

어젠다코드	1 - 7 - 22		구 분	세부완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S04	작목구분코드	PG-03-PG31
과제종류	기관고유		세세부사업	-	
연구과제 및 세부과제			수행기간	과제책임자 및 세부책임자	
자생식물 자원화 기반 구축			'09~'13	농식품연구소	김희연
식물기원 추출물 은행 및 생리활성 library 작성			'09~'13	농식품연구소	김희연
색인용어	자원식물, 추출물				

ABSTRACT

We collected native plants in Gangwon-do of Korea. The native plants were extracted by water and ethanol and registered plant extract bank. In the anti-cancer activity, the growths of both human prostate cancer (DU145) and human colonic carcinoma cell (HT29) were inhibited up 80% by adding 10 mg/ml of plant extracts. Antioxidative activity of plant extracts were determined DPPH radical scavenging activity and SOD-like activity. Anti-inflammatory activity of plant extracts have been evaluated on lipopolysaccharide (LPS) induced release of nitric oxide (NO) by the macrophage RAW 264.7 cells. The selected extracts could be potentially used as a resource of bioactive materials for health functional foods.

1. 연구목표

천연 재료를 활용한 산업제품이 소비트렌드로 굳어져 고부가가치 산업화하고 있으며, 식물자원이 다양한 강원도의 전략산업으로 유망하다. 천연물연구의 효율적 추진을 위하여 식물기원 및 소재의 표준화, 추출물 은행 운영, 효율적이고 정확한 시료의 원활한 공급 등 통합적 연구지원 시스템 구축과 새로운 소재탐색의 기초자료로 활용될 1차 스크리닝 작업이 필요하다.

2. 재료 및 방법

(시험 1) 자생 식물의 수집 및 표본 제작

가. 식물 수집

국내자원은 강원도 자생식물을 중점적으로 수집하였으며, 국외자원은 중국 흑룡강성에 서식하고 있는 기능성 초본과 목본을 수집하였다. 명확한 동정과 지속적인 채집이 어려울 경우 시료와 함께 대부분 종묘나 종자 형태로 같이 수집하여 농식품연구소 유전자원포에 식재해두고, 이용부위, 채취시기에 따라 시료 채집하고, 개화기에 완전표본 제작을 통하여 명확한 식물분류·동정에 사용하였다.

나. 식물 표본 제작

채집한 시료는 채집식물의 크기에 따라 거꾸로 된 형태의 V자, N, M자형으로 적절하게 꺾어서 신문지 4절 안에 들어올 수 있는 크기로 잘 펴서 누르며, 흡습지(시판 압화건조용품 활용)를 표본과 표본 사이에 두고 야책으로 단단히 눌러서 냉풍제습건조기에서 건조하였다. 건조된 표본은 표본용 폴을 이용하여 대지에 부착시키고, 채집 위치, 일시, 채집자 명등을 기입하여 표본보관함에 보관하였다.

(시험 2) 추출물 조제 및 보관

가. 시료 추출 및 조제

본 실험에 사용한 자생식물 시료는 채취 후 동결건조(PVTFD10R, Ilshin, Yangju, Korea)하여 사용하였다. 시료 추출 용매는 물과 에탄올을 사용하였다. 물 추출은 분말 시료 20 g에 1차 증류수 200 ml를 첨가하여 60°C에서 6시간 동안 초음파추출기(8510R-DTH, Branson, Danbury, CT, USA)를 이용하여 2회 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 2, Whatman, Maidstone, England)가 깔려있는 Buchner funnel을 통과시켜 잔재물을 제거한 후 감압여과 하여 rotary vacuum evaporator (N-21NS, EYELA, Tokyo, Japan)로 완전히 농축하였다. 농축이 완료된 후 건조물은 증류수 10 ml를 첨가하여 용해시킨 후, 동결건조 하여 -20°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 에탄올 추출은 분말 시료 20 g에 에탄올 200 ml를 첨가하여 상온에서 120 rpm의 진탕기에서 12시간 동안 2회 추출하였다. 농축 후 시료 제조 과정은 상기와 같다.

나. 추출물 보관 및 추출물 은행 등록

추출물은 수율에 따라 1~5g 내외 수준으로 확보하여 25 ml 바이알에 보존하며, 추출물 등록번호, 용량을 정확하게 표기하여 -20°C에서 저온 보관하였다.

① 유전자원등록관리대장

- G0001~(숫자 앞자리는 수집연도, 나머지 세자리는 일련번호)

② 표본등록대장

- 식물표본 : GWAP0001~(숫자 앞자리는 수집연도, 나머지 세자리는 일련번호)

③ 추출물등록대장

- 등록번호 : 수집용도별 일련번호 기입관리
 - GWAPW0001~ : 자원식물 물 추출물(25°C, 초음파 추출 6h)
(GWAP:강원도농업기술원 농식품연구소, W:Water, E:EtOH)

(시험 3) 기능성 탐색

가. 항암 활성 검정

293 cell, HT-29 cell, DU-145 cell을 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 배양 하면서 실험에 사용하였다. 배양된 세포는 96 well plate에 1×10⁴ cells/ml가 되도록 100 μl씩 분주하여 37°C CO₂ Incubator에서 48시간 배양 하였다. 배지를 제거한 후, serum free 배지 90 μl를 넣고

각 농도별로 조제한 시료를 10 μ l씩 분주 하였으며, 37°C CO₂ Incubator에서 24시간 배양 하였다. 여기에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)용액 20 μ l를 첨가하여 동일한 배양조건에서 4시간 동안 더 incubation하였다. 이때 생성된 formazan결정을 DMSO에 녹여서 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정 하였다(Wang 등 2006)

$$\text{생존율(\%)} = (1\text{-시료 처리군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

나. 항산화 활성 검정

항산화 활성은 DPPH radical에 대한 소거활성과 SOD(superoxide dismutase) 유사활성 으로 측정했으며, Biois의 방법(1958)과 Lee 등의 방법(2009)을 변형하여 측정하였다. 각 농도별로 조제한 시료 0.2 ml에 0.2 mM의 DPPH 용액 0.8 ml를 가하여 혼합한 뒤 상온에서 30분 간 반응시킨 후 UV-visible spectrophotometer(DU 730, Beckman Coulter, Fullerton, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정 하였고, 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였다. DPPH radical 소거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었으며, 기존의 항산화제인 Ascorbic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 대조물질로 사용하여 비교 하였다.

$$\text{DPPH radicals scavenging activity(\%)} = (1\text{-시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

SOD 유사활성은 각각의 추출물 시료 0.2 mL과 Tris-HCl(pH 8.5) 3 mL 및 7.2 mM pyrogallol(Sigma) 0.2 mL을 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응 후 1 N HCl 1 mL을 가하여 반응을 정지시키고, UV/VIS spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정한다. SOD 유사활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

다. 항염 활성 검정

NO 소거활성은 Park 등의 방법(2010)에 따라 한국 세포주 은행에서 분양받은 마우스의 대식세포 세포주인 Raw264.7 세포를 이용하여 측정하였다. 세포는 10%의 FBS가 함유된 DMEM media에서 계대배양하였다. NO 소거활성을 측정하기 위하여 세포를 24 well plate 에 각 well당 1 × 10⁵ cells을 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 그리고 final 농도를 10 mg/ml로 조제한 sample과 1 μ g/ml의 lipopolysaccharide(LPS) 20 μ l를 세포배양 well에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 시료에 대한 대조구로는 1 μ g/ml의 LPS만을 20 μ l처리하여 활성화된 세포를 사용하였다. 배양 후 상정액 100 μ l를 회수하고 여기에 2-naphthylamine이 포함된 Griess solution(Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)을 첨가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 상정액의 발색도를 ELISA reader(ASYS UVM-340, Biochrom Asys, Slazburg, Austria)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포가 생산한 NO는 sodium nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 NO 함량을 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

(시험 1) 수집 시료 목록

식물명	학 명
각시서덜취	<i>Saussurea macrolepis</i> (Nakai) Kitam.
각시원추리	<i>Hemerocallis dumortieri</i> Morren
각시취	<i>Saussurea pulchella</i> (Fisch.)Fisch.
개시호	<i>Bupleurum longeradiatum</i> Turcz.
고광나무	<i>Philadelphus schrenkii</i> Rupr. var. <i>schrenkii</i>
고려엉겅퀴	<i>Cirsium setidens</i> (Dunn) Nakai
고추나물	<i>Hypericum erectum</i> Thunb.
곤달비	<i>Ligularia stenocephala</i> (Maxim.) Matsum.&Koidz.
곤드레	<i>Cirsium setidens</i> (Dunn) Nakai
곰취	<i>Ligularia fischeri</i> (LEDES) TURCZ.
광대싸리	<i>Securinega suffruticosa</i> (Pall.) Rehder
구릿대	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch.exHoffm.) Benth.&Hook.f. ex Franch.&Sav.
기린초	<i>Sedum kamtschaticum</i> Fisch. & Mey.
꿀풀	<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i> Nakai
평의다리	<i>Thalictrum aquilegifolium</i> var. <i>sibiricum</i> Regel & Tiling
나비나물	<i>Vicia unijuga</i> A.Braun
냉이	<i>Capsella bursapastoris</i> (L.) L.W.Medicus
노랑민들레	<i>Taraxacum ohwianum</i> Kitam.
노루오줌	<i>Astilbe rubra</i> Hook.f. & Thomson var. <i>rubra</i>
누룩치	<i>Pleurospermum camtschaticum</i> Hoffm.
논쟁이냉이	<i>Cardamine komarovii</i> Nakai for. <i>komarovii</i>
다래나무	<i>Actinidi aarguta</i> (Siebold&Zucc.) Planch. ex Miq. var. <i>arguta</i>
단풍취	<i>Ainsliaea acerifolia</i> Sch. Bip.
달맞이꽃	<i>Oenothera biennis</i> L.
담배풀	<i>Carpesium abrotanoides</i> L.
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i> (Siebold & Zucc.) Trautv.
돌나물	<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge
돌단풍	<i>Mukdenia rossii</i> (Oliv.) Koidz.
돌미나리	<i>Oenanthe javanica</i> (Blume) DC.
동의나물	<i>Caltha palustris</i> L. var. <i>palustris</i>
두릅	<i>Aralia elata</i> (Miq.) Seem.
땅두릅	<i>Aralia cordata</i> Thunb.
수리취	<i>Synurus palmatopinnatifidus</i> var. <i>indivisus</i> (Makino) Kitam.
뚝갈	<i>Patrinia villosa</i> (Thunb.) Juss.

식물명	학 명
마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.
만병초	<i>Rhododendron brachycarpum</i> D. Don ex G.Don
머위	<i>Petasites japonicus</i> (Siebold & Zucc.) Maxim.
모시대	<i>Adenophora remotiflora</i> (Siebold & Zucc.) Miq.
울릉도 영경귀	<i>Cirsium nipponicum</i> (Maxim.) Makino
돌미나리	<i>Oenanthe javanica</i> (Blume) DC.
미역취	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>asiatica</i> Kitam. ex Hara var. <i>asiatica</i>
박쥐나물	<i>Parasenecio auriculata</i> var. <i>matsumurana</i> Nakai
방가지뚱	<i>Sonchus oleraceus</i> L.
버들나물	<i>Hieracium umbellatum</i> L.
범꼬리	<i>Bistorta major</i> S.F. Gray var. <i>japonica</i> Hara
병풀(말굽)	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.
병풍쌈	<i>Parasenecio firmus</i> (Kom.) Y.L.Chen
부처꽃	<i>Lythrum anceps</i> (Koehne) Makino
비비추	<i>Hosta longipes</i> (Franch. & Sav.) Matsum.
뼈국채	<i>Rhapontic umuniflorum</i> (L.) DC.
사철쭉	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.
산마늘	<i>Allium victorialis</i> var. <i>platphyllum</i> MAKINO.
산미나리	<i>Aegopodium podagraria</i> L.
산쌈바귀	<i>Lactuca raddeana</i> Maxim.
삼주	<i>Atractylodes japonica</i> KOIDZ.
생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i> Blume var. <i>obtusiloba</i>
서덜취	<i>Saussurea grandifolia</i> Maxim.
서양민들레	<i>Taraxacum officinale</i> Weber
섬오갈피	<i>Eleutherococcus gracilistylus</i> (W.W.Sm.) S.Y.Hu
섬초롱	<i>Campanula takesimana</i> Nakai
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i> L.
수박풀	<i>Hibiscus trionum</i> L.
시호	<i>Bupleurum falcatum</i> var. <i>scorzoneraefolium</i> (Willd.) Ledeb.
싱아	<i>Aconogonon alpinum</i> (All.)S chur
싸리나물(싸리)	<i>Lespedeza bicolor</i>
쭉부쟁이	<i>Aster yomena</i> (Kitam.) Honda
쌈바귀	<i>Ixeridium dentatum</i> (Thunb. ex Mori) Tzvelev
어수리	<i>Heracleum moellendorffii</i> Hance
얼레지	<i>Erythronium japonicum</i> (Balrer) Decne.
영경귀	<i>Cirsium japonicum</i> var. <i>maackii</i> (Maxim.) Matsum.
영아자	<i>Asyneuma japonicum</i> (Miq.) Briq.

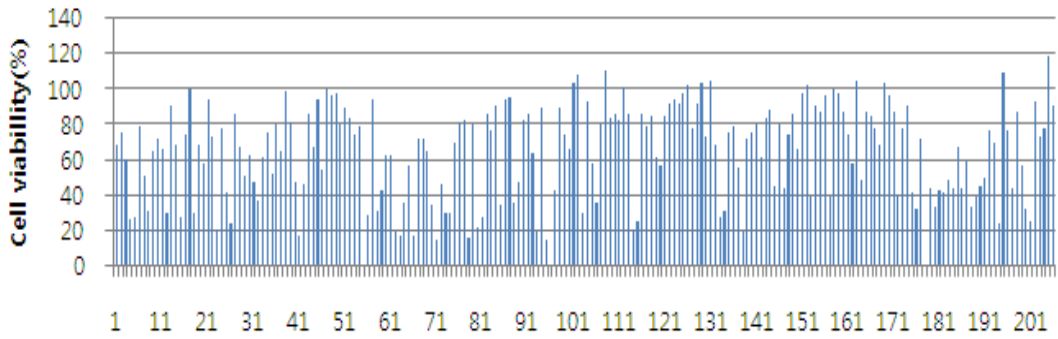
식물명	학 명
오이풀	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.
우산나물	<i>Syneilesis palmata</i> (Thunb.) Maxim.
원추리	<i>Hemerocallis fulva</i>
으아리	<i>Clematis terniflora</i> var. <i>mandshurica</i> (Rupr.) Ohwi
음나무	<i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb. ex Murray) Koidz.
응달고사리	<i>Cornopteris crenuloserrulata</i> (Makino) Nakai
이고들빼기	<i>Crepidiastrum denticulatum</i> (Houtt.) Pak & Kawano
잔대	<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i> (Regel) H.Hara
좁쌀풀	<i>Lysimachia vulgaris</i> var. <i>davurica</i> (Ledeb.) R.Kunth
취뽕나무	<i>Ligustrum obtusifolium</i> Siebold & Zucc.
지리산오갈피	<i>Eleutherococcus divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i> (Nakai) C.H.Kim & B.Y.Sun
진범	<i>Aconitum pseudolaeve</i> Nakai
질경이	<i>Plantago asiatica</i> L.
짚신나물	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.
참나물	<i>Pimpinella brachycarpa</i> (Kom.) Nakai
참당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai
참쑥	<i>Artemisia dubia</i> Wall.
참으아리	<i>Clematis terniflora</i> DC.
کم프리	<i>Symphytum officinale</i> L.
큰까치수염	<i>Lysimachia clethroides</i> Duby
큰미역취	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>gigantea</i> (Nakai) Kitam.
톱풀	<i>Achillea alpina</i> L.
파드득	<i>Cryptotaenia japonica</i> Hassk.
풀고비	<i>Athyrium yokoscense</i> (Franch. & Sav.) H.Christ
풀솨대	<i>Smilacina japonica</i> A.Gray var. <i>japonica</i>
할미질빵	<i>Clematis trichotoma</i> Nakai
홀아비꽃대	<i>Chloranthus japonicus</i> Siebold
활나물	<i>Crotalaria sessiliflora</i> L.
흰민들레	<i>Taraxacum coreanum</i> Nakai

(시험 2) 기능성 탐색

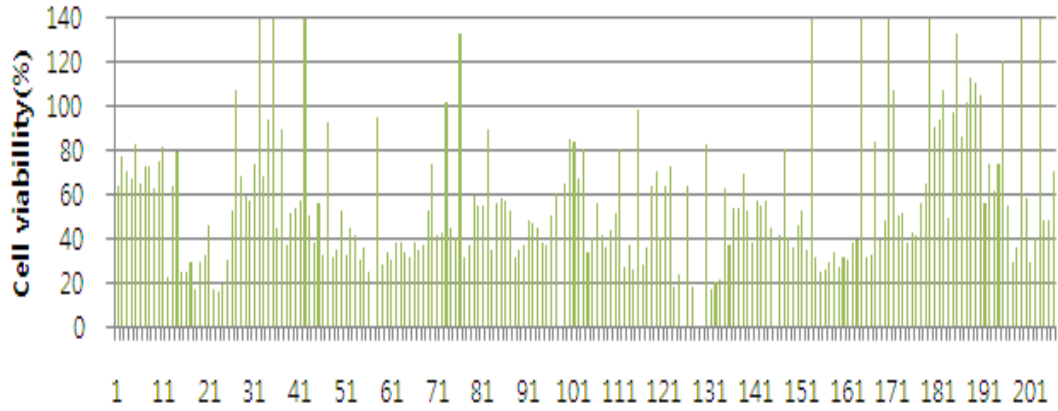
가. 항암활성 소재 탐색

자원식물 205종 용매별 410점 대상으로 정상세포, 전립선암, 장암세포 활성을 검정한 결과 GWAP8044 등 물 추출물 12종, 에탄올 추출물 14종 선발되었다.

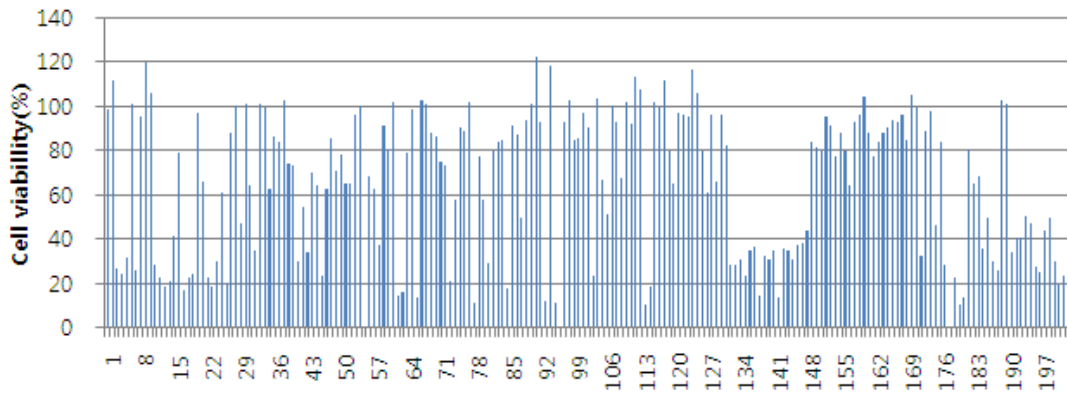
정상세포(293)-water extracts



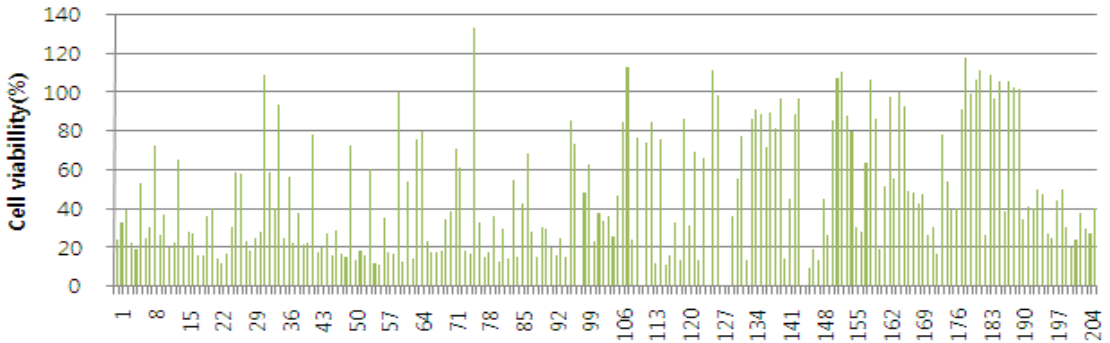
정상세포(293)-ethanol extracts



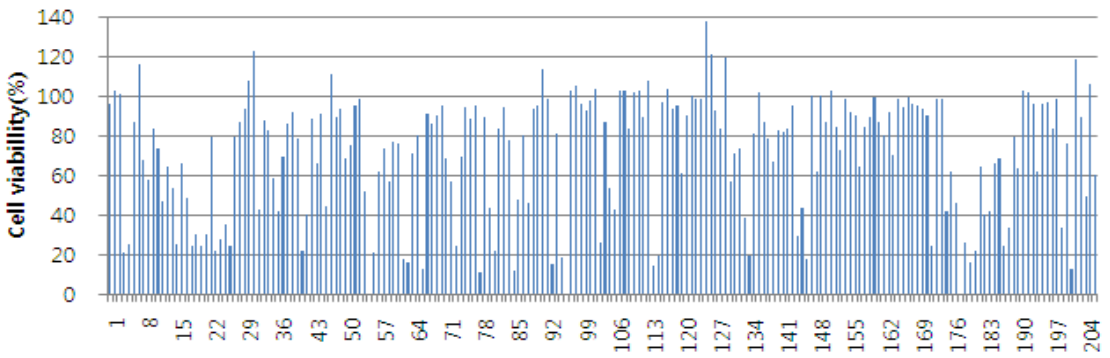
전립선암세포(DU-145)-water



전립선암세포(DU-145)-ethanol



장암세포(HT-29)-water



장암세포(HT-29)-ethanol

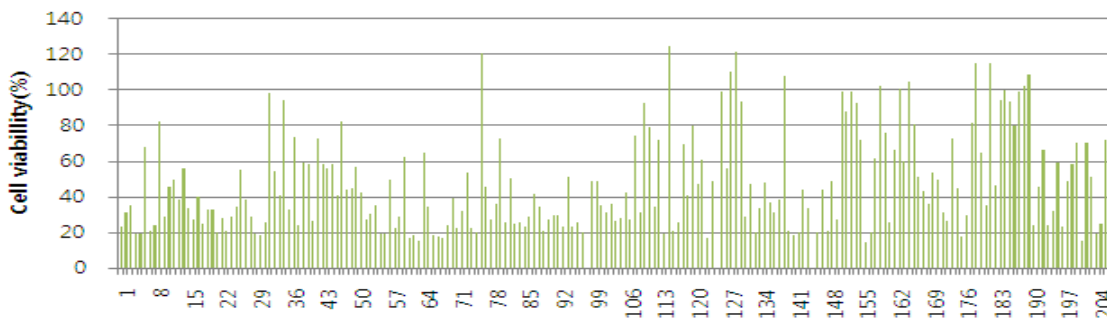
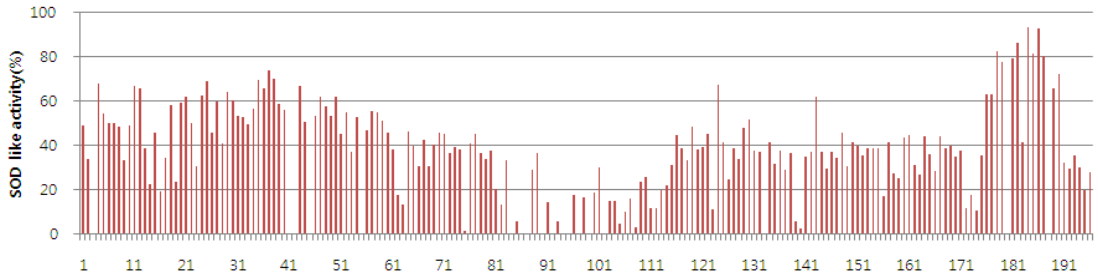


그림 5. 항암활성 결과

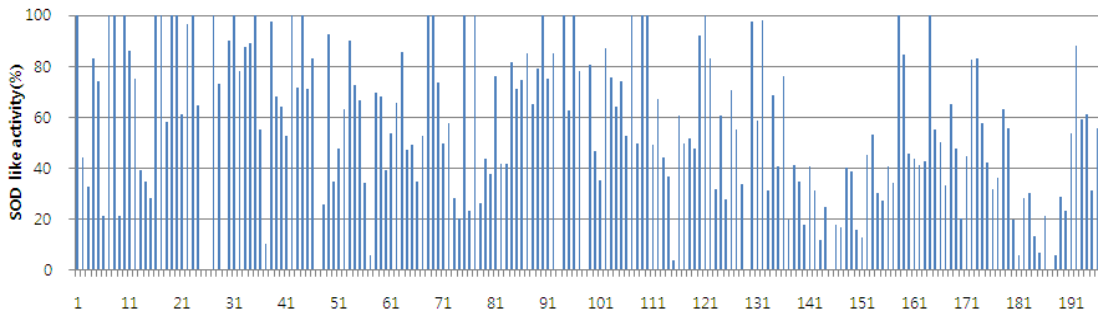
나. 항산화활성 소재 탐색

자원식물 205종 용매별 410점 대상으로 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사활성을 검정한 결과 GWAP8058 등 물 추출물 4종, 에탄올 추출물 4종 선발되었다.

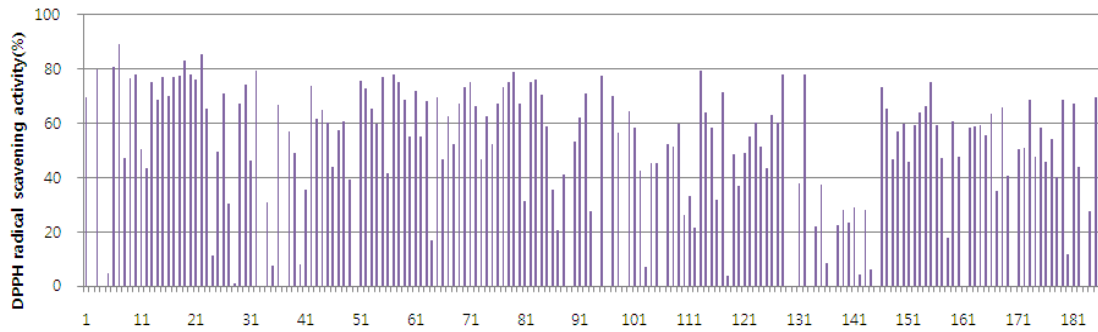
SOD -water extracts



SOD-ethanol extracts



DPPH-water extracts



DPPH-ethanol extracts

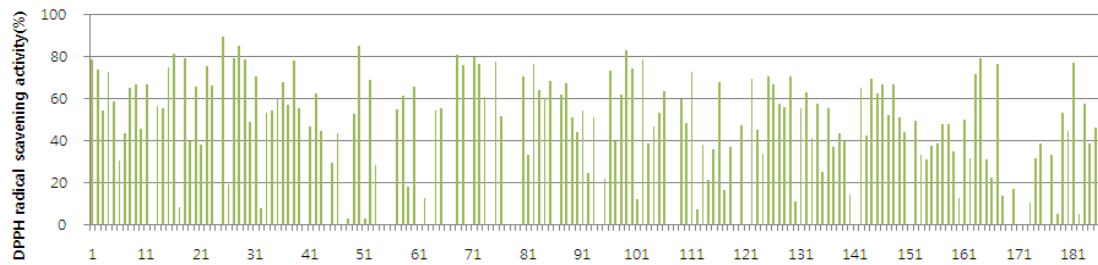


그림 6. 항산화활성 결과

다. 항염활성 소재 탐색

자원식물 205종 용매별 410점 대상으로 NO 생성능을 검정한 결과 GWAP0401 등 14 종 선발되었다.

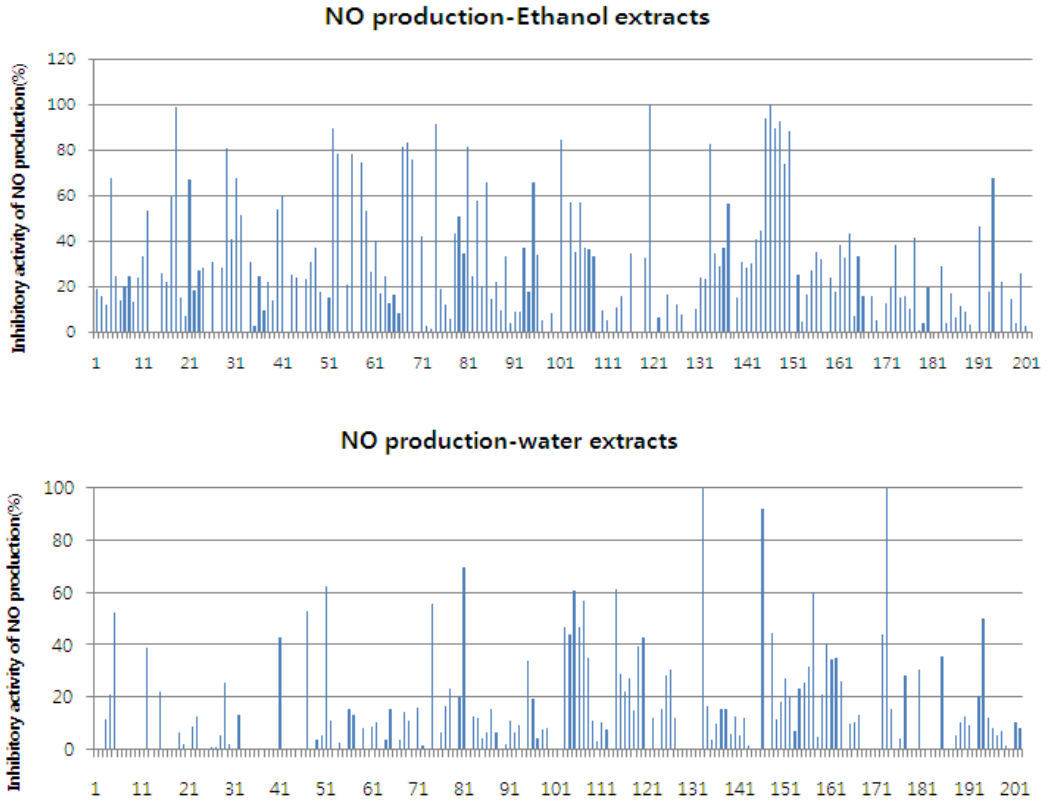


그림 7. 항염활성 결과

4. 적 요

가. 강원도에 서식하는 기능성 초본과 목본을 수집·추출하여 천연물 추출물 은행을 구축함
나. 자원식물 205종 용매별 410점 대상으로 항암 활성을 검정한 결과 GWAP8044 등 물 추출물 12종, 에탄올 추출물 14종이 선발되었고, 항산화 활성 검정결과 GWAP8058 등 물 추출물 4종, 에탄올 추출물 4종이 선발되었고, 항염활성 검정결과 GWAP0401 등 14종이 선발되었음

5. 인용문헌

Wang HZ, Chang CH, Lin CP and Tsai MC. 2006. Using MTT viability assay to test the cytotoxicity of antibiotics and steroid to cultured porcine corneal endothelial

cells. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 12:35-43.

Park YH, Lim SH, Ham HJ, Kim HY, Jeong HN, Kim KH and Kim S. 2010. Isolation of anti-inflammatory active substance β -sitosterol from seabuckthorn(*Hippophae rhamnoides* L.) stem. Journal of Korean Society Food Science Nutrition. 39:980-985.

Biois MS. 1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 26:1198-1201.

Lee KJ, Park MH, Seo HT, Park YH, Kwon CJ, Lim SH, Kim KH, Jeon SJ and Won JH. 2009. Screening of biological activities of ethanol extracts from several varieties of endives. The Korean Society Food Reservation. 16:1008-1012.

6. 연구결과 활용

천연물 연구과제에 추출물을 지원하고 결과 활용은 지원하는 과제의 결과활용에 따름

7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도		
					'11	'12	'13
과제책임자	농식품연구소	농업연구사	김희연	과제 수행	○	○	○
공동연구자	"	"	김시창	"	-	-	○
"	"	농업연구관	허남기	과제 지원	○	○	-
"	"	농업연구사	이광재	생리활성 탐색	○	○	-
"	"	연구원	박유화	추출물 조제	○	-	-
"	"	"	함현주	"	○	-	-
"	"	"	이기연	생리활성 탐색	○	○	○
"	"	"	홍수영	추출물 조제	○	○	○