

발간번호

11-1541000-001758-01

한국 전통 목의 세계화를 위한 건강 기능성 및 우수성 규명 연구

(The study of excellence and health promoting function of
Korean traditional food "Muk" for its globalization)

농림축산식품자료실



0022834

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한국 전통 목의 세계화를 위한 건강 기능성 및 우수성 규명 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 12 월 29 일

연구기관명 순천향대학교

연 구 진

연구기관명 : 순천향대학교

연구책임자 : 박 상 규

책임연구원 : 이 미 영

연구보조원 : 김 점 지

연구보조원 : 박 슬 기

연구보조원 : 전 유 미

연구보조원 : 유 아 림

보 조 원 : 박 길 선

보 조 원 : 박 진 국

보 조 원 : 박 슬 기

보 조 원 : 이 순 영

보 조 원 : 김 철 규

보 조 원 : 이 진 선

목 차

표 목록	4
그림 목록	5
요약문	6
I. 연구개발의 목표 및 필요성	9
1. 연구개발의 목표	9
2. 연구개발의 필요성	9
II. 연구개발 내용 및 방법	15
1. 연구개발 내용	15
2. 연구개발 방법	16
III. 연구개발결과	23
1. 제1세부과제: 한식 목의 항노화 장수 기능성 연구	23
2. 제2세부과제: 한식 목의 항아토피 및 항비만 기능성 연구	35
IV. 연구성과 및 성과활용 계획	49
V. 참고문헌	51

표 목 록

표 1. 도토리 추출물의 농도별 항산화 효능 평가	23
표 2. 메밀 추출물의 농도별 항산화 효능 평가	24
표 3. 녹두 추출물의 농도별 항산화 효능 평가	25
표 4. 도토리 추출물의 열 스트레스 저항성 평가	27
표 5. 메밀 추출물의 열 스트레스 저항성 평가	27
표 6. 도토리 및 메밀 추출물의 수명에의 효능 평가	31
표 7. 도토리 및 메밀 추출물의 번식력에의 효능 평가	34
표 8. 도토리, 메밀, 녹두 분말 투여에 의한 비만 마우스의 체중, 체지방량 및 식이섭취 분석	39
표 9. 메밀 및 녹두 분말 투여에 의한 비만 마우스 혈액내 지질및 호르몬 농도 분석	40
표 10. 도토리 목 추출물 투여에 의한 비장세포에서의 Th1/Th2 cytokine 발현 변화 측정	48

그림 목록

그림 1. 아토피 피부염의 발생기전	10
그림 2. 활성산소에 의한 노화과정	11
그림 3. 아토피 피부염 유발 과정	21
그림 4. 산화성 스트레스 하에서 농도별 도토리 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석	24
그림 5. 산화성 스트레스 하에서 농도별 메밀 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석	25
그림 6. 산화성 스트레스 하에서 농도별 녹두 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석	26
그림 7. 열 스트레스 하에서 도토리, 메밀 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석	28
그림 8. 자외선 스트레스 하에서 도토리, 메밀 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석	29
그림 9. 도토리 추출물에 의한 꼬마선충의 수명 변화	32
그림 10. 메밀 추출물에 의한 꼬마선충의 수명 변화	33
그림 11. 도토리, 메밀 및 녹두 분말 추출물 처리에 의한 3T3-L1 세포 생존율	35
그림 12. 도토리, 메밀 및 녹두 분말 추출물 처리에 의한 3T3-L1 세포내 지질함량 측정	36, 37
그림 13. 목 분말 추출물 처리에 의한 PPAR γ 발현 억제와 p-AMPK 단백질 발현 증가 효과	38
그림 14. 목 분말 추출물 처리에 의한 RBL-2H3 세포 생존율	42
그림 15. β -hexosaminidase 방출 억제	44
그림 16. 아토피 피부염 유사 병변의 육안평가	45
그림 17. 아토피 피부염 유사 병변의 혈청 내 IgE의 농도	46
그림 18. 아토피 피부염 유사 병변의 혈청 내 IL-4 측정	47
그림 19. 아토피 피부염 유사 병변의 혈청 내 IFN- γ 측정	47

요 약 문

본 연구과제에서는 한식 목의 우수성과 기능성을 전 세계에 널리 알리고자 목의 주원료인 도토리, 메밀, 녹두를 이용하여 항산화, 항스트레스, 항노화, 항아토피, 항비만 효능에 대한 검증 및 평가를 실시하였다. 특히, 기존에 연구개발된 천연 항산화제와 천연 식품에 비해 보다 안전하고 우수한 활성을 나타내는 한식 전통 음식인 목을 항산화, 항노화, 항비만, 항아토피 식품으로 개발하기 위하여, 목 재료에 대한 과학적 연구와 다양한 효능을 평가하였다.

먼저 꼬마선충을 이용하여 개체 수준에서의 항스트레스 효능을 평가하였다. 도토리, 메밀, 녹두 목 분말 추출물을 농도별로 처리한 결과, 도토리의 경우, 500mg/L의 농도에서 유의적으로 개체의 항산화능을 증가시켰고, 메밀의 경우, 500 및 1000mg/L의 농도에서 유의적인 항산화능 증가 효능이 관찰되었다. 녹두의 경우에는 연구에 사용된 모든 농도에서 개체의 항산화능 증가를 보이지 못했다. 또한 도토리와 메밀 추출물은 자외선 스트레스에 대한 저항성도 증가시켰다. 하지만 도토리, 메밀 추출물 모두 열 스트레스 저항성에는 유의적인 변화를 유도하지 못했다.

한식 목 재료의 항노화 효능을 규명하기 위해 꼬마선충에서 수명연장 및 항노화 기능성을 연구하였다. 도토리와 메밀 모두 500mg/L의 농도 처리시 두 번의 반복실험 모두에서 유의적인 수명연장 효능을 나타내었다. 그리고 기존의 많은 수명연장 기전에 수반되는 부작용으로 알려진 번식력의 저하가 도토리, 메밀 추출물에 의한 수명연장에는 관찰되지 않았다.

쥐를 이용한 혈청학, 조직학적 수준에서의 항비만 효능평가 결과, 도토리, 메밀, 녹두 목 분말의 물 및 에탄올 추출물 모두 세포내 지방 축적을 유의적으로 억제하였고, adipogenic transcription factor인 PPAR γ 발현을 억제하였다. 비만유도 쥐에서는 도토리, 메밀, 녹두 분말 투여가 체중 및 체지방의 감소를 유도하였고, 메밀 및 녹두 분말 투여로 인해 비만 마우스의 혈청 내 총 콜레스테롤 및 LDL 수치가 감소되고 HDL 수치가 증가되었다. 뿐만 아니라 체중조절과 밀접하게 관련된 호르몬인 leptin과 insulin의 농도도 감소되었다.

한식 목 재료의 항아토피 효능을 규명하기 위해 쥐를 이용하여 세포 및 조직수준에서의 항아토피 효능을 평가하였다. 도토리 분말의 물 추출물은 세포 내 β -hexosaminidase 방출을 억제시켰으나, 메밀 및 녹두 분말 추출물은 β -hexosaminidase 방출을 억제시키지 못하였다. 아토피 피부염 유사 병변 마우스 모델에서는 도토리 분말 투여가 혈중 IgE 농도를 일시적으로 감소시켰다.

본 연구과제에서는 한식 목 재료인 도토리, 메밀, 녹두의 효능을 다양한 실험동물을 이용하여 규명하였다. 본 연구과제의 결과는 향후 도토리, 메밀, 녹두를 이용한 다양한 기능성 식품 개발 시 활용가능한 과학적 근거자료가 될 수 있으며, 나아가 한식 목의 기능성과 우수성을 전 세계에 널리 알리는 과학적 토대가 될 것이다.

SUMMARY

This research project focuses on the identification of biological functions and excellence of Korean traditional food “Muk”. Specifically, anti-oxidant, anti-stress, anti-aging, anti-atopic, and anti-obese activities of acorn, buckwheat, and mung bean extracts were studied in model organisms to provide scientific evidence of Korean traditional food “Muk” for its application to the development of functional food materials.

The resistance to oxidative stress was determined in *Caenorhabditis elegans*. Animals treated with 500mg/L of acorn extracts and 500 and 1000mg/L of buckwheat extracts showed significant increase in resistance to oxidative stress, while mung bean extracts failed to show anti-oxidant activity. Acorn and buckwheat extracts also increased survival under ultraviolet irradiation. However, both extracts have no significant effect on heat stress resistance.

To figure out the anti-aging effect of “Muk”, we monitored the lifespan and fertility of *Caenorhabditis elegans* treated with acorn or buckwheat extracts. Both mean and maximum lifespan were significantly increased by acorn or buckwheat extracts in replicated experiments. Interestingly, these lifespan extension was not accompanied by reduced reproduction which is commonly observed in many long-lived mutants.

Extracts from acorn, buckwheat, or mung bean markedly inhibited lipid accumulation and the expression of PPAR γ , one of adipocyte-specific transcription factor, in mouse adipocytes. Acorn, buckwheat, or mung bean extracts lowered body weight and body fat contents in obese mouse. Buckwheat or mung bean extracts also reduced the levels of serum cholesterol and LDL and increased the level of HDL in obese mouse. The concentrations of leptin and insulin were decreased by buckwheat or mung bean extracts in blood of obese mouse.

Acorn extracts significantly reduced the release of β -hexosaminidase, a biomarker of allergic inflammation, in RBL-2H3 cells. However, buckwheat or mung bean extracts show no effect on β -hexosaminidase release. In addition, acorn extracts decreased blood IgE level in atopy-disease model mouse NC/Nga.

These results demonstrated the biological activities and possible medical and pharmaceutical applications of Korean traditional food “Muk” and suggest that “Muk” materials could be very useful materials for future functional food development.

CONTENTS
(영 문 목 차)

List of Tables 4

List of Figures 5

Summary 6

I. Specific Aims and Significance of the Research 9

 1. Specific Aims 9

 2. Background and Significance 9

II. Research Design and Methods 15

 1. Research Design 15

 2. Materials and Methods 16

III. Results of the Research 23

 1. Project 1: Anti-aging Effect of Korean “Muk” 23

 2. Project 2: Anti-atopic and Anti-obese Effect of Korean “Muk” 35

IV. Outcome and Future directions of the Research 49

V. References 51

I. 연구개발의 목표 및 필요성

1. 연구개발의 목표

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

- 한식 유래 향산화, 항스트레스, 항노화, 항아토피, 항비만 효능의 기능성 규명
 - 최신 생명공학기술을 이용한 한국 전통식품인 목의 기능성 규명
 - 동물모델을 이용한 목의 항스트레스·항노화·항아토피·항비만 효능 규명
 - 고령화 사회의 세계시장을 선점할 한식 유래 기능성 장수식품 재료 발굴
 - 아토피 및 비만 치료에 응용될 수 있는 한식 유래 기능성 물질 발굴

나. 세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

- 1) 제1세부과제: 한식 목의 항노화 장수 기능성 연구
 - 한국 전통식품인 다양한 목의 향산화 및 스트레스 저항성에 미치는 효능 검증
 - 목 재료를 실험동물에 처리하여 *in vivo* 상태에서 항노화·수명연장 효능 규명
 - 항스트레스 및 항노화 효능을 나타내는 한식 목 재료 발굴
- 2) 제2세부과제: 한식 목의 항아토피 및 항비만 기능성 연구
 - *in vitro*와 실험동물에서 항아토피 기능 규명
 - *in vitro*와 실험동물에서 항비만 기능 규명
 - 항아토피 및 항비만 효능을 나타내는 한식 목 재료 발굴

2. 연구개발의 필요성

본 연구과제는 한국인이 즐겨 찾는 한식 중 대표적인 건강식품으로 알려진 한식 목의 우수성과 기능성을 전 세계에 널리 알리고자 하는 목적을 가지고 있다. 구체적으로 한식 목의 주원료인 도토리, 메밀, 녹두를 이용하여 향산화, 항스트레스, 항노화, 항아토피, 항비만 효능에 대한 검증 및 평가를 실시하고자 하였다. 특히, 동물세포와 실험동물을 이용하여 한식 목 재료의 안전성과 체내 기능성을 연구함으로써 향후 한식 목 재료를 활용한 향산화, 항노화, 항비만, 항아토피 식품 및 식품보조제 개발에 기여하고자 한다. 본 연구과제의 결과는 우리나라 전통 음식인 목에 대한 우수성과 효능을 과학적으로 평가한다는 의의를 가지고 있으며, 도토리, 메밀, 녹두를 다양한 식품 재료로 사용 시 활용가능한 과학적 근거자료가 될 수 있다. 나아가 한식인 목의 기능성과 우수성을 전 세계에 널리 알리는 과학적 토대가 되고자 한다.

UN은 2050년 전 세계 인구가 92억 명에 달할 뿐만 아니라, 60세 이상 인구가 전체의 4분의 1을 차지하여 지구촌 전체가 고령화 될 것이라고 전망하고 있다. 이러한 고령인구의 증가는 그에 따른 비만, 노화, 관상 동맥질환, 고혈압, 당뇨, 악성 종양 등의 만성 퇴행성 질환과 각종

성인병의 증가를 수반할 것으로 예상된다. 또한 그동안 선진국의 문제로만 여겨지던 비만이 지방, 소금, 설탕의 식품 함유량 증가와 신체 활동량 감소, 이동수단의 발달 등의 사회적 변화로 인해 개발도상국을 비롯한 여러 나라에서 큰 사회적 문제로 대두되고 있다. 세계보건기구(WHO)는 현재 10억에 달하는 과체중 비만 인구가 2015년에는 50% 이상 증가하여 15억 명 이상일 것으로 예상하고 있으며, 그로 인한 심각한 건강문제를 양산할 것이라고 경고하고 있다. 현재까지 보고된 항비만 기능성 식품소재 및 제품에 관한 특허 분석 결과, 항비만 기능성 식품소재 및 제품 기술은 작용기전, 소재, 성분에 따라 분류할 수 있으며, 이 중 작용기전에 따른 분류에는 소화 및 식욕조절과 지방대사 조절로 분류할 수 있다. 그리고 지방대사 조절은 체지방 합성 억제와 지방 합성 억제로 분류할 수 있다.

급격한 산업화 등의 영향으로 국내를 비롯한 전 세계에서 피부 면역질환 발병률은 매년 증가하고 있는 추세이며, 점진적인 지구온난화에 의한 장기적인 기후변화는 대기오염물질과 꽃가루 같은 알레르기물질의 증가를 유발하여 아토피 질환(아토피 피부염, 천식, 알레르기 비염)의 증가를 유발할 것으로 우려된다. 아토피는 알러지 반응을 일으키게 하는 IgE를 증가시켜 아토피 피부염을 비롯하여 천식, 알레르기성 비염 등을 잘 일으키는 유전적 경향을 뜻한다 (1). 현재까지 밝혀진 아토피의 발병원인은 유전적 요인과 면역학적 요인 이외에 환경적, 정신적 요인 등이 알려져 있으나, 근본적인 원인과 치료법은 아직까지 확실하게 규명되지 못했다. 아토피 피부염의 임상적 특징은 소양증 (국한성 또는 전신성 가려움), 발진, 만성적 재발 등이 있으며, 혈청내 IgE 수치 향상, Eosinophilia, 호염기구의 자발적인 히스타민 분비 증가, CD23 발현 증가, Th2에 의한 IL-4, IL-5 분비 증가 등의 현상을 동반한다 (1, 2). 아토피 피부염은 대부분 IgE와 연관된 면역기전에 의해 발병되는데 특정 allergen에 대한 즉시형 면역반응보다는 T 세포 이상에 의한 지연형 면역 반응이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 아토피 피부염 병변에서는 T 세포가 많이 발견되는데 이중 급성 아토피 피부염에는 Th2가 관여하고, 만성 아토피 피부염에는 Th1이 관여한다. 초기에는 Th2에서 분비하는 IL-4, IL-13가 중요하게 작용하며, 가려움이 생겨 긁기 시작하면 Th1 세포로 이동하게 된다 (그림 1). 가공식품의 섭취율과

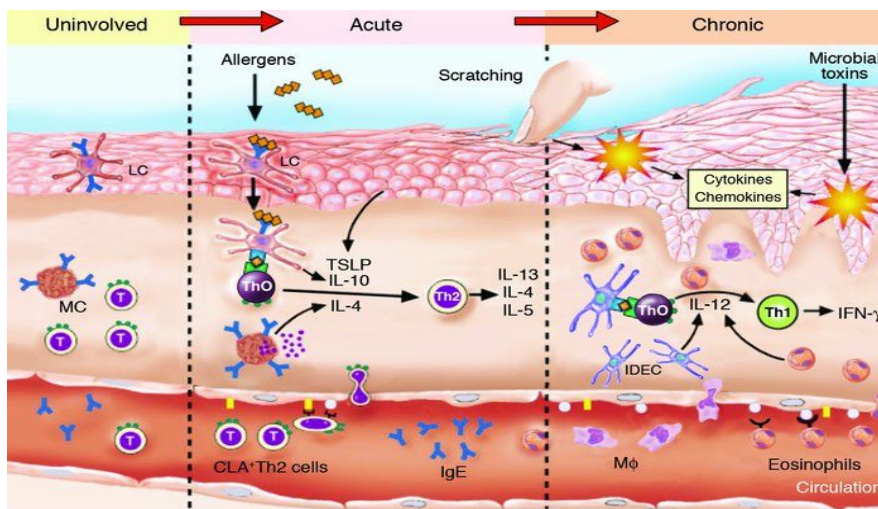


그림 1. 아토피 피부염의 발생기전 (3)

아토피 피부염의 상관관계가 최근의 역학조사에 의해 밝혀졌으며, 비타민 C, E 등의 항산화제와 γ -linoleic acid, 그리고 probiotics 등과 같은 식품 보조제가 아토피 피부염의 치료 및 증상완화에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (4, 5, 6). 최근 Datamonitor 자료에 의하면 미국, 일본, 프랑스 등 7대 세계 의약품 거대 시장 국가들에서 4,000 만명 이상이 아토피 피부염으로 고통받고 있는 것으로 나타났다. 아토피 피부염을 포함한 피부질환의 세계 시장 규모는 2005년 기준 111.9억 달러로 2004년 107.9억 달러에 비해 3.7% 성장하였다. 환경오염, 식습관 및 스트레스 등으로 인한 세계 피부질환(특히, 아토피 피부염) 환자는 급속히 증가할 것으로 전망되고 있어, 관련 시장은 지속적으로 성장할 전망이다.

지난 2000년 65세 이상 노인인구가 전체인구의 7.1%에 달해 고령화 사회 (Ageing Society)에 접어든 우리나라는 오는 2018년 고령사회 (Aged Society : 노인인구 14%), 2026년 초고령사회 (Super-aged Society : 노인인구 20%)에 도달할 전망이다. 특히 65세 이후에는 약 50% 이상의 인구에서 1개 이상의 병변이 발견되며, 노화에 따른 신경퇴행성질환, 암, 동맥경화, 당뇨병 등 노인성 질환의 발병율이 현저히 증가하고 있다. 지금까지 노화의 원인이라고 주장되고 있는 것들 중에 가장 널리 알려지고 학계에서 받아들여지고 있는 노화의 원인은 활성산소에 의한 세포 내 산화적 손상의 축적이다 (7). 세포내 대사과정의 부산물인 활성산소는 노화가 진행됨에 따라 세포내에 계속 축적되게 되고, 축적된 활성산소는 세포내의 주요물질인 유전자, 단백질, 지질을 손상시켜 그들의 기능 손상을 유발한다고 알려져 있다 (그림 2).

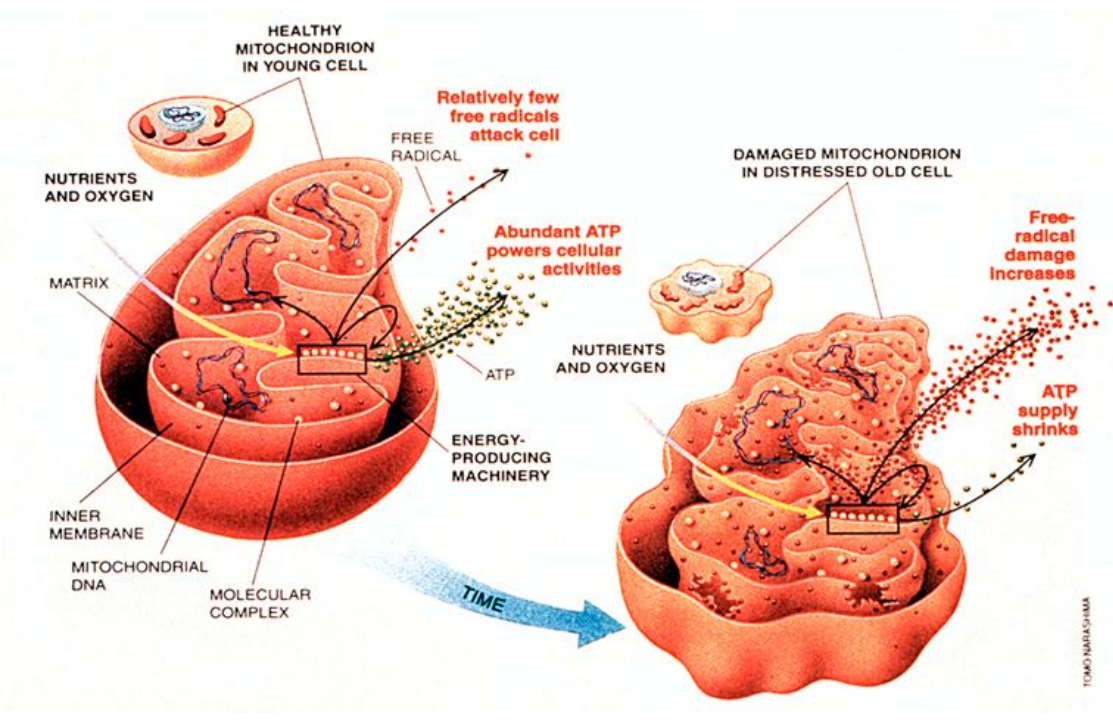


그림 2. 활성산소에 의한 노화과정
(Scientific American, 1996; 274: 46-52)

최근의 연구동향은 활성산소에 의한 손상을 막아줄 수 있는 항산화 물질이 실제 노화와 수명에 어떠한 영향을 미치는가에 집중되고 있다 (8). 대표적인 예로, 항산화 효능을 보이는 포도주의 성분인 resveratrol은 여러 실험동물에서 항노화 및 수명연장 효과가 있음이 보고되었다. 효모를 이용한 연구에서는 resveratrol이 개체의 수명을 70% 연장시켰고, 꼬마선충, 초파리, 어류 등에서도 모두 수명연장의 효과를 나타내었다 (9, 10). 미국 MIT의 David Sinclair 박사 연구팀에서는 포유동물인 쥐에서도 resveratrol의 섭취가 노화에 따른 여러 변화를 저해하고, high-caloric diet 쥐의 수명연장에 관여함을 밝혀내었다 (11). Coenzyme Q10과 alpha-lipoic acid 각각을 섭취시킨 쥐의 경우, 노화관련 유전체 변화의 유의적인 효과를 보였으며, vitamin E의 섭취는 심장 조직에서 노화된 쥐에서 발견되었던 심근세포 거대증 관련 유전자와 면역반응 관련유전자의 발현증가를 억제하였고, 뇌 조직에서도 비슷한 양상의 항노화 효과를 보였다 (12, 13). 천연물을 이용한 신약개발이 아직 개발단계에 머무르고 있는 반면, 항노화 효능을 가지는 것으로 알려진 건강 보조식품은 현재 수많은 제품이 이미 개발되어 전 세계적으로 큰 시장을 형성하고 있다. 대표적으로 다국적 제약회사인 GlaxoSmithKline사는 2008년 하버드대학의 세계적인 노화연구 전문가인 David Sinclair 박사가 설립한 Sirtris 회사를 인수하여, 그가 밝혀낸 포도주내 항산화 물질인 resveratrol을 상품화하여 출시하였다. 미국 내 건강 보조식품 업계의 선두를 차지하고 있는 GNC사에서도 resveratrol 뿐만 아니라 코큐텐, ALS(acetyl-L-carnitine)과 같은 항노화 효능을 가지는 다양한 항산화 제품을 출시하고 있다. 국내 연구진에 의한 개발사례는 서울대 약대, 부산대의 공동연구팀에 의해 한국산 자생 식물로부터 항노화제와 노인성 치매 예방과 기억력 개선에 탁월한 효과를 가진 천연 복합물질을 개발한 사례가 있다. 또한 KAIST 연구진은 CGK7330이라는 세포노화억제물질 개발로 자연노화차단 효능 및 세포 수명연장 가능성을 제시하였다. 이와같이 전 세계적으로 노화에 따른 사회적/의료적 문제를 근본적으로 해결하고, 인간 삶의 질을 향상시키기 위하여 노화과정을 과학적으로 규명하고 노화조절과 항노화제를 개발함으로써 노화 및 노화성 질환에 대한 근본적인 해결방법을 찾기 위한 노력이 증대되고 있다.

한식 묵은 겔 형성 특성을 이용한 우리나라 고유의 식품으로 전분입자는 독특한 구조와 성질을 가지므로 가열에 의한 호화, 호화액의 냉각에 따른 겔화와 노화 성질이 전분마다 다르며 이에 따라 겔 텍스처도 달라진다. 묵의 독특한 텍스처를 형성하는 전분으로 녹두, 메밀과, 도토리가 대표적으로 사용된다. 현재까지 녹두를 포함한 두류 전부의 호화와 겔화 성질에 대해서는 많은 연구가 보고되어 왔으나 메밀과 도토리 전분에 대한 연구는 다소 미비한 실정이다. 특히 묵을 형성하는 주성분인 녹두, 메밀, 도토리에 대한 영양학적 특성이나, 다양한 생물학적 효능에 대한 검증이 부족한 실정이다.

도토리 (Acorn)는 참나무과의 나무열매로서 약 28종의 종류가 있으며, 대표적인 도토리에는 졸참나무의 열매와 상수리나무의 열매가 있다. 전세계 여러 나라에서 빵, 떡, 죽, 대용커피 뿐만 아니라 의약과 산업분야에 널리 활용되고 있는 반면, 우리나라에서는 자연 건강식품이나 묵, 전분, 국수의 재료로 활용되고 있어 그 활용분야에 대한 연구가 미비한 수준이다. 도토리는 전분 65%~69%, 조단백 5.8~7.8%, 조지방 1.1~7.8%, 조섬유 2.1~3.8%, 조회분 1.9~3.4%, 탄닌 4.6~13.7% 내외로 구성되어 있다 (14). 도토리는 예로부터 설사, 위장병 개선에 활용되었고, 피로 숙취해소와 인후염, 구내염, 강장 등에 치료 효과가 탁월하다고 알려져

있다 (15). 도토리의 수렴작용과 지사작용은 도토리에 함유되어있는 탄닌 성분 때문으로 알려져 있다. 도토리는 짙은 맛을 주는 성분인 탄닌을 약 4.6~13.7% 함유하고 있으며 탄닌은 폴리페놀의 중요성분의 하나로 나무껍질과 견과에 널리 분포되어 있고, gallic acid, digallic acid, gallotannin 등과 같은 천연 항산화 성분을 다량 함유하고 있다 (16). 탄닌 성분의 항균, 항종양작용 및 중금속 제거능 등과 같은 생리 활성연구가 이루어졌으나, 탄닌에 대한 *in vivo* 연구들은 부족한 실정이다. 이외에 도토리에 관한 선행 연구로는 도토리의 성분 분석, 도토리 전분의 연구, 도토리의 폴리페놀 성분의 열수 추출의 최적화에 대한 연구 등이 있다 (17). 도토리의 생리활성에 관한 연구로는 도토리 과육 및 내피가 흰쥐의 항산화능 및 항혈전능에 영향을 미치는 연구와 고지방식이로 유도된 비만 쥐의 항산화 효소 활성 효과, 그리고 도토리 추출물의 경구투여가 마우스 면역세포활성에 미치는 효과 등이 발표되었다 (18-20). 또한 비만에 대한 도토리 식이의 영향에 대한 연구가 보고된 바 있으며, 탄닌이 지방흡수를 억제해주고 배설을 촉진시켜 비만 억제에 효능이 있다고 알려져 있다 (21). 뿐만 아니라, 도토리 묵은 수분함량이 높아 포만감을 줄 뿐만 아니라 칼로리가 낮아 건강식으로 각광을 받고 있다. 그러므로 본 연구과제에서 수행한 도토리의 생물학적 효능과 우수성 평가는 도토리의 우수성 규명과 향후 도토리를 이용한 기능성 제품 개발에 필수적이다.

메밀 (Buckwheat)은 예부터 구황작물의 하나로 재배되어 왔으며, 우리나라에서 막국수, 메밀묵, 및 부침개 등과 같은 한식의 주원료로 이용되어 왔다. 최근에는 식생활의 서구화에 따라 증가하는 성인병의 예방과 치료에 메밀이 효과가 있다는 보고와 함께 메밀의 소비도 증가하는 추세이다. 메밀이 새로운 기능성 건강식품으로 그 수요가 증가하는 이유 중 하나는 생리활성 물질로 알려진 플라보노이드 계열의 rutin을 함유하고 있으며 이를 비롯한 quercetin, quercitrin, myricetin을 다량 함유하고 있기 때문이다 (22). Rutin 함량은 일반적으로 메밀종실에서는 극히 적은 양인 약 0.02~0.1% rutin이 함유되어 있다고 알려져 있다. 메밀가루는 탄수화물 65~70%, 단백질을 10~12% 함유하며 지방질은 2~4% 정도 함유되어 있다. 플라보노이드는 폴리페놀 화합물로서 약 5,000여 종류가 있으며 hydroxyl radical, superoxide anion radical, peroxy radical과 같은 자유기의 소거 작용뿐만 아니라, 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 지질과산화와 LDL의 산화를 억제하고 혈소판의 응집을 저해하여 동맥경화증, 고혈압 관상심장 질환을 예방한다고 알려져 있다 (23). 메밀의 기능성에 관련한 연구는 당뇨 및 고혈압저하에 미치는 효과, 당뇨 및 지질대사에 미치는 효과, 동물 실험에서 고혈압 저하에 대한 연구가 아주 단편적으로 실시되었다 (24, 25). 최근에는 *in vivo*, *in vitro* 연구를 통해 메밀의 항염증 연구가 보고되었다. 발아메밀의 에탄올 추출물에 의해 염증관련 사이토카인인 IL-6, IL-8, TNF- α 의 발현이 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (26).

녹두 (Vigna radata L.)는 콩과에 속하며 식미가 독특하여 콩과작물 중 콩, 팥 다음으로 이용도가 높고, 식용뿐 아니라 약용으로도 이용되어 왔다. 한식에서는 녹두전, 청포묵, 죽, 전병 등의 주재료로 활용되고 있다. 최근 녹두의 다양한 약리 효과가 보고되면서 기능성 식품으로서의 활용 가능성이 검토되고 있다. 녹두의 생리활성에 관한 연구로는 이소플라본 함량과 항산화 및 혈전 용해 활성이 보고되었으며, 녹두 나물 생즙이 카드뮴에 의한 흰쥐 간 손상의 회복에 미치는 영향이 보고된 바 있다 (27). 또한 녹두에서 분리된 vitexin과 isovitexin은 항산화, 항염증 및 미백활성이 있음이 보고되었고, 녹두잎은 rutin을 약 1% 정도 함유하고 있으며 항당뇨 및

혈압강하 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다 (28, 29). 녹두 가루의 주성분은 전분으로 54.9%, 단백질은 21.2%, 지방은 1% 정도로 구성되어있다 (30). 그 외에 녹두가 항균, 항당뇨 그리고 혈중 콜레스테롤 저하 효과와 같은 생물학적 효능을 나타냄이 보고되었고, 녹두의 에탄올 추출물이 백내장, 동맥경화, Alzheimer's disease의 질환과 관련이 있는 진행성 당화 종말 생성물의 생성을 억제하는 효과가 있다고 나타났다 (31). 뿐만 아니라 녹두 추출물이 염증 관련 효소인 LOX, phospholipase A2 (PLA2), COX-2의 활성을 전반적으로 억제하며, 염증 효소계의 기질인 arachidonic acid의 생성을 억제함으로써 염증반응 초기단계에서 항염증 작용을 개시할 수 있을 것으로 보인다는 연구결과가 있다 (32).

최근 노화와 비만, 성인병, 그리고 아토피와 같은 알레르기질환의 원인 중의 하나가 세포 내 산화성 스트레스라는 학설이 점차 인정되어짐에 따라 산화 스트레스를 조절할 수 있는 천연물질 및 항산화제에 대한 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 항산화 효소계열인 SOD (superoxide dismutase), catalase, glutathioneperoxidase 등과 천연 항산화제인 tocopherol, 비타민 C, 카로테노이드, catechin, glutathione 및 합성 항산화제인 BHA, BHT, Trolox-C를 필두로 한 많은 항산화제가 알려져 있다. 그리고 현대인의 최대 관심사인 노화를 지연하고, 비만을 치료하기 위한 다양한 물질에 대한 연구가 이루어지고 있지만 원인이 다양한 질병에 대한 근본적인 치료제를 개발하는데 어려움을 겪고 있는 실정이다. 게다가 웰빙 시대에 힘입어 자연 건강식품에 대한 관심이 높아짐에 따라 각종 성인병의 예방과 치료를 위한 천연 기능성 물질의 탐색과 기능성 장수 식품 및 소재의 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다. 이러한 세계적 추세에 근거하여 천연 한식 목 재료인 도토리, 메밀, 녹두의 우수성과 기능성을 규명하는 본 연구결과는 향후 한식의 우수성을 세계에 알리는데 필요한 과학적 근거를 제공하고, 한식 재료를 이용한 기능성 제품 개발에 크게 기여할 것으로 사료된다.

II. 연구개발 내용 및 방법

1. 연구개발 내용

	연구개발목표	주요내용	연구범위
제1 세부 과제	<ul style="list-style-type: none"> - 한국 전통식품인 다양한 목의 항산화 및 스트레스 저항성에 미치는 효능 검증 - 실험동물을 이용하여 <i>in vivo</i> 상태에서 항노화·수명연장 효능 규명 - 항스트레스 및 항노화 효능을 나타내는 한식 목 재료 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - 한식 목 자료 수집 및 원료 확보 - 실험동물을 이용한 한식 목의 항산화 효능 분석 - 개체 수준에서의 스트레스 저항성에 미치는 효능 검증 - 실험동물을 이용한 한식 목의 항노화 기능 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - 한식 목 관련 자료 수집 - 한식 목 원료 확보 - 선충을 실험동물로 이용하여 Paraquat에 산화성 스트레스에 대한 목의 항산화 효능 분석 - 목이 자외선 및 열 스트레스에 대한 저항성에 미치는 효능 검증 - Lifespan assay를 이용하여 선충의 평균수명 및 최대수명에 미치는 효과 규명 - Fertility assay를 통해 노화의 주요 생체지표인 개체의 번식률에 미치는 영향 평가
제2 세부 과제	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>와 실험동물에서 항아토피 기능 규명 - <i>in vitro</i>와 실험동물에서 항비만 기능 규명 - 항아토피 및 항비만 효능을 나타내는 한식 목 재료 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - 쥐를 이용한 세포 및 조직수준에서의 항아토피 효능 평가 - 쥐를 이용한 혈청학, 조직학적 수준에서의 항비만 효능 평가 - 항아토피, 항비만 효능의 기능성 식품 재료 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - Basophil 세포주를 이용한 MTT assay를 통해 세포 독성 측정 및 세포내 β-hexosaminidase 방출 억제 효능 평가 - BALB/c 마우스를 이용한 혈중 IgE, IL-4, IFN-γ 측정 - 비장세포에서의 Th1/Th2 측정 - 마우스 전구 지방세포 3T3-L1을 이용한 지방분해능 측정 및 Oil Red O 염색 - 지방 축적의 정도를 확인할 수 있는 지표인 leptin, insulin의 농도측정 - 실험동물을 이용한 혈액지표인 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, 인슐린 등의 농도 측정 - 실험동물을 이용한 증체율 측정 및 장기 중량 측정

2. 연구개발 방법

1. 제1세부과제: 한식 목의 항노화 장수 기능성 연구

1) 항산화 효능 시험

수정된 이후부터 각 한식 목이 첨가된 NGM 배양배지에서 키운 성체 꼬마선충을 체내에서 산화성 스트레스를 일으키는 유도물질인 paraquat이 들어있는 배양배지로 옮긴 후, 시간에 따른 개체의 사망률을 기록하였다. 실험에 사용한 모든 개체가 사망하면, 생존률 곡선을 그리고 log-rank test에 의한 대조군과의 유의적 차이 여부를 계산하였다.

2) Heat shock에 대한 저항성 시험

20도 저온 배양기에서 성체로 자랄 때까지 키운 꼬마선충을 35도 배양기로 옮겨 16시간동안 heat shock 스트레스를 가하였다. 16시간 후에 해부현미경으로 꼬마선충을 관찰하여 생존률을 계산하였다. Student t-test 통계처리 방법을 이용하여 대조군과 시험군에서의 heat shock에 대한 저항성 변화의 유의성을 분석하였다.

3) 자외선 조사에 대한 저항성 시험

20도 저온 배양기에서 키운 성체 꼬마선충을 자외선 조사기로 옮긴 후, $20\text{J}/\text{m}^2$ 의 자외선을 1분간 조사하였다. 실험동물을 다시 20도 배양기로 옮긴 다음, 매일 생존률을 계산하였다.

4) 수명연장 효과 시험

수명측정은 꼬마선충 성장의 최적온도인 20도에서 수행하였다. 한식 목을 첨가시킨 NGM 배양배지에서 키운 꼬마선충의 수명을 아무것도 첨가하지 않은 NGM 배양배지에서 키운 대조군과 비교하여 수명연장 효과를 규명하였다. 구체적으로 부화 후 3일이 경과한 후부터, 2-3일 간격으로 각 개체를 새로운 NGM 배양배지 (30개체/plate)로 옮겨주며, 매일 사망한 개체의 수를 기록하였다. 꼬마선충의 경우, 어떠한 물리적 자극에도 반응하지 않는 경우를 “사망”으로 간주하며, 기록되어진 데이터는 생존률 곡선과 log-rank test를 이용하여 통계 처리하여 평균 수명과 최대수명에의 효과를 분석하였다.

5) 번식률 시험

부화 후 2일이 경과된 꼬마선충을 NGM 배양배지로 한 plate당 한 마리씩, 매일 새로운 배양배지로 옮겨주며, 남겨진 배양배지는 2일이 경과한 후, 수정란으로부터 부화되는 다음 세대의 꼬마선충의 수를 기록하였다. 대조군과 시험군의 노화에 따른 번식률의 변화를 정량적으로 통계 처리하였다.

2. 제2세부과제: 한식 목의 항아토피 및 항비만 기능성 연구

1) 실험재료

실험에 사용한 메밀묵가루 (메밀분 100%, 봉평영농조합), 도토리묵가루 (도토리100%, 판교농협) 그리고 녹두묵가루 (녹두전분 99%, 늘푸른) 모두 시중에서 판매되고 있는 묵가루를 구입

하여 시료로 사용하였다.

2) 목 분말의 추출물 제조

일반적으로 식품소재의 추출방법은 식품소재의 특성에 맞는 다양한 추출용매를 이용한다. 물 추출의 경우 생리활성물질의 수율이 높지 않을 뿐 아니라 그 활성 또한 약하다고 알려져 있다. 따라서 식품소재로부터 생리활성물질의 최적 추출 조건을 찾기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 목 분말의 생리활성 및 특성 증진을 위해서는 추출 조건이 가장 중요하다고 할 수 있다 (33). 따라서 본 연구에서는 추출용매조건을 달리하여 목 분말의 용매별 추출물의 항비만 및 항아토피 효과를 증대시키고자 하였다. 동물세포주를 사용한 항비만 및 항아토피 연구에서는 각각의 목 분말을 물과 에탄올을 사용하여 추출하여 사용하였고 (추출물), 실험동물을 사용한 항비만 및 항아토피 연구에서는 각각의 목 분말을 멸균 증류수에 녹여 바로 경구 투여하였다.

동물세포주를 사용한 항비만 연구에 사용된 목 분말 추출물의 경우 각 목 분말가루 5g에 증류수와 ethyl alcohol을 부피 50mL이 되게 첨가하여 상온에서 24시간 동안 가볍게 흔들어 분후 3,000rpm에서 20분간 원심 분리하고 상등액만 취하여 0.22um filter로 여과한 뒤 -20°C에 보관하여 사용하였다.

3) 3T3-L1 adipocyte의 배양

본 연구에서 사용한 3T3-L1 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양받아 연구에 사용하였다. 세포는 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM/high glucose) 배지를 사용하여 95% air, 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다. 계대하고 3~4일 후 세포가 confluent 하게 되면 0.05% Trypsin/0.53mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 처리하여 세포를 분리하고 원심분리기 (1500rpm, 3min)에서 세포를 모은 후 세포밀도를 5×10^3 cell/mL로 희석하여 24-well palte에 1mL씩 plating하여 배양하였다. 2일에 한번씩 10% FBS가 포함된 새로운 DMEM 배양액으로 바꿔주었다. 4일 후 세포가 confluent하게 되면 DMEM 배양액에 5mg/mL insulin, 0.25mM dexamethasone, 0.5mM Isobutylmethylxanthin (IBMX)가 첨가된 differentiation medium을 처리하고 2일 후에 5mg/mL insulin만 포함된 DMEM 배양액으로 이틀에 한번 씩 배양액을 교환하여 분화를 유도하였다 (34). 분화유도 6일 째에는 insulin이 포함되어 있지 않은 배양액으로 교환하고 7일째에 시료를 처리하여 24시간 후에 Oil Red O 염색을 실시하였다.

4) Oil Red O 염색

세포 배양액을 버리고 4% formaldehyde를 500μL씩 각 well에 넣고 4°C에서 1시간 동안 배양하여 세포를 고정시켰다. formaldehyde를 버리고 PBS로 세 번 씻어낸 후 0.45μm filter로 여과한 Oil Red O 염색약을 500μL씩 각 well에 넣고 상온에서 1시간 동안 염색한 후 PBS로 세 번 씻어내었다. 염색된 세포는 현미경으로 관찰하며, 관찰 후 500μL isopropyl alcohol로 지방에 염색된 염색시약을 추출하여 spectrophotometer로 592nm에서 OD값을 측정하였다 (34).

5) 도토리, 메밀, 녹두 목 분말 추출물의 3T3-L1 세포독성

각 목 분말 추출물의 세포독성 평가는 MTT assay를 실시하였다 (35). 24-well plate에 분화 유도시킨 3T3-L1 세포에 농도별로 목추출물 시료를 처리하고 24시간 동안 세포를 배양한 후 5mg/mL MTT 시약을 300 μ L씩 각 well에 넣고 3시간동안 배양하였다. 반응 종료 후 잔여 MTT 시약을 제거하고 500 μ L DMSO를 각 well에 넣어 용해시킨 후 570nm에서 OD값을 측정하였다. 세포의 생존율은 대조군 대비 백분율로 표시하였다.

6) 웨스턴 블롯

1 \times PBS, 1/2 PBS, 1/10 PBS로 차례로 수세하고, 세포용 스크래퍼를 이용하여 세포를 수거한 후 튜브에 넣고 4 $^{\circ}$ C, 10,000rpm에서 20분 동안 원심 분리하였다. 수확한 세포에 1% protein inhibitor cocktail과 1mM PMSF가 포함된 RIPA buffer 100 μ L를 넣어 30분 동안 얼음에 두면서 10분마다 약 2분씩 강하게 vortexing 하면서 세포를 용해하였다. 단백질 추출물들은 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이전되었다. Membrane은 0.1% Tween 20 그리고 5% 탈지 건조된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline을 가지고 blocking 하였다. Membrane은 1차 항체를 가지고 blotting하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, ECL western blot detection 시약을 사용하여 원하는 단백질을 규명하였다.

7) 실험동물의 사육 및 식이

실험동물을 사용한 항비만 연구에서는 각각의 목 분말을 멸균 증류수에 넣고 바로 경구투여하였다. 실험동물은 4주령의 수컷 C57BL/6 마우스로 (주)오리엔트바이오에서 구입하였다. 사육 조건은 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도는 50 \pm 10%, 조명 12시간 명암으로 유지시켜 주었다. 처음 1주간 pellet형의 lab-chow 식이 (일반식이)를 제공하면서 적응시킨 후, 난괴법에 의하여 3개의 군으로 나누었다. 고지방 식이군 (high fat diet, HFD)들은 고지방 식이 (high fat feed)를 사용하여 총 열량의 60%를 지방으로 공급하고 식수와 같이 자유식으로 먹게 하여 6주 동안 사육하였다. 목 분말 섭취군은 고지방 식이 섭취 이틀 뒤부터 농도별로 제조된 도토리, 메밀 그리고 녹두 목 분말을 격일 간격으로 7.5mg/g 양을 경구투여 하였다.

8) 비만마우스의 체중 및 체지방량 측정

마우스의 식이 섭취량은 이틀에 한 번 식이 잔량을 측정하여 식이 제공량으로부터 뺀 값을 기록하였고 체중 또한 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다. 체지방량은 마우스의 복부 및 장기에서 백색지방과 갈색지방을 적출하여 생리식염수로 헹군 후 물기를 제거하여 무게를 측정하였다.

9) 혈액 지표 농도 및 체지방량 측정

마우스의 혈청 채취는 12시간 절식 후 C57BL/6 마우스를 에틸에테르로 마취한 후 복부하대 정맥에서 채혈하여 얻은 혈액을 실온에서 20분간 방치한 뒤 13,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하며 혈액 지표인 중성지방, 총콜레스테롤, high density lipoprotein cholesterol (HDL), low density lipoprotein cholesterol

(LDL) 측정용 시액 (아산제약)을 사용하여 각각 정량하였다. 또한 렙틴과 인슐린은 ELISA kit (APLCO)를 사용하여 각각의 농도를 측정하였다.

10) 항아토피 효능연구를 위한 세포주 및 세포주의 배양

본 연구에 사용한 basophilic leukemia cell line인 RBL-2H3 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. RBL-2H3 세포는 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Hyclone)과 1% antibiotics (penicillin-streptomycin) (Hyclone)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Hyclone) 배지를 사용하여 5% CO₂, 95% air가 공급되는 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

11) 목 재료의 분말화

동물세포를 사용한 항아토피 연구를 위해 목 분말 추출물의 경우 도토리, 메밀, 녹두 목 분말 30g을 증류수 100mL에 충분히 녹도록 하룻동안 교반 후 3,000rpm, 20분간 원심분리하여 상등액만 얻었다. 이렇게 얻은 상등액은 4일간 동결건조시켜 증류수와 에탄올 성분을 완전 제거 후 얻어진 분말은 -80°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

12) 세포생존율 측정

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)용액은 1×PBS buffer에 5mg/mL의 MTT를 용해 후 살균된 여과지로 여과하여 불용성 물질을 제거한 후 사용하였다 (35). 세포수를 5×10⁴cells/mL로 희석하여 96 well plate에 100μL씩 분주한 뒤 5% CO₂, 95% air가 공급되는 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. 그 후 도토리, 메밀, 녹두 물 추출물과 70% EtOH 추출물을 1×PBS에 녹여 0.45μm syringe filter를 이용하여 필터 후 농도별로 첨가하여 24시간 더 배양하고 조제한 MTT solution을 50μL/well씩 첨가하여 37°C에서 2 시간 동안 반응시켜 살아있는 세포가 보라색의 불용성 formazan을 형성하게 되면 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 100μL/well씩 가하고 잘 교반하여 침전물을 완전히 용해하였다. 용해된 formazan 산물이 들어있는 각 well의 흡광도는 ELISA reader를 이용하여 570nm에서 측정하였다. 결과는 대조군의 살아있는 세포를 100%로 하였을 때의 상대적인 비율로 나타내었다.

13) β-hexosaminidase 측정

Rat basophilic leukemia cell line인 RBL-2H3 세포는 10% FBS, 100unit/mL의 penicillin과 streptomycin을 포함하는 DMEM 배지와 37°C의 5% CO₂를 포함하는 조건에서 1.5×10⁵cell/well로 48 well plate에서 3시간 배양한 후, 상등액을 제거하고 anti-DNP IgE 3 μg/mL이 포함된 DMEM을 각 well에 500μL씩 첨가한 후 37°C에서 16시간이상 배양하였다. 배양 후 extracellular HEPES buffer (pH 7.4)를 각 well당 500μL씩 첨가하여 2회 세척하고 도토리, 메밀, 녹두 목 분말의 물 추출물과 70% EtOH 추출물을 0.1% BSA가 포함된 extracellular HEPES buffer (pH 7.4)로 미리 희석하여 500μL씩 첨가하고 37°C에서 1시간 30분간 반응하였다. 그 후 다시 extracellular HEPES buffer (pH 7.4)로 2회 세척 후 800ng/mL의 DNP-HSA를 첨가하고 37°C에서 1시간 재차 반응시켰다. 상등액과 동량의 2mM

p-nitrophenyl-β-acetyl-glucosamide가 포함된 0.05M citrate buffer (pH 4.5)를 37°C에서 1시간동안 반응시키고, total β-hexosaminidase 농도 측정을 위해 1% Triton X-100으로 세포를 분해시킨 후 상등액과 동량의 2mM p-nitrophenyl-β-acetyl-glucosamide가 포함된 0.05M citrate buffer (pH 4.5)를 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 그 후 0.05M sodium carbonate buffer (pH 10)을 넣어 반응을 종결시켰다. 그리고 ELISA reader를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. β-hexosaminidase는 아래와 같은 방법으로 계산하였다 (36).

$$\% \text{ Degranulation} = \text{OD}_{\text{supernatant}} / (\text{OD}_{\text{supernatant}} + \text{OD}_{\text{triton x-100}}) \times 100$$

14) 동물 배양

실험동물을 사용한 항아토피 연구에서는 각각의 목 분말을 멸균 증류수에 녹인후 바로 실험에 사용하였다. 4주령 수컷 NC/Nga 마우스는 오리엔트 바이오로부터 공급받아 실험에 사용하였다. 실험동물 NC/Nga 마우스 18마리를 음성대조군, 두 농도 조건의 시험군으로 나누었으며, 무작위로 3~4마리씩 그룹별로 나누었다. 시험물질인 도토리 목 분말을 멸균증류수에 녹여 1% (1.5mg/150μL)와 5% (7.5mg/150μL)가 되도록 매 실험마다 제조 후 사용하였다. 사육 조건은 온도 21~23°C, 습도 40~60%, 조명 12시간 명암으로 유지시켰으며, 시험동물은 분양 받은 후 7일간 순화 과정 후 실험에 사용하였다.

15) 아토피 피부염 유사 병변 유발

NC/Nga 마우스는 등을 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치하였다. 피부 자극을 위해 사용한 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)는 4:1 비율의 아세톤-올리브오일에 녹여 사용하였다. 먼저 피부감작을 위해 1% DNCB 용액 200μL를 제모 부위에 0일째와 3일째에 도포하였다. 7일째부터는 0.4% DNCB 용액 150μL를 이전과 같은 방법으로 일주일에 3회씩 5주간 도포하여 총 6주간 (42일)에 걸쳐 아토피 피부염 유사 병변을 유발하였다. 도포하면서 동시에 농도별 도토리 목을 경구 투여 하였다. 음성대조군 (negative control)의 경우 아토피 피부염 유사 병변 유발과 동량의 멸균 증류수를 경구투여 하여 도토리 목의 아토피 개선 효능을 평가하였다. 아토피 피부염 유사 병변의 효능 평가를 위해 NC/Nga 마우스는 7일 간격으로 안와채혈을 통해 혈액을 분리하였다. 아토피 피부염 유발 실험은 식약청 가이드라인을 준수하여 진행하였다 (37).

16) 혈중 IgE의 농도 측정

NC/Nga 마우스로부터 혈액을 채취하여 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액인 혈청만 분리하였다. 이렇게 얻은 혈청은 분주하여 -70°C에 보관하면서 ELISA법을 사용하여 IgE 정량을 실시하였다. 1차 항체와 0.1M sodium carbonate (pH 9.5) 용액을 1:250으로 희석하여 96 well plate에서 4°C, 16시간 이상 코팅한 후 혈청과 assay diluent를 1:250으로 희석하여 2 시간 동안 반응시키고 biotin이 부착된 2차 항체를 결합시킨 후 horseradish peroxidase (HRP)와 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB)를 사용하여 발색시켜 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

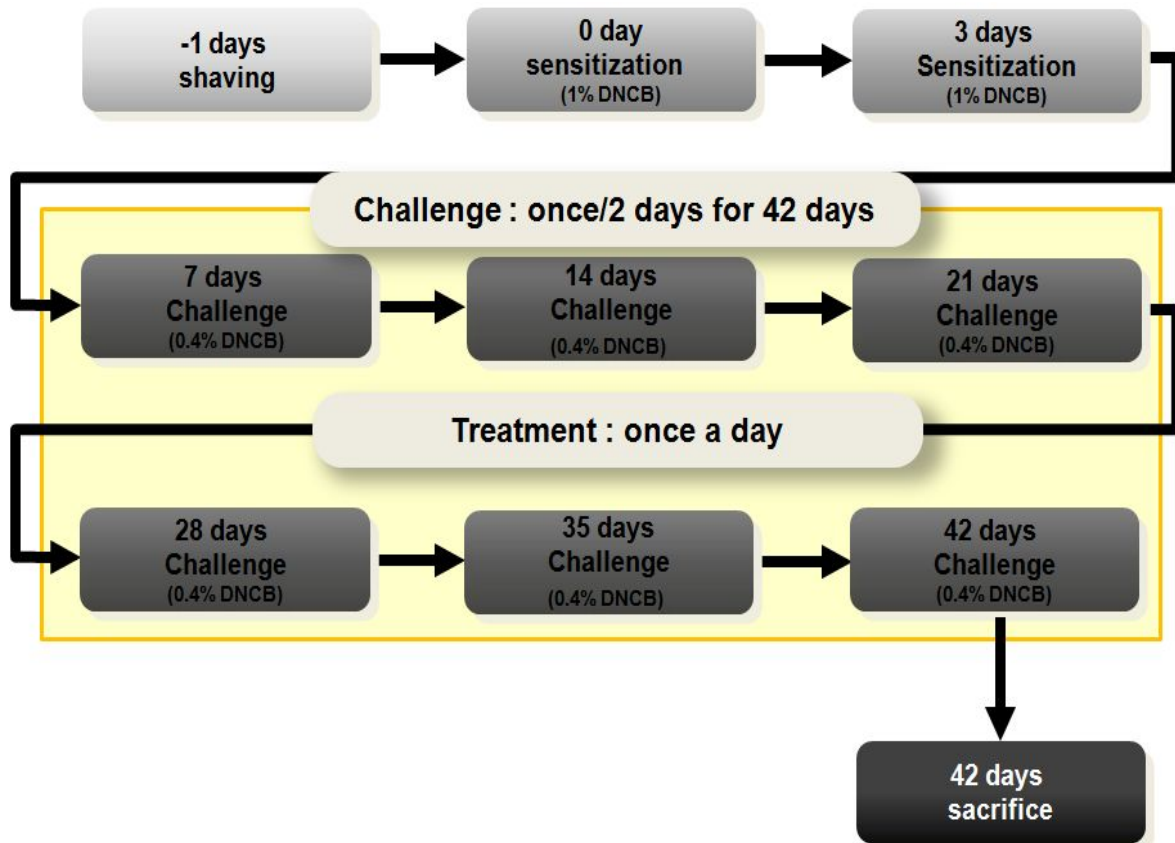


그림 3. 아토피 피부염 유발 과정

17) ELISA를 이용한 혈청 내의 사이토카인 (IL-4, IFN- γ) 측정

NC/Nga 마우스로부터 채취한 혈액의 혈청을 이용한 사이토카인 IL-4, IFN- γ 의 정량은 ELISA 키트 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)의 사용 설명서에 따라 검사하였다. IL-4과 IFN- γ 는 1차 항체를 0.1M sodium carbonate (pH 9.5) 용액에 1:500으로 희석하여 96 well plate에서 4°C, 16시간이상 코팅하였다. 그 후 assay diluent로 비특이적 반응을 차단하였다. 혈청 원액을 2시간동안 반응시키고 biotin이 부착된 2차 항체를 부착시킨 후 horseradish peroxidase (HRP)와 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB)를 이용하여 발색시킨 후 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

18) 비장세포에서 Th1/Th2 cytokine 발현 변화 측정

NC/Nga 마우스에서 비장 (spleen)을 적출하여 비장세포 (splenocyte)를 분리하여 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배양배지에 배양하였다. 비장세포 부유액을 동일한 세포가 포함되도록 넣은 후 T cell-specific mitogen인 ConA (concanavalin A)를 2 μ g/mL의 농도로 3일간 처리하였고, 이 때 ConA가 포함되지 않은 비장세포도 함께 배양하였다. 배양한 후 배양액으로부터 Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) 농도를 ELISA로 측정하였다.

19) 통계학적 분석

결과는 독립된 3 번의 실험을 통해 Mean \pm SEM으로 나타내었으며, 통계는 SPSS for Windows 12.0 프로그램을 이용하였다. 각 시험군의 유의성은 ANOVA를 사용하여 분석했으며 Duncan's multiple-range test에 따른 사후 검정을 실시하였다. 모든 실험에서 유의한 p 값은 0.05 이하로 분석하였다.

III. 연구개발결과

1. 제1세부과제: 한식 목의 항노화 장수 기능성 연구

1) 실험동물을 이용한 한식 목의 항산화 효능 분석

한식 도토리묵, 메밀묵, 청포묵의 재료인 도토리, 메밀, 녹두 가루를 증류수에 녹인 후, 이를 실험동물에 농도별로 처리하여 동물 개체의 산화성 스트레스 저항성의 변화를 관찰하였다. 실험동물로는 꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*)를 사용하였으며, 산화성 스트레스 유발물질로는 paraquat을 조건실험을 거쳐 20mM의 농도로 사용하였다. 다양한 농도에서의 항산화 효능을 검증하기 위해 각 추출물을 0, 50, 100, 500, 1000mg/L의 농도로 준비하여, 각 농도에서의 항산화 효능을 분석하였다. 먼저 도토리 가루의 경우 1차 실험에서는 50, 100, 1000mg/L의 농도로 배양배지에 첨가한 실험군에서는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 500 mg/L 실험군에서는 유의적인 산화성 스트레스 저항성의 증가를 보였다 (p -value = 0.0001, 16% 증가, 표 1). 그림 4에서 나타낸 바와 같이 산화성 스트레스 하에서의 꼬마선충의 생존률은 500mg/L의 도토리 추출물에 의해 증가함을 관찰할 수 있었다. 재연성 검증을 위한 2차 실험에서는 500과 1000mg/L의 농도에서 유의적인 산화성 스트레스 저항성 증가를 보였다 (표 1). 메밀 가루의 경우에는 1차 실험에서는 100mg/L 농도 처리군을 제외한 모든 농도에서 유의적인 항산화 효능을 보여주었다 (p -value \ll 0.001, 표 2). 생존률 곡선 또한 이러한 메밀 추출물의 항산화 효능을 잘 보여주고 있다 (그림 5). 메밀 추출물을 이용한 2차 실험에서는 분석에 사용한 모든 농도의 메밀 추출물이 유의적으로 산화성 스트레스 저항성을 증가시키는 것으로 나타났다 (표 2). 반면 청포묵 재료인 녹두 가루의 경우에는 모든 추출물 농도에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다 (표 3과 그림 6). 따라서 도토리와 메밀 목 가루의 경우, 최적의 농도 처리 시 강한 항산화 효능을 보임을 입증하였다.

표 1. 도토리 추출물의 농도별 항산화 효능 평가

	Conc. (mg/L)	Mean survival time (h)	p -value
도토리 추출물	0	70.6	
1차 실험	50	67.1	0.287
	100	68.5	0.087
	500	81.8	<0.001
	1000	75.2	0.420
	도토리 추출물	0	79.9
2차 실험	50	78.8	0.801
	100	77.6	0.405
	500	92.5	<0.001
	1000	94.5	0.017

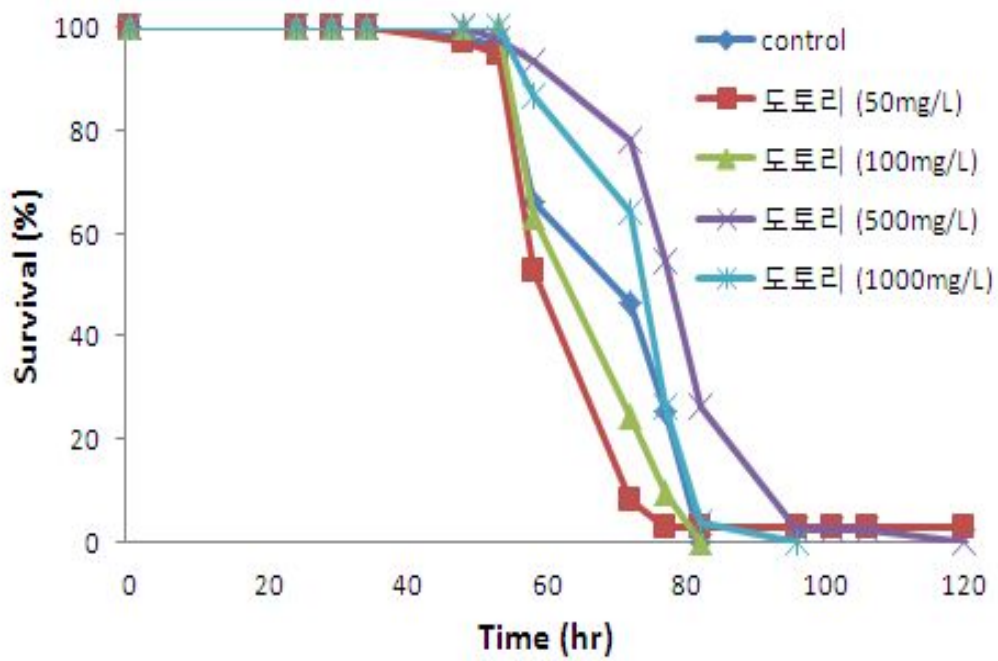


그림 4. 산화성 스트레스 하에서 농도별 도토리 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석

표 2. 메밀 추출물의 농도별 항산화 효능 평가

	Conc. (mg/L)	Mean survival time (h)	<i>p</i> -value
메밀 추출물 1차 실험	0	42.0	
	50	48.8	0.042
	100	43.8	0.938
	500	68.9	<0.001
	1000	69.1	<0.001
메밀 추출물 2차 실험	0	61.8	
	50	74.8	0.004
	100	83.9	<0.001
	500	88.2	<0.001
	1000	82.2	<0.001

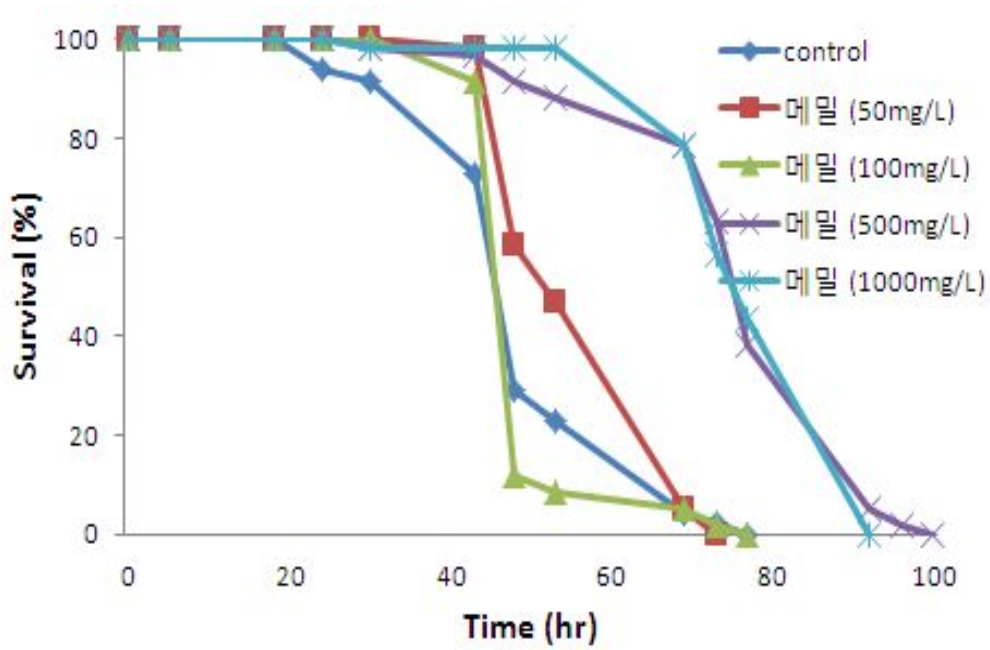


그림 5. 산화성 스트레스 하에서 농도별 메밀 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석

표 3. 녹두 추출물의 농도별 항산화 효능 평가

	Conc. (mg/L)	Mean survival time (h)	<i>p</i> -value
녹두 추출물 1차 실험	0	63.3	
	50	66.0	0.655
	100	68.3	0.078
	500	66.1	0.945
	1000	66.0	0.982

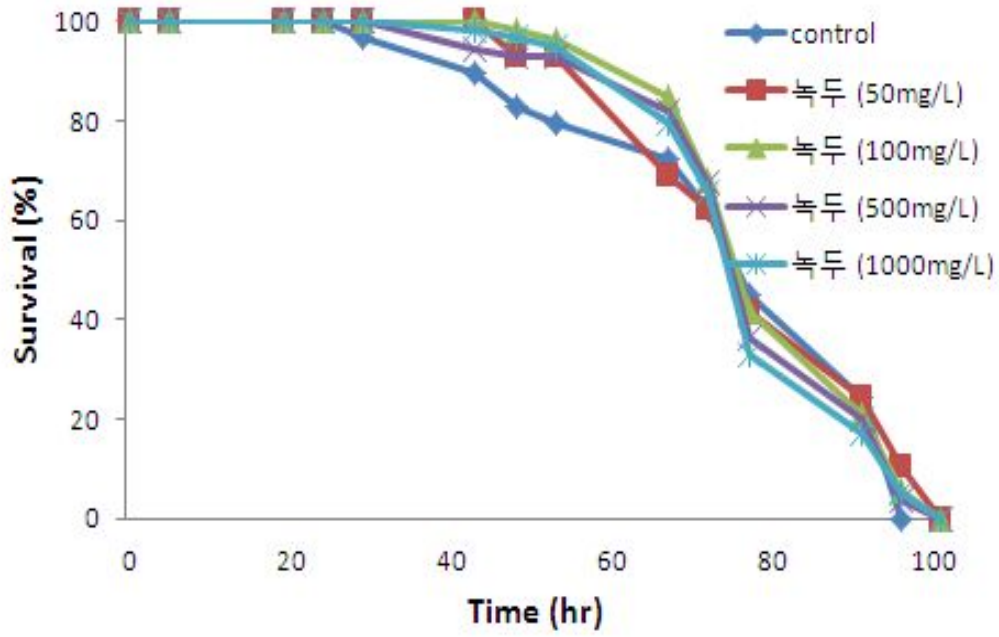


그림 6. 산화성 스트레스 하에서 농도별 녹두 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석

2) 목 재료의 heat shock 스트레스 하에서의 생존률에 미치는 영향 평가

목 재료가 항산화 이외의 다른 환경적 스트레스에 대한 저항성에 미치는 효능을 평가하기 위해 열 스트레스에 대한 저항성의 변화를 실험 동물에서 평가하였다. 먼저 동물모델인 꼬마선충을 20도 배양기에서 3일간 성장시켜 성체로 자라게 한 후, 배양배지를 35도 배양기로 옮겨 일정 시간 동안 열 스트레스에 노출시킨 후, 생존률을 분석하였다. 대조군을 이용한 조건 실험 결과, 35도 배양기에서 10시간 동안 노출시킨 후, 꼬마선충을 다시 20도 배양기에서 24시간 배양한 다음 생존률을 비교하는 assay법을 확립하였다. 앞선 항산화 효능 평가 실험의 결과를 근거로 유의적인 항산화 효능을 보여준 도토리과 메밀 가루를 시험하였으며, 실험에 사용한 농도는 가장 효과적인 항산화 효능을 보여주었던 500mg/L의 농도를 사용하였다. 총 3회에 걸친 실험 결과, 도토리과 메밀 추출물 모두 꼬마선충에서 열 스트레스 하에서의 생존률을 유의적으로 변화시키지는 못하는 것으로 나타났다 (표 4와 5).

그림 7에서 나타낸 바와 같이, 도토리 추출물을 이용하여 실험한 결과에서는 control의 경우 10시간의 열 스트레스 후, $70.3 \pm 4.12\%$ (mean \pm SEM)의 생존률을 보였고, 도토리 추출물에 노출시킨 경우에는 $56.4 \pm 5.45\%$ 의 생존률을 보여 생존률이 오히려 약간 감소하는 경향을 보였으나 두 그룹사이에 통계적으로 유의적인 차이는 보이지 못했다 (p -value = 0.112). 메밀 추출물의 경우에도 control ($23.6 \pm 4.37\%$)에 비해 메밀 추출물 처리군 ($29.4 \pm 2.20\%$)에서 생존률의 유의적인 차이를 보이는데 실패했다 (p -value = 0.304).

표 4. 도토리 추출물의 열 스트레스 저항성 평가

	control		도토리		생존률 (%)	
	alive	dead	alive	dead	control	도토리
1차	38	22	32	24	63.3	57.1
2차	42	18	28	32	70.0	46.7
3차	45	13	38	20	77.6	65.5

표 5. 메밀 추출물의 열 스트레스 저항성 평가

	control		메밀		생존률 (%)	
	alive	dead	alive	dead	control	메밀
1차	19	41	15	45	31.7	25.0
2차	10	50	17	38	16.7	30.9
3차	13	45	18	38	22.4	32.1

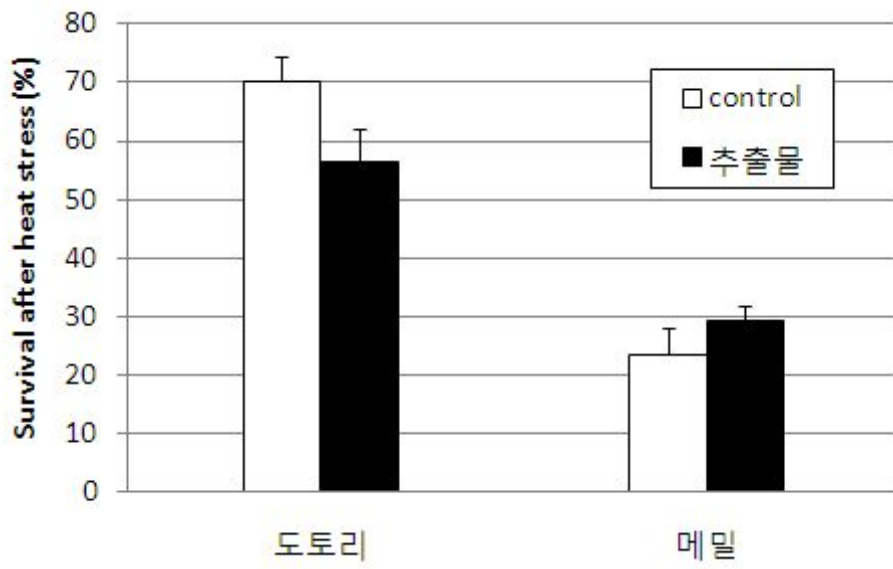


그림 7. 열 스트레스 하에서 도토리, 메밀 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석

3) 목 재료의 자외선 스트레스 하에서의 생존률에 미치는 영향 평가

목 재료가 자외선 조사에 의한 스트레스 조건에서의 생존률에 미치는 영향을 평가하였다. 20도 배양기에서 키운 성체 꼬마선충을 자외선 조사기로 옮겨 1분간 20J/m²의 세기로 자외선을 조사하였다. 항산화 효능 평가 실험의 결과를 근거로 유의적인 항산화 효능을 보여준 500mg/L 농도의 도토리과 메밀 가루를 사용하였다. 그림 8에 나타낸 바와 같이 도토리과 메밀 추출물 모두 꼬마선충에서 자외선 스트레스 하에서의 생존률을 유의적으로 증가시켰다 (그림 8).

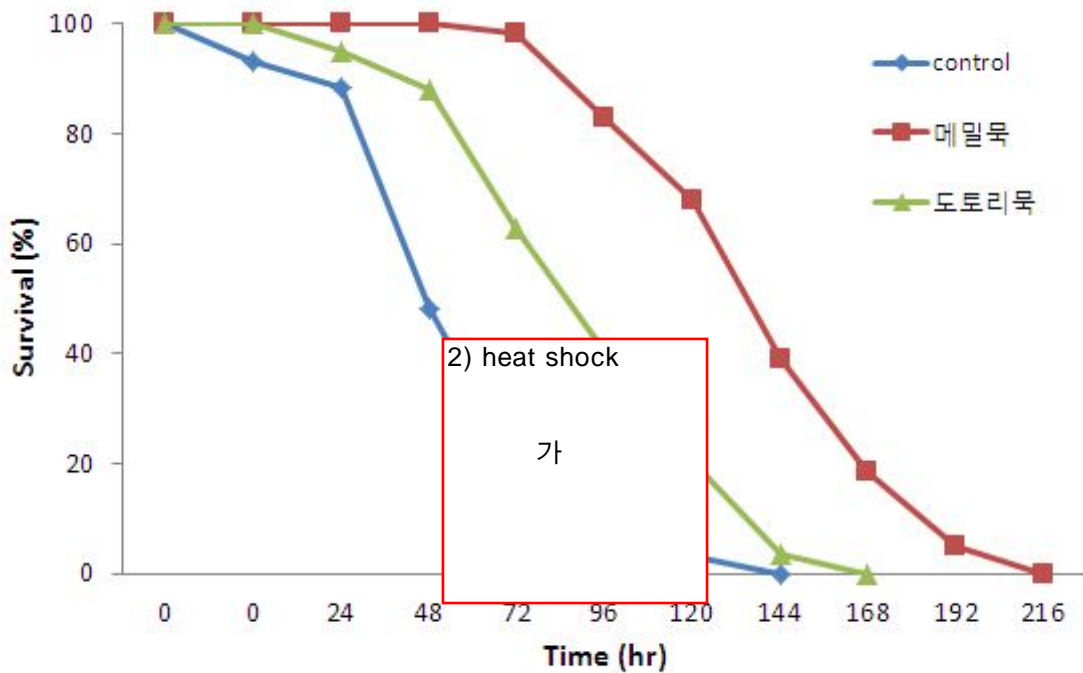


그림 8. 자외선 스트레스 하에서 도토리, 메밀 추출물에 의한 꼬마선충의 생존률 분석

4) 실험 동물을 이용한 목 재료의 항노화 기능성 연구

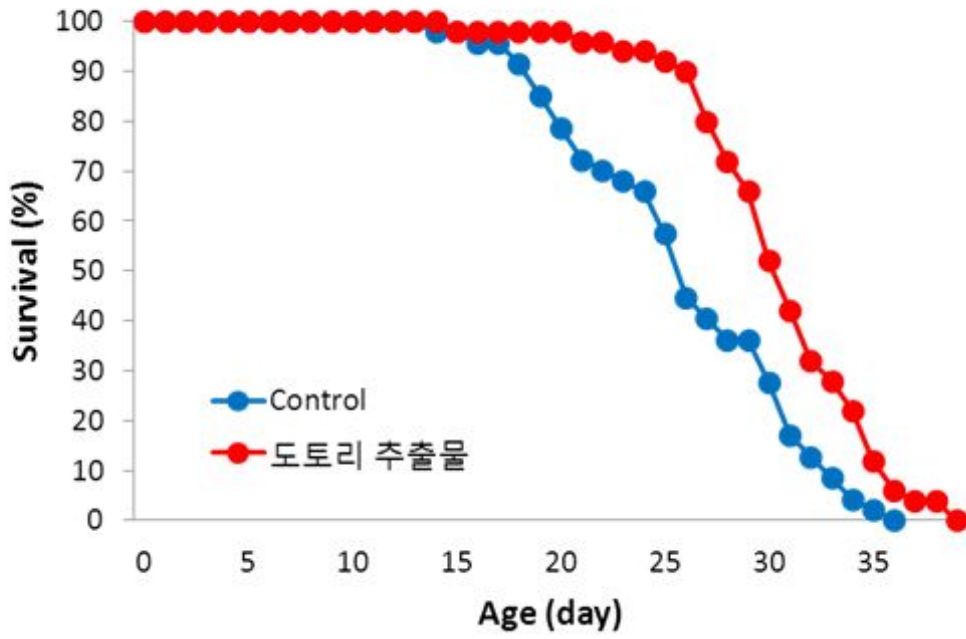
항산화 저항성은 개체의 수명과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구과제에서는 도토리과 메밀 가루의 항산화 효능을 규명하였으므로 이들의 항산화 효능이 개체의 수명 연장에도 유의적인 효능이 있는지 여부를 분석하였다. 꼬마선충에 각 추출물을 유의적 항산화 효능을 보였던 500mg/L의 농도로 처리한 다음, 실험에 사용된 모든 개체가 사망할 때까지 생존률을 계산함으로써 평균 및 최대 수명의 변화를 비교하였다. 표 6에 나타낸 바와 같이 도토리 가루의 경우, 1차 실험에서는 수명이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 대조군의 평균 수명에 비해 도토리 추출물 처리군에서 평균 수명이 22.4% (p -value < 0.001) 증가하였다. 하지만 2차 실험에서는 수명에서 대조군과의 차이를 보이는데 실패했다. 메밀 추출물의 경우에는 1차, 2차 실험에서 모두 유의적인 수명 연장의 효능을 나타내었다 (표 6). 1차 실험에서는 평균 수명이 19.7일에서 22.6일로 14.4% 증가하였고, 2차 실험에서는 평균 수명이 19.3일에서 24.0일로 23.4% 증가하였다. 최대 수명은 두 실험 모두에서 27일에서 30일로 증가하였다. 이러한 결과는 메밀 추출물의 항산화 효능이 개체의 수명 연장 효능까지 보임을 증명한다. 도토리 추출물의 경우에는 향후 추가 실험이 필요하다고 사료된다. 그림 9과 그림 10에 도토리 추출물과 메밀 추출물의 개체의 수명 연장에 미치는 효능을 생존률 곡선으로 나타내었다.

지금까지 알려진 항노화 및 수명 연장 효능을 가진다고 알려진 유전자와 물질들은 많은 경우 번식력의 저하를 수반하는 결과를 보이고 있다. 꼬마선충의 경우, 수명을 연장시키고 개체의 항산화 저항성을 증가시키는 것으로 알려진 insulin/IGF-1-like 신호전달계의 기능 저하가 개체의 번식력의 감소를 유발하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 수명 연장 효능을 나타내는 한식 목 재료 추출물의 번식력에의 영향을 평가하기 위해 각 개체가 생산하는 자손의 수를 개체의 번식기간 동안 매일 측정하여 대조군과 비교하였다. 그 결과, 도토리 추출물과 메밀 추출물 모두 개체의 전체 자손 수에는 유의적인 차이가 없음이 밝혀졌다 (표 7). 또한 번식 가능기간 동안의 날짜별 자손 수도 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러므로 도토리와 메밀 추출물은 개체의 번식력에는 아무런 영향을 미치지 않는다고 볼 수 있다. 특히 메밀 추출물의 경우, 강력한 항산화력을 보여주었고, 그로 인해 개체의 수명이 연장되는 효능을 보여주었는데, 이러한 항산화, 항노화 효능이 기존의 다른 수명 연장 기전들과는 달리 번식력 저하라는 부작용을 수반하지 않음을 시사한다. 다시 말해 한식 목 재료인 메밀 추출물의 경우, 향후 부작용 없는 천연 유래 항노화 식품 개발로 활용될 수 있다고 사료된다.

표 6. 도토리 및 메밀 추출물의 수명에의 효능 평가

	Conc. (mg/L)	평균 수명 (일)	최대 수명 (일)	<i>p</i> -value	% increase (%)
도토리 추출물	0	25.1	35		
1차 실험	500	30.7	39	<0.001	22.4
도토리 추출물	0	26.9	30		
2차 실험	500	26.6	31	0.954	0.0
메밀 추출물	0	19.7	27		
1차 실험	500	22.6	30	<0.001	14.4
메밀 추출물	0	19.3	27		
2차 실험	500	24.0	30	<0.001	23.4

(a)



(b)

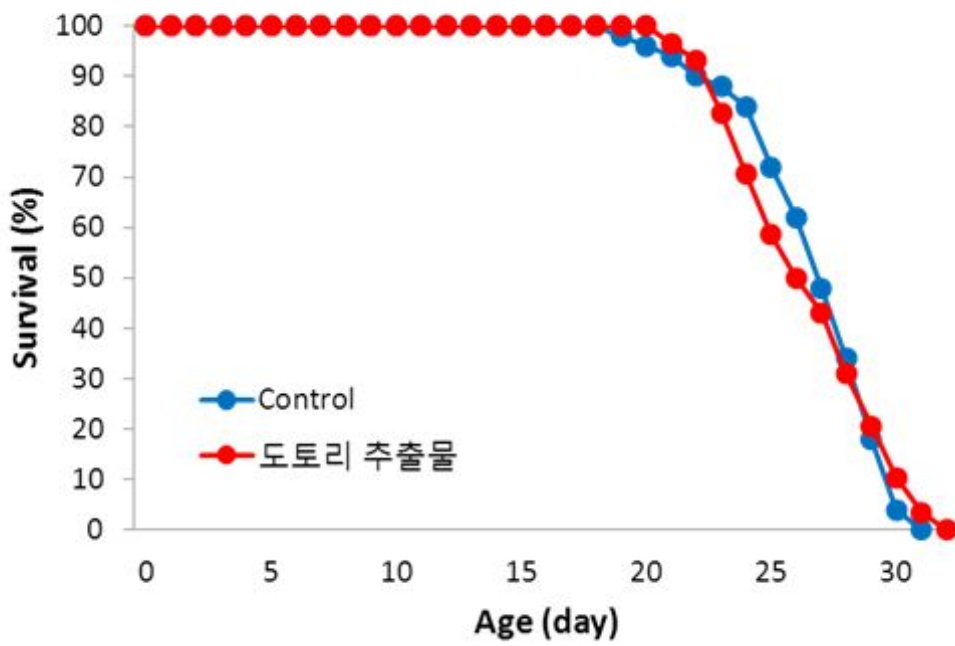


그림 9. 도토리 추출물에 의한 꼬마선충의 수명 변화 (a) 1차 실험 (b) 2차 실험

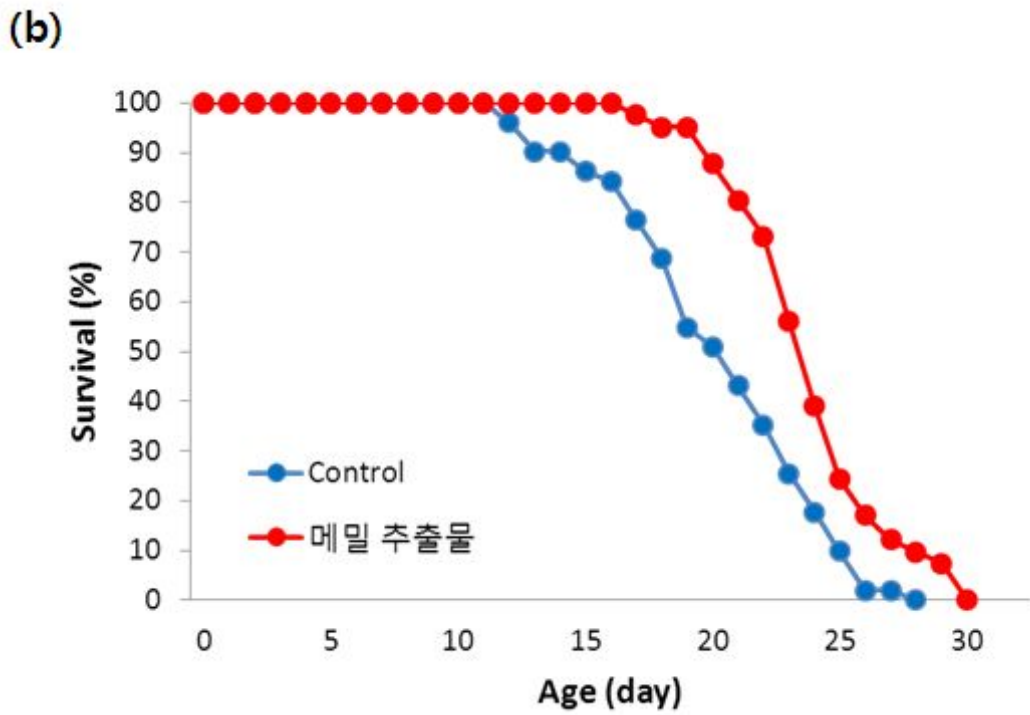
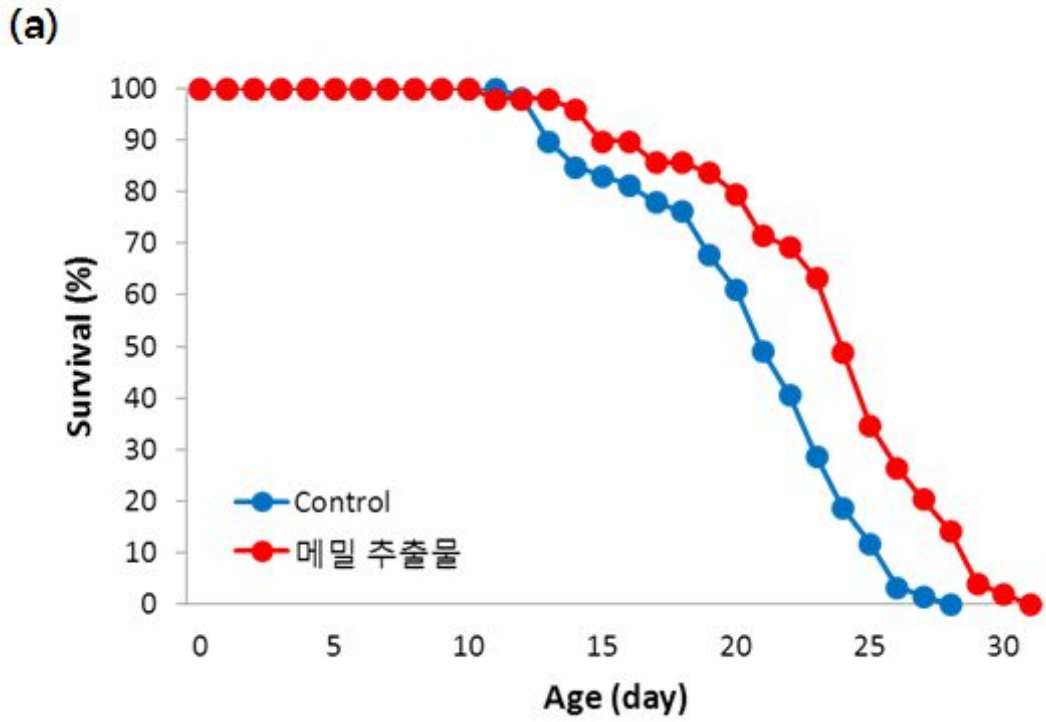


그림 10. 메밀 추출물에 의한 꼬마선충의 수명 변화 (a) 1차 실험 (b) 2차 실험

표 7. 도토리 및 메밀 추출물의 번식력에의 효능 평가

	Conc. (mg/L)	Number of worms used	Total number of progeny	<i>p</i> -value
도토리 추출물	0	8	123.5±42.24	0.126
	500	6	110.2±32.70	
메밀 추출물	0	9	175.0±28.70	0.298
	500	7	157.0±36.23	

2. 제2세부과제: 한식 목의 향아토피 및 항비만 기능성 연구

1) 도토리, 메밀 그리고 녹두 목 분말의 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

한국 전통 식품인 도토리, 메밀, 녹두 목 분말의 물 및 에탄올 추출물의 농도별 cell viability를 측정하기 위하여 지방전구세포인 3T3-L1을 이용하여 MTT assay를 수행하였다. cell viability는 물 추출 0.312% 농도에서는 도토리가 약 97%, 메밀이 약 94%, 녹두는 약 90%로 나타났으며, 에탄올추출 0.157% 농도에서는 도토리가 약 97.7%, 메밀이 약 91%, 녹두가 약 95%로 나타났다 (그림 11).

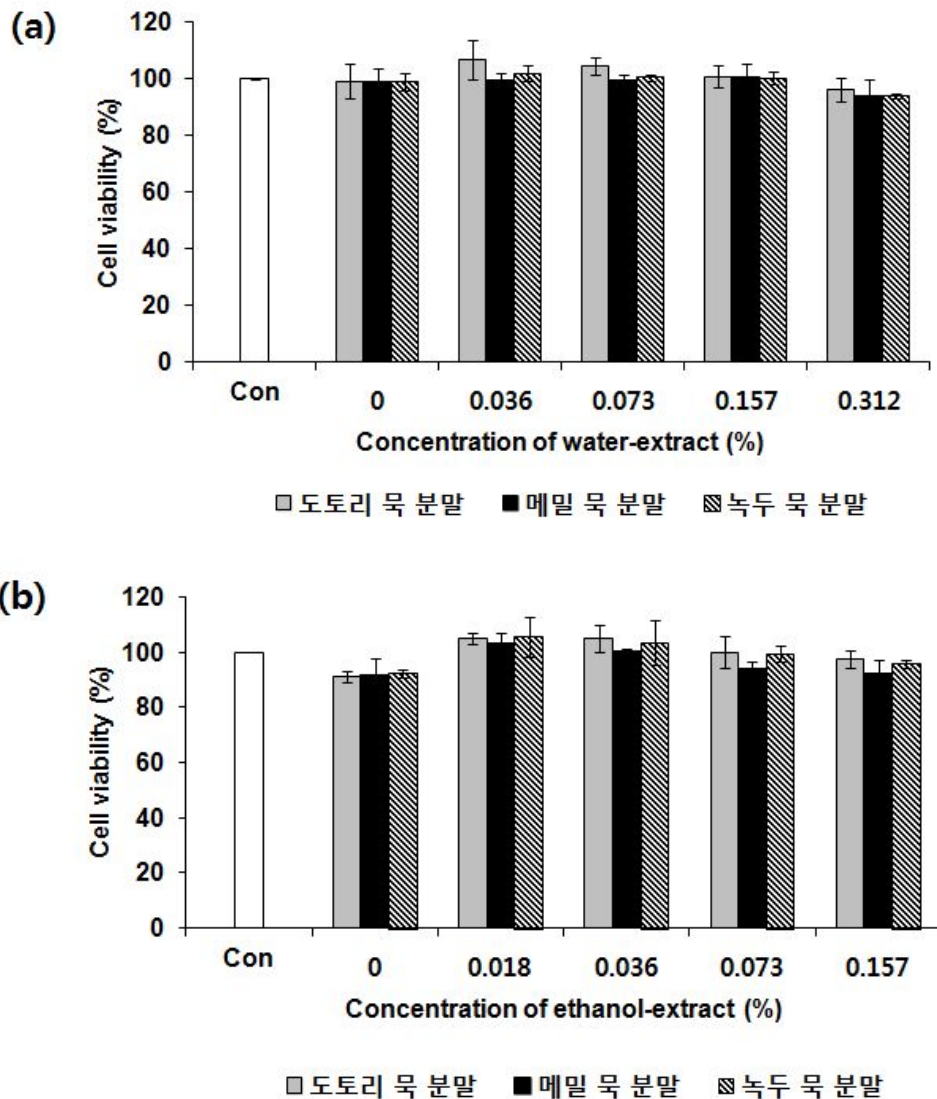
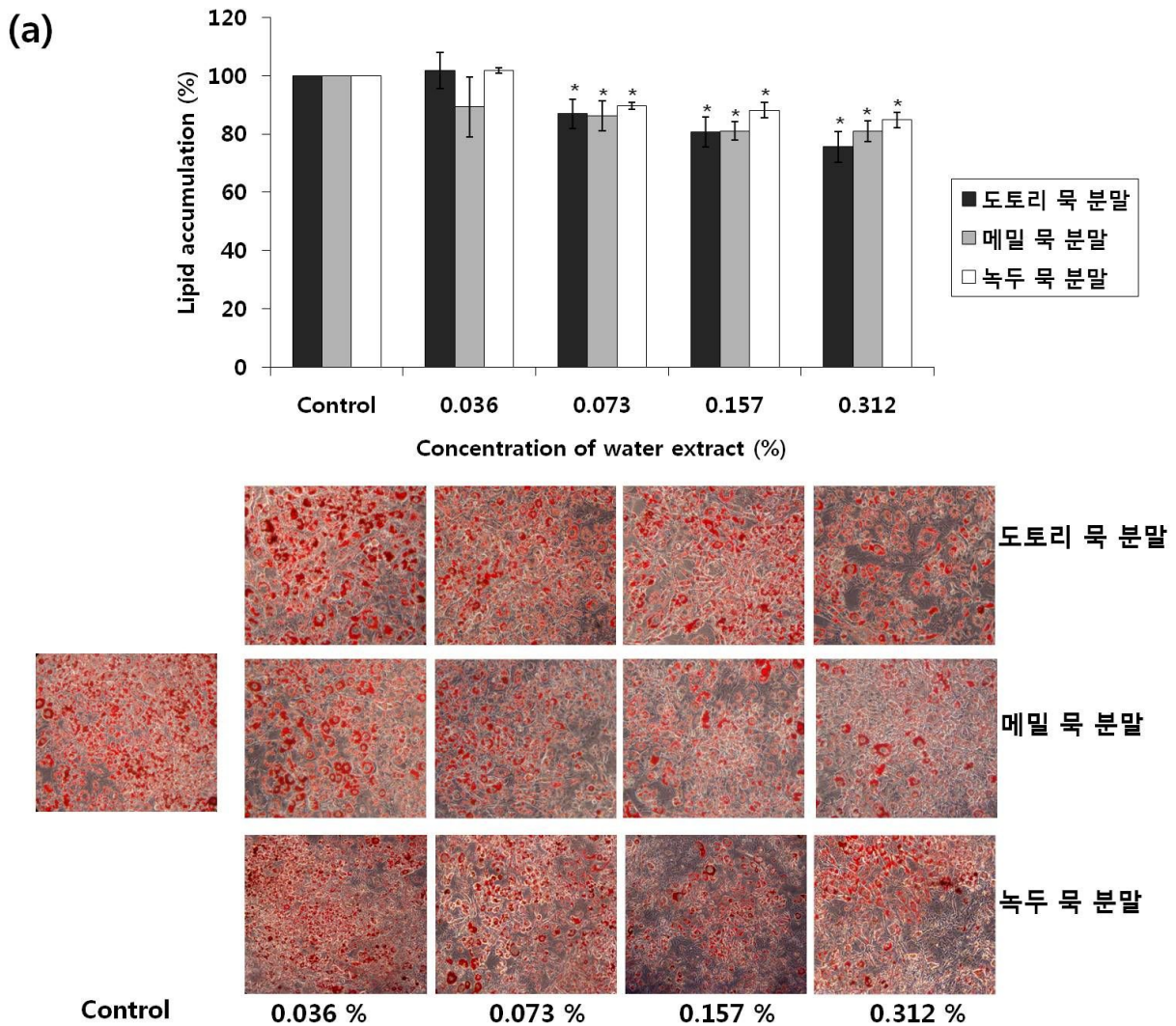


그림 11. 도토리, 메밀 및 녹두 목 분말 추출물 처리에 의한 3T3-L1 세포 생존율 (a) 물 추출물, (b) 에탄올 추출물

2) 목 소재 추출물이 3T3-L1 세포 내 지방 축적 억제에 미치는 영향

Preadipocyte 3T3-L1 세포에 분화배지를 이용하여 분화를 유도하면서 도토리, 메밀, 녹두 분말의 물 및 에탄올 추출물을 각각 농도별로 처리한 후 세포 내 형성된 지방구를 Oil-Red O 시약으로 염색하여 정량화하였다. 도토리 분말의 경우, 물 추출물 0.157% 농도에서 대조군에 비해 약 25%, 에탄올 추출물 0.073% 농도에서는 대조군에 비해 약 15%의 지방 축적 억제력을 나타내었다. 메밀 분말의 물 추출물 0.157% 농도에서는 대조군에 비해 약 13%, 에탄올 추출물 0.073% 농도에서는 약 20%의 지방 축적 억제력을 나타내었다. 녹두 분말 물 추출물의 경우 0.073% 농도에서 대조군에 비해 약 10%, 에탄올 추출물 0.036% 농도에서 약 16%의 지방 축적 억제력을 나타내었다 (그림 12). 따라서 Oil-Red O 염색을 통한 지방미분화세포의 분화억제 효능 평가에서는 도토리와 메밀 분말 추출물이 녹두 분말 추출물 보다 더 우수한 것으로 보인다.



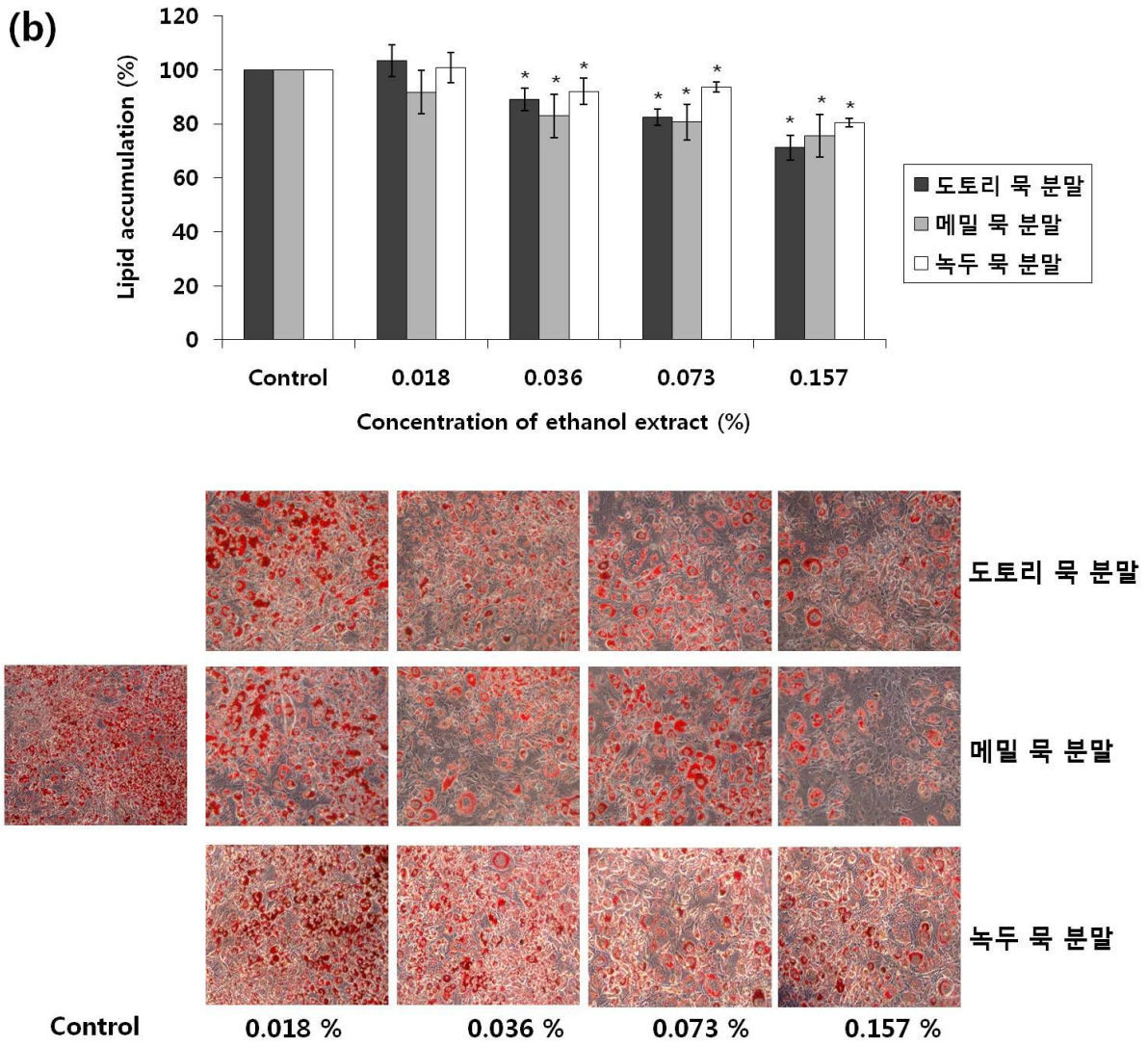


그림 12. 도토리, 메밀 및 녹두 목 분말 추출물 처리에 의한 3T3-L1 세포내 지질함량 측정
 (a) 물 추출물, (b) 에탄올 추출물

3) 목 소재 추출물이 adipogenic transcription factor 발현변화에 미치는 영향

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정에는 형태적 변화뿐 아니라 다양한 adipocytokine의 분비 및 transcription factor와 adipogenic protein의 발현이 수반된다. PPAR γ 및 C/EBP α 와 β 지방세포에 나타내는 특이적인 전사 인자로서 C/EBP β 는 분화 초기에 PPAR γ 는 분화 후기에 발현되어 여러 leptin과 aP2 및 FAS 등과 같은 adipocytokine과 adipogenic protein 발현에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 Oil-Red O 염색을 통한 지방 분화 억제 효능평가에서 효과가 있는 것으로 나타난 도토리과 메밀 분말의 추출물이 PPAR γ 의 발현변화에 미치는 영향을 western blot으로 확인하였다. 먼저 5 μ g/mL insulin으로 지방세포로 분화를 유도하면서 도토리과 메밀 분말의 추출물을 농도별로 처리하여 확인하였다. 그 결과 분화만 유도된 대조군에 비해 도토리 분말의 물과 에탄올 추출물 처리 시 모두 농도 의존적으로 adipogenic transcription factor인 PPAR γ 단백질의 발현을 억제하였다. 또한 메밀 분말의 물과 에탄올 추출물 처리 시 도토리 분말의 추출물 처리와 유사하게 PPAR γ 단백질 발현이 억제되었다. 따라서 도토리과 메밀 분말 추출물 모두 지방세포 분화의 주요 전사인자인 PPAR γ 를 효과적으로 억제하는 것으로 보인다 (그림 13).

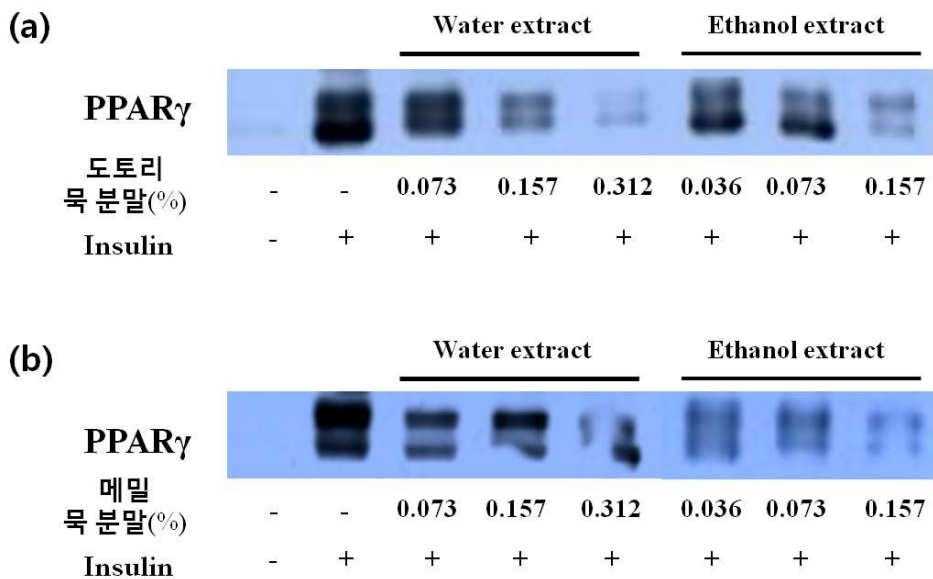


그림 13. 목 분말 추출물 처리에 의한 PPAR γ 발현 억제 효과
(a) 도토리 목 분말, (b) 메밀 목 분말

4) 도토리, 메밀 그리고 녹두 목 분말 투여가 비만 마우스의 체중변화에 미치는 영향

실험동물을 고지방식이로 6주간 비만을 유도한 결과, 표 1에서와 같이 고지방식이 (HFD)군은 체중이 15.71g 증가한 반면 일반식이 (NFD)군은 6.18g 증가하였다. 고지방식이에 1% 도토리 목 분말을 급여한 (HDF+ AM)군에서는 6주 후에 13.02g의 체중이 증가하여 HFD군에 비해 약 17.2% 체중 증가가 억제 효능을 보였다. 또한 고지방식이에 5% 메밀 목 분말을 급여한 (HDF+ BML)군과 10% 메밀 목 분말을 급여한 (HDF+ BMH)군에서는 HFD 군에 비해 각각 약 31.7%와 23.3%의 체중 증가 억제 효능을 나타냈다. 뿐만 아니라 고지방식이에 5% 녹두 목 분말을 급여한 (HDF+ MML)군과 10% 녹두 목 분말을 급여한 (HDF+ MMH)군에서는 HFD 군에 비해 각각 약 16.3%, 28.9%의 체중 증가 억제 효능을 보였다. 실험동물에서 적출한 지방량은 HFD군이 3.12g, HFD+ AM군이 1.99g으로 HFD+ AM군 지방생성량이 HFD군에 비해 약 36% 감소되었다. HFD+ BML군과 HFD+ BMH 군에서는 각각 1.88g과 2.52g으로 HFD군에 비해 각각 약 39%, 19% 감소하였다. 마지막으로 HDF+ MML군과 HDF+ MMH 군에서는 지방량이 각각 2.26g, 1.81g으로 HFD군에 비해 각각 약 27%, 41% 감소하였다. 따라서 도토리, 메밀 및 녹두 목 분말은 체중 감량뿐만 아니라 체지방 감소에도 효능이 있는 것으로 나타났다 (표 8).

표 8. 도토리, 메밀, 녹두 목 분말 투여에 의한 비만 마우스의 체중, 체지방량 및 식이섭취 분석

	Groups	Initial Weight(g)	Final Weight(g)	Weight Gain(g)	Food intake (g/day)	Total fat pad weight (g)
	NFD	17.68±0.86	23.86±2.47	6.18±0.29	2.89±0.01	0.54
	HFD	17.75±0.48	33.46±1.21 ^a	15.71±0.86 ^a	2.02±0.01 ^a	3.12 ^a
Acorn	HFD+AM	13.1±1.19	26.12±2.01 ^b	13.02±0.49 ^b	2.25±0.03 ^b	1.99 ^b
Buckwheat	HFD+BML	18.38±1.29	29.12±0.31 ^b	10.74±1.84 ^b	2.01±0.12 ^a	1.88 ^b
	HFD+BMH	17.93±0.35	29.99±0.43 ^b	12.06±0.54 ^b	2.04±0.04 ^a	2.52 ^b
Mung bean	HFD+MML	17.61±0.76	30.76±1.15 ^b	13.15±1.35 ^b	2.27±0.02 ^b	2.26 ^b
	HFD+MMH	18.05±0.98	29.22±1.01 ^b	11.17±0.53 ^b	2.11±0.07 ^b	1.81 ^b

NFD(normal diet): 일반 식이군, HFD(high fat diet): 고지방 식이군, HFD+ AM: 고지방식이+ 도토리목 분말 1% 처리군, HFD+ BML: 고지방식이+ 메밀목 분말 5% 처리군, HFD+ BMH: 고지방식이+ 메밀목 분말 10% 처리군, HFD+ MML: 고지방식이+ 녹두목 분말 5% 처리군, HFD+ MMH: 고지방식이+ 녹두목 분말 10% 처리군

5) 메밀 및 녹두 목 분말 투여가 비만유도 마우스의 혈청 지질 및 호르몬 농도에 미치는 영향

평균 증류수에 녹인 메밀 및 녹두 분말을 6주간 급여한 후 혈청내 총 콜레스테롤과 중성지방 함량, LDL, HDL, Leptin 그리고 insulin에 미치는 영향을 살펴보았다. NFD (normal diet)군은 일반 식이군, HFD (high fat diet)은 고지방 식이군, HFD+BML은 고지방식이+메밀 목 분말 5% 처리군, HFD+BMH은 고지방식이+메밀 목 분말 10% 처리군, HFD+MML은 고지방식이+녹두 목 분말 5% 처리군, HFD+MMH은 고지방식이+녹두 목 분말 10% 처리군을 의미한다. 그 결과 혈청 중의 총 콜레스테롤 함량은 NFD군의 경우 96.17mg/dl 이었으며, HFD군은 138.51mg/dl로 NFD 군에 비해 증가하였다. HFD+BML군과 HFD+BMH군은 각각 112.52mg/dl과 126.04mg/dl로 HFD군의 약 81%, 90%으로 저하됨을 보였다. 또한 HFD+MML군과 HFD+MMH군에서 총 콜레스테롤 함량이 각각 120.47mg/dl과 110.69mg/dl로 측정되어 HFD군의 각각 약 86%, 79% 수준으로 저하되는 것으로 나타났다. 또한 LDL-콜레스테롤 농도는 NFD군에 비하여 HFD 군에서 증가하였으며, 고지방식이와 함께 농도별 메밀과 녹두를 급여한 군에서는 다소 감소하는 경향을 보였다. 뿐만 아니라 혈중 HDL-콜레스테롤 농도가 NFD군에 비하여 HFD군에서 감소하였으며, 메밀과 녹두를 급여한 군에서 HFD군에 비해 다소 증가하는 경향을 보였다. 그러나 중성지방인 triglyceride 경우 예상밖으로 HFD군보다 메밀 및 녹두 분말급여군이 오히려 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 insulin 농도가 메밀 및 녹두 목 분말 급여에 의해 감소하는 양상을 보인점을 고려해볼때 목 분말내 탄수화물 섭취로 인한 혈당증가와 인슐린 분비촉진으로 인한 중성지방 축적 (38)에 기인 한다고 보기에 는 무리가 따르며 추후 연계보강연구가 필요한 부분으로 생각된다. Leptin은 식욕과 에너지 소비율을 조절하는 호르몬으로 체중 및 체지방량과 상관관계가 높으며 고지방 식이에 의해서 leptin의 발현 및 혈중 leptin 농도가 증가한다고 알려져 있다 (39). 또한 insulin은 leptin 생성의 주 조절인자로 leptin의 생성을 촉진한다고 알려져 있다. 본 연구 결과 혈중 leptin 농도는 NFD군이 5912.83pg/mL 이었으며, HFD군은 20654.33pg/mL로 NFD군에 비해 증가하였다. 이에 비해 고지방 식이와 함께 메밀 및 녹두를 급여한 군에서는 HFD군에 비해 혈중 leptin 농도가 감소하는 경향을 보였다. 혈중 insulin 농도 검사결과에서도 leptin과 유사한 양상을 보였다 (표 9).

표 9. 메밀 및 녹두 목 분말 투여에 의한 비만 마우스 혈액내 지질 및 호르몬 농도 분석

Groups	Concentration (mg/dL)					Insulin (uIU/ml)	Leptin (pg/ml)
	Total cholesterol	Tri-glyceride	LDL-C	HDL-C			
NFD	96.17	99.25	92.50	21.00	18.00	5912.83	
HFD	138.51 ^a	120.00 ^a	126.66 ^a	15.00 ^a	22.00 ^a	20654.33 ^a	
Buckwheat	HFD+BML	112.52 ^b	136.27 ^b	93.75 ^b	16.25 ^b	19.33 ^b	14026.79 ^b
	HFD+BMH	126.04 ^b	125.10 ^b	97.50 ^b	15.10 ^a	21.33 ^a	19686.33 ^b
Mung bean	HFD+MML	120.47 ^b	147.23 ^b	100.00 ^b	16.04 ^b	20.50 ^b	15285.89 ^b
	HFD+MMH	110.69 ^b	158.29 ^b	90.00 ^b	16.70 ^b	11.75 ^b	8004.59 ^b

NFD(normal diet): 일반 식이군, HFD(high fat diet): 고지방 식이군, HFD+BML: 고지방식이+메밀목 분말 5% 처리군, HFD+BMH: 고지방식이+메밀목 분말 10% 처리군, HFD+MML: 고지방식이+녹두목 분말 5% 처리군, HFD+MMH: 고지방식이+녹두목 분말 10% 처리군

6) 한식 목 재료의 세포 생존율 측정

항아토피 효능 평가를 위한 세포 모델인 RBL-2H3 세포에 도토리, 메밀 및 녹두 분말 추출물을 처리하여 MTT 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 도토리 분말의 물 추출물과 70% EtOH 추출물은 0.156% 농도에서부터 세포 독성이 거의 나타나지 않았다. 메밀 분말 물 추출물의 경우 0.625% 농도부터 세포 독성이 나타나지 않았다. 녹두 물 추출물의 경우 0.312% 농도 처리 시 세포 독성이 거의 나타나지 않았으며, 70% EtOH 추출물은 0.156% 농도에서는 약 10%, 0.078% 농도에서는 약 5%의 세포 독성이 나타났다 (그림 14). 따라서 0.07%~0.62% 농도에서 목 분말 추출물의 β -hexosaminidase 방출억제 효능 평가를 실시하였다.

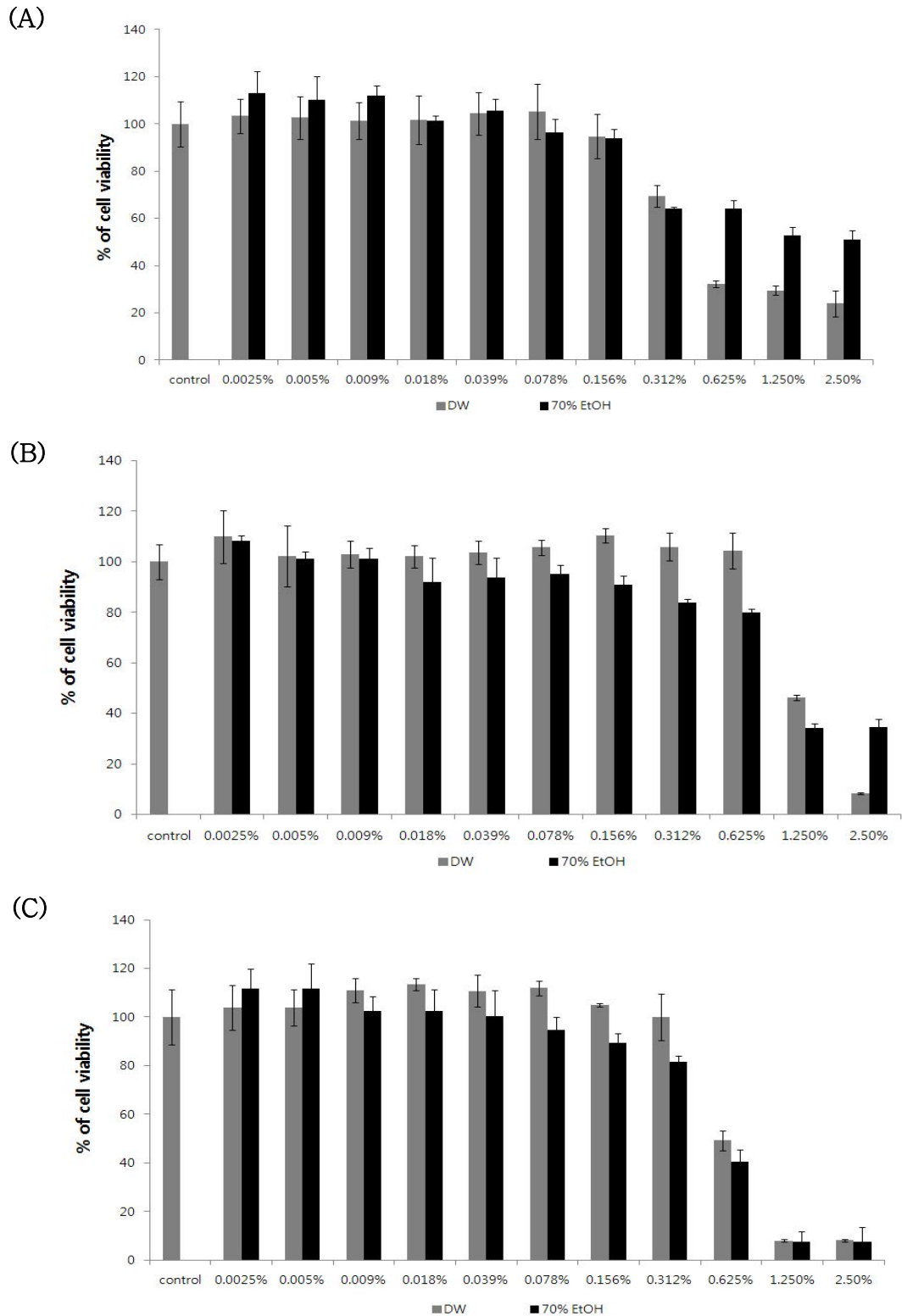


그림 14. 목 분말 추출물 처리에 의한 RBL-2H3 세포 생존율
 (A) 도토리 목 분말, (B) 메밀 목 분말, (C) 녹두 목 분말

7) β -hexosaminidase 측정

β -hexosaminidase는 히스타민과 함께 탈과립의 지표물질로 이 물질들은 비만세포의 과립에 존재하고 비만세포가 면역학적 활성을 나타내면 방출되어 알레르기성 반응을 일으킨다. 본 연구에서는 도토리, 메밀, 녹두 분말의 물 추출물과 70% EtOH 추출물의 β -hexosaminidase 방출 억제 정도를 확인함으로써 아토피와 같은 알레르기성 염증에 효과가 있는지를 평가하였다. 도토리 분말의 물 추출물의 경우 0.078% 농도에서는 약 11%의 방출 억제 효과가 나타났지만 유의적으로는 감소하지 않았다. 하지만 0.156% 농도에서는 약 18%, 0.312% 농도에는 약 20%, 그리고 0.625% 농도에서는 약 22%의 농도가 증가함에 따라 β -hexosaminidase 방출 억제 효과가 나타났으며 이는 항원만 처리한 그룹에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 그러나 앞서 세포 생존을 측정 시 도토리 분말의 물 추출물 0.312%와 0.625%는 세포 독성이 있는 것으로 나타남에 따라 0.156% 농도에서 β -hexosaminidase 방출이 억제된다고 볼 수 있다. 반면 도토리 분말의 70% EtOH 추출물과 메밀, 녹두 분말의 물 추출물과 70% EtOH 추출물은 세포 독성이 없는 조건에서 β -hexosaminidase 방출 억제효과가 없는 것으로 나타났다 (그림 15). 따라서 도토리 분말의 물 추출물이 항아토피 효능도 가장 클 것으로 추측되어 동물모델을 이용한 아토피 유발 질환 실험에 도토리 분말을 사용하였다.

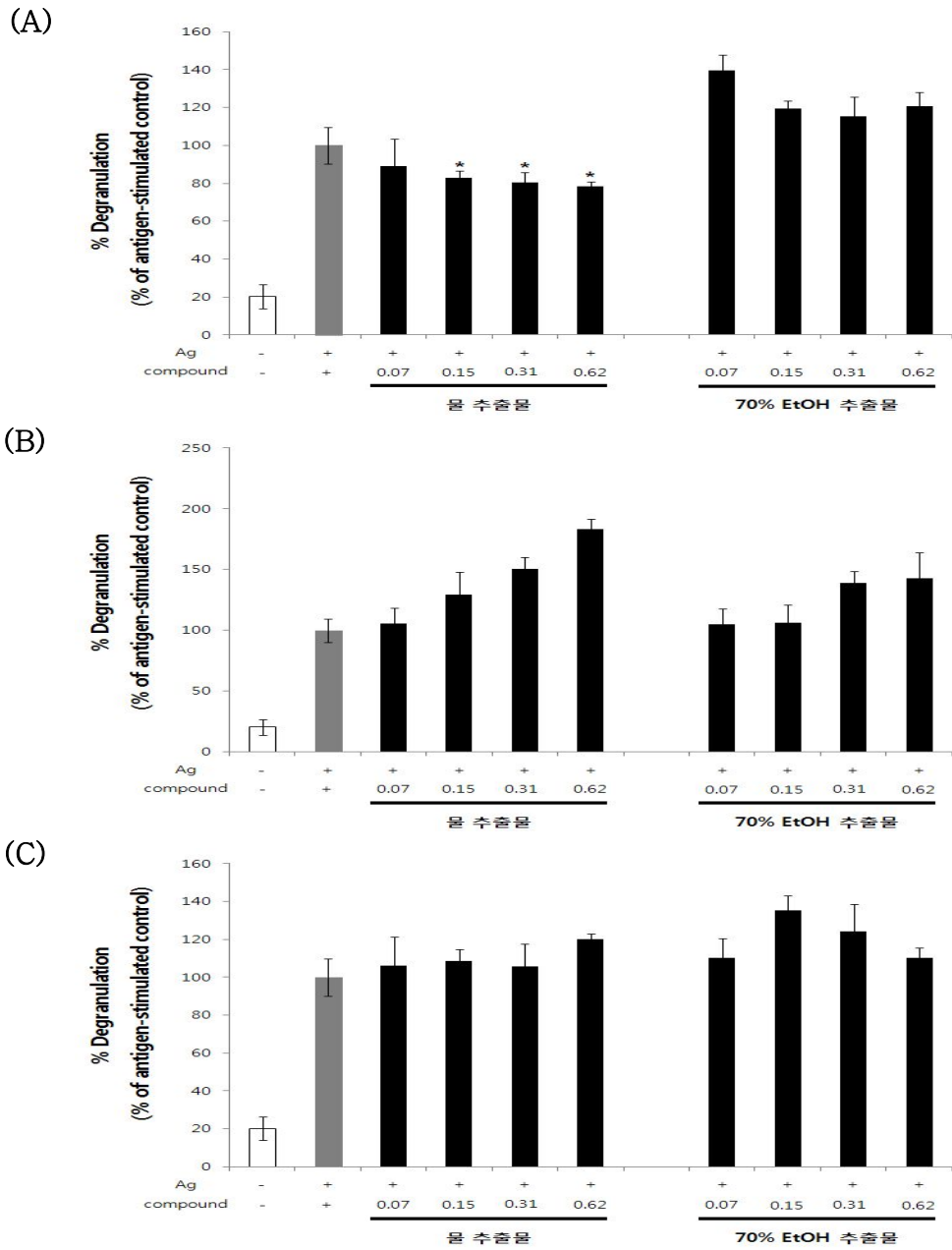


그림 15. β -hexosaminidase 방출 억제

(A) 도토리 목 분말 추출물, (B) 메밀 목 분말 추출물, (C) 녹두 목 분말 추출물

8) 아토피 피부염 유사 병변이 유발된 마우스의 외형 관찰

그림 16는 아토피 피부염 유사 병변 유발 마우스의 외형과 시험물질에 의한 치료과정을 보여 주고 있다. NC/Nga 마우스는 1주차에서 6주차로 갈수록 아토피 피부염이 심해졌고 홍반 (erythema), 출혈 (hemorrhage), 부종 (edema), 찰상 (excoriation), 짓무름 (erosion), 건조 (dryness) 등의 다양한 아토피 증상이 나타났다. 이러한 마우스를 무작위로 선정하여 그룹을 나누는 후 세포수준에서의 β -hexosaminidase 방출억제 실험을 통해 가장 큰 효과를 보인 도토리 목 분말의 물 추출물을 사용하여 동물수준에서의 항아토피 실험을 진행하였다. 그 결과 1×PBS를 처리한 음성대조군은 아토피 피부염 유사 병변 개선의 효과 없이 계속 아토피가 유발되는 것으로 관찰하였고, 35 일째부터는 자연적으로 치유되는 것을 확인 할 수 있었다. 육안 평가 결과에서는 도토리 분말 1% 처리군과 5% 처리군에서 아토피 피부염 유사 병변 회복을 거의 관찰할 수 없었다.

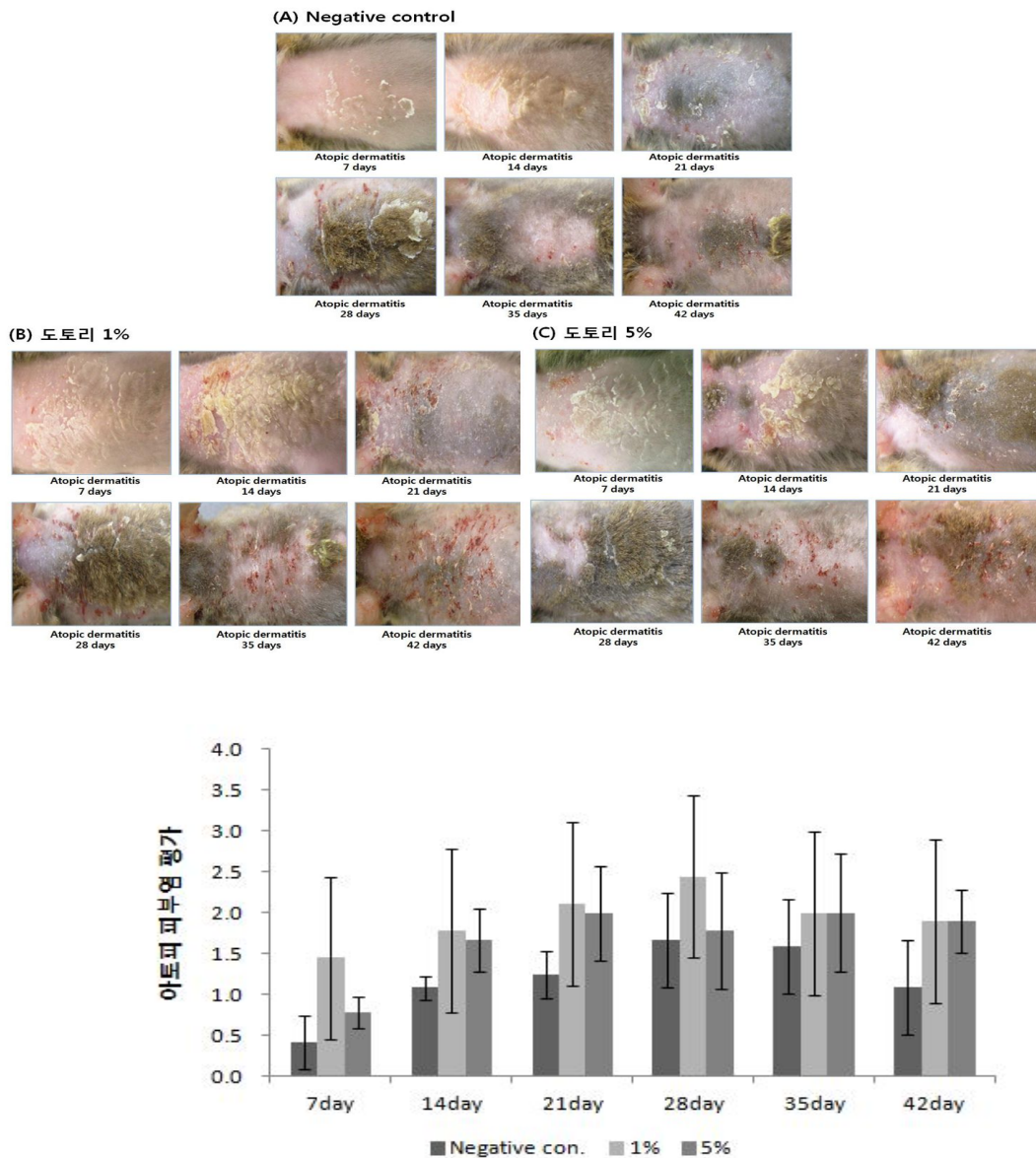


그림 16. 아토피 피부염 유사 병변의 육안평가

9) 혈중 IgE 측정 결과

도토리 목 분말이 아토피 피부염 유사 병변을 유도한 NC/Nga 마우스의 혈중 IgE 농도에 미치는 영향을 확인하기 위해 안와채혈을 통해 혈액을 분리 후 ELISA법으로 IgE 농도를 측정하였다. NC/Nga 마우스의 혈중 IgE 농도는 도토리 목 분말 1%와 5% 처리 14일까지는 감소하는 것으로 나타났지만 그 이후 처리 기간에서는 음성대조군에 비교해 증가하는 경향을 보이는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 17). 이러한 결과는 단기적 (~14일)으로는 도토리 분말이 IgE 감소에 효과가 있지만 그 이후부터는 IgE 감소에 크게 기여하지 않음을 보여준다.

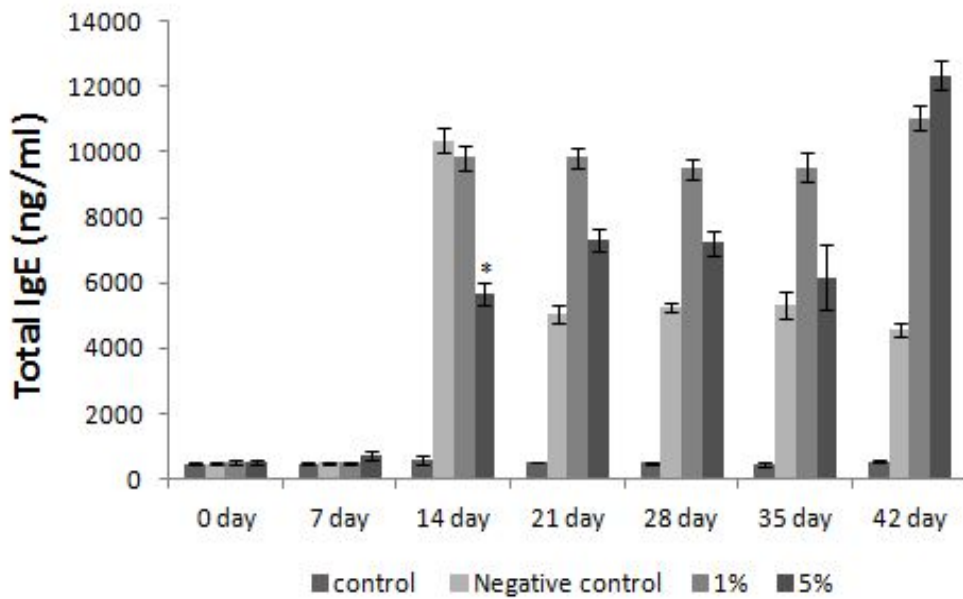


그림 17. 아토피 피부염 유사 병변의 혈청 내 IgE의 농도

10) 혈청 내 사이토카인 (IL-4, IFN- γ)의 농도 측정 결과

아토피 피부염은 피부에 존재하는 랑게르한스 세포의 IgE 수용체를 갖고 있으며 피부에 도달한 항원은 IgE 수용체와 결합하여 항원전달 세포에 의해 T cell에 전달된다. 그 결과 급성 아토피 피부염에서는 Th2에 의한 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13이 생산되며, 만성 아토피 피부염은 Th1에 의해 cytokine의 발현이 유발된다. 또한 Th1과 Th2 세포에서 특이하게 발현되는 사이토카인은 역관계를 나타내는데, Th1인 IFN- γ 에 의해 Th2인 IL-4, IL-5의 생산이 억제되며 IL-4, IL-5에 의해 IFN- γ 의 생산이 억제된다 (40). 따라서 본 연구에서는 아토피 피부염 유사 병변을 유도한 NC/Nga 마우스에 도토리 목 분말 1%와 5%로 처리하여 Th1 cytokine인 IFN- γ 와 Th2 cytokine인 IL-4를 측정하였다. 그 결과 7일째에는 음성대조군에 비해 도토리 목 분말 1%와 5% 처리군 모두에서 IL-4 농도 변화가 미미 하였으며, 42일이 지난 후에도 IL-4 농도 변화가 미미한 것을 확인할 수 있었다 (그림 18). IFN- γ 의 경우 아토피 피부염 유사 병변 유발 마우스에 물질 처리한지 14일째에 음성대조군에 비해 도토리 목 분말 1% 처리군에서 수치가 증가하는 것으로 나타났지만 물질처리 14일 이후부터는 도토리 목 분말 1%와 5% 처리군 모두에서 IFN- γ 농도 변화가 음성대조군과 비슷한 것을 확인할 수 있었다 (그림 19). 이러한 결과는 도토리 분말이 혈청내 Th1 cytokine인 IFN- γ 와 Th2 cytokine인 IL-4의 농도 정상화에 크게 기여하지 못함을 보여준다.

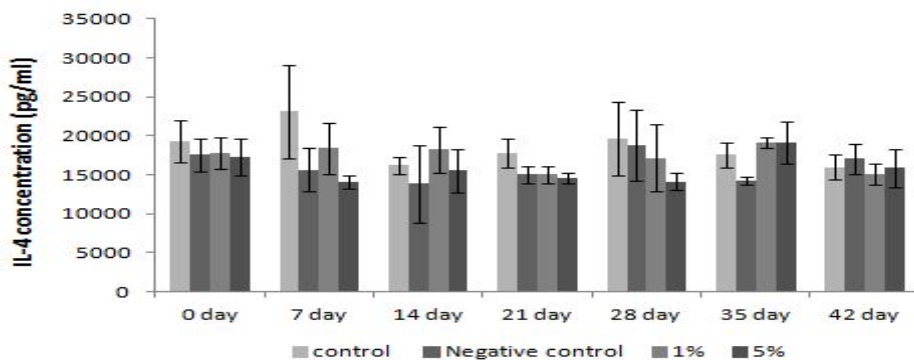


그림 18. 아토피 피부염 유사 병변의 혈청 내 IL-4 측정

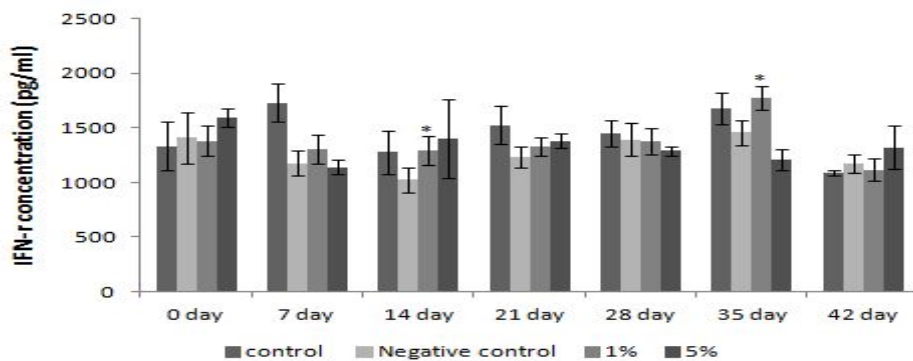


그림 19. 아토피 피부염 유사 병변의 혈청 내 IFN-r 측정

11) 비장세포에서 Th1/Th2 cytokine 발현 변화 측정

아토피 피부염은 폐, 림프절, 비장, 흉선 등의 면역기관 내 다양한 반응을 유도한다. 시험물질인 도토리 목 분말이 Th1/Th2 cytokine 발현 변화에 미치는 영향을 확인하기 위해 아토피 피부염 유사 병변을 유도한 NC/Nga 마우스의 비장 (spleen)으로부터 비장세포를 분리하여 ELISA법으로 Th2 cytokine인 IL-4와 Th1 cytokine인 IFN- γ 의 농도를 측정하였다. 그 결과 비장세포에 ConA를 처리하지 않을 경우 IL-4와 IFN- γ 의 농도는 모든 그룹에서 동일한 수치를 보였다. 하지만 ConA로 자극을 주었을 때 발현 변화를 확인할 수 있었는데 IL-4의 경우 음성대조군이 $56.56 \pm 3.82 \text{ pg/mL}$ 이었다. 하지만 도토리 분말의 물 추출물 1% 처리군의 IL-4 농도는 $53.19 \pm 4.27 \text{ pg/mL}$ 이었고, 5% 처리군은 $58.08 \pm 4.60 \text{ pg/mL}$ 로 두 그룹 모두 음성대조군에 비해 감소하지 않음을 확인할 수 있었다. IFN- γ 의 경우에도 음성대조군이 $9.98 \pm 0.99 \text{ pg/mL}$ 으로 측정되었고 도토리 분말의 물 추출물 5%의 농도로 처리한 그룹의 수치는 $9.12 \pm 1.28 \text{ pg/mL}$ 으로 음성대조군에 비해 유의적으로 증가하지 않음을 확인할 수 있었다. 하지만 1% 처리군은 $20.38 \pm 2.86 \text{ pg/mL}$ 로 음성대조군에 비해서는 증가함을 확인하였다 (표 10). 따라서 도토리 분말의 물 추출물 1%가 negative control에 비해 IFN- γ 를 증가시킴을 알 수 있었다.

3종류의 한식 목 중 β -hexosaminidase 방출 억제효과를 세포수준에서 보인 도토리 분말을 사용하여 동물실험을 수행했을 때, 도토리 분말은 아토피 피부염 유사 병변의 외형 관찰, 혈중 IgE, 혈청 내 IL-4, IFN- γ 의 농도 및 비장세포에서의 Th1/Th2 cytokine 발현변화 등에서 항아토피 효능을 뚜렷하게 보이지 않는 것으로 보인다.

표 10. 도토리 목 추출물 투여에 의한 비장세포에서의 Th1/Th2 cytokine 발현 변화 측정

	Concentration (pg/ml)	
	IL-4	IFN- γ
control	42.67 ± 4.43	3.58 ± 0.60
Negative control (ConA 2 ug/ml)	56.56 ± 3.82	9.98 ± 0.99
1%	53.19 ± 4.27	$20.38 \pm 2.86^*$
5%	58.08 ± 4.60	9.12 ± 1.28

IV. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 연구성과

- 2012 KSBMB Annual Meeting 학회에 학술발표
2012.05.30 ~ 2012.06.01
'Effect of Korean traditional Muk extract on the adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes'
김점지, 전유미, 박길선, 김지혜, 유아름, 박상규, 이미영
- 2012 KSMCB Annual Meeting 학회에 학술발표
2012.10.10 ~ 2012.10.12
'Extracts of Korean traditional Muk enhance resistance to oxidative stress and extend lifespan in *C. elegans*'
김철규, 이순영, 박진국, 이진선, 박상규
- 8th ICT-2012 학회에 학술발표
2012.11.01 ~ 2012.11.02
'Anti-obesity activity of buckwheat Muk powder'
전유미, 박길선, 왕윤영, 함영호, 박상규, 이미영

○ 연구논문

- Buckwheat extract increases resistance to oxidative stress and lifespan in *Caenorhabditis elegans*, 김철규, 박상규, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 2013, 21(1): 1-6.
- Effect of acorn extracts on resistance to oxidative stress and lifespan in *Caenorhabditis elegans*, 이순영, 이진선, 박상규, *Korean Journal of Food and Nutrition*, 2013, accepted (in press).
- Anti-obesity activity of Korean buckwheat Muk extract. 박길선, 전유미, 박상규, 이미영, *Molecular and Cellular Toxicology*, 2013, submitted (under review).

○ 연구성과 활용분야

- 2050년 전세계는 60세 이상 인구가 전체의 4분의 1을 차지하여 지구촌 전체가 (초)고령화 사회가 될 것으로 전망되며, 현재 고령 인구의 증가와 함께 각종 노인성 질환인 비만, 노화, 관상 동맥질환, 고혈압, 당뇨, 악성 종양 등의 만성 퇴행성 질환과 각종 성인병이 증가하는 추세이다. 노인성질환은 대부분 환자의 운동능력과 인지기능을 상실시켜 경제적 폐인으로 만들뿐만 아니라, 환자의 치료 및 간호를 위하여 막대한 경제적 부담을 사회에 가

저으므로 연장된 삶의 질적 향상 측면에서 항노화 식품을 개발하게 되면 신경퇴행성 질환 같은 노인성질환에 대한 예방과 역제가 가능하다.

- 미국과 일본을 포함하는 세계 선진국들의 노화연구에 대한 투자와 성과에 비해 국내 노화연구 분야는 아직까지 그 연구기반이 미흡한 수준이다. 따라서 국내 연구 여건에 적합하며, 우리가 선점할 수 있는 연구 및 기술 분야에 대한 연구역량의 집중이 필요하다. 본 연구는 전통 한식 재료 유래 물질에 의한 항스트레스, 항노화, 항아토피 및 항비만 효능을 규명함으로써, 인류가 오랫동안 꿈꿔왔던 노화방지와 수명연장의 메커니즘을 밝히는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 또한 근본적인 노화의 원인과 과정에 대한 완벽한 이해를 앞당기는데 크게 기여할 것이다.
- 본 연구과제를 통해 개발된 연구 기술들은 그 응용범위가 광범위하여 다가올 고령화 사회에 큰 파급효과를 가져올 것으로 기대된다. 특히 진단, 예방, 치료를 포함한 의약산업, 식품산업, 화장품산업의 발전을 일으킬 것으로 기대된다. 항스트레스·항노화·항아토피·항비만 효능을 가지는 기능성식품의 개발과 상품화에 기여하여 우리 농산물의 동반 수출 증대 효과 뿐만 아니라 고부가가치 산업화를 통한 수익 증대 정책에 반영 가능하다.
- 세계인들에게 한식의 우수성을 알리기 위하여 저명한 국제학술지에의 논문게재 뿐만 아니라, 연극 결과물을 국제 식품전시회에 출품, 재외공관을 통한 홍보 및 외국의 재외동포 거주 지역을 중심으로 목의 기능성과 우수성 홍보를 통하여 한식 세계화에 단계적으로 집중적으로 접근 가능하다.
- 2007년의 미국의 National Institute on Aging (NIA)의 연구 결과에 의하면 현대의 의학과 과학의 비약적인 발전으로 말미암아 우리나라를 포함한 여러 나라들이 2026년을 전후로 초고령 사회(65세 이상 인구가 총 인구의 20% 이상)로 진입할 것으로 예상되며, 따라서 고령인구의 건강과 삶의 질을 보장할 수 있는 노화 관련 연구에 대한 필요가 증가되고 있다. 항노화 제품에 대한 세계시장은 2006년 1,352억 달러에서 연평균 8.9%로 성장하여 2012년 2,243억 달러 규모로 성장할 것으로 예상되므로 본 연구과제의 결과가 항노화 장수 기능성 식품의 개발에 응용된다면 향후 고령화 사회에서 우리나라가 세계시장을 선점할 수 있는 기반이 될 수 있다.
- 본 연구과제가 항노화 산업에 응용될 수 있는 분야는 전통 한식 재료를 이용한 항노화 및 수명연장, 나아가 노화관련 질병의 조기 진단 기술 및 예방, 치료에 대한 원천기술의 확보이다. 또한 장수 기능성 식품 개발은 본 연구과제의 결과가 직접적으로 적용되는 분야로서 향후 고령화 사회에 큰 경제적 파급효과를 가져올 것이다.
- 한식의 기능성과 우수성을 뒷받침하는 과학적 자료의 부족으로 세계인을 대상으로 하는 목의 상품화가 어려웠으나, 본 연구를 통하여 well-aging 시대에 적합한 새로운 상품으로 건강과 삶의 가치를 추구하고 전세계인의 사랑을 받을 수 있는 목 상품 개발이 가능할 것이다.

V. 참고문헌

1. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104:S99-108.
2. Kim MS, Kim MH. Atopic dermatitis. *J Subtropical Agri & Biotech.* 2008; 24:21~28.
3. Donald Y.M. Leung, Mark Boguniewicz, Michael D. Howell, Ichiro Nomura, Qutayba A. Hamid: New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004; 113: 651-657.
4. Park NS, Jeon ES, Kim YN, Cho KD, Baek OH, Lee BH. Comparative study on eating habits, dietary intake patterns, and nutrient intakes between elementary school children with and without atopic dermatitis. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009; 38:1543~1550.
5. Na HY, Song YH, Kim BJ, Yu JH, Hong SJ, Lee SY. Allergen sensitization of severe atopic dermatitis in children under 2 years. *Pediatr Allergy Respir Dis.* 2009; 19:146-154.
6. Finch J, Munhutu MN, Whitaker-Worth DL. Atopic dermatitis and nutrition. *Clin Dermatol.* 2010; 28:605-614.
7. Weindruch R. Caloric restriction and aging. *Scientific American,* 1996; 274: 46-52
8. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr* 2005; 24: 172-183.
9. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004; 430: 686-689.
10. Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellarino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 2006; 16: 296-300.
11. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006; 444: 337-342.
12. Lee CK, Pugh TD, Klopp RG, Edwards J, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA. The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Radical Biology and Medicine.* 2004; 36: 1043-1057.
13. Park SK, Page GP, Kim K, Allison DB, Meydani M, Weindruch R, Prolla TA. alpha- and gamma-Tocopherol prevent age-related transcriptional alterations in the heart and brain of mice. *J Nutr* 2008; 138: 1010-1018.

14. Lee MH, Jeon JH, Oh MJ. Antioxidative activity of gallic acid in acorn extract. *J Korean Soc Food Nutr.* 1992; 21: 693-700.
15. Shin TH, Jin YS, Sa JH, Shin IC, Heo SI, Wang MH. Studies for component analysis and antioxidative evaluation in acorn powders. *Korean J Food Technol.* 2004; 36: 800-803.
16. Kim SH, Lee JM. Optimization of hot-water extraction conditions for preparation of polyphenol and gallic acid from acorn. *Korean J Food Preserv.* 2008; 15: 58-65.
17. Kim BN. A study on the literature review of acorn in Korea. *Korea J Soc Food Sci.* 1005; 11: 158-163.
18. Jung MJ, Heo SI, Wang MJ. Comparative studies for component analysis in acorn powders from Korean and China. *Kor J Pharmacogen.* 2007; 38: 90-94.
19. Yook GJ, Lee HJ, Kim MK. Effect of chestnut and acorn on lipid metabolism, antioxidative capacity and antithrombotic capacity in rats. *The Korean Journal of Nutrition.* 2002; 35: 172-182.
20. Kang MH, Lee, JH, Lee JS, Kim JH, Chung HK. Effects of acorn supplementation on lipid profiles and antioxidant enzyme activities in high fat diet-induced obese rats. *The Korean Journal of Nutrition.* 2004; 37: 169-175.
21. Liu X, Kim JK, Li Y, Li J, Liu F, Chen X. Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *J Nutr.* 2005; 135: 165-171.
22. Havsteen B. Flavonoids a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology.* 1983; 32: 1141-1148.
23. Kreft I, Bonafacci G, Zigo A. Secondary metabolites of buckwheat and their importance in human nutrition. *Food Technology and Biotechnology Review.* 1994; 32: 195-197.
24. Kim JY, Son BK, Lee SS. Effects of adlay, buckwheat, and barley on transit time and the antioxidative system in obesity induced rats. *Nutrition Research and Practice.* 2012; 6: 208-212.
25. Koh ES, Ju JS, Choi MG, Yoon TH, Ahn YS, Lim KJ, Kim SO, Kim JD. Effects of buckwheat, potato and rice on glycemic indices in healthy subjects. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 2002; 10: 253-258.
26. Ishii S, Katsumura T, Shiozuka C, Ooyauchi K, Kawasaki K, Takigawa S, Fukushima T, Tokuji Y, Kinoshita M, Ohnishi M, Kawahara M, Ohba K. Anti-inflammatory effect of buckwheat sprouts in lipopolysaccharide-activated human colon cancer cells and mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72: 3148-3157.
27. Choi IH, Kim SO, Kim KS, Lee MY. Effect of mungbean sprouts juice on cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1998; 27: 980-986.
28. Imm JY, Kim SJ. Anti-cancer and anti-inflammatory effects of mung bean and soybean extracts. *Korean J Food Sci Technol.* 2010; 42: 755-761.

29. Yao Y, Chen F, Wang M, Wang J, Ren G. Antidiabetic activity of Mung bean extracts in diabetic KK-Ay mice. *J Agric Food Chem.* 2008; 56: 8869-8873.
30. Kim DK, Chon SU, Lee KD, Kim JB, Rim YS. Variation of flavonoids contents in plant parts of mungbean. *Korean J Crop Sci.* 2008; 53: 279-284.
31. Peng X, Zheng Z, Cheng KW, Shan F, Ren GX, Chen F, Wang M. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chemistry.* 2008; 106: 475-481.
32. Kwon ES, Kim IR, Kwon HJ. Inhibitory effects on the enzymes involved in the inflammation by the ethanol extracts of plant foodstuffs. *Korean J Food Sci Technol.* 2007; 39: 348-352.
33. Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. A study of antioxidative and hypoglycemic activities of Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. *Korean J Food & Nutr.* 2009; 22: 41-47.
34. Gao Y, Zhou Y, Xu A, Wu D. Effects of an AMP-Activated Protein Kinase Inhibitor, Compound C, on Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Cells. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31: 1716-1722.
35. Cha SY, Jang JY, Lee YH, Lee G, Lee HJ, Hwang KT, Kim Y, J W, Lee J. Lipolytic Effect of Methanol Extracts from *Luffa cylindrica* in Mature 3T3-L1 Adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010; 39: 813-819.
36. Naal RM, Tabb J, Holowka D, Baird B. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. *Biosens Bioelectron.* 2004; 20: 791-796.
37. 식품의약품안전청 바이오생약국. 생약·한약 제제의 효력시험 가이드라인. 1-019-2010-0000(0). 2010.
38. Kelpel CL, Johnson LM, Poitout V. Increasing triglyceride synthesis inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat islets of langerhans: a study using adenoviral expression of diacylglycerol acyltransferase. *Endocrinology.* 2002; 143: 3326-3332.
39. Park MY, Ahn SA, Cho WK, Cho KS, Park SH, Han SH, Jung MH, Suh BK. Serum leptin, adiponectin and resistin levels in obese children and their correlations with insulin resistance. *Korean Journal of Pediatrics.* 2009; 52: 766-771.
40. Kim HS, Oh TH, Son JC, Kim DI, Lim AK, Yang DC. Inhibitory effects of korean red ginseng extract on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Lab Anim Res.* 2010; 26: 265-271.