

발간등록번호

11-1541000-001082-01

기능성 깻잎을 이용한 가공제품 개발

(Development of processed products with high-functional *perilla* leaf)

제 1 세부: 고기능성 깻잎의 상품화 및 실용화

(Commercializing and putting to practical use of the high-functionality *perilla* leaf)

제 1 협동: 고기능성 들깻잎의 효능 및 안전성 평가

(Evaluation of functionality and safety utilizing high-functional *perilla frutescens* extracts)

제 2 협동: 들깨 품종의 고기능성 배양 조건 확립

(Establishment of culture conditions for high functionality *perilla* breed.)

(주)바이오버드

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능성 깻잎을 이용한 가공제품 개발에 관한 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2011 년 6 월 28 일

주관연구기관명 : 바이오버드

주관연구책임자 : 김 종 탁

1세부연구책임자 : 김 종 탁

연 구 원 : 황 재 훈

연 구 원 : 서 문 영

연 구 원 : 권 오 희

1협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

1협동연구책임자 : 이 광 원

연 구 원 : 홍 충 의

연 구 원 : 구 윤 창

연 구 원 : 남 미 현

연 구 원 : 양 성 용

연 구 원 : 이 지 영

연 구 원 : 홍 윤 진

연 구 원 : 하 영 민

2협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

2협동연구책임자 : 이 호 정

연 구 원 : 권 예 립

연 구 원 : 오 지 은

# 요 약 문

## < 기능성 깻잎을 이용한 가공제품 개발 >

### 제 1 세 부 : 바이오버드 김종탁

#### I. 제 목

고기능성 깻잎의 상품화 및 실용화

#### II. 연구개발의 목적

기존의 깻잎보다 기능성이 강화된 고기능성 깻잎을 이용한 차/시즈닝 제품 개발을 위한 로스팅과 관능평가를 시행하여 최적의 로스팅 조건을 선정한다. 이를 이용한 고기능성 깻잎의 상품화와 실용화를 통하여 농가의 신소득원과 함께 소비자의 이용 증대를 기할 수 있는 새로운 제품군 연구를 진행한다.

#### III. 연구개발 내용 및 범위

깻잎을 이용한 차, 시즈닝 개발을 목적으로 로스팅한 차/시즈닝의 관능적 특성과 기능성을 조사하여 최적의 로스팅 조건을 선정한다. 볶음의 온도는 120~200℃와 볶음시간 15~35분으로 두 가지 조건을 독립변수로 하고 관능검사를 통한 맛 색, 향기 등의 기능적 특성을 종속변수로 하여 측정된 결과를 고기능성 깻잎 차 및 시즈닝 개발을 위한 로스팅 조건을 최적화한다. 최적 조건을 바탕으로 고기능성 깻잎의 추출물의 기업형 scale-up을 통한 대량 생산 및 로스팅 후 시제품을 제작한다.

#### IV. 연구개발결과

고기능성 깻잎 개발을 위한 품종 선별 과정에서 높은 기능성 성분을 지닌 보라 품종과 생산자의 선호도가 높은 남천 품종을 고기능성 깻잎 후보군으로 선정 후 깻잎 차 개발을 위한 로스팅 과정을 진행하였다. 관능평가에서는 남천 깻잎의 경우 160℃, 25분간 로스팅한 조건, 보라 깻잎의 경우 140℃, 30분간 로스팅한 조건에서 가장 높은 선호도를 나타내었다.

깻잎 시즈닝 개발을 위한 관능평가에서는 남천 깻잎의 경우 140℃, 30분간 로스팅한 조건, 보라 깻잎의 경우 120℃, 35분간 로스팅한 조건에서 가장 높은 선호도를 나타내었다. 또한 가장 높은 선호도 외에 남천 깻잎은 160℃, 35분간 로스팅, 보라 깻잎은 100℃, 30분간 로스팅에

서도 높은 선호도를 나타내었다. 위의 결과를 토대로 시즈닝 시제품 개발 준비 및 시제품 생산을 완료 하였다.

## V. 연구활용 계획

고기능성 깻잎의 차/시즈닝 제품 개발을 위한 로스팅 조건 설정과 그에 따른 기능성 측정 연구로 고부가가치의 새로운 제품을 개발하고 새로운 소비시장을 창출할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 차/시즈닝 제품 뿐만아니라 고기능성 깻잎 자체의 개발로 농민소득 증대에 기여할 것으로 사료된다.

### 제 1 협동 : 고려대학교 이광원

#### I. 제 목

고기능성 들깻잎의 효능 및 안전성 평가

#### II. 연구개발의 목적

고기능성 깻잎의 생리활성을 나타내는 이차대사산물을 함유하는 추출물을 제조, 동결 건조 후 지표 성분의 함량을 측정하고, 항산화 기능성, 간보호 활성, 피부 미백 활성 등 효능을 측정한다. 또한 단회투여와 반복투여 독성 시험을 통하여 고기능성 깻잎 추출물의 안전성을 확인한다.

#### III. 연구개발 내용 및 범위

고기능성 깻잎 추출물의 기능성 지표물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid 함량을 HPLC를 통하여 분석하고, polyphenol, flavonoid, DPPH, ABTS, FRAP assay를 통한 항산화 능력을 측정한다. HepG2 세포주와 SD rat을 이용한 간보호 활성 측정과 B16F10 세포주를 이용한 미백 활성을 측정하여 기능성을 확인한다.

SD rat을 이용한 단회투여, 14일 반복투여 독성 시험을 진행하여 고기능성 깻잎의 안전성을 확인한다.

#### IV. 연구개발결과

다양한 품종의 깻잎을 이용하여 기능성과 생산자의 선호도가 높은 보라와 남천 품종을 고기능성 깻잎 후보군으로 하였으며, 최종적으로 6% 설탕물을 이용하여 재배한 남천 품종으로

선택하였다. 6% 설탕물을 이용한 납천 품종은 항산화 능력의 증가폭도 크며, 생산자의 선호도가 높아 기능성과 생산적인 측면에서 가장 뛰어났음. 일반 깻잎에 비하여 6% 설탕물을 처리한 깻잎의 경우 간보호 활성이 증가하였으며, 일반 깻잎과 고기능성 깻잎의 경우 둘 다 피부 미백효과는 나타나지 않았다.

동물 모델 system에서 단회투여, 반복투여 독성 시험을 진행하였을 때, 저농도(1000mg/kg)과 고농도(2000mg/kg)의 추출물을 경구 투여하였을 때 독성은 나타나지 않았다.

## V. 연구활용 계획

본 연구에 관한 이론을 기초로 “Isolation of caffeic acid from *perilla frutescens* and its role in enhancing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activity and glutathione level”의 제목으로 “Food Chemistry 119(2), 724-730(2010)”에 게재 하였으며, “Protective Effect of extracts of *perilla frutescens* nurtured with sucrose aqueous on oxidative hepatotoxicity”의 제목으로 “Food Chemistry”에 투고 중이다. 또한 고기능성 깻잎의 간보호 활성에 대한 특허로 “기능성 들깻잎 추출물을 함유하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 조성물”을 출원 (10-2011-0040273) 하였다.

본 연구 결과를 바탕으로 건강기능식품 소재 등록을 통한 간보호 건강기능식품 제품화를 한다면 농가에 부가가치를 창출 할 수 있으며, 더불어 국가경쟁력을 제고 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 2 협동 : 고려대학교 이호정

### I. 제 목

들깨 품종의 고기능성 배양 조건 확립

### II. 연구개발의 목적

식물의 2차 대사산물인 phenolic 화합물의 생체합성을 조절하기 위하여 성장조절제를 개발하여 재배지 적응성 및 성장조절제 투여시기, 수여량 등을 연구하여 기능성물질의 함량을 더욱 높인 친환경 고기능성 깻잎의 재배 조건을 확립하고, 분자생물학적인 연구를 통하여 유전자의 발현 정도를 측정한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

이차대사산물이 많이 생성되는 껌잎 품종을 획득하기 위해 여러 배양 조건에서 다양한 껌잎을 품종 별로 키워서 플라보노이드가 많이 생산되는 라인을 선별한다. 선별된 껌잎 품종의 재배지 생육 최적화를 위한 성장조절제를 개발하고 이차대사산물 생산 최적 배양 조건에서의 합성 증가 기전 구명을 위한 생리적/분자적 특성을 조사한다.

#### IV. 연구개발결과

식물의 안토시아닌 및 플라보노이드의 합성 및 세포 내 축적은 식물 호르몬에 의해서 조절된다는 문헌을 바탕으로 우선 5개의 품종을 이용하여 호르몬 처리에 따른 안토시아닌의 함량을 조사하였다. 그 결과 다른 어느 호르몬 처리보다도 설탕이 현저하게 안토시아닌의 함량을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

F3'H 유전자를 선택하여 보라와 남천에서의 발현을 살펴보고, 이 유전자의 모델 식물 형질 전환체를 만들어 스트레스에 대한 내성을 조사한 결과 F3'H유전자 과 발현체가 더 많은 플라보노이드를 합성해냈다. 또한 식물이 비생물적 스트레스에 노출될 경우 더 많은 항산화 성분 함유로 인해 그 생존률이 높아진 것을 확인하였다.

#### V. 연구활용 계획

본 연구에 관한 이론을 기초로 “Flavonoid Compounds Are Enriched in Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Leaves by a High Level of Sucrose and Confer Increased Antioxidant Activity”의 제목으로 “Hort Science, 2009, 44(7), 1907-1913”에 게재 하였으며, “A mutation in ELA1, an age-dependent negative regulator of PAP1/MYB75, causes UV- and cold stress-tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings”의 제목으로 “Plant Science, 2009, 176(5), 678-686”에 게재 하였다. 또한 “The ethylene signaling pathway has a negative impact on sucrose-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*”의 제목으로 “Journal of Plant Research, 2011, 124(1), 193-200”에 게재 하였다.

또한 이차대사산물인 안토시아닌을 증가시키는 조절제 개발에 대한 특허로 “식물의 안토시아닌 합성 증대 조절제”를 출원(10-2009-0021670)하였다.

본 연구 결과를 바탕으로 건강기능식품 소재 등록을 통한 간보호 건강기능식품 제품화를 한다면 농가에 부가가치를 창출 할 수 있으며, 더불어 국가경쟁력을 제고 시킬 수 있다.

## SUMMARY

### <Development of Processed Product with high-functional *perilla* leaf>

#### ***Part 1 : Biobud Kim Jong Tak***

##### **I. The title of study**

Commercializing and putting to practical use of the high-functionality *perilla* leaf

##### **II. The purpose of the study**

In this research, the characterization of roasting conditions for high functional *perilla* leaf is given. This research is focused on the high functional *perilla* leaf of which the commercialization is expected to bring an new source of incomings for agricultural producer, mean while, the consumption is going to be raised.

##### **III. The content and the scope of the study**

By studying the sensual characteristics and functionality of roast tea/seasoning made by *perilla* leaf, the optimized condition for roasting is to be determined. Roasting temperatures are 120~200°C, and roasting periods are 15~35 minutes. Temperatures and periods are set to be independent. Furthermore, taste, smell, and color are variables subordinate to previous two independent variables. By considering these variables, the optimal condition is determined for the development of high functional sesame leaf.

##### **IV. The result**

During the process of selecting experimental candidates of *perilla* leaf, the Bora *perilla* leaf and Namchun *perilla* leaf were selected and being prepared for the first roasting process. According to the evaluation process, the Bora *perilla* leaf has shown the best preference during the 25 minutes roasting at 160°C, where as the Namchun *perilla* leaf has shown the best preference during the 30 minutes roasting at 140°C.

During the sensual characterization process for the development of *perilla* leaf seasoning, the Namchun *perilla* leaf has shown the best preference at 140°C with 30 minutes roasting, whereas the Bora *perilla* leaf has shown the best preference at 120°C for 35 minutes roasting. Nevertheless, both Namchun *perilla* leaf and Bora *perilla* leaf have shown better preference at 160°C with 30 minutes roasting and 100°C with 30 minutes roasting respectively. According to above results, we make the seasoning prototype product.

## **V. The outcome of the study and further plans**

The characterization of roasting condition for high functional *perilla* leaf, as well as the functionality research on it, are expected to bring new market and new value added products. Furthermore, it is expected to bring new source of incomings to the agricultural industry.

## **Part 2 : Korea University Lee Kwang Won**

### **I. The title of study**

Evaluation of functionality and safety utilizing high-functional *perilla frutescens* extracts

### **II. The purpose of the study**

Evaluate the antioxidant potential, liver protective effect, and skin-whitening effectiveness by manufacturing and freeze-drying *perilla* extract which contains secondary metabolites. In addition, in order to confirm the safety of consuming this high functional *perilla* extract we performed the single dose and repeated dose toxicity studies.

### **III. The content and the scope of the study**

Analyze contents of caffeic acid and rosmarinic acid which are considered as the functional indicator of *perilla* extract through HPLC analysis, and evaluate the antioxidant effectiveness through polyphenol, flavonoid, DPPH, ABTS, and FRAP assay. Liver-protection functionality was measured by using HepG2 cell line and SD rat while its whitening effect was measured by applying B16F10 cell line.

#### **IV. The result**

Bora and Namchun breed were selected as candidates because of their high functionality and customer's tastes. Finally Namchun breed cultivated by 6% sugar water was selected. Namchun breed cultivated by 6% sugar water has high increment in its antioxidant ability, high customer's preference, confirm that it is excel in both functionality and productivity. Compare to normal *perilla*, *perilla* cultivated by 6% sugar water has higher liver-protection effectiveness. Normal *perilla* and high functionality *perilla* both do not show any sign of skin whitening effect.

In toxicity experiment by using animal model system, single dose and repeated dose do not cause toxicity in both high concentration (2000 mg/kg) and low concentration (1000 mg/kg) by oral administration of extract.

#### **V. The outcome of the study and further plans**

The theory of this research was published at "Food Chemistry 119(2), 724-730(2010)" with the title "Isolation of caffeic acid from *perilla frutescens* and its role in enhancing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activity and glutathione level", and paper with title "Protective Effect of extracts of *perilla frutescens* nurtured with sucrose aqueous on oxidative hepatotoxicity" was submitted to "Food Chemistry". In addition, the patent of this research is pended with the title "Liver protection, liver disease prevention and treatment composition which contains functional *perilla* extract" (10-2011-0040273).

Based on the results of this study, we able to produce the functional food for liver health by *perilla* leaf, also we create added value for agricultural product and increase national competitiveness.

### **Chapter 3: Korea University Lee Ho Kyeong.**

#### **I. The title of study**

Establishment of culture conditions for high functionality *perilla* breed.

#### **II. The purpose of the study**

Develop growth regulator, study plantation period adaptability and growth regulator treatment to adjust bio-synthesis of phenolic composition and establish culture condition

for high functionality *perilla*. Besides that , we also measure its gene expression through molecular biological experiment.

### **III. The content and the scope of the study**

In order to harvest the *perilla* which produce high secondary metabolite, we first grow a variety of breed of *perilla* in different culture condition and sort the high flavonoids content *perilla* line. Develop growth regulator to optimize *perilla* growth, study physiological and molecular characteristic of secondary metabolites under optimized conditions.

### **IV. The result**

Report shows that anthocyanin and polyphenol synthesis and their accumulation in cells was affected by the plant's hormone itself. Based on this reference, we selected 5 breeds of *perilla* leaf for hormone treatment and measure their anthocyanin contents. Nevertheless, result shows that *perilla* leave cultivated with sucrose has higher anthocyanin compare with any other *perilla* leave treated with hormone.

### **V. The outcome of the study and further plans**

The theory of this research was published at "Hort Science, 2009, 44(7), 1907-1913" with the title "Flavonoid Compounds Are Enriched in Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Leaves by a High Level of Sucrose and Confer Increased Antioxidant Activity" and published at "Plant Science, 2009, 176(5), 678-686)" with the title "A mutation in ELA1, an age-dependent negative regulator of PAP1/MYB75, causes UV- and cold stress-tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings". Besides that , paper with title "The ethylene signaling pathway has a negative impact on sucrose-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*" was also published at "Journal of Plant Research, 2011, 124(1), 193-200".

Besides that, the development of regulator which boost up the synthesis of anthocyanin secondary metabolites was patented with title "A regulator that induce synthesis of anthocyanin in plant"(10-2009-0021670)

Based on the results of this study, we expected to bring an added-value product for agricultural producer by commercialize the liver protective functional food through registration of functional food material. In addition, it may help to raise the national competitiveness.

## CONTENTS

<b>Chapter 1 Outline of the Study</b> .....	<b>14</b>
Section 1. Objectives of the Research .....	15
Section 2. Needs of the Research .....	15
1. Technology Aspect .....	15
2. Industry and Economic Aspect .....	17
3. Social and Cultural Aspect .....	18
Section 3. Research Scope .....	20
<b>Chapter 2 Status of Technology Development at Home and Aboard</b> .....	<b>21</b>
Section 1. The Abroad Standards .....	21
Section 2. Domestic Standards .....	21
Section 3. Current Research Status at Home and Abroad .....	23
<b>Chapter 3 Research Content and Results</b> .....	<b>24</b>
Section 1. Commercializing and Practicality of high functionality <i>perilla</i> leave .....	25
1. Research on optimal roasting condition for development of high functionality <i>perilla</i> leaf tea and seasoning .....	25
2. Evaluation of the effective compound on the liquidize and powderize of high functionality <i>perilla</i> leave and research on its manufacturing process .....	27
3. Review on its cultivation cost, production yield and insect pest resistance .....	28
4. Determine the optimal roasting condition for development of high <i>perilla</i> leaf tea and seasoning (Establish the huge production condition) .....	29
5. Establishment of marketing strategies for commercialization .....	34
6. Manufacturing of the high functionality <i>perilla</i> leaf seasoning trial product .....	35
Section 2. Validation of functionality and safety <i>perilla</i> leave .....	36
1. Research on high functionality <i>perilla</i> leaf extraction .....	37
2. Antioxidant of high functionality <i>perilla</i> leaf .....	44
3. <i>in vivo</i> liver protective effect of high functionality <i>perilla</i> leaf .....	58
4. Evaluation of <i>perilla</i> leaf functionality after roasting process .....	69
5. General toxicity examination in high functionality <i>perilla</i> leaf .....	74
6. Development of cosmetic product by using high functionality <i>perilla</i> leaf .....	88

7. Benzopyrene synthesis in high functionality <i>perilla</i> leaf after roasting .....	92
Section 3. Establishment of the cultivation condition for <i>perilla</i> breed ·	94
1. Screening of high functionality <i>perilla</i> leaf breeds .....	96
2. Determine the cultivation condition for high functionality <i>perilla</i> leaf .....	104
3. Gene cloning for the synthesis of anthocyanin in <i>perilla</i> .....	110
4. Transformation of <i>Arabidopsis</i> by flavonoid 3'-hydroxylase gene .....	115
5. Comparison of the resistance of <i>Arabidopsis</i> origin and transformation .....	116
<b>Chapter 4 Goal Achievement and Contribution to Related Industries .....</b>	<b>120</b>
Section 1. Achievements of Goals and Contributions .....	121
Section 2. Technology Aspect .....	124
Section 3. Industry and Economic Aspect .....	124
Section 4. Social and Cultural Aspect .....	125
<b>Chapter 5 Result of the Study and Application Plan .....</b>	<b>126</b>
Section 1. A Patent Application .....	127
Section 2. A Patent Registration .....	127
Section 3. Paper .....	128
Section 4. Academic Presentation .....	130
Section 5. Other Application Plans .....	131
<b>Chapter 6 International Science and Technology Information Gathered in the Process of the Study .....</b>	<b>132</b>
Section 1. Development of functional tea and beverage commerlization	133
Section 2. Increase of rosmarinic acid content by sucrose treatment ·	134
Section 3. Research on the secondary metabolite of <i>perilla</i> leaf .....	134
<b>Chapter 7 References .....</b>	<b>135</b>

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b> .....	<b>14</b>
제 1 절	연구개발의 목적 .....	15
제 2 절	연구개발의 필요성 .....	15
1.	기술적 측면 .....	15
2.	경제 · 산업적 측면 .....	17
3.	사회 · 문화적 측면 .....	18
제 3 절	연구개발의 범위 .....	20
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>21</b>
제 1 절	국외 수준 .....	21
제 2 절	국내 수준 .....	21
제 3 절	국내외 연구 현황 .....	23
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>24</b>
제 1 절	제 1 세부 고기능성 깻잎의 상품화 및 실용화 .....	25
1.	고기능성 깻잎을 이용한 차 및 시즈닝 개발을 위한 로스팅 조건 연구 (실험 조건 설정) .....	25
2.	고기능성 깻잎의 액상화 및 분말화에 따른 유효성분 농도 검증 및 제품 제조 공정 연구 .....	27
3.	재배원가, 생산량, 병충해 저항성 등 생산에 직접 연관되는 사항 검토 및 연구 .....	28
4.	고기능성 깻잎을 이용한 차 및 시즈닝 개발을 위한 로스팅 조건 연구 (대량 생산 조건 설정) .....	29
5.	제품화를 위한 마케팅 전략 수립 .....	34
6.	고기능성 깻잎 시즈닝 시작품 제작 .....	35
제 2 절	제 1 협동 고기능성 들깻잎의 효능 및 안전성 평가 .....	36
1.	고기능성 들깻잎의 추출 및 검색 연구 .....	37
2.	고기능성 들깻잎의 항산화 능력 측정 및 <i>in vitro</i> 기능성 평가 .....	44
3.	고기능성 들깻잎의 <i>in vivo</i> 간 보호 활성 측정 .....	58
4.	고기능성 들깻잎의 로스팅 과정 후 기능성 효능 측정 .....	69
5.	고기능성 들깻잎 추출물의 일반 독성 시험 .....	74

6. 고기능성 들깨잎 추출물의 화장품 개발 연구 .....	88
7. 고기능성 들깨잎의 로스팅 후 벤조피렌 생성 확인 .....	92
<b>제 3 절 제 2 협동 들깨 품종의 고기능성 배양 조건 확립 .....</b>	<b>94</b>
1. 고기능성 깻잎 개발을 위한 들깨 품종 스크리닝 .....	96
2. 고기능성 깻잎 재배를 위한 재배 조건 설정 .....	104
3. 들깨의 안토시아닌 합성에 관여하는 유전자 클로닝 .....	110
4. 들깨 flavonoid 3'-hydroxylase gene을 애기 장대로 형질전환 .....	115
5. 정상 개체와 형질 전환 개체의 저항성 비교 .....	116
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>120</b>
제 1 절 연구개발의 달성도 및 기여도 .....	121
제 2 절 기술적 측면 .....	124
제 3 절 경제 · 산업적 측면 .....	124
제 4 절 사회 · 문화적 측면 .....	125
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....</b>	<b>126</b>
제 1 절 특허 등록 .....	127
제 2 절 특허 출원 .....	127
제 3 절 논문 .....	128
제 4 절 학술 발표 .....	130
제 5 절 그 외 활용 계획 .....	131
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>132</b>
제 1 절 차와 음료를 대상으로 기능성과 제품화 연구 .....	133
제 2 절 설탕물 처리를 통한 rosmarinic acid 함량 증가 연구 .....	134
제 3 절 들깨잎의 이차대사산물 연구 .....	134
<b>제 7 장 참고문헌 .....</b>	<b>135</b>

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

연구개발 최종목적 : 기능성 깻잎을 이용한 가공제품 개발	
고기능성 깻잎의 상품화 및 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 고기능성 깻잎 또는 그 추출물을 이용한 차, 시즈닝, 액기스, 화장품 등의 기능성 제품 개발</li> <li>● 제품화를 위한 시제품 제작</li> </ul>
고기능성 들깻잎의 효능 및 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 다양한 깻잎 품종의 간 재생 및 보호효과</li> <li>● 타 품종에 비해서 기능성이 좋은 품종을 선별</li> <li>● 고기능성 깻잎의 안전성을 검토함</li> </ul>
들깨 품종의 고기능성 배양 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 고기능성을 가진 물질의 생산성 증대를 위하여 식물 생리학적인 지식을 근거로 식물 이차대사산물의 합성 및 대사과정 경로를 조절</li> <li>● 유용 이차대사산물의 합성을 증가시킬 수 있는 최적 조건을 확립</li> </ul>

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 과거에는 주로 종실유를 채취할 목적으로 들깨가 재배되어왔으나 최근 육류의 소비증가, 외식문화의 발달 및 웰빙으로 인한 쌈채소 소비 시장의 급성장으로 최근 들깻잎용 품종이 개발되어 연중 생산이 가능해졌다.
- 녹황색채소의 항암효과에 대한 연구에서 식용하는 대부분의 채소가 효과가 좋지만, 그 중 들깻잎은 암 예방 효과가 가장 좋은 채소 중 하나임. 암 예방 효과를 나타내는 물질은 파이톨 (phytol), ETA (eicosatrienoic acid) 및 엽록소인 것으로 밝혀졌다.
- 깻잎의 주요 성분물질로 로즈마리산(rosmarinic acid), 안토시아닌, 카페인산(caffeic acid) 등이 보고된 바 있다.<sup>1)~5)</sup> 이들 성분은 수용성 성질이 높기 때문에 섭취하였을 경우 높은 체내 이용률을 기대할 수 있으며 특히 카페인산은 섭취하였을 경우 소장 흡수율이 95% 이

상이다. 식물체에 많이 함유되어 있는 quercetin의 경우 소장 흡수율이 25% 미만으로 알려져 있어 *in vitro*에서 강한 생리활성을 가지고 있으나 *in vivo*에서는 활성을 기대하기 어렵다고 알려져 있다. 그러나 로즈마릭산(rosmarinic acid), 카페인산(caffeic acid)은 높은 흡수율과 수용성이 좋아 다양한 생리활성을 기대할 수 있다.

- 카페인산은 강한 항산화 활성을 가지고 있으며 특히 채소나 과일류에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 서양 향신료인 타임(*Thymus vulgaris* L)에는 kg 당 17,000 mg, 마조람에는 6,000 mg 정도가 함유되어 있으나 대부분 서양 조리시 향신료로 이용되고 있다. 우리나라에서 섭취되는 채소류에는 우엉 2,500 mg, 감자 280 mg, 양배추 70 mg, 고추 34 mg에 비해 깻잎은 700 mg 정도 함유되어 있으나 생리활성을 기대하기에는 낮은 함량이다.
- 본 연구진(1협동, 고려대)은 깻잎 추출물이 간 보호 및 재생 효과를 가지고 있으며 그 활성의 본체가 카페인산이라는 것과 카페인산이 산화적인 스트레스로부터 활성산소를 제거하여 간을 보호해주는 효능과 항산화 효소인 글루타치온(GSH, glutathione)를 높여주는 글루타치온의 합성에 관여하는  $\gamma$ -GCS( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase)의 활성을 증가시킨다는 것을 rat을 이용한 *in vivo* 실험을 통하여 확인하여 국제 학술지에 발표하였다.<sup>6)</sup>
- 또한 DSS(dextran sulphate sodium)에 의해서 유발된 대장염이 카페인산에 의해 억제됨을 MPO(myeloperoxidase) activity 저해 효과를 통해 확인한 바 있다.
- 로즈마릭산은 카페인산과 같은 페놀릭 화합물로 강한 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 특히 자외선에 의한 피부손상 억제 활성을 가지고 있어 천연 화장품 소재로 이용된다.
- 고부가가치 식물을 생산하기 위하여 다양한 방법이 시도되어 왔다. 분자유종은 경우 오랜 시간이 소요되며 유전자 변형은 소비자로 하여금 거부감을 일으킨다. 그러나 식물생장조절제는 식물 호르몬이라고도 하며 식물이 자체적으로 2차 대사를 조절하게 하여 특정 성분을 다량 함유하게 하는 방법으로 현재 주로 화훼산업이나 과수산업에서 이용되고 있다.<sup>7)~10)</sup>
- 식물 이차대사산물의 다양성은 인간에 의해 만들어진 chemical library 보다도 훨씬 더 많은 다양성을 가지고 있으며 이는 앞으로도 새로운 식물의 이차대사산물이 발견될 가능성이 높아, 최근에는 여러 관련 기술과 접목하여 새로운 기술력이 창출될 수 있는 분야로 여겨진다.
- 생명과학적인 측면에서의 식물 이차 대사산물의 합성

- 밭 생산은 식물이라는 특성 때문에 미비한 단계이나 식물의 유전자 발현 연구의 활성화로 한 단계 진보되어 가고 있는 분야로 인식되고 있으며 전 세계적으로 다양하고도 독창적인 기술들이 개발되고 있는 실정이다.
- 들깨는 꿀풀과의 일년생 초본이며, 원산지는 한반도를 포함한 동부아시아 고원지대이다. 농상집요(農桑輯要, 1273년)에 처음으로 기록되었고 참깨보다도 재배역사가 오래며, 고서에는 임(荏), 임자(荏子), 수임(水荏), 수소마(水蘇麻), 유마(油麻), 지마(脂麻) 등으로 불려졌다.
- 들깨는 우리 민족 전통식품으로 들기름, 들깻묵, 들깻잎 등은 우리들의 건강을 지켜왔고, 독특한 향미를 주는 들깨의 잎은 우리 민족이 가장 즐겨 애용하는 대표식품이며 세계에 자랑할 수 있는 훌륭한 기능성식품이라 할 수 있으나 단순히 생식으로만 소비되고 있는 소비 형태와 수확시기의 잉여품에 대한 저장성의 문제로 저가 소득 작목으로 인식되고 있다.
- 동의보감에 보면 들깻잎은 속을 고르게 하고 취기를 없애 상기혜수(上氣咳嗽)를 치료하고 벌레 물린데, 또는 종기에도 찢어서 붙인다고 기록되어 있으나 일본과 우리나라 등 일부 아시아권에서만 식용되며 기능성에 대한 과학적 연구가 부족한 실정이다.
- 본 연구에서는 우리나라 사람이 즐겨 먹는 깻잎의 기능성 성분인 카페인산과 로즈마리산과 같은 비휘발성 페놀릭(phenolic) 화합물을 식품자체의 2차 대사과정을 조절하는 식물 생장 조절제를 이용해 함량을 증가시킨 고기능성 깻잎을 생산하고 이것의 생산 및 생산 기술을 확보하고자 한다.

## 2. 경제 · 산업적 측면

- 깻잎은 한국인이 즐겨먹는 채소이며 독특한 향과 향기성분이 있어 예로부터 콩밭이나 조밭 주변에서 소의 접근을 막기 위하여 작목되어 왔으며, 한국인에게 있어서 들깨의 향기는 비교적 좋은 이미지로 평가되고 있다.
- 국내 들깨의 생산량은 2000년 이후로 완만한 감소를 보이다가 2005년부터 쌈채소 붐과 더불어 급격한 증가를 나타내고 있다. 들깻잎의 수입량은 2001년에 비해서 2배 이상 증가한 것을 보아 그만큼 국내 깻잎의 소비가 늘어난 것으로 사료된다.
- 들깻잎은 단순히 생식의 형태로 섭취하거나 또는 절임, 찜 등의 형태에 국한되어 소비되고 있으며 유통 중 저장성의 한계로 인하여 수확시기와 비수확시기 간의 가격 격차가 약 2배 정도 된다.

- 최근 허브티의 소비가 증가하고 있으므로 비교적 좋은 이미지를 가지고 있는 깻잎을 이용하여 간 재생 효능을 가지고 있는 기능성 차 제품, 알코올 및 육류 섭취 시 곁들일 수 있는 깻잎 시즈닝 및 자외선 보호효과를 가진 화장품 소재로의 이용 시 깻잎의 가치를 보다 향상시킬 수 있고, 차 또는 시즈닝으로 개발하여 소비패턴을 다양화하면 수확시기의 잉여 작물을 효과적으로 이용할 수 있는 장점이 있다.
- 결과적으로 농가소득의 증대 및 관련 산업의 발전을 도모함과 동시에 국민건강의 증진을 꾀할 수 있을 것으로 예상된다.

### 3. 사회 · 문화적 측면

- 생활패턴의 변화로 인하여 간질환, 고혈압, 암, 당뇨병 등의 생활습관성 질환이 증가하고 있으며, 일상생활에서 기능성 식품을 통해 이러한 질병을 극복하고자 하는 노력이 계속되고 있다.
- 평균수명의 증가, 질병패턴의 변화와 함께 소득수준이 증가하면서 선진국형 생활패턴으로 가고 있는 국민의 필요에 맞는 우수한 기능성 식품 소재에 대한 관심이 증대되고 있다.
- 최근 웰빙시대를 맞아 소비자는 건강에 관련된 제품을 선호하는 것이 세계적인 추세로 채소도 예외 없이 보건적 효과가 높은 고품질 · 기능성채소의 경우 소비자의 선호도가 가장 높은 것으로 나타난다.
- 한국인의 육류 소비량이 늘었다고는 하지만 고기만 섭취하기 보다는 여러 가지 쌈채소를 곁들여 먹는 소비패턴을 나타내기 때문에 그만큼 채소의 소비량도 늘어났으며, 주로 소비되는 쌈채소 중 하나인 깻잎을 이용하여 고기능성 깻잎을 개발할 경우 국민건강의 증진에 충분한 기여를 할 것으로 예상된다.
- 손상된 간을 재생시키는 능력과 대장염증 예방효과가 뛰어난 카페인산 성분이 강화된 고기능성 깻잎 및 이를 이용한 기능성 제품을 고기와 함께 자연스럽게 섭취한다면 치료약 또는 알약 형태로 되어있는 다른 건강기능식품을 섭취하지 않아도 질병 예방에 큰 도움을 얻을 수 있으리라 예상된다.
- 의학의 발달로 인해 인간의 평균수명이 증가함에 따라 건강에 대한 관심이 급증하고 있다.

### 제 3 절 연구개발의 범위

<p>시작품 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● “기능성 깻잎을 이용한 가공제품 개발” 과제로 고기능성 깻잎의 재배 조건의 확립을 통하여 고기능 깻잎을 재배 · 생산하고, 이를 이용한 가공제품 (차/시즈닝) 시작품을 개발함</li> </ul>
<p>제품 또는 공정개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 고기능성 깻잎을 이용한 차/시즈닝 제품 개발을 위한 로스팅 조건의 선정 을 위해 온도별, 시간별 조건에 따른 항산화 기능성 측정과 관능평가를 진행하여 최적 로스팅 조건을 선정함</li> <li>● 안전성 평가를 통해 식물성 가공 소재로 부가가치가 높은 식품소재를 개발 및 생산함으로써 농가소득에 획기적인 도움이 될 수 있음</li> <li>● 기능성을 증대시키는 생육 조건을 최적화함으로써 농가의 새로운 재배 방법 보급을 통한 농업 발전에 큰 이익을 가져올 것으로 예상됨</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

## 제 1 절 국외 수준

기술 안정화 단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 작물의 기능성을 향상시키는 연구는 세계적으로 많이 진행되어 왔으며 최근엔 다양한 육종 방법을 통한 품종 개량과 기능성 강화 작물이 나타나고 있음</li> <li>● 깻잎의 주요 성분인 caffeic acid의 세포내 항산화 물질인 glutathione 생합성 증가 활성화는 본 연구진이 최초임</li> </ul>
-----------	---

- 1961년 독일과학자 Schuphan이 채소품질에 대하여 언급한 이후 현재 독일은 유럽 기능성 채소의 효시이며 영국의 경우 1975년 Arthey가 원예식품의 품질개념을 정립하면서 본격적인 연구가 진행되었다.
- 일본의 경우 1980년대부터 연구를 시작하여 다양한 연구가 진행되고 있음. 들깻잎에서 추출한 성분으로 로즈마릭산, 루테올린, 우르소릭산을 포함한 트리터핀산류가 보고되었고 이 물질들은 항염증효과가 있었다.<sup>5)</sup>
- 그러나 깻잎에서 카페인산이 항산화제인 글루타치온을 증가를 확인한 것은 본 연구진이 최초이다.<sup>6)</sup>
- 미국의 경우 유전자 재조합 기술을 이용하여 기능성 성분을 증가시킨 작물이 활발히 연구되고 있다. 특히 기능성과 선호도가 높은 토마토를 유전공학 기법으로 2002년 Dharmapuri가 라이코펜의 함량을 2-3배 증가시킨 품종을, 1997년 Hauptmann이 당근의 카로틴 함량을 증가시킨 품종을 보고하였다. 그러나 육종은 되었으나 농가와 소비자가 유전자 변형 품종에 대한 선호도가 낮아 보급될지는 미지수이다.

## 제 2 절 국내 수준

- 국내 다소비 채소의 기능성에 대한 연구는 고추의 capsacin, 무의 isothiocyanate 및 각종 수경재배 작물에 대한 영양소 성분변화 및 특정 성분 증진이 연구되고 있다.
- 생활수준의 향상으로 국민들의 건강에 대한 관심이 급증하였고, 여러 가지 질병을 예방해 줄 수 있는 기능성 물질을 많이 함유한 채소의 소비가 증가하였다.

- 2001년 항암활성이 있는 셀레늄을 이용하여 상추, 배초향을 대상으로 연구가 진행되어 많은 성과를 올렸으며 최근 상추와 썩갓을 이용한 셀레늄증진 연구를 진행하고 있다.
- 1999년 상추를 기능성 채소화 시키기 위하여 철분 함량을 증가시키는 양액재배와 엽면 살포법이 연구되었음. 기능 강화성분의 양을 증기시키는 과정에서 상추의 성장이 저하되어 지속적인 연구를 필요로 하고 있다.
- 국내 고기능화 방법으로는 대부분 고기능성 품종을 선택하여(외국산과 교배 집목) 육종하는 방법이 많이 연구되고 있으며 야생종을 발굴하여 재배종으로 개발하는 연구도 진행되고 있다.
- 육류를 섭취하면서 쌈채소를 곁들여먹는 우리나라의 소비패턴으로 인해 여러 가지 쌈채소의 소비가 증가하였고, 대표적인 쌈채소 중 하나인 깻잎의 소비량 및 생산량도 증가하였다.
- 하지만 식물 성장조절제의 경우 화훼 또는 과수산업에 주로 이용되고 특히 채소류의 기능성 성분을 증진시키는 것과 관련된 연구는 부족하다.
- 기능성을 나타내는 식물의 이차대사산물은 그 합성경로가 비슷하기 때문에 관련된 대사 작용을 촉진하는 성장조절제를 처리하면 비슷한 대사과정을 통해 합성되는 기능성 성분이 같이 증가한다. 따라서 카페인산을 증가시킴으로 인해서 비슷한 합성경로를 가진 다른 기능성 물질들도 함께 증가하는 부가적인 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.
- 이러한 특성을 이용하여 깻잎의 기능성을 나타내는 이차대사산물을 증가시킨다면 일상생활에서 깻잎을 섭취함과 동시에 건강증진의 효과를 볼 수 있고, 소비자의 요구를 충족하여 충분히 경쟁력을 갖출 수 있을 것으로 예상된다.

### 제 3 절 국내외 연구 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
이태리, Dharmapuri 미국, Hauptmann	유전자재조합 방식을 이용한 토마토 육종 개발 및 당근 육종 개발	소비자와 생산자의 거부감으로 육종 개발만 진행된 상태로 상품의 판매는 유보된 상태
한국, 제일 종묘농산	항암 성분의 일종인 베타 카로틴이 일반 배추보다 48배 많이 함유되어 있는 기능성 싹배추가 개발되었음	일부 제품이 개발된 상태이긴 하지만 적극적인 유통 및 홍보가 부족하여 일반 소비자들의 인식 정도는 미미하며 인터넷 사이트 등을 통해 소규모로 거래되는 정도임
한국, 태평양	태평양은 97년 경희대 한의대와 공동연구를 통해 6년 근 인삼과 옥, 죽, 작약, 연자육, 백합, 자황 등 5가지 한약재를 달여 설화수를 출시한 바 있으며, 미백이 뛰어난 닥나무 추출물을 함유한 제품, 한란을 원료로 한 향수, 티트리 추출물인 멜라레우카알터니폴리아라는 천연성분 원료로 만들어 피부, 상처 부위를 깨끗하게 가꿔주는 제품을 개발하였음	현재 한방 제품으로 개발 단계임

### 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

# 제 1 절 : 제 1 세부 고기능성 깻잎의 상품화 및 실용화

(바이오버드 김종탁)

## 1. 고기능성 깻잎을 이용한 차 및 시즈닝 개발을 위한 로스팅 조건 연구 (실험 조건 설정)

### 가. 시험방법

#### (1) 재료

깻잎은 영남농업기술시험장에서 분양받은 종자를 밀양농업기술센터에서 동일 구획 내에서 2008년 9월에 파종하여 11월에 온실재배 후 수확한 것을 고려대학교를 통하여 약 2000 g을 받아 3~4번씩 흐르는 물에 세척공정을 한 후 건조하여 이를 분쇄한 후 약 100 g씩 나누어 polyethylene 필름에 넣어 냉장(5~10℃)이하로 보관하였다.

#### (2) 로스팅 조건의 실험계획

깻잎을 이용한 차 및 시즈닝 개발을 목적으로 로스팅한 차/시즈닝의 관능적 특성을 조사하여 최적의 로스팅 조건을 설정하였다. 볶음의 온도는 120~240℃와 볶음시간 5~25분 등 두 가지 조건을 독립변수로 하고 관능검사를 통한 맛, 색, 향기 등의 기능적 특성을 종속변수로 하여 측정된 결과를 고기능성 깻잎 차 및 시즈닝 개발을 위한 로스팅 조건을 최적화하였다.

본 연구에서는 고기능성 깻잎을 이용하여 차 및 시즈닝을 제품으로 만들기 위한 최초의 조건인 최적 로스팅 조건의 선행연구가 필요하여 로스팅의 온도와 시간 변화에 따른 관능적 즉각적, 후각적, 시각적인 부분을 통하여 최적의 로스팅 조건을 설정하고자 하였다.

로스팅 조건의 최적화를 위하여 실험계획은 중심합성계획에 의하여 설계하였다. 중심합성계획은 독립변수( $X_n$ ) 로는 볶음온도( $X_1$ ) 및 볶음시간( $X_2$ )이었으며 실험계획은 -2, -1, 0, 1, 2로써 다섯 단계로 부호화하여 실험값은 Table 1에 나타냈다. 또한 깻잎의 관능적 품질에 관련된 맛, 향기, 색 등의 관능평가를 실시하였다.

**Table 1. Levels of roasting conditions in experimental design.**

X	Roasting conditions	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub>	Temperature(℃)	120	150	180	210	240
X <sub>2</sub>	Time(min)	5	10	15	20	25

**(3) 로스팅 공정**

깻잎 차 및 시즈닝의 로스팅 공정은 가열 팬을 미리 소정의 온도를 올린다음 로스팅 온도는 120, 150, 180, 210, 240℃에서 각각의 5, 10, 15, 20, 25min으로 설정하여 로스팅 하였고 이때 가스렌지 화력을 조절하였으며 온도변화는 표면온도계를 사용하여 가열팬의 중앙부분을 온도를 제어 조절하면서 반복 측정하였다.

**(4) 관능적 품질평가**

각 조건의 로스팅 후 시료의 Taste, Flavor, Color 관능적 품질평가를 위하여 본 회사 직원과 고려대학교 학생 등 20명의 관능검사 원으로 선정하여 실험목적과 및 평가 항목들에 대해 설명하고 반복하여 실험한 후 Taste, Flavor, Color에 대한 각 항목 5점 만점으로 매우 좋다 5점, 좋다 4점, 보통 3점, 나쁘다 4점, 매우 나쁘다 1점으로 실시하였다.

**나. 결과 및 고찰**

**(1) 깻잎을 이용한 차, 시즈닝 개발을 위한 최적 로스팅 조건**

깻잎차의 관능적 품질로서 맛, 향, 색에 의해 설계된 로스팅 처리에 따른 품질평가는 Table 2와 같다.

Table 2. Experimental data for organoleptic scores and electron donating ability under various roasting conditions of *perilla* leaf by reponse surface methodology.

Exp. No.	roasting conditions <sup>1)</sup>		organoleptic scores <sup>2)</sup>		
	Temp(°C)	time(min)	Taste	Flavor	color
1	210(1)	20(1)	3.4	3.2	3.8
2	210(1)	10(-1)	3.2	3.0	3.2
3	150(-1)	20(1)	1.8	1.8	1.4
4	150(-1)	10(-1)	2.0	1.8	1.4
5	180(0)	15(0)	2.2	2.4	2.8
6	180(0)	15(0)	3.0	2.4	3.0
7	240(2)	15(0)	3.0	2.6	3.6
8	120(-2)	15(0)	2.0	1.8	2.2
9	180(0)	25(2)	2.8	3.0	3.2
10	180(0)	5(-2)	2.2	1.8	1.8

<sup>1)</sup>Numbers in parentheses are the coded symbols of levels of roasting conditions for entral composite design.

<sup>2)</sup>Organoleptic score; 5point scales

최적의 roasting condition은 Table 2에서와 같이 로스팅 온도는 210°C이고 시간은 20분인 것으로 나타났다.

## 2. 고기능성 깻잎의 액상화 및 분말화에 따른 유효성분 농도 검증 및 제품 제조 공정 연구

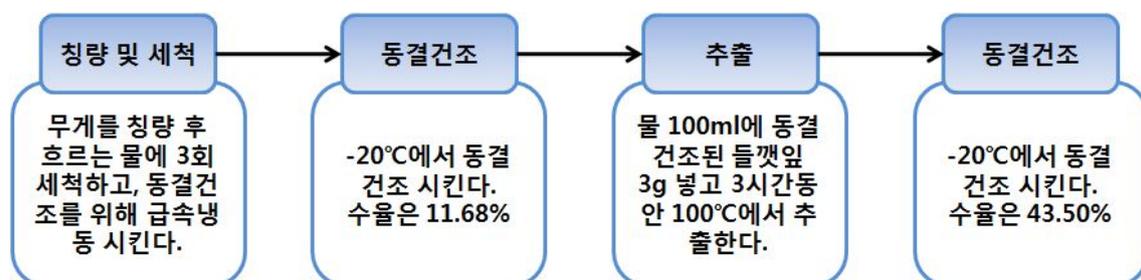


Fig. 1. Preparation of *perilla frutescens* leaf(Namchun, Bora) powder product

들깻잎 열수추출을 통한 제조 공정은 위의 모식도와 같이 진행하였으며, 이 때 최종 추출물

수율은 5.08%이며, 유효성분 농도는 생물 100 g을 기준으로 남천 들깨의 경우 caffeic acid는 807 µg이며, rosmarinic acid는 4,817 µg 이다. 또한 보라 들깨의 경우 caffeic acid 958 µg, rosmarinic acid 3,817 µg 이다.

### 3. 재배원가, 생산량, 병충해 저항성 등 생산에 직접 연관되는 사항 검토 및 연구

#### 가. 재배원가

처리면적 : 66m<sup>2</sup> (1라인 기준)

1회 처리량 : 200 l

처리형태별 소요경비(생산원가 및 평균판매가격)

구분	처리방법	66m <sup>2</sup> 당		생산원가		평균판매가격	
		1회처리 소요경비	1회생산 가능량	kg당 생산원가	비율	kg당 판매가격	비율
1	무처리	0	8kg	2,170	100%	4,280	100
2	설탕40g/1 l (8kg/200 l)	10,660	"	3,500 (2,170+1,330)	161%	5,610	131
3	설탕60g/1 l (12kg/200 l)	16,000	"	4,170 (2,170+2,000)	192%	6,280	147
4	설탕80g/1 l (16kg/200 l)	21,330	"	4,840 (2,170+2,670)	223%	6,950	162

생산비가 61~123%가 증가되어, kg당 판매가격은 31~62%가 상승되나, 고기능성 껌잎으로 인정되어 고가 판매될 경우 생산에는 어려움이 없을 것으로 판단된다.

#### 나. 생산량

처리구별 생산량의 차이는 없으며, 설탕 처리농도가 높을수록 처리직후 성장점 부위 잎 가운데가 황변(黃變)하는 경향이 있으나 수확 전 회복됨. 또한 설탕 처리 시 보라들깨의 경우 잎 뒷면 보라색이 진해지는 경향이 있다.

#### 다. 병해충 저항성

처리구별 병해충 저항성 차이는 느낄 수 없었다.

#### 4. 고기능성 껏잎을 이용한 차 및 시즈닝 개발을 위한 로스팅 조건 연구 (대량 생산 조건 설정)

##### 가. 실험 재료

들껏잎은 영남농업기술시험장에서 분양 받은 종자를 밀양농업기술센터에서 동일 구획 내에서 2009년 9월에 파종하여 11월에 온실재배 후 수확한 남천 들껏와 보라 들껏를  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 냉동 보관하면서 실험재료로 사용하였다. 고기능성 껏잎 제품을 위해서 일반적으로 재배하는 들껏잎이 아닌 6% 설탕물로 재배한 들껏잎을 사용하였다. 6% 설탕물로 재배한 들껏잎의 경우 항산화력 및 caffeic acid, rosmarinic acid 함량이 일반적으로 재배하는 들껏잎에 비해 3~4배 가량 더 증가하는 것으로 나타났다. (1협동 고려대학교)

##### 나. 로스팅 조건의 실험계획

###### (1) 중심합성계획

볶음조건의 최적화를 설정하기 위해 반응표면분석법의 중심합성계획을 토대로 설계하였고, 요인변수( $X_n$ )로는 볶음온도( $X_1$ )와 볶음시간( $X_2$ )이며 실험계획은 -2, -1, 0, +1, +2로써 다섯 단계로 부호화하여 나타내었다.

중심합성계획에서 중심점의 수는 두 개의 중심점(0,0)으로 설정하고 축 점의 수는 볶음조건이 2개이므로 4개의 축 점으로 하였으며, 축 점에서  $a$  및  $-a$  값은 각각 2 및 -2로 하고 축점으로  $(a,0), (-a,0), (0,a), (0,-a)$ 로 설정하여 요인변수( $X_n$ )는 중심합성계획에 따라 10개의 실험구를 설정하여 실험하였다.

중심합성계획은 독립변수( $X_n$ )로는 볶음온도( $X_1$ ) 및 볶음시간( $X_2$ )이었으며 실험계획은 -2, -1, 0, 1, 2로써 다섯 단계로 부호화하여 실험값은 Table 3, 4에 나타내었다. 껏잎의 관능적 품질에 관련된 맛, 향기, 색 등의 관능평가를 하였다.

또한, 껏잎 차의 경우 뜨거운 물을 이용하여 우려내서 섭취하지만, 시즈닝은 별도의 조리없이 그 상태 그대로 섭취하게 되므로, 고온에서 로스팅을 하게 되면 향미 성분이 파괴되어 관능적 특징이 감소할 수 있으므로 들껏잎 차와 들껏잎 시즈닝의 로스팅 조건은 온도와 시간을 다르게 설정하여 실험을 진행하였다.



Fig. 2. Picture of *perilla frutescens* leaf(Namchun, Bora) after roasting

Table 3. Levels of roasting conditions in experimental design for *perilla* leaf Tea.

Roasting conditions	Levels				
	-2	-1	0	1	2
Temperature(°C)	120	140	160	180	200
Time(min)	15	20	25	30	35

Table 4. Levels of roasting conditions in experimental design for *perilla* leaf seasoning.

Roasting conditions	Levels				
	-2	-1	0	1	2
Temperature(°C)	100	120	140	160	180
Time(min)	20	25	30	35	40

1차년도에 실시하였던 로스팅 조건과 당해년도에 진행한 로스팅 조건의 차이가 발생하였는데, 1차년도 연구 수행에서는 일반적인 fan frying을 통해 관능평가에 사용한 시료를 준비하였지만, 당해년도 연구 수행에서는 제품의 제작을 위해 scale-up 과정에서 로스팅 기계(Convection Oven MP29N)를 사용하게 되어 조건이 변화하였다. 하지만 이는 1차년도 연구 수행과 비슷한 성상의 들깨잎 시료를 유지하는 수준이었다.

## (2) 로스팅 처리

볶음 장치는 Convection Oven MP29N을 사용하여 미리 소정의 온도까지 상승시킨 오븐 내에 일정한 크기(1 cm<sup>2</sup>)로 절단된 시료를 넣고 실시하였음. 볶음이 완료된 시료를 즉시 오븐에서

꺼내어 송풍 냉각장치에 옮겨 실은까지 냉각시킨 다음 밀봉하고, 이를 각종 분석용 시료로 사용하였다.

### (3) 관능적 품질평가

각 조건별로 볶은 시료에 대하여 관능적 품질검사는 고려대학교 식품공학과 대학원생 중에서 본 실험에 흥미가 있고 차이식별 능력을 갖춘 10명의 남녀 학생을 관능검사 요원으로 선정하여 이들에게 들깨잎 차의 색상, 맛, 및 향에 대한 평가요령을 훈련시킨 뒤 관능평가를 실시하였다.

평가지료의 조제는 예비실험을 거쳐 기호도가 가장 양호한 조건으로서, 볶은 들깨잎 1 g을 티백용지에 넣고 95℃ 정수 150 mL에서 2분간 침출 시킨 다음 80℃ 부근에서 10 점 채점법에 의해 실시하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

깨잎을 이용한 차, 시즈닝 개발을 위한 최적 로스팅 조건의 깨잎 차의 관능적 품질로서 맛, 향, 색에 의해 설계된 들깨잎 종류별, 여러 로스팅 조건 처리에 따른 품질평가는 Table 5, 6, 7, 8과 같다.

들깨잎 차 개발을 위한 관능평가에서는 남천 들깨의 경우 160℃, 25분간 로스팅한 조건, 보라 들깨의 경우 140℃, 30분간 로스팅한 조건에서 가장 높은 선호도를 나타내었다. 또한 남천 들깨와 보라 들깨에서 200℃, 25분간 로스팅한 조건에서 가장 낮은 선호도를 나타내었다. 200℃에서 로스팅할 경우 깨잎의 원래 상태를 유지하지 못하고, 갈변한 정도가 심하였으며, 침출시켰을 때 깨잎 고유의 향이 아닌 이상취가 발생하였다. (Table 5, 6)

**Table 5. Experimental data on organoleptic scores of *perilla leaf*(Namchun) under different conditions of *perilla leaf* tea roasting.**

Roasting condition			Organoleptic cores			
Exp No.	Temp(℃)	Time(min)	Color	Aroma	Taste	Overall
1	180	30	5.8	5.4	4.8	5.6
2	180	20	5.9	5.9	5.7	6.0
3	140	30	5.1	5.7	4.5	5.3
4	140	20	4.5	5.9	5.9	5.8
5	160	25	6.8	6.5	6.4	6.5
6	160	25	6.7	6.5	7.0	6.7
7	200	25	3.2	3.4	3.1	3.3
8	120	25	5.5	4.1	4.6	5.0
9	160	35	6.5	6.0	5.2	5.7
10	160	15	5.7	5.2	5.6	5.5

**Table 6. Experimental data on organoleptic scores of *perilla leaf*(Bora) under different conditions of *perilla leaf* tea roasting.**

Roasting condition			Organoleptic cores			
Exp No.	Temp(℃)	Time(min)	Color	Aroma	Taste	Overall
1	180	30	5.5	5.4	5.3	5.4
2	180	20	5.9	5.2	5.3	5.2
3	140	30	5.9	5.6	5.6	5.8
4	140	20	6.2	5.4	5.0	5.8
5	160	25	5.9	5.7	5.6	5.7
6	160	25	5.8	5.6	5.0	5.5
7	200	25	3.2	2.4	2.7	2.8
8	120	25	5.2	5.0	5.1	5.1
9	160	35	6.0	5.8	5.6	5.5
10	160	15	5.3	6.1	5.3	5.5

고기능성 깻잎 시즈닝 개발을 위한 관능평가에서는 납천 들깨의 경우 140℃, 30분간 로스팅한 조건, 보라 들깨의 경우 120℃, 35분간 로스팅한 조건에서 가장 높은 선호도를 나타내었다. 하지만 가장 높은 선호도 외에 납천 들깨는 160℃, 35분간 로스팅, 보라 들깨는 100℃, 30분간 로스팅에서도 높은 선호도를 나타내었다. 그리고 납천 들깨와 보라 들깨에서 180℃, 30분간 로스팅한 조건에서 가장 낮은 선호도를 나타내었다. 180℃에서 로스팅 할 경우 갈변한 정도가 심하였으며, 색에 대한 관능도가 많이 떨어지는 경향을 나타내었다. (Table 7, 8)

관능 평가의 결과뿐만 아니라 각각 로스팅 조건에 따른 기능성 성분의 함량 및 항산화력을 비교하기 위해 1협동(고려대학교)에서 실험을 진행하였다.

**Table 7. Experimental data on organoleptic scores of *perilla leaf*(Bora) under different conditions of *perilla leaf* seasoning roasting.**

Exp No.	Roasting condition			Organoleptic cores		
	Temp(℃)	Time(min)	Color	Aroma	Taste	Overall
1	160	35	4.9	5.7	6.0	6.2
2	160	25	5.8	5.7	5.3	5.7
3	120	35	6.3	5.5	5.4	6.0
4	120	25	5.5	5.2	5.0	4.8
5	140	30	5.6	5.5	5.4	5.8
6	140	30	6.8	5.3	6.2	6.3
7	180	30	3.5	3.7	3.1	3.2
8	100	30	6.3	5.3	6.1	5.8
9	140	40	5.1	4.8	4.9	5.3
10	140	20	6.0	5.3	6.0	5.9

Table 8. Experimental data on organoleptic scores of *perilla leaf*(Bora) under different conditions of *perilla leaf* seasoning roasting.

Exp No.	Roasting condition		Organoleptic cores			
	Temp(°C)	Time(min)	Color	Aroma	Taste	Overall
1	160	35	2.8	4.4	4.3	4.3
2	160	25	3.7	4.2	4.7	4.6
3	120	35	5.9	5.0	5.7	5.7
4	120	25	4.1	4.3	4.3	4.3
5	140	30	3.2	3.2	3.6	3.3
6	140	30	3.9	4.2	4.4	4.4
7	180	30	1.8	2.8	2.4	2.3
8	100	30	6.5	5.1	4.4	5.3
9	140	40	4.5	3.8	4.4	4.3
10	140	20	4.5	4.5	4.8	4.3

### 5. 제품화를 위한 마케팅 전략 수립

요즘 시대는 미디어의 발달로 기술에 대한 정보를 누구나 손쉽게 얻을 수 있는 Digital, Internet 시대이기에 Off-line 뿐만 아니라 On-line Marketing 또한 매우 중요한 부분이기 때문에 두 가지 모두 병행하는 Marketing 전략을 수립하였다.

먼저 우리가 항상 접하고 있는 신문에 홍보하는 전략으로 일간지와 식품 전문지 두 종류의 매체를 이용하여 들갯잎 차와 시즈닝 제품에 대한 홍보를 하고자 한다.

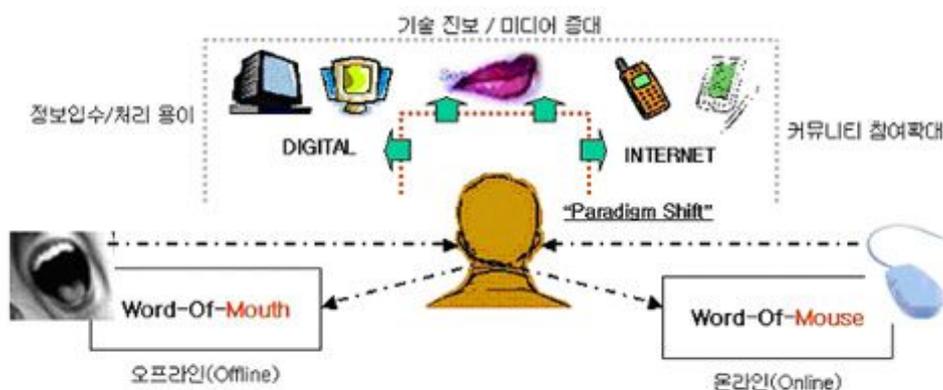


Fig. 3. Marketing plan combining online and offline marketing

## 가. 일간지 및 전문지 활용

### (1) 일간지를 활용한 홍보

영남일보 기사와 광고를 통한 직접적인 소비자 홍보 전략으로 밀양시에서 재배한 고기능성 깻잎의 제품 개발과 깻잎 차 및 시즈닝 제품을 소개한다.

### (2) 전문지를 활용한 홍보

식음료신문, 외식경제신문 등을 통한 유통업 종사가 홍보 전략으로 신 제품개발사례와 들깻잎의 기능성 및 유효성에 대한 컬럼을 통해 소비자에게 깻잎의 항산화와 간 보호 기능 활성을 강조하여 홍보한다.

## 나. On-line Marketing 활용

On-line Cafe, Blog를 통한 관심 소비자 홍보전략을 수립하여 기능성 깻잎에 대한 홍보와 시각적효과의 극대화를 통한 구매층을 확보할 계획이다.

## 6. 고기능성 깻잎 시즈닝 시작품 제작

고기능성 깻잎 시즈닝 제품 개발을 위해 선정한 최적의 로스팅 조건을 바탕으로 대량 생산 공정에 적용하여 시작품을 제작하였다. 최적의 로스팅 조건으로는 관능평가와 기능성 평가를 모두 고려하였을 때 가장 적합한 160℃, 35분을 사용하였다.

최적 로스팅 조건을 선정하기 위하여 진행하였던 실험과 달리 시작품 제작은 기업형 scale-up 공정을 이용하였으며, 깻잎 시료 10kg을 로스팅 하였다. 하지만 대량 생산 공정에서도 전년도 연구와 유사한 성상의 고기능성 깻잎 시즈닝을 얻을 수 있었으며, scale-up에 따른 다른 문제점은 확인할 수 없었다.



## 제 2 절 : 제 1 협동 고기능성 들깨잎의 효능 및 안전성 평가

(고려대학교 이광원)

들깨(*perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara)는 중국에서 처음으로 재배되기 시작하여 인도, 중국, 일본 그 밖의 동남아 지역에서 재배되었으며, 최근에는 러시아, 미국, 남아프리카, 이집트 등지에서도 재배되고 있는 꿀풀과(Labiatae)의 일년생 초로 우리나라에서는 농상집요(農桑輯要, 1273년)에 처음으로 기록되었고 참깨보다도 재배역사가 오래되었다. 과거에는 주로 종실유를 채취할 목적으로 들깨가 재배되어왔으나 최근 육류의 소비증가, 외식문화의 발달 및 웰빙에 의한 쌈채소 소비 시장의 급성장으로 최근 들깨잎용 품종이 개발되어 연중 생산이 가능해졌음. 최근 들깨잎이 가지는 기능성에 관하여 들깨잎의 항돌연변이 효과에 관한 보고에서 aflatoxin B1에 의하여 유발되는 돌연변이가 억제되었으며, 이러한 억제효과를 나타내는 물질로 phytol 및 methyl 11,14,17-eicosatrienoate등이 동정된 바 있음. 또한 중요한 생리활성 물질로 알려져 종양세포에 직접적인 증식 억제효과를 나타내며, UV나 ethyl methane sulfonate(EMS)에 의한 Salmonella와 Drosophila의 돌연변이 유발을 억제한다.

Glutathione(L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl cysteinylglycine, GSH)은 glutamic acid, cysteine, glycine으로 구성된 tripeptide로 생체에서 가장 풍부한 sulfhydryl group의 급원으로서 활성산소기(reactive oxygen radical, ROS)에 의한 세포 손상 등의 독성에 대하여 방어 작용을 하는 세포 내 방어물질의 하나로 알려져 있으며, GSH의 생합성에는  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase ( $\gamma$ -GCS)가 매우 중요한 효소이다.

본 연구진의 앞선 연구결과 들깨잎 열수 추출물이 *tert*-butyl hydroperoxide로 유도된 간세포의 산화적 손상을 억제하며 투여한 실험동물의 간 조직에서 정상 대조군보다 GSH의 함량이 증가한 것을 확인하였고 그 활성의 본체가 caffeic acid임을 밝혀내었다.

Caffeic acid는 polyphenol계 화합물로서 발암억제제로 작용하고, 생체 안과 밖에서 항산화제로 알려져 있으며 아플라톡신(aflatoxin)의 생산을 95%이상 줄여 줄 뿐만 아니라, 산화 스트레스 유발 및 아플라톡신의 생산을 억제할 수 있다고 알려져 있고, *in vitro* 실험 결과, dicaffeoyl ester, chicoric acid(CRA)가 glucose-uptake와 인슐린 분비를 촉진시키는 사실이 알려져 있다.

또한 caffeic acid의 dimer인 rosmarinic acid는 인체에서 형성되는 독성물질인 활성산소를 제거함으로써 인체의 노화와 각종 질병을 예방해주고 유지식품의 산화에 의한 부패를 막아주는 물질로, 이외에도 그 중 주요작용으로는 항산화작용, 항염증작용, 항돌연변이작용, 항미생물작용, 항바이러스작용, 그리고 항암활성을 가지고 있다고 알려져 있음. 또한 식후에 영양소가

혈중으로 들어가기 위해 혈액상태가 일시적으로 걸쭉해 지는데 rosmarinic acid는 맥아당을 포도당으로 분해시키는 작용을 해서 혈중에 흩어진 당분을 체외로 배출시키는 작용을 한다. 그로 인해 혈당치의 상승을 억제하고 고혈압, 당뇨, 고지혈증을 예방한다고 보고되고 있다.

본 연구진은 기존의 깻잎보다 이차대사산물인 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량이 증가된 고기능성 깻잎의 생산을 위해 재배 시 설탕을 첨가하여 고기능성 깻잎이 기존 깻잎의 항산화력 및 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량 변화를 확인하고자 한다.

또한 고기능성 깻잎을 로스팅하였을 때 로스팅 조건에 따른 항산화력 및 caffeic acid와 rosmarinic acid 함량의 변화를 측정함으로써 고기능성 깻잎을 이용한 가공제품 개발 시 가장 적합한 조건을 선정하는데 활용할 수 있다.

## 1. 고기능성 들깻잎의 추출 및 검색 연구

### 가. 고기능성 들깻잎의 품종 선별을 위한 *in vitro* 항산화 능력 평가

#### (1) 연구 목적

현재 국내에 재배되는 들깻잎 품종 중 고기능성 들깻잎 개발에 사용할 후보군 품종 선별을 위하여 *in vitro* 상에서 기능성을 검증한다.

#### (2) 연구 방법

##### (가) 실험 재료

사용한 들깻잎은 총 5개의 품종으로 보라, 새보라, 동글 2호, 남천, 늘보라 깻잎을 사용하였으며 들깻잎은 영남농업기술시험장에서 분양받은 종자를 밀양농업기술센터에서 동일 구획 내에서 2008년 9월에 파종하여 11월에 온실재배 후 수확한 것을 약 50 g 정도씩 3-4번씩 흐르는 물에 세척하여 동결 건조하였다. 이를 분쇄하여 약 3 g씩 증류수 100 mL에 넣어서 3시간 동안 환류 추출 후 여과한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

##### (나) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Fenglin 등에 의한 방법<sup>11), 12)</sup>을 일부 변형하여 정량하였다. 즉, 추출물 100  $\mu$ L에 folin-ciocalteu reagent 0.25 mL를 가한 후 증류수 0.4 mL을 넣어 희석한 후 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>포화 용액 1.25 mL을 가하여 잘 섞고, 실온에서 40분 방치한 후 spectrophotometer

(BioTek)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 표준물질로 gallic acid의 농도를 달리하여 조제한 후 표준 곡선을 작성하여 계산하였다.

#### (다) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드의 함량은 각 추출액 100  $\mu$ L에 2%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  용액을 100  $\mu$ L 가하고 5분 방치한 후, 흡광도 값 430 nm에서 측정하였음. 또한 표준물질로는 quercetin dihydrate를 사용하였다.<sup>13)</sup>

#### (라) Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

Total antioxidant power를 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해서 ferric-tripyridyltriazine 복합체가 ferrous-tripyridyltriazine로 환원되는 방법으로 측정하였다.<sup>13)</sup> FRAP 활성은 Benzie, Strain에 의한 방법을 일부 변형하여 측정하였다. FRAP reagent로서 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 2.5 mL에 20 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2.5 mL과 pH 3.6의 0.3 M acetate buffer 25 mL을 가하였다. 그 후 FRAP reagent 3 mL에 농도별 들깨잎 추출액 100  $\mu$ L를 넣어 혼합한 것을 37°C에서 5분 경과 후에 593 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 곡선으로  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 산출하였다.

#### (마) DPPH Free Radical-Scavenging Assay

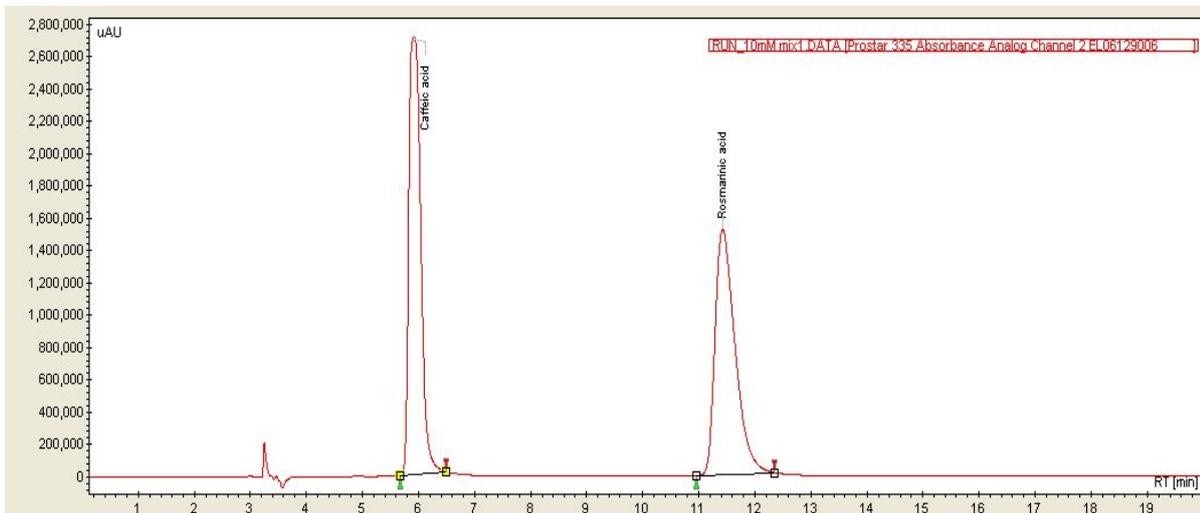
1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)용액은 ascorbic acid, tocopherol과 방향족 화합물 등에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 수소 공여능을 측정하는 방법이다. 들깨잎 열수 추출액의 radical scavenging property는 유리기인 DPPH에 대한 소거능을 측정하였다. 에탄올에 녹인 200  $\mu$ M DPPH reagent 100 $\mu$ L에 농도별 시료 100  $\mu$ L를 넣고 잘 섞어주고 어두운 상태로 30분간 보관한 후 515 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였고, 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였음. 각 시료의  $\text{SC}_{50}$ (scavenging activity 50%)은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 하였다.<sup>11), 12)</sup>

#### (바) Caffeic acid와 rosmarinic acid 함량 측정

품종별 들깨잎 추출물에 들어있는 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량은 HPLC(Varian Prostar)를 이용하여 측정하였다. 분석조건은 Table 9와 같고, 표준물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid의 peak는 Fig. 4와 같다.

**Table 9. Instrument and condition for identification and quantification of caffeic acid and rosmarinic acid in HPLC analysis.**

Instrument	Varian Prostar
Column	Waters Spherisorb 5 μm ODS2 (4.6×250 mm)
Mobile phase	A : 0.05% trifluoroacetic acid B : MeOH 0→20 min (A:B=50:50), 20→21 min (A:B=0:100), 21→25 min (A:B=0:100), 25→26 min (A:B=50:50), 26→28 min (A:B=50:50)
Retention time	6 min(caffeic acid), 11.5min(rosmarinic acid)
Flow rate	1 mL/min
Detector	340 nm



**Fig. 4. Peaks of caffeic acid and rosmarinic acid**

As standard materials, a peak of caffeic acid was detected at 6 min and a peak of rosmarinic acid was found at 11.5 min by HPLC system

**(2) 연구 결과**

**(가) 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정**

국내에서 생산되는 5종의 들깨잎 종자를 동일한 생육조건으로 생육시킨 후 수확하여 각 품종의 깻잎에 따른 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 보라들깨가 69.4±4.5, 동글2호 61.8±2.3, 늘보라들깨 58.8±2.2, 남천들깨가 53.1±0.7, 새보라들깨가 48.6±3.4 g gallic acid

equivalents(GAE)/kg dry matter(DM)로 가장 낮은 폴리페놀 함량을 나타냈다(Table 10). 각 품종에 따른 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과(Table. 10), 늘보라들깨 64.5±3.6, 보라들깨 39.0±7.5, 새보라들깨 29.1±5.4, 남천들깨 29.9±11, 동글2호 20.5±4.5 g quercetin equivalents(QE)/kg DM로 플라보노이드를 함유하고 있었다.

#### (나) Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

FRAP assay는 Fe(III)(TPTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>을 산화제로 사용하여, pH 3.6에서 항산화제에 의해 Fe(II)(TPTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>로 환원되는 것을 이용하는 분석법으로 환원력은 보라들깨가 796±80로 가장 높았고, 동글2호는 748±62이었으며, 늘보라들깨는 687±1.9, 남천들깨는 604±44, 새보라들깨가 530±13 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/g DM로 가장 낮았다. 이를 통해 보라들깨가 가장 높은 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있다.(Table 10).

#### (다) DPPH Free Radical-Scavenging Assay

DPPH는 화학적으로 안정화된 프리라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515 nm에서 최대 흡광도를 가지며, 전자를 받으면 흡광도가 감소함. 환원력이 있는 물질과 만나면 전자를 내어 주면서 DPPH의 라디칼이 소멸되고 그 특유의 보라색이 투명하고 노란빛을 띄게 되는 방법이다. 늘보라들깨는 SC50값이 429±14 µg DM/mL로 확연하게 낮은 free radical-scavenging 능력을 가지고 있었고, 새보라들깨는 324±19 µg DM/mL, 남천들깨는 324±6.7 µg DM/mL, 보라들깨는 261±7.0 µg DM/mL을 나타내었다. 동글2호는 241±3.6 µg DM/mL로 가장 높은 항산화력을 가지고 있다(Table 10).

Table 10. Total polyphenol, flavonoid, FRAP, and DPPH · SC<sub>50</sub> of hot-water extracts from various the leaves of *perilla frutescens*.

	Namchun	Donggeul-2	Bora	Sae-bora	Neul-bora
Total polyphenol (g GAE/kg DM)	53.1±0.7 <sup>c1)</sup>	61.8±2.3 <sup>b</sup>	69.4±4.5 <sup>a</sup>	48.6±3.4 <sup>cd</sup>	58.8±2.2 <sup>bc</sup>
Flavonoid (g QE/kg DM)	29.9±11 <sup>a</sup>	20.5±4.5 <sup>b</sup>	39.0±7.5 <sup>b</sup>	29.1±5.4 <sup>b</sup>	64.5±3.6 <sup>b</sup>
FRAP (mM FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O/g DM)	604±44 <sup>b</sup>	748±62 <sup>ab</sup>	796±80 <sup>a</sup>	530±13 <sup>bc</sup>	687±1.9 <sup>ab</sup>
DPPH · SC <sub>50</sub> (µg DM/mL)	324±6.7 <sup>a</sup>	241±3.6 <sup>b</sup>	261±7.0 <sup>c</sup>	324±19 <sup>a</sup>	429±14 <sup>d</sup>

(라) Caffeic acid와 rosmarinic acid 함량 측정

HPLC를 통한 분석 결과(Fig. 5), 생물 100 g 기준으로 계산하였을 때, caffeic acid는 보라들깨는 0.87 mg, 새보라들깨는 0.71 mg, 동글2호는 0.58 mg, 남천들깨는 0.50 mg 순으로 함량이 감소하였고, 늘보라들깨의 경우 0.11 mg으로 다른 품종에 비하여 매우 낮은 caffeic acid 함량을 나타내었다. rosmarinic acid의 경우, 동글 2호가 121 mg으로 가장 높은 함유량을 보였고, 늘보라들깨가 91.6 mg, 보라들깨가 90.4 mg, 남천들깨가 59.5 mg, 새보라들깨가 47.1 mg을 나타내었다. 이를 통해서 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량은 각각 보라들깨와 동글2호가 가장 높은 것을 알 수 있고, 이 결과는 앞의 항산화력 측정 실험 결과에서 항산화력이 높은 품종이 동글2호와 보라들깨였던 것과 연관지어 생각해 볼 수 있다. 첫 번째 총 폴리페놀 함량 측정에서 보라들깨와 동글2호가 높은 결과를 나타내었고, 두 번째 FRAP에서는 보라들깨가 첫 번째로, 동글2호가 두 번째로 높은 항산화력을 나타내었다. DPPH의 결과에서도 역시 동글2호가 가장 높은 항산화력을 나타내었고, 그다음은 보라들깨였다. 이것은 높은 항산화력을 가진 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량이 많은 보라들깨와 동글2호가 항산화력 측정 실험 결과에서 높은 항산화 활성을 나타낸 것으로 확인할 수 있다. 이에 반해, 늘보라들깨는 플라보노이드 함량에서 높은 결과를 나타내었지만, caffeic acid나 rosmarinic acid의 함량이 낮았고,

DPPH에서는 가장 낮은 결과를 나타내었으며, 나머지 다른 항산화 측정법에서도 높지 않은 결과를 나타내었다.

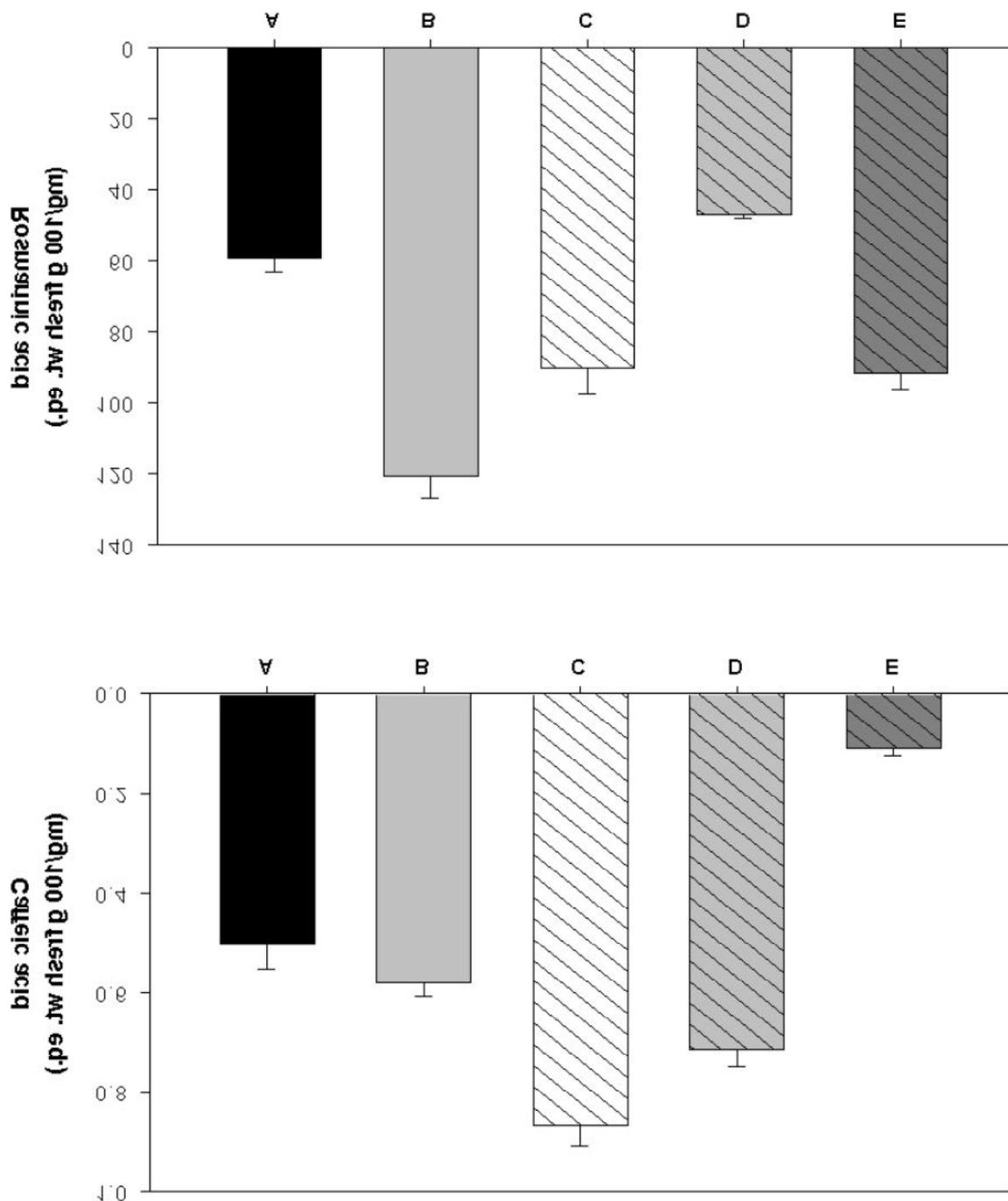
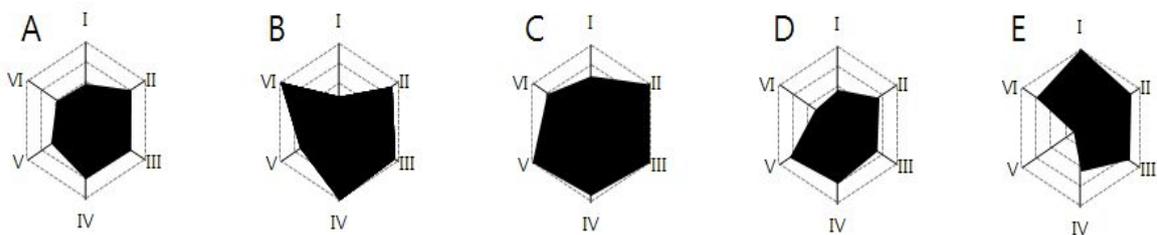


Fig. 5. Caffeic acid contents and rosmarinic acid contents of various leaves of *perilla frutescens*.

A: Namchun, B: Donggeul-2, C: Bora, D: Sae-bora, E: Neul-bora

항산화측정법과 HPLC를 통한 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량을 종합적으로 방사형 그래프로 표현해 본 결과(Fig. 6), 면적은 보라들깨가 87.9%, 동글2호가 80.3%로 확연하게 높은 결과를 나타내었으며, 늘보라들깨가 68.6%, 남천들깨가 63.4%이었고, 새보라들깨가 62.9%로 가장 낮았다. 이를 통해 보라들깨와 동글2호가 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량과 항산화력 측면에서 보았을 때, 항산화관련 기능성 식품소재로 가장 적합한 품종이라고 결론지을 수 있다. 하지만 농업인들의 재배 의향이 동글2호가 매우 낮은 것으로 밝혀져, 보라들깨와 남천들깨로 고기능성 깻잎 품종을 결정하였다.



	A	B	C	D	E
Area (%)	63.4	80.3	87.9	62.9	68.6

**Fig. 6. Radar charts demonstrating characteristic features in the antioxidant properties of various species of leaves of *perilla frutescens*<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup>Scale expressed as the ratio when each value is compared with correspondingly maximum

A: Namchun, B: Donggeul-2, C: Bora, D: Sae-bora, E: Neul-bora, I: Flavonoid, II: Total polyphenol, III: FRAP, IV: DPPH, V: Caffeic acid content, VI: Rosmarinic acid content

## 2. 고기능성 들깨잎의 항산화 능력 측정 및 *in vitro* 기능성 평가

### 가. 고기능성 들깨잎의 *in vitro* 항산화 능력 측정

#### (1) 연구 목적

설탕물 처리 농도에 따른 기능성 성분의 변화를 측정하여 최적 재배 조건을 설정하고 이를 활용하여 고기능성 깻잎으로 선정한다.

#### (2) 연구 방법

##### (가) 실험 재료

고기능성 깻잎 재배를 위하여 관수법을 이용한 설탕물 재배를 실시하였음. 설탕물은 4%, 6%, 8%의 농도로 처리한 3개의 시료와 설탕물을 처리하지 않은 일반 들깨잎 시료를 이용하였으며 들깨잎은 영남농업기술시험장에서 분양받은 종자를 밀양농업기술센터에서 동일 구획 내에서 2009년 9월에 파종하여 11월에 온실재배 후 수확한 것을 약 50 g 정도씩 3-4번씩 흐르는 물에 세척하여 동결 건조하였다. 이를 분쇄하여 약 3 g씩 증류수 100 mL에 넣어서 3시간 동안 환류 추출 후 여과한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

##### (나) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 일부 변형하여 정량하였다. 즉, 추출물 100  $\mu$ L에 folin-ciocalteu reagent 0.25 mL를 가한 후 증류수 0.4 mL을 넣어 희석한 후 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 포화 용액 1.25 mL을 가하여 잘 섞고, 실온에서 40분 방치한 후 spectrophotometer(BioTek)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 표준물질로 gallic acid의 농도를 달리하여 조제한 후 표준 곡선을 작성하여 계산하였다.<sup>11), 12)</sup>

##### (다) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드의 함량은 각 추출액 100  $\mu$ L에 2%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  용액을 100  $\mu$ L 가하고 5분 방치한 후, 흡광도 값 430 nm에서 측정하였음. 또한 표준물질로는 quercetin dihydrate를 사용하였다.<sup>13)</sup>

### (라) Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

Total antioxidant power를 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해서 Ferric-tripyridyltriazine 복합체가 Ferrous-tripyridyltriazine로 환원되는 방법으로 측정하였다. FRAP 활성은 Benzie, Strain에 의한 방법을 일부 변형하여 측정하였다. FRAP reagent로서 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 2.5 mL에 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.5 mL과 pH 3.6의 0.3 M acetate buffer 25 mL을 가하였다. 그 후 FRAP reagent 3 mL에 농도별 들깨잎 추출액 100 µL를 넣어 혼합한 것을 37°C에서 5분 경과 후에 593 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 곡선으로 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 사용하여 산출하였다.<sup>13)</sup>

### (마) DPPH Free Radical-Scavenging Assay

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)용액은 ascorbic acid, tocopherol과 방향족 화합물 등에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 수소 공여능을 측정하는 방법이다. 들깨잎 열수 추출액의 radical scavenging property는 유리기인 DPPH에 대한 소거능을 측정하였다. 에탄올에 녹인 200 µM DPPH reagent 100µL에 농도별 시료 100 µL를 넣고 잘 섞어주고 어두운 상태로 30분간 보관한 후 515 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였고, 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다. 각 시료의 SC<sub>50</sub>(scavenging activity 50%)은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 하였다.<sup>11), 12)</sup>

### (바) ABTS Radical-Scavenging Assay

ABTS 라티칼 소거능은 ABTS 용액이 방향족 화합물 등 항산화능력이 뛰어난 물질에 의하여 짙은 녹색이 탈색됨을 흡광도로 측정하여 수소 공여능 활성을 확인하는 방법으로 들깨잎 열수 추출액을 이용하여 ABTS radical의 소거능을 측정하였다. 7mM ABTS와 2.45mM potassium persulfate를 이용하여 reagent를 만든 후 농도별 시료 20µL에 160µL ABTS reagent를 넣은 후 6분 동안 암소에서 반응시키고, 그 후 734nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 각 시료의 SC<sub>50</sub>(scavenging activity 50%)은 ABTS의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 하였다.<sup>14)</sup>

### (사) caffeic acid와 rosmarinic acid 함량 측정

설탕물을 농도별 처리한 들깨잎 추출물에 들어있는 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량은 HPLC(Varian Prostar)를 이용하여 측정하였다. 분석조건은 Table 11과 같고, 표준물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid의 peak는 Fig. 7과 같다.

Table 11. Instrument and condition for identification and quantification of caffeic acid and rosmarinic acid in HPLC analysis.

Instrument	Varian Prostar
Column	Waters Xterra RP <sub>18</sub> 5 μm ODS2 (3.9×150 mm)
Mobile phase	A : 0.05% trifluoroacetic acid B : MeOH 0 min : Sol. A / Sol. B (100/0), 40min : Sol. A / Sol. B (0/100)
Retention time	14.5 min(caffeic acid), 25.8min(rosmarinic acid)
Flow rate	1 mL/min
Detector	340 nm

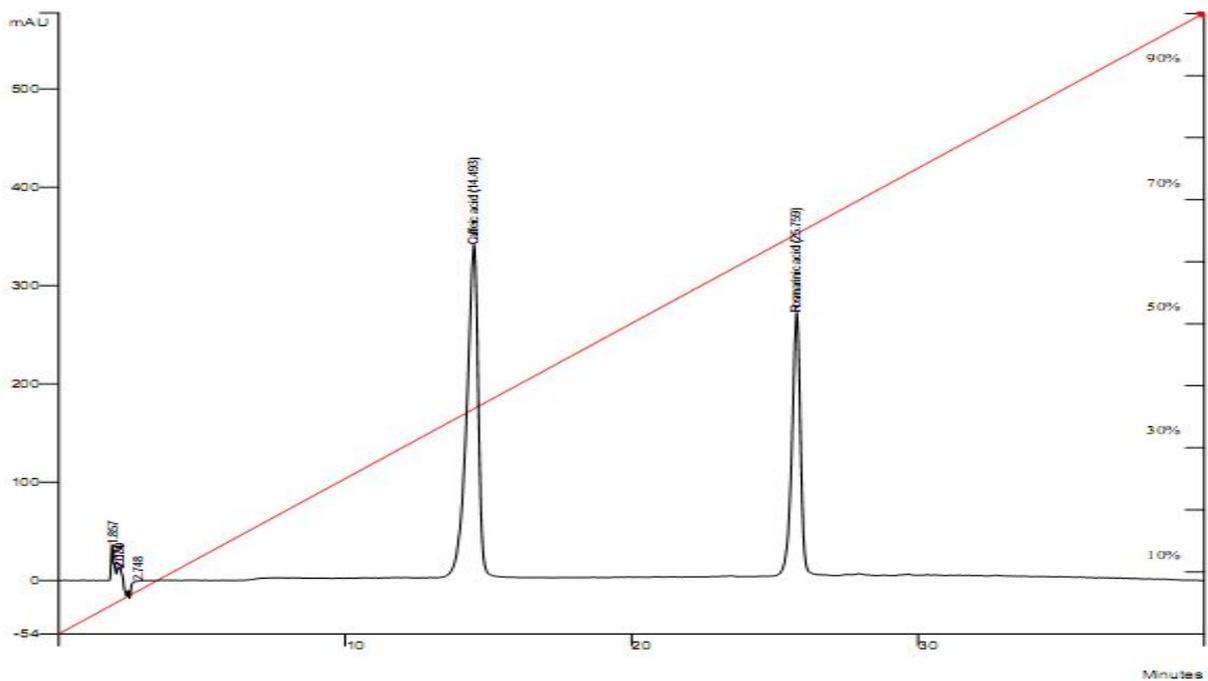


Fig. 7. Peaks of caffeic acid and rosmarinic acid

As standard materials, a peak of caffeic acid was detected at 14 min and a peak of rosmarinic acid was found at 26min by HPLC system.

## (2) 연구 결과

### (가) 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

2 종의 선별된 품종에 각각 설탕물의 농도를 달리하여 동일한 생육조건(빛, 습도 등)으로 생육시킨 후 수확하여 각 품종의 껍질에 따른 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 무처리, 4%, 6% 8% 설탕물 처리 납천 들깨가 39.59±1.34, 46.24±2.78, 70.94±1.07, 58.91±1.21 g gallic acid equivalents(GAE)/kg dry matter(DM) 순으로 나타났다. 또한 보라 들깨도 같은 순서로

32.10±1.23, 64.02±0.29, 60.30±4.28, 69.34±1.62 g gallic acid equivalents(GAE)/kg dry matter(DM)를 나타냈다 (Table 10). 각 처리군에 따른 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 (Table 10), 납천 들깨 무처리, 4%, 6%, 8% 처리군은 13.06±2.05, 16.10±4.83, 26.52±0.87, 35.42±1.18 g quercetin equivalents(QE)/kg DM로 나타냈다. 또한 보라 들깨도 같은 순서로 29.92±3.13, 30.30±9.34, 17.80±1.64, 23.11±1.83 g quercetin equivalents(QE)/kg DM로 플라보노이드를 함유하고 있다.

#### (나) Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

FRAP assay는 Fe(III)(TPTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>을 산화제로 사용하여, pH 3.6에서 항산화제에 의해 Fe(II)(TPTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>로 환원되는 것을 이용하는 분석법으로 환원력은 납천 들깨 무처리, 4%, 6%, 8% 순으로 0.42±0.01, 0.74±0.02, 1.07±0.02, 1.09±0.02 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/g DM를 나타냈다. 보라 들깨도 같은 순서로 0.40±0.02, 0.92±0.02, 0.89±0.04, 0.95±0.05 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/g DM으로 나타냈다(Table 10).

#### (다) DPPH Free Radical-Scavenging Assay

DPPH는 화학적으로 안정화된 프리라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515 nm에서 최대 흡광도를 가지며, 전자를 받으면 흡광도가 감소한다. 환원력이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 DPPH의 라디칼이 소멸되고 그 특유의 보라색이 투명하고 노란빛을 띄게 되는 원리이다. 납천 들깨 무처리, 4%, 6%, 8% 순으로 740±63, 226±2, 306±0.3, 207±13 µg DM/mL이었으며 보라 들깨도 같은 순서로 381±9, 330±4, 251±0.6, 211±8 µg DM/mL을 나타냈다 (Table 10).

#### (라) ABTS Free Radical-Scavenging Assay

ABTS 라디칼 소거능은 ABTS 용액이 방향족 화합물 등 항산화능력이 뛰어난 물질에 의하여 짙은 녹색이 탈색됨을 흡광도로 측정하여 수소 공여능 활성을 확인하는 방법으로 들깨잎 열수 추출액을 이용하여 ABTS radical의 소거능을 측정하였다.

납천 들깨 무처리, 4%, 6%, 8% 순으로 601±31, 415±30, 363±19, 491±23 µg DM/mL이었으며 보라 들깨도 같은 순서로 764±35, 387±20, 214±22, 338±14 µg DM/mL을 나타냈다 (Table 10).

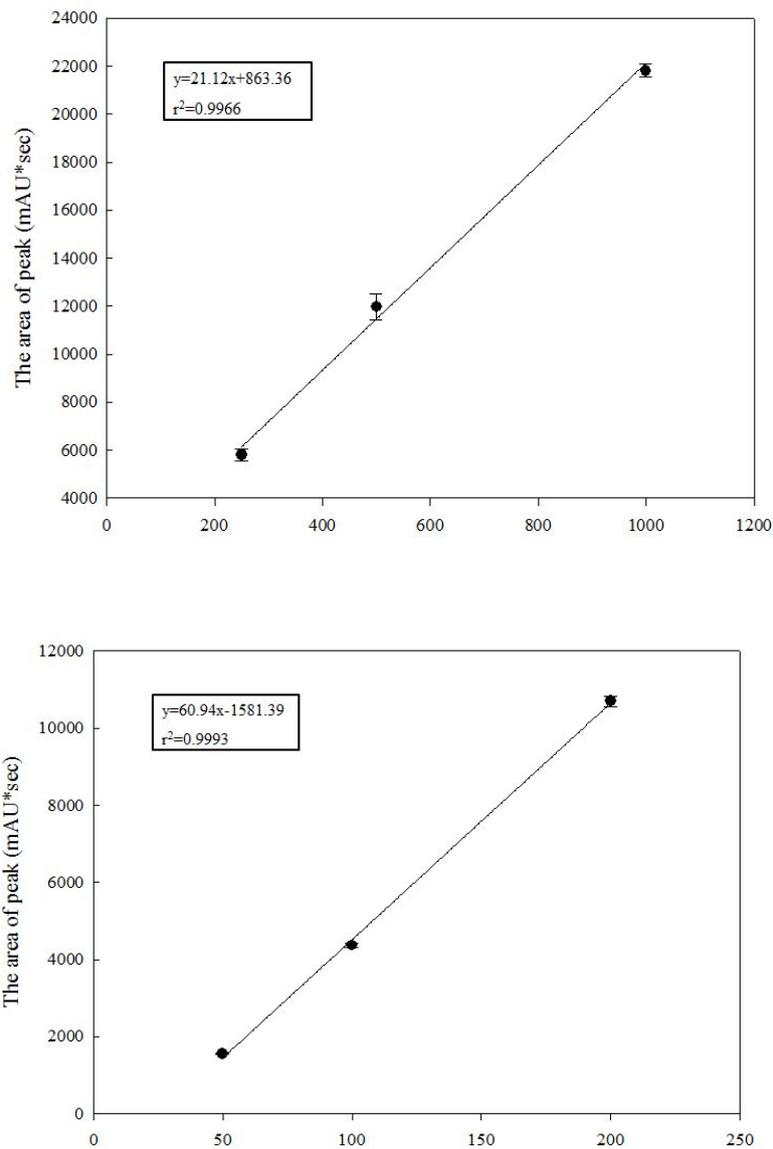
Table 12. Total polyphenol, flavonoid, FRAP, and DPPH · SC<sub>50</sub> of hot-water extracts from leaves of *perilla frutescens*(Namchun, Bora) treated with sucrose aqueous solution.

	Total flavonoid (ug quercetin /mg DM)	Total polyphenol (ug GAE / mg DM)	DPPH-SC <sub>50</sub> (ug DM / ml)	FRAP (mM FeSO <sub>4</sub> / mg DM)	ABTS-IC <sub>50</sub> (ug DM / ml)
<b>Namchun</b> (Non sucrose)	13.1 ± 2.04	39.6 ± 1.34	739.7 ± 62.84	0.4 ± 0.01	601.1 ± 31.06
<b>Namchun</b> (4% sucrose)	16.1 ± 4.83	46.2 ± 2.78	225.9 ± 2.11	0.7 ± 0.01	415.1 ± 30.29
<b>Namchun</b> (6% sucrose)	26.5 ± 0.87	70.9 ± 1.07	306.4 ± 0.28	1.1 ± 0.02	363.6 ± 19.74
<b>Namchun</b> (8% sucrose)	35.1 ± 1.18	59.0 ± 1.21	207.5 ± 13.00	1.1 ± 0.02	491.1 ± 23.38
	Total flavonoid (ug quercetin /mg DM)	Total polyphenol (ug GAE / mg DM)	DPPH-SC <sub>50</sub> (ug DM / ml)	FRAP (mM FeSO <sub>4</sub> / mg DM)	ABTS-IC <sub>50</sub> (ug DM / ml)
<b>Bora</b> (Non sucrose)	29.9 ± 3.13	32.1 ± 1.23	380.8 ± 8.68	0.4 ± 0.02	764.6 ± 35.95
<b>Bora</b> (4% sucrose)	30.3 ± 9.34	64.0 ± 0.30	329.6 ± 3.70	0.9 ± 0.02	387.3 ± 20.92
<b>Bora</b> (6% sucrose)	17.8 ± 1.64	60.3 ± 4.28	251.4 ± 0.65	0.9 ± 0.04	214.6 ± 22.26
<b>Bora</b> (8% sucrose)	23.1 ± 1.83	69.3 ± 1.62	211.5 ± 8.27	1.0 ± 0.05	338.2 ± 14.40

#### (마) caffeic acid와 rosmarinic acid 함량 측정

HPLC를 통한 분석 결과(Fig. 9), 생물 100 g 기준으로 계산하였을 때, caffeic acid는 남천 들깨 무처리, 4%, 6%, 8% 순으로 0.65 mg, 0.67 mg, 0.80 mg, 0.67 mg 으로 나타났으며, 보라 들깨는 0.54 mg, 0.65 mg, 0.96 mg, 0.59 mg의 caffeic acid 함량을 나타냈다. rosmarinic acid의 경우, 남천 들깨 무처리, 4%, 6%, 8% 순으로 1.29 mg, 2.91 mg, 4.82 mg, 3.79 mg으로 나타났으며, 보라 들깨는 2.94 mg, 4.84 mg, 3.82 mg, 4.44 mg의 rosmarinic acid 함량을 나타냈다. 이를 통해서 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량은 설탕의 농도를 증가할 때 증가하는 경향을 보이나 8% 이상 처리시는 오히려 caffeic acid와 rosmarinic acid가 감소하는 경향을 나타냈다. 이 결과는 앞의 항산화력 측정 실험 결과에서 항산화력이 설탕을 처리한 것이 무처리 군보다 높은 것과 연관 지어 생각할 수 있음. 첫 번째 총 폴리페놀 함량 측정에서 설

탕 6% 처리 납천 들깨와 8% 처리 보라 들깨에서 높은 결과를 나타내었고, 두 번째 FRAP에서는 8% 처리 납천 들깨와 8% 처리 보라 들깨에서 항산화력을 나타냈다. DPPH의 결과에서도 8% 처리 납천 들깨와 8% 처리 보라 들깨가 가장 높은 항산화력을 나타냈다. 하지만 ABTS 결과에서는 6% 처리 납천 들깨와 6% 처리 보라 들깨가 가장 높은 항산화력을 나타냈음. 8% 처리군과 6% 처리군과 비교하였을 때 항산화력의 유의적인 차이는 크게 나타나지 않았으며, 오히려 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량은 설탕 6% 처리군에서 가장 높은 것으로 나타났다.



**Fig. 8. Standard curve of caffeic acid and rosmarinic acid contents**

To analyze caffeic acid and rosmarinic acid contents, synthetic caffeic acid and rosmarinic acid contents was used for standard curve.

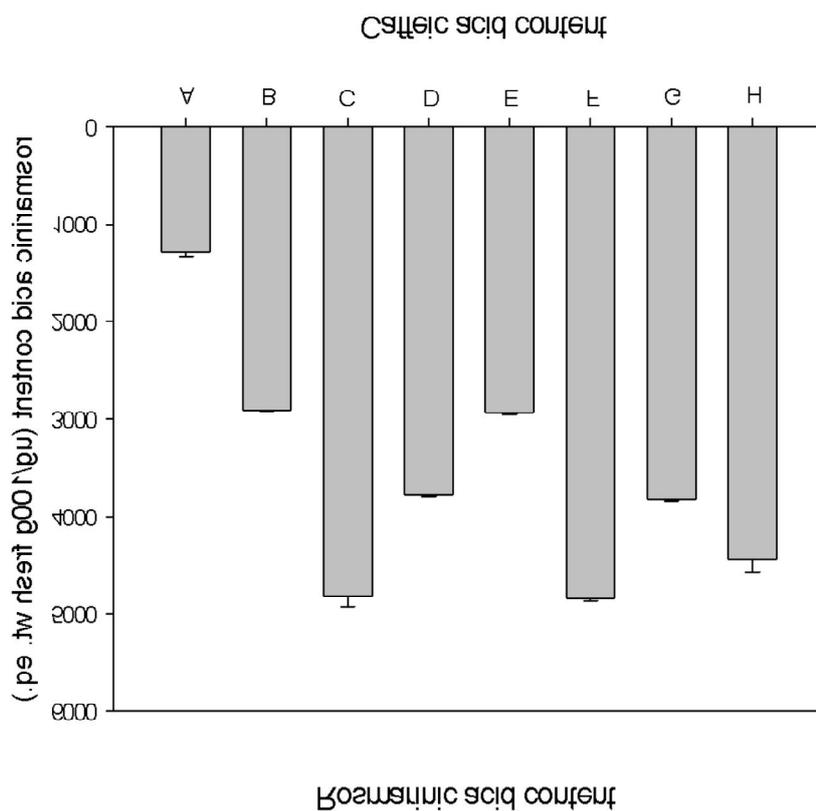
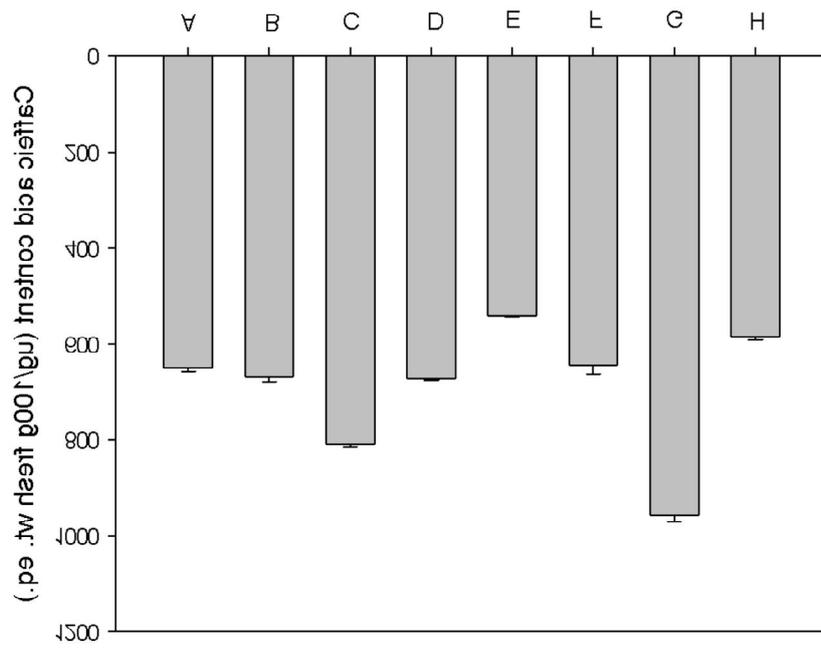
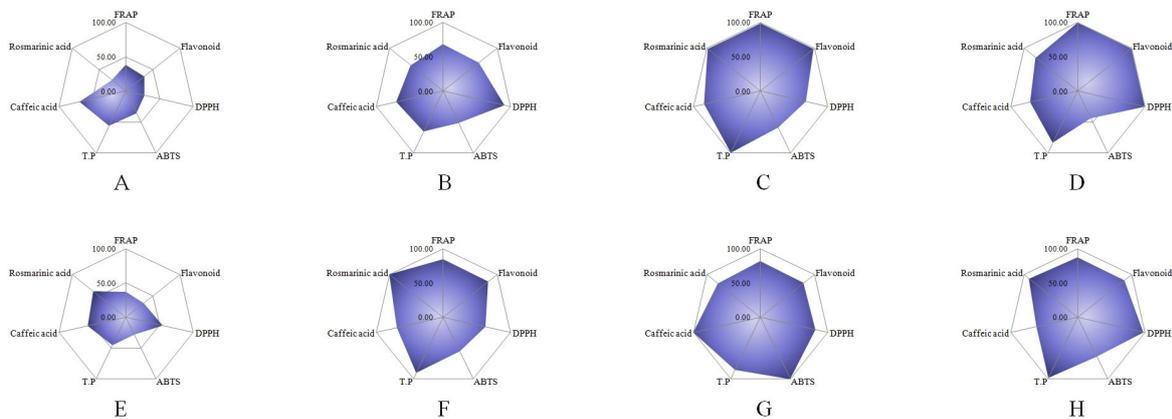


Fig. 9. Caffeic acid contents and rosmarinic acid contents of various leaves of *perilla frutescens* treated with sucrose aqueous solution.

A : Namchun(Non sucrose), B : Namchun(4% sucrose), C : Namchun(6% sucrose), D : Namchun(8% sucrose), E : Bora(Non sucrose), F : Bora(4% sucrose), G : Bora(6% sucrose), H : Bora(8% sucrose)

항산화측정법과 HPLC를 통한 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량을 종합적으로 방사형 그래프로 표현해 본 결과(Fig. 10), 전체 면적 대비(%)는 남천 깻잎의 경우 무처리, 4%, 6%, 8% 순으로 22.5%, 53.9%, 80.1%, 78.5%로 나타났으며, 보라 깻잎의 경우 무처리, 4%, 6%, 8% 순으로 23.0%, 64.2%, 82.5%, 77.9%로 나타났다.



**Fig. 10. Radar charts demonstrating characteristic features in the antioxidant properties of various species of leaves of *perilla frutescens* 1)**

1) Scale expressed as the ratio when each value is compared with correspondingly maximum

A: Namchun(Non sucrose), B: Namchun(4% sucrose), C: Namchun(6% sucrose), D: Namchun(8% sucrose), E: Bora(Non sucrose), F: Bora(4% sucrose), G: Bora(6% sucrose), H: Bora(8% sucrose)

이를 통해 남천 깻잎과 보라 깻잎의 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량과 항산화력 측면에서 보았을 때, 6% 설탕물 처리까지는 항산화 능력이 증가하는 것을 확인할 수 있지만, 오히려 8% 설탕물을 처리하였을 때 항산화 능력이 감소하였다. 따라서 고기능성 깻잎의 재배는 6% 설탕물을 처리하였을 때로 선정하였다. 또한 남천 깻잎과 보라 깻잎에서 기능성은 보라 깻잎이 더 우수하지만 보라 깻잎 생산하기가 까다로우며 식감이 남천에 비하여 월등히 떨어지기 때문에 생산과 소비의 측면을 고려하였을 때 남천 깻잎을 6% 설탕물 처리하여 재배한 깻잎을 고기능성 깻잎으로 선정하였다.

추루 세포 주와 동물을 이용한 실험에는 일반 깻잎(PLE-I)과 고기능성 깻잎(PLE-III)을 사용하여 진행하였다.

## 나. 고기능성 들깨잎의 *in vitro* 세포 생존률 측정

### (1) 연구 목적

고기능성 들깨잎의 간 보호 기능 활성을 측정하기 위하여 기초가 되는 간 세포 생존률을 측정함으로써 간 보호 활성 효과에 대한 선행 연구를 실시한다.

### (2) 연구 방법

#### (가) 세포 배양 및 깻잎 추출물 처리

Human Hepatoma cell line인 HepG2는 ATCC를 통하여 구입하였으며, 배지는 Minimum Essential Medium Eagle을 10% FBS와 2.2 g/L의 sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub> 존재하에 37°C를 유지하며 배양하였다. 간세포의 세포주인 HepG2를 24-well plate에 1.5×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하고 하루 동안 incubation 시킨 후, 깻잎 열수 추출물을 하루 동안 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL로 처리한다. 그리고 배지 제거한 후 MTT assay를 통해 cell viability를 측정해 열수 추출물의 독성 유무를 확인한다.

#### (나) 세포 배양 및 간 보호 활성 측정

Human Hepatoma cell line인 HepG2는 ATCC를 통하여 구입하였으며, 배지는 Minimum Essential Medium Eagle을 10% FBS와 2.2 g/L의 sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub> 존재하에 37°C를 유지하며 배양하였다.

*tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP)는 지질과산화물을 일으키는 대표적인 물질로 배양 간세포에 저농도로 처리할 경우 간세포에서 cytochrome P-450 효소에 의해 세포 구성물들을 산화시킬 수 있는 alkoxy free radical이나 peroxy free radical로 분해되며, 이러한 산물들이 DNA의 손상을 가져와 결국 세포를 죽이는 결과를 초래하여 간세포의 산화적 손상을 일으키는 실험 모델로 흔히 사용되고 있다. 또한 *t*-BHP는 간세포에서 GOT, LDH 유리, malonaldehyde(MDA) 형성 등을 초래한다고 보고되었다. 이러한 free radical에 의한 생체의 산화적 손상은 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), glutathione-S-transferase(GST)와 같은 항산화효소와 vitamine A, vitamine C, vitamine E

및 glutathione(GSH)과 같은 비효소적 항산화물질에 의해 방어된다.

간세포의 세포주인 HepG2를 24-well plate에  $1.5 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 하루 동안 incubation 시킨 후, 0.3mM *t*-BHP만 처리한 실험군 또는 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물을 처리 후, 37°C incubator에서 2시간 처리 후 MTT assay를 실시하였다.

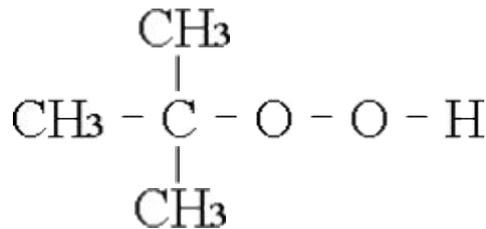


Fig. 11. Structure of *tert*-butyl hydroperoxide

#### (다) 세포 생존률 측정 (MTT assay)

MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium 염이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리를 이용한 실험이다. 따라서 살아있고 대사적으로도 왕성한 세포의 농도를 흡광도 값으로 변형하여 세포 생존률을 측정할 수 있다.

MTT 용액과 배지를 1 : 5 의 비율로 섞은 후 240  $\mu$ L씩 넣고 3시간 처리 후 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨 것에 DMSO를 넣어 녹인 후 Multiplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 처리군의 MTT 값은 대조군을 100%로 기준하여 viability 감소로 표시하였다.<sup>15)</sup>

### (2) 연구 결과

#### (가) 고기능성 깻잎 열수추출물의 간세포에 대한 독성

HepG2 세포에 고기능성 깻잎 추출물을 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL의 농도로 하루 동안 처리하였을 때 세포 생존률은 Fig. 12와 같음. 20 mg/mL을 처리하였을 때 세포 생존률은 약 31%, 10 mg/mL을 처리하였을 때 세포 생존률은 약 48%, 5 mg/mL을 처리하였을 때 세포 생존률은 약 75%, 1 mg/mL을 처리하였을 때 세포 생존률은 약 96% 이다. 고기능성 깻잎 추출물은 5 mg/mL의 농도 이상에서 세포 독성을 나타냈으며, 독성이 나타나지 않은 1 mg/mL을 추후 실험을 위한 세포의 처리 농도로 정하였다.

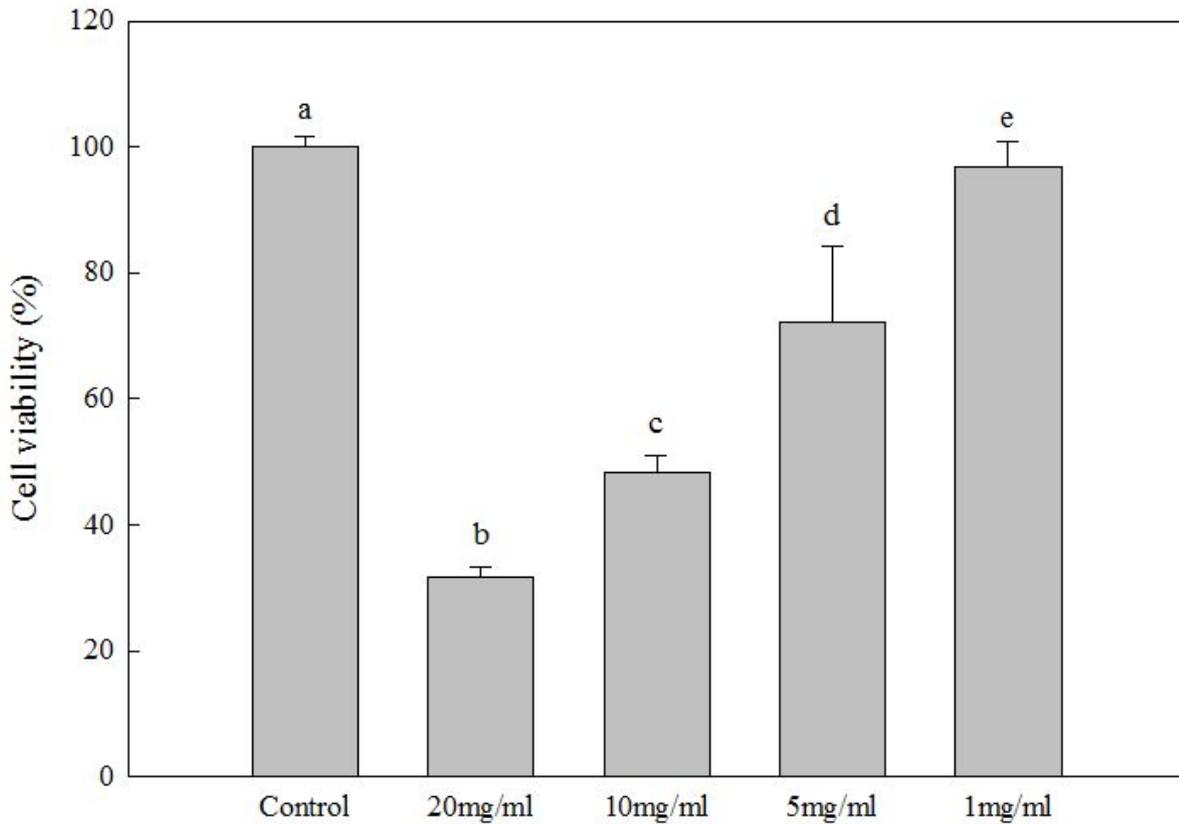


Fig. 12. Cytotoxicity of *perilla frutescens* treated with 6% sucrose solution extract. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). Different letters indicate significance difference ( $p < 0.05$ )

#### (나) 고기능성 깻잎 열수추출물의 간 보호 활성 측정

HepG2 cell에 *t*-BHP 0.3 mM을 처리하였을 때 세포 생존률은 대조군에 비하여 22.7%를 나타냈음. 같은 농도의 *t*-BHP에 깻잎 열수추출물을 처리하였을 때 설탕을 첨가하지 않은 남천 들깨는 36.9%, 6% 설탕 처리 남천 들깨는 43.2% 생존률을 나타냈다. 설탕 6% 처리하여 재배한 고기능성 깻잎은 항산화력과 기능성 성분 함량 증가뿐만 아니라 간 보호효과도 기존의 들깻잎에 비하여 더 뛰어남을 확인하였다 (Fig. 13).

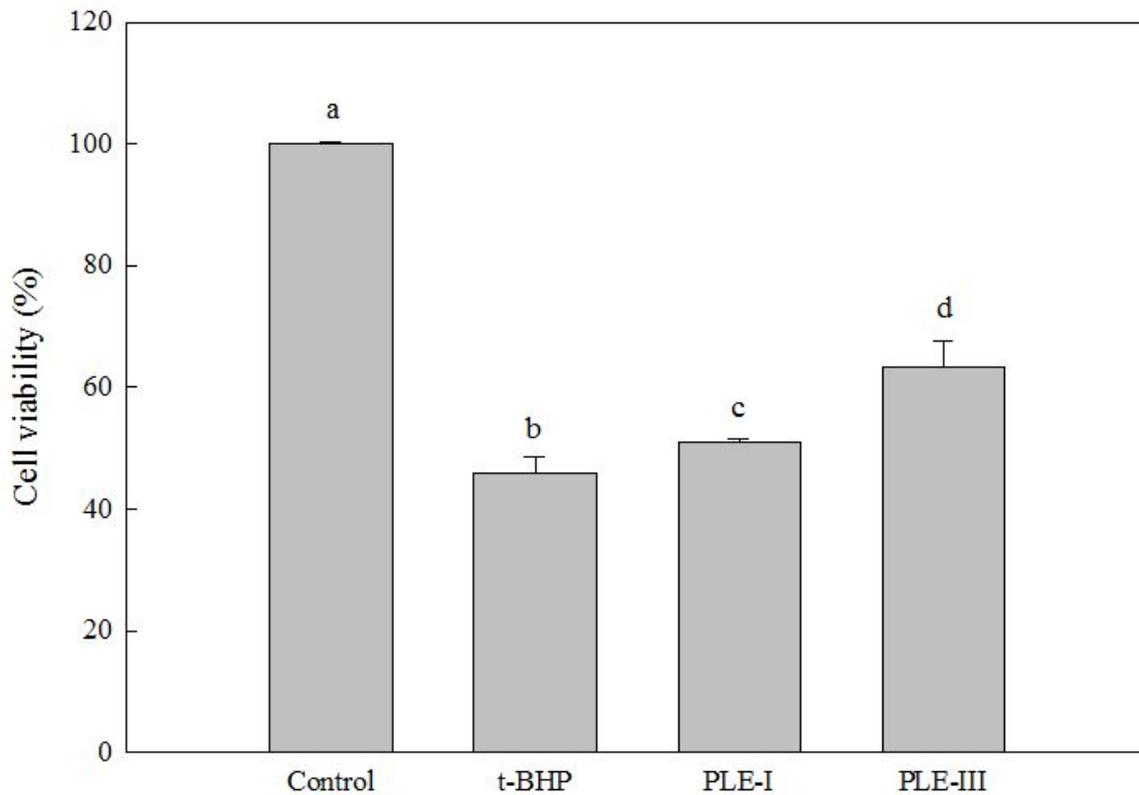


Fig. 13. Effect of *perilla frutescens* extract on *t*-BHP-induced hepatotoxicity in HepG2 cells

Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). Different letters indicate significance difference ( $p < 0.05$ )

#### 다. 고기능성 들깨잎의 *in vitro* 간 보호 활성 측정

##### (1) 연구 목적

고기능성 들깨잎의 간 보호 기능 활성을 측정하기 위하여 산화스트레스로 간 세포 손상 유발 후 지질과산화와 세포 내 항산화 물질인 glutathione의 함량을 측정하여 간 보호 활성을 측정한다.

##### (2) 연구 방법

##### (가) 세포 배양

Human Hepatoma cell line인 HepG2는 ATCC를 통하여 구입하였으며, 배지는 Minimum Essential Medium Eagle을 10% FBS와 2.2 g/L의 sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub> 존재하에 37°C를 유지하며 배양하였다.

#### (나) 지질과산화 측정 (TBAR assay)

이 방법은 지방의 산패가 진행됨에 따라 생성되는 carbonyl 화합물 중 malonaldehyde의 생성에 근거를 둔 것으로서 malonaldehyde는 두 분자의 thiobarbituric acid와 한 분자의 malonaldehyde가 반응하여 적자색의 복합체를 형성하는 원리를 이용한 측정법이다.

간세포의 세포주인 HepG2를 6-well plate에  $1.5 \times 10^6$  cells/well로 분주하고 하루 동안 incubation 시킨 후, 0.3mM *t*-BHP만 처리한 실험군 또는 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물을 처리 후, 37°C incubator에서 2시간 처리 후 cell을 회수하여 실험을 진행하였다.

Cell은 0.2% Triton X-100을 처리하고 Trichloroacetic acid (TCA) buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5 mL을 첨가하여 상등액과 배양액을 합쳐서 95°C 수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식혀서 *n*-butanol을 넣고 격렬히 흔든다. 원심분리 (800 rpm, 10 min) 후 상층액은 excitation 515 nm 와 emission 552 nm에서 형광분석기를 이용하여 측정함. thiobarbituric acid reactive substance (TBARs)는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도 (pmol/mg protein)로 표기한다.<sup>16)~18)</sup>

#### (다) 세포 내 glutathione 함량 측정

HepG2 세포 내 glutathione 함량을 측정하기 위한 실험을 실시한다. 간세포의 세포주인 HepG2를 6-well plate에  $1.5 \times 10^6$  cells/well로 분주하고 하루 동안 incubation 시킨 후, 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물을 처리 후, 22시간 후 *t*-BHP 0.3 mM을 처리함. 37°C incubator에서 2시간 후 cell을 회수하여 실험을 진행하였다.

회수한 세포에 1 mL의 50 mM N-Ethylmaleimide (NEM)을 혼합한 후 ultra sonicator를 이용하여 균질화 한다. 균질화된 용액에 perchloric acid (PCA)를 5%의 농도로 첨가하고 1000 rpm, 4°C에서 원심분리를 실시한다. 상등액을 1 mL의 0.01 M iodoacetic acid (IAA) 100  $\mu$ L를 첨가한 후, NaHCO<sub>3</sub>을 이용하여 중성화 한다. 그 후, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB)을 이용하여 유도체화하여 HPLC를 이용하여 glutathione 함량을 측정한다.<sup>19)</sup>

### (3) 연구 결과

#### (가) 지질과산화 측정 (TBAR assay)

실험군은 대조군과 *t*-BHP 0.3 mM, 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물 1000 µg/mL 과 *t*-BHP 0.3 mM 같이 처리한 실험군으로 나뉘어진다. *t*-BHP는 간독성을 일으키는 물질로 실험 결과 *t*-BHP를 처리한 실험군은 대조군보다 지질 과산화가 많이 진행되었다. 그리고 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물을 *t*-BHP 0.3 mM과 같이 처리한 group에서 유의적인 차이를 나타내며 지질 과산화가 감소한 것을 확인할 수 있다. 또한 일반 깻잎과 고기능성 깻잎을 비교하였을 때 유의적인 차이를 나타내며 고기능성 깻잎의 간 세포에 대한 지질 과산화 억제능이 뛰어난 것을 알 수 있다.

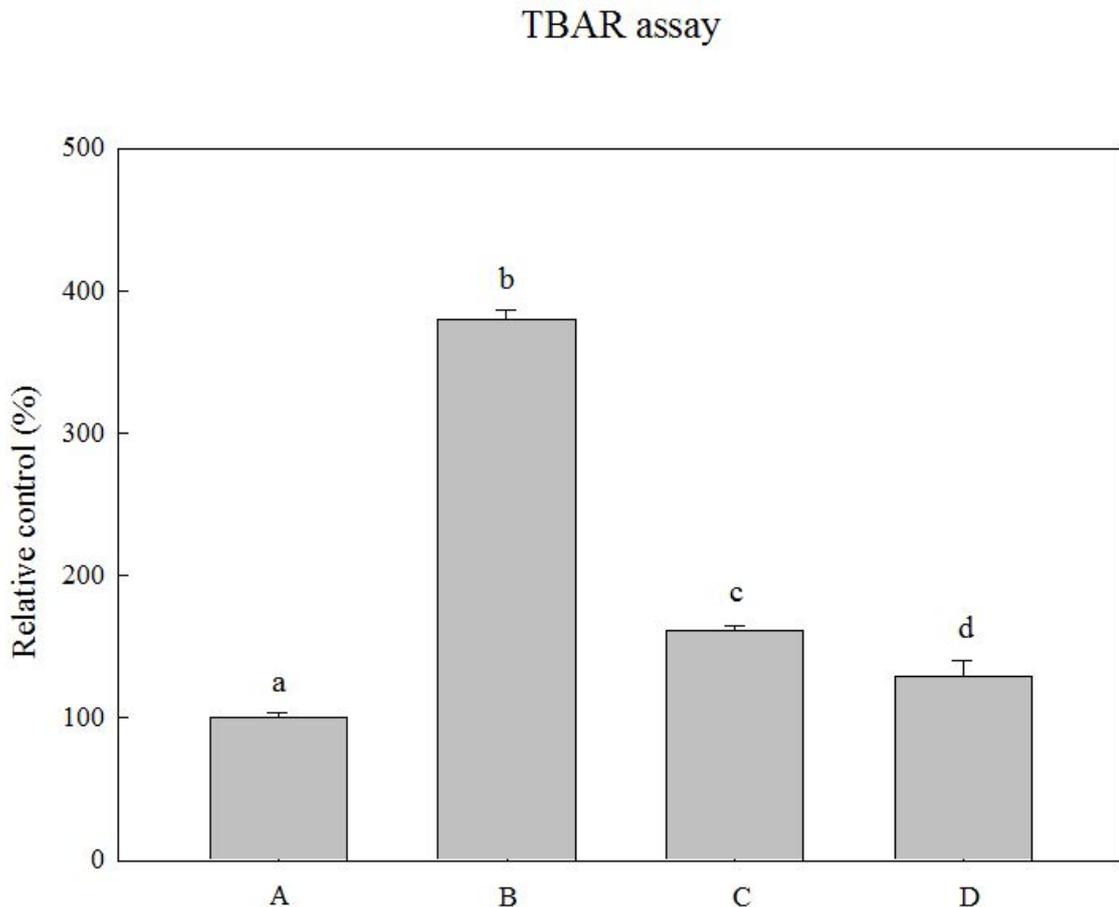


Fig. 14. Effects of PLE-I and PLE-III on formation of *t*-BHP-induced lipid peroxidation in HepG2 cells.

A, negative control; B, *t*-BHP (0.3mM); C, *t*-BHP with PLE-I; D, *t*-BHP with PLE-III.

Values are expressed as mean±SD (n=3).

Different letters indicate significance difference ( $p < 0.05$ )

### (나) 세포 내 glutathione 함량 측정

실험군은 대조군과 *t*-BHP 0.3 mM, 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물 1000 µg/mL 과 *t*-BHP 0.3 mM 같이 처리한 실험군으로 나뉘어진다. *t*-BHP 0.3 mM을 처리한 실험군은 대조군에 비하여 glutathione 함량이 약 25% 정도 수준으로 감소하는 것을 나타내지만, 일반 깻잎과 고기능성 깻잎 추출물 1000 µg/mL을 *t*-BHP 0.3 mM과 같이 처리하였을 때 대조군에 비하여 150%, 185% 정도 증가하는 결과를 나타냈다.

일반 깻잎과 고기능성 깻잎을 비교하였을 때 고기능성 깻잎 추출물의 경우 유의적인 차이를 나타내며 일반 깻잎 추출물에 비하여 높은 glutathione 함량을 나타냈으며, 이는 지질 과산화 결과와도 일치하는 경향을 나타냈다.

따라서 *in vitro* 수준의 결과를 보면 설탕물 6%을 이용하여 재배한 고기능성 깻잎의 경우 일반 깻잎에 비하여 약 3~4배 높은 항산화 활성을 나타내며, 산화스트레스에 대한 간 세포주인 HepG2의 손상을 억제하는 효능이 뛰어남을 확인하였다.

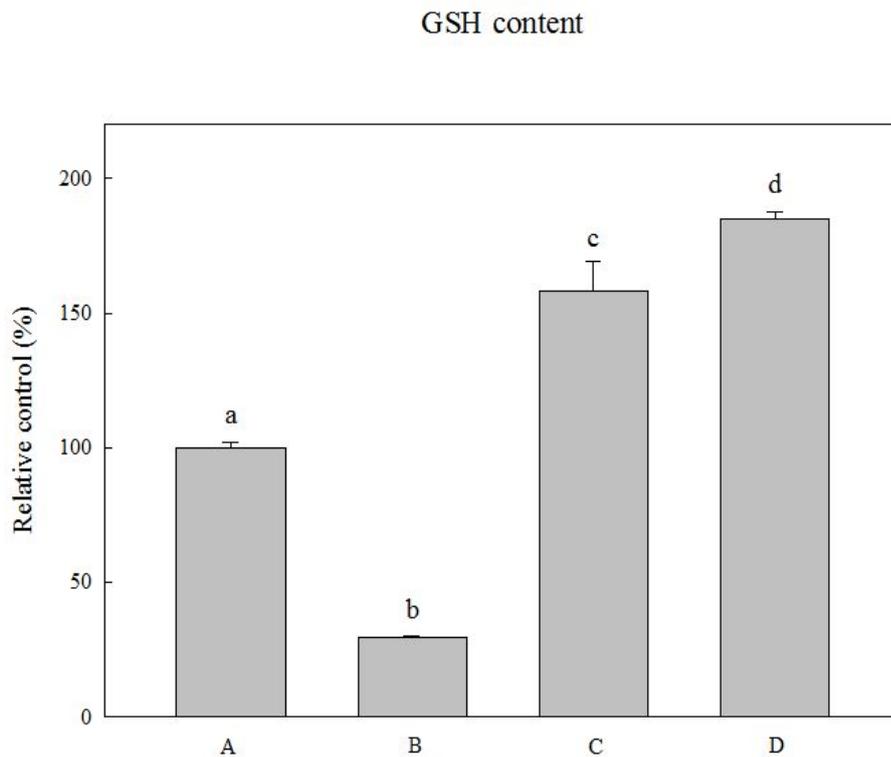


Fig. 15. Effects of PLE-I and PLE-III on formation of *t*-BHP-induced glutathione levels in HepG2 cells.

A, negative control; B, *t*-BHP (0.3mM); C, *t*-BHP with PLE-I; D, *t*-BHP with PLE-III.

Values are expressed as mean±SD (n=3).

Different letters indicate signification difference (p < 0.05)

### 3. 고기능성 들깨잎의 *in vivo* 간 보호 활성 측정

#### 가. 동물모델을 이용한 고기능성 들깨잎의 간 보호 활성 측정

간은 인체에 있어서 가장 큰 장기 중 하나로서 생활하는데 필수조직이며, 다른 조직의 기능들을 전체적인 맥락에서 조화롭게 관리한다. 그리고 동원 가능한 에너지의 근원을 쉽게 저장, 제공하므로 영양소의 대사기능, 해독기능, 순환조절기능에 관여하고 있으며, 간의 화학적 잠재력과 빠른 재생력 등의 이유로 '화학 공장', '저장고', '침묵의 장기'라고도 한다.

간 손상의 원인으로는 알코올, 흡연 외에도 바이러스에 의한 감염, 독물 또는 약제에 의한 중독, 영양장애 및 순환장애에서 스트레스 같은 신변의 원인 등 여러 가지를 들 수 있다. 또한, 산화적 스트레스에 의한 반응성 유해 산소종(reactive oxygen species; ROS)의 생성은 간 섬유화, 신장염, 피부질환, 당뇨병 등의 여러 가지 질환의 원인이 될 수 있음. 특히 free radical( $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$ )은 분자상 산소가 활성산소로 변하여 다른 분자들과 반응하면서 생성되어 노화, 염증, 발암, 동맥경화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 불포화지방산이 풍부한 세포막은 생성된 free radical에 의해서 지질과산화의 표적이 되어 세포 소기관들이 정상적인 구조 및 기능을 잃게 되며, 국소적인 손상은 물론 알데하이드와 같은 지질과산화 분해산물이 생성 부위에서 멀리 떨어진 부위로 이동하여 세포손상을 일으키게 된다. 이러한 지질과산화를 일으키는 대표적인 물질인 *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP)를 투여 할 경우 간 세포에서 cytochrome P-450 효소에 의해 세포 구성물들을 산화시킬 수 있는 alkoxy free radical이나 peroxy free radical로 분해되며, 이러한 산물들이 DNA의 손상을 가져와 결국 세포를 죽이는 결과를 초래하여 간 세포의 산화적 손상을 일으키는 실험 모델로 흔히 사용되고 있다. 또한 *t*-BHP는 간 세포에서 malondialdehyde(MDA) 형성 등을 초래한다고 보고되었다. 이러한 free radical에 의한 생체의 산화적 손상은 항산화 효소와 vitamine A, vitamine C, vitamine E와 같은 비효소적 항산화 물질에 의해 어느 정도 방어된다. 특히 몇몇 천연물들은 지질과산화에 의한 손상을 효과적으로 보호함으로써 종양 및 노화의 예방에 있어서도 매우 중요한 역할을 수행함을 보여주고 있다.

따라서 본 연구에서는 고기능성 깻잎 추출물이 *t*-BHP에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 간기능 개선효과를 확인하기 위하여 간 손상시 유도되는 혈액학적 효소인 ALT, AST 그리고 LDH를 조사하고, 지질과산화 정도를 나타내는 MDA와 세포 내 항산화물질인 glutathione(GSH), 조직병리학적인 관찰을 통하여 간기능 개선효과를 알아보고자 한다.

## (1) 연구 목적

고기능성 들깨잎 추출물의 *in vitro*에서 검증된 간 보호 기능 활성을 동물 실험을 통한 *in vivo*에서 재검증하여, 고기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 기능효과를 검증한다.

## (2) 연구 방법<sup>20)~26)</sup>

### (가) 실험 동물

실험 동물은 체중 200g 정도되는 7주령 Sprague-Dawley Rat 수컷을 (주)샘타고로부터 분양받아 일주일간 적응 사육시킨 후 체중에 따른 난괴법에 의하여 각 군당 7마리씩 4군으로 나누어 총 1주 동안 사육하였다. 동물사육실의 온도는 20~22°C, 습도 50%, 채광은 12시간 명암 조명(07:00~19:00)을 유지하였으며, 물과 식이는 자유급식을 시켰으며, 체중과 식이섭취량은 총 4회 측정하였다.

### (나) *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP)에 의한 간 독성 유발 및 동물처리

본 실험은 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)에 의해 유도된 랫드의 간 독성에 대한 고기능성 들깨잎의 보호효과를 살펴보기 위해 진행하였다. 즉, 산화스트레스를 유발하는 *t*-BHP의 간보호 효과를 조사하기 위해 1일 1회 5일간 일정시간에 경구 투여법으로 일반 들깨잎 추출물과 고기능성 들깨잎 추출물을 1000 mg/kg b.w. 투여한 후, 마지막 날 0.5 mmol/kg b.w. *t*-BHP를 복강 주사하여 급성 간 독성을 유발하였다. 대조군은 *t*-BHP 대신 생리식염수를 복강 주사하였음. 복강 주사한지 18시간 후, 에테르로 마취시켜 혈액 생화학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였고, 간은 생리식염수로 닦은 후 무게를 재고 조직학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 간 조직은 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동 후 -70°C에 저장하였다. 채취한 혈액은 3000 rpm, 4°C, 15 분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 장기와 혈청시료는 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

### (다) 혈청 생화학적 수치 검사

혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈청만을 모아 효소 활성을 측정한다. 효소 활성도 측정은 Bayer(USA)사의 AST reagent kit, ALT reagent kit, LDH reagent kit을 ADVIA(Japan) 분석기를 사용하여 혈청에서 측정하였다.

### (라) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

Hematoxylin & Eosin staining을 일반 염색이라 부르며, 가장 기본적인 조직 진단법으로서 사용되었다. 병리학적 영향을 측정하기 위하여 채취된 간을 10% 포르말린을 이용하여 고정 후, 24시간 동안 탈수 과정을 거쳐 조직을 투명화하여 paraffin을 침투하여 포매한다. 완성된 블록은 5  $\mu$ m로 절편을 만들어 슬라이드에 도말, 건조한 후, xylene으로 paraffin을 제거한다. Hematoxylin은 염염기성이므로 핵산에 결합하여 핵을 자주색으로 염색, Eosin은 약산성이므로 염기성을 가진 단백질에 결합하여 세포질을 분홍색으로 대조 염색한다. 질병에 의해 일어난 조직의 변화는 광학 현미경으로 검사하였다.

### (다) 혈청 생화학적 수치 검사

*t*-BHP에 노출이 되면 생체메커니즘에 의해 산화반응이 일어나 그렇지 않은 정상군에 비해 많은 지질과산화물을 생성하게 되고, 이렇게 생성된 지질과산화물은 다시 생체메커니즘에 관여하여 많은 산화생성물을 생성하여 생명체에 나쁜 영향을 주게 된다.

TBARs 측정은 외부의 산화 스트레스에 의해 생성되는 carbonyl 화합물 중 malonaldehyde (MDA)의 생성에 근거를 둔 것으로서 MDA는 두 분자의 TBA와 한 분자의 MDA가 반응하여 적자색의 복합체를 형성하는 것을 측정하는 방법이다.

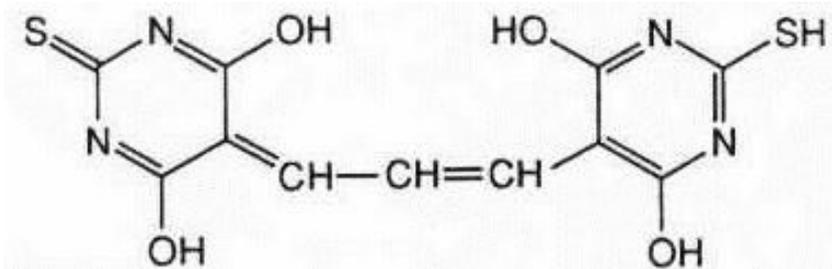


Fig. 16. Structure of TBA-MDA complex

간 조직을 homogenizer를 이용하여 1.15 M KCl buffer에서 잘 마쇄 한 다음, 그 상등액 0.5 mL에 trichloroacetic acid (TCA) buffer 0.5 mL을 첨가하여 상등액과 배양액을 합쳐서 95°C 수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식혀서 n-butanol을 넣고 격렬히 흔든다. 원심분리 (800 rpm, 10 min) 후 상층액은 excitation 515 nm와 emission 552 nm에서 형광분석기를 이용하여 측정한다. thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도 (pmol/mg protein)로 표기한다.

### (다) 조직 내 glutathione 함량 측정

glutathione (GSH)은 매우 작은 단백질 펩타이드로 세포내에서 자연적으로 생성된다. 이는 글루타메이트, 글리신, 시스테인의 세가지 아미노산이 결합한 하나의 트리펩타이드로 세포 내 항산화 물질로 세포의 생존에 필수적인 물질이다. 특히 간 세포내의 GSH는 ROS에 의한 산화 스트레스로부터 간 세포를 보호하는 역할을 하여 그 중요성이 매우 큰 것으로 알려져 있다.

적출한 간 조직 100 mg을 1 mL의 50 mM N-Ethylmaleimide (NEM)을 혼합한 후 ultra sonicator를 이용하여 균질화 한다. 균질화된 용액에 perchloric acid (PCA)를 5%의 농도로 첨가하고 1000 rpm, 4°C에서 원심분리를 실시한다. 상등액을 1 mL의 0.01 M iodoacetic acid (IAA) 100  $\mu$ L를 첨가한 후,  $\text{NaHCO}_3$ 을 이용하여 중성화 한다. 그 후, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB)을 이용하여 유도체화하여 HPLC를 이용하여 glutathione 함량을 측정한다.

### (3) 연구 결과

#### (가) 실험 기간 중 몸무게의 변화와 식이 섭취량

몸무게, 식이량 그리고 음수량의 각 그룹 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 실험 기간 중 몸무게는 모든 그룹에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 각 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 식이량과 음수량 또한 5일간 각 실험군의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

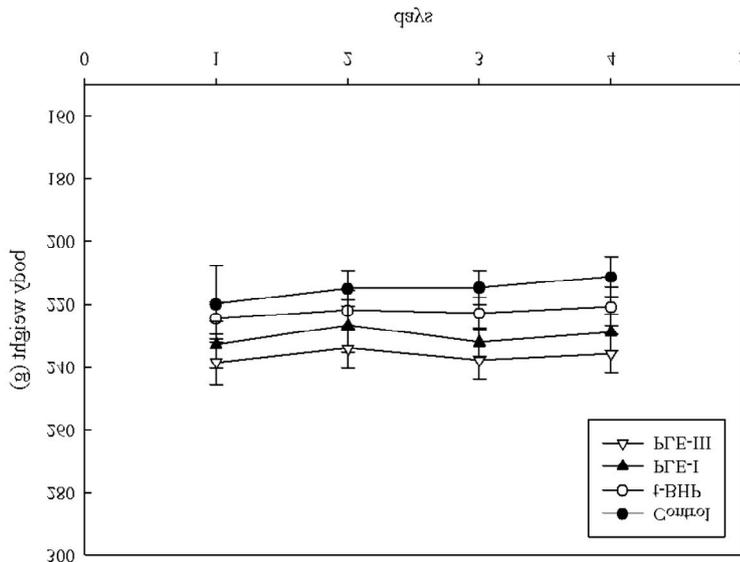


Fig. 17. Change in body weight of S.D. rat during treatment with PLE for 5 days values are presented as means  $\pm$  SD of 7 S.D. rat

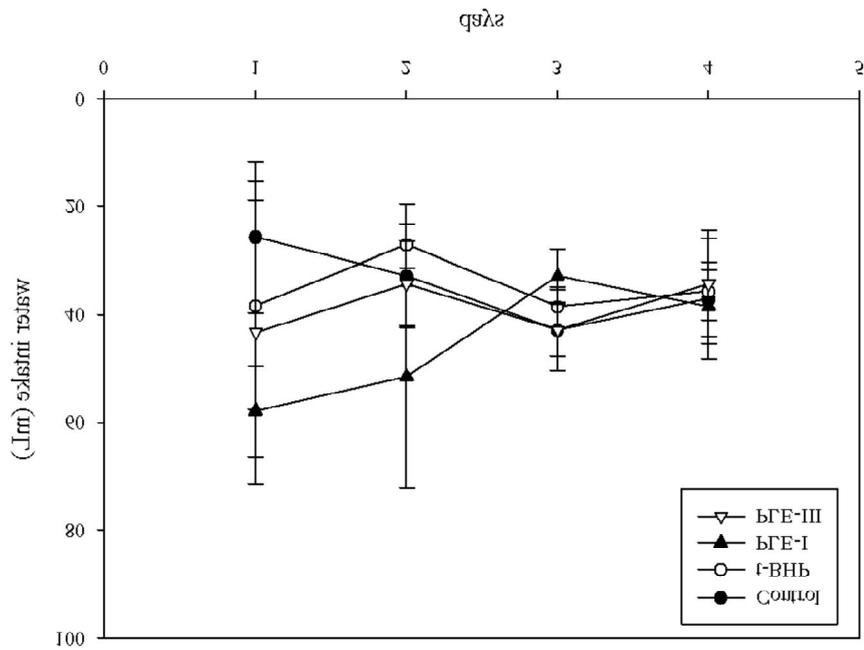


Fig. 18. Change in water intake of S.D. rat during treatment with PLE for 5 days

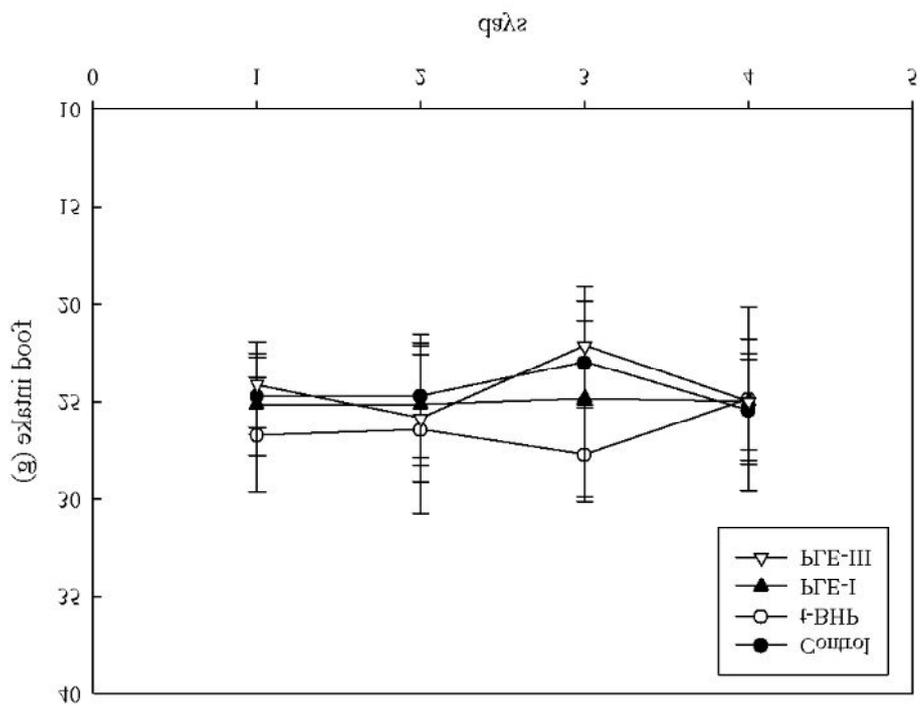


Fig. 19. Change in food intake of S.D. rat during treatment with PLE for 5 days

(나) 각 처리군에 따른 장기 무게

간이나 신장의 조직 무게 측정 결과 7 g 과 2 g 내외로 비슷한 무게를 보였으며, 위 결과를 토대로 그룹 간에 일반 깻잎 추출물과 고기능성 들깻잎 추출물의 투여에 의해 성장이나 발육에 영향을 미치지 않았음을 확인 할 수 있다.

Table 13. Organ weight of S.D. rat fed PLE.

Group	Liver (g)	Kidney (g)
Control	7.60 ± 0.37	2.02 ± 0.06
t-BHP (0.5mmol/kg b.w.)	7.19 ± 0.16	1.92 ± 0.07
PLE-I (1000mg/kg b.w.)	6.95 ± 0.22	1.92 ± 0.09
PLE-III (1000mg/kg b.w.)	7.21 ± 0.37	2.08 ± 0.12

(다) 혈청 생화학적 수치 검사

혈청 중 ALT (alanine aminotransferase)와 AST (aspirate aminotransferase)는 간세포 내에 있는 효소로 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행함에 따라 aminotransferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상의 지표로 사용되고 있다. LDH는 lactate dehydronase라는 당분해과정의 마지막 단계에 작용하는 효소로 이 LDH는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소임. 따라서 간이 손상될 경우 LDH 수치는 증가하게 된다.

혈청 중 ALT와 AST는 간세포 내에 있는 효소로 GPT (glutamic pyruvic transaminase)와 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)라고 한다. 이 효소들은 거의 모든 장기에 존재하며, 이 중 AST는 심장, 간, 골격, 혈구 내에 주로 존재하고, 80%가 세포 내의 미토콘드리아에 존재한다. 이에 비해 ALT는 주로 간에 분포하고 세포질에 존재한다. Fig. 21, 22에서 보는 바와 같이 ALT, AST 및 LDH는 t-BHP 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군에 비해 각각 60.6 (U/L), 304 (U/L)와 4442 (U/mL)로 약 1.9배, 2.5배 및 1.6배의 증가를 나타냈다. 일반 깻잎과 고기능성 깻잎 추출물 투여군은 1000 mg/kg 군에서 ALT 활성이 각각 36.0 (U/L)와 184.6 (U/L)으로, AST 활성이 각각 37.7 (U/L)와 140.0 (U/L)으로 나타났다. 또한 LDH의 경우 일반 깻잎과 고기능성 깻잎 추출물 투여군은 1000 mg/kg 군에서 활성이 각각 3540 (U/mL)와 1933 (U/mL)으로 t-BHP 투여군에 비해서 월등히 효소의 활성을 감소시키는 효과를 보여 t-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 일반 깻잎 추출물에

비하여 고기능성 깻잎 추출물에서 더 높은 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 나타났다.

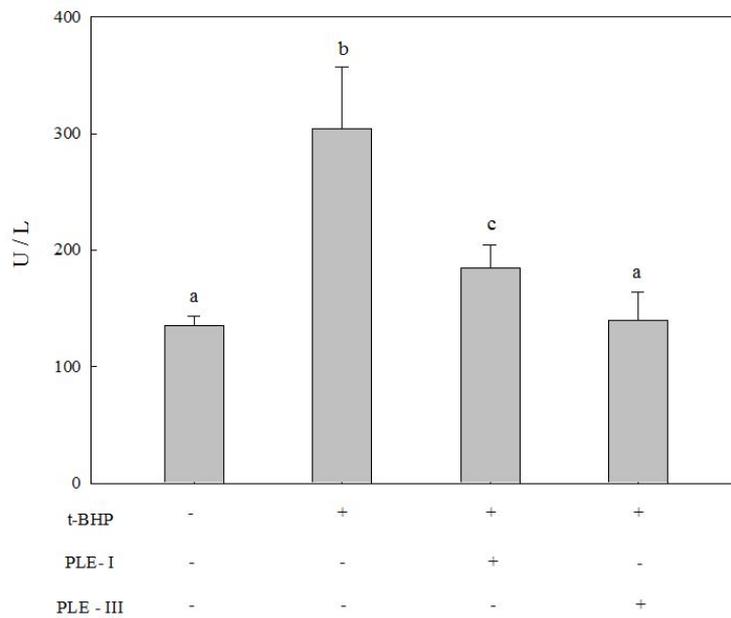


Fig. 20. Effect of PLE on serum enzymes aspartate aminotransferase (AST) activities.

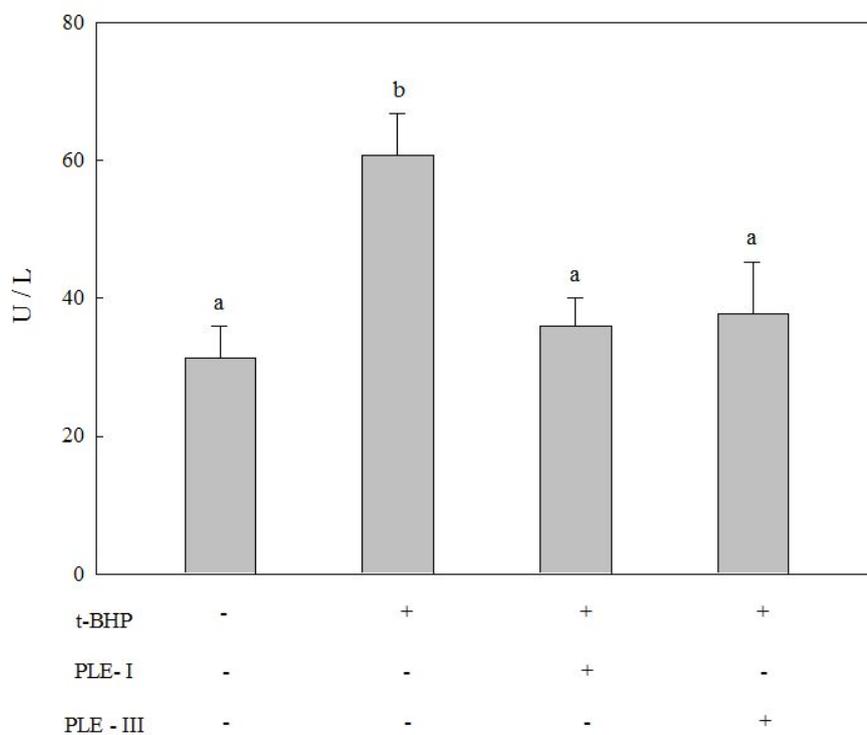


Fig. 21. Effect of PLE on serum enzymes alanine aminotransferase (ALT) activities.

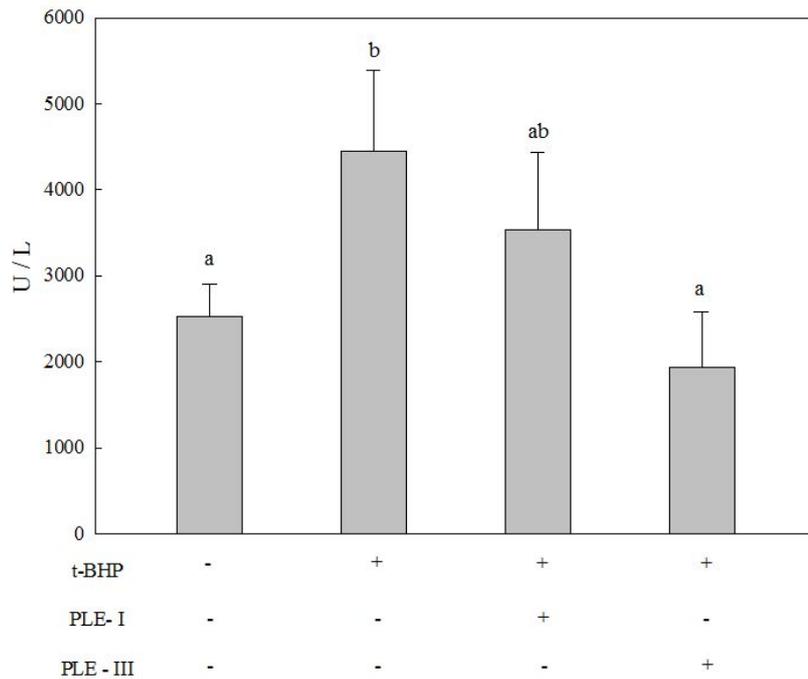


Fig. 22. Effect of PLE on serum enzymes lactate dehydrogenase (LDH) activities.

#### (라) 지질과산화의 억제활성 평가

이 실험은 세포막 손상 정도와 관련된 것으로 세포 내 ROS (reactive oxygen species)가 발생하면 인지질 막에 다량 함유되어 있는 불포화지방산 수소원자를 제거하게 된다. 이로서 지질과산화의 연쇄반응이 유발되고 지방산 사슬에서 peroxy radical과 alkoxy radical이 생성된다. 이것들은 수소원자와 결합하여 lipid hydroperoxide를 생성하는데 이는 분해되어 malondialdehyde (MDA) 등의 aldehyde를 생성하게 됨. 이렇게 생성된 지질과산화물은 세포막의 투과성을 증가시키고 체액의 손실을 일으켜 단백질 변화를 유발시킨다. 이로 인해 암이나 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병을 일으키게 된다. 본 실험에서는 TBARs 법에 의해 지질과산화의 생성지표인 malondialdehyde (MDA)를 측정하였다. TBARs 법에서는 thiobarbituric acid와 불포화지방산이 반응하여 malondialdehyde를 생성하며 이것은 붉은 빛을 띠게 된다. 이 붉은 빛을 띠는 물질을 excitation 515 nm/emission 552 nm에서 측정한다.

처리 그룹은 control과 *t*-BHP 만 처리한 그룹, 그리고 *t*-BHP와 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물 1000 mg/kg b.w. 을 투여한 그룹으로 나누었으며, *t*-BHP은 간 독성을 일으키는 물질로 간에 산화스트레스를 유발하여 간독성에 관여되어 있다.

실험 결과 *t*-BHP 만 처리한 그룹은 control 그룹보다 lipid peroxidation을 많이 일으켜 많은 MDA를 생성한 것을 나타내고 있지만, 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물을 투여한 그룹은 모두 MDA 생성을 감소시킨 것을 나타내고 있다. Fig. 23에서 보는 바와 같이 일반 깻

잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물을 투여한 그룹은 *t*-BHP를 처리한 그룹에 비하여 약 1.2배 및 1.5배 감소한 것으로 나타나 월등히 높은 MDA 생성을 줄여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있음을 나타냈다. 또한 일반 깻잎 추출물에 비하여 고기능성 깻잎 추출물에서 더 높은 MDA 생성을 줄여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 더 큼을 확인하였다.

### TBAR assay

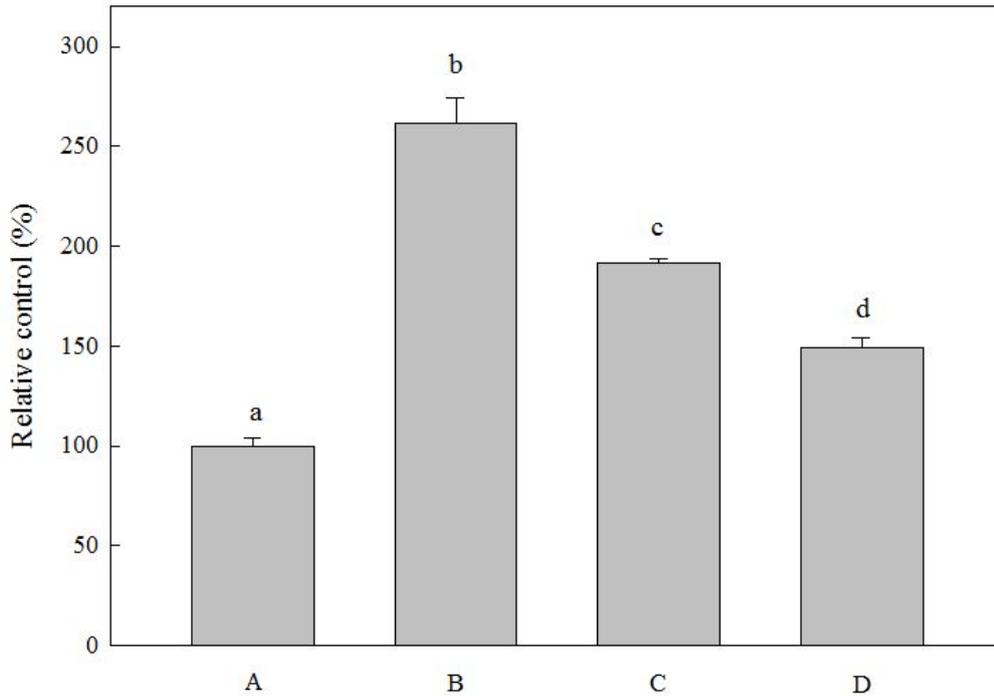


Fig. 23. Liver malondialdehyde levels in S.D. rats treated with PLE

#### (마) 조직 내 glutathione 함량 측정

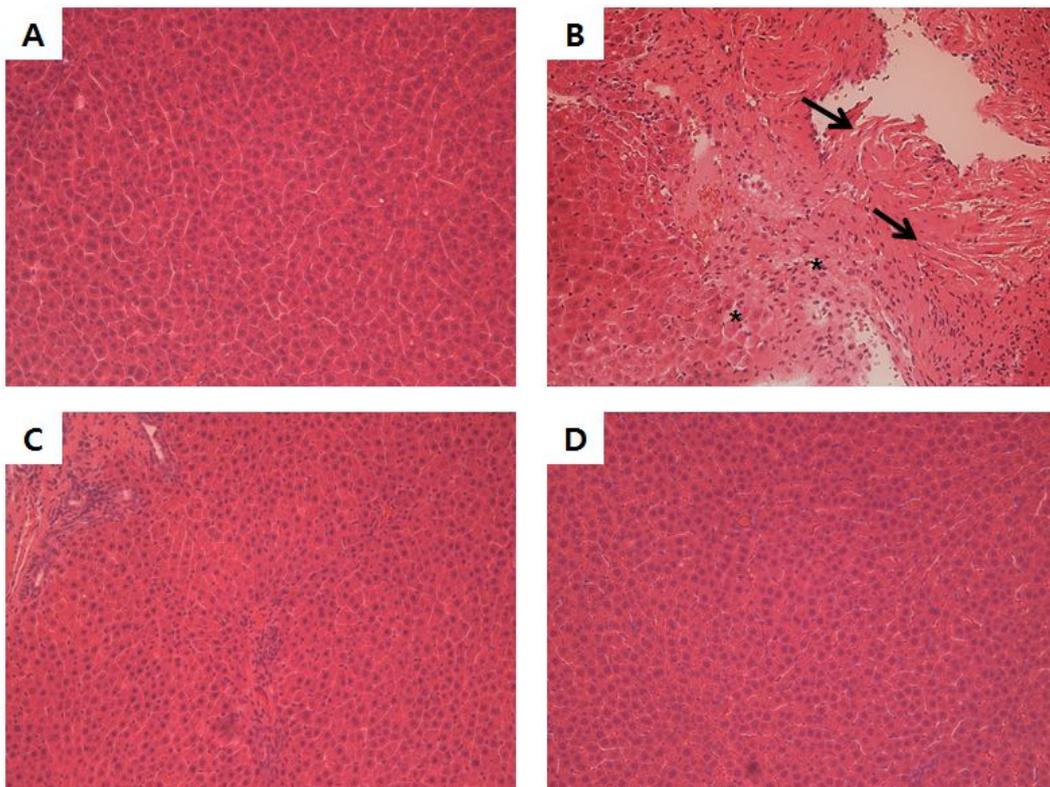
실험군은 대조군과 *t*-BHP 0.5 mmol/kg b.w. 처리군, 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물 1000 mg/kg/ b.w.과 *t*-BHP 0.5 mmol/kg b.w. 같이 처리한 실험군으로 나뉘어진다. *t*-BHP 0.5 mmol/kg b.w. 을 처리한 실험군은 대조군에 비하여 glutathione 함량이 약 75% 정도 수준으로 감소하는 것을 나타내지만, 일반 깻잎과 고기능성 깻잎 추출물 1000 mg/kg b.w. 을 *t*-BHP 0.5 mmol/kg b.w. 과 같이 처리하였을 때 대조군에 비하여 160%, 185% 정도 증가하는 결과를 나타냈다.

일반 깻잎과 고기능성 깻잎을 비교하였을 때 고기능성 깻잎 추출물의 경우 유의적인 차이를 나타내며 일반 깻잎 추출물에 비하여 높은 glutathione 함량을 나타냈으며, 이는 지질 과산화 결과와도 일치하는 경향을 나타냈다.

### (바) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

간의 조직학적 검경은 생체의 형태 및 기능의 변화를 확인하여 질병의 원인, 발병 기전, 형태적 변화 및 기능적 장애를 관찰하여 질병의 진단과 예후 판정을 하는 것이다. Fig. 24에서 보는 바와 같이 대조군(A)은 정상세포로서 핵이 뚜렷이 보이며 그 간격이 일정하고, 잘 짜여진 소엽구조를 관찰할 수 있으며, *t*-BHP 처리군(B)은 세포 괴사(화살표)와 세포간극이 넓어진 조직 이상(별표)이 관찰되었다. 일반 깻잎 추출물 투여군(C)과 고기능성 깻잎 추출물 투여군(D)은 대조군과 비교하였을 때 간세포의 necrosis 염증소견의 차이는 보이지 않아 *t*-BHP에 의한 간 손상을 회복되었음을 확인할 수 있다. 또한 조직병리학적으로는 일반 깻잎 추출물과 고기능성 깻잎 추출물의 차이는 크게 나타나지 않았다.

따라서 *in vivo* 수준의 결과를 보면 설탕물 6%을 이용하여 재배한 고기능성 깻잎의 경우 일반 깻잎에 비하여 혈액학적, 조직병리학적으로 산화스트레스에 대한 간 손상을 억제하는 효능이 뛰어남을 확인하였다.



**Fig. 24. Effect of PLE on *t*-BHP-induced liver damage**

A, Control (n=6); B, Rats treated with *t*-BHP (0.5mmol/kg) showed liver cell death (arrow) and several ballooning degeneration of hepatocytes (asterisk); C, Rats pretreated with 1000 mg/kg of PLE-I and then *t*-BHP; D, Rats pretreated with 1000mg/kg of PLE-III and then *t*-BHP. Hematoxylin/eosin staining; magnification x200.

#### 4. 고기능성 들깨잎의 로스팅 과정 후 기능성 효능 측정

##### 가. 고기능성 들깨잎의 차/시즈닝 로스팅 과정 후 항산화 활성 및 지표 성분 함량 측정

###### (1) 연구 목적

고기능성 들깨잎을 이용하여 차/시즈닝 제품 개발을 위한 로스팅 과정 후 기능성 들깨잎의 항산화 활성과 지표 성분인 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량을 측정하여 최적의 로스팅 조건을 선정하는데 그 목적이 있다.

###### (2) 연구 방법

###### (가) 시료의 로스팅 방법 및 조건

고기능성 들깨잎을 이용한 제품의 제작을 위해 로스팅 기계(Convection Oven MP29N)를 사용하였으며, 차/시즈닝에 따른 로스팅 조건은 다음과 같음. 들깨잎 시료는 6% 설탕물 처리를 통하여 재배한 남천과 보라 품종을 대상으로 실시하였다.

볶음 장치는 Convection Oven MP29N을 사용하여 미리 소정의 온도까지 상승시킨 오븐 내에 일정한 크기(1 cm<sup>2</sup>)로 절단된 시료를 넣고 실시하였다. 볶음이 완료된 시료를 즉시 오븐에서 꺼내어 송풍 냉각장치에 옮겨 실온까지 냉각시킨 다음 밀봉하고, 이를 각종 분석용 시료로 사용하였다.

Table 14. Levels of roasting conditions in experimental design for *perilla leaf* Tea.

Roasting conditions	Levels				
	-2	-1	0	1	2
Temperature(°C)	120	140	160	180	200
Time(min)	15	20	25	30	35

Table 15. Levels of roasting conditions in experimental design for *perilla leaf* seasoning.

Roasting conditions	Levels				
	-2	-1	0	1	2
Temperature(°C)	100	120	140	160	180
Time(min)	20	25	30	35	40

(나) 항산화 활성 및 caffeic acid와 rosmarinic acid 함량 측정

앞서 연구 방법에서 기술하였던 방법을 이용하여, 항산화 활성은 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, FRAP 환원력을 통하여 측정하였으며, caffeic acid와 rosmarinic acid 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였다.

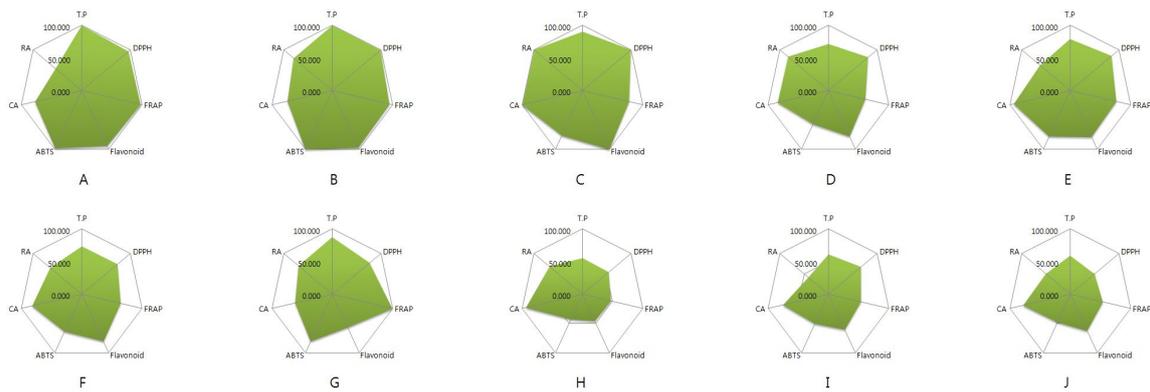
(2) 연구 결과

(가) 고기능성 깻잎 차 제품 개발을 위한 로스팅 과정 후 항산화 활성 측정

깻잎 로스팅은 다음과 같이 10개의 실험군으로 나뉘서 진행하였으며, 고기능성 깻잎인 남천(6% 설탕 처리)과 보라(6% 설탕 처리)를 이용하였다(Table 16). 남천을 사용하였을 때 항산화력 및 caffeic acid, rosmarinic acid 함량 변화를 방사형 그래프를 이용하여 전체 면적 대비 %로 나타냈다. 140℃, 30분간 로스팅한 실험군이 84.0%로 가장 높았으며, 120℃, 25분간 로스팅한 실험군이 35.5%로 가장 낮았다.

Table 16. Various condition of roasting for tea.

Exp.No.	Roasting conditions		Exp.No.	Roasting conditions	
	Temp.(℃)	Time(Min)		Temp.(℃)	Time(Min)
1	180(+1)	30(+1)	6	160(0)	25(0)
2	180(+1)	20(-1)	7	200(+2)	25(0)
3	140(-1)	30(+1)	8	120(-2)	25(0)
4	140(-1)	20(-1)	9	160(0)	35(+2)
5	160(0)	25(0)	10	160(0)	15(-2)

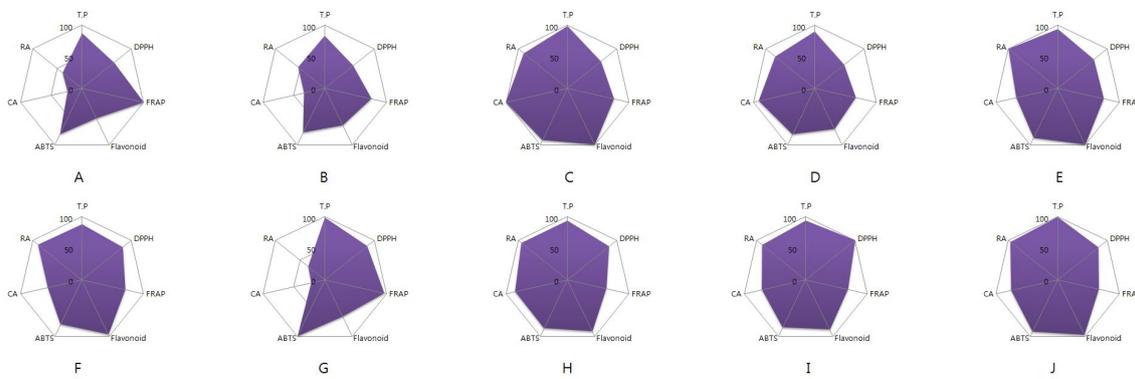


	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Area (%)	83.7	82.7	84.0	55.1	66.9	55.4	66.3	35.5	59.9	60.4

Fig. 25. Radar charts demonstrating characteristic features in the antioxidant properties of leaves of *perilla frutescens*(Namchun) after roasting process.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Scale expressed as the ratio when each value is compared with correspondingly maximum  
 A: 180°C, 30min; B: 180°C, 20min; C: 140°C, 30min; D: 140°C, 20min, E: 160°C, 25min; F: 160°C, 25min; G: 200°C, 25min; H: 120°C, 25min; I: 160°C, 35min; J: 160°C, 15min

같은 방법으로 보라 들깨를 로스팅하였을 때, 140°C, 30분간 로스팅한 실험군이 85.9%로 가장 높았으며, 180°C, 20분간 로스팅한 실험군이 48.0%로 가장 낮았다.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Area (%)	57.7	48.0	85.9	67.0	74.6	65.1	69.3	69.6	68.5	71.5

Fig. 26. Radar charts demonstrating characteristic features in the antioxidant properties of leaves of *perilla frutescens*(Bora) after roasting process.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Scale expressed as the ratio when each value is compared with correspondingly maximum  
 A: 180°C, 30min; B: 180°C, 20min; C: 140°C, 30min; D: 140°C, 20min, E: 160°C, 25min; F: 160°C, 25min; G: 200°C, 25min; H: 120°C, 25min; I: 160°C, 35min; J: 160°C, 15min

(나) 고기능성 깻잎 시즈닝 제품 개발을 위한 로스팅 과정 후 항산화 활성 측정

깻잎 시즈닝 제품 개발을 위한 로스팅 조건 설정 시 각 처리군에 따른 항산화력 및 caffeic acid, rosmarinic acid 함량의 변화를 측정하였다. 깻잎 차와 달리 시즈닝 제품은 직접 섭취하는 형태이므로 향미 성분의 변화를 줄이기 위해 로스팅 온도와 시간 조건을 변화하여 진행하였다.

Table 17. Various condition of roasting for seasoning.

Exp.No.	Roasting conditions		Exp.No.	Roasting conditions	
	Temp.(℃)	Time(Min)		Temp.(℃)	Time(Min)
1	160(+1)	35(+1)	6	140(0)	30(0)
2	160(+1)	25(-1)	7	140(+2)	30(0)
3	120(-1)	35(+1)	8	100(-2)	30(0)
4	120(-1)	25(-1)	9	140(0)	40(+2)
5	140(0)	30(0)	10	140(0)	20(-2)

시즈닝 제품 개발을 위한 로스팅 조건으로 납천 들깨를 사용하였을 때 항산화력 및 caffeic acid, rosmarinic acid 함량 변화를 방사형 그래프를 이용하여 전체 면적 대비 %로 나타냈다. 160℃, 35분간 로스팅 하였을 때 96.9%로 가장 높았으며, 100℃ 30분간 로스팅하였을 때 24.6%로 가장 낮았다.

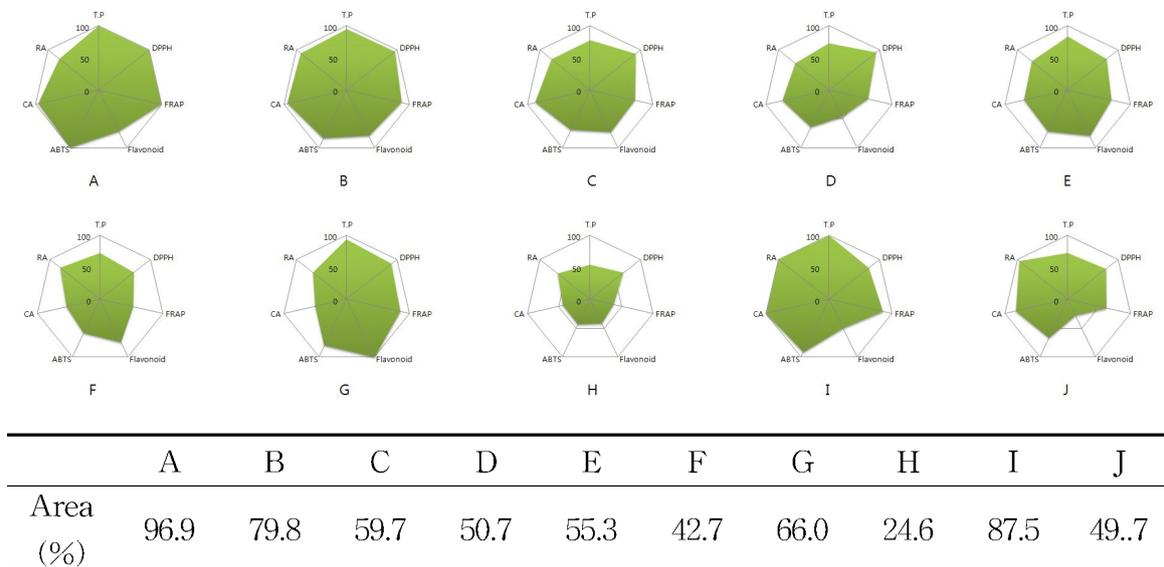


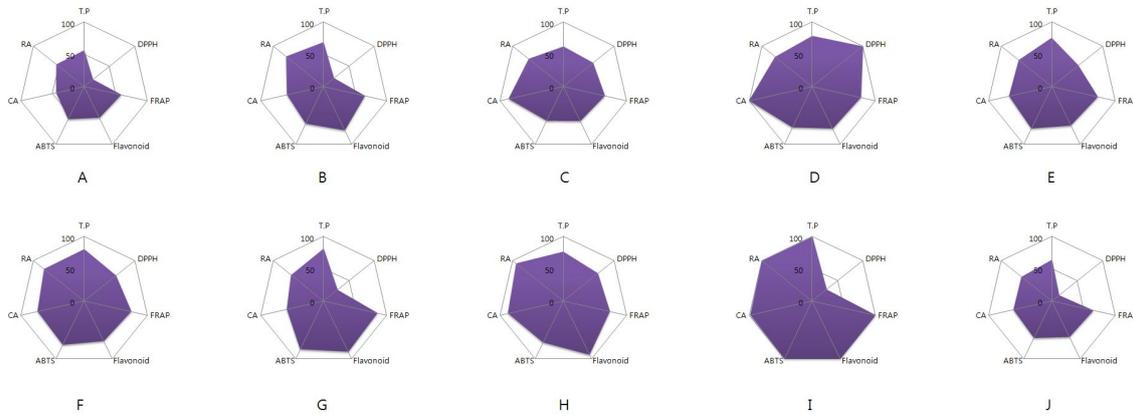
Fig. 27. Radar charts demonstrating characteristic features in the antioxidant properties of leaves of *perilla frutescens*(Namchun) after roasting process.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Scale expressed as the ratio when each value is compared with correspondingly maximum

A: 160℃ 35min; B: 160℃, 25min; C: 120℃, 35min; D: 120℃, 25min, E: 140℃, 30min;

F: 140℃, 30min; G: 180℃, 30min; H: 100℃, 30min; I: 140℃, 35min; J: 140℃, 20min

같은 방법으로 보라 들깨를 로스팅하였을 때, 140°C, 35분간 로스팅한 실험군이 98.0%로 가장 높았으며, 160°C, 35분간 로스팅한 실험군이 28.9%로 가장 낮았다.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Area (%)	28.9	44.7	46.2	67.8	51.0	57.6	59.7	68.6	98.0	40.7

**Fig. 28. Radar charts demonstrating characteristic features in the antioxidant properties of leaves of *perilla frutescens*(Bora) after roasting process.<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup> Scale expressed as the ratio when each value is compared with correspondingly maximum

A: 160°C 35min; B: 160°C, 25min; C: 120°C, 35min; D: 120°C, 25min, E: 140°C, 30min; F: 140°C, 30min; G: 180°C, 30min; H: 100°C, 30min; I: 140°C, 35min; J: 140°C, 20min

## 5. 고기능성 들깨잎 추출물의 일반 독성 시험

### 가. 고기능성 들깨잎 추출물의 단회 투여, 14일 반복 투여 일반 독성 시험

전 세계적으로 현대 의학을 보완하는 대체의학에서 대한 관심이 높아짐에 따라 부작용이 적은 천연물 소재의 의약 대체품들이 주목받고 있다. (Yokozawa et al) 천연물을 기원으로 하는 생약은 기존에 한방에서 질병 치료제나 보약의 처방으로 널리 사용되어 왔으나, 최근에 들어서는 각종 기능성 식품, 기능성 화장품 등의 소재로 다양하게 개발되고 있다. 이러한 천연 식물들의 우수한 기능성 때문에 의약품이나 기능성 식품으로서의 이용 가치가 점차 증가하고 있으나, 이에 대한 안전성 평가 자료가 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 생강나무 추출물에 대하여 전임상 수준의 안전성 평가 실험의 일환으로 급성독성과 반복 투여 시 발현 될 수 있는 독성을 질적, 양적으로 평가한다.

#### (1) 연구 목적

전임상 수준으로 랫드에 있어서 고기능성 들깨잎 추출물의 단회 경구투여에 의한 급성 독성의 정보를 얻기 위하여 실시한다.

#### (2) 연구 방법<sup>27)~29)</sup>

##### (가) 시험물질

동결 건조된 고기능성 들깨잎을 분쇄하여 열수를 이용하여 3시간 동안 환류 냉각 추출 후, 추출물은 원심분리(7000 rpm, 30 min, 4 °C) 한 후 재차 상등액을 whatman No. 42로 여과하였다. Filtering된 상등액을 동결건조를 하여 열수 추출물 분말을 얻었고 추출물은 차광 상태로 냉장 보관하여 사용하였으며, 각 투여군의 농도에 따라 멸균 정제수에 현탁하여 사용하였다.

##### (나) 랫드를 이용한 독성시험

본 시험은 의약품 등의 독성 시험 기준과 비임상시험 관리기준을 참조하였다.

#### ① 시험 동물 및 사육환경

본 시험에서는 샘타코(주)로부터 구입한 6주령의 Spargue-Dawley rat를 사용하였다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것 중 체중이  $180 \pm 5$  g의 것을 시험에 공시한다. 실험동물은 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기회수 10~20회/hr, 조명 시간 12시간(08:00 점등~20:00소등), 조도 150~300 Lux로 설정된 환경에서 사육한다. 사료와 물은

자유롭게 섭취하도록 하고, 매일 일정한 시간에 각각의 섭취량을 측정한다.

## ② 단회투여 용량설정

본 시험에서는 식약청 고시에 명시된 최고 농도인 2000 mg/kg b.w. 용량을 고농도로 500 mg/kg b.w.를 저농도 시험물질 투여군으로 하여 한계 용량군을 설정하였으며, 주사용 멸균 증류수를 투여하는 부정대조군을 두어 시험을 실시하였다.

## ③ 14일 반복투여 독성시험

단회 투여 독성 시험에서 아무런 독성 소견이 관찰되지 않는 농도인 2000 mg/kg b.w.를 고용량으로 하고, 1000 mg/kg b.w.를 저용량으로 투여하였다. 대조군은 용매인 주사용 멸균 증류수만을 투여한다. 각 군당 암수 5마리를 시험에 사용한다.

## ④ 투여방법 및 투여기간

시험 물질은 임상적용경로를 따라 경구투여하며, 투여기간은 단회투여 독성 시험의 경우 시험 물질을 시험 개시 시 투여 전에 하룻밤 절식시킨 후 주사기를 사용하여 1회 투여 후 2주간 임상증상을 관찰하게 되며, 14일 반복투여 독성 시험의 경우 시험 물질을 1일 1회 14일 동안 주사로 경구투여 한다. 각 개체가 해당하는 군의 투여 당일 체중 평균을 기준으로 그 군에 해당하는 용량에 맞게 멸균증류수에 시험물질을 용해시켜 경구투여 한다.

## ⑤ 일반증상 및 사망동물의 관찰

단회투여 독성시험의 경우 투여당일은 8시간까지 매시간 일반증상을 관찰하고, 투여 다음날 부터는 매일 1회씩 일반 증상의 변화, 독성 증상, 운동성, 외관 및 사망동물의 유무를 주의 깊게 관찰한다. 14일 반복투여 독성시험의 경우 시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 2회 일정한 시간에 일반 증상의 변화, 독성증상, 빈사 및 사망 유무를 관찰한다.

## ⑥ 체중측정

단회투여 독성 시험의 경우 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시 직전(1일)과 투여 후 2, 5, 8 및 15일째에 측정하였다. 14일 반복투여 독성시험의 경우 시험기간 중 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후 매일, 그리고 부검 직전까지의 체중을 측정한다.

## ⑦ 사료 및 음수 섭취량 측정

단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 실험 개시 후 매일 일정량의 사료와 음수를 오전 10시에 공급하고 익일 같은 시각에 잔량을 측정하여 기록한다.

### ⑧ 부검 및 장기중량 측정

단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 부검 전날 밤부터 절식시킨다. 이산화탄소로 마취시킨 다음, 복대정맥으로부터 채혈을 실시하고 방혈시켜 안락사를 시킨 후 육안으로 모든 장기를 관찰한다. 그 후 전 실험 동물에 대하여 흉선, 폐, 심장, 신장, 간, 비장, 고환, 난소의 중량을 측정한다.

### ⑨ 혈액학적 검사

단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 혈액학적 검사를 위해 계획, 도살 일에 복대정맥으로부터 채혈하여 EDTA-3K로 항응고 처리를 하고 자동혈구계산기를 이용하여 백혈구수(WBC, white blood cell count), 적혈구수(RBC, red blood cell count), 혈색소량(Hb, hemoglobin concentration), 헤마토크리트치(HCt, hematocrit), 평균적혈구용적(MCV, mean corpuscular volume), 평균적혈구혈색소농도(MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), 혈소판(PLT, platelet)을 측정한다.

### ⑩ 혈액생화학적 검사

단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 혈액생화학적 검사를 위해 계획 도살 일에 복대정맥으로부터 채취한 혈액의 일부를 30분간 4℃에 냉장보관 후 원심분리(2000 rpm, 20 min)하여 혈청을 분리한다. 분리한 혈청은 자동생화학분석기를 이용하여 총 단백질(T.P, total protein), 알부민(ALB, albumin), 포도당(GLU, glucose), 콜레스테롤(CHOL, total cholesterol), 총 빌리루빈(T.BIL, total bilirubin), glutamate pyruvatetransaminase(GPT), glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), alkaline phosphatase(ALP)를 측정한다.

### ⑪ 통계처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내며 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 하며, Duncan's multiple-range test로  $p < 0.05$ 의 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

(2) 연구 결과

(가) 단회 투여 독성시험

① 사망동물

사망동물은 시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 관찰되지 않았다.

Table 18. Mortality of Rats.

GROUP SUMMARY OF MORTALITY																
		DAYS ON TEST										MALE				
DOSE (mg/kg)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		DAYS ON TEST										FEMALE				
DOSE (mg/kg)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a = Number animals alive at the start of each study day

b = Number of mortalities during each study day

② 일반증상

시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 특이한 이상 증상은 관찰되지 않았다.

③ 체중변화

시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 체중의 이상변화는 관찰되지 않았다.

④ 부검소견

암수 모든 동물에서 시험물질 투여와 관련된 육안적으로 이상이 있는 소견은 관찰되지 않았다.

Table 19. Clinical Signs of Rats.

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE		MALE		
GROUP:	Control	PLE-III	PLE-III	
PERIOD DOSE(mg/kg)	0 mg/kg b.w.	500 mg/kg b.w.	2000 mg/kg b.w.	
DAY 1				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 2				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 3				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 4				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 5				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 6				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 7				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 8				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 9				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 10				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 11				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 12				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 13				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 14				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 15				
Normal	5/5	5/5	5/5	

Number of Animals with Sing/Total Number of Animals Observed

Table 19 (Continued). Clinical Signs of Rats.

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE		FEMALE		
GROUP:	Control	PLE-III	PLE-III	
PERIOD DOSE(mg/kg)	0 mg/kg b.w.	500 mg/kg b.w.	2000 mg/kg b.w.	
DAY 1				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 2				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 3				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 4				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 5				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 6				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 7				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 8				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 9				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 10				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 11				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 12				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 13				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 14				
Normal	5/5	5/5	5/5	
DAY 15				
Normal	5/5	5/5	5/5	

Number of Animals with Sing/Total Number of Animals Observed

**Table 20. Gross Findings of Rats.**

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS		MALE		
GROUP:	Control	PLE-III	PLE-III	
DOSE(mg/kg)	0 mg/kg b.w.	500 mg/kg b.w.	2000 mg/kg b.w.	
NUMBERS OF ANIMALS:	5	5	5	
Observed/No remarkable finding	5	5	5	
No. of Observations	5	5	5	
FEMALE				
GROUP:	Control	PLE-III	PLE-III	
DOSE(mg/kg)	0 mg/kg b.w.	500 mg/kg b.w.	2000 mg/kg b.w.	
NUMBERS OF ANIMALS:	5	5	5	
Observed/No remarkable finding	5	5	5	
No. of Observations	5	5	5	

**⑩ 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사**

대조군과 시험물질 투여군에서 시험물질 투여 후 혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서 유의할 만한 변화가 없었다.

**Table 21. Hematological values in SD rats orally administered with PLE-III for acute toxicity test.**

Parameter	Male dose (mg/kg)			Female dose (mg/kg)		
	0	500	2000	0	500	2000
WBC (10 <sup>3</sup> /uL)	4.0±1.0	4.0±0.7	4.7±1.5	3.6±0.7	3.2±0.6	5.5±2.2
RBC (10 <sup>6</sup> /uL)	8.0±0.3	7.8±0.4	8.0±0.5	8.7±0.8	7.4±0.2	7.9±0.2
Hb (g/dL)	16.6±0.5	16.2±0.5	16.4±1.0	17.6±1.8	14.8±0.3	15.2±0.7
Hct (%)	50.9±1.9	50.3±2.7	53.3±4.1	53.1±4.6	46.0±1.3	47.3±2.0
MCV (fL)	64.0±1.4	65.0±1.2	66.3±2.3	61.0±1.6	62.0±1.8	59.7±2.0
MCH (pg)	20.8±0.6	20.9±0.3	20.5±0.4	20.2±0.5	20.0±0.6	19.2±0.7
MCHC (g/dL)	32.5±0.4	32.2±0.9	30.9±0.6	33.0±0.6	32.2±0.3	32.1±0.8
PLT (10 <sup>3</sup> /uL)	1028.8±57.2	1286.5±315.2	1711.3±238.5	1243.5±175.1	1377.2±123.2	1576.0±169.4

**Table 22. Serum biochemical values in SD rats orally administered with PLE-III extract for acute toxicity test.**

Parameter	Male dose(mg/kg)			Female dos(mg/kg)		
	0	500	2000	0	500	2000
T.P (g/dL)	5.5±0.3	5.9±0.4	3.6±0.1	5.6±0.2	6.0±0.3	6.1±0.3
ALB (g/dL)	3.4±0.1	3.6±0.2	3.6±0.1	3.5±0.1	3.6±0.2	3.7±0.2
T.BIL (mg/dL)	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1
ALP (U/L)	218.8±15.3	172.2±21.5	199.0±23.3	138.4±28.3	142.0±13.9	155.6±24.2
AST (U/L)	181.8±23.5	144.2±28.0	167.2±44.4	174.0±43.9	133.8±26.4	119.6±18.5
ALT (U/L)	88.6±23.5	52.2±11.4	65.4±27.1	55.8±14.7	41.6±9.8	36.2±3.1
Creatinine (mg/dL)	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1
BUN (mg/dL)	32.9±13.3	14.9±2.3	15.5±3.2	23.7±2.2	18.2±1.0	18.7±1.3
T.CHOL (mg/dL)	41.8±12.3	66.0±10.8	65±13.4	49.0±5.8	66.0±6.0	61.6±12.3
LDL CHOL (mg/dL)	7.0±2.5	13.2±2.8	12.4±3.3	7.8±1.1	6.8±0.4	7.6±1.1
Triglycerid e (mg/dL)	14.2±2.4	27.8±6.8	36.2±11.0	28.0±5.0	29.8±5.4	28.6±4.0
Glucose (mg/dL)	100.0±19.3	126.4±27.4	113.4±34.3	87.2±12.9	101.8±15.2	120.8±32.9

(나) 14일 반복투여 독성시험

① 사망동물

사망동물은 시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 관찰되지 않았다.

Table 23. Mortality of Rats.

GROUP SUMMARY OF MORTALITY																
		DAYS ON TEST										MALE				
DOSE (mg/kg)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		DAYS ON TEST										FEMALE				
DOSE (mg/kg)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a = Number animals alive at the start of each study day

b = Number of mortalities during each study day

② 일반증상

모든 시험 기간 동안 사망개체는 발생하지 않았으며 유의할 만한 이상 증상도 관찰되지 않았다.

Table 24. Clinical Signs of Rats.

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE			MALE
GROUP: PERIOD DOSE(mg/kg)	CONTROL 0	PLE-III 1000 mg/kg b.w.	PLE-III 2000 mg/kg b.w.
DAY 1			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 2			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 3			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 4			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 5			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 6			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 7			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 8			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 9			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 10			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 11			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 12			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 13			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 14			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 15			
Normal	5/5	5/5	5/5

Number of Animals with Sing/Total Number of Animals Observed

Table 24 (Continued). Clinical Signs of Rats.

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE			FEMALE
GROUP: PERIOD DOSE(mg/kg)	CONTROL 0	PLE-III 1000 mg/kg b.w.	PLE-III 2000 mg/kg b.w.
DAY 1			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 2			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 3			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 4			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 5			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 6			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 7			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 8			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 9			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 10			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 11			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 12			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 13			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 14			
Normal	5/5	5/5	5/5
DAY 15			
Normal	5/5	5/5	5/5

Number of Animals with Sing/Total Number of Animals Observed

#### ④ 사료 및 음수 섭취량

시험기간 동안 각 군당 사료섭취량과 음수섭취량의 변화는 대조군 및 농도별 투여군에서 암수 모두 유의할만한 차이가 인정되지 않았다.

#### ⑤ 부검소견

부검결과 모든 생존 동물에서 본 시험물질 투여와 관련된 어떠한 육안병변도 관찰되지 않았다. 또한 장기무게를 측정해 본 결과 시험물질과 관련하여 어떠한 무게의 증감도 관찰되지 않았다.

Table 25. Organ weights in SD rats treated with PLE-III for 14-day repeated toxicity test.

Organs	Male(mg/kg)			Female(mg/kg)		
	0	1000	2000	0	1000	2000
Thymus	0.59±0.06	0.53±0.08	0.54±0.19	0.46±0.04	0.47±0.09	0.54±0.05
Lung	1.32±0.13	1.34±0.10	1.34±0.10	1.11±0.15	1.10±0.06	1.15±0.07
Heart	1.24±0.21	1.09±0.09	1.09±0.09	0.79±0.06	0.85±0.06	0.80±0.06
Kidney	2.36±0.23	2.36±0.06	2.44±0.29	1.66±0.15	1.59±0.09	1.60±0.01
Liver	9.43±1.05	8.71±0.77	8.90±0.93	5.94±0.33	5.96±0.40	6.43±0.84
Spleen	0.72±0.02	0.66±0.11	0.68±0.09	0.55±0.06	0.55±0.03	0.59±0.06
Testis/Ovary	3.24±0.25	3.28±0.23	3.28±0.35	0.15±0.04	0.15±0.05	0.12±0.02

Values are presented as means ± S.D. for 5 rats.

⑥ 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사

대조군과 시험물질 투여군에서 시험물질 투여 후 혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서 유의할 만한 변화가 없었다.

Table 26. Hematological values in SD rats orally administered with PLE-III for acute toxicity test.

Parameter	Male dose (mg/kg)			Female dose (mg/kg)		
	0	1000	2000	0	1000	2000
WBC (10 <sup>3</sup> /uL)	5.5±2.3	3.6±1.4	4.7±1.9	3.1±1.2	1.5±0.4	1.9±0.9
RBC (10 <sup>6</sup> /uL)	7.7±0.3	7.7±0.1	7.4±0.3	7.6±0.6	7.3±0.1	7.4±0.1
Hb (g/dL)	15.1±0.5	15.3±0.3	14.5±0.8	15.4±1.1	15.2±0.5	14.9±0.5
Hct (%)	47.8±2.1	48.5±1.7	46.0±2.5	47.2±3.7	46.1±0.9	45.3±1.2
MCV (fL)	62.0±2.1	62.7±1.4	62.1±1.2	61.7±1.7	62.8±0.8	60.9±1.4
MCH (pg)	19.5±0.6	19.8±0.2	19.6±0.4	20.1±0.4	20.7±1.0	20.0±0.6
MCHC (g/dL)	31.6±0.2	31.5±0.5	31.6±0.3	32.6±0.4	33.0±1.7	32.8±0.5
PLT (10 <sup>3</sup> /uL)	1269±169	1055±220	1281±211	1144±109	1087±326	1262±96

**Table 27. Serum biochemical values in SD rats orally administered with PLE-III extract for acute toxicity test.**

Parameter	Male dose(mg/kg)			Female dos(mg/kg)		
	0	1000	2000	0	1000	2000
T.P (g/dL)	5.7±0.16	6.0±0.15	5.8±0.11	5.8±0.26	6.0±0.13	6.1±0.12
ALB (g/dL)	3.9±0.13	4.2±0.15	4.0±0.14	4.1±0.18	4.3±0.12	4.2±0.15
T.BIL (mg/dL)	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1
ALP (U/L)	126±29	141±13	152±35	100±13	124±32	102±13
AST (U/L)	170±54	148±11	165±11	155±20	141±20	131±28
ALT (U/L)	27±1.3	33±6.4	28±5.1	23±4.8	22±3.7	25±4.3
Creatinine (mg/dL)	0.4±0.07	0.4±0.04	0.4±0.07	0.3±0.08	0.4±0.01	0.4±0.01
BUN (mg/dL)	17±1.1	16±1.5	15±2.9	16±1.3	16±2.1	17±2.4
T.CHOL (mg/dL)	66±2.6	76±9.8	66±3.1	52±7.7	73±15.4	84±13.8
LDL CHOL (mg/dL)	10±1.6	15±3.1	11±2.1	5.6±0.8	9.4±2.8	10.4±4.5
Triglyceride (mg/dL)	34±7.8	40±9.7	31±5.6	26±4.8	28±4.8	26±4.2
Glucose (mg/dL)	102±18	82±15	86±14	59±10	66±10	53±8

## 6. 고기능성 들깨잎 추출물의 화장품 개발 연구

### 가. 고기능성 들깨잎 추출물 피부 미백 활성 측정

#### (1) 연구 목적

고기능성 들깨잎의 피부 미백 효과를 확인하여 미백 기능성 화장품 제품 개발을 위한 가능성을 확인한다.

#### (2) 연구 방법

##### (가) tyrosinase activity inhibition assay - cell free system

96 well plate에 0.1 M Tris-HCl (pH 6.5) 220  $\mu$ l와 농도별로 조제한 고기능성 들깨잎 추출물 용액 20  $\mu$ l, 그리고 2,000 U/ml tyrosinase용액 20  $\mu$ l를 순서대로 넣고 이 용액에 1.5 mM tyrosine 용액 40  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 10분 동안 방치시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시료액으로 0.1 M PBS (pH 6.5) 20  $\mu$ l를 넣어 실험하였으며, 대조군으로는 kojic acid를 처리한 군을 사용하였다. 미백능이 있는 시료와 tyrosinase가 있을 경우 시료가 tyrosinase의 활성을 저해하여 기질인 L-dopa와 만났을 때 Dopachrome을 만들지 못하게 하는 원리를 이용한다.<sup>30)</sup>

##### (나) 멜라닌 세포 배양

B16 melanoma F10 cell은 10% fetal bovine serum 과 penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 IU/ml 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 용액에서 37°C, 0.5% CO<sub>2</sub> 조건의 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

##### (다) 세포 생존률 측정

B16 melanoma F10 cell을 24well에 well 당  $1 \times 10^4$  cell씩 분주하였다. 20시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 고기능성 들깨잎 추출물 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu$ g/mL을 각 well에 1 ml씩 분주하였다. 72시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 MTT 용액을 넣고, 다시 4시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고, DMSO로 cell을 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage(%)로 표기하였다.<sup>15)</sup>

### (라) Tyrosinase activity inhibition assay - *in vitro* (cell system)

B16 melanoma F10 cell 을 6-well에 well당  $10^5$  cells씩 분주하였다. 20 시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 고기능성 들깨잎 추출물 125, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 각 well에 1 ml씩 분주하였다. 72 시간 동안  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양한 후 배지를 걷어내고 PBS 2 ml로 2 회 세척한 후 1 M tris-HCl 이 포함된 lysis buffer를 이용하여 cell을 lysis 시키고  $\times 10,000$  g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액의 protein 량을 측정하고 농도는 lysis buffer로 맞춰준다. 상층액 90  $\mu\text{l}$ 와 10 mM dihydroxyphenylalanine(DOPA) 용액 10  $\mu\text{l}$  를 섞어 37  $^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 방치 시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## (2) 연구 결과

### (가) tyrosinase activity inhibition assay - cell free system

Cell free system을 이용하여 tyrosinase activity inhibition을 측정한 결과 고기능성 들깨잎 추출물의 경우 tyrosinase activity를 억제하는 활성은 나타나지 않았다. tyrosinase activity 억제가 뛰어난 것으로 알려진 kojic acid를 이용하였을 때 125, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 80%, 90%, 95% 의 tyrosinase activity 억제 활성을 나타냈지만, 고기능성 들깨잎 추출물을 동일 농도로 처리하였을 때 tyrosinase activity는 100% 이상으로 활성화되는 것을 확인할 수 있다. 세포가 존재하지 않은 상태의 실험 결과로 보았을 때, 피부 미백 활성과 밀접한 관계가 있는 tyrosinase activity 억제 활성은 고기능성 들깨잎 추출물에서 나타나지 않았다.

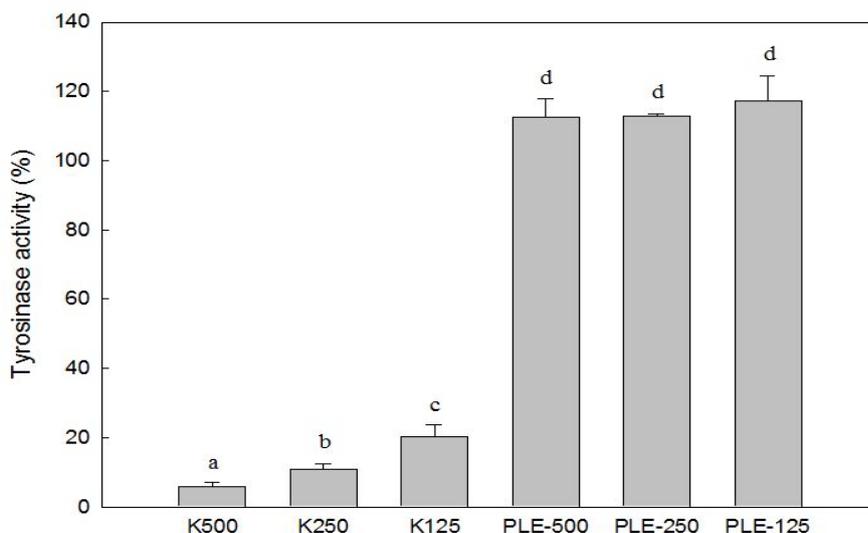


Fig. 29. Tyrosinase inhibitory activity of PLE-III

(나) 세포 생존률 측정

고기능성 들깨잎 추출물의 세포 독성은 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상에서 독성이 나타났다. (Fig. 30). 그 이하의 농도에서는 모두 80% 이상의 세포생존률을 나타내며 세포 독성이 없음을 확인하였다. 이 후의 세포를 이용한 tyrosinase activity 는 세포 독성이 나타나지 않은 농도 범위인 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 실시하였다.

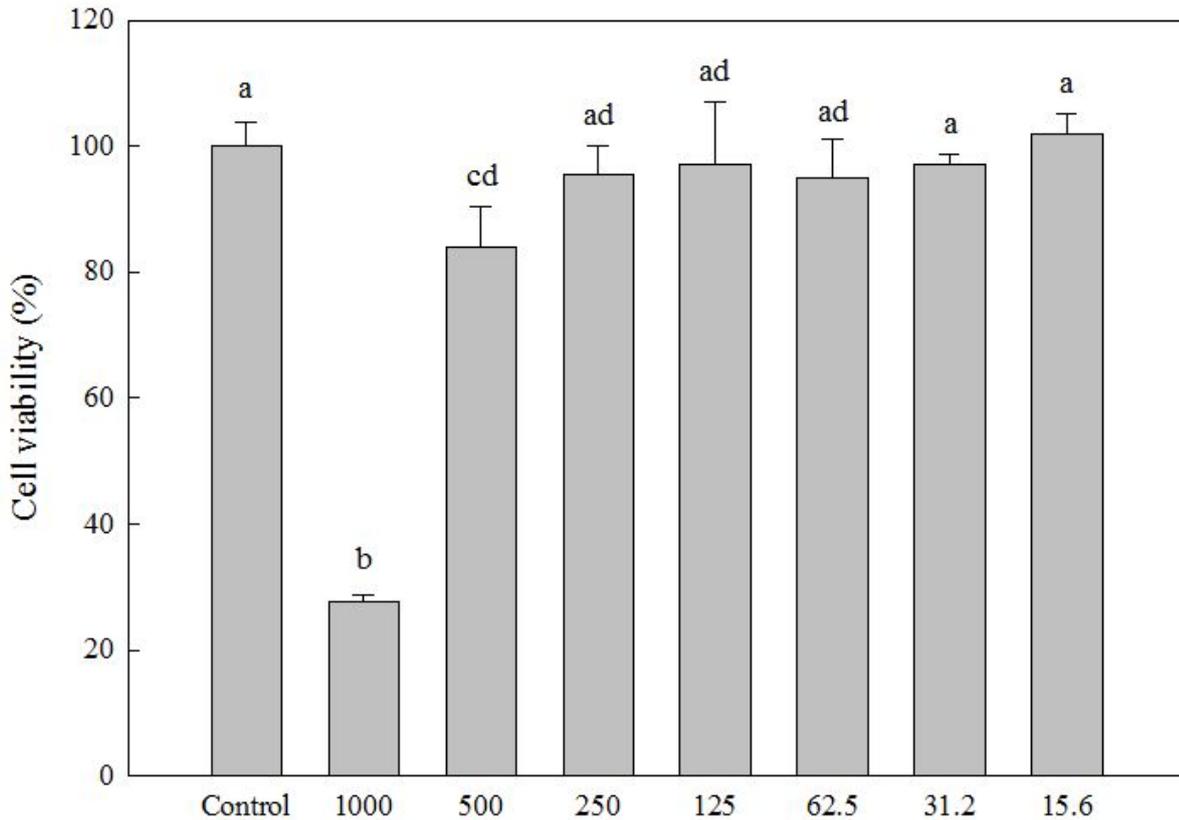


Fig. 30. Cell viability of PLE-III for 72 hr on B16 melanoma F10 cells

(다) Tyrosinase activity inhibition assay - *in vitro* (cell system)

Cell free system을 이용하여 tyrosinase activity inhibition을 측정한 결과 고기능성 들깨잎 추출물의 경우 tyrosinase activity를 억제하는 활성은 나타나지 않았다. 따라서 B16 melanoma F10 세포주를 이용하여 tyrosinase activity 억제능을 다시 한번 확인하고자 실험을 진행하였다. tyrosinase activity 억제능이 뛰어난 것으로 알려진 kojic acid를 이용하였을 때 kojic acid의 세포 독성 때문에 20, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하였다. 이 때 tyrosinase activity 억제 활성이 12%, 22%로 나타났지만, 고기능성 들깨잎 추출물을 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 처리하였을 때

tyrosinase activity는 100% 이상으로 활성화되는 것을 확인할 수 있다. 세포가 존재하지 않은 상태의 실험 결과와 마찬가지로 피부 미백 활성화와 밀접한 관계가 있는 tyrosinase activity 억제 활성화는 고기능성 들깨잎 추출물에서 나타나지 않았다.

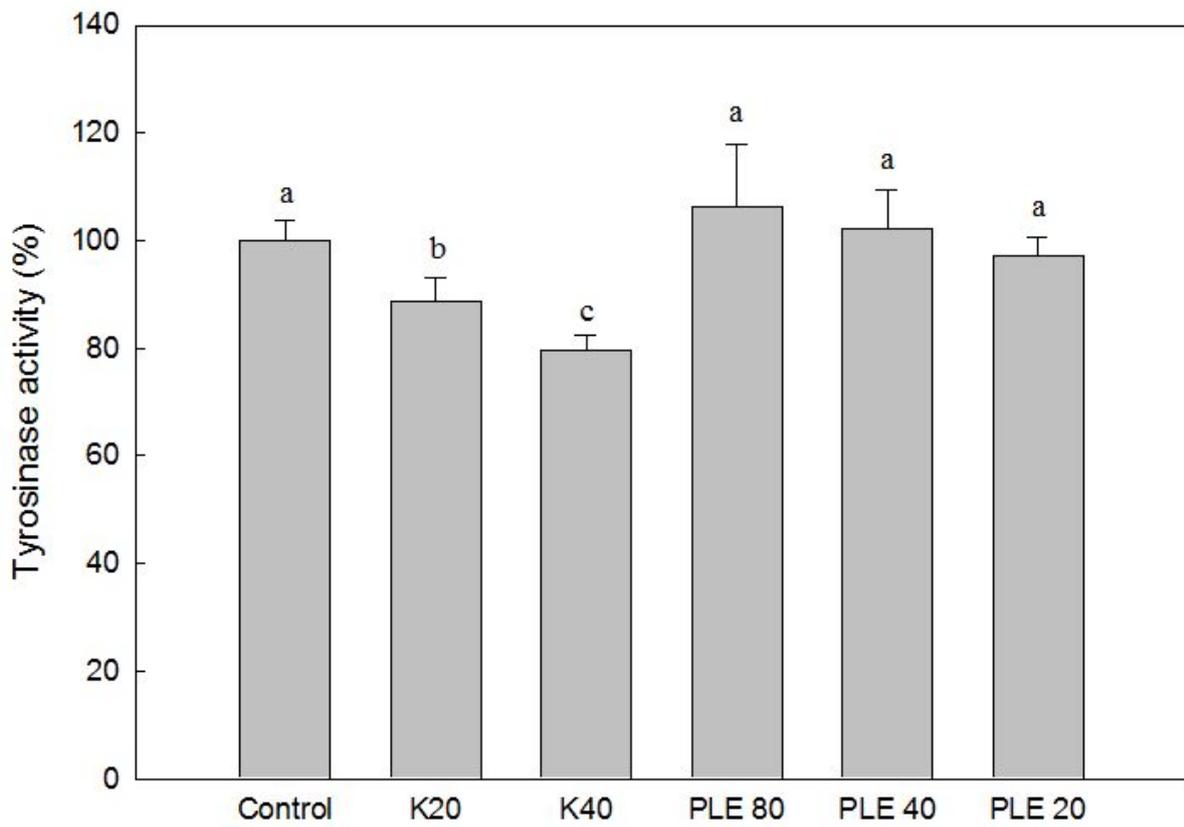


Fig. 31. Tyrosinase inhibitory activity of PLE-III on B16 melanoma F10 cells

## 7. 고기능성 들깨잎의 로스팅 후 벤조피렌 생성 확인

### 가. 고기능성 들깨잎의 로스팅 후 벤조피렌 검출 시험

#### (1) 연구 목적

고기능성 들깨잎의 차/시즈닝 제품화를 위한 로스팅 과정 후 식품 내 위해물질인 벤조피렌의 생성 여부를 확인하여 식품으로 개발하기 위한 안전성을 확인한다.

#### (2) 연구 방법

##### (가) 벤조피렌 검출 시험

벤조피렌 표준품을 이용하여 정량 곡선을 작성함. 벤조피렌의 검출은 널리 알려진 형광 측정 방법을 이용하여 excitation 395nm, emission 429nm 에서 측정하였으며, 벤조피렌 표준품은 stock solution 100 ppm을 0.2, 0.1, 0.05, 0.03 ppm으로 희석하여 사용하였다.

##### (나) 고기능성 깻잎 시료 제작

앞서 연구한 10가지 조건으로 로스팅 한 고기능성 깻잎 시료 1 g을 95°C, 50 mL의 증류수를 이용하여 10분간 용출시킨 후 filtering 하고 불순물이 제거된 시료를 형광 분석하여 벤조피렌 정량 곡선에 대입하여 벤조피렌 함량을 측정한다.<sup>31)</sup>

#### (3) 연구 결과

##### (가) 벤조피렌 정량 곡선

벤조피렌 0.2, 0.1, 0.05, 0.03 ppm 표준품을 이용하여 정량 곡선을 작성하였으며,  $r^2$ 는 0.999 이상으로 나타났다.

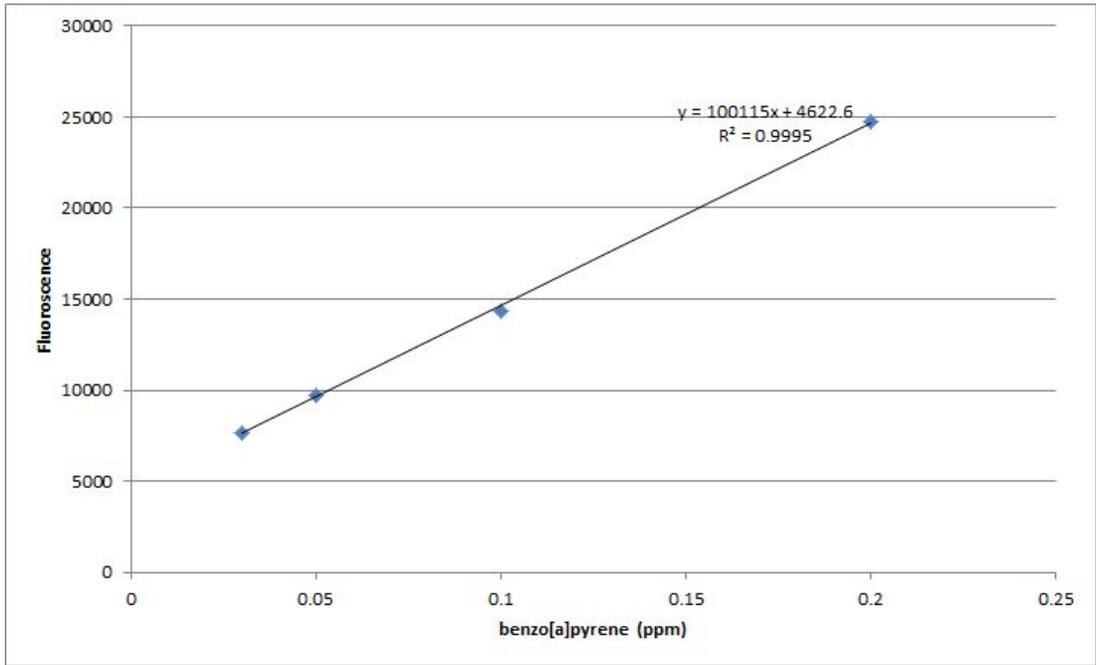


Fig. 32. Standard curve of benzo[a]pyrene

(나) 고기능성 깻잎 시료의 벤조피렌 함량

고기능성 깻잎의 로스팅 과정 후 생성되는 벤조피렌의 함량을 측정하였을 때, 모든 로스팅 조건에서 벤조피렌은 검출되지 않았다.

Table 28. Experimental data on benzo[a]pyrene analysis of roasting *perilla frutescens*

No.	Temp(°C)	Time(min)	benzo[a]pyrene	No.	Temp(°C)	Time(min)	benzo[a]pyrene
1	180	30	N.D <sup>1)</sup>	6	160	25	N.D
2	180	20	N.D	7	200	25	N.D
3	140	30	N.D	8	120	25	N.D
4	140	20	N.D	9	160	35	N.D
5	160	25	N.D	10	160	15	N.D

1) N.D : not detected

### 제 3 절 : 제 2 협동 들깨 품종의 고기능성 배양 조건 확립

(고려대학교 이호정)

식물은 우리가 일상생활에서 필요로 하는 영양소를 섭취할 수 있는 중요한 자원이다. 이러한 영양소 및 기타 풍부한 미네랄은 식물에 존재하는 이차대사산물의 다양한 합성 경로를 통하여 이루어지는데, 이와 관련된 합성 효소들은 또한 천연 자원 식물에서 많이 발견되는 항생제 및 다른 의약소재의 합성에도 긴밀하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 미국의 경우는 이러한 인류의 건강 및 생활에 유용한 이차대사산물을 함유한 식물 자원을 찾기 위해 여러 가지 방법이 강구되고 있는 실정이다. 최근에는 기존의 유용 식물을 이용하여 그의 대사과정 경로를 조절하여 기존의 유용 이차대사산물의 합성을 증가시키거나, 혹은 새로운 물질을 합성해 내는 방향으로도 그 연구가 활발하게 진행되고 있는 실정이다.<sup>32)~34)</sup>

지구상에는 대략 400,000 종의 식물이 서식하고 있는 것으로 알려져 있으나 그 중 약 10%만이 연구의 대상이 되고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 매우 중요한 약리성분의 대부분은 식물에서 추출되어 이용되어 왔으며 어떤 것은 200년 전부터 연구되어 온 것도 있다. 현재 시중의 일반인에 의해 소비되는 약들 중 약 25%가 식물 유래인 것으로 알려져 있다. 약 처방전에 따른 식물유래 이차대사산물의 가치는 미화로 3 백억 달러에 이르는 것으로 추정된다(2002년).

본 연구에서는 이러한 비휘발성 페놀릭(phenolic) 화합물을 천연 피부 건강기능 촉진 소재로 개발하기 위하여 다양한 들깨 품종을 확보하여 그의 생리활성 물질인 안토시아닌의 함량 조사를 하고자 하였다. 궁극적으로는 이들을 다양한 조건에서 배양하고 이로부터 비휘발성 페놀릭 및 플라보노이드계 화합물의 항산화능을 조사함으로써 피부 건강기능 촉진 가능성을 검증하여 피부건강기능성분을 대량생산하는데 그 목적이 있다. 식물의 이차대사산물의 다양성은 인간에 의해 만들어진 chemical library 보다도 훨씬 더 많은 다양성을 가지고 있으며 이는 앞으로도 새로운 식물의 이차대사산물이 발견되어질 가능성이 커, 최근의 "omics" 관련 기술과 접목될 때 새로운 기술력이 창출될 수 있음을 시사한다. 즉, "omics" 기술을 아직까지 연구되어 있지 않은 새로운 식물체에 연루시켜 연구할 경우 새로운 이차대사산물의 창출까지도 생각할 수 있는 분야이다.

미용의 측면에서도 다양한 식물재료를 이용한 천연재료가 그 중요성을 더해가고 있으며 그 예로 급속한 노령화 및 사회 전반으로 확산되고 있는 웰빙 바람은 독일 화장품시장에도 변화

를 불러 오고 화학성분보다는 천연재료에 관심이 높아지고, 미용에 치료 및 예방효과를 원하는 소비자들의 니즈와 맞물려 기능성 천연화장품이 인기를 끌고 있다. 한 예로, 영국의 국제 시장조사 전문기관인 유로모니터(Euromonitor)에 따르면 독일의 화장품시장은 미국, 일본, 프랑스 다음으로 세계에서 4번째로 큰 시장이며, '03년 시장규모는 112억 유로를 기록했다. 2002년 대비 성장률은 2.2%이며, 1997년 대비 22.8% 성장함. 이중 천연화장품시장은 현재 전체 화장품시장의 매출에 4%인 4억5천만유로로 틈새시장에 불과하지만, 점증적인 성장세를 보이고 있음. 독일 의약품, 건강식품, 대체식품 및 바디케어 협회(BDIH)에서는 이와 같은 긍정적인 추세가 지속되어, 머지않아 천연화장품 시장의 비중이 5%선을 넘을 것으로 추정하고 있다.

비휘발성 페놀릭 화합물에는 다양한 기능성 성분들이 포함되어 있을 것으로 사료되는 바, 기존 농가에서 재배되는 품종들을 스크리닝하여 선발된 고기능성 들깨 품종의 효능에 대한 체계적 연구가 필요하며 이를 이용하여 식의약 천연소재를 개발할 경우 외국산 기능성 화장품제품의 수입을 상당부분 대체하는 효과가 있을 것으로 기대되며, 특히 근래 급신장하고 있는 건강기능 식품시장은 다양한 건강기능을 지닌 새로운 천연소재의 개발이 요구하고 있는 점에 비추어 식물 유래 천연 엑기스 및 화장품소재 개발은 경제 산업적으로 큰 의의를 가진다.

## 1. 고기능성 깻잎 개발을 위한 들깨 품종 스크리닝

### 가. 5가지 들깨 품종을 이용한 안토시아닌 함량 측정

#### (1) 연구 목적

고기능성 깻잎의 개발을 위한 후보군 선정을 위하여 5가지 품종을 들깨를 이용하여 항산화 능력과 밀접한 연관이 있는 안토시아닌 함량을 측정한다. 5가지 품종에 서로 다른 호르몬을 처리하였을 때 안토시아닌 생성량을 측정한다.<sup>35), 36)</sup>

#### (2) 연구 방법

##### (가) 용매 추출

건조시킨 들깨 품종을 막자사발로 분쇄하고 시료를 80% 에탄올에 넣어서 24시간동안 환류 시킨다. 상층액을 0.45  $\mu\text{m}$ 의 membrane 2장(watman)을 겹쳐서 filtering 시킨다. 1차로 얻어낸 상층액은 냉장보관하며 위의 방법으로 2번 반복하여 최종 3번에 걸쳐 상층액을 얻어낸다. 얻어낸 추출물 용액은 evaporator로 78°C 이상에서 용매를 증발시키고 flask에 남은 물질은 스패출러로 잘 긁어내어 동결건조 시킨 후 실험에 사용하였다.

##### (가) 총 플라보노이드 및 안토시아닌 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 추출물 0.1 mL에 80% 에탄올 0.9 mL를 가하여 이 혼합액 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 80% 에탄올 4.3 mL를 각각 첨가한다. 위 반응액을 상온에서 40분 방치한 후 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였으며 표준물질로 quercetin을 사용하여 함량을 계산하였다. 안토시아닌 역시 흡광도를 이용하여 조사하였다. 본 연구를 위해 살균된 MS(Murashige and Skoog) 배지에서 자란 레몬 밤(*Melissa officinalis* L., Lamiaceae) 및 들깨 (*perilla frutescens* var, japonica Hara)를 사용하였다. 레몬 밤과 들깨는 영양 증식(vegetative multiplication)을 통해 2% (50 mM) 수크로스가 있는 고형 MS 배지에서 쉽게 증식할 수 있다. 우선, 말단(tip)과 한 쌍의 잎을 포함하고 있는 약 2cm 길이의 외식편(explant)을 전량(full-strength, 4 g/l) MS 및 6 g/l 아가(agar, pH 5.7)로 고형화된 50 mM 수크로스 제조된 배양/테스트 배지로 옮기고, 15시간 빛/9시간 어둠에서 보관한 후 테스트 배지에서 20일 동안 배양하였다. 우선, 생잎 샘플(fresh leaf samples) 100 mg을 액체 질소에 얼린 후 갈아서 가루로 만든 다음 1% HCl (v/v)을 함유하는 메탄올 혼합액 250  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 4°C에서 하룻밤(overnight)동안 추출하였으며, 증류수 250  $\mu\text{L}$ 를 각 튜브에 첨

가하였다. 추출물을 회수하고, 클로로필(chlorophyll)을 제거하기 위해 클로로포름(chloroform) 500  $\mu$ L를 혼합하고 3000 rpm에서 2 분간 원심분리하였다. 수상(aqueous phase) 200  $\mu$ L를 96-웰 플레이트(96-well plate)의 각 홀에 채우고, 흡광도는 530 nm 에서 마이크로플레이트 분광광도계(microplate spectrophotometer)로 측정하였다.

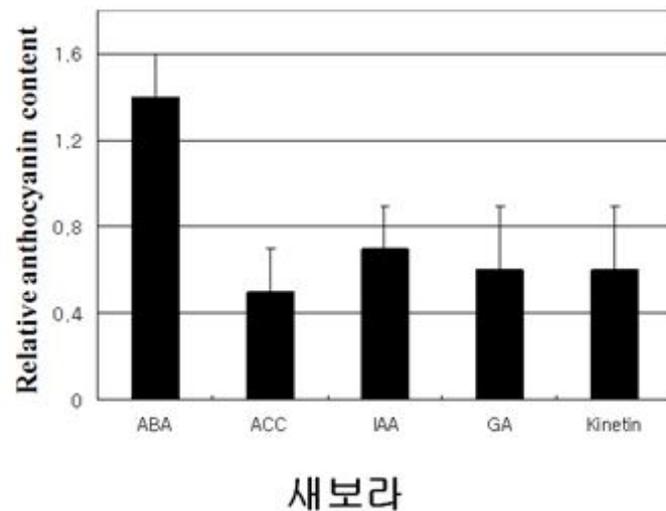
## (2) 연구 결과

밀양의 농가에서 재배 및 생산이 되었거나 이전에 재배되었던 들깨 품종 5종을 밀양농업시험장 연구소의 협조로 확보하여 이들을 본 실험에 사용하였다. 우선 이들 품종의 생장에 최적인 배양토와 온도 및 광 조건을 확립하였다. 이 과정에서 본 연구진은 기내 배양보다는 배양토에서의 직접적인 발아 및 발육이 훨씬 더 빠르고 효과적이라는 사실을 알아내어 이를 본 실험에 이용하였다. 무균 기내 배양의 경우는 발아에 걸리는 시간이 훨씬 더 길었으며 발아율도 감소하는 것으로 나타났다. 무균 배양의 경우 배양토로 바꾸어 실험할 경우 차별이 날 수 있는 점 또한 감안하여 본 연구에서는 바로 배양토를 사용하는 것으로 실험의 내용을 확립하였다. 새보라, 남천, 보라, 동글2호, 늘보라 이렇게 5 대의 품종으로 안토시아닌의 함량을 조사하기로 하였다. 아래의 Fig. 33에서 보이는 바와 같이 배양토에서 키울 경우 동글2호의 생육이 제일 빠르고 우수했으며 그에 비해 나머지 4개의 품종은 약간씩의 차별성을 보이는 것으로 나타났다. 또한 엽육에 침착되는 안토시아닌의 색소에 따라 그 색깔이 현저하게 다른 것으로 나타났다는데 이는 추후의 안토시아닌 함량 조사에서도 동일하게 나타났다.



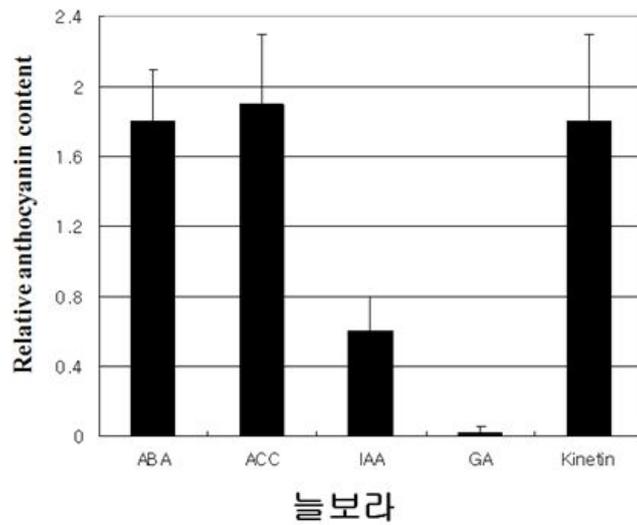
Fig. 33. The pots of *perilla*: Saebora, Nlbora, Bora, Namchun, Dongle 2. This picture shows the growth of *perilla* after about 2 months of its plant.

본 연구진은 다른 과제의 수행 결과로 식물의 안토시아닌 및 플라보노이드의 합성 및 세포 내 축적이 식물의 호르몬에 의해서 조절된다는 실험 결과를 바탕으로 우선 이들 5개의 품종을 이용하여 호르몬 처리에 따른 안토시아닌의 함량을 조사하였다. 우리는 이를 위하여 5 개의 식물 호르몬 (IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene)을 농도별로 처리하고 안토시아닌의 축적량이 어떻게 변하는 지를 알아보았다. Fig. 34, 35, 36, 37, 38에서 얻은 결과는 우선 각 식물 호르몬의 농도를 0, 5, 10 uM 로 배양토에 처리한 뒤 3, 6일 후에 얻은 조직에서 선행 연구를 한 후에 10 uM이 가장 효과적인 농도라는 것을 확인한 뒤에 실시한 실험 결과이다. 3일간의 처리가 가장 효과적인 나타나서 우리는 이후의 모든 실험에서 각 처리를 3일로 하였다.



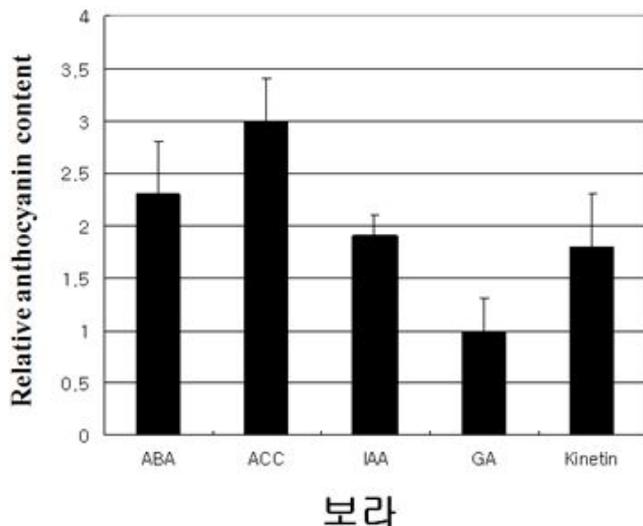
**Fig. 34. Anthocyanin content of Saebora treated with plant hormones.** The relative anthocyanin content of Saebora dependent on ABA, ACC, IAA, GA, Kinetin. The amount of each sample was 50 mg.

Fig. 34는 새보라를 4 주간 배양토에서 배양한 후에 IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene을 10 uM 로 배양토에 처리한 뒤 3일 후에 얻은 조직에서 안토시아닌을 추출하고 그 함량을 흡광도로 조사하였다. 새보라의 경우는 ABA를 처리하였을 경우에 그 함량이 다른 호르몬 처리 시 보다 2 배정도 높은 것으로 나타났다.



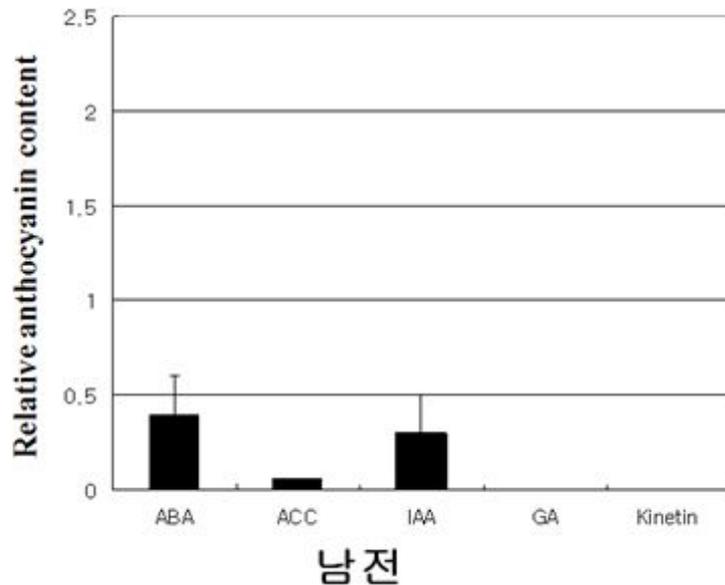
**Fig. 35. Anthocyanin content of Nlbora treated with plant hormones.** The relative anthocyanin content of Nlbora dependent on ABA, ACC, IAA, GA, Kinetin. The amount of each sample was 50 mg.

Fig. 35는 늘보라를 4 주간 배양토에서 배양한 후에 IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene을 10 uM 로 배양토에 처리한 뒤 3일 후에 얻은 조직에서 안토시아닌을 추출하고 그 함량을 흡광도로 조사하였다. 새보라의 경우와 달리 ABA, ACC, Kinetin에 의해 골고루 높게 나타났고, IAA에 의해서는 낮게 나타났으며 특히, GA에 의해서는 거의 나타나지 않는 것으로 확인되었다.



**Fig. 36. Anthocyanin content of Bora treated with plant hormones.** The relative anthocyanin content of Bora dependent on ABA, ACC, IAA, GA, Kinetin. The amount of each sample was 50 mg.

Fig. 36은 보라를 4 주간 배양토에서 배양한 후에 IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene을 10 uM 로 배양토에 처리한 뒤 3일 후에 얻은 조직에서 안토시아닌을 추출하고 그 함량을 흡광도로 조사하였다. 이 품종의 경우는 GA를 제외한 모든 호르몬에서 골고루 안토시아닌의 함량이 증가하는 것으로 나타났다.



**Fig. 37. Anthocyanin content of Namchun treated with plant hormones.** The relative anthocyanin content of Namchun dependent on ABA, ACC, IAA, GA, Kinetin. The amount of each sample was 50 mg.

Fig. 37은 남천을 4 주간 배양토에서 배양한 후에 IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene을 10 uM 로 배양토에 처리한 뒤 3일 후에 얻은 조직에서 안토시아닌을 추출하고 그 함량을 흡광도로 조사하였다. 전체적으로 보아 모든 호르몬에 매우 낮게 반응하는 것으로 나타났으나 역시 ABA에 의해서는 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 IAA에 의해서도 증가하는 것으로 나타났다.

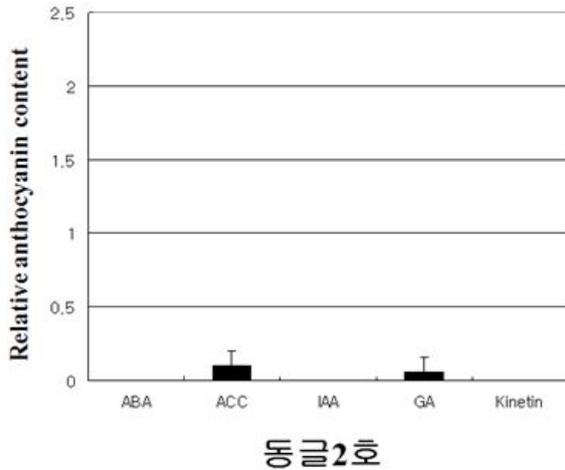


Fig. 38. Anthocyanin content of Dongle 2 treated with plant hormones. The relative anthocyanin content of Dongle 2 dependent on ABA, ACC, IAA, GA, Kinetin. The amount of each sample was 50 mg.

Fig. 38은 동글2호를 4 주간 배양토에서 배양한 후에 IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene을 10 uM 로 배양토에 처리한 뒤 3일 후에 얻은 조직에서 안토시아닌을 추출하고 그 함량을 흡광도로 조사하였다. 거의 모든 호르몬에 대한 반응성이 없는 것으로 나타났다.

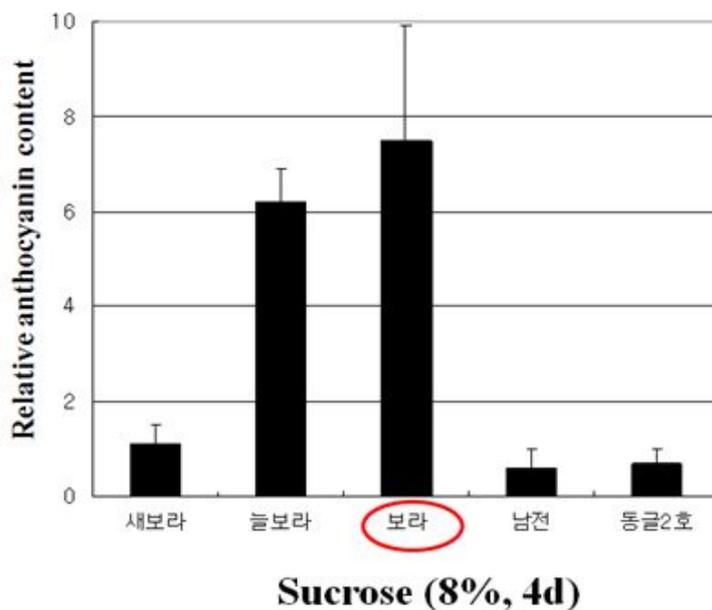
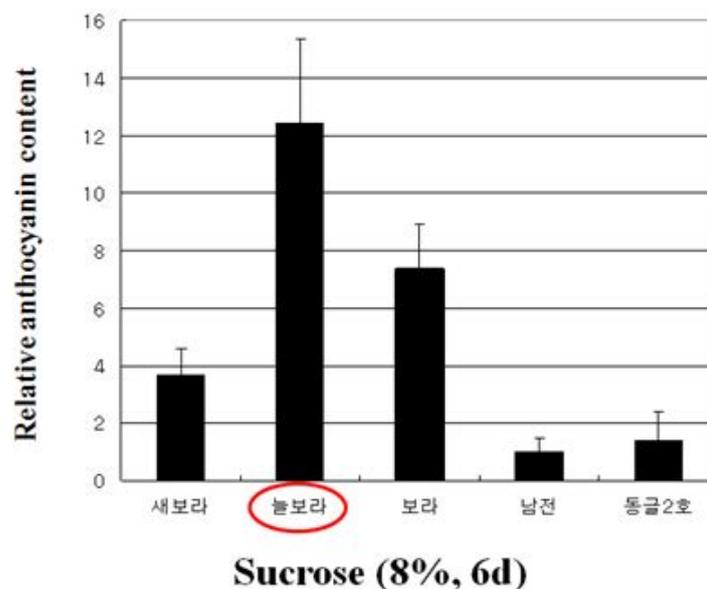


Fig. 39. Anthocyanin content of Saebora, Nlbora, Bora, Namchun, Dongle 2 treated with 8% sucrose for 4 days. The anthocyanin content of Bora is the highest. The anthocyanin content of Saebora, Namchun, Dongle 2 is remarkably low.

이번에는 안토시아닌의 함량 증가에 가장 효과적인 것으로 알려진 수크로스를 배양토에 처리하는 실험을 수행하였다. 우선 우리는 수크로스를 50, 100, 150, 200, 300 mM로 처리한 배양토에서 식물을 키운 결과 10 일 경 후에도 여전히 잘 자라고 있는 것을 확인하였다(참고로 50 mM이 1% 수크로스이다). 우리가 이 실험을 진행한 이유는 수크로스는 고농도로 처리 시에 osmotic stress를 유발할 수 있기 때문이었다. 위 내용을 정량화하기 위하여 우리는 상기 조건 등에서 들깨를 배양한 다음 그 무게를 측정된 결과 수크로스 300 mM 이상으로 처리할 경우에는 식물의 생육에 문제를 보이거나 그 이하의 농도 즉, 200 mM에서는 큰 문제를 보이지 않은 것으로 확인되었다. 그러나 수크로스가 250 mM 이상이 될 경우에는 어느 정도의 osmotic stress를 유발하는 것으로 짐작해볼 수 있는 결론으로 생각된다. 이 실험의 결론으로 우리는 200 mM의 수크로스를 사용하였고 그 배양토 처리 기간은 4, 6일로 한 뒤 잎 조직을 얻어서 안토시아닌의 함량을 조사하였다.



**Fig. 40. Anthocyanin content of Saebora, Nlbora, Bora, Namchun, Dongle 2 treated with 8% sucrose for 6 days.** The anthocyanin content of Nlbora is the highest against Fig 39. The anthocyanin content of Saebora, Namchun, Dongle 2 is remarkably low.

위의 Fig 39, 40 결과들에서는 200 mM의 수크로스 처리 시에 상당한 양의 안토시아닌이 축적되는 것으로 미루어 우리는 안토시아닌 획득에 가장 경제적인 조건을 생각해 보기로 하였다. 그 결과 배양토의 경우 수크로스의 농도는 200 mM로 하는 것이라는 결론에 도달하였다. 그러나 그 처리 기간에 대한 것은 보다 더 많은 실험을 필요로 하는 것으로 판단되어 차년도

에 이를 수행하고자 한다. 5 품종 중에 새보라, 남천, 동글 2호의 경우는 수크로스 처리 시에도 안토시아닌의 함량이 크게 증가하지 않는 것으로 나타났으나, 늘보라, 새보라의 경우는 그 엽육의 색깔에서도 보이는 바와 같이 수크로스 처리 시에 안토시아닌의 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 늘보라의 경우는 수크로스를 6일간 처리 시에 보다 더 높게 나타났으며 그 양도 4일 처리 시보다 두 배나 증가하였다. 보라의 경우는 4일이나 6일이나 그 함량에 별 변화를 보이지 않았다.

## 나. 적요

현재 밀양의 농가에서 재배 및 생산이 되었거나 이전에 재배되었던 들깨 품종 5종을 밀양농업시험장 연구소의 협조로 확보하여 이들을 본 실험에 사용하였다. 기내 배양보다는 배양토에서의 직접적인 발아 및 발육이 훨씬 더 빠르고 효과적이라는 사실을 알아내어 이를 본 실험에 이용하였다. 무균 기내 배양의 경우는 발아에 걸리는 시간이 훨씬 더 길었으며 발아율도 감소하는 것으로 나타났다. 무균 배양의 경우 배양토로 바꾸어 실험할 경우 차별이 날 수 있는 점 또한 감안하여 본 연구에서는 바로 배양토를 사용하는 것으로 실험의 내용을 확립하였다. Fig. 33에서 보이는 바와 같이 배양토에서 키울 경우 동글2호의 생육이 제일 빠르고 우수했으며 그에 비해 나머지 4개의 품종은 약간씩의 차별성을 보이는 것으로 나타났다.

실험의 효율성 및 농가 재배 환경을 고려하여 우리는 각 세부과제별로 회의를 하여 보라, 늘보라, 새보라, 남천, 동글2호의 5 개 품종 중에서 보라와 남천 2호를 2년차에서 집중적으로 연구하기로 결정하였다. 보라의 경우 생육이 그렇게 나쁘지 않으며 안토시아닌의 함량이 여러 처리에서 증가하는 것으로 나타난 반면 새보라, 늘보라는 원래 생육이 별로 좋지 않은 것으로 나타났기 때문이다. 농가에서는 늘보라, 보라, 새보라를 이와 같은 이유로 재배하지 않는다고 하였으나 본 과제의 성격 상 엑기스 및 화장품의 용도로는 생육이 조금 떨어져도 생리활성 물질이 많이 나오는 품종이 경제적으로 유리할 것으로 판단되어 보라 품종을 연구하는 것으로 결정하였다. 동글 2호의 경우는 생육은 좋으나 잎의 표면에 존재하는 털로 인해 농가에서 재배하지 않는다는 사실을 알게 되어 이 품종을 추후 연구에서 제외하기로 하였다. 남천을 연구에 포함시킨 이유는 현지 밀양 농가에서 가장 선호하고 대부분 재배되고 있는 품종이기 때문이었다. 또한 잎의 안토시아닌 착색에 따라 출하 시에 그 가격이 현저하게 달라진다는 사실을 현지 농가 방문을 통하여 알게 되었고 이러한 이유로 이 품종을 추후 연구에 포함시켜 농가소득에 기여하고자 하는 목표를 세우게 되었다.

## 2. 고기능성 깻잎 재배를 위한 재배 조건 설정

### 가. 수크로스를 이용한 고기능성 깻잎 재배 조건 설정 연구

#### (1) 연구 목적

고기능성 깻잎의 개발을 위한 재배 조건 설정을 위하여 8% 수크로스와 이미 알려진 호르몬을 처리하여 안토시아닌의 증가를 확인한다. 이를 통하여 최적 재배 조건을 위한 처리 농도와 처리 기간 설정에 관한 연구를 진행한다.

#### (2) 연구 내용

본 연구진은 다른 과제의 수행 결과로 식물의 안토시아닌 및 플라보노이드의 합성 및 세포 내 축적이 식물의 호르몬에 의해서 조절된다는 실험 결과를 바탕으로 우선 이들 5개의 품종을 이용하여 호르몬 처리에 따른 안토시아닌의 함량을 조사하였다. 우리는 이를 위하여 5 개의 식물 호르몬 (IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene)과 수크로스를 함께 배합하여 농도별로 처리하고 안토시아닌의 축적량이 어떻게 변하는 지를 알아보았다. Fig 34, 35, 36, 37, 38에서 얻은 결과는 우선 각 식물 호르몬의 농도를 0, 5, 10 uM 로 배양토에 처리한 뒤 3, 6일 후에 얻은 조직에서 선행 연구를 한 후에 10 uM이 가장 효과적인 농도라는 것을 확인한 뒤에 실시한 실험 결과이다. 3일간의 처리가 가장 효과적인 나타나서 우리는 이후의 모든 실험에서 각 처리를 3일로 하였다.

#### (3) 연구 결과

Fig. 41은 보라를 4 주간 배양토에서 배양한 후에 IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene 10 uM 과 수크로스를 함께 배양토에 처리한 뒤 3일 후에 얻은 조직에서 안토시아닌을 추출하고 그 함량을 흡광도로 조사하였다.

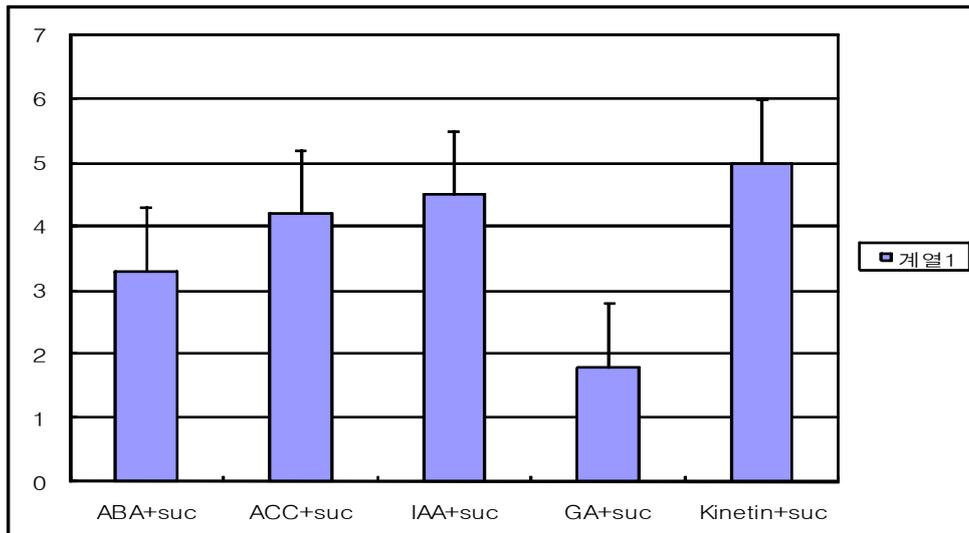


Fig. 41. Anthocyanin content of Bora treated with various hormones and 8% sucrose

Fig. 42는 새보라를 4 주간 배양토에서 배양한 후에 IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene 10 uM과 수크로스를 함께 배양토에 처리한 뒤 3일 후에 얻은 조직에서 안토시아닌을 추출하고 그 함량을 흡광도로 조사하였다. 새보라의 경우와 달리 ACC와 수크로스를 함께 배합했을 때 높게 나타났고, GA 및 IAA와 수크로스를 함께 배합했을 때에는 그 효과가 그다지 크지 않았다.

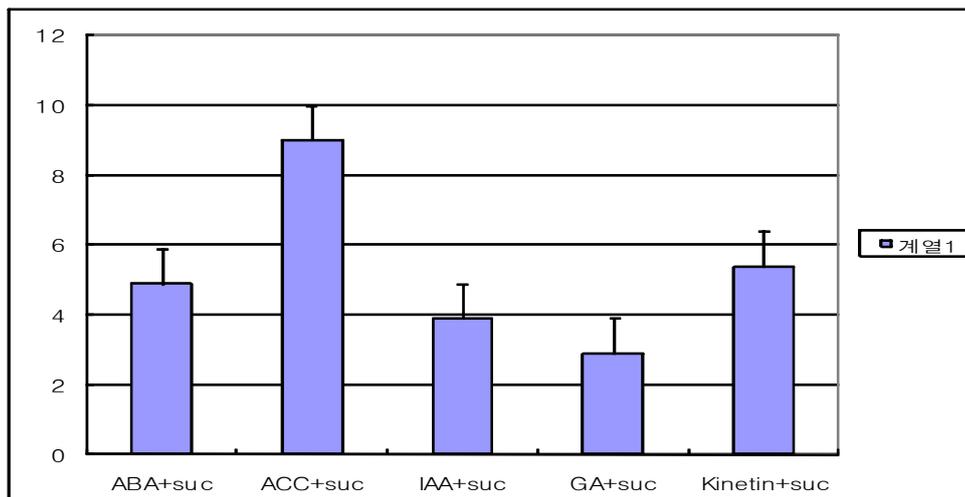


Fig. 42. Anthocyanin content of Saebora treated with various hormones and 8% sucrose

Fig. 43은 늘보라를 4 주간 배양토에서 배양한 후에 IAA, ABA, GA, ACC, Ethylene 10

uM과 수크로스를 함께 배양토에 처리한 뒤 3일 후에 얻은 조직에서 안토시아닌을 추출하고 그 함량을 흡광도로 조사하였다. 이 품종의 경우는 ACC를 제외한 모든 호르몬에서 골고루 안토시아닌의 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

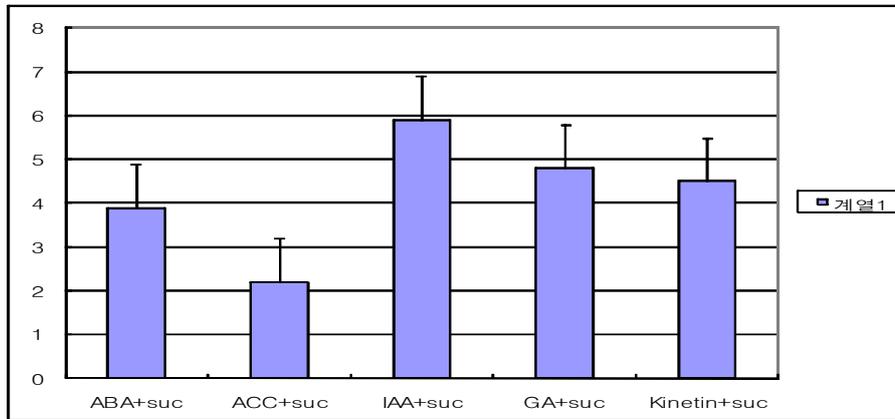


Fig. 43. Anthocyanin content of Nlbora treated with various hormones and 8% sucrose

Table 29. DPPH scavenging assay of *perilla frutescens* leaves treated with 8% sucrose for 4 or 6 days.

Treatment duration	IC <sub>50</sub> (μl ml <sup>-1</sup> )					p
	Bora	Nalbora	Sebora	Doboung	Namsong	
4 days	1944.0±231.9 a	1155.9±535.0 a	6498.7±3683.6 a	6022.0±1816.6 a	1001.5±346.7 a	NS
6 days	353.1±72.9 a	508.1±196.1 a	362.3±119.5 a	250.4±69.1 a	135.9±14.9 a	NS

Each data represents the mean value and Standard Error of three independent replications. Same letters indicate no significant difference in ANOVA and DMTR at  $p > 0.05$  level. NS means non significant.

Table 29는 각 품종에 대해 DPPH 라디칼 소거능을 통한 항산화 활성을 조사한 것으로 늘보라에서 상당히 그 활성이 높은 것으로 나타났다. 이는 색소의 짙음과 항산화 활성이 비례한다는 것을 보여주는 결과가 된다. 그러나 안타깝게도 소비자 기호도에 근거하여 선정해야 하는 관계로 우리는 늘보라가 아닌 남천과 보라를 실험 대상으로 정하게 되었다.

## 나. 설탕, 자스몬 산, IAA처리에 따른 보라, 남천 품종의 안토시아닌의 함량

### (1) 연구 목적

선별된 2종의 품종인 보라와 남천을 이용하여 고기능성 껌 개발을 위한 설탕물 재배 방법의 효과를 비교하기 위하여 널리 알려진 자스몬 산과 IAA 호르몬 처리와 비교하여 효과를 검증한다.

### (2) 연구 내용

본 연구진은 기존 연구 결과를 바탕으로 보라, 새보라, 남천, 동글 2호의 5개 품종 중에서 보라와 남천을 집중적으로 연구하기로 결정하였다. 자스몬 산은 처리시 안토시아닌의 축적에 영향을 준다고 알려져 있고, 자스몬 산에 의한 안토시아닌 생합성 과정 중의 *DFR*의 발현이 설탕에 의존적이라고 밝혀져 있으며, IAA 또한 플라보노이드 생합성 과정에 관여하는 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있어 설탕과 자스몬 산, IAA를 처리했을 경우에 남천과 보라 품종의 안토시아닌 함량을 비교해 보았다. Fig 44, 45에서 얻은 결과는 앞서 얻은 결과를 토대로 4% 설탕물, 8% 설탕물, 1  $\mu\text{M}$  자스몬 산, 10  $\mu\text{M}$  자스몬 산, 10  $\mu\text{M}$  IAA, 8% 설탕과 10  $\mu\text{M}$  IAA 혼합물을 각각 3시간, 6시간 처리한 것으로 안토시아닌의 함량을 측정하였다.

### (3) 연구 결과

Fig. 44는 남천 품종을 4% 설탕, 8% 설탕, 1  $\mu\text{M}$  자스몬 산, 10  $\mu\text{M}$  자스몬 산, 10  $\mu\text{M}$  IAA, 8% 설탕과 10  $\mu\text{M}$  IAA의 혼합물을 각각 3시간, 6시간 처리한 것으로 안토시아닌의 함량을 측정한 표이다.

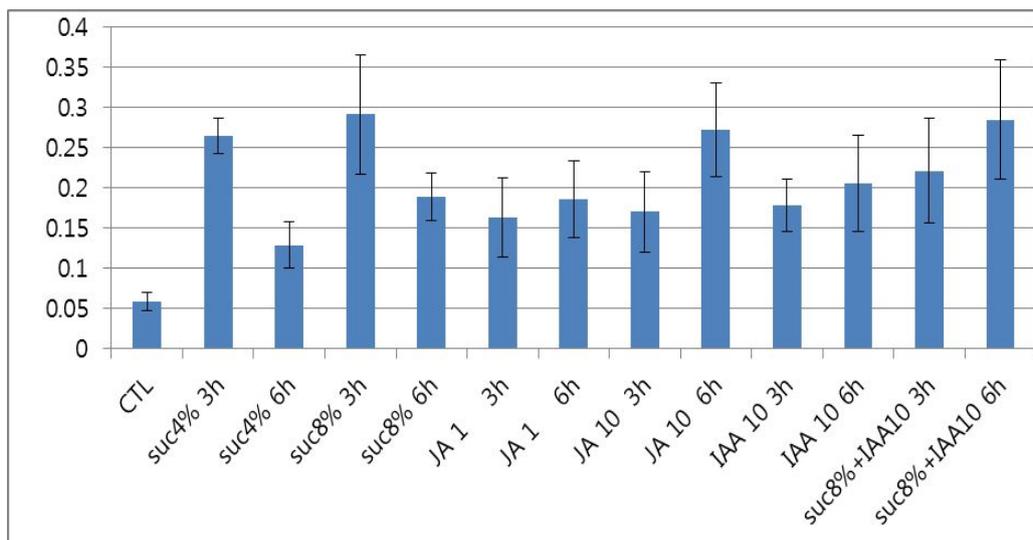


Fig. 44. Anthocyanin content of Namchun treated with sucrose, jasmonic acid, and IAA.

아무것도 처리하지 않은 무처리 상태에 비해 설탕과 자스몬 산, IAA를 처리해 주었을 때 안토시아닌의 함량이 훨씬 높게 측정되었다. 설탕의 경우, 6시간 처리한 것이 3시간 처리한 것보다 안토시아닌의 함량이 더 낮았다. 자스몬 산과 IAA는 농도가 높을수록, 처리한 시간이 길수록 안토시아닌 함량이 높았다.

Fig. 45는 보라 품종에 4% 설탕, 8% 설탕, 1  $\mu$ M 자스몬 산, 10  $\mu$ M 자스몬 산, 10  $\mu$ M IAA, 8% 설탕과 10  $\mu$ M IAA의 혼합물을 각각 3시간, 6시간 처리한 것으로 안토시아닌의 함량을 측정한 표이다. 보라의 경우, 아무것도 처리하지 않은 대조군도 안토시아닌의 함량이 높았고, 설탕과 자스몬 산을 처리해 준 것은 농도가 높을 경우에 오히려 안토시아닌의 함량이 감소하였다. IAA를 처리해 준 것은 농도가 낮을 때 보다 높을 때에 안토시아닌의 함량이 증가하였으나, 무처리 상태보다 안토시아닌의 함량이 낮았다.

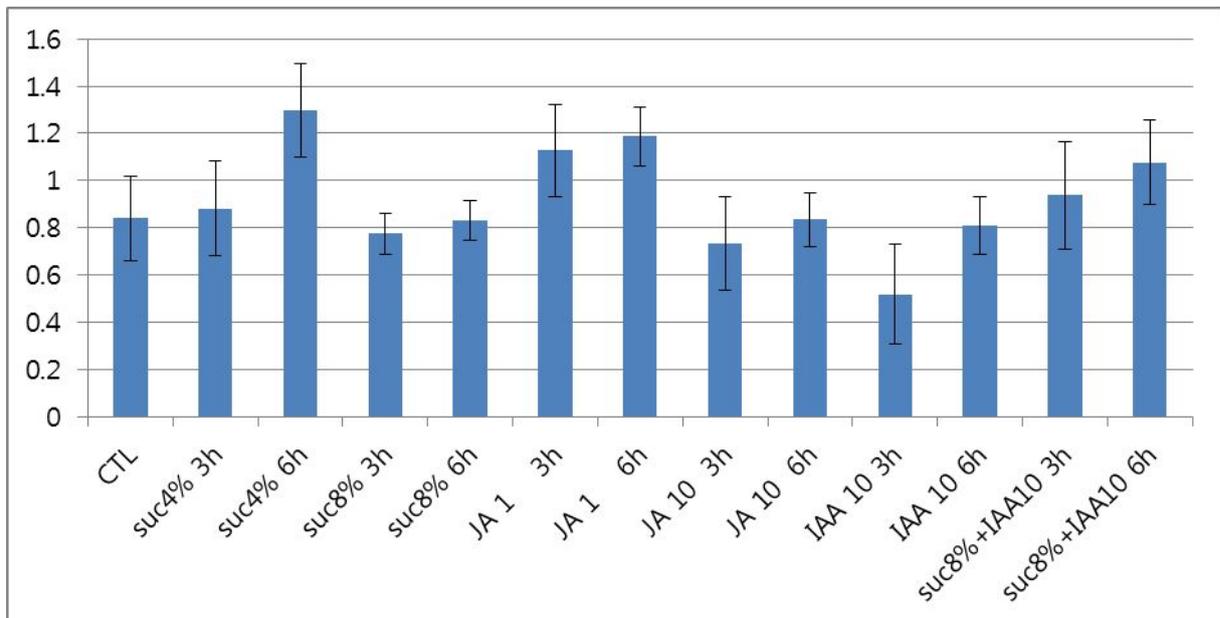


Fig. 45. Anthocyanin content of Bora treated with sucrose, jasmonic acid, and IAA.

Fig. 44, 45를 같이 비교해 보면, 보라는 남천 품종에 비하여 무처리 상태에서 안토시아닌의 함량이 높고, 설탕 등 다른 물질 처리시에 훨씬 더 많은 안토시아닌을 포함한다는 것을 한 눈에 알 수 있다.

#### 다. 적요

밀양 기술원의 협조 하에 우리는 밀양 시험 연구 센터에 위와 같이 들깨를 재배하고 처리하기로 하였다. 보라와 남천만이 선택되었고 재배지에 수크로스과 호르몬을 주기적으로 관수하기로 하였다. 우리가 이 실험을 진행한 이유는 실험실 내에서 얻은 결과들이 노지에서 얻은 것과 동일한 결과들 보여주는 지를 검증하고자 하는 것이 첫 번째 목표였다. 두 번째로는 노지에서 위 성장조절제를 처리할 경우 어느 정도의 비용이 소요되는 지를 조사하는 데 있었다. 이는 제1세부과제에서 상세히 기술하기로 한다. 우선 우리는 수크로스의 농도를 4, 6, 8%로 하였고 여러 가지 호르몬을 하기로 하였으나 그 비용상 ABA 호르몬만 우선적으로 처리하여 보았다. 수크로스는 고농도로 처리 시에 osmotic stress를 유발할 수 있기 때문에 8%를 최대치로 선정하였다. 현장에서 키우고 성장조절제를 처리한 뒤에 얻은 샘플에 대한 결과는 제1협동 과제에서 상세히 기술하기로 한다.

남천과 동글 2호는 호르몬 10 uM, 수크로스 8%로 처리 후 4 일째에 안토시아닌 측정 시에 측정 값이 거의 제로로 나왔기 때문에 위에는 결과를 나타내지 않았다.

밀양 농업기술원 방문하여 토의한 결과 남천과 보라를 추후 계속 실험하기로 하였다. 남천은 소비자 기호도에 근거하였고, 보라는 가공품 생산에 유리하다는 것에 근거하여 이와 같이 결정하였다.

### 3. 들깨의 안토시아닌 합성에 관여하는 유전자 클로닝

#### (1) 연구 목적

깨잎의 안토시아닌 생성에 관여하는 유전자를 찾아내 클로닝을 함으로써 기능성 성분을 강화에 관련된 기작을 연구한다.

#### (2) 연구 내용

들깨 이차 대사산물 합성 효소의 유사 유전자를 들깨로부터 클로닝하고 모델식물 시스템에 도입하여 타겟 이차대사산물의 합성량이 증가하였는지를 검정할 수 있는 시스템 확립한다. 이로 유용 이차대사산물 합성 관련 유전자의 발현을 적극적으로 조절할 수 있다면 그 유용 물질의 생산량 증가에 획기적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 더 나아가 이들 이차대사산물 생합성 유전자의 조절 인자가 확보되면 이들의 기능 도메인을 각종 방법으로 다른 조절인자의 그것과 치환시켜 봄으로써 가장 효과적으로 이들 유전자를 발현 혹은 억제시키는 단백질 만들 수 있을 것이다. 들깨 이차대사산물 합성 효소들이 어떤 조건에서 가장 잘 발현하는지를 분자수준에서 연구하여 추후 보다 적합한 성장조절제의 제조에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

들깨에서 플라보노이드 합성에 관여하는 유전자를 찾기 위하여 기존의 gene bank를 조사하였다. 그 중에서 F3'H 유전자를 선택하여, 이 유전자에 대한 염기 서열 정보를 NCBI에서 조사하여 primer를 제작하였고 cloning을 시도하였다.

### Flavonoid biosynthesis pathway

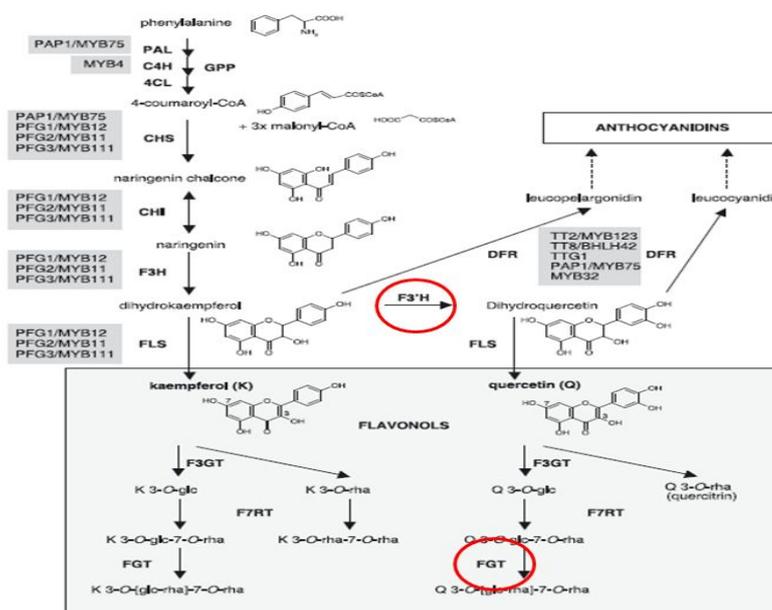


Fig. 46. Flavonoid biosynthesis pathway.

다음으로 우리는 들깨의 품종을 결정하는 분자적 기전을 알아보기 위하여 그리고 그 유전자를 확보하기 위하여 다음과 같은 일련의 실험을 수행하였다. 먼저 들깨에서 플라보노이드 합성에 관여하는 유전자를 찾기 위하여 우리는 기존의 gene bank를 조사하였다. 그 중에서 아래와 같이 3 개의 유전자를 선택하였다.

### (3) 연구 결과

다음은 플라보노이드 합성 경로를 보여주는 그림으로 우리 유전자의 작용 경로를 나타내고 있다. 이들 중 위 보기의 유전자가 위치한 곳은 다음과 같다. 아래 보이는 유전자들을 들깨에서 찾아서 그 효능을 살펴보면 추후 좋은 연구가 될 것이다.

#### *Perilla frutescens* target genes for study

P1 : F3'H (Flavonoid 3' hydroxylase)

P2 : F3G (Flavonoid 3-O-glucosyltransferase)

P3 : FS (Flavone synthase )

위 유전자에 대한 염기 서열 정보를 NCBI에서 조사하여 프라이머를 제작하였고 크로닝을 시도하였다. 아래에서 보는 바와 같이 우리는 이 유전자의 염기 서열이 기존에 알려진 염기서열과 거의 유사하다는 사실을 확인하게 되었다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 한 개의 염기서열만이 바뀌어 있음을 확인하였다. 이 유전자는 현재 binary vector에 크로닝되어 모델식물에 형질전환을 할 단계에 와 있다.

## Perilla frutescens Flavonoid 3'-hydroxylase

```

>dbj|AB045593.1| Perilla frutescens var. crispa SHT12 mRNA for flavonoid 3'-hydroxylase,
complete cds
Length=1804

Score = 1849 bits (1001), Expect = 0.0
Identities = 1088/1124 (96%), Gaps = 29/1124 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 146 ATGATCAGTGCCGCCGTAAGTTTGATCATATGCACTTCCATTTTAGGGGTACTGGTTTAT 205
          |||
Sbjct 42 ATGATCAGTGCCGCCGTAAGTTTGATCATATGCACTTCCATTTTAGGGGTACTGGTTTAT 101

Query 206 TTTTGTTCCTCAGCGGGGCGGCGGAGTAATGGGCGGCCTCTGCCTCCAGGGCCGAGG 265
          |||
Sbjct 102 TTTTGTTCCTCAGCGGGGCGGCGGAGTAATGGGCGGCCTCTGCCTCCAGGGCCGAGG 161

Query 266 CCGTGGCCGGTTGTCGGCAACCTTCCGCAGCTGGGGCCGAAGCCCCACCAGTCGATGGCA 325
          |||
Sbjct 162 CCGTGGCCGATTGTCGGCAACCTTCCGCAGCTGGGGCCGAAGCCCCACCAGTCGATGGCA 221

Query 326 GCCTTGGCCCGGGTGCATGGCCCCCTCATGCATCTCAAGATGGGGTTCGTGCATGTTGTG 385
          |||
Sbjct 222 GCCTTGGCCCGGGTGCATGGCCCCCTCATGCATCTCAAGATGGGGTTCGTGCATGTTGTG 281

Query 386 GTGGCCGCCTCCGCCACCGTGGCGGAGAAGTTCTTGAAGGTGCACGACACCAACTTCTTG 445
          |||
Sbjct 282 GTGGCCGCCTCCGCCACCGTGGCGGAGAAGTTCTTGAAGGTGCACGACACCAACTTCTTG 341

Query 446 AGCCGCCCCCCAACTCCGGCGCCGAGCACATTGCTTACAACACTACAACGACTTGGTTTTT 505
          |||
Sbjct 342 AGCCGCCCCCCAACTCCGGCGCCGAGCACATTGCTTACAACACTACAACGACTTGGTTTTT 401

Query 506 GCTCCCCACGGCCCGCGGTGGCGGTTGCTTCGGAAAATTTGTGCCCTCCACCTCTTCTCC 565
          |||
Sbjct 402 GCTCCCCACGGCCCGCGGTGGCGGTTGCTTCGGAAAATTTGTGCCCTCCACCTCTTCTCC 461

Query 566 TCCAAGGCCTTAGATGACTTCCGCCATGTTAGAGAGGAAGAAGTGGGGATCCTCATTCCG 625
          |||
  
```

Fig. 47은 들깨 (*perilla frutescens*) 유전자 Flavonoid 3'-hydroxylase의 발현을 보기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과이다. 우선 들깨를 흙에서 키운 뒤 4 주 정도 되었을 때에 RNA를 trizol 용액으로 추출하여 cDNA를 합성하였다. 아무 처리도 하지 않은 샘플과 8% 수크로스를 3일 처리한 식물을 함께 이용하였다. 보이는 바와 같이 보라의 경우 8% 수크로스 처리 시에 이 유전자가 발현되는 반면에 남천에서는 그 발현이 확인되지 않았다. 그러나 gDNA로 PCR을 수행한 결과 우리는 남천도 이 유전자를 가지고 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 아래 보이는 결과는 보라 품종만이 수크로스에 반응하여 그 유전자가 발현되고 이는 안토시아닌 등의 플라보노이드 합성으로 연결됨을 나타내는 것이라고 할 수 있다. 온도를 달리 한 것은 PCR 반응이 잘 되는 조건을 찾기 위함이었다.

*Perilla frutescens* Flavonoid 3'H-hydroxylase

Perilla 8% 설탕물처리(24시간) cDNA-PCR

20090724

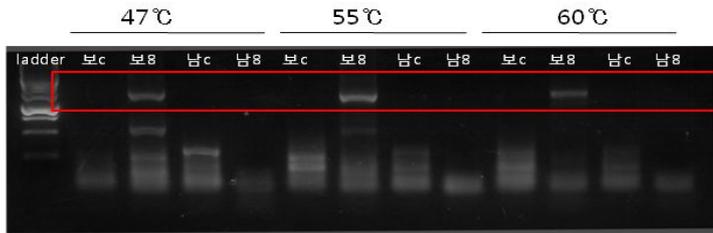


Fig. 47. Flavonoid 3' H-hydroxylase mRNA expression of *perilla frutescens* leaves on different annealing temperature.



Fig. 48. RT-PCR of Bora and Namchun treated sucrose and Jasmonic acid I. P1 means 1.5 kb *perilla frutescens* F3'H gene primer, and short P1 means 0.3 kb *perilla frutescens* F3'H gene primer.

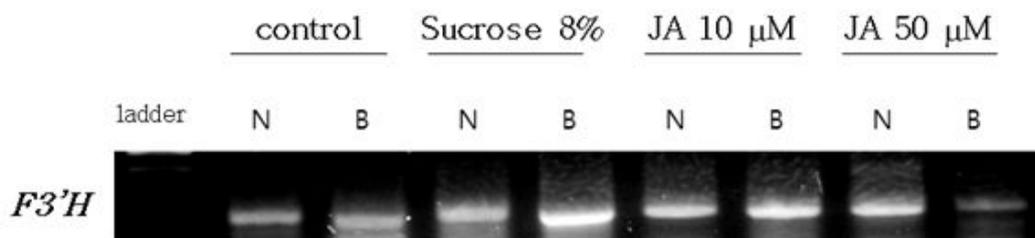


Fig. 49. RT-PCR of Bora and Namchun treated sucrose and Jasmonic acid II. Short P1 (0.3 kb *perilla frutescens* F3'H gene primer) was used. N means Namchun, and B means Bora.

Fig. 48의 그림은 남천과 보라 품종을 F3'H gene primer를 이용하여 RT-PCR한 결과를 나타낸 것이다. 1 kb의 길이로 만든 primer를 이용한 것으로는 밴드가 잘 보이지 않아서, 0.3 kb의 길이로 만든 short F3'H gene primer로 RT-PCR를 하였더니 밴드를 볼 수가 있었다. 남천의 경우, 8%의 설탕을 6시간 처리한 경우에 밴드가 진하게 보였으며, 보라의 경우, 4%의 설탕을 24시간 처리한 경우와 8%의 설탕을 24시간 처리한 경우에 밴드가 진한 것을 볼 수 있었다. 자스몬 산도 안토시아닌 관련 유전자의 활성을 도울 수 있다는 것을 토대로 자스몬 산을 처리한 남천과 보라 품종으로도 RT-PCR을 하였다. 그 결과, 보라의 경우에는 1  $\mu$ M의 자스몬 산을 6시간 처리한 것, 1  $\mu$ M의 자스몬 산을 24시간 처리한 것, 10  $\mu$ M의 자스몬 산을 6시간 처리한 것, 10  $\mu$ M의 자스몬 산을 24시간 처리한 것 모두에서 밴드를 확인할 수 있었으나, 남천의 경우에는 뚜렷한 밴드를 확인할 수 없었다. 조금 더 단순하고 명확한 비교 결과를 얻기 위하여, 8% 설탕과 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 자스몬 산을 처리한 남천과 보라 품종만 0.3 kb의 길이로 만든 short F3'H gene primer로 RT-PCR해 보았다. Fig. 49를 보면, 8% 설탕을 처리한 경우에, 보라 품종의 밴드가 확연하게 진하게 나온 것을 볼 수 있다.

다음으로 우리는 다른 2 유전자에 대해서도 동일한 실험을 수행하였다. Flavonoid3'-O-glucosyltransferase와 Flavone synthase가 수크로스에서 반응하는 지를 위의 샘플을 이용하여 RT-PCR 방법으로 알아보았다. 역시 Flavonoid3'-O-glucosyltransferase와 Flavone synthase도 보라 품종에서만 수크로스 처리 시에 확연하게 그 유전자가 발현한다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 Flavone synthase의 경우에는 남천에서도 희미하게 발현되는 것이 관찰되었다.

## P2 : F3G (Flavonoid 3-O-glucosyltransferase)

### P3 : FS (Flavone synthase)

2009.7.23. perilla- cDNA/ PCR

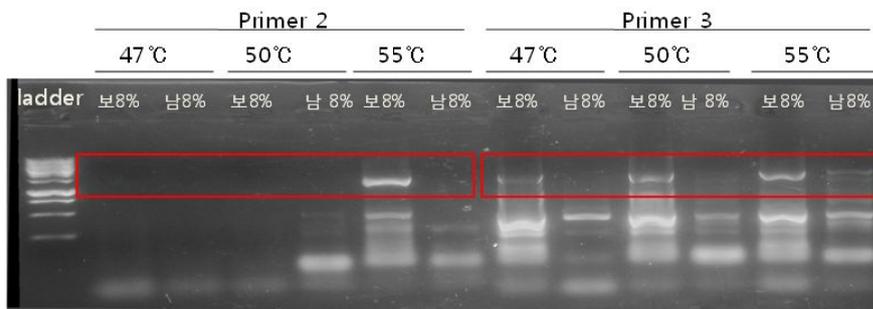


Fig. 50. Flavonoid3'-O-glucosyltransferase and flavone synthase mRNA expression of *perilla frutescens* leaves on different annealing temperature.

#### 4. 들깨 flavonoid 3'-hydroxylase gene을 애기 장대로 형질전환

##### (1) 연구 목적

들깨의 플라보노이드 생합성에 관여하는 유전자원을 클로닝하여 애기 장대를 이용하여 형질 전환 후 들깨 유전자원 발현을 통하여 본 유전자원의 기능을 검증한다.

##### (2) 연구 내용

애기 장대의 변종인 tt7은 F3'H 유전자의 기능 부재로 인해 씨나 잎의 상태가 정상적인 애기 장대에 비해 색이 누렇게 나타나므로 안토시아닌의 과 발현에 따른 차이를 알기에 적합하다고 판단하여 형질 전환하는 식물로 사용하였다. 처음 유전자를 형질 전환한 세대의 각각의 식물에 번호를 붙였으며, 들깨의 F3'H 유전자를 애기 장대의 변종인 tt7에 형질 전환시킨 후에 그 세대의 씨를 받아 다시 키운 후, 그 식물에서 추출한 cDNA를 short F3'H gene primer를 이용하여 RT-PCR 하였다.

##### (3) 연구 결과

Fig. 51은 들깨의 F3'H 유전자를 애기 장대의 변종인 tt7에 형질 전환시킨 후에 그 세대의 씨를 받아 다시 키운 후, 그 식물에서 추출한 cDNA를 short F3'H gene primer를 이용하여 RT-PCR 한 것이다. 처음 유전자를 형질 전환한 세대의 각각의 식물에 번호를 붙였는데, 그 중 1번 식물에서 밴드가 나온 것으로 보아 들깨의 short F3'H 유전자가 1번 식물에 제대로 형질 전환되어 있음을 알 수

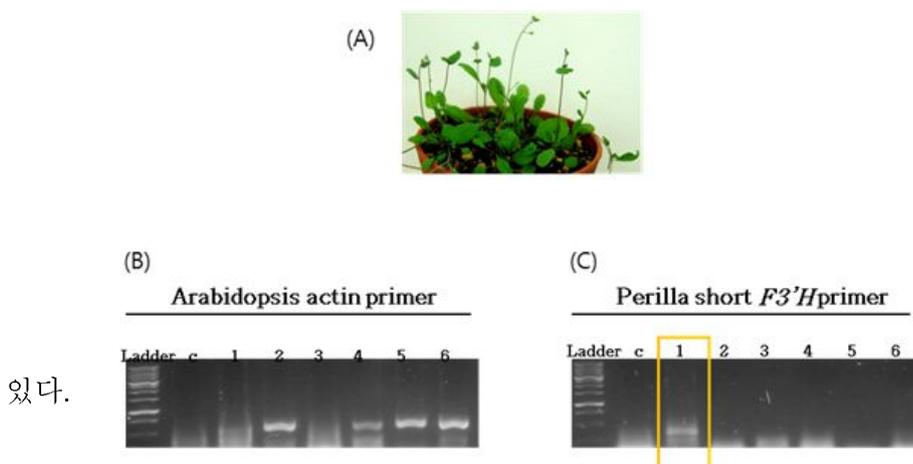


Fig. 51. *perilla frutescens* flavonoid 3'-hydroxylase gene expression in transgenic *Arabidopsis*. (A) *Arabidopsis* in a pot, (B) RT-PCR using *Arabidopsis* actin primer, (C) RT-PCR using *perilla frutescens* short F3'H gene primer. In case of short F3'H gene primer PCR, line 1 shows that *perilla frutescens* F3'H gene was transformed to *Arabidopsis thaliana*.

## 5. 정상 개체와 형질 전환 개체의 저항성 비교

### (1) 연구 목적

들깨로부터 얻은 유전자원을 애기장대를 이용하여 형질 전환 후 정상 애기장대와 형질 전환 애기장대의 저항성을 비교하여 스트레스에 대한 민감성을 조사한다.

### (2) 연구 내용

들깨의 F3'H 유전자를 애기장대에 형질 전환시킨 후에 그 세대의 씨를 받아서 살균된 고품 MS (Murashige and Skoog) 배지에서 키웠다(Fig. 52). 비교를 위해서 애기장대의 col-0 ecotype을 대조군으로 사용하였고, Fig. 49에서 밴드가 나온 1번 식물과 나머지 중 5번 식물을 실험에 이용하였다. 또한 설탕 처리 하에서의 저항성을 보기 이전에, 애기장대의 저항성을 비교하는 데 가시적인 차이를 확인할 수 있는 스트레스 물질인 NaCl 처리시의 저항성을 살펴보기로 하였다. 100 mM, 200 mM, 300 mM 의 NaCl이 포함된 MS배지로 옮겨 4일 동안 키운 후의 성장정도를 비교하였다. Fig 52, 53을 토대로 다른 물질을 처리하지 않은 MS배지에서 4일 정도 키운 애기장대의 col-0 ecotype과 F3'H 유전자가 과 발현된 애기장대를 6% 설탕이 포함된 MS배지로 옮겨 다시 4일간 키운 후 관찰해 보았다.

### (3) 연구 결과

Fig 52, 53, 54에서 ox는, F3'H 유전자가 과 발현된 것을 의미한다. 다른 물질을 처리하지 않은 MS배지에서는 애기장대의 col-0 ecotype과 F3'H 유전자가 과 발현된 애기장대의 성장에 차이가 없어 보였다.

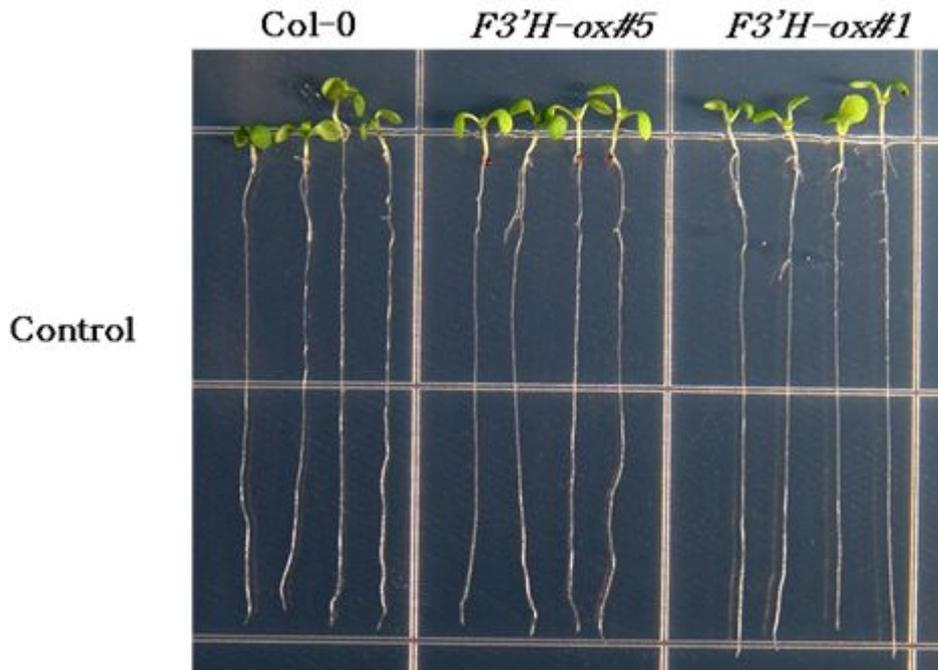


Fig. 52. Arabidopsis transgenic plant with *perilla frutescens* flavonoid 3'-hydroxylase gene (control). This MS was treated by nothing. Ox #1 and ox #5 are Arabidopsis transgenic plants that F3'H gene was over expressed in col-0 ecotype of Arabidopsis thaliana.

100 mM, 200 mM, 300 mM 의 NaCl이 포함된 MS배지로 옮겨 4일 동안 키운 후의 생장은 애기장대의 col-0 ecotype과 F3'H 유전자가 과 발현된 애기장대 사이에 차이가 보였다(Fig. 52). 100 mM NaCl에서는 F3'H 유전자가 과 발현된 애기장대가 col-0 ecotype보다 길이가 짧아 생장이 저조한 것처럼 보이지만, 300 mM NaCl에서는 col-0 ecotype의 잎이 누렇게 변질된 것에 비해 F3'H 유전자가 과 발현된 것의 잎은 초록 빛을 유지하고 있다. F3'H 유전자가 과 발현된 애기장대가 col-0 ecotype에 비해 NaCl에 대한 저항성이 강하다는 것을 알 수 있다.

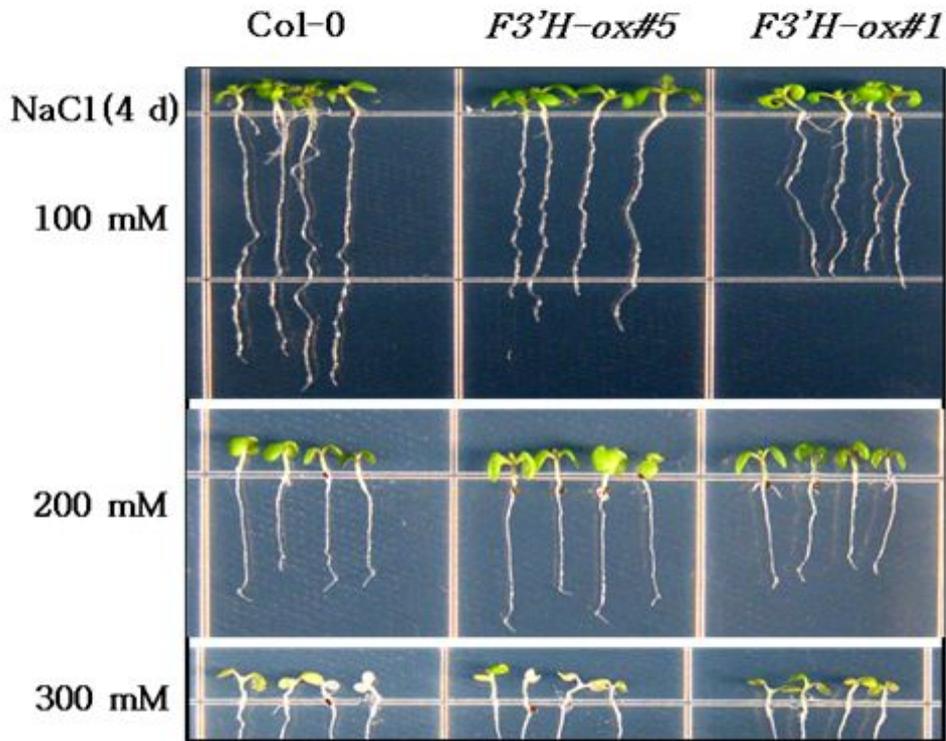


Fig. 53. Arabidopsis transgenic plant with *perilla frutescens* flavonoid 3'-hydroxylase gene (treated with NaCl). Ox #1 and ox #5 are Arabidopsis transgenic plants that F3'H gene was over expressed in col-0 ecotype of Arabidopsis thaliana.

Fig. 52, 53을 토대로 다른 물질을 처리하지 않은 MS배지에서 4일 정도 키운 애기장대의 col-0 ecotype과 F3'H 유전자가 과 발현된 애기장대를 6% 설탕이 포함된 MS배지로 옮겨 다시 4일간 키운 후 관찰해 본 결과, 애기장대의 col-0 ecotype보다 F3'H 유전자가 과 발현된 애기장대가 더 길게 자란 것으로 보아 설탕에 저항성이 더 강한 것으로 추측할 수 있다.

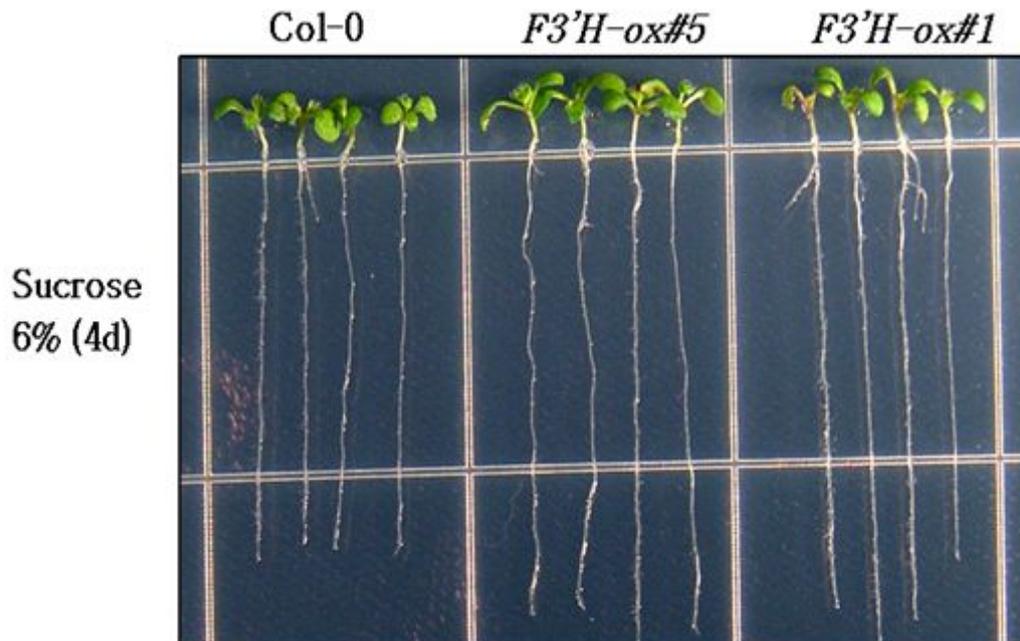


Fig. 54. Arabidopsis transgenic plant with *perilla frutescens* flavonoid 3'-hydroxylase gene (treated with sucrose). Ox #1 and ox #5 are Arabidopsis transgenic plants that F3'H gene was over expressed in col-0 ecotype of Arabidopsis thaliana.

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 1 절 연구개발의 달성도 및 기여도

연차	목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
제 1 세 부 1차년도	갯잎을 이용한 차/시즈닝 제품 개발을 위한 로스팅 시간에 따른 관능평가 실시	<p>갯잎의 로스팅 조건(온도, 시간)에 따른 소비자의 기호도를 분석하기 위한 관능평가를 실시하였으며, 밀양시 농업 기술센터와 연계하여 차년도 연구를 위한 갯잎을 보급함.</p> <p>이에 당초 계획하였던 목표를 100% 완료하였기에 1차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.</p>	<p>갯잎 차/시즈닝 제품 개발에 필요한 로스팅 과정 후 관능평가를 통해 최적의 조건 선정에 대한 기초 자료를 얻음.</p> <p>밀양시 농업 기술 센터와 연계를 통한 갯잎 연구를 진행함</p>
	고기능성 갯잎의 액상화, 분말화 연구 및 재배 방법의 현장 적용에 따른 고려사항 연구	<p>갯잎 차/시즈닝 제품 개발을 위한 최적 로스팅 조건을 선정하였으며, 액상화 및 분말화 연구를 통하여 최적의 생산루트를 선별하였음.</p> <p>고기능성 갯잎 재배 방법을 현장에 적용함에 있어 생산단가 및 생산량, 병충해 저항성 등에 대하여 연구하였음.</p> <p>이에 당초 계획하였던 목표를 100% 완료하였기에 2차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.</p>	<p>제품 개발을 위한 최적 로스팅 조건을 선정하였으며, 제품 생산과 밀접한 관련이 있는 재료의 제형 연구를 실시하였음.</p> <p>고기능성 갯잎 재배의 능가 적용에 있어 문제점이 없음을 확인하였음.</p>
	고기능성 갯잎의 시즈닝 제품화 및 화장품 소재화 연구	<p>고기능성 갯잎을 이용한 시즈닝 제품화를 위하여 선정된 최적의 로스팅 조건을 이용하여 기업형 scale-up 공정을 따라 시즈닝 시작품을 제작하였음.</p> <p>또한 화장품 소재화 연구를 진행할 예정이었으나, 고기능성 갯잎의 피부 미백 활성이 나타나지 않아 화장품 소재화 연구를 대신하여 시즈닝 제품의 안전성을 확인하는 연구를 진행하였음.(1협동)</p> <p>이에 당초 계획하였던 목표를 전부 수행하지는 못하였지만 다른 항목을 추가하여 연구하였으므로 3차년도 과제를 100% 완료하였음.</p>	<p>고기능성 갯잎을 이용한 시즈닝 제품의 시작품을 제작 완료하였으며, 이의 안전성을 확인하여 추후 제품화의 안전성에 관련된 기초 자료로 사용함에 있어서 기여함.</p>

연차	목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
1차년도	기능성 성분의 간 재생 및 보호 효과 검토	<p>갯잎을 품종별로 확보하여 이차대사산물을 포함하는 추출물을 powder로 획득한 각 추출물의 이차대사산물을 HPLC로 측정하였으며 항산화 능력 측정 완료하였음.</p> <p>이에 당초 계획하였던 목표를 100% 완료하였기에 1차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.</p>	<p>품종별 추출물을 통하여 간 보호 활성과 연관이 있는 항산화 활성 및 이차대사산물 측정으로 고기능성 갯잎 개발을 위한 품종 스크리닝에 기초 자료를 얻음.</p>
2차년도	고기능성 갯잎의 간보호 기능성 성분 함량 및 효능 비교	<p>일반 갯잎에 비하여 높은 간 보호 활성을 나타내는 고기능성 갯잎을 이용하여 추출물을 획득하고, 이를 이용하여 간 보호 활성을 <i>in vitro</i> 수준에서 측정하였음.</p> <p>또한 갯잎 차/시즈닝 제품을 위한 로스팅 과정 후 기능성 성분의 변화를 측정하여 최적의 로스팅 조건을 선정하였음.</p> <p>이에 당초 계획하였던 목표를 100% 완료하였기에 2차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.</p>	<p>고기능성 갯잎의 간보호 활성을 확인하였으며, 고기능성 갯잎 재배법 확립으로 농가 적용시 소득 증대에 기여할 수 있음.</p> <p>로스팅 조건 확립을 통하여 제품 생산에 관한 연구에 기여함.</p>
3차년도	고기능성 갯잎의 기능성/안전성 검토	<p>고기능성 갯잎 추출물의 단회투여독성과 14일 반복투여 독성실험을 실시하여 안전성 검증을 완료하였음.</p> <p>동물 모델을 이용하여 고기능성 들갯잎 추출물의 간 보호 활성을 혈액학적, 혈액생화학적, 조직병리학적으로 확인하였음.</p> <p>또한 갯잎 차/시즈닝 개발을 위한 로스팅 과정 후 볶음과정에서 생길 수 있는 벤조피렌의 생성 유무를 측정하였음.</p> <p>피부 미백 화장품 제품으로의 가능성을 확인하기 위하여 미백 기능에 관한 실험을 진행하였음.</p> <p>이에 당초 계획하였던 목표를 100% 완료하였기에 3차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.</p>	<p>고기능성 들갯잎의 안전성을 확인하였으며, 간 보호 기능성과 안전성 자료를 바탕으로 여러 가지 의약품이나 기능성 식품 소재로 활용 할 수 있으며, 이러한 소재로 적용이 된다면 안전성과 기능성 자료로 사용할 수 있음.</p>

연차	목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
1차년도	고기능성 들깨 품종 스크리닝	<p>여러 배양 조건에서 다양한 들깨를 품종별로 키워서 플라보노이드가 많이 생산되는 라인을 선별함.</p> <p>기능성, 소비자 기호도와 생산자 선호도를 종합하였을 때 고기능성 깻잎 개발 품종으로 남천 품종과 보라 품종을 선별함에 당초 계획하였던 목표를 100% 완료하였기에 1차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.</p>	<p>소비자의 기호도와 생산자의 효율성을 고려하고, 기능성을 확인하여 고기능성 들깻잎 개발 시 생산과 소비의 측면의 고려 사항을 확인함</p>
2차년도	선별된 고기능성 들깨 품종의 생육, 배양 조건 다양화를 통한 이차대사산물 생산 최적화 조건 확립	<p>농도별 설탕물 처리 방법을 통하여 고기능성 깻잎 재배 방법을 연구하였음.</p> <p>이미 알려진 호르몬과 설탕물을 이용한 재배 방법을 통하여 안토시아닌 함량을 증가시킨 고기능성 깻잎 재배 방법을 확립하였음.</p> <p>이에 당초 계획하였던 목표를 100% 완료하였기에 2차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.</p>	<p>고기능성 깻잎의 재배 방법을 확립하였으며, 이를 통한 고기능성 깻잎의 재배로 농가의 소득 증진에 기여할 수 있음</p>
3차년도	고기능성 들깨의 재배지 생육 최적화를 위한 성장조절제 개발 및 이차대사산물 생산 최적화 기전 연구	<p>들깨로부터 안토시아닌 생합성과 관련된 유전자원을 획득하였으며, 이를 이용하여 애기 장대에 형질 전환을 하여 유전자의 발현을 확인하였음. 또한 이를 이용하여 형질 전환 개체의 스트레스 저항성을 확인하여 기능성 강화 시 생산과 관련된 고려사항을 확인하였음.</p> <p>이에 당초 계획하였던 목표를 100% 완료하였기에 3차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.</p>	<p>고기능성 깻잎의 기능성 강화와 관련된 유전자원 발굴로 향후 농가의 기능성 강화 작물 육종 등과 관련된 기술 개발에 기여할 것으로 예상됨.</p> <p>또한 고기능성 깻잎 생산과 관련된 스트레스 저항성을 확인하여 농가의 고기능성 깻잎 생산에 도움을 줄 것으로 사료됨.</p>

## 제 2 절 기술적 측면

- 기존 깻잎 중에서 간보호 효과를 가지는 기능성성분의 함량이 높은 품종을 선별하고 생장 조절제를 이용함으로써 고기능성 깻잎을 개발하여 농가소득을 창출할 수 있다.
- 고기능성 물질을 증가시키는 그 작용기작을 밝혀 생장조절제로 허가를 받음과 동시에 화훼 산업과 과수산업에 집중되어있는 생장조절제의 시장을 확장할 수 있는 계기가 될 것으로 예상된다.
- 소비자나 생산자가 거부하는 유전자 재조합 방식이 아닌 친환경적 공법을 이용하여 고부가가치 작물을 생산하는 식물 생장 조절제를 개발하여 다른 작물에서의 활용도를 높일 수 있다.

## 제 3 절 경제 · 산업적 측면

- 식물 생장 조절제는 일반적으로 화훼나 과수산업에서만 이용되어 왔으며 작물의 특정 성분을 높이기 위한 목적으로는 거의 사용되지 않는 실정이다. 건강에 대한 국민의 관심 증가로 인해 채소의 섭취가 늘어나고 있으며 기능성을 중시하는 소비경향이 나타나고 있다.
- 따라서 기능성을 높인 깻잎을 개발할 경우 소비자의 요구를 충족시킴과 동시에 깻잎의 부가가치를 높일 수 있고 국민건강의 증진에 이바지할 수 있다.
- 깻잎의 소비는 일반적으로 쌈채소, 절임, 튀김, 나물, 김치, 양념 등으로 이루어지는데, 저장성의 한계로 인하여 수확시기와 비수확기의 가격 변동이 2배 이상 차이가 난다. 깻잎을 이용한 차, 시즈닝, 화장품 등을 개발하여 소비패턴의 다양화를 이루면 연중 비교적 일정한 가격을 형성하여 안정적인 농가소득을 가져올 수 있을 것으로 예상된다.
- 작물은 수확시기에 잉여 생산물의 증가로 가격이 불안정하며 생산자의 생산욕구를 저하시키나 본 연구는 생물의 고부가가치 창출뿐만 아니라 잉여생산물의 가공을 통하여 가격의 안정을 도모할 수 있다.
- 특히 기존 깻잎을 이용한 차(tea) 제품이나 roasting 시즈닝 제품의 개발은 전무한 실정으로 새로운 소비형태를 창출할 수 있음.

- 깻잎의 소비는 주로 육류의 섭취와 동시에 일어나므로 육류를 구울때 이용할 수 있는 시즈닝은 소비자로 하여금 매우 긍정적인 반응이 기대되며 특히 고기능성 깻잎 차는 알콜 섭취나 활성산소에 의해 손상된 간조직의 재생효과를 가지고 있으므로 알콜 섭취 후 음용 시 다양한 생리적 기능을 기대할 수 있다.

## 제 4 절 사회 · 문화적 측면

- 고기능성 깻잎을 이용한 고부가가치 웰빙 기능성 식·의약 소재 개발로 농업분야에 있어 주변 국가와의 경쟁에서 차별성과 우월성을 확보하여 농가 발전 도모를 기대할 수 있다.
- 고기능성 깻잎의 우수한 생리적 안전성, 기능성이 검증 및 이용으로 국민보건 향상과 국가 위상 제고에 역할을 할 것으로 기대된다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 특허 등록

1. 발명의 명칭 : 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법,  
그로부터 제조된 카페인산, 및 상기 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물  
등록일자 : 2009. 12. 02  
등록번호 : 10-0930927  
출원인 명칭 : 고려대학교 산학협력단 출원  
발명자 성명 : 이광원, 이현순, 박호영

## 제 2 절 특허 출원

1. 발명의 명칭 : 식물의 안토시아닌 합성 증대 조절제  
출원일자 : 2009. 03. 13  
출원번호 : 10-2009-0021670  
출원인 명칭 : 고려대학교 산학협력단  
발명자 성명 : 이호정, 김경현, 김수아, 호세인
2. 발명의 명칭 : 기능성 들깨잎 추출물을 함유하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 조성물  
출원일자 : 2011. 04. 28  
출원번호 : 10-2011-0040273  
출원인 명칭: 고려대학교 산학협력단  
발명자 성명: 이광원, 양성용, 홍충의, 남미현, 이지영

### 제 3 절 논문

1. 저널 : Food chemistry

저자 : Ho-Young Park, Mi-Hyun Nam, Hyun-Sun Lee, Woojin Jun, Suzanne Hendrich, Kwang-Won Lee

제목 : Isolation of caffeic acid from *perilla frutescens* and its role in enhancing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activity and glutathione level

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2010, 119(2), 724-730

2. 저널 : Hort science

저자 : Md. Aktar Hossain, Sooah Kim, Kyoung Heon Kim, Sung-Joon Lee, Hojoung Lee1

제목 : Flavonoid Compounds Are Enriched in Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Leaves by a High Level of Sucrose and Confer Increased Antioxidant Activity

게재 년도, 볼륨, 페이지 : 2009, 44(7), 1907-1913

3. 저널 : Plant Science

저자 : Seungwon Choi, Ye Rim Kwon, Md. Aktar Hossain, Suk-Whan Hong, Byeong-ha Lee, Hojoung Leea, ,

제목 : A mutation in ELA1, an age-dependent negative regulator of PAPI/MYB75, causes UV- and cold stress-tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings

게재 년도, 볼륨, 페이지 : 2009, 176(5), 678-686

4. 저널 : Journal of Plant Research

저자 : Yerim Kwon, Jee Eun Oh, Hana Noh, Suk-Whan Hong, Seong Hee Bhoo, Hojoung Lee

제목 : The ethylene signaling pathway has a negative impact on sucrose-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*

게재 년도, 볼륨, 페이지 : 2011, 124(1), 193-200

5. 저널 : 한국식품과학회

저자 : 이현순, 이현아, 홍충의, 양성용, 홍성유, 박상률, 이호정, 이광원

제목 : 품종별 들갯잎 열수추출물의 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량 및 항산화력  
비교

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2009, 41(3), 302-306

6. 고기능성 갯잎의 간 보호 활성화에 대한 연구를 국제 저널에 투고 중

(*Food chemistry*, Protective effect of extracts of *perilla frutescens* nurtured with sucrose aqueous on oxidative hepatotoxicity)

7. 갯잎 추출물과 주요 성분의 간 보호 활성화에 대한 연구를 국제 저널에 투고할 예정

(*Food and chemical toxicology*, Protective effect of *perilla* leaf extract and its constituents on *t*-BHP-induced oxidative stress in liver)

8. 고기능성 갯잎을 이용한 최적 로스팅 조건에 대한 연구를 국내 저널에 투고할 예정

(한국식품과학회, 고기능성 들갯잎을 이용한 침출차의 품질 극대화를 위한 최적 볶음조건 연구)

## 제 4 절 학술발표

### 1. 국제

가. 학회 : Experimental Biology 2010

발표자 : Sung Yong Yang, Chung-Oui Hong, Yun-Chang Koo, Mi-Hyun Nam, Ji Hoon Kim, Wangzeng, Ma Yuanyuan, Sang Hee Noh, Kwang-won Lee

제목 : Effect of extracts from leaves of *perilla frutescens* treated with sucrose aqueous solution on antioxidant activities and glutathione level in HepG2 cell

발표일시: 2010. 04 (LB 218)

### 2. 국내

가. 학회 : 2009 한국식품영양과학회

발표자 : Hyun Ah Lee, Chung Oui Hong, Young Seomun, Ji Hoon Kim, Mi Hyun Nam, Wang Zeng, Kwang-Won Lee

제목 : Inhibition of Melanogenesis by Quercetrin Isolated from *Lindera obtusiloba* Blume Leaves

발표일시: 2009. 10 (P8-164)

나. 학회 : 2009 한국식품영양과학회

발표자: Sung Yong Yang, Hyun Ah Lee, Chung-Oui Hong, Sang Hee Noh, Kwang-won Lee

제목: Antioxidant activities and quantification of caffeic acid and rosmarinic acid of extracts from leaves of *perilla frutescens* treated with sucrose aqueous solution

발표일시: 2009. 10 (P8-163)

나. 학회 : 2010 한국식품영양과학회

발표자: Sung-Yong Yang, Chung-Oui, Yun-Chang Koo, Mi-Hyun Nam, Ji Hoon Kim, Wang Zeng, Ma Yuanyuan and Kwang-Won Lee

제목: Protective Effect of Extracts of *perilla frutescens* Grew up with Sucrose Aqueous on Oxidative Hepatotoxicity in Rat Liver.

발표일시: 2010. 10 (P8-124)

라. 학회 : 2011 한국응용생명화학회

발표자 : Young-hye Kim, Jee Eun Oh, Hana Noh, Suk-Whan Hong, Hojoung Lee

제목 : Identification of the flavonoid 3' hydroxylase gene from *Perilla frutescens*

발표일시: 2011. 04

## 제 5 절 그 외 활용계획

- 고기능성 깻잎 시즈닝 시제품 개발완료
- 간 보호 활성을 나타낸 고기능성 깻잎의 재배 방법을 밀양시 농업기술센터에 기술이전 한다.
- 개발된 고기능성 깻잎을 시즈닝 제품 이외에도 건강기능성 식품이나 화장품 원료 등 관련 산업에서 이용하도록 한다.
- 고기능성 깻잎을 각 지방기관과 협력하여 재배 농가를 선정 후 전문적으로 재배 및 산업화를 착수할 계획이다.
- 생리학적 안전성과 향미특성을 갖춘 고기능성 깻잎 시즈닝의 제조 공정의 완성 후 각 지방기관과 협력하여 고기능성 깻잎 생산자 및 가공업자를 선정하여 제품화 및 산업화 착수할 계획

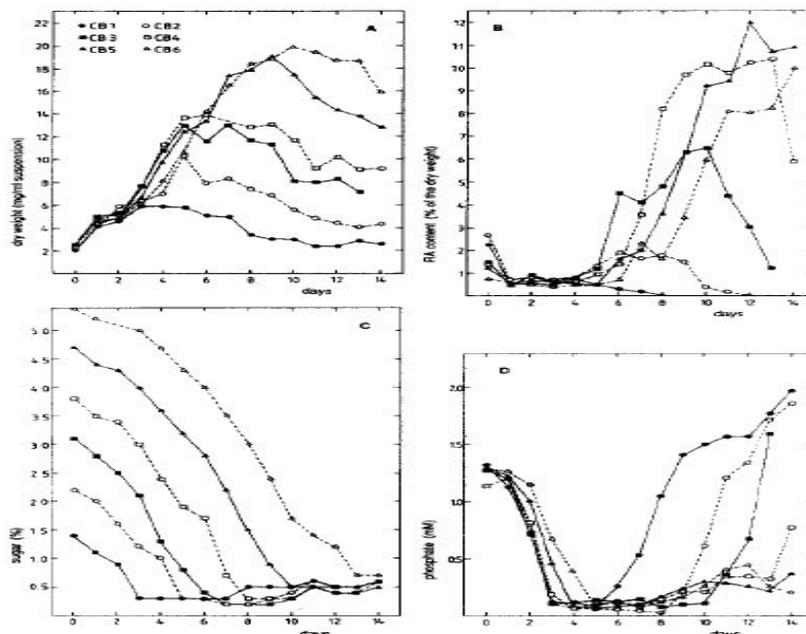
## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 1. 차와 음료를 대상으로 기능성과 제품화 연구

해외에서의 연구기술 동향을 살펴보면 차와 음료의 기능성에 대한 연구가 진행되고 있다. 차에 포함된 페놀화합물의 항산화 활성에 대한 연구가 상당수를 차지하고 있고 그 밖에 항암 효과 등에 대한 연구들이 진행되고 있다.

대체적으로 볼 때 포장방법에 다소 뒤떨어지나 국내 연구개발 현황은 세계 수준의 95% 수준으로 큰 차이가 없는 것으로 판단된다.

## 2. 설탕물 처리를 통한 rosmarinic acid 함량 증가 연구



**Fig. 1.** Characterization of a cell culture of *Coleus blumei* in CB-media with 1% (●, CB1), 2% (○, CB2), 3% (■, CB3), 4% (□, CB4), 5% (▲, CB5) and 6% (△, CB6) sucrose. (A) dry weight ( $\text{mg ml}^{-1}$ ); (B) rosmarinic acid (% of the dry weight); (C) sugar in the medium (%), measured as refractive index; (D) phosphate in the medium (mM).

Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*, 1993, *Plant cell, Tissue and organ culture*, 34, 183-190

*Coleus blumei*를 재배하는 과정에서 배지에 1~6%의 sucrose를 첨가하였을 때 식물의 이차 대사산물인 rosmarinic acid의 함량이 증가한다는 연구 결과를 보여주고 있다. 이는 본 과제 of 고기능성 껌을 개발하기 위한 재배 방법 연구와 비슷한 경향을 나타내고 있다.

### 3. 들깨잎의 이차대사산물 연구

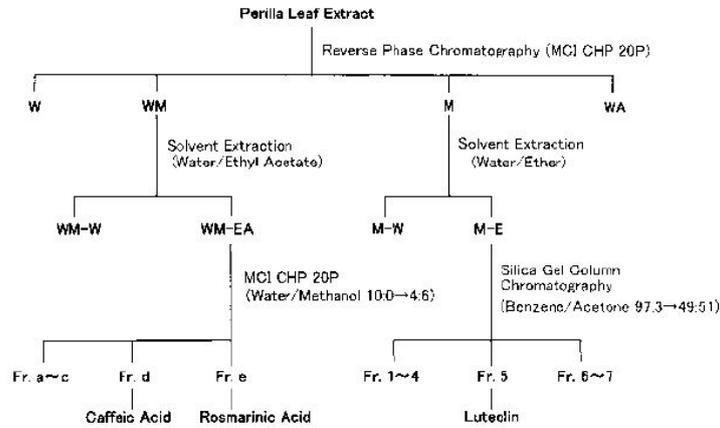


Fig. 2. Isolation of the Active Constituents from Perilla Leaf Extract

PLE was applied to reverse phase chromatography with MCI CHP 20P. The methanol fraction (M) was further fractionated by 4 step silica gel chromatography which used ether, benzene-ethyl acetate, chloroform-methanol and benzene-ethyl acetate again. The 50% methanol (W : M) fraction was also further extracted with 50% ethyl acetate and gel filtration chromatography with Sephadex LH-20. Each fraction was investigated for its *in vitro* TNF- $\alpha$  inhibitory activity. The final purified fractions were analyzed by  $^{13}\text{C}$ -NMR and the components were identified.

Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *perilla frutescens*, 2002, *Biol. Pharm. Bull.*, 25(9), 1197-1202

위의 연구에서는 깻잎을 이용하여 이차대사산물인 caffeic acid와 rosmarinic acid를 분리·정제 하였다. 본 연구진이 특허로 등록한 깻잎으로부터 caffeic acid를 분리·정제하는 방법과는 차이가 있지만 본 연구 과제를 수행함에 있어 지표 물질로 생각하는 caffeic acid와 rosmarinic acid를 깻잎으로부터 분리·정제한 내용은 비슷한 결과를 보여주고 있다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Chen, J. H. and C. T. Ho (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(7): 2374-2378.
2. Nardini, M., F. Natella, V. Gentili, M. DiFelice and C. Scaccini (1997). Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: An in vivo study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 342(1): 157-160.
3. Frankel, E. N., S. W. Huang, R. Aeschbach and E. Prior (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1): 131-135.
4. Osakabe, N., A. Yasuda, M. Natsume and T. Yoshikawa (2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *perilla* frutescens extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* 25(4): 549-557.
5. Takano, H., N. Osakabe, C. Sanbongi, R. Yanagisawa, K. Inoue, A. Yasuda, M. Natsume, S. Baba, E. Ichiishi and T. Yoshikawa (2004). Extract of *perilla* frutescens enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Experimental Biology and Medicine* 229(3): 247-254.
6. Kim, M. K., H. S. Lee, E. J. Kim, N. H. Won, Y. M. Chi, B. C. Kim and K. W. Lee (2007). Protective effect of aqueous extract of *perilla* frutescens on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 45(9): 1738-1744.
7. Rolland, F., B. Moore and J. Sheen (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185-S205.
8. Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 49-81.
9. Gertlowski, C. and M. Petersen (1993). Influence of the Carbon Source on Growth and Rosmarinic Acid Production in Suspension-Cultures of *Coleus-Blumei*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34(2): 183-190.
10. Hossain, M. A., S. Kim, K. H. Kim, S. J. Lee and H. Lee (2009). Flavonoid Compounds Are Enriched in Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Leaves by a High

Level of Sucrose and Confer Increased Antioxidant Activity. *Hortscience* 44(7): 1907-1913.

11. Lee H. S., Won N. H., Kim H. H., Lee H. J. Yun W. J. and Lee K. W. (2005). Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebular* in vivo and in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 28(9); 1639~1644..
12. Fenglin, H., Ruili, L., Bao, H., Liang, M. (2004). Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medical plants. *Fitoterapia* 75; 14~23.
13. Maksimovic, Z., D. Malencic and N. Kovacevic (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology* 96(8): 873-877.
14. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10): 1231-1237.
15. Mallick, S., S. K. Mandal and R. Bhadra (2002). Human placental lipid induces mitogenesis and melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Journal of Biosciences* 27(3): 243-249.
16. Hogberg J., Orrenius, S., O'Brien, P.J. (1975). Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. *European J. Biochem.* 59; 449~455.
17. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95; 351~353.
18. Lee, Y. T., L. Y. Chiang, W. J. Chen and H. C. Hsu (2000). Water-soluble hexasulfobutyl[60]fullerene inhibit low-density lipoprotein oxidation in aqueous and lipophilic phases. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 224(2): 69-75.
19. Reed, D. J., J. R. Babson, P. W. Beatty, A. E. Brodie, W. W. Ellis and D. W. Potter (1980). High-Performance Liquid-Chromatography Analysis of Nanomole Levels of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Related Thiols and Disulfides. *Analytical Biochemistry* 106(1): 55-62.
20. Chau-Jong Wang, Jin-Ming Wang, Wea-Lung Lin, Chia-Yih Chu, Fen-Pi Chou and

- Tsui-Hwa Tseng, (2000). Protective Extract of Hibiscus Anthocyanins Against tert-butyl Hydroperoxide-induced Hepatic Toxicity in Rats. Food and Chemical Toxicology 38 ; 411~416.
21. Chuen-Lan Liua, Jin-Ming Wangb, Chia-Yih Chub, Ming-Tzong Chengc, Tsui-Hwa Tseng, (2002). In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide -induced rat hepatotoxicity. Food and Chemical Toxicology 40; 635~641.
  22. GOW-CHIN YEN, CHI-TAI YEH, AND YEN-JU CHEN, (2004). Protective Effect of Mesona procumbens against tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Acute Hepatic Damage in Rats. J. Agric. Food Chem, 52; 4121~4127.
  23. Hyun-Sun LEE, Nam Hee WON, Kyoung Heon KIM, Hojoung LEE, Woojin JUN, and Kwang-Won LEE, (2005). Antioxidant Effects of Aqueous Extract of Terminalia chebula in Vivo and in Vitro, Biol. Pharm. Bull. 28(9); 1639~1644
  24. Jin-Ming Hwang, Chau-Jong Wang, Feu-Pi Chou, Tsui-Hwa Tseng, Yih-Shou Hsieh, Wea-Lung Lin, Chia-Yih Chu, (2002). Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. Arch. Toxicol. 76; 664 - 670.
  25. Jin-Ming Hwang, Tsui-Hwa Tsengb, Yu-Ying Tsaic, Huei-Jane Leec, Feu-Pi Chouc, Chau-Jong Wangc & Chia-Yih Chub, (2005). Protective effects of baicalein on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rat hepatocytes. Journal of Biomedical Science 12: 389~397.
  26. Min-Koung Kim, Hyun-Sun Lee, Eun-Jin Kim, Nam-Hee Won, Young-Min Chi, Byoung-Chul Kim, and Kwang-Won Lee, (2007). Protective effect of aqueous extract of *perilla frutescens* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. Food and Chemical Toxicology. 45; 1738~1744..
  27. Park B. G., Lee H. S., Jung S. H., Koo Y. C., Hong C. O., LEE S. J. and Lee K. W. (2007). Single & 14-Day Repeated Oral Toxicity Study and Genotoxicological Safety Estimate of Plantamajoside Isolated from Plantago asiatica. J.Toxicol.Pub.Health. 23(1);79-86.
  28. Park B. G., Lee H. S., Jung S. H., Koo Y. C., Hong C. O., Won H. J., Park H. Y., Ryu Y. S., LEE S. J., Kim K. H., Park H. W. and Lee K. W. (2007). A 90 day repeated oral toxicity study on Plantamajoside concentrate from Plantago asiatica. Phytother

Res. 21; 1118~1123.

29. 식품의약품안전청. 2005. 의약품 등의 독성 시험 기준, 식품 의약품 안전청 고시 제 2005-60호
30. Fujii T., Saito M. (2009) Inhibitory Effect of Quercetin Isolated from Rose Hip (*Rosa canina* L.) against Melanogenesis by Mouse Melanoma Cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73:1989-1993.
31. Hiroyuki M., Takashi K. (2006) Specific Dual Beam Fluorometry Analysis of Benzo[a]pyrene and Benzo[k]fluoranthene in Diesel Exhaust Particulate Samples. *Environmental Science*. 13, 353-362
32. Gomez-Galera S, Pelacho AM, Gene A, Capell T, Christou P. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants, *Plant cell report*. 26(10):1689-715 (2007)
33. Meng L, Lozano YF, Gaydou EM, Li B. (2008). Antioxidant activities of polyphenols extracted from *perilla* frutescens varieties, *Molecules*. 14(1):133-40
34. Meng L, Lozano YF, Gaydou EM, Li B. (2008). Antioxidant activities of polyphenols extracted from *perilla* frutescens varieties, *Molecules*. 14(1):133-40
35. Yamazaki M, Nakajima J, Yamanashi M, Sugiyama M, Makita Y, Springob K, Awazuhara M, Saito K. (2003). Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-varietal forms of *perilla* frutescens, *Phytochemistry*. 62(6):987-95
36. Yamazaki M. (2002). Molecular biological studies on diversity of secondary metabolism in medicinal plants and application to the production in transgenic plants, *Yakugaku zasshi*, 122(1):47-56