

316006-05

통한 건강기능식품 개발

2021

농림축산식품부

제주산 흑무 및 유색무 육성을

농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003666-01

제주산 흑무 및 유색무를 육성을 통한 건강기능식품 개발

2021. 09. 29.

주관연구기관 / 제주테크노파크
협동연구기관 / 제주대학교, 콜마BNH

(전문기관)농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “제주산흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품 개발” 최종보고서로 제출합니다.

2021. 09

주관연구기관명 : 제주테크노파크 대표자

태성길 (인)

협동연구기관명 : 제주대학교 산학협력단 대표자

도양희 (인)

협동연구기관명 : 콜마비앤에이치 대표자

정화영, 윤여원(인)

주관연구책임자 : 김기욱

협동연구책임자 : 이남호

협동연구책임자 : 신태균

협동연구책임자 : 이학성

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서										보안등급 일반[○], 보안[]		
중앙행정기관명		농림축산식품기술기획평가원			사업명		농산업육성사업					
전문기관명 (해당 시 작성)					내역사업명 (해당 시 작성)							
공고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			연구개발과제번호			316006-5				
기술분류								원예작물		40%		농촌사회
국가과학기술 표준분류		식품과학	30%	기능성식품 및 소재		40%	영양 기능성평가		30%			
농림식품과학기술분류		식품영양	30%									
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문										
		영문										
연구개발과제명		국문	제주산 흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품 개발									
		영문	The development of health functional food and standardization from jeju's black and multi-colored radishes									
주관연구개발기관		기관명		제주테크노파크		사업자등록번호		616-82-15584				
		주소		(우)63608		법인등록번호						
연구책임자		성명		김기옥		직위		연구위원				
		연락처		직장전화		064)720-2831		휴대전화		010-3698-3908		
				전자우편		kimgk350@naver.com		국가연구자번호		1009-4414		
연구개발기간		전체		2016. 05. 01 - 2021. 06. 30(5 년 2 개월)								
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2016. 05. 01 - 2021. 06. 30(5 년 2 개월)						
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기업부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발 비외 지원금	
		현금	현금	현물	현금		현물		현금	현물	합계	
총계		1,870,000	18,895	126,440	750,000				2,638,895	126,440	2,765,335	
1단계		1년차	270,000	2,600	17,400	150,000				422,600	17,400	440,000
		2년차	400,000	3,640	24,360	150,000				553,640	24,360	578,000
		3년차	400,000	3,640	24,360	150,000				553,640	24,360	578,000
		4년차	400,000	3,640	24,360	150,000				553,640	24,360	578,000
		5년차	400,000	5,375	35,960	150,000				555,375	35,960	591,335
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편		비고		역할	기관 유형	
공동연구개발기관		제주대학교	신태균	교수	4691-3363	shint@jejunu.ac.kr		세부책임		학		
		제주대학교	이남호	교수	2692-7578	namho@jejunu.ac.kr		세부책임		학		
		콜마비엔에이치	이학성	부장	8882-8085	mildpeople@kolmarbnh.co.kr		세부책임		기업		
위탁연구개발기관		성산농협	현용행	조합장	4508-4187			위탁		농협		
		소남(영)	김문준	대표	2020-2902			위탁		농가		
		고마촌(영)	김길호	대표	3697-0099	dde784@cho.com		위탁		농가		
		어깨동무(영)	오영철	이사	8662-6474			위탁		농가		
		제주향	김승철	대표	8661-3252			위탁		기업		
		진산	장동훈	대표	9168-8979			위탁		기업		

연구개발기관 외 기관	헬스크레임	하기찬	대표	5127-8366	omphalos9121@hanmail.net	용역	기업
연구개발담당자 실무담당자	성명		김기옥		직위		연구위원
	연락처	직장전화	064)720-2831		휴대전화		010-3698-3908
		전자우편			국가연구자번호		

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2021 년 09 월 일

연구책임자:

김 기 옥



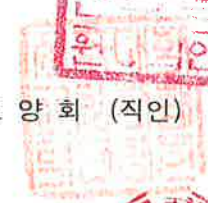
주관연구개발기관의장: 제주테크노파크원장

태 성 길



공동연구개발기관의장: 제주대학교산학협력단장

도 양 화 (직인)



공동연구개발기관의장: 콜마비앤에이치대표 정 화 영, 윤 여 원 (직인)



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

사업명		농생명산업기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호		316006-5	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	식품과학	30 %	원예작물	40 %	농촌사회	30%	
	농림식품 과학기술분류	식품영양	30 %	기능성식품 및 소재	40 %	영양 기능성평가	30%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)								
연구개발과제명		제주산 흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품 개발 사업						
전체 연구개발기간		5년 2개월						
총 연구개발비		총 2,765,335 천원 (정부지원연구개발비: 1,870,000천원, 기관부담연구개발비 : 145,335천원, 지방자치단체: 750,000천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(1) 종료시점 목표(8)		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구 개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제주산 흑무 및 유색무의 간 건강 개선 건강기능 개별인정원료 개발 및 농용 자원화 <ul style="list-style-type: none"> - 원료자원화: 간 기능 완화 분야 작용기전이 확립된 원료(흑무, 유색무)의 자원화 1식 - 원료표준화: 식품의약품안전처 개별인정형 지표물질 및 기능성분(유효성분) 추출 1건 - 제주산 흑무, 유색무의 건강기능식품 개별인정원료 자료 확보 및 신청: 생리활성 기능 2등급 - 제품개발: 생리활성기능 2등급 이상의 글로벌 건강기능식품 개발 1건 이상 ○ 기능성 무 (흑무, 유색무 등) 유전자원 30품종 <ul style="list-style-type: none"> - 제주산 기능성 무 품종의 농용자원화를 위한 대량 생산기술 확립 1식 - 기능성 물질 증강 기술 1건 이상 - 농가 실증 재배 및 보급(10농가 이상) ○ 국내외논문 15건 이상 ○ 특허출원 12건 이상 ○ 흑무 및 유색무 기능성물질 분석 및 지표물질 생산 방법 개발 ○ 제주 흑무 및 유색무 이용 기능성 식품 개발 및 글로벌 마케팅 ○ 유용성분 함유 고부가가치 건강지향성 식품 개발 및 상품 다양화 						
	전체 내용	<p>■ 연구의 목적 및 내용</p> <p>○ 제주 월동채소는 동절기(12월 ~ 3월)까지 생산되는 작물(무, 양배추, 브로콜리, 비트 등)로서 2,000년부터 급성장하여 제주농가소득에 많은 기여를 하여왔다. 제주월동무는 높은 당도와 좋은식감으로 김치, 찜무, 치킨무 소비시장이 육지부의 가을무를 제치고 각광 받는 채소로 자리매임을 하여 왔다. 그러나 2010년부터 월동</p>						

무 생산은 급성장 하였다. 2019년도 주요 통계를 보면, 재배면적 5,000ha에서 35~40만톤이 생산되어 가격폭락으로 이어져 농가소득 및 농촌경제를 어렵게 하고 있는 실정이다. 그 동안 제주도와 행정시에서는 산지폐기, 감축방안, 시장격리 등의 다양한 정책을 수립하여 시장안정과 과잉공급 예방정책을 수립하여 왔으나 가시적인 성과는 얻지를 못하는 실정이다. 그리고 현재 제주에서 월동무로 재배되는 품종은 100%가 백무 품종으로서 식품가공 방향으로 전환하는데 한계가 있으며, 또한 가공식품 품목 역시 단순가공 식품으로 제한되어 있어 기능성무 발굴과 관련 효능 연구가 시급한 실정이다. 본 연구는 월동무(백무) 대체작물을 발굴하고 그 효능을 연구하여 건강지향형 식품, 건강기능식품 등을 개발하여 백무재배 면적 감축 효과와 더불어 다양한 식품 소재로 개발 될 수 있도록 기초 및 응용 연구결과를 제공한다. 그리고 제주월동채소산업 육성 및 제주월동무 산업 경쟁력을 확보하고자 본 사업을 수행 하였다.

○ 흑무 및 유색무 재배기술 확립

- 23종 다양한 유색무 품종을 확보하여 적응 및 생육시험을 걸쳐 제주토양에 적응과 생육 양호한 품종 3종(흑무, 적무, 과일무)을 선발 함.
- 선발된 품종을 파종시기, 시비량, 미생물제제 살포 시험 등을 통하여 3품종에 대한 재배기술을 확보 함.

○ 흑무 및 유색무에서 유전자 분석을 통한 마커 개발

- 선발된 3종 및 11품종에서 trnL, ITS, rpl, 유전자 분석을 통해 유전자마커 및 계통유연 관계를 규명 함.

○ 흑무 추출물 및 발효추출물 효능평가 확립을 통한 산업화 기술 확립

- 1) 흑무추출물을 제조하여 항염증 효능 연구(NO억제효과, iNOS, Cox-2, 염증성 사이토카인 등 염증성 인자 억제 효과) 및 기작 연구, 2) 항비만 연구(지방세포 분화억제 효과 및 관련 인자(C/EBP, RRAR-r 등) 발현 억제효과 및 기전 연구, 3) 간세포 보호 효과 연구(Oleic acid에 의한 지방간 억제 효과 및 MDA 생성억제) 기작연구, 4)간암세포, 대장암세포, monocyte에서 항암효과 연구(흑무추출물-Cu chelating의한 cell apoptosis 효과), 5) Insulin resistance 간세포(HepG2)모델에서 glucose uptake 효과 연구를 통한 제2형당뇨 개선 효과 확립 함.

○ 흑무 잎 성분인 Kaempferitrin (kaempferol-3,7-bisrhamnoside) 효능

- 흑무잎에 가장 많이 함유된 flavonoid 화합물로서, insulin resistance HepG2 세포와 3T3-L1세포에서 glucose uptake 효과가 매우 뛰어나 항당뇨 개선 소재 활용 그리고 활성산소(ROS) 억제 효과가 뛰어나 성인병 예방 및 개선소재 개발

○ 흑무차 제조방법 및 흑무차 항염증 효과 연구

- 흑무차를 개발하여 차의 항염증 효과(NO, iNOS, IL6 단백질 또는 mRNA 발현 억제효과)를 분석하여 흑무차의 우수성 확보

○ 제주산 어린흑무(young black radish) 추출물과 발효물의 성분 분석 및 효능 연구

어린흑무(파종후 40일)를 확보하여 주요성분 분석 및 효능연구를 수행 하였다.

주요 물질로서는 kaepferitin 계열물질이 메인 천연화합물로 구성하고 있으며, 유산균 발효를 통해 Afzelin으로 전환되는 기술을 확보함. 그리고 발효와 비발효 추출물의 항염증 효과, 지방간 개선 효과 분석을 어린검정무 우수성을 확보하여 산업화소재로 활용 할수 있는 원천기술을 개발 함.

○ 건강기능식품 개별인증을 위한 지표물질 발굴, 선정 및 분석조건 확립

- 흑무 및 흑무발효물에서 용매분획, HPLC, MP-LC, NMR 등을 사용하여 glucosinolate 등 총 20여개 물질을 분리 및 정제 그리고 구조를 분석 함.
- 검정무 추출물에서는 phenylalanine, 3-hydroxymethyl-2-pyrrolidinethione, 3-(ethoxy-methylthio)methyl-2-pyrrolidinethione, 등 8종 분리 하여 구조분석 함
- 검정무 발효물에서는 phenyllactic acid, a-linolenic acid, glucoraphenin, glucoraphasatin, glucobrassicin 등 8종의 천연물을 분석 함
- 검정무 및 검정무 발효물에서 공통으로 일정하게 유지되는 α-linolenic acid을 지표 물질로 확정함.
- 흑무 앞에서는 keapferitin 등 7개 화합물을 분리하여 구조분석 및 화합물을 동정 하여 흑무산업화 기반에 필요한 phytochemical 성분 정보를 확보함으로써 식품소재 개발에 활용할 수 있는 기반 마련.

○ 흑무추출물과 융합소재 발굴 연구

- 흑무추출물과 융합할 소재를 발굴하여 건강지향형 식품소재, 건강기능식품소재 발굴을 위하여 제주특산 소재인 돌외(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) 추출물을 이용하여 항바이러스 효과를 분석 함.
- 그 결과 돌외 추출물은 PR8-GFP 바이러스로서 이용한 infection 억제 효과와 면역강화 관련 cytokine(INF-a,b, TNFa, IL-1b 등) 증강 효과 기술을 확보하여 향후 흑무추출물과 융합하여 면역 강화제 소재와 건강지향형 식품으로 개발 하 원천기술을 확보함. 그리고 관련 특허를 출원 하였으며, 향후 코로나 바이러스 억제소재로 개발 예정 임
- 둘째 융합소재로는 제주갓(*Brassica juncea jeju*) 추출물로서 지방간 억제 (hepatic steatosis) 억제 효과, 지방세포 분화(adipogenesis) 억제효과
- 셋째 융합소재로는 Disulfiram(DSF)의 항비만 효과 연구
알코올 중독치료제로 사용되는 DSF를 지방세포 분화 억제 및 항비만 인자들(C/EBPα, PPARγ, aP2)를 억제하여 항비만 관련 원천기술을 확보 함.

○ 실험동물을 이용한 비알콜성지방간 모델에서 흑무의 효능 평가 시스템구축 및 건강기능식품 개발을 전임상연구 자료 확보

- 검정무 발효 분말의 고지방식이 동물 모델에서의 효능 평가 : 고지방식으로 간손상을 유도한 후, 검정무 발효 분말을 투여한 경우, 효능을 확인함.
- 사염화탄소(CCl₄)에 의한 간손상 모델에서 검정무 추출물과 발효물에 대한 효능 평가에서는 급성과 만성 비알콜성 지방간 동물모델에서 모두 간손상 지표 효소를 억제하였고, 항산화 효과, 항염, 항섬유화 효과를 확인함.
- MCD diet 의한 간손상 모델에서 검정무 발효분말의 효능 평가에서는 간손상 지표효소가 낮아지고, 항염, 항산화 효과를 통해 간손상 완화 효과를 확인함.
- 흑무의 phytochemical성분인 Indole-3-carbinol, α-linolenic acid, Allyl isothiocyanate에 대한 효능 평가에서는 장손상 및 간손상 모델에서의 효능은 손상정도가 완화되었음을 확인함.
- 어린검정무 발효분말을 이용한 항비만 효과: 검정무의 수확 시기별 효능을 고

지방식이로 유도한 비알콜성지방간 모델에서 평가하였고 그 결과 항비만, 항염효과가 있음을 확인함. 따라서 흑무발효물 및 비발효물 그리고 다양한 단일 천연물을 이용하여 비알콜성지방간 동물모델에 적용한 결과 지방간 개선 및 염증개선 효과 및 관련 기전연구를 수행 함으로서 흑무산업화 발판을 마련 함.

○ 흑무발효물을 이용한 숙취해소소재 개발

숙취해소 개선소재 개발 : 시험관 및 동물 시험을 통해 Lactobacillus 속 균주를 활용한 흑무발효분말이 ADH와 ALDH의 활성을 증가시켜 숙취해소 개선에 효과가 있음을 확인하였음.

○ 건강기능식품 개별인정 추진을위한 표준화 및 제품화

- 제주산 흑무 원재료 표준화 : 수확시기, 건조조건, 추출조건 등을 고려하여 가장 높은 효능을 나타내는 원재료를 확보하였으며, 유전자 수준에서 흑무와 백무 간의 구분이 가능한 scar marker를 개발하였음.
- 제조공정 표준화, 기능/지표성분 설정 : 생물전환기술을 활용하여 2~4배의 수율을 개선하였으며 단순추출물과 동등 이상의 효능을 보이는 것을 확인하였음. 기능/지표성분 설정은 알파-리놀렌산과 식이섬유로 설정하였음.
- 원료의 기준규격/유통기한 설정 : 정상, 중금속 및 미생물의 기준규격을 설정하였음. '건강기능식품의 유통기한 설정 가이드라인'에 따라 가속 조건을 설정하였고 6개월 후 정상 변화 확인 및 유통기한 설정을 완료하였음. 공인시험기관을 통해 1년 이상 보관한 시료에 대해 지표 안정성을 확인하였음.
- 임상단계 효능평가 및 개별인정신청 자료 수집 : 경질캡슐타입의 인체적용시험 시제품을 제조하여 CRO기관에 제공하였음. 건강기능식품 기능성 원료 신청을 위해 잔류농약, 영양분석 등의 공인시험성적서를 확보함.
- 개별인정형원료 등록 및 제형개발, 제품화 : CRO인 헬스케어크레임스앤드맨 내지먼트와 협업하여 개별인정형 기능성 원료 신청을 진행 중에 있음. 제주검정무분말스틱 및 검정무발효분말의 품목제조보고를 진행하였음.

○ 개별인정형 기능성원료인정 신청 요약

- 기능성원료 신청 제출 서류 구비
- 지표물질 선정 후 공인시험기관 의뢰
 - 알파-리놀렌산, 식이섬유 가속시험 조건 함량 평가
- CRO인 헬스케어크레임스앤드맨내지먼트와 협업하여 개별인정형 기능성원료인정 신청 진행

항 목	개별인정형 기능성원료 신청 요약문
1. 원료명	검정무발효분말
2. 원재료	검정무(학명: <i>Raphanus sativus L. var. niger</i>)
3. 지표성분	지표성분 : 식이섬유, 알파리놀렌산
4. 제조공정	검정무 뿌리부위 세척 → 절단 → 정제수 1 : 1 첨가 → 95℃, 15분 열처리 → 121℃ 멸균, 15분 → 발효 (종균액을 검정무 종량대비 1% 첨가, 37℃에서 48시간 발효) → 95℃, 15분 살균 → 동결건조 신청원료
5. 규격 및 시험방법	1) 정상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미를 갖는 회갈색의 분말 2) 지표성분 : 식이섬유 260mg/g, 알파리놀렌산 3.3mg/g (표시량의 80~120%) 3) 납(mg/kg) : 5 이하 4) 총비소(mg/kg) : 5 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1 이하 6) 총수은(mg/kg) : 1 이하 7) 대장균군 : 음성 8) 아플라톡신 : 지 표 성 분 시험법 - 공인시험방법으로 분석 - 총 식이섬유(TDF) 정량 (불용성 식이섬유(IDF) 및 수용성 식

				이섬유(SDF), 단백질 및 회분량 보정	
			잔류농약	식품의 기준 및 규격」에 신청원료에 대한 농약의 잔류허용기준이 있으며, 수입식품등 검사에 관한 규정」 [별표 3] 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목에 대하여 분석한 결과 ‘불검출’ 임을 확인함	
		6. 안전성	의사결정도		신청원료는 섭취경험이 있는 무(<i>Raphanus sativus L. var. niger</i>)를 고시형 프로바이오틱스(<i>L. plantarum</i>)로 발효, 동결건조하여 제조한 것으로, 알려진 부작용이 없으며, 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하지 않았으므로 의사결정도 ‘나’에 해당함
				섭취 근거	<p><인정현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦국내 : 식품의 원료로 사용 가능 ◦국외 : 식품 원료로 널리 사용됨 <p><사용현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦국내 : 국내에서는 대부분 김치, 요리 등에 소비됨 ◦국외 : 샐러드 및 식이보충제 등으로 사용
			안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> ◦안전성 정보 DB : 알려진 부작용 없음 ◦섭취시 주의사항 : 과도한 용량을 섭취시 위장관 자극증상이 발생할 수 있음 	
			섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신청원료의 제안 섭취량 <ul style="list-style-type: none"> - 신청원료로서 960 mg/일 - 원재료로 환산 시 12 g/일(수율 8% 적용) ○ 전통적 약재로서의 섭취량(무=나복) <ul style="list-style-type: none"> - 무 원재료(즙)로서 240~1300 g/일 ○ 국외 유통제품 섭취량 <ul style="list-style-type: none"> - 유사원료로서 500~1,500 mg/일 ○ 원재료 섭취량(국민건강영양조사통계) : 원물(무)로서 하루 평균섭취량 26.3 g/일(2019년) ○ 섭취량 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 신청원료의 제안 섭취량(검정무발효분말로서 960 mg/일, 원재료로서 12 g/일)은 일상적으로 섭취하는 원료의 평균섭취량(26.3 g/일)의 1/2 수준에 불과함 	
			인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 만 19세 이상의 남녀(108명)를 대상으로 신청원료인 검정무발효분말 960 mg/일을 12주간 섭취시킨 결과, 안전성 지표(혈액학적, 생화학적, 오 검사 및 활력징후)에서 모두 정상 범위였으며, 임상적으로 유의할 만한 신청원료의 이상반응 보고는 없었음 	
			섭취 시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 영유아, 어린이, 임산부 및 수유부는 섭취에 주의 ○ 무 알레르기가 있는 분은 섭취에 주의 ○ 과도한 용량을 섭취시 위장관 자극증상이 발생할 수 있음 	
			7. 기능성	신청 기능성	간 건강 개선에 도움을 줄 수 있음
		신청 일일 섭취량		검정무발효분말로서 960 mg/일	
		세포시험		<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ HepG2 간세포, 100~2,000 µg/mL 처리 <ul style="list-style-type: none"> - 중성지방(TG) 및 malondialdehyde(MDA) : 유의적 감소(대조군 대비, $p<0.05$) 	
		동물시험		<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ CCl4-비알콜성 지방간 SD rat 모델, 250, 500 mg/kg 경구투여 <ul style="list-style-type: none"> - ALT 및 AST : 500 mg/kg 유의적 감소(대조군 대비, $p<0.05$) - Malondialdehyde(MDA) : 유의적 감소 (대조군 대비, $p<0.05$) - 쿠퍼세포 활성화 유의적 감소 (대조군 대비, $p<0.05$) 	

		<p>○ MCD diet 지방간 SD rat 모델, 50, 100, 200, 400mg/kg, 2주 동안, 경구투여</p> <ul style="list-style-type: none"> - ALT : 모든 농도에서 유의적 감소 (대조군 대비, $p < 0.05$) - AST, ALP : 200 mg/kg 농도에서 유의적 감소 (대조군 대비, $p < 0.05$) - 조직학적 변화: 100 mg/kg 유의적 손상 감소 - iNOS 발현 유의적 감소 - 간 섬유화 유의적 감소 <p>[신청원료]</p> <p>○ 건강한 성인(n=108), 960 mg/일, 12 주(RCT, DB)</p> <ul style="list-style-type: none"> - FA 주분석군 : <u>MDA 항목</u>에서 유의적 개선 (대조군 대비, $p < 0.05$) - PP 분석군 : <u>지방간지수(FLI)</u> 항목에서 유의적 개선 경향 ($p = 0.051$), <u>MDA 항목</u>에서 유의적 개선 (대조군 대비, $p < 0.05$) - PP 추가분석군 : <u>GGT, 지방간지수(FLI), MDA 항목</u>에서 유의적 개선 (대조군 대비, $p < 0.05$) <p>※ 인체적용시험기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터/원광대학교 전주한방병원/우석대학교 한방병원 (21), 시험책임자 : 이승옥/주종천/박수정</p> <p>[유사원료]</p> <p>○ 건강한 성인(n= 20), 2.22 g/일, 4주(open label, pilot study)</p> <ul style="list-style-type: none"> - GGT 유의적 감소(섭취전 대비, $p < 0.05$) <p>※ 시험물질 : 검정무건조분말</p>																											
		<p>○ 임상시험 증화분석 결과 요약</p> <p>1차 유효성 평가인 GGT가 시험군에서 -4.29 ± 18.17 U/L 감소하였으며, 위약군에서는 4.36 ± 18.37 U/L 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p = 0.033$). 2차 유효성 평가 항목 중 지방간 지수 중 FLI 항목에서 시험군에서 -3.22 ± 11.24 감소하며, 위약군에서 2.12 ± 8.89 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이를 보였으며($p = 0.013$), 항산화 지표 중 MDA에서 시험군에서 -5.84 ± 27.86 pmol/mL 감소하였으며, 위약군에서 11.39 ± 36.13 pmol/mL 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p = 0.013$)</p>																											
		<table border="1"> <caption>MDA (pmol/ml)</caption> <tr><th>Group</th><th>0주</th><th>12주</th></tr> <tr><td>대조군</td><td>103.32</td><td>104.18</td></tr> <tr><td>처리군</td><td>93.06</td><td>95.68</td></tr> </table> <table border="1"> <caption>GGT (U/L)</caption> <tr><th>Group</th><th>0주</th><th>12주</th></tr> <tr><td>대조군</td><td>57.86</td><td>61.71</td></tr> <tr><td>처리군</td><td>61.33</td><td>57.05</td></tr> </table> <table border="1"> <caption>지방간 지수 (FLI)</caption> <tr><th>Group</th><th>0주</th><th>12주</th></tr> <tr><td>대조군</td><td>68.81</td><td>71.11</td></tr> <tr><td>처리군</td><td>68.81</td><td>65.29</td></tr> </table>	Group	0주	12주	대조군	103.32	104.18	처리군	93.06	95.68	Group	0주	12주	대조군	57.86	61.71	처리군	61.33	57.05	Group	0주	12주	대조군	68.81	71.11	처리군	68.81	65.29
Group	0주	12주																											
대조군	103.32	104.18																											
처리군	93.06	95.68																											
Group	0주	12주																											
대조군	57.86	61.71																											
처리군	61.33	57.05																											
Group	0주	12주																											
대조군	68.81	71.11																											
처리군	68.81	65.29																											
		<p>○ 본 연구를 통해 백무를 대체할 흑무를 선발하여 재배기술 확보, 학술연구, 평가효능 기술, 식품소재의 표준화, 식품공정기술, 안전성평가, 전임상 및 임상시험을 수행하여 제주월동무 산업화, 헬스케어 식품 및 기능성식품산업 발전 기반을 마련 하였다. 향후 위 연구 결과를 토대로 학술적인 근거와 기업의 사업화 전략을 융합하여 상용화가 되도록 지속적인 연구개발이 필요하다. 또한, 다양한 연구결과와 공개를 통해 제주흑무 식품소재 및 고품질 식품 생산기술 개발에 활용될 수 있도록 농가와 기업간의 연계방안 마련, 실용화 사업 등을 발굴하여 다양한 식품소재로 활용할수 있는 포스트 실용화 사업 발굴 노력과 사업화를 위한 중소단위의 법인구성 단체가 필요하다고 사료된다.</p>																											
1단계 (해당 시 작 성)	<p>목 표</p> <p>내용</p>	<p>흑무를 이용한 효능 기작 연구 및 건강기능식품 개발</p>																											

연구개발성과	<p>1) 특허출원 26건</p> <p>2) 특허등록 9건</p>
--------	--------------------------------------

	<p>3) 기술이전 2건 4) 제품화 11건 5) 논문 16건 (SCI 8, 비SCI 8건) 6) 학술발표 32건 7) 교육지도 25건 8) 인력양성 25건 9) 홍보전시 25건 10) 정착활용 2건 11) 매출액 3.4억 12) 유전자원 등록 33건</p>
<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 건강기능식품 개별인증 추진을 통한 농산업 육성 <ul style="list-style-type: none"> - 개별인증을위한 인체적용실험 완료 - 식약처 개별인증 신청 - 콜마비엔에이치로 기술 이전 추진 ○ 흑무발효물을 이용한 숙취해소 음료 상용화 추진 <ul style="list-style-type: none"> - 콜마비엔에이치와 제주테크노파크가 공동 개발한 숙취해소 기술을 콜마 비엔에이로 기술이전 추진 후 상용화 ○ 특허 출원 및 등록된 지식재산권 기술이전 추진을 통한 농산업 육성 <ul style="list-style-type: none"> - 항비만, 간보호, 항암효과 지식재산권 기술 이전 추진 ○ 기 확보된 기술을 통한 흑무연구개발 계속 추진 <ul style="list-style-type: none"> - 공동연구를 통한 전임상, 임상 연구 추진을 통한 농산업 육성 - 콜마BNH와 유유헬스케어와의 지속적인 산업화 연구 ○ 전임상연구를 통한 검정무 발효 분말의 전임상 평가를 통해 본과제의 최종목표인 건강기능성식품 인증을 위한 자료로 활용됨. ○ 비알콜성 지방간의 개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능성식품인증을 통한 국민건강에 기여할 수 있을 것으로 기대됨. ○ 다양한 비알콜성지방간 동물모델에서의 적용 및 질병완화 기전연구를 통해 기초자료의 활용이 기대 됨. ○ 재배농가 기술보급 및 정착: 소남(영), 고마촌(영), 어깨동무(영), 성산농협 등 <ul style="list-style-type: none"> - 원료구매: BK-바이오(주), (주)대봉엘이스, 콜마(주), 이화(주), 쿠팡 온라인 등 지속적으로 흑무소비 증가 추이 - 유유헬스케어(주) 산업화 및 기술이전 추진 - 김치연구소와 기능성 김치 연구 추진(세계최초) ○ 현재 월동무 시장은 백무 중심으로 시장을 형성 하고있으며 가공의 한계로 치킨무를 제외하고는 생무시장이 95%를 형성 함. 따라서 기능성 흑무 도입으로 가공식품 원료, 개별인증 원료 및제품으로 시장 진입시 백무감축 효과와 흑무 확대효과가 동시에 성장 함. 따라서 제주월동무 농가 조수익이 1,800억(2000년)에서 2,500(2025년)억으로 증가 효과 ○ 국내 식품원료시장은 70%가 수입에 의존하고 있는 만큼 흑무원료가 국산화 될 경우 식품원료산업 및 기능성식품 시장이 성장 가능함 ○ 최근 코로나19 장기화에 따른 긴오성식품 시자잉 급성장 함에 따라 흑무를 원료로한 다양한 개별인증형 기능성식품이 다양하게 추진 될 것으로 예측 되면, 향후 이에 대한

	<p>수요가 급증 할 것으로 예측 됨. 흑무를 기반으로한 식품 원료 시장이 현재 3.4억원 (2021년)에서 500억원(2025년) 이상 증가 기대.</p> <p>○ 향후 검정무는 간 보호, 항비만, 면역력 강화 등 원료로 개발되어 국내 만성질병 및 성인병 환자의 식생활 개선 및 건강증진에 도움.</p>											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	16	35	5		1			33				
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비 명		규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)		ZEUS 등록번호	
국문핵심어 (5개 이내)	흑무(검정무)			흑무발효물		간보호		비알콜성지방간		월동무		
영문핵심어 (5개 이내)	black radish			black radish ferment		liver health		non-alcoholic fatty liver disease		winter radish		

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	14
1-1. 연구개발 배경 -----	14
1-2. 사업의 필요성과 목적-----	17
1-3. 사업의 방향-----	22
1-4. 사업의 범위-----	24
1-5. 연구개발 주요내용-----	26
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	36
2-1. 주관기관 (제주테크노파크) -----	36
2-2. 협동기관1.(제주대산학협력단) -----	211
2-3. 협동기관2.(제주대산학협력단) -----	262
2-4. 협도기관3.(콜마BNH) -----	305
2-5. 위탁기관 및 공동 실적-----	332
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 -----	356
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 -----	409
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 -----	410

붙임 자료 : 인체적용시험 결과 보고서

별첨 자료 : 자체평가 의견서 및 성과활용 계획서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 배경 및 목적

□ 제주월동무는 2000년부터 재배가 시작되어 2020년도 현재 5,000ha에 350,000톤이 생산되고 있으나 가격은 폭락하여 5,000원/18kg 정도로 농가 및 제주농촌 경제는 매우 어려움을 겪고 있는 실정 임.

- 농업기술발달로 무생산량은 지속적으로 증가되고 있으나, 월동무 가격은 매우 불안하여 농촌 경제 어려움 발생
- 국내 월동무 소비시장은 지속적으로 감소하여 10년전보다 10kg/1인 이상 감소하는 추세이며, 향후 지속적으로 감소할 전망이다. 주요 요인으로는 20~30대에서 식생활 습관이 변화, 무김치 소비감소, 가정요리에서도 소비량은 감소하는 추세임. 그러나 치킨무 시장만의 미미하게 상승하는 추세를 보이고 있으나 월동무 생산 대비 소비시장을 유지 할수 있는 시장은 불가능 함.
- 월동무를 대체할만한 대체작물 개발 전략 및 연구는 매우 미비한 실정 임.

□ 고품질화, 다양화를 통한 소비자 기호도 변화의 대응

- 제주 월동무의 주 소비원은 전통 식품의 김치(깍두기, 찜, 김치, 단무지 등)와 요리(찜 등), 그리고 전통적 가공식품(말랭이, 시래기, 차 등)에 제한됨.
- 새로운 가공 및 요리 특성을 갖춘 품종, 고품질 원료 품종, 식용으로 영양가가 높고 가공성이 우수한 품종, 가축의 비육 생산성이 우수한 사료 품종 등의 육성과 기능성 성분 등의 유용물질을 생산하는 작물, 신에너지 자원 작물, 지역 특산작물 등의 도입 및 육성을 위한 추진이 필요함. 또한 농작물의 식품소재로서의 이화학적, 용도별 이용.가공특성을 해명하는 등 품질 평가 및 유통 이용에 관련된 기반기술 개발이 필요함.

백무재배에 집중	연구, 제품 미흡
	<p style="text-align: center;">Natural Antioxidants and Anthocyanins for Natural Vision Health Support</p> 
부가가치 낮다	브랜드 없다
	

< Fig. 1. 제주 무 산업 문제점 >

□ 혁신적 기술개발 및 산업화 요구

- 산·학·연 공동 연구를 통해 무의 우수성을 알리고, 첨단가공식품 공장 설립과 운영을 통하여 제주형 식품 산업 선도
- 최근에는 Omics Biology, DNA chip 기술이 개발되어 실용화되는 만큼 월동무의 효능에 대한 체계적 연구와 상품 개발에 지원할 수 있는 기초자료 확보가 시급함.
- 제주도 내 월동채소(양배추, 무, 당근, 마늘, 양파, 콜라비, 브로콜리 등)에 대한 재배연구는 활발히 진행되었으나 가공상품 개발은 매우 미흡함.
- 특히 소비자들이 상품 구매 시 필요로 하는 효능 연구, 홍보, 마케팅, 관련 가공상품에 대한 Benefit은 매우 취약함.

□ 첨단 기술 이용한 기능성 무 발굴 및 효능 검증 필요

- 현재 월동무로 재배되는 백무(맛동무, 신대지월동무, 만사형통)가 97% 이상을 차지하고 있는 만큼 출하시기 조절과 과잉 생산 시 가공원료로 대처 할 수 있는 품종발굴, 가공식품 다양화, 기능성식품 개발을 위해서는 사탕무, 콜라비, 레드비트 등 관련 품종 재배확대가 필요함.
- 매년 반복되는 월동무의 생산과잉 및 가격불안정을 해소하기 위한 무의 재배면적 분산과 품종 다양화가 필요함.
- 특히 제주는 아열대 기후를 활용한 품종(사탕무, 콜라비 등)을 도입하여 고부가가치 가공식품과 관련 상품 개발을 통해 지리적, 지정학적으로 발생하는 비용 최소화가 시급함.

□ 글로벌 사회 진입에 따른 식품 산업 육성

- 글로벌 식품산업에서도 감성, 지식, 문화, 창의 등 소프트적 요인이 반영되는 소프트화 경향을 뚜렷이 보이고 있음. 그리고 전 세계적으로 요구되고 있는 식품안전, 착한가격, 로하스 경영, 지역브랜드 등 현지화 전략 과 수출 촉진 노력을 강화해야 할 것으로 보임
- 중국 및 인도 등 아시아 신흥국이 주요 산업에서 세계 최대의 생산대국이자 소비시장으로 빠르게 성장하고 있어 신흥국 산업의 급성장에 따른 미래지향적인 시장 진입 준비. 한-중, 한-호주, 한-뉴질랜드, 한-베트남 FTA 체결 등에 따른 시장기회 및 위협요인을 명확하게 포착하고, 이에 대응하는 새로운 수출 전략 마련이 필요

□ 글로벌시장에서 경쟁력 확보 할 수 있는 제품 개발 시급

- 우리나라는 BT기술 발전과 천연물, 농산물을 바탕으로 한 신소재 물질개발 및 제품화로 세계시장에서 우수한 경쟁력을 확보할 수 있는 역량 확보. 그러나 아직까지도 국내 자체개발 건강기능식품원료는 30% 정도 머물고 있어 무엇보다 세계경쟁력 있는 국내 원료 자체개발 확대가 필요
- 건강기능식품은 의약품 대체재 산업으로서의 중요성이 인식되고 있으며 새로운 개별인정, 생산성 향상, 고부가가치화가 절실히 요구되고 있음. 그리고 미국, 유럽, 일본의 선진국을 중심으로 대부분 시장이 형성 됨에 따라 관련제품의 신규 시장 진입을 위해서는 틈새시장인 아시아 거대시장 시장인 중국, 인도 시장진출에 새로운 전략 요구. 최근 중국은 경제 성장으로 건강에 대한 관심이 높아져 시장이 급격하게 성장하고 있는 상태임
- 또한 나고야 의정서로 인한 산업계와 학계는 생물자원 사용에 부담감과 함께 사용 가능 여부에 대한 혼란이 가중되고 있어 이에 대한 대책 마련 시급함.

□ 노령화 사회 및 헬스케어 시대 진입 대비

- 국민의 건강관리 및 국가 의료정책의 패러다임이 질병치료에서 질병예방의 개념으로 전환되면서 건강을 유지·개선할 수 있는 건강기능식품의 필요성에 대한 인식과 사회적 욕구가 증가.
- 삶의 질 개선 및 인구고령화에 따른 노인성질환 증가에 따라 건강에 대한 관심이 증가하면서 '자가관리(self care)'를 위한 건강기능식품의 수요가 증가
- 향후 만성퇴행성질환 및 신종 질병예방에 대한 욕구 증대와 국제적 시장 개방으로 건강기능식품산업 시장 규모 성장에 따른 국내 건강기능 식품 산업 육성 필요
- 고령화, 실버산업 활성화에 따른 건강기능식품 개발 요구, 웰빙과 웰니스 산업 그리고 실버산업 활성화에 따른 맞춤형 또는 건강지향형 식품 요구

□ 국내 건강기능식품 다양화 요구

- 홍삼, 알로에 등 단일제품 중심에서 벗어난 시장의 확대 필요. 국내 BT산업의 확대 발전으로 건강기능성 식품 산업은 성장 잠재력이 매우 높은 산업으로 전망 됨. 그러나 홍삼, 알로에 등 몇몇 제품이 국내 시장을 대부분 차지하고 있음. 따라서 건강식품업계의 활성화를 위해서는 다이어트 제품 및 야채 섭취 보조제품 등 다양한 건강기능식품 개발 섹션 등 패러다임이 변화가 필요

□ 제주형 건강기능식품 개발을 통한 품종 다양화 유도

- 백무 품종에 치중된 재배 및 생산을 기능성 무 품종으로 전환
- 무(radish) 활용한 전통식품 식단에서 기능성, 현대식 식단위주로 소비 시장이 및 소비자 기호성 변화에 따라 기능성무 (유색무) 요구
- ※ 기능성무(functional radish)란 : 안토시아닌, glucosinolate류, sugar류가 풍부한 무품종(radish) 및 비트(beet) “레드비트, 청피홍심, 흑무, 레드볼, 보르도무, 사탕무” 등

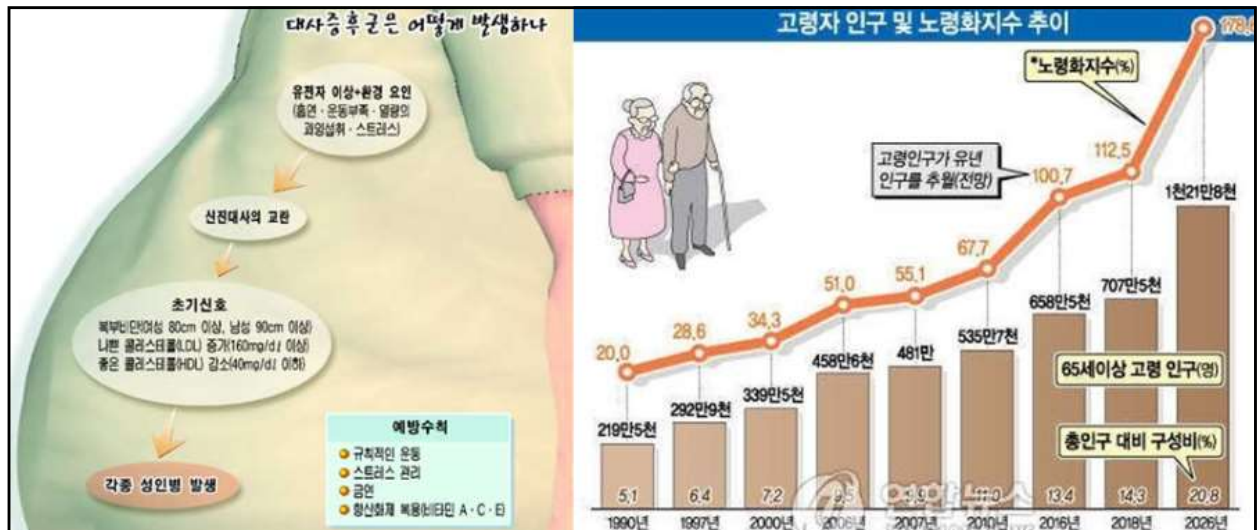
□ 본 사업이 목적은 제주 월동무 산업의 활성화와 농가 조수익 안정화를 위해서

- 백무재배에 집중된 면적을 감축하고 대신 흑무를 비롯한 유색무, 기능성무 재배 면적을 확대 정책 기획
- 또한 가공기술 개발, 제품개발, 판로개척 및 마케팅 산업을 병행하여 브랜드 육성을 추진하여 제주 월동무 산업 활성화 방안 기획.
- 흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능성식품개발과 건강지향형 제품 개발 기획
- 개발 상품의 브랜드 육성 및 판로개척 등 기획을 통해서 제주 월동무산업 활성화를 위한 백무 재배에 치중된 월동무 산업을 흑무, 기능성무 재배에서 가공으로 연결 시키고 6차산업으로 발전 방향을 제시하고자 함

1-2. 사업의 필요성과 목적

□ 초고령화 사회 진입에 따른 실버산업 육성 상품 개발 필요

- 2011년 통계청자료에 따르면 2013년에는 24%가 65세 이고, 2060년에는 40%가 될 것으로 전망됨에 따라 건강기능식품 시장 증가.
- 고령화 사회 진입과 함께 건강에 대한 의식수준이 높아지면서 전 세계적으로 건강기능식품 시장이 확대되고 있음. 건강기능식품은 질병 완화 및 예방과 같은 효능을 발휘하면서도 의약품 대비 제품화가 용이하고, 다양한 채널로 판매할 수 있다는 강점이 있음.



< Fig. 2. 노령화 사회 추이 >

□ 국가경쟁력 강화 측면

(1) 수입의존도 탈피

- 우리나라의 건강기능식품은 자체 연구개발보다는 수입의존도가 높고 다른 나라에 비해 원천기술력도 낮은 수준임.

(2) 건기식 개발 역량 및 경쟁력 강화 시급

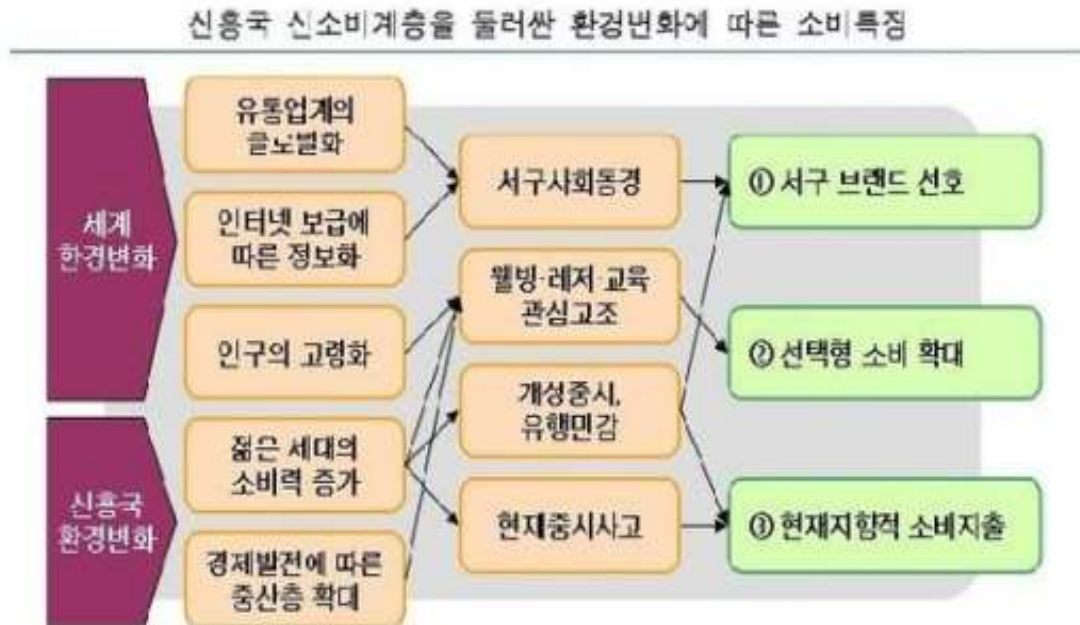
- 농산물, 자생 약용식물, 생약성분 등 기초 연구는 지속 수행되었으나 산업계와 연계 미흡으로 산업화가 저조한 실정임 그리고 국내 업체가 대부분 영세하여 수입산에 비해 많은 연구개발비용과 시간적 소요가 큰 상황임

(3) 글로벌 시장 진입 전략 요구

- 향후 k-food 활성화 및 확대에 따라 관련 식품시장이 증가될것으로 전망됨. 따라서 관련 건강기능성 식품 개발과 브랜드 육성을 하기 위해서는 글로벌 시장에 진입전략 수립에 앞서 진입시장이 법령, 규정등 이해 시급
- 세계 건강기능식품 시장의 1위인 미국의 NDI((New Dietary Ingredient) 규정, Supplement Facts 규정 등 이해, 일본의 건강증진법, 식품 위생법, 중국의 식품위생법 22조, 마지막으로 EU 법령은 유럽연합진행위원회(European Commission, EC)규정 등을 이해하고 진입전략 마련 필요
- 국내외 소비시장 변화에 따른 전략식품 개발 필요
- 제주 월동무 산업의 가장 어려운 점은 소비자 시장 외면이 가장 큰 요인 임. 지난 10년간 무 소비량은 30kg/인에서 18kg/인으로 감소하고 있으나 제주 월동무 생산량은 지속적 성

장세임. 따라서 20~30대의 식생활 변화, 서구식 음식 선호, 관련 가공식품 부재 등이 월동무 산업을 어렵게 하고 있음.

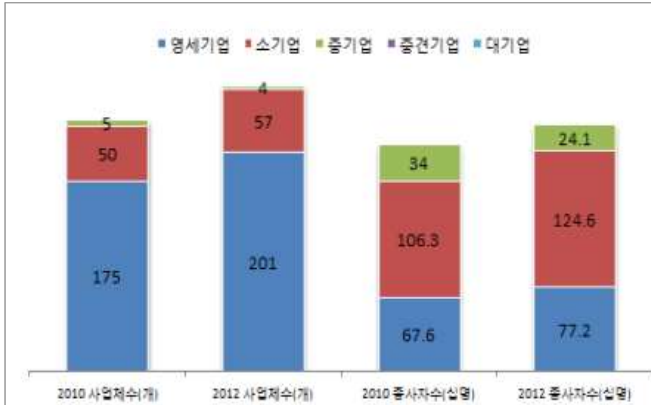
- 따라서 기능성 식품 및 건강지향형 식품 개발, 정보화예따른 마케팅 전략 수립, 젊은 소비력 증가 요소 개발 시급



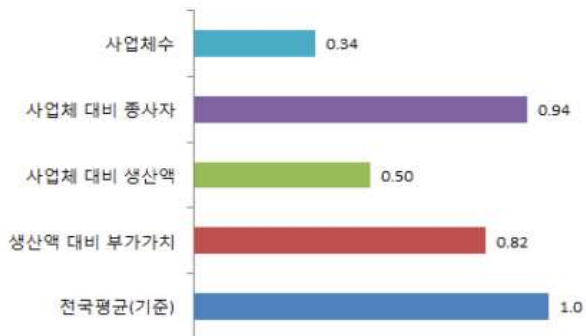
< Fig. 3. 신흥국 소비 트렌드 >

□ 제주특별 자치도 측면

- 건강기능식품 개발 선도 기업과 제주 농산업 연계 필요
 - 콜마비앤에이치는 당귀혼합추출물을 주 원료로 하는 개별인정형 최초 면역증진 건강기능식품인 ‘해모힘’의 급성장과 함께 관계사 한국 콜마를 통한 우수한 품질과 합리적인 가격대의 화장품 판매 확대로 높은 성장세를 이어갈 전망.
 - 콜마비앤에이치의 2015년 매출액은 전년동기대비 +31.9% 성장한 2,197억원, 영업이익은 전년대비 42.1% 증가한 336억원을 달성할 전망
 - 제주 월동무 산업 발전 핵심은 가공사업과의 연계는 필수 이다. 따라서 기능성 무품종 도입과 생산 그리고 가공기술 융합을 통해 안전정 농가 조수익 확보와 기업 매출 증가 연계.
- 농산업과 관광산업 연계한 농식품 산업 활성화
 - 15년도 제주를 찾은 관광객은 1,500만명이며, 외국인은 300만명 정도 방문한 것으로 보고됨
 - 특히 외국인 방문객 비중은 중국의 80%이상 차지하고 있으며 다음으로 일본 순으로 분석 됨
 - 그러나 이를 활용한 상품개발, 판로, 브랜드육성 등은 관광객으로부터 구매력이 매우 저조한 실정 임
- 제주 식품산업 경쟁력 강화위한 연구개발 투자 필요



<종사자 규모별 사업체/종사자수 현황>



<전국평균 대비 경쟁력>

- 식품산업 사업체수는 영세기업과 소기업이 98%를 차지하는 영세한 구조(2012년 사업체조사 기준)
- 2010년 대비 2012년 사업체 수는 15.0% 증가, 영세기업(1~9명)에서 소기업(10~49명)으로 도약 한 기업이 존재하지만 소기업에서 중기업 이상의 도약은 미미
- 식품산업 관련 업종의 종사자는 전국평균(1.0)과 비슷한 수준(0.94)이나, 생산액 대비 부가가치는 전국평균보다 다소 낮고(0.827), 사업체수, 사업체 대비 생산액 0.34, 0.50로 열위에 있는 것으로 파악

< Fig. 4. 제주 식품산업 추이 >



< Fig. 5. 제주 산업구조 >

○ 제주식품산업 SWOT 분석

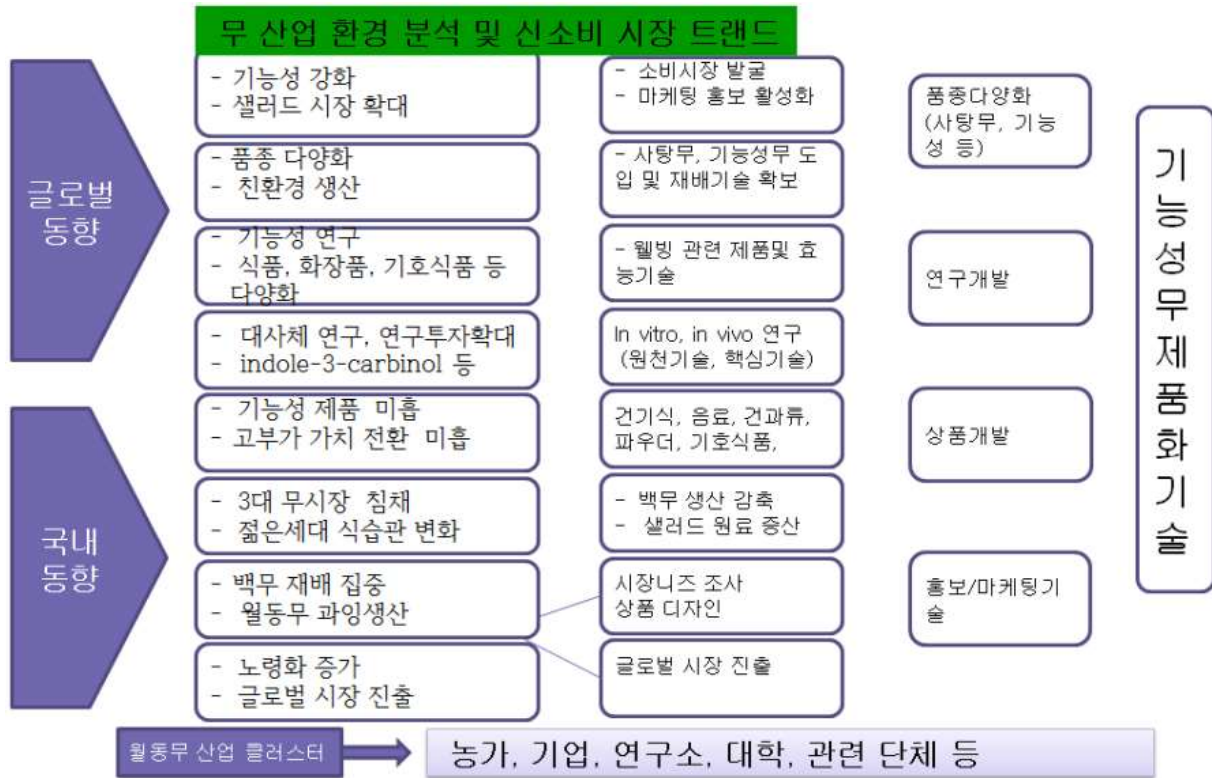
외부환경	내부역량	강점(Strength)	약점(Weakness)
		<ul style="list-style-type: none"> ○ 지자체의 식품산업 육성 의지 ○ 1차 산업 기반 지역 특산품 발달 ○ 식품산업 인프라 조성 등 산업화 기반 확대 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 영세한 사업체 규모와 기술 경쟁력 취약 ○ 낮은 브랜드 인지도 및 상품기획 역량 취약 ○ 단순가공제품 생산 구조
기회(Opportunity)		SO전략	WO전략
<ul style="list-style-type: none"> ○ 고령화에 따른 기능성식품 등의 수요 증가 ○ 세계자연유산 등재 등 제주도 청정브랜드 인지도 향상 ○ 산업, 기술 간의 융.복합 산업 및 시장 확대 		<ul style="list-style-type: none"> ○ 기 구축된 인프라를 활용한 융.복합 상품개발 ○ 청정제주 브랜드 인지도 활용 해외시장 진출 확대 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 청정브랜드 이미지 활용을 통한 대표브랜드 육성 ○ 융.복합 기술기반 강소기업 집중 육성
위협(Threat)		ST전략	WT전략
<ul style="list-style-type: none"> ○ FTA 시장 개방에 의한 1차 농축산물 수입 증가 ○ 중국, 동남아 국가의 경쟁국 급부상 ○ 국내외 식품안전관리 기준 강화 		<ul style="list-style-type: none"> ○ 지역 1차 산물을 활용한 특산제품 개발 확대 ○ 품질경쟁력 강화를 위한 인증시스템 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 글로벌 표준화 선도기술 확보 ○ 국내외 판로개척 확대를 위한 상품기획 역량강화

< Table 1. 제주식품산업 SWOT분석 >

주요 SWOT 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대부분 농업법인들이 재배 및 가공을 겸하고 있어 차별화 식품개발 어려움, 낮은 기술장벽으로 시장 경쟁력 낮음 ○ 지자체의 지원정책에 따른 고부가가치 산업 발굴 및 육성계획 반영 <ul style="list-style-type: none"> - 지역의 열악한 재정자립도로 산업 육성에 한계 대두 ○ 중소기업 및 중견기업 유치를 통한 지역 내 산업구조 변화 <ul style="list-style-type: none"> - 도외 중견기업 유치 이후 실질적인 상생협력 모델 발굴 미흡
제약 요인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 중소기업의 산업 경쟁력 약화 요인 및 환경 규제 등으로 인한 신규사업 아이템 개발 등의 어려움 발생 ○ 낮은 임금수준, 공공기관 선도 경향 등으로 지역 중소기업의 전문인력 수급이 어려운 실정 ○ 제주기업 대부분 업체가 아직도 단순생산·가공에 치중 ○ 낮은 기술력, 가공장비 및 관련 인프라 부족 ○ 관련 종사자 확보 어려움
한계점	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정책수립 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 중앙정부의 지역산업육성 정책의 잦은 변화와 투자예산의 감소로 지역 내 중소기업들의 R&D와 비R&D 사업의 참여가 제한되고, 산업의 지속적인 성장에 한계 직면 ○ 지역산업구조 및 기술·인프라 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 전략산업, RIC 등 정부의 지원사업으로 지역 내 필요한 인프라가 구축되고, 기업이 양적으로 팽창 - 반면, R&D 기술 수준의 더딘 성장과 대다수의 기업이 연구개발보다 마케팅에 의존하는 구조로 산업의 질적인 성장에 한계 노출 ○ 성과관리 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 지역산업 성과관리시스템과 개별사업 간의 연차평가시스템의 상호 연계성 부족으로 사업구조조정 및 예산배정에 한계 노출
시사점	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지역 산업의 지속적인 육성을 위한 법적 제도 보완 및 인프라 확대 필요

- 기업의 질적 확대를 위해 R&BD사업투자 확대와 서비스산업연계 지원사업 추진
- 혁신기관 간 통합관리지원시스템 구축을 통한 운영으로 지역지원사업의 프로세스 효율성 증대

○ 제주 무 (Jeju-Radish) 산업 방향 및 환경 분석



< Fig. 6. 무 시장 환경 분석 >

1-3. 사업의 방향

□ 단순 재배에서 가공 산업으로 전환

- 2013년도 생산된 월동 무는 약 33만톤 정도 추정되고 있으며, 가격은 평년의 1/3정도로서 산지폐기, 시장 격리, 자율감축 등의 대책 진행되고 있음.
- 가격 하락요인은 과잉 생산되고 있지만 타 지역의 가을 부 풍작(전북, 경북 등)과 소비시장의 위축, 식생활 변화, 시자재로서의 한계, 가공식품의 제약 등으로 분석되고 있음.
- 그러나 대책방안으로는 보상비 확보 문제, 생산 농가 불안 심리, 농가 경영난 문제 발생 등으로 지역 농가에서 부가적으로 발생하는 제주 산업을 근본적 해결은 재배 및 단순 가공에서 탈피가 필요함.

□ 주기적으로 반복되는 월동무 파동 극복 방안

- 2012년도 월동무 시장격리, 산지폐기 등의 월동무 수급조정에 도비(6억원) 민자 등 17억 4500만원 지원하고 있으나 근본적 해결 방안 못 찾음.
- 2014년도 역시 반복되는 월동무 파동으로 도비 9억원, 국비 27억이 투입됨.



< Fig. 7. 월동 무 자구책마련 노력 >

□ 제주특별자치도는 바이오산업을 지역전략사업으로 육성

- 식품가공, 화장품가공 공장을 건립하여 관련 기업들을 지원하고 있음.
- 바이오 제품품질관리를 위한 KOLAS 인증, 자가품질검사기관을 추진하고 있음.
- 지역 농산물 연구개발 및 가공산업 지원 및 지역바이오산업 활성화 지원 하고 있음.

□ 지자체의 확고한 의지

- 제주특별자치도와 서귀포시는 기능성무와 가공 산업 육성 방안을 마련 중임.
- 서귀포시는 지역 내 관련기관((재)제주테크노파크, 동부농업기술센터, 온난화대응농업연구소, 성산일출봉농협, 관련 가공기업)과 무 가공 및 기능성무 확대 MOU 체결함.
- 흑무 및 유색무 가공 및 제품개발 지원
 - 제주특별자치도 식품산업과에서 월동무 산업 및 농가소득 안정 정책
 - 월동 채소류에 대한 연구개발비 투자 확대
- 선진국 수준의 기술 확보를 통한 농산업 발전 마련

- 미국이나 일본, EU 등 선진국들은 생명자원 R&D 국가전략을 수립하여 생물자원 소재 개발을 국가 우선 기술개발 과제의 하나로 추진
- 선진국은 노화억제, 장수, 안전 및 건강수명 연장 등 고부가가치 기능성 식품 소재화 기술개발 강화
- 다양한 식품 및 천연소재 유래의 기능성 물질에 대한 유효성을 높이기 위한 생체 흡수효율증진 기술과 질환 목표전달 기법 개발이 주요한 기술로 부각
- 유효물질의 생체 흡수율 제고를 위하여 발효기술, 물리화학적 전환, 생화학적인 효소 반응기술을 적용하여 경제성 확보를 위한 대량생산시스템 구축을 위한 연구로 확대되는 추세 임
- 기능성 식품소재는 선진국 업체가 가격적으로 기술적으로 우위에 있어, 국내 업체의 경쟁력은 비교적 낮은 것으로 평가되고 있다. '농산자원 및 천연물 유래 식의약소재 개발기술'의 경우, 최고기술보유국 대비 6.6년의 기술격차(농림수산식품기술기획평가원, 2014), '식품 신소재 개발기술'은 4.4년, '영양 및 기능성 식품개발 기술'은 4.8년의 기술격차를 보이고 있음(한국농수산식품유통공사, 2013)

□ 농축산 자원의 고부가가치화와 활용도를 증진 기술 미흡

- 원료농산물에 대한 가공연구는 비교적 활발하게 이루어 지고 있으나, 국내 채소분야 연구는 식품제조업체에 대한 접근성이나 활용도가 매우 미흡한 실정이다.
- 현재 쌀, 보리, 밀, 콩, 잡곡 등 주요 곡물류에 대한 가공적성을 규명하고 최적 가공용 품종을 보급 추진하거나 개발된 품종의 다양한 활용가치 차원으로 접근하고 있지만 채소류식품가공과의 연계성은 부족한 실정이다.
- 또한 친환경 야채 중 근채류의 가공식품으로의 용도 확대를 통한 최적 가공적성 기술 개발을 위한 중간소재의 규격화 및 상품화 기술 개발이 필요하다.
- 국내 채소 자급율은 타작물에 비교해 매우 높은 편이나 가공식품으로서의 기초 원료로 공급비율이 매우 낮은 편임. 향후 농식품산업이 농업의 수요처로서 제 역할을 하기 위해서 가공산업, 제품연구개발 투자 필요.

□ 기존 무의 문제점 및 가공 식품의 한계

- 국내 무 품종은 대부분 백무 재배에 국한되어 있으며 전국 과잉 생산으로 인한 가격 폭락이 이루어지고 있는 실정임.
- 제주도는 월동무 재배에 유리한 지형을 갖고 있고 특히 동부지역은 무가 자라기 좋은 기후와 물 빠짐이 좋은 토양을 갖고 있어 제주도 70%정도의 생산량이 동부지역에서 이루어지고 있으나, 제주 월동무산업 또한 백무 품종에 집중되어 있고 국내 가을무 풍작에 따라 가격 경쟁력이 결정되는 구조임.
- 월동무의 주 소비원은 전통식품의 김치와 요리(찜 등) 그리고 가공식품(치킨 무, 단무지, 무말랭이)에 제한되고 있음. 그러나 최근 생산량은 증가하고 있으나 소비시장이 정체되어 있어 백무에 대한 과잉생산이 큰 문제점으로 부각되고 있음.
- 이런 과잉 생산을 방지하고자 다양한 백무 가공식품이 만들어지지만 제주도에선 단순 세척 및 가공시설이 있어 무말랭이, 단무지, 치킨 무 이외에 다양한 제품을 만들 수 없음.

□ 새로운 무 품종 재배 및 고부가가치 상품 차별화

- 제주도가후가 아열대기후로 변하면서 다양한 무 재배환경이 변함에 따라 제주도는 이러한 백무 중심의 과잉생산 문제점을 개선하고자 다양한 신품종 무 재배를 추진하고 있음.

□ 제주지역 특화 전략식품 개발 기술 육성

- 건강과 삶의 질에 대한 관심의 급증으로 고급화된 식문화에 대응 가능한 로컬푸드나 에스닉 푸드 등의 수요가 지속적으로 증가
- 지자체와 지역농협을 중심으로 지역 농산물의 부가가치를 향상시키고 지역경제의 활성화를 위한 지역특화 식품개발 필요.
- 지역특화식품의 상당수를 차지하는 전통식품 기술수준은 선진국(최대기술 보유국: 일본)대비 낮은 수준(83.8%)이다. '전통식품 기술'은 최고기술보유국 대비 3.9년의 기술격차를 보이고 있으며(농림수산식품기술기획평가원, 2012), '전통식품의 현대적 제조공정기술'은 최고 기술 대비 2.0년의 기술격차(한국농수산식품유통공사, 2013)를 보임.
- 따라서 월동무 가공산업은 제주지역의 특화 전략 식품산업으로 성장할수 있는 높은 잠재력을 가지고 있는 만큼 적극적인 육성 전략 필요

1-4. 연구범위

□ 최종목표

- 제주산 흑무 및 유색무의 간 건강 개선 건강기능 개별인정원료 개발 및 농용 자원화
 - 원료자원화: 간 기능 완화 분야 작용기전이 확립된 원료(흑무, 유색무)의 자원화 1식
 - 원료표준화: 식품의약품안전처 개별인정형 지표물질 및 기능성분(유효성분) 제출 1건
 - 제주산 흑무, 유색무의 건강기능식품 개별인정원료 자료 확보 및 신청: 생리활성 기능 2등급
 - 제품개발: 생리활성기능 2등급 이상의 글로벌 건강기능식품 개발(과제수행중 5년) 1건 이상
- 기능성 무 (흑무, 유색무 등) 유전자원 30품종
 - 제주산 기능성 무 품종의 농용자원화를 위한 대량 생산기술 확립 1식
 - 기능성 물질 증강 기술 1건 이상
- 농가 실증 재배 및 보급(10농가 이상)
 - 국내외논문 15건 이상
 - 특허출원 12건 이상
 - 흑무 및 유색무 기능성물질 분석 및 지표물질 생산 방법 개발
 - 제주 흑무 및 유색무 이용 기능성 식품 개발 및 글로벌 마케팅
 - 유용성분 함유 고부가가치 건강지향성 식품 개발 및 상품 다양화

<기술분야>	<특 상>	<목표 및 추진 방향>
재배기술	재배, 유전자원 확보 기능성 물질 축적 재배	기능성 무 유전자원 확보 기능성물질 증가 기술 개발 농가보급 및 재배기술 고도화
기능성연구	무 산업화 중심, 지표물질 등	Glucosinolate 분석 및 효능기술 anthocyanin 효능 및 기능연구 in vitro, in vivo 연구 대사체 이용 관련유전자, 질환개선 및 예방
전임상, 임상 연구	타겟질환 기장 이해 및 첨단기술 활용	장 및 간기능 개선 효과 비알콜성, 알콜성 간질환 개선 phase1, 2 관련 대사 및 디톡스 효능
건강기능성 식품 개발	식약처 개발인증고시 시장 진입	흑무추출물 및 발효물 중심으로 한 액상, 분말, 과립, 음료 등 레시피 개발 IRB 승인 획득 인체적용시험 개별인증원료 고시 신청 및 등록
일반식품 개발	무의 특징을 활용한 가공식품 개발, 기호식품 개발	웰빙사회 수요 관점의 식품 개발 건강지향형 식품 개발 흑무를 원료 기반 유망기술 및 상품 발굴

□ 정량적 목표 및 성과(실적)

성과목 표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	억 원	건	억 원	억 원	명	억 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	15	10		5		10	5		10				10	10	10	5	10		
최종목표	14	8		1		10	10		5				10	18	20	2	13		
총 사 업 년 도	실 적	26	9		2		10	3.44		6				32	25	25	2	25	
달성율 (%)		185	150		200		100	68.8		120				320	250	125	100	192	

1-5. 연구개발 주요내용

1) 흑무(Black Radish) 및 유색무 재배기술 확보

- 무품종 라이브러리(15품종) 확보 및 재배적응 기술
- 흑무(검정무), 적무, 수박무 선발 및 재배기술 확보
- 시비에 따른 유색무 재배기술 확립
- 파종시기에 따른 유색무 성장 연구
- 2,4-D처리에 의한 glucosinolate, anthocyanin 증진 효과 연구

2) 흑무 및 유색무 유전자 분석

- 2속(*Raphanus*, *Brassica*) 3종(*Raphanus sativus*, *Raphanus sativus niger*, *Brassica juncea*) 11품종에서 3종류 유전자 (trnL, ITS, rpl) 분석
 - 계통 유연관계 분석
- 흑무, 제주갓 유전자 마커 발굴
- ITS 유전적 거리지수는 0.020로서 trnL (0.0020)과 rpl(0.0005)보다 높은 유전자 변이 및 다형 현상이 높음

3) 흑무 추출물의 항염효과

- 항염증 연구
 - mouse monocyte RAW264.7세포에서 NO생성, 염증성cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 억제효과
 - 염증성 인자 iNOS, COX-2 발현 억제 효과
- 항염증 메카니즘 연구
 - 흑무추출물의 IL6-Jak2-STAT3 pathway에 의한 항염증 기작 확립
 - Nrf2/HO-1 pathway에 의한 항염증 기작 확립

4) 흑무추출물의 항비만 효과

- 3T3-L1 지방세포 분화유도억제를 통한 항비만 효과
 - oil red 염색 및 TG분석을 통한 중성지방 억제효과
 - 지방세포 분화 인자 PPAR- γ , C/EBP- α , aP2, 등 단백질 발현 억제효과
 - qPCR 분석을 통한 지방세포 분화 인자 SREBP1, ACC, FAS, SCD, ADD1 등 mRNA 발현 억제 효과
- 흑무추출물의 항비만 효과 메카니즘 연구
 - AMPK/ Nrf2-HO1 인자에 의한 지방세포 분화 억제 기작 확립

5) 흑무 추출물의 간보호효과

- 비알콜성 지방간 개선 효과 연구
 - Oleic acid처리에 따른 지방간세포 개선 연구

- 지방세포 분화 및 TG(중성지방) 합성 억제 효과
- MDA 생성억제 효과

□ 지방간 분화억제기작 연구

- 추출물에 의한 Nrf2, Cyp1A2, HO-1 효과 촉진 효과
- 흑무 추출물의 간 염증인자(IL-6, LPS) 활성 억제효과

□ 밀크시슬과 흑무추출물의 비교 연구

- 밀크시슬 추출물은 Cyp1A2, Nrf/HO-1 의한 지방간 개선 효과 없음

□ 흑무추출물의 Nrf2 활성에의 타겟 유전자 활성연구

- 세포보호 및 방어, 그리고 항산화 활성을 갖는 인자 NQO1, CYP1A1, HO-1, GCLC, GCLM 등 mRNA 발현 분석

6) 흑무 발효물의 효능 분석

□ steatosis 억제 효과

- 지질 및 중성지방(TG) 억제, AST 억제
- AMPK 및 pACC 활성화를 통한 지방간 억제

□ 간세포에서 Phase II 유전자 발현 효과

- 간기능 보호 및 활성화를 촉진하는 UGT1A1, SULT2A1 ALDH3A1 mRNA 발현 효과
- 검정무 추출물의 ID-1, ID-2, ID-3유전자 유도 효과

□ 흑무 발효 추출물의 항비만 효과

- 3T3-L1 세포에서 지방세포 분화 억제 효과
 - Lipid 및 중성지방 합성 억제 효과
- 흑무발효물의 지방합성 인자 발현 억제 효과
 - C/EBP- α , PPAR- γ , SREBP1, aP2, FAS 단백질 억제효과
 - C/EBP- α , PPAR- γ , SREBP1, aP2, FAS mRNA 발현 억제효과

□ 흑무 발효물의 항비만, 세포보호 등 관련 인자 효과 분석

- MMP-3 발현 억제 효과
- Lcn2, Sqstm1, Wsd, Plin2 발현 분석

□ PA처리에 의한 지방간 유도 억제 효과

- 지질합성억제
- 지방간 유도인자 발현 억제 효과

7) Indole-3-carbinol(I3C) 천연물의 효능 분석

□ I3C 천연물의 항비만 효과

- 3T3-L1세포에서 지방합성 억제효과
- 지방합성 인자 단백질 발현 억제효과
 - C/EBP a, PPAR-r, aP2 단백질 발현 억제 효과

8) 흑무추출물 및 Cu 화합물의 항암효과

□ 추출물-구리 화합물 chelating 연구

- cell viability분석에 의한 HepG2 및 RAW264.7세포 apoptosis 유도 효과

□ cell apoptosis 연구

- ROS(활성산소) 촉진 분석
- cell apoptosis 인자 단백질 발현 분석
 - p-ERK, p-JNK, Bax, caspase-3, caspase-9 증가
 - 흑무 추출물과 DSF(disulfiram) 비교 연구
 - AKT, PTEN, ALDH2, Nrf2 등은 DSF에 의한 cell apoptosis와 다른 효과
- flowcytometer를 이용한 cell apoptosis 분석 연구
- cell cycle를 이용한 cell apoptosis 분석 연구
- 흑무추출물-Cu chelating의한 대장암세포주 cell apoptosis 효과
 - annexin-pi염색에 의한 cell apoptosis효과
 - cell apoptosis인자(bax, caspase-3, caspase-9) 발현연구

9) 흑무잎(black radish leaf)추출물 효능 연구 및 개발

- 항염증 효과
 - NO생성 억제효과
- 지방간 개선 효과
 - 지질 합성 억제효과
- 항비만 효과
 - 지방세포분화 억제효과
 - 중성지방 및 지질합성 억제효과

10) NGS분석에 의한 흑무추출물의 항염증 및 항비만 효과

- 항염증 효과
 - 총 26,665 개의 유전자중 2,585개의 유전자에서 염증 물질(Lipopolysaccharide, LPS)에 있어 유의한 유전자 발현을 보였으며 이중 1,137개의 유전자에서는 up-regulated 되었으며, 1,448개의 유전자에서는 down-regulated 되어졌다(|Fold-Change| \geq 2 & Q-value \leq 0.05). 따라서 염증 물질 처리를 하지 않은 집단과 염증 물질 처리를 한 집단 간에는 유의하게 다른 발현양상을 가지는 것으로 확인.
- 항비만 효과
 - NGS를 이용하여 날짜별 지방분화 전후의 발현량 차이를 확인한 결과 2,547개, 3,395개의 유전자의 발현유전자를 확인할 수 있었다.(Fig14). 지방 분화 관련 유전자 8개 -Add1, Cfd, Pnpla1, Fas, Slc2a4, Lipe, Scd1, Srebf1-의 발현양상은 아래와 같이 발현되어졌으며, 2days 에 비해 6days 에서 보다 더 많이 차이가 나는 것을 알수 있다.(Fig15) 이는 지방섬유세포의 분화과정이 preadipocyte 상태의 3T3-L1이 mature adipocyte 단계를 거쳐 Hypertrophy단계로 분화되어지는데, mature adipocyte 단계보다 Hypertrophy단계의 지방세포에서의 지방분화유전자의 발현량이 더욱 많이 발현됨을 확인.

11) 흑무 추출물의 항당뇨 효과

- Insulin resistance 3T3-L1 세포에서 glucose uptake 효과
 - 2-NBDG uptake 효과
 - Insulin 신호전달에 관여하는 IRS1, Akt, Glut4 단백질 발현 분석
- Insulin resistance 간세포(HepG2)모델에서 glucose uptake 효과
 - 발효물에서의 glucose uptake 효과 증진

12) 제주갯 효능 연구

- 항비만 및 항염증 효과
 - 지방세포 분화 억제효과
 - NO생성 억제 효과

13) Kaempferitrin (kaempferol-3,7-bisrhamnoside) 효능평가 연구

- 항당뇨효과
 - HepG2세포에서 glucose uptake 효과 증진
- 지방세포 분화 억제 효과
 - 3T3-L1세포에서 지방합성 억제 효과

14) Disulfiram(DSF)의 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과

- 지방세포 분화억제 효과
 - 지질 및 중성지방 합성 억제효과
- 지방합성 인자 단백질 억제효과
 - C/EBP-a, PPAR-r, aP2 단백질 발현 억제효과
- 지방합성 인자 mRNA 발현 억제효과
 - DSF가 adipogenesis를 조절하는 전사인자(C/EBP- α , PPAR- γ), 관련유전자(SCD1, aP2) PPAR-r 타겟유전자(AQP7, PCK1, OLR1) 그리고 ALDH2 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지 3T3-L1 분화(day-6)에 DSF를 각각 처리하여 real time RT-PCR을 통해 mRNA 발현 억제 효과
- DSF에 의한 ALDH2 억제 효과
 - DSF가 ALDH2억제를 통해서 PPAR-r억제 기작 분석

15) 검정무 EtOAc분획물과 적색무 새싹 추출물의 항비만 비교 연구

- 적무새싹 추출물과 흑무EtOAc분획물 항비만 효과
 - 검정무 EtoAC 분획물은 적색무 새싹추출물보다 2.5배 이상 지방세포분화와 lipid축적이 감소 효과
- 흑무 추출물이 C/EBP-a, FABP4 단백질 발현이 현저하게 억제
- Nrf2/HO-1 단백질이 흑무추출물에서 강하게 발현

16) 흑무차 개발

- 흑무차 레시피 개발 흑립
 - 흑무차 제조기술 개발
- 흑무차 효능 연구
 - 흑무차개발을 위한 항염증 조성물 개발
 - 염증인자 Nitric oxide 분비 억제
 - INOS, COX-2 mRNA발현, 단백질 발현 억제 효과
 - cytokine IL-1b, IL-6, TNA-a mRNA발현 억제 효과

17) 흑무 seedling 추출물 산업화 소재를 위한 연구

- HepG2 세포에서 steatosis 억제효과
- seedling 유산균 발효물에 의한 afzelin 효과
- NO생성 억제 및 항염증 효과
 - Nrf2/HO-1 발현 촉진 효과
 - 염증인자 iNOS, COX-2 발현 억제효과
 - 염증성 사이토카인 IL-1b, IL-6, TNF-a mRNA 발현 억제효과

18) 돌외 추출물 항바이러스 효과

- 추출물을 이용한 항바이러스 연구
 - 돌외 {*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino}추출물을 유효성분이라는 항바이러스 약학조성물 및 기능성식품 조성물 개발
- 항바이러스 메카니즘 연구
 - PRB-GFP바이러스 감염 억제 효과
 - 돌외추출물의 바이러스 감염 억제인자 사이토카인 IL-1b, TNF- α , IL-6, INF-b촉진 효과

19) 유색무 15품종에서의 수확 시기별 glucosinolate, 안토시아닌 함량 조사

- 1월과 3월 채집한 유색무에서의 glucosinolate, 안토시아닌 함량은 3월 채집 시료에서가 모두 높게 분석 됨

20) 흑무 조건별 추출물 제조 및 HPLC 분석

- 제주산 흑무를 건조조건별 (비건조, 열처리, 동결건조, 열풍건조 등), 추출용매 조건별 (열수, 30-70% 주정) 등 다양한 조건에서 추출물 제조 및 HPLC 분석
- 흑무 추출물 용매 분획물 제조 및 HPLC 분석

21) 흑무 추출물로 부터 단일물질 분리

- 흑무 Diaion HP-20 공정을 이용한 분리
- 용매분획을 이용한 분리 분석
- 흑무의 지표성분 발굴 및 분석조건 확립
- 분리된 화합물의 함량 분석

22) 건조방법과 추출법의 차이에 따른 흑무의 glucosinolate 함량 조사

- 동결건조, 70% EtOH추출이 열풍건조, 자연건조에서보다 높은 glucosinolate 함량을 보임

23) 흑무 발효물에 대한 지표물질 발굴 기술 확립

- 발효 추출물의 단일물질 분리, 지표물질 선정 및 분석
- 흑무 발효물의 glucosinolate 분석
 - glucoraphenin, glucoraphasatin, glucobrassicin, glucoraphenin, glucobrassicin의 함량 분석
- 검정무 발효물의 glucoraphasatin 함량 분석을 통한 지표물질 규명
- 검정무 및 검정무 발효물의 α -linolenic acid 함량 분석
- 검정무 및 발효물의 2-furoic acid 함량 분석

24) 제주산 흑무 유색무 지상부(잎)의 물질 분석 및 효능 연구

- 흑무 지상부의 추출, 극성별 용매분획 및 단일물질 분리
- 흑무 지상부(잎)의 지표물질 동정 및 함량 분석
- kaempferitrin, kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopyranoside, afzelin, lolliolide, *p*-coumaric acid, ethyl caffeate, fulgic acid 확인
- 제주산 적무의 단일물질 분리, 지표물질 선정 및 분석 확립
- NMR분석을 통한 Feruloyl malate, β -sitosterol, Fulgic acid 동정

25) 제주산 흑무 및 유색무의 화장품 소재 연구

- 흑무 지상부 추출물의 polyphenol함량, 항산화 효과 분석
- B16F10 melanoma cell의 melanogenesis 억제 효과
- 흑무 발효물의 항산화 활성
- 흑무 발효물의 항균 활성
- 적무로부터 분리한 지표성분인 feruloyl malate의 항산화 활성
- 적무의 분획물의 항염 활성

26) 제주산 어린흑무(seedling) 추출물과 발효물의 성분분석 및 효능 연구

- 어린흑무 및 발효 추출물 제조
- 어린흑무 및 발효 추출물의 HPLC 분석
- 어린무 발효 용매분획물의 항염 효능 실험
- 어린무 및 어린무 발효 추출물의 미백 효능 연구
- 어린무 발효 추출물 및 극성별 용매 분획물의 항균 효능 연구

27) 검정무의 임상 적용 농도 및 추출물별 효능 평가

- 정상동물에서 2주동안 농도에 따른 차이 및 추출방법에 따른 차이를 비교하였음.
- 간기능과 관련되 바이오마커에 대한 분석을 통해 검사할 바이오마커를 결정함.

28) 추출방법에 따른 분획물에 대한 효능 연구

- 콜마(제2세부)에서 추출된 추출물에 대한 효능 평가를 위해 3일간 투여한 후, 사염화탄소로 비알콜성 지방간을 유도한 후, 평가함.

29) 정상 동물에서 흑무 및 유색무 추출물의 LD50 조사 (용량결정)

- 정상동물에서 2주간 농도별로 경구 투여하면서 임상증상 및 체중, 침울정도를 매일 확인 하였음.
- 흑무 추출물의 투여 유무 및 농도에 따른 유전자의 발현정도를 비교하기 위해 조직을 NGS 분석을 위해 위탁연구기관에 전달함.

30) 고지방식이 급여에 의한 비알콜성 지방간 모델의 정립

- 6주간 고지방식이(60 Kcal)의 식이 공급을 통해 비알콜성지방간 모델을 정립함.

31) 비알콜성 간손상 동물모델에서의 흑무 및 유색무의 효능 연구

- 1차년도에 정립된 비알콜성 지방간 동물모델에서 흑무 추출물 및 지표물질에 대한 효능 평가
- 고지방식이에 의한 동물모델에서의 효능 평가
- 2세부에서 개발된 추출물에 대한 추출물별, 성분별 동물에서의 효능 평가함
- 바이오마커 분석: 혈청학적, 조직학적 분석을 바탕으로 항산화 작용에 대한 바이오마커를 통한 효능을 평가함.

32) 실험동물에서 검정무 발효 분말과 비발효 분말의 비교

- 총폴리페놀함량과 항산화능을 평가
- 사염화탄소 모델에서 발효 분말의 효능을 비교 평가함

33) 건강기능식품 개발을 위한 전임상연구

- 만성 모델에서의 효능 평가
- 사염화탄소를 이용한 모델과 Methionine choline deficient (MCD) diet에서의 효능 평가

34) 구축된 동물모델을 이용한 검정무 발효 분말의 효능 평가 및 단일물질에 대한 효능 평가

- MCD diet 4주간 급여, 비알콜성 지방간 모델 유도한 후, 2주간 검정무 발효 분말의 효능평가 및 단일물질에 대한 효능평가
- 흑무의 성분 중, 단일 물질에 대한 평가
- 나노기술을 이용한 기능소재의 제형화하여 흡수 효율, 효과 증대
- 분무건조를 이용한 미세입자화, 리포솜포집, 초고압 및 초음파 균질을 통한 나노 콜로이드 용액의 제조를 통한 효능 평가

35) 건강기능식품 개발을 위한 전임상연구

- 비알콜성지방간 모델(CCl₄ 투여, 고지방식의)을 유도한 후, 검정무 발효분말의 간보호 효능을 평가하였음.

36) MCD diet 급여에 의한 간 손상 시 관련 장기의 손상 연구

- MCD diet 급여에 의한 간, 신장, 고환 등 다른 장기의 손상을 비교하였음.

37) 장염모델에서의 효능평가

- Dextran sodium sulfate (DSS)로 장염모델을 유도함.
- DSS를 이용한 장염모델을 유도하기 전, 후에 검정무 발효분말을 투여하여 효능을 평가함.
- 간손상과 관련된 바이오마커 및 장염모델에서의 바이오 마커를 이용하여 검정무 발효 분말의 효능을 평가함.

38) 어린 검정무 발효 추출물에 대한 효능을 고지방식이 사료를 급여한 비만 모델에서 항비만 효능 및 대사성 질환 관련 인자들을 평가 함.

- AST, ALT, 감소효과를 보이며, TP는 증가 함.
- 부고환 지방 감소효과, 항염인자(Iba1) 감소 효과, 신장보호 효과

39) 흑무의 원재료 표준화

- 수확시기 설정
 - 흑무는 1년에 2차례(봄무, 월동무) 재배되기 때문에 수확시기에 따른 표준화
- 건조조건 설정
 - 흑무 원재료는 수분함량이 85% 이상이기 때문에 원재료 표준화를 위한 건조가 요구됨
 - 건조 기준을 수분함량 10% 미만으로 설정
 - 50°C에서 12시간, 24시간의 두가지 조건으로 열풍건조와 -80°C에서 96시간 동결건조 진행
 - 건조 흑무 원재료의 수분함량은 12시간 건조시 5%, 24시간 건조시 2%, 동결건조시 3%로 확인되었으며, 시간, 비용등을 고려해 12시간 열풍건조로 설정
 - 건조 흑무 원재료 추출물 분석 결과 비건조 추출물보다 수율 증대됨을 확인
 - HPLC분석결과 비건조 흑무 원재료 추출물에 없는 물질peak 확인

○ 원재료의 수확시기별 표준화

- 가장 높은 효능을 나타내는 원재료 확보를 위해 수확시기별 표준화 작업진행
- 파종 후 3개월이 된 미숙 흑무와 파종 후 6개월이 된 완숙 흑무의 효능 비교
- 미숙흑무와 완숙흑무를 각각 건조조건 및 추출조건에 따라 추출물 제조 후 Raw 264.7 세포주를 활용하여 항염증 효능평가 진행
- 항염증 효능평가에서는 완숙흑무가 미숙흑무보다 더 나은 NO억제 효능을 보임
- IL-6 분비억제활성에서는 모든 추출조건에서 완숙흑무가 우수한 효능을 보임
- TNF- α 분비억제활성에서는 비건조 및 동결건조 열수추출조건을 제외하고는 완숙흑무가 우수한 효능을 보임
- 따라서 최종 수확시기를 완숙기로 설정함

○ 유전자 수준에서의 표준화

- 지표성분 외에 원재료의 유전자수준에서 표준화를 위해 유전자분석 진행
- 일반적으로 사용되는 MatK유전자 부위를 이용해 PCR 시퀀싱 결과 흑무와 백무간의 상동성이 99%로 구분이 어려움
- 기본적으로 흑무(*Raphanus sativus* var. *niger*)는 백무(*Raphanus sativus*)의 변종으로, 구분을 위해 종특이 primer 설정이 필요
- 흑무와 백무간의 구분이 가능한 scar marker개발(multiplex)
- 흑무에서만 확인되는 181 bp의 유전자와 흑무와 백무 공통적으로 확인되는 102 bp의 유전자를 확인하여 원재료의 유전자수준에서의 관리 적용

40) 제조공정 표준화

○ 최적 추출조건 설정

- 기능성분의 고효율 추출을 위해 추출용매조건을 달리하여 추출진행
- 정제수, 30% 주정, 50% 주정, 70% 주정의 4개 용매조건으로 추출진행
- 적합한 추출시간 설정을 위해 30분, 1시간, 2시간, 4시간 단위로 추출물을 샘플링하여 수율 측정
- 용매 조건별 추출물을 HPLC분석한 결과 주정추출물들은 각 peak의 함량차이는 있었으나 전체적은 패턴은 동일하였고, 정제수 추출물의 경우 패턴에 차이를 보임
- 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정 결과 비건조 원재료 추출물과 건조 원재료 추출물간의 차이가 있는 것을 확인하였으며, 총 폴리페놀 함량은 비건조 원재료 추출물에서 정제수>30% 주정>50% 주정>70% 주정 순이었으며 건조 원재료 추출물에서는 70% 주정>30% 주정>50% 주정>정제수 순이었다. 총 플라보노이드 함량은 비건조 원재료 추출물에서 70% 주정>정제수>50% 주정>30% 주정순이었으며, 건조 원재료 추출물에서는 정제수>50% 주정>70% 주정>30% 주정 순으로 측정됨

○ 고효율 추출기술 개발

- 기능성분을 최적으로 추출할수 있는 추출조건 설정을 진행
- 흑무의 원재료 특성상 수분함량이 높아 비건조, 열풍건조, 동결건조의 3가지 건조조건과 정제수, 30% 주정, 50% 주정, 70% 주정 추출의 4가지 추출조건별로 설정하여 항염증 효능평가를 통해 최적 추출조건 설정
- Raw 264.7세포주에서 NO분비 억제, IL-6 및 TNF- α 분비 억제효능평가 결과 NO분비 억제는 건조조건별 차이가 거의 없었으며, 비교적 비건조에서 효능을 보였고, 추출조건 중에서는 70% 주정추출에서 가장 좋은 효능을 보임
- TNF- α 분비 억제 효능에서는 전반적으로 보았을 때, 열풍건조>동결건조>비건조 순으로 효능을 나타내었으나, 분비억제효능이 가장 좋은 추출조건은 비건조 70% 주정추출임
- IL-6분비 억제 효능에서는 건조조건간에 큰 차이는 없었으며, 비건조 70% 주정추출 조건에서 가장 높은 효능을 보임
- 따라서 최종 추출조건을 비건조 70% 주정추출로 설정하려 하였으나, 추출수율이 4% 전후로

향후 산업화에 어려움이 예상되어 생물전환기술을 적용하기로 함

○ 생물전환기술을 통한 효능 증대

- 식품원재료로 사용가능한 Lactobacillus속의 유산균을 활용하여 유산균 발효 진행
- 흑무의 매운맛은 효소인 myrosinase가 흑무의 여러 대사산물을 분해하여 발생시키는데 이때, 기능성분도 파괴될 가능성이 있어, 유산균 발효 전 살균과정을 통해 myrosinase의 불활성화도 병행
- 1차로 살균 후 마쇄하여 유산균 발효를 위한 배지 제조 후 멸균하여 유산균 접종(48시간 배양)
- 발효된 흑무는 살균 후 동결건조하여 분말화 진행
- 기존의 비건조 70%주정추출물의 수율이 4%내외인데 반해 발효물의 경우 원재료를 거의 그대로 활용하여 수분을 제외한 13%내외의 수율을 얻을 수 있음
- 유산균 발효물의 항산화 효능평가 결과 추출물 대비 높은 활성을 보였으며, 발효전보다 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 증가한 것을 확인함
- Raw 264.7세포주에서의 항염증 효능평가에서는 NO생성 억제 효능이 확인되었으나, IL-6나 TNF- α 와 같은 염증인자의 억제는 보이지 않은 것으로 보아 발효 후 기존과 다른 기작으로 작용하는 것으로 보임
- HepG2세포주에서의 지방구형성 억제 효능평가에서는 단순추출물과 동등하거나 그 이상의 효능을 보였으며, 오히려 저농도에서 더 좋은 활성을 나타냄
- 유산균 발효물이 추출물과 비교하여 효능면에서 동등하나 수율면에서 월등히 우수하기 때문에 유산균 발효를 제조공정으로 최종 설정

41) 기준규격 설정

○ 성장, 유해물질규격 설정

- 검정무 발효분말의 기준규격은 식품의약품안전처의 '건강기능식품의 기준 및 규격'에 따라 설정함
- 성상은 '이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 황갈색의 분말'로 설정
- 중금속규격은 납(Pb) 5 mg/kg 이하, 총비소(As) 5 mg/kg 이하, 카드뮴(Cd) 1 mg/kg 이하, 총수은(Hg) 1 mg/kg 이하로 설정
- 미생물 기준규격은 대장균군 및 유산균 모두 불검출을 기준규격으로 설정

42) 안정성 시험

- 상온유통을 전제조건으로 하여 25 \pm 2 $^{\circ}$ C/상대습도 60 \pm 5%의 대조군과 30 \pm 2 $^{\circ}$ C/상대습도 75 \pm 5%, 45 \pm 2 $^{\circ}$ C/상대습도 75 \pm 5%의 2개의 실험군을 지정함
- 1년 이상 보관한 시료의 지표성분 안정성을 확인함
- 대조군에서는 알파-리놀렌산 함량 0.28 g/100 g, 식이섬유 25.63 %로 확인되었으며, 실험군 1번에서 알파-리놀렌산 0.29 g/100 g, 식이섬유 26.61 %로 확인되었다. 또한 실험군 2번에서의 알파-리놀렌산 함량이 0.29 g/100 g, 식이섬유 29.74 %로 확인되었으므로 지표성분의 안정성을 확인할 수 있었음

43) 인체적용시험

○ 인체적용시험 시제품 제조

- 정제타입으로 제조 시 원료가 갖는 발효물 특유의 향미로 인해 섭취용이성이 떨어진다는 점과 원료의 비중이 낮고 잘 멩치지 않아 정제타입 제조시 필요한 부형제의 비율이 높아져 원료 함량이 1정당 최대 30% 수준임을 확인
- 경질캡슐로 제조 시 1캡슐에 80% 비율로 기능성 원료를 충전할 수 있었으며, 발효원료의 고유한 향미를 차단할 수 있었음
- 인체적용시험 시제품 제조는 경질타입으로 진행

- IRB 신청 및 승인
- 108명 대상 인체적용시험 완료
- 섭취량 결정(960mg/일)
- 주요결과
 - MDA 항목에서 유의적인 감소(대조군대비 $p < 0.05$)
 - 지방간 지수에서 유의적 감소(대조군대비 $p < 0.05$)
 - GGT지수에서 유의적 감소(대조군대비 $p < 0.05$)

담도계 질환(담낭절제술, 담낭 용종 등)의 병력이 유효성평가 결과에 영향을 미칠 것으로 판단하여 통계분석 전 단계에서 해당 대상자를 제외(시험군 3명, 위약군 2명 제외) 후 층화분석하기로 결정되었다. 층화분석한 결과를 Table 1에 요약하였다. 1차 유효성 평가인 GGT가 시험군에서 -4.29 ± 18.17 U/L감소하였으며, 위약군에서는 4.36 ± 18.37 U/L증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.033$). 2차 유효성 평가 항목 중 지방간 지수 중 FLI 항목에서 시험군에서 -3.22 ± 11.24 감소하며, 위약군에서 2.12 ± 8.89 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이를 보였으며($p=0.013$), 항산화 지표 중 MDA에서 시험군에서 -5.84 ± 27.86 pmol/mL 감소하였으며, 위약군에서 11.39 ± 36.13 pmol/mL 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.013$)

Table 1. 섭취 전·섭취 12주 후 유효성 평가 항목 변화

	시험군 (n=44)				위약군 (n=47)				p -value ²⁾	
	Baseline	12 week	Change value	p -value ¹⁾	Baseline	12 week	Change value	p -value ¹⁾		
1차 유효성 평가 항목										
간기능 지표	GGT# (U/L)	61.33 ± 29.89	57.05 ± 28.53	-4.29 ± 18.17	0.134	57.36 ± 31.66	61.71 ± 37.28	4.36 ± 18.37	0.132	0.033*
2차 유효성 평가 항목										
지방간지수	FLI	68.51 ± 23.88	65.29 ± 26.66	-3.22 ± 11.24	0.064	68.99 ± 17.81	71.11 ± 17.61	2.12 ± 8.89	0.109	0.013*
항산화지표	MDA (pmol/mL)	107.44 ± 55.72	101.59 ± 54.38	-5.84 ± 27.86	0.171	93.16 ± 42.52	104.55 ± 48.57	11.39 ± 36.13	0.036*	0.013*

Values are presented as mean \pm SD

¹⁾ Analyzed by paired t-test between baseline and 12 weeks within each group

²⁾ Analyzed by independent t-test for change value between the groups

* $p < 0.05$

Outlier was excluded (R012, R037, R045, R047, R055, R063, R068)

- 식약처 개발 인증 신청 진행 중
 - 식약처 관련 법규 변경으로 잔류농약, 성분분석, 아플라톡신 분석 재분석
 - 시험 성적서 재 발행 (한국기능성식품연구원)

44) 시제품 개발

- 혼합음료
- 흑무차
- 흑무 발효물 (티백, 숙취해소제 등)

2. 연구개발과제의 수행과정 및 수행 내용

2-1. [주관기관: (재)제주테크노파크]

1) 재배기술 확립

(1) 시기별, 시비량별 생육조사

15품종을 확보하여 시험재배를 수행한 결과 흑무와 유색무 3종(흑무, 적색무, 과일무)를 선정 하였다. 그리고 파종 시기별, 시비량 별로 파종하여 생육 조사를 실시였다. 그리고 파종한지 한 달 뒤부터 3차례 생육조사 하였다(Table 1).

○ 파종시기별로 생육이나 성분 분석을 위해서 시기별 시비량별 파종

가. 밭 파종을 위한 500평 로타리 작업(트렉터작업) <Fig.1>

나. 흑무(330평), 적색무(85평), 수박무(85평) 구간을 나누어 테이프 2알씩 파종<Fig.1>

다. 비료(원예1호복합 성분 11-7-10+3+0.6) 30포 시비(1000평)

라. 농약<제초제-등실(듀알골드 등록번호 제2-제초-274호) 1봉과

사단(등록번호 6-제초-38)> 1봉 1:1 비율로 혼합 살포

마. 농약(살충제-대풍 등록번호 6-제초-154) 8봉

- 로타리 치기 전 4봉 살포 후 씨앗테이프 파종 후 4봉 추가 살포,

농약(살충제-보라톤 등록번호 8-살충-64) 1봉 살포



<Fig. 1. 트렉터 작업 및 테이프 파종>

<Table 1. 흑무, 유색무 2종 시기별, 시비량별 시험재배 조건>

품종	흑무, 적색무, 과일무		
파종일	2016.08.29.	2016.09.10.	2016.09.22
시비량별	100%	100%, 110%, 120%	100%, 110%, 120%
생육조사일	2016년 9월 30일, 2016년 10월 30일, 2016년 11월 30일	2016년 10월 10일, 2016년 11월 10일, 2016년 12월 10일	2016년 10월 20일, 2016년 11월 20일, 2016년 12월 20일

※ 흑무, 유색무 2종 생육조사결과 (파종일:2016.08.29.)

<Table 2. 흑무 생육조사표 >

흑무 (파종일: 16.08.29.) (시비량: 100%)			
파종 후 조사항목	30일	60일	90일
근초장(mm)	90 ± 3.1	215 ± 1.2	238 ± 1.9
엽초장(mm)	285 ± 1.2	450 ± 4.1	460 ± 6.1
근직경(mm)	5 ± 0.3	40 ± 1.1	83 ± 0.8
근중량(g)	10 ± 10.1	57 ± 13.1	387 ± 53.7
엽중량(g)	32 ± 31.2	154 ± 12.4	249 ± 64.3

<Table 3. 적색무 생육조사표>

적색무 (파종일: 16.08.29.) (시비량: 100%)			
파종 후 조사항목	30일	60일	90일
근초장(mm)	130 ± 5.1	260 ± 3.2	212 ± 4.3
엽초장(mm)	220 ± 3.3	350 ± 7.2	290 ± 4.1
근직경(mm)	5 ± 2	55 ± 5.5	75 ± 1.8
근중량(g)	10 ± 10.2	184 ± 5.5	489 ± 7.8
엽중량(g)	22 ± 10.5	98 ± 20.1	87 ± 14.4



▲ 파종 후, 30일 경과

▲ 파종 후, 60일 경과

▲ 파종 후, 90일 경과

<Fig. 2. 파종일에 따른 흑무의 근, 엽 성장 변화>



▲ 파종 후, 30일 경과 ▲ 파종 후, 60일 경과 ▲ 파종 후, 90일 경과
 <Fig. 3. 파종일에 따른 적색무의 근, 엽 성장 변화>

<Table 4. 과일무 생육조사표>

과일무 (파종일: 16.08.29.) (시비량: 100%)			
파종 후 조사항목	30일	60일	90일
근초장(mm)	145 ± 5.5	210 ± 7.4	177 ± 4.9
엽초장(mm)	175 ± 3.5	300 ± 5.1	278 ± 2.4
근직경(mm)	3 ± 0.5	50 ± 3.8	56 ± 1.9
근중량(g)	5 ± 1.2	84 ± 7.9	144 ± 10.6
엽중량(g)	16 ± 10.5	74 ± 5.5	193 ± 11.8



▲ 파종 후, 30일 경과 ▲ 파종 후, 60일 경과 ▲ 파종 후, 90일 경과
 <Fig. 4. 파종일에 따른 과일무의 근, 엽 성장 변화>

○ 흑무 파종 시기별, 시비량별 생육조사 결과 (파종일:2016.09.10.)

<Table 5. 흑무 시비량에 따른 생육조사>

흑무 (파종일: 16.09.10) -근초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	115 ± 4.1	190 ± 5.3	207 ± 0.6
110%	65 ± 6.6	190 ± 10.2	188 ± 5
120%	70 ± 1.3	205 ± 12.5	198 ± 2.3

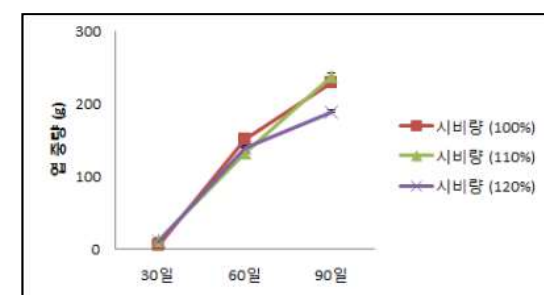
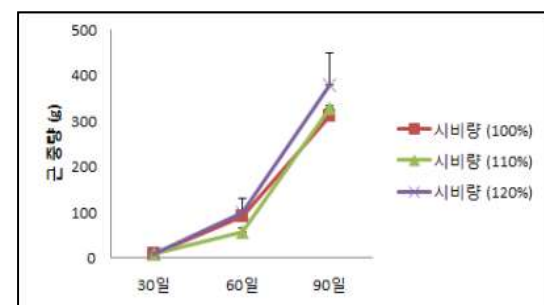
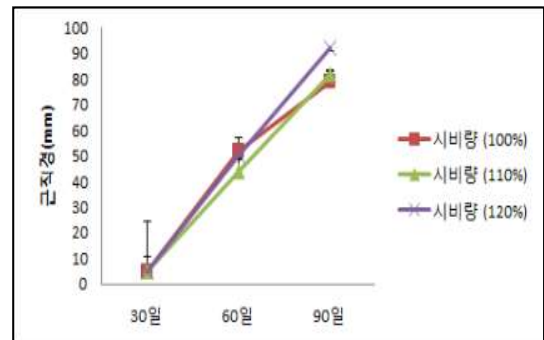
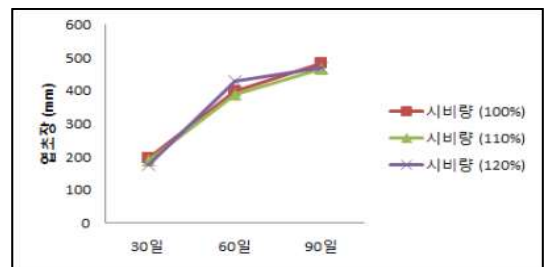
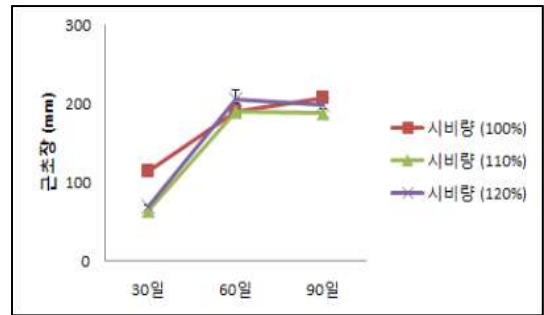
흑무 (파종일: 16.09.10) -엽초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	195±10.2	400 ± 6.3	483 ± 5.5
110%	190 ± 19.4	390 ± 5.3	465 ± 4
120%	175 ± 1.1	430 ± 5.6	468 ± 4.5

흑무 (파종일: 16.09.10) -근직경(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5 ± 9.2	52 ± 4.5	79 ± 0.6
110%	5 ± 11.2	44 ± 7.5	82 ± 0.2
120%	5 ± 5.5	50 ± 4.3	92 ± 1.7

흑무 (파종일: 16.09.10) -근중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	10 ± 3.5	92 ± 5.4	313 ± 15.6
110%	10 ± 4.1	58 ± 7.4	328 ± 5.4
120%	10 ± 2.1	99 ± 30.5	380 ± 68.6

흑무 (파종일: 16.09.10) -엽중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5.8±6.5	151 ± 7.5	229±7.1
110%	12.4 ± 4.1	133 ± 10.4	237 ± 5.6
120%	10.1 ± 1.5	140 ± 1.5	189 ± 3.5

<Fig. 6. 시비량별 흑무의 근, 엽 성장 변화>

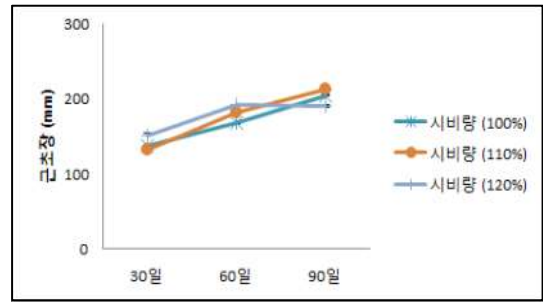


○ 흑무 파종 시기별, 시비량별 생육조사 결과 (파종일:2016.09.22.)

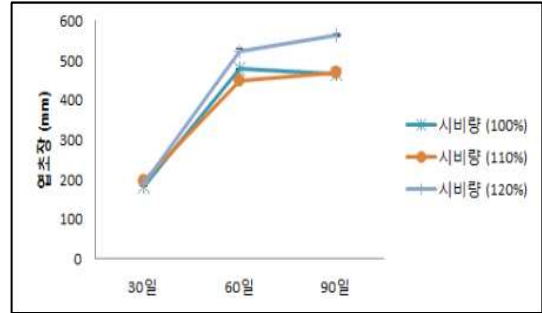
<Table 6. 흑무 시비량별 생육조사 표>

Fig. 7. 시비량별 흑무의 근, 엽 성장 변화

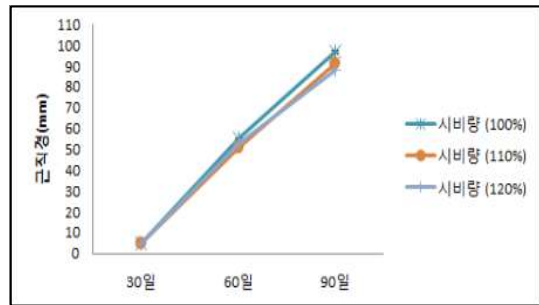
흑무 (파종일: 16.09.22) -근초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	138 ± 0.5	168 ± 1.2	205 ± 1.8
110%	133 ± 1.5	182 ± 2	213 ± 2.3
120%	152 ± 2.5	192 ± 0.3	190 ± 1.7



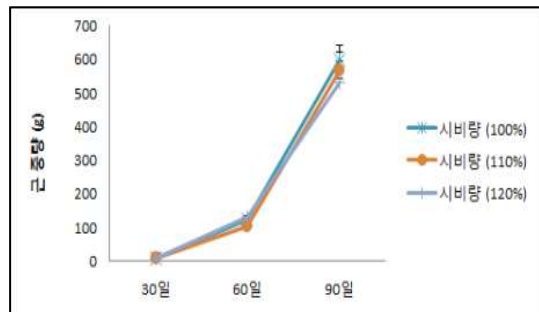
흑무 (파종일: 16.09.22) -엽초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	183 ± 1.5	478 ± 0.8	467 ± 9.9
110%	198 ± 3.4	450 ± 4	470 ± 1.7
120%	190 ± 6.3	525 ± 6.9	563 ± 3.1



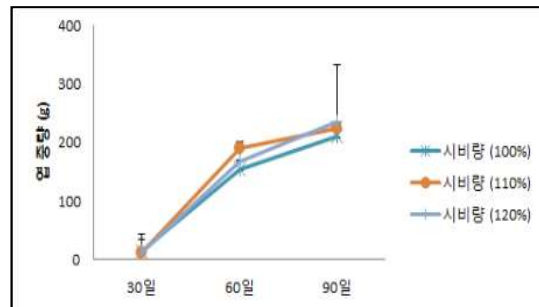
흑무 (파종일: 16.09.22) -근직경(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5 ± 2.5	55 ± 0.3	97 ± 0.4
110%	5 ± 3.5	51 ± 0.2	91 ± 1.9
120%	5 ± 5.2	53 ± 0.7	88 ± 10.3



흑무 (파종일: 16.09.22) -근중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	10 ± 10.3	122 ± 13.4	597 ± 24
110%	10 ± 15.5	105 ± 2.1	565 ± 76.4
120%	10 ± 4.3	133 ± 4.2	531 ± 10.4



흑무 (파종일: 16.09.22) -엽중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	14 ± 20.5	154 ± 15.6	210 ± 19.1
110%	12 ± 2.6	190 ± 7.1	224 ± 7.8
120%	12 ± 30.5	168 ± 34.6	235 ± 98.3



흑무의 뿌리의 경우 길이는 8/29파종분과 9/10파종 분은 60일까지는 생육일과 비례하여 성장하며 9/22파종 분은 앞의 2와 다르게 30일까지는 더 빠르게 성장하다가 60일 즈음엔 파종시기와 무관하게 비슷해지고 그 이후로는 길이 생장은 더뎈다. 그에 반해 두께는 30일까지 거의 늘지 않다가 그 이후로는 90일까지 생육시간에 비례하여 꾸준히 증가하고 무게는 두께의 제곱에 비례하였다. 비료 시비량차이는 보이지 않고 파종시기별은 9/22 파종 시 가장 크게 자랐다.

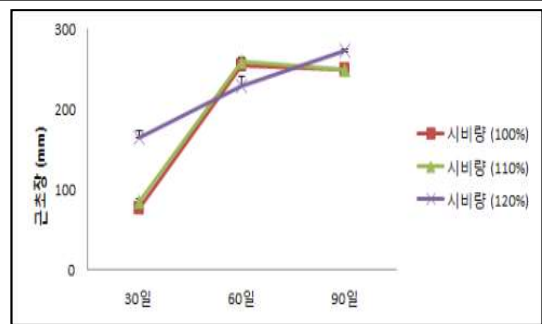
줄기/잎의 경우 길이는 60일까지 꾸준한 성장을 보이다가 그 이후로는 성장이 더뎈지고, 무게는 30일까지는 성장이 미미하다가 그 이후 크게 성장하고 다시 60일 이후로는 완만한 성장을 한다. 파종시기 및 표준시비량 이상의 비료시비에 따른 차이 비슷한 생육을 보인다(Table 2, 5, 6., Fig. 3, 6, 7).

○ 적색무 파종 시기별, 시비량별 생육조사 결과 (파종일:2016.09.10.)

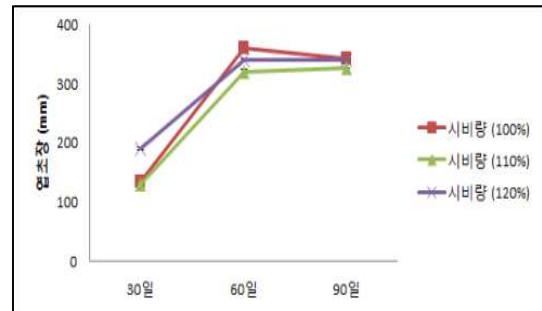
<Table 7. 적색무 생육조사표>

Fig. 8. 시비량별 적색무의 근, 엽 성장 변화

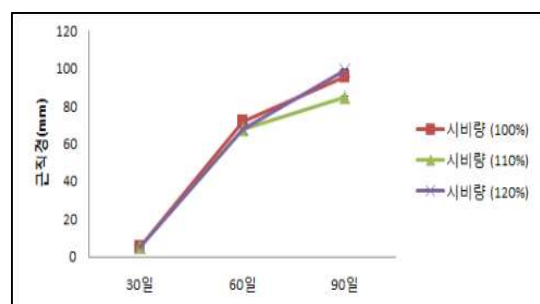
적색무 (파종일: 16.09.10) -근초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	76 ± 2	255 ± 5.7	250 ± 1.7
110%	85 ± 4	260 ± 5.5	250 ± 0
120%	165 ± 7.5	230 ± 10.5	273 ± 2.1



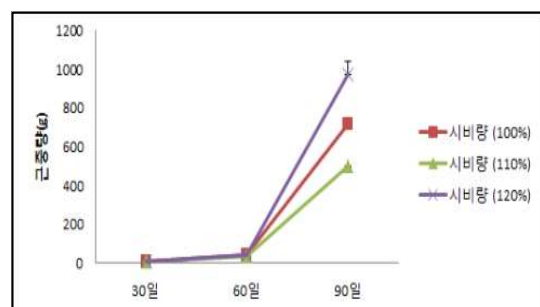
적색무 (파종일: 16.09.10) -엽초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	135 ± 5.5	360 ± 7.3	343 ± 3.2
110%	130 ± 3.3	320 ± 5.5	327 ± 0.6
120%	190 ± 3.5	340 ± 1.5	340 ± 2



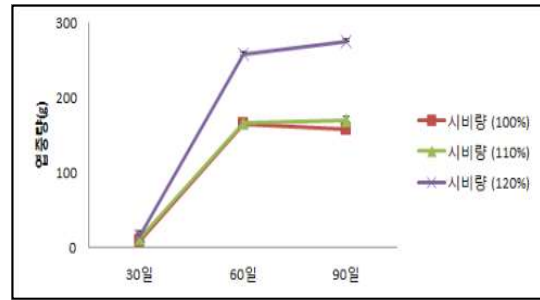
적색무 (파종일: 16.09.10) -근직경(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5 ± 0.5	72 ± 1.7	96 ± 0.2
110%	5 ± 1.5	68 ± 1	85 ± 0.6
120%	5 ± 0.5	68 ± 0.2	99 ± 0.6



적색무 (파종일: 16.09.10) -근중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	10 ± 10.1	43 ± 20.8	716 ± 15.6
110%	10 ± 3.5	37.7 ± 4.1	498 ± 5.4
120%	10 ± 10.5	42 ± 30.5	973 ± 68.6

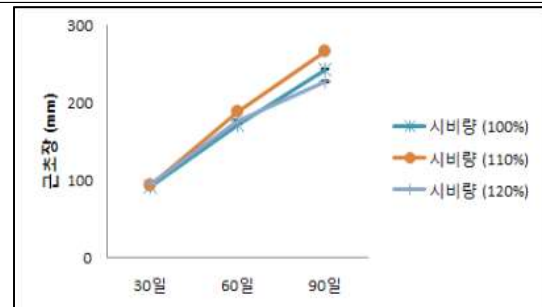


적색무 (파종일: 16.09.10) -엽중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	9 ± 3.5	165 ± 1.5	158 ± 7.1
110%	12 ± 7.5	166 ± 3.5	169 ± 5.6
120%	16 ± 6.5	258 ± 2.7	276 ± 3.5

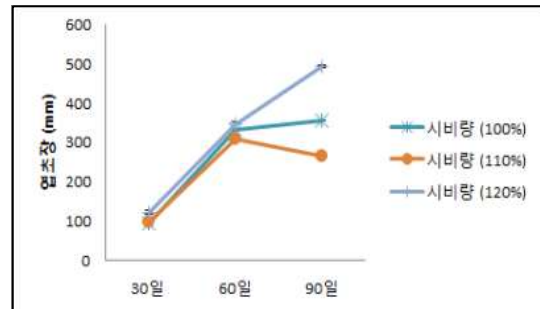


○ 적색무 파종시기별, 시비량별 생육조사 결과 (파종일: 2016.09.22.)

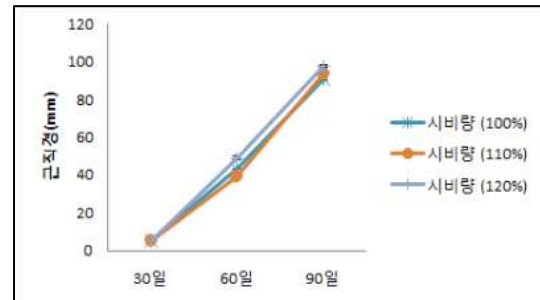
적색무 (파종일: 16.09.22) -근초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	91 ± 2	172 ± 1.6	243 ± 1.5
110%	93 ± 4.1	188 ± 2.3	267 ± 2.1
120%	95 ± 1.7	177 ± 0.8	227 ± 2.5



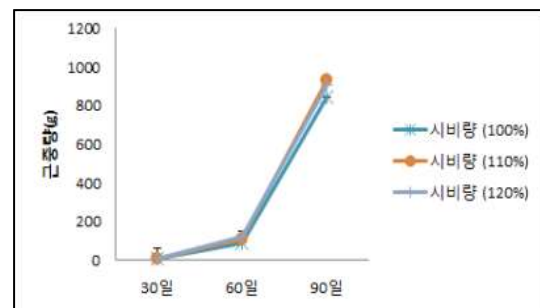
적색무 (파종일: 16.09.22) -엽초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	94 ± 1.5	333 ± 2.5	357 ± 0.6
110%	97 ± 2.1	310 ± 3.6	267 ± 8.4
120%	121 ± 6.5	347 ± 5.8	493 ± 5



적색무 (파종일: 16.09.22) -근직경(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5 ± 0.1	43 ± 0.5	91 ± 0.4
110%	5 ± 2.5	39 ± 1.3	94 ± 0.7
120%	5 ± 2	49 ± 1	98 ± 0.7

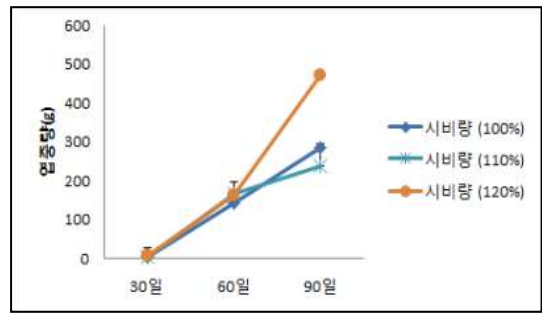


적색무 (파종일: 16.09.22) -근중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	10 ± 3.5	901 ± 4.2	847 ± 55.2
110%	10 ± 4.5	112 ± 21.2	936 ± 9.9
120%	10 ± 50.5	123 ± 26.2	908 ± 47.4



적색무 (파종일: 16.09.22) -엽중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5 ± 10.3	145 ± 17.7	285 ± 11.7
110%	3 ± 25.3	166 ± 32.5	239 ± 50.9
120%	6 ± 10.5	163 ± 10.6	474 ± 4.2

<Table 8. 적색무 생육조사표>

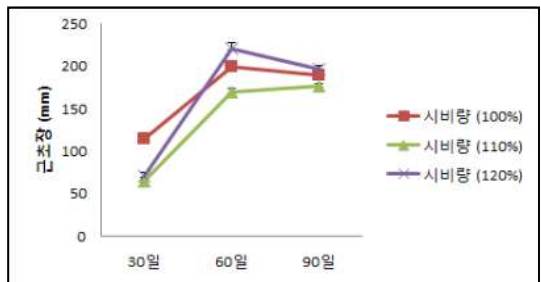


<Fig. 9. 시비량별 적색무의 근, 엽 성장 변화>

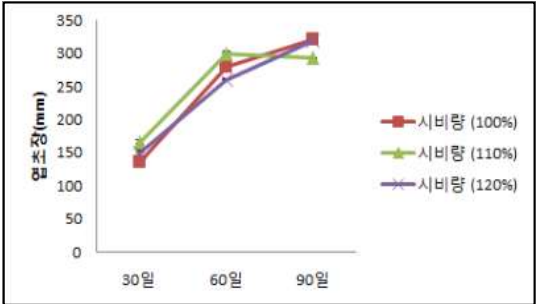
적색무 뿌리의 경우 길이는 8/29파종 분과 9/10파종 분은 60일까지는 생육일과 비례하여 성장하며 그 이후로는 길이 생장이 더뎈다. 9/22파종 분은 90일까지 길이 생장이 꾸준했다. 두께는 30일까지 거의 늘지 않다가 그이후로는 90일까지 생육시간에 비례하여 꾸준하게 증가하고 무게는 60일 이후 매우 가파르게 성장하였다. 비료시비량에 따른 차이는 보이지 않고 파종시기별은 8/29파종 시 가장 90일 생육 시 가장 작으며 나머지 둘은 비슷했다. 줄기/잎의 길이는 60일까지 꾸준한 성장을 보이다가 그이후로는 성장세가 더뎈다. 파종시기별 차이는 없으며 표준시비량 이상의 비료시비라도 많지 않으면 더 크게 자라는 것으로 관찰되었다(Table 3, 7, 8., Fig. 4, 8, 9).

○ 과일무 파종 시기별, 시비량별 생육조사 결과 (파종일:2016.09.10.)

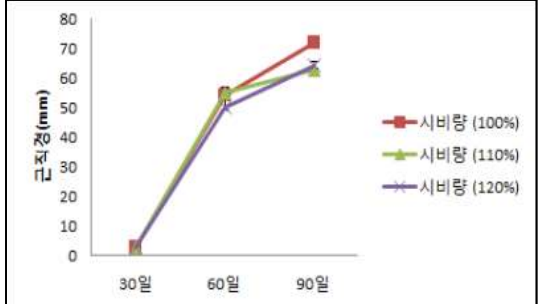
과일무 (파종일: 16.09.10) -근초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	115 ± 3.5	200 ± 4.8	190 ± 1.7
110%	65 ± 1.6	170 ± 4.5	177 ± 2.5
120%	70 ± 5.5	220 ± 7.5	197 ± 3.8



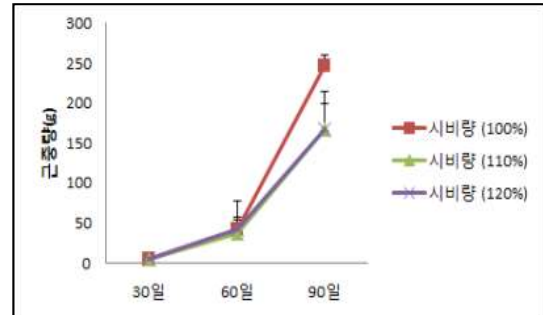
과일무 (파종일: 16.09.10) -엽초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	135 ± 2.9	280 ± 2.4	322 ± 5.8
110%	165 ± 4.7	300 ± 3.5	293 ± 1.2
120%	150 ± 3.3	260 ± 2.8	320 ± 1



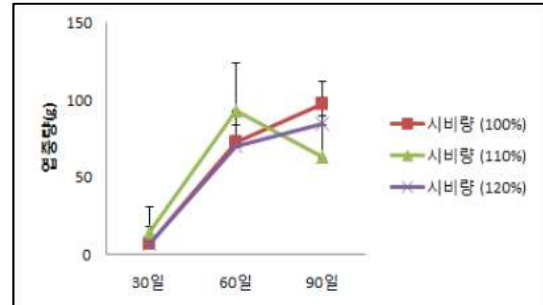
과일무 (파종일: 16.09.10) -근직경(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	3 ± 0.8	54 ± 0.5	72 ± 0.4
110%	3 ± 1.3	55 ± 2	63 ± 0.3
120%	3 ± 0.6	50 ± 2.5	64 ± 1.4



과일무 (파종일: 16.09.10) -근중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5 ± 1	84 ± 10.8	246 ± 13.4
110%	5 ± 1.5	38 ± 20.1	167 ± 32.7
120%	5 ± 2.1	42 ± 35.1	166 ± 48.8



과일무 (파종일: 16.09.10) -엽중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	7 ± 10.5	73 ± 20.1	98 ± 14.1
110%	15 ± 16.5	93 ± 30.8	64 ± 26.4
120%	7 ± 2.4	70 ± 13.8	85 ± 17

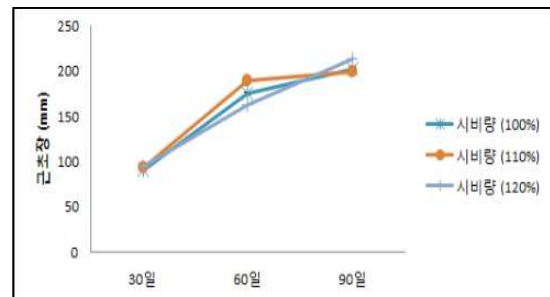


<Table 9. 과일무 생육조사표>

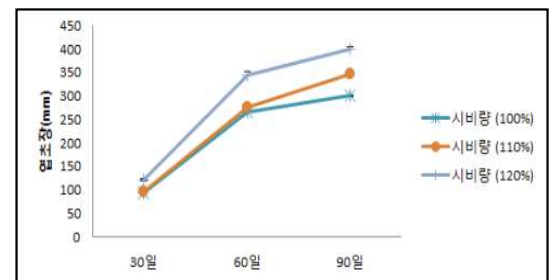
<Fig. 10. 시비량별 과일무의 근, 엽 성장 변화>

○ 과일무 파종 시기별, 시비량별 생육조사 결과 (파종일:2016.09.22.)

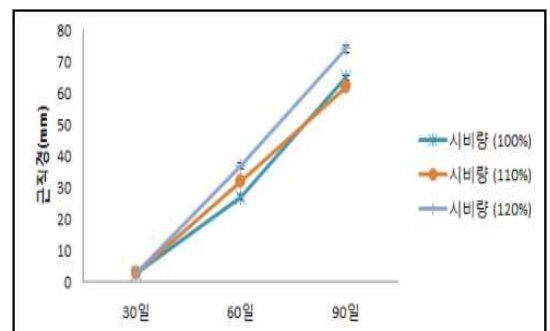
과일무 (파종일: 16.09.22) -근초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	91 ± 0.6	175 ± 1.5	203 ± 1.5
110%	93 ± 1.2	190 ± 1.7	200 ± 0
120%	95 ± 0.5	163 ± 1.3	213 ± 0.6



과일무 (파종일: 16.09.22) -엽초장(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	94 ± 1.5	267 ± 2.5	300 ± 2
110%	97 ± 2.5	277 ± 3.2	347 ± 4.7
120%	121 ± 3.5	345 ± 7.2	400 ± 4



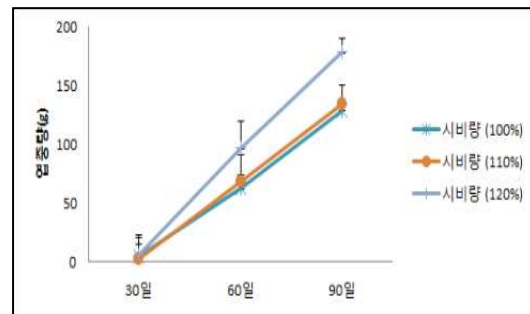
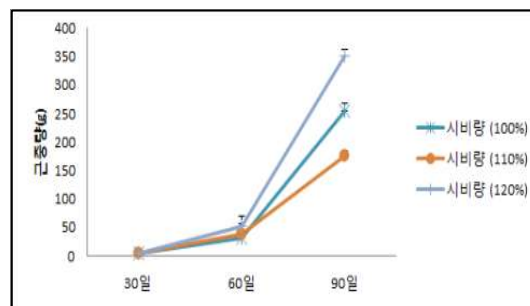
과일무 (파종일: 16.09.22) -근직경(mm)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	3 ± 0.3	27 ± 1	65 ± 0.5
110%	3 ± 0.5	32 ± 0.3	62 ± 0.3
120%	3 ± 0.2	37 ± 1	74 ± 1.2



과일무 (파종일: 16.09.22) -근중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5 ±	32 ± 23.1	255 ± 14.1
110%	5 ± 2.2	37 ± 7.8	176 ± 8.5
120%	5 ± 2.1	52 ± 19.1	351 ± 11.3

과일무 (파종일: 16.09.22) -엽중량(g)-			
파종 후 시비량	30일	60일	90일
100%	5 ± 10.3	63 ± 28.3	129 ± 7.8
110%	3 ± 20.1	69 ± 5.5	135 ± 15.6
120%	6 ± 15.2	97 ± 23.3	179 ± 11.3

<Table 10. 과일무 생육조사표>



<Fig. 11. 시비량별 과일무의 근, 엽 성장 변화>

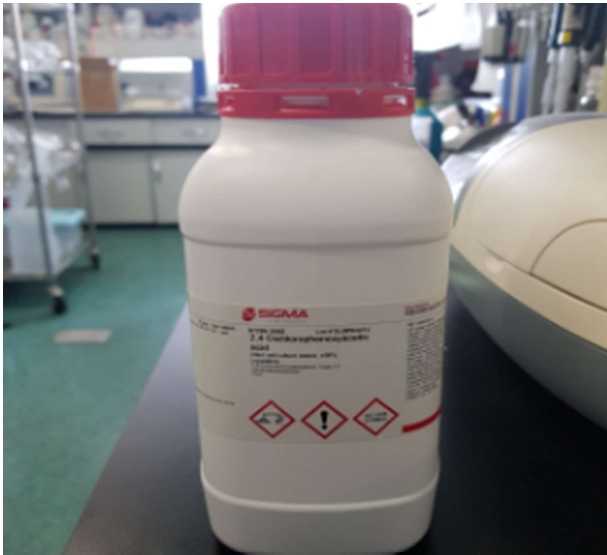
과일무 뿌리의 경우 길이는 60일까지는 생육일과 비례하여 성장하며 그 이후로는 길이 생장이 더뎈다. 두께는 30일까지 거의 늘지 않다가 그이후로는 90일까지 생육시간에 비례하여 꾸준하게 증가하고 무게는 두께의 제곱에 비례하는 것으로 보인다. 비료시비량에 따른 차이는 보이지 않고 파종시기별은 8/29파종 시 가장 90일 생육 시 가장 작으며 나머지 둘은 비슷했다. 줄기/잎의 길이는 60일까지 꾸준한 성장을 보이다가 그이후로는 성장세가 더뎈다. 파종시기나 비료시비량에 따른 차이는 보이지 않는다(Table 4, 9, 10., Fig. 5, 10, 11).

(2) 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 처리 시범재배

Auxin type의 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)을 농도별 처리하였을 때 흑무 glucosinolate 함량 변화를 알아보기 위해 시범재배를 실시하였다.

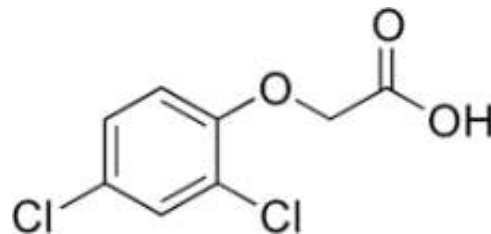
□ 2,4-D 처리 시범재배

2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)(Sigma, USA)(Fig. 12)를 에탄올과 물에 녹인 후, 100mg/ml 로 만들었다. 실험 처리구를 1평(3.3m³)에 대조군(물 살포)과 2.-4-D처리: 0.1 / 0.5 / 1 / 3 / 5 (mg/L) (5처리구)로 하여 총 6개 처리구역으로 정하였다. 물과 2,4-D를 1,2회 살포하였고, 살포 10일 후, 처리구 당 5개씩 수확 후, glucosinolate, 아토시아닌 분석을 실시 하였다.



<Fig. 12. 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)와 2,4-D 농도별 용액 제조>

2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)는 잎이 넓은 잡초를 제어하는 데 쓰이는 일반적인 제초제 농약 가운데 하나이다(Fig. 12). 전 세계에서 가장 널리 쓰이고 있는 제초제이며 북아메리카에서 세 번째로 많이 쓰인다. 2,4-D는 옥신 타입의 합화물로 식물세포 분열을 촉진 시키는 영향이 있다. 쌍떡잎식물의 줄기 꼭대기에 작용하여 비정상인 세포 분열을 발생시켜 말려 죽이는 작용을 하며, 온도가 높을수록 제초 효과가 현저하다. 한편, 벼과 등의 외떡잎식물에는 별로 영향을 주지 않고(선택성 제초제), 논이나 잔디의 제초에 넓게 이용되고 있다(Fig.12, 13). 제초제로서 시판될 때, 무기염류(나트륨 염류 등)나 유기염류(아민 염류), 및 에스테르의 제재로 여겨진다.



<Fig. 13. Chemical structure of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)>

2,4-D 처리가 무 glucosinolate 함량에 미치는 영향 조사한 결과(Table 11)에서처럼 대조구인 물만 처리한 것보다 2,4-D를 처리하였을 때 총 glucosinolate 함량은 전반적으로 낮게 나왔으나 큰 유의성이 없는 것으로 나타났다. 2,4-D 농도별 처리에서도 총 glucosinolate 함량 변화의 유의성이 없어 보였고 1회 처리와 2회 처리에서도 큰 상관관계가 없는 것으로 판단되어 2,4-D 처리는 무 glucosinolate 생합성에 미치는 영향이 거의 없는 것으로 판단된다. 대조군과 2,4-D 실험군들의 glucosinolate 성분 함량의 유의적인 차이가 보이지 않았다.

<Table 11. Effect of 2,4-D treatment on glucosinolate content in radish>

No.	Trivial name	물 1회	물 2회	0.1mg/L 1회	0.1mg/L 2회	0.5mg/L 1회	0.5mg/L 2회
Average ± STDEV (µmol/g dry wt.)							
1	Glucoraphanin	0.07 ± 0.01	0.2 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.8 ± 0.10	0.09 ± 0.01
2	4-Hydroxyglucobrassicin	0.76 ± 0.05	0.49 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.61 ± 0.05	0.49 ± 0.02
3	Glucobrassicinapin	0.15 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.1 ± 0.00	0.07 ± 0.01
4	Glucoruciferin	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.14 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.02
5	Glucoraphasatin	27.62 ± 3.44	19.93 ± 3.91	17.47 ± 0.79	16.56 ± 1.13	20.77 ± 0.78	21.17 ± 1.87
6	4-Methoxyglucobrassicin	0.63 ± 0.05	0.87 ± 0.15	0.92 ± 0.03	0.7 ± 0.04	0.6 ± 0.04	0.5 ± 0.1
	Total	29.39 ± 3.62	21.67 ± 4.18	18.9 ± 0.85	17.63 ± 1.20	23.06 ± 0.98	22.45 ± 1.93
No.	Trivial name	1.0mg/L 1회	1.0mg/L 2회	3.0mg/L 1회	3.0mg/L 2회	5.0mg/L 1회	5.0mg/L 2회
Average ± STDEV (µmol/g dry wt.)							
1	Glucoraphanin	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.00	0.29 ± 0.07	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.15 ± 0.06
2	4-Hydroxyglucobrassicin	0.5 ± 0.06	0.51 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.46 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.61 ± 0.05
3	Glucobrassicinapin	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.01
4	Glucoruciferin	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.1	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.03
5	Glucoraphasatin	16.87 ± 3.95	13.36 ± 0.35	15.02 ± 1.17	21.05 ± 0.48	23.25 ± 0.15	16.77 ± 5.65
6	4-Methoxyglucobrassicin	0.53 ± 0.11	0.56 ± 0.02	1.06 ± 0.09	0.51 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.6 ± 0.11
	Total	18.15 ± 4.20	14.63 ± 0.43	16.8 ± 1.39	22.19 ± 0.53	24.59 ± 0.21	18.22 ± 5.91

□ 2,4-D 처리가 적무 뿌리배양체 안토시아닌 함량에 미치는 영향 조사

2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-D) 처리가 적무 안토시아닌 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험의 정확도를 고려하여 뿌리 배양체에 처리 후 안토시아닌 함량을 관찰하였다. 적무 뿌리 배양체를 20일 동안 배양 후 1/2 Murashige and Skoog (MS) 배지에 배양한 것과 1mg/l 2,4-D 처리한 시료에서 안토시아닌 함량을 조사한 결과(Table 12, 13)에서처럼 대조구인 1/2 MS 배지에 배양한 적무 뿌리 배양체에서는 배양 기간 동안 총 안토시아닌 함량의 변화가 크게 없는 것으로 나타났다. 1mg/l 2,4-D 처리한 적무 뿌리 배양체에서는 배양기간 중 8일째 가장 높은 총 안토시아닌 함량을 보였으며, 2,4-D 처리군이 대조군에 비하여 배양 20일째 기준으로 3배 이상의 총 안토시아닌 함량을 보였다(Fig.14). 이 결과를 바탕으로 적무 재배시 2,4-D가 glucosinolate 함량에는 큰 영향을 미치지 않는 못하였으나 안토시아닌 함량은 증대 시킬 것으로 예상된다.

<Table 12. Effect of 1/2 MS medium on anthocyanin production in red radish root culture>

No. a)	RT (min)	Trivial name	1/2MS					
			control	4 day	8 day	12 day	16 day	20 day
1	8.287	Pelargonidin 3-diglucoside-5-glucoside	ND ^{b)}	ND	ND	ND	ND	ND
2	9.220	Pelargonidin 3-diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10.233	Unknown 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10.474	Unknown 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	10.825	Pelargonidin 3-(caffeoyl)diglucoside-5-glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	11.130	Unknown 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	12.378	Cyanidin 3-(glucosyl)rhamnoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	13.087	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	13.309	Pelargonidin 3-(caffeoyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	14.714	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.09±0.01	0.09±0.02	0.13±0.01	0.14±0.05	0.14±0.02	0.17±0.02
8	15.457	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)(caffeoyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.08±0.01	0.06±0.03	0.07±0.02	0.07±0.05	0.08±0.05	0.09±0.01
9	15.954	Pelargonidin 3-(feruloyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	16.425	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.11±0.04	0.09±0.03	0.15±0.01	0.17±0.05	0.13±0.11	0.24±0.00
11	17.463	Pelargonidin 3-(feruloyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.25±0.01	0.12±0.10	0.25±0.00	0.30±0.02	0.13±0.05	0.18±0.07
12	20.916	Pelargonidin 3-(feruloyl)(caffeoyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	25.130	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)(feruloyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Total	0.52±0.04	0.36±0.15	0.59±0.02	0.68±0.09	0.48±0.20	0.69±0.08

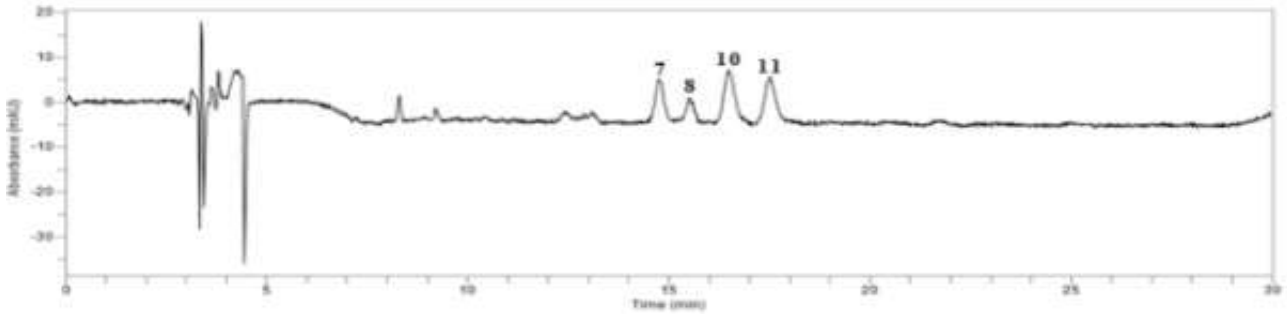
a)No., the elution order of anthocyanins HPLC analysis

b)ND, not detected.

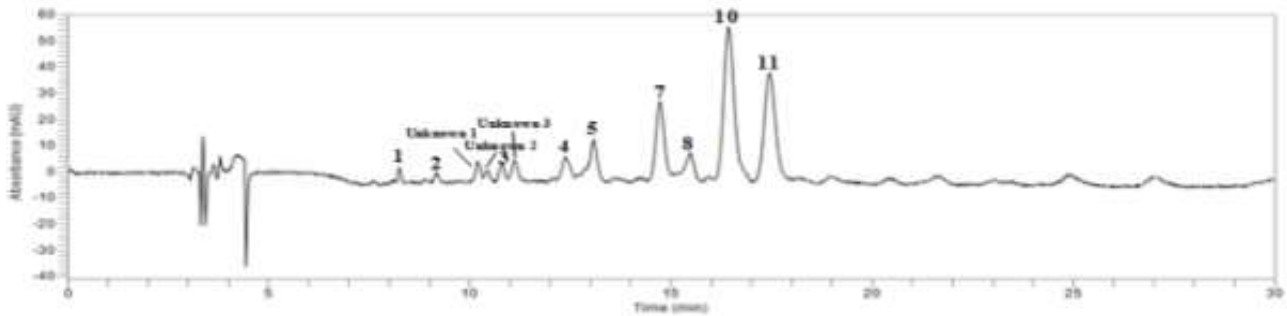
<Table 13. Effect of 1mg/l 2,4-D treatment on anthocyanin production in red radish root culture>

No. ^{a)}	RT (min)	Trivial name	1mg/l 2,4-D					
			control	4 day	8 day	12 day	16 day	20 day
1	8.287	Pelargonidin 3-diglucoside-5-glucoside	ND ^{b)}	ND	0.03±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.00
2	9.220	Pelargonidin 3-diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	0.04±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
	10.233	Unknown 1	ND	ND	0.09±0.00	0.11±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01
	10.474	Unknown 2	ND	ND	0.05±0.00	0.06±0.01	0.06±0.01	0.08±0.00
3	10.825	Pelargonidin 3-(caffeoyl)diglucoside-5-glucoside	ND	ND	0.08±0.00	0.15±0.01	0.15±0.00	0.19±0.01
	11.130	Unknown 3	ND	ND	0.10±0.01	0.16±0.02	0.16±0.01	0.19±0.01
4	12.378	Cyanidin 3-(glucosyl)rhamnoside	ND	ND	0.17±0.04	0.14±0.02	0.16±0.01	0.15±0.04
5	13.087	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	0.24±0.01	0.30±0.02	0.31±0.01	0.27±0.03
6	13.309	Pelargonidin 3-(caffeoyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	14.714	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.09±0.01	0.17±0.02	0.52±0.07	0.27±0.01	0.26±0.05	0.24±0.03
8	15.457	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)(caffeoyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.08±0.01	0.08±0.05	0.19±0.04	0.13±0.01	0.11±0.04	0.10±0.03
9	15.954	Pelargonidin 3-(feruloyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	16.425	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.11±0.04	0.23±0.02	1.25±0.01	0.82±0.05	0.82±0.07	0.78±0.03
11	17.463	Pelargonidin 3-(feruloyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.25±0.01	0.35±0.01	0.90±0.04	0.63±0.03	0.64±0.04	0.51±0.04
12	20.916	Pelargonidin 3-(feruloyl)(caffeoyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	25.130	Pelargonidin 3-(<i>p</i> -coumaroyl)(feruloyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Total	0.52±0.04	0.83±0.10	3.67±0.13	2.86±0.12	2.91±0.19	2.74±0.17
a)No., the elution order of anthocyanins HPLC analysis								
b)ND, not detected.								

A)



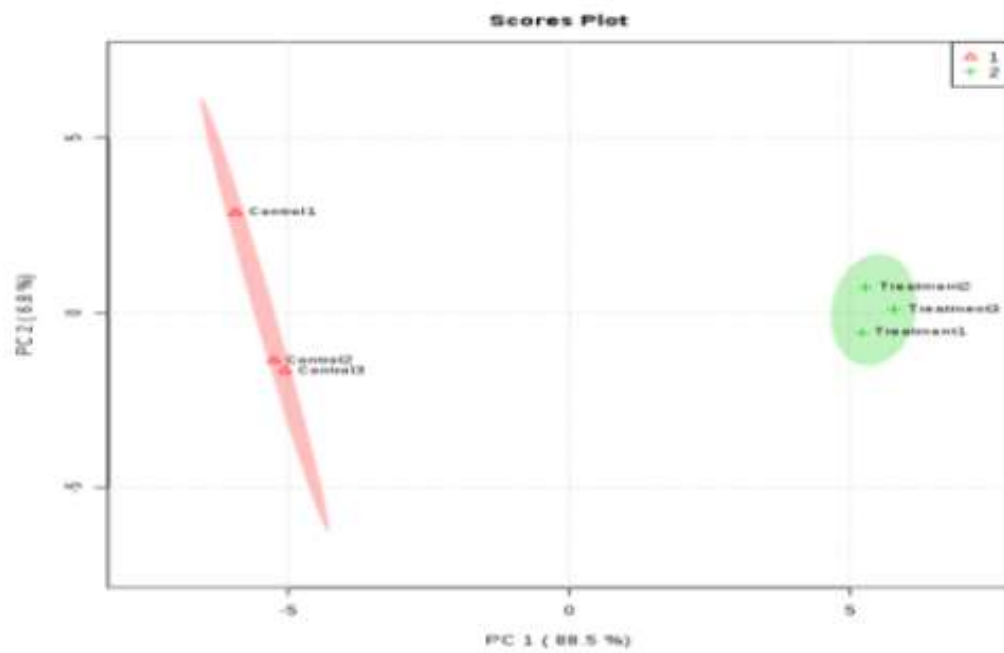
B)



<Fig 14. HPLC chromatogram of anthocyanins in red radish hairy root with no treatment (A), 2,4-D treatment(B) after 8 days.>

GC-TOFMS로부터 획득한 40개 대사물질을 metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) 통하여 autoscaling를 통하여 normalization한 후 주성분 분석을 수행하였다. 주성분 1 (PC 1)로 전체 변이의 88.5 %를 설명할 수 있었고 주성분 2 (PC2) 전체 변이의 6.8 %를 설명할 수 있었다 (Fig.15). 개별적 대사물질 종류 중 bioplots의 우측면에 해당하는 xylose, fructose, galactose, glucose, mannose, sucrose, cellobiose, trehalose, raffinose를 포함하는 당류 및 citric acid, succinic acid, fumaric acid, malic acid를 포함하는 TCA 회로에 관여하는 대사물질들 및 bioplots의 좌측면에 해당하는 aspartic acid, glycolic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, pyroglutamic acid, methionine, lactic acid, threonine, mannitol이 실험군과 대조군 사이에 변이에 크게 영향을 미쳤다(Fig. 15). 특히, 실험군은 당류 및 TCA 관련 대사물질들의 함량이 상대적으로 높았다. 앞서 HPLC 분석을 통하여 대조군에 비하여 2,4-D 처리 시 안토시아닌 생합성이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 고려할 때, 2,4-D 처리는 적무 모상근의 당류들의 합성을 증가시키며 이로 인하여 대조군에 비하여 보다 많은 탄소원 및 에너지를 공급하게 되어 안토시아닌 생합성이 증가하는 것으로 사료된다. 또한, TCA 회로 관련 물질들은 과거 연구결과를 통하여 플라보놀 생합성에 관여한다는 것이 보고된 바 있다. 즉, 실험군에서 TCA 회로 관련 물질들의 상대적으로 높은 함량은 실험군에서의 안토시아닌의 높은 함량을 뒷받침하는 것으로 생각된다.

A



B

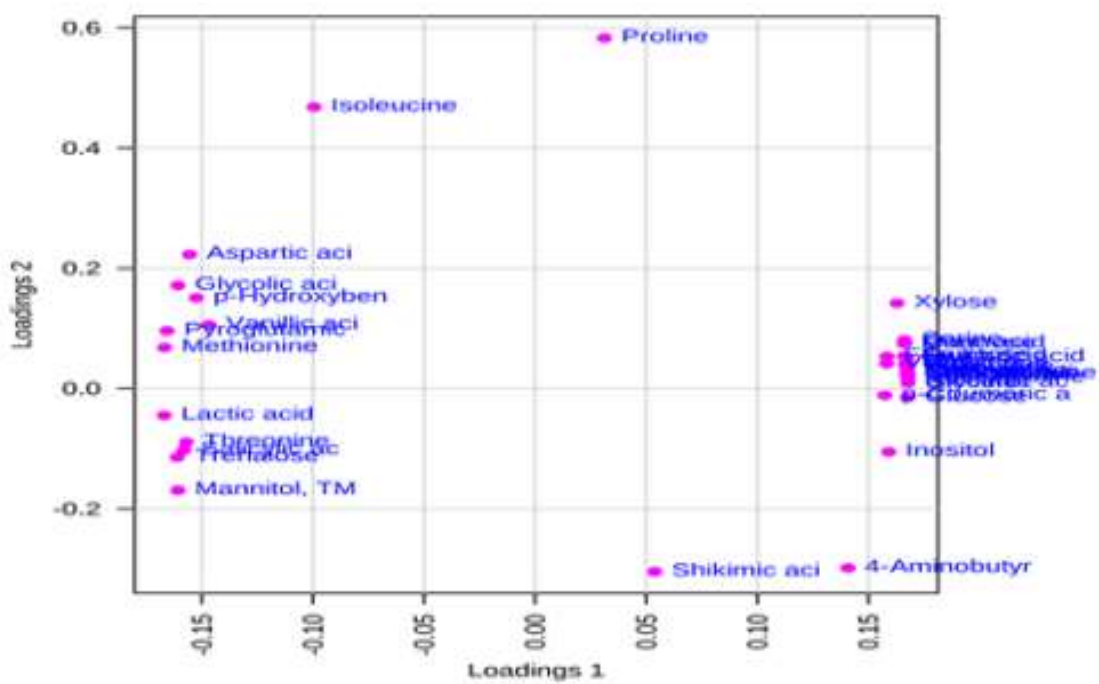


Fig. 15. Scores (A) and loading plots (B) of principal components 1 and 2 of the PCA results obtained from polar metabolite data of radish hairy roots cultured in 1/2 MS and treated with 2,4-D for 20 days.

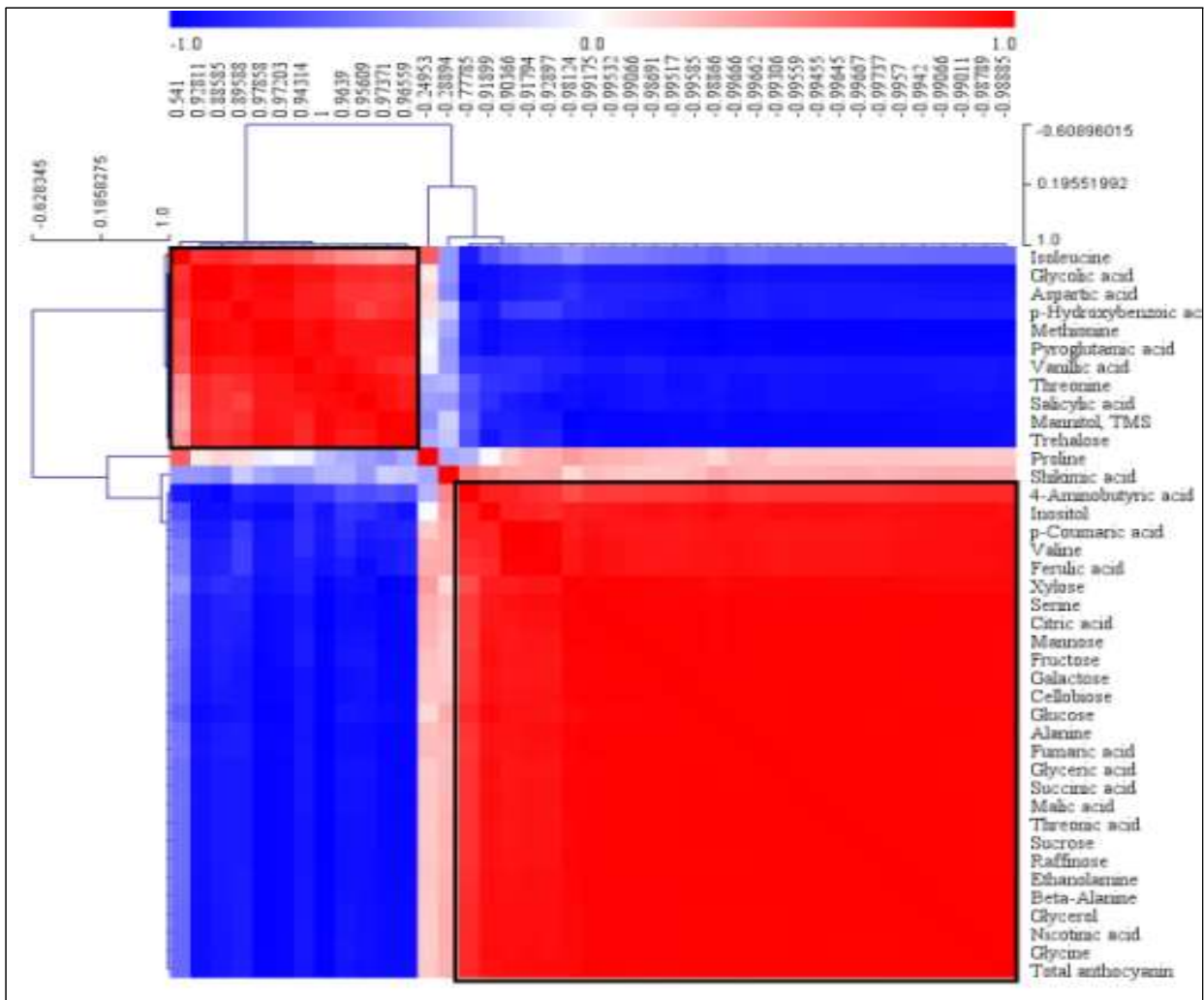


Fig. 16. SCorrelation matrix of metabolites from radish hairy roots cultured in 1/2 MS and treated with 2,4-D for 20 days. Each square indicates the Pearson's correlation coefficient of a pair of compounds, and the value of the correlation coefficient is represented by the intensity of the blue or red color, as indicated on the color scale. Secondary metabolite was marked by a dotted box.

추가적으로 SAS를 이용하여 상관관계를 분석하였다(Fig. 16)일반적으로 상관분석 시 상관계수(r)이 $0.1 < r \leq 0.3$ 일 때, 약한 양의 상관관계, $0.3 < r \leq 0.7$ 일 때, 강한 양의 상관관계, $0.7 < r \leq 1.0$ 매우 강한 양의 상관관계를 나타내고, $-0.1 < r < 0.1$ 일 때, 상관관계 없음, $-1.0 < r \leq -0.7$ 일 때, 매우 강한 음의 상관관계, $-0.7 < r \leq -0.3$ 일 때, 강한 음의 상관관계, $-0.3 < r \leq -0.1$ 일 때, 약한 음의 상관관계를 나타낸다.

Fig. 15와 같이 Total anthocyanin의 함량은 glycerol ($r=0.99833$, $p<0.0001$), xylose ($r=0.96876$, $p=0.0014$), fructose ($r=0.98423$, $p=0.0004$), galactose ($r=0.98661$, $p=0.0003$), glucose ($r=0.99208$, $p<0.0001$), mannose ($r=0.98486$, $p=0.0003$), sucrose ($r=0.99298$, $p<0.0001$), cellobiose ($r=0.99157$, $p=0.0001$), raffinose ($r=0.99445$, $p<0.0001$)의 함량과 매우 강한 양의 상관관계를 나타내었다. 게다가, citric acid ($r=0.99037$, $p=0.0001$), succinic acid ($r=0.9931$, $p<0.0001$), fumaric acid ($r=0.99335$, $p<0.0001$), malic acid ($r=0.99271$, $p<0.0001$) p를 포함하는 TCA 회로 관련 물질들과 매우 강한 양의 상관관계를 보였다. 유사하게도, p-coumaric acid ($r=0.95605$, $p=0.0029$)와 ferulic acid ($r=0.96228$, $p=0.0021$)를 포함하는 페놀산과도 강한 양의 상관관계를 나타내었다.

(3) 흑무의 미생물제제 처리에 따른 생육변화

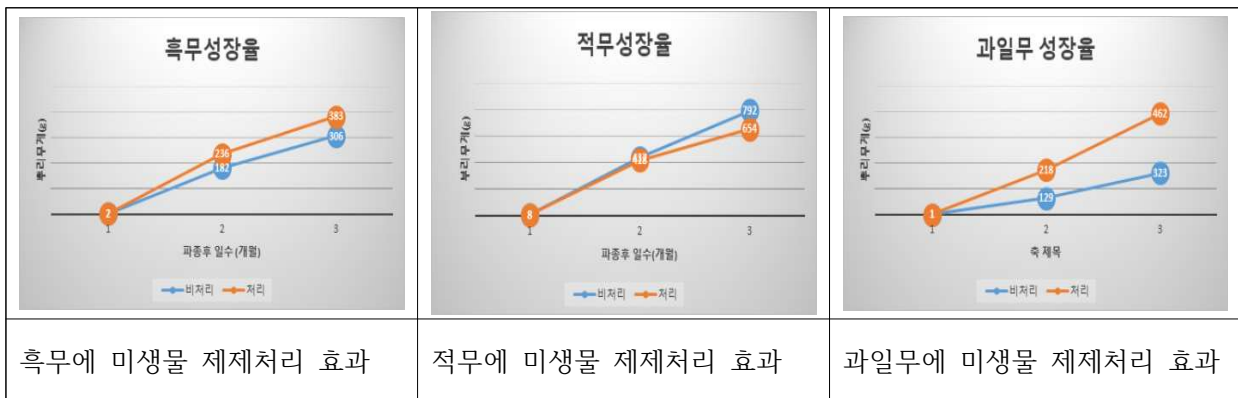
흑무의 토양미생물제제를 살포하였을 때, 대조군과 실험군에서 glucosinolate 함량 변화와 생육변화를 알아보기 위해 시범재배를 실시하였다.

□ 흑무의 미생물제제 처리에 따른 생육변화 연구

흑무를 2017년 9월 19일에 파종하였다. 토양미생물제제 시범재배는 포전을 반으로 나누어 실험군과 대조군으로 정하고 실험군에만 파종 1개월 후부터 월 2회, 총 4회 살포하고, 생육조사 하였다(Fig.17).



<Fig. 17. 2차년도 흑무, 유채무 포장지 전경 및 파종구역>



<Fig. 18. 유채무 미생물제제 처리 효과>

농업기술원에서 확보한 미생물제제를 3품종에 총 4회 살포하여 3개월간 뿌리 생육상태를 조사 하였다. 그 결과 흑무아 과일무 뿌리 성장은 촉진 하는 것으로 관찰 되었다. 그러나 적무에서는 유의적인 차이를 관찰 되지 않았다(Fig. 18).

□ 흑무 및 유색무 시험재배

흑무 및 유색무 품종 확보를 위해 09월 19일에 4품종을 파종하였고, 내용은 아래와 같다.

-파종지번 : 서귀포시 성산읍 온평리 2445 (4,950㎡)

-재배품종 : 흑무 2종, 유색무 2종

-파종일로부터 1개월 단위로 생육조사 예정

<Table 14. 파종된 흑무 및 유색무 품종>

구분	설명	품종명	매입처	면적	비고
흑무	둥근모양	깜둥이	아시아종묘	1,980㎡	
적색무	긴타원형	레드썬	아시아종묘	990㎡	
과일무	구형	단홍무	아시아종묘	990㎡	



흑무(흑비바리) 재배 사진



적색무(레드썬) 재배 사진



과일무(단홍무) 재배 사진

<Fig. 19. 흑무 및 유색무 품종 재배현황>

(4) 흑무, 유색무 자연재해에 의한 피해조사 및 방제 방법

가. 10월 4일 제 18호 태풍 차바 영향권(10.04 ~ 10.05) 에 속한다는 일기예보를 듣고 생육상태 점검.

나. 10월 5일 1, 2, 3차 파종구역 흑무, 수박무, 적색무 태풍 피해는 없는지 확인(Fig. 20)

- 18호 태풍 차바의 영향으로 모든 작물이 누워있거나 줄기 꺾어져 있었음.
- 비가 많이 와서 토사가 흘러 내려와 작물을 덮는 등 피해가 있었음.
- 대체적으로 피해는 있었지만 작물이 살 수 있다는 판단되어 약을 칩.

다. 10월 6일 1, 2, 3차 파종구역 농약 살포

- 북살(복합비료 등록번호 충남13-가-복합4-1호) 2병, 다이센엠(종합살균제 등록번호 41-살균-14) 2봉, 프레바톤(살충제 8-살충-272) 2봉을 혼합하여 50말을 1, 2, 3차 파종구역에 살포하였음(Fig. 20).





농약 살포

<Fig.20 태풍전,후 유색무 파종 현황 및 병충해 방제>

2) 흑무(black radish) 및 무속(Raphanus genus) 유전자분석

(1) 검정무 유전자 분석 연구

무(*Raphanus sativus L.*)는 십자화과(Cruciferae)에 *Raphanus* 속하는 뿌리식물로서 2,700 년전 부터 재배되어왔다. 18 개 염색체($2n=2x$)를 가지고 있으며 자가불화합성 식물로서 곤충에 의해서 수분되어 종자를 맺는 것으로 알려지고 있어 유전적 변이는 매우 심한 종의 하나이다. 무의 원산지는 지중해연안으로 알려지고 있으며 현재는 상용화되어 중국, 일본, 한국에서 중요한 채소산업으로 자리 잡고 있다. 또한 무(radish)는 유전적 변이에 의하여 다양한 품종이 만들어 지고 있으며, 특히 뿌리는 다양한 크기, 색, 형태를 갖고 있을 뿐만 아니라 잎에서도 다양한 특징(크기, 모양, 표면 특징 등)을 나타낸다. 대표적으로 중국에서 생산되는 무의 색채 특징을 보면 대표적으로 4 가지(red, white, green with white, red fresh)을 가지고 있다.

무는 특히 동아시아 뿐만 아니라 전 세계적으로 재배되고 소비되는 경제적으로 중요한 채소 작물이다. 무의 다양한 종류와 전통 품종은 길기, 진화 및 육종의 역사를 통해 개발되었으며 뿌리 크기, 모양, 색 및 맛, 그리고 수확과 같은 다른 특성에 큰 변화를 보여준다. 무의 두꺼운 뿌리는 일반적으로 채소로 수확되며, 잎이 많은 채소, 평지 채소 또는 유채 작물로 사용되는 품종도 있다. 아프리카에서는 식물의 뿌리가 쓸개 문제, 당뇨병, 간염 및 위장 장애와 같은 많은 질병의 치료제로 사용된다 (Chaturvedi 2008). 한국에서는 10대 주요 채소 중 하나이며, 국내에서는 김치, 치킨, 찜, 나물 및 초절임의 형태로 다양하게 소비되는 채소이다. 국내 채소종자 시장 및 해외 수출에서도 작목별 매출액 비교에서 고추, 양배추 다음으로 높았다(Ministry for food, agriculture, forestry and fisheries, 2012). 그러나 농업에서 중요한 채소 작물임에도 불구하고 배추, 양배추, 유채 등의 다른 배추과 작물에 비해 유전학적, 분자생물학적인 연구가 미진하다. 최근에 유색무(color radish)가 화장품(cosmetic), 건강기능식품(functional food), 와인(wine)에 사용되면서 무에 있는 안토시아닌 색소에 많은 관심이 높아지고 있다. 그 뿐만 아니라 유색무 품종의 유전적 계통관계를 분석하기 위하여 RAPD(random amplified polymorphic DNA), AFLP(amplified fragment length polymorphism), ITS region 분석, cpDNA 등 유전자 분석을 통해 무 품종 간의 유연관계가 활발히 연구 되고 있다.

Raphanus 속은 지중해 연안과 흑해 연안지역에서 유래되었다(Kaneko et al., 2007). *R. sativus* 는 *R. maritimus*와 *R. landra* (Kitamura 1958, Kaneko et al. 2007) 사이의 혼성화에 의해 유래 되었다고 서술하는 반면, 대부분의 학자들은 야생 무(*R. raphanistrum* L.)에서 재배 된 무(*R. sativus* L.)가 퍼짐의 과정에서 신선한 식용 체리 무(*R. sativus* L. var. *radicola* Pers), 오일 무 (*R. sativus* L. var. *oleifera*), 사료(*R. sativus* L. var. *caudatus*), 검은 무(*R. sativus* L. var. *niger*) 및 큰 뿌리 무(Daikon)(*R. sativus* L. var. *longipinnatus* Bailey) 등의 변이종이 재배되었다고 보고하였다. 일본에서 동아시아에 분포하는 야생종 무 간에 AFLP, SSR 마커를 이용하여 분석한 결과를 보고하였고(Huh and Ohnishi, 2002; Ohsako et al., 2010), 미토콘드리아의 염기서열을 이용하여 야생종 무와 재배종의 근연관계 분석을 통해 유럽과 아시아의 재배종 무의 기원에 대한 연구(Yamagishi and Terachi, 2003; Yamane, 2004)와 엽록체 염기서열을 이용한 분석 결과를 보고하였다(Lü et al., 2008; Yamane et al., 2005). 한국에서는 RAPD 마커를 이용하여 한국 재래종과 야생종과의 근연관계 분석을 보고하였으며(Choi et al., 2008), AFLP 마커를 이용하여 품종구분에 관하여 보고 한 바 있다(Kwon et al., 2003).

본 연구에서는 검정무 품종을 중심으로 제주에 가장 많이 재배되는 월동무(white radish, 백무)와 유색무(적색무, 과일무, 검정무), 갓(여수 돌산갓, 흥갓, 제주갓, 제주흥갓) 등 11품종을 ITS, rpl, TrnL 유전자를 분석하여 계통유연관계를 규명하고자 분석하였다(Table 15, Fig. 21).

- 시료 채취 2017년 10월까지 종자를 구입하여 고마촌영농조합(성산을 난산리)에서 재배하였다. 발아 후 2개월 된 경엽을 채취하여 total DNA를 분리 하였다.

<Table 15. 유색무, 갓 등 무 11 품종>

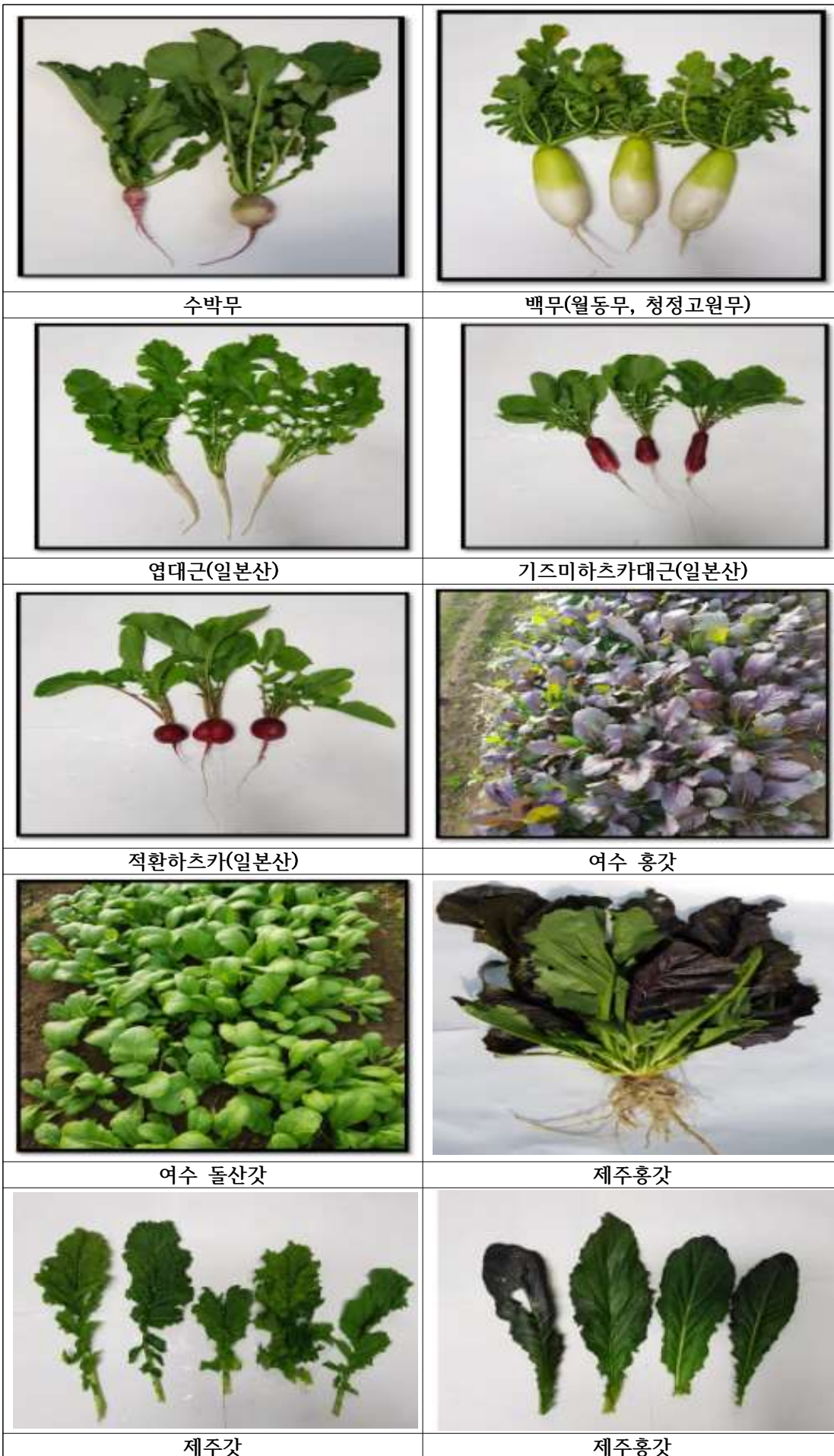
Taxa(species)	Seed Collection site	date	region(national)
Black radish (<i>Raphanus sativus. niger</i>)	아시아 종묘	2017. 09	스페인
Red radish (<i>Raphanus sativus. </i>)	아시아 종묘	2017. 09	국산
white radish (<i>Raphanus sativus. </i>)	아시아종묘	2017. 09	국산
수박무 (<i>Raphanus sativus. </i>)	아시아종묘	2017. 09	국산
제주갓(<i>Brassica juncea var.</i>)	제주(서귀포시,야생)	2017. 09	제주
제주홍갓 (<i>Brassica juncea var.</i>)	제주(서귀포시,야생)	2017. 09	제주
여수돌산갓(<i>Brassica juncea var.</i>)	경신종묘	2017. 09	여수
여수홍갓(<i>Brassica juncea var.</i>)	경신종묘	2017. 09	여수
엽대근(<i>Raphanus sativus. </i>)	일본(도호구 종묘)	2017. 08	일본
기스미하츠카대근(<i>Raphanus sativus. </i>)	일본(도호구종묘)	2017. 08	일본
적환하츠카(<i>Raphanus sativus. </i>)	일본(도호구종묘)	2017. 08	일본



검정무



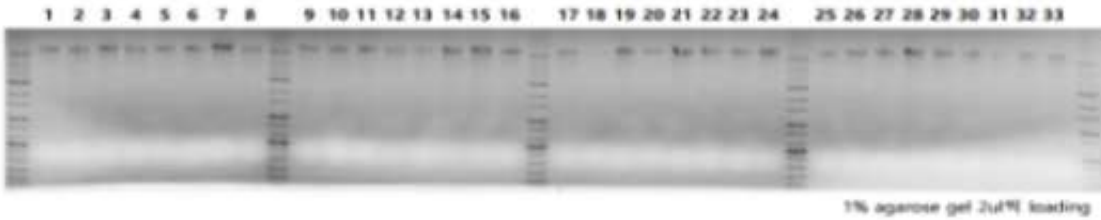
적색무



<Fig. 21. 유색무, 갓 등 무 11 품종 사진>

○ Genomic DNA 분리

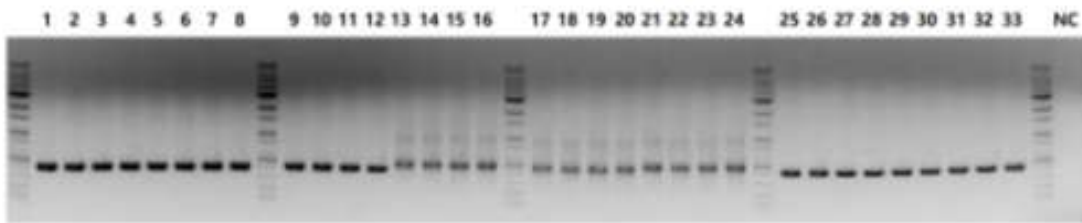
2종 11품종 33시료에서 분리된 genomic DNA는 아래와 같다.



<Fig. 22. 유색무, 갓 등 11 품종에서 분리된 genomic DNA>

○ trnL gene 합성 및 sequence 분석

PCR을 이용하여 trnL gene(trnL-trnF region) 합성하였다. 합성 유전자 길이는 331bp로 확인되었다(Fig.23).



<Fig. 23. 유색무, 갓 등 11 품종 trnL gene(trnL-trnF region) PCR 합성 DNA>

trnL-trnF 영역을 Alignment한 결과 2종 11품종 유전자 상동성은 98.49% homology을 보였다. Raphanus sativus 품종간 상동성은 100%이며, Brassica juncea var 품종간 상동성 역시 100%를 보였다. 그러나 out group인 배추는 무속(raphanus) 보다는 갓(Brassica juncea) 유전자 상동성 99.8%로 높았다(Fig. 24).

	10	20	30	40	50	
검정무	TTATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
적색무	TTATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
백무	TTATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTATTTTCT	
수박무	TTATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
제주갓	TGATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
제주홍갓	TGATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
돌산갓(여수)	TGATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
홍갓(여수)	TGATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
엽대근(일본)	TTATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
하츠카대근	TTATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
적환하츠카	TTATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	
Brassica	TGATCTTTTT	TCATTCATCC	GACACTTTTA	CAAACCTCGAA	TTTCTTTTCT	

	60	70	80	90	100
검정무	TATTATAGAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
적색무	TATTATAGAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
백무	TATTATAGAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
수박무	TATTATAGAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
제주갓	TATTATATAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
제주홍갓	TATTATATAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
돌산갓(여수)	TATTATATAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
홍갓(여수)	TATTATATAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
엽대근(일본)	TATTATAGAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
하츠카대근	TATTATAGAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
적환하츠카	TATTATAGAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG
Brassica	TATTATATAC	AAGTCCTTGTG	GGATATATCA	TACATATACA	AATGAGAAAAG

	110	120	130	140	150
검정무	AAATATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATCATTTTTTC	ATTCTAAAAC
적색무	AAATATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATCATTTTTTC	ATTCTAAAAC
백무	AAATATCGAT	TTGAATTAGT	TCGAATCTAA	ATCATTTTTTC	ATTCTAAAAC
수박무	AAATATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATCATTTTTTC	ATTCTAAAAC
제주갓	AACTATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATAATTTTTTC	ATTCTAAAAC
제주홍갓	AACTATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATAATTTTTTC	ATTCTAAAAC
돌산갓(여수)	AACTATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATAATTTTTTC	ATTCTAAAAC
홍갓(여수)	AACTATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATAATTTTTTC	ATTCTAAAAC
엽대근(일본)	AAATATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATCATTTTTTC	ATTCTAAAAC
하츠카대근	AAATATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATCATTTTTTC	ATTCTAAAAC
적환하츠카	AAATATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATCATTTTTTC	ATTCTAAAAC
Brassica	AACTATCGAT	TTGAATTATT	TCGAATCTAA	ATAATTTTTTC	ATTCTAAAAC

	160	170	180	190	200
검정무	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATG	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
적색무	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATG	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
백무	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATG	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
수박무	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATG	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
제주갓	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATA	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
제주홍갓	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATA	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
돌산갓(여수)	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATA	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
홍갓(여수)	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATA	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
엽대근(일본)	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATG	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
하츠카대근	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATG	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
적환하츠카	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATG	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT
Brassica	TTAGAAAGTC	TTCTTTTCGA	AGATCCAATA	AATTCCCGGT	CCAAAACTTT

	210	220	230	240	250
검정무	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
적색무	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
백무	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
수박무	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
제주갓	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
제주홍갓	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
돌산갓(여수)	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
홍갓(여수)	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
엽대근(일본)	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
하츠카대근	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
적환하츠카	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT
Brassica	TTTCATTTAC	TACTTTTGCG	TTTCCTTTTAA	TTGACATAGA	CCTAAGTCAT

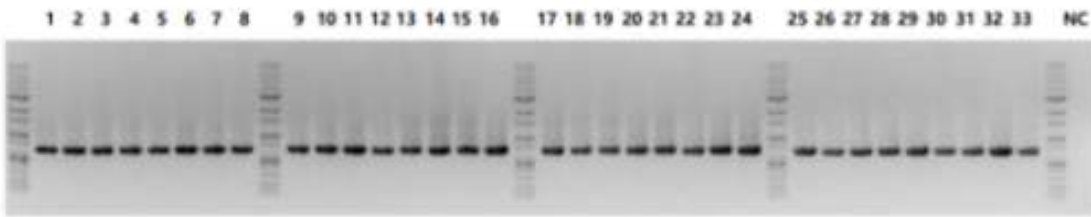
	260	270	280	290	300
검정무	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
적색무	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
백무	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
수박무	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
제주갓	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
제주홍갓	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
돌산갓(여수)	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
홍갓(여수)	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
엽대근(일본)	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
하츠카대근	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
적환하츠카	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG
Brassica	CTCATAAAAT	GAGAAATGATA	CTTCGGTAAT	GGCCGGGATA	GCTCAGTTGG

	310	320	330	
검정무	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
적색무	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
백무	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
수박무	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
제주갓	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
제주홍갓	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
돌산갓(여수)	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
홍갓(여수)	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
엽대근(일본)	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
하츠카대근	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
적환하츠카	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C
Brassica	TAGAGCAGAG	GACTGAAAAT	CCTCGTGTCA	C

<Fig. 24. Alignment of trnL- trnF gene sequence >

○ ITS gene 합성 및 gene sequence 분석 결과

PCR을 이용하여 ITS gene(ITS1 - ITS4 region) 합성하였다. 합성 유전자 길이는 636bp로 확인 되었다(Fig. 25).



<Fig. 25. 유색무, 갓 등 무 11 품종에서 합성된 ITS gene(ITS1 - ITS4 region) DNA>

11 품종에서 유전적 특성은 적환하츠카(일본 여름무)에서는 2site에 deletion gene 9bp (21-29bp사이), 7bp ('3말단) 관찰이 되었다. 적환하츠카 무 품종에서는 '3-말단에 31bp가 결실이 발견 되었다(Fig. 26).

○ ITS1-ITS4 영역을 Alignment한 결과 2종 11품종 유전자 상동성은 58.2% homology을 보였다.

Raphanus sativus 품종간 상동성은 92.9%이며, Brassica juncea var 품종간 상동성 역시 95.3%를 보였다. 그러나 out group인 배추 유전자 분석에서는 무속(raphanus) 보다는 갓(brassica juncea) 유전자 상동성 94%로 높았다. out group(배추)와 무속(Raphanus)간의 ITS 유전자 상동성은 75.1%이나, 배추(*Brassica rapa*)와 갓(*Brassica juncea var*)간의 ITS 유전자 상동성은 95.3%로 나타났다. 따라서 제주갓, 여수갓은 유전적으로 배추유전자와 매우 높은 상동성을 보였다.

국내산 여수갓(돌산갓, 흥갓)과 제주갓(흥갓, 제주갓)에서 ITS-gene 비교분석을 보면 변이가 무속에 비하여 매우 변이율이 높게 나타났다. 특히 흥미로운 사실은 제주흥갓과 여수흥갓 유전자 상동성(96.8 %)이 매우 높게 보였다. 여수돌산갓과 제주갓과의 유전자 상동성은 97.3%로 보였다. 특히 제주갓과 여수 돌산갓 ITS-gene 영역 내에 5' region에 26bp addition(1~26bp 사이, CCTGGAAACAGAACGACCTGAGAACG), 10bp deletion (462~480bp사이), 20bp deletion(560~580bp region CAATCTCCTCGTCATATCGTCGGTC), 3'-region 20bp deletion (616~636bp region, AGTCCTCAACGCGACCCAGGTCAGG)분석 되었다. 그리고 흥갓 특이적 deletion region (125~132bp, GGTCTCG)발견 되었다. 제주흥갓에는 5'-region쪽에 6bp deletion (106~112bp region), 7bp deletion (125~132bp region), 22bp deletion/addition(557~579bp region, -----CTCGT-ATAT-GTCG--C) 분석 되었다. 따라서 위 결과는 국내산 갓(*Brassica juncea var*) DNA marker 활용에 기초 자료를 제공 할 것으로 사료된다. 그리고 out group으로 사용된 배추와 갓 ITS 유전자 상동성은 94.87%로 나타났다(Fig. 26).

[ITS-gene]

김정무 -----GTTGAACATCACTCTCGGTGGGCTGGGTTCCTTT ACCGGAATCC-ATGCCTTCCGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCT--
 적색무 -----GTTGAACATCACTCTCGGTGGGCTGGGTTCCTTT ACCGGAATCC-ATGCCTTCCGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCT--
 백무 -----GTTGAACATCACTCTCGGTGGGCTGGGTTCCTTT ACCGGAATCC-ATGCCTTCCGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCT--
 수박무 -----GTTGAACATCACTCTCGGTGGGCTGGGTTCCTTT ACCGGAATCC-ATGCCTTCCGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCT--
 제주갓 **CCTGGAAACAGAACGACCCGAGAAG**ATGAAACACCACTCTCGGTGGGCTGGGTTCCTTT AGCGGATTC-GTGCCTC-GATTTCCGTGGTTATGTGTTCCTCCCGGTCAAGACTTA
 제주홍갓 -----ATGAAACA-CACTCTCGGT-G----- GCCGTTCT--GTGCCTGCCGATTCCTGGTTATG-----GTTCTCCGG-CAAGACTTC
 돌산갓(여수) **CCTGGAAACAGAACGACCCGAGAAG**ATGAAACAC-ACTCTCGGTGG-**CCGGT**----**TCTT** AGCGGATTC-GTGCCT-**GATTTCCGTGGTTATG**-GTTCCGTC-**CGGTTCAAGACTTA**
 홍갓(여수) -----ATGAAACATCACTCTCGGTAG----- GCCGTTTCCCGTCCGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCTTC
 열대근(일본) -----GTTGAACATCACTCTCGGTGGGCTGGGTTCCTTT ACCGGAATCC-ATGCCTTCCGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCT--
 하츠가무(일본) -----GTTGAACATCACTCTCGGTGGGCTGGGTTCCTTT ACCGGAATCC-ATGCCTTCCGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCT--
 천환무(일본) -----GTTGAACATCACTCTCGGTGG-----TCTT ACCGGAATCC-ATGCCTTCCGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCT--
 배추 -----ATGAAACATCACTCTCGGTAG----- GCCGTTTCT-GTGCCTGTGATTCCTGGTTATGTGTTCCTCCCGGT-CAAGGCTTC

* **** ***** * * * ***** ***** * * **** **

김정무 -----GGTCTGTCACATAGCTTCCGGA-ATCACCAAACCCCGGCACGAAA AGTGTCAAGGAACATGCAACTAAACAG-TTGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 적색무 -----GGTCTGTCACATAGCTTCCGGA-ATCACCAAACCCCGGCACGAAA AGTGTCAAGGAACATGCAACTAAACAGTGTGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 백무 -----GGTCTGTCACATAGCTTCCGGAATCACCAAACCCCGGCACGAAA AGTGTCAAGGAACATGCAACTAAACAGTGTGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 수박무 -----GGTCTGTCACATAGCTTCCGGAATCACCAAACCCCGGCACGAAA AGTGTCAAGGAACATGCAACTAAACAG-TTGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 제주갓 **CTTAGTCTCGGTTCGATCGTGCATAGCTTCCGGAATTCACCAAACCCCGGCACGAAA** --TGTCAGGAACATGCA-CTAAACAGTGTGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 제주홍갓 **AGTT-----GTTGGATCGTACGCATAGCTTCCGGAT-TCACCAAACCCCGGCACGAAA** AGTGTCAAGGAAA-TGCAACTAAACAGCTGTGTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 돌산갓(여수) **CTTAGGT-TCGGT-GGATCGT-CGCATAGCTTCCGGATT-CACCAAACCCCGGCACGAAA** --TGTCAGGAAA-ATGCA-CTAAACAG-CTGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 홍갓(여수) **AGTTTTG-----GTTGGATCGTACGCATAGCTTCCGGATATCACCAAACCCCGGCACGAAA** AGTGTCAAGGAAAATGCAACTAAACAGC-TGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 열대근(일본) -----GGTCTGTCACATAGCTTCCGGAATCACCAAACCCCGGCACGAAA
AGTGTCAAGGAACATGCAACTAAACAGTGTGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 하츠가무(일본) -----GGTCTGTCACAT-GCTTCCGGATATCACCAAACCCCGGCACGAAA AGTGTCAAGGAACATGCAACTAAACAGTGTGCTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT
 천환무(일본) -----GGGCTG-----CACTGCTTC-GGAGATCACCAA-CCCGGCACGAAA-GTGTCAAGGAACATGCAACTAA-CA-CTGCTTTC-CCAACC-----GGAACGGTGTGTTGTT
 배추 **AGTTTTG-----GTTGGATCGTACGCATAGCTTCCGGATATCACCAAACCCCGGCACGAAA** AGTGTCAAGGAAAATGCAACTAAACAGCTGTGTTTCGCCAACCCGGAACGGTGTGTTGTT

* * ** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** * *****

김정무 CGAACA-GTTCTGAAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 적색무 CGAACA-AGTTCTGAAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 백무 CGGAAACAGTTCTGAAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 수박무 CGAACA-AGTTCTGAAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 제주갓 CGGAAGTAGTGTGCAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 제주홍갓 CGGAAGCAGTGTGCAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 돌산갓(여수) CGGAAG-AGTGTGCAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 홍갓(여수) CGGAAG-AGTGTGCAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 열대근(일본) CGGAAACAGTTCTGAAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 하츠가무(일본) CGGAAACAGTTCTGAAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 천환무(일본) CGAAG-----TCTGAAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT C-ATCGATAAA-ACGTAACGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA
 배추 CGGAAGCAGTGTGCAATGTAAGTCTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT CGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAA

** * ** ***** ***** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

김정무 CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATAGGACGGAAGCTGGTCTCC
 적색무 CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATAGGACGGAAGCTGGTCTCC
 백무 CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATAGGACGGAAGCTGGTCTCC
 수박무 CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATAGGACGGAAGCTGGTCTCC
 제주갓 CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATAT-----GGG-TCT-----CC
 제주홍갓 CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATGGGACGGAAGCTG-TCCTCC
 돌산갓(여수) CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATAT-----GGGTCT-----CC
 홍갓(여수) CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATGGGACGGAAGCTGATCTCC
 열대근(일본) CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATAGGACGGAAGCTGGTCTCC
 하츠가무(일본) CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATAGGACGGAAGCTGGTCTCC
 천환무(일본) C-ATC-AGTCTTTGAAACG-----TTGC-CCCCAAGCCTTCTGGCCGAGG-AGTCTGC-T GGTGTTC-AAATCGT-TCCTCCCATCTCCCGATTG-----AGGAATCG-----CC
 배추 CCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTCTGGCCGAGGGCAGTCTGCCT GGTGTTCACAAATCGTCTCCCCCATCTCTCGAGGATATAGGACGGAAGCTGATCTCC

* ** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

김정무 CGTGTGTTTACCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGATGCCAGGAGCTCTTGAC ATGCGGTGTGTAATTCAACTCTCTCGTCAATATCGTGGTCTCCGGTCCAAAAGCTCTC
 적색무 CGTGTGTTTACCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGATGCCAGGAGCTCTTGAC ATGCGGTGTGTAATTCAACTCTCTCGTCAATATCGTGGTCTCCGGTCCAAAAGCTCTC
 백무 CGTGTGTTTACCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGATGCCAGGAGCTCTTGAC ATGCGGTGTGTAATTCAACTCTCTCGTCAATATCGTGGTCTCCGGTCCAAAAGCTCTC


```

수박무      CGTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGATGCCAGGAGCGTCTTGAC ATGCGGTGGTGAATTCATCTCCTCGTCATATCGTCGGTCGTTCCGGTCCAAAAGCTCTC
제주갯      CGTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGACG-CAGGAGCGTCT-GAC ATGCGGTGGTGAATT-----GTTCCGGTCCAGAAGCTCTC
제주홍갯    CGTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGG-CG-CAGGAGCGTCT-GAC ATGCGGTGGTGAATTAA-----CTCGT-ATAT-GTCG-CGTTCGGTCCAAAAGCTCT-
돌산갯(여수) CGTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGG-CG-CAGGAGCGTCTGAC ATGCGGTGGTGAATT-----GTTCCGGTCCA-AAGCTCT-
홍갯(여수)  CGTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGATGCCAGGAGCGTCTTGAC ATGCGGTGGTGAATTTAA--TTCTCGTCATATAGTCAGACGTTCCGGTCCAAAAGCTCTT
엽대근(일본) CGTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGATGCCAGGAGCGTCTTGAC ATGCGGTGGTGAATTCATCTCCTCGTCATATCGTCGGTCCGGTCCAAAAGCTCTC
하츠가무(일본) CGTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAG-ATGCCAGGAGCGTCTTGAC ATGCGGTGGTGAATTCATCTCCTCGTCATATCGTCGGTCCGGTCCAAAAGCTCTC
전환무(일본) CCTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCAG---CAAAGATGCCAGGACG-CTTGAC -TGGC-TGGTGAATTTCA--TCCCTCTCTATCCCGTCG-----TTCGGTCCAAA--CTC
배추        CGTGTGTTACCGCACGCGGTTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGATGCCAGGAGCGTCTTGAC ATGCGGTGGTGAATTTAA--TTCTCGTCATATAGTCAGACGTTCCGGTCCAAAAGCTCTT
* **** * ***      ***** * *   * * **** * * **** * * *****

```



```

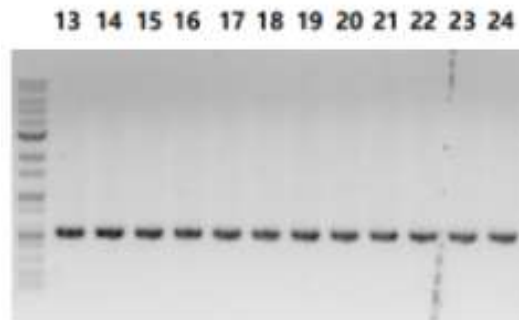
검정무      GATGACCCAAAATCCTCAACGCGACCCAGGTCAGG
적색무      GATGACCCAAAATCCTCAACGCGACCCAGGTCAGG
백무        GATGACCCAAAATCCTCAACGCGACCCAGGTCAGG
수박무      GATGACCCAAAATCCTCAACGCGACCCAGGTCAGG
제주갯      GATGACCCAA-----
제주홍갯    GATGACCCAAAATCCTCAACGCGACCCAGGTCAGG
돌산갯(여수) GATGACCCAA-----
홍갯(여수)  GATGACCCAAAATCCTCAACGCGACCCAGGTCAGG
엽대근(일본) GATGACCCAAAATCCTCAACGCGACCCAGGTCAGG
하츠가무(일본) GATGA-----
전환무(일본) TATGACC---AGTCCTC---GCACCC---
배추        GATGACCCAAAATCCTCAAC-----
****

```

<Fig. 26. Aligment of ITS1- ITS4 gene sequence >

○ rpl gene 분석

PCR을 이용하여 rpl gene(rpl12-rpl20 region) 합성하였다. 합성 유전자 길이는 451bp로 확인되었다. 11품종간 유전자 상동성은 99.44%로 매우 높게 나타났다(Fig. 28).



<Fig. 27. 유색무, 갯 등 무 11 품종에서 합성된 rpl gene(rpl12-rpl20 region) DNA>

[rpl-trimming]

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              10       20       30       40       50
검정무      ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG
적색무      ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTATAAAAAAG
백무        ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTATAAAAAAG
수박무      ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTATAAAAAAG
제주갯      ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG
제주홍갯    ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG
돌산갯(여수) ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG
홍갯(여수)  ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG
엽대근(일본) ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG
하츠카대근  ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG
적황하츠카  ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG

```

Brassica ATAAATTGCC TTGGTACTTG ATATAAAAAA AATAGAATAA CTACAAAAAG
Clustal Co *****

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
60 70 80 90 100

검정무 TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
적색무 AGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
백무 TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
수박무 TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
제주갓 TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
제주홍갓 TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
돌산갓(여수) TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
홍갓(여수) TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
엽대근(일본) TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
하츠카대근 TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
적황하츠카 TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
Brassica TAGTAAATAG AAATGGATAA ATAGTGGGTT CCTTCGTTTC TATGGTTACT
Clustal Co *****

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
110 120 130 140 150

검정무 TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
적색무 TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
백무 TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
수박무 TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
제주갓 TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
제주홍갓 TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
돌산갓(여수) TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
홍갓(여수) TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
엽대근(일본) TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
하츠카대근 TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
적황하츠카 TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
Brassica TCTAAAACGG TGAGGTCCTC TCTATACACC GGAGCTCCTT CTTTAAATTA
Clustal Co *****

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
160 170 180 190 200

검정무 ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
적색무 ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
백무 ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
수박무 ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
제주갓 ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
제주홍갓 ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
돌산갓(여수) ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
홍갓(여수) ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
엽대근(일본) ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
하츠카대근 ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
적황하츠카 ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
Brassica ATCAATACTA TTGGTAACTT GTACAATTCA CATTCTTTGG CTCTACCCCA
Clustal Co *****

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
210 220 230 240 250

검정무 TTAATATTCC AGTAAATAGG TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
적색무 TTAATATTCC AGTAAATAGG TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT

```

백무      TTAATATTCC AGTAAATAGG TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
수박무    TTAATATTCC AGTAAATAGG TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
제주갯    TTAATATTCC AGTA-ATAGA TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
제주홍갯  TTAATATTCC AGTA-ATAGA TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
돌산갯(여수) TTAATATTCC AGTA-ATAGA TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
홍갯(여수) TTAATATTCC AGTA-ATAGA TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
엽대근(일본) TTAATATTCC AGTAAATAGG TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
하츠카대근 TTAATATTCC AGTAAATAGG TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
적화하츠카 TTAATATTCC AGTAAATAGG TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
Brassica  TTAATATTCC AGTA-ATAGA TCTTTCACAA TGAGATCCAC TTTATACAGT
Clustal Co ***** ***** ***** ***** *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      260      270      280      290      300
검정무    AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
적색무    AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
백무      AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
수박무    AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
제주갯    AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
제주홍갯  AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
돌산갯(여수) AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
홍갯(여수) AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
엽대근(일본) AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
하츠카대근 AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
적화하츠카 AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
Brassica  AACGGTATTT TATTTTAAAA TTGATTTGGT CATTTACCC TTTAGTCCGT
Clustal Co ***** ***** ***** ***** *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      310      320      330      340      350
검정무    TTTTTTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
적색무    TTTTTTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
백무      TTTTTTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
수박무    TTTTCTTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
제주갯    TTT-TTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
제주홍갯  TTT-TTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
돌산갯(여수) TTT-TTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
홍갯(여수) TTT-TTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
엽대근(일본) TTTTCTTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
하츠카대근 TTTTTTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
적화하츠카 TTTTTTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
Brassica  TTT-TTCTTT CAAGAGTGGA ATCTTTTTTAA TAAAAAATGG GATTTCCCC
Clustal   ***-***** ***** ***** ***** *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      360      370      380      390      400
검정무    GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTCTA AAAAATGGAG
적색무    GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTCTA AAAAATGGAG
백무      GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTCTA AAAAATGGAG
수박무    GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTCTA AAAAATGGAG
제주갯    GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTCTA AAAAATGGAG
제주홍갯  GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTCTA AAAAATGGAG
돌산갯(여수) GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTCTA AAAAATGGAG

```

```

홍갓(여수) GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTTCTA AAAAATGGAG
엽대근(일본) GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTTCTA AAAAATGGAG
하츠카대근 GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTTCTA AAAAATGGAG
적환하츠카 GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTTCTA AAAAATGGAG
Brassica GCTTAATTGA TAACCATTTG TTATCATTTG GGGTTTTCTA AAAAATGGAG
Clustal Co *****

```

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

 410 420 430 440 450

```

검정무 TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
적색무 TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
백무 TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
수박무 TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
제주갓 TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
제주홍갓 TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
돌산갓(여수) TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
홍갓(여수) TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
엽대근(일본) TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
하츠카대근 TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
적환하츠카 TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
Brassica TTGATTGGAT TTGCACCAAT GTAAACCATA AGTTTCAGAC ACAATAGAAG A
Clustal Co *****

```

<Fig. 28. Alignment of *tpl20*- *rps12* gene sequence >

○ 계통학적 분석 결과

무속(*Raphanu*) 7종과 국내산 갓(*Brassica juncea* var.) 4종 그리고 outgroup 1종(배추, *Brassica*) *trnL*, ITS, *rpl* 염기서열을 분석하여 Neighbor Joining (NJ) tree를 작성하였다.

trnL 유전자 염기서열 분석을 통해서 Neighbor Joining (NJ) tree를 작성한 결과 두 group clade로 형성 하였다(Fig. 29). 한 group은 배추속(*brassica*)에 포함되는 국내산 갓 4종과 outgroup으로 사용된 배추가 one clade를 형성하였다. 또 다른 one clade는 무속(*Raphanus*)에 포함되는 7종이 한 group를 형성하였다. *brassica*속간에 유전적 거리는 거의 없으나 배추속 (*brassica*)과 무속(*Raphanus*)간의 유전적 거리 지수는 현저한 차이를 보였다. 그리고 제주에서 가장 많이 제배되는 백무(청정고원무) 품종은 타 무 품종에 비교 유전적 거리지수가 차이를 보였다. 이 원인은 품종개량 중에 많은 반복 교배 과정에서 기인된 것으로 사료 된다.

ITS 유전자 분석결과 *rpl*, *trnL* 유전자보다 유전적 변이가 가장 많은 나타났으며, 232 site에 염기 insertion/deletion 또는 갭이 확인 되었다(Fig. 30).

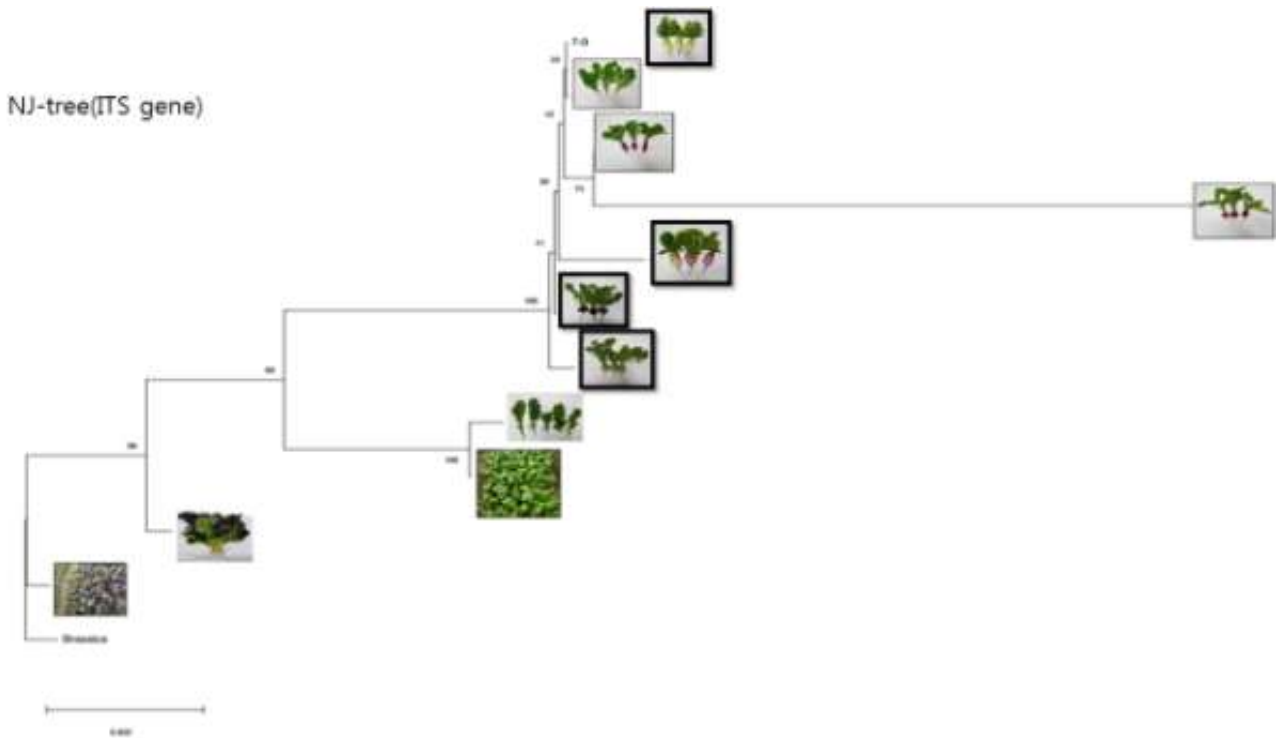
유전적 거리지수도 *trnL* (0.0020)과 *rpl*(0.0005)보다 높은 0.020로서 유전자 변이 및 다형현상이 높음을 알 수가 있다. ITS 유전자 염기서열 분석을 통해서 Neighbor Joining (NJ) tree를 작성한 결과 두 group clade로 형성하였다(Table 16).

특히 무 품종은 three clade 형성되었다. one clades(흑무, 수박무, 적색무), two clades(일본산 기스미하츠카무, 적환무) 마지막 clades(엽무, 백무)로 구성되었다. 특징적인 것은 제주갓, 돌산갓

이 매우 이웃종으로 나타났다(Fig. 30). 그러나 배추(brassica), 여수홍갓, 제주홍갓, 분지되면서 돌산갓과 제주갓이 이웃품종으로 분화되는 것으로 관찰 되었다. 여수와 제주와는 지리적으로 격리되어 있음에도 불구하고 홍갓류(제주홍갓, 여수홍갓)와 갓류(제주갓, 여수돌산갓)는 분명히 다른 품종으로 분화되고 있음이 확인 되었다.



<Fig. 29. Distance tree of 11 taxa of desmid based on NJ(Neighbor Joining) analysis of trnL gene sequence. Numbers below branches represent bootstrap values>



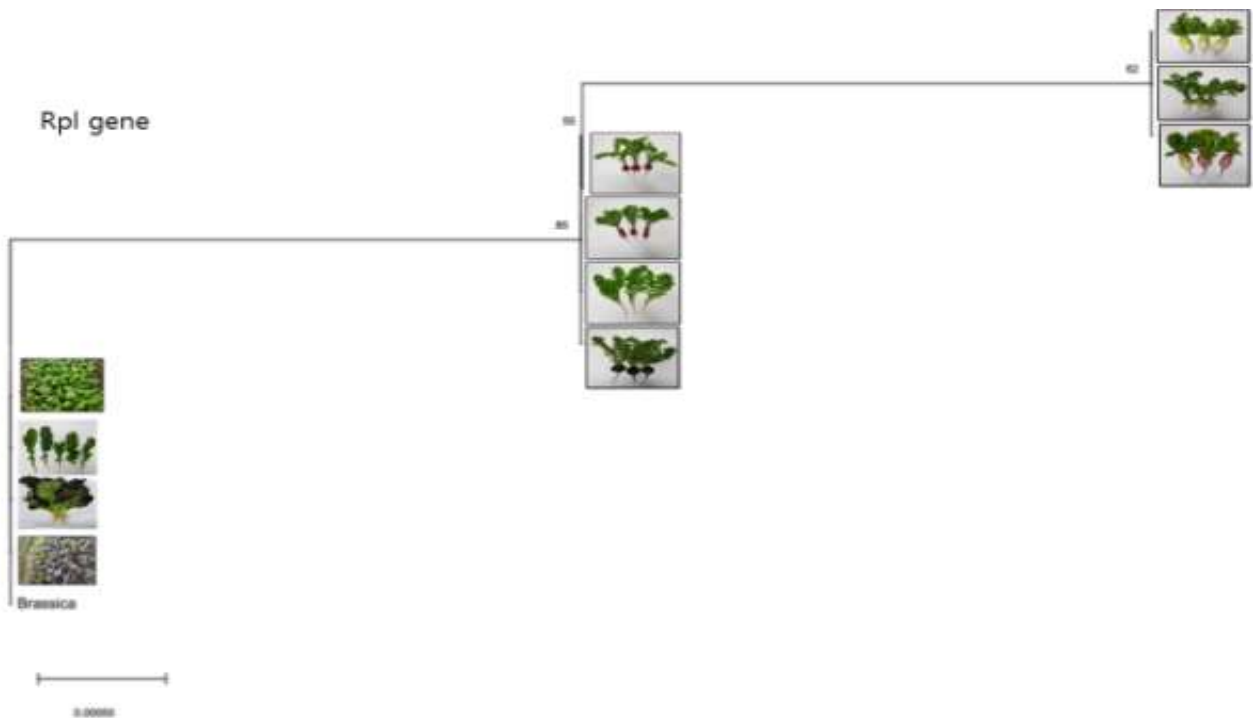
<Fig. 30. Distance tree of 11 taxa of desmid based on NJ(Neighbor Joining) analysis of ITS gene sequence. Numbers below branches represent bootstrap values>

kimura 2-parameter에 의한 pairwise distance를 비교하여 보면, 무속간의 식물들은 0~7.5%로 나타났으며, 갯품종간은 4.2~5.8% 보였다. 갯속과 무속간의 pairwise distance 0~15.9%로 나타났다.

검정무		0.004	0.000	0.002	0.013	0.011	0.012	0.013	0.000	0.000	0.015	0.013
적색무	0.010		0.004	0.005	0.015	0.013	0.014	0.014	0.004	0.005	0.017	0.014
백무	0.000	0.012		0.003	0.013	0.011	0.013	0.013	0.000	0.000	0.015	0.013
수박무	0.002	0.016	0.005		0.014	0.011	0.013	0.013	0.003	0.003	0.016	0.013
제주갯	0.063	0.073	0.064	0.067		0.012	0.002	0.012	0.013	0.014	0.022	0.014
제주홍갯	0.053	0.065	0.054	0.055	0.058		0.010	0.007	0.011	0.012	0.023	0.006
돌산갯(여수)	0.058	0.069	0.060	0.062	0.002	0.042		0.010	0.013	0.013	0.022	0.012
홍갯(여수)	0.070	0.082	0.071	0.070	0.058	0.024	0.045		0.013	0.014	0.026	0.003
엽대근(일본)	0.000	0.012	0.000	0.005	0.064	0.054	0.060	0.071		0.000	0.015	0.013
기스미하츠카대근(일본)	0.000	0.013	0.000	0.005	0.066	0.058	0.061	0.076	0.000		0.014	0.014
적환하츠카(일본)	0.084	0.092	0.083	0.090	0.131	0.143	0.129	0.162	0.083	0.075		0.025
배추	0.070	0.082	0.071	0.072	0.069	0.020	0.053	0.007	0.071	0.074	0.159	

<Table 16. Pairwise distance using kimura-2 parameter method of 12 desmids>

- rpl gene 유전자 염기서열 분석을 통해서 Neighbor Joining (NJ) tree를 작성한 결과 3 group clade로 형성하였다. one clade는 갯속(제주갯, 제주홍갯, 여수홍갯, 여수갯, 배추), 둘째 clade(흑무, 적환하츠카무, 엽대근, 기스미하츠카무), 셋째 clade(수박무, 백무, 적색무)으로 구성되었다. 특히 셋째 clade으로 구성된 수박무, 백무, 적색무는 둘째 clade와는 유전적거리 지수가 다소 거리가 있음이 확이 되었다(Fig. 31).



<Fig. 31. Distance tree of 11 taxa of desmid based on NJ(Neighbor Joining) analysis of rpl gene sequence. Numbers below branches represent bootstrap values>

○ 이상의 결과를 살펴보면 검정무 유전자 마커로 활용 가능 한 부분은 규명하지 못 했다. 그러나 ITS 유전자 분석에서 제주갓과 여수갓에서 유전자 마커로 활용 할수 있는 부분을 발굴 하였다. 그리고 국내산 갓으로부터 유전자원 발굴은 향후 식품원료 개발 및 바이오자원 개발에 유용하게 이용할 수 있다고 사료 된다.

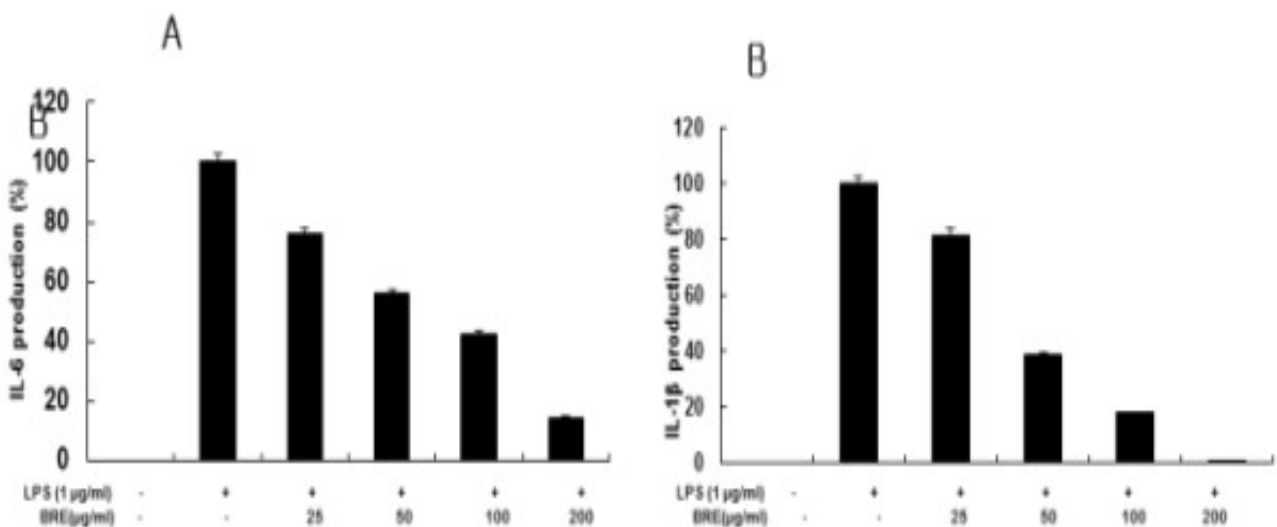
○ 최근 중국의 (Liu et al. 2007)는 RAPD, AFLP,SRAP 마커를 이용하여 17 무 품종(11종의 중국 품종, 5종의 외국 재배 품종, 1종 야생종) 유전적 다양성 분석을 실시하였다. 그 결과 RAPD 마커는 세가지 마커 유형 중 가장 다형현상 (93.4 %) 높게보였으며, AFLP 분석에서는 평균 23.25 개의 다형현상으로 비교적 낮은 나타났다. RAPD와 SRAP 데이터에 기초한 형태적 특징에 따른 분류와 높은 일치율을 보였다고 보고 하였다. 향후 무속에 많이 함유된 glucosinolate 함량과 유전자 마커와의 상관관계를 분석하여 양질의 채소를 발굴하는데 본 연구 자료를 활용 할 수 있을 것으로 사료 된다.

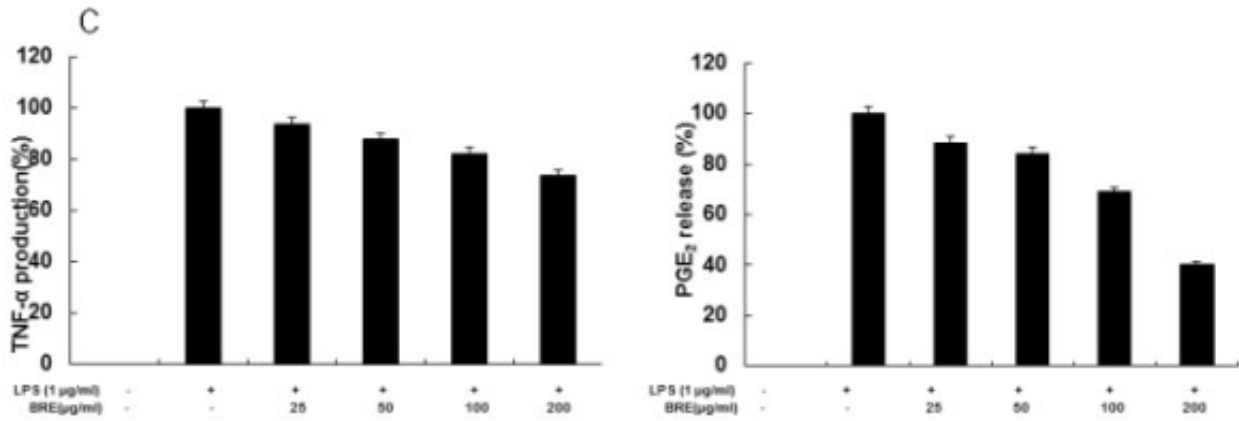
○ 무속(Raphanus)은 식물은 자가불화합성 식물로서 종간, 이종간, 품종간 교배가 심하게 일어난 것으로 알려지고 있다 따라서 육종과 자원보호 측면에서 국산채소류로부터 유전자원 발굴은 확대 할 필요가 있다고 사료 된다.

3) 흑무(black radish) 추출물의 항염효과

(1) 염증성 cytokine 및 인자 (IL1, IL6, TNF α , PGE2)분석

대식세포에서 염증반응유도는 LPS(lipopolysaccharide)을 배양액에 첨가하여 24시간 내외로 배양한다. 이때 대식세포는 염증성cytokine(IL1b, IL6, TNF α)와 COX-2에 의해서 만들어진 PGE2가 분비된다. 본 연구에서는 마우스유래 대식세포주 RAW264.7 cells를 이용하여 흑무추출물의 항염인자인 cytokine과 PGE2 생성 억제효과를 분석하였다(Fig. 32).



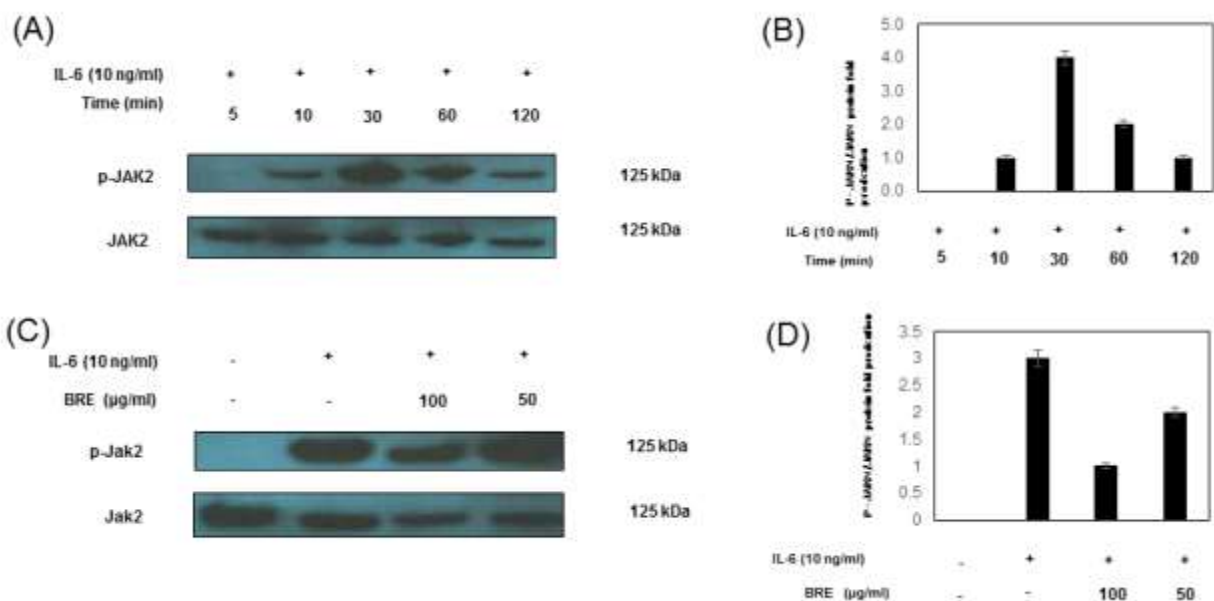


<Fig. 32. Effect of BRE on IL6, IL1b, TNFa and PGE2 production in RAW 264.7 cells>

그 결과는 염증성 cytokine (IL6, IL1b, TNFa)와 인자(PGE2)모두 흑무추출물 농도 의존적으로 감소하였다(Fig.32). 특히 IL6와 IL1b cytokine 억제효능은 매우 뛰어난 결과를 보였다.

(2) 흑무추출물의 IL6/Jak2/STAT3 신호전달억제 효능

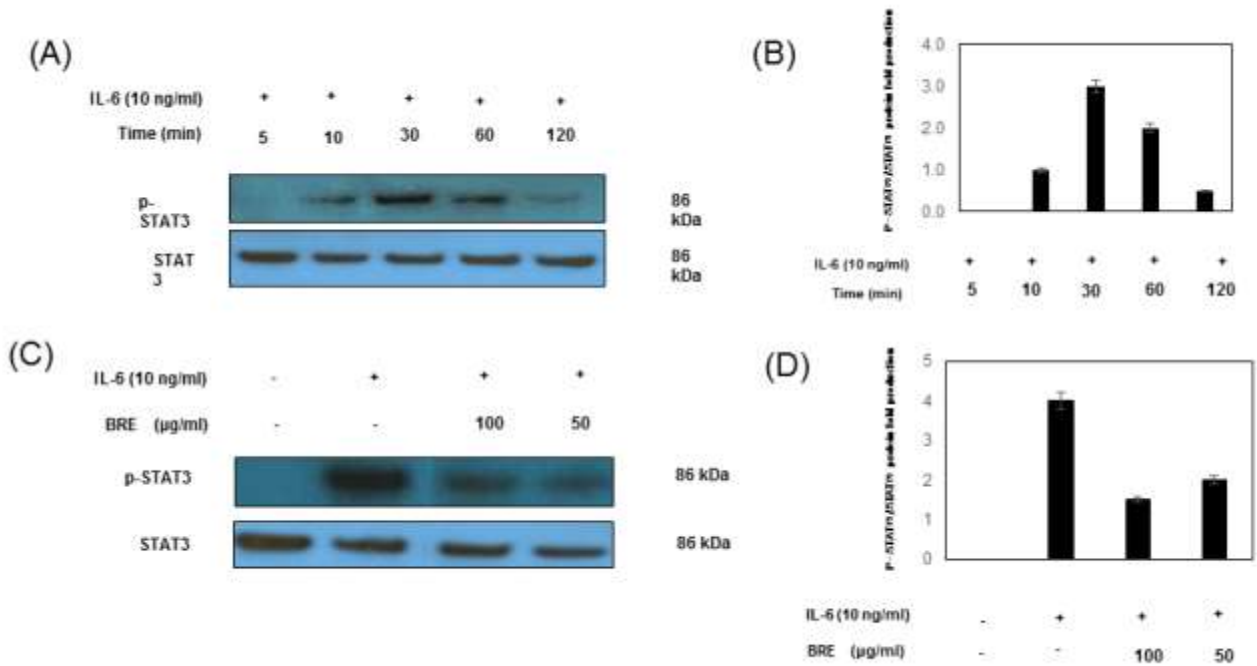
염증반응 시 강하게 발현되는 proinflammatory성 IL6(interlukin6)는 염증반응에서 중요한 역할을 한다. IL6는 세포표면에 있는 IL6 수용체(IL6 receptor)를 통해 JAK2/STAT3 pathway을 걸쳐 핵(nuclear)으로 이동하여 염증인자와 anti-apoptosis 관련 유전자를 활성화 시킨다. 따라서 IL6/JAK2/STAT3 신호전달 경로는 염증과 암세포 발병기작에 매우 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 RAW264.7세포에 IL6와 LPS를 처리하여 JAK2, STAT3 인산화 및 염증억제효과를 분석 하였다. 먼저 IL6를 처리하여 처리 후 시간별 JAK2 인산화를 western blot으로 확인한 결과 처리후 30분에서 가장 높은 인산화를 확인 하였다(Fig. 33 A). 그리고 흑무추출물 100ug, 50ug/ml처리구 모두 JAK2 인산화는 현저하게 억제되었다(Fig. 33 C).



<Fig. 33. Effect of BRE on IL-6 induced p-JAK2 activation in RAW 264.7 cells>

그리고 IL6를 처리하여 처리 후 시간별 STAT3 인산화를 western blot으로 확인한 결과 처리

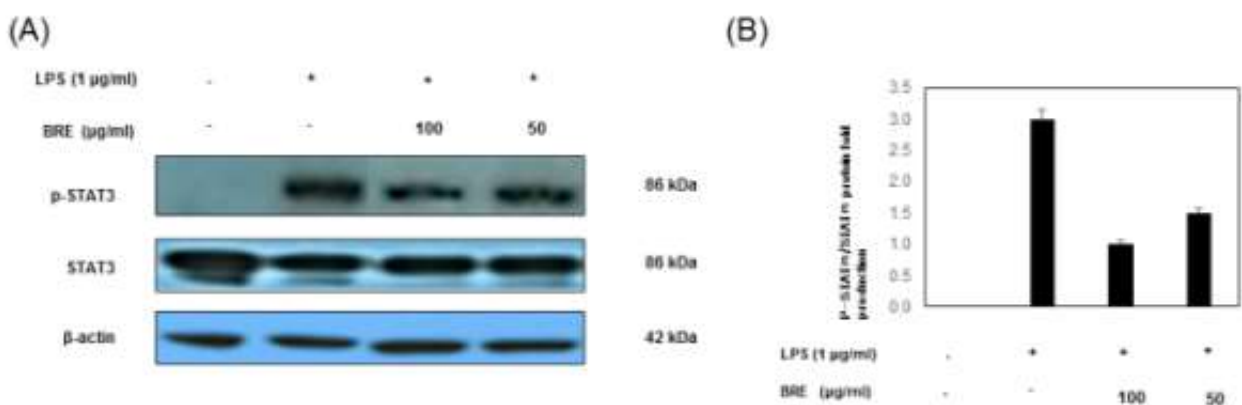
후 30분에서 가장 높은 인산화를 확인 하였다(Fig.3 A, B) 그리고 흑무추출물 100ug, 50ug/ml처리구 모두 STAT3 인산화는 IL6처리구에 비해 현저하게 억제되었다(Fig. 34 C, D)



<Fig. 34. Effect of BRE on IL6-induced p-STAT3 activation in RAW 264.7 cells>

(3) LPS(lipopolysccaride)의해 STAT3 활성화 억제 효능

RAW264.7세포에 흑무추출물은 100ug, 50ug/ml를 천리한 후 1시간후에 LPS(1ug/ml)를 처리하여 STAT3 phosphorylation을 억제효과를 western blot으로 확인 하였다. 흑무추출물은 100ug, 50ug/ml처리 모두에서 IL6 단독처리구보다 STAT3인산화는 현저하게 억제되었다(Fig 35).

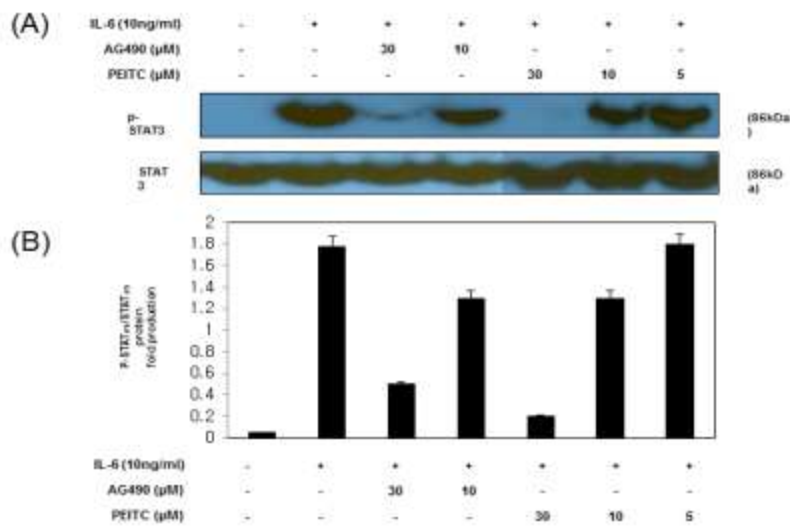


<Fig. 35. Effect of BRE on LPS-induced p-STAT3 activation in RAW 264.7 cells>

(4) PEITC, AG490에 의한 Jak2/STAT3 신호전달 억제 효능

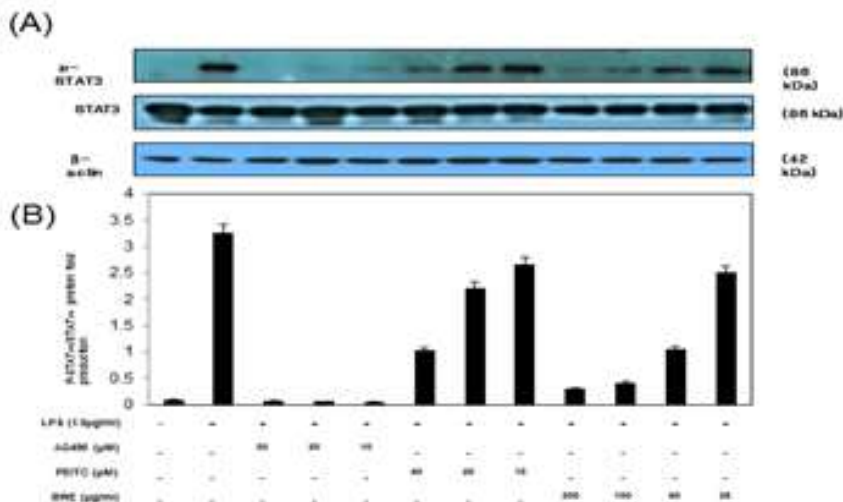
PEITC(phenethyl isothiocyanate)는 십자과식물에 많이 함유된 glucosinolate의 한 종류로서 IL6/JAK2/STAT3 신호전달 경로를 차단하여 항암효과를 보인다고 보고되어 있다(Gong et al, 2014). 그리고 AG490 화합물은 JAK2 inhibitor로 알려져 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia (Meydan et al 1996)치료제로 알려져 있다.

본 연구에서는 Peitc와 AG490 약물을 이용하여 IL6에 의해 유도된 STAT3인산화 억제효과를 western blot으로 분석하였다(Fig.5). AG490약물을 30uM, 10uM 그리고 Peitc 30, 20, 5uM처리 한 결과 STAT3 인산화는 농도 의존적으로 억제되었다(Fig.36.)



<Fig.36. Effect of AG490 and PEITC on IL6 or LPS-induced p-STAT3 activation in RAW264.7 cells>

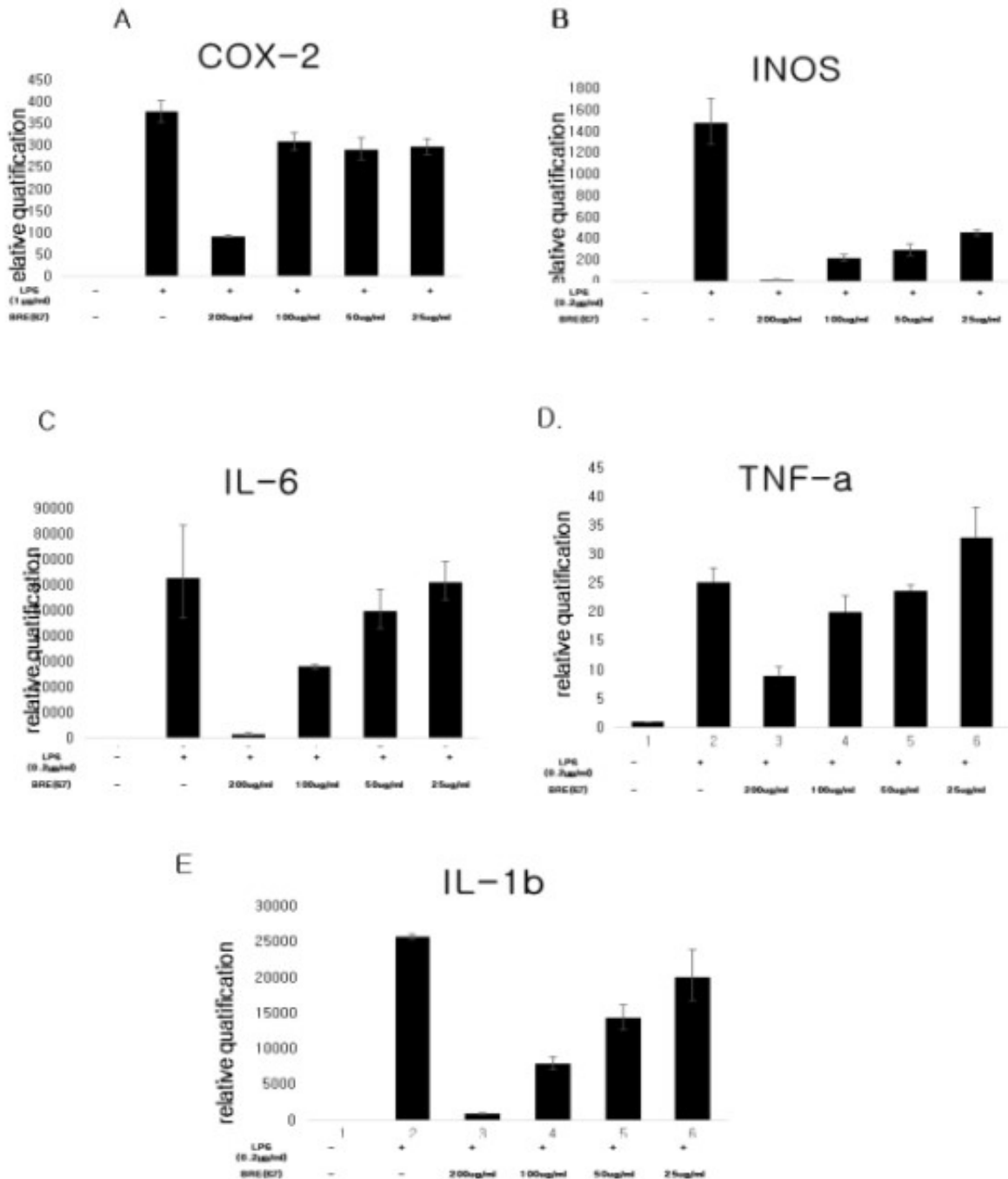
LPS에 의해서 유도된 STAT3 인산화를 AG490, PEITC약물이 억제여부를 흑무추출물 처리와 함께 조사하였다. 그 결과 Fig. 36처럼 IL6의해서 유도된 STAT3 활성 억제 효능과 일치하는 결과를 얻었다(Fig. 37). 따라서 이미 보고된 AG490, PEITC의 STAT3 인산화를 억제하여 염증 및 종양 증식을 억제하는 결과와 일치 하였다. 따라서 본 연구는 흑무추출물의 AG490, PEITC 약물처럼 항염증제 및 항종양제로 활용할 수 있다고 사료 된다.



<Fig. 37. Effect of AG490, PEITC and BRE on LPS-induced STAT3 phosphorylation in RAW264.7 cells>

(5) qPCR를 이용한 염증관련 유전자mRNA(Cox-2, iNOS, IL6, IL-1 β , TNF α) 발현 연구

본 연구에서는 염증성 cytokine과 관련 인자 분석 결과(Fig.33, 34)를 토대로 하여 qPCR기법을 이용하여 mRNA발현 수준을 분석 하였다(Fig. 38).



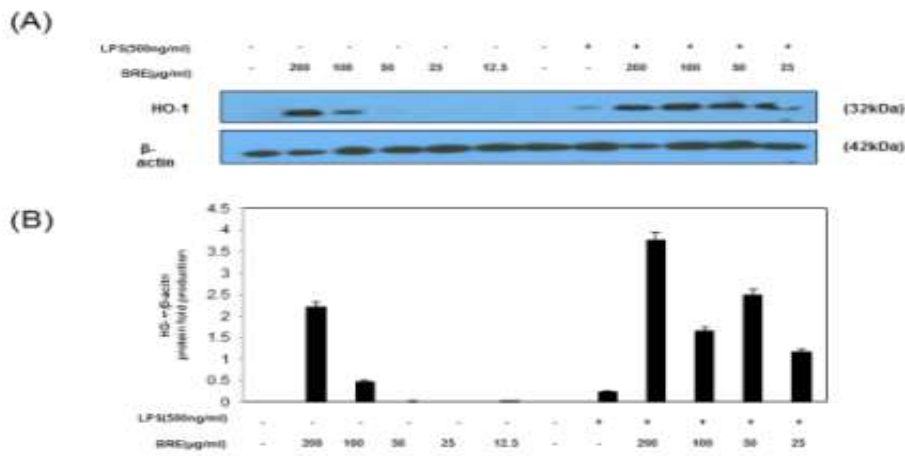
<Fig. 38. Effect of BRE on LPS-induced Cox-2, iNOS, IL6, TNF α , IL-1 β mRNA expression in RAW 264.7 cells>

흑무추출물은 염증인자 단백질 iNOS와 관련사이토카인 IL6, TNF α , IL-1 β mRNA 발현이 농도의존적으로 억제되었다(Fig.38). 이 결과는 흑무추출물은 염증인자 및 관련 유전자의 단백질 수준과 mRNA 발현수준 모두에서 억제되었다(Fig. 38).

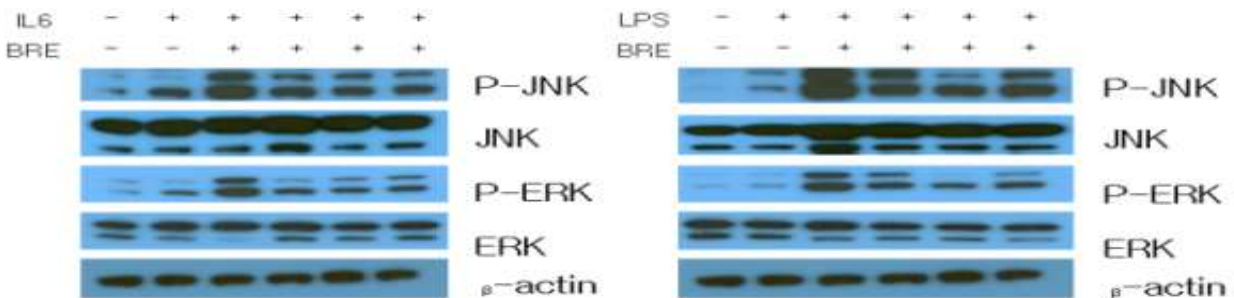
(6) 흑무추출물의 HO-1, JNK, ERK 활성화 연구

Heme Oxidase-1(HO-1) 단백질은 Nrf2 활성화에 의해서 유도된 단백질로서 분해된 헴(Heme)을 활용하여 Fe분자/ferritin 활용, CO생산, Biliverdin생성 등을 통하여 anti-oxidation, anti-apoptosis, anti-inflammation, vasodilation, immunomodulation 등의 기능을 한다.

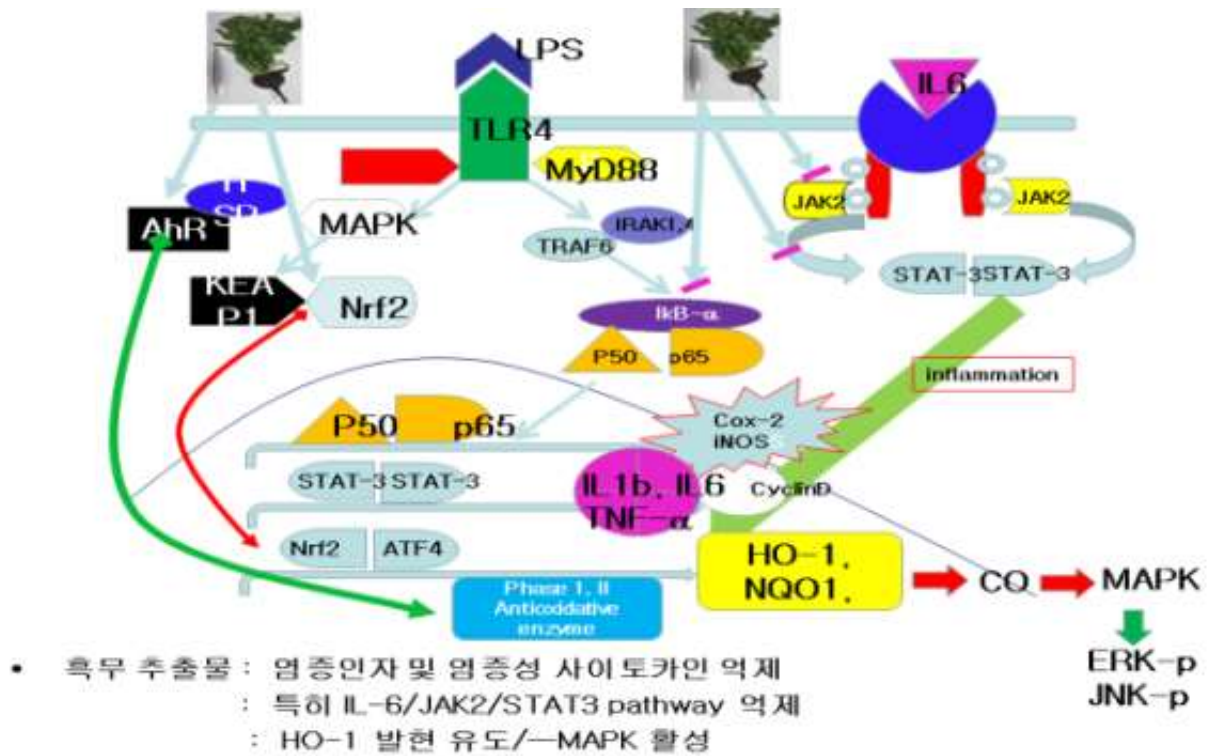
본 연구는 흑무추출물을 RAW264.7 세포에 처리하여 HO생성과 ERK, JNK인산화를 western blot으로 분석 하였다. 그 결과 흑무 추출물은 HO-1 발현은 농도 의존적으로 유도 하였으며, LPS와 혼합처리시는 보다 강하게 HO-1이 발현 되었다(Fig. 39). 최근 Pae *et al*(2008)보고에 의하면 HO-1에 의해서 생성된 CO는 cGMP를 생성하여 vasodilation, anti-proliferation 효과를 유도하다. 그리고 또 다른 효과는 MAPK pathway를 활성화 시켜 p38, ERK, 그리고 JNK활성화를 유도하여 anti-proliferation, anti-apoptosis, anti-inflammation 파급효과를 가져온다고 보고 되었다. 본 연구에서는 흑무추출물을 IL6, LPS를 혼합처리한후 JNK, ERK 인산화를 western blot으로 분석 하였다. 그 결과 IL6와 LPS처리는 비처리구에 비해 인산화가 급격히 증가 하였다. 그리고 흑무추출물의 농도(200, 100, 50, 25ug/ml)를 처리한 결과 농도의존적으로 ERK, JNK 인산화는 증가 되었다(Fig. 40) 이 결과는 Pae et.al., 보고서와 일치하는 결과를 보였다. 따라서 흑무추출물은 Nrf2를 유도하여 HO-1유전자를 발현시키고, 활성화된 HO-1는 CO를 생성하여 MAPK활성화를 통해서 anti-inflammation효과를 가져온 것으로 사료된다(Fig. 41).



<Fig. 39. Effect of BRE on HO-1 expression in RAW 264.7 cells>



<Fig. 40. Effect of BRE on JNK and ERK phosphorylation in RAW264.7 cells>



<Fig. 41. A schematic illustration of the anti-inflammation of BRE>

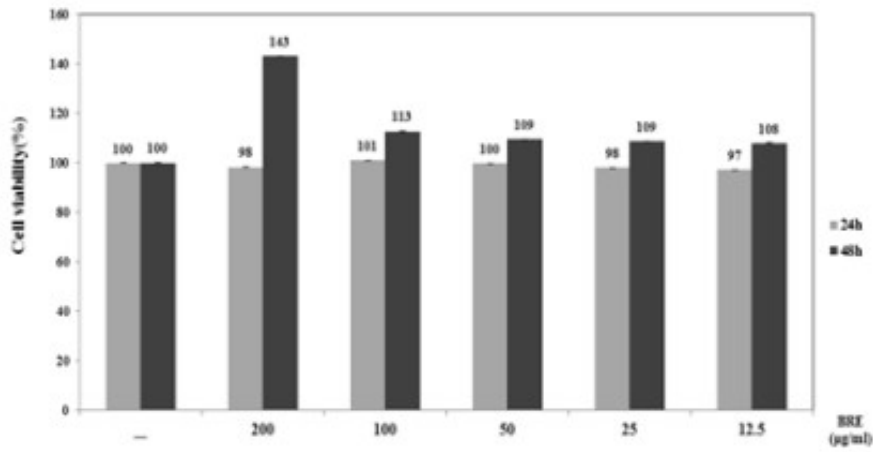
4) 항비만(anti-obesity) 효과

(1) 흑무추출물의 지방세포 분화 억제연구

비만 및 지방세포 분화 연구모델로 3T3-L1가 널리 사용되고 있다. 3T3-L1 preadipocyte에서 adipocyte로 분화진행에는 전사인자인 C/EBPβ, C/EBPδ 발현을 시작으로 C/EBPα, PPAR-γ 발현 활발이 진행되면서 SREBP-1 전사인자가 작동되어 adipogenesis는 진행된다. 이때 adipocyt gene marker로는 aP2, GLUT4, Adipoq, ACC, Adipsin, ATGL, FAS, SCD등이 알려져 있다.

□ 흑무추출물 3T3-L1세포 MTT 연구

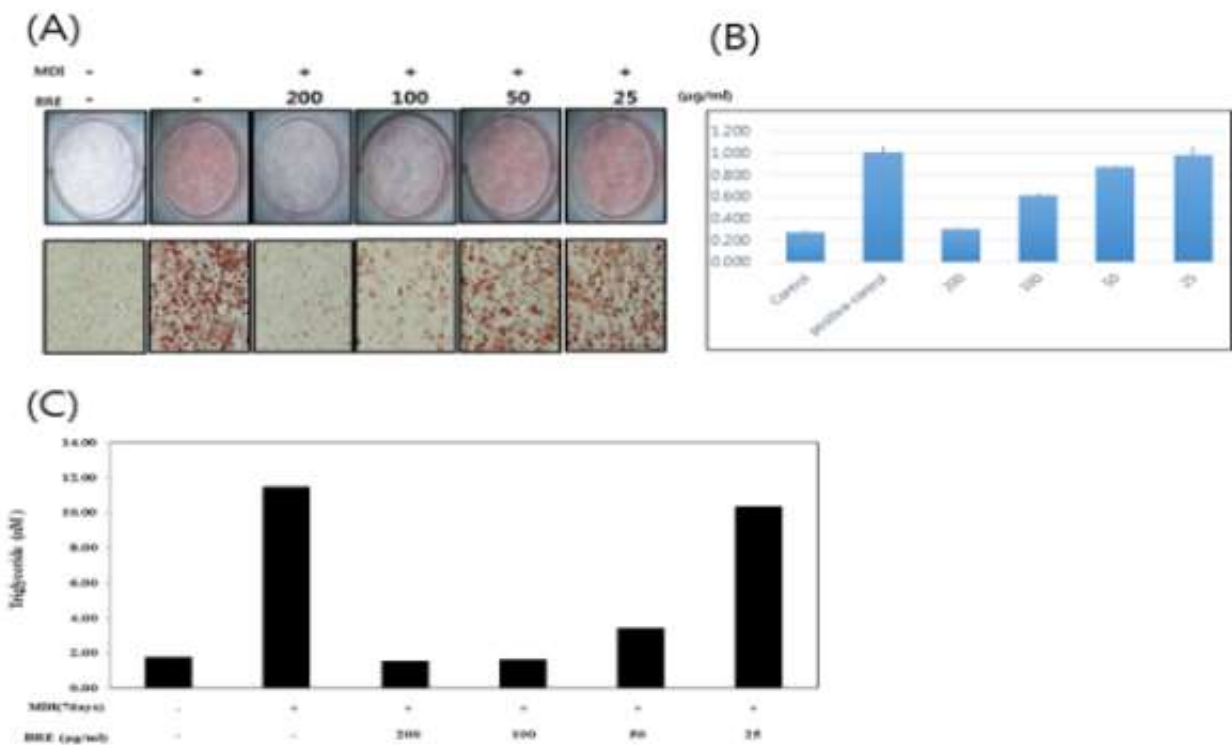
먼저 3T3-L1세포를 96wells에 5×10⁴/ml cell을 seeding후 24시간 배양후 흑무추출물을 농도 별로 처리 후 48시간후 MTT용액을 넣고 4시간 배양 후 DMSO용액을 넣고 formazan를 녹인 후 540nm에서 측정 하였다. 그 결과 흑무추출물 처리농도(200, 100, 50, 25, 12.5ug/ml)가 높을수록 세포성장율은 높게 보였다(Fig. 42)



<Fig. 42. Effect of BRE on cell ability in 3T3-L1 mouse preadipocytes>

□ 추출방법에 따른 지방세포 분화억제 연구

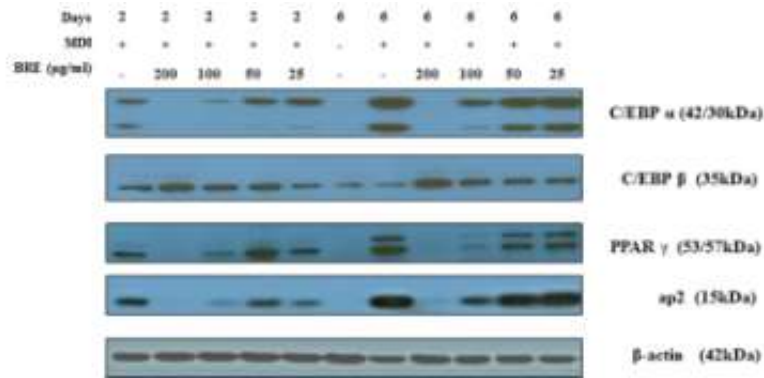
다음은 preadipocyte에서 adipocyte 분화과정 중 흑무 추출물의 분화억제효과를 oil-red staining분석, adipocyte에 축적된 lipid분석, total TG분석을 수행 하였다. 먼저 Oil Red O 염색 후 위상차 현미경으로 관찰 후 촬영 하였다(Fig.43, A). 그 결과 흑무 고농도에서는 현저하게 lipid droplet 감소하였다. 그리고 관찰 후 isopropanol에 lipid droplet를 녹인 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. MDI를 처리하여 지방세포로 분화된 처리구에서는 미분화된 세포에서보다 흡광도가 5배가량 높게 보였다. 그리고 흑무추출물 처리에서는 농도의적으로 감소 되었다 (Fig.12. B). 또한 Triglyceride분석은 Triglyceride quantification assay kit(abcam)를 이용하여 매뉴얼 에따라 수행 하였다. 그 결과 흑무추출물 200, 100, 50 µg/ml처리에서 현저하게 감소 되었다(Fig.43. C)



<Fig. 43. Effect of BRE on ORO staining(A), total lipid(B) and TG analysis(C) in the 3T3-L1 adipocytes>

(3) preadipocyte와 adipocyte에서 관련 유전자 발현 억제 연구

preadipocyte에서 adipocyte 로 분화하기 위해서는 분화초기에는 C/EBP-β가 발현되어 C/EBP-α, PPAR-γ 유전자를 유도함으로 정상적인 adipogenesis가 진행 된다. 우리는 preadipocyte (배양 후 2일)와 지방세포로 완전히 분화된 (배양 후 6일)에서 C/EBP-β, C/EBP-α, PPAR-γ, aP2 단백질 발현을 western blot으로 분석 하였다(Fig. 44).

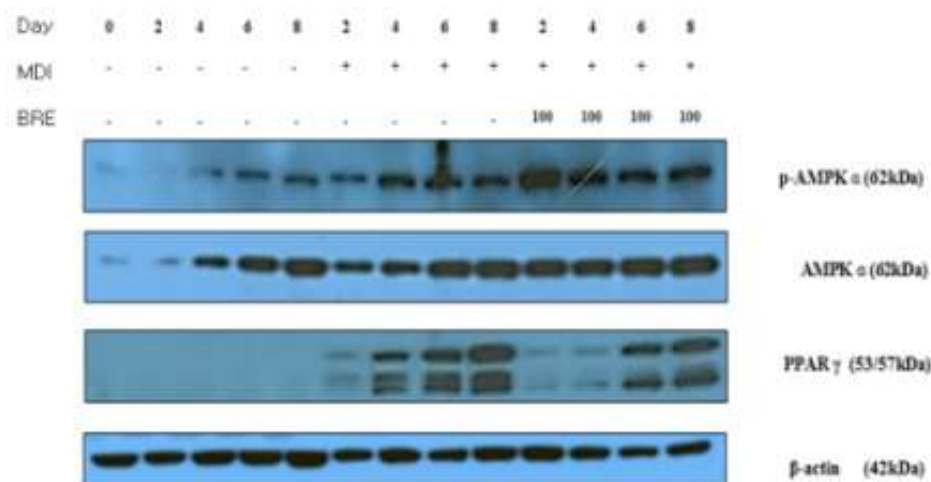


<Fig. 44. Effect of BRE on C/EBP-α, C/EBP-β, PPAR-γ and aP2 proteins in 3T3-L1 mouse preadipocyte and adipocyte>

C/EBP-α, PPAR-γ, aP2 단백질 발현은 흑무추출물 농도 의존적으로 감소하여 total lipid, TG 분석결과와 일치함을 보였다(Fig. 44). 그러나 C/EBP-β 단백질 발현은 dose dependent 하게 발현되었다.

(4) 흑무 추출물의 AMPK 활성화 효과

AMP-activated protein kinase(AMPK)는 지방산의 합성과 분해를 중재하는 중요한 역할을 한다. AMPK의 활성화는 ATP 대사를 촉진하여 지방대사 관련 유전자들을 활성화 또는 불활성화를 조절한다고 알려져 있다. 또한 지방산 산화를 촉진하여 세포내 지방 축적으로 억제하는 기능을 한다. 지방세포에서 AMPK활성화는 ACC억제와 HSL를 통해 지방축적 및 분해를 억제한다는 보고도 있다.



<Fig. 45. Effect of BRE on AMPK phosphorylation during differentiation preadipocyte to adipocyte>

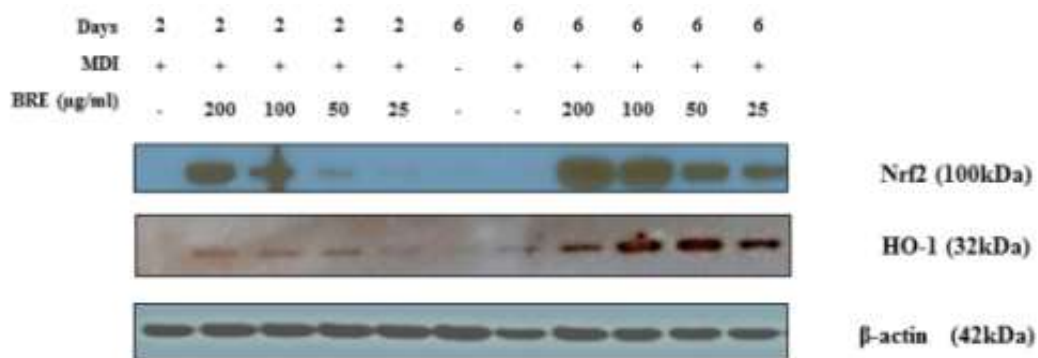
본 연구는 preadipocyte에서 adipocyte로 분화되는 동안 흑무추출물의 AMPK 활성화와 지방세포로 분화 하는 전사인자인 PPAR-r 발현관계를 분석 하였다. 분화유도 동안(2, 4, 6, 8일) AMPK 단백질 발현은 MDI 미처리구, 처리구 모두에서 시간이 경과할수록 높게 나타났다. 그러나 AMPK인산화는 MDI를 처리하지 않은 처리구에서는 처리구에 비해 매우 낮게 발현 되었다. 또한 흑무추출물 처리시는 preadipocyte에서 adipocyte분화가 진행되는 동안 AMPK인산화는 높게 나타났다(Fig. 45).

PPAR-r 단백질 발현은 preadipocyte에서 adipocyte분화 될수록 강하게 발현 되었다. 그러나 흑무추출물을 처리하면 PPAR-r 발현은 억제되는 결과를 보였다. 이 결과는 흑무추출물에 의해서 활성화된 AMPK는 PPAR-r를 직 간접적으로 발현을 억제하여 지방세포분화를 억제하는 것으로 사료된다.

(5) 흑무추출물의 Nrf2, HO-1발현 효과

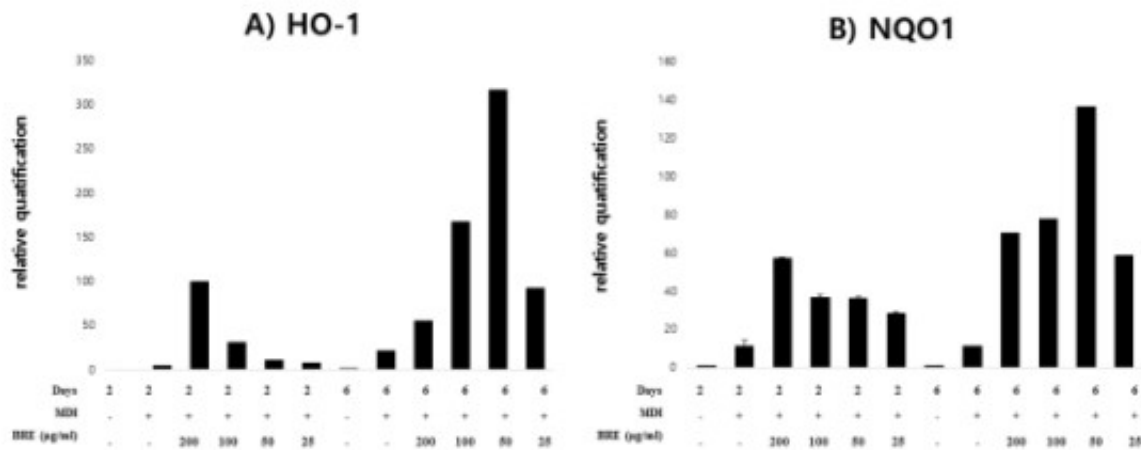
Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2 related factor 2)유전자는 산화적 스트레스 또는 항산화물질이 세포 또는 조직을 자극으로 발현되는 전사인자 유전자로서 HO-1, NQO1, GCLM, SOD, catalase, thioredoxin 등을 발현시켜 cytoprotective, 항산화, 항염, anti-adipogenesis 등의 기능을 수행한다.

Nrf2는 보통 세포질에서 Nrf2의 억제제인 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)과 복합체를 이루고 있지만, Nrf2의 활성 신호에 의하여 Keap1과 분리되면 핵 속으로 이동하여 해당 유전자 promoter의 antioxidant response element 자리에 결합하여 HO-1을 포함한 다양한 항산화 효소들의 전사 활성을 증가시킨다. 따라서 Nrf2의 활성화를 통한 HO-1 발현 증대는 세포내 항산화방어를 위한 중요한 신호 기전으로 인식되고 있다. 최근까지 보고된 Nrf2 activator로는 sulforaphane, curcuminoid, EGCG, Allyl sulfides, resveratrol, Lycopene 등이 알려져 있다.



<Fig. 46. Effects of BRE treatment on the protein abundance of adipogenic gene products of Nrf2 and HO-1 in 3T3-L1 cells 2 and 6 days after the initiation of differentiation>

본 연구에서는 preadipocyte와 adipocyte에서 흑무추출물의 Nrf2 유도 및 그 전사체인 HO-1 단백질 발현을 분석 하였다(Fig. 46). 그 결과 3T3-L1 preadipocyte(분화유도 2일)과 adipocyte로 분화가 된 상태에서(분화유도 6일) Nrf2 단백질과 HO-1 단백질은 고농도에서 강하게 발현되었다.



<Fig. 47. Real-time RT-PCR analysis of HO-1 and NQO1. Total RNA was prepared from 3T3-L1 cells at 2 and 6 days>

그리고 qPCR기법을 이용하여 흑무추출물이 농도별로 처리된 preadipocyte와 adipocyte에서 Nrf2 전사체인 HO-1과 NQO1 유전자의 mRNA를 정량분석 하였다. 그 결과 흑무 추출물은 Nrf2 전사 뿐만 아니라 타겟 유전자인 HO-1, NQO1 발현시킴을 확인 하였다. HO-1 mRNA발현은 adipocyte에서가 preadipocyte에서보다 최고 3배 이상 높게 나타났다. NQO1 mRNA 발현 역시 adipocyte에서가 높게 나타나는 특징을 보였다. 또 하나의 특징은 preadipocyte에서는 흑무추출물 처리에 따른 HO-1, NQO1 발현은 농도 의존적으로 발현 양성을 보이나, adipocyte에서 HO-1, NQO1 유전자 발현은 흑무추출물 50ug/ml처리에서가 가장 높게 발현되는 양상을 보였다 (Fig. 47).

(6) qPCR를 이용한 지방세포분화 관련 유전자 mRNA(C/EBP α , δ , PPAR- γ , SREBP-1c, ACC, FAS, SCD, GLUT4, Ap2, Adipsin, ATGL) 분석

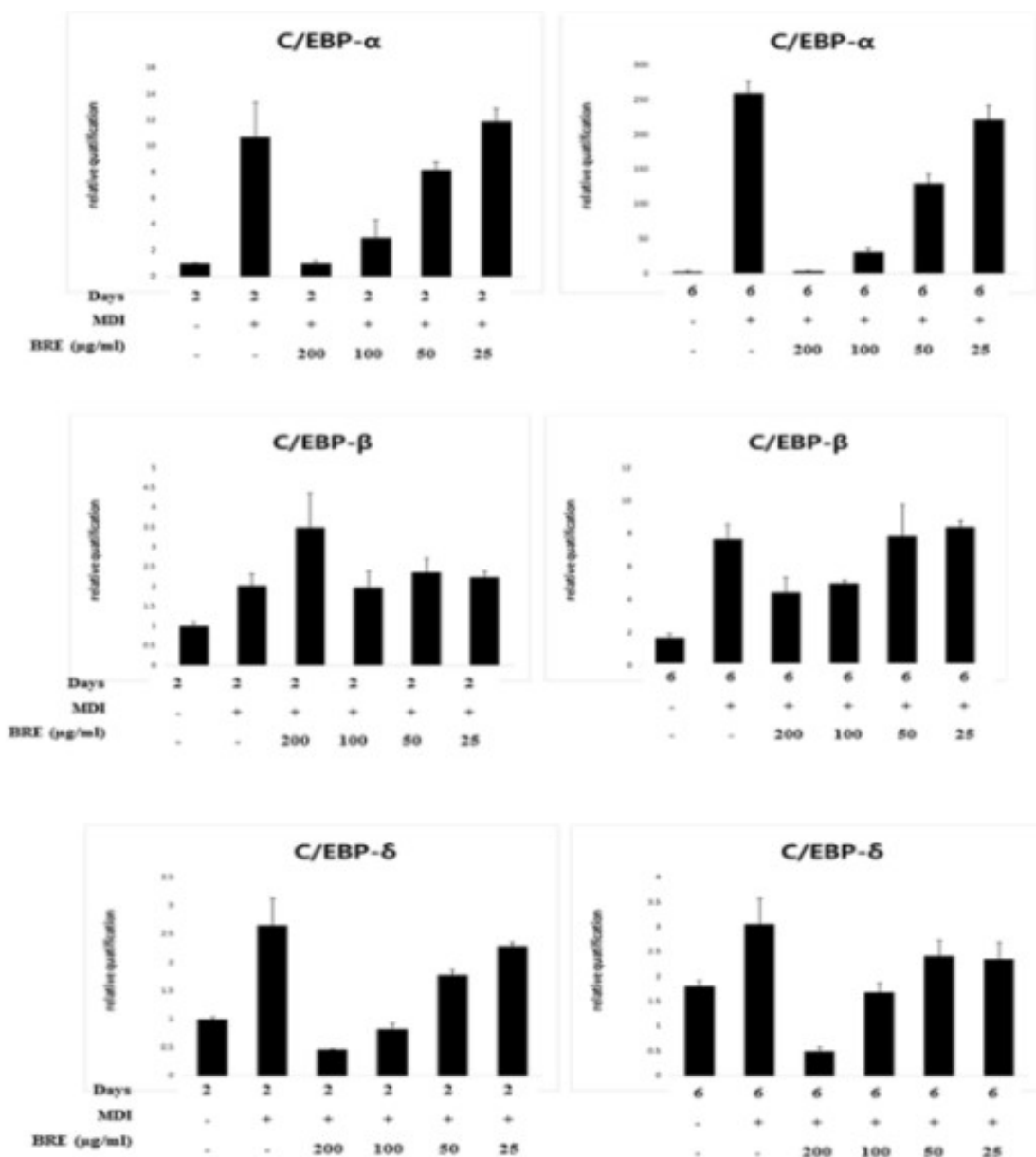
흑무 추출물(BRE) 처리에 의해 지방분화에 관련된 15개 유전자의 발현이 억제 되는 것을 확인하였다(Fig. 48, 49, 50, 51, 52). 3T3-L1 세포에 MDI(분화유도물질)와 흑무추출물(BRE)을 처리하고 분화관련 15개 유전자(C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- δ , PPAR- γ , SREBP-1c, ACC, FAS, SCD, ADD1, ATGL, HSL, Adipsin, GLUT4, aP2, MGL)의 mRNA를 실시간유전자 증폭기를 이용하여 정량분석 하였다.

C/EBP- α 유전자는 C/EBP- β 에 의해서 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. MDI 처리군에서 2일, 6일 모두 발현양이 급상승하였으며 6일 처리군에서는 2일보다 25배 이상 많이 발현되었다. 따라서 C/EBP- α 는 지방세포 분화 및 조절에 매우 중요한 유전자임을 확인 하였다. 그리고 흑무추출물 처리군에서는 2일, 6일 모두 흑무추출물은 농도 의존적으로 C/EBP- α 발현양이 감소하였다(Fig.17). 흑무추출물의 C/EBP- α 발현 억제효과는 2일에서는 90%(200ug/ml), 73%(100ug/ml), 24%(50ug/ml), -10%(25ug/ml)이고, 6일에서는 98.1%(200ug/ml), 89%(100ug/ml), 50%(50ug/ml), 15%(25ug/ml) 이다(Fig. 48).

C/EBP- β 유전자는 전구지방세포에서의 분화시발 인자로 알려져 있다. 분화 후 2일과 6일에서 mRNA 발현양상을 비교 하였다. MDI만 처리한 군에서는 6일에서가 2일보다 약 3배 많이 발현되었다. 흑무추출물을 함께 처리한 군에서는 2일 및 6일 모두 발현이 감소하는 양상을 보였으나 2일에서는 200ug/ml 처리군에서 발현이 증가하는 특징을 보였다. 그리고 6일 처리군에서는 2일보다

C/EBP- β 발현이 약 2배 이상 많이 발현됨을 확인하였다(Fig.48)

C/EBP- δ (CCAAT/enhancer binding protein- δ) 유전자는 전구지방세포에서 분화초기에 C/EBP- β 와 함께 C/EBP- α 및 PPAR- γ 를 조절하는 유전자이다. 분화된 세포에서의 C/EBP- δ 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 2.6배, 6일에서는 1.7배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(도 14a). 흑무추출물의 C/EBP- δ 발현 억제효과는 2일에서는 82.4%(200ug/ml), 68.8%(100ug/ml), 34.1%(50ug/ml), 14%(25ug/ml)이고, 6일에서는 83.7%(200ug/ml), 44.8%(100ug/ml), 21%(50ug/ml), 21.5%(25ug/ml)이다. MDI처리 후 2일과 6일에서 C/EBP- δ mRNA발현 비교에서는 6일에서가 2일에 비교해 약 1.15배 증가 하였다. 흑무추출물은 2일 및 6일 모두 농도 의존적으로 C/EBP- δ mRNA 발현을 억제 하였다(Fig.48).



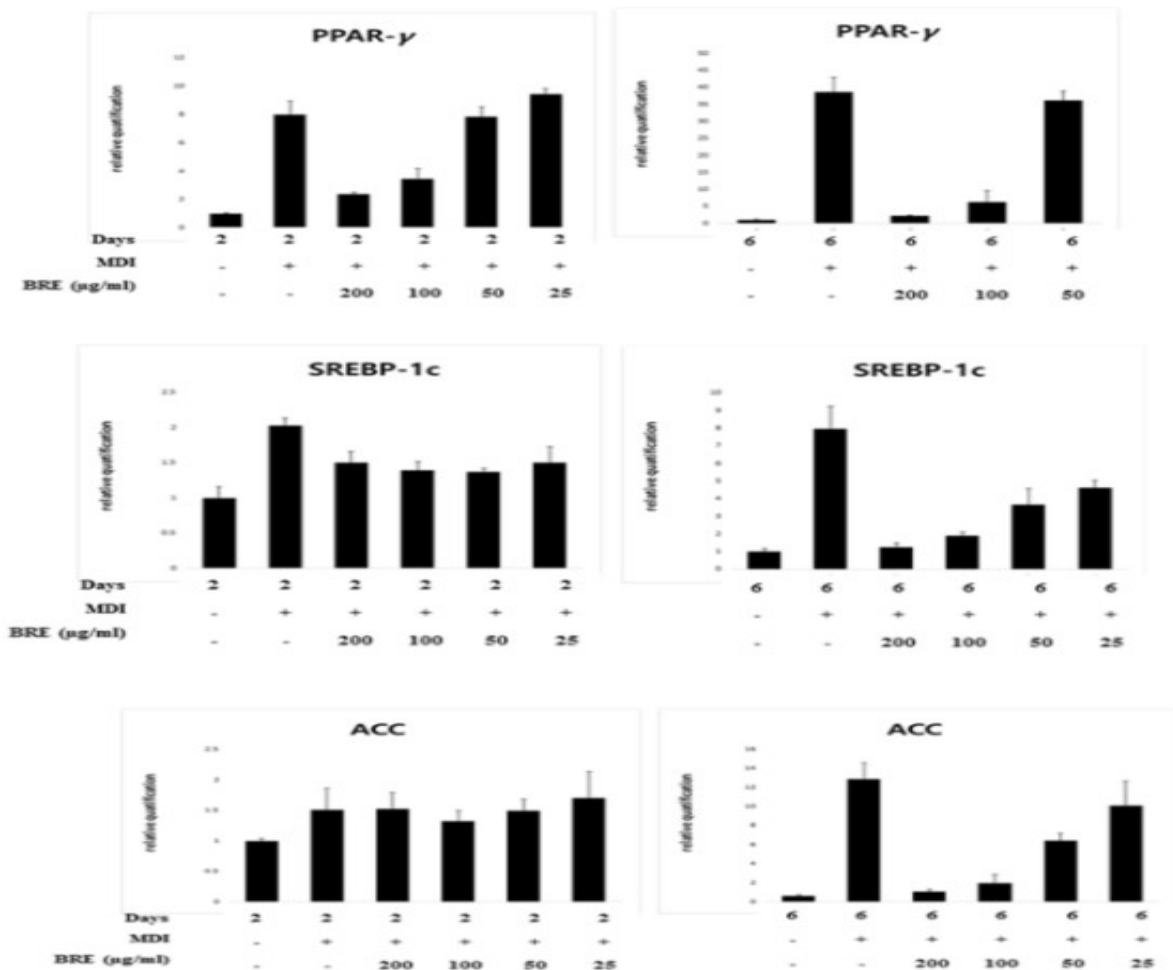
<Fig. 48. Effect of BRE on C/EBPs mRNA expression in preadipocytes(2days) and adipocytes(6days)>

PPAR- γ 유전자는 C/EBP- β , SREBP-1에 의해 발현이 조절된다. 이 유전자는 지질, 지방합성에 매우 중요한 역할을 한다. 분화된 세포에서 PPAR- γ 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 8배, 6일에서는 36배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(Fig.49). 흑무추출물의 PPAR- γ 발현 억제효과는

2일에서는 72%(200ug/ml), 57.5%(100ug/ml), 3%(50ug/ml), -18%(25ug/ml)로 나타났다. 6일에서는 95.5%(200ug/ml), 94.2%(100ug/ml), 55.3%(50ug/ml), 33.5%(25ug/ml)의 mRNA발현 억제 효과를 보였다(Fig. 49).

SREBP-1c 유전자는 지방대사 및 콜레스테롤 대사에 매우 중요한 기능을 한다. 분화된 세포에서의 SREBP-1c mRNA 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 2배, 6일에서는 8배 이상 많이 발현되었다. 흑무추출물의 SREBP-1c 발현 억제효과는 2일에서는 25%(200ug/ml), 32.5%(100ug/ml), 32%(50ug/ml), 25%(25ug/ml)로 나타났다. 6일에서는 85.3%(200ug/ml), 76.2%(100ug/ml), 54%(50ug/ml), 42%(25ug/ml)의 mRNA 발현 억제 효과를 보였다. MDI 처리된 6일 처리군에서는 2일 처리군보다 SREBP-1c mRNA가 4배정도 많이 발현되었다(Fig.49). 그러나 흑무처리군 2일에서는 25%정도 억제하는 양상을 보였으며, 6일 처리군에서는 흑무 추출물 농도의존적으로 SREBP-1c mRNA 발현이 억제되었다.

ACC(Acetyl-CoA-carboxylase) 유전자는 지방산과 콜레스테롤 합성을 조절하는 유전자로서 SREBP-1,2에 의해 조절된다. 분화된 세포에서 ACC 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 1.5 배, 6일에서는 19배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(Fig.8). 분화유도 후 2일에서는 흑무추출물은 ACC 발현을 유의적으로 억제하지는 못했다. 6일에서는 92.2%(200ug/ml), 84.5%(100ug/ml), 50%(50ug/ml), 22%(25ug/ml)의 mRNA발현 억제 효과를 보였다. MDI 처리된 6일 처리군에서는 2일보다 12배 많이 발현되었다(Fig. 49).



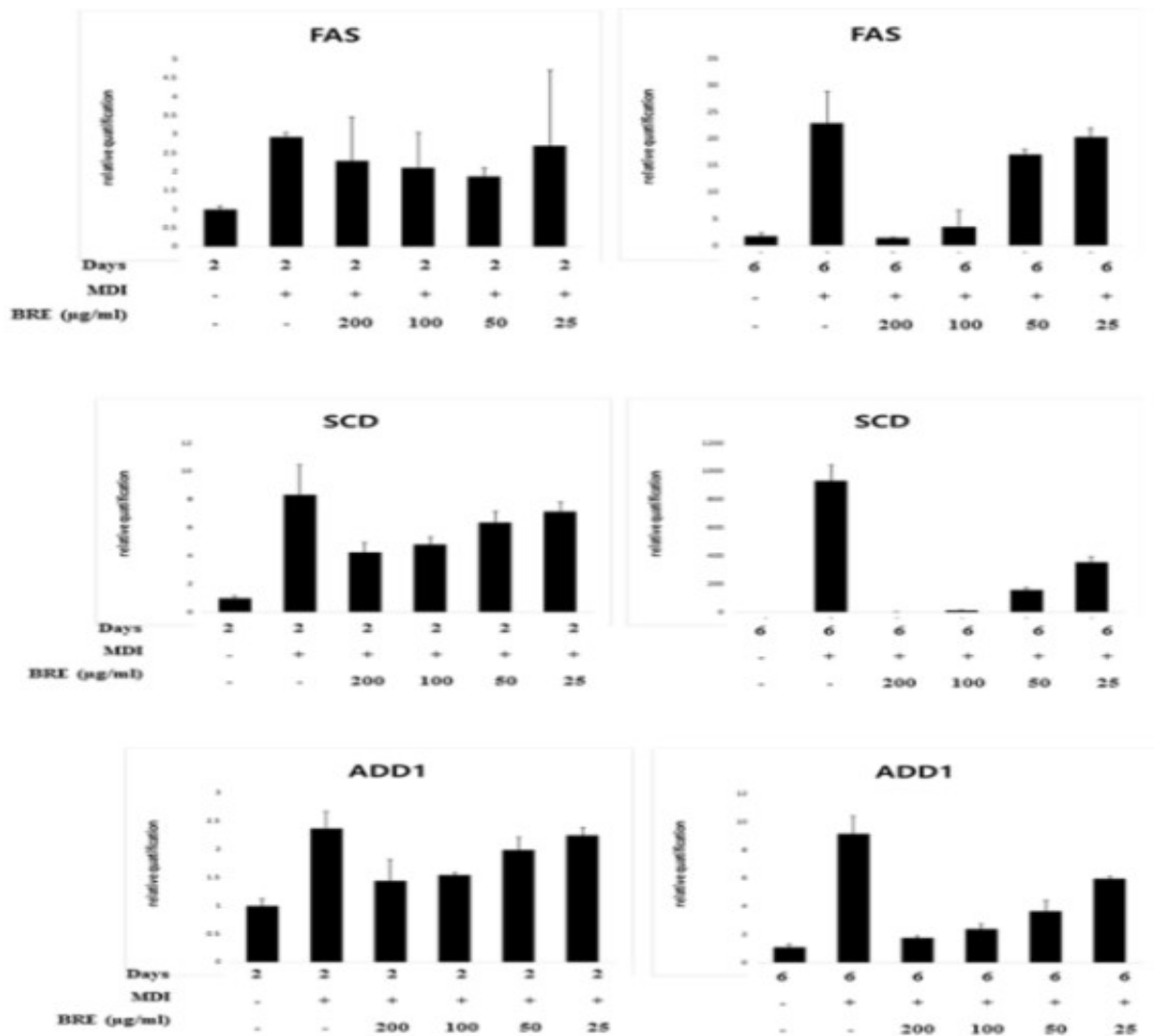
<Fig. 49. Effect of BRE on PPAR-r, SREBP-1c and ACC mRNA expression preadipocytes(2days) and adipocytes(6days)>

FAS(fatty acid synthase)는 지방산 합성에 중요한 유전자로서 SREBP-1,2에 의해서 조절 된다. 분화된 세포에서 FAS mRNA 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 3배, 6일에서는 13배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(Fig. 50). 분화유도 후 2일 처리군에서는 흑무추출물은 FAS발현을 유의적으로 억제하지는 못했다. 6일에서는 93.7%(200ug/ml), 84.8%(100ug/ml), 25.4%(50ug/ml), 11.8%(25ug/ml)의 mRNA발현 억제 효과를 보였다. MDI 처리된 6일 처리군에서는 2일보다 7.8배 많이 발현되었다(Fig. 50).

SCD(stearoyl-CoA desaturase)는 SREBP-1c에 의해 조절되는 유전자로서 지질합성에 주요한 기능을 한다. 분화된 세포에서 SCD 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 8.3배, 6일에서는 670배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(도 50c). 흑무추출물의 SCD 발현 억제효과는 2일에서는 49%(200ug/ml), 42%(100ug/ml), 24%(50ug/ml), 14.5%(25ug/ml), 6일에서는 99.6%(200ug/ml), 98.6%(100ug/ml), 83%(50ug/ml), 62%(25ug/ml) 이다. 흑무추출물은 2일, 6일 모두 농도 의존적으로 SCD mRNA 발현을 억제 하였다(Fig. 50).

ADD1 (adipocyte differentiation and determination factor 1)은 SREBP-1과 함께 PPAR- γ , C/EBP- α 를 조절하는 유전자로서 전구지방세포에서 지방세포로 분화하는데 매우 중요한 유전자이다. 2일 및 6일 모두에서 흑무처리군 농도 의존적으로 mRNA 발현이 억제 되었다(Fig.20). 분화된 세포에서 ADD1 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 2.3배, 6일에서는 8.2배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(Fig.50).

흑무추출물의 ADD1 발현 억제효과는 2일에서는 40%(200ug/ml), 35%(100ug/ml), 17.4%(50ug/ml), 4.4%(25ug/ml) 이고, 6일에서는 81.4%(200ug/ml), 73.7%(100ug/ml), 60.5%(50ug/ml), 35.2%(25ug/ml) 이다. MDI 처리 후 2일과 6일에서 ADD1 mRNA 발현을 비교하면 6일에서가 2일에 비해 약 4배정도 많이 발현되었다. 흑무추출물은 2일, 6일 모두 농도 의존적으로 ADD1 mRNA 발현을 억제하였다(Fig. 50).



<Fig. 50. Effect of BRE on FAS, SCD and ADD1 mRNA expression preadipocytes(2days) and adipocytes(6days)>

ATGL(adipocyte triglyceride lipase) 유전자는 중성지방을 글리세롤과 지방산으로 전환시키는 지방분해 역할을 한다. 분화된 세포에서 ATGL 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 13배, 6일에서는 600배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(Fig. 51). 흑무추출물의 ATGL 발현 억제효과는 2일에서는 76.3%(200ug/ml), 64.7%(100ug/ml), 18.4%(50ug/ml), 18.1%(25ug/ml) 이고, 6일에서는 99.5%(200ug/ml), 90.1%(100ug/ml), 36.5%(50ug/ml), 15.3%(25ug/ml) 이다. MDI 처리 후 2일과 6일에서 ATGL mRNA 발현을 비교하면, 6일에서가 2일에 비해 약 47배정도 많이 발현되었다. 흑무추출물은 2일, 6일 모두 농도 의존적으로 ATGL mRNA 발현을 억제 하였다(Fig. 51).

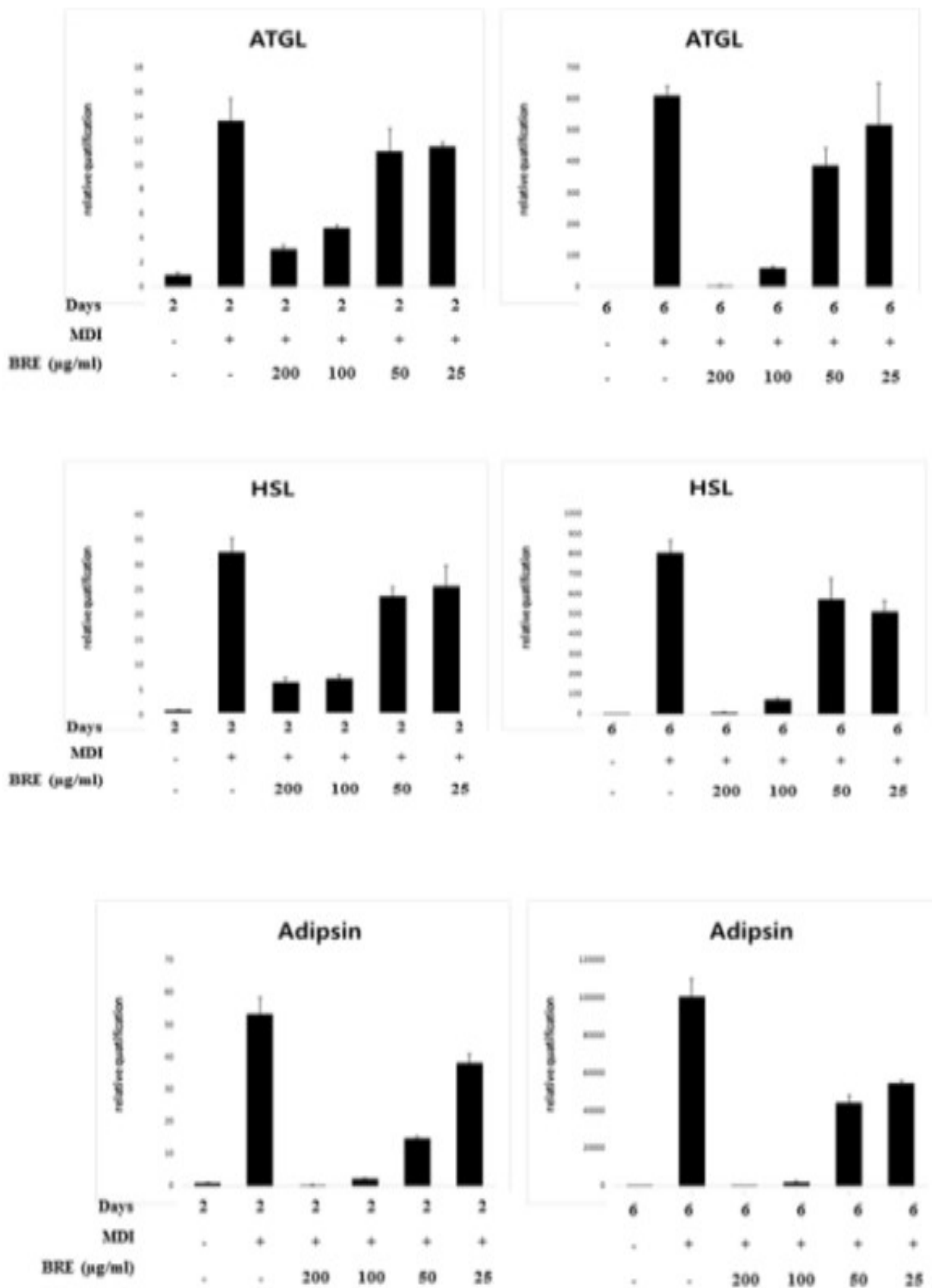
HSL(hormone sensitive lipase) 유전자 역시 지방을 분해하는 역할을 한다. 분화된 세포에서 HSL 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 31배, 6일에서는 671배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(Fig.20). 흑무추출물의 HSL 발현 억제효과는 2일에서는 80%(200ug/ml), 77.6%(100ug/ml), 27%(50ug/ml), 21.3%(25ug/ml) 이고, 6일에서는 99.2%(200ug/ml), 91.1%(100ug/ml), 28.8%(50ug/ml), 34.3%(25ug/ml) 이다. MDI 처리 후 2일과 6일에서 HSL mRNA 발현을 비교하면 6일에서가 2일에 비해 약 25배 많이 발현되었다. 흑무추출물은 2일, 6일 모두 농도 의존적으로 HSL mRNA 발현을 억제 하였다(Fig. 51).

Adipsin은 분화된 지방세포에서 강하게 발현되는 유전자로서 지방세포 유전자 마커로 알려져 있다. 분화된 세포에서 Adipsin 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 53배, 6일에서는 13259배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(Fig. 51). 흑무추출물의 Adipsin 발현 억제효과는 2일에서는 99%(200ug/ml), 96.3%(100ug/ml), 62.3%(50ug/ml), 28%(25ug/ml) 이고, 6일에서는 99.6%(200ug/ml), 97.8%(100ug/ml), 56.2%(50ug/ml), 35.9%(25ug/ml) 이다. MDI처리 후 2일과 6일에서 Adipsin mRNA발현을 비교하면 6일에서가 2일에 비교 약 1900배정도 많이 발현되었다. 흑무추출물은 2일, 6일 모두 농도 의존적으로 Adipsin mRNA 발현을 억제 하였다(Fig. 51).

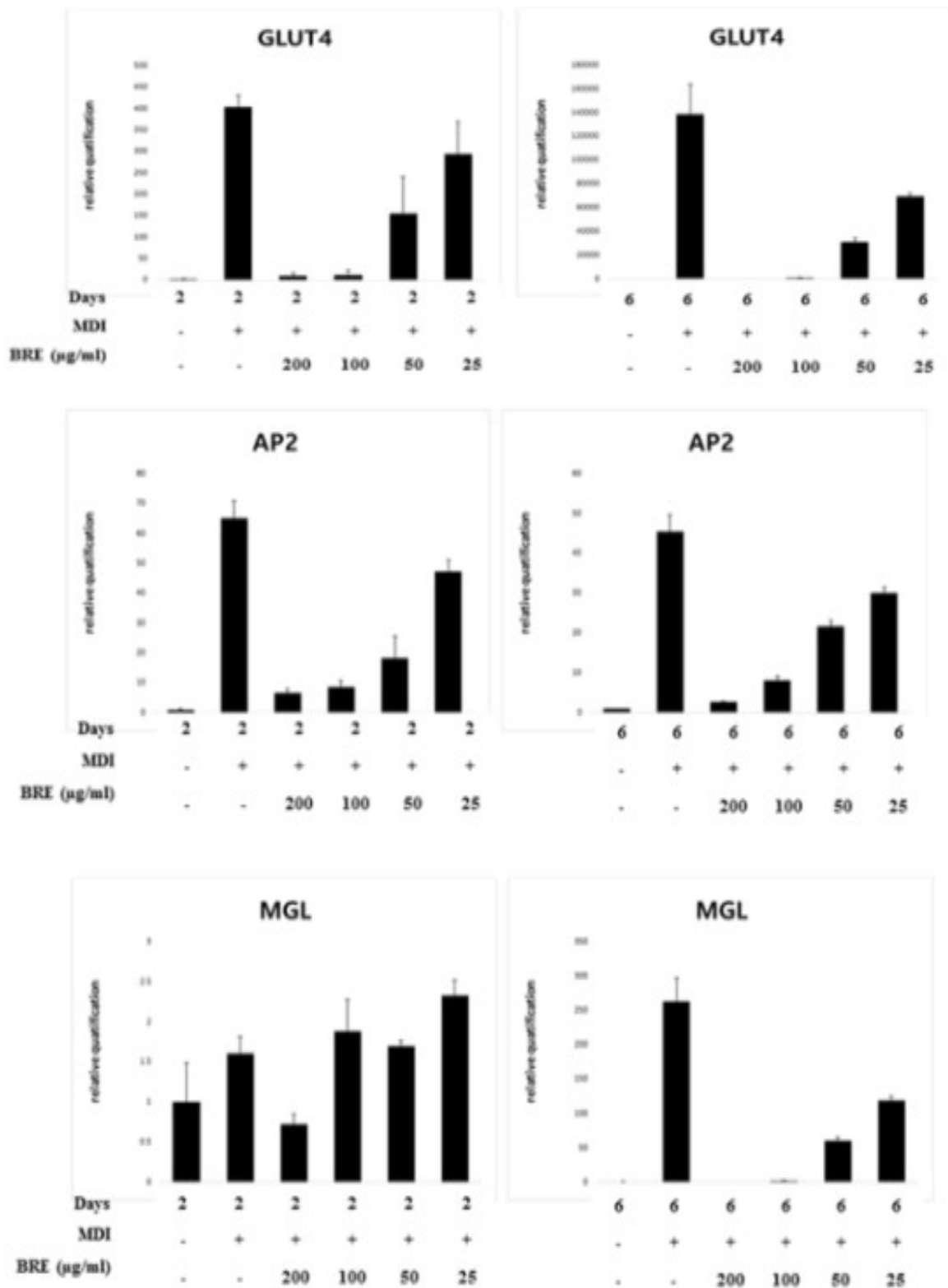
GLUT4 (glucose transporter 4) 유전자는 지방형성 유전자이다. Fig. 51를 보면 2일과 6일에서 미분화 세포와 분화세포간의 GLUT4 mRNA발현 차이는 각각 400배와 30,000배 차이를 보인다. 흑무추출물의 GLUT4 발현 억제효과는 2일에서는 97%(200ug/ml), 96.5%(100ug/ml), 62%(50ug/ml), 27%(25ug/ml) 이고, 6일에서는 99.7%(200ug/ml), 99.1%(100ug/ml), 78%(50ug/ml), 50%(25ug/ml) 이다(Fig. 52).

AP2 (fatty acid-binding protein 4) 유전자는 지방형성 유전자로서 분화된 세포에서의 aP2 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 65배, 6일에서는 45배 이상 mRNA가 많이 발현되었다. 흑무추출물의 aP2 발현 억제효과는 2일에서는 90%(200ug/ml), 87%(100ug/ml), 73%(50ug/ml), 28%(25ug/ml) 이고, 6일에서는 94.3%(200ug/ml), 82%(100ug/ml), 52%(50ug/ml), 44%(25ug/ml) 이다(Fig. 52).

MGL(monoacylglyceride lipase) 유전자는 지방분해 반응에 역할을 하는 유전자이다. 분화된 세포에서 MGL 발현은 미분화 세포에서 보다 2일에서는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 6일에서는 280배 이상 mRNA가 많이 발현되었다(Fig. 52). 흑무추출물의 MGL 발현 억제효과는 2일에서는 55.3%(200ug/ml), -13%(100ug/ml), -11%(50ug/ml), -55.3%(25ug/ml) 이고, 6일에서는 99.6%(200ug/ml), 99.14%(100ug/ml), 87.2%(50ug/ml), 54.8%(25ug/ml) 이다. MDI처리 후 2일과 6일에서 MGL mRNA발현을 비교하면 6일에서가 2일에 비해 약 164배정도 증가 하였다. 흑무추출물은 2일 처리군에서는 고농도에서만 억제효과를 보였지만, 6일 처리군에서는 농도 의존적으로 MGL mRNA 발현을 억제 하였다(Fig. 52).



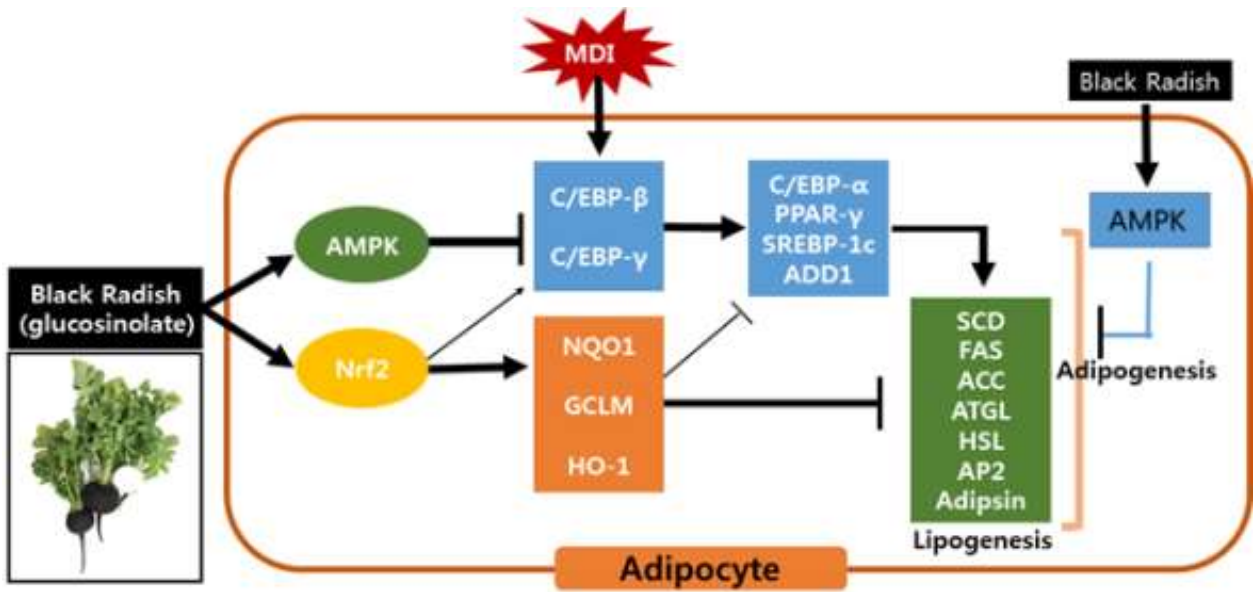
<Fig. 51. Effect of BRE on ATGL, HSL and adipsin mRNA expression in preadipocytes(2days) and adipocytes(6days)>



<Fig. 52. Effect of BRE on GLUT4, aP2 and MGL mRNA expression in preadipocytes(2days) and adipocytes(6days)>

이상의 결과를 보면 흑무추출물이 지질 축적을 감소시킨 것은 전사인자(transcription factor)인 C/EBP- α , C/EBP- δ 와 PPAR- γ 의 발현억제에서 기인 한 것이다. 전구지방세포에서 지방세포로의 분화는 C/EBP- α , C/EBP- δ 및 PPAR- γ 를 비롯한 여러 전사 인자의 순차적 활성화에 의해 제어된다. 따라서 흑무추출물은 AMPK 활성화를 통해 전구지방세포에서 지방세포로의 분화에 관여하는 C/EBP- α , C/EBP- δ 및 PPAR- γ 전사인자를 억제하는 것이다. 또한, 흑무추출물은 상기 전사인자 외에도 지방 발생 관련 단백질의 발현을 감소시킴으로써 지방 생성을 억제하는 것이다

(Fig. 53). 따라서, 본 연구 결과는 흑무추출물은 비만의 예방 또는 치료용 약학조성물 또는 식품조성물로 제조될 수 있다고 사료된다.

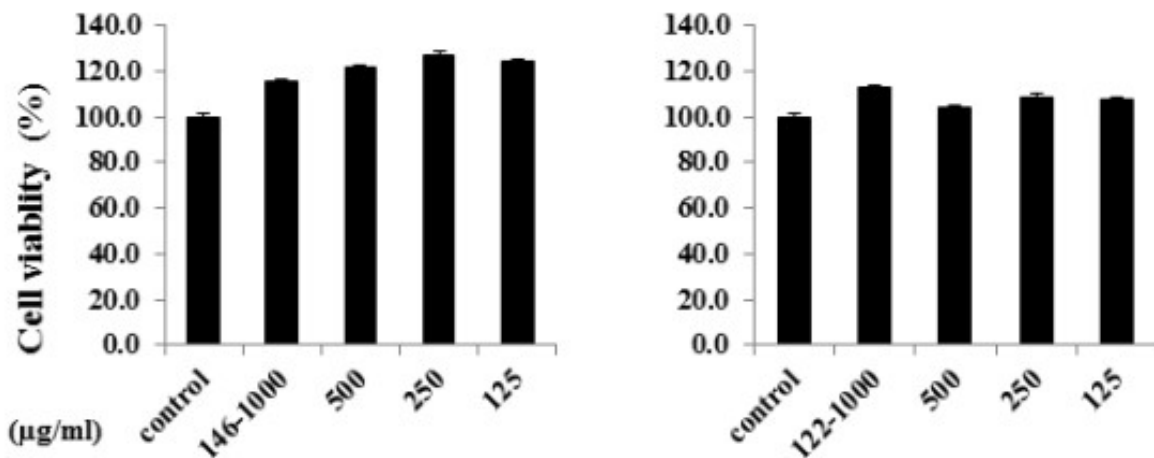


<Fig. 53. 흑무추출물의 항비만 효과 기작>

5) 흑무 추출물의 간보호 효과 (흑무추출물의 비알콜성 지방간 억제 효능연구)

(1) 간세포(HepG2 cells) MTT assay

먼저 흑무추출물의 세포독성을 MTT assay를 통해 확인하였다(Fig. 54). 흑무추출물을 1,000 ~ 125ug/ml 투여 후 24시간 배양 하였다. 흑무발효물(146), 흑무미발효추출물(122)을 HepG2세포에 처리하여 분석하였다.

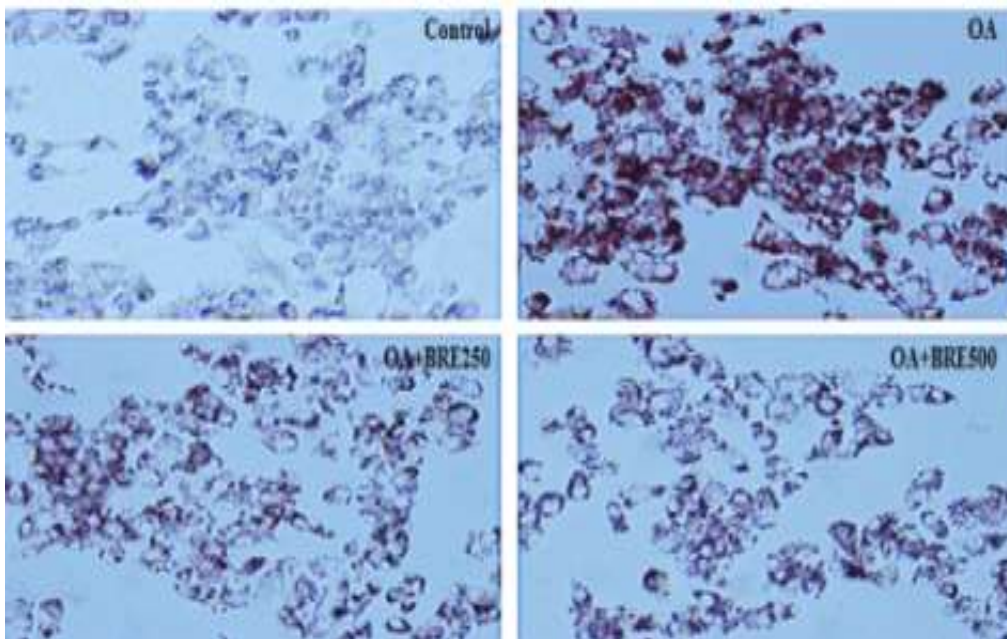


<Fig. 54. Effect of BRE on HepG2 cells viability>

흑무발효물(146), 흑무미발효추출물(122) 모두에서 1,000ug/ml처리 이하에서 세포독성은 관찰 되지 않았다(Fig. 54). 세포독성을 일으키는 한계농도를 확인하지는 못하였으나 두 추출물 모두 안전범위는 확인 하였다(Fig. 54).

(2) Oleic acid 처리에 따른 간세포에서 지방축적 억제 연구

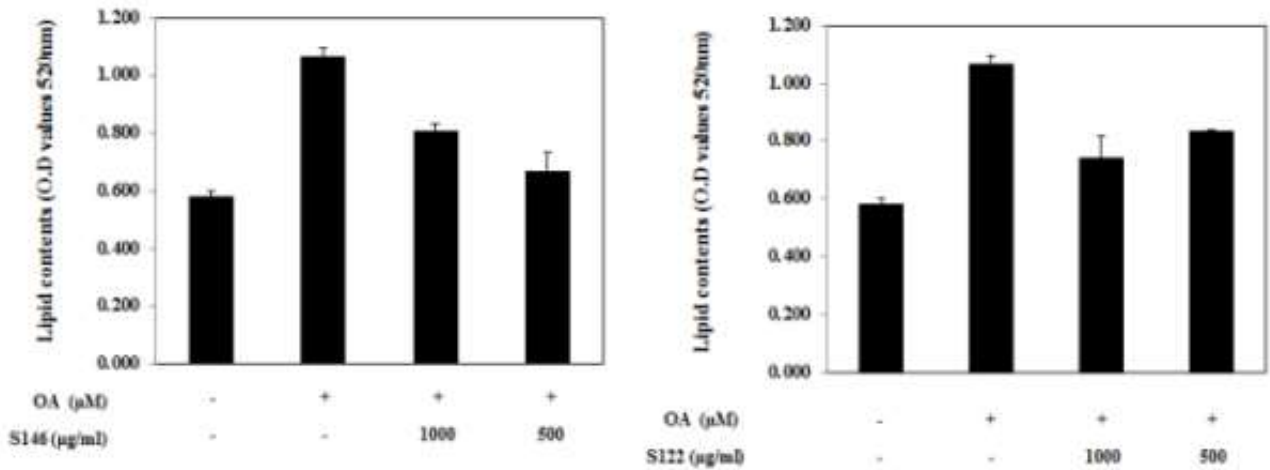
간세포에서 lipid 축적억제효과를 확인하기 위하여 Oleic acid (600uM)를 처리하여 유발한 비알콜성 지방간모델(NAFLD)에 흑무발효물과 흑무 미발효추출물을 농도별로 처리하였다. 간세포에 지방증을 유도하기 위해 16시간 동안 FBS가 함유되지 않은 DMEM배지에서 cell starvation 후, 흑무추출물을 농도별로 처리하고, 2시간 후 Oleic acid를 처리하고, 다시 24시간동안 배양 하여 cell steatosis 억제 효과를 분석 하였다. intercellular lipid 함량분석은 Oil-Red Staining방법으로 염색 후 위상차현미경으로 촬영 하였으며, 함량분석은 isopropanol에 녹인후 520nm에서 흡광도를 측정 하였다. 흑무발효물과 흑무미발효추출물 모두 intercellular lipid가 감소하는 효과를 보였으며 흑무발효물에서는 500ug/ml에서 억제효과가 유의성 있게 높게 나타났다. 그러나 흑무미발효추출물에서는 1,000,500ug/ml 처리에서 오차범위에서 cellular lipid 축적은 억제 되었다(Fig. 55). 이 결과로 흑무추출물은 간세포 내 지방축적 억제 효과를 보임으로서 비알콜성지방간에도 효과가 있음을 확인하였다.



<Fig. 55. Effect of BRE on intercellular lipid accumulation in HepG2 cells>

(3) TG(Triglyceride)합성 억제 연구

Steatosis 유도된 간세포에서 흑무추출물의 Triglyceride 합성 억제효과를 분석하였다. Triglyceride분석은 Triglyceride quantification assay kit(abcam)를 이용하여 매뉴얼에 따라 수행하였다. 그 결과 흑무발효추출물, 흑무미발효추출물 모두 1,000, 500 ug/ml처리구에서 현저하게 감소되었다(Fig. 56).

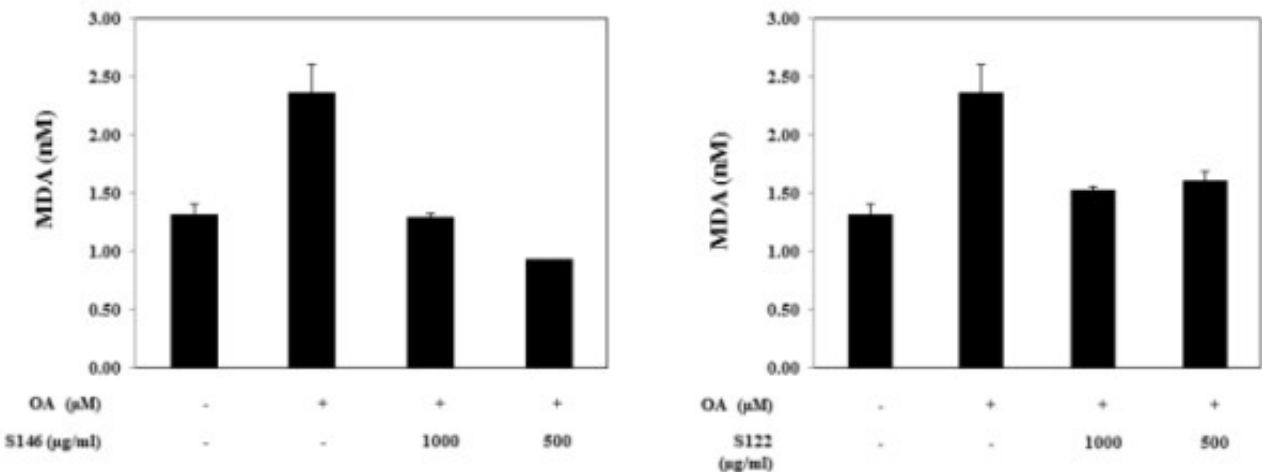


<Fig. 56. Effect of BRE on Triglyceride accumulation in HepG2 cells>

이 결과는 intercellular lipid 축적 억제효과와도 일치하는 결과로서 흑무추출물은 steatosis를 억제함을 재확인 되었다.

(4) 흑무추출물의 MDA 생산억제 연구

지질과산화물은 steatosis가 진행됨에 따라 활성산소가 발생됨에 따라 증가된다. 지질과산화물인 malondialdehyde(MDA) 분석은 OA와 흑무추출물을 처리하여 흑무추출물의 지질과산화물 억제효과를 분석하였다. 분석은 Lipid peroxidation colorimetric kit(BioVision, USA)를 사용하여 매뉴얼에 따라 수행하였다.



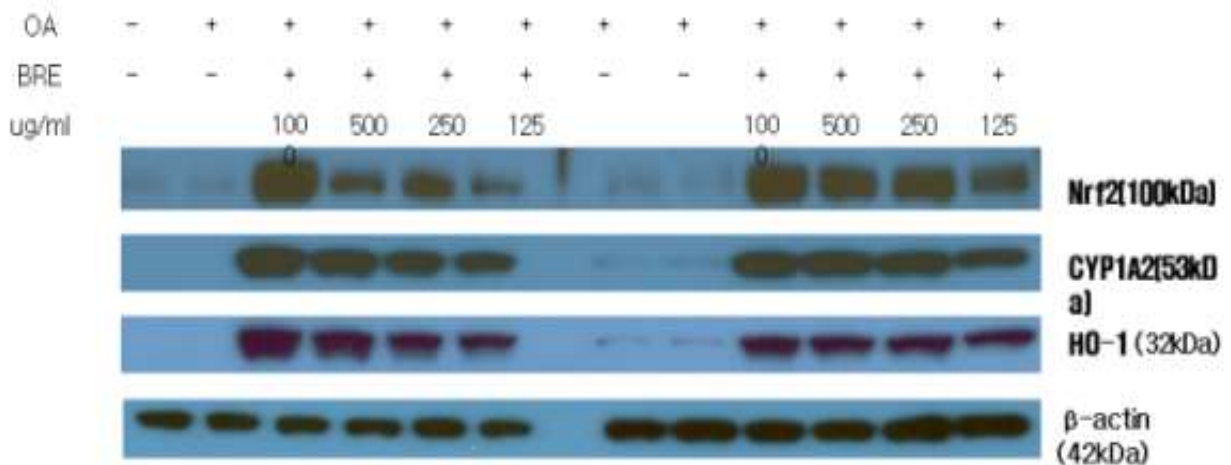
<Fig. 57. Effect of BRE on Malondialdehyde(MDA) levels in HepG2 cells>

MDA함량을 측정한 결과 Oleic acid (1,500uM) 처리구(2.4 ± 0.25 nM)에서는 무처리구 (1.3 ± 0.1 nM)보다 2배정도 MDA가 많이 생성되었다. 반면 흑무발효물 처리구 1,000ug/ml (1.25 ± 0.1 nM), 500ug/ml(0.9 ± 0.1 nM) 각각 생성되었다. 흑무미발효추출물에서는 1,000ug/ml (1.5 ± 0.1 nM), 500ug/ml (1.6 ± 0.1 nM) 각각 생성되었다 (Fig. 57). 따라서 OA에 의해서 유도된 과산화지질을 흑무추출물이 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

(5) 흑무추출물의 간세포(HepG2)에서 Nrf2 활성화 기작 연구

Nrf2(Nuclear factor erythroid-2 related factor 2)는 redox status에 민감한 전사인자로서 다양한 항산화 관련 유전자를 발현시킨다. Nrf2는 세포질에서 Keap1(kelchlike ECH-associated protein-1)과 복합체를 이루어 불활성화 상태로 존재하다가 ROS (reactive oxygen species), phytochemical(curcumin, sulforaphane, resveratrol, dimethyl fumarate), 중금속, AhR 등 자극이 되면 Keap1과 해리되어 세포핵으로 이동하여 ARE(antipxydant response element) sequence를 가지고 는 유전자 promoter에 결합하여 타겟유전자를 발현 시킨다. Nguyen *et al.*(2003)보고에 의하면, Nrf2 knockout 생쥐 모델에서 발암물질, 독성화합물, 등에 노출시킨 결과 정상쥐보다 산화적 injury가 매우 높게 나타났다는 보고가 있다. 현재까지 알려진 Nrf2 타겟 유전자로서는 HO-1(heme oxygenase-1), NQO1(NADPH- quinone oxidoreductase), GCLM (glutamate cysteine ligase modifier subunit), GCLC (glutamate cysteine ligase catalytic), 등 50여개 유전자가 알려져 있다. HO-1 단백질은 항염증과 anti-apoptosis 기능을 하는 것으로 알려져 있으며 본 연구는 Oleic Acid 의해서 steatosis된 HepG2 세포에서 흑무추출물의 Nrf2 활성 및 그 타겟 유전자인 HO-1, CYP1A2유전자 발현효과를 분석 하였다(Fig. 58).

흑무추출물은 1,000~250 ug/ml처리한 결과 Nrf2, CYP1A2, HO-1단백질 모두 농도 의존적으로 발현 되었다. 따라서 흑무 추출물은 Nrf2 활성화에 강력하게 작용 하는 것으로 사료된다. 그리고 이 결과는 흑무추출물의 steatosis을 억제하는 기작을 Nrf2의 강력한 작용과 HO-1, 그리고 CYP1A2 단백질 발현에 기인된 것으로 사료된다. 이를 뒷받침 하는 증거로서 간세포에서 intercellular lipid 축적 억제효과 효과를 보였다(Fig. 58).

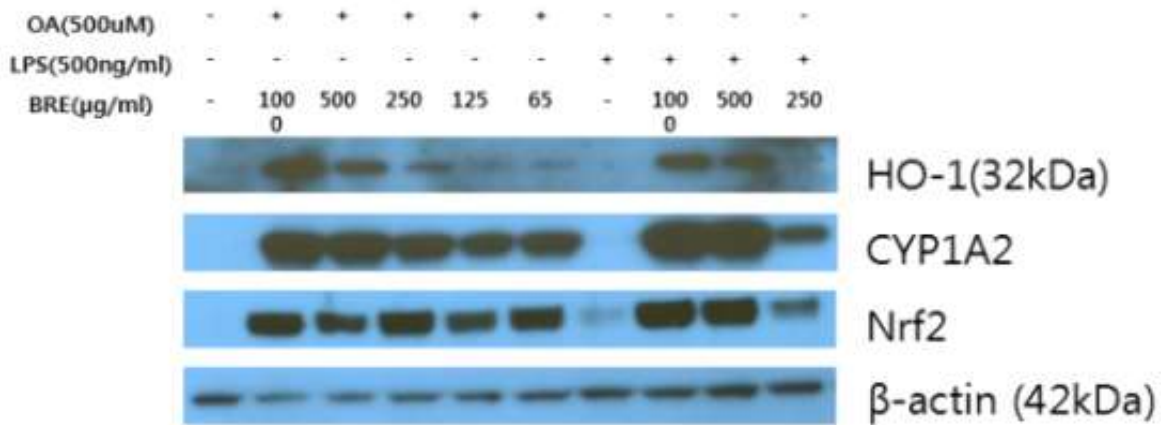


<Fig. 58. Effect of BRE on Nrf2, CYP1A2, and HO-1 protein expression in HepG2 cells>

OA에 의해서 유도된 Triglyceride 억제효과(Fig. 56), MDA 생성억제 효과(Fig. 57)등의 결과를 종합하여 보면 흑무추출물의 Nrf2 activator로 작용한 결과라 사료된다. 또한 이 결과는 이미 상용화된 Nrf2 activator(Xymogen사), Protandim(LiferVantage사), Nrf2 Rising(Nutricology사), Nrf2 Boost, Ultimate Nrf2(Nordic Clinical사), Nrf2 power(DrJockers사), Nrf2 support(Physian Nutrients사)등 선진 각국에서 출시되는 상품처럼, 본 연구 결과를 활용하여 건강기능 식품, 건강보조식품, 건강지향형 제품 원료로 활용 및 개발시 충분한 경쟁력이 있다고 사료된다.

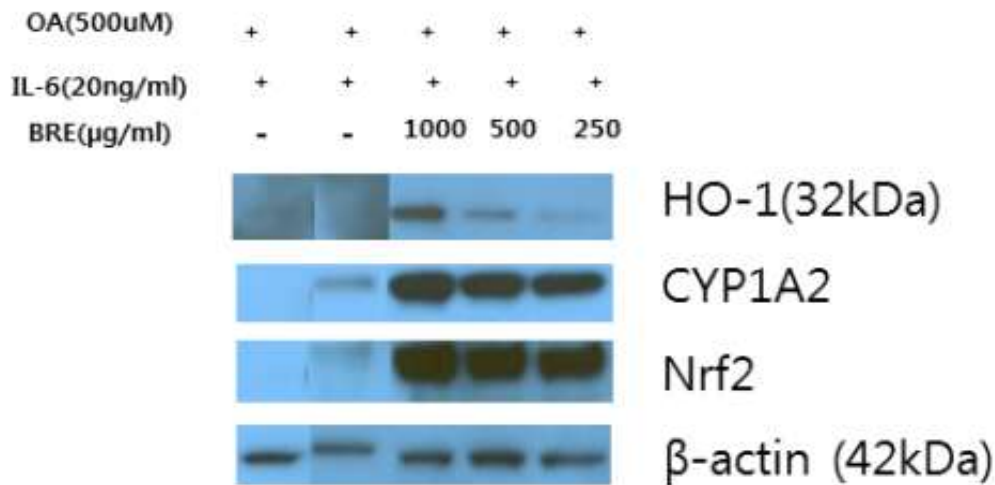
(6) Hepatic Steatosis와 염증인자(LPS, IL-6)처리에서 Nrf2활성 연구

일반적으로 IL-6는 간에서 간세포 보호, 증식 및 재생을 하는데 매우 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 Hepatic Steatosis에서 IL-6는 비알콜성지방간, 비알콜성지방간 질환 모두에서 간질병을 악화시키는 인자로 알려져 있다. 이 때 IL-6는 인슐린 저항성 및 2형 당뇨, 지방구 합성 촉진에도 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 steatosis과정에서 IL-6, IPS처리하여 Nrf2 발현에 미치는 영향을 조사 하였다(Fig. 59, 60).



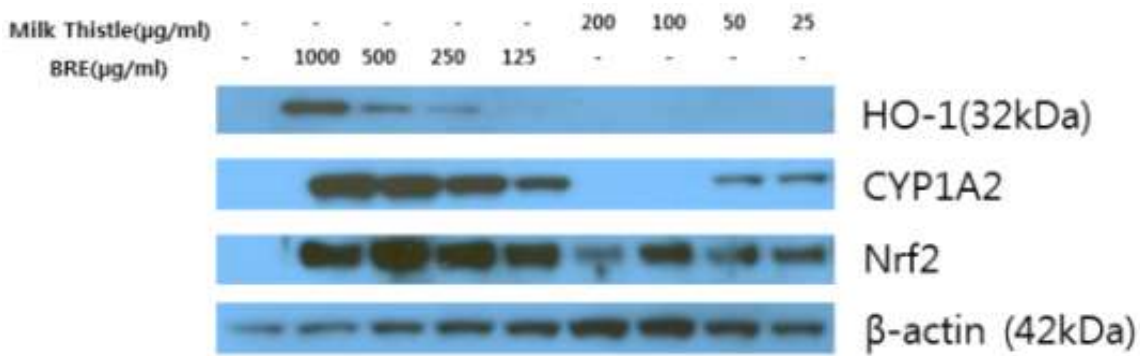
<Fig. 59. Effect of BRE on Nrf2, CYP1A2 and HO-1 protein expression in HepG2 cells>

위 결과를 보면 지질대사 관련 유전자와 Nrf2 관련 유전자 상호작용은 단백질 translation levels 이 아니라 단백질간의 상호작용에 의해서 anti-steatosis가 이루어지는 것으로 사료된다. Hepatic Steatosis동안 OA, IL-6, LPS처리에는 Nrf2, HO-1, CYP1A2 발현에는 영향이 없었다.



<Fig. 60. Effect of BRE on Nrf2, CYP1A2 and HO-1 protein expression in HepG2 cells>

(7) 밀크씨슬(Milk Thistle)과 흑무추출물의 Nrf2 활성 비교



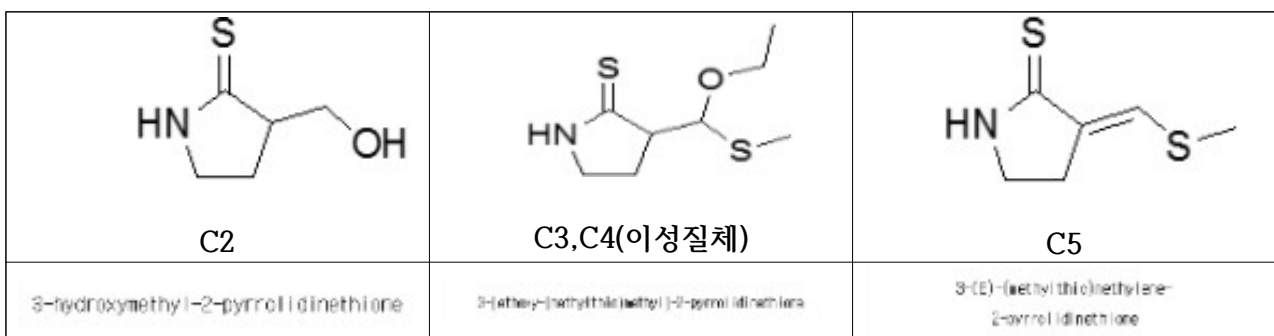
<Fig. 61. Effect of BRE on Nrf2, CYP1A2 and HO-1 protein expression in HepG2 cells>

밀크씨슬은 간건강에 도움을 주는 건강기능식품 원료로서 16년도 밀크씨슬제품 시장은 1,090억 원으로서 홍삼, 프로바이오틱, 비타민에 이어 4위를 차지하고 있다. 본 연구는 흑무추출물과 밀크씨슬이 Nrf2 활성여부를 western blot으로 비교분석 하였다. 그 결과 흑무는 Ho-1, Cyp1A1, Nrf2모두에서 밀크씨슬보다 강하게 유도 되었다. 이 결과는 간보호 효과에 있어서 검정무와 밀크씨슬과는 다른 메카니즘을 갖는 것으로 확인 되었다(Fig. 61).

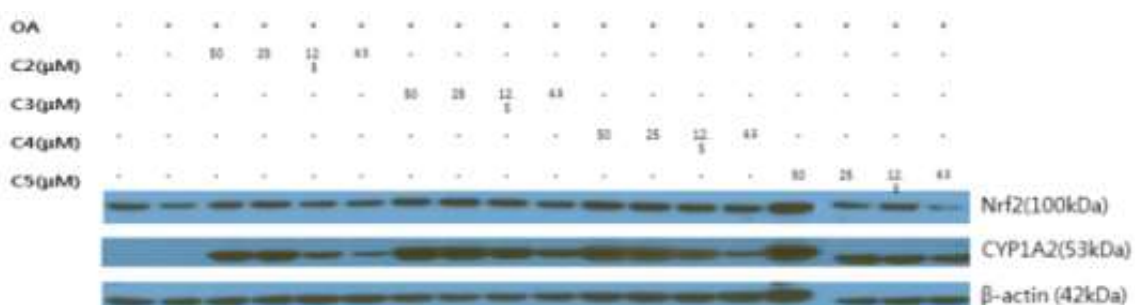
(8) pyrrolidinethione 화합물(C2~C5)의 Nrf2 활성연구

흑무추출물로부터 분리된 4개 화합물(C2 ~ C5)(Fig.9. A)을 협동1(제주대 화학과)로부터 얻은 후, hepatic steatosis에 유도된 HepG2세포에 처리하여 Nrf2와 CYP1A2 단백질 발현을 분석하였다(Fig. 62. B).

(A)



(B)



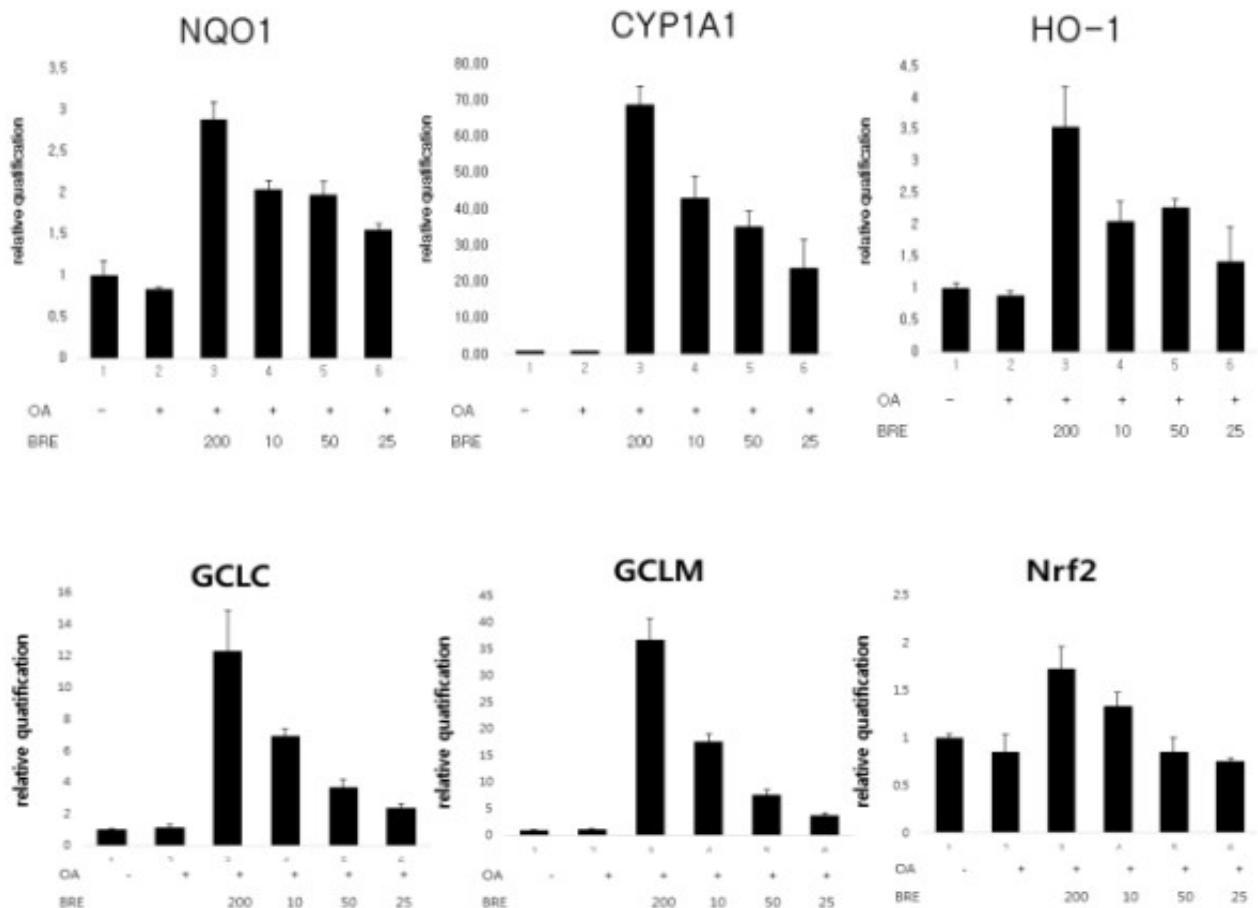
<Fig. 62. Effect of compounds(C2~C5) on Nrf2 and CYP1A2 protein expression in HepG2 cells>

그 결과 흑무에서 추출된 단일 pyrrolidinethione 화합물 모두 Nrf2 단백질과 AhR 시그널인 CYP1A2 단백질이 강하게 발현 되었다(Fig. 62). 4종류 화합물간 Nrf2활성에서는 C3, C4, C5 화합물처리에서가 C2보다 조금 높게 발현됨을 확인 하였다. 그러나 무처리구와 OA처리구에서는 Nrf2, Cyp1A2 모두 발현되지 않는았다. 따라서 흑무에서 분리된 glucosinolate 계열인 pyrrolidinethione 화합물은 강력한 Nrf2 activator로 활용 할 수 있을 것으로 사료된다.

(9) 흑무추출물의 Nrf2활성에 의한 타겟유전자 mRNA(NQO1, CYP1A1, HO-1, GCLC, GCLM)발현 분석

먼저 연구에서 흑무추출물의 Nrf2를 유도하고 타겟 항산화 관련 HO-1 단백질을 western blot 으로 확인하였다(Fig.58, 59). 본 실험에서는 흑무추출물이 Nrf2 발현을 유도함으로써 antioxidant response element (ARE)을 갖고있는 타겟 유전자인 NQO1, CYP1A1, HO-1, GCLC, GCLM mRNA level 를 qPCR 기법으로 분석하였다. 본 연구 결과는 5개 유전자 모두 흑무 추출물 dose-dependent manner하게 발현되었다(Fig. 63).

따라서 흑무에 의해서 유도된 Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2 related factor 2)유전자는 중성지방(Oleic acid)에 의해서 발생하는 산화적 스트레스와 lipid 축적 증가를 NQO1, CYP1A1, HO-1, GCLC, GCLM 등을 통해 간세포 보호, cytoprotective, 항산화, 항염, anti-adipogenesis, hepatic steatosis을 제어하는 것으로 사료된다.

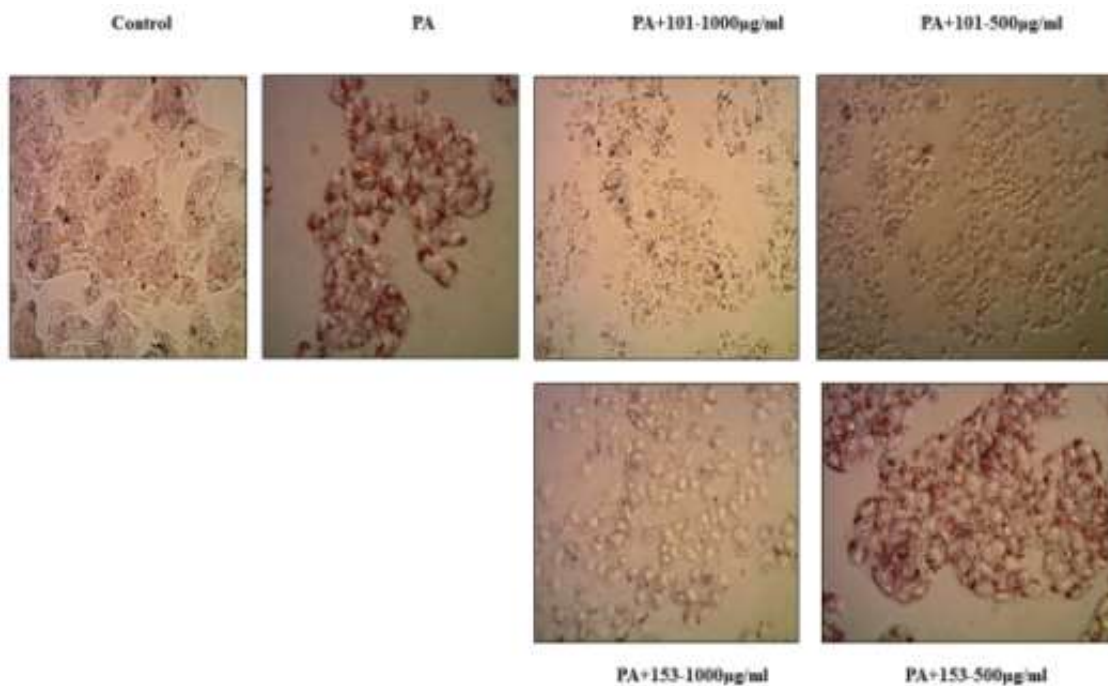


<Fig. 63. Effect of Radish on NQO1, Cyp1A1, HO-1, GCLC, GCLM and Nrf2 mRNA expression in HepG2 cells>

기 보고된 자료에 의하면 NOQ1 기능은 TNF α -mediated apoptosis기능, inflammation cytokine (IL1b, TNFa)억제, 알츠하이머 억제 기능 등을 가지고 있어 향후 관련 연구 및 천연물 연구에 좋은 tool로 사용될 것으로 전망된다. 흑무추출물의 비알콜성지방간 개선 효과 기작은 Fig. 66, 67과 같이 Nrf2 활성을 통해서 NQO1, HO-1, GCLM, GCLC, CYP1A1 유전자 활성화에 기인된 것으로 보인다.

□ palmitate acid(PA)의한 간세포 지질합성 억제 효과

- HepG2 cell line(간세포)를 DMEM 배지(10% Fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin(P/S))에서 배양하였다. 그리고 24 well plate에서 4×10⁴ml/cells seeding 하였다. 그리고 250 μ M PA와 발효물, 비발효물을 처리 한 후 1일 배양 하였다. 그리고 Oil-Red-O 염색 후 사진 촬영 및 Lipid 함량을 분석하였다. 그 결과 발효물 및 비발효물에서 모두 hepatic steatosis가 억제되었다(Fig. 64)

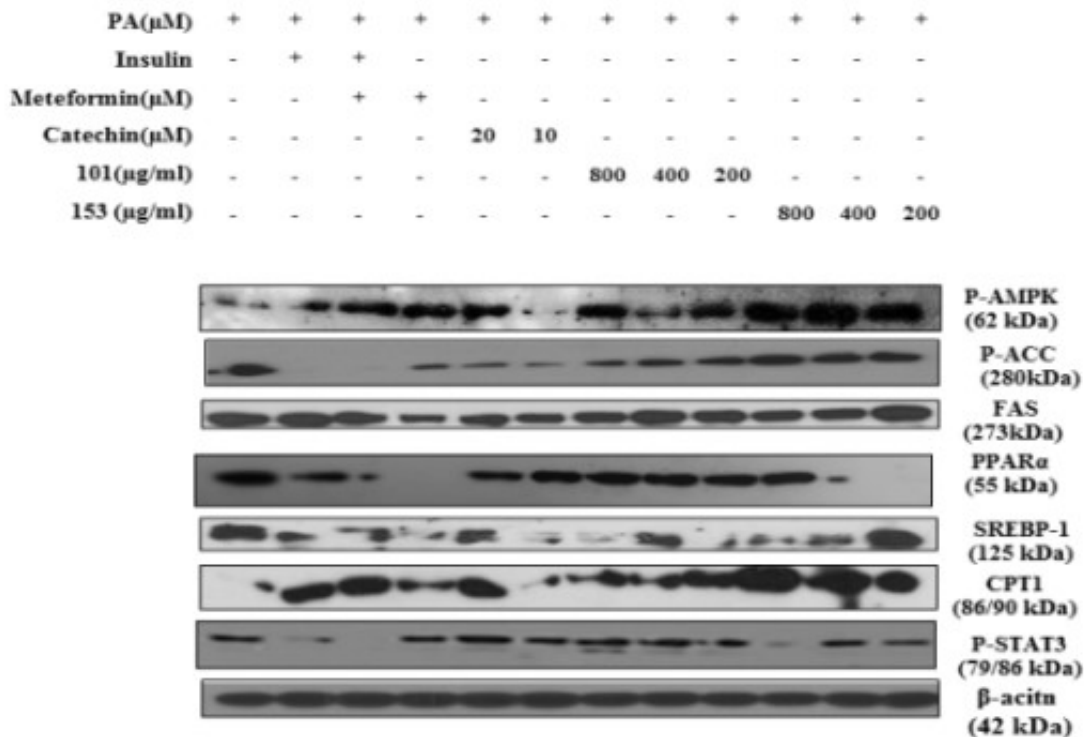


<Fig. 64. 발효물과 비발효물의 HepG2 cell에서 hepatic steatosis 억제효과>

○ 발효 및 비발효물의 간세포 지질합성 억제 관련 단백질 발현 분석

- 간(liver)은 포도당 및 지질 대사에서 중추적인 역할을 담당과 더불어 포도당 생성 (gluconeogenesis), β -산화(oxidation), 지방 생성 및 lipoprotein을 흡수 및 분비한다. 5'AMP-activated protein kinase(AMPK)는 간 지질 대사(liver lipid metabolism)의 핵심적인 기능을 한다. AMPK가 활성화되면 Acetyl-CoA carboxyase(ACC) 및 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase(HMGCR)는 인산화를 통해 지질 합성이 억제된다. 그 결과 fatty acid synthase(FAS)와 melony-CoA carboxylase는 발현이 감소되어 간세포에서 지방산 및 콜레스테롤 합성 감소되어 지방간 형성이 완화된다. AMPK 활성화에 의한 ACC의 활성억제는 malonyl-CoA 감소로 이어져 지방산의 산화를 자극하게 된다. 그 결과 Carnitine palmitoyl transferase1(CPT1)의 활성을 증가시킨다.

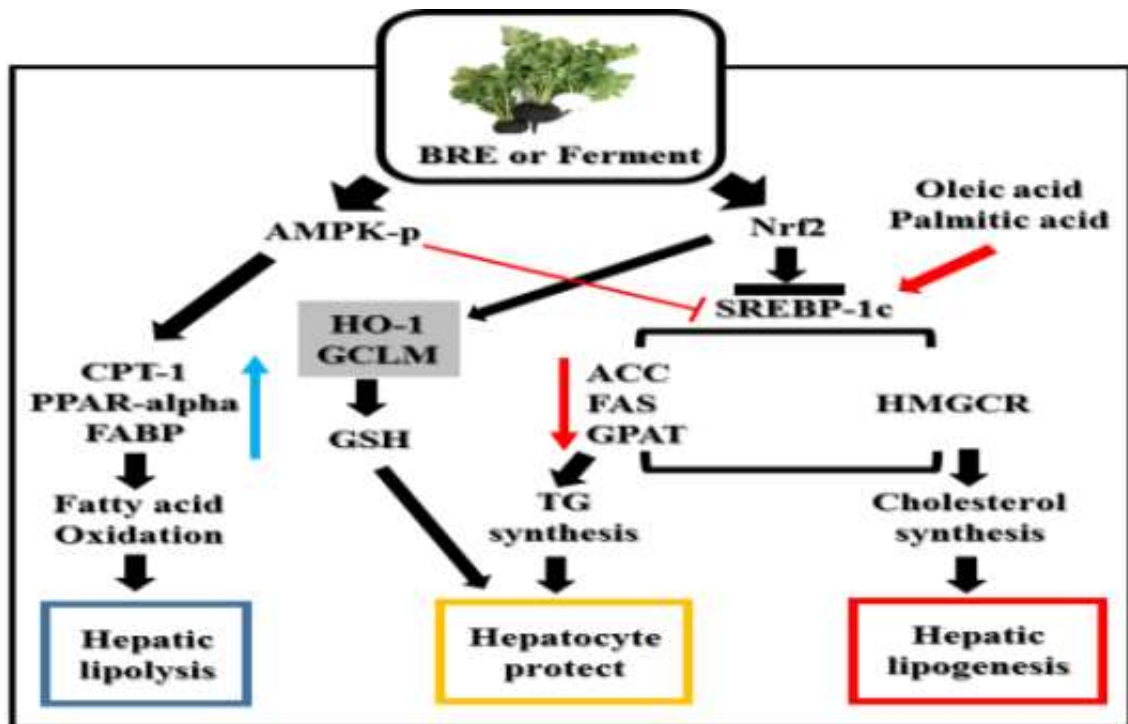
- HepG2 cell을 palmitic acid(PA)를 처리하여 steatosis를 유도하였다. 그리고 비발효물과 발효물을 농도별로 처리 한 후 18시간동안 배양하였다. 그리고 PBS로 세척 후 RIPA buffer를 이용하여 cell lysis 시킨 후 Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다. 그리고 SDS-gel eletrophoresis 후 gel에 있는 단백질을 I-blot(Invitrogene) 장비를 이용하여 nylon membrane으로 전이시켰다. membrane에 1st Antibody (AMPK, ACC, FAS, PPAR α , SREBP-1, CPT1, STAT3)와 2nd antibody를 이용하여 단백질 발현을 분석하였다(Fig. 65).



<Fig. 65. Western blot에 의한 발효 및 비발효물 처리에서 hepatic steatosis 관련 단백질 발현 분석>

- phospho-AMPK 활성화는 비발효물(101)보다 발효물(153)에서 2배 이상 증가하였다. 그리고 당뇨병 치료제인 metformin과 녹차성분 catechin(EGCG) 처리구에서도 control 대조구에 비해 3배 이상 증가되었다. 또한 발효물(153)은 metformin, catechin(EGCG)보다 2배 이상 AMPK 활성이 높게 나타났다. phospho-ACC 활성 역시 검정무 추출물에서 강한 활성화를 보이며, 특히 발효물은 비발효물보다 2배 이상 강한 활성화를 보였다(Fig.65). 그러나 PA+insulin, PA+metformin+insulin 혼합 처리구에서는 phospho-ACC 활성은 없었다. FAS는 지방산을 합성하는 유전자로서 catechin, metformin 그리고 검정무 발효추출물 고농도(800, 400 μ g/ml)에서 억제되었다. PPAR α 발현은 metformin, 발효물 처리구에서 억제되었다. SREBP-1 발현은 PA, 발효물 저농도 처리를 제외하고 전체적으로 억제되었다. CPT1은 미토콘트리아 out membrane에 있는 단백질로서 미토콘트리아 활성화와 직접적인 영향을 미치는 단백질이다. 그리고 지방산 산화를 촉진하여 lipolysis를 유도하는 단백질로 알려져 있다. HepG2 cell에서 PA에 의해서 유도된 hepatic steatosis에서 CPT1 발현은 발효물이 비발효물 보다 3~4배 이상 높게 발현되었다. 이 결과, 발효물은 세포증식과 세포보호에 직접 관여하는 것으로 사료된다. 염증인자로 관여하는 phospho-STAT3활성은 insulin과 발효물 고농도 처리구에서 억제하였다(Fig. 65). 따라서 검정무발효물은 AMPK활

성화를 통해 FAS, ACC, SREBP1을 조절하여 hepatic steatosis을 억제한다(Fig. 66).



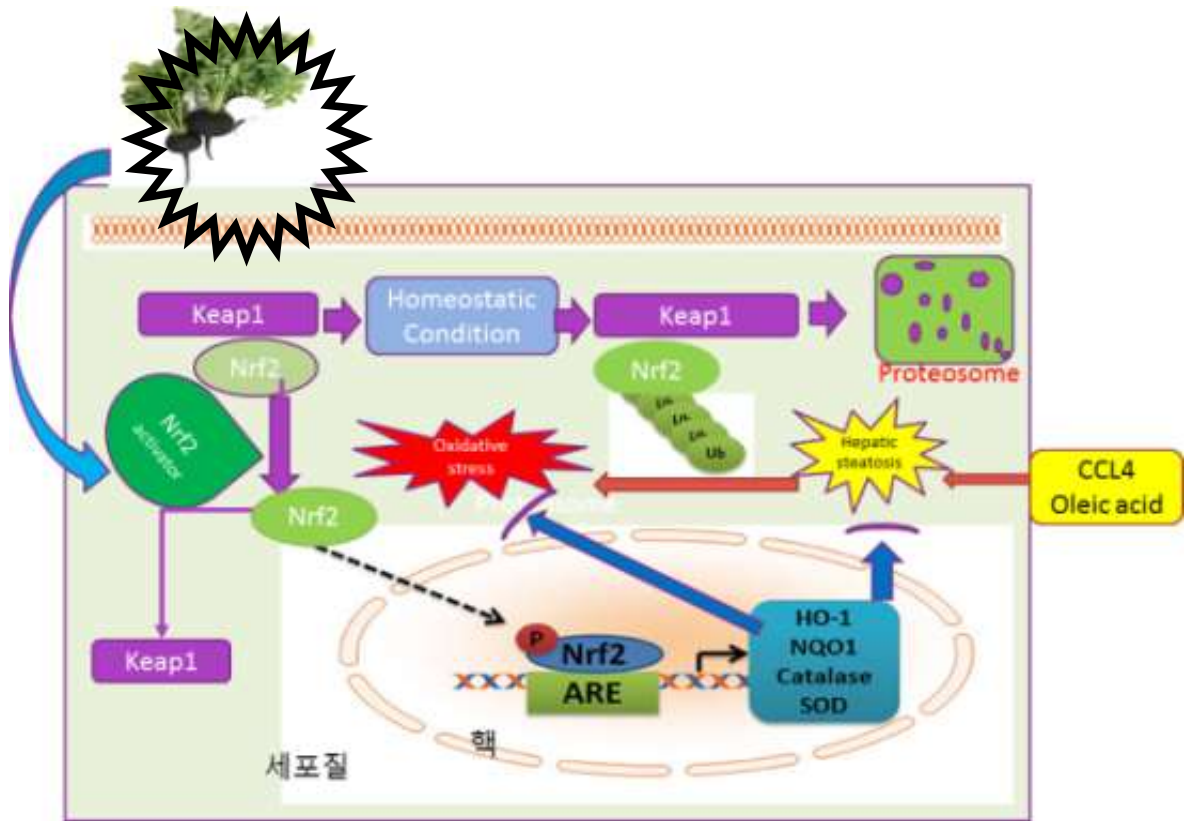
<Fig. 66. Hepatic steatosis에서 검정무 추출물의 AMPK pathway 활성 기작>

(10) 흑무 추출물의 간세포에서 Nrf2 기능 및 간보호효과 및 과제

결론적으로 흑무추출물은 Nrf2 활성을 통해서 항염증, 항비만, 항 Hepatic steatosis을 갖는다고 결론을 할 수 있다. 따라서 현재까지 보고된 Nrf2기능은 아래와 같다(Fig. 67).

- antioxidant protein : NQO1, HO-1, GST(glutathione S-transferase), Gpx(glutathione peroxidase)
- Glutathione producing protein : GCLC(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit), GCLM(glutamate-cysteine ligase modifier subunit)
- Drug-metabolizing enzyme : UGT1A(UDP-glucuronosyl-transferase 1A1), CBR1(carbonyl reductase), AKR(aldo-keto reductase), cytochrome P450(CYPs), G6PD, TKT, PPAR-r
- Drug efflux transporter : ABCG2, MRP3, MRP4
- Xenobiotic transporters(ATP-binding cassette(ABC)transport) : ATP phosphohydrolase, MRP1(multidrug resistance protein 1)
- stress response proteins : thioredoxin, ferritin subunit, copper/zinc superoxide dismutase

향후 흑무추출물과 Nrf2 효능과의 관계를 규명하기 위해서는 Nrf2 siRNA를 제작하여 cell transfection 후 RT-PCR로 확인 및 관련 연구 수행이 필요하다고 사료된다. 또한 흑무추출물을 이용한 Nrf2 활성화제 상품을 개발하는 것은 건강기능식품 원료 개발에 기여 할 것으로 사료 된다.



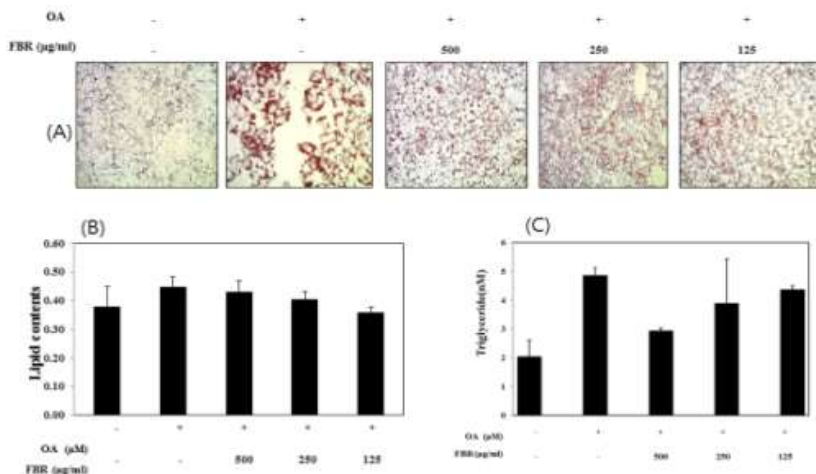
<Fig. 67. Regulation of Nrf2 in hepatic steatosis in HepG2 cells>

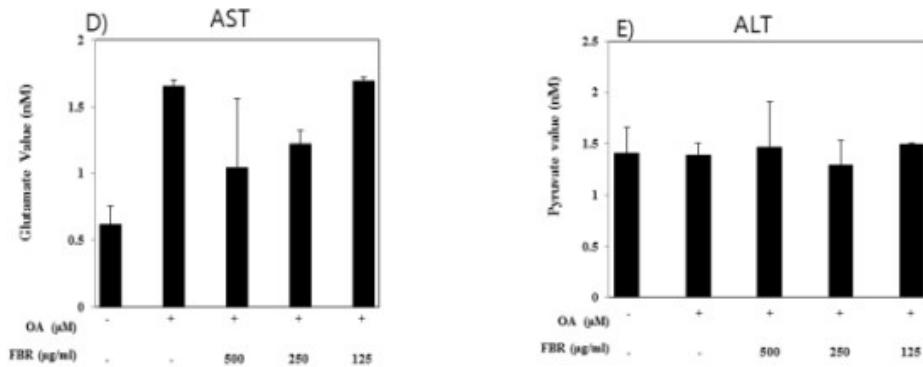
6) 검정무 발효추출물의 steatosis 억제 효과

(1) 발효 검정무 추출물의 steatosis 억제효과 연구

검정무 발효분말(Fermented Black Radish)을 콜마BNH로부터 공급받아 70% 주정으로 추출, 농축 후 세포시험에 사용하였다.

HepG2세포는 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Altas, USA), Penicillin & Streptomycin (P/S, 100U/ml, GIBCO Inc., United States)가 함유된 MEM 배지(Hyclone, United States)에서 배양하면서 유지하였다. Steatosis 유도는 cell seeding 후 다음날(24h) FBS가 없는 DMEM배지로 교체 후 OA(oleic acid, Sigma, United States) 500 μ M 처리하여 유도하였다. 발효 검정무 추출물 (FBR) 처리는 OA 처리 전 1시간 전에 처리하였다.





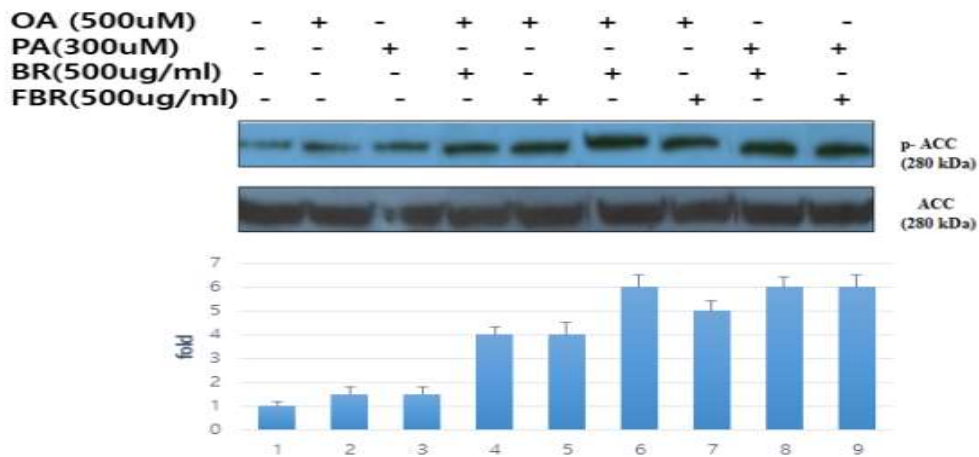
<Fig. 68. Effect of FBR on oleic acid-induced steatosis HepG2 cells. (A) Oil-Red- O-staining (B) Lipid content, (C) Triglyceride content (D) Aspartate aminotransferase (E) Alanine aminotransferase.>

Steatosis가 유도된 HepG2세포를 Oil-Red-O 염색 후 위상차 현미경(200X 배율)으로 사진촬영 하였다(Fig. 68, A). 그리고 Lipid content분석은 Oil-red-O 염색을 isopropanol에 녹인 후 microplate reader(Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 68. B). Triglyceride 분석은 triglyceride quantification assay kit(abcam, United Kingdoms) 사용하였다(Fig. 68, C). Lipid 분석에서는 FBR처리가 lipid함량을 감소하는 경향은 보이나 유의성은 없었다. 그러나 Triglyceride 분석에서는 FBR 500μg/ml처리에서 현저하게 억제 효과를 보였다.

Steatosis가 유도된 hepG2세포에서 Aspartate aminotransferase(AST)와 Alanine aminotransferase(ALT)분석은 Aspartate aminotransferase assay kit(Biovision, USA)와 Alanine aminotransferase assay kit(Biovision, USA)를 사용하였다. FBR처리구에서는 AST가 현저하게 감소되었으나(Fig. 68, D), ALT는 유의적인 차이가 없었다(Fig. 68, E).

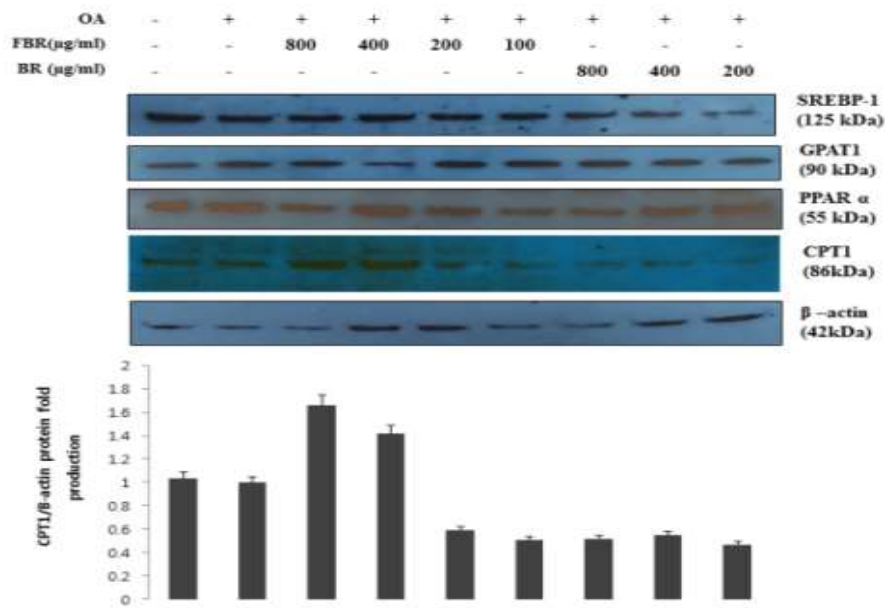
○ 발효 검정무 추출물, 비발효 검정무 추출물의 Phospho-acetyl-CoAcarboxylase(p-ACC) 활성

흑무추출물과 발효추출물이 phospo-ACC 활성을 통해서 지질합성 억제여부를 western blot을 이용하여 분석 하였다. HepG2 세포에 OA(500uM)와 PA(300uM) 처리와 함께 흑무추출물 처리구에서는 phospo-ACC가 결과 높은 활성을 보였다(Fig. 69, A).



(A)

(B)



<Fig. 69. Effect of FBR and BR on the expression of p-ACC and CPT1 protein oleic acid-induced steatosis HepG2 cells. ·FBR: 발효 검정무 추출물, BR: 비발효 검정무 추출물>

그리고 SREBP1, GPAT1, PPARα, CPT1을 분석한 결과 CPT1이흑부발효물에서 높게 발현 되었다(Fig. 69) 따라서 지방산은 ACC 인산화를 통해서 지방산으로 분해를 억제하여 지방세포 분화를 억제제하고, 미토콘드리아에서 CPT은 흑무에의해서 활성화되어 대사를촉진 함으로서 지방간으로분화를 억제하는 것으로 사료 된다.

(2) 간세포에서 Phase II 유전자 발현 효과

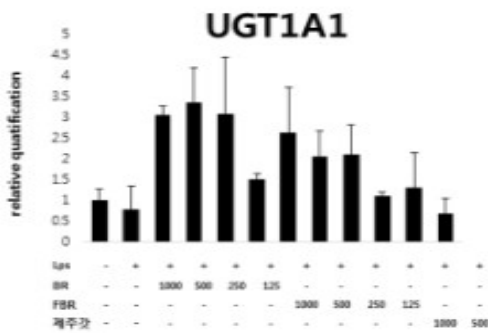
Liver Phase 2 단계는 약물 또는 식품을 섭취하면 대부분 간조직에서 약물에 대한 Glucouronidation, Sulfation, Acetylation, Methylation, Conjugation with glutathione, Conjugation with amino acids eg. taurine, glutamine, glycin 등 여러 가지 다른 방식으로 화합물을 대사가 진행된다. 이때 관련 대사가 원만하게 진행이 안 될 경우는 부작용이 발생되어 약물 중독현상이 발생하게 된다. HepG2 세포주는 약물(식품개발) 개발의 초기 단계에서 세포 독성을 스크리닝을 하는 유용한 세포주로 알려져있다. 반응성 및 독성 대사산물을 생성하는 일부 화합물은 HepG2 세포에서 독성 물질로 분류된다. 이를 조사하기 위해 대부분 실험실에서는 Cytochrome P450 및 2 Phase 효소 수준을 분석하고 있다. 본 연구는 HepG2세포에서 UDP-glucuronosyl transferases(UGTs), sulfotransferases(SULTs), Acetaldehyde dehydrogenase (ALDHs)에서 각각 1개 유전자를 선정하여 mRNA를 분석하였다. HepG2세포를 6 well plate에 seeding후 24시간 배양하였다. 그리고 LPS를 1μg/ml, FBR과 BR을 각각 농도별로 처리하여 배양하였다. Total RNA(NucleoSpin RNA kit, Macherey-nagel, Germany)를 분리 후 cDNA를 합성(ReverTra Ace-a kit, Toyobo, Japan)하였다. qPCR(LineGene K Plus Real-Time PCR Detection System, bioer, China)을 이용하여 SULT1A2, UGT1A1 및 ALDH3A1 mRNA 발현을 비교 분석하였다. qPCR에 사용된 primer는 아래와 같다(Table 17).

Table 17. Primer sequence

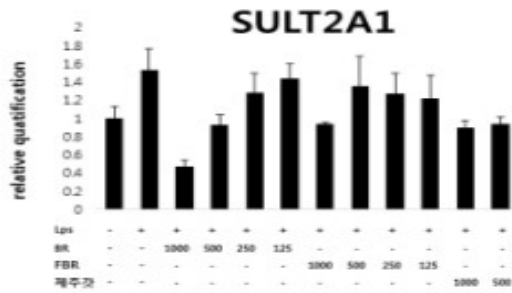
Oligo name		SEQUENCE (5' --> 3')
UGT1A1	Forward	ATG ACC CGT GCC TTT ATC ACC CAT
	Reverse	AGT CTC CAT GCG CTT TGC ATT GTC
ALDH3A1	Forward	CAT TGG CAC CTG GAA CTA CC
	Reverse	GGC TTG AGG ACC ACT GAG TT
SULT2A1	Forward	TAT GAG GAG CTG AAA CAG GAC
	Reverse	TCT TCG GGT TCT AAC GTC TTT C

HepG2 세포에서의 UGT1A1발현은 비처리구 및 LPS(1ug/ml)처리구보다 최고 3배 이상 높게 발현되었고, 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물 농도별 처리구에서는 비발효 검정무 추출물에서 발현이 더 높게 나타났다. 전체적으로 dose-depdent하게 발현되었다(Fig3. A). SULT1A2 mRNA발현 분석에서는 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 70. B). ALDH3A1 전사체의 수준은 비처리구와 LPS처리구 보다 최고 30배 이상 높게 발현되었다(Fig. 70. C).

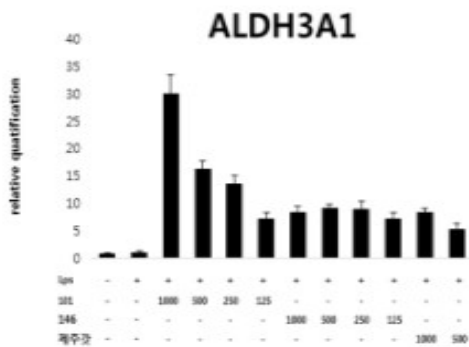
(A)



(B)



(C)



<Fig. 70. Effect of FBR and BR on the expression of UGT1A1, SULT2A1 and ALDH3A1 mRNA LPS-induced HepG2 cells. FBR: 발효 검정무 추출물, BR: 비발효 검정무 추출물>

(3) 검정무 추출물의 ID-1, ID-2, ID-3유전자 유도 효과

ID(Inhibitor of DNA binding, ID1, ID2, ID3)단백질은 DNA 결합 도메인이 없는 helix-loop-helix(HLH)성 전사인자 패밀리이다. 따라서, 이들은 basic-HLH성 전사자와 dimer가

되어 세포내에서 전사 조절자로서 기능한다. heterodimer(Id / bHLH)는 DNA에 결합하지 못하므로 ID 단백질은 bHLH 단백질의 지배적인 조절 인자로 작용한다. ID 단백질 (Id1-Id4)의 크기는 120-160 개의 아미노산으로 구성되며, 4개의 모든 ID 단백질 중 HLH 도메인이 매우 보존 되었음에도 불구하고 상동성은 낮다. ID 유전자에 대한 기능은 세포주기 조절, 세포 증식, 세포 분화, 세포 운명 결정, 조혈, 혈관 형성 및 종양 형성과 같은 다중 세포 과정 조절에 관련한다. 일반적으로 ID 단백질은 세포 유형별 유전자 발현을 조절하는 bHLH (basic helix-loop-helix) 전사 인자의 negative 조절 인자로 작용하여 억제 효과를 유도한다.

일반적으로 ID 단백질은 세포 유형별 유전자 발현을 조절하는 bHLH(basic helix-loop-helix) 전사 인자의 음성 조절 인자로 작용하여 억제 효과를 유도한다. 이들은 DNA 결합 bHLH 단백질과 heterodimer를 형성하고 DNA 결합 및 전사 활성을 방지한다. 예를 들어, ID1은 전사 활성제 E47과 Ets2에 직접 결합하여 세포주기 억제제 p16의 전사를 조절합니다. ID 단백질의 잘 알려진 표적으로는 E 단백질, Rb, p107, p130, PAX, Ets, MyoD 및 Myf-5가 있다.

ID2유전자는 sterol response element binding protein-1c(SREBP-1c)라고도 알려진 지방 세포 결정 및 분화 인자 adducin 1(ADD1)을 직접 조절한다. SREBP-1c는 지방산 및 트리글리세리드 대사에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절하고 Fatty acid synthase(FAS)의 강력한 트랜스-활성화제(trans-activator)이다. ID2는 SREBP-1c에 직접 결합하여 FAS의 transactivating을 억제함으로써 지방산 합성 및 대사를 조절한다. 또한, SREBP-1c는 글리세롤 -3- 인산 아실 트랜스퍼라제, S14, Stearoyl-CoA desaturase(SCD1), adiponectin 및 leptin과 같은 다수의 유전자를 조절한다. 특히 ID2 유전자는 natural killer(NK) cell 생성에 중요한 역할을 할뿐만 아니라 소장에서 Peyer's patch 분화 및 발달을 조절한다.

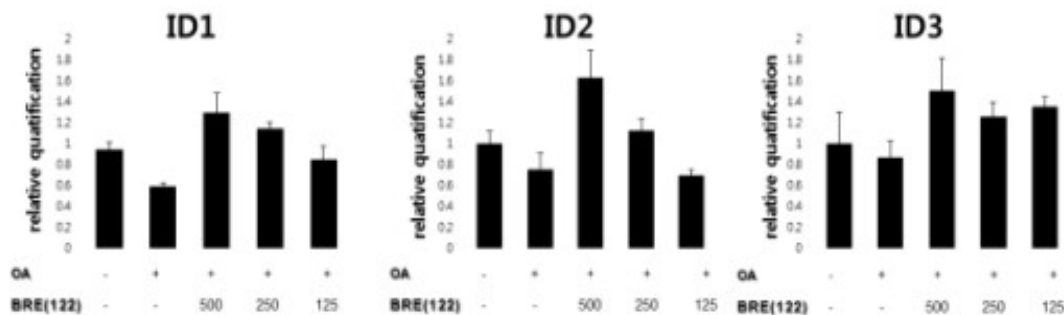
최근 연구는 ID3와 SREBP-1c가 서로 상호 작용함으로써 ID3가 FAS 프로모터의 SREBP-1c transactivation을 길항한다는 것을 보여주었다. ID3가 E- 단백질 E47을 통해 SREBP-1c를 억제한다는 것을 발견했다. E47은 adiponectin의 양성 조절자인 SREBP-1c와 상호 작용하며 SREBP-1c 매개 adiponectin 프로모터 활성화를 향상시킨다. ID3 / E47 및 E47 / SREBP-1c는 상호 작용하는 것으로 나타났으며 SREBP-1c에 대한 ID3의 작용은 SREBP-1c 상호 작용 파트너, E47의 억제를 통해 일어난다. 결과적으로, 시험 관내에서 ID3의 과발현에 의해 adiponectin 프로모터에 결합하는 E47이 현저히 감소되었고, 역으로 ID3의 부족은 Id3 - / - 지방 조직에서 adiponectin 발현을 증가시켰다. Id3가 E47과 상호 작용하여 간접적으로 SREBP-1c 활성을 조절함으로써 SREBP-1c에 대한 E47 결합이 adiponectin 프로모터 및 그 발현의 손상된 장애를 일으키는 것을 방지한다. 그리고 ID3는 B-cell 형성과 분화를 조절과 Ig생성에도 중요한 역할을 한다.

NGS자료에서 검정무 추출물을 처리한 간세포(HepG2)에서 ID-1 유전자 발현이 점진적으로 증가되는 것은 발견하였다. 따라서 NGS자료를 재확인하기 위하여 검정무 추출물 처리된 HepG2세포에서 total RNA(NucleoSpin RNA kit, Macherey-nagel, Germany)분리 후 cDNA를 합성(ReverTra Ace-a kit, Toyobo, Japan)하였다. qPCR(LineGene K Plus Real-Time PCR Detection System, bioer, China)을 이용하여 ID-1, ID-2, ID-3 mRNA 발현을 비교 분석 하였다. qPCR에 사용된 primer는 아래와 같다(Table 18).

Table 18. Primer sequence

Oligo name		SEQUENCE (5' --> 3')
ID1	Forward	GCT GTT ACT CAC GCC TCA AG
	Reverse	CCC TGA TGT AGT CGA TGA CG
ID2	Forward	TCG CAT CCC ACT ATT GTC AG
	Reverse	TCA GAA GCC TGC AAG GAC A
ID3	Forward	CGA CTA CAT TCT CGA CC GCT
	Reverse	TGT CGT TGG AGA TGA CAA GTT C

qPCR를 이용하여 ID1,-2,-3 mRNA발현을 분석한 결과, OA(Oleic acid)단일 처리구에서는 20~40%정도 감소하였다. 그러나 검정무 추출물과 혼합 처리한 세포에서는 대조구에 비해 1.3~1.6배 높게 발현 되었다(Fig. 71, A, B, C). 따라서 검정무 추출물은 OA처리에 의한 스트레스 ID 유전자 발현 감소를 검정무가 detox하는 것으로 사료된다. 최근 Ushio et al(2018) 보고에 의하면 간세포에서 ID1 발현은 ID1/Ets heterodimer을 형성하여 p16 활성을 억제하여 간세포가 증식하는 것으로 보고 하였다. 따라서 검정무 추출물은 ID유전자 발현을 유도함으로써 간세포 증식과 간조직 재생에도 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.



<Fig. 71. Effect of BR on the expression of ID1, ID2 and ID3 mRNA OA-induced HepG2 cells.>

(4) 발효 검정무 추출물의 hepcidin-gene 조절효과

Ferroportin-hepcidin 연관관계는 근위 십이지장의 장 세포를 철 흡수를 조절하고 간세포와 세망 내피 세포로부터 저장 철을 방출하는 철 항상성에 중요한 역할을 하는 시스템이다. 유 Ferroportin(FPN1, SLC40A1)은 세포 내 N-말단과 C-말단을 갖는 12개의 transmembrane domain으로 구성된 62.5 kDa의 단백질이다. FPN1은 십이지장, 대 식세포 및 간세포의 enterocytes에 의해 표현되며 transferrin에 철분의 방출기능을 한다. ferroportin 단백질은 hepcidin과 iron transport에 의한 posttranslational mechanism을 통해 조절되는 유일한 세포질 단백질이다. FPN1은 시스테인이 풍부한 펩타이드인 hepcidin의 유일한 수용체로서 불 활성화는 간과 췌장에서 심한 철분 과다 현상을 초래한다.

Hepcidin 유전자는 84 개의 아미노산으로 이루어진 preprohepcidined이다. 다음으로 이 전구체는 단백질 분해효소에 의하여 60아미노산으로 구성된 pro-hepcidine 만들어지고, 최종적으로 25 개의 아미노산으로 이루어진 성숙한 hepcidine이 된다. Hepcidin-25는 disulfide 브리징,

ferroportin ubiquitination 및 proteasomal 분해와 관련된 FPN의 세포 외 루프에 결합한다. hepcidin/FPN1 복합체의 분해는 FPN1의 down조절과 철분의 세포외 방출을 막는다.

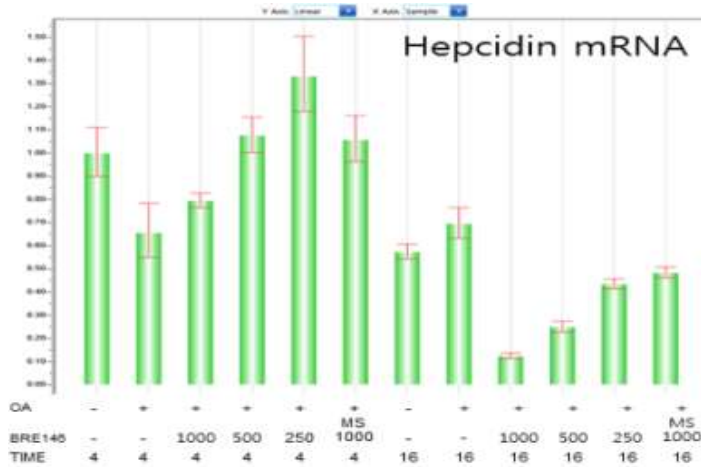
Hepcidin은 빈혈이나 철이 감소되며 급격히 감소되며, 반대로 염증이거나 감염은 hepcidine 발현을 증가시킨다. 신장질환에서 발생하는 전신성 염증 반응으로 hepcidine 발현 증가와 철가용성 감소, EPO(적혈구 조혈인자) 불균형 등으로 만성신장병 치료에 어려움이 있다.

NGS자료에서 검정무 추출물을 처리한 간세포(HepG2)에서 Hepcidine 유전자 발현이 점진적으로 증가되는 것은 발견 하였다. 따라서 NGS자료를 재확인하기 위하여 발효 검정무 추출물이 처리된 HepG2세포에서 total RNA(NucleoSpin RNA kit, Macherey-nagel, Germany)분리 후 cDNA를 합성(ReverTra Ace-a kit, Toyobo, Japan)하였다. qPCR(LineGene K Plus Real-Time PCR Detection System, bioer, China)을 이용하여 hepcidine, ferritinH, ferroportin, TfR-1 mRNA 발현을 비교 분석 하였다. qPCR에 사용된 primer는 아래와 같다 (Table 19).

<Table 19. primer sequences>

Oligo name		SEQUENCE (5' --> 3')
Hepcidin	Forward	GAC CAG TGG CTC TGT TTT
	Reverse	CAC ATC CCA CAC TTT GAT
Ferroportin	Forward	CCA AAG GGA TTG GAT TGT
	Reverse	AAA TAA AGC CAC AGC CGA
TfR-1	Forward	GAG GAG CCA GGA GAG GA
	Reverse	ACG CCA GAC TTT GCT GA
Ferritin H	Forward	TCA AGA AAC CAG ACT GTG ATG
	Reverse	GTC ACA CAA ATG GGG GTC AT

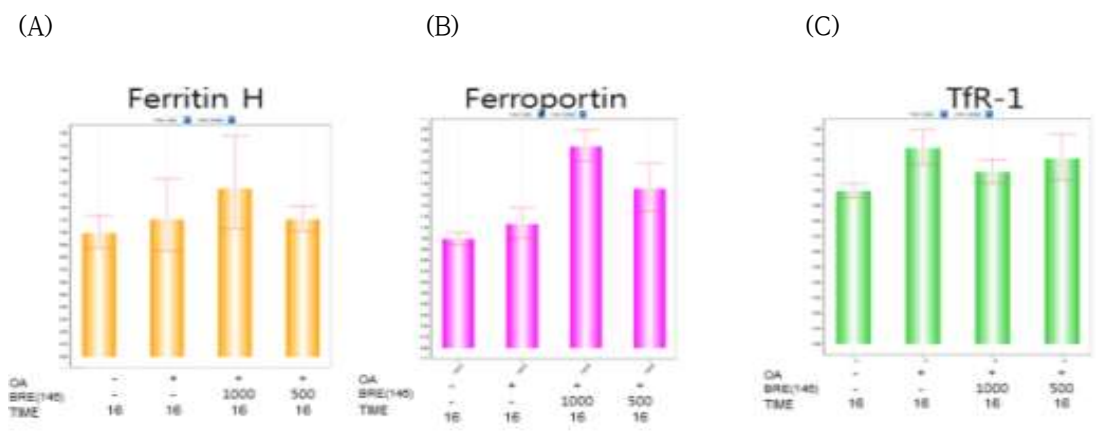
OA처리구에서 Hepcidine mRNA발현은 비처리구에 비하여 4시간 처리구에서는 감소하였으나, 16시간 처리구에서는 비처리구에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 그리고 OA와 발효 검정무 추출물 혼합 처리구에서는 고농도처리구에서 억제하는 경향을 보였다. 그리고 16시간 처리구에서는 4시간대보다 Hepcidine 발현이 50% 감소하는 경향을 보였다. 최근에 건강기능식품으로 등록된 밀크씨슬(MS, 1000µg/ml)처리와의 비교에서는 발효 검정무 추출물 효과와 매우 유사한 결과를 얻었다(Fig. 72.)



<Fig. 72. Effect of FBR and MS on the expression of Hepcidin mRNA OA-induced HepG2 cells.>

따라서 본 연구 결과는 염증 또는 감염성으로 기인한 hepcidine의 불균형시 검정무를 섭취하여 철 균형유지에 도움이 되는 식품으로 개발이 가능 하다고 사료 된다. 그리고 향후 단백질 수준에서 분석이 필요하다. 따라서 hepcidine 증가는 만성 염증에서 빈혈을 예방 할 수 있는 hepcidin antagonist 식품으로 개발 및 적용 할 수 있다.

Transferrin receptor(TfR1)은 세포막 단백질로서 혈장내에서 순환하는 철-transferrin복합체를 결합하여 엔도솜을 형성하여 세포내로 유입시키고, 2가철이온을 3가철이온으로 전환시키면서 세포내의 철농도를 조절하는 기능을 한다. Ferritin은 세포내로 유입된 철분자를 저장하는 단백질로서 대식세포와 간세포에서 많이 분포한다. Ferroportin 기능은 체내 철 항상성을 조절하는 단백질로서 철을 세포내에서 세포 밖으로 배출하는 기능을 한다. 그리고 이 유전자는 hepcidin에 의해서 조절된다. 간세포(hepG2)에 OA와 검정무 발효물을 함께 16시간 처리후 Ferritin, ferroportin, TfR1유전자 mRNA 발현을 분석 한 결과 ferroportin은 농도의존적으로 발현이 증가 되었다(Fig. 6. A).따라서 hepcidin 유전자 발현과의 상관성은 정-반-합 조절기작으로 보인다. 그러나 ferritin, TfR1 유전자 발현은 증가하는 경향을 보이나 유의적인 차이는 없다(Fig. 73. B, C).



<Fig. 73. Effect of FBR and MS on the expression of Ferritin, ferroportin and TfR1 mRNA OA-induced HepG2 cells.>

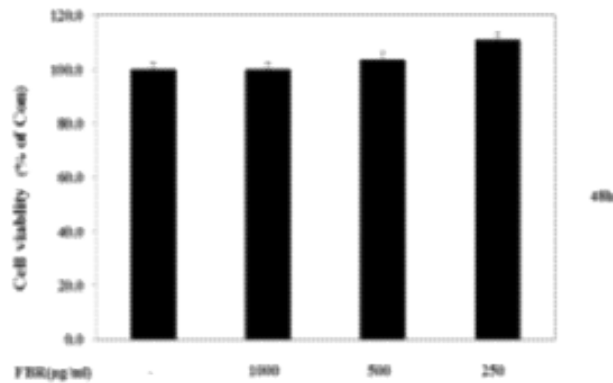
7) 발효 검정무 추출물의 지방세포 분화억제 효과 연구

(1) 발효 검정무 추출물의 지방세포분화 억제 효과

○ 발효 검정무 추출물의 지방세포분화 억제 효과

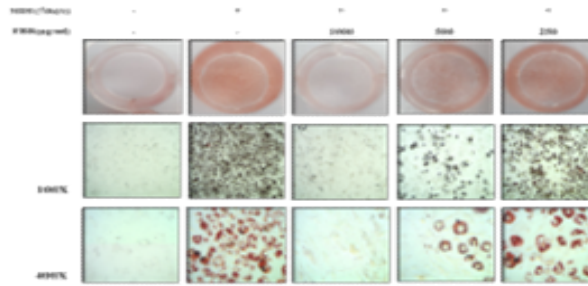
미분화된 지방세포 (3T3-L1 cell) 유지는 10% BS(bovine serum)와 1% p&s(penicillin & streptomycin)가 포함된 DMEM배지에서 배양 하였다. 3T3-L1 cell에 발효 검정무 추출물(FBR)을 2일간 처리 후 cell viability를 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정하였다. 발효 검정무 추출물에서는 세포 독성은 나타나지 않았다(Fig. 74).

3T3-L1 세포에서 지방분화 억제 효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 전구지방세포를 24well(1×10^5 cells/ml)에 분주한 후, 100% confluency 시점에 전구지방세포를 분화유도물질 0.5mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma-Aldrich, USA), 1 μ M Dexamethasone (Sigma-Aldrich, USA), 10 μ g/ml Insulin (Sigma-Aldrich, USA) 처리하여 분화유도를 촉진시켰다. 2일 후 기존 배지를 제거하여 10 μ g/ml Insulin이 함유된 10% FBS DMEM 배지로 교환하여 2일간 배양하였으며, 그 후 2일마다 4일 동안 10% FBS DMEM 배양액으로 교체하였다. 총 분화유도는 7일 동안 실시하였으며, 발효 검정무추출물을 농도별로 분화유도물질과 함께 처리하였다. 분화유도 시작일로부터 7일째 되는 날 Oil Red O 염색법과 Triglyceride assay을 수행하였다. 분화유도 처리구와 FBR 1,000, 500, 250 μ g/ml 처리군과의 지방합성 억제율은 98%, 49%, 17% 억제효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 75. A, B).

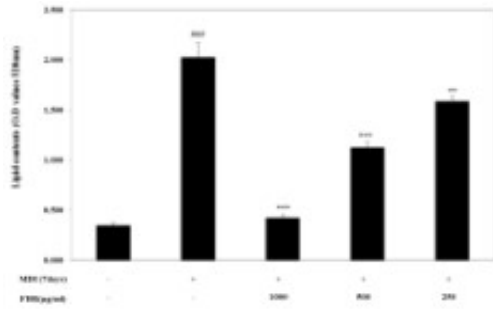


<Fig. 74. Effect of FBR on cell viability in 3T3-L1 mouse preadipocytes>

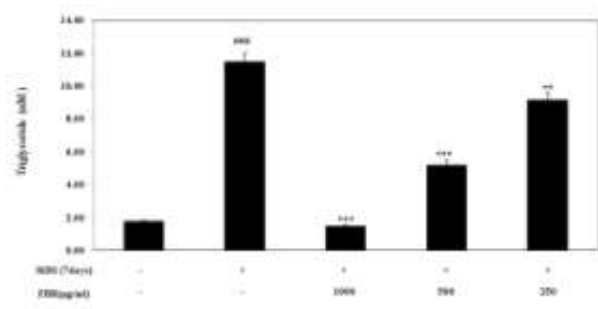
(A)



(B)



(C)



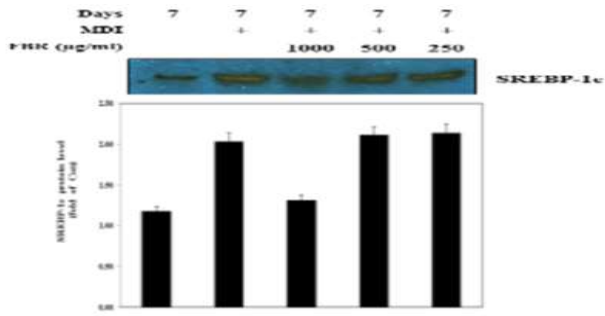
<Fig. 75. Effect of FBR on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. (A)Oil Red O-staining, (B)Lipid content, (C)Triglyceride content>

또한, FBR 처리군에서 세포내 측정된 Triglyceride(TG) 생성량 역시 1,000 μ g/ml(80%), 500 μ g/ml(55%), 250 μ g/ml(17%) 각각 억제 하였다. 따라서 발효 검정무 추출물은 농도 의존적으로 감소하여 지방세포분화 억제 및 Lipid, TG합성 억제 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 75. C).

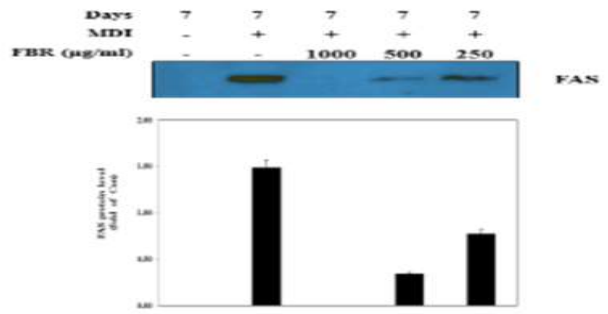
○ 발효 검정무 추출물의 adipocyte differentiation 관련 단백질 발현 억제 효과

lipogenesis 관련 Sterol regulatory element-binding protein(SREBP-1c) 과 Fatty acid synthase(FAS) 단백질 발현 정도는 분화유도물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 MDI 처리군에서 SREBP-1c, FAS 단백질 발현량이 약 1 ~ 1.5배 증가하였고, FBR을 1,000, 500, 250 μ g/ml 처리하는 농도 의존적 감소적으로 감소하였다(Fig. 76. A, B). CCAAT-Enhancer-Binding Proteins(C/EBP- α), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma(PPAR- γ), Adipocyte protein 2(aP2) adipocyte 관련 단백질 발현 수준을 Western blot 방법으로 수행한 결과, 분화유도물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 MDI 처리군에서 PPAR- γ , aP2, C/EBP- α , 단백질 발현량이 약 0.7 ~ 1.5배 증가하였고, FBR 1,000, 500, 250 μ g/ml 처리하는 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 76 C, D, E, F).

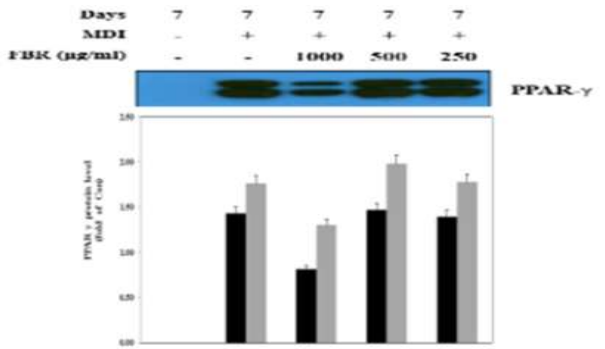
(A)



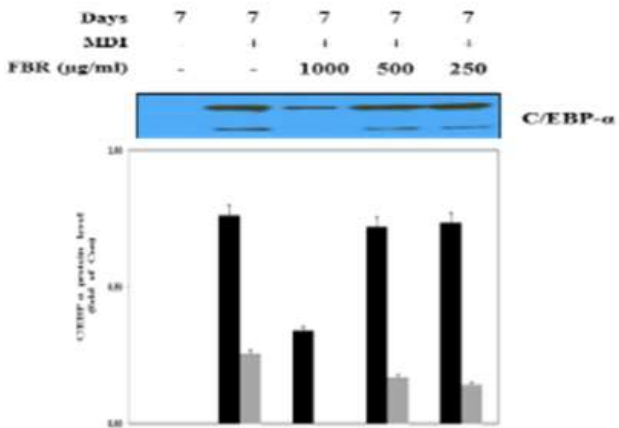
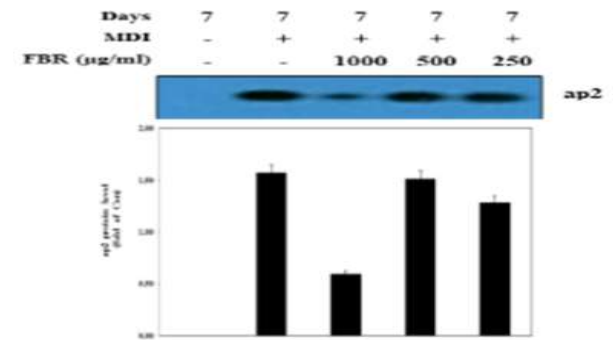
(B)



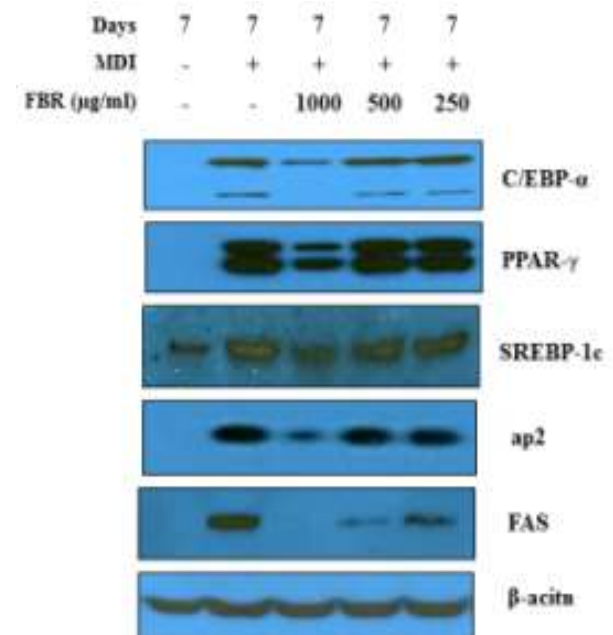
(C)



(D)



(E)



<Fig. 76. Effect of FBR on the expression of lipid accumulation protein in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μM dexamethasone, and 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells.>

따라서 발효 김정무 추출물은 지방세포 분화 억제와 관련 단백질 억제에 효과가 농도의존적으로 보였다.

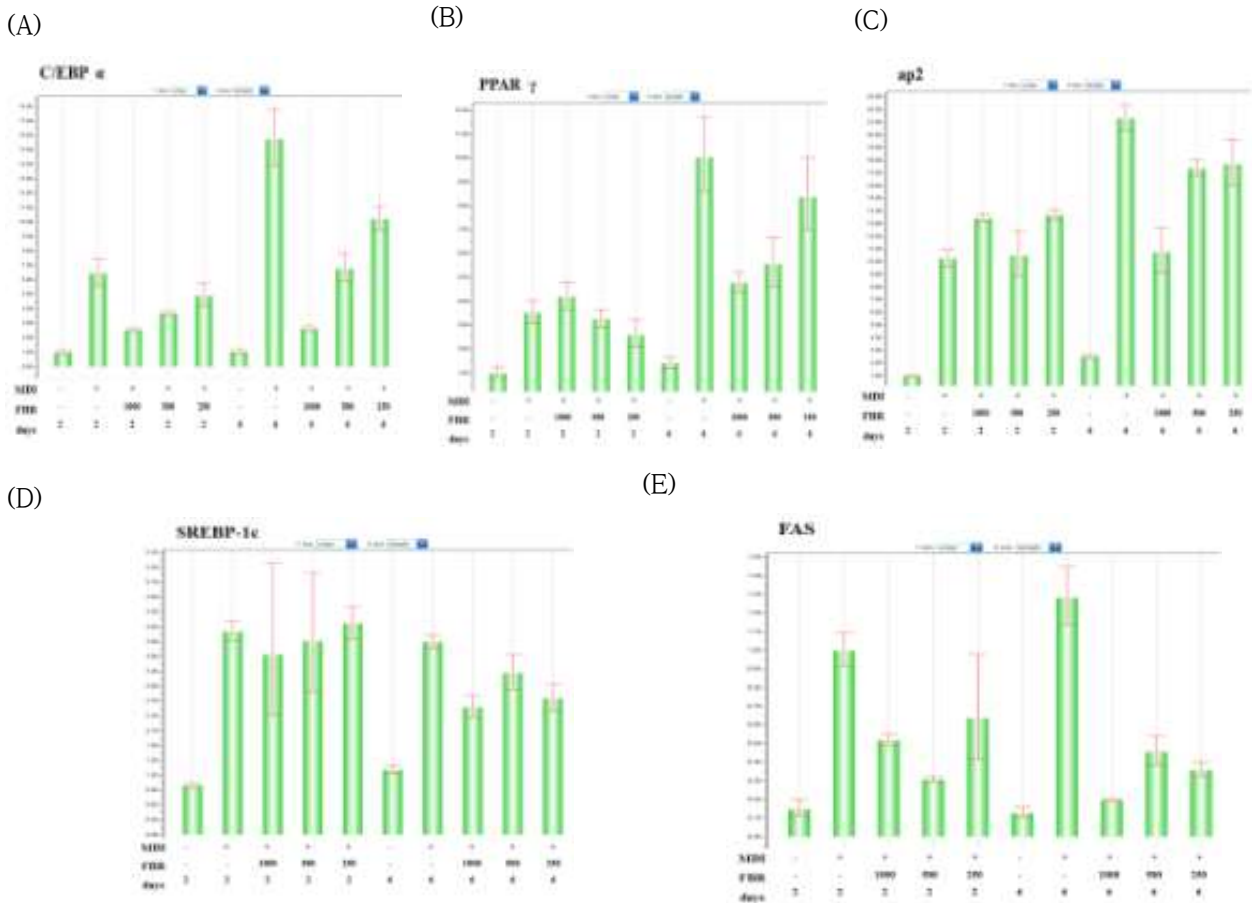
○ 발효 흑무추출물(FBR)의 adipocyte와 관련 유전자 mRNA 발현 억제 효과

Ccaat-enhancer-binding proteins(C/EBP- α), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR- γ) Adipocyte protein 2(aP2) adipocyte 관련 mRNA 발현을 분화 유도 시작 후 2일(preadipocyte), 6일(adipocyte) 각 각 분석하였다(Fig. 77). 이때 사용된 primer 는 Table 20과 같다.

<Table 20. Primer sequence>

Oligo name		SEQUENCE (5' --> 3')
C/EBP- α	Forward	CTGGAAAGAAGGCCACCTC
	Reverse	AAGAGAAGGAAGCGGTCCA
PPAR- γ	Forward	CAAGAATACCAAAGTGCGATCAA
	Reverse	GAGCTGGGTCTTTTCAGAATAATAAG
aP2	Forward	GCCAGACACCCCTGCTA
	Reverse	GTTCTGGGCGTCACTCC
SREBP-1c	Forward	GGTTTTGAACGACATCGAAGA
	Reverse	CGGGAAGTCACTGTCTTGGT
FAS	Forward	GTTGGGGGTGTCTTCAACC
	Reverse	GAAGAGCTCTGGGGTCTGG
β -actin	Forward	CATCCTGCGTCTGGACCTGG
	Reverse	TAATGTCACGCACGATTTCC

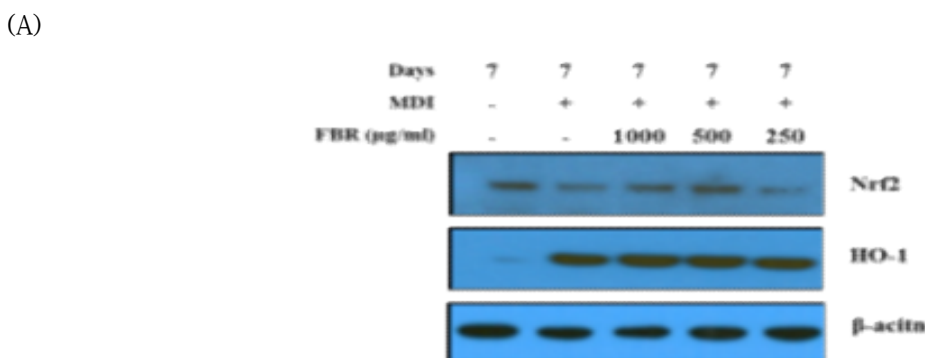
그 결과, 분화유도물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 MDI 처리군에서 C/EBP- α mRNA 발현은 2일, 6일 처리구에서 모두 현저하게 높게 나타났다. 그리고 발효추출물 1000, 500, 250ug/ml 처리에서 C/EBP- α mRNA 발현은 농도의존적으로 억제 하였다(Fig. 77 A). preadipocyte(2일)에서 흑무발효물을 농도별로 처리한 결과 PPAR- γ mRNA 발현은 고농도에서는 촉진하였다. 그러나 분화된 지방세포(6일)에서는 농도의존적으로 억제 하였다(Fig.77 B). 그리고 aP2 mRNA 발현 역시 preadipocyte에서는 촉진하였다(Fig. 77 C). 그러나 지방세포로 분화된 adipocyte(6일)에서는 농도의존적으로 억제 하였다. SREBP1 mRNA 발현분석에서는 흑무추출물에 의한 억제효과는 2일처리구에서는 없으나, 6일 처리구에서는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 77 D). 그리고 흑무추출물에 의한 FAS mRNA 발현 분석에서는 분화후 2일, 6일 모두에서 억제 하였다(Fig. 77 E). 따라서 흑무추출물은 preadipocyte, adipocyte 모두에서 C/EBPa와 FAS mRNA 발현을 억제하였다. 따라서 이 결과는 미발효물처리에서는 5개유전자 모두 농도의존적으로 억제하는 결과와는 다소 차이가 있는 것으로 확인 되었다. 이런 차이는 발효물에서 생성되는 인자(단쇄지방산(SCFA) : butyrate, acetate, propionate)와 유산균 산물에 의한 것으로 사료된다.



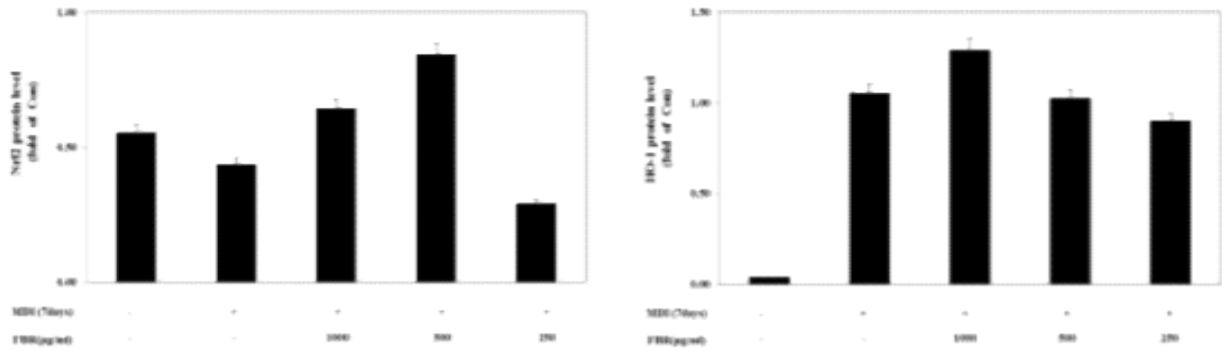
<Fig. 77. Effect of FBR on the expression of lipid accumulation mRNA in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells.>

○ 흑무 발효추출물의 Nrf2, HO-1 유전자 발현 효과

Nrf2(NFE-2(Nuclear factor erythroid derived-2)-related factor 2)는 외부 스트레스에 의해 유발되는 염증, 심혈관계질환, 폐섬유화, 중추신경계 질환, 당뇨, 노화, 암 등 발생과정에서 세포를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려진 전사인자(transcription factor)이다. Nrf2는 산화 스트레스가 없는 상태에서는 세포질(cytoplasm)에서 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein1)과 결합하여 복합체 상태로 존재하다가 ubiquitin-proteasome에 의해 분해된다. 그러나 산화적 스트레스가 오면 Nrf2는 인산화되어 Keap1와 분리되어 핵으로 이동 후 타겟 유전자(CYP1A2, HO-1, NQO1 등)의 ARE(antioxidant response element)에 결합하여 전사가 이루어진다. 항산화 효소 및 항염증 효소의 발현을 유도함으로써 인체방어에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 발효 검정무 추출물의 지방세포분화 동안 발현을 western blot방법으로 분석 하였다 (Fig. 78).



(B) (C)



<Fig. 78. Effect of FBR on the expression of Nrf2 and HO-1 protein in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells.>

total Nrf2 발현은 500 μ g/ml처리에서가 높게 분석 되었으며, 비처리구, MDI처리구 역시 발현 되었다. 그러나 HO-1 단백질 발현은 미분화 adipocyte를 제외하고 모두 강하게 발현 되었다. 따라서 Nrf2 단백질 기능은 핵(nuclear)에서 ARE(antioxidant response element)에 결합하여 HO-1, NQO1등 타겟 단백질이 발현을 조절하는 만큼, 향후 cytosol type과 nuclears type를 구분하여 분석할 필요가 있다고 사료된다.

○ 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물에서 Sqstm1(p62), MMP3, LCN2, Pin2 mRNA발현 연구 sqstm1(p62), MMP3, LCN2, ESD, Pin2 mRNA발현 분석에 사용한 primer는 아래와 같다 (Table 21) primer 합성은 바이오니아(대전)에서 디자인 및 합성을 의뢰하여 확보하였다.

<Table 21. Primer sequence>

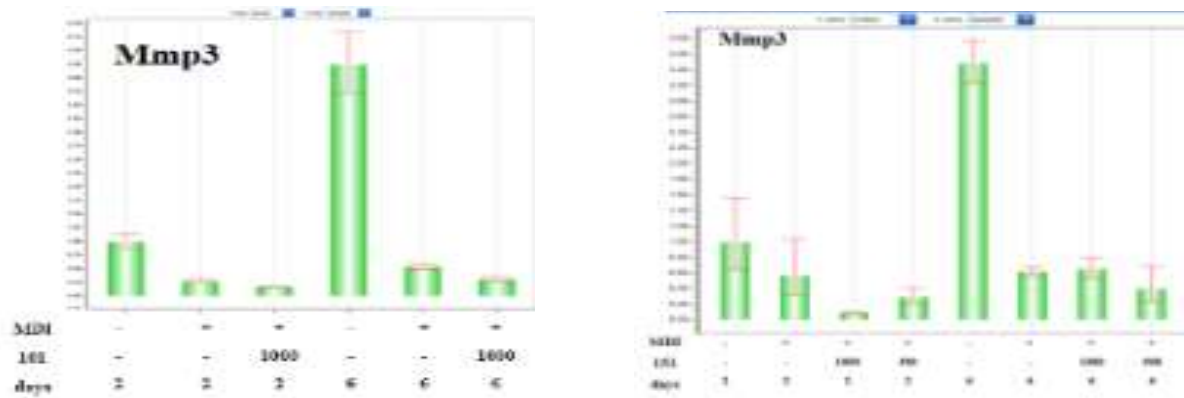
Oligo name		SEQUENCE (5' --> 3')
MMP3	Forward	TCCTTTGCAGTTGGAGAACA
	Reverse	GTGACATCCTCTGTCCATCG
Lcn2	Forward	ACAGCACCATCTATGAGCTAC
	Reverse	TCTGCATATTTCCAGAGTGA
sqstm1	Forward	GAAACATGGACACTTTGGCTG
	Reverse	TGACATTGGGATCTTCTGGTG
Esd	Forward	CCACGGAGCTCTGATTTGTG
	Reverse	CATCTGGTCCCAAATATCCACT
plin2	Forward	AAGAGCCAGGAGACCATTTC
	Reverse	CACTCCACCCACGAGACATA
β -actin	Forward	CATCCTGCGTCTGGACCTGG
	Reverse	TAATGTACAGCAGGATTTC

○ 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물의 MMP3 mRNA 발현 억제효과

Preadipocyte와 adipocyte에 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물을 처리하여 matrix metalloproteinase-3(MMP-3) 발현 억제 연구를 수행 하였다. MMP3 발현은 Preadipocyte(6일 배양세포)에서만 강하게 유도 되었다. 그러나 MDI 처리구와 검정무 추출물 비교에서는 감소하는 경향을 보였다. 분화유도 후 2일에 발효물처리구에서의 MMP3는 감소하는 경향을 보이나 6일째 배양세포에서는 현저하게 차이를 보이지는 않았다(Fig. 79). 위 연구는 In vitro 연구를 좀 더 확장한 기전연구와 실험동물 모델에서 연구가 필요하다고 사료 된다.

(B)

(A)

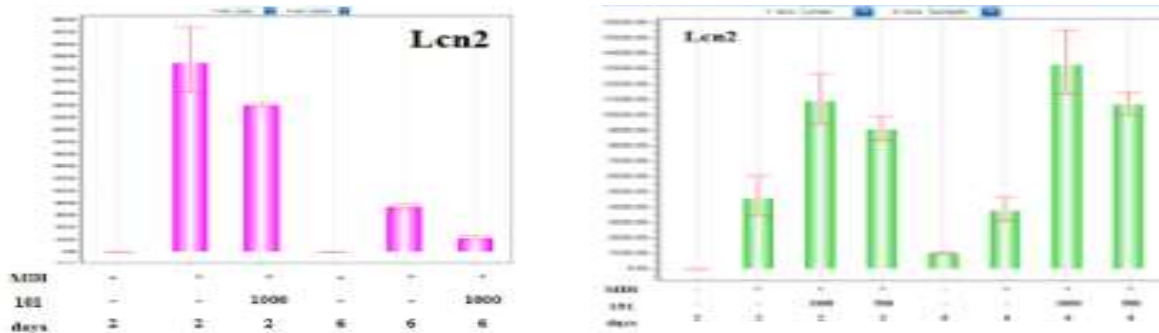


<Fig. 79. Effect of black radish on the expression of MMP3 mRNA in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells (2days, 6days). ·101: 비발효 검정무 추출물, ·151: 발효 검정무 추출물>

○ Preadipocyte와 adipocyte에서 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물의 Lcn2 mRNA 발현 Lipocalin-2(neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL))은 염증성 cytokine증가와 밀접한 관계를 가지고 있으며, 지방세포 분화와 함께 급속히 증가되는 것으로 보고되어있다. 본 연구에서는 미분화 지방세포와 분화된 지방세포에 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물을 처리하여 Lcn2 mRNA 발현을 qPCR방법을 이용하여 분석 하였다(Fig. 80). 비발효 검정무 추출물 처리에서는 감소하는 경향을 보였다. 그러나 발효 검정무 추출물에서는 증가하는 양상을 보여 서로 상반된 결과를 얻었다(Fig. 80). 그러나 Lipid 함량과, TG함량은 동일하게 감소하는 결과를 나타내고 있어 좀 더 진전된 pathway연구가 필요하다.

(A)

(B)

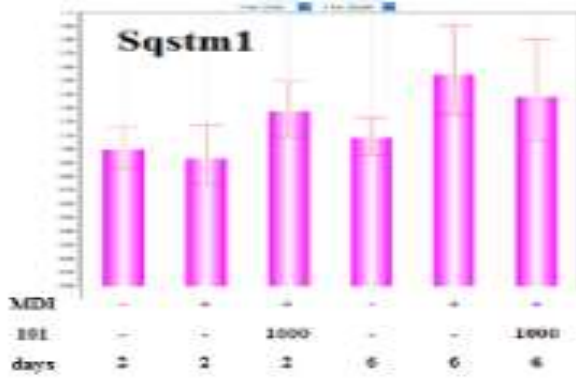


<Fig. 80. Effect of black radish on the expression of Lcn2 mRNA in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells (2days, 6days). ·101: 비발효 검정무 추출물, ·151: 발효 검정무 추출물>

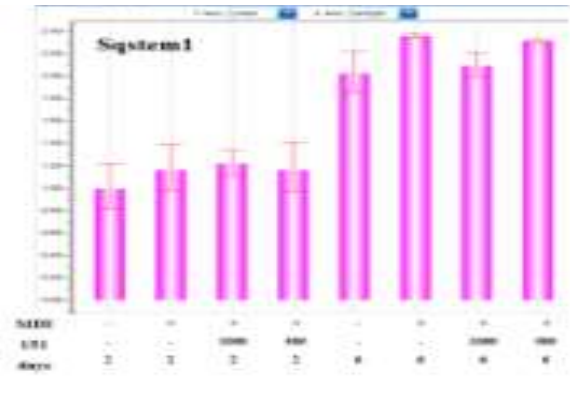
○ Preadipocyte와 adipocyte에서 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물의 sqstm1(p62) mRNA 발현

Sequestosome 1(p62)는 stress-inducible intercellular protein으로서 cell survival, cell death에서 중요한 pathway를 갖는다. P62는 autophagy을 억제, 노화억제, 세포재생, 비만억제 기능과 neurodegenerative disease, cancer 세포 등 질환에서는 Nrf2와 함께 중요한 기능을 갖는다. 비발효 검정무 추출물 처리에서는 증가하는 경향을 보였다(Fig. 81. A). 그러나 발효 검정무 추출물에서는 비처리구와 처리구간의 차이는 유의적이지 못했다. 그러나 발효 검정무 추출물 처리군에서는 2일과 6일배양 세포간에서 p62 mRNA발현은 현격한 차이를 보였다(Fig. 81. B).

(A)



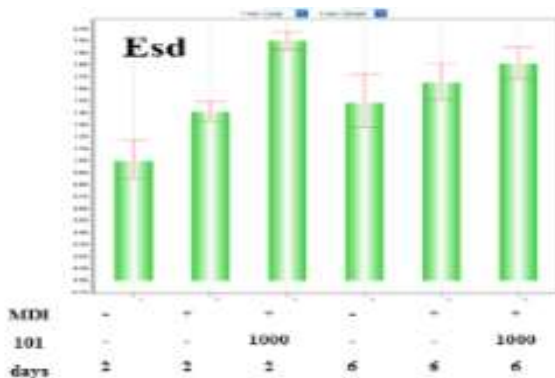
(B)



<Fig. 81. Effect of black radish on the expression of sqstm1 mRNA in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells (2days, 6days). ·101: 비발효 검정무 추출물, ·151: 발효 검정무 추출물>

○ Preadipocyte와 adipocyte에서 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물의 Esd mRNA 발현
S-formylglutathione hydrolase(ESD)는 glutathion thiolesterase 효소로서 hydrolyze S-formylglutathion을 glutathione과 formate로 분해시키는 디톡스 유전자이다. 비발효물(101) 처리에서는 증가하는 경향을 보였다. 그러나 발효 검정무 추출물, 비발효 검정무 추출물 모두에서 비처리구와 처리구간의 차이는 유의성이 없었다(Fig. 82 A, B).

(A)



(B)

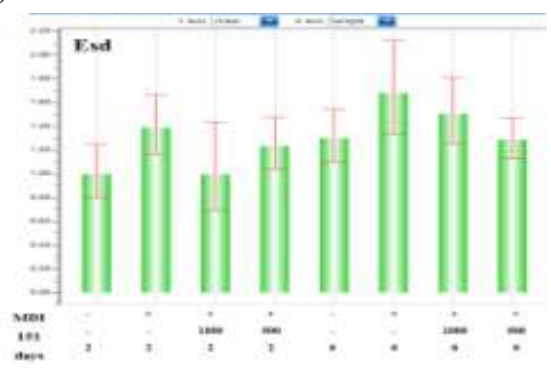


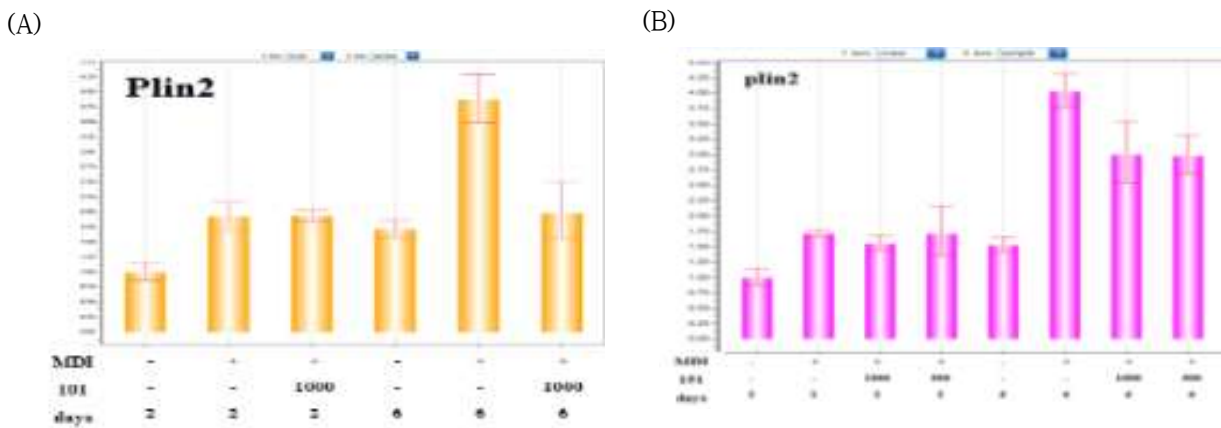
Fig. 82. Effect of black radish on the expression of Esd mRNA in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells (2days, 6days).

○ Preadipocyte와 adipocyte에서 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물의 plin2 mRNA 발현
Perlipin 2(Plin2)의 기능은 지질 방울의 형성, 지방산 섭취 증가에 의한 지방간 형성을 포함합니다. Perlipin 2의 발현 감소는 지방간을 감소시키지만 Perlipin의 발현 증가는 2형 당뇨병, 인슐린 저항, 심장 질환. 또한 그 발현은 다른 연령 관련 질환과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 이 단백질은 작은 구체 표면 막 물질과 관련이 있으며 소구 표면의 주요 구성 성분입니다. mRNA 수준의 증가는 지방 세포 분화의 초기 징후 중 하나이다.

최근 보고에 따르면 Adipose differentiation-related protein(perilipin 2, plin2) knockout mice(plin2 결핍 마우스)는 지방염증 및 인슐린 저항성에 완화되어 혈액 내 FFA 농도가 감소한 것으로 나타났다(McManaman et al., 2013). 그러나, Plin2가 처음에는 지방 세포에서 고도로 발

현 된 유전자로 밝혀졌지만, 지방 세포에서의 주요 역할은 크게 밝혀지지 않았다.

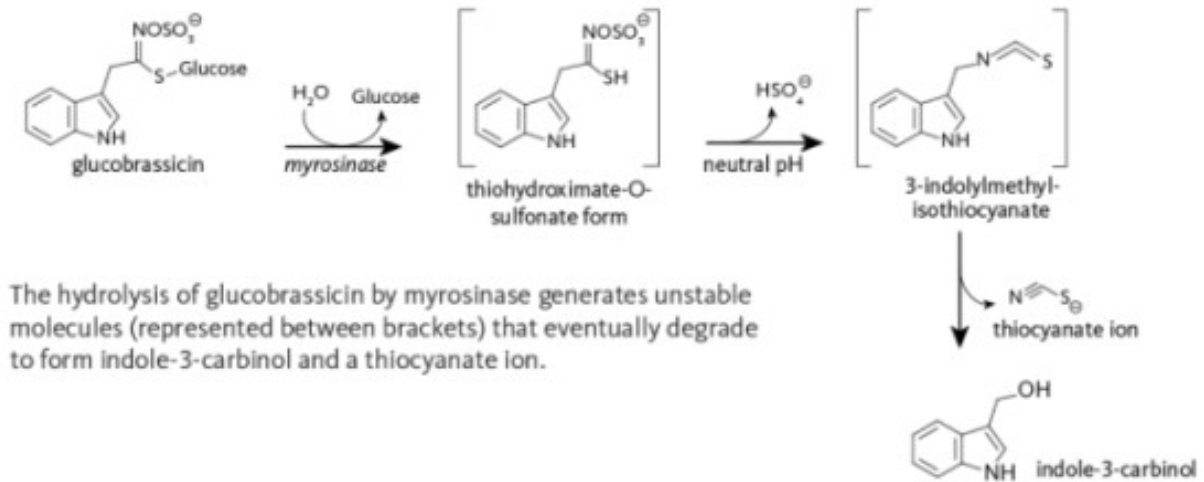
본 연구에서는 미분화 지방세포와 분화된 지방세포에 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물을 처리하여 Plin2 mRNA 발현을 qPCR방법을 이용하여 분석하였다. Plin2 mRNA는 preadipocy에서 MDI처리는 비MDI처리보다 2배정도 증가하였다(Fig. 83). 또한 preadipocyte에서 발효 검정무 추출물과 비발효 검정무 추출물간의 Plin2 발현은 차이가 없었다. 그러나 adipocyte로 분화된 처리구에서는 비발효 검정무 추출물처리와 발효 검정무 추출물 모두 Plin2가 억제되었다. 그리고 비발효 검정무 추출물처리가 발효 검정무 추출물처리구보다 Plin2 mRNA 발현은 현저하게 억제되었다. 따라서 실험동물을 이용한 연구가 필요하다고 사료된다.



<Fig. 83. Effect of black radish on the expression of sqstm1 mRNA in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells (2days, 6days).>

8) Indole-3-carbinol(I3C)의 지방세포 분화억제 기전 연구

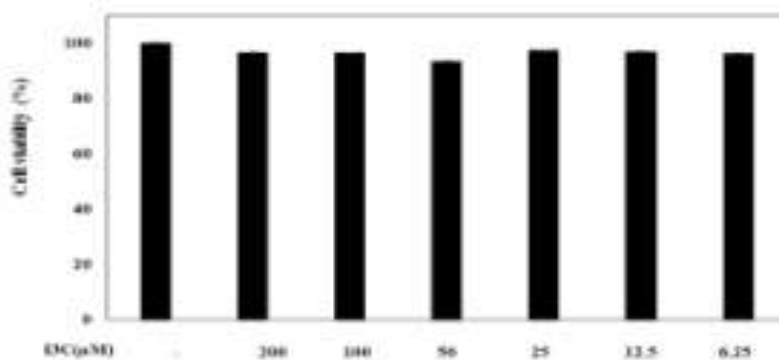
십자과 식물에 함유된 glucosinolate는 aliphatic류, indolic류, Benzenic류 구분된다. 그리고 Indole-3-carbinol은 indolic 계열에 대표적인 화합물이다(Fig. 84). 그리고 검정무에는 indole-3-carbinol 전구체인 glucobrassicine이 많이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구는 I3C 화합물(SIGMA, United States)을 구입하여 지방억제 연구를 수행하였다.



<Fig. 84. The process of glucobrassicin changing to indole-3-carbinol>

(1) 지방세포(3T3-L1 cells) Indole-3-carbinol(I3C) MTT assay

3T3-L1 cell에 I3C을 2일간 처리 후 cell viability를 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 I3C 6.25 ~ 200 μ M 농도 범위에서는 세포 독성은 없었다(Fig. 85.).

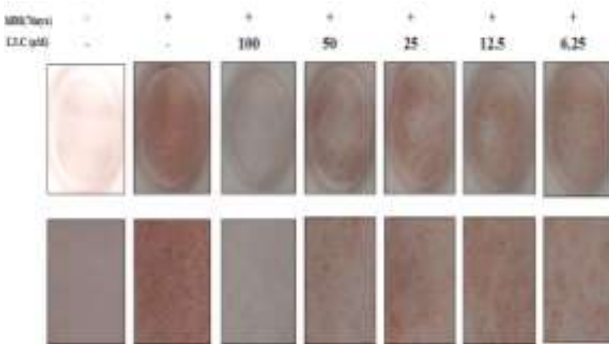


<Fig. 85. Effect of Indole-3-carbinol(I3C) on cell viability in 3T3-L1 mouse preadipocytes>

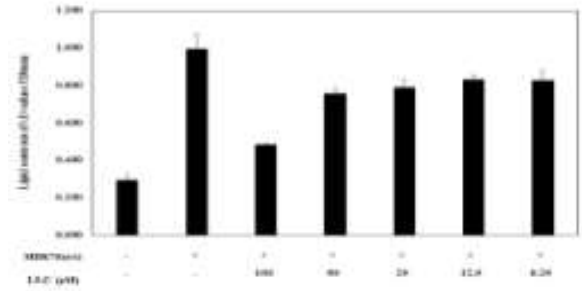
(2) Indole-3-carbinol의 지방분화 억제 효과

I3C을 농도별로 분화유도물질과 함께 처리하여 분화유도 시작일로부터 7일째 되는 날 Oil Red O 염색법과 Triglyceride assay을 수행하였다. 분화유도 처리구와 I3C 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μ g/ml 처리군과의 지방합성 억제율은 50% ~ 80% 억제효과를 확인할 수 있었다(Fig. 86. A, B). 따라서 I3C은 농도 의존적으로 감소하여 지방세포분화 억제 및 Lipid합성 억제 효과를 확인할 수 있었다.

(A)



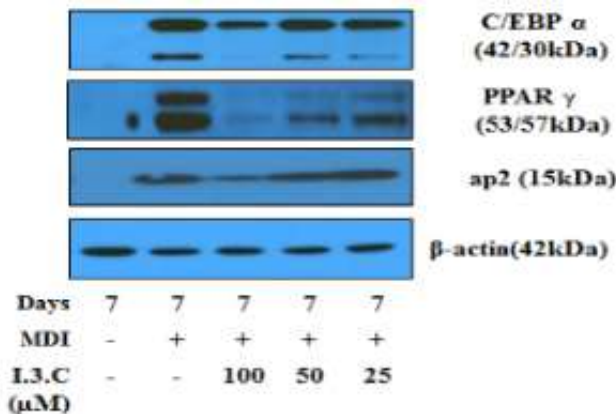
(B)



<Fig. 86. Effect of I3C on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes.>

(3) Indole-3-carbinol의 adipocyte 관련 유전자 단백질 발현 억제 효과

C/EBP- α , PPAR- γ , aP2 단백질 발현 수준을 Western blot 방법으로 수행한 결과, 분화유도물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 MDI 처리군에서 C/EBP- α , PPAR- γ , aP2 단백질 발현량이 현저하게 증가하였다. 그리고 I3C를 100, 50, 25 μ M 처리하였을 때, 지방구 합성에 관여하는 단백질 C/EBP- α , PPAR- γ , aP2 농도 의존적으로 발현량이 감소하였다(Fig. 87.).



<Fig. 87. Effect of I3C on the expression of lipid accumulation protein in 0.5mM Isobutylmethylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/ml insulin(MDI)-induced 3T3-L1 cells.>

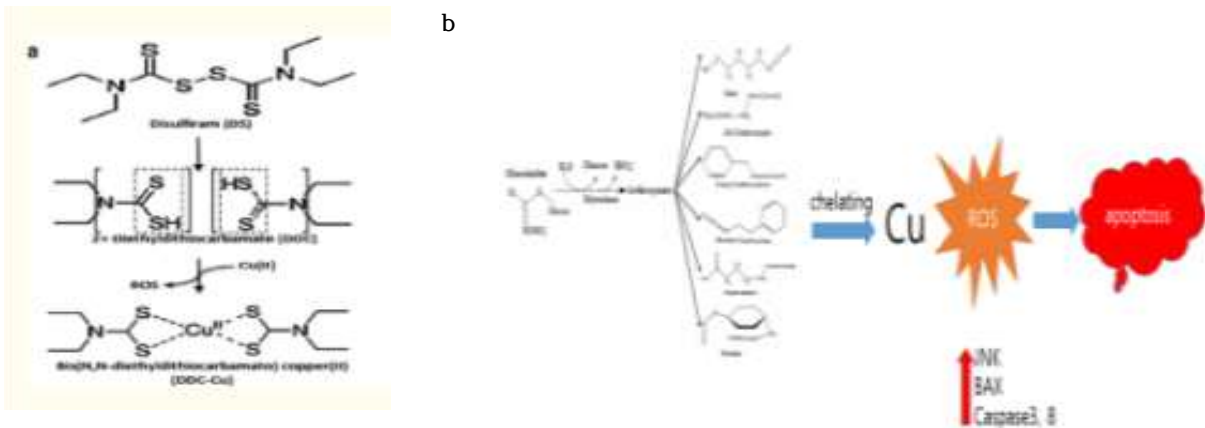
(4) 결론

위 연구에서는 peradipocyte에서 adipocyte로 분화되는 동안 검정무 발효 및 미발효추출물의 지방세포 분화 효능을 지방 및 지질합성 억제 효능, 지방세포분화에 관여하는 CBP/E, PPAR- γ , aP2, FAS, SREBP-1, 단백질 및 전사체 수준에서 연구하였다. 그리고 2차년도 NGS연구에서 특이적으로 억제 또는 과발현되는 유전자 MMP3, LCN2, p62, ESD, Plin2 유전자를 qPCR를 이용하여 전사체 수준에서 분석 하였다. 그 결과 Plin2와 MMP3 유전자가 지방세포 분화억제 결과와 일치하게 결과를 얻었다. 검정무에 많이 함유된 glucobrassicine 최종 산물인 indole-3-carbinol을

역시 지방세포 분화억제 효능 평가를 하여 농도 의존적으로 지방세포가 억제됨을 확인하였다. 따라서 발효 검정무 추출물 및 비발효 검정무 추출물 모두 지방세포 분화를 억제하여, 향후 월동무 홍보 및 유색무 보급에 활용 할 수 있는 자료를 마련하였다.

9) 항암효과(검정무 추출물, Cu-gluconate 복합체에 킬레이트 효과 연구)

Disulfiram(DSF)는 약물은 개발된 지 70년 이상 된 화합물이다(Fig.88 a). 그 기능을 보면 알데히드탈수소효소(ALDH)를 특이적으로 억제하여 알코올로부터 전환된 아세트알데히드(acetaldehyde)의 분해를 차단한다. 이렇게 축적된 아세트알데히드는 체내에서 다양한 부작용을 일으키는 기작을 응용하여 알콜중독치료제(항알코올 약물) 개발되어 사용되고 있다. 지난 30 년 동안 DSF 대한 연구는 다양하게 이루어진 결과 항암 활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다. DSF는 Proteasome/NFκB pathway, MDR1, topoisomerase, MMP, NPL4를 억제 할 뿐만 아니라 MAPKinase 경로도 조절한다고 알려져 있다. 최근에는 암줄기세포 (cancer stem cells; CSC)를 근절하고 내성 암 세포주에서 화학 저항성을 극복시킨다고 보고되고 있다. 암세포에서 세포 독성은 구리(Cu)농도의 의존적이다. DSF-Cu 혼합처리에 의한 항암효과 대해서는 임상 중인 것으로 알려져 있다. 우리 연구팀은 DSF-Cu chelating에 의한 cell apoptosis 기작을 기반으로 검정무추출물에서의 새로운 항암효과를 발명하였다(Fig. 88 b).



<Fig. 88. Disulfiram-구리 chelating(a) 및 검정무 추출물-구리화합물(b)의 Chelating 기작>

(1) 검정무 추출물 제조

검정무 원료는 성산일출봉농협에서 재배된 검정무를 2월에 수확 후, 비건조 검정무 peel(거피, Black Radish Peel), 동결건조 시료를 80% 주정으로 실온에서 24시간 추출 후 감압 농축 사용하였다. 수율은 검정무 비건조 peel에서는 4~5%, 검정무 동결건조 시료에서 31~34%정도 추출물을 확보하였다.

(2) polyphenol 함량

검정무 비건조 peel 추출물(101)과 검정무 동결건조 추출물(115)을 Folin-Denis법을 이용하여 비색 정량하였다. 그 결과 검정무 비건조 peel 추출물에서는 1159.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 검정무 동결건조 추출물에서는 899.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 함량이 포함되었다. 따라서 검정무 비건조 peel 추출물에서 약 250 μg 이상 polyphenol 함량이 높게 관찰 되었다(Fig. 89).

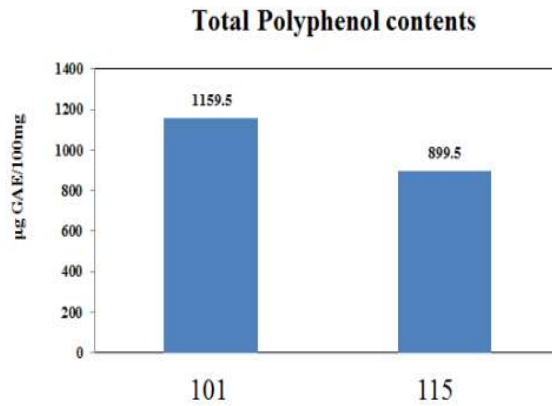


Fig. 89 . Polyphenol content

- 101: 검정무 비건조 peel 추출물
- 115: 검정무 동결건조 추출물

(3) Cell viability

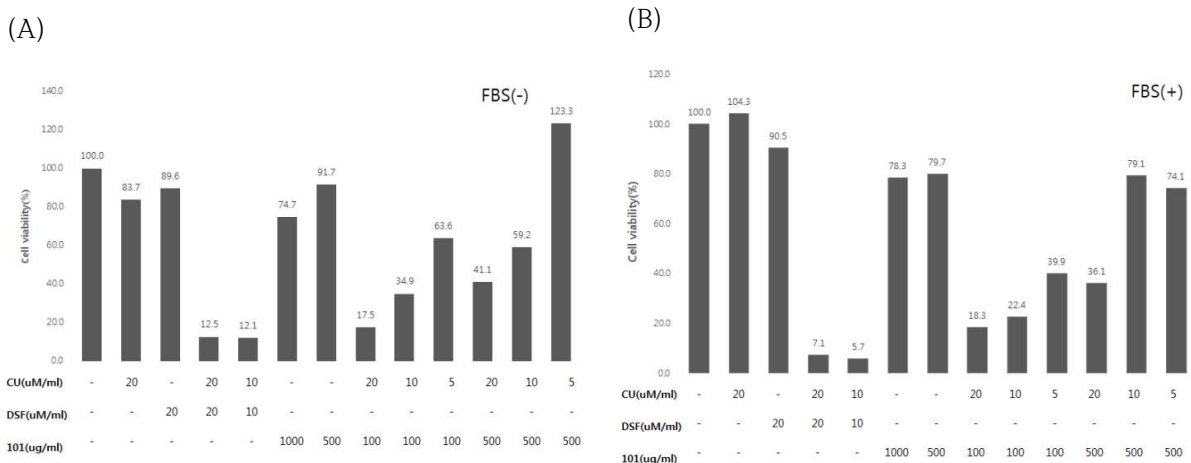
MTT 방법을 이용하여 cell viability(RAW264.7세포) 확인하였다. 먼저 세포배양액 DMEM에 10% fetal bovin serum(FBS) 첨가 또는 미첨가 상태에서 Cu(II)-gluconate(Cu), DSF(Disulfiram), 검정무 추출물을 농도별로 처리한 후 20시간 후에 분석하였다. 10% FBS가 포함되지 않은 배지에서 배양한 세포 viability는 Cu-gluconate(20 μM), DSF(20 μM)처리구에는 control보다 10~13%정도 감소하였다(Fig. 90.A). 그러나 혼합처리구 Cu(20 μM)-DSF(20 μM)와 Cu(10 μM)-DSF(10 μM)에서는 12.5%, 12.1%로 세포생존율은 매우 낮게 관찰되었다. 그리고 검정무 비건조 peel 추출물(101) 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리구에서 cell viability는 74.7%, 91.7%을 보였다(Fig. 90A).

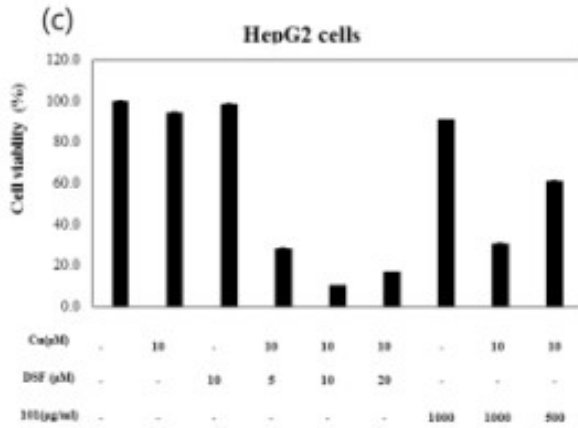
그리고 검정무 비건조 peel 추출물(101)과 Cu(II)-gluconate 혼합처리구 101-Cu(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -20 μM), 101-Cu(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10 μM), 101-Cu(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -5 μM)에서 cell viability는 각각 17.5%, 34.9%, 63.6%를 보여 Cooper농도 의존적으로 세포 성장이 억제 되었다. 그리고 검정무 비건조 peel 추출물(101) 처리 농도를 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 낮추고 Cu 농도는 위 처리와 동일하게 시험한 결과 101-Cu(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -20 μM), 101-Cu(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10 μM), 101-Cu(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -5 μM)에서 cell viability는 각각 41.1%, 59.2%, 123%를 보였다. 위 결과는 세포배양액에 FBS가 없는 상태에서는 Cu 농도와 검정무 추출물에 포함된 화합물농도는 상호 의존적으로 세포 성장 또는 apoptosis를 조절 하는 것으로 관찰되었다(Fig. 90A).

10% FBS가 포함된 배지에서 배양한 세포 viability율은 Cu(20 μM)에서는 104.3%, DSF(20 μM) 처리구에는 90.5%로서 FBS가 없는 배지에서 보다 증가되었다. 그러나 혼합처리구 Cu(20 μM)-DSF(20 μM)와 Cu(10 μM)-DSF(10 μM)에서는 7.1%, 5.7%로 세포생존율은 매우 낮게 관찰되었다. 그리고 검정무 비건조 peel 주정추출물(101) 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리구에서 cell viability는 78.3%, 97.7%을 보였다(Fig. 90, B).

그리고 검정무 비건조 peel 추출물(101)과 Cu(II)-gluconate(Cu) 혼합처리구 101-Cu(1000 μ g/ml-20 μ M), 101-Cu(1000 μ g/ml-10 μ M), 101-Cu(1000 μ g/ml-5 μ M)에서 cell viability는 각각 18.3%, 22.4%, 39.9%를 보여 Cu 농도 의존적으로 세포 성장이 억제와 FBS를 첨가하지 않은 배지에서보다 세포성장이 현저하게 억제되었다. 그리고 검정무 비건조 peel 추출물(101) 처리 농도를 500 μ g/ml 낮추고 Cu 농도는 위 처리와 동일하게 시험한 결과 101-Cu(500 μ g/ml-20 μ M), 101-Cu(500 μ g/ml-10 μ M), 101-Cu(500 μ g/ml-5 μ M)에서 cell viability는 각각 36.1%, 79.1%, 74.1%를 보였다(Fig. 90, B). 위 결과는 세포배양액에 FBS가 있는 상태에서는 FBS가 없는 상태에서보다 cell apoptosis 또는 cell 성장을 억제하는 결과를 보였다. 따라서 FBS가 있는 상태에서가 Cu-DSF 킬레이팅이 잘 이루어지는 것으로 사료되며, Cu-검정무 비건조 peel 추출물과의 킬레이팅도 이루어지는 것으로 사료된다. 따라서 위 결과는 RAW264.7 세포에서의 Cooper(Cu) 킬레이터(chelator)로 DSF 뿐만 아니라 검정무 비건조 peel 추출물도 강력한 킬레이팅을 이루고 있어 세포성장 또는 apoptosis를 조절 하는 것으로 확인되었다(Fig.90, A, B).

Human liver cancer cell(HepG2)에서 MTT 방법을 이용하여 cell viability을 분석하였다. 세포배양액 DMEM에 10% fetal bovin serum(FBS) 첨가 또는 미첨가 상태에서 Cu(II)-gluconate(Cu), DSF(Disulfiram), 검정무 비건조 peel 추출물(101)을 농도별로 처리한 후 20시간 후에 분석 하였다(Fig. 90. C). 세포 viability는 Cu(10 μ M), DSF(10 μ M)처리구에는 control과 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 90, C). 그러나 혼합처리구Cu(10 μ M)-DSF(20 μ M)와 Cu(10 μ M)-DSF(10 μ M), Cu(10 μ M)-DSF(5 μ M)에서는 18%, 12%, 26%로서 세포생존율은 매우 낮게 관찰되었다. 그리고 검정무 비건조 peel 추출물(101) 1000 μ g/ml와 500 μ g/ml에 Cu 10 μ M 각각 혼합처리시 cell viability는 36%, 62%을 보였다. 따라서 Cu-검정무 비건조 peel 추출물 혼합처리는 간암세포(hepG2)에서 cytotoxic activity 활성을 보였다.

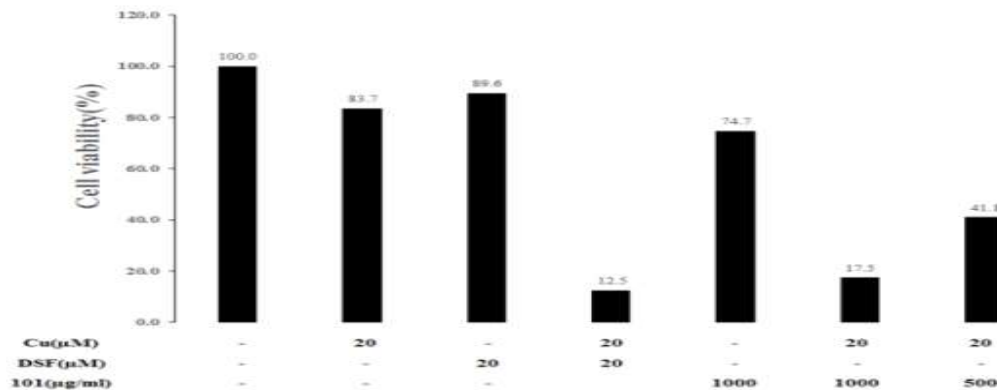




<Fig.90 . Cell growth and apoptosis effect due to chelating of the combination of black radish extract and Cu(II)-gluconate.(A, B: RAW264.7 cells, C; HepG2 cells).>

○ 검정무 추출물-Cu chelating에 의한 RAW264.7 cells viability 연구

- 검정무추출물-구리(Cu)화합물의 혼합체가 암세포 사멸정도를 확인하기 위하여 MTT분석을 실시하였다. Fig. 5 에서 보는 것처럼 양성대조구로 Disulfiram(20μM)-Cu(20μM) 혼합처리구에서 98% 세포들이 사멸되었다. 그리고 검정무추출물-구리 혼합처리 1000-20, 500-20(μg/ml-μM)에서는 82.5%, 59% 세포가 사멸되었다. 이 결과는 검정무추출물-구리 혼합물은 상호 chelating에 의하여 암세포를 강력하게 사멸시킨다는 것을 알 수 있다(Fig. 91).



<Figure 91. Disulfiram-구리 및 검정무 추출물-구리화합물 처리에 의한 cell viability>

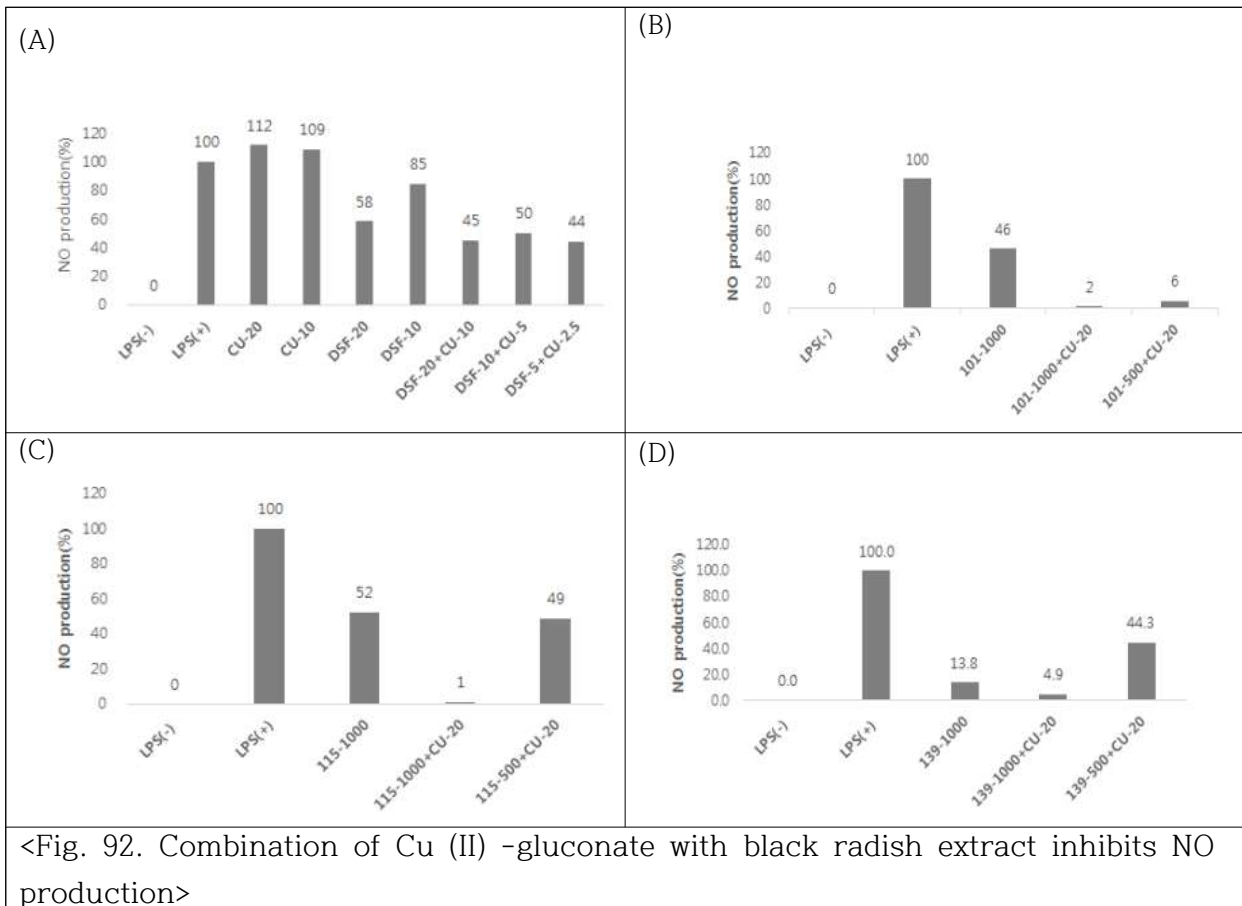
(4) NO분석

NO 생성 저해능은 RAW 264.7 세포를 1×10⁵ cells/mL로 조절한 후 48 well plate에 접종하고 여러 농도의 단일시료(Cu, DSF, 검정무 비건조 peel 추출물(101), 검정무 동결건조 추출물(115), 무종자 추출물(139) 또는 혼합시 (Cu-DSF, 검정무 비건조 peel 추출물(101), 검정무 동결건조 추출물(115), 무종자 추출물(139)를 1시간 동안 처리한 후 lipopolysaccharide(LPS) 500 ng/mL를 가하여 24시간 배양한 후 생성된 NO를 Griess시약을 이용하여 측정하였다.

먼저 LPS(500ng/ml)처리구에서 생성된 NO량을 100%로 기준하여 각각의 시료 처리된 세포에서 비교분석하였다. cooper(II)-gluconate 20uM, 10uM처리구에서 NO생성량은 112%, 109%로 나타났다. DSF 20uM, 10uM 처리구에서의 NO생성은 58, 85%로 억제되었다(Fig. 92 A). 그리고 Co-DSF 혼합처리구 DSF-Cu(20uM-10uM), DSF-Cu(10uM-5uM), DSF-Cu(5uM-2.5uM)에서 NO생성은 45%, 50%, 47%나타났다. 이 결과는 cooper단일 금속화합물은 ROS를 증가시켜 NO생성을 촉진시켰다. DSF 단일 화합물은 NO생성을 현저하게 억제하였다. 그리고 Cu-DSF 혼

합처리구에서는 DSF단일처리구보다 현저하게 NO생성을 억제하였다. 이 결과는 Cu-DSF가 킬레이팅되어 세포성장 및 cell apoptosis에 기인된것으로 사료 된다(Fig. 92 A).

검정무 비건조 peel 주정추출물(101)과 Cu 각 각 또는 복합처리한 세포에서 NO생성을 분석 한 결과 검정무 비건조 peel 주정추출물(101)에서는 46%, 101-Cu(1000ug/ml-20uM)처리에서는 2%, 101-Cu(500ug/ml-20uM)처리에서는 6%로 나타났다(Fig. 5B). 그리고 검정무 동결건조 주정추출물(115)와 무종자 주정추출물(139)에서 실험한 결과 모두 억제하였다(Fig.92 C).



※검정무 비건조 peel 추출물(Black radish peel extract; BRPE)

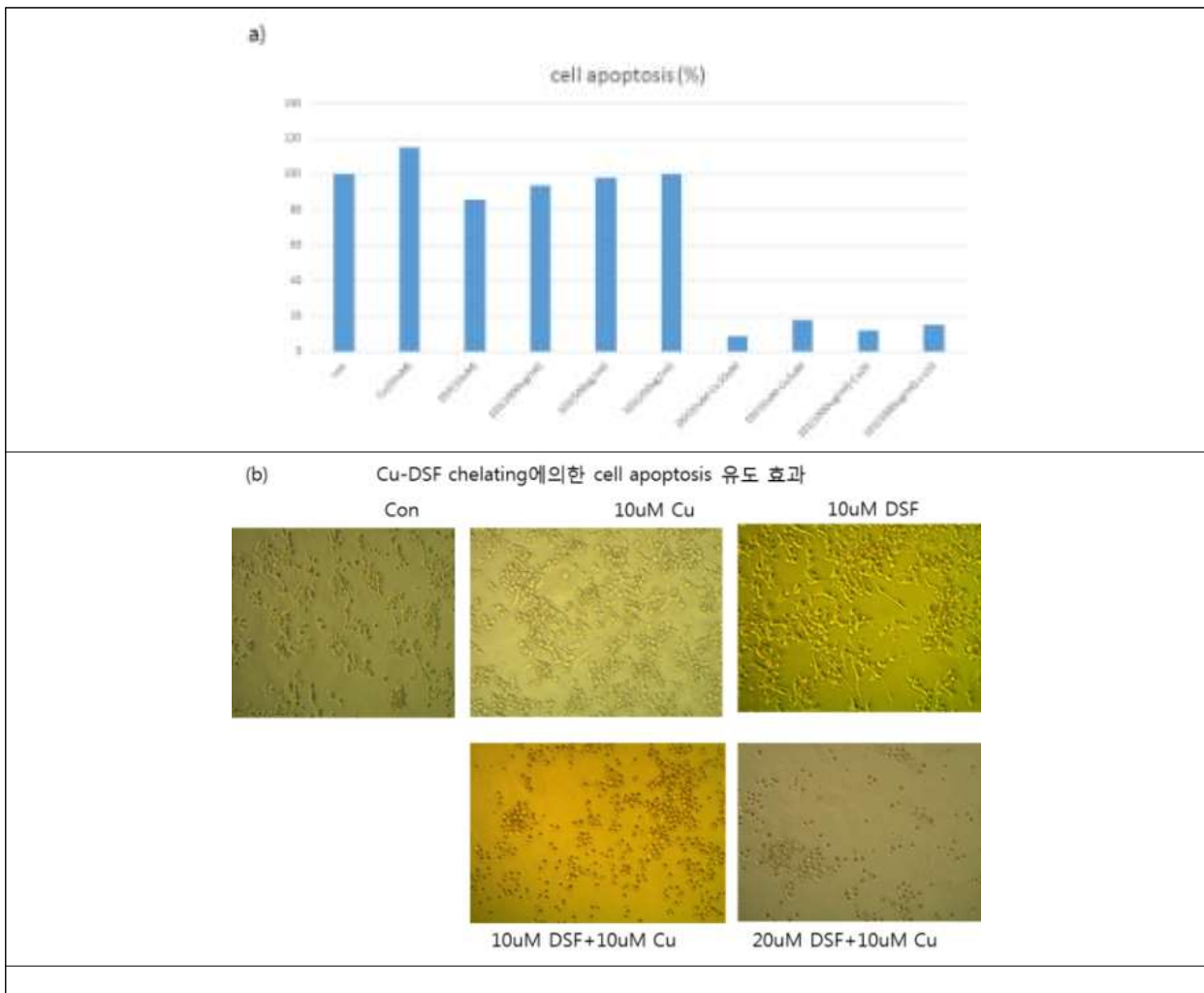
(5) Cell apoptosis

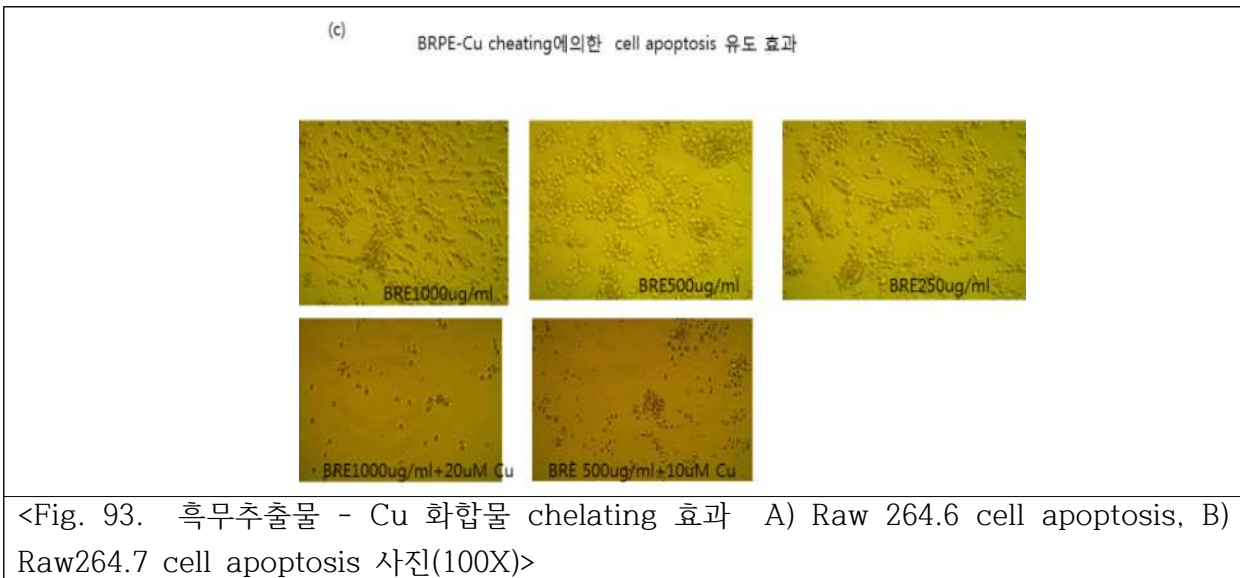
RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/mL로 조절한 후 12well plate에 seeding하여 24시간 후 여러 농도의 시료로 16시간 동안 처리하여 사진촬영과 0.4% Trypan blue(Gibco Life Technologies)를 혼합 사용하여 Hemocytometer로 세포를 counter하였다.

비처리구와 단일 화합물인 Cu 또는 DSF 처리구에서는 미세한 증식 및 억제효과를 보였다. 이 결과는 MTT분석결과와도 일치하여 Cu와 DSF처리에서는 염증세포성장에는 관여하는 세포사멸기작에는 효과가 없는 것으로 사료된다. 그리고 고농도 검정무 비건조 peel 주정추출물(Black radish peel extract; BRPE) 처리구에서는 15%내외 성장억제 효과를 보이거나 농도에서는 세포성장에 지장을 초래하지 않은 것으로 보였다. 그러나 DSF-CU(20uM-10uM)혼합처리구에서는 90%, 저농도 (20uM-5uM)혼합처리구에서는 80%이상 cell apoptosis를 유도하였다(Fig. 93 A). 세포형태를 보

면 혼합처리구(DSF-CU), 모두 정상세포보다 fibrosis가 관찰되지 않고 있으며, 세포숫자가 현저히 감소됨을 관찰 되었다(Fig. 93 b). 이 결과는 Liu et al(2012)연구팀에서 보고한 glioblastoma cell에의 결과와도 일치하였다(Fig. 93 a,b). 그리고 BRPE-Cu 혼합처리한 세포에서 세포형태를 보면, DSF-Cu혼합처리구와 동일하게 세포형태는 cell cytotoxicity의한 cell apoptosis를 유도하였다(Fig. 93 C). 본 연구에서는 BRPE와 Cu를 혼합처리후 cell apoptosis를 분석한 결과 매우높은 cell apoptosis를 유도되었다(Fig. 93 a, c). 이 결과는 이미 보고된 DSF-Cu 처리구에서의 cytotoxic효과와 거의 대등한 결과를 보였다.

따라서 검정무 peel속에는 많은 glucosinolate가 함유하고 있다. 이들 화합물들의 특징은 sulfur화합물을 함유하고 있어 DSF-Cu복합체를 형성한 것처럼 glucosinolate-Cu 보합체에 한 ROS생성에 기인된 cell apoptosis라 사료된다.





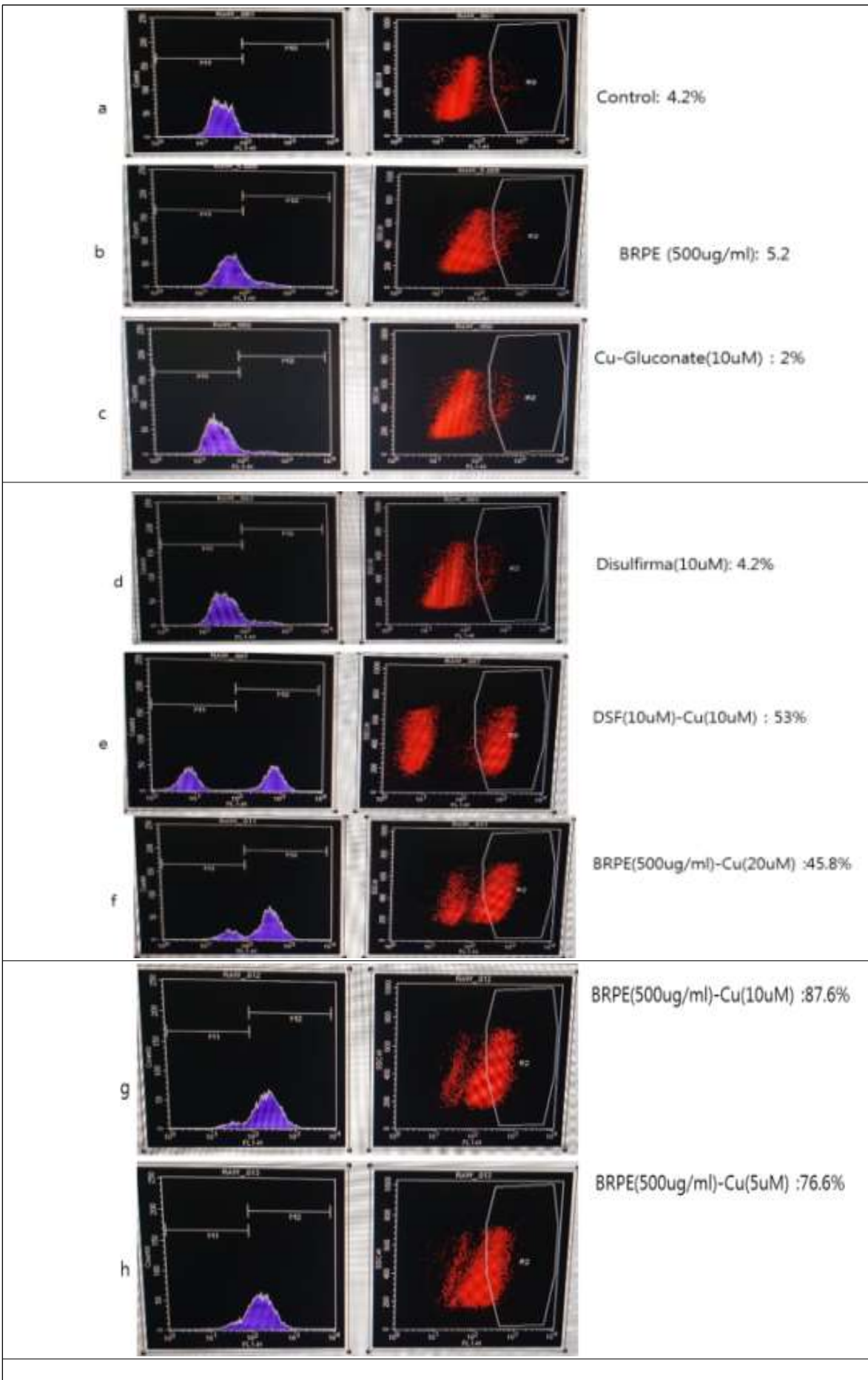
(6) Reactive Oxygen Species(ROS) 분석

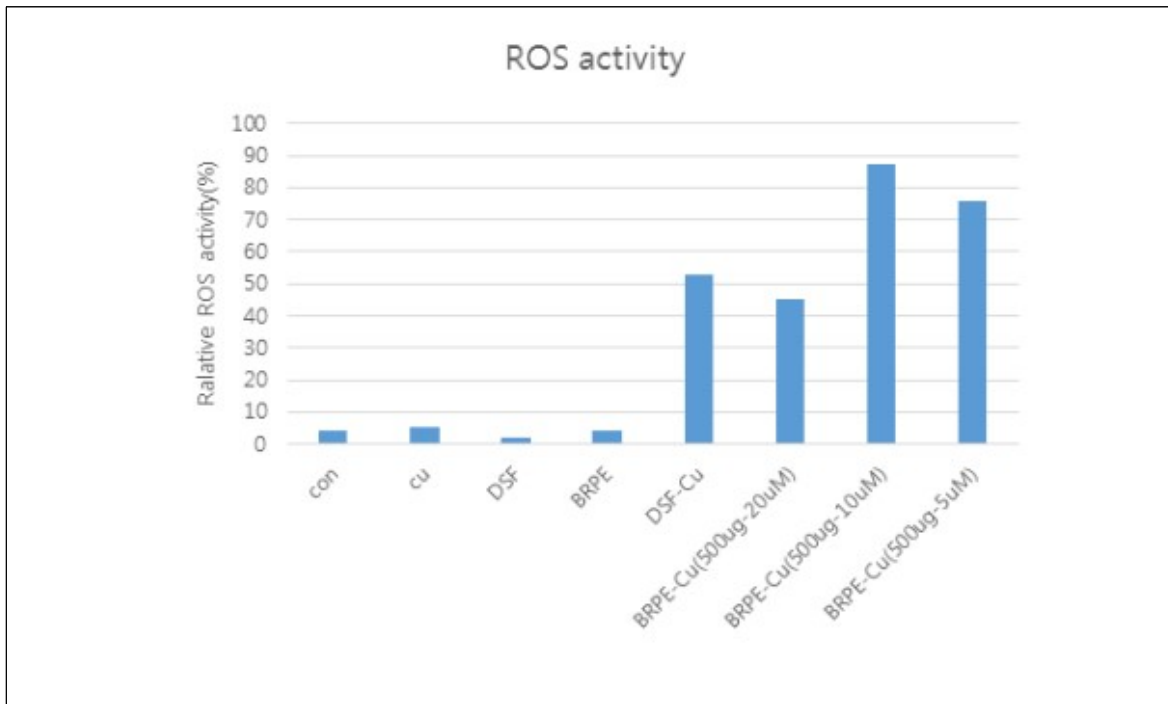
세포내 활성산소의 농도변화를 측정하기 위하여 형광 dye probe는 Dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA, sigma)를 사용하였다. 먼저 12 well plate에서 24시간 배양후 고농도 검정무 비건조 peel 주정추출물(Black radish peel extract; BRPE), cooper gluconate(Cu), disulfiram(DSF)을 각각 또는 혼합하여 2시간 처리 후 PBS로 2회 세척하여 수확한 후 flow cytometry (Bector Dickinson)를 이용하여 ROS의 변화량을 분석하였다(Fig. 94).

본 실험에서는 이미 보고된 BRPE, DSF, Cu을 농도별로 RAW264.7세포에 처리한 결과, 각 ROS 생성률은 control에서는 2%, 10uM DSF처리구에서는 6.2%, 10uM Cu-gluconate처리구에서는 4.2%, BRPE처리구에서는 14.6%를 보였다(Fig. 94). 그러나 DSF(10uM)-Cu(10uM) 혼합처리구에서 ROS 발생은 47.1%로서 단일 처리구보다 8~12배 높게 발생되었다(Fig. 94). 그리고 BRPE(500ug/ml)를에 Cu를 농도별 BRPE(500ug/ml)+ Cu20uM, BRPE(500ug/ml)+ Cu 10uM, BRPE(500ug/ml) + Cu 5uM로 처리한 결과 각각 77.2%, 82.8%, 75.5%로 높은 ROS발생률을 보였다(Fig. 94).

이 결과는 검정무 비건조 peel 주정추출물이 강력한 ROS 유도과 함께 cell apoptosis을 유도함으로써 항암제 약물조성물가능성을 확인시키는 연구 결과이다.

최근 치료용연구가 활성화 되고있는 DSF-Cu복합체는 위장, 산성 종양 환경에서 DSF는 즉시 Cu(II)를 킬레이트 하는 DEDTC-Cu 복합체 전환되어 DSF 자체보다 더 안정화되어 항암 작용을 촉진합니다. 그러나 DSF의 Cu 사용을 제한하는 주의 사항 중 하나는 정상 조직에 대한 중대한 독성을 갖고 있다. 우리는 식재료로 사용하는 검정무 비건조 peel 주정추출물과 cu-gluconate복합체를 이용하여 식의약품으로 적용하고자 한다.



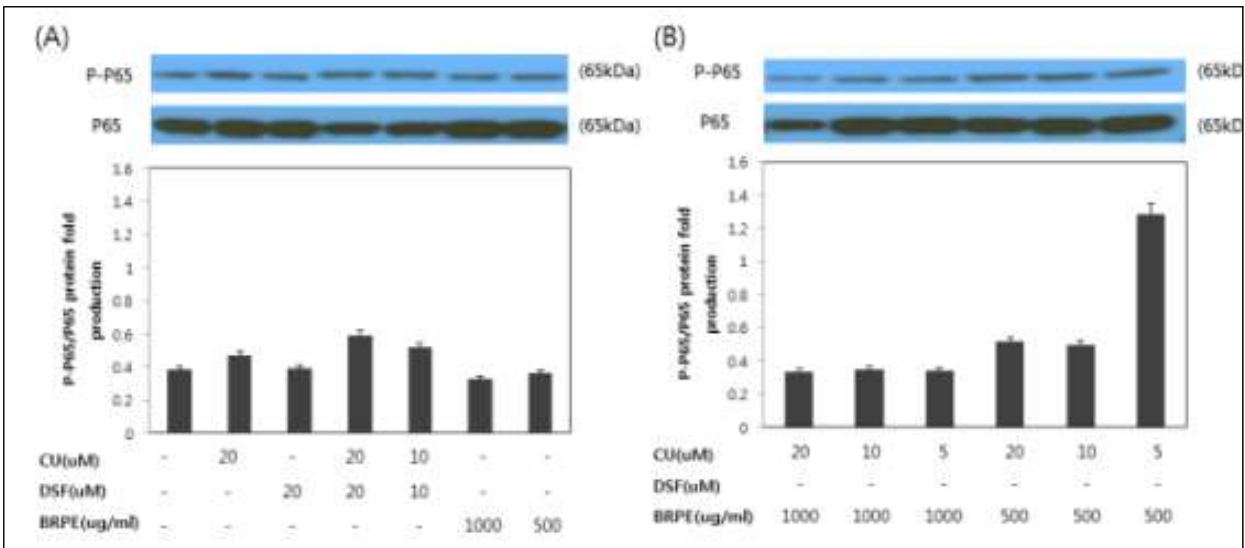


<Fig. 94. 흑무추출물-Cu 화합물 chelating의한 ROS 생성 효과 A) flow cytometer 분석, B) ROS생성을>

(7) apoptosis 관련 단백질 활성화 및 발현분석

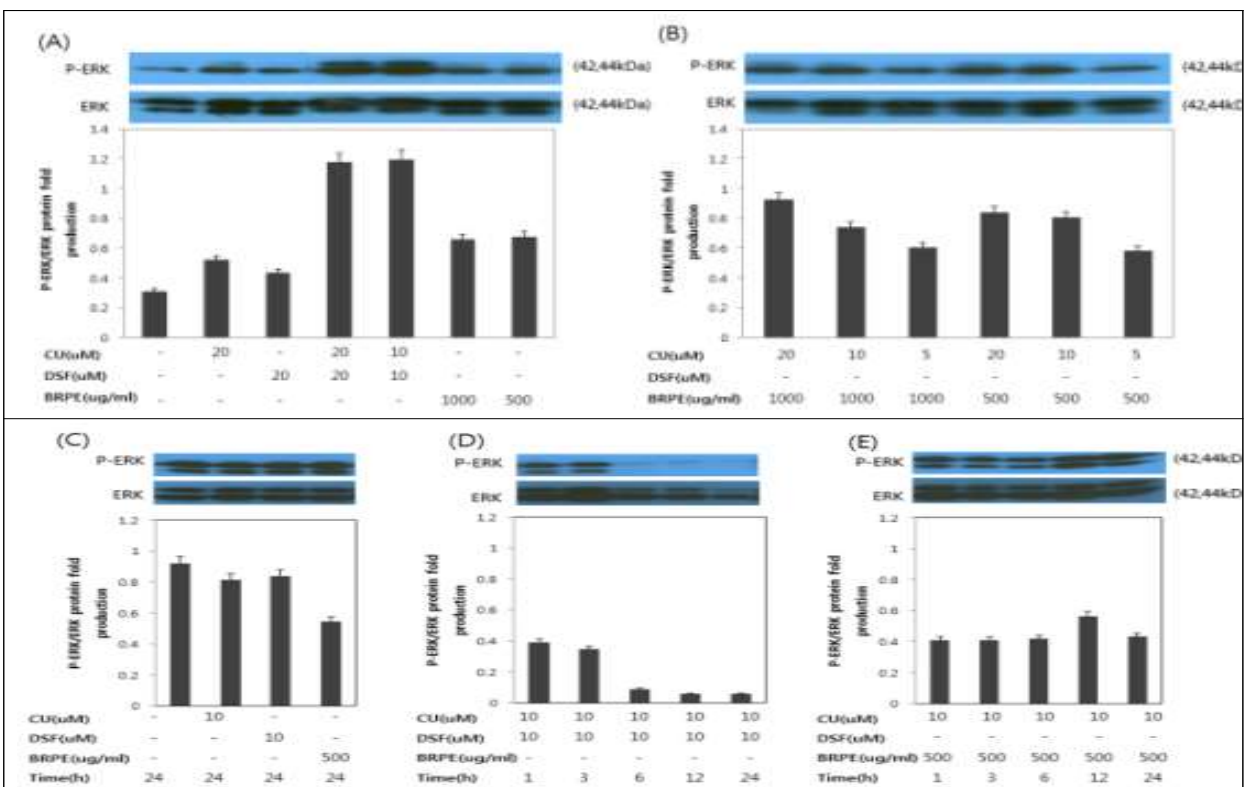
○ p65(NFκB), phospho-ERK, phospho-JNK 등 apoptosis 관련 단백질 활성화 및 발현분석

1차항체 phospho-p65, p65(NFκB), phospho-ERK, ERK, phospho-JNK, JNK, Caspase-3, caspase-9을 이용하여 immunoblot을 실시하였다. NF-κB신호전달에서 p65 발현 및 인산화는 염증인자 형성에 중요한 인자로서 LPS 처리시 급속히 활성화되어 염증성 사이토카인 및 인자를 생성한다. Fig. 95에서 관찰하여보면 phospho-p65 활성화는 비처리구에 비해 변화는 없으나 Cu-BRPE(1000ug/ml)처리구에서 약간의 억제하는 경향성을 보이고 있으며, 단백질 발현은 Cu-DSF 복합처리구와 고농도 Cu-BRPE((1000ug/ml)처리구에서 억제되었다(Fig. 95).



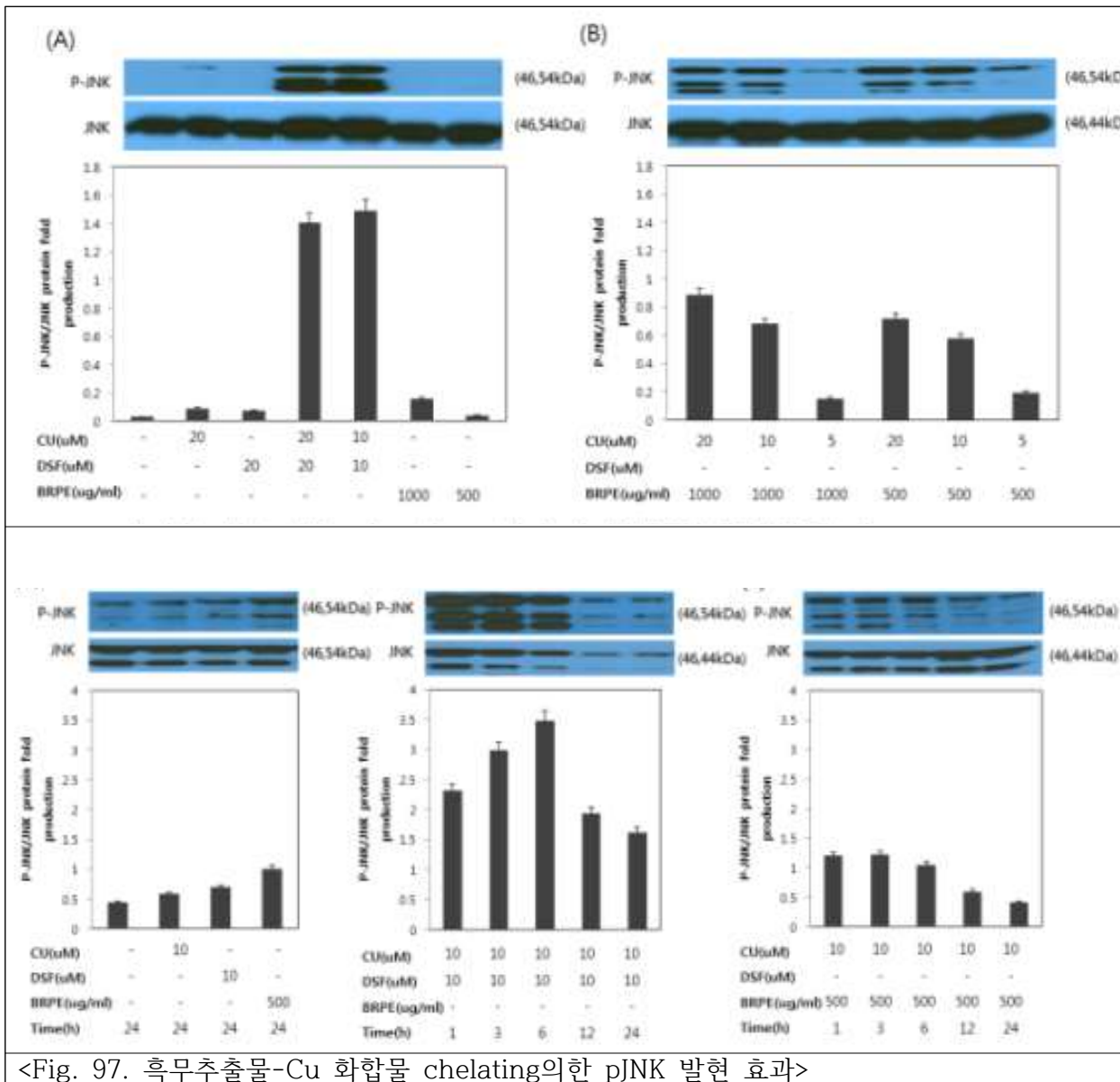
<Fig. 95. 흑무추출물-Cu 화합물 chelating의한 p65 발현 효과>

○ Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달에는 ERK(extracellular signal-regulated kinase), JNK(c-JUN N-terminal kinase), p38 등이 포함되며 다양한 cytokine, growth factor, 세포자극 등에 의해서 활성화가 이루어진다. 특히 JNK와 p38 활성화는 cell stress response, growth arrest, cell apoptosis을 유도하는 것으로 알려져있다. ERK(p44/42) 활성화는 phospho-ERK항체를 이용하여 immunoblot 수행하였다. control보다 Cu, DSF, BRPE 그리고 혼합처리구 모두에서 phospho-ERK(p42/44)가 활성화되었다. 특히 Cu-DSF 혼합처리구에서는 강력한 인산화가 유도되었다. 그리고 Cu-BRPE(혼합처리구에서의 phospho-ERK활성은 Cu dose dependent하게 활성이 보였다. 따라서 Cu-DSF 킬레이팅 형성이 phospho-ERK을 강력하게 유도하는 것으로 보이는 것처럼 검정무 비건조 peel 주정추출물과 Cu 킬레이팅으로 인하여 ERK(p42/44)활성을 유도하는 것으로 확인하였다(Fig. 96).



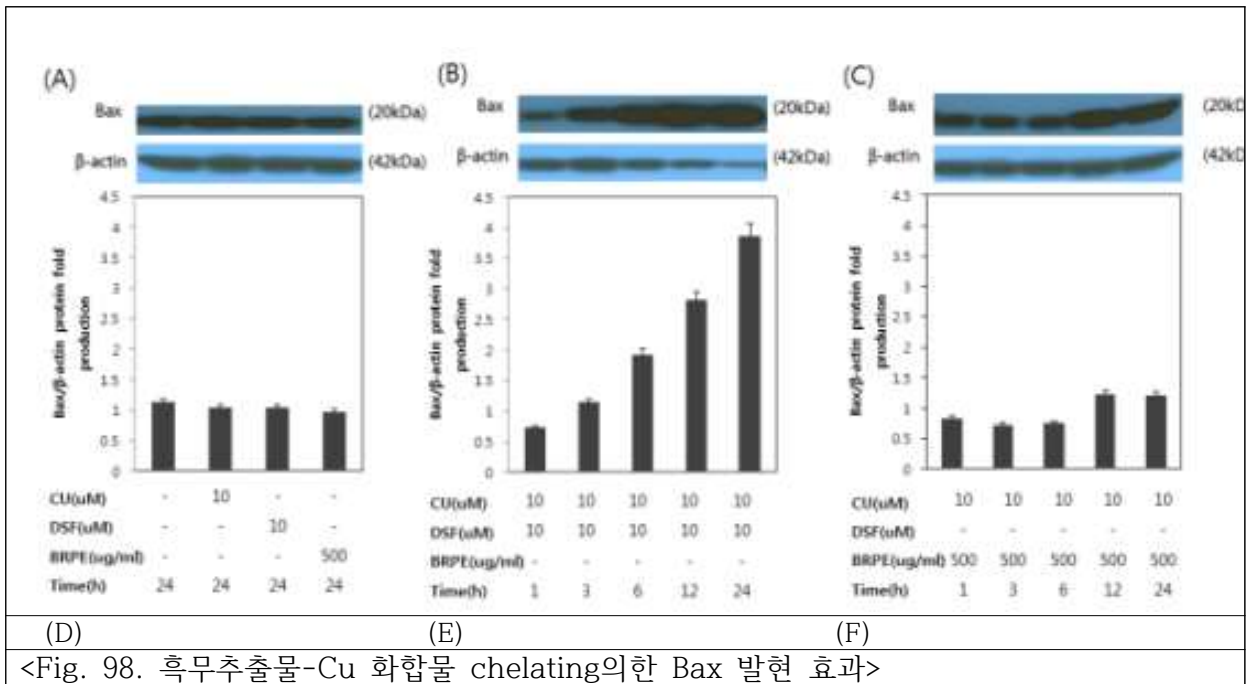
<Fig. 96. 흑무추출물-Cu 화합물 chelating의한 pERK 발현 효과>

○ Phospho-SAPK/JNK(Thr183/tyr185)항체를 이용하여 JNK 활성화를 분석하였다. control 를 포함한 단일처리구(Cu, DSF, BRPE)에서는 활성화가 관찰되지 않았다. 그러나 혼합처리구 (Cu-DSF, Cu-BRPE)에서는 강력하게 JNK활성이 유도되었다(Fig. 97). 이 결과는 Cu-DSF 킬레이팅으로 인하여 JNK인산화가 유도결과는 Liu et al(2012)이 Glioblastma 세포에서 MAPK pathway 연구결과와 일치였다. 그리고 또 다른 연구팀인 Cheriyan et al(2014)이 Malignant pleural mesothelioma(MPM)에서 Cu-DSF 킬레이팅 연구에서도 종양세포 성장 억제와 더불어 phospho-JNK가 강하게 발현되어 proapoptosis를 유도하였다. 따라서 강한 JNK인산화는 검정무peel 추출물과-Cu 복합체형성으로 ROS 생성에 기인된 것으로 사료된다.



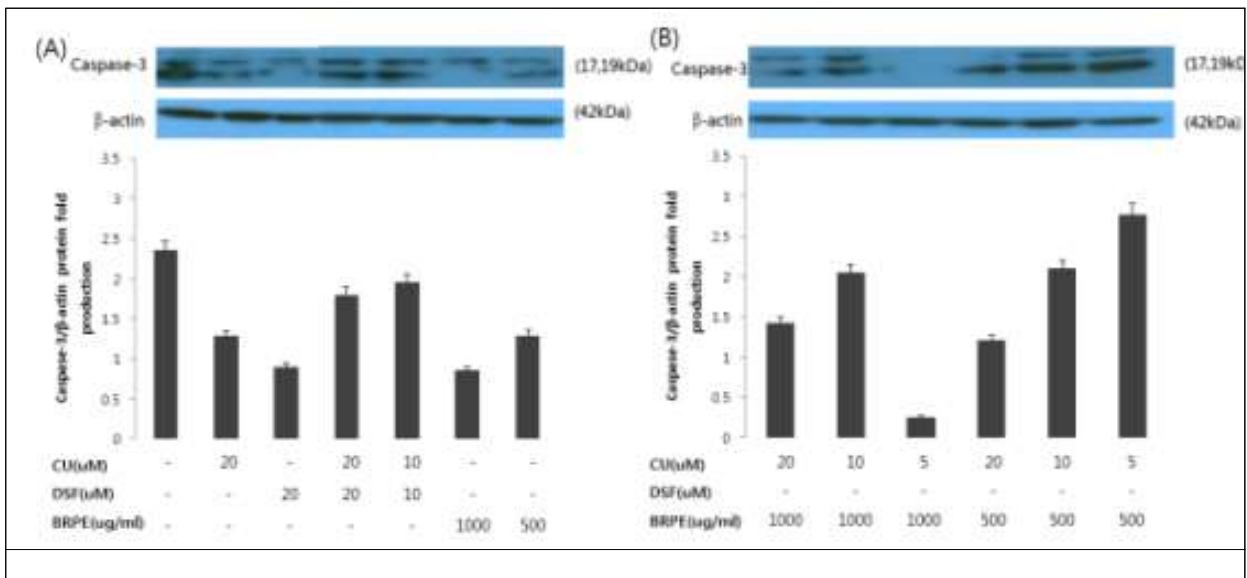
<Fig. 97. 흑무추출물-Cu 화합물 chelating의한 pJNK 발현 효과>

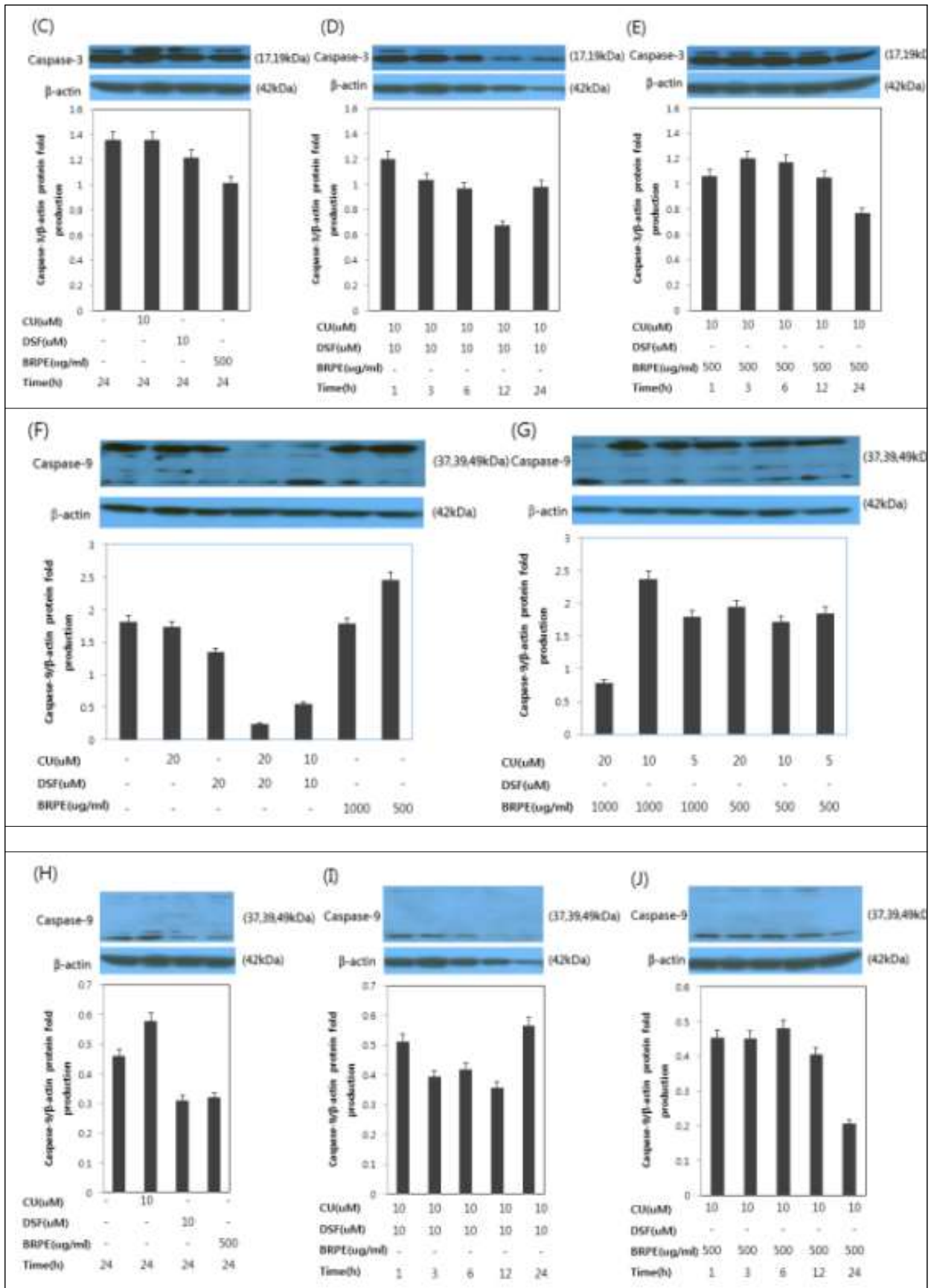
○ 세포사멸(cell apoptosis) 기작에서 Bax는 Bcl-2 family속하는 세포질성 단백질로서 미토콘 트리아의 pro-apoptosis 과정에서 미토콘트리아 막에 구멍을 형성하여 cytochrome c와 다 른 apoptosis factor를 방출을 촉진 시켜 세포사멸을 유도 한다. Bax 발현은 control과 24 시간 단일처리구(Cu, DSF, 101)에서는 변화가 없으나, 복합처리구(Cu-DSF, Cu-101)에서는 현저하게 time dependent하게 발현 되었다(Fig.98). Papadakis et al(FEBS letter, 2006) 에서 JNK(c-jun N-terminal protein apoptosis)활성에 의해서 pro-apoptosis 시그널인 Bax 단백질이 활성화되어 cell apoptosis가 유도된다고 보고하였다.



<Fig. 98. 흑무추출물-Cu 화합물 chelating의한 Bax 발현 효과>

○ Caspase-9(inator) 단백질은 Bax에의해 미토콘트리아에서 방출된 cytochrome c에의해서 활성화 되어 Caspases 3,6,7(effect)을 활성화 된다. pro-caspase-9 역시 control을 포함한 단일처리구(Cu, DSF, 101)에서는 변화가 없으나 혼합처리구에서는 현저하게 감소 되었다. 따라서 cu-DSF와 Cu-검정무peel 추출물 chelating에 의해서 phospho-JNK, phospho-ERK, Bax 가 활성화 되어 pro-caspase-9을 cleaved form으로 바뀌게 되면서 감소한 것으로 확인 되었다(Fig. 99).

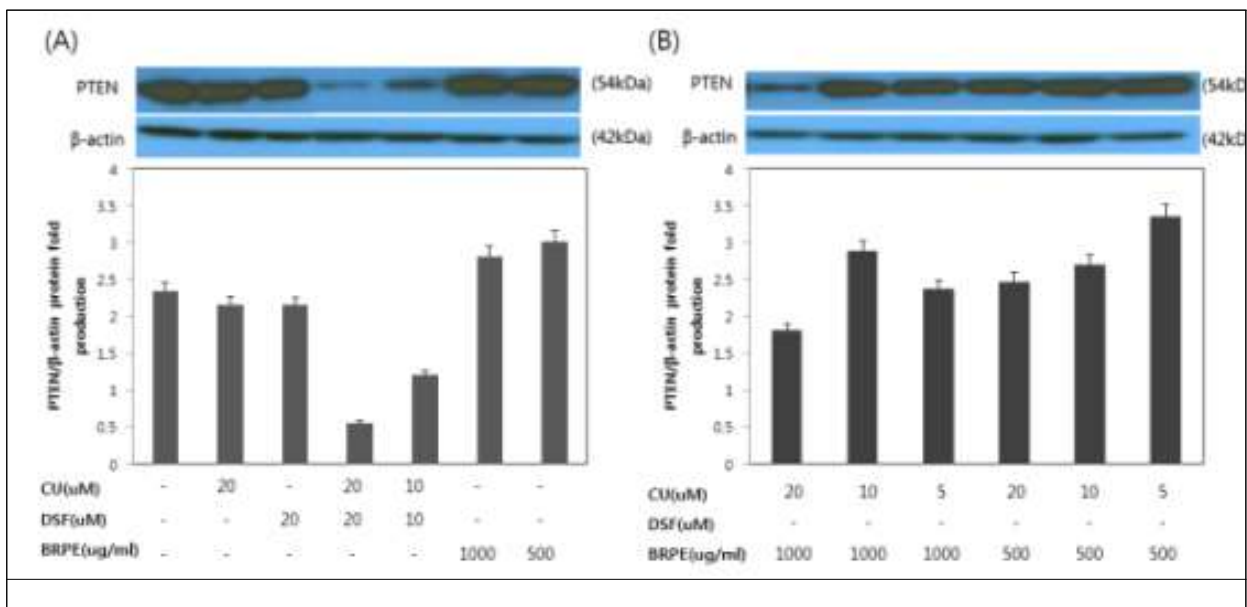


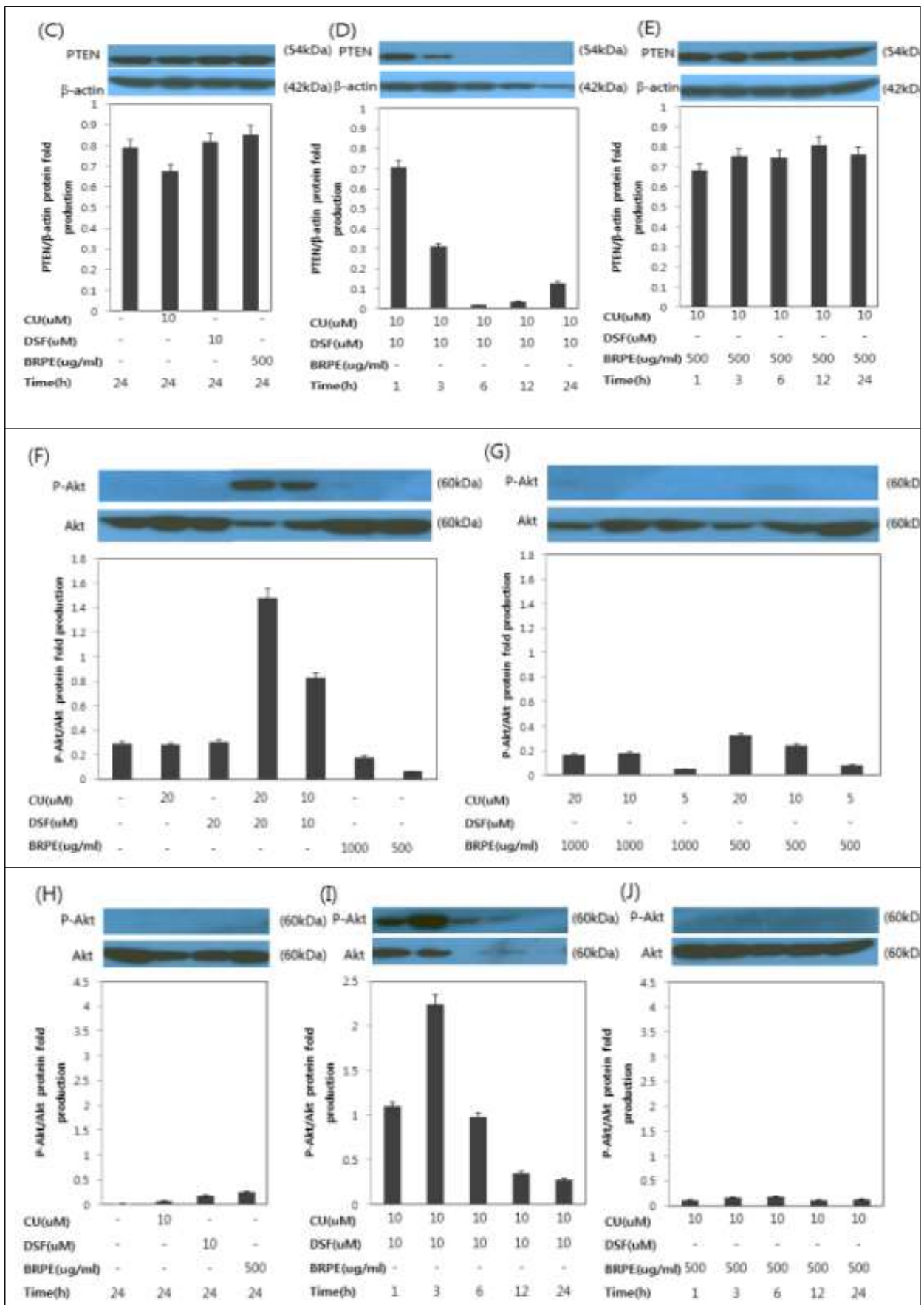


<Fig. 99. 흑무추출물-Cu 화합물 chelating의한 caspaease-3, -9 발현 효과>

(8) Akt 와 PTEN 발현 분석

- PTEN(phosphatase and tensin homologue)의 주요기능은 Pi-3 Kinase 활성화하는 인지질3인산(phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate)을 탈인산화 시켜 PDK와 Akt활성을 조절하여 세포의 성장과 생존, 분화, 암세포 억제 등을 수행한다. 따라서 PTEN 활성화는 Akt활성을 억제하여 세포성장에 많은 장애를 가져온다. 그리고 AKT(PKB kinase)는 anti-apoptosis에 직간접으로 관여하는 단백질로서 BAD, Bcl-XL, Bim, caspase-9, MDM2등을 인산화시켜 cell apoptosis를 억제 시킨다. 이외에도 glucose대사, insulin대사, 세포증식, 염증조절, cell cycle조절, angiogenesis, cell survival 등에 관여하는 단백질을 조절하는 것으로 보고되었다. 실질적으로 많은 암세포 주 또는 암조직에서 AKT는 과발현되어 있거나 constitutively하게 활성화 되어 있다. 유방암 세포주에서는 Her2 overexpression으로 PI3K/AKT가 활성화되어 있으나 PTEN유전자 발현의 거의일어나지 않는다(Fig. 100)
- PTEN발현은 control을 포함한 단일처리구(Cu, DSF, 101)에서는 변화가 없으나 혼합처리구에서는 현저하게 감소 되었다. 특히 Cu-DSF 혼합처리구에서는 매우 강력하게 억제하고 있어서 PI3K/AKT 의존성 악성종양, cancer, tumor에 치료제로 사용할수 있다고 사료된다. 또한 Cu-검정무peel 추출물 chelating에서도 고농도에서 억제양상을 보였다(Fig.100). 그리고 AKT 발현및 phospho-AKT 분석에서도 복합처리구에서 현저하게 발현이 억제됨을 관찰할수 있었다. 그러나 phospho-Akt는 Cu-DSF 혼합처리구에서만 유일하게 관찰 되었다. 따라서 Cu-DSF복합체가 PTEN을 강력하게 억제함으로써 PI3K/AKT Pathway가 활성화 된 것으로 사료된다.





<Fig.100. 흑무추출물-Cu 화합물 chelating의한 PTEN, pAktp 발현 효과>

(9) ALDH2 발현 분석

Cancer stem cells(CSC)에서 다양한 chemotherapeutic 연구가 이루어지고 있으나 세포내 미세소관(microtubule)저항성 인하여 암치료에 걸림돌로 작용하고 있다. 최근 이런 내성기작을 갖는 원인이 P-glycoprotein(P-gp)이 과잉발현인 것으로 밝혀졌다. 그리고 CSC가 약물내성은 ALDH의 높은 발현 수준에 기인된 것으로 보고되었다. ALDH 활성은 다양한 암세포 유형에서 CSC이 표지인자임을 보여주는 증거가 있다. 본 연구에서는 단일 호합물처리구에서는 발현양상이 변화가 없으나 DSF-Cu복합처리구에서는 강력하게 발현을 억제하고 있으며, 검정무peel추출물-Cu 복합처리구에서는 농도와 시간별 모두 억제하는 경향을 보였다(Fig.101).

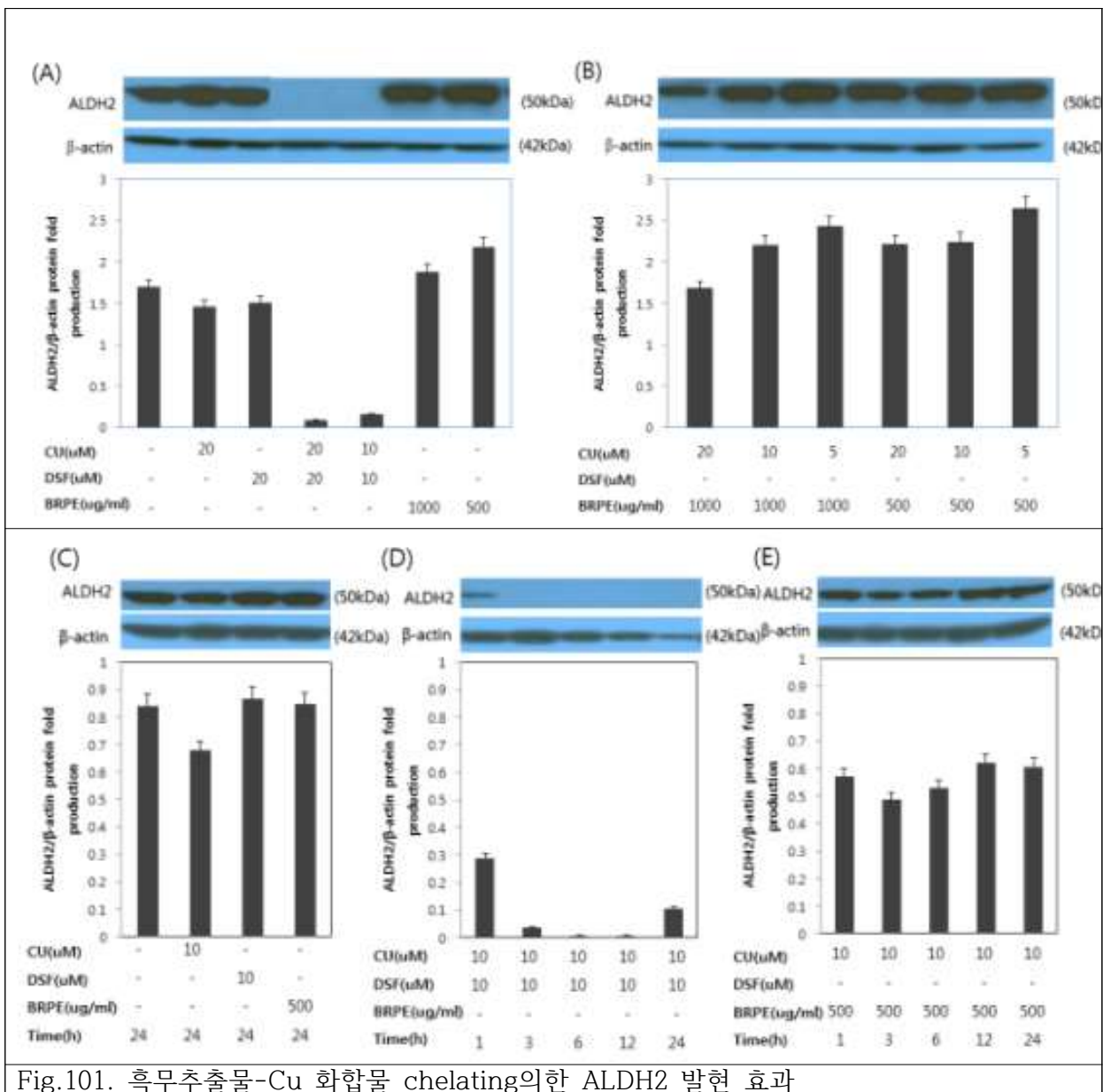


Fig.101. 흑무추출물-Cu 화합물 chelating의한 ALDH2 발현 효과

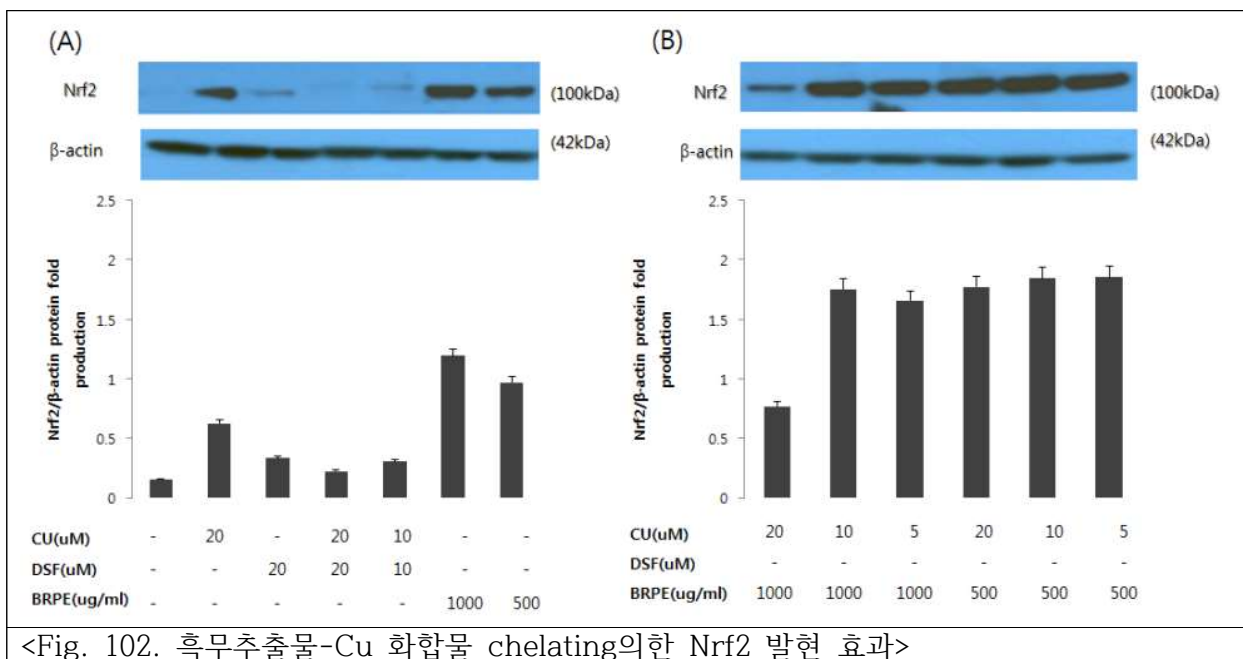
(10) Nrf2 발현 분석

Nrf2-ARE (Nrf2, nuclear factor-erythroid-2-related factor; ARE, antioxidant response element) 신호전달기작은 ROS(reactive oxygen species)과 RNS(reactive nitrogen species)의

과도한 생산을 포함하는 산화 스트레스에 대한 세포 손상을 피하기 위한 세포 생존 반응이다.

불활성상태 Nrf2는 세포질내에서 Nrf2-Keap1 복합체 형태로 존재한다. 그리고 Nrf2 활성화를 유도하는 Curcumin, resveratrol, 그리고 시스테인 티올 변형 화합물이 자극하면 Keap1으로부터 Nrf2의 해리되어 세포질에서 핵으로 이동하여 ARE프로모터 영역에 binding하여 다양한 해독 유전자 들을 활성화 시킨다. 대표적으로 알려진 유전자로는 NQO1, 글루타티온 S-transferase, thioredoxin, heme oxygenase-1 (HO-1)과 같은 항산화 효소가 있다. 최근에, Nrf2의 기능이 알려지면서 해독/항산화 효소의 발현을 가속화시키고 세포의 증식을 유도하는 다양한 인간 암세포에서 발견되었다.

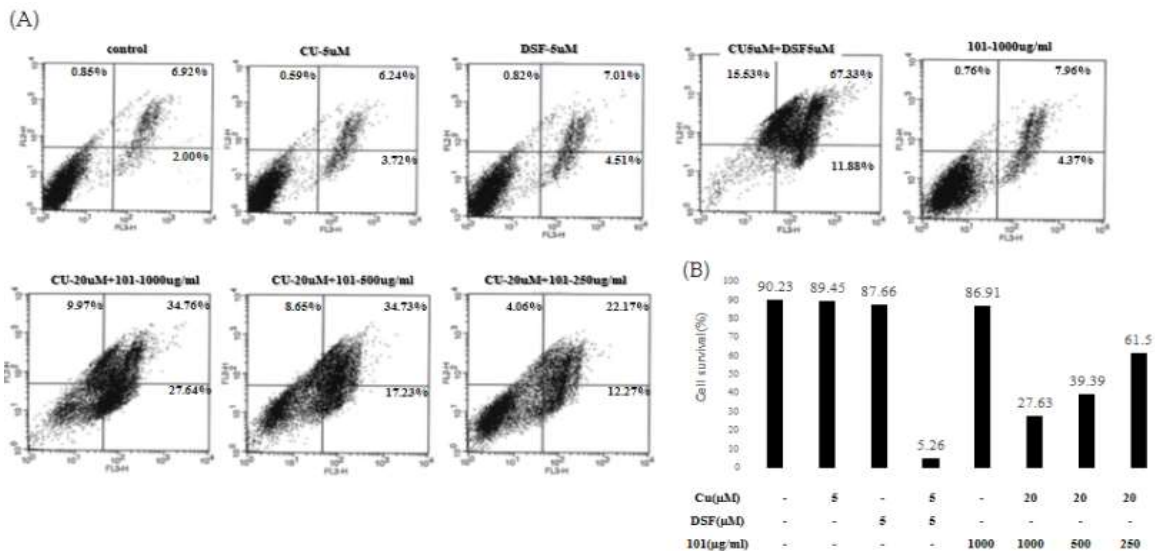
- 유망한 chemopreventive로 작용하는 천연화합물류로는 페놀 및 황 함유 화합물이다. 페놀 화합물은 항암 작용을 비롯한 여러 생물학적 활성에 잘 알려져있다. Nrf2/Keap1 신호 전달을 통한 2 단계 해독 및 항산화 방어 효소의 유도 pathway는 polyphenols의 암 화학 예방 효과에 대한 가장 중요한 분자 기작 중 하나로 인식되어왔다. Curcumin과 resveratrol은 여러 유형의 화학적 예방 특성을 지닌 천연 화합물로 광범위하게 연구되어왔다. 화학적으로 유도된 여러 동물 발암 모델에서 종양 발생의 억제는 녹차 폴리 페놀에 대해서도 입증되었다. Epigallocatechin-3-gallate와 epicatechin-3-gallate은 ARE 매개 루시퍼 라제 활성의 강력한 유도를 보이는 Nrf2 활성화제로 알려져 있다.
- 본 연구에서는 검정무peel 추출물을 농도별 처리후 분석한 결과 control과 DSF처리구에서는 Nrf2가 발현이 관찰되지 않았음. 그러나 Cu처리구에서는 control에 비교해 현저하게 발현되었다. 그리고 검정무peel추출물이 함유된 처리구에서는 단독 또는 복합처리구 모두에서 Nrf2는 현저하게 발현되었다(Fig. 102)



(11) 검정무 추출물-Cu chelating에 의한 RAW264.7 cells apoptosis 연구

- RAW264.7 cells을 DMEM 배지와 함께 12 well plate에서 24시간 배양하였다. 그리고 Cu, DSF, 검정무 추출물, 혼합처리를 통해 cell apoptosis를 16시간 동안 유도하였다. 그리고 세포를

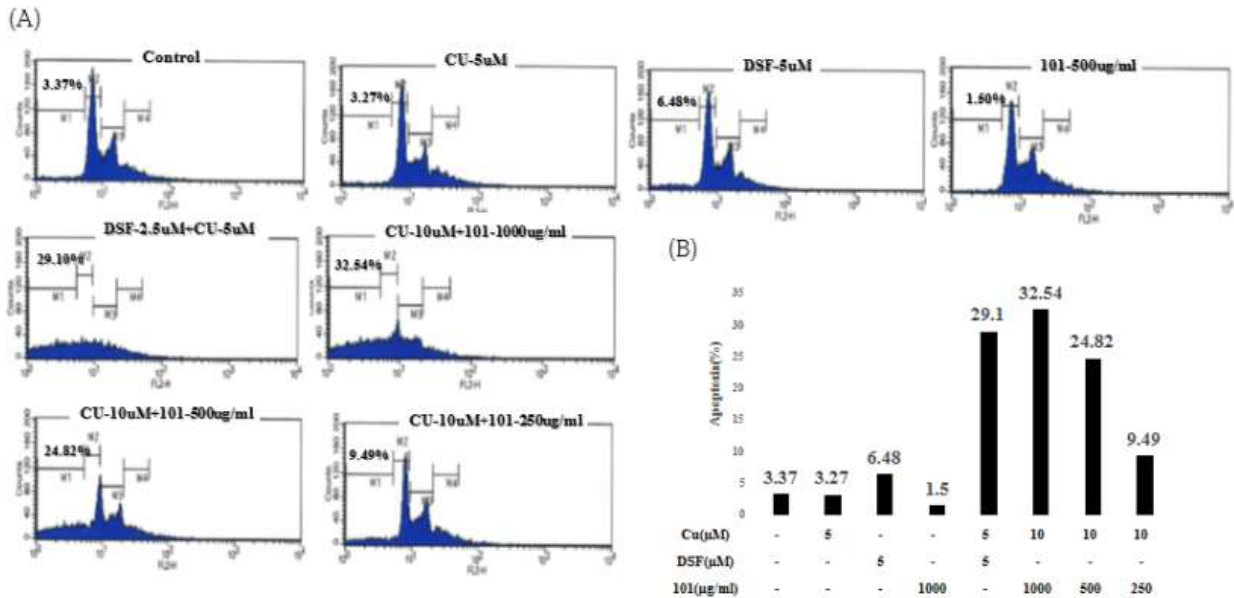
PBS로 2회 washing 후 PE Annexin V apoptosis detection kit(BD)을 이용하여 매뉴얼에 따라 염색하였다. 1X binding buffer 400 μ l를 추가한 후 FACS 분석을 실시하였다(Fig. 103). 단일화합물 또는 추출물에서는 double positive cells는 6~7% 정도 보였다. 그러나 DSF-Cu 혼합 처리구에서는 67% 정도로서 control의 10배 정도 세포사멸이 일어났다. 그리고 검정무 추출물-Cu혼합 처리구 1000-20, 500-20, 250-20(μ g/ml- μ M)에서 double positive cell population(7AAD-PE)은 34%, 34%, 22%로 나타났다. 그리고 PE positive에서는 27%, 17%, 12% cell population이 형성되었다(Fig. 103). 이 결과는 위 MTT 결과와 일치하여 검정무 추출물-구리 화합물 혼합처리는 강력한 항암효과를 갖는 결과라 할 수 있다.



<Fig. 103. Disulfiram-구리 및 검정무 추출물-구리화합물 처리에 RAW264.7 cell apoptosis 효과 FACS 분석 결과(A) 및 세포생존율(B)>

○ 검정무 추출물-Cu chelating에 의한 RAW264.7 cells cycle 연구

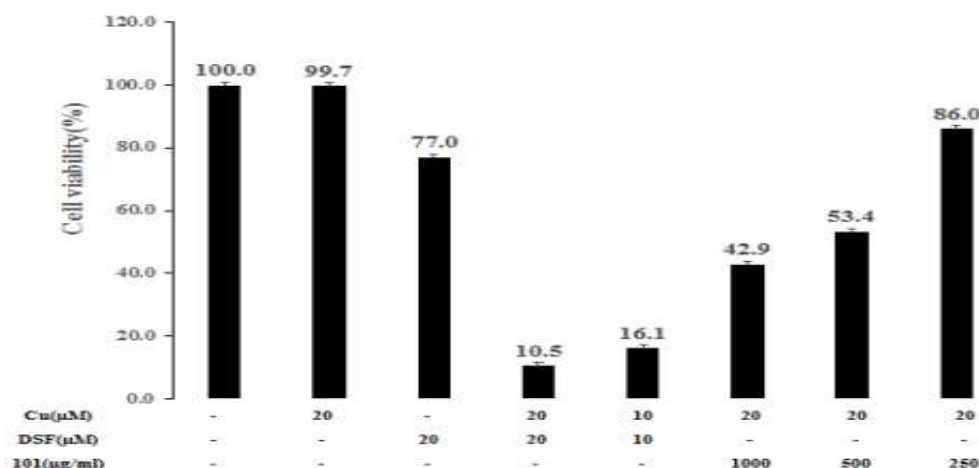
- Cell cycle 분석을 통해 검정무추출물-구리 화합물 혼합처리가 cell apoptosis 효과를 분석하였다(Figure 104). cell cycle 분석은 다양한 농도 Disulfiram, 구리화합물, 검정무추출물들을 단일 또는 혼합 처리 후 16시간동안 배양하였다. 그리고 차가운 70% EtOH을 이용하여 세포를 고정시켰다. over night 후 PBS로 2회 세척하고 RNase(20 μ g/ml), PI(50 μ g/ml)을 각각 처리하여 FACS caliver에서 cell cycle을 분석하였다(Fig 104). 그 결과 subG1(apoptosis cells), G0/G1, S, G2/M로 구분되었다. Disulfiram-구리(5 μ M)처리에서 29%, 검정무 추출물-구리화합물 1000-10, 500-10, 250-10(μ g/ml- μ M) 처리에서 각각 32%, 24%, 8% 세포 apoptosis가 되었다(Fig. 104). PE-Annexin V apoptosis detection, cell cycle analysis, MTT assay 기법으로 분석한 결과 모두 일치하는 결과를 보여줌으로서, 검정무추출물-구리화합물 혼합처리에 의한 chelating은 강력한 항암제 및 암 예방식품으로 사용이 가능하다고 할 수 있다.



<Fig. 104. Disulfiram-구리 및 검정무 추출물-구리화합물 처리구에서 의한 cell cycle 분석 FACS 분석 결과(A) 및 cell apoptosis 세포사멸율(B)>

○ 검정무 추출물-Cu chelating에 의한 MDA-MB-231 cells viability 연구

- 검정무 추출물-구리(Cu)화합물의 혼합체가 유방암세포 사멸정도를 확인하기 위하여 MTT분석을 실시하였다. Fig. 105에서 보는 것처럼, 양성대조구로 Disulfiram(20μM)-Cu(20μM), (10 μM)-Cu(10μM) 혼합처리구에서 각각 90%, 83.9% cells들이 사멸되었다. 그리고 검정무추출물 -구리혼합처리 1000-20, 500-20, 250-20(μg/ml-μM)에서는 57.9%, 46.6%, 14%세포가 사멸되었다. 이 결과는 검정무 추출물-구리 혼합물은 상호 chelating에 의하여 MDA-MB231 cells(유방암 세포)를 강력하게 사멸시킨다는 것을 알 수 있다(Fig. 105).

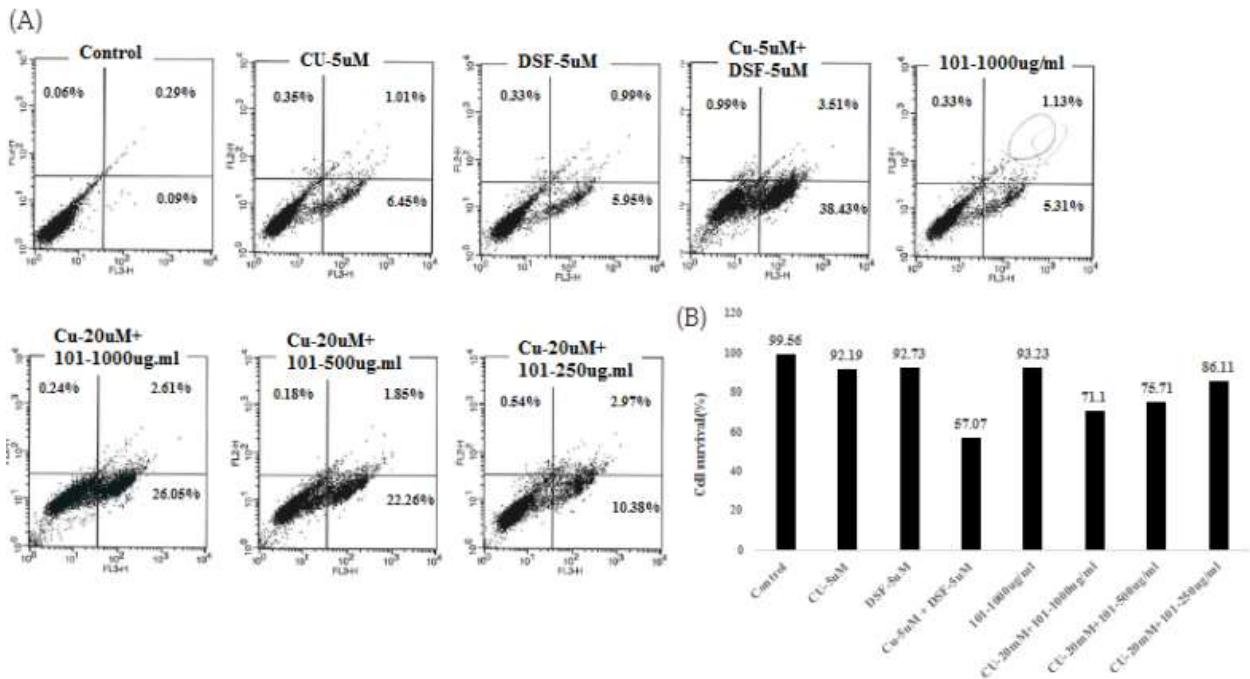


<Fig. 105. 검정무 추출물-Cu chelating에 의한 MDA-MB-231 cells viability 효과>

○ 검정무 추출물-Cu chelating에 의한 MDA-MB-231 cells apoptosis 연구

- 유방암세포주인 MDA-MB231 cells을 DMEM 배지와 함께 12 well plate에서 24 시간 배양하였다. Cu, DSF, 검정무 추출물, 혼합처리를 통해 cell apoptosis를 16 시간 동안 유도하였다. 그리고 세포를 PBS로 2회 washing 후 PE Annexin V apoptosis detection kit(BD)을 이용하여

매뉴얼에 따라 염색하였다. 1X binding buffer 400 μ l를 추가한 후 FACS 분석을 실시하였다(Fig. 106). 단일화합물 또는 추출물에서는 double positive cells population 6~7% 정도 보였다. 그러나 DSF-Cu혼합 처리구에서는 41.9% 정도로서 단일화합물 처리의 6배 정도 세포사멸이 일어났다. 그리고 검정무 추출물-Cu혼합 처리구 1000-20, 500-20, 250-20(μ g/ml- μ M)에서 double positive cell population과 PE positive population은 각각 26.4%, 23.8%, 17% 정도 apoptosis가 일어났다. 이 결과는 위 MTT결과와 일치하여 검정무 추출물-구리 화합물에 의한 chelating으로 monocyte와 유방암세포에서 강력한 항암효과를 보였다.



<Fig. 106. Disulfiram-구리(Cu) 및 검정무 추출물-구리(Cu) chelating 의한 MDA-MB-231 cells apoptosis 효과, FACS 분석 결과(A) 및 세포 생존율(B)>

○ Allenswrth *et al*(2015)보고에 의하면 Disulfiram-Cu chelating은 Reactive oxygen species(ROS)을 증가시키면서 JNK-BAX-Caspase3, 9 pathway을 통해서 cell apoptosis가 이루어진다고 보고되었다. 그리고 최근에는 NF-kB pathway, ALDH1, SOD1 효소, XIAP, eIF4G1 전사인자, MAPK pathway 등도 직간접적으로 조절한다. Fig.107에서 보는 바와 같이 DSF-Cu, 검정무 추출물(101)-Cu을 혼합 처리시 cell apoptosis가 증가되었다. 그리고 apoptosis 관련 단백질인 Bax, Caspase-3, 9 발현을 분석하였다(Fig. 107).

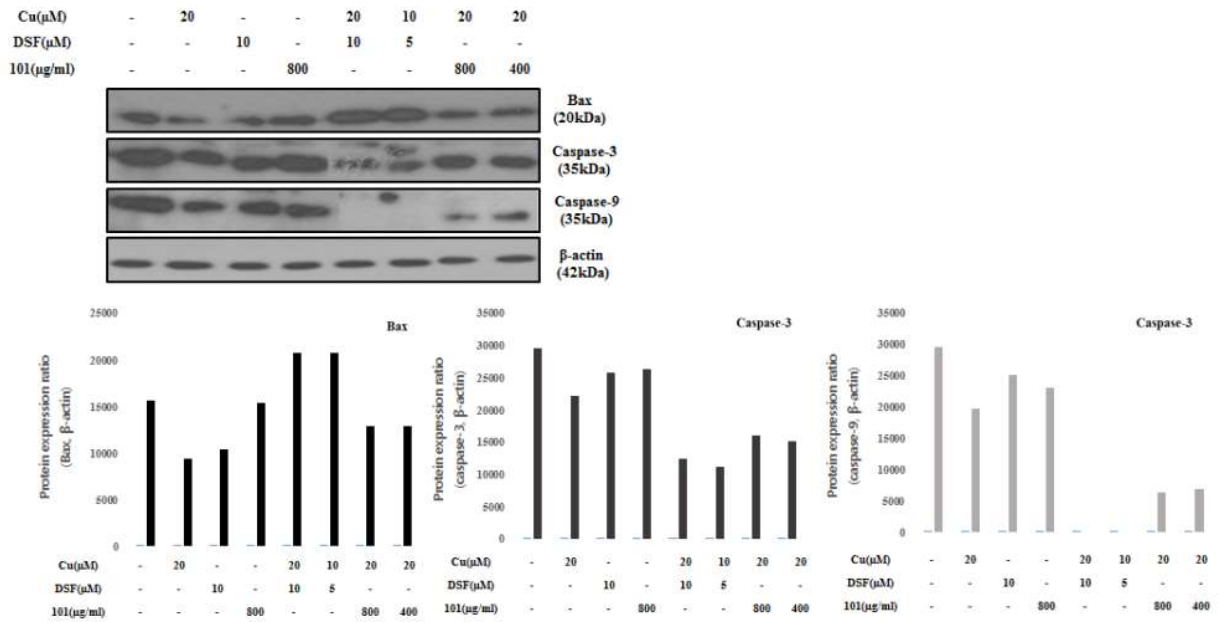
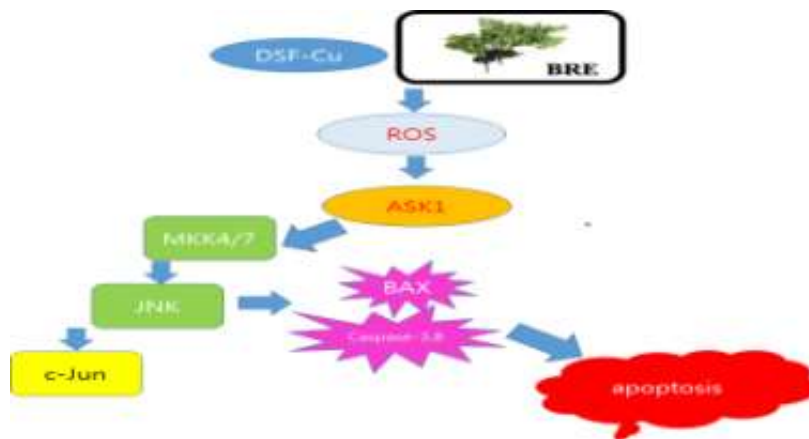


그림 107. Disulfiram-구리 및 검정무 추출물-구리화합물 처리에 의한 MDA-MB-231 cells apoptosis 관련 단백질 발현

- 본 연구 결과 단일화합물, 천연물 처리 시 Bax, Caspase-3, 8 발현은 변화가 없었으나, 혼합처리인 DSF-Cu 처리구에서는 Bax 단백질이 급격히 증가하였다. 그러나 검정무 추출물-Cu 처리구는 변화가 없었다. 그리고 Caspase8 발현은 DSF-Cu 처리구, 검정무 추출물-Cu 처리구 모두 활성화 form으로 변화된 결과를 얻었다.



<Fig. 108. DSF-Cu처리구 및 검정무 추출물-Cu chelating에 의한 cell apoptosis 기작>

위 결과들을 종합하면, 검정무 추출물-Cu 혼합처리는 염증세포와 지방암세포를 강력하게 세포사멸을 유도함으로써 항암제로 개발 가능성이 매우 높다(Fig. 108). 그리고 위 결과는 건강기능식품 개발에도 기초자료로 활용될 수 있다고 사료된다.

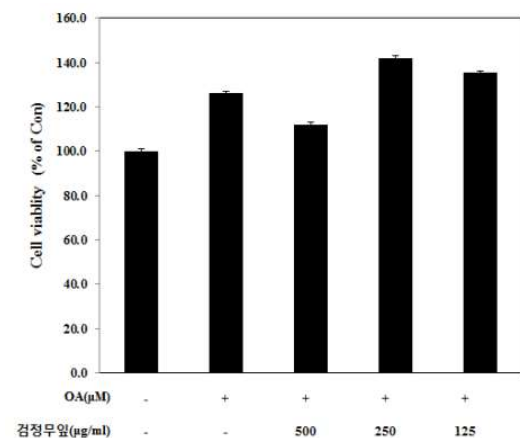
10) 흑무잎(Black radish leaf)에서 효능 연구

무(*Raphanus sativus*)는 항균 활성, 항암제, 항 당뇨병, 위장 및 자간 조절제, 항 궤양 및 심장 조절제, 간 보호 작용 등 연구가 활발히 진행되고 있다. Baek et al(2008)에 연구 결과에 따르면 뿌리 추출물이 파라세타몰 (paracetamol) 및 CCl₄에 의한 간세포 보호 효과를 보고 하였다. 그리고 본 과제 협동기관(제주대-화학·코스메틱스학과)에서도 검정무 잎에서 다양한 화합물 (kaempferitrin, afzelin, lolliolide, coumaric acid, ethy caffeate, fulgicidic acid 등)을 분리하였다.

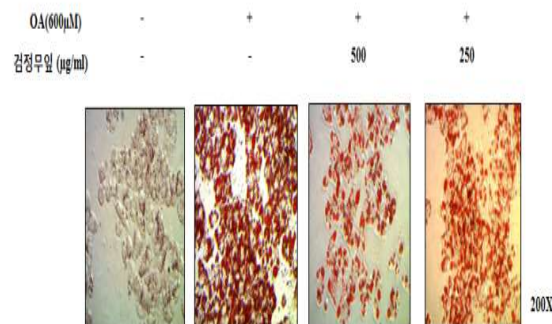
(1) 간세포(HepG2)에서 lipid 합성 억제효과

검정무 잎을 건조시킨 후 70% EtOH에 2일 동안 침출 시켰다. 그리고 filter 후 감압 농축 및 동결 건조하여 시료를 준비 하였다. 간세포를 steatosis 유도하기 전 cell viability를 수행하여 처리 농도를 결정하였다(Fig. 109. A). 그리고 24 well plate에 간세포를 seeding 후 24시간 동안 배양하였다. 다음날 DMEM배지로 교환하여 검정무 잎 추출물과 500 μ M OA(oleic acid)를 처리하였다. 그 결과 검정무 잎 추출물은 steatosis를 억제하였다(Fig. 109. B).

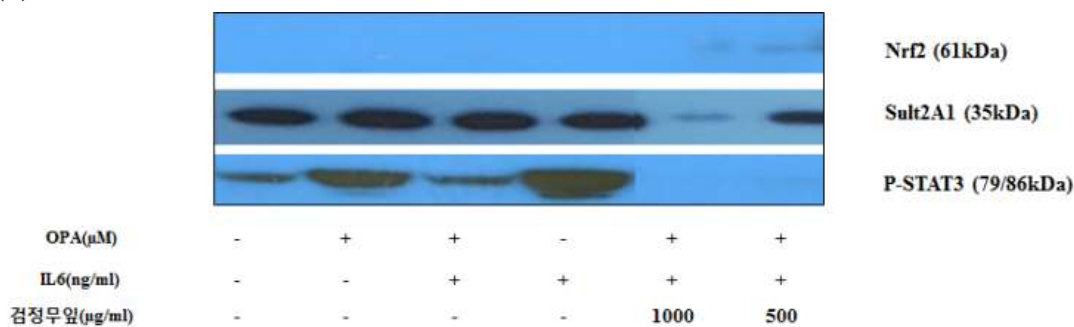
(A)



(B)



(C)



>Fig. 109. Effect of Black radish leaf on oleic acid-induced steatosis HepG2 cells.>

그리고 간세포로부터 500 μ M OPA(oleic acid-palmitate acid), IL6(10ng/ml)와 검정무 잎 추출물을 처리하여 Nrf2, Sult2A1, p-STAT3 활성화 및 발현을 western blot방법으로 분석하였

다. 그 결과 검정무잎 추출물은 Sult2A1발현과 p-STAT3 인산화를 강력하게 억제하였다(Fig. 109. C). 따라서 검정무잎은 염증성 인자를 억제함으로써 화장품 원료, 가공식품 원료로 충분한 가치가 있다고 사료된다.

(2) 검정무잎의 항염증 효과

염증억제효과를 분석하기 위하여 마우스 대식세포(RAW264.7 cell)를 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Altas, USA)와 1% Penicillin&Streptomycin(P/S, 100U/ml, GIBCO Inc., USA)가 첨가된 DMEM 배지에 세포를 배양하였다. RAW264.7 cell 세포에 검정무 잎 추출물을 처리하여 cell viability를 분석하였다(Fig. 110. A). Griess시약과 sodium nitrite(NaNO₂) 표준곡선을 작성하여 NO 생성량을 산출하였다. 그 결과 검정무 처리구에서는 농도의존적으로 NO생성이 억제되었다(Fig. 110. B)

(A)

(B)

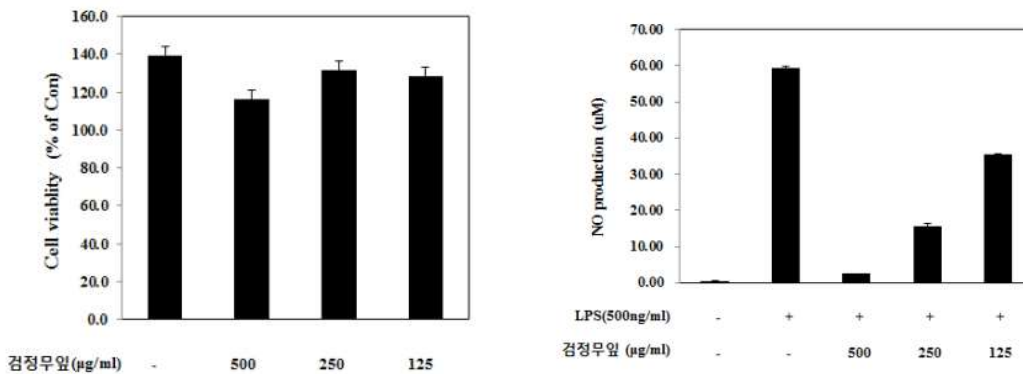
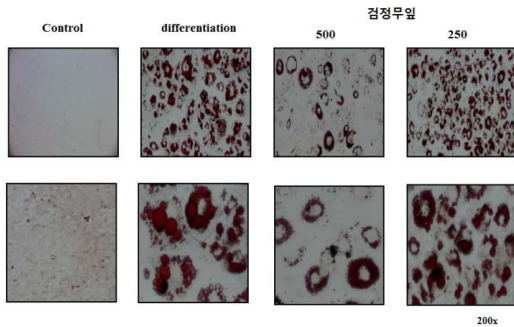


Fig. 110. Effect of Black radish leaf on LPS-induced RAW264.6 cells.

(3) 검정무잎 추출물의 지방세포 분화억제 효과

지방세포를 24well plate에 seeding 한 뒤, 4일 후부터 분화를 유도하였다. 분화유도물질 0.5mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) (Sigma-Aldrich, USA), 1µM Dexamethasone(Sigma-Aldrich, United States), 10µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, United States)(MDI)이 함유된 10% FBS(fetal bovine serum, GIBCO™, United States)DMEM 배지로 교환하여 2일 동안 분화유도를 촉진시켰다. 2일 후 기존 배지를 제거하여 10µg/ml Insulin이 함유된 10% FBS DMEM 배지로 교환하여 2일간 배양하였으며, 그 후 2일마다 10% FBS DMEM 배양액으로 교체하였다. 총 분화유도는 7일 동안 실시하였으며, 검정무잎 추출물을 농도별로 분화유도물질과 함께 처리하였다. 분화가 끝나면 Oli-Red-O 염색법으로 염색 후 위상차 현미경을 이용하여 세포상태를 관찰하였다. 그리고 lipid함량 분석은 Oil-red-O를 isopropanol에 녹인 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 검정무잎 추출물은 500µg/ml 처리구에서 현저하게 지방세포 분화를 억제하였다. 그리고 lipid함량 역시 감소하였다(Fig. 111. A, B)

(A)



(B)

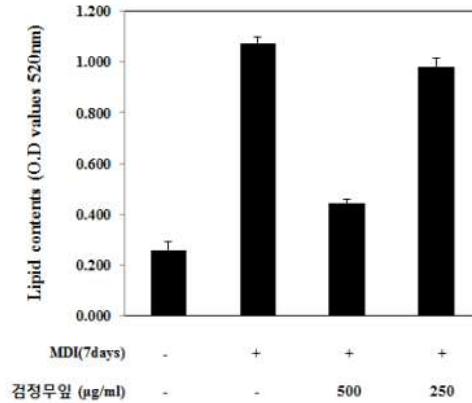


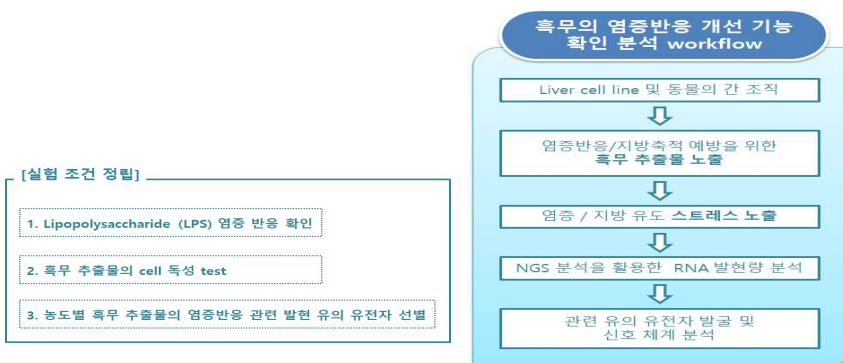
Fig. 111. Effect of Black radish leaf on MDI-induced 3T3-L1 cells.
(MDI: IBMX, Dexamethasone, Insulin)

11) NGS에의한 흑무 추출물 항염증 관련 유전자 발굴 연구

(1) RAW 264.7를 이용한 흑무 추출물의 염증관련 유전자 발현 연구

염증 반응 진행에 대한 흑무의 개선 효능을 판단하기 위해 대표적 면역 세포주 (RAW 264.7)를 이용하여 염증을 일으키는 조건을 확립한 후, 흑무의 효과를 관찰하였다.

흑무 효과 관찰을 위한 접근 방법은 염증반응 관련 유전자들의 발현량 변화라는 측면에서 시도했으며, 이를 위해 세포주 배양, 염증 유도 반응 확립, 흑무 추출물의 최고 농도 (독성) 확인의 기저 실험을 실시했다. 그리고 이 실험을 바탕으로 흑무 처리 등을 거친 각 그룹의 염증관련 유전자 발현량을 RNA sequencing을 통해 관찰하였다.



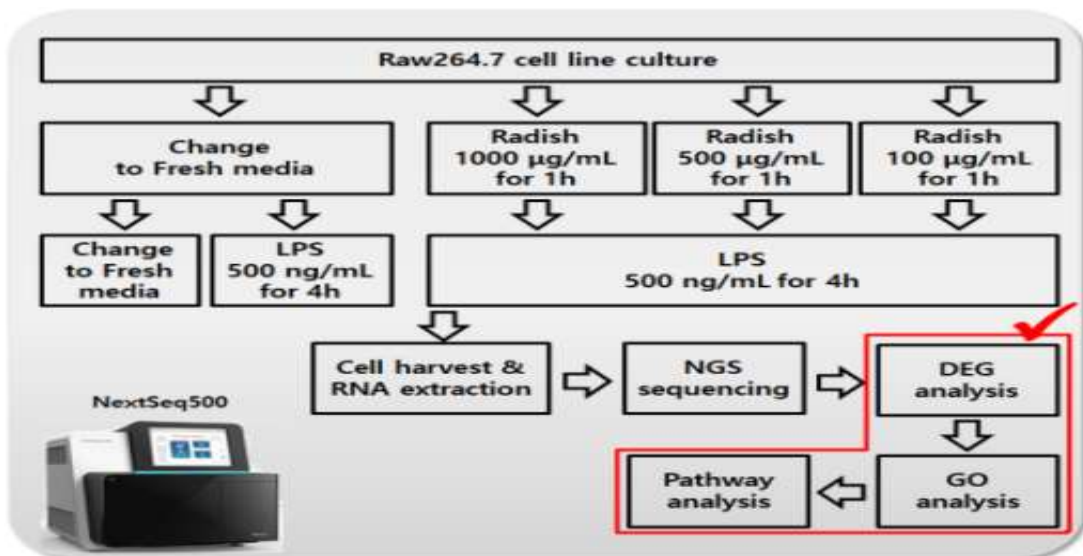
<Fig.112. 염증 반응 개선 기능 확인 실험 workflow>

○ 시료처리, total RNA 분리 및 RNA sequencing

- 샘플: RAW264.7 세포주의 대조군 및 처리군

- RAW264.7 세포주 (음성 대조군) 3개
- RAW264.7 세포주에 LPS 500ng/mL 4시간처리 3개
- RAW264.7 세포주에 흑무 추출물 1mg/mL 1시간 처리후 LPS 500ng/mL 4시간처리 3개
- RAW264.7 세포주에 흑무 추출물 0.5mg/mL 1시간 처리후 LPS 500ng/mL 4시간처리 3개
- RAW264.7 세포주에 흑무 추출물 0.1mg/mL 1시간 처리후 LPS 500ng/mL 4시간처리 3개

- 세포주로부터 total RNA 분리 및 quality 측정
 - Trizol을 사용하여 제조자 메뉴얼에 따라 세포주에서 RNA 분리
 - Agilent BioAnalyzer를 이용하여 RNA Nano chips (Agilent)을 통해 제조자 메뉴얼에 따라 분리된 RNA의 quality를 측정
- mRNA library 제작 및 Next Generation Sequencing
 - 분리된 RNA를 cDNA로 전화 후 sequencing을 위한 아래와 같이 library 제작
 - Illumina TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit이용
 - Illumina TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit에서 제공하는 Oligo dT magnetic bead를 이용하여 mRNA 추출
 - enzyme를 이용하여 mRNA를 sequencing에 적합한 길이로 cutting 함(200bp 내외).
 - mRNA를 이용하여 cDNA를 합성할 때, 1차 stranded는 actinomycin D에 의해 라벨링을 하고, 2차는 일반 시약을 이용하여 cDNA를 합성
 - cDNA가 합성된 mRNA의 3` end의 Adenylation 유도
 - 샘플별 index를 포함한 sequencing Adaptor를 double stranded cDNA 절편의 양쪽 말단에 결합시키는 반응 유도
 - Adaptor가 결합된 cDNA 절편을 adaptor 특이적 PCR primer set을 이용하여 증폭
 - 제작된 library는 Bioanalyzer를 통하여 QC 실시
 - 각 샘플의 Library는 각각 Q-PCR을 통해 4nM로 균일화 하여 NGS data 생성 시 특정 샘플의 data가 편향적으로 생성되는 것을 방지
 - NextSeq 500 sequencer(illumina)를 이용하여 mRNA sequencing 실시하였으며, 2x75cycle format으로 sequencing

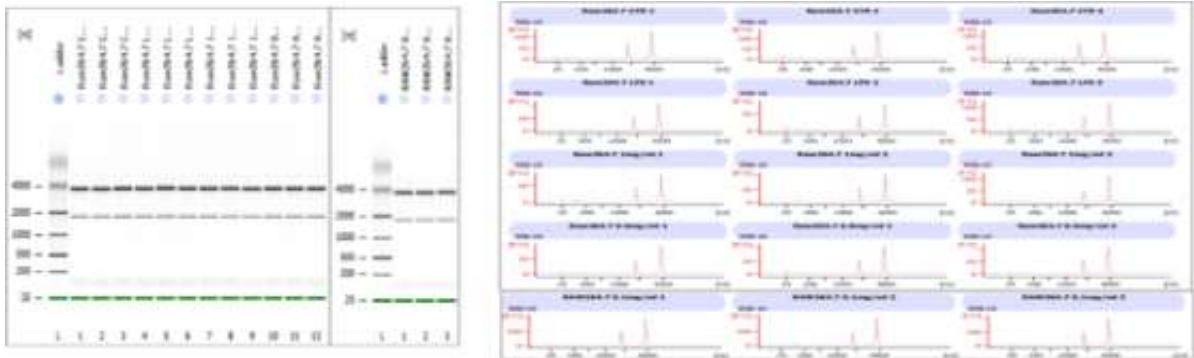


<Fig. 113. mRNA sequencing workflow>

(2) mRNA sequencing을 통한 염증 반응의 유도 및 무즙 처리에 의한 염증 반응 개선 기능 유전자의 발현량 변화 확인

- RAW264.7 세포주에서 분리한 RNA Quality check 결과

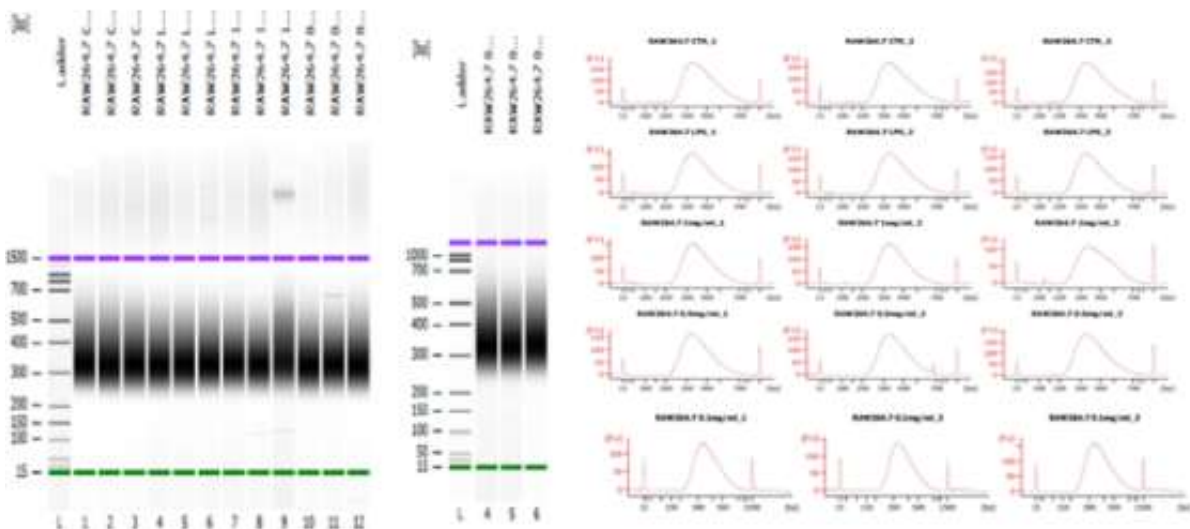
- RNA는 Trizol 방법을 이용하여 분리하였으며, mRNA sequencing을 하기 위하여 Agilent 사의 Bioanalyzer를 이용하였다.
- 18S rRNA band와 28S rRNA band의 integrity의 정보 (Fig.114)를 통해 분리된 total RNA의 상태가 매우 우수함을 확인하였다.



<Fig. 114. sample gel electrophoresis Image 및 electropherogram>

- mRNA library 제작 결과

- Illumina에서 제공하는 mRNA library prep kit을 이용하여 Illumina NextSeq500에 사용할 library를 제작하였다.
- library 제작 성공률을 확인하기 위해 BioAnalyzer (Agilent)를 사용하여 제작된 library의 양 및 분포를 관찰하고(Fig.115), 원하는 크기 및 분포를 보이는 library가 제작되었음을 확인하였다.



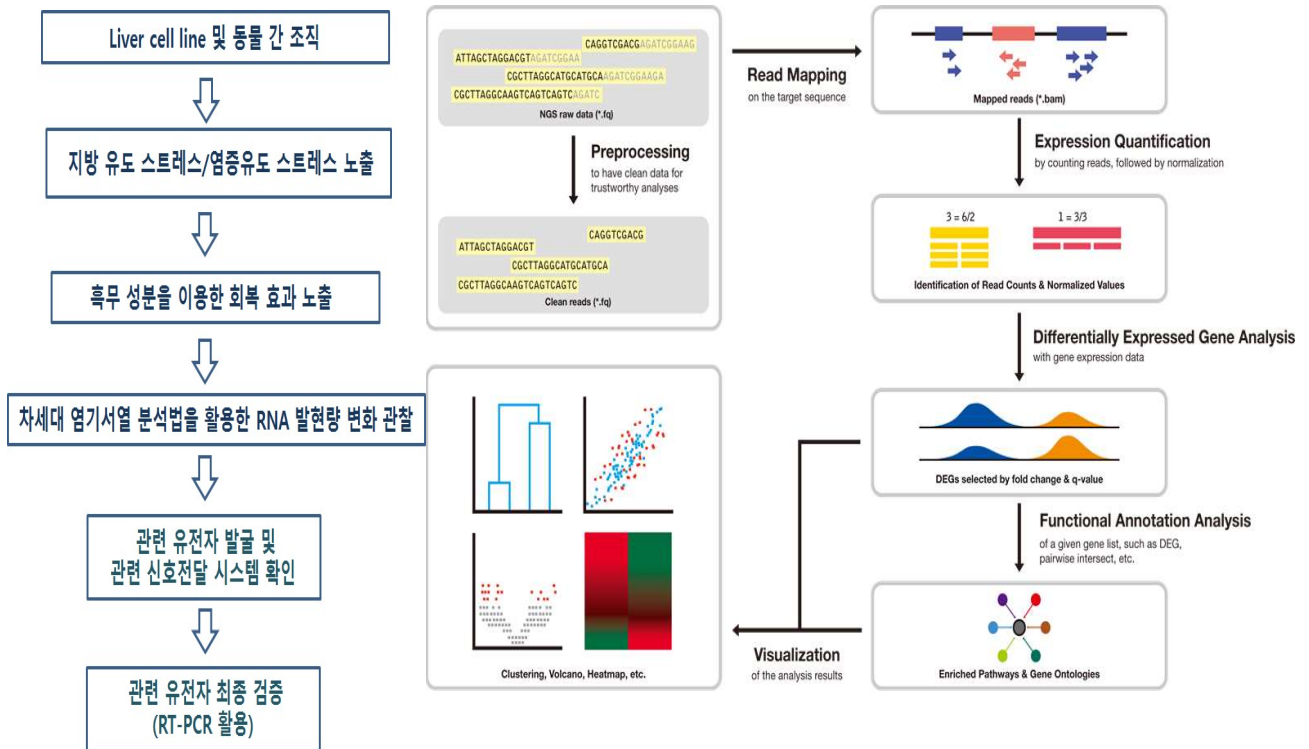
<Fig. 115. Library QC gel electrophoresis Image 및 electropherogram>

- Sequencing 결과

- 제작된 library를 이용하여 Illumina NextSeq500 76 paired-end read sequencing을 진행되었다.
- sequencing quality의 척도인 Q30 score가 모든 샘플에서 90% 이상으로 나타났다.
- 유전자 발현의 증가 및 감소를 관찰할 수 있는 충분한 read가 만들어졌음을 확인할 수 있었다; 모든 샘플에서 한쪽 방향 (single pair) sequencing 결과에서 2천만개 이상의 read수를 얻었으며, 양방향 (paired end) sequencing 결과를 합산하면 4천만개 이상의 read수를 확보할 수 있었다.

(3) 생물정보분석

sequencing 및 mapping 결과

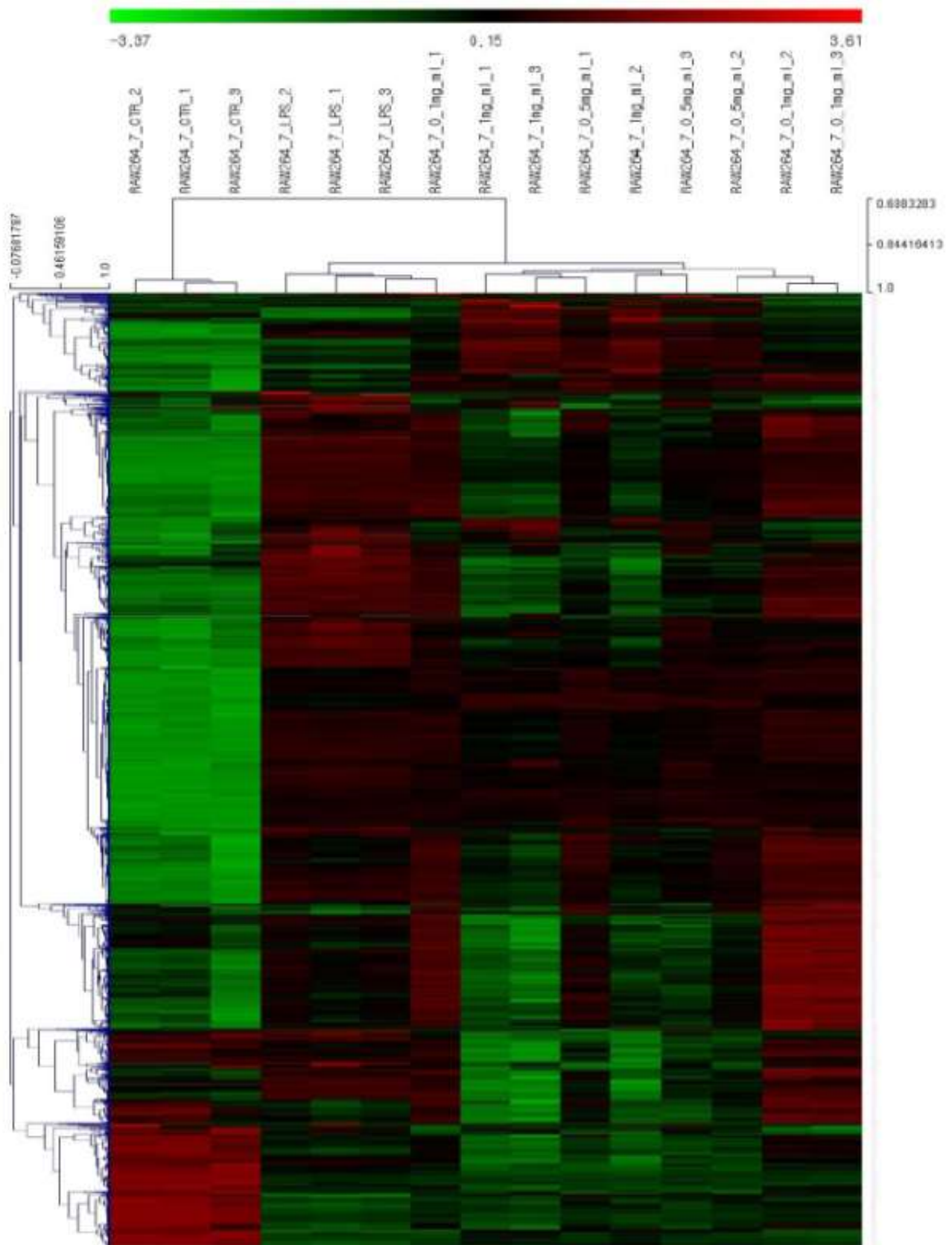


<Fig.116. 생물정보 분석 workflow>

NextSeq500 장비를 이용한 15sample의 대용량 염기서열 raw 데이터를 workflow에 따라 data preprocessing을 거쳐 mouse reference genome에 mapping하여 RNA 발현량 및 sample들의 sequence alignment 와 cluster를 확인하였다(Table 22, Fig. 117). control구와 LPS처리구 비교에서는 염증인자 관련 유전자 발현이 높게 나타났다. 그러나 흑무 추출물 100, 500, 1,000 ug/ml처리구에서는 농도의존적으로 염증 인자발현이 농도의존적으로 감소 하였다(Fig. 117).

<Table 22. sequence alignment result>

Sample	Num. of reads	Num. of trimmed reads	Trimmed/ Raw(%)	reads mapping		Aligned Pairs
				Mapped	rate	
RAW264_7_CTR_1	24,385,792	24,300,054	99.65	22,866,631	94.1	21,872,203
	24,385,792	24,300,054	99.65	22,343,715	91.9	
RAW264_7_CTR_2	25,466,891	25,318,874	99.42	23,826,668	94.1	22,703,892
	25,466,891	25,318,874	99.42	23,192,312	91.6	
RAW264_7_CTR_3	24,089,782	24,003,352	99.64	22,525,711	93.8	21,457,451
	24,089,782	24,003,352	99.64	21,966,689	91.5	
RAW264_7_LPS_1	24,589,870	24,520,185	99.72	23,328,803	95.1	22,363,759
	24,589,870	24,520,185	99.72	22,845,103	93.2	
RAW264_7_LPS_2	24,877,790	24,723,166	99.38	23,508,629	95.1	22,421,801
	24,877,790	24,723,166	99.38	22,897,250	92.6	
RAW264_7_LPS_3	26,460,570	26,334,251	99.52	25,012,525	95.0	23,887,824
	26,460,570	26,334,251	99.52	24,406,284	92.7	
RAW264_7_1mg_ml_1	23,147,160	23,005,491	99.39	21,811,841	94.8	20,803,270
	23,147,160	23,005,491	99.39	21,246,737	92.4	
RAW264_7_1mg_ml_2	24,746,168	24,653,925	99.63	23,348,991	94.7	22,376,006
	24,746,168	24,653,925	99.63	22,836,824	92.6	
RAW264_7_1mg_ml_3	25,674,027	24,641,884	95.98	23,250,039	94.4	20,958,861
	25,674,027	24,641,884	95.98	21,473,694	87.1	
RAW264_7_0_5mg_ml_1	25,427,554	25,240,546	99.26	23,994,074	95.1	22,864,371
	25,427,554	25,240,546	99.26	23,349,523	92.5	
RAW264_7_0_5mg_ml_2	24,881,364	24,763,319	99.53	23,451,585	94.7	22,254,818
	24,881,364	24,763,319	99.53	22,750,274	91.9	
RAW264_7_0_5mg_ml_3	24,216,575	24,085,420	99.46	22,905,812	95.1	21,879,922
	24,216,575	24,085,420	99.46	22,341,526	92.8	
RAW264_7_0_1mg_ml_1	23,654,160	23,507,047	99.38	22,321,617	95.0	21,284,840
	23,654,160	23,507,047	99.38	21,743,573	92.5	
RAW264_7_0_1mg_ml_2	25,388,646	25,224,298	99.35	24,004,416	95.2	22,913,162
	25,388,646	25,224,298	99.35	23,389,470	92.7	
RAW264_7_0_1mg_ml_3	23,425,674	23,266,555	99.32	22,107,769	95.0	21,043,922
	23,425,674	23,266,555	99.32	21,495,540	92.4	



<Fig. 117. Heatmap for clustering all samples with the 2000 most variable expression genes>

(4) NGS를 이용한 흑무추출물의 항염증 분석

- 염증 물질 (Lipopolysaccharide, LPS) 처리 여부 확인

본 연구 과제에 따라 염증물질(LPS)의 처리 여부 확인과 농도별 흑무추출물과 염증반응의 관련 유의 발현 유전자 후보군을 예측하고 그 유전자들의 신호 체계를 분석하고자 한다.



<Fig.118. 염증 물질 처리 여부확인을 위한 시료명>

Group 1	Group 2
RAW264.7 CTR 1	RAW264.7 LPS 1
RAW264.7 CTR 2	RAW264.7 LPS 2
RAW264.7 CTR 3	RAW264.7 LPS 3

총 26,665 개의 유전자중 2,585개의 유전자에서 염증 물질(Lipopolysaccharide, LPS)에 있어 유의한 유전자 발현을 보였으며 이중 1,137개의 유전자에서는 up-regulated 되었으며, 1,448개의 유전자에서는 down-regulated 되어졌다(|Fold-Change| ≥ 2 & Q-value ≤ 0.05). 따라서 염증 물질 처리를 하지 않은 집단과 염증 물질 처리를 한 집단 간에는 유의하게 다른 발현 양상을 가지는 것으로 확인되어진다(Fig. 118).

- 농도별 흑무 추출물 처리후 LPS 처리 : 농도별 유의 유전자 발현 양상 확인을 통한 흑무의 염증반응 관련 유의 유전자 발굴 및 신호 체계 분석

- 시료처리정보



<Table 23. 흑무 추출물 농도별 염증반응 관련 유의 유전자 발굴을 위한 시료명>

Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
RAW264.7 LPS 1	RAW264.7 1mg/ml 1	RAW264.7 0.5mg/ml 1	RAW264.7 0.1mg/ml 1
RAW264.7 LPS 2	RAW264.7 1mg/ml 2	RAW264.7 0.5mg/ml 2	RAW264.7 0.1mg/ml 2
RAW264.7 LPS 3	RAW264.7 1mg/ml 3	RAW264.7 0.5mg/ml 3	RAW264.7 0.1mg/ml 3

(5) 흑무의 염증반응 관련 후보 유의 유전자 발굴

흑무추출물을 RAW 264.7 세포주에 농도별로 1시간 처리하고 LPS 500ng/ml를 4시간 처리하여 흑무 농도별 염증물질 억제 관련 유의 유전자를 확인한 결과 총 26,665 개의 유전자중 991개의 발현 유의 유전자를 확인할 수 있었으며 모든 농도에서 유의하게 발현된 유전자는 32개이다. 그리고 LPS처리구와 흑무추출물처리구별 유의 유전수는 Table 24와 같다.

<Table 24. 흑무의 염증반응 관련 발현 유의 유전자 수>

비교 그룹		유의 유전자수
Group 2	Group 3	961
Group 2	Group 4	314
Group 2	Group 5	39

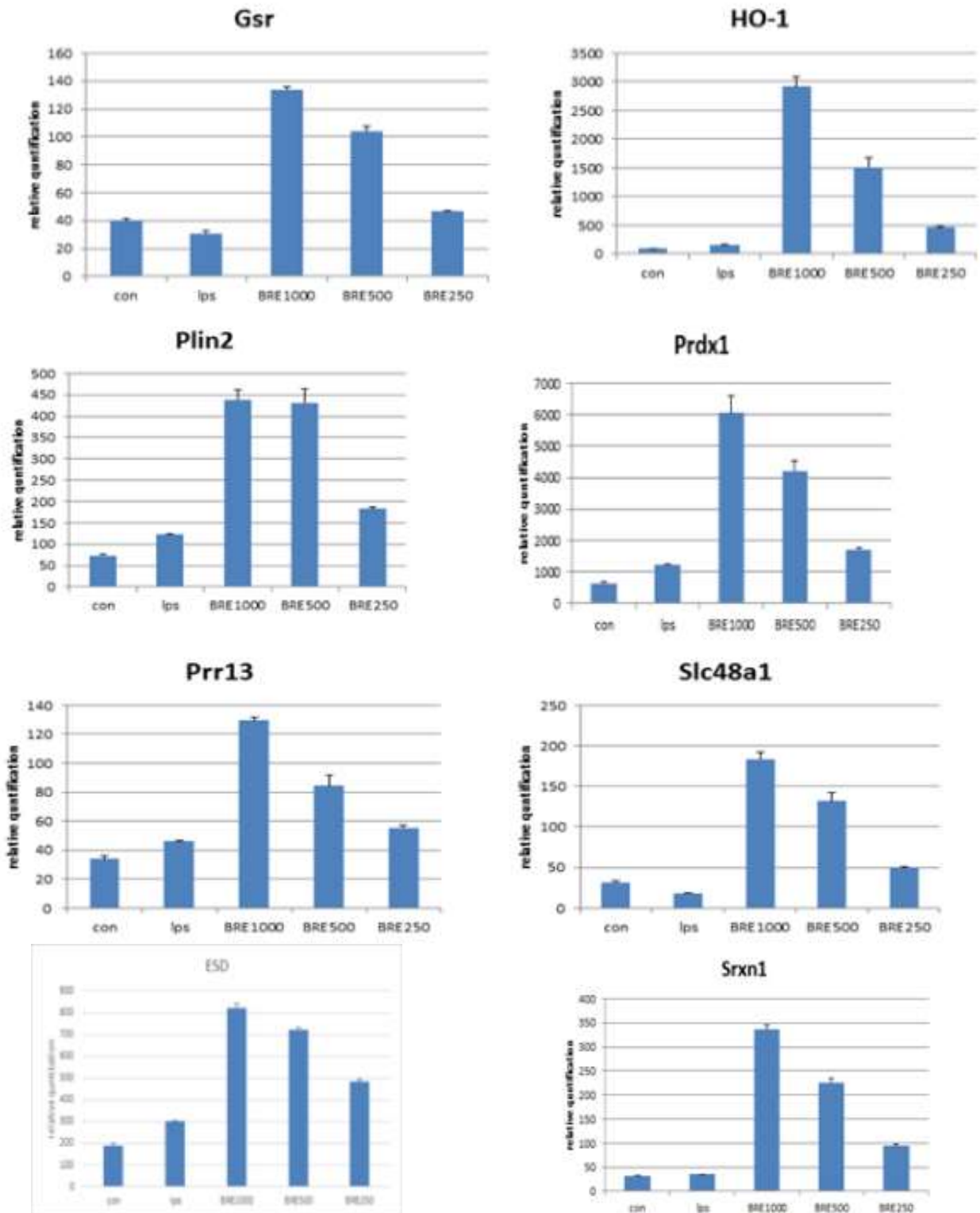
- Gene ontology 분석 및 KEGG pathway분석

농도별 흑무 추출물의 염증반응 관련 발현 유전자들에 대하여 유의하게 나타났던 유전자들을 대상으로 DAVID를 이용하여 biological process 및 molecular function에 대한 gene ontology 분석 진행하였다(Table 25).

Biological Process	p-value
Immune system process	2.27.E-25
cellular response to interferon-beta	1.35.E-21
innate immune response	6.86.E-17
inflammatory response	1.13.E-16
response to virus	2.98.E-16
Molecular Function	p-value
cytokine activity	8.15E-14
chemokine activity	8.31E-10
oxidoreductase activity	5.65E-08
tumor necrosis factor receptor binding	5.62E-06
GTPase activity	1.22E-05
KEGG pathway	p-value
Cytokine-cytokine receptor interaction	5.42.E-12
Steroid biosynthesis	5.78.E-09
TNF signaling pathway	1.66.E-08
Herpes simplex infection	1.61.E-06
Rheumatoid arthritis	2.48.E-06

<Table. 25. 농도별 흑무 추출물의 염증반응 관련 DEG 의 Gene Ontology>

(6) NGS 분석을 통한 대식세포(Raw264.7)에서 Nrf2 target 유전자 발굴

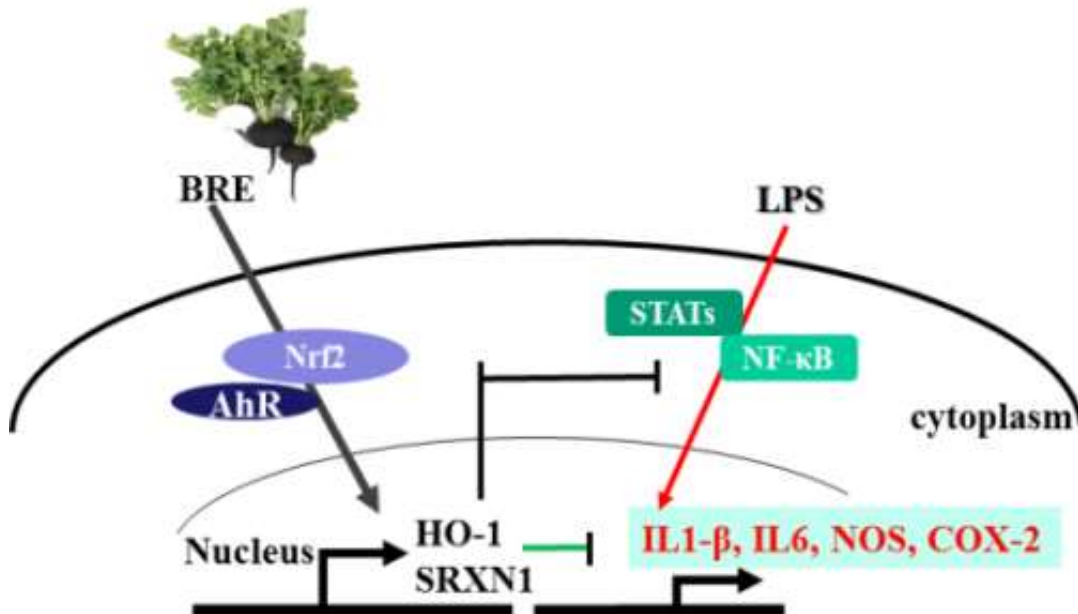


<Fig. 119. Effect of BRE on Abcc1, Blvrb, Cat, Cxcl3, Ft11, Gclm, Gsr, Ho-1, Plin2, Prdx1, Prr13, Slc48a1, Srxn1, and Esd mRNA expression in RAW264.7 cells.>

- 대식세포에서 흑무추출물에 의해 전사가 유도되는 유전자 14개 (Abcc1, Blvrb, Cat, Cxcl3, Ft11, Gclm, Gsr, Ho-1, Plin2, Prdx1, Prr13, Slc48a1, Srxn1, Esd)를 발견하였고, 그 결과(Fig. 119)에 나타내었다. 이중 7개(Blvrb, Cxcl3, Gsr, Plin2, Prr13, Slc48a1, Srxn1, Esd) 유전자가 신규로 발견한 Nrf2전사체로 사료된다. Blvrb는 flavin 환원효소(reductase)의 이성체(isoform)로서 산화스트레스에 작용한다. Cxcl3는 C-X-C motif chemokine 3 전구체 분자로서 chemokine 조절에 관여한다. Ft11(ferritin light chain 1)은 철 분자 수용체이고, Gsr은 glutathione 환원효소(reductase) 이다.

Prr13(proline-rich protein)은 전사 단계에서 TSP1(Thrombospondin 1)의 발현을 억제한다. Plin2(Perilipin-2)는 지방분화 관련 단백질이고, Slc48a1은 heme 운반체(transporter)이다. Srxn1은 sulfiredoxin이고 항산화 물질 대사에 관여한다. Esd는 s-formylglutathione 가수분해 효소(hydrolase)이다. 따라서 염증모델세포에서 무 추출물은 염증 스트레스를 억제하는 것은 물론 산화 스트레스까지 억제하는 기능을 한다고 볼 수 있다.

- 최근 Planson *et al*(2011)보고에 의하면 Srxn1(sulfiredoxin1)은 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 유도된 마우스 endotoxic shock모델에서 강력한 효능을 입증하였다. 그리고 Srxn1 유전자 발현은 Nrf2 전사인자에 의해서 유도된다는 보고도 이미 발표 되었다(kim et al. 2010). 따라서 흑무추출물을 250, 500, 1,000ug/ml을 처리하면 Srxn1 mRNA 발현은 각각 3배, 7배, 10배 증가 하였다(Fig.9). 이 결과는 흑무추출물의 Nrf2를 활성화를 유도하고, 핵으로 translocation 한후 Srxn1을 전사시키는 기작으로 설명된다. 다시 단백질로 변화된 Srxn1은 HO-1과 함께 LPS에 의해 발생되는 염증인자 NFkB, STAT1,3를 불활성화 시켜 염증성 사이토카인(IL1b, IL6, TNFa), 염증인자(PGE2, iNOS, COX-2)을 억제하는 것으로 사료된다(Fig.120).



<Fig. 120. Effect of BRE on HO-1, Srxn1 expression in RAW264.7 cells>

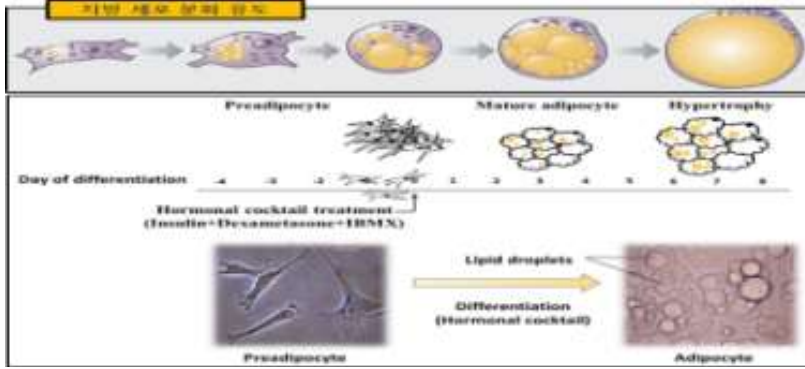
12) NGS분석에 의한 흑무추출물의 지방세포분화 억제 유전자 발굴 연구

지방 축적 지연 및 분화 촉진에 대한 위한 흑무의 효능을 살펴보기 위해 대표적 지방 세포주 (3T3-L1)을 통해 이를 관찰하고자 하였다. 이를 위해 Fibroblast 상태의 세포주를 지방세포 (Adipocyte)로 분화시킨 후 농도를 달리하는 흑무 추출물에 일정기간 노출시켜 지방 세포로의 분화에 대한 효과를 관찰하고, 개선효과 관찰의 접근은 세포주로부터 지방 분해 및 지방 생성에 관여하는 유전자들의 발현 변화를 mRNA sequencing으로 밝혀내고자 하였다.

(1) 3T3-L1 (Mouse adipocyte fibroblast) 섬유 아세포에 지방 분화 유도

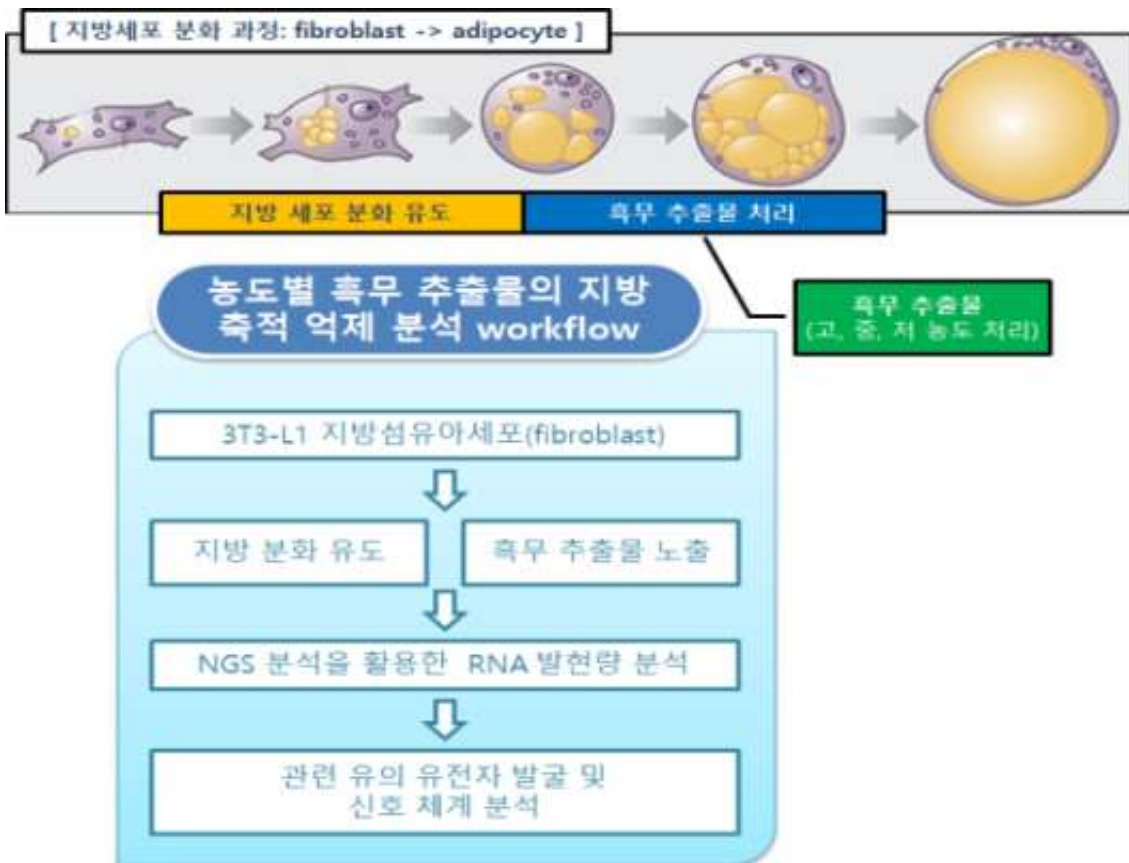
- 3T3-L1(fibroblast)에 Insulin, Dexamethason, 3-Isobutyl-1-methylxathine (IBMX)을 이용하여 지방세포(adipocyte)로 분화 유도(Fig. 121, 122). 섬유 아세포에 지방 분화를 위하여

Dexametasone, Insuline, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)를 세포에 처리 하였다.



<Fig. 121. 3T3-L1 섬유아세포의 지방 분화 과정>

- 3T3-L1 세포주에 지방 분화를 유도하기 위해 Dexamethason, Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 로 해당 세포주에 처리하고 지방이 유도 되는지 확인한다.
- 궁극적으로는 3T3-L1 세포주에 지방 분화 유도를 일으킨 뒤, 흑무 추출물을 처리 하였을 때, 흑무추출물 효능 기작을 규명한다(Fig. 122).



<Fig. 122. 3T3-L1의 지방 분화세포에 미치는 흑무추출물의 지방세포 분화 억제 기능 확인을 위한 workflow>

(2) 3T3-L1(Mouse adipocyte fibroblast) 섬유아세포에 지방 분화 유도

○ 분석디자인

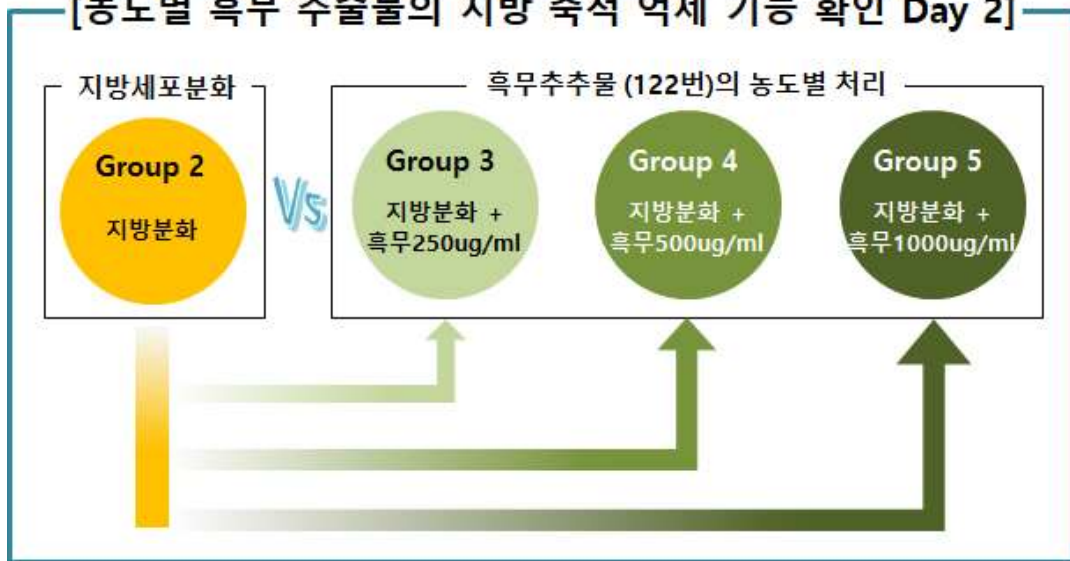
- mRNA sequencing을 통한 3T3-L1 지방 세포 분화 및 흑무 추출물 처리를 통한 지방 축적 개선 관련 유의 유전자 선별

- 샘플: 3T3-L1 세포 및 처리 군; 지방 분화 2일째 샘플 군
 - 3T3-L1 세포주 대조군 (배양 2일째) ; 3개
 - 3T3-L1 세포주+Dexamethason, Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 처리 (배양 2일째) ; 3개
 - 3T3-L1 세포주+Dexamethason,Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 처리+ 흑무 추출물 S122 1000 ug/ml (배양 2일째) ; 3개
 - 3T3-L1 세포주+Dexamethason,Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 처리+ 흑무 추출물 S122 500 ug/ml (배양 2일째); 3개
 - 3T3-L1 세포주+Dexamethason,Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 처리+ 흑무 추출물 S122 250 ug/ml (배양 2일째); 3개

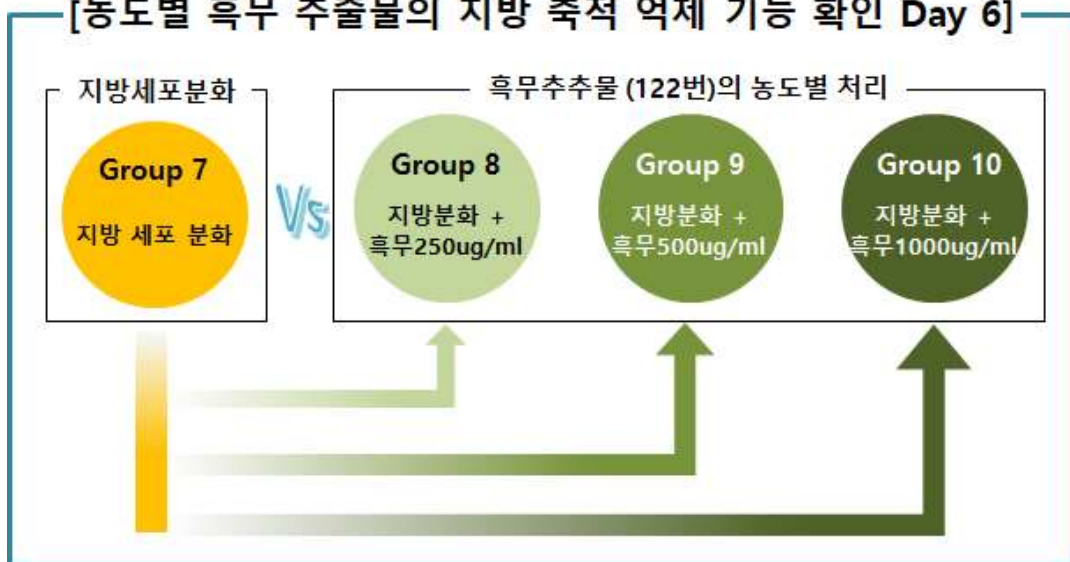
- 샘플: 3T3-L1 세포 및 처리 군; 지방 분화 6일째 샘플 군
 - 3T3-L1 세포주 대조군 (배양 6일째) ; 3개
 - 3T3-L1 세포주+Dexamethason,Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 처리 (배양 6일째) ; 3개
 - 3T3-L1 세포주+Dexamethason,Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 처리+ 흑무 추출물 S122 1000 ug/ml (배양 6일째) ; 3개
 - 3T3-L1 세포주+Dexamethason,Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 처리+ 흑무 추출물 S122 500 ug/ml (배양 6일째); 3개
 - 3T3-L1 세포주+Dexamethason,Insulin, 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMX) 처리+ 흑무 추출물 S122 250 ug/ml (배양 6일째) ; 3개



[농도별 흑무 추출물의 지방 축적 억제 기능 확인 Day 2]



[농도별 흑무 추출물의 지방 축적 억제 기능 확인 Day 6]

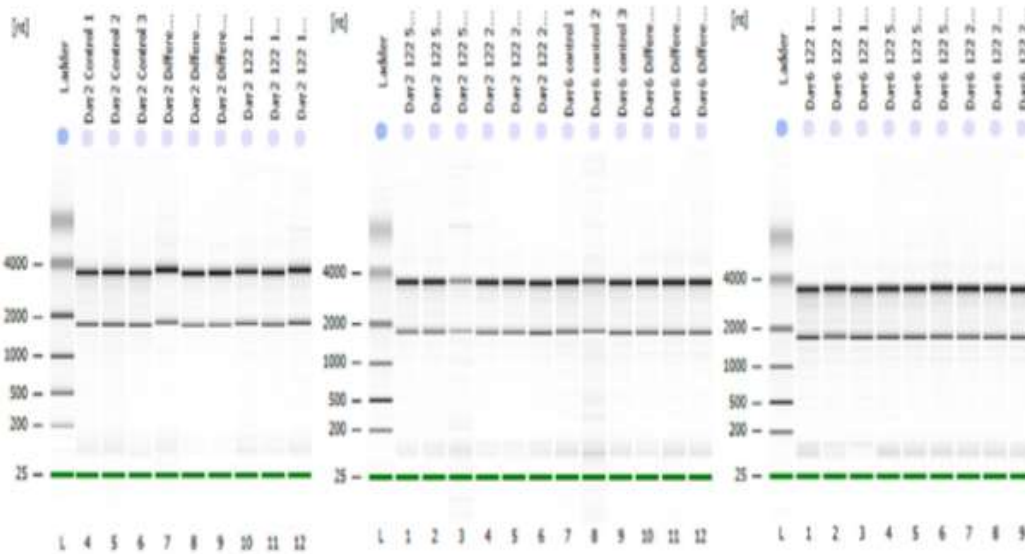


<Fig. 123. 흑무추출물의 지방축적 억제 기능 확인을 위한 workflow>

(3) total RNA 분리 및 RNA sequencing

- 세포주로부터 total RNA 분리 및 quality 측정
 - Trizol을 사용하여 제조자 메뉴얼에 따라 세포주에서 RNA 분리
 - Agilent BioAnalyzer를 이용하여 RNA Nano chips (Agilent)을 통해 제조자 메뉴얼에 따라 분리된 RNA의 quality를 측정
 - 세포주로부터 RNA 의 분리는 Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol lysis 방법을 사용하였음.
 - 추출된 RNA는 spectrophotometer 방법을 통하여 단백질 오염 여부를 확인하고, ribogreen을 사용하여 정량을 시도하였으며 Bioanalyzer를 이용하여 degradation 및 integrity 및 여부를 확인(Fig. 124).

 - mRNA library 제작 및 Next Generation Sequencing
 - 분리된 RNA를 cDNA로 전화 후 sequencing을 위한 아래와 같이 library 제작
 - Illumina TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit이용
 - Illumina TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit에서 제공하는 Oligo dT magentic bead를 이용하여 mRNA 추출
 - enzyme을 이용하여 mRNA를 sequencing에 적합한 길이로 cutting 함 (200bp 내외).
 - mRNA를 이용하여 cDNA를 합성할 때, 1차 stranded는 actinomycin D에 의해 라벨링을 하고, 2차는 일반 시약을 이용하여 cDNA를 합성
 - cDNA가 합성된 mRNA의 3` end의 Adenylation 유도
 - 샘플별 index를 포함한 sequencing Adaptor를 double stranded cDNA 절편의 양쪽 말단에 결합시키는 반응 유도
 - Adaptor가 결합된 cDNA 절편을 adaptor 특이적 PCR primer set을 이용하여 증폭
 - 제작된 library는 Bioanalyzer를 통하여 QC 실시
 - 각 샘플의 Library는 각각 Q-PCR을 통해 4nM로 균일화 하여 NGS data 생성 시 특정 샘플의 data가 편향적으로 생성되는 것을 방지
- NextSeq 500 sequencer(illumina)를 이용하여 mRNA sequencing 실시하였으며, 2x75cycle format으로 sequencing분석 하였다.



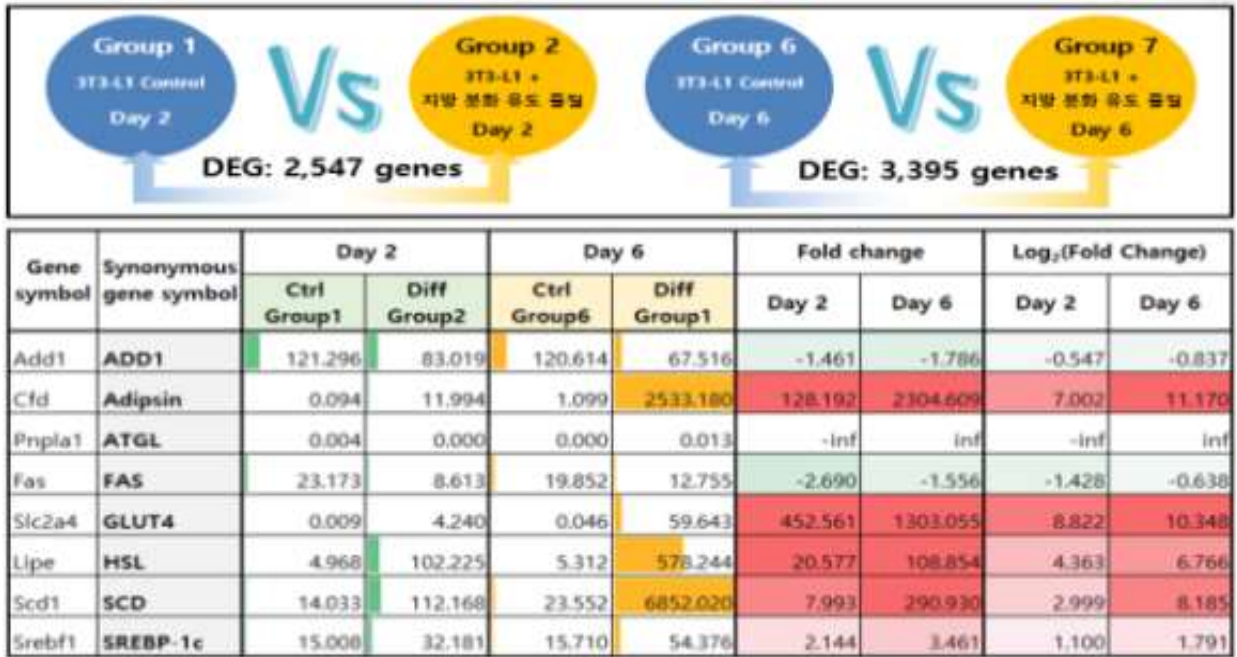
<Fig. 124. Bioanalyzer를 이용한 3T3-L1 세포주 분리 RNA의 integrity 측정>

(4) 결과

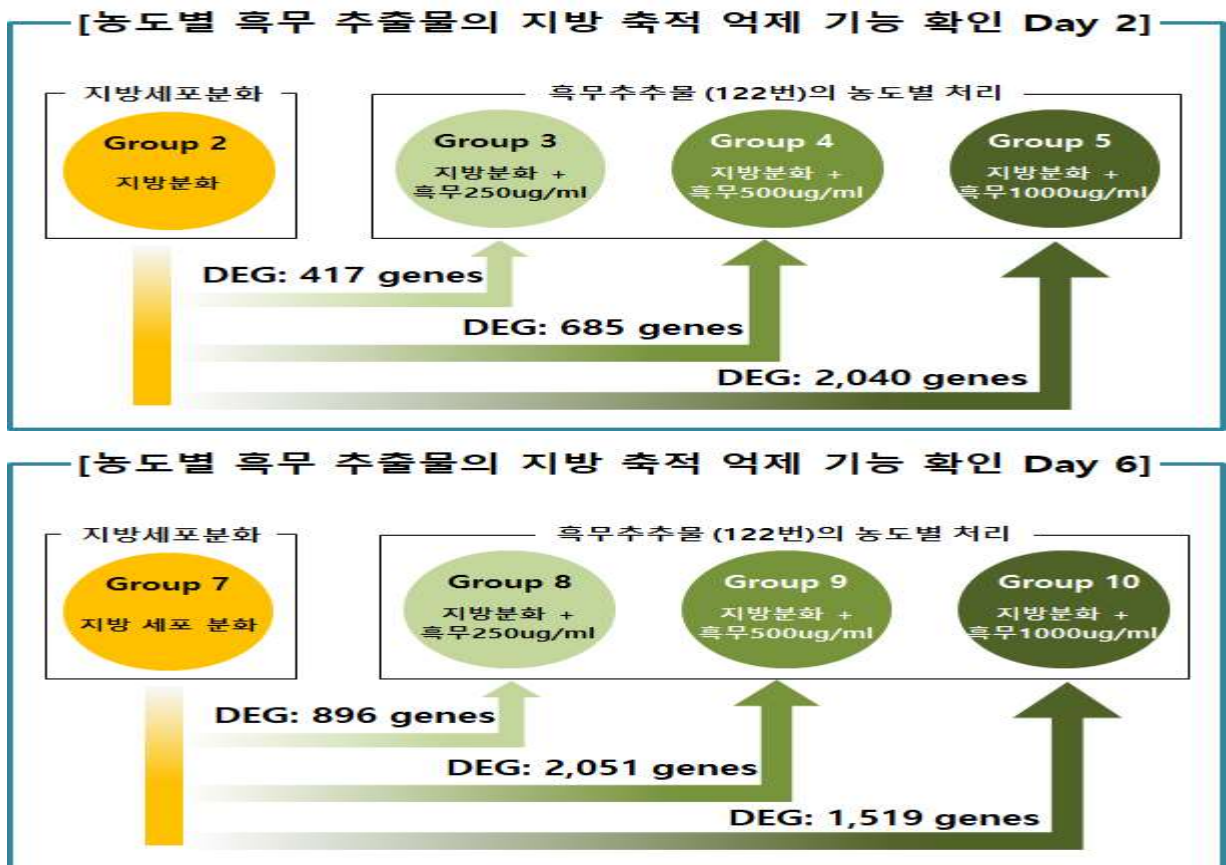
○ NGS를 이용하여 날짜별 지방분화 전후의 발현량 차이를 확인한 결과 2,547개, 3,395개의 유의발현유전자를 확인할 수 있었다.(Fig. 125). 지방 분화 관련 유전자 8개 (Add1, Cfd, Pnpla1, Fas, Slc2a4, Lipe, Scd1, Srebf1)의 발현양상은 아래와 같이 발현되어졌으며, 2days에 비해 6days에서 보다 더 많이 차이가 나는 것을 알 수 있다.(Fig. 126) 이는 지방섬유세포의 분화과정이 preadipocyte 상태의 3T3-L1이 mature adipocyte 단계를 거쳐 Hypertrophy 단계로 분화되어지는데, mature adipocyte 단계보다 Hypertrophy 단계의 지방세포에서의 지방분화유전자의 발현량이 더욱 많이 발현됨을 나타낸다.

○ 먼저 preadipocyte(2 day)에서 유전자 발현양상을 분석한 결과, MDI처리와 MDI와 흑무추출물 혼합처리구에서 비교하면 250, 500, 1,000ug/ml처리 유의적으로 발현되는 유전수는 417, 685, 2,044개로 보였다(Fig.126). adipocyte로 분화된(6 day)세포에서는 896(250ug/ml), 2,051(500ug/ml), 1519개(1,000ug/ml)로 분석되었다(Fig.126). 따라서 preadipocyte, adipocyte 모두에서 농도의존적으로 증가, 감소하는 유전자가 현저하게 관찰되었다. 그리고 미분화지방세포(predipocyte)에서보다 지방세포로 분화된 세포에서가 흑무추출물처리에 의한 증,감되는 유전자가 증가되었다. 이 결과는 흑무는 비만 및 지방합성 억제효과 강력하게 막는다고 볼 수 있다.

[NGS를 이용한 발현량 비교]



<Fig. 125. NGS를 이용한 지방분화관련 유전자 (Add1, Cfd, Pnpla1, Fas, Slc2a4, Lipe, Scd1, Srebf1)의 발현량 확인 및 2/6 days control 그룹과 지방 분화그룹의 DEG (Differential Expressed Genes) 확인>



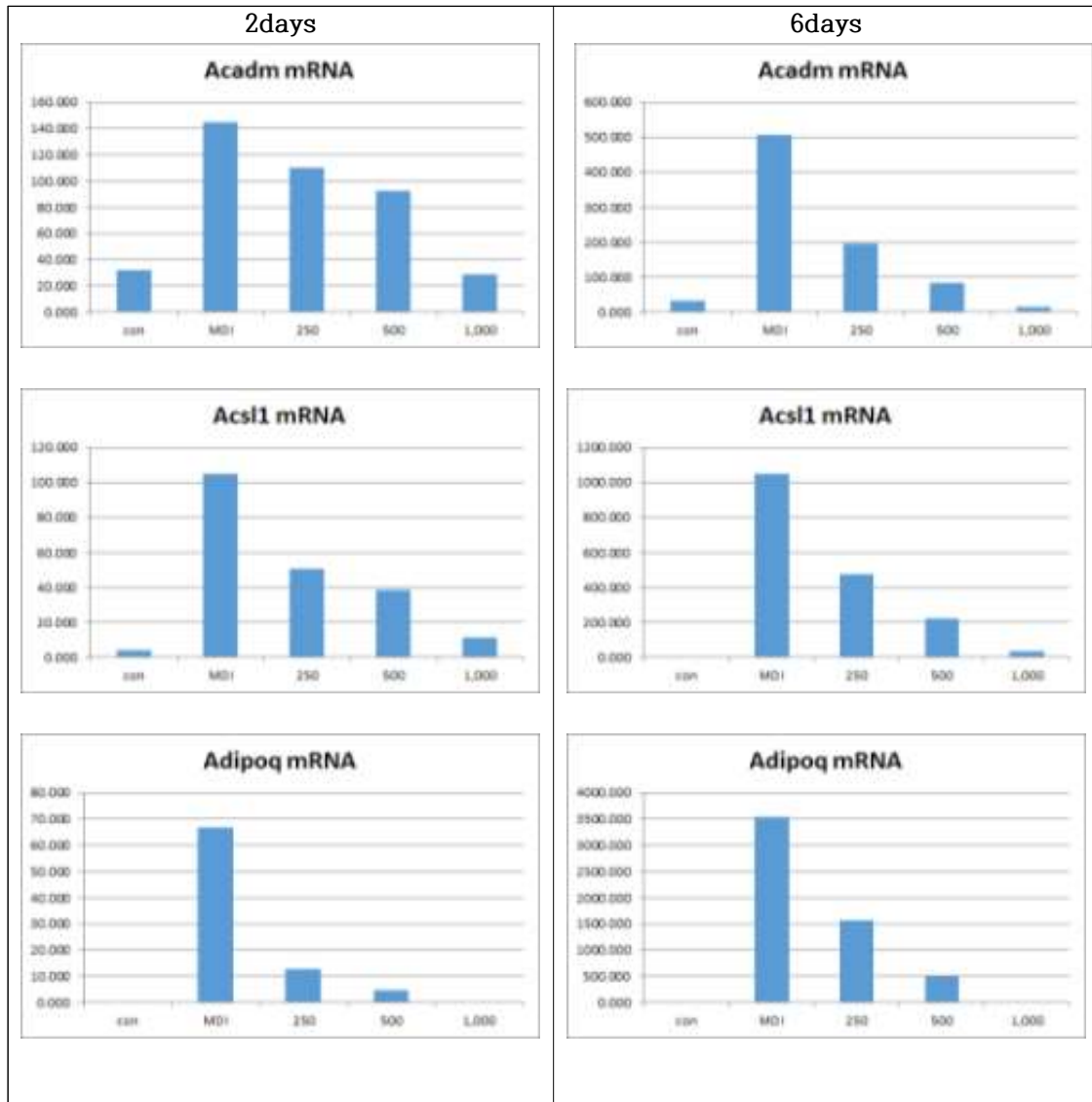
<Fig. 126. 농도별 흑무 추출물의 지방 축적 억제 기능 관련 발현 유의유전자 확인>

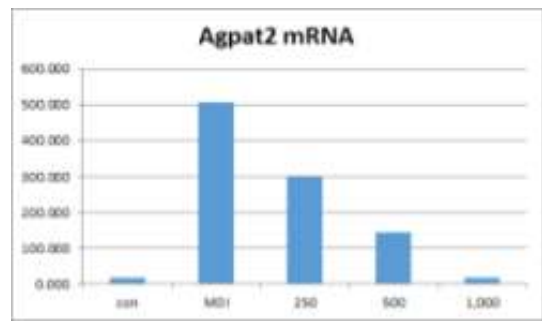
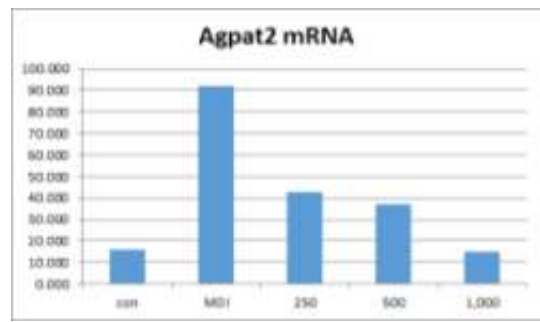
(5) 생물정보 분석의한 지방합성 바이오마커 유전자 발굴

○ 농도별 흑무 추출물의 지방 축적 억제 기능 관련 발현 유의유전자

지방분화가 유도되어진 것을 기준으로 day 2/ day 6 날짜별 흑무 추출물의 농도별 처리 (250ug/ml, 500ug/ml, 1000ug/ml)의 발현 유의 유전자는 아래 그림과 같다. (Fig. 127).

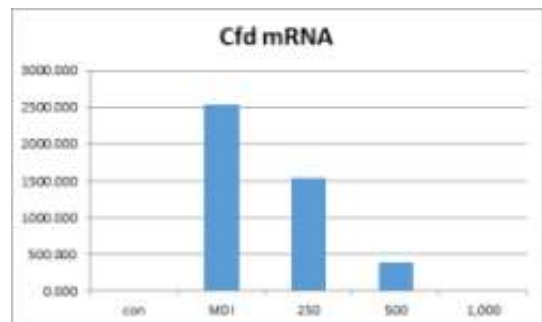
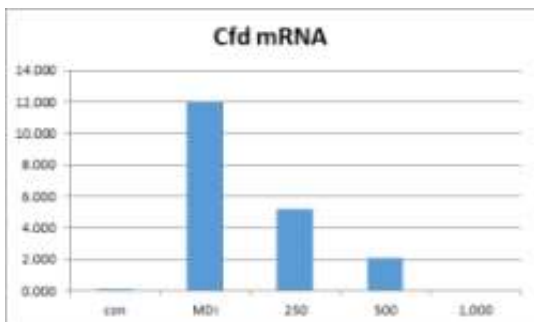
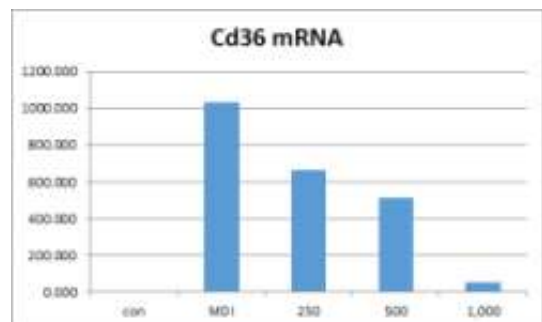
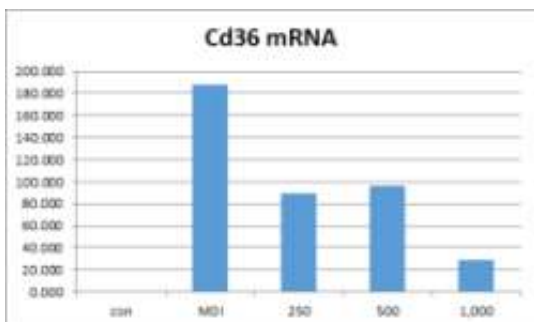
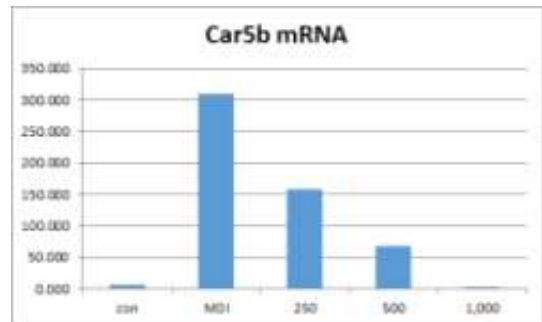
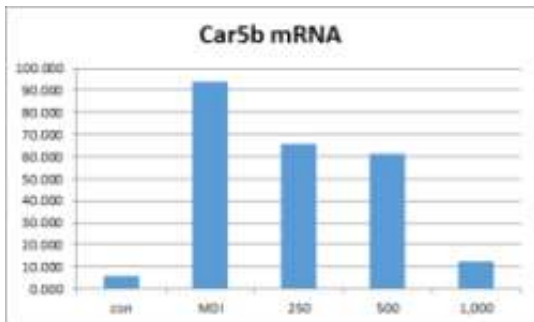
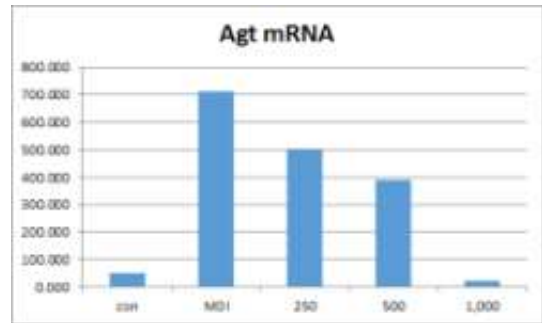
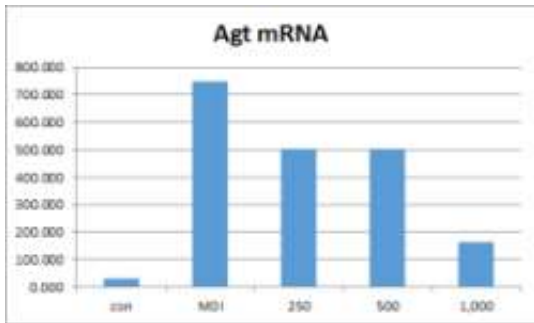
- 먼저 지방세포 바이오마커로 보이 유전자는 총 31개(Acadm, Acs11, adipoq, agpat2, Agt, Car5b, CD36, cfd, Cidec, Dgat2, Etfb, Fabp4, Fabp5, Fasn, Glu1, Gpd1, Hsd11b1, Lipe, Lpl, Mdh1, Mgst3, Nabp1, Orm1, Pank3, Pcx, Pnpla2, Retn, Rgs2, S100a1, SCD1, Thrsp) 유전자를 발굴하였다(Fig. 127).





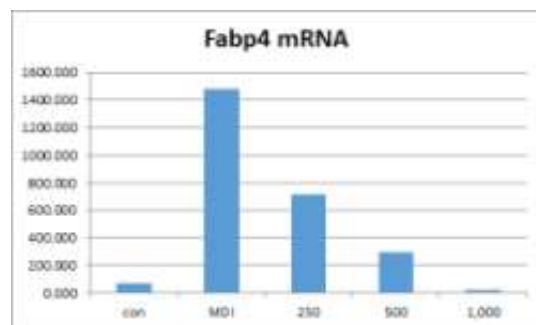
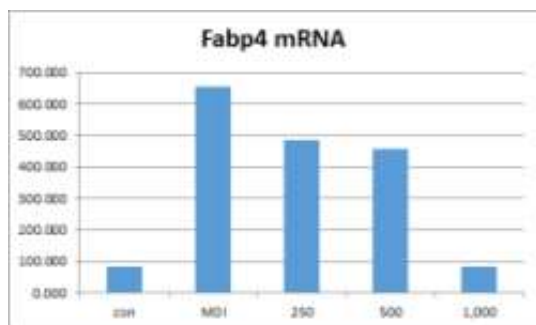
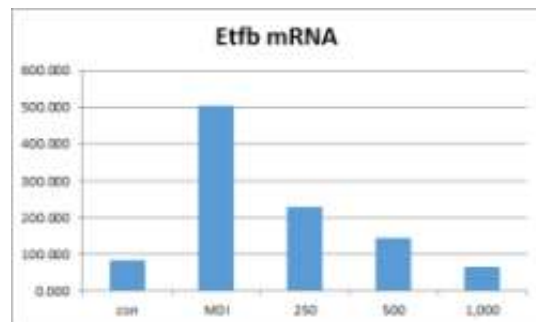
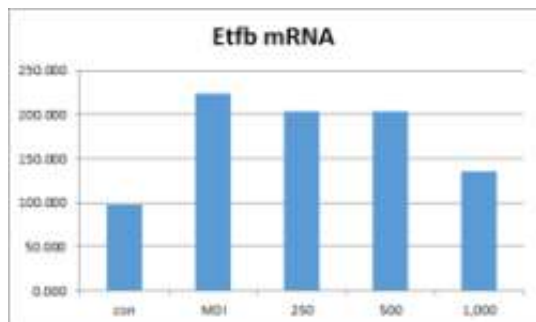
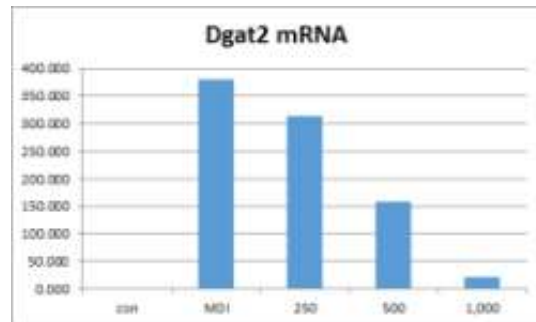
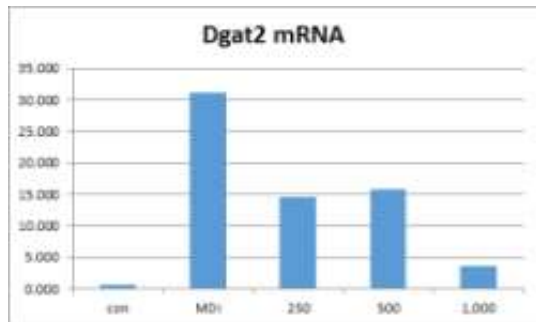
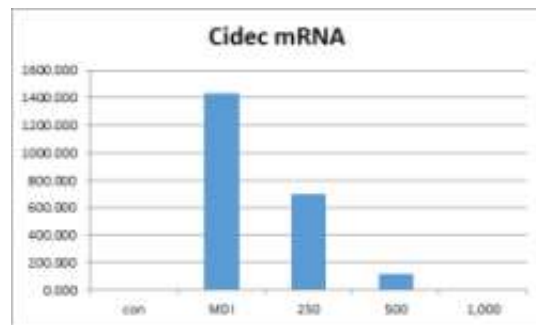
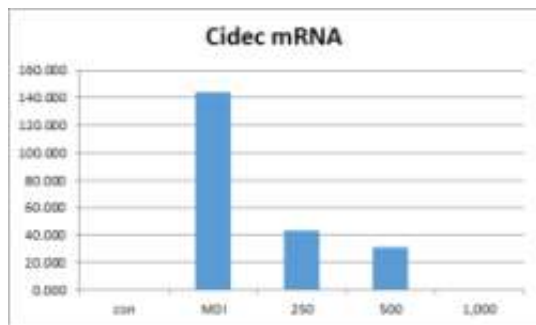
2days

6days



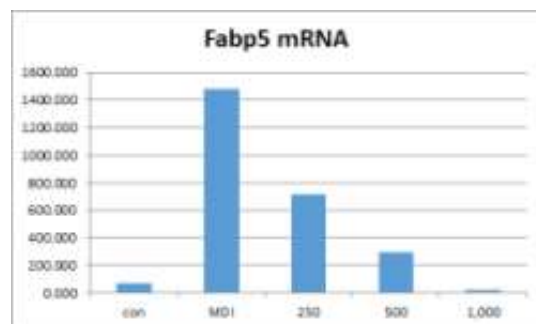
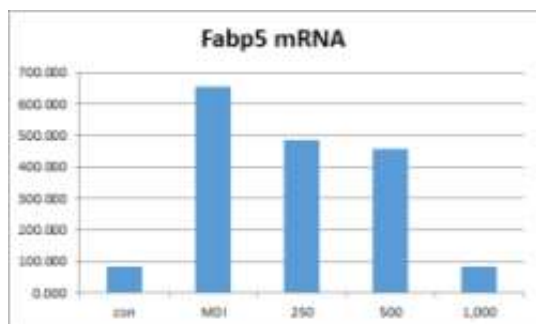
2days

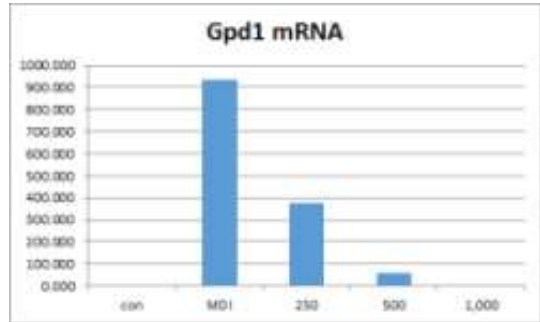
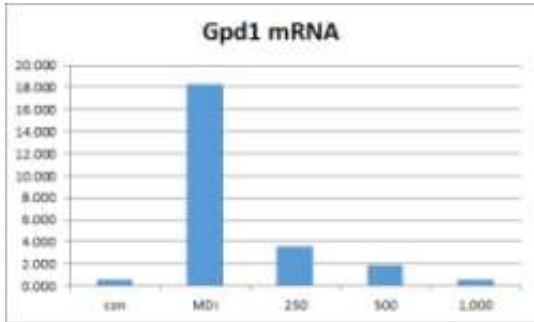
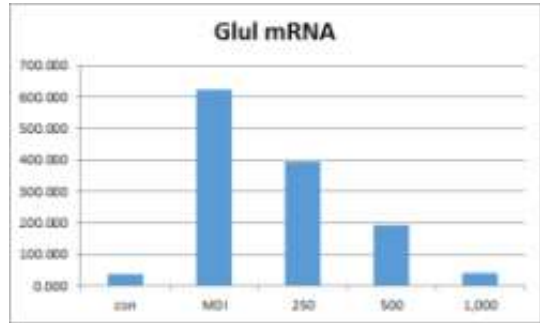
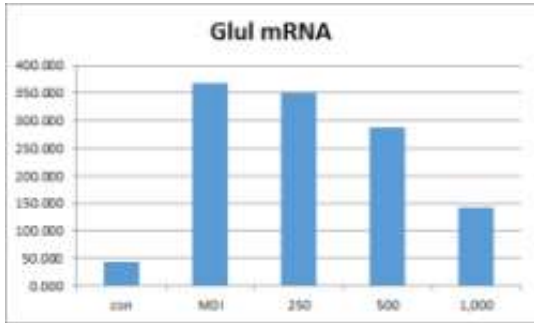
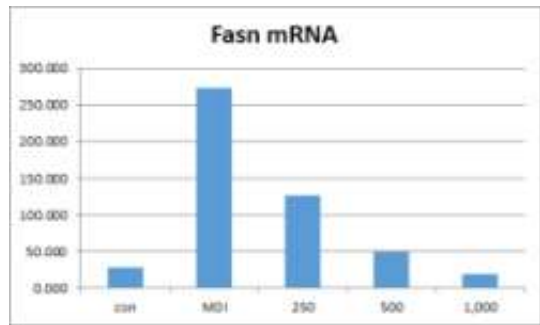
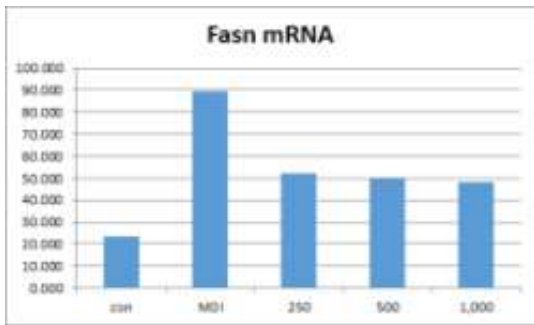
6days



2days

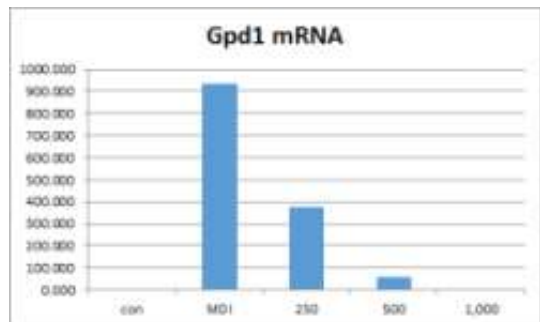
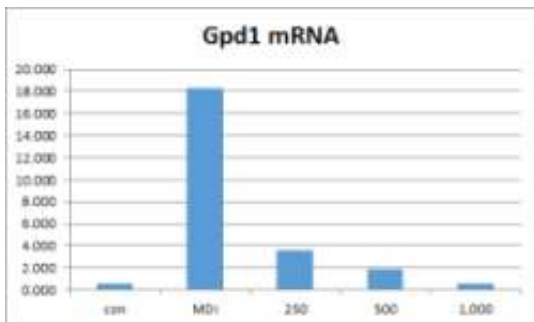
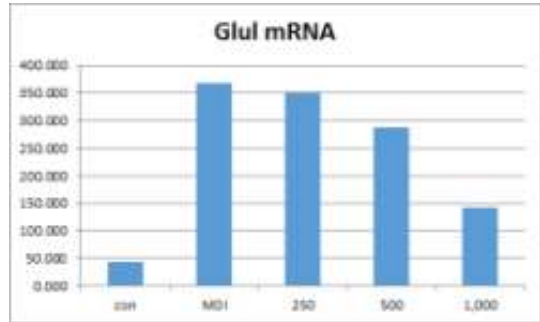
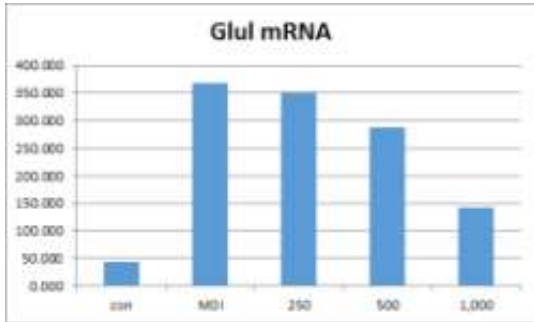
6days

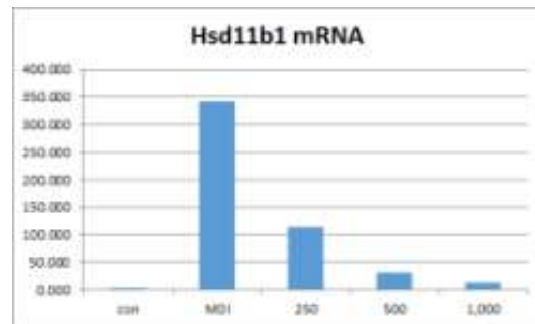
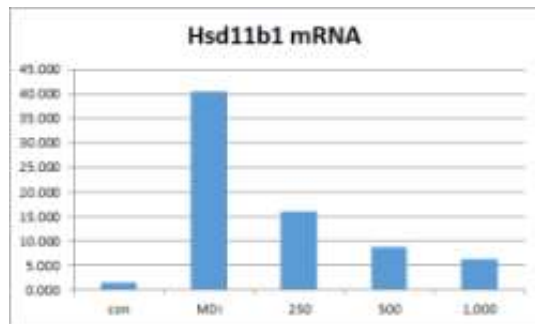
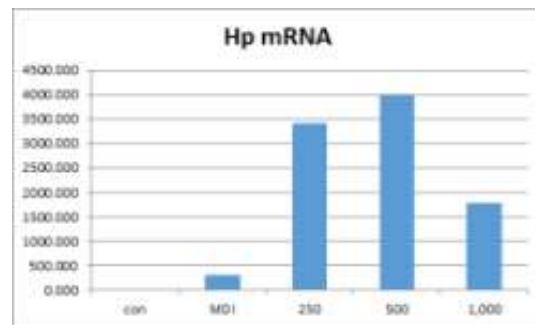
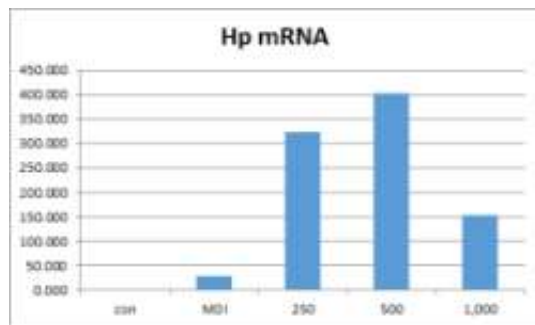




2days

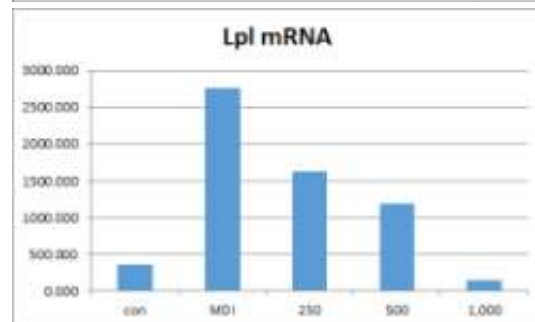
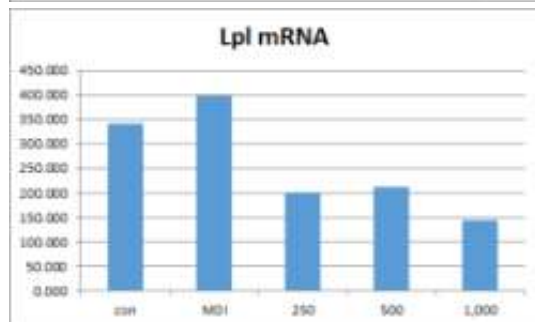
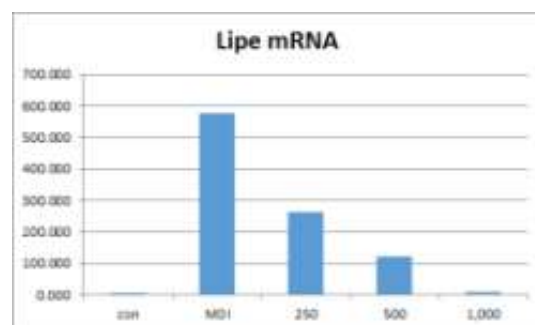
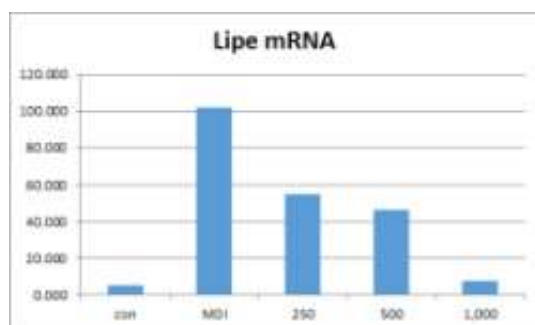
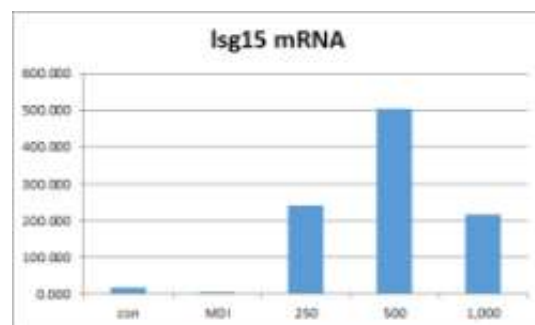
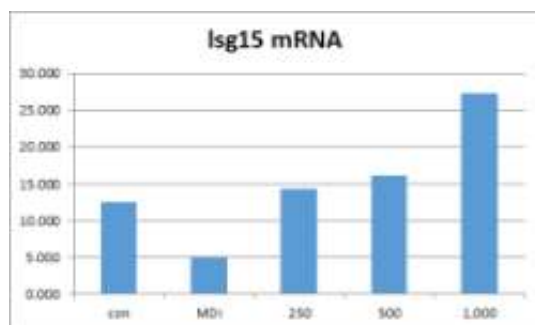
6days

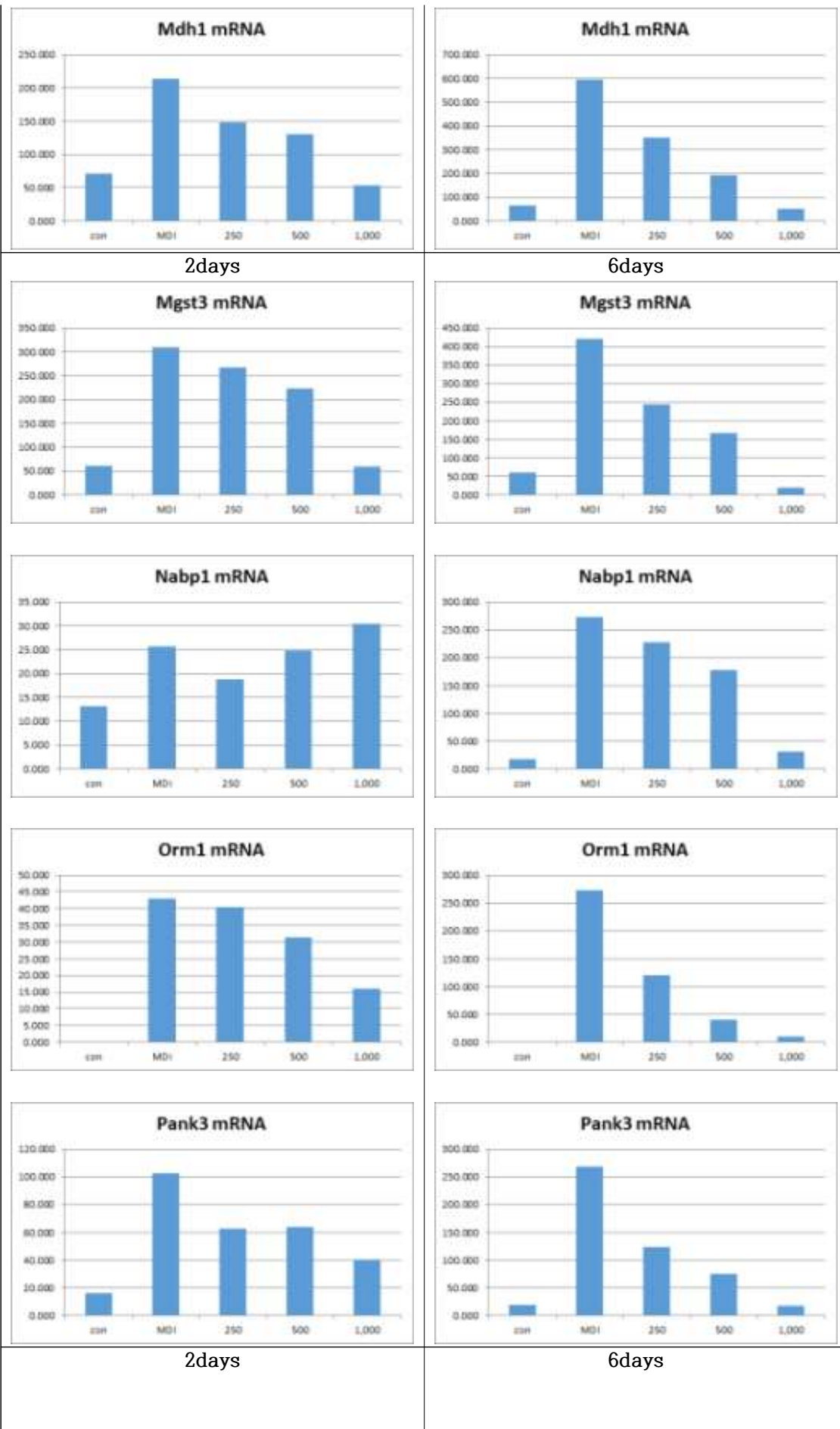


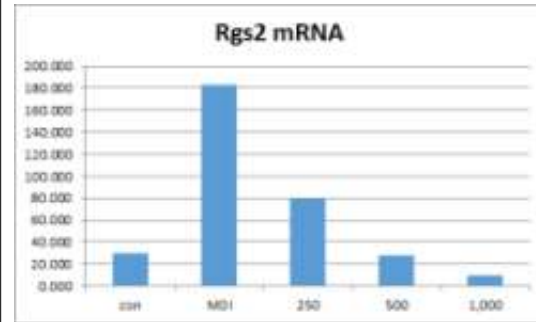
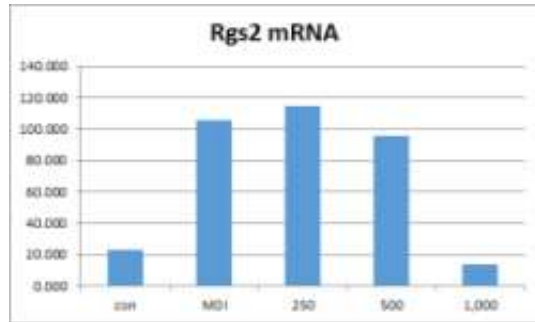
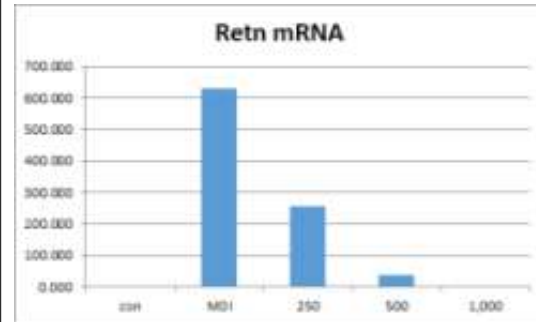
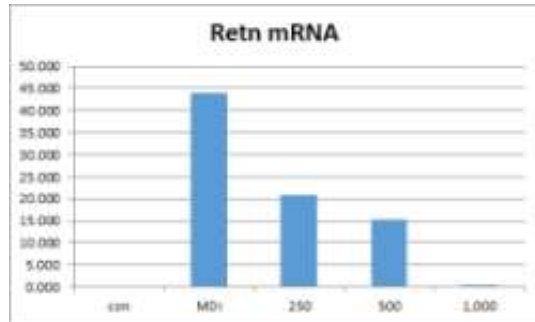
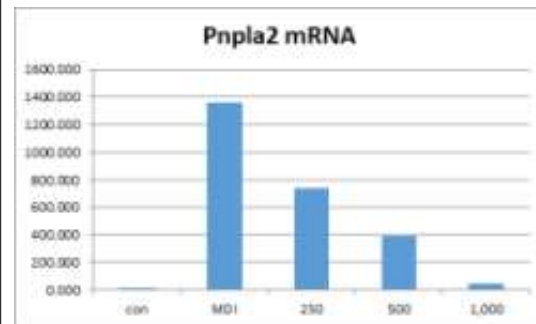
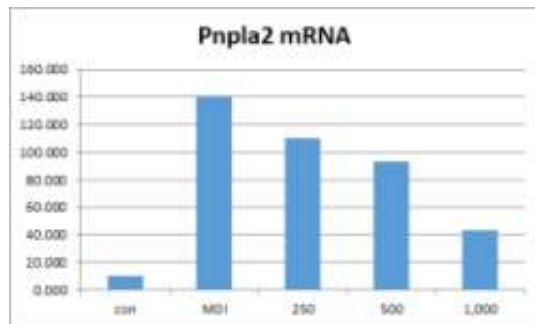
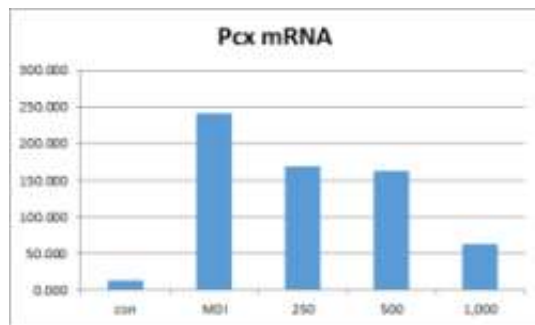


2days

6days

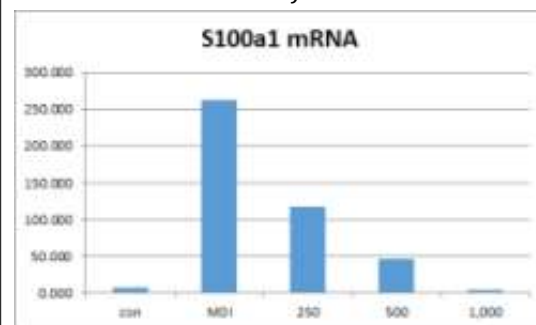
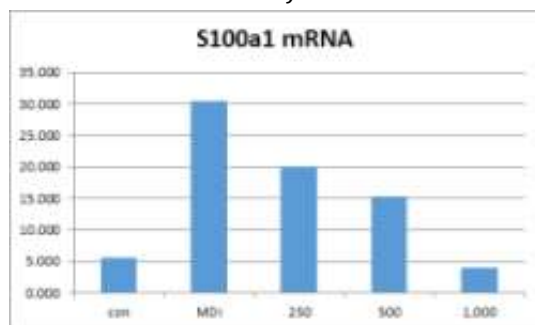






2days

6days



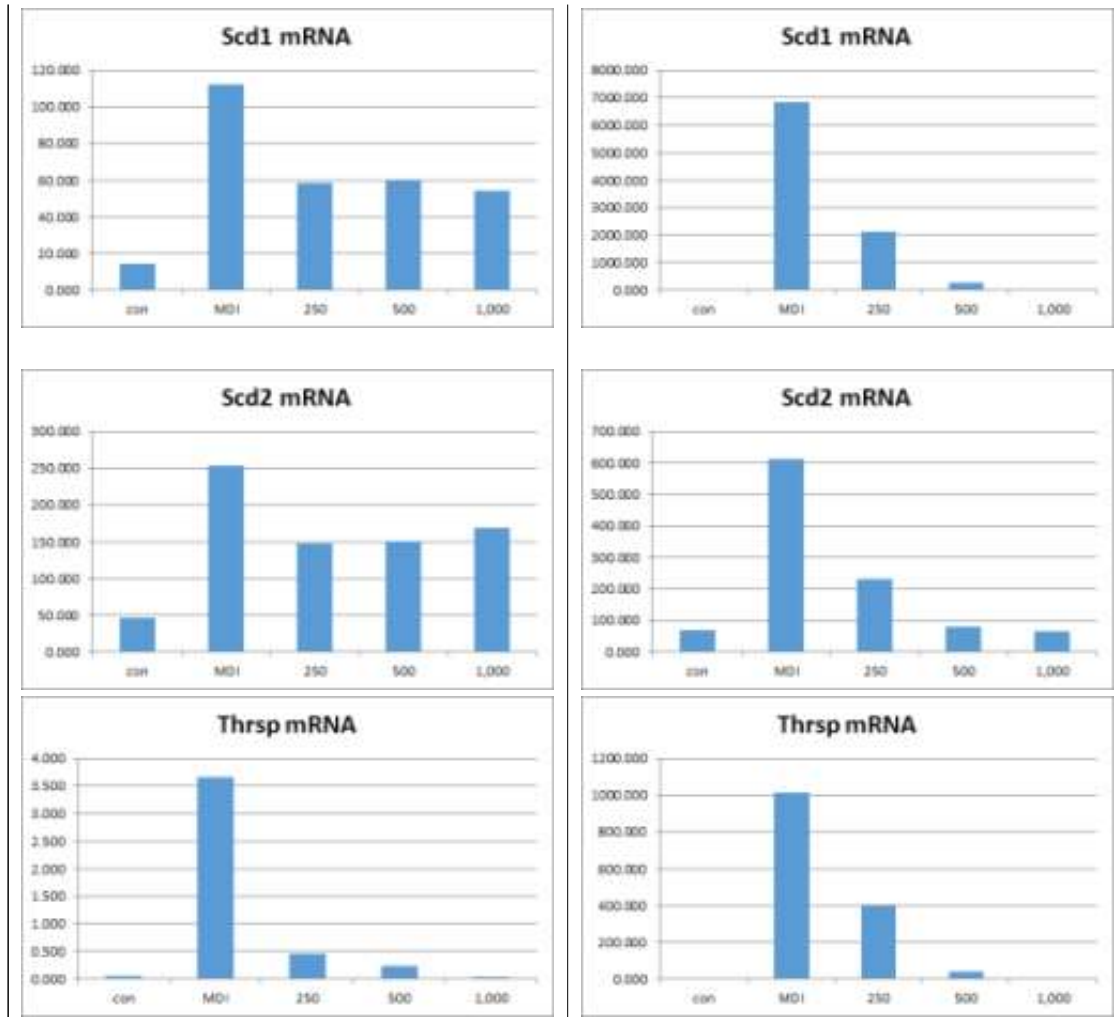


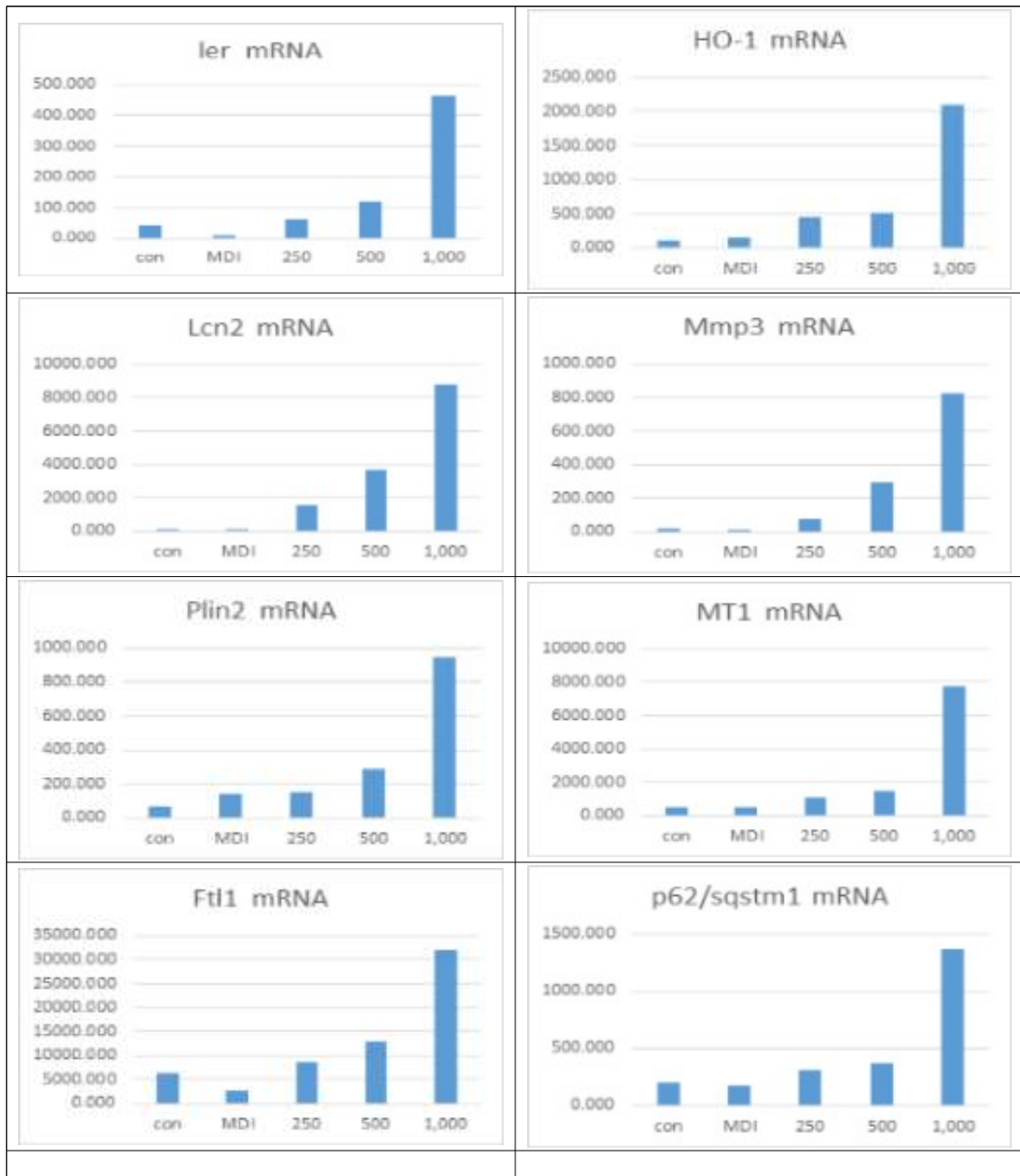
Fig. 127. 농도별 흑무 추출물의 지방축적 억제 관련 유전자 발굴>

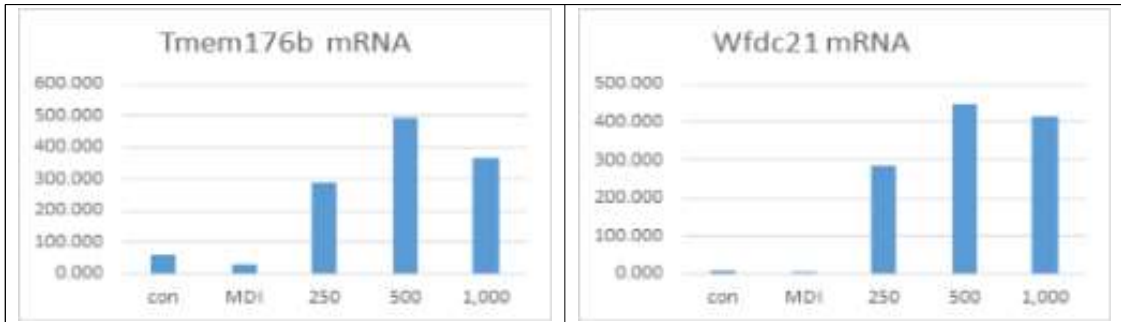
(6) 지방세포에서 Nrf2 전자체 규명

○ Nrf2는 전사인자로서 불활성 상태에서는 세포질에서 Keap1 단백질과 결합하여 있다. 그리고 활성화 인자(항산화인자; rasvelatrol, curcumin 등)에 의해 keap1과 해리되어 핵으로 이동하여 타겟유전자(HO-1, NQO1, GCLM 등을 발현시켜 이독스, 세포보호, 항산화작용, anti-apoptosis, cellula redox, 등의 기능을 한다. 지방세포에서 Nrf2 기능에 관련된 연구로는 Sulforaphan을 지방세포에 처리하여 Nrf2활성 과 NQO1 유전자 활성을 통해 TG accumulation 억제와 지방세포 분화억제 기작을 보고하였다(Vombof-Dekrey and Picklo, 2012). 그리고 또다른 그룹인 Kendig *et al.*(2011)과 Pi *et al.*(2010)은 Nrf2는 직접적으로 C/EBP-b, PPAR-r 유전자를 조절한다고 보고 하였다.

우리 연구결과는 Nrf2활성화에 의해서 발현된 유전자는 총 8개(Fth1, HO-1, Lcn2, Mmp3, Plin2, Sqstm1, MT1, Ler)를 발굴하였다(Fig.128). 흑무추출물에 의한 지방축적에 관여하는 유전자를 발굴 하였다. 아래 Fig.127 에서 보는 것처럼 adipogenesis 관련 유전자(Acadm, Acs11, Adipoq, Agpat2, Agt, Car5b, CD36, Cfd, Cidec, Dgat2, Etfb,

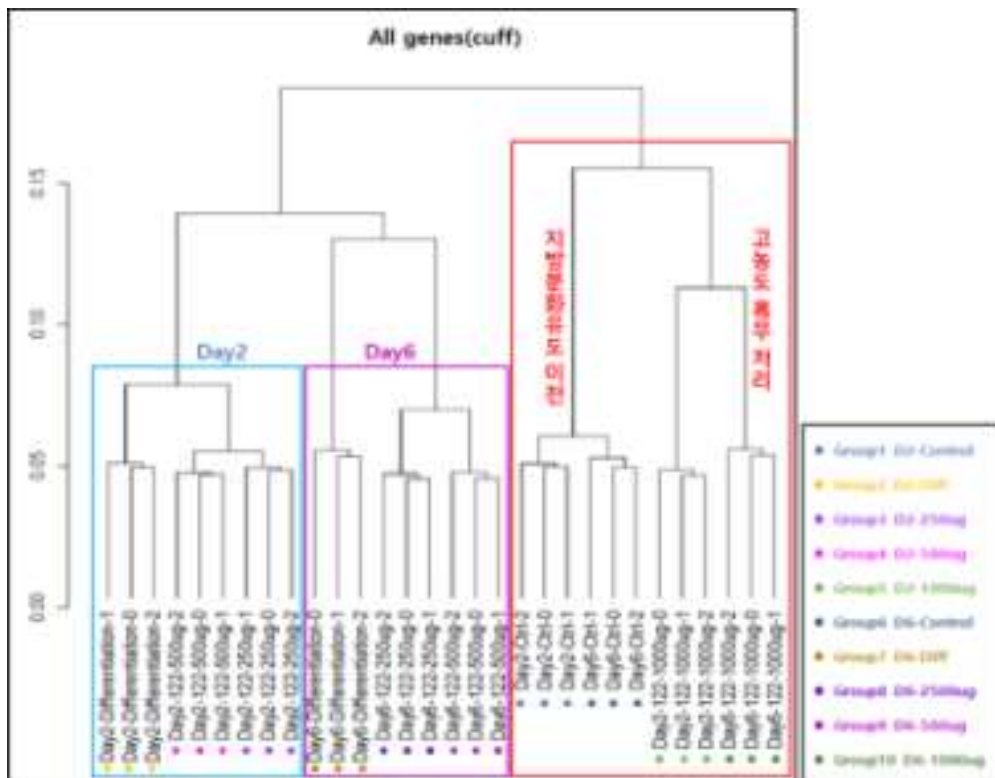
Fabp4, Fabp5, Fasn, Glu1, Gpd1, Hsd11b1, Lipe, Lpl, Mdh1, Mgst3, Nabp1, Orm1, Pank3, Pcx, Pnpla2, Retn, Rgs2, S100a1, SCD1, Thrsp)들에 의해 preadipocyte에서 adipocyte로 분화가 일어난다, 그리고 Nrf2 유전자에 의해 발현된 10개 유전자 Fth1, HO-1, Lcn2, Mmp3, Plin2, Sqstm1, MT1, Ler는 직,간접적으로 지방세포분화는 억제한다고 결론 내릴 수 있다(Fig.128). 향후 상세한 메카니즘연구가 세포 수준과 실험동물 수준에서 연구가 필요하다.



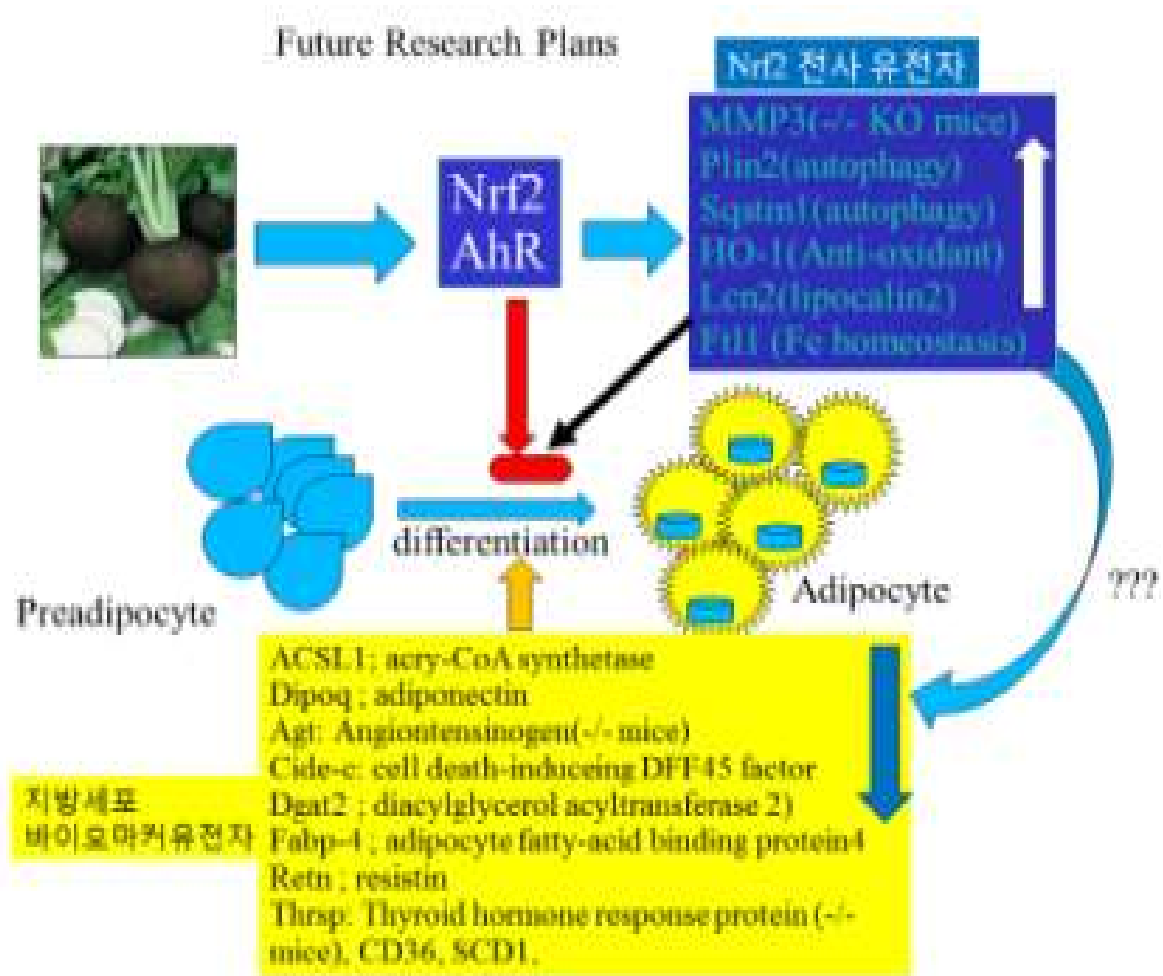


<Fig. 128. Effect of BRE on Nrf target gene expression in 3T3-L1 cells.>

흥미로운 것은 그림 129에서 Day 2 / Day 6의 control 그룹, 지방분화후 흑무추출물 1,000ug/ml를 처리한 그룹과 미분화 세포 그룹이 유사한 발현 패턴을 보였다. 그리고 250ug/ml와 500ug/ml를 처리한 그룹과 처리 일짜별로 지방 분화 그룹과 함께 cluster 되어지는 것을 확인할 수 있다(Fig. 129).



<Fig. 129. Expression clustering based on gene expression profiles>



<Fig. 130. Schematic representation of the dual role of Nrf2 on adipogenesis>

이 결과로부터 지방분화가 이루어진 후 고농도의 흑무추출물 (1,000ug/ml)을 처리하면 Insulin, Dexamethason, 3-Isobutyl-1-methylxathine (IBMX)등 지방분화가 유도되어 지는 환경에서도 지방 축적을 억제할 수 있다는 것을 의미한다. 흑무가 지방축적 억제기능을 가지는지에 대한 실험으로부터 우리는 다음과 같은 신호체계를 확인할 수 있었다. 기본적으로 분화유도된 지방세포를 control로 하여 지방이 축적되어지는 것을 억제하는 흑무추출물의 농도별 변화에 대하여 진행된 실험이므로, fatty acid degradation 관련 신호체계와 그 신호체계에 속한 DEGs 의 발현양상을 나타낸다. 향후 흑무추출물/ Nrf2/adipogenesis pathway에대한 심층적인 연구가 필요하다고 사료된다(Fig. 130).

(7) 결론

이상의 결과를 요약하면 흑무추출물은

가) 항염증 효과

- 염증성 사이토카인 (IL1b, iL6, TNFa)와 염증인자발현(iNOS, Coc-2)을 억제 한다
- 특히 염증성 사이토카인인 IL6/Jak2/STAT3 신호전달억제하여 항염증 효능 갖음
- Nrf2를 활성화시켜 8개 유전자(Blvrb, Cxcl3, Gsr, HO-1, Plin2, Prr13, Slc48a1, Srxn1, Esd)를 발현시킴.

- 따라서 흑무추출물은 Nrf2를 통해서 항염증 효과를 갖음

나) 지방세포분화 억제 효과

- 중성지방 및 cellular lipid 억제 효과
- 지방합성 및 adipogenesis인자인 C/EBP-a, PPAR-1, aP2 등을 억제하여 지방세포 분화를 억제 함
- 지방세포 바이오마커 유전자31개(Acadm, Acs11, adipoq, agpat2, Agt, Car5b, CD36, cfd, Cidec, Dgat2, Etfb, Fabp4, Fabp5, Fasn, Glu1, Gpd1, Hsd11b1, Lipe, Lpl, Mdh1, Mgst3, Nabp1, Orm1, Pank3, Pcx, Pnpla2, Retn, Rgs2, S100a1, SCD1, Thrsp) 발굴 함.
- Nrf2 활성화에 따른 8개 유전자(Fth1, HO-1, Lcn2, Mmp3, Plin2, Sqstm1, MT1, Ler)가 유도되어 post- function으로서 지방세포 분화관련 유전자를 조절하여 항비만 효과를 나타냄.

13) 흑무 추출물의 항당뇨 효과 연구

최근 비만은 고지혈증(hyperlipidemia), 고혈압(hypertension), 동맥 경화증(atherosclerosis) 및 II 형 당뇨병(type II diabetes mellitus)과 같은 다양한 대사 질환을 유발하기 때문에 점점 더 주목을 받고 있다. 간은 지질, 당 대사와 관련된 중요한 기관으로서 in vitro에서 간세포와 관련된 만성 질환모델 연구가 활발히 진행되고 있다. 간에서 지방 생성은 다양한 전사 인자, 호르몬 조절, 관련 유전자 발현 등을 통해 지방 및 지질이 합성된다. 전사 인자의 sterol regulatory element-binding protein(SREBP) family는 세포 지질 대사의 조절에서 중추적인 역할을 한다. SREBP-1은 주로 지방산과 트리글리세리드의 대사를 조절하는 반면 SREBP-2는 콜레스테롤의 생합성을 조절한다. 지방 합성과 관련된 FAS는 SREBP-1에 의해 조절된다. 그리고 SREBP-2는 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGCR) 발현을 통해 콜레스테롤 생합성을 조절한다. 예를 들어 마늘과에 함유된 Allicin화합물은 AMPK/SREBP 신호 전달 경로를 활성화시켜 지방 생성을 억제 시킨다고 보고되었다. 따라서, AMPK/SREBP 경로에서 palmitate acid처리 동안 지방 생성 억제는 간 기능 개선 대사에서 중요하다. 또한 혈압강하, 항산화제, 항암 및 항염증제 효능을 갖는 apigenin은 AMPK/SREBP pathway를 통해 hepatic steatosis 억제한다고 보고되고 있다.

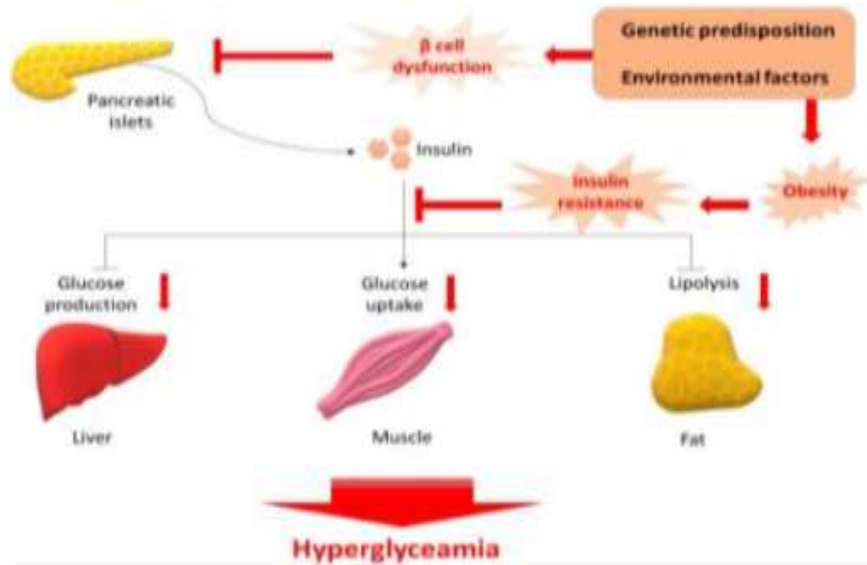
당뇨병 역학조사 결과에 따르면 국내 당뇨병 환자 수는 2020년에는 455만 명을 넘어서 2030년이면 545만 명에 이를 전망이다. 기존 당뇨치료제들이 가지고 있는 불쾌감에 의한 구토 및 복부팽만 등 소화기 계통에 대한 부작용과 다양한 생리학적 대사과정에 미치는 문제점들이 보고되고 있어 한국을 비롯한 많은 선진국들은 이러한 문제점들을 개선하기 위한 신약 개발에 집중하고 있다. 특히, 최근에는 신물질 개발보다 부작용이 없고 체중 감소와 함께 혈당을 낮출 수 있는 천연물을 이용한 당뇨 치료제 개발에 집중적인 투자와 연구가 이루어지고 있어서 천연물 소재 개발에 대한 중요성이 매우 절실하게 요구되고 있다. 당뇨병은 신체 내에서 혈당 조절에 필요한 인슐린의 절대적 또는 상대적 결핍에 의해 발생된 고혈당을 특징으로 탄수화물 대사이상, 단백질과 지질대사 및 전해질 대사에 이상을 초래

하는 대사성 질환이다. 발병 원인에 따라 제1형 당뇨와 제2형 당뇨로 구분되는데 췌장에서 인슐린을 생산하지 못하는 인슐린의 절대적 결핍에 의한 제1형 당뇨병과 인슐린 저항성 및 분비기능 이상에 의한 제2형 당뇨병으로 구분한다. 제2형 당뇨병은 고지혈증, 고혈압, 염증 및 심혈관계 질환을 높이는 위험인자로서 비만 중에서도 특히 복부 비만이 인슐린 저항성을 유발하는 가장 큰 요인이며 인슐린 저항성이 상당히 오랜 기간 동안 지속된 후 인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포 파괴까지 일어나게 되므로, 인슐린 저항성 개선을 통한 혈당조절을 목표로 치료제 개발이 활발히 이루어지고 있다. 본 연구는 검정무(Black radish) 발효물과 비발효물 추출물의 간세포에서 지질합성 효과와 그 신호기작을 비교 분석하였다.

(1) 검정무발효 및 비발효 추출물처리에서 2형 항당뇨(Type 2 diabetes, T2D) 효과 연구

최근 생활환경의 변화와 더불어 식생활 패턴의 서구화로 암 뿐만 아니라 심장병, 고혈압, 당뇨병 등의 순환기계 질환의 사망률이 크게 높아짐에 따라 국민의 건강에 관심이 크게 고조되고 있다. 질병관리본부 ‘2018 만성질환 현황과 이슈 통계집’에 따르면, 우리나라 국민의 당뇨병 사망률은 인구 10만 명당 25.6명으로 OECD 36개국 중 8위 인 것으로 나타났다. OECD평균은 인구 10만 명당 22.4명이었고, 2016년 우리나라 국민 당뇨병 유병률은 11.3%로 증가 추세(‘10년 9.6%)에 있으며 특히 남자에게서 증가 양상이 뚜렷했다.

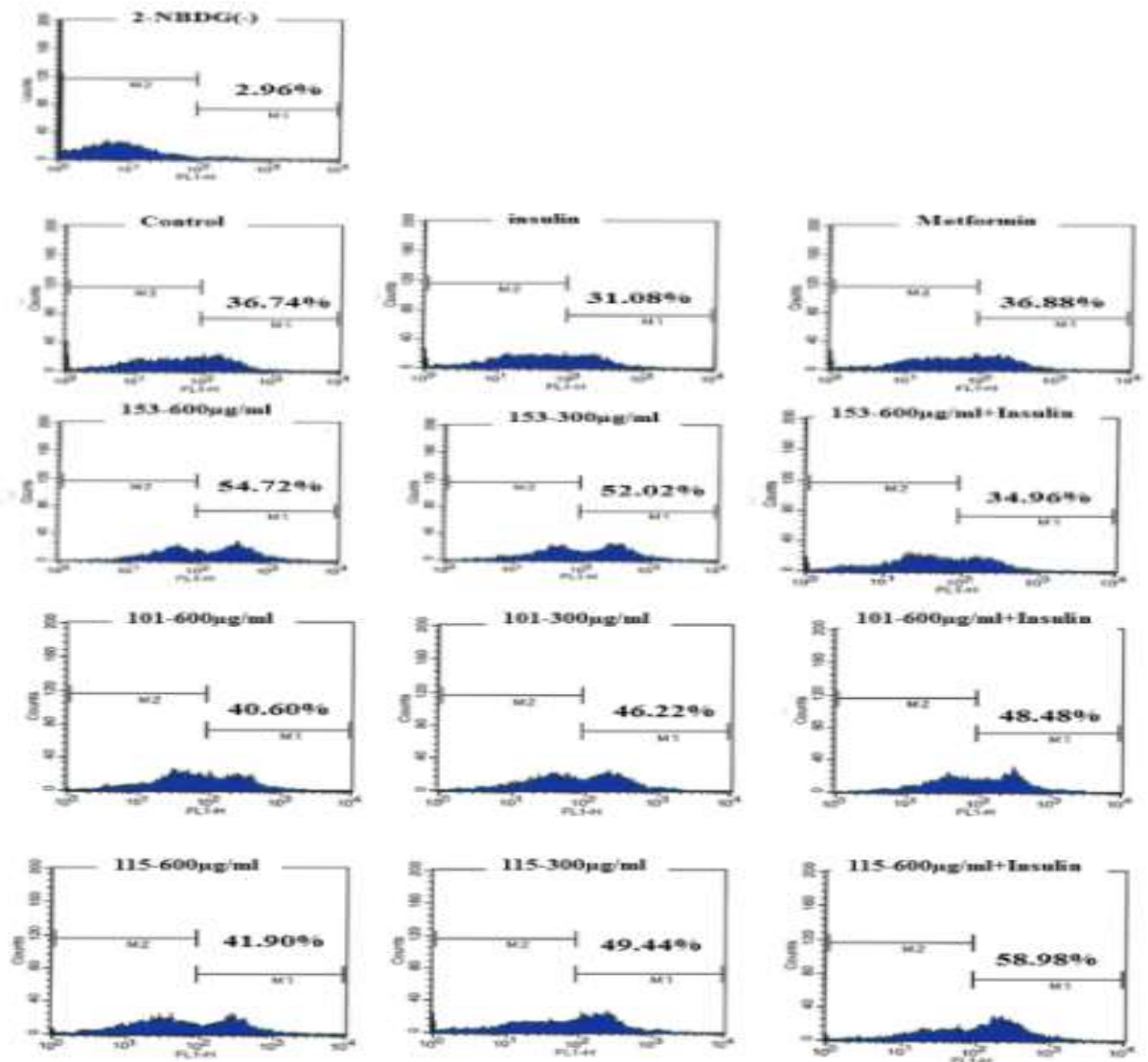
당뇨병은 인슐린의 분비 부족이나 인슐린에 저항성 증가로 인해 발병되는 질환으로 당질사 이상을 래할 뿐만 아니라 단백질, 지질 해질 등의 사조기능에 도 이상이 발생하게 된다. 당뇨병 환자에서 고당의 지속화와 만성화로 포도당의 당화과정에서 생성된 자유라디칼은 지질과산화물을 진하여 체내의 산화 스트레스를 증가시켜 세포조직의 손상을 초래하여 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증, 당뇨성 망막증, 말초신경병증 등 각종 당뇨 합병증을 일으킨다. 따라서 항산화제의 투여가 항산화 스트레스로부터 체내를 보호하여 당뇨 합병증을 감소시킬 수 있다(Fig. 131). 항산화 방어계에는 SOD, catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소계와 β -carotene, 비타민 C, 비타민 E, 셀레늄과 같은 항산화 영양소들이 있다. 최근 천연물로부터 당뇨병 유발을 억제할 수 있는 생리활성물질을 찾으려는 연구와 더불어 로부터 한방 민간에서 당강하제로 사용된 여러 약용식물의 항당뇨 효능을 과학으로 밝히려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 천연물의 생리활성을 증진시키는 주요한 기술로 발효가 많이 적용되고 있다. 발효를 통한 홍삼의 유효성분 증진, 천연물의 항산화 활성 증대 등이 보고되었다. 그리고 발효 녹차에서 EGCG, EGC, gallic acid 등 증진 기술이 개발되어 항산화, 항당뇨, 항비만 등 치료제의 개발이 진행되고 있다. 본 연구는 제주산 검정무 유산균 발효물과 비발효물에서 항당뇨 연구를 glucose uptake, 당뇨 관련 유전자 분석 등을 수행하였다.



<Fig. 131. 제2형 당뇨병모델 <Fang et al 2019>

○ Insulin resistance 3T3-L1 세포에서 glucose uptake 효과

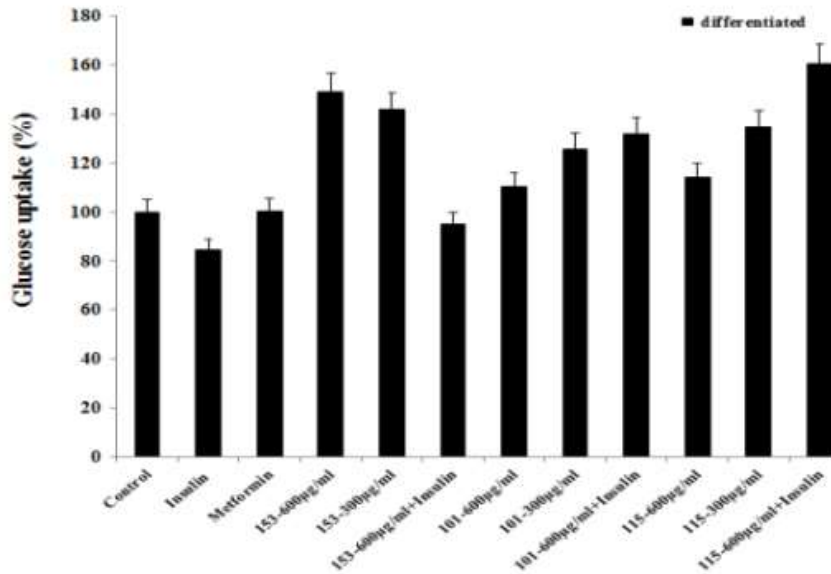
- insulin 저항성 유도는 MDI를 처리하여 6일 동안 배양하였다. 지방세포로 분화된 3T3-L1에 발효물(153)과 비발효물 peel 추출물(101), 비발효물 추출물(115)을 다양하게 처리하여 16 시간 배양 하였다. 그리고 3시간 glucose free DMEM 배지에서 4시간 배양 후 50 μ M 2-NBDG (2-N(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose)(형광 물질)와 100 nM insulin을 처리하여 30분 후 FACS(BD Calibur)기기에서 FL1 channel를 이용하여 glucose uptake 분석을 실시하였다.
- 2-NBDG 비처리구에서는 세포 수는 2.96%을 갖고 있으나 2-NBDG을 처리한 3T3-L1 control, insulin 처리, metformin 처리구에서는 36.7%, 31%, 그리고 36.8% 정도의 glucose uptake 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 132).



<Figure 132. FACS 분석에 의한 3T3-L1 세포에서 glucose uptake 효과>

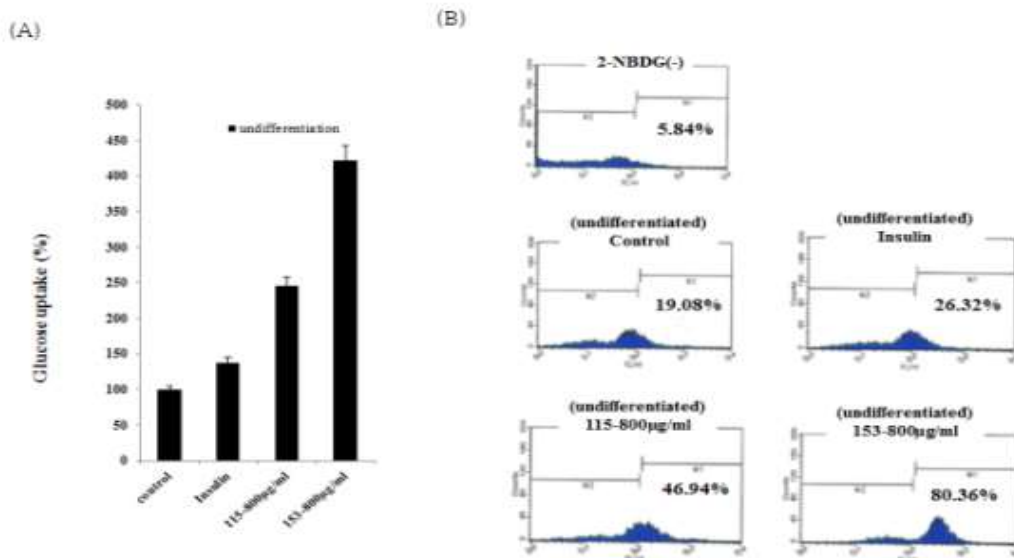
발효물(153) 600, 300 µg/ml 처리에서 glucose uptake 효과는 54.7%, 52% 그리고 비발효 peel 추출물(101) 처리에서는 40.6%, 46.2%, 비발효 추출물(115) 처리구에서는 41.9%, 49.4%의 세포가 glucose를 흡수한 것으로 보였다(Fig. 132, 133). 따라서 검정무 발효물은 control에 비해 1.6배, 비발효물 보다는 1.3배 높은 효과를 보였다. 그리고 insulin과 검정무 발효 및 비발효 추출물 처리 시 insulin resistance 3T3-L1 세포는 인슐린 저항성을 극복하는 것으로 나타났다.

insulin 단일처리, insulin+발효추출물 처리, insulin+비발효 peel 추출물, insulin+ 비발효 추출물에서 glucose uptake 효과는 31%, 34.96%, 48.4%, 58.9%의 glucose uptake 효과를 보였다(Fig. 132, 133). 이 결과는 발효물과 비발효물 모두 insulin resistance를 극복하는데 도움을 줄 수 있을 뿐만 아니라 2형 당뇨병 개선 관련 식품으로 가치가 있다고 사료 된다.



<Figure 133. FACS 분석에 의한 3T3-L1 세포에서 glucose uptake 효과>

- 정상적인 3T3-L1세포에 2-NBDG를 처리한 후 glucose uptake 효과를 분석하였다. 그 결과 비발효(115) 및 발효물(153) 추출물들은 insulin(100nM)처리 보다 1.7배, 3배 이상 높은 효과를 보였다. 이 결과는 검정무 추출물은 glucose를 원활하게 흡수시켜 운동량이 많은 운동선수 및 근력운동이 많은 노동자, 성장기 어린이 운동 음료개발에 도움이 될 것으로 사료된다(Fig. 134).

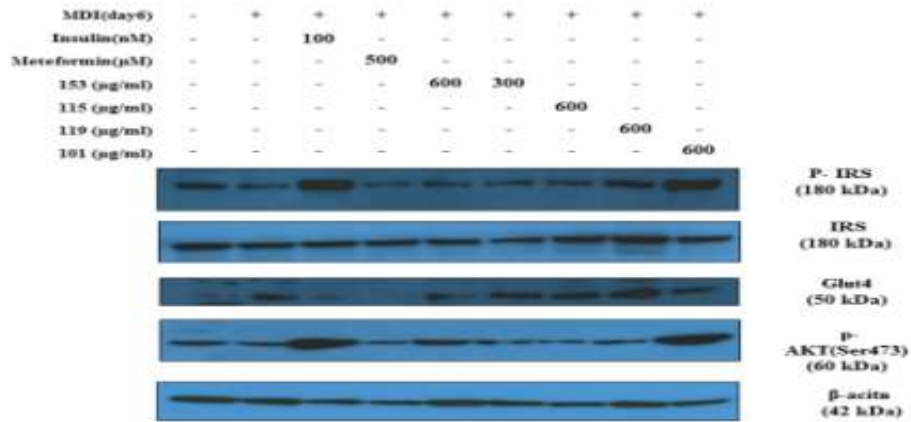


<Fig. 134. FACS 분석에 의한 3T3-L1 세포에서 glucose uptake 효과 glucose uptake%(A), FACS 분석(B)>

○ Western blot에 의한 glucose uptake 인자 발현 분석

- 제2형 당뇨병(type 2 diabetes)발병은 비만인자 및 steatosis 등 인자에 의해서 일어난다. 본 연구는 3T3-L1 세포를 지방세포로 분화시킨 후 insulin 저항성 비만세포로 유도하였다. 지방세포로 분화된 3T3-L1에 발효물(153)과 비발효물 peel 추출

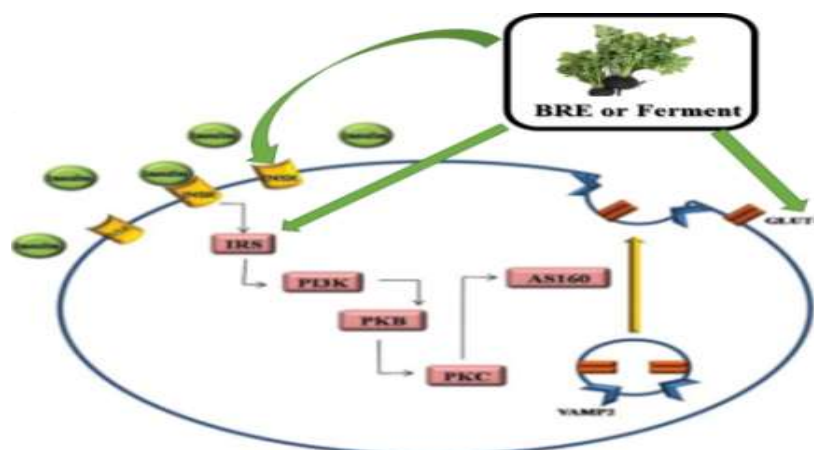
물(101), 비발효 추출물(115)을 다양하게 처리하여 16시간 배양 후 RIPA buffer를 이용하여 cell lysis후 western blot을 실시하였다.



<Fig. 135. 3T3-L1세포에서 Western blot에 의한 glucose uptake 인자 발현 분석>

인슐린저항을 갖는 지방세포에서 insulin signal에 관여하는 IRS1(insulin receptor substract1), AKT(protein kinase B), Glut4(glucose transport 4) 단백질을 western blot으로 분석 하였다(Fig. 5). phospho-IRS1는 insulin 처리구와 비발효구(101, 119)처리에서 강하게 유도되었다. Glucose을 운송하는 단백질인 Glut4 발현은 발효물, 비발효물 모두에서 강하게 발현이 이루어지고 있음이 확인되었다. 마지막으로 phospho-Akt는 insulin, 발효물(158), 비발효 peel 추출물에서 강하게 유도되었다(Fig. 135).

이 결과는 아래 모식도와 같이 검정무 추출물 및 발효물은 insulin 저항성 지방세포를 자극하여 Phospho-IRS 활성화, PKB 활성화 및 Glut4 유도를 통해서 glucose 흡수를 촉진한 결과 세포 활성화 또는 정상적인 glucogenesis가 이루어진다(Fig. 136).

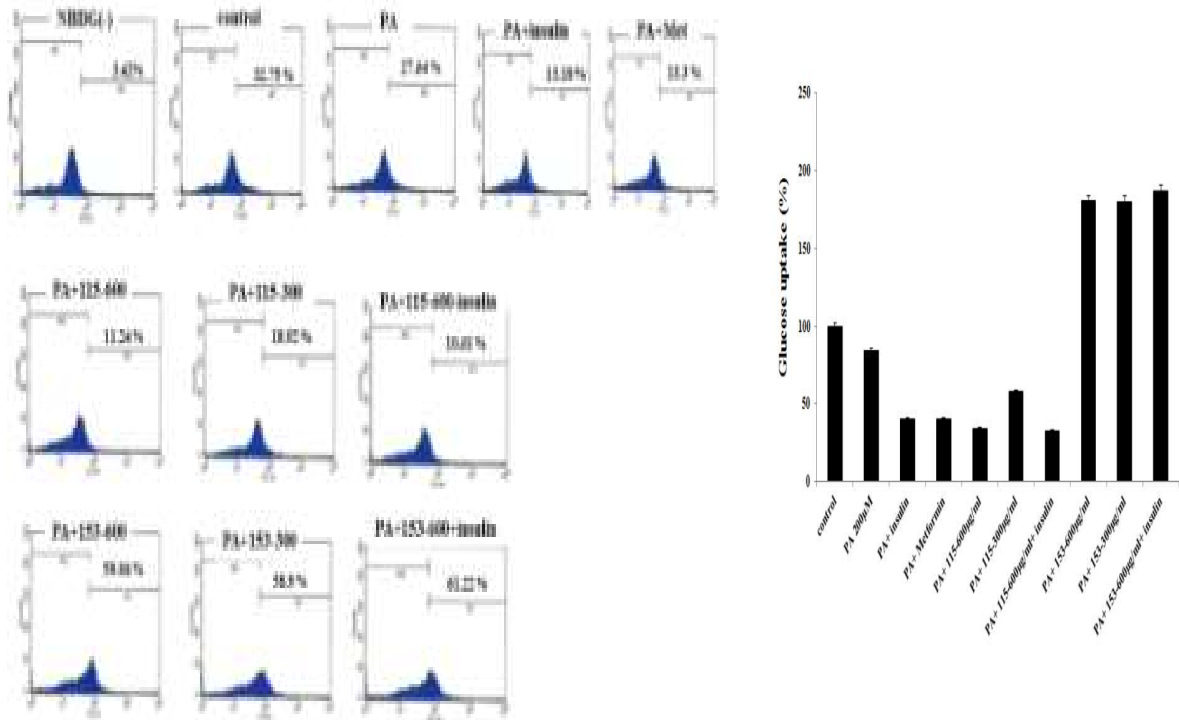


<Fig. 136. Glucose uptake와 insulin signal pathway>

따라서 검정무 발효물은 인슐린저항 지방세포에서 2형 당뇨병 개선 식품원료로 가치가 매우 높다고 할 수 있다.

○ Insulin resistance 간세포(HepG2)모델에서 glucose uptake 효과

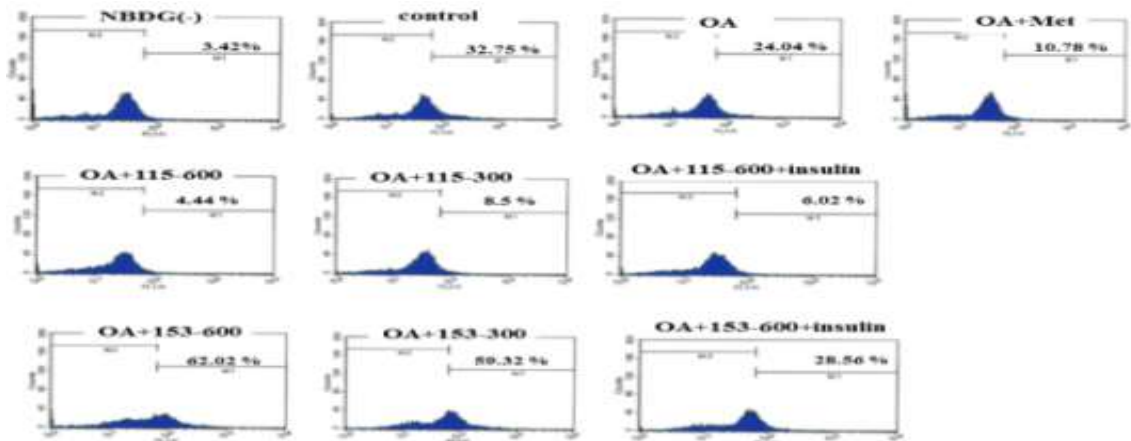
- 간세포를 12 well plate에 3×10^5 cells/well로 seeding 한 후 24시간 동안 배양하였다. 그리고 insulin resistance를 유도하기 위하여 Palmitate acid(250 μ M), Oleic acid(OA)(500 μ M)를 각각 처리하였다. 그리고 16시간 이후에 insulin, 발효물, 비발효물을 처리하여 24시간 배양 후 4시간 glucose free 배지에서 배양 후 2-NBDG를 처리하여 FACS 분석하였다.



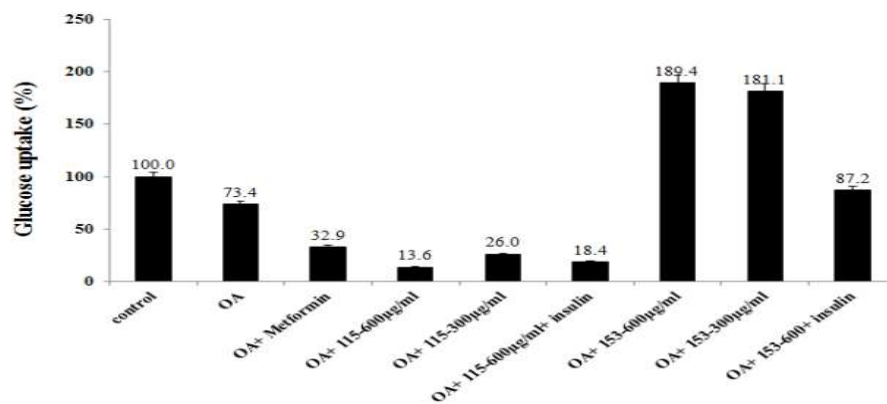
<Fig. 137. PA처리에 의한 insulin resistance 간세포(HepG2)모델에서 glucose uptake 효과>

먼저 PA 유도 insulin resistance 간세포 glucose uptake 효과를 보면 control과 PA 처리구에서 각각 32.7%, 27.6%의 glucose 흡수율이 현저하게 차이를 보여 insulin resistance 모델이 만들어 졌음을 확인하였다. 그리고 발효물(153)이 비발효물(115) 보다 glucose uptake 효과는 3~5배 정도 높았다(Fig. 137). 그리고 OA 유도에 의한 insulin resistance 간세포 glucose uptake 효과를 보면 control과 OA 처리구에서 각각 32.7%, 24%의 glucose 흡수율이 현저하게 차이를 보였다(Fig. 138). PA 유도에 의한 insulin resistance 모델에서의 결과처럼 발효물(153) 600, 300 μ g/ml처리에서 62%, 59%의 glucose uptake 효과를 보여 control 보다는 2배, OA 처리구 보다는 2.6 배 정도 높은 흡수율을 보였다. 따라서 insulin resistance 간세포 모델에서 glucose 흡수효과는 발효물에서 매우 뛰어난 결과를 보였다(Fig. 137, 138). 따라서 위 결과에 대해 signal pathway 및 관련 유전자 발현에 대한 심층적인 연구가 필요하다고 사료 된다.

(A)



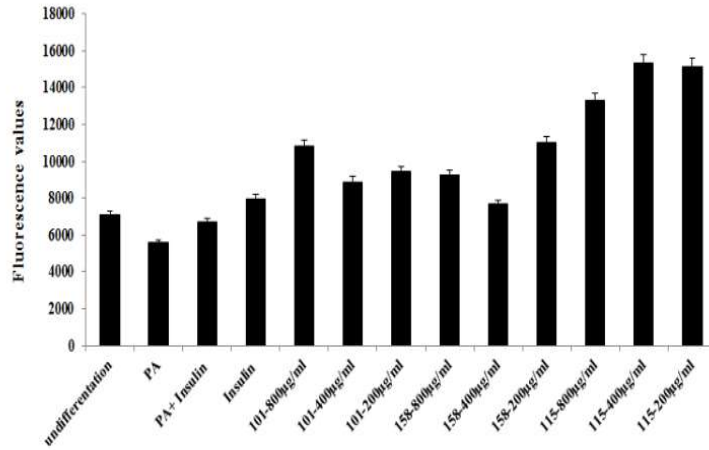
(B)



<Fig. 138. OA 처리에 의한 insulin resistance 간세포(HepG2)모델에서 glucose uptake 효과 FACS에 의한 glucose uptake 분석 결과(A) 및 glucose uptake(%)>

○ insulin resistance 근육세포(C2C12)에서 glucose uptake 효과

C2C12 myoblasts cell line을 DMEM 배지(10% FBS, 1% P/S)에서 배양하였다. C2C12 myoblast 세포 분화는 DMEM 배지에 3% horse serum 첨가하여 3일 동안 배양하였다. insulin resistance 유도는 PA(250µM)를 처리하여 1일 동안 유도하였다. glucose uptake는 발효물 및 비발효물을 16시간 처리 후 3시간 glucose와 FBS free 배지에서 starvation하였다. 그리고 PBS를 3회 세척 후 50µM 2-NBDG를 30분 동안 처리하였다. 그리고 PBS washing 후 Victor3에서 488nm excitation/550nm emission에서 형광 값을 측정하였다. 비발효 peel 추출물(101) 800, 400, 200µg/ml 처리하였을 때 PA 처리보다 1.8배, 1.6배, 1.7배 증가하였다. 발효물(158)에서의 glucose uptake 효과는 PA처리구에 비교하여 1.6배, 1.3배 증가하였다. 발효물(158)은 800, 400, 200µg/ml 처리구에서 2.5배, 3배 정도 증가하였다(Fig. 139). insulin resistance 근육세포(C2C12 myoblast)에서 glucose uptake 효과는 발효물 및 비발효물 모두 효과가 있는 것으로 보였다. 그러나 3T3-L1과 HepG2 세포와는 달리 발효물과 비발효물에서 glucose uptake 효과는 다른 결과를 보였다. 따라서 위 결과에 대해 signal pathway 및 관련 유전자 발현에 대한 심층적인 연구가 필요하다고 사료 된다.



<Fig. 139. PA 처리에 의한 insulin resistance 근육세포(C2C12)에서 glucose uptake 효과>

14) 제주갓(Brassica juncea jeju)추출물의 효능 연구

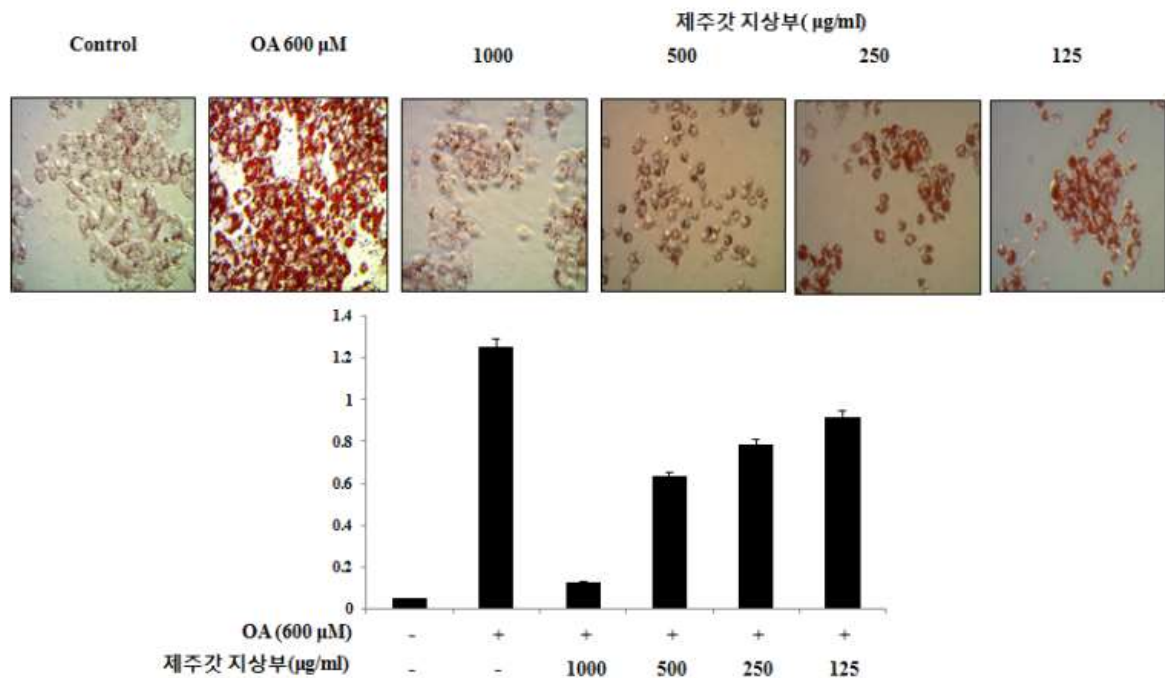
갓류(겨자)는 수세기 동안 야채, 조미료 및 식용 및 산업용 오일로 사용되고 있다. 갓(Brassica juncea, mustard, 겨자)은 십자과에 속하는 채소로서 종자를 가공하여 갈색 겨자, 아시아 겨자, 동양 겨자, 중국 겨자, 인도 겨자, 잎 겨자, 자이언트 레드, sarepta 겨자, 아시아 겨자, 겨자 녹색 및 야생 브라질 겨자 등으로 다양하게 알려져 있다. 우리나라에서는 김치 재료, 조미료, 향신료 등에 사용되고 있다. 동아시아 및 남아시아 고유의 연간 약초로 사용되고 있으며, 인도, 중앙 아프리카 및 러시아 남부와 카스피 대초원에서 널리 재배되고 있다. 갓은 인도, 호주와 뉴질랜드에서도 사용되고 있으며, 전통 의학에서는 진통제, 아페리티프(식전주), 이뇨제, 구토제, 루비 페스트제 및 자극제, 관절염, 발통, 요통 및 류머티즘, 제2형 당뇨병개선제로 사용하고 있다.

특히, 갓(겨자)류에 함유된 글루코시놀레이트(glucosinolates) 황 화합물들은 항균성 및 대립 형 중간 대사산물들은 박테리아 감염, 곰팡이 침입, 뿌리의 선충 침입 및 곤충 침입을 예방한다. 글루코시놀레이트는 십자과(Brassicaceae)에서 방출된 휘발성 오일에 존재하기 때문에 대부분의 곤충 해충에 대해 구충제이다. 예를 들어, 자연 살충제로 사용될 수 있으며 진딧물, 붉은 거미 진드기 및 파리에 효과적이다. 겨자의 살충 활성은 피레트로이드(permethrin)와 유사한 퍼메트린(Pyrethroid)이다. 또한, 곤충이나 기생충의 신경 세포막에 작용하여 신경 세포막의 분극을 담당하는 나트륨 채널 전류를 억제한다. 결과적으로 막의 재분극이 지연되고 결국 해충이 마비되고 죽는다. 겨자의 성분은 지방족 글루코시놀레이트-알릴 티오시아네이트(aliphatic glucosinolates-allyl thiocyanate), 알릴이소티오시아네이트(allyl isothiocyanate), 알릴이소시아네이트(allyl isocyanate), 알릴시아나이드(allyl cyanide), 방향족 이소시아네이트(aromatic isocyanates), 페닐(phenyl), 벤질(benzyl), 펜에틸 및 2-나프틸리소티오시아네이트(phenethyl and 2-naphthylisothiocyanate), 니트릴(nitriles), 3-인돌릴-아세토나이트릴(3-indolyl-acetonitrile), 곤충 나트륨 채널 전류를 억제하여 이온 투과성 및 항상성에 영향을 미침으로써 살충 활성을 갖는 것으로 나타났다.

글루코시놀레이트는 글루코오스 및 아미노산으로부터 유도된 황 및 질소 함유 천연 화합물이다. 온전한 형태의 유기 화합물은 생물학적 활성이 낮고, 미로시나 아제 효소의 작용에 의해 형성된 그의 가수 분해 생성물은 높은 생물학적 활성을 발휘한다. 형성된 다양한 가수 분해 생성물 중에서 이소 티오시아네이트(isothiocyanates: ITC)는 탁월한 활성으로 나타난다. 이들 화합물들은 산화 스트레스 조건에서 세포 항상성을 유지하는 데있어 외부적이고 중요한 요소로 작용한다. 최근에 Arora et al(2016)은 갓(*Brassica juncea*)에서 분리한 3-butenyl ITC 약물의 항암 효과 연구 결과를 보고하였다.

○ 제주갓 추출물의 hepatic steatosis 억제 효과

- HepG2 간세포를 DMEM 배지(10% FBS, 1% P/S)에서 배양하면서 제주갓 추출물과 Oleic acid(600 μ M)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그리고 Oil-Red-O를 이용하여 염색한 후 현미경 관찰 및 lipid 함량을 분석하였다(Fig. 140).

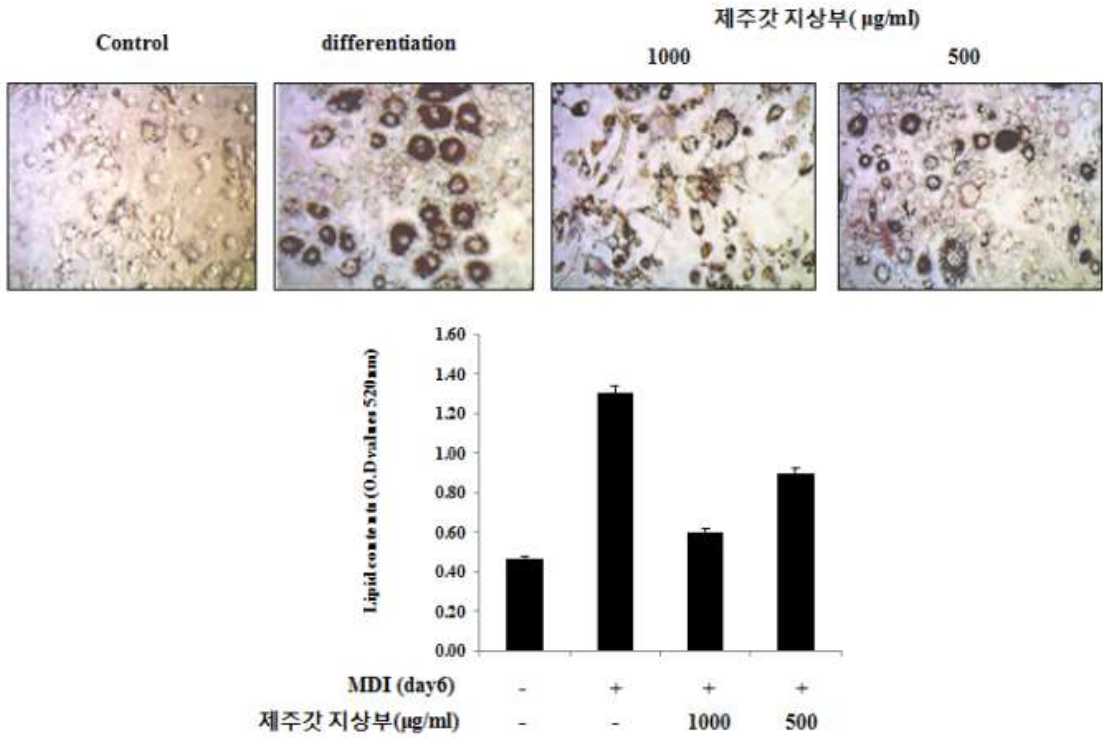


<Fig. 140. 제주갓 추출물의 hepatic steatosis 억제 효과
Oil-Red-O 염색(A) 및 lipid 함량(B)>

그 결과 제주갓 추출물은 농도 의존적으로 지방구 합성과 steatosis를 억제하여 비알콜성 지방간 억제 약물 개발 후보로 가능성이 있음을 확인하였다(Fig. 140).

○ 제주갓 추출물의 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과

- 제주갓 추출물의 지방세포분화억제 효과를 알아보기 위하여 3T3-L1 미분화 지방세포를 24 well plate에 1×10^5 cells로 seeding하였다. 그리고 2일 배양 후 MDI와 제주갓 추출물을 6일 동안 처리한 후 Oil-Red-O 염색으로 lipid 함량 및 지방세포 분화 억제효과를 분석하였다.

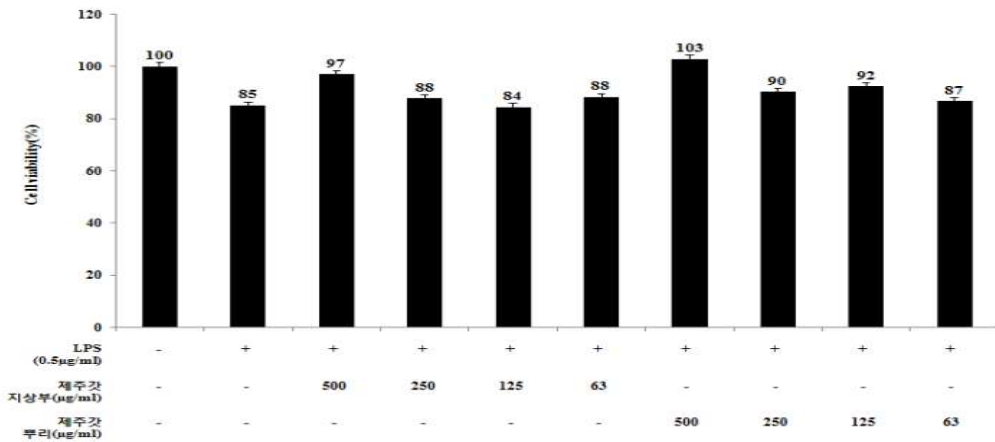


<Fig 141. 제주갓 추출물의 지방세포 분화 억제 효과 Oil-Red-O 염색(A) 및 lipid 함량(B)>

그 결과 제주갓 추출물은 1000, 500µg/ml처리에서 지방세포 분화 억제와 lipid 합성을 억제하여 건강식품소재로 진전된 연구가 필요하다고 사료 된다(Fig. 141).

○ 제주갓 추출물의 염증억제 효과

- RAW 264.7 monocyte을 48 well plate에 1×10^5 cells로 seeding 하였다. 그리고 24시 0.5µg/ml lipopolysaccharide(LPS)와 제주갓 추출물을 다양한 농도로 처리한 후 24시간 후에 MTT와 NO생성량을 분석하였다.



<Fig. 142. RAW264.7 세포에서 제주갓 추출물의 cell viability 효과>

- 제주갯 추출물은 LPS와 처리 시 독성효과는 없으나 고농도 제주갯 추출물 처리구에서 세포증식효과가 있는 것으로 보였다. 그리고 NO 생성 억제효과에서는 뿌리 추출물에서는 효과가 없으나 지상부 추출물에서는 500, 250 μ g/ml 처리구에서 각각 43%, 14%의 억제효과를 보였다(Fig. 142).

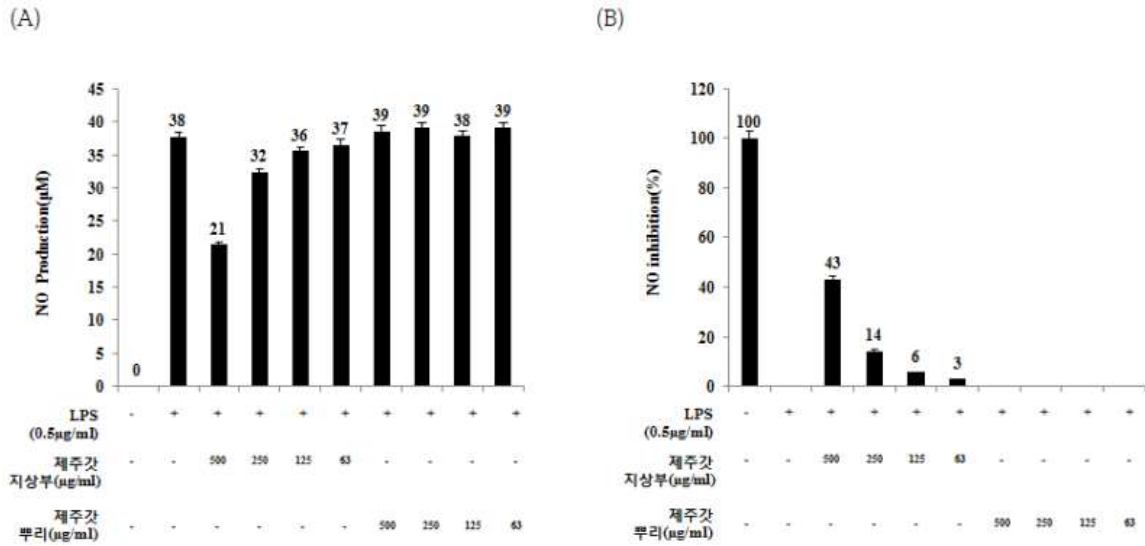
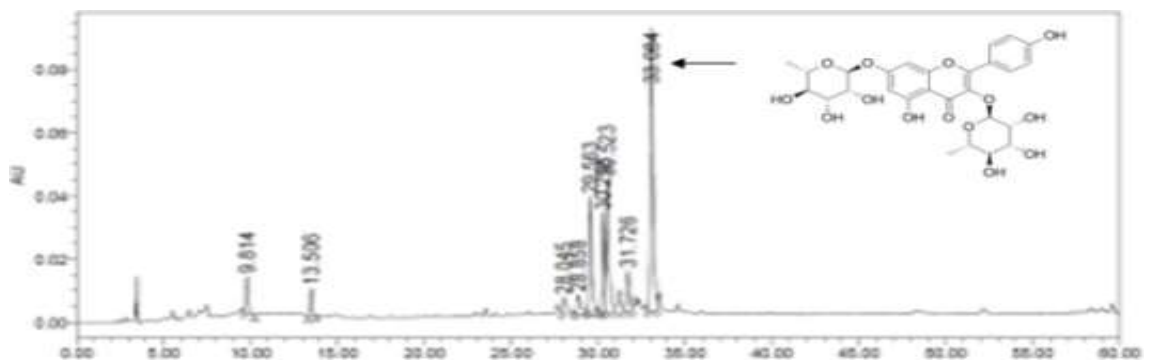


Figure 142. RAW264.7세포에서 제주갯 추출물의 염증억제 효과. NO 생성량(A) 및 NO 생성 억제율(B)

15) Kaempferitrin (kaempferol-3,7-bisrhamnoside) 효능평가 연구

- 검정무 잎(Black radish leaf)에는 kaempferitrin, kaempferol-3-O-a-L-arabinopyranoside, afzlin, loliolide, p-coumaric acid, ethy caffeate, fulgic acid 등이 포함되어있다. 특히 kaempferitrin은 70% 에탄올 추출물에는 7.4mg/g(0.64%), EtOAc 분획에는 163mg/g(16.3%), BuOH 분획물에는 15.7mg/g(1.57%) 함유됨을 확인하였다(Fig. 143).



<Fig. 143. 검정무 잎 추출물 HPLC 양상 및 kaempferitrin peak>

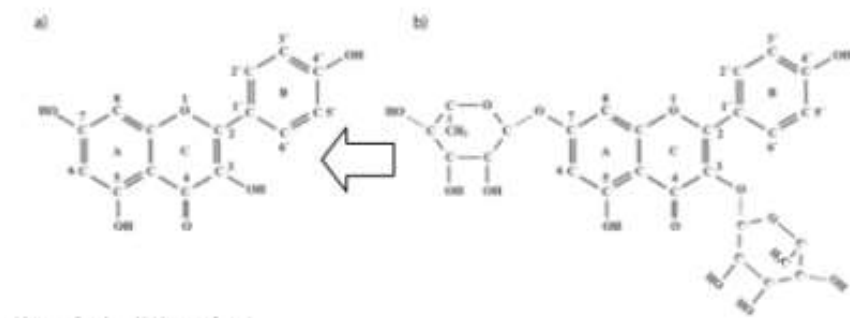
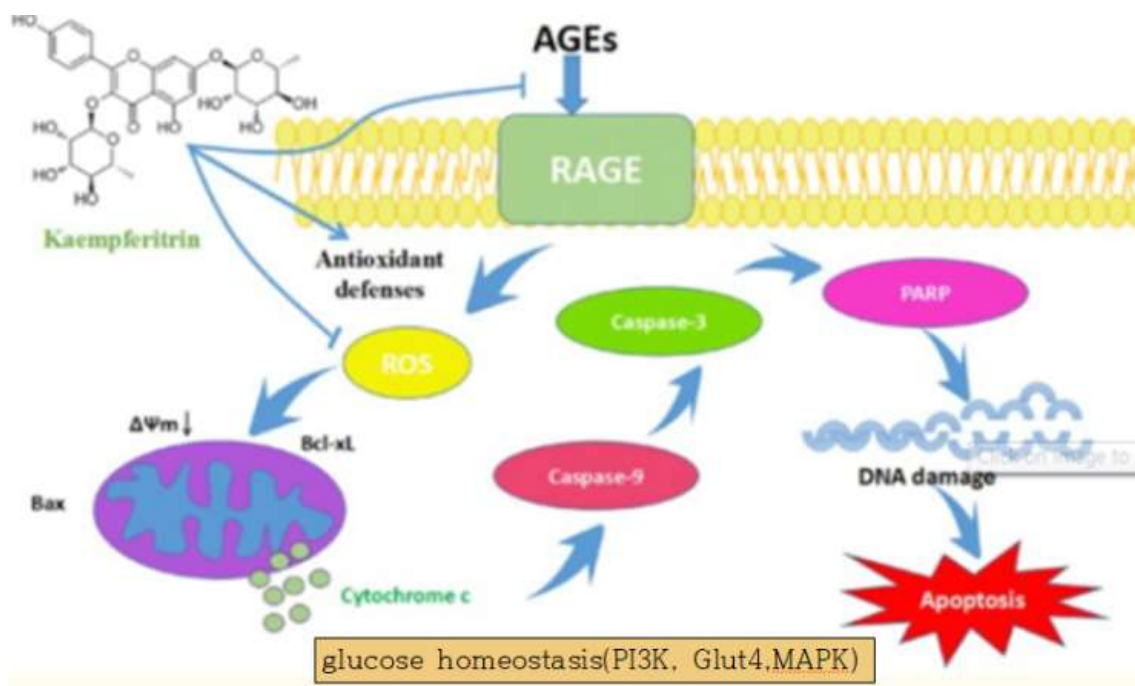


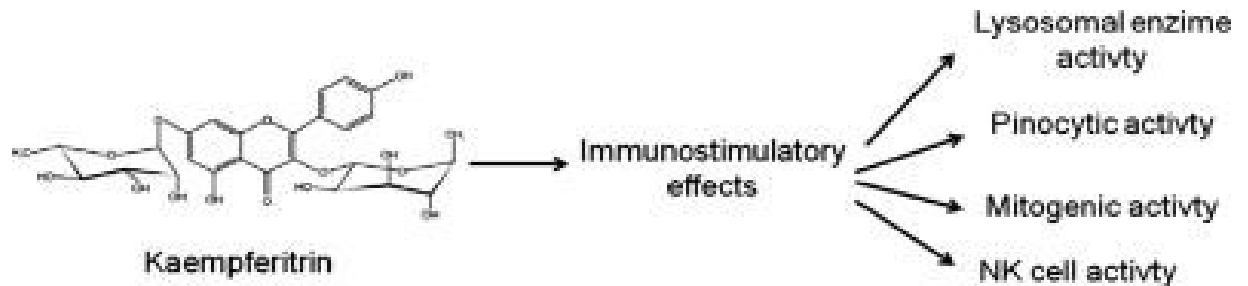
Fig. 144. structure of kaempferol(a) and kaempferitrin(b)

- 본 연구는 검정무 잎에 가장 많이 함유된 Kaempferitrin 천연물의 효능을 분석하였다. kaempferitrin 연구에 대한 보고로는 insulin signal 촉진을 통한 항당뇨 효과 (Cazarolli *et al* 2013), Rheumatoid arthritis 질환에서 synovial fibroblast 세포 성장 억제, apoptosis 유도, 염증억제효과가 있다(Wang and Zhao, 2019). 또한, Jiang et al.(2018)은 AGE-induced glomerular mesangial cells 모델에서 kaempferitrin은 cell apoptosis와 Oxidative stress를 억제하여 신장세포를 보호한다(Figure 25). kaempferitrin에서 2개의 당이 제거되면 kaempferol이 된다 (Fig. 144, 145).



<Fig. 145. kaempferitrin 효능 기작>

그리고 멕시코 전통의약소재(*Justicia spicigera*)에서 Kaempferitrin을 분리하여 면역 활성을 확인 하였다(Del Carmen et al 2013)(Fig. 146).



<Fig. 146. kaempferitrin의 면역활성 기작>

○ Kaempferitrin의 염증 억제 효과

- 검정무 앞에서 분리된 Kaempferitrin과 LPS를 농도별로 RAW264.7 세포에 처리하여 MTT분석과 NO 생성 효과를 분석하였다. 그 결과 cell viability는 LPS와 차이를 나타내지 않았다. 그리고 NO 생성 역시 효과를 보이지 않았다(Fig. 147).

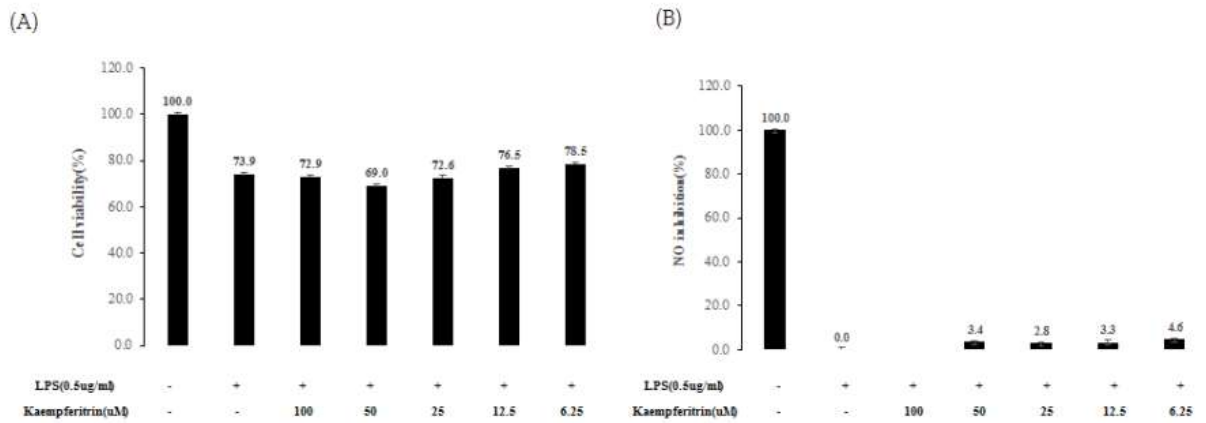


Figure 147. RAW264.7 세포에서 Kaempferitrin의 염증 억제 효과
Cell viability(A) 및 NO 생성 억제율(B)

○ Kaempferitrin의 ROS 억제 효과

- RAW264.7 세포에서 Kaempferitrin의 ROS 억제 효과를 분석하기 위하여 tert-butyl hydroperoxide(tBHP)을 200μM 처리하여 ROS를 유도하였다. 그리고 Kaempferitrin를 다양한 농도를 처리한 후 FACS를 이용하여 ROS 생성 세포수를 분석하였다(Figure 148). 그 결과 Kaempferitrin는 고농도에서는 억제하는 경향을 보이나 저농도(50, 25μM)에서는 ROS 생성을 촉진하였다(Fig.148).

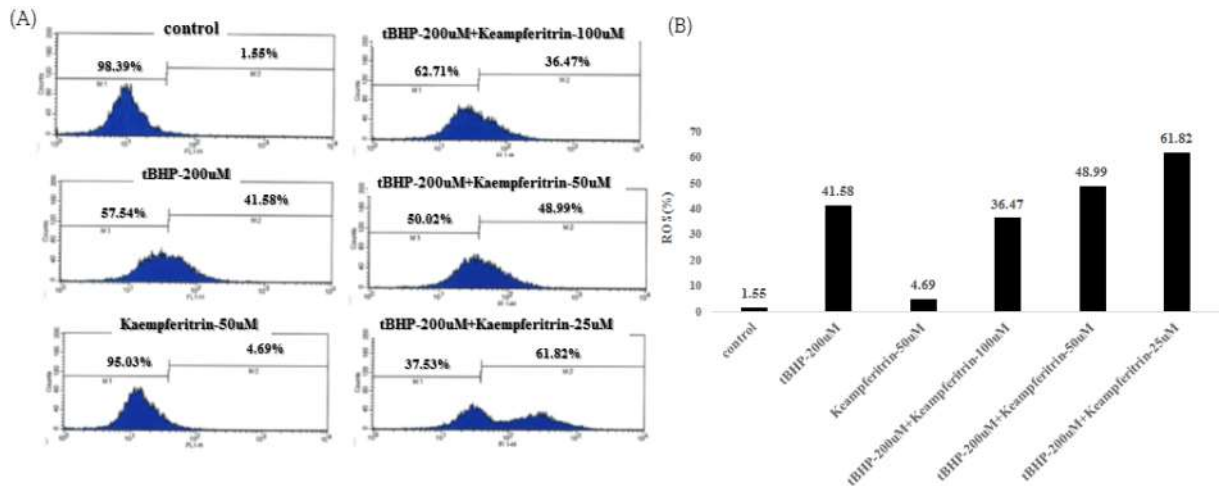
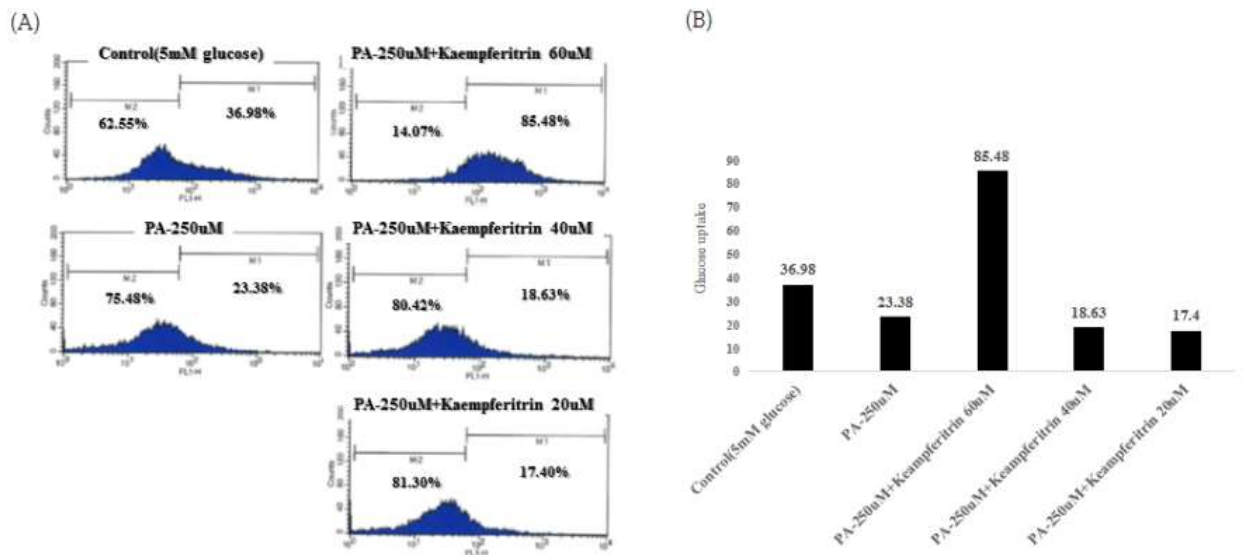


Fig. 148. RAW264.7 세포에서 Kaempferitrin의 ROS 억제 효과
FACS에 의한 ROS 분석 결과(A) 및 ROS 분석(B)

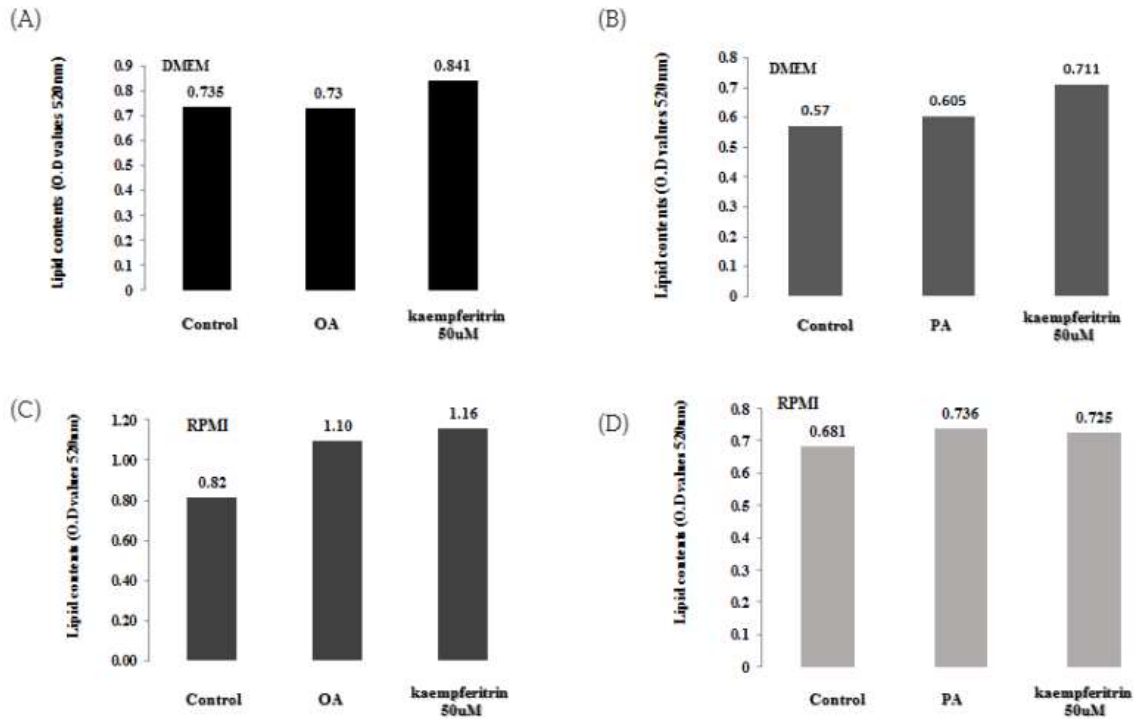
- Kaempferitrin의 insulin resistance HepG2 세포에서 항당뇨 효과
 - HepG2 간세포를 5mM glucose DMEM 배지에서 200 μ M PA를 처리하여 insulin resistance 유도한 후 Kaempferitrin를 60, 40, 20 μ M 처리한 후 16시간 동안 배양하였다. 그리고 4시간 starvation시킨 후 2-NBDG 처리 후 FACS를 이용하여 glucose uptake 효과를 분석하였다. 그 결과 Kaempferitrin는 60 μ M에서 정상세포의 2.5배 정도의 glucose를 흡수하여 항당뇨 효과가 우수한 것으로 보였다 (Figure 29). 이 결과는 Cazarolli et al(2013) 결과 보고와 일치하였다(Fig. 149).



<Fig. 149. Kaempferitrin의 HepG2세포에서 항당뇨 효과
FACS에 의한 glucose uptake 결과(A) 및 glucose uptake(%)>

○ Kaempferitrin의 HepG2세포에서 hepatic steatosis 효과

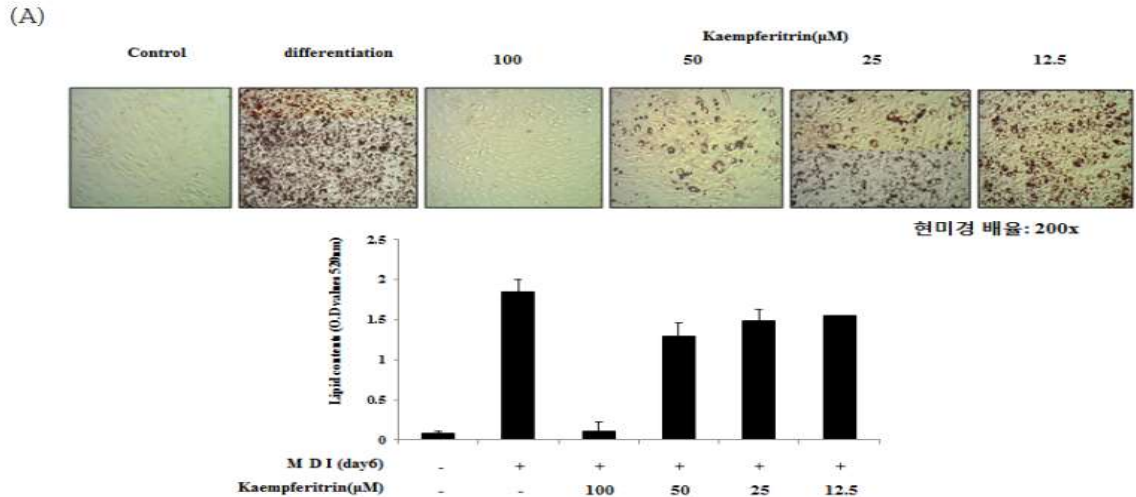
- HepG2 간세포를 이용하여 지방간 모델을 유도하였다. HepG2 세포에 중성지방 OA, PA와 같이 Kaempferitrin를 처리한 결과, OA, PA 처리 모두에서 steatosis는 증가되었다(Fig. 150). 따라서 Kaempferitrin는 glucose 흡수를 촉진하여 세포내 지방구 및 지질 합성을 촉진하는 것으로 사료된다.



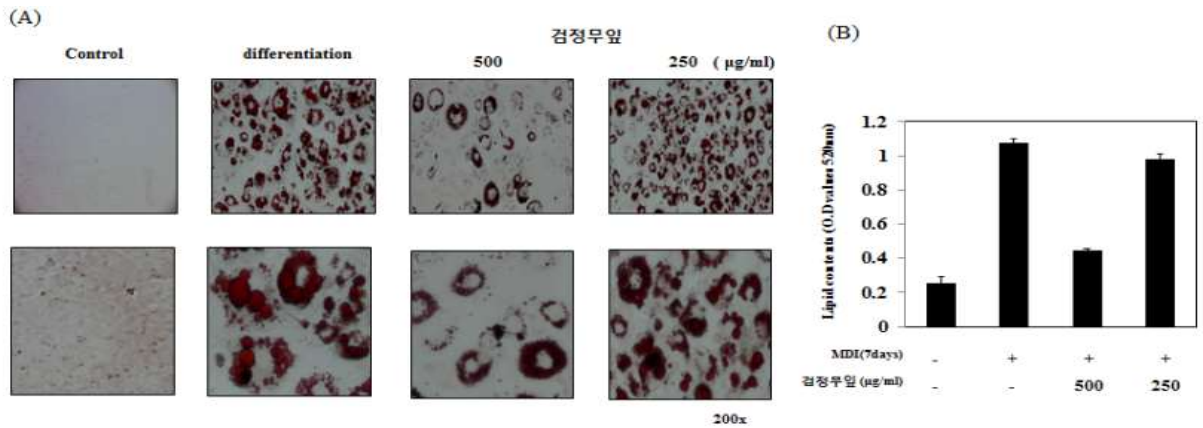
<Fig. 150. Kaempferitrin의 HepG2세포에서 steatosis 효과
OA(A,C)와 PA(B,D) 처리에 따른 lipid 축적 및 분석>

○ Kaempferitrin과 흑무잎에서 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과

- 3T3-L1 미분화세포를 MDI와 Kaempferitrin를 함께 처리하여 6일 동안 배양하여 지방세포로 분화를 유도하였다. 그리고 배양 후 Oil-Red-O를 이용하여 염색 후 사진 촬영 및 중성지방을 분석하였다. 그 결과 Kaempferitrin은 100, 50, 25 μ M 처리에서 현저하게 지방세포 분화를 억제하였다(Fig. 151). 그리고 고농도 흑무잎 추출물(500ug/ml) 처리구에서 3T3-L1지방세포 분화가 억제됨을 확인 하였다(Fig.152)



<Fig. 151. Kaempferitrin의 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과 Oil-Red-O 염색(A) 및 lipid 함량(B)>



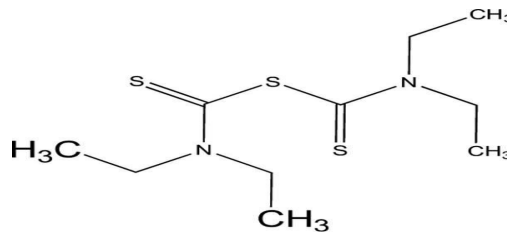
<Fig. 152. 검정무 잎 추출물의 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과 Oil-Red-O 염색(A) 및 lipid 함량(B)>

그리고 우리는 Kaempferitrin의 지방세포분화 억제를 확인하였다. 또한 Kaempferitrin이 다량 함유된 검정무잎에서 지방세포분화 억제효과를 분석 하였다(Figure 152). 그 결과 농도 의존적으로 지방세포 분화가 억제됨을 관찰하였다. 따라서 검정무 잎을 이용한 건강지향형 식품개발에 유용한 원료라 사료되며, 향후 검정무로부터 Kaempferitrin 관련 심층적인 연구가 필요하다고 사료된다.

16) Disulfiram(DSF)의 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과

- Disulfiram(DSF) 화합물은 1950년대 만들어진 알콜중독 치료제이다. DSF는 알콜분해에 관여하는 ADH(alcohol dehydrogase), ALDH(acete aldehysease)효소를 억제하여 acetaldehyde가 체내에 축적됨으로서 대사장애로 인하여 알콜식이를 막는 기작이다 (Fig. 153).

○ Disulfiram(DSF)은 경구 생체 이용 가능한 카바 모일 (carbamoyl)유도체로서 알콜중독 치료제로 사용되고 있다. 또한 항종양(antineoplastic)과 chemosensitizing 활성을 갖는 프로 테아 쯘 억제제로도 보고되고있다. DSF는 에탄올 대사 산물 아세트알데히드(acetaldehyde)를 아세트산(acetic acid)으로 산화시키는 효소 인 ALDH2(acetaldehyde dehydrogease2)에 불가 역적으로 결합하고 효소활성을 억제한다. 아세트 알데히드 탈수소 효소의 억제는 아세트 알데히드의 축적을 초래하고 다양한 매우 불쾌한 증상을 생성하며,이를 함께 다이 설피 램-에탄올 반응 (DER)이라고 한다. 또한, DSF는 금속을 킬레이트하는 강력한 능력을 가지고 있으며, 항 종양 활성은 암세포에 선택적으로 축적되는 금속 인 구리 (Cu)에 결합하는 것에 크게 의존한다. DSF / Cu는 반응성 산소 종 (ROS)을 생성하고 프로 테아 쯘 활성을 억제하여 유비퀴틴 화 된 단백질의 축적을 초래하고; 이 두 가지 과정 모두 세포사별(apoptosis)를 유도합니다. 또한, DSF / Cu는 다양한 암 특이 적 경로를 억제하여 종양 세포 성장 억제로 이어진다.



<Fig.153. Disulfiram(DSF) 화합물의 구조>

또한, DSF는 암 치료와 같은 새로운 용도 매우 활발히 연구되고있어 많은 학자들이 매우 매력적이고 흥미 진진한 약물로 평가 받고있. DSF는 인체에 알려진 프로파일의 고유한 특성, 저렴한 비용, 작은 부작용 및 다양한 암에 대한 높은 선택성 및 다른 약물과의 시너지 효과로 인해 잠재적 인 항암제로 연구되고있다. DSF만의 독특한 특성과 생물학적 특성은 금속화합물과의 친화력이 매우 높은 복합화를 구성한다.

최근에는 DSF는 기존 항암제보다 쉽게 구할 수 있고 비용 부담이 적으며, 그리고 부작용이 적기 때문에 항암제 개발에 많은 학자들이 관심이 집중되고 있다. 또 다른 중요한 특징은 DSF가 프로 테아 쯘 억제에 대한 새롭고 유망한 접근법을 나타내는 종양 프로 테아 쯘 활성을 보여주는 능력이다. 또한 DSF는 ROS, PIK, MAPK, NF-κB, ALDH, EGFR / Src / VEGF 등을 포함한 다른 암 관련 경로를 억제 한다고 보고되고 있다.

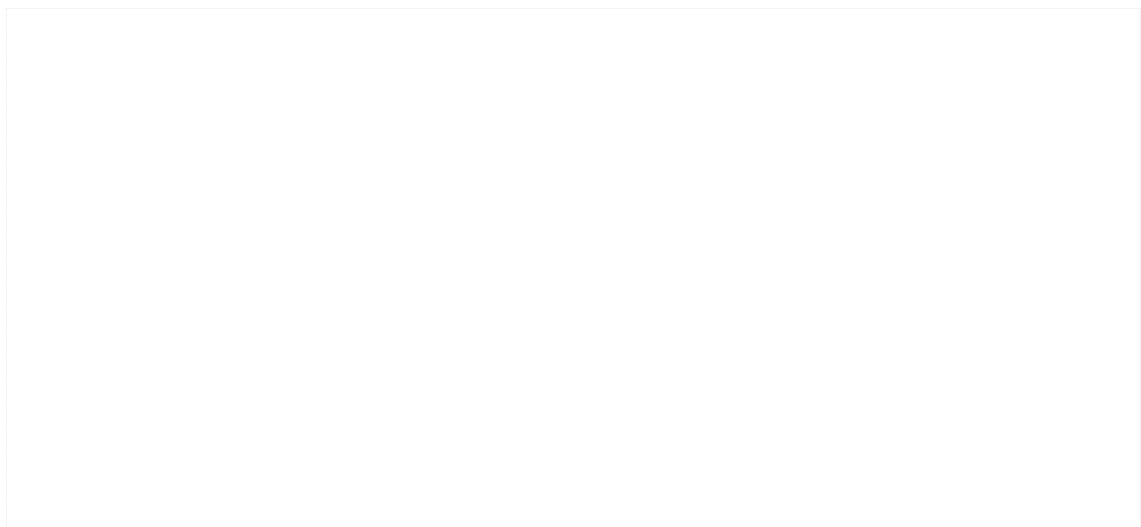
Acetadehyde dehydrogease(ALDH)는 Aldehyde에서 카르복실산(carboxylic acids)으로의 해독에 관여하는 NAD(P)⁺-dependent enzyme로는 19개의 isoenzyme들이 있다. ALDH 활성은 간, 신장, 자궁 및 뇌, 지방세포, 등에서 발현된다.

모든 인간 ALDH 동종 효소 중에서, ALDH1A1, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3B1 및 ALDH7A1만이 생화학 적으로 확인되었다. 이들 효소는 상대적 기질 특이성 (기관의 겹치는 스펙트럼)을 가지며, 동종 효소-특이 적 효과를 정확하게 묘사하기가 어

럽다. 약리학 적 억제, 알코올대사, 항암제에 관여하는 ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH2 효소에 대한 연구는 매우 활발히 연구되고 있다..

DSF에 의한 ALDH의 억제를 설명 할 수있는 메카니즘에서, 관련된 두 가지 메카니즘에 의한 분자 내 이황화 결합의 형성 : (i) DSF와 효소의 활성 부위 티올 사이; 또는 (ii) 불안정한 혼합 디설파이드 부가 물을 통한 다른 시스테인 잔기의 활성 부위 티올과 티올 사이 DSF는 ALDH2보다 ALDH1에 대한 친화력 및 효능이 더 크다. ALDH1 효소에는 자연적인 기질이 DSF와 함께 들어가서 억제 효과를 발휘하는 소수성 터널이 존재한다. DSF는 결합 이황화물의 감소 및 DTC의 방출을 통해 ALDH의 활성을 억제한다. DSF의 대사 산물은 세포 또는 생체 내에서 ALDH활성을 다양하게 억제한다. DSF는 생체 내에서 미토콘드리아 ALDH2의 다른 강력한 억제제로 전환된다 간 티올 메틸 트랜스퍼 라제에 의해 형성된 S-methyl-N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide(DETC) 및 S-methyl-N,N-diethylthiolcarbamate (Me-DDTC)는 시토크롬 P-450을 통한 DSF의 촉매 생성물을 만들어 낸다, 예를 들어 Me-DDTC, DETC-SO (DETC-Sulfoxide), S-methyl N, N-diethylthiolcarbamate sulfoxide(MeDDTC-SO) 및 S-methyl N, N-diethylthiolcarbamate sulfone(Me-DDTC-SO₂)도 미토콘드리아 ALDH를 억제한다. 이들 화합물은 촉매 Cys302 잔기의 카르 바 밀화 때문에 비가 역적 반응을 한다 (Fig.154).

지난 몇 년 동안 다양한 암세포에서 ALDH 효소 발현에 대한 연구는 매우 활발히 진행되어 왔다. 이는 이 효소가 암 세포 생존과 진행에 중요하다는 것을 시사합니다. 암의 경우, 두 가지 동종 효소가 가장 중요한 ALDH1A1 및 ALDH1A3이며, 암의 발달, 진행 및 예후, 종양 지속 및 침습과 관련이 있다. ALDH1A1 양성은 폐암, 자궁 경부암 종, 난소 암, 진행성 편평 상피 세포 두경부, 비 인두 암종, 방광암 및 자궁 내막 암 선암종에서 발견되며 ALDH1A3 활성은 유방암, 담관암, 전립선 암 및 신경 교종에서 강하게 발현 된다.

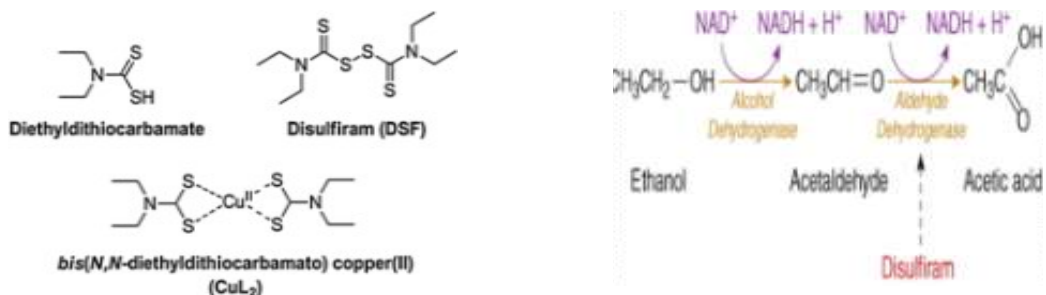


<Fig. 154. DSF의 다양한 중합반응 기작 (출처: Pike MG, Mays DC, Macomber DW, and Lipsky JJ (2001) Metabolism of a disulfiram metabolite, S-methylN,N-diethyldithiocarbamate, by flavin monooxygenase in human renal microsomes. Drug Metab Dispos 29:127-132)>.

4-hydroxynonenal(4-HNE)은 지질 과산화로부터 생성된 알데히드성 화합물로서 비만을 포함한 수많은 산화 스트레스 관련 질병에서 높게 보인다. 지질 대사에 관여하는 여러 단백질은 4-HNE에 의해 카르보닐화되어 세포신호 전달을 변형시킨다. 지방 세포에서 증가된 세포 내 4-HNE- 단백질 부가 생성물 형성은 지방분해 반응을 유도하며, 이는 4-HNE가 분화된 지방 세포에서 관련 생물학 역할을 한다는 것을 나타낸다. 또한, 4-HNE 축적은 알데히드 탈수소 효소 2 (ALDH2)와 같은 주요 효소를 불활성화함으로써 알데히드 해독을 방해한다. 비만 동물모델 ob/ob mice와 High-fat diet(HFD)-fed mice white 지방조직에서 ALDH2 감소하였다(Yu et al., 2016). 그리고 shALDH2-3T3-L1세포에서는 지방세포분화관련 유전자 FABP4, adiponectin, LPL mRNA발현이 감소하였다

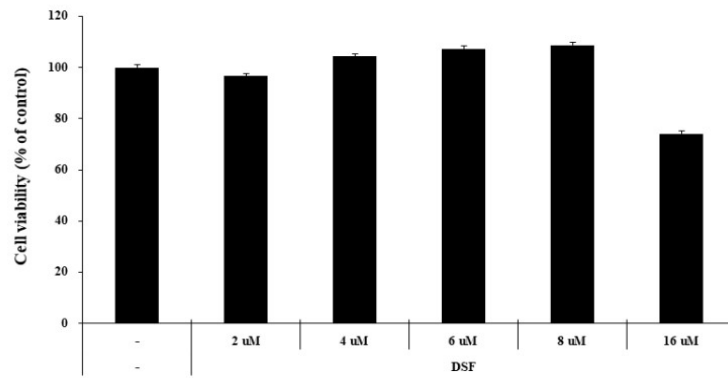
ALDH2 유전자는 에탄올 대사에서 아세트 알데히드가 아세트산으로 산화 될뿐만 아니라 4-HNE 대사에 중요한 효소 인 미토콘드리아 ALDH2를 코딩한다. ALDH2 활성은 PKCε에 의한 직접 인산화를 통해 증가합니다. ALDH2 발현은 마우스에서 비만과 음의 상관 관계가 있는 것으로 보고 되었으며, 4-HNE 축적은 비만과 양의 연관성이 있으며 말단 지방 세포 분화에서 증가된다. 본 연구는 DSF가 ALDH2을 억제하여 4-HNE를 생성하게되면 지방세포 분화인자(PPAR- α 등)을 억제하여 지방합성 및 비만을 억제하는 가설을 설정 하였다(Fig. 155) 그리고 현재까지 PKCε-ALDH2 조절 축이 4-HNE의 대사를 통해 지방 생성을 매개하는지 여부는 아직 결정되지 않았다. 따라서, 본 연구는 지방 세포 분화에 대한 PKCε 및 ALDH2의 효과를 평가 하였다.

우리는 3T3-L1 세포를 분화시켜 DSF의 지방세포분화 억제효과를 분석하였다. 3T3-L1 미분화세포를 MDI와 Disulfiram를 함께 처리하여 6일 동안 배양하여 지방 세포로 분화를 유도하였다. 그리고 배양 후 Oil-Red-O를 이용하여 염색 후 사진 촬영 및 중성지방을 분석하였다. 그 결과 DSF은 10, 5, 2.5, 1.25 μ M 처리에서 고농도 순으로 현저하게 지방세포 분화를 억제하였다(Figure 157). 세포생존을 시험에서 DSF 10 μ M처리구에서 독성이 관찰되어 본 실험에서는 제외시켰다(Fig. 156)

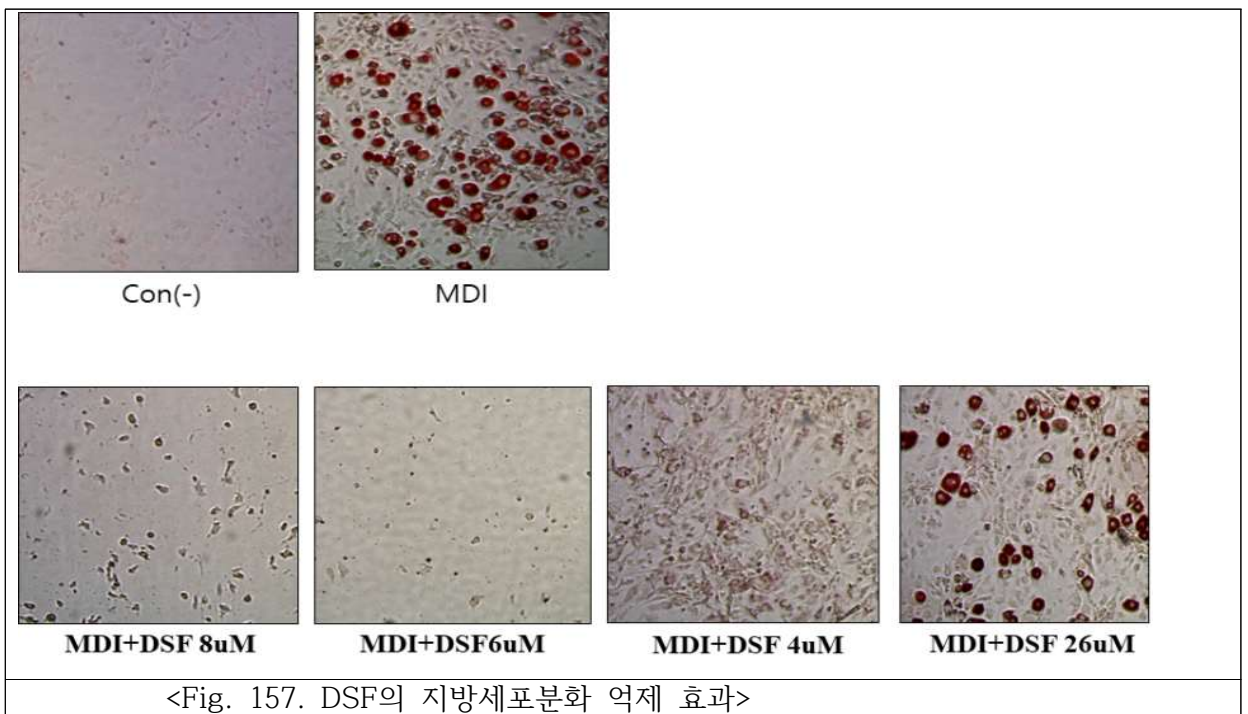


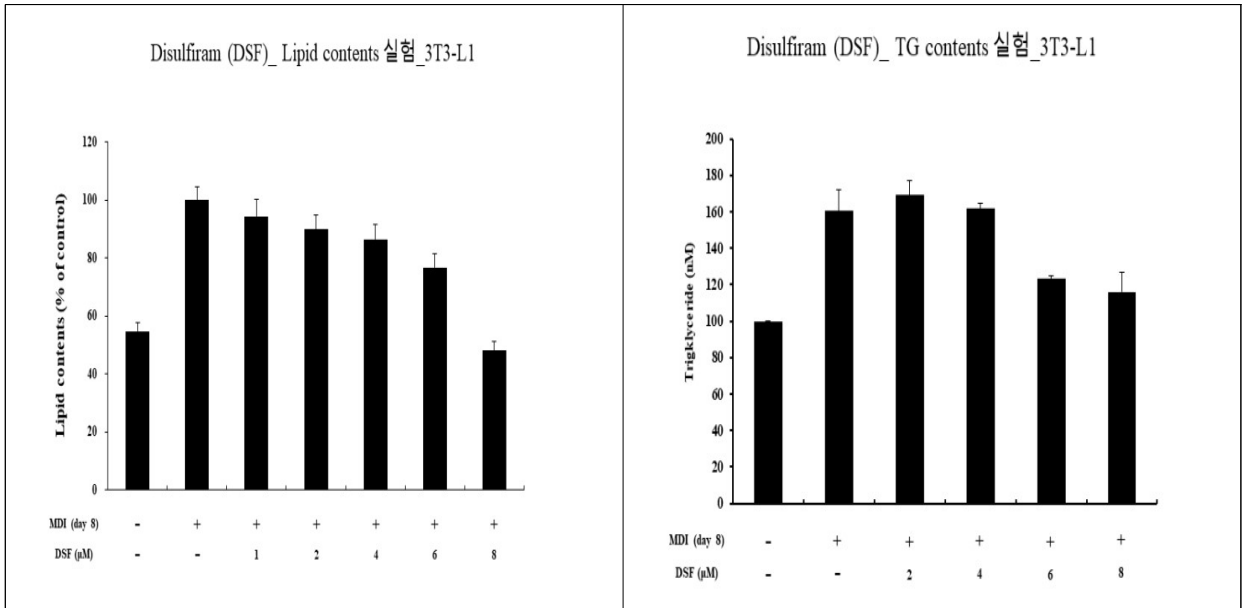
<Fig. 155. Disulfiram-Cu chelating 및 ALDH2 억제기능>

Disulfiram (DSF)_ MTT assay_3T3-L1



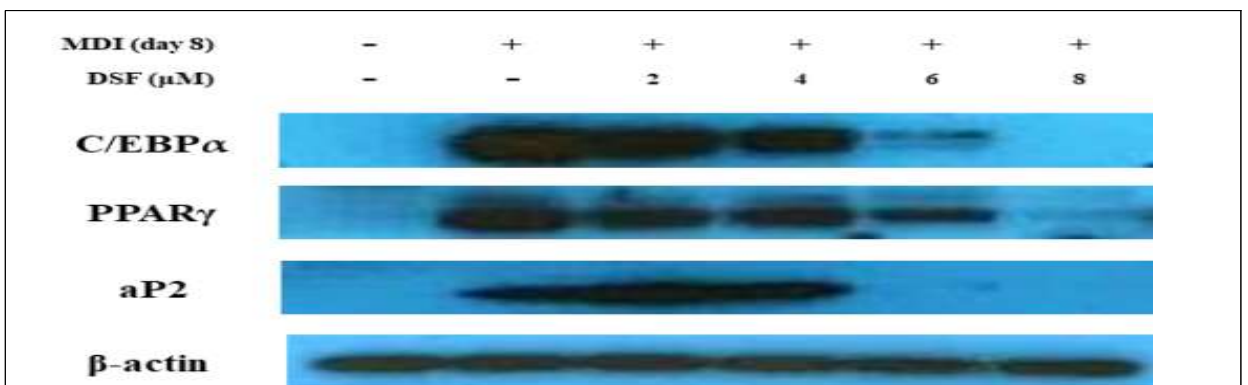
<Fig. 156. MTT에 의한 세포독성 분석>





<Fig. 158. 3T3L1세포에서 지방세포 분화에서 DSF처리효과. 레드오일 염색에 의한 lipid 함량 및 중성지방 억제효과>

분화가 완료된 3T3-L1 지방세포를 위의 방법과 동일하게 ORO 염색을 실시하였다. 각각의 검정무추출물이 3T3-L1 세포내 지방구의 수와 크기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현미경 관찰을 실시하였다. 분화시키지 않은 3T3-L1 전지방세포는 지방구가 형성되지 않았으며, MDI처리하여 분화를 유도한 양성대조군은 많은 수의 지방구가 형성되어 적절한 연구모형을 확립하였다(Fig. 157). 3T3-L1 세포에서 DSF의 adipogenesis 억제활성을 평가하기 위하여 세포 독성이 나타나지 않은 DSF을 Day6까지 다양한 농도로 처리한 후 Day7에 ORO 염색법을 통하여 adipogenesis 억제활성을 확인하였다(Fig. 158). 그리고 관찰 후 isoprophanol에 lipid droplet를 녹인 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. MDI를 처리하여 지방세포로 분화된 양성대조구에서는 미분화된 세포에서보다 흡광도가 5배가량 높게 보였다(Fig. 157.). 그리고 DSF 처리군이 양성대조군(OD값 1.0)과 비교하였을 때 2, 4, 6, 8uM 처리시 점차적으로 lipid합성 억제활성을 나타냈었다(도3). 또한 Triglyceride분석 결과에서는 DSF 2, 4, 6 그리고 8 uM 처리에서 TG함량은 농도의존적으로 현저하게 감소 되었다(Fig. 158) . 이상의 결과는 DSF은 항비만 소재의 가능성을 보여주는 결과라고 사료된다

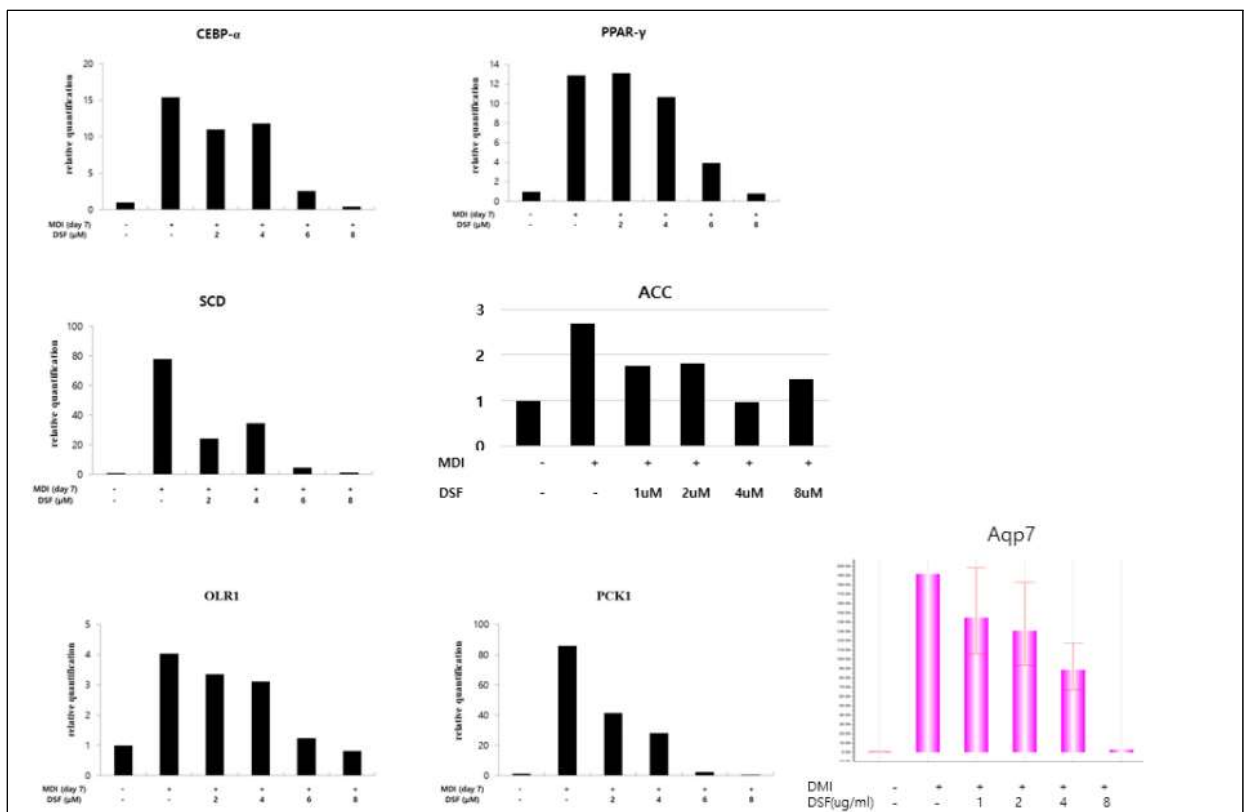


<Fig.159. DSF의 지방세포 분화인자(C/EBP-a, PPAR-r, aP2) 발현 억제 효과>

지방세포로 완전히 분화된 지방세포 분화후기(6-day)에서 C/EBP- α , PPAR- γ , aP2 단백질 발현을 western blot으로 분석 하였다(Fig. 159). DSF은 6-day모두에서 C/EBP- α , PPAR- γ , aP2 단백질 발현은 농도 의존적으로 감소하였다. 이 결과는 total lipid, TG분석 결과와 일치함을 보였다(Fig. 158).

○ DSF의 지방세포분화 관련 유전자 mRNA 발현 억제 효과

위의 결과로부터 우리는 DSF의 세포독성을 나타내지 않는 범위에서 3T3-L1 세포 adipogenesis를 효과적으로 억제하는 것을 total lipid 분석, TG분석, 전사인자및 단백질 발현분석을 통해 확인하였다. 따라서 DSF이 adipogenesis를 조절하는 전사인자(C/EBP- α , PPAR- γ), 관련유전자(SCD1, aP2) PPAR-r 타겟유전자(AQP7, PCK1, OLR1) 그리고 ALDH2 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지 3T3-L1 분화(day-6)에 DSF을 각각 처리 하여 real time RT-PCR을 통해 mRNA 발현을 분석하였다(Fig. 160).



<Fig.160. DSF의 지방세포 분화인자(C/EBP-a, PPAR-r, aP2, ACC, SCD) 및 PPAR-r 타겟 인자(OLR1, PCK1, aqp1) 발현 억제 효과>

MDI의해서 유도된 분화 6day에서는 미유도된 처리구보다 약 15배 정도 높게발혀되어 지방세포로 분화된 결과와 일치하였다. 그리고 DSF 6, 8uM 처리구에서 혀저하게 억제되었다. C/EBP α , mRNA발현은 mRNA발현은 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 160). 이 결과는 C/EBP α 단백질 발현 결과와도 일치하였다. 따라서 DSF는 지방세포

분화관련 전사인자 C/EBP α 을 mRNA, 단백질 수준모두 억제하는 결과를 보였다 (Fig. 159, 160).

SREBP-1c(sterol regulatory element binding protein-1)유전자는 지방세포분화에 관여하는 전사인자로서 지방산대사와 lipid생합성에 관여한다. 표적유전자로서는 LPL, GPAT, SCD1, ACC등이 있으며 대부분 지방산 대사조절에 중요한 역할을 담당한다 (Rangwala & Lazar, 2000).

따라서 DSF은 SCD1, ACC mRNA발현을 전사수준에서 억제하면 지방세포분화 억제와 지방산 대사및 lipid합성 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 사료 된다. 위 연구에서, DSF처리구에서 SCD, ACC mRNA 발현은 농도의존적으로 억제 되었다(Fig. 160). SCD1(stearoyl-CoA desaturase) mRNA 발현은 분화미분화세포에서보다 80배 정도 강하게 발현이 이루어지고 있으며, DSF처리구에서는 2uM에서부터 강하게 억제되었다. 그리고 6, 8uM처리구에서는 미분화세포 수준으로 억제됨을 확인 하였다(Fig 160). 지방세포로 분화된 세포에서 ACC mRNA발현은 약 2.5배정도 높게 발현되었다. DSF처리에 억제 효과는 저농도와 고농도 모두에서 억제하였다 (Fig. 160). 따라서 DSF는 지방세포 분화에 중추적인 역할을 하는 전사인자인 C/EBP β 와 PPAR-g 전사수준에서 억제함으로써 adipocyte terminal marker 유전자(ACC, FAS, SCD1, aP2) mRNA 발현을 억제시키는 것으로 보였다

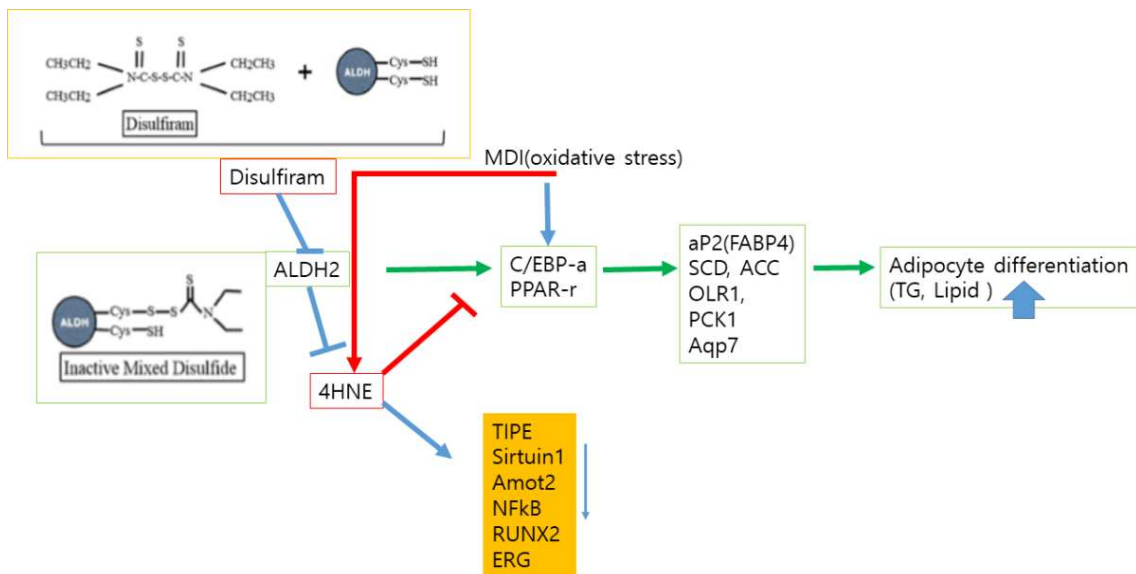
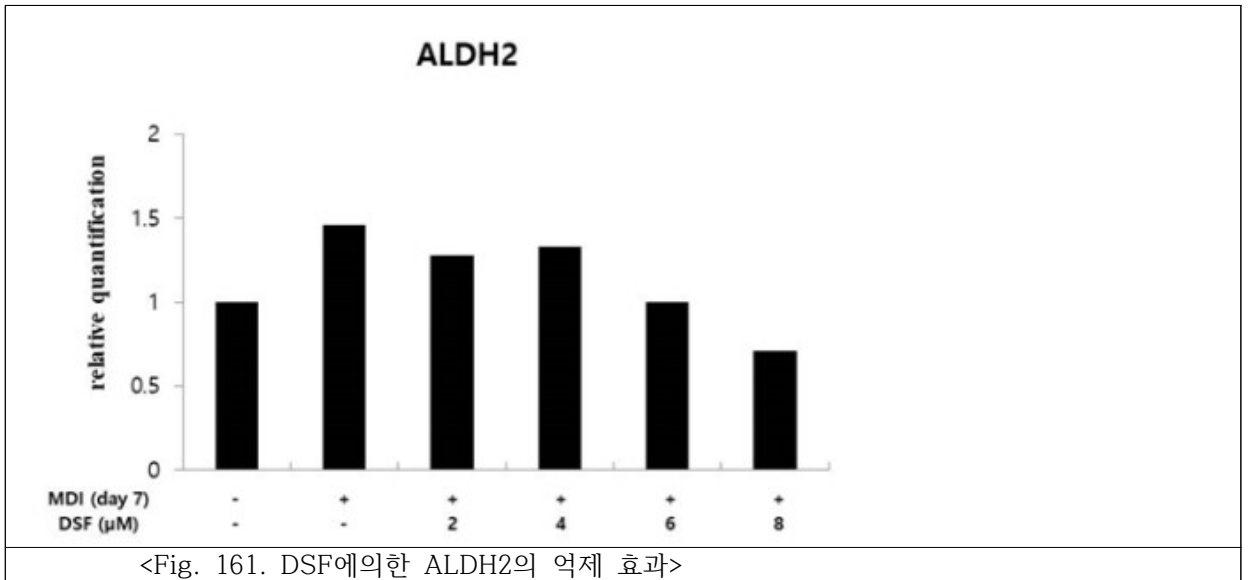
(6) DSF에 의한 PPAR-r 타겟 유전자 mRNA 발현 억제효과

전지방세포에서 지방세포로 분화하는데 가장 핵심적인 역할을 하는 C/EBP α 와 PPAR- γ 발현은 다양한 유도인자 또는 복합 조절인자로 작용한다(Ntambi, 2000). 따라서 PPAR- γ 유전자는 지방세포 분화에 강력한 인자이며 C/EBP family와 함께 지방세포 분화를 촉진한다. 위 결과에서 DSF는 PPAR-r 단백질 수준, mRNA수준 모두 감소함을 확인 하였다. 따라서 PPAR-r pathway downstream 기능도 억제되는지를 확인하였다. PPAR-r 전사인자의 주요 표적유전자로는 Aquaporin7 (AQP7), Acyl-coenzyme A oxidase 2(Acox2), Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1), nuclear receptor subfamily1(NR1H3), Oxidised low density lipoprotein receptor 1(OLR1) 등이 있다. 여기에서 AQP7, PCK1, OLR1 mRNA 발현 억제 여부를 확인 하였다(Fig. 160). DSF처리시 AQP7과 PCK1 유전자 발현은 농도의존적으로 억제효과를 보였다. 그러나 OLR1 mRNA발현은 6, 8uM에서 현저하게 억제효과를 보였다. 따라서 DSF는 지방세포 분화에 직접적으로 관여하는 PPAR-r 유전 발현을 강력하게 억제를 통하여 지방세포분화를 억제하는 것으로 확인 하였다. PPAR- γ 유전자는 지방세포 분화에 강력한 인자이며 C/EBP family와 함께 지방세포 분화를 촉진한다, 주요 표적유전자로는 AQP7, Acox2, PCK1, NR1H3, OLR1 등이 있다. MDI처리하여 지방세포 유도 후 6-day에서 mRNA발현은 미분화 세포에서보다 13배정도 높게 발현되었다. 그리고 DSF에 의한 PPAR- γ mRNA 발현은 농도의존적으로 억제 되었다(Fig. 160). 특히 DSF 8uM처리구에서는 미분화세포 수준의 PPAR-r 발현이 억제되었다. MDI처리하여 지방세포로 분화된 세포에서 aP2 mRNA발현은 미분화 세포보다 약40배정도 높게 발현 되었다. 그리고 DSF 2, 4uM처리구에서는 억

제경향이 매우 미약하였으나, 6, 8uM처리구에서는 강력하게 aP2 mRNA발현이 억제되었다. 이 결과는 Fig.159에서보는 바와같이 aP2 단백질 발현 수준과 일치하였다(Fig 159, 160).

○ DSF에 의한 ALDH2 mRNA 발현 억제효과

DSF가 ALDH2와 PPAR-r, C/EBP-a를 억제하여 지방세포 분화 및 지방구 형성을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 DSF처리가 지방세포 분화동안 ALDH2발현에 어떤영향을 미치는지 qPCR를 통해 조사 하였다. 그 결과 Fig 161에서 관찰 것 처럼 지방세포로 분화된 세포에서는 ALDH2가 미분화세포보다 1.5배 증가하였다. 그러나 ALDH2 억제약물인 DSF처리시 6, 8uM처리시에는 유의적으로 ALDH2 유전자 발현이 억제됨을 확인 하였다 (Fig 161).



<Fig. 162. DSF에 의한 지방세포 분화억제 기작 모식도>

(7) 결론

본 연구에서는 DSF의 항비만 효과 및 그에 따른 생화학적과 분자생물학적 기전기전 연구를 MDI처리된 3T3-L1세포에서 adipogenesis 과정에 관여하는 전사인자(C/EBP α , PPAR-r) 지방대사관련 유전자(ACC, aP2, SCD1), PPAR-r 타겟유전자(AQP7, PCK1, OLR1) 발현을 western blot과 qPCR기법으로 분석하였다. 따라서 3T3-L1분화와 함께 처리한 DSF은 lipid droplet 형성과 Triglyceride 축적이 현저하게 감소시키는 결과를 관찰 하였다. 또한 DSF을 분화 후 Day-6에 처리한 결과 adipogenesis의 전사조절인자와 단백질인 C/EBP α , PPARg, aP2의 단백질 발현수준을 감소시켰다. 그리고 qPCR를 통해 day-6에서 전사인자 및 지방대사 관련 유전자 12개(C/EBP α , PPAR-r, ACC, aP2, SCD1) 를 분석한 결과, 모두 농도의존적으로 mRNA는 억제되었다.

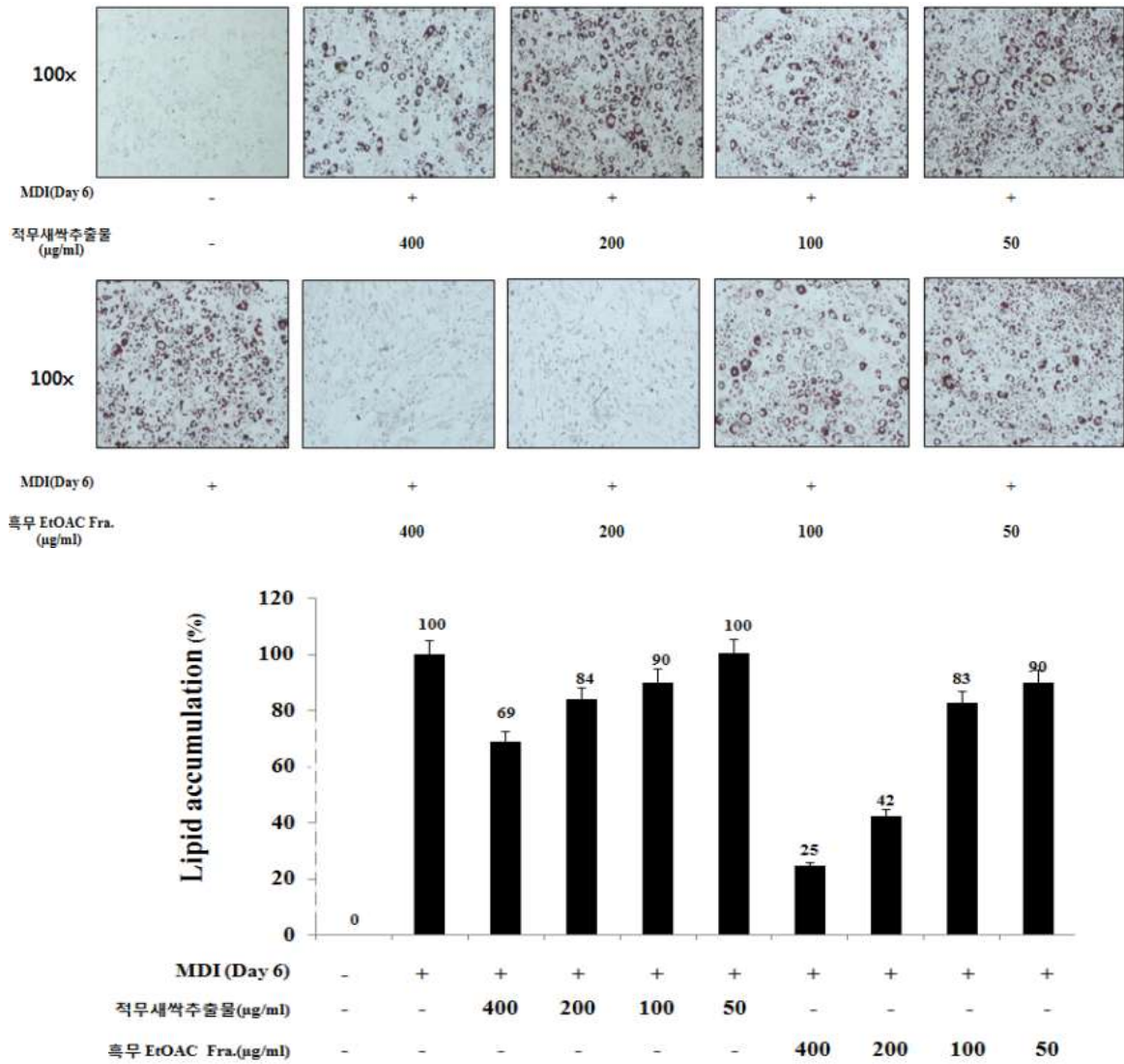
따라서 DSF은 직접적으로 C/EBP전사인자, PPAR-g 발현을 억제할 뿐만 아니라 ALDH2 발현을 억제시켜 지방세포 분화를 억제하는 것으로 사료된다. 그리고 DSF은 ALDH2를 불화성화시켜 4HNE를 세포내 축적하여 adipogenesis 진행을 억제하는 것으로 사료된다. 이 결과는 지방세포분화 동안 ALDH2 활성은 지방세포 분화관련 유전자 활성화 유도, 4HNE 분해, 아세트알데하이드 분해 등에 직접 또는 간접적으로 관여하여 지방세포 분화를 억제하는 것으로 사료된다(Fig. 162).

DSF는 항비만 건강기능식품 및 미용기능식품 소재, 항비만 의약품으로서의 가능성을 보여주는 결과로 생각되며, 향후 전임상 및 임상연구를 통해 식약품소재 개발 연구가 추가적으로 요구된다.

17) 흑무(검정무) EtOAc 분획물과 적색무 새싹 추출물의 항비만 비교 연구

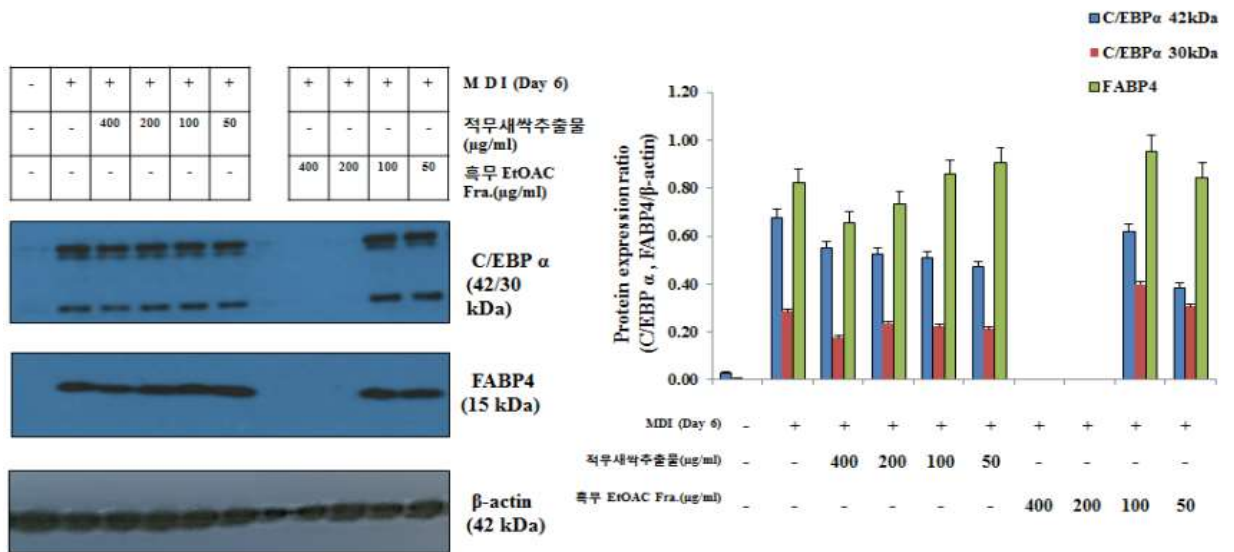
○ 검정무 (*Raphanus sativus* L. var *niger*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료조성물 특허출원 보완 연구(출원번호: 제 10-2017-0117286호)

- 우리는 2017년도에 검정무추출물 비만 및 지방간 예방 관련 특허를 출원 하였으나 사전 보고된 적색무 새싹 연구와 기술적 차별화를 위하여 재실험을 진행하였다.
- 검정무 EtOAc 분획물과 적색무 새싹 추출물을 3T3-L1 세포에 MDI와 같이 6일 동안 처리하였다. 그 결과 검정무 EtoAC 분획물은 적색무 새싹추출물보다 2.5배 이상 지방세포분화와 lipid축적이 감소되었다(Fig. 163).



<Fig. 163. 적색무 새싹 추출물과 검정무 EtOAc 분획물 처리에서의 지방세포 지방억제효과. Oil Red O염색(A)과 Lipid 함량 그래프(B)>

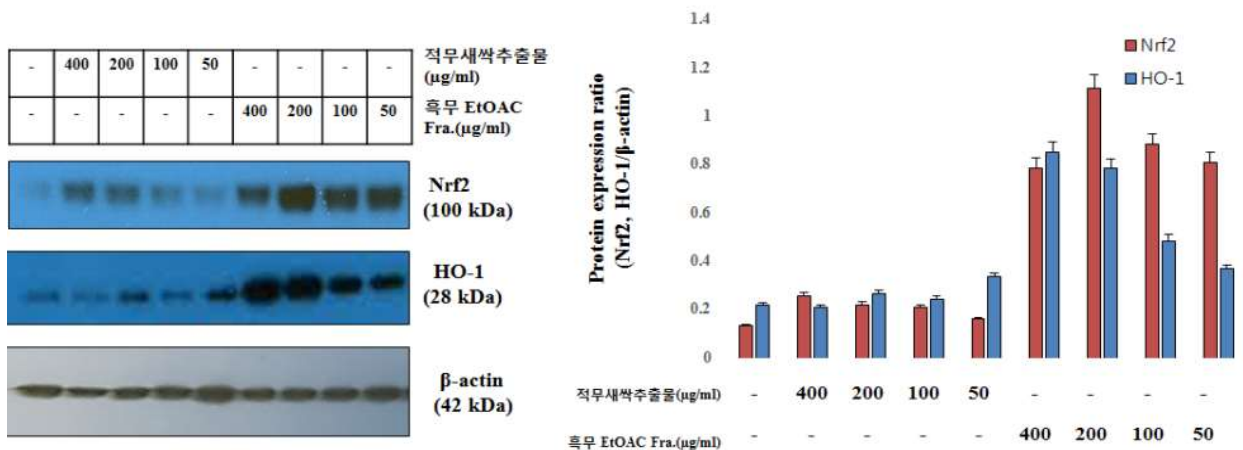
- 그리고 적색무 새싹 추출물과 검정무 EtOAc 분획물 처리구에서 지방세포분화 관련 유전자 C/EBP α , FABP4(ap2) 발현을 Western blot으로 비교분석 하였다(Fig. 164). 검정무 EtOAc 분획물 400, 200 μ g/ml처리구에서의 C/EBP α , FABP4(ap2) 발현은 완벽하게 억제 되었다. 그러나 적색무 새싹 추출물에서는 MDI처리구와 비교해 400 μ g/ml 처리구에서 억제 경향성은 보이나 차이를 없었다. 따라서 검정무 EtOAc 분획물은 적색무 새싹 추출물보다 항비만 효과가 매우 탁월한 결과라 사료 된다.



<Fig. 164. 적색무 새싹 추출물과 검정무 EtOAc 분획물처리에서의 C/EBPα, FABP4(ap2)단백질 발현 억제 효과>

○ 검정무(*Raphanus sativus L. var niger*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 Nrf2 활성화 조성물 및 상기 무 추출물 제조방법 특허출원 보완 연구(출원번호:제 10-2017-0094598호)

- 간세포 HepG2를 DMEM 배지에서 배양 하면서 적색무 새싹 추출물과 검정무 EtOAc 분획물을 처리하여 8시간 후 RIPA buffer을 사용하여 단백질을 추출하였다. 그리고 western blot 방법으로 Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor-2), HO-1(hemeoxygenase-1) 단백질을 발현을 분석 하였다(Fig. 165).



<Fig. 165. 적색무 새싹 추출물과 검정무 EtOAc 분획물처리에서의 Nrf2, HO-1 단백질 발현 효과>

Fig. 165에서 보는 바와 같이 검정무 EtOAc 분획물은 Nrf2 발현을 강력하게 유도하고 있음을 알 수 있다. 적색무새싹 추출물보다 4 ~ 5배 이상 높게 나타났다. 따라서 검정무는 간보호 및 알콜성 지방간 예방과 개선에 탁월한 것으로 사료된다.

18) 흑무차 개발 및 효능 연구

□ 흑무차 개발을 위한 연구 배경

○무(*Raphanus sativus*)는 전 세계에서 재배되고 소비되는 뿌리 채소이며, 일부 국가에서는 식탁의 일부로 간주될 정도로 중요한 식재료인데, 유럽에서는 주로 아삭한 식감의 무를 날 것으로 섭취하며, 중동의 일부 국가는 건강상의 이점을 추구하기 위해 주스의 형태로 갈아서 마시는 것을 선호한다. 또한, 무는 황달, 담석, 간 질환, 직장 탈출증, 소화 불량 및 기타 위통과 같은 다양한 질병을 치료하기 위한 가정 요법으로 사용되는데, 무에는 탄수화물, 당분, 식이섬유, 단백질뿐만 아니라, 지방과 불포화지방산이 포함되어 있다. 또한 다양한 수용성 비타민(B1, B2, B3, B5, B6, B9, C)과 미네랄(칼슘, 철, 마그네슘, 망간 아연, 칼륨, 인) 등이 포함되어 있다. 무엇보다도 무에는 최근 인간에게 잠재적인 건강상의 이점이 있는 독특한 생리활성 화합물이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌는데, 상기의 생리활성 화합물은 글루코시놀레이트(예 : 글루코라파닌, 4-하이드록 시글루코브라시신, 글루코에루신, 글루코라파사틴, 글루코브라시신, 4-메티옥시글루코브라시신, 네오글루코브라시신), 카르비놀 및 이소티오시아네이트(예 : 설포라 펜, 설포라판) 등이다.

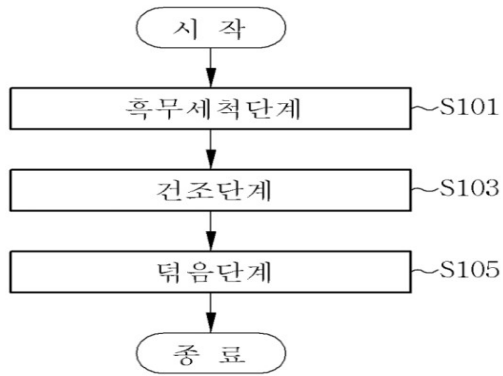
무의 한 종류인 흑무(*Raphanus sativus L. Var*)는 GSH 합성 전구체로 간주되는 황산염 및 시스테인이 풍부한 단백질 뿐만 아니라 높은 글루코시놀레이트 농도를 포함하는 십자화과 채소로, 스페인, 이란, 중국 및 터키 등에서 민간요법으로 헛배, 담석, 천식, 기관지염 및 기타 호흡기 질환을 치료하는데 사용되고 있으며, 폐 섬유증 치료뿐만 아니라 항산화 및 항당뇨 등의 효과도 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 목적은 맛과 향이 우수할 뿐만 아니라, 흑무에 함유된 항염증 효과를 나타내는 유효성분을 차의 형태로 간편하게 섭취할 수 있도록 하는 흑무차의 제조방법 및 그 흑무차의 추출물을 이용한 항염증용 조성물을 연구하였다.

본 연구의 다른 목적은 흑무에 함유된 항염증 효과를 나타내는 유효성분의 용출효과를 향상시켜 우수한 염증억제 효과를 나타내는 흑무차의 제조방법 및 그 흑무차의 추출물을 이용한 항염증 효과를 연구하였다

□ 흑무차 레시피 개발

○ 흑무차 제조기술 개발

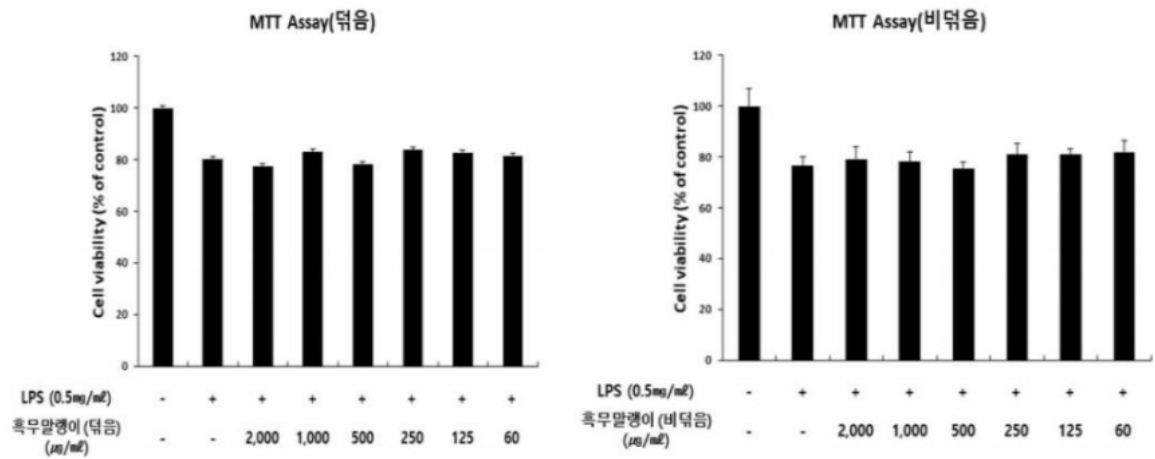
효능 연구전 차제조는 채집- 세척 - 절단 - 열품건조 - 덩음단계 - 열수추출 - 농축 - 동결건조를 하여 시험 시료를 준비 하였다 (Fig.166)



<Fig.166. 흑무차 개발 process>

□ 흑무차 항염증 효능 연구

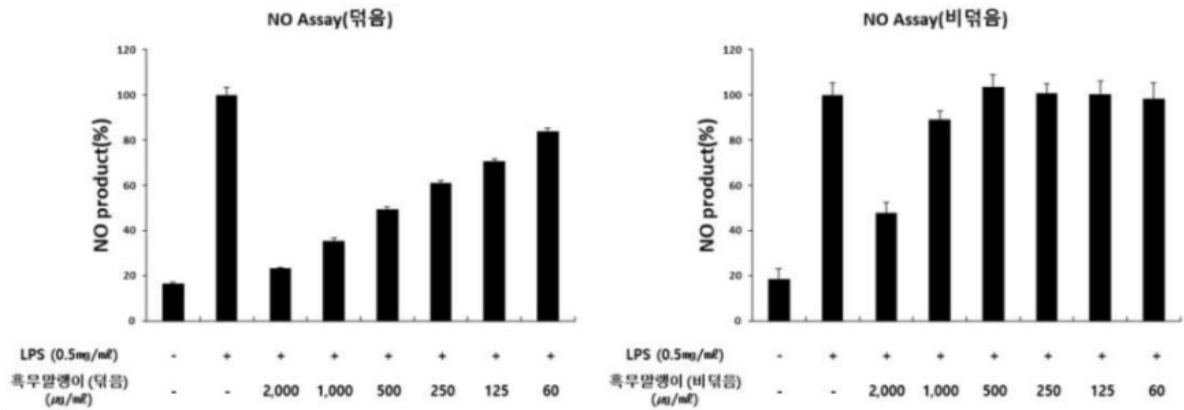
○ 흑무차 cell viability assay



<Fig. 167. 흑무차를 이용한 MTT assay>

뒤움과 비뒤움 추출물을 마크로파아지 monocyte인 RAW264.7세포에 농도별 처리후 24 시간후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 control보다 약간 낮은 cell viability를 보였다. 그러나 LPS처리구와는 동일한 세포 생존율을 나타내었다(Fig.167).

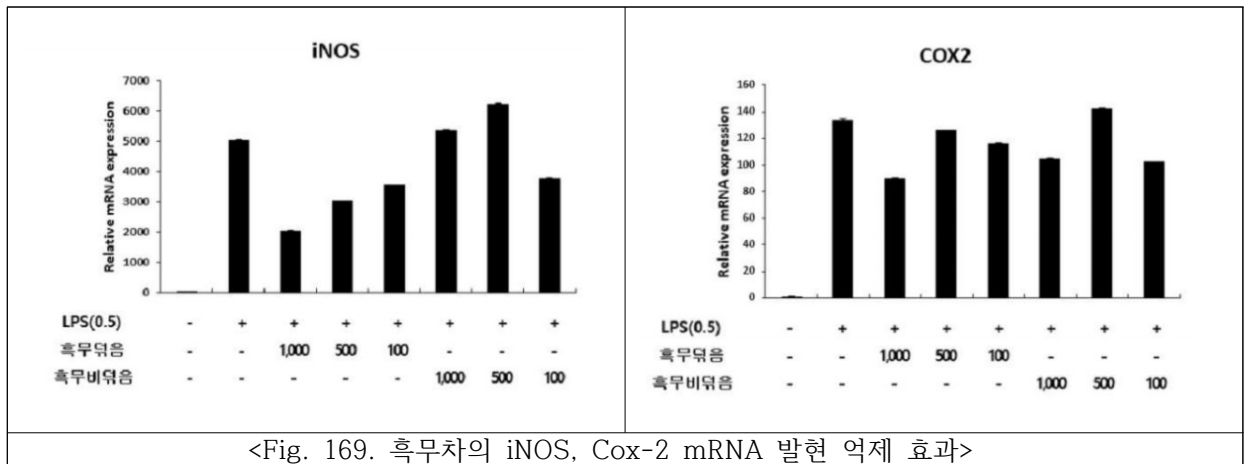
○ 염증인자 Nitric oxide 분비 억제 효과



<Fig. 168. 흑무차의 NO생성 억제 효과>

산화질소 생성 억제 활성 연구에서 덧됨추출물은 농도 의존적으로 산화질소 생성을 억제하고, 특별히 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있다. 그러나 비교예 1(비덧됨)의 항염증용 조성물은 고농도에서만 산화질소의 생성 억제효과를 나타내었으며 저농도에서는 억제효과를 나타내지 않았다(Fig. 168).

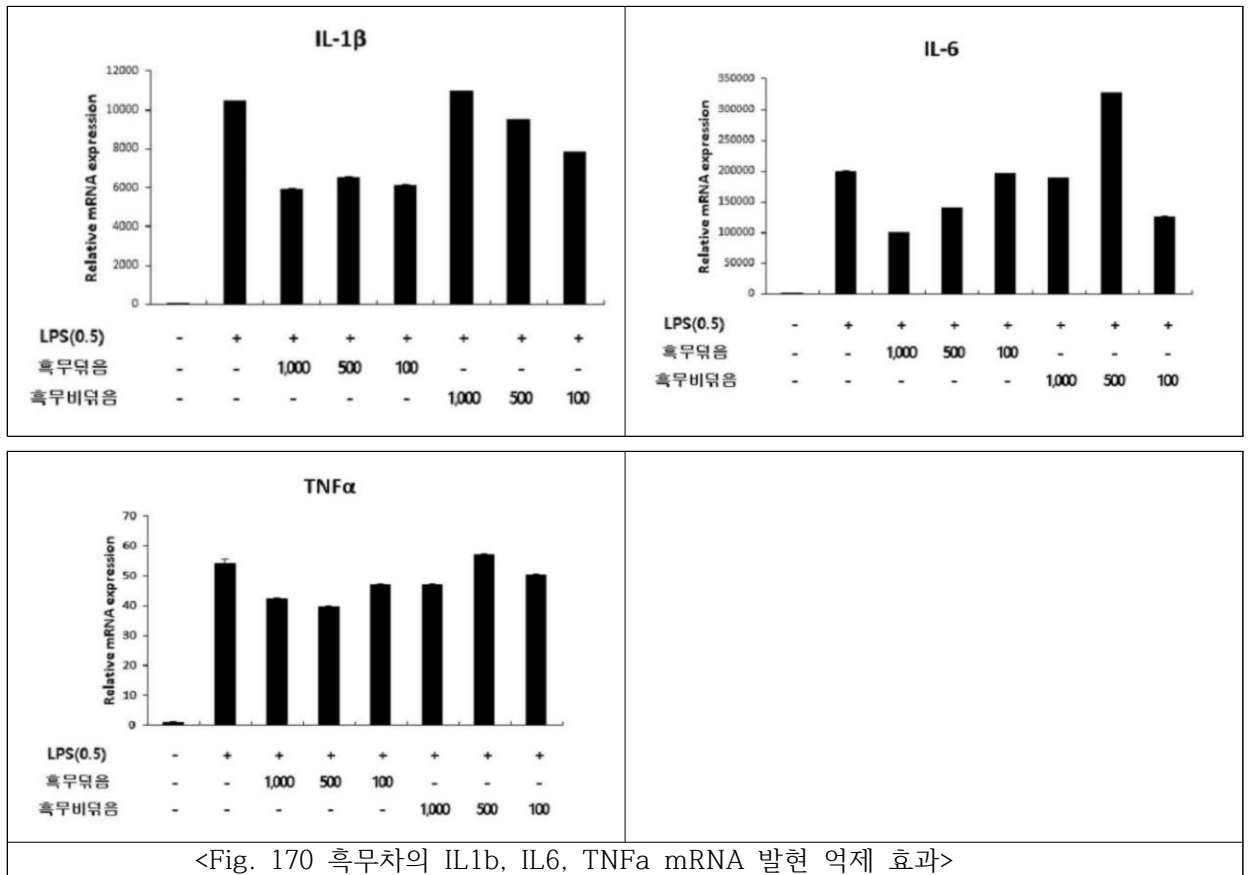
○ iNOS, COX-2 mRNA 발현 억제 효과



<Fig. 169. 흑무차의 iNOS, Cox-2 mRNA 발현 억제 효과>

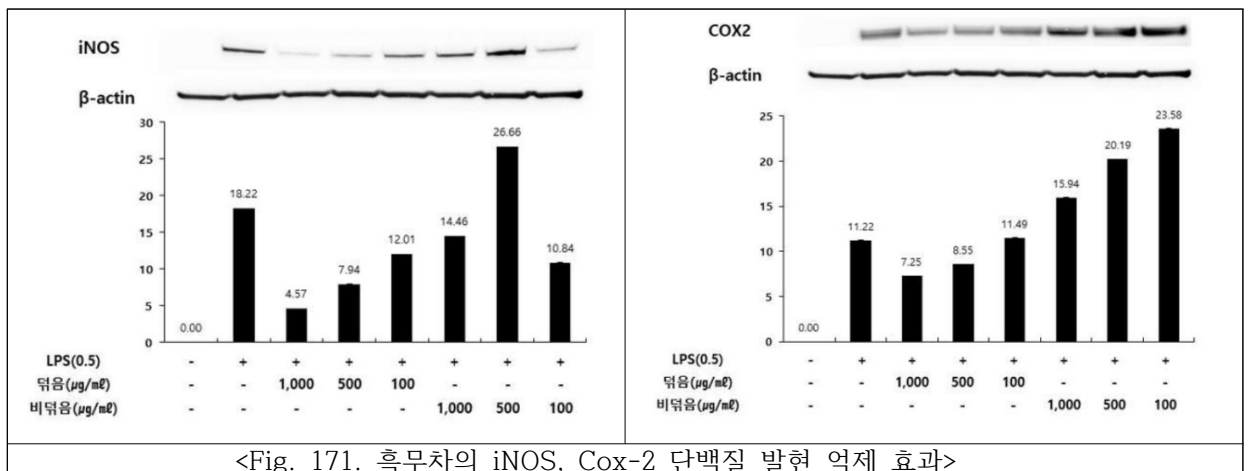
iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 억제 활성에 대한 연구에서는 흑무덧됨 추출물은 농도 의존적으로 이들 mRNA발현은 억제 하였다(Fig. 169). COX-2의 경우 흑무덧됨)과 흑무비덧됨 추출물 모두 고농도에서는 억제경향을 나타내었으나, 저농도에서는 억제하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서, 흑무차 추출물은 고농도에서만 COX-2를 억제하는 것을 알 수 있다.

○ cytokine IL-1b, IL-6, TNA-a mRNA발현 억제 효과



염증성 사이토카인 IL-1β의 발현 억제 활성에 대한 연구결과는 흑무덩음 추출물에서만 염증성 사이토카인인 IL-1β 발현이 억제됨을 알 수 있다. 그러나 흑무비덩음 추출물은 고농도일수록 IL-1β의 발현을 촉진시키는 것을 알 수 있다. 또한, 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF-a 발현 억제 활성에 대한 결과를 에서도 고농도 흑무덩음 추출물만의 염증성 사이토카인들을 억제되었다(Fig. 170)..

○ iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 효과



iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성화에 대한 연구결과 덩음 흑무차만의 농도 의존적으로 iNOS, COX-2 효소의 단백질 발현을 억제하는 것을 알 수 있다. 그러나, 비덩음 추출물은 고농도 처리구에서는 INOS, COX-2 억제 경향을 보였으나, 저농도에서는 억제하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 흑무 차 추출물은 고농도에서 COX-2를 억제하는 것을 알 수 있다(Fig. 171)

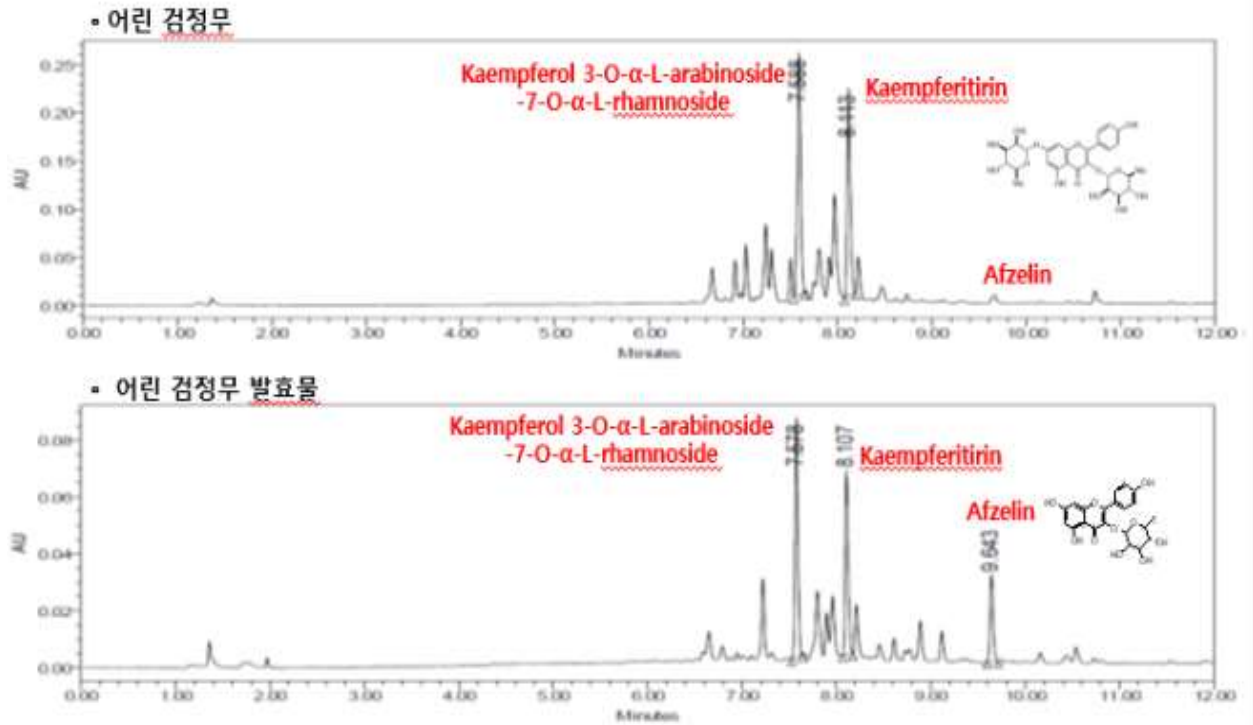
19) 어린검정무(yong black radish extract) 추출물 및 발효물 효능 연구

무(radish)는 뿌리 외에도 잎과 새싹은 영양학적 및 의약적으로 중요한 것으로 보고되었습니다. 무의 추출물은 예로부터 민간 요법에서 위장장애(stomach disorders), 변비(constipation), 요로 감염(urinary infection), 간 염증(liver inflammation), 심장 장애(cardiac disorders) 및 궤양 치료(ulcers)에 사용되어 왔습니다. 또한 무(radish)의 항균[antimicrobial], 항암[anticancer], 항산화[antioxidant], 불안 감소[anxiety reducing]에 대한 다양한 보고가 있다. 무(radish)에 2차 대사 산물에는 glucosinolate(GLS), isothiocyanates 및 폴리페놀이 포함되어 있습니다. GSL의 화학적 구조는 (Z)-N-hydroximosulfate ester에 결합된 β -D-thioglucosides 잔기를 가지고 있으며, 전구체 아미노산에 따라 지방족(aliphatic) 글루코시놀레이트(AGSL), 방향족(aromatic) 글루코시놀레이트(ArGSL) 및 인돌릭(indolic) 글루코시놀레이트(IGSL)와 같은 세 가지 유형으로 분류됩니다. 최근, GSL는 제약 산업, 항암 및 항염증 약물의 설계에서 엄청난 관심을 얻었습니다. 따라서 현재 연구중인 무의 항산화, 화학 예방, 간 보호 및 항당뇨병 특성에 대한 현재 연구 진행 상황에 대한 포괄적인 정보를 제공할 것이다.

(1) 검정무 seedling 유산균 발효

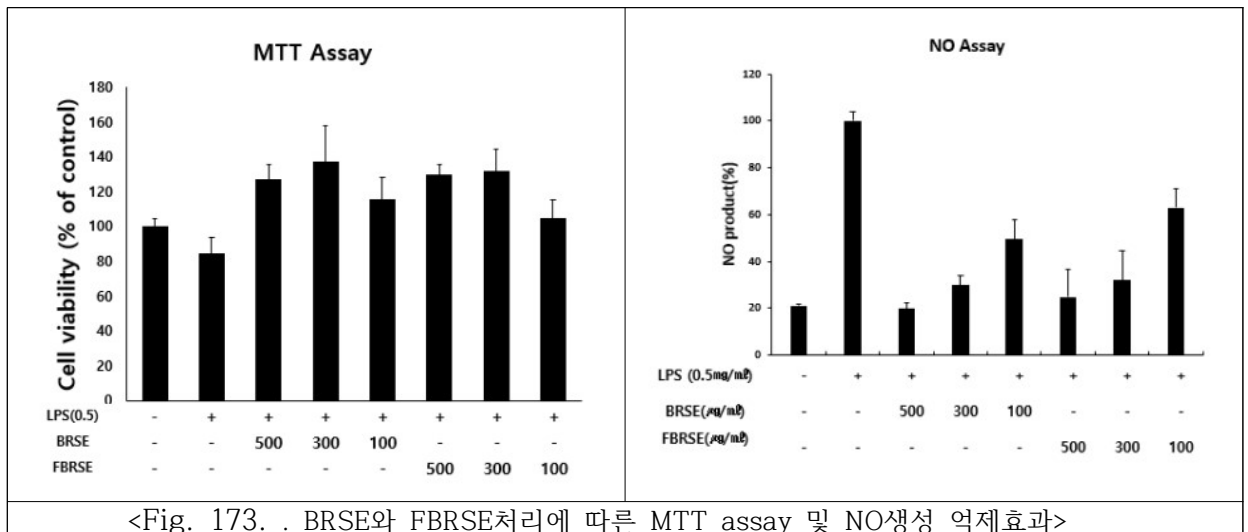
검정무 seedling 준비는 파종 후 40~50일 사이에 수확하여 흐르는 물에 세척 후 호모미스에서 분쇄 후 유산균(*L. plantarum*)을 접종하여 48시간 혐기성 배양을 하였다. 그리고 동결건조 후 70%주정 추출하여 시료로 사용 하였다.

Fig. 172에서 보는바와 같이 검정무seedling 추출물(BRSE)에서는 kaempferitirin과 keaemfrol 3-O-a-1-arbinoside-7-O-a-L rhamnoside성분이 주성분을 이루고 있다, 그러나 발효후 .kaempferitirin과 keaemfrol 3-O-a-1-arbinoside-7-O-a-L rhamnosidetjde 성분이 급감하여 새로운 물질인 Afzelin이 증가 되었다. 이결과는 발효 과정에서 유산균이 conversion효과로 사료 되었다(Fig. 172)

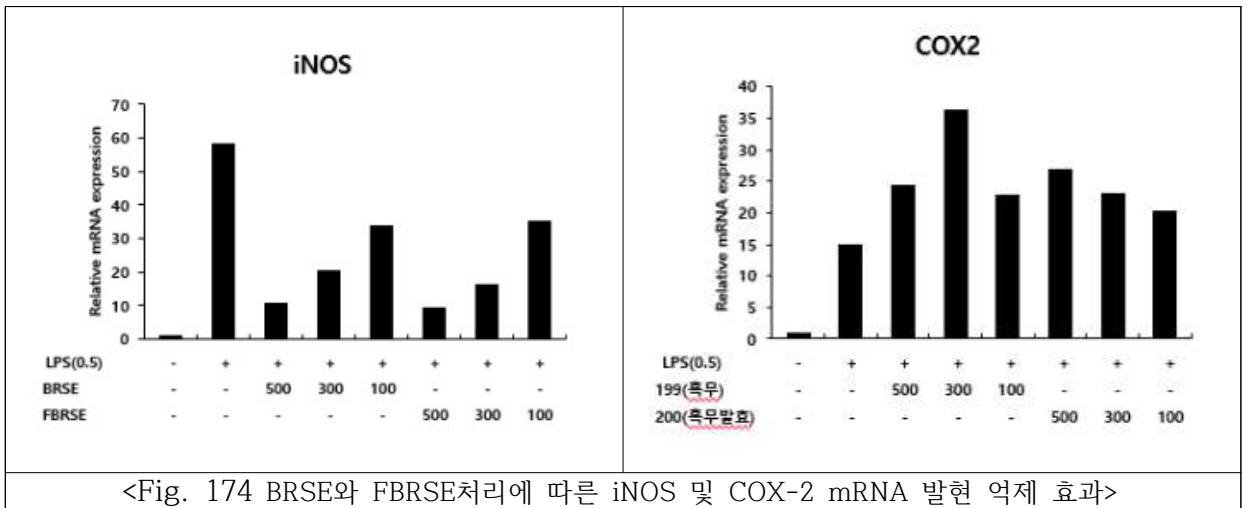


<Fig. 172. 검정무 발효전(BRSE), 발효후 추출물(FBRSE)의 변화>

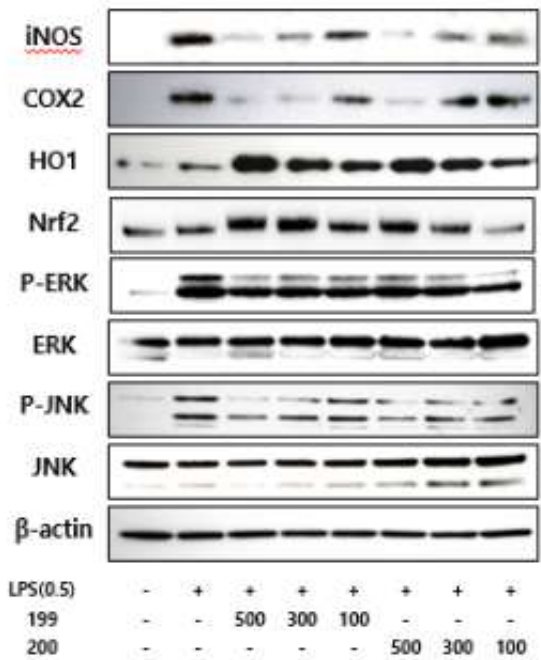
○ 마우스 매크로파아지 cell line에서 항 염증 효과



어린흑무 추출물(BRSE)과 발효물(FBRSE)처리에따른 MTT 및 NO생성 억제효과에서 어린흑무 추출물 및 발효무즙이 세포촉진 효과를 보였다. 그리고 NO생성은 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 173).

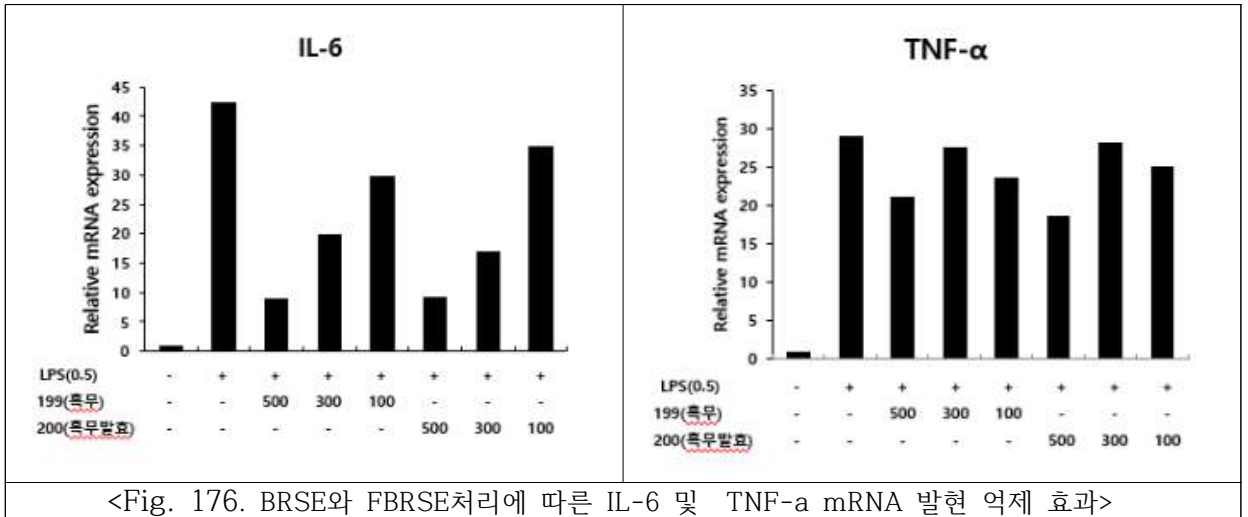


qPCR 방법을 이용하여 iNOS, Cox-2 mRNA 발현 억제효과를 분석 하였다. iNOS mRNA는 농도의존적으로 억제되었다. 그러나 COX-2 mRNA 발현은 오히려 촉진하는 양상을 보였다(Fig. 174).



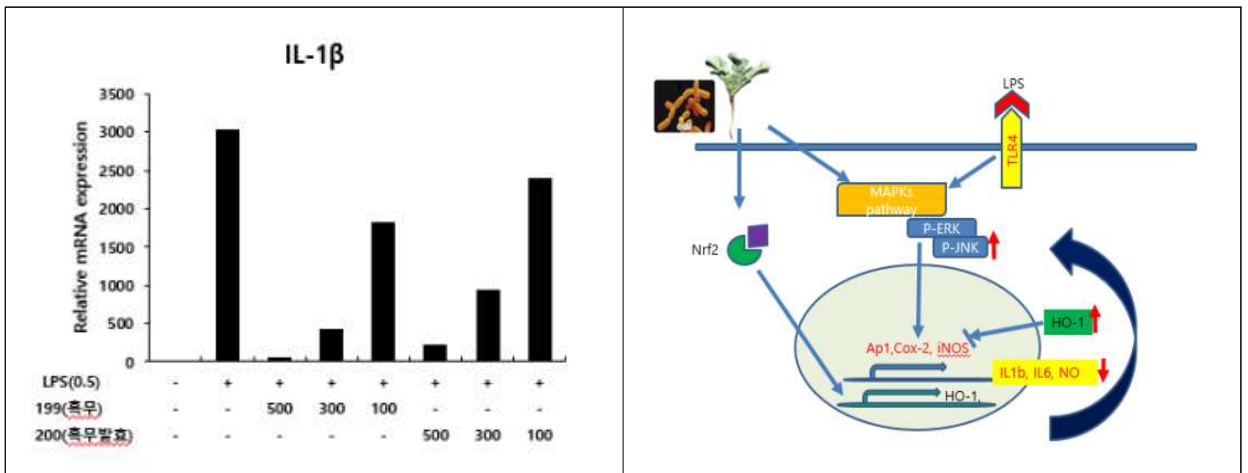
<Fig. 175. western blot에 의한 항염증관련 인자 및 단백질 발현>

- BRSE와 FBRSE처리 결과 iNOS와 Cox-2 단백질 발현을 농도의존적으로 억제되었다. 그리고 Nrf2/HO-1 모두 농도의존적으로 증가되어 어린 검정무 및 발효물 모두 세포보호 및 산화스트레스를 억제하는 결과를 예측 할수 있다. 그리고 JNK, ERK 인산화 억제효과를 보였다 (Fig. 175).

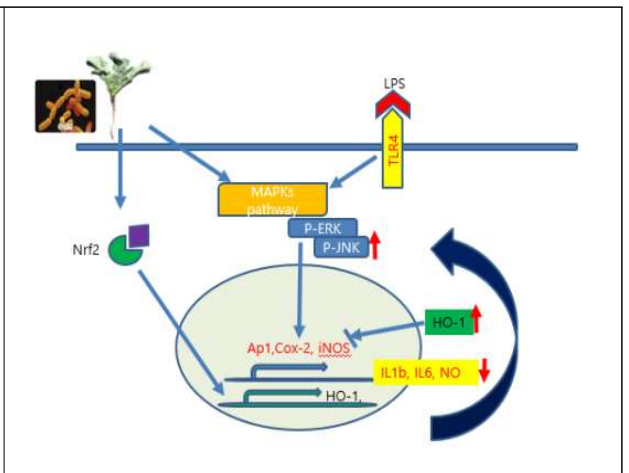


<Fig. 176. BRSE와 FBRSE처리에 따른 IL-6 및 TNF-a mRNA 발현 억제 효과>

염증에는 관여하는 사이토카인은 IL-6, TNF-a, IL1b등이 보고되고 있다. 본 연구에서는 qPCR 기법을 이용하여 어린 흑무 및 발효물이 IL-6, TNF-a, IL1b 억제효과를 분석하였다. 그 결과 BRSE와 FBRSE처리 IL-6, IL-1b는 농도의존적으로 억제 효과를 보였다. 그러나 TNF-a mRNA 발현은 고농도에서는 억제하였으나 저농도 처리구에서는 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 176, 177).



<Fig. 177. BRSE와 FBRSE처리에 따른 IL-1b mRNA 발현 억제 효과>



<Fig. 178. 어린검정무 추출물의 항염증 효과 signla pathway>

위 결과를 종합하여보면 어린 검정무(young black radish)추출물 및 발효물은 강력한 항염증 인자로서 산업화 가치가 매우 높다. 그리고 직접적으로 JNK, ERK활성화를 억제하여 염증인자 발현을 억제하고 있으며, 사이토카인 발현도 TNF-a를 제외하고는 강력하게 억제함을 보였다. 따라서 BRSE와 FBRSE는 항염증 억제를 Nfe2/HO-1 pathway를 통해서 항염증을 보인다고 할수 있다(Fig. 178)

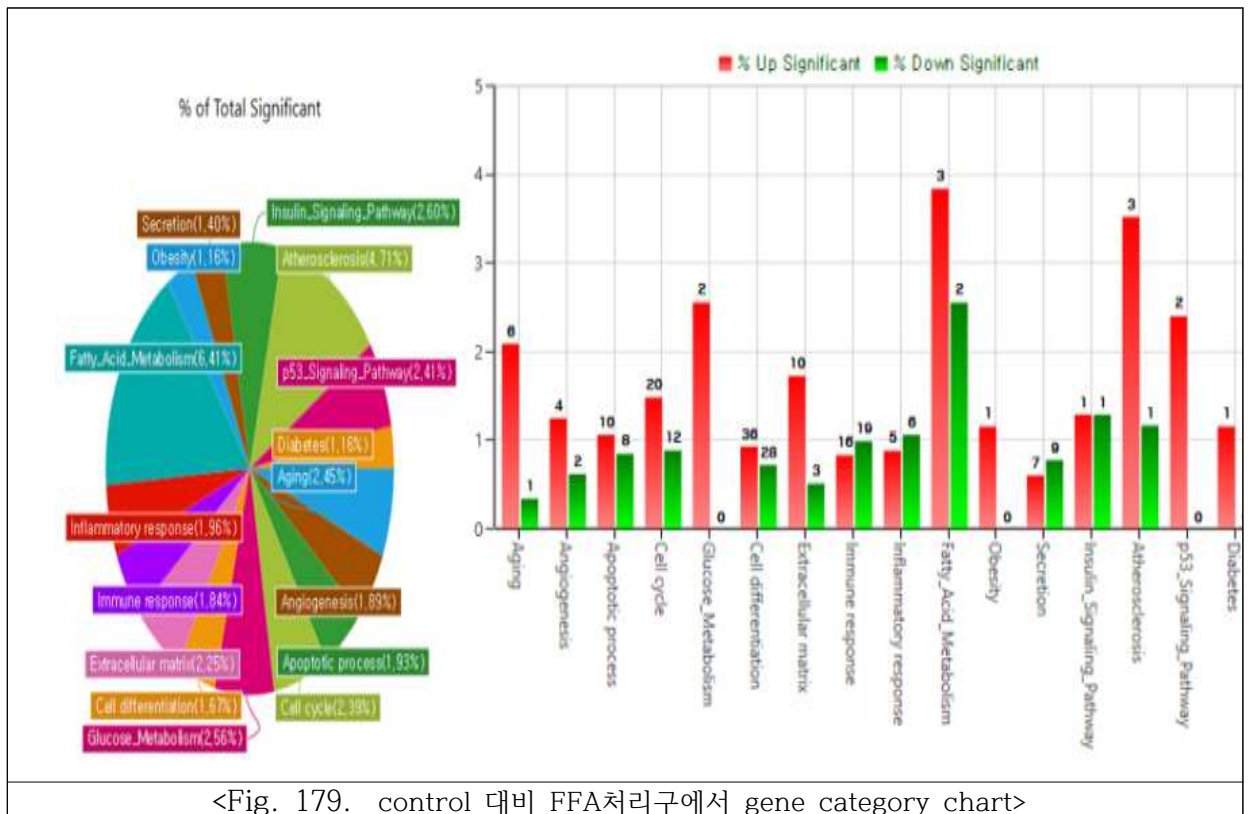
○ HepG2 세포에서 steatosis 억제효과

지방간 모델을 유도하여 어린흑무추출물(BRSE)을 농도별로 처리하여 지방간 관련 인자

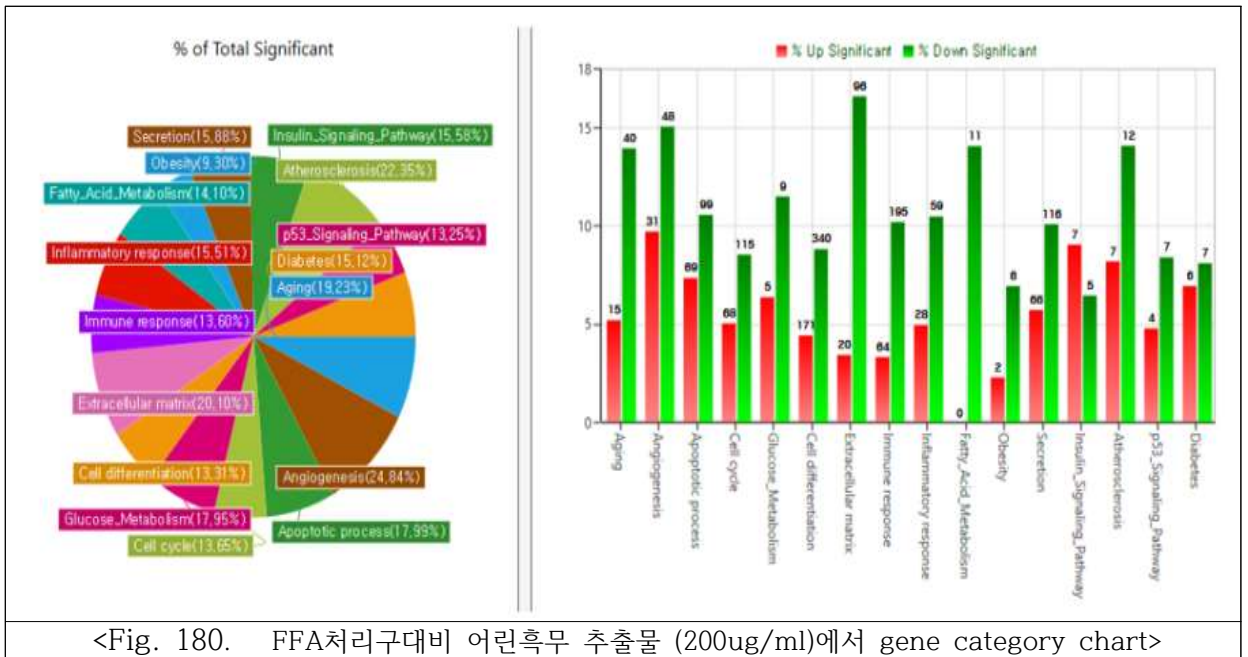
들을 NGS기술을 이용하여 분석 하였다.

시료처리는 HepG2(간세포)를 5×10^5 /ml 6well plate에 seeding후 24시 배양한다. 그리고 12시간 FBS가 없는 DMEM배지로 교환후 4~8시간 배양한다.그리고 FFA(oleic acid:palmitic acid, 2:1)용액을 500uM과 시료를 200, 100, 50ug/ml처리후 24시간 배양 후 total RNA를 분리 하였다. 분석은 주)이바이오젠에서 개발한 ExDEEGA GraphicPlus v20.를 사용하였다.

유의성있는 유전자 선별은 대조구와 처리구간의 유전자발현 차이를 fold change:2, Normalized Data (log2):4, p- value:0.05 를 선택하였다. Gene category분석은 Significant Gene Selection 에서 DEGs 를 선택하고 Gene Category 의 Cell differentiation 을 선택하여 비교 그룹에서 유의하게 발현이 증가 또는 감소한 유전자를 분석 하였다.

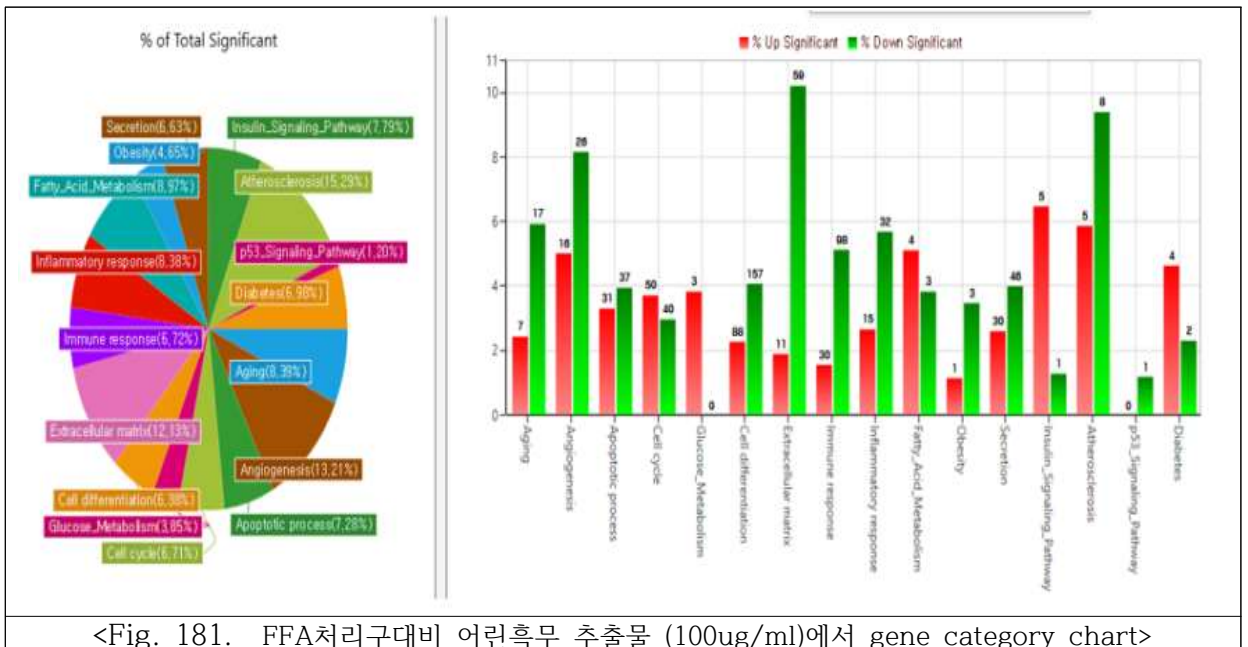


Gene category는 총 16개(aging, angiogenesis, apoptotic process, cell cycle, glucose metabolism, cell differentiation, extracellular matrix, immune response, inflammatory response, fatty acid metabolism, obesity, secretion, insulin pathway, atherosclerosis, p53 signal, diabetes) 관찰되었으며, 이 중 4개 category는 down, 12개 카테고리는 up 발현 되었다. 이결과는 FFA처리는 지방간 모델이 정상적으로 돌출되어다고 사료 됨다(Fig. 179). 특히, glucose metabolism, fatty acid metabolism, insulin pathway, atherosclerosis, p53 signal, diabetes 카테고리가 유의적으로 돌출 되어 지방간 모델 작동됨을 알수 있다.



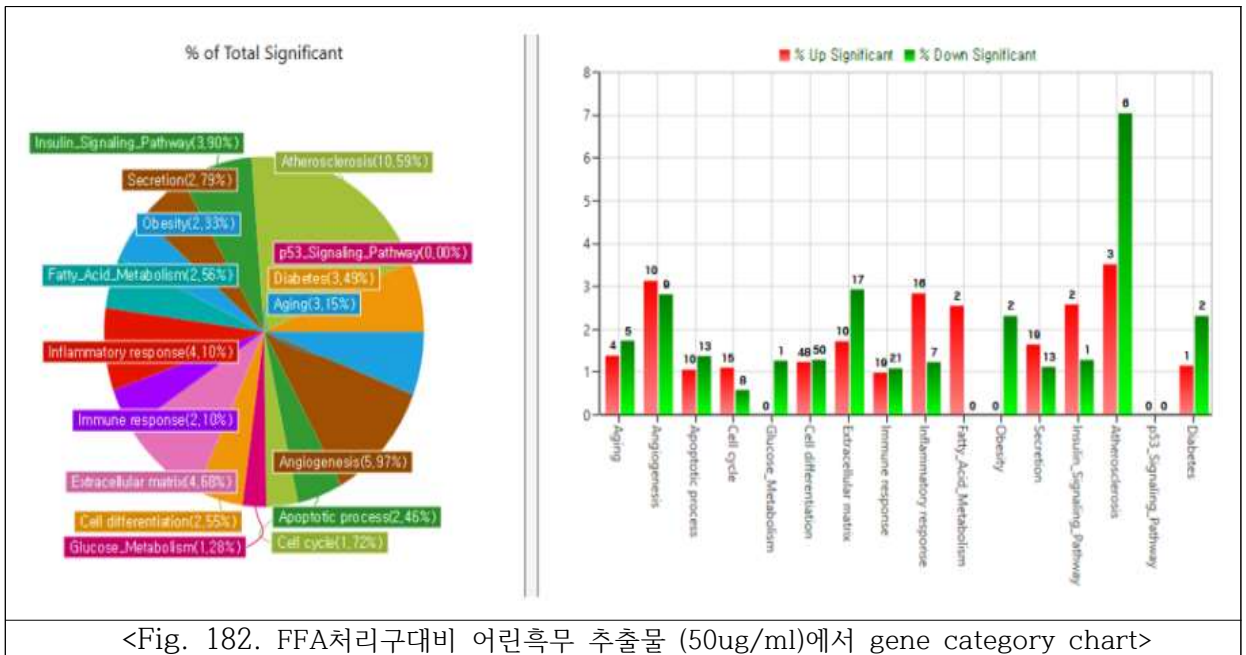
<Fig. 180. FFA처리구대비 어린흑무 추출물 (200ug/ml)에서 gene category chart>

어린검정무 추출물(BRSE) 200ug/ml처리구에서는 16개 gene 카테고리 chart가 Fig. 179과는 대조적으로 모두 down으로 전환 되었다(Fig. 180). 특히 지방간 대사에 관여하는 glucose metabolism, fatty acid metabolism, insulin pathway, atherosclerosis, p53 signal, diabeters 카테고리가 모두 감소하여 어린검정무 추출물의 지방간 대사 및 억제자 유의적으로 이루어 지고 있음을 알수 있다.



<Fig. 181. FFA처리구대비 어린흑무 추출물 (100ug/ml)에서 gene category chart>

어린검정무 추출물(BRSE) 100ug/ml처리구에서는 16개 gene 카테고리 chart중 5개 gene 카테고리 (cell cycle, glucose metabolism, fatty acid metabolism, insulin pathway, diabeters) 가 다시 증가하였다(Fig. 181).



어린검정무 추출물(BRSE) 50ug/ml처리구에서는 16개 gene 카테고리 chart중 5개 gene 카테고리 (angiogenesis, cell cycle, inflammatory response, secretion, fatty acid metabolism, insulin pathway) 가 다시 증가하였다(Fig. 182). 따라서 어린검정무 추출물(BRSE)은 항염효과와 지방간 억제효과를 보여 향후 어린검정무 산업화를위한 기초 자료로 활용 될수 있다고 사료 된다. 그리고 시험동물 연구 및 인체적연구와 같은 보다 광범위한 연구가 필요하다고 사료 된다.

20) 돌외(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) 추출물 항바이러스 효과

□ 연구배경

과학기술기획평가원이 최근 발간한 '신종 감염병 발생 및 피해 현황' 보고서 에 따르면 2000년 이후 6대 신종 감염병(사스, 신종인플루엔자, 조류인플루엔자, 에볼라바이러스, 메르스, 지카바이러스) 발생에 따른 전 세계 사회 및 경제적 손실 액이 8000억달러(약 864조 원)에 달하는 것으로 집계됐다. 신종 감염병 별로는 중증 호흡기증후군(SARS, 2003년)은 29개국 8098명이, 신종플루(H1N1, 2009년)는 전 세계적으로 13만명 이상 각각 감염된 것으로 조사됐다. 조류인플루엔자(H7N9, AI, 2013년) 인체 감염증은 주로 중국에서 발생했다. 특히 2016년 10월 이후 AI 인체감염 환자가 429명이 나타났고, 지난해 초 사망자만 99명에 달하며 치사율이 40%로 나타났다. 에볼라바이러스(에볼라출혈열, 2014년)의 치사율도 41%로 AI 인체 감염 증에 못지 않은데, 주로 아프리카에서 창궐하는 에볼라바이러스는 2만4509명이 감염된 것으로 나타났다. 또한, 2015년 국내 유행으로 대규모 피해를 끼친 중동호흡기증후군(메르스)은 중동 및 북아프리카 등 12개국에서 발생했는데, 1040명이 감염됐고, 치사율도 37%로 높은 편이었다.

그러나, 많은 수의 항 인플루엔자 약물이 존재 함에도 불구하고, 매년 독감 전염병감염은

여전히 높은 수준이며, 최근 개발된 약물은 현재 순환하는 인플루엔자 바이러스 균주에 대해 매우 효과적이지만, 바이러스의 내성속도는 약물이나 백신의 개발속도 보다 더 빠르게 진화하고 있다. 이와 관련하여, 광범위한 활성 범위를 갖는 새로운 치료 접근법 및 약물이 필요한 실정이다

한편 돌외(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)는 Cucurbitaceae과 *Gynostemma* Bl 속에 포함된다. 동북 아시아와 동남아시아에 널리 분포되어 있다. *G. pentaphyllum*은 중국에서 수백 년 동안 식품 및 보조 제품에 사용되어 왔으며 주로 Qingling Mountains와 Yangtze River의 남쪽에 분포되어 있다. 한의학에 따르면 *G. pentaphyllum*의 맛과 본질은 약간 쓴 맛, 중성, 따뜻하다. *G. pentaphyllum*는 명나라 때부터 혈뇨, 부종, 인두의 통증, 목의 열과 부종, 종양과 외상을 치료하는데 민간에서 사용되어 왔다. 현재 많은 돌외 제품들은 미국, 중국, 유럽각국에서 차, 정제, 인스턴트 파우더, 캡슐, 경구 액체 및 타정 등이 출시되어 있으며, 건강기능식품과 면역활성 강화 식품으로 개발되고 있다

본 연구는 돌외 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 우수한 항바이러스 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포독성이 낮아 예방목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 돌외 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 개발을 위한 자료를 제공하고자 실시하였다.

□ 돌외 추출물을 이용한 항바이러스 연구

○ MTS assay

RAW 264.7 세포를 96 well 세포 플레이트에서 seeding(1×10^5 /well)하고, 상기 제조예 1을 통해 제조된 돌외 추출물을 1 μ g/mL에서 200 μ g/mL까지 농도별로 24시간 처리한 후, MTS 시약을 10 μ l 투입하여 2시간 동안 반응시킨 후에 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

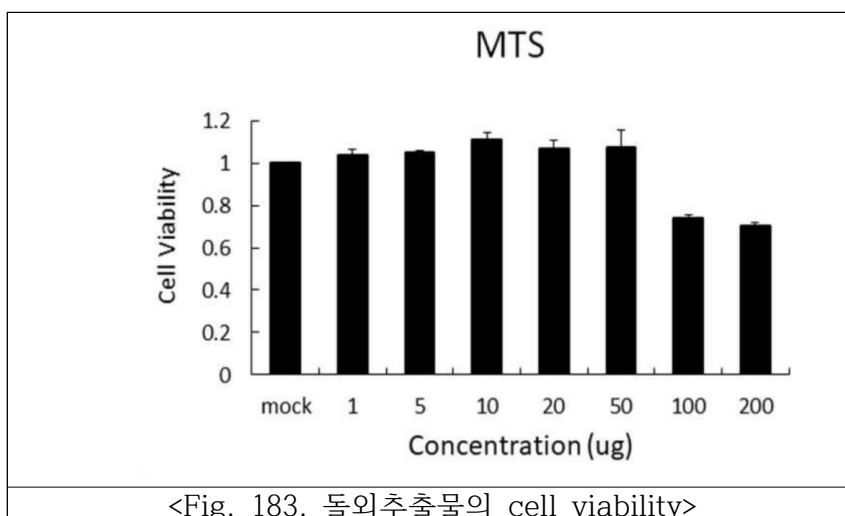
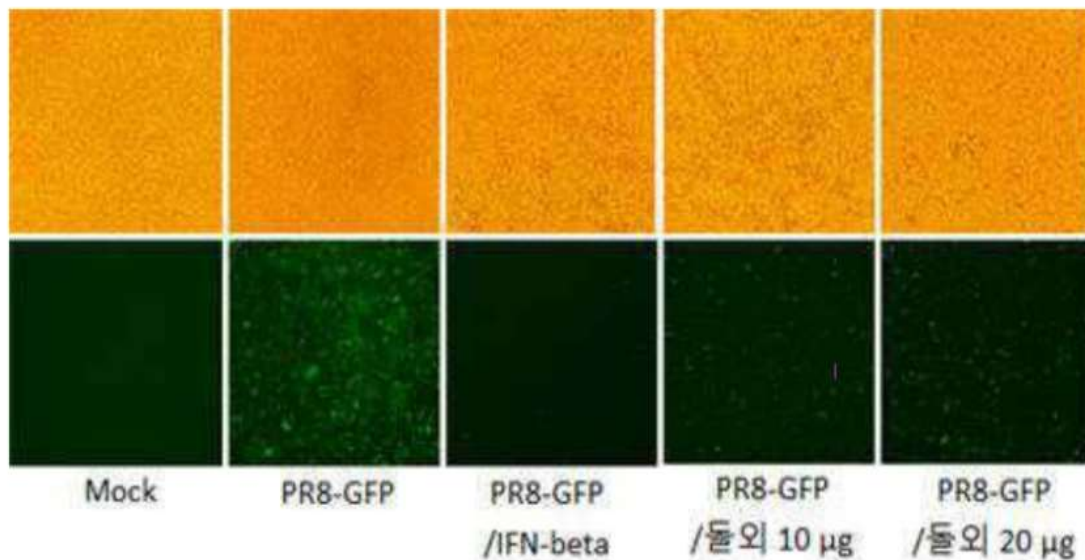


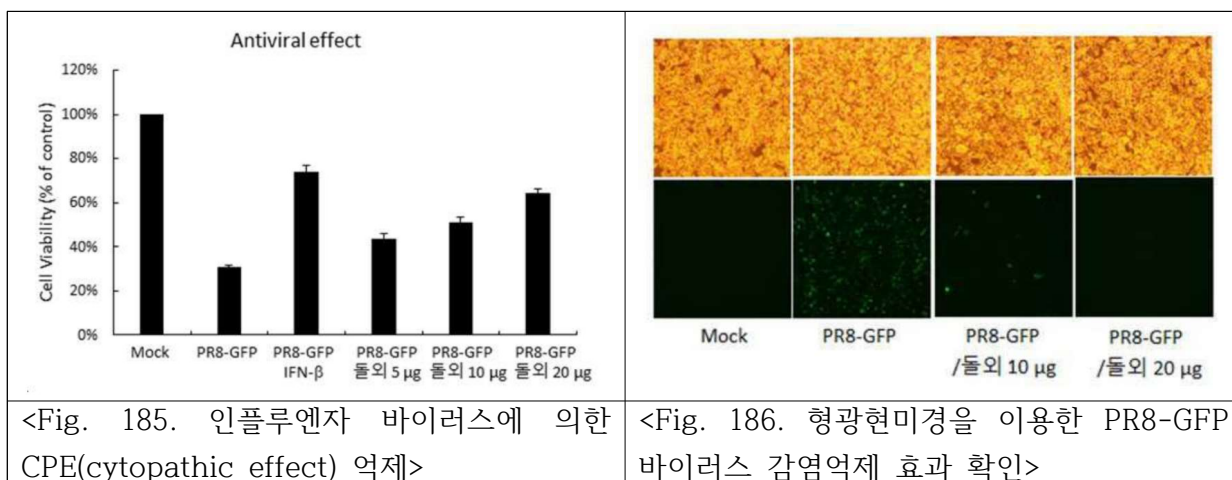
Fig. 183.에서처럼 MTS 시약으로 확인했을 때는 50 μ g/mL까지 세포 독성이 없었으나, 100 μ g/mL이상에서 세포 독성이 관찰되었다.

○ 바이러스감염 억제 효과



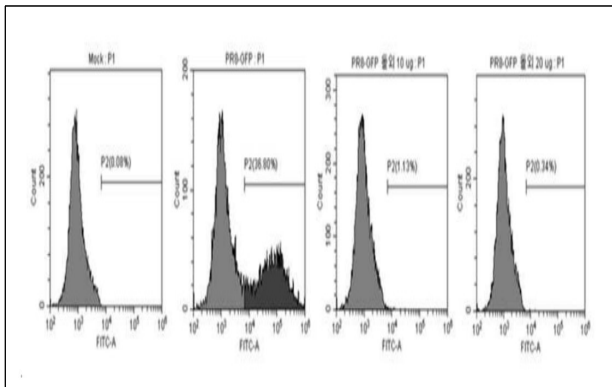
<Fig. 184. 인플루엔자 바이러스(PR8-GFP virus) 예방효과>

Raw 264.7 세포에 처리한 후 12시간 뒤에 형광 단백질(green fluorescence protein; gfp)를 부착한 인플루엔자 바이러스(PR8-GFP virus)를 10 MOI 감염시킨 뒤 12 또는 24 시간 동안 더 배양한 후, 세포 내에서의 VSV-gfp virus의 복제(replication)를 gfp 형광 발현을 통해 관찰하였다(Fig. 184). Fig. 184처럼 돌외 추출물을 처리한 후 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 경우에 바이러스가 복제하면서 나타내는 형광이 감소하는 것을 알 수 있다.

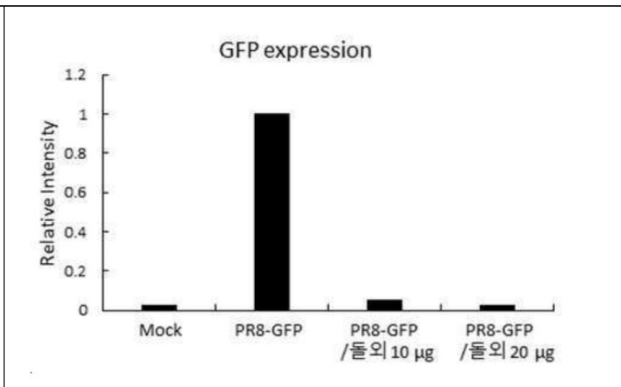


인플루엔자 바이러스가 복제하고 증식하면 세포가 죽으면서 CPE 현상이 나타 난다. 따라서 돌외 추출물이 인플루엔자 바이러스에 대한 CPE가 억제되어 세포 생존률이 증가하는지 확인하고자 CCK-8 어세이를 진행하였다. 돌외 추출물을 처리한 후에 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 경우 세포 생존이 농도의존적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 따라서, 돌외 추출물이 인플루엔자 바이러스의 복제에 의한 CPE를 억제함으로 인해 항바이러스 효능이 나타내는 것을 것을 확인하였다(Fig. 185).

돌외 추출물 10 또는 20 μ g/mL와 인플루엔자 바이러스(PR8-GFP virus)를 동시에 배양된 Raw 264.7 세포에 감염시키고 24시간 후 GFP 형광을 촬영하였다. 돌외 추출물의 처리구에서 GFP 형광이 현저하게 감소되는 것을 알 수 있다. 따라서 돌외 추출물은 바이러스 감염을 억제 하는 효과를 얻었다(Fig. 186).

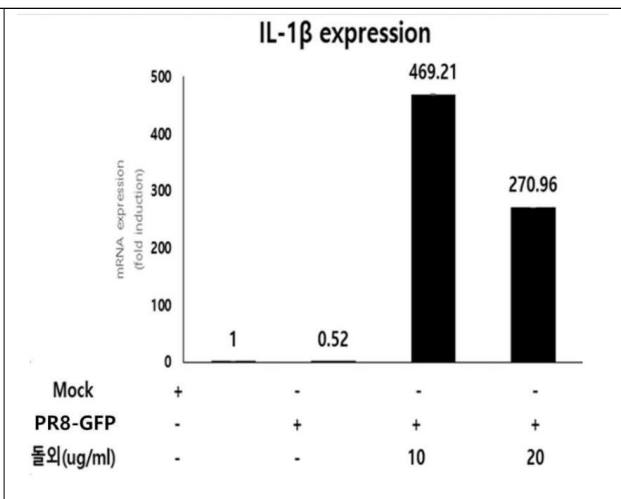
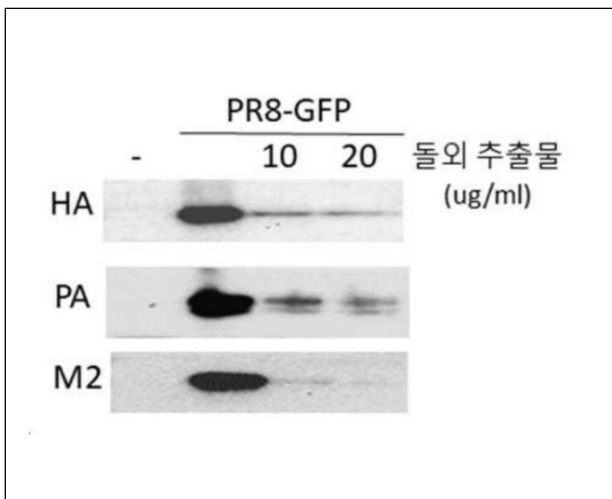


<Fig. 187. 유세포분석기를 통한 항바이러스 효능 확인>



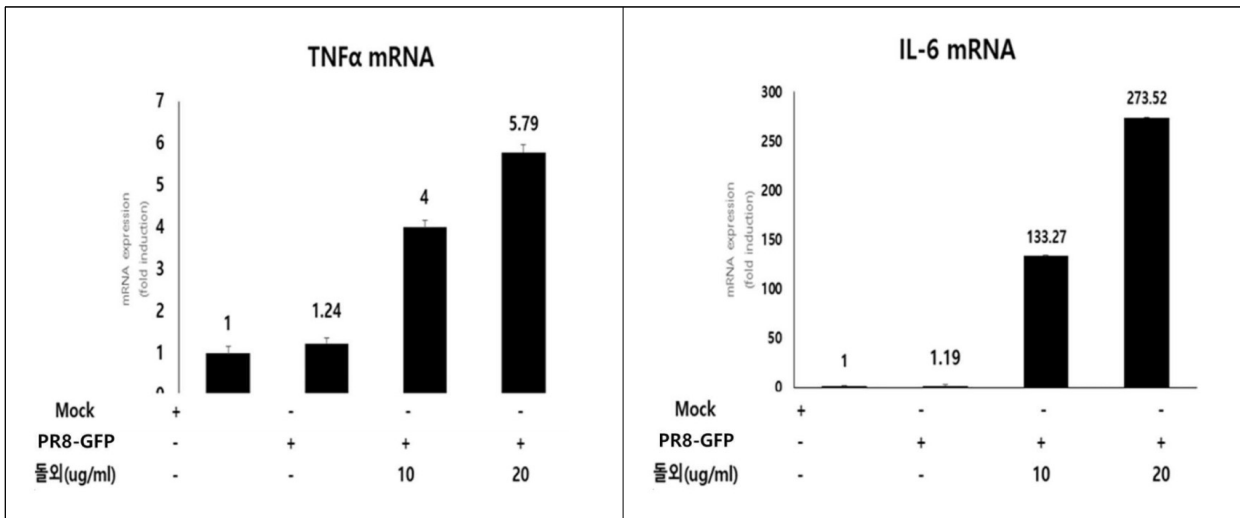
<Fig. 188. 돌외추출물의 항바이러스 효과>

바이러스 와 돌외 추출물을 처리한 후 24시간후에 세포를 3.7% 포르말린 용액으로 고정 후에, PBS(Phosphate buffered saline) 용액에 재현탁하여 유세포분석기(FACS, Fluorescence activated cell sorter)로 형광의 발현 정도를 분석한 히스토그램 결과를 얻었다 . 그 결과 바이러스 처리구에서는 36.8%의 전염율을 보였으나 돌외 추출물 10, 20ug/ml처리구에서는 1.13%, 0.34%의 전염율을 보였다(Fig. 187, 188)



<Fig. 189. Western blot 분석을 통한 인플루엔자 바이러스 단백질 발현 억제 효과>	<Fig. 200. 돌외 추출물의 IL-1b mRNA 발현 효과>
---	--------------------------------------

돌외 추출물과 바이러스를 동시에 처리한 RAW 264.7 세포를 원심분리하여 모은 후 상등액을 버리고 세포를 파쇄한 후에 RIPA 버퍼에 세포를 현탁하고 단백질을 정량하여 30 µg을 SDS-PAGE로 전기영동한 후 PVDF membrane으로 이동시켰다. 인플루엔자 단백질인 HA, PA, M2에 대한 항체를 이용하여 확인한 결과 돌외 추출물이 바이러스 단백질의 발현을 억제하는 것을 알 수 있다(Fig. 189).



<Fig. 202. 돌외 추출물의 TNFα, IL6 mRNA 발현 효과>

RAW264.7 cells에 돌외추출물과 PR8-GFP 바이러스 처리 anti-viral cytokine mRNA를 qPCR법으로 분석하였다. IL-1β mRNA발현은 MOCK 처리와 PR8-GFP 바이러스 처리에서 IL-1b 발현의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 돌외추출물을 10, 20ug/ml 처리에서는 469.21, 270.96 fold 발현이 유도되었다(Fig. 201). TNF-α 역시, 돌외추출물 10, 20ug/ml 처리에서 4, 5.79 fold 발현이 유도되었다 (Fig. 202). 또한, IL-6 발현은 돌외추출물 10, 20ug/ml 처리에서 각각 133.27, 273.52 fold 발현이 유도되었다(Fig. 202). 돌외 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물은 우수한 항바이러스 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포독성이 낮아 예방 목적으로 제품을 개발 할 수 있는 자료를 제시 하였다.

2-2. [제2세부 공동연구기관: 제주대산학협력단 화학코스메틱학부]

1) 유색무 15품종에서의 수확 시기별 glucosinolate, 안토시아닌 함량 조사

(1) glucosinolate 분석

15 품종의 유색무의 수확 시기별 glucosinolate 함량을 조사한 결과, Table 1, 2에서처럼 품종 26이 1, 3월에 채취한 시료 모두에서 가장 높은 glucosinolate 함량을 보였다. 반면 품종 25가 1월에 채취한 시료에서 가장 낮은 glucosinolate 함량을 보였다.

시기별로는 전반적으로 모든 품종이 3월에 수확한 것들이 비교적 1월에 수확한 시료들에 비하여 높은 glucosinolate 함량을 보였다. 그래서 건강기능성식품 개발용 무는 3월에 수확한 무를 사용하는 것이 유리 할 것으로 판단된다.

Table 1. Glucosinolate content in 15 cultivars of colored radish harvested on January 23, 2017

No.	Trivial name	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>
		(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(18)	(24)
Average ± STDEV (µmol/g dry wt.)									
1	Glucoraphanin	0.34 ± 0.03	0.00	0.09 ± 0.00	0.00	0.16 ± 0.03	0.35 ± 0.10	0.58 ± 0.11	0.15 ± 0.04
2	Sinigrin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	Glucoalyssin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Gluconapin	0.07 ± 0.02	1.62 ± 0.44	0.08 ± 0.00	0.82 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.01
5	4-Hydroxyglucobrassicin	0.00	0.00	0.00	0.04 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.24 ± 0.08	0.44 ± 0.03	0.17 ± 0.02
6	Glucoclearin	0.1 ± 0.04	0.8 ± 0.10	0.06 ± 0.01	0.46 ± 0.09	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.00	0.00
7	Glucobrassicinapin	0.00	0.00	0.00	0.02 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
8	Glucourucin	0.05 ± 0.00	0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.1 ± 0.01	0.06 ± 0.01
9	Glucoraphasatin	7.43 ± 0.48	0.6 ± 0.10	5.1 ± 0.34	7.29 ± 1.93	5.64 ± 0.57	4.12 ± 1.45	7.94 ± 1.44	9.87 ± 2.84
10	Glucobrassicin	0.00	0.00	0.00	2.07 ± 0.22	1.58 ± 0.10	0.65 ± 0.03	1.72 ± 0.22	0.00
11	4-Methoxyglucobrassicin	0.37 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.65 ± 0.04	0.72 ± 0.06	0.49 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.4 ± 0.03	0.24 ± 0.04
	Total	8.36 ± 0.58	3.26 ± 0.66	6.04 ± 0.40	11.48 ± 2.38	8.47 ± 0.77	6.03 ± 1.71	11.23 ± 1.86	10.57 ± 2.96
No.	Trivial name	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>Brassica juncea subsp</i>
		25	26	27	28	29	30	31	(짜사미)
Average ± STDEV (µmol/g dry wt.)									

1	Glucoraphanin	0.09 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.1 ± 0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	Sinigrin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	631 ± 0.37
3	Glucolalyssin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34 ± 0.02	0.00	0.00	0.00
4	Gluconapin	0.34 ± 0.05	0.00	0.07 ± 0.01	0.00	0.32 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.00
5	4-Hydroxyglucobrassicin	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.35 ± 0.05	1.45 ± 0.08	0.14 ± 0.00	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.2 ± 0.01
6	Glucocochlearin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	Glucobrasicanapin	0.00	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.44 ± 0.14	0.00	0.00	0.02 ± 0.00	0.00
8	Glucoerucin	0.00	0.1 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.61 ± 0.47	0.00	0.00	0.00	0.00
9	Glucoraphasin	0.02 ± 0.01	21.66±0.60	10.46±0.70	4.5 ± 0.35	0.52 ± 0.08	0.53 ± 0.06	0.63 ± 0.04	0.00
10	Glucobrasicin	0.00	0.00	0.00	0.09 ± 0.01	0.00	0.24 ± 0.03	0.67 ± 0.12	0.1 ± 0.01
11	4-Methoxyglucobrassicin	0.04 ± 0.02	0.63 ± 0.10	1.5 ± 0.05	1.57 ± 0.08	0.07 ± 0.00	0.00	0.00	0.18 ± 0.01
	Total	0.52 ± 0.10	22.88±0.76	12.59±0.85	8.66 ± 1.27	1.39 ± 0.15	1.25 ± 0.15	1.43 ± 0.21	6.8 ± 0.40

Table 2. Glucosinolate content in 15 cultivars of colored radish harvested on March 10, 2017

No.	Trivial name	<i>R. sativus</i> (11)	<i>R. sativus</i> (12)	<i>R. sativus</i> (13)	<i>R. sativus</i> (14)	<i>R. sativus</i> (15)	<i>R. sativus</i> (16)	<i>R. sativus</i> (18)
Average(µmol/g dry wt)								
1	Glucoraphanin	0.48 ± 0.06	0.45 ± 0.17	0.71 ± 0.11	0.08 ± 0.04	0.37 ± 0.06	0.95 ± 0.19	0.62 ± 0.19
2	Sinigrin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	Glucolalyssin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Gluconapin	2.09 ± 0.77	3.23 ± 0.79	0.16 ± 0.07	0.96 ± 0.2	0.3 ± 0.02	0.00	0.00
5	4-Hydroxyglucobrassicin	0.00	0.00	0.00	0.05 ± 0.02	0.15 ± 0.00	0.39 ± 0.03	0.89 ± 0.03
6	Glucocochlearin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	Glucobrasicanapin	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.03 ± 0.01
8	Glucoerucin	0.07 ± 0.02	0.1 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.07 ± 0.01
9	Glucoraphasatin	8.04 ± 0.27	8.13 ± 1.21	10.81 ± 1.45	10.39 ± 0.6	6.4 ± 1.13	13.3 ± 0.29	9 ± 0.61
10	Glucobrasicin	0.22 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.00	1.05 ± 0.05	0.23 ± 0.01	0.46 ± 0.00	0.00
11	4-Methoxyglucobrassicin	1.03 ± 0.12	0.77 ± 0.19	0.56 ± 0.04	0.65 ± 0.09	0.86 ± 0.07	0.66 ± 0.02	0.24 ± 0.03
	Total	11.96 ± 1.27	12.79 ± 2.41	12.48 ± 1.69	13.34 ± 1.05	8.4 ± 1.32	16.02 ± 0.54	10.85 ± 0.87
No.	Trivial	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>Brassica</i>	

name	26	27	28	30	31	<i>juncea</i> <i>subsp</i> (짜사이)	
	Average($\mu\text{mol/g dry wt}$)						
1	Glucoraphanin	0.5 \pm 0.3	0.06 \pm 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	Sinigrin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	31.97 \pm 2.71
3	Glucosalysin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Gluconanin	0.00	2.22 \pm 0.9	6.24 \pm 0.3	0.7 \pm 0.05	6.24 \pm 0.3	1.9 \pm 0.2
5	4-Hydroxyglucobrassicin	0.00	0.21 \pm 0.01	0.00	0.66 \pm 0.01	0.00	0.95 \pm 0.09
6	Glucocochlearin	0.56 \pm 0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	Glucobrasicanapin	0.11 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	1.04 \pm 0.04	0.44 \pm 0.03	1.04 \pm 0.04	0.00
8	Glucoerucin	0.25 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.91 \pm 0.05	0.38 \pm 0.04	0.91 \pm 0.05	0.00
9	Glucoraphasatin	22.97 \pm 0.57	10.49 \pm 1.27	0.83 \pm 0.09	0.45 \pm 0.05	0.83 \pm 0.09	0.00
10	Glucobrasicinin	0.67 \pm 0.05	0.28 \pm 0.01	0.00	0.00	0.00	0.18 \pm 0.01
11	4-Methoxyglucobrassicin	1.21 \pm 0.11	0.6 \pm 0.03	0.29 \pm 0.06	0.26 \pm 0.03	0.29 \pm 0.06	0.19 \pm 0.02
	Total	26.27 \pm 1.1	13.97 \pm 2.24	9.31 \pm 0.54	2.89 \pm 0.21	9.31 \pm 0.54	35.19 \pm 3.03

(2) 유색무 15 품종의 수확 시기별 안토시아닌 함량 분석

- 유색무에서 안토시아닌 분석 방법은 Table 3에서처럼 추출하여 Table 8에서 서술한 조건으로 HPLC를 이용하여 분석하였다.

Table 3. Sample preparation for anthocyanins in red radish

- ① 시료 0.1 g을 2.0 mL eppendorf tube에 넣는다.
- ② 추출용매 (water: formic acid, 95: 5 (v/v)) 2 mL를 넣는다.
- ③ 5분 동안 진동혼합(Vortexing)을 한다
- ④ 20분 동안 약하게(Low) 초음파 처리 (sonication)를 한다.
- ⑤ 원심분리(Centrifugation)를 (12,000 rpm, 4°C, 15min)을 한다.
- ⑥ 0.45 μL PTFE hydrophilic syringe filter(직경 13mm)로 여과한 후, HPLC용 갈색 vial에 넣는다.

Table 4. HPLC analysis for anthocyanins in red radish

HPLC	Agilent Technologies 1200 series
Column	Synergi 4 μ POLAR-RP 80A (250 x 4.6mm, 4 μ m Phenomenex)
Guard Column	Security Guard Cartridges Kit AQ C18 4 x 3.0mm KJO-4282 (Phenomenex)
Wavelength	520 nm
Oven temperature	40°C
Mobile phase	Solvent A (water: formic acid, 95:5 (v/v)) Solvent B (acetonitrile: formic acid, 95:5 (v/v))
Flow rate	1.0mL/min
Gradient conditions	2.0 min solvent B 18% 4.0 min solvent B 18% 9.00 min solvent B 20% 14.00 min solvent B 20% 19.00 min solvent B 21% 24.00 min solvent B 21% 24.10 min solvent B 5% 30.00 min solvent B 5%

- 15품종의 유색무의 수확 시기별 안토시아닌 함량을 조사한 결과, Table 5, 6에서처럼 1월에 채취한 품종 29가 가장 높은 안토시아닌 함량을 보였으므로 안토시아닌 중 Pelargonidin 3-(feruloyl)sophoroside-5-glucoside가 주 성분으로 나타났다. 수확 시기별로는 glucosinolate와 같이 전반적으로 모든 품종이 3월에 수확한 것들이 비교적 1월에 수확한 시료들에 비하여 높은 안토시아닌 함량을 보였다. 그래서 건강기능성식품 개발용 무는 3월에 수확한 무를 사용하는 것이 유리 할 것으로 판단된다.

Table 5. Anthocyanin content in 15 cultivars of colored radish harvested on January 23, 2017

No.	Trivial name	<i>R. sativus</i> 11	<i>R. sativus</i> 12	<i>R. sativus</i> 13	<i>R. sativus</i> 14	<i>R. sativus</i> 15
		Area(μ g/ml)				
1	Pelargonidin 3-(p-coumaroyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	Pelargonidin 3-(feruloyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinylnylactechol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Pelargonidin 3-malyglucoside	11.57 \pm 1.5	36.09 \pm 3.2	0.00	21.37 \pm 0.4	0.00
5	Cyanidin-3-digulcoside-5-glucoside	0.00	8.88 \pm 1.89	0.00	0.00	0.00
6	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinylnylphenol	21.49 \pm 3.5	64.15 \pm 0.8	22.61 \pm 2.1	27.03 \pm 3.6	0.00
7	Pelargonidin 3-acetylglucoside	0.00	0.00	135.88 \pm 2.7	0.00	0.00
8	Petunidin-3-gulcoside pyruvic derivative	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	Peonidin-3-glucoside-4-vinylcatechin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	Petunidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Total	33.06 \pm 5.0	109.12 \pm 5.8	158.49 \pm 2	48.4 \pm 3.9	0.00

No.	Trivial name	<i>R. sativu</i>	<i>R. sativu</i>	<i>R. sativu</i>	<i>R. sativus</i> 25	<i>R. sati</i>	<i>R. sati</i>
-----	--------------	------------------	------------------	------------------	-------------------------	----------------	----------------

		<i>s</i> ₁₆	<i>s</i> ₁₈	<i>us</i> ₂₄	Area(µg/ml)		
1	Pelargonidin 3-(p-coumaroyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	348.34 ± 17.07	0.00	0.00
2	Pelargonidin 3-(feruloyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	1151.65 ± 66.23	0.00	0.00
3	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyllactechol	0.00	0.00	0.00	312.96 ± 185.31	0.00	0.00
4	Pelargonidin 3-malyglucoside	0.00	0.00	0.00	26.69 ± 11.15	0.00	0.00
5	Cyanidin-3-digulcoside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	42.08 ± 0.5
6	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyphenol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	Pelargonidin 3-acetylglucoside	0.00	0.00	0.00	100.79 ± 13.34	0.00	0.00
8	Petunidin-3-gulcoside pyruvic derivative	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	Peonidin-3-glucoside-4-vinylcatechin	0.00	0.00	0.00	94.44 ± 34.79	0.00	0.00
10	Petunidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total		0.00	0.00	0.00	2034.87 ± 327.89	0.00	42.08 ± 0.5

No.	Trivial name	<i>R. sativus</i> ₂₈	<i>R. sativus</i> ₂₉	<i>R. sativus</i> ₃₀	<i>R. sativus</i> ₃₁	<i>Brassica juncea</i> subsp (짜사이)
Area(µg/ml)						
1	Pelargonidin 3-(p-coumaroyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	1800.39 ± 115.3	0.00	0.00	0.00
2	Pelargonidin 3-(feruloyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	5962.46 ± 691.7	0.00	0.00	0.00
3	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyllactechol	0.00	1886.28 ± 603.9	0.00	0.00	0.00
4	Pelargonidin 3-malyglucoside	0.00	191.86 ± 87.04	23.56 ± 2.17	0.00	0.00
5	Cyanidin-3-digulcoside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyphenol	0.00	0.00	20.24 ± 1.04	0.00	0.00
7	Pelargonidin 3-acetylglucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	Petunidin-3-gulcoside pyruvic derivative	0.00	72.27 ± 8.36	0.00	0.00	0.00
9	Peonidin-3-glucoside-4-vinylcatechin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	Petunidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total		0.00	9913.25 ± 303.10	43.80 ± 1.13	0.00	0.00

Table 6. Anthocyanin content in 15 cultivars of colored radish harvested on March 10, 2017

No.	Trivial name	<i>R. sativus</i> ₁₁	<i>R. sativus</i> ₁₂	<i>R. sativus</i> ₁₃	<i>R. sativus</i> ₁₄
Area(µg/ml)					
1	Pelargonidin 3-(p-coumaroyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00
2	Pelargonidin 3-(feruloyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00

3	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyllactechol	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Pelargonidin 3-malyglucoside	23.3 ± 0.16	47.89 ± 2.5	0.00	41.47 ± 0.86
5	Cyanidin-3-digulcoside-5-glucoside	6.38 ± 1.19	15.81 ± 3.4	0.00	8.29 ± 1.11
6	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyphenol	77.67 ± 1.89	153.37 ± 8	16.72 ± 3.3	67.63 ± 2.0
7	Pelargonidin 3-acetylglucoside	0.00	232.8 ± 28	212.52 ± 9.3	683.05 ± 77.71
8	Petunidin-3-gulcoside pyruvic derivative	0.00	0.00	0.00	0.00
9	Peonidin-3-glucoside-4-vinylcatechin	0.00	0.00	0.00	680.93 ± 8.41
10	Petunidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside	42.91 ± 2.85	50.3 ± 14.2	162.35 ± 10.6	145.1 ± 27.78
	Total	150.25 ± 6.1	500.17 ± 56.1	391.59 ± 23.1	1626.47 ± 117.9

No.	Trivial name	<i>R. sativus</i> 15	<i>R. sativus</i> 18	<i>R. sativus</i> 24	<i>R. sativus</i> 26	<i>R. sativus</i> 27
		Area(µg/ml)				
1	Pelargonidin 3-(p-coumaroyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	Pelargonidin 3-(feruloyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyllactechol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Pelargonidin 3-malyglucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	32.84 ± 0.27
5	Cyanidin-3-digulcoside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	145.69 ± 0.04
6	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyphenol	12.81 ± 4.12	0.00	0.00	0.00	28.48 ± 2.13
7	Pelargonidin 3-acetylglucoside	1967.2 ± 183.1	0.00	0.00	0.00	0.00
8	Petunidin-3-gulcoside pyruvic derivative	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	Peonidin-3-glucoside-4-vinylcatechin	794.88 ± 99.53	0.00	0.00	0.00	59.02 ± 0.45
10	Petunidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00	17209 ± 9.35
	Total	2775.5 ± 286.7	0.00	0.00	0.00	438.12 ± 12.24

No.	Trivial name	<i>R. sativus</i> 28	<i>R. sativus</i> 30	<i>R. sativus</i> 31	<i>Brassica juncea</i> subsp (꽃사리)
		Area(µg/ml)			
1	Pelargonidin 3-(p-coumaroyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00
2	Pelargonidin 3-(feruloyl)sophoroside-5-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00
3	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyllactechol	0.00	0.00	0.00	0.00
4	Pelargonidin 3-malyglucoside	0.00	13.14 ± 0.93	0.00	0.00
5	Cyanidin-3-digulcoside-5-glucoside	0.00	46.98 ± 2.24	0.00	0.00
6	Peonidin-3-(p-coumaroyl)glucoside-4-vinyphenol	0.00	0.00	0.00	0.00
7	Pelargonidin 3-acetylglucoside	0.00	316.79 ± 23.98	0.00	0.00
8	Petunidin-3-gulcoside pyruvic derivative	0.00	0.00	0.00	0.00
9	Peonidin-3-glucoside-4-vinylcatechin	0.00	635.42 ± 10.43	0.00	0.00
10	Petunidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glucoside	0.00	0.00	0.00	0.00
	Total	0.00	1012.33 ± 37.58	0.00	0.00

2) 흑무 조건별 추출물 제조 및 HPLC 분석

(1) 건조에 따른 HPLC 분석

- 제주산 흑무를 건조조건별 (비건조, 열처리, 동결건조, 열풍건조 등), 추출용매 조건별 (열수, 30-70% 주정) 등 다양한 조건에서 추출을 실시하였다.
- 1차적으로 총 15가지의 조건별 추출물을 제조하였다.

Table 7. 각 추출물의 추출 조건 및 수율

No.	sample	부위	전처리	투입량	추출조건	수득량	수율
1	S101	겉피	비건조	3.5 kg	80% 주정, 5 L	229.6 g	6.6%
2	S102	육질	비건조	6.5 kg	80% 주정, 10 L	260.9 g	4.0%
3	S103	흑무	비건조	5 kg	80% 주정, 8 L	168.9 g	3.4%
4	S104	흑무	비건조	5 kg	열수, 10 L	184.6 g	3.7%
5	S105	흑무	열처리(70~80°C, 10 min), 열풍건조(96 h)	200 g	30% 주정, 2L	65.0 g	32.5%
6	S106	흑무	열처리(70~80°C, 10 min), 열풍건조(96 h)	200 g	50% 주정, 2L	69.3 g	34.7%
7	S107	흑무	열처리(70~80°C, 10 min), 열풍건조(96 h)	200 g	70% 주정, 2L	69.7 g	34.9%
8	S108	흑무	열풍건조(96 h)	300 g	열수(4 h), 3L	93.1 g	31.0%
9	S109	흑무	열풍건조(96 h)	300 g	30% 주정, 3L	92.0 g	30.7%
10	S110	흑무	열풍건조(96 h)	300 g	50% 주정, 3L	97.3 g	32.4%
11	S111	흑무	열풍건조(96 h)	300 g	70% 주정, 3L	99.3 g	33.1%
12	S112	흑무	동결건조(48 h)	300 g	열수(4 h), 3L	121.9 g	40.6%
13	S113	흑무	동결건조(48 h)	300 g	30% 주정, 3L	109.0 g	36.3%
14	S114	흑무	동결건조(48 h)	300 g	50% 주정, 3L	108.0 g	36.0%
15	S115	흑무	동결건조(48 h)	300 g	70% 주정, 3L	127.4 g	42.5%

- 각 추출물에 대하여 HPLC 분석을 실시하였다. 분석 준비는 DMSO에 100 mg/mL 로 추출물을 녹인 후, 에탄올을 이용해 10 mg/mL로 희석한 후 분석에 사용하였다. HPLC (High performance liquid chromatography)는 Alliance 2695-2998 system (Waters Co., Massachusetts, USA)를 이용하였다.

Column	Atlantis [®] dC18 5 µm, 4.6×250 mm			
Injection volume	10 µL			
Mobile phase	(A) Water (B) Methanol			
Detector	PDA			
Gradienct conditions	Time (min)	A (%)	B (%)	Flow (mL/min)
	0	100	0	1.0
	5	90	10	1.0
	50	20	80	1.0
	55	0	100	1.0
	60	0	100	1.0

- HPLC 분석을 통하여 RT 34.6 (peak 1) 및 31.9 (peak 2) 피크를 흑무의 주성분으로

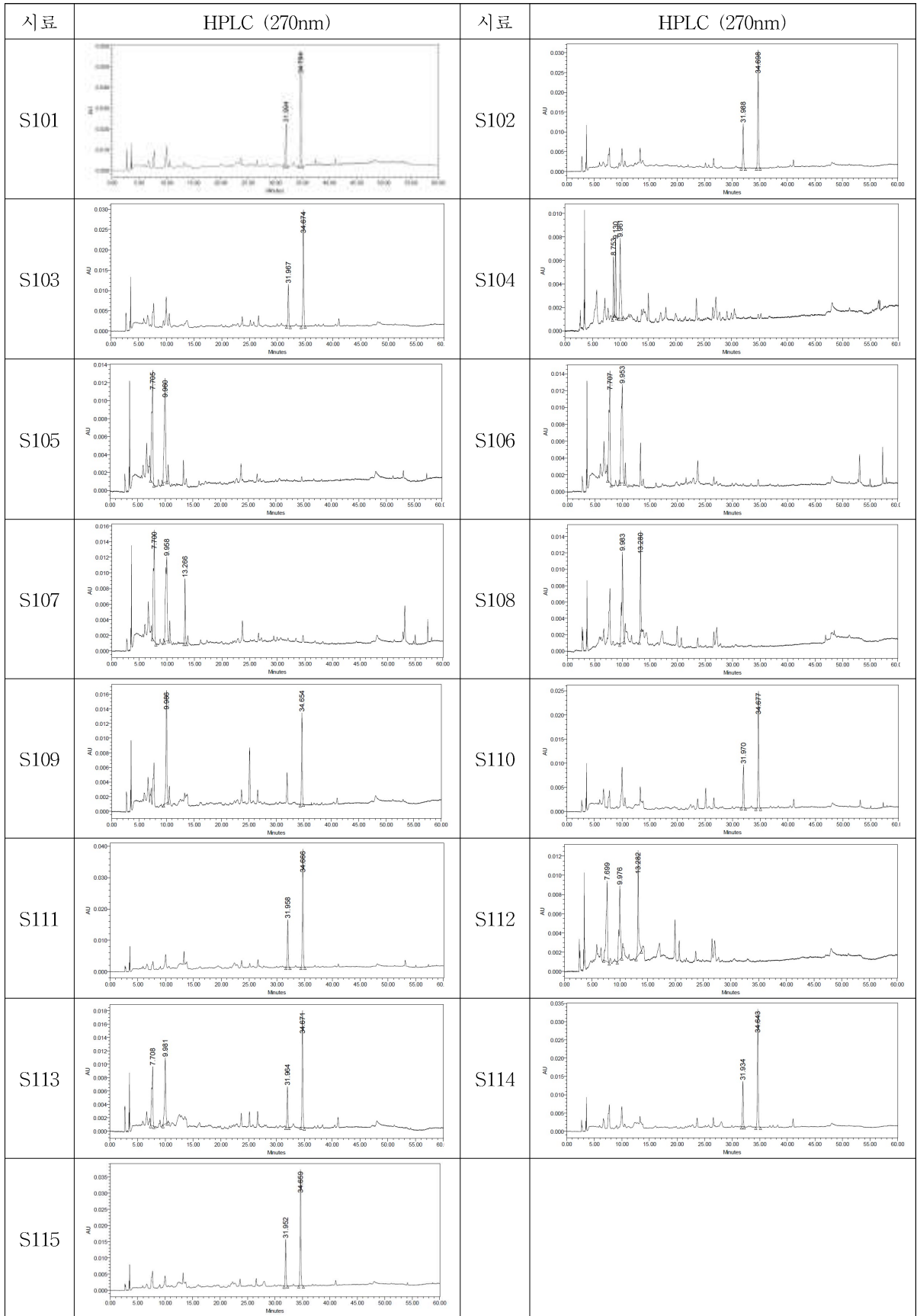


Figure 1. 흑무 조건별 추출물에 따른 HPLC 분석 결과

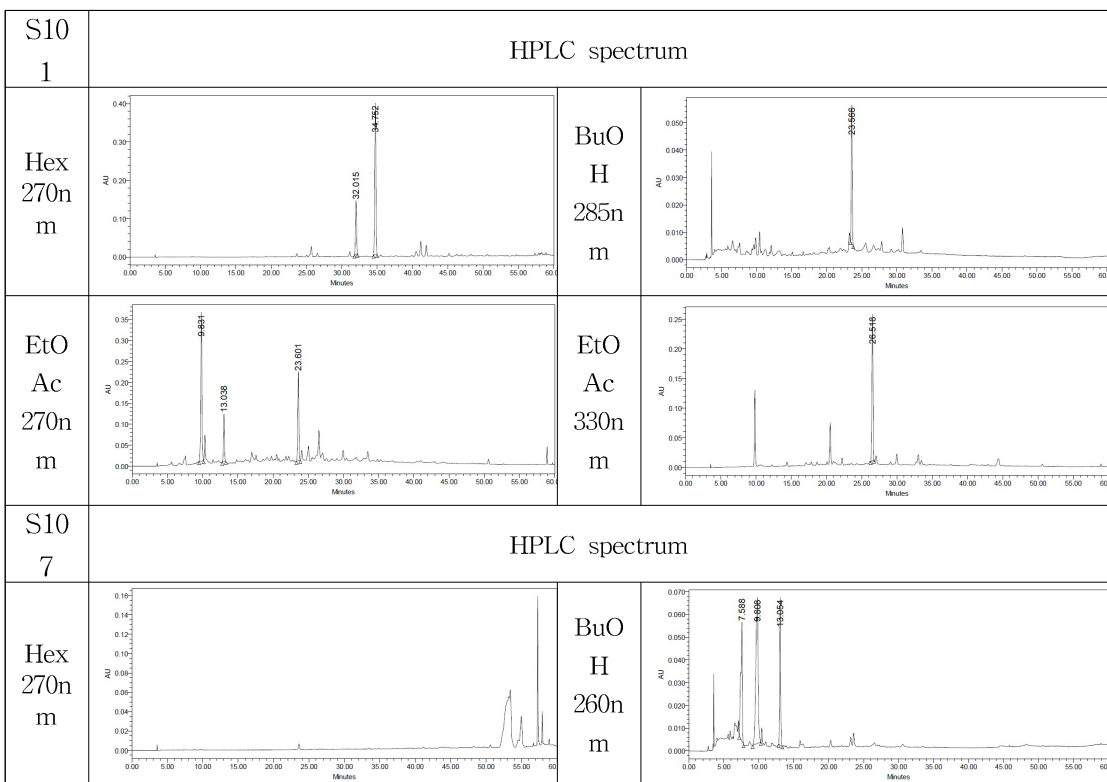
예상할 수 있었으며, 열처리 및 열수 조건에서는 peak 1, 2가 사라지고 RT 13.2 (peak 3) 피크가 공통적으로 분석됨을 확인함.

(2) 흑무 추출물 용매 분획물 제조 및 HPLC 분석

- 각 조건별 추출물 중 HPLC 분석 데이터 및 JTP 종다양성연구소의 효능 분석 결과를 토대로 4개의 추출조건을 선정, S101, S107, S108, S115에 대하여 용매분획을 실시하였다. 용매분획은 추출물을 용매의 극성에 따라 나누기 위해 각 추출물을 증류수에 현탁시킨 후, hexane, ethyl acetate, butanol 등의 극성순서에 따라 분획을 진행하였다. 각 분획물의 수율은 다음과 같으며, 각 용매분획물에 대하여 HPLC 분석을 실시하였다(Table 8, Fig. 2).

Table 8. 각 추출물의 추출 조건 및 수율

No.	시료부위 / 건조조건	추출조건		Hex	EtOAc	BuOH	H ₂ O
S101	흑무 겉피 / 비건조	80% 주정	분획물양 (g)	0.4	0.56	2.97	9.66
			수율 (%)	2.02	2.78	14.85	48.29
S107	흑무 / 열처리, 열풍건조	70% 주정	분획물양 (g)	0.39	0.23	2.99	11.59
			수율 (%)	1.96	1.16	14.98	57.96
S108	흑무 / 열풍건조	열수	분획물양 (g)	0.06	0.1	1.44	10.64
			수율 (%)	0.3	0.53	7.2	53.19
S115	흑무 / 동결건조	70% 주정	분획물양 (g)	0.46	0.21	1.87	13.27
			수율 (%)	2.32	1.05	9.33	66.35



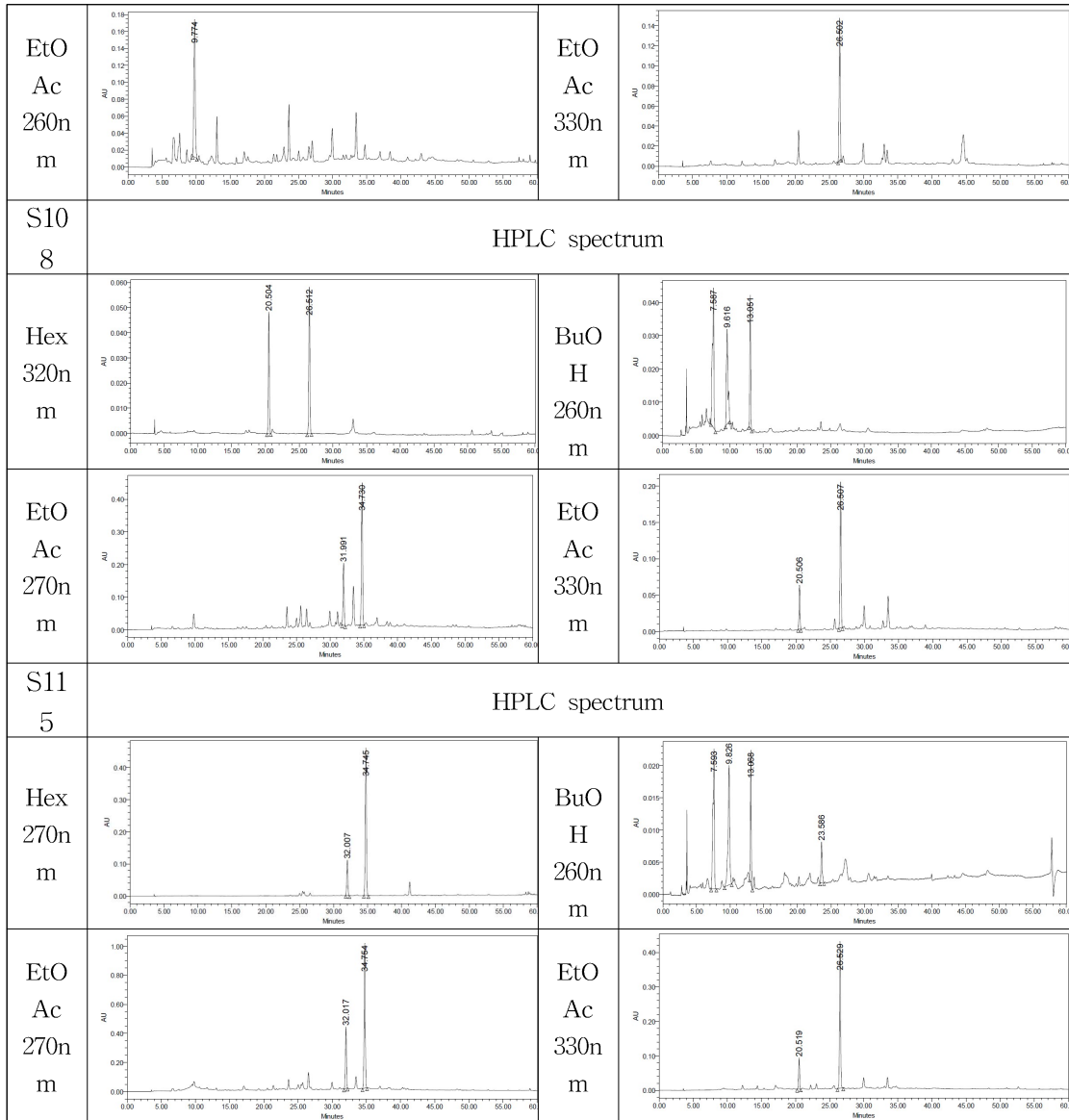


Figure 2. 흑무 추출물 용매 분획물의 HPLC 분석 결과

- HPLC 분석을 통하여 S101 Hex, S115 Hex, EtOAc 분획물에서 흑무의 주성분으로 예상하였던 RT 34.6 min (peak 1) 및 31.9 min (peak 2) peak가 확인되었다. 또한 각 추출물의 EtOAc 분획물의 330 nm 파장대에서 26 min대의 주요 peak가 확인되었으며, 이 역시 지표성분으로서의 가능성을 모색해볼 수 있었다.

3) 흑무 추출물로 부터 단일물질 분리

(1) 흑무 Diaion HP-20 공정을 이용한 분리

- JTP 종다양성연구소로부터 흑무 추출물의 당성분을 제거한 HP-20 column 공정추출물을 전달 받아 분리 실험을 진행하였다.
- Diaion HP-20 resin은 당성분을 분리하거나 혹은 제거하는데 유용하게 사용되는 충전제로서, 흑무의 분획 결과 극성부분인 물층이 다른 분획물에 비해 양이 많은 것으로 보아 당성분이 많을 것이라 사료되어 JTP 종다양성연구소에서 Diaion HP-20 공정을 실시하였고, 이 추출물을 받아

제주대학교 화학과에서는 화합물 분리 실험을 진행하였다.

- 실험에는 흑무 에탄올 추출물을 Diaion HP-20 컬럼 공정을 실시한 #15 추출물과, 흑무 습식분쇄 에탄올 추출물을 Diaion HP-20 공정을 실시한 #16 추출물을 이용하였으며, Sephadex LH-20 column chromatography를 물과 메탄올을 용리액으로 사용하여 분리를 진행하였다.

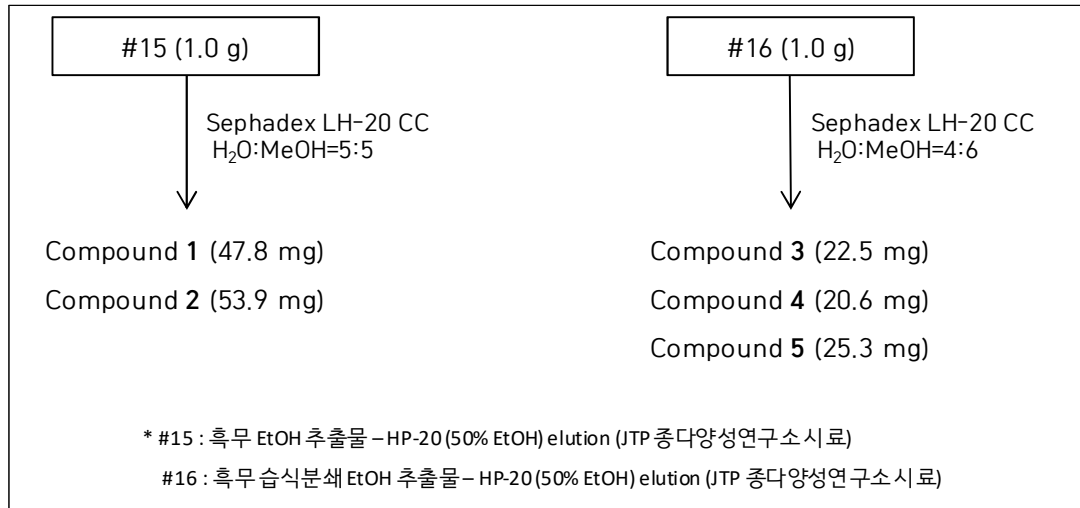


Figure 3. 화합물 분리 공정도

- 각각의 추출물로부터 5개의 화합물을 분리하였으며, 분리된 화합물은 NMR과 MASS spectrometer를 이용하여 구조 동정을 실시하였으며, 문헌과 비교하여 구조를 확인하였다. 분리된 화합물들은 Fig.4와 같다.

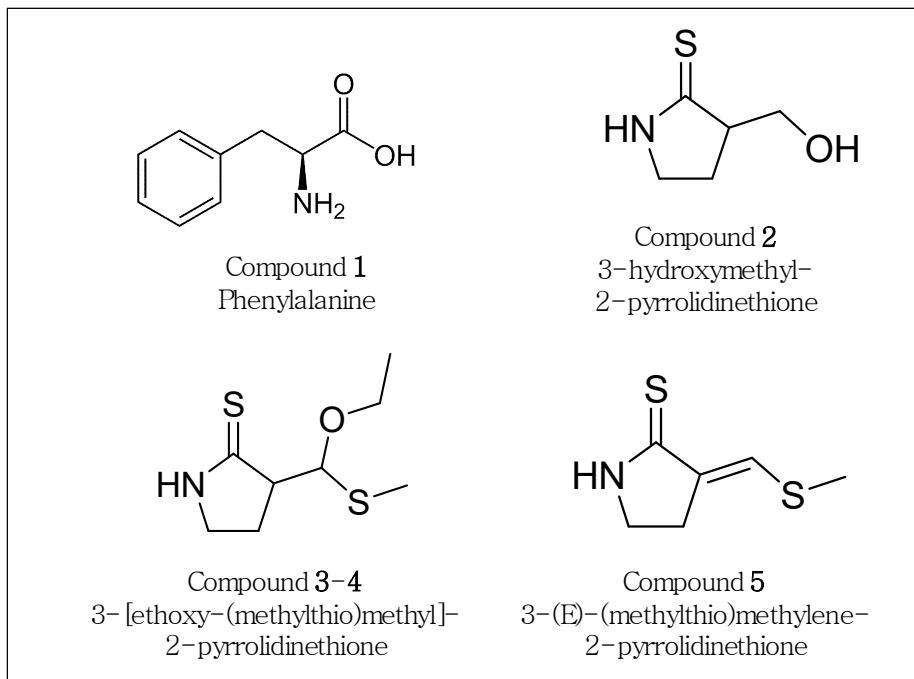


Figure 4. 흑무로부터 분리된 화합물 구조

(2) S120 추출물을 이용한 화합물 분리

- HP-20 공정을 진행한 추출물 외에 다른 극성부분의 화합물을 분리하고자 S115의 대량 추출물인 S120을 가지고 화합물 분리 실험을 진행하였다.
- S120 추출물 120 g을 용매분획을 실시하여 *n*-Hex (0.53 g), EtOAc(1.59 g), *n*-BuOH (16.5 g), H₂O (101.2 g)의 분획물을 얻었다. 얻어진 분획물 중 ethyl acetate 분획물을 이용하여 순상 silica gel을 이용해 vacuum liquid chromatography를 수행하였다. Hexane, ethyl acetate, methanol을 이용하여극성을 높이는 방법으로 총 21개의 fraction을 얻었다. 얻어진 fraction들을 silica gel 혹은 sephadex LH-20 충진제를 이용해 column chromatography를 진행하여 5개의 화합물들을 분리하였다. 분리된 화합물들은 Fig.5와 같다.

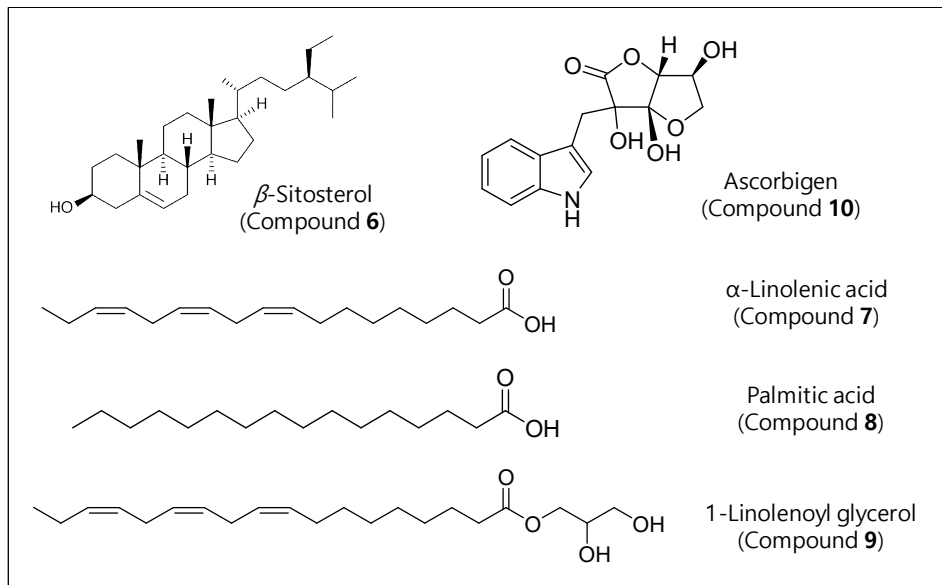


Figure 5. S120 추출물로부터 분리된 화합물 구조

(3) 흑무의 지표성분 발굴 및 분석조건 확립

○ 분리된 화합물의 HPLC 분석

- 분리된 화합물들에 대하여 HPLC 분석을 실시하였다. 화합물들은 시중에 판매하고 있는 표준품이 없기 때문에 분리된 화합물로 표준품을 대체해 측정하였다. 분리된 compound 1-5를 메탄올을 이용하여 500 ppm 농도로 녹인 후 0.4 μ m syringe filter로 필터한 후, HPLC (High performance liquid chromatography) Alliance 2695-2998 system (Waters Co., Massachusetts, USA)을 이용하여 측정하였다. 분석 조건은 다음과 같다.
- 그 결과 흑무의 주요 성분으로 예상하였던 RT 34.6 min (peak 1) 및 31.9 min (peak 2)가 compound 3과 4 (부분이성질체)임을 확인하였으며, 330 nm 파장대에서 주요 peak로 확인된 26 min의 화합물이 compound 5임을 확인하였다(Fig. 6).

No.	HPLC spectrum	No.	HPLC spectrum
-----	---------------	-----	---------------

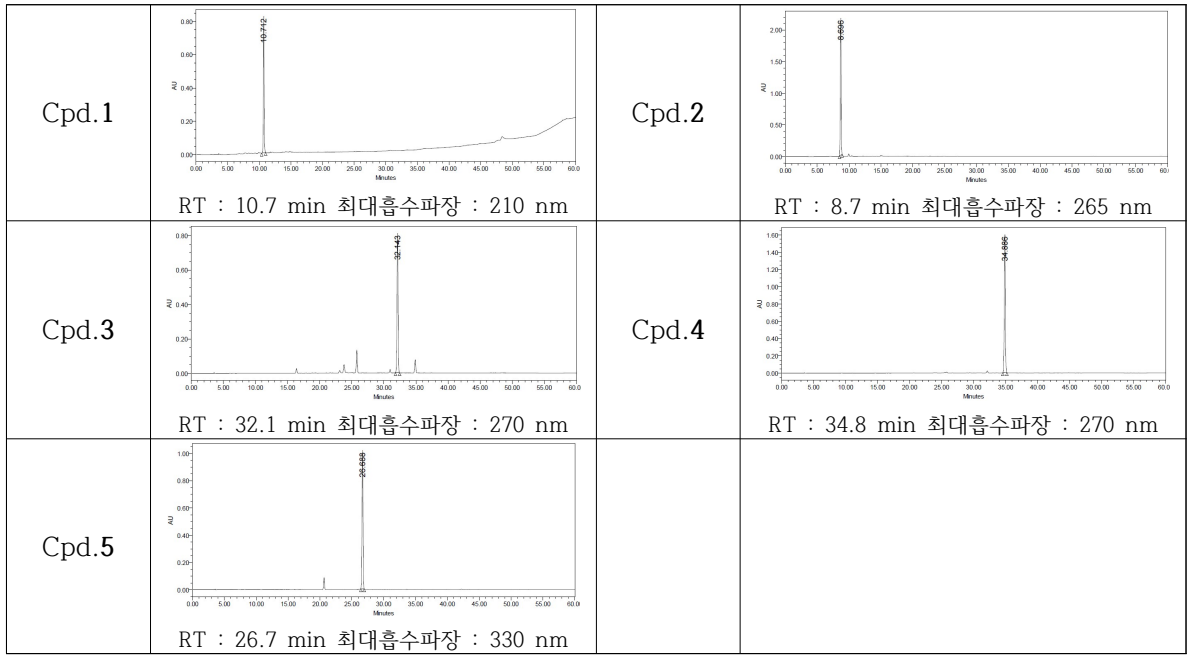


Figure 6. 분리된 화합물들의 HPLC 분석 결과

○ 분리된 화합물의 함량 분석

- 각 조건별 추출물 24종에 대하여 1차로 분리된 compound 1-5 의 함량 분석을 실시하였다. 함량분석은 HPLC를 이용하였으며, 먼저 분리된 화합물을 농도별로 HPLC 분석을 실시해 검량곡선을 작성한 후, 추출물에서의 해당 화합물의 peak 면적을 검량곡선에 대입하여 함량을 계산하였다(Table. 9).

Table 9. 조건별 추출물에서의 화합물 함량 분석 결과

No.	부위	전처리	추출조건	수율	Compound 3 (ug/g)	Compound 4 (ug/g)	Compound 5 (ug/g)
S101	겉피	비건조	80% 주정	6.6%	1193.1	3156.1	776.0
S102	육질	비건조	80% 주정	4.0%	676.1	1799.9	420.3
S103	흑무	비건조	80% 주정	3.4%	625.8	1739.5	488.7
S104	흑무	비건조	열수	3.7%	-	-	166.7
S105	흑무	열처리(70~80°C, 10 min), 열풍건조(96 h)	30% 주정	32.5%	-	-	134.2
S106	흑무	열처리(70~80°C, 10 min), 열풍건조(96 h)	50% 주정	34.7%	-	-	149.0
S107	흑무	열처리(70~80°C, 10 min), 열풍건조(96 h)	70% 주정	34.9%	-	-	156.5
S108	흑무	열풍건조(96 h)	열수(4 h)	31.0%	-	-	339.0
S109	흑무	열풍건조(96 h)	30% 주정	30.7%	303.6	897.5	326.2
S110	흑무	열풍건조(96 h)	50% 주정	32.4%	557.3	1514.8	384.4
S111	흑무	열풍건조(96 h)	70% 주정	33.1%	890.4	2215.4	405.6
S112	흑무	동결건조(48 h)	열수(4 h)	40.6%	-	-	437.9
S113	흑무	동결건조(48 h)	30% 주정	36.3%	414.0	1161.9	424.1
S114	흑무	동결건조(48 h)	50% 주정	36.0%	743.8	1924.2	499.1
S115	흑무	동결건조(48 h)	70% 주정	42.5%	842.2	2122.7	427.6

S116	줄기	열풍건조(48 h)	70% EtOH	35.5%	-	-	-
S 117	겉피	비건조	80% 주정	4.1%	1639.2	4611.4	1404.0
S 118	흑무	동결건조	EA추출	1.2%	-	-	577.9
S 119	백무	열풍건조	70%주정	35.0%	428.8	1108.0	83.1
S 120	흑무	동결건조 (48 h)	70% 주정	30.4%	500.1	1323.0	229.6
S 121	흑무	열풍건조(96 h)	70% 주정	39.2%	456.1	1156.6	99.7
S 122	흑무	열처리(70~80°C, 10 min), 열풍건조(96 h)	70% 주정	29.0%	-	-	147.5
S 123	흑무 과육	비건조	80% 주정	2.6%	518.3	1655.2	422.8
S 124	S117	HP-Column 1차Fr.	50% EtOH	2.6%	-	-	1070.8

- Compound 5가 모든 조건별 추출물에서 공통적으로 분석이 되었다. Compound 3과 4의 경우는 열처리하지 않은 주정추출물에서만 분석이 되기 때문에, 후에 열처리를 하거나 주정을 사용하지 않는 가공물에서는 지표성분으로 사용할 수 없을 것이라 사료된다.
- Compound 1번과 2번은 각 추출물에서 양이 적거나, 여러 피크들이 뭉쳐져 있어서 함량을 계산할 수 없었다.

4) 건조방법과 추출법의 차이에 따른 흑무의 glucosinolate 함량 조사

○ 글루코시놀레이트 분석

- 유색무에서 글루코시놀레이트 분석 방법은 Table 1에서처럼 추출하여 Table 2에서 서술한 조건으로 HPLC를 이용하여 분석하였다.

Table 10. Sample preparation for glucosinolates analysis in red radish

1. DEAE-Sephadex A-25 활성화 및 mini-column 준비
 - ① 활성화 - DEAE-Sephadex A-25 (30g/L)는 D.W에 녹여 분액여두(분별깔때기)에 넣은 다음 약 1.5배 (v/v)의 D.W를 넣고 거의 빠져나가면 0.5M sodium acetate (68g/L)를 넣어 H⁺형태로 활성화 시킨다.
 - ② Mini-column - 1mL pipette tip 끝을 탈지면(솜)으로 막고 D.W를 가득 채운 후 위에 조금씩 resin을 넣어준다
2. 조(Crude) GSLs를 추출
 - ① 2.0ml tube에 분말시료(100mg)를 평량하여 70°C의 70% MeOH (1.5ml)를 넣는다.
 - ② 진동혼합(Vortex)한 다음 70°C의 항온 수조(Water bath)에서 5분간 조(Crude) GSLs를 추출.
 - ③ 원심분리 (12,000rpm, 10min, 4°C) 한 후에 상층액을 수거한다.
이 과정을 2회 더 반복한다.
 - ④ GSL 조 추출물 (Crude extract)을 pasteur pipette으로 mini-column에 로딩한다.
 - ⑤ 추출물이 다 빠져나가면, D.W 2mL(1mL×2)를 넣는다.
 - ⑥ D.W가 다 빠져나가면 mini-column 아래부분을 paraffin film으로 막고,
Aryl sulfatase solution (115mg/5mL) 75μL을 넣는다.
 - ⑦ Mini-Column 윗부분을 Paraffin film으로 막고, 16~18h 동안 실험실 상온 (RT)에 정치시킨다.
 - ⑧ 정치후, 2.0ml tube에 증류수로 용출.
 - ⑨ 용출시킨 시료는 0.45μm hydrophobic PTFE millipore filter(직경 13mm)로 여과한 후 HPLC용 vial 병에 넣어 냉장 보관

Table 11. HPLC analysis for glucosinolates in red radish

HPLC	Agilent Technologies 1200 series		
Column	Inertsil ODS-3 column(150 x 3.0 mm, particle size 3μm)		
Guard Column	Inertsil ODS-2 Cartridge Guard column E (10 x 2.0 mm, particle size 5μm)		
Wavelength	227 nm	Oven temperature	40°C
Mobile phase	Solvent A (water) Solvent B (acetonitrile)		
Flow rate	0.4mL/min		
Gradient conditions	0.0 min, solvent A 100%, solvent B 0% 0.0 - 2.0 min, solvent A 100%, solvent B 0% 2.0 - 7.0 min, solvent A 90%, solvent B 10% 7.0 - 16.0 min, solvent A 69%, solvent B 31% 16.0 - 19.0 min, solvent A 69%, solvent B 31% 19.0 - 21.0 min, solvent A 100%, solvent B 0% 21.0 - 27.0 min, solvent A 100%, solvent B 0%		

- 건조방법과 추출법의 차이에 따른 흑무의 glucosinolate 함량 조사를 한 결과 Table 225

3에서처럼 총 15개 조건 중 동결 건조 후 70% 주정으로 추출한 S115 시료가 가장 높은 glucosinolate 함량을 보였다. 비건조 후 80% 주정으로 추출한 시료에서 가장 낮은 glucosinolate 함량을 보였다. 모든 처리구에서 glucosinolate 중 glucoraphasatin이 주 물질로 나타났다.

- 2차적으로 건조방법과 추출법의 차이에 따른 흑무 부위별 glucosinolate 함량 조사를 한 결과 Table 4에서처럼 S117(흑무 겉피 비건조 시료)를 Hp-Column으로 2차 Fraction한 시료가 가장 높은 glucosinolate 함량을 보였다. 흑무 줄기를 열풍 건조 후 70% 에탄올로 추출한 시료에서도 비교적 높은 glucosinolate 함량을 보여서 줄기의 활용을 고려할 필요성이 높은 것으로 판단된다. 짜사이 열풍 건조 후 70% 에탄올로 추출한 시료에서는 흑무와 다르게 sinigrin에 주된 glucosinolate로 나타났다.

Table 12. Effect of different drying process and extraction methods on glucosinolate content ($\mu\text{mol/g}$ dry wt.) in black radish

No	sample	전처리	추출조건	4-Hydroxyglucobrassicin	Glucoerucin	Glucoraphasatin	Glucobrassicin	4-Methoxyglucobrassicin	Total
1	S 101	비건조	80% 주정	0.12 \pm 0.02	0	0.22 \pm 0.02	0.92 \pm 0.10	0.52 \pm 0.06	1.77 \pm 0.18
2	S 102	비건조	80% 주정	0	0	0.04 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.13 \pm 0.01
3	S 103	비건조	80% 주정	0.29 \pm 0.18	0	0.04 \pm 0.01	0.57 \pm 0.05	0.1 \pm 0.02	1.01 \pm 0.26
4	S 104	비건조	열수	0.11 \pm 0.02	0.25 \pm 0.04	0.4 \pm 0.06	0.11 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	0.89 \pm 0.14
5	S 105	열처리 열풍 건조	30% 주정	0.15 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.15 \pm 0.00	0.5 \pm 0.02	0.07 \pm 0.00	0.87 \pm 0.03
6	S 106	열처리 열풍 건조	50% 주정	0.1 \pm 0.09	0.02 \pm 0.01	0.14 \pm 0.06	0.55 \pm 0.22	0.08 \pm 0.04	0.91 \pm 0.42
7	S 107	열처리 열풍 건조	70% 주정	0.15 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00	0.29 \pm 0.01	0.7 \pm 0.04	0.2 \pm 0.02	1.37 \pm 0.07
8	S 108	열풍 건조	열수	0.13 \pm 0.06	0	0	0.05 \pm 0.00	0	0.18 \pm 0.06
9	S 109	열풍 건조	30% 주정	0.22 \pm 0.15	0.01 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.51 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.89 \pm 0.18
10	S 110	열풍 건조	50% 주정	0.24 \pm 0.22	0.02 \pm 0.00	0.2 \pm 0.01	0.63 \pm 0.05	0.29 \pm 0.01	1.37 \pm 0.30
11	S 111	열풍 건조	70% 주정	0.15 \pm 0.05	0.04 \pm 0.00	0.76 \pm 0.08	0.69 \pm 0.04	1.5 \pm 0.1	3.13 \pm 0.27
12	S 112	동결 건조	열수	0.12 \pm 0.03	0	0	0.05 \pm 0.01	0	0.17 \pm 0.04
13	S 113	동결 건조	30% 주정	0.25 \pm 0.06	0.01 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.49 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.88 \pm 0.08
14	S 114	동결 건조	50% 주정	0.16 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.16 \pm 0.03	0.9 \pm 0.17	0.28 \pm 0.06	1.53 \pm 0.28
15	S 115	동결 건조	70% 주정	0.12 \pm 0.00	0.29 \pm 0.03	14.54 \pm 1.10	1.79 \pm 0.12	2.27 \pm 0.17	19.02 \pm 1.41

Table 13. Effect of different drying process and extraction methods on glucosinolate content ($\mu\text{mol/g}$ dry wt.) in black radish

No.	sample	부위/ 전처리	추출조 건	Glucoraph anin	4-Hydroxy glucobras sicin	Glucoeruc in	Glucoraph asatin	4-Methox yglucobra ssicin	Total
1	S 116	줄기/ 열풍건 조	70% EtOH	8.44 ± 0.30	0	0	9.2 ± 0.33	0.32 ± 0.03	17.96 ± 0.07
2	S 117	겉피/ 비건조	80% EtOH	0	0	0.24 ± 0.02	1.47 ± 0.19	0.65 ± 0.04	2.36 ± 0.21
3	S 118	흑무/ 동결건 조	EA 추 출물	0	0	0	0	0	0
4	S 119	백무/ 열풍건 조	70% EtOH	0.56 ± 0.01	0.32 ± 0.00	0.23 ± 0.05	2.82 ± 0.41	1.08 ± 0.05	5.04 ± 0.49
5	S 120	흑무/ 동결건 조	70% EtOH	0.2 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.36 ± 0.00	10.1 ± 0.01	2.01 ± 0.05	12.89 ± 0.11
6	S 121	흑무/ 열풍건 조	70% EtOH	2.35 ± 0.77	0.5 ± 0.03	1.34 ± 0.31	23.47 ± 5.56	1.77 ± 0.15	29.43 ± 6.82
7	S122	흑무/ 열처리 열풍건 조	70% EtOH	4.3 ± 0.00	0	6.97 ± 0.21	25.58 ± 1.14	1.36 ± 0.73	38.21 ± 0.61
8	S 123	흑무/ 과육 비건조	80% EtOH	0	0	0	0	0	0
9	S 124	S117/ Hp-Col umn, 2 차	50% EtOH	1.48 ± 0.69	2.51 ± 0.05	11.66 ± 0.28	62.65 ± 7.25	8.79 ± 0.03	87.09 ± 8.20
10	S 125	Fractio n S117/ Hp-Col umn, 1 차	D.W	0.71 ± 0.03	0.6 ± 0.02	1.24 ± 0.12	0.54 ± 0.05	0.08 ± 0.01	3.17 ± 0.01
11	S 126	흑무/ 열풍건 조	70% EtOH	1 ± 0.04	0.35 ± 0.04	2.33 ± 0.55	32.35 ± 7.92	1.57 ± 0.12	37.59 ± 8.66
12	S127	흑무줄 기/열풍 건조	70% EtOH	12.72 ± 0.88	0.95 ± 0.02	1.58 ± 0.25	29.68 ± 1.25	1.28 ± 0.12	46.2 ± 2.51
No.	sample	부위/ 전처리	추출조 건	Sinigrin	4-Hydroxy glucobras sicin	Glucoeruc in	Glucoraph asatin	4-Methox yglucobra ssicin	Total
13	S128	짜사이/ 열풍건 조	70% EtOH	29.11 ± 0.14	0.99 ± 0.03	0	0.89 ± 0.03	0	30.99 ± 0.2

5) 흑무 발효물에 대한 HPLC 분석

- 콜마비엔에이치에서 진행한 흑무 발효물에서의 분리된 화합물들의 유무 및 함량을 알아보기 위
227

해서 HPLC 분석을 실시하였다.

- 협동기관으로부터 전해 받은 흑무 발효물을 70% 주정으로 추출하여 얻어진 추출물의 HPLC 분석을 실시하였으며, 기존 흑무 추출물중 S122와 비교하여 보았다.

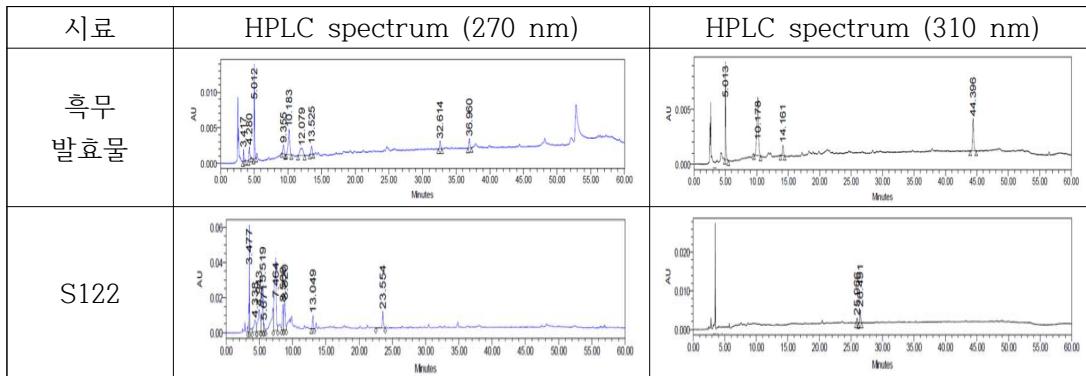


Figure 7. 흑무 발효 주정추출물과 S122 HPLC 분석 결과

- 흑무발효 주정 추출물에서 S122의 주요 peak인 compound 5가 검출되지 않았다. 또한 310 nm 파장대에서 S122에서는 없었던 RT 10, 14, 44 min의 peak들이 나타났다.
- 이는 발효과정에서 배당체 화합물들의 당이 떨어져나가면서 변화가 있을 것이라 사료된다.

(1) 제주산 흑무 발효 추출물의 단일물질 분리, 지표물질 선정 및 분석조건 확립

○ 흑무 발효 추출물의 단일물질 분리 및 함량 분석

- 흑무 1차 발효물을 70% 에탄올로 추출하여 추출물 293 g을 얻었다. 그 중 추출물 166 g을 diaion HP-20 컬럼 크로마토그래피를 하여 용매 극성에 따라 5개의 분획물로 나누었고, Fr. HP3은 추가적으로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 하여 phenyllactic acid를 분리하였다. 화합물의 구조는 ^1H 및 ^{13}C NMR을 이용하여 문헌을 통해 동정하였다. 이 화합물은 일반적인 유산균 발효과정에서 나오는 부산물로 지표로 사용하기는 적합하지 않다고 판단되어 추가적인 단일물질 분리과정을 2차 발효물에서 진행하였다.

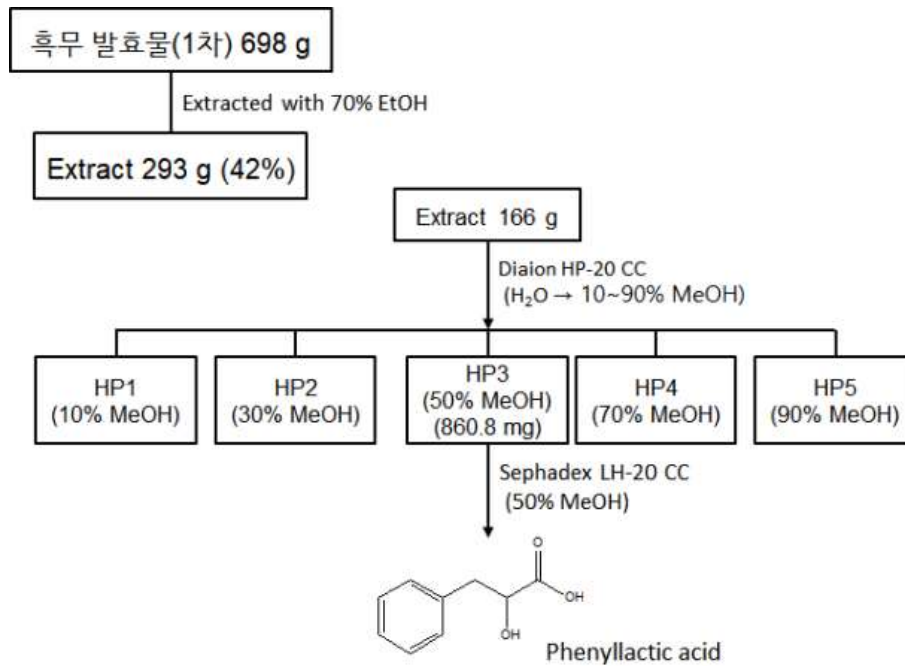


Figure 8. 흑무 1차 발효물의 단일물질 분리과정

- 흑무 2차 발효물은 메탄올로 추출하였으며, 추출물 27.9 g을 diaion HP-20 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 3-HMPT(신규화합물)를 분리하였다. 3-HMPT는 자연계에서 처음 분리되어 화합물 관련 참고문헌이 없으며, NMR 및 LC-MS를 통해 구조를 동정하였다. 추가적인 HR-MS 분석을 의뢰하여 분자량이 일치함을 확인하였으며, 이 화합물은 2차년도 흑무 EtOH 추출물 HP-20(50% EtOH)에서 분리하였던 화합물이다. 또한 이 화합물은 2차 발효물에서만 분석되며 1차 및 3차 발효물에서는 분석되지 않았고, 신규 화합물로 표준품을 판매하지 않으므로, 함량분석을 할 수 없으며 종합적으로 판단하였을 때, 지표로 적합하지 않다고 사료된다. 추가적으로 2차 발효물을 EtOAc로 추출하여 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 통해 α -linolenic acid를 분리하였다. 이 화합물은 흑무 원물 및 발효물(1, 2, 3차)에서 모두 분석되지만, 자연계에 흔한 물질일 뿐만 아니라 기존 건강기능식품의 지표로 알려져 있어서 지표로 선정하기에는 특이성이 부족하여 적합하지 않다고 판단된다.

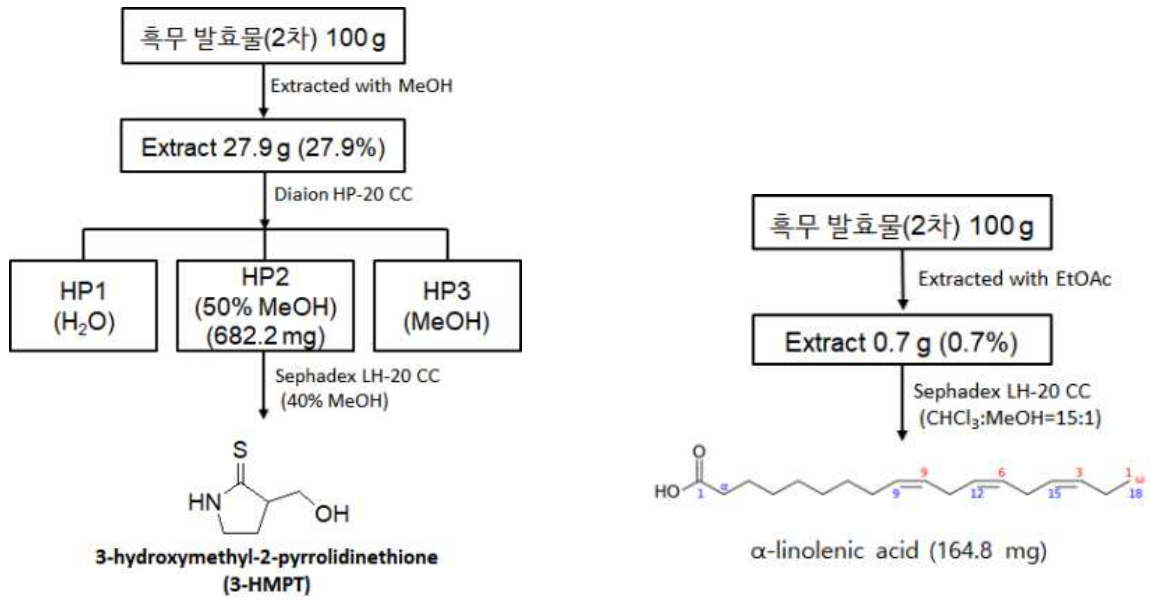


Figure 9. 흑무 2차 발효물의 단일물질 분리과정

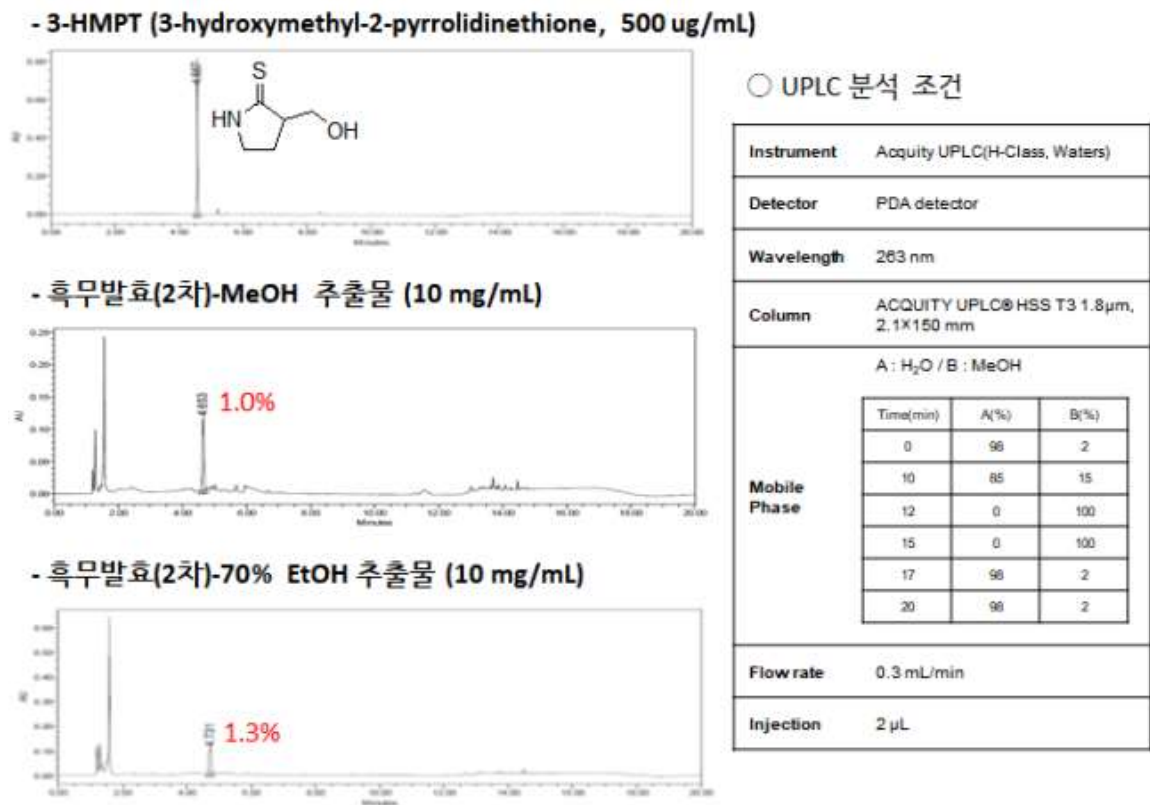
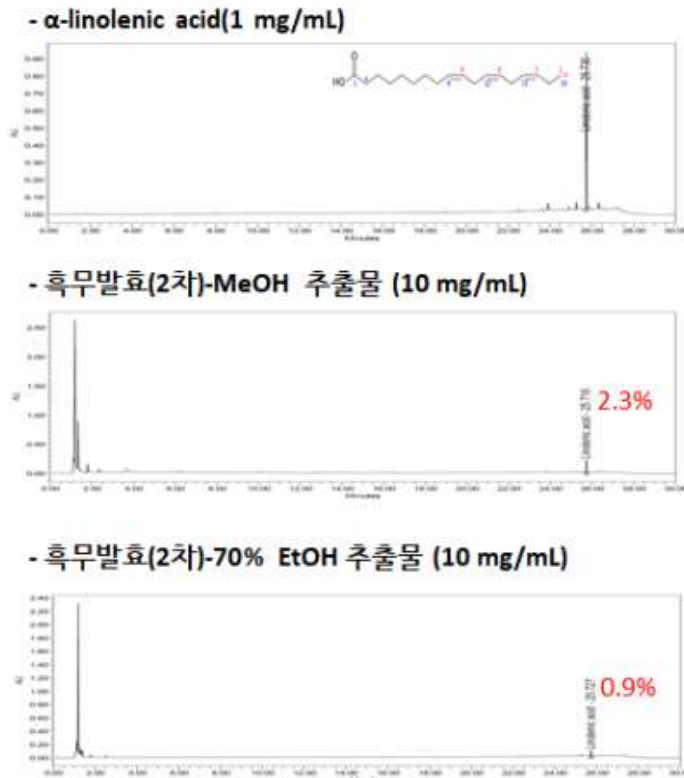


Figure 10. 흑무 발효물의 3-HMPT(신규화합물) 함량 분석

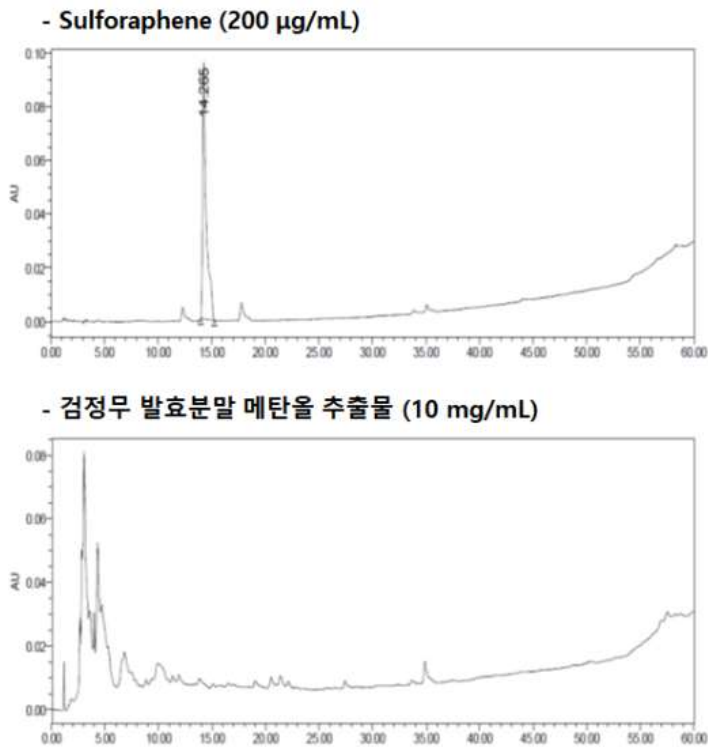


○ UPLC 분석 조건

Instrument	Acquity UPLC(H-Class, Waters)		
Detector	PDA detector		
Wavelength	211 nm		
Column	ACQUITY UPLC® HSS T3 1.8 μ m, 2.1X150 mm		
Mobile Phase	A : H ₂ O / B : MeOH		
	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	90	10
	20	40	60
	22	0	100
	24	0	100
25	90	10	
30	90	10	
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection	2 μ L		

Figure 11. 흑무 발효물의 α -linolenic acid 함량 분석

- 추가적으로 흑무 또는 무에 많이 함유되어 있다고 알려져 있는 화합물인 sulforaphen의 함량을 분석하였으나, 흑무 발효물에는 sulforaphen이 함유되어 있지 않은 것으로 확인되었다.



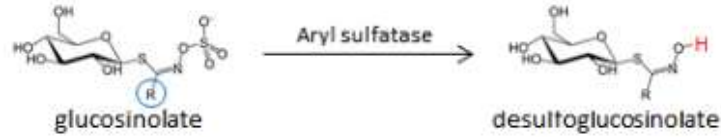
- HPLC 분석 조건

Instrument	Waters 2695		
Detector	PDA detector		
Wavelength	225 nm		
Column	Atlantis® dC18 5 μ m, 4.6 x 250 mm		
Mobile Phase	A : H ₂ O / B : MeOH		
	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	80	20
	50	20	80
	55	0	100
60	0	100	
Flow rate	1 mL/min		
Injection	10 μ L		

Figure 12. 흑무 3차 발효물의 sulforaphen 함량 분석

(2) 흑무 발효물의 glucosinolate 분석

- 일반적인 glucosinolate 분석은 glucosinolate 화합물을 sulfatase 효소로 처리하여 탈황시킨 후, desulfo-glucosinolate의 형태로 분석하며, sinigrin 표준품을 기준으로 각 화합물의 RT 확인 및 factor 값을 곱하여 함량을 계산할 수 있다. 그러나 이러한 방법은 탈황을 하는 전처리 과정에서의 재현성이 떨어지고, 단순 RT 비교만으로는 화합물을 특정할 수 없다는 문제점이 있다.



- 2차년도 충남대학교 분석법으로 흑무 2차, 3차 발효 추출물 및 흑무 3차 발효 원물에 대한 glucosinolate 분석 결과, RT 9.8 물질의 함량이 가장 많은 것으로 보이며, 문헌조사 등을 통해 흑무에 많이 함유되어 있다고 알려진 glucoraphenin으로 추정하였으나, 표준품 구매 후 분석결과 일치하지 않음을 확인하였다.

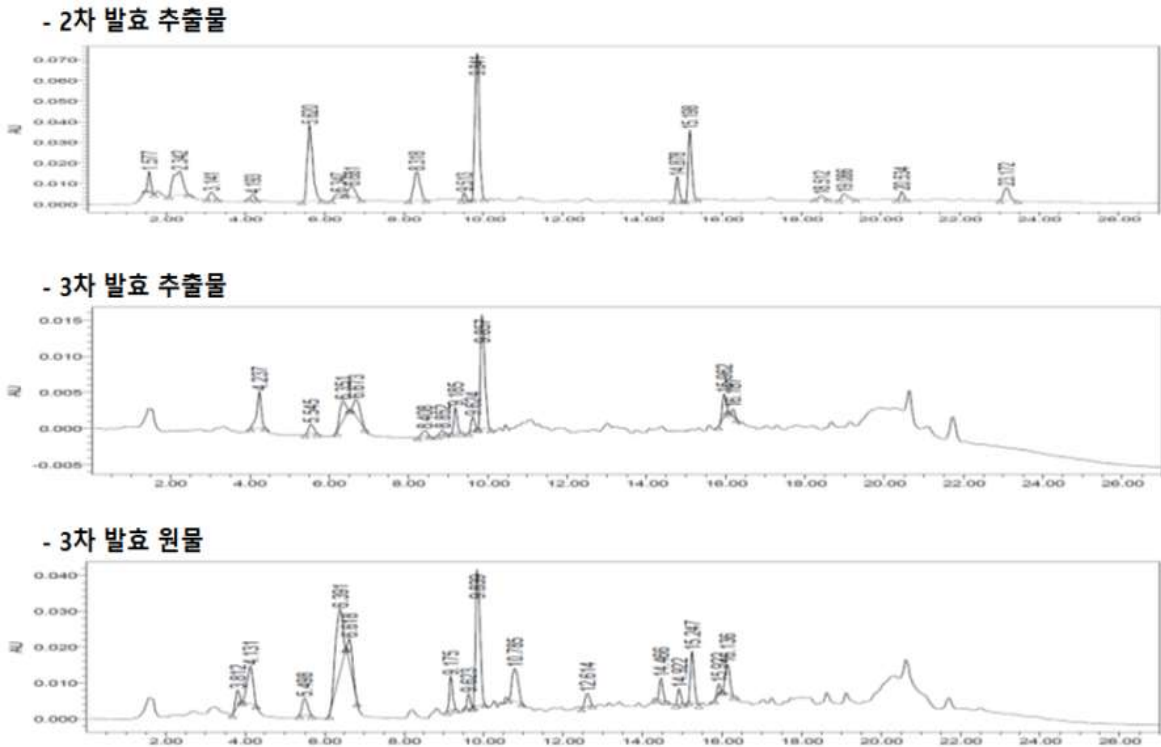


Figure 13. 흑무 2차 및 3차 발효물의 glucosinolate 분석 결과

- RT 9.8 물질의 HPLC 분석 조건을 바꿔보니, 2개의 피크가 겹친 것으로 확인되었으며, 추가적인 LC/MS 분석을 통해 각 피크의 분자량을 확인하였다.

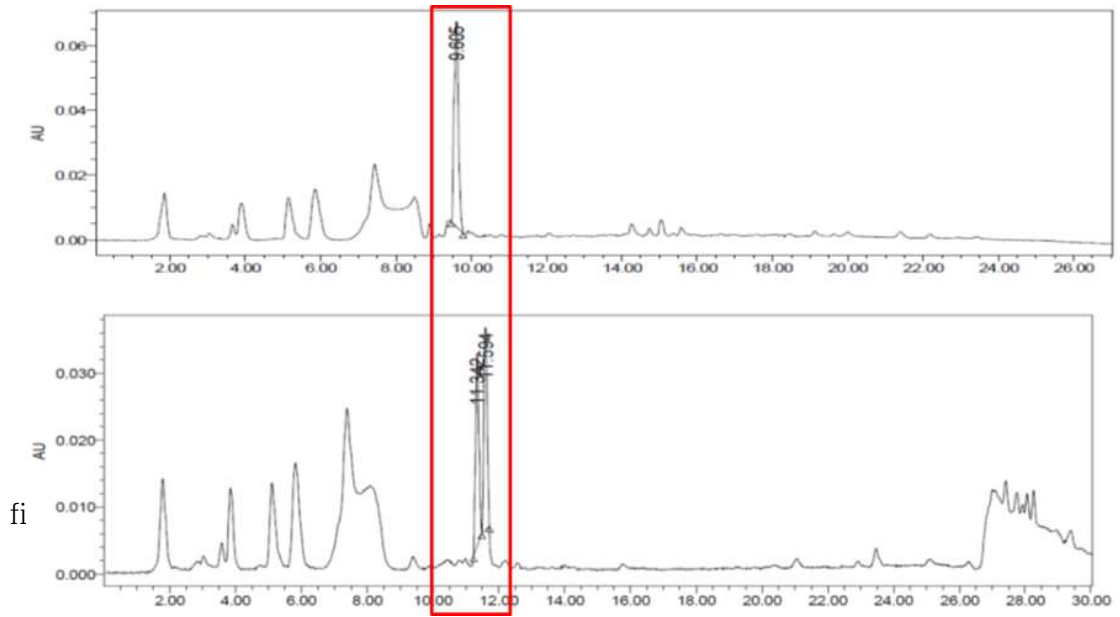


Figure 14. 흑무 3차 발효물의 desulfur-glucosinolate 분석 결과

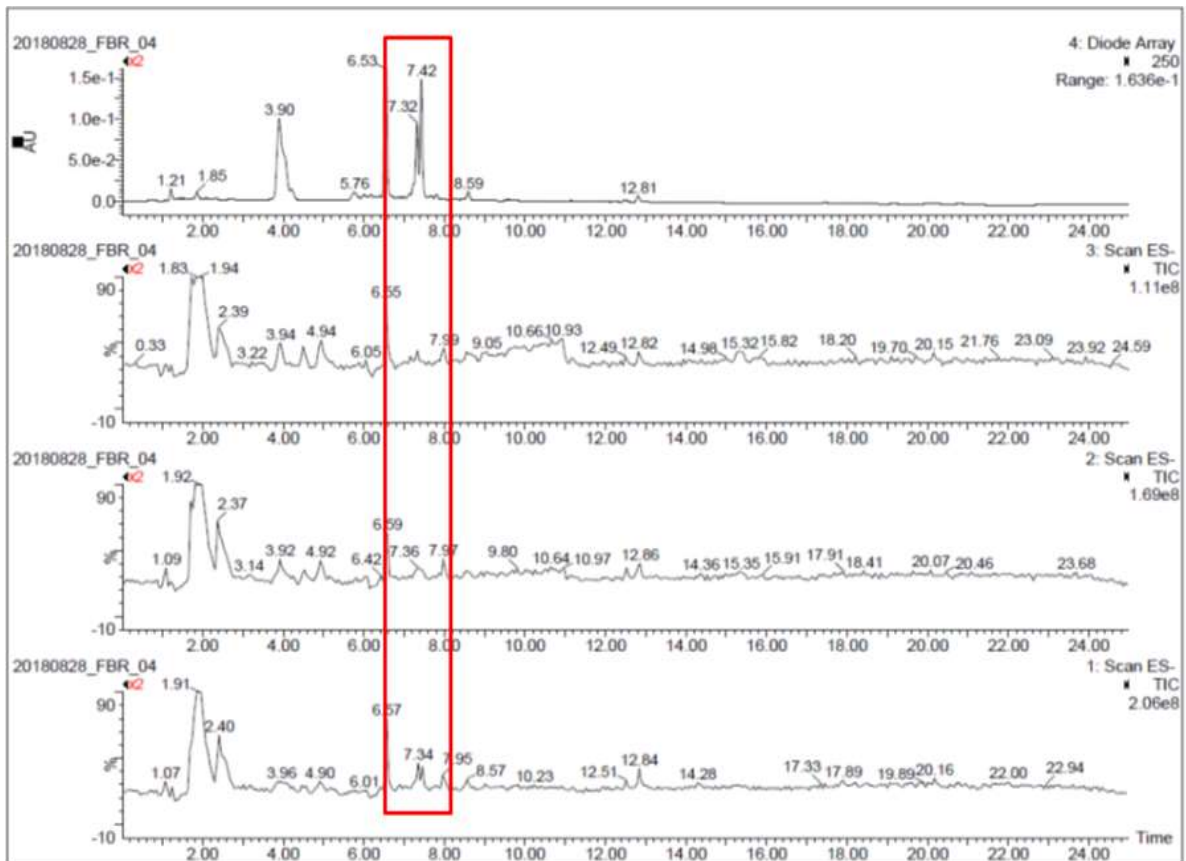


Figure 15. 흑무 3차 발효물의 LC/MS 분석 결과

- LC/MS 분석을 통해 확인한 주요 피크 2개의 분자량은 267 및 282였으며, 이는 desulfur-glucosinolate의 분자량이므로, glucosinolate 분자량으로 환산하여 추정 물질의 분자량을 확인하였으며, 347 및 362로 나타났다. 문헌조사를 통해 분자량 347의 물질은 glucolepidiin으로 예상하였으며, 분자량 362의 물질은 glucosinolate 화합물 중 일치하는 화합물을 확인하지 못

하였다. MS 분석을 통해 분자량을 확인한 것은 단순 추정물질로 정확한 화합물을 특정할 수 없으므로, glucolepidiin 표준품을 구매하여 분석한 결과, 흑무 발효물에는 함유되지 않음을 확인하였다.

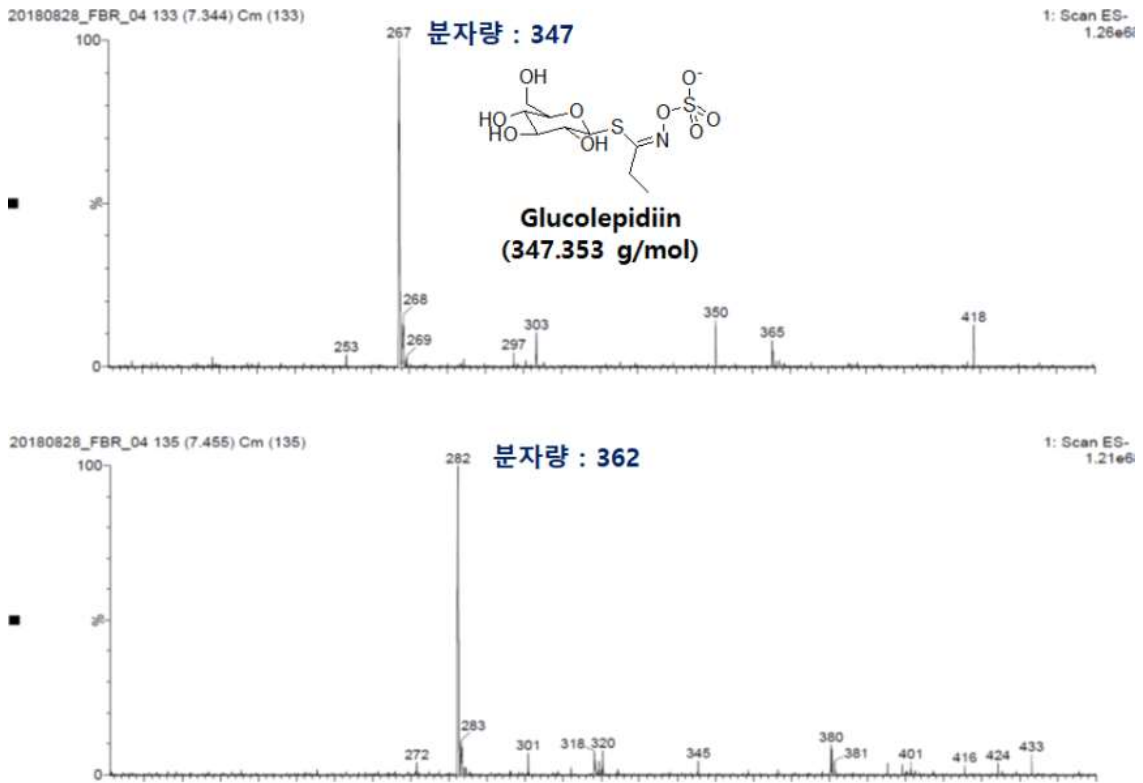


Figure 16. 흑무 3차 발효물의 LC/MS 분석 결과

- Glucosinolate 분석법의 재현성을 확인하기 위해 3차 발효 원물을 3번의 반복 실험을 하였으며, LC 피크 패턴이 3번의 반복 실험에서 비슷하게 나타남을 확인하였다. 그러나 흑무 발효물의 desulfur-glucosinolate의 피크들이 주요 피크인 RT 9~10 사이에 집중되어 있어 피크의 정성 및 정량 분석이 어렵다고 판단되어, 주관 및 협동기관과 논의 결과, RT 14~16 사이의 피크를 확인하기로 하여, glucosinolate 표준품 8종을 구매하여 분석하였다.

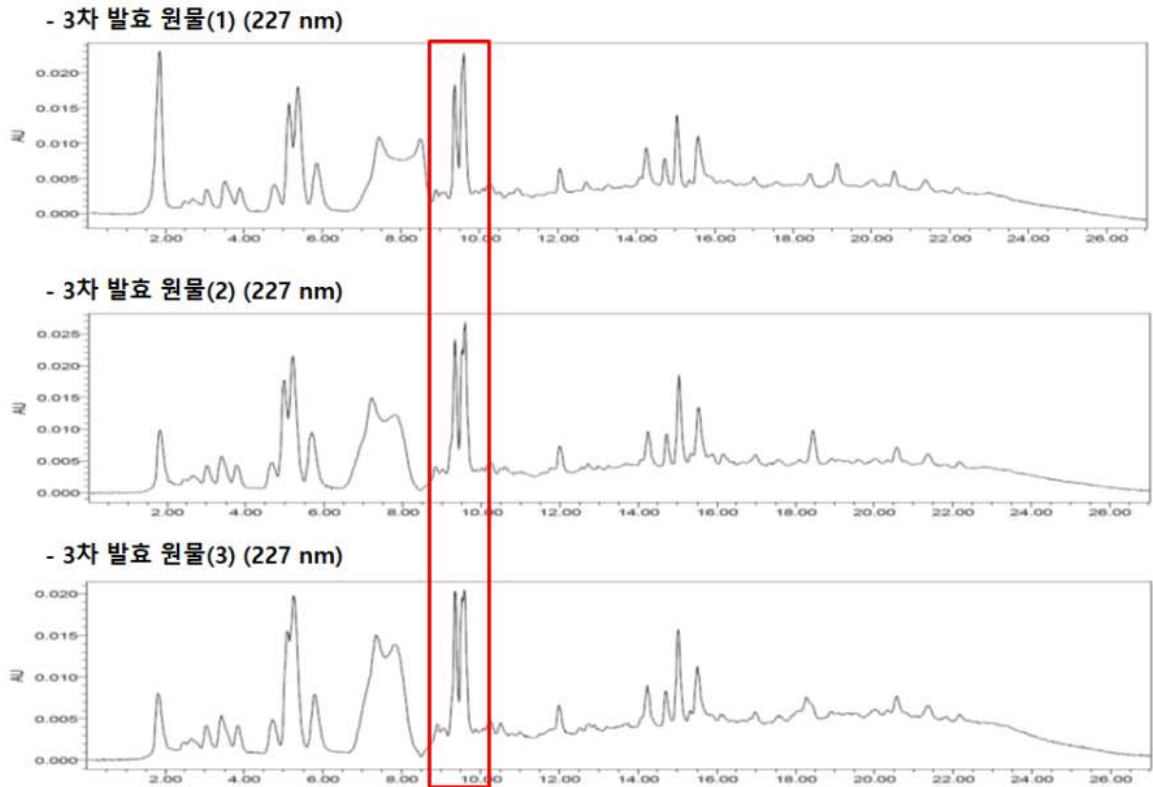
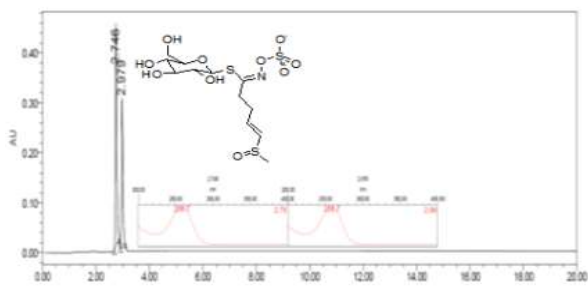


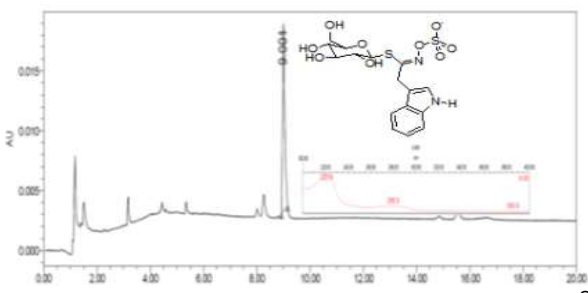
Figure 17. 흑무 3차 발효물의 glucosinolate 분석 재현성 실험 결과

- 흑무 발효물의 glucosinolate 분석을 위해, 흑무 및 무에 함유되어 있다고 알려져 있는 표준품 8 종(glucoraphenin, glucolepidiin, glucoraphanin, sinigrin, glucobrassicinapin, glucoerucin, glucoraphasatin, glucobrassicin)을 구매하여 분석을 진행하였다. 그 결과, glucoraphenin, glucoraphasatin, glucobrassicin이 함유되어 있음을 확인하였으나, glucoraphenin의 경우 표준품의 피크가 2개로 분석되어 정성 및 정량 분석을 할 수 없으며, glucobrassicin의 경우 함량이 너무 낮아 정량을 할 수 없었다.

○ Glucoraphenin 표준품



○ Glucobrassicin 표준품



○ UPLC 분석 조건

Instrument	Acquity UPLC(H-Class, Waters)		
Detector	PDA detector		
Wavelength	227 nm		
Column	ACQUITY UPLC [®] HSS T3 1.8 μ m, 2.1 \times 150 mm (Waters)		
Mobile Phase	A : H ₂ O / B : ACN		
	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	100	0
	2	90	10
20	75	25	
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection	4 μ L		

Figure 18. Glucoraphenin 및 glucobrassicin 표준품 분석 결과

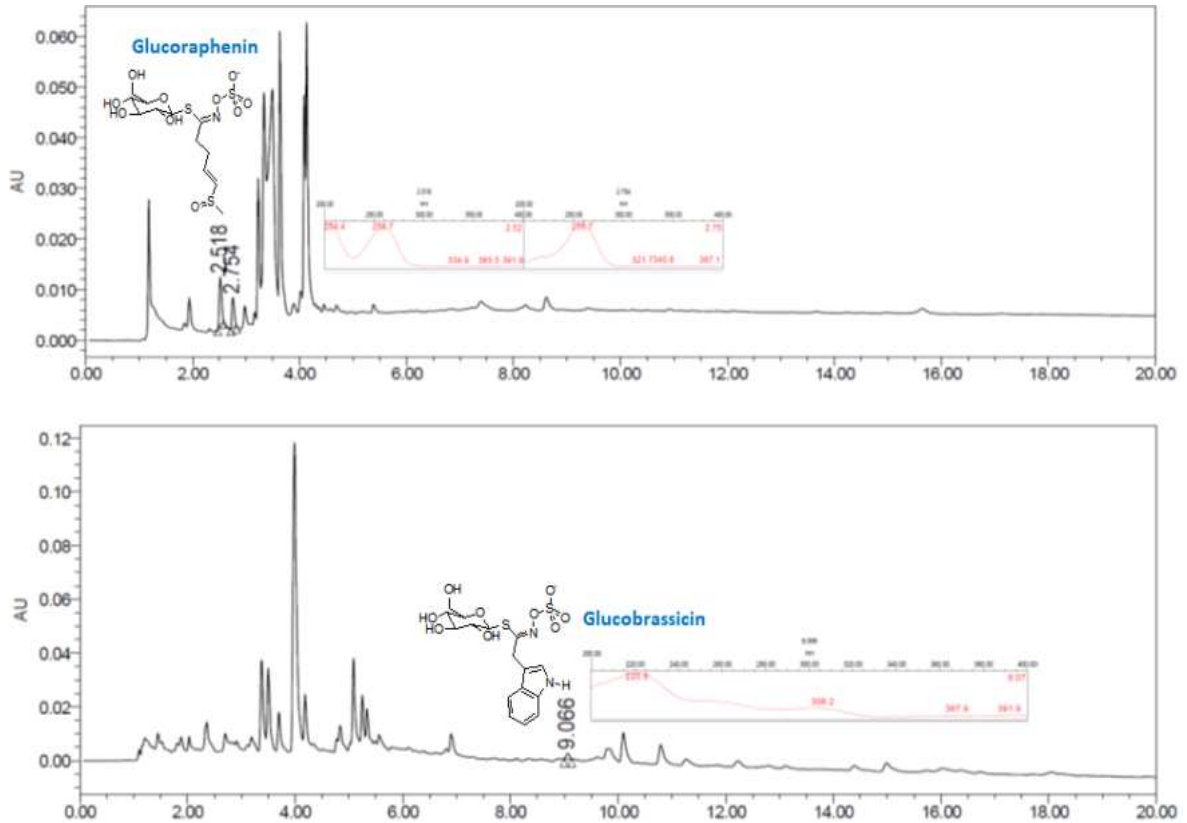
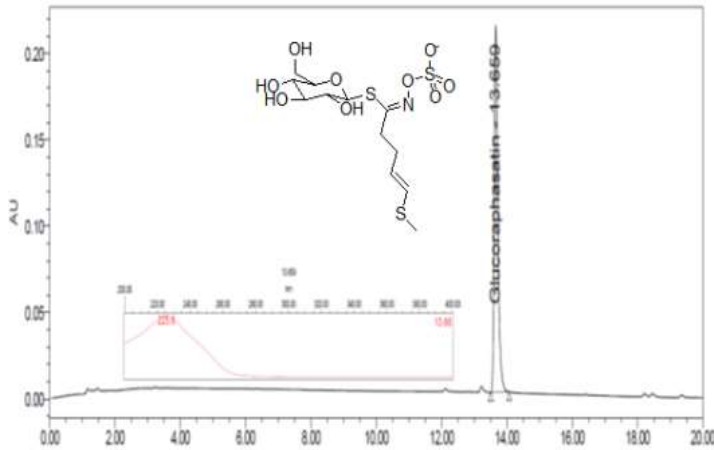


Figure 19. 흑무 3차 발효물의 glucoraphenin 및 glucobrassicin 분석 결과

- 흑무 발효물의 glucoraphasatin 함량은 분석조건을 바꾸어 진행하였으며, 각 조건별 조추출물에서 glucoraphasatin의 함량을 확인하였다. 그 결과, glucoraphasatin의 함량이 100% 물을 이용하여 추출한 흑무 발효물에서 97.8 ppm (97.8 µg/g) 함유되어 있음을 확인하였다. 또한 glucosinolate 분석의 경우, 용매 추출물보다 원물을 바로 조추출하여 분석하는 방법이 glucosinolate 함량이 높으며, 특히 100% 물을 이용한 추출 방법이 함량이 높음을 확인하였다.

○ Glucoraphasatin 표준품



○ UPLC 분석 조건

Instrument	Acquity UPLC(H-Class, Waters)									
Detector	PDA detector									
Wavelength	225.6 nm									
Column	ACQUITY UPLC [®] HSS T3 1.8 μ m, 2.1 \times 150 mm (Waters)									
Mobile Phase	A : H ₂ O / B : MeOH									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table>	Time(min)	A(%)	B(%)	0	100	0	20	60	40
	Time(min)	A(%)	B(%)							
0	100	0								
20	60	40								
Flow rate	0.3 mL/min									
Injection	4 μ L									

Figure 13. Glucoraphasatin 표준품 분석 결과

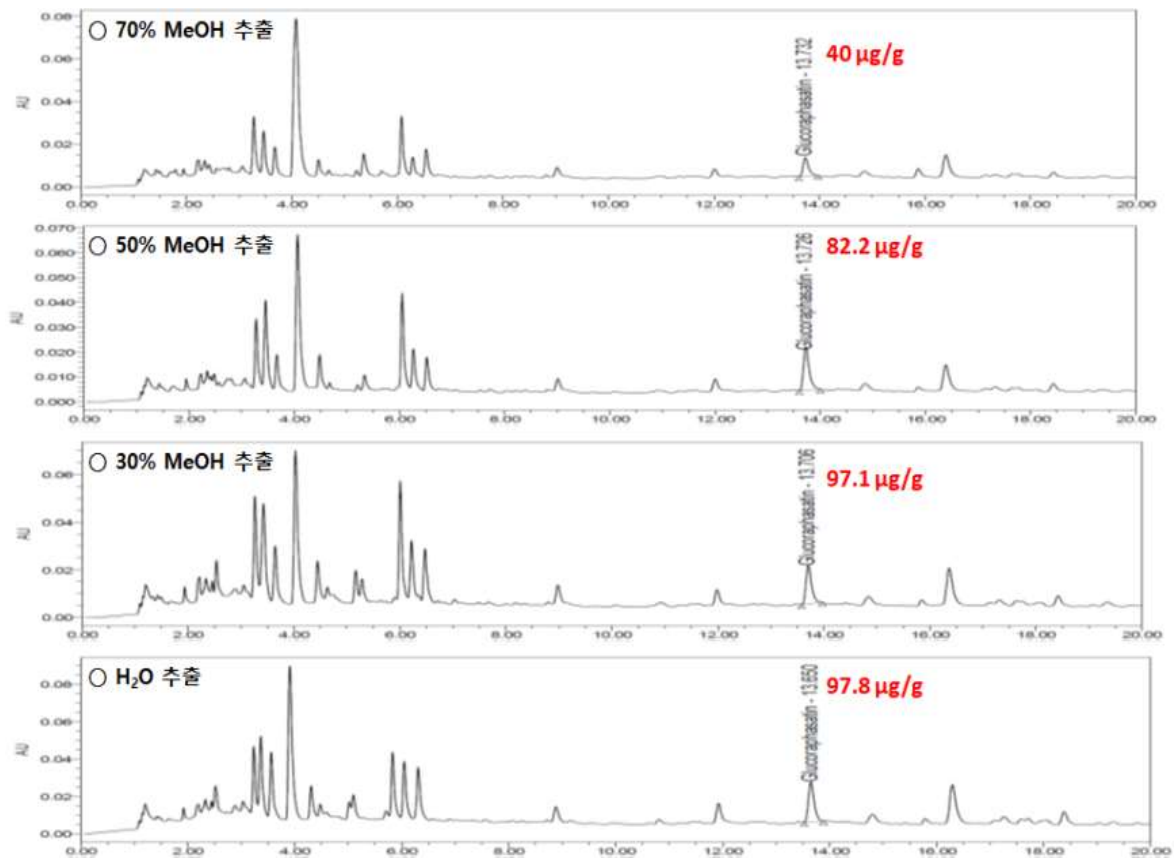


Figure 20. 흑무 3차 발효물의 glucoraphasatin 함량 분석 결과

(3) 검정무 발효물의 glucoraphasatin 함량 분석

- 콜마비앤에이치(주)로부터 2019년도에 제조된 검정무 발효물(1, 2, 3 batch)을 제공받아, 검정무

에서 가장 많이 함유되었던 glucoraphasatin의 함량을 UPLC를 이용하여 정량하였다. 그 결과, 검정 무 발효물의 glucoraphasatin 함량은 일정하게 나타나지 않고 각 batch 간 편차가 허용오차범위를 벗어나므로, 지표로 설정하기 어렵다고 판단됨.

	Glucoraphasatin 함량($\mu\text{g/g}$, ppm)
검정무 발효물(2019년도 1 batch(1))	62.8
검정무 발효물(2019년도 1 batch(2))	55.0
검정무 발효물(2019년도 2 batch)	138.2
검정무 발효물(2019년도 3 batch)	204.0

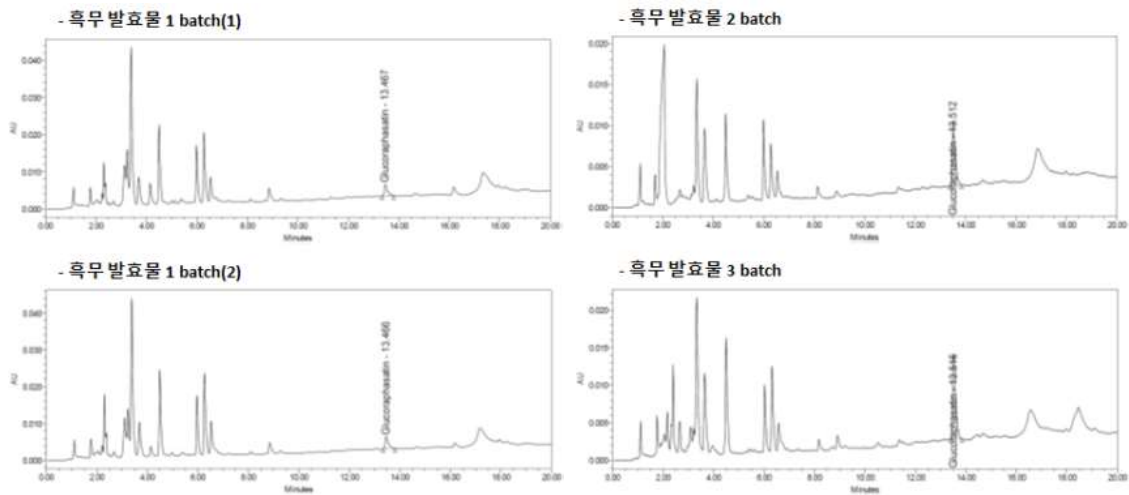


Figure 21. 검정무 발효물(2019년도)의 glucoraphasatin 함량 분석 결과

(4) 검정무 및 검정무 발효물의 α -linolenic acid 함량 분석

- 검정무 원물 및 발효물에서 꾸준히 나왔던 성분인 α -linolenic acid의 함량을 UPLC를 이용하여 정량하였다. 그 결과, 발효 전·후 및 각 batch 간 함량이 균일하여 지표로 설정이 가능하나, 지표로 설정하기에는 특이성이 부족함.

	α -Linolenic acid 함량($\mu\text{g/g}$, ppm)
백무	379
검정무	543
검정무 발효물(2019년도 1 batch)	440
검정무 발효물(2019년도 2 batch)	416
검정무 발효물(2019년도 3 batch)	449

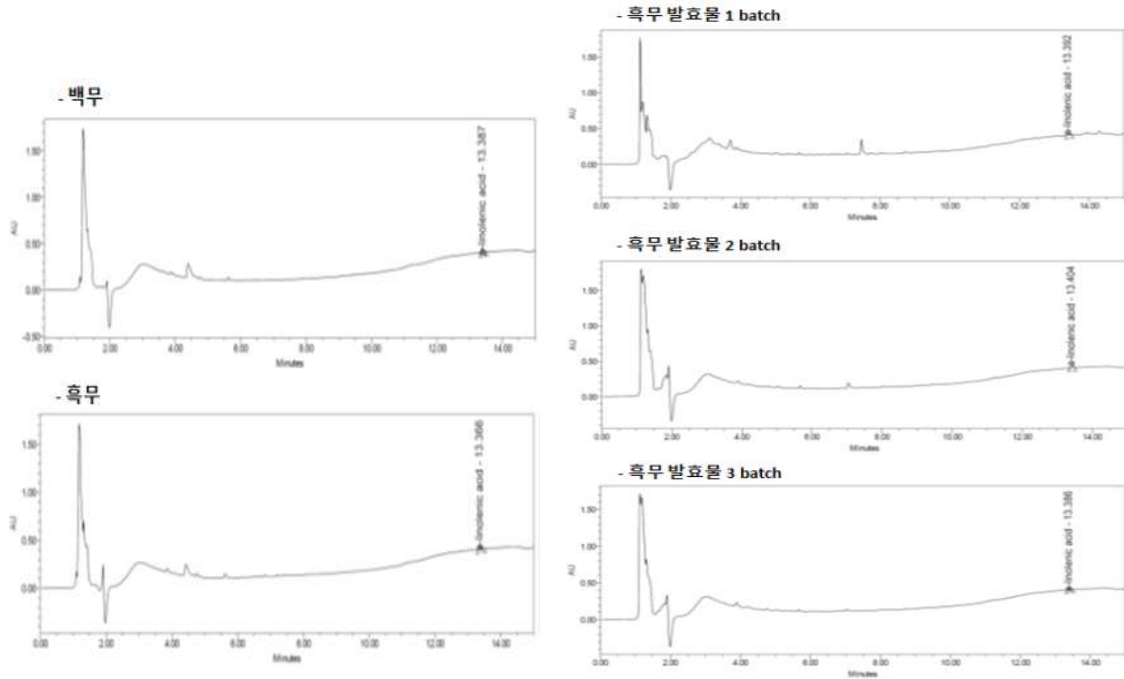
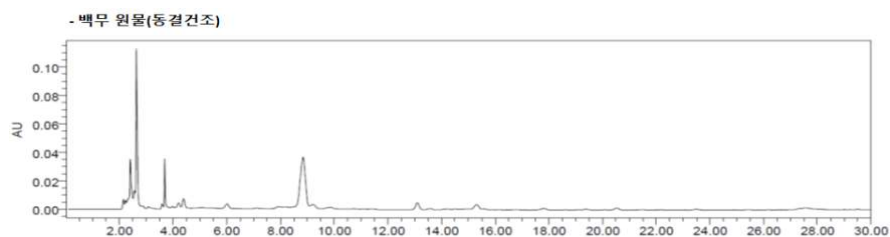


Figure 22. 백무, 검정무 및 발효물의 α -linolenic acid 함량 분석 결과

(5) 검정무 및 발효물의 2-furoic acid 함량 분석 결과

- 검정무 발효물에 함유되어 있는 성분인 2-furoic acid에 대한 함량을 UPLC를 이용하여 정량하였다. 그 결과, 발효물에서의 함량은 균일하나, 검정무 원물에서 검출되지 않아 지표로 설정하기 어렵다고 판단됨.

	2-Furoic acid 함량($\mu\text{g/g}$, ppm)
백무	-
검정무	-
검정무 발효물(2018년도 2차)	504.8
검정무 발효물(2018년도 3차)	516.0
검정무 발효물(2018년도 여름무)	571.6
검정무 발효물(2019년도 1 batch)	664.3
검정무 발효물(2019년도 2 batch)	725.6
검정무 발효물(2019년도 3 batch)	800.1



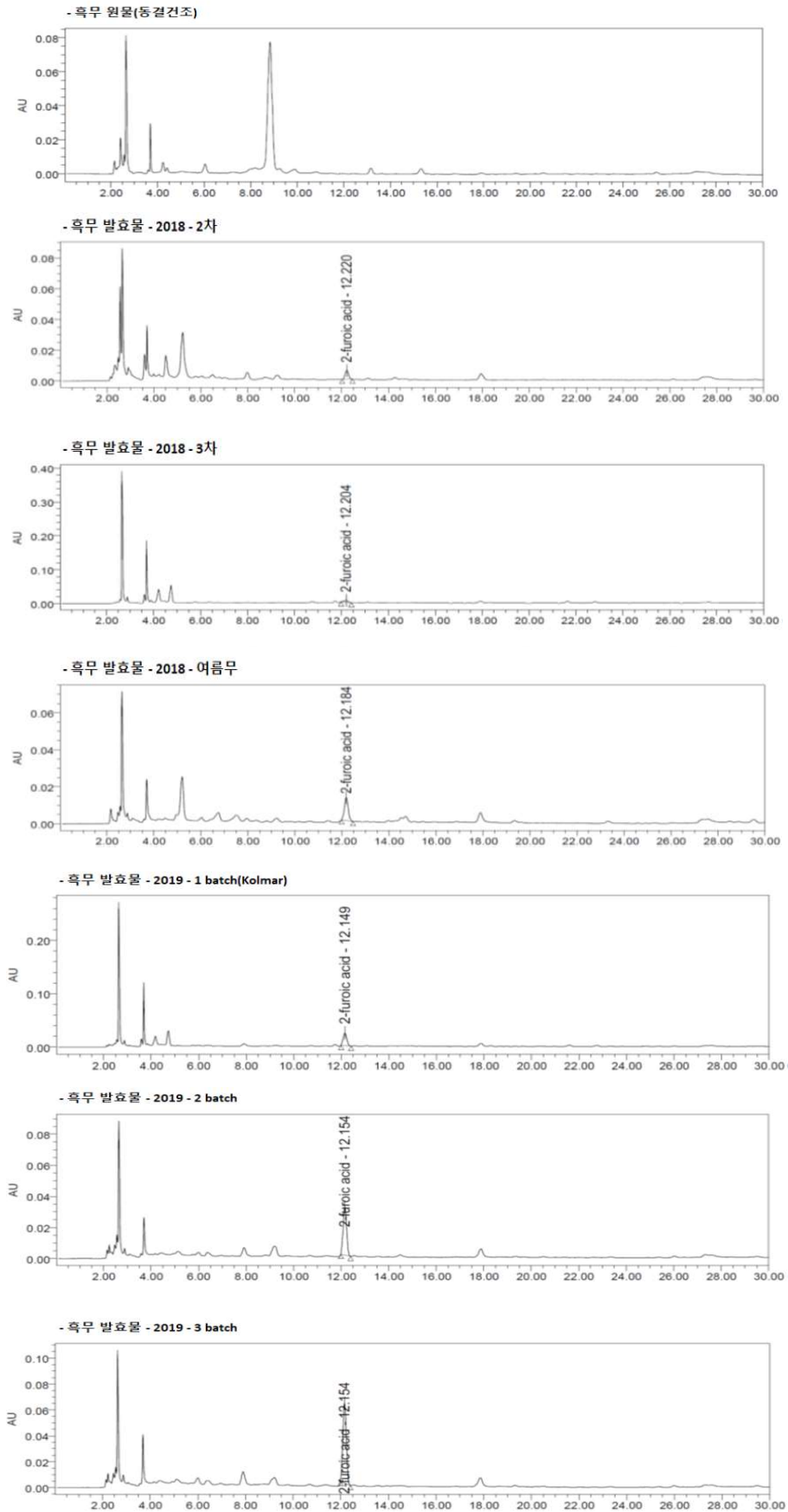


Figure 23. 백무, 검정무 및 발효물의 2-furoic acid 함량 분석 결과

(6) 검정무 발효물의 단일물질 분리 및 분석

- 검정무 발효물의 지표성분을 탐색하기 위해 UPLC 분석을 수행한 결과, 두 개의 주요 피크(RT 6.6 및 RT 16.8)를 확인하였다.

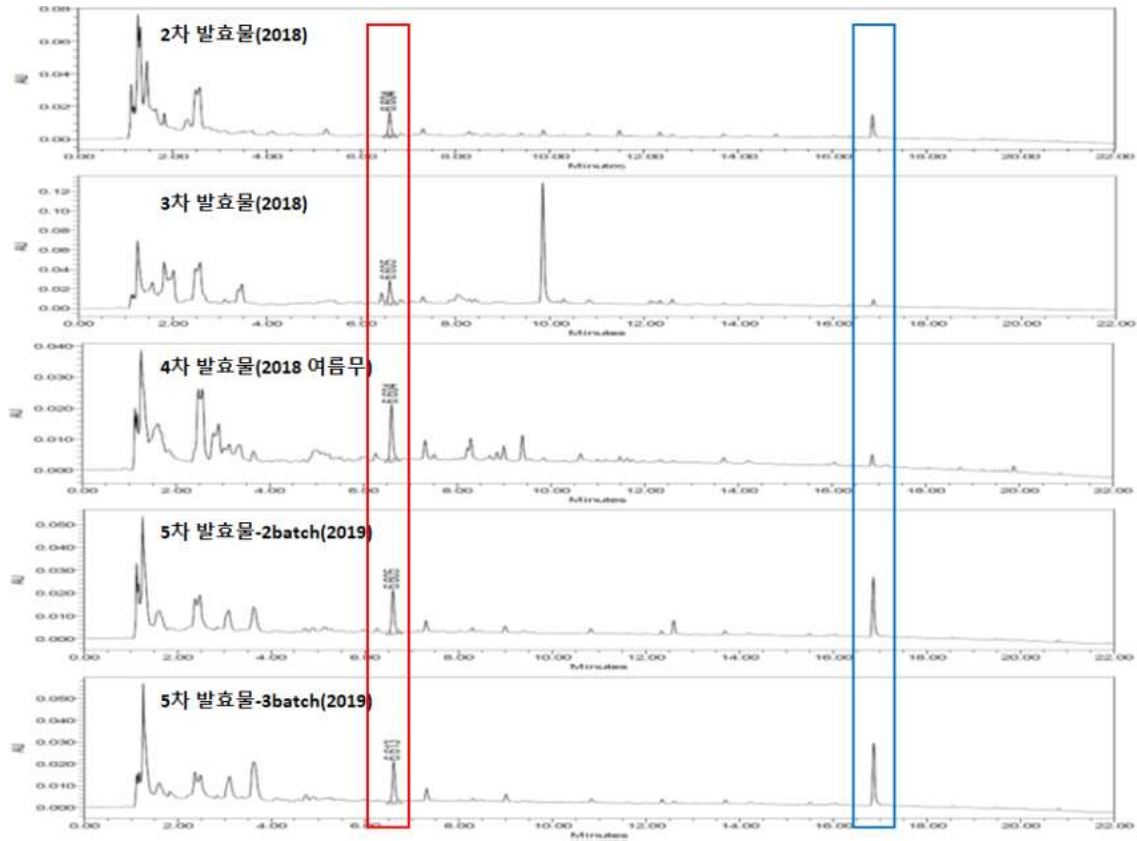


Figure 44. 검정무 발효물의 UPLC 크로마토그램

- RT 6.6의 피크를 분리하기 위해, 검정무 3차(2018년도) 발효물을 70% EtOH로 추출한 후, 극성별 용매 분획을 하였다. 그 중 BuOH 분획물을 이용하여 VLC 및 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 단일 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물을 ¹H, ¹³C NMR 및 2D NMR을 측정하여 구조 동정을 진행하고 있음.

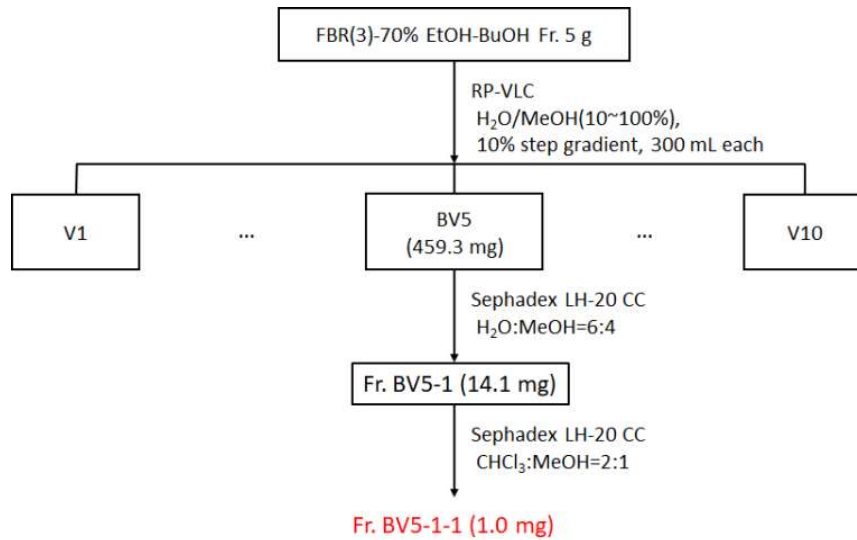


Figure 25. 검정무 발효물의 단일물질 분리 과정

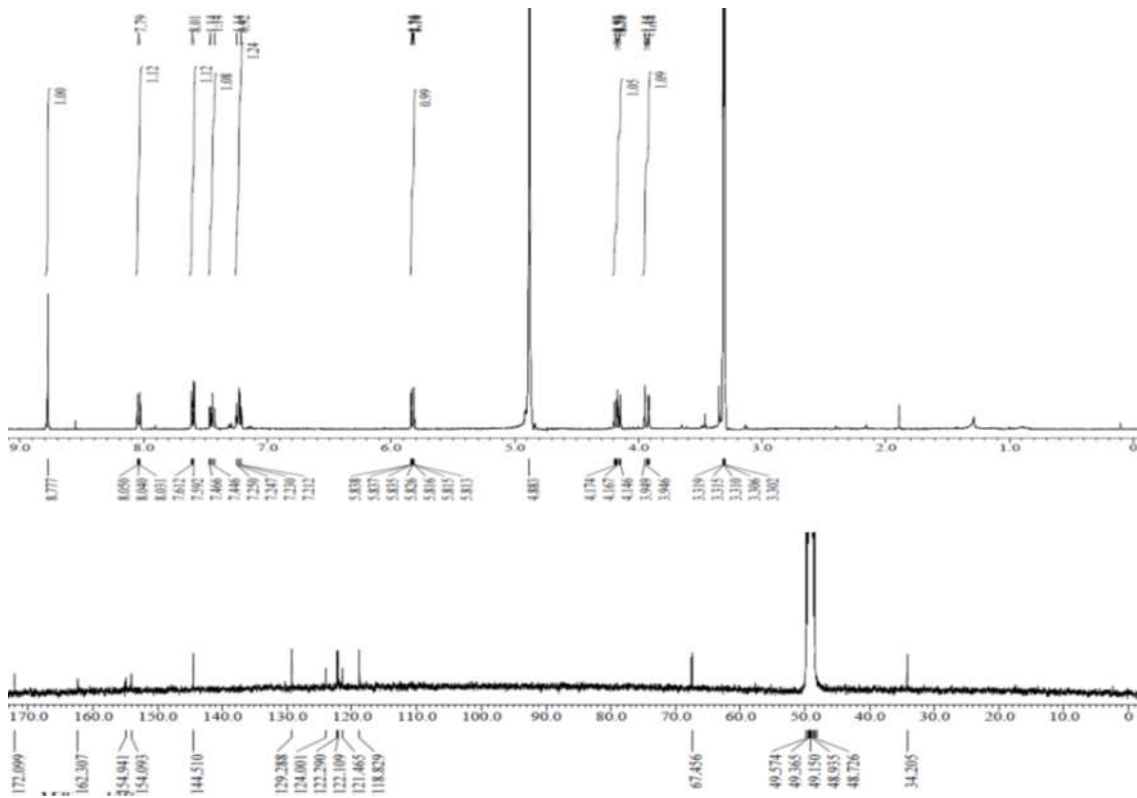


Figure 26. 검정무 발효물에서 분리한 단일 화합물의 1H 및 13C NMR 스펙트럼

6) 제주산 흑무 유색무 지상부의 물질 분석 및 효능 연구

(1) 흑무 지상부의 추출, 극성별 용매분획 및 단일물질 분리

- 흑무 지상부(잎, 줄기)는 2016년 12월에 제주 서귀포시 성산읍에서 채집하였다. 채집한 흑무 지상부는 물로 세척한 후에 40°C의 열풍 건조기에서 48시간 동안 건조시켰으며, 건조물은 분쇄한 후

추출 과정에 사용하였다. 건조 및 분쇄된 흑무 지상부 705 g을 70% 에탄올로 2회 추출하여, 추출물 250.1 g을 얻었다. 추출물 136.4 g을 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex (10.2 g), EtOAc (3.5 g), *n*-BuOH (21.0 g) 및 H₂O (100.8 g) 분획물을 얻었다.

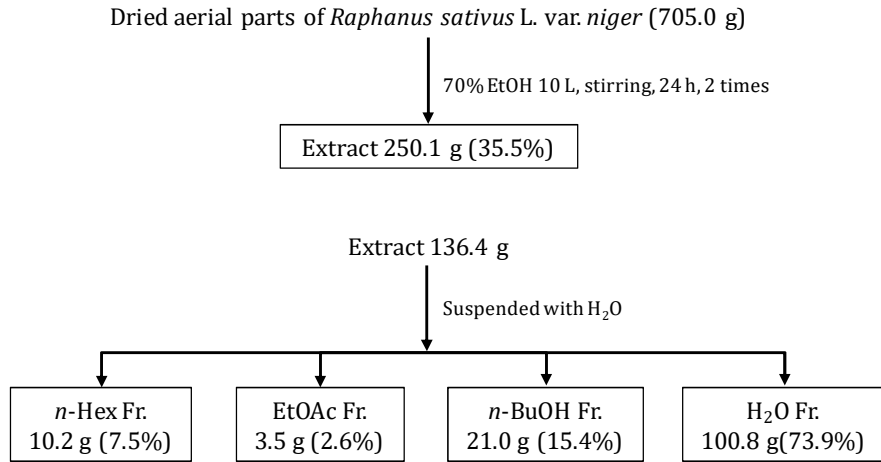


Figure 27. 흑무 지상부의 추출 및 극성별 용매분획

- 용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중 EtOAc 분획물 3.0 g에서 유효성분을 분리하기 위해 MPLC 및 Sephadex LH-20, silicagel 컬럼 크로마토그래피를 하여 7개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 ¹H, ¹³C NMR 스펙트럼 분석 및 문헌과의 비교를 통하여, kaempferitrin (1), kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopyranoside (2), afzelin (3), lolliolide (4), *p*-coumaric acid (5), ethyl caffeate (6), fulgic acid (7)로 확인되었다.

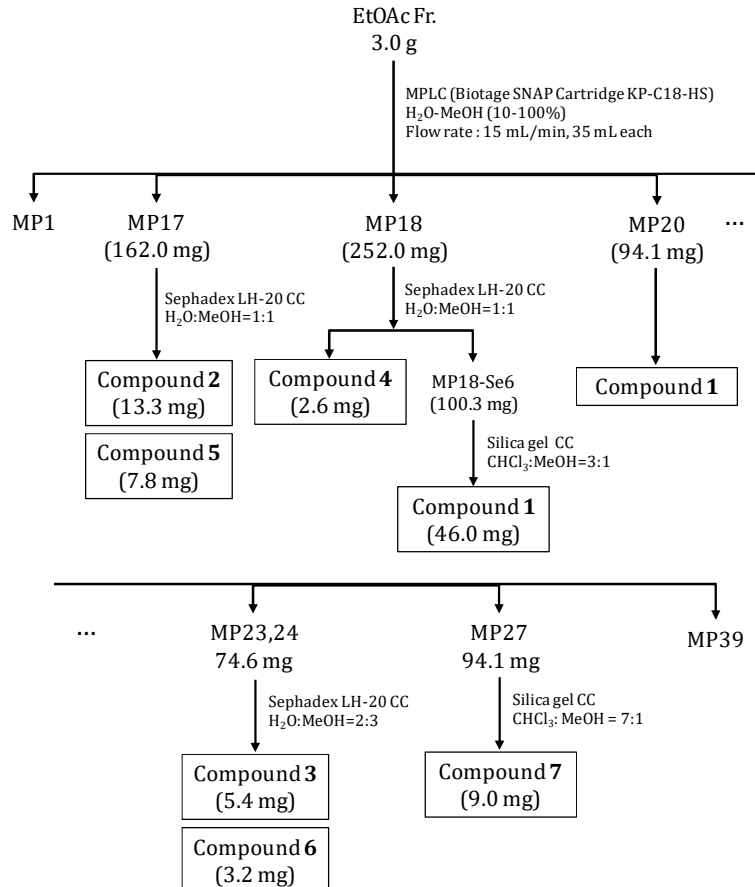


Figure 28. 흑무 지상부 EtOAc 분획물의 단일물질 분리과정

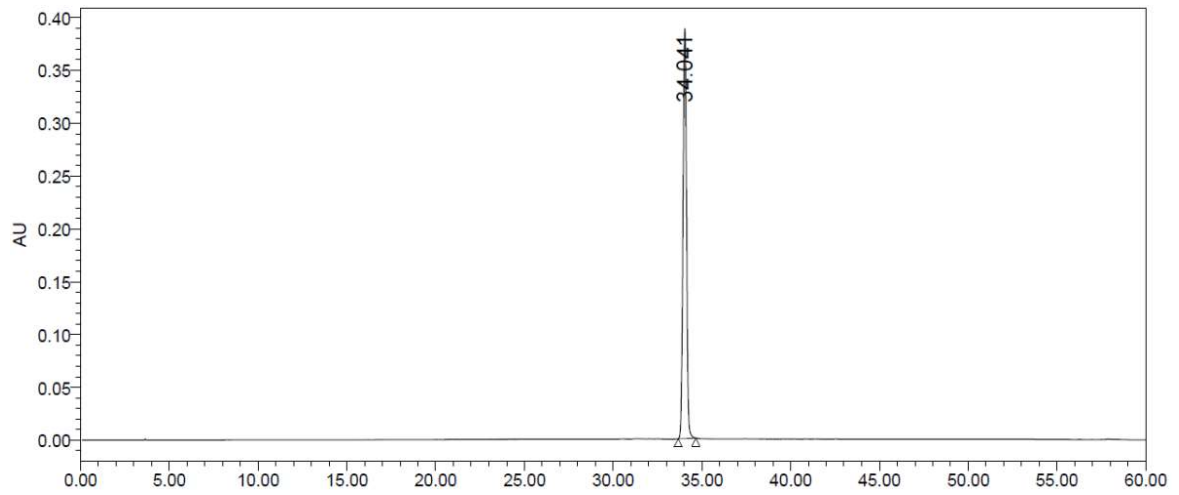


Figure 31. Kaempferitrin의 HPLC chromatogram

Tabel 1. 흑무 지상부 추출물 및 용매분획물의 kaempferitrin 함량 분석 결과

추출·분획물	HPLC chromatogram	Kaempferitrin 함량 (mg/g, %)
70% EtOH 추출물		6.4 mg/g, 0.64%
EtOAc 분획물		163.0 mg/g 16.3%
BuOH 분획물		15.7 mg/g 1.57%

(3) 제주산 적무의 단일물질 분리, 지표물질 선정 및 분석조건 확립

○ 제주산 적무의 추출 및 극성별 용매분획

- 적무 추출물은 (재)제주테크노파크 종다양성연구소로부터 제공받아 사용하였다. 추출물 30.8 g을 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex (0.96 g), EtOAc (0.75 g), *n*-BuOH (7.2 g), H₂O (21 g) 분획물을 얻었다.

○ 적무 EtOAc 분획물의 HPLC 스크리닝

- 적무 EtOAc 분획물에서 유효성분을 분리하기 위해 HPLC 스크리닝을 진행하였다. 그 결과, RT 9.0, 10.8 및 15.7의 피크가 주요 성분인 것으로 보이며, 이를 분리하기 위해 추가적인 단일물질 분리과정을 진행하였다.

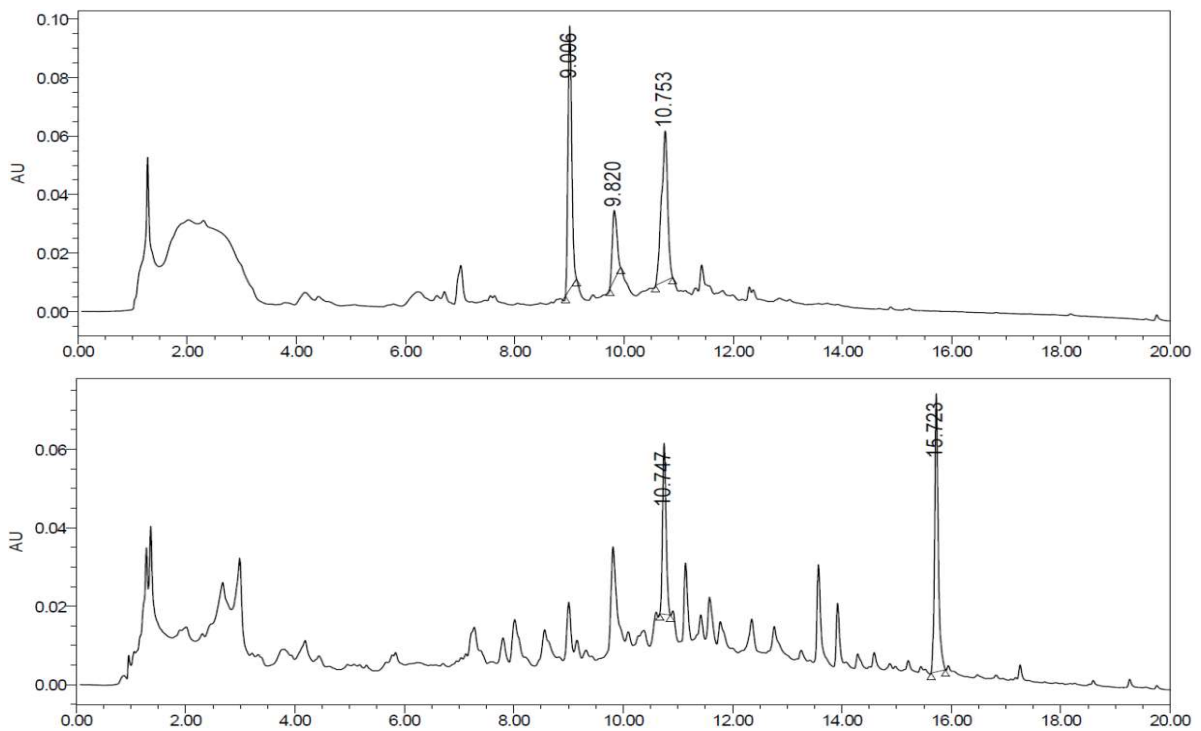


Figure 32. 적무 EtOAc 분획물의 HPLC chromatogram (330 & 260 nm)

(4) 제주산 적무의 단일물질 분리, 지표물질 선정 및 분석 조건 확립

○ 적무의 지표물질 분리과정

- 적무 추출물은 (재)제주테크노파크로 종다양성연구소로부터 제공받아 사용하였다. 추출물 45.8 g을 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex (1.3 g), EtOAc (0.5 g), *n*-BuOH (10.4 g) 및 H₂O (30.0 g) 분획물을 얻었다. 그 중, EtOAc 분획물을 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 7개의 fraction으로 나누었으며, Fr. E5 (99.5 mg)를 다시 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 Feruloyl malate (22.4 mg)을 분리하였다.

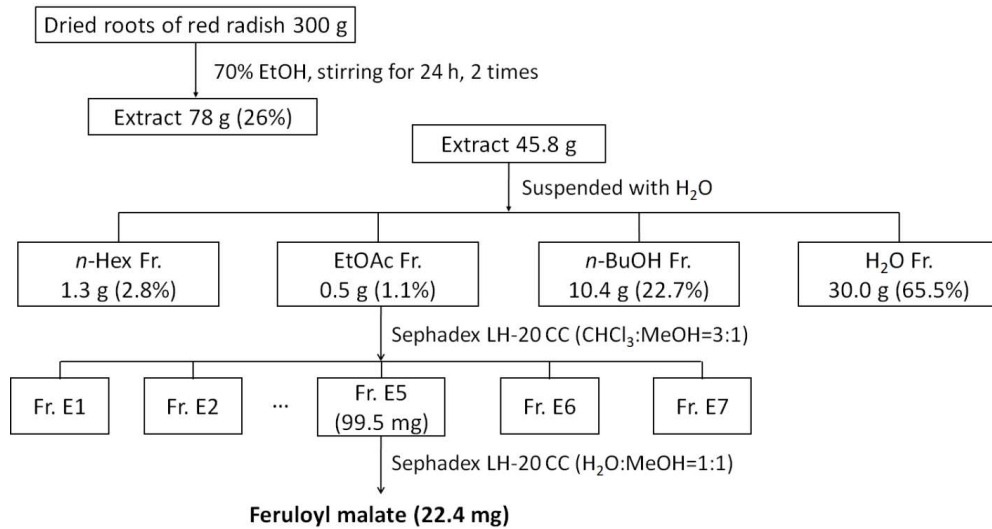


Figure 33. 적무 지표성분인 Feruloyl malate의 분리과정

- 분리된 화합물은 ^1H , ^{13}C NMR 스펙트럼 분석 및 문헌과의 비교를 통하여 화학 구조를 확인하였다.

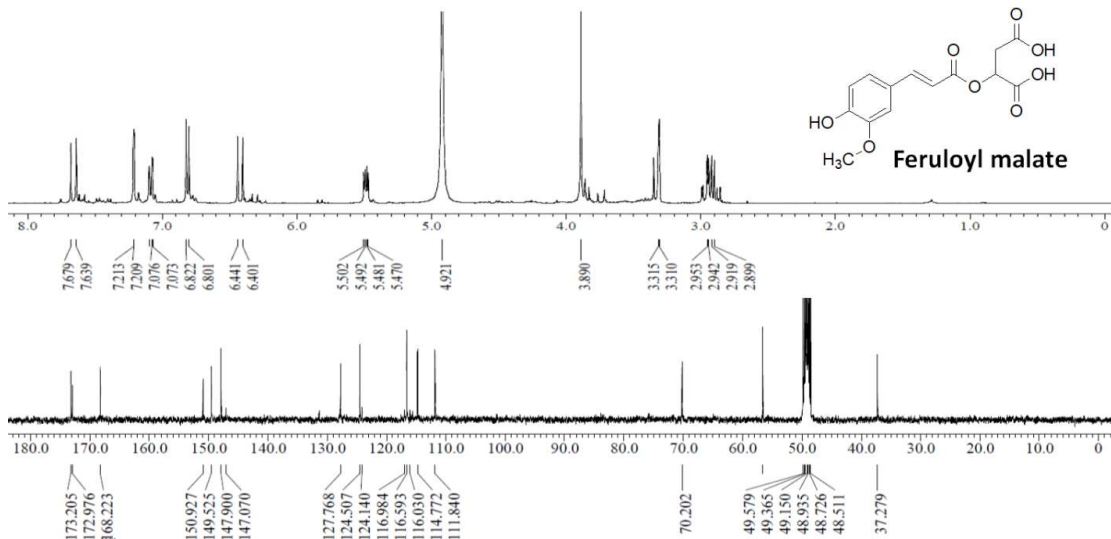


Figure 34. Feruloyl malate의 화학구조 및 ^1H , ^{13}C NMR 스펙트럼

- 마찬가지로 방법으로 단일물질 분리과정을 진행하여 적무에서 2개의 화합물을 더 분리하였으며, 화학 구조를 확인하였다.

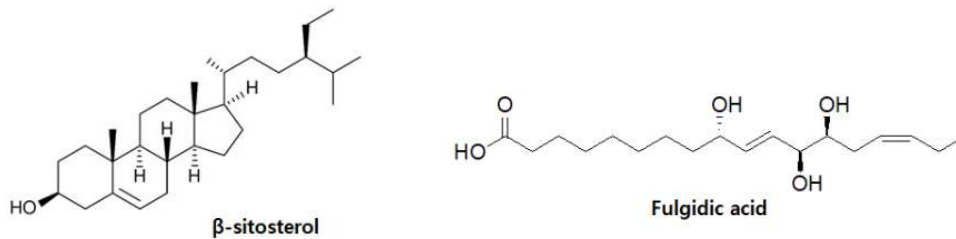


Figure 35. 적무에서 분리한 화합물의 화학 구조

(5) 적무의 지표물질 함량 분석

- 적무의 지표성분인 feruloyl malate의 함량을 확인하기 위해 UPLC 분석을 진행하였다. 추출물 및 용매 분획물은 5 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹여 PTFE syringe filter로 여과하여 사용하였다. 지표물질은 메탄올에 녹여 200, 100, 50, 25 µg/mL의 농도로 제조하여 peak 면적을 구하고 회귀방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였다. 그 결과, 추출물의 feruloyl malate 함량이 2.0 mg/g (0.2%), EtOAc 분획물이 143.8 mg/g (14.4%), n-BuOH 분획물이 2.7 mg/g (0.3%) 함유하고 있었으며, 특히 EtOAc 분획물의 함유량이 가장 높았다.

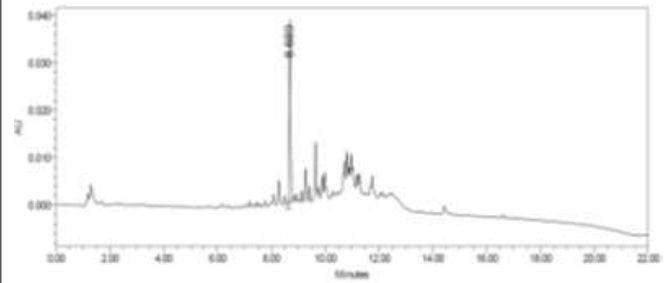
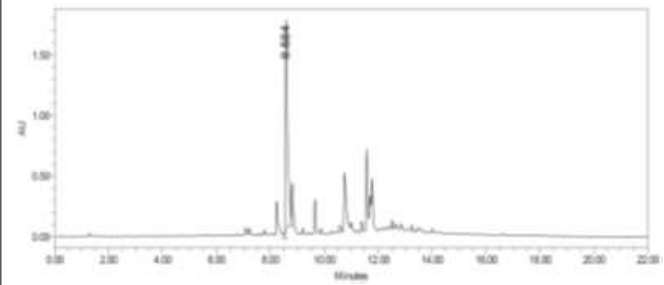
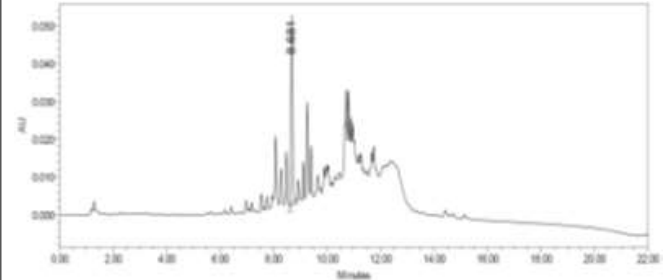
	UPLC 크로마토그램	Feruloyl malte 함량(mg/g, %)
70% EtOH 추출물		2.0 mg/g (0.2%)
EtOAc 분획물		143.8 mg/g (14.4%)
n-BuOH 분획물		2.7 mg/g (0.3%)

Figure 36. 분획물에서의 Feruloyl malte 함량

7) 제주산 흑무 및 유색무의 화장품 소재 연구

(1) 흑무 지상부의 항산화 활성

- 총 폴리페놀 함량은 표준물질 gallic acid의 검정곡선을 이용하여 흑무 지상부 추출물 및 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서 101.2 mg/g GAE를 나타내었으며, 분획물 중 EtOAc 분획물에서 269.1 mg/g GAE로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다.

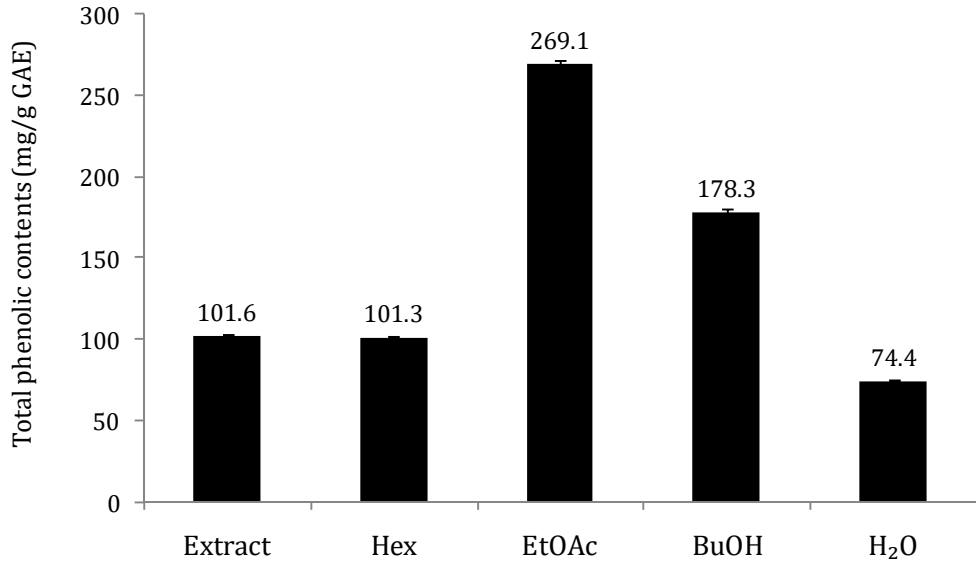


Figure 37. 흑무 지상부 추출물 및 용매분획물의 총 폴리페놀 함량

- 총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin의 검정곡선을 이용하여 추출물 및 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었으며, 실험 결과 EtOAc와 BuOH 분획물에서 각각 36.2, 17.5 mg/g QE의 플라보노이드 함량을 나타내었다.

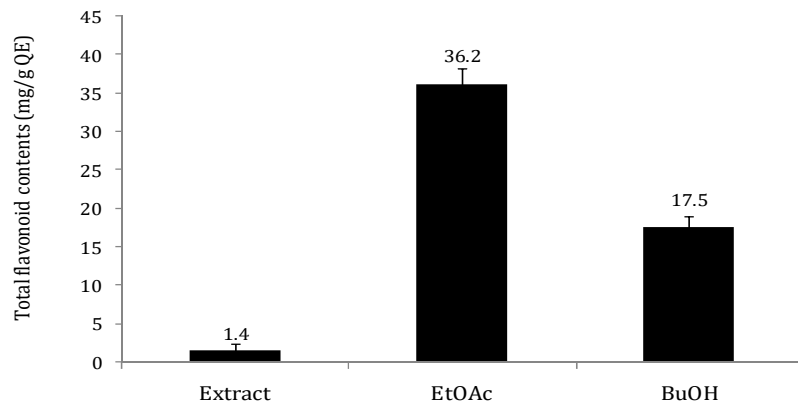


Figure 38. 흑무 지상부 추출물 및 용매분획물의 총 플라보노이드 함량

- 흑무 지상부 추출물 및 용매 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들에 대하여 15.63~500 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 EtOAc, BuOH 분획물이 대조군으로 사용한 BHT와 유사한 DPPH radical 소거활성이 있음을 확인하였다.

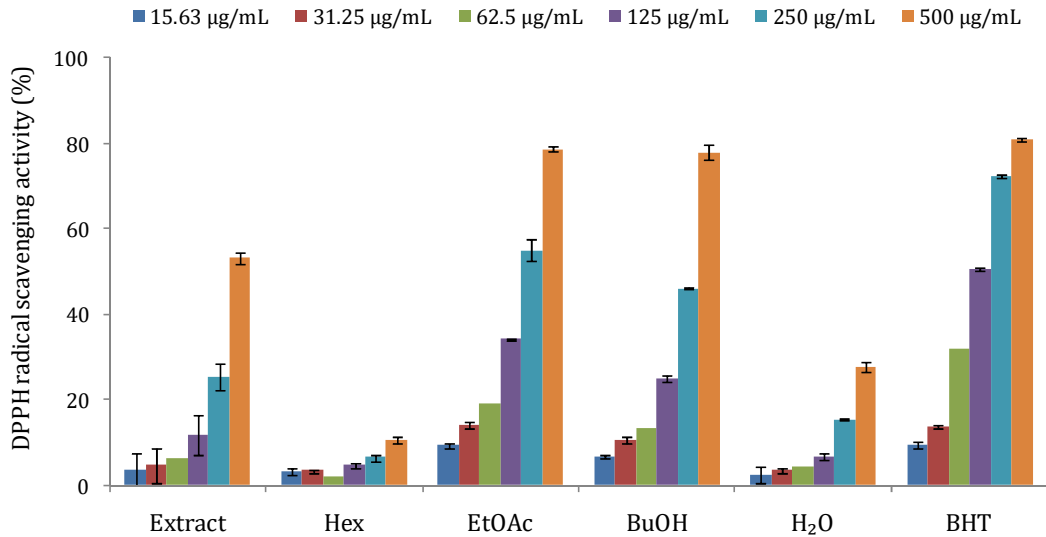


Figure 39. 흑무 지상부 추출물 및 용매분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성

- 흑무 지상부 추출물 및 용매 분획물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들에 대하여 15.63~500 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 EtOAc 분획물이 활성이 있음을 확인하였다.

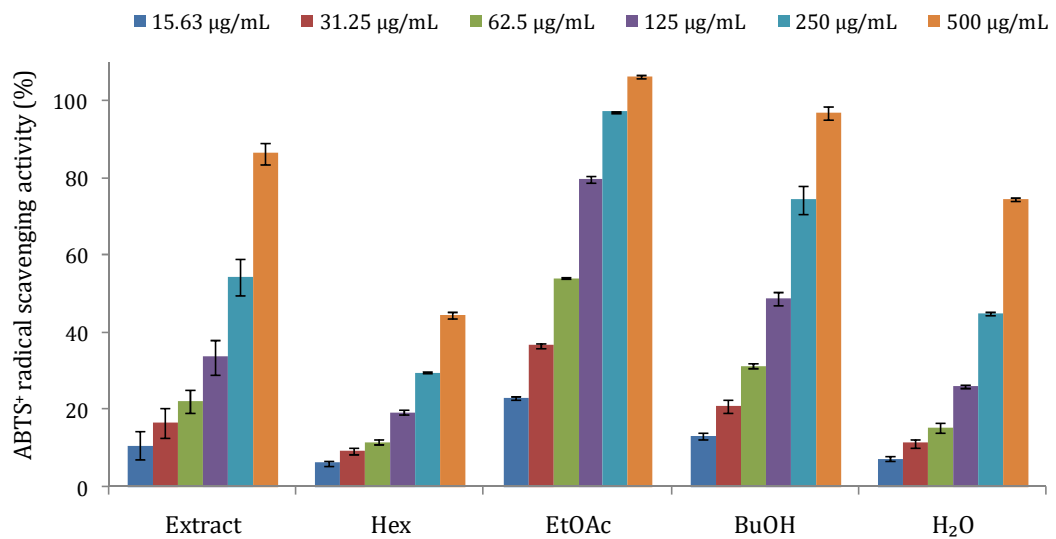


Figure 40. 흑무 지상부 추출물 및 용매분획물의 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

- 흑무 지상부로부터 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각각의 화합물들에 대하여 15.63~500 µM의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 화합물 2, 3, 6의 SC₅₀ 값이 각각 205.1, 321.4, 114.1 µM로 대조군인 BHT (SC₅₀ = 409.3 µM)보다 우수한 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다.

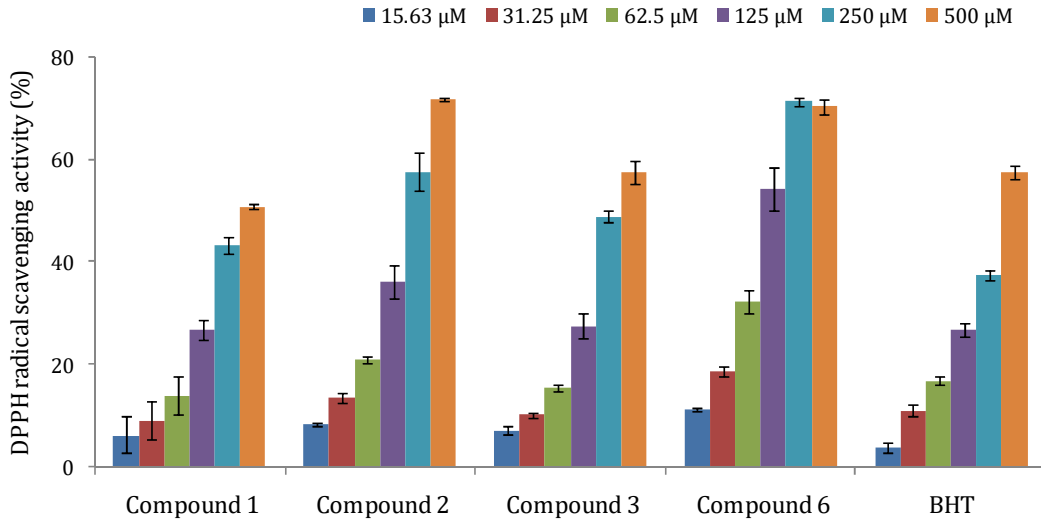


Figure 41. 흑무 지상부로부터 분리된 화합물의 DPPH 라디칼 소거 활성

- 흑무 지상부로부터 분리된 화합물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 각각의 화합물들에 대하여 15.63~500 μM의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 분리된 화합물 중 compound 7을 제외한 나머지 화합물들에서 ABTS⁺ radical 소거 활성을 확인할 수 있었다. 특히 compound 1, 2, 3의 flavonoid 배당체 화합물과 compound 5, 6의 phenyl propanoid계 화합물에서 ABTS⁺ radical 소거 활성이 확인되었다.

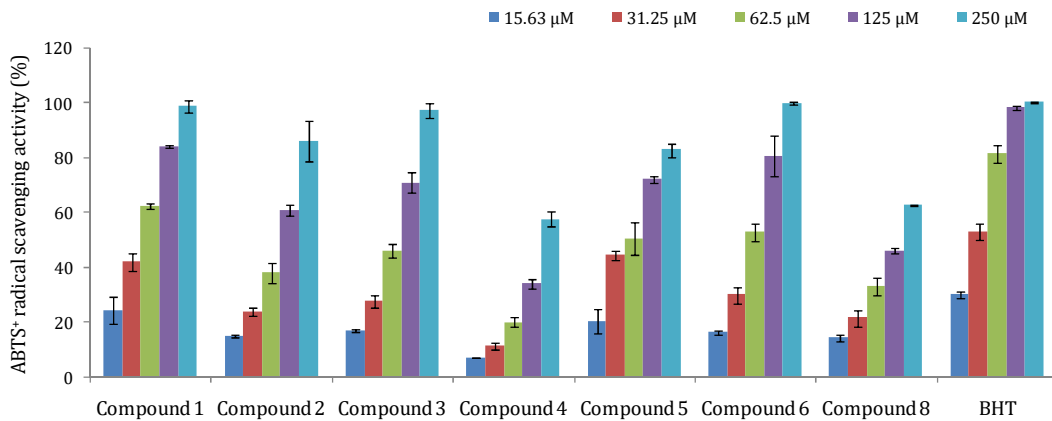


Figure 42. 흑무 지상부로부터 분리된 화합물의 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

(2) 제주산 적무의 항산화 활성

- 총 폴리페놀 함량은 표준물질 gallic acid의 검정곡선을 이용하여 적무 추출물 및 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서 12.3 mg/g GAE를 나타내었으며, 분획물 중 EtOAc 분획물에서 47.3 mg/g GAE로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다.

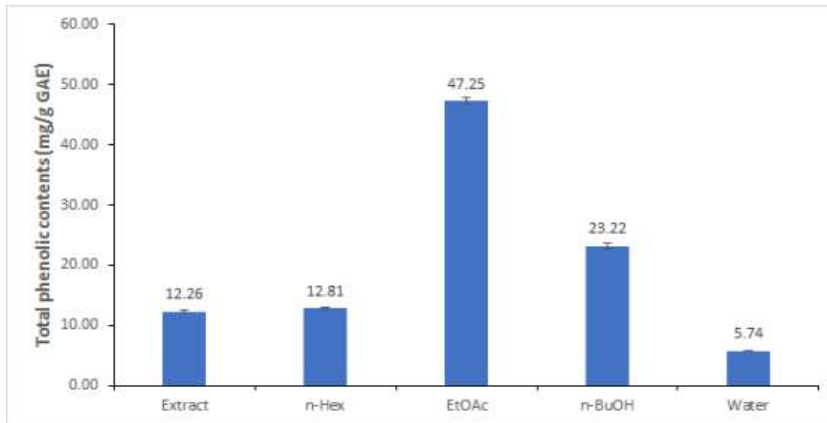


Figure 43. 적무 추출물 및 용매분획물의 총 폴리페놀 함량

8) 제주산 흑무 및 발효추출물의 화장품 소재 연구

○ B16F10 melanoma cell의 melanogenesis 억제 효과

- Murine B16F10 melanoma cell을 이용하여 흑무 추출물 및 분획물의 melanin 생성 억제 효과를 확인하였다. 실험에는 흑무 70% 주정 추출물인 S120 추출물과 그의 분획물들을 이용하였다.
- 우선 70% 주정 추출물 및 각 분획물을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 *n*-hexane과 ethyl acetate 분획물의 melanin의 생성량이 50% 이상 줄어드는 것이 확인되었으나, ethyl acetate 분획물의 경우 100 µg/mL의 농도에서 세포에 대한 독성이 약간 있었다 (Figure 8).
- 따라서 독성이 없는 범위 내에서 멜라닌 생성 억제 활성을 다시 확인하기 위하여 추가적으로 hexane과 ethyl acetate 분획물에 대하여 40, 20, 10, 5 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과 hexane 및 ethyl acetate 분획물이 40 µg/mL 이하의 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 9).

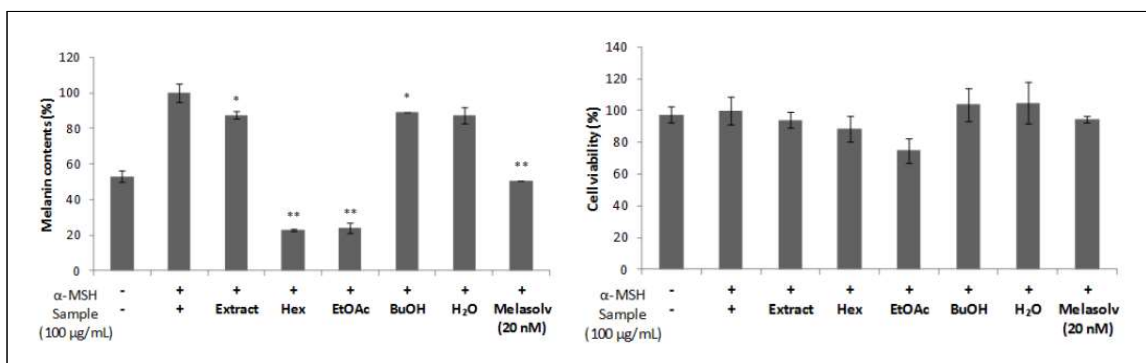


Figure 44. 흑무 70% 주정 추출물 및 분획물의 멜라닌 생성량 및 세포독성 측정 결과

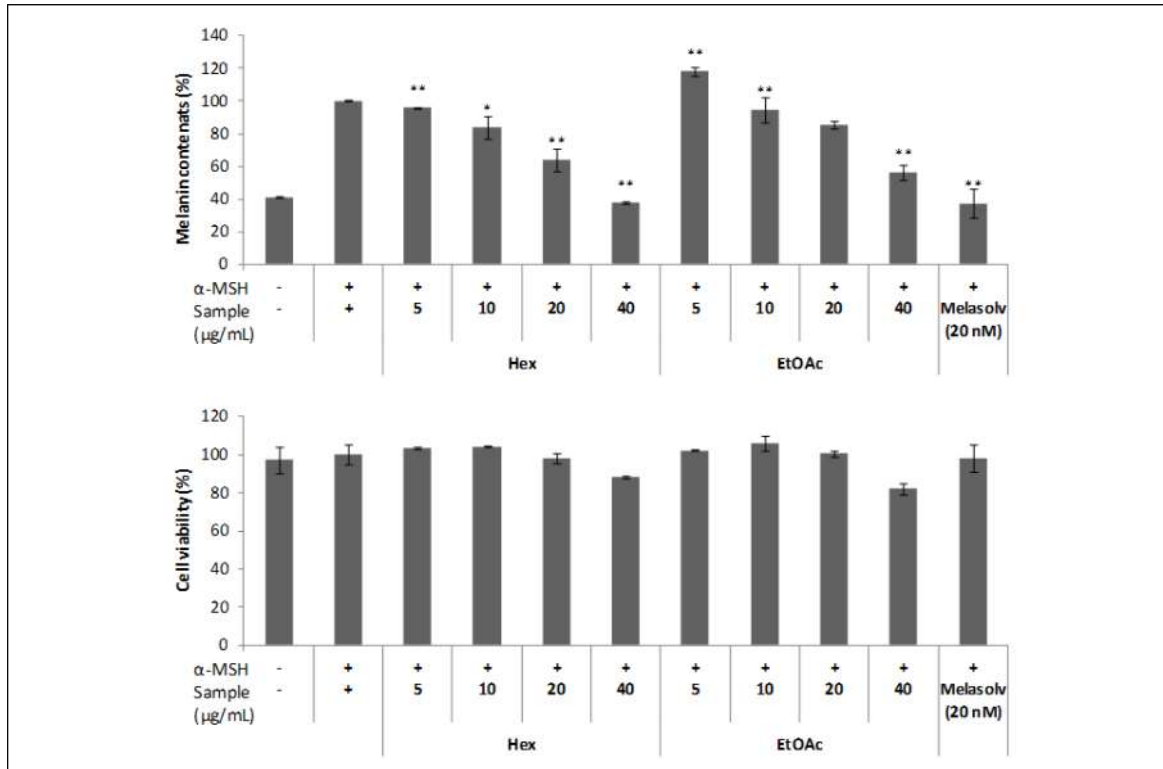


Figure 45. 흑무 hexane 및 ethyl acetate 분획물의 멜라닌 생성량 및 세포독성 측정 결과

○ 검정무 발효물의 항산화 활성

- 총 폴리페놀 함량은 표준물질인 gallic acid의 검정곡선을 이용하여 검정무 발효 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 검정무 발효물의 폴리페놀 함량은 높지 않음을 확인하였다.

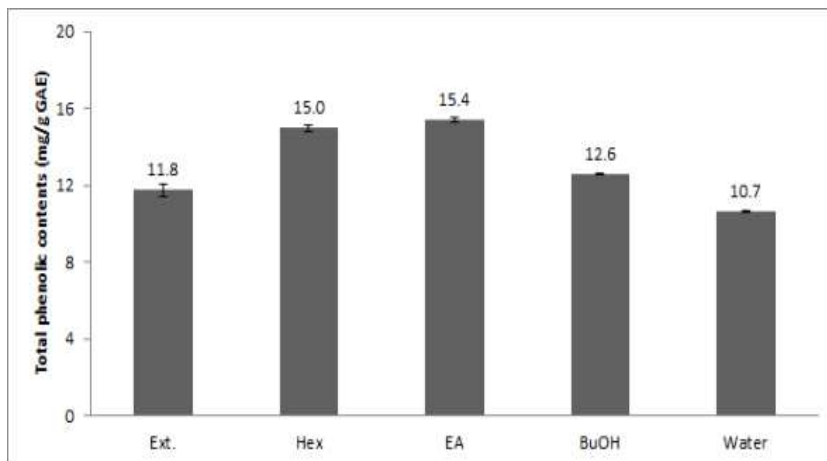


Figure 46. 검정무 발효 추출물 및 용매 분획물의 총 폴리페놀 함량

- 검정무 발효 추출물 및 용매 분획물의 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성을 측정하였으며, 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였다.

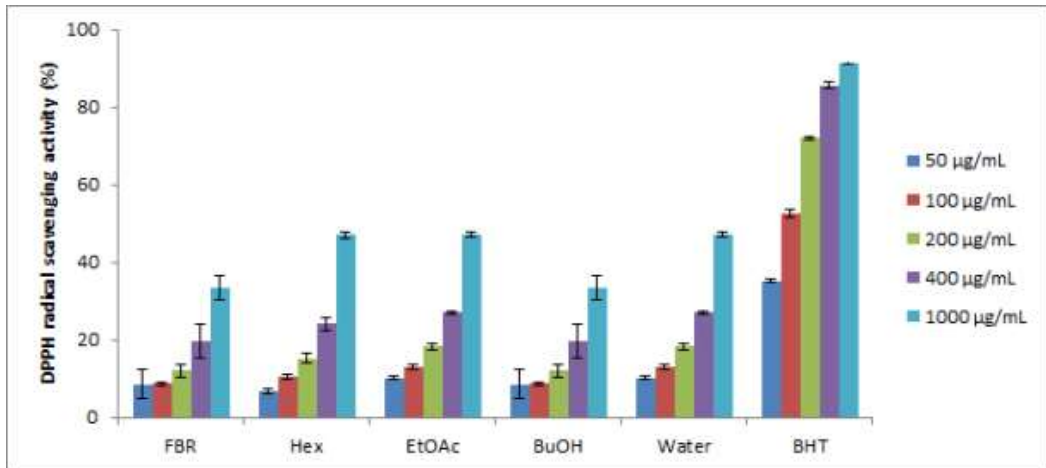


Figure 47. 검정무 발효 추출물 및 용매 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성

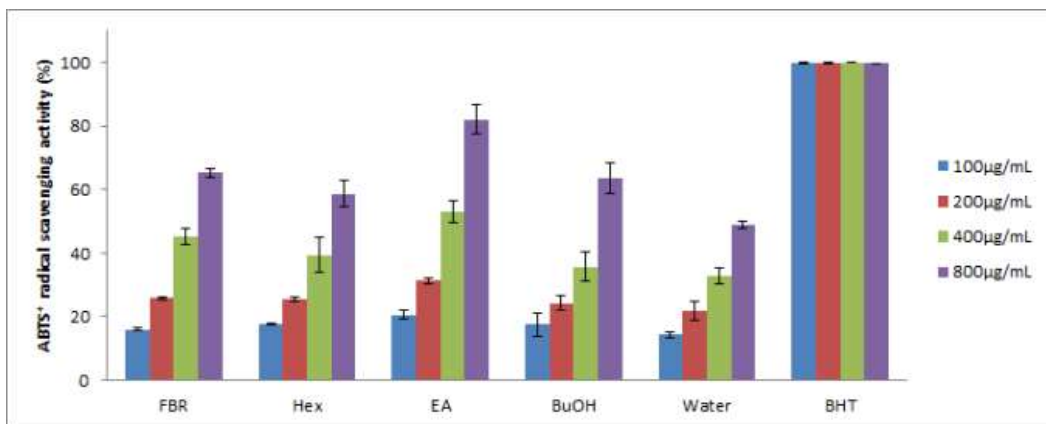


Figure 48. 검정무 발효 추출물 및 용매 분획물의 ABTS+ 라디칼 소거 활성

○ 검정무 발효물의 미백 활성

- 검정무 발효 추출물 및 용매 분획물의 미백 활성을 측정하기 위해 B16F10 멜라노마 세포를 이용하여 멜라닌 생성량 및 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 검정무 발효물 n-Hex 분획물에서 세포독성 없이 농도의존적으로 멜라닌의 생성을 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다.

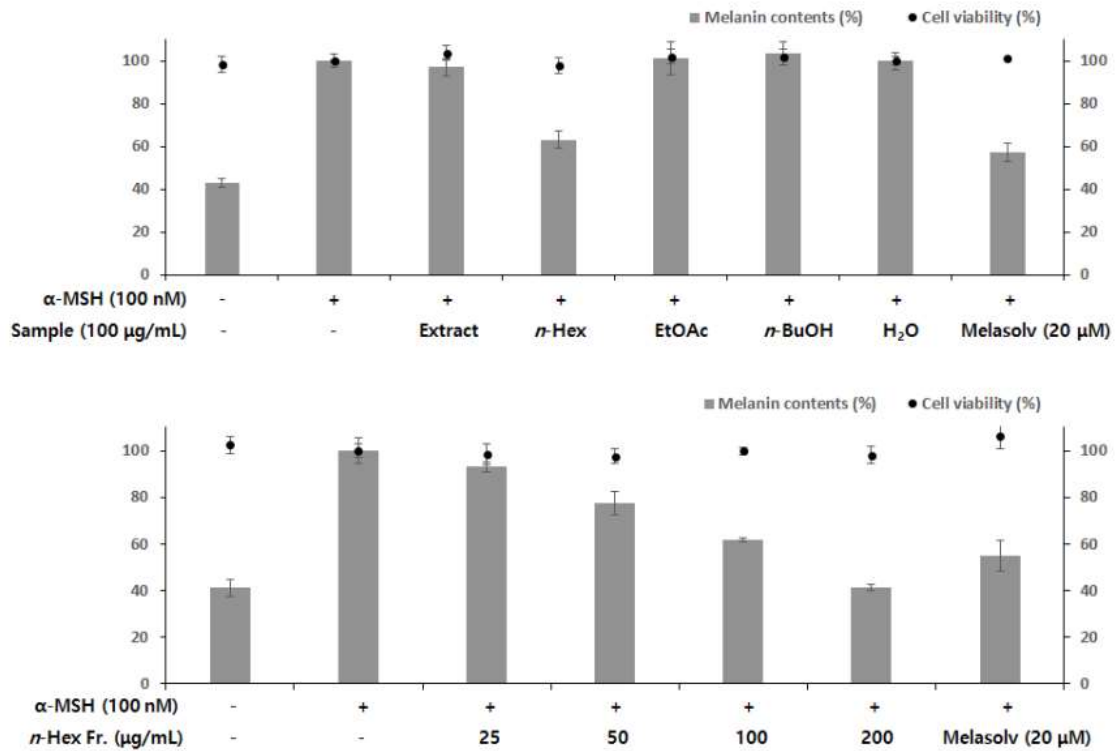


Figure 49. 검정무 발효 추출물 및 용매 분획물의 미백 활성

○ 검정무 발효물의 항균 활성

- 검정무 발효 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 확인하기 위해 피부관련 균주인 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*) 및 여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대해 한천확산법으로 clear zone의 크기를 확인하였다. 그 결과, EtOAc 및 n-BuOH 분획물에서 항균 효과가 있음을 확인하였다.

Table 14. 흑무발효물의 항균 효과

	Celar zone (mm)				
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>	
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9010
Extract	-	-	-	-	-
n-Hex	-	-	-	-	-
EtOAc	13.5	11	10	8.5	8.5
n-BuOH	10	9	-	-	-
H ₂ O	-	-	-	-	-
Erythromycin	30	-	29	56	-

○ 적무의 항산화 활성

- 총 폴리페놀 함량 실험 결과, 적무 EtOAc 분획물의 폴리페놀 함량이 129.0 mg/g GAE로 가장 높음을 확인하였다.

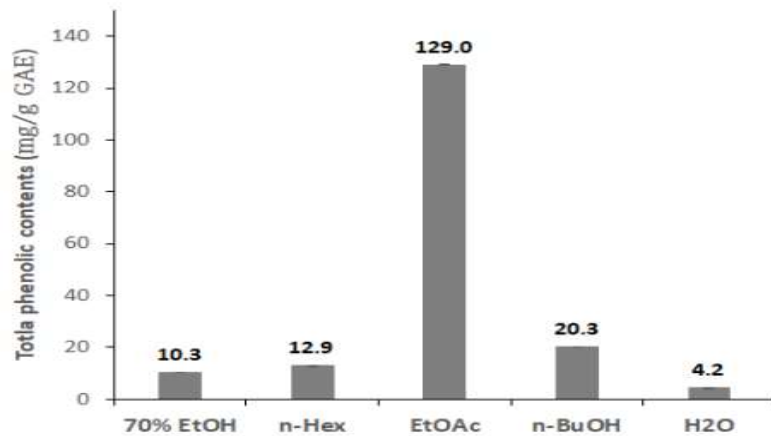


Figure 50. 적무 추출물 및 용매 분획물의 총 폴리페놀 함량

- 적무 추출물 및 용매 분획물의 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성을 측정하였으며, 그 결과 적무 EtOAc 분획물의 라디칼 소거 활성이 대조군인 BHT와 유사함을 확인하였다.

		70% EtOH	n-Hex	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	DPPH radical	>400	>400	101.7	>400	>400	108.4
	ABTS ⁺ radical	>100	>100	11.0	97.3	>100	6.7

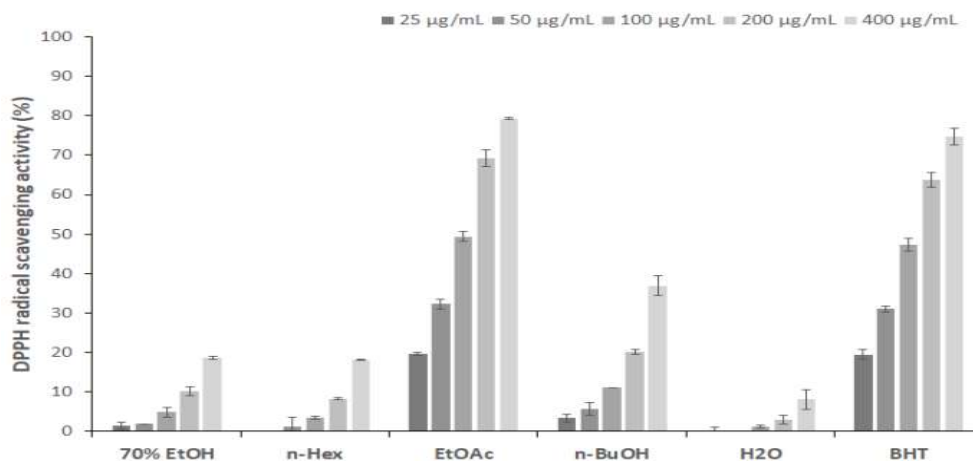


Figure 51. 적무 추출물 및 용매 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성

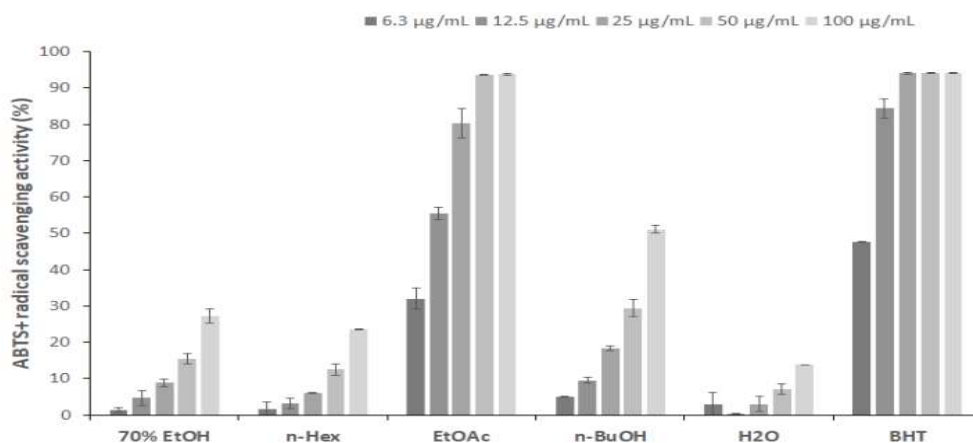


Figure 52. 적무 추출물 및 용매 분획물의 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

- 적무로부터 분리한 지표성분인 feruloyl malate의 항산화 활성 측정 결과, DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성이 대조군인 BHT 보다 우수함을 확인하였다.

		Feruloyl malate	BHT
SC ₅₀ (μM)	DPPH radical	335.4	436.7
	ABTS ⁺ radical	27.3	30.6

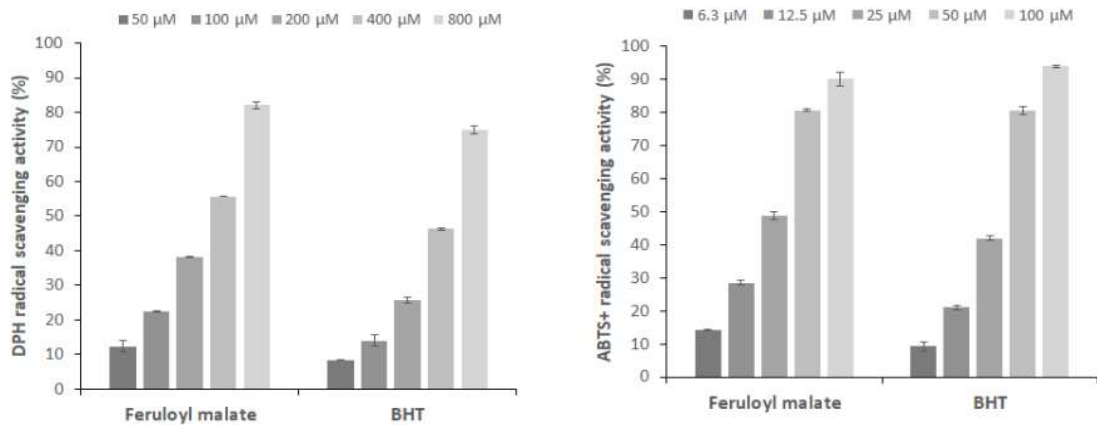


Figure 53. 적무의 지표성분인 feruloyl malate의 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

○ 적무의 분획물의 항염 활성

- 적무 추출물 및 용매 분획물의 항염 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 이용하여 NO 생성 억제 및 세포 독성을 측정하였다. 그 결과, 적무 EtOAc 분획물은 세포에 대한 독성 없이 농도의존적으로 NO의 생성을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 적무의 지표성분인 feruloyl malate의 NO 생성 억제 효과는 없음을 확인하였다.

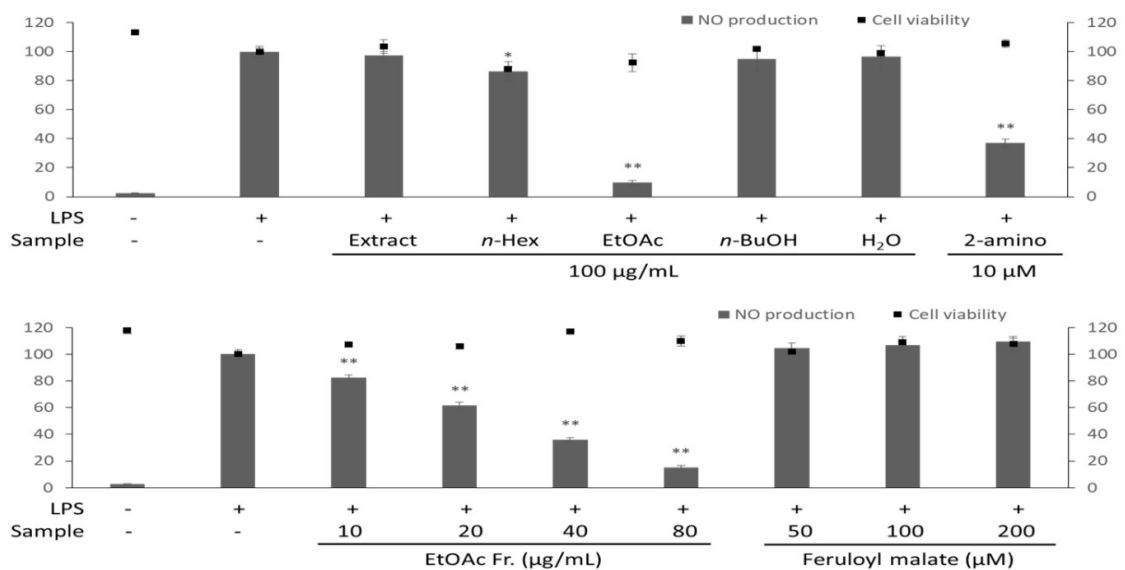


Figure 54. 적무 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성

9) 제주산 흑무 어린무(seedling) 추출물과 발효물의 성분분석 및 효능 연구

(1) 검정무 어린무 및 어린무 발효물의 추출물 제조

- 검정무 어린무 동결건조 분말 및 어린무 발효물 동결건조 분말을 (재)제주테크노파크로부터 제공받아 70% 에탄올을 이용하여 추출하여 추출물을 제조하였다.

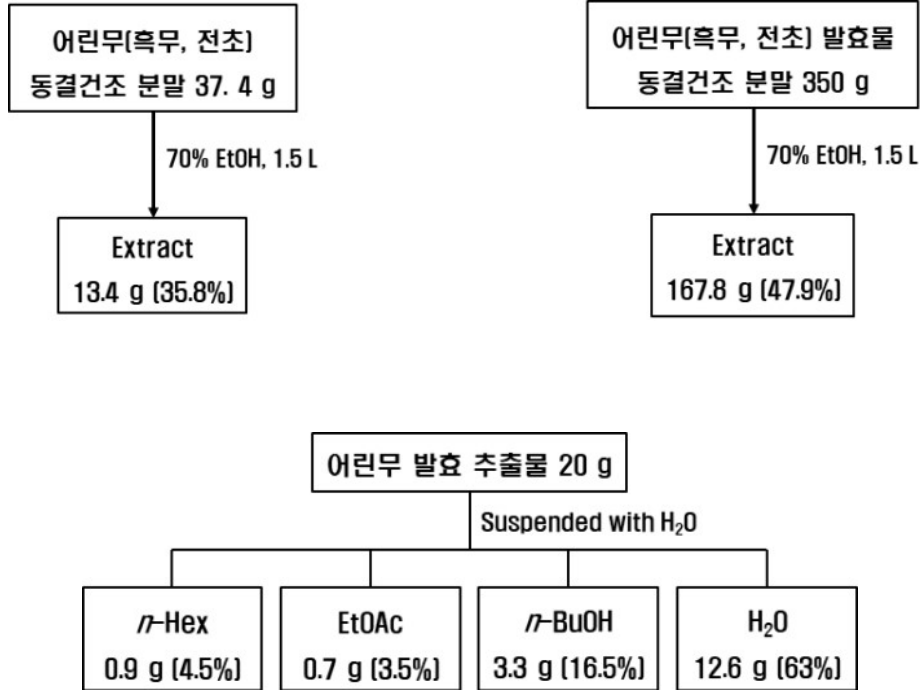


Figure 55. 에탄올 추출물 제조 및 분획 수율

- 또한, 어린무 발효 추출물 20 g을 증류수 1L에 현탁시켜, 용매 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여, n-Hex, EtOAc, n-BuOH, H₂O 분획물을 얻었다.

(2) 검정무 어린무 및 어린무 발효 추출물의 HPLC 분석 결과

- 지표물질인 Kaempferitrin의 함량 분석 결과, 어린무 추출물에서는 4.3 mg/g(0.43%), 어린무 발효 추출물에서는 1.5 mg/g(0.15%)의 함량으로 분석되었으며, 발효 추출물에서 함량이 낮아지는 것을 확인하였다. 이는 유산균 발효 과정에서 kaempferitrin에 결합되어 있는 당 성분의 결합이 끊어져, afzelin이나 kaempferol 등으로 바뀌었을 것이라 예상되어, 추가적인 분석 과정을 진행하였다.

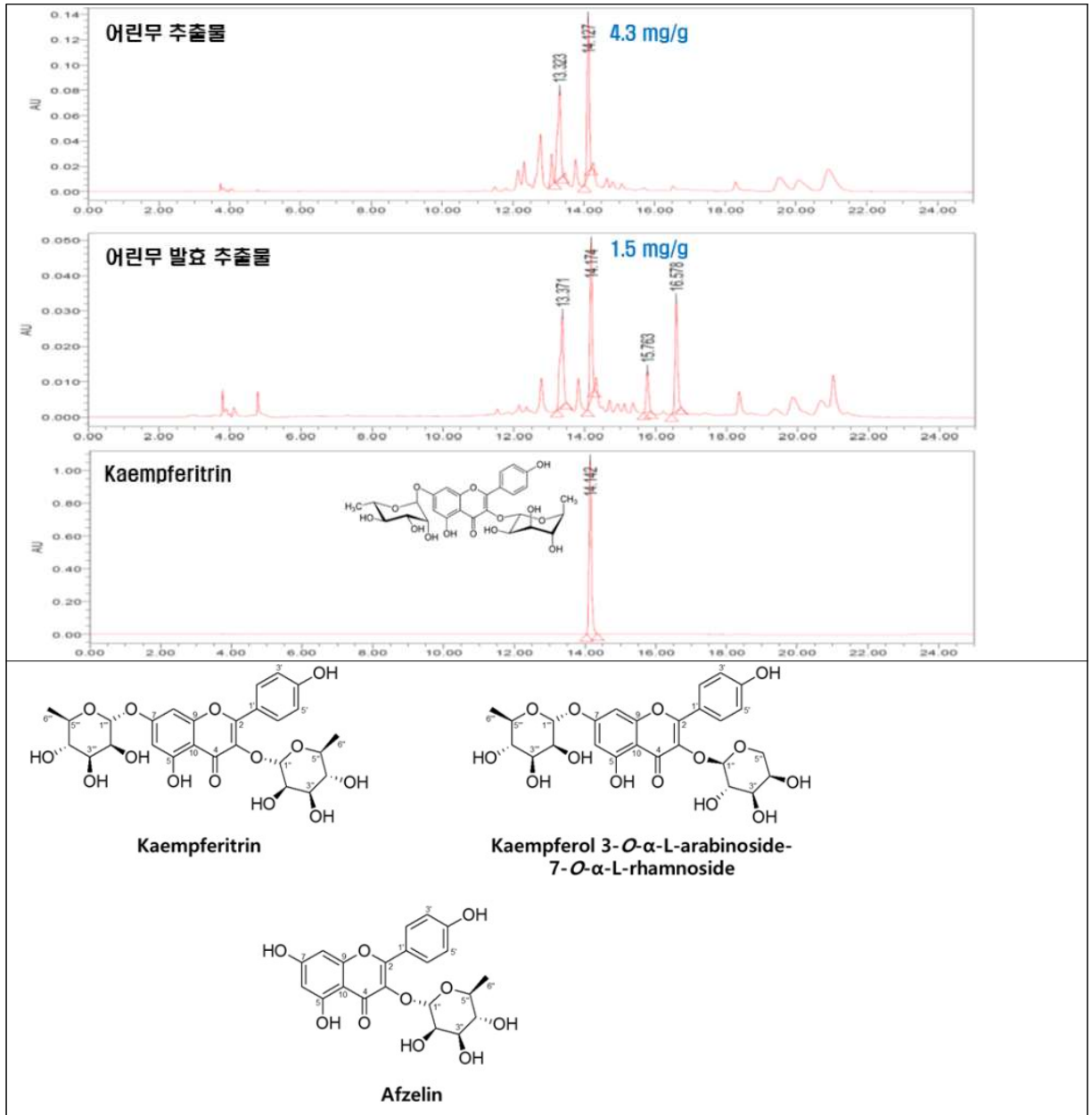


Figure 57. 어린흑무 추출물 및 발효물에서의 HPLC 양상 및 주요 성분

- 어린무 발효물의 성분 확인을 위해, 3차년도 검정무 지상부에서 분리했던 성분인 kaempferol 3-O-α-L-arabinoside 7-O-α-L-rhamnoside 및 afzelin에 대해서도 추가로 함량 분석을 진행하였다. 그 결과, 어린무 발효물에서는 2개의 당이 결합된 배당체인 kaempferol 3-O-α-L-arabinoside 7-O-α-L-rhamnoside 및 kaempferitrin의 함량은 줄어드는 반면, 1개의 당이 결합되어 있는 afzelin의 함량은 증가하는 것을 확인하였다. 이는 유산균 발효과정에서 배당체 한 개의 결합이 끊어진 것이라 사료된다.

(3) 어린무 발효 용매분획물의 항염 효능 실험 결과

- 항염 효능이 나타난 어린무 발효 추출물에 대해 추가적으로 극성별 용매분획물에 대한 NO 생성 억제 효능 실험을 진행하였으며, 그 결과 n-Hex 및 EtOAc 분획물에서 세포독

성 없이 NO 생성 억제 효능이 나타남을 확인하였다.

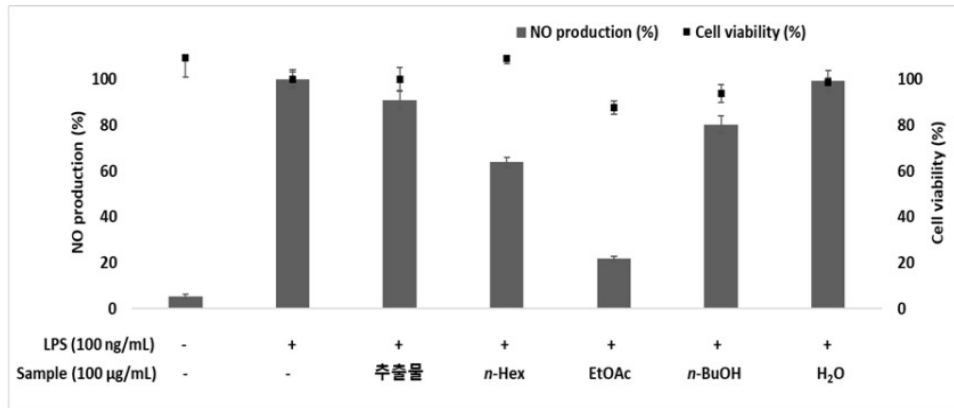


Figure 58 어린무 발효 용매분획물의 항염 효능

○ 어린무 및 어린무 발효 추출물의 미백 효능 실험 결과

- B16F10 멜라노마 세포를 이용하여 멜라닌 생성 억제 및 세포독성 실험을 하였으며, 그 결과 어린무 및 어린무 발효물은 미백 효능이 나타나지 않음을 확인하였다.

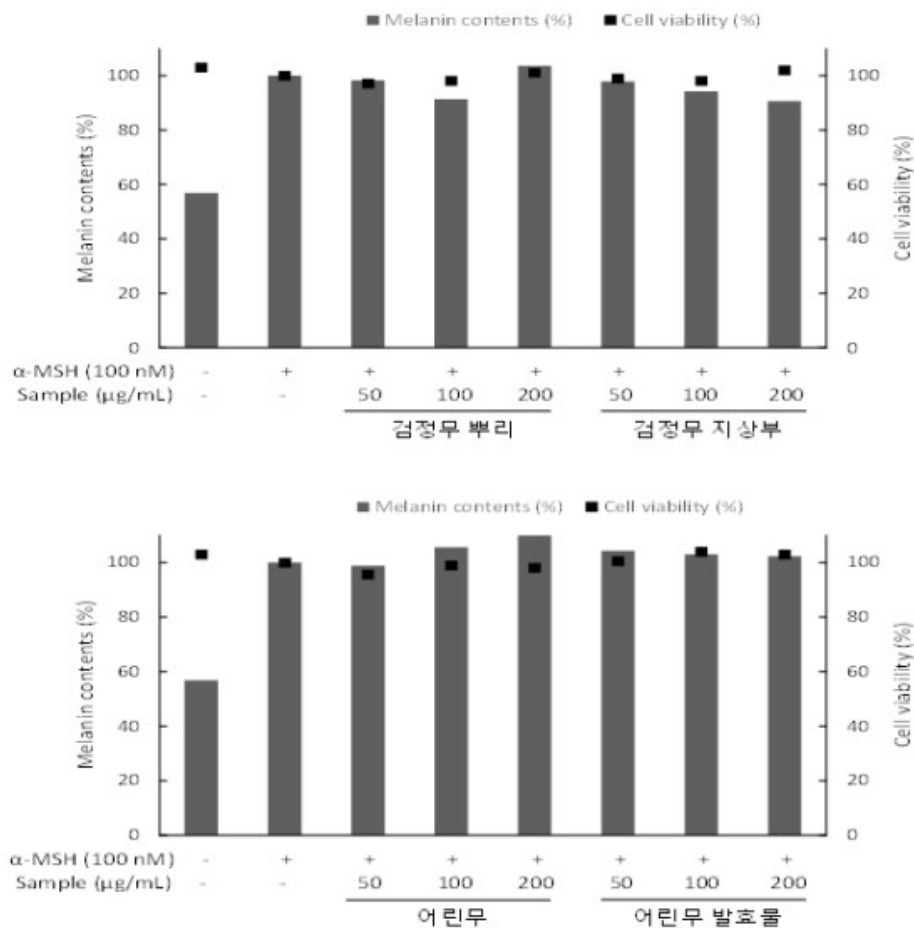


Figure 59. 어린무 발효 용매분획물의 항염 효능

○ 어린무 발효 추출물 및 극성별 용매 분획물의 항균 효능 실험 결과

- 어린무 발효 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 확인하기 위해 피부관련 균주인 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*) 및 여드름균(*Propionibacterium acnes*)에 대해 한천확산법으로

clear zone의 크기를 확인하였다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 항균 효과가 있음을 확인하였다.

Table 15. 어린무 발효 추출물 및 극성별 용매 분획물의 항균 효능

	Celar zone (mm)					
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010
어린무 발효물	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -Hex	-	-	-	-	-	-
EtOAc	12.5	11	11.5	9	8.5	9
<i>n</i> -BuOH			-	-	-	-
H ₂ O	-	-	-	-	-	-
Erythromycin	31	-	30	58	-	-

2-3. [제3세부 공동연구기관: 제주대산학협력단, 수의학과]

1) 검정무의 임상 적용 농도 및 추출물별 효능 평가

- 정상동물에서 2주동안 농도에 따른 차이 및 추출방법에 따른 차이를 비교하였음.
- 간기능과 관련되 바이오마커에 대한 분석을 통해 검사할 바이오마커를 결정함.

○ 적용 농도 및 추출물별 효능 평가

- 정상동물에서 2주 동안 흑무 추출물의 농도에 따른 차이를 체중 및 폐사율을 평가하고, 희생후 간의 육안 및 현미경에 따른 비교 분석, 혈청검사를 통해 간세포 및 담도계 손상을 분석하였음.
- 선행연구를 통해 500mg/kg이 효과가 있음을 확인하였고, 이보다 높은 농도인 1,000mg/kg, 2,000mg/kg, 4,000mg/kg을 경구투여 한 후, 동물의 상태를 확인하였으나 각 그룹별 폐사개체는 없었음. 간의 육안소견 결과: 외관상 큰 차이를 나타내지는 않았으나, 4,000mg/kg인 경우 간실질내에서 출혈소견이 관찰됨(Figure 1).



Figure 1. 추출물 농도별 투여 후, 간의 육안소견 소견 (control, 1,000, 2,000, 4,000mg/kg 급여)

○ 현미경 분석 결과

- 정상군에서는 선명한 동모양 모세혈관이 관찰되고, 중심정맥내 이물이 관찰되지 않음. 1,000mg/kg 투여군에서도 정상과 유사한 소견이 관찰됨. 그러나 2,000, 4,000mg/kg을 투여한 그룹에서는 동모양모세혈관내 출혈 소견 및 중심정맥내 염증세포가 관찰되고, 실질내 출혈병변이 관찰됨. 이러한 결과는 2,000mg/kg 이상을 투여할 경우, 간에 손상을 줄 수 있음을 의미함(Figure 2).

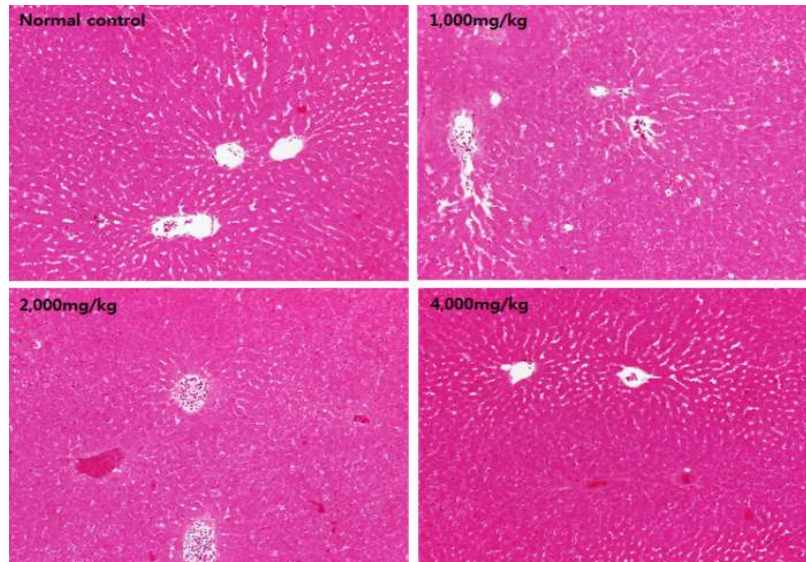


Figure 2. 추출물 농도별 투여 후 간 조직 H-E염색 소견 (control, 1,000, 2,000, 4,000mg/kg 급여)

○ 간세포 및 배설 기능, 담도계 이상, 췌장기능에 대한 혈청학적 분석결과

Table 1 검정무 추출물 농도별 투여 후, 혈청학적 분석 결과

Parameters groups	ALB (g/dl)	ALP (U/I)	AST (U/I)	AMY (U/L)	TBIL (Mg/dl)	BUN (Mg/dl)
Normal control	4.325±0.17 ^a	192±53.34	60.3±10.30	884±30.90	0.15±0.10	15±1.63
BR 1000 mg/kg	4.725±0.12 ^{***}	303.5±55.05 [*]	45.8±2.75 [*]	827±45.90	0.2±0.01	12±1.82 ^{***}
BR 2000 mg/kg	4.875±0.17 ^{***}	315.3±43.56 [*]	45±6.06 [*]	816±46.10	0.2±0.01	9.75±0.95 ^{***}
BR 4000 mg/kg	4.767±0.05 ^{***}	287±45.71 [*]	45±6.56 [*]	807±108.0	0.2±0.01	9.667±1.15 [*]

parameters group	CA (Mg/dl)	PHOS (Mg/dl)	CRE (Mg/dl)	GLU (Mg/dl)	NA ⁺ (mM/l)	TP (g/dl)	GLOB (g/dl)
Normal control	10.8±0.38	9.65±1.60	0.25±0.21	108±24.5	143±1.41	6.5±0.48	1.475±0.98
BR 1000 mg/kg	11.2±0.28	10.55±1.37	0.38±0.05	134±44.7	143±1.41	5.98±0.25	1.275±0.37
BR 2000 mg/kg	11.1±0.17	10.675±0.97	0.43±0.15	115±17.8	145±6.98	6.03±0.19	1.125±0.15
BR 4000 mg/kg	11.4±0.31	11.267±1.67	0.35±0.07	127±21.7	143±3.0	6.3±0.4	1.533±0.40

^a Each value is represented as the mean (%) ± S.E. (n=3/each group)

* P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs. normal control

위의 표에 제시한 바와 같이 간기능의 지표성분인 알부민(ALB) 측정결과, 흑무를 투여하였을 경우 세 용량에서 유의성 있는 결과(p<0.001)를 확인함. ALP와 AST의 변화 또한 흑무를 투여한 경우 유의성 있게 감소되었음을 확인함 (p<0.05). 해로운 물질의 배설 기능을 평가할 수 있는 BUN 결과 또한 흑무를 투여할 경우 유의성 있게 감소 되었음을 확인함 (p<0.05).

정상 동물에게 흑무 추출물을 투여한 경우이므로, 다른 이온의 변화 및 지방 대사와 관련된 효소들은 투여하지 않은 경우와 큰 차이가 없었음 (Table 1).

2) 고지방식이에 의한 비알콜성 지방간 모델의 정립

- 비알콜성 지방간 동물모델 중, 고지방식이 (60kcal) 급여에 의한 대사성 지방간을 유도해 흑무 추출물의 효능을 평가하기 1차년도에 모델을 정립하고자 하였음.
- 6주간 고지방식을 실시하였고, 간 및 음낭 내 지방 무게 및 간의 변화를 확인 하였음. 그 결과, 고지방식을 투여한 경우, 처음 유도 전 보다 2배이상 증가되었음 (Figure 3).

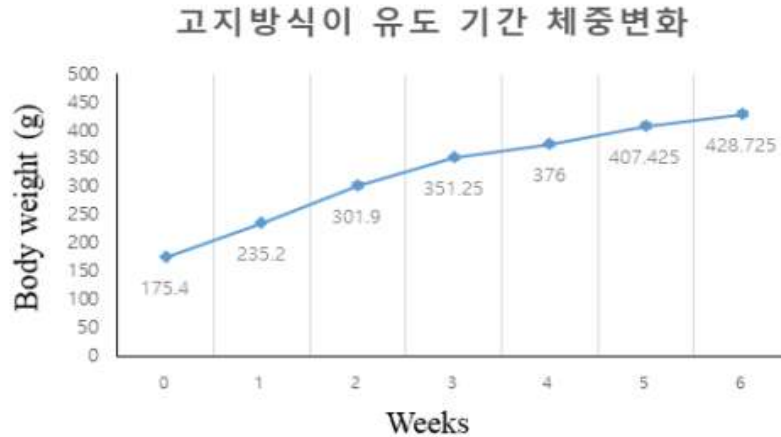


Figure 3, 고지방식이 모델유도 확인을 위한 체중 변화

- 6주 후, 고칼로리사료 급여를 일반사료로 바꾸어 주고, 각 그룹별로 5마리씩 임의로 나누어, 흑무 추출물 100mg/kg, 500mg/kg, 1,000mg/kg 으로 농도별로 투여하였음. 또한 양성대조군인 실리마린을 60mg/kg의 농도로 투여하였고, 흑무의 유효성분으로 알려진 아릴아이소티오시아네이트(아릴) 5mg/kg을 투여한 그룹으로 나누어 2주간 매일 경구투여하였고, 2주간 체중의 변화를 확인하였음.
- 그 결과, 2주 동안 대조군 그룹은 체중이 증가되었으나, 흑무 추출물 100mg/kg, 1,000mg/kg과 아릴을 투여한 그룹에는 체중의 변화가 거의 없었고, 흑무 500mg/kg을 투여한 그룹에서는 실리마린을 투여한 그룹과 유사하게 체중이 감소되었음을 확인함 (Figure 4).

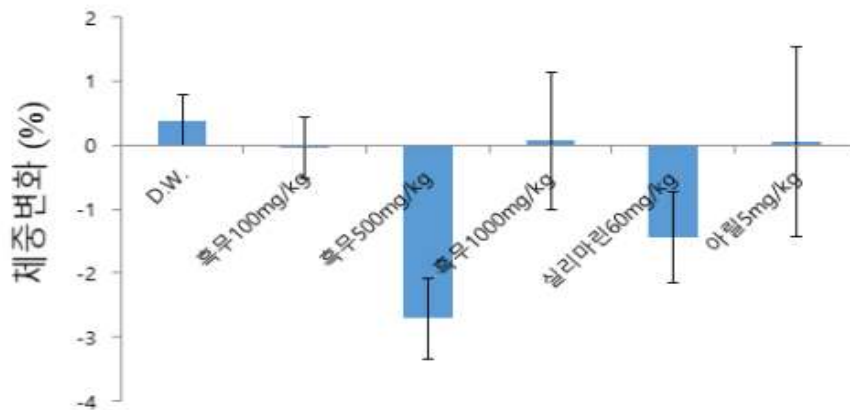


Figure 4, 고지방식이(6 주) 유도 후, 흑무 추출물의 투여(2 주)에 따른 체중의 변화

3) 사염화탄소를 이용한 간손상 모델에서 흑무 추출물의 효능 평가

흑무 추출물을 1주일간 농도별로 경구 투여 한 후, 사염화탄소를 1.5mg/kg으로 경구투여 하였고, 24 시간 후에 심장으로 혈액을 채취한 후, 희생하여 간 조직을 분리하여 연구에 사용하였다.

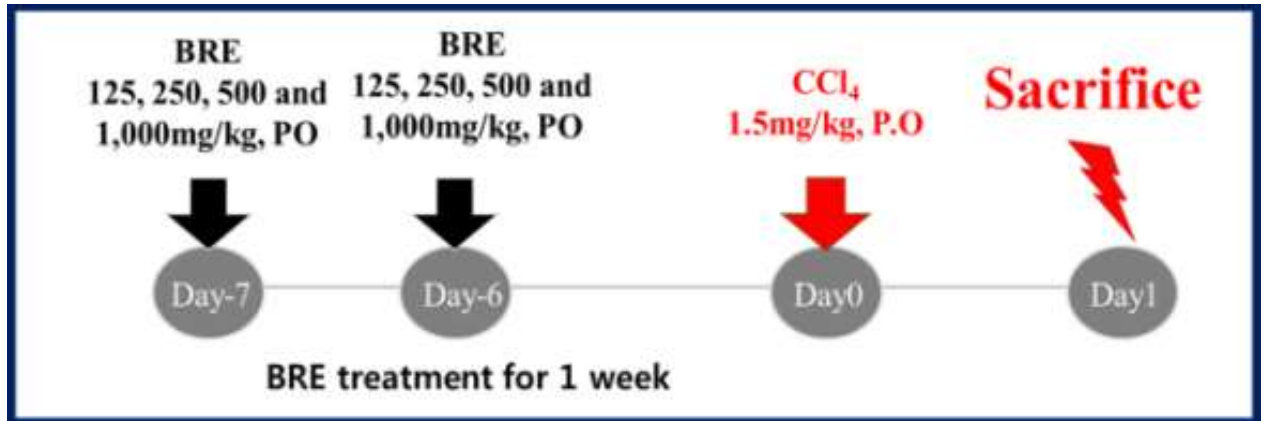


Figure 5. 사염화탄소를 이용한 연구방법에 대한 모식도

간손상의 지표가 되는 바이오마커를 혈청에서 분석한 결과, 흑무 추출물을 투여하지 않은 그룹에 비해 흑무추출물 250mg/kg 투여한 그룹부터 ALT와 AST가 유의성 있게 감소함을 확인하였다.

500mg/kg에서도 유의성 있는 결과를 보였으나, 1,000mg/kg 농도에서는 500을 투여한 결과보다 유의성 있게 나타나지 않았다. 이러한 결과는 농도가 높다고 해서 좋은 결과를 나타내는 것이 아니라, 250mg/kg 의 농도에서 500mg/kg까지의 농도가 사염화탄소를 이용한 간손상 모델에서는 유의하다는 결론을 내릴 수 있다(Table 2).

Table 2. 혈청분석 결과

Group	Treatment	ALT (U/L)	AST (U/L)	TCHO (mg/dl)	GLU (mg/dl)	BUN (mg/dl)
I	Normal control	56.4 ± 1.2	126.2 ± 8.7	65.8 ± 2.6	141.8 ± 8.8	13.2 ± 0.5
II	Vehicle + CCl ₄	719.7 ± 64.9 ^{***}	1625.7 ± 178.7 ^{***}	44.2 ± 2.5	113.7 ± 4.7	20.9 ± 1.4
III	BRE 125 + CCl ₄	634.3 ± 135.7	974.8 ± 273.7 [#]	51.8 ± 8.1	110 ± 10.5	16.1 ± 1.4
IV	BRE 250 + CCl ₄	449.0 ± 135.1 ^{###}	831.3 ± 154.5 ^{##}	51.5 ± 8.1	104.8 ± 6.8	17.8 ± 1.0
V	BRE 500 + CCl ₄	216.6 ± 38.6 ^{###}	633.9 ± 183.5 ^{###}	49.3 ± 4.2	113.1 ± 5.7	17.8 ± 1.8
VI	BRE 1,000 + CCl ₄	460.3 ± 86.5 [#]	1420.0 ± 192.8	53.4 ± 6.1	105.1 ± 5.3	24.1 ± 0.7

^a Each value is represented as the mean (%) ± S.E. (n=3/each group)

***P < 0.001 vs. normal control, [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01 and ^{###}P < 0.001 vs. vehicle treatment group

항산화와 관련된 지질과산화와 항산화효소를 간조직에서 측정된 결과, 흑무추출물을 투여하지 않은 그룹에 비해 흑무 추출물 125mg/kg을 투여한 그룹에서 지질과산화 효소가 유의성 있게 감소하였으며, 항산화 효소인 SOD, Catalase가 유의성 있게 증가되었음을 확인하였다 (Table 3).

Table 3. 흑무 추출물이 사염화탄소에 의한 산화적손상으로부터 간을 보호한 항산화효소들에 대한 변화

Group	Treatment	MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
I	Normal control	0.32 ± 0.02	3.45 ± 0.4	11.5 ± 0.9
II	Vehicle + CCl_4	$1.64 \pm 0.10^{***}$	$2.09 \pm 0.6^*$	$7.0 \pm 0.8^{**}$
III	BRE 125 + CCl_4	$0.37 \pm 0.05^{###}$	$4.46 \pm 0.8^\#$	$10.5 \pm 0.9^\#$
IV	BRE 250 + CCl_4	$0.39 \pm 0.06^{###}$	$3.91 \pm 0.2^\#$	$11.5 \pm 0.5^\#$
V	BRE 500 + CCl_4	$0.31 \pm 0.05^{###}$	$3.49 \pm 0.78^\#$	$11.8 \pm 0.6^\#$
VI	BRE 1,000 + CCl_4	$0.80 \pm 0.21^\#$	2.10 ± 0.8	$12.6 \pm 0.3^\#$

^a Each value is represented as the mean (%) \pm S.E. (n=3/each group)

* P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs. normal control, [#]P < 0.05 and ^{###}P < 0.01 vs. vehicle treatment group.

비알콜성 지방변성을 확인하기 위해 oil-red O 염색법을 이용하여 지방구를 염색한 결과, 흑무 추출물을 투여하지 않은 그룹에 비해 흑무추출물을 500mg/kg을 투여한 그룹부터 농도 의존적이게 지방구의 생성이 억제됨을 확인하였다 (Figure 6).

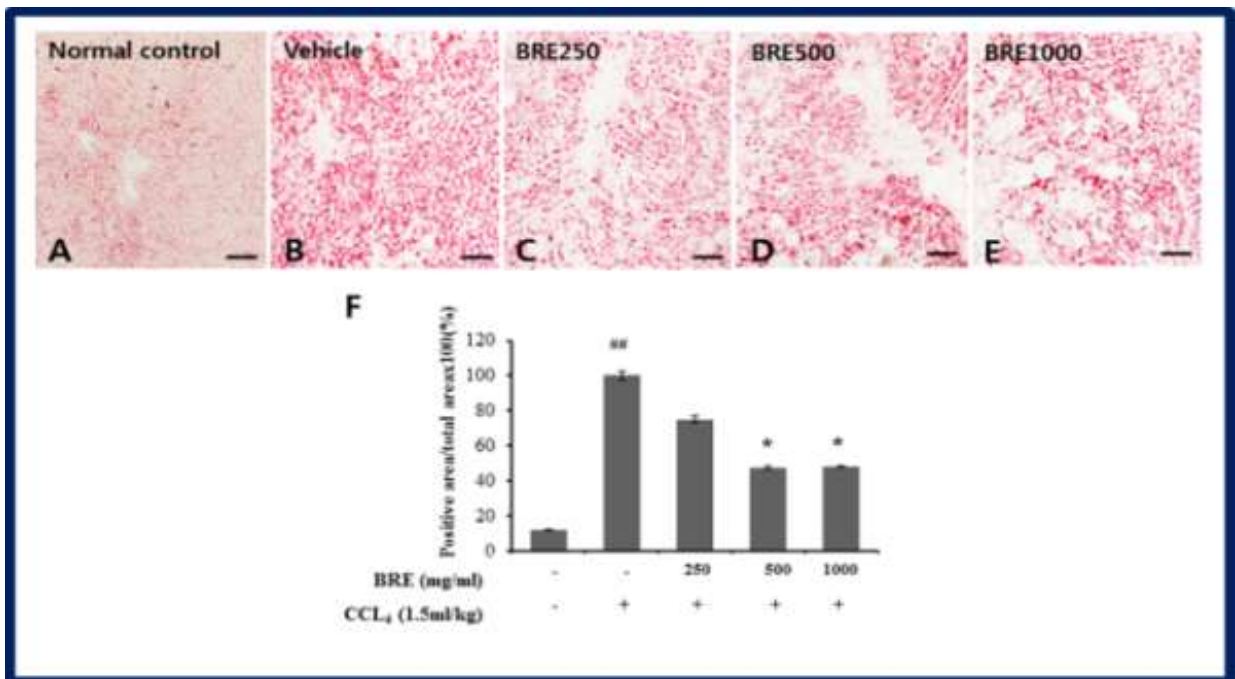


Figure 6. 비알콜성 지방간 모델에서의 지방구형성에 대한 억제 효과 (A-E) 정상간조직과 흑무를 투여하지 않은 조직, 흑무를 농도별로 투여한 간조직의 지방구 형성의 변화 (F) 지방구형성에 대한 면적을 측정 한 결과

사염화탄소의 유도 간의 조직에서의 변화는 중심정맥 주변 공포 변성 및 염증세포의 침윤, 중심정맥 주변 조직의 괴사를 특징으로 한다. 이러한 조직 손상 정도가 흑무 추출물에 의해 변화가 있는지를 조직표본을 통해 확인한 결과, 정상 간조직에서는 간세포의 배열이 규칙적이고, 공포변성이나 염증세포의 침윤이 확인되지 않으나, 대조군인 간조직에서는 중

심정맥 주변의 공포 변성 및 염증세포의 침윤이 확인된다. 이러한 변화는 흑무 추출물 500mg/kg을 투여한 그룹과 1000mg/kg을 투여한 그룹에서 감소되었음을 확인하였다 (Figure 7).

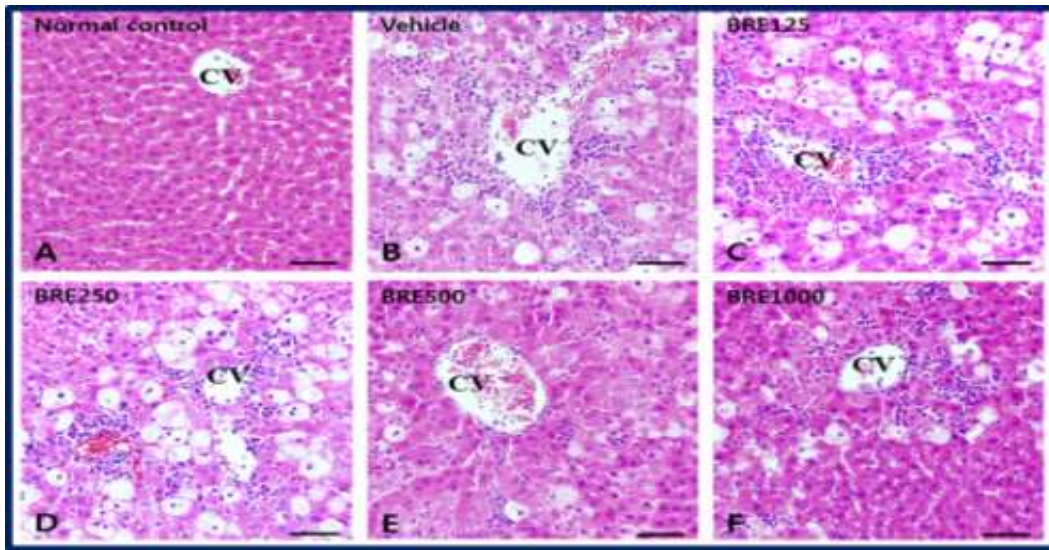


Figure 7. 조직분석결과, Hematoxylin-eosin staining, scale bar=20um

사염화탄소에 의한 간손상에는 cytochrom p 450 (CYP)과 관련된 효소들이 반응을 하는데, 그 효소 중 하나인 CYP2E1의 변화를 확인한 결과, 흑무 추출물을 투여하지 않은 그룹에서 유의성 있게 감소하였다가 흑무 추출물 250mg/kg을 투여한 그룹에서부터 농도의 존적으로 이 효소가 유의성 있게 증가됨을 확인하였고, 간세포 내에 이 효소가 발현된 것을 면역조직화학염색 기법을 통해 확인한 결과, 웨스턴 블릿 결과와 일치함을 확인하였다 (Figure 8).

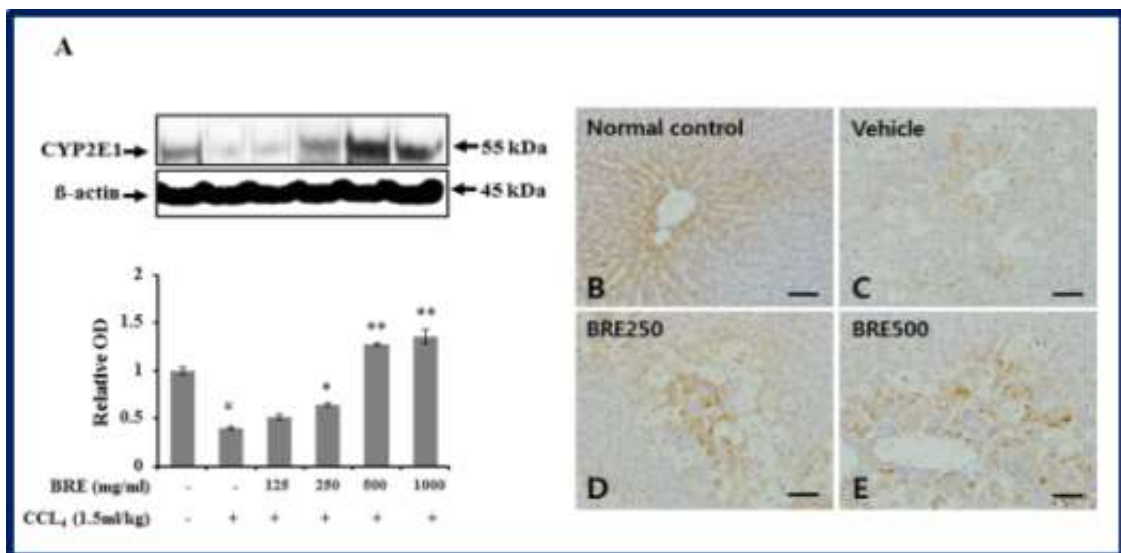


Figure 8. CYP2E1의 변화, 웨스턴 블릿 결과(A) 및 (B-E) 면역염색 결과. Scale bar=20um

4) 고지방식이에 의한 동물모델에서의 효능평가

(1) 고지방식이에 의한 간손상 동물모델에서의 효능 평가

고지방식이(High fat diet (60% Kcal), HFD)사료를 급여한 후, 동물모델 유도여부를 체중 및 혈당 검사를 통해 확인하였다. 8주 동안 체중의 변화를 확인한 결과, 일반식이를 한 동물 그룹에 비해 HFD를 급여한 그룹에서 8주에 약 2배 이상의 체중이 증가하였다 (Figure 9).

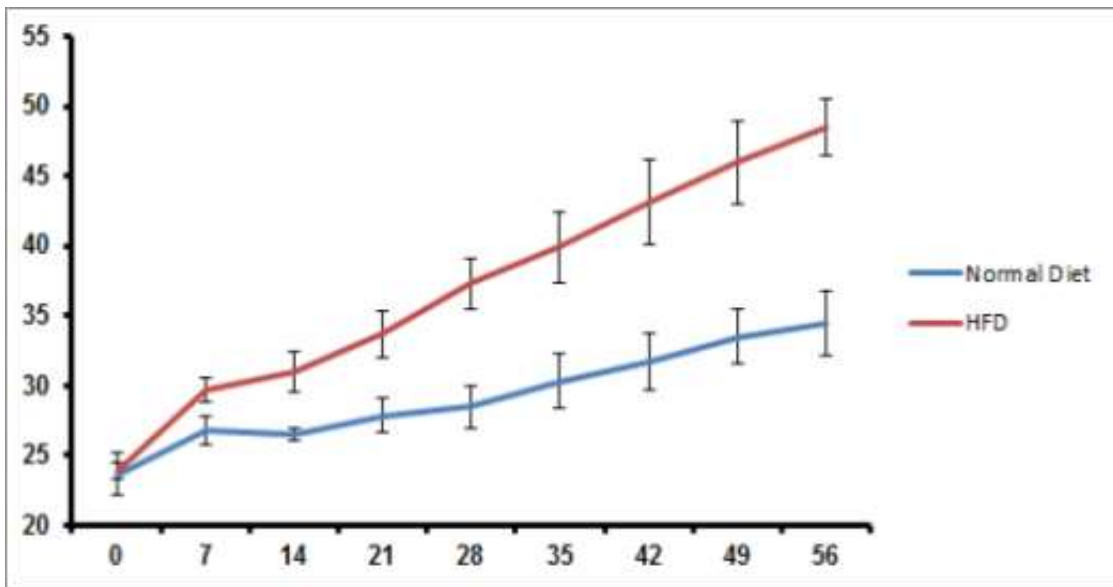


Figure 9. 8주간 고지방식이 사료를 급여한 경우와 정상 사료를 급여한 경우의 체중의 변화

매주, 혈당의 변화를 확인한 결과, 혈당의 변화는 체중 변화에 비해 현저한 차이를 나타내지 않았다 (Figure 10).

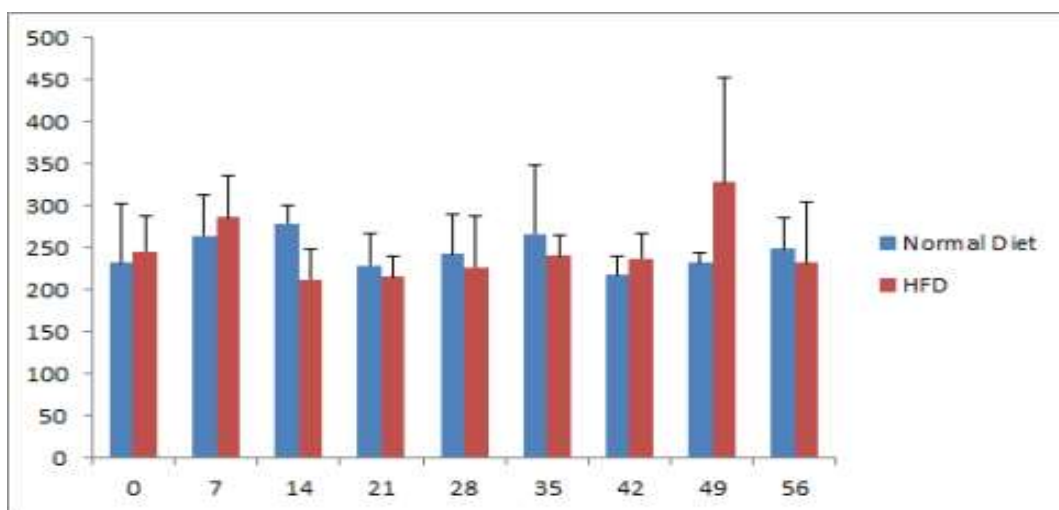


Figure 10. 8주간 고지방식이 사료를 급여한 경우와 정상 사료를 급여한 경우의 혈당의 변화

조직학적 변화를 확인한 결과, 정상 조직에 비해 HFD를 급여한 동물의 간조직에서 지방 변성을 확인함. 정상 식이를 급여한 경우의 간은 정상적인 간의 구조를 보이나, 고지방 식이를 급여한 동물의 간의 소견으로 간세포의 지방변성이 확인되었다(Figure 11).

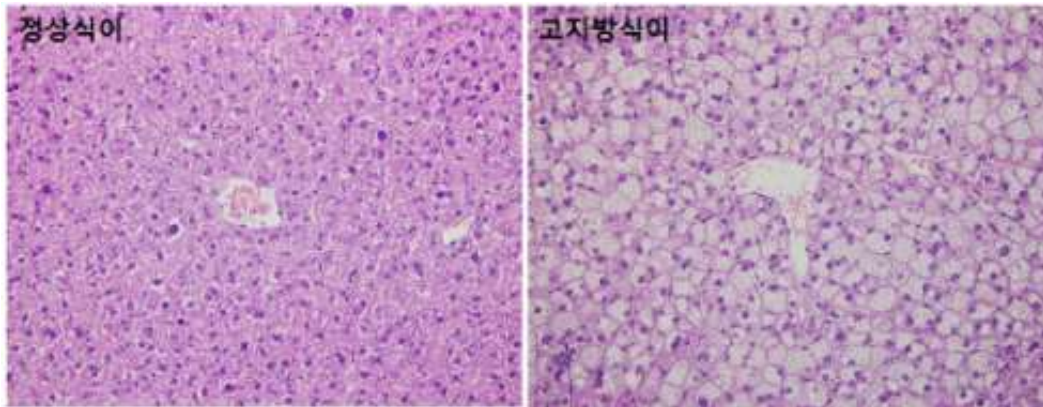


Figure 11. 8주간 고지방식이 사료를 급여한 경우와 정상 사료를 급여한 경우의 조직학적 변화

혈청학적 변화를 확인한 결과, 정상식이를 급여한 경우와 비교했을 때 큰 차이를 나타내지 않았다. 체중의 변화 및 조직학적 변화는 있었으나 혈청학적 변화를 Figure 12와 같다.

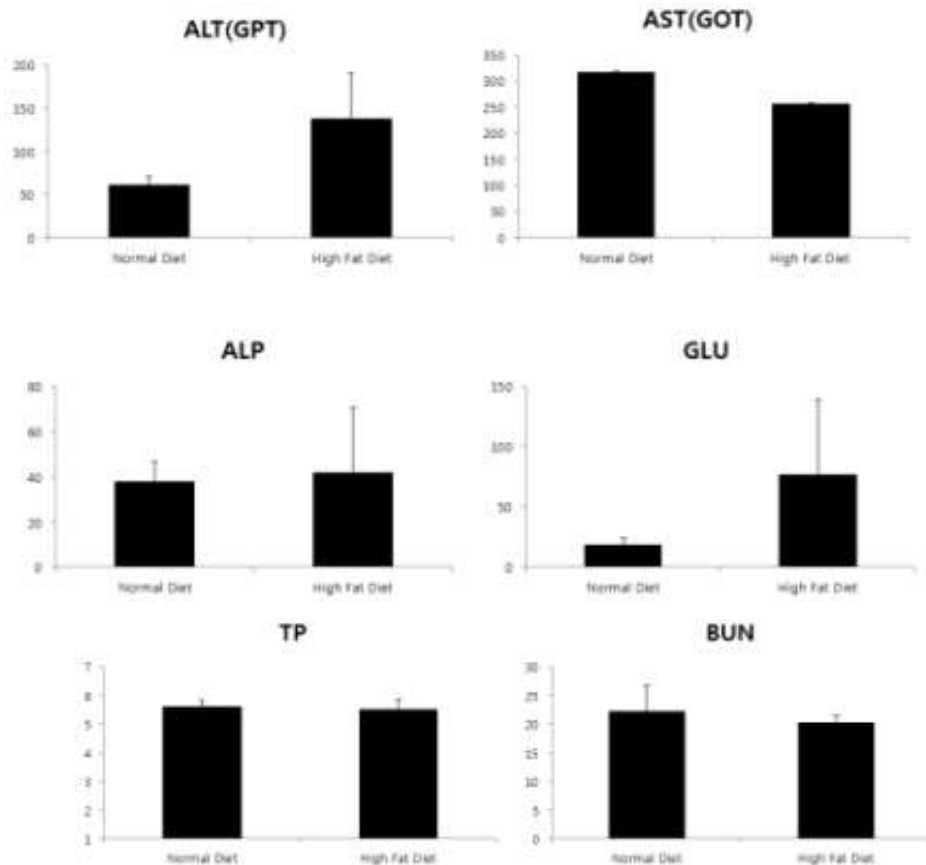
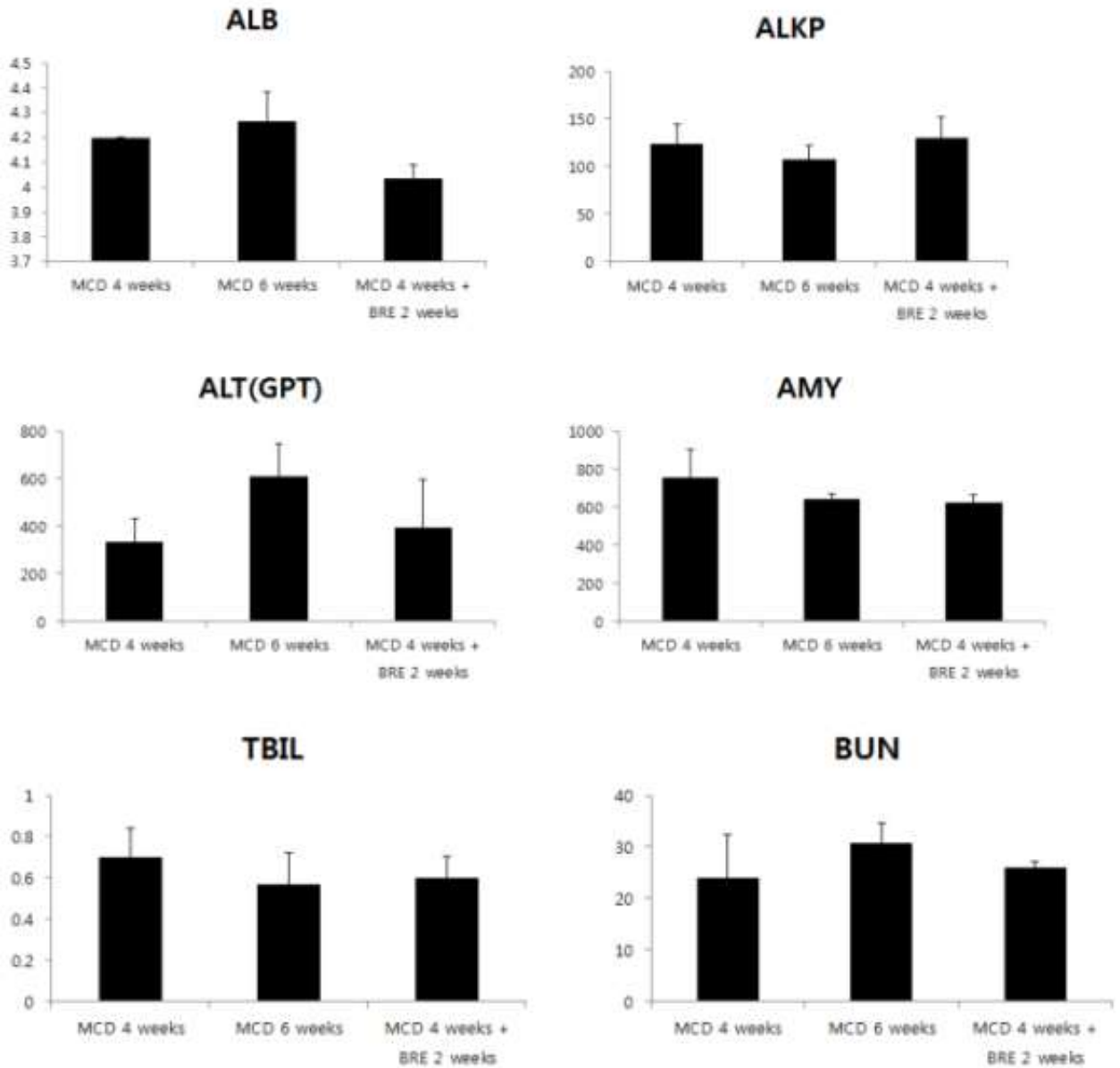


Figure 12. 8주간 고지방식이 사료를 급여한 경우와 정상 사료를 급여한 경우의 혈청학적 변화

5) MCD diet 급여에 의한 간손상 모델개발

4주동안 MCD diet를 급여 한 후, 흑무 추출물을 500mg/kg으로 매일 2주 동안 경구 투여하

였다. MCD diet를 4주동안 급여한 후, 2주 동안 선정된 추출물을 이용한 효능을 평가하였다. 간손상 모델이 유도가 되었는지를 혈청검사를 통해 확인한 결과, 간손상의 혈청학적 바이오마커인 ALP, ALT, AMY의 값이 증가하였고, 조직학적 소견으로도 비알콜성 지방간이 유도된 것을 확인하였다(Figure13).



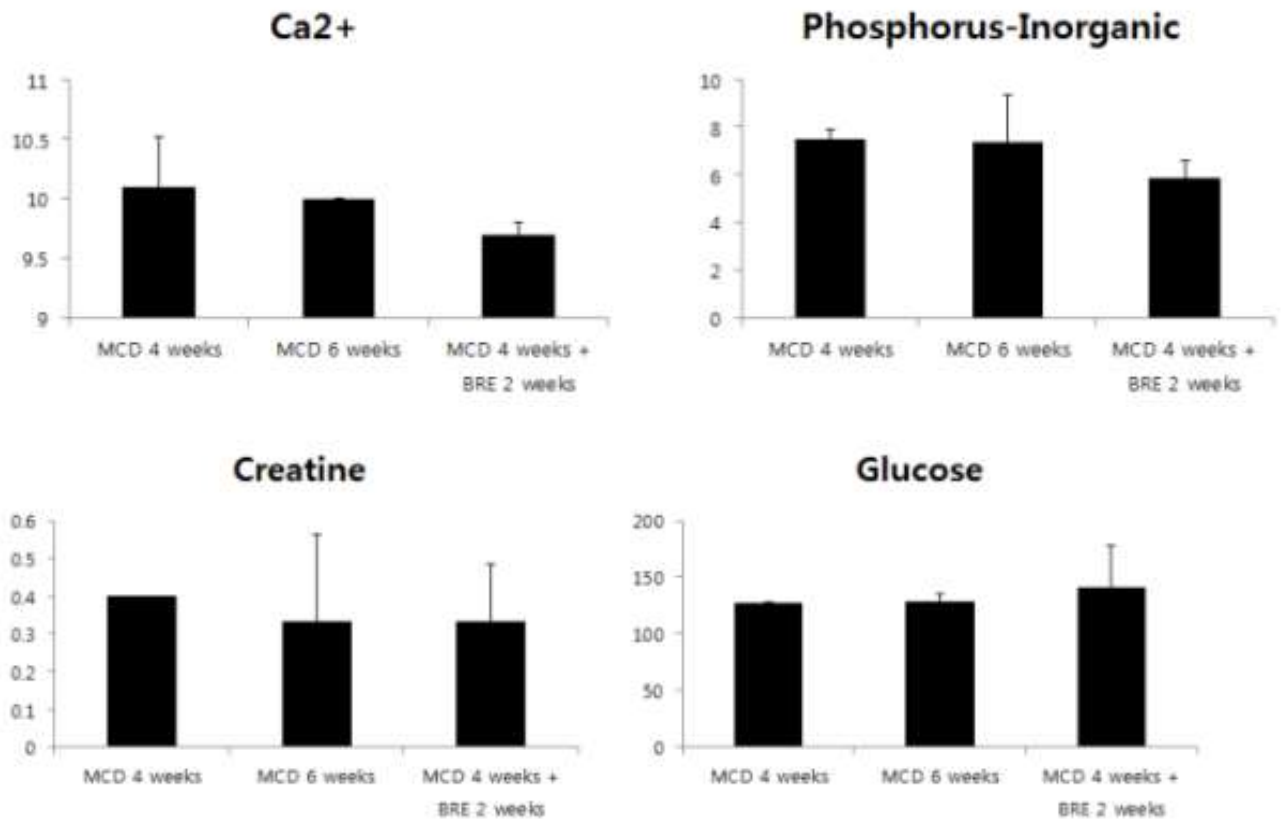


Figure 13. 4주간 MCD 사료를 급여한 경우와 정상 사료를 급여한 경우의 혈청 바이오마커의 변화

조직학적 변화를 확인한 결과, 지방변성 및 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 동물 모델은 4주 급여 후에 비알콜성 지방간의 조직학적 소견이 관찰되었고, 6주간 투여한 경우에는 더 심해진 것을 확인하였다(Figure 14).

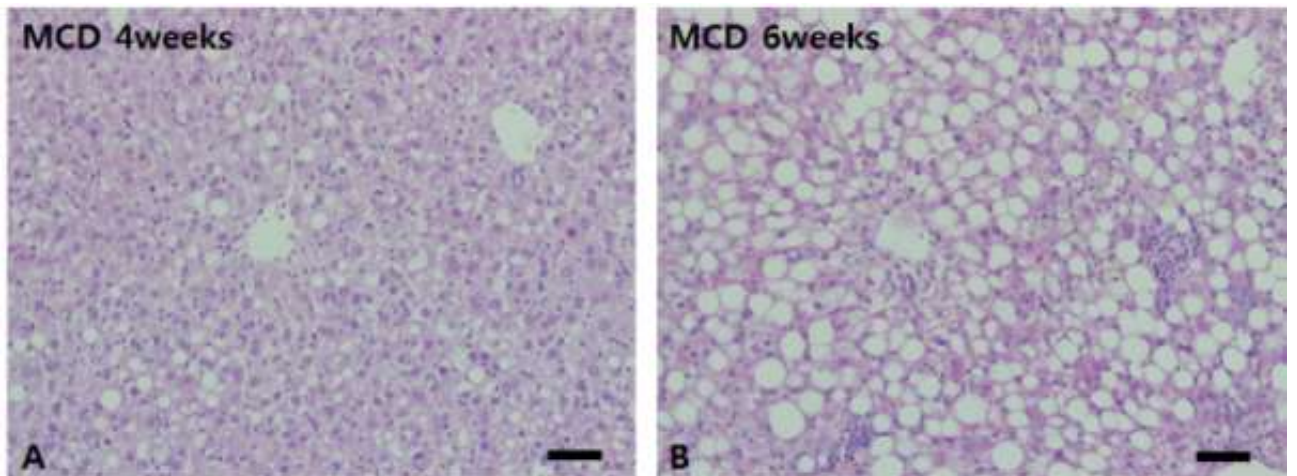


Figure 14. MCD 사료 급여 후, 4주(A)와 6주(B)의 간조직의 변화

6) 추출물별 동물에서의 효능 평가

(1) 조건별 추출물에 대한 효능 평가

사염화탄소를 이용한 비알콜성 지방간 모델에서 S107와 S122의 효능 비교와, 흑무발효물의 효능을 평가하였다. S107, S122은 채집 시기가 다른 흑무를 열처리 후, 열풍건조하여 70%주정 추출하였다(S107:12월 채집, S122:1월 채집). 흑무발효물은 콜마비엔에이치에서 공급하였다. S107, S122, 흑무발효물을 1주일 동안 투여한 후, 1.5ml/kg의 사염화탄소를 1:4로 올리브 오일로 희석하여 경구투여하고, 3시간 후에 희생시켜 혈청검사 및 조직학적 검사를 통해 비교하였다.

S122을 농도별로 평가하였을 때, 500mg/kg에서만 유의성 있는 변화가 있었다. S107 또한 500mg/kg에서 효과가 있었으므로 효과 있는 농도에서 비교한 결과, S107과 S122는 큰 차이가 없었다(Figure 15, 16).

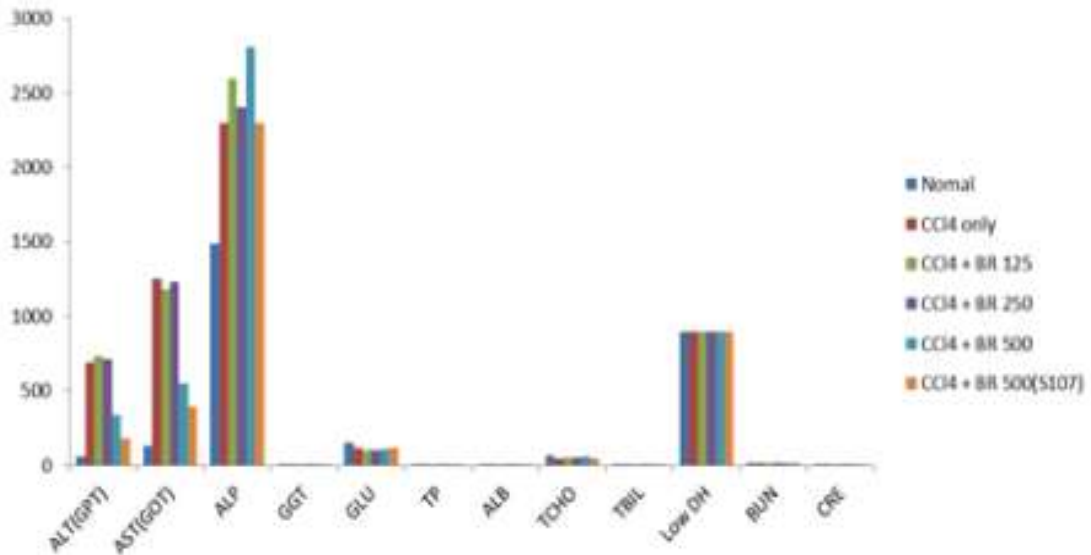


Figure 15. 사염화탄소를 이용한 비알콜성 지방간 모델에서 S107, S122의 혈청 바이오 마커 분석

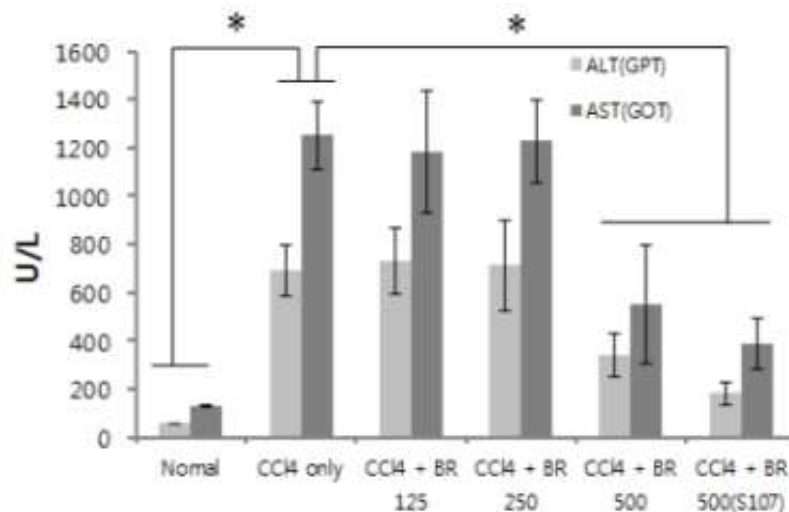


Figure 16. 사염화탄소를 이용한 비알콜성 지방간 모델에서 S107, S122의 ALT, AST에 대한 분석 결과

또한 조직 소견에서 사염화탄소에 의한 비알콜성 지방간 소견인 공포변성 및 간세포의 괴사, 염증세포 침윤 등이 나타났고, 추출물을 투여한 경우, 이 소견이 완화되었으며, 수확시기에 따른 두 그룹간 큰 차이를 나타내지 않았다 (Figure 17).

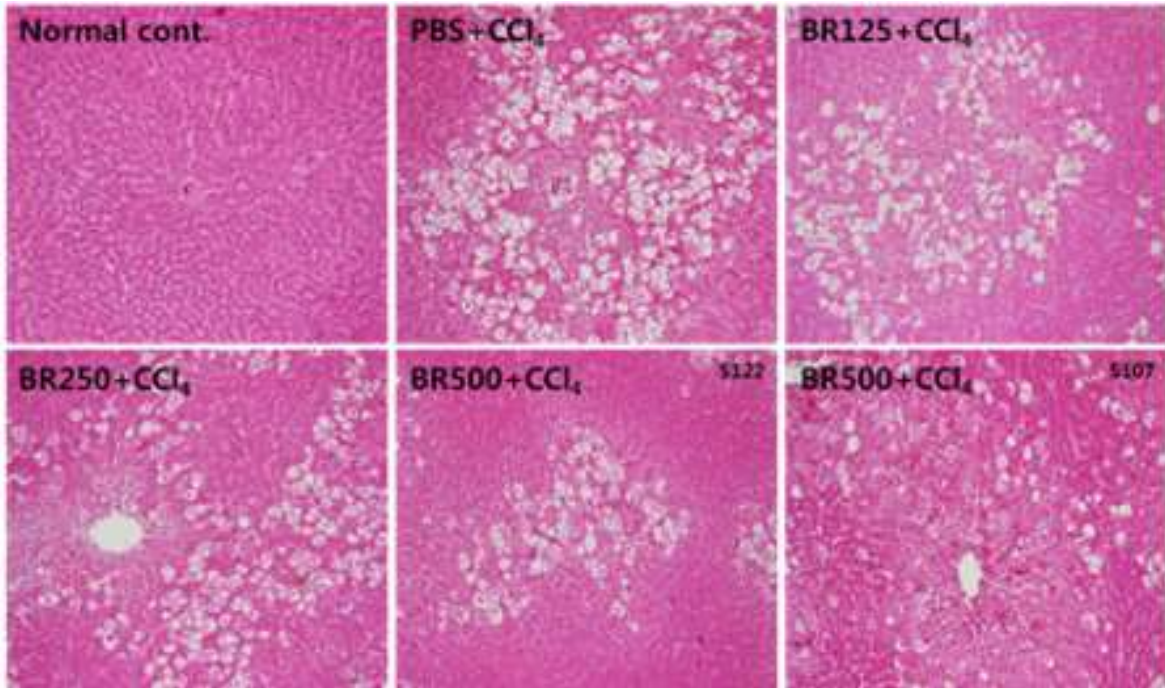


Figure 17. 사염화탄소를 이용한 비알콜성 지방간 모델에서 S107, S122의 조직학적 변화

S107, S122의 지질과산화의 억제능을 평가한 결과, 혈청 및 조직학적 변화와 마찬가지로, 추출물을 투여하지 않은 그룹에 비해 지질과산화가 억제되었고, 추출물을 투여한 그룹에서는 조건별 차이를 보이지는 않았다 (Figure 18).

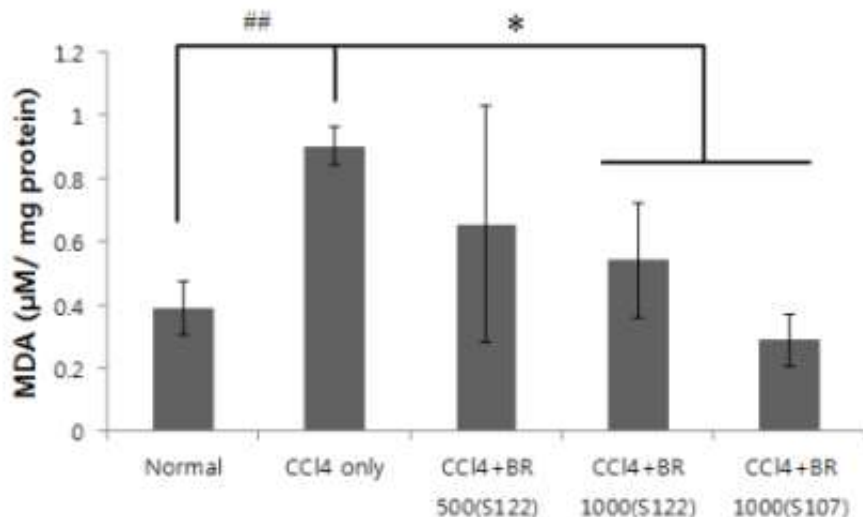
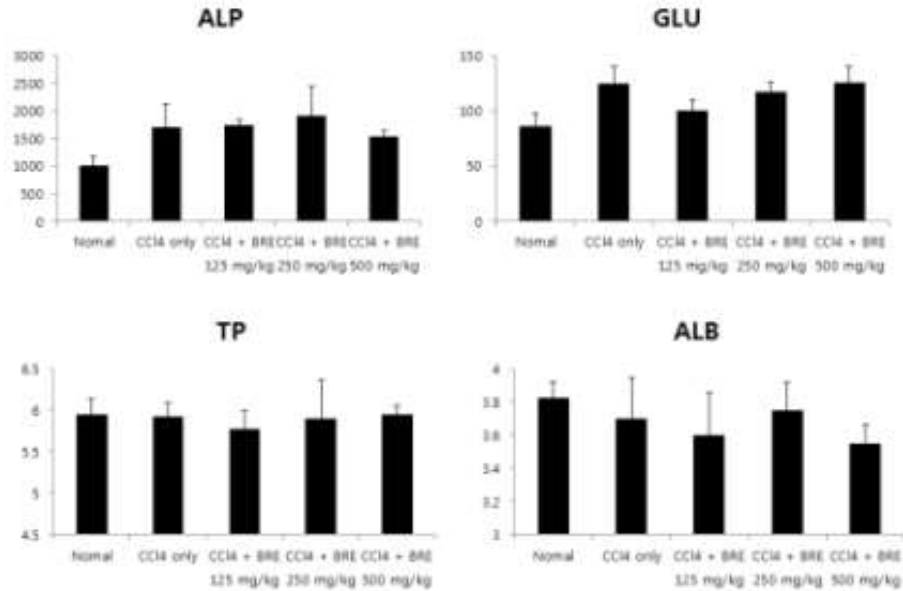


Figure 18. 사염화탄소를 이용한 비알콜성 지방간 모델에서 S107, S122 지질과산화 억제 효과

흑무발효물에 대한 사염화탄소를 이용한 동물모델에서 효능을 평가하였다. 혈청을 이용하여 바이오마커를 분석하였다(Figure 19).

(F)



(J)

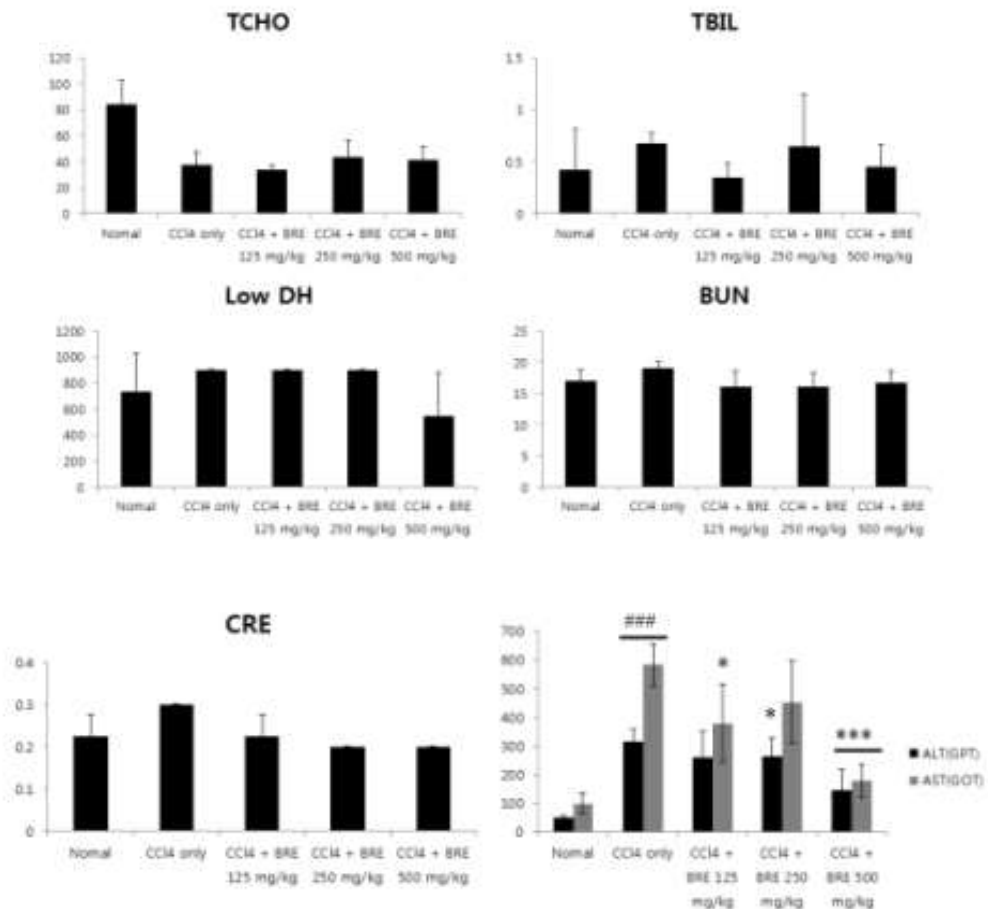


Figure 19. 사염화탄소를 이용한 비알콜성 지방간 모델에서 흑무발효물의 혈청 바이오 마커 분석

분석한 바이오마커 중, 유의성 있는 ALT, AST를 분석한 결과, 흑무발효물 125mg/kg의

농도에서 투여하지 않은 그룹에 비해 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었다.

조직학적 변화를 관찰한 결과, 다른 조건의 추출물들과 마찬가지로 흑무발효물을 투여한 경우, 공포변성 및 염증세포의 침윤, 간세포의 괴사 소견 등이 완화되었음을 확인하였다 (Figure 20).

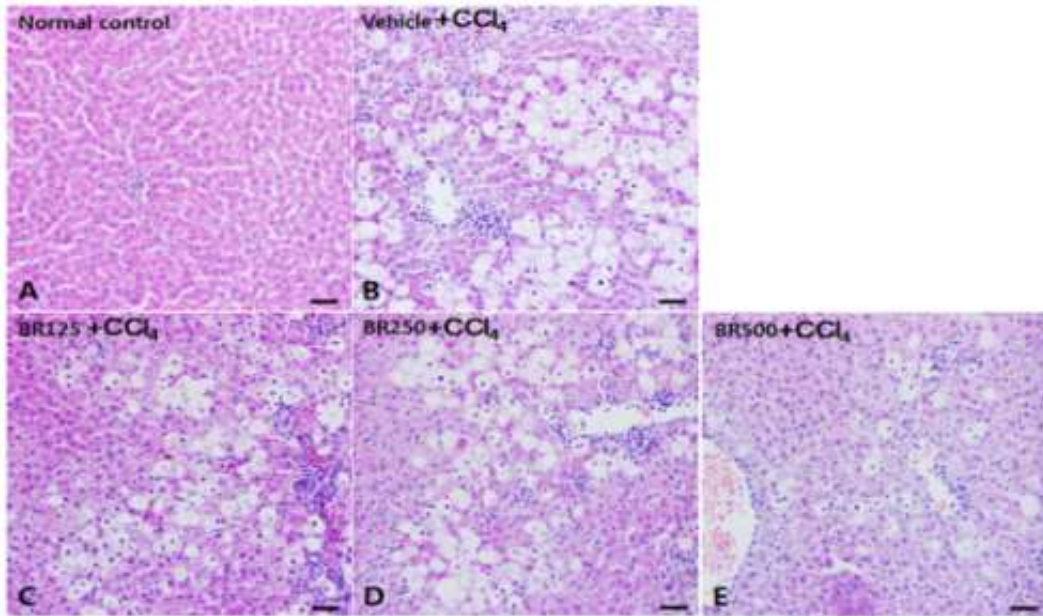


Figure 20. 사염화탄소를 이용한 비알콜성 지방간 모델에서 흑무발효물에 대한 조직학적 분석 결과

흑무발효물이 산화적 손상 시 증가되는 지질과산화를 억제하는 효능을 확인한 결과, 다른 추출물들과 마찬가지로 흑무발효물도 지질과산화를 억제하였다(Figure 21).

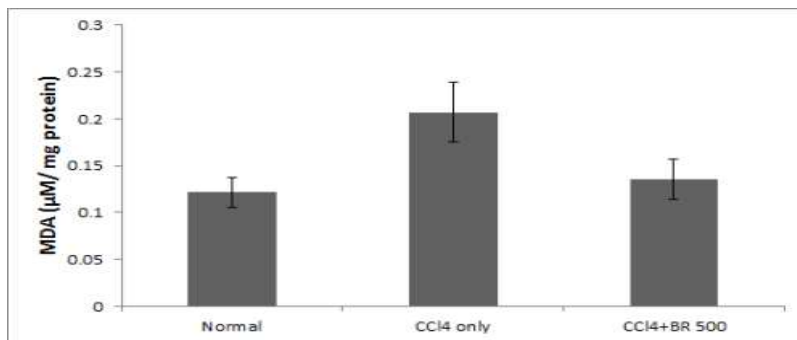


Figure 21. 사염화탄소 유도 비알콜성 지방간 모델에서 흑무추출물의 지질과산화 효능 평가

□ 간손상 지표에 대한 혈청 및 조직학적 분석

화학적간손상 모델 두 종류 (사염화탄소, 아세트아미노펜)와 식이에 의한 비알콜성지방간 유도모델(고지방식이, MCD 식이)에서 추출 조건에 따른 간손상 지표에 대한 분석을 실시하였다. 혈청학적지표 AST, ALT, ALP, GGT, TP, ALB, TCHO, TBIL, LDH, BUN, CRE를 분석하였고, 조직소견상의 지표인 HE염색, Oil red O 염색, 항산화 효과를 확인하기 위해 SOD, Catalase, MDA에 대한 평가를 통해 흑무의 간보호 효과를 확인하였다. 이러한 결과를 아래

의 모식도로 나타내었다(Figure 22).

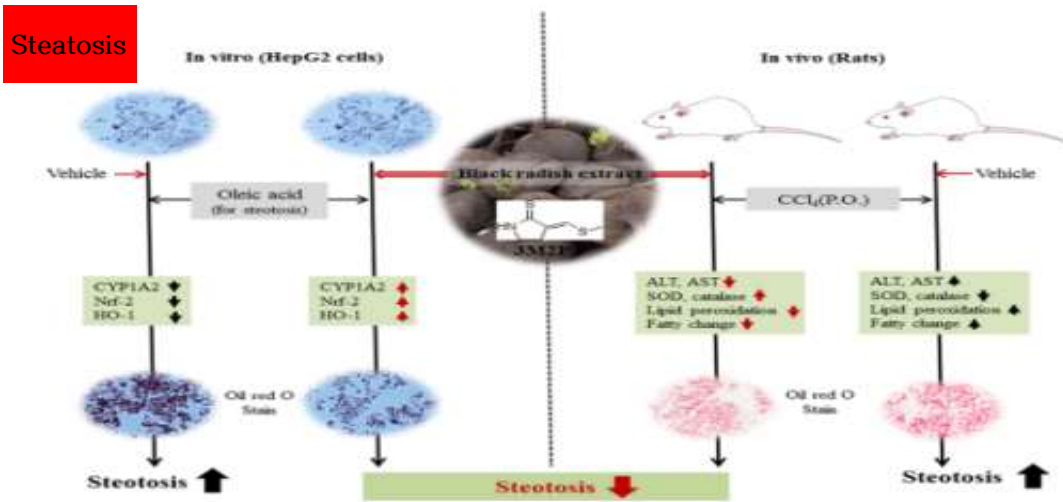


Figure 22. 사염화탄소에 의한 비알콜성 지방간 모델에서 흑무의 효과에 대한 모식도

(5) 결론

이러한 연구내용을 바탕으로, 흑무는 간조직에서 산화적 스트레스에 의해 증가되는 바이오마커 중, ALT, AST, lipid peroxydation, SOD, Catalase 등과 같은 효소를 억제 또는 증가시켜 간을 산화적 스트레스로부터 보호하고, 특히 비알콜성 지방증을 억제시키는 것으로 확인된다. 이러한 과정에서 산화적 스트레스로부터 간을 보호하기 위한 항산화효소의 발현을 증가시켜, 간을 보호했을 것으로 기대된다.

흑무는 비알콜성 지방간에서 지방구의 형성을 억제하였으며, 산화적 손상으로부터 간을 보호하였고, 혈청학적으로 간손상의 지표가 되는 효소들을 감소시키는 결과로 비알콜성 간손상으로부터 간을 보호하였을 것으로 사료된다.

7) 검정무 발효 분말과 비발효 분말의 간보호 효능 비교.

- 사염화탄소를 이용한 비알콜성 지방간 동물모델에서 유도하기 전 분말을 일주일동안 두 분말을 200mg/kg과 400mg/kg을 경구투여 하여 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST) 를 동물모델에서 비교하였음. 그 결과, ALT는 정상 동물에 비해 사염화탄소에 의해 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.01$), 검정무 발효 분말을 400mg/kg을 투여한 경우에만 유의성있게 감소하였다. ($p < 0.05$). 그러나 AST의 변화는 ALT의 변화와 유사하였으나 특히 400mg/kg을 투여한 발효분말과 비발효 분말사이에서 유의성 있는 결과를 확인하였다 ($p < 0.05$). 이는 발효분말이 비발효분말에 비해 효과가 있음을 의미함(Figure 23).

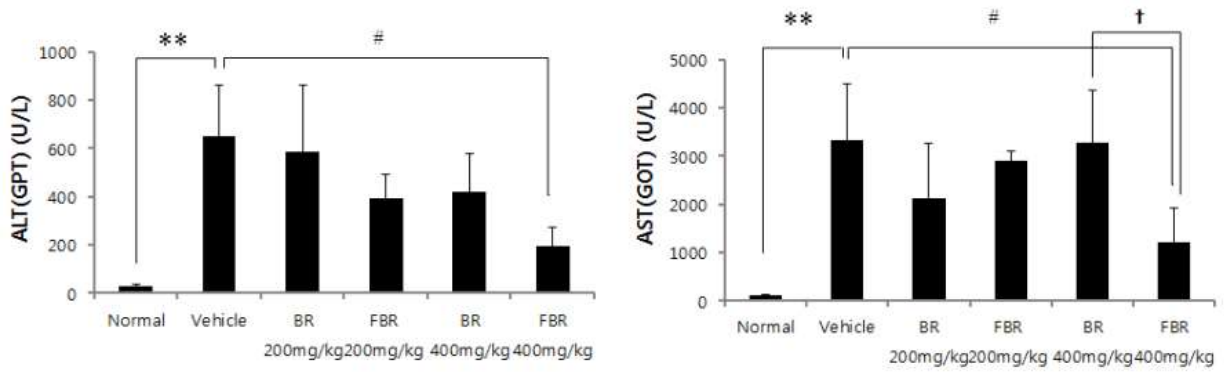


Figure 23. 사염화탄소를 이용한 동물모델에서 검정무 발효 분말과 비발효 분말의 혈청학적 비교

(1) 검정무 발효분말의 사염화탄소 만성 간손상 모델에서의 효능 평가

- 2차년도에는 표준화된 검정무 발효분말을 이용하여 사염화탄소에 의한 급성 간손상 모델에서 효능을 평가하였고, 그 연구의 연속으로 사염화탄소에 의한 만성 간손상을 유도하여 간손상이 지표가 되는 바이오마커를 통해 평가함.
- 8주 동안 사염화탄소를 일주일에 2회씩 투여하면서, 검정무 발효분말을 8주간 매일 투여하였음. 검정무 발효분말의 투여 농도는 50, 100, 200, 400mg/kg으로 투여하였고, 양성 대조군인 silymarin은 100mg/kg으로 농도로 투여하였음.
- 검정무 발효 분말의 혈청학적 효과를 비교한 결과, ALT, AST 모두 정상 동물에 비해 사염화탄소에 의해 유의성 있게 증가하였으며, 검정무 발효 분말 50mg/kg을 투여한 그룹에서부터 모든 그룹에서 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었음. 또한 양성 대조군인 silymarin 100mg/kg과 비교해 보면, 검정무 발효분말은 50mg/kg에서도 유의성 있는 결과를 보임(Table 4).

Table 4. 사염화탄소에 의한 간손상 모델에서 검정무 발효분말의 혈청학적 효능 비교

	ALT (U/L)	AST (U/L)
Normal	47.67 ± 6.66	143.33 ± 22.55
CCl ₄ +Vehicle	2178.67 ± 896.52**	3032 ± 1222.91**
CCl ₄ +Silymarin100mg/kg	1298.67 ± 344.10**.#	2406.67 ± 81.22***
CCl ₄ +FBR50mg/kg	1228 ± 148***.#	1316 ± 96.99***.#
CCl ₄ +FBR100mg/kg	1233.33 ± 484.02**	1860 ± 684.40**
CCl ₄ +FBR200mg/kg	1329.33 ± 404.18**	1646.67 ± 804.33**.#
CCl ₄ +FBR400mg/kg	1580 ± 558.27**	2604 ± 1394.01**

Values are means ± SEM.

** p < 0.01, ***p<0.001vs.Normalcontrolgroup.

p < 0.05, ##p<0.01vs.CCl₄+Vehiclegroup.

Abbreviations. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; FBR: fermented black radish

- 간조직의 손상 정도를 비교한 결과, 사염화탄소의 유도 간의 조직에서의 변화는 중심정맥 주변 공포 변성 및 염증세포의 침윤, 중심정맥 주변 조직의 괴사를 특징으로 함. 이러한 조직 손상 정도가 검정무 발효 분말에 의해 변화가 있는 지를 조직표본을 통해 확인한 결과, 정상 간 조직에서는 간세포의 배열이 규칙적이고, 공포변성이나 염증세포의 침윤이 확인되지 않으나, 대조군인 간조직에서는 중심정맥 주변의 공포 변성 및 염증세포의 침윤이 확인된다. 이러한 변화는 검정무 발효분말 50mg/kg을 투여한 그룹에서부터 투여한 모든 농도에서 유사한 결과를 확인할 수 있었고, silymarin를 투여한 그룹과도 유사한 결과를 확인할 수 있었음 (Figure 24).

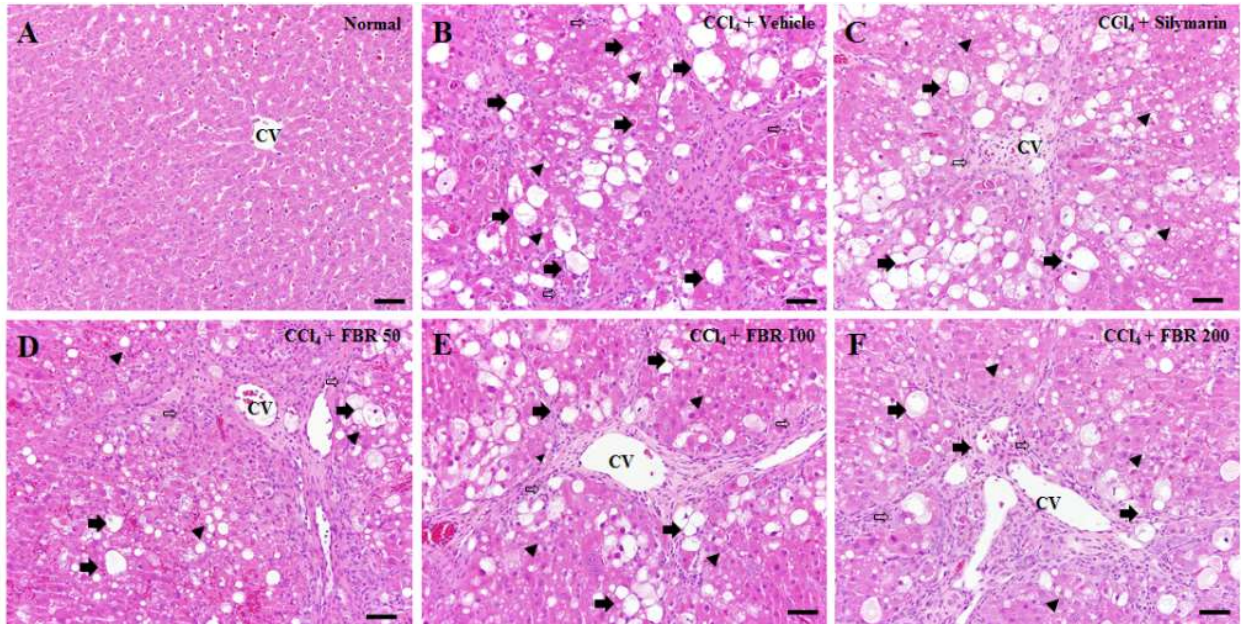


Figure 24. 조직학적 비교. Arrows, hydropic degeneration; arrowheads, vacuolation; hollow arrows, inflammatory cells; necrosis; CV, central vein. Scale bars = 50 μ m.

- 만성 간손상 동물모델에서, 간에서 만성시 나타나는 섬유화에 대한 평가를 실시함. 섬유화 정도는 Sirius-red 염색법을 이용하여, 간조직 내 콜라겐이 침착된 섬유소에 양성반응이 나타나며, image J 프로그램을 이용하여 그 양을 정량하여 평가하였음.
- 그 결과, 사염화탄소에 의해 간의 섬유화가 증가되었고($p < 0.001$), 검정무 발효 분말에 의해 간섬유화가 유의성 있게 감소함을 확인하였음 ($p < 0.01$) (Figure 3)
- 또한 사염화탄소에 의한 간손상시 간조직 내에 염증세포인 쿠퍼세포가 활성화되는데, 이러한 쿠퍼세포의 활성을 검정무 발효분말이 억제할 수 있는지를 Iba-1 항체를 이용하여 평가하였음.
- 그 결과, Sirius red 염색 결과와 유사하게 쿠퍼세포의 활성화도 확인되었음(Figure 25). 사염화탄소에 의해 쿠퍼세포의 활성이 증가되었으나 ($p < 0.01$), 검정무 발효 분말에 의해 유의성 있게 감소되었음을 확인함(Figure 26).

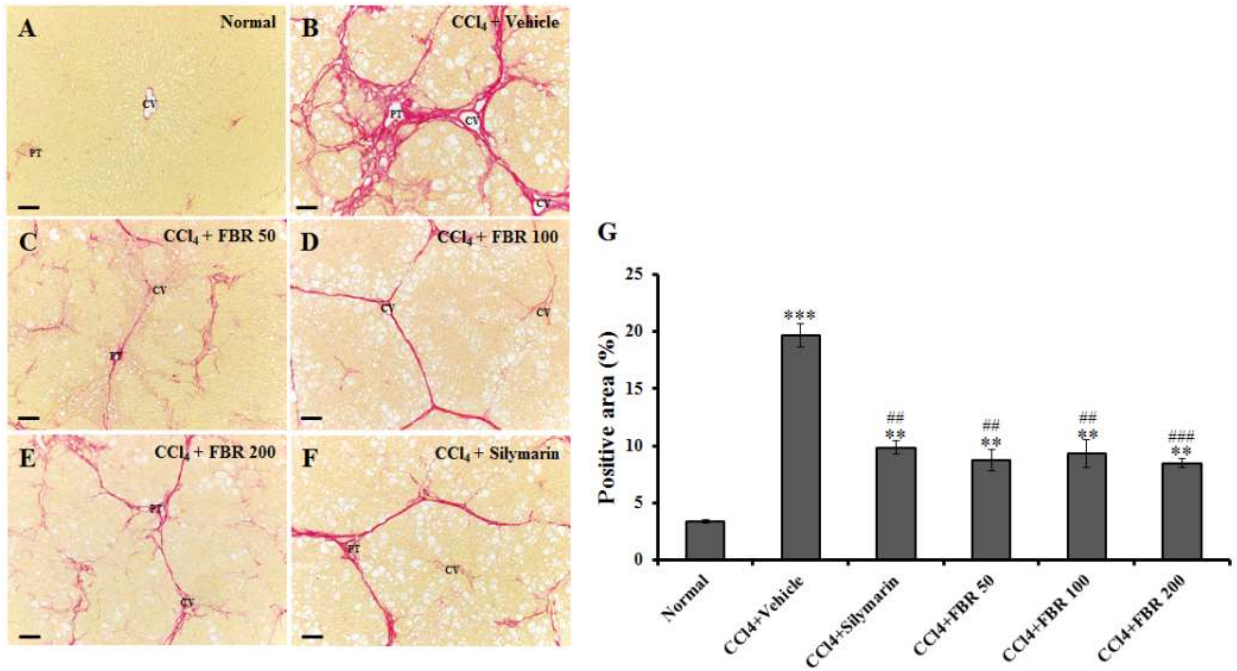


Figure 25. Sirius red 염색을 이용한 간의 섬유화 상태에서의 검정무 발효 분말의 효능평가, CV, central vein; PT, portal triad. Scale bars = 100 μ m.

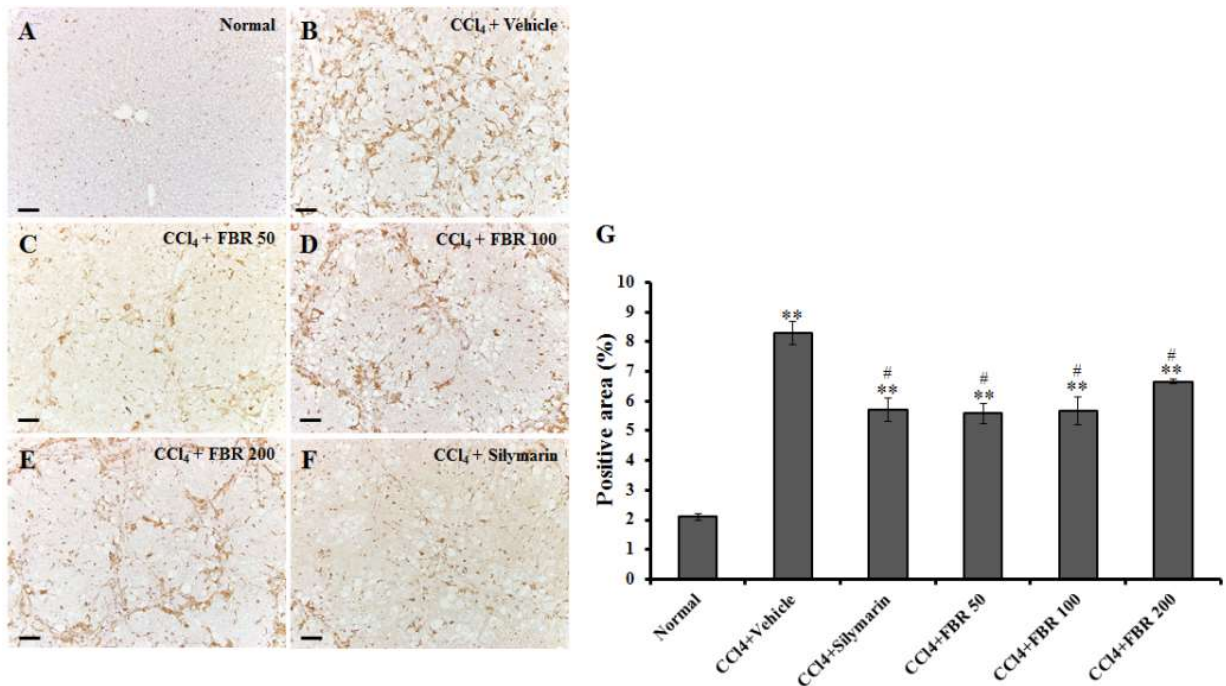


Figure 26. 검정무 발효 분말의 투여가 Iba-1 염색을 이용한 간조직내 활성화된 염증세포의 침윤억제 효과. Scale bars = 50 μ m.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 검정무 발효 분말은 양성대조군인 silymarin과 같이 사염화탄소에 의한 만성 비알콜성 지방간 동물모델에서 혈청학적 변화, 지방간증의 간조직의 변화, 간의 섬유화 및 염증세포의 활성화 억제 효과를 통해 간을 보호하였을 것으로 생각

됨.

(2) 검정무 발효분말의 MCD diet에 의한 간손상 모델에서의 효능 평가

○ MCD diet를 이용한 동물모델 개발하였음.

- Choline과 methionine 은 간에서 지방 대사에 아주 중요한 역할을 함. 비정상적인 지방의 축적을 예방함. 간에서 축적된 지방을 제거해 주는 “lipotropic” factor 역할을 함 (Figure 27).

Metabolism of methionine-choline related steps for fatty acids synthesis

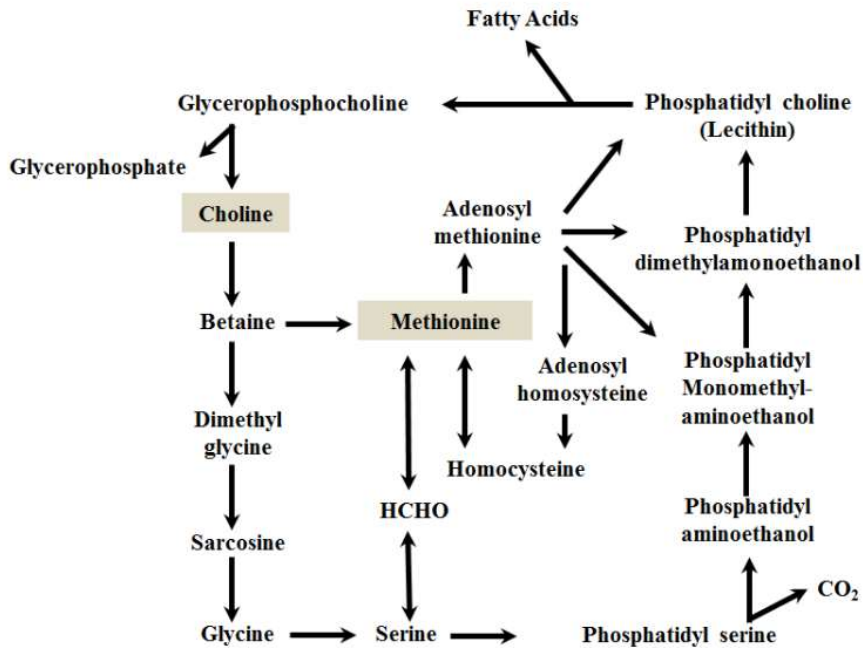


Figure 27. Methionine과 choline의 지방대사기전

○ MCD diet를 8주간 급여한 후, 계속 MCD diet를 급여하면서 4주 동안 검정무 발효분말을 4농도 (50, 100, 200, 400 mg/kg)로 매일 경구 투여 하였다. 정상대조군은 normal diet를 같은 기간 급여하였고, 양성대조군으로 silymarin을 100mg/kg으로 같은 기간 같은 방법으로 투여하였음(Figure 28).

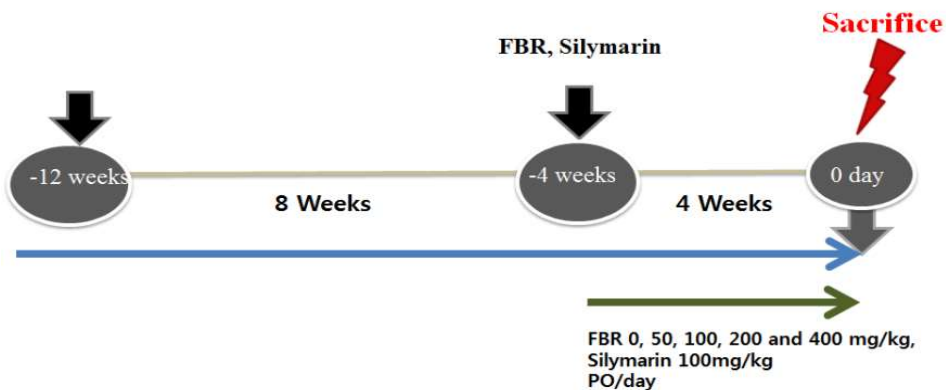


Figure 28. MCD diet에 의한 비알콜성지방간 동물모델에서 검정무 발효분말 (FBR)의 효능 평가를 위한 실험 설계

○ 혈청학적 바이오마커의 변화

- 투여 종료 후, 심장으로 혈액을 채취한 후, 혈청을 분리하여 혈청학적 바이오마커인 ALT, AST, alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (TCHO), Triglyceride (TG)와 glucose (GLU)를 분석하였음.
- 모든 바이오마커가 정상동물에 비해 검정무 발효분말을 투여하지 않은 MCD에 지방간이 유도된 동물에서 유의성 있게 증가하였음.
- ALT의 변화는 검정무 발효분말을 투여한 경우, 각 농도별 그룹에서 모두 유의성 있는 결과를 확인하였음. AST, ALP, GLU인 경우 200mg/kg농도로 투여한 그룹에서 유의성 있는 결과를 확인하였음. (p<0.05). 또한 TG의 변화는 100mg/kg의 농도부터 유의성 있는 결과를 확인하였음. TCHO에는 유의적인 변화가 없었으며, 양성 대조군인 silymarin은 모든 혈청 바이오마커에서 유의성 있는 결과를 확인하였다(Table 5)

○ 조직학적 변화

- 실험종료 후, 간조직을 채취한 후, 4% paraformaldehyde 에 고정한 후, 통상적인 방법으로 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였고, 현미경으로 검사하였음.
- 조직학적 손상정도의 평가는 Kleiner et al., (2005)의 non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score (NAS) 평가방법을 이용하여 비교하였음. 간조직에서 steatosis (0-3), lobular inflammation (0-2), hepatocellular ballooning (0-2) 정도를 각각 지시된 단계로 평가하였음.
- 그 결과, 정상조직에 비해 MCD diet 로 유도된 대조군은 모두 손상 정도가 유의성 있게 증가되었고, 검정무 발효분말을 투여한 경우 100mg/kg 투여군부터 모두 평가 지표가 유의성 있게 감소하였음(Figure 29).

Table 5. Biochemical analysis of sera from MCD-induced NALFD mice with or without FBR treatment.

Group	Treatment	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	TCHO (mg/dl)	GLU (mg/dl)	TG (mg/dl)
I	Normal control	84.3 ± 2.8	16.8 ± 0.3	63.8 ± 6.4	75.6 ± 3.3	256.5 ± 15.5	45.8 ± 3.3
II	MCD + Vehicle	528.4 ± 37.9 ^{***}	447.2 ± 178.7 ^{**}	129.0 ± 16.0 ^{**}	34.4 ± 10.9 ^{**}	96.8 ± 12.6 ^{***}	65.8 ± 7.2 [*]
III	MCD + FBR 50	562.2 ± 57.8	407.0 ± 57.7	133.8 ± 11.7	29.5 ± 1.0	94.9 ± 5.4	62.5 ± 8.2
IV	MCD + FBR 100	334.3 ± 11.9 [#]	299.3 ± 31.5	118.0 ± 8.2	18.4 ± 1.9	160.7 ± 10.7 ^{##}	30.8 ± 2.1 ^{##}
V	MCD + FBR 200	248.7 ± 4.6 ^{##}	238.9 ± 30.6 [#]	88.8 ± 13.3 [#]	25.6 ± 3.8	133.8 ± 23.2	25.4 ± 6.5 ^{##}
VI	MCD + FBR 400	360.8 ± 37.3 [#]	377.3 ± 71.4	103.6 ± 3.5	27.2 ± 3.2	151.2 ± 11.1	30.0 ± 3.9 ^{##}
VII	MCD + Silymarin 100	309.6 ± 13.4 [#]	193.2 ± 33.9 [#]	86.0 ± 8.04 [#]	22.6 ± 1.0	143.7 ± 10.6 [#]	22.2 ± 1.7 ^{##}

Each value is represented as the mean ± S.E.

*** P < 0.001 vs. normal control group, # P < 0.05, ## P < 0.01 vs. vehicle-treated MCD induced NAFLD group.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, Alkaline phosphatase, TCHO, total cholesterol; GLU, glucose

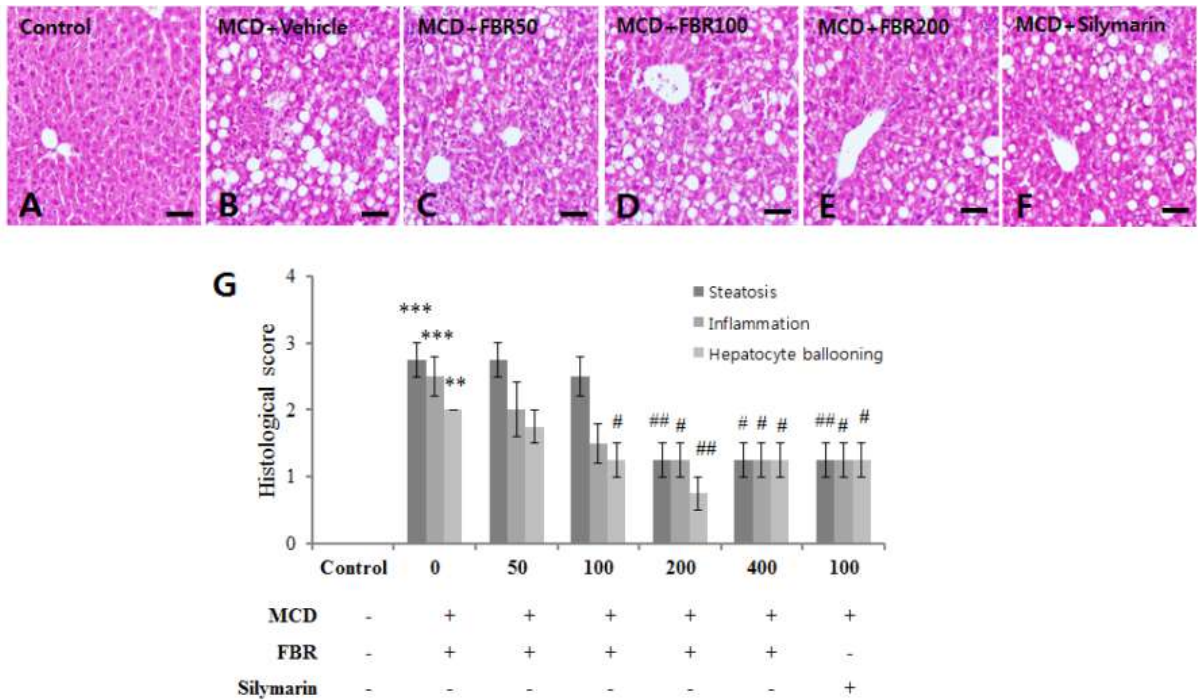


Figure 30. 검정무 발효분말의 조직학적 분석 (HE staining, scale bar=50um)

○ 지방구 형성 억제 효과

- 간조직에서 Oil-red O 염색을 통해 검정무 발효분말이 지방구 형성을 억제하였는지를 평가하였음.
- 그 결과, 정상 간조직에서는 지방구 형성이 거의 관찰되지 않았으나, 검정무 발효분말을 투여하지 않은 동물의 간조직에서는 붉은색으로 염색된 지방구가 거의 대부분의 간조직 안에 형성된 것을 확인 할 수 있었고, 검정무 발효분말을 투여한 동물의 간에서는 지방구 형성이 덜 되었음을 확인하였음 (Figure 30).
- 이러한 지방합성에 관여하는 유전자의 변화를 3T3-L1 세포주에서 지방구로 분화시킨 후, 지방구 형성과 관련된 단백질인 ap2, C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , SREBP1, FAS, p-ACC 를 이용하여 검정무 발효분말에 의해 억제되는지를 웨스턴블롯팅 방법으로 비교 분석하였다. 그 결과, 이러한 지방합성과 관련된 단백질이 모두 검정무 발효분말에 의해 완화되었음을 확인하였다 (Figure 31). 이러한 결과는 검정무 발효분말이 간에서 지방구 형성을 억제시켰을 것으로 기대됨.

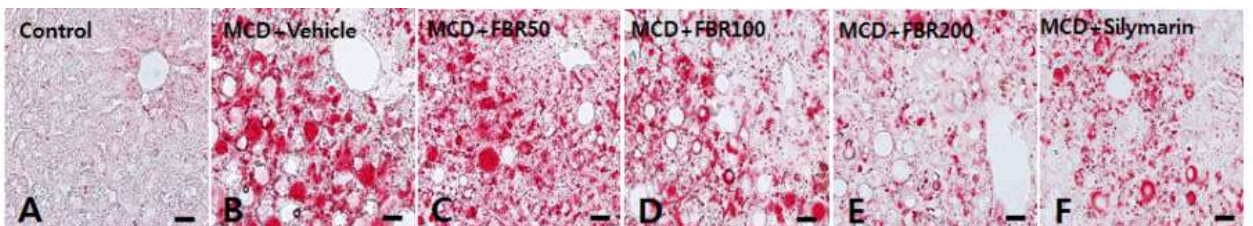


Figure 30. Oil-red O 염색을 통한 검정무 발효분말의 지방구 형성 억제 결과

○ 염증 억제 효과

- 간조직에서 검정무 발효분말이 MCD diet 에 의해 유도된 간의 염증을 억제하는 지를 Iba-1 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 실시하였음.
- 그 결과, 간의 활성화된 염증세포가 검정무 발효분말을 투여한 경우, 감소하였음을 확인함 (Figure 31). 또한 염증매개물질로 알려져 있는 inducible Nitric Oxide (iNOS) 유전자의 발현을 real time PCR 기법을 이용하여 확인하였음.
- 그 결과, iNOS 의 발현은 정상 동물의 간조직에 비교해 볼 때, 검정무 발효분말을 투여하지 않은 MCD diet 로 비알콜성 지방간에 유도된 동물의 간조직에서 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.01$), 검정무 발효분말을 투여한 동물의 간조직에서 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$). 또한 양성대조군인 silymarin 을 투여한 경우에도 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$) (Figure 31). 이러한 결과는 검정무 발효분말이 비알콜성 지방간이 유도된 동물에서 유의성 있게 간의 염증을 완화시켰음을 의미한다.

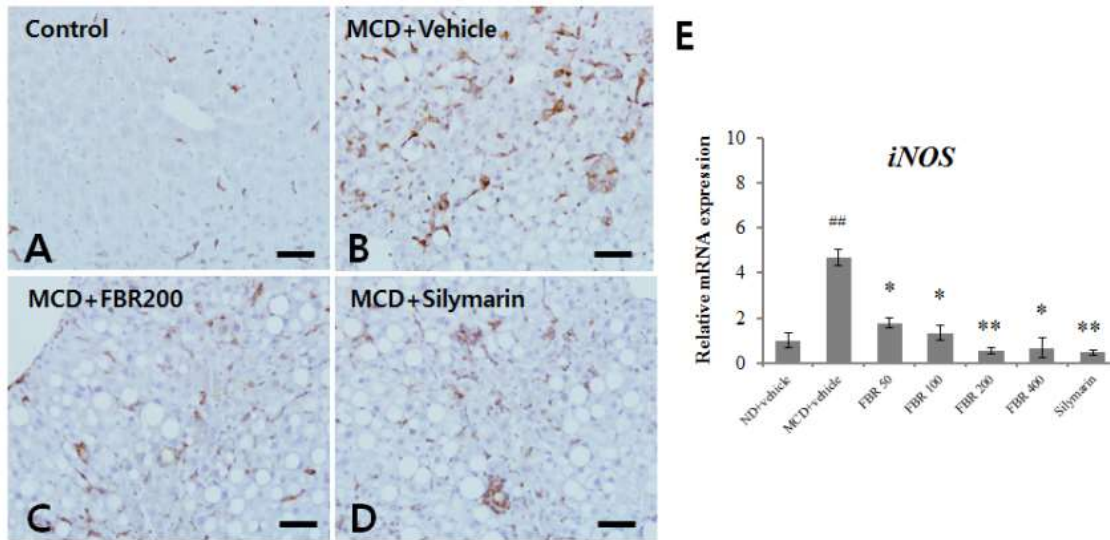


Figure 31. 검정무 발효분말의 간조직에서의 염증 억제 효과

○ 섬유화 억제 효과

- 간조직에서 검정무 발효분말이 MCD diet 에 의해 유도된 간의 섬유화를 억제하는 지를 Sirius-red 염색을 실시하여 평가하였다 (Figure 32). 간의 섬유화 정도를 image J software 를 이용하여 양성 면적을 평가한 결과, 정상 동물에 비해 MCD diet 에 의해 유도된 검정무 발효분말을 투여하지 않은 그룹에서 유의성 있게 증가하였고, 검정무 발효분말을 유의성 있게 완화시켰다 ($p < 0.05$) (Figure 32). 또한 간의 섬유화를 Ishak staging system 평가방법을 이용하여 평가하였다. 이 평가는 0-6 단계로 나누어 지고, 0 은 섬유화가 없는 정도, 1 은 일부 문맥에서 섬유화가 관찰되고 간소엽 사이에는 섬유화가 있거나 없는 정도, 2 는 대부분의 문맥에서 섬유화가 관찰되고 간소엽 사이에는 짧은 섬유화가 있는 정도, 3 은 대부분의 문맥에서 섬유화가 관찰되고 때때로 문맥과 문맥사이에 섬유화가 연결된 정도, 4 는 대부분의 문맥에서 섬유화가 관찰되고 대부분 문맥과 문맥사이, 문맥과 중심정맥사이에 섬유화가 연결된 정도, 5 는 4 의 상태에서 일부 섬유화 덩어리가 관찰되는 경우, 6 은 완전한 모든 조직에서 경화소가 관찰되는 경우로 나누어 평가하였다.

- 그 결과, 정상동물의 간조직은 약 1 정도였으나 MCD diet 에 의한 섬유화는 유의성 있게 증가되었고 ($p < 0.01$), 검정무 발효분말을 투여한 경우 모두 유의성 있게 감소함을 확인하였다. 또한 양성 대조군인 silymarin 도 같은 결과를 확인하였다 ($p < 0.05$ vs 50 과 100; $p < 0.01$ vs. 200, 400 그리고 silymarin)(Figure 32).
- 또한 간 섬유화와 관련된 유전자인 TGF β 1, Col1A1 과 α -SMA 의 변화를 real time PCR 기법을 이용하여 비교하였다. 그 결과, 이 유전자가 정상 간조직에 비해 MCD diet 에 의해 비알콜성 지방간이 유도된 간조직에서 유의성 있게 증가하였고, 검정무 발효분말을 투여한 경우, 유의성 있게 감소함을 확인하였다 (Figure 13). 이러한 결과는 검정무 발효 분말이 TGF β 1, Col1A1, α -SMA 와 같은 유전자의 변화를 통해 간의 섬유화를 억제시켰음을 의미한다(Figure 33).

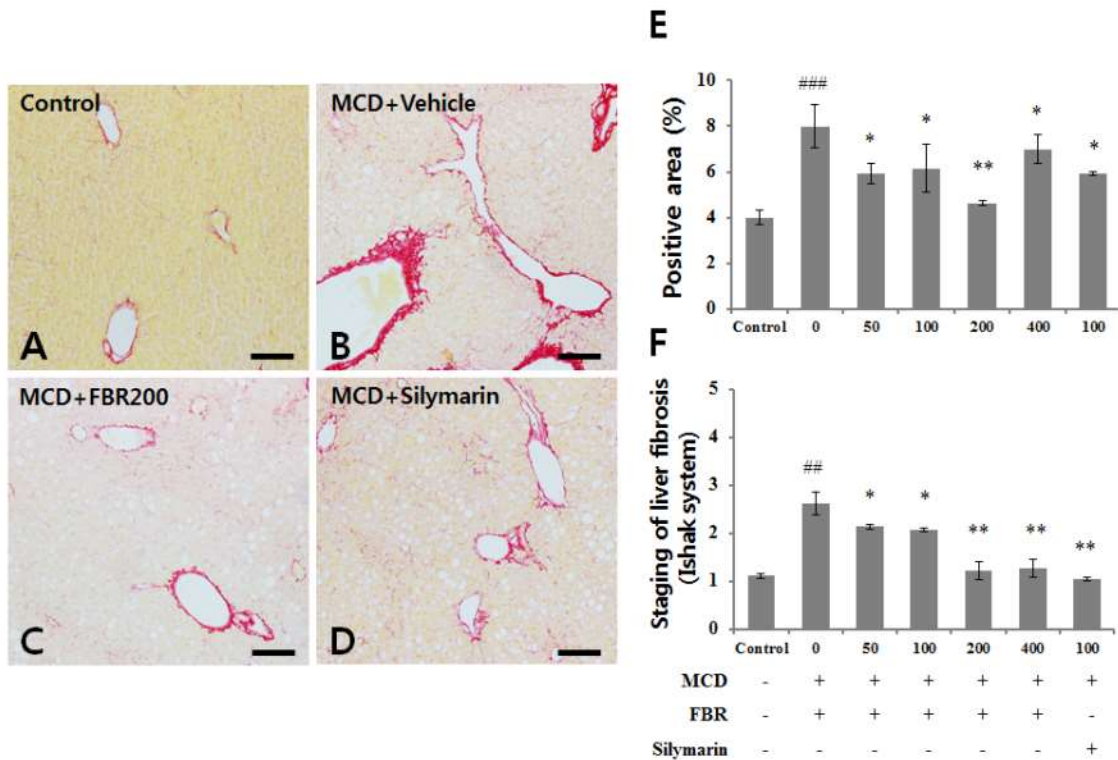


Figure 32. 검정무 발효 분말의 간의 섬유화 억제 효과

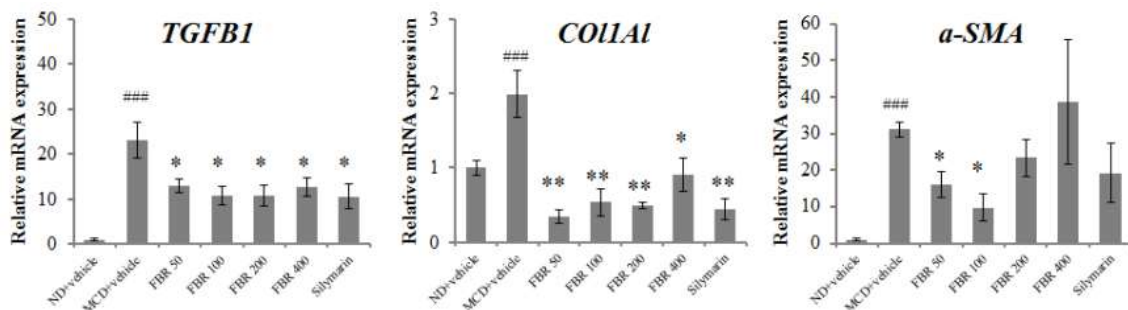


Figure 33. 간의 섬유화와 관련된 유전자의 변화

이상의 결과를 종합해 볼 때, 검정무 발효 분말은 MCD diet 에 의해 유도된 비알콜성 지방간 동물모델에서 간손상의 혈청학적 지표들을 통해 간손상이 완화되었음을 확인

하였고, 간의 조직학적 소견이 완화되었으며, 간의 지방구 침착, 간의 염증 및 간의 섬유화를 억제시켰을 것으로 기대 된다(Figure 34).

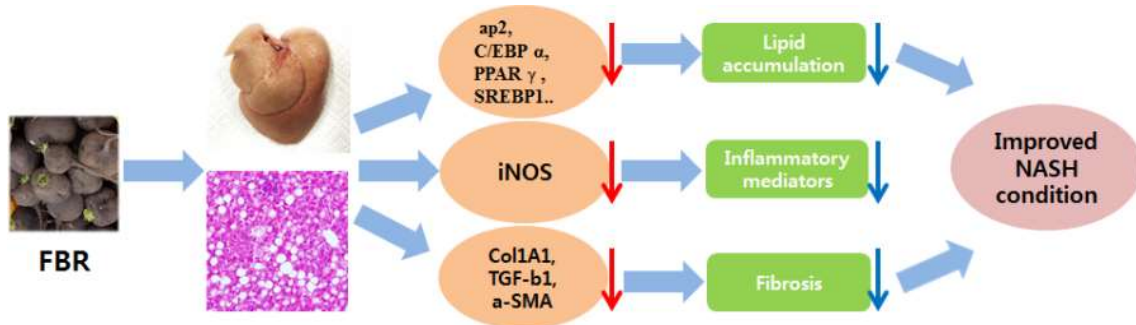
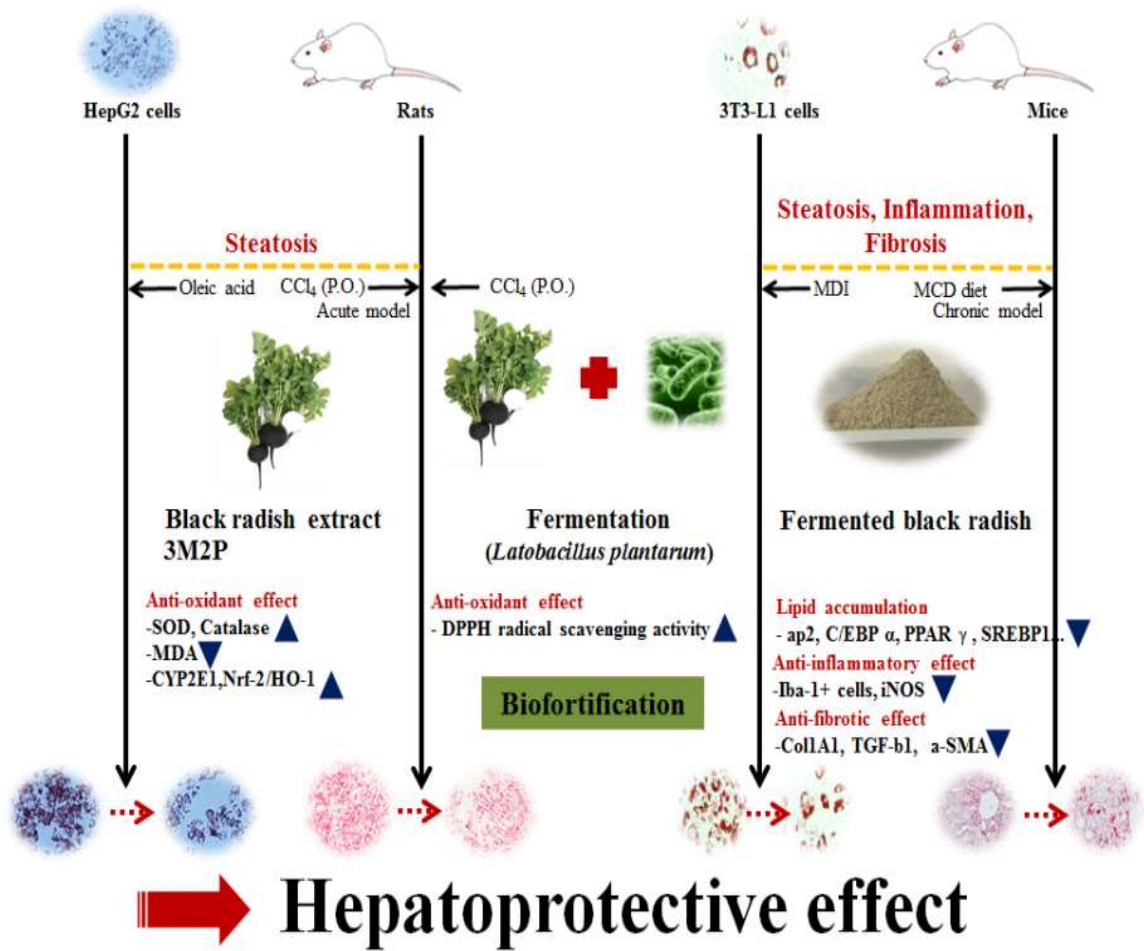


Figure 34. 검정무 발효분말의 비알콜성 지방간 완화 기전에 대한 요약

○ 검정무 추출물과 발효물의 효능에 대한 요약

검정무 추출물과 발효물에 대한 효능을 요약하면, 화학적 간손상인 사염화탄소에 의한 급성과 만성 모델과 식이에 의한 MCD diet에 의한 비알콜성 지방간 모델에서 산화적 손상으로부터 간을 보호하고, 간의 지방증 및 염증세포의 침윤 억제, 간의 섬유화 억제 기전을 통해 간이 보호되었을 것으로 사료 됨.



8) 구축된 동물모델을 이용한 검정무 발효 분말의 효능 평가 및 단일물질에 대한 효능평가

- 검정무에 주 성분 중 글루코시놀레이트 중 한 종류인 indol-3-carbinol(I3C)에 대한 효능 시험화탄소를 주사한 비알콜성지방간 동물모델에서 평가함. 그 결과 간의 혈청학적 변화 및 조직학적 변화에서 효능이 있음을 확인하였음.
- 혈청학적 분석 결과, AST와 ALT 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 확인함 (Figure 35)

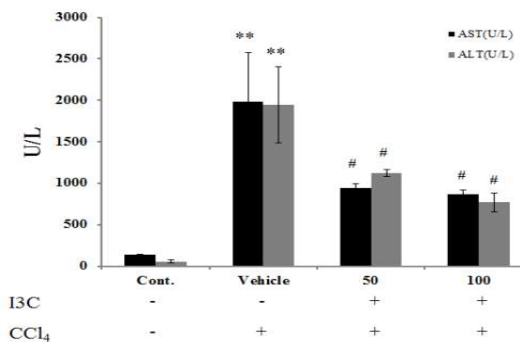


Figure 35. Effects of pretreatment with indole-3-carbinol (I3C) on alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels in the livers of mice with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity.***P < 0.001 vs. vehicle-treated CCl₄ groups

- 조직학적 분석 결과, 간에서 손상부위의 면적이 감소하였음을 확인함(Figure 36).

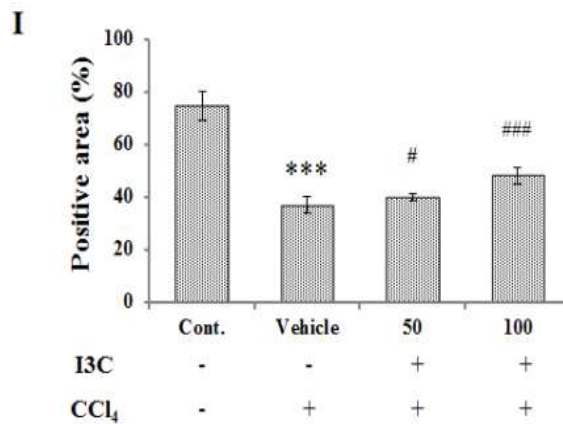
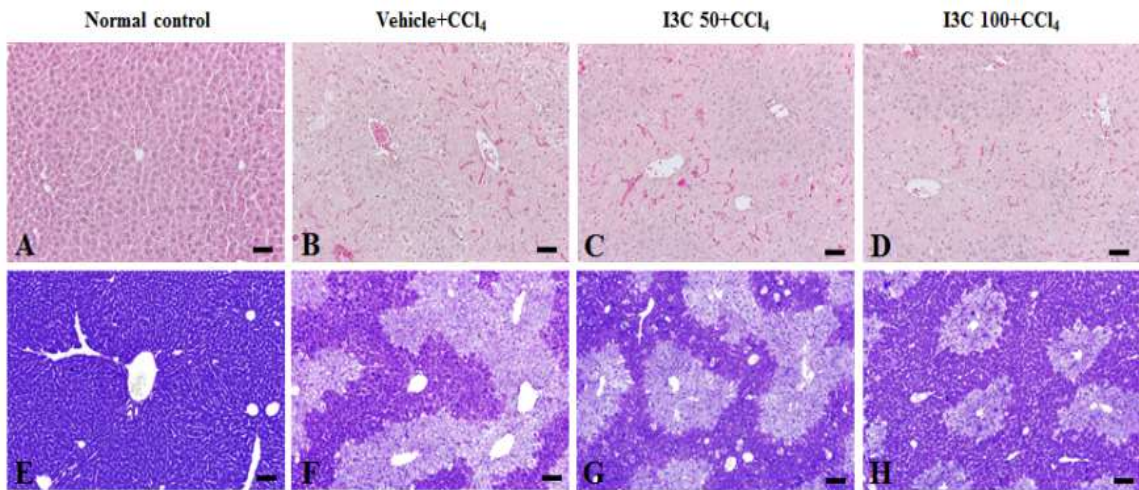


Figure 36. I3C 투여 후, 간조직의 조직학적 소견 *** $P < 0.001$ vs. normal control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle-treated CCl_4 group. Scale bars=50µm.

- 간조직 내 염증세포의 침윤정도를 면역염색을 이용하여 확인 한 결과, 염증세포가 침윤된 면적이 I3C를 투여한 경우에 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 확인하였음 (Figure 37)

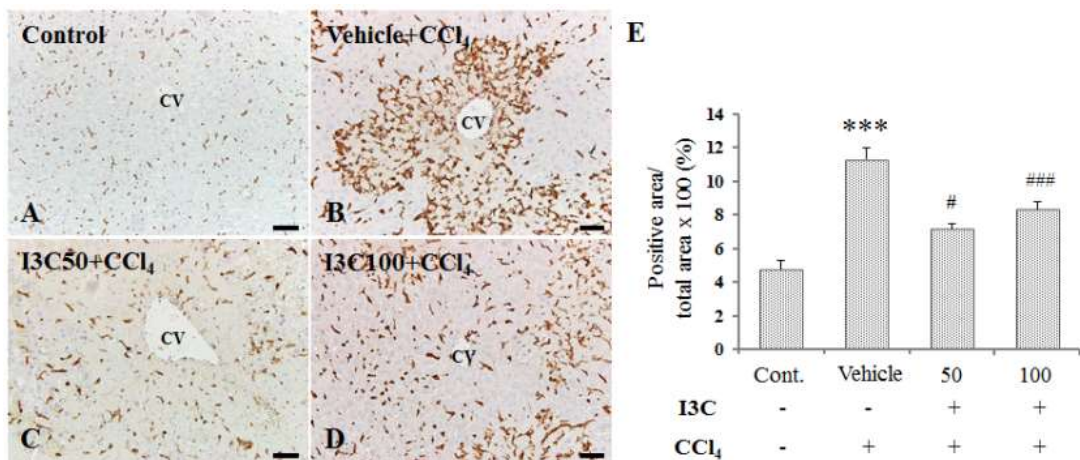


Figure 37. 염증세포 침윤정도에 따른 간조직의 현미경 소견. CV, central vein. *** $P < 0.001$ vs. normal control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. vehicle-treated CCl_4 group. Scale bars=50µm.

- 이상의 결과를 종합해 볼 때, 검정무 중, 글루코시놀레이트의 한 성분인 I3C은 지방구 생성을 억제하고 간조직에서의 염증을 억제하여 간세포를 보호하였을 것으로 생각됨 (Figure 38).

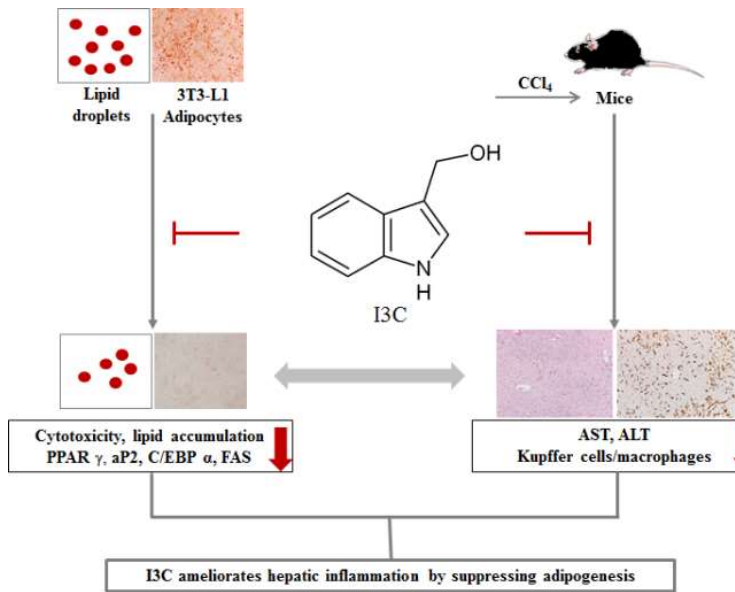


Figure 38. Schematic diagram of the hepatoprotective mechanism of I3C *in vitro* and *in vivo*

9) 어린 검정무 발효 추출물에 대한 효능을 고지방식이 사료를 급여한 비만 모델에서 항비만 효능 및 대사성 질환 관련 인자들을 평가.

(1) 고지방식이 급여 동물모델을 이용한 어린 검정무의 발효물의 효능 평가

60% 고지방식이를 8주간 급여 후, 2주 동안 어린 검정무 발효 분말을 투여하여 평가함 (Figure 39)

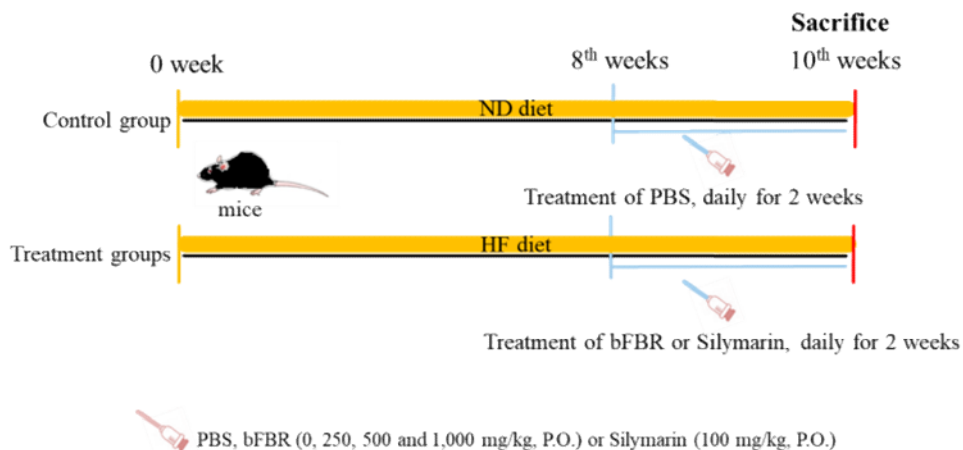


Figure 39. 실험계획에 대한 모식도

- 체중의 변화를 측정한 결과 8주간 고지방식이를 한 그룹에서 체중이 유의성 있게 증가하였고, 체중이 증가된 개체를 선별하여 어린검정무 발효 분말을 투여하여 바이오마커를 분석하였음.
- 체중 증가율의 증가가 검정무어린분말을 투여한 경우에 증가율의 감소하는 것을 확인하였

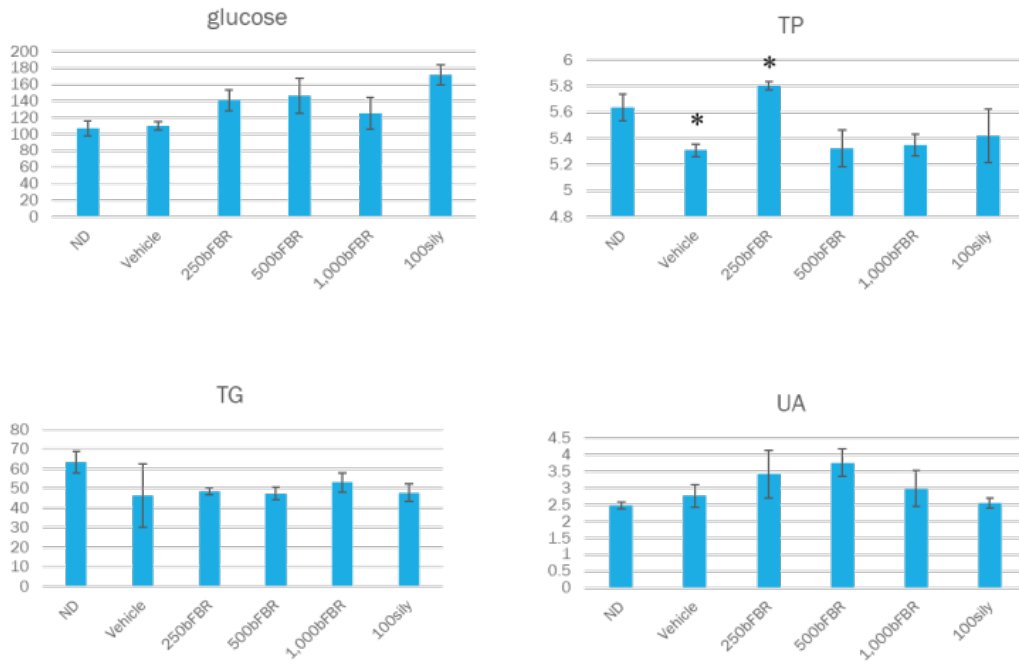


Figure 41. 혈청학적 검사 결과

- 혈액학적 검사 결과, 총단백질 (total protein, TP)의 변화가 어린 검정무 발효 분말 250mg/kg을 투여한 경우 유의성 있는 차이를 나타냈고, 다른 항목에서는 유의성 있는 결과를 관찰할 수 없었음(Figure 41).
- 부고환 지방의 무게를 측정한 결과, 대조군은 정상 그룹에 비해 유의성있게 증가하였으며, 어린검정무 발효분말 500mg/kg을 투여한 경우, 유의성 있게 감소함을 확인하였음 (Figure 42).

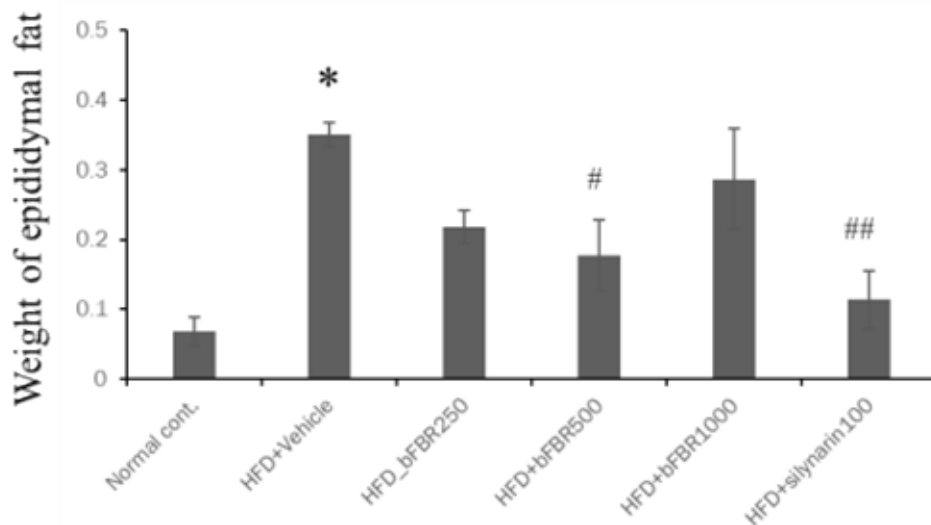


Figure 42. 부고환지방의 무게 변화

- 조직학적인 변화를 헤마톡실린-에오진 염색을 통해 분석한 결과, 고지방식을 투여한 마우스의 간조직은 간세포의 괴사 및 지방변성이 관찰되었고, 어린 검정무 발효 분말을 투여한 경우 그 정도가 완화되었음을 확인하였음(Figure 43).

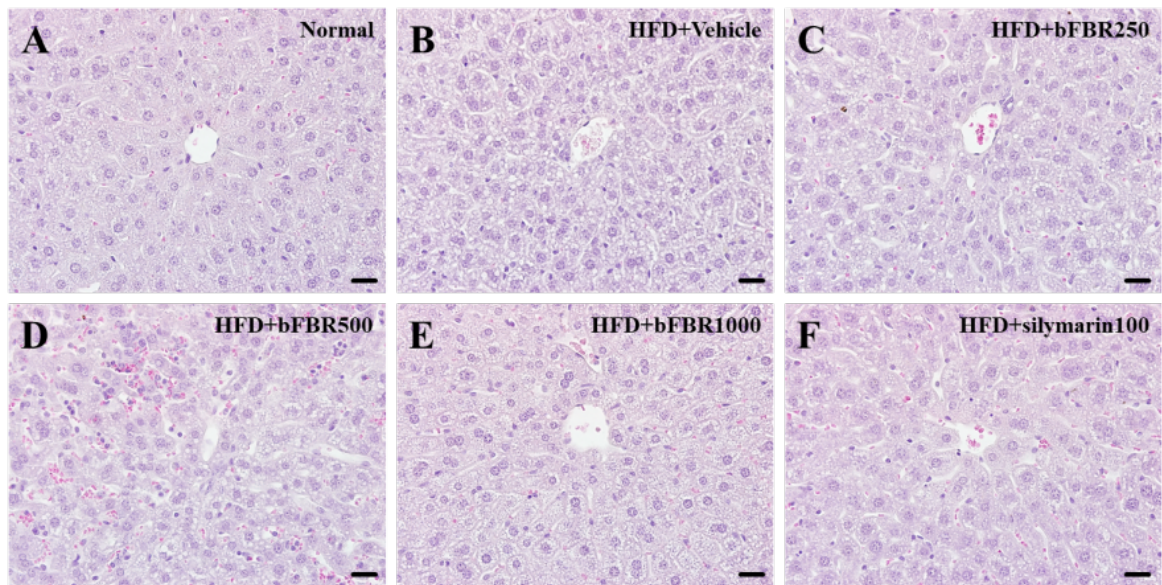


Figure 43. 간조직의 헤마톡실린-에오진 염색 결과

- 조직내 염증세포의 침윤을 염증세포를 확인할 수 있는 Iba-1 항체이용하여 면역조직화학 염색을 이용하여 분석한 결과, 어린 검정무 발효 분말 1,000mg/kg을 투여한 경우 유의성 있게 ($p < 0.05$) 염증이 감소함을 확인함(Figure 44).

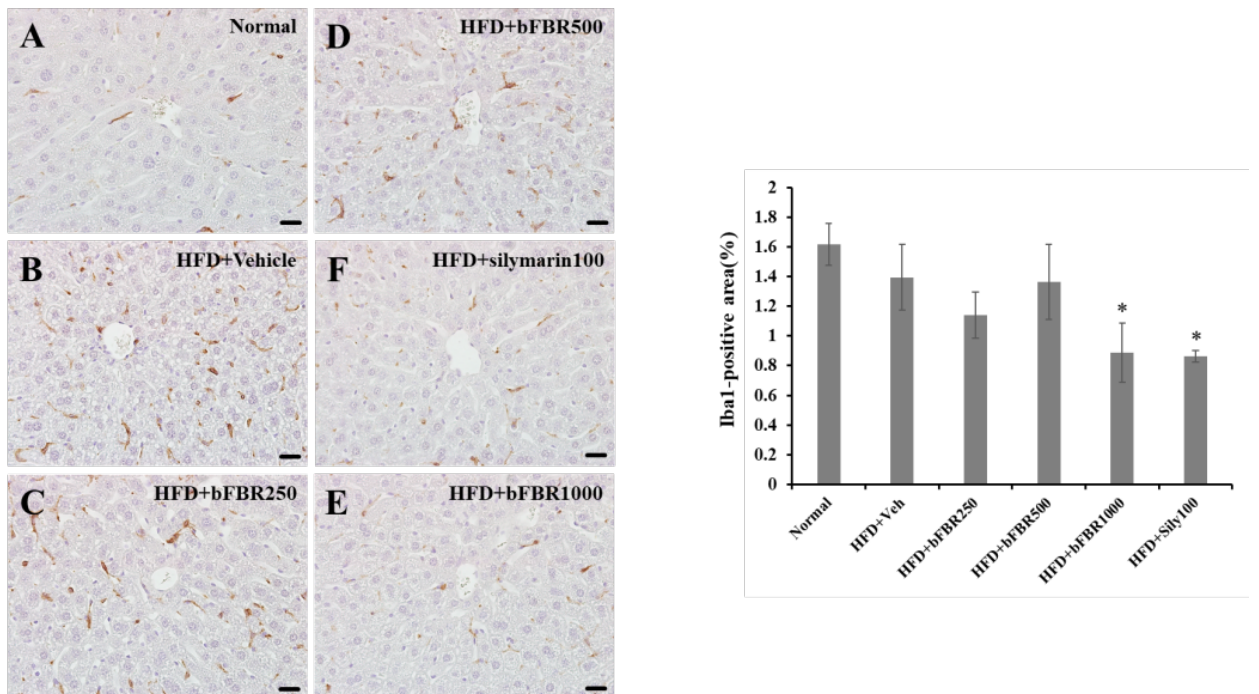


Figure 44. 간조직내 염증세포 침윤 및 쿠퍼세포의 활성화 염색 결과)

- 간의 섬유화를 Sirius red 염색을 이용하여 분석한 결과 어린 검정무 발효 분말을 투여한 경우 유의성있는 결과를 확인할 수는 없었음 (Figure 45)

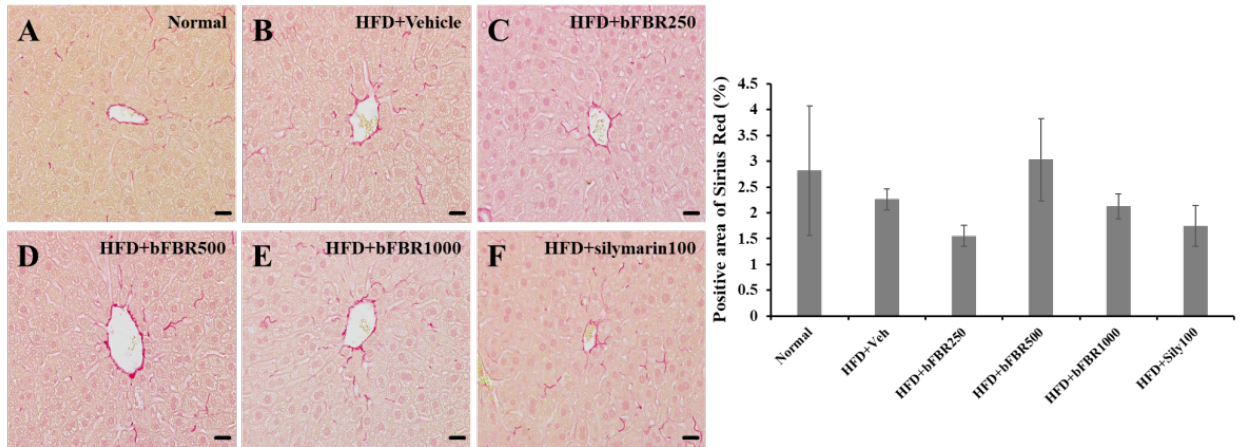


Figure 45. 간의 섬유화 정도 비교

- 지방조직내 지방세포 크기를 분석한 결과, 고지방식을 급여한 경우 유의성있게 모든 그룹에서 증가하였고, 어린검정무를 투여한 경우 유의성있게 감소됨을 확인하였음 (Figure 46)

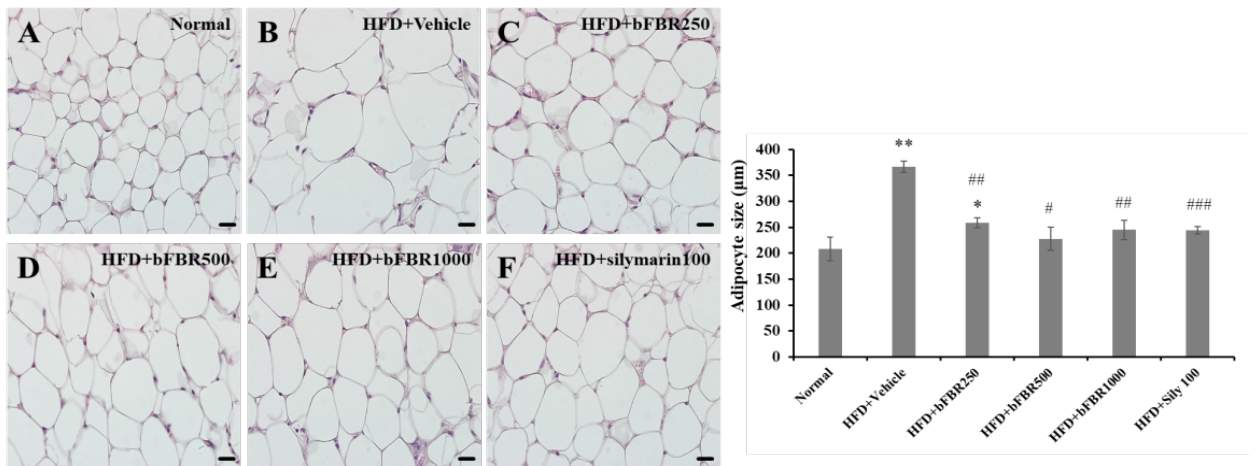
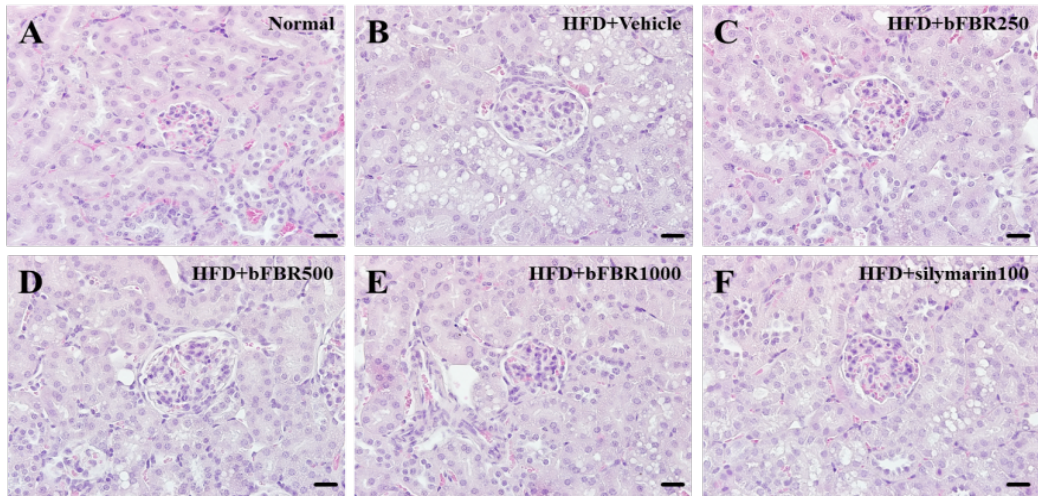
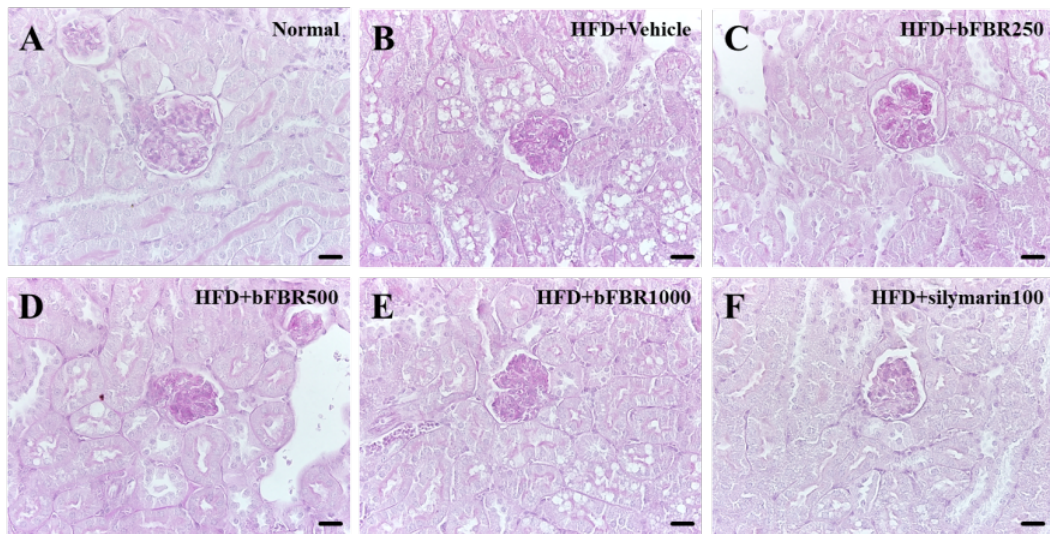


Figure 46. 지방세포의 크기 변화

- 신장의 손상을 헤마톡실린 에오진 염색을 통해 비교한 결과, 신장조직내 공포변성의 정도, 사구체의 위축 및 염증세포의 침윤정도가 어린 검정무 발효분말을 투여한 경우 완화되었음 (Figure 57). 또한 신장내 당관련 점액질을 염색하여 손상정도를 비교한 결과, 어린 검정무 발효 분말의 투여로 손상정도가 완화되었음을 확인하였음 (Figure 48).



(Figure 47. 신장조직의 헤마톡실린-에오진 염색 결과)



(Figure 48. 신장조직의 PAS 염색 결과)

9) 장염모델에서의 효능평가

- Dextran sodium sulfate (DSS)은 dextran 및 sulfate 화 된 무수 글루코스 단위로 구성된 합성 sulfate 다당류이며, 수용성이 높다. DSS은 일반적으로 대장염을 유도하기 위해 분자량 36-50 kDa가 사용됨.

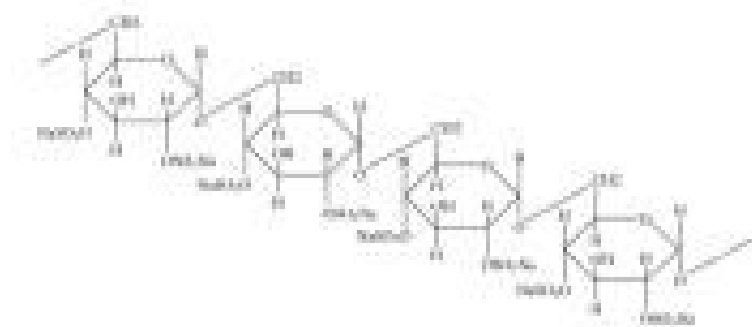
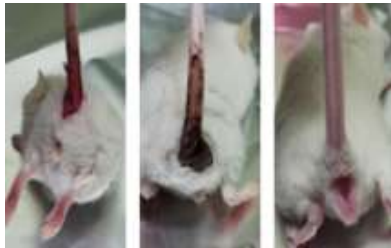


Figure 49. Dextran sodium sulfate의 화학구조

- 이러한 구조를 가진 DSS를 2%, 5% 농도별로 따른 장염모델의 유도를 평가하였음. 14일 동안 음수에 급여하여 장염모델을 유도하여 농도별로 평가하였음.
- 평가 지표는 Disease Activity index (DAI) calculation으로 평가하였음 (Table 6).

Table 6. 장염 모델에서 평가 지표



Disease activity index (DAI) calculation			
Score	Weight loss (%)	Stools consistency	Peranal bleeding
0	None	Normal, formed	None
1	1~5		
2	5~10	Pasty (Sticky) stools	Occult bleeding
3	10~20		
4	>20	Liquid stools (diarrhea)	Gross (visible) bleeding

- 그 결과, 2% DSS 는 거의 control과 유사하였고, 5%에서 큰 차이를 나타내었음 (Figure 50).

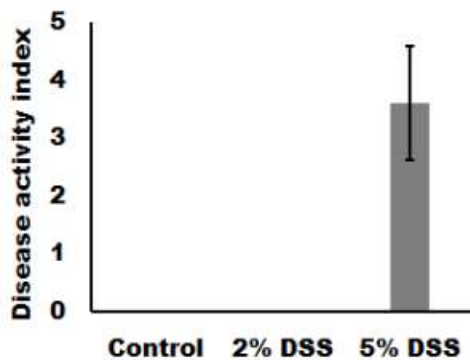


Figure 50, DSS 농도별 DAI 비교

- DSS를 이용하여 후보물질의 효능을 평가하기 위한 적절한 농도를 재설정 하기 위해 3%, 5%의 두 그룹으로 평가한 후, 육안 및 조직학적 소견을 비교하였음. 그 결과, 3%가 유의한 결과를 나타내었고, 3%로 손상을 유도하고 후보물질들에 대한 효능을 평가하고자 하였음(Figure 51).

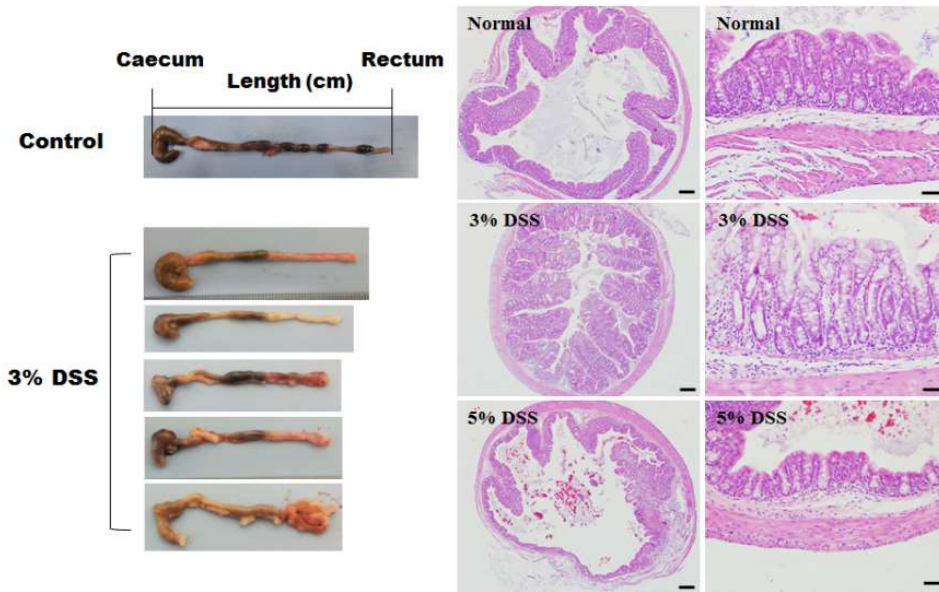


Figure 51. 3%와 5% DSS의 농도별 대장의 길이 및 현미경 소견.

- 검정무 발효 분말과 발효분말에서 분리해낸 alpha-linolenic acid, 양성대조군으로 Sulfasalazine을 투여하여 14일동 3%DSS를 급여하면서 동시에 14일동안 투여한 그룹, 7일 동안 3% DSS를 투여하고 그 이후 7일동안 후보물질을 투여한 그룹, 후보물질을 먼저 7일동안 투여 한 후, 7일동안 3% DSS를 공급하는 그룹으로 나누어 실험을 진행함(Figure 52).

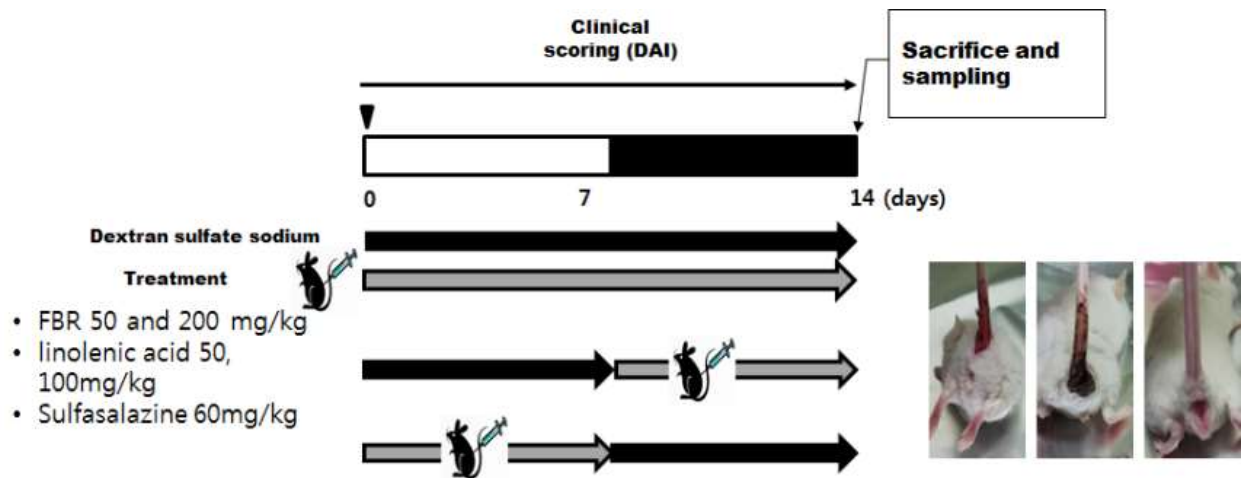


Figure 52. 실험계획에 대한 모식도

- 위의 계획 중, 7일 동안 후보물질을 투여하고 3% DSS를 투여한 그룹을 제외하고는 유의한 결과가 나타나지 않아, 이러한 일정으로 후보물질에 대한 분석을 진행하였음.
- 위의 결과로 투여 기간을 설정하여 후보물질을 7일 동안 투여한 후, 3% DSS로 7일동안 장염을 유도한 후, 임상 증상 및 조직학적 소견을 바탕으로 물질의 효능을 평가하였음.
- 투여기간 중, 체중을 측정한 결과, 7일이후에 체중이 감소하였음을 확인하였음 (Figure 53).

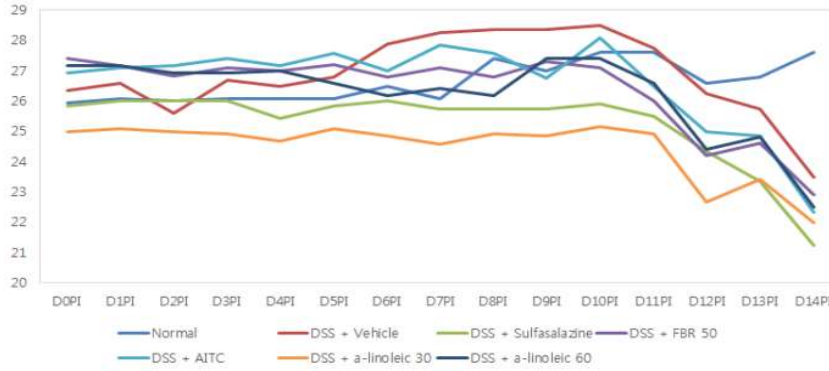


Figure 53. DSS 투여기간 중, 체중의 변화

- 임상 지표인 DAI를 측정된 결과, 대조군에 비해 a-linolenic acid를 투여한 그룹에서 유의성 있는 결과를 확인하였음 (Figure 54).

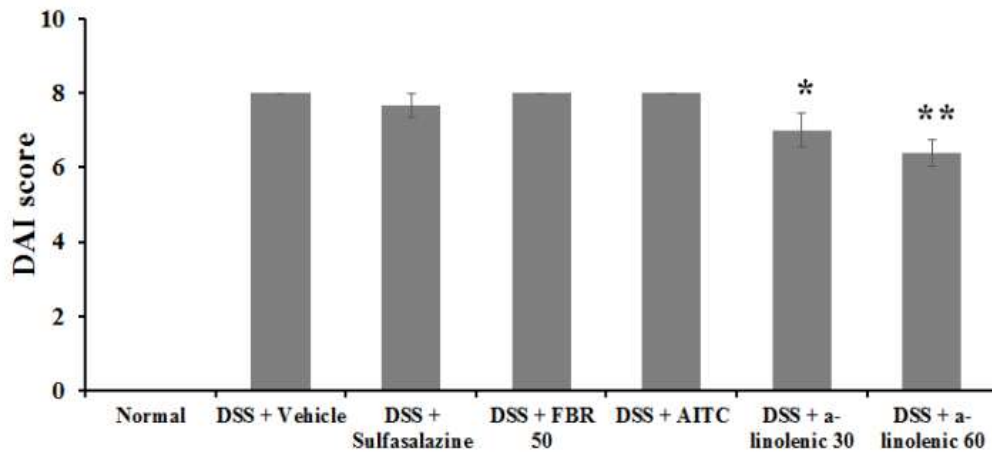


Figure 54. 후보물질에 대한 DAI의 평가 결과

- 장의 길이를 비교하여 분석하였음. 그 결과, 정상 장 조직에 비해 3% DSS 장조직이 유의성 있게 감소하였으나, 후보물질의 그룹 간에는 유의성이 없었음 (Figure 55).

- 이러한 결과를 바탕으로 a-linolenic acid (ALA)의 결과를 분석하였음 (Figure 55). 그 결과, ALA를 투여한 경우 DAI와 장의 길이 모두 유의성 있는 변화를 확인함.

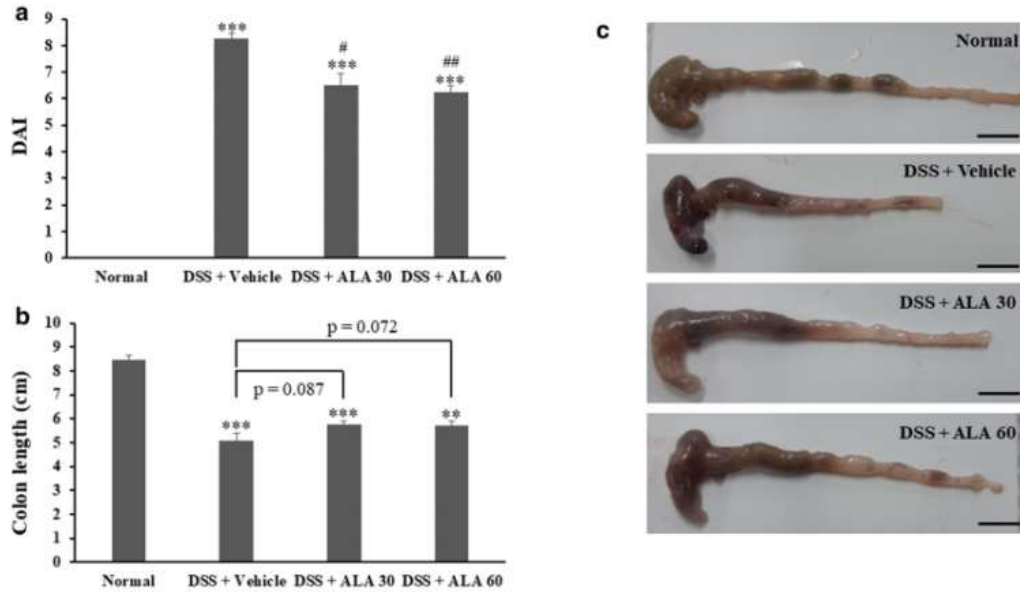


Figure 55. ALA 투여 후 DAI 및 장길이의 변화

- 또한 장조직 내의 염증세포의 길이를 측정한 결과, ALA 투여한 그룹에서 유의성 있게 증가됨을 확인하였음 (Figure 55)

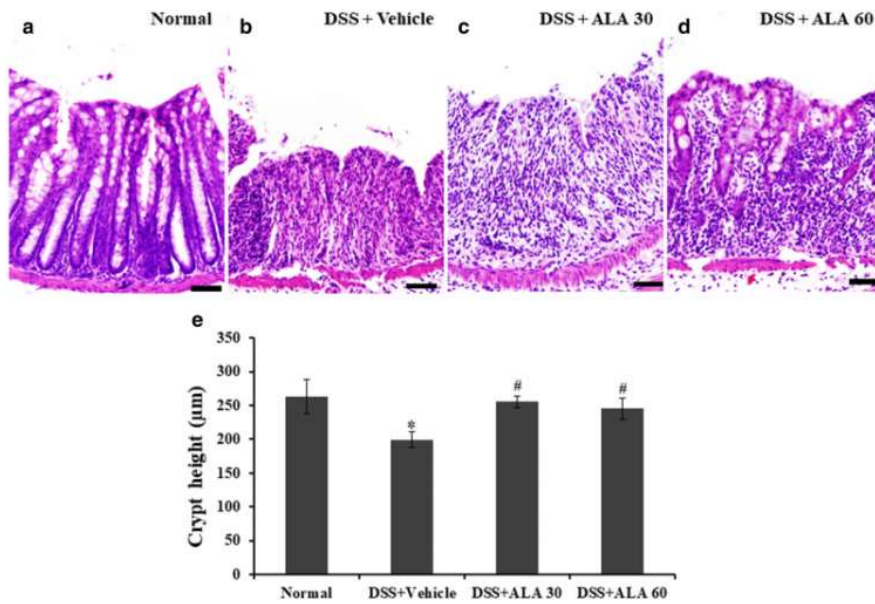


Figure 56. 장조직의 염색세포의 길이의 변화

- 또한 장조직내 염색세포의 침윤정도를 비교한 결과, ALA를 투여한 경우 현저히 감소되었음을 확인하였음 (Figure 57)

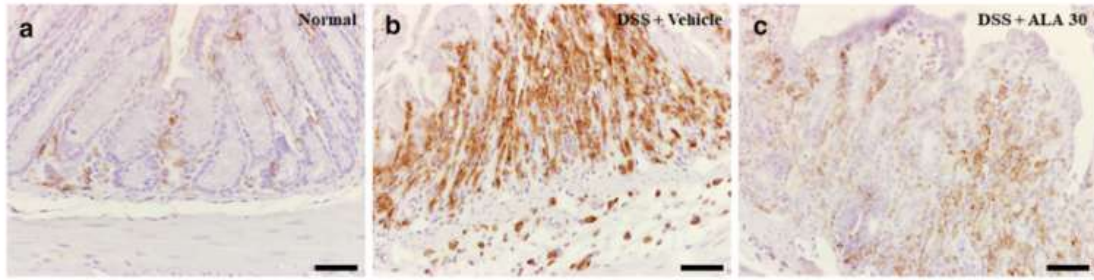


Figure 57. 장조직내 염증세포의 침윤 정도 비교

이상의 결과를 종합해 볼 때, DSS에 의해 유도된 장염모델에서 ALA는 장의 손상을 줄여줘 장을 보호했을 것으로 기대됨 (Figure 58).

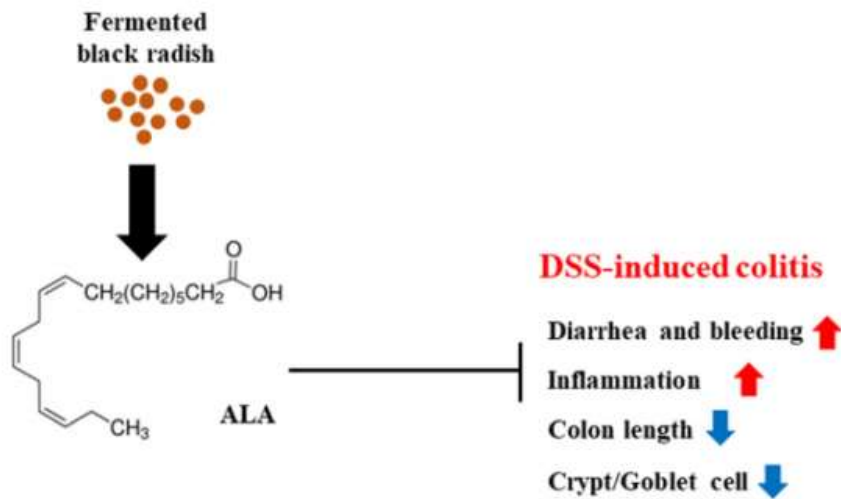


Figure 58. 검정무 발효분말 내 ALA의 장보호 효과 기전요약

10) 분무건조를 이용한 백무 및 흑무 추출물의 미세입자화

가. 동결건조 된 백무 및 흑무 발효추출물의 항산화 활성 측정 및 입도관찰

(1) 재료 및 방법

- 주관기관으로부터 제공 받은 백무 및 흑무 발효물의 동결건조물은 후드믹서(BL133AKR, Tefal ®)를 이용하여 30초간 분쇄 후 40 mesh 체(425 μ m, CHUNG GYE)에 걸러서 균일화 하였다.
- 시료의 총 페놀 함량은 Singleton VL & Rossi JA(1965)의 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 200 μ L와 증류수 900 μ L를 혼합한 후, 2 M Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 가한 후 상온의 암소에서 5분 간 반응시킨다. 그 후 2% Na_2CO_3 (Daejung chemicals & Metals Co., Ltd., Gyeonggi, Korea) 300 μ L를 혼합하여 증류수로 2 mL 정용하

여 상온의 암소에서 1시간 반응 후, microplate reader (Epoch™, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)를 사용하여 760 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid (Sigma-Aldrich) 용액으로 작성하였으며, 시료의 총 페놀 함량은 100 mL 중의 mg gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다.

- DPPH assay는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)시약을 사용하여 0.3 mM DPPH solution (in ethanol)를 제조하여 0.3 mM DPPH solution 0.8 mL와 시료 2 mL를 혼합하여 암소에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader를 사용하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 아래의 식으로 환산하여 DPPH radical 소거능을 나타내었다.
- FRAP assay는 Benzie IFF & Strain JJ(1996)의 방법을 본 연구에 맞게 일부 수정하였다. FRAP reagent 용액은 Sigma-Aldrich에서 구매한 300 mM acetate buffer(pH 3.6) 10 mM TPTZ in 40 mM HCl과 20 mM FeCl₃을 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 제조하였다. 그 후 시료 100 µL, 증류수 300 µL와 FRAP reagent 용액 3 mL를 혼합하여 37°C의 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader(BioTek Instruments, Inc.)를 사용하여 593 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 FeSO₄·7H₂O 용액(Sigma-Aldrich)으로 작성하여 mM로 나타내었다.

(2) 실험 결과

- 동결건조물의 외관 및 색도를 보면 확연히 차이가 있음을 확인할 수 있다[표1]. 백무의 색도는 흑무 보다 명도, 적색도, 황색도가 모두 높게 측정되었으며, 외관으로 보아도 황색계열의 색으로 더 보인다.

Table 7 동결건조물의 색도

시료/색도	L	a	b
백무 동결건조물	77.54±0.03	6.3±0.05	10.72±0.02
흑무 동결건조물	68.61±0.10	1.41±0.09	4.73±0.09



Figure 59. 분쇄 및 40 mesh 체질 후 백무 발효추출물 동결건조물(좌), 흑무 발효추출물 동결건조물(우)

- Minitab 16 프로그램을 이용하여 2-표본 t 분석을 한 결과 두 시료간의 유의성이 없는 것으로 분석되었다[표2].

Table 8 동결건조 된 백무 및 흑무 발효추출물의 총폴리페놀 함량 및 항산화능, 입도

동결건조 시료	TPC	DPPH	FRAP	ABTS	40 mesh 통과 입자크기 (μm)
	gGAE/g	Ascorbic acid (ppm)	Ferroussulfate heptahydrate (mM)	ABTS scavenging ability(%)	
백무	21.04±0.79	83.74±0.52	0.89±0.10	64.80±2.51	약 425
흑무	19.67±1.66	80.01±4.05	0.77±0.04	69.15±3.46	
p-값	0.012	0.005	0.002	0.032	

나. 백무 및 흑무 발효추출물 분무건조

(1) 재료 및 방법

- 주관기관으로부터 제공받은 백무 및 흑무 발효물을 분무건조법(Mini Spray Dryer B-290, Buchi)을 이용하여 분말화 하였다. 에탄올 추출물의 경우 분산매 특성이 분무건조기 운전에 적합하지 않아 분산매가 물인 발효추출물만 분무건조 하였다.
- 건조공정을 위해 시료의 전처리는 다음의 순서로 진행하였다. 시료와 분산매를 1:2 비율로 혼합 후 말토덱스트린 첨가 10%(w/w) 한다. 최대한 분산을 시키기 위해 믹서기로 1 min 혼합하고, 초고속 균질기로 10,000 rpm, 3 min 분산한 후 원심분리 40,000 rpm, 10 min, 25°C를 통해 고형물(무슬러리) 제거한다. 마지막으로 상등액을 microfluidizer를 이용하여 20,000 psi, 1 cycle 조건으로 초고압 균질하여 분산 하였다. [표3]의 조건으로 분무건조 하였다.

Table 9 분무건조 조건

항목	조건
부형제	10% maltodextrin
inlet temperature	160°C
outlet temperature	85-90°C
Aspirator	90%



- 분무건조물의 입자특성은 dynamic light scattering (DLS) 원리에 의하여 DelsaMax Pro (Beckman Coulter, USA)으로 분석하였다. 제타전위(ζ -potential) 측정은 electrophoretic light scattering (ELS) 원리에 의하여 DelsaMax Pro (Beckman Coulter, USA)으로 분석하였다. 건조물은 증류수에 재분산하여 3회 반복하여 측정하였다.
- DPPH assay는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)시약을 사용하여 0.3 mM DPPH

solution (in ethanol)를 제조하여 0.3 mM DPPH solution 0.8 mL와 시료 2 mL를 혼합하여 암소에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader를 사용하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 아래의 식으로 환산하여 DPPH radical 소거능을 나타내었다.

(2) 실험 결과

- 분무건조의 경우 추출물에 직접 열이 가해지므로 열안정제로서 부형제인 말토덱스트린을 사용하였다. 또한 부형제 사용의 목적은 분무건조공정을 효율적하기 위해 최소 15~20%총고형분 함량을 맞추기 위해 첨가하였으며, 추출물만 건조했을 시 당성분으로 인해 끈적임일 증가하여 입자들끼리 붙는 것을 방지하기 위함이다. 건조수율은 백무의 경우 7.21%, 흑무의 경우 5.25%로 계산되었다.
- 분무건조 후에는 백무와 흑무에 따른 외관차이가 동결건조물에 비해 없어 보이나 이것은 부형제로 첨가한 말토덱스트린의 영향이다. 외관향상을 위해 동결건조 공정시 부형제를 첨가하는 것이 필요하다고 사료된다.



Figure 60. 백무발효물 분무건조물(좌), 흑무발효물 분무건조물(우)

- 분무건조 된 백무 및 흑무 발효건조물의 입자 특성은 Table 10 및 Figure 120과 같다. 백무, 흑무 분말을 재분산하여 입자특성을 관찰한 결과 모두 200 nm이하의 나노수준의 입자로 형성되었다. 동결건조 후 분쇄한 경우 425 μm 인것에 비해 현저하게 입자를 감소시킬 수 있었다. 제타전위(Zeta Potential)는 -20 mV 수준으로 측정되었다. 제타전위의 경우 절대값 30 mV수준 이상이어야 분산이 안정적으로 되었다고 판단한다. PD Index는 분산매속의 분산상의 분산상태를 나타내는 값으로 0.4 이하이면 단분산상으로 판단한다. 두 시료는 다분산상에 가까운 것으로 측정되었으나, [Figure119]에서 보듯이 대부분의 입자가 유사한 입도를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

Table 61 입자특성

시료	Diameter (nm)	Zeta Potential (mV)	PD Index
백무	176.86 \pm 9.33	-17.99\pm1.07	0.388 \pm 0.16
흑무	174.40 \pm 21.50	-20.5775\pm1.71	0.571\pm0.00

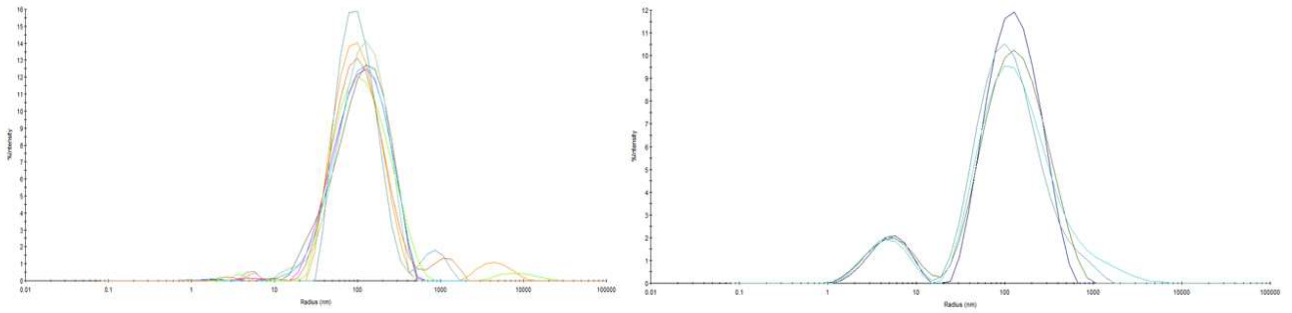


Figure 61. 분무건조된 백무(좌) 및 흑무(우) 발효물의 입자분산도

- 분무건조 된 백무 및 흑무 발효물의 DPPH 라디칼 소거능은 [표5]와 같다. 총폴리페놀 함량의 경우 흑무가 유의적으로 높게 측정된 것으로 관찰되었다. DPPH 라디칼 소거능은 두 시료간의 유의적 차이가 없었다. 부형제가 첨가되지 않은 동결건조물의 항산화능 Table 8도 약 11배정도 낮은 것으로 측정되었으나, 이는 분무건조물의 경우 단위질량당 추출물과 부형제 비율이 약 1:10 정도 되므로 추출물함량이 매우 낮은 상태이기 때문이다.
- 동결건조보다 공정비가 낮은 분무건조를 사용할 경우 유사한 항산화능을 나타낼 수 있음이 확인되었고, 적용목적에 따라 항산화능의 조절이 가능할 것으로 판단한다. 다양한 연구논문을 보면 나노수준의 입자크기는 난용성물질의 가용화에 적합하고, 용해도를 증진시켜 가공적성을 향상시키고, 인체내 침투력이 우수하다는 결과가 많이 발표되었다. 후속연구에서 분무건조 된 시료를 이용한 가공식품 개발과 in vitro 및 in vivo study 가 필요할 것으로 보인다.

Table 11 분무건조 된 백무 및 흑무 발효추출물의 총폴리페놀함량 및 DPPH라디칼 소거능

분무건조시료	TPC (gGAE/g)	DPPH free radical scavenging (%)
백무	1.75±0.07	8.00±1.39
흑무	1.95±0.07	7.17±0.73
p-값	0.505	0.001

(2)검정무건조분말의 조건별 효능평가 (분무건조를 이용한 흑무의 미세입자화)

- 에탄올 추출물과 발효 추출물의 분무건조, 발효 추출물의 동결 건조의 품질 특성 비교하기 위해 Figure 121과 같은 공정으로 미세입자화 하였고, 공정별 분말의 형태를 확인함 (Figure 122)

- 검정물 에탄올추출물과 발효물에 대한 미세입자화 조건별의 품질 검사를 진행함 (Table 12).

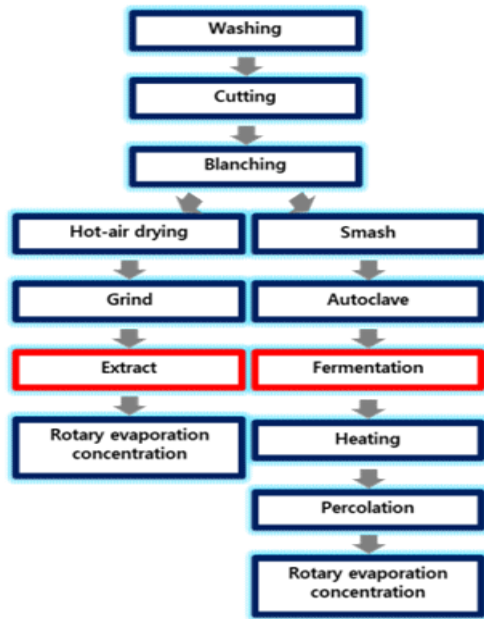


Figure 62. 미세입자화 공정과정

Drying method	Contents	Condition
Spray drying	Maltodextrin	10%
	Inlet temperature	160~180°C
	Outlet temperature	85~90°C
Freeze drying	Aspirator	90%
	time	72 h

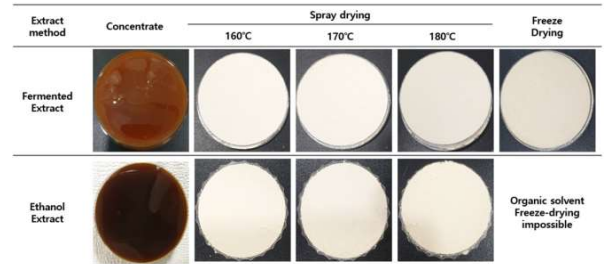


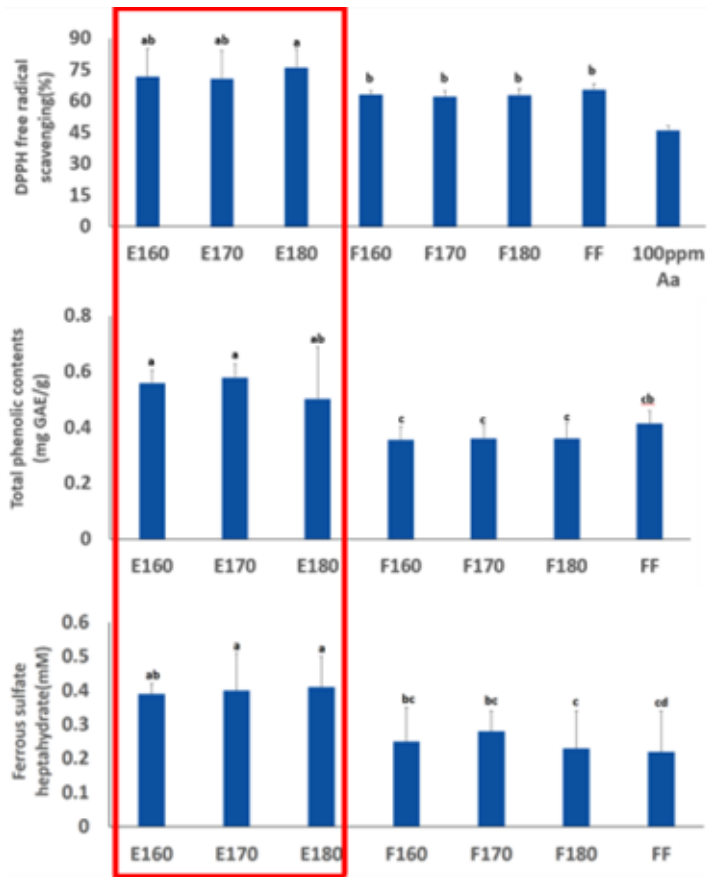
Figure 63. 각 공정별 검정무의 파우더 형태

Table 12. Moisture contents, pH and color of black radish concentrate and powder each process

Process	Moisture %	pH	Color			
			L	a	b	
Ethanol Extracts	Concentrates	22.76±4.87 ^b	4.49±0.11 ^b	29.46±1.41 ^b	-0.72±0.80 ^d	0.39±0.70 ^a
	160°C	2.94±0.34 ^c	4.81±0.17 ^a	89.46±1.50 ^a	3.76±0.27 ^b	-2.89±1.09 ^b
	170°C	2.41±0.22 ^c	4.79±0.07 ^a	89.12±1.79 ^a	3.51±0.48 ^b	-3.09±1.39 ^b
	180°C	2.47±0.36 ^c	4.78±0.08 ^a	89.00±2.60 ^a	3.65±0.18 ^b	-2.81±1.94 ^b
Fermented Extracts	Concentrates	48.46±10.64 ^a	3.80±0.10 ^c	32.57±0.57 ^b	0.79±1.01 ^c	0.73±0.81 ^a
	160°C	3.29±0.25 ^c	3.90±0.09 ^c	90.33±0.80 ^a	4.03±0.30 ^{ab}	-3.83±0.95 ^b
	170°C	3.03±0.27 ^c	3.91±0.08 ^c	86.33±10.16 ^a	3.57±0.54 ^b	-4.31±0.54 ^b
	180°C	3.13±0.27 ^c	3.93±0.05 ^c	89.64±1.29 ^a	3.71±0.35 ^b	-4.08±1.37 ^b
	Freeze drying	72 h	3.37±0.37 ^c	3.91±0.06 ^c	87.34±3.28 ^a	4.69±0.22 ^a

Table 13. particle properties of black radish spray drying powder each extract

Process	Diameter (nm)	Zeta Potential (mV)	PD Index	
Ethanol Extracts	160°C	307.0±30.1 ^a	-51.92±4.46 ^b	0.571±0.000 ^a
	170°C	272.8±12.1 ^b	-52.12±6.43 ^b	0.571±0.000 ^a
	180°C	289.9±7.0A ^b	-50.19±7.41 ^b	0.571±0.000 ^a
Fermented Extracts	160°C	192.7±12.4 ^c	-19.41±1.98 ^a	0.556±0.064 ^a
	170°C	192.2±11.6 ^c	19.07±2.77 ^a	0.571±0.000 ^a
	180°C	188.8±12.1 ^c	18.78±2.28 ^a	0.562±0.042 ^a



-에탄올 추출물의 건조 분말은 발효 추출물의 분무건조분말보다 항산화능, 입자 직경 및 제타전위의 값이 더 높음. -발효 추출물의 동결 건조 분말은 분무건조분말과 항산화능에서 유의한 차이가 없음 ($p>0.05$).

⇒ 효과적 추출방법 : 에탄올 추출 > 발효 추출

⇒ 효과적 건조방법 : 분무건조 > 동결건조




Figure 64. 검정무 에탄올 추출물과 발효물의 미세입자화 후 효능 평가

2-4. [제4세부 공동연구기관: 콜마BNH]

1) 흑무의 원재료 표준화

○ 건조 조건 설정

흑무 원재료는 수분함량이 85% 이상으로 운반, 보관, 추출시 효율에 문제가 있어 건조조건 설정이 요구된다. 따라서 원재료 표준화 조건을 위해 건조조건을 설정 실험을 진행하였으며, 열풍건조와 동결건조를 진행하였다. 건조 기준은 수분함량이 10% 미만이 되는 것으로 설정 하였다. 총 3개의 건조조건을 설정하여 실험을 진행하였다. 흑무 원재료는 흐르는 물에 1분간 세척하여 이물질 제거하고, 세로로 4등분 후 0.5 ~ 1.0 cm 두께로 편으로 절단하여 준비하였다. 열풍건조 50°C, 12시간(조건 1), 열풍건조 50°C, 24시간(조건 2), 동결건조 -80°C, 96시간(조건 3)의 3개 조건으로 흑무 원재료를 건조하고, 성상과 수분함량을 관찰하였다. 측정결과, 조건 1과 2에서 외견상 수축과 갈변이 확인되었고, 조건 3은 외견상 변화가 없었다. 수분함량은 조건 1이 5%, 조건 2가 2%, 조건 3이 3%로 기준인 10%에는 모두 충족하였다. 따라서 비용적인 측면과 건조시간을 고려하여 조건 1을 선정하였다(표 1).

표 1. 건조조건별 외견 및 수분함량			
건조조건	조건 1	조건 2	조건 3
건조방법	열풍건조	열풍건조	동결건조
건조온도(°C)	50	50	-80
건조시간(시간)	12	24	96
외견			
	수축 및 일부 갈변	수축 및 일부 갈변	변화 없음
수분함량(%)	5	2	3

○ 유전자 수준에서의 표준화

흑무의 원재료 표준화를 위해 흑무의 유전자 수준에서 표준화 실험을 진행하였다. 흑무(*Raphanus sativus* var. *niger*)는 백무(*Raphanus sativus*)의 변종이며, 십자화과의 식물로서 유사한 다른 십자화과 식물과 구분하기 위해 유전자 분석을 진행하였다. 일반적으로 사용되는 MatK 부위 유전자를 이용하여 PCR 시퀀싱한 결과 백무와의 상동성이 99%로 구분 할 수 없었다(그림 1).

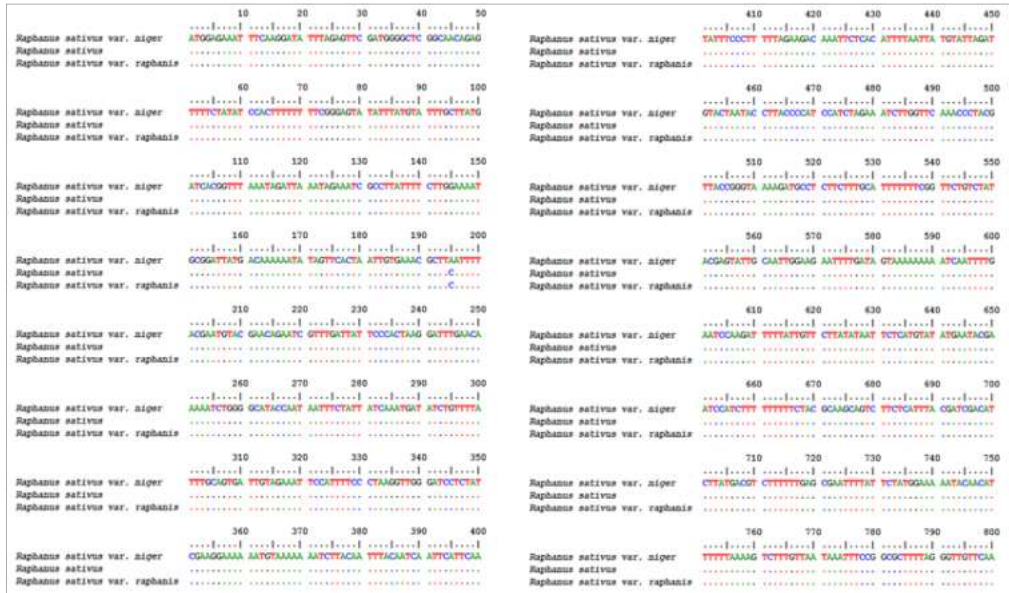


그림1. 흑무 및 백무의 MatK 유전자 분석

○ 원재료의 수확시기별 표준화

천연물은 수확시기에 따라 활성에 차이가 있기 때문에 수확시기의 표준화가 필수적이다. 따라서 원재료 수확시기 표준화를 위해 숙기에 따른 추출물을 제조하여 효능평가를 진행하였다. 파종후 3개월이 된 흑무(약 50%생육)와 파종후 6개월이 된 흑무(100% 생육, 완숙)로 나누어 추출물을 제조하였으며, 제조된 추출물은 Raw 264.7 세포주를 이용한 항염증 효능평가를 진행하였다. Raw 264.7 세포주에 LPS를 처리하여 NO 및 염증성 사이토카인을 유도하였으며, 추출물이 이를 얼마나 억제하는지를 평가하였다. 평가결과 NO생성 억제효능은 각 시료의 500 µg/ml농도에서 완숙흑무의 비건조 70%주정추출물이 가장 우수한 효능을 보였으며(그림 2A, 2B), 염증성사이토카인인 IL-6와 TNF-α 억제에서도 비건조 70%주정추출물이 가장 우수한 효능을 보였다(그림 2C, 2D).

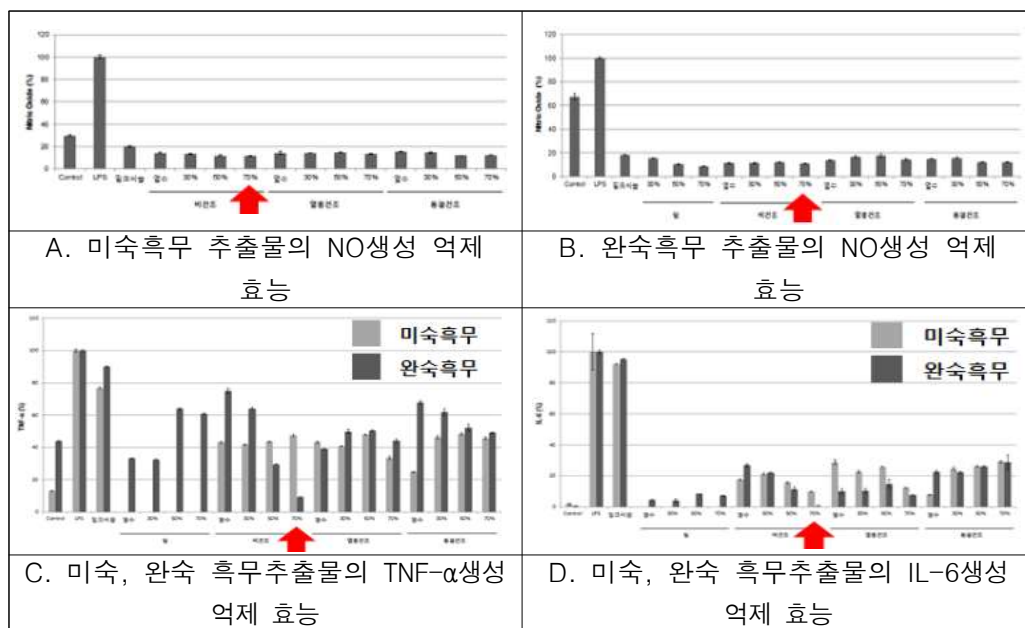


그림 2. 미숙, 완숙 흑무 추출물의 항염증 효능평가

○ 흑무의 유전자 수준에서의 구분법

흑무의 경우 외관상으로는 기타 다른 무와 구분이 쉽지만 외피가 검정색이라는 것 외에 흑무 속의 경우 일반 백무와 같이 흰색을 띠고 있다. 따라서 향후 유사 원재료의 혼입을 막기 위해 기능/지표성분을 통한 이화학적인 방법 외에 추가적으로 흑무를 유전자수준에서 백무와 구분하기 위한 실험법을 개발에 착수하였다. 1차년도에 시행하였던 흑무와 백무의 유전자 분석 결과를 토대로 scar marker를 이용하여 흑무에만 존재하는 181bp크기의 유전자와 흑무와 백무에 공통으로 존재하는 102bp크기의 유전자를 동시에 분석하여 유전자수준에서 구분할 수 있는 방법을 개발하였다(그림 3).

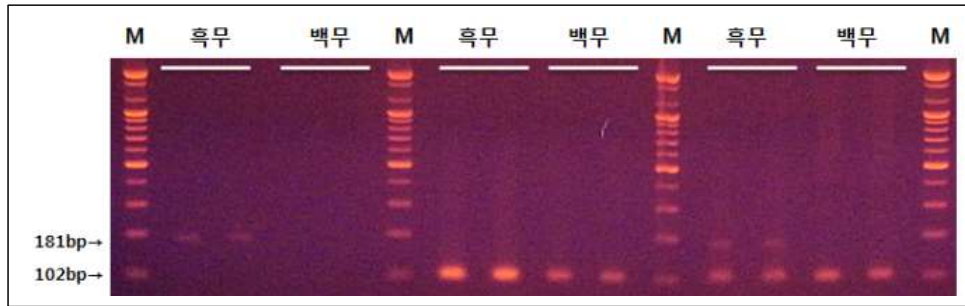


그림 3. Scar marker를 이용한 흑무와 백무의 유전자수준 구분법

2) 흑무 추출물의 제조공정 표준화

○ 추출조건 설정

- 추출조건별 수율

흑무가 가진 기능성분의 고효율 추출을 위해 정제수 조건과 30%, 50%, 70% 주정(물 혼합)조건으로 추출을 진행하였고, 조건 1로 건조된 원재료가 이화학적 성분이나 효능적으로 문제가 없는지 확인하기 위해 비 건조 원재료와 건조 원재료 모두 용매 조건별로 추출하였다. 또한, 적정 추출시간 설정을 위해 30분, 1시간, 2시간, 4시간 단위로 추출물을 샘플링하여 수율을 측정하였으며, 조건별로 제조한 추출물은 수율, 이화학적 분석을 진행하였다. 수율 측정결과, 추출 시작 후 2시간을 기점으로 수율이 포화되는 경향을 보였으며, 건조 원재료의 수율이 비 건조 원재료의 수율에 비해 10배가량 높은 것으로 확인되었다(그림 4). 동일 원재료의 추출조건별 수율을 비교해본 결과 정제수>50%주정>30%주정>70%주정 순이었으며, 주정 비율별 추출물간의 수율차이는 그다지 크지 않았다. 따라서 수율측면에서는 정제수를 이용한 열수추출이 가장 우수하지만 정제수 추출물과 주정 추출물 간의 구성 화합물 차이가 있는지 확인하기 위해 이화학적 분석을 진행하였다.

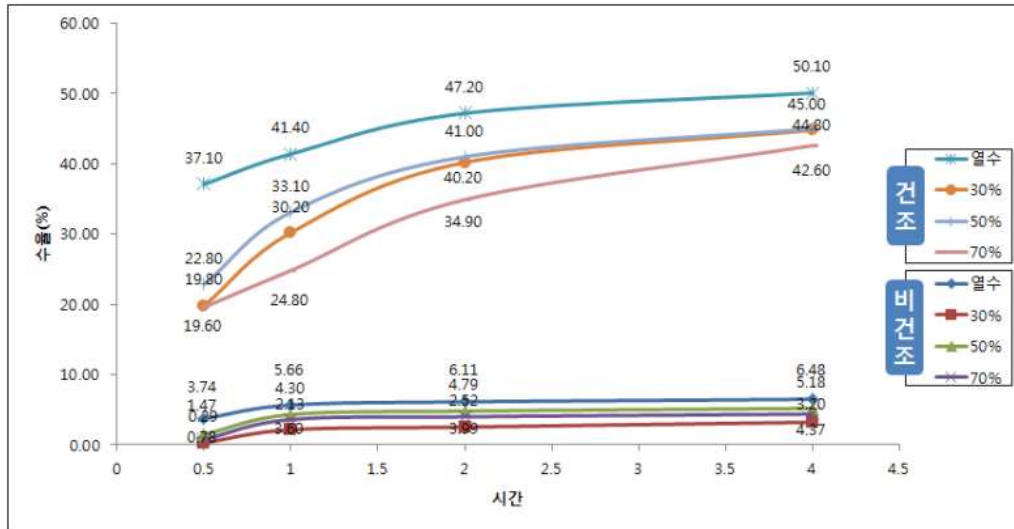


그림 4. 추출시간에 따른 추출수율

- 추출조건별 이화학적 분석

샘플링한 각 추출물은 pore size 0.45 μm PVDF syringe filter로 여과한 뒤 Shimadzu社의 LC-20 series의 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 고정상은 Atlantis® dC18, 5 μm , I.d. 4.6*250 mm을 이용하였으며, 이동상은 0.04% trifluoroacetic acid buffer(이하 '이동상 A')와 methanol(이하 '이동상 B')를 이용하였으며, 자세하게는 0분부터 2분까지는 이동상A:이동상B = 90:10으로 유지하다가 이동상 B의 비율을 서서히 증가시켜 50분에 비율이 이동상A:이동상B = 50:50이 되도록 하였다. 52분까지 이동상A:이동상B = 0:100으로 증가시켜 60분까지 유지한 후, 62분까지 이동상A:이동상B = 90:10으로 이동상B의 비율을 낮춘 뒤, 70분까지 그 비율을 유지하였다. 유속은 1 ml/min으로 유지하였으며, 시료 주입량은 20 μl 이다. Detector는 PDA를 사용하였으며, UV파장은 260 nm와 331 nm에서 관찰하였다.

비건조 원재료 추출물을 260 nm에서 관찰한 결과, 주정 추출물간의 분석 패턴은 유사하였으나 정제수 추출물과 비교하였을 때, 많은 차이를 보였다. Retention time(머무름 시간, 이하 RT)값 5분에서 10분사이에 정제수 추출물과 주정 추출물간의 차이를 확인 할 수 있었으며, RT 39분, RT 45분에 주정 추출물에서만 관찰되는 peak를 확인하였다.

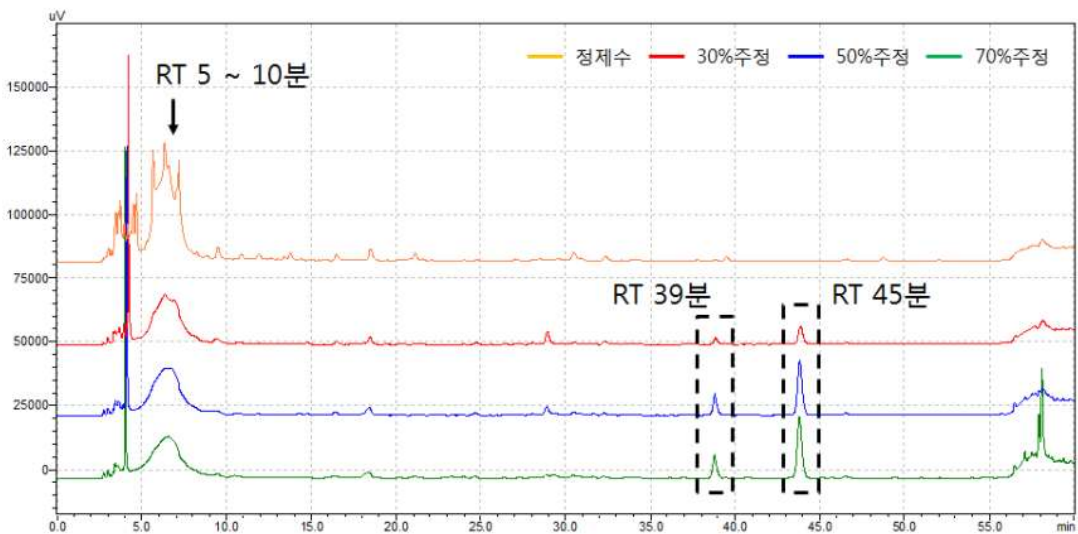


그림 5. UV-260 nm에서 관찰한 비건조 원재료 추출물의 HPLC spectra

비건조 원재료 추출물을 331 nm에서 관찰하였을 때, RT 21분, RT 30.6분에서 공통적인 peak가 확인되었으며, 정제수 추출물의 경우 RT 13분과 RT 38분 전후에 주정 추출물에는 없는 peak가 확인되었다(그림 6).

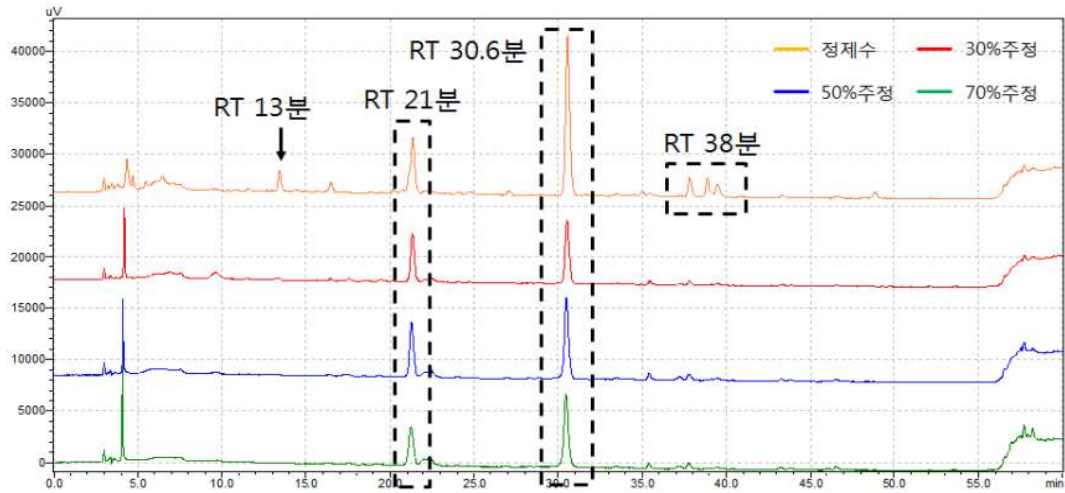


그림 6. UV-331 nm에서 관찰한 비건조 원재료 추출물의 HPLC spectra

건조 원재료 추출물을 260 nm에서 관찰한 결과, 비건조 원재료 추출물과는 다른 패턴을 보였다. RT 5 ~ 10분 사이의 peak패턴이 가장 큰 차이를 보였으며, RT 39분 RT 45분의 peak가 사라졌으며 전체적으로 peak가 새로 생성되거나 없어진 것을 확인하였다(그림 7).

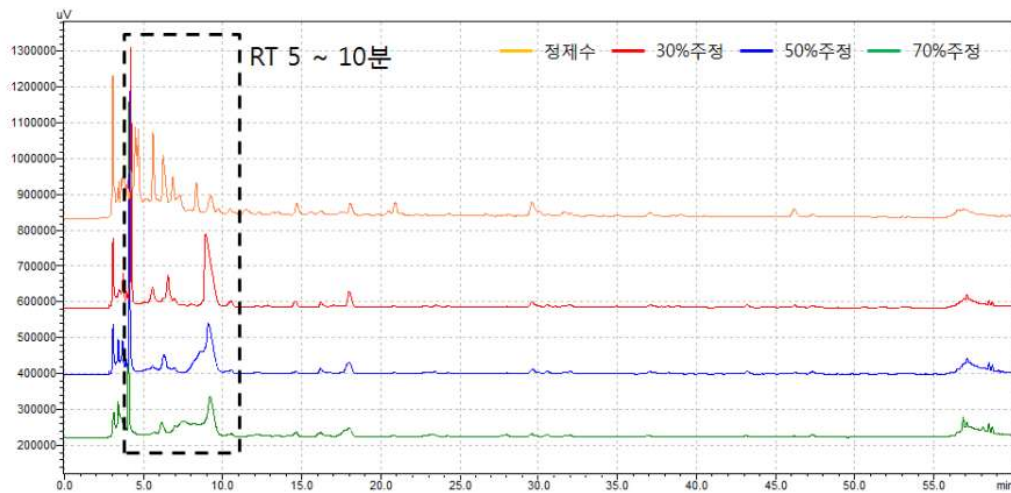


그림 7. UV-260 nm에서 관찰한 건조 원재료 추출물의 HPLC spectra

331 nm에서 관찰하였을 때는 RT 5~10분 구간에 새로 peak가 생성되었으며, RT 21분의 peak가 확연하게 줄어든 것을 확인하였고, RT 35~40분 구간에 새로 peak가 생성된 것을 확인하였다(그림 8).

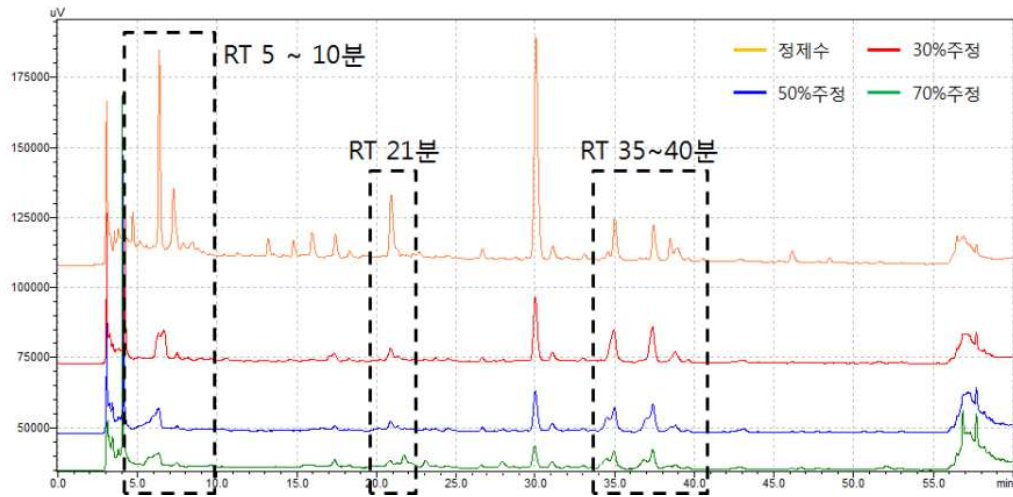


그림 8. UV-331 nm에서 관찰한 건조 원재료 추출물의 HPLC spectra

십자화과 식물에 많이 알려져 있는 것으로 알려진 glucosinolate계 화합물인 indole-3-carbinol(I3C)과 그 이합체인 3, 3'-diindolylmethane(DIM)의 표준품을 sigma-aldrich社에서 구매하여 분석하였다.

비건조 원재료 추출물과 표준품을 비교해본 결과, 정제수 추출물에서 유사한 RT값(40분 전후)을 갖는 peak를 확인하였으며, 주정 추출물에서는 I3C와 DIM 모두 유사한 peak를 확인 할 수 없었다(그림 9). I3C와 DIM 그리고 정제수 추출물에서 확인된 peak의 UV 패턴을 비교해본 결과 두 peak는 서로 다른 물질로 확인 되었다(그림 10).

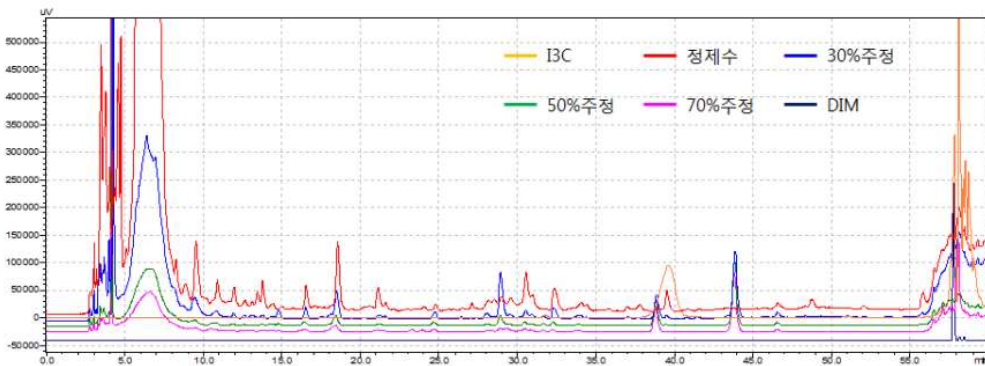


그림 9. 표준품 및 비건조 원재료 추출물의 HPLC spectra 비교

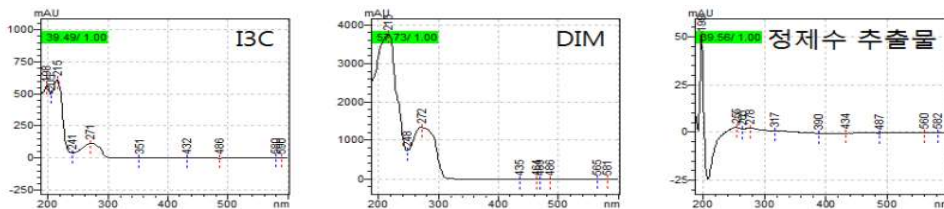


그림 10. I3C, DIM 그리고 정제수 추출물의 UV패턴

열풍건조 원재료의 조건별 추출물과 표준품의 HPLC분석 결과를 비교하였다. 정제수 추출물과 주정 추출물 모두에서 I3C와 DIM은 확인되지 않았으며, 유사한 RT값이나 UV패턴을 갖는 peak 또한 확인 할 수 없었다.

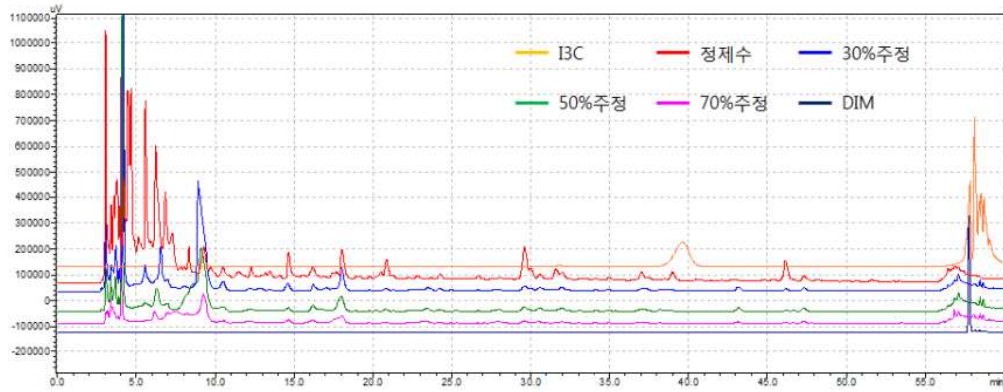


그림 11. 표준품 및 열풍건조 원재료 추출물의 HPLC spectra 비교

Folin-denis'법을 이용하여 조건별 추출물의 총 폴리페놀함량을 측정하였다. 시험에 사용된 Folin-denis 시약과 탄산나트륨(sodium carbonate, Na_2CO_3), gallic acid는 Sigma-aldrich 社(St. Louis, Missouri, US)의 제품을 사용하였다. 시료 20 μl 에 folin-denis시약 100 μl 를 가한 후 40°C에서 1분간 반응시켰다. 그 후 7.5% sodium carbonate 80 μl 를 첨가한 뒤 40°C에서 15분간 반응시키고 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량 측정을 위한 검량선을 그리기 위해 표준품으로 gallic acid를 40, 80, 120, 160, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 만든 후 사용하였다(그림 12). 비건조 원재료 추출물과 건조 원재료 추출물의 총 폴리페놀함량 측정결과 비건조 원재료 추출물은 정제수 추출물이 10.39 mg/g, 30%주정 추출물이 8.07 mg/g, 50%주정 추출물이 7.67 mg/g, 70%주정 추출물이 7.20 mg/g으로 정제수 추출물이 가장 높게 측정되었다. 하지만 건조 원재료 추출물에서는 정제수 추출물이 8.31 mg/g, 30%주정 추출물이 9.64 mg/g, 50%주정 추출물이 8.88 mg/g, 70%주정 추출물이 9.42 mg/g으로 주정추출물에서 더 높게 측정되었다(그림 13).

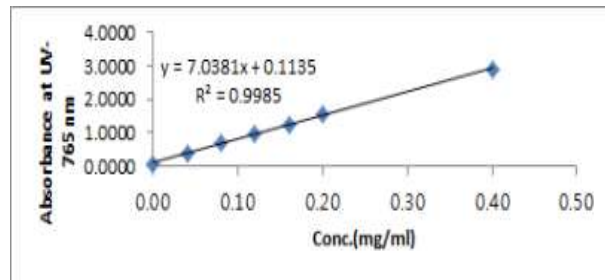


그림12. Gallic acid 검량선

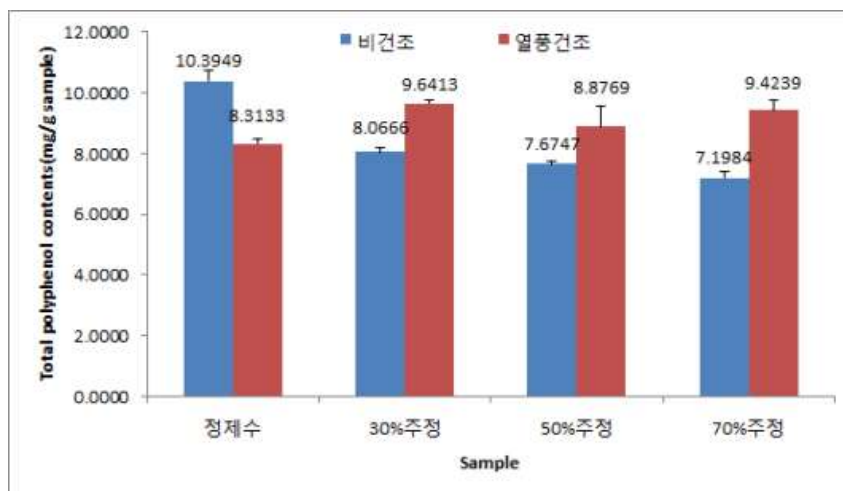


그림 13. 조건별 추출물의 총 폴리페놀 함량

Diethylene glycol을 이용해 조건별 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 시험에 사용된 diethylene glycol과 sodium hydroxide(수산화나트륨, NaOH), naringin은 Sigma-aldrich社(St. Louis, Missouri, US)의 제품을 사용하였다. 시료 20 μ l에 diethylene glycol 200 μ l와 1 N NaOH용액 20 μ l을 가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량 측정을 위한 검량선을 그리기 위해 표준품으로 naringin을 40, 80, 120, 160, 200, 400 μ g/ml 농도로 만든 후 사용하였다(그림 14). 각 조건별 추출물의 총 플라보노이드 함량 측정 결과 비건조 원재료 추출물에서는 정제수 추출물이 8.39 mg/g, 30% 주정 추출물이 4.48 mg/g, 50% 주정 추출물이 5.88 mg/g, 70% 주정 추출물이 9.27 mg/g으로 70% 주정 추출물이 가장 높게 측정되었으며, 건조 원재료 추출물은 정제수 추출물이 9.99 mg/g, 30% 주정 추출물이 5.87 mg/g, 50% 주정 추출물이 6.76 mg/g, 70%주정 추출물이 6.02 mg/g으로 정제수 추출물이 가장 높게 측정되었다(그림 15).

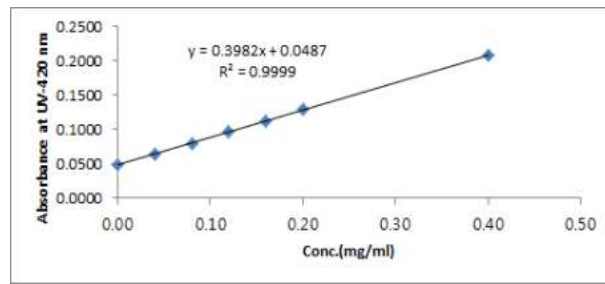


그림 14. Naringin 검량선

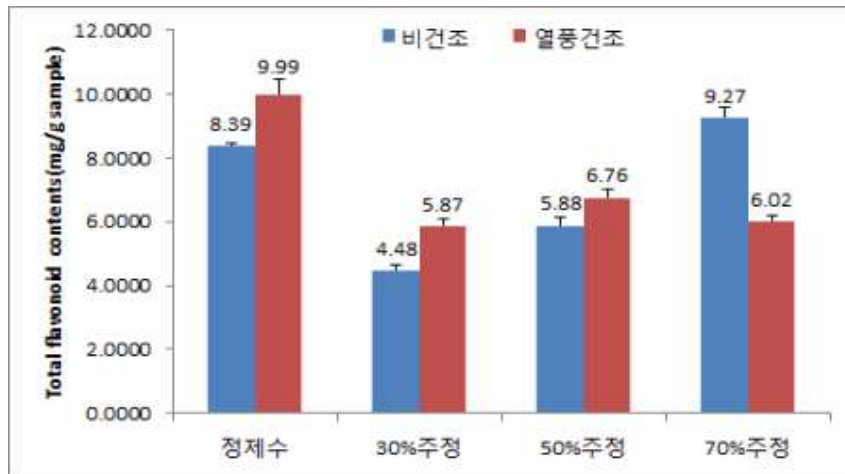


그림 15. 조건별 추출물의 총 플라보노이드 함량

조건별 추출물의 수율 측면을 고려하였을 때, 원재료의 건조과정은 필수적이며, 건조 원재료 추출물 중 정제수 추출물의 수율이 가장 높으며 주정 추출물간의 차이는 미비하였다. 그리고 HPLC 분석 결과 정제수 추출물에 비해 주정 추출물에 조금 더 다양한 생리활성 물질이 존재하는 것으로 보이나, 생리활성의 간접적인 지표로 사용되는 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 분석결과로는 주정 추출물에 비해 정제수 추출물에 폴리페놀 및 플라보노이드 계열의 화합물이 더 많이 존재하는 것으로 보인다. 따라서 추출 수율 및 이화학적 분석 결과로 보았을 때, 정제수 혹은

50% 주정 추출물이 타당한 것으로 보이며 효능평가를 위해 조건별 추출물을 참여기관에 공급하였다.

○ 고효율 추출기술 개발

흑무에 함유되어있는 기능성분의 최적으로 추출하기 위해 비건조, 열풍건조, 동결건조의 3가지 조건 및 열수, 30% 주정, 50% 주정, 70% 주정의 4가지 조건으로 추출하여 항염증 효능을 평가하였다. 비건조 혹은 건조된 흑무 중량의 15배수의 정제수 혹은 혼합주정을 가한 후 95°C 혹은 70°C로 가열하여 4시간동안 1차추출을 진행하였다. 1차 추출 종료 후 여과하여 남은 잔사에 1차추출과 동일한 용매를 투입 원재료 중량의 10배수로 가하고 1차 추출의 동일 온도로 2시간동안 2차추출을 진행하였다.

NO생성 억제 효능평가에서는 건조조건 및 추출조건에 따른 효능차이는 유사하게 control의 절반 수준이나 비건조 70% 주정추출에서 가장 낮은 효능을 보였다(그림 16A). TNF- α 생성 억제 효능평가에서는 건조조건 및 추출조건에 따라 큰 차이를 보였으며, 비건조 70%주정 추출물에서 억제 효능이 약 80%로 가장 우수한 효능을 보였다(그림 16B). IL-6생성 억제 효능 역시 비건조 70%주정추출물에서 가장 높은 효능을 보였다(그림 16C). 하지만 비건조 70%주정추출물의 경우 추출 수율이 4% 내외로 향후 산업화를 전망하기 어렵다는 단점이 있다. 따라서 효능은 유지 혹은 증가시키거나 수율을 증가시킬 수 있는 제조공정을 고려하게되었다.

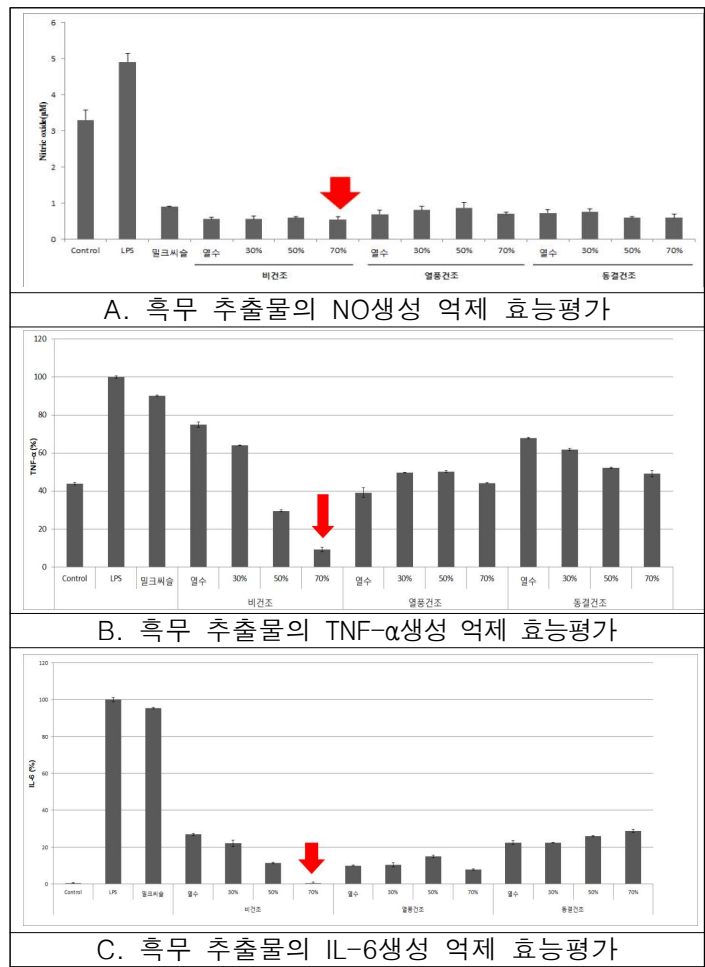


그림 16. 흑무 조건별 추출물의 항염증 효능평가

○ 생물전환기술을 활용한 효능 증대

흑무의 효능 혹은 수율 증대를 위해 원재료의 효능증대나 신규 기능성 발굴에 많이 적용되는 방법인 미생물을 활용한 발효 방법을 흑무에 적용하였다. 식품원재료로 사용 가능하며 산업화가 가능한 *Lactobacillus*속의 *lactobacillus plantarum* 유산균을 선정하여 발효를 진행하였으며, 발효에 사용할 영양원으로 흑무 열수추출물과 흑무 자체를 마쇄한 마쇄물의 2가지를 이용하여 유산균 발효물을 제조하였다.

열수추출물은 기존의 제조공정에 따라 제조한 후 6 brix까지 농축하여 발효에 사용하였다. 마쇄물은 흑무 원재료를 세척한 후, 95°C로 15분 동안 가열하여 1차 살균 후 마쇄하였다. 그 후 진탕 배양시 유동성을 주기 위해 마쇄물에 동량의 정제수를 혼합한 후 121°C에서 15분 동안 멸균하여 발효에 사용하였다. 발효물의 제조는 먼저 분양받은 *lactobacillus plantarum*균주를 MRS agar배지에 37°C, 24시간 배양 후, 형성된 단일균집을 MRS broth배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양시켜 종균액으로 사용하였다. 그 후 준비된 흑무배지(열수추출물 혹은 마쇄물)에 0.7 ~ 1.0%로 종균액을 접종시킨 후 37°C에서 48시간동안 진탕배양 하였다. 배양 종료 후 95°C에서 15분간 살균하여 발효를 종료시켰다.

제조한 발효물은 대식세포인 Raw 264.7 세포주를 활용한 항염증 효능평가와 간세포주인 HepG2를 이용한 지방구 형성 억제 효능평가를 진행하였다. 간세포가 손상을 받게 되면 지방구가 형성되며 지방간으로 진행되게 되는데 이를 억제할 경우 간 보호 효능으로 볼 수 있다.

항염증 효능평가 결과 열수추출물 발효물과 마쇄물 발효물 모두 기존의 추출물과 유사한 수준의 control의 절반수준으로 NO억제 효능을 보였으며, 둘 간의 차이는 없었다(그림 17A). 하지만 염증성사이토카인인 TNF- α 와 IL-6억제에서는 별다른 효능은 나타나지 않았다(그림 17B, 17C). 이에 반해 NO생성 억제 효능이 있는 것으로 보아 유산균 발효를 통해 구성성분이 변화하였으며, 기존 추출물과는 다른 기전으로 작용하는 것으로 예상된다. 하지만 수율 측면에서 열수추출물 발효물은 기존의 추출물과 크게 다르지 않으며, 마쇄물을 발효시킨 경우 흑무의 수분을 제외한 대부분을 이용하게 때문에 약 13~15%의 수율을 확보할 수 있다. 이는 비건조 70%주정 추출물의 4%보다 4배 많은 양이기 때문에 유사한 효능을 나타낼 경우 산업화 측면에서 발효물이 더 이득이라고 볼 수 있다. 따라서 이후 진행된 지방구 형성 억제효능평가는 마쇄물 발효물과 기존 추출물간의 비교로 진행하였다.

HepG2 세포주의 지방구 형성 억제 효능평가 결과 발효물과 기존 추출물 모두 지방구 형성을 억제하였지만 두 그룹간의 큰 효능차이는 보이지 않았다(그림 18). 그리고 발효물에서 농도 증가에 따른 지방구 형성 증가 추세가 보였으나 이는 세포생존률 측정결과 발효물의 농도가 증가할수록 세포의 증식률이 증가하는 경향을 보였다. 즉 세포수가 증가함에 따라 지방구 형성도 증가한 것으로 이는 근본적으로 지방구를 형성한다고 보기에는 어렵다.

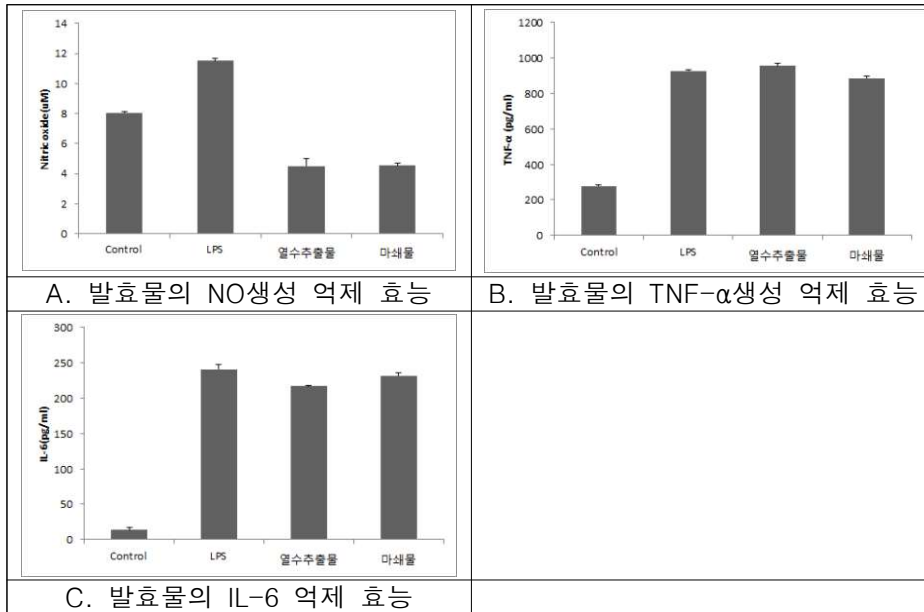


그림 17. 발효물의 항염증 효능평가

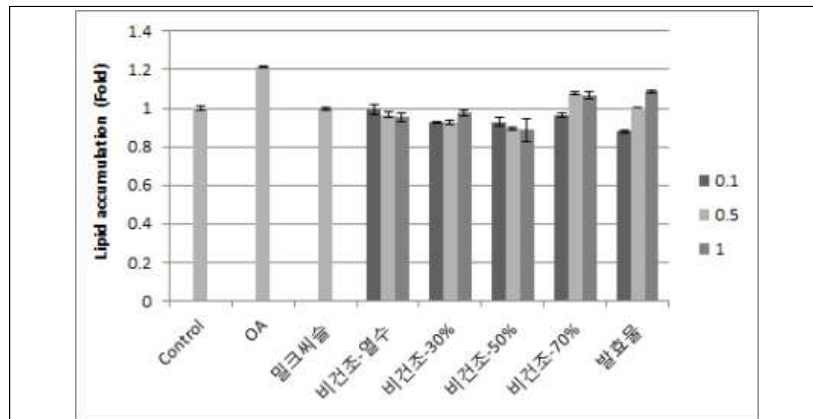


그림 18. 단순 추출물 및 발효물의 지방구 형성 억제 효능평가

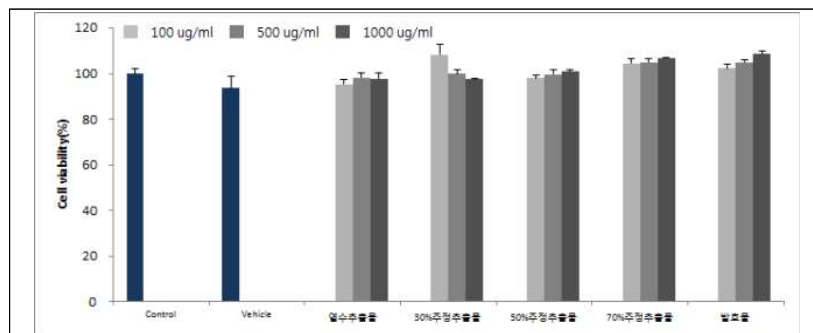


그림 19. 단순 추출물 및 발효물의 HepG2 세포생존률

기존의 단순추출과 차별화되는 유산균 발효 공정을 적용하여 효능과 수율 두 가지 측면을 모두 확보하였다. 유산균 발효물은 기존의 추출물과 비교하여 유사한 효능을 보이지만 수율측면에 있어 2~4배 정도의 이득이 있으며, 주정이 투입되지 않고 제조공정이 비교적 간단하여 제조 단가 측면에서도 우수하다. 또한 마케팅 측면에서도 기존의 건강기능식품들과 차별화 전략으로 소비자에게 다가갈 수 있다. 그리고 기능/지표성분 분석 및 동물실험을 위해 각 참여기관으로 발효물을 공급하였다.

3) 기준규격 설정

○ 성상, 유해물질규격 설정

검정무 발효분말의 기준규격은 식품의약품안전처의 ‘건강기능식품의 기준 및 규격’에 따라 설정하였다. 개발 원료는 분말제형으로써 성상과 기능/지표성분, 유해물질규격을 설정하여야 하며 원료가 발효물인 특성을 고려해 발효 후 유산균 잔류에 의한 추가 발효나 성분의 변화를 막기 위해 추가 기준규격으로 유산균 규격을 설정하였다.

1) 성상: 검정무 발효분말의 성상은 ‘이미, 이취가 없고 고유의 향미를 갖는 회갈색의 분말’로써 제조과정 중 가열에 의해 갈변된 검정무의 색상이 그대로 반영된 것으로 여겨진다.

2) 유해물질규격: 유해물질규격은 중금속과 미생물규격으로 나뉘며, 중금속규격은 납(Pb), 총비소(As), 카드뮴(Cd), 총수은(Hg)이고 미생물규격은 원료의 제형이 분말이므로 법령에 따라 대장균군을 설정하였다. 하지만 본 원료가 발효물이기에 유산균이 잔류할 경우 추가적인 발효에 의한 원료의 변화나 유산균 자체에 의해 기존에 고려하지 않았던 작용이 유도될 수 있으므로 유산균이 멸균과정에서 완전히 사멸하였는지 판단하기 위해서 별도 규격으로 설정하였다.

① 중금속: 식약처의 ‘유해물질규격설정항목’에 따라 중금속별 1일 최대 노출허용량이 설정되어 있으며, 개발원료의 일일섭취량을 토대로 기준규격을 설정하여야 한다. 검정무 발효분말은 제주대학교 수의학과의 In vivo 효능평가를 토대로 일일섭취량을 960 mg으로 설정하였으며 이에 따라 각 중금속 항목의 기준규격을 설정하였다. 각 중금속 항목의 측정법은 ‘건강기능식품 공전’의 각 항목별 실험법에 따른다.

항목	1일 최대 노출허용량(μg)	원료 기준규격($\mu\text{g}/\text{g}$)	원료 기준규격에 의한 일일 노출량(μg)
납(Pb)	10.8	5 이하	4.80
총비소(As)	150	5 이하	4.80
카드뮴(Cd)	3.0	1 이하	0.96
총수은(Hg)	2.1	1 이하	0.96

② 미생물: 미생물 기준규격은 대장균군과 세균수의 두 가지 항목이 있으며 세균수는 액상제품에만 해당되는 규격으로 분말제형인 검정무 발효분말에는 해당되지 않는다. 하지만 검정무 발효분말은 유산균을 원물에 투입하여 발효한 원료로써 살아있는 유산균이 잔류 할 경우 추가적인 발효가 이루어져 변질이나 본래 의도치 않은 반응이 일어날 수 있기에 추가로 유산균에 대한 기준규격을 설정하였다. 대장균군의 시험법은 건강기능식품 공전의 실험법에 따라 진행하며, 유산균 또한 건강기능식품 공전의 실험법에 따라 MRS배지를 사용하여 실험한다. 대장균군 및 유산균 모두 불검출을 기준규격으로 설정하였다.

○ 기능/지표성분 설정

기능/지표성분은 원료의 기준규격항목에서 필수 항목 중 하나로 제주대학교 화학과에서 설정을 담당하고 있고 콜마비앤에이치에서 원료 공급등의 보조 하였다. 현재까지 제조된 원료인 시험제조원료 3건 및 대량제조 1건의 원료를 공급하였으며, 제주대학교 화

학과에서 검정무가 속한 십자화과에서 다량 함유된 것으로 알려진 glucosinolate 계열의 화합물을 탐색하였으며 최종적으로 알파-리놀렌산과 식이섬유를 기능/지표성분으로 설정하였다.

4) 안정성 시험

유통기한설정을 위한 안정성 시험은 식약처 가이드라인에 따라 장기보존시험과 가속시험의 2가지로 나뉜다. 그 중 비교적 단기간내 시험진행이 가능한 가속시험을 진행할 예정이며, 상온유통을 전제조건으로 하여 25±2°C/상대습도 60±5%의 대조군과 30±2°C/상대습도 75±5%, 45±2°C/상대습도 75±5%의 2개의 실험군을 지정하였다. 검정무의 재배시기가 겨울이어서 12월경 검정무 수확 후 원료를 제조한 다음 4차년도에 안정성 시험을 진행하였다.

5) 인체적용시험을 위한 시제품 제조

인체적용시험은 대상 기능성에 영향을 줄 수 있는 부원료는 사용이 제한되므로 일반 시판제품과는 달리 제조하게 된다. 기능성 평가를 담당하고 있는 제주대학교 수의학과의 In vivo 실험 결과에 따르면 MCD를 통한 간 손상 유도 마우스에서 검정무 발효분말 200 mg/kg에서 유의적인 AST, ALT 개선효과를 확인하였다. 해당 투여 용량을 인체에 적용하여 환산하면 200 mg/kg x 60 kg x 0.08 = 960 mg으로 계산됨에 따라 일일 섭취량을 960 mg으로 설정하였다. 일일섭취량에 따라 시험약을 제조하였으며 정제타입과 경질캡슐의 2가지 제형을 제조하였다. 섭취용이성 및 총 섭취량 등을 고려하였을 때, 더 적합한 경질캡슐을 선정하였다.

○ 인체적용시험 시제품 제조

- 정제타입

정제타입은 많이 사용되는 제형으로 제조가 비교적 쉬운 장점이 있다. 하지만 검정무 발효분말은 정제타입으로 제조 시 원료가 갖는 발효물 특유의 향미로 인해 섭취용이성이 떨어진다는 점과 원료의 비중이 낮고 잘 뭉치지 않아 정제타입 제조시 필요한 부형제의 비율이 높아져 원료 함량이 1정당 최대 30% 수준이었다. 제조된 정제타입은 1정당 800 mg이었으며, 1일 2회, 1회 2정 섭취로 하루 4정이므로 3200 mg을 섭취하여야 한다. 1정당 기능성 원료의 함량이 낮으면 섭취해야되는 정제의 수가 많아지게 되고 이는 복용순응도가 낮아지는 원인이 된다. 이러한 문제점으로 인해 정제타입은 인체적용 시험용 시험약에서 배재하였다.



검정무 발효분말 시험약 정제타입 배합비		
번호	원료명	배합비율(%)
1	검정무 발효분말	30.00
2	결정셀룰로오스	54.00
3	스테아린산	1.00
4	스테아린산마그네슘	1.33
5	유당혼합분말	2.50
6	해조분말	5.00
7	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	1.50
8	히드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC)	3.20
9	글리세린지방산에스테르	0.32
10	이산화티타늄	1.00
11	카카오색소	0.15

- 경질캡슐 타입

경질캡슐은 콜라겐 재질의 캡슐 내에 원료를 충전하고 결합하는 방식으로 제조되며 내부 원료가 외부에 노출되지 않기 때문에 원료가 가진 특유의 발효 향미를 차단할 수 있다는 장점이 있다. 캡슐내 원료 충진을 원활하게 하기 위한 일부 부형제를 혼합한 후 충전 테스트를 진행하였다. 테스트 결과 300 mg 용량의 1캡슐에 80% 비율로 기능성 원료를 충전할 수 있었으며, 발효원료의 고유한 향미를 차단할 수 있었다. 섭취방법은 1일 2회, 1회 2캡슐로 정제타입과 동일하지만 1캡슐당 크기가 정제타입의 800 mg보다 더 작아진 300 mg으로써 실제 섭취하는 총량은 1200 mg이 된다. 따라서 인체적용시험의 시험약 제형을 경질캡슐로 정하고 이에 맞추어 플라세보를 제조하였다. 플라세보의 경우 경질캡슐이 불투명하여 내용물을 확인하기 어려우나 일부 피험자의 경우 캡슐을 분리시켜서 볼 수 있기에 부형제를 혼합하여 원료와 비슷한 색을 내도록 제조한 후 충전 하였다.



검정무 발효분말 시험약 경질캡슐 타입 배합비		
번호	원료명	배합비율(%)
1	검정무 발효분말	80.00
2	유당혼합분말	16.20
3	스테아린산마그네슘	1.90
4	이산화규소	1.90

검정무 발효분말 플라세보 경질캡슐 타입 배합비		
번호	원료명	배합비율(%)
1	코코아분말	35.00
2	유당혼합분말	61.20
3	스테아린산마그네슘	1.90
4	이산화규소	1.90

6) 검정무 발효분말의 안정성평가




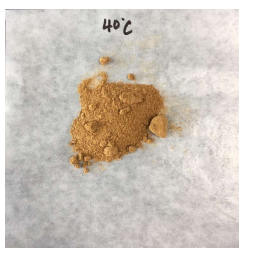
○ 유통기한설정

검정무 발효분말의 안정성은 지표성분을 포함한 성상, 유해물질이 보관조건에서 변화가 있는지를 확인하였다. 건강기능식품 원료 및 제품에 있어 안정성이라 함은 유통기한과 연결되며 유통기한의 설정은 식품의약품안전처에서 발간한 ‘건강기능식품의 유통기한 설정 가이드라인’에 따라 시험하여 설정하게 된다. 검정무 발효분말은 가속시험 가이드라인에 따라 보관조건을 설정하여 실험을 진행하였다.

- 보관조건: 대조군 1조건과 시험군으로써 가속조건 2조건을 설정하여 보관하며 포장재는 실제 유통시에 적용하는 것과 동일하게 PP재질의 비닐팩으로 1차 포장 후 은박재질의 파우치로 2차 포장하였다.

검정무 발효분말 유통기한설정시험 조건			
온도/상대습도	대조군	가속조건1	가속조건2
온도(℃)	25	35	40
상대습도(%)	60	75	75

- 각 조건에 보관한지 6개월 후 외견 관찰 및 성상변화를 확인하였다. 검정무 발효분말을 상온에 보관한 경우와 대조군은 큰 차이가 없이 동일한 것을 확인하였으며, 가속조건1의 경우 대조군 대비 원료의 뭉침현상이 약간 관찰되었다. 하지만 쉽게 부서져 다시 분말화 되는 것을 확인하였다. 가속조건2의 경우 뭉침현상이 조금더 많았으나 역시 쉽게 부서졌고 가속조건2와 달리 색상이 약간 진해진 것을 확인하였다. 냄새는 모든 조건에서 큰 차이를 보이지 않았으며 맛의 변화도 없었다. 결과적으로 가속조건2에서 색상의 진해짐 외에는 변화를 보이지 않았으며 35℃까지는 원료의 성상이 유지되는 것을 확인하였다.

			
상온보관 검정무 발효분말	25℃보관 검정무 발효분말(대조군)	35℃보관 검정무 발효분말(가속조건1)	40℃보관 검정무 발효분말(가속조건2)

- 1년 이상 보관한 시료에 대해 지표성분 함량을 분석한 결과 상온보관한 시료와 가속조건으로 보관한 시료 간의 함량 차이가 크게 나타나지 않는 것으로 보아 지표성분으로 설정한 알파-리놀렌산과 식이섬유의 안정성을 확인할 수 있었다.

	상온보관	25℃보관 (대조군)	35℃보관 (가속조건1)	40℃보관 (가속조건2)
알파-리놀렌산	0.32 g/100 g	0.28 g/100 g	0.29 g/100 g	0.29 g/100 g
식이섬유	26.09 %	25.63 %	26.61 %	29.74 %

7) 검정무 발효분말의 제품화

○ 검정무 발효분말 활용 건강지향식품 개발

검정무 발효분말의 제품화는 개별인정형 원료로서 아직 인정되지 않았기에 건강지향식품으로 개발을 진행하였다. 간 기능 개선 기능성식품을 주로 찾는 소비자층은 20대부터 50대 중장년층까지 그 범위가 넓으며 대부분 직장인인 경우가 많은 것을 고려하여 섭취와 보관이 용이한 제형을 고려하였다. 또한 건강지향식품은 품목제조보고시 일반식품으로 분류되며 일반식품의 정제타입제형은 ‘캔디류’로 한정되어 당류를 50%이상 함유해야하기에 개발대상에서 제외하였다. 따라서 원료의 성상과 용이성을 고려하였을 때 분말을 스틱형 파우치에 포장한 분말스틱 제형이 적합하다고 보고 개발을 수행하였다.

검정무 발효분말은 유산균을 이용하여 발효한 원료로서 발효물 특유의 향과 맛이 있는데 이러한 향미는 사람에 따라 호불호가 나뉠수 있어 대중성을 고려하여 발효물 특유의 향미를 저감하는 방향으로 1차 시제를 고려하였다. 발효물 특유의 향을 저감하면서 항산화효능이 있는 계피와 생강 추출물을 부원료로 활용하였으며 발효물의 시큼한 맛을 저감하기 위해 당류를 일부 첨가하였다. 제조된 시제품을 자체 관능평가해본 결과 발효물 특유의 향미 저감을 위해 투입한 부원료로 인해 전체적인 섭취량이 증가하여 1포당 5 g이 되었고 계피와 생강의 향이 강하다는 의견이 있어 새로이 시제를 진행하였다.

1차 분말스틱시제 배합비	
원료명	배합비율(%)
검정무 발효분말	19.2
결정포도당	53.0
이산화규소	1.80
계피추출분말	20.0
생강추출분말	2.0
꿀분말	4.0

2차 시제는 부원료인 계피와 생강추출분말의 비율을 감소시켰으며 결정포도당 대신 기능성원료인 자일리톨을 사용하였고 그 외 간 기능 개선에 효능이 있는 기능성 원료를 일부 첨가하였다. 부원료로 투입된 기능성원료의 경우 일일섭취량보다는 섭취량이 낮아 기능성을 표시할 수는 없지만 간기능 개선 건강지향식품의 컨셉원료로 투입하였다. 또한 전체적인 부원료 투입량을 감소시켜 1포당 3 g으로 낮추었다. 내부 관능평가 결과 계피와 생강의 향을 완화 시켰으나 부원료의 함량이 감소함에 따라 발효물 특유의 신맛이 적절히 저감되지 않았으며 계피의 향이 여전히 강하다는 의견이 있어 배합비를 수정하여 3차 시제를 진행하였다.

2차 분말스틱시제 배합비	
원료명	배합비율(%)
검정무 발효분말	32.0
자일리톨	15.0
이산화규소	2.0
계피추출분말	15.0
생강추출분말	2.0
꿀분말	3.7
헛개나무열매추출분말	0.1
울금추출분말	0.1
결명자추출분말	0.1
유당혼합분말	30.0

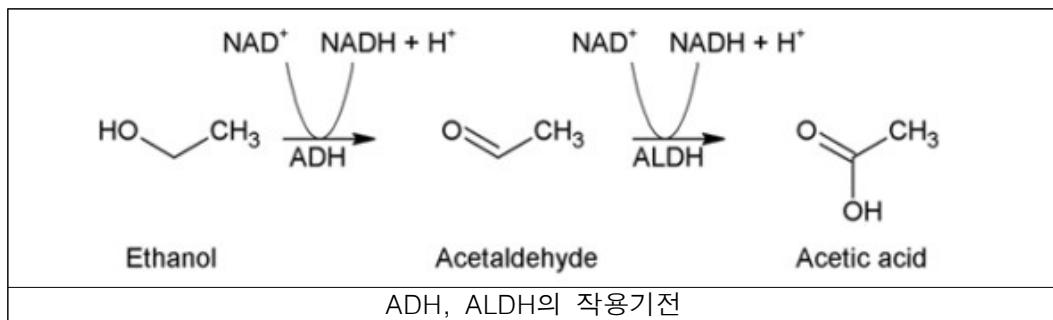
2차 시제에서 계피의 향이 강하고 신맛이 올라온다는 의견을 반영하여 계피추출분말의 함량을 더욱 낮추었고 제품 섭취 후 끝의 신맛을 저감하기 위해 감미료로서 스테비아를 첨가하였다. 아울러 부원료 함량이 감소함에 따라 제품 중량이 1포당 2 g으로 낮아져 섭취와 휴대가 더 용이해졌다.

제조된 3종의 시제품 중 1종을 선정하기 위해 관능평가를 실시하였다. 동일한 스틱포에 포장된 3종의 시제품을 각 참여기관별 연구원을 대상으로 시식후 3가지 시제품을 선호도별로 나열하도록 하였다. 선호도에 따라 1순위는 5점, 2순위는 3점, 3순위는 1점을 주었으며, 합산한 점수가 가장 높은 시제품을 선정하였다. 그 결과 3차 시제품이 36점, 2차 시제품이 34점, 1차 시제품이 20점으로 채점되었다. 따라서 3차 시제의 배합비율로 최종 확정하고 품목제조보고를 진행하였다.

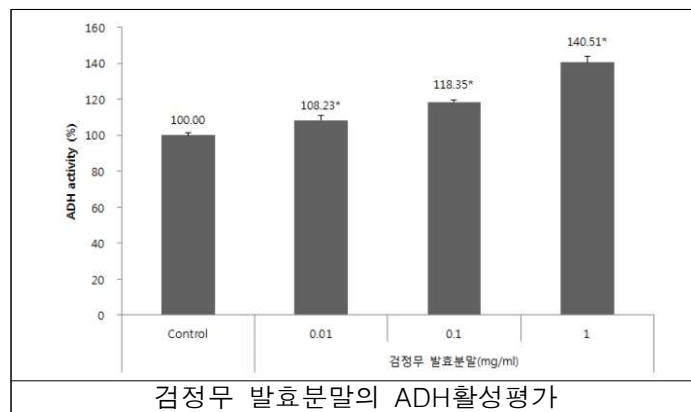
번호	1순위(5점)	2순위(3점)	3순위(1점)
피험자1	2	1	3
피험자2	2	3	1
피험자3	1	3	2
피험자4	3	2	1
피험자5	3	2	1
피험자6	3	2	1
피험자7	3	2	1
피험자8	2	3	1
피험자9	2	1	3
피험자10	3	1	2

정무 발효분말의 숙취해소 개선소재로서의 개발을 검토하였다. 숙취해소 효능은 건강기능식품의 기능성으로 인정되지는 않으나 특허등록 및 적합한 과학적근거가 뒷받침 될 경우 표기할 수 있어 개별인정형 원료 외에 검정무를 다각도로 활용할 수 있는 방법이 될 것으로 보인다.

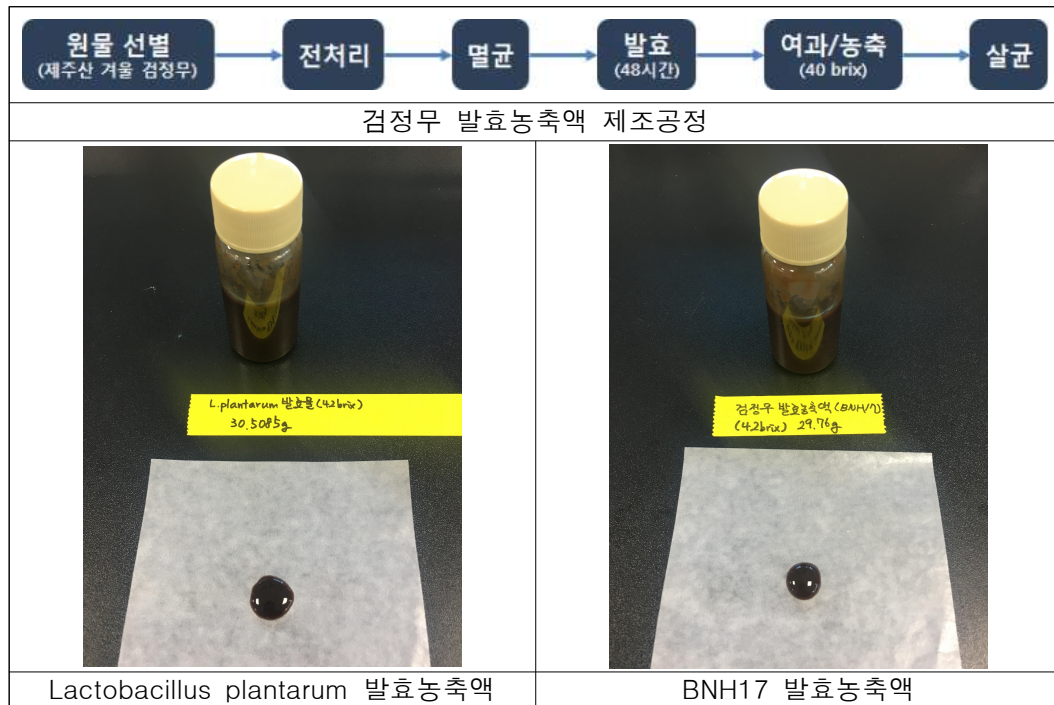
숙취해소 기능성의 원리는 체내에 알코올이 들어오면 먼저 ADH(Alcohol dehydrogenase)가 작용하여 에탄올을 아세트알데히드(Acetaldehyde)로 전환시키고 뒤이어 ALDH(Aldehyde dehydrogenase)에 의해 아세트산(Acetic acid)로 전환된 뒤 체외로 배출되게 된다. 이때 아세트알데히드는 숙취의 원인이 되는 물질로서 ADH의 활성을 촉진하면 혈중알콜농도의 상승을 억제하게되고 ALDH의 활성을 촉진하면 숙취를 개선하게 된다. 이러한 작용기전을 기반으로 In vitro에서는 ADH, ALDH의 활성평가를 통해 숙취해소 기능성을 평가하고 In vivo에서는 ADH, ALDH외에 혈중알콜농도, AST, ALT등을 추가로 확인하여 숙취해소 기능성을 평가한다. 따라서 검정무 발효분말의 숙취해소 기능성을 검토하기 위해 먼저 ADH활성평가를 실험하였다.



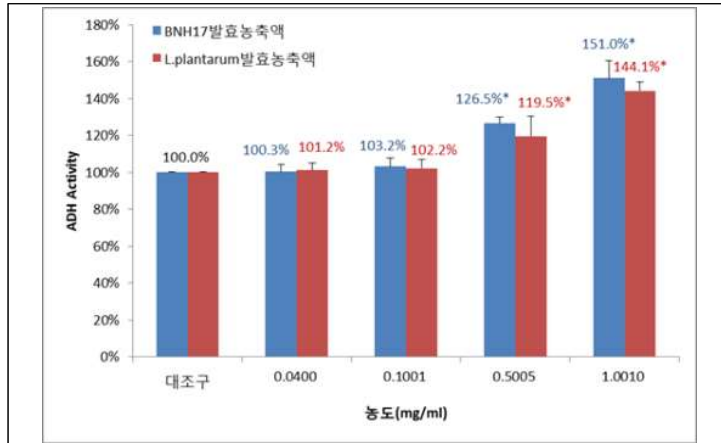
검정무 발효분말을 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml농도로 처리하여 ADH활성을 측정한 결과 0.01 mg/ml농도부터 무처리군 대비 유의하게 ADH활성이 증가한 것을 확인하였다.



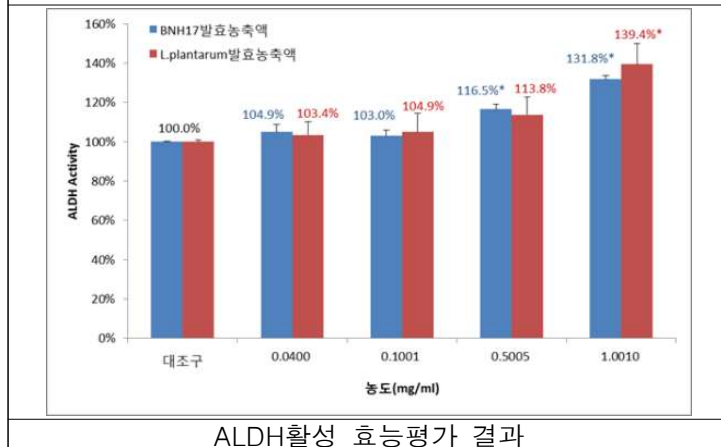
검정무 발효분말은 기획 초기에 개별인정형을 고려하여 분말 원료로 제조하였으나 제조 공정상 동결건조가 있어 기능성원료가 아닌 일반원료로서는 제조공정이 복잡하며 시중에 유통되는 숙취해소 제품 대부분이 음료임을 고려할 때 분말보다는 농축액형태의 액상원료가 적합할것으로 보고 제조공정을 일부 간략화하여 일반원료에 적합하게 개선하였다. 기존의 발효 후 동결건조 대신 발효 후 여과하여 액상만 남긴 후 40 brix이상의 고농도로 농축하여 원료를 제조하였다.



또한 발효공정에 있어 기존 검정무 발효분말 제조에 사용하던 식품용 *Lactobacillus plantarum*(이하 *L. plantarum*)외에 콜마비엔에이치에서 자체적으로 분리, 동정한 신균주인 *Lactobacillus plantarum* BNH17(이하 BNH17)을 이용하여 발효를 수행하였다. BNH17을 활용한 발효농축액의 ADH 및 ALDH활성평가 결과 0.5 mg/ml농도 이상에서 무처리군 대비 유의적인 활성의 증가를 확인하였으며 이를 원료 투입량으로 환산하면 검정무 발효농축액 0.05% 투입시 ADH와 ALDH의 활성이 유의적으로 증가한다는 것을 의미한다. *L. plantarum*발효농축액도 0.5 mg/ml농도 이상에서 무처리군 대비 유의적인 효능을 확인하였으며, *L. plantarum*발효농축액과 BNH17발효농축액간에는 유의적인 차이는 없었다. 이와 같이 기존에 검정무 발효분말 제조에 사용되던 *L. plantarum*균주를 이용한 발효농축액은 ADH와 ALDH의 활성을 증가시켜 숙취를 개선하는 효능이 있다고 볼수 있으며, 콜마비엔에이치의 신균주인 BNH17도 *L. plantarum*대비 동등한 수준의 효능을 갖고 있다고 할 수 있다.



ADH활성 효능평가 결과



ALDH활성 효능평가 결과

○ 동물 시험

- 에탄올 투여 30분 전, 후로 검정무발효분말을 저/중/고농도로 경구투여 하였으며, 에탄올 투여 시간을 기준으로 Time point 별로 (10분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간) 행동학적 검사(Rotarod, Open field test), 알코올 대사 분석(Ethanol, Acetaldehyde, Lactate, ADH, ALDH), 간 조직병리, 혈청 임상병리(16종)를 수행하였다.

- 조직병리및 임상병리 결과 흑무발효추출물 투여시급성의 독성학적 변화는 보이지 않았으며, 흑무발효추출물의 저/중/고 농도에 따른 농도 의존성 또한 확인할 수 없었다.

- 행동 분석

① Rotarod test: G1(WT)과 G2(알코올투여군)에서 행동 양상은 유효한 차이를 보였다. 행동 경향성으로 튀는 값 정리했을 때, Set2에서 G3(positive control)의 수치가 G1(WT)에 근접하게 변화하는 양상을 볼 수 있었고, G4(low)은 G3값과 가까우며 G1과 변화 양상이 유사하였다.

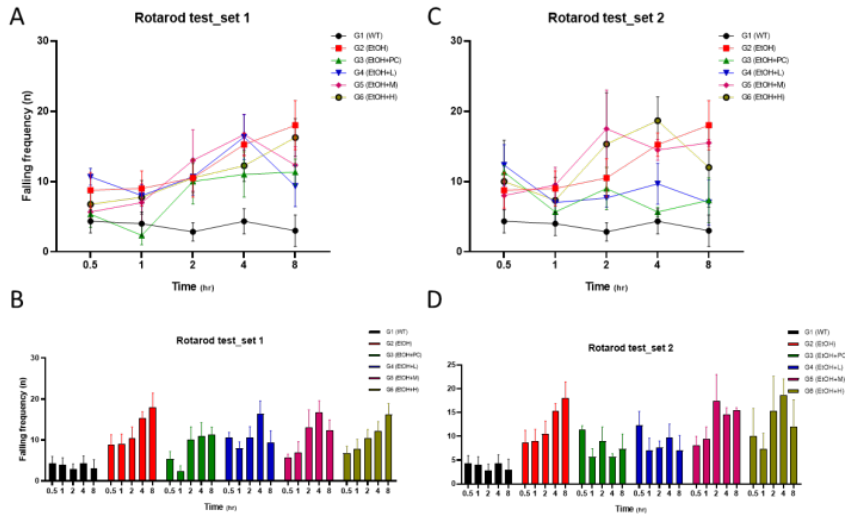


Table. Two-way ANOVA with Dunnett's Method (Set 1)

Groups Min.	Control	EtOH +Positive	EtOH +Low	EtOH +Midium	EtOH +High
30	ns	ns	ns	ns	ns
60	ns	ns	ns	ns	ns
120	*	ns	ns	ns	ns
240	**	ns	ns	ns	ns
480	***	ns	ns	ns	ns

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. EtOH group

Table. Two-way ANOVA with Dunnett's Method (Set 2)

Groups Min.	Control	EtOH +Positive	EtOH +Low	EtOH +Midium	EtOH +High
30	ns	ns	ns	ns	ns
60	ns	ns	ns	ns	ns
120	ns	ns	ns	ns	ns
240	*	ns	ns	ns	ns
480	***	*	*	ns	ns

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. EtOH group

② Open field test: WT의 행동양상은 4시간 쯤(약14:00)까지 반복실험을 하면서 exploration 과정이 줄어들어 총 이동거리는 감소하는 경향을 보였다. 그러나 8시간 쯤(약 18:00)에 실험에서 조금 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 4시간 만에 실험을 해서 context에 대한 단기기억 문제인지, 야행성 동물의 활동 시간대로 인한 증가인지 모호했다. Set 1: 알콜투여군(G2)에 비해 실험물질 투여군(G3~6)에서 알코올 투여 1시간째에 총 이동거리가 급격하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 8시간 쯤에 총 이동거리는 알코올 투여군의 경우 최초 총 이동거리에 가깝게 높은 상승을 보이니 실험물질 투여군의 경우 WT과 유사한 양상을 보였다.

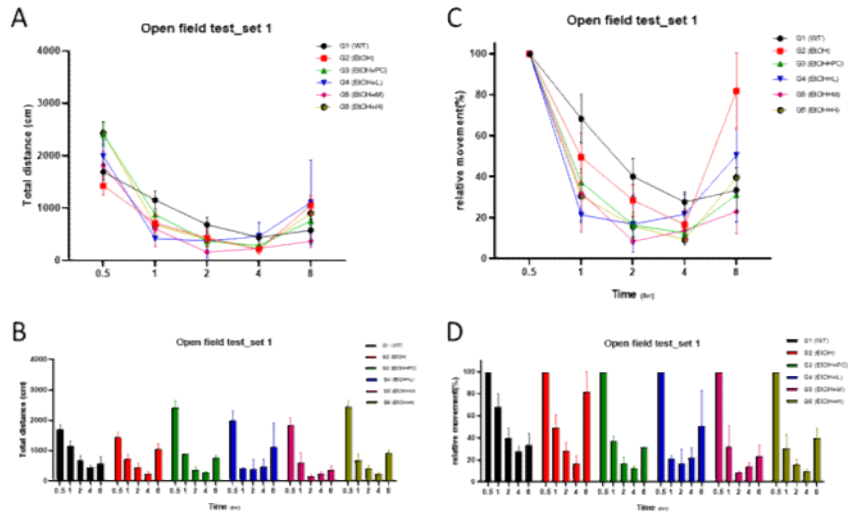


Table. Two-way ANOVA with Dunnett's Method (Set 1)

Groups Min.	EtOH				
	Control	+Positive	+Low	+Midium	+High
30	ns	**	ns	ns	***
60	ns	ns	ns	ns	ns
120	ns	ns	ns	ns	ns
240	ns	ns	ns	ns	ns
480	ns	ns	ns	ns	ns

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. EtOH group

Set2: G4~6군은 G3에 비해 행동변화 양상이 WT과 가까운 것을 확인할 수 있었다.

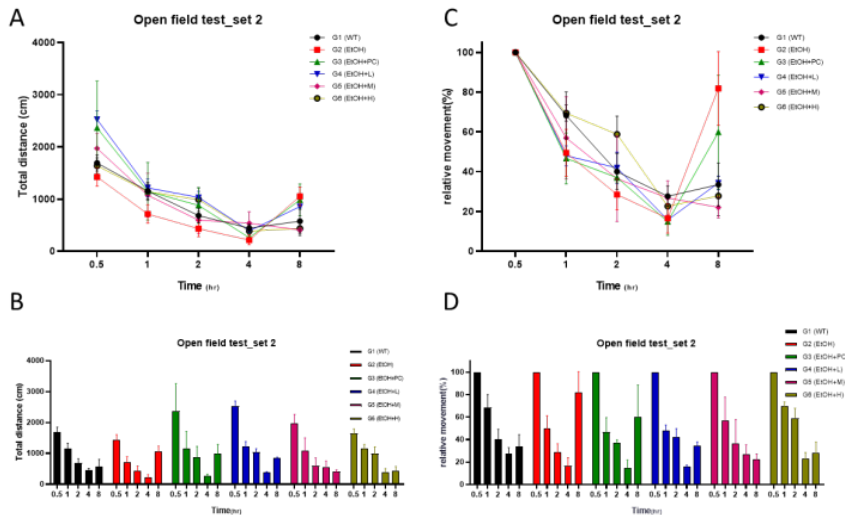


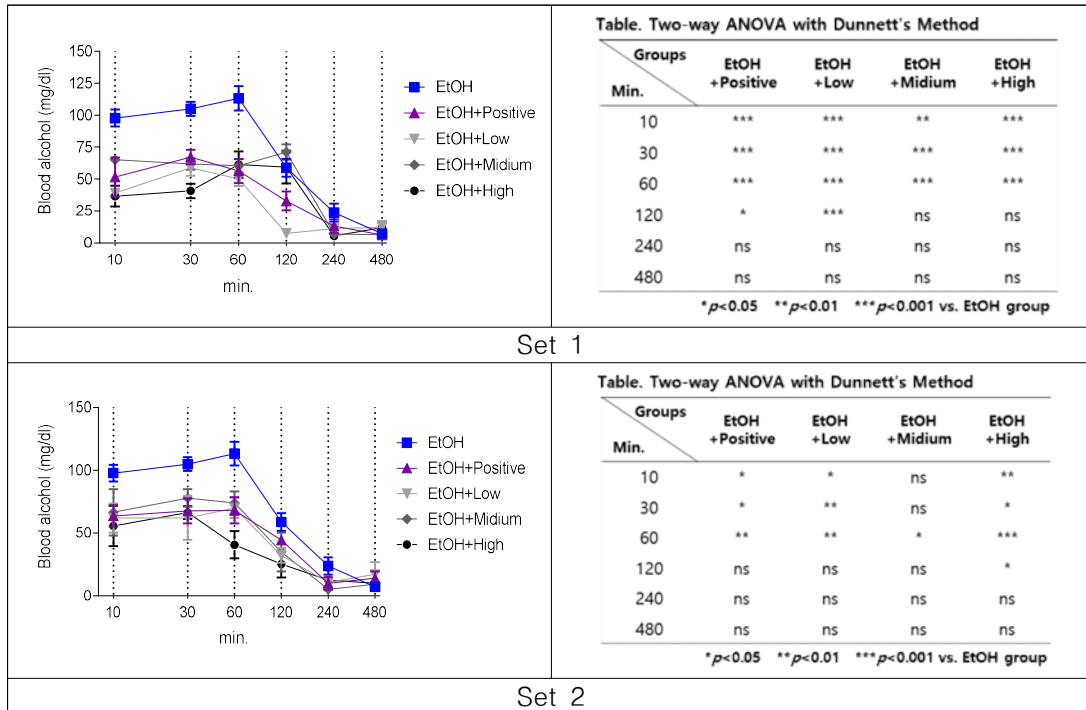
Table. Two-way ANOVA with Dunnett's Method (Set 2)

Groups Min.	Control	EtOH +Positive	EtOH +Low	EtOH +Midium	EtOH +High
30	ns	*	**	ns	ns
60	ns	ns	ns	ns	ns
120	ns	ns	ns	ns	ns
240	ns	ns	ns	ns	ns
480	ns	ns	ns	ns	ns

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. EtOH group

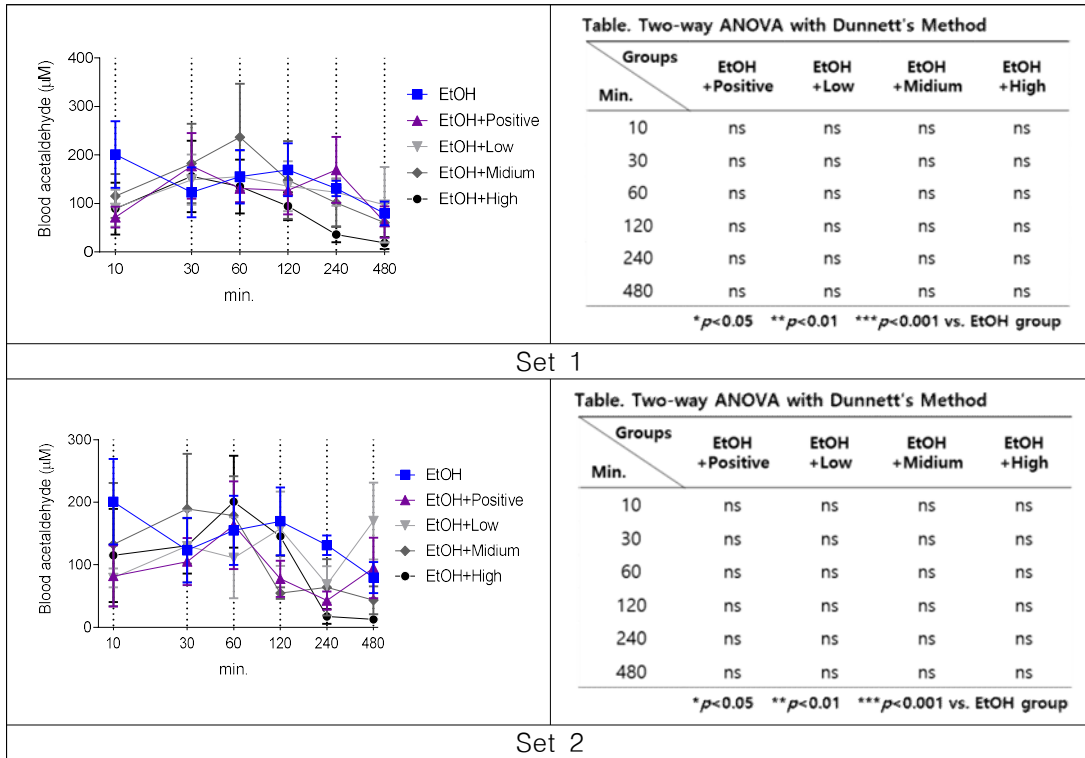
- 알코올 대사 평가

① Blood Alcohol (Ethanol): Set-1, Set-2 G3(양성대조군) 및 G4~6(검정무발효분말 저,중,고용량) 그룹에서 전반적으로 알코올 단독투여군에 비해 혈중 에탄올 농도가 감소됨을 보였다. Set-1 2시간 구간에서 검정무발효분말 투여 그룹의 차이는 물질 성상에 따른 알코올 흡수 차이일 가능성이 있었다. (G5>G6>G4)



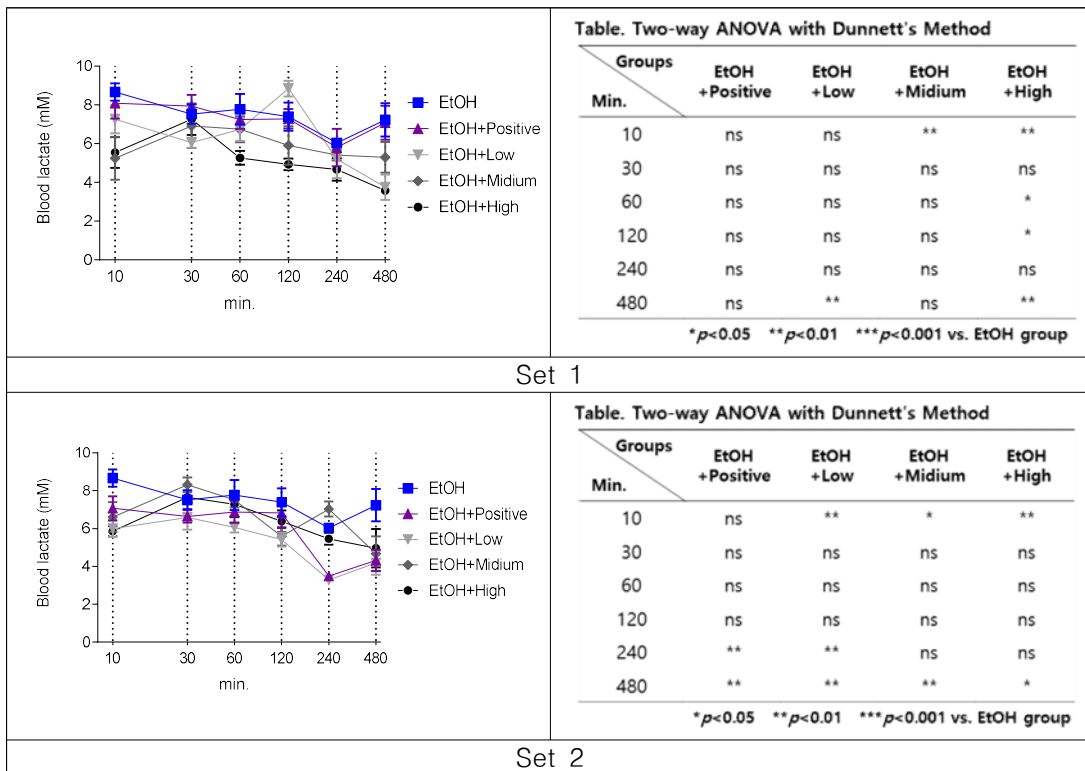
Blood alcohol 확인 평가

② Acetaldehyde: Set-1에서 2시간 시점 이후에 G6(검정무발효분말 고용량)의 혈중 Acetaldehyde 농도가 감소됨을 보였고, Set-2에서 2~4시간 시점 이후에 G2(에탄올) 비해 G3~6에서 혈중 Acetaldehyde 농도가 감소됨을 확인할 수 있었다.



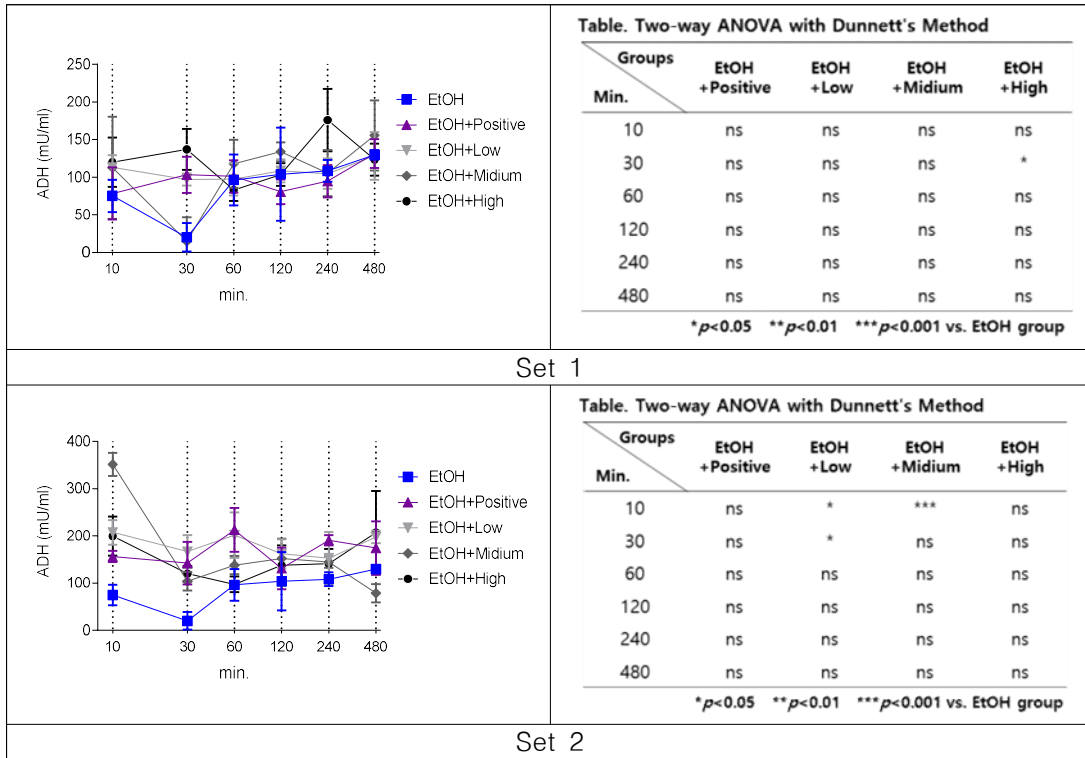
Acetaldehyde 확인 평가

③ Lactate: Set 1에서 G2와 G3의 경향이 비슷한 것을 확인할 수 있었다. G5, G6에서 G2 대비 감소 경향이 보이며 Set 2에서 G3, G4, G6에서 감소 경향이 보다.



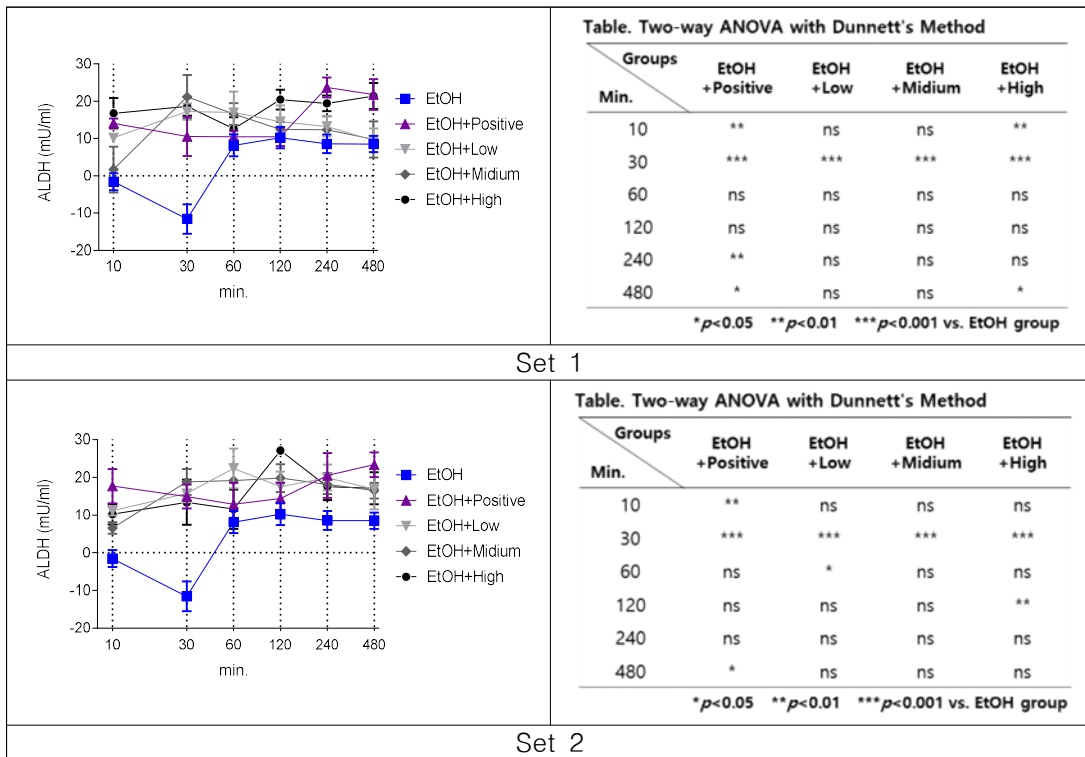
Lactate 확인 평가

④ ADH: Set-1 30분 시점에서 G3,4,6가 G2에 비해 상승 경향을 보이며 Set-2 8시간 시점에서 G4,5가 G2에 비해 상승 경향을 보였다.



ADH 확인 평가

⑤ ALDH: Set-1 및 2 G3,4,5,6에서 G2 대비 ALDH activity가 상승 경향을 보였다.



ALDH 확인 평가

- 행동학적 평가 및 혈중 Ethanol, Acetaldehyde, Lactate, ALD, ALDH 결과를 검토하였을 때, 흑무발효추출물은 숙취해소 가능성이 있을 것으로 사료된다.

물질투여 조건	실험물질	결과 요약 (에탄올 투여군 대비)
Set 1 (에탄올 투여 30분 전 시료섭취)	저농도	Ethanol 감소, ADH 증가 (30분 시점), ALDH 증가
	중농도	Ethanol 감소, Lactate 감소, ADH 증가 (30분 시점), ALDH 증가
	고농도	Ethanol 감소, Acetaldehyde 감소 (2시간 이후), ADH 증가 (30분 시점), ALDH 증가
Set 2 (에탄올 투여 30분 후 시료섭취)	저농도	Rotarod 감소, Openfield 증가, Ethanol 감소, Acetaldehyde 감소 (4시간 이후), ALDH 증가
	중농도	Openfield 증가, Ethanol 감소, Acetaldehyde 감소 (2시간 이후), ALDH 증가
	고농도	Openfield 증가, Ethanol 감소, Acetaldehyde 감소 (4시간 이후), Lactate 감소, ALDH 증가

2-5. [공동연구 및 위탁사업 실적]

1) 시제품 개발

(1) 검정무 분말을 이용한 타정 시제품 개발

- 건기식 개발 이외에 일반식품 개발 미흡으로 6차산업화 추진에 어려움이 발생하여 검정무를 활용한 타정 시제품 개발을 진행하였다.



Figure 52. 타정 시제품 공정도

- 검정무 분말화 방법으로 검정무 습식분쇄후 열풍건조하여 건식분쇄하였다. 분말화된 검정무 및 감태분말, 기타 부형제를 배합비에 맞춰 혼합하고 타정기를 이용하여 압축성형하였다.

Table 3. 검정무 분말 타정 배합비

검정무 분말 타정 배합비	
원료명	배합비율(%)
검정무 분말	35%
결정셀룰로오스	53%
스테이린산 마그네슘	1.33%
유당혼합분말	2.50%
감태분말	2%
카르복시메틸셀룰로오스칼슘	1.50%
히드록시프로필메틸셀룰로오스	3.20%
글리세린지방산에스테르	0.47%
이산화티타늄	1%



- 검정무 분말의 특성상 냄새 및 압축성형시 흐트러짐 발생으로 부형제 및 배합비율의 변경을 통하여 시제품을 보완할 예정이다.

보완된 검정무 타정 시제품은 사용자가 언제 어디서나 휴대 및 섭취가 용이하고 이를 활

- 용한 기타 제품에도 적용 가능할 것으로 사료된다.
- 향후 관련 기술 및 제품을 기술이전 기업을 발굴하여 제품독려 및 매출 증대되도록 지원할 계획이다.

(2) 제주 컬러푸드 6종과 흑무를 활용한 음료 레시피 개발

- 진산비버리지의 슬로건 중 하나인 “제주컬러를 마시자”와 독창성 있는 제주산 원물인 흑무를 접목하여 소비자들에게 편히 다가 갈 수 있는 컨셉의 음료를 개발.
- 대표적인 제주의 컬러푸드와 흑무 외에 다른 뿌리채소 원물을 활용한 음료 개발을 위해 관련 제주 농산물을 탐색함.

Table 1. 컬러별 원물

컬러	원물
레드	적양배추, 레드비트
옐로우	청굴
그린	브로콜리, 양배추
화이트	콜라비
블랙	흑무



Figure 1. 제주5컬러를마시자 제품 원물 소개

○ 탐색한 제주산 농산물을 활용하여 음료 레시피 개발함.

Table 2. 제주5컬러를 마시자 배합비

구분 No.	원료 code	원료명		함량 (%)	제조량 (g)	기준 Bx
1		야채 혼합농축액	양배추	95		30
2			적채			30
3			검정무			30
4			브로콜리			30
5			콜라비			30
6			레드비트			30
7		청귤착즙액		5		8

○ 위 레시피로 제품을 개발했을 때 원료 단가도 적절하며 소비자에게 건강지향성, 기호성을 만족할 수 있다고 판단하여 레시피를 확정함.

○ 제주컬러농산물 6종과 흑무를 활용한 음료는 제주농산물 7종을 이용한 점 그리고 5가지 컬러를 활용했다는 점을 마케팅 포인트로 활용하기 위해 “제주5컬러를 마시자”라는 제품명으로 출시함.

나. 제주5컬러를 마시자 제품 개발

○ 제주5컬러를 마시자 잔류농약 검사 완료

- 잔류농약 320종 검사 결과 모든 성분 불검출 (Figure 2)

○ 제주5컬러를 마시자 영양성분 분석 완료 (Figure 3)

시험 성적서
 (08595)서울특별시 금천구 필립로 1130, 806호 (가산동, 디제일명파라데이빌딩)
 TEL : 070-4044-8832-3 FAX: 02-865-8832 www.oatc.co.kr

* 발급번호 : 잔류농약02-1284호

신청인: (주)전산버버리지 (주)전산버버리지 대표자명: 장종훈
 주소: 제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로3길 13 (조천리) 전화번호: 070-8900-8988
 제품명: 제주 5컬러를 마시자
 제조일자: 유동기한

검사목적: 식품 안전성-잔류농약
 검사항목: 잔류농약-320종
 검사결과: 검출성분: -, 검출지(mg/kg): -, 허용기준(mg/kg): -, 적용기준(용액): -

담당검사원: 성명: 박정진

주식회사 오에이티씨 (OATC Inc.)
 2019-03-21

Figure 2. 잔류농약 검사 성적서

시험 · 검사 성적서
 문서화번호 : IZUC-NUPV-49GE-7EE

발행번호: R20190328-0041
 검사완료일: 2019-03-28
 제품명: 제주 5컬러를 마시자
 (용액)제조번호: 1903280041-01
 (용액)제조일자: 2019-03-28

유형: 과일 · 음료명: 기타(기타주류) 유동(용액)유지기간: 유동(용액)유지기간
 제조(수입)일: 2019-03-28
 피의자: (08595)제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로3길 13 (주)전산버버리지
 소재지: 전화번호: 070-8900-8988 팩스번호: 064-783-8088 전자우편: -
 제조명: 업체명: 제조역: -
 소재지: 소재지: -

시험 · 검사목적: 식품 | 기타(참고용)

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
열량(kcal/100g)	기준없음	38.74	상기사항확인	
나트륨(mg/100g)	기준없음	22.70	상기사항확인	
단수화물(g/100g)	기준없음	7.43	상기사항확인	
당류(g/100g)	기준없음	6.85	상기사항확인	
지방(g/100g)	기준없음	0.02	상기사항확인	
트랜스지방(g/100g)	기준없음	0.00	상기사항확인	
포화지방(g/100g)	기준없음	0.00	상기사항확인	
콜레스테롤(mg/100g)	기준없음	0.00	상기사항확인	
단백질(g/100g)	기준없음	2.21	상기사항확인	

Figure 3. 영양성분 분석 성적서

○ 제주5컬러를 마시자 자가품질 검사 완료

- 대장균군, 세균수, 납, 카드뮴 검사 결과 모두 적합 (Figure 4).

문서확인번호 : 4NWX-AS7K-LJKS-L5K4

시험 · 검사성적서

식품안전관리인증번호 : 식품 제093호

발행번호	R20190715-0122	접수번호	190102991.001
검사일	2019-07-15	접수연월일	2019-07-02
제품명	제주 5컬러를 마시자		
(품목)제조번호	품목제조신고번호 2017062863017		
유형 · 재질 · 품목명	과.제주수		
제조(수입)일	2019-06-04	유통(유통유지)기한	2020-06-03
의뢰자	성명	장동준	업체명 (주)진산비버리지
	소재지	(63335)제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로3길 13	
		전화번호: 070-8900-8988	팩스번호: 064-783-8988
제조사	업체명	(주)진산비버리지	제조국
	소재지	제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로3길 13	
시험 · 검사목적	식품 자가품질위탁검사		

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
대장균군	n=5, c=1, m=0, M=10	0, 0, 0, 0, 0	적합	
세균수	n=5, c=1, m=100, M=1000	0, 0, 0, 0, 0	적합	
납(mg/kg)	0.05이하	0.00	적합	
카드뮴(mg/kg)	0.1이하	0.0	적합	

종합판정 : 적합
 시험검사장 : 강보라, 김다비 시험검사책임자 : 김남길, 임진강
 비고 :
 ※ 위 표점은 의뢰인 시험 · 검사 항목만을 대상으로 된 것입니다.
 ※ 지점이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과만을 별지로 작성 가능합니다.
 ※ 검사결과를 광고하거나 유통기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.
 *식품 · 의약품분야 시험 · 검사 등에 관한 법률, 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험 · 검사성적서를 발급합니다. 2019년 07월 15일

주식회사 오에이티씨(OATC Inc.)

08595 서울특별시 관악구 봉암로 1130 (가산동, 디지털라이더) 801-806호 T:070-4044-8830 F:02-865-8832
 8906-8927호 8906-8928호 81010-1011호


본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 조회하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
 또한, 전자서명된 발급도도도 전자확인시스템을 전자확인프로그램을 이용 수 있습니다. http://lms.mfds.go.kr Page 1 of 1

Figure 4. 자가품질 검사 성적서

○ 흡소핑 5무 확정

- 설탕 무첨가, 인공감미료 무첨가, 착향료 무첨가, 착색제 무첨가, 소브산(보존료) 무첨가 (Figure 5-7).

- 식약처에서 보존료 표시를 제한하겠다는 고시가 있어 소브산으로 대체함.


제일분석센터
 http://www.cheilab.com
 © 08389 서울서구로구 디지털로 272번지 안산(시) 91302 전화02-862-4666 팩스02-862-4610

검사성적서
 제주시 5컬러를 마시자

성명 / 상호	주식회사 진산비버리지	사업자등록번호	892-87-001
주소	제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로3길 13	전화번호	070-8900-8
시료명	제주 5컬러를 마시자		
접수년월일	2019. 04. 01	검사완료일	2019. 04. 09
접수번호	19-04-FD0001	검사목적	참고용

검사결과
 검사항목: 질량(mg/100g) 결과: 1.08
 판정: 시험유형인양

시험책임자: 정승희
 2019년 04월 10일
 제일분석센터 대표이사 이은미

Figure 5. 설탕(100g당 5mg 미만 무첨가 표시 가능) 검사성적서

검사성적서
 발급번호: IB20190419-0001 접수번호: 일반-19-0126

제출명	제주5컬러를 마시자	제품명이나 유통구입 또는 제조번호	
의뢰업소명	진산비버리지	의뢰대표자	정승희
의뢰소재지	제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로3길 13 (조천리)		
접수년월일	2019. 4. 9	검사완료일	2019. 4. 19
식용유형	-	검사목적	기타

시험항목 및 결과

시험항목	기준	결과	단위	시험방법
사카린나트륨	-	불검출	g/100g	식품안전 제8.3.2.2
안식향산	-	불검출	g/kg	식품안전 제8.3.1

발행: - 검사자: 조은빛
 비교: - 책임자: 이주연
 부상기 판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.
 2019년 4월 19일
 제주대학교생명과학기술혁신센터장

Figure 6. 인공감미료(사카린나트륨) 착향료(안식향산) 검사성적서

시험·검사성적서
 발행번호: R20190603-0119 접수번호: 190603073001
 검사완료일: 2019-05-03 접수연월일: 2019-03-27

제출명: 제주 5컬러를 마시자
 의뢰업소명: 진산비버리지
 의뢰소재지: 제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로3길 13 (조천리)
 접수년월일: 2019. 4. 9
 검사완료일: 2019. 4. 19
 검사목적: 기타

시험항목 및 결과

시험항목	기준	결과	단위	시험방법
타르색소	기준없음	불검출	mg/kg	식품안전 제8.3.2.2
보존료(소브산)	기준없음	불검출	mg/kg	식품안전 제8.3.1

발행: - 검사자: 조은빛
 비교: - 책임자: 이주연
 부상기 판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.
 2019년 4월 19일
 제주대학교생명과학기술혁신센터장

Figure 7. 착색제(타르색소) 보존료(소브산) 검사성적서

○ 파이토키미칼(Phytochemical) 분석 완료

- 제주5컬러를 마시자에서 안토시아닌(Anthocyanin) 7성분 중 2성분(Petunidin-3-glucoside, Pelargonidin-3-glucoside), 플라보노이드(Flavonoid) 333mg /250ml, 폴리페놀(Polyphenol), 설포라판(Sulforaphane), 글루코시놀레이트(Glucosinolate)가 검출됨 (Figure 8-11).



Figure 15. 수입포장재 시험성적서(Paper)

Figure 16. 수입포장재 시험성적서(Cap)

- CJ오쇼핑 Audit 평가 (2019.04.23.)
 - CJ 품질평가팀 1명 평가 진행(CJ오쇼핑 품질센터 이영재 대리)
 - 결과: 통과
- 홈쇼핑 웹 상세페이지 제작(Figure 17)



제주 5컬러를 마시자



01 WHY?

400g WHO 하루 야채 권장 섭취량 충족

02 WHAT?

100% 유네스코 지정 자연 지역 제주 5 Colors 과채 100%

03 HOW?

1Day 하루 한번 섭취로 OK!

5 COLORS A DAY CAMPAIGN
5(COLORS) A Day! for better health!!

WHO(세계 보건기구)를 포함 미국, 영국, 독일 등 선진국에서 국가 캠페인으로 시행 중인 **하루 5번(5가지 컬러) 야채를 먹자는 건강 개선 캠페인**입니다. 미국에서 시작된 이 캠페인은 연구와 성과를 토대로 WHO에서 도입 하면서 전 세계로 확산되었습니다.

Promoting fruit and vegetable consumption around the world

Introduction

Fruit and vegetables are important components of a healthy diet, and their sufficient daily consumption could help prevent major diseases, such as cardiovascular diseases and certain cancers. Approximately 16.0 million (1.0%) disability adjusted life years (DALYs, a measure of the potential life lost due to premature mortality at the years of productive life lost due to disability) and 1.7 million (2.8%) of deaths worldwide are attributable to low fruit and vegetable consumption.

Moreover, insufficient intake of fruit and vegetables is estimated to cause around 14% of gastrointestinal cancer deaths, about 11% of ischaemic heart disease deaths and about 9% of stroke deaths globally.

A recently published WHO/FAO report recommends a minimum of 400g of fruit and vegetables per day for the prevention of chronic diseases such as heart disease, cancer, diabetes and obesity as well as for the prevention and alleviation of several micronutrient deficiencies especially

최근 발표한 WHO/FAO 보고서에 따르면 매일 400g의 과일과 채소를 섭취하게 되면 각종 건강에 도움을 준다고 한다.

POINT 01

하루 야채 권장섭취량, 400g

한국인 10명중 9명의 채소(과일) 섭취는 350g에도 미치지 못한다.

7가지 과일야채 100%

WHO 하루 권장 섭취 400g

350g (일본 후생노동성 1일 야채 섭취권장량: 한국인 10명 중 1명 충족섭취)
(한국보건산업진흥원, 2011년 국민영양통계)

- 홈쇼핑 웹 상세페이지 제작(계속)

POINT 02

Only JEJU 100%, 5컬러 과채

제주도에서 만들어진 다섯가지 컬러푸드 이야기
*본 내용은 제품이나인 원료에 대한 정보로 제품과 차이가 있을 수 있음

RED :
적양배추
안토시아닌
레드비트
베타레인

WHITE : 콜라비
폴리페놀/안토시아닌

GREEN : 브로콜리, 양파
셀레늄/폴리페놀

BLACK(PURPLE) : 흑무
폴라보노이드/안토시아닌

YELLOW : 풋콜(청굴)
폴라보노이드/비타민C

적양배추란?

■ 양배추 ■ 적양배추

• 적양배추에는 일반 양배추에 없는 안토시아닌 함유(농촌진흥청) 및 단백질, 탄수화물, 철, 칼륨 함량이 더 높다.

(출처: 100g 생것기준, 농식품종합정보시스템)

적양배추 VS 양배추

	적양배추	양배추
비타민 B1 (μg)	80 (2.3배)	35
비타민 B2 (μg)	85 (2.6배)	33
비타민 K1 (μg)	15.54 (1.9배)	12.29
필수아미노산 (mg)	447 (1.3배)	346

Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Red Cabbage Extract
Hwang et al. / J. Hort. Sci. Technol. 2013

적양배추는 양배추와 맛이나 질감은 비슷하지만 안토시아닌(Anthocyanin)이 풍부하게 함유되어 있다.

(출처: Drangho G.A. 외 8명, (2013). Red cabbage millennium's functional food. JOURNAL of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 17(4), 52-55.)

흑무의 유효성분

흑무에서 발견되는 글루코시놀레이트(glucosinolate)는 생활성 성분으로 십자화과 식물의 2가 대사산물로서 약 120종과 서로 다른 글루코시놀레이트가 알려져 있다.

(출처: 대한민국 특허청, 출원번호 10-2019-0082181)

핵심성분

일명 자연의 감옥
파이토케미칼

식이섬유
함유량
1,250mg

WHO 하루야채 권장 섭취량
400g

글루코시놀레이트, 안토시아닌

폴라보노이드, 폴리페놀

아미노산 18종, 필수아미노산 10종

미네랄 12종, 비타민 10종

5 컬러 과채별 핵심 성분 약 50여종 함유

글루코시놀레이트, 안토시아닌, 폴리페놀 함유량 79mg, 폴라보노이드 함유량 333mg, 아미노산 18종, 미네랄 10종, 비타민 10종
경부기관(국립농업과학원) 확인자료

식품성분 분석서 폴라보노이드, 폴리페놀 분석서

단순히 원료가 좋은 성분 함유하고 있는 것이 아닌, 얼마나 좋은지 공인시험기관에서 확인한 결과값이 있다.

POINT 03

먹거리의 안전성

먹거리의 안전성을 최우선으로 생각하여, 원료부터 다르지만 다시 인증받고, 검증받았습니다.

5無

- ✓ 無착향료
- ✓ 無착색제
- ✓ 無소브산(보존제)
- ✓ 無설탕
- ✓ 無인공감미료

미국 FDA 등록 공장

320종 안전성 테스트

가족을 생각하는 마음

미국 FDA 등록

원연벌트 75% 소재의 아테리 Caliz팩을 사용

건강과 자연을 고민하여 만들었습니다.

Haccp 인증(제주 생산)

- 홈쇼핑 웹 상세페이지 제작(계속)

CHECK POINT

1 5가지의 자연 고유의 컬러

총 7종의 제주산의 제대로 된 자연 고유의 컬러별 과채를 엄선하여 넣었습니다.



유네스코 지정 청정 자연지역 제주도

유네스코 지정 청정 자연지역인 제주도에서 만들어진 100% 제주 원료로 사용합니다.

3 국제기구 WHO 권장 영양성분

WHO권장량으로 만든 야채 400g, 1개당 식이섬유량 1,250mg, 플라보노이드 333mg, 폴리페놀 79mg 함유가 되어 있습니다.

믿을 수 있는 먹거리

Haccp은 기본, USDA 인증 최첨단 스마트 공장(자체 생산시설)에서 생산하였으며, 품질을 위해OEM(위탁가공) 생산을 하지 않습니다. 또한, 320종 안전성 Test로 다시 한번 안전성에 만전을 기하여 만들었습니다.



제품 상세 정보

제품명	제주5컬러를 마시자	내용량	250mL (97kcal)	식품유형	과채주스
유통기한	유통 또는 영면표기(일/개지)	등록번호	2017062663017	포장재질	플라스틱
홈페이지	www.jinsanfrb.com	소비자상담실	070-6900-6988		
제주영양매진	백진산(하루) 제주특별자치도 제주시 주천읍 남곡로 321 13				
원재료명	[야채혼합물중량(브로콜리(제주산), 양배추(제주산), 감동무(제주산), 청양배추(제주산), 물라비(제주산), 레드비트(제주산)) 95%, 황금박(제주산) 5%				
보관방법	· 실온보관, 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관하십시오. · 개봉 후 냉장보관하십시오(4~5°C 이하에서 보관)				
주의사항	· 알레르기 성질 수 있으므로 유통기한이 경과하였거나 인상을 받고 통풍이 드세요. · 병뚜껑이 손상되어 있거나 제품이 부풀어오르는 경우 구별하여 마시지 마세요. · 이 제품은 우유, 계란, 땅콩, 대두, 밀, 옥수수, 표미트를 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다. · 부정 식품상 식용신고는 국번없이 1399 · 본 제품은 공중(가래)와 고시(소시지) 분광해결 기준에 위 기준, 관할 또는 보살핌 받을 수 있습니다.				

열량	나트륨	탄수화물	당류	지방	트랜스지방	포화지방	콜레스테롤	단
97	3 %	6 %	17 %	0 %	0g	0 %	0 %	1
kcal	57 mg	19 g	17 g	0 g	0 g	0 mg	0 mg	5


총내용량 250mL 당 1일 영양성분 기준치에 대한 비율(%)은 2,000kcal 기준이므로 개인의 필요량에 따라 다를 수 있습니다.

Figure 17. 홈쇼핑 Web 상세 페이지

다. 홈쇼핑 방송 계획

1) CJ오쇼핑

① CJ오쇼핑 9월 방송 불가 및 10월 방송 약속 공문



주식회사 씨제이 이엔엠

서울 서초구 역전대로 870-13 (PC) ENM Tel: (02)13357-1771 Fax: (02)13357-0332 담당자: 이석은 님

문서번호: CJ ENM 제 201909 - 009호 2019. 09. 20

수 신 : (주)울창 대표이사

참 조 : 영운용 실장

제 목 : '제주5 컬러를 마시자' 상품 런칭 일정 안내의 편

1. 귀 제단의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 당사의 동가 상품방송 '1은1명품' 상품 관련하여, 아래와 같이 확인 드립니다.

- 다 음 -

1. 상품명 : 제주5 컬러를 마시자

2. 제조사 : 진산비버리지

3. 품절검사 완료 일자 : '19년 9월 10일 (화)

4. 방송 예정일 : '19년 10월 中 녹화 및 본정 예정

주식회사 씨제이 이엔엠
대표이사 허민호

'제주5컬러를 마시자' 상품 런칭 일정 안내의 편

- 홈쇼핑사들은 방송 재승인 등 여러 제약으로 중앙 정부와 국회의 영향력에 매우 민감하게 반응함.
- 중기부장관이 바뀌고 9월 중기부차관이 홈쇼핑사와 미팅을 하면서 후원하는 중소기업 제품의 방송 push가 많아 9월 방송이 불가하게 됨.
- 9월 방송 약속이 어겨진 점에 대해 미안하다는 전언이고, 진산비버리지와 TP가 매우 곤란해짐을 알기에 공문을 예외적으로 보냄.

Figure 18. CJ 공문(19.09.20)

② CJ오쇼핑 녹화: 10/1(화) 녹화 완료



Figure 19. CJ오쇼핑 방송 녹화(녹화일: 19.10.01.)

③ CJmall(온라인몰): 10/18(금)부터 노출, 제품 판매중

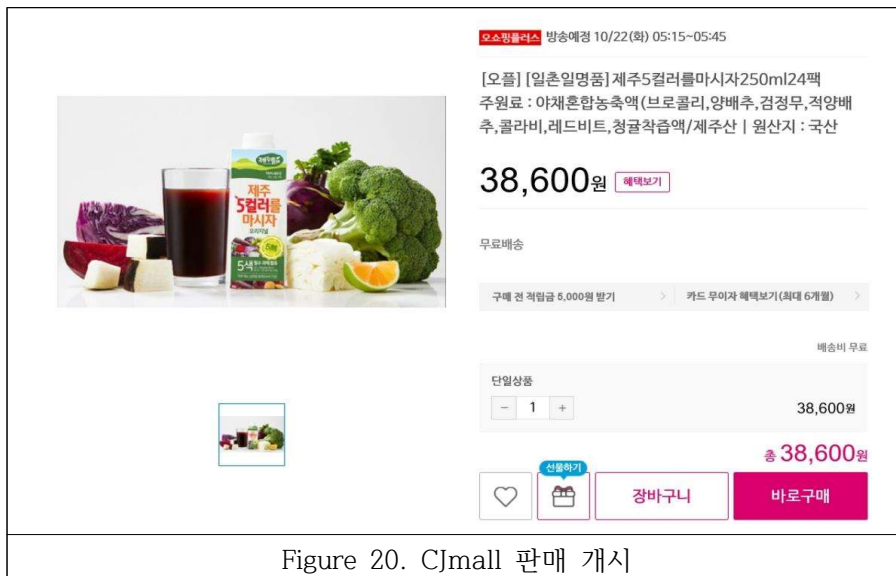


Figure 20. CJmall 판매 개시

④ CJ오쇼핑 홈쇼핑 방송

- CJ오쇼핑플러스(오픈) 방송: 10/21(월)부터 진행

3) 홈앤쇼핑 광고방송

- 홈앤쇼핑 광고방송: 10/6(일) 04:03~04:06(3분), 10/10(목) 15:08~15:11(3분) 총2회방송



Figure 22. 홈앤쇼핑 광고방송 영상 캡처본

(3) 흑무 파우치

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		기술수명
							국내	국외	
2	제품화	-신제품개발	국내	흑무, 제주자원을 이용한 건강즙 개발	-건강즙 2종 개발 (흑무즙, 흑무진액)	(주)비케이바이오	-	-	-

○ 제품화

No.	내용	코드번호	
		제품명	
1	제조공정도	1.제주 자연담은 흑무즙	2.제주 자연담은 흑무진액

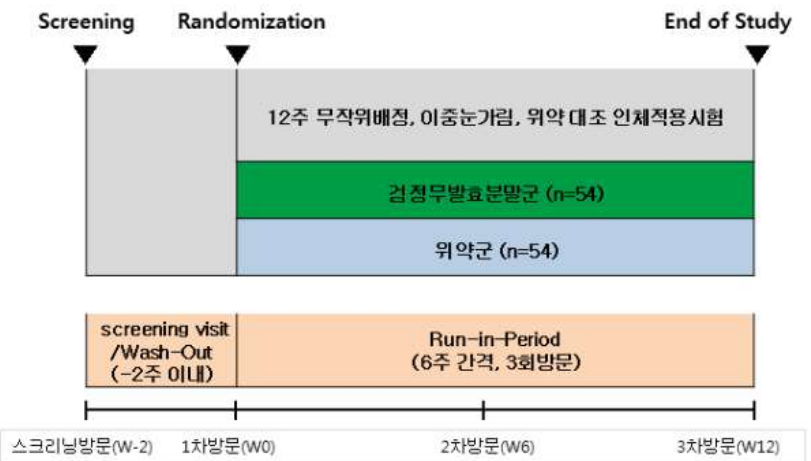
2	제품 디자인		
3	시험성적서		

을 제시하고 있으며, 본 인체적용시험은 그 가이드라인에 기초하여 계획하였다. 인체적용시험은 12주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조로 진행되며 기능성 평가를 위한 1차 바이오마커로서 alanine transaminase(ALT)를 평가한다. 2차 바이오마커로서 간기능지표(AST, ALP, gamma-GT, total bilirubin), 다차원피로척도(MFS), 지질대사지표를 평가하였다.

○ 인체적용시험 요약문

제목	검정무발효분말의 간기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 인체적용시험
목적	간기능 저하 소견을 보이는 자를 대상으로 검정무발효분말을 12주간 섭취하였을 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 위약 섭취와 비교하여 평가하였다. <ul style="list-style-type: none"> • 1 차 목적 ALT, GGT 로 평가되는 간기능 개선에 대한 검정무발효분말의 유효성을 위약 섭취와 비교 평가하였다. • 2 차 목적 간기능지표, 지질대사지표, 지방간 지수, 항산화지표, 염증지표 및 다차원 피로척도로 평가되는 간기능 개선에 대한 검정무발효분말의 유효성 및 안전성을 위약 섭취와 비교 평가하였다.
계획서 번호	JTP-LF-FBR
단계	인체적용시험
시험기간	IRB 승인일로부터 12개월 <ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험 시작일: 2019.01.21 (연구대상자 최초등록일) - 인체적용시험 종료일: 2021.03.11 (연구대상자 최종방문일)
실시기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 원광대학교 전주한방병원 우석대학교 부속한방병원
시험책임자	전북대학교병원 소화기내과 교수 이승욱 원광대학교 전주한방병원 사상체질과 교수 주종천 우석대학교 부속한방병원 사상체질과 교수 박수정
공동연구자	전북대학교병원 의생명연구원 교수 채수완 전북대학교병원 의생명연구원 교수 김영곤 전북대학교 의과대학 생화학교실 교수 박병현 원광대학교 전주한방병원 내과 교수 한민석 우석대학교 부속한방병원 침구의학과 교수 송범용 우석대학교 부속한방병원 가정의학과 교수 장지숙
시험담당자	○전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 정수진, 오미라, 장희연, 김순영, 박미현, 나혜선, 이애란, 장경아, 박태영, 노순옥, 최재순, 이수진 ○원광대학교 전주한방병원 : 박정애

	<p>○우석대학교 부속하방병원 : 오수정, 김윤서, 최승희</p>
선정기준	<p>○ 스크리닝 검사 당시 연령이 만 19세 이상, 70세 이하인 성인 남녀</p> <p>○혈청 ALT 수치가 수행기관 정상 상한치를 초과하고 정상 상한치 3배 이내의 범위에 있는 자</p> <p>○본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p>
제외기준	<p>○ BMI 35 kg/m² 이상인 고도비만에 해당하는 자</p> <p>○혈청 GGT, AST 수치가 수행기관 정상 상한치의 3배를 초과하는 자</p> <p>○급성, 만성 간염 환자 또는 B 형 또는 C 형 바이러스 보유자</p> <p>○간경화, 간암 또는 간암의 징후가 인정되는 자</p> <p>○치료가 필요한 담도계 질환 (담낭염이 없는 2 cm 미만 담석, 담낭 절제술 받은 경우 등록 가능함)</p> <p>○치료를 요하는 임상적으로 유의한 급성 또는 만성 심뇌혈관계, 내분비계, 면역계, 호흡기계, 신장 및 비뇨기계, 신경정신계, 근골격계, 염증성 및 혈액·종양성 질환, 위장관계 질환 등이 있는 자</p> <p>○스크리닝 검사 전 1년 이내에 식도정맥류 출혈, 간성 혼수, 복수 등 한 가지 이상의 병력이 있는 자</p> <p>○인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 (예: 크론병)이나 위장관계 수술 (단, 단순맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자</p> <p>○스크리닝 검사 전 4주 이내에 간기능 개선 의약품 및 건강기능식품을 복용한 자</p> <p>○스크리닝 검사 전 12주 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자</p> <p>○약물 중독이 의심되는 자</p> <p>○스크리닝 검사 전 12주 이내에 평균 알코올 섭취량이 21 unit/주 이상인 자</p> <p>○약물 및 시험용제품에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자</p> <p>○임신 혹은 수유중인 여성</p> <p>○가임여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우</p> <p>○스크리닝 검사 전 12주 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자</p> <p>○진단검사의학검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자</p> <p style="padding-left: 20px;">☞ Serum Creatinine > 2.0 mg/dL</p> <p>○진단검사의학 검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자</p>
연구대상자 수	총 108 명 (검정무발효분말군 54명, 위약군 54명)
시험방법	<p>○시험자는 서면동의서를 작성한 자원자에 한하여 스크리닝 검사를 시행하여 선정기준에 부합하는 연구대상자를 선정하였다. 연구대상자는 스크리닝 방문으로부터 2주 이내에 1차 방문하여 연구대상자 선정/제외기준 적합성을 재검토 받은 후 인체적용시험에 등록되었으며, 검정무발효분말군과 위약군에 무작위배정 되어 1차 방문일까지 기초평가(Baseline)을 완료하였다. 이후 시험용제품을 하루 2번씩 12주간 매일 섭취하면서 6주마다 수행기관에 방문하여 유효성평가, 활</p>

	<p>력징후, 약물투여력 및 의학적상태변화 조사, 이상반응 조사 등을 수행하였다.</p> <p>시험자는 인체적용시험용제품 최종 섭취 후 혹은 조기종료 방문 후 필요에 따라 연구대상자 추적 관찰을 실시하였다.</p>  <p>The diagram illustrates the study timeline. It is divided into three main phases: Screening, Randomization, and End of Study. The Screening phase includes a 'screening visit / Wash-Out (-2주 이내)'. The Randomization phase begins at '1차방문 (W0)' and includes a 'Run-in-Period (6주 간격, 3회방문)'. Following the Run-in-Period, the study is split into two parallel treatment arms: the Gemigliptin group (n=54, green bar) and the Placebo group (n=54, blue bar). Both groups receive treatment for 12 weeks. The End of Study phase concludes at '3차방문 (W12)'. Key visits are marked as '스크리닝방문(W-2)', '1차방문(W0)', '2차방문(W6)', and '3차방문(W12)'.</p>
<p>섭취방법</p>	<p>연구대상자는 다음 두 군 중 하나에 무작위배정 되어 12주 동안 인체적용시험용제품을 1일 2회 경구 섭취하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 검정무발효분말군: 1일 2회, 1회 2캡슐, 아침/저녁 식후 경구 섭취(1,200 mg/day, 검정무발효분말로써 960 mg/day) • 위약군: 1일 2회, 1회 2캡슐, 아침/저녁 식후 경구 섭취(1,200 mg/day, 검정무발효분말로써 0 mg/day)
<p>평가기준 및 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효성 평가 <ol style="list-style-type: none"> 1) 1차 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • ALT (Alanine Transaminase) • GGT(Gamma-glutamyl transferase) 2) 2차 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 간기능지표: AST (Aspartate Transaminase), ALP (Alkaline Phosphatase), total bilirubin • 지질대사지표: total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol • 지방간 지수: FLI(Fatty Liver Index), HSI(Hepatic Steatosis Index) • 항산화지표: TAS (Total Antioxidant Status), MDA (Malondialdehyde) • 염증 지표: hs-CRP • 다차원 피로척도(MFS; Multidimensional Fatigue Scale) ○ 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 자 · 타각 증상 등 이상반응 모니터링 - 진단검사의학 검사

통계분석	<p>- 활력징후, 신체검진, 심전도</p> <ul style="list-style-type: none"> • 분석에 사용할 프로그램은 Window용 SAS를 이용하고, 통계학적 유의수준은 p값이 0.05 미만으로 설정하였다. • 집단 간 기저치 분포의 차이가 있는지를 확인하기 위한 검정은 Chi-Square test 또는 Fisher's exact test 와 Independent t-test 를 이용하였다. • 유효성 분석/안전성 분석 <p>○1차 유효성 평가 변수</p> <p>섭취 전 - 섭취 12 주 후의 ALT, GGT 변화량에 대해서 섭취군 별로 기술통계량을 제시하고, 시험군과 대조군간 차이에 대하여 independent t test를 이용하여 분석하였다. 추가적으로, 각 섭취군 별로 섭취 전 대비 12주 시점의 ALT, GGT 변화 차이는 paired t test를 이용하여 분석하였다. 잠재적 혼동요인(성별, 나이, 식이섭취, 신체활동, 체중 변화, 음주, 흡연, 염증지표, 이상반응, 병용약물, 이상치 등) 및 유효성 평가에 영향을 미칠 것으로 판단되는 항목(성별, ALT, GGT, AST, BMI 등)에 대하여 추가분석을 실시하였다. 식이섭취량 및 신체활동량, 각 유효성 평가 항목의 기저치 및 동질하지 않은 인구학적정보 항목은 covariate로 보정하여 ANCOVA를 실시하였다.</p> <p>○2차 유효성 평가 변수</p> <p>섭취 전 - 섭취 12주 후의 간기능지표, 지질대사지표, 지방간 지수, 항산화지표, 염증지표 및 다차원 피로척도 변화량에 대해서 섭취군 별로 기술통계량을 제시하고, 시험군과 대조군간 차이에 대하여 independent t-test를 이용하여 분석하였다. 추가적으로, 각 섭취군 별로 섭취 전 대비 12주 시점의 간기능지표, 지질대사지표, 지방간 지수, 항산화지표, 염증지표 및 다차원 피로척도 변화 차이는 paired t- test를 이용하여 분석하였다. 잠재적 혼동요인(성별, 나이, 식이섭취, 신체활동, 체중 변화, 음주, 흡연, 염증지표, 이상반응, 병용약물, 이상치 등) 및 유효성 평가에 영향을 미칠 것으로 판단되는 항목(성별, ALT, GGT, AST, BMI 등)에 대하여 추가분석을 실시하였다. 식이섭취량 및 신체활동량, 각 유효성 평가 항목의 기저치 및 동질하지 않은 인구학적정보 항목은 covariate로 보정하여 ANCOVA를 실시하였다.</p> <p>○안전성 평가 변수</p> <p>인체적용시험 기간 동안 발생한 모든 이상반응에 대하여 전체와 섭취군 별로 빈도, 퍼센트로 요약하였다. 섭취군 간 이상반응의 발생 양상을 chi-square test 또는 fisher's exact test를 이용하여 분석하였다.</p> <p>진단검사의학 검사와 활력징후 결과에 대하여 섭취군내 비교와 섭취군간 비교를 실시하였다. 섭취군내 비교의 경우, 기술통계량을 제시하고 평균 변화에 대하여 paired t-test를 이용하여 분석하였다. 섭취군간 비교의 경우, 평균 변화량에</p>
------	--

	<p>대하여 independent t-test를 이용하여 비교 분석하였다.</p>
<p>결론</p>	<p>○ 본 인체적용시험은 검정무발효분말의 간기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 인체적용시험이다.</p> <p>○ 총 240명의 자원자(잠재적 연구대상자)가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 실시하여 선정기준에 부합하는 총 108명을 적격 연구대상자로 선정하였다. 연구대상자는 무작위배정, 이중눈가림 방법을 통해 본 인체적용시험에 등록{검정무발효분말군 (이하 “시험군”이라 한다) 54명, 위약군 54명} 되고 하루 2번씩 매일 시험용제품을 섭취하면서 12주 동안 인체적용시험에 참여하였다.</p> <p>○ 모든 연구대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라 ALT, GGT, 간기능지표, 지질대사지표, 지방간 지수, 항산화 지표, 염증지표, 다차원 피로척도에 해당하는 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 수행하였다.</p> <p>○ 유효성 평가는 주 분석군인 FA(Full Analysis)군으로써, 선정/제외기준 위반 3명(시험군 1명, 위약군 2명), 무작위배정 이후 자료가 전무한 대상자 4명(시험군 3명, 위약군 1명)이 FA군 분석 제외 대상 기준에 따라 분석에서 제외되어 총 101명을 대상으로 분석하였다. 또한, 추가분석군은 PP군으로써, 선정/제외기준 위반 3명(시험군 1명, 위약군 2명), 인체적용시험 참여 중 동의철회 5명(시험군 3명, 위약군 2명), 순응도 80% 미만 2명(시험군 1명, 위약군 1명), 병용금지약물투여 1명(시험군 1명), 과도한 음주로 간기능 지표가 과도하게 튀는 자 1명(시험군 1명)이 발생함으로써 총 96명의 연구대상자가 인체적용시험계획서에 명시한 바에 따라 인체적용시험을 정상적으로 완료하여, 총 96명에 대하여 추가분석하였다. 안전성 평가는 Safety 군에 해당하는 연구대상자 108명(시험군 54명, 위약군 54명)을 대상으로 분석하였다.</p> <p>○ 연구대상자들의 인구학적 정보 및 유효성 평가 항목 기저치를 비롯한 신체활동조사, 연구 참여 기간 제품 섭취 순응도, 음주량 및 흡연량 조사 등의 생활습관을 분석한 결과, 인구학적 정보, 유효성 평가 항목 기저치, 순응도를 비롯한 생활습관 분석에서 두 섭취군 간 차이가 없어 무작위배정이 잘 이루어졌다고 판단하였다.</p> <p>○ 주 분석군인 FA군 분석 결과 항산화지표 중 MDA에서 시험군 내에서는 감소하고, 위약군 내에서는 통계적으로 유의하게 증가하여 ($p=0.033$), 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p=0.008$). 이외 항목에서는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).</p> <p>○ 추가분석 군인 PP군 분석 결과, 지방간지수 중 FLI에서 시험군에</p>

	<p>서 감소하며, 위약군에서는 증가하여 두 섭취군 간 긍정적인 결과의 경향을 보였다($p=0.051$). 또한, 항산화지표 중 MDA에서 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.013$). 이외 항목에서는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).</p> <p>○ 담도계 질환(담낭절제술, 담낭 용종 등)의 병력이 유효성평가 결과에 영향을 미칠 것으로 판단하여 통계분석 전 단계에서 해당 대상자를 제외(시험군 3명, 위약군 2명 제외) 후 층화분석하기로 결정되었다. 층화분석한 결과, 1차 유효성 평가인 GGT가 시험군에서 -4.29 ± 18.17 U/L 감소하였으며, 위약군에서는 4.36 ± 18.37 U/L 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.033$). 2차 유효성 평가 항목 중 지방간 지수 중 FLI 항목에서 시험군에서 -3.22 ± 11.24 감소하며, 위약군에서 2.12 ± 8.89 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이를 보였으며($p=0.013$), 항산화 지표 중 MDA에서 시험군에서 -5.84 ± 27.86 pmol/mL 감소하였으며, 위약군에서 11.39 ± 36.13 pmol/mL 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.013$).</p> <p>○ 연구대상자 108명(Safety군)을 대상으로 안전성 평가 항목을 분석한 결과, 총 108명 중 11명에서 14건의 이상반응이 발생 하였으나, 두 섭취군 간 이상반응 발생에 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$). 진단검사의학 검사, 활력징후 항목 등의 결과에서도 두 섭취군 간 임상적으로 의미 있는 변화가 없었다.</p> <p>○ 요약하면, 본 인체적용시험을 통해 간기능 저하 소견을 보이는 자를 대상으로 검정무발효분말 12주 섭취가 층화분석군에서 GGT, 지방간 지수(FLI), 항산화지표(MDA)가 개선됨을 확인하였다. 또한 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체 변화가 관찰되지 않아서 검정무발효분말 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.</p>
--	---

○ 인체적용시험 결과

본 인체적용시험은 검정무발효분말의 간기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 인체적용시험이다.

총 240명의 자원자(잠재적 연구대상자)가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 실시하여 선정기준에 부합하는 총 108명을 적격 연구대상자로 선정하였다. 연구대상자는 무작위배정, 이중눈가림 방법을 통해 본 인체적용시험에 등록{검정무발효분말군(이하 “시험군”이라 한다) 54명, 위약군 54명} 되고 하루 2번씩 매일 시험용제품을 섭취하면서 12주 동안 인체적용시험에 참여하였다.

모든 연구대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라 ALT, GGT, 간기능지표, 지질대사지표, 지방간 지수, 항산화 지표, 염증지표, 다차원 피로척도에 해당하는 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 수행하였다.

유효성 평가는 주 분석군인 FA(Full Analysis)군으로써, 선정/제외기준 위반 3명(시험군 1명, 위약군 2명), 무작위배정 이후 자료가 전무한 대상자 4명(시험군 3명, 위약군 1명)이 FA군 분

석 제외 대상 기준에 따라 분석에서 제외되어 총 101명을 대상으로 분석하였다. 또한, 추가분석군은 PP군으로써, 선정/제외기준 위반 3명(시험군 1명, 위약군 2명), 인체적용시험 참여 중 동의철회 5명(시험군 3명, 위약군 2명), 순응도 80% 미만 2명(시험군 1명, 위약군 1명), 병용 금지약물투여 1명(시험군 1명), 과도한 음주로 간기능 지표가 과도하게 튀는 자 1명(시험군 1명)이 발생함으로써 총 96명의 연구대상자가 인체적용시험계획서에 명시한 바에 따라 인체적용시험을 정상적으로 완료하여, 총 96명에 대하여 추가분석하였다. 안전성 평가는 Safety 군에 해당하는 연구대상자 108명(시험군 54명, 위약군 54명)을 대상으로 분석하였다.

연구대상자들의 인구학적 정보 및 유효성 평가 항목 기저치를 비롯한 신체활동조사, 연구 참여 기간 제품 섭취 순응도, 음주량 및 흡연량 조사 등의 생활습관을 분석한 결과, 인구학적 정보, 유효성 평가 항목 기저치, 순응도를 비롯한 생활습관 분석에서 두 섭취군 간 차이가 없어 무작위배정이 잘 이루어졌다고 판단하였다.

주 분석군인 FA군 분석 결과 항산화지표 중 MDA에서 시험군 내에서는 감소하고, 위약군 내에서는 통계적으로 유의하게 증가하여($p=0.033$), 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.008$). 이외 항목에서는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

추가분석 군인 PP군 분석 결과, 지방간지수 중 FLI에서 시험군에서 감소하며, 위약군에서는 증가하여 두 섭취군 간 긍정적인 결과의 경향을 보였다($p=0.051$). 또한, 항산화지표 중 MDA에서 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.013$). 이외 항목에서는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

담도계 질환(담낭절제술, 담낭 용종 등)의 병력이 유효성평가 결과에 영향을 미칠 것으로 판단하여 통계분석 전 단계에서 해당 대상자를 제외(시험군 3명, 위약군 2명 제외) 후 총화분석하기로 결정되었다. 총화분석 결과, 1차 유효성 평가인 GGT가 시험군에서 -4.29 ± 18.17 U/L감소하였으며, 위약군에서는 4.36 ± 18.37 U/L증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.033$). 2차 유효성 평가 항목 중 지방간 지수 중 FLI 항목에서 시험군에서 -3.22 ± 11.24 감소하며, 위약군에서 2.12 ± 8.89 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이를 보였으며($p=0.013$), 항산화 지표 중 MDA에서 시험군에서 -5.84 ± 27.86 pmol/mL 감소하였으며, 위약군에서 11.39 ± 36.13 pmol/mL 증가하여 두 섭취군간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.013$).

연구대상자 108명(Safety군)을 대상으로 안전성 평가 항목을 분석한 결과, 총 108명 중 11명에서 13건의 이상반응이 발생 하였으나, 두 섭취군 간 이상반응 발생에 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$). 진단검사의학 검사, 활력징후 항목 등의 결과에서도 두 섭취군 간 임상적으로 의미 있는 변화가 없었다.

요약하면, 본 인체적용시험을 통해 간기능 저하 소견을 보이는 자를 대상으로 검정무발효분말 12주 섭취가 총화분석군에서 GGT, 지방간 지수(FLI), 항산화지표(MDA)가 개선됨을 확인하였다. 또한 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 검정무발효분말 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 흑무 재배기술 확보
 - 시비, 파종시기, 2,4-D처리 등 에 따른 성장 효과 및 안토시아닌함량 분석
 - 흑무 및 무속 (radish genus) 유전자 분석
 - 흑무, 백무, 제주갓, 돌산갓 등 12품종에 대한 ITS, TRN-LF, rpl20 유전자 분석을 통한 유전자 마커 규명
 - 흑무 추출물 기능성 및 효과 입증 확보
 - 잎 , 뿌리, 등 추출물의 항염, 항비만, 항당뇨 효과 등
 - 흑무 발효기술 확보 및 효능평가 기술 확보
 - 유산균을 이용한 발효기술
 - 발효물의 간보호 효과 기술 확보
 - 항비만 효과 기술 확보
 - 흑무 추출물의 항암효과
 - 흑무추출물과 구리(Cu) chelating의한 함암 효과
 - 갓추출물의 항비만 및 항염효과 입증
 - 제주갓, 돌산갓 추출물의 항 α lipase, 항비만 효과
 - 흑무 - 돌외 혼합 추출물의 항비만 효과
 - 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과
 - Disulfiram의 항비만 효과
 - 3T3-L1 지방세포 분화 억제 효과
 - PPAR α 억제 효과
 - ALDH2 억제효과
 - 돌외 추출물의 항바이러스 효과
 - 바이러스 방어효과
 - 항바이러스성 사이토카인 촉진 효과
 - 시제품 개발 10건
 - 발효분말 및 스틱 등 2건
 - 음료 3건
 - 타정 1건
 - 기타 4건
-

-
- 인체적용시험 및 개별 인증 신청
 - 인체적용시험 (108명 대상)
 - 식약처 개별인증 신청 1식
 - 간보호 효과
 - 검정무 발효물 분말 12주 섭취 후 분석군인 FA군 분석, 추가분석 군인 PP군 분석, 그리고 증화분석군 분석 결과 두 섭취군간 통계적으로 GGT, 지방간 지수(FLI), 항산화지표(MDA)가 개선됨을 확인함 유의한 차이를 보임($p=0.033, 0.013, 0.013$).

 - 또한 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 검정무발효분말 섭취가 인체에 안전하다고 판단함

 - 제주산 무 원재료 표준화
 - 원재료 표준화

 - 기능/지표성분 설정
 - 지표/기능성분 설정
 - 추출공정 조건 및 대량생산 공정 확립

 - 원료의 기준규격/유통기한 설정
 - 기준규격 시험법 설정
 - 기준규격 설정
 - 유통기한 설정

 - 임상단계 효능평가 및 개별인증신청 자료 수집
 - IRB 승인 및 인체적용시험
 - 인체적용시험 설계 및 연구
 - 인체적용시험 전문 CRO 의뢰
 - 인체임상시험기관 및 연구자 선정
 - 피험자 모집 및 임상 연구 진행
 - 제주도 맞춤형 건강지향식품 개발

 - 유통기한 설정 및 제품 디자인
 - 산업화 및 마케팅 수립

 - 개별인증형원료 등록 및 제형개발, 제품화
 - 개별인증형 기능성원료 등록 및 사업화
 - 산업화 및 마케팅 추진
-

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

- 1) 특허출원 26건
- 2) 특허등록 9건
- 3) 기술이전 2건
- 4) 제품화 11건
- 5) 논문 16건 (SCI 8, 비SCI 8건)
- 6) 학술발표 32건
- 7) 교육지도 25건
- 8) 인력양성 25건
- 9) 홍보전시 25건
- 10) 정책활용 2건
- 11) 매출액 3.4억
- 12) 유전자원 등록 33건

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	유전자등록	목표(단계별)			
		실적(누적)	33건	33건	
		목표(단계별)			
		실적(누적)			
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)	2	2	
		실적(누적)	2	2	
	고용창출	목표(단계별)	5	5	
		실적(누적)	6	6	
	특허출원	목표(단계별)	14	14	
		실적(누적)	26	26	
	특허등록	목표(단계별)	8	8	
		실적(누적)	9	9	
	제품화	목표(단계별)	10	10	
		실적(누적)	10	10	
	매출액	목표(단계별)	10억	10억	
		실적(누적)	3.4억	3.4억	
	논문	목표(단계별)	15	15	
		실적(누적)	15	15	
	학술발표	목표(단계별)	12	12	
		실적(누적)	32	32	
	교육지도	목표(단계별)	18	18	
		실적(누적)	25	25	
	인력양성	목표(단계별)	20	20	
		실적(누적)	16	16	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	정책활용	목표(단계별)	2	2	
		실적(누적)	2	2	
	홍보전시	목표(단계별)	13	13	
		실적(누적)	25	25	
계					

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비 SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율 (%)
01	CURRENT POTENTIAL HEALTH BENEFITS OF SULFORAPH ANE	Experiment al and Clinical Sciences, Internation al Online Journal	Jae kwang Kim 등 2인	15	국외	EXCLI	SCIE	June.28. 2016	1611-215 6	100
02	Metabolic profiling of pale green and purple kohlrabi (Brassica oleracea var. gongyloides)	Applied Biological Chemistry	Chang Ha Park, Hyun Ji Yeo, Nam Su Kim, Park Ye Eun	60	국내	한국응용 생명화학 회	SCIE	March 24,2017	2468-083 4	100
03	Black Radish (Raphanus sativus L. var. niger) Extract Mediates Its Hepatoprotec tive Effect on Carbon Tetrachloride -Induced Hepatic Injury by Attenuating Oxidative Stress	Journal of medicinal food	Meejung Ahn 등 8인	21	국외	한국식품 영약과학 회	SCI	2018	1096-620 X	100
04	Antimelanogenic Effects of Raphanus sativus L. var. niger Roots on α -MSH Stimulated B16F10 Melanoma Cells	Bulletin of the Korean Chemical Society	Ha Na Ko 등 7인		국내	한국화학 회	SCIE	Agust 22, 2018	0253-296 4	100
05	Allyl isothiocyanat e reduces liver fibrosis by regulating Kupffer cell activation in rats	The Journal of veterinary medical science	Jeongtae KIM 등 6인		국외	대한수의 학회	SCIE	April 17, 2018	0916-725 0	100
06	Fermented black radish (Raphanus sativus L. var. niger)	Food science & nutrition	Meejung Ahn 등 8인		국외	Wiley	SCI	Agust 12, 2019	2048-717 7	100

	attenuates methionine and choline deficient diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice									
07	Alpha-Linolenic Acid Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice	Inflammation	Jeongtae Kim 등 8인	43	국외	SpringerLink	SCI	2020	0360-3997	100
08	Sulforaphane controls the release of paracrine factors by keratinocytes and thus mitigates particulate matter-induced premature skin aging by suppressing melanogenesis and maintaining collagen homeostasis	Phytomedicine : international journal of phytotherapy and pharmacology	Hyun Ju Ko 등 4인	77	국외	Elsevier	SCI	2020	0944-7113	50
09	Amino Acids Content in Different Cultivars of Young Radish (Raphanus sativus)	Asian Journal Chemistry	JAE KWANG KIM	29	국외	Asian Journal Chemistry Society	SCIE	2017	0970-7707	100
10	유산균 발효 흑무의 항산화 및 지방구 형성 억제 효과	Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition	김성은 등 4인	47	국내	한국식품영양과학회지 = J	비SCIE	2018	1226-3311	100
11	3T3-L1 세포에서 김정무 추출물의 Adipogenesis 억제 효과	Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition	양다운 등 6인	81	국내	한국식품영양과학회지	비SCIE	2019	1226-3311	100
12	Hepatoprotective effect of fermented black radish (Raphanus sativus L. var	한국예방수의학회	Jeongtae Kim	41	국내	한국예방수의학회	비SCIE	2017	2287-8009	100

	niger) in CCl4 induced liver injury in rats									
13	Indole-3-carbinol alleviates carbon tetrachloride-induced liver injury by inhibiting inflammatory response and regulating lipid metabolism	Advances in Traditional Medicine	Meejung Ahn 등 5인	21	국내	Springer	비SCIE	2020	2662-4052	100
14	Antifibrotic effects of fermented black radish (<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>niger</i>) on chronic liver injury in rats	Oriental Pharmacy and Experimental Medicine	Jengtae Kim 등 6인	20	국내	Springer	비SCIE	2020	2662-4052	100
15	Inhibitory effect of black radish (<i>Raphanus sativus</i> L. Var. <i>niger</i>) extracts on lipopolysaccharide induced inflammatory response in the mouse monocytoma crophage like cell line RAW 264.7	Preventive Nutrition and Food Science	Hyungsik Jeon 등 6인	25	국내	한국식품영양과학회	SCIE	2020	2287-1098	100
16	Effects of <i>Raphanus sativus</i> var. <i>niger</i> (Black Radish) Fermented with <i>Lactobacillus plantarum</i> on Alcohol Metabolism in Rats	Food Suppl. Biomater. Health	강경구 등 8인	1	국내	FSBH (건기식 국제학술지)	비SCI	2021	2765-4699	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
01	한국생물공학회	Da-Wun Yang	2016.10.14	김대중컨벤션센터	Ethanol extract from the Black Radish (<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>niger</i>) inhibit the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide

					-stimulat
02	대한수의학회	Mee-jung Ahn	2016.10.28	진주MBC컨벤션센터	Hepatoprotective effects of indole-3-carbinol against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice
03	한국식품영양과학회	Seong-Eun Kim	2016.11.02	제주국제컨벤션센터	Antioxidant effects and hepatoprotection in cell based assay of Raphanus sativus L. var. niger extracts
04	한국식품영양과학회	Seong-Eun Kim	2016.11.02	제주국제컨벤션센터	Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive compounds from Raphanus sativus L. var. niger
05	한국식품영양과학회	Gi-Ok Kim	2016.11.02	제주국제컨벤션센터	Project of strengthen the competition for jeju radish brand
06	Melbourne 5th International Conference on	Jeongtae KIM	2016.12.17	호주멜버른	A black radish (Raphanus sativus L. var. niger) extract protects hepatic cells both in vitro and in vivo
07	대한생화학분자생물학회	SeungHyun HONG	2017.05.19	부산벙스코	Black Radish (Raphanus sativus L. var. niger) ameliorates inflammatory response via suppressing JAK2-STAT3 signaling pathway activation in RAW 264.7 -
08	한국응용생명화학회	Ha Na Ko	2017.06.15	해운대그랜드호텔	Anti-inflammatory Activities of Ethyl acetate Fraction from Aerial Parts of Raphanus sativus L. var. niger
09	기초의학학술대회	yuna Choi	2017.06.30	서울 그랜드힐튼호텔	Protective effects of black radish(Raphanus sativus L.var niger) extrract on carbon tetrachloride -induced hepatic injury in rat
10	한국생물공학회	SeungHyun HONG	2017.10.13	부산벙스코	Black radish extract(BRE) ameliorates hepatic lipid

					accumulation by transcriptional factor Nrf2 activation in HepG2 cells
11	아시아수의해부학회	Jeongtae Kim	2017.10.15	말레이시아 리버사이드마제 스틱호텔	Protective effect of black radish(Raphanus sativus l. Var. Niger) extract on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by enhancing anti-oxidative fa
12	한국비임상시험연구회	GiOk Kim	2017.10.20	제주휘닉스아일랜드 호텔	Black radish extract(BRE) ameliorates hepatic lipid accumulation by transcriptional factor Nrf2 activation in HepG2 cells
13	국제건강기능식품과학회	SeungHyun HONG	2017.10.24	새만금컨벤션센터	Black radish extract(BRE) ameliorates hepatic lipid accumulation by transcriptional factor Nrf2 activation in HepG2 cells
14	실험동물학회	안미정	2018.01.24	원주시 한솔오크밸리 빌리지센터	Hepatoprotective effect of both aqueous extracted and fermented black radish in CCl4 induced liver injury in rats by a
15	한국유화학회	고하나	2018.05.25	제주대학교(아라캠퍼스)	제주 흑무 추출물의 항염 활성 성분 연구
16	대한화장품학회	고하나	2018.05.31	서울과학기술대학교 100주년기념관	제주 흑무 추출물의 B16F10 melanoma 세포에 대한 멜라닌 생성 억제 효과
17	실험동물학회	안미정	2018.07.19	부산백스코	Fermented black radish (Raphanus sativus L. var. niger) attenuates methionine choline deficient diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice
18	Bioavailibility	김정태	2018.09.10	영국.노리치	Allyl isochiocyanate ameliorates the hepatotoxicity in carbon tetrachloride-induced hepatic injury

19	Bioavailibility	신태균	2018.09.10	영국.노리치	Biofortification of radish ingredients by fermentation
20	Bioavailibility	안미정	2018.09.10	영국.노리치	Black radish(Raphanus sativus L. var. niger)extract ameliorate non-alcoholic steatohepatitis
21	한국생물공학회	양다운	2018.10.11	세종대학교	Black radish(Raphanus sativus var. niger) inhibits adipogenesis in 3T3L1 cells
22	한국약학회	신태균	2018.10.18	제주국제컨벤션센터	Bioavailability of black radish (Raphanus sativus L. var. niger) in liver disease model
23	한국식품영양과학회	김성은	2018.10.31	부산백스코	Inhibitory Effects of Fermented Black Radish (Raphanus sativus L. var niger) on Antioxidant and Lipid Accumulation
24	한국식품영양과학회	홍승현	2018.11.01	부산백스코	Fermented black radish(FBR) ameliorates hepatic lipid accumulation by transcriptional factor Nrf2 activation in HepG2 cells
25	한국화장품학회	고하나	2018.11.16	서울과학기술대학교	제주 감정무 지상부 추출물의 항산화 효과
26	대한화장품학회	김정은	2019.05.17	서울과학기술대학교	Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of Red Radish Root
27	한국식품과학회	홍승현	2019.06.27	송도컨벤시아	Induced Apoptosis by ROS-JNK-Bax pathway through the BRE and copper chelating in RAW264.7 cells
28	한국식품영양과학회	양다운	2019.10.23	제주국제컨벤션센터	The effect of Black Radish Extract(BRE) on 3T3-L1 cells adipogenesis by NGS analysis
29	한국독성학회	김정태	2019.11.04	제주국제컨벤션센터	Fermented black radish ameliorated the fibrosis in the liver with CCl4 injury
30	한국독성학회	최유나	2019.11.04	제주국제컨벤션센터	Alpha-linolenic acid ameliorates the dextran sulfate

					sodium-induced acute colitis
31	한국식품과학회	전형식	2020.07.01	김대중컨벤션센터	Anti-inflammatory Effect of Jeju Radish Seedling Extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 Macrophages
32	한국분자세포생물학회	전형식	2020.10.05	온라인	Anti-Inflammatory Effect of Black Radish (Raphanus sativus L. var. niger) Extracts on LPS
33	한국생물공학회	전형식	2020.10.21	온라인	Inhibitory Effect of Disulfiram (DSF) on Adipogenesis in 3T3-L1 Cells

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기 관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
01	제주홍갯잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1562-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
02	적색무잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1547-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
03	검정무잎 PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1535-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
04	여수홍갯잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1542-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
05	제주홍갯잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1540-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
06	기스미하츠카대근(일본품종)잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1555-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
07	백무잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1537-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
08	제주갯잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1561-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
09	적환하츠카(일본품종)잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1556-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
10	적색무잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1558-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
11	기스미하츠카대근(일본품종)잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1566-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
12	백무잎 PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1559-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
13	적환하츠카(일본품종)잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1545-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
14	검정무잎 PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1546-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
15	제주갯잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1550-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
16	엽대근(일본품종)잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1554-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
17	백무잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1548-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
18	수박무잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1549-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
19	여수홍갯잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1553-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
20	기스미하츠카대근(일본품종)잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1544-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
21	제주홍갯잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1551-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
22	돌산갯잎PCR Product rpl 유전자 서열	NS-1552-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
23	엽대근(일본품종)잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1543-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
24	수박무잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1560-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
25	검정무잎 PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1557-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
26	적환하츠카(일본품종)잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1567-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
27	엽대근(일본품종)잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1565-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
28	여수홍갯잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1564-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
29	돌산갯잎PCR Product trnL 유전자 서열	NS-1563-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
30	수박무잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1538-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
31	제주갯잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1539-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
32	돌산갯잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1541-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018
33	적색무잎PCR Product ITS 유전자 서열	NS-1536-000001	농업생명공학정보센터(NABIC)	2018

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 기재)	국명	출원				등록			기여율 (%)	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
01	특허	흑무 추출물을 이용한 간기능 개선용 조성물	(재) 제주테크노파크, 콜마비앤에이치 주식회사	2016-10-26	제2016-0140131호	10-2016-0140131				100	
02	특허	흑무 추출물을 이용한 항염증용 조성물	(재) 제주테크노파크	2016-10-26	제2016-0140144호	10-2016-0140144	(재) 제주테크노파크, 콜마비앤에이치(주)	2018-10-15	제10-1910156호	100	
03	특허	흑무 추출물을 이용한 항염증용 조성물	(재) 제주테크노파크, 콜마비앤에이치 주식회사	2017-03-02	제2017-0027032호	10-2017-0027032	제주테크노파크	2020.04.09	제10-2101383호	100	
04	특허	무(radish) 추출물을 유효성분으로 포함하는 Nrf2 활성화 조성물 및 상기 무추출물의 제조방법	제주테크노파크	2017-07-26	제2017-0094598호	10-2017-0094598				100	
05	특허	흑무(Raphanus sativus L. var niger)추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물	(재) 제주테크노파크	2017-09-13	제2017-0117286호	10-2017-0117286				100	
06	특허	흑무 추출물을 이용한 항염증용 조성물	(재) 제주테크노파크	2017-10-26	제2017011940호(PCT)					100	
07	특허	흑무 추출물, 이의 분획물, 또는	제주대학교	2018-04-17	제2018-0044601	10-2018-0044601	제주대학교산	2020.03.24	제10-2094949호	100	

		이로부터 분리된 화합물을 포함하는 미백용 조성물	산학협력단, 콜마비앤에이치(주)		호	8-0044601	학협력단, 콜마비앤에이치				
8	특허	흑무 유산균 발효물을 포함하는 간 기능 개선용 조성물 및 이를 제조하는 방법	(재)제주테크노파크, 콜마비앤에이치(주)	2018-05-31	제2018-0062300호	10-2018-002300	콜마비앤에이치, (재)제주테크노파크	2021-03-09	제201910125554.7호 (ZL201910125554.7)	100	
9	특허	흑무발효물을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물	제주대학교산학협력단	2018-06-04	제2018-0064276호	10-2018-0064276				100	
10	특허	제주도산 흑무 유산균 발효물을 포함하는 간 기능 개선용 조성물 및 제주도산 흑무 유산균 발효물을 제조하는 방법	콜마비앤에이치 주식회사, (재)제주테크노파크	2018-10-26	제2018-0129216호	110-2002284-0000	콜마비앤에이치 주식회사, (재)제주테크노파크	2019-07-16	제10-2002284호	100	
11	특허	십자과(Brassicaceae family) 식물 무 추출물과 Cu(II) 금속화합물과의 복합체를 유효성분으로 함유한 약학적 조성물	(재)제주테크노파크	2018-10-26	제2018-0129058호	10-2018-0129058	제주테크노파크	2020.07.01	제10-2131076호	100	
12	특허	(흑무 유산균 발효물을 포함하는 간 기능 개선용 조성물 및 이를 제조하는 방법	(재)제주테크노파크, 콜마비앤에이치	2019-02-20	중국 제201910125554.7호	ZL201910125554.7				100	
13	특허	흑무(Raphanus sativus L. var niger) 추출물을	(재)제주테크노파크	2019-07-08	2019-0082181호	1020190082181	제주테크노파크	2020.02.25	제10-2083472호	100	

		유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물								
14	특허	무(radish) 추출물을 유효성분으로 포함하는 Nrf2 활성화 조성물 및 상기 무 추출물의 제조방법	(재)제주테크노파크	2019-08-19	제2019-0101005호	10-2019-0101005				100
15	특허	돌외 및 검정무의 혼합추출물을 포함하는 약학 조성물	(재)제주테크노파크	2019-10-28	제2019-0134238호	10-2019-0134238				100
16	특허	풋굴 및 검정무의 혼합발효물을 포함하는 약학 조성물	(재)제주테크노파크	2019-10-28	제2019-0134239호	10-2019-0134239				100
17	특허	검정무 발효 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 하는 항균용 조성물	제주대학교 산학협력단.(재)제주테크노파크	2020-05-14	제2020-0057788호	10-2020-0057788				100
18	특허	무 발효물의 건조 분말 제조 방법 및 이의 활용	제주대학교 산학협력단.(재)제주테크노파크	2020-06-03	제2020-0067032호	10-2020-0067032				100
19	특허	풋굴의 유산균 발효물을 포함하는 약학 조성물	(재)제주테크노파크	2020-06-24	제2020-0077301호	10-2020-0077301				100
20	특허	디설피람 및 그 유도체를 이용한 지방세포의 분화억제 효과를 갖는 비만 개선 및 치료용 약학적 조성물	(재)제주테크노파크	2020-07-20	제2020-0089492호	10-2020-0089492				100
21	특허	돌외 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적	(재)제주테크노파크, 한국한의학연구원	2020-09-14	제2020-017705호	10-2020-0117705				34

		조성물 및 건강기능식품 조성물	구원, 나눔제약 주식회사								
22	특허	(수의학)노르갈란 타민을 포함하는 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물	상지대학교 산학협력단	2021-03-17	제2021-0034652호	10-2021-0034652				100	
23	특허	흑무차의 제조방법 및 그 흑무차의 추출물을 이용한 항염증용 조성물	(재)제주테크노파크	2021-03-24	제2021-0037860호	10-2021-0037860				100	
24	특허	검정무 유산균 발효물을 포함하는 숙취 해소용 조성물	콜마비앤에이치 주식회사, (재)제주테크노파크	2021-06-02	제2021-0071759호	10-2021-0071759				100	
25	디자인	제주 현무암 토양에서 자란 검정무 진액	(재)제주테크노파크	2018-05-17	제2018-0023020호	30-2018-0023020	(재)제주테크노파크	2018-10-25	제30-0978781호	100	
26	상표	제주 현무암 토양에서 자란 검정무 진액, 검정무즙(흑무진액, 흑무즙)	(재)제주테크노파크	2018-05-24	제2018-0070704호	40-2018-0070704	(재)제주테크노파크	2019-05-27	제40-1482570호	100	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√			√	√					
2	√			√	√					

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
01	제주5컬러를 마시자	2019-04-1 5	(주)진산비버 리지					
02	제주검정무 분말스 틱	2019-10-0 1	콜마비엔에 이치(주)					
03	제주자연담 은 흑무즙	2017-11-1 5	(주)비케이바 이오					
04	제주자연담 은 흑무진 액	2017-11-1 5	(주)비케이바 이오					
05	제주컬러를 마시자 7	2018-12-0 3	(주)진산비버 리지					
06	제주향레드 비트청 굴	2020-06-2 4	농업회사법 인(주) 제주향					
07	착한제주 유기농 보리 흑무차	2021-06-0 3	영농조합법 인 제주다					
08	착한제주 흑무조 릿대차	2021-05-2 1	영농조합법 인 제주다					
09	착한제주 흑무차	2021-05-2 1	영농조합법 인 제주다					
10	흑무음료	2019-10-2 5	(주)진산비버 리지					
11	검정무발효 분말	2019-02-2 2	(주)바이오토 피아					

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
01	통상실시권	통상실시권 허여 계약(상표권)	진산비버리지	2019-01-02		
02	통상실시권	통상실시권 허여 계약(디자인권)	진산비버리지	2019-01-02		

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내(천원)	국외(달러)		

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
(주)진산비버리지		264,923천원		264,923천원	
소남친환경(영)		62,000천원		62,000천원	
농업회사법인(주)제주향		16,791천원		16,791천원	
합계		3.44억원		3.44억원	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		건강기능식품, 숙취해소, 건강지향식품 등			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3			
	소요예산(천원)	300,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		340,000	1,500,000	3,000,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			0.01	0.1	5
국내					
	국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
01	박상민	(주)진산비버리지	(고용창출일)2018-02-01		
02	김준범	(주)진산비버리지	(고용창출일)2019-03-11		
03	양다운	(재)제주테크노파크	(고용창출일)2016-09-01		
04	홍승현	(재)제주테크노파크	(고용창출일)2016-11-09		
05	고동길	(주)비케이바이오	(고용창출일)2017-01-16		
06	전형식	(재)제주테크노파크	(고용창출일)2020-03-23		
07	김슬기	콜마비앤에이치(주)	(고용창출일)2017-07-01		
08	백신화	콜마비앤에이치(주)	(고용창출일)2017-01-02		
09	조영희	콜마비앤에이치(주)	(고용창출일)2017-05-08		
10	전혜린	콜마비앤에이치(주)	(고용창출일)2018-01-02		
11	최한솔	콜마비앤에이치(주)	(고용창출일)2020-09-14		
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	-
		생산인력	-
	개발 후	연구인력	11
		생산인력	-

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원
01	2016 찾아가는 농식품 R&D 과제관리컨설팅	2016-10-13 ~ 2016-10-13	오동관, 양다운	진주대학교	100
02	안동대학교 농업개발원 최고농업경영자과정	2016-12-02 ~ 2016-12-02	안동대학교 농업개발원 최고농업경영자	제주 생물종다양성연구소 2층 세미나실	70

	교육		과정생		
03	기능성식품개발과 인허가 전략	2017-08-03 ~ 2017-08-03	사업 참여연구원	제주, 제주대학교 수의과대학 2층 회의실	7
04	글루코시노레이트: 생합성, 분석, 기능성 그리고 수확 후 변화	2017-08-21 ~ 2017-08-21	사업 참여연구원, 대학원생	제주, 제주대학교 화학과 3층 회의실	17
05	흑무 및 십자화과 채소를 이용한 기능성 음료 제조 관련 전문가 초청세미나	2018-04-13 ~ 2018-04-13	사업 참여연구원	(주)진산비버리지 3층 회의실	12
06	미생물 대사를 통한 신소재 개발 관련 전문가 초청세미나	2018-05-24 ~ 2018-05-24	사업 참여연구원	생물종다양성연구소 2층 회의실	11
07	흑무사업 관련 세포실험 유동세포분석기 활용 및 연구 내용 발표	2018-07-02 ~ 2018-07-02	사업 참여연구원	생물종다양성연구소 2층 회의실	6
08	월동무 및 기능성무 작물재배기술 교육	2018-07-16 ~ 2018-07-16	사업 참여연구원 등	성산일출봉농협 2층 대회의실	55
09	컬러푸드 유산균 발효산물을 이용한 유방암세포 억제제 개발 관련 전문가 초청세미나	2018-07-18 ~ 2018-07-18	사업참여연구원 등	생물종다양성연구소 2층 회의실	13
10	제주 유색무를 이용한 HMR 개발 가능성 및 HMR 식품안전관리 교육	2019-05-22 ~ 2019-05-22	사업참여연구원, 식품 관련 기업 종사자	(주)진산비버리지 3층 회의실	19
11	제주산 흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품 개발사업 전문가 초청 세미나	2019-06-13 ~ 2019-06-13	사업 참여연구원	생물종다양성연구소 2층 회의실	11
12	검정무 추출물 효능평가 관련 퍼킨엘머 연구장비 교육	2019-06-25 ~ 2019-06-25	사업 참여연구원	생물종다양성연구소 세미나실	8
13	검정무 브랜드믹스 성공전략 전문가 초청 세미나 교육	2019-07-03 ~ 2019-07-03	사업참여연구원, 제주대학교 연구원	제주대학교 생명과학기술혁신센터 2층 교육실	13
14	월동무 및 기능성무 안정생산기술교육	2019-08-08 ~ 2019-08-08	사업 참여연구원, 무 재배 농민	성산일출봉농협 2층 대회의실	81
15	월동채소를 이용한 식품 연구 개발 전문가 초청 세미나	2019-10-11 ~ 2019-10-11	흑무사업 사업참여연구원 등	생물종다양성연구소 2층 회의실	14
16	흑무 작목특성 및 재배기술 토론회 교육	2019-10-14 ~ 2019-10-14	검정무 재배 농민, 사업 참여연구원	성산일출봉농협 소회의실	7
17	FTA대응 월동무대체 신제품 무 시범재배 지원사업 설명회	2017-06-15 ~ 2017-06-15	농업인	성산일출봉농협 2층 대회의실	20
18	화장품 신소재 기술동향	2017-07-06 ~ 2017-07-06	사업 참여연구원	제주, 오션스위치호텔	20
19	흑무 재배기술 토론회 교육	2017-10-17 ~ 2017-10-17	농업인	성산일출봉농협친환경연구회 정경수 회장 자택	4
20	흑무 및 유색무 교육	2017-11-30 ~ 2017-11-30	흑무 재배농가	성산천환경연구회 채인규 부회장 자택	17

21	흑무재배기술현장교육	2017-12-05 ~ 2017-12-05	흑무 재배 농가	제주, 성산읍 온평리 2445 (흑무 시험포장)	16
22	공동워크샵 및 세미나 개최	2020-06-04 ~ 2020-06-04	흑무사업 참여연구원 등	코델리아S호텔	13
23	흑무사업관련 전문가 초청 세미나	2020-07-03 ~ 2020-07-03	흑무사업 참여연구원 등	생물종다양성연구소 2층 회의실	14
24	제품 디자인 및 마케팅 관련 교육	2020-10-27 ~ 2020-10-27	위탁기업 임직원 및 참여연구원 등	농업회사법인(주)제주향	10
25	흑무사업 전문가 초청 세미나 개최	2020-11-06 ~ 2020-11-06	흑무사업 참여연구원 등	생물종다양성연구소 2층 회의실	15

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
01	정책건의	서귀포시청 2018년도 향토산업육성사업	중앙행정부처 농림축산식품부	2017-05-31	2017-12-31
02	정책건의	초광역 협력 프로젝트 발굴 및 기획지원사업	중앙행정부처 국가균형발전위원회	2020-10-23	2021-07-01

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
01	박창하	2016		1				✓						
02	양다운	2016		1					✓					
03	홍승현	2016		1				✓						
04	방효진	2016			1			✓						
05	김남수	2017			1			✓						
06	고하나	2018	1						✓					
07	염현숙	2018		1					✓					
08	이종택	2018		1				✓						
09	안미정	2018	1						✓					
10	김정태	2018	1					✓						
11	안미정	2019	1						✓					
12	박지훈	2019		1				✓						
13	김하영	2019			1				✓					
14	최유나	2019		1					✓					
15	김정태	2019	1					✓						
16	김정은	2019	1						✓					
17	현지은	2019		1					✓					
18	김진아	2019			1				✓					
19	안미정	2017	1						✓					
20	이종택	2017			1			✓						
21	김정태	2017	1					✓						
22	고하나	2017		1					✓					
23	박예은	2020												
24	이학성	2016	1					✓						
25	홍수영	2016	1					✓						
26	최동원	2016		1				✓						
27	김성은	2016		1				✓						
28	이진규	2016		1				✓						
29	진혜주	2016		1					✓					
30	김슬기	2017		1				✓						
31	백신화	2017		1					✓					
32	전혜린	2018		1					✓					
33	도현동	2019		1				✓						
34	조영희	2020		1					✓					
35	최한솔	2021		1					✓					

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

01	기타	홍보브로셔 제작	농생명산업기술개발사업 Black Radish 제주산 흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품 개발사업 제주월동채소 브랜드	2016-12-20
02	지방전문지	제민일보	육성 필요한가	2017-03-08
03	기타	포럼 개최	제4회 무산업 발전 포럼	2017-03-24
04	지방전문지	제민일보	4회 월동무 산업 발전 포럼을 마치며	2017-05-04
05	기타	제주대학교 홍보자료	제주산 흑무, 비알콜성 간손상에 효과 탁월	2018-02-26
06	지방전문지	제주투데이	제주산 흑무, 비알콜성 간손상에 효과 탁월	2018-02-26
07	지방전문지	헤드라인제주	제주산 흑무, 비알콜성 간 손상 완화에 효과 탁월	2018-02-26
08	지방전문지	한라일보	'제주산 흑무, 비알코올성 지방간 억제 효과'	2018-02-26
09	지방전문지	제주일보	"제주 월동무, 간경화 지방간 예방 효과 탁월"	2018-02-26
10	지방전문지	제주신보	제주산 흑무, 비알콜성 간 손상 개선에 탁월한 효과	2018-02-26
11	지방전문지	제주신문	제주산 흑무 '간 손상'에 효과	2018-02-26
12	지방전문지	제주레저신문	제주산 흑무, 비알콜성 간 손상 탁월한 효과	2018-02-26
13	기타	에듀동아	제주산 흑무, 비알콜성 간 손상 탁월한 효과 있어	2018-02-26
14	지방전문지	시사제주	제주산 '흑무', 건강기능식품 개발 연구	2018-02-26
15	지방전문지	서귀포신문	흑무 기능성 활용, 농업과 가공산업 육성 전망	2018-02-26
16	지방전문지	뉴스제주	제주산 흑무, 비알콜성 간 손상에 효과 보여	2018-02-26
17	중앙일간지	국제뉴스	제주산 흑무, 비알콜성 간 손상 탁월한 '효과'	2018-02-26
18	지방전문지	경인투데이뉴스	제주산 흑무 비알콜성 간 손상에 효과 탁월	2018-02-27
19	지방전문지	제주저널	제주산 흑무, 비알콜성 간 손상 탁월한 '효과'	2018-02-27
20	중앙전문지	한국농어민신문	제주 흑무, 비알코올성 간 손상 억제 건강기능식품 개발 본격화	2018-03-02
21	지방전문지	뉴스원	제주테크노파크, 제주산 검정무 건강기능식품으로 개발	2018-07-26
22	지방일간지	서귀포신문	간기능 개선에 탁월하다는 제주 검정무, 인체실험 시작	2018-07-27
23	지방전문지	제주환경일보	제주산 검정무, 건강기능식품 개발 인체적용시험 착수	2018-07-27
24	지방일간지	시사제주	제주테크노파크, 검정무 발효 추출물 인체적용시험 착수	2018-07-27
25	지방일간지	제주도민일보	제주산 검정무 건강기능식품 인체 실험	2018-07-27
26	지방일간지	타임뉴스	제주 검정무 발효추출물 연구 성과 가시화	2018-07-27
27	지방일간지	일간제주	제주산 검정무 발효 추출물, 인체적용시험 착수	2018-07-27
28	지방일간지	제주신보	제주 검정무 건강기능식품으로 개발	2018-07-30
29	지방일간지	제주신보	제주 검정무 건강기능식품으로 개발	2018-07-31
30	지방일간지	제민일보	제주산 검정무 건강기능식품으로 개발	2018-08-05

			본격	
31	지방일간지	제주신보	월동무파동'검정무'가 구원투수로 났다	2018-09-26
32	지방일간지	제주신보	되풀이되는 월동무 파동 '검정무'가 구원투수로	2018-09-27
33	기타	NBS 한국농업방송	월동무 파동의 대안으로 검정무 및 유색무 재배 활성화 및 기능성 식품 개발	2018-10-15
34	월간잡지	디지털농업	기능성 건강식품으로 안성맞춤 검정 무	2018-12-01
35	지방일간지	제민일보	제주의 경쟁력은 농산업 육성이다	2018-12-03
36	지방일간지	제민일보	제주의 경쟁력은 농산업 육성이다	2018-12-04
37	지방일간지	제민일보	비타푸드(Vitafood) 박람회를 보면서	2019-05-29
38	지방일간지	제민일보	비타푸드(Vitafood) 박람회를 보면서	2019-05-30
39	지방일간지	제민일보	제주월동채소 HMR(가정편의식) 식품으로 변화 필요	2019-07-28
40	지방일간지	제민일보	제주월동채소 HMR(가정편의식) 식품으로 변화 필요	2019-07-29
41	지방일간지	제민일보	제주산업단지 확대없이 청년일자리 한계 있다	2019-09-18
42	중앙일간지	제민일보	제주산업단지 확대없이 청년일자리 한계 있다	2019-09-19
43	지방일간지	제주신보	정정 제주산으로 만든 과채주스 CJ오쇼핑서 소개	2019-10-20
44	지방일간지	한라일보	제주 웰빙 오색 과채주스 홈쇼핑타고 '월~월'	2019-10-20
45	지방전문지	뉴스N제주	제주 웰빙 오색 과채주스, CJ오쇼핑 방송 진출	2019-10-21
46	지방전문지	제주인뉴스	제주 웰빙 오색 과채주스, CJ오쇼핑 방송 탄다!	2019-10-21
47	지방일간지	제주도민일보	제주 웰빙 오색 과채주스 방송탄다	2019-10-25
48	지방전문지	제주의소리	제주 '웰빙 5색' 과채주스 홈쇼핑 공략 나선다	2019-10-25
49	지방일간지	미디어제주	제주서 개발 '제주5컬러를 마시자' 홈쇼핑 진출	2019-10-26
50	중앙일간지	파이낸셜뉴스	"제주 5컬러를 마시자" 한 병이면 1일 채소 권장량 '끝'	2019-10-26
51	지방일간지	제민일보	월동무 효능을 아시나요	2019-11-06
52	지방일간지	제민일보	월동무 효능을 아시나요	2019-11-07
53	기타	e-대학저널	제주대 기초과학연구소, '2020년 제1회 생물종다양성연구소 세미나'	2020-06-20
54	지방일간지	제주도민일보	제주대 기초과학연구소, 정기세미나 개최	2020-06-20
55	지방일간지	헤드라인제주	제주대 기초과학연구소, 생물종다양성연구소 연계 세미나 개최	2020-06-20
56	지방전문지	베리타스알파	제주대 기초과학연구소, 생물종다양성연구소 연계세미나 열어	2020-06-22
57	지방일간지	한라일보	제주대 기초과학연구소 정기 세미나	2020-06-22
58	기타	홍보브로셔	BLACK RADISH	2020-09-25
59	중앙일간지	국제뉴스	'제주산 검정무 산업화 가시화'...탁월한 효능 인정	2020-10-05
60	지방일간지	한라일보	'고기등성 제주산 검정무 산업화 가시화'	2020-10-05
61	지방전문지	뉴스원	'간 기능 개선 탁월'	2020-10-05

62	지방일간지	뉴제주일보	제주산 검정무 산업화 성공 제주 검정무 산업화 가시화...성인병 예방 효과 입증	2020-10-05
63	지방일간지	일간제주	'제주산 검정무 산업화 가시화'...JTP, 제주산 검정무 효능 연구 모음집 발간	2020-10-05
64	지방일간지	제주일보	탁월한 효능 '제주산 검정무' 산업화 가시화 주목	2020-10-05
65	중앙일간지	파이낸셜뉴스	간 기능 개선 탁월...제주산 검정무 산업화 속도	2020-10-05
66	지방전문지	경인투데이뉴스	제주산 검정무 산업화 가시화.....항비만, 항염증, 간기능 개선 등 성인병 예방에 효과 있는 것으로 확인	2020-10-06
67	중앙TV방송	KBS1	6시내고향 "제주 서귀포에는 검은색 무가 있다?"	2021-03-09
68	기타	2016 한국유전학회 국제학술대회	제주산 무 연구결과 포스터 및 활용 제품	2016-11-10 ~ 2016-11-11
69	기타	2016 감귤데이 1주년 기념행사	흑무 및 유색무(수박무, 적색무, 자색무 등)	2016-12-01
70	기타	제24회 정산일출봉 일출축제	무관련 제품 및 성과결과발표	2016-12-30 ~2017-01-01
71	기타	2017 농식품과학기술 미래전망 대회	전시회 및 세미나 참석	2017-02-16
72	기타	제4회 제주 무산업 발전 포럼	무를 이용한 식품 및 실험결과 포스터 전시	2017-03-24
73	박람회	제7회 로하스박람회	검정무 포스터 및 검정무 사업 홍보	2018-09-06 ~ 2018-09-09
74	박람회	2018 제주천연화장품&뷰티 박람회	검정무 소개 및 검정무 사업 홍보	2018-11-02 ~ 2018-11-04
75	박람회	13th HEALTH EXPO 2019	제주5컬러를마시자	2019-06-07 ~ 2019-06-09
76	기타	2020 농식품 R&D 유망기술발표회	보유특허기술	2020-12-09 ~2020-12-10
77	박람회	2019 제주식품대전	제주5컬러를마시자, 검정무 타정제품	2019-06-27 ~ 2019-06-30
78	박람회	제7회 제주국제크루즈포 럼	제주5컬러를 마시자, 검정무타정제품	2019-08-28 ~ 2019-08-31

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
01	수상	우수포스터상	2018 한국실험동물학 회 국제학술대회 우수포스터상 수상		2018-07-20	(사)한국실험 동물학회
02	수상	우수포스터상	한국생물공학회 추계국제학술대 회 우수포스터상 수상		2018-10-12	사단법인 한국생물공학 회

○ 증빙 1. 논문 실적

EXCLI Journal 2016; 15: 571-577 – ISSN 1631-3156
Received: June 28, 2016, accepted: August 24, 2016, published: October 13, 2016

Letter to the editor:
CURRENT POTENTIAL HEALTH BENEFITS OF SULFORAPHANE

Jae Kwang Kim¹ and Sang Un Park^{2*}

¹ Division of Life Sciences, College of Life Sciences and Bioengineering, Incheon National University, Incheon, 406-772, Korea
² Department of Crop Science, Chungnam National University, 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 305-764, Korea
* Corresponding author; E-mail: supark@cnu.ac.kr, Tel.: +82-42-822-2631, Fax: +82-42-822-2631

<http://dx.doi.org/10.17179/excli16016-485>
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Dear Editor,

Sulforaphane [SFN; 1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane] belongs to the isothiocyanate class of phytochemicals. Glucoraphanin, a glucosinolate precursor of SFN, is a glucosinolate found in cruciferous vegetables such as broccoli, cabbage, cauliflower, and kale. All glucosinolates are composed of a basic structure consisting of a β-D-thioglucose group, a sulfonated oxime group, and an amino acid-derived side chain. Glucosinolates are activated by enzyme-dependent hydrolysis to their respective isothiocyanates. SFN (molecular formula C₆H₁₁NOS₂) is the biologically active isothiocyanate produced by the metabolism of glucoraphanin by the enzyme myrosinase (Fahey et al., 2015).

SFN is one of the most frequently studied plant-derived isothiocyanate organosulfur compounds. It has been reported to exhibit a wide range of biological effects including antioxidant (Fahey and Talalay, 1999), antimicrobial (Johansson et al., 2008), anticancer (Amjad et al., 2015), anti-inflammatory (Greaney et al., 2016), anti-aging (Sikdar et al., 2016), neuroprotective (Tarozzi et al., 2013), and antidiabetic (Lee et al., 2012).

SFN shows a range of biological activities and health benefits in humans, has been found to be a very promising chemopreventive agent against not only a variety of cancers such as breast, prostate, colon, skin, lung, stomach, and bladder but also against cardiovascular and neurodegenerative diseases and diabetes (Yang et al., 2016). In this present study, we reviewed the most recent studies on the biological and pharmacological activities of SFN (Table 1).


Acknowledgements
This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (316006-5).

Fahey J, Talalay P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol.* 1999;37:973-9.
Fahey JW, Holtzclaw WD, Webpage SL, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. Sulforaphane bioavailability from glucoraphanin-rich broccoli: control by active endogenous myrosinase. *PLoS One.* 2015;10:e0146963.

1) 설포라판의 건강 benefit (김재광 외 1인)

Appl Biol Chem (2017) 60(3):249–257
DOI 10.1007/s13765-017-0274-z

Online ISSN 2468-0842
Print ISSN 2468-0834

 CrossMark

ARTICLE

Metabolic profiling of pale green and purple kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*)

Chang Ha Park¹ · Hyun Ji Yeo¹ · Nam Su Kim¹ · Park Ye Eun¹ · Sun-Ju Kim² · Mariadhas Valan Arasu³ · Naif Abdullah Al-Dhabi³ · Soo-Yun Park⁴ · Jae Kwang Kim⁵ · Sang Un Park¹

Received: 17 January 2017 / Accepted: 24 March 2017 / Published online: 4 April 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

role as an energy source and in plant metabolism. The total amount of carbons (represented mainly by sugars such as xylose, glucose, mannose, galactose, fructose, sucrose, trehalose, and raffinose) in the purple cultivar was lower than that in the green cultivar, which reflected on carbon and energy demand to support anthocyanin metabolism.

Acknowledgments This research was supported by Agriculture, Food and Rural Affairs Research Center Support Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs and Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (316006-5).

2) 자색콜라비의 대사 프로파일 (박창하 외 9인)

Black Radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) Extract Mediates Its Hepatoprotective Effect on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury by Attenuating Oxidative Stress

Meejung Ahn,¹ Jeongtae Kim,² Seunghyun Hong,² Jungeun Kim,³ Hana Ko,³ Nam-Ho Lee,³ Gi-Ok Kim,² and Taekyun Shin¹

¹College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju, Korea.

²Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Jeju, Korea.

³Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Jeju National University, Jeju, Korea.

ABSTRACT Nonalcoholic fatty liver disease is a serious liver disorder associated with oxidative stress. Black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) extract (BRE) can lower the risk of this disease. The hepatoprotective effect of BRE containing 3-(E)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinedithione was evaluated in human hepatocyte carcinoma (HepG2) cells and in rat livers with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic injury. BRE was administered at 125, 250, 500, and 1000 µg/mL to the oleic acid-induced HepG2 cells. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into seven groups: the control group, BRE group, CCl₄ group, and BRE + CCl₄ group. BRE was administered orally at 125, 250, 500, and 1000 mg/kg/day once daily for 7 consecutive days, followed by a single oral treatment of 1.5 mL/kg CCl₄. Inhibition of lipid accumulation, serum markers of liver injury, histological evaluations, levels of oxidative stress related enzymatic and nonenzymatic antioxidants in HepG2 cells and liver tissue were investigated. The protein expression of main liver P450 isoenzymes such as cytochrome p450(CYP2E1, the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor-2(Nrf-2) and heme oxygenase-1(HO-1) were also studied. BRE has an inhibitory effect on lipid accumulation and caused acute hepatotoxicity manifested by increased levels of lipid peroxidation, serum alanine aminotransferase, and aspartate aminotransferase with corresponding histopathological changes and high levels of oxidative stress. BRE treatment significantly increased the level of CYP2E1, Nrf-2, and HO-1 in a dose-dependent manner. Besides, 3-(E)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinedithione significantly increased radical-scavenging effects and the expression of Nrf-2 in oleic acid-treated HepG2 cells. These results suggest that BRE treatment reduces lipid accumulation in oleic acid-induced steatosis of HepG2 cells, and has a hepatoprotective effect against CCl₄-induced liver injury in rats, possibly through Nrf-2/HO-1-mediated antioxidant effects.

KEYWORDS: • black radish extract • carbon tetrachloride • hepatoprotection • nonalcoholic fatty liver

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries (IPET) through Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 316006-05-1-HD040).

3) 흑무추출물의 사염화탄소에 의한 간손상 억제 효과 (안미정 외 7인)

Article

DOI: 10.1002/bkcs.11583

H. N. Ko et al.

BULLETIN OF THE
KOREAN CHEMICAL SOCIETY

Antimelanogenic Effects of *Raphanus sativus* L. var. *niger* Roots on α -MSH Stimulated B16F10 Melanoma Cells

Ha Na Ko,¹ Jung Eun Kim,¹ Yeon Jeong Jo,¹ Seung Hyun Hong,¹ Da Wun Yang,¹ Gi Ok Kim,¹ and Nam Ho Lee^{1,*}

¹Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea.

*E-mail: namho@jeju.ac.kr

²Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Jeju 63608, Korea

Received July 30, 2018, Accepted August 22, 2018, Published online October 9, 2018

This study was conducted to identify the antimelanogenic components from *Raphanus sativus* L. var. *niger* (black radish). Phytochemical study with the ethanol extract of black radish roots resulted in the isolation of six compounds: 3-(E)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinedithione (**1**), ascorbigen (**2**), β -sitosterol (**3**), palmitic acid (**4**), α -linolenic acid (**5**), and 1-linoleonyl glycerol (**6**). Among the isolates, the thione **1** efficiently inhibited melanin synthesis in a concentration-dependent manner in α -MSH stimulated B16F10 melanoma cells. Western blotting analysis for the key melanogenic enzymes showed that compound **1** decreased tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 expressions. These results demonstrated that the black radish extract including pyrrolidinedithione **1** could be useful as antimelanogenic agents in cosmetic or pharmaceutical applications.

Keywords: Black radish, *Raphanus sativus* L. var. *niger*, Antimelanogenesis, Isolation, Structure determination

Acknowledgments. This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Project No. 316006-5). This research was also supported by the 2018 scientific promotion program funded by Jeju National University.

Supporting Information. Additional supporting information is available in the online version of this article.

10. E. Njumbé Ediage, J. Diana Di Mavungu, M. L. Scippo, Y. J. Schneider, Y. Larondelle, A. Callebaut, J. Robbins, C. Van Peteghem, S. De Saeger, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4398.
11. J. H. Han, S. H. Byeon, C. G. Hyun, N. H. Lee, *J. Appl. Pharm. Sci.* **2014**, *4*, 166.
12. J. S. Hwang, H. J. Shin, H. S. Noh, H. J. Park, S. M. Ahn, D. S. Park, D. H. Kim, B. G. Lee, I. S. Chang, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **2002**, *28*, 135.
13. C. Y. Ragasa, V. D. Ebajo, M. C. S. Tan, R. Brkljaca, S. Urban, *Der Pharma Chem.* **2015**, *7*, 354.
14. S. Biskov, C. E. Olsen, H. Sorensen, S. Sorensen, *Biochem. Biophys. Methods* **2000**, *43*, 175.

4) 흑무추출물의 항 멜라닌 합성 억제 효과(고하나 외 6인)



NOTE

Pathology

Allyl isothiocyanate reduces liver fibrosis by regulating Kupffer cell activation in rats

Jeongtae KIM¹), Hyojin BANG¹), Meejung AHN¹), Yuna CHOI¹), Gi Ok KIM²) and Taekyun SHIN¹)*

¹Department of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Seoguipo city, Jeju 63608, Republic of Korea

J. Vet. Med. Sci.
80(6): 893–897, 2018
doi: 10.1292/jvms.17-0637

Received: 27 November 2017
Accepted: 3 April 2018
Published online in J-STAGE:
17 April 2018

ABSTRACT. Allyl isothiocyanate (AITC), a metabolite of the glucosinolate sinigrin, protects the liver of rats injured by carbon tetrachloride (CCl₄). This study evaluated whether AITC reduces hepatic fibrosis in rats repetitively exposed to CCl₄. Serum chemistry showed that AITC (doses of 5 and 50 mg) administered to rats exposed to CCl₄ significantly reduced the levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activity that were elevated in CCl₄-intoxicated rats. The connective tissue in AITC-treated rats was significantly reduced based on Sirius staining. In addition, Kupffer cell activation was significantly reduced in the AITC and CCl₄ co-treated groups. Collectively, this study suggests that AITC mitigates hepatic fibrosis in rats repetitively exposed to CCl₄ with concurrent regulation of Kupffer cell and monocyte activation.

KEY WORDS: allyl isothiocyanate, carbon tetrachloride, fibrosis, Kupffer cell

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 316006-05-1-HD040).

5) allyl isothiocyanate의 간섬유화 감소 효과(김정태 외 5인)

Received: 2 July 2019 | Revised: 2 August 2019 | Accepted: 12 August 2019
DOI: 10.1002/fsn3.1200

ORIGINAL RESEARCH

Food Science & Nutrition | WILEY

Fermented black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) attenuates methionine and choline deficient diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice

Meejung Ahn¹ | Jeongtae Kim¹ | Yuna Choi¹ | Poornima Ekanayake¹ | Ji-Yeon Chun² | DaWun Yang³ | Gi-Ok Kim³ | Taekyun Shin¹

¹Department of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju, Republic of Korea

²Department of Food Biotechnology, College of Engineering, Jeju National University, Jeju, Republic of Korea

³Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Seoguipo, Republic of Korea

Correspondence: Taekyun Shin, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea. Email: shint@jeju.ac.kr

Funding information: Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) Grant/Award Number: 316006-05-1-HD040

Abstract

As one of the wide-ranging form of chronic liver disease, there are only limited therapeutic options for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). We evaluated whether fermented black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*; FBR) ameliorates lipid accumulation, inflammation, and hepatic fibrosis, which are characteristics of the pathogenesis of NAFLD. Fermented black radish treatment reduced lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes, which appeared to be associated with the downregulation of adipogenic transcription factors, including sterol regulatory element-binding protein 1c, CCAAT/enhancer-binding protein α, peroxisome proliferator-activated receptor γ, and lipid accumulation-related genes including adipocyte protein-2 and fatty acid synthase. Administration of FBR to C57BL/6J mice challenged with methionine and choline deficient (MCD) diet significantly attenuated the increased serum levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, and triglyceride. In addition, treatment with FBR interestingly repressed the hepatic inflammation induced with MCD diet, by lowering the expression of inducible nitric oxide synthase and suppressing the inactivation of macrophages and Kupffer cells in the liver. Fermented black radish was also shown to mitigate liver fibrosis through the inhibition of alpha-smooth muscle actin, transforming growth factor beta-1, and collagen type I alpha 1 chain. Our results indicate that FBR ameliorates NAFLD and its related metabolic disease by regulating multiple pathways, suggesting that FBR may be an effective dietary supplement for ameliorating NAFLD.

KEYWORDS

fermented black radish, fibrosis, inflammation, MCD diet, steatosis

6 | ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 316006-05-1-HD040).

Diseases and Sciences, 61(5), 1325–1336. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>
Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groot, J., Gudat, F., Thaler, H. (1995). Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 22(6), 696–699. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80226-6](https://doi.org/10.1016/0168-8278(95)80226-6)
Kim, J., Ahn, M., Kim, S.-E., Lee, H. S., Kim, H. K., Kim, G. O., Shin, T. (2017). Hepatoprotective effect of fermented black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) in CCl₄ induced liver injury in rats. *Journal of*

6)비알코성 지방간 모델에서 흑무발효물의 지방간 억제 효과(안미정 외 7인)



Alpha-Linolenic Acid Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice

Jeongtae Kim,^{1,2} Meejung Ahn,^{1,3} Yuna Choi,¹ Taeyoung Kang,¹ Jungeun Kim,⁴ Nam Ho Lee,⁴ Gi Ok Kim,⁵ and Taekyun Shin^{1,6}

Abstract—Ulcerative colitis (UC) is a type of inflammatory bowel disease characterized by inflammation of the large intestine, rectal bleeding, and abdominal pain. It can be alleviated by certain bioactive compounds, including α -linolenic acid (ALA), which is a bioactive component in fermented black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*). The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effects of ALA in dextran sulfate sodium (DSS)-induced UC in mice. UC was induced in C57BL/6 mice by allowing them to freely drink water containing 2.5% DSS for 7 days, followed by oral administration of ALA (30 and 60 mg/kg/day) or vehicle control for 7 days. DSS-induced colitis was evaluated using the Disease Activity Index (DAI) and by measuring colon length and performing a histopathological examination. Compared to the control group, the vehicle-treated group showed a higher DAI score, shorter colon, goblet cell loss, and crypt shortening. The ALA treatment mitigated clinical signs of UC and histopathological changes. Furthermore, it mitigated intestinal inflammation by reducing the expression of ionized calcium binding adaptor molecule 1-positive macrophages in the colon. These results show that ALA alleviates DSS-induced UC by suppressing colon damage, which includes goblet cell loss, crypt shortening, and a reduction of macrophages in the colon.

KEY WORDS: alpha-linolenic acid; colitis; dextran sulfate sodium; fermented black radish; inflammatory bowel disease; macrophages.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (grant number: 316006-05-1-HD040).

inflammatory activity of the seeds of *Raphanus sativus* L. in experimental ulcerative colitis models. *Journal of Ethnopharmacology* 179: 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.045>.

- Eichele, D.D., and K.K. Kharbanda. 2017. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 23 (33): 6016–6029. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6016>.
- Goncalves, N. B., R. F. Bannitz, B. R. Silva, D. D. Becari, C. Poloni, P. M. Gomes, M. C. Foss, and M. C. Foss-Freitas. 2018. Alpha-linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose toler-

7) 생쥐 DSS 장염모델에서 α -linolenic acid 효과 (김정태 외7인)

Phytomedicine 77 (2020) 153276
Contents lists available at ScienceDirect
Phytomedicine
journal homepage: www.elsevier.com/locate/phyomed

Sulforaphane controls the release of paracrine factors by keratinocytes and thus mitigates particulate matter-induced premature skin aging by suppressing melanogenesis and maintaining collagen homeostasis

Hyun Ju Ko^{a,b,*}, Jin Hwa Kim^a, Geun Soo Lee^a, Taekyun Shin^{b,*}

^a Skin science research team, Creation & Innovation Research Institute, ITS HANBUL CO., LTD., Gangnam-gu, Seoul 06101, Republic of Korea
^b College of Veterinary Medicine and Veterinary Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

ARTICLE INFO
Keywords:
Coculture system
Collagen homeostasis
Melanogenesis
Particulate matter 2.5
Premature skin aging
Sulforaphane

ABSTRACT
Background: Skin aging, potentially caused by exposure to particulate matter (PM)_{2.5}, is characterized by wrinkling, abnormal pigmentation, and skin dryness triggered by several keratinocyte-derived paracrine factors. Sulforaphane (4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate, SFN), commonly found in cruciferous vegetables, has diverse biological effects on skin tissue.
Purpose: In the present study, we have investigated whether SFN may alleviate PM_{2.5}-induced premature skin aging.
Methods: We used keratinocyte/melanocyte or keratinocyte/fibroblast coculture models of skin cells and measured the parameters of melanogenesis, collagen homeostasis and inflammation.
Results: SFN inhibited the development of reactive oxygen species in keratinocytes exposed to PM_{2.5}. In keratinocyte/melanocyte cocultures, it significantly inhibited the upregulation of melanogenic paracrine mediators (including endothelin-1 and prostaglandin E2) in keratinocytes exposed to PM_{2.5}; the synthesis of melanogenic proteins including microphthalmia-associated transcription factor, tyrosinase-related protein 1, and tyrosinase; and the levels of melanin in melanocytes. SFN treatment of keratinocyte/fibroblast cocultures significantly reduced the PM_{2.5}-induced expression of NF- κ B-mediated cytokines including interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor α , and cyclooxygenase-2. In fibroblasts of the keratinocyte/fibroblast coculture system, the expression levels of phospho-NF- κ B, cysteine-rich protein 61, and matrix metalloproteinase-1 were significantly decreased whereas procollagen type I synthesis was significantly increased.
Conclusion: Collectively, our results suggest that SFN mitigates PM_{2.5}-induced premature skin aging by suppressing melanogenesis and maintaining collagen homeostasis. It acts by regulating the release of paracrine factors from keratinocytes.

H.J. Ko, et al. / *Phytomedicine* 77 (2020) 153276

Acknowledgements
This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 316006-05-1-HD040).

26 (6), 922–928.
Leiros, G.J., Kuslitsky, A.G., Balana, M.E., Hagelin, K., 2017. Triolein reduces MMP-1 upregulation in dermal fibroblasts generated by ROS production in UVB-irradiated keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 85, 124–130.
Li, M., Vierhöfner, A., Schikowski, T., Hils, A., Ding, A., Matsui, M.S., Deng, B., Ma, C., Ren, A., Zhang, J., Tan, J., Yang, Y., Jin, L., Krutmann, J., Li, Z., Wang, S., 2015. Epidemiological evidence that indoor air pollution from cooking with solid fuels accelerates skin aging in Chinese women. *J. Dermatol. Sci.* 79, 148–154.
Mishra, K., Morel, F., Langouët, S., Kramer, H., Le Ferrec, E., Ketterer, B., Guillouzo, A., 1997. Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione s-transferases by

8)keratinocyte에서 설포라판의 메라닌 합성 억제와 콜라겐합성 촉진 효과 (고현주 외 3인)

Amino Acids Content in Different Cultivars of Young Radish (*Raphanus sativus*)

JAE KWANG KIM¹, SUN JU BONG² and SANG UN PARK^{2*}

¹Division of Life Sciences and Bio-Resource and Environmental Center, Incheon National University, Incheon 406-772, Republic of Korea
²Department of Crop Science, Chungnam National University, 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Republic of Korea

*Corresponding author: Fax: +82 42 8222631; Tel: +82 42 8215730; E-mail: supark@cnu.ac.kr

Received: 22 December 2016; Accepted: 15 February 2017; Published online: 13 May 2017; AJC-18366

The variations in the amino acid contents of five different Korean cultivars of young radish were investigated in this study. Twenty-one amino acids were detected among the different cultivars and the presence and quantity of amino acids varied greatly among the cultivars. The cultivar Martjjang contained the highest total quantity of amino acids, with values 3.65, 2.26, 2.10 and 1.80 times higher than the total amino acid content in the Saebaram, Chuha, Chudong and Super Red cultivars, respectively. Martjjang also contains the highest levels of all amino acids except for a few. The levels of leucine, lysine, γ -amino butyric acid, asparagine and alanine were much higher in the Martjjang cultivar, which had 23.58, 12.01, 3.71, 3.16 and 2.83 times higher concentrations of these amino acids, respectively, than the Saebaram cultivar, which had the lowest content. In all cultivars, the amino acids aspartate, serine, glycine, threonine, cysteine, valine, methionine, phenylalanine and isoleucine were found in moderate quantities, with Martjjang containing the highest quantity of each. The levels of aspartate, serine, glycine, threonine, cysteine, valine, phenylalanine and isoleucine in Martjjang were 3.83, 5.39, 2.10, 5.22, 4.31, 6.58, 5.02 and 9.36 times higher, respectively, than those in the Saebaram cultivar, which had the lowest concentrations of these amino acids. The levels of vitamin U, glutamine and histidine were the lowest irrespective of cultivar, with Martjjang containing the highest quantity of each except histidine. The cultivar Super Red contains the second highest quantity of total amino acids (738.26 mg/100 g dry wt.), where only histidine and arginine were found in the highest quantities. In conclusion, the present results demonstrate that Korean young radish cultivars contain variable quantities of amino acids, while the Martjjang cultivar showing the greatest potential to serve as a commercial source of amino acids.

Keywords: Amino acids, Cultivars, Young radish, Vegetables, Korean side dish.

1430 Kim et al.

Asian J. Chem.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (316006-5).

- S.H. Shu and J. Schacht, *Heart Res.*, **142**, 34 (2000); [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(00\)80003-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(00)80003-4)
- H.Y. Fu, D.E. Shieh and C.T. Ho, *J. Food Lipids*, **9**, 35 (2002); <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2002.tb00206.x>
- H. Gomes and E. Rosa, *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 295 (2001); [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200102\)81:3<295::AID-JSFA811>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200102)81:3<295::AID-JSFA811>3.0.CO;2-E)
- G.S. Gilani, C. Xiao and N. Lee, *J. AGMC Int.*, **91**, 894 (2008).

9) 재배조건에 따른 어린 무에서의 아미노산 함량 (김재광 외 2인)

유산균 발효 흑무의 항산화 및 지방구 형성 억제 효과

김성은 · 백신화 · 이학성 · 김현규
 글마비엔에이치(주) 식품과학연구소

Inhibitory Effects of Black Radish Fermented with Probiotics on Antioxidant and Lipid Accumulation

Seong-Eun Kim, Sinhwa Baek, Hak Sung Lee, and Hyun-Kyu Kim
 Food Science R&D Center, Komar BNH Co., Ltd.

ABSTRACT Black radish (*Raphanus sativus* var. *niger*) has been reported to have anti-oxidant, anti-inflammatory and detoxification effects. In this study, we investigated the antioxidant and lipid accumulation inhibitory effects of fermented black radish (FBR) with *Lactobacillus plantarum* compared with non-fermented black radish (BR) and black radish extracts obtained using water, and 30%, 50%, 70% ethyl alcohol. The lipid accumulation inhibitory effect was determined by Oil-Red O staining activity after oleic acid treatment of HepG2 cells. Treatment with FBR at doses of 100 and 500 μ g/mL inhibited lipid accumulation by 103% and 108% and BR at the same dose inhibited lipid accumulation by 72% and 61%, respectively. Extracts inhibited lipid accumulation ranging by 17% to 93% when applied in the same doses. FBR led to significant inhibition of lipid accumulation compared with BR and extracts. In addition, FBR demonstrated antioxidant effect such as scavenging activity of (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical and super oxide dismutase (SOD)-like activity. Also the FBR was measured total polyphenol contents (TPC) and total flavonoid contents (TFC). Moreover, FBR showed significant greater antioxidant activity than BR and extracts. The TPC of FBR increased more than BR and the TFC of FBR was higher than that of other extracts. These results suggest that FBR might be a potential health functional food ingredient for enhancing liver function.

Key words: black radish, fermentation, antioxidant, lipid accumulation inhibitory activity, *Lactobacillus plantarum*

감사의 글

본 연구는 2017년도 농림축산식품부 농림수산식품기술기획과원에서 시행한 농경명산업기술개발사업(과제번호: 316006-5)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

- Jeng KC, Chen CS, Fang YP, Hou RCW, Chen YS. 2007. Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-Erh tea. *J Agric Food Chem* **55**: 8787-8792.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**: 1231-1237.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of

10) 유산균 발효의 항산화 및 지방구 형성 억제 효과 (김성은 외 3인)

3T3-L1 세포에서 검정무 추출물의 Adipogenesis 억제 효과

양다운¹ · 홍승현² · 이학성² · 이남호³ · 신태균⁴ · 김기욱³

¹(재)제주테크노파크 생물종다양성연구소, ²콜마비엔에이치(주) 식품과학연구소
³제주대학교 화학·코스메틱스학과, ⁴제주대학교 수의과대학

Inhibitory Effect of Black Radish Extract (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) on Adipogenesis in 3T3-L1 Cells

Dawun Yang¹, Seunghyun Hong², Hak Sung Lee², Nam Ho Lee³, Taekyun Shin⁴, and Giok Kim³

¹Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark

²Food Science R&D Center, Kolmar BNH Co., Ltd.

³Department of Chemistry and Cosmetics and ⁴Department of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University

ABSTRACT Black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) is a root vegetable that is distributed all over the world and it is used for folk medicine to treat jaundice, liver disease, indigestion and gastric pains. In the present study, we investigated the anti-obesity activity of black radish extract (BRE) by conducting various experiments. The inhibitory, dose dependent effect of BRE on adipogenesis was shown in 3T3-L1 preadipocytes with Oil Red O staining, and it effectively decreased the intracellular triglyceride concentration of adipocytes. The effect of BRE on the expression of various adipogenesis-related genes was analyzed via western blotting and quantitative real time PCR. We demonstrated that BRE significantly down regulated the expression of C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , aP2, SREBP-1c, ADD1, ACC, FAS, SCD, ATGL, HSL, and adipon in a dose dependent manner. The specific mechanism mediating the anti-adipogenesis effects of BRE was the inhibitory effect of BRE on AMP-activated protein kinase activation and the Nrf2/HO-1 pathway. In addition, we found that BRE significantly increased C/EBP β protein and mRNA, and this was all influenced through Nrf2 activation during an early stage (day 2). BRE inhibits lipid accumulation by regulating adipogenesis and lipogenesis related genes and signaling proteins. BRE may a good candidate for a nutraceutical and pharmaceutical formulation for treating or controlling obesity.

Key words: black radish, anti-obesity, anti-adipogenic effect, AMPK, Nrf2

3T3-L1 세포의 adipogenesis를 억제하였다고 보고하였다 (Lee 등, 2018). 또 다른 연구에서는 wasabi 추출물에서 adipogenic 관련 유전자와 단백질 발현을 억제하여 3T3-L1 세포의 adipogenesis를 억제한다고 보고하였다(Ogawa 등, 2010). 따라서 검정무 추출물은 AMPK 활성화를 통해

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음 (316006-5).

11) 흑무추출물의한 지방세포 분화 억제 효과(양다운 외 5인)



Hepatoprotective effect of fermented black radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*) in CCl₄ induced liver injury in rats

Jeongtae Kim¹, Meejung Ahn¹, Seong-Eun Kim², Hak Sung Lee², Hyun Kyu Kim², Gi Ok Kim³, Taekyun Shin^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Kolmar BNH, Food science R&D, Sejong 30003, Republic of Korea

³Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Jeju 63608, Republic of Korea

Abstract: Oxidative stress is one of common cause of fatty changes in the liver. Antioxidant capacity was confirmed in various vegetables including black radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*). Fermentation of vegetables using *Lactobacillus plantarum* has been known to generate bioactive components. This study was conducted to determine if fermented black radish (FBR) ameliorates oxidative liver injury induced by CCl₄ in rats. To accomplish this, FBR (250 and 500 mg/ kg) was orally administered to rats for 7 consecutive days, single CCl₄ (1.5 mL/kg) treatment or no treatment orally. Serum chemistry at 24 hours after CCl₄ injury showed that FBR (500 mg/kg) significantly reduced the level of both alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in CCl₄ exposed rats. Moreover, FBR treatment significantly increased radical-scavenging effects in livers with the reduction of lipid peroxidation in CCl₄ exposed rats. Histopathologic findings including Kupffer cell activation in the liver of each group matched those of serum chemistry. Collectively, black radish, through fermentation, exerts hepatoprotective capacity in CCl₄ induced liver injury in rats through anti-oxidation.

Key words: Black radish, liver, oxidative, fermentation

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 316006-05-1-HD040).

- 9. Gutierrez RM, Perez RL. *Raphanus sativus* (Radish): their chemistry and biology. *ScientificWorldJournal*. 2004, 4:811-837.
- 10. Hanlon PR, Barnes DM. Phytochemical composition and biological activity of 8 varieties of radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts and mature taproots. *J Food Sci*. 2011, 76:C185-192.

12) 사염화탄소 간손상 모델에서 흑무 발효물의 간보호 효과(김정태 외 7인)



Indole-3-carbinol alleviates carbon tetrachloride-induced liver injury by inhibiting inflammatory response and regulating lipid metabolism

Meejung Ahn^{1,2} · Jeongtae Kim^{1,3} · Dawun Yang⁴ · Ji-Yeon Chun⁵ · Gi Ok Kim⁴ · Taekyun Shin¹

Received: 19 February 2020 / Accepted: 14 April 2020
© Institute of Korean Medicine, Kyung Hee University 2020

Abstract

The hepatoprotective effects of indole-3-carbinol (I3C), one of the byproducts of the breakdown of glucosinolate glucobras-sin, were examined in mice with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity. I3C was administered orally at a dose of 50 or 100 mg/kg to C57BL/6 mice for 3 consecutive days with or without a subsequent single oral administration of CCl₄ (1.5 mL/kg). I3C treatment significantly suppressed the increases in alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels in the sera of CCl₄-injured mice. In addition, I3C treatment markedly suppressed CCl₄-induced hepatic inflammation, by suppressing the activation of macrophages and Kupffer cells in the liver. To examine the effects of I3C on lipid accumulation, 3T3-L1 pre-adipocytes were differentiated with I3C or vehicle control. I3C treatment reduced lipid accumulation, which appeared to be associated with the downregulation of adipogenic transcription factors, such as CCAAT/enhancer-binding protein α , peroxisome proliferator-activated receptor γ , and lipid accumulation-related genes, including adipocyte protein-2. Taken together, the present study suggest that I3C treatment reduces hepatocyte death and lipid accumulation in hepatocytes in CCl₄-induced hepatic injury with concurrent suppression of macrophages/Kupffer cells, which was further evidenced by I3C-treated pre-adipocytes in vitro, through downregulation of lipid metabolism.

Keywords Indole-3-carbinol · Carbon tetrachloride · Inflammation · Adipocyte differentiation

Acknowledgements This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 316006-05-1-HD040).

Choi HS, Jeon HJ, Lee OH, Lee BY (2014) Indole-3-carbinol, a vegetable phytochemical, inhibits adipogenesis by regulating cell cycle and AMPK α signaling. *Biochimic* 104:127–136
Choi Y, Abdelmegeed MA, Song BJ (2018) Preventive effects of indole-3-carbinol against alcohol-induced liver injury in mice via

13) 생쥐 사염탄소 간손상 모델에서 I3C의 염즈 및 지방대사 억제효과(안미정의 5인)



Antifibrotic effects of fermented black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) on chronic liver injury in rats

Jeongtae Kim¹ · Meejung Ahn¹ · Yuna Choi³ · Poornima Ekanayake¹ · Gi-Ok Kim² · Taekyun Shin¹

Received: 3 July 2019 / Accepted: 14 August 2019
© Institute of Korean Medicine, Kyung Hee University 2019

Abstract

We evaluated the antifibrotic effects of fermented black radish (FBR) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced chronic liver injury in rats. Serum biochemical analysis indicated that FBR treatment attenuated the upregulation of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. Moreover, Sirius red staining and histopathological examination revealed decreased fibrosis and inflammation in FBR-treated rats compared with CCl₄ + vehicle-treated rats. Western blot analysis of alpha-smooth muscle actin expression levels confirmed the downregulation of fibrosis in the FBR treatment group compared with the CCl₄ + vehicle treatment group. These results suggest that FBR treatment suppressed liver fibrosis in CCl₄-exposed rats.

Keywords Carbon tetrachloride · Chronic injury · Fermented black radish · Fibrosis · Liver

Acknowledgements This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (Grant number: 316006-05-1-HD040).

Ahn M, Moon J, Park C, Bang H, Kim GO, Kim SJ, Kim KH, Shin T (2016b) Chungpibongsim radish (*Raphanus sativus* L. cv. Chungpibongsim) ameliorates ethanol-induced gastric injury in rats. *Orient Pharm Exp Med* 16:37–43
Arya EM, Adams BA, Periasamy G, Srinayudu B, Gebrelbanos Hiben

14) 생쥐 만성 간손상 모델에서 흑무 발효물의 간섬유질화 억제 효과(김정태외 5인)

Inhibitory Effect of Black Radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) Extracts on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in the Mouse Monocyte/Macrophage-Like Cell Line RAW 264.7

Hyungsik Jeon¹, Dawun Yang², Nam Ho Lee³, Meejung Ahn⁴, and Giok Kim¹

¹Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Jeju 63608, Korea

²Research Team, Creation & Innovation Research Institute, IT'S HANBUL Co., Ltd., Seoul 06101, Korea

³Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

⁴Department of Animal Science, College of Life Science, Sangji University, Gangwon 26339, Korea

ABSTRACT: Black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*), which is cultivated worldwide, is used in traditional medicine as it aids liver function, gastric secretion, gallbladder function, and gallstone mitigation. In this study, we examined the anti-inflammatory effects of black radish extract (BRE) on the lipopolysaccharide (LPS)- and interleukin (IL)-6-mediated inflammatory responses in the RAW 264.7 cell lines. Our findings show that BRE significantly ameliorated LPS-induced nitric oxide (NO) release and production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and prostaglandin E₂. The levels of cyclooxygenase (COX)-2 and inducible NO synthase (iNOS) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells were found to be suppressed by BRE. Further, BRE significantly suppressed the LPS-induced expression of mRNAs encoding COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6, and TNF- α in a concentration-dependent manner. BRE treatment significantly inhibited Janus kinase 2 (JAK2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation in IL-6- and LPS-treated RAW 264.7 cells. In addition, BRE decreased the levels of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases and c-Jun N-terminal kinase under the same conditions. Moreover, BRE induced high nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) levels and its target gene heme oxygenase 1 (HO-1) in the absence of LPS. These data demonstrate that BRE may be beneficial for treating inflammation through selective immunomodulatory effects, which may be mediated by inhibition of the STAT3/JAK2 and activation of the NRF2/HO-1 signal transduction pathways.

Keywords: anti-inflammatory effects, black radish, JAK2/STAT3, LPS/IL-6, NRF2

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by Ministry of agriculture, food and Rural affairs (MAFRA) (Grant number: 316006-05).

15) 흑무추출물의 항염증 억제 효과(전형식 외 4인)

Original Article

Check for updates

Effects of *Raphanus sativus* var. *niger* (Black Radish) Fermented with *Lactobacillus plantarum* on Alcohol Metabolism in Rats

Kyung-Ku Kang,^{1,*} Min-Soo Seo,^{1,*} Soo-Eun Sung,¹ Joo-Hee Choi,¹ Sijoon Lee,¹ KilSoo Kim,^{1,2} Wookju Jang,² Hak Sung Lee^{1,4}

¹Laboratory Animal Center, Daegu-Gyeongbuk Medical Innovation Foundation, Daegu, Korea

²Department of Veterinary Toxicology, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

³Efficacy Evaluation Team, Food Science R&D Center, Kolmar BNH CO., LTD, Seoul, Korea

⁴Natural Product Research Team, Food Science R&D Center, Kolmar BNH CO., LTD., Seoul, Korea

OPEN ACCESS

Received: Apr 28, 2021

Revised: Jun 24, 2021

Accepted: Jun 30, 2021

Correspondence:

Hak Sung Lee, PhD

Natural Product Research Team, Food Science R&D Center, Kolmar BNH CO., LTD., 61 Heollisang-ro 8-gil, Seocho-gu, Seoul 06800, Korea.
E-mail: mlsp@people@kolmarbnh.co.kr

*These authors contributed equally to this work.

© 2021 Health Supplements Future Forum
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID iDs

Min-Soo Seo

<https://orcid.org/0000-0001-7817-2222>

Soo-Eun Sung

<https://orcid.org/0000-0001-9971-3443>

Joo-Hee Choi

<https://orcid.org/0000-0001-4019-7650>

ABSTRACT

Excessive drinking causes various side effects including hepatic and neurological diseases that can lead to serious social problems, and thus, efforts to search for a way to help to promote alcohol decomposition are increasingly needed. *Raphanus sativus* var. *niger* commonly known as black radish has been reported to have biologically active glycosides such as glucosinolates and also known to improve liver functions, suggesting that this vegetable may have an action to promote alcohol metabolism. In the present study, this possibility was tested with an extract prepared from the black radish fermented with *Lactobacillus plantarum* in rats. This fermented black radish extract (75 or 300 mg/kg) or saline (2 mL/kg) was administered orally. After 30 minutes, ethanol (4 g/kg) was administered orally using 25% ethanol in water and blood was sampled at 0, 1, 2 and 4 hours after ethanol administration and then euthanasia was performed to get the liver. The sera obtained from the blood samples were used for the concentration analysis of ethanol and acetaldehyde and the examination of blood chemistries. The liver tissues were used for the activity assays for alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). It was observed that in the rats administered the fermented black radish extract, the concentrations of ethanol and acetaldehyde decreased more and simultaneously the activities of ADH and ALDH increased more than those in the saline-treated rats. Any significant changes in the blood chemistries and histology of liver tissues were not observed. These results suggest that the fermented black radish extract has a potential that may ameliorate hangover symptoms caused by excessive alcohol ingestion.

16) 흑무 발효물의 숙취해소 효과

○ 증빙 2: 특허출원 및 등록 실적

**관인생략
출원번호통지서**

출원일자 2016.10.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 창조번호(16438)
출원번호 10-2016-0140131 (접수번호 1-1-2016-1042475-15)
출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6) 외 1명
대리인성명 특허법인태웅(9-2012-100102-8)
발명자성명 김기욱 양다운 이승욱 오동관 고창식 이학성 김현규 김성은 진혜주 신태균
발명의명칭 흑무 추출물을 이용한 간 기능 개선용 조성물

특 허 청 장

1) 흑무 추출물을 이용한 간 기능개선 조성물

**관인생략
출원번호통지서**

출원일자 2016.10.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 창조번호(16439)
출원번호 10-2016-0140144 (접수번호 1-1-2016-1042547-15)
출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6) 외 1명
대리인성명 특허법인태웅(9-2012-100102-8)
발명자성명 김기욱 양다운 이승욱 오동관 고창식 윤원중 이용범 송상목 윤선아 이학성 김현규 김성은 진혜주
발명의명칭 흑무 추출물을 이용한 항염증용 조성물

특 허 청 장

2) 흑무추출물을 이용한 항염증 조성물

**관인생략
출원번호통지서**

출원일자 2017.03.02
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 창조번호(17049)
출원번호 10-2017-0027032 (접수번호 1-1-2017-0210415-49)
출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6) 외 1명
대리인성명 특허법인태웅(9-2012-100102-8)
발명자성명 김기욱 양다운 이승욱 오동관 고창식 홍승현 이용범 송상목 윤선아 이학성 김현규 김성은 진혜주
발명의명칭 흑무 추출물을 이용한 항염증용 조성물

특 허 청 장

3) 흑무 추출물을 인요한 항염증 조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2017.07.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0094598 (접수번호 1-1-2017-0718936-95)
출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
대리인성명 특허법인 세원(9-2011-100121-1)
발명자성명 김기욱 이남호 양다운 홍승현 정용환 오동관
발명의명칭 무(radish) 추출물을 유효성분으로 포함하는 Nrf2 활성화 조성물 및 상기 무 추출물의 제조방법

특 허 청 장

4) 무추출물을 유효성분으로 포함하는 nrf2 활성화 조성물 및 상기 무추출물의 제조 방법

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2017.09.13
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0117286 (접수번호 1-1-2017-0890472-02)
출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
대리인성명 특허법인 세원(9-2011-100121-1)
발명자성명 김기욱 김창숙 양다운 홍승현 이도승 오동관
발명의명칭 흑무(Raphanus sativus L. var niger) 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

5) 흑무 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료조성물

PCT/KR2017/011940

특 허 협 력 조 약
(PATENT COOPERATION TREATY)

PCT

국제출원번호 및 국제출원일 통지서
(PCT 규칙 20.2(e))

발신: 수리관청 수신: 특허법인 태풍 대한민국 06252 서울시 강남구 역삼로 114, 13층		발송일 (일/월/년) 2017년 11월 02일 (02.11.2017)
출원인 또는 대리인의 서류참조기호 OPP17-071PCT		중요통지사항
국제출원번호 PCT/KR2017/011940	국제출원일 (일/월/년) 2017년 10월 26일 (26.10.2017)	우선일 (일/월/년) 2016년 10월 26일 (26.10.2016)
출원인 개년법인 제주테크노파크		
발명의 명칭 흑무 추출물을 이용한 항염증 조성물		
1. 이 국제출원은 위에 기재된 바와 같이 국제출원번호와 국제출원일이 부여되었습니다. 2. 이 국제출원의 기록원본은: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> _____ 자로 국제사무국에 송부되었습니다. <input type="checkbox"/> 아래의 사유로 인하여 아직 국제사무국에 송부되지 않았으며, 이 통지서의 사본은 국제사무국에 송부되었습니다*: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 국가안전보장에 필요한 허가를 얻지 못했음 <input type="checkbox"/> 기타 (이유를 설명): <p style="font-size: small; margin-top: 10px;">* 국제사무국은 수리관청에 의한 기록원본의 송달을 감시하고 그 접수사실을 출원인에게 통지합니다. (서식 PCT/IB/301). 국제사무국은 우선일부터 14일이 경과할 때까지 기록원본을 수령하지 않은 때에는 출원인에게 이를 통지합니다. (규칙 22.1(e)).</p>		
수리관청명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스번호: +82 42 472 3473 서식 PCT/RO/105 (2008년 7월)	특허청장 전화번호: 82-42-481-5202	

6) 흑무추출물을 이용한 항염증 조성물(PCT 출원)

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2018.04.17
특 기 사 황	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(DP20180064)
출 원 번 호	10-2018-0044601 (접수번호 1-1-2018-0381442-72)
출 원 인 명 칭	제주대학교 산학협력단(2-2004-016727-0) 외 1명
대 리 인 성 명	김진동(9-2007-001204-4)
발 명 자 성 명	이남호 고하나 김현규 이학성 김성은
발 명 의 명 칭	흑무 추출물, 이를 분획물, 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 미백용 조성물

특 허 청 장

7) 흑무 추출물, 이를 분획물, 또는 이로부터 분리된 화합물 포함하는 미백용 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2018.05.31
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2018-0062300 (접수번호 1-1-2018-0535265-10)
출원인명칭 콜마비엔에이치 주식회사(1-2015-005724-8) 외 1명
대리인성명 특허법인 프렌즈(9-2012-100082-8)
발명자성명 김현규 이학성 김성은 백신화 김기욱 양다운 홍승현
발명의명칭 흑무 유산균 발효물을 포함하는 간 기능 개선용 조성물 및 이를 제조하는 방법

특 허 청 장

8) 흑무 유산균 발효물을 포함하는 간기능 개선용 조성물 및 이를 제조하는 방법

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2018.06.04
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2018-0064276 (접수번호 1-1-2018-0548258-94)
출원인명칭 제주대학교 산학협력단(2-2004-016727-0)
대리인성명 김순웅(9-2006-000534-4)
발명자성명 신태균 안미정 김정태
발명의명칭 흑무 발효물을 유효성분으로 포함하는 간 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

9) 흑무발효물을 유효성분으로 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2018.10.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2018-0129216 (접수번호 1-1-2018-1062221-74)
출원인명칭 콜마비엔에이치 주식회사(1-2015-005724-8) 외 1명
대리인성명 특허법인 프렌즈(9-2012-100082-8)
발명자성명 김현규 이학성 김성은 백신화 김기욱 양다운 홍승현
발명의명칭 제주도산 흑무 유산균 발효물을 포함하는 간 기능 개선용 조성물 및 제주도산 흑무 유산균 발효물을 제조하는 방법

특 허 청 장

10) 제주도산 흑무 유산균 발효물을 포함하는 간기능 개선용 조성물 및 제주도산 흑무 유산균 발효물을 제조하는 방법

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2018.10.26
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2018-0129058 (접수번호 1-1-2018-1061352-78)
출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
대리인성명 특허법인 세원(9-2011-100121-1)
발명자성명 김기욱 홍승현 양다운 주홍구
발명의명칭 십자과 식물 추출물과 Cu(II) 금속화합물과의 복합체를 유효성분으로 함유한 약학적 조성물

특 허 청 장

11) 십자과 식물 추출물과-Cu 금속 화합물과의 복합체를 유효성분으로 함유한 약학조성물

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110547416 A

(43)申请公布日 2019. 12. 10

(21)申请号 201910125554.7 A23L 29/00(2016.01)
(22)申请日 2019.02.20 A23L 33/00(2016.01)
(30)优先权数据 A61K 36/21(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
10-2018-0062300 2018.05.31 KR
10-2018-0129216 2018.10.26 KR
(71)申请人 科玛美保株式会社
地址 韩国大田广域市
申请人 济州科技园
(72)发明人 金炫圭 李学性 金声恩 白新和
金基玉 梁茶云 洪承贤
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 金玲 黄纶伟
(51)Int. Cl.
A23L 19/00(2016.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图3页

12) 흑무 유산균 발효물을 포함하는 간기능 개선용 조성물 및 이를 제조하는 방법(중국출원)

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2019.07.08
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2019-0082181 (접수번호 1-1-2019-0698028-63)
 출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
 대리인성명 특허법인 세원(9-2011-100121-1)
 발명자성명 김기욱 김창숙 양다운 홍승현 이도승 오동관
 발명의명칭 흑무(*Raphanus sativus* L. var *niger*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

13) 흑무추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 치료용 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2019.10.28
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(KPA191251)
 출원번호 10-2019-0134238 (접수번호 1-1-2019-1096972-19)
 출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
 대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
 발명자성명 김기욱 양다운 홍승현
 발명의명칭 돌외 및 검정무의 혼합추출물을 포함하는 약학 조성물

특 허 청 장

14) 돌외 및 검정무의 혼합추출물을 포함하는 약학 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2019.10.28
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(KPA191414)
 출원번호 10-2019-0134239 (접수번호 1-1-2019-1096973-54)
 출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
 대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
 발명자성명 김기욱 양다운 홍승현 이남호 김정은 한상현
 발명의명칭 풋굴 및 검정무의 혼합발효물을 포함하는 약학 조성물

특 허 청 장

15) 풋굴 및 검정무의 혼합물을 포함하는 약학조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.05.14
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(DP20200004)
출원번호 10-2020-0057788 (접수번호 1-1-2020-0488369-15)
출원인명칭 제주대학교 산학협력단(2-2004-016727-0) 외 1명
대리인성명 김진동(9-2007-001204-4)
발명자성명 이남호 김정은 김기욱 전형식 정유철 이학성 김성은
발명의명칭 검정무 발효추출물, 이의 분획물을 포함하는 항균용 조성물

특 허 청 장

16) 검정무 발효추출물, 이의 분획물을 포함하는 항균용 조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.06.03
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2020-0067032 (접수번호 1-1-2020-0571458-17)
출원인명칭 제주대학교 산학협력단(2-2004-016727-0) 외 1명
대리인성명 김순웅(9-2006-000534-4)
발명자성명 천지연 김하영 신태균 안미정 김기욱 전형식
발명의명칭 무 발효물의 건조 분말 제조 방법 및 이의 활용

특 허 청 장

17) 무 발효물의 건조 분말 제조방법 및 이의 활용

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.06.24
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2020-0077301 (접수번호 1-1-2020-0652166-13)
출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
대리인성명 특허법인 한얼(9-2020-100061-3)
발명자성명 김기욱 양다운 홍승현 이남호 김정은 한상현
발명의명칭 풋굴의 유산균 발효물을 포함하는 약학 조성물

특 허 청 장

18) 풋굴의 유산균 발효물을 포함하는 약학 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2020.07.20
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2020-0089492 (접수번호 1-1-2020-0751994-34)
 (DAS접근코드 AA5D)
 출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
 대리인성명 특허법인 세원(9-2011-100121-1)
 발명자성명 김기욱 전형식 정유철
 발명의명칭 디설피람 및 그 유도체를 이용한 지방세포의 분화억제 효과를 갖는 비만 개선 및 치료용 약학적 조성물

특 허 청 장

19) 디설피람 및 그 유도체를 이용한 지방세포의 분화억제 효과를 갖는 비만개선 및 치료용 약학적 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2020.09.14
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2020-0117705 (접수번호 1-1-2020-0972431-24)
 (DAS접근코드D05C)
 출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6) 외 2명
 대리인성명 특허법인 세원(9-2011-100121-1)
 발명자성명 김기욱 전형식 마진열 조원경
 발명의명칭 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물

특 허 청 장

20) 돌의 추출물 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2021.03.17
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P20U10C2103)
 출원번호 10-2021-0034652 (접수번호 1-1-2021-0313877-84)
 (DAS접근코드C229)
 출원인명칭 상지대학교산학협력단(2-2005-041363-4)
 대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8)
 발명자성명 안미정 양나연 고명순 신태균
 발명의명칭 노르갈란타민을 포함하는 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

21) 노르갈란타민을 포함하는 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.03.24
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2021-0037860 (접수번호 1-1-2021-0344738-62)
 (DAS접근코드03E1)
 출원인명칭 재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
 대리인성명 특허법인 세원(9-2011-100121-1)
 발명자성명 김기욱 전형식
 발명의명칭 흑무차의 제조방법 및 그 흑무차의 추출물을 이용한 항염증용 조성물

특 허 청 장

22) 흑무차의 제조방법 및 그 흑무차의 추출물을 이용한 항염증 조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.06.02
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2021-0071759 (접수번호 1-1-2021-0639575-57)
 (DAS접근코드BB2B)
 출원인명칭 콜마비엔에이치 주식회사(1-2015-005724-8) 외 1명
 대리인성명 특허법인성암(9-2018-100001-1)
 발명자성명 이학성 최한솔 김슬기 장육주 김기욱
 발명의명칭 검정무 유산균 발효물을 포함하는 숙취해소용 조성물

특 허 청 장

23) 검정무 유산균 발효물을 포함하는 숙취해소용 조성물

등록특허 10-1910156

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">(45) 공고일자</td> <td>2018년10월19일</td> </tr> <tr> <td>(11) 등록번호</td> <td>10-1910156</td> </tr> <tr> <td>(24) 등록일자</td> <td>2018년10월15일</td> </tr> </table>	(45) 공고일자	2018년10월19일	(11) 등록번호	10-1910156	(24) 등록일자	2018년10월15일
(45) 공고일자	2018년10월19일						
(11) 등록번호	10-1910156						
(24) 등록일자	2018년10월15일						
<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/31 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01) A61K 8/97 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 A61K 36/31 (2013.01) A23L 33/105 (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0027032 (22) 출원일자 2017년03월02일 심사청구일자 2017년03월02일 (65) 공개번호 10-2018-0045770 (43) 공개일자 2018년05월04일 (30) 우선권주장 1020160140144 2016년10월26일 대한민국(KR) (56) 선행기술조사문헌 Res Pharm Sci, vol.10, no.5, pp.429-435 (2015.).</p> <p>전체 청구항 수 : 총 6 항</p> <p>(54) 발명의 명칭 흑무 추출물을 이용한 항염증용 조성물</p>	<p>(73) 특허권자 재단법인 제주테크노파크 제주특별자치도 제주시 중앙로 217, 9층 (이도이동, 제주벤처마루) 콜마비엔에이치 주식회사 대전광역시 유성구 테크노3로 22 (관평동)</p> <p>(72) 발명자 김기욱 제주특별자치도 제주시 인다14길 14, 102동 409호 (아라일동, 원일아파트) 양다운 제주특별자치도 제주시 원수로 7, 202호 (이도이동, 파크빌) (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 특허법인 태웅</p> <p style="text-align: right;">심사관 : 고일영</p>						

24) 흑무 추출물을 이용한 항염증 조성물

디자인등록증 CERTIFICATE OF DESIGN REGISTRATION



등록 제 30-0978781 호
Registration Number

출원번호 제 30-2018-0023020 호
Application Number

출원일 2018년 05월 17일
Filing Date

등록일 2018년 10월 25일
Registration Date

등록의 구분 일부 심사 등록
Type of Registration
(PARTIALLY EXAMINED REGISTRATIONS)

상품권 Class
제19류
디자인의 대상이 되는 물건 : Product
정사피

디자인권자 Owner
재단법인 제주테크노파크(220122-*****)
제주특별자치도 제주시 중앙로 217, 9층 (이도이동, 제주벤처마루)

출처자 Creator
등록사항원에 기재

위의 디자인은 「디자인보호법」에 따라 디자인등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Design Protection Act, a design has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



특허청
Korean Intellectual
Property Office

2018년 10월 25일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

박원주



QR코드로 전자기증
등록사항을 확인하세요

이 디자인권증은 「디자인보호법」 제46조(권리 및 행사) 제46조(권리 및 행사) 등의 등록보전에 대한 행사를 하지 아니한 디자인등록부상서용에 한정됩니다.

25) 흑무 디자인 출원(30-2018-0023020) 및 26)등록 (30-0978781),



등록특허 10-2083472



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월02일
(11) 등록번호 10-2083472
(24) 등록일자 2020년02월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/31 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/31 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-0082181(분할)
- (22) 출원일자 2019년07월08일
- 심사청구일자 2019년07월08일
- (65) 공개번호 10-2019-0084927
- (43) 공개일자 2019년07월17일
- (62) 원출원
특허 10-2017-0117286
- 원출원일자 2017년09월13일
- 심사청구일자 2017년09월13일
- (56) 선행기술조사문헌
생명과학회지, Vol.24, No.11 (2014.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
재단법인 제주테크노파크
제주특별자치도 제주시 중앙로 217, 9층 (이도이동, 제주벤처마루)
- (72) 발명자
김기욱
제주특별자치도 제주시 인다14길 12, 102동409호(아라일동, 권일아파트)
- 양다운
제주특별자치도 제주시 현수로 7, 202호(이도이동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인세원

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 흑무(Raphanus sativus L. var niger) 추출물을 유효성분으로 포함하는 비반 또는 제방간의 예방 또는 치료용 조성물

30) 흑무 추출물을 유효성분 포함하는 비반 또는 제방간의 예방 및 치료용 조성물



공개특허 10-2019-0121091



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0121091
(43) 공개일자 2019년10월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 31/40 (2006.01)
A61K 36/31 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2018-0044601
- (22) 출원일자 2018년04월17일
- 심사청구일자 2018년04월17일

- (71) 출원인
제주대학교 산학협력단
제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)
- 콜마비엔에이치 주식회사
대전광역시 유성구 테크노3로 22 (관평동)
- (72) 발명자
이남호
제주특별자치도 제주시 금월길 46-4 프로빌APT 104동 202호(아라일동)
- 고하나
제주특별자치도 제주시 조천읍 함덕5길 9 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진동

전체 청구항 수 : 총 11 항


(54) 발명의 명칭 흑무 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 미백용 조성물

31) 흑무 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 미백용 조성물

발송번호: 9-5-2020-012132658 수신 서울특별시 서초구 사임당로 26, 11층 (서초동, 신영빌딩)(특허법인세원)
 발송일자: 2020.02.18. 특허법인세원[신동준] 귀하(귀중) 06651

YOUR INVENTION PARTNER
특 허 청
특허결정서

출원인	성명	영	재단법인 제주테크노파크 (특허고객번호: 220050393146)
	주소	소	제주특별자치도 제주시 중앙로 217, 9층 (이도이동, 제주벤처마루)
대리인	영칭	청	특허법인세원
	주소	소	서울특별시 서초구 사임당로 26, 11층 (서초동, 신영빌딩)(특허법인세원)
			지경원변리사 신동준
발명자	성명	영	김기욱
	주소	소	제주특별자치도 제주시 인다14길 12, 102동409호(아라일동, 천일아파트)
발명자	성명	영	아남호
	주소	소	제주특별자치도 제주시 금월길 46-4, 프로빌C단지연립주택 2층 202호(아라이동, 프로빌C단지연립주택)
발명자	성명	영	양다운
	주소	소	제주특별자치도 제주시 천수로 7, 202호(이도이동)
발명자	성명	영	홍승현
	주소	소	제주특별자치도 제주시 청단로동길 106, 310동 204호(월평동)
발명자	성명	영	오동관
	주소	소	제주특별자치도 서귀포시 동홍로162번길 30, 가동 7층 802호(동홍동, 동홍반석아르미)
출원번호	번호	호	10-2019-0101005
발명의명칭	명칭	청	무(radish) 추출물을 유효성분으로 포함하는 Nrf2 활성화 조성물 및 상기 무 추출물의 제조방법


2020.02.18.
특허청 **화학생명기술심사국**
 약품화학심사과 심사관 **고일영** 

32) 무 추출물을 유효성분으로 포함하는 Nrf2 활성화 조성물 및 상기 무 추출물의 제조 방법

발송번호: 9-5-2020-023286661 수신 서울특별시 서초구 사임당로 26, 11층 (서초동, 신영빌딩)(특허법인세원)
 발송일자: 2020.04.01. 특허법인세원[신동준] 귀하(귀중) 06651

YOUR INVENTION PARTNER
특 허 청
특허결정서

출원인	성명	영	재단법인 제주테크노파크 (특허고객번호: 220050393146)
	주소	소	제주특별자치도 제주시 중앙로 217, 9층 (이도이동, 제주벤처마루)
대리인	영칭	청	특허법인세원
	주소	소	서울특별시 서초구 사임당로 26, 11층 (서초동, 신영빌딩)(특허법인세원)
			지경원변리사 신동준
발명자	성명	영	김기욱
	주소	소	제주특별자치도 제주시 인다14길 12, 102동409호(아라일동, 천일아파트)
발명자	성명	영	홍승현
	주소	소	제주특별자치도 제주시 청단로동길 106, 310동 204호(월평동)
발명자	성명	영	양다운
	주소	소	제주특별자치도 제주시 천수로 7, 202호(이도이동)
발명자	성명	영	주홍구
	주소	소	제주특별자치도 제주시 청단로동길 106, 313동 106호(월평동)
출원번호	번호	호	10-2018-0129058
발명의명칭	명칭	청	십자과 식물 추출물과 Cu(II) 금속화합물과의 복합체를 유효성분으로 함유한 약학적 조성물

2020.04.01.
특허청 **화학생명기술심사국**
 약품화학심사과 심사관 **이재정** 

33) 십자과 식물 추출물과 Cu 금속화합물과의 복합체를 유효성분으로 함유한 약학적 조성물

证书号第 4290038 号



发明专利证书

发明名称：包含黑萝卜乳酸菌发酵产物的肝功能改善用组合物及黑萝卜乳酸菌发酵产物的制造方法

发明人：金炫圭；李学性；金声恩；白新和；金基玉；梁茶云；洪承贤

专利号：ZL 2019 1 0125554.7

专利申请日：2019 年 02 月 20 日

专利权人：科玛美保株式会社；济州科技园

地址：韩国大田广域市

授权公告日：2021 年 03 月 09 日

授权公告号：CN 110547416 B

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发发明专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。专利权期限为二十年，自申请日起算。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



34) 중국 특허등록 (흑무 유산균 발효 추출물 제조방법)

증빙 3 : 제품개발



1) 제주 자연을 담은 흑무즙



2) 제주 자연을 담은 흑무진액



3) 제주컬러를 마시자7



4) 제주5컬러를 마시자



5) 제주검정무 분말스틱



6) 흑무음료



7) 착한제주 흑무차



8) 착한제주 흑무조릿대차



9) 착한제주 유기농보리 흑무차



10) 제주향 레드비트청귤

증빙 4 : 기술이전

통상실시권 허여 계약서

(제)제주테크노파크(이하 "갑" 이라 한다)와 ㈜진산비버리지(이하 "을" 이라 한다)는 "갑"이 보유하고 있는 특허에 대한 통상실시권 무상 허여와 관련하여 다음과 같이 계약을 체결한다.

제1조(목적) 본 계약은 제3조에 기재된 "갑"의 소유 상표권을 "을"에게 통상실시권을 무상 허여하고 "을"은 통상실시권 무상허여에 대한 실시권을 사용함에 있어 당사자간 상호 권리와 의무를 규정함을 목적으로 한다.

제2조(용어의 정의) 본 계약에서 사용되는 용어는 다음 각 호의 같이 정의한다.

1. "계약상표"란 본 계약의 대상이 되는 "갑"이 보유한 상표권을 의미하며 상표의 범위에는 상표를 구성하는 것에 필요한 컨셉 개발, 디자인, 문자, 명칭, 상표, 표장 또는 기타 표시 등을 포함한다.
2. "계약품"이란 계약상표를 표시·무작하게 된 제품을 의미한다.
3. "계약상표"란 "갑"이 보유한 상표권을 활용하여 컨셉 개발, 디자인, 제품홍보 등을 포함한 상품기획을 위해 통상실시한 상표권을 기초로 한 일체의 리뉴얼 또는 추가 창작 등을 의미한다.
4. "제3자"란 "갑"과 "을"이 사전 서면합의에 의해 "을"이 제3자에게 "상표권"의 일부 또는 전부의 실시권을 제공하는 것을 말하며, "갑" 또는 "을"의 "계약상표" 일부 또는 전부를 사용하는 경우를 포함한다.

제3조(특약권) 본 계약의 목적이 되는 특허의 내용은 다음과 같다.

1. 출원번호 : 제40-2018-0070704호
2. 상표의 명칭 : 제주 현무암 도양에서 지관 김정무 전액, 김정무(흑무전액, 흑무즙)

제4조(실시권의 범위) ① "갑"이 "을"에게 허여한 본 계약의 대상이 되는 계약상표에 대한 통상실시권 실시범위는 국내로 한정한다. 단, 국외로 사용을 하고자 할 경우 "을"은 "갑"과 협의하여야 한다.

② "갑"은 본 계약체결일 이후 계약상표의 개발에 따른 지식재산권 출원, 보정, 계약상표의 유지, 제3자로부터의 권리침해와 관련된 방어비용 등 본 계약상표의 유지·관리와 관련된 소요 비용을 부담한다.

③ "을"은 본 계약상표 및 개발에 따른 상표권에 대한 실시권을 "갑"의 사전 승인없이 제3자에게 양도하거나 재실시 또는 담보 제공 등 "갑"의 권리를 침해하는 일체의 행위를 할 수 없다.

제15조(계약의 효력 및 중요사항의 변경) ① 본 계약의 효력은 본건 계약 제5조 제1항에 정한 바와 같이 계약체결일로부터 3년으로 한다.

② 본 계약은 "갑"과 "을"간 상표권 실시에 관한 기본적인 사항을 규정한 것으로 "갑"과 "을"간의 모든 분쟁에 우선한다.

③ "갑"과 "을"은 본 계약 체결 후, 주소, 대표자 등 중요사항을 변경하였을 시에는 상대방에게 서면으로 통지하여야 하며, 통지 불이행으로 인한 상대방의 좌오는 중요사항이 변경된 자의 책임으로부터 면책된다.

제16조(해지) 본 계약에 정지되지 아니하거나 본 계약상의 해지상 자이가 있는 경우에는 "갑"과 "을" 상호합의에 의해 조정하되, 조정이 되지 않는 경우에는 "갑"의 해지에 따른다.

본 계약의 체결을 증명하기 위하여 2통을 작성하여 기명날인을 한 후 각각 1통씩 보관한다.

첨부 1. "갑"과 "을"의 법인인감증명서	각 1부.
2. "갑"과 "을"의 사업자등록증 사본	각 1부.

2019. 1. 2.

(갑)
(제)제주테크노파크
 제주특별자치도 제주시 중앙로 227, 제주벤처마루 9층
 원 장 허 영 호 (인)

(을)
 ㈜진산비버리지
 제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로 3길 13
 대표자 장 동 훈 (인)

- 1 -

1) 통상실시권 (상표권)

통상실시권 허여 계약서

(제)제주테크노파크와 "갑" 이라 한다와 ㈜진산비버리지가 "을" 이라 한다는 "갑"이 보유하고 있는 특허에 대한 통상실시권 무상 허여와 관련하여 다음과 같이 계약을 체결한다.



제1조(목적) 본 계약은 제3조에 기재된 "갑"의 소유 디자인권을 "을"에게 통상실시권을 무상 허여하고 "을"은 통상실시권 무상허여에 대한 실시권을 사용함에 있어 당사기간 상호 권리와 의무를 규정함을 목적으로 한다.

제2조(용어의 정의) 본 계약서에서 사용되는 용어는 다음 각 호와 같이 정의한다.

1. "계약디자인"이란 본 계약의 대상이 되는 "갑"이 보유한 디자인권을 의미하며 디자인의 범위에는 디자인을 구성하는 것에 필요한 컨셉 개발, 디자인, 문자, 명칭, 상표, 표장 또는 기타 표시 등을 포함한다.
2. "계약품"이란 계약디자인을 표시·부착하게 될 제품을 의미한다.
3. "개발디자인"이란 "갑"이 보유한 등록 디자인권을 활용하여 컨셉 개발, 디자인, 제품종류 등을 포함한 상품기획을 위해 통상실시권 디자인권을 기초로 한 일체의 디자인 또는 추가 창작 등을 의미한다.
4. "재실시"란 "갑"과 "을"이 사전 서면합의에 의해 "을"이 제3자에게 "디자인권"의 일부 또는 전부의 실시권을 제공하는 것을 말하며, "갑" 또는 "을"의 "개발디자인" 일부 또는 전부를 사용하는 경우를 포함한다.

제3조(특허권) 본 계약의 목적이 되는 특허의 내용은 다음과 같다.

1. 출원 번호 : 제30-2018-0023030호
2. 디자인의 명칭 : 제주 현무암 토양에서 자란 검정무 검액(Black Radish)



제4조(실시권의 범위) ① "갑"이 "을"에게 허여한 본 계약의 대상이 되는 계약디자인에 대한 통상실시권 실시범위는 국내외 한정한다. 단, 국외로 사용을 하고자 할 경우 "을"은 "갑"과 협의하여야 한다.

② "갑"은 본 계약체결일 이후 계약디자인의 개발에 따른 지식재산권 출원, 모질, 계약디자인 유제, 제3자로부터의 권리침해와 관련된 방어비용 등 본 계약디자인의 유지·권리와 관련된 전 소모 비용을 부담한다.

③ "을"은 본 계약디자인 및 개발에 따른 디자인권에 대한 실시권을 "갑"의 사전 승인없이 제3자에게 양도하거나 재실시 또는 담보 제공 등 "갑"의 권리를 침해하는 일체의 행위를 할 수 없다.

- 제15조(계약의 효력 및 중요사항의 변경) ① 본 계약의 효력은 본건 계약 제5조 제1항에 정한 비의 길이 계약체결일로부터 3년으로 한다.
- ② 본 계약은 "갑"과 "을"간 디자인권 실시에 관한 기본적인 사항을 규정한 것으로 "갑"과 "을"간의 모든 문서에 우선한다.
- ③ "갑"과 "을"은 본 계약 체결 후, 주소, 대표자 등 중요사항을 변경하였을 시에는 상대방에게 서면으로 통지하여야 하며, 통지 불이행으로 인한 상대방의 책임은 중요사항이 변경된 지의 람변으로부터 면제된다.

제16조(해석) 본 계약에 명기되지 아니하거나 본 계약상의 해석상 차이가 있는 경우에는 "갑"과 "을" 상호합의에 의해 조정하되, 조정이 되지 않는 경우에는 "갑"의 해석에 따른다.

본 계약의 체결을 증명하기 위하여 2통을 작성하여 기밀날인을 한 후 각각 1통씩 보관한다.

- 첨부 1. "갑"과 "을"의 법인인감증명서 각 1부.
2. "갑"과 "을"의 사업자등록증 사본 각 1부.

2019. 1. 2.

(갑)

(제)제주테크노파크

제주특별자치도 제주시 중앙로 2110 제주벤처마루 9층 원장 허영호 (인)



(을)

㈜진산비버리지

제주특별자치도 제주시 조천읍 남조로 3길 13 대표자 장동훈 (인)




2) 통상실시권 (디자인권)

증빙5 : 사업화실적

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서							
과제명	제주산 흑우 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품개발						
주관연구기관	(제)제주테크노파크	참여기관	(주)비개이비이오				
책임자	김기욱	연구기간	2016년 5월 - 2020년 12월(총 5년)				
정부출연금	1,870,000,000	기업부담금	132,000,000	총계	2,002,000,000		
기술이전명	-	기술실시대상기관	-				
기술료	-	기술실사일	-				
구분	기술상시 입제 권장액 (근무) 1백만원 * 최근연도 결산보고서에 의해 작성			해당기술을 통한 사업화 실적			
실적	자산 총계	-	재정연수	1			
	자본 총계	-	기술·혁신개발용 매출액	-			
	부채 총계	-					
	매출액 총계	-					
제품별 실적							
구분	제품명 (시제품)	제품사진 (시제품)	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	제주자연담은 흑우즙		2017.10.	-	-	제주	-
※제품설명: PEF처리기술로 생산된 흑우 착즙액과 과일농축액을 배합하여 흑우즙 제품을 개발하였다.							
2017년 10월 31일 연구책임자 : 김기욱 (서명 또는 인)							

1) 제주 자연을 담은 흑우즙

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서


과제명		제주산 흑무 및 유채무 육성을 통한 건강기능식품개발					
주관연구기관		(재)제주테크노파크		참여기관		(주)비케이바이오	
책임자		김기욱		연구기간		2016년 5월 - 2020년 12월(총 5년)	
정부출연금		1,870,000,000	기업부담금	132,000,000	총계	2,002,000,000	
기술이전명		-		기술실시대상기관		-	
기술료		-		기술실시일		-	
구분		기술실시 업체 결산액 (단위 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적			
실 적	자산 총계	-		제품건수		1	
	자본 총계	-					
	부채 총계	-		기술개발성과 활용 매출액		-	
	매출액 총계	-					
제품별 실적							
구 분	제품명 (시제품)	제품사진 (시제품)	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	제주자연담은 흑무진액		2017.10.	-	-	제주	-
<small>*제품설명: 박막서은농축기술로 생산된 흑무 농축액과 과일농축액을 배합하여 흑무진액 제품을 개발하였다.</small>							

2017년 10월 31일

연구책임자 : 김기욱 (서명 또는 인)

2) 제주 자연을담은 흑무진액

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서


과제명		제주산 흑무 및 유채무 육성을 통한 건강기능식품 개발사업						
주관연구기관		(재)제주테크노파크		참여기관		(주)진산비버리저		
책임자		김기욱		연구기간		2016년 5월 - 2020년 12월(총 5년)		
정부출연금		1,870,000,000	기업부담금	132,000,000	총계	2,002,000,000		
기술이전명		-		기술실시대상기관		-		
기술료		-		기술실시일		-		
구분		기술실시 업체 결산액 (단위 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적				
실 적	자산 총계	-		제품건수		1		
	자본 총계	-						
	부채 총계	-		기술개발성과 활용 총 매출액 (국내매출액 + 해외매출액)		219,974,400원 (국내매출액 30,254,400원+ 해외매출액 189,720,000원)		
	매출액 총계	-						
제품별 실적								
구 분	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)		해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	제주 5컬러를 마시자		2019.04	국내	30	100	대한 민국 (제주)	-
				해외	190			
<small>* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)</small>								

2019년 10월 30일

연구책임자 : 김기욱 (서명 또는 인)

3) 제주5컬러를 마시자

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	제주산 흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품 개발사업						
주관연구기관	(재)제주테크노파크		참여기관	(주)진산비버리지			
책임자	김기욱		연구기간	2016년 5월 - 2020년 12월(총 5년)			
정부출연금	1,870,000,000	기업부담금	132,000,000	총계	2,002,000,000		
기술이전명	-		기술실시대상기관	-			
기술료	-		기술실시일	-			
구분	기술실시 임계 결산액 (단위 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적				
실적	자산 총계	-	제품건수	1			
	자본 총계	-	기술개발임차비용 총 내역액 (연구개발액 + 해외수출액)	-			
	부채 총계	-					
	매출액 총계	-					
제품별 실적							
구분	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	제주검정무 분말스틱		2019.10.	국내	-	-	대한 민국 (충북)
				해외	-		
* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)							


2019년 10월 28일

연구책임자 :

김기욱 (서명)

4) 제주검정무 분말스틱

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	제주산 흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품 개발사업						
주관연구기관	(재)제주테크노파크		참여기관	(주)진산비버리지			
책임자	김기욱		연구기간	2016년 5월 - 2020년 12월(총 5년)			
정부출연금	1,870,000,000	기업부담금	132,000,000	총계	2,002,000,000		
기술이전명	-		기술실시대상기관	-			
기술료	-		기술실시일	-			
구분	기술실시 임계 결산액 (단위 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적				
실적	자산 총계	-	제품건수	1			
	자본 총계	-	기술개발임차비용 총 내역액 (연구개발액 + 해외수출액)	-			
	부채 총계	-					
	매출액 총계	-					
제품별 실적							
구분	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	흑무음료		2019.10.	국내	-	-	대한 민국 (제주)
				해외	-		
* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)							

2019년 10월 28일

연구책임자 :

김기욱 (서명)

5) 흑무음료

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 흑무 재배기술 확립	○ 파종시기, 시비량, 미생물제제 등 살포를 통한 흑무 및 유색무 재배기술 확립	100
○ 흑무추출물 및 발효 추출물 효능연구	○ 흑무 추출물의 항염증, 항비만, 간보호, 항산화, 항암 효능 분석 및 작용기전 연구	100
○ 흑무추출물의 항당뇨 효과,	○ 흑무뿌리, 잎 추출물, 제주갓 추출물의 항당뇨효과	100
○ 흑무추출물에서 지표물질 확립	○ 흑무추출물 및 발효물에서 a-linolenic acid, 식이섬유 지표물질 설정	100
○ 비임상 실험을 통한 흑무 및 흑무 발효물의 효능 연구	○ 지방간 모델에서 흑무 및 유색무 조추출물의 간기능 개선 기능성 평가 - 비알콜성 간손상 동물모델에서의 흑무 및 유색무의 효능평가 - 약물(사염화탄소) 및 사료(Methionin choline deficient diet, MCD) 급여에 의한 간손상 동물모델에서 표준화된 원료 및 지표물질에 대한 평가 시스템 구축 - 비알콜성지방간 모델을 유도한 후, 검정무 발효분말의 간보호 효능을 평가 - DSS를 이용한 장염모델을 유도하기 전, 후에 검정무 발효분말을 투여하여 효능을 평가	100
○ 원재료 표준화	○ 최적의 효능 및 추출 수율을 나타낼 수 있는 조건 설정, 흑무와 혼입이 가장 쉬운 백무와 scar marker를 통한 유전자 수준에서의 구분법을 설정하여 원재료 관리법 적용	100
○ 기능/지표성분 설정	○ 알파-리놀렌산과 식이섬유를 지표성분으로 설정	100
○ 원료의 기준규격/유통기한 설정	○ 성상, 중금속, 미생물에 대한 기준규격 설정 및 유통기한 산출	100
○ 임상단계 효능평가 및 개별인정신청 자료 수집	○ CRO 기관으로 헬크에어크레임스엔드멘내지먼트 선정하였고 기관과 연계하여 개별인정신청 진행 중임 - 검정무 발효물 분말 12주 섭취 후 분석군인 FA군 분석, 추가분석 군인 PP군 분석, 그리고 총화분석군 분석 결과 두 섭취군간 통계적으로 GGT, 지방간 지수(FLI), 항산화지표(MDA)가 개선됨을 확인함 유의한 차이를 보임($p=0.033, 0.013, 0.013$)	90
○ 개별인정형원료 등록 및 제형개발, 제품화	- 또한 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 검정무발효분말 섭취가 인체에 안전하다고 판단함 ○ 건강지향식품으로 품목제조신고 완료	50
○ 시제품 개발	○ 10개 제품을 개발하여 판매 중	100
○ 농가보급 및 홍보	○ 4개 영농조합 법인 재배 참여	

○ 마케팅 및 시장 확대	<ul style="list-style-type: none"> - 소낭(영), 어깨동무(영), 성산일출봉 농협, 참귀한 농장 ○ KBS 6시 내고향 방송 등 30여건 홍보 실적으로 흑무 우수성 노출로 점진적 시장 확대 ○ 식품기업 수요 발생 <ul style="list-style-type: none"> - 유유헬스케어(주), BK-바이오(주), 이화(주), 대봉엘리스 등에서 흑무 산업화 착수 - 큐팡 온라인 판매 개시 	100
---------------	---	-----

4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 세계최고의 무(Radish)관련 연구소로 탄생
 - 무관련 특허, 논문, 학술발표 등 세계 최다 보유
- 새로운 간 기능 개선 소재의 신규 발굴을 통한 기능성이 검증된 활성 소재 개발에 기여
- 흑무를 이용한 고부가가치 기능성 식품 제조기술 개발에 대한 대량생산체계 확립
- 제주 월동무 산업 개편에 활력
 - TV, 신문, 온라인 미디어 광고로 기능성 무 홍보
 - 소낭(영)은 미화(벤더)와 손잡소 큐팡 입점
 - 유유헬스케어, 대봉엘리스, BK-바이오 등에서 산업화 착수
- 식품 신소재 개발로 수입 의존도 감소
 - 간건강, 장건강 등 소재로 확장 중
- 제주식품산업 활성화 기여
 - 백무가공 시장의 한계를 극복한 사례
- 제주 월동무(백무) 대체작물 발굴
 - 백무는 비가공시장으로 진출을 촉진하고, 흑무는 가공시장으로 유도 및 촉진
 - 흑무재배면적 확대하면서 백무 재배 면적 감소 유도하는 정책
- 흑무재배기술 확보로 참여농가 발굴 용의
 - 시비량, 미생물제제, 파종시기등 관련 기술 확보
- 건강기능식품 개별인증
 - 밀크씨드, 허개나무 시장에 의존하는 간보호 원료시장 개편
 - 전량 수입하는 밀크씨드, 허개나무 원료 대체 효과
 - ※ 간건강 기능성식품시장 1,050억원(2019년)
- 숙취해소 원료를 개발 효과
 - 흑무발효 추출물의 숙취해소 원료 개발
 - 간보호 효과와 더불어 숙취해소 가능한 신원료 개발
 - 콜마BNH에서 산업화 착수

- 본 세부연구는 제주산 유색무를 활용한 건강기능식품 개발의 전임상 연구를 담당하였으며, 비알콜성 지방간 동물모델의 확립 및 적절한 농도의 설정 및 적용을 통해 건강기능식품개발의 기초 자료를 제공함.
- 제주산 유색무의 추출물별 효능 평가 및 전임상 연구를 통해 질병의 기전 연구 및 다양한 바이오마커 분석을 통해 효능을 평가하는 기초 자료를 제공하여 제주산 유색무의 적용가능성에 대한 기초 자료를 제공함.

5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 개별인증 신청 및 인증 추진
 - 원료화, 지표물질 설정, 전임상연구, 임상연구 완료
 - 원료 및 제품 시험성적서
 - 인체적용시험에서 지방간 지수 감소, MDA 감소 효과, GG 감소효과 등 유의성 확인
- 제주산 흑무의 지표성분으로 제시한 알파-리놀렌산 및 식이섬유의 함량 분석 결과는 건강기능식품 기능성원료 인정을 위한 자료로 활용
- 간 기능 개선 및 숙취 해소에 도움을 주는 건강기능식품개발에 활용
- 본 성과를 바탕으로 면역활성소재 개발 착수 (유유제약과 공동연구 착수)
 - 흑무 와 제주 아열대 신소재 융합 제품 개발
- 기술이전 추진
 - 본 연구로 출원 36건, 등록9건을 바탕으로 참여기업인 콜마BNH, 유유제약, 등에 기술 이전 협의 중임
- 흑무 원물 전자상거래 입점 (쿠팡).
- 흑무(검정무) 산업화를 위한 단체 구성 추진
 - 농가, 연구소, 농협 등과 교류 협의회 및 판로개척 추진
- 김치연구소와 mou 체결 및 기능성 김치 개발 추진
 - 농가, 연구소, 김치가공기업 등과, MOU 및 연구개발 사업 추진
- 후속사업으로 위궤양 식의약품 개발 추진
 - 흑무에 다량 함유한 indole-3-carbinol, glucoraphasatin등 glucosinolate를 베이스로 한 위건강 식의약품 개발 추진

○ 분야별 성과활용계획

구 분	활용목표	활용계획
공공적 성과	○ 월동무 산업 안정적 정착	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 무재배 및 생산을 확대하여 백무생산량 감축으로 월동무 산업 안정적 성장 발판 마련 ○ 월동무는 감귤폐원대처 작목, 축산경쟁력 강화에 기여하는 월동무 산업 정착 ○ 2,800농가의 안정적 수익 창출 ○ 유통산업(시장출한), 동절기 잉여수익 증대 기여
기술적 성과	○ 고부가 가치제품 개발 기반 마련	○ 백무 가공품과 제품개발의 한계를 극복하여 제주식품, 화장품, 고급사료, 농업바이오산업 발전 기반
학술적 성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외 학술지 투고 ○ 국내외 관련 전문기관 네트워크 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지역대학의 향토자원을 활용한 기술개발에 참여함으로써 산학연 연계 강화 <ul style="list-style-type: none"> - SCI 8편, 비SCI 8편 게재 완료 ○ 학술포럼, 학술교류 등을 통하여 관련 기술전문가 양성
경제적 성과	○ 3,000억 시장 확보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 월동무산업은 신선채소로서의 기능 중심으로 가공식품 원료, 친환경 흑무, 제주형 패스트푸드 글로벌화 등을 통해 800억 시장을 3,000억 달성 계획 ○ 바이오산업 활성화 기여 ○ 식품및 화장품 개발로 중소기업 혁신역량 및 연구 역량 강화 ○ 현재 제주 월동무 조수익은 2,000억 내외 임. 따라서 흑무재배를 확대하고 백무재배를 감축할시 현재까지 불안한 월동무 가격이 안정적인 조수익 확보 및 증가 가능
신품종 도입 효과	○ 월동무 상품 브랜드 신뢰성 제고	<ul style="list-style-type: none"> ○ 흑무 연구개발 및 상용화를 통해서 식품시장 활성화와 우너료시장 자립화 제고 ○ 최근 채소시장은 다양화, 기능성 원료를 요구하고 있는 만큼 해외에 우수한 원예채소 유전자원 확보 모델로 활용

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내 매년 목표치	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계	1	
특허출원	국내		
	국외		
	계	1	
특허등록	국내		
	국외		
	계	1	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전	1	
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보		1	
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업 연구개발 과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.