

어젠다코드	2 - 20 - 74		구분	계속	
기술분야코드	V1	기술유형코드	H03	작목구분코드	FC-04-0401
과제종류	공동연구		세부사업(약어)	경제협력권산업육성	
과제명	자색옥수수 추출물을 이용한 간기능성 건강기능식품 개발				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	박상재		농업연구사	(주)메디언스	
연구기간	2016.10 ~ 2019.09		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 자색옥수수 추출물의 생산공정개발			(주)메디언스	박상재	2016.10 ~ 2019.09
2) 자색옥수수 추출물의 간보호 효능 검정			농식품연구소	김희연	2016.10 ~ 2019.09
색인용어	자색옥수수포엽, 간보호				

I. 연구목적

- 새로운 소재의 간보호 건강기능식품개발 필요
 - 자색옥수수 추출물에 함유된 안토시아닌의 높은 함량은 항산화에 기인하는 기능성 소재의 개발 가능성이 높음
 - 자색옥수수 추출물은 국내 최초의 소재로서 시장에서 요구하는 스토리텔링이 가능한 소재로 기존의 간건강 개선용 기능식품 시장으로의 진입이 용이

II. 2017년도 추진목표 대비 당해연도 목표 달성도

추진목표	달성내용	달성도
<제2세부과제 : 자색옥수수포엽 추출물의 간보호효능 검정> ○ 표준재배법 개발 ○ 항산화 효능검정 ○ 간보호효과 검정	[결과활용 건수 : 학술발표 2] ○ 포엽 추출물의 아세트아미노펜으로 유도된 급성 간보호효과 ○ 포엽 추출물의 알콜성 간보호효과	100%

III. 주요 연구내용 및 결과요약

1. 연구내용

<제2세부과제 : 자색옥수수포엽 추출물의 간보호 효능 검정>

(시험1) 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 표준재배법 개발

가. 시험재료(품종): 색소1호

나. 처리내용: 질소시비량(0/0, 50/0, 50/50, 50/150%)

1차이삭 수확시기(출사 후 20, 23, 26, 29, 32일)

2차이삭 수확시기(1차이삭 수확(27일) 후 0, 2, 4, 6일 후)

다. 수확시기: 색소분석을 위한 수확시기는 수확시기 시험을 제외한 모든 시험은 출사 후 27일경에 수확 후 분석

라. 조사항목 : 포엽 및 속대생산량, 색소함량 등

(시험2) 자색옥수수포엽 및 속대추출물의 효능검정

가. 시험재료: 색소1호 포엽 및 속대추출물

나. 처리내용

- 시험관실험
 - In vitro 상에서 HepG2 세포내 산화적 스트레스에 대한 억제효과 : HepG2 세포 total RNA 분리 후 RT-PCR 실시
- 동물실험 : 아세트아미노펜 유도 급성간독성 모델 투여량 조사실험
 - 3구간이상 약량 투여 후, 임상을 위한 간기능 개선 투여량 결정검증실험
 - 혈액 중 생화학적 간 기능 지표(ALP, AST, LDH), 간세포 내 항산화 효소(SOD, GPX, catalase)와 지질과산화물(MDA) 분석
 - 간 기능의 보호효과를 확인하고 간 조직을 사용하여 Microarray 분석

2. 연구결과 요약

<제2세부과제 : 자색옥수수포엽 추출물의 간보호 효능 검정>

(시험1) 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 표준재배법 개발

가. 시비량에 따른 생육 및 색소함량

- 시비량에 따른 포엽건조중은 무비에서 수량이 가장 적었고, 50/150 시험구에서 가장 컸고, C3G 색소 함량도 0.70%로 가장 높았음. 속대 건조중은 뚜렷한 경향은 없었고, 색소함량도 무비를 제외하고는 0.18~0.19%로 큰 차이 없었음

표 1. 시비량에 따른 생육현황 및 색소함량

(과종기: 4월 27일)

기비/ 추비(%)	출사일 수(일)	간장 (cm)	도복 (1-9)	포엽건조중 (kg/10a)	지수 (%)	포엽 C3G(%)	속대건조중 (kg/10a)	지수 (%)	속대 C3G (%)
0/0	82	251	1	50	82	0.57	86	97	0.15
50/0	74	266	1	65	107	0.63	87	98	0.19
50/50	74	264	1	61	100	0.61	89	100	0.18
50/150	74	248	1	73	120	0.70	92	103	0.19

※ 추비시기: 6~7엽기, C3G : cyanidin-3-glucoside



기비/추비(%) : 0/0



기비/추비(%) : 50/0



기비/추비(%) : 50/50



기비/추비(%) : 50/150

나. 1차이삭 수확시기에 따른 수량 및 색소함량

- 1차이삭 수확시기에 따른 포엽 및 속대 건조중은 큰 차이가 없었으나, C3G 함량은 출사후 32일의 속대의 C3G함량이 0.36%로 가장 높았음

표 2. 1차이삭 수확시기에 따른 수확량 및 색소함량

(파종기: 4월 27일)

수확기	포엽건조중 (kg/10a)	포엽 C3G(%)	속대건조중 (kg/10a)	속대 C3G(%)
출사후 20일	88	0.82	82	0.26
23일	90	0.82	72	0.29
26일	97	0.85	79	0.28
29일	82	0.83	80	0.28
32일	93	0.83	82	0.36

다. 2차이삭 수확시기에 따른 수량 및 색소함량

- 2차이삭 수확시기에 따른 포엽 및 속대 건조중은 큰 차이가 없었으나, 포엽은 1차이삭 수확 후 6일 이후부터 C3G 함량이 감소하였음

표 3. 2차이삭 수확시기에 따른 수확량 및 색소함량 (과종기: 4월 27일)

수확기 (1차이삭 수확 후)	포엽건조중 (kg/10a)	포엽 C3G(%)	속대건조중 (kg/10a)	속대 C3G(%)
0일	59	0.96	54	0.32
2일	46	0.91	41	0.31
4일	51	1.00	46	0.34
6일	57	0.89	53	0.34

※ 1차이삭 수확시기: 출사 후 27일

(시험2) 자색옥수수 포엽 및 속대추출물의 효능검정

가. HepG2 세포의 산화적 스트레스로부터의 항산화 효과 검정

- 자색옥수수포엽/속대 추출물의 DPPH와 ABTS radical 소거능을 측정한 결과, DPPH radical 소거활성은 0.1, 0.5, 1 µg/ml의 농도에서 각각 19.91%, 77.05%, 97.89%이었으며, ABTS radical 소거활성은 0.05, 0.1, 0.5 µg/ml의 농도에서 각각 10.27%, 23.55%, 94.26%이었음

표 4. 자색옥수수포엽/속대 추출물처리에 따른 DPPH 라디칼소거능

Samples	µg/mL				
	PPH radical scavenging activity(%)				
	0.01	0.05	0.1	0.5	1
자색옥수수 추출물	3.48±0.63	10.53±0.61	19.91±1.53	77.05±0.76	97.89±0.29
Ascorbic acid	13.71±0.14	95.26±0.12	-	-	-

표 5. 자색옥수수포엽/속대 추출물처리에 따른 ABTS 라디칼소거능

Samples	µg/mL				
	ABTS radical scavenging activity(%)				
	0.05	0.1	0.5	10	100
자색옥수수 추출물	10.27±3.36	23.55±4.88	94.26±2.15	-	-
Ascorbic acid	-	-	-	3.60±0.25	89.83±2.21

- HepG2 세포 배양 후, 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물의 세포독성 확인 결과, 1mg/ml처리 농도까지 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였음(그림 1).

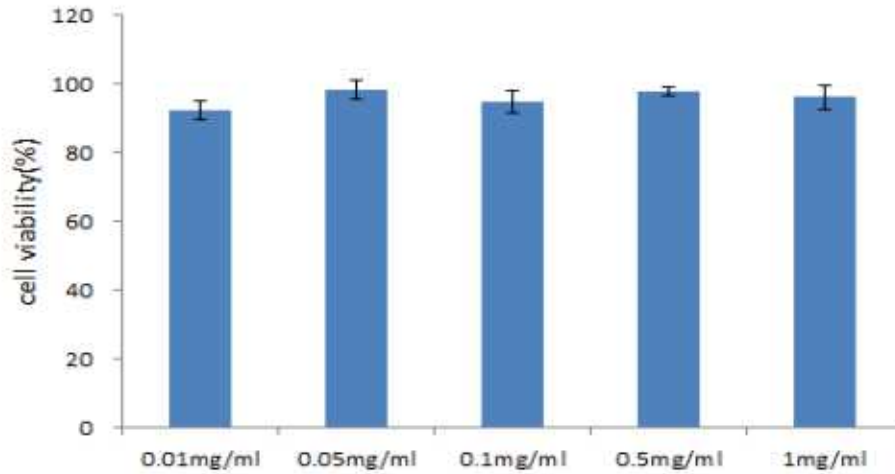


그림 1. 자색옥수수추출물 처리에 따른 간암세포 생존율

- HepG2 세포에서 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물처리가 세포 내 활성산소종 생성에 미치는 영향을 DCFH-DA assay로 확인하였다(그림 2). HepG2 세포에 t-BHP로 단독 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 대조군의 경우 25분간 처리 후 fluorescence의 값은 41,935로 나타내는 반면, 자색옥수수추출물 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 처리군의 fluorescence의 값은 38,224로 나타나는 것으로 분석되어 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 처리에 의해 증가한 ROS 생성이 감소하는 것으로 나타났음

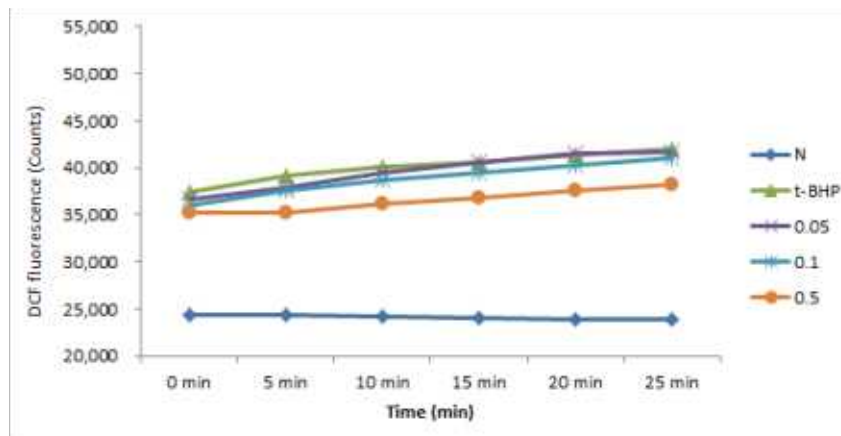


그림 2. 산화스트레스가 유도된 간암세포에서 ROS 생성 억제효과

- HepG2 세포주에서 hydrogen peroxide에 의해 유발된 산화스트레스 및 간세포 손상으로부터 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 처리에 의한 주요 항산화 효소들의 유전자 발현량을 realtime PCR로 분석하였음(그림 3). SOD-1, SOD-2, GPx, CAT, GCS, γ -GT, GR의 경우 hydrogen peroxide를 단독 처리한 대조군보다 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리 농도에서 각각

26%, 39%, 9%, 11%, 20%, 76%, 54% 높은 발현량이 분석되었으며, 농도가 증가함에 따라 항산화 효소 유전자의 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였음

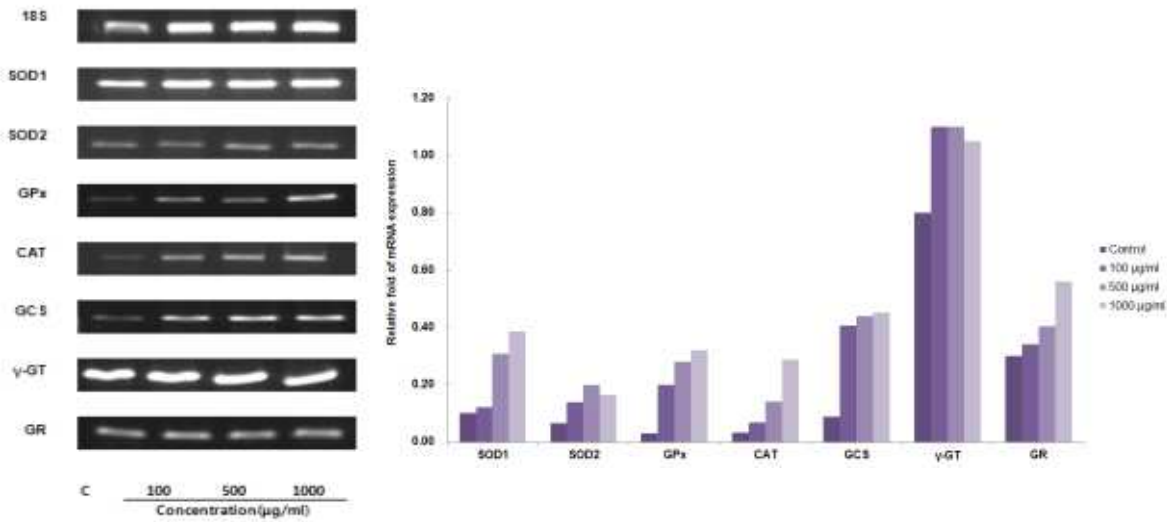


그림 3. 주요 항산화 효소들의 유전자 발현량 측정

나. 자색옥수수 포엽과 속대 추출물의 급성 간독성 보호효과 구명

- SD-rat 6주령 대상으로 4일간 추출물을 경구투여하고, 아세트아미노펜으로 급성 간독성유발 후, 혈청 및 조직을 분석하였음

표 6. 실험군 분리

Experimental group	Diet
Normal (N)	1% tween 80
Control (C)	1% tween 80 + APAP ¹⁾ 1.2 g/kg
Positive control (PC)	Sylimarine + APAP 1.2 g/kg
Treatment 1 (T1)	EHCP 0.1 mg/kg + APAP 1.2 g/kg
Treatment 2 (T2)	EHCP 1 mg/kg + APAP 1.2 g/kg
Treatment 3 (T3)	EHCP 10 mg/kg + APAP 1.2 g/kg
Treatment 4 (T4)	EHCP 100 mg/kg + APAP 1.2 g/kg

¹⁾ APAP : Acetaminophen

- SD-rat의 체중 측정결과, 정상군이 가장 높았으며, 나머지 처리군은 비슷한 수준이었음. 간의 무게의 경우, 정상군이 가장 낮았으며, 추출물 처리약량이 증가할수록 간의 무게는 감소하는 것으로 나타났음

표 7. 실험종료 후 간 및 신장 무게 변화 및 체중증가

Groups	Liver (g)	Kidney (g)	Body weight gain (g/day)
N	7.77 ± 0.49 ^a	1.92 ± 0.14	22.44 ± 4.25 ^b
C	8.46 ± 0.65 ^{ab}	1.89 ± 0.14	21.33 ± 2.74 ^{ab}
PC	8.77 ± 1.00 ^{bc}	2.01 ± 0.18	17.40 ± 3.60 ^a
T1	9.58 ± 1.11 ^c	2.05 ± 0.21	20.90 ± 7.26 ^{ab}
T2	8.69 ± 0.90 ^{ab}	1.95 ± 0.18	18.30 ± 2.63 ^a
T3	8.60 ± 0.97 ^{ab}	1.94 ± 0.10	21.00 ± 2.94 ^{ab}
T4	7.99 ± 0.91 ^{ab}	1.95 ± 0.25	18.70 ± 2.16 ^{ab}

- 실험종료 후, 복대정맥으로부터 채취한 혈청의 간독성지표인 AST와 ALT를 분석한 결과, 대조군에서 모두 통계적으로 가장 높은 함량이 측정되었으며, 자색 옥수수 포엽 및 속대 추출물 처리량이 증가할수록 AST와 ALT의 함량은 낮아지는 경향을 보였으며, AST의 함량의 경우 T4처리군이 정상군과 비슷한 수치를, ALT의 경우 T3와 T4의 함량이 정상군과 비슷한 수치를 나타냈음

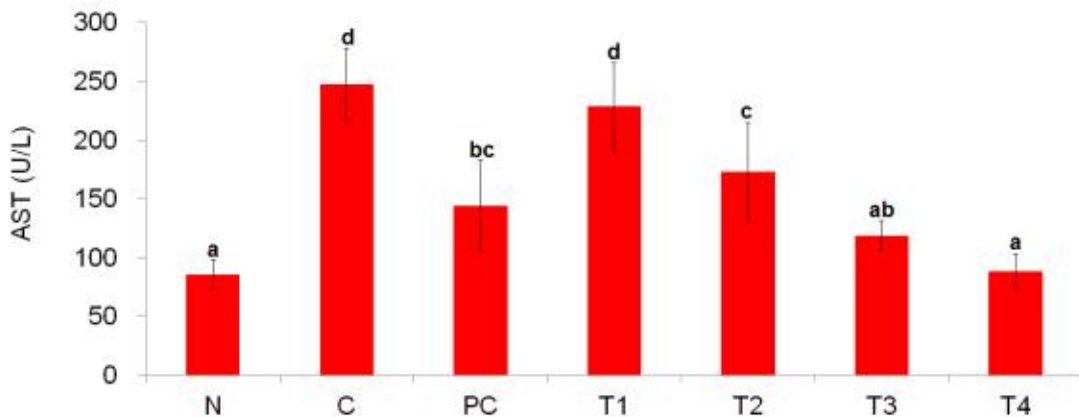


그림 4. 실험동물 혈청의 AST 함량

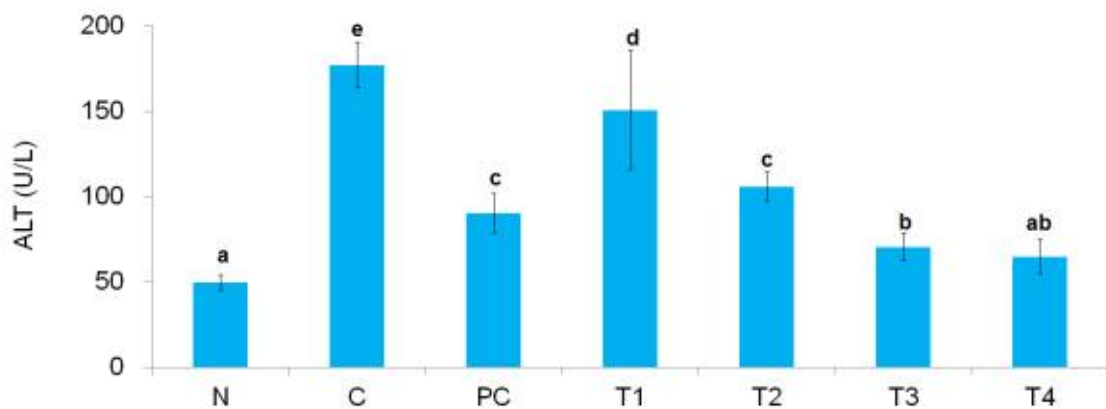


그림 5. 실험동물 혈청의 ALT 함량

- 아세트아미노펜을 투여한 랫드의 경우 간에서 관찰된 주요 병변으로는 간문맥 주변부 간세포의 괴사와 단핵구 염증세포 침윤이었고, 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 10 mg/kg(T3 군)과 100 mg/kg투여군(T4 군)에서는 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물이 아세트아미노펜에 의해 유도된 염증이 현격히 완화되었음

표 8. 처리군별 간조직 관찰결과 요약

(단위 : mg/kg)

CLASS	No treatment	Acetoaminophen treated groups					
		Vehicle	Purple corn extract treatment		sylimarin		
GROUPS	N	C	T1	T2	T3	T4	PC
DOSE TREATED	Normal	0	0.1	1.0	10	100	80
No. examined	5	5	5	5	5	5	5
No specific lesion	4(80.0)	1(20.0)	0(0.00)	0(0.00)	4(80.0)	5(100.0)	0(0.00)
Cell necrosis and inflammation, paracentral	1(20.0)	4(80.0)	5(100.0)	5(100.0)	1(20.0)	0(0.00)	5(100.0)
Grades: minimal (1+)	1	3	2	0	1	0	2
mild (2+)	0	1	3	5	0	0	3
Hemorrhage, centrilobular	0(0.00)	0(0.00)	1(20.0)	3(60.0)	1(20.0)	0(0.00)	0(0.00)
Grades: minimal (1+)	0	0	0	1	0	0	0
mild (2+)	0	0	0	1	1	0	0
moderate (3+)	0	0	1	1	0	0	0

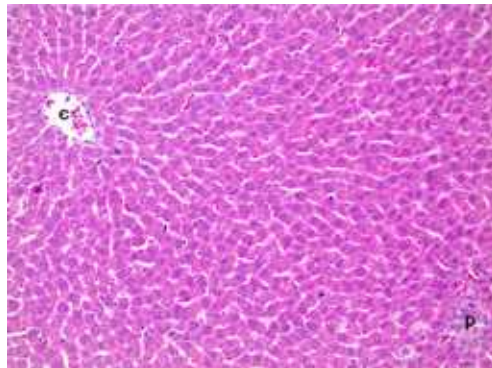


그림 6. 정상군의 간 조직 (N-3)

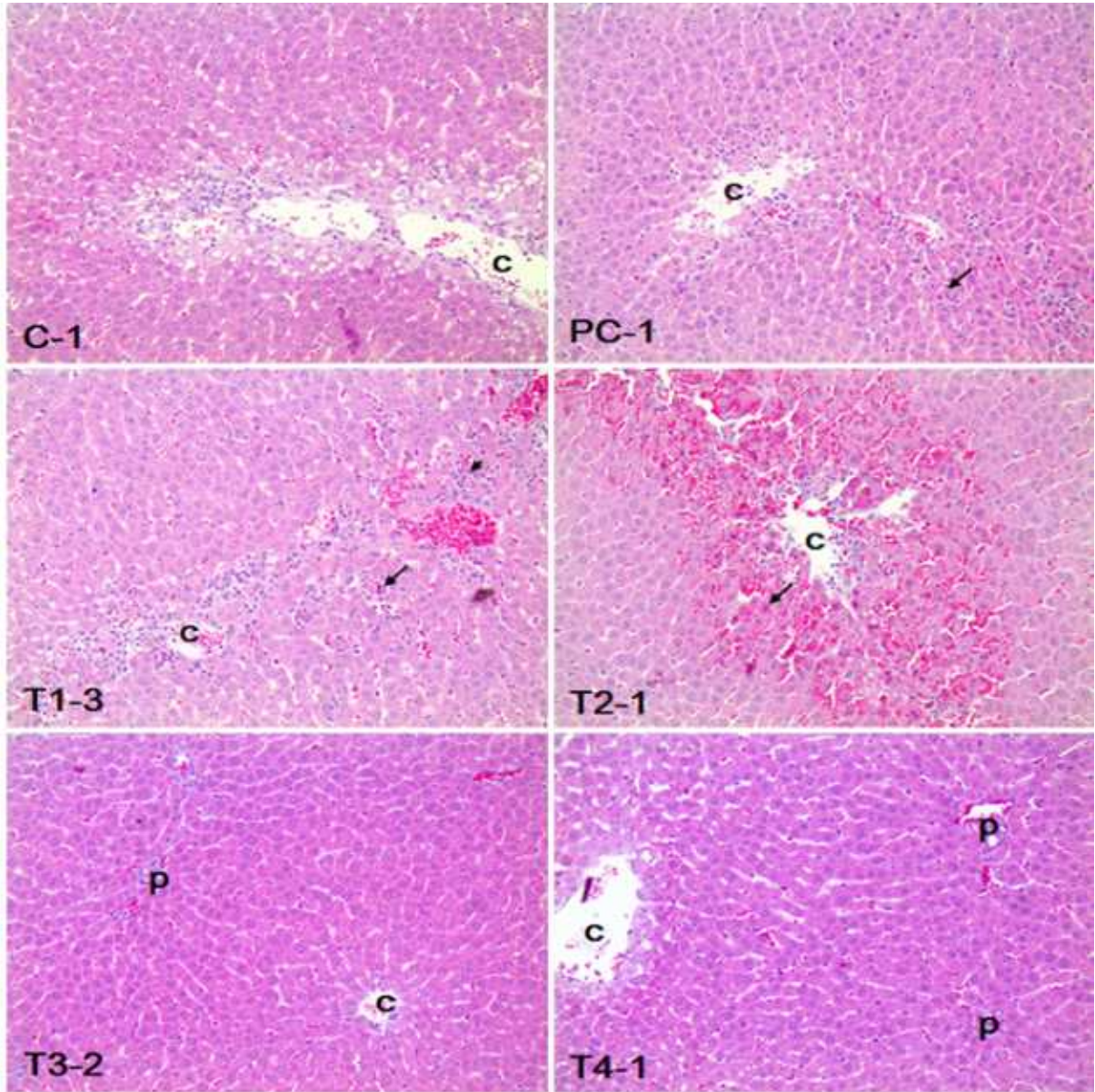


그림 7. 아세트아미노펜 처리군의 간조직 변화

(C-1 : 아세트아미노펜 처리군, PC-1 : 양성대조군, T1~T4 : 자색옥수수추출물 투여군)

다 .자색옥수수 포엽과 속대 추출물의 에탄올 투여 간독성 보호효과 구명

- SD-rat 5주령 대상으로 6주간 추출물과 에탄올을 표 9와 같이 경구투여하고, 시험종료 후, 혈청 및 간조직을 분석하였음

표 9. 실험군 분리

Experimental group	Diet
Normal (N)	water
Control (C)	25% Ethanol
Positive control (PC)	UDCA ¹⁾ + 25% Ethanol
Treatment 1 (T1)	EHCP 10 mg/kg + 25% Ethanol
Treatment 2 (T2)	EHCP 50 mg/kg + 25% Ethanol
Treatment 3 (T3)	EHCP 100 mg/kg + 25% Ethanol
Treatment 4 (T4)	EHCP 200 mg/kg + 25% Ethanol

¹⁾ UDCA : ursodeoxycholic acid

- 각 처리별로 체중을 매주 측정된 결과, 대조군은 통계적으로 감소하였으며, T2 처리군을 제외하고는 정상군과 비슷한 수준을 나타냄. 간의 무게는 정상군이 가장 높았으며, 대조군과 PC, T1처리군은 통계적으로 낮았음

표 10. 시험군별 간, 신장 무게 및 체중증가

Groups	Liver (g)	Kidney (g)	Body weight gain (g/day)
N	2.81 ± 0.21 ^b	2.53 ± 0.28 ^b	5.63 ± 0.93 ^{ab}
C	2.50 ± 0.07 ^a	2.30 ± 0.14 ^a	5.01 ± 0.49 ^a
PC	2.54 ± 0.07 ^a	2.44 ± 0.23 ^a	5.46 ± 0.77 ^{ab}
T1	2.56 ± 0.14 ^a	2.23 ± 0.16 ^a	5.16 ± 0.67 ^{ab}
T2	2.79 ± 0.20 ^b	2.45 ± 0.23 ^{ab}	5.84 ± 0.38 ^b
T3	2.62 ± 0.12 ^{ab}	2.39 ± 0.11 ^a	5.37 ± 0.37 ^{ab}
T4	2.67 ± 0.17 ^{ab}	2.41 ± 0.21 ^{ab}	5.26 ± 0.38 ^{ab}

- 시험종료 후, 복대정맥으로부터 채취한 혈청의 간독성지표인 AST와 ALT를 분석한 결과, 대조군에서 모두 통계적으로 가장 높은 함량이 측정되었으며, 처리군 모두 대조군보다는 낮고 정상군과 비슷한 수준으로 자색옥수수 포엽 및 속대 추출물 투여로 인해 알코올유발 간독성 보호 효과를 확인하였음

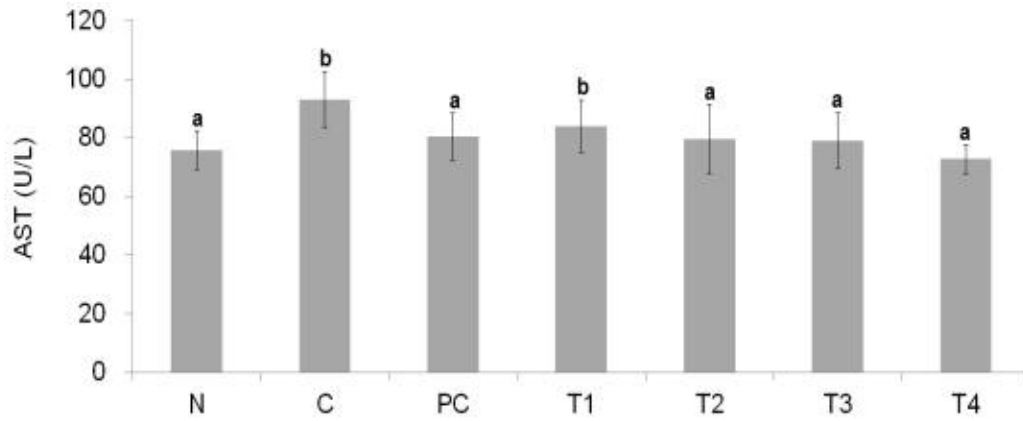


그림 8. 자색옥수수추출물 투여에 의한 혈중 AST 변화

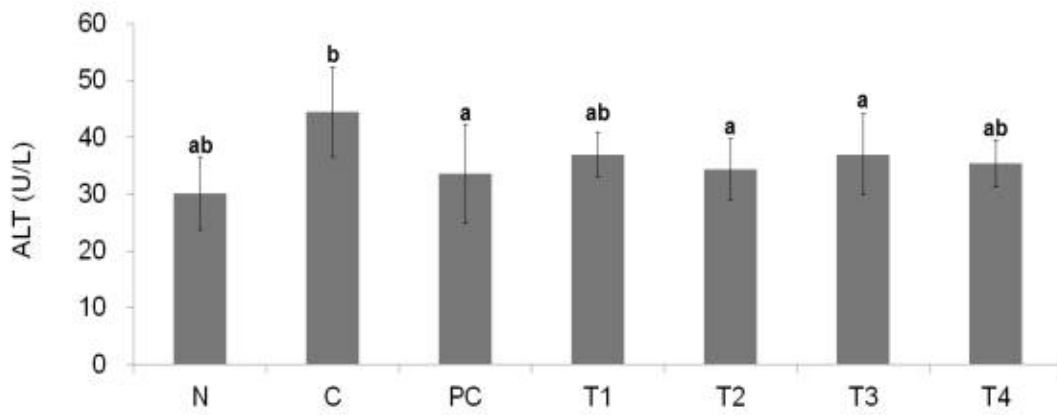


그림 9. 자색옥수수추출물 투여에 의한 혈중 ALT 변화

3. 적 요

<제2세부과제 : 자색옥수수포엽 추출물의 간보호 효능 검정>

(시험1) 옥수수 포엽 및 속대 생산을 위한 표준재배법 개발

가. 시비량에 따른 생육 및 색소함량

- 시비량에 따른 포엽건조중은 무비에서 수량이 가장 적었고, 50/150 시험구에서 가장 컸고, C3G 색소 함량도 0.70%로 가장 높았음. 속대 건조중은 뚜렷한 경향은 없었고, 색소함량도 무비를 제외하고는 0.18~0.19%로 큰 차이 없었음

나. 1차이삭 수확시기에 따른 수량 및 색소함량

- 1차이삭 수확시기에 따른 포엽 및 속대 건조중은 큰 차이가 없었으나, C3G 함량은 출사후 32일의 속대의 C3G함량이 0.36%로 가장 높았음

다. 2차이삭 수확시기에 따른 수량 및 색소함량

- 2차이삭 수확시기에 따른 포엽 및 속대 건조중은 큰 차이가 없었으나, 포엽은 1차이삭 수확 후 6일 이후부터 C3G 함량이 감소하였음

(시험2) 자색옥수수포엽 및 속대추출물의 효능검정

가. 시험관실험

- 자색옥수수포엽/속대 추출물의 DPPH와 ABTS radical 소거능을 측정한 결과, DPPH radical 소거활성은 1 µg/ml의 농도에서, ABTS radical 소거활성은 0.5 µg/ml의 농도에서 90%이상이었음
- In vitro 상에서 HepG2 세포내 산화적 스트레스에 대한 억제효과를 검정한 결과, 자색옥수수포엽 및 속대추출물의 농도가 증가함에 따라 항산화 효소 유전자의 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였음

나. 동물실험

- 아세트아미노펜 유도 급성간독성 모델 간독성 보호효과를 검정한 결과, 옥수수포엽 및 속대 추출물 처리량이 증가할수록 AST와 ALT의 함량은 낮아지는 경향을 보였음
- 에탄올 투여 간독성 보호효과를 검정한 결과, 자색옥수수포엽 및 속대 추출물 투여로 인해 알코올유발 간독성 보호 효과를 확인함

IV. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제목
2017(1년)	학술발표	자색옥수수수포엽 추출물의 항산화 활성
	학술발표	급성간독성모델에서 자색옥수수추출물의 간보호효과
2018(2년)	학술발표	고지방-고콜레스테롤 식이로 유발된 지방간증에서의 자색옥수수 추출물의 간보호효과
	논문게재	자색옥수수수포엽 추출물의 항산화 활성
2019(3년)	학술발표	급성간독성모델에서 자색옥수수추출물의 간보호효과
	논문게재	고지방-고콜레스테롤 식이로 유발된 지방간증에서의 자색옥수수 추출물의 간보호효과

V. 기대 및 파급효과

- 한정되고 관리된 원료의 생산 및 고품질화로 추출물의 고기능성, 시장가격의 통제를 통한 고부가가치 제품으로의 개발이 가능하여 기업의 성장을 견인예상
- 색소옥수수 특화된 단지의 조성을 통하여 관련 농가의 소득향상에 기여