

3cm

11-15430
00-00277
5-01

4cm

발간등록번호

11-1543000-002775-01

쑥부쟁이를
활용한
만성
질환
개선
다기능
소재
개발

최
종
보
고
서

2019

5cm

농림축산식품부

3
cm

고부가가치 기술개발사업 R&D Report

쑥부쟁이를 활용한 만성질환 개선 다기능 소재 개발 최종보고서

2019.07.

주관연구기관/농업회사법인 구례삼촌
협동연구기관/한국기초과학지원연구원
협동연구기관 / 호남대학교

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “쑥부쟁이를 활용한 만성질환 개선 다기능 소재 개발”(개발기간 : 2016 .07. 07 . ~ 2018 .12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 07 . .

주관연구기관명 : 농업회사법인 구례삼촌 (대표자) 이명엽 (인)
협동연구기관명 : 한국기초과학연구원 (대표자) 김현식 (인)
참여기관명 : 호남대학교 (대표자) 서상완 (인)

주관연구책임자 : 이명엽

협동연구책임자 : 김현식, 서상완

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

보고서 요약서

과제고유번호	116035-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016. 07. 07 - 2018. 12. 31 (30개월)	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	쑥부쟁이를 활용한 만성질환 개선 다기능 소재 개발			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	세부 : 쑥부쟁이를 활용한 가공제품 개발 및 사업화 협동1: 쑥부쟁이 지표 성분의 분석 방법 발굴 협동2: 쑥부쟁이를 활용한 비만/천식 억제 효과 연구			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 12명 내부: 8명 외부: 4명	해당단계 연구개발비	정부:190,000천원 민간: 47,500천원 계: 237,500천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 36명 내부: 24명 외부: 12명	총 연구개발비	정부: 560,000원 민간: 140,000천원 계:700,000 천원	
연구기관명 및 소속부서명	농업회사법인 구례삼촌 한국기초과학지원연구원 호남대학교			참여기업명 농업회사법인 구례삼촌	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- 썩부쟁이 관련 제품을 개발함으로써 사업화 단계를 이룸.
- 썩부쟁이 추출물에서 비만/천식 억제 효과를 확인하였음.
- 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정을 하였음.
- 썩부쟁이의 기능성과 안정성을 평가하기 위한 인체적용시험을 신청하였음.
- 원료에 대한 기준규격 및 지표물질 밸리데이션을 확립하였음.
- 유통루트 다변화를 통해 매출증대 및 고용창출을 하였음.

보고서 면수

<국문요약문>

연구의 목적 및 내용	<p>▶ 구례산 쑥부쟁이를 이용한 2개 이상의 만성 질환(천식, 비만) 예방 및 완화를 위한 복합 기능성 식품소재 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 구례산 쑥부쟁이의 기관지 천식 억제 효능 검증 및 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보 ○ 연구 결과의 사업화로 쑥부쟁이 재배 농가 수익 증대 및 지역경제 활성화 ○ 제품에 대한 시장 분석 및 전략 수립 <ul style="list-style-type: none"> - 만성 질환2개 영역(천식, 비만)에 따른 쑥부쟁이 소재 선정 - 기존 제품과 차별화된 형태의 쑥부쟁이 건강 기능성 제품의 개발을 위한 제품 개발 방향 설정 ○ 복합 기능성 소재의 대량생산공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 기능성 원료의 제조공정표준화 및 생산 공정 최적화 - 소재에 대한 가공 적성연구 - 소재에 대한 안정성 연구 ○ 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정 <ul style="list-style-type: none"> - 분획물 조제 및 표준화 - 분획물 및 생리 활성성분에 대한 효능 평가 - 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정 ○ 원료에 대한 기준규격 및 지표물질 밸리데이션 ○ 기능성 활성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 세포 및 동물 ○ 시제품 개발 ○ 식약처 개별 인정 기능성 원료 신청을 위한 인체 적용시험 신청 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 특허 출원 3건, 특허 등록1건 ○ SCI 논문 3편, 비SCI 논문3편 ○ 학술발표 6건 ○ 기술이전 1건 ○ 인력양성 5명 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비용이 상대적으로 적고, 발굴 속도가 빠른 신개념 신물질 발굴방법 활용으로 국제적인 경쟁력 강화 ○ 만성질환 (기관지 천식, 비만)에 대한 멀티 기능성을 나타내는 새로운 복합 건강 기능식품 소재의 제품 개발 및 산업화 ○ 지역 특화 자원의 우수성 확보를 통한 식품 소재 및 건강기능식품 산업의 세계 시장 비교 우위 선점으로 국가경쟁력 확보 ○ 주관기업의 수익증대에 따른 우수 원료 계약 재배로 쑥부쟁이 농가의 안정적인 판로 확보를 통한 농가 매출 증대 ○ 쑥부쟁이 제품 개발로 인해 관광, 체업, 지역경제 활성화 등 최근 국가산업 방향인 6차 산업과의 연계 가능 				
국문핵심어 (5개 이내)	쑥부쟁이	천식	만성질환	건강기능식품	복합기능성물질

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<영문요약문>

<p align="center">Purpose and contents of the research</p>	<p>▶ Development of multifunctional food materials for prevention and alleviation of two or more chronic diseases (asthma, obesity) using <i>Aster Yomena</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Verification of bronchial asthma inhibition efficacy and gaining evidence data for individual functional foods of <i>Aster Yomena</i> ○ As a result of the commercialization of the research result, profitable farmers increase profit and regional economic activation ○ Market analysis and strategy for products <ul style="list-style-type: none"> - Selection of the <i>Aster Yomena</i> material according to two chronic diseases (asthma, obesity) - Establishing product development direction for development of health functional products that are differentiated from existing products ○ Mass production process of complex functional materials <ul style="list-style-type: none"> - Standardization of manufacturing process of functional raw materials and optimization of production process - A study on the machinability of materials - Stability study on materials ○ Isolation and identification of physiologically active ingredients <ul style="list-style-type: none"> - Fraction preparation and standardization - Evaluation of efficacy on fractions and bioactive components ○ Reference standards and indicator material validation for raw materials ○ Functional activity evaluation ○ Prototype development ○ Application for human body application test for application of individual approved functional raw materials 				
<p align="center">R & D achievement</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3 patent applications, 1 patent registration ○ 3 SCI theses, 3 non-SCI theses ○ Academic Presentation 6 cases ○ Technology transfer 1 case ○ 5 manpower training 				
<p align="center">Plan to utilize R & D achievements</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Strengthening international competitiveness by utilizing new concept finding method with relatively low cost and speed of excavation ○ Product development and industrialization of new complex-function food materials that show multi-functionality against chronic diseases (bronchial asthma, obesity) ○ Securing national competitiveness by securing excellence of local specialized resources and gaining comparative advantage of global market of food material and health functional food industry ○ Increase sales of farm households by securing a stable market for poor farmers by cultivating contracts for good raw materials in accordance with the increase of profit of the main enterprise 				
<p align="center">Keyword in English</p>	<p align="center"><i>Aster yomena</i></p>	<p align="center">Asthma</p>	<p align="center">Chronic disease</p>	<p align="center">Health functional food</p>	<p align="center">Complex functional components</p>

< Contents >

1. Outline of Research and Development Project	1
2. Research content and results	5
3. Achievement goal and contribution to related field	85
4. Plan for utilization of research results	86
5. References	87
6. Enclosure	90

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	5
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	85
4. 연구결과의 활용 계획 등	86
5. 참고 문헌	87
6. 별첨	90

1. 연구개발과제의 개요

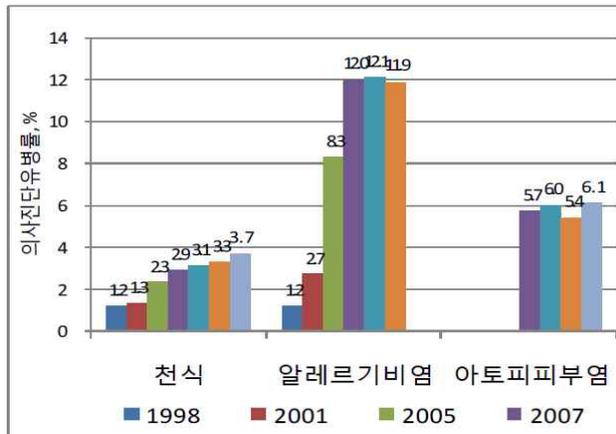
1-1. 연구개발 목적

- 구례산 썬부쟁이를 이용한 2개 이상의 만성 질환(천식, 비만) 예방 및 완화를 위한 복합 기능성 식품소재 개발
- 구례산 썬부쟁이의 기관지 천식 억제 효능 검증 및 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보
- 썬부쟁이 상품화로 지역경제에 직·간접 매출액 500억원 창출

1-2. 연구개발의 필요성

- 한국은 빠른 경제성장 이상으로 급속하게 고령화 사회로 옮겨지고 있어서 수명연장에 따른 만성질환이 많아지고 있으며, 특히 아토피·천식은 삶의 질을 좌우하는 가장 큰 요인이 되고 있음.
- 2007년 국민건강보험공단의 조사에 의하면 3대 알레르기성 질환인 아토피 피부염·알레르기성 비염·천식을 앓고 있는 인구가 약 730만 명으로 우리나라 전체 인구(4800만명)의 약 15.2%에 달해 우리나라에서 가장 빈번한 성인병인 고혈압 환자 수를 약 622만명으로 추산하고 있는데 천식을 포함한 아토피 질환자는 이보다 108만 명이나 더 많음.

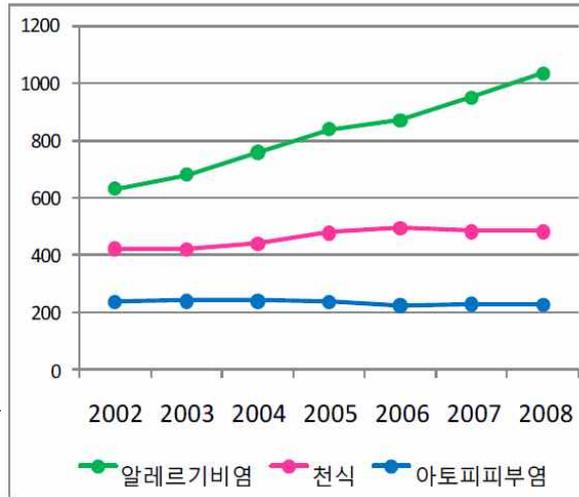
<알레르기질환 유병률 추이 (%)>



<국민건강영양조사(천식, 아토피피부염:1세이상, 알레르기비염:19세이상)>

- 또한 보건복지부가 실시한 2008년 국민건강영양조사결과를 보면 아토피 피부염, 천식 및 비염으로 의사에게 진단받은 환자 수는 2002년과 비교하여 증가 추세에 있음.

<진료환자수 추이 (명/1만 명)>



- 있음

<건강보험공단 2002-2008 진료비 지급자료 분석결과>

- 특히 천식은 암, 심혈관계 질환과 비견되는 사회경제적 질병부담이 증가되고 있음.

<한국 주요 만성질환 질병부담 >

	남성		여성	
	질병명	DALY	질병명	DALY
1위	간경화증	1,113	뇌혈관질환	730
2위	뇌혈관질환	1,112	당뇨	708
3위	당뇨	1,091	만성폐쇄성폐질환	476
4위	허혈성심질환	990	허혈성심질환	432
5위	천식	609	천식	398

<어린이·청소년의 질병부담>

	0~9세		10~19세	
	질병명	DALY	질병명	DALY
1위	천식	4,379	천식	1,226
2위	중이염	509	소화성궤양	382
3위	피부질환	195	피부질환	206
4위	간질	154	정신분열병	172

* DALY(Disability Adjusted Life Year) : 장애보정생존년수, 단위: DALY/인구 10만명 당

<한국천식알레르기협회 2008>

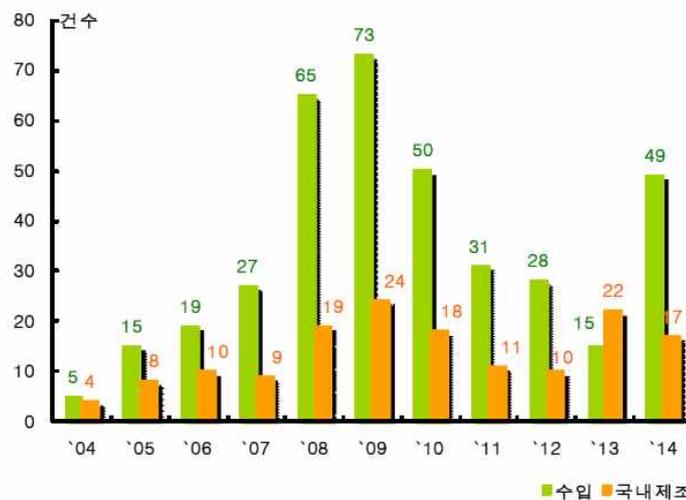
- 특히 비만은 천식과 관계되어 있다는 사실이 최근 들어 밝혀지고 있으며, 체중감소를 통해 기도과민성(airway hyper-responsiveness; AHR)이 개선이 된다는 보고들도 있어 비만과 천식 발병은 밀접한 관계가 있는 것으로 보임.
- 한편, 국내 건강기능성 식품산업은 질병예방을 통한 국민 의료비 절감과 건강증진으로 삶의 질 향상에 기여하는 고부가가치 미래핵심 동력산업이며, 세계 보건산업정책의 새로운 트렌드는 질병의 치료에서 질병예방으로, 일반식품의 개발은 고부가가치 기능성식품으로 바뀌어가고 있음.

(단위 : 억원, %)

구분	2009	2010	2011	2012	2013	전년대비 성장률	연평균 성장률 (09~13)
생산액	9,598	10,671	13,682	14,091	14,820	5.2	11.5
수입액	2,417	2,593	3,729	3,532	3,854	9.1	12.4
수출액	415	460	556	584	754	29.1	16.1
국내 시장규모	11,600	12,804	16,855	17,039	17,920	5.2	11.5

<국내 건강기능성 식품 시장 규모 - 식품의약품안전처>

- 예방의학적 차원과 국내산 농산물의 소비확산 차원에서 기능성 식품 및 식품소재를 이용한 만성질환 개선 연구는 꾸준히 증가할 전망.
- FTA 협상 등이 가시화되고 본격화됨으로써 세계는 글로벌화와 자국 이익추구 양상이 심화되고 있는 반면, 우리나라의 경우 국도가 협소하고 농업 경쟁력이 취약하여 주요 농산물의 수입의존도가 높고 국제 경쟁력도 매우 취약함.
- 현재 우리나라 농업부분의 경쟁력을 높이고 시장개방에 능동적으로 대응하기 위해서는 농산물을 수출산업으로의 육성이 매우 시급하며, 특히 전라남도는 타도에 비해서 1차 산업인 농업의 비중이 높기 때문에 농산물의 수출산업과 같은 수출농업으로의 적극 전환이 시급함.
- 따라서 실질적인 농가 소득으로 이어지기 위해서는 국내 자생식물의 기능성 식품 개발을 통하여 수입 원료의 의존도를 낮추고, 연구개발을 통하여 세계 시장에서 경쟁력이 확보된 기능성 식품 산업화가 필요하므로 적극적인 관련 연구가 요구됨.



<인정된 기능성 원료들의 수입 및 국내제조-식품의약품안전처('04~'13)>

- 현재까지 한국에서 건강기능식품으로 개발된 원료로는 고시형 88종, 개별인정형 243종(이중기능성 22종 포함)이 개발되었으나 만성질환(천식, 비만, 혈당)을 동시에 완화시키는 소재는 개발되어 있지 않음.

기능성 소재	기능성
대나무 추출물	항산화, 콜레스테롤, 혈중중성지방
복분자 추출물	간건강, 항산화
녹차 추출물	기억력 개선, 체지방, 항산화
홍삼 농축액	기억력 개선, 피부건강, 혈행개선
은행잎추출물	기억력 개선, 혈행개선
표고버섯 추출물	간건강, 면역기능
코엔자임 Q10	혈압, 항산화
L-글루타민	면역, 혈압
실크	기억력 개선, 혈당
정제오징어유	혈중중성 지방, 혈행 개선
정어리정제어유	혈중중성 지방, 혈행 개선
액상 프락토올리고당	장 건강, 칼슘흡수
가시오가피복합추출물	관절/뼈 건강, 기억력 개선
구아바잎 추출물	면역, 혈당
N-아세틸글루코사민	관절, 피부 건강
대두	관절/뼈 건강, 장 건강, 체지방
테아닌 복합추출물	기억력 개선, 긴장 완화
홍경천 복합추출물	피로개선, 혈당
당귀	기억력 개선, 면역
인삼	기억력 개선, 혈당
지방산 복합물	관절/뼈 건강, 체지방
나토배양분말	혈압, 혈행 개선

<2중 기능성 건강기능식품 개발 원료 및 기능성(2014년기준)>

- 쑥부쟁이는 현재까지 연구된 대표적인 기능성으로는 항산화 효과(노화방지), 항염증, 항암, 미백, 주름 개선, 천식, 비만개선등에 뛰어나다고 알려져 있음.
- 본 연구에서는 최근에 각광받고 있으며 다 기능성을 지닌 구례산 쑥부쟁이를 이용하여 비만 및 천식을 개선할 수 있는 건강기능식품을 개발하여 복합적 만성질환을 동시에 예방 및 치료하고 합병증 위험이 감소될 영향 및 기전을 밝히고자 함.

1-3. 연구개발 범위

- 구례산 쑥부쟁이의 기관지 천식 억제 효능 검증 및 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보
- 연구 결과의 사업화로 쑥부쟁이 재배 농가 수익 증대 및 지역경제 활성화
- 제품에 대한 시장 분석 및 전략 수립
 - 만성 질환2개 영역(천식, 비만)에 따른 쑥부쟁이 소재 선정
 - 기존 제품과 차별화된 형태의 쑥부쟁이 건강 기능성 제품의 개발을 위한 제품 개발 방향 설정
- 복합 기능성 소재의 대량생산공정 확립
 - 기능성 원료의 제조공정표준화 및 생산 공정 최적화
 - 소재에 대한 가공 적성연구
 - 소재에 대한 안정성 연구
- 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정
 - 분획물 조제 및 표준화
 - 분획물 및 생리 활성성분에 대한 효능 평가
 - 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정
- 원료에 대한 기준규격 및 지표물질 밸리데이션
- 기능성 활성 평가
 - 세포 및 동물

- 시제품 개발
- 식약처 개별 인정 기능성 원료 신청을 위한 인체 적용시험 신청

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 기능성 원료 재배 공정 표준화

1) 쑥부쟁이 종자의 발아특성

(가) 연구 목적

쑥부쟁이 종자는 소립종자로서 발아 전처리 및 육묘에 많은 어려움을 겪고 있다. 쑥부쟁이의 발아율에 영향을 줄 수 있는 발아온도, 침종, 저온처리 등 몇 가지 요인에 따른 종자 발아 특성을 구명하고자 본 실험을 수행하였다.

(나) 연구 방법

(1) 실험 재료

본 실험에서 사용된 쑥부쟁이 종자는 구례삼촌영농조합에서 2015년 9월에 채종한 종자이며, 온실에서 3일(72시간)동안 자연건조를 시킨 뒤 정선작업을 통해서 건실한 종자만을 골라 polyvinyl 봉지에 밀봉하여 5℃ 냉장고에 저장하였다.

(2) 종자 형태적 특성평가

종자의 형태적 특성을 알아보기 위하여 다기능줌현미경(AZ100, NIKON, JAPAN)을 이용하여 장, 폭을 3반복으로 측정하여 장폭비를 산출하였고, 분석저울(EPG214C, OHAUS, USA)을 이용하여 1000립중을 3반복으로 측정하였다.

(3) 온도 조건이 발아에 미치는 영향

쑥부쟁이 종자의 적정 발아온도를 구명하기 위한 본 실험은 87 X 15 mm petridish에 90mm filter paper를 1매씩을 깔고 증류수 5ml을 넣고 충분히 적셔 준 뒤에 종자를 50립씩을 치상하였다. 온도조건은 10℃, 15℃, 20℃, 25℃ 로 설정하였고, 다운도발아기(5008.00.00.5, SEED PROCESSING, HOLLAND)에서 3반복으로 실시하였다.

(4) 침종 및 저온처리가 발아에 미치는 영향

침종 및 저온처리가 발아에 미치는 영향을 알아보기 위해 20℃ 증류수에 24시간, 5℃ 증류수에 24시간 침지한 후 87 X 15 mm petridish에 90mm filter paper를 1매씩을 깔고 증류수 5ml을 넣고 충분히 적셔 준 뒤에 종자를 50립씩을 치상하였다. 온도조건은 10℃, 15℃, 20℃, 25℃ 로 설정하였고, 다운도발아기(5008.00.00.5, SEED PROCESSING, HOLLAND)에서 3반복으로 실시하였다.

발아기간 동안 건조하지 않도록 증류수를 24시간마다 보충해주었으며, 발아는 백체가 1mm 내외로 자란 경우 출현한 것으로 하였고, 치상 후부터 20일까지 발아한 립수를 1일 간격으로 조사하여 발아율을 조사하였다.

(5) 발아율, 발아세 측정

발아율은 최종 조사일에 정상적으로 발아된 종자 수를 백분율로 계산하였고, 발아세는 아래와 같은 공식(양, 2007)으로 계산하였다.

$$\text{germination speed} : \sum (ni/ti)$$

ni : 조사 당일 발아종자수

ti : 치상 후 조사 일수

(6) 통계분석

통계 프로그램은 SPSS PASW STATICS 18.0(Predictive Analytics SoftWare Inc., USA)을 사용하여 평균간 비교 검정을 하였다.

(다) 연구 결과

(1) 종자의 형태적 특성

쑥부쟁이(*Aster yomena* Makino) 종자의 형태적 특성은 표. 1과 같다. 쑥부쟁이의 종자의 길이와 폭은 각각 $2.26 \pm 0.15\text{mm}$, $0.80 \pm 0.10\text{mm}$ 로 나타났으며, 폭이 좁은 장타원형으로 관찰되었다. 또한, 천립중은 $577.39 \pm 15.02\text{mg}$ 으로 소립종자로 판단되며 관모가 없는 수과이고 투명한 갈색을 띄었다(Table 1).

Table 1. Seed characteristics of *Aster yomena* Makino.

1000-seed Weight (mg)	Length (mm)	Width (mm)	length/width ratio
577.39 ± 15.02	2.26 ± 0.15	0.80 ± 0.10	2.85 ± 0.23



(2) 온도가 발아에 미치는 영향

발아온도 20°C 에서 57.6~69.0%로 발아율이 가장 높게 나타났으며, 15°C(50.0~57.8%), 25°C(56.4~63.5%) 순으로 나타났으며, 유의성은 인정되었다. 한편, 30°C 이상 조건은 발아율 31.3% 이하로 발아에 적절치 않은 온도로 판단된다(Table 2, Fig. 1).

(3) 종자처리가 발아에 미치는 영향

침종 24시간, 20°C 와 25°C 의 발아율은 각각 69.0%, 58.9%로 무처리에 비해 약 4.5~19.8%

증가하였으며, 발아기간을 1~2일 단축시켰다. 저온처리 24시간, 20℃의 발아율과 발아세는 각각 69.7%, 4.92로 모든 처리 중 가장 높게 나타났으며, 무처리에 비해 발아기간을 약 3일 단축시켰다(Table 2, Fig. 1).

(4) 종자처리가 종자오염에 미치는 영향

쑥부쟁이 발아시 문제가 되는 종자 오염율을 살펴본 결과, 무처리는 14~38%로 가장 많이 오염된 반면, 침종 24시간과 저온처리 24시간은 각각 12~19%, 10~18%로 무처리에 비해 종자오염을 억제하는 효과를 보였다. 또한, 침종 및 저온처리 기간 동안 종자 내에 축적되는 발아 억제물질, 저장양분 등의 변화, 종자저장 조건, 채종시기에 따른 발아율의 영향 등의 연구가 추가적으로 필요할 것으로 판단된다(Table 2, Fig. 1).

Treatment	Temperature	Germination percentage(%)	Germination speed	Seed Contamination(%)
Control	15℃	50.0	3.02	15.3
	20℃	57.6	4.00	22.0
	25℃	56.4	3.46	14.0
	30℃	28.7	2.08	38.0
Soaking 24 h	15℃	53.0	3.49	17.0
	20℃	69.0	4.31	16.0
	25℃	58.9	3.32	12.0
	30℃	27.8	1.97	19.0
Chilling 24 h	15℃	57.8	3.31	15.0
	20℃	69.7	4.92	12.0
	25℃	63.5	3.49	10.0
	30℃	31.3	2.64	18.0
P-value (<i>P</i> =0.05)	Treatment	**	**	**
	Temp.	**	**	**
	Treatment*Temp.	ns	*	*

Table 2. Seed germination of *Aster yomena* Makino. * : significant at 5% level, ** : significant at 1% level

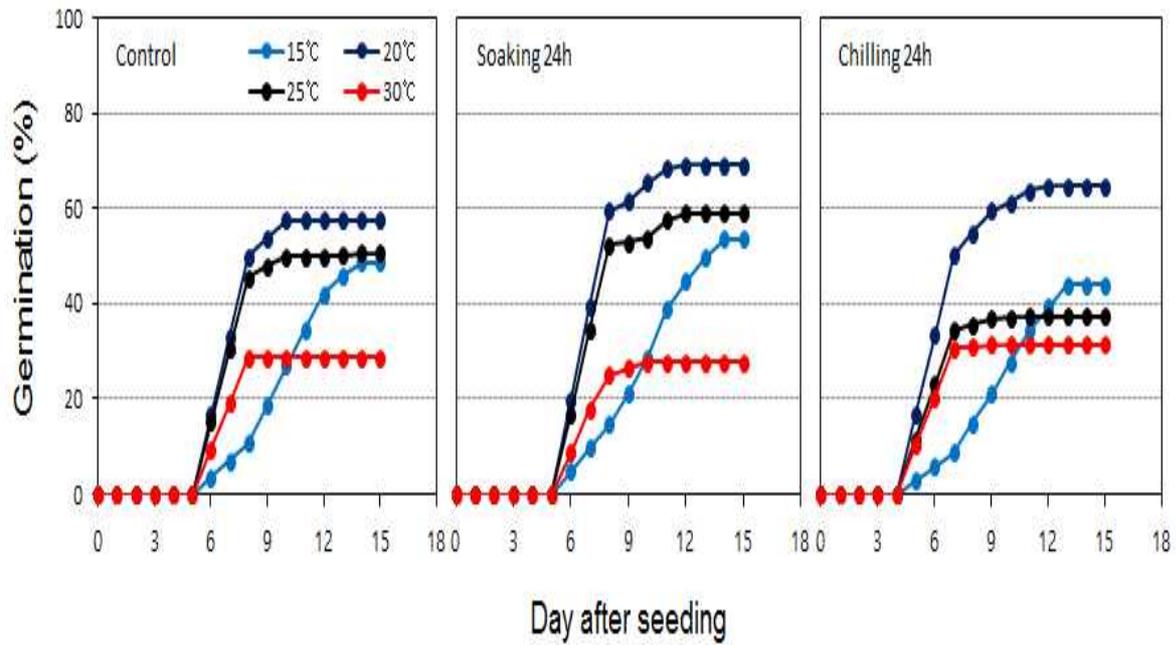


Fig. 1. Effect of treatment time and temperatures on seed germination in *Aster yomena* Makino.

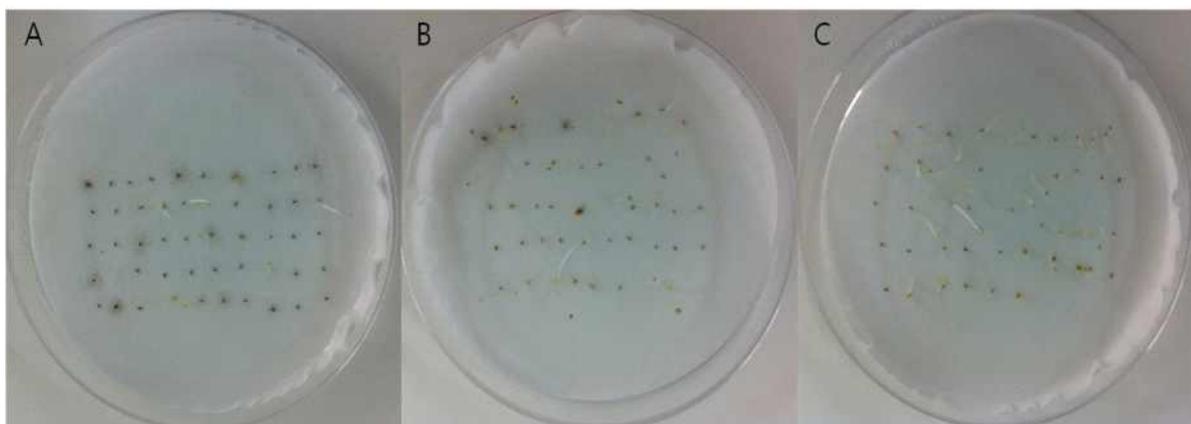


Fig. 2. Effect of treatment time on seed contamination in *Aster yomena* Makino
 A: Control, B: Soaking 24hour, C: Chilling 24hour

2) 축부쟁이 재배기술별 생육비교

구례에서 자생하는 축부쟁이 자원중에 선발된 우수종에 대해 재배를 통한 수확량을 평가하여 수량성을 확보할 수 있는 재배기술을 확보하였다.

가) 시비(미생물) 투입에 따른 수량성 평가

시험구별 투입 미생물 양이 요인별 변이에 영향을 끼치지 못하는 것으로 판단되고 무처리에 비해 미생물 투입 시험구의 수량이 다소 높은 것으로 보임(20㎡ 당 미생물 원액 12 ~ 15 ml 투입)

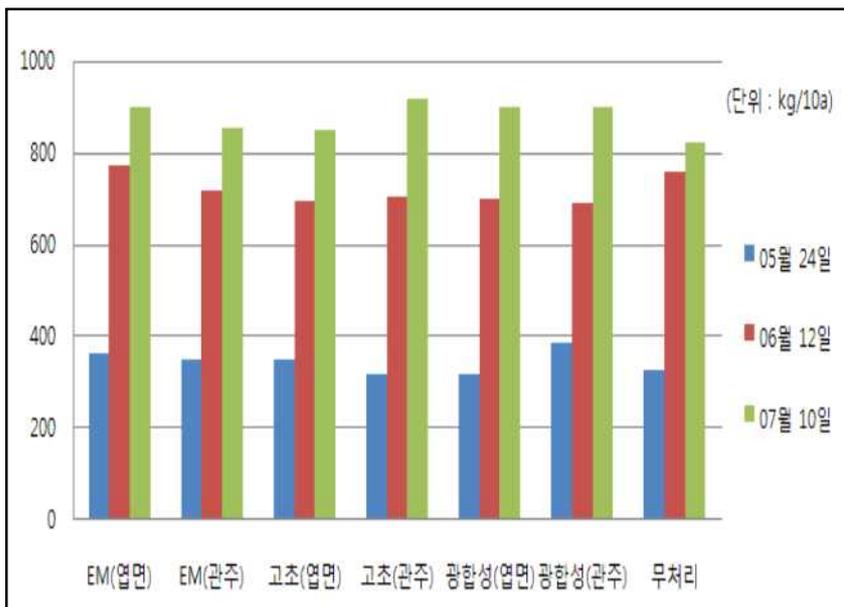


그림 3. 미생물 시험구별 수량성

나) 비가림 차광 재배 수량성

비가림 차광재배 시험구의 경우 무차광 시험구와 비교했을 때 5월의 수량차이는 거의 없었으나 그 이후 온도가 높아질수록 수량이 현격히 감소하는 경향을 보임

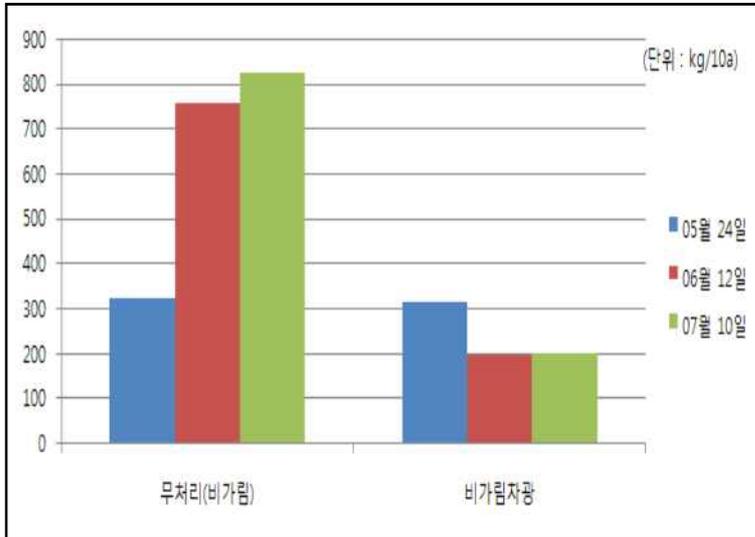


그림 4. 비가림 차광재배 수량성

3) 쑥부쟁이 재배법 확립

가) 적지

햇볕이 잘 들고 보수력이 있는 땅이 좋으며 생장력이 왕성한 들풀이지만 그늘진 곳에서는 품질을 기대하기 어려우며, 산기슭의 빈터 또는 휴경지를 이용한 재배가 가능하다.

나) 번식

쑥부쟁이는 종자번식 시 파종한 당년에 개화가 가능하기 때문에 재배적으로는 일년초로 취급할 수 있다. 하지만 쑥부쟁이는 Aster속 내 다른 종들과 자연교잡이 매우 잘 되기 때문에 근처에 다른 Aster속 식물(개쑥부쟁이 등)이 있으면 개화기 때 방화곤충들에 의해 자연교잡이 왕성하게 일어나게 된다. 종자파종법과 영양번식 방법 2가지 모두 이용할 수 있다.

(1) 종자파종

종자수명은 상온에 보관해도 2년 정도 가지만 발아율이 떨어지기 때문에 전년도에 수확한 종자를 이용하는 것이 좋다. 발아는 종자 저장방법이나 GA처리 유무에 관계없이 잘 되는 것으로 보아 휴면성은 아주 약하다. 발아조건은 온도 20~25℃이고 광이 있는 조건에서 발아가 더 잘된다. 발아율은 보통 80% 이상이다. 파종은 상자파종이나 플러그파종 모두 가능하다. 균일한 묘를 대량으로 생산하고 육묘 및 가식에 들어가는 노력을 절감하기 위해서는 플러그 파종이 유리하다. 파종은 4월 이전에 하면 당년에 개화가 가능 하지만 개화기 때 정상적인 생육을 위해서는 2월에 온실에서 파종하고 육묘한 다음 4월경에 정식하는 것이 좋다. 파종 시 용토는 피트모스와 펄라이트를 1 : 1로 섞어서 써도 되지만 파종용 조제용토를 쓰는 것이 좋다. 대량생산 시에는 기계파종을 하지만 손으로 파종해도 된다. 파종 전에는 파종 상자나 플러그트레이에 용토를 채우고 아래에서 물이 충분히 흡수되도록 한 뒤 종자를 뿌리면 된다. 파종 후에는 버미큘라이트 등으로 종자두께(2mm) 정도의 양을 복토해 준다. 20~25℃의 온실에서 파종 후 약 1~2주면 발아하는데, 발아할 때까지 표면이 마르지 않도록 물 관리를 잘 해주어야 한다. 파종 후 싹이 나오면 용토가 너무 습하지 않도록 물 관리를 잘 해야 한다. 물을 줄 때 표면으로 주는 것보다는 저면으로 주는 것이 좋으며 하루 한번씩 1회 20분정도 저면으로 흡수되도록 관수하면 좋은 묘를 충분히 생산할 수 있

다. 육묘온도는 20~25℃를 유지하되 특히 너무 고온이 되지 않도록 환기 등에 유의해야 한다. 육묘는 본엽이 4~5매 정도 나올 때까지 계속하는데, 이 시기에 플러그묘의 경우 묘를 뽑아 보면 뿌리가 적당히 들고 있다. 정식용으로 쓸 수 있는 본엽 4~5매기까지는 파종 후 약 5~6주가 걸린다.

(2) 영양번식

쑥부쟁이는 종자번식이 잘 되지만 앞서 말한 변이주 발생 문제 때문에 모본관리가 여의치 않아 균일묘를 생산하고자 할 때는 영양번식을 할 수도 있다. 쑥부쟁이의 동지아 채취를 위해서는 꽃이 완전히 피기 전 꽃봉오리가 나오기 시작할 때 꽃눈을 어느 정도 제거해 주어야 한다. 이것은 완전히 개화된 포기는 당년에 종자를 맺히고 죽게 되기 때문인데 개화기에 체내 저장양분이 먼저 개화와 종자형성을 위해 모두 소모되고 지하부에서 뿌리로의 전류는 어렵기 때문에 나타나는 현상으로 보인다. 따라서 동지아 채취용 모본은 미리 꽃을 어느 정도 제거해 주게 되면 속근성으로 자라게 된다. 동지아는 봄철에 근경의 마디로부터 나오는 어린묘를 채취하여 발근시키면 된다.

다) 재배관리

(1) 이식재배

묘를 키워 정식하는 경우로써 심을 자리를 사전에 경운작업을 하여 흙을 부드럽게 하고 잡초를 제거한 다음, 퇴비도 약간 넣고 잘 혼합하여 표면을 고른다. 심는 간격은 30×30cm 간격으로 하고 심은 후에는 새 뿌리가 내릴 때까지는 물 관리를 잘해야 한다. 심은지 15일 정도 지나면 새 뿌리가 나온다.

(2) 직파재배

직파할 경우에도 이식재배와 마찬가지로 씨앗을 뿌리기 전에 심을 자리는 경운작업을 하여 흙을 부드럽게 하고 잘 골라야 한다. 표면이 잘 골라지면 물을 충분히 주어 파종 후에 종자가 표면에 잘 붙도록 한다. 직파하게 되면 발아율이 상당히 떨어지므로 이를 감안하여 씨앗을 촘촘히 뿌려야 한다. 심는 장소에 따라 다르지만 씨앗을 뿌린지 보통 2주정도 지나면 싹이 나오며 그 뒤 다시 2~3주정도 지나면 새 뿌리가 내리게 된다.

(3) 물 관리

재배방법에 관계없이 묘나 종자가 잘 활착할 때까지는 물 관리가 매우 중요하다. 물주는 방법은 재배양식에 따라 다르겠지만 한번 줄 때는 속흙까지 젖을 수 있도록 충분히 주는 것이 좋다. 이식재배의 경우 새 뿌리가 나오는 2~3주 동안 흙이 건조하지 않도록 물을 주어야 한다. 심은 지 처음 1주일엔 하루에 한번씩, 2주째부터는 이틀에 한번씩 준다. 직파재배의 경우는 특히 물 관리를 잘 해야 한다. 즉 씨앗을 뿌린 후 싹이 나오고 새 뿌리가 나올 때까지 건조하지 않도록 자주 물을 주어야 하는데, 이 기간이 약 한달 정도 걸린다. 따라서 파종 후 처음 1~2주 동안의 발아기에는 하루에 한번, 그 뒤부터는 2~3일에 한번씩 물을 준다. 완전히 활착하고 나면 자연강우에 의존해도 된다.

라) 수확

노지재배의 경우 3월부터 7월까지, 시설재배의 경우는 연중 수확 할 수 있으며 연한순은 꽃봉오리기 나오기 전까지도 가능하며 꽃봉오리도 튀김용으로 이용할 수 있다. 초기재배포

장 조성시 두둑을 평평하게 만들어 나물수확기로 수확할 경우 인력 수확 대비 10배(330㎡/1시간)의 능률을 올릴 수 있다.



그림 5. 수확기 활용 수확

마) 재배유형별 특징

(1) 노지재배

직파 또는 이식 재배하여 3월 하순부터 7월 하순 꽃봉오리 나오기 전 까지 4~5회 수확 가능하며 1회 10a당 생체량 300kg정도 수확이 가능하다.

(2) 비가림재배

수확기 활용 수확할 수 있도록 3m 두둑을 양쪽으로 2개 만들어 직파 또는 이식하는데 직파는 발아율이 다소 떨어지므로 이식 재배하는 것이 유리하다. 이식 후 물관리가 중요한데 이식 후 1~2주간은 하루에 한번씩 속 흙까지 젖을 수 있도록 충분히 관수하는 것이 좋다. 2월 중순부터 2~3주에 1회 수확이 가능하며 노지재배보다 2~3회 더 많은 수확을 할 수 있어 소득 및 가격경쟁력에서 앞선 재배형태이다.



그림 6. 비가림차광재배



그림 7. 수확

나. 썩부쟁이 추출물 비만 생리활성 평가

1) 재료 및 방법

가) 시료추출 및 제조

실험에 사용한 썩부쟁이는 주관기관인 구례 썩부쟁이 영농조합법인에서 재배하고 있는 것을 이용하였다. 썩부쟁이 잎을 채취하여 세척한 후 그늘에서 건조하여 분쇄 한 후 혼합물의 10배 용량의 증류수를 첨가하여 105℃ 3시간 동안 3회 열수추출한 후 여과하여 불순물을 제거하였다. 열수추출한 시료는 Freeze dry(PVTFD20R, 일신랩(주), 대한민국)를 사용하여 동결 건조(Ilshin, Korea) 시킨 후 실험 시료로 사용하였다.

나) 세포배양 및 분화유도

실험에 사용한 3T3-L1 세포는 마우스 지방전구세포로 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 10% new born calf serum(NBCS, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)과 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin(Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)이 함유된 DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 세포가 confluence 상태가 되면 10% FBS-DMEM에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX), 0.25 mM dexamethasone, 10 μ g/ml insulin 이 첨가된 배지를 처리하여 분화를 2일간 유도 한 뒤 다시 2일간 10% FBS-DMEM에 10 μ g/ml insulin이 첨가된 배지로 교체해주었다. 그 후 2일마다 10% FBS-DMEM 배지로 교체하였다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다.

다) 세포독성 실험

본 실험에 사용한 썬부쟁이 열수추출물이 지방세포에 독성을 나타내는지를 측정하기 위하여 MTS assay를 수행 하였다. 3T3-L1 preadipocyte를 96 well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하였으며, 10% NBCS가 함유된 DMEM을 넣어 well당 최종 용적을 100 μ L로 하였다. 24시간 동안 배양한 후 추출물을 각각의 농도별(0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μ g/ml) 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 후의 각각 세포 배양액 용량의 1/10배의 MTS 용해액을 첨가한 후 37°C에서 2시간 배양한 후 ELISA microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라) Oil-red O 염색 및 Triglyceride 함량

앞의 과정을 거친 다음 배지를 제거해서 pH 7.4 PBS로 세척하고 10% formalin 용액으로 2시간 동안 고정한 이후, 고정액 제거 후 다시 PBS로 3회 세척하였다. 완전히 건조시킨 후 Oil red O 염색액(Oil red O staining kit, sciencell, CA, USA)을 처리하여 15분간 상온에서 염색하고, 염색액을 제거한 후 물로 3회 세척 한 다음 Microscope(Nikon TS100, Tokyo, Japan)로 관찰하였다. 또한, 흡광도 측정을 위하여 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용출시켜 ELISA microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Triglyceride 함량은 triglyceride colorimetric assay kit(Cayman, Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 확인하였다. 세포는 PBS(pH 7.4)를 이용하여 3회 세척한 후 lysis buffer(1% Triton X-100 in PBS)를 첨가하여 스크래퍼로 모은 후 4°C에서 30초간 sonication 하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 상층액을 분리하였다. 상층액 10 μ L에 150 μ L의 enzyme buffer solution을 첨가하여 혼합 한 다음 실온에서 15분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마) 지방관련 유전자 Real-time PCR 분석

Total RNA는 배양한 3T3-L1 지방전구세포를 TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 분리하였다. 즉 배양된 세포에서 배지를 제거하고 PBS로 세척하여 TRIzol 1 mL를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200 μ l를 넣고 다시 교반

하여 15,000 rpm, 4°C 에서 10분간 원심분리한 다음, 상등액 500 μ l 에 이소프로판올을 가하여 다시 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었다. 5 ug의 mRNA를 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystem 4368814)를 이용하여 cDNA로 합성을 하였다. 합성된 합성된 cDNA 1 μ L, primer 1 μ L, SYBR Master Mix II(Appiled biosystem, California, USA) 10 μ L, 3차 증류수 8 μ L를 넣고 Real-time PCR기기(ABI7500, Applied biosystem, California, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 또한 Real-time PCR 반응 조건은 50°C 에서 2분 95°C 에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C 에서 15초 어닐링 온도 60°C 에서 15초 신장온도 72°C 15초인 사이클을 40회 반복 수행하였다. 유전자 특이적 primer의 정보는 다음표와 같다.

Table1. Primer sequence for Real time RT-PCR

Gene	Sequences of forward and reverse primer 5' - 3'	
PPAR γ	Forward	TTC TGA CAG GAC TGT GTG ACA G
	Reverse	ATA AGG TGG AGA TGC AGG TTC
FAS	Forward	AGA CCC GAA CTC CAA GTT ATT G
	Reverse	GAT ACC ACC AGA GAC CGT TAT G
C/EBP α	Forward	GCG CAA GAG CCG AGA TAA A
	Reverse	GGT GAG GAC ACA GAC TCA AAT C
FABP4	Forward	AGC TCC TCC TCG AAG GTT TA
	Reverse	CTG TCG TCT GCG GTG ATT T
GAPDH	Forward	GGG TGT GAA CCA CGA GAA ATA
	Reverse	GGG TCT GGG ATG GAA ATT GT

바) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균 \pm 표준편차(mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 통계 처리는 SPSS(18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시한 후 세포실험은 Student's t-test로 동물실험은 Duncan's multiple range test로 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

2) 결과

가) 세포독성에 미치는 각 추출물의 영향

각 추출물이 3T3-L1 세포에 대한 세포독성을 알아보고 실험 농도 조건의 설정을 위해 MTS assay를 실시하였다. 그 결과 (Fig. 1) 물추출물에서는 독성이 나타나지 않았으나 에탄올 추출물에서만 500 μ g/mL농도에서 독성이 나타났다. 이후 실험은 독성이 없는 농도에서 진행하였다.

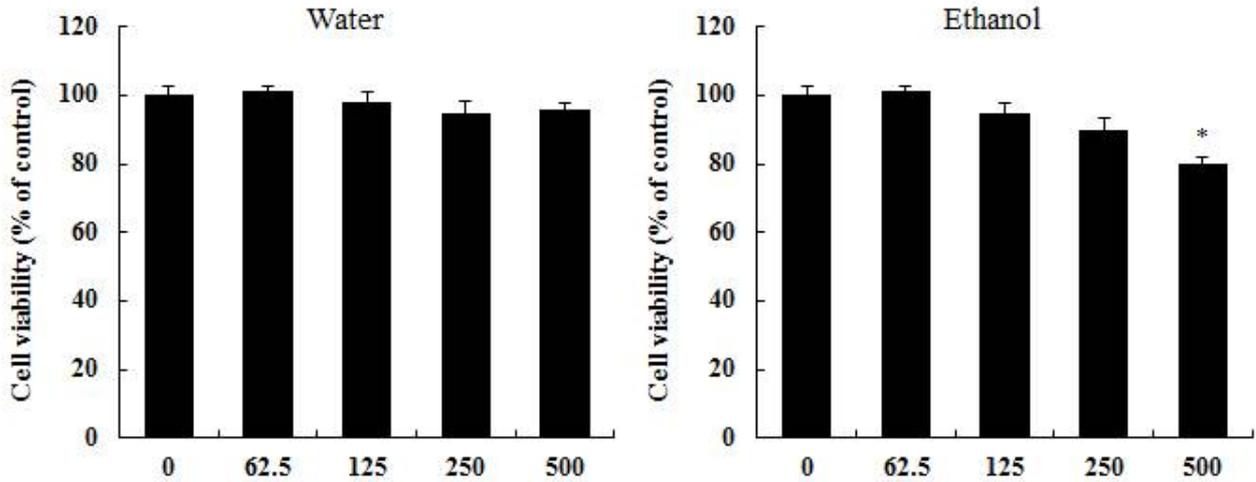


Fig. 1. Effects of cell viability on water and ethanol of preadipocyte. The values are expressed as the means \pm S.D.

나) Lipid droplet 생성 및 중성지방 함량에 미치는 각 추출물의 영향

Lipid droplet은 소포체의 이중막 사이에 triglyceride와 cholesterol ester가 축적되어 층이 나누어지기 시작하면서 만들어지며, 지방이 점점 더 축적되면 ‘lens’ 구조가 나타나게 되고 lipid droplet이 소포체에서 떨어져 나오게 된다고 알려져 있다. 이렇게 생성된 lipid droplet은 phospholipid monolayer와 관련 단백질에 둘러싸여 있는 비활성 소낭으로서 precursor fibroblast에서부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나며, PPAR γ 와 같은 중요한 adipogenic transcription factors에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다. 이러한 lipid droplet은 비만유 발뿐 만 아니라 고지혈증, 동맥경화 및 제2형 당뇨병 등과 같은 대사성 질환에도 관련성이 크다고 보고되고 있다. 따라서 각 추출물이 3T3-L1 preadipocytes가 adipocytes로 분화되는 과정에 나타나는 lipid droplet 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 Oil red O 염색을 하여 세포 내 lipid droplet의 생성 정도를 도립 현미경으로 관찰하였다(Fig. 2 &3).

아래 결과에서 알 수 있듯이 각 추출물을 처리 하지 않고 분화를 유도하였을 경우에 세포 질 내 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되는 것으로 관찰되었으나, 각 추출물을 처리하였을 경우에는 처리농도 의존적으로 lipid droplet의 형성이 현저하게 농도의존적으로 감소되었다. 따라서 추출물 모두 3T3-L1 preadipocytes에서 adipocytes로의 분화를 억제한다는 것을 알 수 있었다. 3T3-L1 세포 내에 생성된 지방의 양을 정량적으로 평가 하기 위해 염색된 지방을 추출하여 triglyceride 함량을 측정한 결과, 지방 축적율과 유사한 경향으로 추출물 처리군에서 triglyceride 함량이 유의적으로 감소되었다.

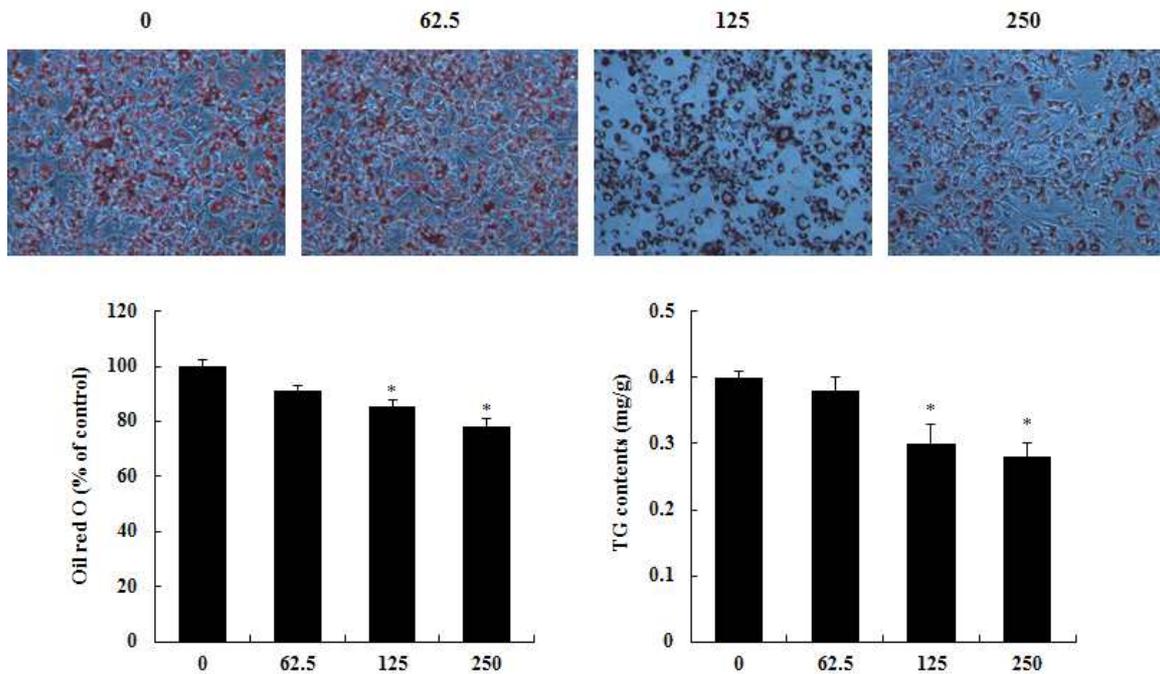


Fig. 2. Effects of AY water extract on lipid droplet accumulation of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means \pm S.D. and significantly different between groups according to Student's t test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ HV treated group versus adipocyte, ### $p < 0.05$ preadipocyte versus adipocyte.

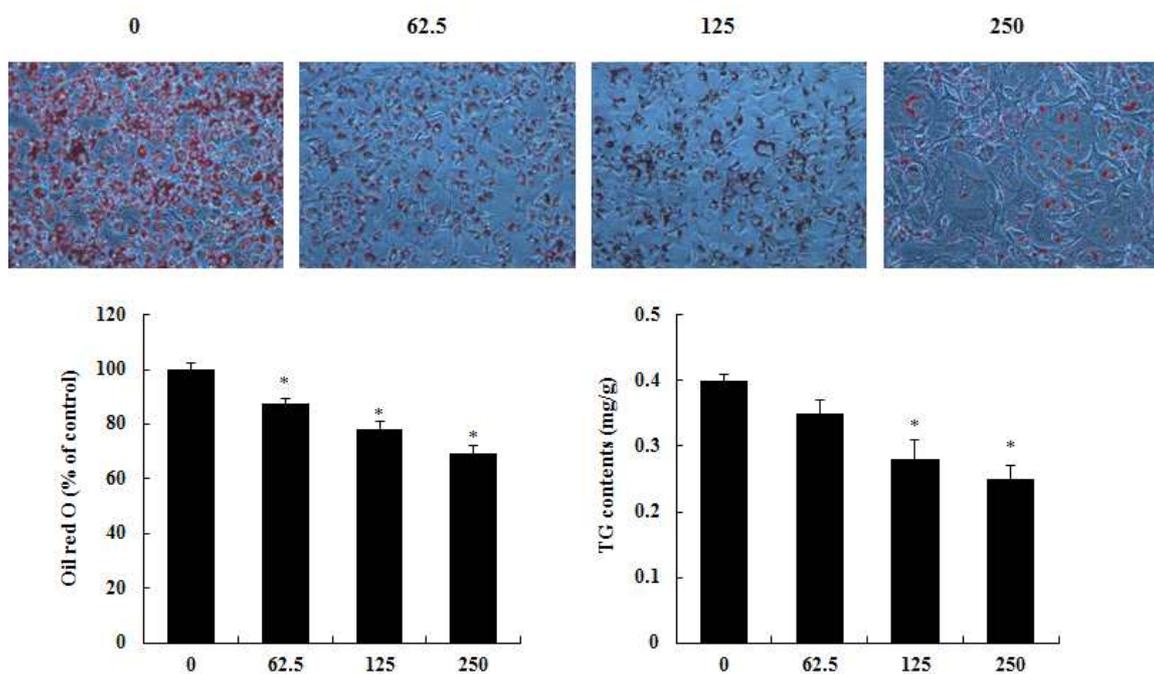


Fig. 3. Effects of AY EtOH extract on lipid droplet accumulation of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means \pm S.D. and significantly different between groups according to Student's t test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ HV treated group versus adipocyte, ### $p < 0.05$ preadipocyte versus adipocyte.

다) Adipogenic transcription factors 및 adipocyte expressed genes의 발현에 미치는 각 추출물의 영향

Adipogenesis의 핵심 조절자로 불리는 C/EBP α 및 PPAR γ 는 서로 상호작용하여 상승 효과를 나타내어 최종적으로 분화과정을 완성하게 되며, 그 결과로 백색지방세포에서 나타나는 lipid droplet 생성 및 triglyceride의 축적과 함께 세포의 크기 증가 등과 같은 형태적 특징과 더불어 FABP4 등과 같은 adipocyte expressed genes의 발현을 유발함으로써 지방세포의 특징을 지니게 된다. (Fig. 4 &5).

먼저 adipogenic transcription factors의 발현 정도를 확인한 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 분화를 유발하였을 경우 PPAR γ , C/EBP α 의 발현이 현저하게 증가하였지만 썬부쟁이 물추출물 처리에 의하여 농도 의존적인 감소가 유발되었다. 또한 adipocyte expressed genes인 FABP4 및 FAS 경우에도 Fig. 4에서와 같이 물추출물 처리에 의하여 현저하게 감소하였음을 확인하였다. EtOH 추출물의 adipogenesis 관련 유전자 발현 정도는 Fig. 5에 나타내었다. 분화대조군에 비해 모든 농도에서 농도 의존적으로 발현 정도가 감소하였음을 확인하였다. 위 결과와 마찬가지로 EtOH 추출물에서는 동일한 농도에서 효과가 더 나타남을 확인할 수 있었다.

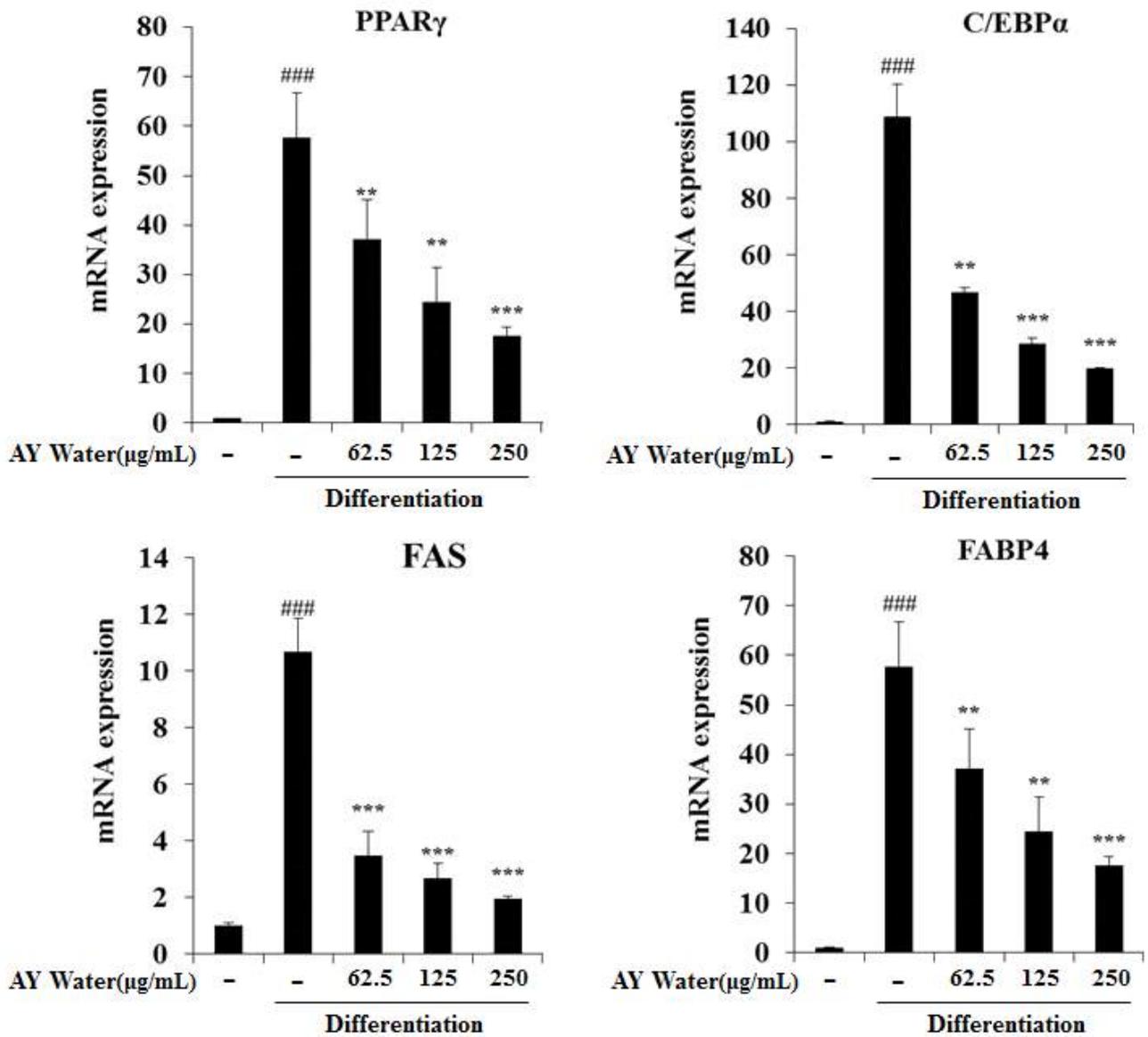


Fig. 4. Effects of AY Water extract on adipogenic transcription factors and adipocyte expressed genes expression of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means \pm S.D. and significantly different between groups according to Student' s t test. **p < 0.01, ***p < 0.001 AY treated group versus adipocyte, ###p < 0.05 preadipocyte versus adipocyte.

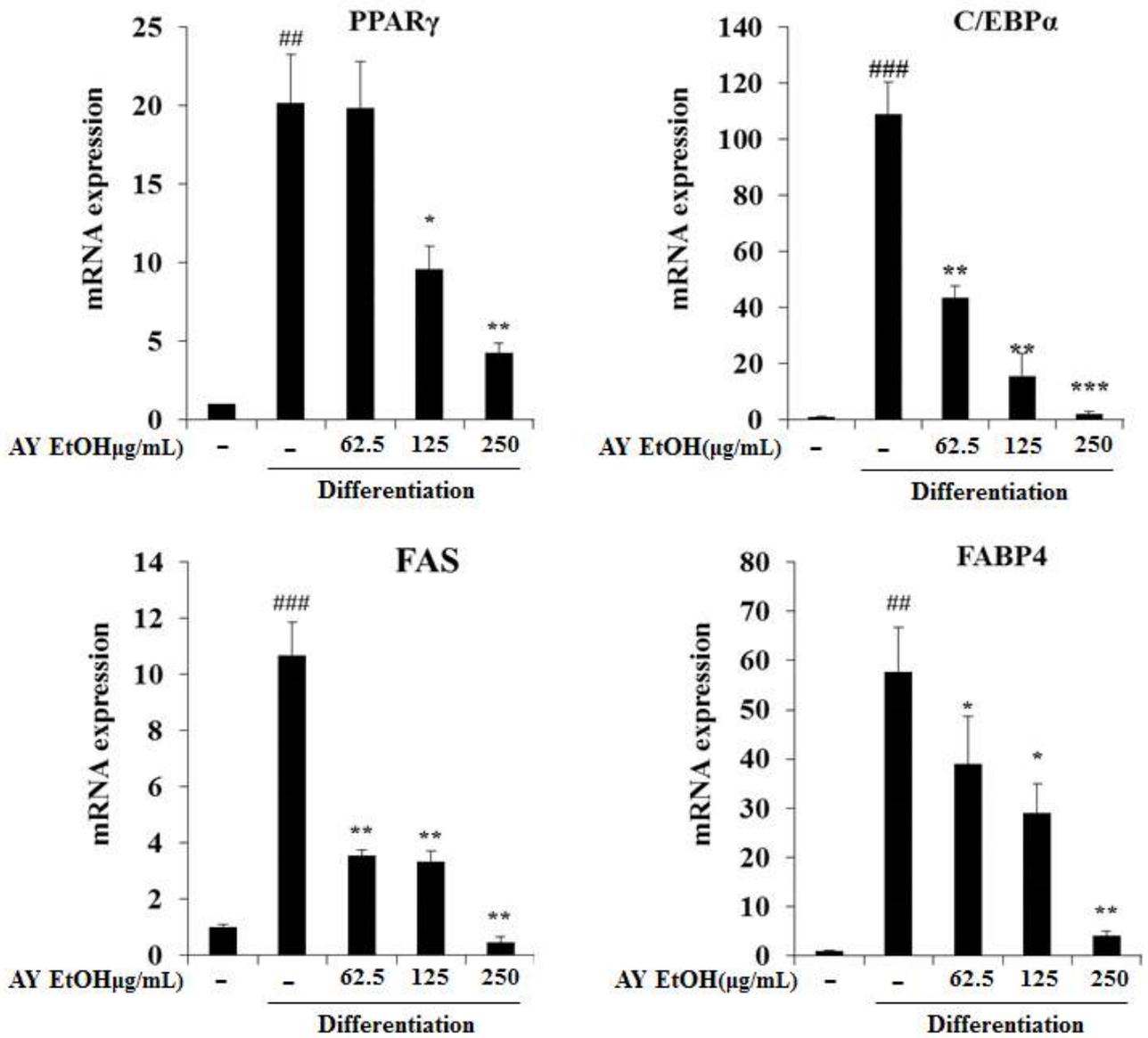


Fig. 5. Effects of AY EtOH extract on adipogenic transcription factors and adipocyte expressed genes expression of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means \pm S.D. and significantly different between groups according to Student' s t test. **p < 0.01, ***p < 0.001 AY treated group versus adipocyte, ###p < 0.05 preadipocyte versus adipocyte.

다. 썬부쟁이 추출물 항염증 생리활성 평가

1) 재료 및 방법

가) 실험 재료

물 추출물 (Water extract), 70% 에탄올 추출물 (EtOH extract)

나) 세포주 및 세포배양

Raw 264.37 세포주는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 10% fetal Bovine serum (FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여, CO₂ 배양기 (MCO-17A1, Sanyo, Osaka, Japan)에서 온도 37°C 조건에서 배양하였다.

다) 세포 독성 평가 (MTS 분석)

물 추출물, 70% 에탄올 추출물과 아카시아 고온 추출물의 RAW 264.7에 대한 세포 독성효과를 측정하기 위해 MTS assay를 실시하였다. 96 well plate에 3×10^5 cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양하였고 10% FBS DMEM 조건에서 시료를 농도별로 처리해 24시간 동안 배양하였다. 그 후 각각 10 μ l의 MTS 용액을 첨가한 후 37°C에서 4시간 동안 배양한 다음 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Mannedrf, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라) Nitiric oxide (NO) 농도 측정

LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 물 추출물 70% 에탄올 추출물과 아카시아 고온 추출물의 NO 생성 억제를 측정하기 위해 시료를 여러 농도로 처리하고 LPS (500 ng/ml)를 24시간 동안 처리 하였다. 그 후 griess reagent system을 이용하여 NO를 측정하였으며, 96 well plate에 세포 배양 상등액과 griess reagent를 1 : 1로 혼합하여 넣고 10분 동안 반응 시킨 후 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Mannedrf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마) Prostaglandin E₂ (PGE₂) 측정

물 추출물, 70% 에탄올 추출물과 아카시아 고온 추출물의 PGE₂ 분비 억제능을 측정하기 위해 ELISA kit를 이용하여 분석하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/ml로 분주하여 배양하였고, 10% FBS DMEM 조건에서 시료를 농도별로 전처리하고 2시간 후에 LPS (500 ng/ml)를 각각 처리한 다음 RAW 264.7 세포를 24시간 배양하였다. 그 후 세포배양 상층액을 취하여 ELISA kit 사용자 매뉴얼에 기재된 방법대로 정량하여 분석하였다.

바) Cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 측정

염증성 사이토카인 생성에 미치는 추출물의 효과를 확인하기 위해 LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 세포를 자극하기 전, 물 추출물, 70% 에탄올 추출물과 아카시아 고온 추출물을 30분 동안 전처리 하였다. LPS로 24시간동안 자극한 뒤 사이토카인 측정을 위해 세포상층액을 이용하여 ELISA kit의 매뉴얼대로 실험을 수행하였다.

2) 결과

가) 추출물이 RAW 264.7 세포주에서 세포생존률에 미치는 영향

물 추출물, 70% 에탄올 추출물의 세포독성에 대해 알아보기 위해 MTS 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 물 추출물과 70% 에탄올 추출물은 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다. (Fig. 1, 2)

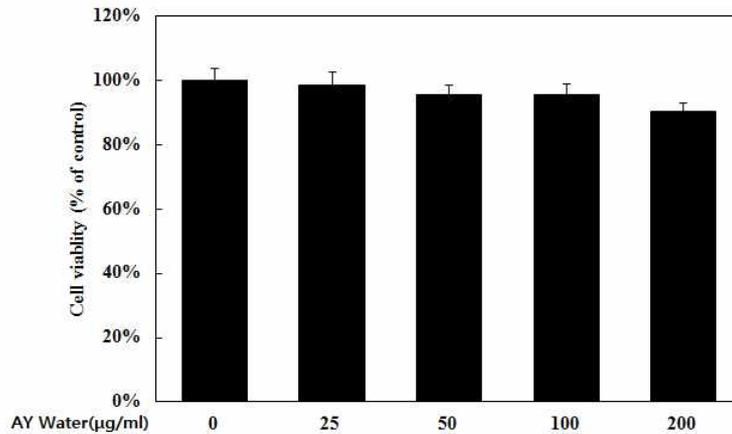


Fig. 1. Effect of Water extract on cell viability in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated for 24 hrs in the presence or absence of water extract indicated dose. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared to the control. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Data represent the mean \pm S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

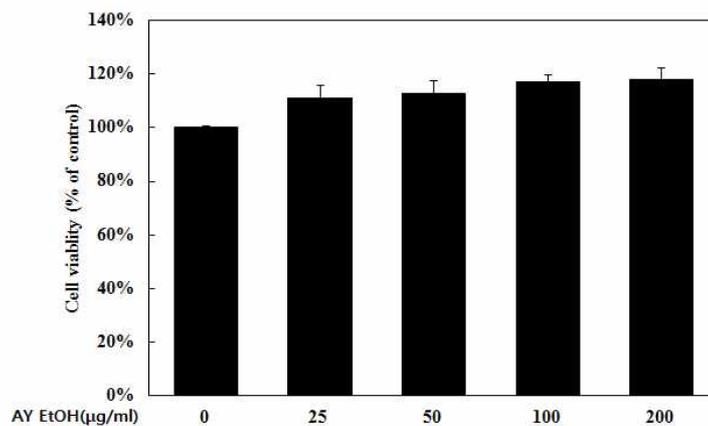


Fig. 2. Effect of EtOH extract on cell viability in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated for 24 hrs in the presence or absence of EtOH extract indicated dose. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared to the control. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Data represent the mean \pm S.D. of triplicate determinations from three separate experiment

나) 추출물의 nitric oxide 생성 억제 효과

물 추출물, 70% 에탄올 추출물이 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 여러 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정했을 뿐만 아니라 추출물은 전처리하고 LPS로 자극하여 24 시간 후에 세포 배양액에서 NO의 생성을 측정하였다. LPS 단독처리군은 LPS 비처리군과 비교하였을 때 NO 생성량이 현저하게 증가하였으며, 각각 추출물을 처리하였을 때 물 추출물과 70% 에탄올 추출물은 농도의존적으로 NO의 생성을 억제하였다. (그림 3, 4).

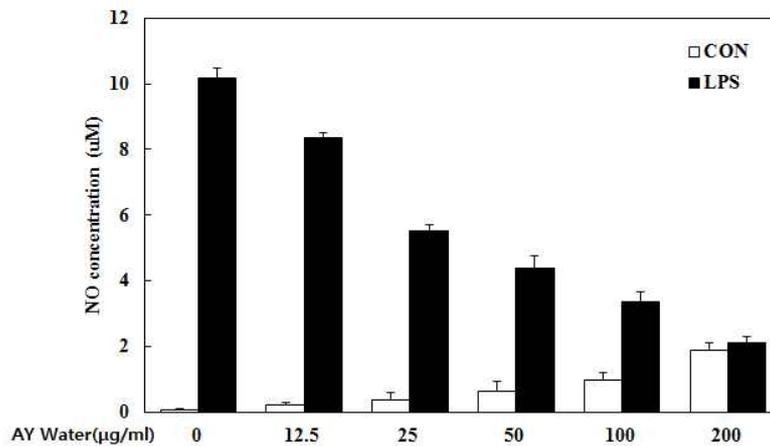


Fig. 3. Effect of Water extract on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of Water extract for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared to the control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ when compared to the LPS alone treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Values shown are the mean \pm S.D. of triplicate determinations from three separate experiments. CON : control, LPS : LPS treated.

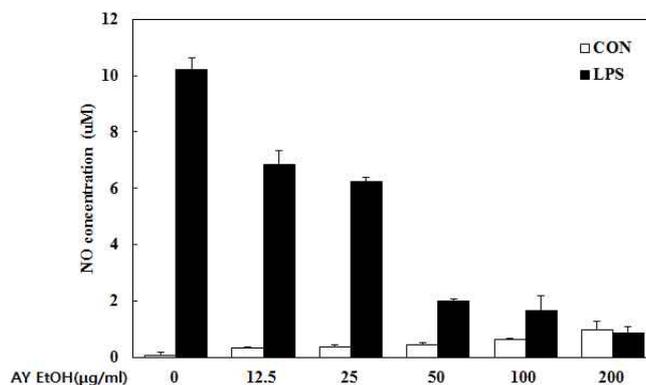


Fig. 4. Effect of EtOH extract on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of EtOH extract for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

0.01 when compared to the control group; #p < 0.05, ##p < 0.01 when compared to the LPS alone treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Values shown are the mean \pm S.D. of triplicate determinations from three separate experiments. CON : control, LPS : LPS treated.

다) 추출물의 Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 효과

물 추출물, 70% 에탄올 추출물이 LPS 자극에 의해 생성되는 PGE₂를 억제 할 수 있는지 조사하기 위해 추출물을 여러 농도로 세포에 전처리하고 LPS로 24시간 동안 자극하였다. 세포 배양액에서 PGE₂의 농도를 측정하였을 때, 각각 추출물은 LPS에 의해 증가된 PGE₂의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 5, 6).

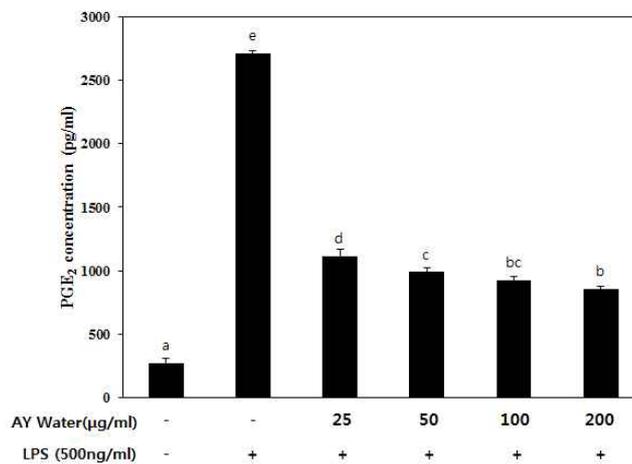


Fig. 5. Effect of Water extract on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of Water extract for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was collected, and the levels of PGE₂ was analyzed using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The values are expressed as the means \pm S.D. abcdeMeans not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test (DMRT) at p < 0.05.

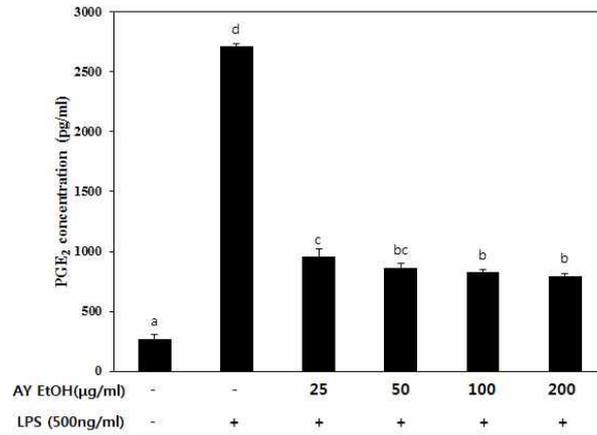
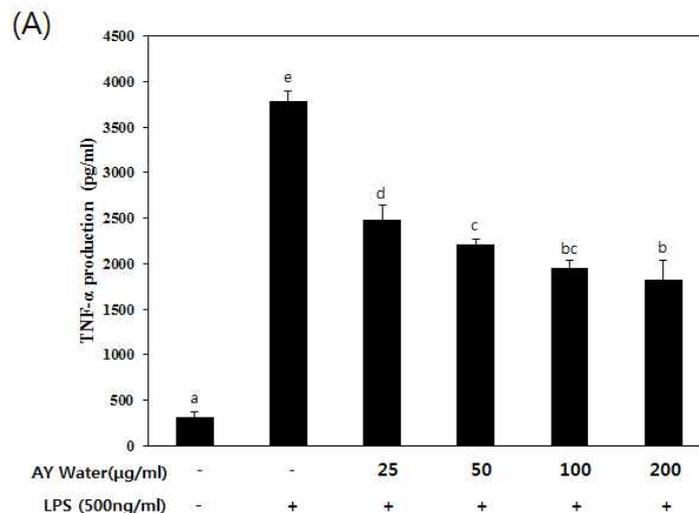


Fig. 6. Effect of Etoh extract on LPS-induced PGE2 production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of Etoh extract for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was collected, and the levels of PGE2 was analyzed using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The values are expressed as the means \pm S.D. abcdMeans not. sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test (DMRT) at $p < 0.05$.

라) 추출물의 염증관련 사이토카인의 생성 억제 효과

물 추출물, 70% 에탄올 추출물이 LPS 자극에 의해 생성되는 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-1 β)을 억제 할 수 있는지 조사하기 위해 추출물을 여러 농도로 세포에 전처리하고 LPS로 24시간 동안 자극하였다. 세포배양액에서 염증성 사이토카인의 농도를 측정하였을 때, 각각 추출물은 LPS에 의해 증가된 염증성 사이토카인의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 7, 8).



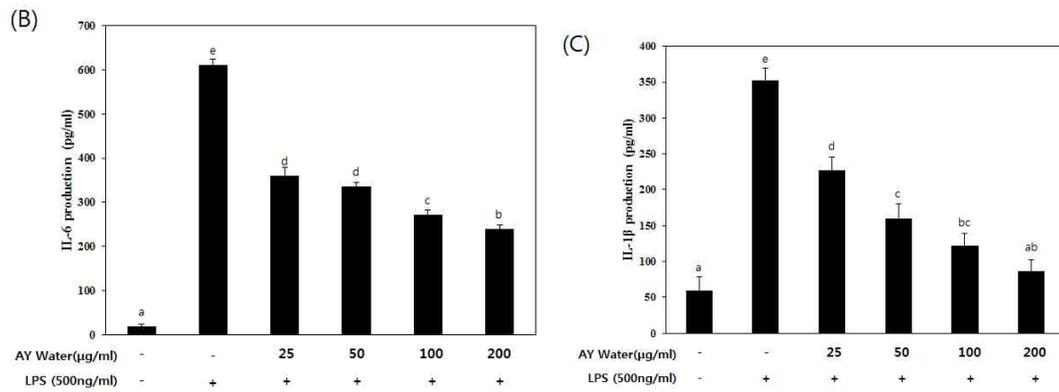


Fig. 7. Effect of Water extract on LPS-induced proinflammatory cytokine production in RAW 264.7 cells (A) TNF- α , (B) IL-6, and (C) IL-1 β .

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of Water extract for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was collected, and the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β were analyzed using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The values are expressed as the means \pm S.D. abcdeMeans not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test (DMRT) at $p < 0.05$.

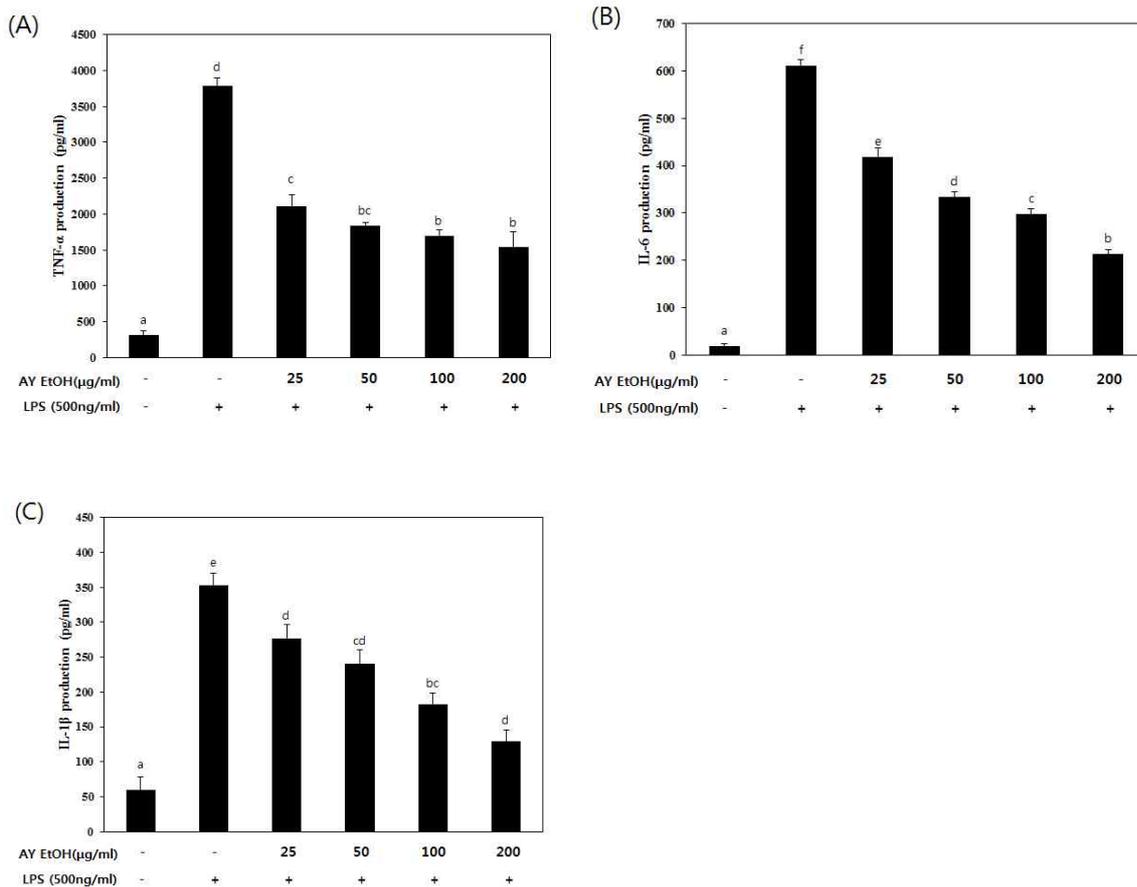


Fig. 8. Effect of Etoh extract on LPS-induced proinflammatory cytokine production in RAW 264.7 cells (A) TNF- α , (B) IL-6, and (C) IL-1 β .

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of Etoh extract for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was collected, and the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β were analyzed using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The values are expressed as the means \pm S.D. abcdefMeans not. sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test (DMRT) at $p < 0.05$.

라. 쉑부쟁이 추출물 비만 및 항염증 in vivo 및 분획물 생리활성 평가

1. 재료 및 방법

1) 시료추출 및 제조

실험에 사용한 쉑부쟁이는 구례삼촌에서 구입하였다. 쉑부쟁이를 건조 한 후 건조된 쉑부쟁이 1Kg당 20L용량의 70% 발효주정을 첨가하여 80 $^{\circ}$ C 3시간 동안 3회 추출한 후 여과하여 불순물을 제거하였다. 추출한 시료는 Freeze dry(PVTFD20R, 일신랩(주), 대한민국)를 사용하여 동결건조(Ilshin, Korea) 시킨 후 실험 시료로 사용하였다.

2) 세포배양 및 분화유도

실험에 사용한 3T3-L1 세포는 마우스 지방전구세포로 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 10% new born calf serum(NBCS, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)과 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin(Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)이 함유된 DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 그 외 시약은 Sigma에서 구입하였다. 세포가 confluence 상태가 되면 10% FBS-DMEM에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), 0.25 mM dexamethasone, 10 μ g/ml insulin 이 첨가된 배지를 처리하여 분화를 2일간 유도 한 뒤 다시 2일간 10% FBS-DMEM에 10 μ g/ml insulin이 첨가된 배지로 교체해주었다. 그 후 2일마다 10% FBS-DMEM 배지로 교체하였다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다. RAW 264.7 세포주는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM (Thermo, Waltham, MA, USA)에 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였고. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고 유지하였다.

3) 세포독성 실험

본 실험에 사용한 쉑부쟁이 70%EtoH 추출물이 지방세포에 독성을 나타내는지를 측정하기 위하여 MTS assay를 수행 하였다. 3T3-L1 preadipocyte를 96 well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하였으며, 10% NBCS가 함유된 DMEM을 넣어 well당 최종 용적을 100 μ L로 하였다. 24시간 동안 배양한 후 추출물을 각각의 농도별로(0, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml) 처리하여 48

시간 동안 배양하였다. 그 후의 각각 세포 배양액 용량의 1/10배의 MTS 용해액을 첨가한 후 37°C에서 2시간 배양한 후 ELISA microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Oil-red O 염색

앞의 과정을 거친 다음 배지를 제거해서 pH 7.4 PBS로 세척하고 10% formalin 용액으로 2시간 동안 고정한 이후, 고정액 제거 후 다시 PBS로 5회 세척하였다. 완전히 건조시킨 후 Oil red O 염색액(Oil red O staining kit, sciencell, CA, USA)을 처리하여 15분간 상온에서 염색하고, 염색액을 제거한 후 물로 5회 세척 한 다음 Microscope(Nikon TS100, Tokyo, Japan)로 관찰하였다. 또한, 흡광도 측정을 위하여 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용출 시켜 ELISA microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 실험동물 디자인 및 실험식이 조성

실험동물은 6주령 된 C57BL/6 마우스를 샘타코(SAMTAKO, Korea, Osan)로부터 구입하였다. 마우스는 1주간 고형식으로 적응시킨 후 난피법에 의하여 일반식이군(Normal)과 고지방식이군으로 나누어서 5주간 사육하였다. 그 뒤, 고지방군은 다시 난피법에 의하여 고지방대조군(HF), 고지방-췌부쟁이(100mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg)군으로 나누어 4주간 사육하였다. 동물사육실의 환경은 항온($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 항습($50 \pm 5\%$). 12시간 간격(08:00~20:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하고 동물들은 폴리카보네이트 사육상자에 5 마리씩 분리하여 사육하였다.

본 실험에 사용한 45Kcal% fat whit 1.25% cholesterol 고지방 식이는 RESEARCH DIETS (RESEARCH DIETS, New Jersey, USA)로부터 구입하여서 제공하였으며, 물과 식이는 제한 없이 섭취하도록 하였고 체중은 매주 1회 일정시각에 측정하였으며, 식이섭취량은 매일 일정시각에 공급량에서 잔량을 감하였다.

6) 혈청 및 장기 채취

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후 안와정맥채혈을 통해 공복혈액을 채취하였다. 혈액은 $3000 \times g$ (4°C)에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 실험동물의 장기조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 phosphate buffered saline(PBS)용액으로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거하여 칭량하였으며, 일부분을 잘라 -70°C 에 보관하고, 나머지 부분을 Formalin solution, neutral bufferd, 10% 용액에 넣어 보관 하였다.

7) 간 및 지방조직 세포 형태학적 분석(H&E)

Formalin solution, neutral bufferd, 10% 용액에 넣어 보관한 장기들은 H&E(Hematoxylin and Eosin) stain을 하였다. H&E stain을 한 장기조직은 Microscope(Nikon Coolscope2, Tokyo, Japan)로 관찰 하였다.

8) 혈청 지질 함량 분석

혈청 중의 total cholesterol(TC), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C), triacylglycerol(TG)은 kit(Asan Pharm, korea)를 이용하여 분석을 하였다.

9) NO (nitric oxide) 농도 측정

LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 각 추출물의 NO 생성 억제효과를 측정하기 위해 치료를 여러농도 전처리한 뒤 LPS (500 ng/ml)를 24시간동안 처리하였다. 그 후 griess reagent system (Promega, Fitchburg, WI, USA)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라서 수행하였다. RAW 264.7 세포주를 96 well plate에 2×10^5 cells/ml 농도가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% 배양기에서 24시간 배양한 후 추출물을 각각 100, 200, 300, 400 그리고 500 μ g/ml 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 세포배양액과 griess reagent를 1 : 1 비율로 혼합하여 넣고 10분 동안 반응시킨 다음 microplate reader Infinite® 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 통계처리(V)

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 \pm 표준편차(mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS(18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 동물실험은 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

2. 결과

1) 3T3-L1 preadipocyte의 증식에 미치는 쑥부쟁이 70%EtoH 추출물의 영향

쑥부쟁이가 3T3-L1 preadipocyte의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 0 ~ 500 μ g/mL 농도의 쑥부쟁이 70%EtoH 추출물(AE-E70)을 48시간 동안 처리한 다음 MTS assay를 실시한 결과는 Fig. 1. 에 나타내었다. 결과에서 볼 수 있듯이 모든 농도에서 세포 증식억제효과가 나타나지 않았다.

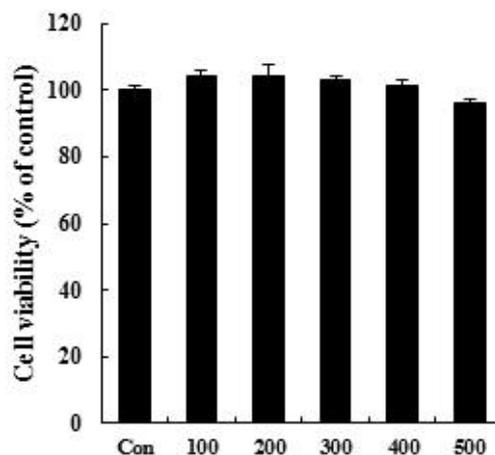


Fig. 1. Effects of AY-E70 on the cell growth in 3T3-L1 preadipocytes. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control \pm SD of three separate experiments

2) Lipid droplet 생성에 미치는 AY-E70의 영향

Lipid droplet은 소포체의 이중막 사이에 triglyceride와 cholesterol ester가 축적되어 층이 나누어지기 시작하면서 만들어지며, 지방이 점점 더 축적되면 ‘lens’ 구조가 나타나게 되고 lipid droplet이 소포체에서 떨어져 나오게 된다고 알려져 있다. 이렇게 생성된 lipid droplet은 phospholipid monolayer와 관련 단백질에 둘러싸여 있는 비활성 소낭으로서 precursor fibroblast에서부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나며, PPAR γ 와 같은 중요한 adipogenic transcription factors에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다. 이러한 lipid droplet은 비만유발뿐만 아니라 고지혈증, 동맥경화 및 제2형 당뇨병 등과 같은 대사성 질환에도 관련성이 크다고 보고되고 있다. 따라서 AY-E70이 3T3-L1 preadipocytes가 adipocytes로 분화되는 과정에 나타나는 lipid droplet 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 Oil red O 염색을 하여 세포 내 lipid droplet의 생성 정도를 도립 현미경으로 관찰하였다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 AY-E70을 처리하지 않고 분화를 유도하였을 경우에 세포질 내 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되는 것으로 관찰되었으나, AY-E70을 처리하였을 경우에는 처리농도 의존적으로 lipid droplet의 형성이 현저하게 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 AY-E70은 3T3-L1 preadipocytes에서 adipocytes로의 분화를 억제한다는 것을 알 수 있었다.

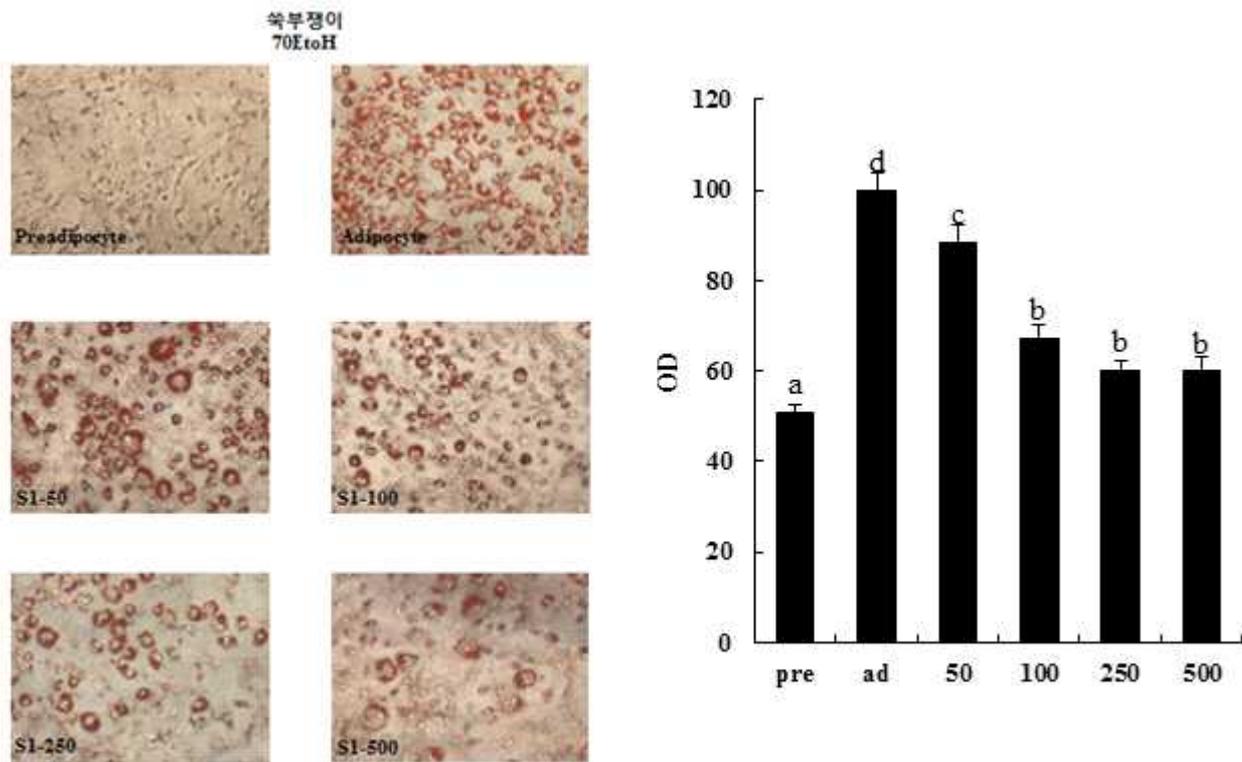


Fig. 2. Effects of AY-E70 on lipid droplet accumulation of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means \pm S.D. Significant differences were compared with the control at $p < 0.001$ by Student's t-test.

3) 고지방식이로 유도된 비만 모델의 장기조직 세포에 미치는 AY-E70의 영향

AY-E70의 섭취가 mouse의 지질대사 조절 기관에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 간 조직의 H&E (Hematoxylin and Eosin)staining을 진행하였다(Fig.4). 실험 결과 정상식이군 의 간 조직에 비해 고지방식이군 (HF)의 간 조직에서 더 크고 많은 lipiddroplet의 흔적들을 확인할 수 있었다. 이들은 비만으로 인하여 간에 축적된 droplet으로, HF군과 비교하여 AY-E70을 투여한 군의 간에서 감소하였고 특히 500F 에서는 droplet이 현저하게 감소한 것 을 확인했다. 간 조직은 탄수화물로부터 지방산 합성과 지질의 흡수,저장,방출 등과 같은 중추적인 역할을 하여 혈중 지질함량과 지방산 대사를 조절한다. 간의 중성지질 함량은 고지방식이의 섭취에 의해 증가하며,특히 동물성 고지방식이의 경우 중성지질의 함량이 현저히 증가한다는 보고가 있다. 간의 조직학적 변화로 포화지방산을 대량 포함하고 있는 콜레스테롤의 함량이 높은 고지방사료를 섭취시킨 HF군의 간은 지방의 축적이 광범위하고 명확하게 관찰되었으나, AY-E70의 투여에 의해 지방축적의 감소를 보여 AY-E70이 간조직의 재생과 지방의 배출효과가 있음을 확인하였다. 부고환지방 조직에서도 HF군의 지방세포 크기가 일반식이군의 지방세포 크기보다 큰 것을 확인 할 수 있다. AY-E70를 투여한 경우 지방세포의 크기가 감소하는 것을 확인했다. 이를 통해 AY-E70의 투여는 체내 지질 대사에 긍정적인 효과를 미쳤을 것이라 사료된다.

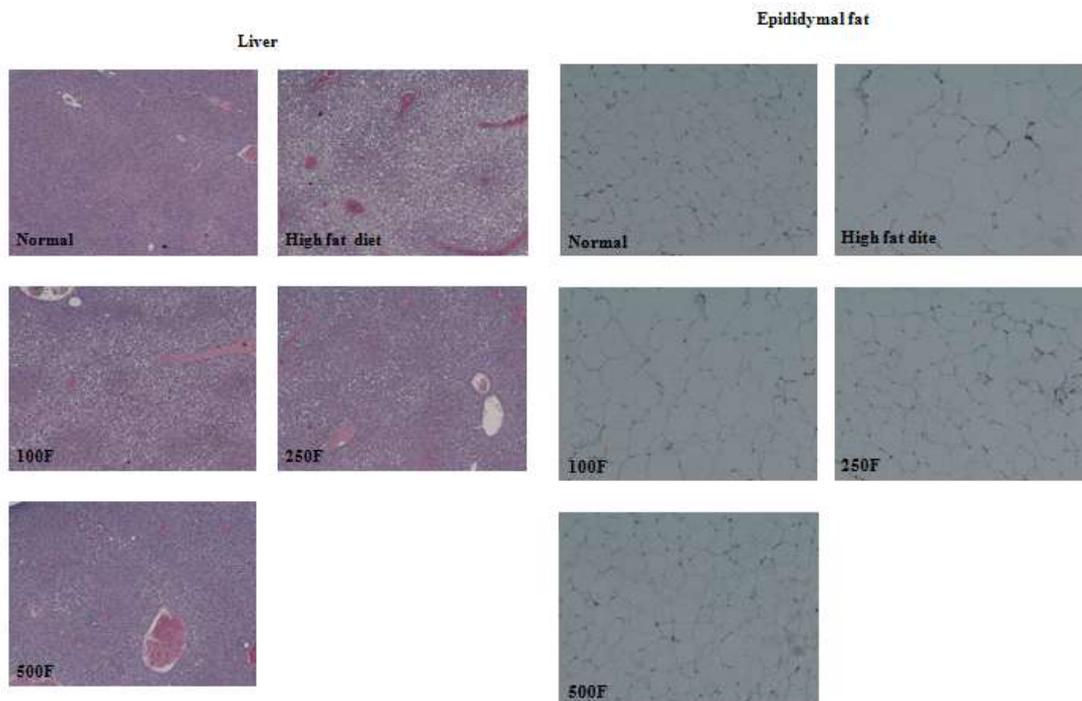


Fig. 3. Histologic Observations of Hepatic and Epididymal Adipose Tissues in HY-E70 Treated HF-Induced Mice Hematoxylin and eosin (H & E) staining ($\times 100$).

4) 고지방식으로 유도된 비만모델에서 혈중 지질함량 및 혈중 콜레스테롤 수치에 미치는 AY-E70의 영향

혈액내의 지질 농도 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. 혈청 내 TG함량은 고지방식이에 의해 가장 큰 영향을 받는데 고지방식이만을 섭취한 HF군에 비해 500F에서 혈청 TG 함량이 유의적으로 감소하였다. HDL 콜레스테롤은 혈액 중의 동맥경화를 일으키는 저분자 콜레스테롤을 제거하여 간으로 이동시키는 역할을 하는 좋은 콜레스테롤로 알려져 있다. 본 연구에서는, HDL-C의 함량은 HF군과 시료 섭취군에서는 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 AY-E70섭취가 전체 콜레스테롤 중 HDL-C의 비율을 증가함으로써 HV 추출물 섭취가 혈중 콜레스테롤 농도 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 결과적으로 AY-E70의 섭취는 전체 콜레스테롤 중 HDL-C의 비율을 증가시키고 TG함량을 낮춤으로서 고지방식으로 유도된 고지혈증에 개선에 효능이 있는 것으로 판단된다.

Table 1. Effect of AY-E70 on plasma biomarkers in mice fed a high-fat-diet.

	Normal	HF	100F	250F	500F
TG (mg/dL)	113.3±11.98	143.11±3.96	133.31±5.41	133.44±3.12	123.76±2.53
TC (mg/dL)	151.81±9.65	222.91±20.18	206.8±0.22	179.64±5.37	169.54±28.67
HDL-C (mg/dL)	75.18±2.42	117.24±1.19	116.51±3.55	112.58±7.88	114.06±9.71

Mean ± SD. Means not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test at p < 0.05.

5) 고지방식으로 유도된 비만 모델에서 체중에 미치는 AY-E70의 영향

체중 변화 및 체중 감소량에 대한 결과는 Fig. 4.에 나타내었다. 고지방식이를 섭취한군은 정상식이군에 비해 유의적으로 체중증가가 유도되었으며, AY-E70를 섭취한 군에서 체중이 감소하는 경향을 나타냈다. AY-E70의 섭취는 고지방식으로 유도된 비만 모델에서 체중을 감소함으로써 비만에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

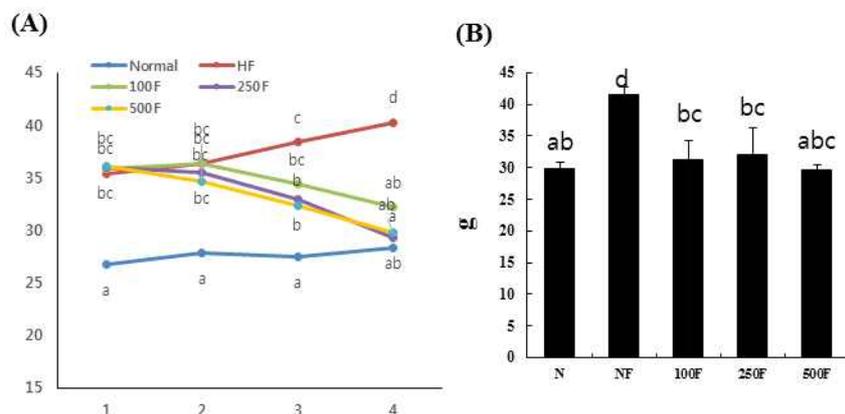


Fig. 4. Effects of AY-E70 on body weight change (A) and body weight loss (B) in mice fed a high-fat-diet. The values are expressed as the means \pm S.E. abcdMeans not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test at $p < 0.05$.

6) 고지방식이로 유도된 비만 모델에서 간 및 부고환지방에 미치는 AY-E70의 영향

고지방식이 섭취는 간에 중성지방 및 콜레스테롤 등의 축적을 일으켜 간 중량을 증가시킨다. 본 실험 결과에서 간 무게는 고지방 식이의 영향으로 HF군이 Normal군에 비하여 유의적으로 증가하였으며, 이는 고지방식이에 의해 간 내에 콜레스테롤 및 중성지방등이 축적 된 것으로 사료된다. AY-E70의 섭취에 따라서는 간 무게가 모든 섭취군 에서 유의적으로 감소하였다. 고지방식이의 섭취로 인한 지방조직의 중량 증가는 지방조직에 중성지방이 축적되어 발생하며 복부지방 함량이 증가할수록 대사성 질환 위험 역시 증가된다고 알려져 있다. 중성지방의 저장 고인 부고환 지방조직의 무게를 살펴보면 정상군에 비하여 HF군이 유의적으로 증가하였으며, AY-E70 섭취군 에서는 모든 섭취군이 유의적으로 감소하였다.

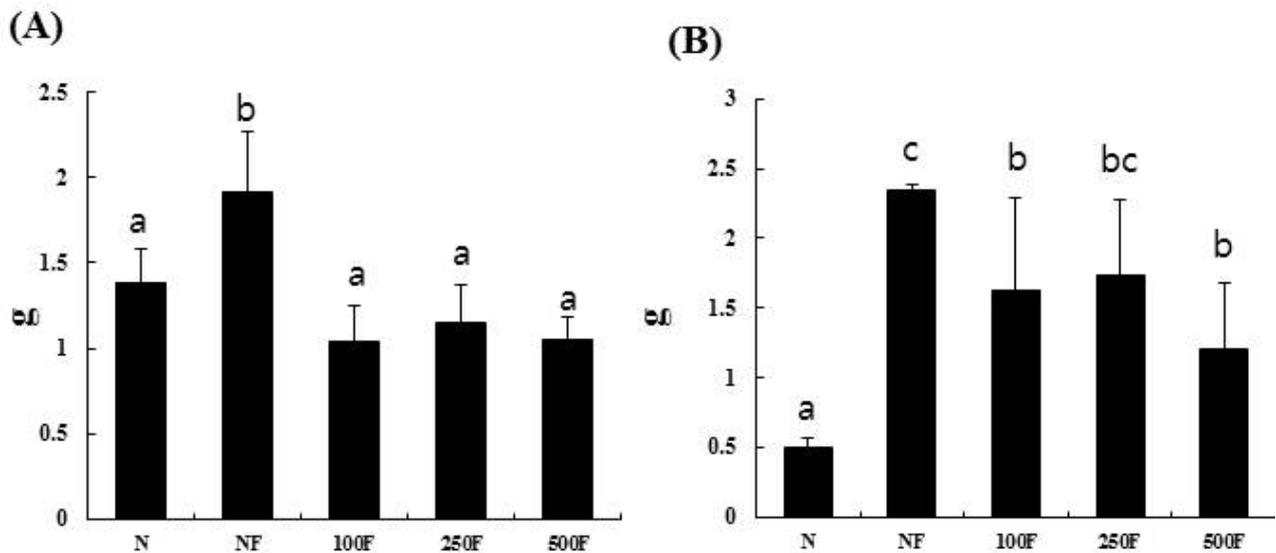


Fig. 5. Effects of AY-E70 on liver weight (A) and epididymal fat weight (B) in mice fed a high-fat-diet. The values are expressed as the means \pm S.E. abcMeans not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test at $p < 0.05$.

7) Adipogenic transcription factors 및 adipocyte expressed genes의 발현에 미치는 AY-E70의 영향

Adipogenesis의 핵심 조절자로 불리는 PPAR γ 는 서로 상호작용하여 상승 효과를 나타내어 최종적으로 분화과정을 완성하게 되며, 그 결과로 백색지방세포에서 나타나는 lipid droplet 생성 및 triglyceride의 축적과 함께 세포의 크기 증가 등과 같은 형태적 특징과 같은 adipocyte expressed genes의 발현을 유발함으로써 지방세포의 특징을 지니게 된다. 먼저 adipogenic transcription factors의 발현 정도를 확인한 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 분화를 유발하였을

경우 PPAR γ 의 발현이 현저하게 증가하였지만 HV 처리에 의하여 농도 의존적인 감소가 유발되었다. 또한 adipocyte expressed genes인 FAS 경우에도 Fig. 6 에서와 같이 HV 처리에 의하여 현저하게 감소하였음을 확인하였다. 이상의 결과를 살펴볼 때 HV는 adipogenic transcription factors의 발현을 억제함으로써 lipid droplet 및 triglyceride 생성 감소와 함께 adipocyte expressed genes의 발현을 감소시킴으로써 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있을 것으로 추정된다.

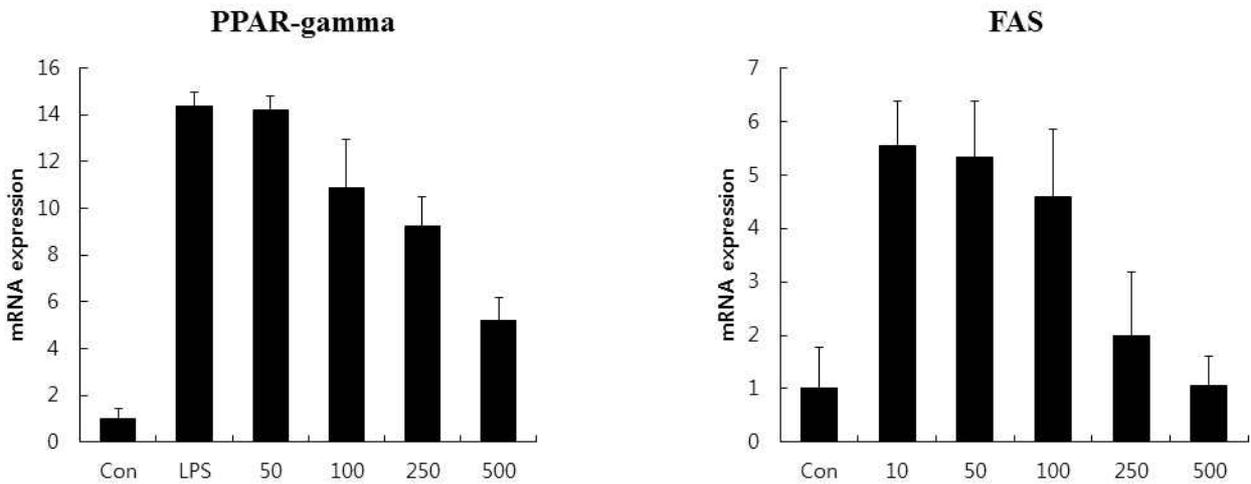


Fig. 6. Effects of AY-E70 on adipogenic transcription factors and adipocyte expressed genes expression of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means \pm S.D. Significant differences were compared with the control at *** $p < 0.001$ by Student's t-test.

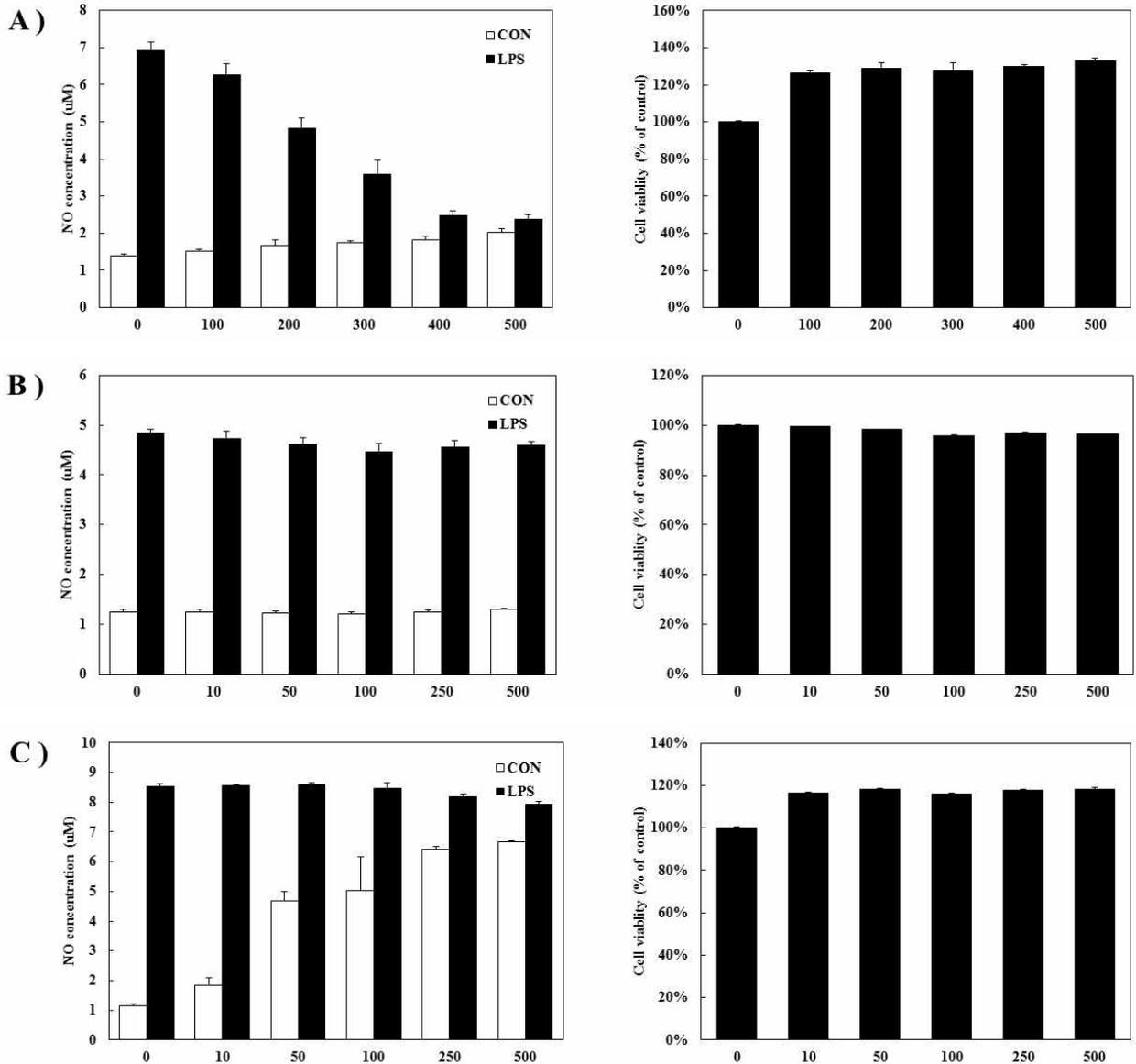
8) AY-E70의 nitric oxide (NO)생성 억제효과

각각 추출물이 LPS 자극에 의해 증가되는 nitric oxide 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 NO assay를 진행하였다. 추출물들을 각각 100, 200, 300, 400 그리고 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 전처리 한 뒤 LPS를 500 ng/ml 의 농도로 24시간 동안 처리하였다. LPS 단독 처리군은 비처리군에 비교하여 NO 생성량이 각각 실험에서 유의적으로 증가하였다.

AY-E70을 투여한 처리군에서 LPS 단독 처리군에 비하여 눈에 띄게 감소하는 것이 보여진다. 이에 생리활성을 보이는 물질을 찾기위해 ACN(Acetonitrile)을 사용해 %별로 분리정제 하여 재 실험을 진행하였다. 저농도에서도 활성을 보기위해 전처리 시 농도는 10, 50, 100, 250 그리고 500 $\mu\text{g/ml}$ 으로 설정하였다. B(ACN 3~11%),C(ACN 11~22%)에서는 NO 생성량이 LPS 단독 처리군에 비해 거의 감소하지 않았다. (Fig. 7-B,C). D(ACN 22~36%)에서는 LPS 단독 처리군의 NO 생성량이 약간 감소하였으나 LPS를 처리하지 않은 군에서도 NO의 발현이 점차적으로 증가하였다.(Fig. 7-D) E(ACN 36~68%),F(ACN 68~100%)에서는 추출물 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 군에서 세포 독성이 나타났으며 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 농도의존적으로 NO생성량을 감소시킨 결과를 확인하였다 (Fig. 7-E,F). G(ACN 100%)에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포독성이 나타났으며 10 그리고 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 NO생성이 유의적으로 감소하였다.(Fig. 7-G) 결과를 종합하였을 때 E,F에서 NO 생성 억제효과가 가장 많이 나타났으며, 그 중 E가 F에 비해 NO 생성 억제효과가 좀 더 높은

것으로 확인되었다.

NO는 작은 분자량은 가지는 free radical (유리기)이며, 신경전달과 혈압을 조절할 수 있는 등 인체에서 중요한 역할을 한다. 또한 세포독성을 가지기 때문에 염증반응이 일어날 때 숙주방어 기전에서 세포독성에 관여하는 매개체로 알려져 있다 (Kim and Kim, 2002). 따라서 NO의 억제는 염증반응을 억제 할 수 있는 것으로, 쑥부쟁이 에탄올 추출물이 항염증 활성을 가지고 있다고 생각된다. 하지만 이는 RAW 264.7 세포주 내에 NO 생성량만을 확인한 결과로, 세포내에서 NO 생성에 관여하는 NOS (nitric oxide synthase)의 단백질 또는 mRNA 발현량을 확인하여 어떤 과정에서 NO 생성을 억제하는지 알아보는 추가 실험이 필요하다고 생각된다.



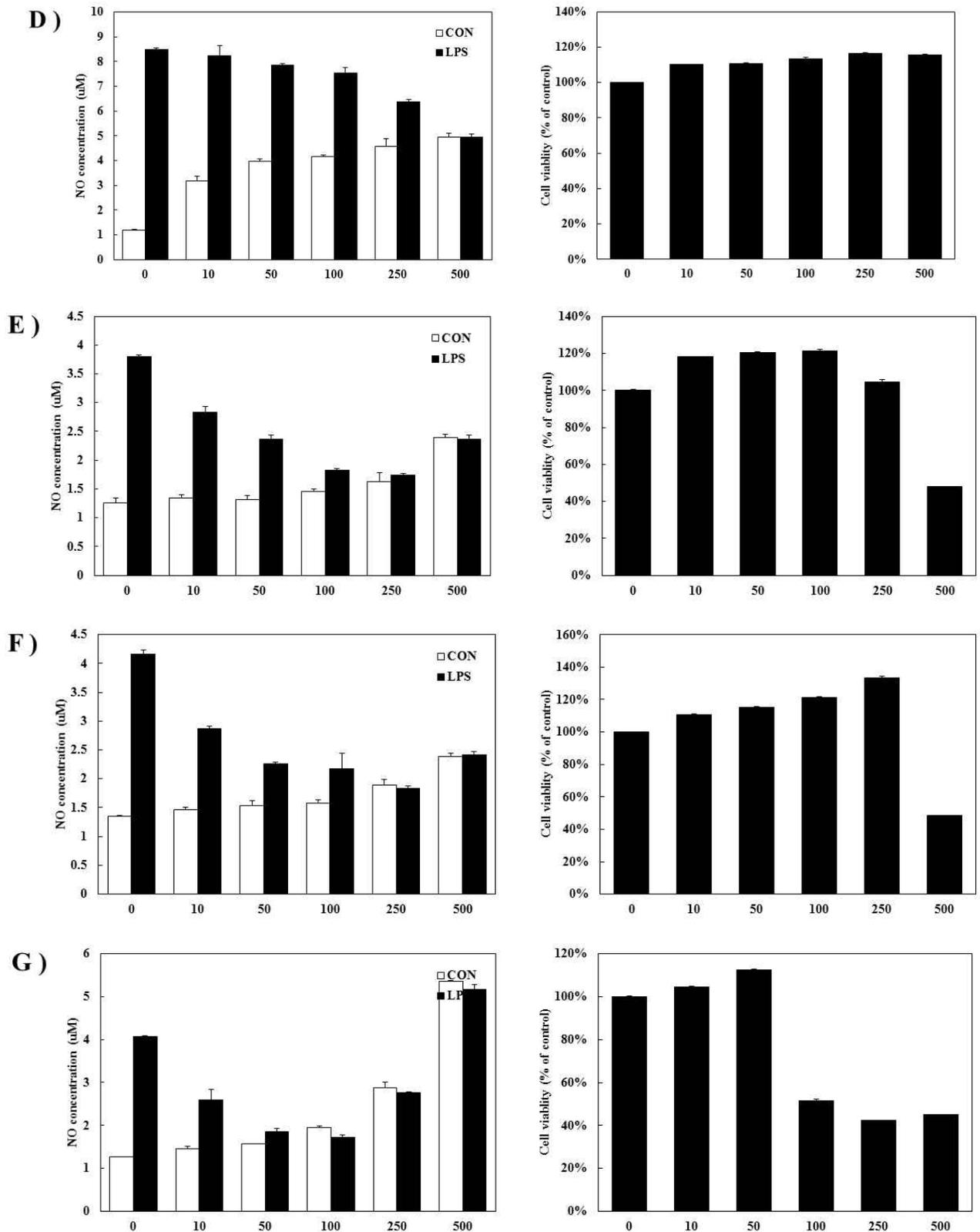
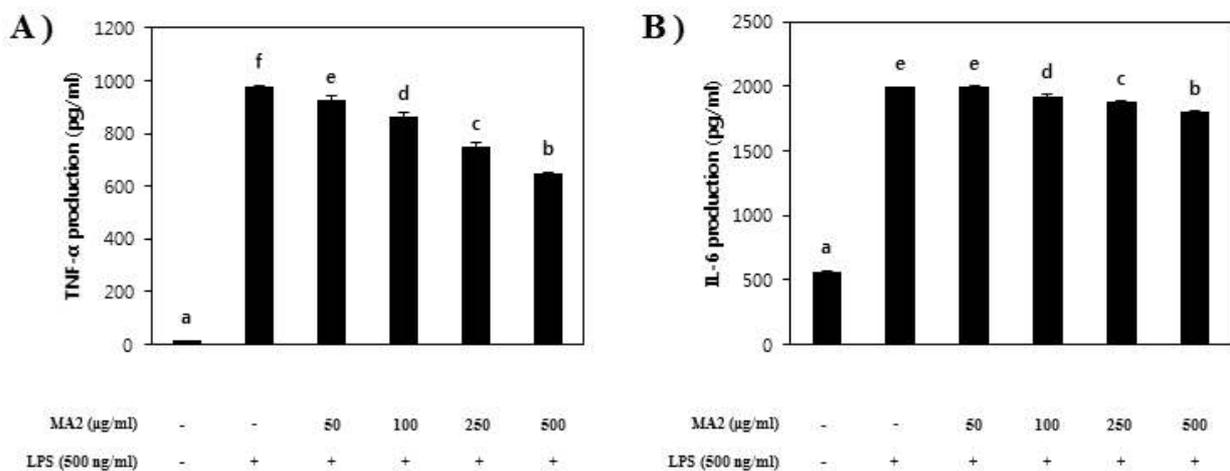


Fig. 7. Effect of extracts on LPS-stimulated NO production in RAW 264.7 cells / Cytotoxic evaluation of extracts in RAW 264.7 cells. After pretreatment with 500 ng/ml LPS (lipopolysaccharide) for 30 min, RAW 264.7 cells were treated with various concentration of

extract for 24 h. Culture medium was subjected to NO assay. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. *Means with difference letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. RAW 264.7 cells were treated with extracts for various concentration. Cell viability was measured by MTS assay. Means values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means with difference letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

9) AY-E70의 Cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 억제효과

다음으로 NO 생성 억제효과가 높게 나타났던 쪽부쟁이 에탄올 추출물이 염증매개인자 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 TNF- α , IL-6, IL-1 β 에 대한 ELISA assay를 진행하였다. 추출물들을 각각 50, 100, 250 그리고 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 전처리 한 뒤 LPS를 500 ng/ml 의 농도로 24시간 동안 처리하였다. TNF- α 의 농도는 LPS 단독 처리군은 비처리군에 비교하여 979.06 ± 3.98 pg/ml 의 농도로 증가하였지만 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 AY-E70을 처리하였을 때 650.17 ± 3.25 pg/ml 로 감소하였다 (Fig. 6A). IL-6 ELISA assay에서 LPS 단독 처리군은 IL-6 생성이 1990.38 ± 10.79 pg/ml 로 증가되었지만 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 AY-E70을 처리하였을 때 1804.13 ± 27.46 pg/ml 의 농도로 감소되었다 (Fig. 6B). 다음으로 IL-1 β 생성을 확인해본 결과, LPS 단독 처리군은 생성량이 288.28 ± 14.84 pg/ml 으로 증가되었지만 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 AY-E70을 처리하였을 때 220.38 ± 3.67 pg/ml 의 농도로 감소되었다 (Fig. 6C). 결과를 종합하자면 500 ng/ml LPS 처리에 의해 증가된 IL-6, IL-1 β 의 경우 감소된 정도가 미약했으나, TNF- α 의 생성은 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 AY-E70을 처리했을 때 눈에 보이게 감소되었다. 이에 TNF- α , IL-6 그리고 IL-1 β 의 발현을 조절하는 전사인자 (transcription factor)인 NF- κ B (nuclear factor kappaB)의 단백질 또는 mRNA 발현량과 NF- κ B의 핵내 이동 (nuclear translocation)을 확인하는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.



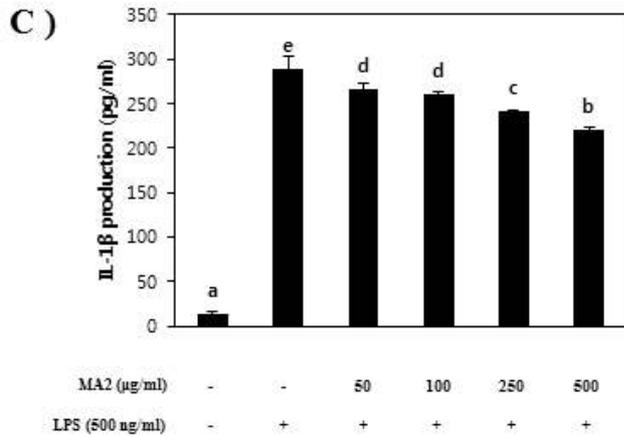


Fig. 8. AY-E70 reduced LPS-stimulated cytokine production in RAW 264.7 cells. After pretreatment with 500 ng/ml LPS (lipopolysaccharide) for 30 min, RAW 264.7 cells were treated with various concentration of extract for 24 h. Culture medium was subjected to ELISA assay. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. *Means with difference letters are significantly different at $p < 0.05$ b'y duncan's multiple range test.

마. 원료에 대한 기준규격 및 지표물질 밸리데이션

1. 쑥부쟁이 추출법 확립

에탄올 70% 주정 용매를 7리터를 사용하여 3시간에 걸쳐 4회 반복 추출한 추출물 2.5 Kg을 HP-20 open column을 사용하여 쑥부쟁이 추출물(AY50) 성분 균일화를 위한 대용량 추출법을 표준화하였다.

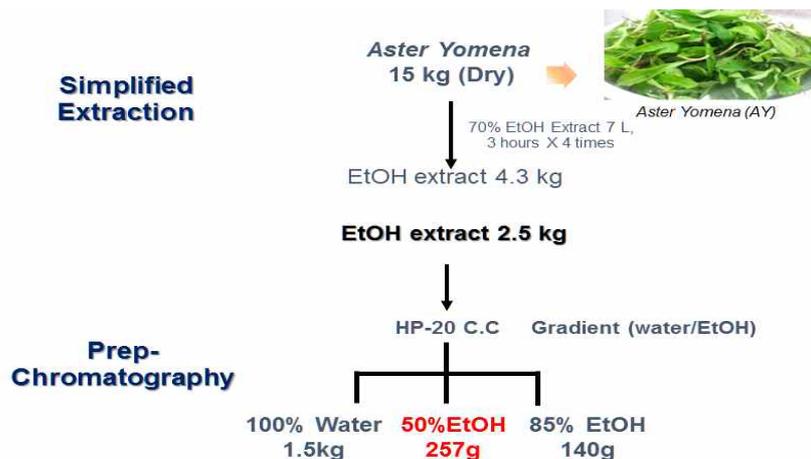


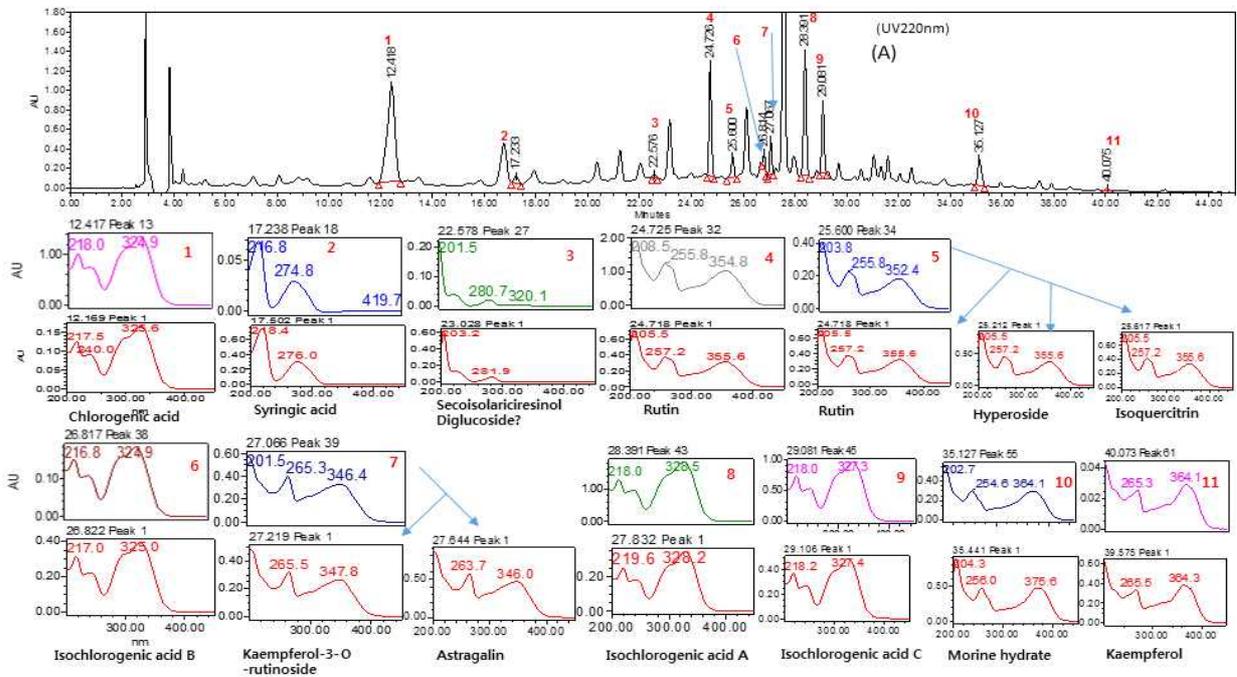
Fig 1. 쑥부쟁이 추출 방법 및 조건 확립

2. LC-PDA-MS 방법으로 지표물질 선정

(1) LC retention time 과 UV spectrum을 이용한 AY50 구성 Known 성분확인

LC분석조건을 확립하고, PDA 검출기로 UV-Vis 스펙트럼을 기록하여, 기존의 UV-Vis spectrum과 retention time 값 library를 비교하여 추출물 구성 성분을 예측하였다.

Fig 2. 쑥부쟁이 각 성분별 UV 파장 (1) Chlorogenic acid, (2) Syringic acid, (3) Secoisolariciresinol



Diglucoside, (4) Rutin, (5) Hyperoside, Isoquercitrin, (6) Isochlorogenic acid B, (7) Kaempferol-3-O-rutinoside, Astragalinal (8) Isochlorogenic acid A (9) Isochlorogenic acid C, (10) Morine, (11) Kaempferol

(2) LCMS 분석을 통하여 LCPDA 예상 지표 성분 분자량 확인

UV-Vis spectrum과 retention time 값으로 예상되었던 구성 성분을 표준품을 구입하여 표준품에 대한 LCMS 실험을 통해 retention time과 분자량 값을 얻어 확인하였다. 예측된 쑥부쟁이 추출물(AY50)의 구성 성분이 대부분 LCMS를 통하여 일치함을 확인하였다.

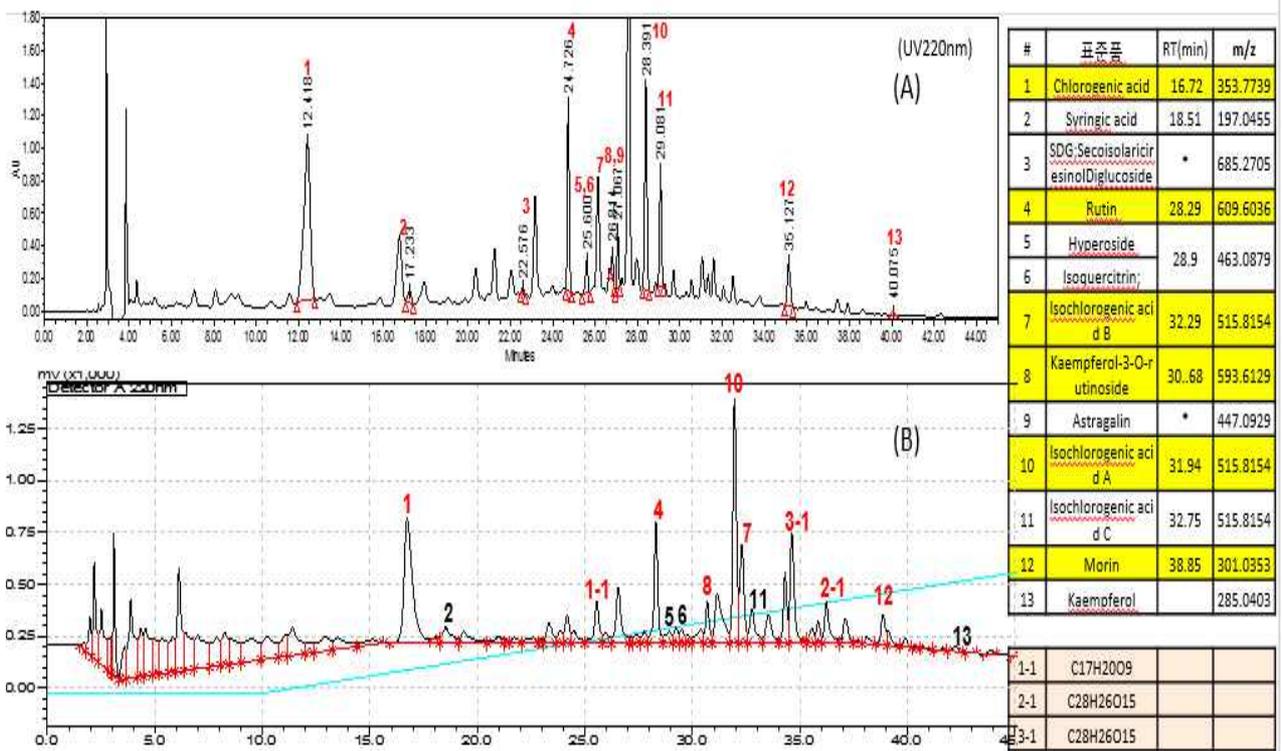


Fig 3. 쑥부쟁이 추출물 (A) LCPDA chromatogram, (B) LCMS chromatogram.

A 분석조건		B 분석조건	
기기	Waters e2695 separation module, 2998	기기	SHIMADZU HPLC
컬럼	Phenomenex Luna C18(2), 250×4.6mm, 5µm	컬럼	Phenomenex Luna C18(2), 250×4.6mm, 5µm
컬럼온도	40°C	컬럼온도	40°C
주입량	20µℓ	주입량	20µℓ
유속	1 mL/min	유속	1 mL/min
이동상	A) 0.1% trifluoroacetic acid in water B) Acetonitrile	이동상	A) 0.1% Formic acid in water B) Acetonitrile

Fig 4. 쪽부쟁이 추출물 (A) LCPDA 실험 조건, (B) LCMS 조건.

3.. LCMSMS 분석을 통한 지표물질 함량 분석

(1) LCMS를 이용한 지표물질 표준품과 추출물에 포함된 지표 물질 정성 분석

표준용액의 지표물질 2 종간에 상대적인 량을 측정하기 위하여 LCMSMS 조각이온 크로마토그램을 작성하였을 때, 다른 지표물질로 부터 간섭 등의 영향이 없음을 확인하였다. 시험용액에서 2종의 지표물질들의 LCMSMS 조각이온 크로마토그램을 작성하였을 때, 해당 성분에 대한 머무름시간 및 크로마토그램의 패턴들이 각 성분들이 서로 간섭없이 정량분석이 가능함을 확인하였다.

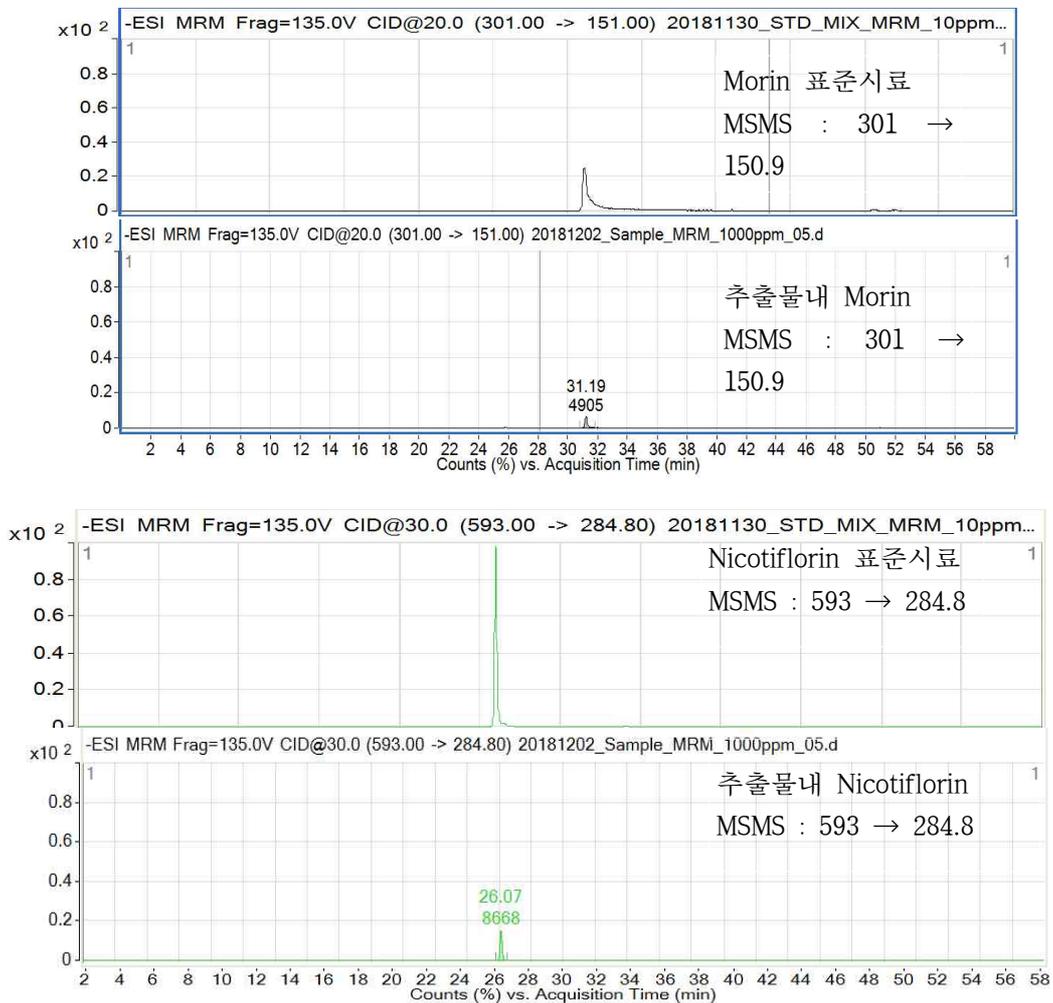


Fig 4. 쪽부쟁이 추출물에 포함된 지표 물질, (Morin, Nicotiflorin)과 그 표준품의 조각이온 생성 확인

(2) LCMSMS 분석을 통하여 지표 물질 분자 구조가 표준품과 일치함 확인

(가) Nicotiflorin 표준물질의 LCMSMS 실험

상대 충돌 에너지 10, 20, 30, 40을 Nicotiflorin 분자이온(593.0 u)에 주입하여 분자이온을 조각이론으로 만들어 특성 조각 이온값 (284.7 u)을 결정하였다.



Fig 15. Nicotiflorin LC-MS/MS spectrum

(나) 추출물 구성 성분 Nicotiflorin의 LCMSMS 실험

상대 충돌 에너지 30 을 Nicotiflorin 분자이온(593.0 u)에 주입하여 분자이온을 조각이론으로 만들어 특성 조각이온값 (284.7 u)의 질량스펙트럼 피크 면적으로 AY50에 포함된 Nicotiflorin 성분의 함량을 결정하였다.

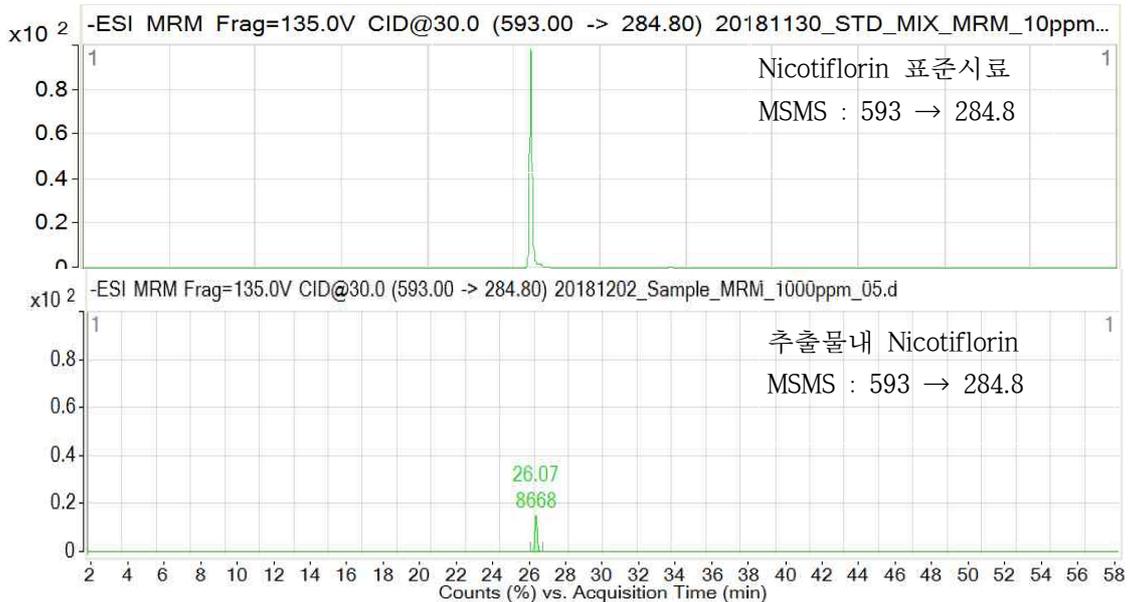


Fig 16. 추출물에 포함된 Nicotiflorin LC-MS/MS spectrum

(다) Morin 표준물질의 LCMSMS 실험

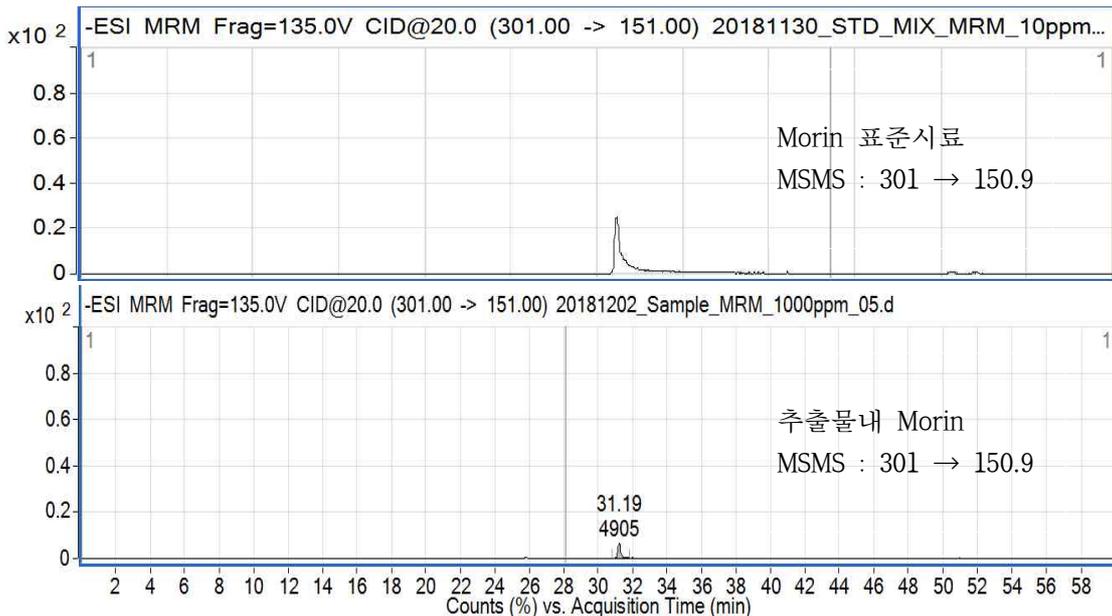
상대 충돌 에너지 10, 20, 30, 40을 Morin 분자이온(301.0 u)에 주입하여 분자이온을 조각이론으로 만들어 특성 조각 이온값 (150.9 u)을 결정하였다.



Fig 15. Morin LC-MS/MS spectrum

(라) 추출물 구성 성분 Morin의 LCMSMS 실험

상대 충돌 에너지 10 을 Morin 분자이온(300.9 u)에 주입하여 분자이온을 조각이론으로 만들어



특성 조각이온값 (150.9 u)의 질량스펙트럼 피크 면적으로 AY50에 포함된 Morin 성분의 함량을 결정하였다.

Fig 16. 추출물에 포함된 Morin LC-MS/MS spectrum

(7) LCMSMS 분석을 통하여 지표 성분 함량 확인 시험법

썩부쟁이 추출물에 포함된 원재료에 포함된 건조된 썩부쟁이 잎으로부터 추출된 추출물에 포함된 지표 성분 함량을 측정하여, 썩부쟁이가 포함된 식품의 규격을 정량화할 수 있는 근거를 제공하고자 한다.

1. 장비와 재료

1.1 실험실 장비 및 소모품

- 1.1.1 1 mL 에펜도르프 튜브
- 1.1.2 Vial
- 1.1.3 용매용 일회용 실린지
- 1.1.4 여과용 멤브레인필터 (PTFE, 0.45 μ m)
- 1.1.5 초음파진탕기
- 1.1.6 HPLC용 유리병 (2 l)
- 1.1.7 진탕기(Vortex)
- 1.1.8 파이펫 (1000 μ L)
- 1.1.9 파이펫 (100 μ L)
- 1.1.10 E-tube (1.5 mL)

1.2 분석장비

- 1.2.1 초고속미세유체분리형 질량분석기 (Agilent Triple Quad MS)
- 1.2.2 고성능 액체크로마토그래피 (Agilent 1200)

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

Nicoflorin

분자식 : $C_{27}H_{30}O_{15}$, 분자량 : 593.151u, CAS No. : 17650-84-9

Morin hydrate

분자식 : $C_{15}H_{10}O_7$, 분자량 : 301.035u, CAS No. : 480-16-0 ; 654055-01-3

2.2 일반시약

- 2.2.1 메틸 알코올(methyl alcohol, JT baker)
- 2.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 2.2.3 증류수(Distilled water)
- 2.2.4 포름산 (Formic acid, Sigma Aldrich)

3. 시험과정

3.1 표준용액 제조

- 3.1.1 표준 물질 적정량을 70% 메탄올 (물:메탄올 = 30:70, 부피 비)로 용해하여 1 mg/mL이 되게 하여 표준 원액으로 한다.
- 3.1.2 상기용액을 녹인 후 70% 메탄올로 희석하여 표준용액으로 한다. (1, 5, 25, 50, 100 ng/mL)

3.2 시험용액 제조

- 3.1.1 건조된 쑥부쟁이 40 Kg을 에탄올 70% 용매를 7리터를 사용하여 3시간에 걸쳐 4회 반복 추출한다.
- 3.1.2 70% 에탄올 추출로부터 HP-20 open column을 사용하여 물 100%, 에탄올 50%, 에탄올 85%를 순서대로 분액 받아 그 중 에탄올 50% 분액을 건조한 후 쑥부쟁이 표준 시료로 사용한다.
- 3.1.3 표준 시료 약 1 mg을 취한 후 1 mL 에펜도르프 튜브에 넣는다. (1 mg/mL)
- 3.1.4 70% 메탄올을 표선까지 맞춘 뒤 초음파진탕기에서 녹인 후 표준시료 시험용액으로 사용한다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

표1. 고성능 액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	10 μ l
컬럼온도	상온
이동상	A 용매 0.1% Formic acid
	B 용매 Acetonitrile
유속	0.2 ml/min
검출기 파장	220 nm

표2. 이동상 조건

시간(분)	용매	
	A%	B%
0	90	10
10	90	10
40	40	60
45	0	100
50	90	10
60	90	10

표3. 질량분석 조건

이온화 장치 조건			positive	negative
가스온도	350 $^{\circ}$ C	capillary	3500V	3500V
가스 유속	10 l/min	노즐 전압	0V	0V
분무기 압력	35psi			
보조 가스 온도	350 $^{\circ}$ C			
보조 가스 유속	12 l/min			

표4. MSMS조건

성분	선택이온	MS 해상도	조각이온	MSMS 해상도	충돌에너지
Nicoflorin	593	1 μ	284.8	1 μ	30
Morin	301	1 μ	151	1 μ	20

4.2 계산
표준품 검량선
<Morin>

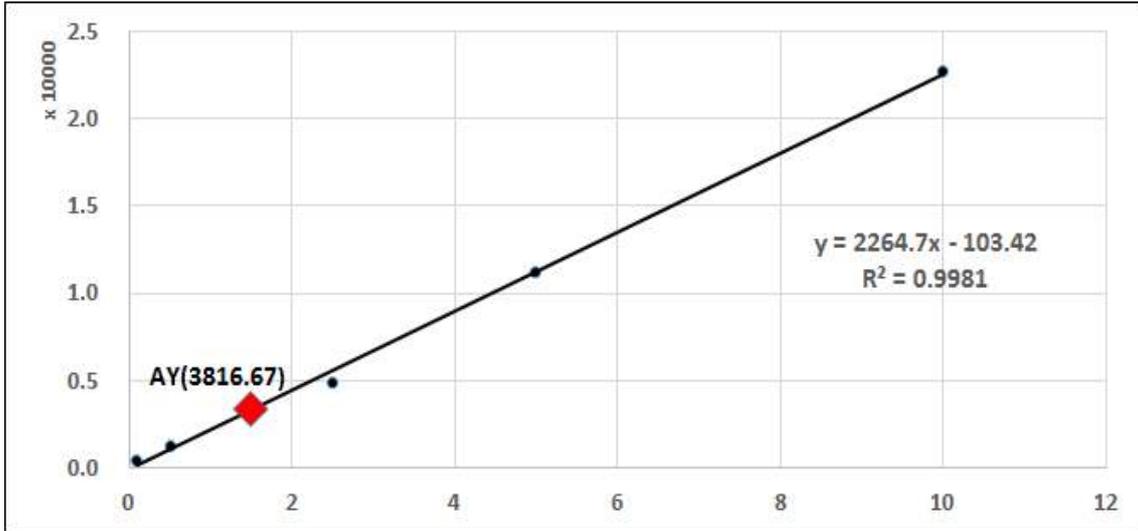


Fig 17. Morin 표준품 검량선

<Nicotiflorin>

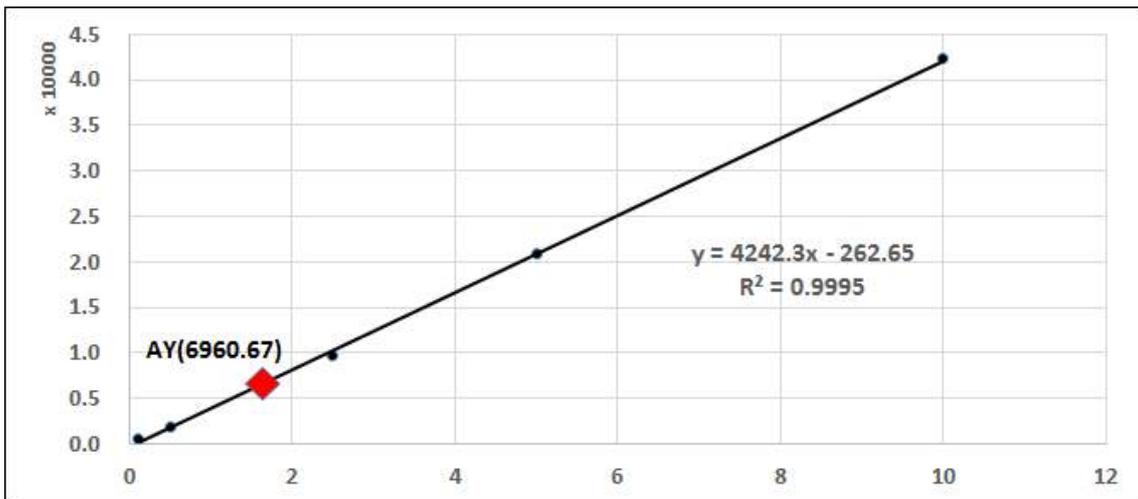


Fig 18. Nicotiflorin 표준품 검량선

검출한계 (LOD) = $3.3 \times SE/S = 3.3 \times 163.27/3050.23 = 0.176639$

정량한계 (LOQ) = 검출한계 $\times 3 = 0.53$

SE: 공시료를 포함한 가능한 낮은 농도들로 작성한 검량선 회귀직선의 y 절편 표준편차

표5. 지표 물질 함량 분석표

Morin			Nicotiflorin		
함량 (μg)	피크면적 (Au)	S/N	함량 (μg)	피크면적 (Au)	S/N
0.22	402.05	2.85	0.23	622.38	8.40
0.61	1274.71	4.96	0.50	1906.88	3.37
2.20	4874.33	16.83	2.16	9744.64	21.64
5.00	11226.89	12.05	4.52	20842.49	17.08
10.07	22696.38	23.85	9.09	42356.50	45.37
기울기	2264.70	12.11	기울기	4242.30	19.17
y절편	-103.42		y절편	-262.65	
기울기 평균(s)	3050.23		y절편의 표준편차	163.27	
정량한계	0.53				

[시료 중 최종 농도 계산식]

- 실험 용액 중의 Nicoflorin, Morin 함량
- 실험 용액의 부피 = 1 mL
- 실험 용액의 농도 = 1 mg / mL
- LCMSMS 시료 주입량 = 10 uL (시료주입중량 0.01 mg)
- 시료 중의 Nicotiflorin, Morin 함량(%)을 표준품 검량선을 적용하여 삼반복 측정된 후 평균하여 정량함.

Nicotiflorin 함량 : 0.170269 %

$$x = [(6960.67+262.65)/4242.3]ng/0.01 \text{ mg} = 0.170269 \%$$

Morin 함량 : 0.173095 %

$$x = [(3816.67+103.42)/2264.7]ng/0.01 \text{ mg} = 0.173095 \%$$

(8) 지표성분 표준품 정보

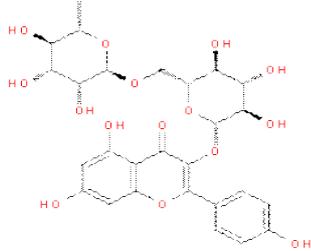
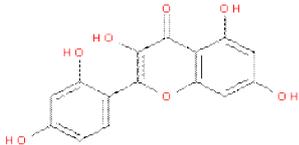
□시판되는 표준품	표준품 명	Nicotiflorin
	제조 판매회사명	Chem Faces
	CAS No.	17650-84-9
	구조식	
	함량	0.170269 %
	표준품 명	Morin hydrate
	제조 판매회사명	Chem Faces
	CAS No.	480-16-0 ; 654055-01-3
	구조식	
	함량	0.173095 %

Fig 19. 지표물질 함량 및 분자 구조 정보

바. 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정

1. 분획물 조제 및 표준화

- Prep-HPLC 분리 조건 확립 및 분획물 제작

Prep-HPLC를 이용하여 단일 Peak 및 R.T (Retention time)을 이용한 방법으로 획득한 분획물을 획득하여 비만 및 염증 제어 효과를 갖는 성분을 발굴하기 위하여 상대적 제어 강도를 측정하고 HPLC를 이용하여 성분 분석을 시행하였다.

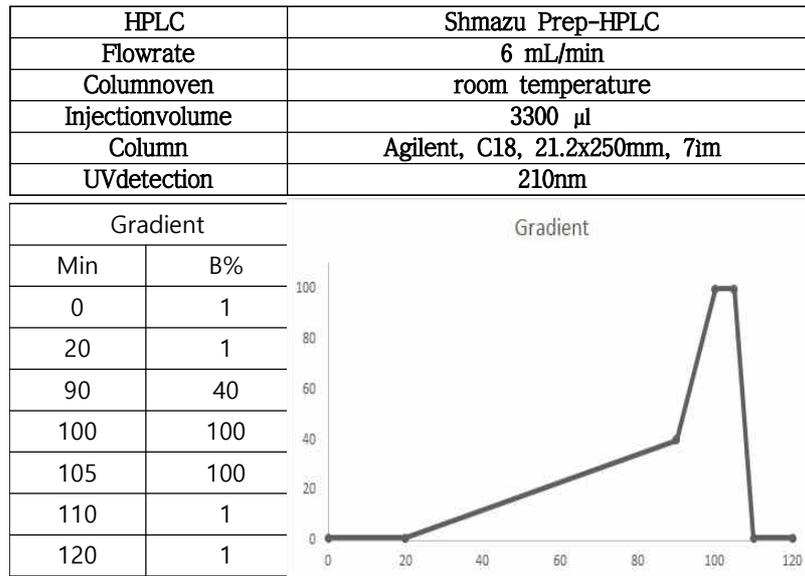


Fig 20. 쑥부쟁이 추출물의 HPLC Profile of Prep-HPLC fraction #1 ~ #24

- 쑥부쟁이 추출물의 HPLC 데이터를 이용한 화합물 프로파일 작성
- 1차년도에 작성된 표준 HPLC 분리방법을 사용하여 Prep-HPLC 분획의 성분 프로파일을 작성하였다.

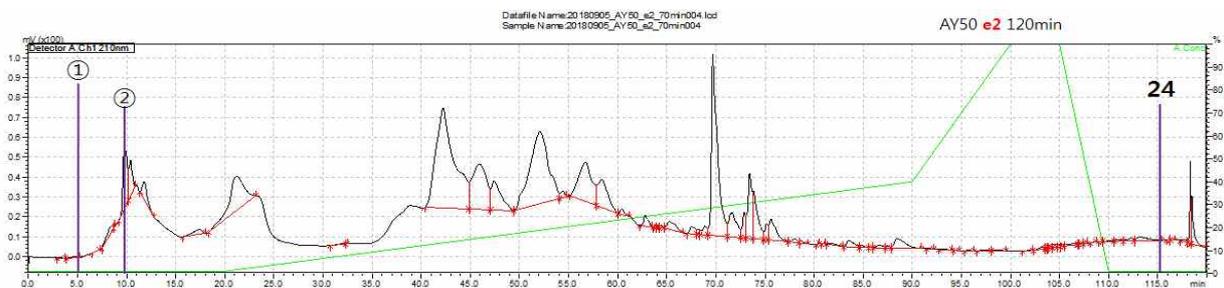


Fig 21. 쑥부쟁이 추출물의 Prep-HPLC fraction #1 ~ #24

*조건을 탐색하기 위해서 샘플 농도에 330 μ l Injection 하여 조건을 탐색

Fig 22. 쪽부쟁이 추출물의 표준분액 Activity Profile

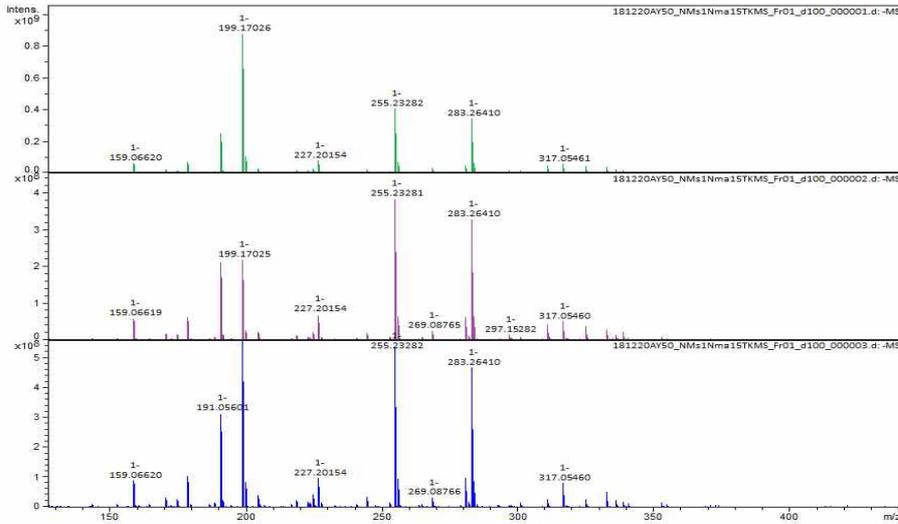


Fig 23. 쪽부쟁이 분액 Fr.1 MS

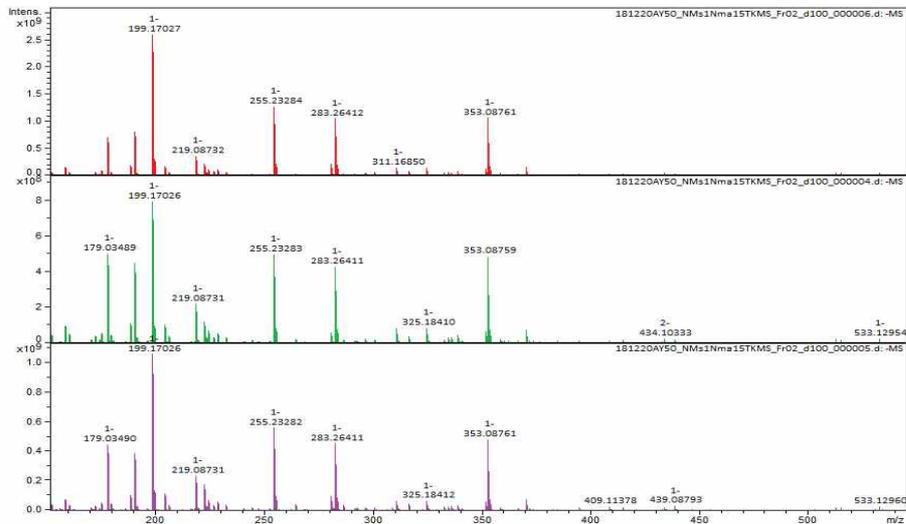


Fig 24. 쪽부쟁이 분액 Fr.2 MS

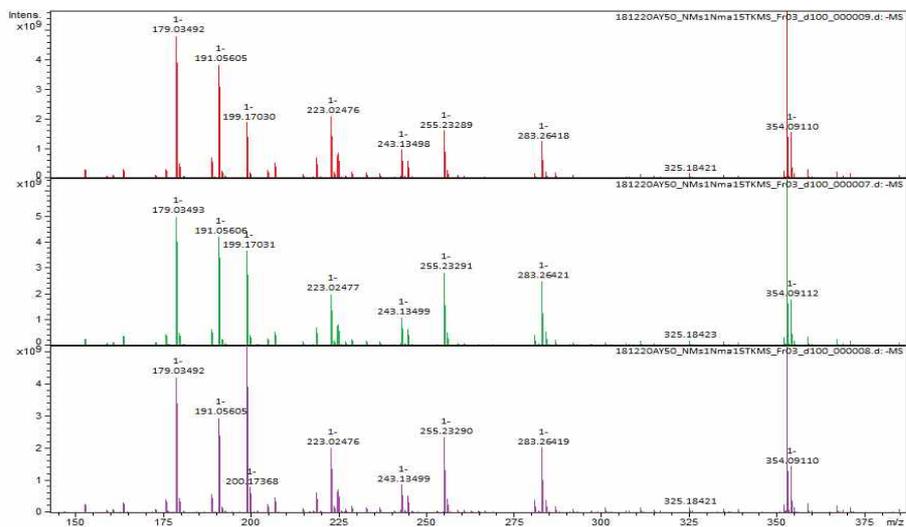


Fig 24. 쪽부쟁이 분액 Fr.3 MS

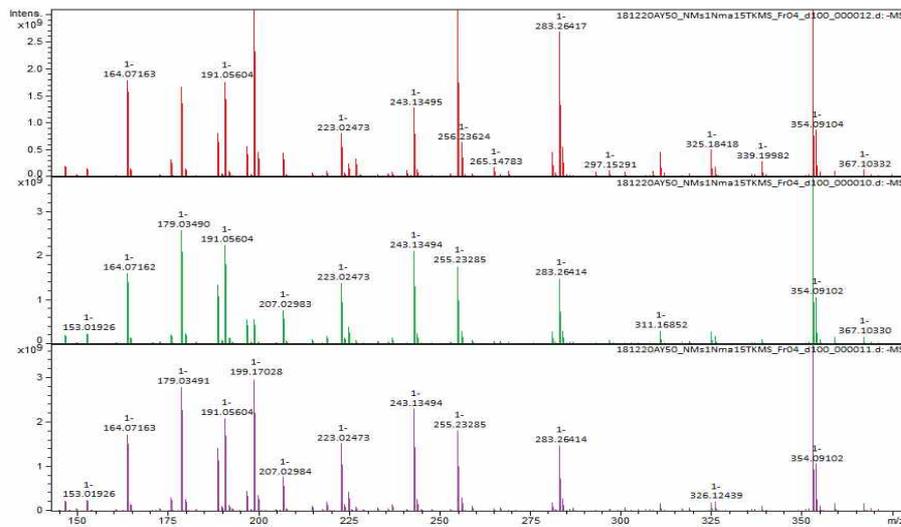


Fig 25. 쪽부쟁이 분액 Fr.4 MS

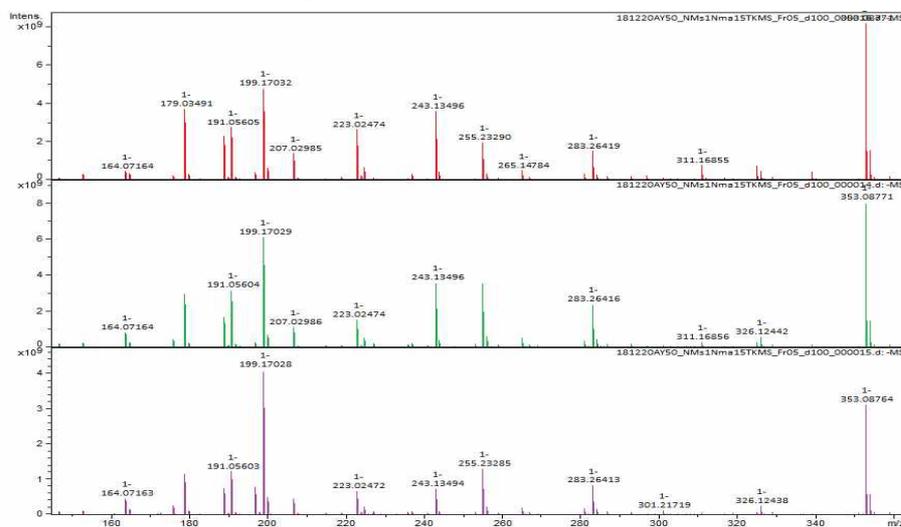


Fig 26. 쪽부쟁이 분액 Fr.5 MS

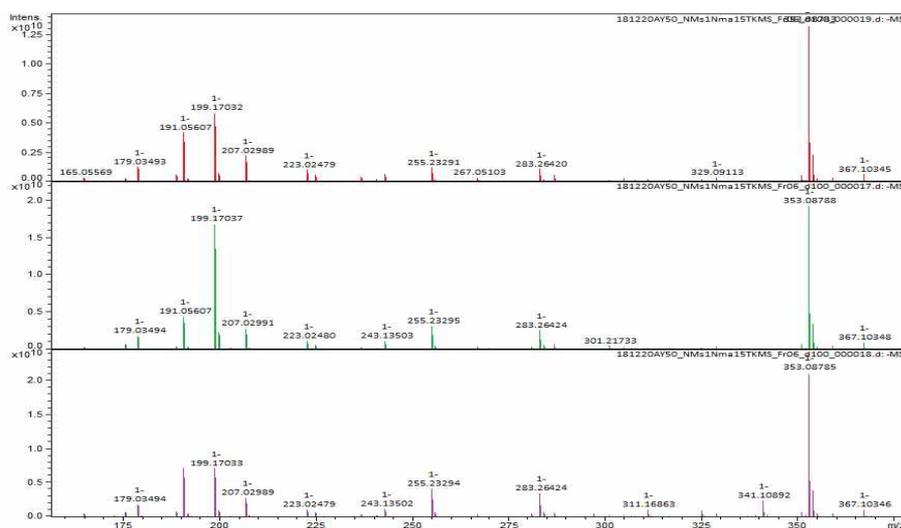


Fig 27. 쪽부쟁이 분액 Fr.6 MS

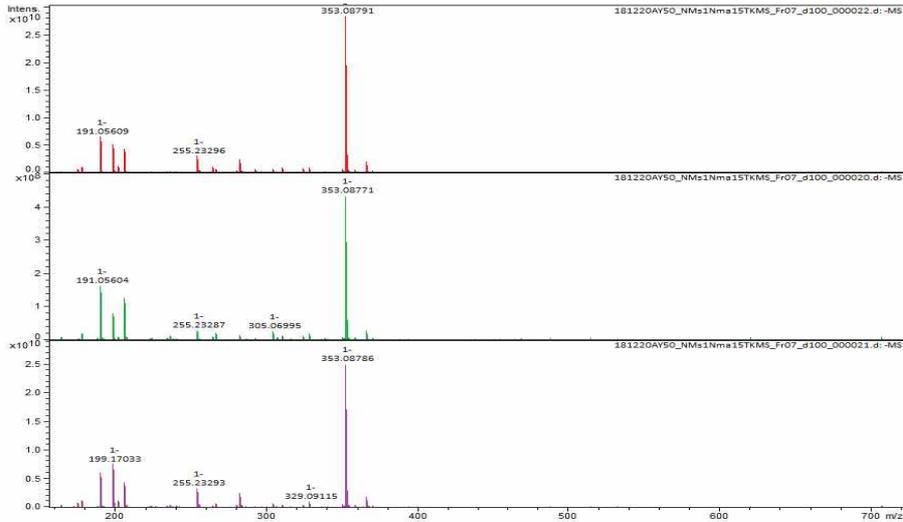


Fig 28. 축부쟁이 분액 Fr.7 MS

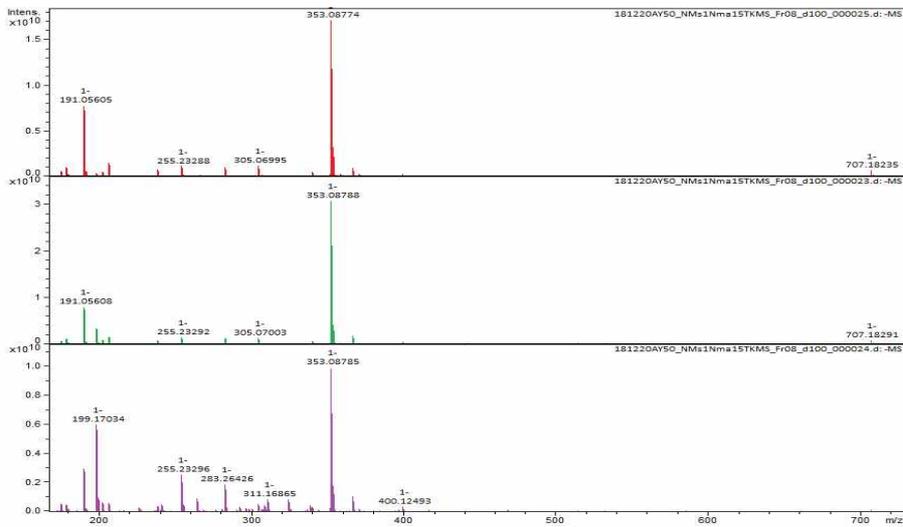


Fig 29. 축부쟁이 분액 Fr.8 MS

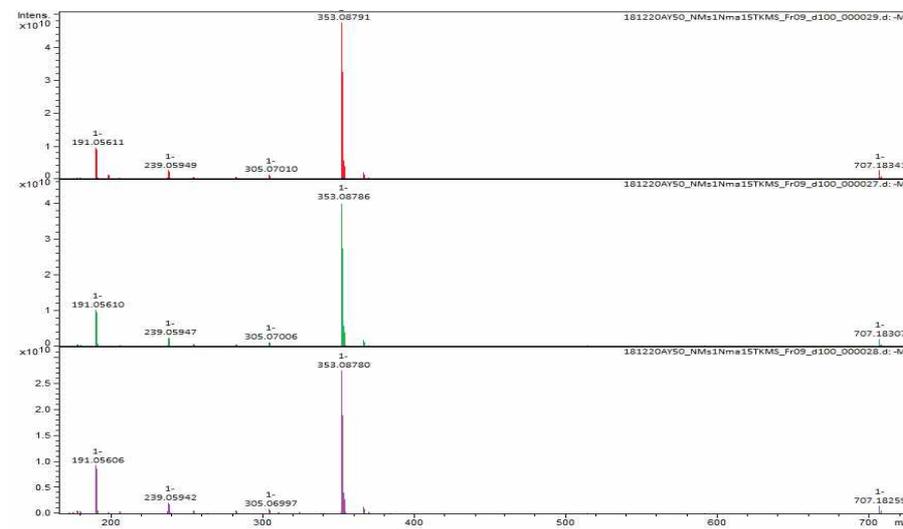


Fig 30. **썩부쟁이** 분액 Fr.9 MS

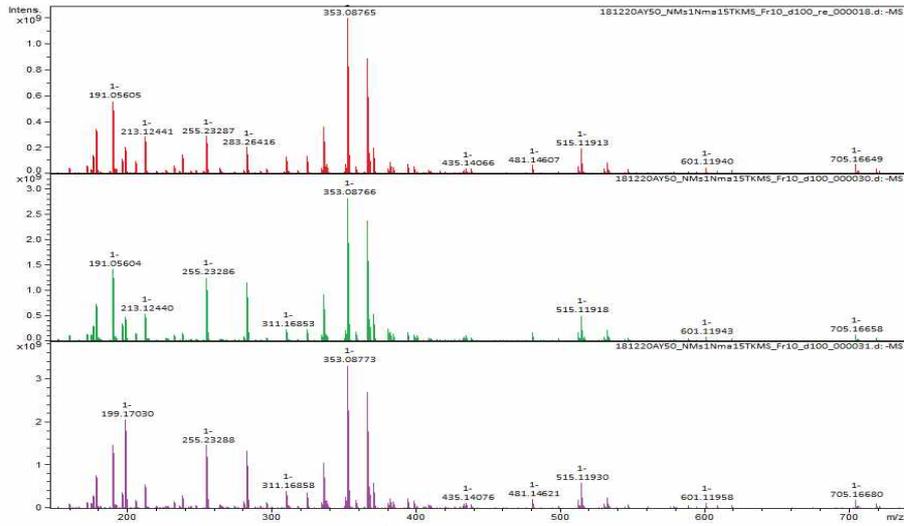


Fig 31. **썩부쟁이** 분액 Fr.10 MS

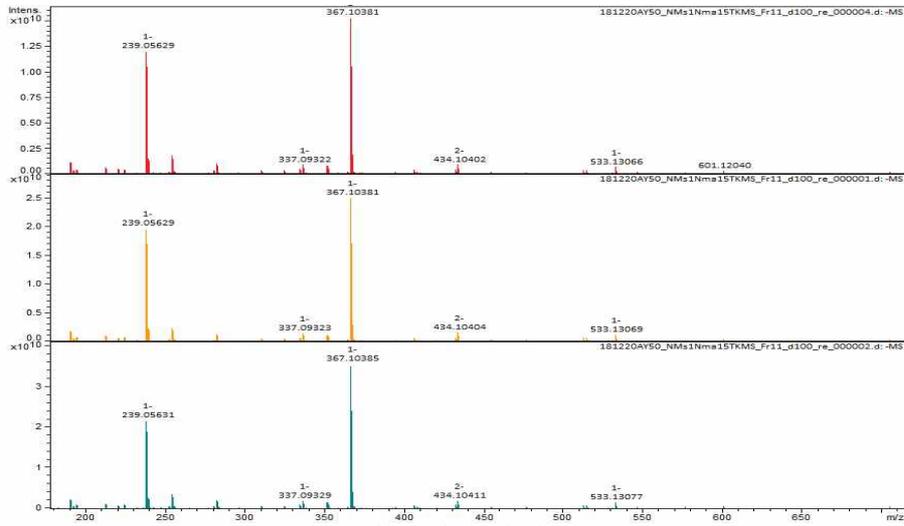


Fig 32. **썩부쟁이** 분액 Fr.11 MS

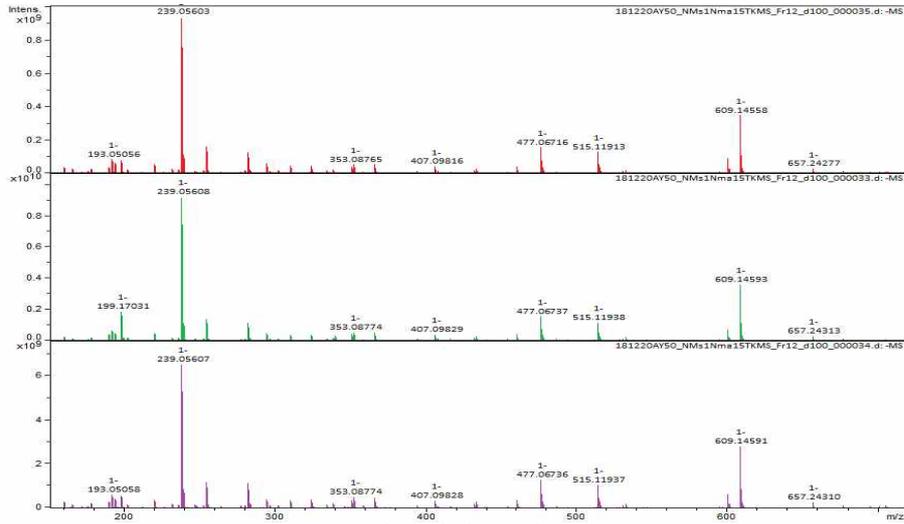


Fig 32. **썩부쟁이** 분액 Fr.12 MS

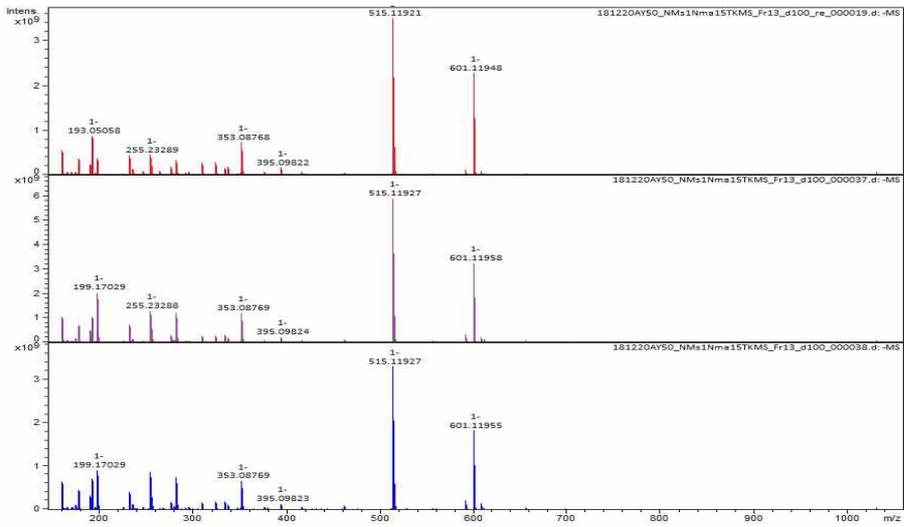


Fig 33. 쪽부쟁이 분액 Fr.13 MS

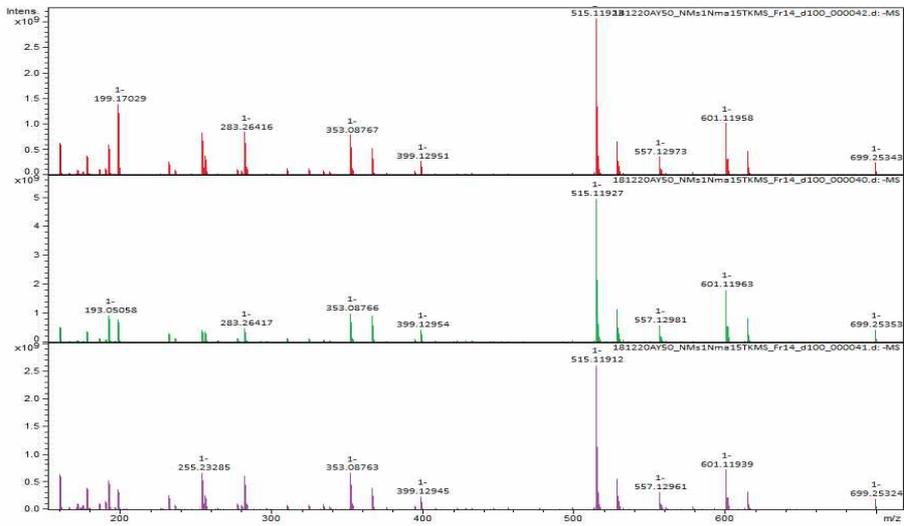


Fig 34. 쪽부쟁이 분액 Fr.14 MS

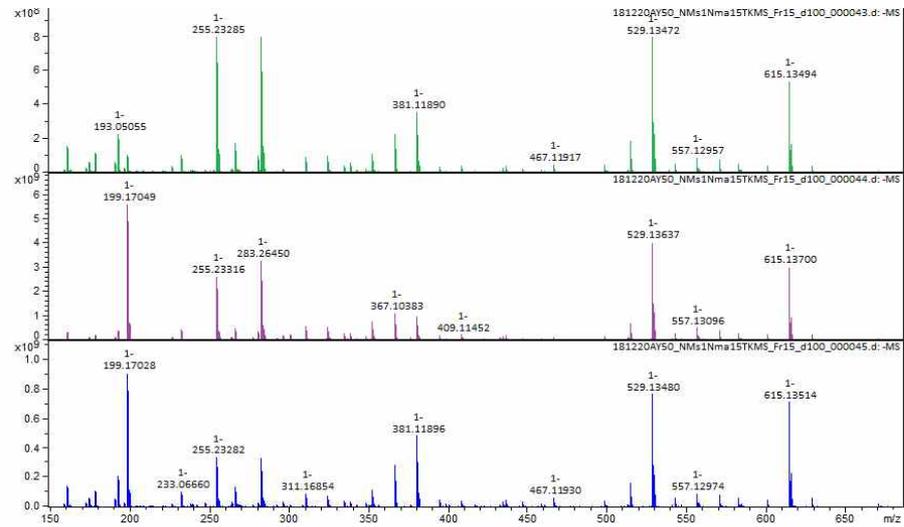


Fig 35. 쪽부쟁이 분액 Fr.15 MS

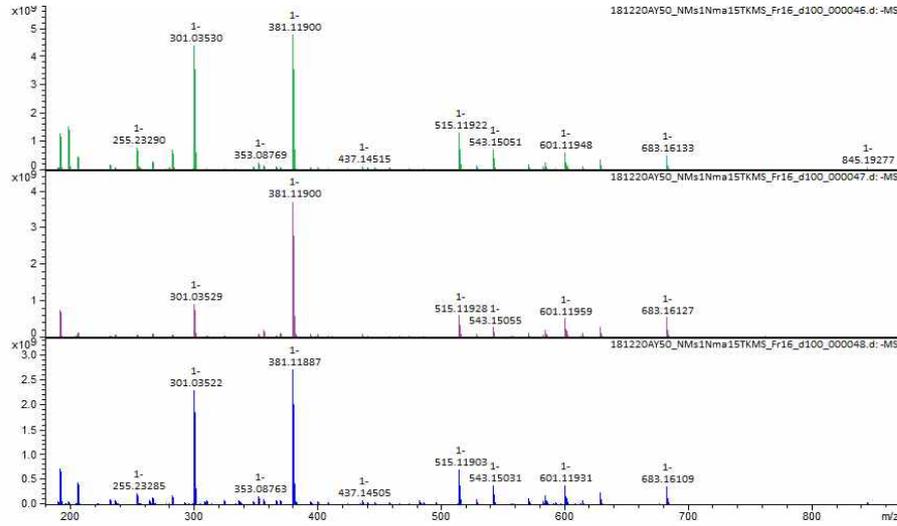


Fig 36 **썩부쟁이** 분액 Fr.16 MS

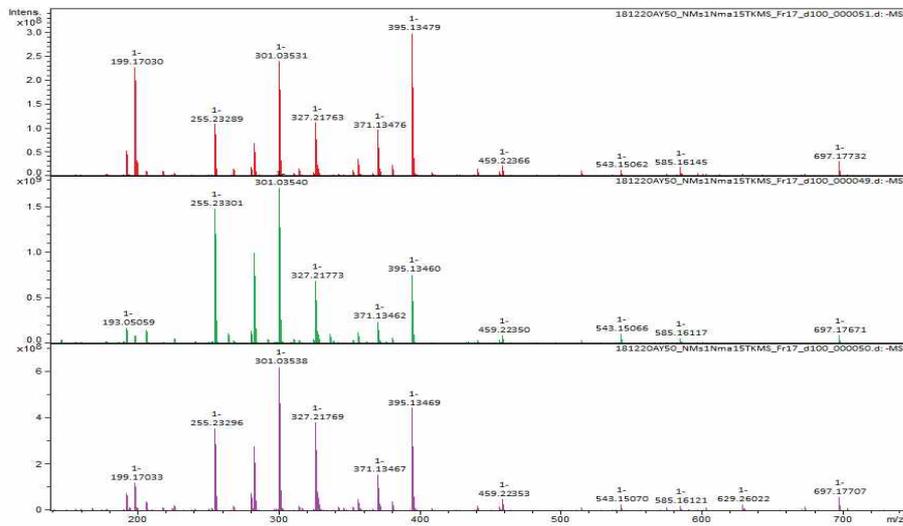


Fig 37 **썩부쟁이** 분액 Fr.17 MS

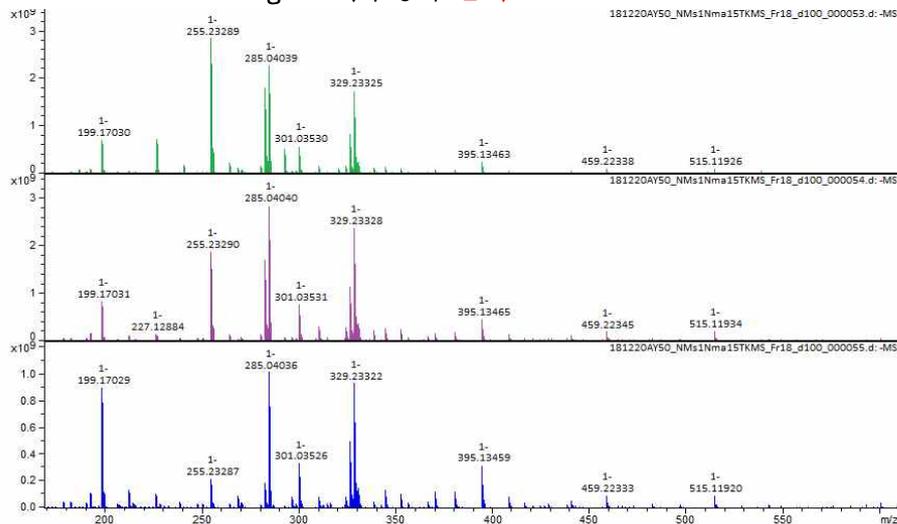


Fig 37 **썩부쟁이** 분액 Fr.18 MS

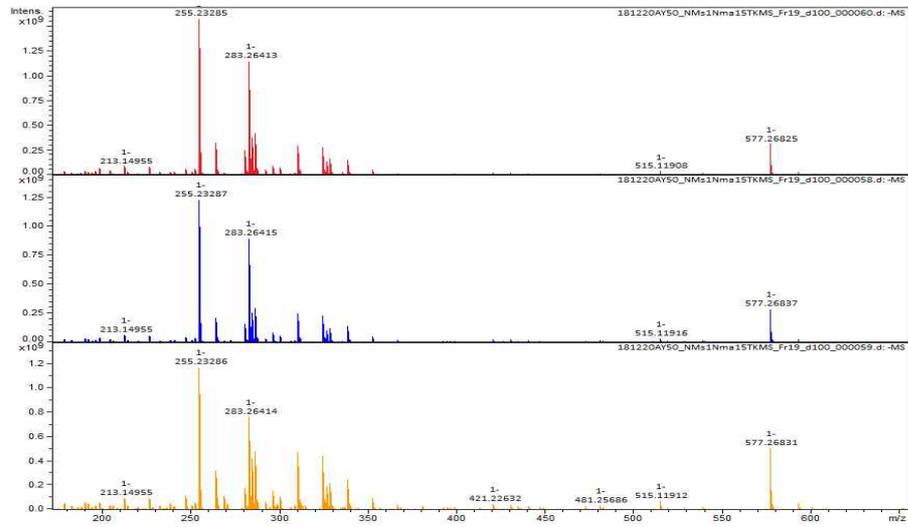


Fig 38 **썩부쟁이 분액 Fr.19 MS**

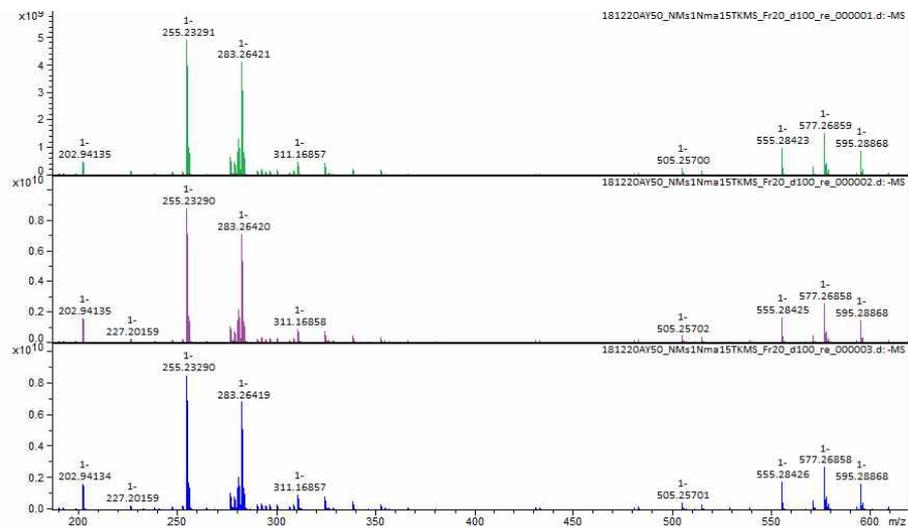


Fig 39 **썩부쟁이 분액 Fr.20 MS**

2. 분획물 질량프로파일 및 생리 활성 프로파일 상관관계기반 고속 유효 성분 발굴
 SCAMP를 활용한 효능 함량 연계분석을 활용한 유효성분 발굴

Fraction #	1.0000	2.0000	3.0000	4.0000	5.0000	6.0000	Score	검출 피크수	상관계수	피크세기	상대활성
Activity	0.1771	0.1823	0.1769	0.1787	0.0859	0.0205					
227.1995	0.3863	0.3443	0.0156	0.0000	0.2538	0.0000	0.1557	4	0.3114	1.150E+07	100.00
239.0550	0.0000	0.6471	0.3529	0.0000	0.0000	0.0000	0.1810	2	0.2560	1.170E+07	97.67
255.2312	0.4688	0.2257	0.0401	0.0688	0.0000	0.1966	0.1476	5	0.3300	7.840E+06	97.66
199.1693	0.5182	0.4818	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1795	2	0.2539	3.380E+06	86.41
283.2627	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	2.160E+07	82.85
353.0870	0.8032	0.1759	0.0209	0.0000	0.0000	0.0000	0.1779	3	0.3081	3.130E+05	81.18
241.0711	0.4616	0.4616	0.0768	0.0000	0.0000	0.0000	0.1795	3	0.3109	2.680E+05	80.88
367.1027	0.3612	0.6388	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1803	2	0.2550	5.360E+05	77.10
609.1439	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	6.090E+06	75.95
253.2162	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1823	1	0.1823	3.450E+06	74.50
191.0548	0.7793	0.2207	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1781	2	0.2519	3.880E+05	73.95
353.0874	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1823	1	0.1823	2.630E+06	72.99
223.0239	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1769	1	0.1769	3.020E+06	71.33
399.1283	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	2.080E+06	70.09
238.0709	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	2.010E+06	69.91
269.2480	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1769	1	0.1769	2.240E+06	69.72
237.0390	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	1.800E+06	69.30
267.0877	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	1.760E+06	69.18
341.1082	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1823	1	0.1823	1.250E+06	68.86
207.0646	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	1.480E+06	68.24
281.2485	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1769	1	0.1769	1.450E+06	67.37
377.0849	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1769	1	0.1769	1.440E+06	67.33
473.2827	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	1.240E+06	67.27
209.0441	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	1.240E+06	67.27
134.0458	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	1.210E+06	67.14
309.2055	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	1.100E+06	66.62
256.1071	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	6.710E+05	63.93
417.1941	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	5.340E+05	62.68
193.0488	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	4.450E+05	61.69
205.1579	0.0000	0.0000	0.0000	0.6074	0.8896	0.0000	0.1423	2	0.2012	7.750E+05	60.78
249.1325	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1787	1	0.1787	2.160E+05	57.75
283.2628	0.0672	0.0683	0.0269	0.0000	0.2796	0.5578	0.0646	5	0.1445	3.830E+07	42.27
593.1487	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	6.140E+06	31.77
329.2317	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	4.280E+06	30.82
327.2156	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	4.230E+06	30.79
447.0910	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	6.950E+05	26.06
675.3578	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	6.780E+05	25.99
452.2765	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	6.650E+05	25.94
285.0386	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	5.580E+05	25.48
579.1684	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	4.880E+05	25.13
457.1688	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0859	1	0.0859	3.160E+05	23.99
730.5478	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	1.790E+07	1.23
1345.6003	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	1.680E+07	1.19
1391.6373	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	1.520E+07	1.13
311.2217	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	1.310E+07	1.04
1477.6650	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	1.110E+07	0.93
293.2109	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	8.230E+06	0.75
350.3049	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	8.050E+06	0.73
295.2266	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	6.110E+06	0.56
352.3203	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	6.030E+06	0.55
391.2244	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	3.620E+06	0.23
329.2320	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	3.160E+06	0.15
195.1010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0205	1	0.0205	2.490E+06	0.00

SACMP 고속 활성 물질 발굴 시스템을 이용하여 활성 성분으로 예상되는 물질 7종이 발굴 되었으며, 이 중 peak area 가 넓어서 LC/MS에서 peak 크기가 크고, SCAMP에서 활성이 높고, 분리 및 정제가 쉬운 물질을 지표 물질로 선정하였다.

3. 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정

- Prep-HPLC를 이용하여 단일 peak 및 R.T(Retention time)을 이용한 방법으로 획득한 분획물 획득하여 효과를 갖는 성분 발굴을 위하여 썬부쟁이의 유효성분 확인을 위하여 MPLC를 이용한 성분 분획을 하였다.

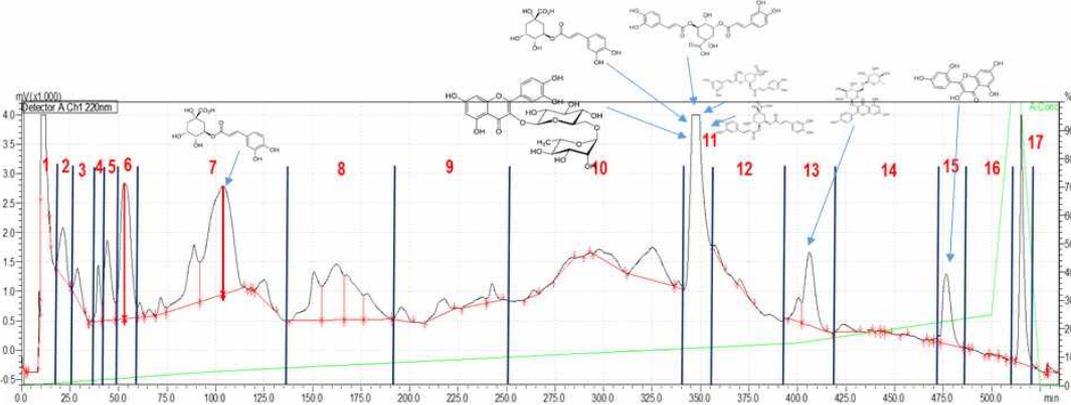


Fig 40. 썬부쟁이 분획 UV 파장 (210nm) 7. Chlorogenic acid (353.7739 m/z), 7,11 . Rutin (609.6036m/z), 11, 15. Isochlorogenic acid A, B, C (515.6398 m/z), 13. Nicoflorin (593.6129 m/z), 15. Morin (301.0353 m/z)

- 발굴된 항염 약효 물질의 상대적인 활성도가 측정되었다. 항염 성분이 발굴되었으며 표준품의 LC-PDA Library로 확인되었으며 지표성분인 morin과 nicotiflorin은 NMR로 구조 확인이 되었다.
- 정제 과정은 isocratic prepLC를 사용하여 분획 중의 순물질 정제를 수행하였다.

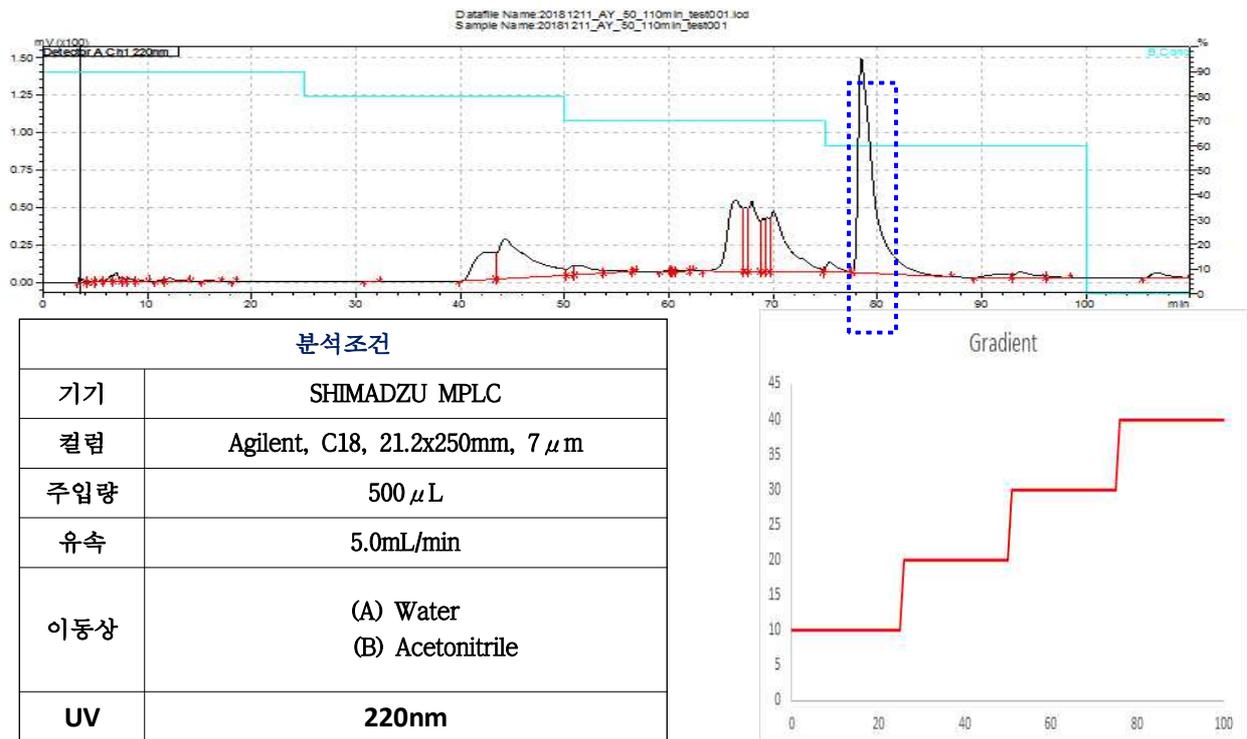


Fig 41. Morin 정제 방법

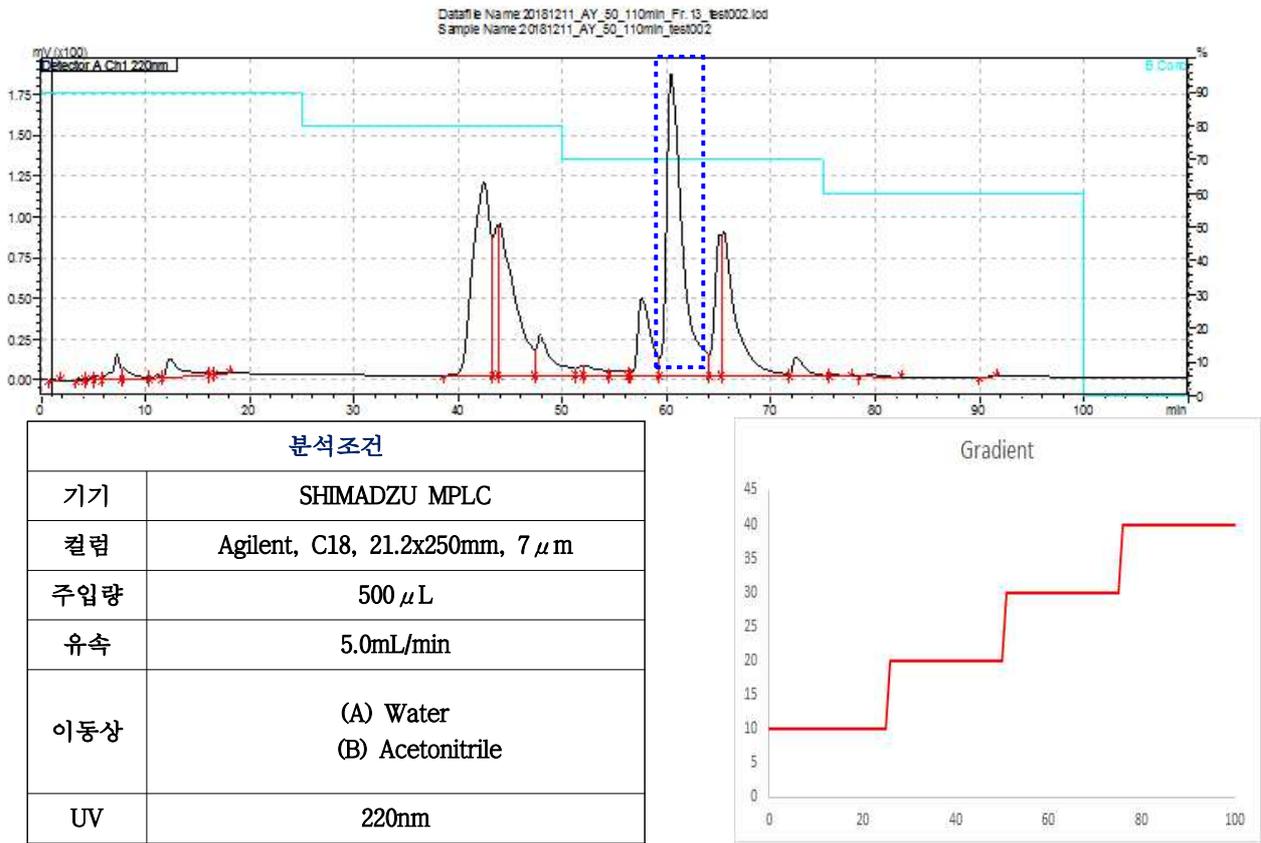
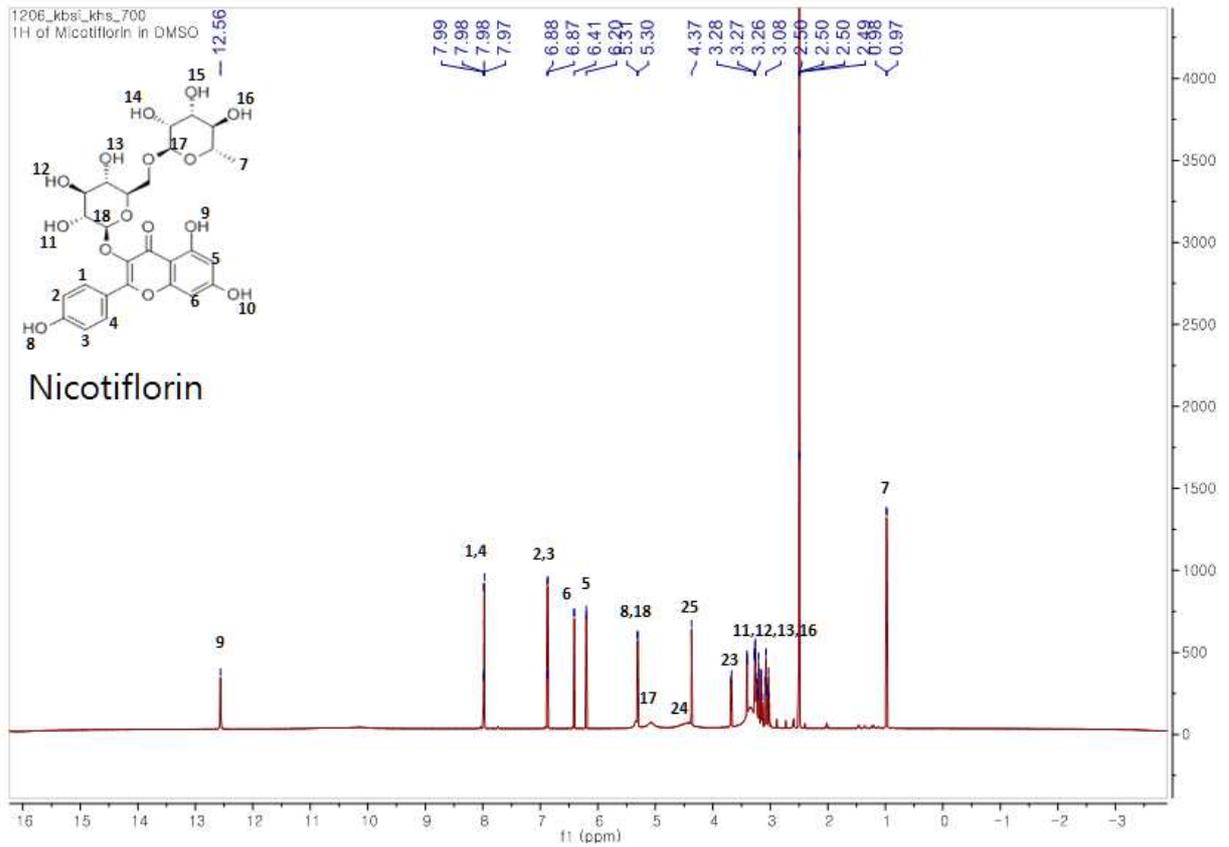
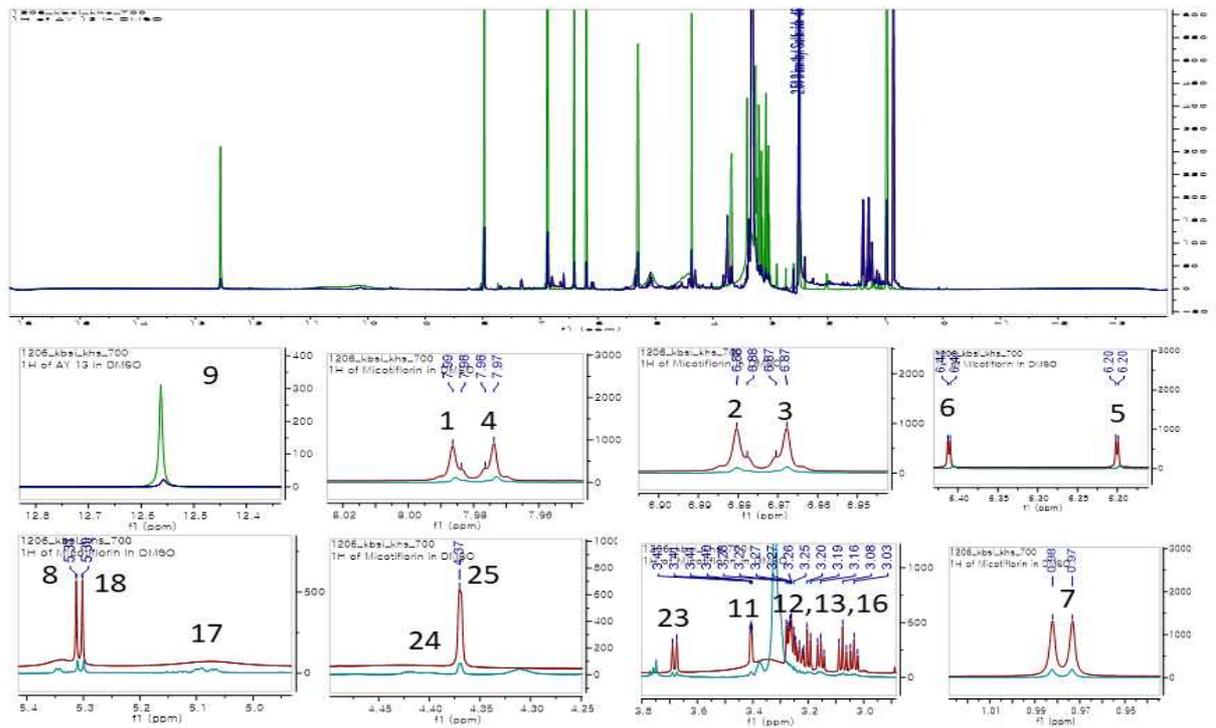


Fig 42. Nicotiflorin 정제 방법

(다) 표준물질 Nicotiflorin의 Proton NMR 실험



(라) 분리 정제한 Nicotiflorin 과 표준품의 동등성 NMR 실험



사. 다기능 개별인정 기능성 원료 등록을 위한 전략 수립

1) 쑥부쟁이 안전성 관련 자료

가) 쑥부쟁이 고문헌조사

쑥부쟁이(*Aster yomena* Makino)는 한국 고유 특산종으로 쑥부쟁이라는 명칭으로 나온 고문헌은 없으며, 전통적으로 이용되어온 자료를 찾기 위해서 생약명을 기준으로 조사한 결과 중국문헌에 산백국이라는 생약명으로 까실쑥부쟁이가 수재되어 있으며, 한국에서 이를 약재로 활용하기 위하여 같은 생약명으로 동속근연종까지 모두 포함하여 유사한 효능을 나타냈다고 표기하고 있다. 특히 독성관련 자료에서 특별한 독성은 나타나지 않은 것으로 조사되었다.

(1) 기원식물

- 한국본초도감 : 국화과의 여러해살이풀 쑥부쟁이(*Aster yomena* Makino), 까실쑥부쟁이(*Aster ageratoides* Turcz. ssp. *ovatus* {Franch. et. Savat.} Kitamura), 개쑥부쟁이(*Aster ciliosus* Kitamura), 눈개쑥부쟁이(*Aster hayatae* Lev. et. Vnt), 섬쑥부쟁이(*Aster glehni* Fr. Schm. var. *hondoensis* Kitamura)의 지상부이다.

- 중화본초 : 까실쑥부쟁이(*Aster ageratoides* Turcz. ssp. *ovatus* {Franch. et. Savat.} Kitamura)

(2) 성미: 맛은 쓰고 매우며 성질은 서늘하다.

(3) 성분: 플라보노이드류, 사포닌류, 당류, 탄닌, 단백질, 아미노산, 엽록소 등이 확인되었다.

(4) 효능

- 풍열(風熱)로 인한 감기로 열이 나는 증상 및 편도선염, 기관지염 등에 진해, 거담 효과를 보인다.

- 유방염, 종기에 유효하며, 뱀에 물린 데에 붙여도 해독시킨다.

(5) 독성 관련 자료

마우스에게 당제 240g/kg(성인이 192배 량) 또는 추출물 I(산백국의 알코올 엑스의 수용성 부분을 ether로 추출한 후 모액(母液)을 다시 ethyl acetate로 추출하여 얻은 것)을 4g/kg(생약 500g/kg에 해당) 내복시키면 3일 이내에는 모두 사망하지 않았고 다만 안정되어 호흡이 완만해졌으며 털이 부드럽고 습하게 될 뿐으로 12~24시간 만에 회복되었다. 추출물 I을 마취한 토끼에게 22 • 42 • 100mg/kg을 정맥 주사하니 혈압이 단시간에 하강했는데, 호흡에는 뚜렷한 영향이 없었으며 마취한 guinea pig에게는 64mg/kg을 복강 주사하여도 심전도에 뚜렷한 이상이 없었다.

2) 식약처 식품의 기준 및 규격(제2016-43호, 2016.05.31.)

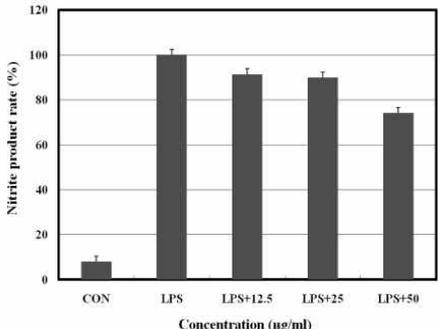
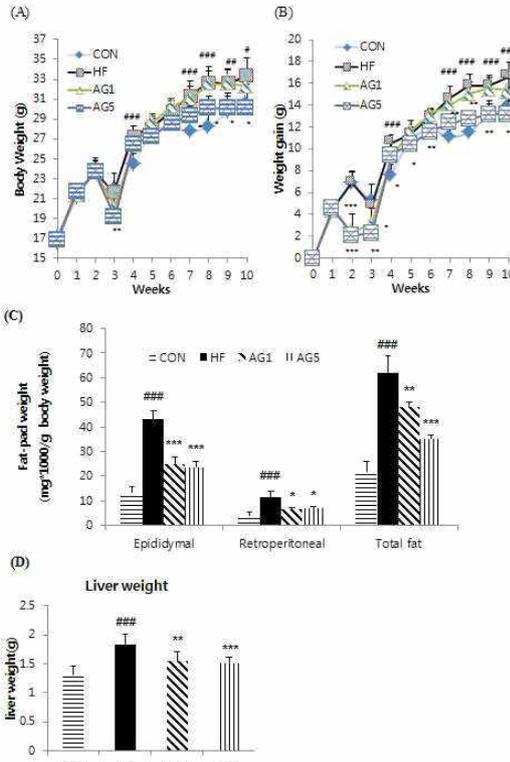
식약처 식품 기준 및 규격에 쑥부쟁이 기원식물 관련 자료를 확인해 본 결과 잎이나 순이 식용가능한 원료로 등재되어 있으며 특별한 제한사항은 없다.

원재료	이명 또는 영명	학명 또는 특성	가능	제한	사용 부위
쑥부쟁이	왜쑥부쟁이, 가새쑥부쟁이, 쑥부쟁이, Field	<i>Aster yomena</i> (Kitam.) Honda / <i>Aster incisa</i> var. <i>yomena</i> Kitam.	O	X	잎

	aster				
가는썩부쟁이	가는잎썩부쟁이, 가는썩부장이, Thick-stem aster	Aster pekinensis (Hance) Chen / Aster holophyllus Hemsl. / Aster integrifolius (Turcz.) Franch.	O	X	순
가새썩부쟁이	가새썩부장이, 고려썩부쟁이, Incised-leaf aster	Kalimeris incisa Fisch. / Aster macrodon Lev. & Vaniot / Aster pinnatifidus f. robustus Makino	O	X	앞
갯썩부쟁이	Bristle-hair aster	Aster hispidus Thunb. / Aster batakensis Hayata	O	X	순
까실썩부쟁이	껍질썩부쟁이, 산썩부쟁이, Rough surface aster	Aster ageratoides Turcz. / Aster ageratoides subsp. amplexifolius (Siebold & Zucc.) Kitam.	O	X	앞
눈개썩부쟁이	개썩부장이, 눈개썩부장이, Dwarf Korean plum yew	Aster hayatae H.Lév. & Vaniot	O	X	순
별개미취	고려썩부쟁이, 별개미취, Korean starwort, Montane aster	Aster koraiensis Nakai / Asteromoea koraiensis (Nakai) Kitam. / Gymnaster koraiensis (Nakai) Kitam.	O	X	앞
섬썩부쟁이	부지쟁이, 섬썩부장이, 구메리나물, Ulleungdo aster	Aster glehni F.Schmidt / Aster korsakoviensis Lev. & Vaniot	O	X	순

3) 썩부쟁이 기능성 관련 자료

기능/효능	관련자료	설명												
총폴리페놀 화합물	<p>Table 1. The contents of total polyphenols of solvent fractions extracts isolated from <i>Aster glehni</i> Fr. Schm.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Solvent for extraction</th> <th>Contents of polyphenols (mgTAE/g)¹⁾</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Hexane Fr.</td> <td>2.78±0.12²⁾</td> </tr> <tr> <td>EtOAc Fr.</td> <td>7.91±0.07</td> </tr> <tr> <td>n-BuOH Fr.</td> <td>6.45±0.27</td> </tr> <tr> <td>H₂O Fr.</td> <td>5.95±0.66</td> </tr> <tr> <td>MeOH extracts</td> <td>6.77±0.43</td> </tr> </tbody> </table> <p>¹⁾TAE standards for tannic acid equivalents ²⁾Result are means±S.D of triplicate data.</p>	Solvent for extraction	Contents of polyphenols (mgTAE/g) ¹⁾	Hexane Fr.	2.78±0.12 ²⁾	EtOAc Fr.	7.91±0.07	n-BuOH Fr.	6.45±0.27	H ₂ O Fr.	5.95±0.66	MeOH extracts	6.77±0.43	-에틸아세테이트 분획물에서 tannic acid를 이용하여 함유량 계산시 7.91mgTAE/g로 가장 많이 함유되어 있었으며, 물 분획물에서도 5.95mgTAE/g 함유
Solvent for extraction	Contents of polyphenols (mgTAE/g) ¹⁾													
Hexane Fr.	2.78±0.12 ²⁾													
EtOAc Fr.	7.91±0.07													
n-BuOH Fr.	6.45±0.27													
H ₂ O Fr.	5.95±0.66													
MeOH extracts	6.77±0.43													

<p>항산화능</p>	<p>Table VII. Antioxidant activity of solvent fractionations from the flower, the stem and the root of <i>Aster cilisus</i> Kitamura on DPPH radical scavenging method</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Fractions</th> <th colspan="3">Antioxidant activity (IC₅₀:µg/ml)¹⁾</th> </tr> <tr> <th>Flower</th> <th>Stem</th> <th>Root</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Water ext.</td> <td>109.40</td> <td>117.73</td> <td>102.83</td> </tr> <tr> <td>EtOH ext.</td> <td>45.15</td> <td>48.43</td> <td>42.03</td> </tr> <tr> <td>75% EtOH ext.</td> <td>51.17</td> <td>56.01</td> <td>41.25</td> </tr> <tr> <td>MeOH ext.</td> <td>56.44</td> <td>46.32</td> <td>101.39</td> </tr> <tr> <td>CHCl₃ ext.</td> <td>358.78</td> <td>373.71</td> <td>118.54</td> </tr> </tbody> </table> <p>Control antioxidants</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>BHT</td> <td>5.4</td> </tr> <tr> <td>Vitamin-C</td> <td>4.2</td> </tr> <tr> <td>α-Tocopherol</td> <td>3.3</td> </tr> </tbody> </table> <p>¹⁾Amount required for 50% reduction of DPPH(0.2 mM) after 30 min.</p>	Fractions	Antioxidant activity (IC ₅₀ :µg/ml) ¹⁾			Flower	Stem	Root	Water ext.	109.40	117.73	102.83	EtOH ext.	45.15	48.43	42.03	75% EtOH ext.	51.17	56.01	41.25	MeOH ext.	56.44	46.32	101.39	CHCl ₃ ext.	358.78	373.71	118.54	BHT	5.4	Vitamin-C	4.2	α-Tocopherol	3.3	<p>-추출 부위별 및 용매별 항산화 (DPPH) 작용능 비교시 줄기>꽃>뿌리 순</p> <p>-대조구로 비교한 동일 농도의 BHT, vitamin C, α-tocopherol 보다 월등히 높은 수준</p>
Fractions	Antioxidant activity (IC ₅₀ :µg/ml) ¹⁾																																		
	Flower	Stem	Root																																
Water ext.	109.40	117.73	102.83																																
EtOH ext.	45.15	48.43	42.03																																
75% EtOH ext.	51.17	56.01	41.25																																
MeOH ext.	56.44	46.32	101.39																																
CHCl ₃ ext.	358.78	373.71	118.54																																
BHT	5.4																																		
Vitamin-C	4.2																																		
α-Tocopherol	3.3																																		
<p>항염증</p>	 <p>Fig. 7. Effects of solvent fractionation extracts from <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. on the production of nitric oxide in macrophage cell (Raw 264.7). ■, AG E, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. ethyl acetate extracts. Result are means ± S.D. of triplicate data.</p>	<p>-대식세포 Raw 364.7 cell의 nitric oxide 생성 억제를 유의적으로 하였으며, Raw 364.7 cell 내 LPS에 의해 유도된 iNOS 단백질에서 50µg/mL의 EtOAc 추출물을 처리시 81.5%의 발현 억제 효과가 확인됨.</p>																																	
<p>비만</p>		<p>-섬쑥부쟁이 추출물 또는 이의 분획물은 체중을 감소시키고, 체내 지방량을 감소시키며, 혈장 내 클루코즈 및 총 콜레스테롤 수준을 감소시키고 체내 지방 축적량을 감소시키며 특히 지방대사 및 지방세포형성에 관여하는 유전자 발현을 감소시킴이 확인됨</p>																																	

<p style="text-align: center;">항암</p>	<p>Fig. 1. Inhibitory effect on cell survival of the fractions from the methanol extract of <i>Aster yomena</i> on HepG2 cells. AYMH: Hexane partition layer of <i>Aster yomena</i>. AYMEE: Ethyl ether partition layer of <i>Aster yomena</i>. AYMEA: Ethyl acetate partition layer of <i>Aster yomena</i>. AYMB: Butanol partition layer of <i>Aster yomena</i>. AYMA: Aqueous partition layer of <i>Aster yomena</i>. AYM: Methanol partition layer of <i>Aster yomena</i>.</p>	<p>-인체 간암세포주인 HepG2에 용매별 각 시료 분획물을 100~500µg/mL의 농도를 첨가하였을 때의 암세포 증식 억제 효과를 보았을 때 200µg/mL 첨가시부터 AYMEE, AYMEA 및 AYMB 층에서 94.5%의 높은 암세포 증식효과를 나타냄.</p>
<p style="text-align: center;">미백</p>	<p>Fig. 1. Tyrosinase inhibition rate of extracts isolated from <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. □: AG H, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. Hexane extracts; ▤: AG E, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. Ethyl acetate extracts; ▥: AG B, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. Butanol extracts; ▦: AG W, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. Water extracts; ■: Vit. C, Ascorbic acid. Result are means±S.D. of triplicate data.</p>	<p>-피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해하는 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과 1,000µg/mL 농도에서 50%의 저해능을 보임. 비교군인 vitamin C 100µg/mL에서 99%의 저해능을 보인것보다는 낮은 값을 보였지만, 진달래꽃 열수 및 에탄올 추출물 1,000µg/mL에서 24%, 48%의 저해를 보인것과 비교하면 쑥부쟁이의 활성이 우수함을 알 수 있음.</p>
<p style="text-align: center;">주름</p>	<p>Fig. 2. Elastase inhibition rate of extracts isolated from <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. □: AG H, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. Hexane extracts; ▤: AG E, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. Ethyl acetate extracts; ▥: AG B, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. Butanol extracts; ▦: AG W, <i>Aster glehnii</i> Fr. Schm. Water extracts; ■: CA, Catechin. Result are means±S.D. of triplicate data.</p>	<p>-피부의 탄력성 유지와 주름생성과 관련있는 elastase 저해활성을 1,000µg/mL에서 측정된 결과 대조군인 vitamin C의 경우 49%의 저해효과가 나타났으며, 쑥부쟁이 헥산 분획물 21.4%, 쑥부쟁이 에틸아세테이트 분획물이 44.9%의 elastase 저해 효과가 나타남. 물 분획물에서는 거의 나타나지 않음. 익지인 열매의 열수, 에탄올, 메탄올 추출물에서 25%, 7%, 26%의 결과와 비교시 쑥부쟁이의 elastase 저해 활성이 우수함.</p>

향료	Table 2. Chemical composition of essential oil from <i>Azorella mexicana</i> . The essential oil was extracted by steam distillation apparatus and volatile components were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry.																																																																																																																																																																																																																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Components</th> <th>Compound Name</th> <th>Retention time (min)</th> <th>Content (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td rowspan="45">Hydrocarbon</td><td>Germacrene D</td><td>11.19</td><td>11.56</td></tr> <tr><td>Caryophyllene</td><td>11.10</td><td>3.18</td></tr> <tr><td>Germacrene B</td><td>12.12</td><td>3.09</td></tr> <tr><td>2-Methylpropyl 9-methyl 9-methyl-4,10-dioxolene</td><td>13.84</td><td>2.60</td></tr> <tr><td>β-Eten</td><td>10.68</td><td>2.03</td></tr> <tr><td>α-Terpinene</td><td>10.16</td><td>1.79</td></tr> <tr><td>β-Etenesene</td><td>11.46</td><td>1.43</td></tr> <tr><td>β-Cadinene</td><td>12.35</td><td>1.29</td></tr> <tr><td>α-Caryophyllene</td><td>11.53</td><td>1.03</td></tr> <tr><td>Carypene</td><td>10.47</td><td>0.88</td></tr> <tr><td>Ottosapon</td><td>21.67</td><td>0.82</td></tr> <tr><td>β-Bisabolene</td><td>12.80</td><td>0.71</td></tr> <tr><td>Allicornadiolone</td><td>12.18</td><td>0.60</td></tr> <tr><td>β-Selinene</td><td>10.94</td><td>0.57</td></tr> <tr><td>Camphor</td><td>9.91</td><td>0.53</td></tr> <tr><td>(1S,5S)-bornadiene</td><td>11.61</td><td>0.53</td></tr> <tr><td>Cymene</td><td>5.50</td><td>0.12</td></tr> <tr><td>Murolene</td><td>12.41</td><td>0.46</td></tr> <tr><td>α-Cadinene</td><td>14.15</td><td>0.44</td></tr> <tr><td><i>n</i>-Limonene</td><td>18.27</td><td>0.38</td></tr> <tr><td>Terpinene</td><td>20.04</td><td>0.38</td></tr> <tr><td>α-Anisophene</td><td>12.28</td><td>0.33</td></tr> <tr><td>Linalene</td><td>16.07</td><td>0.30</td></tr> <tr><td>α-Cymene</td><td>10.18</td><td>0.30</td></tr> <tr><td>Heptacene</td><td>23.18</td><td>0.22</td></tr> <tr><td>Valencen</td><td>12.54</td><td>0.21</td></tr> <tr><td>α-Cadinene</td><td>12.05</td><td>0.18</td></tr> <tr><td>(E)-β-Terpinolene</td><td>16.41</td><td>0.18</td></tr> <tr><td>Bisabolene</td><td>26.10</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>γ-Muurolene</td><td>11.37</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>Terpinolene</td><td>25.26</td><td>0.11</td></tr> <tr><td>α-Terpinene</td><td>5.96</td><td>0.11</td></tr> <tr><td>Valencen</td><td>11.70</td><td>0.11</td></tr> <tr><td>β-Terpinolene</td><td>15.99</td><td>0.10</td></tr> <tr><td>Cyclohexene</td><td>10.36</td><td>0.10</td></tr> <tr><td>10E,11-epimachala-9(12),10-diene</td><td>10.82</td><td>0.08</td></tr> <tr><td>α-Bisabolene</td><td>5.17</td><td>0.06</td></tr> <tr><td>Terpinolene</td><td>6.41</td><td>0.06</td></tr> <tr><td><i>n</i>-Dodecane</td><td>19.17</td><td>0.05</td></tr> <tr><td>Ylangene</td><td>10.39</td><td>0.05</td></tr> <tr><td>Bornene</td><td>16.24</td><td>0.04</td></tr> <tr><td>Cineolene</td><td>18.08</td><td>0.04</td></tr> <tr><td>Tetraene</td><td>20.87</td><td>0.03</td></tr> <tr><td><i>n</i>-Nonane</td><td>22.44</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>α-Terpinene</td><td>5.35</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>Trans octene</td><td>5.79</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>β-Bisabolene</td><td>21.99</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>1,10-Epoxydodecane</td><td>23.51</td><td>0.01</td></tr> <tr><td rowspan="5">Alcohol</td><td>Myrcenol</td><td>6.08</td><td>1.36</td></tr> <tr><td>(1) Spatheolol</td><td>13.14</td><td>1.21</td></tr> <tr><td>Bornol</td><td>7.65</td><td>1.19</td></tr> <tr><td>Bacalpytol</td><td>5.97</td><td>0.86</td></tr> <tr><td>β-Terpinenol</td><td>11.76</td><td>0.83</td></tr> <tr><td>β-Bisabolol</td><td>13.74</td><td>0.83</td></tr> <tr><td>Phytol</td><td>18.49</td><td>0.24</td></tr> <tr><td rowspan="3">Ketone</td><td>Bornol</td><td>10.79</td><td>0.04</td></tr> <tr><td>Camphor</td><td>7.37</td><td>5.23</td></tr> <tr><td>2-Hydroxycyclopropanone</td><td>23.41</td><td>0.09</td></tr> <tr><td rowspan="3">Oxide</td><td>β-Thujone</td><td>6.85</td><td>0.04</td></tr> <tr><td>Caryophyllene oxide</td><td>13.18</td><td>3.38</td></tr> <tr><td>Hexacyclic oxirane</td><td>19.48</td><td>0.04</td></tr> <tr><td rowspan="2">Acetate</td><td>Isobornyl acetate</td><td>9.25</td><td>1.64</td></tr> <tr><td>Murolol acetate</td><td>9.76</td><td>1.13</td></tr> <tr><td rowspan="2">Aldehyde</td><td>Longibornaldehyde</td><td>13.67</td><td>0.56</td></tr> <tr><td>Hexahydroterpenyl acetone</td><td>15.84</td><td>0.28</td></tr> <tr><td rowspan="2">Acid</td><td>Isobornyl acid</td><td>20.34</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>Dodecyl succinic anhydride</td><td>19.30</td><td>0.01</td></tr> <tr><td rowspan="1">Anhydride</td><td>Urbone</td><td>24.41</td><td>0.41</td></tr> </tbody> </table>	Components	Compound Name	Retention time (min)	Content (%)	Hydrocarbon	Germacrene D	11.19	11.56	Caryophyllene	11.10	3.18	Germacrene B	12.12	3.09	2-Methylpropyl 9-methyl 9-methyl-4,10-dioxolene	13.84	2.60	β -Eten	10.68	2.03	α -Terpinene	10.16	1.79	β -Etenesene	11.46	1.43	β -Cadinene	12.35	1.29	α -Caryophyllene	11.53	1.03	Carypene	10.47	0.88	Ottosapon	21.67	0.82	β -Bisabolene	12.80	0.71	Allicornadiolone	12.18	0.60	β -Selinene	10.94	0.57	Camphor	9.91	0.53	(1S,5S)-bornadiene	11.61	0.53	Cymene	5.50	0.12	Murolene	12.41	0.46	α -Cadinene	14.15	0.44	<i>n</i> -Limonene	18.27	0.38	Terpinene	20.04	0.38	α -Anisophene	12.28	0.33	Linalene	16.07	0.30	α -Cymene	10.18	0.30	Heptacene	23.18	0.22	Valencen	12.54	0.21	α -Cadinene	12.05	0.18	(E)- β -Terpinolene	16.41	0.18	Bisabolene	26.10	0.15	γ -Muurolene	11.37	0.15	Terpinolene	25.26	0.11	α -Terpinene	5.96	0.11	Valencen	11.70	0.11	β -Terpinolene	15.99	0.10	Cyclohexene	10.36	0.10	10E,11-epimachala-9(12),10-diene	10.82	0.08	α -Bisabolene	5.17	0.06	Terpinolene	6.41	0.06	<i>n</i> -Dodecane	19.17	0.05	Ylangene	10.39	0.05	Bornene	16.24	0.04	Cineolene	18.08	0.04	Tetraene	20.87	0.03	<i>n</i> -Nonane	22.44	0.03	α -Terpinene	5.35	0.03	Trans octene	5.79	0.03	β -Bisabolene	21.99	0.01	1,10-Epoxydodecane	23.51	0.01	Alcohol	Myrcenol	6.08	1.36	(1) Spatheolol	13.14	1.21	Bornol	7.65	1.19	Bacalpytol	5.97	0.86	β -Terpinenol	11.76	0.83	β -Bisabolol	13.74	0.83	Phytol	18.49	0.24	Ketone	Bornol	10.79	0.04	Camphor	7.37	5.23	2-Hydroxycyclopropanone	23.41	0.09	Oxide	β -Thujone	6.85	0.04	Caryophyllene oxide	13.18	3.38	Hexacyclic oxirane	19.48	0.04	Acetate	Isobornyl acetate	9.25	1.64	Murolol acetate	9.76	1.13	Aldehyde	Longibornaldehyde	13.67	0.56	Hexahydroterpenyl acetone	15.84	0.28	Acid	Isobornyl acid	20.34	0.03	Dodecyl succinic anhydride	19.30	0.01	Anhydride	Urbone	24.41	0.41
Components	Compound Name	Retention time (min)	Content (%)																																																																																																																																																																																																																						
Hydrocarbon	Germacrene D	11.19	11.56																																																																																																																																																																																																																						
	Caryophyllene	11.10	3.18																																																																																																																																																																																																																						
	Germacrene B	12.12	3.09																																																																																																																																																																																																																						
	2-Methylpropyl 9-methyl 9-methyl-4,10-dioxolene	13.84	2.60																																																																																																																																																																																																																						
	β -Eten	10.68	2.03																																																																																																																																																																																																																						
	α -Terpinene	10.16	1.79																																																																																																																																																																																																																						
	β -Etenesene	11.46	1.43																																																																																																																																																																																																																						
	β -Cadinene	12.35	1.29																																																																																																																																																																																																																						
	α -Caryophyllene	11.53	1.03																																																																																																																																																																																																																						
	Carypene	10.47	0.88																																																																																																																																																																																																																						
	Ottosapon	21.67	0.82																																																																																																																																																																																																																						
	β -Bisabolene	12.80	0.71																																																																																																																																																																																																																						
	Allicornadiolone	12.18	0.60																																																																																																																																																																																																																						
	β -Selinene	10.94	0.57																																																																																																																																																																																																																						
	Camphor	9.91	0.53																																																																																																																																																																																																																						
	(1S,5S)-bornadiene	11.61	0.53																																																																																																																																																																																																																						
	Cymene	5.50	0.12																																																																																																																																																																																																																						
	Murolene	12.41	0.46																																																																																																																																																																																																																						
	α -Cadinene	14.15	0.44																																																																																																																																																																																																																						
	<i>n</i> -Limonene	18.27	0.38																																																																																																																																																																																																																						
	Terpinene	20.04	0.38																																																																																																																																																																																																																						
	α -Anisophene	12.28	0.33																																																																																																																																																																																																																						
	Linalene	16.07	0.30																																																																																																																																																																																																																						
	α -Cymene	10.18	0.30																																																																																																																																																																																																																						
	Heptacene	23.18	0.22																																																																																																																																																																																																																						
	Valencen	12.54	0.21																																																																																																																																																																																																																						
	α -Cadinene	12.05	0.18																																																																																																																																																																																																																						
	(E)- β -Terpinolene	16.41	0.18																																																																																																																																																																																																																						
	Bisabolene	26.10	0.15																																																																																																																																																																																																																						
	γ -Muurolene	11.37	0.15																																																																																																																																																																																																																						
	Terpinolene	25.26	0.11																																																																																																																																																																																																																						
	α -Terpinene	5.96	0.11																																																																																																																																																																																																																						
	Valencen	11.70	0.11																																																																																																																																																																																																																						
	β -Terpinolene	15.99	0.10																																																																																																																																																																																																																						
	Cyclohexene	10.36	0.10																																																																																																																																																																																																																						
	10E,11-epimachala-9(12),10-diene	10.82	0.08																																																																																																																																																																																																																						
	α -Bisabolene	5.17	0.06																																																																																																																																																																																																																						
	Terpinolene	6.41	0.06																																																																																																																																																																																																																						
	<i>n</i> -Dodecane	19.17	0.05																																																																																																																																																																																																																						
	Ylangene	10.39	0.05																																																																																																																																																																																																																						
	Bornene	16.24	0.04																																																																																																																																																																																																																						
	Cineolene	18.08	0.04																																																																																																																																																																																																																						
	Tetraene	20.87	0.03																																																																																																																																																																																																																						
	<i>n</i> -Nonane	22.44	0.03																																																																																																																																																																																																																						
	α -Terpinene	5.35	0.03																																																																																																																																																																																																																						
Trans octene	5.79	0.03																																																																																																																																																																																																																							
β -Bisabolene	21.99	0.01																																																																																																																																																																																																																							
1,10-Epoxydodecane	23.51	0.01																																																																																																																																																																																																																							
Alcohol	Myrcenol	6.08	1.36																																																																																																																																																																																																																						
	(1) Spatheolol	13.14	1.21																																																																																																																																																																																																																						
	Bornol	7.65	1.19																																																																																																																																																																																																																						
	Bacalpytol	5.97	0.86																																																																																																																																																																																																																						
	β -Terpinenol	11.76	0.83																																																																																																																																																																																																																						
β -Bisabolol	13.74	0.83																																																																																																																																																																																																																							
Phytol	18.49	0.24																																																																																																																																																																																																																							
Ketone	Bornol	10.79	0.04																																																																																																																																																																																																																						
	Camphor	7.37	5.23																																																																																																																																																																																																																						
	2-Hydroxycyclopropanone	23.41	0.09																																																																																																																																																																																																																						
Oxide	β -Thujone	6.85	0.04																																																																																																																																																																																																																						
	Caryophyllene oxide	13.18	3.38																																																																																																																																																																																																																						
	Hexacyclic oxirane	19.48	0.04																																																																																																																																																																																																																						
Acetate	Isobornyl acetate	9.25	1.64																																																																																																																																																																																																																						
	Murolol acetate	9.76	1.13																																																																																																																																																																																																																						
Aldehyde	Longibornaldehyde	13.67	0.56																																																																																																																																																																																																																						
	Hexahydroterpenyl acetone	15.84	0.28																																																																																																																																																																																																																						
Acid	Isobornyl acid	20.34	0.03																																																																																																																																																																																																																						
	Dodecyl succinic anhydride	19.30	0.01																																																																																																																																																																																																																						
Anhydride	Urbone	24.41	0.41																																																																																																																																																																																																																						

4) 개별인정 복합기능성 원료 등록을 위한 전략 수립

가) 비만 관련 건강기능식품 인증 현황

현재 비만 관련 건강기능식품은 체지방 감소에 도움을 주는 건강기능식품으로 분류되어 있으며 원료 현황은 아래와 같음

번호	원료명	인정등급	일일섭취량	섭취시 주의사항
1	히비스커스 등 복합추출물	생리활성 기능 2등급	히비스커스등 복합추출물로서 2,079 mg/일	체지방 감소는 반드시 식사조절과 운동이 병행되어야 효과적임
2	공액리놀레산(유리지방산)	생리활성 기능 2등급	총 공액리놀레산 으로서 2~4 g/일 (인정번호에 따라 일일섭취량 차이)	① 위장장애가 발생할 수 있으므로 주의 ② 영·유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동을 같이 하는

				것이 바람직 함
3	Green Mate Extract EFLA® 920	생리활성 기능 2등급	Green Mate Extract EFLA® 920로서 3 g/일	
4	가르시니아 캄보지아껍질 추출물	생리활성 기능 1등급	가르시니아 캄보지아껍질 추출물로서 총 (-)-HCA 750~2,800 mg/일	임산부와 수유기 여성 은 섭취를 피하는 것이 좋음
5	APIC 대두배아 추출물등 복합물	생리활성 기능 2등급	APIC 대두배아 추출물등 복합물 로서 700 mg/일	① 알르제기성 비염, 천 식, 우유 알레르기 반응을 나타내는 사 람 섭취 주의 ② 임산부, 수유기 여성 및 어린이는 섭취에 주의
6	중쇄지방산(MCFA) 함유 유지	생리활성 기능 2등급	일반 식용유 섭취방법과 동일	
7	식물성유지 디글리세라이드	생리활성 기능 2등급	일반 식용유 섭취방법과 동일	
8	콜레우스 포스 콜리 추출물	생리활성 기능 2등급	콜레우스 포스콜리 추출물로서 500 mg/일	① 항응고제 또는 혈압 조절제를 복용하거 나 혈압이 낮은 분은 섭취 주의 ② 임산부, 수유여성, 어린이 섭취 주의 유·소아, 임산부 및 수 유부 여성은 섭취 주의
9	깻잎추출물	생리활성 기능 2등급	깻잎추출물 (PF501)로서 2.7 g/일	유·소아, 임산부 및 수 유부 여성은 섭취 주의
10	L-카르니틴 타르트레이트	생리활성 기능 2등급	L-카르니틴 으로서 2 g/일	
11	레몬 밤 추출물 혼합분말	생리활성 기능	레몬 밤 추출물 혼합분말로서 1380 mg/일	① 알레르기 반응이 나

		2등급		타날 경우 섭취중단 ② 섭취 후 진정작용이 나타날 수 있으므로 주의 ③ 어린이, 임산부 수유 부 섭취주의
12	녹차추출물	생리활성 기능 2등급	카테킨 으로서 0.3 ~ 0.5 g/일	카페인 함유되어 있 어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있으므로 주의
13	서리태 (쥐눈이콩) 펩타이드복합물	생리활성 기능 2등급	서리태(쥐눈이콩) 펩타이드복합물로서 4.5 g/일	
14	키토올리고당	생리활성 기능 3등급	키토올리고당으로서 3g	게 또는 새우에 알레르기 가 있는 사람 섭취 주의 (게 또는 새우를 원 재료 로 사용한 경우에 한함)
15	마테열수 추출물	생리활성 기능 3등급	마테열수추출물로서 3 g/일	
16	돌외잎주정 추출분말	생리활성 기능 2등급	돌외잎주정추출분말로서 450 mg/일	과량섭취시 위장 장애 (구토와 위장운동 증가)
17	핑거루트 추출분말	생리활성 기능 2등급	핑거루트추출분말로서 600 mg/일	
18	락토페린(우유정제 단백질)	생리활성 기능 2등급	락토페린 로서 300 mg/일	우유 및 유제품 알레르 기가 나타나는 사람 섭 취 주의
19	미역등 복합 추출물(잔티젠)	생리활성 기능	미역등 복합 추출물(잔티젠) 으로서 600 mg/일	① 임산부, 수유부는 섭

		3등급		취 시 주의 ② 석류 알레르기가 있는 사람 섭취 주의 ③ 에스트로겐 호르몬에 민감한 사람섭취 주의
20	키토산	생리활성 기능 2등급	키토산으로서 3.0 ~ 4.5 g/일	게 또는 새우에 알레르기가 있는 사람은 섭취에 주의 (게 또는 새우를 원재료로 사용한 경우에 한함)

나) 천식 관련 건기식 현황

현재 기관지 천식 관련된 건강기능식품은 면역 기능 개선 중 과민면역반응 개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품으로 분류되어 있어 복합기능성의 타겟을 과민면역반응개선으로 명확히 해야 할 것이며, 과민면역반응개선 건강기능식품 원료는 아래와 같다.

번호	원료명	인정등급	일일섭취량	섭취시 주의사항
1	Enterococcus faecalis 가열처리 건조분말	생리활성 기능 2등급	Enterococcus faecalis FK-23 효소 및 가열처리건조분말로서 1 g/일	
2	구아바잎추출물 등 복합물	생리활성 기능 2등급	구아바잎 추출물등 복합물로서 800 mg/일	임산부, 수유 여성 섭취 삼가
3	다래추출물	생리활성 기능 2등급	다래추출물로서 2 g/일	임산부, 수유기 여성은 섭취 전 의사와 상담
4	피카오프레토 분말등복합물	생리활성 기능 3등급	신청원료 중 ‘아세로라농축물, 계피추출물, 피카오프레토 분말 3종 혼합물’로서 1,350 mg/일	임산부, 수유부, 어린이 섭취 주의

5	소엽추출물	생리활성 기능 4등급		
---	-------	-------------------	--	--

다) 복합 기능성 관련 건강기능식품 현황

기능성원료가 한 제품에 2가지 이상 복합하여 포함되어 있는 제품들을 조사한 결과 한 제품에 복합하여 함유되어 있는 기능성원료의 개수는 2개에서 37개의 원료를 복합한 제품까지 다양하였다. 복합하여 사용하고 있는 기능성 원료에는 비타민 및 무기질이 다수로 비타민 및 무기질의 영양소를 제외하고 동일한 기능성분을 제공하기 위한 기능성 원료들을 하나의 원료로 간주하여 파악한 결과 복합 건강기능식품으로 파악된 제품의 개수는 183개 제품이었고, 이들 중 기능성 원료를 2개 이상 함유하고 있는 제품은 총 177제품, 3가지 이상 함유하고 있는 제품은 모두 6개 제품이 있었다. 현재의 식약처 건기식 인증 관련 체계에 따라 복합기능성 제품을 개발하기 위해서는 현재 개발 중인 축부쟁이 이외의 소재를 선정하여 따로 개발하는 방법이 있지만 사업기간과 사업비의 한계가 있을 것으로 생각되며 우선 한가지 기능성 인증을 획득한 이후에 추가로 개별인증형 원료 인증을 받아야 할 것으로 사료된다.

(1) 복합기능성 제품 시장

대부분 제품이 기능성원료 2개 이상 함유하여 복합기능성 제품으로 출시되고 있다.

제품사진	제품명	판매원	기능성	원재료
	폴비타슬립 업 뷰티	올가	체지방감소, 피부건강, 배변활동에 도움	가르시니아캄보 지아, 식이섬유, 베타카로틴
	가르시니아 맥류약엽	JW중외제 약	체지방감소, 피부건강	가르시니아 캄보지아, 맥류약엽
	해초록	대상	콜레스테롤 개선, 피부건강	키토올리고당, 클로렐라
	리튬 프로아이	LG생명과 학	눈 건강	루테인지아잔틴 복합추출물, 베타카로틴

5) 시제품 제형 연구

가) GRS-1(썩부쟁이) 추출물 소재의 특성에 맞는 최적 시제품 개발을 위하여 정제, 액상 등의 제형에 대한 제조공정을 연구하고 제형 특성을 분석하였음

나) 분말화 연구

① GRS-1 복합추출물의 건강기능성 원료 제조를 위해 부형제를 일정량 혼합하여 분말화 연구를 진행하였음

② 말토덱스트린 첨가

- 아래와 같은 비율로 말토덱스트린을 첨가하여 결정 분말화 가능 여부를 확인하였음

구 분	덱스트린 첨가 비율(%)			
	20%	30%	60%	100%
결정 분말화 가능 여부	불가능	가능	가능	가능

* GRS-1 추출물 : 덱스트린 무게비 %

- 말토덱스트린을 이용하여 분말화 연구를 진행한 결과, GRS-1 추출물 고형분 함량(70%)에 덱스트린 30%를 첨가하여 분무건조를 통해 분말화가 가능하였음

다) 정제 제형 연구

가) 앞의 분말·과립화 연구를 통하여 GRS-1 추출물의 분말화가 가능함을 확인하였고 이를 통해 고형제 연구를 진행할 수가 있었음

나) 섭취와 보관이 용이하며 휴대성이 높은 정제화 연구는 상품성을 높일 수 있는 제품의 고품격화를 보일 수 있을 것이라 판단되며 이에 대한 연구를 진행하였음

다) 부형제 첨가 조건 검토

① 타정 시 부피를 채워주기 위하여 결정셀룰로오스 21.25%와 유당분말13%를 첨가하였음

② 정제 제작과정에서 원료에 포함된 다당류에 의하여 타정기 내에 원료가달라붙는 문제점이 발생하였음 이를 해결하기 위한 방법으로 활택제로서 스테아린산마그네슘 1.2%를 첨가하여 문제를 개선할 수 있었음



그림 1. 체지방 감소에 도움을 주는 GRS-1 시제품 제형

6) GRS-1 추출물의 인체적용시험 신청

1) 진행 단계

가) CRO 업체와 선정 및 계약

① (주)파마크로 : 2018년 12월 계약 완료

나) 인체적용시험 시험군, 대조군 시료 제조

① 시험군은 GRS-1 추출물을 이용하여 시제품 개발과 동일한 방법으로 제작함

나) IRB 신청 준비

① IRB 신청 자료 작성 및 제출

② IRB 신청 자료는 식약처 개별인정 신청 서류의 양식을 토대로 작성중이며 (주)파마크로에 전달하여 검토를 요청할 예정임

③ 인체적용시험 프로토콜 작성 : 인체적용시험을 통한 체지방 개선 소재인 GRS-1 추출물 정제에 대한 기능성 평가를 하기 위해 피험자수, 시험방법, 통계처리 방법 등에 관한 프로토콜을 작성하여 양지병원에 제출할 예정임

3. 기능성 원료 인정 신청을 위한 자료 요약

1. 원료명	쑥부쟁이 추출물	
2. 원재료	쑥부쟁이(<i>Aster yomena</i>) 잎	
3. 기능(지표)성분	Rutin, Nicotiflorin, Morin	
4. 제조공정	원재료→세척→주정추출→여과→농축→부형제 첨가 및 건조→쑥부쟁이 추출물	
5. 규격 및 시험방법	○ 성상: 진한 갈색의 뽀얀 맛이 나는 분말 ○ 기능(지표)성분: Rutin 9.3μg/g, Nicotiflorin 1.7μg/g, Morin 1.7μg/g 3) 유해성분 • 납: 1 ppm 이하 • 총비소: 1 ppm 이하 • 카드뮴: 0.5 ppm 이하 • 총수은: 0.5 ppm 이하	
	기능(지표)성분 시험법	자사시험법 *시험법 검증 자료 첨부
	규격외 (잔류농약)	잔류농약 50종 분석 결과, 모두 불검출
6. 안전성	의사결정도	의사결정도: 나 (섭취경험이 있는 원재료를 제조·가공한 것으로 섭취량이 일상섭취량 보다 증가하지 않음)
	섭취 근거	<인정현황> <input type="checkbox"/> 국내

		<p>. 쑥부쟁이는 식품원료로 사용가능함 (식품공전, 식약처 고시 제2015-제5조1항)</p> <p>. 현재 쑥부쟁이 추출물로 과민면역완화 건강기능식품 기능성 원료로 신청중임</p> <p><input type="checkbox"/>국외</p> <p>. 일본에서 쑥부쟁이가 식품으로 분류되어 있음 (후생노동성식품안전부의 농수산물 등의 식품분류표)</p> <p><사용현황></p> <p><input type="checkbox"/>국내</p> <p>. 쑥부쟁이 환, 분말 제품이 일반식품으로 판매되고 있음</p> <p><input type="checkbox"/>국외</p> <p>. 일본에서 쑥부쟁이는 분말, 과립 형태의 일반식품으로 유통되고 있음</p>								
	안전성 정보	<p><input type="checkbox"/> 안전성 정보 DB</p> <p>. 쑥부쟁이에 대한 이상반응, 부작용 보고 없음</p>								
	섭취량 평가	<p>1) 인체적용시험 유효 용량에 따른 쑥부쟁이 1일 섭취 기준</p> <table border="1" data-bbox="459 987 1401 1084"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>주정추출분말</th> <th>건조물</th> <th>생물</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1일 섭취량</td> <td>2g</td> <td>6.7~10g</td> <td>67-100g</td> </tr> </tbody> </table>	구분	주정추출분말	건조물	생물	1일 섭취량	2g	6.7~10g	67-100g
구분	주정추출분말	건조물	생물							
1일 섭취량	2g	6.7~10g	67-100g							
	독성 시험	해당사항없음.								

아. 썬부쟁이 제품개발

가공상품의 개요	썬부쟁이 머핀, 쿠키	
필요성	<ul style="list-style-type: none"> • 국내외 관광객을 위한 지역 대표 먹거리 및 관광자원화 • 지역 대표 먹거리 개발을 통한 지역경제 활성화 및 일자리 창출 • 지역특산물을 활용하여 기호성과 건강성이 강화된 식품 개발 필요 	
대표제품 용도	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <ul style="list-style-type: none"> • 지역 대표 먹거리 • 직접 수확한 썬부쟁이를 가지고 특화된 머핀, 쿠키 만들기 체험 접목 • 카페 대표 주전부리 • 선물용 제품 	
성능(품질) 지역특산 등	<ul style="list-style-type: none"> • 구례지역 활력작목 썬부쟁이 활용 대표 간식 • 직접 재배한 친환경 썬부쟁이를 이용 • 부재료인 우리 밀, 쌀은 구례군 생산 제품 사용 • 국내산 원료만 사용 • 기존 머핀에 비해 다양한 야채와 여러 종류의 견과류가 포함되어 영양균형이 잡혀 있는 완전식품 • 안전한 식품 (친환경 인증 무항생 달걀 사용, 색소나 방부제 혹은 식품첨가제를 사용하지 않음) • 구례의 유명 관광지에서 판매될 수 있는 우수한 관광 상품 • 신선한 썬부쟁이를 연중 생산하고 공급할 수 있는 전국 유일의 업체 	
특성 (외관구조, 디자인 등)	<ul style="list-style-type: none"> • 각 제품은 개별포장 및 패키지로 포장됨 • 고객의 요청에 따라 다양한 규격을 생산함 • -40℃급속 냉동식품으로 장기간 보관 가능하고 해동 후 식감 그대로 유지 • 삼면자동포장 및 금속검출기 통과로 안전성 확보 	



국내외 관련기술현황

- 안동을 비롯한 전국 지자체에서 지역 특산품을 이용한 가공식품 개발 및 이를 활용한 관광 상품화를 통하여 지역 경제와 농민의 수익증대에 도움을 주고 있음

※ 지역 특화 빵류 특허 현황

주요 내용	특허권자	특허등록번호
◦대추 추출물을 포함하는 빵 조성물	학교법인 영남학원	10-0529003
◦울금, 녹차, 영지버섯, 흰목이버섯을 포함하는 빵의 제조방법	(주)파고다에프에스, 조선대학교 산학협력단	10-1068522
◦오곡분을 이용한 빵 제조방법	주식회사 파리크라상	10-0803336
◦기능성 동아 빵 및 그 제조방법	전라북도(농업기술원)	10-0446986
◦귀리 발아 효소를 이용한 빵의 제조방법	김범안	10-1215510
◦천마를 함유하는 기능성 빵	씨에프 주식회사	10-0411506
◦꾸지뽕 효소를 이용한 빵의 제조방법	김상균	10-1226149
◦빵잎분말을 이용한 빵의 제조방법	조남지(충남)	10-0314910
◦한국산 겨우살이 추출물을 이용한 향당노빵 제조방법과 이로부터 얻어지는 향당노 활성을 갖는 당노빵	김종배, 허상녕	10-0547187
◦상황버섯을 이용한 찰보리빵 제조방법	허정미	10-0775145
◦고구마와 오디가 함유된 쌀빵의 제조방법 및 이에 의해 제조된 쌀빵	김행중	10-0774240
◦찰보리빵 및 그 제조방법	서영석	10-0451057
◦백년초 열매를 이용한 찰보리케이크 제조방법	구복선	10-1069505
◦저혈당지수 특성을 갖는 제과·제빵용 조성물 및 이를 제조하는 방법	경남대학교 산학협력단	10-1181876
◦버찌 분말을 포함하는 노화방지용 건강식품의 제조방법	충남대학교 산학협력단	10-1110198

기술경쟁력

■ 2년간 제품개발 시험연구 기술

- 쫄부쟁이와 베이스(우리밀, 쌀)의 배합비율, 숙성시간, 반죽정도 조건 정립
- 소비자 반응 조사를 통한 제품 개발
- 쫄부쟁이 우수종 선발 시험연구 : 자생쫄부쟁이 *Aster yomena*종 육성
- 쫄부쟁이 분말화 조건 확립
- 쫄부쟁이 머핀, 쿠키 제조방법 특허출원 : 2건
- 쫄부쟁이 기능성 시너지 효과
 - 쫄부쟁이 비만억제, 체중 감소효과 첫 확인(KBS1 뉴스광장)
 - 쫄부쟁이 추출물의 간세포내 지방축적 억제효과 연구결과 발표
 - ※ 상지대학교 한의학과 안효진 교수
 - 칼슘과 철분보충 및 과잉 섭취한 나트륨 배출에 탁월한 효과(세종전통음식연구소)
 - 쫄부쟁이 기능성 식품원료 등재 시험연구(농촌진흥청 기능성식품과)



■ 브랜드 파워

- TV 6시 내고향, 생생 정보통, 한국인의 밥상 등 12회 방영
- 경향신문 「눈도 입도 즐거운 쫄부쟁이의 변신」, 전남일보, 조선일보 등 신문 보도 340회



가공상품의 개요	쭈부쟁이 간편 비빔밥
필요성	<ul style="list-style-type: none"> • 쭈부쟁이 즉석 조리나물의 간편식화 • 쭈부쟁이 음식의 대중화 • 지역특산물을 활용하여 기호성과 건강성이 강화된 식품 개발 필요 • 체지방 감소 효능이 있는 쭈부쟁이 활용성 증대 필요
대표제품 용도	<div style="text-align: center;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> • 지역 대표 먹거리 • 직접 수확한 쭈부쟁이를 가지고 선별하여 각종 야채와 함께 넣은 즉석조리 제품 • 카페 대표 주전부리 • 선물용 제품
성능(품질) 지역특산 등	<ul style="list-style-type: none"> • 직접 재배한 친환경 쭈부쟁이를 이용 • 국내산 원료만 사용 • 안전한 식품 (친환경 인증 무항생 달걀 사용, 색소나 방부제 혹은 식품첨가제를 사용하지 않음) • 구례의 유명 관광지에서 판매될 수 있는 우수한 관광 상품 • 신선한 쭈부쟁이를 연중 생산하고 공급할 수 있는 전국 유일의 업체
특성 (외관,구조)	<ul style="list-style-type: none"> • 각 제품은 개별포장 및 패키지로 포장됨

디자인 등)	<ul style="list-style-type: none">● -40℃급속 냉동식품으로 장기간 보관 가능하고 해동 후 식감 그대로 유지● 삼면자동포장 및 금속검출기 통과로 안전성 확보
--------	--

자. 썩부쟁이 제품 홍보 및 판매

2016년 5월 19일 목요일 007면 기화

지리산 자락 지천이던 들국화 '꽃보다 요리' 먹혔다

화기차 노년층 ▶ 부가적으로 입맛 ▶ 향미향미도 부유한 기화



이웃은 눈도 즐겁게 하지만 건강도 챙기게 한다. 최근 들국화 견본이 국내 최대의 썩부쟁이 축제인 '꽃보다 요리'에 참가했다. 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다. 특히 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다. 특히 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다. 특히 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다.

▲ 전라일보

2015년 10월 15일 목요일 047면 은희

눈도 입도 즐거운 '썩부쟁이의 변신'

이웃은 눈도 즐겁게 하지만 건강도 챙기게 한다. 최근 들국화 견본이 국내 최대의 썩부쟁이 축제인 '꽃보다 요리'에 참가했다. 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다. 특히 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다. 특히 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다.

▲ 경향신문

2015년 10월 23일 화요일 009면 기화

썩부쟁이 쿠키, 떡 맛체험

이웃은 눈도 즐겁게 하지만 건강도 챙기게 한다. 최근 들국화 견본이 국내 최대의 썩부쟁이 축제인 '꽃보다 요리'에 참가했다. 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다. 특히 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다. 특히 들국화 견본은 맛과 향미가 뛰어나다.

▲ 전라일보

경향신문 ▶

▼ 썩부쟁이 쿠키, 떡 맛체험



피아골단풍제

▼ 썩부쟁이 아이스크림 홍보



부안국제식품대전

선경일보

2015년 06월 23일 화요일 009면 기화

구례군, 부산국제식품대전 썩부쟁이 홍보부스 '성황'

자연과 활력을 맛보세!

구례군은 지난 17일부터 20일 부산국제식품대전에서 자연과 활력을 맛보세! 라는 주제로 썩부쟁이 홍보부스를 운영했다. 이번 행사에 부각된 썩부쟁이 아이스크림 홍보부스는 특히 큰 인기를 끌었다. 이번 행사에 부각된 썩부쟁이 아이스크림 홍보부스는 특히 큰 인기를 끌었다.

8월 27일

8888.com



▲ 한가위명절상품전



▲ 부산국제식품대전

2015년 10월 15일 목요일 047면 은희

썩부쟁이 더 맛있게 먹는 법

저온·저압·항균·항산화 등 다양한 효능을 가진 썩부쟁이. 썩부쟁이 효능을 극대화하기 위해서는 썩부쟁이를 잘 익혀 먹는 것이 중요하다. 썩부쟁이를 잘 익히기 위해서는 썩부쟁이를 잘 익혀 먹는 것이 중요하다.



▲ KBC 남도의 아침



▲ KBS 필동



▲ 공영홈쇼핑 통한 판매

■ 유통 채널 다변화

- 공영홈쇼핑 채널을 통한 판매
 - 2018년 12월 24일 오후 3:20~4:10분 방영
 - 구례삼촌 나물비빔밥 1200세트 판매
- 해외 시장 개척
 - 쪽부쟁이 건나물 수출 약 1,500kg

■ 납품성과

- 쪽부쟁이 나물, 쿠키세트 1,600상자 추석선물세트 납품
- 오수휴게소 풀무원, 황전 휴게소 삼립식품 머핀, 쿠키 8월 납품
- 인사동 사찰음식점 6,000개/1년 납품 계약 체결
- 카페업체와 쪽부쟁이 머핀, 쿠키 납품 계약 체결 : 6개소(서울, 일산, 목포 등)
- 급식업체 햇뜰푸드(부산), 떡수라(부산, 창원) 머핀 납품 협의 중
- 전국 단체급식 납품

■ 기타 과제 선정

- 2017년 쌀 산학협력사업 가공품 개발업체에 선정
 - 올해 전라남도농업기술원에서 추진한 산학협력사업에 농업회사법인 구례삼촌이 선정되어 3000만 원 사업비를 지원받아 우리쌀 머핀, 쿠키, 호두과자 등 쌀주전부리 개발을 추진

■ 쪽부쟁이 전문 산채밥상 개발

- 쪽부쟁이 전문 식당 양성을 위한 산채밥상 개발



구례군,썩부쟁이전문 산채밥상개발'눈길'

'지리산꽃나물명가육성시범사업평가회'에서시범보여

김성수 기자 승인 2017.12.12 13:44 댓글 0



구례군 농업기술센터가 지난 8일 개최한 '지리산꽃나물명가육성시범사업평가회'에서 선보인 육류없이 산채 나물밥. 사진제공=구례군



○ 썩부쟁이 전문 식당 컨설팅



▣ 수상실적

○ 6차산업 경진대회 농촌진흥청장상 우수상 수상 (2017. 10. 18)



○ 세계농업 기술상 수상 (2016. 8. 16)



2-2. 연구개발 성과

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코드번호		C-06-01		
					국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	High-Throughput Detection of Antioxidants in Mulberry Fruit Using Correlations between High-Resolution Mass and Activity Profiles of Chromatographic Fractions	Plant Methods	Ye Ji Par, Si Hyun Seong, Min Sun Kim, Sang-Wan Seo, Mee Ree Kim, Hyun Sik Kim	13:108	영국	BioMed Central	SCI IF=4.269 JCR상위 10%	2018.12	
2	고지방 식이로 유도된 비만 생쥐에서 췌부췌이 에탄올 추출물의 항비만 효과	동의생리병리학회지	이호재, 김현식, 서상완		대한민국	대한동의생리학회	비SCI	2017.11	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	코드번호	
				장소	국명
1	한국질량분석학회	김민선	2016.08.18	경주컨벤션센터	대한민국
2	한국자원식물학회	서상완	2017.09.28	세명대학교 학술관	대한민국
3	한국질량분석학회	박솔비	2018.08.23	창원컨벤션센터	대한민국

다. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

						코드번호	C-06-04		
No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증 조성물	대한민국	구례삼촌, 한국기초과학지원연구원, 호남대학교	2016.12.29	1020160182976				
2	쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물	대한민국	구례삼촌, 한국기초과학지원연구원, 호남대학교	2016.12.29	1020160182864				
3	쑥부쟁이 에탄올 추출물을 유효성분으로 하는 항비만 조성물	대한민국	구례삼촌, 한국기초과학지원연구원, 호남대학교	2017.12.28	1020170182159				
4	쑥부쟁이 추출물 또는 쑥부쟁이 분획추출물을 이용한 항염 및 항비만 조성물과 상기 조성물을 제조하는 방법	대한민국	구례삼촌, 한국기초과학지원연구원, 호남대학교	2018.12.28	1020180173303				

바. 전문연구 인력양성

						코드번호	C-06-06						
No 1	분류	기준 년도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력양성	2016			1		1					1	
		2017		1	2		3			1		2	
		2018		1	1		2					2	

아. 기술거래(이전) 등

				코드번호	C-06-08	
No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	기술이전	고분해능 질량분석법과 약리활성검사를 이용한 천연물의 약리 활성물질 발굴 방법	제천한약영농조합법인	2018.12.1	3,000,000	3,000,000

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- ▶ 구례산 쪽부쟁이를 이용한 2개 이상의 만성 질환(천식, 비만) 예방 및 완화를 위한 복합 기능성 식품소재 개발
- 구례산 쪽부쟁이의 기관지 천식 억제 효능 검증 및 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보
- 연구 결과의 사업화로 쪽부쟁이 재배 농가 수익 증대 및 지역경제 활성화

3-2. 목표 달성여부

연도	구분	세부과제명	연구개발 목표 및 내용	가중치 (%)	달성도 (%)
1차년도	제1세부(주관)	쪽부쟁이를 활용한 가공제품 개발 및 사업화	· 원료 재배방법 표준화 · 추출 조건 설정 및 제조공정 표준화 · 개별인정 기능성 원료 등록을 위한 전략 수립	30	100
	제1협동	쪽부쟁이 지표 성분의 분석 방법 발굴	· 추출법 확립 및 생리활성 성분 분석 · 지표물질 선정	30	100
	제2협동	쪽부쟁이를 활용한 비만/천식 억제 효과 연구	· 천식 기능성 평가(in vitro) · 비만 기능성 평가(in vitro)	40	100
2차년도	제1세부(주관)	쪽부쟁이를 활용한 가공제품 개발 및 사업화	· 기능성 원료의 제조공정 표준화 및 기준규격 설정 · 시제품 개발	30	100
	제1협동	쪽부쟁이 지표 성분의 분석 방법 발굴	· 생리활성성분 분리방법 표준화 · 원료기준 규격 확립 · 기능성 원료의 기능성 평가 인체적용시험 준비	30	100

	제2협동	쫄부쟁이를 활용한 비만/천식 억제 효과 연구	· 천식 기능성 평가(in vivo) · 비만 기능성 평가(in vivo)	40	100
3 차 년 도	제1세부 (주관)	쫄부쟁이를 활용한 가공제품 개발 및 사업화	· 대량생산공정 확립 · 시제품 개발 및 사업화 · 쫄부쟁이의 기능성과 안정성을 평가하기 위한 인체적용 시험 신청	30	70
	제1협동	쫄부쟁이 지표 성분의 분석 방법 발굴	· 시제품 성분 분석 표준화	30	100
	제2협동	쫄부쟁이를 활용한 비만/천식 억제 효과 연구	· 쫄부쟁이의 기능성에 대한 기전 연구 · 기능성 원료 인정신청 제출자료 작성	40	90

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 기능성 원료의 기능성 평가 인체적용시험 준비 미비 사유

- IRB 승인 조건인 기능성 원료의 특성에 대한 검토를 바탕으로 기능성분(또는 지표성분)의 대표성이 확보되었는지 여부에서 쫄부쟁이는 지표물질이 밝혀지지 않았기 때문에 쫄부쟁이의 성분을 분획하여 생리활성 물질을 탐색하는 과정에서 시간이 지체되어 사업기간내에 달성이 힘들었음. 2019년 1월에 NMR을 통하여 성분을 확인하여 IRB 승인을 받는다는 무리가 없어보임.

○ 논문실적 미비 사유

쫄부쟁이는 지표물질이 밝혀지지 않았기 때문에 쫄부쟁이의 성분을 분획하여 생리활성 물질을 탐색하는 과정에서 시간이 지체되어 사업기간내에 달성이 힘들었음. 그러나 생리활성 물질을 규명하여 2019년 4월부터 논문(쫄부쟁이 에탄올 추출물의 급성취장염 보호 효과/대한분초학회지)이 게재되었음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

○ 활용방안

- 만성질환(비만, 천식)에 대한 멀티 기능성을 나타내는 새로운 복합 기능 식품 소재의 제품 개발 및 산업화
- 기업에 연구성과물 기술 이전을 통하여 건강기능식품 개별 인정 추진
- 산학연 공동으로 사업단 구성하여 산업화 추진 (유통 및 마케팅 추진)

- GMP 시설을 이용한 건기식 원료 및 제품 생산
- 제형별 검토를 통한 시제품 생산 및 소비자 니즈를 충족시킬 수 있는 제품 추구
- 나아가 관광, 체험, 지역경제 활성화 등 최근 국가 산업 방향인 6차 산업과의 연계 가능

붙임. 참고문헌

1. Keffe EB, Adesman PW, Stenzel P, Palmel RM. Steatosis and cirrhosis in an obese diabetic. Resolution of fatty liver by fattening. *Dig Dis Sci* 1987;32:441-5.
2. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983;May;67(5):968-77.
3. Lee, CB. Coloured flora of Korea. pp. 322. Hyangmoon-sa, Seoul, Korea. 2006.
4. Hotta, MK, Ogata, A. Nitta, K. Hosokawa, M. Yanagi and K.Yamazaki. 1989. Useful Plants of the World. Heibonsha, Tokyo, Japan. p. 125-7.
5. Jung BM, Lim SS, Park YJ, Bae SJ. Inhibitory effects on cell survival and quinone reductase induced activity of *Aster yomena* fractions on human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*.2005;34:8-12.
6. Chon SU, Kim DI, Choi YS. Assessments on insecticidal and fungicidal activities by aerial part extracts from several compositae plants. *Kor J Weed Sci*. 2003;23:81-91.
7. Sim MO, Ham JR, Lee HI, Seo KI, Lee MK. Long-term supplementation of umbelliferone and 4-methylumbelliferone alleviates high-fat diet induced hypertriglyceridemia and hyperglycemia in mice. *Chem Biol Interact*. 2014 Jun 5;216:9-16.
8. Hou J, Wang L, Long H, Wu H, Wu Q, Zhong T, Chen X, Zhou C, Guo T, Wang T. Hypoxia preconditioning promotes cardiac stem cell survival and cardiogenic differentiation in vitro involving activation of the HIF-1 α /apelin/APJ axis. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):215
9. Kraus NA, Ehebauer F, Zapp B, Rudolphi B, Kraus BJ, Kraus D. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte*. 2016;5(4):351-8.
10. Sim MO, Lee HI, Ham JR, Seo KI, Lee MK. Long-term supplementation of esculetin ameliorates hepatosteatosis and insulin resistance partly by activating AdipoR2-AMPK pathway in diet-induced obese mice. *J. Funct. Foods*. 2015.15:160-71.

11. Anghebem-Oliveira MI, Martins BR, Alberton D, Ramos EAS, Picheth G, Rego FGM. Type 2 diabetes-associated genetic variants of FTO, LEPR, PPAR α , and TCF7L2 in gestational diabetes in a Brazilian population. *Arch Endocrinol Metab.* 2017;61(3):238-8.
12. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008Mar;22(3):659-61.
13. Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, Baile CA. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci.* 2008 May 7;82(19-20):1032-9.
14. Xu J, Wang X, Cao K, Dong Z, Feng Z, Liu J. Combination of β -glucan and *Morus alba* L. Leaf Extract Promotes Metabolic Benefits in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients.* 2017;12;9(10).
15. Hamm JK1, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):18464-71.
16. Jung HJ, Park JH, Kim MJ. Ethanol extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaves inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J. Plant Res.* 2015;28:582-590(in Korean).
17. Schriffler AJ, Schrlmerich and C. Bchler. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2005;6:273-80.
18. Kim S, Jin SH, Kim TH. A Study on etiological factors, symptoms of a disease, and treatments of obesity based on Dong-Yi Bo Gam. *Journal of Oriental Medical Classics.* 1998;125-36.
19. Nagai H, Tanaka T, Goto T, Kusudo T, Takahashi N, Kawada T. Phenolic compounds from leaves of *Casimiroa edulis* showed adipogenesis activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78(2):296-300
20. Roncari DA, Lau DC, Kindler S. Exaggerated replication in culture of adipocyte precursors from massively obese persons. *Metabolism.* 1981 May;30(5):425-7.
21. Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr.* 2000 Dec;130(12):3116S-3121S.

22. Rosen ED, Macdougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006;7:885-96.
23. Kang HJ, Jeong JS, Park NJ, Go GB, Kim SO, Park C, Kim BW, Hong SH, Choi YH. An ethanol extract of *Aster yomena* (Kitam.) Honda inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages. *Biosci Trends.* 2017;11(1):85-94.
24. Min YD, Choi SJ, Lee KN. Terpenoids from the Aerial Parts of *Aster glehni*. *Yakhak Hoeji.* 2004;48:65-69
25. Ryu HJ, Um MY, Ahn JY, Jung CH, Huh D, Kim TW, Ha TY. Anti-obesity effect of *Hypsigus marmoreus* in high fat-fed mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2011;40:1708-14.
26. Soukas AP, Cohen ND, Socci JM, Friedman. Leptin specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* 2000;14:963-80.
27. Park YM, Lim JH, Seo EW. Anti-obesity effect of by-product from soybean on mouse fed a high fat diet. *Korean J. Plant Res.* 2015;28:168-77.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 쑥부쟁이를 활용한 만성질환 개선 다기능 소재 개발					
	(영문)Development of multi-fuctional material on prevention of the chronic disease using <i>Aster yomena</i>					
주 관 연구 기관	농업회사법인 구례삼촌		주 관 연 구 책 임 자	(소속)농업회사법인 구례삼촌		
참 여 기 업				(성명)이명엽		
총 연구개발비 (700,000 천원)	계	700,000천원	총 연 구 기 간	2016.07.07~2018.12.31(2년 6월)		
	정부출연 연구개발비	560,000천원		총 참 연 구 원 수	총 인 원	36
	기업부담금	140,000천원			내부인원	24
	연구기관부담금				외부인원	12
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>▶ 구례산 쑥부쟁이를 이용한 2개 이상의 만성 질환(천식, 비만) 예방 및 완화를 위한 복합 기능성 식품소재 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 구례산 쑥부쟁이의 기관지 천식 억제 효능 검증 및 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보 - 연구 결과의 사업화로 쑥부쟁이 재배 농가 수익 증대 및 지역경제 활성화 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제품에 대한 시장 분석 및 전략 수립 <ul style="list-style-type: none"> - 만성 질환2개 영역(천식, 비만)에 따른 쑥부쟁이 소재 선정 - 기존 제품과 차별화된 형태의 쑥부쟁이 건강 기능성 제품의 개발을 위한 제품 개발 방향 설정 2. 복합 기능성 소재의 대량생산공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 기능성 원료의 제조공정표준화 및 생산 공정 최적화 - 소재에 대한 가공 적성연구 - 소재에 대한 안정성 연구 3. 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정 <ul style="list-style-type: none"> - 분획물 조제 및 표준화 - 분획물 및 생리 활성성분에 대한 효능 평가 - 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정 4. 원료에 대한 기준규격 및 지표물질 밸리데이션 5. 기능성 활성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 세포 및 동물 6. 시제품 개발 7. 식약처 개별 인정 기능성 원료 신청을 위한 인체 적용시험 신청 						

○ 연구성과 활용실적 및 계획

▶ 구례산 쑥부쟁이를 이용한 2개 이상의 만성 질환(천식, 비만) 예방 및 완화를 위한 복합 기능성 식품소재 개발

- 구례산 쑥부쟁이의 기관지 천식 억제 효능 검증 및 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보
- 연구 결과의 사업화로 쑥부쟁이 재배 농가 수익 증대 및 지역경제 활성화

○ 연구내용 및 결과

1. 제품에 대한 시장 분석 및 전략 수립

- 만성 질환2개 영역(천식, 비만)에 따른 쑥부쟁이 소재 선정
- 기존 제품과 차별화된 형태의 쑥부쟁이 건강 기능성 제품의 개발을 위한 제품 개발 방향 설정

2. 복합 기능성 소재의 대량생산공정 확립

- 기능성 원료의 제조공정표준화 및 생산 공정 최적화
- 소재에 대한 가공 적성연구
- 소재에 대한 안정성 연구

3. 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정

- 분획물 조제 및 표준화
- 분획물 및 생리 활성성분에 대한 효능 평가
- 생리활성 성분에 대한 분리 및 동정

4. 원료에 대한 기준규격 및 지표물질 밸리데이션

5. 기능성 활성 평가

- 세포 및 동물

6. 시제품 개발

7. 식약처 개별 인정 기능성 원료 신청을 위한 인체 적용시험 신청

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		116035-3	
사업구분	농림기술개발사업				
연구분야	농림기술개발사업			과제구분	단위
사업명	고부가가치 식품기술개발 사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	쭉부쟁이를 활용한 만성질환 개선 다기능 소재 개발			과제유형	(기초,응용,개발✓)
연구기관	구례삼촌			연구책임자	이명엽
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도		170,000	42,500	212,500
	2차연도		200,000	50,000	250,000
	3차연도		190,000	47,500	237,500
	4차연도				
	5차연도				
	계		560,000	140,000	700,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018.12.05

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
구례삼촌	대표이사	이명엽

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

- 지역 특산 산업자원의 기능성 발굴을 통한 지역 영농조합법인의 연구 개발 경쟁력 확보 및 원천기술을 활용한 자립화가 가능하였음
- 썩부쟁이 항염증 및 비만 효과 관련 생리활성물질을 발굴하여 추후 지속적인 연구성과 발생 가능성이 높음
- 주관기관의 유통역량 등으로 사업화 제품의 성공적인 매출 증대와 고용창출효과 달성
- 지역특화자원의 우수성 확보를 통한 식품소재 및 건강기능식품 산업의 세계시장 비교 우위 선점으로 국가 경쟁력 확보가 가능하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

- 비용이 상대적으로 적고, 발굴 속도가 빠른 신개념 신물질 발굴방법 활용으로 국제적인 경쟁력 강화
- 만성질환 (기관지 천식, 비만)에 대한 멀티 기능성을 나타내는 새로운 복합 건강기능식품 소재의 제품 개발 및 산업화
- 지역 특화 자원의 우수성 확보를 통한 식품 소재 및 건강기능식품 산업의 세계시장 비교 우위 선점으로 국가경쟁력 확보
- 주관기업의 수익증대에 따른 우수 원료 계약 재배로 썩부쟁이 농가의 안정적 판로 확보를 통한 농가 매출 증대
- 썩부쟁이 제품 개발로 인해 관광, 체험, 지역경제 활성화 등 최근 국가산업 방향인 6차 산업과의 연계 가능

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

- 만성질환(비만, 천식)에 대한 멀티 기능성을 나타내는 새로운 복합 기능 식품 소재의 제품 개발 및 산업화
- 기업에 연구성과물 기술 이전을 통하여 건강기능식품 개별 인정 추진
- 산학연 공동으로 사업단 구성하여 산업화 추진 (유통 및 마케팅 추진)
- GMP 시설을 이용한 건기식 원료 및 제품 생산
- 제형별 검토를 통한 시제품 생산 및 소비자 니즈를 충족시킬 수 있는 제품 추구
- 나아가 관광, 체험, 지역경제 활성화 등 최근 국가 산업 방향인 6차 산업과의 연계 가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

- 기관별 목표달성을 위해 연구개발을 성실히 수행하였음
- 기관별 유기적 연구성과 달성을 위해서 노력하였음
- 기관별 MOU를 통해서 연속적인 연구 업무 협업을 약속하고 있음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

연구개발성과의 경우 논문 2편, 학술대회 발표 3건, 지적소유권4건, 홍보실적 50건, 전시회 박람회 제품설명회 참석 10회등 연구개발성과들이 존재하며 이를 홍보하고자 노력하였음.

II . 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
쑥부쟁이를 활용한 가공제품 개발 및 사업화	40	100	쑥부쟁이를 활용한 제품 개발 및 기타 파생상품개발을 통한 성공적 사업화를 이루었으며 계속적으로 개발된 시제품의 사업화를 진행하고있어 연속적인 성과창출이 가능할 것으로 판단됨
쑥부쟁이 지표 성분의 분석 방법 발굴	30	100	쑥부쟁이 지표 성분 분석을 통하여 제품 품질 규격 확립에 지대한 영향을 끼쳤음.
쑥부쟁이를 활용한 비만/천식 억제 효과 연구	30	100	쑥부쟁이 추출물을 통한 비만/천식 기능성 검증을 통해 제품 개발에 지대한 영향을 미쳤음
합계	100점	100	

III . 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본과제 사업이 년차를 진행하면서 평가의견 반영과 내부여건 변화등으로 많은 수정이 이루어져 다소 집중하지 못하고 분산되는 연구결과를 얻었다는 대에는 감점의 요지가 충분히 존재하나 기술사업화라는 본래 취지에 맞게 개발된 기술개발의 사업화에는 충실이 이행하여 매출과 고용창출에 집중하였음
뿐만 아니라 개발된 연구성과가 단발로 끝나는 것이 아니라 신사업 창출등 지속적인 성과 창출로 이어질 가능성이 매우 높음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

기술사업화 지원사업의 취지에 맞게 다음 항목들을 본과제의 평가시 고려 부탁드립니다.

- 기술 개발과 개발 기술의 사업화 여부
- 추가적 사업화 가능성
- 개발된 기술의 지적재산권 확보 여부
- 연계사업 발굴에 따른 신성장동력 확보 가능성 높음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 과제를 통해서 얻어진 연구결과로 다양한 축부쟁이 가공식품이 개발되었으며 사업화가 완료된 제품이 있는가하면 추가적인 개선 등을 통해 사업화를 진행 예정인 제품들이 상당 수 존재함. 아직 사업화 준비단계의 기술과 제품들을 연내 조기 출시하여 성과 창출이 가능하도록 할 예정

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농림기술개발사업	
연구과제명	썩부쟁이를 활용한 만성질환 개선 다기능 소재 개발			
주관연구기관	구례삼촌		주관연구책임자	이명엽
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	560,000	140,000		700,000
연구개발기간	2016.07.07~2018.12.31(2년 6월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(타연구활용) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 기능성 원료의 제조공정 표준화 및 기준규격 설정	추출법 확립 및 규격설정 하였음.
② 생리활성성분 분리방법 표준화	- Open Coulmn을 사용한 대용량 분획물 확보 - 효능-함량 연계분석을 활용한 유효 물질 발굴
③ 비만/천식 기능성 평가	- in vitro/vivo 실험을 통하여 억제 확인
④ 기능성 원료의 기능성 평가 인체 적용시험 신청	- 예비 인체적용시험 준비 계획서, IRB 심의 준비 완료 후 신청중
⑤ 기능성 원료를 이용한 제품 개발	- 썩부쟁이 환/쿠키 등 다양한 제품 개발

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		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	백 만 원	건 수	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10		10	10	10	10		10				10		10		10			
최종목표	3	1		1	15	4	800	750	3			3	3	3	3	3	7			
연구기간내 달성실적	4			1	3	4	50 0		3			1	1	3	3	6	50			
달성율(%)	10 0			10 0	20	10 0	62. 5		10 0			33	33	10 0	10 0	10 0	10 0			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	썩부쟁이 추출물 및 분획물을 유효성분으로 포함하는 항염증 조성물
②	썩부쟁이 추출물 및 분획물을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물
③	고분해능 질량분석법과 약리활성검사를 이용한 천연물의 약리 활성물질 발굴 방법

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		✓				✓	✓	✓	✓	
②의 기술		✓				✓	✓	✓	✓	
③의 기술	✓					✓	✓	✓	✓	
· ·										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	본 기술을 통하여 천식 및 항염증 억제 기능성 식품/제약/ 화장품 산업화에 기여할 것으로 예상됨
②의 기술	본 기술을 통하여 비만 억제 관련 건강기능식품 개발에 활용할 계획임
③의 기술	본 기술을 통하여 천연물 유효물질 발굴이 용이할 것으로 기대됨

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	10	10		10	10	10		10					10		10		10		
최종목표	3	3		1	20	0	2,000	0	7		1	5	5		5	5	5		
연구기간내 달성실적	4			1	3	4	500		3			1	1		3	3	6	50	
연구종료후 성과창출 계획	3	3		1	20	6	1,200	0	7		1	5	5		5	5	5	5	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	고분해능 질량분석법과 약리활성검사를 이용한 천연물의 약리 활성물질 발굴 방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	3,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2019.01-2019.12.31	실용화예상시기 ³⁾	2019
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	계약완료 상태임		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)