

민들레의 항염증 활성 구명 및 기능성제품 개발 연구

Anti-inflammatory property of Dandelion and
Its Functional Products

연구기관

한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “민들레의 항염증 활성 구명 및 기능성제품 개발 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009년 4월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
주관연구책임자 : 최 희 돈
세부연구책임자 : 박 용 곤
연 구 원 : 최 인 옥
연 구 원 : 김 윤 숙
연 구 원 : 석 호 문
연 구 원 : 성 기 승
연 구 원 : 고 윤 정
참 여 기 업 : (주)바이오코트

요 약 문

I. 제 목

민들레의 항염증 활성 구명 및 기능성 제품 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

염증은 조직세포의 손상이나 외부감염원 (박테리아, 곰팡이, 바이러스 등)에 감염되었을 때 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종 발열 통증 등 외적 증상이 나타나는 병증임. 정상인 경우 염증은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 여러 가지 질환을 일으키게 된다.

만성염증 등의 난치성 질환에는 현재까지 특별한 치료제가 개발되어 있지 못하여 대증적인 치료약을 반복 사용하거나 기존 약물을 혼용 및 교체하면서 사용하는 실정이며, 이러한 질환에는 장기적으로 식이요법에 의한 꾸준한 예방관리 및 치료가 필요하다. 오랜 기간 복용하여도 안전한 천연물을 대상으로 유용한 생리활성 물질을 규명하고 이를 함유한 기능성 식품을 개발하는 것은 염증의 예방과 치료에 효과적인 방법이라 할 수 있다. 따라서 안전성, 영양성이 우수한 천연자원인 민들레의 항염증 활성을 규명하고 항염증 활성 성분의 소재화를 통해 다양한 기능성제품을 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 민들레의 항염증 활성 규명

- 민들레 부위별 식품학적 특성 조사
- 민들레 부위별 *in vitro* 항염증 활성 탐색
- 민들레 항염증 활성물질의 규명

2. 민들레 항염증 활성물질의 소재화

- 항염증 활성물질의 추출 및 농축
- 항염증 소재의 피부염 및 관절염 유발 동물모델에서의 항염증 효과
- 항염증 소재의 특성 조사 및 독성시험

3. 민들레를 이용한 기능성 제품 개발

- 민들레 음료 개발
- 항염증 소재를 이용한 여드름 치료 및 관절염 예방용 제품 개발

IV. 연구개발결과

1. 민들레의 항염증 활성 규명

민들레 잎과 뿌리의 주요 구성성분을 분석한 결과, Vit C는 잎이 뿌리에 비해 다소 높은 함량을 나타내었고, 베타-카로텐은 잎에 10.8 mg/100 g의 함량을 나타낸 반면 뿌리에는 0.5 mg/100 g으로 함량이 매우 낮은 것으로 나타났으며, 총 식이섬유 함량은 뿌리의 식이섬유 함량이 다소 높았다. 총폴리페놀과 총플라보노이드는 잎이 17627.3 mg/100 g과 13421.7 mg/100 g으로 뿌리에 비해 월등히 높은 함량을 나타내었다. 민들레 잎과 뿌리의 아미노산 조성을 비교한 결과, 잎의 경우 glutamic acid, arginine, lysine, serine 등의 함량이 높았고, 뿌리는 glutamic acid, lysine, glycine, aspartic acid 등의 함량이 높았다. 무기질은 잎이 뿌리에 비해 높은 무기질 함량을 나타내었고, 잎의 경우 K, Ca, P, Mg 등이, 뿌리의 경우에는 K, P, Na, Ca 등의 함량이 높은 것으로 나타났다.

민들레 잎과 뿌리로부터 70% MeOH 추출물과 용매별 분획을 제조한 후 NO, PGE₂, cytokines(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 등의 생성에 대한 저해율을 측정함으로써 이들의 항염증 활성을 탐색하였다. LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 NO 생성에 대한 민들레 잎과 뿌리의 추출물과 분획의 저해효과를 조사한 결과, 70% MeOH 추출물과 n-BuOH, 물 분획은 NO 생성억제 효과가 없었지만 chloroform과 ethyl acetate 분획은 큰 억제효과를 나타내었다. 민들레 잎과 뿌리의 추출물과 분획의 PGE₂ 그리고 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 cytokines 생성에 대한 저해 효과에서도 NO 생성 억제효과와 동일한 경향을 나타내었다. NO, PGE₂ 및 cytokines의 생성을 크게 억제하는 것으로 확인된 민들레 잎의 chloroform, ethyl acetate 분획의 iNOS와 COX-2의 발현에 대한 억제 효과를 western blot을 통해 확인한 결과, chloroform의 처리에 의해 iNOS와 COX-2의 발현이 농도의존적으로 저해되었다. Ethyl acetate 분획에 의해서도 iNOS의 발현이 농도의존적으로 감소된 것으로

나타났지만 COX-2의 발현은 크게 감소시키지 않았다. Pro-inflammatory mediators인 NO, PGE₂와 cytokines 그리고 NO와 PGE₂의 조절단백질은 외부 자극에 의해 MAPKs와 JAT-State system의 발현을 통하여 활성화된다. 민들레 잎의 MeOH 추출물과 chloroform, ethyl acetate의 분획이 MAPKs의 생성에 대한 영향을 확인하기 위해 LPS로 유도된 phosphorylated ERK1/2와 JNK1/2 MAPK의 발현을 western blot을 통해 확인한 결과, chloroform과 ethylacetate 분획을 처리한 macrophage의 phosphorylated ERK1/2와 JNK1/2의 발현이 농도의존적으로 크게 감소하는 것으로 나타나 민들레 잎의 chloroform과 ethyl acetate 분획의 처리는 MAPKs의 phosphorylation을 억제하여 염증을 매개하는 인자들의 생성을 저해하는 것으로 나타났다.

항염증 효과가 뛰어난 chloroform과 ethyl acetate 분획의 활성물질을 silica gel column chromatography, TLC와 prep-LC를 통해 정제하였고 LPS로 유도된 NO 생성 억제효과를 측정하였다. Silica gel chromatography를 통해서 분획물을 75:25의 chloroform과 MeOH의 혼합용매로 용출시켜 NO 활성이 뛰어난 물질로 분리하였다. 이 물질을 다시 TLC를 통해 4개의 fraction으로 분리했고 이 중 높은 활성을 보인 1번째와 2번째의 fraction을 다시 silica gel column chromatography를 통해 8개의 fraction으로 분리하였으며, 높은 활성을 나타낸 2번째 분획물을 C₁₈ column을 사용한 HPLC로 분석한 결과 하나의 주요 피크가 나타났다. 따라서 이를 prep-LC를 통해 분리해내어 LC/MS와 NMR을 통해 구조 동정을 하였다.

2. 민들레 항염증 활성물질의 소재화

민들레 잎으로부터 항염증 활성 물질을 분리하여 소재화하기에 적합한 민들레 잎의 적정 열수추출 및 농축조건을 조사하였다. 60~90°C의 추출 온도에서의 추출물의 특성을 조사한 결과, 60°C 추출물의 수율이 가장 높았고, flavonoid의 함량은 온도가 증가함에 따라 증가하였지만 항염증 활성은 감소하는 경향을 나타내었다. 가장 높은 항염증 활성을 나타낸 60°C 추출물의 유용성분의 추출을 증가시키기 위해 세포벽 분해 효소를 처리한 결과 민들레 잎에서 추출된 flavonoid 함량과 추출 수율이 1.5배 증가하고 항염증 활성도 감소하지 않는 것으로 나타나 세포벽 분해효소 처리가 항염증 활성물질의 추출증가에 상당한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 효소 처리에 의한 민들레 잎으로부터 추출한 항염증 활성물질을 농축시키기 위해 column chromatography를 실시한 결과, Amberlite XAD-2와 Sepabeads SP-850에 흡착된 물질 모두 항염증 활성이 매우 높은 것으로 나타났다. 그러나 Sepabeads SP-850에 흡착된 물질의 수율이 2배 이상 높았기 때문에 민들레 잎의 항염증 활성물질을 농축하는데 Sepabeads SP-850 resin이 훨씬 효과적이었다.

민들레 잎으로부터 분리한 항염증 소재의 피부염 및 관절염 유발 동물모델에서의 항염증 효과를 조사하였다. TPA와 croton oil로 실험동물의 귀에 염증을 유발하고 염증 유발 전과 후의 귀 두께를 측정하여 항염증 소재의 귀 부종 억제 효과를 측정하였다. TPA 처리 염증모델에서 대조군인 indomethacin 처리군의 경우 귀 두께가 15.2 μm 증가한 반면 항염증 소재 처리군은 처리량 1~100 mg일 때 귀 두께가 39.1~23.9 μm 증가하였고 처리량이 증가할수록 농도의존적으로 귀 두께가 감소하는 것으로 나타났다. Croton oil 처리 염증모델에서도 100 mg 농도에서 가장 큰 억제능력을 보였고 농도가 증가할수록 높은 효능이 있는 것으로 나타났다. 민들레 잎의 항염증 소재가 관절염 유발 모델에서의 항염증 효과를 검증하기 위해 염증 유발후 항염증 소재의 9일 동안의 투여에 따른 족 부종의 부피, squeaking, 체중 분배비율 등을 측정한 결과 항염증 소재 투여에 의해 족 부종 부피 등의 행동양식이 크게 개선되는 것으로 나타났으며, 투여량이 증가할수록 높은 효능을 나타내었다.

민들레 잎의 항염증 소재의 온도와 pH에서의 안정성을 확인하기 위하여 항염증 소재를 30~90 $^{\circ}\text{C}$, pH 3~11에서 처리한 후 LPS로 유도된 macrophage의 NO 생성 저해율을 측정한 결과 온도가 증가하여도 항염증 소재의 활성에 영향을 끼치지 않았지만 pH가 9 이상으로 높아지면서 활성이 감소하였다. 항염증 소재의 여드름균 (*Propionibacterium acnes*, *Streptococcus epidermidis*) 대한 항균성은 없었으며, 항산화성은 상당히 높은 것으로 나타났다. 민들레 항염증 소재의 독성 유무를 조사하기 위해 고농도의 단회 투여 및 장기복용에 의한 동물에서의 독성을 시험하였다. 고농도 (2000 mg/kg)의 단회투여에서 독성이 나타나지 않았으며, 장기복용에 따른 독성시험 결과 항염증 소재 투여에 의해 특정한 행동변화와 이상증상을 관찰되지 않았고, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서도 이상이 발견되지 않았다. 부검결과 대부분의 장기에서는 이상이 발견되지 않았지만 항염증 소재 투여군의 신장에서 이상증상이 발견되어 신장에 대해서 조직병리학적 검사를 실시하였지만 이상이 없는 것으로 판명되었다.

3. 민들레를 이용한 기능성 제품 개발

민들레 음료 제조에 적합한 민들레 잎의 튀움조건을 확립하기 위하여 튀움처리에 의한 민들레 잎과 열수추출액의 이화학적 및 관능적 특성을 조사하였다. 열수추출액의 아미노태질소, 총폴리페놀 등이 크게 감소한 반면 환원당의 경우에는 생잎에 비해 더 많은 양이 추출되는 것으로 나타났다. 열수추출액의 향미묘사분석에 의해 짠맛, 쓴맛, 풀냄새, 탄맛, 단내 등 5가지 관능적 특성이 도출되었고, 짠맛, 쓴맛, 풀냄새가 처리구간 유의적인 차이를 나타내었으며, 관능적 기호도 측정 결과 튀움횟수가 증가할수록 색과 맛에 대

한 기호도가 증가하여 종합적인 기호도도 크게 증가하는 것으로 나타났다. 적정 추출조건을 확립하기 위하여 4회 덩음처리한 민들레 잎을 60, 75, 90℃에서 열수추출하여 추출온도 및 추출횟수별 추출액의 이화학적 특성을 비교한 결과 모든 항목에서 추출온도에 따른 값의 차이가 거의 나타나지 않은 반면 추출횟수가 증가할수록 각 특성값은 크게 감소하는 것으로 나타났다. 민들레의 추출온도별 추출액에 대한 향미묘사시험을 통해 짙은맛, 쓴맛, 풀냄새, 탄맛, 구수한 맛 등 5가지 관능적 특성을 도출하였고 90℃ 추출액은 쓴맛이 감소하고 구수한 맛이 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 토대로 하여 민들레 음료 개발을 위한 적정 전처리 및 추출조건을 덩음온도 180℃, 덩음횟수 4회, 추출온도 90℃, 추출횟수 2~3회로 결정하였다. 민들레 음료 제조를 위한 추출액의 적정 음용농도를 결정하기 위하여 농축액을 희석하여 관능검사한 결과 0.3 °Bx가 적정 음용농도이었으며, 색이나 맛의 변화를 최소화하면서 음료의 맛에 크게 영향을 미치지 않는 안정제를 검토하였다. 낮은 음용농도 때문에 민들레 고유의 향미가 약한 것으로 나타나 이를 보완하기 위해서 향 첨가시험을 실시하여 국화향을 선발하였다.

민들레 항염증 소재를 이용하여 여드름 치료용 및 관절염 예방용 기능성 제품을 개발할 목적으로 함께 첨가할 생약재의 항염증 활성을 측정한 결과 오디, 인진쑥, 초피나무의 열수추출물의 NO 생성 억제율이 우수하여 항염증 소재와 함께 첨가할 생약재로 선정하였다. 항염증 소재가 여드름균에 대한 항균효과를 나타내지 않았기 때문에 화장품, 연고 등의 여드름 환자용 제품을 개발하기 위해서는 여드름균에 대한 항균성을 갖는 항균제가 필요하다. 포도씨 추출물, 자몽씨 추출물, 파인-오렌지 등의 천연 항균제를 이용하여 여드름균에 대한 항균력을 측정한 결과 포도씨 추출물(GS-1000)이 가장 우수한 항균력을 나타내었다. 민들레 항염증 소재와 항염증 활성이 우수한 것으로 확인된 초피나무, 인진쑥, 오디 추출물 그리고 여드름균에 대한 항균력이 뛰어난 포도씨 추출물 (GS-1000)을 혼합하여 여드름 환자용 크림, 연고, 비누를 개발하였다. 민들레 항염증 소재와 초피나무, 인진쑥, 오디 추출물을 혼합하여 관절염 예방용 환과 과립차를 개발하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 기술이전 (1건)

1. 음료 제조용 민들레의 추출기술 (관련특허 : 민들레로부터 폴리페놀 추출물을 제조하는 방법 (등록번호 : 10-0787823호)) : 한일물산(주)

나. 학술지 (5건)

1. 최희돈, 고윤정, 김윤숙, 최인욱, 차동수. 볶음처리에 의한 민들레 잎의 이화학적 및 관능적 특성 변화. 한국식품과학회지 39: 515-520 (2007)
2. 고윤정, 차동수, 최희돈, 박용곤, 최인욱. 항산화 활성 증진을 위한 민들레 잎의 열수추출 조건의 최적화. 한국식품과학회지 40: 283-289 (2008)
3. 함대현, 서봉준, 한동오, 박재현, 정은택, 이해정, 고윤정, 최희돈. 급성염증유발 동물모델에서 포공영의 염증억제 효과. 동의생리병리학회지 22: 810-814 (2008)
4. Bong-Jun Sur, Yoon-Jeong Koh, Hee-Don Choi, Insop Shim, Hyejung Lee, Dae-Hyun Hahm. Protective effect of orally administrated dandelion against carrageenan-induced ankle arthritis in rats. Exp Neurobiol 17: 63-69 (2008)
5. 고윤정, 박용곤, 김윤숙, 차동수, 최희돈. 항염증 활성이 증진된 민들레 잎의 열수추출물 제조조건 설정. 한국식품영양과학회지 38: 391-395 (2009)

다. 학술발표 (3건)

1. 최희돈, 고윤정, 석호문, 김윤숙, 김겸수, 차동수. 볶음처리에 의한 민들레 잎의 이화학적 및 관능적 특성 변화. 2007년 한국식품과학회 제 74차 학술대회 및 정기총회 6. 20 - 6. 22 부산 BEXCO
2. 최희돈, 고윤정, 김윤숙, 차동수. 민들레 잎으로부터 항염증 활성물질의 추출을 위한 열수 추출조건의 최적화. 2007년 한국식품영양과학회 학술대회 2007. 10. 17 - 10. 19 무주리조트
3. Yoon-Jeoung Koh, Hyun-Jin Park, Hee-Don Choi. Anti-inflammatory effect of methanol extract and its fractions from *Taraxacum officinale* leaves in LPS-stimulated RAW 264.7 cell. 제 56차 대한면역학회 춘계 학술대회 2008. 4. 17 - 2008. 4. 19 무주리조트

라. 특허출원 및 등록

(1) 특허출원

1. 최희돈, 김윤숙, 박용곤, 석호문, 최인욱. 민들레로부터 폴리페놀 추출물을 제조하는 방법 (출원번호 10-2007-0006345호, 대한민국)
2. 최희돈, 김윤숙, 박용곤, 석호문, 최인욱, 성기승, 고윤정, 차동수. 민들레 잎 추출물을 포함하는 식품 (출원번호 10-2009-0034928호, 대한민국)

(2) 특허등록

1. 최희돈, 김윤숙, 박용곤, 석호문, 최인욱. 민들레로부터 폴리페놀 추출물을 제조하는 방법 (등록번호 10-0787823호, 2007, 대한민국)

마. 인력양성 (1건)

1. Yoon-Jeoung Koh. Anti-inflammatory effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves and isolation of bioactive compounds. 고려대 석사학위논문 (2008)

2. 성과활용 계획

본 연구과제의 수행 결과 얻어진 과제는 다음과 같이 활용할 계획이다.

가. 국내외 전문 학술지 논문 게재

1. 'Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide, PGE₂, cytokines and inducible NOS and COX-2 via ERK/JNK MAP kinases in RAW 264.7 cells by the leaves of *Taraxacum officinale*' 투고 예정
2. '민들레 잎 추출물의 Rat에 대한 단회 경구투여 및 4주 반복 경구투여에 의한 독성시험' 투고 예정

나. 관련기술의 기업체 기술이전 추진

1. '민들레의 항염증 활성물질의 소재화 기술'을 참여기업 등으로의 기술이전 추진

다. 신문, 방송 등의 매체를 통한 홍보

SUMMARY

I . Title

Anti-inflammatory property of Dandelion and Its Functional Products

II. Objectives and Significance

The inflammation is an essential events; this protective response may lead to potentially damaging consequences. Various autoimmune disorders are characterized by marked inflammation and associated failure of repair process. Pro-inflammatory molecules like TNF- α , certain interleukins, prostaglandins and even pathogenic concentration of nitric oxide are instrumental in raising such response. Many current anti-inflammatory drugs target these mediators at different levels, yet they lack specificity and their untoward effects restrict their long-term use. Hence, there is a constant demand for better therapeutic alternatives. Herbal products are well known for their reputed medicinal properties; however, most of them are empirically used. Dandelion is used in traditional medicine world wide from very ancient time. Therefore, we are willing to investigate the anti-inflammatory activity of dandelion and develop various functional products using dandelion.

III. Contents and Scope

1. Investigation on anti-inflammatory activity of dandelion

- Characteristics of different parts of dandelion
- *In vitro* anti-inflammatory property of extracts from different parts of dandelion
- Identification of anti-inflammatory compounds from dandelion

2. Materialization of anti-inflammatory compounds from dandelion

- Extraction and concentration of anti-inflammatory compounds from dandelion

- *In vivo* anti-inflammatory effect of anti-inflammatory compounds in dermatitis and arthritis model
- Characteristics and oral toxicity of anti-inflammatory compounds from dandelion

3. Development of functional products using dandelion

- Development of dandelion beverage
- Development of products for acne treatment and arthritis prevention

IV. Major Results and Conclusion

1. Investigation on anti-inflammatory activity of dandelion

The nutrient components of leaves and roots of dandelions were analyzed, and leaves and roots showed differences for various characteristics. Leaves of dandelion had higher vitamin C, β -carotene, total polyphenol and flavonoid content compared to dandelion roots, but roots had higher dietary fiber content. According to the result of measurement of their mineral and amino acid composition, leaves of dandelion had high content in K, Ca, P, Mg in case of mineral, and glutamic acid, arginine, lysine, serine in case of amino acid, and roots of dandelion had high content in K, P, Na, Ca in case of mineral, and glutamic acid, lysine, glycine and aspartic acid in case of amino acid.

Dandelion leaves and roots were extracted with 70% MeOH and their extracts were fractionated sequentially with various solvents. And then anti-inflammatory activities of these extracts and fractions were determined by measuring inhibition on production of NO, PGE₂ and cytokines. The inhibition of LPS-induced NO production on RAW 264.7 macrophages of extract and its fractions from dandelion leaves and roots was evaluated. Conclusively, the 70% MeOH extract, n-BuOH and water fractions had little effect on inhibition of NO production, however, the chloroform and ethyl acetate fractions were most effective. The extracts and fractions from dandelion leaves and roots inhibited production of PGE₂, and cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 with the same tendency of inhibition of NO production. The chloroform and ethyl acetate fraction from dandelion significantly suppressed production of NO, PGE₂ and cytokines. Furthermore, the expressions of LPS-induced iNOS and COX-2 on

RAW 264.7 macrophages of the fractions were detected by western blotting. As the results, the expressions of iNOS and COX-2 were remarkably decreased in a dose-dependent manner by treatment of the chloroform fraction. It was showed that the expression of iNOS decreased in a dose-dependent manner by the ethyl acetate fraction, but it slightly suppressed the expression of COX-2. Pro-inflammatory mediators such as NO and PGE₂, cytokines and regulating enzymes of NO and PGE₂ were activated depending on the external signals through the expressions of MAPKs and JAT state systems. Western blot of expressions of LPS-induced phosphorylated ERK1/2 and JNK1/2 MAPK was performed to determine whether the MeOH extract, chloroform and ethyl acetate fractions were related to the modulation of the activation of MAP kinases. As the results, the chloroform and ethyl acetate suppressed dose-dependently the induction of LPS-induced phosphorylation of ERK1/2 and JNK1/2. From this finding, it is assumed that the chloroform and ethyl acetate fractions in LPS-treated macrophages suppressed inflammatory mediators by inhibiting phosphorylation of MAPKs.

Bioactive compounds that increased anti-inflammatory activity were fractionated and separated from chloroform and ethyl acetate fractions by silica gel column chromatography, TLC on silica and prep-LC. The anti-inflammatory activity of each preparations was determined by measuring of LPS-induced NO production. Fractions were separated by eluting with chloroform and MeOH mixtures (75:25) from silica gel column chromatography, and the separated fractions showed increased anti-inflammatory activity. These fractions were more separated into 4 fractions by TLC. Among these 4 fractions, the first and second fractions that showed significantly increased activity were purified by silica gel column chromatography again. The second of 8 fractions from the silica gel column chromatography showed the highest activity. From this finding, the last second fraction was analyzed by HPLC using C₁₈ column, resulting that the one major peak was detected. Finally, the compound of the major peak was separated by prep-LC, and then it was identified by LC/MS and NMR.

2. Materialization of anti-inflammatory compounds from dandelion

To materialize anti-inflammatory compounds from dandelion leaves, we studied

optimal conditions of hot water extraction and concentration. We investigated the properties of extracts on various temperatures between 60 and 90°C. As the result, extraction yields at 60°C were the highest as 39.2±1.3% and flavonoid contents were increased by heating. However, anti-inflammatory activities were remarkably decreased by increasing temperature. According to the results that the highest anti-inflammatory activities of water extract at 60°C were demonstrated, cell wall degrading enzyme treatment was carried out to increase extraction yield of anti-inflammatory compounds. The enzyme treatment resulted in increased yields and flavonoids from dandelion leaves as 1.5 times and anti-inflammatory activities were not decreased. Also, column chromatography was used for concentration of anti-inflammatory compounds from extract of dandelion leaves treated with enzyme. It demonstrated that anti-inflammatory activities of adsorbed compounds on Amberlite XAD-2 and Sepabeads SP-850 were significantly increased. But yields of adsorbed compounds were increased over two times on Sepabeads SP-850 compared to Amberlite XAD-2. Thus Sepabeads SP-850 were more effective than Amberlite XAD-2 to concentrate the anti-inflammatory compounds of dandelion leaves.

To verify the anti-inflammatory activity of anti-inflammatory compounds from dandelion leaves, their *in vivo* anti-inflammatory effect in dermatitis and arthritis model was investigated. TPA-induced or croton oil-induced acute edema was developed in the mouse ears, and they were applied to both sides of inflamed ears. It was found that they could significantly reduce the ear swelling, compared to that of non-treated control. In the case of DA-100 treatment, its anti-inflammatory effect was comparable to that of indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug. In order to verify the anti-arthritic effect of anti-inflammatory compounds from dandelion leaves, several behavioral parameters such as paw volume, squeaking score, and weight distribution ratio were investigated in a carrageenan-induced arthritis rat model. Their therapeutic effect was observed on 9th day after the arthritis induction, as compared to saline-treated control group. Oral administration of them significantly alleviated apparent symptoms of paw volume, squeaking score, and weight distribution ratio in rats. Therefore, it could be concluded that topically applied anti-inflammatory compounds from dandelion leaves exhibited its potentials as a new drug candidate with an effective anti-inflammatory activity.

Inhibitory activity on NO production of LPS induced macrophage of anti-inflammatory compounds from dandelion leaves was determined to evaluate the

stability of anti-inflammatory activity with temperature of 30~90°C and pH of 3~11. Applied temperature did not affect, but pH above 9 reduced the activity. Antibacterial activity of anti-inflammatory compounds on acne-causing bacteria(*Propionibacterium acnes*, *Streptococcus epidermidis*) were also determined and its activity was not detected. Toxicity of anti-inflammatory compounds was determined with high dose one-time trial and for long-term trial with rats. One-time high dose(2000 mg/kg) trial did not show any toxicity. Long term trial also did not show any symptom of specific behavior abnormality and had no concern from serum biochemical analysis data. Autopsy did not present any disorder from organs examined but kidney and kidney were also proven to be normal with histopathological observation.

3. Development of functional products using dandelion

To establish the roasting conditions of dandelion leaves for the manufacture of beverages, we investigated the physicochemical and sensory characteristics of dandelion leaves and their hot water extracts by roasting treatment. As the number of roasting times increased, the amino nitrogen and total polyphenol contents of the roasted dandelion leaf hot water extracts also decreased greatly, and their L-, a-, and b-values showed much lower values than those of the raw leaf extracts. However, a greater amount of reducing sugars was extracted in the roasted leaves than in the raw leaves, suggesting that the roasting process allows for easier extraction of the compounds in dandelion leaves. Five sensory characteristics, including astringent taste, bitter taste, green flavor, burnt taste, and sweet odor, were deduced through quantitative descriptive analysis of the hot water extracts. Among them, astringent taste, bitter taste, and green flavor showed significant differences between roasting treatments. The sensory evaluation results show that as the number of roasting times increased, the palatability of the hot water extracts increased greatly, in terms of color and taste.

In order to establish extraction condition of dandelion leaves, physicochemical properties of extracts of 4-times roasted dandelion leaves extracted with different extraction temperatures and extraction times were investigated. There was no difference in values of measurement items with different extraction temperatures, but as the extraction times increased, values of physicochemical properties decreased greatly. Five sensory characteristics, including astringent taste, bitter taste, green

flavor, burnt taste, and savory taste, were deduced through quantitative descriptive analysis of the hot water extracts. Bitter taste of extracts decreased and savory taste of extracts increased with increase of extraction temperature. Taken together, it was concluded that roasting temperature of 180°C, roasting of 4 times, extraction temperature of 90°C and extraction of 2~3 times were optimum pretreatment and extraction condition for development of dandelion beverage. As a result of sensory test to determine concentration of extracts relevant to drink, 0.3 °Bx was optimum concentration. Additives of vitamin C, sodium ascorbate and sodium bicarbonate et al. were added to dandelion extracts to minimize the changes in color and taste of beverages. To complement the low intensity of natural dandelion flavor, various flavors were examined, and chrysanthemum flavor was selected.

Water extract of mulberries, mugwort, *Zanthoxylum piperitum* DC. had excellent inhibition activity on NO production and were most desirable subsidiary material for development of a functional food products effective on acne and arthritis with the anti-inflammatory compounds from dandelion leaves. Cosmetics and ointment for acne patients were developed with grape seed extract(GS-1000) which were most effect antimicrobial compounds on acne bacteria among known natural antimicrobial agents and extracts from extract of *Zanthoxylum piperitum* DC., mugwort, mulberry. Pills and granule type products for arthritis patients were also developed with the anti-inflammatory compounds from dandelion leaves and extract of *Zanthoxylum piperitum* DC., mugwort, mulberry.

V. Outcomes and Applications of the Results

1. Outcomes

A. Technology transfer (1)

1. Extraction technology of dandelion for manufacture of beverages (Patent No. : 10-0787823) : Hanil C&T Ltd.

B. Journals (5)

1. Hee-Don Choi, Yoon-Jeoung Koh, Yoon-Sook Kim, In-Wook Choi, Dong-Soo Cha. Changes in physicochemical and sensory characteristics of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves by roasting treatment. Korean J Food Sci Technol 39: 515-520 (2007)
2. Yoon-Jeoung Koh, Dong-Su Cha, Hee-Don Choi, Yong-Kon Park, In-Wook Choi. Hot water extraction optimization of dandelion leaves to increase antioxidant activity. Korean J Food Sci Technol 40: 283-289 (2008)
3. Dae-Hyun Hahm, Bong-Jun Sur, Dong-Oh Han, Park-Jae Hyun, Eun-Tack Jung, Hye-Jung Lee, Yoon-Jeoung Koh, Hee-Don Choi. Anti-inflammatory activity of dandelion in mice. Korean J Orient Physiol Pathol 22: 810-814 (2008)
4. Bong-Jun Sur, Yoon-Jeoung Koh, Hee-Don Choi, In-Sop Shim, Hye-Jung Lee, Dae-Hyun Hahm. Protective effect of orally administrated dandelion against carrageenan-induced ankle arthritis in rats. Exp Neurobiol 17: 63-69 (2008)
5. Yoon-Jeoung Koh, Yong-Kon Park, Yoon-Sook Kim, Dong-Soo Cha, and Hee-Don Choi. Preparation of hot water extracts of dandelion leaves to increase anti-inflammatory activity. J Korean Soc Food Sci Nutri 38: 391-395 (2009)

C. Scientific presentation (3)

1. Hee-Don Choi, Yoon-Jeoung Koh, Ho-Moon Seog, Yoon-Sook Kim, Kyum-Soo Kim, Dong-Soo Cha. Changes in physicochemical and sensory characteristics of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves by roasting treatment. The 74th Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology (2007. 6. 20 - 6. 22)
2. Hee-Don Choi, Yoon-Jeoung Koh, Yoon-Sook Kim, Dong-Soo Cha. Hot water extraction optimization of dandelion leaves to increase antioxidant activity. Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Nutrition (2007. 10. 17 - 10. 19)
3. Yoon-Jeoung Koh, Hyun-Jin Park, Hee-Don Choi. Anti-inflammatory effect of methanol extract and its fractions from *Taraxacum officinale* leaves in LPS-stimulated RAW 264.7 cell. The 56th Annual Meeting of Korean Association of Immunobiologists (2008. 4. 17 - 2008. 4. 19)

D. Patent application and registration

(1) Patent application

1. Hee-Don Choi, Ho-Moon Seog, Yoon-Sook Kim, Yong-Kon Park, In-Wook Choi. Method for extracting polyphenol from dandelion (No. 10-2007-0006345, Korea)
2. Hee-Don Choi, Ho-Moon Seog, Yoon-Sook Kim, Yong-Kon Park, In-Wook Choi, Ki-Seung Seong, Yoon-Jeoung Koh, Dong-Soo Cha. Foodstuff comprising dandelion leaf extract. (No. 10-2009-0034928, Korea)

(2) Patent registration

1. Hee-Don Choi, Ho-Moon Seog, Yoon-Sook Kim, Yong-Kon Park, In-Wook Choi. Method for extracting polyphenol from dandelion (No. 10-0787823, 2007, Korea)

E. Education (1)

1. Yoon-Jeoung Koh. Anti-inflammatory effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves and isolation of bioactive compounds. Korea University Master's Thesis (2008)

2. Application of results

A. Journals

1. 'Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide, PGE₂, cytokines and inducible NOS and COX-2 via ERK/JNK MAP kinases in RAW 264.7 cells by the leaves of *Taraxacum officinale*'
2. 'Single and 4-week oral toxicity studies of dandelion extracts in SD rats'

B. Technology transfer

1. Transfer of 'Materialization technology of anti-inflammatory compounds from dandelion leaves' to industry

C. Public relation through newspaper and broadcasting *et al.*

CONTENTS

Abstract	
Summary	
Chapter 1. Introduction	
Chapter 2. Current State of Domestic and Foreign Technologies	
Chapter 3. Experiments and Results	
I. Materials and Methods	
1. Investigation on anti-inflammatory activity of dandelion	
A. Characteristics of different parts of dandelion	
(1) Dandelion	
(2) Amino acid	
(3) Mineral	
(4) Fatty acid	
(5) Vitamin	
(6) Dietary fiber and free sugar	
(7) Total polyphenol	
(8) Total flavonoid	
B. <i>In vitro</i> anti-inflammatory activity of dandelion	
(1) Extraction and fraction of extract	
(2) Cell culture	
(3) Cell viability	
(4) Nitrite	
(5) PGE ₂	
(6) Cytokines	
(7) Western blot	
C. Identification of anti-inflammatory compounds from dandelion	
(1) Preparation of samples for purification	
(2) Purification of anti-inflammatory compounds	

(3) Anti-inflammatory activity of isolates	
(4) Structural analysis of anti-inflammatory compounds	
2. Materialization of anti-inflammatory compounds from dandelion	
A. Extraction and concentration of anti-inflammatory compounds	
(1) Extraction and enzyme treatment	
(2) Column chromatography of extracts	
(3) Yields	
(4) Total flavonoid contents	
(5) Cell culture	
(6) Nitrite, PGE ₂ , TNF- α productions	
(7) Statistical analysis	
B. <i>In vivo</i> anti-inflammatory effect of compounds in dermatitis model	
(1) Induction of TPA(or Croton oil) inflammation and treatment anti-inflammatory compounds	
(2) Ear edema test	
(3) Statistical analysis	
C. <i>In vivo</i> anti-inflammatory effect of compounds in arthritis model	
(1) Experimental groups and induction of arthritis	
(2) Behavioral and pre-clinical parameters	
(3) Statistical analysis	
D. Characteristics of anti-inflammatory compounds	
(1) Safety in processing conditions	
(2) Antimicrobial activity	
(3) Antioxidant activity	
E. Toxicity of anti-inflammatory compounds	
(1) Single oral dose toxicity	
(2) 4-week repeated oral dose toxicity	
3. Development of functional products using dandelion	
A. Development of dandelion beverage	
(1) Optimization of roasting conditions of dandelion	
(2) Optimization of extract conditions of dandelion	
(3) Manufacturing conditions of dandelion beverage	
B. Development of products for acne treatment and arthritis prevention	
(1) Determination of anti-inflammatory herbs	

- (2) Determination of anti-microbial natural antibiotics on acne-forming bacteria
- (3) Development of functional products for acne treatment
- (4) Development of functional products for arthritis treatment

II. Results and Discussions

1. Investigation on anti-inflammatory activity of dandelion
- A. Characteristics of different parts of dandelion
- B. *In vitro* anti-inflammatory activity of dandelion
- (1) Cell viability
- (2) Effect of on NO production of macrophage
- (3) Effect of on PGE₂ production of macrophage
- (4) Effect of on cytokines production of macrophage
- (5) Effect of dandelion extracts on iNOS and COX-2 expression
- (6) Effect of dandelion extract on ERK1/2 and JNK1/2 MAPKs expression
- C. Identification of anti-inflammatory compounds from dandelion
- (1) Purification of anti-inflammatory compounds by silica gel column chromatography
- (2) Purification by TLC and preparative HPLC
- (3) Anti-inflammatory activity of isolates
- (4) Structural analysis of anti-inflammatory compounds
2. Materialization of anti-inflammatory compounds from dandelion
- A. Extraction and concentration of anti-inflammatory compounds
- (1) Properties of hot water extracts on various temperature
- (2) Properties of hot water extracts by enzyme treatment
- (3) Concentration of anti-inflammatory compounds
- B. *In vivo* anti-inflammatory effect of compounds in dermatitis model
- (1) Effect of anti-inflammatory compounds on induced TPA-induced inflammation model
- (2) Effect of anti-inflammatory compounds on induced croton oil-induced inflammation model
- C. *In vivo* anti-inflammatory effect of compounds in arthritis model
- D. Characteristics of anti-inflammatory compounds
- (1) Safety in processing conditions

(2) Antimicrobial activity on acne-forming bacteria	
(3) Antioxidant activity	
E. Toxicity of anti-inflammatory compounds	
(1) Single oral dose toxicity	
(2) 4-week repeated oral dose toxicity	
3. Development of functional products using dandelion	
A. Development of dandelion beverage	
(1) Optimization of roasting conditions of dandelion	
(2) Optimization of extraction conditions of dandelion	
(3) Determination of manufacturing conditions of dandelion beverage	
B. Development of products for acne treatment and arthritis	
(1) Determination of anti-inflammatory herbs	
(2) Determination of antimicrobial natural antibiotics on acne-forming bacteria	
(3) Development of functional products for acne treatment	
(4) Development of functional products for arthritis treatment	
Chapter 4. Accomplishment of objects and contribution for the related fields	
Chapter 5. Outcomes and applications of the results	
Chapter 6. Accumulated informationsforeign scientific technology ..	
Chapter 7. References	

목 차

요약문

Summary

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

제 2 절 연구개발의 필요성

제 3 절 연구개발의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황.....

제 1 절 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....

제 1 절 연구수행 방법

1. 민들레의 항염증 활성 규명

가. 민들레 부위별 식품학적 특성조사

(1) 민들레

(2) 아미노산

(3) 무기질

(4) 지방산 조성

(5) 비타민

(6) 식이섬유 및 유리당

(7) 총 폴리페놀

(8) 총 플라보노이드

나. 민들레의 *in vitro* 항염증 활성 탐색

(1) 추출물 제조 및 추출물의 분획

(2) 세포배양

(3) 세포생존율

(4) Nitrite
(5) PGE ₂
(6) Cytokines
(7) Western blot
다. 민들레의 항염증 활성물질의 규명
(1) 정제용 시료제조
(2) 활성물질의 정제
(3) 정제물의 항염증 활성분석
(4) 항염증 활성물질의 구조분석
2. 민들레 항염증 활성물질의 소재화
가. 항염증 활성물질의 추출 및 농축
(1) 추출 및 효소처리
(2) 추출물의 column chromatography
(3) 수율
(4) 총 Flavonoid 함량
(5) 세포배양
(6) Nitrite, PGE ₂ , TNF- α 생성량
(7) 통계분석
나. 항염증 소재의 피부염 유발 동물모델에서의 항염증 효과
(1) TPA(또는 Croton oil)염증 유발 및 항염증 소재 처치
(2) 귀부중 측정
(3) 통계분석
다. 항염증 소재의 관절염 유발 동물모델에서의 항염증 효과
(1) 실험군 분류 및 관절염 유발
(2) 행동실험
(3) 통계분석
라. 항염증 소재의 특성 조사
(1) 온도 및 pH 등 가공조건별 안전성
(2) 항균성
(3) 항산화성

- 마. 항염증 소재의 독성시험
- (1) 단회경구투여
- (2) 4주경구투여
- 3. 민들레를 이용한 기능성 제품 개발
- 가. 민들레 음료 개발
- (1) 민들레의 적정 볶음처리 조건 설정
- (2) 민들레의 적정 추출조건 설정
- (3) 민들레 음료 제조조건 설정
- 나. 항염증 소재를 이용한 여드름 치료 및 관절염 예방용 제품 개발
- (1) 항염증 활성 생약재 선정
- (2) 여드름균에 대한 항균성을 갖는 천연 항균제 선정
- (3) 여드름 치료용 기능성 제품 개발
- (4) 관절염 예방용 기능성 제품 개발

제 2 절 연구수행 결과

- 1. 민들레의 항염증 활성 규명
- 가. 민들레 부위별 식품학적 특성
- 나. 민들레의 *in vitro* 항염증 활성 탐색
- (1) 세포의 생존율
- (2) Macrophage의 NO생성에 대한 민들레 추출물의 효과
- (3) Macrophage의 PGE₂생성에 대한 민들레 추출물의 효과
- (4) Macrophage의 Cytokines 생성에 대한 민들레 추출물의 효과
- (5) Macrophage의 iNOS와COX-2 생성에 대한 민들레 잎 추출물의 효과
- (6) Macrophage의 ERK1/2 와 JNK1/2 MAPKs 생성에 대한 민들레 추출물의 효과
- 다. 민들레 항염증 활성물질의 규명
- (1) Silica gel column chromatography에 의한 항염증 활성물질의 정제
- (2) TLC 및 preparative HPLC에 의한 정제
- (3) 정제물질의 구조동정

- 2. 민들레 항염증 활성물질의 소재화
 - 가. 항염증 활성물질의 추출 및 농축
 - (1) 추출 온도별 민들레 잎 열수 추출물의 특성
 - (2) 효소처리에 의한 민들레 잎 열수 추출물의 특성 변화
 - (3) 항염증 활성물질의 농축
 - 나. 항염증 소재의 피부염 유발 동물모델에서의 항염증 효과
 - (1) TPA 염증 유발 동물모델에 대한 항염증 소재의 영향
 - (2) Croton oil 염증 유발에 대한 항염증 소재의 영향
 - 다. 항염증 소재의 관절염 유발 동물모델에서의 항염증 효과
 - 라. 항염증 소재의 특성
 - (1) 항염증 소재의 온도 및 pH등 가공조건별 안정성
 - (2) 여드름균에 대한 항균성
 - (3) 항산화성
 - 마. 항염증 소재의 독성시험
 - (1) 단회경구투여
 - (2) 4주경구투여

- 3. 민들레를 이용한 기능성 제품 개발
 - 가. 민들레 음료 개발
 - (1) 민들레의 적정 볶음처리 조건 확립
 - (2) 민들레의 적정 추출 조건 설정
 - (3) 민들레 음료 제조 조건 설정
 - 나. 항염증 소재를 이용한 여드름 치료 및 관절염 예방용 제품 개발
 - (1) 항염증 활성 생약재 선정시험
 - (2) 천연 항균제의 여드름균에 대한 항균성 조사
 - (3) 여드름 치료용 기능성 제품 개발
 - (4) 관절염 예방용 기능성 제품 개발

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- 안전성, 영양성이 우수한 천연자원인 민들레로부터 항염증 활성을 갖는 성분을 규명하고 이들 성분의 소재화를 통해 다양한 기능성식품을 개발함으로써 민들레의 부가가치를 제고하고 생산농가의 소득증대에 기여
- 민들레로부터 유용성분을 분리, 활용할 수 있는 신기술의 개발로 민들레의 효율적 활용 및 이를 통한 참여업체의 경쟁력 제고

제 2 절 연구개발의 필요성

민들레는 학명은 *Taraxacum*, 한방명은 포공영(蒲公英, *Taraxacum Herba*)이고, 국화과(*Compositae*)에 속하는 다년산 초본으로 이른봄부터 늦가을에 이르기까지 우리나라 전역에 걸쳐 널리 분포하고 있으며, 뿌리, 잎, 꽃, 줄기 등 식물체 모두를 약용할 수 있는 약초이다. 민들레에는 상당히 다양한 성분이 함유되어 있고 영양면에서 훌륭한 식품으로 비타민과 무기질이 풍부하고 지방함량과 칼로리가 낮아 현대인의 식품으로 적당하다고 보고되고 있다. 민들레의 주요 성분으로는 hydroxycinnamic acid, chicoric acid, monocaffeoyltartaric acid 그리고 chlorogenic acid 등이 있으며, 잎에는 coumarins, cichoriin, aesculin 등과 glycoside류, Ca 및 Fe 등이 풍부하고, 비타민 A가 14,000IU./100g이나 함유되어 있고, 꽃 부위는 luteolin 7-glucoside, quercitin 그리고 luteolin 등을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 뿌리에는 taraxacin과 inulin의 함량이 특히 많으며, 카로테노이드 성분인 taraxathin, triterpene 성분인 taraxol과 taraxasterol 및 choline이 풍부하다고 보고되고 있다. 또한 민들레의 잎에는 lysine, leucine 등이 필수아미노산이 많이 함유되어 아미노산의 조성과 함량이 우수한 것으로 보고되어 있다.

한방에서의 민들레의 성미(性味)와 약효를 보면, 민들레의 맛은 쓰고 짜며 성질은 평(平)하고 한(寒)하나 독이 없다고 함. 그리고 열을 내리고 해독과 이뇨, 최유(催乳)효과가 있고, 울결(鬱結)을 풀어주거나 염증이나 종기를 낮게 하며, 간과 담낭질환의 치료에 이용된다고 한다. 본초강목(本草綱目)에서는 민들레즙을 계속 마시면 머리카락이 검어지고 위(胃)와 골(骨)이 튼튼

해진다고 하였고, 본초정의(本草定議)에서는 포공영의 성질이 청량하여 열독, 홍종(紅腫), 창정(瘡疔), 용양(癰瘍)의 치료에 내복과 외용이 모두 가능하며 그 효과가 대단히 크다고 전한다. 민간이나 한방에서는 강장, 해열, 이뇨, 건위, 거담, 해독제 등에 이용되어 왔으며, 서양에서도 담즙분비 촉진, 항류마티스, 이뇨 등의 작용으로 약제로 사용되고 있다.

염증은 조직세포의 손상이나 외부감염원 (박테리아, 곰팡이, 바이러스 등)에 감염되었을 때 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종 발열 통증 등 외적 증상이 나타나는 병증이다. 정상인 경우 염증은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 여러 가지 질환(과민성 질환, 만성 염증, 암 등)을 일으키게 된다. 만성염증 등의 난치성 질환에는 현재까지 특별한 치료제가 개발되어 있지 못하여 대중적인 치료약을 반복 사용하거나 기존 약물을 혼용 및 교체하면서 사용하는 실정이며, 이러한 질환에는 장기적으로 식이요법에 의한 꾸준한 예방관리 및 치료가 필요하다. 오랜기간 복용하여도 안전한 천연물을 대상으로 유용한 생리활성 물질을 규명하고 이를 함유한 기능성 식품을 개발하는 것은 염증의 예방과 치료에 효과적인 방법이라 할 수 있다. 따라서 안전성, 영양성이 우수한 천연자원인 민들레로부터 항염증 활성을 갖는 성분을 규명하고 이들 성분의 소재화를 통한 다양한 기능성식품의 개발 연구가 필요하다.

예로부터 민들레의 어린 순과 뿌리는 나물이나 국, 영양강장식으로 식용하였고, 식량이 없을 때에는 구황식물로 식량대용으로 사용되어 왔다. 서구유럽에서는 잎은 샐러드용으로, 뿌리는 커피대용으로, 꽃은 와인재료로 이용해 왔으며, bakery, ravioli 등의 다양한 조리 부재료로 이용하고 있다. 또한 민들레 뿌리차, 민들레 와인 등의 가공제품이 생산되고 있으며, 민들레를 미세분말화, 착즙화하여 tablet, capsule로 만들어 건강보조식품으로 판매되는 등 매우 다양하게 제품화되어 있다. 반면 우리나라에서는 일부에서 생즙이나 나물로 이용되다가 최근에서야 쌈채소나 샐러드 채소로의 이용이 증가하면서 그 소비가 증대되고 있는 추세이며, 민들레를 이용한 차, 커피대용차, 환 등이 특허출원된 보고가 있다. 그러나 아직까지 차, 환 등 단순가공에 의한 제품이 일부 유통되고 있는 정도이기 때문에 민들레가 농가에 널리 보급되지 않고 극히 제한적으로 일부 농가에서 재배되고 있는 실정이다.

민들레의 기능성, 안전성, 재배·육종학적 측면을 고려해볼 때 민들레의 식품학적 가치는 매우 높으며, 또한 현대인의 건강에 대한 관심이 크게 증가하고 건강기능성 식품 시장이 폭발적으로 증가하고 있으므로 민들레를 이용한 다양한 가공 및 기능성식품 등 새로운 용도개발이 이루어질 경우 민들레의 부가가치를 제고할 뿐만 아니라 농민들의 새로운 소득작물로 자리매김할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 절 연구개발의 범위

구분	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	민들레의 in vitro 항염증 활성 탐색	<ul style="list-style-type: none"> ○민들레 부위별 식품학적 특성 조사 ○추출물 및 분획의 in vitro 항염증 활성탐색 <ul style="list-style-type: none"> - macrophage의 세포증식에 미치는 영향 - LPS에 의한 macrophage의 NO, PGE2, cytokine 생성에 미치는 영향 - LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현억제
	민들레 음료 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○민들레의 적정 전처리 조건 및 추출조건 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 덩음처리 조건별 추출액 특성 조사 - 추출조건별 추출액 특성 조사 ○민들레 음료 제조조건 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 당산비 조정, 가향시험 및 과실 농축액 적용조건 설정 - 저장중 품질 안정화 기술 확립
2차년도	민들레의 항염증 활성물질의 구명	<ul style="list-style-type: none"> ○항염증 활성물질의 분리.정제 <ul style="list-style-type: none"> - 용매분획에 의한 활성물질의 분리 및 컬럼 크로마토그래피, prep HPLC에 의한 활성물질의 정제 - 정제물의 항염증 활성 분석 ○항염증 활성물질의 구조분석 <ul style="list-style-type: none"> - 활성 물질의 순도 확인 - MS 및 NMR 등에 의한 분자량 및 구조 확인
	항염증 활성물질의 소재화	<ul style="list-style-type: none"> ○항염증 활성이 증진된 활성획분 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 항염증 활성이 증진된 활성획분 제조조건 설정 - 컬럼크로마토그래피에 의한 활성획분의 농축조건 설정 ○활성소재의 특성 조사 및 독성시험 <ul style="list-style-type: none"> - 가공조건별 활성소재의 안정성 - 활성소재의 항염증 활성 및 항균, 항산화성 조사 - 활성소재의 독성시험
3차년도	항염증 소재의 in vivo 항염증 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○TPA 및 croton oil-induced ear edema법에 의한 활성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - TPA 및 croton oil에 의한 염증 유도 - 경과시간별 부종억제 효과 측정 ○Carrageenan-induced foot edema법에 의한 활성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 카라기난 주입에 의한 염증 유도 - 경과시간별 부종억제 효과 측정
	항염증 소재를 이용한 가공제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○여드름 치료용 기능성 제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 항염증 소재의 여드름 균에 대한 항균성 조사 - 기능성 화장품, 연고 및 비누 제조 ○항염증 효능 기능성 가공제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 과립차, 환 제조

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

염증반응은 생체가 병원성 물질의 침입을 방어하는데 중요한 process이며, 만성적인 염증반응은 천식이나 비염과 같은 기관지 allergy와 자가 allergy 유발물질에 대한 면역반응의 비정상적인 발생에 의한 자가면역질환으로 구분되며, 자가면역질환에는 다발성 경화증, 류마티스 관절염 등이 해당되기 때문에 항염증제의 개발은 제약 및 의학분야에서 주요한 개발 우선분야이다. 대식세포 (macrophage)는 T cell에서 생성되는 lymphokine에 의해 활성화되어 O^2 와 같은 활성산소종이나 nitric oxide (NO)와 같은 반응질소 중간물질을 생성하여 외부감염원을 분해시켜 조직세포 내에서의 방어와 항상성 유지에 중요한 역할을 담당한다. 그러나 nitric oxide 및 활성산소종의 과도한 생성은 조직손상, 염증 발현 및 각종 암화를 매개하는 인자로 작용하며, 또한 유도성 cyclooxygenase(COX-2) 및 nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 과다하게 생성된 prostaglandins과 NO에 의해 염증반응이 악화되고 암화가 촉진되는 것으로 보고되고 있다.

Prostaglandins 및 NO가 여러 질병 및 암화과정에 밀접한 연관이 있기 때문에 이들을 조절할 수 있는 물질이 각종 질환의 치료제 또는 예방제로서 주목을 받고 있다. 최근 천연물 및 각종 식품류에서 새로운 물질을 탐색하는 방향으로의 연구가 있으며, 실제로 콜라겐에 의해 유도된 관절염 모델 동물에 대해 녹차 폴리페놀이 관절염 발생빈도를 줄이고 증세를 크게 완화시켰다고 하여 녹차 폴리페놀이 높은 항염증 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 이외에도 콩류의 isoflavone, curcumin, 포도의 resveratrol 그리고 여러 가지 방향성 식물 등이 염증 예방 및 치료효과가 있는 것으로 보고되고 있으며 이에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

민들레의 생리활성에 관한 연구로는 항산화 및 라디칼 소거활성과 유해 미생물의 생육을 억제하는 항균작용에 관한 연구가 많이 보고되어 있으며, 항암 및 항종양활성에 관한 연구결과도 일부 보고되고 있다. 이외에 민들레의 체내 지질대사 개선효과, 간기능 개선 효과 등이 있는 것으로 보고되어 있다. 한편 민들레 추출물의 항위염 효과, 위장보호 효과, 그리고 동물에서의 항염증 활성이 보고되어 있으며, 또한 민들레 추출물이 동물의 astrocyte로부터의 TNF- α 와 IL-1의 분비를 억제하여 중추신경계에서의 항염증 활성을 나타낸다는 보고 등 특히 민들레의 항염증 활성에 관한 연구결과가 많이 보고되어 있다.

한편 민들레 추출물의 화학성분과 이들의 항균성, 항종양성, 항알러지성 및 다른 약제와의 상호작용 등에 대해 보고되었고, 이들을 이용한 알콜 추출 약용주 제조, 다른 한약제와의 혼합에 의한 차 제조 등에 관하여 일부 보고되어 있다. 또한 일부 연구기관에서의 항염증 활성 조사 결과가 보고되어 있지만 단지 추출물 수준에서 분석되어 활성성분이 규명되지 않은 상태이며

이러한 기능성을 이용한 건강보조식품이 전혀 개발되지 않은 상태이다. 또한 차, 환 등 일부의 제품을 제외하고는 가공제품도 거의 개발되지 않은 상태이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행방법

1. 민들레의 항염증 활성 규명

가. 민들레 부위별 식품학적 특성 조사

(1) 민들레

본 실험에 사용한 민들레는 경남 의령군에 소재한 (주)민들레식품에서 재배하는 민들레로서 채취한 민들레를 잎과 뿌리로 부위를 구분하여 사용하였으며, 깨끗이 세척하여 50℃ 열풍 건조기에서 건조한 후 10℃ 저장고에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

(2) 아미노산

일정량의 민들레 분말에 6 N HCl 용액을 가하고 질소가스를 충전한 후 110℃에서 22시간 가수분해하고 감압농축시켜 염산을 제거하였다. 이를 0.45 µm membrane filter로 여과하고 여액중 일부를 취해 건조 튜브에 넣고 유도체 시약 methanol : triethylamine : water : phenyl isothiocyanate(PITC) (7:1:1:1, v/v) 혼합용액을 첨가하여 유도체화시킨 다음 이를 감압건고하였다. 건고물을 용해시킨 후 pico-tag 방법에 따라 HPLC로 분석하였다. 이때 분석조건은 instrument: JASCO HPLC System, column: pico-tag, column temp.: 40℃, eluent: pico-tag eluent A & B, flow rate: 1.0 mL/min, chart speed: 1.0 cm/min, detector: UV 254 nm, injection volume: 10 µL이었다.

(3) 무기질

민들레 분말을 예비탄화한 후 550℃ 회화로에서 회화시키고 회화시킨 회분에 염산을 가하여 용해시키고 일정량으로 정용한 후 ICP-AES(Inductively coupled plasma, JA38 PLUS, ISA Instrument S.A., France)로 분석하였다. ICP-AES의 작동조건은 power: 1 kW for aqueous, nebulizer pressure: 3.5 bars for meinhasd type C, aerosol flow rate: 0.3 L/min이었으며, 각 무기질의 검출파장은 Ca: 393.37, Mg: 279.55, Na: 588.99, K: 766.49, P: 213.62, Fe: 238.20, Zn: 213.86, Mn: 257.61, Se: 196.09 nm이었다.

(4) 지방산 조성

지방산은 민들레 분말을 *n*-hexane으로 추출하여 얻은 지질 200 mg에 0.5 N NaOH/MeOH 5 mL를 가하여 분해시킨 다음 BF₃ 촉매 하에 methyl ester를 만들어 GC (HP5890, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다.

(5) 비타민

비타민 C 정량은 2,4-dinitrophenyl hydrazine 비색법을 이용하여 측정하였다. 시료 1 g을 취하여 5% metaphosphoric acid에 녹인 후 시료액 2 mL를 취해 20 mL 정도의 시험관에 가하여 비타민 C 정량에 사용하였다. 각 시험관에 DCP 용액 1 mL를 가하여 1분간 방치후 용액이 핑크색으로 변하면 2% thiourea-metaphosphoric acid 2mL를 가하였다. 총 비타민 C 측정용 시험관에는 DCP 용액 1 mL를 가하여 37°C 수욕에서 3시간 반응시킨 후 85% 황산 5 mL를 천천히 가한 다음 30분 방치후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

베타-카로틴 정량은 chloroform/methanol/water의 혼합용매로 시료를 추출, 전처리하여 HPLC로 분석하였다. 칼럼은 μ -Bondapak C₁₈ (3.9 mm I.D. × 300 mm), 온도는 40°C, 용매는 methanol : water = 90:10 (v/v), 이동속도는 1.0 mL/min, 검출기는 UV (325 nm)이었다.

(6) 식이섬유 및 유리당

식이섬유는 Prosky 등의 방법에 따라 분석하였으며, 유리당은 추출물을 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 이때 사용한 칼럼은 carbohydrate analysis column (Waters, Co.), 온도는 30°C이었으며, 이동상으로 80% acetonitrile을 사용하였고, 용매의 이동속도는 1.0 mL/min, 시료의 주입량은 20 μ L, 검출기는 RI이었다.

(7) 총 폴리페놀

총 폴리페놀의 함량은 Folin-Ciocalteu 법을 이용하여 측정하였다. 민들레 분말 0.5 g에 70%(v/v) MeOH 용액 60 mL를 가하여 80°C에서 1시간 환류추출 후 냉각하고 70% MeOH로 100 mL로 정용하여 여과한 여액을 시액으로 사용하였다. 추출물에 Folin-Ciocalteu 시약을 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 방치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 표준물질은 chlorogenic acid를 사용하였다.

(8) 총 플라보노이드

민들레의 총 플라보노이드 정량은 민들레 분말 0.5 g에 50%(v/v) MeOH 용액 60 mL를 가하여 80°C에서 1시간 환류추출 후 냉각하고 50% MeOH로 100 mL 정용하여 여과한 여액을 시액으로 사용하였다. 시험관에 diethylene glycol 10 mL와 시액 1 mL를 취해 잘 혼합한 후 여기에 1 N NaOH 1 mL를 가하여 다시 잘 혼합하고 37°C에서 1시간 가온 후 420 nm에서 흡

광도를 측정하였다. 이때의 표준곡선은 catechin의 농도가 0~0.5 mg% 범위가 되도록 제조한 표준용액을 이용하여 검량선을 작성하여 플라보노이드 측정에 사용하였다.

나. 민들레의 *in vitro* 항염증 활성 탐색

(1) 추출물 제조 및 추출물의 분획

열풍건조한 민들레 잎과 뿌리의 분말과 15배 중량의 70% MeOH 용액을 환류 냉각관이 부착된 flask 내에 넣고 MeOH 추출물을 제조하였다. 80°C에서 1시간씩 2회 추출하고 여과하여 여액을 진공농축기로 감압농축한 후 동결건조하여 70% MeOH 추출물을 얻었다. 또한 70% MeOH 추출물을 chloroform, ethyl acetate, n-BuOH, 물로 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 각 추출물을 얻었다.

(2) 세포배양

본 실험에서 사용한 Macrophage Raw 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 10% FBS(fetal bovine serum)와 0.25% penicillin을 포함하고 있는 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

(3) 세포 생존율 (Cell viability)

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay로 측정하였다. 2×10^5 cells/mL 수준의 배양 세포 100 μ L를 96 well plate에 분주한 후, overnight시킨 후에 각 농도별의 시료를 처리하고 4시간 후에 1 μ g/mL의 Lipopolysaccharide(LPS)를 처리하였다. 44시간 후 MTT 시약을 50 μ L 첨가한 후, 4시간 incubation하고 원심분리(1000 rpm, 4°C, 5분)하였으며, 상정액을 버리고 DMSO를 150 μ L 처리 후 25분 동안 37°C에서 shaking incubation시키고 ELISA microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Nitrite (Nitric oxide, NO)

96 well plate에 2×10^5 cells/mL로 macrophage를 분주한 후, overnight시킨 후에 각 농도의 시료를 처리하고 4시간 후에 1 μ g/mL의 LPS를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. 20시간 후에 cell culture medium 100 μ L와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% H₃PO₄ (1:1 mixture)) 100 μ L를 96 well plate에서 혼합한 후 15분간 상온에서 반응시키며, ELISA microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 nitrite를 정량하였다.

(5) PGE₂

Prostaglandin E₂(PGE₂) 측정은 Assay Design의 Correlate-EIA™ Prostaglandin E₂ (PGE₂) kit를 사용하였다. 96 well plate에 2×10⁵ cells/mL로 macrophage를 하루동안 배양한 후에 LPS 1 µg/mL 및 각 농도의 시료를 100 µL 처리하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. 이로부터 얻은 media를 EIA kit의 시료로 사용하여 PGE₂의 양을 측정하였다.

(6) Cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6)

TNF-α, IL-1β, IL-6 측정은 Assay Design의 enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA) kit를 사용하였다. 96 well plate에 2×10⁵ cells/mL로 macrophage를 하루동안 배양한 후에 각 농도의 시료를 처리하고 4시간 후에 LPS 1 µg/mL를 처리하여 20시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. 이로부터 얻은 media를 ELISA kit의 시료로 사용하여 TNF-α, IL-1β, IL-6의 양을 측정하였다.

(7) Western blot

6 well plate에 2×10⁵ cells/mL로 macrophage를 하루동안 배양한 후에 민들레 잎의 MeOH 시료와 chloroform과 ethyl acetate 분획물을 처리하고 4시간 후에 LPS 1 µg/mL를 처리하여 20시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. 배양후 세포를 수집하여 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 2~3회 세척한다. 세척 후 lysis buffer (Tris-HCl 20mM pH 7.5, 10 mM NaF, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 mM Na₃VO₄, leupeptin 10 µg/mL, and trypsin inhibitor 10 µg/mL)을 첨가하여 30 분간 cell을 lysis시킨 후, 13000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액을 취했다. Lysate에 있는 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)을 표준으로 하여 Bio-Rad Protien Assay kit를 사용하여 정량하였다. 같은 단백질 농도의 lysate를 8% SDS-PAGE로 전기영동을 하여 분리하고 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane에 transfer하였다. Nonspecific binding은 5% skim milk가 함유된 TBST (1 M Tris-HCl, pH 7.6, 2.5 M NaCl, 0.5% Tween 20)로 2시간 동안 blocking하였다. 1차 항체 (iNOS, COX-2(Santa Cruz, CA, USA), β-actin, phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-JNK, JNK(Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA))는 TBST에 희석시켜 4°C에서 overnight 반응시켰다. 반응 후 TBST로 세척하고 2차 항체와 반응시켰다. 2차 항체로는 HRP (horseradish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG (Santa cruz)를 TBST로 희석하여 사용하였다. Immunoblots은 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

다. 민들레 항염증 활성물질의 규명

(1) 정제용 시료 제조

선행연구 결과 활성이 우수한 것으로 확인된 민들레 잎 70% MeOH 추출물에 10배 가수한 후, 같은 양의 chloroform, ethyl acetate, n-BuOH을 첨가하여 얻은 분획물로 항염증 활성 측정 결과 chloroform 분획물과 ethyl acetate 분획물의 활성이 가장 우수한 것으로 나타나 두 분획물을 합하여 정제용 시료로 사용하였다.

(2) 활성물질의 정제

(가) Silica gel column chromatography에 의한 활성물질의 정제

Chloroform과 ethyl acetate 분획의 혼합물을 silica gel로 충전된 column에 투입한 후 먼저 100% chloroform으로 시작하여 MeOH 혼합비율을 75:25, 50:50, 25:75으로 높여서 순차적으로 용출하고 마지막에 100% MeOH로 용출시켰다.

(나) TLC와 preparative HPLC에 의한 활성물질의 정제

Silica gel이 코팅된 TLC plate로 silica gel column chromatography에 의해 분리된 활성물질을 chloroform과 MeOH을 17:3으로 혼합된 용액을 이동상으로 하여 분리하였으며, 분리된 활성물질을 다시 silica gel column chromatography에 주입하여 75:25의 chloroform과 MeOH의 혼합용액으로 용출하여 분리하였다. 정제된 활성물질을 prep-HPLC column에 주입하고, 표 1의 조건에서 0.1% formic acid가 포함된 MeOH과 water를 용매로 하여 활성물질을 분리하였다.

표 1. Preparative HPLC 조건

조 건	
컬럼	μ -Bondapack C ₁₈ column (7.8x300 mm)
용매	Solvent A : 5% MeOH (in 0.1% formic acid)
	Solvent B : 95% MeOH (in 0.1% formic acid)
	0-10 min : 2-5% solvent B
	10-50 min : 5-35% solvent B
	50-60 min : 35-40% solvent B
60-70 min : 40-60% solvent B	
70-90 min : 60% solvent B	
유속	3.5 mL/min
파장	280 nm
시간	90 min.

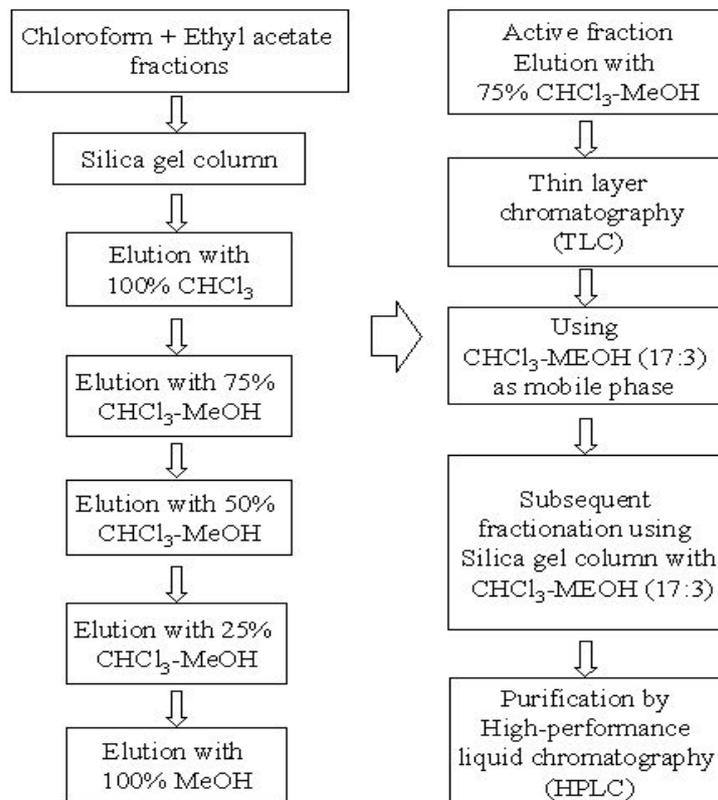


그림 1. 민들레 잎 70% MeOH 추출물의 chloroform과 ethyl acetate 분획 혼합물의 분리 정제

(3) 정제물의 항염증 활성 분석 (LPS에 의한 macrophage의 NO 생산)

1-나-(4)와 동일한 방법으로 측정하였다.

(4) 항염증 활성물질의 구조분석

분리 정제된 항염증 활성물질의 분자량을 측정하기 위하여 JMS-SX102A (Jeol, Japan; Ionization-electron impact; Ionization voltage-70 eV; Ionization current-300 μ A; Acceleration voltage-10 kV source temperature-230 $^{\circ}$ C)로 분석하여 Electron Impact Mass Spectrum (EI-MS)로 나타내었다. 또한 활성물질의 구조분석을 위하여 proton nuclear magnetic resonance (1 H-NMR)와 correlation NMR spectra인 COSY를 Varian UI-500 (500 MHz) spectrometer를 통해서 측정하였다.

2. 민들레 항염증 활성물질의 소제화

가. 항염증 활성물질의 추출 및 농축

(1) 추출 및 효소 처리

민들레 잎 분말 5 g에 100 mL의 증류수를 첨가하고 60~90 $^{\circ}$ C에서 1시간씩 2회 반복 추출한 후, 여과하고 동결 건조하여 수율, flavonoid와 항염증 활성 측정 시료로 사용하였다. 또한 열수 추출물의 수율과 유용성분의 추출을 증가시키기 위해 cellulase를 주요 효소로 하면서 hemicellulase가 함유된 효소인 Econase CE (EC 3.2.1.4) (비전바이오켐, 성남, 한국)를 사용하였다. 효소 첨가 시 추출 용액은 citric acid로 pH 4.0으로 조절하고, Econase CE를 5% 첨가하여 shaking water bath에서 120 rpm, 60 $^{\circ}$ C 조건으로 1시간씩 2회 추출하였다. 추출액을 여과한 후 탄산수소나트륨으로 pH 5.8 (pH 조절하지 않은 민들레 잎 열수추출물의 pH)로 조정하고 동결건조하였다.

(2) 추출물의 column chromatography

Sepabeads SP-850 (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan)와 Amberlite XAD-2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 column에 충전한 후 민들레 잎 추출물을 주입하고 증류수를 흘려 resin에 투과하는 물질과 흡착하는 물질을 구분하였고 흡착물질은 MeOH을 흘려 탈착시킨 후 투과물질과 흡착물질을 동결건조하여 시료로 사용하였다.

(3) 수율

추출물의 수율은 추출액을 동결건조한 후 추출액 제조에 사용한 원료 건물량에 대한 고

형분 양(% , d.b.)으로, 투과 및 흡착물질의 수율은 column chromatography에 의해 분리한 투과물질과 흡착물질을 동결건한 후 추출물 건물량에 대한 고형분 양 (% , d.b.)으로 나타내었다.

(4) 총 flavonoid 함량

민들레 잎 열수추출물과 투과 및 흡착물질의 총 flavonoid 함량은 1-가-(8)과 동일한 방법으로 측정하였다.

(5) 세포배양

1-나-(2)와 동일한 방법을 사용하였다.

(6) Nitrite, PGE₂, TNF- α 생성량

1-나-(4), 1-나-(5), 1-나-(5)와 동일한 방법으로 측정하였다.

(7) 통계분석

추출온도별 수율과 flavonoid 함량은 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분산분석을 하고 Duncan's multiple range test로 시료간 유의차를 검증하였으며, 효소처리에 따른 수율, flavonoid 함량, NO 생성에 대한 저해율은 paired t-test를 실시하였다.

나. 항염증 소재의 피부염 유발 동물모델에서의 항염증 효과

(1) TPA (또는 croton oil) 염증 유발 및 항염증 소재 처리

염증 유발 전에 dial thickness gauge (Peacock Co., Japan)로 mouse 왼쪽 귀의 두께를 측정 후, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-acetate)로 염증을 유발하였다. TPA를 2.5 μ g을 정량하여 20 μ L의 acetone에 녹여 사용하였고 귀의 양면에 각각 10 μ L씩 도포하였다. Croton oil의 경우에는 0.5 μ g을 정량하여 20 μ L의 acetone에 녹여 사용하였으며 귀의 양면에 각각 10 μ L씩 도포하였다. TPA (혹은 croton oil) 처리 후 5분경과 시점에 TPA(혹은 croton oil)를 처리한 왼쪽 귀에 항염증 소재를 도포하였다. 먼저 일정량의 항염증 소재를 1~100 mg/mL의 농도로 acetone에 녹인 후, 20 μ L를 mouse 왼쪽 귀의 양면에 각각 10 μ L씩 도포하였다. 실험군은 항염증 소재의 처리 농도에 따라 100 mg/mL의 농도로 사용한 DA-100 처리군, 50 mg/mL의 농도로 사용한 DA-50 처리군, 10 mg/mL의 농도로 사용한 DA-10 처리군 그리고 1 mg/mL의 농도로 사용한 DA-1 처리군 등, 총 4개의 군으로 나누었다. 양성대조군 (INDO)으로는 indomethacin을 사용했으며 0.5 mg을 20 μ L의 acetone에 녹여 항염증 소재 처리방법

과 마찬가지로 염증 유발 5분 후 mouse 왼쪽 귀 양면에 각각 10 μ L/site 로 도포하였다. 음성 대조군 (CONT) 은 왼쪽 귀에 TPA만 처리한 군으로 하였다. 실험 대조군으로는 acetone만을 mouse 왼쪽 귀의 양면에 각각 10 μ L씩 도포해 준 mouse를 사용하였다.

(2) 귀 부종 측정 (Ear edema test)

염증 유발 및 항염증 소재 처리 7시간 경과 후 양쪽 귀의 두께를 측정하여 염증을 유발 시킨 귀와 유발 시키지 않은 귀의 두께를 비교하였다.

Percent inhibition (%)

$$= \frac{(\Gamma_7 - T_0) \text{ control} - (\Gamma_7 - T_0) \text{ treated group}}{(\Gamma_7 - T_0) \text{ control}} \times 100$$

(3) 통계분석

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고 실험 데이터는 one-way ANOVA를 사용하여 분석하였고 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다. 보다 정확한 검증을 위해 사후검증은 Tukey post hoc test를 사용하였다.

다. 항염증 소재의 관절염 유발 동물모델에서의 항염증 효과

(1) 실험군 분류 및 관절염 유발

쥐에게 관절염을 유발시키기 위하여 3% carrageenan을 100 μ L pyrogen-free saline에 섞어 혼합용액을 쥐의 좌측 무릎관절에 주입하였으며, saline을 처리한 음성대조군 (CON), 20 mg/kg의 항염증 소재 처리군 (DA-20), 100 mg/kg의 항염증 소재 처리군 (DA-100), 200 mg/kg의 항염증 소재 처리군 (DA-200), 10 mg/kg prednisolone을 처리한 양성대조군 (PRE) 으로 나뉘었다. 염증 유도후 9일동안 매일 1회씩 항염증 소재 및 prednisolone을 투여하였다.

(2) 행동실험 (Behavioral and pre-clinical parameters)

(가) 족 부종 부피 (Evaluation of paw volume)

족 부종 부피 (paw volume)는 water displacement plethysmometer (Ugo-Basile Biological Research Apparatus Co., Comerio Varese, Italy)를 이용하여 측정하였다. 족 부종부피 측정 전에 carrageenan을 주입하고 난 후 측정된 값을 control volume으로 사용하였다. 부종부피는 첫날의 측정값을 최대로 하여 상대적인 측정값으로 나타내었다.

(나) Squeaking test

관절염으로 인한 과민 통증에 의한 쥐의 발성을 측정하는 것으로, 총 5회에 걸쳐 무릎 밑의 슬관절을 천천히 굴신시키고 울음소리에 따라 1점에서 최대 10점까지 부여 하게 된다. 굴신을 할 때마다 쥐의 울음소리를 측정하여 그 양을 매일 측정하였다.

(다) 체중분배비율 (Evaluation of weight distribution ration)

무릎관절의 통증 수준을 정량적으로 측정하는 것으로, 체중의 분배에 따라 하지의 체중분배의 영향을 incapitance meter를 이용하여 측정하였다. 쥐를 incapitance meter 시험통에 넣고 각 하지에 실리는 체중을 두 mechanotransducers를 통하여 정량하며, 각 하지에 실리는 체중의 5초 평균을 4회 반복 측정하여 그 평균값을 사용하였다. 체중분배비율은 다음과 같은 공식을 사용하여 산출한다.

Weight Distribution Ratio(%) =

$$100 \times (\text{weight borne by ipsilateral limb} / \text{total weight borne by both limbs})$$

(3) 통계분석 (Data analysis)

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 실험결과는 one-way ANOVA를 이용하여 분석하였으며, 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다. 정확한 검증을 위하여 Tukey post-hot test 를 사후 검증방법으로 사용하였다.

라. 항염증 소재의 특성 조사

(1) 온도 및 pH 등 가공조건별 안정성

항염증 소재의 열과 pH 등의 가공조건에 대한 안정성을 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 열 안정성 확인을 위하여 추출물을 물에 녹인 후 30~90℃에서 2시간 동안 열처리한 후, 동결건조하여 항염증 활성을 측정하였다. pH 안정성은 추출물을 물에 녹인 후 0.05 N NaOH와 HCl을 이용하여 각각 pH 3, 5, 7, 9, 11로 조정한 후 30℃에서 2시간 반응시키고 다시 pH 6으로 중화한 후에 동결건조하여 활성을 측정하였다. 이 때 어떠한 처리도 하지 않은 추출물을 대조구로 하였다. 얻어진 시료의 항염증 활성은 macrophage의 LPS로 유도된 NO의 생성농도를 측정하였다.

(2) 항균성

여드름균인 *Propionibacterium acnes*에 대하여 paper disc method로 항균성을 측정하였

다. 멸균한 Reinforced Clostridial Medium (RCM) agar 25 mL에 균 배양액 100 μ L을 접종한 후, 멸균된 paper disc(직경 8mm)를 plate에 놓고 일정 농도의 민들레 잎 추출액을 disc에 20 μ L씩 흡수시킨 후 37 $^{\circ}$ C incubator에서 혐기 조건으로 3일간 배양시켰다. 배양 후 disc 주변에 생성된 clear zone의 크기를 비교하였다.

(3) 항산화성

추출물의 항산화성은 DPPH 자유 라디칼에 대한 환원력으로 측정하였다. EtOH에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 1 mL, EtOH 1 mL와 각 농도별로 희석한 시료 0.5 mL를 혼합하여 15분 경과 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유 라디칼 소거활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{자유 라디칼 소거활성 (\%)} = [1-(C-D)/(A-B)] \times 100$$

A: 대조용액의 520nm에서 흡광도

B: 대조용액 Blank의 흡광도

C: 시료용액의 흡광도

D: 시료용액의 Blank의 흡광도

마. 항염증 소재의 독성시험

(1) 단회 경구투여

4주령의 SPF SD rat 수컷을 이용하여 공급받은 후 1주간 안정시킨 후 온도 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 \pm 5%, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux가 유지되는 실험 동물실에서 수행되었으며, 고형사료와 정제수를 자유 섭취하도록 하였다. 일반적으로 경구독성 시험의 한계량으로 사용되는 5,000 mg/kg 투여군을 최고 용량군으로 하고 2,000 mg/kg 투여군을 중용량군으로, 500 mg/kg 투여군을 저용량군으로 설정하였으며, 군간 체중을 고르게 6마리씩 배치하였다. 동물체중의 평균을 측정하여 항염증 소재를 농도별로 계산하여 각 투여군에 개체당 1 mL씩 경구투여하였다. 투여당일은 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간, 14일까지는 매일 1회씩 일반증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 시료 경구투여 후 0, 1, 4, 7, 14일에 모든 동물의 체중을 측정하였다. 시료 경구투여 14일 후에 치사시킨 후, 육안적으로 모든 내부장기를 관찰하였다.

(2) 4주 경구투여

반복투여 독성시험에서는 500 mg/kg을 최고 용량으로, 50 mg/kg을 저용량으로 설정하였다. 군 당 6마리씩 배치하여 투여군과 대조군으로 실시하였다. 투여시 동물체중의 평균을 측정하여 시험물질을 농도별로 계산하여 각 투여군에 개체당 매일 1회, 4주 동안 1 mL씩 경구투여하였다. 시험기간 중 매일 1회씩 모든 동물에 대하여 전 시험기간 동안 일반증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 시험기간 중 매일 1회씩 모든 동물의 체중을 측정하였고, 주 1회씩 사료의 섭취량을 측정하였다. 부검전 절식시킨 동물의 안구를 통해 채혈하여 얻은 혈액의 일부를 응고되지 않은 상태에서 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤모글로빈(HGB), 헤마토크리트치(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT) 검사를 수행하였다. 혈액응고시간에 있어서 prothrombin time (PT)와 activated partial thromboplastin time(APTT)을 측정하기 위해 혈액의 일부를 sodium citrate가 처리된 tube에 취한 후 잘 혼합하여 원심분리하여 얻은 혈장을 이용하였다. 또한 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리해서 얻은 혈청에 대하여 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase(ALP), total protein(TP), blood urea nitrogen(BUN), creatinine, total bilirubin(T-BIL), cholesterol, glucose, sodium(Na), potassium(K), chloride(Cl)를 측정하였다. 혈액 채취후 치사시켜 장기를 적출하여 육안으로 검사하고 심장, 간, 위, 신장(좌, 우), 비장, 폐, 갑상선 및 뇌의 장기에 대하여 절대장기 중량을 측정하였다. 신장의 조직병리학적 검사를 위하여 적출된 신장을 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 후 조직처리과정을 거쳐 파라핀포매하였다. 포매된 조직은 박절한 후 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하여 광학현미경하에서 조직병리학적인 검사를 실시하였다.

3. 민들레를 이용한 기능성 제품 개발

가. 민들레 음료 개발

(1) 민들레의 적정 볶음처리 조건 설정

(가) 볶음처리 및 열수추출액 제조

볶음처리하지 않는 생잎은 수세한 민들레 잎을 40℃ 열풍건조기에서 건조하였으며, 볶음처리 민들레는 볶음솥을 이용하여 180℃에서 3분 볶음 후 유념하면서 볶음횟수를 1, 4, 7 회로 달리하여 제조한 후 40℃ 열풍건조기에서 건조하였다. 건조한 민들레 잎을 10배 용량의 물과 혼합하여 90℃에서 60분 동안 열수추출하였고, 추출액을 여과한 후에 추출시 사용한 물의 양과 동일하게 맞춰 주었다.

(나) 민들레 및 열수추출액의 이화학적 및 관능적 특성 조사

① 유리당

1-가-(6)과 동일한 방법으로 측정하였다.

② 유리 아미노산

민들레 잎 분말에 70% EtOH 용액을 가하여 80℃에서 환류추출한 후 여과하고 여액을 감압농축한 다음 25% trichloroacetic acid (TCA) 용액을 가하여 단백질을 침전시키고 원심분리하였다. 상정액을 건조 후 PITC (phenylisothiocyanate)로 유도체를 만들고 용매 A에 용해, 원심분리한 후 시료로 사용하였다. 이때 사용한 칼럼은 Waters Symmetry C₁₈, 검출기는 UV detector (HP 1100 series, 254 nm)를 사용하였고, 이동상은 용매 A (1.4 mM NaHAc, 0.1% triethylamine, 6% CH₃CN, pH 6.1)과 용매 B (60% CH₃CN)를 gradient법으로 용매 이동 속도 1.0 mL/min, 시료 주입량 10 µL, 칼럼온도 46℃의 조건에서 분석하였다.

③ 무기질

1-가-(3)과 동일한 방법으로 측정하였다.

④ 총폴리페놀

1-가-(7)과 동일한 방법으로 측정하였다.

⑤ 가용성 고형분, pH, 색도, 환원당 및 아미노태질소

민들레 잎의 열수추출액의 가용성 고형분은 당도계 (ATAGO, No. 1, Japan)를, pH는 pH meter (420Benchtop, Orion Research Inc., USA)를 사용하여 측정하였다. 색도는 색차계 (ColorQUEST II, HunterLab, USA)를 이용하여 L, a, b 값을 측정하였다. 환원당은 Somogyi-Nelson 법을 이용하였다. 시료 2 mL와 A 시약 2 mL를 혼합하여 가열하고 냉각시킨 후 B 시약 2 mL를 첨가하고, 25 mL까지 증류수로 정용한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준물질은 D(+)-glucose를 이용하였다. 아미노태질소는 추출액에 포르말린용액 (37%)을 가한 후 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 소비된 양과 바탕시험을 통한 소비량으로 아미노태질소 함량을 계산하였다.

⑥ 관능검사 및 통계처리

민들레 열수추출액을 1 °Bx로 조정된 후 10명의 훈련된 관능검사원을 대상으로 추출액에 대한 향미묘사시험을 통해 관능적 특성을 도출하였고 관능적 특성의 강도에 대해 관능검사를 실시하여 측정값을 QDA diagram으로 나타내었다. 그리고 추출액에 대한 관능적 기호도를 측정하기 위하여 평가항목으로 색, 향, 맛, 종합적 기호도에 대하여 9점 기호척도법으로

관능검사를 실시하였으며, 결과를 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분산분석을 하고 Duncan's multiple range test로 시료간 유의차를 검증하였다.

(2) 민들레의 적정 추출조건 설정

(가) 추출조건별 추출액 제조

4회 덩침처리한 민들레 잎을 분쇄한 후에 10배의 물로 60, 75, 90℃에서 각각 1, 2, 3회 90분 씩 열수추출하였고, 추출액을 여과한 후에 추출시 사용한 물의 양과 동일하게 맞춰주었다.

(나) 추출액의 이화학적 및 관능적 특성 조사

① 당도, pH 및 색도

3-가-(1)-(나)-⑤와 동일한 방법으로 측정하였다.

② 환원당

3-가-(1)-(나)-⑤와 동일한 방법으로 측정하였다.

③ 적정산도

1(시료) : 10(물)으로 추출한 추출액 10 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4까지 적정하여 다음 식을 이용하여 적정산도를 구하였다.

$$\text{식품 중 유기산의 양(\%)} = V \times F \times A \times D \times \frac{1}{S} \times 100$$

V: 0.1N NaOH 용액의 소비량 (ml)

F: 0.1N NaOH 용액의 역가

A: 0.1N NaOH 용액 1 mL에 상당하는 유기산의 양 (citric acid= 0.0064)

D: 희석배수

S: 시료 채취량

④ 아미노태 질소

3-가-(1)-(나)-⑤와 동일한 방법으로 측정하였다.

⑤ 총 폴리페놀

1-가-(7)과 동일한 방법으로 측정하였다.

⑥ 관능검사 및 통계처리

3-가-(1)-(나)-⑥과 동일한 방법으로 조사하였다.

(3) 민들레 음료 제조조건 설정

(가) 추출액의 농축 및 적정 음용농도 결정

민들레 잎을 앞의 연구결과에서 결정된 추출조건에 의해 추출한 추출액을 50℃로 조정된 감압 농축기를 이용하여 60 °Bx까지 농축하였으며, 민들레 음료 제조를 위한 추출액의 적정 음용농도를 결정하기 위하여 농축액을 0.1~0.4 °Bx로 희석하여 관능검사를 실시하였다.

(나) 음료의 기호성 증진을 위한 첨가물 배합시험

고온에 의한 살균처리시 이미,이취 발생, 변색 등 품질변화가 심한 민들레 추출액의 적정 음용농도를 기준으로 품질 변화를 최소화하기 위하여 Vit C (0.04%)와 Sodium ascorbate (0.02%), 탄산수소나트륨 (0.03%) 등을 첨가하였으며, 민들레 음료에 적합한 향을 선별하기 위하여 과일향, 허브향 등 10여종의 향을 대상으로 관능검사를 실시하였다.

(다) 음료의 살균

민들레 음료의 살균처리후 저장시 품질변화를 조사하기 위하여 제조한 민들레 음료를 그림 2와 같은 pilot UHT 살균설비를 이용하여 2단계 살균을 실시하였다. 얇은 관을 통하여 투입된 음료는 98℃로 조정된 1차 살균기를 약 20초에 걸쳐 통과하고 곧바로 135℃로 조정된 2차 살균기를 약 15초에 걸쳐 통과함으로써 살균처리되었다.



그림 2. Pilot UHT 살균장치

나. 항염증 소재를 이용한 여드름 치료 및 관절염 예방용 제품 개발

(1) 항염증 활성 생약재 선정

민들레 항염증 소재를 이용한 기능성 제품 개발시 함께 첨가하기에 적합한 생약재를 선정하기 위하여 문헌적으로 항염증 효과가 있는 것으로 보고된 생약재들을 대상으로 열수추출 후 추출물의 항염증 활성을 측정하였다. 강황, 감초, 개다래, 계피, 복령, 산초, 생강, 어성초, 영정귀, 오디, 인진쑥, 천궁과 초피나무 등을 구입하여 이들의 항염증 활성을 RAW 264.7 cell의 LPS로 유도된 NO의 생성량을 통해 측정하였다.

(2) 여드름균에 대한 항균성을 갖는 천연 항균제 선정

여드름균인 *Propionibacterium acnes*와 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 천연 항균제의 항균성을 paper disc method로 측정하였다. 각각 멸균한 Reinforced Clostridial Medium (RCM) agar와 Tryptic soy agar 25 mL에 균 배양액 100 μ L을 접종한 후, 멸균된 paper disc (직경 8mm)를 plate에 놓고 일정 농도의 민들레 잎 추출액을 disc에 20 μ L씩 흡수시킨 후 37°C incubator에서 혐기 조건으로 3일간 배양시켰다. 배양 후 disc 주변에 생성된 clear zone의 크기를 비교하였다.

(3) 여드름 치료용 기능성 제품 개발

(가) 화장품 제조

항염증 활성이 우수한 것으로 확인된 초피나무, 인진쑥, 오디 추출물과 여드름균에 대한 항균효과가 뛰어난 것으로 확인된 천연 항균제 포도씨 추출물 (GS-1000)을 민들레 항염증 소재를 혼합하여 여드름 환자용 크림을 제조하였다. 민들레 항염증 소재와 초피나무 등의 생약재 추출물을 20 °Bx 농도로 조정하여 ointment base에 첨가한 후 균질기를 이용하여 혼합하였다. 이때 민들레 항염증 소재와 생약재 농축액의 혼합은 생약재의 항염증 활성, 가격, 수율 등을 고려하여 항염증 소재 20, 오디 4, 인진쑥 3, 초피나무 3의 비율로 하였다.

(나) 연고 제조

초피나무, 인진쑥, 오디 추출물과 포도씨 추출물 (GS-1000)을 민들레 항염증 소재를 혼합하여 여드름 치료용 연고를 제조하였다. 민들레 항염증 소재와 초피나무 등의 생약재 추출물을 50 °Bx 농도로 조정하여 base에 첨가하였다. 이때 항염증 소재와 생약재 농축액의 혼합은 항염증 소재 20, 오디 4, 인진쑥 3, 초피나무 3의 비율로 하였다.

(다) 비누 제조

초피나무, 인진쑥, 오디 추출물과 포도씨 추출물 (GS-1000)을 민들레 항염증 소재를

혼합하여 여드름 환자용 비누를 제조하였다. 민들레 항염증 소재와 초피나무 등의 생약재 추출물을 50 °Bx 농도로 조정하여 base에 첨가하였다. 이때 항염증 소재와 생약재 농축액의 혼합은 항염증 소재 20, 오디 4, 인진쑥 3, 초피나무 3의 비율로 하였다.

(4) 관절염 예방용 기능성 제품 개발

(가) 환 제조

초피나무, 인진쑥, 오디 추출물 및 민들레 항염증 소재의 농축액(50 °Bx)을 민들레 잎, 오디, 인진쑥, 초피나무 분말과 혼합하여 환을 제조하였다. 이때 항염증 소재와 생약재 농축액의 혼합은 항염증 소재 20, 오디 4, 인진쑥 3, 초피나무 3의 비율로 하였으며, 농축액 50과 분말 50을 혼합하고 분말의 비율은 민들레 50, 오디분말10, 인진쑥 분말 30, 초피나무 분말 10으로 하였다.

(나) 과립차 제조

초피나무, 인진쑥, 오디 추출물 및 민들레 항염증 소재의 농축액(50 °Bx)과 함수결정 포도당을 혼합하여 과립차를 제조하였다. 이때 항염증 소재와 생약재 농축액의 혼합은 항염증 소재 20, 오디 4, 인진쑥 3, 초피나무 3의 비율로 하였다.

제 2 절 연구수행결과

1. 민들레 항염증 활성 규명

가. 민들레 부위별 식품학적 특성

채취한 민들레 잎과 뿌리의 Vit C, 베타-카로틴과 총식이섬유, 총폴리페놀, 총플라보노이드 함량을 측정한 결과는 표 2와 같다. Vit C는 잎이 뿌리에 비해 다소 높은 함량을 나타내었고, 베타-카로틴은 잎에 10.8 mg/100 g의 함량을 나타낸 반면 뿌리에는 0.5 mg/100 g으로 함량이 매우 낮은 것으로 나타났으며, 총 식이섬유 함량은 잎 41.9 g/100 g, 뿌리 51.5 g/100 g으로 뿌리의 식이섬유 함량이 다소 높았다. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드는 잎의 경우 17627.3±314.1 mg/100 g, 13421.7±1352.6 mg/100 g, 그리고 뿌리의 경우 13421.7±1352.6 mg/100 g, 743.2±42.3 mg/100 g으로 잎이 뿌리에 비해 월등히 높은 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 나타내었다. 표 3은 민들레 잎과 뿌리의 유리당 조성을 측정한 결과로서 포도당, 과당, 자당 등이 검출되었고 부위에 상관없이 비슷한 값을 나타내었다.

표 2. 민들레 잎과 뿌리의 Vit C, 베타-카로틴, 식이섬유, 폴리페놀, 플라보노이드 함량

	민들레 잎	민들레 뿌리
Vit C (mg/건물 100 g)	109.6	78.3
베타-카로틴 (mg/건물 100 g)	10.8	0.5
총 식이섬유 (g/건물 100 g)	41.9	51.5
총 폴리페놀 (mg/건물 100 g)	17627.3±314.1	1280.5±54.0
총 플라보노이드 (mg/건물 100 g)	13421.7±1352.6	743.2±42.3

표 3. 민들레 잎과 뿌리의 유리당 함량

	(g/건물 100g)	
	민들레 잎	민들레 뿌리
Glucose	2.5	2.9
Fructose	1.2	1.7
Sucrose	0.3	0.3

민들레 잎과 뿌리의 아미노산 조성을 비교한 결과는 표 4와 같다. 표준물질을 기준으로 17종의 아미노산이 분리되었고 잎은 13,344.0 mg/100 g, 뿌리는 5,755.2 mg/100 g의 함량을 나타내어 잎이 상대적으로 높은 아미노산 함량을 나타내었다. 그리고 잎의 경우 glutamic acid (2,257.3±85.7 mg/100 g), arginine (1,450.7±26.6 mg/100 g), lysine (1,372.2±16.4 mg/100 g), serine (1,360.2±1.7 mg/100 g) 등의 함량이 높았고, 뿌리의 경우에는 glutamic acid (958.5±32.2 mg/100 g), lysine (841.7±31.2 mg/100 g), glycine (579.2±24.5 mg/100 g), aspartic acid (549.6±7.1 mg/100 g) 등의 함량이 높은 것으로 나타났다. 또한 arginine, lysine 등의 필수아미노산의 함량이 총 아미노산 함량의 37.2~41.1%를 나타내어 민들레가 매우 우수한 필수아미노산의 공급원임을 알 수 있었다.

표 4. 민들레 잎과 뿌리의 아미노산 조성

아미노산	(mg/건물 100 g)	
	민들레 잎	민들레 뿌리
Aspartic acid	1,212.1±72.7	549.6±7.1
Serine	1,360.2±1.7	494.9±13.9
Glutamic acid	2,257.3±85.7	958.5±32.2
Glycine	1,085.1±35.7	579.2±24.5
Histidine	144.1±0.7	82.9±2.2
Threonine	354.5±14.9	132.0±4.7
Arginine	1,450.7±26.6	522.7±5.3
Alanine	980.1±19.5	215.0±8.3
Proline	1,047.0±14.8	368.1±11.4
Cystein	317.6±14.5	118.5±5.8
Tyrosine	124.6±2.0	103.8±3.6
Valine	477.2±22.6	200.3±8.1
Methionine	117.2±5.5	85.7±2.8
Lysine	1,372.2±16.4	841.7±31.2
Isoleucine	263.9±5.4	151.2±5.8
Leucine	584.9±29.3	246.6±5.1
Phenylalanine	195.5±6.3	104.3±4.4
Total	13,344.0	5,755.2

표 5는 민들레 잎과 뿌리의 무기질 함량을 비교한 결과로서 잎은 6,086.2 mg/100 g, 뿌리는 1,926.4 mg/100 g의 함량을 나타내어 잎이 상대적으로 높은 무기질 함량을 나타내었다. 잎의 경우 K (3,832.6 mg/100 g), Ca (1,366.3 mg/100 g), P, Mg 등이, 뿌리의 경우에는 K (790.9 mg/100 g), P (389.0 mg/100 g), Na, Ca 등의 함량이 높은 것으로 나타났다. 표 6은 민들레 잎과 뿌리의 지방산 조성을 비교한 결과로서 linoleic acid와 linolenic acid와 같은 필수지방산의 비율이 잎의 경우 각각 20.9%, 36.3%, 뿌리의 경우에는 43.8%, 14.2%로 매우 높았으며, 불포화 지방산의 비율도 전체 지방산의 59.9%, 68.5%를 차지하여 민들레가 영양적으로 매우 바람직한 지방산 조성을 가진 것으로 판단된다.

표 5. 민들레 잎과 뿌리의 무기질 조성 비교

무기질	(mg/건물 100 g)	
	민들레 잎	민들레 뿌리
Na	43.2	312.5
Ca	1366.3	292.6
Fe	13.5	5.2
K	3832.6	790.9
Mg	406.1	132.5
P	417.3	389.0
Zn	3.2	2.2
Mn	4.0	1.5

표 6. 민들레 잎과 뿌리의 지방산 조성

화학식	지방산	지방 100 g 당 조성비 (%)	
		민들레 잎	민들레 뿌리
C12:0	Lauric acid	0.2	0.6
C14:0	Myristic acid	1.2	2.3
C16:0	Palmitic acid	18.5	19.9
C16:1	Palmitoleic acid	0.1	0.3
C18:0	Stearic acid	2.0	2.1
C18:1	Oleic acid	2.6	10.2
C18:2	Linoleic acid	20.9	43.8
C18:3	Linolenic acid	36.3	14.2
C20:0	Arachidic acid	1.3	0.7
C22:0	Behenic acid	1.7	1.1
C24:0	Lignoceric acid	1.5	1.3
	Unknown	13.7	3.5
	합계	100.0	100.0

나. 민들레의 *in vitro* 항염증 활성 탐색

(1) 세포 생존율

민들레 잎과 뿌리의 70% MeOH 추출물 및 용매별 분획의 항염증 활성 탐색을 위해 macrophage RAW 264.7 cell에 대한 세포 생존율을 측정된 결과는 그림 3, 4와 같다. 민들레 잎의 70% MeOH 추출물과 ethyl acetate, n-BuOH, 물 분획은 모든 농도 (62.5~250 µg/mL)에서 세포 생존율에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 chloroform 분획은 125 µg/mL까지는 세포 생존율에 영향을 미치지 않으나 250 µg/mL에서는 41.9±5.0%로 세포 생존율을 크게 감소시켜 RAW cell의 증식에 큰 영향을 미쳤다. 민들레 뿌리는 chloroform 분획이 250 µg/mL에서도 세포 생존율에 영향을 미치지 않고 다른 분획들도 250 µg/mL에서도 세포에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

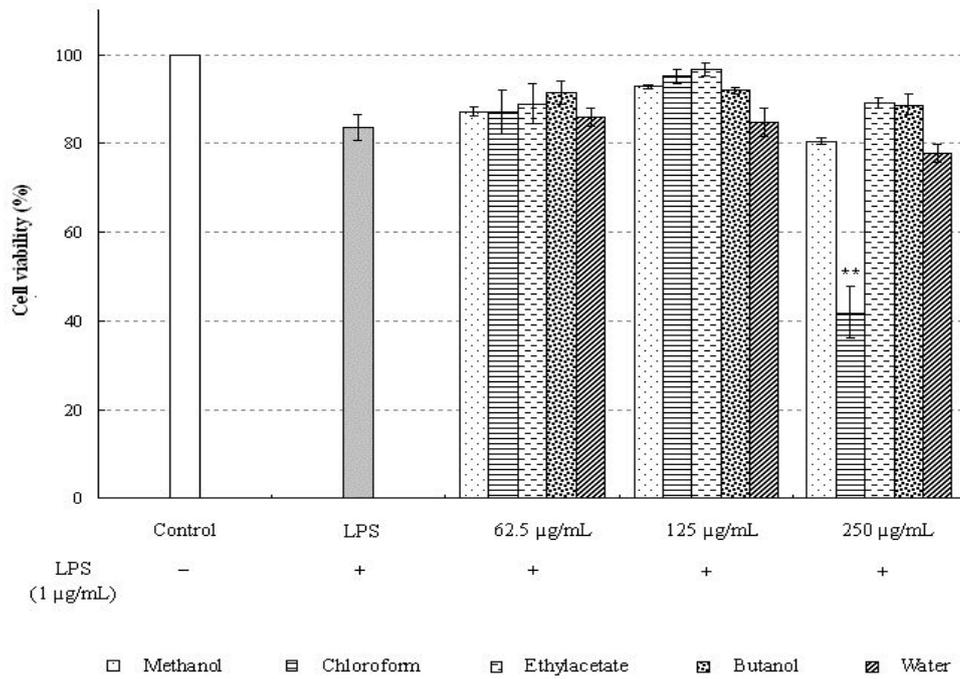


그림 3. 민들레 잎의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 세포 생존율에 미치는 영향

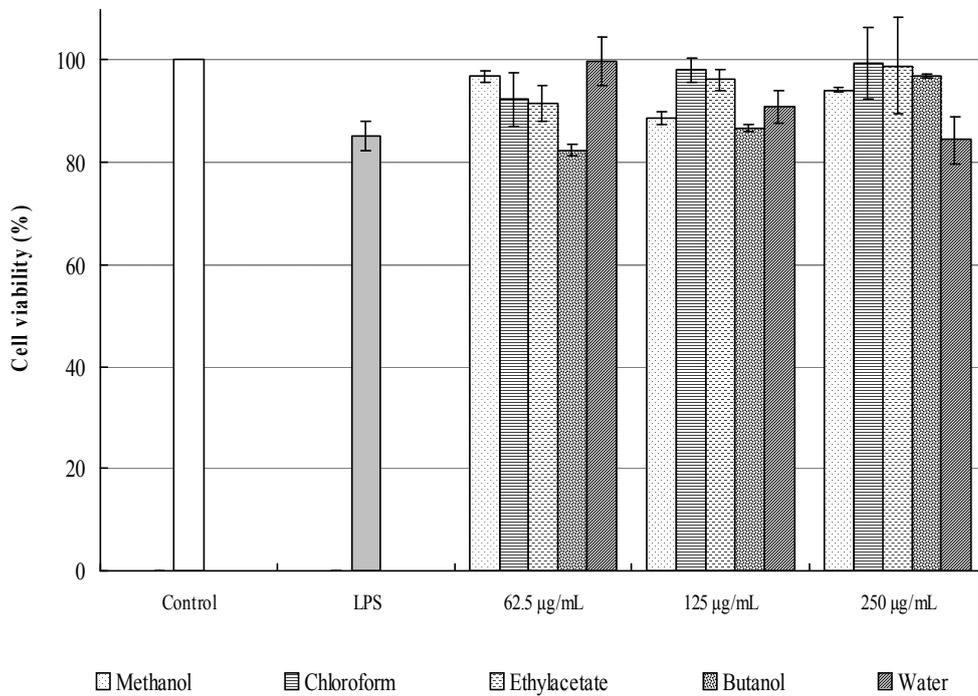


그림 4. 민들레 뿌리의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 세포 생존율에 미치는 영향

(2) Macrophage의 NO 생성에 대한 민들레 추출물의 효과

LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 NO 생성에 대한 민들레의 효과를 조사한 결과는 그림 5, 그림 6과 같다. 앞(그림 5)의 경우 70% MeOH 추출물과 n-BuOH, 물 분획은 NO 생성에 거의 영향을 미치지 않았지만, chloroform과 ethyl acetate 분획은 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. LPS만 처리한 대조구의 경우 40.1 μ M의 NO가 생성되었고, 이때 chloroform 분획은 62.5, 125, 250 μ g/mL의 농도에서 각각 24.4, 7.5, 0.7 μ M의 NO가 생성되었다. Chloroform 분획의 경우 250 μ g/mL 농도에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않지만 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 낮은 농도에서도 LPS로 유도된 NO 생성 저해효과가 큰 것으로 나타났다. Ethyl acetate 분획은 모든 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않으면서 62.5, 125, 250 μ g/mL의 농도에서 각각 32.6, 22.6, 12.3 μ M의 NO가 생성되었다. 즉 chloroform은 125 μ g/mL에서 NO 생성을 약 81% 저해하였고, ethyl acetate는 250 μ g/mL 일 때 약 69%의 저해율을 나타냈다.

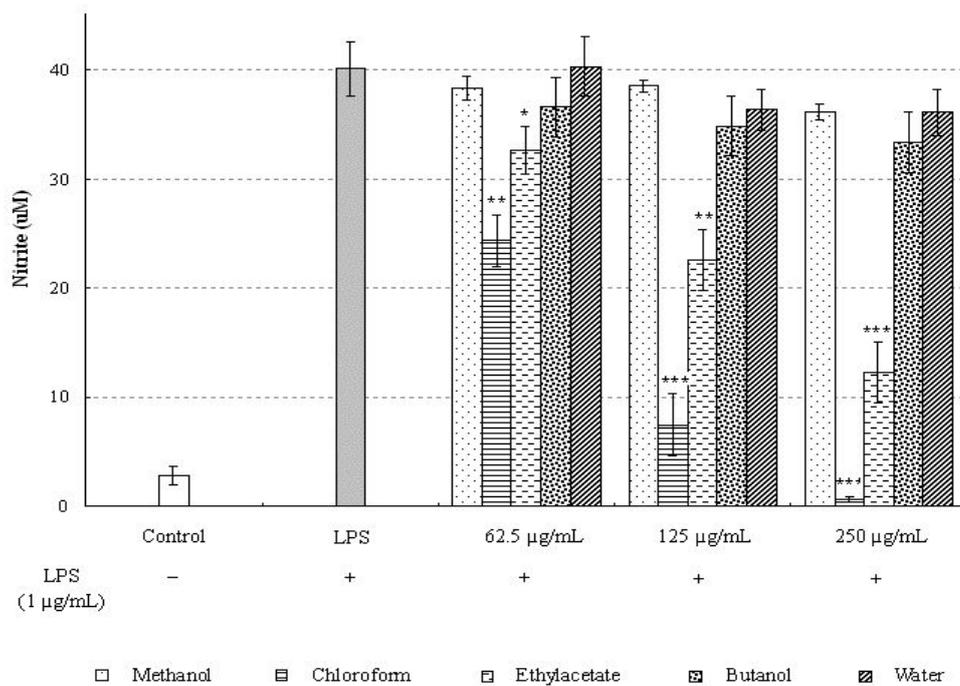


그림 5. 민들레 잎의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 NO 생성에 미치는 영향

뿌리의 경우(그림 6) 앞과 마찬가지로 70% MeOH 추출물과 n-BuOH, 물 분획은 NO 생성 억제 효과가 없지만, chloroform과 ethyl acetate 분획은 NO 생성 억제 효과가 큰 것으로 나타났다. LPS만 처리된 대조구의 NO 생성농도가 43.1 μ M 일 때 chloroform 분획은 62.5, 125, 250 μ g/mL 농도에서 각각 21.5, 7.5, 0.7 μ M의 NO가 생성되었다. 또한 ethyl acetate 분획은 62.5 μ g/mL 농도에서 25.4 μ M, 125 μ g/mL 일 때 15.3 μ M, 250 μ g/mL 농도에서는 6.23 μ M

M의 NO가 생성되었다. 따라서 민들레 잎과 뿌리의 chloroform 과 ethyl acetate 분획이 LPS 로 유도된 NO의 생성을 크게 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

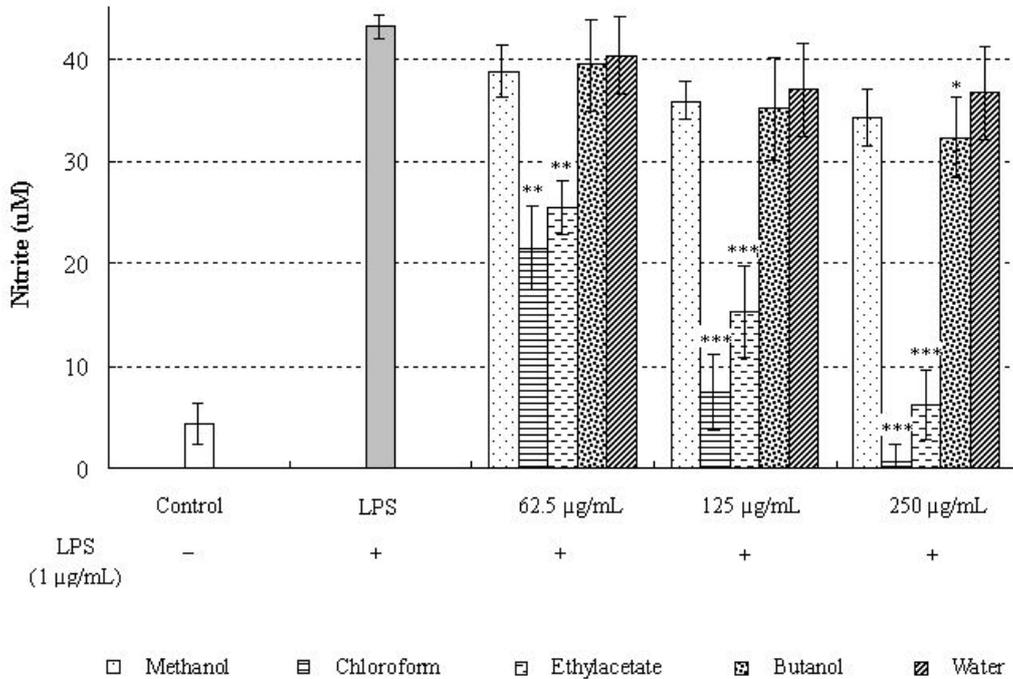


그림 6. 민들레 뿌리의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 NO 생성에 미치는 영향

(3) Macrophage의 PGE₂ 생성에 대한 민들레 추출물의 효과

민들레 잎과 뿌리의 70% MeOH 추출물과 각 용매별 분획물의 PGE₂ 생성저해 효과는 그림 7와 그림 8에 나타내었다. 민들레 잎 추출물 및 분획이 뿌리 추출물 및 분획에 비해 다소 높은 저해 효과를 나타내었고 ethyl acetate와 chloroform 분획의 저해효과가 높은 것으로 나타났다. 특히 대조구의 LPS로 유도된 PGE₂의 농도가 2138.8 pg/mL 일 때, 민들레 잎의 chloroform 분획은 62.5 µg/mL에서는 1196.8 pg/mL, 125 µg/mL에서는 901.1 pg/mL이 생성되었고 250 µg/mL에서는 588.0 pg/mL이 생성되어 농도 의존적으로 PGE₂ 생성을 크게 억제하는 것으로 나타내어 가장 우수한 저해효과를 나타내었다. 하지만 민들레 뿌리는 macrophage의 LPS로 유도된 PGE₂ 생성에는 크게 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다.

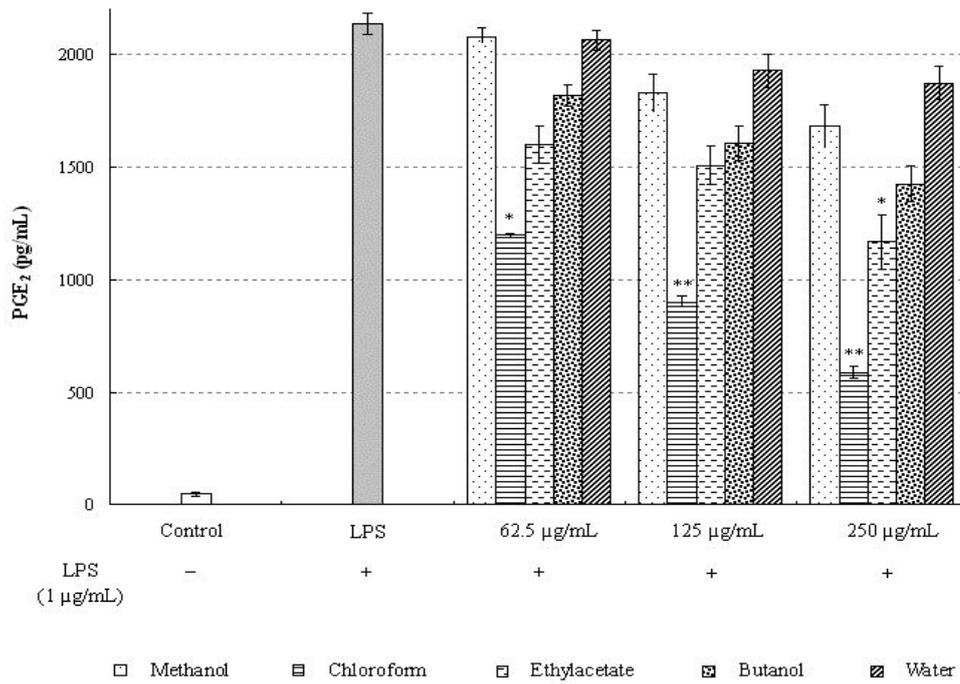


그림 7. 민들레 잎의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 PGE₂ 생성에 미치는 영향

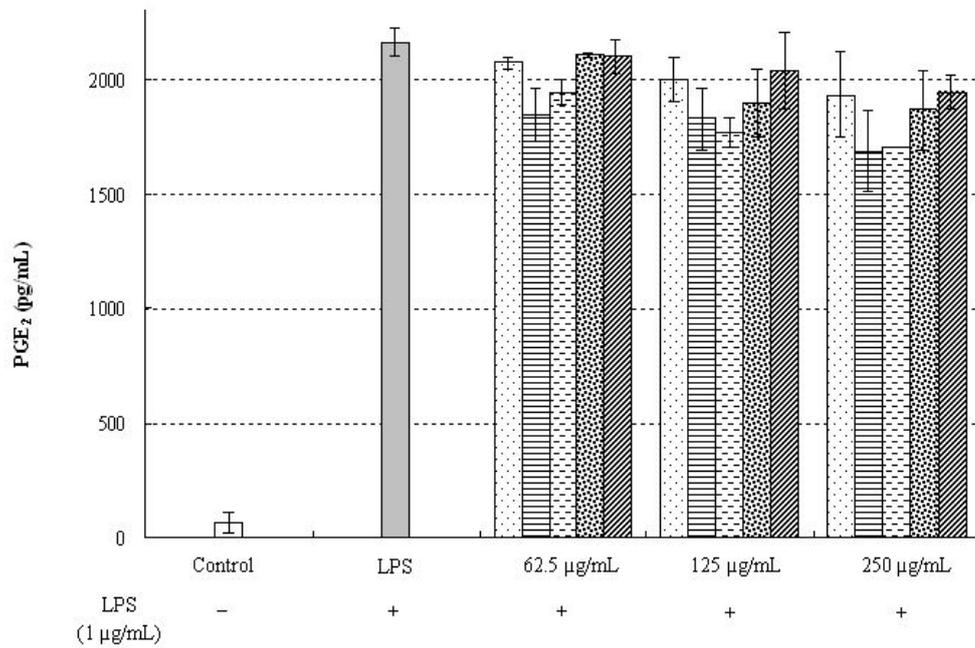


그림 8. 민들레 뿌리의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 PGE₂ 생성에 미치는 영향

(4) Macrophage의 cytokines 생성에 대한 민들레 추출물의 효과

민들레 잎과 뿌리의 70% MeOH 추출물과 각 용매별 분획물의 TNF- α 생성저해 효과는 그림 9와 그림 10에 나타내었다. 잎의 70% MeOH 추출물과 n-BuOH, 물 분획은 TNF- α 생성에 효과를 미치지 않은 반면 chloroform과 ethyl acetate 분획은 농도 의존적으로 TNF- α 생성을 크게 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 뿌리의 경우에는 chloroform 분획의 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서만 크게 감소되었지만 다른 농도에서는 저해효과가 전혀 나타나지 않았으므로 단지 세포 생존율에 미치는 영향으로 감소된 것으로 보인다. 또한 다른 분획들은 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 LPS로 유도된 TNF- α 생성에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다.

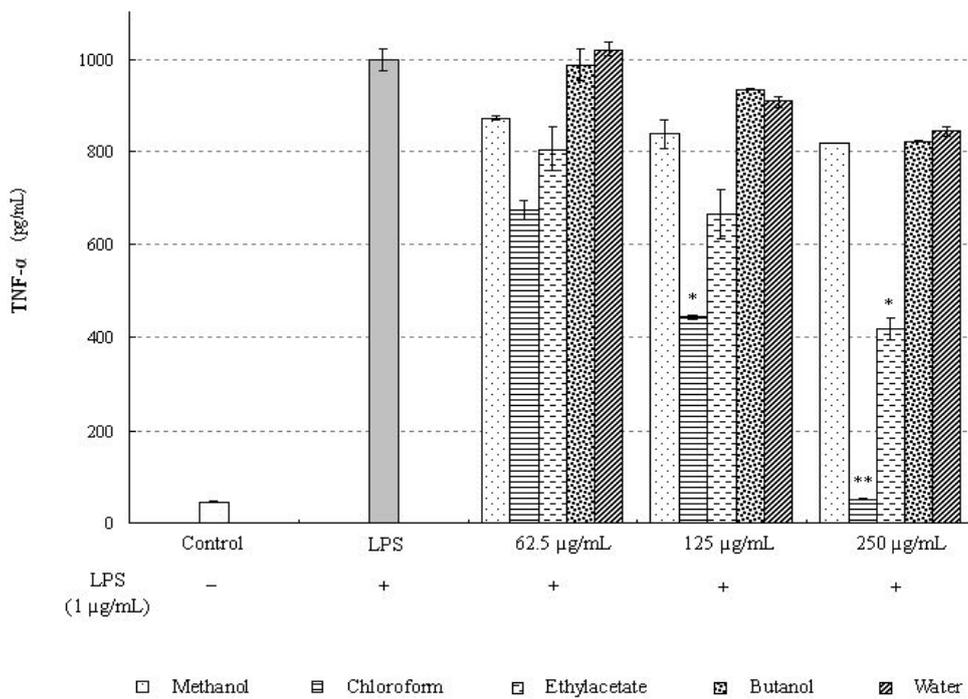


그림 9. 민들레 잎의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 TNF- α 생성에 미치는 영향

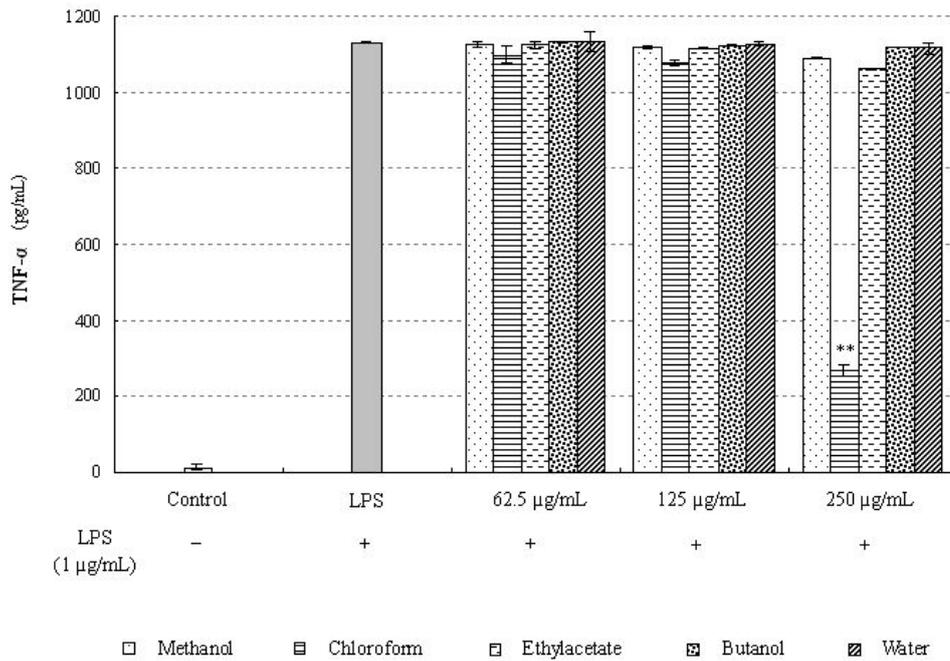


그림 10. 민들레 뿌리의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 TNF- α 생성에 미치는 영향

또한 민들레 잎의 LPS로 유도된 cytokine의 생성 억제효과를 보기 위하여 IL-1 β 와 IL-6에 대하여 확인해보았다(그림 11, 12). 실험 결과 LPS만 처리한 대조구의 IL-1 β 의 농도가 176.4 pg/mL으로 생성되었고, 모든 처리구가 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 70% MeOH, chloroform과 ethyl acetate 분획의 처리구가 농도 의존적으로 크게 감소된 것으로 나타났다. IL-6의 경우 70% MeOH, n-BuOH과 물 분획 처리구는 약간씩 감소한 경향을 보인 반면, chloroform과 ethyl acetate 분획 처리구는 농도 의존적으로 크게 감소하여 LPS로 유도된 IL-6 생성 억제에 매우 큰 효과가 있는 것으로 나타났다.

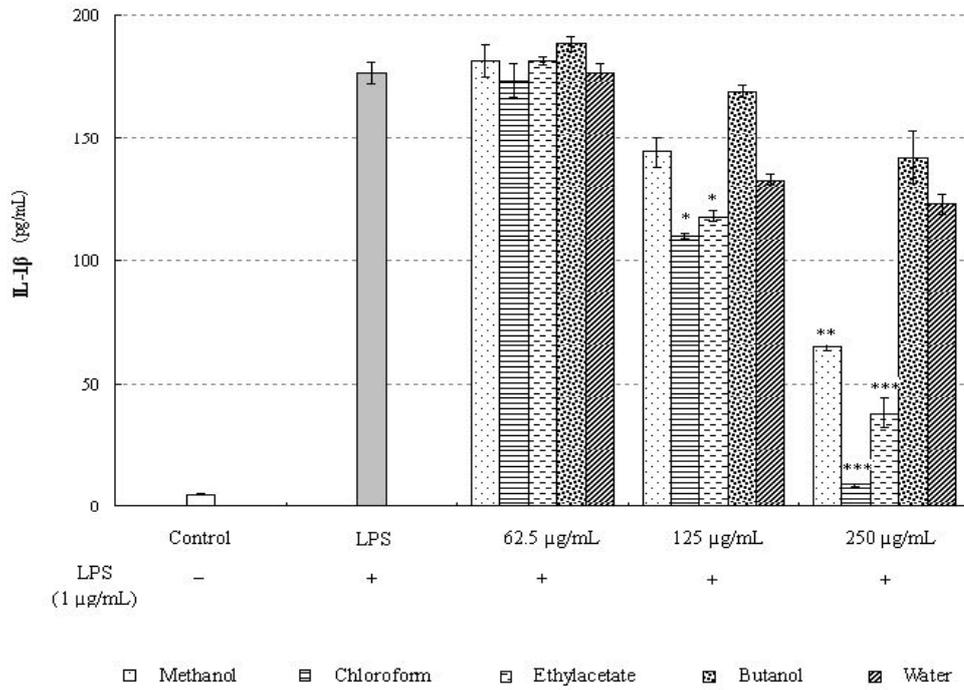


그림 11. 민들레 잎의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 IL-1 β 생성에 미치는 영향

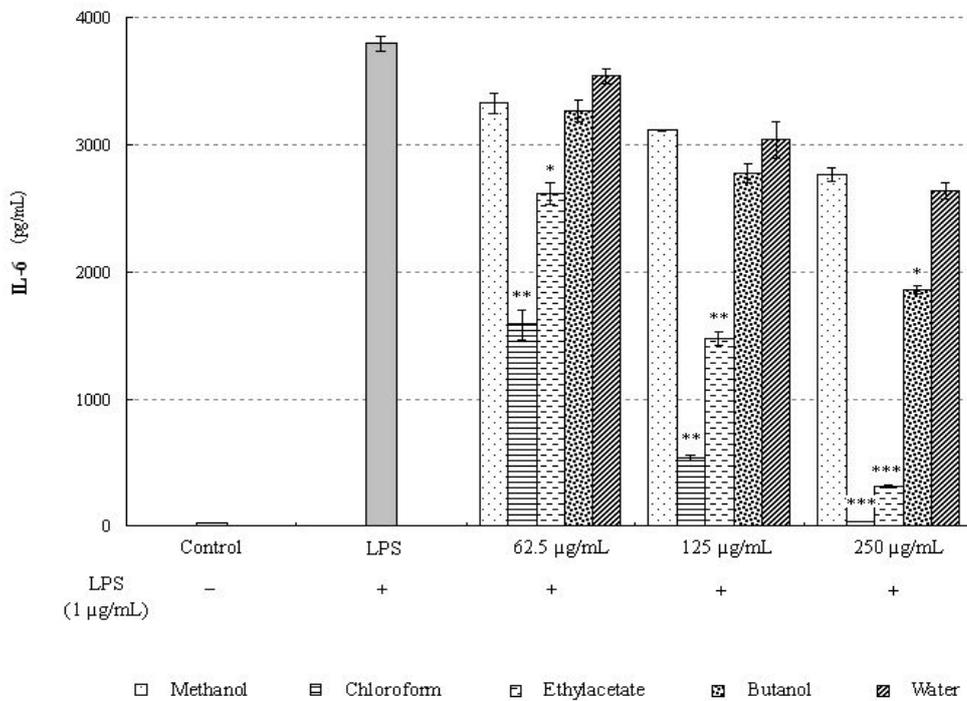


그림 12. 민들레 잎의 MeOH 추출물과 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 IL-6 생성에 미치는 영향

(5) Macrophage의 iNOS와 COX-2 생성에 대한 민들레 잎 추출물의 효과

본 연구를 통해 민들레 잎으로부터 분리된 chloroform, ethyl acetate 분획이 LPS로 자극된 macrophage가 유리하는 NO와 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 NO와 PGE₂의 조절 단백질 중 LPS에 의해 유도되는 가장 대표적인 단백질인 iNOS와 COX-2의 발현을 효과적으로 억제할 것으로 기대되는 민들레 잎의 chloroform 분획과 ethyl acetate 분획의 효과를 western blot을 통해 확인하였다. 그림 13에서 보는 바와 같이 chloroform의 처리로 인해 iNOS의 발현이 농도별로 크게 저해되었으며, COX-2의 발현도 chloroform의 처리로 인해 농도별로 크게 감소되었다. Ethyl acetate 분획에 의해 iNOS의 발현도 농도별로 감소된 것으로 나타났지만 COX-2의 발현은 크게 감소시키지 않았다. MeOH 추출물은 분획물에 비해 iNOS와 COX-2의 발현에 대해 크게 영향을 끼치지 않는 것으로 보였다. 또한 house keeping gene인 β -actin의 발현은 실험한 처리구들의 최고농도에서도 영향이 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 iNOS와 COX-2의 실험결과와 NO와 PGE₂의 실험결과를 비교해봤을 때 비슷한 경향으로 chloroform과 ethyl acetate 분획에 의해 저해되는 것을 알 수 있었다. 따라서 민들레 잎의 chloroform과 ethyl acetate 분획이 LPS로 유도되는 macrophage의 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하여 NO와 PGE₂의 생성을 저해하는 것으로 판단된다.

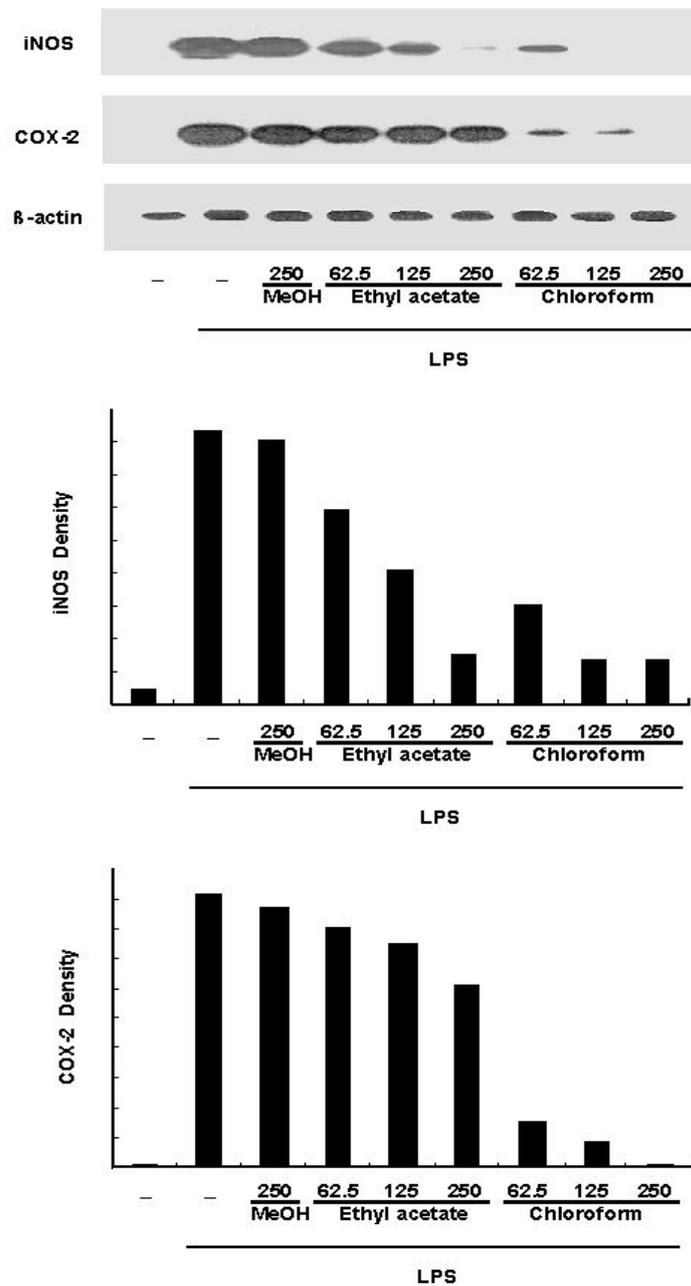


그림 13. 민들레 잎의 70% MeOH 추출물과 chloroform, ethylacetate 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 iNOS와 COX-2 생성에 미치는 영향

(6) Macrophage의 ERK1/2와 JNK1/2 MAPKs 생성에 대한 민들레 잎 추출물의 효과

Pro-inflammatory mediators인 NO, PGE₂와 cytokines인 TNF-α, IL-1β, IL-6 등과 NO와 PGE₂의 조절단백질은 외부 자극에 의해 MAPKs와 JAT-State system의 발현을 통하여 활성화되는 것으로 알려져 있다. 따라서 민들레 잎의 MeOH 추출물과 chloroform과 ethyl acetate의 분획이 MAPKs의 생성에 영향을 미치는지를 확인하기 위해 LPS로 유도된

phosphorylated ERK1/2와 JNK1/2 MAPK의 발현을 western blot을 통해 확인하였다(그림 14). 실험 결과, chloroform과 ethyl acetate 분획을 처리한 macrophage의 LPS로 유도된 phosphorylated ERK1/2와 JNK1/2의 발현이 농도의존적으로 크게 감소한 것으로 나타났다. MeOH 추출물은 phosphorylated ERK1/2의 발현에는 영향을 미치지 않았지만 phosphorylated JNK1/2의 발현은 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 모든 처리구의 non-phosphorylated ERK1/2와 JNK1/2의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 보아 처리한 분획의 ERK1/2와 JNK1/2의 phosphorylation 억제가 non-phosphorylated ERK1/2와 JNK1/2의 생성저해로 인한 것이 아님을 알 수 있었다. 따라서 LPS로 자극한 macrophage에서 민들레 잎의 chloroform과 ethyl acetate 분획의 처리는 MAPKs의 phosphorylation을 억제하여 염증을 매개하는 인자들의 생성을 저해하는 것으로 생각된다. 따라서 민들레 잎의 70% MeOH 추출물의 chloroform과 ethyl acetate의 분획이 염증 억제에 큰 효능이 있는 것으로 사료된다.

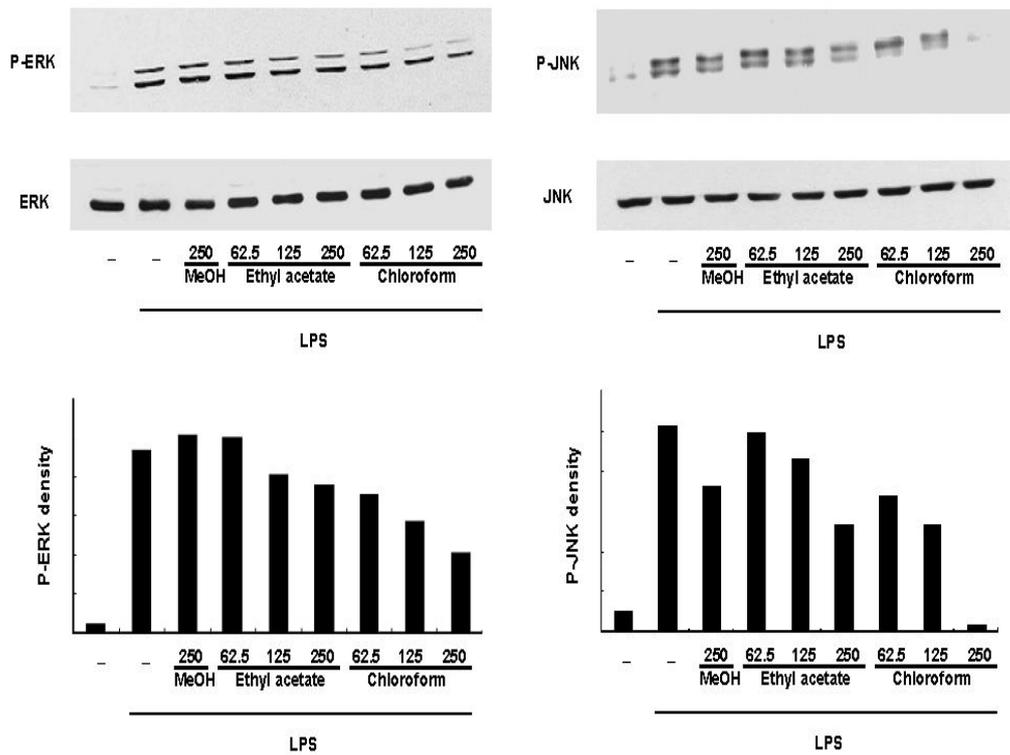


그림 14. 민들레 잎의 MeOH 추출물과 chloroform, ethyl acetate 용매 분획이 macrophage RAW 264.7 cell의 p-ERK1/2와 p-JNK1/2 MAPKs 생성에 미치는 영향

다. 민들레 항염증 활성물질의 규명

(1) Silica gel column chromatography에 의한 항염증 활성물질의 정제

민들레 잎의 70% MeOH 추출물의 chloroform과 ethyl acetate 분획을 silica gel이 충전된 open column으로 주입하고 chloroform과 MeOH의 비율을 비극성에서 극성 쪽으로 혼합하여 흘려주어 용출시켰다. 용출용액의 혼합비율은 각각 chloroform과 MeOH이 100:0, 75:25, 50:50, 25:75과 0:100이었다. 대부분(68.2±0.1%)이 chloroform 75%인 용액에서 용출되었고 극성이 커질수록 용출되어 나오는 수율이 감소하였다(표 7). 이렇게 용출되어 나온 분획물을 건조시켜 항염증 활성 실험에 사용하였다. Macrophage RAW 264.7 cell의 LPS로 유도된 NO의 생성량을 측정된 결과, 75% chloroform에서 용출되어 나온 분획물이 다른 비율의 혼합용액에서의 분획물 보다 농도 의존적으로 NO 생성이 현저히 감소된 것을 알 수 있었다(그림 15). 또한 각 혼합비율의 용액에서 용출되어 나온 분획물의 HPLC 분석 결과 그림 16과 같다. 75% chloroform 용액에서 용출된 분획물은 다른 비율의 혼합용액에서 용출된 분획물보다 C₁₈ column에서 retention time이 긴(RT: 60~80 min) 비극성 쪽에 물질이 더 많은 것을 알 수 있었다. 따라서 다른 분획물에서 측정되지 않는 RT 60~80 min 사이에 있는 피크부분에 활성물질이 많은 것으로 예측되었다.

표 7. Silica gel column chromatography에 의해 분리된 분획물의 수율

용출 용매	수율 (%)
100 % CHCl ₃	-
75% CHCl ₃ -MeOH	68.2 ± 0.1
50% CHCl ₃ -MeOH	17.2 ± 1.4
25% CHCl ₃ -MeOH	8.2 ± 0.4
100% MeOH	4.1 ± 0.7

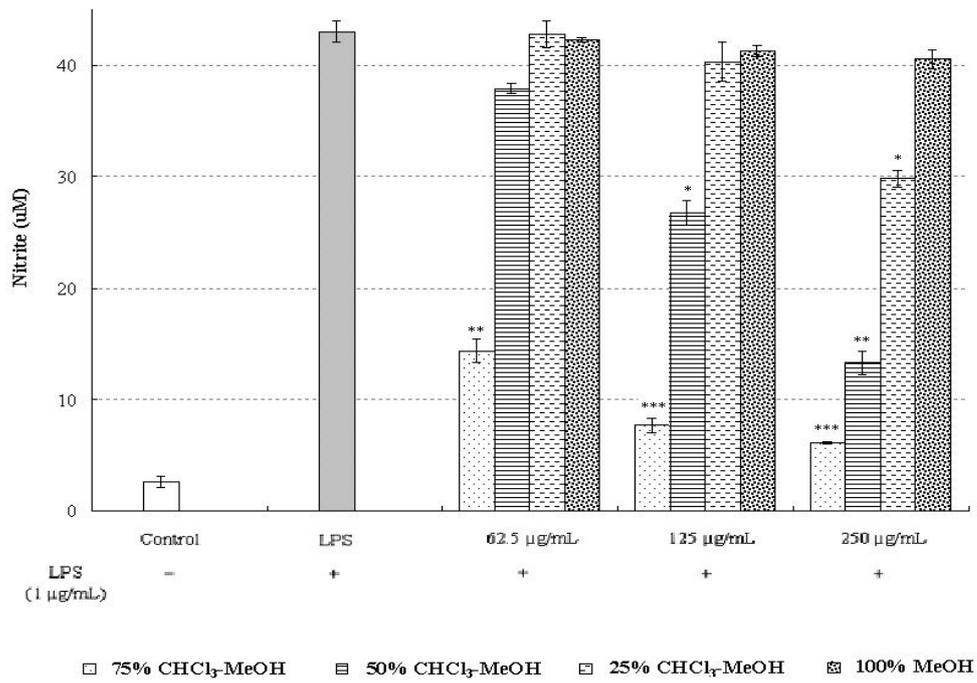


그림 15. Silica gel column chromatography에 의해 분리된 분획물의 macrophage RAW 264.7 cell에서의 NO 생성량

***P<0.001, **P<0.01 and *P<0.05 as compared to LPS group

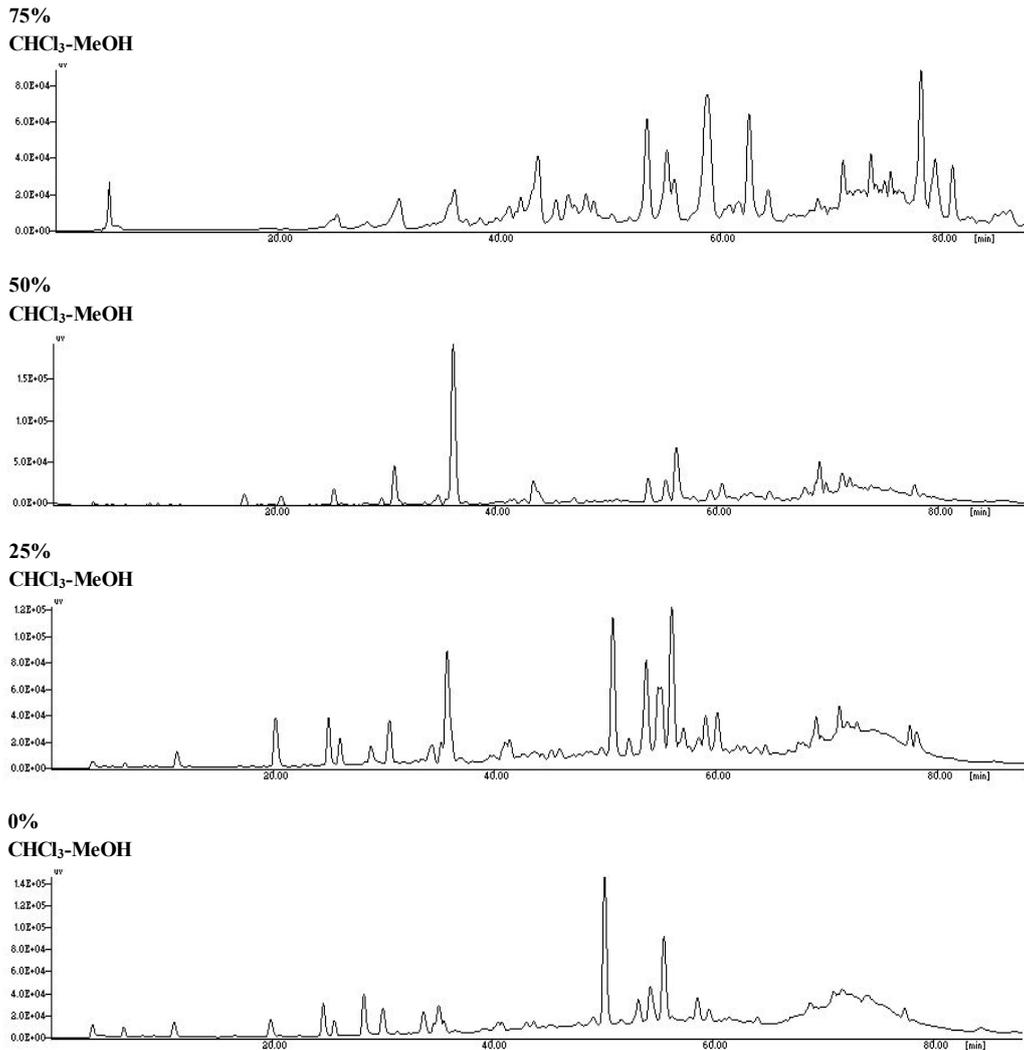


그림 16. Silica gel column chromatography에 의해 분리된 분획물의 HPLC 크로마토그램

(2) TLC 및 preparative HPLC에 의한 정제

Silica gel column에 의해 분리된 활성물질을 다시 정제를 하기 위해 Thin Layer Chromatography를 사용하였다. 정제할 활성물질을 silica gel preparative TLC glass plate (20×20 cm, F254)에 분주한 후 chloroform과 MeOH 혼합용액 (17:3)으로 전개하여 분리하였다. UV 254 nm에서 확인 결과 여러 물질들이 넓게 분포되어 있어서 254 nm 파장에서 진하게 보이는 곳을 중심으로 4구간으로 나누어 항염증 활성을 측정해보았다. 구간은 표 8과 같이 용매 전개 시작점을 중심으로 분리된 물질이 전개된 높이의 비율값인 R_f를 5곳을 정하여 4구간으로 나누었다. 활성측정결과 R_f 값이 0.03~0.22인 구간 I 과 0.22~0.45인 구간 II의 NO 생성량이 농도 의존적으로 크게 감소되었다(그림 17).

활성이 뛰어난 구간 I 과 II의 물질을 다시 silica gel column chromatography로 분리하였다. 두 구간의 물질을 합하여 silica gel open column으로 주입한 후 17:3의 chloroform과 MeOH의 혼합용액으로 분리하여 다시 8개의 fraction을 얻었다. 이 8개 fraction의 항염증 활성을 측정 한 결과(그림 18) 2번째의 fraction이 가장 효과가 뛰어난 것을 알 수 있었다. 이 물질의 HPLC 분석결과는 그림 19와 같이 나타났다. 이러한 결과로 보아 retention time이 77.308인 물질이 민들레 잎 분획물의 주요 활성물질인 것으로 예측되었다.

표 8. TLC에 의해 분리된 분획물의 R_f 값

	R _f
I	0.03 - 0.22
II	0.22 - 0.45
III	0.45 - 0.69
IV	0.69 - 0.92

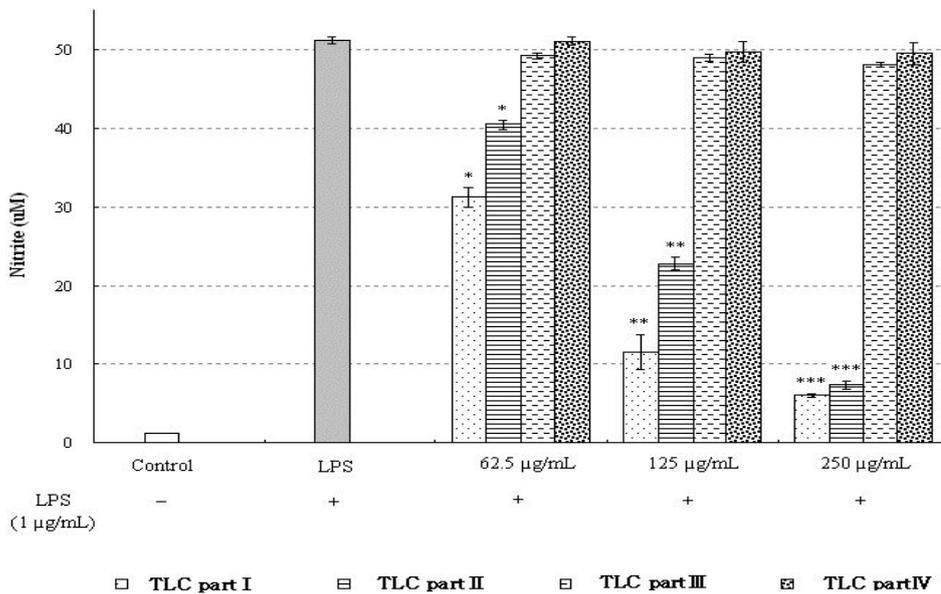


그림 17. Thin layer chromatography (TLC)로 분리된 물질의 macrophage RAW 264.7 cell에서의 NO 생성량

***P<0.001, **P<0.01 and *P<0.05 as compared to LPS group

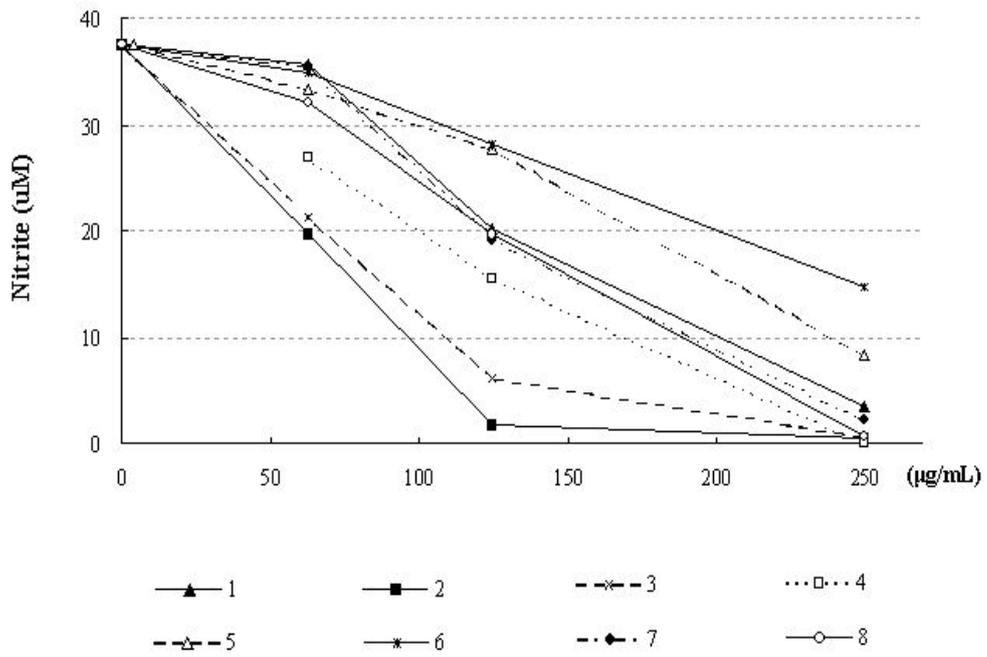


그림 18. 구간 I 과 II 물질의 silica gel column chromatography로 분리한 분획물의 macrophage RAW 264.7 cell에서의 NO 생성량

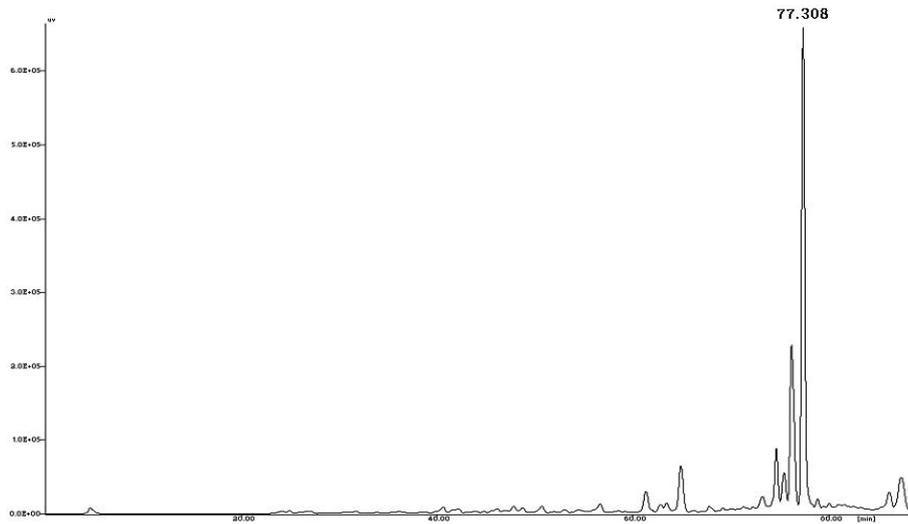


그림 19. TLC의 구간 I 과 II로부터 silica gel column chromatography에 의해 분리된 2번째 분획물의 HPLC 크로마토그램

(3) 정제물질의 구조동정

정제된 단일물질을 prep-LC로 받아내어 LC-MS(그림 20)와 ¹H-NMR 분석(그림 21)을 한 결과 분자량은 787이었으며, 6.72 ppm과 7.40 ppm에서 두 개의 doublet signal이 관측되고 3.45~3.53 ppm 영역에서 signal이 관측되는 것으로 볼 때 aromatic ring을 갖는 flavonoid의 일종인 것으로 판단된다.

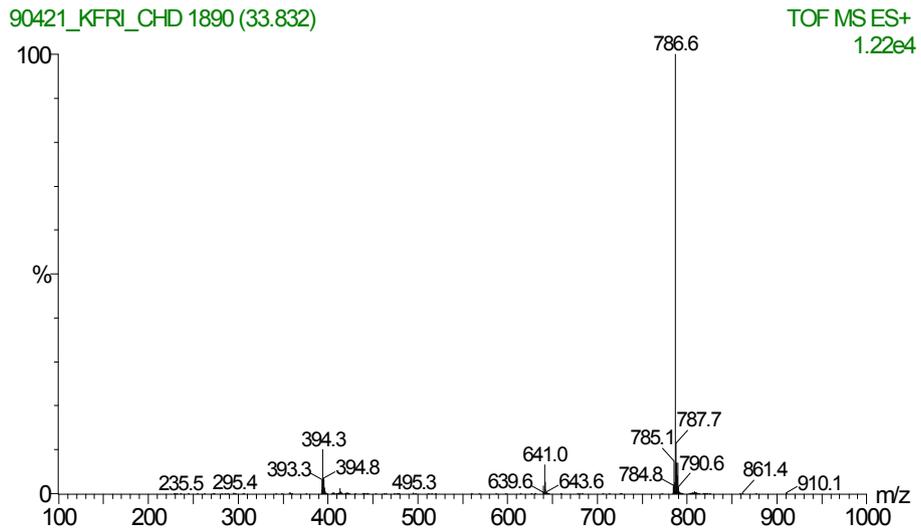


그림 20. 정제물질의 LC/MS TOF spectrum

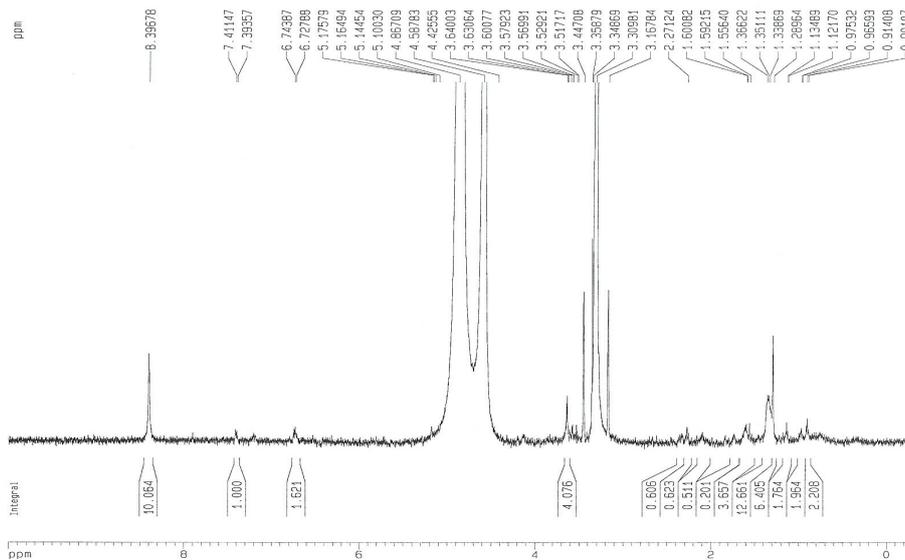


그림 21. 정제물질의 NMR spectrum

2. 민들레 항염증 활성물질의 소재화

가. 항염증 활성물질의 추출 및 농축

(1) 추출온도별 민들레 잎 열수 추출물의 특성

추출온도를 달리하여 제조한 민들레 잎 열수 추출물의 수율과 총 flavonoid 함량을 측정 한 결과는 표 9와 같다. 수율은 60°C의 추출온도에서 39.2±1.3%로 가장 높은 값을 나타내었지만 flavonoid 함량은 60°C 추출물이 17.4±3.2 µg/mg으로 가장 낮았고, 70, 80, 90°C 추출물은 각각 25.7±4.8, 29.9±5.1, 44.1±4.5 µg/mg으로 온도가 증가함에 따라 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다. 또한 민들레 잎 열수 추출물의 항염증 활성을 측정하기 위해 NO 생성에 대한 저해율을 측정한 결과는 그림 22와 같다. 농도 의존적으로 항염증 활성이 증가하였지만 80°C와 90°C 추출물은 농도 250 ppm에서는 NO 저해능이 전혀 나타나지 않았고, 500 ppm에서는 각각 3.4±1.5%, 3.1±0.37%로 나타났다. 또한 1000 ppm에서도 80°C 추출물은 9.3±1.1%, 90°C 추출물은 6.2±1.1%로 매우 낮은 활성을 나타내었다. 반면 60°C에서 추출한 추출물은 250, 500, 1000 ppm에서 각각 7.5±2.9, 19.5±2.2와 29.8±0.7%로 가장 높은 항염증 활성을 나타내어 민들레 잎에 함유된 항염증 활성물질이 열에 상당히 민감한 물질임을 알 수 있었다.

표 9. 여러 온도에서의 민들레 잎의 열수추출물의 수율과 플라보노이드 함량

추출온도	수율 (%)	플라보노이드 (µg/mg)
60°C	39.2±1.3 ^{a1)}	17.4±3.2 ^b
70°C	36.8±0.2 ^b	25.7±4.8 ^{ab}
80°C	34.1±2.2 ^b	29.9±5.1 ^{ab}
90°C	35.5±1.3 ^b	44.1±4.5 ^a

Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05).

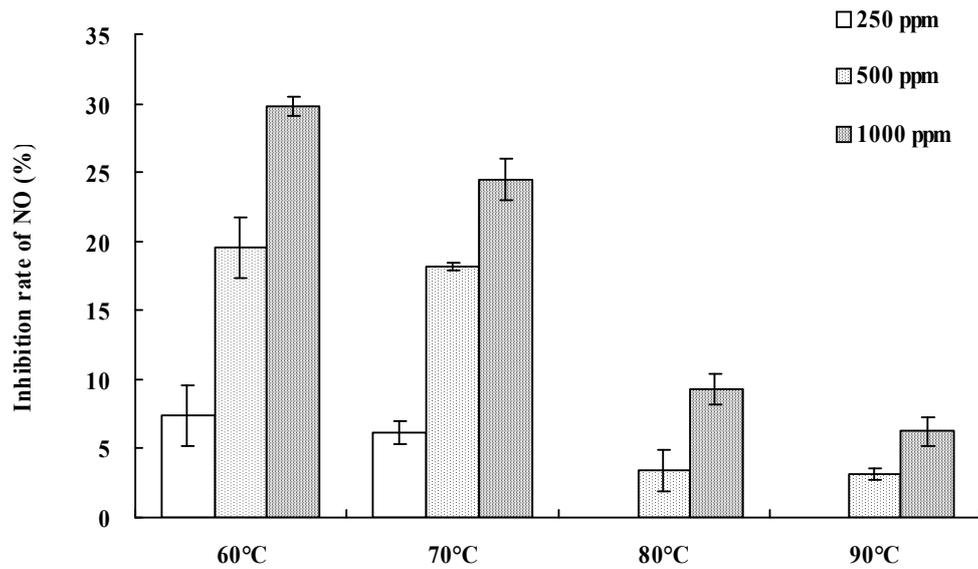


그림 22. 여러 온도에서의 민들레 잎 열수추출물의 LPS로 유도된 NO의 생성 저해율

(2) 효소 처리에 의한 민들레 잎 열수 추출물의 특성 변화

60°C 추출물이 flavonoid 함량은 낮지만 항염증 활성이 가장 우수하게 나타난 결과를 바탕으로 민들레 잎의 수용성 유용성분을 더 많이 추출하기 위해 세포벽 분해 효소를 민들레 잎 분말에 처리하여 60°C에서 추출한 후 효소처리하지 않은 60°C 추출물과 수율, flavonoid 함량 및 항염증 활성을 비교하였다(표 10). 효소처리하지 않은 대조구와 효소 처리한 추출물의 flavonoid 함량은 각각 $17.4 \pm 3.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 와 $16.4 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mg}$, NO 생성에 대한 저해활성은 각각 $19.5 \pm 2.2\%$ 와 $19.0 \pm 1.6\%$ 로 비슷한 것으로 나타났지만 수율은 각각 $39.2 \pm 1.3\%$ 와 $60.1 \pm 0.1\%$ 로 약 1.5배로 효소 처리에 의해 크게 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 전체적으로 민들레 잎 분말에서 추출된 flavonoid와 항염증 활성물질도 1.5배 증가된 것이므로 세포벽 분해효소 처리가 민들레 잎의 수용성 항염증 활성물질의 추출증가에 영향을 미침을 알 수 있었다.

표 10. 세포벽 분해 효소 처리한 민들레 잎의 열수추출물의 수율, 플라보노이드 함량과 LPS로 유도된 NO의 생성 저해율

	수율 (%)	플라보노이드 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	NO 생성 저해율 (500 ppm) (%)
대조군	39.2 ± 1.3	17.4 ± 3.2	19.5 ± 2.2
효소 처리군	60.1 ± 0.2	16.4 ± 2.0	19.0 ± 1.6

(3) 항염증 활성물질의 농축

효소 처리에 의해 제조한 민들레 잎 추출물로부터 염증 억제 효과가 뛰어난 활성물질을 농축하기 위해 column chromatography를 검토하였다. Sepabeads SP-850와 Amberlite XAD-2를 컬럼에 충전한 후 제조한 민들레 잎 추출물을 주입하여 투과물질과 흡착물질로 구분하고 이들의 수율, flavonoid 함량 및 항염증 활성을 조사하였다. LPS로 유도된 RAW cell의 NO의 생성에 대한 저해능을 조사한 결과(표 11), Amberlite XAD-2와 Sepabeads SP-850 투과물질은 500 ppm의 농도에서 저해활성을 나타내지 않았지만, 흡착물질은 각각 68.4±0.5%, 63.1±0.5%의 매우 높은 저해활성을 나타내어 Amberlite XAD-2와 Sepabeads SP-850 처리가 민들레의 항염증 활성물질을 분리하는데 매우 효과적임을 알 수 있었다. 그러나 Amberlite XAD-2 흡착물질의 수율은 3.5±0.6%인 반면, SP-850 흡착물질의 수율은 7.2±0.4%로 약 2배 이상의 차이를 나타내어 민들레 잎의 항염증 활성물질을 농축하는데 Sepabeads SP-850이 훨씬 효과적임을 알 수 있었다.

한편 Sepabeads SP-850 투과 및 흡착물질을 이용하여 LPS로 유도된 RAW cell의 TNF-α 생성과 PGE₂ 생성에 대한 저해능을 측정된 결과는 그림 23 및 그림 24와 같다. 효소처리하여 제조한 대조구와 Sepabeads SP-850 투과물질은 TNF-α 생성 저해활성을 거의 나타내지 않은 반면 흡착물질은 농도 1000 ppm과 2000 ppm에서 각각 23.8±3.5%와 97.4±0.2%의 높은 활성을 나타내었다 (그림 23). 또한 PGE₂의 생성에 대한 저해활성을 측정된 결과, 대조구는 500 ppm에서 12.4±0.7%, 1000 ppm에서 24.2±0.6%, 2000 ppm에서 47.1±0.8%, Sepabeads SP-850 투과물질은 각각 13.4±0.7%, 18.1±0.6%, 31.7±0.1%의 낮은 저해활성을 나타낸 반면, 흡착물질은 각각 75.2±0.2%, 89.6±0.5%, 90.1±0.4%의 높은 저해활성을 나타내었다 (그림 24). 이상의 결과에서 보는 바와 같이 효소 처리를 통해 획득한 민들레 잎 추출물을 Sepabeads SP-850 resin에서의 흡착, 탈착 과정을 통해 항염증 활성이 크게 증진된 회분을 회수할 수 있었다.

표 11. Resin을 충전한 컬럼에 의해 분리된 활성물질의 수율 및 플라보노이드 함량

Resin		수율 (%)	플라보노이드 (μg/mg)	NO 생성 저해율 (500 ppm) (%)
XAD-2	투과	85.3±1.1	NT ¹⁾	- ²⁾
	흡착	3.5±0.6	NT ¹⁾	68.4±0.5
SP-850	투과	66.3±2.7	12.2±1.8	- ²⁾
	흡착	7.2±0.4	58.9±2.0	63.1±0.5

¹⁾ not tested

²⁾ negligible

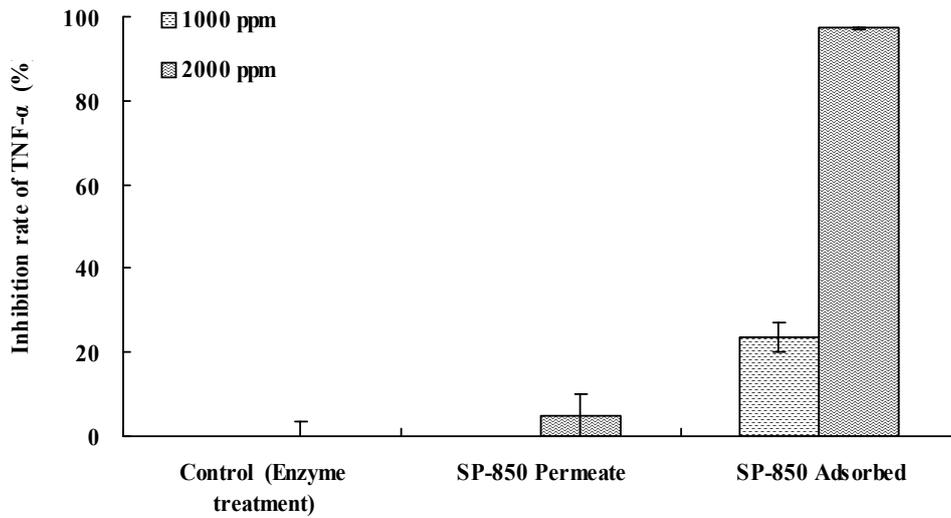


그림 23. Sepabeads SP-850 resin에 의해 분리된 활성물질의 LPS로 유도된 TNF- α 생성 저해율

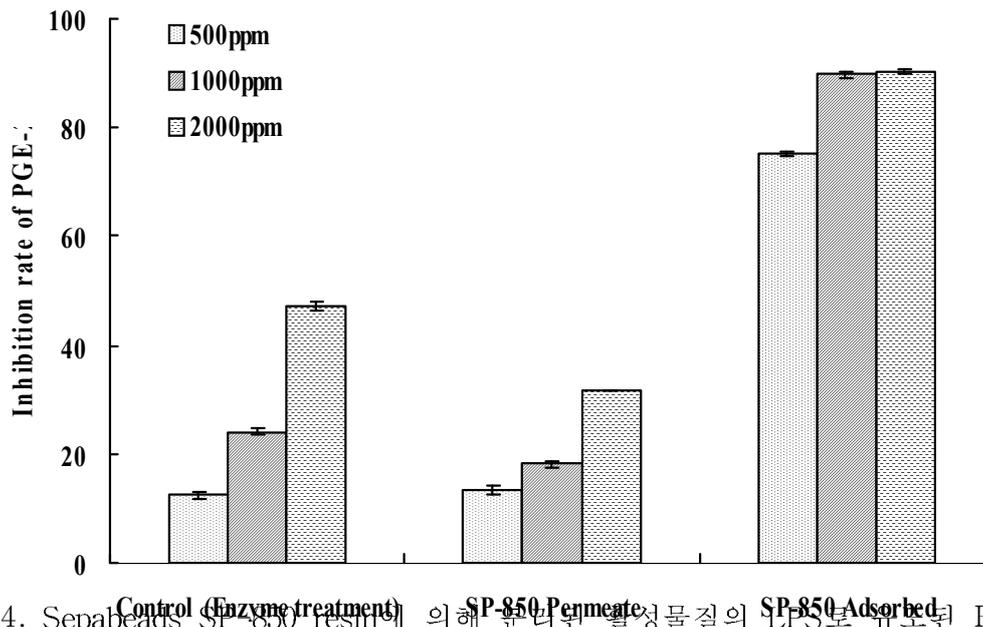


그림 24. Sepabeads SP-850 resin에 의해 분리된 활성물질의 LPS로 유도된 PGE₂ 생성 저해율

나. 항염증 소재의 피부염 유발 동물모델에서의 항염증 효과

(1) TPA 염증 유발 동물모델에 대한 항염증 소재의 영향

TPA로 염증 유발 후 음성 대조군의 경우 45.7 μ m의 두께 증가량을, 양성 대조군인

INDO군은 15.2 μm 의 증가량을 나타내었다. DA-100 실험군의 경우 귀 두께 증가량이 23.9 μm 으로 DA-50, DA-10, 및 DA-1 실험군에 비해 농도 의존적으로 두께 증가량이 감소하는 것으로 나타나 항염증 소재가 TPA로 유발한 마우스 염증모델에서 염증억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(그림 25).

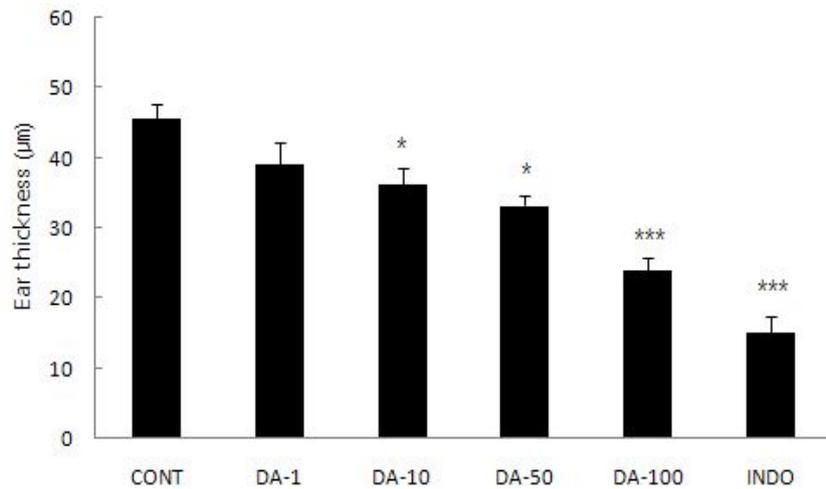


그림 25. 민들레 항염증 소재의 TPA 유도 귀 부종에 대한 항염증 효과
 *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ as compared to CONT group

(2) Croton oil 염증 유발에 대한 항염증 소재의 영향

Croton oil로 염증 유발 후 음성 대조군의 경우 43.1 μm 의 두께 증가량을, 양성 대조군인 INDO군은 25.0 μm 의 증가량을 나타내었다. DA-100 실험군의 경우 귀 두께 증가량이 27.9 μm 으로 DA-50, DA-10, 및 DA-1 실험군에 비해 농도 의존적으로 두께 증가량이 감소하는 것으로 나타날 뿐만 아니라 INDO군과 유사한 값을 나타내어 항염증 소재가 croton oil로 유발한 마우스 염증모델에서 염증억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(그림 26).

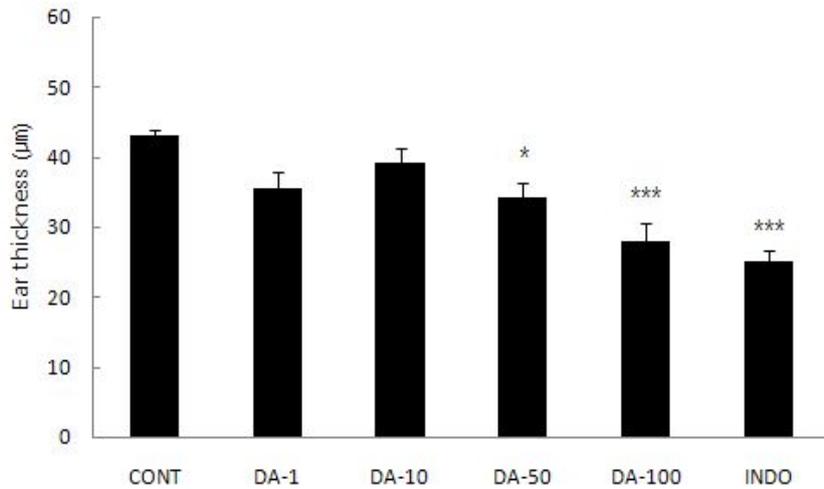


그림 26. 민들레 항염증 소재의 croton oil 유도 귀 부종에 대한 항염증 효과
 ***P<0.001 and *P<0.05 as compared to CONT group

다. 항염증 소재의 관절염 유발 동물모델에서의 항염증 효과

민들레의 항염증 소재가 관절염 유발 동물에게도 효과를 나타내는지 확인하기 위해 관절염을 유발시킨 쥐에게 9일 동안 1일 1회 경구투여로 항염증 소재를 투여한 후 족 부종의 부피, squeaking 점수, 체중 분배 비율 등을 측정하였다. 부종 부피를 측정한 결과(그림 27), 실험 첫째 날의 경우 부종의 부피는 DA-100, DA-200, 그리고 PRE의 실험군 순으로 나타났고, 7일과 9일에는 항염증 소재 처리군과 PRE 처리군에서 음성 대조군과 비교하여 확연하게 부종의 부피가 감소하였다. Squeaking 점수에서는 정상군의 경우 1일부터 실험종료일인 9일까지 총 10점을 획득하였지만 DA-100과 DA-200 실험군의 경우 실험 5일째부터는 조금씩 감소하였으며, PRE 실험군의 경우 지속적으로 감소하였다. DA-100, DA-200 실험군과 PRE 실험군은 대조군에 비해 squeaking 점수가 농도 의존적으로 감소하였다 (그림 28). 체중분배비율의 경우에도 항염증 소재의 처리에 의해 관절염이 유도된 쥐에게 효과가 있는 것으로 나타났다. 체중분배비율은 정상쥐의 경우 대부분 50%이지만 관절염이 유발된 대조군의 경우에는 대부분 20% 내외로 나타났다. 반면 관절염을 유도한 항염증 소재 실험군과 PRE 실험군의 경우 관절염이 유도된 초기의 경우에는 체중분배비율이 15%를 나타냈지만 실험시작 2일째부터 변화가 보였고 5일째부터는 크게 변화를 나타내었다(그림 29).

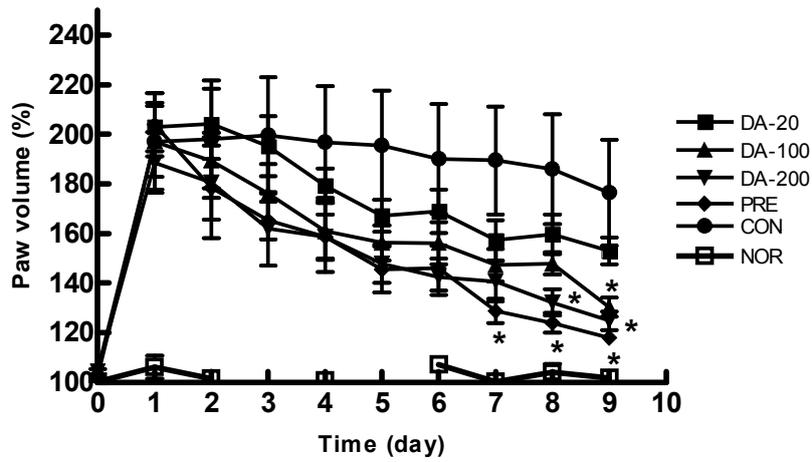


그림 27. Carrageenan으로 유도된 관절염 쥐의 무릎 부종의 부피 변화
*P<0.05 as compared to CON group

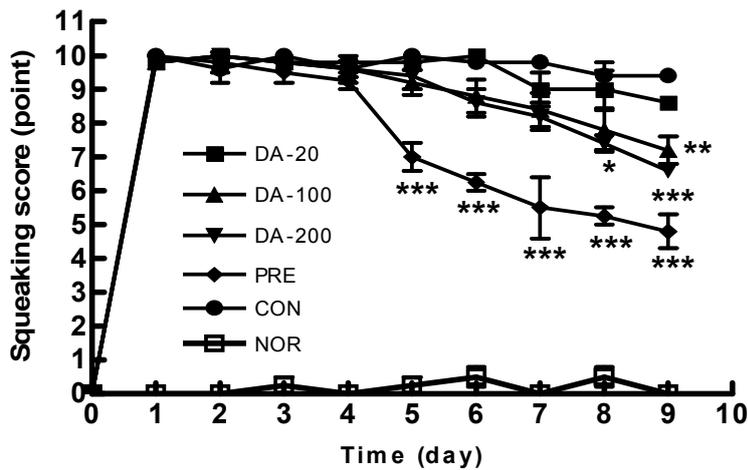


그림 28 . Carrageenan으로 유도된 관절염 쥐의 squeaking 점수
***P<0.001, **P < 0.01and *P<0.05 as compared to CON group

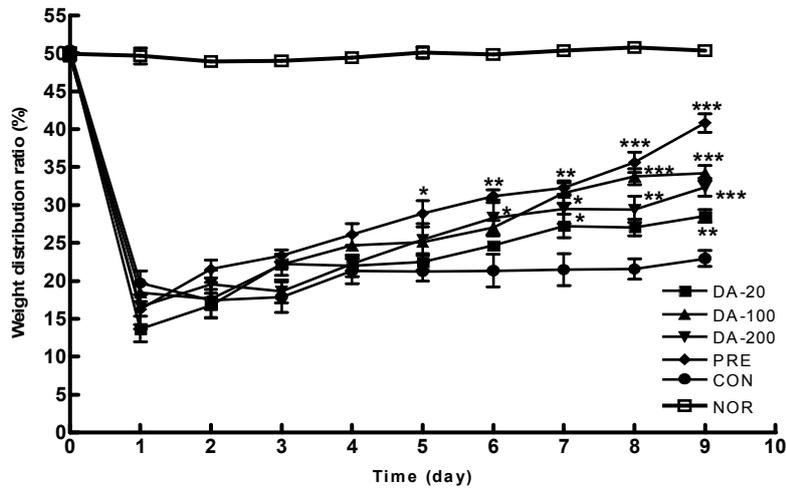


그림 29. Carrageenan으로 유도된 관절염 쥐의 체중분배비율
 ***P<0.001, **P < 0.01and *P<0.05 as compared to CON group

라. 항염증 소재의 특성

(1) 항염증 소재의 온도 및 pH 등 가공조건별 안정성

민들레 항염증 소재의 열과 pH에서의 안정성을 확인하기 위하여 항염증 소재를 각각 30~90℃의 온도와 pH 3~11에서 처리한 후 LPS로 유도된 macrophage의 NO 생성 저해율을 측정하였다. 측정 결과 온도가 증가하여도 항염증 소재의 활성에 영향을 미치지 않았지만(그림 30), pH가 9 이상으로 높아지면서 활성이 감소하였다(그림 31). 온도를 전혀 가하지 않은 항염증 소재인 대조구는 농도 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL로 처리할 때 NO 생성 저해율이 각각 49.0±2.3, 65.9±2.7, 70.8±1.9%로 측정되었지만, pH 9에서 처리할 경우 각각 20.1±1.1, 34.8±2.2, 55.0±2.2%로 대조구에 비해서 크게 감소하였다. 또한 pH 11에서 처리한 시험물질도 각 농도에서 10.2±0.8, 18.0±5.0, 44.9±3.4%의 NO 생성 저해율을 나타내어 pH 9 이상에서 pH가 증가할수록 항염증 소재의 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다.

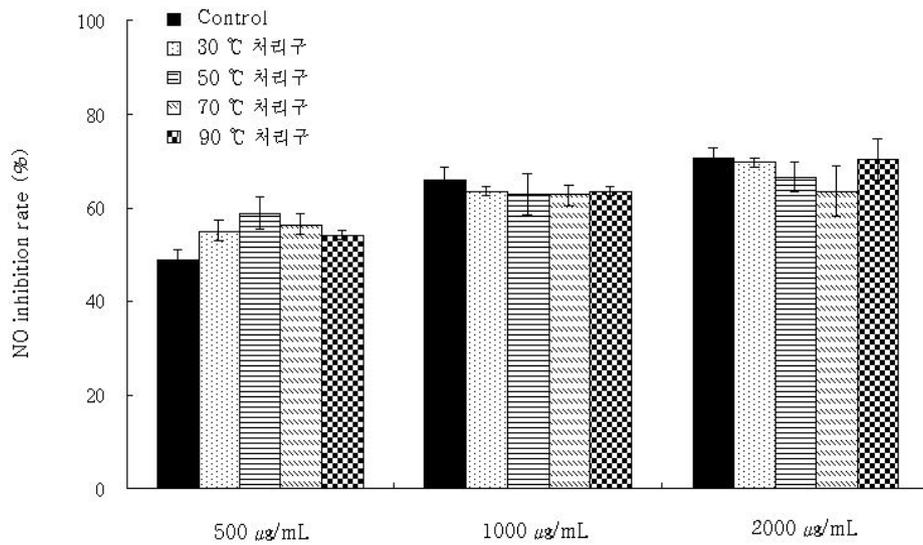


그림 30. 민들레 잎 항염증 소재의 온도 안정성

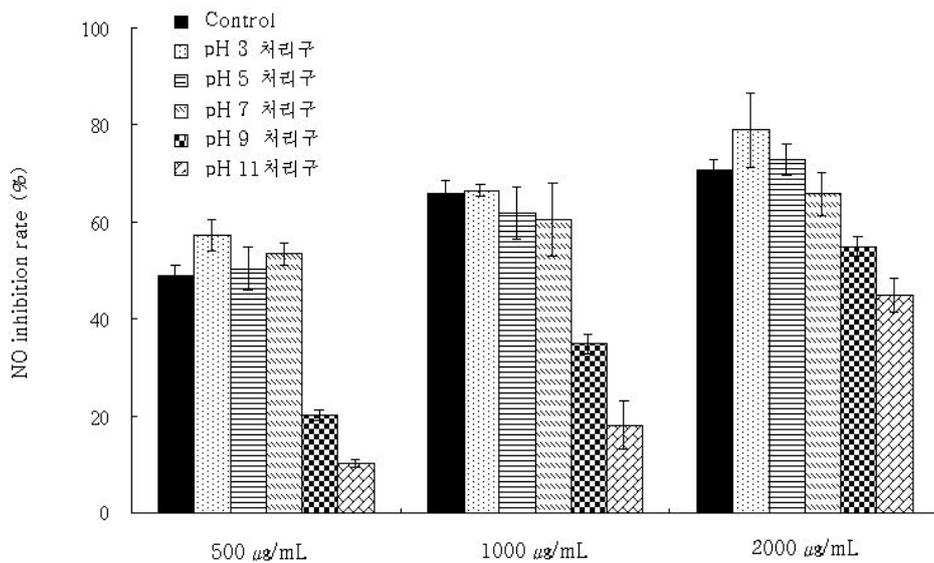


그림 31. 민들레 잎 항염증 소재의 pH 안정성

(2) 여드름균에 대한 항균성

여드름균인 *Propionibacterium acnes*와 *Streptococcus epidermidis*에 대한 민들레 항염증 소재의 항균성을 paper disc법으로 측정하였다. 항염증 소재의 농도를 50 mg/mL과 100 mg/mL으로 처리하여 3일 배양 후 확인한 결과 양쪽 균에서 고농도 처리군에서도 clear zone 이 생성되지 않았다(표 12). 따라서 민들레 잎의 항염증 소재는 여드름균에 대해서 항균 효과가 없는 것으로 나타났다.

표 12. 여드름 균에 대한 민들레 잎 항염증 소재의 paper disc법에 의한 항균력

항염증 소재	Clear zone (mm)	
	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Streptococcus epidermidis</i>
50 mg/mL	-	-
100 mg/mL	-	-

(3) 항산화성

민들레 항염증 소재의 DPPH 자유 라디칼에 대한 환원력을 측정하였고 이때 BHA를 대조물질로 사용하였다. 항염증 소재는 250, 500, 1000 µg/mL, BHA는 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도에서 측정하였을 때 항염증 소재는 각 농도에서 24.2±4.4, 47.1±0.8, 70.5± 0.3%의 소거능을, BHA는 25.2±1.1, 44.2±0.8, 75.0±0.8%의 소거능을 나타내었다(그림 32).

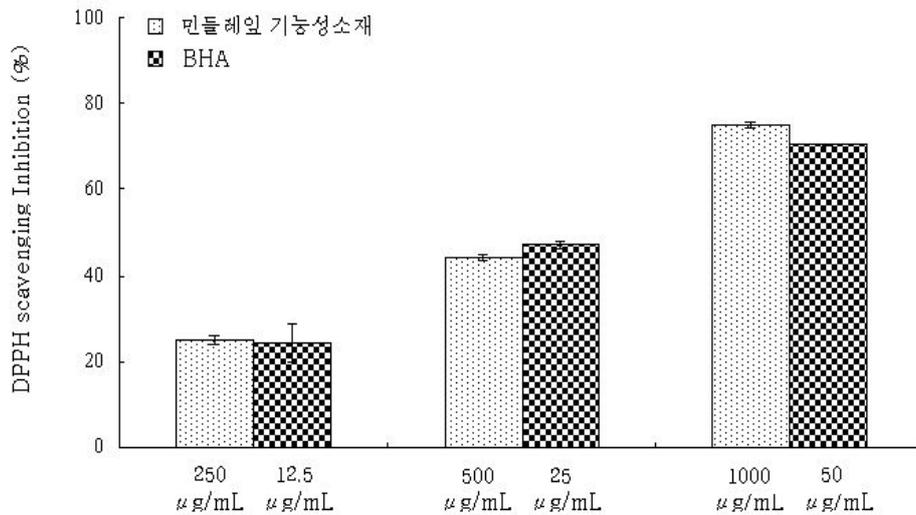


그림 32. 민들레 항염증 소재와 BHA의 항산화능

마. 항염증 소재의 독성시험

(1) 단회 경구투여

민들레 항염증 소재의 고농도 섭취시 독성여부를 확인하기 위하여 랫트에 500, 1000, 2000 mg/kg의 고농도의 항염증 소재를 단회 경구투여하였다. 시험 전 기간 동안 사망개체는 발생되지 않았으며, 시험물질의 투여와 관련된 임상증상도 관찰되지 않았다 (표 13). 또한 대조

군과 항염증 소재 투여군 간의 체중 차이는 없었으며 (그림 33), 부검결과에 있어서도, 항염증 소재 투여와 관련된 어떠한 육안 병변도 관찰되지 않았다.

표 13. 민들레 잎의 항염증 소재의 랫트에 대한 단회 경구투여 시 사망률 및 임상증상

투여농도 (mg/kg/day)	사망률 (dead/total)	임상증상
0	0/6	-
500	0/6	-
2000	0/6	-
5000	0/6	-

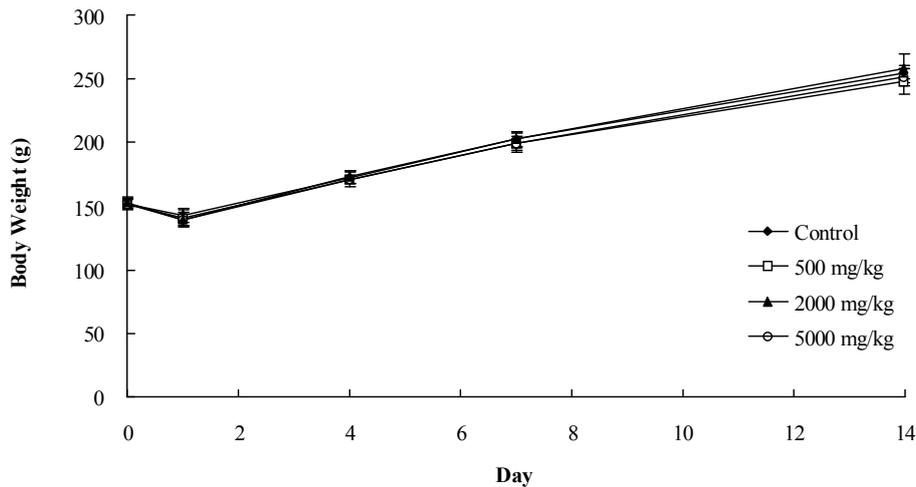


그림 33. 민들레 잎의 항염증 소재의 랫트에 대한 단회 경구투여시 체중변화

(2) 4주 경구투여

민들레 항염증 소재의 장기복용시 안정성 평가를 위해 4주 동안 여러 농도의 항염증 소재를 1일 1회 경구투여 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하고 혈액학적 검사를 실시하였다. 시험 전 기간 동안 대조군을 포함한 모든 투여군에서 사망동물을 관찰되지 않았으며, 특정한 행동변화 및 이상증상이 관찰되지 않았다(표 14). 체중의 변화에 있어서도 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았으며(그림 34) 사료 섭취량은 대조군과 약간의 차이가 있었지만 개체간의 차이로 인한 오차가 크므로 항염증 소재 투여로 인한 결과는 아닌 것으로 판단된다(그림 35).

표 14. 민들레 항염증 소재의 랫트에 대한 4주 반복 경구투여시 사망률 및 임상증상

투여농도 (mg/kg/day)	사망률 (dead/total)	임상증상
0	0/6	-
50	0/6	-
500	0/6	-

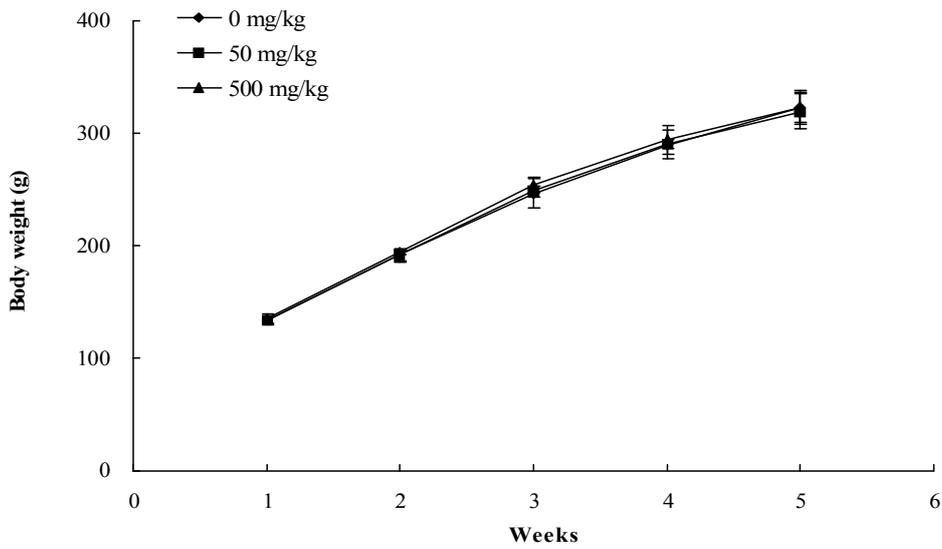


그림 34. 민들레 항염증 소재의 랫트에 대한 4주 반복 경구투여시 체중변화

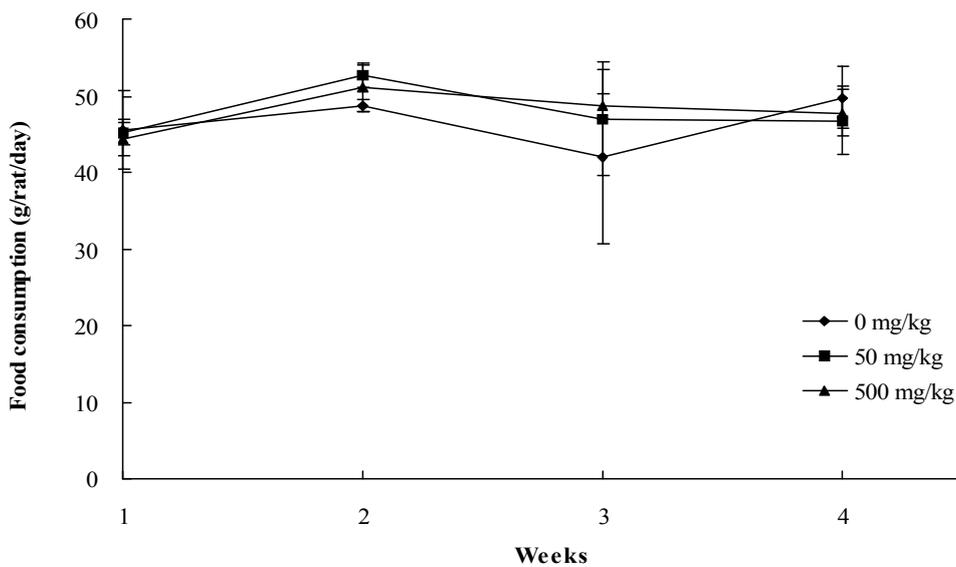


그림 35. 민들레 항염증 소재의 랫트에 대한 4주 반복 경구투여시 사료 섭취량 변화

혈액학적 검사 결과 고용량 투여군에서 백혈구가 약간 증가하였지만 유의적 차이는 나타나지 않았으며, 적혈구는 고용량 투여군에서 약간 감소하였지만 역시 유의적 차이는 나타나지 않았다. 하지만 혈소판 수는 농도 의존적으로 유의적 차이가 있게 증가하는 것으로 나타났다. 그 외의 다른 지표에서는 시험물질의 투여와 관련된 유의적인 변화가 관찰되지 않았다 (표 15). 혈액생화학적 소견에서 각 지표들은 대조군과 비교해 보았을 때 ALT, AST, ALP는 약간의 증가가 있었지만 용량의존적인 현상으로 나타나지 않은 것으로 보아 시험물질 투여로 인한 결과는 아닌 것으로 판단되고, 그 외의 다른 지표들에서도 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (표 16).

표 15. 민들레 항염증 소재의 랫트에 대한 4주 반복 경구투여시 혈액학 검사

Item	Dose (mg/kg)		
	0	50	500
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8.2 \pm 1.6	8.3 \pm 1.6	9.2 \pm 3.0
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.2 \pm 0.2	7.1 \pm 0.1	7.1 \pm 0.6
HGB (g/dL)	14.2 \pm 0.2	14.3 \pm 0.2	14.3 \pm 0.8
HCT (%)	42.8 \pm 0.7	42.4 \pm 0.7	42.9 \pm 2.6
MCV (fL)	60.1 \pm 1.7	59.2 \pm 0.5	61.0 \pm 2.7
MCH (pg)	19.9 \pm 0.5	20.3 \pm 0.1	20.4 \pm 0.9
MCHC (g/dL)	33.1 \pm 0.4	33.6 \pm 0.4	33.4 \pm 0.3
PLT ($10^3/\text{uL}$)	948.7 \pm 63.7	1192.0 \pm 100.4	1229.5 \pm 55.9
PT (sec)	14.6 \pm 0.5	14.6 \pm 0.5	15.6 \pm 0.4
APTT (sec)	24.6 \pm 4.6	21.3 \pm 1.2	21.7 \pm 1.8

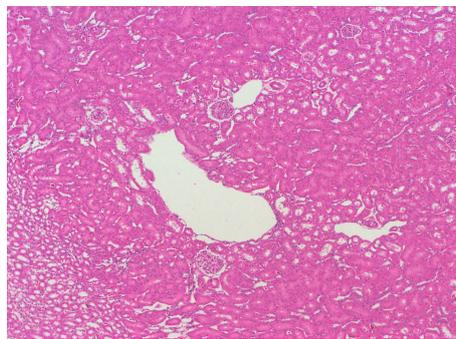
표 16. 민들레 함염증 소재의 랫트에 대한 4주 반복 경구투여시 혈액생화학 검사

	Dose (mg/kg)		
	0	50	500
ALT (U/L)	51.3±3.5	54.8±4.8	48.5±4.1
AST (U/L)	90.0±3.0	98.3±4.8	95.0±3.7
ALP (U/L)	480.0±38.1	491.3±22.9	490.3±26.5
T-protein (g/dL)	6.2±0.1	6.1±0.1	6.3±0.1
BUN (mg/dL)	16.8±0.9	18.4±2.1	18.0±1.4
Creatinine (mg/dL)	0.5±0.1	0.6±0.1	0.5±0.0
T-BIL (mg/dL)	<0.1	<0.1	<0.1
Cholesterol (mg/dL)	66.7±3.5	75.3±7.9	69.0±2.2
Glucose (mg/dL)	136.7±4.0	140.0±2.5	144.5±4.2
Na (mmol/L)	143.3±0.6	143.5±0.6	142.8±1.0
K (mmol/L)	5.2±0.1	5.3±0.2	5.6±0.3
Cl (mmol/L)	104.3±1.2	104.0±0.0	103.5±0.6

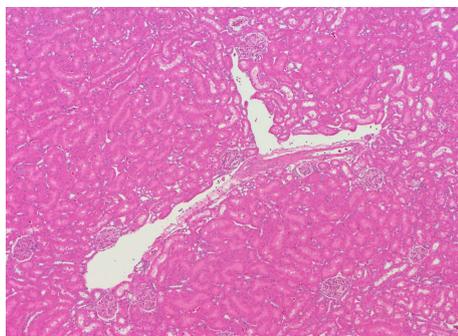
절대장기중량 측정 결과 신장 좌측과 우측 모두 농도 의존적으로 증가하는 것을 나타냈고, 뇌의 무게도 증가하였다 (표 17). 위의 무게는 반대로 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 부검소견 결과, 대부분 장기에서는 고농도 투여군에서도 이상증상이 발견되지 않았지만 500 mg/kg 투여군의 신장에서 이상증상이 발견되어 신장에 대해서 조직병리학적 검사를 실시하였다. 검사 결과 모든 실험군에서 distal tubule이 cystic dilation된 것으로 나타났는데 모든 동물에서 관찰되는 것으로 보아 동물 종에 따른 특성으로 함염증 소재의 투여와는 관련이 없는 것으로 판단된다. 이외의 이상 소견은 발견되지 않았다.

표 17. 민들레 항염증 소재의 랫트에 대한 4주 반복 경구투여시 장기의 절대무게

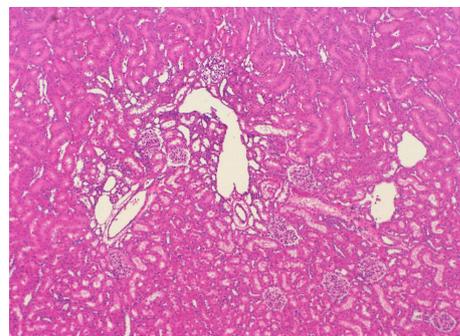
		Dose (mg/kg)		
		0	50	500
신장	체중	322.7±14.4	319.6±15.8	323.6±13.6
	심장	1.1±0.0	1.0±0.0	1.1 ± 0.0
	간	14.5±1.1	14.2±1.2	15.4±1.5
	R	1.3±0.0	1.3±0.1	1.4±0.1
	L	1.3±0.0	1.3±0.1	1.4±0.1
	비장	0.6±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1
	갑상선	0.4±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1
	폐	1.4±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1
	위	1.5±0.2	1.5±0.1	1.4±0.1
	뇌	1.8±0.1	1.9±0.1	1.9±0.1



(대조군)



(50 mg/kg 처리군)



(500 mg/kg 처리군)

그림 36. 민들레 항염증 소재의 랫트에 대한 4주 반복 경구투여시 신장의 조직병리학적 검사

3. 민들레를 이용한 기능성 제품 개발

가. 민들레 음료 개발

(1) 민들레의 적정 볶음처리 조건 확립

(가) 민들레 잎의 이화학적 성분 변화

볶음횟수에 의한 민들레 잎의 유리당 조성 및 총 폴리페놀 함량 변화를 조사한 결과는 표 18과 같다. 민들레 잎에서 fructose, glucose, sucrose, maltose 등의 유리당이 검출되었으며, 이중 sucrose가 4.25 ± 0.20 g/100 g으로 가장 함량이 높았고 glucose 1.33 ± 0.04 g/100 g, maltose 1.06 ± 0.09 g/100 g, fructose 0.69 ± 0.03 g/100 g의 순으로 나타났다. Sucrose의 경우 생잎의 4.25 ± 0.20 g/100 g에서 볶음횟수가 1, 4, 7회로 증가함에 따라 각각 4.11 ± 0.32 g/100 g, 3.94 ± 0.28 g/100 g, 3.47 ± 0.14 g/100 g으로 감소하였고, fructose, glucose, maltose도 볶음횟수가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타나 볶음처리시 유리당이 마이알 반응에 관여하여 함량이 감소하는 것으로 판단된다. Glucose와 fructose 등의 환원당들은 아미노 화합물과 함께 마이알 반응의 기질로 관여하여 소모되며, 비환원성당인 sucrose와 maltose는 열분해에 의해 glucosidic bond가 가수분해되어 환원당인 glucose와 fructose로 전환되어 마이알 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.

한편 총폴리페놀 함량은 생잎의 $4,093.8 \pm 90.6$ mg/100 g에서 볶음횟수가 1, 4, 7회로 증가함에 따라 각각 655.0 ± 6.7 , 684.9 ± 16.9 , 619.7 ± 23.8 mg/100 g으로 크게 감소하는 것으로 나타나 민들레 잎의 폴리페놀이 열에 매우 쉽게 분해됨을 알 수 있었다. 또한 볶음횟수별(1~7회) 시료에서는 폴리페놀 함량에서 큰 차이가 나지 않아 볶음횟수 보다는 볶음처리 자체가 민들레 잎의 폴리페놀 함량에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다. Ismail 등은 여러 가지 채소를 끓는물에서 1분간 열처리한 후 폴리페놀 함량을 측정하여 열처리 전에 비해 swamp cabbage는 26%, 양배추 20%, 시금치 14%, shallot 13%, 케일은 12%의 폴리페놀 함량이 감소하였으며, 짧은 조리시간임에도 불구하고 폴리페놀이 열처리에 매우 민감하다고 보고하였다. Sahlin 등도 토마토를 끓임, 굽기, 튀김 등을 하였을 때 폴리페놀, 비타민 C, lycopene 함량이 크게 감소한다고 보고하였으며, Crozier 등은 이러한 폴리페놀 함량 감소에 대해 여러 가지 열처리에 의해 폴리페놀이 열분해되기 때문이라고 하였다.

표 18. 튀음횟수에 따른 민들레 잎의 이화학적 특성

튀음횟수	유리당 (g/100 g, dry basis)				총폴리페놀 (mg/100 g, dry basis)
	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	
0	0.69±0.03	1.33±0.04	4.25±0.20	1.06±0.09	4,093.8±90.6
1	0.70±0.05	1.20±0.13	4.11±0.32	1.06±0.05	655.0±6.7
4	0.59±0.04	1.09±0.11	3.94±0.28	0.91±0.03	684.9±16.9
7	0.55±0.05	0.88±0.11	3.47±0.14	0.93±0.02	619.7±23.8

표 19는 민들레 생잎 및 튀음처리한 민들레 잎의 유리 아미노산 조성과 함량을 조사한 결과로서 cystein, aspartic acid 등 총 20종의 유리 아미노산이 검출되었으며, 생잎의 경우 proline (583.5±9.7 mg/100g), asparagine (444.3±10.8 mg/100 g), glutamine (321.3±9.6 mg/100 g), valine (122.3±4.8 mg/100 g), serine (110.6±7.4 mg/100 g) 등이 주요 유리 아미노산이었다. Shin은 민들레의 잎과 뿌리의 유리 아미노산을 분석하여 잎의 경우 aspartic acid, serine, asparagine, glutamic acid 등이 주요 유리 아미노산이었고 특히 glutamic acid의 함량이 높다고 하였는데 이는 본 연구의 결과와는 약간 차이가 나는 것이었다. 유리 아미노산의 총 함량은 튀음횟수가 1, 4, 7회로 증가함에 따라 생잎의 2,247.2 mg/100 g에서 각각 834.5, 799.2, 690.7 mg/100 g으로 크게 감소하여 튀음처리가 민들레의 유리 아미노산 함량을 크게 감소시킴을 알 수 있었으며, 이는 표 18의 유리당 감소 경향과 동일한 결과로서 튀음처리에 의한 마이알 반응 때문인 것으로 판단된다.

표 19. 볶음횟수에 따른 민들레 잎의 유리 아미노산 함량

(mg/100 g, dry basis)

유리 아미노산	볶음횟수			
	0	1	4	7
CYS	41.7±0.6	16.6±0.6	11.9±0.4	10.4±0.5
ASP	96.2±2.0	102.2±6.6	100.5±2.6	79.7±1.8
GLU	17.9±0.4	19.4±0.7	41.1±1.3	36.0±1.4
ASN	444.3±10.8	107.7±2.3	101.5±2.9	95.5±2.0
SER	110.6±7.4	48.7±1.5	37.7±1.8	21.8±3.1
GLN	321.3±9.6	167.9±2.8	148.9±5.2	128.4±2.4
GLY	16.5±1.1	4.9±0.5	3.9±0.8	4.7±1.0
HIS	22.0±1.4	11.9±0.4	12.3±0.8	10.9±0.6
ARG	34.1±0.8	10.8±0.4	10.6±0.4	8.7±0.7
THR	72.0±2.6	22.6±1.4	16.4±1.6	2.4±0.4
ALA	83.3±1.8	53.0±2.5	48.0±1.9	43.2±2.0
PRO	583.5±9.7	130.9±7.0	131.1±6.0	131.7±3.9
TYR	17.5±0.8	4.8±0.6	6.3±0.4	5.3±0.3
VAL	122.3±4.8	40.4±1.3	40.0±1.2	34.1±1.2
MET	10.4±0.3	6.6±0.5	3.7±0.4	4.5±0.5
ILE	70.8±1.8	29.5±0.7	30.6±0.7	25.6±1.3
LEU	82.8±2.2	24.2±1.1	21.9±0.8	18.5±1.3
PHE	58.7±1.5	19.8±1.0	20.1±0.3	19.0±1.0
TRP	19.5±0.8	6.5±0.4	6.9±0.3	6.9±0.6
LYS	21.8±0.9	6.1±0.7	5.8±0.2	3.4±0.4
Total	2,247.2	834.5	799.2	690.7

표 20은 민들레 생잎 및 볶음처리한 민들레 잎의 무기질 조성 및 함량을 조사한 결과로서 K, Ca, P, Mg 등이 민들레 잎의 주요 무기질을 구성하고 있으며, 특히 K와 Ca의 함량이 높은 것으로 나타났다. 볶음횟수가 증가함에 따라 Ca 함량이 다소 감소한 반면 기타 무기질은 볶음횟수에 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다. Kang 등도 민들레 잎과 뿌리의 무기질 함량을 분석하여 민들레 잎에 K와 Ca이 매우 풍부하다고 하였으며, 특히 K의 함량이 높기 때문에 민들레 섭취에 의한 이뇨작용시 야기될 수 있는 저칼륨증 방지에 도움이 될 것이라

고 하였다.

표 20. 볶음횟수에 따른 민들레 잎의 무기질 함량

(mg/100 g, dry basis)

무기질	볶음횟수			
	0	1	4	7
Na	52.6±6.7	55.0±4.5	53.0±9.8	54.3±1.1
Ca	1,050.9±12.8	960.9±13.9	951.8±7.2	942.6±14.6
K	5,266.0±89.3	5,379.2±147.1	5,467.0±78.7	5,174.7±98.6
Mg	295.5±0.2	283.4±4.8	291.4±5.6	287.9±4.3
P	427.4±7.6	415.8±7.7	411.3±1.6	424.8±3.7
Fe	10.4±0.4	9.0±0.3	8.1±0.6	7.7±0.4
Zn	2.6±0.1	2.6±0.1	2.7±0.0	2.8±0.1

(나) 민들레 잎 열수추출액의 이화학적 특성 변화

볶음횟수를 0, 1, 4, 7회로 달리하여 제조한 민들레 잎을 열수추출한 추출액의 가용성 고형분, pH, 색도 등의 이화학적 특성을 조사하였으며, 그 결과는 표 21과 같다. 가용성 고형분은 볶음처리 하지 않은 생잎이 2.7±0.1 °Bx로 가장 높았으며, 볶음횟수가 증가할수록 추출액의 가용성 고형분이 2.1±0.0~2.4±0.1 °Bx로 감소하는 것으로 나타나 볶음처리에 의해 민들레 잎의 추출 수율이 감소함을 알 수 있었고 추출액의 pH는 5.6±0.0~5.7±0.0으로서 거의 차이가 없었다. 또한 열수추출액의 색도를 측정된 결과 L 값이 생잎의 21.4±1.2에서 볶음처리시 7.9±0.5~10.5±0.7로, a 값은 생잎의 18.3±1.6에서 볶음처리시 11.5±0.8~13.5±1.3로, b 값은 생잎의 13.5±1.0에서 볶음처리시 4.3±0.2~6.3±0.7로 크게 감소하여 볶음처리에 의해 민들레 잎이 갈변화되어 생잎의 열수추출액과 비교할 때 색도가 큰 차이를 나타내었다. 한편 볶음횟수가 증가함에 따라 민들레 잎이 더 이상 갈변화하지 않고 오히려 L, a, b 값이 증가하는 경향을 나타냈다.

표 21. 덩음횟수에 따른 민들레 잎의 열수추출물의 이화학적 특성

덩음횟수	가용성 고형분 (°Bx)	pH	색도		
			L	a	b
0	2.7±0.1	5.6±0.0	21.4±1.2	18.3±1.6	13.5±1.0
1	2.4±0.1	5.6±0.0	7.9±0.5	11.5±0.8	4.3±0.2
4	2.3±0.0	5.6±0.0	9.7±0.4	13.2±1.2	5.8±0.6
7	2.1±0.0	5.7±0.0	10.5±0.7	13.5±1.3	6.3±0.7

덩음횟수를 달리하여 제조한 민들레 잎을 열수추출한 추출액의 환원당, 아미노태질소 및 총폴리페놀의 함량을 조사한 결과는 표 22와 같다. 환원당은 덩음처리하지 않은 민들레 생잎이 241.9±4.0 mg%로 가장 낮은 반면 덩음처리한 민들레의 추출액은 각각 456.2±5.1 mg%, 399.2±6.2 mg%, 408.7±6.4 mg%를 나타내어 덩음처리에 의해 환원당 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 덩음횟수별 민들레 잎의 유리당 함량을 조사한 표 18의 결과와 달리 열수추출하였을 때 생잎에 비해 덩음처리한 민들레에서 더 많은 양의 환원당이 추출된 것은 민들레 잎이 덩음과 유념 공정을 거치면서 환원당의 용출이 용이해지도록 민들레 잎의 조직이 변화되었기 때문인 것으로 판단된다. 한편 아미노태질소는 생잎의 104.0±5.3 mg%에서 덩음처리에 의해 44.7±3.6~67.3±4.4 mg%로 크게 감소하는 것으로 관찰되어 표 19의 민들레 잎의 유리 아미노산 분석 결과와 동일한 결과를 나타내었다. 총폴리페놀도 생잎의 194.6±4.4 mg%에서 덩음처리에 의해 57.4±2.4~69.4±2.1 mg%로 크게 감소하는 것으로 나타나 표 18의 민들레 잎의 총폴리페놀 분석 결과와 동일한 경향이였다. 하지만 덩음처리한 잎에서의 열수추출액에서의 아미노태질소와 총폴리페놀의 차이는 추출액이 아닌 원료상태에서의 차이에 비해 훨씬 감소된 것으로 보아 아미노태질소와 총폴리페놀도 환원당 결과와 마찬가지로 덩음 및 유념공정에 의해 쉽게 용출되었기 때문인 것으로 판단된다. 그리고 덩음처리한 민들레 잎 및 열수추출액 모두 덩음횟수에 따른 차이는 생잎과 덩음처리 잎의 차이에 비해 그다지 크지 않는 것으로 나타났다.

표 22. 덩음횟수에 따른 민들레 잎 열수추출물의 환원당, 아미노태질소와 총 폴리페놀 함량

덩음횟수	환원당 (mg/100 mL)	아미노태질소 (mg/100 mL)	총폴리페놀 (mg/100 mL)
0	241.9±4.0	104.0±5.3	194.6±4.4
1	456.2±5.1	67.3±4.4	69.4±2.1
4	399.2±6.2	57.7±6.2	61.3±3.1
7	408.7±6.4	44.7±3.6	57.4±2.4

(다) 민들레 잎의 열수추출액의 관능적 특성 변화

민들레의 덩음횟수별 추출액에 대한 향미묘사시험을 통해 짠맛, 쓴맛, 풀냄새, 탄맛, 단내 등 5가지의 관능적 특성을 도출하였고 이에 대한 정량묘사분석을 실시하여 표 23과 그림 37에 결과를 나타내었다. 덩음처리 하지 않은 생잎의 추출액은 짠맛과 쓴맛, 풀냄새 등 기호도에 나쁜 영향을 미치는 특성값이 강하였고 덩음처리에 의해 이러한 특성들은 크게 감소하면서 열처리에 의해 생성되는 단내는 약간 증가하는 것으로 나타났다. 짠맛(F=7.36), 쓴맛(F=33.79) 그리고 풀냄새(F=13.08)가 처리구간 유의수준 1% 이하에서 차이를 나타내었지만 단내와 탄맛은 처리구 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 민들레 추출액에 대한 관능적 기호도를 측정된 결과 표 24에서 보는 바와 같이 덩음횟수가 증가할수록 색과 맛에 대한 기호도가 증가하여 종합적인 기호도도 크게 증가하였다. 특히 덩음처리에 의해 민들레 고유의 짠맛과 쓴맛이 감소하여 맛에 대한 기호도가 크게 증가함으로써 종합적 기호도도 증가하였으며, 4회와 7회 덩음처리한 추출액이 기호적으로 가장 우수하였고 이들의 기호도는 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 색에 대한 기호도의 경우 덩음처리하지 않은 생잎의 추출액은 녹색을 띠면서 약간 불투명한 상태인 반면 덩음처리한 잎 추출액은 갈변에 의해 갈색을 띠면서 투명한 상태였기 때문에 덩음처리한 추출액이 유의적으로 높은 기호도를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 민들레 잎을 덩음 및 유념처리할 때 민들레 고유의 쓴맛과 짠맛, 풀냄새 등이 상당히 감소하여 추출액의 기호도가 크게 증가하고 폴리페놀을 비롯한 유용성분의 용출이 용이해지는 잇점이 있지만 추출수율이 감소하고 또한 열처리에 의한 유용성분의 손실이 커지는 단점이 있기 때문에 이를 종합적으로 판단하여 가공제품의 형태에 따라 적합한 덩음조건을 확립하여야 할 것으로 생각된다.

표 23. 볶음횟수에 따른 민들레 잎 열수추출물의 관능적 특성 (강도)

특성	볶음횟수			
	0	1	4	7
뽀은맛**	8.3±1.2 ^a	6.3±1.4 ^{ab}	4.9±1.7 ^b	5.6±1.7 ^b
쓴맛**	8.8±0.5 ^a	6.9±0.8 ^b	4.9±1.0 ^c	5.3±1.0 ^c
풀냄새**	8.1±1.0 ^a	6.3±1.4 ^b	4.8±1.3 ^b	4.6±1.4 ^b
단내	3.9±2.8 ^a	5.0±2.1 ^a	4.8±1.2 ^a	5.4±1.1 ^a
탄맛	5.1±2.7 ^a	5.5±1.2 ^a	4.6±1.3 ^a	5.0±1.9 ^a

*, ** Significant at the 5% and 1% probability levels, respectively.

Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05).

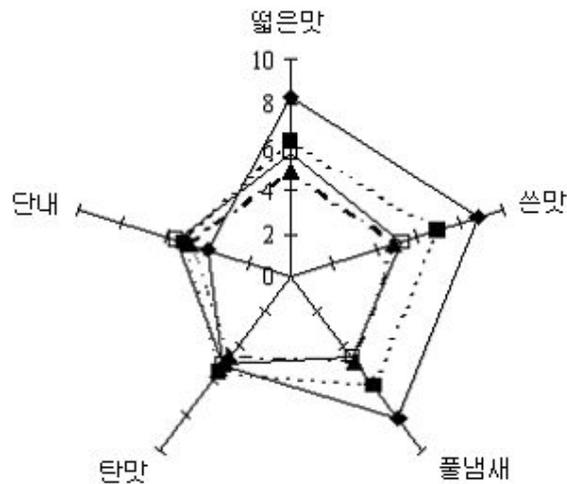


그림 37. 볶음횟수에 따른 민들레 잎의 열수추출물의 관능적 특성 (QDA diagram)

-●-: 볶음 0회, -■-: 볶음 1회, -▲-: 볶음 4회, -□-: 볶음 7회

표 24. 덩음횟수에 따른 민들레 잎 열수추출물의 관능적 특성 (기호도)

덩음횟수	색	향	맛	종합적 기호도
0	4.8±1.2 ^b	5.0±2.0 ^a	1.6±1.1 ^b	1.9±1.0 ^c
1	5.9±0.6 ^{ab}	5.6±2.1 ^a	4.0±1.3 ^a	3.9±1.4 ^b
4	6.6±1.2 ^a	5.9±1.7 ^a	5.4±1.7 ^a	5.6±1.6 ^a
7	5.9±1.4 ^{ab}	5.9±1.9 ^a	5.3±1.9 ^a	5.5±1.4 ^a

Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

(2) 민들레의 적정 추출조건 설정

민들레 음료 제조를 위한 적정 추출조건을 확립하기 위하여 4회 덩음처리한 민들레 잎을 60, 75, 90°C에서 90분간 각각 3회 열수추출하여 추출온도 및 추출횟수별 추출액의 이화학적 특성을 비교하였으며, 그 결과는 표 25과 같다. 당도, 환원당, 적정산도, 아미노태 질소와 총 폴리페놀 등 모든 항목에서 추출온도에 따른 값의 차이가 거의 나타나지 않은 반면 추출횟수가 증가할수록 각 특성값은 크게 감소하는 것으로 나타났다.

표 25. 민들레의 추출조건별 추출액의 이화학적 특성

추출 온도 (°C)	추출 횟수	당도 (°Bx)	환원당 (mg%)	pH	적정산도 (mg%)	아미노태질소 (mg%)	폴리페놀 (mg%)	색도		
								L	a	b
60	1	2.5	442.3	6.09	0.61	8.4	140.7	13.4	24.5	22.2
	2	1.2	127.1	6.20	0.32	2.8	59.2	30.4	20.7	48.0
	3	0.5	35.0	6.50	0.10	0.4	27.7	46.2	15.0	57.5
75	1	2.6	390.3	6.02	0.64	8.4	148.3	7.6	19.9	12.8
	2	1.1	130.4	6.07	0.22	2.5	65.2	32.1	17.7	48.7
	3	0.5	46.4	6.43	0.06	1.1	27.1	43.7	11.3	53.3
90	1	2.8	387.1	5.93	0.67	8.4	146.2	13.4	23.3	21.9
	2	1.4	148.1	5.84	0.29	2.5	67.6	35.9	19.2	54.0
	3	0.4	45.8	6.09	0.13	1.1	29.8	44.7	11.7	54.5

민들레의 추출온도별 추출액에 대한 향미묘사시험을 통해 짙은맛, 쓴맛, 풀냄새, 탄맛, 구수한 맛 등 5가지 관능적 특성을 도출하였고 이에 대한 정량묘사분석을 실시하여 그림 38과 같은 QDA diagram으로 나타내었다. 60℃와 75℃ 추출액의 경우 관능적 특성에서 거의 차이를 나타내지 않았지만 90℃ 추출액은 쓴맛이 감소하고 구수한 맛이 증가하는 것으로 나타났으며, 이와 같은 결과에 의해 표 26의 관능적 기호도 조사 결과에서 보는 바와 같이 90℃에서 추출한 민들레 추출액의 기호도가 가장 양호한 것으로 나타났다.

따라서 이상의 결과를 토대로 하여 민들레 음료 개발을 위한 적정 진처리 및 추출조건을 튀움온도 180℃, 튀움횟수 4회, 추출온도 90℃, 추출횟수 2~3회로 결정하였다.

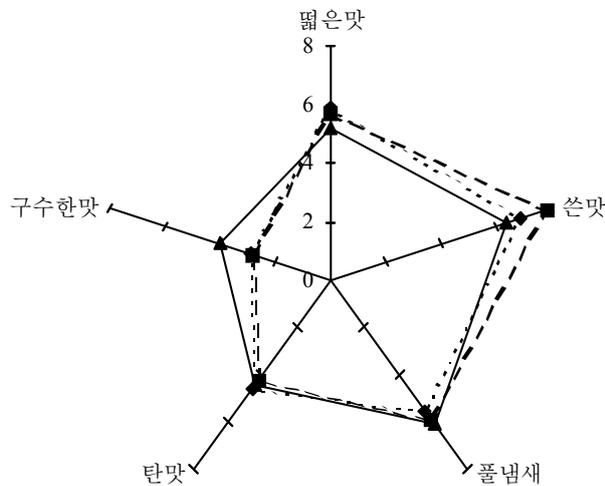


그림 38. 민들레의 추출온도별 추출액의 관능적 특성
 -●-: 60℃, -■-: 75℃, -▲-: 90℃

표 26. 민들레의 추출온도별 추출액의 관능적 기호도 조사 결과

추출온도(℃)	색	향	맛	종합적 기호도
60	5.2±1.6 ^a	4.8±2.2 ^a	3.0±2.1 ^a	3.6±2.1 ^{ab}
75	4.9±1.2 ^a	4.8±1.6 ^a	2.7±1.9 ^a	3.1±1.6 ^b
90	5.8±1.5 ^a	5.0±1.8 ^a	4.4±1.5 ^a	4.9±1.5 ^a

Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05).

(3) 민들레 음료 제조조건 설정

(가) 민들레 음료의 최적 배합비 결정

민들레 음료 제조를 위한 추출액의 적정 음용농도를 결정하기 위하여 농축액을 0.1~0.4 °Bx로 희석하여 관능검사를 실시하였으며 그 결과는 표 27과 같다. 추출액의 당도가 증가함에 따라 짙은 갈색을 띠었으며, 또한 민들레 고유의 향과 맛이 강하여지면서 0.3 °Bx까지는 기호도가 증가하였으나 0.4 °Bx에서는 고유의 쓴맛과 풋내가 강하여져 기호도가 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 민들레 음료 제조를 위한 민들레 추출액의 적정 음용농도는 0.3 °Bx임을 알 수 있었다.

표 27. 민들레 추출액의 적정 음용농도 결정을 위한 관능검사 결과

농도	색	향	맛	종합적 기호도
0.1 °Bx	5.9±1.3 ^a	5.1±0.8 ^a	5.3±0.9 ^b	5.3±0.7 ^b
0.2 °Bx	6.8±1.1 ^a	5.0±0.5 ^a	6.3±1.5 ^{ab}	6.3±1.2 ^{ab}
0.3 °Bx	6.8±1.2 ^a	5.4±0.7 ^a	7.2±0.7 ^a	7.2±0.7 ^a
0.4 °Bx	5.6±1.8 ^a	5.2±0.4 ^a	6.2±1.3 ^{ab}	6.0±1.3 ^b

Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

적정 음용농도가 상당히 낮기 때문에 민들레 고유의 향미가 약한 것으로 나타나 이를 보완하기 위해서 향 첨가시험을 실시하였다. 과실향, 허브향 등 10여종의 향을 검토한 결과 (표 28) 국화향이 음료의 향미를 풍부하게 하면서 기호적으로 증진시키는 효과를 나타내었으며, 특히 국화향 B의 효과가 가장 우수하였다. 복숭아향도 비교적 좋은 효과를 나타내면서 맛에 대한 기호도가 상당히 높았지만 향이 너무 강하여 음료의 전체적인 맛을 복숭아맛으로 변화시키는 것으로 나타났다.

표 28. 민들레 음료의 기호도 증진을 위한 여러 가지 향료 첨가 배합시험

향료	관능적 기호도	향료	관능적 기호도
국화향 A	+++	복숭아향 A	++
국화향 B	++++	복숭아향 B	++
국화향 C	+	복숭아향 C	+
국화향 D	++	레몬향 A	++
유자향	+	레몬향 B	+
자스민향	+	한란향	++

(나) 민들레 음료 제조

적음 덩어리 및 추출에 의해 제조한 민들레 잎 추출물을 이용하여 민들레 음료를 제조하였다. 일반적으로 녹차와 민들레와 같은 차류 및 채소류를 이용하여 음료를 제조할 때에는 고온에서의 살균처리에 의해 이미와 이취 발생 또는 변색 등의 품질변화가 심한 특징이 있다. 그리하여 색이나 맛의 변화를 최소화하면서 음료의 맛에 크게 영향을 미치지 않는 안정제로서 비타민 C를 첨가하였고, 또한 비타민 C 첨가에 의한 pH 및 맛의 변화를 최소화하기 위하여 아스콜빈산 나트륨과 탄산수소나트륨 등의 첨가물을 첨가하였다. 본 연구에서도 적정 음용농도의 민들레 추출액을 기준으로 하여 Vit C, 아스콜빈산 나트륨, 탄산수소나트륨을 첨가하여 살균시의 품질변화를 최소화하였다. 민들레 음료를 제조하기 위한 제조공정과 최적 배합비는 그림 39, 표 29와 같다.

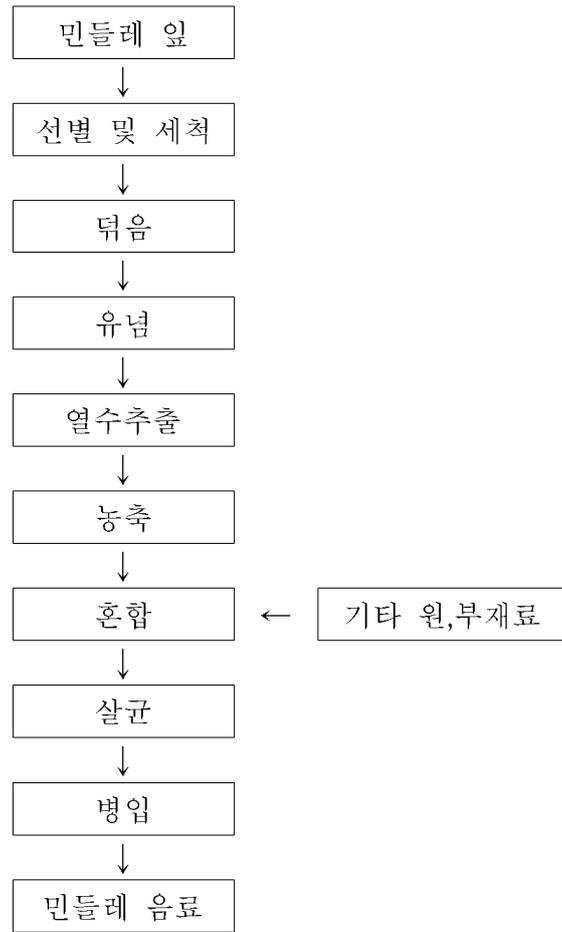


그림 39. 민들레 음료 제조과정

표 29. 민들레 음료 제조 배합비

성분	함량 (%)
민들레 농축액 (°60 Bx)	0.5
설탕	8
비타민 C	0.5
아스콜빈산 나트륨	0.05
탄산수소나트륨	0.05
향료	0.02
정제수	90.88
합계	100



그림 40. 민들레 음료

나. 항염증 소재를 이용한 여드름 치료 및 관절염 예방용 제품 개발

(1) 항염증 활성 생약재 선정 시험

항염증 활성을 가지는 민들레 잎 추출물의 가공제품 개발시 같이 첨가할 생약재인 강황, 감초, 개다래, 계피, 복령, 산초나무, 생강, 어성초, 영경귀, 오디, 인진쑥, 천궁과 초피나무의 활성을 RAW 264.7 cell의 LPS로 유도된 NO의 생성을 측정하여 시료를 처리하지 않은 대조구에서의 NO 생성에 대한 억제율이 나타내었다. 실험결과 농도의존적으로 NO 생성을 억제하였고, 특히 오디, 인진쑥, 초피나무의 억제율이 뛰어나 2.0 mg/mL에서는 각각 68.8 ± 0.4 , 63.5 ± 1.7 , $74.8 \pm 1.5\%$ 의 억제율을 나타내었다(표 30). 따라서 이 3가지의 생약재를 가공제품 개발시 첨가되는 생약재로 선정하였다.

표 30. 생약재의 LPS로 유도된 NO의 생성 억제율 및 추출수율

생약	추출수율 (%)	NO 생성 억제율 (%)		
		0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	2.0 mg/mL
감초	19.7	29.9±1.1	44.4±1.9	53.0±6.5
강황	6.7	14.5±1.3	24.8±0.6	34.7±0.6
개다래	11.0	0.6±0.4	13.2±1.8	23.9±6.3
계피	2.4	13.7±1.9	32.8±6.1	41.7±1.1
복령	2.0	24.9±3.0	29.1±0.6	32.1±0.0
산초나무	2.6	24.8±0.8	27.7±1.1	41.4±0.0
생강	12.2	2.7±0.3	13.7±0.6	21.5±0.6
어성초	16.6	12.2±0.6	20.1±3.1	30.0±1.8
오디	33.1	44.1±1.5	57.6±0.8	68.8±0.4
인진쑥	14.2	29.6±3.6	41.9±0.2	63.5±1.7
천궁	16.6	15.2±1.8	24.9±7.8	35.5±6.0
초피나무	6.4	46.3±3.8	58.7±0.8	74.8±1.5

(2) 천연 항균제의 여드름 균에 대한 항균성 조사

천연 항균제인 포도씨 추출물 (GS-1000), 자몽씨 추출물 (DF-100), 파인-오렌지와 티트리 오일을 여드름균인 *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*)균과 *Staphylococcus epidermidis* (*S.epidermidis*)에 대하여 paper disc method를 사용하여 항균력을 측정하였다. 각 시험물질의 disc 주변에 생성된 clear zone의 크기는 표 31과 같다. 측정 결과 포도씨 추출물이 측정한 천연 항균제 중에서 항균력이 가장 뛰어났다. *S. epidermidis*에 대해서는 티트리오일을 제외한 3 항균제들이 비슷하게 농도 의존적으로 항균력을 나타내었고, *P. acens*에 대해서는 포도씨 추출물의 clear zone이 0.2% 처리구에서 21.5±0.7 mm, 2% 처리구에서 35.5±0.7 mm, 10% 처리구에서 43.5±2.1 mm으로 나타나 여드름균에 대해서 큰 항균효과가 있는 것으로 나타났다.

표 31. 천연 향균제의 여드름 균에 대한 항균력 측정

	처리량	<i>P. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>
GS-1000	0.2%	21.5±0.7	15.0±0.0
	2%	35.5±0.7	21.5±0.7
	10%	43.5±2.1	26.5±0.7
DF-100	0.2%	15.5±0.7	15.5±0.7
	2%	31.0±0.0	24.5±0.7
	10%	37.0±1.4	21.0±1.4
파인-오렌지	0.2%	10.0±0.0	12.0±0.0
	2%	28.5±0.7	20.5±0.7
	10%	37.0±0.0	23.5±0.7
티트리오일	0.2%	-	-
	2%	-	-
	10%	10.0±1.4	-

(3) 여드름 치료용 기능성 제품 개발

(가) 화장품 (크림)

항염증 활성이 우수한 것으로 확인된 초피나무, 인진쑥, 오디 추출물과 여드름균에 대한 항균효과가 뛰어난 것으로 확인된 포도씨 추출물 (GS-1000)을 민들레 항염증 소재를 혼합하여 여드름 환자용 크림을 제조하였다. 민들레 항염증 소재와 초피나무 등의 생약재 추출물을 20 °Bx 농도로 조정하여 배합실험 결과 ointment base에 4% 첨가하였을 때 크림의 물성이 가장 우수한 것으로 나타나 첨가량을 4%로 결정하였으며, 50℃에서 성분들이 골고루 균질화될 때 까지 균질기를 이용하여 혼합하였다. 여드름 환자를 위한 크림의 제조공정과 최적 배합비는 그림 41, 표 32 와 같다.

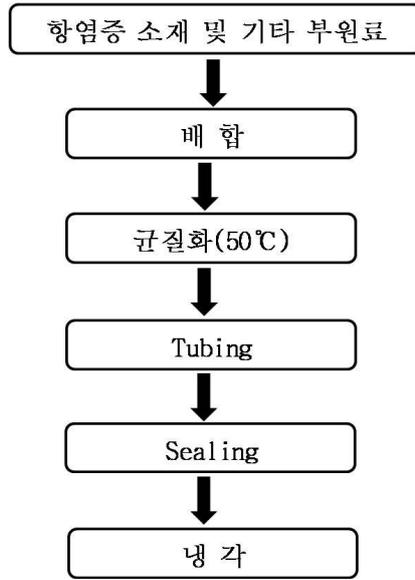


그림 41. 여드름 환자용 크림 제조과정

표 32. 여드름 환자용 크림 성분비

성분	함량(%)
정제수	100
부틸렌글라이콜	12.00
하이드로제네이티드폴리데센	7.00
글리세린	5.00
항염증 소재 및 생약재 농축액 (20 °Bx)	4.00
옥틸도데실미리스테이트	2.50
폴리글리세릴-3메칠글루코오스디스테아레이트	2.00
페도우폼씨오일	2.00
베타-글루칸	2.00
세틸에칠헥사노에이트	2.00
낮토검	1.00
세테아릴알코올	1.00
하이드로제네이티드식물성오일	1.00
스테아릭애씨드	0.60
글리세릴스테아레이트	0.50
망고씨드버터	0.50
디메치콘	0.50
페녹시에탄올	0.30
마치현추출물	0.20
메칠파라벤	0.20
트리에탄올아민	0.15
카보머	0.13
향료	0.13
프로필파라벤	0.07
디소듐이디티에이	0.02
소듐하이알루로네이트	0.02



그림 42. 항염증 소재를 이용한 크림

(나) 연고

초피나무, 인진쑥, 오디 추출물과 포도씨 추출물과 민들레 항염증 소재를 혼합하여 여드름 치료용 연고를 제조하였다. 민들레 항염증 소재와 초피나무 등의 생약재 추출물을 50 °Bx 농도로 조정하여 배합실험 결과 base에 5% 첨가하였을 때 연고의 물성이 가장 우수한 것으로 나타나 적정 첨가량을 5%로 결정하였다. 여드름 치료를 위한 연고의 제조공정과 최적 배합비는 그림 43, 표 33과 같다.

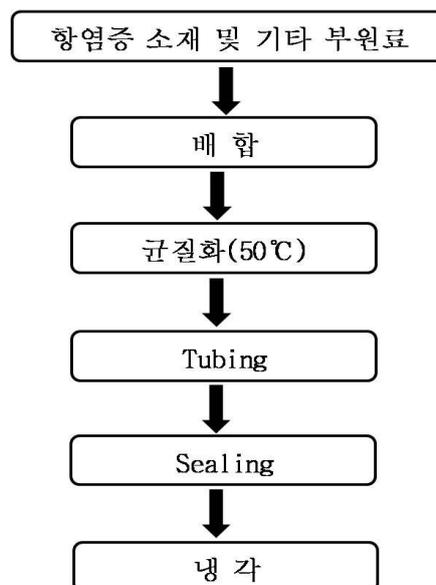


그림 43. 여드름 치료용 연고 제조공정

표 33. 여드름 치료용 연고 성분비

성분	함량(%)
항염증 소재 및 생약재 농축액 (50 °Bx)	5
부틸렌글라이콜	6
폴리옥시40수소화피마자유	0.8
카보머940	적량
수산화나트륨	적량
에데트산나트륨수화물	0.05
페녹시에탄올	0.3
파라옥시벤조산메틸	0.15
에탄올	4
정제수	적량
합계	100



그림 44. 항염증 소재를 이용한 연고

(다) 비누

초피나무, 인진쑥, 오디 추출물과 포도씨 추출물과 민들레 항염증 소재를 혼합하여 여드름 환자용 비누를 제조하였다. 민들레 항염증 소재와 초피나무 등의 생약재 추출물을 50 °Bx 농도로 조정하여 1% 첨가하여 제조하였다. 여드름 환자를 위한 비누의 제조공정과 최적 배합비는 그림 45, 표 34와 같다.

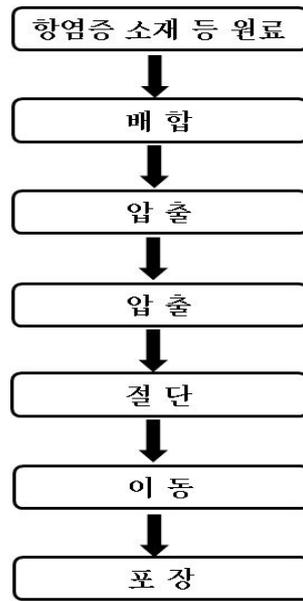


그림 45. 여드름 환자용 비누 제조공정

표 34. 여드름 환자용 비누 성분비

성분	함량(%)
비누소지	91
글리세린	1.2
항염증 소재 및 생약재 농축액 (50 °Bx)	1.0
식이유황(MSM)	1.0
죽염	0.5
알로에	0.5
항균제	3.0
올리브오일	0.4
토코페롤	0.3
키토산	0.3
비타민C	0.3
살구씨오일	0.3
레티놀	0.2
라벤더	1.0
합계	100



그림 46. 항염증 소재를 이용한 비누

(4) 관절염 예방용 기능성 제품 개발

(가) 환

초피나무, 인진쑥, 오디 추출물 및 민들레 항염증 소재의 농축액(50 °Bx)을 민들레 잎, 오디, 인진쑥, 초피나무 분말과 혼합하여 환을 제조하였다. 환을 제조하기 위하여 원료 중 민들레 잎 분말, 초피나무 분말 등의 분말 원료를 호바트믹서기로 혼합한 다음 민들레 항염증 소재 및 생약재의 농축액 등의 액상 원료와 혼합하여 반죽기로 혼합하고 다시 2단롤러로 재반죽하였다. 이 반죽물을 일정한 모양으로 성형하여 자환기에 내리고 내려진 가락을 절단기에서 환 모양으로 절단하여 제환하고 이를 환제틀에 넣고 정환하였다. 정환된 환들을 열풍건조기에 40~65℃까지 단계적으로 온도를 높여가면서 건조시켰다. 1차로 건조된 환은 코팅을 하고 재건조하여 제품으로 하였다. 관절염 예방을 위한 환의 제조공정과 최적 배합비는 그림 47, 표 35와 같다.

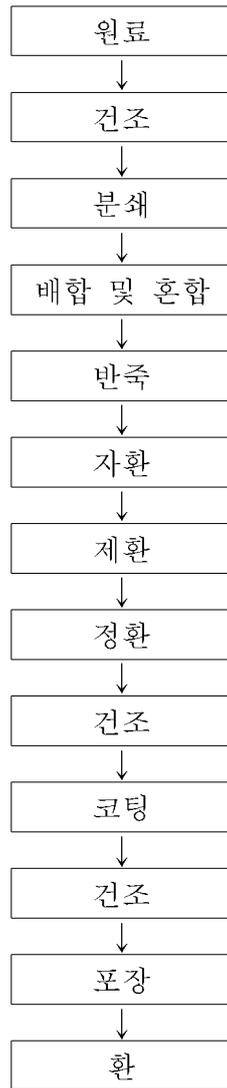


그림 47. 관절염 예방을 위한 환 제조과정

표 35. 관절염 예방용 환 성분비

성분	함량(%)
항염증 소재 및 생약재 농축액 (50 °Bx)	45
민들레 잎 등 생약재 분말	40
현미 분말	10
꿀	5
합계	100



그림 48. 항염증 소재를 이용한 환

(나) 과립차

초피나무, 인진쑥, 오디 추출물 및 민들레 항염증 소재의 농축액(50 °Bx)과 함수결정 포도당을 혼합하여 과립차를 제조하였다. 제조한 과립차에 여러 가지 생약재가 혼합되어 맛이 다소 무거운 느낌이 있기 때문에 상큼한 맛을 부여하기 위해 비타민 C와 구연산을 혼합하여 비타민 C 과립과 유사한 맛을 부여하였다. 관절염 예방을 위한 과립차의 제조공정과 최적 배합비는 그림 49, 표 36과 같다.

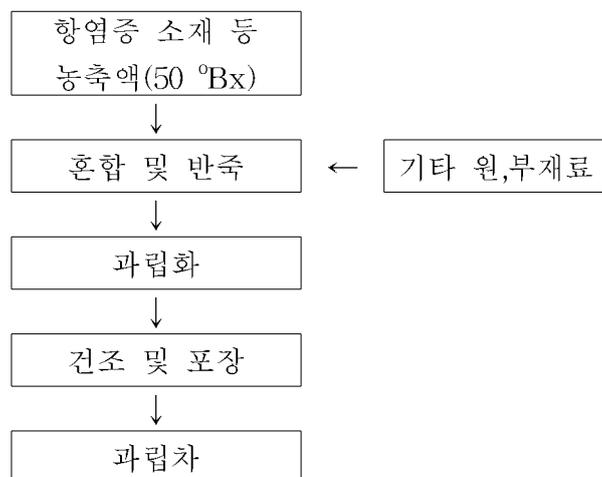


그림 49. 관절염 예방용 과립차 제조공정

표 36. 관절염 예방용 과립차 성분비

성분	함량(%)
항염증 소재 및 생약재 농축액 (50 °Bx)	12
포도당	84
비타민 C	2
구연산	2
합계	100



그림 48. 항염증 소재를 이용한 과립차

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
민들레의 항염증 활성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 민들레의 부위별 유리당, 무기질, 아미노산, 폴리페놀 등의 식품학적 특성을 규명함 - 민들레의 부위별 추출물 및 용매 분획의 macrophage 의 LPS 처리에 의한 NO, PGE₂ 및 cytokines의 생성 억제 효능을 조사하고 염증조절 단백질인 iNOS와 COX-2 그리고 MAPKs의 발현에 대한 억제 효과 조사를 통해 민들레의 항염증 효과 기작을 규명함 - 민들레의 항염증 활성물질을 컬럼 크로마토그래피, TLC, prep-HPLC 등의 방법으로 정제하고 LC-MS, NMR 등의 방법으로 동정함 	30
민들레 항염증 활성물질의 소재화	<ul style="list-style-type: none"> - 민들레로부터 항염증 활성물질을 세포벽 분해효소 처리와 컬럼 크로마토그래피에 의해 효율적으로 추출, 농축할 수 있는 기술을 개발하였음 - 개발한 항염증 소재의 피부염 및 관절염 유발 동물모델에서의 항염증 효과를 검증하였고 항염증 소재로서의 활용 가능성을 제시하였음 - 항염증 소재의 가공조건별 안정성과 항균, 항산화성을 조사하였고 독성시험을 통해 소재로서의 안전성을 확보하였음 	40
민들레를 이용한 기능성 제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 민들레 음료제조를 위한 적정 전처리, 추출조건 및 음료제조조건 등의 제조공정을 제시하였음 - 항염증 활성 조사를 통해 항염증 소재와 함께 활용될 수 있는 생약재와 여드름균에 대한 항균효과를 갖는 천연 항균제를 선별하였음 - 민들레로부터의 항염증 소재, 생약재 추출물 및 천연 항균제를 이용하여 연고, 화장품, 비누, 환, 과립차 등을 제조할 수 있는 제조공정을 제시하였음 	30

2. 기여도

다양한 생리활성이 보고되고 있음에도 불구하고 체계적인 연구가 이루어지지 않아 부가가치가 높은 가공제품이 개발되지 않고 있는 민들레를 이용한 본 과제의 수행을 통해 민들레의 항염증 활성 규명 및 항염증 소재로서의 가능성에 대한 연구가 체계적이고 광범위하게 진행되었다. 또한 민들레 및 항염증 소재를 이용한 다양한 기능성 제품을 개발하여 민들레의 활용성 극대화 및 고부가가치화를 위한 기반을 본 과제를 통하여 마련하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 기술이전 (1건)

1. 음료 제조용 민들레의 추출기술 (관련특허 : 민들레로부터 폴리페놀 추출물을 제조하는 방법 (등록번호 : 10-0787823호)) : 한일물산(주)

나. 학술지 (5건)

1. 최희돈, 고윤정, 김윤숙, 최인욱, 차동수. 덩이뿌리에 의한 민들레 잎의 이화학적 및 관능적 특성 변화. 한국식품과학회지 39: 515-520 (2007)
2. 고윤정, 차동수, 최희돈, 박용곤, 최인욱. 항산화 활성 증진을 위한 민들레 잎의 열수추출 조건의 최적화. 한국식품과학회지 40: 283-289 (2008)
3. 함대현, 서봉준, 한동오, 박재현, 정은택, 이혜정, 고윤정, 최희돈. 급성염증유발 동물모델에서 포공영의 염증억제 효과. 동의생리병리학회지 22: 810-814 (2008)
4. Bong-Jun Sur, Yoon-Jeong Koh, Hee-Don Choi, Insop Shim, Hyejung Lee, Dae-Hyun Hahm. Protective effect of orally administrated dandelion against carrageenan-induced ankle arthritis in rats. Experimental Neurobiology 17: 63-69 (2008)
5. 고윤정, 박용곤, 김윤숙, 차동수, 최희돈. 항염증 활성이 증진된 민들레 잎의 열수추출물 제조조건 설정. 한국식품영양과학회지 38: 391-395 (2009)

다. 학술발표 (3건)

1. 최희돈, 고윤정, 석호문, 김윤숙, 김점수, 차동수. 덩이뿌리에 의한 민들레 잎의 이화학적 및 관능적 특성 변화. 2007년 한국식품과학회 제 74차 학술대회 및 정기총회 6. 20 - 6. 22 부산 BEXCO
2. 최희돈, 고윤정, 김윤숙, 차동수. 민들레 잎으로부터 항염증 활성물질의 추출을 위한 열수 추출조건의 최적화. 2007년 한국식품영양과학회 학술대회 2007. 10. 17 - 10. 19 무주리조트
3. Yoon-Jeoung Koh, Hyun-Jin Park, Hee-Don Choi. Anti-inflammatory effect of methanol extract and its fractions from *Taraxacum officinale* leaves in LPS-stimulated RAW 264.7

cell. 제 56차 대한면역학회 춘계 학술대회 2008. 4. 17 - 2008. 4. 19 무주리조트

라. 특허출원 및 등록

(1) 특허출원

1. 최희돈, 김윤숙, 박용곤, 석호문, 최인욱. 민들레로부터 폴리페놀 추출물을 제조하는 방법 (출원번호 10-2007-0006345호, 2007, 대한민국)
2. 최희돈, 김윤숙, 박용곤, 석호문, 최인욱, 성기승, 고윤정, 차동수. 민들레 잎 추출물을 포함하는 식품 (출원번호 10-2009-0034928호, 2009, 대한민국)

(2) 특허등록

1. 최희돈, 김윤숙, 박용곤, 석호문, 최인욱. 민들레로부터 폴리페놀 추출물을 제조하는 방법 (등록번호 10-0787823호, 2007, 대한민국)

마. 인력양성 (1건)

1. Yoon-Jeoung Koh. Anti-inflammatory effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves and isolation of bioactive compounds. 고려대 석사학위논문 (2008)

2. 성과활용 계획

본 연구과제의 수행 결과 얻어진 과제는 다음과 같이 활용할 계획이다.

가. 국내외 전문 학술지 논문 게재

1. 'Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide, PGE₂, cytokines and inducible NOS and COX-2 via ERK/JNK MAP kinases in RAW 264.7 cells by the leaves of *Taraxacum officinale*' 투고 예정
2. '민들레 잎 추출물의 Rat에 대한 단회 경구투여 및 4주 반복 경구투여에 의한 독성시험' 투고 예정

나. 관련기술의 기업체 기술이전 추진

1. '민들레의 항염증 활성물질의 소재화 기술'을 참여기업 등으로의 기술이전 추진

다. 신문, 방송 등의 매체를 통한 홍보

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 식물로부터 폴리페놀을 추출, 농축하는 방법 (일본특허 1997104822, BERKEM)

양지꽃(Potentilla)으로부터 카테킨을 비롯한 폴리페놀을 추출하기 위하여 물 또는 극성의 유기용매가 일부 함유된 용매를 이용하여 추출, 농축 및 정제과정을 포함한다. 물과 oligomeric 카테킨폴리페놀의 상태로 있는 추출물로부터 유기용매를 제거하고 농축과 건조공정을 통해 카테킨 폴리페놀의 건조된 시료를 얻는다.

2. 항여드름 조성물 및 화장품 (일본특허, 2001117919, Pharmafoods Kenkyusho)

Bacterium속의 Propionibacterium으로부터 추출된 항여드름 성분으로 달걀의 면역에 이용되는 단백질 항원에 대한 항체를 포함하고 있으며, 여드름을 예방하고, 정상 피부에 영향을 미치지 않는다. 여드름 치료제로 활용될 수 있고 여드름 화장품에도 활용될 수 있다.

제 7 장 참고문헌

Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 59-63 (1975)

Choi HJ, Lee WS, Hwang SJ, Lee IJ, Shin DH, Kim HY, Kim KU. Changes in chemical compositions of green tea (*Camellia sinensis L.*) under the different extraction conditions. Korean J Life science. 10: 202-209 (2000)

Choi MA, Park NY, Jeong YJ. Optimization of hot water extraction conditions from *Hericium erinaceus*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 1068-1073 (2004)4. Fridovich I. Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. J. Biol. Chem. 264: 7761-7762 (1989)

Choi U, Shin DH, Chang YS, Shin JL. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 142-148 (1992)

Cacace JE, Mazza G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. J Food Eng. 59: 379-389 (2003)

Dietmar Kammerer, Achim Claus, Andreas Schieber, Reinhold Carle. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera L.*) pomace. J Food Sci. 70: 157-163 (2005)

Fridovich, I. Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. J. Biol. Chem, 264: 7761-7762 (1989)

Fridovich, K. Superoxide dismutase. Adv. Enzymol, 41: 36-37 (1974)

Gontard N, Guilbert S, Cuq JL. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. J. Food Sci. 57: 190-196 (1992)

Halliwell B, Aruoma OJ. DNA damage by oxygen-derived species. FEBS Letters 281: 9-19 (1991)

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Third ed., Oxford University Press, New York (1999)

Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. Chem. Pharm. Bulletin 36: 1090-1097 (1988)

Hirohashi N, Morrison DC. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. Infect Immun. 64: 1011-1015 (1996)

Han SH, Hwang JK, Park SN, Lee KH, Ko KI, Kim KS, Kim KH. Potential effect of solvent fractions of *Taraxacum mongolicum* H. on protection of gastric mucosa. Korean J Food Sci Technol. 37: 84-89 (2005)

Hahm DH, Sur BJ, Han DO, Park JH, Jung ET, Lee HJ, Koh YJ, Choi HD. Anti-inflammatory of dandelion in mice. Korean J Oriental Physiol Pathol. 22: 810-814 (2008)

Hu C, Kitts DD. Luteolin and luteolin-7-*O*-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. Mol Cell Biochem. 265: 107-113 (2004)

Jeon HJ, Kang HJ, Jung HJ, Kang YS, Lim CJ, Kim YM, Park EH. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. J Ethnopharmacol. 115: 82-88 (2008)

Jeong MC, Lee SE, Lee YC. Yield and quality of ginger extracts produced by enzymatic hydrolysis. Korean J. Food Sci Technol 31: 391-398 (1999)

Jia M, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64: 555-559 (1999)

Jennings PE, Barnett AH. New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic

microangiopathy. *Diabetes Med.* 5: 1111-1117 (1988)

Jorge M, Ricardo DS, Jacques R, Vernonique C, Anni C, Michel M. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochem.* 30: 1259-1264 (1991)

Jung CJ. Ways to use of wild plants(2). *Native plants* 13: 92 (1989)

Kim TJ. Our flower, 100 species (9 ed.). pp. 2-5. Hyunamsa, Seoul, Korea (1994)

Kang MJ, Kim KS. Current trends of research and biological activities of dandelion. *Food Ind. Nutr.* 6: 60-67 (2001)

Kang MJ. Antioxidant activity and free radical scavenging effect of dandelion extract. Ph.D. Thesis, Yeungnam Univ. Kyungsan, Korea (2001)

Kim SH, Kim IH, Kang BH, Lee SH, Lee JM. Optimization of ethanol extraction conditions for effective components from *Gastrodia elata* Blume. *Korean J. Food Preserv.* 13: 506-512 (2006)

Kang MJ, Shin SR, Kim KS. Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from Dandelion(*Taraxacum officinale*). *Korean J. Food Preserv.* 9: 253-259 (2002)

Kwak JH, Kweon MH, Ra KS, Sung HC, Yang HC. Purification and physicochemical properties of superoxide anion radical scavenger from capsella bursa-pastoris. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 28: 184-189 (1996)

Lozano C, Bujons J, Torres J.L. Novel separation of bioactive catechin derivatives from complex plant mixtures by anion-exchange chromatography. *Sep Purif Technol.* 62: 317-322 (2008)

Lee GD, Lee JE, Kwon JH. Application of response surface meghodology in food industry. *Food Ind.* 33: 33-45 (2000)

Miller N, Rice-Evans C. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Res.* 26: 195-199 (1997)

Mohamed AAF, Lee CY. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chem.* 108: 977-985 (2008)

Meyer AS, Jepsen SM, Sorensen NS. Enzymatic release of anti-oxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *J Agric Food Chem.* 46: 2439-2446 (1998)

Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 79: 319-326 (1987)

Racz-Kotilla E, Racz G, Solomon A. The action of *Taraxacum officinale* extracts on the body weight and diuresis of laboratory animal. *Planta medica*, 26: 212-217 (1974)

Richmond R, Halliwell B, Chauhan J, Darbre A. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compound. *Anal. Biochem.* 118: 328-330 (1981)

Seog HM, Seo MS, Kim SR, Park YK, Lee YT. Characteristics of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J Food Sci Technol.* 34: 775-779 (2002)

Seo SW, Koo HN, An HJ, Kwon KB, Lim BC, Seo EA, Ryu DG, Moon G, Kim HY, Kim HM, Hong SH. *Taraxacum officinale* protects against cholecystokinin-induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroentero.* 11: 597-599 (2005)

Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16: 144-158 (1965)

Starke, P.E. and Farber, J.L. Endogenous defense against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260: 86-88 (1985)

Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, Masuda K, Arai Y, Shiojima K, Ageta H. Anti-carcinogenic of *Taraxacum* plant. I. *Biol Pharm Bull.* 22: 602-605 (1999)

Tina H, Tanya H. *Medicinale herbs.* A Dorling Kindersley Book, 101-102 (1993)

Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch. Biol. Med.*

Exp. 21: 85-92 (1988)

Weinberg ZG, Akiri B, Potoyevski E, Kanner J. Enhancement of polyphenol recovery from rosemary (*rosmarinus officinalis*) and sage (*salvia officinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC). J Agric Food Chem. 47: 2959-2962 (1999)

Williams CA, Goldstone F, Greenham J. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. Phytochem. 42: 121-127 (1996)

Yang KS, Jeon CM. Effect of *Taraxacum coreanum* Nakai on low density lipoprotein oxidation. Korean J Pharmacogn. 27: 267-273 (1996)

Youn SJ, Kim GE, Jeoung YJ. Extract characteristics of old pumpkin on enzyme treatment. Korean J Food Preserv 10: 302-307 (2003)

Zhang Y, Jiao J, Liu C, Wu X, Zhang Y. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. Food chem 107: 1326-1336 (2008)

Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. Mol Med. 6: 347-373 (2000)