 잎의 부패를 막을 수 있는 것으로 생각되었다.

신선채소의 품질을 판단하는 외관상 기준은 잎의 색이 중요한데, 돌나물의 수확 후 저장온도에 따른 엽록소 함량과 잎색의 변화를 조사한 결과(Table 13, 14), SPAD 값으로 조사한 엽록소 함량은 저장온도가 높아짐에 따라 급격히 감소하였으며, 저온일수록 변화가 적었다. 10℃와 20℃ 저장에서는 6일과 4일 이후에 급격한 감소를 보였으나, 5℃ 저장에서는 완만한 감소를 보였다. 그러나 4일경까지는 육안으로는 변화를 알기가 어려웠다. 반면 잎색은 20℃ 저장에서는 수확후 4일후부터, 10℃ 저장에서는 6일경부터 하위 잎에서 황화하기 시작하여 2-3일 후에는 심하게 변색되었다. 5℃ 저장에서는 8일경부터 하위 잎에서 변색이 나타나기 시작하였다. 잎의 색도 변화를 조사한 결과, 잎색의 명도를 나타내는 Hunter L값과 녹색-적색을 나타내는 a값은 저장온도가 높을수록 저장일수에 따라 증가하였으며, 10일째에는 4계통 모두 수확당시보다 유의하게 증가하였다(Table 14). 황색-청색을 나타내는 b값은 저장온도가 낮을수록 감소폭이 적었으며, 10일째에는 수확당시보다 4계통에서 모두 유의한 감소를 보였다.

Table 11. Variation of fresh weight by storage temperature and days after storage in four local strains of *S. sarmentosum*.

Storage temp. (°C)	Days after storage	Reduction of fresh weight (%) ^z			
		Wanju	Gunsan	Pohang	Wando
20	0	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
	2	95.4 b	94.6 b	92.8 b	93.2 b
	4	92.2 c	91.1 c	88.4 c	89.1 b
	6	89.3 d	88.1 d	85.2 d	85.3 c
	8	84.4 e	83.5 e	80.9 e	81.8 d
	10	80.8 f	78.2 f	74.7 f	75.7 e
10	0	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
	2	98.1 b	96.4 b	94.2 b	95.7 b
	4	95.6 c	94.7 b	90.8 c	94.0 b
	6	93.4 d	92.8 c	89.7 cd	91.1 c
	8	92.4 d	90.9 d	88.2 cd	89.8 cd
	10	89.3 e	88.1 e	87.2 d	88.5 d
5	0	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
	2	98.2 a	97.5 b	96.6 b	95.7 b
	4	95.8 b	94.4 c	95.3 c	95.0 c
	6	93.9 bc	92.6 d	93.5 d	94.0 d
	8	92.6 cd	91.3 e	91.9 e	92.4 e
	10	91.3 d	90.4 f	89.8 f	90.8 f
Significance			LS × ST		***
Local strain (LS)		***	LS × DAS		**
Storage temperature (ST)		***	ST × DAS		***
Days after storage (DAS)		***	LS × ST × DAS		NS

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

*, ***, ^{NS}Nonsignificant or significant at $P \leq 0.05$ or 0.001, respectively.

Table 12. Variation of SPAD value by storage temperature and days after storage in local strains of *S. sarmentosum*.

Storage Temp. (°C)	Days after storage	SPAD value among local strains ^y			
		Wanju	Gunsan	Pohang	Wando
20	0	35.35 a	35.64 a	33.85 a	33.84 a
	2	32.04 b	34.12 b	31.77 b	31.90 ab
	4	29.44 c	32.26 c	28.56 c	29.83 bc
	6	26.11 d	28.14 d	26.76 d	28.08 cd
	8	24.76 de	25.53 e	25.49 d	25.84 de
	10	23.29 e	23.83 f	23.22 e	24.87 e
10	0	35.00 a	35.99 a	34.37 a	32.91 a
	2	33.16 b	35.32 ab	33.75 ab	32.02 ab
	4	31.48 bc	34.21 b	31.16 b	30.65 bc
	6	29.99 c	31.74 c	30.07 b	29.62 c
	8	28.07 d	28.40 d	28.31 c	28.94 c
	10	26.88 d	27.24 d	25.28 d	26.69 d
5	0	34.73 a	35.72 a	34.75 a	33.36 a
	2	33.44 b	35.42 ab	33.96 a	33.21 a
	4	32.84 bc	34.15 ab	32.25 b	31.10 b
	6	31.80 c	32.21 b	30.59 c	30.18 b
	8	28.67 d	29.94 c	29.26 d	29.48 b
	10	27.69 d	27.88 d	26.83 e	27.37 c
Significance			LS × ST		*
Local strain (LS)		***	LS × DAS		***
Storage temperature (ST)		***	ST × DAS		***
Days after storage (DAS)		***	LS × ST × DAS		NS

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

*, ***, NS Nonsignificant or significant at $P \leq 0.05$ or 0.001, respectively.

Table 13. Variation of Hunter L value, a and b by storage temperature and days after storage in local strains of *S. sarmentosum*.

Storage Temp. (°C)	Days after storage	L value			
		Wanju	Gunsan	Pohang	Wando
20	0	45.22 a	45.75 a	45.97 a	45.56 a
	2	46.82 b	46.06 b	47.54 b	46.44 b
	4	49.36 c	48.74 c	49.29 bc	49.07 c
	6	51.27 d	51.83 d	50.74 c	50.89 d
	8	53.52 e	52.96 e	52.15 d	53.44 de
	10	58.57 e	57.81 e	59.48 d	59.03 e
10	0	45.74 a	44.78 a	45.60 a	46.12 a
	2	46.42 b	45.78 b	46.50 b	46.55 b
	4	48.83 c	47.55 bc	47.20 c	47.65 c
	6	49.26 c	48.43 c	48.75 d	49.19 d
	8	50.13 d	49.29 d	50.08 e	50.63 e
	10	52.65 d	52.09 d	52.45 f	52.35 e
5	0	46.07 a	45.11 a	45.84 a	45.76 a
	2	46.30 b	45.60 b	46.26 b	46.20 b
	4	47.01 c	46.43 c	46.92 c	47.15 c
	6	48.22 d	47.49 d	48.13 d	48.28 d
	8	49.08 de	48.80 e	49.53 e	49.61 e
	10	50.88 e	50.86 e	51.11 f	51.05 e
Significance					
Local strain (LS)			***		
Storage temperature (ST)			***		
Days after storage (DAS)			***		
LS × ST			NS		
LS × DAS			NS		
ST × DAS			***		
LS × ST × DAS			NS		

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

*, ***, NS Nonsignificant or significant at $P \leq 0.001$, respectively.

Table 14. Variation of Hunter a and b value, a and b by storage temperature and days after storage in local strains of *S. sarmentosum*.

Storage Temp. (°C)	Days after storage	a				b			
		Wanju	Gunsan	Pohang	Wando	Wanju	Gunsan	Pohang	Wando
20	0	-25.07 a	-25.91 a	-25.49 a	-26.43 a	20.59 a	20.91 a	20.69 a	20.51 a
	2	-26.41 b	-26.93 b	-26.16 b	-27.63 b	19.45 b	19.07 b	19.08 b	19.17 b
	4	-27.95 c	-27.92 c	-27.38 c	-27.63 c	18.21 c	17.92 c	17.96 c	17.96 c
	6	-29.58 d	-28.74 d	-29.54 d	-28.78 d	16.12 d	16.85 d	16.67 d	16.16 d
	8	-31.87 d	-30.14 e	-31.29 e	-30.31 e	15.70 e	15.31 e	15.20 de	14.60 d
	10	-32.74 e	-32.82 f	-33.15 f	-32.73 f	13.66 f	12.97 f	13.67 e	13.06 e
10	0	-25.68 a	-25.45 a	-25.87 a	-26.22 a	20.88 a	20.67 a	20.43 a	20.66 a
	2	-26.81 b	-26.18 b	-26.28 a	-26.61 b	20.10 b	19.52 b	19.89 b	19.47 b
	4	-27.07 c	-27.34 c	-27.20 b	-27.16 c	19.01 c	18.59 c	18.62 c	18.89 c
	6	-28.30 d	-28.17 d	-28.06 c	-27.88 d	17.35 d	17.92 d	17.73 d	17.77 cd
	8	-30.12 d	-29.83 e	-29.85 d	-28.82 e	16.89 d	16.27 e	17.04 e	16.87 de
	10	-31.73 e	-31.44 f	-31.31 e	-30.11 f	14.95 e	15.19 f	15.07 e	15.75 e
5	0	-25.84 a	-25.68 a	-26.22 a	-25.84 a	20.84 a	20.95 a	20.77 a	20.42 a
	2	-26.40 a	-26.37 b	-26.57 b	-26.21 a	20.32 a	20.01 b	20.13 b	20.07 b
	4	-26.91 b	-27.19 c	-27.00 c	-26.86 b	19.46 b	19.64 c	19.22 c	19.56 c
	6	-27.44 c	-27.84 d	-27.75 d	-27.56 c	18.06 bc	18.53 c	18.37 d	18.32 cd
	8	-28.59 d	-29.00 e	-29.25 e	-28.45 d	17.20 bc	17.11 d	17.58 d	17.81 de
	10	-29.17 e	-30.95 f	-30.75 f	-29.59 e	15.98 c	15.81 d	16.44 e	16.38 e
Significance									
Local strain (LS)		NS				NS			
Storage temperature (ST)		***				***			
Days after storage (DAS)		***				***			
LS × ST		*				**			
LS × DAS		***				***			
ST × DAS		***				***			
LS × ST × DAS		NS				**			

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

*, ***, ^{NS}Nonsignificant or significant at $P \leq 0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

신선 돌나물을 20, 10, 5℃에 저장후 10일째에 잎의 50% 이상이 변색되었거나 하부의 잎이 부패하여 상품가치가 없는 줄기수를 조사한 결과, 저장온도가 높은 20℃에서 크게 증가하였으며, 저장온도 및 계통들 간에 유의한 차이($P \leq 0.0001$)를 보였다. 계통간에는 완주 지역종이 비교적 저장성이 높았으며, 완주>군산>완도>포항 순으로 변색 및 부패 비율이 높았다(Fig. 8, 9). 이는 수확시의 수분함량이 완주 지역종이 가장 낮은 것과 밀접한 관계가 있었는데(Fig. 10), 변색 및 부패 비율은 수분함량과 유의한 정의 상관관계($P \leq 0.01$, $r = 0.697, 0.638, 0.724/20, 10, 5^\circ\text{C}$)를 보였다.

돌나물은 신선채소로서 수분함량이 높아 수확 후 품질유지를 위한 저온저장이 필수적인데, 저장온도는 낮을수록 생체중 감소가 적으며, 황화 및 외관상 변화가 적었다. Ko(2004)는 상추의 저온저장에서 5℃에서 8일까지 저장이 가능하며, Hunter L값도 유의하게 감소하였다고 하여, 돌나물 저장성과 비슷한 특성을 보였다. 잎상추의 경우, 0-5℃가 적정 저온저장 온도로 알려져 있는데(Kader, 1992), 0-1℃ 저장이 4-5℃저장보다 생체중 감소가 적으며, 황화 및 외관상 변화가 적으며(Jeong 등, 1990). 0℃에서도 동해가 나타나지 않는다(Bae와 Chung, 2003). 또한 0℃를 기준으로 10℃ 올라가면 잎상추의 부패지수는 3배나 증가하는데, 이는 호흡율의 높아짐으로서 증산량이 많아지고 유해가스의 발생량이 증가하기 때문이다(Kader, 1992; Watada 등, 1996). 신선채소의 저장시 발생하는 에틸렌은 조직을 조기에 노화시키거나 부패를 촉진시키기 때문에 발생된 에틸렌 가스를 직접 흡착 또는 제거하여 저장성을 높일 수도 있다(Jeong 등, 2003; Saltveit, 1999; Watada, 1986). 또한 신선편이 식품에서도 적정 유통온도는 0℃이지만, 대부분의 유통업자들이 5℃ 또는 10℃에서 유통시킴으로서 호흡율(Q10)의 값을 높게 되므로 품질저하가 빨라지게 된다(Paull, 1999; Watada 등, 1996). 한편 포장재의 종류도 저장성에 영향을 미치는데, 상추를 PE필름을 이용하여 5℃ 저장하는 경우에는 유공필름보다 무공필름에서 저장성이 높다(Lee 등, 2006). 돌나물에서 현재 관행적으로 이용되는 랩포장은 증산에 의한 포장재 내부의 결로현상으로 소비자들의 선호도가 낮아지고, 이로 인하여 품질저하 및 위생에도 문제가 발생할 수 있기 때문에(Wagner, 2001), 수확직후부터 소매점으로 이동시에는 무공필름이 생체중의 감소가 적어 좋을 것으로 보이며, 소매점의 경우 유공필름을 이용하는 것이 결로현상을 방지하고 에틸렌 발생에 의한 노화와 부패를 지연시킬 수 있어 바람직 할 것으로 보이며, 앞으로 이에 대한 상세한 연구가 필요하다. 이와 같이 신선채소의 수확 후 품질유지를 위해서는 저온저장과 저온유통이 필수적이지만, 돌나물에서는 현실적으로 저온유통 체계가 확립되지 않아 어려움이 있으므로, 소매점에서라도 5℃ 정도의 저온보관 및 판매 체계가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 본 연구결과, 돌나물을 관행과 같이 스티로폼 접시에 랩포장하는 경우, 저장온도에 따른 생

체중 및 잎의 외관상 변화를 기준으로 한 돌나물의 신선도는 20℃에서는 4일 이내, 10℃에서는 6일 이내, 5℃에서는 수확후 8일까지가 신선도를 유지한 상태로 유통이 가능할 것으로 판단되었다.

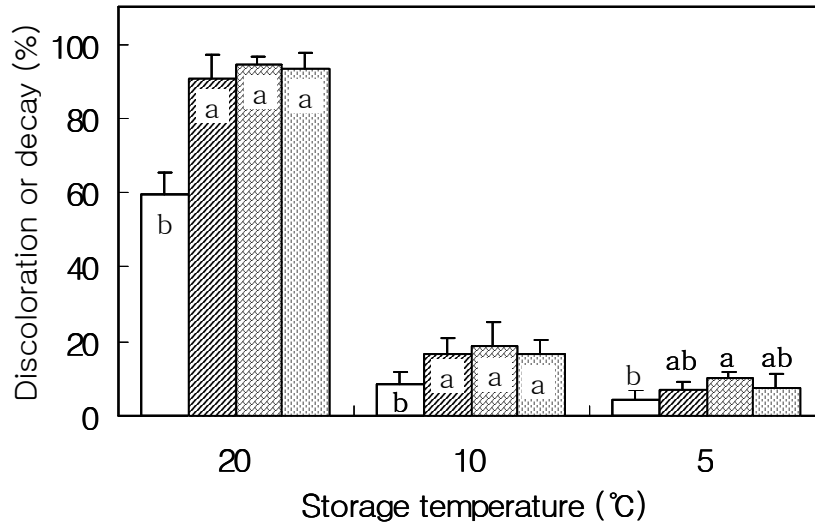


Fig. 8. Percentage of discolored or decayed shoot at 10 days after storage in fresh shoot of *S. sarmentosum*.

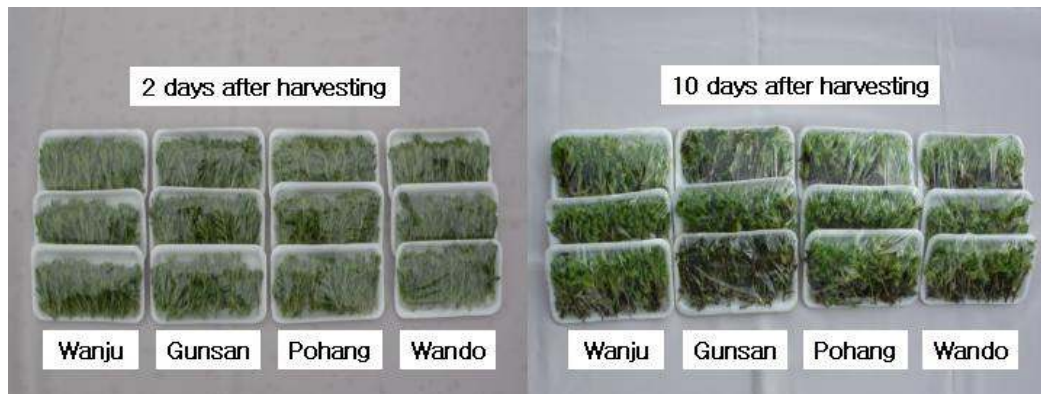


Fig. 9. Inferiority aspects of fresh shoot under 15°C storage after harvesting in *S. sarmentosum*.

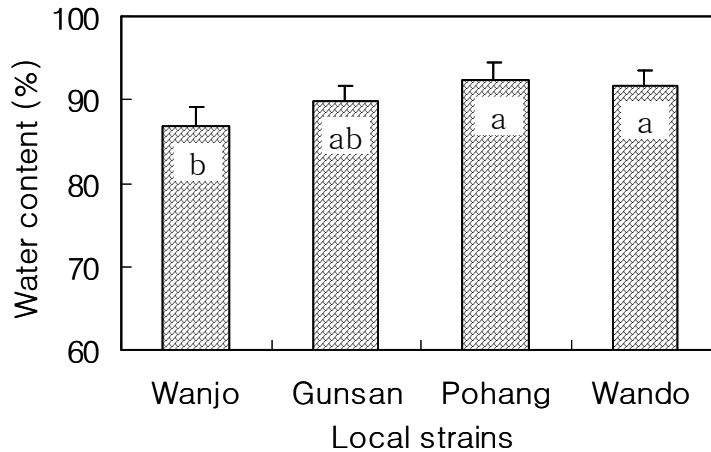


Fig. 10. Water content of fresh shoot in four local strains of *S. sarmentosum*.

라. 지역 수집종들의 항산화 활성 및 비타민 C 함량

1) 들나물 우량계통의 항산화능

수집한 들나물 유전자원 중에서 생육특성이 양호한 13 지역종을 동일조건으로 재배하여 항산화활성을 비교한 결과(Table 15), 광양 순천 완도 지역종에서 항산화 활성이 높았으며, 제주, 부천, 용인, 원주 지역종이 낮은 활성을 보였다. 부안, 금산 지역종은 생체검정 및 동결건조 간에 차이를 보였는데, 녹즙제조와 관련한 재료가 아닐 경우는 동결건조에 의한 방법이 정확한 것으로 생각되었다.

세포의 호흡과정에서 생성되는 활성산소(free radical)는 항상 체내에 존재하며, 과도한 스트레스나 운동, 자외선, 흡연이나 배기가스와 같은 환경오염물질 등에 의하여 발생하는데, 강한 살균작용을 가지고 있어 인체를 병원체로부터 보호하는 역할을 한다. 그러나 지나치게 발생된 활성산소는 단백질, DNA, T 세포 등의 기능을 손상시키고 세포의 사멸을 유도할 수도 있어, 각종 암을 비롯한 질병의 원인이 되기도 하는데, 활성산소는 대개 몸속의 bilirubin, glutathione, superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), peroxidase(GSH-Px) 등의 항산화 물질 및 효소에 의해 분해된다(Ames 등, 1993; Dean 등, 1993). 식품에는 비타민 A, C, E, 건강기능성 식품 flavonoids, anthocyanins, carotenoids, tanic acid 등의 항산화물질이 풍부하게 들어 있어 활성산소가 생기는 것을 막고 노화를 억제시키거나, 각종 암 및 질병을 예방하는데 도움이 된다(Cameron 등, 1979; Sen, 1955).

Table 15. Antioxidant activity of fresh and freeze-drying extracts in shoot of *S. sarmentosum*.

Fresh extract		Freeze-drying extract	
Local strain	Antioxidant activity (%)	Local strain	Antioxidant activity (%)
Gwangyang	66.54	Gwangyang	82.36
Suncheon	57.47	Wando	77.69
Geumsan	56.08	Suncheon	71.79
Wando	53.01	Mokpo	71.69
Pocheon	52.99	Buan	70.92
Mokpo	51.43	Gunsan	69.87
Pohang	51.09	Pohang	69.45
Gunsan	50.42	Poch대n	68.53
Wanju	50.00	Bucheon	65.94
Bucheon	49.94	Wanju	65.79
Yongin	48.87	Yongin	64.62
Buan	47.43	Jeju	61.34
Jeju	44.95	Geumsan	61.30

최근 건강기능성 식품에 대한 관심이 부각되면서 항산화활성이 높은 식용 및 약용식물에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 전통적으로 천연물을 이용한 대체의학이 발달한 한국, 중국, 인도, 일본 등에서 많은 약용식물 추출물들이 항암, 항균, 항산화 활성이 뛰어나다는 것이 밝혀졌다(Kim 등, 2004; 2006; Rastogi와 Dhawan, 1990; Ruan 등, 2006; Takeya, 2000). 이들 중 돌나물과의 *Sedum*속에 속하는 자주꿩의비름(Bonina 등, 2000)이나 기린초(Kim 등, 2004) 등은 항산화 및 항염증 작용이 높은 것으로 알려져 있다. 우리나라에 자생하고 있는 *Sedum*속에는 애기기린초(*S. middendorffianum*), 태백기린초(*S. latiovalifolium*), 꿩의비름(*S. drythrostichum* MIQ.), 땅채송화(*S. oryzifolium*), 둥근잎꿩의비름(*S. rotundifolium*), 등이 있는데 (Kwon 과 Jeong, 1999), 주로 관상용으로 이용되고 있으며 돌나물만이 식용으로 이용된다. 돌나물(*Sedum sarmentosum* BUNGE.)은 돌나물과에 속하는 다육질의 다년생 초본식물로 약리효과가 뛰어나 한방에서는 청열소종의 효능이 있어 예로부터 인후염과 만성간염의 치료에 이용되어 왔으며, 해독작용도 뛰어나 독충이나 해충에 물렸을 때 전초를 으깨어 환부에 붙이기도 한다. 최근의 연구에 의하면 HIV 및 간염 바이러스에도 억제효과가 있으며(He 등, 1998; Woo 등, 1997), 항암작용(Kang 등, 2000; Park 등, 2002), 항고혈압 작용(Oh 등, 2004) 및 에스트로겐 유사 작용(Kim 등,

2002b) 등과 같은 약리효과를 갖는다. 한편 돌나물은 비타민 C와 칼슘 함량이 높은 신선채소로서 가치가 높아 어린 싹을 초고추장 무침, 김치, 샐러드 등의 식용으로 이용되고 있다. 건강 기능성 식품소재로서 항산화 활성이 높고(Kim 등, 2006), 음료개발에도 좋은 특성을 가지고 있어(Kim 등, 2002a), 앞으로 돌나물은 건강식품은 물론 생식, 녹즙 등 신선채소로의 이용도 크게 증가할 것으로 보인다,

2) 돌나물 우량계통의 비타민 C 함량

한편, 13지역중에 대한 비타민 C 함량을 분석한 결과(Fig. 11), 식용부위인 shoot의 비타민 C 함량은 완주, 군산, 부안, 금산, 부천, 포천 지역중에서 비교적 높았으나, 대체로 비슷한 수준을 나타내었다. 생육특성과는 달리 비타민 C 함량의 지역중간 차이는 크지 않았다.

따라서 이들 항산화능과 비타민 C 함량이 비교적 높고 생육특성이 양호한 우량계통들은 삼목번식을 통하여 제품개발을 위한 증식을 하였고, 기내에서는 multi-shoot를 유도하여 유전자원으로 보존하였다.

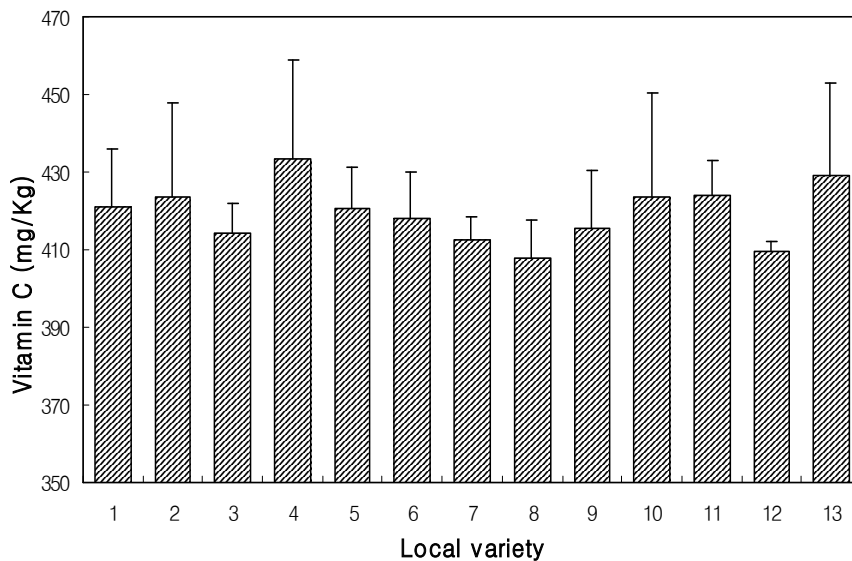


Fig. 11. Vitamin C contents in local strains of Korean native *Sedum sarmentosum*. Materials were collected at April 30th in field. 1, Wanju; 2, Gunsan; 3, Gwangyang; 4, Buan; 5, Suncheon; 6, Jeju; 7, Mokpo; 8, Pohang; 9, Wando; 10, Keumsan; 11, Bucheon; 12, Yongin; 13, Pocheon.

4. 결 론

가. 돌나물 유전자원의 유연관계

돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge.)의 31 지역종에 대한 개화전 생육특성과 개화기 화기특성을 토대로 군집 분석을 실시한 결과, 크게 2군으로 나눌 수 있었으며, I 군에는 29 지역종이 속하였고, II 군에는 꽃이 피지 않는 완주 및 군산 지역종 등이 속하였다. I 군은 다시 두개의 소그룹으로 나눌 수 있었는데, I-1 군은 개화특성이 양호한 금산, 부천, 포천, 용인 등 4개 지역종이 속하였고, 특성이 비슷한 25 지역종들은 I-2 군에 속하였다. RAPD를 이용한 유연관계를 분석한 결과, 선발된 14종의 10-mers primer로부터 47개의 polymorphic band를 얻어 primer당 평균 band수는 3.4개였으며, 20-mers primer로부터는 90개의 polymorphic band를 얻어 primer당 평균 15개의 band를 얻었다. 31개 수집종들은 크게 2군으로 분류할 수 있었으며, I 군에는 완주 및 군산 지역종을 포함한 27개 지역종이 속하였고, II 군에는 줄기와 잎이 가늘고 꽃이 잘 피는 금산, 부천, 포천, 용인 등 4 지역종이 속하였다.

나. 돌나물 유전자원 기내 활성보존 및 초저온 동결보존

돌나물 유전자원의 기내 보존을 위한 기내 배양묘를 육성은 0.2 mg/L BA를 첨가한 MS 배지에서 배양 후 80-90일 경에 초장의 신장이 적당하고, 마디가 짧으며 줄기가 굵은 다아체를 얻을 수 있었고, 기내활성보존 및 초저온 동결보존 재료로 적합하였다. 돌나물의 기내 저온 활성보존은 0.2mg/L BA와 50mg/L sucrose, 1.2% agar를 기본으로 한 배지에 10-20mg/L ABA 또는 6-9% sucrose를 첨가하는 것이 유전자원의 생육 및 활성이 양호하였다.

돌나물 기내신초의 초저온 동결보존 실험결과, 0.4-0.6M sucrose 용액에서 1일 동안 전배양 후 냉동보존한 기내신초의 재생율은 11.1-16.7%의 생존율을 보였다. 생존 shoot는 조직의 일부가 비대하다가 캘러스화 하여 정상 shoot로 재생되기까지는 50일정도 소요되었다. 따라서 돌나물 영양체의 초저온 동결보존보다 기내 저온 보존법이 효과적일 것으로 판단되었다.

다. 수확후 저장온도에 따른 품질변이

돌나물의 수확후 생체중은 저장온도에 따라 8.7-25.3%의 감소를 보였으며, 저장온도가 높을수록 생체중 감소율도 높았다. 생체중 감소는 포항 지역종이 가장 컸으며, 완주 지역종의 변화가 비교적 적었다. 외관상 품질은 20℃에서 4일경, 10℃에서 6일경, 5℃에서 8일경부터 하위 잎에 변색이 나타나기 시작하면서 서서히 부패하기 시작하였다. 계통간에는 완주 지역종의 저장성이 양호하였으며, 군산, 완도, 포항 순으로 부패율이 높았다. 따라서 돌나물을 스티로폼 접시에 랩포장 할 경우, 5℃에서는 수확 후 8일까지 상품성을 유지한 상태로 저장이 가능하였다.

라. 지역 수집종들의 항산화 활성 및 비타민 C 함량

생육특성이 양호한 13 지역종을 동일조건으로 재배하여 항산화활성을 비교한 결과 광양, 순천, 완도 지역종에서 항산화 활성이 높았으며, 제주, 부천, 용인, 완주 지역종이 낮은 활성을 보였다. 돌나물 shoot의 비타민 C 함량은 완주, 군산, 부안, 금산, 부천, 포천 지역종에서 비교적 높았으나, 대체로 비슷한 수준을 나타내었다.

제 2 절 돌나물의 건강기능성 규명 및 고부가가치 제품의 개발

1. 서 언

최근 건강기능성 식품에 대한 관심이 부각되면서 향암, 항균, 항산화활성이 높은 식용 및 약용식물에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 전통적으로 천연물을 이용한 대체의학이 발달한 한국, 중국, 인도, 일본 등에서 많은 약용식물 추출물들이 향암, 항균, 항산화 활성이 뛰어나다는 것이 밝혀졌다(Kim 등, 2004; 2006; Rastogi와 Dhawan, 1990; Ruan 등, 2006; Takeya, 2000). 이들 중 돌나물과의 *Sedum*속에 속하는 자주깽의비름(Bonina 등, 2000)이나 기린초(Kim 등, 2004) 등은 항산화 및 항염증 작용이 높은 것으로 알려져 있다. 우리나라에 자생하고 있는 *Sedum*속에는 애기기린초(*S. middendorffianum*), 태백기린초(*S. latiovalifolium*), 깽의비름(*S. drythrostichum* MIQ.), 땅채송화(*S. oryzifolium*), 둥근잎깽의비름(*S. rotundifolium*), 등이 있는데(Kwon 과 Jeong, 1999), 주로 관상용으로 이용되고 있으며 돌나물만이 식용으로 이용된다. 돌나물(*Sedum sarmentosum* BUNGE.)은 돌나물과에 속하는 다육질의 다년생 초본식물로 약리효과가 뛰어나 한방에서는 청열소종의 효능이 있어 예로부터 인후염과 만성간염의 치료에 이용되어 왔으며, 해독작용도 뛰어나 독충이나 해충에 물렸을 때 진초를 으깨어 환부에 붙이기도 한다. 최근의 연구에 의하면 HIV 및 간염 바이러스에도 억제효과가 있으며(He 등, 1998; Woo 등, 1997), 항암작용(Kang 등, 2000; Park 등, 2002), 항고혈압 작용(Oh 등, 2004) 및 에스트로겐 유사 작용(Kim 등, 2002b) 등과 같은 약리효과를 갖는다. 또한 건강 기능성 식품소재로서 항산화 활성이 높고(Kim 등, 2006), 음료개발에도 좋은 특성을 가지고 있다(Kim 등, 2002a).

또한 돌나물은 비타민 C의 함량이 높고, 칼슘, 철분, 아연 등의 무기물 함량도 높을 뿐 만 아니라, 민간에서는 생즙을 간염, 대하증, 화상 등에 이용하고 있으며, 최근 약리작용이 과학적으로 구명되고 있어 건강식품으로의 개발이 가능하다. 최근 돌나물은 골다공증에 유효하고, 간기능 개선능이 있는 것으로 보고되고 있으나, 저장성이 낮고 이를 이용한 가공 식품이 없어 부가가치가 매우 낮은 식품이다. 그러나 유효지표성분이 분리·동정이 되지 않고 있으며, 체내에서의 기능성 발현 기전 또는 대사관련 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 생식으로 한정되어 있는 돌나물의 이용성과 부가가치를 높이기 위하여, 체내에서의 기능성 발현 기전과 대사관련 연구를 통한 건강 기능성 식품을 개발하고자 실시하였다.

2. 연구방법

가. 돌나물의 용매 추출물 제조

동결건조한 돌나물을 분쇄한 후 methanol을 5배 분량으로 첨가하여 진탕추출하고 그 여액을 1차 추출액으로 하였다. 1차 추출이 끝난 돌나물에 다시 n-hexane을 첨가하여 진탕 추출하고 그 여액을 1차 추출액과 합한 후 감압하여 용매를 제거하고 hexane 추출물을 얻었다. Hexane 분획물 잔사에 ethyl acetate를 첨가한 후 같은 방법으로 추출하여 ethyl acetate 추출물을 얻었다. Ethyl acetate 분획물 잔사에 butanol를 첨가하여 butanol 추출물을 얻었다. 동결분쇄된 돌나물에 증류수와 ethanol을 각각 첨가하여 2시간씩 3회 가열 추출하고, 여과하여 여액을 각각 동결건조와 감압 농축하여 물 추출물과 알콜 추출물로 사용하였다.

나. 효소원의 조제

간조직 1g당 4배량의 0.25M sucrose buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 ultra turax homogenizer (10,000 ×g, 2분)로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 4°C, 600 ×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 후 상등액을 15,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 xanthine oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 활성측정의 효소원으로 사용하였다. 한편 채취한 혈액은 혈청을 분리하여 alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase 및 alkaline phosphatase 활성측정의 효소원으로 사용하였다.

다. 단백질 정량 및 실험결과의 통계처리

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 측정하며, 본 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준오차로 표시하며 통계적 유의성 검증은 students't-test, ANOVA test 등을 이용하여 상호검정하였다.

라. 혈청중 transaminase (SGOT 및 SGPT) 측정

SGOT치 및 SGPT치의 측정은 Rwitman-Frankl 법에 따라 GOT용 기질액 1.0 ml를 가하고 실온에서 정확히 20분 방치후 0.4 N-NaOH 10 ml를 가한다음 10분 방치후 λ_{max} 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도를 측정하였다. SGPT는 SGT기질액 1.0 ml를 가한 다음 SGOT 측정방법과 동일하게 조작하였다.

마. 혈청중 total cholesterol 측정

Cholesterol치의 측정은 Abell-kendall 법에 따라 혈청 0.02 ml취하여 효소시액 3 ml 가한 후, 37°C 항온조에서 5분간 가온 후 10분 방치하여 λ_{max} 500 nm에서 흡광도를 측정하였다(AT: 검액의 흡광도, AS: 표준액의 흡광도).

바. 간장의 병리학적 변화

흰쥐를 각 실험군 모두 최종시료 투여 후 조직 병변을 관찰하기 위하여 24 시간이 경과한 다음, ether로 마취시키고 도살즉시 간장의 일부를 채취하고 10%의 중성 formalin에 고정한 후 hematoxylin-eosin으로 염색하고 광학현미경($\times 200$)으로 간세포 조직을 관찰하면서 지방변성, 괴사, 섬유화현상 및 간조직의 재생 등을 각 실험군 별로 비교 검토하였다.

사. 돌나물로부터 분리된 물질이 항산화작용에 미치는 영향(*in vitro* 시험법)

DPPH(α, α' -diphenyl- β -picrylgydrazyl)법 : DPPH 16mg을 100ml 에탄올에 녹인 후 여기에 100ml 에탄올에 녹인 후 여기에 100ml 증류수를 혼합하여 Whatman 여과지 No.2를 이용하여 여과하고 이 여액 5ml에 일정 농도의 시료용액 1ml을 혼합한 후 528nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군과 비교하여 라디칼 소거율(%)로 표시하였다.

환원력 측정: 농도별로 조제한 시료 20 μ L를 50mM 인산 완충액(pH 6.6)과 1%의 potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$]와 1.4 : 1로 혼합된 용액 1.2mL에 첨가할 다음, 50 $^{\circ}C$ 에서 20분간 반응시킨 후, 0.5mL의 10% trichloroacetic acid를 첨가하고 3,000rpm 10분간의 원심분리를 통하여 얻어진 상정액에 0.1%의 $FeCl_3$ 100 μ L를 넣어서 발색반응을 유도시킨 다음, UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 700nm의 흡광도에서 측정하였다.

아. 돌나물로부터 분리된 물질이 항산화작용에 미치는 영향(*in vivo* 시험법)

실험동물 및 실험식이: SD계 rat (3주령, female)을 대한 동물 사육센터로부터 분양 받아 고형사료 (삼양사)로 1주일간 적응시킨 후 난괴법을 이용하여 각 군당 6마리씩 4군(국내산, 중국산, 뉴질랜드산 녹용 추출물 각각 처리군, 무첨가군) 으로 나누어 6주간 실험식이를 공급하였다. 사육실 환경은 $24 \pm 2^{\circ}C$, 65%의 습도, 12시간 명암주기가 되도록 조절한다. 실험 기간 동안 식이와 물은 자유급식으로 하였다.

실험동물의 체중 및 식이 효율 측정: 체중 매주 1회씩 측정하고, 식이섭취량은 매주 2회씩 일정한 시각에 측정하였다. 식이효율은 식이섭취량에 대한 체중증가량을 비율로 환산하여 나타내었다.

효소원조제: 간 조직 1g당 4배량의 0.25M sucrose buffer를 가하여 빙냉하에서 ultra turax homogenizer(10,000 \times g, 2분)로 마쇄한다. 이 마쇄액의 일부는 TBARS량 측정에 사용하고 나머지는 4 $^{\circ}C$, 600 \times g에서 10분간 원심분리하여 핵

및 미마쇄 부분을 제거한 후 상정액을 $15,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 mitochondria분획을 얻었다. Mitochondria분획을 제거한 상정액을 $105,000 \times g$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol분획을 분리하였다. Mitochondria분획은 catalase 활성측정에, cytosol분획은 SOD, XO 및 GSH-Px 활성측정에 사용하였다. 한편 ALT, ALP 및 LDH활성은 경동맥을 절개하여 혈액을 채취하고 실온에 20분간 방치한 다음 $3,000\text{rpm}$ 에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 혈액자동 분석장치(Johnson & Johnson, 사)로 측정하였다.

효소활성 측정: 간조직 중 XO 활성은 Downey 등의 방법, SOD 활성은 Crapo 등의 방법, catalase 활성은 Aebi의 방법, GSH-Px 활성은 Flohe 등의 방법으로 측정하였다.

자. 3T3-L1 지방세포의 분화능 측정

분화된 3T3-L1 세포는 PBS로 2회 세척한 후 10% formalin 으로 30분간 고정화시켰다. 고정화용액을 PBS로 3회 세척한 후 Oil Red O 염색약으로 10분간 염색하였다. 염색된 Oil Red O를 isopropanol로 용출시켜 ELISA reader 510nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 분화능을 측정하였다.

차. 백서의 지질대사에 미치는 영향

간의 총지질은 Folch법을 이용하여 측정하고, 추출한 총지질을 일정량의 cholroform 용매에 녹여 총 콜레스테롤은 Seligson법으로, 중성지방은 kit을 이용한 효소 비색법으로 측정하였다. 혈청의 총지질은 Frings법에 의해 540nm에서 비색정량하고, 총 콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤, 중성지방의 함량은 kit을 이용하였다. 혈청의 LDL 콜레스테롤은 총콜레스테롤에서 HDL 콜레스테롤과 중성지방/5 을 뺀 값으로 하였다.

카. Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) 활성도

실험동물의 간조직을 균질화 시켜 차가운 PBS로 2회 세척한 후 10mM Tris-HCl (pH7.4)를 첨가하고 sonication하였다. 조직세포 분해물은 4°C , $100,000 \times g$ 에서 40분 동안 원심분리하였다. 상등액에 있는 단백질들은 8% SDS-PAGE 로 전기영동하여 분리한 후 nitrocellulose membrane에 전이시키고 horseradish peroxidase가 결합된 IgG 와 CETP에 대한 항체를 첨가하여 hybridization 시켰다. Nitrocellulose 막은 enhanced chemiluminescence solution을 처리하여 incubation 시킨 후 X-ray film에 노출시켰다.

타. Lipoxygenase 활성도 측정

각각의 들나물분획물(30 mg/mL)들을 lipoxygenase 효소반응액 15 mL (pH9.0, 0.1N borate buffer) 에 넣어 pre-incubation(10~30분)시키거나 또는 pre-incubation 시키지 않고 즉시 일정량(100 μ l)을 취해 효소반응을 시켜 잔존 효소 활성도를 측정하였다. 효소활성도 1unit는 linoleic acid를 기질로하여 25 $^{\circ}$ C, pH 9.0의 반응 조건하에서, 1분당 흡광도(234 nm)를 0.001증가시키는 효소양으로 하였다.

파. 세포접합인자 (ICAM-1과 LFA-1)활성 측정

HL-60는 10%FBS를 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 96 well flatted-bottom plate에 HL-60 세포를 1×10^6 cell/ml (200 μ l/well)가 되도록 분주하고 녹용 분획물들을 30분간 전처리 한 후 PMA를 최종 25 nM의 농도로 첨가한 뒤 48 시간 배양한다. 배양 후 현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 간기능개선 및 간암억제 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발

1) 들나물로부터 간암억제 물질의 분리 및 동정

들나물을 methanol에 24시간 동안 soaking한 후 용매의 극성도에 따라 hexane, ethyl acetate, butanol로 순차 추출하여 농축하였다. 추출 후 농축 시 획득하는 양은 점차 감소하였으며, 추출물의 수율은 용매의 종류를 달리 할 때마다 감소하여 methanol 0.4%, hexane 0.06%, ethyl acetate 0.003, butanol 0.002%이었다.



Fig. 1. Extracted fractions of *S. sarmentosum* based on its polarity.

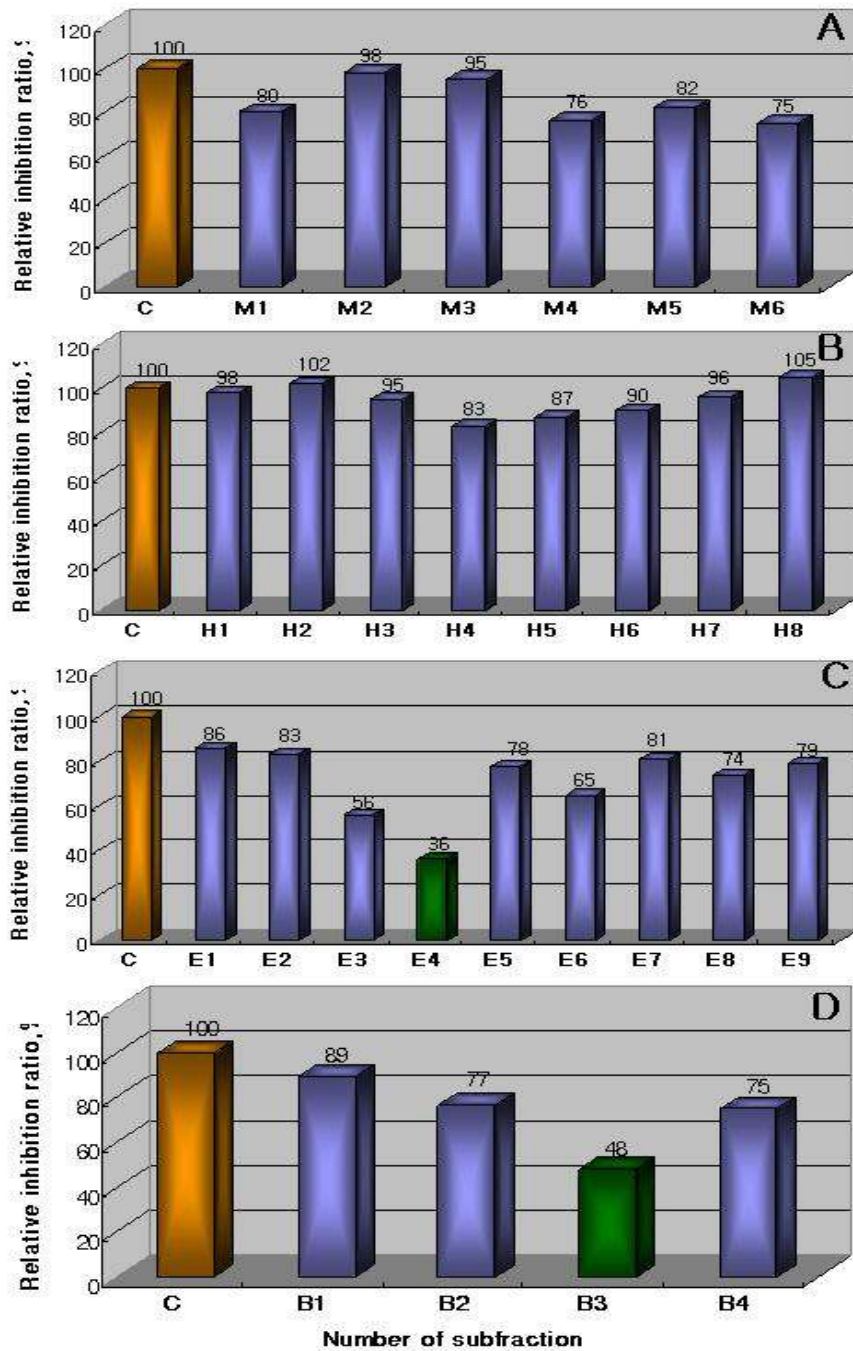


Fig. 2. Effects of subfractions from *S. sarmentosum* extracts on the growth of human hepatocarcinoma cell line, HepG2. A; methanol extract, B; hexane extract, C; ethyl acetate extract, D; butanol extract.

용매의 극성도에 따라 돌나물을 추출하고 박층크로마토그래피를 실시하여 각 용매 추출물의 subfraction을 획득하였다. 이들 subfraction을 분리한 후 인간 간암세포주의 성장에 미치는 영향을 MTT assay를 통하여 측정하였다 (Fig. 2). Fig. 2에서와 같이 butanol 추출물의 3번 분획 (Fig. 3)과 ethyl acetate의 4번 분획 (Fig. 4)이 간암 세포의 성장을 억제하는데 효과적인 것으로 사료되었다 (Fig. 5). Fig. 5에서와 같이 ethyl acetate 추출물 subfraction의 간암 세포 성장 억제 효과가 butanol 추출물보다 우수한 것으로 나타났으므로 상기 subfraction을 분리동정하였다.

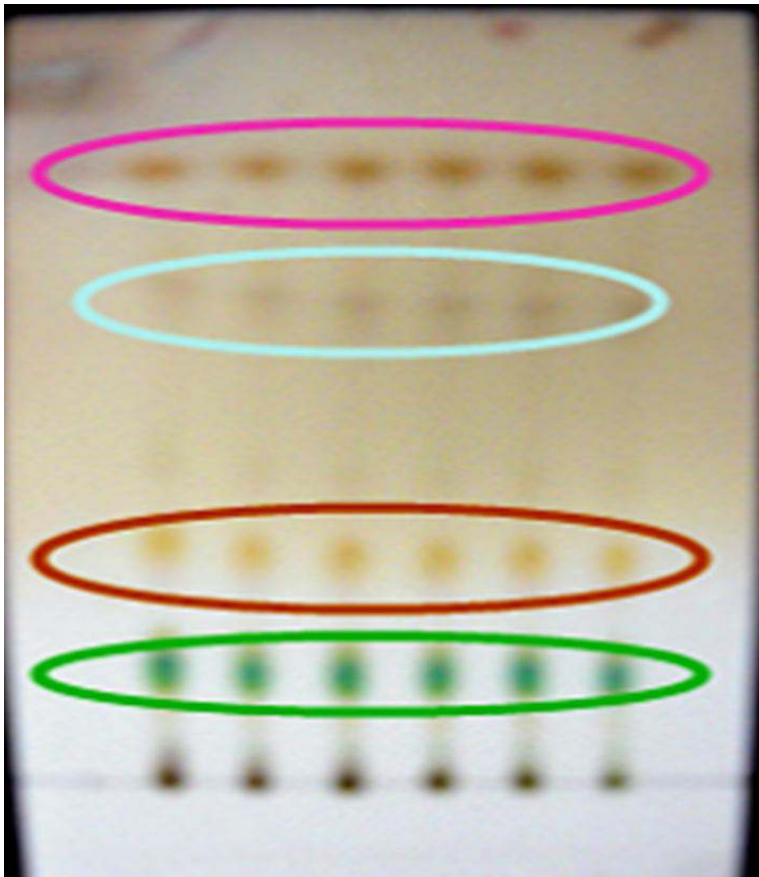


Fig. 3. Thin layer chromatogram of the butanol extracts of *S. sarmentosum*.

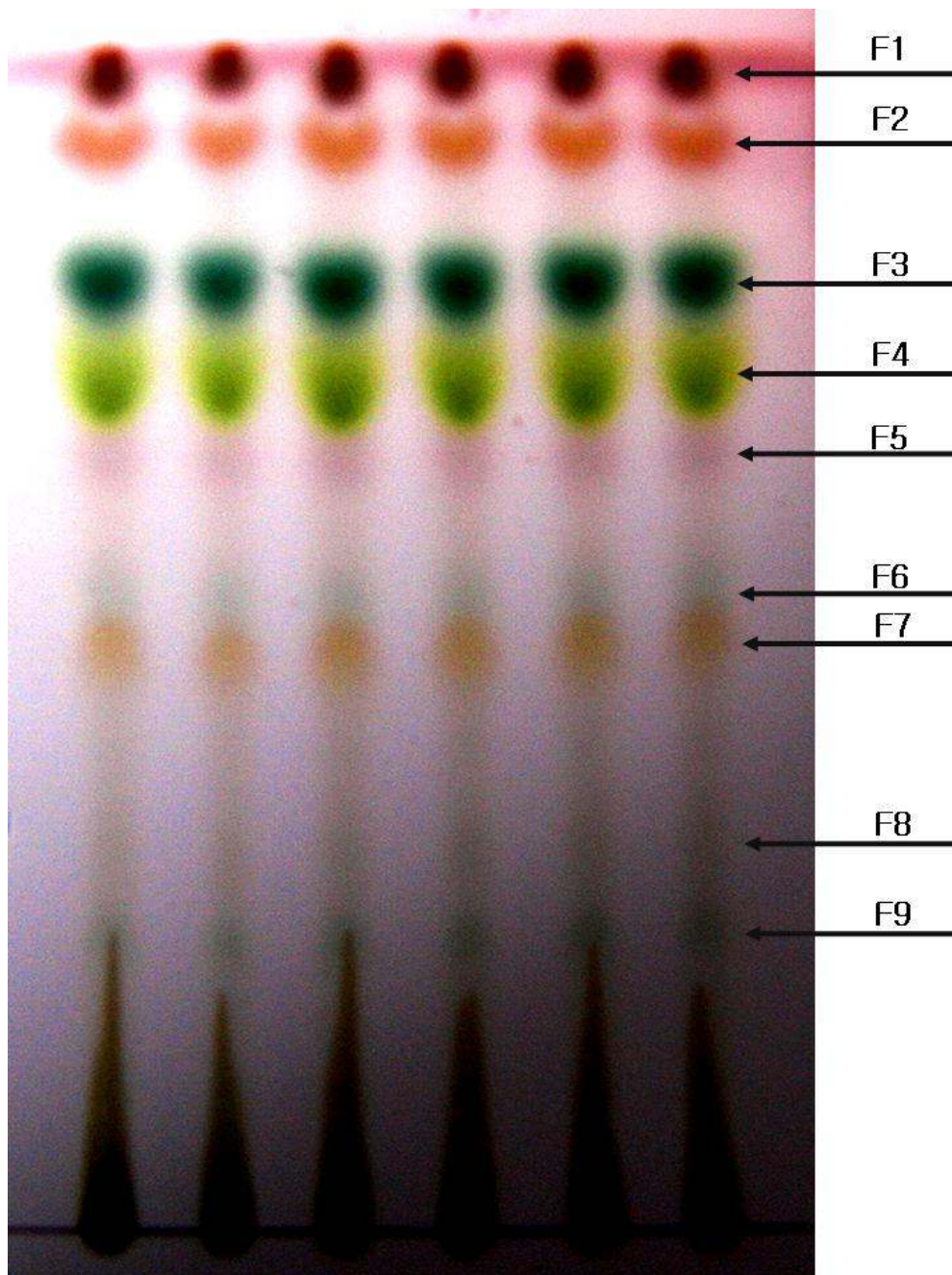


Fig. 4. Thin layer chromatogram of ethyl acetate extracts of *S. sarmentosum*.

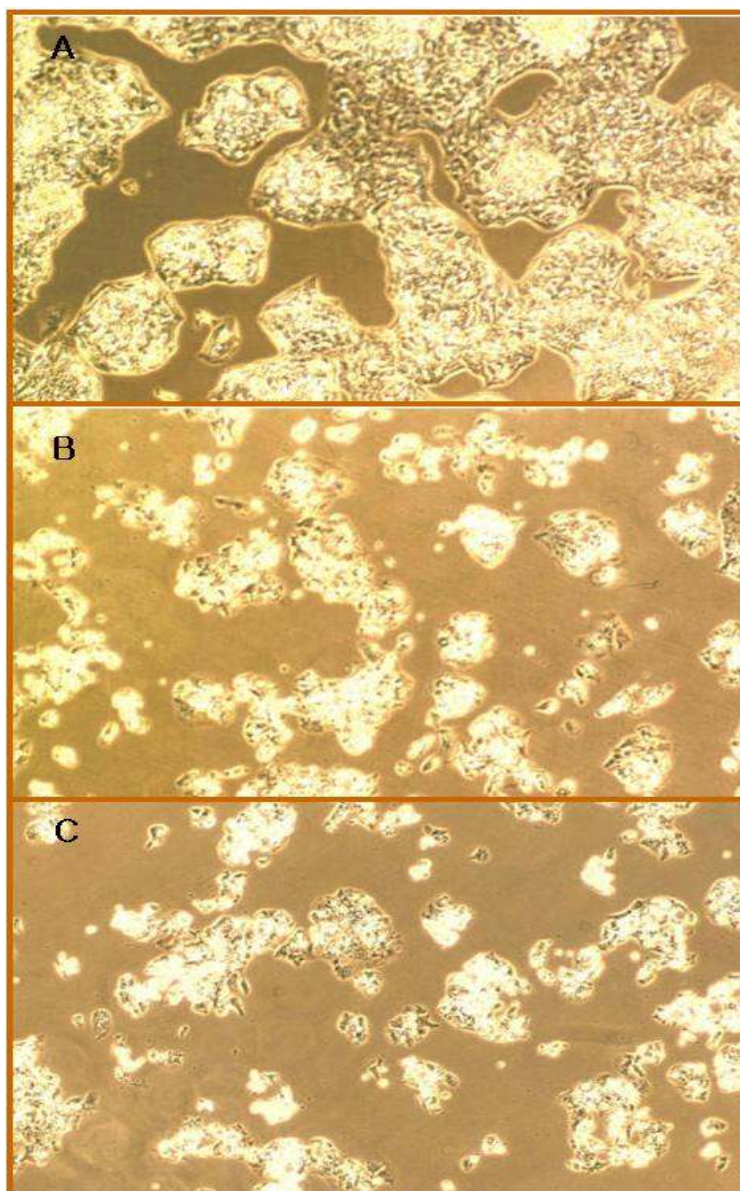


Fig. 5. Effects of butanol and ethyl acetate extracts of *S. sarmentosum* on HepG2 morphology. A: control, B; number 3 subfraction of butanol extract, C; number 4 subfraction of ethyl acetate extract. HepG2 cells were grown for 48 hrs and magnification $\times 200$.

Ethyl acetate 추출물의 4번 subfraction만을 포집하여 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 6과 같다. Fig. 6에서와 같이 ethyl acetate 4번 subfraction은 7개의 서로 다른 물질로 분리되었다. 이들 중 가장 양이 많은 6번 fraction만을 순수분리한 후 이를 동정하였다. Fig. 7에서와 같이 6번 fraction은 TLC plate 상에서 자외선 254 nm 파장 하에서 황색으로 관측되며, FeCl₃를 분무했을 때 양성 반응으로 나타내며 10% H₂SO₄를 분무하고 가열시 황색으로 발색되었다. FT-IR spectrum에서 3407 cm⁻¹ (OH), 1660, 1562 (aromatic carbon, triple band) 등의 흡수대를 나타내어 방향족 화합물인 것으로 사료되었다 (Fig. 8). 6번 화합물을 순수분리하여 GC-MS로 분석한 결과는 Fig. 9와 같다. Fig. 9에서와 같이 본 화합물은 분자량 304인 것으로 확인되었다. ¹H-NMR spectrum의 δ 7.69 (¹H, d), 7.57 (¹H, dd), 6.91 (¹H, d)으로 H-2' 및 H-6'의 meta coupling과 H-6' 및 H-5'의 ortho coupling을 하고 있는 ABX type의 B-ring 구조인 것으로 사료되었다. 따라서 본 화합물의 구조는 tetrahydroxyflavonol (quercetin)인 것으로 사료되었다 (Fig. 10). 또한 ¹³C-NMR spectrum을 library의 quercetin data 비교하여 각각의 signal이 일치하였으므로 본 화합물은 quercetin인 것으로 최종 동정하였다 (Figs. 11~12).

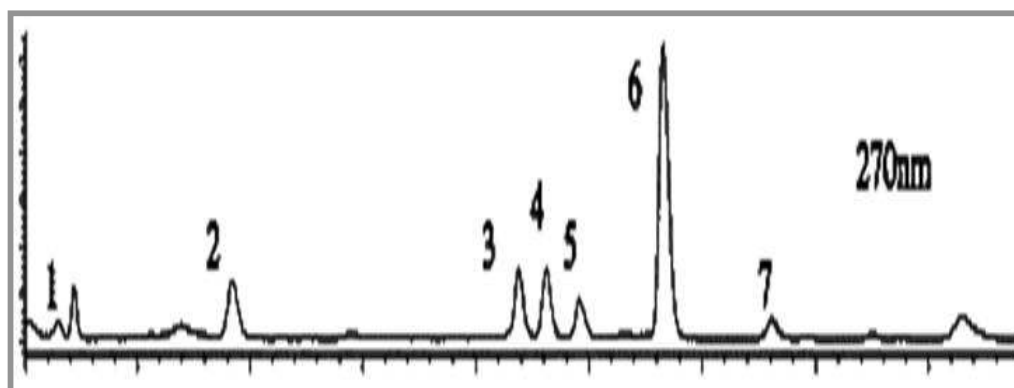


Fig. 6. HPLC analysis of *S. sarmentosum* ethyl acetate extract subfraction #4. Detector UV-Vis: 270 nm. Column 250 mm x 4.6 mm i.d. (C18). Mobile phase: methanol: phosphoric acid 1% (w/v) = 53 : 47.

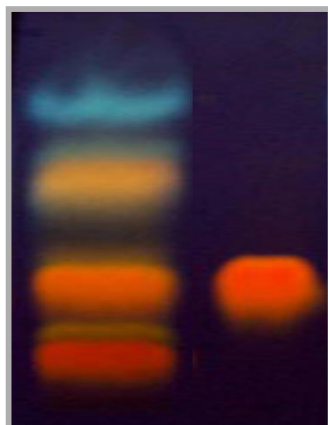


Fig. 7. Thin layer chromatogram of *S. sarmentosum* ethyl acetate extract subfraction #4 under UV 254 nm. Left; subfraction #4, Right; #6 peak in HPLC chromatogram of subfraction #4 (Fig. 6).

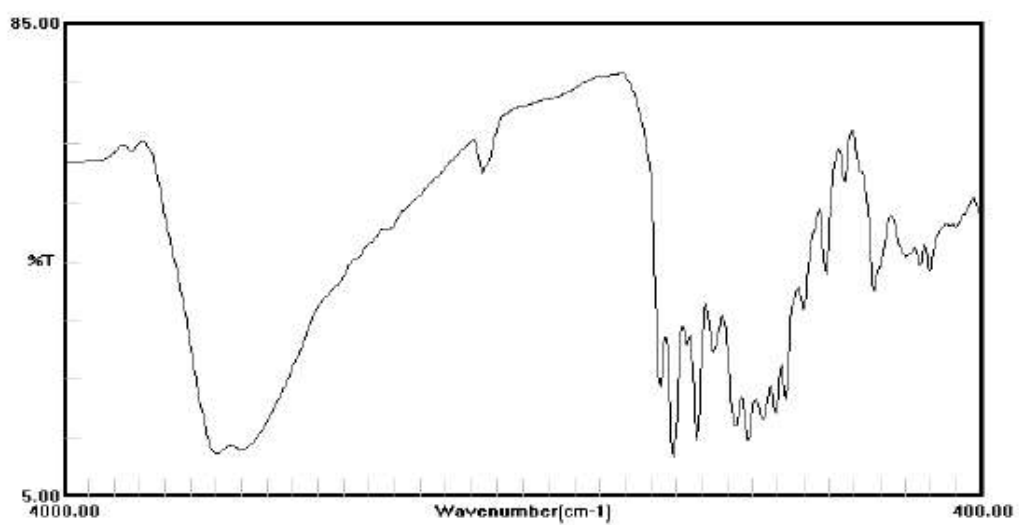


Fig. 8. FT-IR spectrum of compound #6 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract subfraction #4.

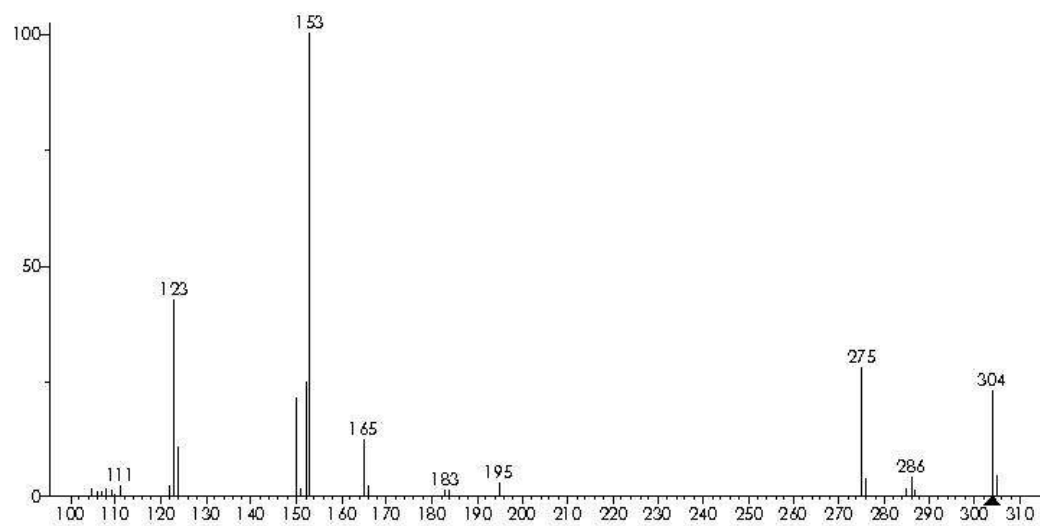


Fig. 9. GC-MS chromatogram of compound #6 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract subfraction #4.

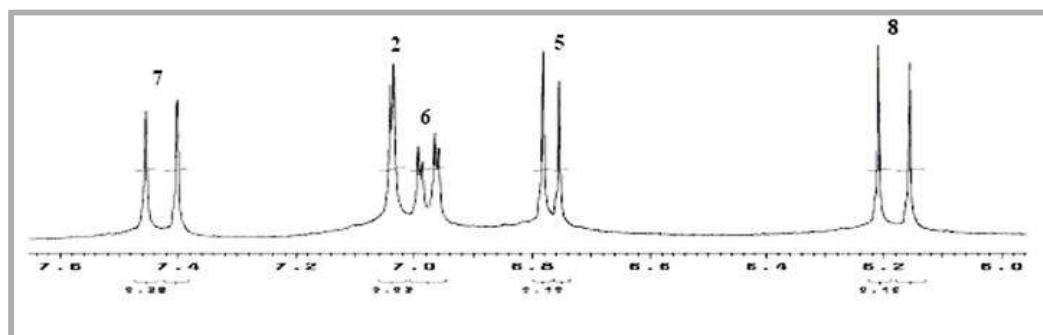


Fig. 10. ¹H-NMR spectrum of compound #6 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract subfraction #4. 300 MHz, DMSO.

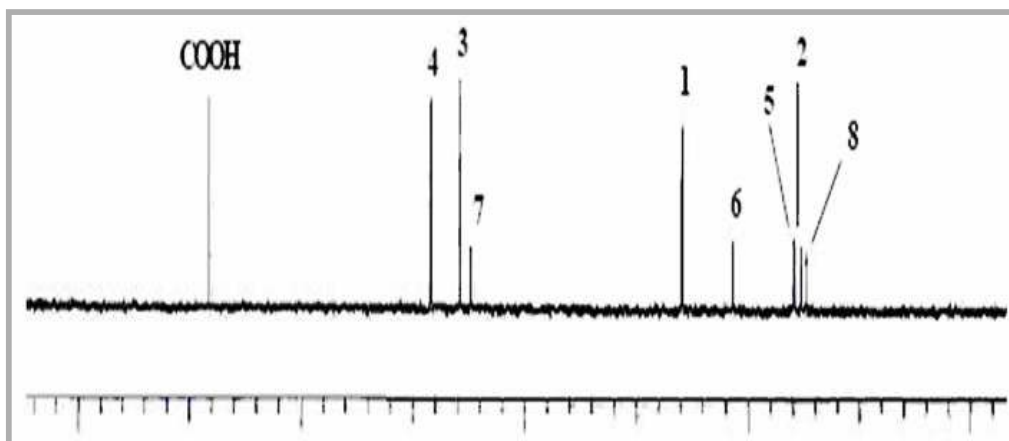


Fig. 11. ^{13}C -NMR spectrum of compound #6 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract subfraction #4. 75 MHz, DMSO.

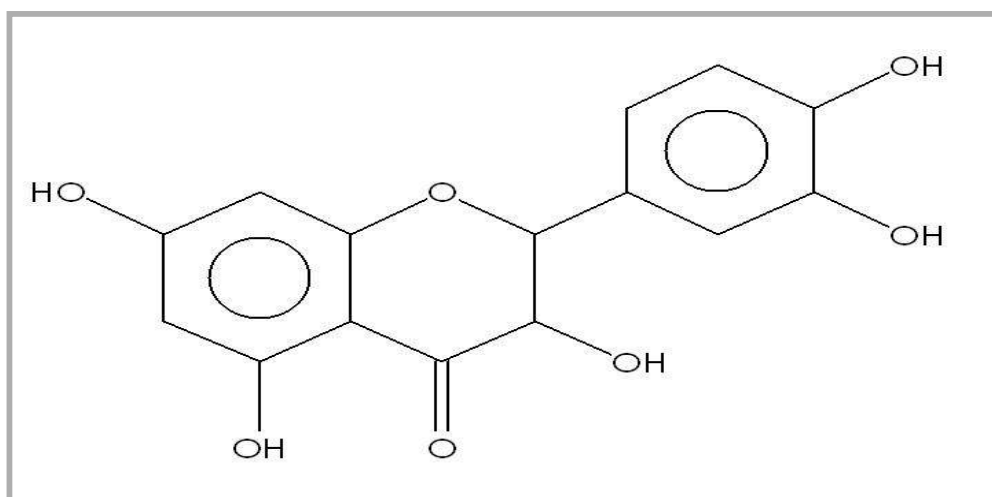


Fig. 12. Structure of compound #6 (quercetin) from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract subfraction #4.

2) 돌나물 및 돌나물추출물이 백서의 간기능에 미치는 영향

가) 돌나물추출물이 사염화탄소로 유도된 간 손상에 미치는 영향

사염화탄소를 백서에 경구투여 급성간독성을 유발하면서 이에 미치는 돌나물 추출물의 효과를 측정하였다 (Table 1). 급성간독성을 유발하였고 실험 기간이 단기간이었으므로 대조구 및 돌나물 추출물 처리구 간의 유의적인 체중 변화는 관측되지 않았다.

Table 1. Effects of *S. sarmentosum* extracts on body and liver weight in CCl₄-treated rats.

Experimental groups	Body weight (g)	Liver weight (g/100g B.W.)	Ratio (L.W. / B.W.)
Control	182.00 ± 7.21	3.70 ± 0.12	2.03 ^a ± 0.34
CCl ₄	181.00 ± 6.56	4.71 ± 0.06	2.60 ^c ± 0.65
CCl ₄ + Silymarin	177.33 ± 19.86	4.15 ± 0.02	2.34 ^b ± 0.07
CCl ₄ + MeOH	179.00 ± 4.15	3.73 ± 0.39	2.08 ^a ± 0.17
CCl ₄ + Hex	178.67 ± 3.98	4.13 ± 1.12	2.31 ^b ± 0.58
CCl ₄ + EtOAc	178.33 ± 3.72	3.79 ± 0.59	2.13 ^{ab} ± 0.46
CCl ₄ + BuOH	178.33 ± 3.98	3.83 ± 0.82	2.15 ^{ab} ± 0.26

Values are mean ± S.D. B.W.; body weight, L.W.; liver weight, MeOH; methanol extract of *S. sarmentosum*, Hex; hexane extract of *S. sarmentosum*, EtOAc; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, BuOH; butanol extract of *S. sarmentosum*. *; Mean with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

그러나 Table 1에서와 같이 체중당 간 중량의 비율은 대조구에 비하여 사염화탄소 처리구가 유의적으로 높았으며, 돌나물 추출물 중 methanol 추출물 처리구는 사염화탄소 투여에 의한 간중량의 증가가 나타나지 않았다. 사염화탄소의 투여로 인해 직접적인 영향을 받는 간의 중량은 정상대조군에 비하여 사염화탄소 처리구에서 약 20%의 증가를 나타내었다. 반면에 돌나물 추출물 처리구는 양성대조구인

silymarin 투여군보다 체중 당 간 중량의 증가폭이 유의적으로 낮은 것으로 관측되었다. 사염화탄소를 투여하면 간 세포막의 손상으로 세포막 투과성이 증가하여 부종이 일어나고 지방변성이 생성되어 간에 다량의 지질이 축적됨으로써 간장 비대가 나타나는 것으로 보고되어있다.

따라서 돌나물 추출물은 사염화탄소에 의한 reticuloendothelium mitochondria 및 microsomes 등의 변화와 같은 간 손상을 억제하여 간에 과량의 지방이 축적되는 것을 억제시키는 효과가 있는 것으로 사료되었다. 즉, 돌나물 추출물의 투여는 사염화탄소로 인해 유발되는 간손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 methanol 추출물의 간손상 보호 효과는 양성대조군으로 사용되는 silymarin 보다 우수한 것으로 사료되었다.

돌나물의 간 손상 보호효과는 GOT (Glutamate oxaloacetate transaminase, AST; Aspartate aminotransferase), GPT (Glutamate pyruvate transaminase, ALT; Alanine aminotransferase) 활성을 측정된 것으로 보다 확실히 나타나고 있다 (Table 2). 사염화탄소는 간세포에서 cytochrome P₄₅₀에 의해 생성되는 free radical metabolite (-CCl₃)가 단백질, 지질, 고분자 물질과 공유결합을 형성하여 세포를 괴사시키며 지방간, 과산화지질 등을 생성하여 간독성을 유발하는 물질이다. 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것이므로 GOT, GPT 등의 효소 활성의 상승은 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 된다.

사염화탄소를 처리하지 않은 군에 비하여 사염화탄소 처리군의 간세포 GOT, GPT 수치가 각각 247.35와 197.51 (Karmen/mL serum)로 증가되었다. GOT 활성은 silymarin 투여군이 234.80 (Karmen/mL serum), methanol 추출물 투여군이 240.59 (Karmen/mL serum), hexane 추출물 투여군이 223.53 (Karmen/mL serum), ethyl acetate 추출물과 buthanol 추출물 투여군이 각각 190.59 (Karmen/mL serum), 213.24 (Karmen/mL serum)로 methanol 추출물을 제외한 모든 돌나물 추출물이 silymarin 투여군에 비하여 보호효과가 높음을 확인할 수 있었다.

GPT 활성은 silymarin 투여군에서 147.31 (Karmen/mL serum)이었고 methanol, hexane, ethyl acetate, buthanol 추출물에서는 각각 138.56 (Karmen/mL serum), 135.50 (Karmen/mL serum), 106.68 (Karmen/mL serum), 109.39 (Karmen/mL serum)로 GOT 활성 변화와 유사하였다.

이는 돌나물 추출물이 silymarin 보다 우수한 간 보호효과를 나타낸 것으로, 특히 ethyl acetate 추출물에서 간손상을 보호하는 효과가 우수하였다.

Table 2. Effects of *S. sarmentosum* extracts on GOT and GPT activities in CCl₄-treated rats.

Experimental groups	GOT (Karmen/ml)	GPT (Karmen/ml)
Control	80.14 ± 16.69 ^{a*}	28.56 ± 1.92 ^a
CCl ₄	247.35 ± 13.79 ^c	197.51 ± 7.07 ^c
CCl ₄ + Silymarin	234.80 ± 47.09 ^b	147.31 ± 63.27 ^b
CCl ₄ + MeOH	240.59 ± 50.59 ^b	138.56 ± 42.04 ^b
CCl ₄ + Hex	223.53 ± 39.12 ^b	135.50 ± 36.94 ^b
CCl ₄ + EtOAc	190.59 ± 20.85 ^b	106.68 ± 52.76 ^{ab}
CCl ₄ + BuOH	213.24 ± 39.17 ^b	109.39 ± 53.98 ^{ab}

Values are mean ± S.D. *; Mean with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. MeOH; methanol extract of *S. sarmentosum*, Hex; hexane extract of *S. sarmentosum*, EtOAc; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, BuOH; butanol extract of *S. sarmentosum*.

사염화탄소로 유발한 간독성에 미치는 돌나물 추출물의 효과를 측정하기 위한 실험 종료 후, 희생시킨 백서의 간조직을 병리학적으로 관측한 결과는 Fig. 13과 같다. Fig. 13에서와 같이 대조구의 간세포와 세포핵의 형태는 일정하게 세밀하고, 퇴화나 변성이 관찰되지 않았으나 사염화탄소를 단독투여한 백서의 간조직에 있어서는 간세포의 형태, 색깔이 모두 불분명하고 핵의 위치나 모양도 일정하지 않았으며 지방 변성 및 괴사가 현저하게 관찰되어 손상의 정도가 심함을 알 수 있었다. 사염화탄소와 양성대조물질인 silymarin을 투여한 군의 간조직에서도 세포괴사가 관찰되었지만 사염화탄소 단독 투여군보다 손상된 조직의 회복이 관찰되었다. 이는 양성대조물질인 silymarin의 투여로 인한 효과로 사료되었다.

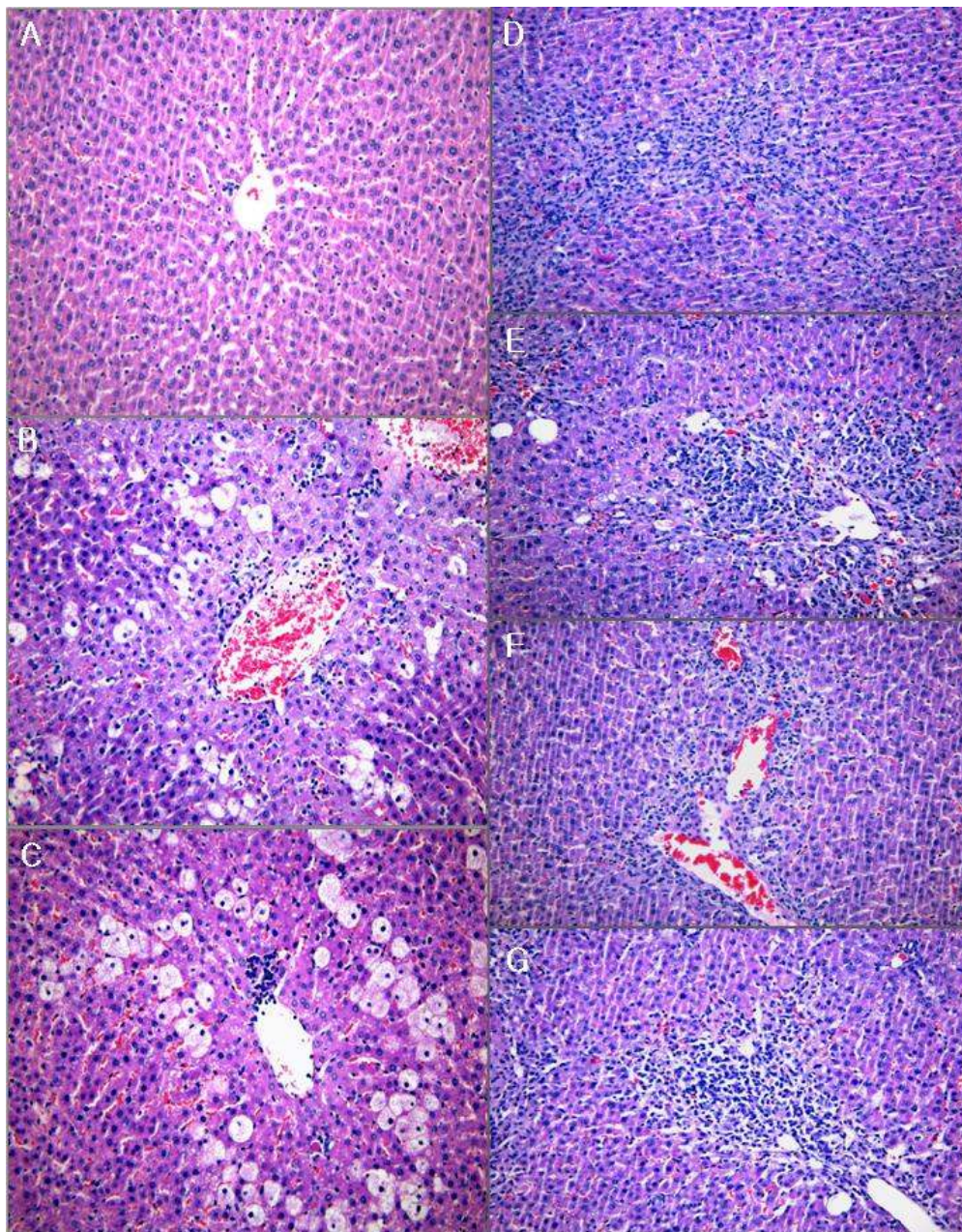


Fig. 13. The light microscopic investigation of hepatocyte in CCl_4 induced hepatotoxic rats with the extracts of *S. sarmentosum*. A; control, B; CCl_4 , C; CCl_4 + silymarine, D; CCl_4 + methanol extract, E: CCl_4 + hexane extract, F; CCl_4 + ethyl acetate extract, G; CCl_4 + buthanol extract.

즉, 조직괴사가 일어난 부분에 세포 재생의 신호인 핵의 밀집을 관찰할 수 있었으며 다른 괴사부분에서도 핵이 나타나 세포 재생이 시작되었음을 확인하였다. 돌나물 methanol 추출물을 투여한 백서의 간조직에서는 세포의 괴사가 관찰되지 않아 그만큼 세포 재생속도가 빠른 것으로 판단하였고, hexane, ethyl acetate, butanol 추출물을 투여한 군에서도 괴사가 일어난 세포 주위로 많은 수의 핵이 무리지어 관찰되었다 (Fig. 13). 따라서 전술한 바와 같이 돌나물 추출물은 사염화탄소로 인한 간 손상을 재생시키는데 효과적인 것으로 사료되었고, 손상된 조직을 회복시키는 속도는 양성대조물질인 silymarin보다 우수한 것으로 사료되었다.

나) 돌나물추출물이 ethionine으로 유도된 지방간에 미치는 영향

Ethionine은 간장내 ATP 농도를 고갈시켜 간독성을 유발시키고, 특히 간 세포 내에 다량의 지방을 축적시켜 미세수포지방증 (microvesicular steatosis)을 유발시키는 물질이다. 지방간이 유도된 간의 중량은 정상의 간 중량보다 증가하는 것으로 보고되어 있다. Table 3에서와 같이 간 중량은 대조군에 비하여 ethionine 단독 투여군에서는 10.7% 증가하였으며, ethionine과 돌나물 추출물을 같이 처리한 모든 군은 대조군보다 6.5~7.7% 만 증가되어 돌나물 추출물이 ethionine에 의한 지방간 형성을 억제하는 것으로 사료되었다.

Table 3. Protective effects of *S. sarmentosum* extracts on ethionine-induced fatty liver disease.

Experimental groups	Liver weight (g/100g B.W.)
Control	3.37 ± 0.22
Ethionine	3.73 ± 0.19
Ethionine + MeOH	3.61 ± 0.23
Ethionine + Hex	3.59 ± 0.11
Ethionine + EtOAc	3.60 ± 0.29
Ethionine + BuOH	3.63 ± 0.16

Values are mean ± S.D. MeOH; methanol extract of *S. sarmentosum*, Hex; hexane extract of *S. sarmentosum*, EtOAc; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, BuOH; butanol extract of *S. sarmentosum*.

Ethionine과 돌나물 추출물을 백서에 투여하고 지방간을 유도한 후, 혈청 콜레스테롤 수치를 측정한 결과는 Fig. 14와 같다. Fig. 14에서 보는 바와 같이 총 콜레스테롤 수치는 ethionine 투여구는 대조구보다 약 47.5% 증가하여 이에 의한 지방간 형성이 정상적으로 유도된 것으로 사료되었다. 반면에 ethionine과 돌나물 추출물을 동시에 투여한 실험구의 총 콜레스테롤 수치는 대조군보다 2.9~20.0%만 증가하였다. 따라서 돌나물 추출물은 ethionine에 의한 지방간 유도를 유의적으로 억제하였고 특히 hexane 및 ethyl acetate 추출물의 지방간 억제 효과가 매우 우수한 것으로 사료되었다.

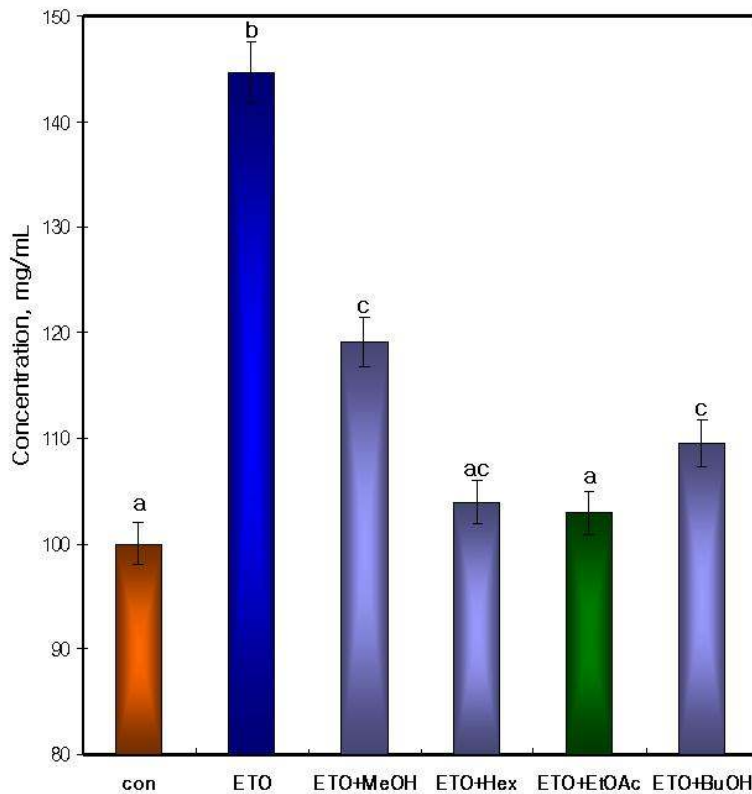


Fig 14. Total cholesterol concentration of ethionine-induced fatty liver disease from *S. sarmentosum* extracts administered rats. Con; control, ETO; ethionine, MeOH; methanol extract of *S. sarmentosum*, Hex; hexane extract of *S. sarmentosum*, EtOAc; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, BuOH; butanol extract of *S. sarmentosum*. Values are mean \pm S.D. Mean with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) 돌나물 추출물이 ethanol로 유도된 지방간에 미치는 영향

10일 동안 ethanol과 돌나물 추출물을 경구투여한 후, 체중과 간 무게를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 체중은 대조구보다 ethanol 단독투여구에서 232.33 ± 12.39 g으로 9.2% 감소하였고, 돌나물 추출물 투여구도 체중 감소가 관측되었다. Ethanol의 과량 섭취로 인하여 체중이 감소하는 이유는 ethanol에 의해 산소의 소비 및 대사율이 증가되어 microsome에서 ATP 생성이 저하되기 때문인 것으로 보고되고 있다. 따라서 Table 4에서와 같이 돌나물 추출물의 투여는 ethanol 섭취로 인해 유발되는 체중 감소 현상을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

Table 4. Effects of *S. sarmentosum* extracts on body and liver weights in ethanol treated rats.

Experimental groups	Body weight (g)	Liver weight (g/100g B.W.)
Control	255.83 ± 6.49 ^a	3.27 ± 0.22 ^a
EtOH	232.33 ± 12.39 ^b	3.53 ± 0.19 ^c
EtOH+MeOH	238.33 ± 12.61 ^{bc}	3.37 ± 0.19 ^{ab}
EtOH+Hex	238.83 ± 10.13 ^{bc}	3.35 ± 0.71 ^{ab}
EtOH+EtOAc	242.60 ± 13.78 ^c	3.30 ± 0.20 ^a
EtOH+BuOH	244.50 ± 10.60 ^c	3.34 ± 0.36 ^{ab}

EtOH; ethanol, MeOH; methanol extract of *S. sarmentosum*, Hex; hexane extract of *S. sarmentosum*, EtOAc; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, BuOH; butanol extract of *S. sarmentosum*. Values are mean ± S.D. Mean with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

간 중량은 지방의 축적으로 인해 대조군에 비하여 ethanol 단독 투여구가 약 8% 정도 증가하였고, 돌나물 추출물 투여구는 0.9~3.1%로 ethanol 투여구보다 유의적으로 낮았다. 특히 ethyl acetate 추출물 투여구의 간 중량은 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 혈청 총콜레스테롤 및 TG 농도는 돌나물 추출물 투여구가 ethanol 투여구보다 유의적으로 낮았다 (Figs. 15, 16). 따라서 돌나물 추출물은 ethanol에 의한 지방간 유도를 억제하는데 효과적인 것으로 사료되었다. GOT

Table 5. Effects of *S. sarmentosum* extracts on GOT and GPT activities in ethanol treated rats.

Experimental groups	GOT (Karmen/ml)	GPT (Karmen/ml)
Control	5.21 ± 3.05	11.84 ± 1.90
EtOH	44.82 ± 1.65	18.91 ± 2.53
EtOH +MeOH	42.18 ± 5.99	12.77 ± 2.66
EtOH +Hex	42.71 ± 3.60	14.61 ± 3.36
EtOH +EtOAc	39.32 ± 7.39	12.30 ± 3.95
EtOH +BuOH	41.52 ± 4.10	12.77 ± 4.72

Values are mean ± S.D. Mean with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. EtOH; ethanol, MeOH; methanol extract of *S. sarmentosum*, Hex; hexane extract of *S. sarmentosum*, EtOAc; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, BuOH; butanol extract of *S. sarmentosum*.

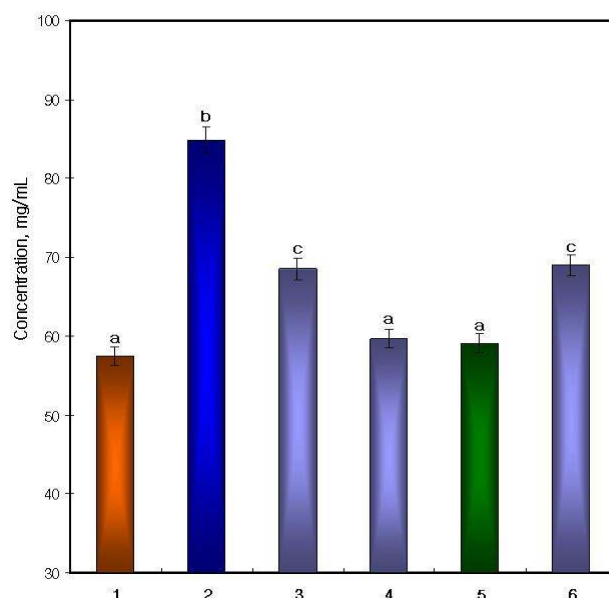


Fig. 15. Total cholesterol concentrations of ethanol-induced fatty liver disease from *S. sarmentosum* extracts administered rats. 1; Control, 2; ethanol, 3; ethanol + methanol extract of *S. sarmentosum*, 4; ethanol + hexane extract of *S. sarmentosum*, 5; ethanol + ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, 6; ethanol + butanol extract of *S. sarmentosum*. Values are mean ± S.D. Mean with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

활성은 ethanol 단독투여구가 대조구에 비해 약 8.6배 이상 증가하였고, 돌나물 추출물 투여구에서는 7.5~8.2배 증가하여 ethanol 단독투여구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. GPT 활성은 대조군에 비해 ethanol 단독투여구가 59.7% 증가하였고, 돌나물 추출물 투여군에서는 3.9~23.4% 증가하였다 (Table 5).

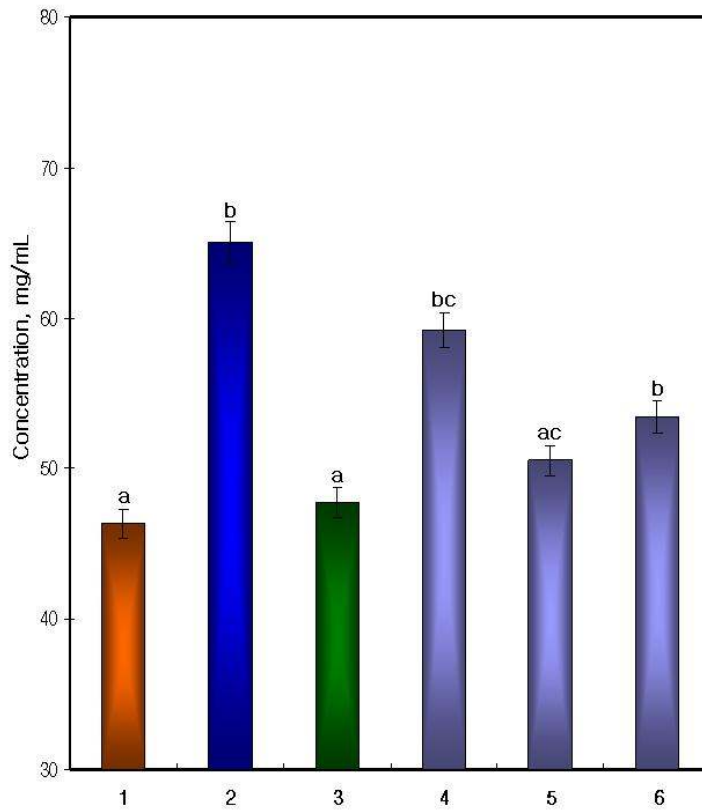


Fig. 16. Total cholesterol concentrations of ethanol-induced fatty liver disease from *S. sarmentosum* extracts administered rats. 1; Control, 2; ethanol, 3; ethanol + methanol extract of *S. sarmentosum*, 4; ethanol + hexane extract of *S. sarmentosum*, 5; ethanol + ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, 6; ethanol + buthanol extract of *S. sarmentosum*. Values are mean \pm S.D. Mean with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) 돌나물 추출물이 간암세포 분화 및 관련 단백질 변화에 미치는 영향

돌나물 추출물이 인간 간암세포주인 HepG2 세포의 성장에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 17과 같다. Fig. 17에서와 같이 돌나물 추출물의 처리 농도가 증가할수록 간암세포주의 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 간암 세포주의 성장을 50% 저해하는 농도 (IC₅₀)는 ethyl acetate 처리구 155.8 µg/mL, hexane 처리구 250.94 µg/mL, methanol 처리구 1.3 mg/mL, butanol 처리구 1.9 mg/mL이었다. 따라서 ethyl acetate 추출물의 간암 세포 성장 억제 효과가 가장 우수한 것으로 사료되었다.

돌나물의 ethyl acetate 추출물이 간암 세포 성장 억제 뿐만 아니라 세포 사멸 효과도 나타낼 것으로 기대되었으므로, ethyl acetate 추출물을 처리한 후 인간 간암세포주의 세포 사멸을 경시적으로 측정하였다 (Fig. 18). 일반적으로 세포는 사멸했을 때, 핵이 노출되거나 응집하는 것으로 알려져 있다. 따라서 DNA 사이에 삽입될 수 있는 물질인 propidium iodide (PI)로 염색한 후, PI의 형광 intensity를 FACS를 이용하여 측정하였다. Fig. 18에서와 같이 배양 48시간동안 대조구에서의 세포 사멸은 관측되지 않았으나 ethyl acetate 처리구에서는 세포사멸이 일어나는 것으로 사료되었다.

돌나물 추출물 처리에 의한 간암 세포주 사멸 현상이 핵의 손상에 의한 것인지를 측정하기 위하여 hoechst 33342로 세포주를 염색하고 DNA의 손상정도를 현광현미경을 이용하여 관측하였다 (Fig. 19). Hoechst 33342는 DNA의 adenine과 thymin 결합 사이에 끼어들어가 자외선 351~364 nm에서 형광을 발현하는 물질이다. 따라서 세포 사멸에 의해 핵이 손상되었다면 hoechst 염색에 의하여 핵의 모양은 응축되거나 심한 경우는 점 모양으로 관측되는 것으로 알려져 있다. Fig. 19에서와 같이 48시간 배양한 HepG2 세포는 morphology (B)가 정상적이고 핵의 모양도 일정한 모양을 유지하며 선명한 형광을 발현하고 있다 (A). 반면에 돌나물 추출물을 처리하여 48시간 배양한 세포는 morphology (D)에서도 정상적인 monolayer를 형성하지 못하고 있을 뿐만 아니라 핵이 응집되어 있으며 DNA 나선을 제대로 유지하지 못하기 때문에 형광의 발현양도 매우 낮았다 (C).

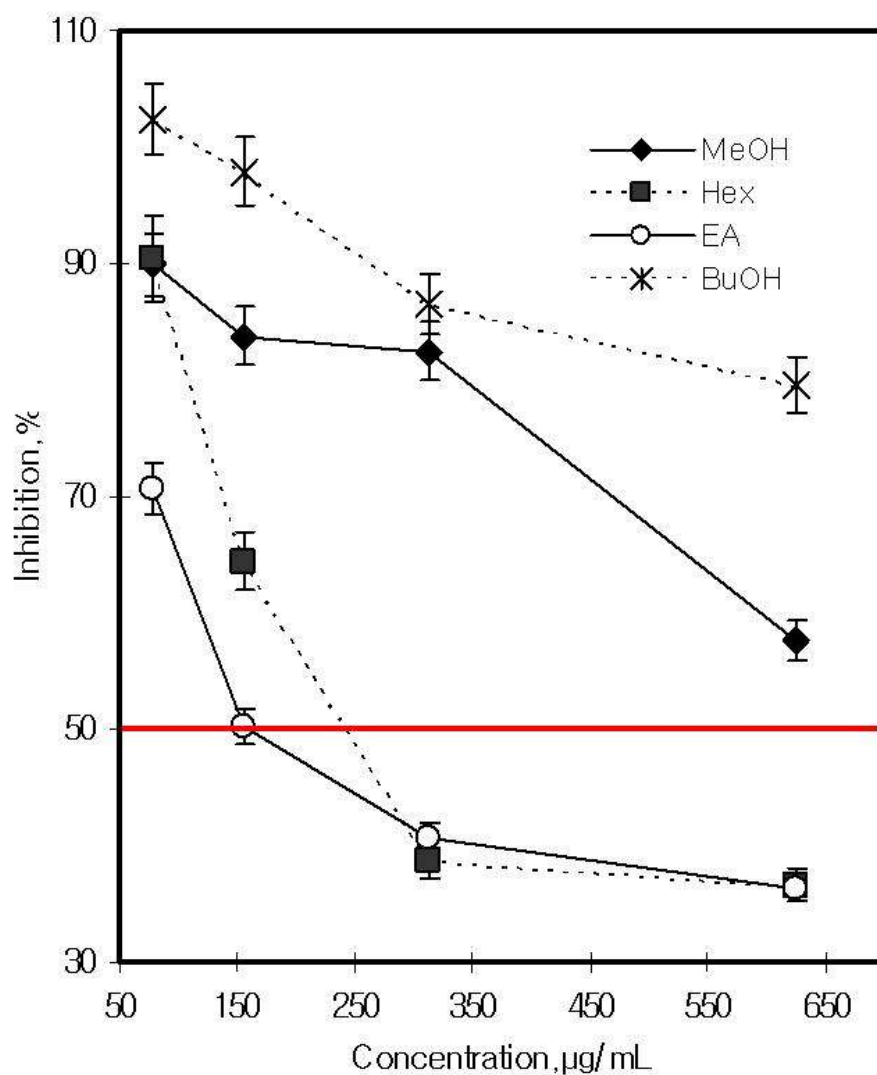


Fig. 17. Inhibitory effects of *S. sarmentosum* extracts on the growth of human hepatoma cell line, HepG2 in MTT assay. IC₅₀ values were calculated from six times experiments. Results are presented mean ± S.D. (n=6). MeOH; methanol extract of *S. sarmentosum*, Hex; hexane extract of *S. sarmentosum*, EA; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, BuOH; butanol extract of *S. sarmentosum*.

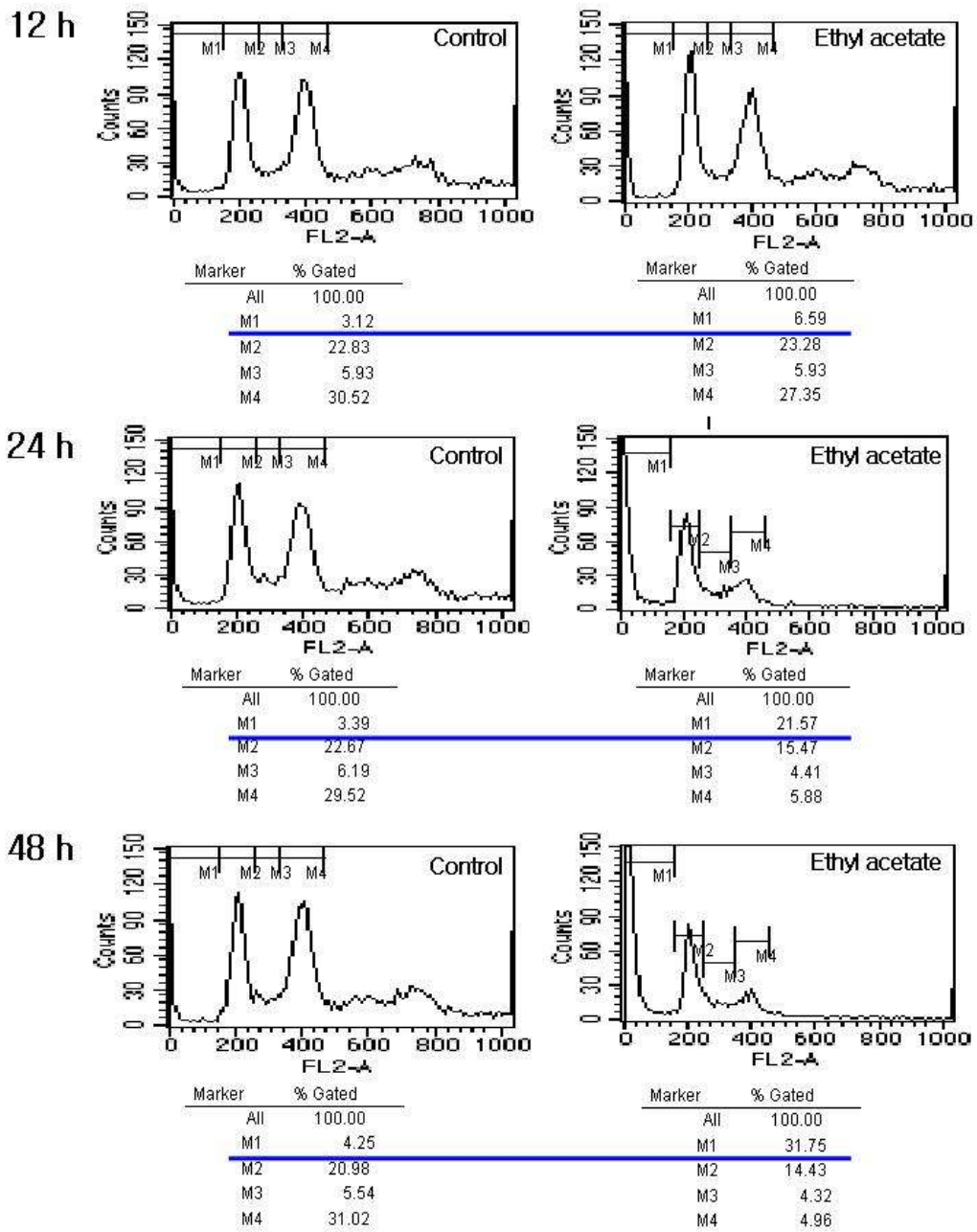


Fig. 18. Determination of necrotic cell death in human hepatoma cell line, HepG2 treated with ethyl acetate extract of *S. sarmentosum* and stained with PI using FACS for 48 hrs.

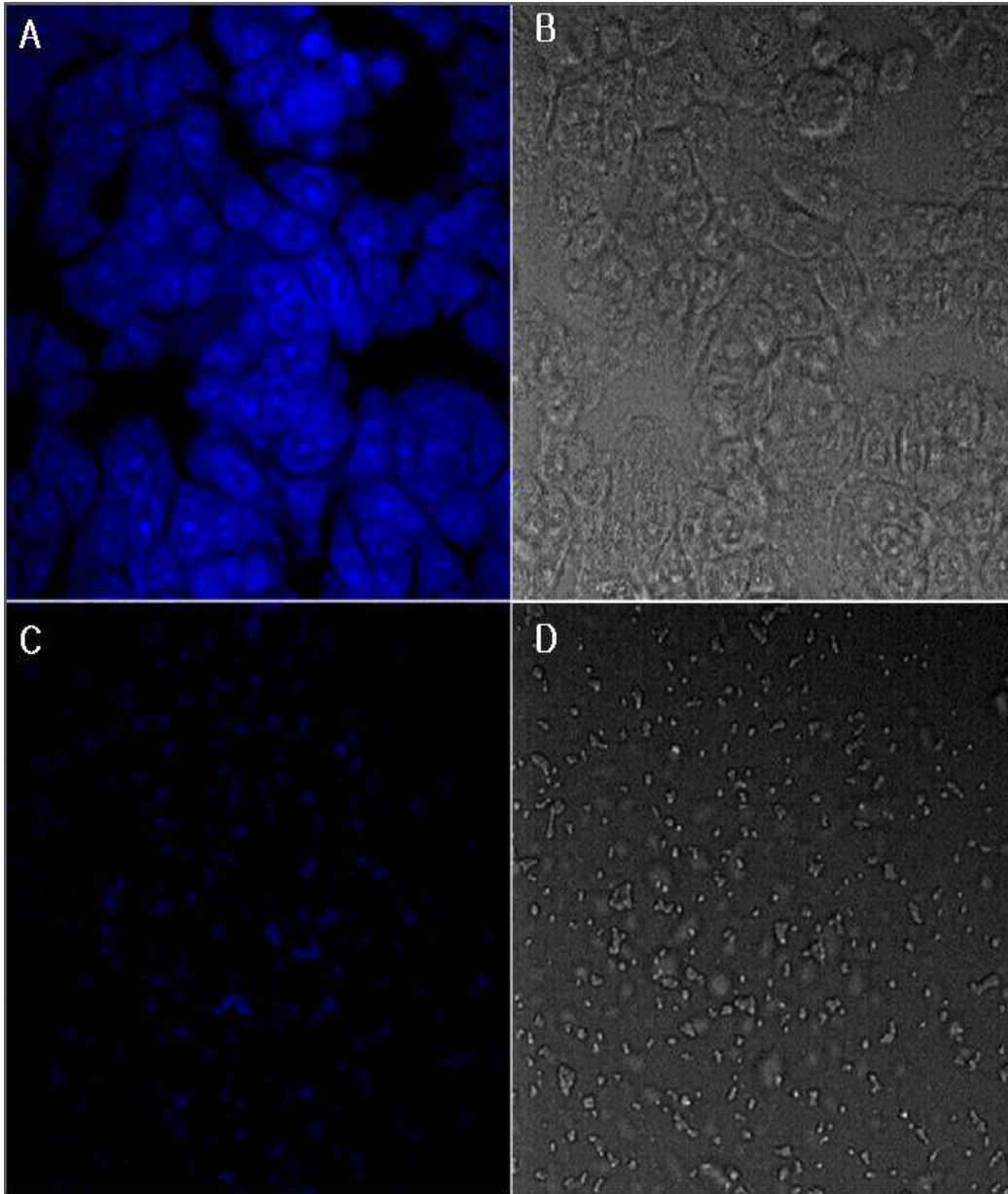


Fig. 19. Determination of necrotic cell morphology in HepG2 treated with ethyl acetate extract of *S. sarmentosum* using confocal and light microscopy (x40) on 48 hrs incubation. A/B; normal HepG2, C/D; *S. sarmentosum* extract treated HepG2.

따라서 돌나물의 ethyl acetate 추출물을 처리한 HepG2 세포의 사멸 현상의 원인은 돌나물 추출물이 간암 세포주의 핵을 손상시키기 때문인 것으로 사료되었다.

세포자살 현상의 초기 단계에서는 세포막의 구조가 변형되면서 정상적인 상태에서는 세포 내부에만 존재하던 phosphatidylserine 같은 인지질이 세포 외부로 노출하는 것으로 보고되고 있다. Annexin V는 calcium dependent phospholipid binding protein으로 특정 조건 하에서 세포 표면에 칼슘이온이 많을 경우 phosphatidylserine에 선택적으로 binding affinity가 높아지므로 세포외막의 PS 노출에 대한 민감한 표지제이다. 반면에 PI는 apoptosis 초기단계의 세포막을 통과할 수 없으므로 annexin V에 대한 양성반응과 PI에 대한 음성반응은 세포 자살 초기단계로, annexin V와 PI에 모두 양성반응인 것은 세포자살 및 세포사멸이 일어난 것으로, 두 가지 물질에 대해 모두 음성반응인 것은 살아있는 세포로 판정되고 있다.

돌나물의 ethyl acetate 추출물 처리에 의한 세포 사멸 현상이 세포 성장 속도를 증가시켜 일어나는 세포 괴사 현상인지 또는 돌나물 추출물 처리에 의한 세포자살 현상 (apoptosis)인지를 관측하기 위하여 돌나물 추출물을 처리한 HepG2 세포를 annexin V와 PI로 이중염색한 후 FACS를 이용하여 fluorescence intensity를 측정하였다 (Fig. 20). Fig. 20에서와 같이 대조구는 72시간까지 세포괴사 및 세포자살이 거의 일어나지 않고 있다. 반면에 돌나물 추출물 처리구에서는 24시간 배양시 약 50% 정도의 세포만이 살아있고 각각 약 17% 정도의 세포가 apoptosis 또는 necrosis 과정으로 이행된 것이 관찰되었다. 배양시간이 길어지면서 세포의 apoptosis 또는 necrosis 현상이 가속되어 48시간 배양시 약 40% 정도의 세포가 apoptosis를 나타내었고, 72시간 배양시에는 거의 모든 세포 (92.75%)가 apoptosis를 거쳐 괴사되었거나 또는 다른 기전을 거쳐 괴사된 것으로 관측되었다.

괴사된 세포인지 초기 apoptosis 과정에 있는 세포인지를 측정하기 위하여 돌나물 추출물을 처리한 HepG2 세포를 acridine orange와 ethidium bromide 용액으로 이중염색하여 형광현미경으로 morphology를 관측하였다 (Fig. 21~23). 괴사된 세포는 ethidium bromide에 염색되어 밝은 오렌지색의 형광을 나타내고, 살아있는 세포 (early apoptotic cell)는 acridine orange에 염색되어 밝은 초록색의 형광을 나타내게 된다. Fig. 21D에서와 같이 대조구는 배양 48시간에도 초록색의 형광을 나타내고 있으므로 살아있는 세포로 사료되었고, 이러한 결과는 annexin V-PI staining 후의 FACS 결과와도 일치하였다. 돌나물 추출물을 처리한 후 48시간이 경과한 후에는

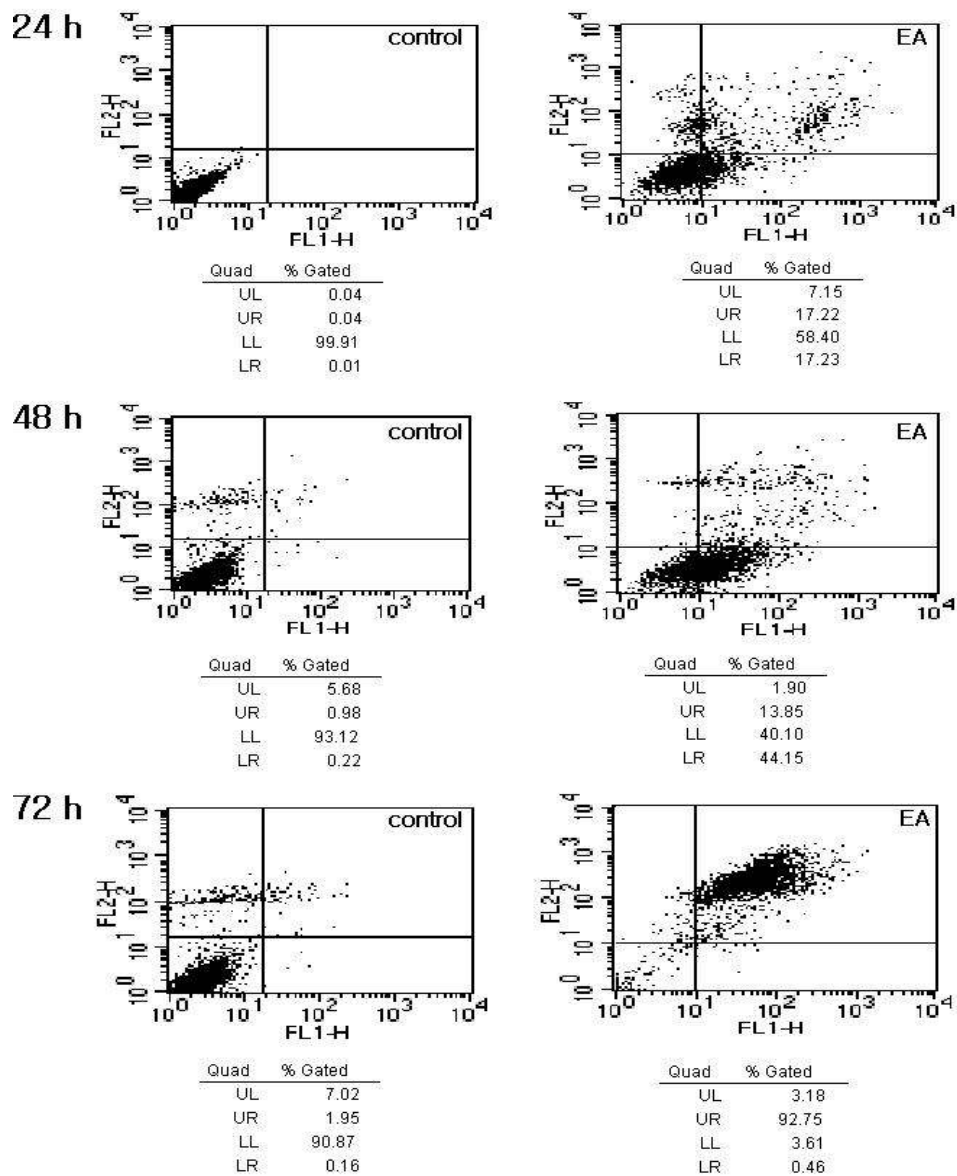


Fig. 20. Apoptosis was measured by flowcytometry analysis of Annexin V–FITC double–labeled cells, HepG2 treated with ethyl acetate extract of *S. sarmentosum* for 48 hrs. LL; viable cell, LR; early apoptotic cell, UR; late apoptotic cell or necrotic cell. EA; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum* treated group.

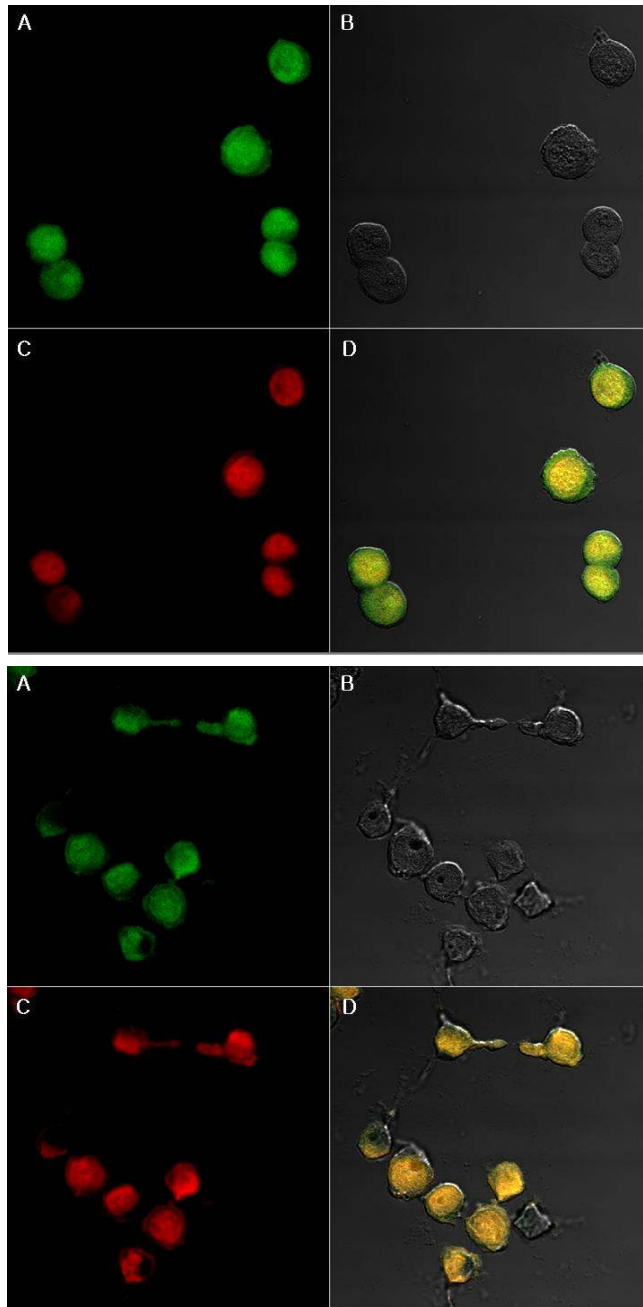


Fig. 21. Morphological change of nuclear chromatin in HepG2 was viewed under a fluorescence microscopy (X100) on 24 (upper) and 48 hrs. (bottom). A; viable cell were stained with acridine orange at 515 nm, B; morphology under light microscopy, C; dead cell were stained with ethidium bromide at 495 nm, D; overlap with A and C.

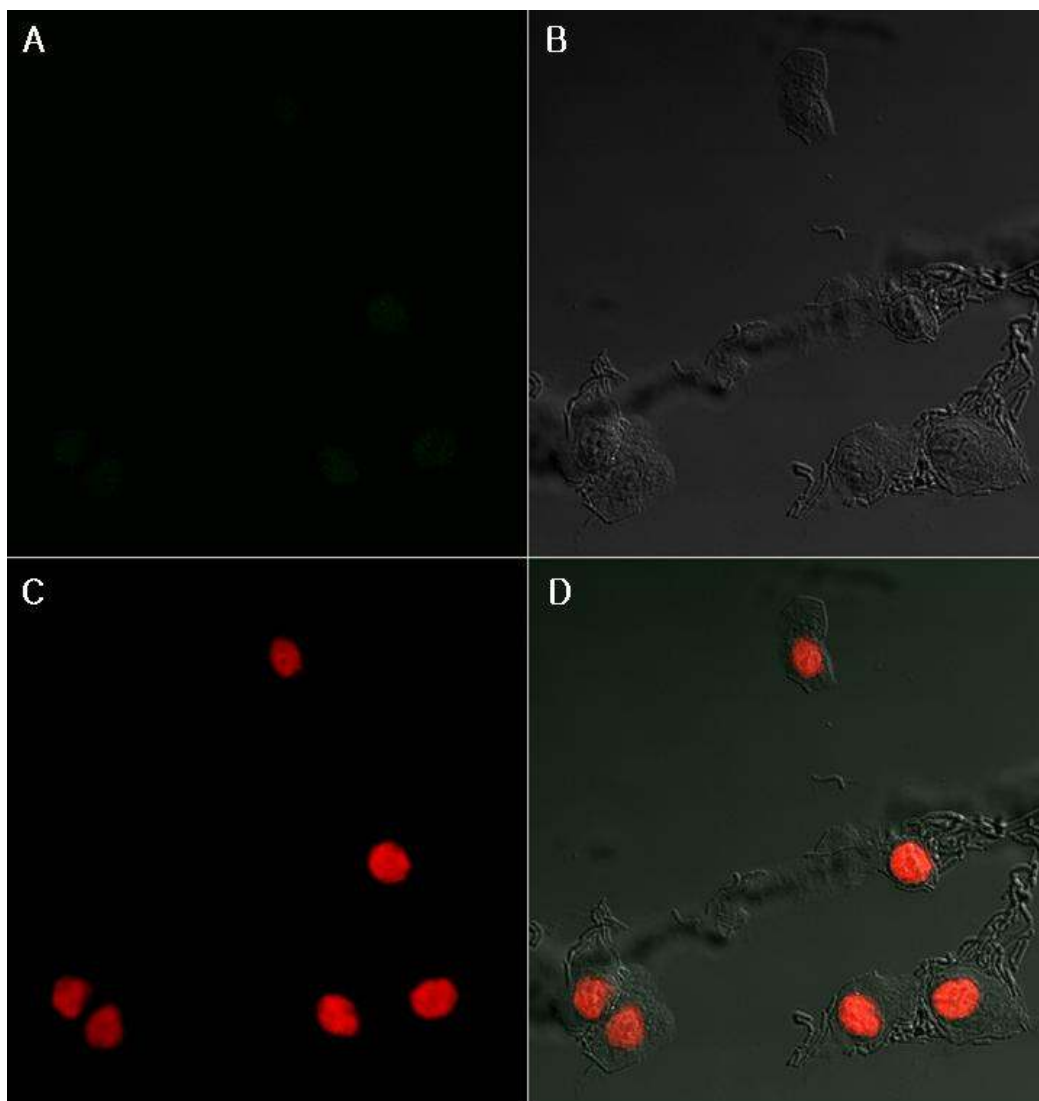


Fig. 22. Morphological change of nuclear chromatin in HepG2 treated with *S. sarmentosum* extract was viewed under a fluorescence microscopy (X100) on 72 hrs. A; viable cell were stained with acridine orange at 515 nm, B; morphology under light microscopy, C; dead cell were stained with ethidium bromide at 495 nm, D; overlap with A and C.

세포의 모양이 불규칙해지고 세포의 염색도 오렌지색을 많이 발현하고 있는 것으로 미루어 세포의 괴사가 진행되는 것으로 사료되었다 (Fig. 21). 배양 72시간 돌나물 추출물 처리구에서는 acridine orange에 약하게 염색되었고 acridine orange와 ethidium bromide 염색한 것을 중첩시켰을 때는 살아있는 세포는 관측되지 않았다 (Fig. 22).

Apoptosis가 진행됨에 따라 핵의 DNA는 세포질 내의 endonuclease에 의해 nucleosome 사이에서 절단되고 180부터 200 bp 배수의 다양한 길이를 지닌 DNA 조각이 발생하는 것으로 보고되고 있다. Fig. 23에서와 같이 대조구는 배양 시간이 경과하여도 단일 band의 DNA만 관측되었으나, 돌나물 추출물을 처리한 세포주는 배양 시간이 경과할수록 DNA 분절의 개수가 증가하였다.

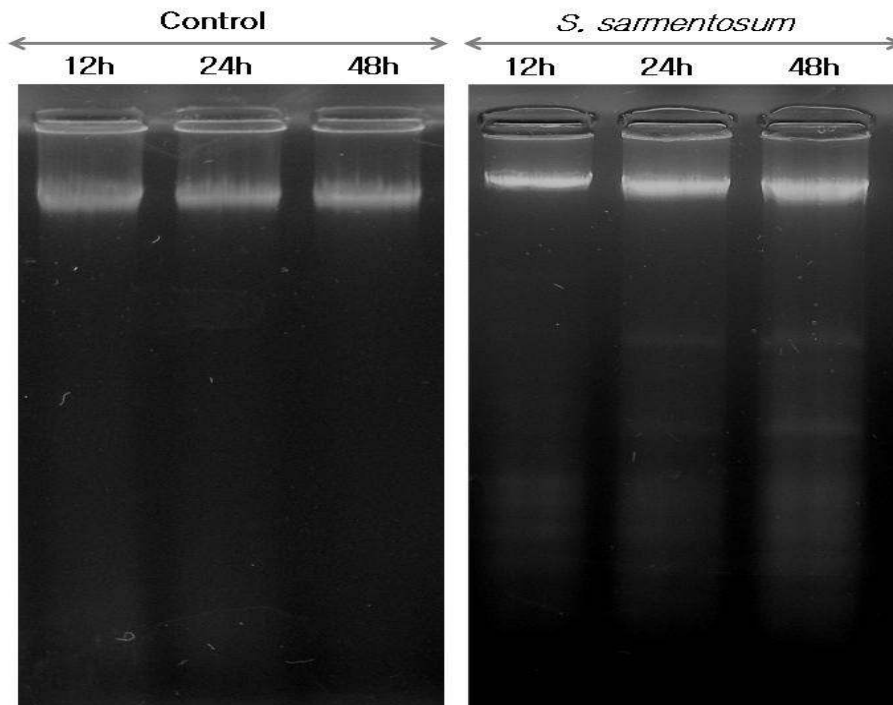


Fig. 23. DNA fragmentation in *S. sarmentosum* extract treating HepG2 for 48 hrs incubation. 2% agarose gel electrophoresis of DNA.

따라서 돌나물 추출물이 apoptosis 기전에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 apoptosis 기전의 key enzyme으로 알려진 caspase 3 및 caspase 6, 7, 9의 발현양을 측정된 결과는 Fig. 24와 같다. Fig. 24에서와 같이 대조구에서는 caspase가 관측되지 않은 반면, 돌나물 추출물 처리구에서는 caspase 3, 7, 9의 발현이 관찰되었다. Caspase 6은 돌나물 추출물 처리구에서도 발현되지 않았다. Caspase 이외에 apoptosis에 관련된 단백질의 발현양을 RT-PCR로 측정된 결과는 Fig. 25과 같다. Fig. 25에서와 같이, Bax 및 Bcl-2는 대조구와 돌나물 추출물 처리구에서 모두 발현된 반면, p53과 p21은 돌나물 추출물 처리구에서만 발현되었고, PARP는 대조구 및 돌나물 처리구 모두에서 관측되지 않았다.

기존에 보고된 cellular apoptosis mechanism (Fig. 26)과 돌나물 추출물 처리구에서 caspase 3, 7 및 9의 발현이 관측된 것을 고려하면 돌나물 추출물은 세포막의 특정 ligand에 결합하거나 또는 apoptosis을 유발할 수 있는 ligand, 즉 Fas ligand, Apo2/Apo3 ligand 또는 TNF-alpha receptor를 자극하는 것으로 추정되었다. 상기 ligand/receptor는 procaspase 8을 caspase 8로 전환시킨다. 활성화된 caspase 8은 apoptosis의 key enzyme인 caspase 3과 caspase 7을 각각 활성화시켜 세포질 내에서 caspase dependent apoptosis가 일어나도록 유도하게 된다. 또한 활성화된 caspase 3은 세포질 내에 존재하는 caspase 9를 활성화하여 apoptosis를 유발시킨다. 그러나 돌나물 추출물 처리구에서 caspase 6의 발현은 관측되지 않았으므로 돌나물 추출물은 caspase substrate의 cleavage를 거쳐 apoptosis를 유도하지는 않는 것으로 사료되었다. 돌나물 추출물 처리구에서 PARP는 발현되지 않았으므로 PARP 활성화에 의해 DNA fragmentation이 일어나지 않는 것으로 사료되었다. 돌나물 추출물 처리시 관찰되는 DNA fragmentation은 미토콘드리아 막의 Bax 및 Bcl-2의 활성화와 관련된 것으로 사료되었다. 즉, Bax 및 Bcl-2가 활성화되어 미토콘드리아 내부에 존재하는 MMP를 활성화시키고, MMP에 의해 세포질 내에서의 apoptosis를 촉진시키는 것으로 사료되었다. 또한 MMP는 세포질 내의 Endo G 또는 Aif를 핵 내로 유입시켜 이들에 의해 핵 내의 DNA fragmentation을 촉진시키는 것으로 사료되었다. MMP에 의해 DNA fragmentation이 유발되면 이들을 복구하기 위한 feedback 기전으로 핵 내의 p53 및 p21이 활성화되고 p53에 의해 세포질의 Bax 및 Bcl-2가 활성화되어 전술한 바와 같은 apoptosis가 일어난 것으로 사료되었다.

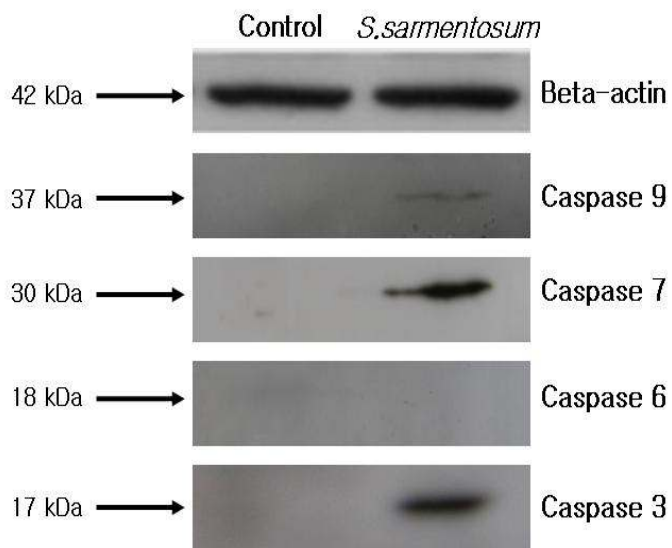


Fig. 24. Determination of caspase 3, 6, 7, and 9 expressions in *S. sarmentosum* extract treating HepG2 on 24 hrs incubation.

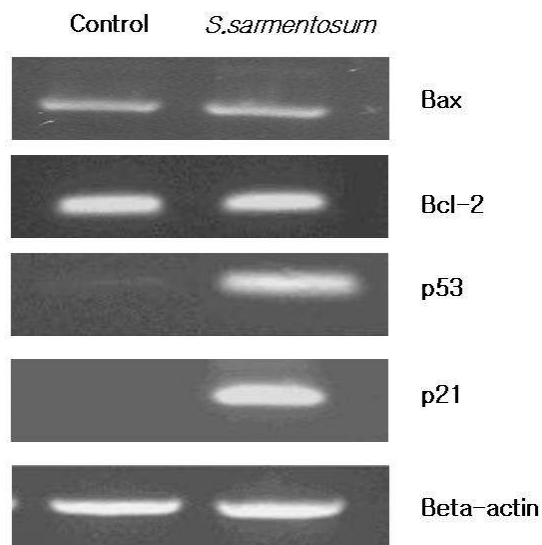


Fig. 25. Expressions of apoptosis related proteins in *S. sarmentosum* extract treating HepG2 on 24 hrs incubation.

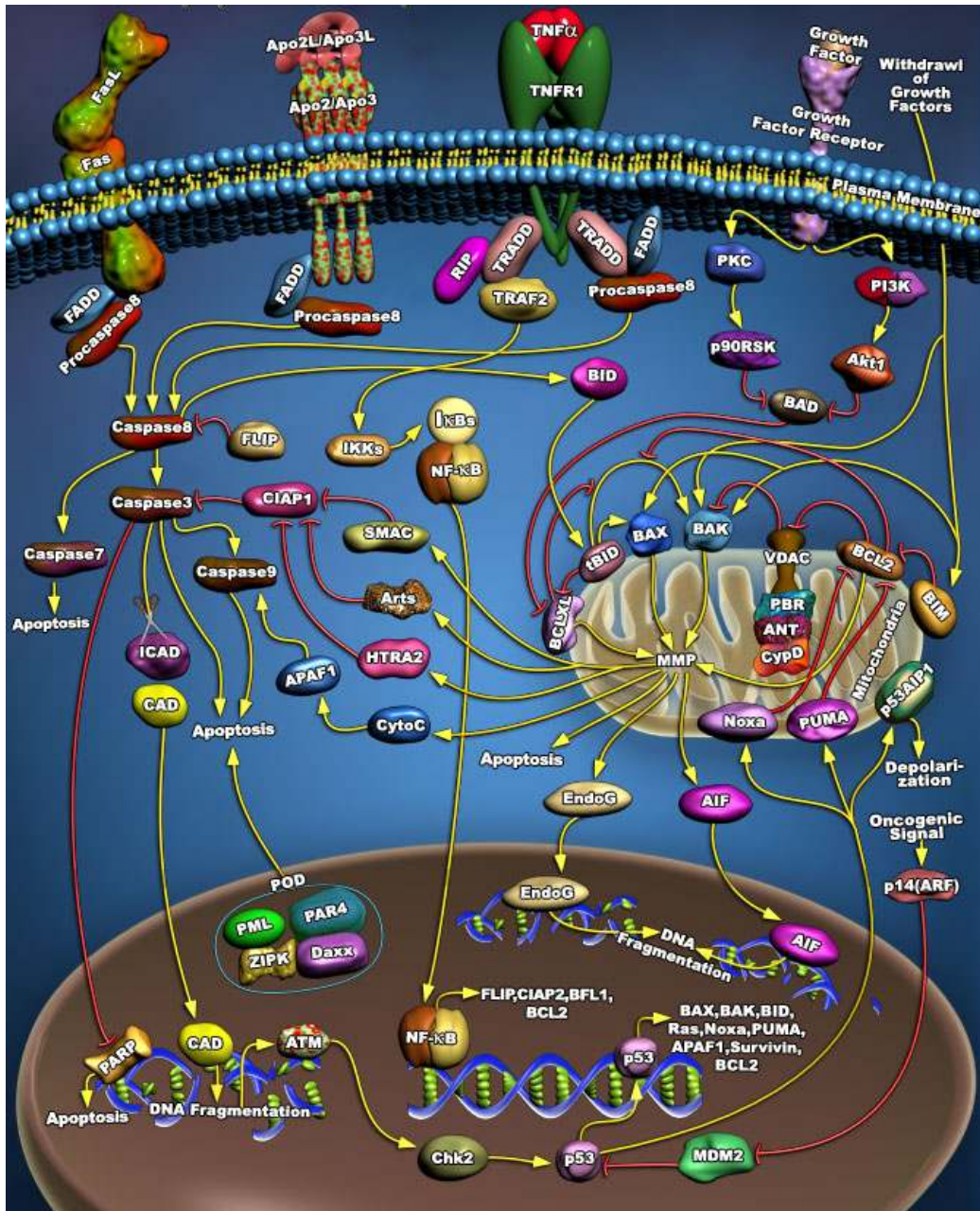


Fig. 26. Cellular apoptosis pathway.

5) 간기능개선 및 간암억제 작용이 강화된 제품의 개발

한국의 알코올 소비는 세계 최고의 수준이며, 간암이나 간경변으로 인한 사망이 한국인의 주요 사망원인이 되는 등 음주로 인한 사회경제적 및 보건학적 피해는 엄청나며 이는 증가 추세에 있다. 과도한 알코올 섭취는 신체의 거의 모든 부분에 영향을 미쳐서 간질환, 위염, 췌장염, 고혈압, 중풍, 식도염, 당뇨병 그리고 심장병 등 많은 질환을 일으키는 것으로 보고 되고 있다. 최근 보건복지부 산하 한국보건사회연구원이 실시한 국민건강 영양조사결과에 의하면, 국내 20세 이상 성인의 경우, 술 마시는 날은 1달 평균 약 8일로서, 남자는 약 11일, 여자는 약 4일 정도인 것으로 나타났고, 이 때 만취 횟수는 주 1회 이상이 약 4.7% 정도, 1개월에 1 내지 3회가 약 10.7% 정도, 3개월에 1 내지 3회가 약 13.2%인 것으로 조사된 바 있으며, 이는 국민 건강의 측면에서 상당히 우려할 만한 수준이다. 이와 같이, 현대인들은 그 정도가 지나쳐 인체 내에서 감당할 수 없을 정도로 알코올을 과량 섭취하고, 그로 인한 부작용인 갈증, 전신권태, 피로감, 기억상실, 복부팽만감, 소화 불량, 구토 설사, 비타민 결핍 등의 숙취 현상으로 고생하는 경우가 많고, 알코올 중독에 걸릴 위험성도 그만큼 증가하고 있는 실정이다. 이와 같은 숙취현상은 간세포와 체내에 축적된 알코올 (alcohol) 및 아세트알데하이드 (acetaldehyde)의 작용에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히, 아세트알데하이드는 음주 후 두통을 유발하는 대표적인 화학물질로서 WHO에서도 그 자체의 독성을 경고한 바 있다.

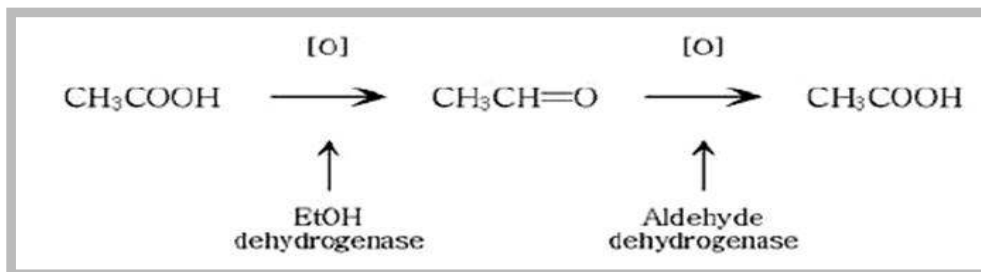


Fig. 27. Oxidative analysis of ethanol.

술의 주성분인 에탄올 (ethanol)은 신체적, 정신적으로 인체에 미치는 효과가 매우 다양하고 광범위하여 그 대사 과정과 독성 발현 특성에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 섭취된 에탄올은 소화관을 통해 흡수되어 섭취 후 20 ~120분 사이에 최고 혈중 농도에 도달한다. 흡수된 ethanol은 간을 비롯한 모든 장기들에서 대사되는데 일부 (약 10%)는 호흡을 통하여 또는 소변 및 땀으로 배설된다. 정상적인 상태에서 소량의 알코올을 섭취할 경우 간 장내로 들어온 에탄올은 세포 cytosol 내의 알코올탈수소효소 (alcohol dehydrogenase, ADH)와 알데하이드탈수소효소 (aldehyde dehydrogenase, ALDH)의 작용에 의해 아세테이트 (acetate)로 전환되고, 이는 순환계를 통해 간세포 밖으로 배설되어진다(Fig. 27). 이중 특히 에탄올의 최초 대사산물인 아세트알데하이드는 에탄올에 비해 반응성이 매우 높고 독성이 강하여 알코올성 간 장애의 주원인 물질로 밝혀진 바 있다. 아세트알데하이드는 세포 내 에너지 생성기관인 미토콘드리아의 호흡을 방해하고 산화적 인산화반응을 억제하며, 막단백질 및 콜라겐 단백질과도 결합하여 항체를 생성하기도 하고, 면역학적으로 세포독성을 나타내며 간세포 분비 단백질의 방출기구를 저해하는 것으로 밝혀진 바 있다. 또한, 아세트알데하이드는 미오피브로블라스트 (myofibroblast)의 콜라겐 합성을 촉진하여 간 섬유화와 간세포의 변성 증대를 일으키며, 생체내 거대분자와 반응하여 어덕트 (adduct)를 형성하기도 한다. 또한, 인체로 섭취된 알코올에 의해서 간 내에 중성지방이 축적되기도 한다. 간에서의 중성지방 축적은 지방산 합성이 증가되기보다는 알코올에 의한 지방산 산화억제가 중성지방축적의 중요인자로 작용하는 것으로 알려져 있다. 간에서의 중성지방 축적은 간의 대사장애를 반영해 주며, 지속적인 중성지방축적은 결국 섬유조직의 증식 및 간세포의 손상을 초래하기도 한다. 이와 같은 알코올 대사의 결과, 지방산이 많이 만들어져 간에 지방이 축적되는데 이를 알코올성 지방간이라고 한다. 이 알코올성 지방간은 특히 만성 간질환으로 진행되는 경우가 많은데, 알코올성 간염의 10-15%가, 간경변증의 8-20% 정도가 알코올성 지방간과 관련 있는 것으로 보고된 바 있다. 간 내에는 아세트알데하이드 뿐만 아니라 각종 약물 및 지방대사산물과 과산화지질의 대사과정, 그리고 C-C 결합의 산화적 절단으로 생체에 극히 유해한 것으로 알려진 여러 종류의 알데하이드가 생성된다. 알데하이드를 포함한 알데히드의 산화에 관여하는 주효소인 aldehyde dehydrogenase는 간, 콩팥, 심장 및 위를 포함한 많은 장기와 조직에 널리 분포하고, cytosol, mitochondria 및 microsome에도 존재하여 폭넓은 기질 특이성을 보이며, 각종 알데하이드에 대응할 수 있는 약물대사효소의 성격을 지니고 있다. 따라서, 어떤 요인에 의하여 간 내 aldehyde dehydrogenase 활성에 변화가 오게 되면, 이는 활성 알데하이드의 해독 및 물질대사에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이 과정에서 알콜과 알데하

이드는 간세포와 뇌세포에 손상을 입히고, 구토 및 두통을 유발시키며, 심하면 오한이나 복통이 유발되며, 이러한 생리적 현상이 숙취의 원인이 되는 것이다. 그리고 alcohol dehydrogenase 등이 부족한 사람의 경우에는 간 기능에 더 많은 부담을 주고 정상적인 대사작용이 방해되어 숙취를 일으키는 현상이 더욱 심해지게 된다. 특히, ALDH는 알데하이드가 저 농도이더라도 산화를 개시하는 II형과, 아세트알데하이드가 고농도로 되지 않으면 작용을 하지 않은 I형이 있으나, 동양인은 일반적으로 II형 ALDH가 결핍 또는 부족하기 때문에 아세트알데하이드 산화가 느리고 따라서 산화되지 않은 아세트알데하이드 및 에탄올의 유독 작용에 의하여 정상적인 신진대사가 방해받아 여러 숙취 현상을 느끼게 되는 것이다.

따라서, 알코올 섭취로 인한 숙취를 제거하고 혈중 알코올 농도를 감소시킬 수 있는 제제를 개발하기 위해 생약 제제 또는 인공제제를 단독 또는 혼합하여 제조된 드링크류가 다수 개발되고 있으며, 민간에서는 북어국이나 콩나물국 등이 숙취해소에 자주 이용되고 있다. 그러나, 최근까지도 알코올 숙취를 해소시킬 수 있는 의약품은 개발되어 있지 않은 상태이며, 숙취해소용 음료가 숙취해소제로서 사용되고 있으며, 현재 국내를 중심으로 다수의 제품이 출시되고 있는 실정이다. 이외에 간장보호제가 음주 후 간장보호용으로 이용되고 있다. 본 연구에서는 전술한 바와 같이 돌나물 추출물이 에탄올 섭취로 유발되는 간 손상을 회복시키는 효과가 우수하였으므로 돌나물 즙을 이용하여 숙취해소 음료를 개발하고자 하였다.

돌나물 추출물이 ADH와 ALDH 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 즉, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도의 돌나물 추출물을 대조구와 비교하여 ADH와 ALDH 활성에 미치는 영향을 측정하였다. Fig. 28에서와 같이 methanol 및 butanol 추출물은 ADH 및 ALDH 효소활성을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났고, ethyl acetate 추출물은 ADH 활성보다 ALDH 효소활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 반면에 hexane 추출물은 ADH 및 ALDH 효소활성을 대조구보다 저하시키는 것으로 관측되었다. 따라서 알코올 분해를 촉진시키는 성분은 극성 용매에 추출되는 것으로 사료되었고, *in vivo* 실험에서는 methanol 및 butanol 추출물을 투여한 group에서의 알코올 분해 속도가 빠를 것으로 예측되었다.

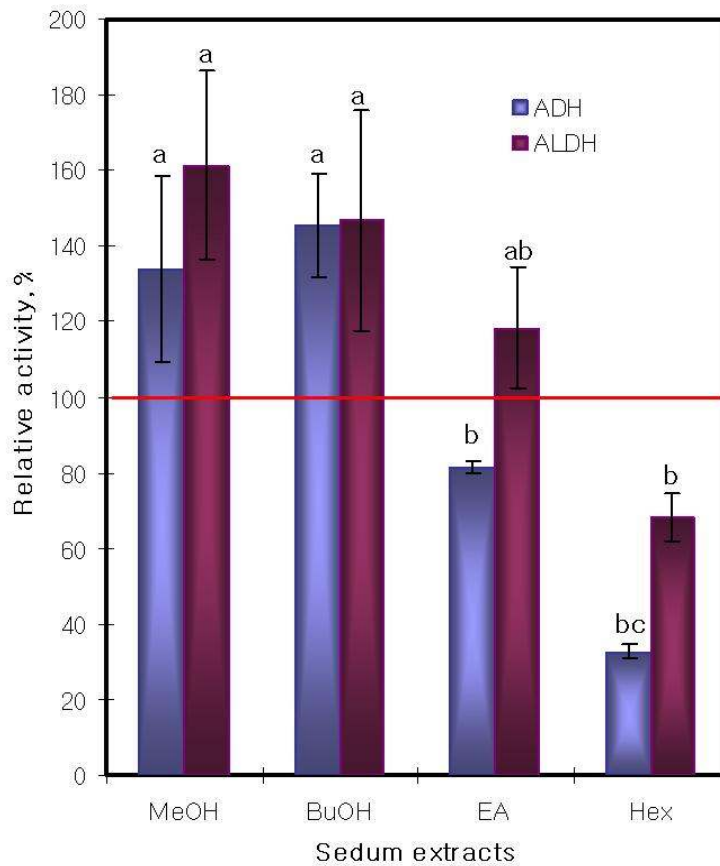


Fig. 28. Relative activities of alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) treated with *S. sarmentosum* extracts. The concentration of *S. sarmentosum* extracts were 50 µg/mL. $p = 0.001$ in ADH, $p = 0.004$ in ALDH. Post hoc test was Scheffe' test.

돌나물 추출물 중에서 극성 용매 추출물에 의한 ADH 및 ALDH 활성이 증가하였으므로 돌나물을 마쇄하여 얻은 돌나물 즙 및 각각의 돌나물 추출물과 ethanol을 백서에 경구투여한 후 경시적으로 혈액을 채취하여 혈액 내의 ethanol 농도를 측정한 결과는 Fig. 29와 같다. Ethanol 만을 투여한 대조구에서의 혈중 ethanol 농도는 ethanol 투여 후 1 시간일 때 가장 높은 농도를 나타내었고 투여 시간이 길어지면서 그 농도가 점점 감소하였다. 돌나물 즙 (SJ) 투여구에서의 혈중 알콜 농도는 전 실험기간 동안 대조구보다 유의적으로 낮았으며, 특히 알콜 투여 후 2 시간이 지났을 때에는 대조구보다 약 2.3배 정도 낮은 혈중 ethanol 농도를 나타내어

돌나물의 ethanol을 분해하는 효과가 용매 추출물보다 우수한 것으로 사료되었다. ADH 활성을 증가시키는 methanol 추출물은 알콜 투여 후 2시간이 지났을 때 그 효과가 최대로 나타나는 것으로 사료되었고, butanol 추출물은 알콜 투여 후 3시간 경과시 혈중 ethanol 농도를 감소시키는 효과가 우수하였다. Hexane 및 ethyl acetate 추출물의 투여구에서도 대조구보다 유의적으로 낮은 혈중 ethanol 농도를 나타내었으나 돌나물 즙 투여구 또는 극성 용매 추출물 투여구보다 그 효과가 높지 않았다. 따라서 혈중 ethanol을 분해하는 효과는 돌나물 즙 > 극성 용매 추출물 > 비극성 용매 추출물 순으로 감소하는 것으로 사료되었다.

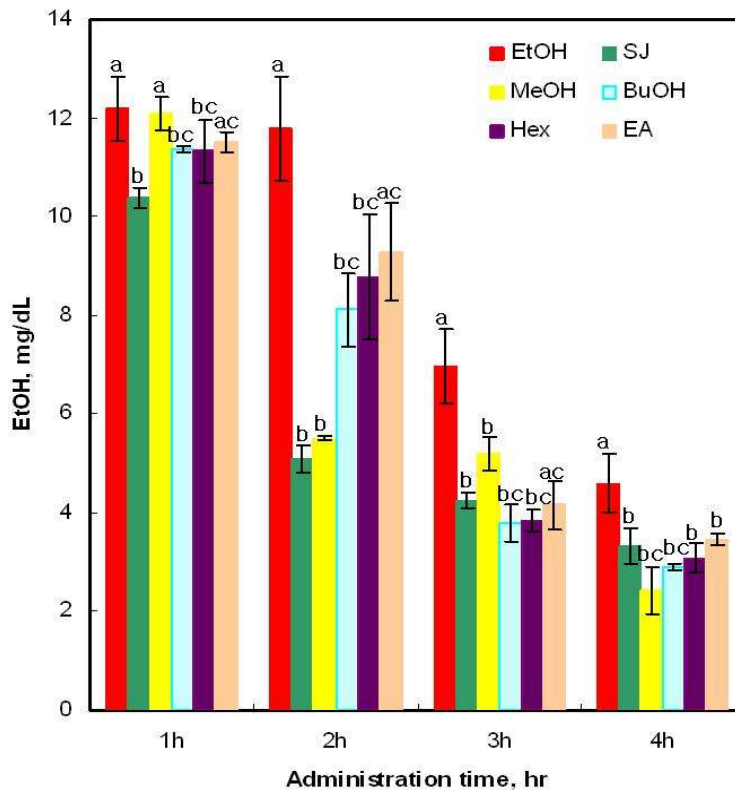


Fig. 29. The concentration of blood ethanol from rats treated with *S. sarmentosum* extracts. The concentration of *S.* extracts were 1.5 mg/mL. EtOH; ethanol treating group, SJ; S.juice, MeOH; methanol extract, BuOH; butanol extract, EA; ethyl acetate extract, Hex; hexane extract. $p = 0.002$ at 1 hr, $p = 0.001$ at 2, 3, and 4 hrs, respectively. Post hoc test was LSD test.

돌나물 추출물과 ethanol을 경구투여한 후 혈중 acetaldehyde 농도를 경시적으로 측정한 결과는 Fig. 30과 같다. 대조구에서는 ethanol 투여 후 2시간에 경과되었을 때 혈중 acetaldehyde 농도가 최대치를 나타내었고, 그 후에는 점차 감소되는 경향을 나타내었으나 실험 종료시까지 상당히 높은 acetaldehyde 농도를 유지하였다. 반면에 돌나물 추출물 투여구에서는 ethanol 투여 후 1시간 경과시에도 혈중 acetaldehyde의 농도가 대조구의 약 50% 정도만을 나타냈으며 실험시간이 경과하면서 혈중의 acetaldehyde 농도는 빠르게 감소하였다. 특히 돌나물 즙 투여구에서는 ethanol 투여 4시간 경과 후에는 혈중 acetaldehyde가 거의 남아 있지 않은 것으로 관측되었다.

따라서 돌나물 추출물은 ethanol을 acetaldehyde로 분해시키는 ADH 활성을 증가시켜 혈중 ethanol을 빠르게 분해시킬 수 있을 뿐만 아니라, ethanol에서 전환되는 독성물질인 acetaldehyde를 빠르게 분해시키는 것으로 사료되었다. 따라서 돌나물 추출물과 알코올을 동시에 섭취할 경우, 혈중 알코올 농도 및 acetaldehyde의 농도가 감소될 것으로 사료되었다. 전술한 바와 같이 acetaldehyde는 알코올 섭취 후에 나타나는 숙취 현상의 원인 물질이다. 돌나물 추출물을 섭취함으로써 acetaldehyde가 빠르게 분해되기 때문에 알코올 섭취에 따른 숙취 현상도 감소할 것으로 사료되었다.

백서를 대상으로 한 실험 결과를 기준으로 하여 사람을 대상으로 한 숙취 해소 실험을 시행하였다. 즉, 20대 남자 10명, 여자 5명을 대상으로 돌나물 즙 섭취 전과 후의 혈중 ethanol 및 acetaldehyde 농도의 변화를 측정하였다. Fig. 31에서와 같이, 돌나물 즙을 섭취 전의 혈중 ethanol 및 acetaldehyde 농도의 변화 경향은 동물 실험 결과와 유사하였다. 즉, 알코올 섭취 후 1시간 경과 후에 가장 높은 혈중 ethanol 농도를 나타내었고 이후 실험시간이 경과하면서 혈중 ethanol 농도는 점차 감소하였다. 혈중 acetaldehyde 농도도 혈중 acetaldehyde 농도의 변화 경향과 유사하였다. 돌나물 즙을 알코올을 마시기 전에 섭취한 실험에서는 알코올만을 섭취했을 때보다 전 시간대에서 유의적으로 낮았다. 따라서 알코올 섭취 전에 돌나물 (즙/ 추출물)의 섭취는 알코올 섭취로 인한 혈중 ethanol 및 acetaldehyde의 농도를 유의적으로 감소시키는 것으로 입증하였다.

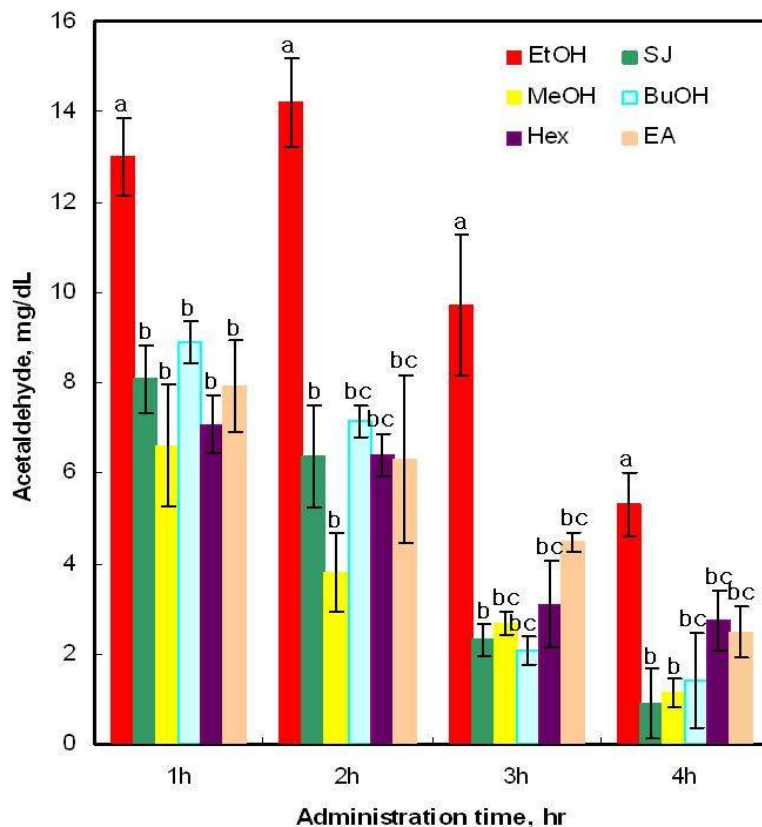


Fig. 30. The concentration of blood acetaldehyde from rats treated with *S. sarmentosum* extracts. The concentration of S.extract were 1.5 mg/mL. EtOH; ethanol treating group, SJ; S.juice, MeOH; methanol extract, BuOH; butanol extract, EA; ethyl acetate extract, Hex; hexane extract. $p = 0.006$ at 1 hr, $p = 0.001$ at 2, 3, and 4 hrs, respectively. Post hoc test was LSD test.

Table 6. Variables and experimental design levels.

Independent variables	Design variables	Range and levels				
		-2	-1	0	+1	+2
S.(g/dL)	A	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5
Red gin (mg/L)	B	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Rice (mg/L)	C	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Angelica (mg/dL)	D	1.05	1.15	1.25	1.35	1.45
Green citrus (mg/L)	E	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4

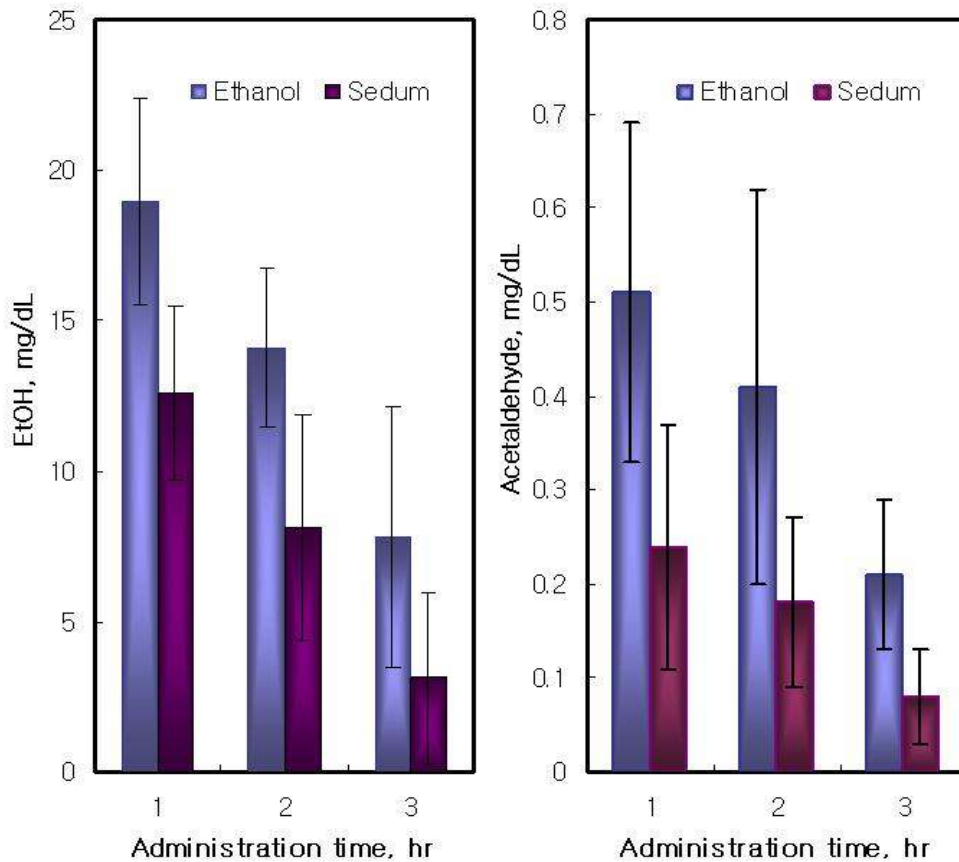


Fig. 31. Changes of blood ethanol and acetaldehyde concentrations in ethanol with/ without *S. sarmentosum* juice administered human. Significant differences were detected in ethanol determination, $p = 0.001$ at 1 hr, $p = 0.001$ at 2 hrs, and $p = 0.004$ at 3 hrs. Significant differences were detected in acetaldehyde determination, $p = 0.001$ at 1 hr, $p = 0.001$ at 2 hrs, and $p = 0.002$ at 3 hrs. Paired t -test was performed.

이상의 결과를 기준으로 하여 돌나물 추출물이 첨가된 숙취해소 음료를 개발하였다. Tables 6~7에서와 같이 돌나물 추출물을 기본으로 하여 숙취 해소 효과가 있는 것으로 알려진 청피, 홍삼박, 당귀 및 상황쌀을 첨가하여 32개의 숙취해소 음료를 제조한 후 9명의 panel을 대상으로 하여 관능검사를 2회 실시하였다 (Table 7).

Table 7. Rotatable central composite design and results of the optimization for making hepatoprotective drink.

std order	A	B	C	D	E	Data 1	Data 2
1	-1*	-1	-1	-1	1	3.5	3.25
2	1	-1	-1	-1	-1	3.64	3.14
3	-1	1	-1	-1	-1	3.8	3.31
4	1	1	-1	-1	1	3.88	3.85
5	-1	-1	1	-1	-1	3.73	3.56
6	1	-1	1	-1	1	4.15	2.74
7	-1	1	1	-1	1	3.58	2.97
8	1	1	1	-1	-1	3.51	3.25
9	-1	-1	-1	1	-1	3.89	3.63
10	1	-1	-1	1	1	4.06	3.1
11	-1	1	-1	1	1	3.84	3.03
12	1	1	-1	1	-1	3.8	3.17
13	-1	-1	1	1	1	3.74	3.46
14	1	-1	1	1	-1	3.51	3.27
15	-1	1	1	1	-1	4.2	3.5
16	1	1	1	1	1	3.51	3.24
17	-2	0	0	0	0	3.38	3.39
18	2	0	0	0	0	3.51	3.03
19	0	-2	0	0	0	3.8	3.29
20	0	2	0	0	0	3.5	3.54
21	0	0	-2	0	0	3.51	3.17
22	0	0	2	0	0	3.75	2.93
23	0	0	0	-2	0	3.73	3.6
24	0	0	0	2	0	3.49	3.32
25	0	0	0	0	-2	3.58	3.75
26	0	0	0	0	2	3.89	3.79
27	0	0	0	0	0	3.89	2.9
28	0	0	0	0	0	3.96	3.04
29	0	0	0	0	0	3.38	3.71
30	0	0	0	0	0	4.04	3.31
31	0	0	0	0	0	3.54	3.75
32	0	0	0	0	0	3.84	3.33

A; *S. sarmentosum*, B; red gin, C; rice, D; *Dangui* (*Angelica gigas*), E; *Chengpi* (*Citrus unshi*). *: coded value. Data 1/2; mean from 2 times sensory tests.

Table 7의 결과를 design expert program으로 분석하여 모델 적합성을 검증한 결과, 모델에 대한 ANOVA 값은 $p = 0.038$ 로 유의적인 결과를 얻었고, Fig. 32와 같은 contour map을 얻을 수 있었다. Fig. 32의 contour map을 충족시키는 10개의 solution을 구할 수 있었다 (Table 8). Table 8의 solution으로 음료를 제조하여 관능검사를 실시한 결과 관능검사 치가 우수한 5개의 solution을 선정하였고, 이들 5개의 solution에 대하여 쓴맛, 향기, 전체적인 맛을 측정하게 하였다(Fig. 33). 가장 관능검사 치가 높은 것을 이용하여 음료를 제조하였고 (Fig. 34), 이에 대한 특허를 출원 중이다.

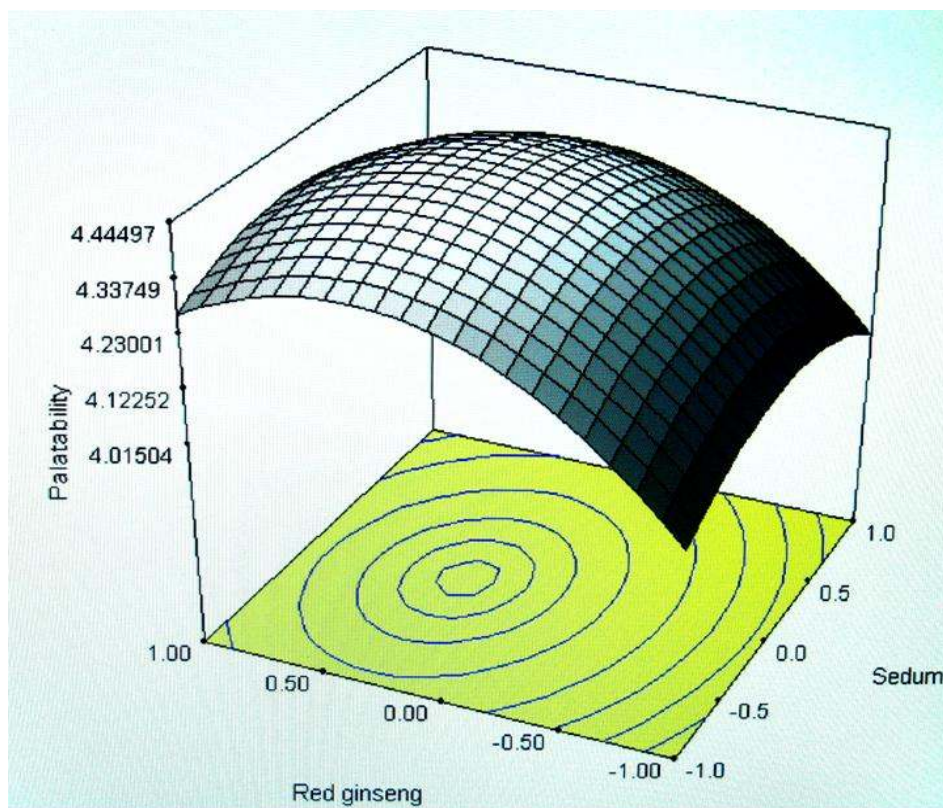


Fig. 32. Acquired contour map from the optimization experiment of making hepatoprotective drink using *S. sarmentosum* extract. $p = 0.038$.

Table 8. Acquired solutions from the optimization experiment of making hepatoprotective drink.

Solutions Number	A*	B*	C*	D*	E*	Desirability
1	<u>0.83</u>	<u>-0.41</u>	<u>-0.26</u>	<u>-0.40</u>	<u>-0.71</u>	<u>1.000</u>
2	<u>0.73</u>	<u>0.90</u>	<u>-0.02</u>	<u>-0.09</u>	<u>-0.24</u>	<u>1.000</u>
3	<u>0.89</u>	<u>-0.36</u>	<u>-0.62</u>	<u>-0.18</u>	<u>-0.49</u>	<u>1.000</u>
4	<u>0.55</u>	<u>0.77</u>	<u>0.05</u>	<u>-0.49</u>	<u>0.97</u>	<u>1.000</u>
5	<u>0.76</u>	<u>0.87</u>	<u>-0.99</u>	<u>-0.59</u>	<u>0.11</u>	<u>1.000</u>
6	<u>0.13</u>	<u>-0.74</u>	<u>0.69</u>	<u>-0.22</u>	<u>-0.24</u>	<u>1.000</u>
7	<u>1.00</u>	<u>0.03</u>	<u>0.82</u>	<u>-0.59</u>	<u>-0.24</u>	<u>1.000</u>
8	<u>0.36</u>	<u>0.76</u>	<u>0.67</u>	<u>-0.53</u>	<u>0.85</u>	<u>1.000</u>
9	<u>0.16</u>	<u>0.42</u>	<u>0.58</u>	<u>-0.20</u>	<u>0.38</u>	<u>1.000</u>
10	<u>0.97</u>	<u>0.05</u>	<u>-0.23</u>	<u>0.23</u>	<u>-0.67</u>	<u>1.000</u>

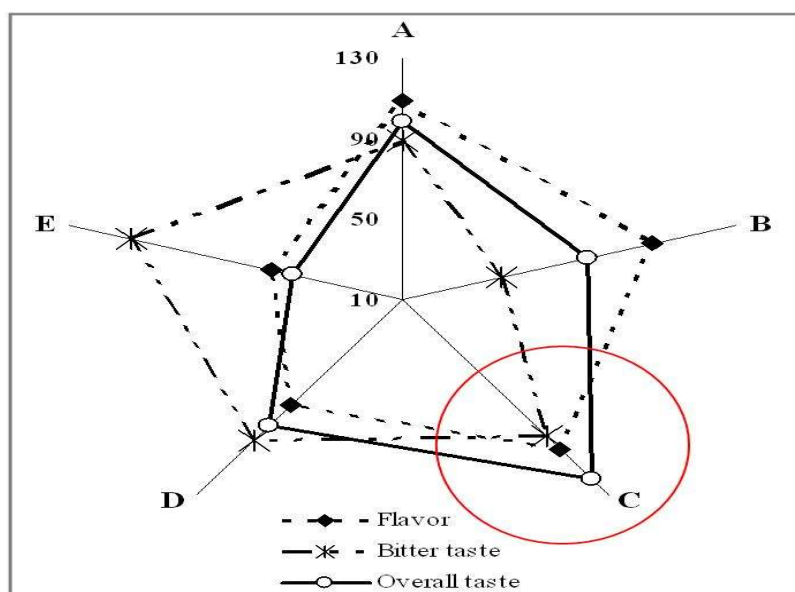


Fig. 33. Sensory test of acquired solutions from the optimization test.



Fig. 34. Pilot product for the prevention of hangover using *S. sarmentosum* extract.

나. 들나물의 항산화 및 면역활성물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발

1) 항산화 및 면역활성물질의 분리 및 동정

들나물 추출물 subfraction의 DPPH radical scavenging 효과를 측정한 결과는 Fig. 35와 같다. Fig. 35에서와 같이 ethyl acetate 추출물의 subfraction E4의 항산화활성이 가장 우수하였다. subfraction E4로부터의 순수물질 분리는 전술한 바와 같이 진행하였으며, 항산화 활성이 가장 높은 물질은 quercetin으로 확인되었다.

또한 들나물 추출물 subfraction의 면역활성 효과를 측정한 결과는 Fig. 36과 같다. Fig. 36에서와 같이 ethyl acetate 추출물 subfraction 5의 면역활성이 가장 우수하였다. 따라서 subfraction E5로부터 면역활성이 높은 물질을 순수분리 동정하였다. Fig. 37에서와 같이 subfraction E5는 TLC plate 상에서 자외선 254 nm 파장 하에서 청색으로 관측되며, FeCl_3 를 분무했을 때 양성 반응으로 나타내며 10% H_2SO_4 를 분무하고 가열시 진한 갈색으로 발색되었다.

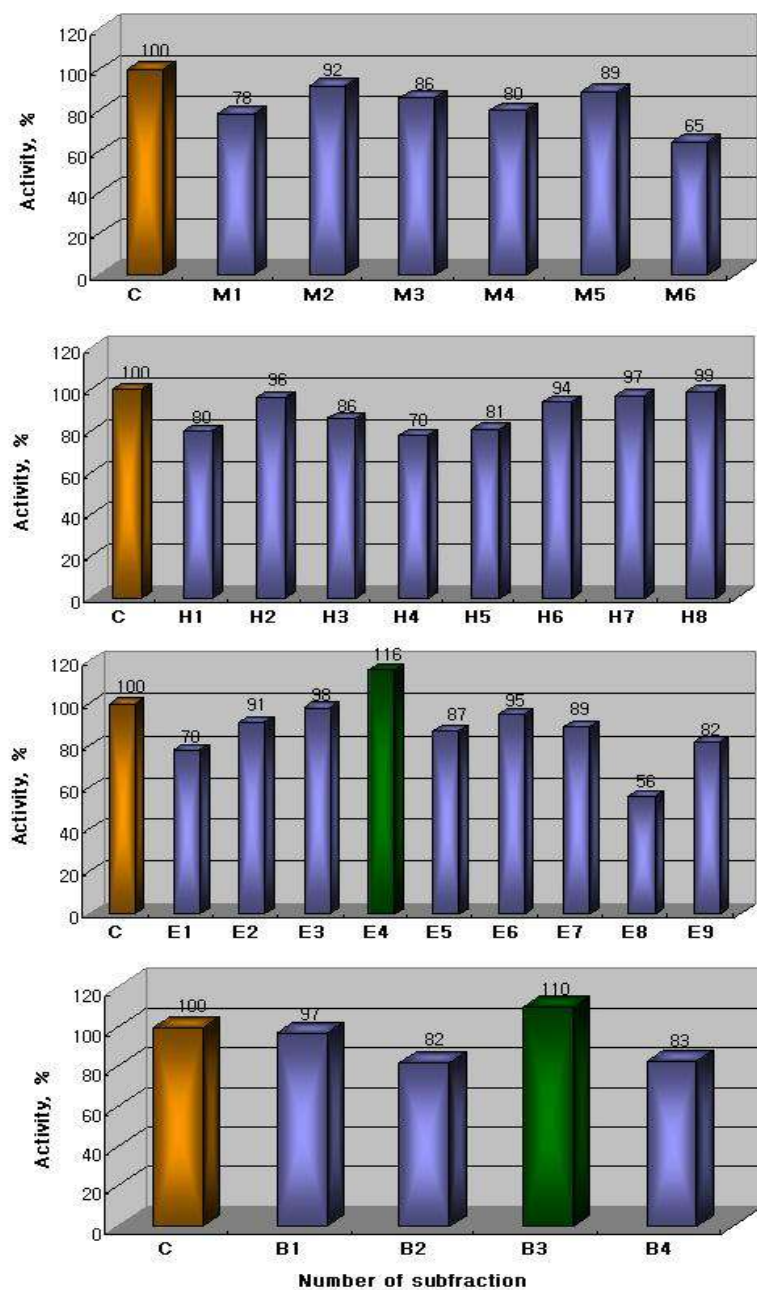


Fig. 35. Antioxidative activities of subfractions from *S. sarmentosum* extracts using DPPH assay. Control; ascorbic acid, A; methanol extract, B; hexane extract, C; ethyl acetate extract, D; butanol extract.

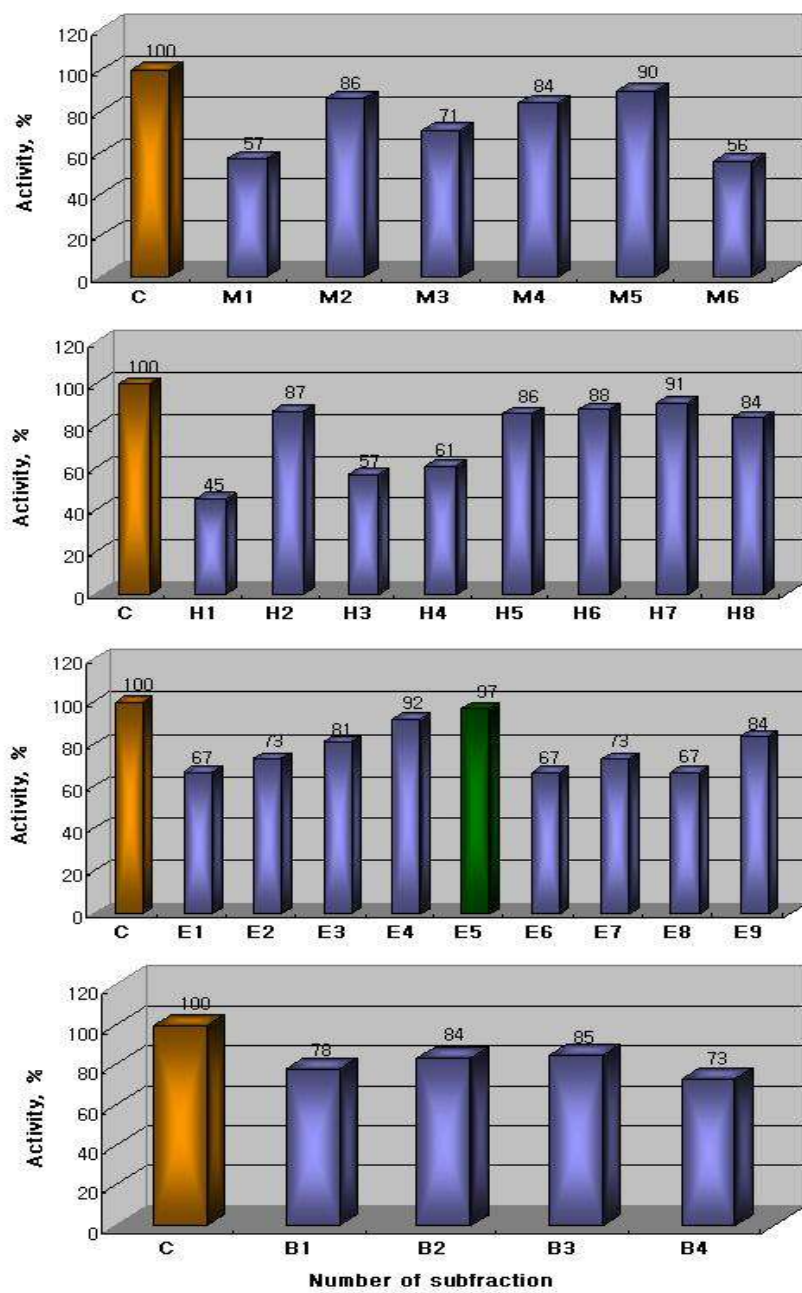


Fig. 36. Nitric oxide synthase activities in LPS stimulated RAW264.7 cell. Control; L-NMMA, A; methanol extract, B; hexane extract, C; ethyl acetate extract, D; butanol extract.

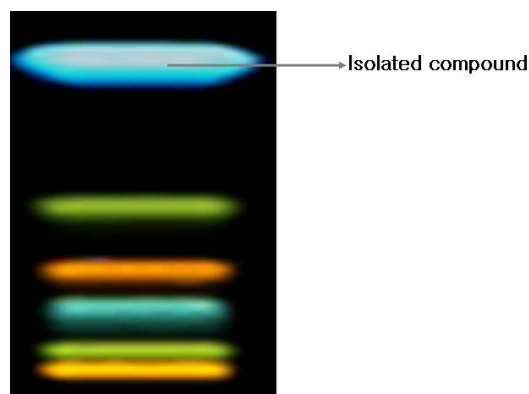


Fig. 37. Thin layer chromatogram of subfraction E5 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract.

FT-IR spectrum에서 3330 cm^{-1} (OH), 1671 , 1526 (aromatic carbon, double band) 등의 흡수대를 나타내어 방향족 화합물인 것으로 사료되었다 (Fig. 38). Fig. 39에서와 같이 본 화합물은 분자량 178인 것으로 확인되었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ 6.96 (^1H , s), 6.73 (^1H , s)에서 각각 singlet으로 나타나 H-8과 H-5의 수소가 meta coupling하고 있음을 확인하였고, δ 7.83 (^1H , d)과 6.10 (^1H , d)의 signal은 cis 형태의 alkene 수소로서 coumarin 계로 추정되었다 (Fig. 40). 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 library의 data 비교하여 각각의 signal이 일치하였으므로 본 화합물은 esculetin인 것으로 최종 동정하였다 (Figs. 41~42).

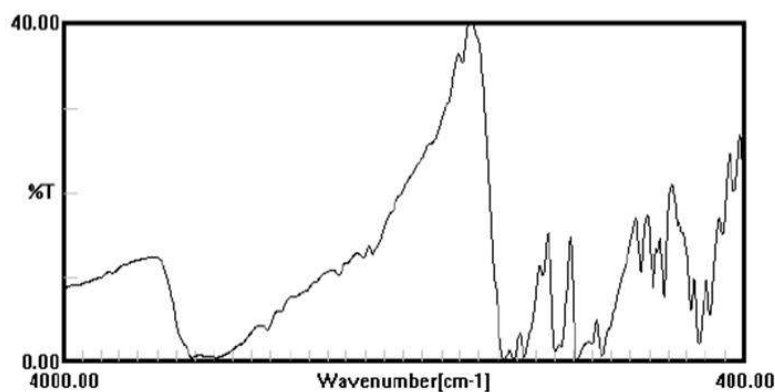


Fig. 38. IR spectrum of subfraction E5 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract.

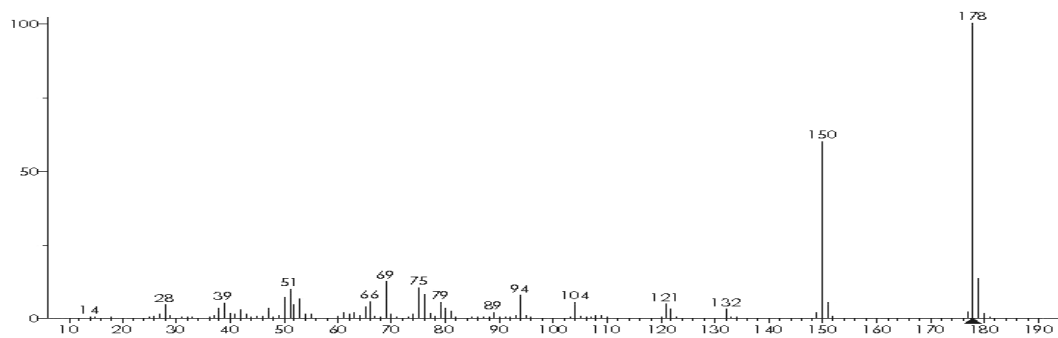


Fig. 39. GC-MS spectrum of subfraction E5 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract.

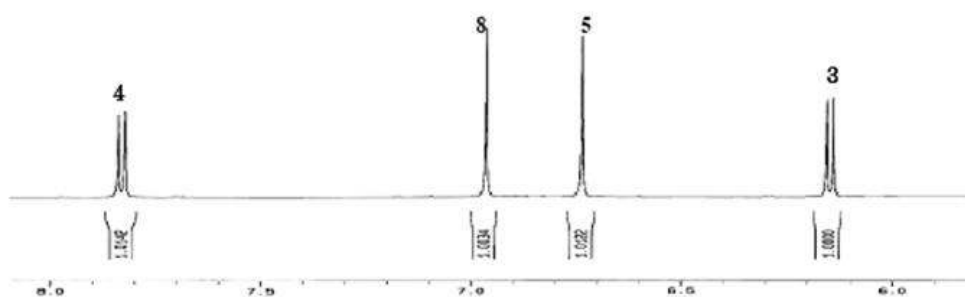


Fig. 40. ^1H -NMR spectrum of subfraction E5 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract.

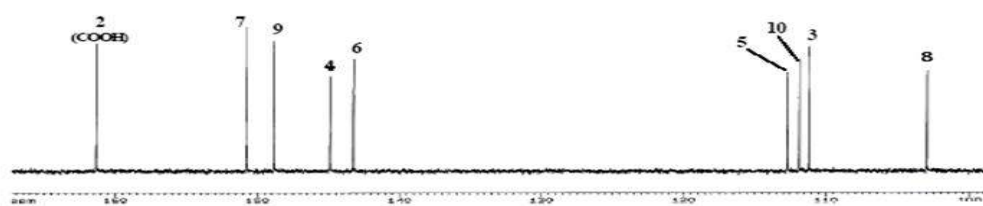


Fig. 41. ^{13}C -NMR spectrum of subfraction E5 from *S. sarmentosum* ethyl acetate extract.

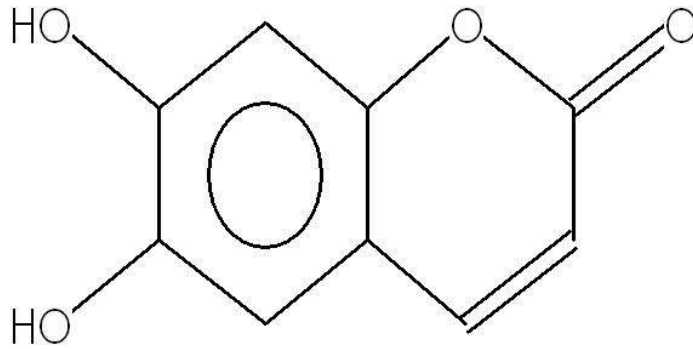


Fig. 42. Structure of esculetin.

2) 돌나물 및 돌나물추출물이 백서에서의 항산화관련 효소활성에 미치는 영향

백서에 돌나물 추출물을 4주간 섭취시킨 후 희생하여 간조직 및 혈액을 채취하여 Figs. 43~48과 같이 항산화능을 평가할 수 있는 것으로 알려진 효소활성도 등을 측정하였다. 이들 그림에서와 같이 항산화능을 평가하는 지표에 따라 돌나물 추출물의 항산화능도 다르게 나타남을 알 수 있다.

그러나 전반적으로 돌나물 추출물 투여구에서 높은 항산화능을 보이고 있으며, 양성대조구인 tocopherol 또는 ascorbic acid와 유사하거나 보다 더 우수한 항산화능을 나타내었다.

돌나물 추출물에 함유된 polyphenol 함량을 측정한 결과는 Fig. 48과 같다. Fig. 48에서와 같이, methanol 추출물과 ethyl acetate 추출물에서 polyphenol 함량이 높게 나타났다. 이는 methanol 추출물 투여구가 전반적으로 높은 항산화능을 나타낸 것과 일치하는 결과이었다.

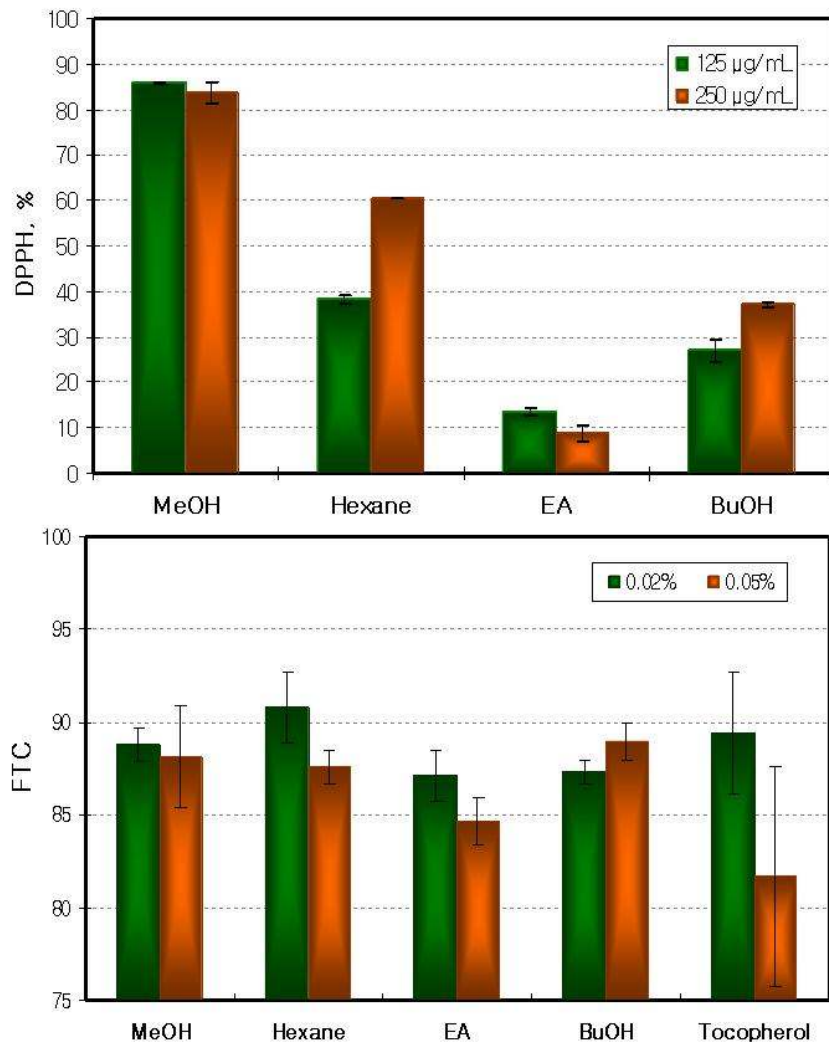


Fig. 43. Radical scavenging effects of *S. sarmentosum* solvent extract in rat. MeOH; methanol extract administered group, Hexane; hexane extract administered group, EA; ethyl acetate extract administered group, BuOH; butanol extract administered group.

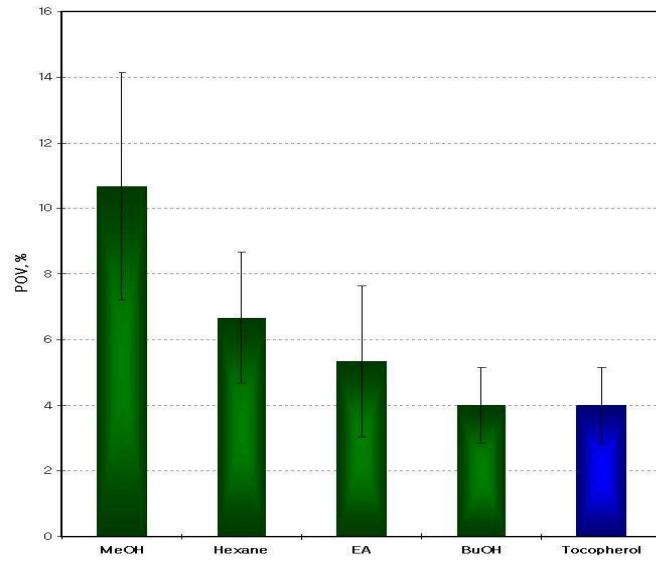


Fig. 44. Peroxide values of *S. sarmentosum* solvent extract in rat. MeOH; methanol extract administered group, Hexane; hexane extract administered group, EA; ethyl acetate extract administered group, BuOH; butanol extract administered group.

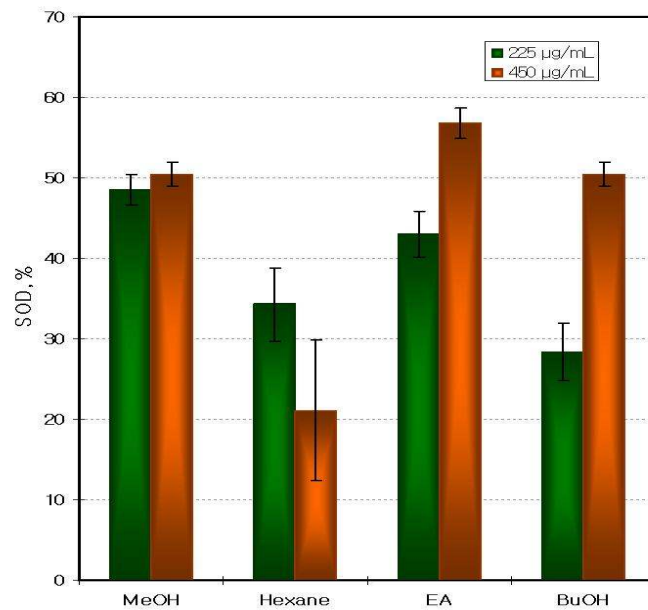


Fig. 45. Superoxide dismutase activities of *S. sarmentosum* solvent extract in rat. MeOH; methanol extract administered group, Hexane; hexane extract administered group, EA; ethyl acetate extract administered group, BuOH; butanol extract administered group.

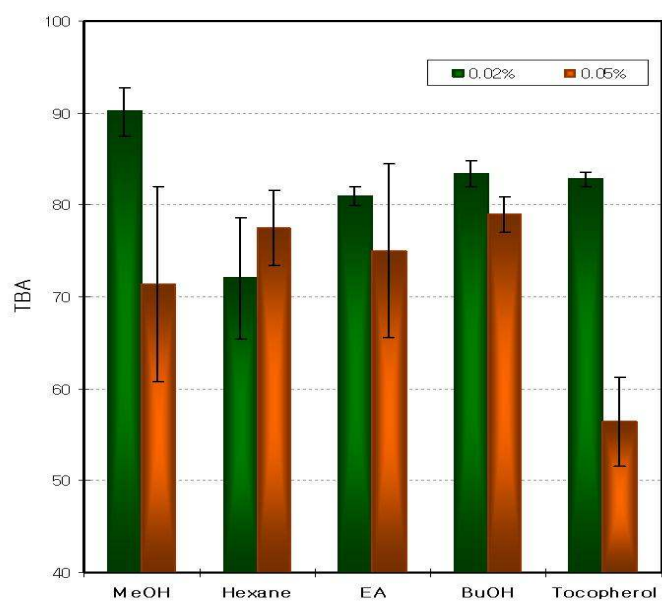


Fig. 46. Thiobarbituric acid values of *S. sarmentosum* solvent extract in rat. MeOH; methanol extract administered group, Hexane; hexane extract administered group, EA; ethyl acetate extract administered group, BuOH; butanol extract administered group.

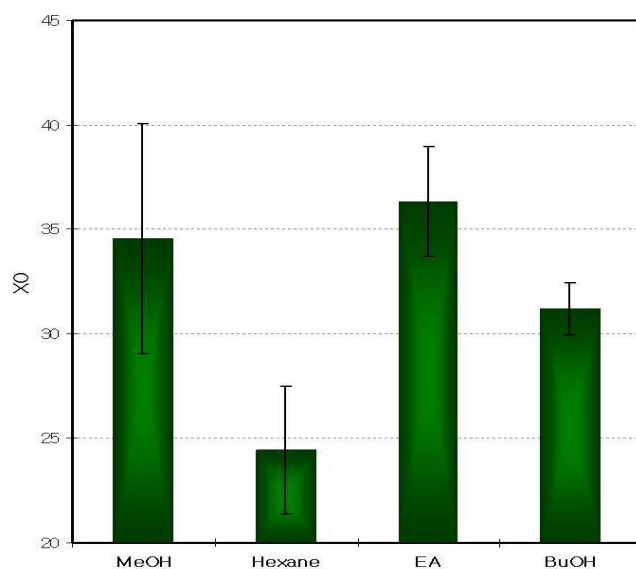


Fig. 47. Xanthin oxidase activities of *S. sarmentosum* solvent extract in rat. MeOH; methanol extract administered group, Hexane; hexane extract administered group, EA; ethyl acetate extract administered group, BuOH; butanol extract administered group.

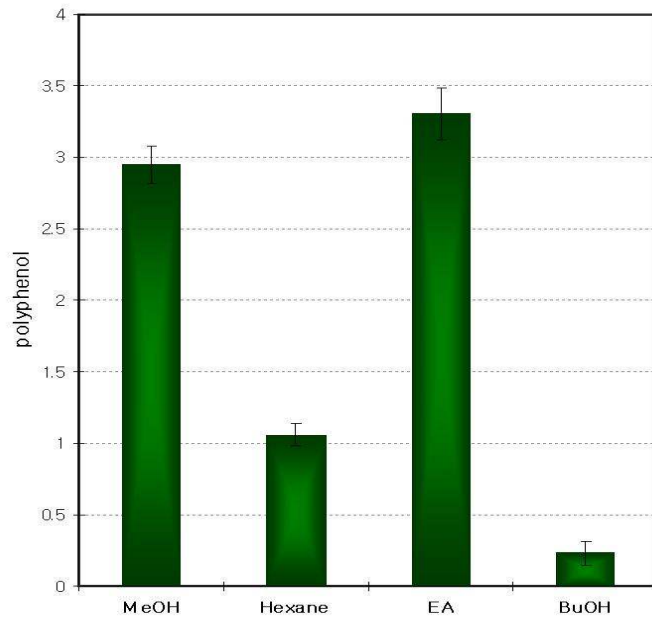


Fig. 48. Total polyphenol contents of *S. sarmentosum* solvent extract. MeOH; methanol extract, Hexane; hexane extract, EA; ethyl acetate extract, BuOH; butanol extract.

3) 돌나물 및 돌나물추출물이 면역활성에 미치는 영향

대식세포인 RAW 264.7 cell line에 돌나물의 각 용매추출분획을 첨가하고 48시간 배양하였을 때의 대식세포 생존율 (relative cell viability, %)을 측정하였다 (Fig. 49). 돌나물 추출물을 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리할 때까지 cell viability에는 변화가 없었다. 그러나 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도로 돌나물 추출물을 처리하였을 때는 농도의존적으로 cell viability가 감소하였다. Cell viability는 용매별로 차이를 나타내었으나, 에틸아세테이트 추출분획과 부탄올 추출분획 간에 유의적인 차이는 관측되지 않았다. 모든 돌나물 용매 추출분획을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때, 세포독성 (cytotoxicity)이 나타나지 않았으므로, 이후의 면역활성 시험에는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최고 농도로 하여 시험하였다.

대식세포인 RAW 264.7 cell lines에 LPS (lipopolysaccharide) 또는 돌나물 용매 추출 분획을 첨가하고 2일간 배양한 후에 생성된 nitric oxide의 양을 측정 한 결과는 Fig. 50과 같다. Fig. 50에서와 같이, 모든 용매 추출 분획 첨가구에서 nitric oxide를 생성하였다. Methanol 추출분획과 butanol 추출분획 처리구에서의 nitric

oxide의 생성량은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 반면에 hexane 추출분획 및 ethyl acetate 추출분획 처리구는 butanol 추출분획보다 약 2배 정도 많이 nitric oxide를 생산하였다.

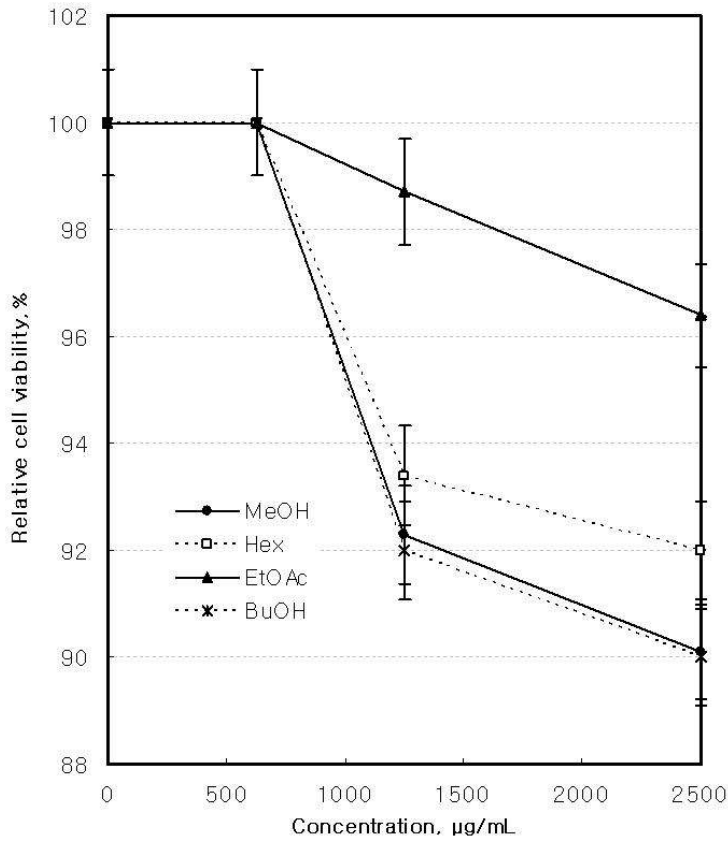


Fig. 49. Viability of RAW264.7 cells after treatment with *S. sarmentosum* solvent extracts. MTT assay was performed to determine viability of cells after treatment with each solvent extract for 48 h. Data represent the mean \pm S.D. with eight experiments. MeOH; methanol, Hex; hexane, EtOAc; ethyl acetate, BuOH; butanol.

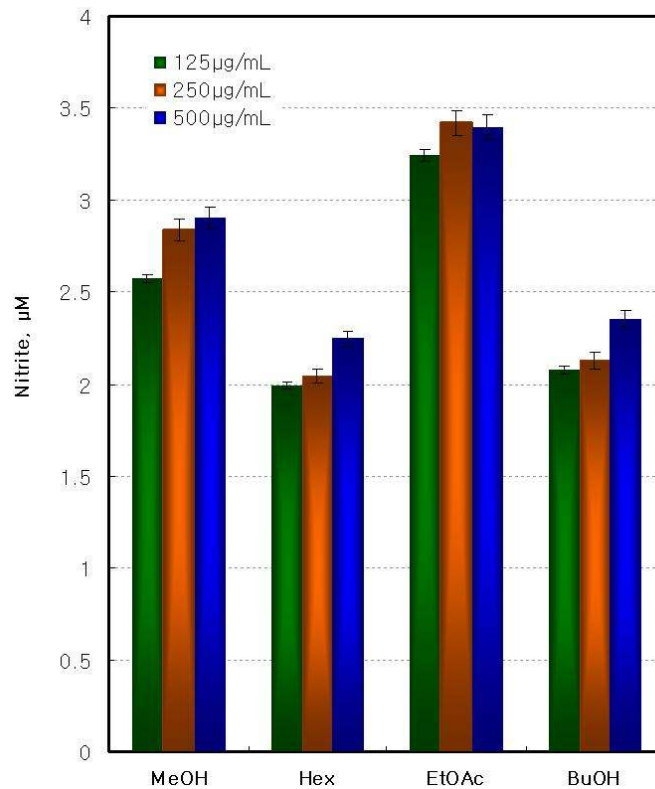


Fig. 50. Effects of *S. sarmentosum* extracts on the nitric oxide production in RAW 264.7 cell lines. Values are the mean \pm S.D. in experiments more than eight times. MeOH; methanol, Hex; hexane, EtOAc; ethyl acetate, BuOH; butanol.

LPS 농도가 0.1~0.4 $\mu\text{g/mL}$ 일 때 방출되는 nitric oxide의 양은 Figs. 51~54와 같다. LPS 농도가 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 일 때, nitric oxide의 양은 약간 증가하였다. 그러나 methanol 추출물, hexane 추출물 및 ethyl acetate 추출물에 의해 생성되는 nitric oxide의 양이 감소되었다. Butanol 추출물은 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS에 의해 유도되는 nitric oxide의 양을 감소시키지 못하였다.

다음으로 돌나물 추출물 및 LPS 처리가 RAW 264.7 세포에서의 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Western blotting을 실시하였다 (Fig. 55). Fig. 55에서와 같이, LPS 처리에 의해 발현되는 iNOS 단백질은 돌나물 추출물에 의해 그 생성양이 감소되는 것으로 확인되었다.

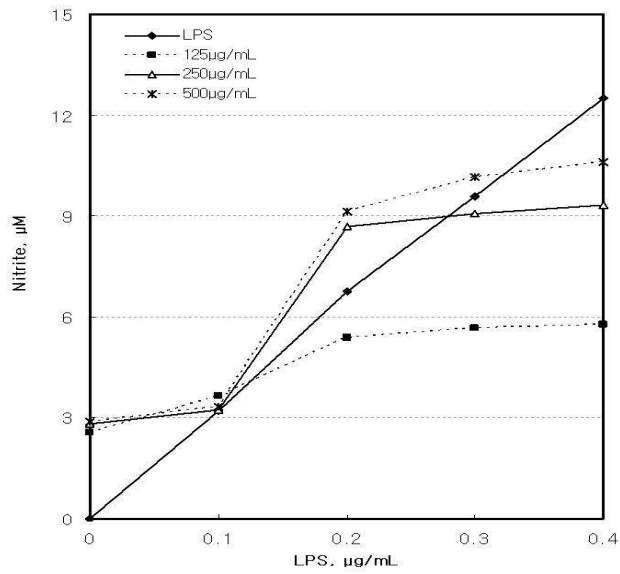


Fig. 51. Production of nitric oxide in LPS and methanol extract of *S. sarmentosum* induced RAW 264.7 cell lines. RAW264.7 cells were plated in 96-well plate at a density of 1×10^5 /mL and incubated with different concentration of LPS (lipopolysaccharide).

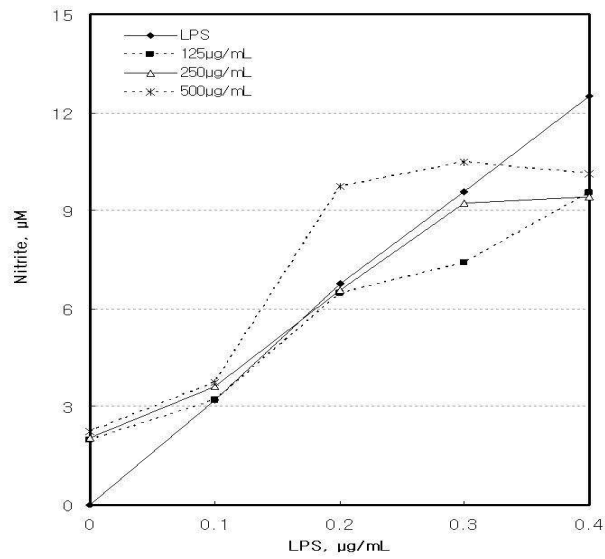


Fig. 52. Production of nitric oxide in LPS and hexane extract of *S. sarmentosum* induced RAW 264.7 cell lines. RAW264.7 cells were plated in 96-well plate at a density of 1×10^5 /mL and incubated with different concentration of LPS (lipopolysaccharide).

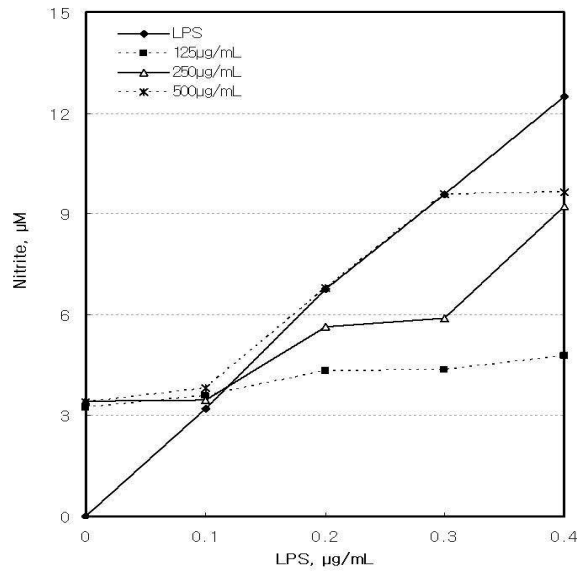


Fig. 53. Production of nitric oxide in LPS and ethyl acetate extract of *S. sarmentosum* induced RAW 264.7 cell lines. RAW264.7 cells were plated in 96-well plate at a density of 1×10^5 /mL and incubated with different concentration of LPS (lipopolysaccharide).

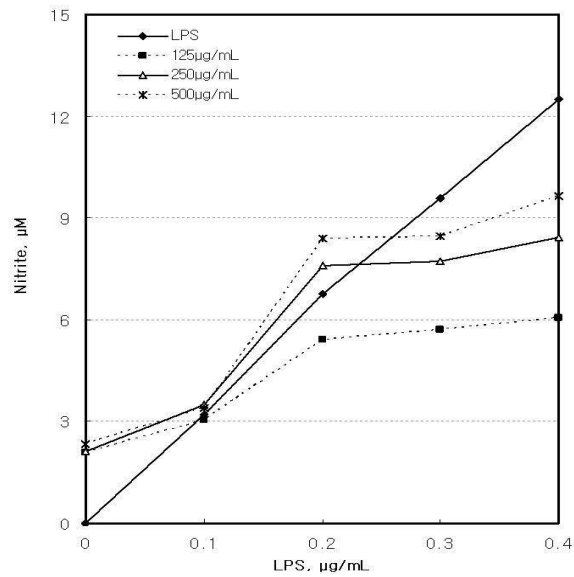


Fig. 54. Production of nitric oxide in LPS and butanol extract of *S. sarmentosum* induced RAW 264.7 cell lines. RAW264.7 cells were plated in 96-well plate at a density of 1×10^5 /mL and incubated with different concentration of LPS (lipopolysaccharide).

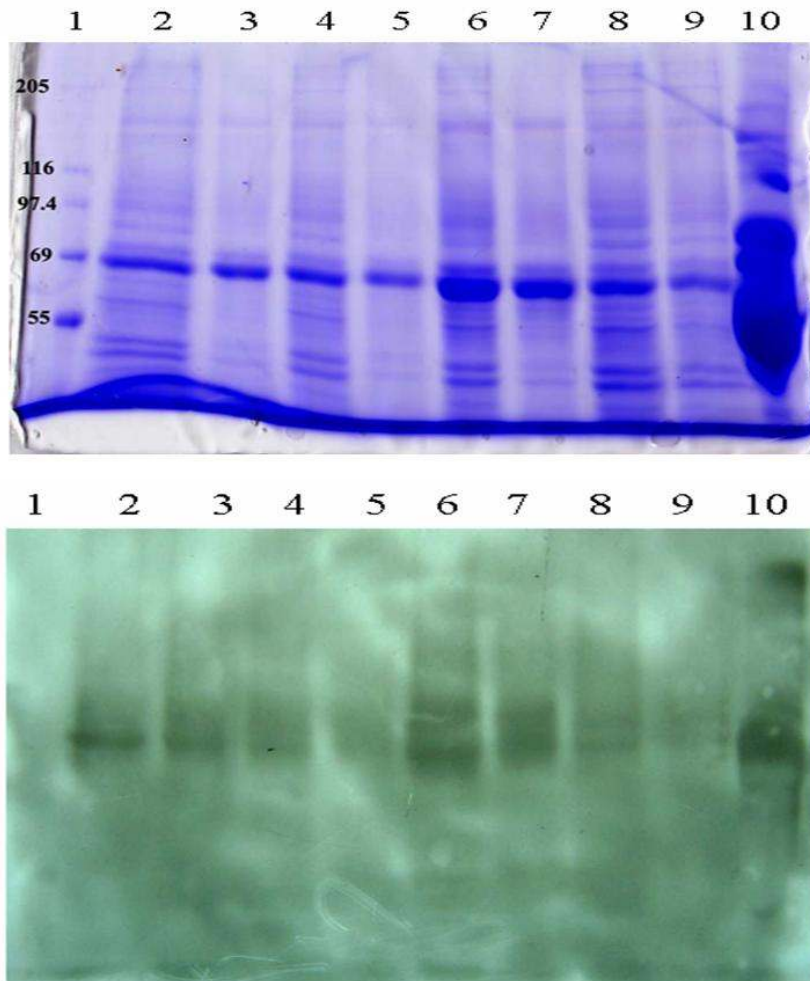


Fig. 55. Effects of *S. sarmentosum* extracts on inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 cell lines. Top; 8% SDS-PAGE gel, Bottom; Western blot analysis, 1; marker, 2; methanol extract and LPS, 3; methanol extract, 4; hexane extract and LPS, 5; hexane extract, 6; ethyl acetate extract and LPA, 7; ethyl acetate extract, 8; butanol extract and LPS, 9; butanol extract, 10; standard, LPS; lipopolysaccharide. The RAW264.7 cell lines were cultured with *S. sarmentosum* extracts, and with or without LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4) 항산화 및 면역활성 관련단백질의 탐색

돌나물 추출물이 항산화 및 면역활성과 관련된 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 Figs. 56~57과 같다. 면역활성은 대식세포주인 RAW 264.7 cell line에, 항산화활성은 백서에 고지방식을 급여하고 돌나물의 용매 추출 분획을 처리하여 단백질 변화를 측정하였다. 돌나물 용매 추출 분획을 처리하였을 때 대조구에 비해 단백질 발현양이 증가하였다. 돌나물 추출물 처리에 의해 변화된 단백질의 발현 양상 중 항산화와 관련된 것은 glutathione peroxidase, glutathione reductase의 발현이 증가되었고, 면역기능과 관련된 단백질 중에서는 COX2의 발현이 증가된 것이 관측되었다.

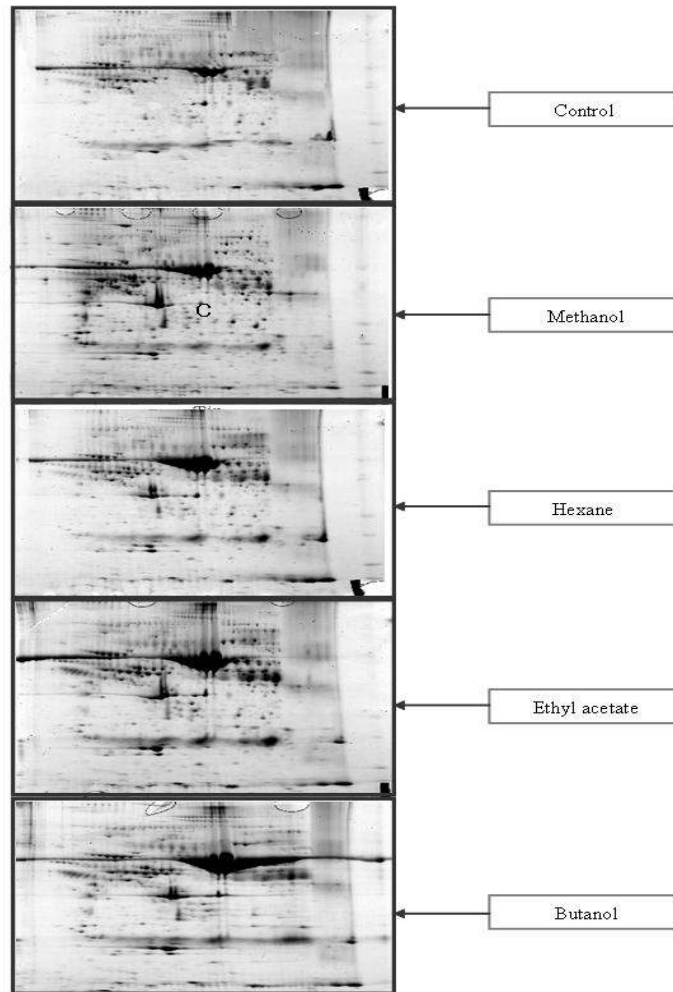


Fig. 56. Two-dimensional gel electrophoresis from *S. sarmentosum* treated RAW 264.7 cell lines using IPG strip pH 4~7.

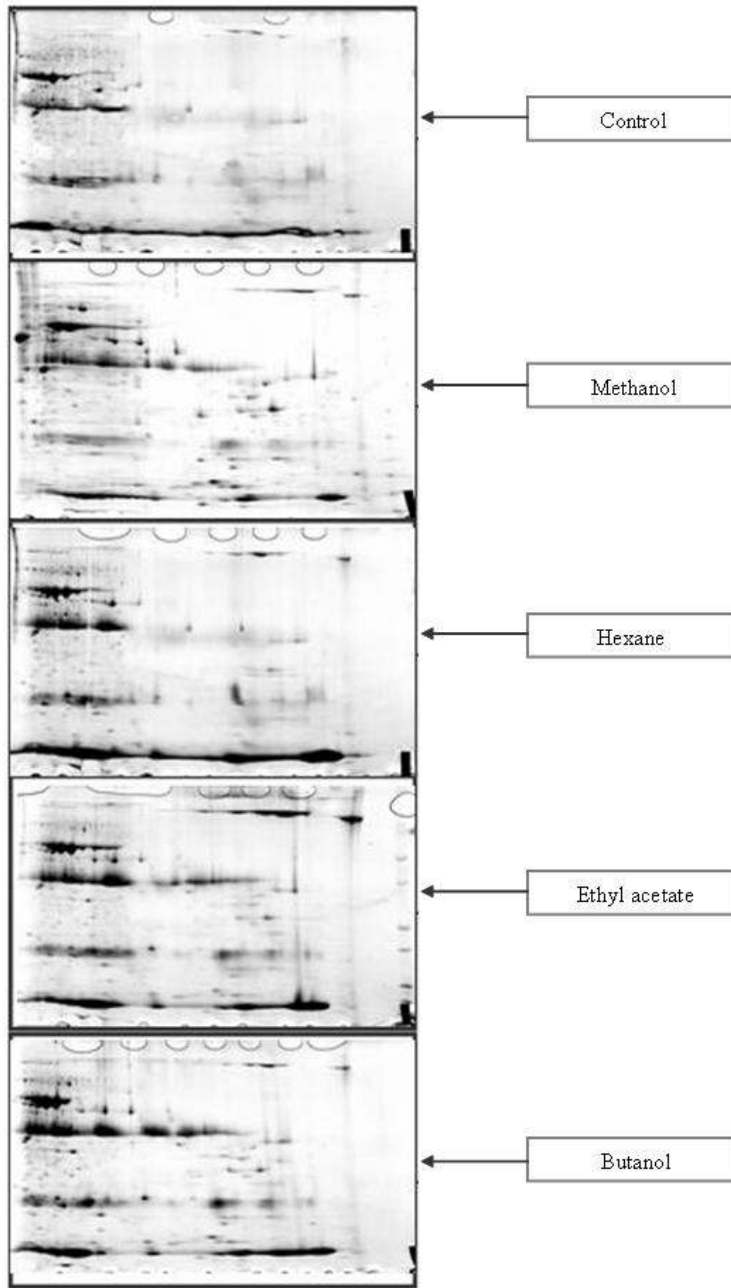


Fig. 57. Two-dimensional gel electrophoresis from *S. sarmentosum* treated RAW 264.7 cell lines using IPG strip pH 6~9.

5) 항산화 및 면역활성이 강화된 제품의 개발

전술한 바와 같이 돌나물 추출물이 항산화 및 면역활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서 돌나물 추출물이 첨가된 젤리를 제조하였다. 젤리 (jelly)는 고대부터 섭취하여 온 음식으로 과채류의 즙 (juice)에 당과 겔화제를 혼합하여 농축, 성형하여 제조한다. 경제가 발전하면서 식생활이 다양화되고 고급화됨에 따라 디저트 식품으로서의 젤리 소비가 증가하고 있으며, 이에 따라 젤리 원료에 대한 연구도 증가하고 있다. 최근에는 건강지향의 식생활이 일반화되고, 질병예방 및 건강에 도움을 주는 식품 및 식품소재에 대한 관심이 증대되면서 기능성 식품의 개발도 증가하고 있다. 또한 천연식품소재 유래의 색소 활용과 동시에 기능성분의 강화효과를 기대하는 가공식품의 개발도 이어지고 있다.

돌나물(*S. sarmentosum* Bunge)은 돌나물과에 속하며 비타민 C, 철분 및 칼슘 등의 영양성분을 많이 함유하고 있는 산채류이다. 돌나물은 골다공증에 유효하고, 간기능 개선능이 있는 것으로 보고되고 있으나, 저장성이 낮고 이를 이용한 가공 식품이 없어 부가가치가 매우 낮은 식품이다. 따라서 본 연구에서는 생식으로 한정되어 있는 돌나물의 이용률과 부가가치를 높이고 돌나물추출액을 첨가하여 천연의 색을 부여한 젤라틴 젤리를 제조하고, 그 식품영양학적 특성을 평가하였다.

대조구와 돌나물 즙을 첨가 (0.5~3%)한 젤리의 당도는 15.3~15.8 °Brix로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이는 돌나물 즙을 젤리에 첨가함으로써 젤리의 당도에 영향을 주지 않기 때문으로 사료되었다.

돌나물 젤리의 ascorbic acid 함량을 측정한 결과는 Fig. 58과 같다. Fig. 58에서와 같이, 대조구에서 관측되지 않았던 ascorbic acid는 돌나물 즙의 첨가량에 비례하여 그 농도가 증가하였다. 식품에 함유된 ascorbic acid는 제품에서의 안정성이 중요한 문제점으로 알려져 있다. 따라서 돌나물 젤리를 제조하여 4°C에서 15일간 저장하면서 ascorbic acid 함량 변화를 측정하였다 (Fig. 59). Fig. 59에서와 같이 2% 이상의 돌나물 즙을 첨가한 젤리의 ascorbic acid 함량은 저장 15일까지 초기함량의 90% 이상을 유지하였다. 그러나 돌나물 즙의 첨가량이 낮을수록 저장기간이 증가되면서 돌나물 젤리에 함유되어 있는 ascorbic acid 농도는 저장 초기에 비해 크게 감소하였다. 따라서 2% 이상의 돌나물 즙을 젤리 제조시에 첨가하는 것이 ascorbic acid 함량을 유지하는데 효과적인 것으로 사료되었다. 일반적으로 ascorbic acid가 결핍되면 잇몸 출혈 및 염증을 유발하는 것으로 알려져 있고, 또한 최근의 연구에 의하면 ascorbic acid는 콜레스테롤 저하작용, 면역증강작용 및 세포 증식 억제 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.

우리나라의 경우, 흡연자를 제외한 전 연령층에서 ascorbic acid의 섭취량은 권장량을 충족하는 것으로 조사되었으나, 성인 남성 흡연자의 경우 권장량의 약 75% 정도만을 섭취하는 것으로 보고되었다. 흡연자는 비흡연자와 동일한 양의 ascorbic acid를 섭취하여도 혈청 내 ascorbic acid 수준은 비흡연자에 비해 낮으므로, 정상 혈청 수준을 유지하기 위해서는 비흡연자보다 더 많은 양의 ascorbic acid를 섭취해야 하는 것으로 보고되고 있다. 더욱이 젊은 여성과 청소년층에서의 흡연율은 급증하고 있는 추세이며, 이들은 성장과 흡연에 따른 대사를 위해 다량의 ascorbic acid가 필요하다. 젤리는 청소년 및 젊은 여성들이 선호하는 식품 형태이며, 열량이 낮아 간식으로의 이용도가 높은 식품이다. 따라서 돌나물 젤리는 젊은층 흡연자들에게 필요한 영양소인 ascorbic acid를 공급할 수 있는 효과적인 식품으로 사료되었다.

돌나물 젤리의 적정산도를 측정한 결과는 Fig. 60과 같다. Fig. 60에서와 같이 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 적정산도는 낮아지는 것으로 나타났다. 이는 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 젤리에 함유된 ascorbic acid 양이 증가하는 것과 돌나물 즙에 포함된 유기산의 양이 증가하기 때문으로 사료되었다.

돌나물 젤리에 함유된 양이온 농도를 측정한 결과는 Fig. 61과 같다. Fig. 61에서와 같이 돌나물 즙을 첨가함으로써 칼슘은 대조구보다 4~28배까지 증가하였다. 2001년 국민건강영양조사에 의하면 영유아 및 청소년층에서의 칼슘섭취량은 권장량의 60~75% 범위로 매우 낮게 나타났으며, 여성 노인층에서는 권장량의 약 55% 정도만을 섭취하고 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 칼슘은 우리 식생활에서 섭취량이 권장량에 비해 가장 미흡한 영양소로, 칼슘의 섭취를 증가시키려는 노력들이 있어왔다. Fig. 61에서와 같이 돌나물즙의 첨가량에 비례하여 젤리에 포함된 칼슘 함량이 증가되었다. 따라서 돌나물즙 첨가 젤리는 칼슘의 섭취를 증가시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

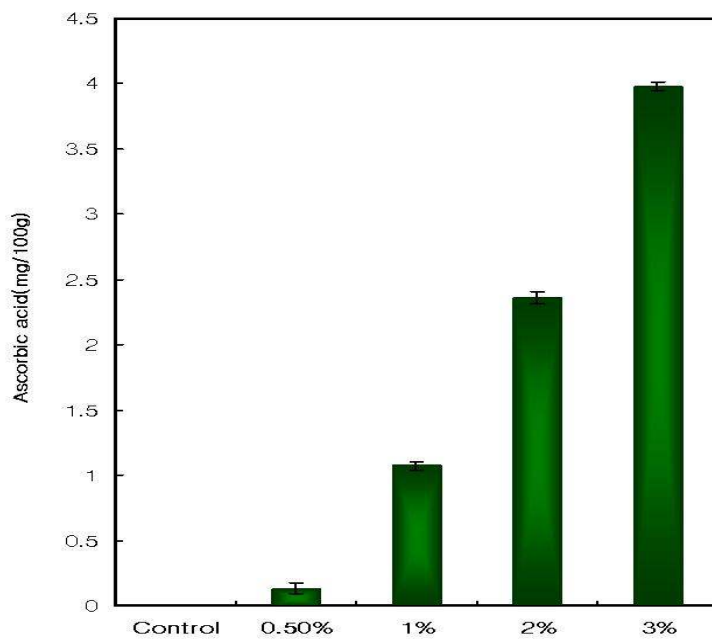


Fig. 58. Ascorbic acid concentration of jelly treated with *S. sarmentosum* extracts.

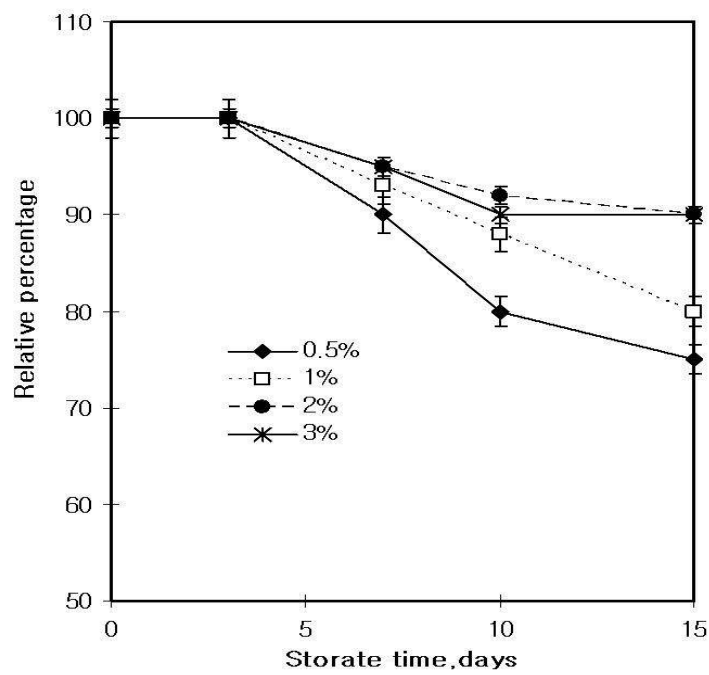


Fig. 59. Stability of ascorbic acid concentration in *S. sarmentosum* jelly at 4°C.

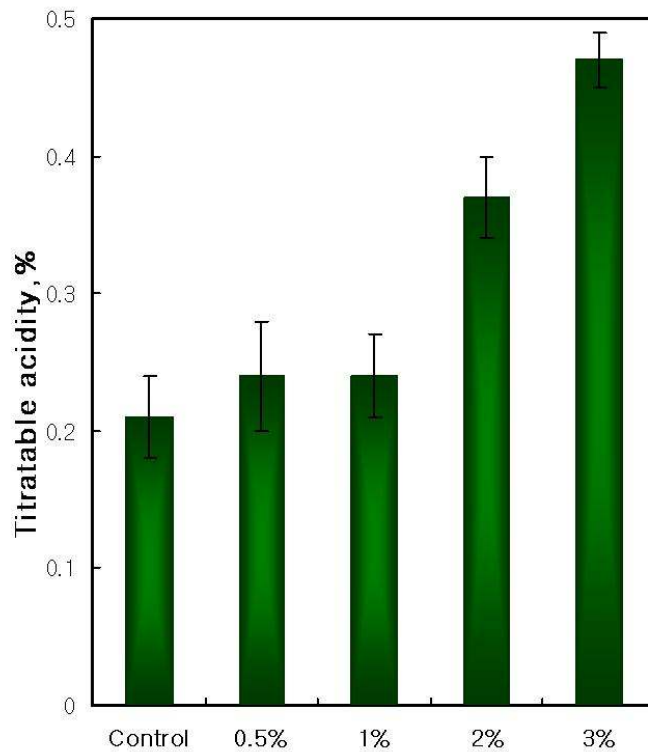


Fig. 60. Titratable acidities of jelly treated with various *S. sarmentosum* extracts.

Fig. 61에서와 같이 대조구에 없었던 철분은 각각 0.023~1.031 mg/100g (젤리 건조 중량)을 함유하는 것으로 분석되었다. 한국인의 철분 영양 상태는 WHO가 정하는 기준으로 판정했을 때, 10세 이상 인구의 2.6~23.1%가 빈혈이며, 특히 65세 이상의 노년층에서의 빈혈이 심각한 것으로 보고되었다. 철분은 헤모글로빈의 구성 성분으로 산소 운반 및 에너지 대사에 필수적이며 효소의 촉매인자로 이용되는 등 체내에서 중요한 역할을 한다. 따라서 철분결핍성 빈혈은 작업수행, 행동과 지능발달, 감염에 대한 저항능력 및 체온 조절능력 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 경제 여건과 관계없이 전 세계적으로 발생 빈도가 높은 공중 보건 문제로서 우리나라의 경우 전통적으로 철분 섭취량이 부족한 형편이다. 따라서 철분 섭취를 증가시키기 위해 식품에 철분을 강화시키려는 노력들이 있어왔다. 돌나물즙 첨가 젤리는 별도의 공정이나 특별한 노력없이 철분의 섭취를 증가시킬 수 있는 것으로 사료되었다.

Fig. 61에서와 같이 돌나물즙의 첨가량이 증가할수록 나트륨 함량은 대조구에 비하여 약간 증가되었고, 대조구에서 관측되지 않은 칼륨은 0.042~2.688 mg/100g (젤리 건조 중량)을 함유하는 것으로 분석되었다. 대조구에서도 나트륨 함량이 높은 것은 젤리 제조시 사용된 젤라틴 때문인 것으로 사료되었다. 나트륨과 칼륨은 세포액에 들어있는 주요 양이온으로 체내 삼투압 유지, 수분 및 산염기 평형 등의 항상성 유지, 신경 및 근육세포의 흥분과 자극전달 조절, 심장 박동 유지에 중요한 역할을 한다. 특히 칼륨은 과잉의 식염 섭취로 인해 유발된 고혈압에 대해 보호기능이 있어 고혈압 환자의 식이에 칼륨 섭취량을 증가시키도록 권장되고 있으나, 일반적으로 식품의 가공 공정 중에 나트륨 함량은 증가되는 반면에 칼륨 함량은 감소되는 것으로 보고되고 있다. 그러나 Fig. 61에서와 같이 돌나물 즙을 첨가함에 따라 나트륨 함량은 미비하게 증가하였으나 칼륨 함량은 매우 많이 증가하였다.

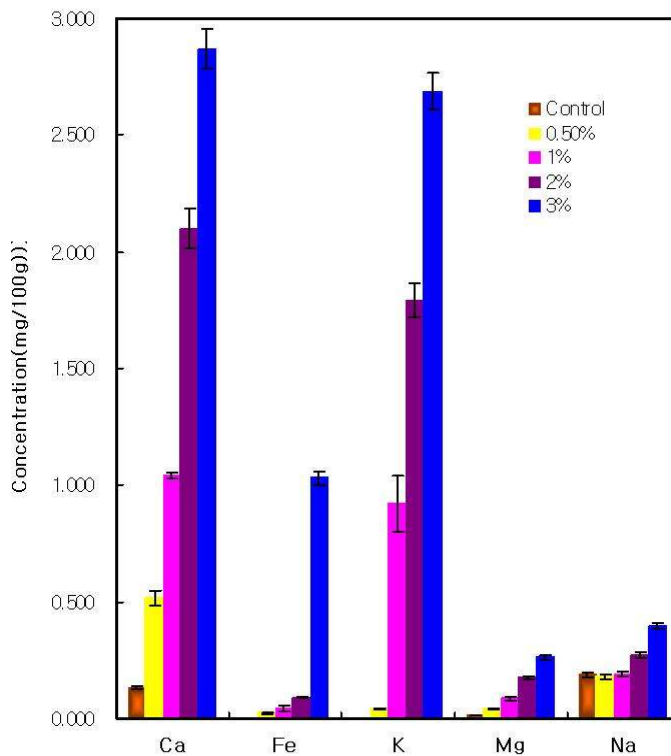


Fig. 61. Mineral concentrations of jelly treated with *S. sarmentosum* extracts.

따라서 돌나물즙 첨가량이 많은 젤리에서의 나트륨 증가량은 영양학적으로 문제되지 않을 것으로 사료되었다. 상기 서술한 바와 같이 젤리 제조시 돌나물 즙을 첨가함으로써, 영양소 강화 등 별도의 공정을 거치지 않고도 ascorbic acid, 칼슘, 철분 및 마그네슘 등의 영양소 섭취를 증가시킬 수 있는 것으로 사료되었다.

돌나물 젤리의 색도를 측정된 결과는 Table 9와 같다. 대조구에 비해 돌나물 즙의 첨가량이 많아질수록 명도값 (L value)은 유의적으로 감소하였다. 이는 대조구가 투명한 젤리를 형성하는 반면에 돌나물 젤리에서는 돌나물 즙의 첨가에 의해 젤리의 색이 짙어지기 때문으로 사료되었다. 또한 녹색도 (-a value)와 황색도 (b value)도 돌나물즙 첨가량이 증가할수록 유의적으로 증가하였으나, 돌나물즙 2% 첨가구와 3% 첨가구 간에 유의적인 차이는 관측되지 않았다. 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 젤리의 hardness와 gumminess가 감소하는 것은 젤리 제조시 사용된 젤라틴의 특성때문인 것으로 사료되었다. 즉, 젤리 제조시에 사용되는 젤라틴은 pH 4.8 과 pH 5.2의 isoioninc point를 지닌 양친밀성 단백질로, pH 5에서 최소의 점도와 최대의 겔형성능을 나타내며, sol 상태의 pH에 따라 겔형성능이 달라지게 된다.

Table 9. Hunter color values of jelly with various concentration of *S. sarmentosum* extracts.

Concentration of <i>S. sarmentosum</i> extracts (% , v/v)	L value	a value	b value
Control	48.96±1.85 ^a	-1.93±0.12 ^a	6.19±0.84 ^a
0.5	44.72±0.82 ^b	-5.95±0.25 ^b	14.88±1.26 ^b
1	40.52±0.68 ^c	-8.24±0.17 ^c	20.41±1.07 ^c
2	37.86±0.89 ^d	-9.58±0.21 ^d	21.41±1.01 ^{cd}
3	35.02±1.52 ^e	-9.62±0.23 ^d	22.98±0.89 ^d

Different superscript letters in the same column show significant differences at $p < 0.05$ by 1-WAY ANOVA and Fisher's protected least-significant differences (LSD) test.

Fig. 62에서와 같이 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 sol 상태의 pH가 낮아지는 것으로 나타났다. 대조구와 0.5~1% 돌나물즙 첨가구 간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 이는 돌나물즙 첨가 젤리의 hardness 측정 결과와 일치하였다. 또한 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 젤리 (sol 상태)의 pH가 유의적으로 감소하였다. 이는 돌나물 즙을 첨가할수록 ascorbic acid의 함량이 증가하는 것과 일치하는 결과이다 (Fig. 58). 즉, 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 돌나물 젤리에 함유된 ascorbic acid의 양이 증가하면서 젤리 (sol)의 pH가 감소하였으며, 이에 따라 젤리 (gel 상태)의 hardness도 감소한 것으로 사료되었다. 또한 돌나물 즙에 포함된 다량의 유기산들도 pH가 감소하는데 영향을 미친 것으로 사료되었다.

20대의 훈련된 관능검사 요원 12명으로 돌나물 젤리의 관능검사를 실시한 결과 (Table 10, Fig. 63), 단맛은 $3.33 \pm 0.19 \sim 3.71 \pm 0.88$ 점으로 대조구 및 돌나물즙 첨가구 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 이는 당분석 결과와도 일치하였다 ($p = 0.889$). 전술한 바와 같이 돌나물즙의 첨가량이 증가할수록 ascorbic acid 함량과 적정산도가 증가하였으나, 관능검사에서는 대조구와 돌나물즙 첨가구 간에 신맛 ($3.63 \pm 0.36 \sim 3.93 \pm 0.71$ 점)에 대한 유의적인 차이를 나타내지 않았다 ($p = 0.063$). Flavor 평가는 대조구가 3.35 ± 1.51 점인 것에 비하여 0.5% 돌나물 즙 첨가구는 3.46 ± 1.37 점, 1% 첨가구는 3.52 ± 1.29 점, 2% 및 3% 첨가구는 평균 3.53점의 관능특성을 나타내어 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 젤리의 flavor 특성도 증가하였다 ($p = 0.061$). 그러나 보다 유의적인 결과를 얻기 위해서는 돌나물 즙의 첨가량과 젤리의 flavor 특성에 대한 기계적인 분석이 뒷받침되어야 할 것으로 사료되었다. 관능검사에서 유의적인 차이를 나타낸 항목은 Table 11과 같다. Table 11에서와 같이, hardness는 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 관능 특성이 감소하였고, 이는 젤리의 물성측정 결과와 일치하였다. 투명도 (transparency)는 대조구에 비해 돌나물 즙의 첨가량 (~2%)이 증가할수록 젤리에 대한 선호도 (appearance, palatability)가 증가하였다. 외관, 색 및 전체적인 맛에서는 돌나물 즙을 2% 첨가하였을 때 가장 높은 선호도를 나타내었다. 관능검사 후, 패널 간의 토론과정에서 돌나물 즙의 첨가량이 증가할수록 쓴맛이 증가하였다고 지적하였다. 따라서 돌나물 즙을 3% 첨가한 군에서의 palatability가 감소한 것은 쓴맛이 증가한 때문으로 사료되었다.

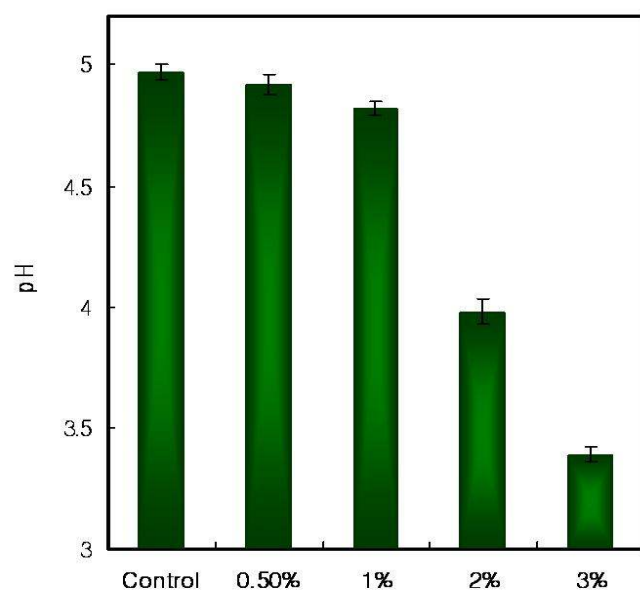


Fig. 62. pHs of jelly (sol state) treated with *S. sarmentosum* extracts.

Table 10. Texture properties of jelly with various concentration of *S. sarmentosum* extracts.

	<i>S. sarmentosum</i> concentration, % (v/v)				
	Control	0.5	1	2	3
Hardness	215.82±23.99 ^a	212.78±18.83 ^a	196.69±11.36 ^{ab}	181.65±12.89 ^b	158.92±20.52 ^c
Gumminess	92.61±12.87 ^a	93.49±10.14 ^a	88.02±10.28 ^b	86.64±16.12 ^b	68.40±11.34 ^c
Adhesiveness	-40.61±5.13	-66.74±18.87	-61.85±34.64	-66.69±29.41	-50.92±24.83
Springiness	0.981±0.012	1.053±0.091	0.995±0.017	1.160±0.241	1.125±0.274
Cohesiveness	0.449±0.063	0.441±0.027	0.447±0.037	0.476±0.044	0.429±0.042
Chewiness	91.25±33.27 ^a	98.79±17.43	87.47±9.95	101.93±35.49	75.65±21.25
Resilience	0.094±0.014	0.106±0.034	0.106±0.026	0.121±0.028	0.127±0.025

Different superscript letters in the same row show significant differences at $p < 0.05$ by 1-WAY ANOVA and Fisher's protected least-significant differences (LSD) test. Significant differences were not detected in adhesiveness, springness, cohesiveness, chewness, and resilience. Therefore, post-hoc tests were not performed in adhesiveness, springness, cohesiveness, chewness, and resilience. p values were 0.048, 0.038, 0.161, 0.139, 0.264, 0.246, and 0.092 for hardness, gumminess, adhesiveness, springiness, cohesiveness, chewness, and resilience, respectively.

Table 11. Sensory properties of jelly treated with *S. sarmentosum* extracts.

	<i>S. sarmentosum</i> concentration, % (v/v)				
	Control	0.5	1	2	3
Appearance	2.77±0.01 ^a	3.20±0.56 ^a	3.61±0.49 ^{ac}	4.57±0.23 ^b	4.17±0.08 ^{bc}
Hardness	4.03±0.20 ^a	4.03±0.37 ^a	3.63±0.37 ^b	3.43±0.32 ^{bc}	3.40±0.41 ^{bc}
Transparency	2.83±0.49 ^a	2.93±0.54 ^a	3.10±0.52 ^a	3.91±0.27 ^b	4.30±0.17 ^b
Color	2.27±0.49 ^a	3.11±0.54 ^{ac}	3.50±0.52 ^{bcd}	4.61±0.27 ^b	4.27±0.17 ^{bd}
Palatability	2.23±0.29 ^a	3.03±0.49 ^b	3.61±0.48 ^b	4.87±0.13 ^{bc}	4.63±0.26 ^{bc}

Different superscript letters in the same row show significant differences at $p < 0.05$ by 1-WAY ANOVA and Fisher's protected least-significant differences (LSD) test, respectively. p values were 0.03, 0.05, 0.05, 0.01, and 0.01 for appearance, hardness, transparency, color, palatability, respectively.



Fig. 63. Jellies with various concentration of *S. sarmentosum* juice.

다. 지질대사 및 혈행개선 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발

1) 지질대사 및 혈행개선 물질의 분리·동정

돌나물 추출물이 지방세포의 분화에 미치는 영향을 측정하고자 MC3T3-L1을 insulin을 처리하여 비만세포로 유도할 때 돌나물 추출물의 효과를 oil red O staining으로 측정하였다 (Fig. 64). Fig. 64에서와 같이 돌나물 추출물을 투여한 지방세포에서의 지방구 크기는 대조구에 비하여 유의적으로 작았다. 따라서 돌나물에 의해 지방세포의 크기가 증가하지는 않는 것으로 사료되었다 (Table 13).

Fig. 65 및 Table 13에서와 같이 지방세포의 성장을 억제하는 효과는 ethyl acetate 추출물이 가장 높았고, ethyl acetate 추출물의 subfraction 중에서는 subfraction E1의 효과가 가장 우수하였다. 따라서 ethyl acetate subfraction E1로부터 지방 세포 성장을 억제하는 물질을 순수분리하여 동정하였다. Subfraction E1은 10% H₂SO₄를 분무하고 가열시 갈색으로 발색되었다.

FT-IR spectrum에서 3438 cm⁻¹ (OH), 1648, 1524 (aromatic carbon, double band) 등의 흡수대를 나타내어 방향족 화합물인 것으로 사료되었다 (Fig. 66). Fig. 67에서와 같이 본 화합물은 분자량 180인 것으로 확인되었다.

¹H-NMR spectrum의 δ 7.04 (¹H, s), 6.97 (¹H, s) 및 6.77 (¹H, d)에서 나타난 signal은 H-2와 H-6이 meta coupling하고 있는 것으로 사료되었고, H-6과 H-5가 ortho coupling하고 있는 3,4-dihydroxylation pattern의 구조로 사료되었다. δ 7.43 (¹H, d)과 6.15 (¹H, d)의 signal은 trans 형태의 alkene 수소로서 3,4-dihydroxycinnamic acid 계로 추정되었다 (Fig. 68).

또한 ¹³C-NMR spectrum을 library의 data 비교하여 각각의 signal이 일치하였으므로 본 화합물은 caffeic acid인 것으로 최종 동정하였다 (Figs. 69~70).

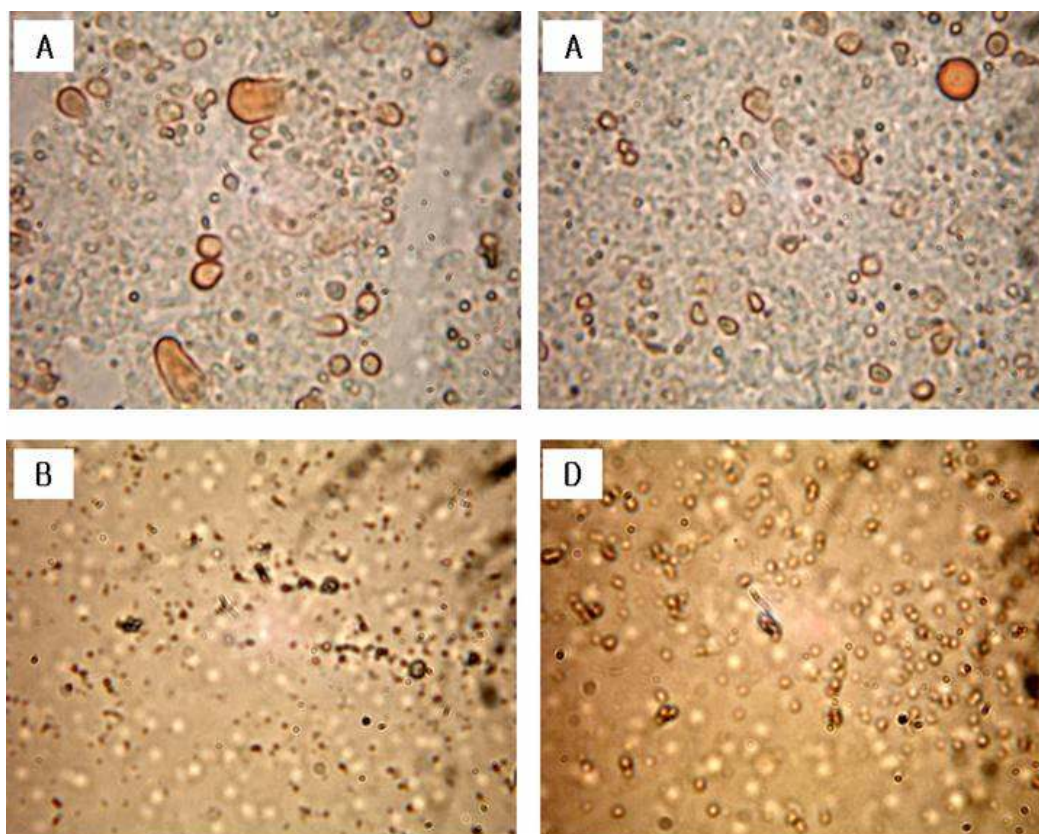


Fig. 64. Oil red O staining of adipocytes treated with *S. sarmentosum* extracts. A; control, B; ethyl acetate extract, D; butanol extract

Table 13. Size of adipocytes treated with *S. sarmentosum* extracts.

Control	MeOH	Hex	EA	BuOH	<i>p</i> value
207.33±41.39 ^a	153.83±13.06 ^b	160.00±11.88 ^b	143.83±15.85 ^b	144.50±29.17 ^b	0.001*

*1-WAY ANOVA and LSD post-hoc test

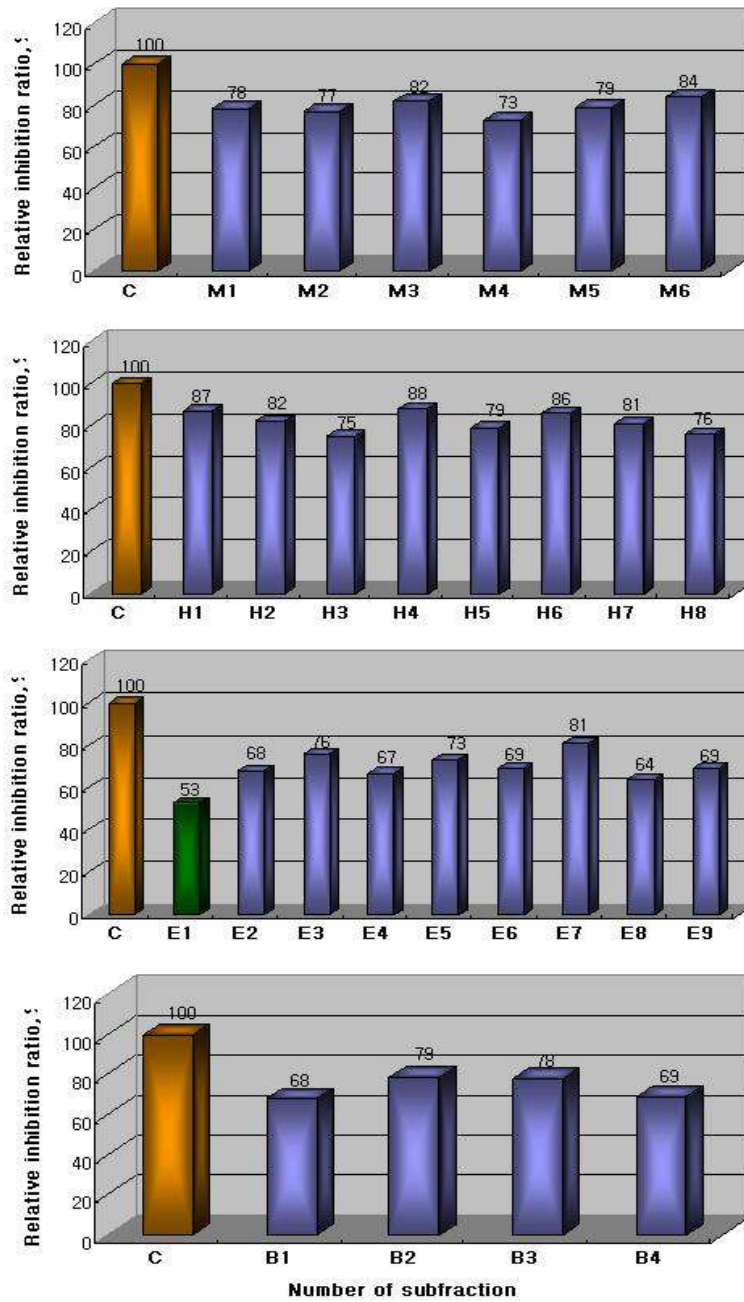


Fig. 65. Relative inhibitory effects of *S. sarmentosum* extracts on the growth of adipocytes. A; methanol extract, B; hexane extract, C; ethyl acetate extract, D; butanol extract.

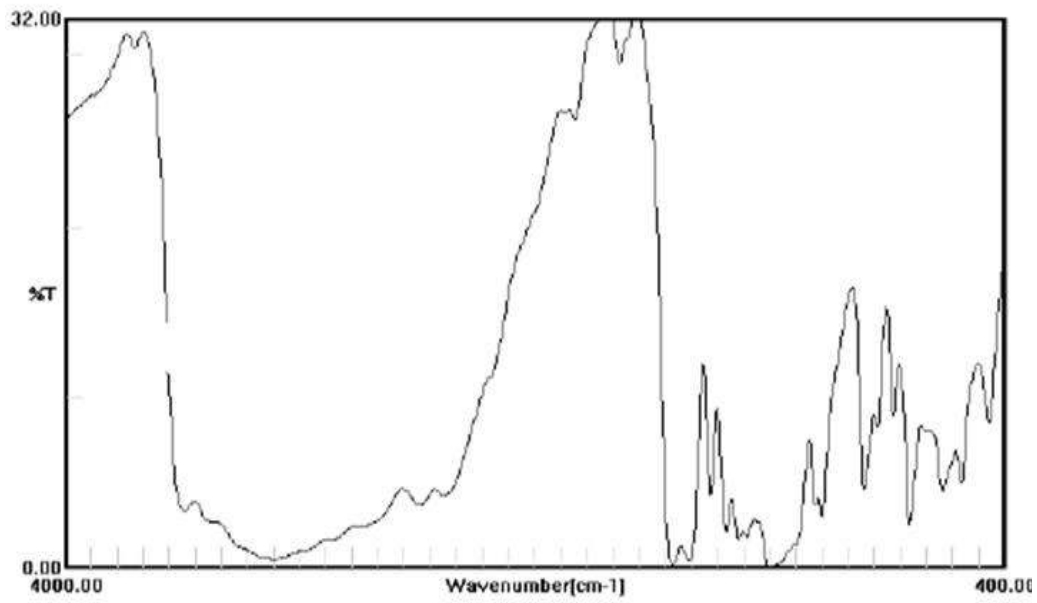


Fig. 66. IR spectrum of subfraction E1 from ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*.

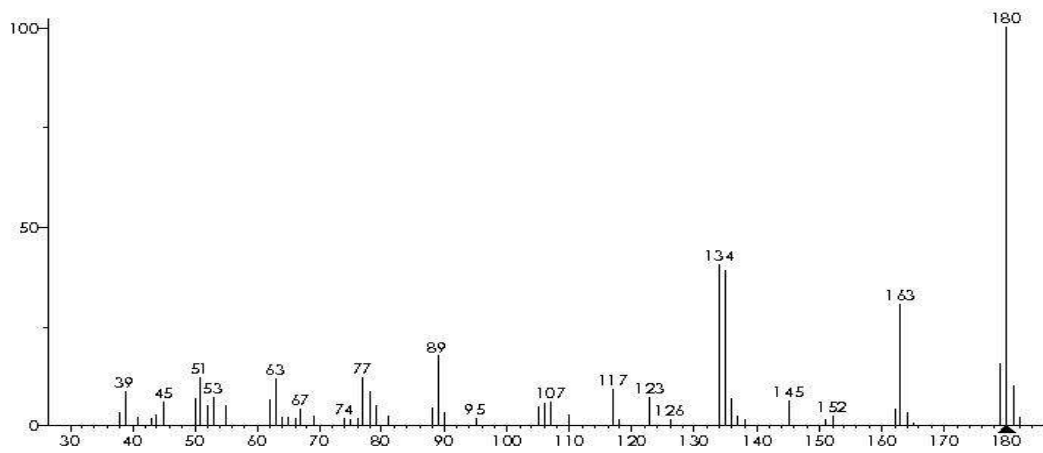


Fig. 67. GC-MS spectrum of subfraction E1 from ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*.

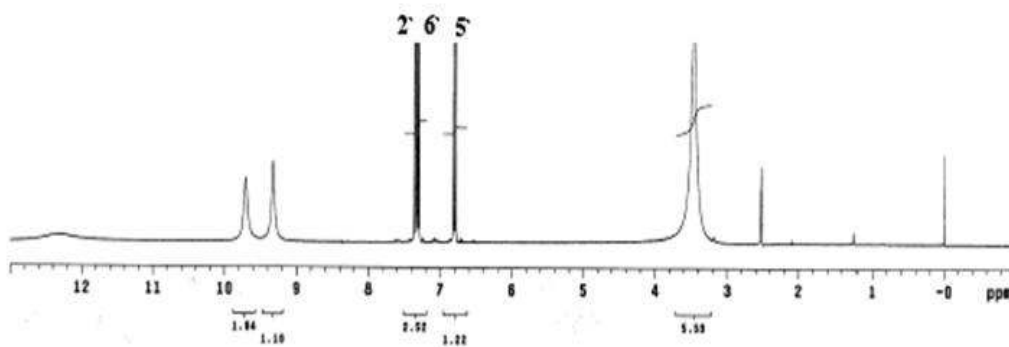


Fig. 68. ^1H -NMR spectrum of subfraction E1 from ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*.

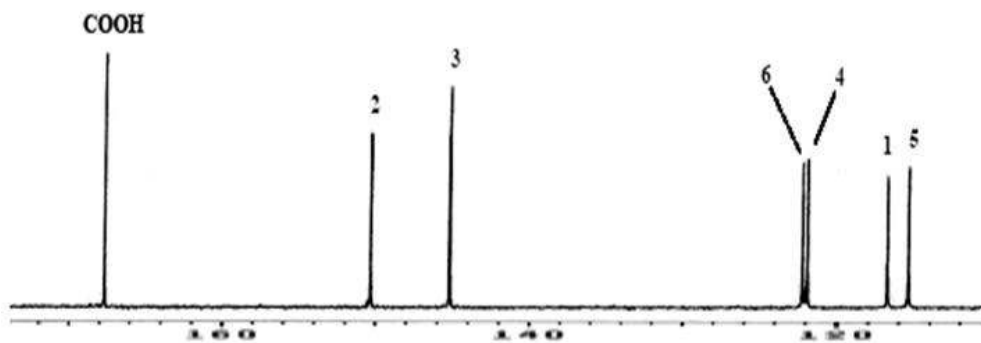


Fig. 69. ^{13}C -NMR spectrum of subfraction E1 from ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*.

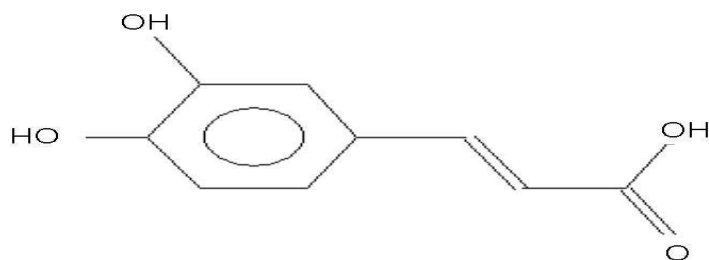


Fig. 70. Structure of caffeic acid.

2) 돌나물 및 돌나물 추출물이 지질대사, 비만 및 혈행개선에 미치는 영향

지방전구세포에 돌나물 추출물을 첨가하고 지방세포로의 분화를 측정하는 결과는 Fig. 71과 같다. Fig. 71에서와 같이 돌나물 추출물의 첨가는 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 나타났다. 지방세포 분화 억제 효과는 돌나물 추출물의 양이 늘어날수록 증가하였으나, ethyl acetate 추출물 첨가구에서 분화억제 효과가 가장 높았다. Ethyl acetate 추출물을 첨가하여 MC3T3-L1 세포가 지방세포로 분화되는 것을 50% 억제시키는 농도 (IC₅₀)는 66.98 µg/mL이었다.

Adopogenesis는 myocytes, osteoblasts 또는 adipocytes를 형성할 수 있는 mesenchymal stem cells에서 시작하는 multistage process이다. Pluripotent mesenchymal stem cell의 운명을 결정짓는 요인으로 BMP가 관여한다고 알려져 있으며, 이는 어떠한 수용체와 결합을 하느냐에 따라 지방세포로 분화하기도 하고 골세포로 분화하기도 한다.

지방전구세포 (preadipocyte)가 지방세포 (adipocyte)로 분화하는 데에는 여러 가지 전사인자들이 작용을 하는 것으로 알려져 있으며 이에 대한 연구는 많이 진행되어왔다. 지방전구세포가 분비하는 IGF-I, Glucocorticoid 와 같은 adipogenic inducers들에 의해 분화가 유도되면 분화 초기전사인자로 C/EBP beta와 C/EBP delta가 발현되고 이는 cascade 반응으로 C/EBP alpha와 PPAR gamma를 발현시킨다. 이 두 전사인자는 지방세포 분화를 이끄는 주된 전사인자로서 서로가 서로의 발현을 증가시키게 되고 이렇게 과량 발현된 C/EBP alpha와 PPAR gamma는 aP2나 adiponectin과 같은 adipocyte specific genes을 발현시켜 형태학적으로나 세포의 기능적으로 변화되어진 adipocyte를 형성하게 된다.

PPAR는 nuclear receptor superfamily에 속하는 member로 alpha, beta(delta로도 불림), gamma 등 3 isotype이 있다. PPAR는 endogeneous ligand인 fatty acid와 그 derivatives에 의해 활성화되며 lipid와 glucose 대사에 관여하는 pathway의 transcriptional regulation에 관여한다. 이 3 isotype은 lipid 대사의 대체적인 작용에 있어서는 서로 유사한 점이 많으나 나름대로의 특이한 역할을 한다.

즉 PPAR α 는 fatty-acid catabolism (beta-oxidation of fatty acid)을 촉진하고, gluconeogenesis와 ketone body 생성을 촉진한다. PPAR γ 는 adipocyte 분화, white adipose tissue 내에 지방의 저장, brown adipose tissue 내에서 에너지 산화 (dissipation) 등의 중요한 역할을 담당한다.

PPAR δ 의 지방대사에서의 역할은 아직 연구 중에 있으며, 오히려 세포의 증식, 분화 및 생존에 깊이 관여하여 carcinogenesis와 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. 이 중 PPAR α 가 지방대사와 가장 밀접하게 관련되어 있다. PPAR α 는 대사 작용이 활발하게 일어나는 조직들, 즉, 간, 심장, 신장, 골격근, brown fat 등에 분포하며, PPAR α 인 fibrate (fenofibrate, clofibrate gemfibrozil)는 혈중 triglyceride을 낮추고, HDL을 높이며, LDL도 다소 낮추는 약리 작용을 한다. 또한 LXR α 을 자극하여 ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8을 활성화시켜 콜레스테롤 efflux를 촉진한다.

한편 콜레스테롤 이동의 acceptor로 작용하며, HDL-cholesterol의 주성분인 apoA-I, apoA-II의 생성을 간에서 촉진하며 간 내 free cholesterol의 cholesterol ester 생성에 관여하는 ACAT (acyl-CoA:cholesterol acyltransferase)를 억제한다. PPAR γ 는 macrophage, fibroblast, lymphocyte, dendritic cell, 지방세포 등에서 주로 발현되며, 상피세포로는 대장에서 나타나는 것으로 알려져 있다. triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol에 작용은 PPAR α 에 비해 다소 약하나 LXR α , ABCA1 등의 receptor에 미치는 영향은 유사한 것으로 알려져 있다.

따라서 지방전구세포에 돌나물 추출물을 처리하였을 때의 유전자들의 발현 양을 측정하였다. Fig. 72에서와 같이 돌나물 추출물 (50 μ g/mL)을 처리하였을 때, PPAR-gamma의 발현이 감소하였음을 알 수 있었다. 즉, butanol 처리구에서는 PPAR-gamma의 발현이 감소하였고, ethyl acetate 처리구에서는 거의 발현하지 않은 것으로 나타났다. 이러한 경향은 C/EBP-alpha 및 aP2 발현을 측정한 것에서도 유사하였다. 돌나물 추출물의 처리 농도가 50 μ g/mL인 것을 고려하면, ethyl acetate 처리구는 지방전구세포가 지방세포로 전혀 분화되지 않았던 것임을 알 수 있었다.

백서에 Table 14와 같이 콜레스테롤 식이를 급여하여 비만 및 고지혈증을 유발하였다. 돌나물의 동결건조한 분말을 1.5~4.5% 첨가하여 돌나물이 비만 및 고지혈증에 미치는 영향을 측정하였다 (Fig. 73). Fig. 73에서와 같이 돌나물 건조분말을 공급받은 실험구에서의 체중 증가량은 대조구와 유의적인 차이를 나타내었다 ($p = 0.001$). 고지방식에 의해 대조구의 체중 증가량은 매우 높았던 반면, 돌나물 분말 공급 실험구에서는 돌나물 분말 급여량이 많을수록 체중 증가량이 감소하였다.

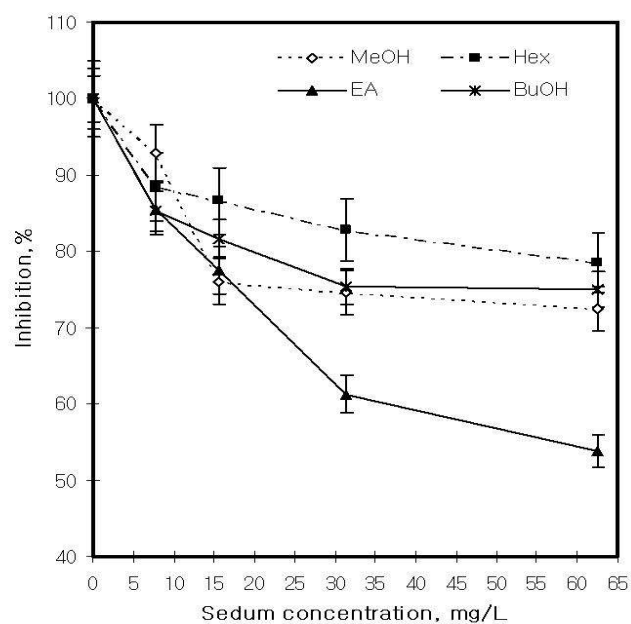


Fig. 71. Inhibitory effects of *S. sarmentosum* extracts on the propagation of adipocyte, MC3T3-L1. Preadipocyte was propagated with insulin, inhibitory tests were performed MTT assay and oil red-O staining.

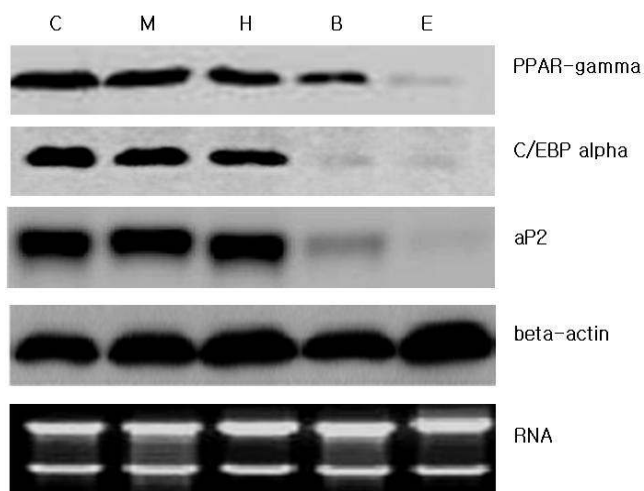


Fig. 72. Adipogenesis related gene expression in MC3T3-L1 treated with *S. sarmentosum* extracts. C; control, M; methanol extract, H; hexane extract, B; butanol extract, E; ethyl acetate extract. All cells were incubated with 50 $\mu\text{g/mL}$ of extracts for 48 hrs after insulin treatments.

Table 14. Experimental groups and compositions of basal and experimental diet.
(g/kg diet)

Ingredients	Control	Experimental group
Casein	2000	2000
DL-methionine	3	3
Corn starch	150	150
Sucrose	490	490
Cellulose powder	50	50
Mineral mixture	35	35
Vitamine mixture	10	10
Choline bitartrate	2	2
Lard	50	50
Cholesterol	7.5	7.5
Sodium cholate	2.5	2.5
<i>S. sarmentosum</i> extract*	0	4.5

*Lyophilized *S. sarmentosum* powder (1.5~4.5%) was used in this study.

돌나물 분말 실험구에서 체중 증가량이 적었던 것이 식이 섭취량 감소에 따른 것인지를 측정하기 위하여 식이섭취량을 조사하였다 (Fig. 73B). Fig. 73B에서와 같이 대조구 및 돌나물 실험구에서의 식이섭취량에는 유의적인 차이가 관측되지 않았고, 오히려 돌나물 실험구에서의 식이섭취량이 약간 높은 것으로 나타났다 ($p = 0.648$). 일반적으로 40% 정도의 고지방식을 백서에 공급하면 다량의 지방 첨가로 인하여 백서의 식이섭취량이 감소하는 것으로 알려져 있다. 그러나 돌나물 분말을 같이 공급함으로써 고지방 투여로 인한 식이량 감소를 완화시킨 것으로 사료되었다.

식이섭취량과 체중증가량의 상관성을 알아보기 위하여 food efficiency ratio (FER)를 측정한 결과는 Fig. 73C와 같다. Fig. 73C에서와 같이 돌나물 실험구에서의 FER은 돌나물 분말의 공급양이 많을수록 감소하였으나 대조구에서의 표준편차가 매우 심하여 대조구와 돌나물 실험구 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 ($p = 0.153$). 그러나 돌나물 실험구에서는 식이섭취량이 대조구보다 많았음에도 체중이 증가되지 않았고, 이러한 이유로 FER도 대조구보다 낮았다.

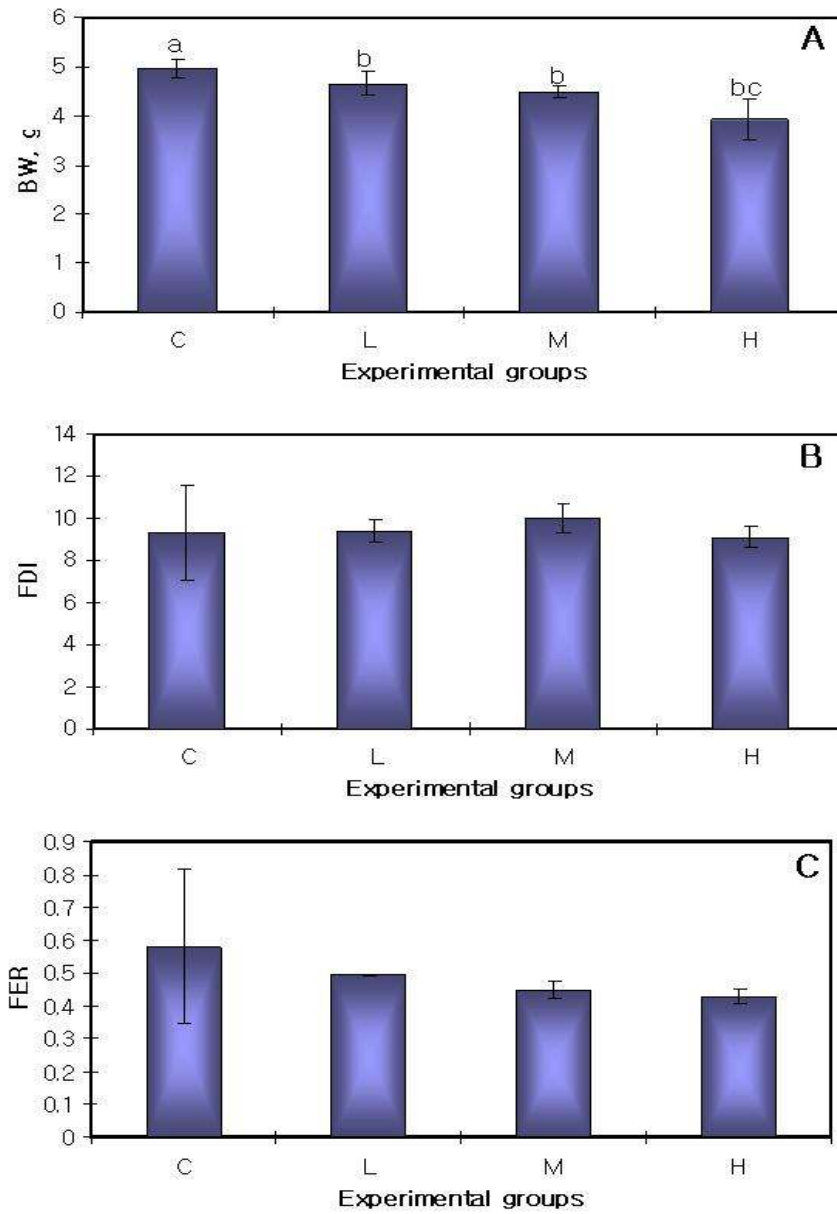


Fig. 73. Administered effects of *S. sarmentosum* powder on the increase of body weight, food intake, and FER in high fat diet rats for 4 weeks. A; gained body weight, B; food intake per a day, C; food efficiency ratio. C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*.

고지방식과 돌나물 급여가 체중에 미치는 영향을 좀 더 자세히 관측한 결과는 Fig. 74와 같다. Fig. 74에서와 같이 실험 시작 시의 체중은 실험구 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 4주간의 고지방식으로 대조구의 체중이 실험 개시 때보다 약 2배 정도 증가된 반면에 돌나물 급여구에서는 대조구보다 유의적으로 낮은 체중을 나타내었다 ($p = 0.002$). 이러한 경향은 돌나물 분말의 섭취량이 많을수록 체중의 증가폭이 낮았다. 이는 전술한 바와 같이 돌나물 급여가 FER을 낮추기 때문인 것으로 사료되었다.

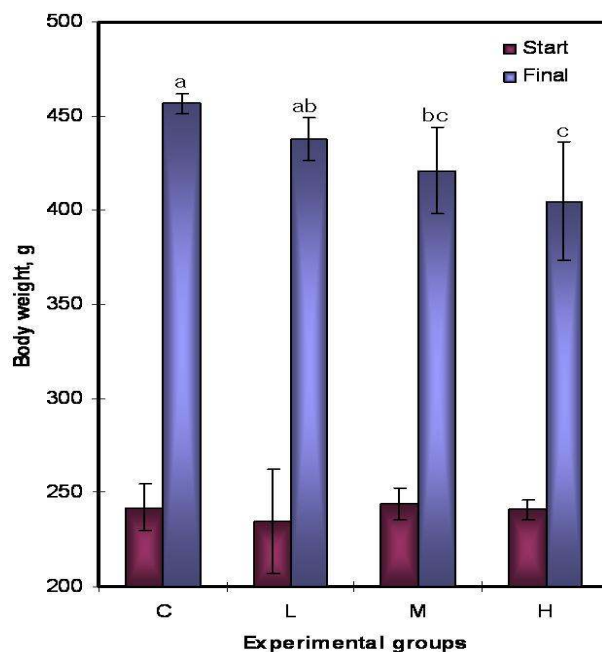


Fig. 74. Effects of *S. sarmentosum* powder on changes of body weight in high fat diet rats for 4 weeks. C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*.

실험 종료시 백서를 희생하여 고지방식과 돌나물 급여가 혈중 지질 구성에 미치는 영향을 측정하였다 (Figs. 75~76). Fig. 75에서와 같이 대조구는 고지방식의 급여로 인하여 total cholesterol, TG 및 LDL 농도가 돌나물 실험구보다 유의적으로 높았다. 반면에 돌나물 실험구에서는 고지방식을 실시하였음에도 불구하고 대조구보다 높은 HDL 농도를 나타내었다. TG 및 LDL 농도를 감소시키고, HDL의 농도를

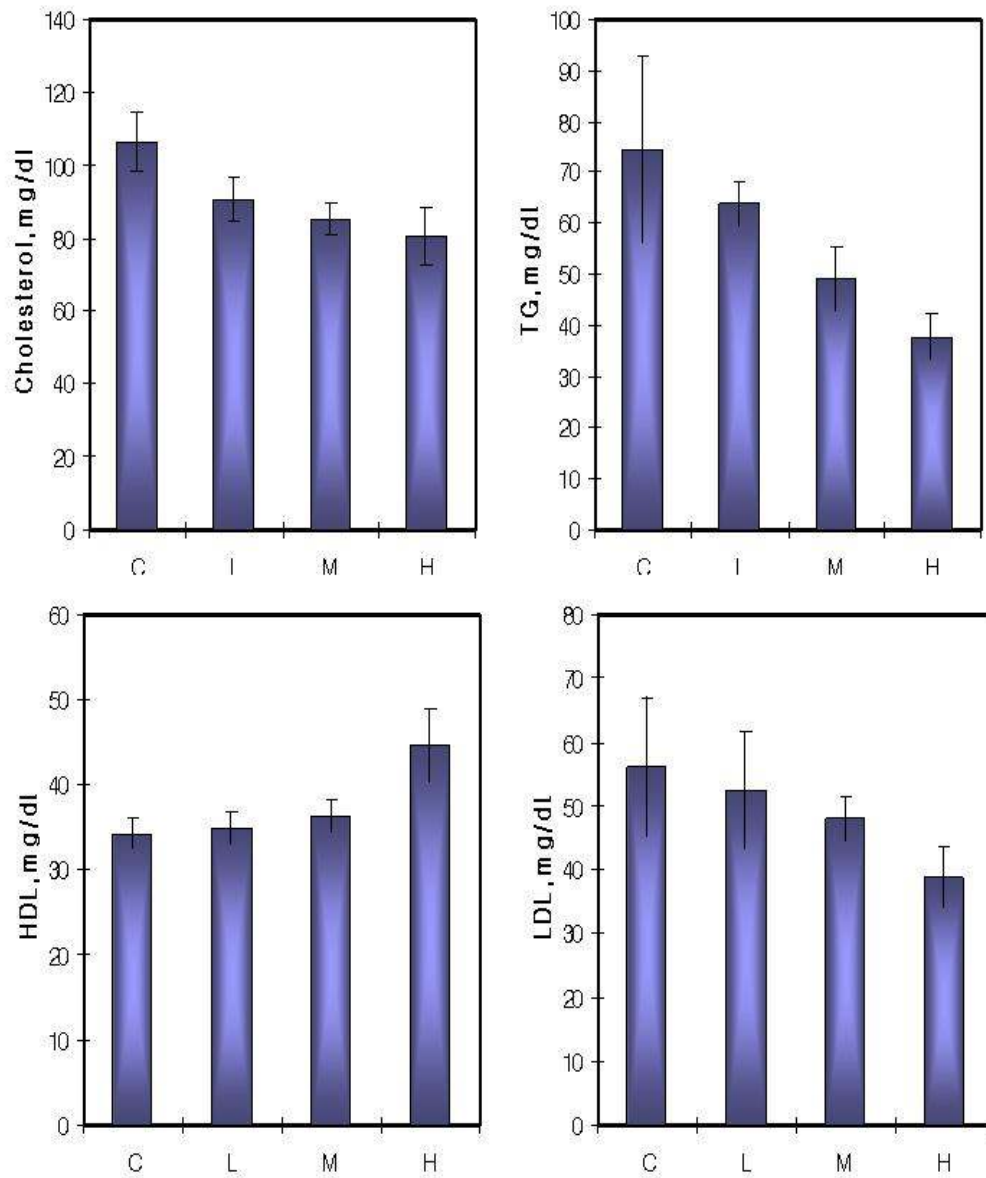


Fig. 75. Effects of *S. sarmentosum* powder on the blood lipid composition in high fat diet rats for 4 weeks. C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*.

증가시키는 효과는 돌나물의 건강기능성을 크게 향상시키는 것으로 사료되었다. 특히 Fig. 76에서와 같이 동맥경화지수 (AI)가 대조구의 경우 정상적인 수치보다 2배 이상 증가된 반면에 고농도의 돌나물 섭취구에서는 고지방식을 실시하였음에도 AI가 정상적인 수치를 나타내었다. 따라서 돌나물의 섭취는 고지방식으로 유도되는 고지혈증 및 이와 관련된 만성질환들인 고혈압, 동맥경화증 및 당뇨병의 발생을 억제시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

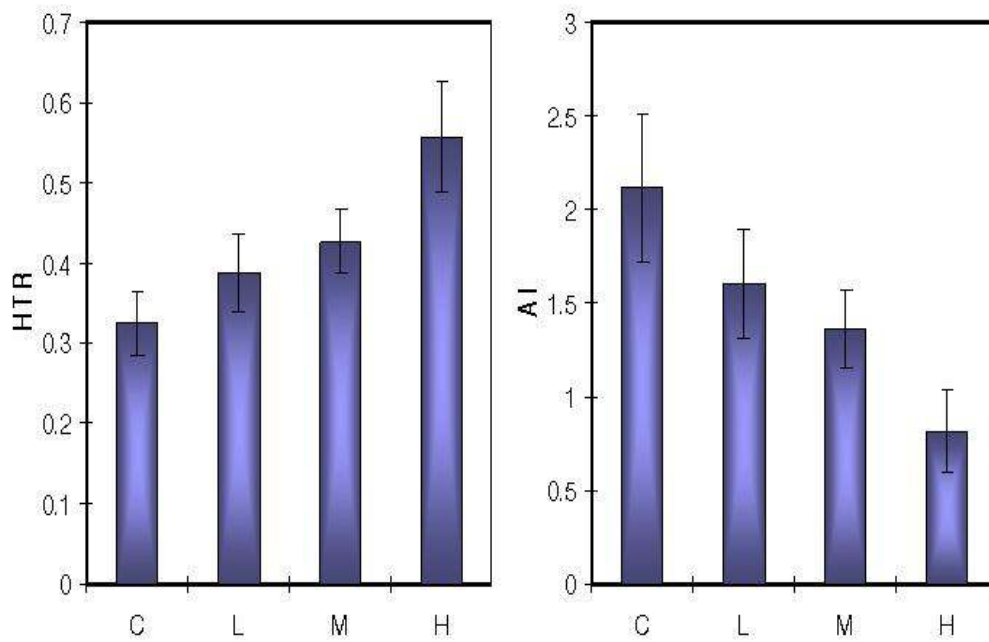


Fig. 76. Effects of *S. sarmentosum* powder on HTR and AI in high fat diet rats for 4 weeks. C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*. HTR; HDL cholesterol/ Total cholesterol, AI (Atherosclerosis index); (total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol.

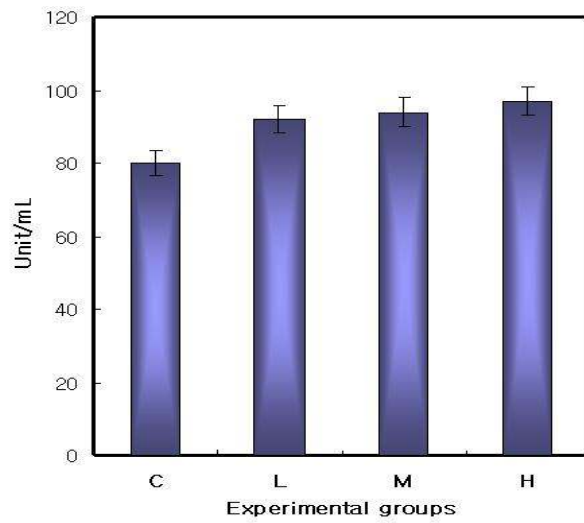


Fig. 77. Effects of *S. sarmentosum* powder on activity of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in serum of hyperlipidemic rats fed the experimental diets for 4 weeks. C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*.

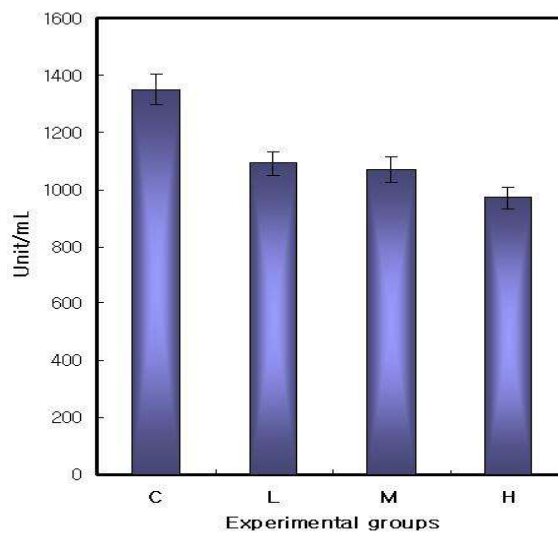


Fig. 78. Effects of *S. sarmentosum* powder on lactate dehydrogenase (LDH) activity in serum of hyperlipidemic rats fed the experimental diets for 4 weeks. C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*.

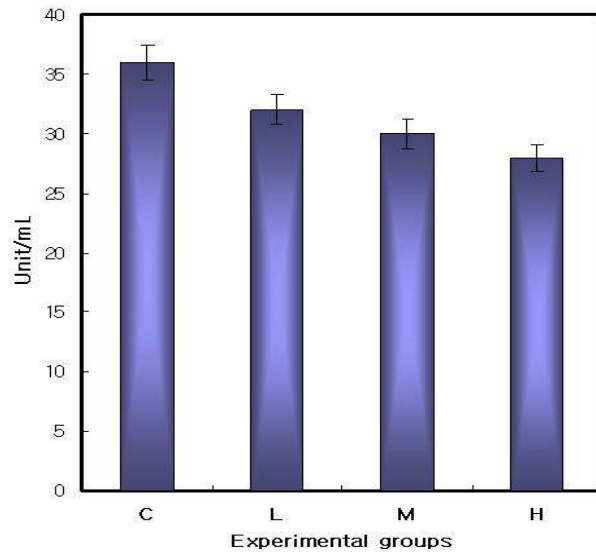


Fig. 79. Effects of *S. sarmentosum* powder on alkaline phosphatase (ALP) activity in serum of hyperlipidemic rats fed the experimental diets for 4 weeks. C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*.

고지방식과 돌나물 분말을 투여한 백서의 혈액 내 단백질 변화를 측정된 결과는 Figs. 77~79와 같다. Figs. 77에서와 같이 돌나물 분말을 고지방식과 같이 급여함으로써 LCAT 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 간과 소장에서 합성되는 HDL은 apoE, apoC, 인지질로 구성되며, 유리 콜레스테롤의 대부분은 lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT)에 의해 에스테르화 된다. LCAT는 간에서 기원되는 효소이지만 혈장에서 작용한다. LCAT의 기질로는 HDL3가 알려져 왔는데, 이는 인지질의 함량이 높아서 유리 콜레스테롤의 효과적인 수용체로서 역할을 할 수 있고, apoA-I이 LCAT에 의한 에스테르화를 촉진시켜 주로 esterified cholesterol을 함유하는 mature HDL2 입자로 변화되어 간으로 이동되어 SR-BI수 용체를 통해 간에 흡수되어 완전 분해되든지 hepatic lipase에 의해 HDL2의 중성지방과 인지질을 가수분해함으로써 HDL2를 HDL3로 전환되어 재활용되기도 한다. VLDL과 LDL의 유리 콜레스테롤도 LCAT의 기질이 될 수 있다. LCAT는 중성지방이 풍부한 물질의 분해에도 역할을 하는데, 이는 지단백의 안쪽 지질은 triglyceride lipases의 작용에 의해서 감

소되는 동안 LCAT가 표면에서 유리 콜레스테롤과 lecithin을 동량제거함으로써 일어난다. Fig. 77에서와 같이 돌나물의 급여로 인해 증가된 LCAT 활성화에 의해 돌나물 처리구에서의 TG 및 total cholesterol 농도가 대조구보다 낮았던 것으로 사료되었다. Fig. 78은 lactated dehydrogenase (LDH) 활성을 측정한 결과이다. LDH는 체내의 당이 분해되어 에너지로 변할 때 작용하는 효소의 하나로, 여러 조직 세포 중에 함유되어 있으므로 세포가 파괴되면 혈중 LDH 농도는 증가하게 된다. 혈중 LDH는 악성종양, 간질환, 심장질환, 혈액질환 등에서 고활성을 보이는 경우가 많으므로 이들 질환을 스크리닝 하는데 유용한 항목으로 이용되고 있다. Fig. 78에서와 같이 고지방식으로 인해 혈청 내의 LDH가 증가되었으므로 다량의 고지방식으로 인해 간세포가 손상된 것으로 사료되었다. 반면에 돌나물 분말 투여구에서는 대조구보다 상대적으로 낮은 LDH 활성을 나타내었다. 따라서 돌나물 투여는 고지방식으로 인해 유발되는 간손상을 억제시키는 것으로 사료되었다.

이상의 결과로부터 고지방식으로 인해 간손상이 유발된 것으로 추정하여 비알콜성지방간의 혈액 지표인 alkaline phosphatase (ALP) 활성을 측정한 결과는 Fig. 79와 같다. Fig. 79에서와 같이 대조구에서의 ALP 활성이 매우 증가된 것이 확인되었다.

따라서 예측했던 바와 같이 대조구에서는 고지방식으로 인하여 지방간이 진행되고 있음을 알 수 있었다. 또한 간조직 내의 지방양을 측정한 결과도 이를 뒷받침해주고 있다 (Table 15). 대조구 간조직의 총지질양, total cholesterol 및 TG의 농도가 돌나물 분말투여구보다 매우 높은 것으로 나타났다. 그러나 돌나물 분말 투여구에서의 간조직에 축적된 지방양 및 혈청의 ALP 농도는 대조구보다 상대적으로 낮았고, 이러한 결과로부터 돌나물이 비알콜성 지방간을 예방하는 효과가 있을 것으로 사료되었다. 비알콜성 지방간질환은 우리나라에서 비만 환자 및 대사증후군 환자가 증가하면서 그 유병률도 꾸준히 증가하고 있는 추세로 보고되고 있다. 따라서 돌나물의 섭취를 증가시킴으로써 간기능을 보호할 수 있을 것으로 사료되었다.

Table 15. Liver total lipid, total cholesterol and triglyceride in rats fed experimental diets.

(mg/g)

Group	Total lipid	Total cholesterol	Triglyceride
C	114.17±5.76	41.88±2.01	60.23±3.15
L	101.31±6.15	39.36±1.98	56.29±5.12
M	97.81±1.85	36.31±2.84	51.71±1.65
H	92.43±6.41	34.87±4.15	49.82±3.19

C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*.

PMA로 자극시킨 HL-60 세포를 이용하여 돌나물 분획에 대하여 ICAM-1/LFA-1 매개성 세포 접착저해활성을 조사하였다. Fig. 80에서와 같이, 무처리구의 HL-60 세포는 48 시간 후 아무런 형태적 변화가 관찰되지 않았으나(Fig. 80D), 최종농도 25 nM PMA를 처리한 실험군에서는 완전한 homotypic aggregation이 관찰되었다 (Fig. 80A). 25 nM PMA와 함께 anti-ICAM-1 mAb (25 ng/mL)를 처리한 실험군에서는 세포응집이 완전히 저해됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 80B). 이 결과는 HL-60 세포의 homotypic aggregation이 ICAM-1/LFA-1 매개성임을 나타내고 있으며, 돌나물 추출물이 세포접합인자의 활성을 저해하는 것으로 사료되었다.

지질대사에 관여하는 apo A-I, Lp(a), CETP 활성을 측정한 결과는 Table 16과 같다. Table 16에서와 같이 대조구 (고지방식 급여)에 비하여 돌나물 분말 투여구에서 현저히 낮은 수치를 나타내었다. 따라서 돌나물 분말은 고지방식으로 유도된 비정상적인 지질대사를 정상수준으로 회복시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

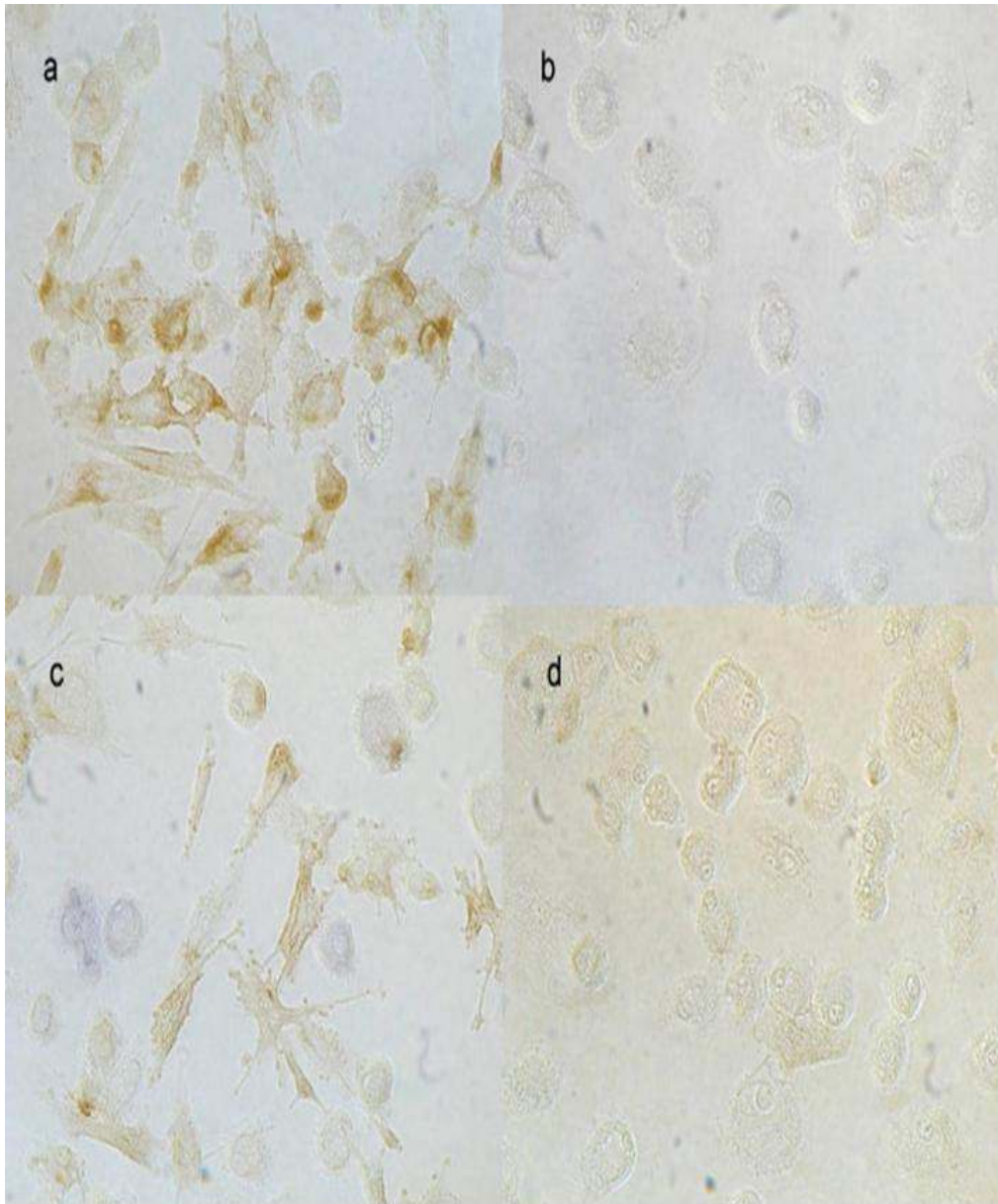


Fig. 80. PMA-induced ICAM-1/LFA-1 mediated aggregation of HL-60 cells. A; stimulated after 48 hours with 25 nM PMA, B; the presence of 25 ng/mL anti-ICAM-1 mAb, C; ethyl acetate extract of *S. sarmentosum*, D; control.

Table 16. Plasma apo A-I, Lp(a) concentrations and CETP activities of deer antler extracts treated groups.

Group	Apo A-I (g/L)	Lp(a) (mg/dL)	CETP (%CE transfer)
C	1.71±0.009	27.70±4.18	34.19±1.86
L	1.52±0.004	20.13±3.90	28.87±2.76
M	1.49±0.002	20.03±1.57	28.35±3.55
H	1.31±0.002	15.62±2.18	25.32±2.11

Lp(a); lipoprotein a, CETP; cholesteryl ester transfer protein, C; control, L; 1.5 g/kg/day powder, M; 3.0 g/kg/day powder, H; 4.5 g/kg/day powder of *S. sarmentosum*.

Lipoxygenase (LPO)는 non-heme을 함유한 dioxygenase로 불포화지방산에 산소를 도입시켜 hydroperoxy acid를 생성하는 효소이다. 동물생체 중의 LPO는 혈소판 또는 백혈구 내에 존재하는 arachidonic acid를 산화시킨다. 혈소판의 12-LPO는 세포 활성화에 관여하는 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid의 형성에, 백혈구 내에 존재하는 5-LPO는 천식, 알레르기, 염증 등의 매개체인 leukotriene의 형성에, 15-LPO는 5-LPO 존재하에 새로운 매개체인 lipoxin의 형성에 각각 관여하는 효소이다. 따라서 LPO의 활성 증가는 세포 염증을 촉진시키는 것으로 보고되고 있다. Fig. 81에서와 같이 돌나물 추출물은 LPO와의 반응시간이 증가하면서 LPO 활성을 억제하는 효과가 증가하였다. 따라서 돌나물은 LPO 활성을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났고, 돌나물에 의해 혈행을 개선시키고 세포의 염증 반응을 억제하는 효과가 있는 것으로 추정되었다. 그러나 기존에 보고되어 있는 LPO 억제제보다는 돌나물이 LPO를 저해하는 효과는 크지 않은 것으로 나타났다.

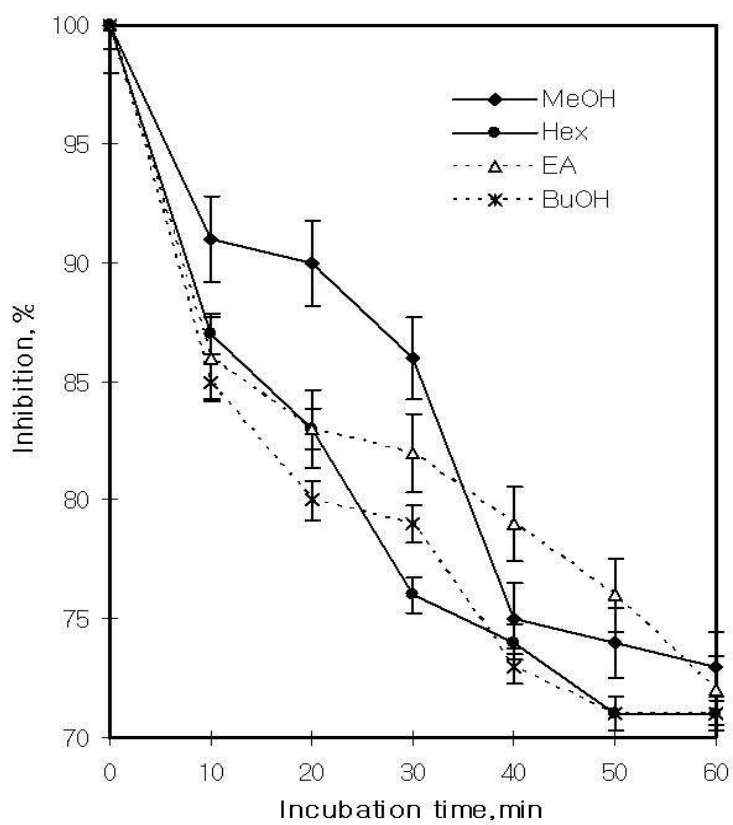


Fig. 81. Relative inhibitory effects of *S. sarmentosum* extracts on the lipoxigenase activity. MeOH; methanol extracts, Hex; hexane extract, EA; ethyl acetate extract, BuOH; butanol extract.

3) 지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 제품의 개발

돌나물 분말이 고지방식으로 유도된 비만/ 고지혈증/ 비알콜성지방간질환에 대한 효과가 우수하였으므로 돌나물 분말을 이용하여 돌나물 차를 개발하였다(Fig. 82).



Fig. 82. Sedum Tea, the product using *S. sarmentosum* powder.

4. 결 론

가. 돌나물의 간기능 개선 및 간암억제 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발

Ethyl acetate 추출물로부터 간기능 개선 및 간암억제 화합물은 tetrahydroxyflavonol (quercetin)인 것으로 동정되었다. 사염화탄소를 백서에 경구투여 급성 간독성을 유발한 결과, 돌나물의 methanol, hexane, ethyl acetate, butanol 추출물은 silymarin (control)보다 체중 당 간 중량의 증가폭이 유의적으로 낮았다. GOT (Glutamate oxaloacetate transaminase, AST; Aspartate aminotransferase), GPT (Glutamate pyruvate transaminase, ALT; Alanine aminotransferase) 활성에서도 methanol 추출물을 제외한 hexane, ethyl acetate, butanol 추출물이 silymarin 투여군에 비하여 보호효과가 높았다. 돌나물의 methanol, hexane, ethyl acetate, butanol 추출물은 사염화탄소로 인한 간 손상을 재생시키는데 효과적이었으며, 특히 methanol 추출물을 투여한 백서의 간조직에서는 세포의 괴사가 관찰되지 않아 그만큼 세포 재생속도가 빨라져, 양성대조물질인 silymarin보다 우수하였다. 돌나물의 methanol, hexane, ethyl acetate, butanol 추출물은 ethionine 및 ethanol에 의한 지방간 유도를 유의적으로 억제하였고, 특히 hexane 및 ethyl acetate 추출물의 지방간 억제 효과가 매우 우수하였다.

인간 간암세포주인 HepG2 세포의 성장에 미치는 돌나물 추출물의 IC₅₀은 ethyl acetate 155.8 µg/mL, hexane 250.94 µg/mL, methanol 1.3 mg/mL, butanol 1.9 mg/mL으로 ethyl acetate 추출물의 간암 세포 성장 억제 효과가 가장 우수하였다. HepG2 세포에 돌나물의 ethyl acetate 추출물을 처리한 후, 72시간 배양시에는 거의 모든 세포 (92.75%)가 apoptosis를 거쳐 괴사되었거나 또는 necrosis 과정으로 이행되었다.

돌나물 즙 및 각각의 돌나물 추출물과 ethanol을 백서에 경구투여한 후 경시적으로 혈액을 채취하여 혈액 내의 ethanol 농도를 측정된 결과, 알콜 투여 후 2시간이 지났을 때에는 대조구보다 약 2.3배 정도 낮은 혈중 ethanol 농도를 나타내어 돌나물 즙의 ethanol을 분해하는 효과가 용매 추출물보다 우수하였다. Ethanol을 투여한 백서에 돌나물의 methanol 및 butanol 추출물은 ADH 및 ALDH 효소활성을 유의적으로 증가시켰으며, methanol 추출물은 알콜 투여 후 2시간 후에, butanol 추출물은 3시간 후에 혈중 ethanol 농도를 감소시키는 효과가 우수하였다. 백서에 ethanol 경구투여 전에 돌나물 즙과 추출물을 투여한 후 혈중 acetaldehyde 농도를 경시적으로 측정된 결과, 돌나물 추출물 투여구에서는 1시간 경과시 혈중 acetaldehyde의 농도가 대조구의 약 50% 였으며, 시간이 경과하면서 빠르게 감소하

였다. 돌나물즙 투여구에서는 ethanol 투여 4시간 경과 후에는 혈중 acetaldehyde가 대부분 감소하였다. 인체에서도 알콜 섭취 전에 돌나물즙과 추출물의 섭취는 혈중 ethanol 및 acetaldehyde의 농도를 유의적으로 감소시켰다.

이에 따라 돌나물 추출물을 주원료로 하여 숙취 해소 효과가 있는 것으로 알려진 청피, 홍삼박, 당귀 및 상황쌀을 첨가하여 돌나물 숙취해소 음료를 제조하였으며, 특허출원중에 있다.

나. 돌나물의 항산화 및 면역활성 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발

돌나물의 DPPH radical scavenging 효과를 측정한 결과, ethyl acetate 추출물의 subfraction E4의 항산화활성이 가장 우수하였으며, 항산화 활성이 가장 높은 물질은 quercetin으로 동정되었다. ethyl acetate 추출물 subfraction 5의 면역활성이 가장 우수하였다. 돌나물의 면역활성은 ethyl acetate 추출물 subfraction 5에서 가장 우수하였으며, 이 물질은 coumarin 계의 esculetin인 것으로 확인되었다.

백서에 돌나물 추출물을 4주간 섭취시킨 후 희생하여 간조직 및 혈액을 채취하여 효소활성도를 측정한 결과, 돌나물 추출물 투여구에서 양성대조구인 tocopherol 또는 ascorbic acid와 유사하거나 보다 더 우수한 항산화능을 나타내었다. 특히 돌나물 methanol 및 ethyl acetate 추출물에서 polyphenol 함량이 높게 나타났으며, 이는 methanol 추출물 투여구가 전반적으로 높은 항산화능을 나타낸 것과 일치하였다.

대식세포인 RAW 264.7 cell lines에 LPS (lipopolysaccharide) 또는 돌나물 용매 추출 분획을 첨가하고 2일간 배양한 후에 생성된 nitric oxide의 양을 측정한 결과, LPS 농도가 0.1 µg/mL일 때, methanol, hexane 및 ethyl acetate 추출물에 의해 생성되는 nitric oxide의 양이 감소되었다. 또한 LPS 처리에 의해 발현되는 iNOS 단백질은 돌나물 추출물에 의해 그 생성량이 감소되는 것을 Western blotting으로 확인하였다.

백서에 고지방식을 급여한 후 돌나물 추출물 처리에 의해 변화된 단백질의 발현 양상은 항산화와 관련된 glutathione peroxidase, glutathione reductase의 발현이 증가되었고, 면역기능과 관련된 단백질 중에서는 COX2의 발현이 증가되었다.

돌나물즙(juice)에 당과 겔화제를 혼합하여 농축, 성형하여 젤리를 제조하였으며, 돌나물 젤리에는 돌나물즙(juice)의 참가농도에 따라 칼슘, 철분, 칼륨, ascorbic acid 및 유기산 등의 함량이 증가되었다. 또한 식이 선호도는 돌나물즙(juice)을 첨가할 경우 가장 높았으며, 녹즙으로 이용할 경우 돌나물 소비를 촉진할 수 있을 것으로 기대되었다.

다. 지질대사 및 혈행개선 물질의 분리·동정과 효과 탐색 및 제품개발

돌나물 추출물의 지방세포의 성장을 억제하는 효과는 ethyl acetate subfraction E1의 효과가 가장 우수하였으며, 지방 세포 성장을 억제하는 물질을 순수분리한 결과, caffeic acid인 것으로 동정되었다.

돌나물의 ethyl acetate 추출물을 첨가하여 지방전구세포 MC3T3-L1이 지방 세포로 분화되는 것을 50% 억제시키는 농도 (IC_{50})는 66.98 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 유전자들의 발현양을 측정된 결과, PPAR- γ 는 ethyl acetate 추출물을 첨가시 거의 발현되지 않았다. 백서에 콜레스테롤 식이에 돌나물의 동결건조한 분말 1.5~4.5% 첨가할 경우, 돌나물 분말 급여량이 많을수록 식이섭취량이 대조구보다 많았음에도 체중 증가량이 크게 감소하였다. 돌나물 분말 투여구에서 total cholesterol, TG 및 LDL 농도 및 동맥경화지수 (AI)가 대조구보다 유의하게 감소하였고, 간조직에 축적된 지방양 및 혈청의 ALP 농도도 대조구보다 상대적으로 낮았다. 따라서 돌나물의 섭취는 고지방식으로 유도되는 비알콜성 지방간을 예방하는 효과가 있고, 고지혈증과 이와 관련된 고혈압, 동맥경화증, 당뇨병 등의 발생을 억제시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 돌나물 추출물은 Lipoxygenase (LPO)와의 반응시간이 증가하면서 LPO 활성을 억제하여 혈행을 개선시키고 세포의 염증 반응을 억제하는 효과가 있으나, 기존에 보고되어 있는 LPO 억제제보다는 효과가 높지 않았다.

돌나물 분말이 고지방식으로 유도된 비만, 고지혈증, 비알콜성지방간질환에 대한 효과가 우수하였으므로 돌나물 분말을 이용하여 돌나물 차를 개발하였다.

제 3 절 돌나물의 성분분석 및 건강기능성 돌나물제품의 안전성 및 안정성 평가

1. 서 언

돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge)은 돌나물과에 속하는 다년생 초본으로 비타민 C와 칼슘 함량이 높아 식품재료로서의 가치가 높을 뿐 만 아니라, 약리효과가 뛰어나다. 한방에서는 석상채(石上採), 수분초(垂盆草), 불갑초(佛甲草), 석련화(石蓮花) 등으로 불리고, 청열소종의 효능이 있어 인후염과 만성간염의 치료에 이용되며, 해독작용도 뛰어나 독충이나 해충에 물렸을 때 환부에 붙이기도 한다. 민간에서 약리효과가 있다고 알려져 있는데, 최근 돌나물 추출물의 항암효과 및 간염, HIV에도 효과적이라는 연구가 국내외적으로 활발하게 이루어지고 있다(He 등, 1998; Park 등, 2002; Woo 등, 1997; 김 등, 2004).

이러한 기능성 식품에는 비타민 A, C, E, flavonoids, anthocyanins, carotenoids, tanic acid 등의 항산화물질이 풍부하게 들어 있어 활성산소가 생기는 것을 막고 노화를 억제시키거나, 각종 암 및 질병을 예방하는데 도움이 된다(Cameron 등, 1979; Sen, 1955). 최근 이러한 기능성 물질이 많이 함유된 식품재료를 이용하여 기능성 식품으로 개발하여 산업화하려는 연구가 많이 이루어지고 있다. 돌나물은 독특한 맛과 향을 가지면서 항산화 활성 및 생리활성 효과가 높을 뿐 만 아니라, 우리나라에서는 어느 지역에서나 생산이 가능한 건강야채로서 건강음료 재료로서도 적합하지만(김 등, 2002), 이를 산업화하려는 적극적 연구는 미흡한 실정이다. 이에 따라 돌나물의 무기성분, 기능성 영양 성분 및 향기성분 분석과 항산화 활성 및 생리활성 등을 다각도로 검정하여 기능성 식품으로 개발할 필요가 있다.

따라서 본 연구는 돌나물을 재료로 음료, 젤리, 차 등의 제품 개발에 영향을 미치는 돌나물 체내의 수분과 회분, 환원당 및 비타민 A, C를 정량하고 조지방, 조단백의 함량 측정과 향기 및 향미성분 분석 등을 수행하고, 개발된 돌나물 제품에서 급성 및 아급성 독성과 유전독성, 세포독성시험과 세포막 안정화 시험 및 간독성 지표 효소의 활성도, 아급성 독성 시험 후의 조직 검사 등을 수행하고자 한다. 또한 생산된 제품의 색상, 중량(용량)편차, 확인시험, 함량시험, 보존제 시험, 미생물오염시험, 중금속시험 및 pH, 알코올 도수 등을 분석하고자 한다.

2. 연구방법

가. 돌나물의 주요성분 분석

1) 돌나물의 수분 및 무기성분 분석

가) 수분 및 회분 정량

수분함량은 적외선 수분측정기를 이용하여 측정하였다. 회분 정량은 1g의 돌나물시료를 항량을 구한 도가니에 넣고 550℃에서 4시간 동안 회화한 후 200℃로 온도가 내려가면 데시케이터에서 방냉한 후 평량하였다. 항량이 될 때까지 회화, 방냉, 평량을 반복하여 함량을 구하였다.

나) 무기성분 분석

시료 1g에 질산 20ml을 비이커에 넣고 서서히 가열하여, 갈색증기의 발생이 끝나고 비이커 속의 액이 5ml 정도 되면 c-HClO₄를 20ml 가하여 무색이 될 때까지 가열하여 냉각시킨 후 초순수로 비이커의 분해액을 씻어 100ml로 정용하여 여과한 후 유도플라즈마원자방출분광법(ICP-AES: Optima 3300DV, Perkin-Elmer Instruments, USA)로 분석하여 무기성분을 정량하였다.

2) 돌나물의 영양성분 분석

가) 조지방 -soxhlet 추출장치 이용

분말 시료 2g을 원통여지에 넣고 탈지면으로 입구를 막아 105℃에서 2시간 건조시켜 데시케이터에서 방냉시킨 후 soxhlet 추출관에 넣고 수기에 2/3정도의 ether를 넣고 65℃에서 8시간 가열 추출하였다. 추출 후 soxhlet관을 분리하여 원통여지를 꺼내고 ether를 수기에 모두 회수하여 evaporator에서 감압농축한 후, 105℃ 오븐에서 1시간 건조한 후 데시케이터에서 방냉하여 수기의 항량이 도달할 때까지 반복하여 조지방의 항량을 구하였다.

나) 조단백 - michro Kjeldahl 장치 이용

분말시료 1g, 분해촉매제(K₂SO₄ : CuSO₄·5H₂O 9:1) 2g, 황산 20ml을 켈달플라스크에 넣고 500℃에서 3시간동안 분해한 후 증류수로 희석하여 250ml로 정용하여 시료분해액으로 사용하였다. 30% NaOH와 시료분해액 10ml을 넣고 증류하여 0.1N H₂SO₄용액에 암모니아 가스를 포집한 후 잔존하는 황산을 0.1N NaOH로 적정하여 조단백질 양을 구하였다.

다) 환원당 정량

환원당에 의해 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)가 환원되어 생성된 3-amino-5-nitrosalicylic acid의 흡광도를 측정하여 당을 정량하였다. 시료용액 1ml에 DNS시약 2ml을 넣고 10분간 끓인 후 냉각하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 당농도는 0.2% glucose 표준용액 standard 곡선에서 계산하였다.

라) 비타민 A 정량

돌나물 분말시료 1g을 검화플라스크에 넣고 50% KOH 3ml과 20ml의 ethyl alcohol을 넣고 80°C 항온 수조에서 30분간 환류냉각하여 검화시킨 후 즉시 찬물로 냉각한 후 분액깔대기에 옮겨 벤젠 100ml을 가하여 강하게 진탕한 후 1N KOH 용액 100ml을 넣고 다시 한번 진탕한 후 물층을 버렸다. 계속해서 0.5N KOH를 넣고 페놀프탈렌 지시약으로 홍색이 나타나지 않을 때까지 진탕하여 물층을 버린다. 분액깔대기의 벤젠층을 탈수시킨 후 소량의 ascorbic acid를 넣어 산화를 방지하고 50ml의 벤젠층을 취해 진공농축하여 클로로포름 1ml에 녹여 시료용액으로 하였다. 클로로포름을 blank로 하고 시료용액 0.3ml, 클로로포름 0.3ml을 tube에 넣고 클로로포름에 녹인 삼염화안티몬 2ml을 넣어 혼합 한 후 바로 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

마) 비타민 C정량

산화형 비타민C는 DNP용액과 작용하여 정량적으로 적색의 osazone을 형성한다. 이것에 황산용액을 가해 정색이 되는 것을 이용하여 비타민 C를 정량하였다. 돌나물 분말시료 5g을 막자사발에 넣고 4ml의 5% 메타인산과 적당량의 해사를 넣고 잘 마쇄하여 5ml의 물을 넣고 원심분리한 후 상층액을 시료용액으로 하였다. 3개의 시험관에 시료용액 2ml을 넣고(a.총비타민 C용,b. dehydroascrobic acid용, c.맹검용) thiourea용액 2ml을 가하였다. a, b의 시험관에 DNP 용액을 각각 1ml씩 넣고 37°C에서 3시간 반응한 후 얼음물 속에 넣고 85% 황산을 5ml씩 넣고 c의 시험관에는 DNP 용액 1ml을 넣은 후 실온에서 30분 방치한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{총비타민 C량(mg/100g)} = C1 \times \frac{A}{2} \times \frac{100}{S}$$

$$\text{dehydroascrobic acid량(mg/100g)} = C2 \times \frac{A}{2} \times \frac{100}{S}$$

환원형 비타민 C량 = 총비타민 C량 - dehydroascrobic acid량

C1 : 시험관 a의 비타민 C량

C2 : 시험관 b의 비타민 C량

A : 조제시료용액(ml), S : 시료채취량(g)

3) 돌나물의 향기성분 분석

돌나물의 생체중을 측정하고 diethyl ether로 3회 추출하고 이들 ether 추출물을 무수 Na_2SO_4 로 탈수시키고 다시 40°C 이하에서 감압농축하여 vial에 옮겨 1 ml 까지 재농축하여 GC와 GC/MS의 분석시료로 사용하였다.

나. 돌나물 제품의 안전성 및 안정성 평가

1) 돌나물 음료의 안전성 및 안정성 평가

돌나물 숙취해소 음료를 시료로 하여 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 식품조사기준에 따라 실시하였다. 또한 실온에 저장시 3개월간 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 1개월 간격으로 조사하였다.

2) 돌나물 젤리의 안전성 및 안정성 평가

돌나물 젤리를 시료로 하여 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 식품조사기준에 따라 실시하였다. 또한 4°C 냉장저장에 따른 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 3, 7, 10일 제에 조사하였다.

3) 돌나물 차의 안전성 및 안정성 평가

돌나물 차를 시료로 하여 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 식품조사기준에 따라 실시하였다. 또한 실온에 저장시 6개월간 제품의 성상, 중량편차, 증발잔류물, 성분확인, 품질 특성에 대한 변화와 대장균, 녹농균, 살모넬라균, 황색포도구균, 일반세균, 진균 등의 미생물 오염을 2개월 간격으로 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 돌나물 주요성분

1) 돌나물의 수분 및 영양성분

채집 지역 및 부위별 돌나물의 수분 및 영양성분을 분석하였다 (Table 1). 수분함량은 개화기 보다 영양생장기에 높은 경향을 보였는데, 영양생장기에는 92.8–98.9%로 수분함량이 높았으며, 개화기에는 86.2–95.6%의 범위를 보였다. 조지방과 조지방은 영양생장기에 다소 높았으나, 조단백질은 차이를 보이지 않았다. 따라서 지역 수집종간 회분, 조지방, 조단백질 함량 간에 유의적인 차이는 없었다.

Table 1. Contents of water content, crude protein, crude fat, and crude ash between vegetative and flowering stage in local strains of *S. sarmentosum*.

Local strain	Material	Water content (%)	crude ash (%)	crude fat (%)	crude protein (%)
<i>Vegetative growth stage</i>					
Wanju	Stem	95.27±2.71	0.81±0.01	0.25±0.05	1.31±0.03
Gunsan	Stem	97.01±3.08	1.01±0.05	0.31±0.04	1.28±0.18
Keumsan	Stem	95.41±0.93	1.16±0.08	0.28±0.05	1.21±0.31
Bucheon	Stem	93.15±1.88	0.91±0.06	0.36±0.03	1.34±0.01
Pocheon	Stem	92.78±2.46	0.94±0.02	0.29±0.08	1.26±0.05
Wando	Stem	98.93±5.22	1.09±0.06	0.29±0.02	1.21±0.01
<i>Flowering stage</i>					
Wanju*	Stem	89.05±3.46	1.15±0.03	0.31±0.08	1.39±0.12
Gunsan*	Stem	86.23±2.84	1.02±0.06	0.42±0.08	1.09±0.09
Keumm	Stem	93.77±1.99	1.66±0.03	0.26±0.01	1.35±0.11
	Flower stock	94.02±3.78	1.59±0.03	0.49±0.08	1.44±0.12
Bucheon	Stem	92.85±1.39	1.38±0.02	0.33±0.07	1.27±0.06
	Flower stock	95.55±4.33	1.26±0.01	0.27±0.04	1.34±0.03
Pocheon	Stem	93.72±2.28	1.46±0.04	0.28±0.07	1.17±0.05
	Flower stock	92.42±2.95	1.38±0.03	0.24±0.03	1.19±0.08
Wando	Stem	91.34±2.88	1.16±0.01	0.31±0.02	1.40±0.04
	Flower stock	94.11±1.49	1.09±0.09	0.36±0.01	1.23±0.09

* Non-flowering strains.

또한 돌나물을 채집 지역별로 분리하여 돌나물 내에 함유된 무기 이온의 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 각 지역 수집종마다 무기 이온의 농도가 다르게 함유되어 있음을 알 수 있었다. 금산(꽃대), 군산(줄기), 완도(꽃대)에서 분석된 칼슘의 농도가 다른 시료들보다 매우 높은 것으로 나타났다. 부천(꽃대), 봉동(줄기), 군산(줄기)의 인의 함량이 높았고, 부천(꽃대), 완도(꽃대), 봉동(줄기)의 나트륨 함량이 높은 것으로 분석되었다. 철분 함량은 군산, 완도, 금산 시료에서 높게 분석되었고, 칼륨 함량은 완도, 부천, 군산 시료에서 높게 나타났다. 나트륨과 인은 우리나라 식이에서 부족하지 않을 뿐만 아니라 섭취량이 많을 경우 다른 영양소의 흡수를 방해할 수 있으므로 이들의 함량이 높다하여 우수한 계통이라고 판단하기는 어려웠다.

Table 2. Contents of inorganic elements between vegetative and flowering stage in local strains of *S. sarmentosum*.

Local strain	Material	Inorganic elements (mg/100g edible portion)				
		Ca	P	Fe	Na	K
<i>Vegetative growth stage</i>						
Wanju	Stem	95.27±2.71	0.81±0.01	0.25±0.05	1.31±0.03	1.31±0.03
Gunsan	Stem	182.72	21.09	2.76	13.87	153.98
Keumsan	Stem	180.27	21.23	2.47	13.03	127.35
Bucheon	Stem	119.02	19.87	2.11	12.98	158.13
Pocheon	Stem	130.99	20.38	2.15	14.22	143.86
Wando	Stem	129.14	23.08	2.56	12.99	170.02
<i>Flowering stage</i>						
Wanju*	Stem	181.18	24.39	2.44	14.83	152.37
Gunsan*	Stem	320.27	28.29	1.20	12.42	100.85
Keumm	Stem	280.21	21.48	1.63	14.03	107.25
	Flower stock	330.09	27.35	1.95	16.84	133.86
Bucheon	Stem	200.19	26.17	1.03	11.24	118.47
	Flower stock	280.62	37.55	2.00	25.05	139.58
Wando	Stem	168.92	20.26	0.65	13.85	109.21
	Flower stock	291.87	24.54	0.95	23.17	120.43
Pocheon	Stem	180.82	24.85	1.44	18.44	122.75

* Non-flowering strains.

그러나 우리나라 식이 섭취 조사에서 전통적으로 섭취량이 부족한 칼슘과 철분의 함량이 높은 돌나물이 우수한 것으로 생각되었다. 또한 우리나라에서는 나트륨의 과잉 섭취가 문제시되고 있다. 대부분의 영양학자들은 나트륨을 과잉 섭취할수록 칼륨의 섭취량도 증가시킬 것을 권장하고 있다. 따라서 칼륨, 칼슘, 철분의 함량이 높은 금산(꽃대), 완도, 군산 시료가 우수한 계통인 것으로 사료되었다.

2) 돌나물의 영양성분

돌나물의 영양성분을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 환원당 함량은 일반 시료와 돌나물 시료 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. Ascorbic acid 함량은 일반 시료에 비하여 군산(줄기) 시료의 함량이 높았고, beta-carotene 함량은 일반 시료에 비하여 군산 시료에서 높게 분석되었다. 이상의 무기이온 및 영양성분을 분석한 결과를 종합하면 여러 지역에서 채취한 돌나물 시료 중 “군산” 시료가 가장 우수한 자원인 것으로 판단되었다.

3) 돌나물의 향기성분

돌나물의 향기성분을 분석한 GC chromatogram은 Fig. 1과 같다. 총 16종의 향기성분이 분리되었고, 이를 GC-MS를 통해 동정하였다 (Table 4). 제품생산에 영향이 있는 풀냄새를 내는 것으로 알려진 방향성분들이 다수 동정되었고, pungent한 물질도 2개가 동정되었다. 돌나물의 향기성분은 대부분 pyrazine 및 이들 유도체인 것으로 사료되었다.

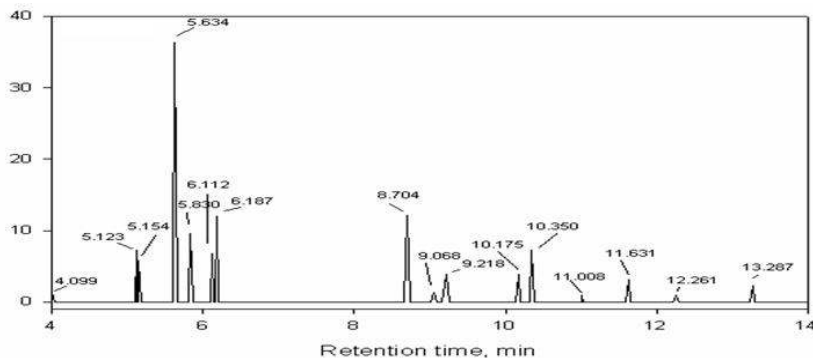


Fig. 1. Chromatogram of volatile compounds from *S. sarmentosum*.

Table 3. Variation of nutritive contents between vegetative and flowering stage in local strains of *S. sarmentosum*.

Local strain	Material	Reducing sugar (g/100g)	Vitamin C (mg/100g)	β-carotin (mg/100g)
<i>Vegetative growth stage</i>				
Wanju	Stem	1.14±0.03	25.27±1.71	695.7±21.7
Gunsan	Stem	1.16±0.08	23.01±1.08	697.1±30.8
Keumsan	Stem	1.16±0.01	25.41±1.93	654.1±29.3
Bucheon	Stem	1.17±0.01	23.15±1.88	691.5±21.8
Pocheon	Stem	1.14±0.05	23.78±1.46	692.8±26.1
Wando	Stem	1.18±0.01	24.93±1.22	689.3±25.2
<i>Flowering stage</i>				
Wanju*	Stem	1.12±0.02	25.45±1.46	690.5±46.6
Gunsan*	Stem	1.17±0.09	26.23±1.84	682.3±24.8
Keumm	Stem	1.13±0.01	23.77±1.99	639.7±19.3
	Flower stock	1.18±0.02	24.02±1.78	640.2±37.2
Bucheon	Stem	1.14±0.06	24.85±1.39	692.5±19.4
	Flower stock	1.18±0.03	25.55±1.33	659.5±34.3
Pocheon	Stem	1.19±0.05	23.72±1.28	637.2±28.2
	Flower stock	1.14±0.08	24.42±1.95	642.2±29.1
Wando	Stem	1.13±0.04	25.34±1.88	639.4±28.8
	Flower stock	1.15±0.09	24.11±1.49	649.1±34.9

* Non-flowering strains

Table 4. Identified volatile compounds from *S. sarmentosum*.

No.	R.T.*	Compounds	Characteristics
1	4.099	2-pentanol	grassy green
2	5.123	2-hexanol	green, grass-like
3	5.154	ethyl acetate	ethereal, fruity, brandy-like odor
4	5.634	Internal standard**	
5	5.830	pyrazine	pungent, greeny
6	6.112	ethyl pyrazine	greeny
7	6.187	hexanal	leafy
8	8.704	2,3-Dimethyl-5-ethyl pyrazine	green, beany
9	9.068	2,6-Diethyl pyrazine	green, bell pepper-like
10	9.218	ethyl butyrate	fruity, pineapple, banana, ethereal
11	10.175	ethyl isovalerate	fruity, apple on dilution odor
12	10.350	2-hexenol	grassy, leaf, metallic
13	11.008	ethyl valerate	fruity, apple odor
14	11.631	hexyl butyrate	fruity, heavy odor
15	12.261	allyl-2-ethyl butyrate	oily-fruity odor
16	13.287	2-butyl benzothiazole	medicinal, slight pungent

나. 간기능 개선 및 간암 억제작용이 강화된 돌나물 제품(숙취해소음료)의 안전성 및 안정성 평가

간기능강화 및 숙취해소 음료를 시료로 하여 제품의 안전성 평가를 실시한 결과는 Tables 5-19와 같다. 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 시행하였다. Tables 5-19에서와 같이 시제품은 모든 안전성 실험에서 안전한 것으로 확인되었고, 동물 실험 종료 후의 조직검사에서도 정상조직과 다른 점을 발견할 수 없었다. 따라서 본 연구에서 개발된 돌나물을 이용한 간기능강화 및 숙취해소 음료의 섭취는 인체에 독성을 유발하지 않는 안전한 제품인 것으로 사료되었다. 또한 Table 20의 안정성 평가에서 실온에 저장시 3개월간 제품의 품질이 변하지 않는 것으로 사료되었다.

Table 5. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding beverage.

Items	Groups	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> beverage	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Initial weight		201.0±15.15	157.7±13.08	205.6±10.01	158.3±10.21
Final weight		290.0±13.16	198.0±15.4	295.8±9.03	197.3±13.87
Weight gain		89.0±16.30	40.3±6.28	90.7±15.48	39.9±10.22
Mean food intake		26.3±1.83	19.0±1.92	26.9±1.72	18.2±1.79
Mean water intake		36.5±2.3	35.5±3.2	35.7±1.9	35.1±2.7
FER		0.24±0.04	0.15±0.02	0.21±0.03	0.15±0.01

Table 6. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding beverage (major organs).

Organs	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> beverage	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Liver		9.172±0.715	6.266±0.592	9.332±0.511	6.283±0.813
Spleen		0.719±0.084	0.512±0.036	0.731±0.075	0.518±0.019
Thyroid gland		0.017±0.002	0.014±0.003	0.017±0.001	0.014±0.006
Brain		1.626±0.055	1.492±0.073	1.627±0.011	1.481±0.027
Heart		1.053±0.099	0.774±0.102	1.052±0.037	0.771±0.073
Kidney	L	1.063±0.072	0.728±0.037	1.061±0.013	0.731±0.029
	R	1.162±0.166	0.757±0.040	1.162±0.053	0.751±0.085
Lung	L	0.481±0.027	0.380±0.022	0.480±0.031	0.379±0.005
	R	0.967±0.090	0.767±0.029	0.959±0.028	0.764±0.034
Adrenal	L	0.024±0.002	0.027±0.006	0.024±0.001	0.027±0.005
	R	0.023±0.003	0.025±0.010	0.023±0.002	0.025±0.009
Testis/	L	1.733±0.139	0.044±0.014	1.739±0.121	0.044±0.011
Ovary	R	1.728±0.103	0.042±0.003	1.713±0.074	0.042±0.009

Table 7. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding beverage (urine).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> beverage	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Excretion	19.03±2.34	21.28±6.38	20.11±2.92	21.57±5.16
pH	8.5±0.00	8.4±0.22	8.5±0.12	8.4±0.21
Glucose(mg/dl)	15.60±11.01	10.80±10.33	15.40±10.63	10.25±11.09
Protein(mg/day)	95.40±12.72	93.50±17.97	95.74±10.38	94.69±12.34
Blood	Negative	Negative	Negative	Negative
Microscopy	Negative	Negative	Negative	Negative
Ketone*	0.60±0.22	0.30±0.27	0.60±0.19	0.31±0.12
Bilirubin	Negative	Negative	Negative	Negative
Nitrite	Negative	Negative	Negative	Negative

Table 8. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding beverage (plasma).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> beverage	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Protein(g/dl)	5.35±0.26	5.52±0.27	5.38±0.17	5.57±0.31
BUN(mg/dl)	15.32±2.96	17.47±3.90	15.02±3.81	16.93±3.02
Glucose(mg/dl)	120.5±13.74	122.5±8.64	121.5±18.73	121.92±9.15
Cholesterol(mg/dl)	88.33±10.25	70.50±10.41	82.54±8.35	68.67±10.81
Bilirubin(mg/dl)	0.10±0.08	0.10±0.00	0.09±0.07	0.09±0.03
Creatinine(mg/dl)	0.50±0.04	0.50±0.00	0.50±0.00	0.50±0.01
Na(mmol/L)	137.17±3.19	137.00±1.67	137.67±1.32	137.02±1.05
K(mmol/L)	41.50±19.55	40.03±6.09	40.84±7.21	40.17±5.42
Cl(mmol/L)	95.83±1.60	96.50±1.97	95.35±1.85	96.39±1.05

Table 9. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding beverage (EDTA–blood).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> beverage	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
RBC(*10 ³ mm ³)	7.09±0.38	7.18±0.29	7.13±0.22	7.25±0.28
WBC(*10 ³ mm ³)	8.70±1.42	5.79±0.62	8.71±1.28	5.73±1.18
HCT(%)	50.00±3.58	48.33±1.51	52.27±0.95	49.26±0.85
Hb(g/dl)	14.17±0.98	14.37±0.53	15.98±0.93	14.38±0.74
MCV(μ ³)	70.33±1.51	67.33±1.03	70.09±2.17	67.78±1.24
MCH(μg)	19.83±0.75	20.00±0.63	21.23±0.83	20.09±0.25
MCHC(g/ml)	28.33±0.52	29.67±0.52	28.37±0.36	29.46±0.47
Platelet(*10 ⁵ mm ³)	9.21±1.56	9.70±0.99	9.19±1.48	9.63±0.45
Reticulocyte(%)	5.73±0.77	4.48±0.50	5.75±0.47	4.49±0.45
Neutrophil Seg(%)	13.00±3.46	13.33±5.92	13.02±4.83	13.28±5.04
Lymphocyte(%)	79.67±4.41	83.33±4.08	80.25±3.83	83.11±3.59
Monocyte(%)	4.83±3.82	4.50±1.97	5.03±1.25	4.47±1.46
Eosinophil(%)	1.50±0.55	1.83±2.04	1.47±0.34	1.79±1.01

Table 10. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract.

Items \ Groups	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Initial weight	203.0±12.15	159.7±12.06	204.3±7.56	158.6±10.49
Final weight	287.0±10.16	197.0±12.3	284.4±13.68	199.7±13.03
Weight gain	84.0±14.21	37.3±5.04	80.7±14.54	41.1±12.22
Mean food intake	27.3±1.75	18.0±1.74	26.9±1.02	18.4±1.69
Mean water intake	37.3±2.7	35.2±2.1	37.8±2.5	34.8±3.1
FER	0.33±1.25	0.48±1.68	0.33±0.98	0.45±1.03

Table 11. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract (major organ).

Organs	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Liver		9.387±0.376	6.376±0.374	8.937±0.382	6.379±0.774
Spleen		0.721±0.044	0.563±0.067	0.711±0.037	0.562±0.048
Thyroid gland		0.016±0.001	0.014±0.002	0.016±0.003	0.015±0.003
Brain		1.673±0.085	1.589±0.077	1.671±0.094	1.538±0.025
Heart		1.046±0.099	0.782±0.112	1.042±0.075	0.797±0.043
Kidney	L	1.053±0.042	0.729±0.052	1.052±0.069	0.743±0.027
	R	1.062±0.093	0.773±0.032	1.052±0.039	0.763±0.099
Lung	L	0.485±0.031	0.386±0.021	0.488±0.062	0.396±0.083
	R	0.976±0.029	0.779±0.083	0.991±0.090	0.781±0.041
Adrenal	L	0.025±0.001	0.026±0.003	0.024±0.004	0.027±0.001
Grand	R	0.024±0.003	0.025±0.009	0.025±0.003	0.026±0.002
Testis/	L	1.725±0.201	0.043±0.017	1.790±0.039	0.045±0.009
Ovary	R	1.782±0.126	0.044±0.023	1.810±0.005	0.047±0.009

Table 12. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract (urine).

Parameters	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Excretion		23.42±1.54	20.36±4.74	23.56±5.87	21.48±2.41
pH		8.5±0.15	8.4±0.14	9.5±0.24	8.4±0.27
Glucose(mg/dl)		13.54±10.45	12.52±10.78	13.48±10.24	11.99±10.27
Protein(mg/day)		90.47±10.77	73.57±27.78	92.58±10.73	77.82±22.58
Blood		Negative	Negative	Negative	Negative
Microscopy		Negative	Negative	Negative	Negative
Ketone*		0.40±0.23	0.40±0.25	0.40±0.23	0.40±0.52
Bilirubin		Negative	Negative	Negative	Negative
Nitrite		Negative	Negative	Negative	Negative

Table 13. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract (plasma).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Protein(g/dl)	5.25±0.16	5.47±0.16	5.27±0.14	5.34±0.18
BUN(mg/dl)	15.98±1.95	16.55±2.98	14.99±7.23	16.43±3.56
Glucose(mg/dl)	123.5±11.54	122.4±7.45	126.1±18.64	120.03±23.22
Cholesterol(mg/dl)	89.35±21.42	78.83±14.78	82.56±8.35	79.82±14.76
Bilirubin(mg/dl)	0.08±0.05	0.08±0.02	0.08±0.03	0.08±0.05
Creatinine(mg/dl)	0.50±0.02	0.50±0.04	0.50±0.01	0.50±0.06
Na(mmol/L)	137.17±2.53	137.00±1.82	137.61±0.25	137.01±2.63
K(mmol/L)	43.57±13.53	40.78±3.94	42.79±4.69	40.32±10.45
Cl(mmol/L)	96.82±1.33	96.73±1.03	96.78±1.94	96.01±1.94

Table 14. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract (EDTA–blood).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
RBC(*10 ³ mm ³)	7.14±1.45	7.21±1.03	7.14±0.36	7.33±0.35
WBC(*10 ³ mm ³)	8.73±1.23	5.81±1.53	8.74±1.56	5.92±1.67
HCT(%)	49.76±2.55	48.02±2.44	50.23±1.00	49.56±2.31
Hb(g/dl)	14.21±0.21	14.67±0.83	15.05±0.63	14.90±0.88
MCV(μ ³)	71.11±1.67	67.01±1.94	71.38±1.89	67.27±2.13
MCH(μg)	20.03±1.67	20.32±0.83	20.92±0.38	20.73±0.33
MCHC(g/ml)	29.74±0.28	29.98±0.47	29.78±0.47	29.98±0.95
Platelet(*10 ⁵ mm ³)	9.07±0.74	8.74±1.04	9.05±0.94	8.93±0.49
Reticulocyte(%)	5.68±1.67	4.31±0.59	5.72±1.75	4.47±1.97
Neutrophil Seg(%)	14.70±2.68	13.34±4.67	14.66±7.35	13.21±4.87
Lymphocyte(%)	80.24±3.56	82.36±3.17	80.23±6.27	83.95±5.38
Monocyte(%)	4.95±2.64	3.98±2.08	5.06±2.84	4.07±0.63
Eosinophil(%)	0.98±0.54	1.21±2.21	1.01±0.23	1.03±0.87

Table 15. Antimutagenic test of *S. sarmentosum* extract.

Sample	S9 mix	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate (mean \pm S.D.)	
			TA98	TA100
H ₂ O	-		24 \pm 1.5	110 \pm 12
	+		24 \pm 2	114 \pm 17.7
Extract	-	2500	24 \pm 2.1	156 \pm 12
	-	1250	32 \pm 0.7	140 \pm 20
	-	625	23 \pm 3.5	146 \pm 5.7
	-	313	23 \pm 5	153 \pm 8.5
	-	156	20 \pm 0.7	143 \pm 7.8
	+	2500	35 \pm 3.5	162 \pm 7.8
Extract	+	1250	33 \pm 1.4	160 \pm 4.2
	+	625	33 \pm 0	143 \pm 0.7
	+	313	35 \pm 0.7	146 \pm 15.5
	+	156	29 \pm 1.4	143 \pm 2.8
	+			
Positive control	-		506 \pm 69 ^a	772 \pm 97 ^b
	+		873 \pm 39 ^c	1408 \pm 82 ^c

Positive control agents: ^a4-Nitroquinoline-1-oxide(0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$), ^bSodium azide(0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$), ^c2-Aminoanthracene(0.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$)

Table 16. Cytotoxicity test of *S. sarmentosum* extract.

Extract	Cell lines		Liver n=8.	Intestine
	L: low concentration	H: High concentration		
control	L		100	100
MeOH	L		101.21 \pm 0.91	97.72 \pm 6.83
	H		99.54 \pm 2.56	99.73 \pm 2.87
Hex	L		99.98 \pm 1.78	100.03 \pm 2.87
	H		97.28 \pm 4.20	97.49 \pm 1.98
EA	L		97.32 \pm 4.09	98.33 \pm 1.87
	H		99.38 \pm 2.21	96.48 \pm 3.82
BuOH	L		98.33 \pm 3.95	99.46 \pm 1.73
	H		96.21 \pm 2.74	98.77 \pm 4.88

Table 17. Inhibition effect of *S. sarmentosum* extract on gastrointestinal cancer cell lines.

Product	Cell lines		MKN-45	HT-29
control	L		100	100
	I		100	100
1×10	L		28.59±5.32	42.44±3.41
	I		35.72±2.56	36.44±3.26
1×10 ²	L		39.99±2.59	47.75±3.53
	I		49.54±3.47	40.31±1.21
1×10 ⁴	L		47.96±4.21	47.99±3.36
	I		50.42±1.57	41.03±0.07
1×10 ⁶	L		81.47±2.73	72.03±7.51
	I		57.02±2.05	43.23±1.32

MKN-45; human gastric cancer cell line, HT-29; human colon cancer cell line, L; live yeast cell diluted in phosphate buffered saline, I; inactivated at 95°C for 30 min, n=8.

Table 18. Hemolysis test of *S. sarmentosum* extract adding beverage.

	<i>S. sarmentosum</i> beverage	
	100%	50%
Hemolysis	0.0975±1.414	0.0062±0.0053

The degree of hemolysis was obtained from standard curve ($y = 0.0108x + 0.0001$, $R^2=0.9999$).

Table 19. Hepatotoxicity test of *S. sarmentosum* extract adding beverage.

Parameters	Group	Untreated control		<i>S. sarmentosum</i> beverage	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
GOT(U/L)		73.17±27.65	66.67±6.80	73.83±12.22	72.00±8.69
GPT(U/L)		41.50±10.37	32.50±4.59	40.17±7.83	41.33±17.26
ALP(U/L)		1.17±1.33	1.50±1.05	0.83±0.75	0.50±0.55

Table 20. Stability of *S. sarmentosum* extract adding beverage.

시험항목		제조초기	1개월 후	2개월 후	3개월 후
성상변화		연녹색, 황갈색, 흑갈색등돌나물 추출액의 색을 띠며	제조 초기의 음료색에 변화가 없음	제조 초기의 음료색에 변화가 없음	제조 초기의 음료색에 변화가 없음
중량편차		130±2.5	129.5±3.0	129.0±2.8	128.7±2.5
증발잔류물		0.3±0.02	0.31±0.01	0.35±0.01	0.34±0.01
성분확인		TLC plate band 확인			
미생물 오염	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라균	불검출	불검출	불검출	불검출
	황색포도구균	불검출	불검출	불검출	불검출
	일반세균	2x10 ² /ml	3.2x10 ² /ml	3.5x10 ² /ml	3.3x10 ² /ml
	진균	25/ml	30/ml	29/ml	28/ml

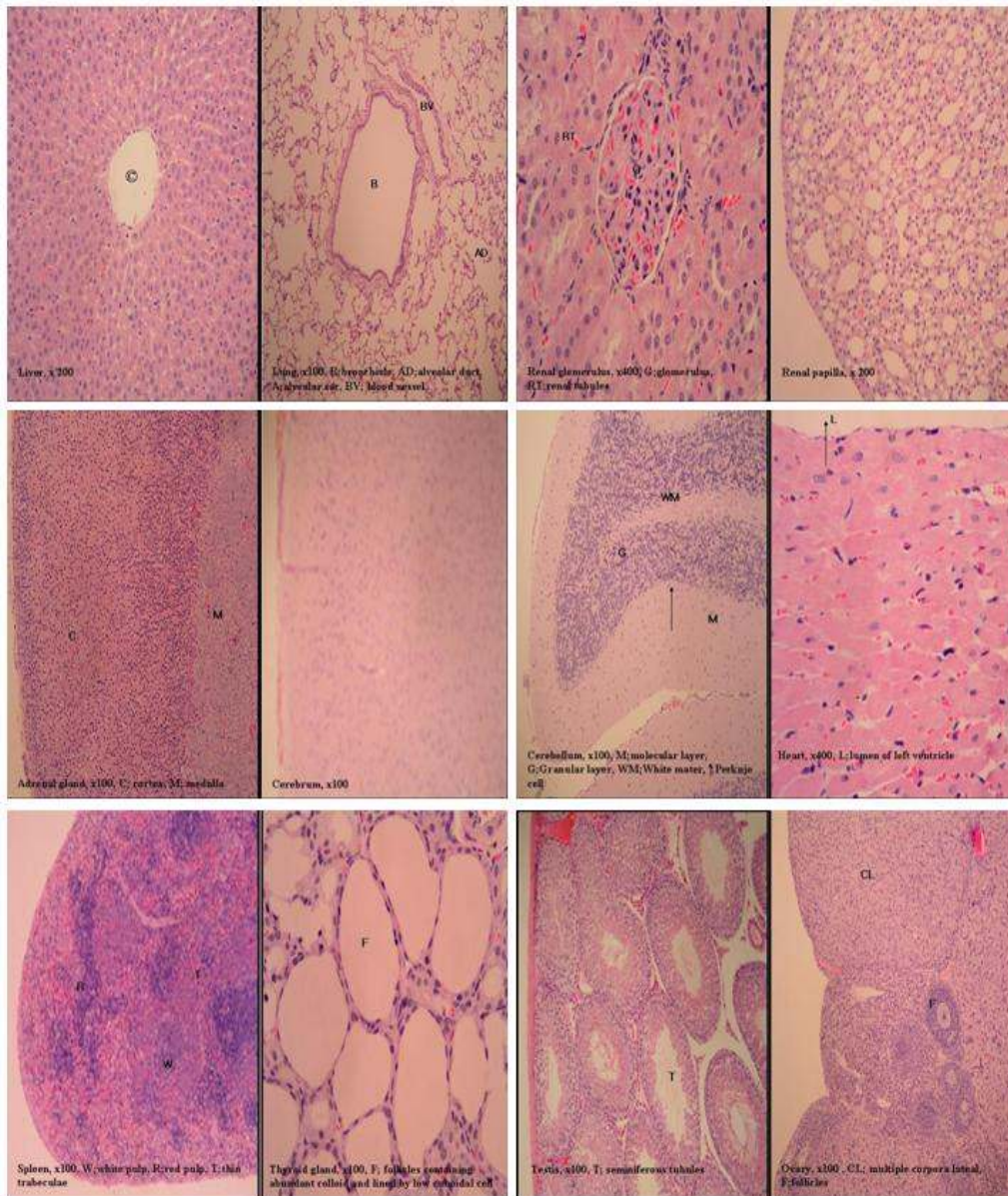


Fig. 2. Histology of *S. sarmentosum* extract treating rat.

다. 항산화 및 면역활성이 강화된 돌나물 제품(돌나물 젤리)의 안전성 및 안정성 평가

항산화 및 면역활성이 강화된 돌나물 제품인 돌나물 젤리를 시료로 하여 제품의 안전성 평가를 실시한 결과는 Tables 21~35와 같다. 반복독성시험, 항돌연변이 원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험을 시행하였다. Tables 21~35에서와 같이 시제품은 모든 안전성 실험에서 안전한 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 돌나물을 이용한 간기능 강화 및 숙취해소 음료의 섭취는 인체에 독성을 유발하지 않는 안전한 제품인 것으로 사료되었다. 또한 Table 36의 안정성 평가에서 냉장 저장시 10일간 제품의 품질이 변하지 않는 것으로 사료되었다.

Table 21. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding jelly (major organs).

Organs	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> jelly	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Liver		9.172±0.715	6.266±0.592	8.832±0.354	6.243±0.770
Spleen		0.719±0.084	0.512±0.036	0.706±0.081	0.552±0.047
Thyroid gland		0.017±0.002	0.014±0.003	0.016±0.004	0.016±0.003
Brain		1.626±0.055	1.492±0.073	1.617±0.090	1.539±0.084
Heart		1.053±0.099	0.774±0.102	1.032±0.069	0.779±0.049
Kidney	L	1.063±0.072	0.728±0.037	1.051±0.088	0.741±0.099
	R	1.162±0.166	0.757±0.040	1.142±0.073	0.756±0.090
Lung	L	0.481±0.027	0.380±0.022	0.489±0.059	0.369±0.021
	R	0.967±0.090	0.767±0.029	0.990±0.099	0.784±0.046
Adrenal	L	0.024±0.002	0.027±0.006	0.023±0.005	0.028±0.006
	R	0.023±0.003	0.025±0.010	0.025±0.007	0.027±0.006
Testis/	L	1.733±0.139	0.044±0.014	1.793±0.119	0.044±0.015
Ovary	R	1.728±0.103	0.042±0.003	1.802±0.096	0.048±0.011

Table 22. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding jelly.

Items	Groups	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> jelly	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Initial weight		201.0±15.15	157.7±13.08	202.3±9.46	159.2±11.29
Final weight		290.0±13.16	198.0±15.4	274.0±15.61	199.0±23.23
Weight gain		89.0±16.30	40.3±6.28	88.7±19.87	39.8±13.82
Mean food intake		26.3±1.83	19.0±1.92	25.9±1.32	18.5±2.47
Mean water intake		36.5±2.3	35.5±3.2	38.7±2.2	33.0±2.3
FER		0.24±0.04	0.15±0.02	0.20±0.06	0.15±0.03

Table 23. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding jelly (urine).

Parameters	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> jelly	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Excretion		19.03±2.34	21.28±6.38	22.55±5.52	19.71±1.35
pH		8.5±0.00	8.4±0.22	8.4±0.42	8.7±0.27
Glucose(mg/dl)		15.60±11.01	10.80±10.33	13.40±13.50	11.25±11.32
Protein(mg/day)		95.40±12.72	93.50±17.97	92.03±20.08	89.60±32.94
Blood		Negative	Negative	Negative	Negative
Microscopy		Negative	Negative	Negative	Negative
Ketone*		0.60±0.22	0.30±0.27	0.60±0.22	0.30±0.22
Bilirubin		Negative	Negative	Negative	Negative
Nitrite		Negative	Negative	Negative	Negative

Table 24. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding jelly (plasma).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> jelly	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Protein(g/dl)	5.35± 0.26	5.52± 0.27	5.28± 0.08	5.27± 0.12
BUN(mg/dl)	15.32± 2.96	17.47± 3.90	14.70± 4.57	16.45± 4.10
Glucose(mg/dl)	120.50±13.74	122.50± 8.64	126.50±28.25	120.17±13.15
Cholesterol(mg/dl)	88.33±10.25	70.50±10.41	79.17± 6.97	78.67±10.56
Bilirubin(mg/dl)	0.10± 0.08	0.10± 0.00	0.08± 0.04	0.08± 0.04
Creatinine(mg/dl)	0.50± 0.04	0.50± 0.00	0.50± 0.00	0.50± 0.06
Na(mmol/L)	137.17± 3.19	137.00± 1.67	137.67± 1.75	135.00± 3.35
K(mmol/L)	41.50±19.55	40.03± 6.09	40.70± 8.99	40.87±13.37
Cl(mmol/L)	95.83± 1.60	96.50± 1.97	96.50± 2.07	96.17± 1.47

Table 25. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract adding jelly (EDTA–blood).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> jelly	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
RBC(*10 ³ mm ³)	7.09±0.38	7.18±0.29	7.44±0.32	7.30±0.27
WBC(*10 ³ mm ³)	8.70±1.42	5.79±0.62	8.73±1.49	5.64±1.79
HCT(%)	50.00±3.58	48.33±1.51	52.67±1.86	49.00±1.55
Hb(g/dl)	14.17±0.98	14.37±0.53	15.58±0.50	14.62±0.62
MCV(μ ³)	70.33±1.51	67.33±1.03	71.17±3.66	67.17±1.83
MCH(μg)	19.83±0.75	20.00±0.63	20.83±0.75	20.17±0.41
MCHC(g/ml)	28.33±0.52	29.67±0.52	29.67±0.82	29.83±0.75
Platelet(*10 ⁵ mm ³)	9.21±1.56	9.70±0.99	9.04±1.54	8.99±1.40
Reticulocyte(%)	5.73±0.77	4.48±0.50	5.27±1.57	4.97±0.56
Neutrophil Seg(%)	13.00±3.46	13.33±5.92	13.67±7.94	13.33±5.85
Lymphocyte(%)	79.67±4.41	83.33±4.08	80.17±8.35	83.83±6.79
Monocyte(%)	4.83±3.82	4.50±1.97	5.17±2.23	4.67±1.75
Eosinophil(%)	1.50±0.55	1.83±2.04	1.00±1.67	1.17±0.41

Table 26. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract used in jelly making.

Items	Groups	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Initial weight		203.0±12.15	159.7±12.06	204.3±7.56	158.6±10.49
Final weight		287.0±10.16	197.0±12.3	284.4±13.68	199.7±13.03
Weight gain		84.0±14.21	37.3±5.04	80.7±14.54	41.1±12.22
Mean food intake		27.3±1.75	18.0±1.74	26.9±1.02	18.4±1.69
Mean water intake		37.3±2.7	35.2±2.1	37.8±2.5	34.8±3.1
FER		0.33±1.25	0.48±1.68	0.33±0.98	0.45±1.03

Table 27. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract used in jelly making (major organ).

Organs	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Liver		9.387±0.376	6.376±0.374	8.937±0.382	6.379±0.774
Spleen		0.721±0.044	0.563±0.067	0.711±0.037	0.562±0.048
Thyroid gland		0.016±0.001	0.014±0.002	0.016±0.003	0.015±0.003
Brain		1.673±0.085	1.589±0.077	1.671±0.094	1.538±0.025
Heart		1.046±0.099	0.782±0.112	1.042±0.075	0.797±0.043
Kidney	L	1.053±0.042	0.729±0.052	1.052±0.069	0.743±0.027
	R	1.062±0.093	0.773±0.032	1.052±0.039	0.763±0.099
Lung	L	0.485±0.031	0.386±0.021	0.488±0.062	0.396±0.083
	R	0.976±0.029	0.779±0.083	0.991±0.090	0.781±0.041
Adrenal	L	0.025±0.001	0.026±0.003	0.024±0.004	0.027±0.001
Grand	R	0.024±0.003	0.025±0.009	0.025±0.003	0.026±0.002
Testis/	L	1.725±0.201	0.043±0.017	1.790±0.039	0.045±0.009
Ovary	R	1.782±0.126	0.044±0.023	1.810±0.005	0.047±0.009

Table 28. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract used in jelly making (urine).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Excretion	23.42±1.54	20.36±4.74	23.56±5.87	21.48±2.41
pH	8.5±0.15	8.4±0.14	9.5±0.24	8.4±0.27
Glucose(mg/dl)	13.54±10.45	12.52±10.78	13.48±10.24	11.99±10.27
Protein(mg/day)	90.47±10.77	73.57±27.78	92.58±10.73	77.82±22.58
Blood	Negative	Negative	Negative	Negative
Microscopy	Negative	Negative	Negative	Negative
Ketone*	0.40±0.23	0.40±0.25	0.40±0.23	0.40±0.52
Bilirubin	Negative	Negative	Negative	Negative
Nitrite	Negative	Negative	Negative	Negative

Table 29. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract used in jelly making (plasma).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Protein(g/dl)	5.25±0.16	5.47±0.16	5.27±0.14	5.34±0.18
BUN(mg/dl)	15.98±1.95	16.55±2.98	14.99±7.23	16.43±3.56
Glucose(mg/dl)	123.5±11.54	122.4±7.45	126.1±18.64	120.03±23.22
Cholesterol(mg/dl)	89.35±21.42	78.83±14.78	82.56±8.35	79.82±14.76
Bilirubin(mg/dl)	0.08±0.05	0.08±0.02	0.08±0.03	0.08±0.05
Creatinine(mg/dl)	0.50±0.02	0.50±0.04	0.50±0.01	0.50±0.06
Na(mmol/L)	137.17±2.53	137.00±1.82	137.61±0.25	137.01±2.63
K(mmol/L)	43.57±13.53	40.78±3.94	42.79±4.69	40.32±10.45
Cl(mmol/L)	96.82±1.33	96.73±1.03	96.78±1.94	96.01±1.94

Table 30. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* extract used in jelly making (EDTA–blood).

Parameters	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> extract	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
RBC(*10 ³ mm ³)		7.14±1.45	7.21±1.03	7.14±0.36	7.33±0.35
WBC(*10 ³ mm ³)		8.73±1.23	5.81±1.53	8.74±1.56	5.92±1.67
HCT(%)		49.76±2.55	48.02±2.44	50.23±1.00	49.56±2.31
Hb(g/dl)		14.21±0.21	14.67±0.83	15.05±0.63	14.90±0.88
MCV(μ ³)		71.11±1.67	67.01±1.94	71.38±1.89	67.27±2.13
MCH(μg)		20.03±1.67	20.32±0.83	20.92±0.38	20.73±0.33
MCHC(g/ml)		29.74±0.28	29.98±0.47	29.78±0.47	29.98±0.95
Platelet(*10 ⁵ mm ³)		9.07±0.74	8.74±1.04	9.05±0.94	8.93±0.49
Reticulocyte(%)		5.68±1.67	4.31±0.59	5.72±1.75	4.47±1.97
Neutrophil Seg(%)		14.70±2.68	13.34±4.67	14.66±7.35	13.21±4.87
Lymphocyte(%)		80.24±3.56	82.36±3.17	80.23±6.27	83.95±5.38
Monocyte(%)		4.95±2.64	3.98±2.08	5.06±2.84	4.07±0.63
Eosinophil(%)		0.98±0.54	1.21±2.21	1.01±0.23	1.03±0.87

Table 31. Antimutagenic test of *S. sarmentosum* extract used in jelly making.

Sample	S9 mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies per plate (mean±S.D.)	
			TA98	TA100
H ₂ O	–		24±1.5	110±12
	+		24±2	114±17.7
Extract	–	2500	24±2.1	156±12
	–	1250	32±0.7	140±20
	–	625	23±3.5	146±5.7
	–	313	23±5	153±8.5
	–	156	20±0.7	143±7.8
	+	2500	35±3.5	162±7.8
Extract	+	1250	33±1.4	160±4.2
	+	625	33±0	143±0.7
	+	313	35±0.7	146±15.5
	+	156	29±1.4	143±2.8
	–		506±69 ^a	772±97 ^b
Positive control	+		873±39 ^c	1408±82 ^c

Positive control agents: ^a4–Nitroquinoline–1–oxide(0.5μg/plate), ^bSodium azide(0.5μg/plate), ^c2–Aminoanthracene(0.4μg/plate)

Table 32. Cytotoxicity test of *S. sarmentosum* extract used in jelly making.

Extract	Cell lines		Liver	Intestine
	L	H		
Control	L		100	100
	H		100	100
MeOH	L		101.21±0.91	97.72±6.83
	H		99.54±2.56	99.73±2.87
Hex	L		99.98±1.78	100.03±2.87
	H		97.28±4.20	97.49±1.98
EA	L		97.32±4.09	98.33±1.87
	H		99.38±2.21	96.48±3.82
BuOH	L		98.33±3.95	99.46±1.73
	H		96.21±2.74	98.77±4.88

L; low concentration, H; High concentration, n=8.

Table 33. Inhibition effect of *S. sarmentosum* extract used in jelly making on gastrointestinal cancer cell lines.

Extract	Cell lines		MKN-45	HT-29
	L	I		
Control	L		100	100
	I		100	100
1×10	L		28.59±5.32	42.44±3.41
	I		35.72±2.56	36.44±3.26
1×10 ²	L		39.99±2.59	47.75±3.53
	I		49.54±3.47	40.31±1.21
1×10 ⁴	L		47.96±4.21	47.99±3.36
	I		50.42±1.57	41.03±0.07
1×10 ⁶	L		81.47±2.73	72.03±7.51
	I		57.02±2.05	43.23±1.32

MKN-45; human gastric cancer cell line, HT-29; human colon cancer cell line, L; live yeast cell diluted in phosphate buffered saline, I; inactivated at 95°C for 30 min, n=8.

Table 34. Hemolysis test of *S. sarmentosum* extract adding jelly.

	Cell	Supernatant
<i>S. sarmentosum</i> jelly	1.6975±1.414	0.0062±0.0053

The degree of hemolysis was obtained from standard curve ($y=0.0108X+0.0001$, $R^2=0.9999$).

Table 35. Hepatotoxicity test of *S. sarmentosum* extract adding jelly.

Parameters	Untreated control		<i>S. sarmentosum</i> jelly	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
GOT(U/L)	73.17±27.65	66.67±6.80	73.83±12.22	72.00±8.69
GPT(U/L)	41.50±10.37	32.50±4.59	40.17±7.83	41.33±17.26
ALP(U/L)	1.17±1.33	1.50±1.05	0.83±0.75	0.50±0.55

Table 36. Stability of *S. sarmentosum* extract adding jelly at 4°C.

시험항목		제조초기	3일 후	7일 후	10일 후
성상변화		연녹색, 황갈색, 흑갈색등돌나물 추출액의 색을 띠	제조 초기의 젤리색에 변화가 없음	제조 초기의 젤리색에 변화가 없음	제조 초기의 젤리색에 변화가 없음
중량편차		100±2.5	100±3.0	100±2.8	100±2.5
증발잔류물		0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
성분확인		TLC plate band 확인			
미생물 오염	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라균	불검출	불검출	불검출	불검출
	황색포도구균	불검출	불검출	불검출	불검출
	일반세균	1x10 ² /ml	1.2x10 ² /ml	1.7x10 ² /ml	1.5x10 ² /ml
	진균	8/ml	7/ml	9/ml	9/ml

라. 지질대사 및 혈행 개선 기능이 강화된 돌나물 제품(돌나물 차)의 안전성 및 안정성 평가

지질대사 및 혈행개선기능이 강화된 돌나물 제품인 돌나물 차를 시료로 하여 제품의 안전성 평가를 실시한 결과는 Tables 37-47 같다. 시제품은 모든 안전성 실험에서 안전한 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 돌나물을 이용한 간기능강화 및 숙취해소 음료의 섭취는 인체에 독성을 유발하지 않는 안전한 제품인 것으로 사료되었다. 또한 Table 48의 안정성 평가에서 실온에서 저장시 6개월 제품의 품질이 변하지 않는 것으로 사료되었다.

Table 37. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder (major organs).

Organs	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Liver		9.172±0.715	6.266±0.592	9.372±0.039	6.276±0.048
Spleen		0.719±0.084	0.512±0.036	0.711±0.081	0.535±0.027
Thyroid gland		0.017±0.002	0.014±0.003	0.017±0.002	0.015±0.002
Brain		1.626±0.055	1.492±0.073	1.623±0.087	1.510±0.084
Heart		1.053±0.099	0.774±0.102	1.045±0.034	0.763±0.424
Kidney	L	1.063±0.072	0.728±0.037	1.059±0.049	0.727±0.037
	R	1.162±0.166	0.757±0.040	1.158±0.143	0.756±0.067
Lung	L	0.481±0.027	0.380±0.022	0.486±0.038	0.372±0.020
	R	0.967±0.090	0.767±0.029	0.988±0.087	0.766±0.034
Adrenal	L	0.024±0.002	0.027±0.006	0.024±0.002	0.027±0.004
Grand	R	0.023±0.003	0.025±0.010	0.024±0.003	0.026±0.004
Testis/	L	1.733±0.139	0.044±0.014	1.738±0.109	0.044±0.013
Ovary	R	1.728±0.103	0.042±0.003	1.798±0.836	0.043±0.001

Table 38. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder.

Items	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Initial weight	201.0±15.15	157.7±13.08	199.3±6.34	158.6±10.32
Final weight	290.0±13.16	198.0±15.4	283.2±9.23	198.5±13.67
Weight gain	89.0±16.30	40.3±6.28	89.3±11.68	40.2±9.44
Mean food intake	26.3±1.83	19.0±1.92	26.2±0.71	18.8±1.43
Mean water intake	36.5±2.3	35.5±3.2	35.6±1.9	35.2±1.8
FER	0.24±0.04	0.15±0.02	0.22±0.01	0.15±0.01

Table 39. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder (urine).

Parameters	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Excretion	19.03±2.34	21.28±6.38	19.75±0.52	20.33±3.57
pH	8.5±0.00	8.4±0.22	8.4±0.02	8.5±0.23
Glucose(mg/dl)	15.60±11.01	10.80±10.33	15.03±10.95	10.46±10.78
Protein(mg/day)	95.40±12.72	93.50±17.97	93.86±12.58	90.34±15.22
Blood	Negative	Negative	Negative	Negative
Microscopy	Negative	Negative	Negative	Negative
Ketone*	0.60±0.22	0.30±0.27	0.60±0.22	0.30±0.25
Bilirubin	Negative	Negative	Negative	Negative
Nitrite	Negative	Negative	Negative	Negative

Table 40. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder (plasma).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Protein(g/dl)	5.35±0.26	5.52±0.27	5.33±0.62	5.61±7.02
BUN(mg/dl)	15.32±2.96	17.47±3.90	14.55±2.55	17.11±0.92
Glucose(mg/dl)	120.5±13.74	122.5±8.64	115.4±10.22	120.83±10.99
Cholesterol(mg/dl)	88.33±10.25	70.50±10.41	75.13±0.99	75.34±8.35
Bilirubin(mg/dl)	0.10±0.08	0.10±0.00	0.09±0.02	0.09±0.03
Creatinine(mg/dl)	0.50±0.04	0.50±0.00	0.50±0.01	0.50±0.03
Na(mmol/L)	137.17±3.19	137.00±1.67	137.55±2.47	135.55±2.45
K(mmol/L)	41.50±19.55	40.03±6.09	41.44±5.61	40.32±10.55
Cl(mmol/L)	95.83±1.60	96.50±1.97	96.01±1.26	95.65±3.57

Table 41. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder (EDTA–blood).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
RBC(*10 ³ mm ³)	7.09±0.38	7.18±0.29	7.04±0.29	7.12±0.23
WBC(*10 ³ mm ³)	8.70±1.42	5.79±0.62	8.70±0.34	5.67±0.46
HCT(%)	50.00±3.58	48.33±1.51	51.34±1.35	48.43±0.95
Hb(g/dl)	14.17±0.98	14.37±0.53	14.65±0.22	14.33±0.28
MCV(μ ³)	70.33±1.51	67.33±1.03	70.45±3.22	67.11±0.44
MCH(μg)	19.83±0.75	20.00±0.63	20.12±0.76	20.09±0.25
MCHC(g/ml)	28.33±0.52	29.67±0.52	27.99±0.22	29.77±0.48
Platelet(*10 ⁵ mm ³)	9.21±1.56	9.70±0.99	9.24±1.51	9.12±1.77
Reticulocyte(%)	5.73±0.77	4.48±0.50	5.71±0.32	4.56±0.52
Neutrophil Seg(%)	13.00±3.46	13.33±5.92	13.23±0.34	13.33±5.33
Lymphocyte(%)	79.67±4.41	83.33±4.08	79.14±4.76	82.55±8.22
Monocyte(%)	4.83±3.82	4.50±1.97	5.01±3.47	4.51±0.98
Eosinophil(%)	1.50±0.55	1.83±2.04	1.37±0.66	1.77±1.35

Table 42. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder.

Items	Groups	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Initial weight		203.0±12.15	159.7±12.06	203.1±4.88	159.6±11.22
Final weight		287.0±10.16	197.0±12.3	283.2±10.34	197.8±10.53
Weight gain		84.0±14.21	37.3±5.04	80.1±10.22	37.8±10.12
Mean food intake		27.3±1.75	18.0±1.74	27.2±1.32	18.2±0.93
Mean water intake		37.3±2.7	35.2±2.1	37.4±2.4	35.3±2.7
FER		0.33±1.25	0.48±1.68	0.33±0.98	0.46±0.03

Table 43. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder (major organ).

Organs	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Liver		9.387±0.376	6.376±0.374	9.326±0.334	6.369±0.384
Spleen		0.721±0.044	0.563±0.067	0.721±0.054	0.562±0.085
Thyroid gland		0.016±0.001	0.014±0.002	0.016±0.002	0.014±0.013
Brain		1.673±0.085	1.589±0.077	1.673±0.085	1.574±0.025
Heart		1.046±0.099	0.782±0.112	1.045±0.065	0.791±0.164
Kidney	L	1.053±0.042	0.729±0.052	1.052±0.086	0.735±0.068
	R	1.062±0.093	0.773±0.032	1.062±0.064	0.770±0.047
Lung	L	0.485±0.031	0.386±0.021	0.486±0.074	0.388±0.054
	R	0.976±0.029	0.779±0.083	0.985±0.064	0.780±0.022
Adrenal	L	0.025±0.001	0.026±0.003	0.024±0.002	0.027±0.001
	R	0.024±0.003	0.025±0.009	0.024±0.003	0.025±0.003
Testis/	L	1.725±0.201	0.043±0.017	1.727±0.053	0.044±0.021
	R	1.782±0.126	0.044±0.023	1.793±0.065	0.045±0.035

Table 44. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder (urine).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Excretion	23.42±1.54	20.36±4.74	23.42±8.34	20.34±1.87
pH	8.5±0.15	8.4±0.14	8.7±0.22	8.4±0.14
Glucose(mg/dl)	13.54±10.45	12.52±10.78	13.55±10.73	12.73±10.33
Protein(mg/day)	90.47±10.77	73.57±27.78	91.32±10.56	75.83±15.39
Blood	Negative	Negative	Negative	Negative
Microscopy	Negative	Negative	Negative	Negative
Ketone*	0.40±0.23	0.40±0.25	0.40±0.22	0.40±0.22
Bilirubin	Negative	Negative	Negative	Negative
Nitrite	Negative	Negative	Negative	Negative

Table 45. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder (plasma).

Parameters \ Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Protein(g/dl)	5.25±0.16	5.47±0.16	5.26±1.03	5.35±1.04
BUN(mg/dl)	15.98±1.95	16.55±2.98	15.13±4.04	16.57±2.85
Glucose(mg/dl)	123.5±11.54	122.4±7.45	125.5±12.93	121.65±10.83
Cholesterol(mg/dl)	89.35±21.42	78.83±14.78	80.33±2.83	76.12±10.32
Bilirubin(mg/dl)	0.08±0.05	0.08±0.02	0.08±0.02	0.08±0.03
Creatinine(mg/dl)	0.50±0.02	0.50±0.04	0.50±0.03	0.50±0.03
Na(mmol/L)	137.17±2.53	137.00±1.82	137.43±0.32	137.32±1.74
K(mmol/L)	43.57±13.53	40.78±3.94	43.74±3.49	41.34±0.96
Cl(mmol/L)	96.82±1.33	96.73±1.03	96.23±1.25	96.64±1.28

Table 46. Repeated toxicity test of *S. sarmentosum* powder (EDTA–blood).

Parameters	Group	Negative control		<i>S. sarmentosum</i> powder	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
RBC(*10 ³ mm ³)		7.14±1.45	7.21±1.03	7.14±1.64	7.23±1.24
WBC(*10 ³ mm ³)		8.73±1.23	5.81±1.53	8.73±1.86	5.85±0.73
HCT(%)		49.76±2.55	48.02±2.44	51.45±0.94	49.83±1.44
Hb(g/dl)		14.21±0.21	14.67±0.83	14.88±0.32	14.86±0.74
MCV(μ ³)		71.11±1.67	67.01±1.94	71.76±1359	67.15±2.43
MCH(μg)		20.03±1.67	20.32±0.83	20.14±1.25	20.52±0.75
MCHC(g/ml)		29.74±0.28	29.98±0.47	29.62±0.53	29.97±0.46
Platelet(*10 ⁵ mm ³)		9.07±0.74	8.74±1.04	9.07±0.64	8.62±0.87
Reticulocyte(%)		5.68±1.67	4.31±0.59	5.69±0.54	4.39±1.24
Neutrophil Seg(%)		14.70±2.68	13.34±4.67	14.69±3.86	13.03±4.65
Lymphocyte(%)		80.24±3.56	82.36±3.17	80.24±3.27	83.13±6.88
Monocyte(%)		4.95±2.64	3.98±2.08	4.99±1.73	3.99±1.87
Eosinophil(%)		0.98±0.54	1.21±2.21	0.99±0.58	1.18±1.23

Table 47. Antimutagenic test of *S. sarmentosum* powder.

Sample	S9 mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies per plate (mean±S.D.)	
			TA98	TA100
H ₂ O	–		24±1.5	110±12
	+		24±2	114±17.7
Powder	–	2500	24±2.1	156±12
	–	1250	32±0.7	140±20
	–	625	23±3.5	146±5.7
	–	313	23±5	153±8.5
	–	156	20±0.7	143±7.8
	+	2500	35±3.5	162±7.8
Powder	+	1250	33±1.4	160±4.2
	+	625	33±0	143±0.7
	+	313	35±0.7	146±15.5
	+	156	29±1.4	143±2.8
Positive control	–		506±69 ^a	772±97 ^b
	+		873±39 ^c	1408±82 ^c

Positive control agents: ^a4–Nitroquinoline–1–oxide(0.5μg/plate), ^bSodium azide(0.5 μg/plate), ^c2–Aminoanthracene(0.4μg/plate)

Table 48. Stability of *S. sarmentosum* tea.

시험항목		제조초기	2개월 후	4개월 후	6개월 후
성상변화		연녹색, 황갈색, 흑갈색 등 돌나물 추출액의 색을 띠	제조 초기의 돌나물차 색에 변화가 없음	제조 초기의 돌나물차 색에 변화가 없음	제조 초기의 돌나물차 색에 변화가 없음
중량편차		100±2.5	100±3.0	100±2.8	98.65±2.5
증발잔류물		0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	1.16±0.01
성분확인		TLC plate band 확인			
미생물 오염	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라균	불검출	불검출	불검출	불검출
	황색포도구균	불검출	불검출	불검출	불검출
	일반세균	2x10 ² /ml	2.1x10 ² /ml	2.7x10 ² /ml	2x10 ² /ml
	진균	1/ml	1/ml	3/ml	3/ml

4. 결 론

가. 돌나물 주요 성분

돌나물의 수분함량은 개화기보다 영양생장기에 높은 경향을 보였는데, 영양생장기에는 92.8-98.9%로 수분함량이 높았다. 조회분, 조지방, 조단백질은, 지역 수집종간에 유의적인 차이는 없었다. 무기 이온의 함량은 지역종 간에 차이를 보였으며, 칼슘 농도는 금산(꽃대), 군산(줄기), 완도(꽃대) 지역종에서 높았다. 철분 함량은 군산, 완도, 금산 시료에서 높게 분석되었고, 칼륨 함량은 완도, 부친, 군산 지역종에서 높게 나타났다. 칼륨, 칼슘, 철분의 함량이 높은 금산, 완도, 군산 지역종이 성분상으로 우수하였다. Ascorbic acid와 beta-carotene 함량은 군산 지역종에서 가장 높았다. 돌나물의 향기성분은 총 16종이 분리되었는데, pyrazine 및 이들 유도체가 주성분이었다. 제품생산에 영향이 있는 풀냄새를 내는 것으로 알려진 방향성분들도 다수 동정되었다.

나. 간기능 개선 및 간암 억제작용이 강화된 돌나물 제품(숙취해소음료)의 안전성 및 안정성 평가

숙취해소 음료를 시료로 하여 제품의 안전성 평가를 실시한 결과, 반복독성 시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물 실험을 통한 간독성유발 시험에서 안전한 것으로 확인되었고, 동물 실험 종료 후의 조직검사에서도 정상조직과 다른 점을 발견할 수 없었다. 따라서 돌나물을 이용한 숙취해소 음료는 인체에 독성을 유발하지 않는 안전한 제품으로 판단되었다. 또한 안정성 평가 결과에서도 실온에 저장할 경우 제품의 품질이 3개월 동안 변하지 않았다.

다. 항산화 및 면역활성이 강화된 돌나물 제품(돌나물 젤리)의 안전성 및 안정성 평가

돌나물 젤리를 시료로 하여 제품의 안전성 평가를 실시한 결과, 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험에서 안전하였다. 또한 안정성 평가에서도 4℃ 냉장 저장할 경우 10일 동안 제품의 품질이 변하지 않았다.

라. 지질대사 및 혈행개선기능이 강화된 돌나물 제품(돌나물 차)의 안전성 및 안정성 평가

돌나물 차를 시료로 하여 제품의 안전성 평가를 실시한 결과, 시제품은 반복독성시험, 항돌연변이원성 검정, 소화기 세포에 대한 세포독성시험, hemolysis test, 동물실험을 통한 간독성유발 시험에서 안전하였다. 또한 안정성 평가 결과, 실온에 저장할 경우 6개월 동안 제품의 품질이 변하지 않았다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구 목표 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
○형태적 특성 및 RAPD를 이용한 돌나물 유전자원의 유연관계 분석	- 31개 지역 수집종의 형태적 특성을 조사하여 유연관계를 조사하였고, DNA 추출하여, Operon random primer(10mer), SRILS uniprimer(20mer)를 이용한 PCR 수행결과, 6개의 SRILS uniprimer를 선발하여 90개의 polymorphic band를 얻었고, 14개의 Operon random primer를 선발하여 46개의 polymorphic band를 얻었다. 이들 polymorphic band를 이용하여 유연관계를 분석한 결과, 형태적인 특성에 의한 군집분석결과와 일치하였음.	100
○유전자원의 기내 활성 보존 및 초저온 동결보존	- 0.2 mg/L BA첨가 MS배지에서 마디배양을 통하여 얻은 multi shoot는 초장 및마디가 짧으며 줄기가 굵어 기내보존에 적합하였고, ABA, agag 농도를 조절 할 경우, 상온 및 저온에서 1년이상 유전자원 보존이 가능하였음. 기내묘 및 휴면기 동아를 기내 저온 또는 초저온 동결보존을 한 결과, 초저온 동결보존은 생존율이 낮아 안전성이 없었으며, 다즙식물인 돌나물은 4℃의 저온저장 또는 기내배양을 통한 유지가(6개월 주기 계대배양) 적합하였음.	100
○돌나물 유통을 위한 저장조건 선발	- 25×10cm 사각 스티로폼 접시에 40개의 돌나물 줄기를 20개씩 두줄로 놓은 다음, 랩(linear LDPE)으로 포장하여 20, 10, 5℃에 각각 저장하였다. 저장후 생체중, 수분함량, 엽록소 함량, 색도 등의 변화를 2일 간격으로 조사한 결과, 돌나물을 스티로폼 접시에 랩포장 할 경우, 5℃에서는 수확 후 8일까지 상품성을 유지한 상태로 저장이 가능하였음.	100
○제품개발을 위한 돌나물 유전자원 확보	- 수집한 돌나물 유전자원의 비타민 C 함량은 지방종간 유의한 차이가 없었으며, 항산화 활성은 광양, 순천, 완도 지방종에서 높았음. 이들 계통들과 함께 생육특성이 양호한 완주, 군산 지방종을 선발하여 증식하였음.	100

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
○ 돌나물로부터 간암억제 물질의 분리 및 동정	- 돌나물의 순차 용매 추출후 MTT assay를 이용한 간암세포 성장 억제 물질의 분리하여 유효성분의 동정	100
○ 돌나물 및 돌나물추출물이 백서의 간기능에 미치는 영향	- 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 백서에서의 간기능관련 효소활성도 측정	100
○ 간기능 관련 단백질의 탐색	- 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 간(암)세포에서 간기능관련 단백질 변화조사하였고, 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 백서에서의 간기능관련 단백질 변화를 조사	100
○ 돌나물 및 돌나물추출물이 간암세포의 분화에 미치는 영향 탐색	- 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 간암세포에서의 세포분화관련 단백질 변화를 탐색	100
○ 간기능개선 및 간암억제 작용이 강화된 제품의 개발	- 간기능개선 및 간암억제작용이 강화된 기능성 음료의 개발의 최적조건 확립하였고, 간기능개선 및 간암억제작용이 강화된 기능성 음료의 관능검사 및 제조공정을 확립	100
○ 지질대사 및 혈행개선 물질의 분리 및 동정	- 돌나물의 순차 용매 추출 - Oil red O staining assay를 이용한 비만성장억제 물질의 분리/동정	100
○ 돌나물 및 돌나물추출물이 비만에 미치는 영향	- 지방세포 분화능 측정 - 고지방식으로 유도된 백서의 비만에 미치는 영향 조사	100
○ 지질대사 및 혈행개선 지표단백질의 동정	- 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 지방세포에서 특이적으로 발현양이 많은 단백질의 양상 분석 - 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 백서에서의 비만관련 단백질 변화 조사	100
○ 돌나물 및 돌나물추출물이 지질대사 및 혈행개선에 미치는 효과	- 백서의 간지질 및 혈청지질 측정 - Lipoprotein lipase, Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) 활성도 측정 - Lipoxygenase 활성, 세포접합인자 활성 측정	100
○ 지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 제품의 개발	- 지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 기능성 제품 개발의 최적조건 확립 - 지질대사 및 혈행개선 기능이 강화된 기능성 제품의 관능검사 및 제조공정 확립	100

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
○항산화 및 면역활성물질의 분리 및 동정	- 돌나물의 순차 용매 추출 - MTT assay를 이용한 면역세포 활성 물질의 분리/동정 - 항산화효소활성을 유도하는 물질의 분리동정	100
○돌나물 및 돌나물추출물이 백서에서의 항산화관련 효소활성에 미치는 영향	- 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 백서에서의 항산화 관련 효소활성도 측정	100
○돌나물 및 돌나물추출물이 면역활성에 미치는 영향	- 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 면역세포에서 단백질 변화 조사 - 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 백서에서의 면역관련 단백질 변화조사	100
○항산화 및 면역활성관련 단백질의 탐색	- 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 백서 및 세포에서의 항산화 관련단백질의 변화 탐색 - 돌나물 및 돌나물추출물을 투여한 백서 및 세포에서의 면역관련단백질의 변화탐색	100
○돌나물의 일반성분, 영양성분, 향기/향미성분 분석	- 돌나물의 일반성분 분석 - 돌나물의 영양성분 분석 - 돌나물의 향기 및 향미성분 분석	100
○항산화 및 면역활성이 강화된 돌나물 제품의 안전성 평가	- 돌나물 제품에서 독성시험, 세포막안정화시험 및 간독성 지표 효소의 활성도	100
○항산화 및 면역활성이 강화된 돌나물 제품의 안정성 평가	- 정상, 중량(용량)편차, 확인시험, 함량시험, 보존제 시험, 미생물오염시험, 중금속시험 및 pH, 알코올수 등을 분석 시험	100

2. 주요 연구 성과 및 활용 실적

가. 산업재산권 출원 및 등록

구 분	명 칭	국 명	출원일	비 고 (등록/출원번호)
발명특허	돌나물 추출물로부터 분리한 플라보노이드 화합물들을 포함하는 고혈압의 예방 및 치료용 약학조성물	대한민국	2006. 10. 27	10-0642151-0000
특허출원	돌나물 즙을 첨가한 젤라틴 젤리 제조 및 품질 특성	대한민국	2008. 4. 15	10-2008-0034532

나. 산업체 기술이전

기 술 내 용	산 업 체	기 술 이 전 일
간기능 보호능이 강화된 돌나물 음료의 제조에 관한 기술	(주)대덕바이오	자체활용 예정
돌나물 즙을 첨가한 젤리의 제조에 관한 기술	(주)대덕바이오	자체활용 예정
돌나물 분말차 제조에 관한 기술	(주)대덕바이오	자체활용 예정

다. 전시회

전시품목	전시회 명칭	일시	장소
돌나물 효능 홍보 판넬 및 우량 계통 증식 포장	2006 돌나물 연구회 현장 간담회	2006. 9. 21	원광대학교
돌나물 기내배양 유전자원 및 돌나물 음료 및 젤리 시제품	자생식물 산업화 기술 발표 및 전시회	2006. 11. 16	경상대학교
돌나물 기능 설명 판넬 및 유전자원 포장	2007 돌나물 연구회 현장 간담회	2007. 8. 29	원광대학교

라. 교 육

교 육 내 용	대상 및 참석인원(장 소)	교육일시
지피식물로서 돌나물을 비롯한 몇가지 약용식물의 이용	전북 진안군 농가/50명 (원광대학교 식물원)	2005. 12. 28 ~ 12. 29
돌나물 우량계통 선발 및 주요 특성	돌나물 연구회원 및 재배농가/25명 (원광대학교 생자대 시청각실)	2006. 8. 30
돌나물 주년생산을 위한 재배 기술	돌나물 연구회원 및 재배농가/28명 (원광대학교 생자대 시청각실)	2007. 8. 29

마. 학술발표

No.	논문제목	학술대회명	발표년월일
1	형태적 특성을 이용한 돌나물 유연관계 분석	'06 한국자원식물학회 추계 학술발표회	2006. 05. 11-12
2	CCl ₄ 급성 간독성에 대한 돌나물 추출물의 간 보호 효과	'06 한국식품과학회 추계 학술발표회	2006. 06. 14
3	돌나물의 캘러스 형성 및 식물체 분화에 미치는 절편부위 및 배지첨가물의 영향	'06 한국자원식물학회 추계 국제 심포지움	2006. 11. 20
4	RAPD 방법을 이용한 돌나물의 유연관계 분석	'07 한국약용작물학회 추계 학술발표회	2007. 05. 18-19
5	돌나물 수집종의 비타민 C 함량 및 항산화 활성 비교	'07 한국자원식물학회 추계 학술발표회	2007. 05. 29-30
6	Effect of medium supplements and basal medium on plant regeneration of <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국육종학회 추계 학술발표회	2007. 7. 05-06
7	Detoxification effect of <i>Sedum sarmentosum</i> on acute alcohol liver injury	The 10th Asian Congress of Nutrition	2007. 09. 09-13
8	<i>Sedum sarmentosum</i> (Dolnamul) prevent ethanol induce liver injury in rats	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
9	Preparation and Quality of Jelly with <i>Sedum sarmentosum</i> (Dolnamul)	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
10	Antiobese and hypolipidemic effects of <i>Sedum sarmentosum</i> (Dolnamul) on high fat diet	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
11	Effect of <i>Sedum sarmentosum</i> (Dolnamul) extract on cell death in cultured liver cancer cell	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
12	Hepatic Detoxification Activity and Reduction of Ethanol and Acetaldehyde Concentrations of <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국식품영양과학회 추계 학술발표회	2007. 10. 19
13	Comparion of Growth and Quality among local strains in Hydroponic Culture of <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국원예학회 추계 학술대회	2007. 10. 26-27
14	Effects of Cutting date and bedsoil on root and shoot growth in cutting of <i>Sedum sarmentosum</i>	'07 한국식물과학협의회 공동 국제심포지움	2007. 11. 01-02

바. 논문게재

논문 제목	게재학술지명	권 및 쪽수 (년도)	구 분
돌나물삼목번식과 기내마디배양에서 신초 형성 및 발근에 미치는 영향	한국원예과학기술지	24(1):43-47 (2006)	국내
국내 자생 돌나물의 형태적 특성에 의한 유연관계 분석	한국원예과학기술지	25(2):103-109 (2007)	국내
돌나물 수집계통의 수확후 저장온도에 따른 품질변이	한국생물환경조절 학회지	16(3):240-246 (2007)	국내
차광재배가 돌나물의 수량 및 품질에 미치는 영향	한국생물환경조절 학회지	16(4):388-394 (2007)	국내
돌나물 즙을 첨가한 젤라틴 젤리의 제조 및 품질특성	한국식품과학회지	39(6):619-624 (2007)	국내
한국산 돌나물 수집종의 RAPD에 의한 유연관계분석	한국원예과학기술지	25(1):68-74 (2008)	국내
돌나물의 가을노지삼목에서 삼수부위 및 삼식방법에 따른 생육특성	한국생물환경조절 학회지	17(1):60-65 (2008)	국내
Optimization of productive composition for beverage adding <i>Sedum sarmentosum</i> extract using response surface methodology	Food Sci. Biotechnol	투고중	SCIE
Hepatoprotective effect of <i>Sedum sarmentosum</i> extract on CCl ₄ induced liver damage	Life Sci.	투고중	SCI
Hepatoprotective effect of <i>Sedum sarmentosum</i> extract on ethanol induced liver damage of rat	Life Sci.	투고중	SCI

사. 연구 인력 양성

구 분	소 속	인 원	비 고
학 사	원광대학교	4	
	충남대학교	6	
석 사	원광대학교	3	
	충남대학교	2	
계	학 사	10 명	총 15명
	석 사	5 명	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 돌나물의 31 지역종에 대한 개화전 생육특성과 개화기 화기특성을 토대로 한 군집 분석 결과와 RAPD를 이용한 유연관계 분석 결과는 일부 지역종을 제외하고는 일치하였으며, 이는 타 작물의 유전자원이나 근연종간 유연관계 분석 및 유전 육종재료로의 이용을 위한 자료로 활용 가능함.
- 기내 배양묘를 육성은 0.2 mg/L BA를 첨가한 MS 배지에서 배양 후 80-90일 경에 초장의 신장이 적당하고, 마디가 짧으며 줄기가 굵은 다아체를 얻을 수 있었고, 기내활성 보존을 위한 agar 농도는 1.6-2.0% agar 첨가할 경우, 상온에서도 년1회의 계대배양으로도 유전자원을 유지·보존 할 수 있었으며, ABA는 20 mg/L 첨가배지에서만 1년 후 까지도 적절한 활성을 유지할 수 있었음. 또한 2℃ 저온항온기에서 agar 및 ABA 첨가에 따른 생육은 농도가 높을수록 억제되는 경향을 보였으며, 1년 후에도 계대배양 없이 양호한 활성을 보여 100% 생존할 수 있어 타 영양변식 작물의 기내보존에 활용가능함.
- 돌나물을 스티로폼 접시에 랩포장 할 경우, 5℃에서는 수확 후 8일까지 상품성을 유지한 상태로 저장이 가능하므로, 돌나물 수확후 저온 유통이 필요하며, 상품의 진열시에도 저온하에서 시판하는 것이 바람직할 것으로 보이며, 이는 돌나물의 유통기한을 늘릴 수 있을 것으로 기대됨.
- 이에 따라 돌나물 추출물을 주원료로 하는 “숙취예방/해소 음료”, 돌나물 즙을 함유하는 “돌나물 젤리” 및 지질대사 개선 효과가 있는 “돌나물차”를 개발하였으며, 이들 제품에 대해서 특허를 출원 중에 있으며, 향후 상업화를 통하여 농가 수익증대에 기여할 수 있을 것으로 기대되며, 돌나물은 다음과 같은 효능을 가지고 있어 국민건강에도 크게 기여할 것으로 보이며, 돌나물 소비촉진에도 크게 기여할 것으로 보여 농가소득 증대가 기대됨.
- ① 돌나물은 고지방식으로 인한 비알코올성 지방간 질환을 예방하고, 과량의 알코올 섭취로 유발되는 간 손상을 예방 또는 회복시키는 효과를 지니고 있는 것으로 확인되었으며, 인간 간암세포의 성장을 억제하는 효과가 있음.

- ② 돌나물은 자체 내에 함유된 다량의 polyphenol 화합물들에 의해 항산화능을 갖고 있었고, *in vitro/ in vivo* 실험계에서 항산화와 관련된 단백질들의 활성을 증가시키며, 장관면역 촉진 효과가 우수함.
- ③ 돌나물은 고지방식으로 유도할 수 있는 고지혈증 및 비만증을 예방하는 효과가 있으며, 혈액의 흐름을 방해하는 혈관 내부의 접합인자들의 활성을 억제하고 이와 관련된 효소 활성을 억제함으로써 지질대사 및 혈행을 개선시키는 효과가 있음.
- 돌나물 지역종의 일반성분과 영양성분을 분석한 결과, 일반성분에서는 산지별로 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 영양성분 분석결과에서는 “군산” 지역종이 가장 우수하였으며, 꽃이 피지 않아 주년생산이 가능하고, 형태적 특성도 양호하므로, 이를 우량품종으로 등록할 예정임.
- 돌나물 및 추출물을 이용한 신규 제품에 대하여 반복독성시험, 항돌연변이원성 시험, 세포막 용혈시험, 소화관 세포 독성시험 및 동물실험 후의 조직검사 등을 시행한 결과, 돌나물을 이용한 제품은 모두 안전한 것으로 판단되어 향후 상업적 생산이 가능하다고 판단되었음.
- 신규 시제품에 대한 안정성 검사에서 돌나물 음료는 실온에서 3개월, 젤리는 냉장보관시 10일, 돌나물차는 실온에서 6개월간 제품의 안정성을 유지하는 것으로 판단되어 비교적 보존기간이 양호하였으므로 상업화에 유리하였음.

따라서 본 연구에서 개발된 제품은 특허 출원/심사 중에 있으며, 특허 진행이 완료되면 참여기업인 (주)대덕바이오에서 상품화되어 시판될 것이다. 또한 본 연구에서는 돌나물의 건강기능성을 방대하게 측정하였으나, 돌나물이 나타내는 건강기능성 기전에 대한 연구는 계속 진행되어야 할 것으로 사료되었다. 한국인의 식품소비 트렌드가 점차 건강지향성으로 전환되고 있음을 고려할 때, 돌나물이 지닌 새롭고 다양한 건강기능성을 파악할 필요성이 있으며, 이와 관련된 기술 및 지식의 축적은 국가경쟁력의 향상에도 기여할 것으로 기대되며 이에 대한 후속적인 연구가 필요한 것으로 보인다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

1. 숙취 해소제 시장 동향 (한국/ 일본/ 중국/ 대만)

알코올 섭취로 인한 숙취를 제거하고 혈중 알코올 농도를 감소시킬 수 있는 제제를 개발하기 위해 생약 제재 또는 인공제재를 단독 또는 혼합하여 제조된 드링크류가 다수 개발되고 있으나, 최근까지도 알코올 숙취를 해소시킬 수 있는 의약품은 개발되어 있지 않은 상태이며, 숙취해소용 음료가 숙취해소제로서 사용되고 있으며, 현재 국내를 중심으로 다수의 제품이 출시되고 있는 실정이다. 이외에 간장보호제가 음주 후 간장보호용으로 이용되고 있다. 한방재료들은 고유의 성분과 독특한 맛과 향을 특징으로 옛날부터 우리 체질에 맞는 약재로 알려져 있다. 참고로 숙취해소제에 사용되는 한약재료로는 헛개나무(지구자나무), 무, 사철, 쑥, 쑬, 감잎, 삼백초, 오가피, 노근, 상심, 금은화, 상엽, 구기자, 천문동, 용안육, 치자, 토사자, 해성차, 녹차, 감초, 갈화, 연화청피, 목향, 굴피, 인삼, 저령, 백복령, 신국, 택사, 건조생강, 백출, 백두구인, 사인, 올리고당, 구루메 등이 있다.

숙취해소용 음료에 첨가되는 성분들은 알코올 흡수를 억제하고, 알코올 대사를 촉진시켜 혈 중 알코올 농도를 감소시키며, 알코올로부터 간세포를 보호하고 위장점막을 도포 함으로써 알코올에 의한 위장점막손상을 방지하고 위장을 보호하는 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한, 장내 소취작용이 강하여 음주 후의 술, 음식냄새를 제거하고, 장내 유해성분의 생성을 억제하며, 장내 정상세균의 균총을 유지시키며, 음주에 의한 대장증상을 완화해주는 역할을 나타내기도 한다. 이외에 암모니아 및 인돌 등의 장내 부패산물의 제거, 혈액의 정화, 신장보호작용, 알코올에 의한 숙취현상을 완화시켜 신체 컨디션 저하를 방지하는 효과 등을 나타내는 것으로 알려져 있다.

숙취해소제는 전술한 알코올 대사특성상 한국을 비롯한 일본, 중국, 대만 등의 동북아시아 국가를 중심으로 시장이 활성화되어 있어 이들 국가에서 다양한 제품 개발이 활발히 진행되고 있다. 최근의 제품 개발은 식물 추출물 등의 유효성분을 주요 기능성분으로 함유하는 것은 이전과 동일하나, 성분의 분리, 정제 및 효능 검증에 있어서 그 수준이 향상되었음을 알 수 있다. 또한, 전통 한방의 처방에 근거해 오가피, 헛개나무, 앵두, 모과 등 숙취해소에 큰 효과가 있는 한약재를 기능성분으로 하는 숙취해소 조성물에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 이에 근거해 과학적이고 체계적인 연구개발 및 엄격한 원료 선정을 통해 숙취해소 음료를 생산하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 최근에는 아스파라긴산 등의 숙취해소 기능성분을 포함하는

단순한 숙취해소 음료 형태의 제품 외에도 숙취 뿐 아니라 피로회복, 위장 보호 등의 복합적 기능을 가지는 숙취해소 기능성 식품의 개발이 더욱 다양해지고 있는 추세이다.

숙취해소용 음료시장은 국내보다는 일본, 중국 및 대만 등지에서 더욱 큰 시장을 형성하고 있고, 국내 대비 국외시장규모가 100배 이상에 달하는 것으로 알려져 있다. 반면, 아직까지 숙취해소제가 국외로부터 수입되는 예는 없는 것으로 파악되고 있다. 국내 판매되고 있는 숙취해소제 관련 제품의 신뢰도가 증가되고 있고, 중국 및 일본 등에서 일부 국산제품에 대해 호응을 얻고 있는 것으로 알려져 있는 바, 향후 지속적인 수출 규모의 증대가 예상되며, 국내내수보다 더 큰 시장을 형성할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 기타 관련분야의 환경변화

돌나물을 신선편이 식품으로서 효과적으로 이용하기 위해서는 년중 생산을 위한 재배기술의 확립과 더불어 수집 유전자원의 유연관계 분석을 바탕으로 우량계통을 선발하여 녹즙용이나 생식용 등으로 보급해야 한다. 그러나 돌나물은 수분함량이 높은 식물로서 수확 후 급격한 시들음 현상 및 랩으로 포장시 과다수분으로 인한 부패가 빨라 문제가 되고 있다. 따라서 선도유지를 위한 포장재 개발과 저온저장 유통이 필수적이나, 이에 대한 체계적인 연구가 미흡한 실정이며, 고품질 안전농산물을 찾는 소비자의 요구에 맞게 신선채소류의 신선편이 가공기술이 필요하다.

돌나물은 신선채소로서 저장 및 유통기간이 짧아 소비량 증가에 한계가 있고, 적절한 유통체계가 확립되어 있지 않아 유통을 원활하게 하기 위해서는 수확후 보존기간의 증대를 위한 기술개발이 필수적이다. 최근 상추에서는 저온에 일정 시간 처리후 MA포장기술을 개발하여 상품성을 2일 이상 연장 할 수 있었고, 양상추에서도 유통 중 적정한 산소와 이산화탄소 농도가 유지되어 갈변 및 이취발생을 모두 억제할 수 있는 micro perforated film을 이용한 MA포장기술을 개발하여 5℃에서 12일간 저장이 가능하였다.

산야채류의 경우 저장전 5-6℃까지 예냉하여 저장한 결과, 예냉효과는 크지 않아 실용가치는 없었으며, P.E.필름 포장 후 저온(2-3℃) 저장시 관행의 골판지상자에 포장후 상온저장한 것보다 7-16일간 저장가능 기간이 연장되었다(2004, 산채시험장). 최근에 북한에서는 돌나물의 유통기한을 연장하기위한 방편으로 염장 돌나물을 판매하고 있다.

돌나물은 독특한 맛과 향을 가지면서 항산화 활성 및 생리활성 효과가 높을 뿐 만 아니라, 우리나라에서는 어느 지역에서나 생산이 가능한 건강야채로서 건강음료 재료로서도 적합하지만(김 등, 2002), 이를 산업화하려는 적극적 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 신선채소로 소비를 확대하기 위하여 재배환경에 따른 일반성분, 무기성분, 향기 및 영양 성분 분석과 항산화 활성 및 생리활성 등을 다각도로 검정할 필요가 있다.

신선채소로 주로 소비되는 돌나물은 민간에서 약리효과가 있다고 알려져 있는데, 최근 돌나물 추출물의 항암효과 및 간염, HIV에도 효과적이라는 연구가 국내 외적으로 활발하게 이루어지고 있다(김미향, 2002; 김옥경, 2004). 그러나 이러한 기전을 나타내는 정확한 유효지표성분이 분리·동정이 되지 않고 있으며, 체내에서의 기능성 발현 기전 또는 대사관련 연구가 지속적으로 이루어져야 한다.

이러한 시점에서 본 연구결과는 좀 더 깊이 있는 돌나물을 비롯한 주요 자생식물에 대한 약리기전 및 동물실험과 인체내에서의 효능을 연구하는데, 중요한 정보를 제공하였으며, 건강 기능성 식품 개발에 따른 원료생산 분야와 식품 가공 및 기전 연구 분야의 합작으로 상호간 연구수행에 큰 도움이 되었다.

제 7 장 참고문헌

1. Ahn, J.H. and S.Y. Lee. 2004. Effects of growth regulators on callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Sedum sarmentosum*. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 31:25-29.
2. Bae L.N., and D.S. Jeong. 2003. Chilling injury temperature and changes of quality during storage or marketing in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). Kor. J. Hort. Sci. Technol. 21:190-193.
3. Bucher T., and H. Redrtzki. 1951. Eine Spezifische photometrische bestimmung von athylakohol auf fermentativen Wege. *Klin Wochenschr* 29:615.
4. Cha B.C., S.B. Lee, T.J. Rhim, and K.H. Lee. 2000. Antioxidative and hepatoprotective effect of compounds isolated from Galla Rhois(*Rhus javanica* Linne). Korean J Medicinal Crop Sci. 8(2):157-164.
5. Cho, W.K., J.M. Lee, M.S. Kwon, and T.Y. Chung. 2002. Evaluation of morphological characteristics and RAPD analysis in Korean landraces of naked barley. Kor. J. Plant Biotech. 29:217-222.
6. Choe, H.S., G.T. Kim, Y.G. An, D.S. Kim, J.G. U, and Y.P. Im. 2003. Analysis of genetic relationships in garlic germplasm and fertile garlic by RAPD. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44:595-600.
7. Chung, Y.H., and J.H. Kim. 1989. A taxonomic study of *Sedum* section *aizoon* in Kor. J. Plant Tax. 19:189-227.
8. Clausen, R.T. 1975. *Sedum* of North America and north of the Mexican plateau. Cornell Univ. Press. pp.742. Ithaca-NY.
9. Debener, T., and L. Mattiesch. 1999. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 99:891-899.
10. He, A., and M. Wang. 1997. Flavonoids from stringy stonecrop(*Sedum sarmentosum*). Chinese Tradit. Herbal Drugs 28(9):522-524.
11. He, A., H. Hao, M. Wang, and D. Zhang. 1997. Sterols from *Sedum sarmentosum*. J. China Pharm. Univ. 28(5):270-274.

12. He, A.M., M.S. Wang, H.Y. Hao, D.C. Zhang, K.H. Lee, A.M. He, M.S. Wang, H.Y. Hao, D.C. Zhang, and K.H. Lee. 1998. Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry* 49:2607–2610.
13. Heo, S.J., B.K. Kwon, H.S. Byeon, J.S. Seo, and K.O. Yoo. 2004. Intraspecific genetic relation of *Wasabia japonica* Matsum. based on RAPD analysis. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 12:31–35.
14. Hong, S.M., and J.C. Koh. 2004. Morphological characteristics and genetic relationship by RAPD marker in *Iris* spp. *Kor. J. Plant Biotech.* 31:19–23.
15. Hwang, H.J., D.Y. Yearn, and K.S. Kim. 1998. Interspecific relationships based on morphological characters and seed protein patterns in several *Rhododendron* species. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 29:20–29.
16. Innis, M.A., and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs. protocols, a guide to methods and application (Innis MA et al., eds). Academic Press, pp.3–12. San Diego.
17. Jang, K.H., G.W. Song, and J.I. Chung. 2004. Analysis of genetic relationships of Korean native *Polygonatum* spp. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 12:214–218.
18. Jeong, C.S., S.M. Park, W.H. Kang. 2003. Research Reports : Effects of charcoal-added functional paper on keeping leafy lettuce fresh during marketing. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 21:102–105.
19. Jeong, J.C., K.W. Park, and Y.J. Yang. 1990. Influence of packing with high-density polyethylene film on the quality of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Cheongchima) during low temperature storage. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 31:219–225.
20. Jeong, J.J. 1999. The distribution, growth environmental conditions, and morphological characteristics of Korean native *Sedum rotundifolium* at native habitats. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 17(4):500–502.
21. Jinhua, P. 2002. Sifting active component involved in protecting liver and reducing enzyme levels from *Sedum sarmentosum* Bunge. *Chinese Pharm. Affairs* 16(6):365–366.
22. Kader, A.A. 1992. Postharvest biology and technology. In: Kader, A.A (ed.), *Postharvest technology of horticultural crops*. University of California, California. pp. 296.
23. Kang, TH., H.O. Pae, J.C. Yoo, N.Y. Kim, Y.C. Kim, G.I. Ko, and H.T. Chung. 2000. Antiproliferative effects of alkaloids from *Sedum sarmentosum* on murine and human hepatoma cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 70:177–182.
24. Kim M.J., C.H. Kim, and C.H. Lee. 1999. The effects of extracts from

- Puerariae radix* roots on the blood ethanol concentration and liver function of rats. Korean J Food Sci. Ani. Resour. 19(3):209–218.
25. Kim B.K., G.G. Shin, B.S. Jun, and J.Y. Cha. 2001. Cholesterol lowering effect of Mushrooms powder in hyperlipidemic rats. J Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2001; 30(3):510–515.
 26. Kim, D.H., B.K. Yang, H.K. Kim, N.Y. Kim, S.J. Jeong, I.S. Kim, J.S. Nam, J.H. Lee, and D.H. 2003. Analysis of genetic variation of *Perilla* germplasm using RAPD. Kor. J. Plant Biotech. 30:221–226.
 27. Kim, G.J., J.K. Choi, G.Y. Gi, K.B. Lim, and T.H. Han. 2006. Selection of RAPD primers for efficient fingerprinting in roses. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 24:253–257.
 28. Kim, H.J., and S.Y. Lee. 2007. Genetic relationships based on morphological characteristics in Korean native *Sedum sarmentosum*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 25:103–109.
 29. Kim, J.H. 1989. A taxonomic study on the genus *Sedum* in Korea. Ph.D Thesis. pp. 216. Seoul Nat'l. Univ. Seoul.
 30. Kim, J.H. 1994. Pollen morphology of genus *Sedum* in Korea. Kor. J. Plant Sci. 37:245–252.
 31. Kim, J.H., and K.Y. Huh. 2003. Growth characteristics of *Sedum oryzifolium* in extensive green roof systems. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 21(4):346–352.
 32. Kim, J.H., H.T. Hart, and J.F. Stevens. 1996. Alkaloids of some asian *Sedum sarmentosum*. Phytochem. 41(5):1319–1324.
 33. Kim, K.Y., D.Y. Hyun, S.J. Yun, C.H. Kim, and Y.P. Lim. 2000. Intra-specific variation and genetic relationships in *Oenanthe javanica* DC. by RAPD analysis. Kor. J. Breed. 32:74–82.
 34. Kim M.Y. 2003. The effects of *Sedum sarmentosum* Bunge on collagen content of connective tissues in ovariectomized rats. J Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32:1114.
 35. Ko, E.Y. 2004. Changes in quality characteristics during low storage temperature of fresh-cut vegetables. Master thesis, Konkuk Univ. Seoul. pp. 1–59.
 36. Kwack, B.H. 1976. On the ecology of *Sedum sarmentosum* Bunge in Korea. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 17:69–77.
 37. Kwon, S.T., and J.H. Jeong. 1999. Genetic relationship among sedum species based on morphological characteristics and RAPD analysis. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 17:490–494.

38. Lee, J.S., and B.M. Kim. 2005. Analysis of genetic relationship among *Arisaema* species using RAPD. *Kor. J. Hort. Technol.* 23:459–464.
39. Lee, J.S. D.S. Chung, J.W. Choi, M.A. Jo, Y.S. Lee, C.H. Chun. 2006. Effects of storage temperature and packaging treatment on the quality of leaf lettuce. *Kor. J. Food Preserv.* 13:8–12.
40. Lee S.B., T.S. Cho, K.W. Yoon, J.C. Lee, S.M. Lee, S.B. Shim. 1998. A study on the hepatoprotective effect of PS-1 from *Artemisia iwayomogi*. *J Appl Pharm.* 6:119–129.
41. Lee, S.Y., B.W. Yae, and K.S. Kim. 2002. Identification and analysis of genetic similarity in wild species and cultivars of carnation using RAPD. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 43 : 738–742.
42. Lee, S.Y., J.H. Ahn, and H.J. Kim. 2006. Factors affecting shoot multiplication and rooting from cutting and *In vitro* node culture of *Sedum sarmentosum*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 24(1):43–47.
43. Lim J.P., and E.S. Suh. 2000. Hepatoprotective, diuretic and anti-inflammatory activities of the extract from *Portulaca oleracea* Linne. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 8(3):189–193.
44. Ling, J.T., R. Sauve, and N. Gawel. 1997. Identification of poinsettia cultivars using RAPD markers. *HortScience* 32:122–124.
45. Menson I.S., and R.Y. Kendal, H.A. Dewar, and D.J. Newell. 1968. Effect of onions on blood fibrinolytic activity. *J Brit. Med.* 3:351.
46. Mo, Y.M. 1999. Cultivation method of wild vegetables. –*Sedum sarmentosum*–. Rural Development Administration. pp. 97–101.
47. Na H.S., K.S. Kim, and M.Y. Lee. 1996. Effect of Jujube methanol extract on the hepatotoxicity in CCl₄-treated rats. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25(5):839–845.
48. Nakai, T. 1909. *Flora Koreana* I. J. Coll. Sci. Imp. Univ. pp. 226–231. Tokyo.
49. Noguchi T., K.L. Fong, E.K. Lai, S.S. Alexander, M.W. Kang, L. Olson, J.L. Poyer, and P.B. McCay. 1982. *Biochem. Pharmacol.* 31:615.
50. Oh SY. 1985. The phytogeographical studies of *Crassulaceae* in Korea. Thes. *Kyungpook Natl. Univ. Natl. Sci.* 39 : 123~159.
51. Park, I.H. 1993. Studies on the shade adaptation of native ground cover

- plants, *Disporum* spp. and *Sedum sarmentosum*. Journal of the Korean Institute of Landscape Architecture 21:1001–1012.
52. Park, K.R., K.B. Lee, and Y.G. Yoo. 2003. Morphological relationships of Korean species of *Sedum* L. subgenus Aizoon (Crassulaceae). Kor. J. Plant Tax. 33:1–15.
 53. Park, K.W. and Y.H. Kim. 1997. Effect of different nutrient solutions on growth and quality in sedum (*Sedum sarmentosum*) deep flow culture. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 15:152–153.
 54. Park S.K., B.G. Choi, and E.B. Lee. 2002. Effect of *Lonicera Japonica* flower on CCl₄-induced hepatotoxicity. J Appl Pharm. 10:32–36.
 55. Park, Y.J., M.H. Kim, and S.J. Bae. 2002. Enhancement of anticarcinogenic effect by combination of *Sedum sarmentosum* Bunge with *Platycodon grandiflorum* A. extracts. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 31 : 136~142.
 56. Paterson, A.H., E.S. Lander, J.D. Hewitt, S. Peterson, S.E. Lincoln, and Tanksley SD. 1988 Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. Nature 335:721–726.
 57. Patwary, M.U. and J.P. Vandermeer. 1994. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta). J. Phycol. 30:91–99.
 58. Paull, R.E. 1999. Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. Postharv. Biol. Technol. 15:263–277.
 59. Recknagel R.O., 1967. Pharmacol. Rev. 19:145.
 60. Reitman, S., and S. Frankel. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am. J Clin. Pathol. 28:56–63.
 61. Reynolds E.S., and H.J. Ree. 1971. Lab. Invest. 25:269.
 62. Rho S.N., and H.S. Oh. 2002. Effect of Omija(*Schizandra Chinensis Baillon*) extracts on the growth of liver cancer cell line SNU–398. Korean Nutr. Soci. 35(2):201–206.

63. Saltveit, M.E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharv. Biol. Technol.* 15:279–292.
64. Shin, Y.M. 2000. Effects of substrate and nutrient solution concentration on growth and quality in hydroponically grown *Sedum* (*Sedum sarmentosum* Bunge). MS. thesis. Korea Univ. pp. 56. Seoul.
65. Sneath, P.H.T., and P.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy – The principle and practice of numerical classification pp.216. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA.
66. Tae, K.H., D.K. Kim, and J.H. Kim. 2005. Analysis of phylogenetic relationship among Korean *Pinellia tenore* (Araceae) using RAPD markers. *Kor. J. Plant Tax.* 35:161–174.
67. Um, J.Y., H.S. Chung, M.S. Kim, H.J. Na, H.J. Kwon, J.J. Kim, K.M. Lee, S.J. Lee, J.P. Lim, K.R. Do, W.J. Hwang, Y.S. Lyu, N.H. An and H.M. Kim. 2001. Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD analysis and PCR–RFLP. *Biol. Pharm. Bull.* 24:872–875.
68. Van Oppen M.J.H., H. Klerk, M. Graaf, W.T. Stam, and J.L. Olsen. 1996. Assessing the limits of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in seaweed biogeography. *J. Phycol.* 32:433–444.
69. Wagner, P. 2001. Anti–fog additives give clear advantage. *Plastics, Additives and Compounding* 3:18–21.
70. Watada, A.E. 1986. Effect of ethylene on the quality of fruits and vegetables. *Food Technol.* 40:82–85.
71. Watada, A.E., N.P. Ko, and D.A. Minott. 1996. Factors affecting quality of fresh–cut horticultural products. *Postharv. Biol. Technol.* 9:115–125.
72. Welsh, J., R.J. Honeycutt, M. McClelland, and B.W.S. Sobal. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP–PCR). *Theor. Appl. Genet.* 82:473–476.
73. Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA makers. *Methods Enzymol.* 218:704–740.

74. Woo, E.R., S.H. Yoon, J.H. Kwak, H.J. Kim, and H. Park. 1997. Inhibition of gp 120-CD4 interaction by various plant extracts. *Phytomedicine* 4:53-58.
75. Yamagishi, M., H. Abe, M. Nakano, and A. Nakatsuka. 2002. PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily, *Sci. Horticult.* 96:225-234.
76. Ye, G.N., M. Hemmat, M.A. Lodhi, N.F. Weeden, and B.I. Reisch. 1996. Long primers for RAPD mapping and fingerprinting of grape and pear. *BioTechniques* 20:368-371.
77. Yoo, K.O., W.T. Lee, and O.K. Kwon. 2004. Interspecific relationships of Korean *Viola* based on RAPD, ISSR and PCR-RFLP analyses. *Kor. J. Plant Tax.* 34:43-61.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.