

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ010156)

들깨 유래 기능성 물질 탐색 및 평가 연구

(Identification of functional substance in perilla)

국립식량과학원

연구수행기간

2014.02 ~ 2016.12

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “들깨 유래 기능성 물질 탐색 및 평가 연구”(개발기간 : 2014.02. ~ 2016. 12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 들깨 리놀렌산 고함유 자원 선발 및 리놀렌산 함량에 따른 저장안전성 연구
제1협동연구과제 : 들기름 내 리놀렌산 정제기술 개발 및 저장 안전성 연구
제2협동연구과제 : 들깨 리놀렌산의 인지능개선 *in vitro* 및 *in vivo* 실험 및 작용 메카니즘연구

2017. 02. 28.

제1세부연구기관명 : 국립식량과학원

제1세부연구책임자 : 이명희

참 여 연 구 원 : 이명희, 배석복, 김성업, 오은영, 오기원, 여운상

제1협동연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단

제1협동연구책임자 : 이상현

참 여 연 구 원 : 이상현, 조성훈, 이재민, Joyce rodriguez, 이강희, 진태후, 이동우

제2협동연구기관명 : 부산대학교 산학협력단

제2협동연구책임자 : 조은주

참 여 연 구 원 : 조은주, 이아영, 김지현

주관연구책임자 : 이 명 희

주관연구기관장 : 국립식량과학원장

직인

농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제번호	PJ010156		연구기간	2014.02.01.~2016.12.31	
연구사업명	단위사업명	현장실용화농업기술			
	세부사업명	농축산물 부가가치 향상 기술개발			
	내역사업명	농축산물 수확후 관리 및 가공기술개발			
연구과제명	주관과제명	들깨 유래 기능성 물질 탐색 및 평가 연구			
	세부(협동) 과제명	(1세부) 들깨 리놀렌산 고함유 자원 선발 및 리놀렌산 함량에 따른 저장안전성 연구 (1협동) 들기름 내 리놀렌산 정제기술 개발 및 저장 안전성 연구 (2협동) 들깨 리놀렌산의 인지능개선 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 실험 및 작용 메카니즘연구			
연구책임자	구분	연구기관		소속	성명
	1세부	국립식량과학원		발작물개발과	이명희
	1협동	중앙대학교		생명자원공학부	이상현
	2협동	부산대학교		식품영양학과	조은주
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 16명 내부: 6명 외부: 10명		총 연구개발비	정부: 555,000천원 민간: 천원 계: 555,000천원	
위탁연구기관명 및 연구책임자			참여기업명		
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
요약				보고서 면수	

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 들깨 유전자원의 농업적 특성 및 지방산 분석 조사를 통해 우수자원을 선발하고, 리놀렌산 함량에 따른 산가 변이 분석을 통해 들기름의 저장안정성을 분석하고자 함 ○ 들기름 내 리놀렌산 정제기술 개발 ○ 들기름 및 들깨로부터 분리 정제한 리놀렌산의 건강 기능성 평가 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 들깨 유전자원으로부터 농업적 특성 및 지방산 우수 자원을 선발하였음 ○ 들기름 내 리놀렌산 함량에 따른 산가 분석을 통해 안전 보관 기간을 설정하였음 ○ 들깨로부터 분리 정제한 리놀렌산 기능성 성분을 이용하여 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>에서 인지능 개선 등 건강 기능성을 평가하고, 그 메커니즘을 규명하여 독성과 부작용이 없는 들깨 유래 기능성 식품 소재로서의 과학적 근거를 제시 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발된 자원을 들깨 육종시 교배 모본으로 활용 ○ 기능성 고함유 들깨 자원의 산업적 활용으로 부가가치 향상 ○ 들기름 건강기능성 및 안전 보관방법에 대한 지속적인 홍보를 통해 대국민 신뢰 향상 				
중심어 (5개 이내)	들깨	리놀렌산	인지능	기능성	저장안정성

〈 Summary 〉

Purpose& Contents	<p>Perilla is one of major oilseed crops, its consumption has been increasing trend for edible seed powder, oil and vegetable leaves in Korea. This study was performed to investigate the agricultural characteristics, oil contents and fatty acid compositions of perilla germplasms, and select useful resources for the development of high yield and good quality fatty acid varieties. It was also measured on acidity change for oil storage conditions.</p> <p>And this study is to investigate the effect of alpha-linolenic acid (ALA) isolated from <i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i> on cognitive ability and its protective mechanisms. Also, the potential of ALA as functional foods with protective activity against Alzheimer's disease (AD)</p>
----------------------	---

Results	<p>This study analyzed were 235 perilla germplasms from National agrobiodiversity center.</p> <p>The seed lipid contents of perilla germplasms ranged from 26.5~51.8% and average content was 41.2%. Linolenic acid content of which major fatty acids ranged from 57.6~66.5% and average was 62.7%.</p> <p>Perilla oil was measured on acidity change fo oil storage conditions. The perilla oil oxidized during storage at 25℃ in the dark, and there was change up after 20 weeks of storage.</p> <p>Perilla oil and ALA showed anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-cancer and neuro-protective effect and Perilla oil and ALA administration showed improvement amyloid beta-injected cognitive dysfunction in AD mouse model. Perilla oil and ALA administration inhibited β-secretase and acetylcholinesterase activity in brain tissue. Supplementation of perilla oil and ALA up- or down-regulated apoptosis, inflammation, amyloid precursor protein processing-related mRNA and protein expressions</p>				
Expected Contribution	<p>Accessions with better essential properties were selected as useful resources for the development of agricultural characteristics and quality fatty acid varieties. There are four accessions, IT185664, IT18565, IT104241, IT104930, it will use as breeding lines.</p> <p>Identification of new property of ALA with cognitive improvement effect and provide possibility of functional food development.</p>				
Keywords	perilla	linolenic acid	recognition ability	functionality	storage stability

〈 목 차 〉

제 1 장	연구개발과제의개요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	3
제 3 장	연구수행 내용 및 결과	4
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	109
제 5 장	연구결과의 활용계획 등	110
제 6 장	연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	111
제 7 장	연구개발성과의 보안등급	112
제 8 장	국가과학기술지식정보서비스에 등록한 연구시설·장비현황	113
제 9 장	연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	114
제 10 장	연구개발과제의 대표적 연구실적	115
제 11 장	기타사항	117
제 12 장	참고문헌	118

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

본 과제는 우리나라 전통 유식작물인 들깨의 소비확대를 위해 들깨 우수자원을 선발하고, 들기름의 저장안정성에 대한 연구와 더불어, 들기름에 함유되어 있는 우수 지방산인 오메가-3 계열 알파-리놀렌산의 정제와 함량 증대를 통해 건강기능성 원료의 가능성을 보고자 하였음. 특히 동물실험을 통해 들기름 및 알파-리놀렌산의 학습능력 및 기억력 개선효과를 통하여 들깨의 우수성 홍보 및 세계화 기틀을 마련하고자 하였음. 제 1세부과제에서는 들깨 유전자원의 농업적 특성 및 지방, 지방산 등 품질 조사를 통해 우수자원을 선발하고, 지방산 내 리놀렌산 함량에 따른 산가 변이 분석을 통해 들기름의 저장안정성을 분석하고자 본 과제를 수행하였음. 제1협동과제에서는 들기름의 리놀렌산 정제기술을 개발하고, 들깨 및 들기름의 저장 안정성에 대한 방법을 연구하였음. 제2협동과제에서는 들기름을 비롯한 들기름으로부터 분리정제한 알파 리놀렌산의 *in vitro* 및 *in vivo* 에서 인지능 개선 등 건강 기능성을 평가하고, 그 메커니즘을 규명하여 독성과 부작용이 없는 들깨 유래 기능성 식품 소재로서의 과학적 근거를 제시하고자 하였음.

제2절 연구 개발의 필요성

들깨는 우리나라가 원산지인 고유의 작물이며, 중국, 네팔, 러시아까지 유전자원이 분포하고 있음. 들기름에는 오메가-3 지방산 계열인 알파 리놀렌산이 50~60% 이상으로 매우 높고 혈압저하, 혈정증 개선, 암세포의 증식억제 등의 효과가 밝혀지고, 들기름의 생리적 기능에 관한 연구로 대장암 발생 억제효과, 동맥경화의 예방 또는 경감효과 및 항콜레스테롤 효과 등이 보고되었음(차 등 I, 2016). 최근 오메가-3 지방산의 관심이 높아짐에 따라 국내 들깨 소비량이 증대되어 재배면적이 꾸준히 증가하여, 2010년 33.4천ha에서 2015년 42.5천ha로 27% 늘어났으며, 수요 또한 증대되고 있음. 특히 들기름의 비만예방, 항염증 효능이 알려지면서 2015년 일본 수출이 2014년 대비 29배 증가하여 수출 유망 품목으로 자리잡았음. 들기름은 주로 무침, 샐러드 용으로 많이 이용되어 왔으며, 기름의 수율과 향을 높이기 위해 높은 온도에서 볶아 압착하여 이용되고 있음. 볶음 온도가 높고 볶음 시간이 길수록 수율은 증가하며, 지방산 조성은 차이가 없었으나, (김 등 I, 1996) 산화안정성은 높아지는 것으로 나타남(김 등 II, 1996). 들깨 볶음 과정 중 발생하는 당과 아미노산 등이 Maillard 반응을 일으켜 향산화력을 나타내 산화안정성에 영향을 미침. 최근 고온 볶음 착유시 발생하는 벤조피렌 등 유해물질에 대한 우려로 cold pressed법에 의한 들기름 시장도 커지고 있음. cold pressed법은 들깨를 볶지 않고 압착하여 생각하는 방식으로, 자연 건조와 압착, 자연 침지 및 여과과정을 통해 만들어짐(조 등, 2009). 들기름 시장의 다양화 및 품질 안정성을 위해 품질 규격화 및 표준화 연구가 향후 필요함(박 등, 2005). 특히 들기름의 지방산 조성으로 인해 산패가 쉽게 일어나 장기 저장 및 유통 중 변질로 소비에 위축이 될 수 있어 이를 해결할 수 있는 보관 조건 및 산패 방지 기술 정립이 필요함. 또한 들깨의 산화안정성을 증진시키고, 들깨 속의 ALA의 분리, 정제기술 및 체내 흡수율 평가 등 다양한 식품 소재 가공 연구를 통해 우리나라 고유 자생 작물인 들깨의 생산, 소비확대 및 우수성 홍보, 세계화 기반 마련이 가능함.

제3절 연구 개발 범위

제1세부과제에서는 들깨 유전자원의 농업적 특성을 평가하고, 우수자원을 선발. 들깨 유전자원의 지방산 및 산가변이 분석을 통한 들기름의 저장안정성을 분석함. 제1협동과제에서는 들기름 내에 존재하는 고함량 리놀렌산의 정제기술을 개발하고, 들깨 및 들기름의 저장안전성에 대한 방법을 연구함. 제2협동과제에서는 들깨의 *in vitro* 건강 기능성 효과 탐색하기 위해서 들기름으로부터 항산화, 항균, 항염증 항암 효과를 탐색하고, 신경세포 보호효과를 측정하였음. *in vivo* 건강 기능성 효과 탐색을 위해 동물 시험을 통해 인지능을 관찰하였으며, 들깨 리놀렌산의 작용 메카니즘을 연구하였음

제 2 장 국내외 기술개발 현황

들깨의 재배면적은 지속적으로 증가하는 추세이고, 2015년에는 42.5천ha로 2014년에 비해 5천 ha가 늘어나 국내 재배면적 3위의 중요작물로 부상하였음. 생산액은 '10년 1,700억원에서 '15년 3,287억 원으로 성장하였으며, 자급률은 2000년 이후 50~60% 수준을 유지하고 있음(국가통계포털, 2015).

- 재배면적 : 24.4('04) → 26.7('08) → 30.1('13) → 37.5('14) → 42.5천ha('15)
- 생산량 : 18.3('04) → 24.2('08) → 33.9('10) → 43.3('14) → 50.9천톤('15)
- 생산액 : 676('04) → 920('08) → 1,794('10) → 1,713('12) → 3,287억원('15)
- 자급률 : 52.7('04) → 57.1('08) → 66.0('10) → 52.1%('13)

국내 들깨 연구는 품종개발 및 재배기술 연구가 주로 진행되어 왔으며, 종실용으로는 28 품종 껏잎용으로는 13품종이 개발되었고 대표적 품종으로는 다유, 들샘(종실용), 남천, 상업(껏잎용) 등이 있음(정 등, 2008, 이 등 2011). 가공이용 분야에서는 들깨의 볶음 조건에 따른 들기름의 성분, 관능적 특성 및 산화 안정성, 산화방지제가 들기름의 산화안정성에 미치는 영향, 볶음으로 인한 갈색물질의 항산화 효과 등 기존의 볶음들깨로 착유 시 품질변화에 대한 연구가 대부분임(김 등 I, II, 1996). 산지별, 수입산에 따른 들깨의 벤조피렌 함량 비교 뿐 아니라 들기름 제조 시 밀폐식 공정보다 개방형 공정에서 들기름의 벤조피렌 함량이 감소하였고 착유 후 활성탄소를 이용한 여과를 통해 들기름의 벤조피렌 저감화 방안 제시하여 벤조피렌 생성 극소화하기 위해서는 볶음공정이 중요한 것을 알 수 있었음(김 등, 2008). 냉압착 들기름과 볶음 압착 들기름의 영양학적, 기능적 특성 비교와 가열 산화 조건에서 산화안정성을 비교하여 기존 들기름 시장에 새로운 추출 기술 방법으로 냉압착 기술을 제시하기도 함(조 등 2009).

해외 들깨 연구는 들기름 및 로즈마린산 등 기능성 성분의 전임상 효과 등에 대해 연구가 진행되어 왔음. 최근 전임상 실험을 통해 들기름 고혈압 예방 효과 및 비알콜성 지방산 경감 효과 등에 대한 논문이 발표되고 있으며, 비슷한 지방산 조성을 가지고 있는 생선 기름과의 비교에서도 효과가 있는 것으로 나타났음(Tian 등, 2016). 들깨는 식물성 오메가-3 지방산을 섭취할 수 있는 우수한 공급원으로 주목받고 있음(Asif, 2011).

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

<제1세부과제: 들깨 리놀렌산 고함유 자원 선발 및 리놀렌산 함량에 따른 저장안전성 연구>
가. 연구수행내용

(시험 1) 들깨 및 근연종 유전자원 특성검정 및 리놀렌산 고함유 자원 선발 ('14~'15)

- 시험재료: 들깨 및 들깨 근연종 유전자원 100여점/년
- 재배법
 - 파종방법 : 휴립을 만들고 비닐피복 후 이식 (6월 하순)
 - 재식거리(cm) : 60 × 25
 - 주당본수 : 1주 1본
 - 시비량(kg/10a) : 성분량(N - P₂O₅ - K₂O) : 4 - 3 - 2
- 농업특성조사 : 개화기, 성숙기, 경장, 화방군 특성 등

조사항목	조 사 기 준	규 모	방 법	단 위
개화기	시험구의 40~50%가 개화한 날	전구	달관	월.일
성숙기	꽃이 진 후 삭이 갈색으로 변하는 시기	"	"	"
경 장	성숙기 때 개체당 지체부에서 주경선단부까지 길이	10주	측정	cm
분지수	성숙기 때 개체당 유효분지의 수 (마디수가 5절 이상 분지)	"	계수	개
마디수	성숙기 때 개체당 주경의 마디수	"	"	"
화방군수	성숙기 때 개체당 꼬투리가 달린 화방군의 수 (이삭길이 5cm 이상)	"	"	"
화방군당삭수	성숙기 때 주경최정단 화방군의 삭수	"	"	"
화방군장	성숙기 때 주경 최정단 이삭의 길이	"	측정	cm
천립중	시험구당 건전립 1,000립의 무게	3회	평량	g

- 조지방 함량
 - 종자 2g을 분쇄 후 4시간동안 ether 용매에 속슬렛법으로 추출
 - 시험기기 : Buchi, B-811
- 지방산 조성
 - 추출한 지방 150 μ l를 용매(methanol: H₂SO₄:Toluene, 20:1:2)와 섞은 후 한시간동안 150℃에 끓임
 - 시료 0.5 μ l를 GC를 이용하여 분석
 - 시험기기 : Agilent GC (A7890)

(시험 2) 리놀렌산 함량에 따른 들깨 저장 안전성 연구('15~'16)

- 시험재료 : 고리놀렌산 자원 및 저리놀렌산 자원
- 처리내용 : 들기름 착유(170℃), 온도처리 (상온, 10℃, 4℃)
- 조사내용 : 저장기간에 따른 산가, 요오드가, 과산화물가

나. 연구결과

(시험 1) 들깨 및 근연종 유전자원 특성검정 및 리놀렌산 고함유 자원 선발('14~'15)

- 들깨 및 근연종 유전자원 분양
 - 2014년 3월 리놀렌산 고/저 함유 자원을 선발하기 위해 농업유전자원센터로부터 238점의 들깨 및 근연종 유전자원을 분양 요청하였음. 농업유전자원센터의 평가정보에서 NIR 분석 결과 지방산 조성 중 리놀렌산 함량이 70% 이상인 230점 리놀렌산 함량이 50% 이하인 8점을 분양 요청하였음

- 들깨 및 근연종 유전자원 238점, 점당 100립씩 분양받아 자원당 50립은 생육조사를 위해 파종하였으며, 50립은 정확한 리놀렌산 함량 분석을 위해 지방산 분석(예비시험)에 이용하였음

○ 들깨 및 근연종 유전자원 농업특성조사 결과 ('14~'15)

- 총 238점 중 발아 불량 자원 3점을 제외하고 235점에 대한 농업특성 조사를 실시하였으며, 들깨 표준재배법에 준하여 재배하였고, 개화기 및 성숙기, 수량구성요소를 조사하였음. 들깨 유전자원의 성숙기는 80%이상의 개체가 9월 하순에서 10월 중순으로 중만숙종으로 종실용 품종 육성에 적합한 자원이었음. 경장은 97~156cm의 분포를 보였으며, 분지수는 3~21개로 소분지 초형에서 다분지 초형으로 다양한 분포를 보였음. 수량에 관련되는 요소인 화방군수의 경우 평균 66개였으며, 90개 이상인 자원이 29점으로 다수성 품종육성에 알맞은 재료로 선발하였음. 그리고 화방군의 길이가 지나치게 길면 동시성숙이 되지 않아 종자 품질이 떨어지므로, 화방군의 길이가 10~15cm 정도의 자원을 선발하였으며, 이는 파종기에 따른 화방군의 길이 및 삭수에 대한 면밀한 분석이 필요한 것으로 보임. 농업적 특성 및 지방산 분석 결과를 토대로 선발한 우수자원 IT185664, IT18565, IT104241, IT104930 등은 2015, 2016년 들깨 우량계통 육성시험의 모부본으로 이용하여 세대 진전 및 선발 중에 있음

표 1. 들깨 유전자원의 생육특성 분포

구 분	생육특성						
	경장 (cm)	분지수 (개)	마디수 (개)	화방군수 (개)	화방군장 (cm)	군당삭수 (개)	천립중 (g)
최 대	156	21	15	174	13.0	45	5.8
최 소	97	3	10	26	6.2	21	2.9
평균±표준편차	130±10.04	14±2.51	13±0.94	66±20.15	9.7±1.49	34±4.28	3.3±0.75

표 2. 들깨 유전자원의 생육 특성

자원명 (번호)	개화기 (월.일)	성숙기 (월.일)	경장 (cm)	분지수 (개)	마디수 (개)	화방군수 (개)	화방군장 (cm)	삭수 (개)	천립중 (g)
IT103368	9.10	10.5	89	11	5	39	7.8	27	2.9
IT104232	9.11	10.8	93	10	4	24	7.9	32	3.7
IT104241	9.10	10.7	98	10	4	22	8.1	31	4.1
IT104486	9.2	9.28	101	10	4	24	8.2	34	3.6
IT104623	9.2	9.28	85	11	4	22	8.9	26	3.4
IT104886	9.10	10.8	100	13	7	34	8.0	30	3.1
IT104890	9.11	10.8	110	14	8	49	8.6	31	4.5
IT104930	9.14	10.8	115	13	8	31	7.3	31	4.1
IT105242	9.9	10.7	125	11	5	57	9.1	33	2.7
IT105275	9.10	10.7	117	13	5	44	9.3	37	3.1
IT105306	9.4	10.2	105	12	6	42	8.2	29	3.7
IT105386	9.13	10.10	130	12	5	45	9.1	36	3.3
IT105396	9.9	10.8	106	12	4	29	9.8	34	3.7
IT105424	9.13	10.12	126	11	5	23	8.1	30	3.8
IT105586	9.10	10.7	117	13	6	69	8.6	28	3.4
IT105748	9.9	10.7	120	13	6	49	10.1	33	4.0
IT105833	9.8	10.7	105	12	4	37	8.6	34	3.0

자원명 (번호)	개화기 (월.일)	성숙기 (월.일)	경장 (cm)	분지수 (개)	마디수 (개)	화방군수 (개)	화방군장 (cm)	삭수 (개)	천립중 (g)
IT105864	9.15	10.10	112	13	6	56	9.5	30	3.2
IT105936	9.8	10.5	93	10	3	29	9.4	32	4.0
IT105939	9.8	10.7	84	11	2	33	9.1	31	2.8
IT108745	9.2	9.28	83	10	2	61	12.0	35	3.1
IT108845	9.3	10.9	76	11	8	37	6.6	23	2.9
IT109580	9.8	10.2	68	9	2	23	7.8	27	2.9
IT109582	9.8	10.2	62	9	2	27	8.0	25	2.7
IT110974	9.7	10.7	78	9	2	28	7.7	31	5.4
IT113112	9.10	10.8	91	10	3	30	7.3	27	2.8
IT116996	9.11	10.8	98	11	3	25	8.1	32	3.4
IT116998	9.6	10.2	86	11	4	28	7.7	32	3.0
IT117000	9.6	10.2	99	12	6	33	7.9	32	3.2
IT117001	9.6	10.7	101	12	7	51	9.1	32	3.5
IT117005	9.8	10.5	91	12	4	29	8.6	31	2.8
IT117007	9.6	9.30	71	9	2	18	7.8	29	2.8
IT117009	9.4	9.28	75	10	1	23	7.8	29	3.0
IT117011	9.8	10.5	76	9	2	24	7.9	30	2.5
IT117015	9.6	10.2	83	11	4	38	6.5	30	2.7
IT117016	9.9	10.5	95	11	4	33	8.3	33	2.7
IT117023	9.9	10.7	92	10	4	26	7.4	31	3.0
IT117031	9.4	9.28	79	11	2	16	8.7	28	3.4
IT117043	9.4	10.5	106	13	8	44	7.3	29	2.8
IT117044	9.6	10.5	104	12	7	38	8.1	32	3.5
IT117045	9.3	9.28	97	12	4	43	9.1	24	4.2
IT117047	9.9	10.5	111	13	7	39	7.0	28	3.3
IT117049	9.9	10.7	91	12	4	30	6.3	29	3.6
IT117056	9.13	10.10	96	11	4	28	7.0	26	3.1
IT117058	9.6	10.5	93	9	1	13	6.5	22	2.7
IT117068	9.9	10.8	94	11	4	28	6.8	23	5.1
IT117070	9.5	10.5	91	10	2	30	8.9	31	4.5
IT117071	9.4	9.30	79	10	2	37	8.0	25	3.1
IT117073	9.8	10.7	77	9	0	16	6.3	22	4.8
IT117076	9.11	10.9	86	9	1	20	6.7	23	5.4
IT117078	9.7	10.5	72	11	2	14	4.4	24	3.2
IT117081	9.3	10.5	66	9	0	17	7.3	30	2.8
IT117084	9.6	10.5	67	10	1	16	7.8	31	4.1
IT117091	9.7	10.7	79	11	2	16	6.6	25	4.6
IT117113	9.7	10.7	93	12	5	48	7.9	33	3.1
IT117122	9.7	10.5	85	10	1	20	8.0	30	2.5
IT117127	9.10	10.7	94	36	2	28	7.1	31	2.7
IT117130	9.14	10.10	91	11	3	28	8.2	30	2.7
IT117139	9.10	10.7	100	11	1	18	6.4	25	4.0
IT117143	9.10	10.7	99	11	4	28	6.9	30	3.8
IT117146	9.13	10.9	103	12	2	22	8.5	30	3.3
IT117149	9.10	10.7	96	11	3	28	7.7	30	3.3
IT117150	9.5	10.5	108	10	3	22	10.5	33	4.9
IT117155	9.9	10.9	100	11	5	23	6.9	27	5.1
IT117161	9.9	10.7	107	11	3	28	7.9	26	5.3

자원명 (번호)	개화기 (월.일)	성숙기 (월.일)	경장 (cm)	분지수 (개)	마디수 (개)	화방군수 (개)	화방군장 (cm)	삭수 (개)	천립중 (g)
IT117173	9.8	10.7	91	12	6	46	7.2	30	2.1
IT117179	9.16	10.15	87	12	3	29	7.5	27	2.8
IT117182	9.16	10.12	85	10	1	19	5.6	24	3.1
IT117184	9.6	10.5	72	9	3	29	7.5	29	2.4
IT117187	9.13	10.8	90	12	4	24	6.9	28	3.2
IT117196	9.8	10.7	86	10	3	23	7.3	27	4.5
IT117205	9.5	9.28	77	10	1	26	9.1	23	4.2
IT117211	9.14	10.10	100	14	6	31	5.7	27	2.6
IT117214	9.9	10.7	99	11	3	35	8.2	30	2.8
IT119983	9.10	10.10	106	12	7	32	8.8	32	4.6
IT121520	9.8	10.7	119	13	9	73	9.2	31	3.4
IT157407	9.3	9.23	112	11	4	52	11.2	39	4.3
IT157414	9.5	10.5	117	13	7	64	10.0	35	3.5
IT157417	9.10	10.5	118	12	6	67	7.9	30	2.9
IT157432	9.7	10.5	123	12	10	96	9.8	32	5.1
IT157451	9.13	10.9	123	14	9	69	8.9	36	3.1
IT157462	9.13	10.9	106	12	7	40	8.6	37	3.3
IT157465	9.14	10.12	126	14	8	41	6.8	29	2.8
IT157466	9.11	10.12	114	11	5	43	8.9	29	3.7
IT157475	9.10	10.9	107	12	7	42	7.8	32	3.6
IT157482	9.8	10.5	89	11	5	43	7.8	28	3.3
IT157489	9.14	10.10	108	11	6	35	8.2	30	3.4
IT157494	9.4	10.5	94	10	5	44	10.7	36	3.6
IT157517	9.11	10.8	93	11	2	19	7.7	25	4.0
IT157536	9.13	10.9	94	11	4	25	7.7	29	3.6
IT157541	9.5	10.5	98	10	4	29	6.4	28	2.9
IT157542	9.10	10.8	79	11	2	23	7.3	30	3.0
IT157553	9.10	10.8	70	10	1	18	6.9	29	3.0
IT157562	9.9	10.7	88	11	3	23	7.6	31	3.4
IT157564	9.6	10.2	91	11	4	47	7.8	29	3.3
IT157569	9.9	10.10	99	12	6	42	7.8	34	2.3
IT157580	9.9	10.12	96	12	5	24	6.5	31	2.7
IT157583	9.9	10.9	94	12	5	33	5.7	24	3.4
IT157585	9.9	9.28	97	10	4	31	7.7	29	2.9
IT157587	9.14	10.13	98	12	3	23	7.3	27	3.1
IT157591	9.17	10.15	95	11	4	33	6.0	25	3.3
IT157597	9.13	10.9	71	11	1	22	6.6	31	2.7
IT157604	9.9	10.7	82	9	1	18	6.1	24	2.6
IT158252	9.2	9.28	70	9	1	26	6.0	26	2.6
IT161051	9.2	10.5	70	10	2	22	7.2	29	2.5
IT162819	9.1	9.30	77	11	3	22	7.0	31	3.0
IT162845	9.13	10.9	83	11	5	27	7.3	30	2.6
IT175906	9.4	10.7	93	12	6	21	5.8	23	-
IT175914	9.4	10.5	96	10	2	20	7.2	24	4.9
IT175963	9.4	10.1	84	11	2	36	6.3	27	3.1
IT175982	9.14	10.10	92	12	4	28	6.3	20	2.6
IT176014	9.9	10.5	82	9	1	21	9.0	30	3.2
IT178421	9.9	10.7	89	11	1	16	7.1	31	3.3

자원명 (번호)	개화기 (월.일)	성숙기 (월.일)	경장 (cm)	분지수 (개)	마디수 (개)	화방군수 (개)	화방군장 (cm)	삭수 (개)	천립중 (g)
IT178424	9.11	10.9	97	13	7	50	6.4	27	3.0
IT178744	9.10	10.8	97	12	4	22	7.4	32	2.9
IT178782	8.27	9.28	69	10	0	24	8.2	26	3.9
IT180471	8.27	9.28	83	11	3	37	9.6	25	4.1
IT180499	8.27	9.28	85	10	4	35	9.9	25	4.0
IT180555	9.14	10.12	96	11	3	34	7.2	30	3.3
IT180595	9.8	10.5	92	11	5	41	7.8	32	2.5
IT180605	9.6	9.30	91	10	2	25	9.5	34	2.8
IT180620	9.9	10.7	113	14	5	34	7.8	32	3.2
IT180653	9.10	10.9	108	12	6	37	7.2	29	3.2
IT180962	9.4	10.7	100	12	6	50	9.9	32	2.8
IT180966	9.9	10.7	106	13	4	27	6.8	26	4.4
IT180973	9.9	10.7	103	10	3	33	8.0	29	3.3
IT180974	9.6	10.5	95	12	4	40	9.6	31	2.8
IT180978	9.8	10.5	103	12	5	50	8.2	31	3.6
IT181907	9.9	10.7	103	12	5	50	10.4	37	2.9
IT181908	9.14	10.12	98	11	4	27	7.4	26	3.8
IT181911	9.15	10.12	127	14	7	48	7.6	27	2.7
IT181994	9.6	10.5	119	12	6	41	8.7	26	3.6
IT181995	9.7	10.7	105	12	4	29	12.7	34	3.5
IT185608	9.8	10.5	110	13	7	59	9.1	34	2.4
IT185615	9.1	9.30	84	11	7	44	7.6	29	2.7
IT185616	9.2	10.7	89	11	5	37	7.0	26	3.5
IT185617	9.14	10.8	92	11	3	26	5.8	26	2.8
IT185620	9.9	10.7	75	10	2	23	6.6	26	3.1
IT185621	9.11	10.7	88	11	5	33	5.8	28	2.5
IT185632	9.9	10.7	103	13	6	45	8.0	30	2.9
IT185633	9.11	10.9	102	11	5	17	7.9	32	4.2
IT185635	9.7	10.9	108	12	7	53	7.2	30	2.8
IT185636	9.11	10.8	120	13	6	30	7.0	28	3.4
IT185641	9.16	10.14	140	14	10	51	7.8	35	3.4
IT185643	9.14	10.12	122	13	7	49	9.4	36	3.4
IT185645	9.8	10.5	128	13	7	45	7.5	26	3.0
IT185652	9.13	10.11	128	12	5	41	8.6	35	3.2
IT185653	9.16	10.12	138	14	6	40	8.3	33	2.8
IT185655	9.20	10.19	128	15	8	41	7.3	36	3.8
IT185656	9.11	10.8	115	13	9	54	9.5	33	3.3
IT185664	9.1	9.28	88	11	2	48	9.5	29	3.6
IT185665	9.15	10.13	126	13	6	32	8.3	29	3.0
IT185668	9.10	10.5	117	13	7	50	9.3	37	2.9
IT185669	9.7	10.5	103	12	7	43	8.4	29	2.9
IT185670	9.10	10.7	120	13	7	42	9.6	35	3.9
IT185672	9.11	10.9	105	11	6	40	8.7	36	2.7
IT191136	9.9	10.7	121	12	9	51	6.9	30	2.6
IT191180	9.14	10.13	114	13	5	39	8.9	32	2.5
IT195157	9.13	10.10	109	13	7	41	8.3	32	2.6
IT195228	9.8	10.6	105	12	6	44	8.7	32	2.8
IT195368	9.1	9.30	82	10	1	37	10.3	31	3.4

자원명 (번호)	개화기 (월.일)	성숙기 (월.일)	경장 (cm)	분지수 (개)	마디수 (개)	화방군수 (개)	화방군장 (cm)	삭수 (개)	천립중 (g)
IT195495	9.1	9.30	84	10	4	41	10.2	34	2.8
IT196899	9.11	10.8	95	12	4	33	8.1	34	2.4
IT201766	9.13	10.8	97	11	6	44	5.9	26	3.0
IT207378	9.13	10.8	110	13	7	32	6.4	24	4.2
IT207381	9.13	10.8	114	12	5	29	7.3	32	3.7
IT207388	9.6	10.5	109	12	5	36	7.1	26	5.4
IT207390	9.6	10.5	113	11	6	36	8.2	33	3.2
IT207956	9.18	10.20	120	12	6	32	6.9	28	3.9
IT207961	9.15	10.12	125	13	8	42	7.7	32	3.3
IT207962	9.15	10.12	116	14	7	58	8.1	34	2.7
IT207964	9.15	10.12	114	12	8	51	8.4	31	2.5
IT207973	9.14	10.12	96	12	5	45	8.3	36	3.3
IT208793	9.13	10.10	104	14	6	37	8.2	33	2.5
IT208894	8.30	9.28	85	12	2	51	9.3	33	2.8
IT208939	9.14	10.10	103	12	5	31	8.2	31	2.9
IT208940	9.15	10.13	111	13	7	37	6.2	25	3.3
IT209220	9.11	10.10	101	12	4	36	8.8	34	3.2
IT209221	9.13	10.9	106	11	4	30	31.2	30	3.5
IT209917	9.20	10.20	92	11	6	25	5.4	26	3.4
IT210189	9.9	10.6	75	11	1	33	7.4	26	2.2
IT210193	9.6	9.30	83	10	3	34	8.4	27	2.4
IT212137	9.13	10.12	68	10	1	21	8.2	33	3.4
IT213777	9.6	10.7	72	11	4	22	6.5	28	3.4
IT213783	9.7	10.6	84	10	1	29	9.5	28	5.0
IT213786	9.7	10.6	84	8	2	20	9.0	28	5.8
IT213787	9.6	10.8	83	10	4	30	7.9	23	5.2
IT214466	9.15	10.10	113	12	6	38	6.9	27	3.8
IT214473	9.7	10.5	100	11	1	33	7.6	28	3.3
IT214476	9.10	10.8	95	11	2	51	8.8	33	2.7
IT214480	9.8	10.7	92	10	1	24	8.3	26	5.3
IT214488	9.6	10.2	87	10	3	39	8.0	25	4.5
IT214489	9.8	10.5	85	10	3	45	8.4	31	2.6
IT214490	9.9	10.2	60	10	1	17	6.7	25	2.8
IT214493	9.4	10.8	77	11	2	26	6.1	25	2.5
IT214508	9.3	10.2	79	11	3	21	7.6	27	3.5
IT215256	9.5	9.30	77	10	1	29	8.8	32	3.0
IT216241	9.9	10.1	86	10	2	22	7.0	22	2.9
IT216243	9.14	10.9	105	12	5	42	7.0	31	3.5
IT216245	9.5	10.5	75	10	1	22	6.6	29	3.0
IT216249	9.17	10.12	82	11	1	27	5.5	26	2.3
IT216253	9.16	10.12	85	11	2	22	6.6	29	2.4
IT216259	9.11	10.8	89	12	3	34	6.7	29	3.0
IT216261	9.5	10.5	84	11	3	26	5.5	26	2.5
IT216263	9.6	10.2	75	11	2	37	10.0	34	2.2
IT216265	9.1	-	79	0	10	20	8.7	23	3.5
IT216266	-	-	129	8	13	40	7.9	31	-
IT216922	9.14	10.9	95	13	6	33	6.5	27	4.3
IT216924	9.1	9.28	74	11	1	38	8.3	36	2.4

자원명 (번호)	개화기 (월.일)	성숙기 (월.일)	경장 (cm)	분지수 (개)	마디수 (개)	화방군수 (개)	화방군장 (cm)	삭수 (개)	천립중 (g)
IT217403	9.20	10.17	111	13	7	34	5.3	28	3.0
IT217409	9.6	10.5	92	11	3	25	7.7	26	4.8
IT217411	9.6	10.5	78	9	1	20	7.0	28	3.3
IT217412	9.9	10.8	68	10	1	23	6.7	24	3.8
IT217415	9.5	10.5	75	8	0	12	6.7	25	4.4
IT217988	9.5	10.5	83	9	1	16	6.0	22	5.2
IT218746	9.20	10.20	64	9	0	11	5.3	25	2.7
IT218812	9.8	10.6	75	10	1	21	6.9	29	2.2
IT218813	9.9	10.9	81	9	0	26	6.1	25	3.2
IT218815	9.9	10.8	74	10	2	28	5.6	26	2.6
IT218816	9.9	10.9	84	12	3	42	7.0	23	2.9
IT218819	9.14	10.9	91	11	1	25	6.1	23	3.6
IT218820	9.14	10.9	92	11	3	30	6.4	30	2.6
IT218821	9.10	-	94	12	4	29	5.3	26	3.1
IT218824	9.13	10.11	88	11	2	20	5.9	27	3.2
IT218825	9.8	10.5	86	11	2	32	6.8	29	2.9
IT218829	9.20	10.19	90	11	5	26	6.2	30	3.8
IT218834	9.15	10.9	85	11	3	18	6.1	28	3.0
IT219476	9.10	10.8	56	10	2	21	5.0	25	2.8
IT220373	-	-	103	11	12	48	6.8	21	-
IT220375	-	-	67	12	7	55	6.5	32	2.3
IT108937	9.13	10.9	75	11	2	26	6.4	30	3.2
IT117188	9.11	10.8	71	10	1	14	7.4	29	3.2
IT201771	9.20	10.18	88	12	8	44	6.3	28	3.4
IT214496	9.1	9.30	70	9	1	25	8.8	25	4.3
IT216235	9.18	10.20	112	13	11	56	7.8	37	3.6
IT217404	9.2	10.5	116	12	5	45	9.1	26	5.6
IT217990	9.10	10.6	134	13	10	60	11.3	36	3.7
IT218833	9.20	10.20	139	14	9	72	10.8	37	3.9

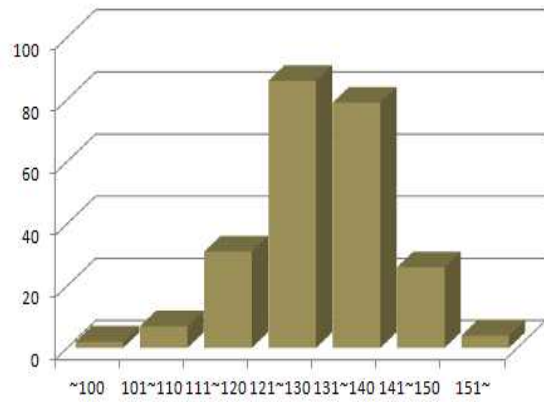


그림 1. 들깨 유전자원 경장(cm) 변이

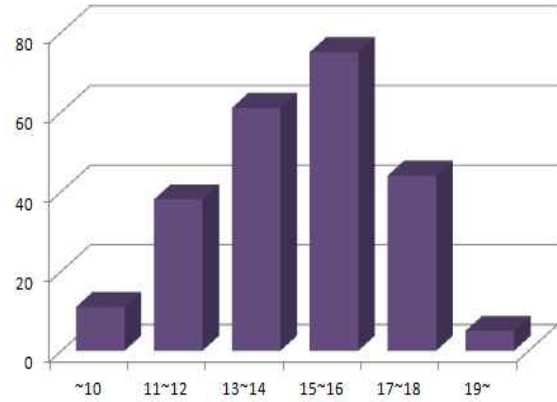


그림 2. 들깨 유전자원 분지수(개) 변이

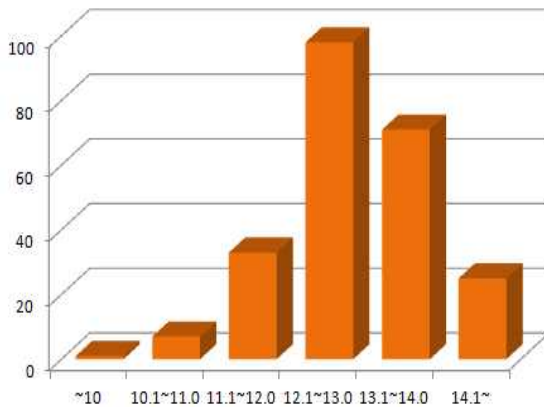


그림 3. 들깨 유전자원 마디수(개) 변이

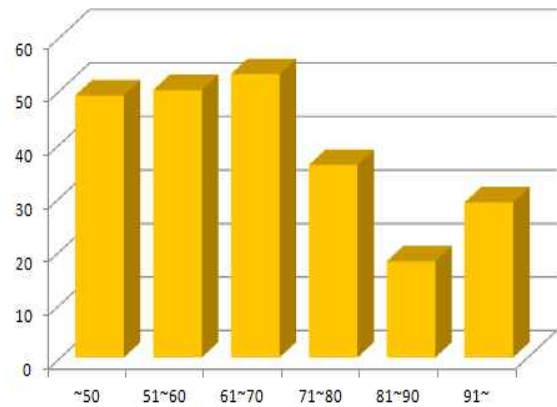


그림 4. 들깨 유전자원 화방군수(개) 변이

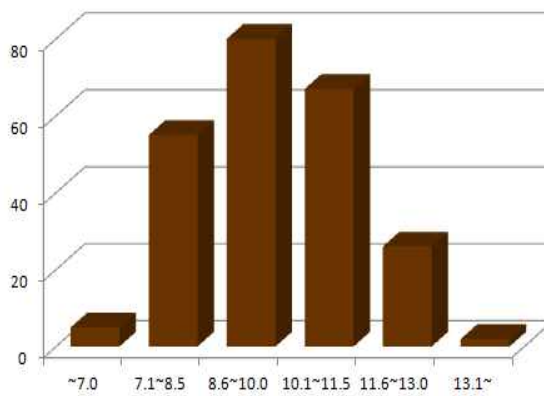


그림 5. 들깨 유전자원 화방군장(cm) 변이

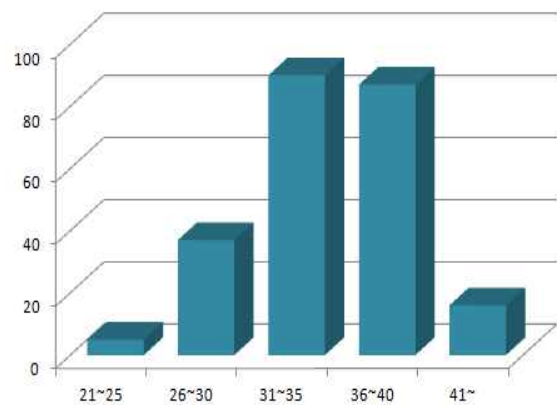


그림 6. 들깨 유전자원 화방군당삭수(개) 변이

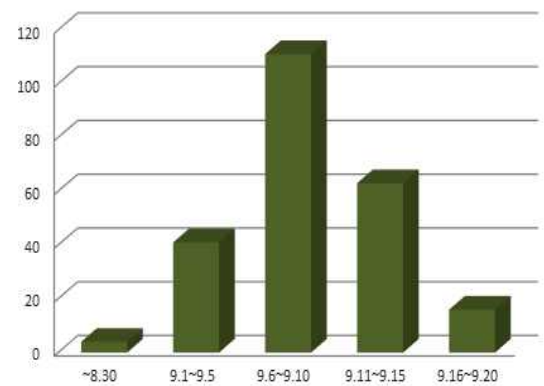


그림 7. 들깨 유전자원 개화기(월.일) 변이

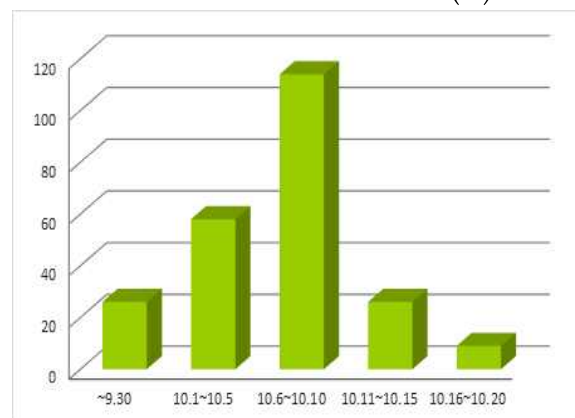


그림 8. 들깨 유전자원 성숙기(월.일) 변이

○ 들깨 및 근연종 유전자원 지방산 분석

- 분양받은 각 자원 100립 중 50립을 지방산 분석에 이용하였음. 종자량이 적어 조지방 분석에는 어려움이 있었으며, 국립농업기술원의 NIR(Near-infrared spectroscopy)을 이용한 결과가 기존 문헌과 차이가 있어 정확한 분석을 위해 지방산 조성을 분석하였음. 본 과제에서 선발하고자 하는 리놀렌산 함량 변이를 분석한 결과, 그 함량이 19.8~66.3%로 분포를 보였다. 50% 이상의 분포를 보이는 기존 들깨 유전자원의 리놀렌산 함량 결과와 상이한 차이를 보여, 수확한 종자를 이용하여 지방 및 지방산 조성을 재분석이 필요하였음(표 2).

표 3. 들깨 유전자원의 지방산 조성 분포(2014년)

구 분	지방산조성(%)				
	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
최 대	21.5	6.9	48.8	18.8	66.3
최 소	5.5	0.0	11.3	8.8	19.8
평균±표준편차	7.46±2.22	2.56±0.96	18.39±5.75	13.94±1.45	57.65±8.29

표 4. 들깨 유전자원의 지방산 조성(2014년)

자원명 (번호)	지방산 조성(%)				
	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT103368	7.7	0.1	19.4	12.3	60.6
IT105242	6.2	2.3	19.5	12.1	60.0
IT105275	6.3	2.7	15.2	13.4	62.4
IT105306	6.5	2.2	16.0	14.1	61.2
IT105386	6.1	2.4	15.2	16.1	60.3
IT105396	6.4	2.2	14.5	12.9	64.0
IT105424	6.4	2.5	18.5	14.8	57.8
IT105586	6.4	2.8	14.4	14.9	61.5
IT105748	6.1	2.1	19.0	11.4	61.5
IT105833	6.4	2.4	15.7	13.1	62.4
IT105864	6.8	2.1	17.0	12.4	61.6
IT105936	6.3	2.5	21.0	14.2	56.0
IT105939	6.7	2.4	18.6	11.6	60.8
IT108745	6.3	2.4	18.0	12.7	60.7
IT108845	6.7	2.1	15.5	12.6	63.1
IT109580	6.6	3.2	20.9	14.3	55.1
IT109582	6.7	2.9	16.3	14.9	59.2
IT110974	6.6	2.4	18.0	16.1	57.0
IT113112	6.4	2.0	14.4	15.0	62.1
IT116996	6.4	2.2	17.4	14.4	59.6
IT116998	6.2	2.6	17.2	12.6	61.4
IT117000	6.2	2.7	17.8	13.2	60.1
IT117001	6.4	2.3	18.5	15.5	57.2
IT117005	6.4	2.4	16.1	15.1	60.0

자원명 (번호)	지방산 조성(%)				
	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT117007	6.2	2.4	16.5	14.8	60.1
IT117009	14.5	6.6	42.0	12.8	24.1
IT117011	6.0	2.6	19.4	13.8	58.2
IT117015	6.3	2.3	17.7	14.5	59.3
IT117016	6.7	2.3	17.2	14.9	58.8
IT117023	6.6	2.6	18.9	13.0	58.9
IT117031	6.4	2.8	20.1	13.0	57.7
IT117043	6.4	2.5	15.4	13.0	62.7
IT117044	6.4	2.7	13.7	12.9	64.4
IT117045	10.9	4.9	24.8	13.7	45.7
IT117047	7.0	2.6	18.4	14.2	57.9
IT117049	6.7	2.8	16.7	12.5	61.4
IT117056	6.3	2.2	20.7	14.0	56.8
IT117058	6.9	2.9	17.9	12.6	59.7
IT117068	7.2	1.9	14.7	15.6	60.6
IT117070	6.3	2.4	17.4	15.2	58.7
IT117071	13.2	4.9	33.6	13.3	35.0
IT117073	6.8	2.0	16.5	14.2	60.7
IT117076	6.8	2.0	18.0	16.4	56.8
IT117078	6.5	2.3	18.6	15.0	57.6
IT117081	6.8	2.0	13.0	14.3	64.0
IT117084	6.4	1.9	13.6	13.9	64.2
IT117091	6.0	2.8	15.7	14.8	60.7
IT117113	6.1	2.2	14.5	14.4	62.8
IT117122	6.7	2.4	17.5	15.6	57.8
IT117127	6.7	2.0	14.6	15.2	61.6
IT117130	6.3	2.1	16.8	12.9	61.9
IT117139	5.8	2.3	16.6	13.9	61.4
IT117143	6.3	2.5	18.6	11.1	61.4
IT117146	6.5	1.9	16.5	13.0	62.1
IT117149	7.1	1.8	14.9	15.2	61.1
IT117150	6.4	2.1	13.8	15.1	62.6
IT117155	6.5	2.2	16.6	18.1	56.7
IT117161	6.8	2.1	16.6	17.9	56.7
IT117173	6.2	2.2	18.1	12.9	60.7
IT117179	5.7	2.0	18.2	12.1	62.0
IT117182	6.6	2.1	16.1	13.7	61.5
IT117184	6.2	2.1	16.0	13.2	62.4
IT117187	6.2	2.2	18.7	13.4	59.5
IT117196	6.8	2.2	18.5	13.4	59.2
IT117205	5.9	2.1	19.0	12.2	60.7
IT117211	6.0	2.5	16.8	12.8	61.9
IT117214	6.3	2.5	18.9	12.1	60.3
IT119983	6.6	2.6	19.8	14.1	57.0
IT121520	7.0	2.5	18.6	14.1	57.8
IT157407	7.1	2.0	15.0	16.2	59.7
IT157414	6.5	2.2	17.6	14.3	59.4
IT157417	6.7	2.0	16.6	16.8	58.0
IT157432	6.6	2.2	16.1	14.9	60.3

자원명 (번호)	지방산 조성(%)				
	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT157451	12.1	4.7	33.4	13.1	36.6
IT157462	7.9	2.4	16.6	14.3	58.8
IT157465	6.5	2.3	16.6	13.1	61.6
IT157466	10.5	3.1	19.8	15.6	51.0
IT157475	7.3	2.4	16.2	15.0	59.1
IT157482	6.3	2.2	15.1	13.1	63.4
IT157489	6.6	2.0	14.7	16.0	60.7
IT157494	11.5	4.1	27.2	14.4	42.8
IT157517	14.3	4.6	37.0	13.1	31.0
IT157536	6.6	2.3	14.2	14.3	62.6
IT157541	21.5	0.1	43.7	14.1	20.8
IT157542	15.5	5.4	31.7	13.0	34.4
IT157553	8.1	2.8	21.2	13.8	54.1
IT157562	6.6	2.7	19.4	12.1	59.1
IT157564	14.5	6.1	37.0	11.2	31.3
IT157569	15.4	6.9	48.8	8.8	20.0
IT157580	6.0	2.1	17.5	12.8	61.7
IT157583	6.4	2.4	18.3	12.8	60.1
IT157585	6.6	2.4	14.2	12.8	64.0
IT157587	6.7	2.1	16.1	11.9	63.3
IT157591	6.2	2.0	18.2	12.4	61.3
IT157597	6.7	1.9	16.4	12.6	62.4
IT157604	6.4	2.3	16.0	14.0	61.4
IT161051	8.2	2.7	19.1	14.0	56.0
IT162819	8.4	2.8	19.6	14.5	54.7
IT162845	6.3	2.1	15.0	12.7	64.0
IT175906	6.6	2.4	19.0	15.6	56.5
IT175914	9.6	3.2	24.8	16.2	46.2
IT175963	16.8	6.5	45.8	11.1	19.8
IT175982	8.0	2.4	19.6	13.4	56.7
IT176014	6.6	2.1	16.0	15.8	59.5
IT178421	6.2	1.9	16.4	13.6	61.8
IT178424	6.2	1.9	15.1	12.8	63.9
IT178744	6.4	2.1	16.3	13.8	61.5
IT178782	8.9	4.1	19.8	12.4	54.9
IT180471	14.0	5.0	35.7	12.5	32.8
IT180499	10.4	3.8	29.9	13.9	42.1
IT180555	11.3	4.3	31.2	13.1	40.1
IT180595	10.7	3.7	24.9	13.6	47.2
IT180605	6.6	2.1	14.7	14.4	62.2
IT180620	6.3	1.9	17.3	14.0	60.5
IT180653	6.5	2.6	17.5	13.0	60.4
IT180962	7.7	2.5	18.5	14.3	57.0
IT180966	6.4	2.1	19.1	14.1	58.4
IT180973	6.3	1.9	16.2	15.1	60.5
IT180974	6.8	2.4	19.2	14.0	57.6
IT180978	10.6	3.3	26.8	15.5	43.9
IT181907	12.1	3.5	24.8	14.7	44.9
IT181908	10.7	4.1	24.8	13.9	46.6

자원명 (번호)	지방산 조성(%)				
	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT181911	6.5	2.7	17.0	13.1	60.7
IT185608	11.3	3.7	27.9	14.7	42.4
IT185617	6.3	2.0	15.3	12.3	64.2
IT185620	7.2	2.6	18.9	13.9	57.5
IT185621	6.3	1.9	15.3	13.0	63.5
IT185632	6.8	2.2	16.6	13.7	60.8
IT185633	9.1	2.8	22.2	15.4	50.6
IT185635	7.5	2.6	16.8	13.2	60.0
IT185636	6.6	2.2	16.2	14.6	60.4
IT185641	6.3	2.7	14.3	14.0	62.7
IT185643	6.6	2.2	16.2	11.9	63.1
IT185645	6.7	2.7	16.3	13.5	60.9
IT185652	6.4	2.0	13.6	13.1	65.0
IT185653	8.7	3.1	21.9	12.0	54.3
IT185655	6.0	3.0	15.4	15.5	60.1
IT185656	6.3	2.3	14.3	12.9	64.3
IT185664	7.0	2.4	12.9	11.5	66.3
IT185665	6.3	2.0	14.4	13.0	64.4
IT185669	6.8	2.1	16.2	13.1	61.8
IT185670	6.2	2.1	15.2	12.0	64.5
IT191136	6.4	0.1	16.5	14.8	62.3
IT195157	6.5	2.3	18.0	13.1	60.0
IT195228	7.0	0.1	13.6	14.4	64.9
IT195368	6.1	2.3	16.6	12.8	62.2
IT195495	6.6	2.0	14.2	14.9	62.4
IT196899	6.3	2.2	15.3	14.1	62.1
IT201766	6.5	2.2	15.8	14.6	60.9
IT207378	6.1	2.6	15.0	12.6	63.8
IT207381	6.3	2.3	17.1	13.1	61.2
IT207390	7.2	2.4	17.8	14.6	58.0
IT207956	7.3	3.1	12.7	15.9	61.1
IT207961	6.4	2.0	14.6	13.0	64.0
IT207962	6.6	1.9	13.7	12.4	65.5
IT207964	9.4	3.2	21.5	12.6	53.4
IT207973	9.2	2.6	18.9	14.3	54.9
IT208793	6.5	2.0	15.4	13.3	62.7
IT208894	10.3	3.2	19.7	15.5	51.3
IT208940	7.5	2.3	16.8	13.9	59.5
IT209220	7.9	2.6	15.4	14.2	59.9
IT209221	8.5	2.4	17.7	12.3	59.1
IT209917	9.5	4.8	22.7	13.0	50.1
IT210189	6.4	2.3	15.3	15.1	60.8
IT210193	6.1	2.3	15.5	14.4	61.8
IT212137	6.3	2.5	16.2	15.3	59.8
IT213777	6.7	2.1	14.4	13.0	63.7
IT213783	6.2	2.2	19.2	10.7	61.8
IT213787	6.9	2.3	17.9	12.6	60.4
IT214466	8.3	2.6	16.6	13.5	59.0
IT214473	6.9	1.9	13.8	12.9	64.5

자원명 (번호)	지방산 조성(%)				
	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT214476	7.2	2.3	16.3	13.1	61.1
IT214480	7.0	2.0	13.9	16.3	61.0
IT214488	14.5	4.6	26.6	13.5	40.8
IT214489	6.2	2.1	17.4	14.0	60.3
IT214490	7.1	3.2	15.7	12.7	61.3
IT214493	6.2	2.4	16.2	12.9	62.3
IT214508	9.1	3.1	25.6	12.4	49.8
IT215256	6.7	2.3	17.7	13.6	59.7
IT216241	8.6	4.8	17.2	15.1	54.4
IT216243	6.2	2.3	18.2	14.9	58.3
IT216245	7.7	3.3	21.8	14.2	53.0
IT216249	6.3	2.6	17.4	14.8	58.9
IT216253	7.7	2.8	20.5	15.7	53.3
IT216259	6.4	2.4	17.2	16.2	57.9
IT216261	7.9	3.2	21.4	16.3	51.2
IT216263	6.2	2.5	15.7	13.5	62.2
IT216265	5.5	2.1	19.4	12.5	60.5
IT216266	6.5	2.2	15.7	15.1	60.6
IT216922	6.8	2.2	13.5	14.2	63.3
IT216924	7.7	2.6	16.5	13.4	59.8
IT217403	7.3	3.3	14.7	14.9	59.8
IT217409	7.4	0.1	18.8	13.3	60.5
IT217411	6.3	1.9	12.4	14.6	64.9
IT217412	6.4	1.9	14.2	13.6	63.9
IT217415	7.3	2.5	14.6	13.2	62.4
IT217988	6.9	1.9	13.8	15.6	61.8
IT218746	6.6	2.0	13.5	13.3	64.7
IT218812	6.7	1.7	14.3	13.7	63.6
IT218813	6.4	1.8	12.0	14.9	65.0
IT218815	6.5	2.2	14.1	14.8	62.4
IT218816	6.3	2.0	15.9	13.4	62.4
IT218819	6.9	1.9	15.7	15.7	59.8
IT218820	6.8	1.8	14.5	14.5	62.4
IT218821	6.3	1.9	13.9	13.3	64.6
IT218824	6.0	2.0	13.8	18.4	59.8
IT218825	6.3	2.4	15.9	14.3	61.2
IT218829	6.4	2.0	14.9	14.9	61.8
IT218834	6.5	2.0	12.6	15.5	63.3
IT219476	6.5	2.4	12.0	13.7	65.4
IT220373	9.3	2.5	20.9	17.2	50.2
IT220375	6.4	2.3	18.6	14.1	58.7
IT108937	10.5	4.3	28.9	16.2	40.2
IT117188	11.0	4.2	33.0	12.1	39.7
IT201771	7.7	2.2	15.8	17.1	57.2
IT214496	7.8	2.5	11.3	15.8	62.6
IT216235	6.4	3.2	14.6	18.8	57.0
IT217404	9.8	3.4	18.5	15.9	52.5
IT217990	9.1	3.4	21.4	12.9	53.2
IT218833	9.0	4.6	21.3	18.2	47.0

- 1, 2년차 증식을 통해 얻은 종자를 이용하여 지방산 분석을 재실시한 결과 기존 문헌이나 자료의 지방산 조성과 크게 다르지 않는 범위에 지방산 조성의 분포를 보였음. 조지방의 경우 26.5~51.8% 범위로 평균은 41.2% 수준이었고, 일부 종자량이 부족해 조지방 함량을 구하지 못한 자원이 일부 있었음. 알파-리놀렌산의 함량 역시 최소 57.6%에서 최대 66.5% 범위이며, 평균은 62.7%로 나타났음. 팔미틱산은 평균 7.46%, 스테아릭산은 2.56%, 올레익산은 18.39%, 리놀레익산은 13.94%로 나타났음(표 3)

표 5. 들깨 유전자원의 조지방 및 지방산 조성 분포(2015~2016년)

구 분	조지방 (%)	지방산조성(%)				
		Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
최 대	51.8	7.7	2.9	18.1	17.3	66.5
최 소	26.5	5.7	1.6	10.8	10.8	57.6
평균±표준편차	41.2	6.3±0.29	2.1±0.26	14.7±1.38	13.9±1.18	62.7±1.83

표 6. 들깨 유전자원의 조지방 및 지방산 조성(2015~2016년)

자원명 (번호)	조지방 함량(%)	지방산 조성(%)				
		Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT103368	46.2	6.3	2.9	12.8	14.7	63.0
IT104232	39.0	6.3	2.4	11.9	16.6	62.6
IT104241	40.3	6.3	2.2	14.6	17.3	59.3
IT104486	35.5	6.3	2.2	15.0	15.0	61.3
IT104623	38.3	6.3	2.0	14.9	13.6	63.0
IT104886	44.8	6.5	2.3	14.8	14.2	62.0
IT104890	39.1	6.1	2.6	14.9	13.4	62.8
IT104930	39.9	6.6	2.3	15.4	16.1	59.3
IT105242	46.8	6.2	2.3	16.9	13.5	60.8
IT105275	46.1	6.2	2.4	12.6	14.7	63.8
IT105306	38.6	7.7	2.3	15.8	16.1	57.8
IT105386	44.6	6.3	2.1	13.6	15.0	62.7
IT105396	43.4	6.1	2.3	13.3	11.8	66.2
IT105424	36.1	6.1	2.0	15.0	13.4	63.3
IT105586	42.4	6.3	2.2	13.4	12.2	65.6
IT105748	42.7	6.1	1.9	14.5	12.7	64.6
IT105833	37.8	6.2	2.3	13.4	12.7	65.1
IT105864	38.5	6.7	1.9	13.1	14.5	63.5
IT105936	36.4	6.2	2.1	18.1	12.9	60.4
IT105939	29.7	6.5	2.0	14.4	10.8	66.2
IT108745	30.3	6.4	2.0	16.1	14.6	60.6
IT108845	29.9	6.1	2.5	15.4	14.0	61.7
IT109580	34.3	6.3	2.1	14.9	15.2	61.2
IT109582	41.3	6.4	2.5	13.2	14.2	63.5
IT110974	38.8	6.4	2.1	15.1	17.1	59.1

자원명 (번호)	조지방 함량(%)	지방산 조성(%)				
		Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT113112	45.6	6.2	2.0	12.1	16.4	63.1
IT116996	48.3	6.2	2.2	16.0	12.9	62.4
IT116998	43.7	6.2	2.6	16.4	13.2	61.4
IT117000	49.7	6.2	2.6	16.4	15.8	58.7
IT117001	48.3	6.2	2.2	16.6	14.8	60.0
IT117005	48.2	6.1	2.3	15.1	15.5	60.7
IT117007	46.6	5.9	2.3	14.7	14.9	61.9
IT117009	26.5	6.0	2.4	16.3	13.8	61.2
IT117011	48.6	5.9	2.3	16.7	13.5	61.2
IT117015	49.7	6.2	2.1	16.1	14.8	60.5
IT117016	51.8	6.4	2.0	14.9	14.0	62.4
IT117023	46.9	6.4	2.4	16.1	13.8	61.0
IT117031	42.2	6.5	2.6	17.6	13.1	60.0
IT117043	47.4	6.3	2.1	13.0	12.8	65.5
IT117044	48.3	6.8	2.5	12.6	14.0	63.8
IT117047	40.5	7.3	2.3	15.5	13.6	60.9
IT117049	41.9	7.0	2.5	15.4	13.1	61.8
IT117056	44.0	6.2	1.8	16.4	12.3	63.2
IT117058	42.1	6.2	2.1	12.4	13.6	65.3
IT117068	38.7	6.3	2.0	14.6	14.9	62.0
IT117070	37.3	6.1	2.1	14.9	15.6	61.1
IT117071	-	6.9	2.1	14.6	13.9	62.3
IT117073	-	6.0	2.0	16.8	13.4	61.5
IT117076	36.1	6.2	1.9	15.9	16.0	59.8
IT117078	35.7	6.3	1.9	15.9	15.5	60.1
IT117081	42.5	6.4	2.5	14.1	15.1	61.7
IT117084	47.8	6.3	1.9	15.0	13.7	62.9
IT117091	37.1	6.1	2.4	14.6	15.1	61.5
IT117113	37.5	6.0	2.0	14.1	14.0	63.7
IT117122	41.3	6.3	2.3	17.1	14.6	59.5
IT117127	42.7	6.3	2.0	14.4	14.6	62.5
IT117130	32.1	6.5	1.8	13.8	12.8	64.8
IT117139	36.5	6.2	2.2	16.5	13.5	61.3
IT117143	-	6.3	2.3	15.2	12.4	63.5
IT117146	-	6.6	1.8	16.5	13.4	61.4
IT117149	-	6.3	2.0	15.6	15.0	60.8
IT117150	-	6.3	2.3	15.6	13.5	61.9
IT117155	-	5.7	2.0	16.0	15.3	60.7
IT117161	-	6.3	1.9	16.0	15.1	60.4
IT117179	32.1	6.2	1.8	14.8	13.1	64.0
IT117182	36.5	6.7	1.9	13.2	13.8	64.1
IT117184	42.2	6.2	1.9	14.8	14.8	62.0
IT117187	43.0	6.4	2.0	14.4	14.2	62.8
IT117196	-	6.2	2.1	18.0	12.6	60.7
IT117205	-	6.1	1.8	15.8	11.5	64.5

자원명 (번호)	조지방 함량(%)	지방산 조성(%)				
		Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT117211	-	6.3	2.5	14.7	14.4	61.9
IT117214	43.0	6.5	2.0	15.9	12.3	63.0
IT119983	33.9	6.1	2.0	15.6	13.0	63.0
IT121520	42.0	6.2	2.1	16.3	13.4	61.7
IT157407	36.0	6.7	1.9	14.7	15.5	61.0
IT157414	42.8	6.4	1.9	15.9	13.3	62.3
IT157417	40.3	6.2	2.0	16.9	17.1	57.6
IT157432	41.4	6.4	1.8	13.2	14.0	64.2
IT157451	40.6	6.2	2.2	13.4	13.3	64.4
IT157462	44.5	6.4	2.1	13.6	13.1	64.5
IT157465	-	6.4	1.9	13.7	12.8	65.0
IT157466	-	6.5	1.9	13.7	14.0	63.7
IT157475	-	6.4	2.2	15.5	13.7	61.9
IT157482	-	6.3	2.1	15.7	13.8	61.9
IT157489	-	6.7	1.9	13.3	15.9	62.0
IT157494	-	6.4	1.9	14.3	15.7	61.4
IT157517	-	6.3	1.8	15.0	14.7	61.9
IT157536	-	6.5	2.0	11.7	16.0	63.5
IT157542	-	6.3	2.2	13.8	12.8	64.6
IT157553	-	6.3	1.8	15.1	13.7	62.8
IT157562	44.7	6.3	2.4	16.3	13.4	61.4
IT157564	43.2	7.1	2.4	14.5		
IT157580	42.4	6.3	1.8	14.4	13.0	64.2
IT157583	40.6	6.3	2.1	16.4	13.8	61.1
IT157585	-	6.0	2.3	12.4	14.4	64.6
IT157587	-	6.4	1.7	13.1	13.0	65.6
IT157591	-	6.2	1.8	14.3	13.0	64.5
IT157597	-	6.3	1.8	14.7	14.7	62.3
IT157604	-	6.1	2.1	13.8	15.2	62.2
IT158252	-	6.2	2.0	15.6	14.4	61.6
IT161051	45.0	6.5	2.1	16.0	14.3	60.8
IT162819	43.0	6.5	2.1	16.0	14.4	60.8
IT162845	-	6.3	1.8	14.1	13.3	64.3
IT175906	49.2	6.1	2.1	15.0	14.0	62.6
IT175914	36.1	6.0	1.9	14.1	14.7	63.1
IT175963	44.6	6.2	2.2	13.9	12.8	64.8
IT175982	44.0	6.4	1.8	16.8	12.1	62.9
IT176014	39.0	6.1	2.0	14.5	13.4	63.7
IT178421	42.2	6.1	1.9	15.1	14.5	62.3
IT178424	-	6.5	2.1	14.6	13.5	63.1
IT178744	42.6	6.4	2.0	14.9	14.3	62.4
IT178782	43.4	6.4	2.9	13.8	13.0	63.8
IT180471	43.5	6.4	1.8	14.1	13.9	63.6
IT180499	42.4	6.1	2.0	15.0	15.2	61.4
IT180555	43.5	6.1	1.9	14.4	13.0	64.4

자원명 (번호)	조지방 함량(%)	지방산 조성(%)				
		Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
IT180595	42.9	6.4	2.1	12.9	13.4	65.0
IT180605	44.8	6.4	2.0	12.8	14.8	63.7
IT180620	38.6	6.3	1.8	15.3	14.9	61.6
IT180653	37.2	6.1	1.9	14.5	14.2	63.2
IT181907	44.2	6.5	1.8	14.3	13.1	64.2
IT181908	41.8	6.1	2.4	13.0	12.6	65.6
IT181911	39.0	6.1	2.2	13.7	13.1	64.7
IT181994	37.6	6.2	2.0	14.9	14.7	62.0
IT181995	44.1	6.2	1.7	13.8	13.2	64.9
IT185608	38.0	6.1	2.1	14.9	13.3	63.3
IT185615	36.3	6.4	1.8	14.8	15.4	61.4
IT185616	36.1	6.2	1.9	15.1	14.2	62.4
IT185617	43.3	6.3	1.9	14.2	12.9	64.5
IT185620	41.4	6.6	2.1	13.8	14.2	63.0
IT185621	-	6.2	2.0	14.5	12.9	64.1
IT185632	41.4	6.6	2.0	15.3	12.6	63.3
IT185633	39.9	6.6	1.8	14.7	13.5	63.3
IT185635	42.1	6.5	2.3	15.0	13.3	62.7
IT185636	43.9	6.2	2.1	15.5	13.6	62.4
IT185641	41.2	6.3	2.6	13.5	14.2	63.1
IT185643	41.9	6.2	2.2	15.3	13.5	62.6
IT185645	42.3	6.4	2.3	12.6	13.0	65.4
IT185652	-	6.2	1.9	13.5	12.4	65.7
IT185653	42.3	6.3	1.7	14.1	12.3	65.2
IT185655	46.8	5.8	2.8	12.1	15.2	63.8
IT185656	-	6.4	2.4	12.8	13.3	64.9
IT185664	-	6.5	2.3	13.0	12.6	65.3
IT185665	-	6.3	1.8	12.6	13.0	66.1
IT185668	42.5	6.3	2.1	14.6	14.7	62.1
IT185669	44.4	6.5	2.0	15.3	13.4	62.7
IT185670	-	6.3	2.1	13.4	14.2	63.8
IT185672	43.2	6.3	1.9	14.1	13.3	64.2
IT191136	42.2	6.3	1.9	14.5	14.2	62.9
IT191180	44.4	6.3	1.7	13.6	14.1	63.9
IT195157	42.0	6.5	1.9	14.0	12.9	64.4
IT195228	-	7.7	1.6	10.8	13.1	66.5
IT195368	41.8	6.2	2.0	16.2	12.6	62.7
IT195495	41.5	6.5	2.0	16.8	14.8	59.7
IT196899	41.3	6.4	2.1	14.2	13.9	63.1
IT201766	31.4	6.3	1.8	13.3	13.3	65.1
IT207378	-	6.1	2.1	12.3	13.1	66.1
IT207381	41.9	6.3	2.0	15.6	12.7	63.2
IT207388	38.9	6.3	2.0	14.1	12.8	64.6
IT207390	37.8	6.2	1.8	16.1	14.5	61.2
IT207956	45.7	6.4	2.8	12.3	14.9	63.2

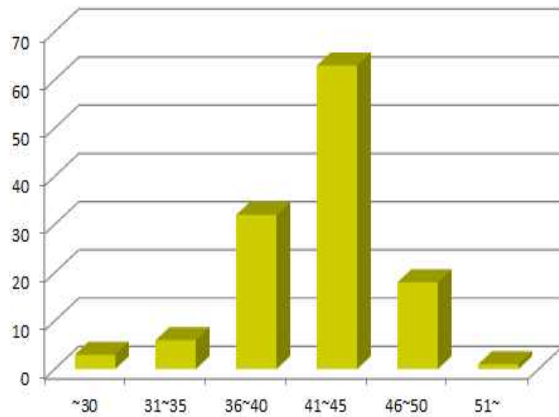


그림 9. 들깨 유전자원 조지방 변이

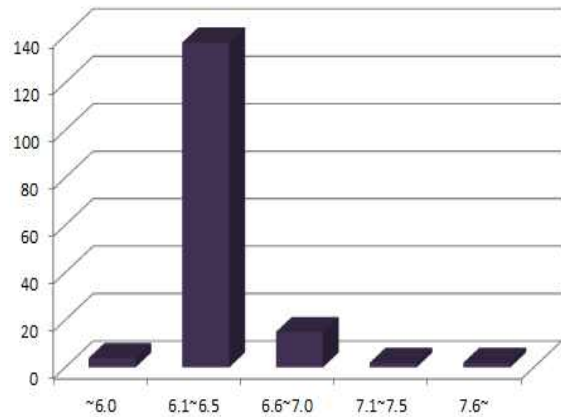


그림 10. 들깨 유전자원 팔미틱산 변이

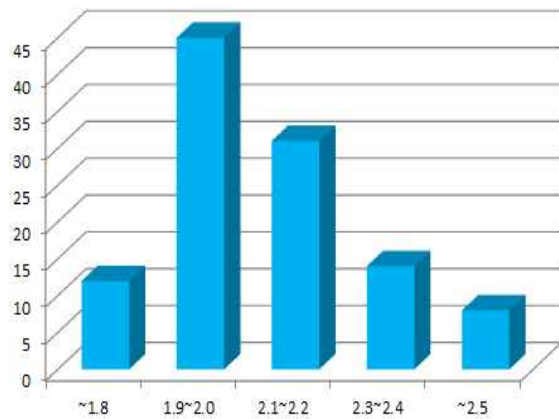


그림 11. 들깨 유전자원 스테아릭산 변이

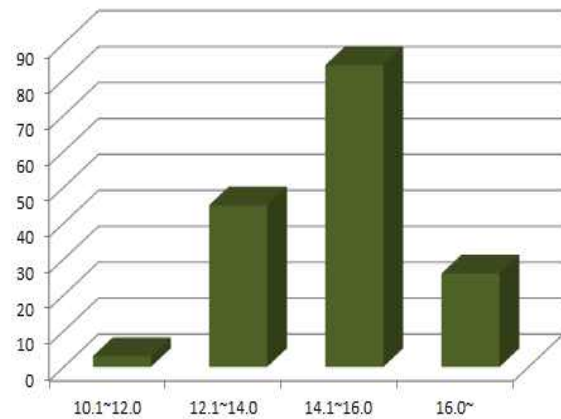


그림 12. 들깨 유전자원 올레인산 변이

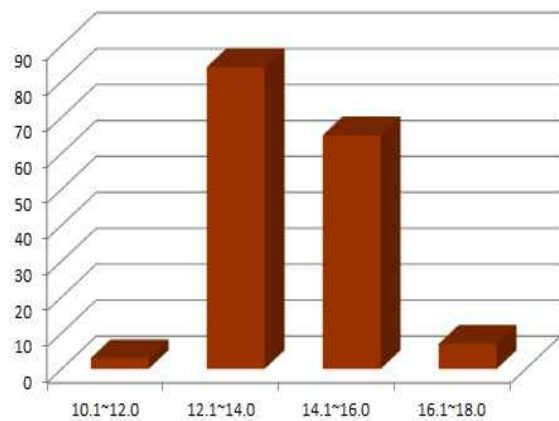


그림 13. 들깨 유전자원 리놀레익산 변이

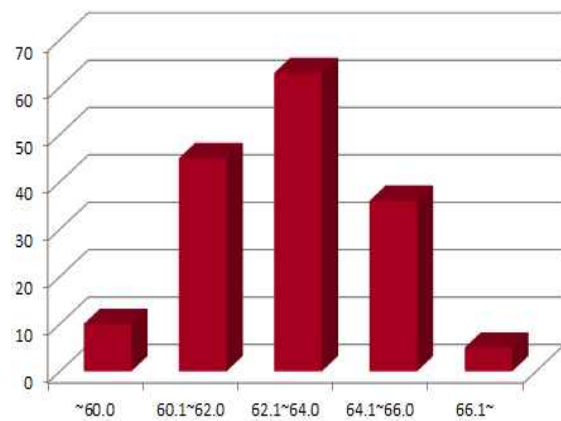


그림 14. 들깨 유전자원 리놀렌산 변이

(시험 2) 리놀렌산 함량에 따른 들깨 저장 안전성 연구('15~'16)

○ 2년차 리놀렌산 함량에 따른 들깨 저장 안전성을 분석하기 위해 먼저 들깨 육성 품종 중 20품종의 지방산 분석을 실시하였음. 들깨 20품종 내 리놀렌산 함량이 60.71%로 가장 낮은 '단조'와 69.81%로 가장 높은 '엽실'을 선발하여 저장 안전성 시험을 하였음 (표 4).

표 7. 들깨 품종별 리놀렌산 함량(2015년)

품종명	지방산 조성(%)				
	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
단조	6.42	2.44	17.11	13.32	60.71
안유	6.22	1.74	16.34	13.15	62.55
다실	5.98	2.22	13.89	13.04	64.87
옥동	6.59	1.85	12.01	14.12	65.43
백진	5.82	1.42	12.03	15.23	65.50
대유	5.88	1.97	12.82	12.73	66.60
백상	5.83	2.07	12.21	13.26	66.63
양산	5.47	2.23	11.18	14.25	66.87
다유	5.84	2.11	12.22	12.53	67.30
대실	5.69	2.21	13.59	11.16	67.35
청산	5.59	1.73	12.48	12.23	67.97
유진	5.71	1.92	10.82	13.50	68.05
아름	5.76	1.81	12.08	12.27	68.08
새엽실	5.78	1.64	12.21	12.13	68.24
백광	5.37	1.71	12.24	12.07	68.61
영호	5.15	1.93	12.21	11.98	68.73
광임	5.94	1.98	11.85	11.25	68.98
향임	5.81	1.35	11.52	12.32	69.00
화홍	5.82	1.75	11.59	11.24	69.60
엽실	5.81	1.61	11.31	11.46	69.81

○ '단조'와 '엽실' 품종을 170℃에서 착유한 후 각각 4, 10, 25℃에 저장한 후 총 18주간 매주 산가, 과산화물가 변이를 분석하였음. 그 결과, 산가의 경우 기간에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으며, 전체적으로 단조보다 엽실의 산가가 높은 경향을 보였음. '단조', '엽실' 두 시료 모두에서 4도와 10도에서는 과산화물가가 저장기간에 다른 차이가 크지 않으나 25도에서 저장한 경우 급격하게 과산화물가가 증가하는 경향을 보임. 특히 25도에서 저장기간이 길어질수록 단조보다 엽실이 더 빠르게 과산화물가가 증가하는 경향을 보였음(그림 13, 14).

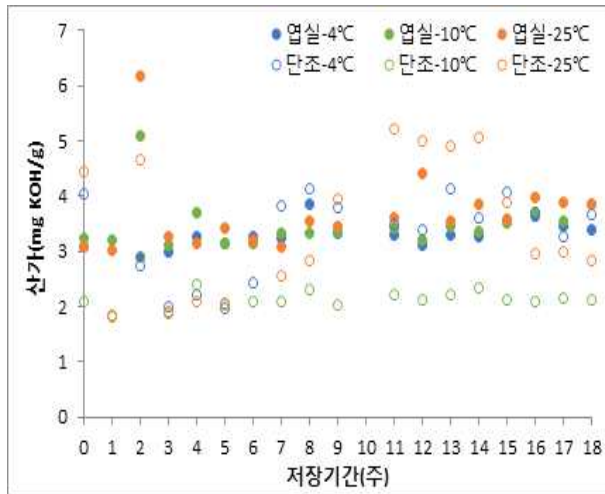


그림 15. 리놀렌산 함량에 따른 산가 변이(15)

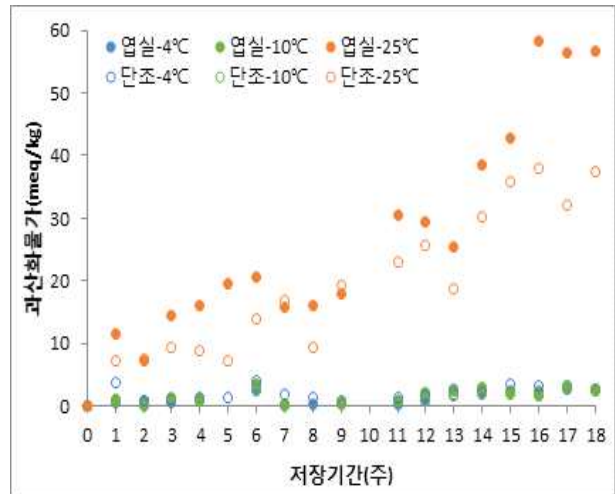


그림 16. 리놀렌산 함량에 과산화물가 변이(15)

○ 2016년에는 들깨 3품종 및 유전자원에 대한 들기름 품질 분석 후 저장 기간에 따른 저장안정성 분석을 실시하였음. 품종의 경우 2015년 분석했던 ‘엽실’, ‘단조’를 포함하여, 가장 많이 재배되고 있는 ‘다유’를 같이 분석하였으며, 각각의 조지방 함량, 착유량, 지방산 조성은 표 5와 같다. 지방함량은 엽실이 가장 높게 나타났으며, 리놀렌산 함량은 IT105396 자원이 가장 높게 나타났음. 유전자원은 2014~2015년 지방산 분석을 통해 리놀렌산 함량이 66.2%로 가장 높은 IT105396자원과 리놀렌산 함량이 57.6%로 가장 낮은 IT117009자원을 대상으로 저장안정성 분석을 실시하였음. 들깨 3품종은 40주간 4주마다 분석하였으며, 유전자원은 40주간 2주마다 분석하였음.

표 8. 들깨 품종 및 유전자원 조지방 및 지방산 조성(2016년)

품 종 및 자 원 명	조지방 (%)	지방산 조성(%)				
		Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)
엽실	48.0	6.7	26	16.5	15.1	59.1
다유	45.8	6.4	24	16.5	13.5	61.2
단조	43.3	6.5	25	18.2	14.3	58.4
IT105396	43.4	6.1	23	13.3	11.8	66.2
IT117009	43.5	6.8	26	16.3	16.7	57.6

표 9. 품종별 들기름 저장기간 및 온도에 따른 산가 변화

(단위: mg KOH/g)

품종명	온도 (℃)	저장기간(주)										
		0	4	8	12	16	20	26	30	34	38	40
엽실	4	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.1	0.9	0.9	1.0	1.0
	10	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.2
	25	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2	1.5	1.8	1.9
단조	4	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.4
	10	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.3
	25	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.1	1.2	1.3	1.7	2.2	2.4
다유	4	0.8	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8
	10	0.8	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.8
	25	0.8	0.7	0.6	0.7	0.7	0.8	0.9	0.9	1.0	1.5	1.7

표 10. 품종별 들기름 저장기간 및 온도에 따른 과산화물가 변화

(단위: meq/kg)

품종명	온도 (℃)	저장기간(주)										
		0	4	8	12	16	20	26	30	34	38	40
엽실	4	3.3	4.2	4.5	4.1	4.3	3.7	4.3	6.1	5.4	5.3	4.0
	10	3.3	4.0	3.8	4.2	4.8	6.7	8.4	16.0	23.7	35.2	22.7
	25	3.3	3.9	4.8	6.8	8.2	25.8	41.2	53.6	77.6	84.1	94.9
단조	4	3.1	3.3	3.6	3.9	4.0	4.0	3.3	3.3	2.8	2.9	4.2
	10	3.1	3.4	3.5	3.6	5.0	13.0	18.9	36.4	55.8	75.6	63.9
	25	3.1	4.0	4.2	4.3	5.9	27.7	47.8	78.6	91.0	119.7	151.7
다유	4	3.1	3.9	3.7	2.6	2.9	2.6	2.3	3.1	2.3	2.6	2.8
	10	3.1	3.1	3.2	3.1	3.6	4.0	6.5	6.9	13.8	25.6	28.9
	25	3.1	3.9	4.3	5.0	6.2	20.3	47.4	69.7	88.2	108.6	122.2

표 11. 품종별 들기름 저장기간 및 온도에 따른 요오드가 변화

(단위: g/100g)

품종명	온도 (℃)	저장기간(주)									
		0	4	12	16	18	23	32	34	38	40
엽실	4	189.7	199.3	189.8	175.9	192.6	179.6	192.5	186.8	177.3	198.1
	10	189.7	191.0	170.4	168.4	186.9	140.7	186.2	190.5	204.4	168.9
	25	189.7	203.1	195.8	187.9	191.7	186.7	198.2	197.5	200.7	196.9
단조	4	180.7	200.9	188.0	174.2	209.1	177.8	211.4	202.0	207.5	165.5
	10	180.7	193.0	186.1	172.4	188.3	189.5	169.6	189.3	197.5	196.2
	25	180.7	206.9	209.7	201.9	186.7	179.9	202.9	171.9	171.8	189.1
다유	4	184.9	195.4	199.5	186.3	195.7	169.8	171.4	179.9	179.8	183.0
	10	184.9	196.5	195.5	183.7	190.5	182.3	177.0	175.5	159.0	181.2
	25	184.9	195.4	221.6	215.3	197.4	182.8	201.4	199.1	183.7	187.6

표 12. 리놀렌산함량에 따른 들기름 저장기간 및 온도에 따른 산가 변화 (단위: mg KOH/g)

자원명	온도 (℃)	저장기간(주)																		
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	23	26	30	32	34	36	38	40
IT105 396(고)	4	0.9	1.0	0.8	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	1.0	1.4
	10	0.9	1.0	0.7	0.7	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	0.9	1.4
	25	0.9	1.1	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.1	1.1	1.0	1.1	1.2	1.4	1.5	1.7
IT117 009(저)	4	1.0	1.1	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.8	0.9	0.9	1.0	1.9
	10	1.0	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.4
	25	1.0	1.1	1.0	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.3	1.5	1.6	1.7

표 13. 리놀렌산함량에 따른 들기름 저장기간 및 온도에 따른 과산화물가 변화 (단위: meq/kg)

자원명	온도 (℃)	저장기간(주)																	
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	23	26	30	34	36	38	40
IT105 396(고)	4	04	06	07	06	08	13	16	17	18	18	18	19	19	15	15	17	19	23
	10	04	06	10	11	15	18	18	22	28	31	42	44	58	126	344	393	551	588
	25	04	08	08	11	22	23	42	43	58	68	248	286	391	511	810	914	1141	1426
IT117 009(저)	4	05	07	13	08	15	15	15	16	19	21	20	21	23	22	22	22	21	18
	10	05	08	21	14	17	18	19	21	24	28	33	34	33	50	115	112	156	242
	25	05	10	15	13	20	22	36	38	43	63	238	289	427	417	759	882	982	1232

표 14. 품종별 들기름 저장기간 및 온도에 따른 요오드가 변화 (단위: g/100g)

자원명	온도 (℃)	저장기간(주)															
		0	2	4	6	8	10	12	16	18	24	28	32	34	36	38	40
IT105 396 (고)	4	195.4	230.8	206.4	197.5	187.8	179.1	190.5	172.1	192.8	174.8	199.2	186.8	196.7	205.9	201.5	154.1
	10	195.4	227.2	190.1	190.0	189.3	182.3	214.6	175.5	199.9	162.8	196.9	189.3	194.9	183.8	189.4	192.0
	25	195.4	157.8	197.8	199.1	198.1	199.4	206.6	195.6	202.5	188.3	195.9	194.8	196.9	174.5	166.0	178.4
IT117 009 (저)	4	181.8	201.7	206.5	191.4	188.2	182.1	189.9	196.8	184.3	164.0	191.7	194.3	191.1	196.6	195.5	188.2
	10	181.8	235.6	220.2	182.3	177.5	175.7	206.5	169.8	190.7	153.5	213.7	187.2	187.0	178.9	169.0	171.2
	25	181.8	181.5	196.2	191.9	192.2	187.3	204.3	166.8	179.9	186.2	180.9	191.3	165.5	183.4	162.4	197.3

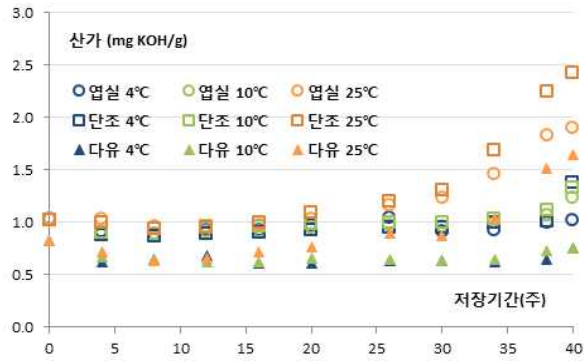


그림 17. 품종별 들기름 내 저장 기간에 따른 산가 변이

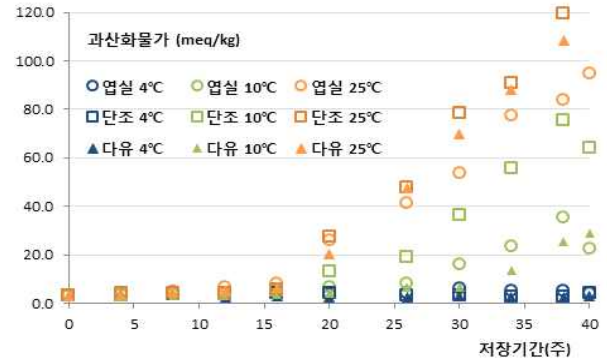


그림 18. 품종별 들기름 내 저장 기간에 따른 과산화물가 변이

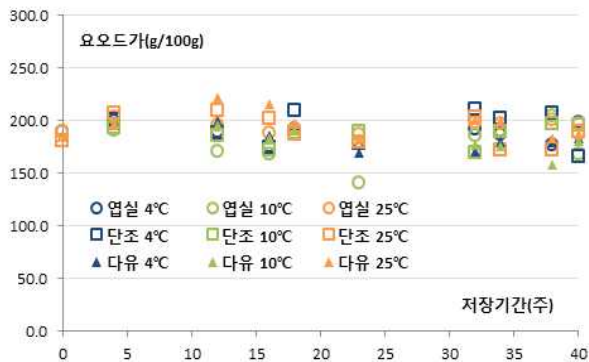


그림 19. 품종별 들기름 내 저장 기간에 따른 요오드가 변이

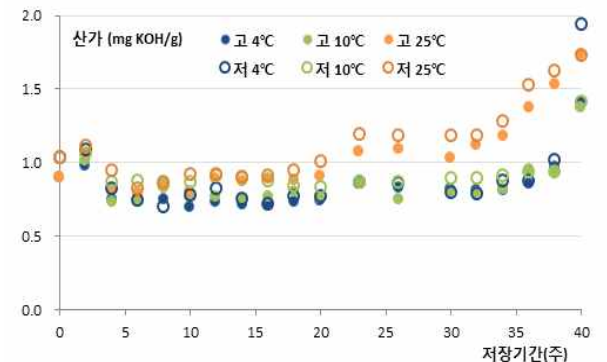


그림 20. 리놀렌산 함량에 따른 들기름 내 저장 기간별 산가 변이

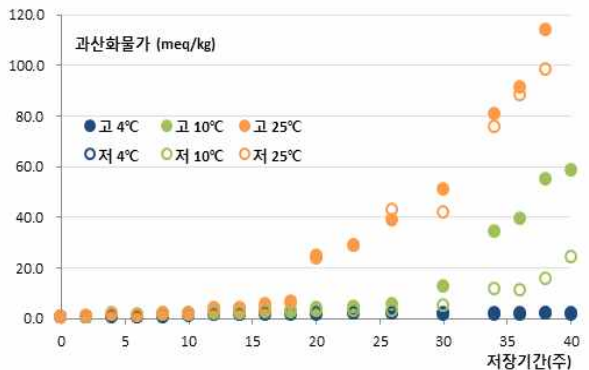


그림 21. 리놀렌산 함량에 따른 들기름 내 저장 기간별 과산화물가 변이

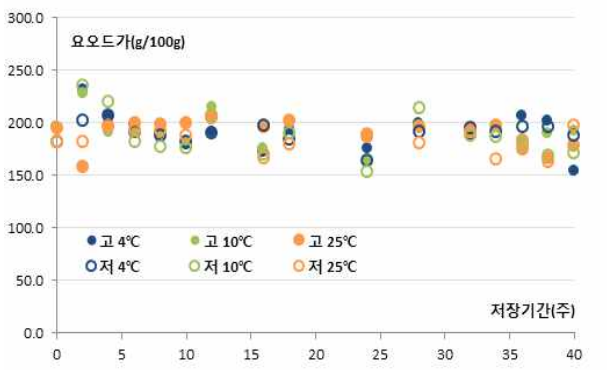


그림 22. 리놀렌산 함량에 따른 들기름 내 저장 기간별 요오드가 변이

- 총 40주간 4주 단위로 3품종에 대한 산가, 과산화물가, 요오드가 변이를 분석한 결과 품종 간 다소 차이는 있으나, 산가와 요오드가의 경우 4, 10°C에서는 저장기간에 따른 차이가 크지 않으나, 25°C에서 저장한 경우 20주 이후 산가가 증가하는 경향을 보였음. 과산화물가 분석 결과에서도 20주 이후에는 4°C 저장을 제외하고 10, 25°C 저장의 경우 급격하게 과산화물가가 증가하는 경향을 보였음. 리놀렌산 함량에 따른 들기름 내 저장기간별 산가 변이에서도 역시 산가와 요오드가의 경우 4, 10°C에서는 저장기간에 따른 차이가 크지 않으나, 25°C에서 저장한 경우 과산화물가가 증가하는 경향을 보였으며, 20주 이후 큰 폭으로 증가하는 경향을 보였으며, 리놀렌산 함량이 높은 자원의 산가가 더 높게 나타나, 리놀렌산 함량과 산가간의 관련이 있음.

<제2협동과제> 들기름 내 리놀렌산 정제기술 개발 및 저장 안전성 연구
가. 연구수행내용

□ 1차년도: 들기름 내 순수 리놀렌산 정제기술 개발

(1) 표준 추출물/분획물 조제

- 시료는 음건한 후 methanol을 이용해 계통적 추출을 실시하며 3회 이상 실시하여 충분한 methanol extract양을 확보하여 표준 추출물을 만든다.

(2) 크로마토그래피 및 Prep-HPLC 분석

- Methanol 추출물을 물에 현탁하여 유기용매로 각각 분획한다. 사용하는 유기용매는 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 등이며, 현탁된 추출물과 각 유기용매를 혼합하여, 두 층으로 분획되면 각 유기용매 분획을 필터하여 농축한 다음 분획물로 만든다. 분획물의 조제는 극성에 따라 순차적으로 진행한다.

(3) 기능성 물질의 분리 및 동정

- 선정된 표준 분획물층은 chromatography를 통해 물질을 분리 정제하여 이 과정은 물질을 수순하게 분리하기 위해 반복 진행된다. 또한 recycling prep-HPLC 등의 기계를 이용하여 소량의 물질을 분리하며 전개용매는 TLC를 통해 분리능이 좋은 용매를 선정하여 실험을 진행한다. 그 외 분획물에서도 신물질 발견과 성분종류의 database구축을 위해 동일하게 물질분리를 실시한다.
- Chromatography는 즉, 비극성 용매인 hexane, MC 및 극성 용매인 ethylacetate, butanol을 이용하여 활성실험을 위한 분획물로 제공된 활성분획을 이용하여 분리를 실시한다.
- 크로마토그래피 등의 기계를 이용하여 소량의 물질을 분리하며 전개용매는 TLC를 통해 분리능이 좋은 용매를 선정하여 실험을 진행하며, 순수물질의 동정은 TLC 등을 이용하여 확인 후 HPLC 등을 이용하여 순도 확인 후 스펙트럼 분석용 표준품으로 사용한다.
- Chromatography를 통하여 분리된 순수결정은 HPLC 방법으로 순도를 확인하고 각 분석스펙트럼을 찍는다. 사용하는 분석기기는 IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, COSY, HMQC, HMBC, MS, FAB-MS 등을 이용하며 각 스펙트럼 데이터 분석을 통하여 구조를 결정하여 성분을 밝힌다.

□ 2차년도: 들깨 리놀렌산의 대량분리 및 기능성 물질의 밸리데이션 분석

(1) 기능성 물질의 대량분리

- 1차년도에서 조제한 표준 추출물 및 표준 분획물을 이용하여 chromatography를 통해 물질을 분리 정제하여 이 과정은 물질을 수순하게 분리하기 위해 반복 진행된다. 또한 recycling prep-HPLC 등의 기계를 이용하여 기능성물질을 대량 분리하여 *in vivo* 동물실험 및 작용 메카니즘 구명을 위한 재료로 활용한다.

(2) 초임계 추출 및 HSCCC

- 초임계 이산화탄소를 이용한 분리: 초임계유체기술은 물질이동과 열 이동이 빠르고, 저점도, 높은 확산계수로 인한 미세공으로 빠른 침투성 등과 같은 초임계유체의 장점을 이용한 기술로서, 기존의 반응 및 분해, 추출, 증류, 결정화, 흡수, 흡착, 건조, 세정 등의 공정에서의 저효율, 저품질, 저속, 환경에의 악영향 등과 같은 기술적 어려움을 해결할 수 있는 새로운 혁신기술로서 주목받고 있다.

- HSCCC(High Speed Countercurrent Chromatography): 두 가지 섞이지 않는 유기용매를 이용하여 분리하는 방법으로, 고체의 고정상이 없다. 한 가지의 액체가 이동상이고, 나머지는 고정상인 것이다.

(3) 기능성 물질의 함량분석 및 밸리테이션 연구

- 들깨의 기능성물질 및 유사물질의 함량을 HPLC로 분석하여 정량하며, HPLC 분석을 위해 샘플은 메탄올로 추출하여 필터한다.
- HPLC 조건: HPLC chromatogram은 Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA)가 장착된 Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA)를 사용하였으며, Phytosterol 분석을 위해 사용한 HPLC 조건(Table 1)에 따라 분석하였다.
- HPLC condition

HPLC	Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA)
Column	Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA). SunFire C-18 stainless steel column (2.1 mm × 50 mm, 5µm thickness)
Wavelength	210nm
Temperature	30 °C
Solvent	Solvent A : MeOH Solvent B : ACN
Flowrate	1 ml/min 0 min 30% A : 70% B 20 min 30% A : 70% B
Gradient	30 min 0% A : 100% B
Condition	40 min 0% A : 100% B 45 min 30% A : 70% B 50 min 30% A : 70% B

- 밸리테이션 실험으로 LOD(background noise와 구별되는 분석물질의 가장 낮은 농도)와 LOQ(정확성과 정밀성을 유지하면서 정량할 수 있는 분석물질의 최대 및 최소량)를 분석한다.

(4) 항당뇨 활성 탐색

- Aldose Reductase 억제활성 측정: 시료전처리과정으로 음건한 샘플을 각각 건조중량 3.0 g에 300 mL MeOH을 이용하여 온침추출법으로 농축물을 수득한다. 수득한 농축물 1 mg을 1 mL의 DMSO로 희석하여 실험을 진행한다. Aldose reductase 효소적출을 위해 Sprague-Dawley rat(무게 250-280 g)으로부터 눈을 적출하여 deep freezer에 하루 이상 보관 후 수정체만 분리하여 원심분리(10,000 rpm, 4°C, 20분)를 통해 효소를 분리하여 사용한다.
- 사용한 시약은 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.2), 1.6 mM NADPH와 0.025 M DL-glyceraldehyde을 사용한다. 비교대조군으로는 quercetin을 동일농도로 조제하여 IC₅₀ 수치를 비교한다. 그리고 분석방법은 Hitachi U-3210 spectrophotometer를 이용하여 측정하며, 340 nm에서 4분간 측정하여 데이터화한다.

□ 3차년도: 들깨 리놀렌산의 저장안전성 연구

(1) GC-MS 분석법

- 기능성물질은 HPLC 분석법 및 GC-MS 분석법을 통하여 산패정도에 따른 리놀렌산의 함량의 정도차이를 분석하고, 최적의 저장조건을 찾는다.

○ GC analytical instruments and conditions

Instrument	GC model : HP 5890A
Detector	FID
Column	DB-6 capillary (60 m × 0.32mm, 0.25 μm film thickness, Hewlett Packard)
Injector / Detector temperature	280 / 300 °C
Record	HP 3392A
Column temperature	120°C(5min) → 270°C(20min)
Carrier gas	Helium
Split ratio	1 : 15

○ MS analytical instruments and conditions

Instrument	MS model : HP 5970 Mass selective detector
Split flow	15 ml/min
Scan mode	50-600 amu
Threshold	400
Sample rate	1.1 scans/s
Ionizing voltage	70ev
Em voltage	2000 V

(2) 들깨 품종 및 들기름 추출방법에 따른 저장안전성 연구

- 들깨 품종 간 수확 후 저장 온도 및 시기에 따른 산패 비교 분석한다.
- 들기름 추출 조건(관행 및 초임계)에 따른 산패 비교 분석한다.

(3) 들깨 및 들기름의 저장, 가공 등 현장의 저장안전성 연구

- 농협, 영농협회 등 수집상의 보관방법 또는 저장방법에 따른 산패 비교분석으로 현장의 실태를 파악하고, 안전한 저장방법에 대한 저장조건을 찾는다.

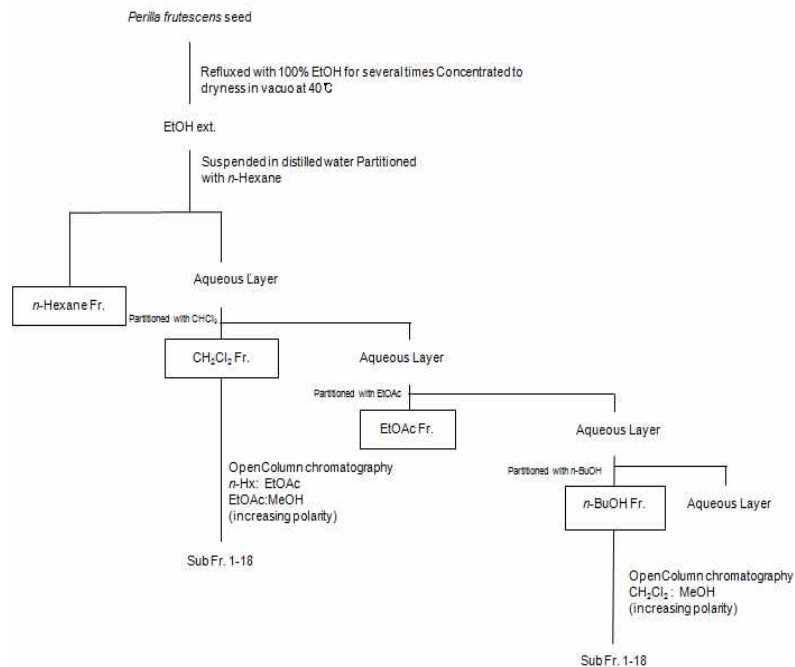
나. 연구결과

□ 1차년도: 들기름 내 순수 리놀렌산 정제기술 개발

(1) 표준 추출물/분획물 조제

- 추출물 및 분획물의 조제방법: 들깨 시료는 ethanol을 이용해 계통적 추출을 실시하며 5회 이상의 추출을 실시하여 충분한 ethanol extract양을 확보하고 시료의 ethanol extract는 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH의 극성별 유기용매를 통해 각각의 분획물을 수득한 후, chromatography를 통해 물질을 분리 정제하며 이 과정은 물질을 순수하게 분리하기 위해 반복 진행된다.
- 표준 추출물 및 분획물의 확보: 들깨 6.0kg 을 취하여 ethanol (21L × 3) 씩 사용하여 온

침출한 후, 추출액을 50℃ 이하에서 감압 농축하여 ethanol 추출물 1285.3g을 얻었다. Ethanol 추출물을 증류수에 현탁 시키고 *n*-hexane으로 4회, EtOAc 7L로 3회, CH₂Cl₂로 3회, *n*-BuOH로 2회씩 순차적으로 분획한 다음 유기용매층을 농축하여 *n*-hexane 분획물 (222.8g), EtOAc 분획물(10.4 g), CH₂Cl₂ 분획물 (9.3 g), *n*-BuOH 분획물 (11.4 g)을 획득하였다.



Scheme 1. 추출 및 분획 모식도

(2) 크로마토그래피 및 Prep-HPLC 분석

- 크로마토그래피 및 Prep-HPLC 분석: CH₂Cl₂ 분획물 (3.1 g)을 open column chromatography를 이용하여 *n*-hexane/EtOAc (100:0 → 0:100), EtOAc/MeOH (100:0 → 0:100)의 조건으로 분리하여, 18개의 fraction을 획득하였다 (그림 1).

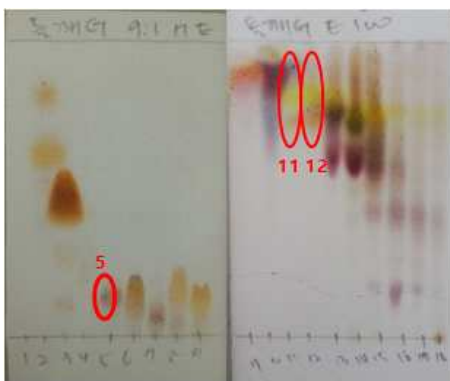


그림 1. 들깨 CH₂Cl₂ 층 grouping TLC

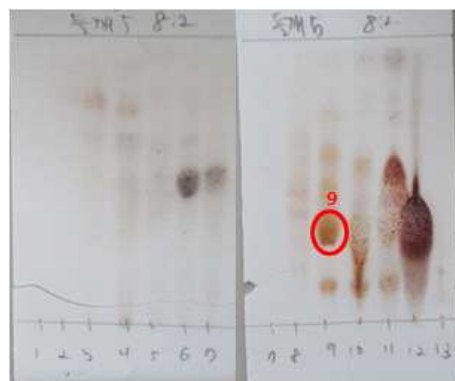


그림 2. CH₂Cl₂층 5번 fraction을 재분리한 후의 TLC

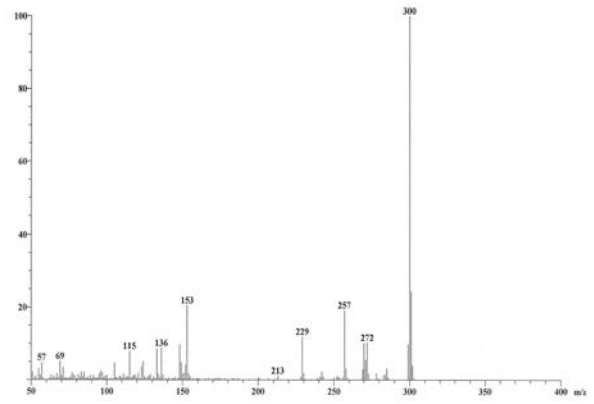
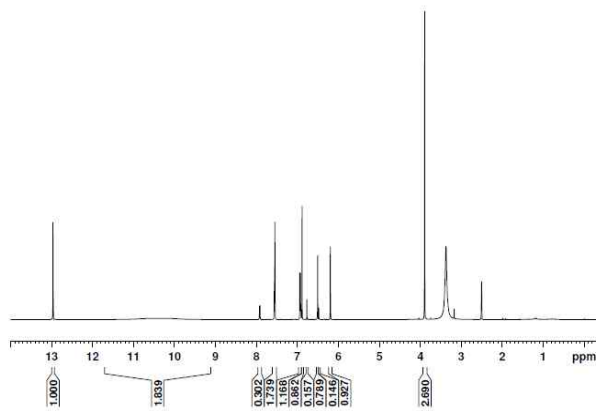
(3) 기능성 물질의 분리 및 동정

- CH₂Cl₂층 5번 fraction에서 여러 물질이 섞여 있음을 확인하고 (그림 1), silica gel을 이용하여 *n*-hexane/EtOAc (100:0 → 0:100), EtOAc/MeOH (100:0 → 0:100)의 조건으로 극성변화를

¹H NMR spectrum of compound **1** in CDCl₃. The spectrum shows a sharp singlet at 7.26 ppm (1H), a sharp singlet at 5.10 ppm (1H), and a complex multiplet region between 0.5 and 2.5 ppm. Integration values are shown below the baseline: 1.000 for the peak at 7.26 ppm, 1.363 for the peak at 5.10 ppm, and a series of values (2.166, 2.414, 3.513, 1.233, 6.074, 5.921, 3.556, 5.071, 3.222, 3.503, 5.645, 10.032, 2.978) for the multiplet region.

The chemical structure of 3-OH-cholesterol is shown. It consists of a steroid nucleus with a hydroxyl group at C3, a double bond at C5, and a branched alkyl chain at C17. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.

- 31 -



(A) (B)
 그림 5. CH₂Cl₂층 12번 fraction 재결정 후의 ¹H-NMR(A), MS(B)

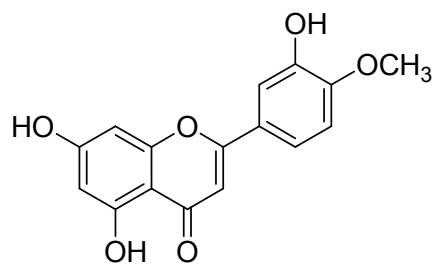
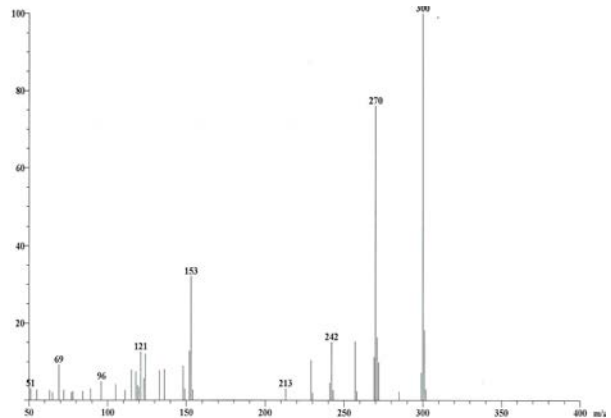
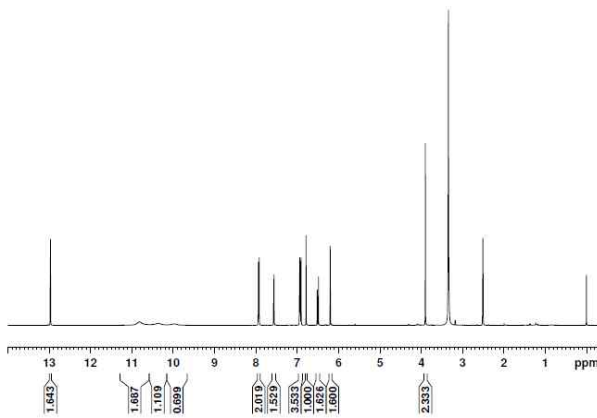


그림 6. diosmetin의 구조



(A) (B)
 그림 7. 들깨 CH₂Cl₂층 11번의 ¹H-NMR(A), MS(B)

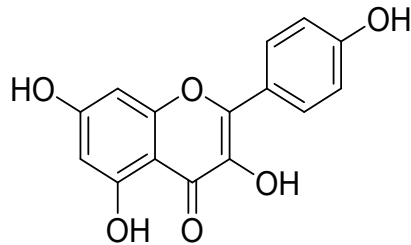


그림 8. Kaempferol의 구조

- CH_2Cl_2 층 중 11번 fraction의 모액에서 여러물질이 섞여 있음을 확인하였다. 이를 LH-20 sephadex를 이용하여 재분리를 하였고, MeOH/D.W (50:50 → 100:0)까지 극성변화를 주면서 chromatography를 시행하여 7개의 fraction을 획득하였다. 그 중 7번 fraction이 단일 물질임을 확인하였다(그림 9). 이를 $^1\text{H-NMR}$ data를 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ 의 12.9ppm에 singlet으로 나온 peak를 통하여 기본적으로 flavonoid 계열의 화합물임을 알아낼 수 있었다. 6.9, 7.9ppm의 2개의 peak를 통하여 B-ring이 A_2B_2 -type인 것을 확인하였다. 또한 6ppm과 7ppm 사이의 peak에 6, 8, 3번 proton이 존재하는 것을 알 수 있었고, 이를 종합하여 기존문헌들과 비교하여 apigenin으로 동정하였다 (그림 10, 11).

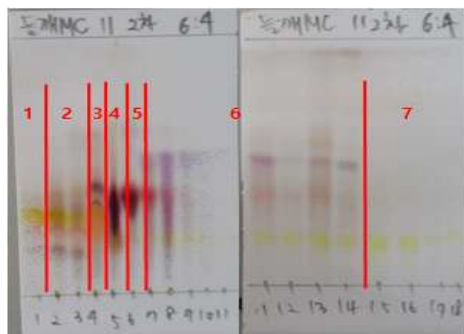
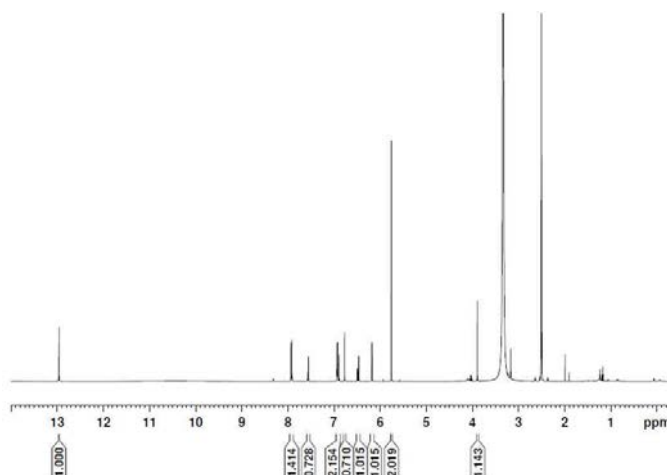
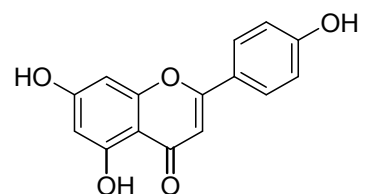
그림 9. 들깨 CH_2Cl_2 층 11번(모액)의 재분리후 TLC사진그림 10. 들깨 CH_2Cl_2 층 11번(모액) 재분리후 7번의 $^1\text{H-NMR}$ 

그림 11. apigenin의 구조

- BuOH 분획물(3.8 g)을 Open column chromatography를 이용하여 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100 :

0 → 0 : 100)의 조건에서 18개의 fraction을 얻었다 (그림 12). 이 중, 5번 fraction이 보라색을 띠는 단일 물질임을 확인하고 (그림 13), $^1\text{H-NMR}$ data를 확인하였을 때, $^1\text{H-NMR}$ 의 5.3 ppm에 이중결합의 peak를 확인할 수 있었다. 5.4ppm에 singlet으로 나온 peak를 통하여 glucose의 anomeric proton임을 알 수 있었다. 이를 종합하여 기존문헌들과 비교하여 daucosterol으로 동정하였다 (그림 14, 15).

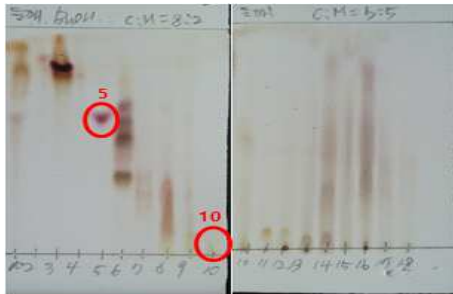
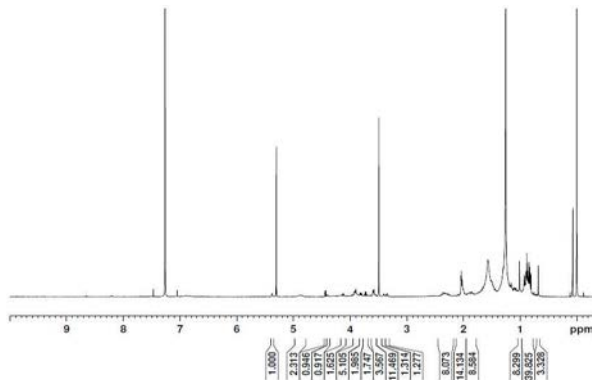


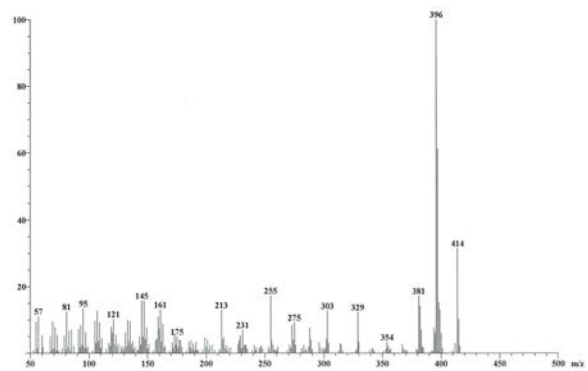
그림 12. 들개 BuOH 층의 Grouping TLC



그림 13. 들개 BuOH층 5번 fraction TLC



(A)



(B)

그림 14. 들개 BuOH층 5번의 $^1\text{H-NMR}$ (A), MS(B)

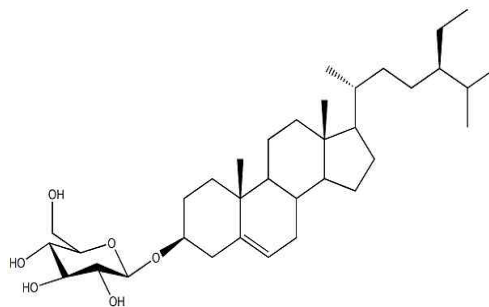


그림 15. Daucosterol의 구조

- 들개 BuOH층 10번 fraction에 여러 물질이 섞여있음을 확인하였다 (그림 12). 이를 LH-20 sephadex를 이용하여 재분리를 하였고, MeOH/D.W (50:50 → 100:0)까지 극성변화를 주면서 chromatography를 시행하였다. 이용하여, 8개의 fraction을 다시 분리하였다 (그림 19). 그 중에서 8번을 $^1\text{H-NMR}$ data를 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ 의 12.9ppm에 singlet으로 나온 peak를 통하여 기본적으로 flavonoid 계열의 화합물임을 알아낼 수 있었다, 6.8, 7.4ppm 사이의 갈라진 peak를 통하여 B-ring이 ABX-type인 것을 확인하였다. 또한 6ppm과 7ppm 사이의 peak에 6, 8, 3번 proton이 존재하는 것을 알 수 있었고, 이를 중

합하여 기존문헌들과 비교하여 luteolin으로 동정하였다 (그림 17, 18).



그림 16. 들깨 BuOH층 10번 fraction을 재분리한 TLC

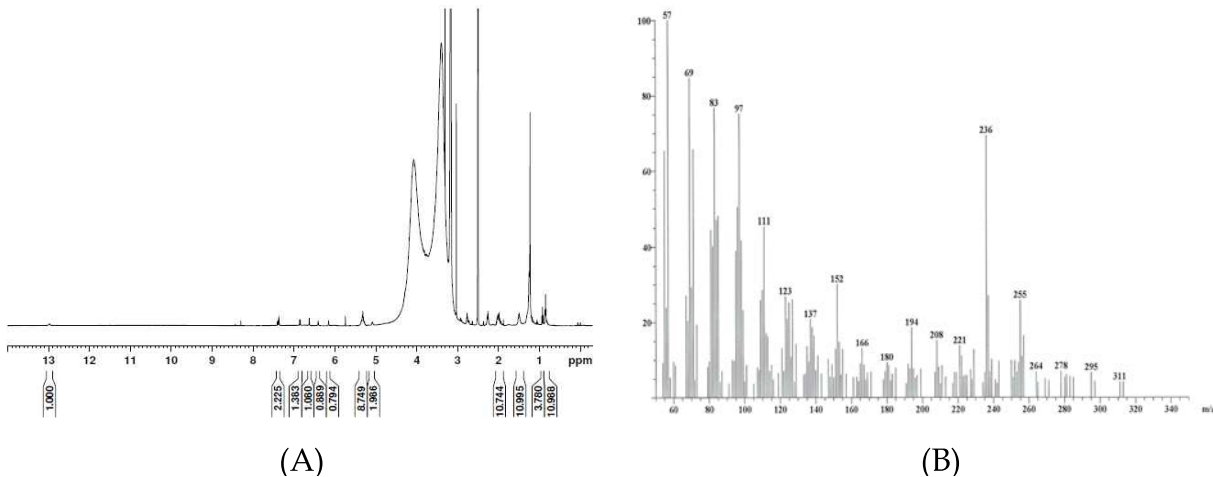


그림 17. 들깨 BuOH층 10번 fraction을 재분리한 후 8번의 $^1\text{H-NMR}$ (A), MS(B)

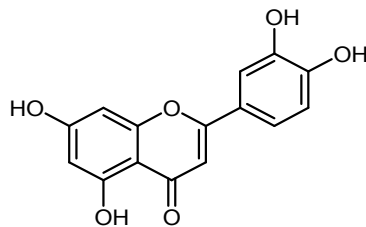


그림 18. luteolin의 구조

(4) 리놀렌산 정제기술

○ 들기름을 이용한 리놀렌산의 분리정제:

- 특수시약 처리 실험 방법: 들깨 기름을 MPLC를 이용하여 비극성 조건으로 오일을 용출하였다. 비극성 조건으로 용출한 오일을 모두 합쳐 농축하여 뒤, 일정 시약을 첨가하여, water bath에서 65-70°C의 온도로 약 1시간 반응시킨다. 반응물에 일정량의 특수시약과 유기용매를 첨가하여 용해를 하여 반응을 시킨다. 반응시킨 오일을 냉장고에 약 24시간동안 유지한다. 24시간 후, 침전물을 filter paper를 이용하여 걸러낸 뒤, 산(acid)과, pH Test paper를 이용하여, pH를 산성으로 맞춘다. 상층액을 취하고, 지방산을 얻어내기 위하여

비극성 용매 5ml를 첨가한다. 층 분리 후 상층액을 취하여, 제습하고 남은 수분과 불순물을 제거한다.

- NaOH 처리 실험 방법: 오일샘플을 NaOH에 분획, 상층액을 취한다. 취한 상층을 염산(HCl)과, pH test paper 이용하여 약산성으로 조절한 뒤, 다시 비극성 용매로 분획, 하층액을 취하여 Sodium Sulfate로 남은 수분과 불순물 제거하여 실험한다.

○ GC를 이용한 분석

- methylation: GC-FID로 성분분석을 확인하기 위하여 샘플 3-5mg, Sodium hydroxide beads (20mg), iodomethane (0.1ml), 그리고 DMSO (0.5ml)를 30분간 반응시킨 뒤, 증류수와 CH_2Cl_2 를 이용하여 분획하였다. 1시간 뒤, CH_2Cl_2 층을 E-tube에 담아 질소를 이용하여 용매를 증발시킨 시료를 분석하였다.

- GC- FID condition

GC : Agilent 7890A(Agilent, USA)

column : DB-Wax(Agilent, 30mm*0.25mm*0.25um)

Injector : 250℃

Detector : FID(280℃, H₂ 35, Air 350, He 35ml/min)

Oven : 50℃ 1min

200℃ 25℃/min, 5min

230℃ 3℃/min, 20min

Injection : 1uL (split ratio 20)

표 2. FAME standard

○ FAME standard

1. Butyric Acid Methyl Ester (C4:0)
2. Caproic Acid Methyl Ester (C6:0)
3. Caprylic Acid Methyl Ester (C8:0)
4. Capric Acid Methyl Ester (C10:0)
5. Undecanoic Acid Methyl Ester (C11:0)
6. Lauric Acid Methyl Ester (C12:0)
7. Tridecanoic Acid Methyl Ester (C13:0)
8. Myristic Acid Methyl Ester (C14:0)
9. Myristoleic Acid Methyl Ester (C14:1)
10. Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:0)
11. cis-10-Pentadecenoic Acid Methyl Ester (C15:1)
12. Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0)
13. Palmitoleic Acid Methyl Ester (C16:1)
14. Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0)
15. cis-10-Heptadecenoic Acid Methyl Ester (C17:1)
16. Stearic Acid Methyl Ester (C18:0)
17. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1n9c)
18. Elaidic Acid Methyl Ester (C18:1n9t)
19. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2n6c)
20. Linolelaidic Acid Methyl Ester (C18:2n6t)
21. γ-Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n6)
22. α-Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n3)
23. Arachidic Acid Methyl Ester (C20:0)
24. cis-11-Eicosenoic Acid Methyl Ester (C20:1n9)
25. cis-11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester (C20:2)
26. cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n6)
27. cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n3)
28. Arachidonic Acid Methyl Ester (C20:4n6)
29. cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester (C20:5n3)
30. Heneicosanoic Acid Methyl Ester (C21:0)
31. Behenic Acid Methyl Ester (C22:0)
32. Erucic Acid Methyl Ester (C22:1n9)
33. cis-13,16-Docosadienoic Acid Methyl Ester (C22:2)
34. cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid Methyl Ester (C22:6n3)

○ 리놀렌산 분석결과

- 들깨기름과 분획물을 이용하여 여러 처리를 한 뒤, GC-FID를 이용하여 분석했다. 그 결과, 먼저 모든 실험구에서 γ-linolenic acid보다는 α-linolenic acid의 함량이 많은 것을 보였고, 특수시약 처리를 한 실험구의 리놀렌산 함량이 NaOH처리를 한 실험구보다 많거나 비슷한 수치를 보였으며, 50%이상의 리놀렌산 함량을 보인 3개의 실험구는 각각 79.892%, 61.136%, 51.869%의 수치를 나타내었으며, 3개의 실험구 모두 특수시약을 처리하였다. 그 중 실험구 중 Treatment G조건으로 처리한 실험구의 리놀렌산 함량이 79.892%로 가장 크게 나왔으며, 이는 리놀렌산의 함량증가가 있었다고 생각되어진다.

표 3. Content of linolenic acids in Perilla

Treatment	α -linolenic acid	γ -linolenic acid
Treatment A	1.333%	0%
Treatment B	3.841%	0.106%
Treatment C	2.586%	5.881%
Treatment D	10.869%	9.438%
Treatment E	4.234%	0%
Treatment F	1.184%	0%
Treatment G	79.892%	0%
Treatment H	0%	0%
Treatment I	2.900%	0%
Treatment J	6.456%	0%
Treatment K	61.136%	0%
Treatment L	51.869%	0%
Treatment M	0%	0%
Treatment N	0%	0%

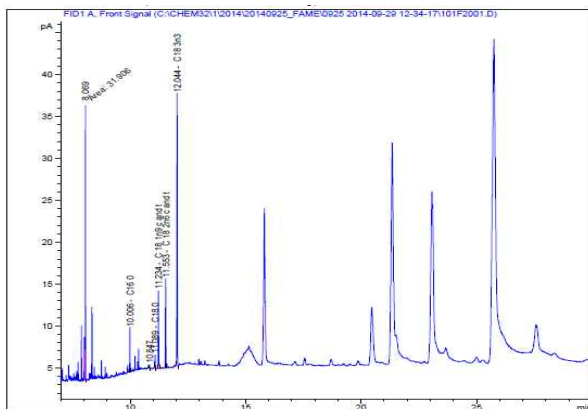


그림 19. Treatment A

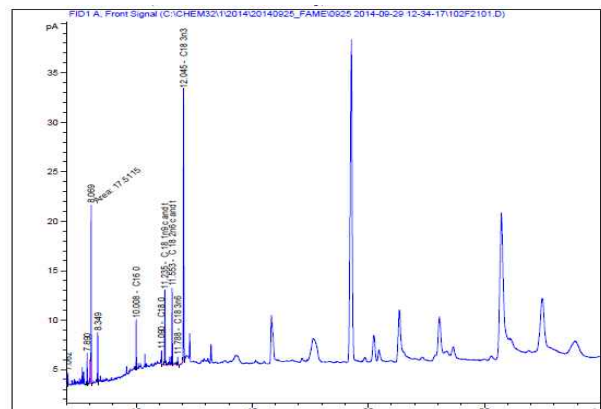


그림 20. Treatment B

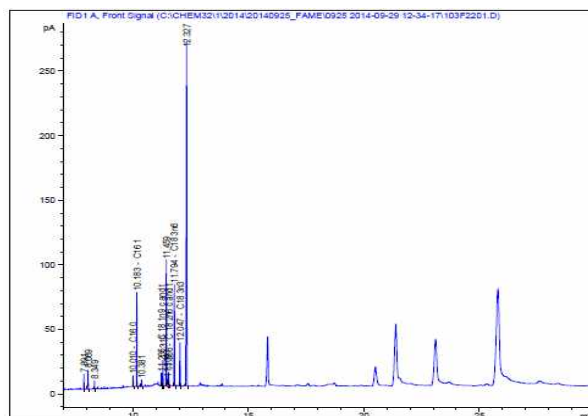


그림 21. Treatment C

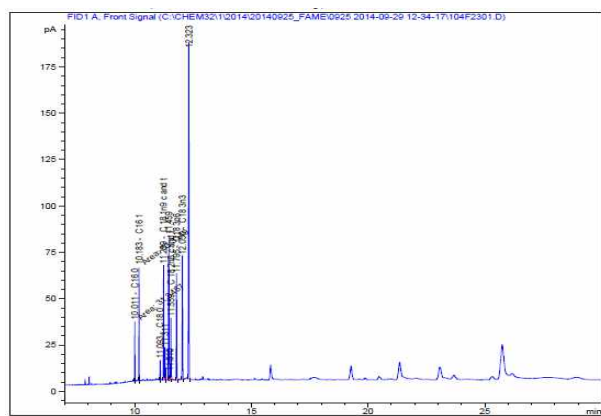


그림 22. Treatment D

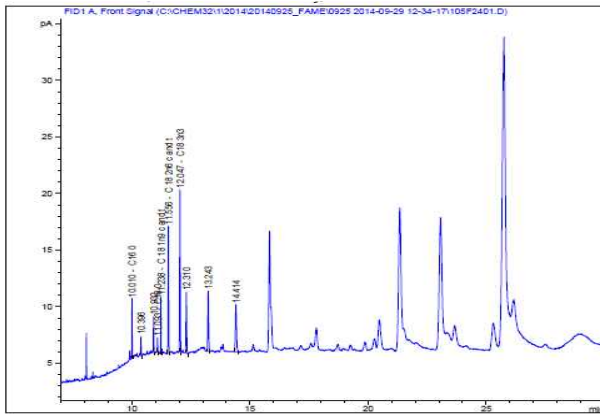


그림 23. Treatment E

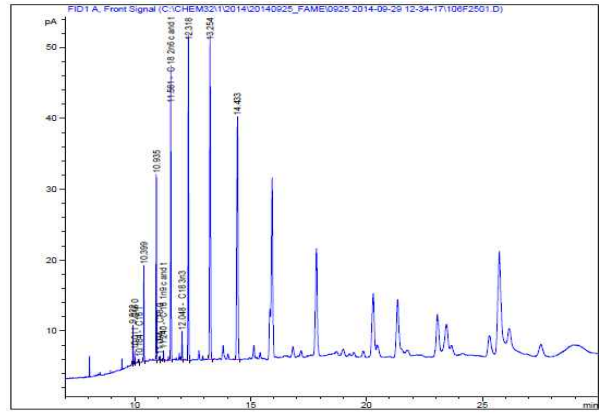


그림 24. Treatment F

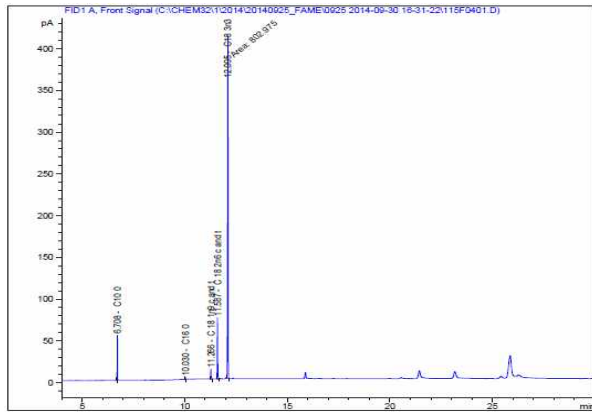


그림 25. Treatment G

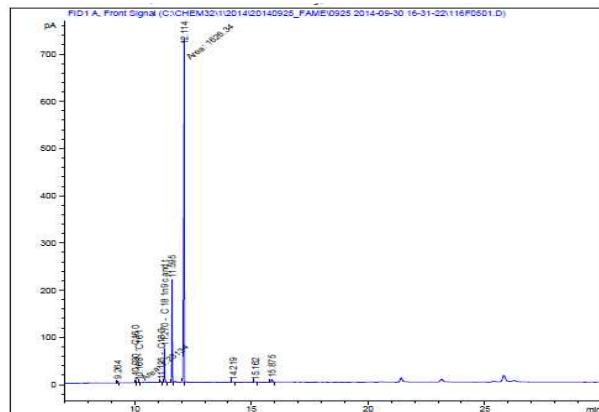


그림 26. Treatment H

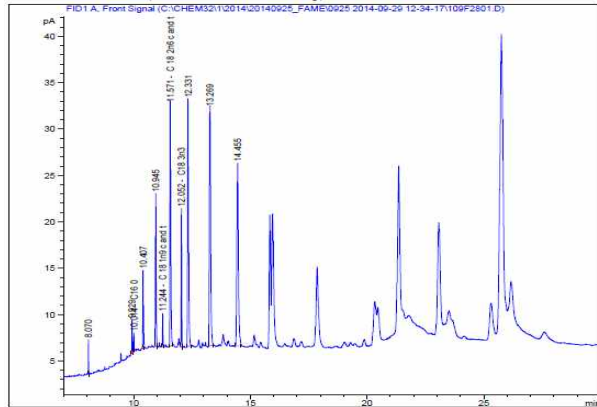


그림 27. Treatment I

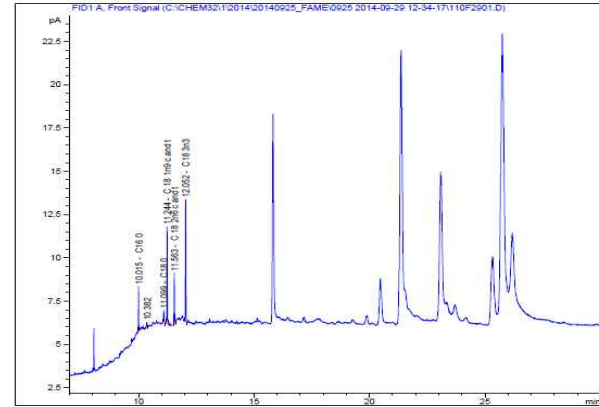


그림 28. Treatment J

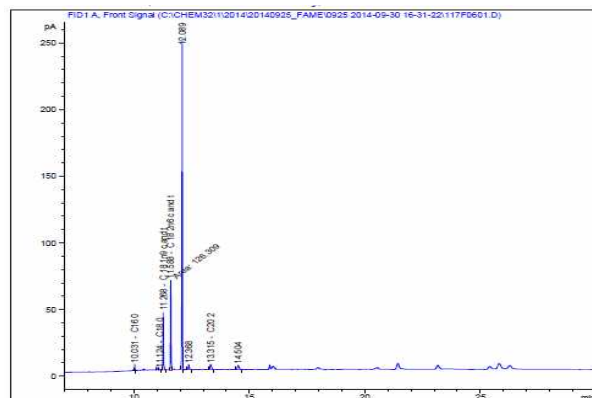


그림 29. Treatment K

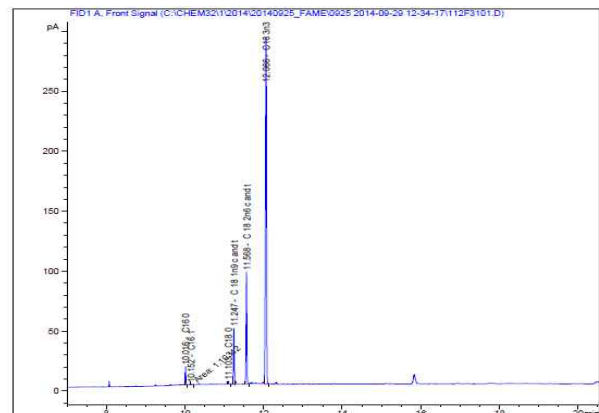


그림 30. Treatment L

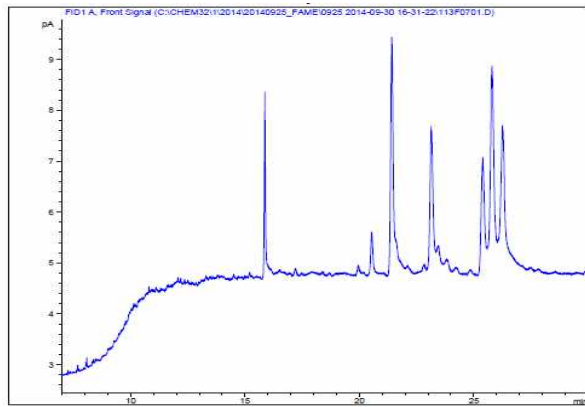


그림 31. Treatment M

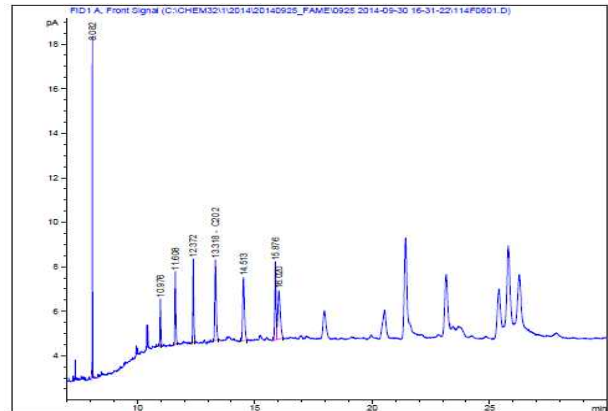


그림 32. Treatment N

□ 2차년도: 들깨 리놀렌산의 대량분리 및 기능성 물질의 밸리데이션 분석

(1) 기능성 물질의 대량분리

○ 요소 처리량에 따른 들깨 리놀렌산의 대량 분리

- 요소 처리 실험 방법: 들깨 기름을 MPLC를 이용하여 *n*-hexane 100%의 조건으로 용출한 다음, 다시 CH_2Cl_2 100%의 조건으로 오일을 용출하였다. CH_2Cl_2 100%의 조건으로 용출한 오일을 모두 합쳐 농축하여 다음, 오일, MeOH, KOH (20g : 10ml : 2g)을 첨가하여, water bath에서 65-70°C의 온도로 약 1시간 반응시켰다. 반응물에 요소와 MeOH (2g : 2g : 10ml)을 첨가하여 용해를 시켰다. 반응시킨 오일을 냉장고에 약 24시간동안 유지하였다. 24시간 후, 침전물을 filter paper를 이용하여 걸러낸 다음, 염산과 pH Test paper를 이용하여, pH를 약 2-3의 산성으로 맞추었다. 상층액을 취하고, 지방산을 얻어내기 위하여 *n*-hexane 10 ml과 ethyl ether 5 ml를 첨가하였다. 층 분리 후 상층액을 취하여, anhydrous sodium sulfate를 이용하여 제습하고 남은 수분과 불순물을 제거하였다.
- 요소처리량에 따른 들깨 리놀렌산의 함량 변화: MPLC를 이용하여 들깨오일을 각각 *n*-hexane, *n*-hexane + CH_2Cl_2 , 그리고 *n*-hexane + CHCl_3 로 용출하였고, 이 오일에 요소의 비율만을 다르게 처리하여 실험을 수행하였다. 각각의 비율은 무처리, 0.5g, 1g, 2g, 4g, 8g의 비율로 수행하였으며, 각각의 실험구를 GC-FID를 이용하여 지방산 조성을 측정 하였다.

표 4. 요소 처리량에 따른 들깨 리놀렌산의 비율

샘플		ALA (%)	
Urea in <i>n</i> -hexane layer (g)	무처리	PU-1	31.98
	0.5	PU-2	57.50
	1	PU-3	37.26
	2	PU-4	61.35
	4	PU-5	2.06
	8	PU-6	65.28
Urea in CHCl_3 layer (g)	무처리	PU-7	58.26

	0.5	PU-8	68.07
	1	PU-9	68.26
	2	PU-10	80.50
	4	PU-11	30.68
	8	PU-12	45.42
	무처리	PU-13	60.89
	0.5	PU-14	-
Urea in	1	PU-15	65.37
CH ₂ Cl ₂ layer (g)	2	PU-16	81.75
	4	PU-17	25.60
	8	PU-18	38.59

- 요소 처리량에 따른 함량 비교 결과, 대체적으로 2g의 비율로 요소를 처리 하였을 때의 들깨 리놀렌산의 함량이 61.35%, 80.50%, 그리고 81.75% (Fig. 4, 10, 16)로 가장 높은 경향을 보였으며, CHCl₃ layer와 CH₂Cl₂ layer에서 80% 이상의 들깨 리놀렌산 비율을 보여주었다. *n*-hexane layer 에서는 무처리 대비 29.37%가, CHCl₃ layer에서는 32.24%가, CH₂Cl₂ layer 에서는 20.86% 가 증가함을 알 수 있었다. Table 1의 결과로 2g의 비율로 요소를 처리하였을 때 가장 들깨 리놀렌산의 비율이 컸고, 특히 CHCl₃ layer에서 무처리 대비 가장 많은 비율이 증가했음을 알 수 있었다.

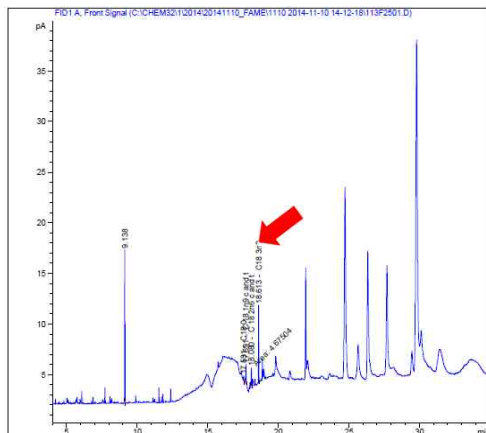


그림 33. PU-1의 GC 크로마토그램

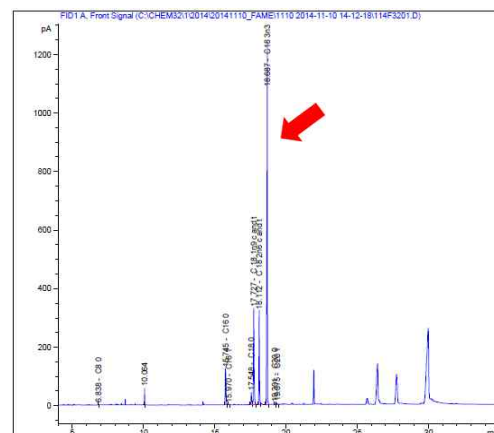


그림 34. PU-2의 GC 크로마토그램

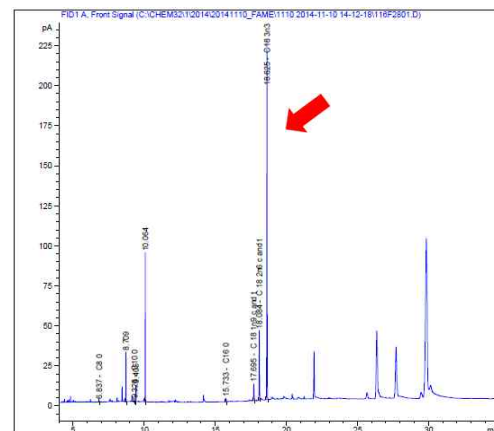
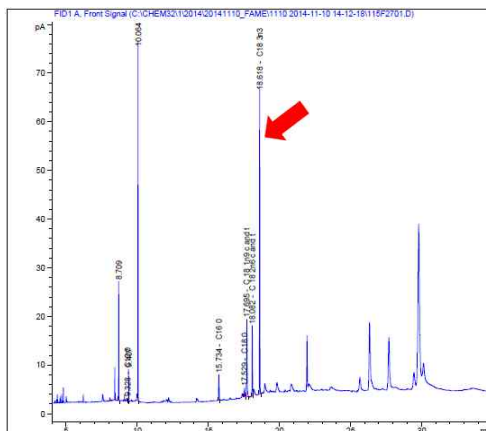


그림 35. PU-3의 GC 크로마토그램

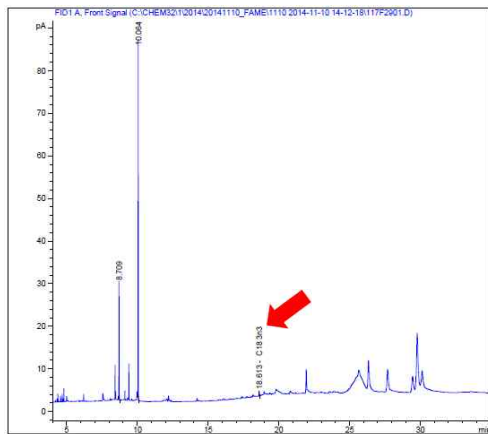


그림 36. PU-4의 GC 크로마토그램

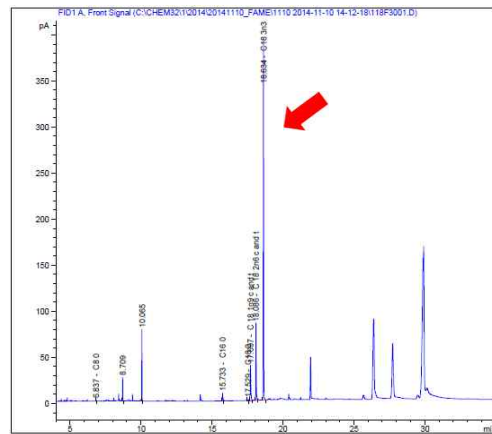


그림 37. PU-5의 GC 크로마토그램

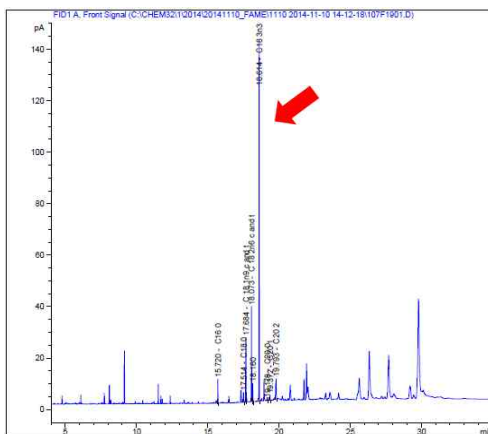


그림 38. PU-6의 GC 크로마토그램

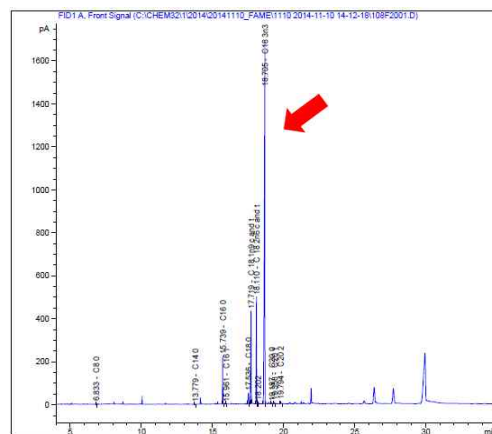


그림 39. PU-7의 GC 크로마토그램

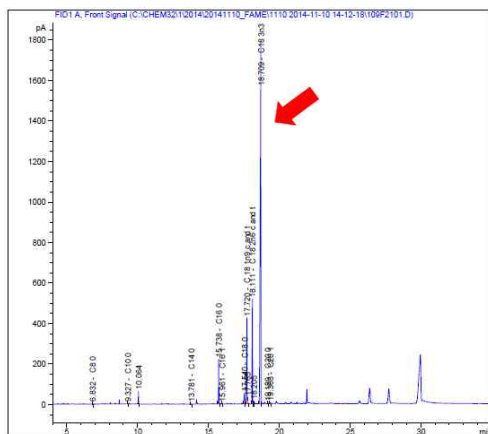


그림 40. PU-8의 GC 크로마토그램

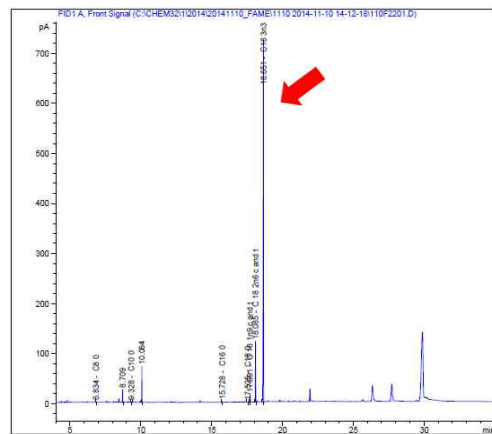


그림 41. PU-9의 GC 크로마토그램



그림 42. PU-10의 GC 크로마토그램



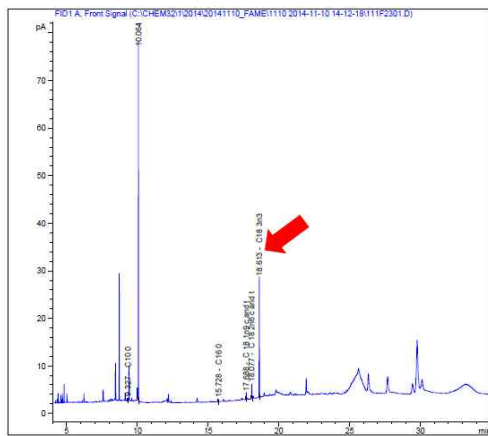


그림 43. PU-11의 GC 크로마토그램

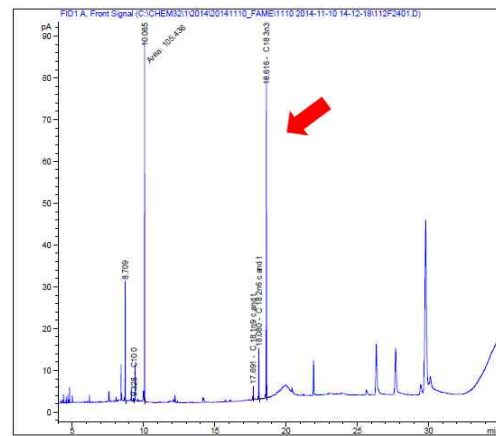


그림 44. PU-12의 GC 크로마토그램

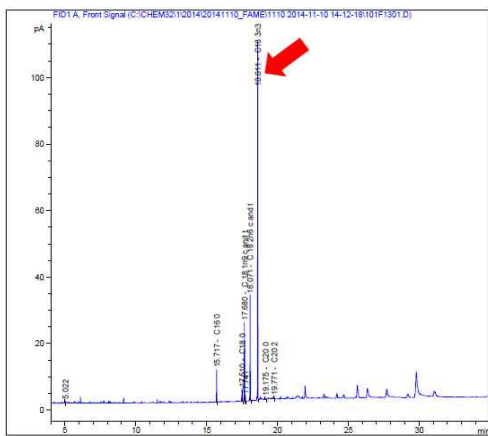


그림 45. PU-13의 GC 크로마토그램

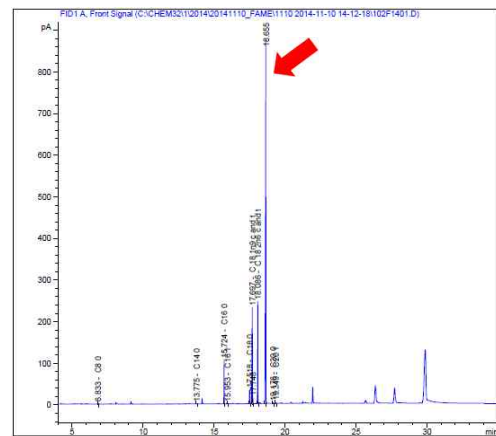


그림 46. PU-14의 GC 크로마토그램

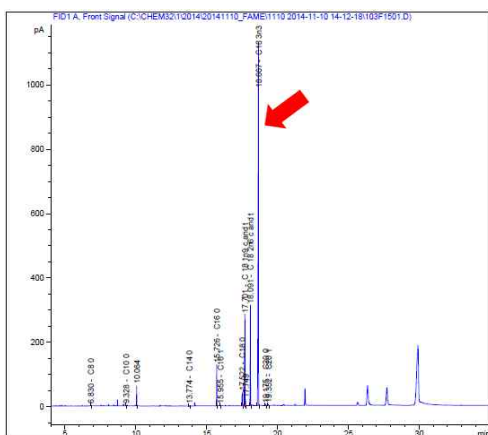


그림 47. PU-15의 GC 크로마토그램

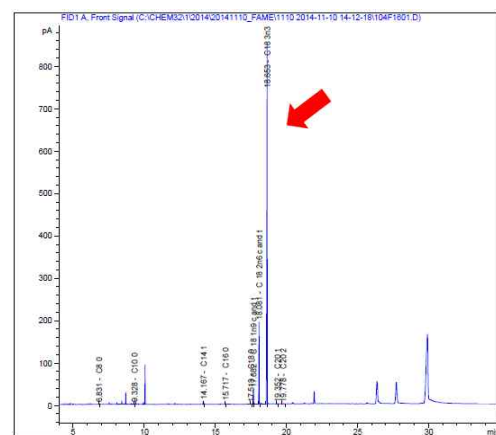


그림 48. PU-16의 GC 크로마토그램

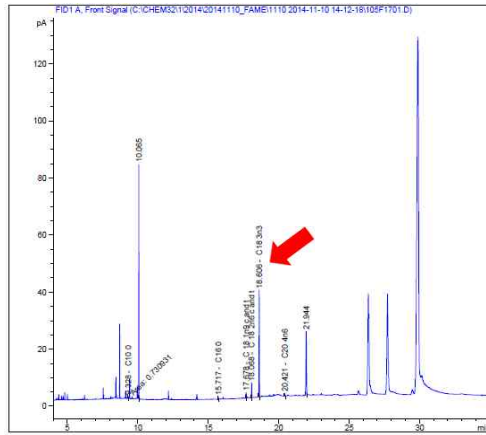


그림 49. PU-17의 GC 크로마토그램

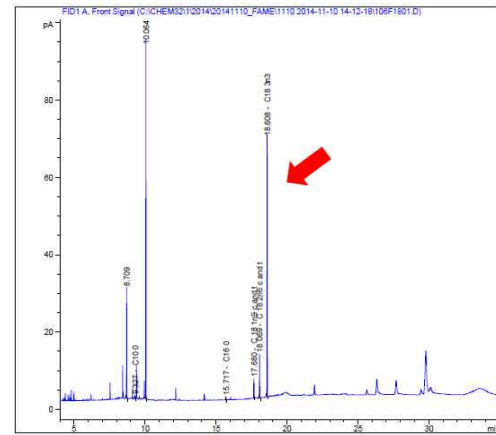


그림 50. PU-18의 GC 크로마토그램

○ 반응온도와 시간에 따른 들깨 리놀렌산의 대량 분리

- 반응 온도와 시간에 따른 들깨리놀렌산 함량: 들깨 기름을 MPLC를 이용하여 *n*-hexane 100%의 조건으로 용출한 다음, 다시 CH_2Cl_2 100%의 조건으로 오일을 용출하였다. CH_2Cl_2 100%의 조건으로 용출한 오일을 모두 합쳐 농축하여 다음, 오일, MeOH, KOH (20g : 10 ml : 2g)을 첨가하여, water bath에서 65-70°C의 온도로 약 1시간 반응시킨다. 반응물에 요소와 MeOH (2g : 2g : 10 ml)을 첨가하여 용해를 시킨다. Deep freezer와 냉장고, 그리고 실온에서 12, 24, 48, 72시간동안 유지한다. 반응 시간 후 침전물을 filter paper를 이용하여 걸러낸 다음, 염산과 pH Test paper를 이용하여, pH를 약 2-3의 산성으로 맞추었다. 상층액을 취하고, 지방산을 얻어내기 위하여 *n*-hexane 10 ml과 ethyl ether 5 ml를 첨가하였다. 층 분리 후 상층액을 취하여, anhydrous sodium sulfate를 이용하여 제습하고 남은 수분과 불순물을 제거하였다.

표 5. 반응 온도와 시간에 따른 들깨 리놀렌산 비율

샘플			ALA (%)
저온냉장고 (-70 °C)	12h	PT-1	60.71
	24h	PT-2	44.02
	48h	PT-3	27.22
	72h	PT-4	69.71
냉장고 (10 °C)	12h	PT-5	51.46
	24h	PT-6	72.03
	48h	PT-7	65.11
	72h	PT-8	53.37
실온 (25 °C)	12h	PT-9	52.70
	24h	PT-10	52.56
	48h	PT-11	53.34
	72h	PT-12	-

- 실험의 결과로서, 대체적으로 냉장고에서 10 °C 로 보관, 유지하였던 샘플들의 들깨리놀렌산 함량이 높았으며, 그 다음으로는 저온냉장고, 실온의 순서로 함량이 높았다. 저온냉장고, 냉장고, 실온에 상관없이 24 시간 보관하였을 때의 수치가 가장 높은 경향을 보이고 있으며, 특히 냉장고에서 24시간 보관 하였을 때 72.03%로 높은 가장 높은 함량을 보였다 (Fig. 24). 실온에서는 보관 시간과 관계없이 50%대의 수율을 나타내고 있었으나, 72시간 보관하였을 때는 들깨 리놀렌산이 검출되지 않았다. 이로 들깨 리놀렌산의 함량은 10 °C의 냉장고에서 약 24 시간 요소반응하였을 때 가장 많은 비율을 보여준다는 결과를 도출하였다.

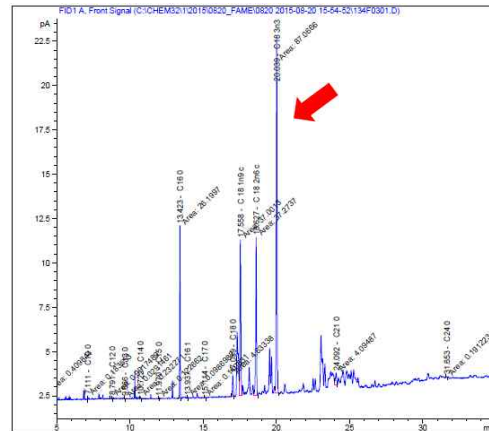


그림 52. PT-2의 GC 크로마토그램

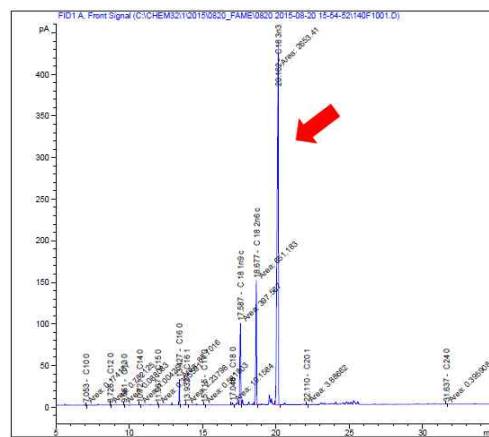


그림 54. PT-4의 GC 크로마토그램

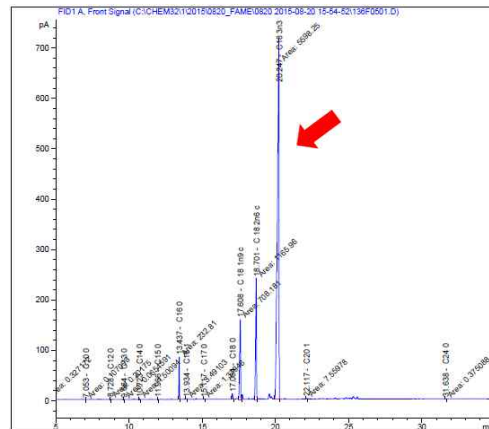


그림 56. PT-6의 GC 크로마토그램

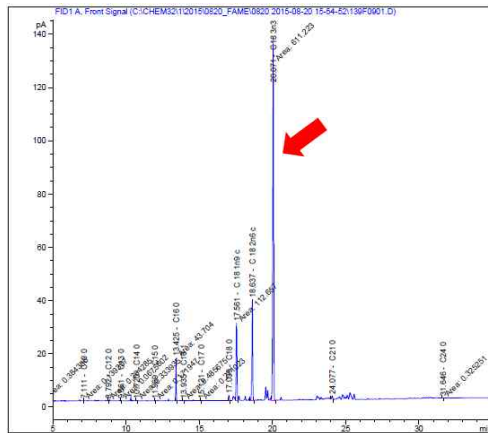


그림 57. PT-7의 GC 크로마토그램

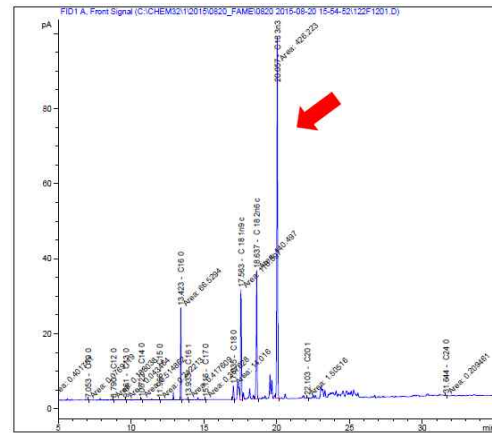


그림 58. PT-8의 GC 크로마토그램

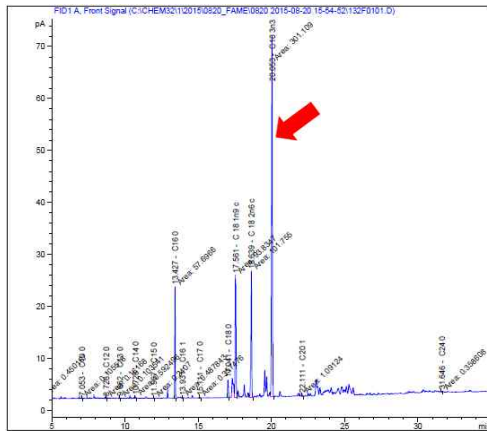


그림 59. PT-9의 GC 크로마토그램

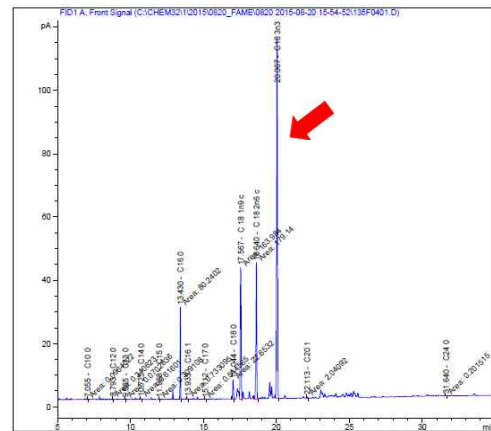


그림 60. PT-10의 GC 크로마토그램

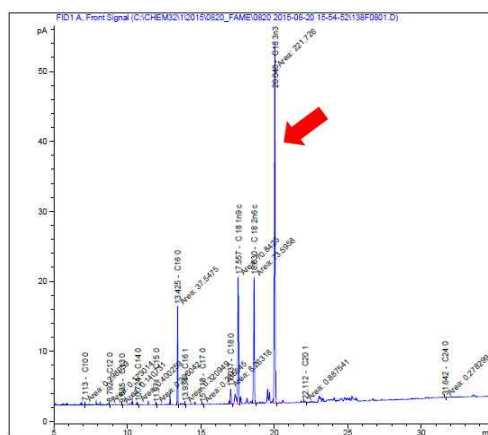


그림 61. PT-11의 GC 크로마토그램

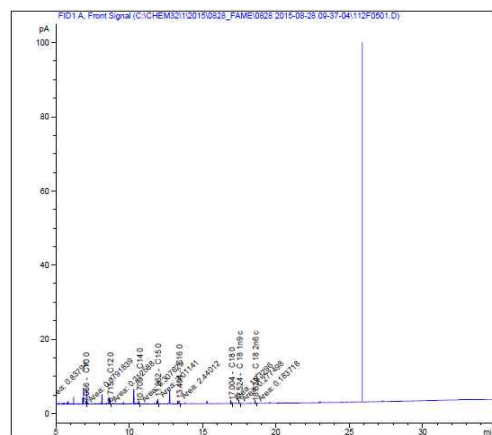


그림 62. PT-12의 GC 크로마토그램

○ GC를 이용한 분석조건

- Methylation: GC-FID로 성분분석을 확인하기 위하여 샘플 3-5mg, Sodium hydroxide beads (20 mg), iodomethane (0.1 ml), 그리고 DMSO (0.5 ml)를 30분간 반응시킨 다음, 증류수와 CH₂Cl₂를 이용하여 분획하였다. 1시간 다음, CH₂Cl₂층을 E-tube에 담아 질소를 이용하여 용매를 증발시킨 시료를 분석하였다.

표 6. GC-FID 측정 조건

Instrument	GC model : Agilent 7890A (Agilent, CA, USA) Detector: FID FID (280°C, H ₂ 35 ml/min, Air 350ml/min, He 35 ml/min)
Column	DB-Wax (Agilent, 30mm × 0.25 mm × 0.25 µm)
Injector temperature	250°C
Column temperature	50°C (1 min) → 200°C (5 min) → 230°C (20 min)
Injection	1 µL (split ratio 20)
Seperator temperature	250°C
Ion Source temperature	200°C

○ 식용 가능한 들깨 리놀렌산의 분리

- 리파아제를 이용한 분석: 비커에 들기름 5 g에 리파아제 porcine 0.5 g 을 첨가하여 약 10 : 1의 비율을 맞춘 다음, 교반기를 이용하여 약 200rpm의 조건으로 각각 48시간, 24시간, 12시간 교반하여 반응 시킨 다음, GC-FID 를 이용하여 측정하였다.

표 7. 리파아제 첨가한 들기름의 들깨 리놀렌산 비율

샘플			ALA (%)
에탄올 무첨가	12h	PL-1	58.40
	24h	PL-2	57.85
	48h	PL-3	58.72
에탄올 첨가	12h	PL-4	59.30
	24h	PL-5	59.69
	48h	PL-6	59.62

- 에탄올을 첨가하여 리파아제를 12, 24, 48시간 반응시킨 모든 실험구들이 에탄올을 첨가하지 않은 실험구와 별차이가 없었다. 12시간 반응시킨 실험구에서는 약 0.7%, 24시간 실험구에서는 1.84%, 48시간 실험구에서는 약 0.9% 정도의 비율이 높게 측정되었다.

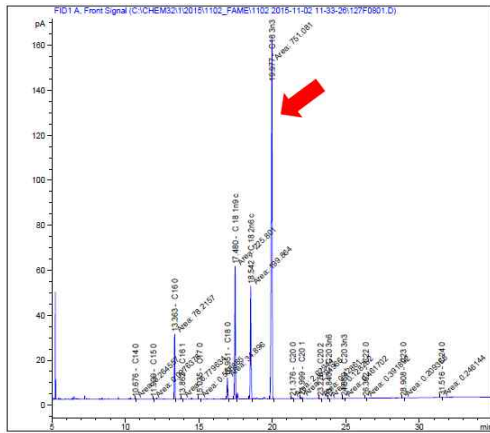


그림 63. PL-2의 GC 크로마토그램

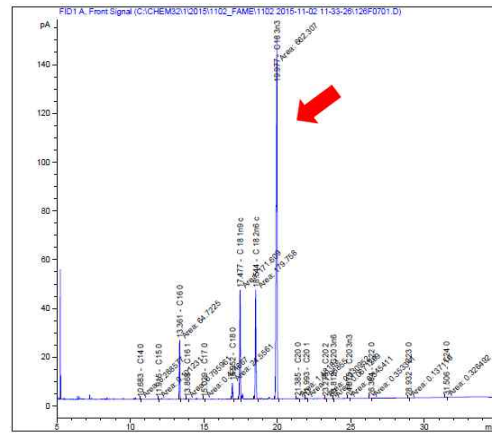


그림 64. PL-5의 GC 크로마토그램

- 젖산을 이용한 분석 방법: 들기름 5 g에 젖산 0.5 g 을 첨가, 교반기를 이용하여 200 rpm 의 조건에서 48시간, 24시간, 12시간 교반하여 반응 시킨 다음, GC-FID를 이용하여 측정하였다.
- 표 8. 젖산에 반응시킨 들기름의 리놀렌산 비율

샘플		ALA (%)
12h	PL-1	58.37
24h	PL-2	59.21
48h	PL-3	58.74

- 젖산에 반응시킨 실험구와 별차이가 없었다.

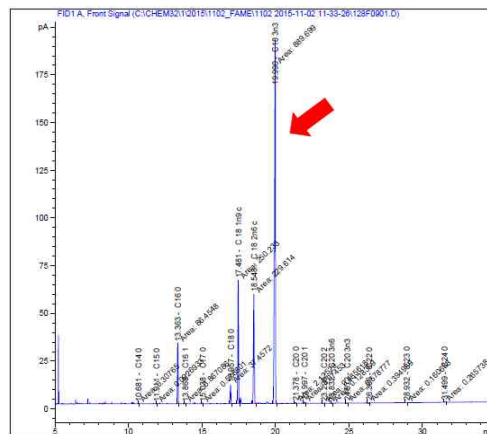


그림 65. PL-2 의 GC 크로마토그램

- 저온 분석 방법: 에탄올과 들기름의 비율을 0.5:1, 1:1, 2:1 로 조성하여 교반기를 이용 교반하여 반응시킨 다음, 24시간 동안 저온냉장고에서 약 -70°C로 보관하였다. 이 후 에탄올 층을 뽑아내어 GC-FID로 측정하였다 (Table 5).

표 9. 저온처리를 한 들기름의 리놀렌산 비율

샘플		ALA (%)
0.5:1	PR-1	59.53
1:1	PR-2	59.20
2:1	PR-3	-

- 저온처리를 한 실험구와 별차이가 없었다.

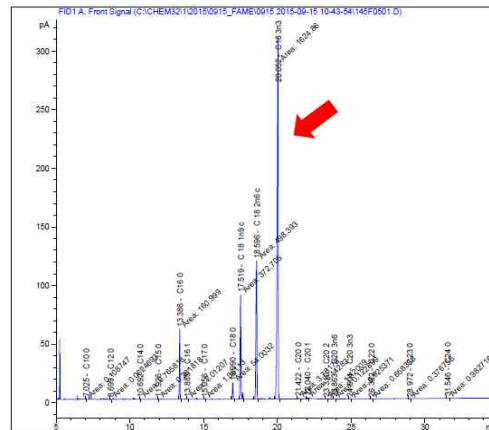


그림 66. PR-1의 GC 크로마토그램

(2) 초임계 추출 및 HSCCC

○ 초임계 추출: 추출 오일의 최적 수율 조건 설정을 위하여 온도 (35~45 ℃) 및 압력 (100 ~ 240 bar)의 조건을 변화시키며 추출을 실시하였다. 약 시료 10g을 추출기에 충전한 뒤, 이산화탄소를 실린더로부터 주입하여 냉각시킨 뒤, 액화하여 압력을 가한뒤, 예열된 이산화탄소가 유입되어 추출하였다.

○ 초임계 추출 및 HSCCC: 추출 오일의 최적 수율 조건 설정을 위하여 온도 (35 ~45 ℃) 및 압력 (100 ~ 240 bar)의 조건을 변화시키며 추출을 실시하였다. 약 시료 10g을 추출하였고, 미량의 오일을 수득할 수 있었다. 이를 GC-FID를 이용하여 측정하였으나 지방산이 불검출 되었다.

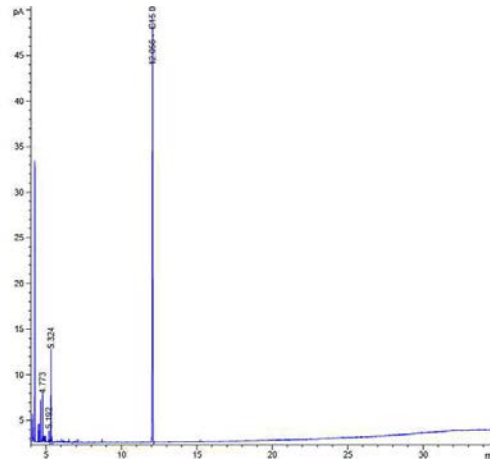


그림 67. 초임계 추출 들깨 오일의 크로마토그램

(3) 기능성 물질의 함량 분석 및 밸리데이션 분석 연구

○ GC-FID를 이용한 들깨 리놀렌산의 함량분석

- 들깨 품종별 지방산 함량분석: GC-FID를 이용한 들깨 리놀렌산 및 지방산의 함량분석을 위해 각 품종별 들깨종자 1 g에 C15:0 Internal Standard (ISTD) 1 mg을 이용하여 추출하였다. 이를 GC를 이용하여 지방산의 지방산 정량 분석을 실시하였다.

표 10. 들깨 품종별 지방산의 함량

품종명	지방산 함량 (mg/g)					Total
	리놀렌산	리놀레인산	올레인산	스테아릭산	팔미틱산	
다미	181.18	36.56	43.03	7.46	19.70	287.94
단조	244.08	64.13	67.20	11.32	27.65	414.38
들샘	256.98	72.50	67.08	9.96	25.70	432.23
대실	241.58	69.40	58.50	8.24	27.84	405.56
안유	225.19	50.00	56.46	7.15	23.38	362.19
유진	248.28	60.19	63.88	7.94	26.91	407.2
다유	222.45	49.76	48.32	9.13	24.65	354.32
엽실	243.52	54.50	47.20	10.18	27.48	382.88
향임	186.49	33.04	39.26	5.17	19.08	283.04
화홍	173.18	38.66	40.42	6.14	18.44	276.85

- 총 10종의 들깨종자를 GC-FID를 이용하여 정량 분석 실시하였다. 그 결과로서 들샘들깨에서 가장 많은 리놀렌산 함량 (256.98 mg/g)을 함유하고 있음을 알 수 있었으며, 화홍에서 가장 적은 함량 (173.18 mg/g)을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 분석한 5가지의 fatty acid 총 함량 역시 들샘이 432.23 mg을 함유하여 가장 많은 양의 지방산을 함유하고 있다고 할 수 있었고, 화홍이 276.85 mg을 함유하여 가장 적은 양의 지방산을 함유하였다.

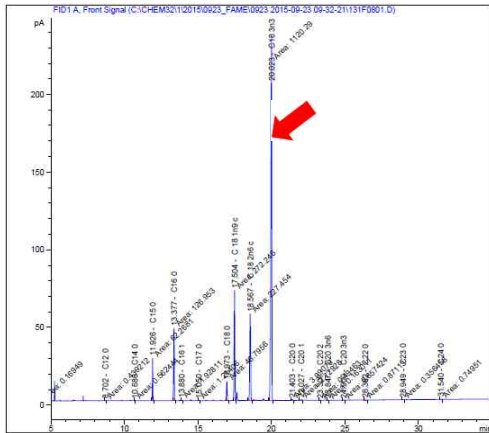


그림 68. 다미기식의 GC 크로마토그램

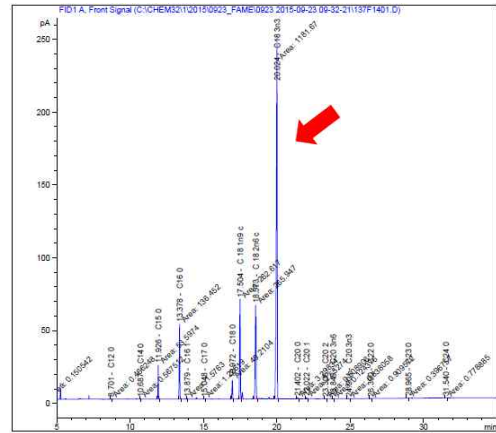


그림 69. 다유의 GC크로마토그램

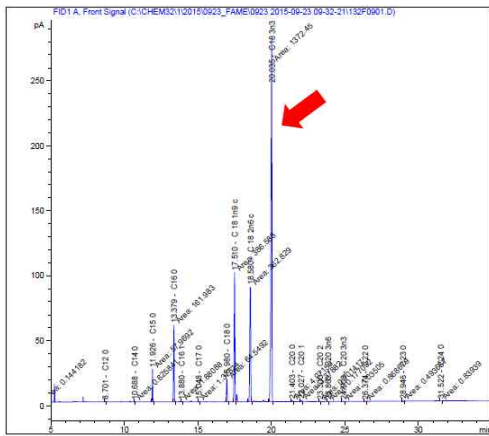


그림 70. 단조기식의 GC 크로마토그램

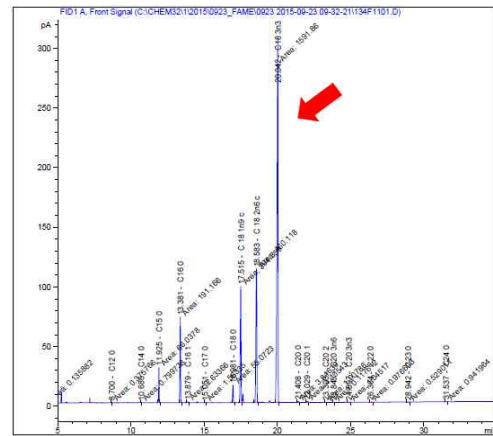


그림 71. 대실기식의 GC 크로마토그램

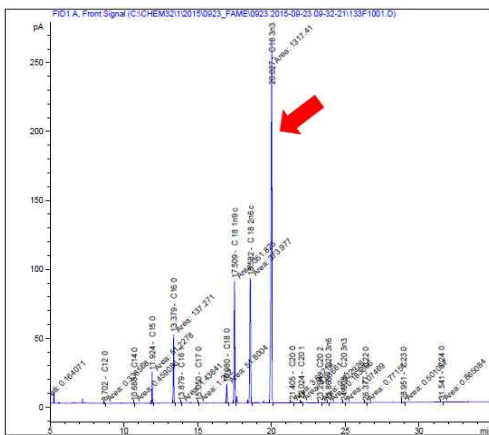


그림 72. 들샘기식의 GC 크로마토그램

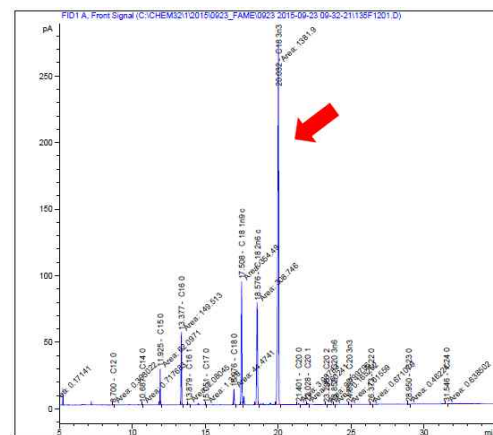


그림 73. 만유기식의 GC 크로마토그램

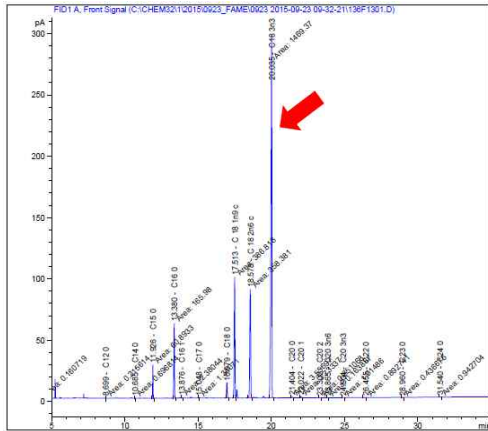


그림 74. 유오기식의 GC 크로마토그램

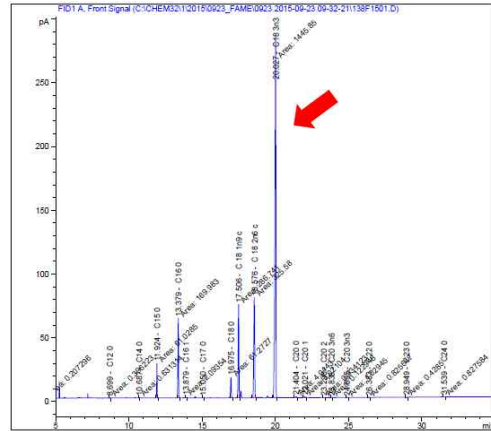


그림 75. 입설의 GC 크로마토그램

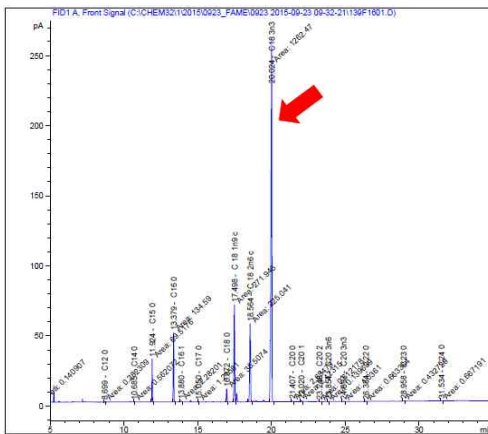


그림 76. 향임의 GC 크로마토그램

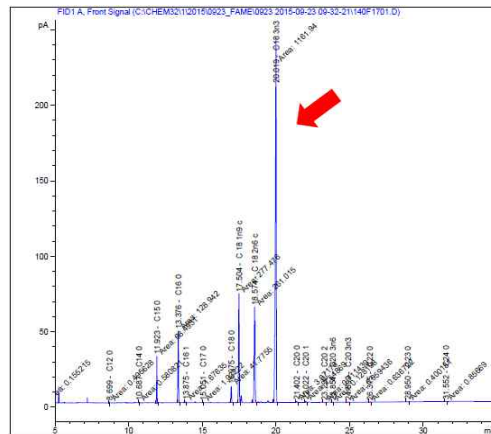


그림 77. 화홍의 GC 크로마토그램

- GC-FID를 이용하여 리놀렌산을 정량한 들깨종의 GC 크로마토그램이다. 이를 통하여 알파 리놀렌산과 올레인산 그리고 리놀레인산이 들깨의 메이저 지방산임을 알아 낼 수 있었으며, 특히 그 중에서도 F 들샘에서 가장 많은 지방산이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

○ HPLC-UV를 이용한 들깨 기능성 물질의 함량분석

- Flavonoid 4종 함량분석: HPLC-UV를 이용한 들깨 기능성물질의 함량분석을 위하여 분리된 4종의 Flavonoid의 동시분석을 실시하였다 (1000 - 0.1 mg/ml). 이후 각 품종별 들깨종자 2 g에 EtOH 200 mL을 첨가하여 추출한 다음, syringe filter를 이용하여 filtering 과정을 거친 다음 10000 ppm의 농도로 조건에 따라 분석을 실시함.

표 11. HPLC 분석 조건

HPLC	Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA) Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA).			
Column	INNO column C18 (4.6 ×× 250 mm, 5 μm)			
Wavelength	340 nm			
Flowrate	1 ml/min			
Solvent	A : Water (0.5% Acetic acid), B : MeOH			
Gradient Condition	시간 min	유속 ml/min	A %	B %
	0	1	70	30
	20	1	45	55
	50	0.5	0	100
	55	0.5	0	100
	60	1	70	30
	65	1	70	30

- Waters사의 HPLC UV detector, 그리고 INNO C18컬럼을 이용하여 측정을 실시하였다. UV 파장은 340nm의 영역에서 측정하였으며, 용매로는 0.5%의 아세트산을 첨가한 물과 메탄올을 이용하였다. 총 65분간 측정을 실시하였으며, 아래의 크로마토그램은 4종의 플라보노이드 스탠더드 peak와 회귀곡선을 나타낸 것이다.

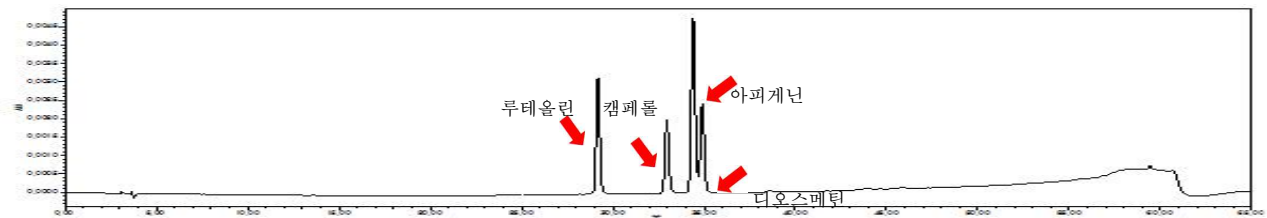


그림 78. 플라보노이드 동시분석 피크

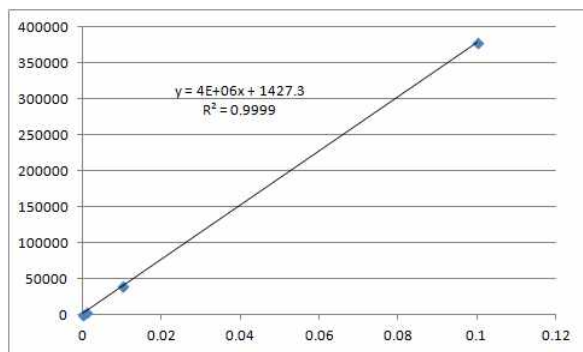
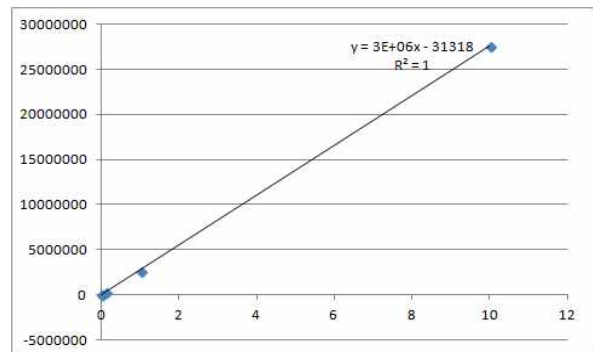


그림 79. Luteolin의 회귀곡선



80. Kaempferol의 회귀곡선

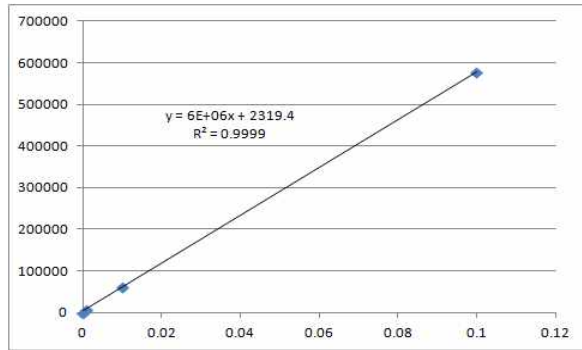


그림 81. Apigenin의 회귀곡선

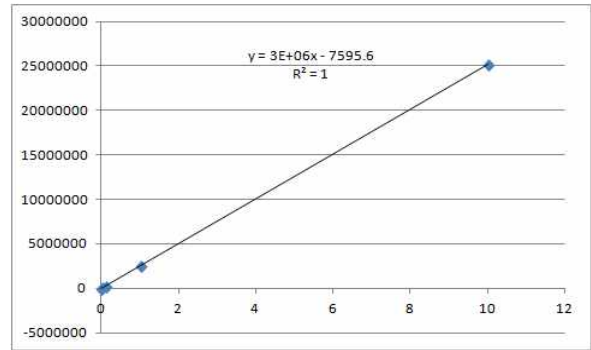


그림 82. Diosmetin의 회귀곡선

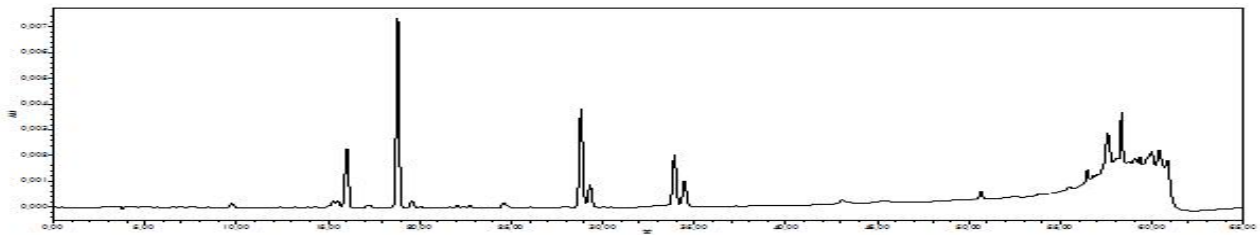


그림 83. 다미의 HPLC 크로마토그램

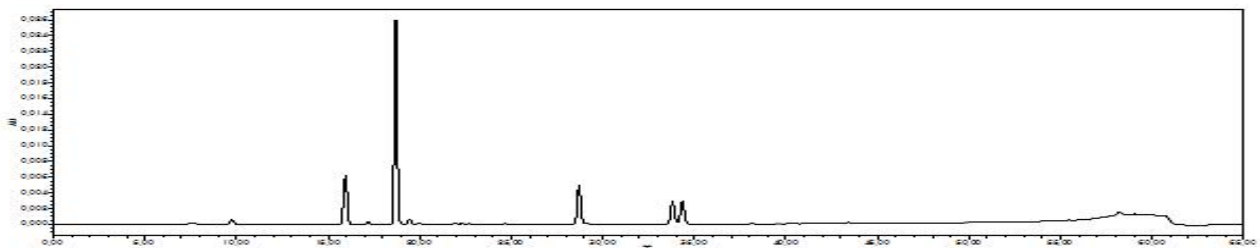


그림 84. 엽실의 HPLC 크로마토그램

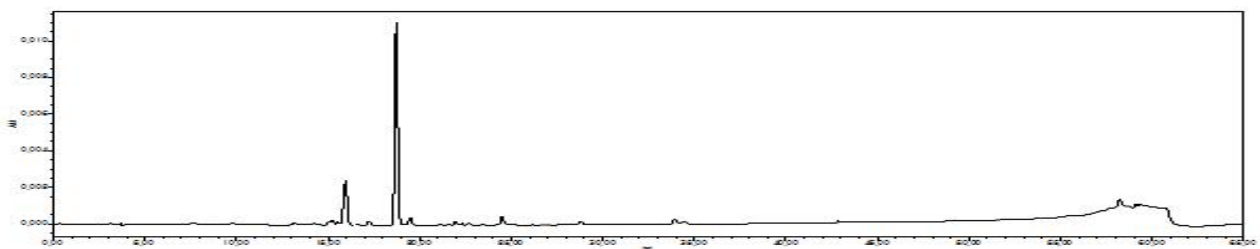


그림 85. 향임의 HPLC 크로마토그램

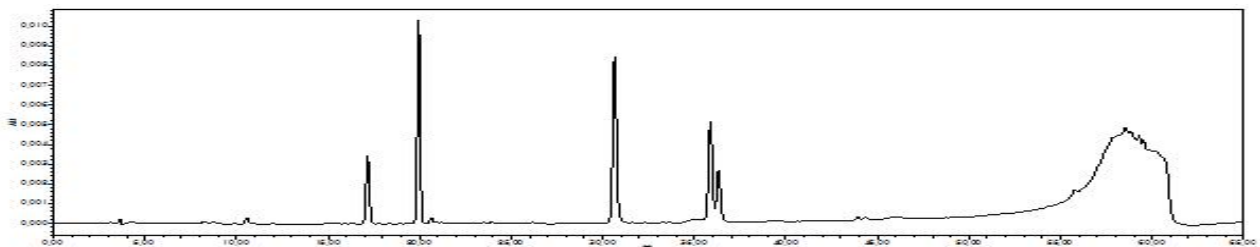


그림 86. 다유의 HPLC 크로마토그램

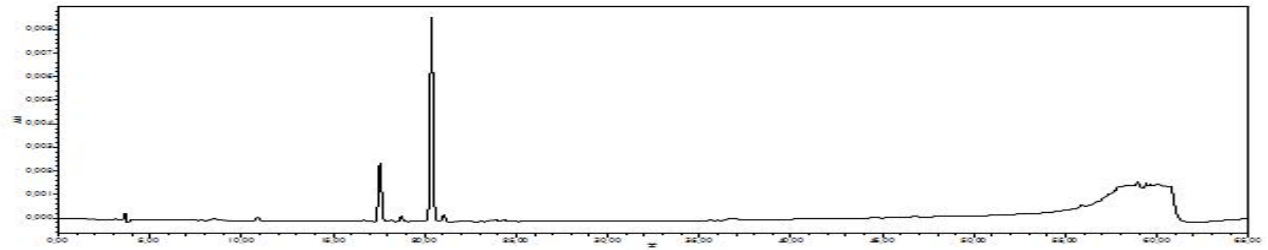


그림 87. 단조의 HPLC 크로마토그램

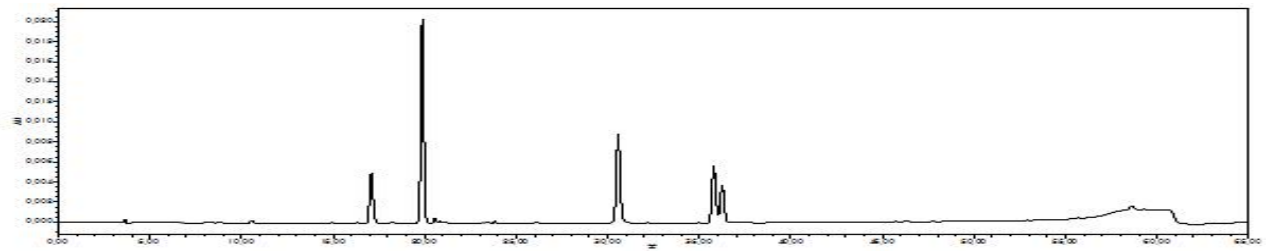


그림 88. 유진의 HPLC 크로마토그램

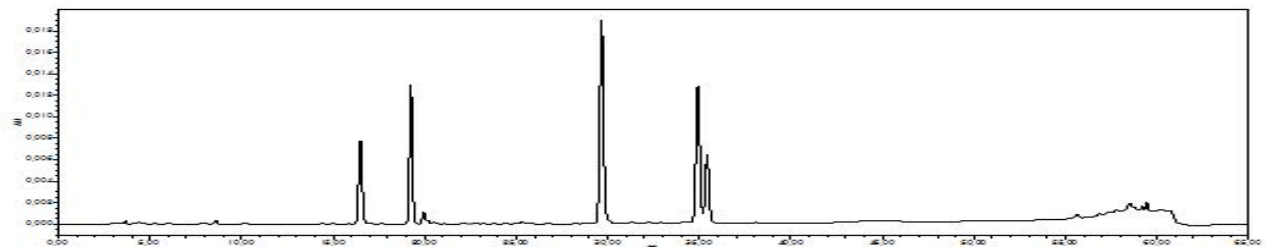


그림 89. 대실의 HPLC 크로마토그램

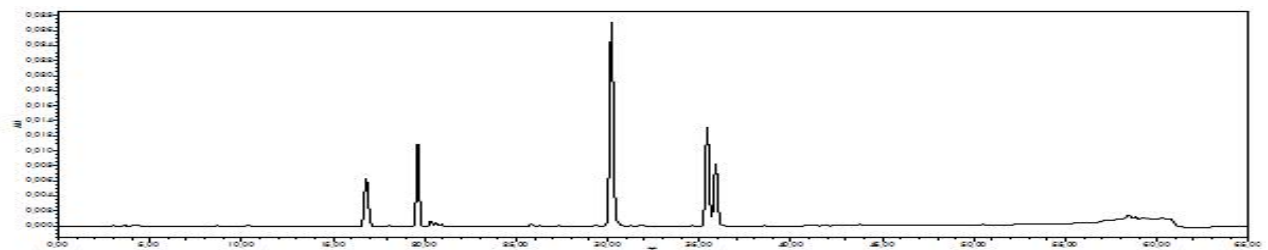


그림 90. 들샘의 HPLC 크로마토그램

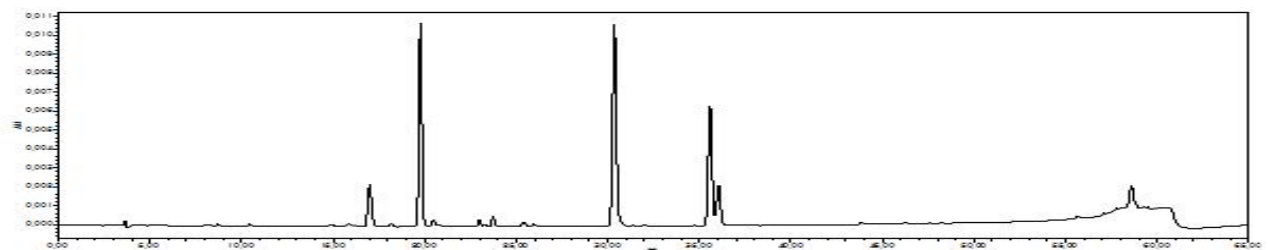


그림 91. 화홍의 HPLC 크로마토그램

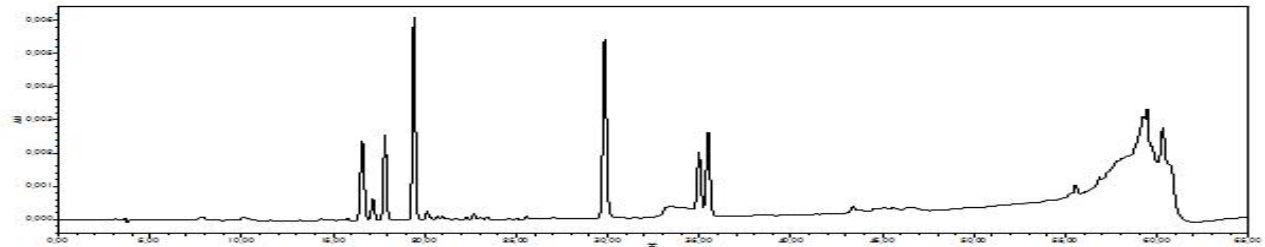


그림 92. 안유의 HPLC 크로마토그램

표 12. 들깨 품종 안에 있는 플라보노이드의 함량

Sample	Flavonoids ($\mu\text{g/g}$)			
	Luteolin	Kaempferol	Apigenin	Diosmetin
다미	0.19 ± 0.00	-	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.00
단조	-	-	-	-
들샘	9.47 ± 0.06	-	2.91 ± 0.25	3.51 ± 0.01
대실	6.57 ± 0.17	-	2.75 ± 0.08	2.50 ± 0.00
안유	1.84 ± 0.04	-	0.35 ± 0.00	1.07 ± 0.00
유진	3.02 ± 0.12	-	1.15 ± 0.01	1.41 ± 0.00
다유	2.77 ± 0.35	-	0.92 ± 0.14	0.82 ± 0.00
엽실	1.46 ± 0.04	-	0.59 ± 0.01	1.19 ± 0.00
향임	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
화홍	3.71 ± 0.01	0.01 ± 0.00	1.29 ± 0.01	0.74 ± 0.00

- 플라보노이드 정량 분석 비교: 총 4종의 플라보노이드 화합물을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 거의 모든 종에서 Luteolin이 가장 많은 함량을 가지고 있음을 알 수 있었으며 Diosmetin, Apigenin의 순서로 많은 양을 함유하고 있었다. 들깨의 품종중에서는 들샘기식이 가장 많은 양의 플라보노이드 화합물들을 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 이와 반대로 단조기식에서는 플라보노이드 화합물이 거의 측정 되지 않는 경향을 보였다.

표 13. 플라보노이드 화합물들의 LOD와 LOQ

Compound	Calibration equation	r^2	Linear range (mg/ml)	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
Luteolin	$Y = 278511X + 348.97$	1	0.01 - 100	0.000	0.003
Kaempferol	$Y = 191896X + 96.42$	1	0.01 - 100	0.001	0.005
Apigenin	$Y = 394029X + 419.36$	1	0.01 - 100	0.000	0.002
Diosmetin	$Y = 194667X + 211.63$	1	0.01 - 100	0.001	0.005

- LOD 와 LOQ: 밸리데이션 실험으로 LOD(background noise와 구별되는 분석물질의 가장 낮은 농도)와 LOQ(정확성과 정밀성을 유지하면서 정량할 수 있는 분석물질의 최대 및 최소량)를 분석하였다.
- 플라보노이드와 리놀렌산 비교: 함께 비교한 들깨 품종 10개 중에서 단조와 들샘의 지방산 함유량이 가장 많았으며, 화홍이 가장 적은 지방산을 함유하고 있었고, 들샘, 대실이 가장 많은

플라보노이드 화합물을 단조이 가장 적은 함량을 보이고 있는 것을 알 수 있었다. 특히 이들 중에서 들샘은 알파 리놀렌산과 플라보노이드 화합물 모두 많은 양을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

(4) 해당노 활성 탐색

○ 추출물과 분획물의 Aldose reductase 억제율 측정

- 들깨 종자 6.0 kg 을 취하여 에탄올 (21L × 4)씩 사용하여 온침추출한 후, 추출액을 50℃ 이하에서 감압 농축하여 메탄올 추출물 285.3 g을 얻었다. 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시키고 *n*-hexane (*n*-Hx), ethyl acetate (EtOAc), CH₂Cl₂, *n*-butanol (*n*-BuOH)로 순차적으로 분획한 다음 유기용매층을 농축하여 *n*-hexane 분획물 (222.8 g), EtOAc 분획물 (10.4 g), CH₂Cl₂ 분획물 (9.3 g), *n*-BuOH 분획물 (11.4 g)을 얻었다. 얻어진 추출물과 분획물들을 Rat lens를 이용, Aldose reductase (AR) inhibitory를 탐색하였다.

표 14. 들깨 추출물 및 분획물의 AR 억제율과 IC₅₀ 수치

Sample	Concentration (μg/ml)	AR inhibition ^a (%)	IC ₅₀ ^b (μg/ml)
EtOH ext.	10	58.38	-
Hx fr.	10	58.38	-
	10	77.32	
MC fr.	1	19.47	5.48
	0.1	10.89	
	10	90.06	
EtOAc fr.	1	31.68	3.64
	0.1	20.79	
<i>n</i> -BuOH fr.	10	46.89	-
	10	87.46	
TMG ^c	1	58.64	0.45
	0.1	32.54	

^a Inhibition rate was calculated as a percentage of the control value.

^b IC₅₀ calculated from the least-squares regression line of the logarithmic concentrations plotted against the residual activity.

^c TMG was used as a positive control.

- 앞서 들깨를 EtOH로 추출하고 분획하여 얻은 표준추출물과 분획물을 이용하여, AR inhibition을 측정하였다. 억제율 측정 결과, EtOAc fr., CH₂Cl₂ fr., *n*-Hx fr., EtOH ext. 그리고 *n*-BuOH fr.의 순으로 억제율이 높은 수치를 보였다. 그중에서, EtOAc와 CH₂Cl₂ 분획물이 가장 높은 억제율을 보였으며, positive control인 TMG에는 미치지 못하지만, 각각 IC₅₀ 값은 5.48과 3.64 μg/ml을 보였다 (Table 9). 높은 수치를 보였던 EtOAc와 CH₂Cl₂ 그리고 *n*-BuOH 분획물에서 분리를 실시하여 4개의 플라보노이드 화합물을 분리했고, 2개의 triterpene 화합물을 분리하였다. 6개의 화합물로 다시 억제율을 측정하였다.

○ Isolated compounds의 Aldose reductase 억제율 측정

- 4개의 플라보노이드 화합물과 2개의 triterpenoid가 AR 억제율 측정 실험에 사용되었다. EtOAc fraction에서 분리한 Luteolin과 Apigenin은 가장 높은 억제율을 보였으며, 그에 대한 억제율은 각각 82.56%와 90.70% 이었으며, IC₅₀ 값은 각각 1.40 μ M과 4.06 μ M이었다. CH₂Cl₂ fraction 에서 분리한 Kaempferol과 Diosmetin 그리고 β -sitosterol은 각각 53.78, 64.74% 그리고 11.05%의 억제율을 보였으며, 마지막으로 *n*-BuOH fraction의 Daucosterol은 45.06%의 억제율을 보였다. 분리된 화합물들 중에서 특히 Luteolin은 positive control 로 사용된 TMG의 IC₅₀ 값인 2.42 μ M보다 더 높은 값을 보여 항 당뇨에 효과가 있음을 알 수 있었다.

표 15. 들깨에서 분리된 화합물들의 AR 억제율과 IC₅₀ 수치

Compound	Concentration (μ g/ml)	AR inhibition ^a (%)	IC ₅₀ ^b (μ M)
Luteolin	10	82.56	1.40
	1	63.95	
	0.1	30.81	
Apigenin	10	90.70	4.06
	1	45.64	
	0.1	8.72	
Kaempferol	10	53.78	-
Diosmetin	10	64.74	-
β -sitosterol	10	11.05	-
Daucosterol	10	45.06	-
TMG ^c	10	87.46	2.42
	1	58.64	
	0.1	32.54	

표14와 같음.

□ 3차년도: 들깨 리놀렌산의 저장안전성 연구

(1) GC-MS 분석법

○ 산패정도 분석방법: 산가 분석, 수분 함량분석, 지방산 함량분석

○ 산패정도 분석방법

- 산가 분석: 삼각플라스크에 들기름을 정확히 칭량하고 ethyl alcohol:ethyl ether (1:2, v/v) 30 ml와 0.1% phenolphthalein-alcohol 용액을 지시약으로 하여, 선홍색이 30초간 지속할 때까지 0.1N KOH-alcohol 용액으로 적정하여 산가를 측정하는 방법을 이용하여 산패도를 측정함.
- 지방산 함량분석: 들기름내의 지방산 함량 분석을 위하여 Gas Chromatography Flame ionization detector (GC-FID)를 이용하여 들깨와 들기름 내 지방산의 조성비와 정량을 분석함. 들깨의 추출과 들기름의 methylation 과정을 거친 후, 아래 Table 2의 조건에 따라 GC-FID 분석을 실시함.

- Methylation: GC-FID로 성분분석을 확인하기 위하여 샘플 3-5mg, Sodium hydroxide beads (20 mg), iodomethane (0.1 ml), 그리고 DMSO (0.5 ml)를 30분간 반응시킨 다음, 증류수와 CH_2Cl_2 를 이용하여 분획함. 1시간 다음, CH_2Cl_2 층을 E-tube에 담아 질소를 이용하여 용매를 증발시킨 시료를 분석함.

표 16. HPLC 측정 조건

HPLC	Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA)			
	Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA).			
Column	Discovery C18 (25cm × 4.6 mm, 5 μm)			
wavelength	325nm			
Flowrate	1 ml/min			
Solvent	A: acetonitrile (50%) B: methanol (50%)			
	시간 min	유속 ml/min	A %	B %
	0	1	70	30
Gradient	30	1	0	100
condition	35	1	0	100
	40	1	70	30
	45	1	70	30

표 17. GC-FID 측정 조건

Instrument	GC model : Agilent 7890A (Agilent, CA, USA)	
	Detector: FID FID (280°C, H_2 35 ml/min, Air 350ml/min, He 35 ml/min)	
Column	DB-Wax (Agilent, 30mm × 0.25 mm × 0.25 μm)	
Injector temperature	250°C	
Column temperature	50°C (1 min) → 200°C (5 min) → 230°C (20 min)	
Injection	1 μL (split ratio 20)	
Seperator temperature	250°C	
Ion Source temperature	200°C	

(2) 들깨 품종 및 들기름 추출방법에 따른 저장안전성 연구

○ 들깨 품종: 밀양에서 제공한 다유품종

○ 들기름 추출 조건(관행, 저온 압착 착유 및 생들기름 착유)에 따른 산패 비교 분석: 추출조건: 들깨를 약 210°C에서 볶아낸 뒤, 압착하여 착유하는 일반적인 착유 방법, 120°C의 저온에서 로스팅 후 저온을 유지하며 착유하는 저온 압착 착유, 그리고 열을 가하는 과정을 제외하고 바로 압착하여 착유하는 생들기름 착유 등의 방법을 이용함.

표 18. 추출방법에 따른 지방산의 비율

구분	Fatty acid (%)				
	α -Linolenic acid	Linoleic acid	Oleic acid	Stearic acid	Palmitic acid
Standard	59.22 \pm 0.21	13.67 \pm 0.02	17.50 \pm 0.12	2.47 \pm 0.02	6.57 \pm 0.05
관행	50.08 \pm 0.05	17.36 \pm 0.29	20.73 \pm 0.42	3.13 \pm 0.19	7.47 \pm 0.66
저온압착 착유	59.71 \pm 1.42	13.26 \pm 0.12	17.60 \pm 0.18	2.41 \pm 0.05	6.46 \pm 0.10
생들기름 착유	59.29 \pm 0.11	13.06 \pm 0.08	18.37 \pm 0.29	2.38 \pm 0.03	6.36 \pm 0.07

- 정성 분석 결과 지방산 중 α -리놀렌산이 가장 많은 비율로 추출되었음을 확인 할수 있었다. 추출 방법에 따라서는 관행조건으로 약 들깨를 약 210°C에서 볶아낸 뒤, 압착하여 착유하는 방식에서 가장 낮은 α -리놀렌산 비율을 보인 것으로 나타났다. 세가지 방법중 α -리놀렌산의 비율이 높았던 저온압착 착유와 생들기름 착유를 정량 분석하였다.

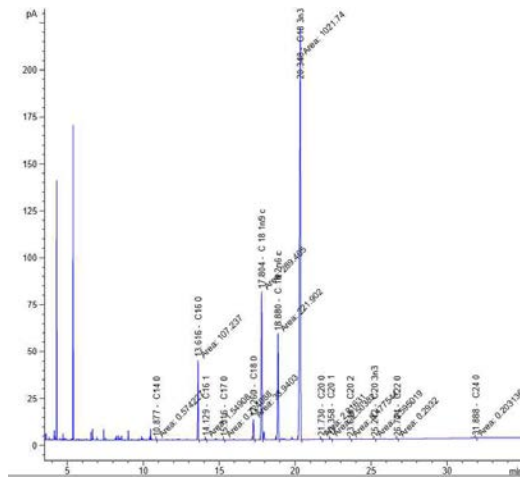


그림 93. 저온압착 착유의 크로마토그램

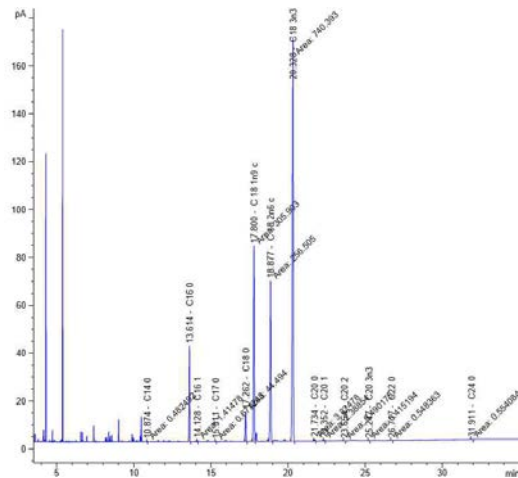


그림 94. 8월 관행 착유의 크로마토그램

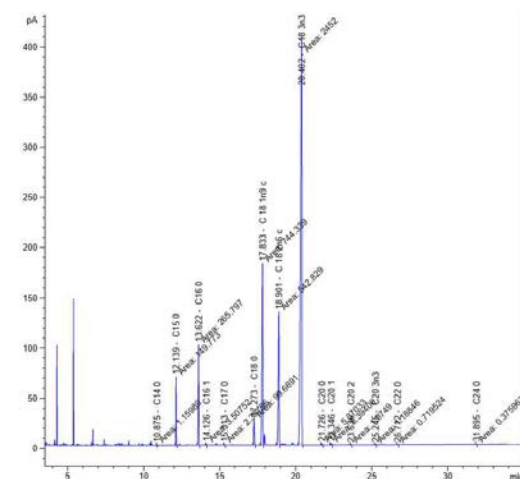


그림 95. 생들기름 착유의 크로마토그램

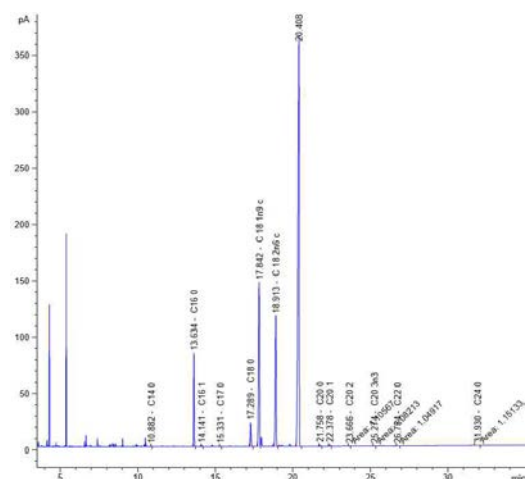


그림 96. Standard의 크로마토그램

표 19. 추출 방법에 따른 지방산 함량

구분	Fatty acid (mg/g)				
	α -Linolenic acid	Linoleic acid	Oleic acid	Stearic acid	Palmitic acid
저온압착 착유	514.794	118.646	160.031	22.305	58.478
생들기름 착유	532.850	119.852	168.925	22.843	59.362

- 지방산 함량의 분석 결과 정성 분석에서는 저온압착 착유와 생들기름 착유의 차이가 거의 미미했던 반면, 정량 분석에는 α -리놀렌산의 함량이 21 mg/g 정도 차이가 났다. 여타 지방산의 경우에는 올레인산이 약 8 mg/g의 차이가 났으며, 나머지 지방산의 경우에는 두 가지 추출 방법에서 큰 차이가 나지 않았다.

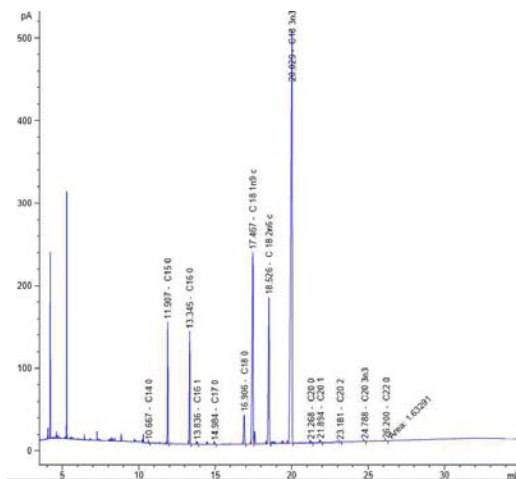


그림 97. 생들기름 착유의 크로마토그램

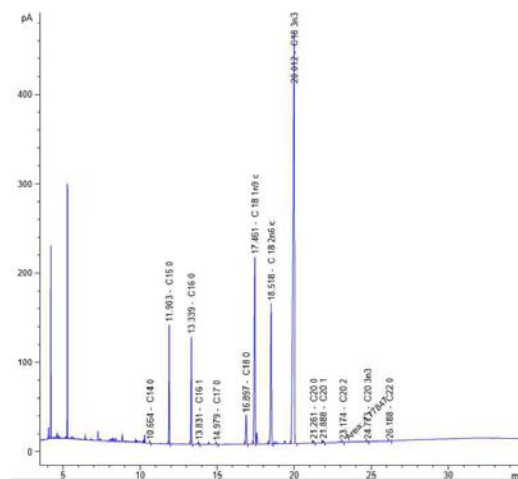


그림 98. 저온압착 착유의 크로마토그램

(3) 들깨 및 들기름의 저장, 가공 등 현장의 저장안전성 연구

- 농협, 영농협회 등 수집상의 보관방법 또는 저장방법에 따른 산패 비교분석 (정성분석) : 2015년 10월부터 매달 화천의 화천토종잡곡과 버딩골 영농조합에서 실외에서 저장한 들깨와 저온저장고에서 저장한 들깨씨를 공급받아 *n*-hexane으로 추출한 뒤, GC-FID를 이용하여 분석을 실시하였다.



그림 99. α -리놀렌산의 실외 및 저온저장 성분 비율 (버딩골 들깨)

표 20. α -리놀렌산의 실외 및 저온저장 성분 비율 (버딩골 들깨)

구분	버딩골 (ALA)	
	실외저장	저온저장
10 월	59.418%	
11 월	55.976%	
12 월	59.617%	
1 월	59.783	59.546
2 월	61.546	62.010
3 월	61.430	61.393
4 월	55.840	55.929
5 월	56.256	56.379
6 월	54.980	55.077
7 월	59.877	59.695
8 월	59.842	59.899

○ 버딩골영농조합에서 다르게 저장하여 공급받은 들깨의 달별 α -리놀렌산 함량을 *n*-hexane을 이용하여 추출한 뒤, GC-FID를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 실외 저장 및 저온 저장에서 비슷한 추이를 보였다. 10월에서 12월까지 약 58-59%의 일정 수준의 α -리놀렌산을 유지하였으나, 날이 추워지는 2월에 약 62%까지 증가하는 경향을 보였다. 그 후, 날이 더워지기 시작하는 3월부터 6월까지 약 55%대 까지 지속적으로 감소하는 경향을 보였으나, 다시 8월부터 증가하는 추세를 보였다. 그러나 증가 및 감소 추세가 큰 차이가 있지 않은 것으로 보여진다.

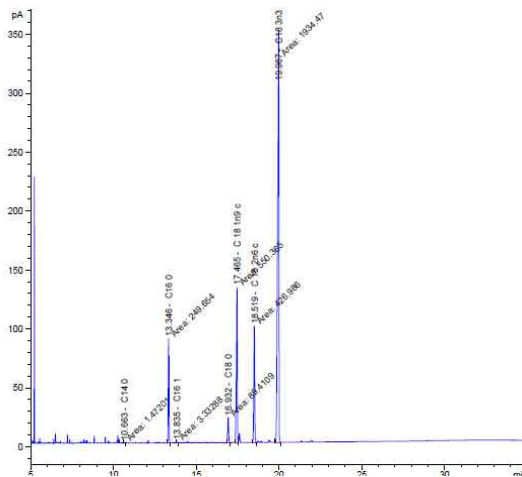


그림 100. 10월 (버딩골)의 크로마토그램

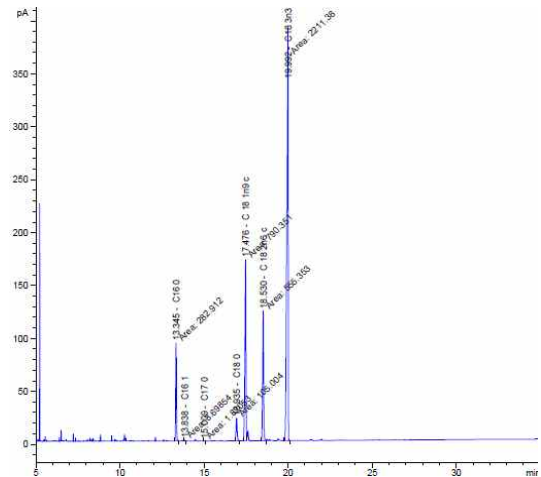


그림 101. 11월 (버딩골)의 크로마토그램

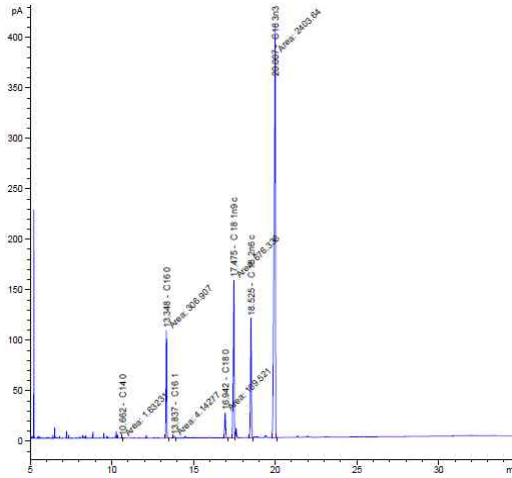


그림 102. 2월 (버딩골)의 크로마토그램

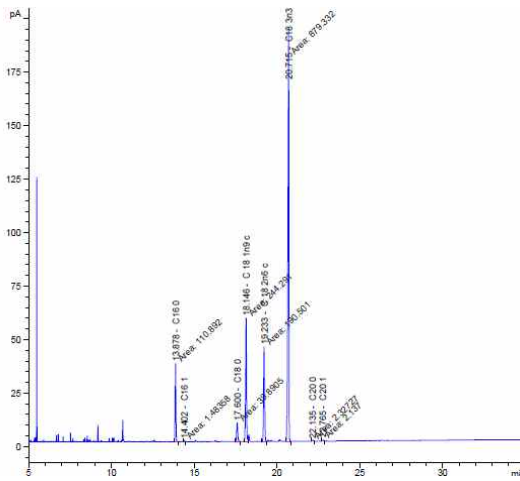


그림 103. 1월 실외저장(버딩골)의 크로마토그램

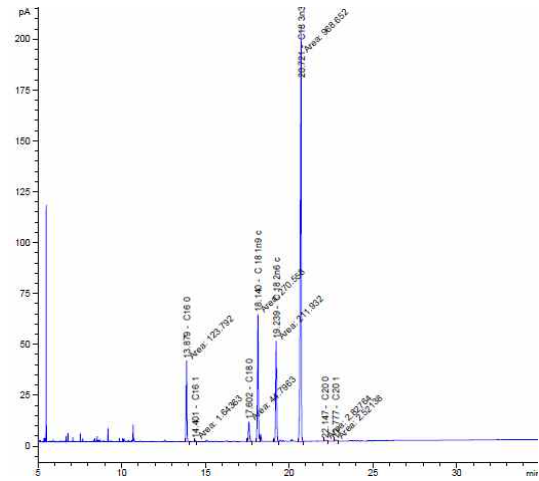


그림 104. 1월 저온저장 (버딩골)의 크로마토그램

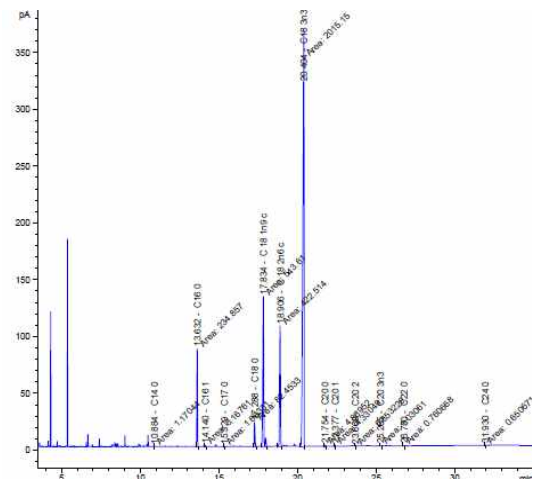
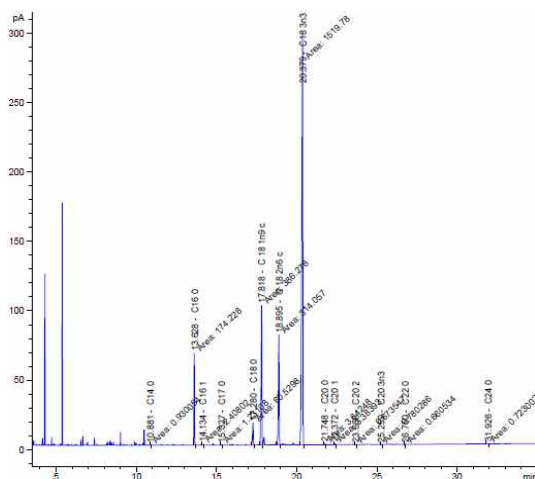


그림 105. 2월 실외저장(버덩골)의 크로마토그램
토그램

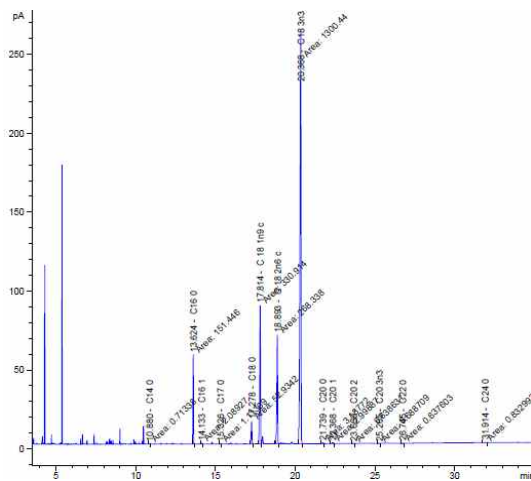


그림 106. 2월 저온저장 (버텅골)의 크로마

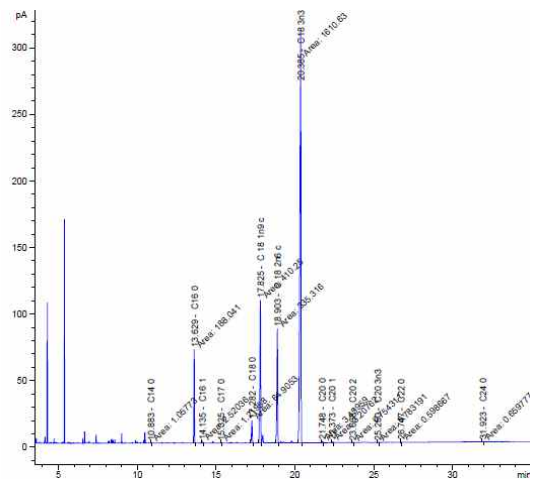


그림 107. 3월 실외저장(버딩골)의 크로마토그램
토그램

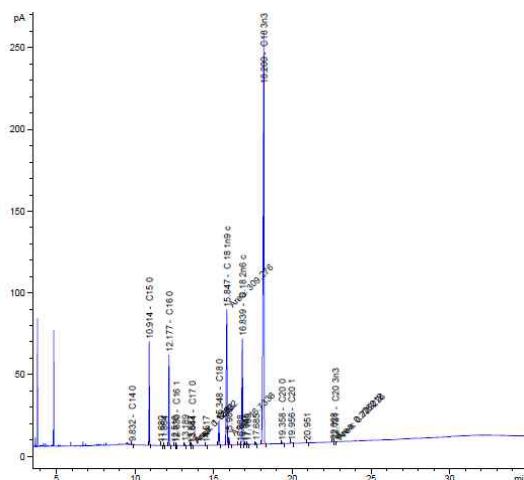


그림 108. 3월 저온저장 (버텅골)의 크로마

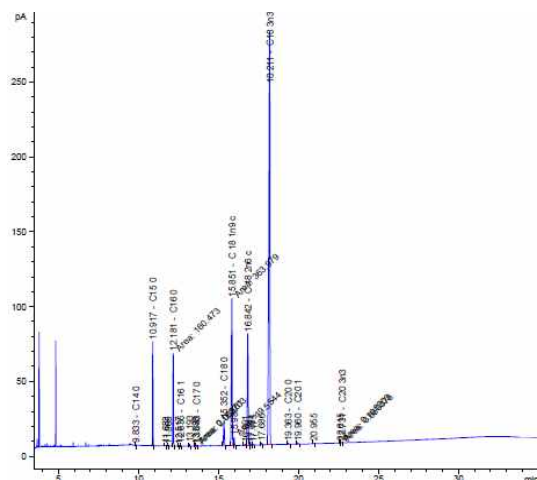


그림 109. 4월 실외저장(버딩골)의 크로마토그램
토그램

그림 110. 4월 저온저장 (버텨골)의 크로마

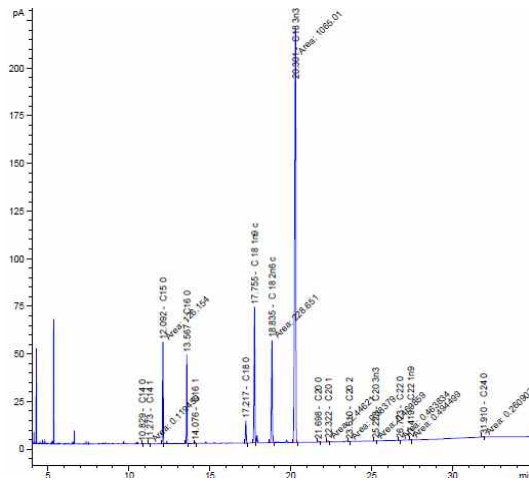


그림 111. 5월 실외저장(버딩골)의 크로마토그램

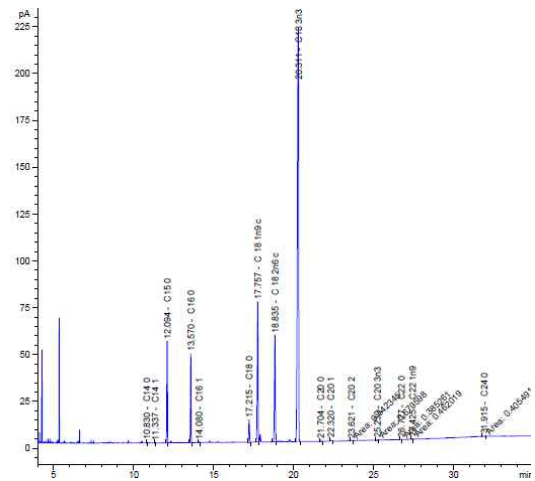


그림 112. 5월 저온저장 (버딩골)의 크로마

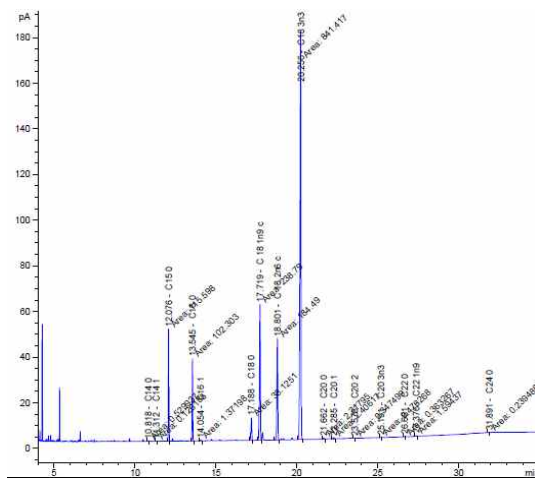


그림 113. 6월 실외저장(버딩골)의 크로마토그램

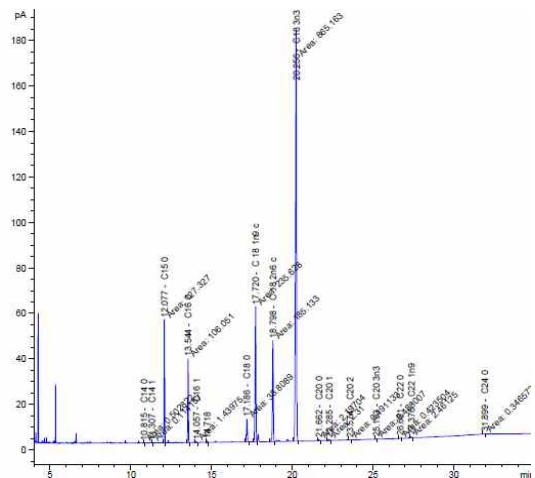


그림 114. 6월 저온저장 (버딩골)의 크로마

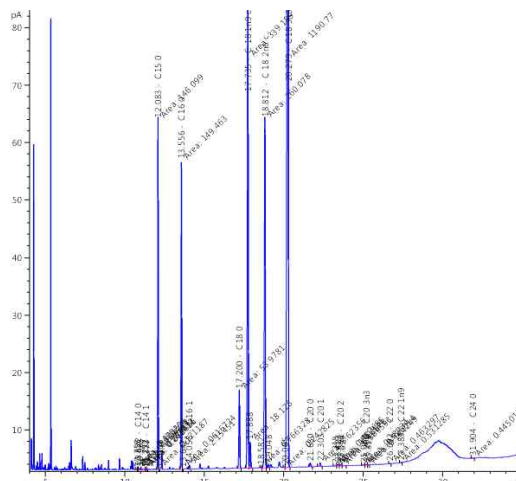


그림 115. 7월 실외저장(버딩골)의 크로마토그램

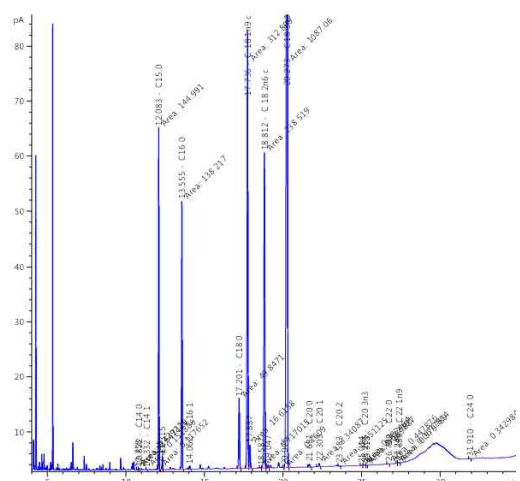


그림 116. 7월 저온저장 (버딩골)의 크로

마토그램

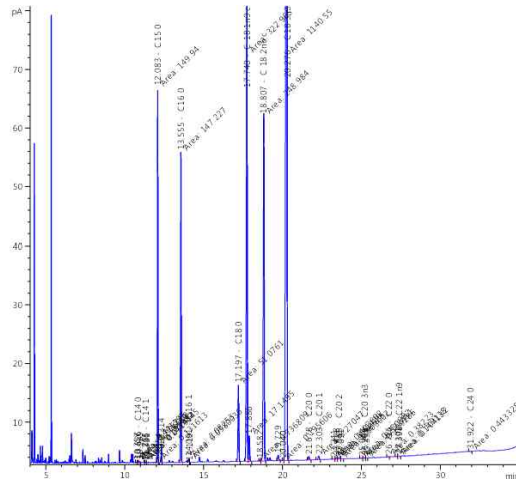


그림 117. 8월 실외저장(버딩골)의 크로마토그램
토그램

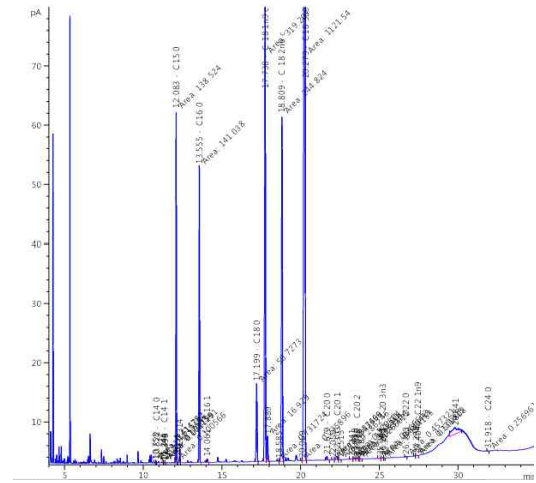


그림 118. 8월 저온저장 (버텅골)의 크로마



그림 119. α-리놀렌산의 실외 및 저온저장 성분 비율 (화천 들깨)

표 21. α -리놀렌산의 실외 및 저온저장 성분 비율 (화천 들깨)

구분	화천(ALA)	
	실외저장	저온저장
10 월	59.418%	
11 월	55.976%	
12 월	59.617%	
1 월	59.783	59.839
2 월	61.546	61.260
3 월	61.430	59.815
4 월	55.840	54.437
5 월	56.256	54.280
6 월	54.980	53.614
7 월	58.145	58.148
8 월	58.810	57.580

- 화천의 화천토종잡곡에서 다르게 저장하여 공급받은 들깨의 달별 α -리놀렌산 함량을 *n*-hexane을 이용하여 추출한 뒤, GC-FID를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 실외 저장에서는 3월까지 α -리놀렌산의 함량이 지속적으로 56%에서 60%까지 증가하는 경향을 보였으나, 날이 더워지기 시작하는 3월에 큰 폭으로 감소하였고, 6월까지 약 54-55%를 웃도는 경향을 보였다. 저온저장에서는 2월까지 약 56%에서 61%까지 증가하는 경향을 보였으나 그 후, 약 55%까지 지속적으로 감소하는 경향을 보였다. 8월까지 다시 증가하는 추세를 보이나 그 차이가 크지 않다고 여겨진다.

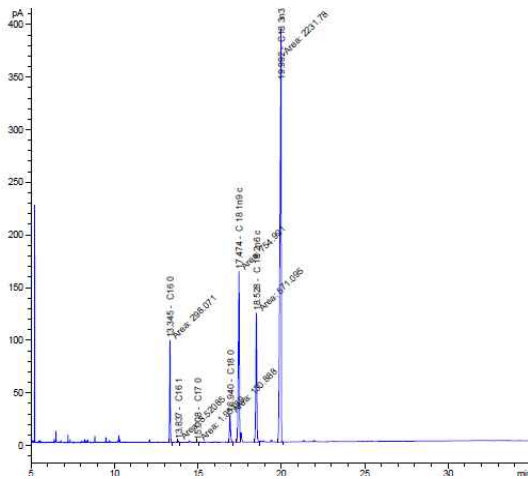


그림 120. 10월 화천의 크로마토그램

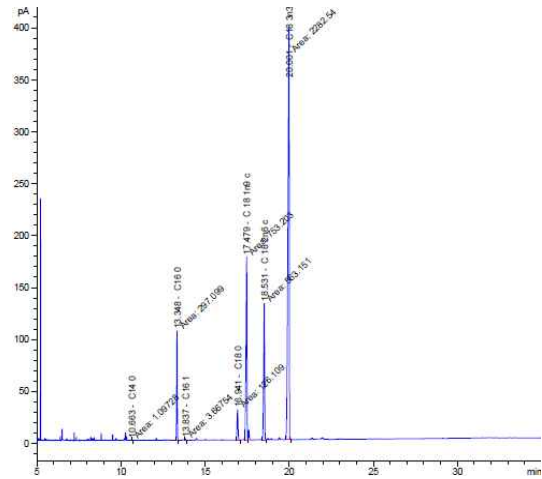


그림 121. 11월 (화천)의 크로마토그램

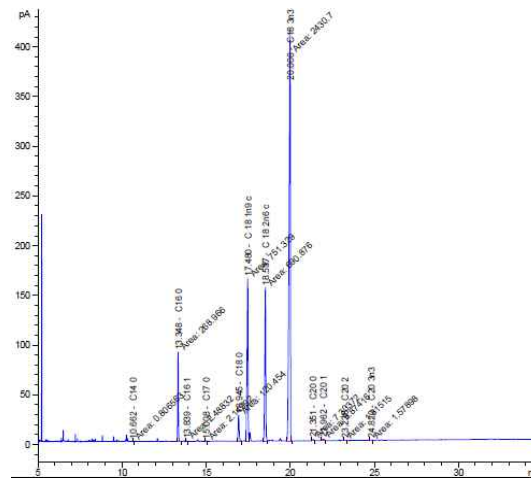


그림 122. 12월 (화천)의 크로마토그램

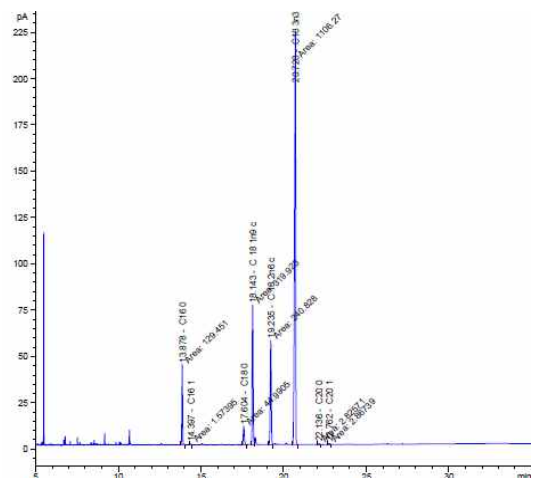
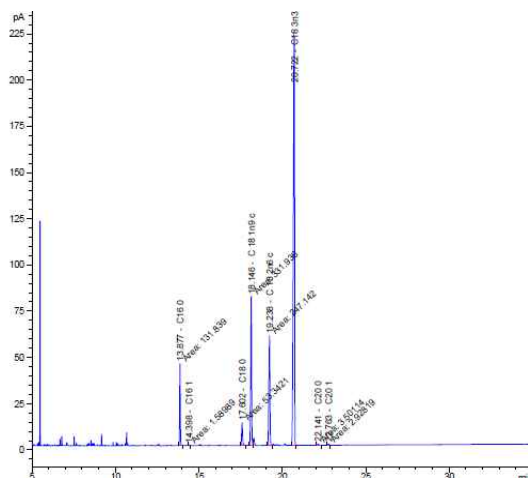


그림 123. 1월 실외저장(화천)의 크로마토그램 그림 124. 1월 저온저장(화천)의 크로마토그램

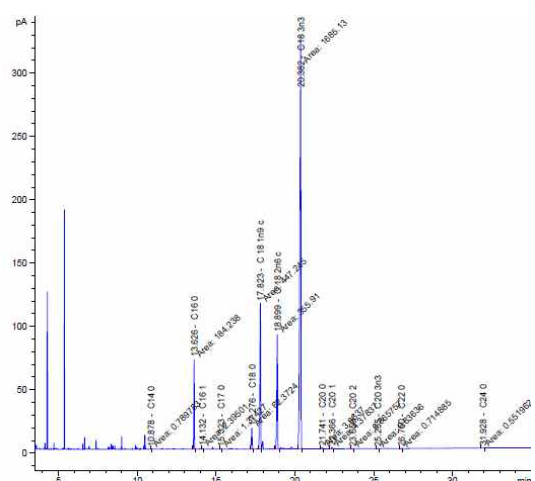
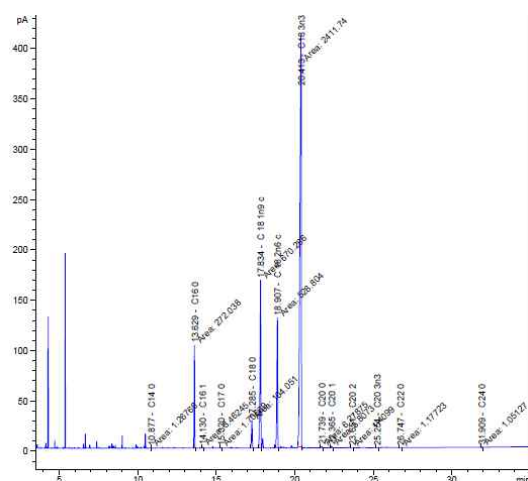


그림 125. 2월 실외저장(화천)의 크로마토그램 그림 126. 2월 저온저장(화천)의 크로마토그램

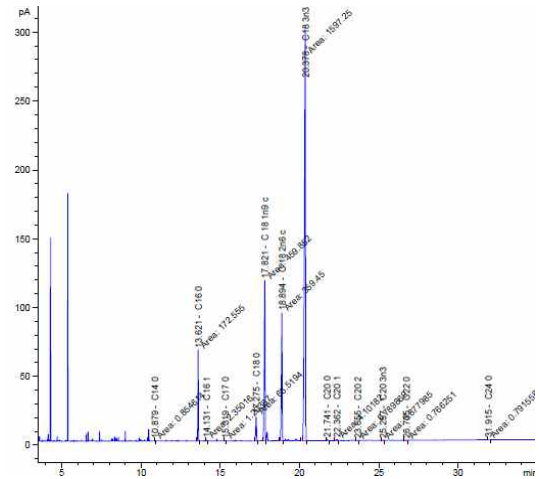
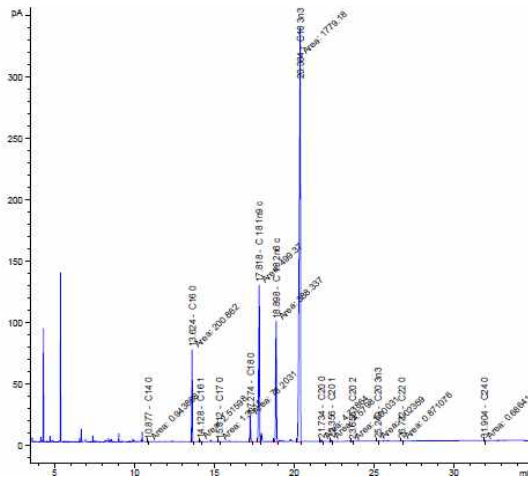


그림 127. 3월 실외저장(화천)의 크로마토그램

그림 128. 3월 저온저장 (화천)의 크로마토그램

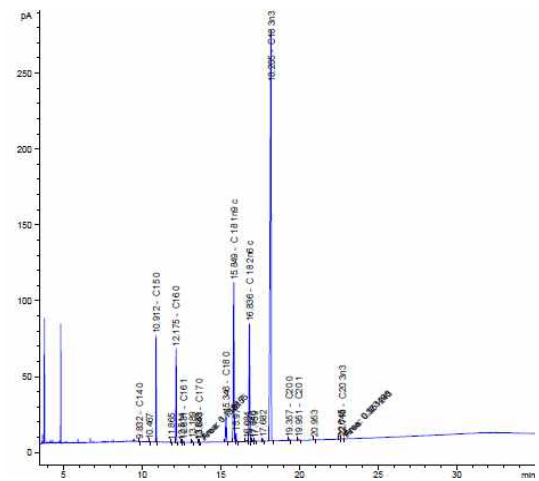
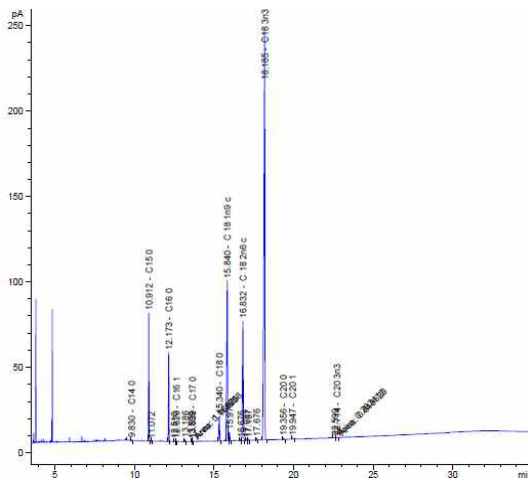


그림 129. 4월 실외저장(화천)의 크로마토그램

그림 130. 4월 저온저장 (화천)의 크로마토그램

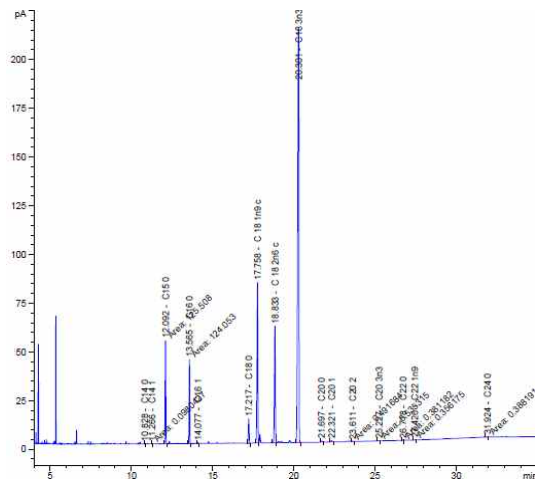
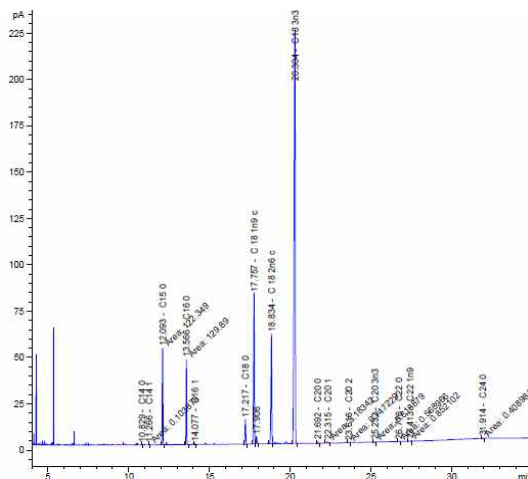


그림 131. 5월 실외저장(화천)의 크로마토그램

그림 132. 5월 저온저장 (화천)의 크로마토그램

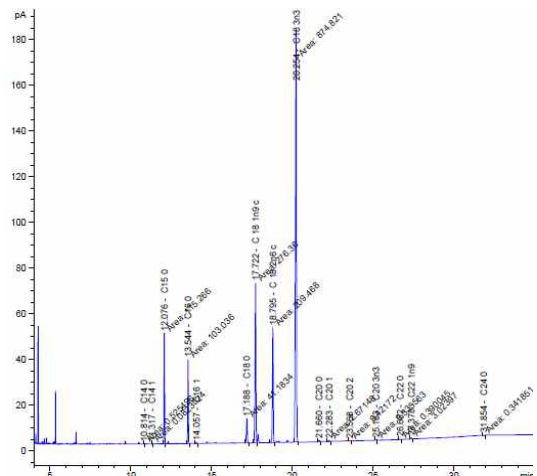
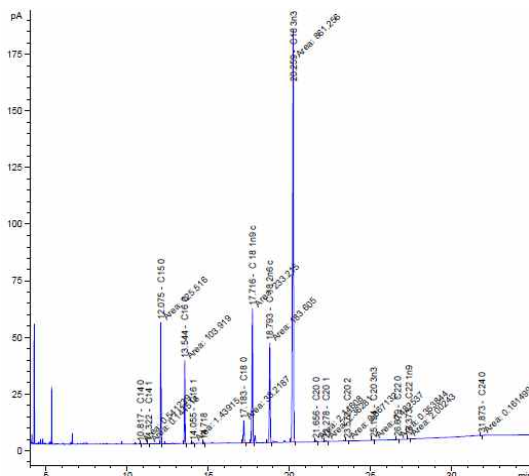


그림 133. 6월 실외저장(화천)의 크로마토그램 그림 134. 6월 저온저장 (화천)의 크로마토그램

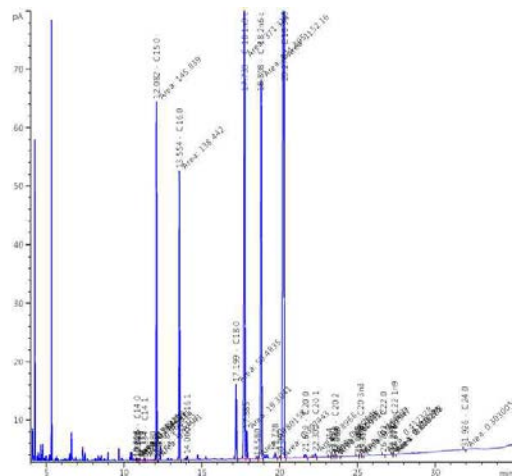
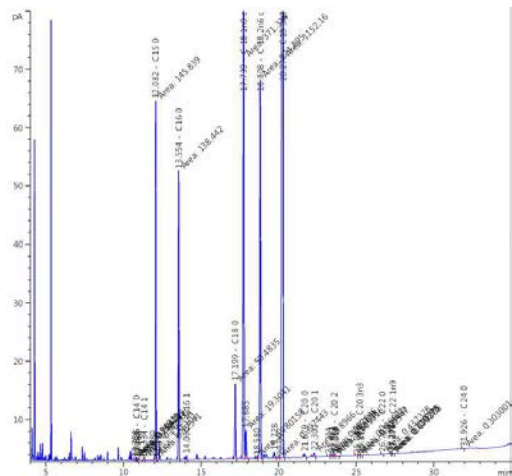


그림 135. 7월 실외저장(화천)의 크로마토그램 그림 136. 7월 저온저장 (화천)의 크로마토그램

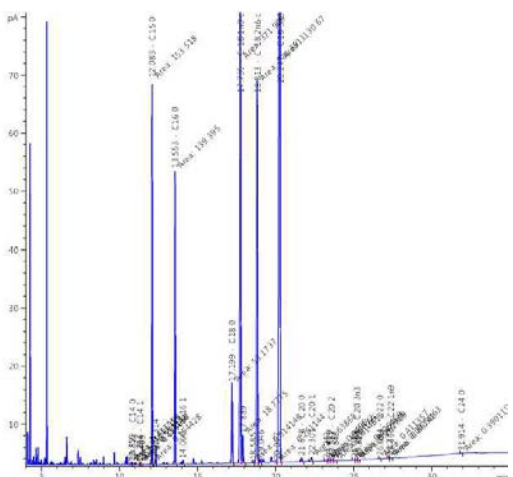
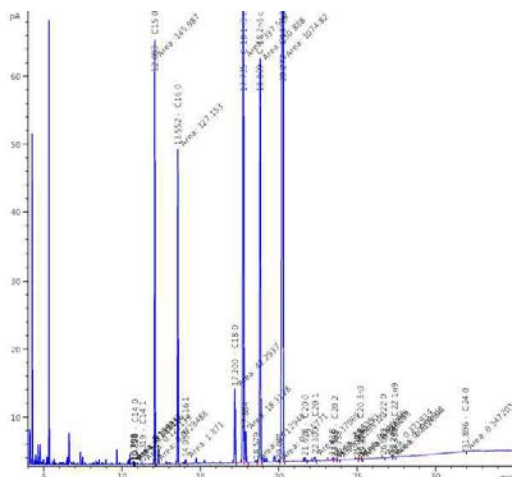


그림 137. 8월 실외저장(화천)의 크로마토그램 그림 138. 8월 저온저장 (화천)의 크로마토그램

○ 농협, 영농협회 등 수집상의 보관방법 또는 저장방법에 따른 산패 비교분석 (산가) : 2015년 10월부터 매달 화천의 화천토종잡곡과 버딩골 영농조합에서 실외에서 저장한 들깨와 저온저

장고에서 저장한 들깨씨를 공급받아 *n*-hexane으로 추출한 뒤, 산가를 측정하였다.

표 22. 월별 들깨의 산가 (버딩골영농조합)

month	산가 (%)	
	실외저장	저온저장
10월	2.57 ± 0.035	
11월	1.25 ± 0.020	
12	1.15 ± 0.029	
1	1.92 ± 0.050	1.62 ± 0.066
2	0.99 ± 0.050	1.98 ± 0.060
3	1.14 ± 0.127	1.23 ± 0.044
4	2.57 ± 0.041	2.20 ± 0.022
5	2.06 ± 0.011	1.99 ± 0.036
6	2.77 ± 0.101	2.05 ± 0.084
7	2.62 ± 0.110	3.46 ± 0.124
8	2.78 ± 0.052	2.33 ± 0.126

- 버딩골 영농조합에서 제공받은 들깨를 이용하여 산가를 측정하였다. 10월부터 12월까지는 실외저장과 저온저장의 차이를 두지 않고 저장을 하여 측정 하였다. 그 결과, 11월부터 2월까지의 큰 차이는 나지 않았지만, 본격적으로 더워지는 3월부터는 산가가 높아지기 시작했다. 이 차이는 들깨의 산패로 인하여 산화도가 증가한 것으로 유추해본다.

표 23. 월별 들깨의 산가 (화천토종잡곡)

month	산가 (%)	
	실외저장	저온저장
10	1.76 ± 0.162	
11	1.35 ± 0.041	
12	1.18 ± 0.030	
1	1.41 ± 0.030	1.56 ± 0.029
2	1.78 ± 0.052	1.54 ± 0.046
3	1.61 ± 0.066	1.91 ± 0.041
4	2.38 ± 0.021	2.00 ± 0.014
5	2.08 ± 0.075	2.04 ± 0.070
6	2.11 ± 0.053	2.09 ± 0.028
7	3.39 ± 0.205	2.08 ± 0.046
8	2.76 ± 0.113	2.50 ± 0.153

- 화천 토종잡곡에서 제공받은 들깨를 이용하여 산가를 측정하였다. 10월부터 12월까지는 실외저장과 저온저장의 차이를 두지 않고 저장을 하여 측정 하였다. 10월부터 3월까지의 큰 차이가 나지 않았지만, 11월부터 2월까지의 큰 차이는 나지 않았지만, 본격적으로 더워지는 3월부터는 산가가 높아지기 시작했다. 이 차이는 들깨의 산패로 인하여 산화도가 증가한 것으로 유추해본다.

- 농협, 영농협회 등 수집상의 보관방법 또는 저장방법에 따른 산패 비교분석 (수분) : 2015년 10월부터 매달 화천의 화천토종잡곡과 버딩골 영농조합에서 실외에서 저장한 들깨와 저온저장고에서 저장한 들깨 씨를 공급받아 드라이 오븐에서 약 105°C의 조건으로 15시간 가온한 뒤, 무게를 측정하여 그 차이를 이용하여 계산하였다.

표 24. 월별 들깨의 수분측정 (버딩골 영농조합)

month	수분측정 (%)	
	실외저장	저온저장
10	1.300 ± 0.200	
11	1.767 ± 0.208	
12	2.244 ± 0.237	
1	2.867 ± 0.321	2.567 ± 0.153
2	2.187 ± 0.181	2.952 ± 0.507
3	1.778 ± 0.302	2.291 ± 0.115
4	2.178 ± 0.333	2.474 ± 0.153
5	3.056 ± 0.221	2.809 ± 0.386
6	1.939 ± 0.395	2.365 ± 0.152
7	2.402 ± 0.100	2.349 ± 0.219
8	2.333 ± 0.152	2.468 ± 0.059

- 버딩골 영농조합에서 받은 들깨로 수분측정을 실시한 결과, 실외 저장의 실험구보다 저온저장에서의 실험구가 수분측정이 더 높았으며, 8월까지 미세하게 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 또한 2월달의 실험구가 특히 3% 가까이 수분량을 보여 많은 수분량을 가지고 있는 것으로 나타났다.

표 25. 월별 들깨의 수분측정 (화천토종잡곡)

month	수분측정 (%)	
	실외저장	저온저장
10	2.200 ± 0.300	
11	1.733 ± 0.208	
12	2.054 ± 0.422	
1	2.033 ± 0.416	1.500 ± 0.173
2	2.553 ± 0.450	3.614 ± 0.180
3	1.550 ± 0.476	3.695 ± 0.800
4	3.231 ± 0.324	3.832 ± 0.601
5	1.808 ± 0.088	1.568 ± 0.303
6	1.417 ± 0.333	1.075 ± 0.307
7	2.375 ± 0.298	1.906 ± 0.816
8	2.394 ± 0.391	2.187 ± 0.201

- 같은 방법으로 화천 토종잡곡에서 받은 들깨로 수분측정을 실시한 결과, 2월부터는 저온저장의 실험구가 실외저장의 실험구보다 수분량이 더 높게 측정되었으며, 이후 5월부터는 차이가 줄어들기 시작하여 점차 비슷해지는 것을 관찰 할 수 있었다.

(4) 처리방법에 따른 저장안정성 연구

바이알의 색 유무 (투명, 갈색), 진공의 여부, 아로마 오일, 그리고 허브가루첨가 등의 처리를 다르게 하여 들깨와 들기름의 산가, 수분, 그리고 함량을 분석하였다. 그 결과는 다음과 같다.

표 26. 처리 방법에 따른 들기름의 산가 측정

들기름의 산가 측정 (%)								
저장 온도	진공 유무	아로마오일	1 month		2 month		3 month	
			투명vial	갈색vial	투명vial	갈색vial	투명vial	갈색vial
오븐 (50°C)	진공	Nutmeg	1.07	1.53	2.70	2.74	1.30	0.67
		clover	1.51	1.21	3.41	4.94	2.81	2.73
		basil	2.39	0.77	1.98	2.70	1.06	0.96
		AR	1.54	0.78	1.75	2.00	2.22	0.92
		anseed	3.31	0.75	3.40	1.68	0.80	0.27
	비진공	Nutmeg	1.60	1.43	3.46	2.71	3.99	0.63
		clover	2.07	1.72	2.70	4.06	2.67	2.70
		basil	3.76	1.17	4.15	2.24	3.17	1.63
		AR	4.55	2.53	5.35	4.59	3.82	0.18
		anseed	2.39	3.02	2.60	4.21	0.20	0.53
냉장고 (4°C)	진공	Nutmeg	2.32	3.08	2.66	1.02	0.45	0.45
		clover	2.01	2.44	2.67	1.67	3.66	3.20
		basil	1.93	1.14	2.20	1.06	0.16	1.09
		AR	2.73	2.02	3.21	2.67	0.53	0.22
		anseed	1.73	2.44	2.05	3.32	0.63	0.58
	비진공	Nutmeg	3.93	1.23	3.25	1.51	0.94	4.34
		clover	2.04	2.55	2.65	2.70	3.71	3.61
		basil	1.93	2.22	2.04	2.70	0.82	0.58
		AR	2.27	1.21	2.61	0.75	1.01	1.05
		anseed	3.09	0.81	2.62	1.13	1.46	0.15
실온 (25°C)	진공	Nutmeg	0.50	1.81	1.10	2.65	0.82	0.44
		clover	0.86	4.62	1.08	2.74	1.95	3.85
		basil	0.17	1.44	1.13	3.59	0.52	0.23
		AR	0.89	1.09	1.32	1.55	1.46	2.45
		anseed	0.49	0.81	1.70	2.06	0.90	1.38
	비진공	Nutmeg	1.07	0.50	1.65	1.06	1.59	0.57
		clover	0.82	0.84	1.39	2.54	2.83	1.62
		basil	0.52	1.16	1.09	1.92	0.61	0.20
		AR	1.10	1.51	1.57	1.58	0.57	0.96
		anseed	1.38	1.86	1.71	1.51	1.96	0.51

- 전체적으로 오븐에서 보관한 경우에 산가가 높아지는 경향을 관측할 수 있었으며 anseed oil과 artemis oil을 처리한 경우에 산가가 비교적 높은 것을 알 수 있었다. 투명vial과 갈색vial은 특별한 차이가 없는 것을 알 수 있었고, 진공이 비진공의 경우에서보다 높은 산가를 나타내는 경향을 나타내었다. 전체적으로는 큰 차이가 없었다.

표 27. 처리 방법에 따른 들깨의 산가 측정

들깨의 산가 측정 (%)								
저장 온도	진공 유무	허브가루	1 month		2 month		3 month	
			투명vial	갈색vial	투명vial	갈색vial	투명vial	갈색vial
오븐 (50°C)	진공	Rosemary	1.76	1.41	4.23	2.24	1.43	1.52
		Rose	3.53	1.66	4.40	2.06	1.20	0.88
		Peppermint	1.47	4.89	2.42	4.09	1.63	1.21
		Lavender	1.15	1.46	1.43	5.83	0.85	0.68
		Camomile	5.25	5.79	5.72	5.91	0.83	1.47
	비진공	Rosemary	2.23	3.61	3.10	2.24	0.96	1.21
		Rose	1.10	1.38	1.99	4.56	0.15	1.49
		Peppermint	4.20	2.05	5.21	4.36	0.77	0.44
		Lavender	3.16	2.40	5.03	4.76	0.80	2.15
		Camomile	3.21	2.28	4.25	3.73	0.74	0.54
냉장고 (4°C)	진공	Rosemary	2.14	2.20	2.94	2.82	0.55	0.98
		Rose	0.03	0.48	2.16	3.29	0.49	0.52
		Peppermint	2.23	2.61	2.58	4.87	0.98	0.61
		Lavender	0.78	1.60	1.61	2.46	0.70	1.60
		Camomile	3.81	1.11	4.28	1.96	0.85	1.43
	비진공	Rosemary	0.03	1.92	0.16	3.02	0.55	0.84
		Rose	1.38	1.11	2.15	1.10	0.89	1.01
		Peppermint	2.41	1.70	1.81	2.41	1.25	1.00
		Lavender	1.43	0.77	2.12	1.70	0.52	1.13
		Camomile	2.75	2.55	2.95	2.59	0.81	1.68
실온 (25°C)	진공	Rosemary	0.46	3.31	1.21	4.57	2.26	0.56
		Rose	2.82	2.01	3.34	2.38	0.96	0.15
		Peppermint	0.03	3.01	1.17	2.27	0.84	0.55
		Lavender	3.74	2.03	5.28	4.21	0.14	0.53
		Camomile	1.75	2.04	1.33	2.67	0.16	2.35
	비진공	Rosemary	0.15	0.49	1.74	1.17	0.69	1.48
		Rose	1.40	2.08	1.86	2.39	0.22	1.82
		Peppermint	2.07	4.45	1.24	4.89	0.86	0.75
		Lavender	1.37	0.46	1.75	2.83	0.49	3.72
		Camomile	3.71	1.72	2.27	2.46	0.12	0.18

- 들깨의 경우에서도 역시 오븐에서 보관한 경우에 산가가 높아지는 경향을 보였고, Peppermint의 향을 처리하였을 때, 산가가 높아지는 것을 발견할 수 있었다. 역시, 들기름과 마찬가지로 투명vial과 갈색 vial은 특별한 차이가 없는 것을 알 수 있었고, 진공이 비진공의 경우에서보다 높은 산가를 나타내는 경향을 나타내었다. 전체적으로는 큰 차이가 없었다.

표 28. 처리 방법에 따른 들깨의 수분 측정

들깨의 수분 측정 (%)								
저장 온도	진공 유무	허브가루	1 month		2 month		3 month	
			투명vial	갈색vial	투명vial	갈색vial	투명vial	갈색vial
오븐 (50°C)	진공	Rosemary	5.66	5.74	5.99	5.23	37.82	25.52
		Rose	4.94	1.88	4.19	1.84	33.96	25.52
		Peppermint	4.96	5.30	5.73	6.20	37.09	49.29
		Lavender	5.66	6.02	5.64	18.64	35.18	11.14
		Camomile	5.49	5.73	5.58	6.16	40.41	33.01
	비 진공	Rosemary	4.31	5.02	5.10	4.65	22.67	20.34
		Rose	1.99	5.99	1.73	5.66	33.16	48.86
		Peppermint	0.65	5.43	5.93	6.02	27.08	26.80
		Lavender	4.99	5.08	5.18	4.88	19.51	44.88
		Camomile	5.92	5.16	5.55	6.73	34.88	33.89
냉장고 (4°C)	진공	Rosemary	6.08	5.74	6.12	4.06	14.95	11.06
		Rose	6.02	6.01	6.91	4.82	25.57	33.49
		Peppermint	6.12	5.86	6.01	5.48	10.20	15.64
		Lavender	6.10	4.52	6.11	7.33	20.93	28.88
		Camomile	6.08	6.01	5.97	6.39	3.25	23.79
	비 진공	Rosemary	6.07	6.27	5.96	7.50	23.00	0.11
		Rose	6.09	6.76	5.89	7.11	23.17	17.87
		Peppermint	5.68	6.58	5.16	5.36	22.21	28.88
		Lavender	5.98	6.35	6.04	7.78	6.16	9.47
		Camomile	6.17	6.99	5.59	6.89	29.23	25.85
실온 (25°C)	진공	Rosemary	6.10	9.19	6.10	10.82	31.89	29.01
		cRose	6.12	5.36	5.42	5.87	35.87	44.08
		Peppermint	6.38	6.07	9.58	6.04	36.84	33.61
		Lavender	6.04	5.88	5.27	8.32	50.73	30.85
		Camomile	6.17	5.91	6.17	5.72	50.81	32.94
	비 진공	Rosemary	5.93	5.44	6.61	4.95	16.70	26.26
		Rose	2.02	3.81	5.60	3.27	16.17	48.98
		Peppermint	6.07	6.02	6.03	5.41	44.73	23.56
		Lavender	6.12	6.00	6.00	3.46	10.83	25.69
		Camomile	5.66	5.45	6.12	6.31	22.29	11.37

○ 수분량 측정의 경우 vial의 색, 처리한 허브가루의 종류, 진공의 여부 보다는 저장 온도가 중요한 것으로 생각되며, 약 50°C의 오븐에서 저장을 한 들깨의 수분량이 낮았다. 이는 고온에서 저장됨에 따라 수분이 증발된 것때문으로 판단이 되며, 시간이 지남에 따라 3번째 달에서 측정한 실험구에서 높은 수분량의 경향을 나타내었다. 전체적으로는 큰 차이가 없었다.

표 29. 처리 방법에 따른 들기름의 정량 (1 month)

들기름의 정량 (mg/g)												
저장 온도	진공유무	아로마 오일	1 month									
			투명vial					갈색vial				
			Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid
오븐 (50°C)	진공	Nutmeg	51.723	19.971	149.027	95.217	380.714	51.728	20.023	142.552	104.033	439.129
		clove	51.391	19.736	141.891	105.327	446.011	50.978	19.605	141.098	108.666	479.650
		basil	51.029	19.626	142.284	105.723	471.013	52.047	20.039	143.644	104.689	441.685
		Artemisia	51.627	19.945	143.355	99.791	415.040	51.771	19.930	142.976	104.500	441.653
		anise seed	49.989	19.258	135.853	83.067	302.046	51.262	19.837	142.415	105.064	447.508
	비진공	Nutmeg	52.829	20.365	147.504	110.079	487.797	51.568	19.947	142.697	103.852	437.604
		clove	52.278	20.277	146.634	111.102	498.651	51.071	19.662	142.345	109.504	482.560
		basil	53.768	20.704	149.580	112.486	501.580	52.637	20.516	145.898	105.765	444.036
		Artemisia	52.487	20.384	147.102	109.951	488.050	51.637	20.024	143.223	104.120	438.090
		anise seed	51.146	19.854	140.011	92.209	359.406	50.780	19.662	140.603	103.638	441.262
냉장고 (4°C)	진공	Nutmeg	51.826	20.028	144.546	107.906	478.113	52.521	20.409	149.252	105.604	463.402
		clove	50.733	19.544	141.374	107.167	479.692	51.329	19.886	146.508	109.101	497.366
		basil	51.491	19.899	142.705	106.211	469.097	50.812	19.531	145.442	101.102	443.595
		Artemisia	51.450	20.049	144.340	107.486	474.649	51.581	19.450	143.446	101.524	443.937
		anise seed	52.600	20.308	145.741	109.442	472.675	53.171	20.354	146.791	106.311	459.439
	비진공	Nutmeg	53.172	20.469	148.456	111.214	494.899	51.332	19.573	145.401	100.863	441.636
		clove	52.368	20.144	146.831	111.874	504.426	52.610	19.985	149.122	109.495	499.774
		basil	55.077	21.373	154.430	115.123	510.791	50.784	19.185	143.019	99.001	433.058
		Artemisia	50.264	19.773	140.079	93.523	369.731	52.908	20.302	148.198	105.179	458.659
		anise seed	50.491	19.503	140.810	105.318	467.917	51.900	19.993	143.831	104.787	455.463
실온 (25°C)	진공	Nutmeg	52.117	19.940	144.777	111.419	491.719	52.008	19.932	143.633	105.249	445.332
		clove	54.185	20.881	151.756	114.302	513.866	50.954	19.718	142.492	109.905	485.666
		basil	52.224	20.157	146.185	110.283	497.200	52.725	20.190	145.047	105.373	443.489
		Artemisia	52.072	20.336	146.967	110.341	495.879	52.139	20.002	144.366	105.779	447.642
		anise seed	52.056	20.094	145.505	108.646	485.518	52.051	20.020	144.011	105.992	450.752
	비진공	Nutmeg	52.796	20.409	147.636	109.042	478.569	52.638	20.197	150.361	104.398	457.612
		clove	52.028	20.155	146.294	110.736	497.871	52.100	20.057	150.044	110.050	505.448
		basil	51.529	19.856	143.806	108.369	484.533	51.759	19.833	147.312	102.456	449.301
		Artemisia	51.922	19.977	144.970	109.294	488.916	52.491	20.093	146.886	104.969	456.663
		anise seed	51.131	19.750	142.388	104.211	451.994	53.456	20.611	148.768	109.129	476.612

표 30. 처리 방법에 따른 들기름의 정량 (2 month)

들기름의 정량 (mg/g)												
저장 온도	진공유무	아로마 오일	2 month									
			투명 vial					갈색 vial				
			Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid
오븐 (50°C)	진공	Nutmeg	53.954	21.760	152.933	104.094	421.267	53.462	21.248	151.369	109.299	475.724
		clove	53.439	21.231	152.378	115.498	519.545	51.488	20.417	147.523	111.658	506.194
		basil	53.853	21.493	153.314	111.256	482.031	52.799	20.959	149.543	107.392	465.922
		Artemisia	54.375	21.802	155.082	112.239	484.798	52.948	21.237	151.228	109.374	476.652
		anise seed	52.960	21.100	150.634	111.691	492.898	52.103	20.695	148.287	110.353	492.907
	비진공	Nutmeg	54.302	21.710	154.522	112.321	487.336	52.428	20.529	151.736	105.986	465.886
		clove	54.163	21.621	154.122	111.482	474.550	52.406	20.711	151.811	110.750	501.755
		basil	53.362	21.334	151.930	110.556	479.069	53.794	21.118	155.967	108.445	474.944
		Artemisia	52.666	20.769	148.596	106.210	455.520	53.586	21.085	152.639	108.642	472.529
		anise seed	53.220	21.286	152.003	112.747	496.110	53.716	21.312	151.931	111.060	482.679
냉장고 (4°C)	진공	Nutmeg	53.986	21.452	153.323	111.741	485.933	52.780	20.503	147.554	107.481	470.884
		clove	52.888	20.956	150.313	114.563	517.754	52.696	21.203	152.227	114.813	519.179
		basil	53.503	21.388	152.560	111.193	483.437	51.902	20.828	147.832	106.994	465.306
		Artemisia	54.015	21.411	152.647	111.706	486.996	52.862	21.164	151.242	109.516	477.539
		anise seed	53.733	21.444	152.944	113.282	499.811	52.092	20.913	149.005	108.897	479.423
	비진공	Nutmeg	53.417	21.382	152.667	110.835	483.546	52.914	21.141	150.347	108.865	471.837
		clove	51.745	20.470	146.828	113.925	506.858	53.893	21.431	153.763	116.145	522.523
		basil	52.682	20.980	149.849	109.070	476.553	53.457	21.311	151.774	110.193	478.528
		Artemisia	53.066	21.206	152.054	110.927	485.898	52.538	20.629	147.272	107.094	465.142
		anise seed	53.123	21.069	150.767	111.633	494.666	52.313	20.378	146.362	108.393	478.276
실온 (25°C)	진공	Nutmeg	52.920	21.249	151.013	109.207	471.861	52.936	20.871	148.696	106.382	459.606
		clover	52.699	21.064	150.657	113.953	510.711	52.178	20.515	148.056	112.076	506.866
		basil	52.220	20.860	148.653	108.023	467.593	56.496	22.733	160.605	116.066	505.572
		Artemisia	52.581	21.140	150.038	109.163	473.642	52.735	20.930	149.401	107.982	469.838
		anise seed	54.857	21.953	155.965	111.875	480.654	53.289	21.068	150.078	109.314	478.733
	비진공	Nutmeg	54.837	21.792	155.129	114.023	482.943	52.265	20.413	145.729	107.241	455.611
		clove	52.866	21.003	150.275	115.481	509.387	51.419	20.274	145.302	112.434	498.719
		basil	53.318	21.282	151.636	107.691	458.636	53.727	21.418	152.478	112.109	475.257
		Artemisia	52.197	20.848	146.795	97.097	380.236	53.222	21.013	149.855	110.256	468.876
		anise seed	51.919	20.743	147.635	106.127	456.191	53.681	21.038	149.523	111.444	478.569

표 31. 처리 방법에 따른 들기름의 정량 (3 month)

들기름의 정량 (mg/g)												
저장 온도	진공유무	아로마 오일	3 month									
			투명vial					갈색vial				
			Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid
오븐 (50°C)	진공	Nutmeg	50.806	19.429	137.735	86.972	328.973	51.523	19.431	139.923	99.487	408.808
		clove	50.732	19.090	138.194	100.702	418.637	49.033	18.348	135.737	106.311	475.228
		basil	48.661	18.368	132.741	91.867	383.402	52.679	19.973	143.341	101.909	418.772
		Artemisia	48.671	18.370	132.118	86.351	339.089	47.079	17.671	128.203	92.181	382.428
		anise seed	46.476	17.781	124.132	72.166	249.625	50.095	18.837	136.830	100.987	429.204
	비진공	Nutmeg	48.913	18.667	130.430	75.236	256.802	52.225	20.046	144.194	100.447	422.984
		clove	48.623	18.392	134.393	102.684	449.883	48.027	18.214	132.625	94.531	401.868
		basil	46.346	17.489	122.342	69.132	232.653	52.744	20.037	144.375	100.589	421.791
		Artemisia	51.300	19.503	136.321	81.993	280.853	51.069	19.342	139.999	97.926	411.629
		anise seed	48.814	18.489	133.137	92.550	387.578	49.623	18.859	137.182	96.582	412.177
냉장고 (4°C)	진공	Nutmeg	54.110	20.694	148.434	102.633	425.210	49.840	18.686	137.836	94.662	402.470
		clove	49.885	18.865	137.693	103.590	460.445	49.945	18.530	139.669	106.081	490.485
		basil	52.516	19.990	144.612	103.664	442.592	49.481	18.525	138.436	93.539	399.089
		Artemisia	50.749	19.068	137.739	95.789	397.770	50.977	19.053	141.337	96.309	406.911
		anise seed	50.415	19.087	137.496	98.120	404.901	53.572	20.291	146.312	102.759	430.998
	비진공	Nutmeg	54.041	20.545	147.611	103.192	430.971	49.042	18.503	133.774	95.487	393.877
		clove	50.489	19.183	140.059	104.748	463.957	51.163	19.392	140.953	107.434	469.702
		basil	51.061	19.553	140.511	97.672	406.005	50.979	19.297	138.946	99.415	410.820
		Artemisia	49.998	18.939	136.513	94.984	395.754	51.127	19.310	139.214	99.023	407.373
		anise seed	51.122	19.562	140.534	99.037	416.863	51.214	19.106	137.762	98.229	404.498
실온 (25°C)	진공	Nutmeg	51.690	19.455	139.930	98.441	400.491	49.926	18.818	135.423	95.704	391.257
		clove	53.140	19.824	144.512	103.960	446.540	50.388	19.045	138.666	105.527	458.926
		basil	52.331	19.921	144.225	101.110	426.421	48.929	18.301	133.290	97.447	411.217
		Artemisia	48.935	18.515	133.930	93.151	390.419	49.648	18.836	135.874	96.943	399.070
		anise seed	49.545	18.818	136.367	95.327	402.573	52.562	20.049	143.995	102.774	424.771
	비진공	Nutmeg	52.887	20.025	143.588	95.255	376.440	51.161	19.427	140.432	98.119	411.517
		clove	50.609	19.096	139.820	105.033	466.044	50.127	18.954	138.967	103.894	461.267
		basil	48.888	18.582	132.391	81.169	294.265	50.517	19.044	138.060	97.188	409.725
		Artemisia	53.180	20.351	146.083	101.667	422.154	51.115	19.251	139.967	98.070	411.762
		anise seed	49.476	18.704	133.680	85.315	320.689	49.577	18.766	135.375	95.171	400.190

표 32. 처리 방법에 따른 들깨의 정량 (1 month)

들깨의 정량 (mg/g)												
저장 온도	진공 유무	허브가루	1 month									
			투명vial					갈색vial				
			Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid
오븐 (50°C)	진공	Rosemary	53.939	21.239	142.532	108.216	435.867	56.606	21.927	148.588	116.423	469.093
		Rose	52.375	20.583	137.605	105.148	429.468	51.085	20.412	136.879	103.919	433.722
		Peppermint	57.808	22.886	153.366	116.951	474.251	52.682	20.460	139.470	107.287	433.925
		Lavender	52.338	20.690	135.582	103.479	427.243	53.056	20.772	141.052	106.550	433.810
		Camomile	58.193	22.872	153.549	114.964	460.456	54.192	20.971	143.390	108.182	440.606
	비진공	Rosemary	57.520	22.411	150.633	115.974	467.432	58.833	22.090	142.732	110.874	482.704
		Rose	56.177	22.394	151.304	116.637	484.068	55.653	21.667	153.707	114.806	465.733
		Peppermint	59.034	23.158	157.740	121.504	496.434	58.533	22.612	153.184	121.651	490.513
		Lavender	54.663	21.387	144.030	111.849	450.671	58.648	22.537	145.552	112.681	490.834
		Camomile	58.076	22.627	153.409	115.418	463.840	60.303	23.809	154.933	119.652	507.652
냉장고 (4°C)	진공	Rosemary	55.165	22.995	140.879	108.681	447.500	54.034	21.136	144.701	112.869	469.994
		Rose	59.370	23.483	160.781	123.471	513.094	55.282	21.537	148.292	115.331	476.304
		Peppermint	58.705	23.379	158.275	121.561	497.583	54.103	21.234	144.809	112.433	465.310
		Lavender	56.796	22.419	152.422	116.570	481.804	54.990	21.589	147.763	114.210	469.105
		Camomile	58.293	23.306	157.692	120.096	487.505	55.598	21.785	148.487	115.732	474.376
	비진공	Rosemary	54.078	21.933	144.949	113.575	476.881	58.753	23.099	158.352	123.818	516.766
		Rose	56.338	22.229	152.932	117.871	486.204	54.610	21.616	148.452	116.081	484.724
		Peppermint	55.801	22.000	150.212	116.701	482.745	55.800	21.577	148.925	116.376	481.396
		Lavender	52.856	21.071	141.617	110.063	460.453	56.413	21.887	151.484	117.176	489.829
		Camomile	59.427	23.481	161.730	123.591	514.464	55.097	21.767	148.784	115.453	482.051
실온 (25°C)	진공	Rosemary	57.262	22.492	153.980	117.647	479.512	49.701	19.818	133.219	101.895	417.933
		Rose	53.527	21.328	142.273	107.566	439.306	50.439	19.651	135.014	102.862	427.454
		Peppermint	55.375	21.687	147.394	113.452	463.670	49.719	19.689	128.188	98.613	409.846
		Lavender	52.617	20.700	142.175	106.702	440.403	52.358	20.570	141.653	107.670	443.475
		Camomile	56.732	22.412	152.515	116.412	476.555	55.066	21.705	148.345	113.682	469.480
	비진공	Rosemary	56.584	22.334	150.612	116.047	473.291	50.875	20.159	130.031	99.350	432.535
		Rose	52.650	21.964	137.420	105.104	433.084	50.703	19.607	135.274	103.488	430.437
		Peppermint	55.106	22.020	150.459	113.260	465.229	49.613	20.296	128.456	99.266	413.057
		Lavender	52.011	21.564	136.982	103.845	425.207	53.264	21.353	139.412	104.231	458.307
		Camomile	52.081	20.670	142.201	106.689	440.591	50.691	19.853	134.283	103.772	430.187

표 33. 처리 방법에 따른 들깨의 정량 (2 month)

들깨의 정량 (mg/g)												
저장 온도	진공 유무	허브가루	2 month									
			투명vial					갈색vial				
			Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid
오븐 (50°C)	진공	Rosemary	56.374	21.328	144.929	115.643	469.461	32.014	12.279	83.523	64.201	264.359
		Rose	41.460	15.426	104.552	82.133	325.227	55.552	20.999	142.405	111.958	447.241
		Peppermint	51.468	19.448	135.179	104.756	419.351	48.019	18.278	124.824	97.810	399.894
		Lavender	54.825	20.669	144.245	112.605	456.313	57.058	21.771	147.510	115.872	465.361
		Camomile	51.284	19.268	131.766	104.027	412.869	51.803	19.230	133.136	105.463	428.102
	비진공	Rosemary	54.229	20.416	142.854	109.959	452.617	53.812	20.543	142.477	106.727	445.311
		Rose	56.284	21.155	146.029	113.888	456.976	54.746	20.727	141.478	110.275	446.768
		Peppermint	49.438	18.929	125.856	81.733	388.684	47.270	17.674	121.158	95.431	384.198
		Lavender	52.102	20.147	130.322	100.190	394.201	53.555	20.058	136.073	107.856	429.966
		Camomile	52.592	20.180	137.485	105.460	429.076	53.706	20.426	148.498	104.431	439.766
냉장고 (4°C)	진공	Rosemary	38.130	14.486	99.464	78.454	321.822	50.331	19.533	132.292	101.849	416.973
		Rose	50.512	19.396	133.209	102.461	422.745	49.686	18.789	130.163	100.570	407.729
		Peppermint	50.626	19.297	134.236	103.531	426.368	53.825	20.463	142.410	109.797	452.455
		Lavender	51.258	19.677	134.304	103.923	424.542	51.048	19.369	133.137	102.685	423.622
		Camomile	3.160	1.230	8.141	5.934	23.054	52.700	20.042	139.943	108.142	438.546
	비진공	Rosemary	61.045	22.900	159.827	118.634	472.882	43.686	15.982	105.999	80.950	358.842
		Rose	52.795	19.929	145.899	105.293	454.360	55.259	20.892	144.849	110.866	451.009
		Peppermint	47.858	18.066	123.314	90.235	352.692	55.969	21.197	147.418	113.888	469.621
		Lavender	52.617	19.802	145.114	111.298	487.544	54.433	20.286	142.109	110.472	449.268
		Camomile	53.154	19.615	136.305	101.512	399.188	38.927	15.025	98.755	74.517	319.031
실온 (25°C)	진공	Rosemary	53.709	20.228	140.356	104.895	417.953	55.006	20.929	144.154	111.347	457.526
		Rose	13.556	5.381	34.686	25.686	102.553	0.038	0.036	0.024	0.000	0.038
		Peppermint	0.098	0.093	0.041	0.027	0.097	52.173	19.613	136.899	105.130	433.011
		Lavender	54.723	20.674	143.309	112.148	462.215	45.940	17.419	120.239	93.123	385.052
		Camomile	54.124	20.456	141.951	109.945	450.443	52.112	19.994	140.014	107.482	439.812
	비진공	Rosemary	55.172	20.942	146.411	112.907	463.141	0.071	0.064	0.061	0.045	0.156
		Rose	51.434	19.405	135.855	106.140	435.592	57.266	21.654	149.734	116.772	482.600
		Peppermint	45.329	17.189	119.176	92.512	378.870	56.670	21.661	148.697	114.223	470.746
		Lavender	40.573	15.262	106.791	82.989	342.012	45.793	17.607	120.035	91.469	374.638
		Camomile	49.846	18.663	130.279	101.075	413.371	57.502	21.606	149.546	116.528	480.795

표 34. 처리 방법에 따른 들깨의 정량 (3 month)

들깨의 정량 (mg/g)												
저장 온도	진공 유무	허브가루	3 month									
			투명vial					갈색vial				
			Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α-linolenic acid
오븐 (50°C)	진공	Rosemary	54.161	20.556	139.207	104.408	398.896	49.163	18.972	128.911	97.904	401.936
		Rose	55.098	20.490	140.616	105.655	407.620	61.019	22.400	154.807	116.613	442.504
		Peppermint	58.707	21.978	149.918	114.515	444.533	56.824	21.215	145.105	110.171	425.975
		Lavender	56.508	21.044	143.845	108.890	421.326	55.145	20.665	142.337	107.098	424.251
		Camomile	57.105	21.650	144.691	107.438	408.356	59.348	22.359	151.594	115.659	452.553
	비진공	Rosemary	58.181	21.616	151.233	111.027	450.319	56.549	21.079	147.810	107.458	443.784
		Rose	54.045	20.003	139.563	100.861	402.821	58.225	21.936	150.254	112.026	448.080
		Peppermint	56.449	20.872	143.922	106.263	405.666	52.636	19.997	138.589	99.743	401.575
		Lavender	55.733	21.033	143.386	105.924	406.547	56.851	21.628	150.276	107.774	435.220
		Camomile	56.799	21.453	149.257	110.612	453.224	55.813	20.890	142.690	107.549	407.023
냉장고 (4°C)	진공	Rosemary	56.400	20.702	146.890	111.700	454.805	56.890	21.529	149.538	108.265	429.559
		Rose	53.835	20.297	140.868	105.537	415.882	58.464	22.107	154.702	114.949	455.140
		Peppermint	55.955	20.856	145.128	108.383	432.114	57.185	21.513	150.708	113.010	451.757
		Lavender	57.594	21.308	149.445	112.460	451.354	56.245	21.083	148.432	107.150	427.773
		Camomile	53.430	20.160	139.654	103.774	413.256	56.263	20.808	144.813	107.698	422.056
	비진공	Rosemary	51.563	19.355	144.243	106.768	482.019	56.820	21.162	144.064	104.171	399.689
		Rose	56.802	21.029	145.986	109.560	436.737	58.600	22.196	154.703	116.762	470.455
		Peppermint	53.276	20.121	145.684	106.283	445.074	57.383	21.665	146.873	108.157	423.851
		Lavender	56.887	21.354	151.601	109.595	458.598	55.691	21.294	147.807	109.498	433.484
		Camomile	52.979	20.131	145.904	105.497	439.618	51.538	19.264	132.897	100.018	395.798
실온 (25°C)	진공	Rosemary	50.241	18.995	137.925	105.208	460.059	55.053	21.121	142.715	103.509	401.518
		Rose	58.716	22.261	153.757	113.394	445.126	52.935	19.838	138.261	102.967	410.778
		Peppermint	38.937	14.823	100.493	73.123	288.019	57.960	21.850	151.407	112.942	448.821
		Lavender	52.572	20.092	138.014	102.762	409.893	56.689	21.202	146.002	109.982	434.370
		Camomile	56.826	21.381	147.978	109.824	435.756	54.731	20.764	143.306	106.522	419.674
	비진공	Rosemary	57.608	21.517	150.128	113.838	458.283	58.197	21.752	150.048	114.650	454.876
		Rose	56.883	21.473	148.207	111.252	444.686	58.672	22.040	152.318	112.234	448.676
		Peppermint	57.079	21.448	149.662	111.273	445.333	52.447	19.905	137.428	101.921	407.201
		Lavender	56.407	21.229	147.462	109.966	437.535	56.378	20.829	146.959	111.887	449.469
		Camomile	56.001	21.212	145.728	110.368	440.258	58.168	21.732	151.679	111.835	447.757



- 85 -

<제3협동과제> 들깨 리놀렌산의 인지능개선 *in vitro* 및 *in vivo* 실험 및 작용 메카니즘연구
가. 연구수행내용

□ 항산화, 항균, 항염증, 항암 효과 탐색

- DPPH 소거능 측정: 시료 100 μ l와 60 μ M DPPH 용액 100 μ l을 96 well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정한다.
- \cdot OH 소거능 측정: Fenton 반응에 따라 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -EDTA에 10 mM의 2-deoxyribose solution과 시료용액을 혼합한 다음, 10 mM의 H_2O_2 를 첨가하여 37°C에서 4 시간 동안 배양한다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid (TCA)와 1% thiobarbituric acid (TBA) solution을 각각 첨가하여 10분간 boiling한 후 cooling하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다.
- LLC-PK₁ cell을 이용한 산화적 스트레스 개선 효과 측정: LLC-PK₁ porcine renal epithelial cell 세포는 96 well plate에 분주하여 세포를 부착시킨 뒤 세포에서 NO, O₂⁻, ONOO⁻의 free radical을 유발하는 generator인 sodium nitroprusside (SNP, 500 μ M), pyrogallol (250 μ M), 3-morpholiniosydnonimine (SIN-1, 1 mM)을 각각 처리하고, 24시간 뒤 시료를 처리한 후 MTT assay를 실시하여 세포 생존율을 측정한다.
- 항균 활성 탐색: 그람 양성균 *S. aureus*는 nutrient 배지 , 그람 음성균 *E. coli*는 luria-bertani 배지를 조제하여 사용하고, 37°C incubator에서 배양한다. 다양한 농도의 각 추출물 100 μ l를 disc paper (지름 8mm)에 흡수시킨 후 37°C의 미호기성 조건에서 24~48 시간 동안 incubation한 다음 disc주위의 clear zone 생성 유무를 확인한다.
- 항염증 효과 측정: 세포 염증 효과 유발: RAW264.7 mouse macrophage cell를 24 well plate에 분주한 후 세포에 시료를 처리하고 24시간 후 1 μ g/ml의 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 다시 24시간 배양하여 세포의 endotoxin을 유도한다. 세포의 상층액을 취하여 griess reagent와 1:1로 반응시켜 세포의 NO생성 억제율을 측정한다.
- 항암 효과 측정: AGS human gastric adenocarcinoma cell를 96 well plate에 분주하고 세포 부착 후 시료를 일정농도로 처리하여 48시간 배양 후 5 mg/ml의 MTT 용액 200 μ l를 첨가하여 4시간 후 생성된 formazan결정을 DMSO에 녹여서 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

□ 신경세포 보호 효과 측정

- C6 glial cell 또는 SH-SY5Y cell을 5×10^4 cells/well로 96well plate에 분주하고 안정화된 후, 시료를 첨가하여 24시간 배양한다. 이후 500 μ M hydrogen peroxide (H_2O_2)와 25 μ M A β 를 처리하여 산화적 스트레스로 인한 신경세포 손상을 유도한다. 세포생존율은 5 mg/ml의 MTT 용액 200 μ L를 첨가하여 4시간 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여서 540 nm에서 흡광도를 측정한다. Reactive oxygen species (ROS) 측정은 DCFDA assay를 이용하며, 80 μ M의 DCFDA 용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분 동안 incubation한 후 fluorescent에서 ex 480 nm, em 535 nm로 측정한다.

□ *In vivo*에서 인지능 개선 효과 탐색

- AD 동물 모델 제작 : ICR mouse에 26-gauge needle이 달려있는 50 μ l Hamilton microsyringe를 이용하여 brain bregma에서 2.2 mm 깊이로 A β 를 5 μ l 주입한다. 정상군의 mouse는 A β 대신 생리식염수를 주입한다.
- 시료 투여 : 실험군에는 2주간 매일 일정한 시간에 100 μ l씩 위내 투여 방법으로 시료를 주입하고, 정상군과 대조군에서는 시료의 용매를 투여 한다.
- 행동 실험 : 시료 투여 1주일이 되는 시점부터 행동실험을 실시한다.
 - Novel object recognition test : 똑같은 물체 두 개 (A, A')를 일정한 간격을 두고 나란히 놓은 후 10분 동안 mouse가 각각의 물체를 만지는 횟수를 체크한다. 24시간이 지난 후 두 가지 물체 중 하나를 새로운 물체(B)로 바꾼 후 같은 반복적으로 실험을 실시하여 mouse가 익숙한 물체(A)와 새로운 물체(B)를 만지는 횟수를 측정한다.
 - T-maze test : T자형 maze에 오른쪽 통로를 막는다. 10분의 시간동안 mouse가 왼쪽 통로로 가는 횟수를 측정한다. 24시간 후 T-maze의 오른쪽 통로를 열어둔 상태에서 10분의 시간동안 mouse가 왼쪽과 오른쪽 통로에 가는 횟수를 각각 측정한다.
 - Morris water maze test : 수조에 도피대가 보이지 않게 한 뒤 사등분한 수조벽면에 공간 단서를 붙인 후 마우스가 공간단서를 이용하여 도피대를 찾아가는 시간을 측정한다. 하루 3번 일정한 간격으로 3일 동안 실시하여 공간위치를 학습한 후 4일째 되는 날 기억검사를 실시한다.
- 지질과산화 측정 : Yagi와 Yokode의 방법을 이용하여, 0.67% TBA 1.5 ml와 20% TCA 1.5 ml를 혼합한 후 95~100℃에서 45분간 끓여 차갑게 식힌 후 *n*-butanol 3 ml과 잘 혼합한다. 이 용액은 원심분리기에 4,000 g로 10분 동안 원심분리 한 후 상층액을 분리해내어 532 nm에서 흡광도를 측정한다.
- NO 생성 억제 측정 : 조직을 생리식염수로 균질화 시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한후 상층액과 증류수를 혼합한다. 그 후 1% sulfanilic acid를 함유한 5% phosphoric acid와 0.1% N-(1-naphthyl)ethlenediamide dihydrochloride 용액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 만든 griess reagent를 넣어 실온에서 15분간 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준곡선은 NaNO₂를 농도별로 조제하여 사용한다.
- Aspartate aminotransferase (AST) 및 Alanine aminotransferase (ALT) 활성 측정 : 혈청 내 AST 및 ALT 활성은 Retiman-Frankel의 방법에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 측정한다.

□ 항우울 효과 탐색

- MAO activity 측정: Monoamine Oxidase Assay kit (고마바이오텍, EMAO-100)를 이용하여 측정 한다.

- Serotonin activity 측정: Serotonin ELISA kit (enzo, ADI-990-175)를 이용하여 측정 한다.

□ 효소 활성 측정

- β -secretase assay: β -secretase activity kit (abcam, ab65357)를 이용하여 측정 한다.
- AChE 활성 측정: 뇌 조직을 생리식염수로 homogenizer를 이용하여 균질화 시킨 후, 1,000 x g 에서 10분간 원심분리한 후 상층액은 AChE 효소원으로 사용한다. AChE 함량은 뇌 균질액 50 μ l 를 취하여 1% hydroxylamine 50 μ l를 첨가하여 혼합한 후 HCl을 이용하여 pH 1.2 \pm 0.2로 조절 한다. 그 다음 FeCl₃ (10% 0.1 N HCl 첨가) 500 μ l를 첨가하고 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

□ 작용 메커니즘 연구

- RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정: 동일한 조건에서 준비된 세포 및 동물 조직으로부터 trizol을 이용하여 분리한 total RNA를 분리 정량한 후, oligo dT primer와 superscript II reverse transcriptase를 이용하여 RNA에서 cDNA를 합성한다. 이 cDNA를 template로 이용하여 NF- κ B, iNOS, COX-2 등의 유전자를 PCR방법으로 증폭한다. 각 PCR 산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 EtBr을 이용하여 염색한 후 UV하에서 발현의 정도를 확인한다.
- Western blot analysis를 통한 단백질 발현 측정: 세포 및 조직은 lysis buffer로 용해한 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한다. 분리된 단백질을 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T에 4°C에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시한다. 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL 용액을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질 양을 분석한다. 염증, 항산화, apoptosis, AD 관련 단백질 발현을 측정하며 이 때 housekeeping gene으로는 β -actin을 사용하여 측정한다.

나. 연구결과

□ 1차년도: 들깨의 *in vitro* 건강 기능성 효과 탐색

가. 들기름의 *in vitro* 건강 기능성 효과

(1) *In vitro*에서 항산화 효과 측정

(가) DPPH radical 소거능 측정: 들기름과 지방산 조성이 다른 4종류의 vegetable oil의 DPPH radical 소거 효과를 비교해본 결과, 농도 의존적으로 소거능이 증가하였으며 그 중에서 들기름이 500 μ g/ml의 농도에서 12.53%로 가장 높은 DPPH 소거 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (Table 1).

Table 1. DPPH radical scavenging activity of vegetable oils

Treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Scavenging activity(%)				
	Olive oil	Corn oil	Perilla oil	Flaxseed oil	Walnut oil
25	0.70 \pm 2.25	-3.13 \pm 2.41	0.02 \pm 3.70	-2.27 \pm 4.28	0.80 \pm 3.24
125	1.30 \pm 2.78	-2.97 \pm 2.63	2.63 \pm 2.10	-2.17 \pm 1.66	2.25 \pm 4.74
250	3.90 \pm 2.52	0.36 \pm 2.87	8.96 \pm 2.38	0.48 \pm 4.00	5.50 \pm 3.52
500	4.41 \pm 2.65	2.97 \pm 2.09	12.53 \pm 3.75	6.20 \pm 5.66	8.52 \pm 4.24

Values are mean \pm SD

(나) $\cdot\text{OH}$ radical 소거능 측정: $\cdot\text{OH}$ radical 소거능을 살펴본 결과 flaxseed oil을 제외한 모든 oil이 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서 80%의 $\cdot\text{OH}$ radical 소거능을 나타내었다 (Table 2).

Table 2. $\cdot\text{OH}$ radical scavenging activity of vegetable oils

Treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Scavenging activity(%)				
	Olive oil	Corn oil	Perilla oil	Flaxseed oil	Walnut oil
25	89.58 \pm 0.20	88.28 \pm 0.37	82.88 \pm 0.52	-41.88 \pm 2.75	86.50 \pm 0.20
125	92.66 \pm 0.05	92.79 \pm 0.21	76.72 \pm 0.36	16.38 \pm 0.37	90.99 \pm 0.18
250	93.60 \pm 0.14	92.85 \pm 0.44	67.40 \pm 0.14	55.31 \pm 0.58	90.75 \pm 0.21
500	93.52 \pm 0.07	93.54 \pm 0.28	42.16 \pm 1.19	78.82 \pm 0.26	90.08 \pm 0.17

Values are mean \pm SD

(2) Cellular system에서의 산화적 스트레스 개선 효과 측정

(가) LLC-PK₁ cell에서 SNP에 의한 산화적 스트레스 개선 효과: LLC-PK₁ cell에 SNP 처리로 NO를 유발시킨 뒤 vegetable oils의 보호 효과를 세포 생존율로 확인하였다. SNP만을 처리한 control군은 세포 생존율이 57.09%로 감소하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 확인할 수 있었고, vegetable oil을 처리한 군에서는 세포생존율이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서 들기름이 다른 oil들 보다 높은 세포 생존율을 보여 NO의 소거를 통한 산화적 스트레스 개선 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다(Table 3).

Table 3. The protective effect of vegetable oils on viability of LLC-PK₁ cells treated with SNP

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (%)		
	Olive oil	Corn oil	Perilla oil
10	76.84 \pm 8.61 ^{bc}	67.62 \pm 10.14 ^{cde}	85.29 \pm 5.24 ^b
50	68.23 \pm 15.63 ^{cde}	77.51 \pm 9.11 ^{bc}	70.02 \pm 3.86 ^{cd}
100	75.06 \pm 9.13 ^{bc}	96.02 \pm 5.39 ^a	59.05 \pm 3.51 ^{de}
Normal	100.00 \pm 5.24 ^a		
SNP-treated Control	57.09 \pm 4.39 ^e		

Values are mean \pm SD. ^{a-e}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(나) LLC-PK₁ cell에서 pyrogallol에 의한 산화적 스트레스 개선 효과: Pyrogallol을 처리한 LLC-PK₁ cell에 대한 3종의 vegetable oil의 보호 효과를 세포 생존율로 비교해본 결과, pyrogallol만을 처리한 control군의 경우 66.84%의 생존율을 보인 반면 vegetable oil을 처리하

였을 때 세포 생존율이 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 들기름 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 74.34%의 가장 높은 세포 생존율을 보였다(Table 4).

Table 4. The protective effect of vegetable oils on viability of LLC-PK₁ cells treated with pyrogallol

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (%)		
	Olive oil	Corn oil	Perilla oil
10	69.25 \pm 3.34 ^{bc}	68.21 \pm 3.98 ^{bc}	74.34 \pm 2.87 ^b
50	73.69 \pm 5.01 ^b	68.52 \pm 7.17 ^{bc}	69.94 \pm 0.57 ^{bc}
100	74.00 \pm 2.62 ^b	70.12 \pm 6.04 ^{bc}	68.19 \pm 4.97 ^{bc}
Normal	100.00 \pm 1.91 ^a		
pyrogallol-treated Control	66.84 \pm 0.60 ^c		

Values are mean \pm SD. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(다) LLC-PK₁ cell에서 SIN-1에 의한 산화적 스트레스 개선 효과: LLC-PK₁ cell에 SIN-1을 처리하여 ONOO⁻를 유발시킨 후 이에 대한 vegetable oil의 보호 효과를 세포 생존율을 통해 살펴해보았다(Table 5). SIN-1만을 처리한 control군은 세포 손상으로 생존율이 55.63%로 감소한 반면, 들기름을 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 66.69%로 유의적으로 세포 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

Table 5. The protective effect of vegetable oils on viability of LLC-PK₁ cells treated with SIN-1

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (%)		
	Olive oil	Corn oil	Perilla oil
10	56.06 \pm 2.54 ^d	65.85 \pm 6.85 ^{bc}	66.69 \pm 5.93 ^b
50	59.69 \pm 3.81 ^{cd}	58.76 \pm 2.48 ^d	65.93 \pm 1.73 ^{bc}
100	67.80 \pm 4.53 ^b	69.94 \pm 4.83 ^b	55.93 \pm 4.08 ^d
Normal	100.00 \pm 5.10 ^a		
SIN-1-treated Control	55.63 \pm 2.65 ^d		

Values are mean \pm SD. ^{a-d}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

나. ALA의 *in vitro* 건강 기능성 효과

(1) *In vitro*에서 항산화 효과 측정: 들기름에서 분리 정제된 ALA의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 농도가 증가할수록 DPPH radical 소거능이 증가하였으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때 21.87%의 radical 소거능을 나타냈다. $\cdot\text{OH}$ radical 소거능 또한 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서 80.70%를 나타내어 ALA는 $\cdot\text{OH}$ radical 소거 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다 (Table 6).

Table 6. DPPH and $\cdot\text{OH}$ radical scavenging activity of ALA from perilla oil

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
DPPH radical		$\cdot\text{OH}$	
Scavenging activity (%)		Scavenging activity (%)	
125	9.57 \pm 2.74 ^c	5	51.45 \pm 0.19 ^c
250	15.72 \pm 2.79 ^b	10	73.73 \pm 0.09 ^b
500	21.87 \pm 3.74 ^a	25	80.70 \pm 0.03 ^a
L-Ascorbic acid ⁽¹⁾	0.06 \pm 0.05	L-Ascorbic acid ⁽¹⁾	0.49 \pm 0.00
IC ₅₀		IC ₅₀	

Values are mean \pm SD. ¹⁾L-Ascorbic acid was used as positive control. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(2) Cellular system에서의 산화적 스트레스 개선 효과 측정

LLC-PK₁ cell에서 pyrogallol 및 SIN-1에 의한 산화적 스트레스 개선 효과: Pyrogallol만을 처리한 control군의 경우 51.55%의 생존율을 보였으나 ALA를 처리하였을 때 세포 생존율이 증가하는 경향을 나타내었으며 5 μ g/ml의 낮은 농도에서는 58.49%의 세포 생존율을 보여 pyrogallol에 의한 산화적 스트레스 개선 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 1). 또한, SIN-1만을 처리한 control군은 세포 손상으로 생존율이 79.89%로 감소한 반면 ALA를 100 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 81.02%의 세포생존율을 보여 ALA는 산화적 스트레스 개선 효과를 가지는 것으로 사료된다 (Figure 2).

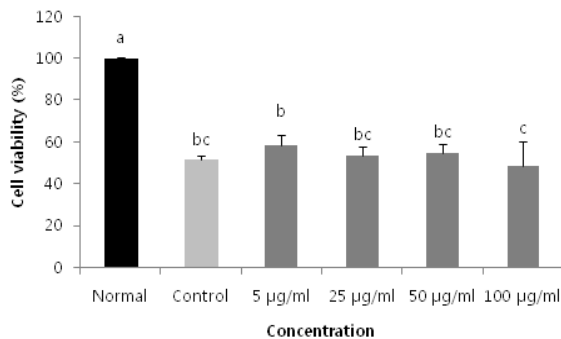


Figure 1. The protective effect of ALA from perilla oil on viability of LLC-PK₁ cells treated with pyrogallol. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

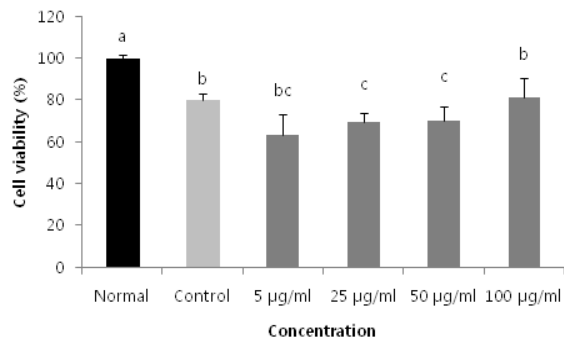


Figure 2. The protective effect of ALA from perilla oil on viability of LLC-PK₁ cells treated with SIN-1. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(3) 항균 활성 탐색

그람 음성균 중 하나인 *E. coli*와 대표적 그람 양성균인 *S. aureus*에 대한 항균활성을 측정한 결과 생육 억제환이 나타나지 않아 항균력은 없는 것으로 사료되어진다 (Table 7).

Table 7. Antibacterial activity of ALA from perilla oil against *E. coli* and *S. aureus*

Concentration (μ g/30 μ l)	Clear zone (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
15	¹⁾	-
30	-	-
Penicillin ²⁾	13.3 \pm 0.6	13.0 \pm 1.0

Values are mean \pm SD. ¹⁾ '-': no effect ²⁾Penicillin was used as a positive control

(4) 항염증 효과 측정

LPS 자극에 의해 NO가 과량발생하게 되면 세포 독성뿐만 아니라, 염증반응 및 종양 발생 등에도 관여한다. LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell에서 NO생성량을 살펴보면, control 군을 100%로 보았을 때 normal군이 64.10%를 나타내었으며 ALA를 농도별로 처리한 결과 유

의적으로 NO 생성량이 감소하였다. 특히, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 처리한 군에서 각각 84.33, 82.85%를 나타내어 ALA가 NO생성을 억제시켜 염증반응을 개선시키는 것으로 사료된다 (Table 8).

Table 8. Anti-inflammatory effect of ALA from perilla oil

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	NO generation (%)
5	99.53 \pm 1.11 ^a
25	96.92 \pm 1.52 ^b
50	84.33 \pm 2.30 ^c
100	82.85 \pm 1.59 ^c
AMT ¹⁾	58.60 \pm 0.99
Control	100.00 \pm 0.55 ^a
Normal	64.10 \pm 1.15 ^d

Values are mean \pm SD. ¹⁾AMT(10 μM) was used as a positive control. ^{a~d}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(5) 항암 효과 측정

AGS 인체 위암세포 성장 억제율을 측정한 결과, 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 30.97%의 가장 높은 항암 활성을 나타냈다(Table 9).

Table 9. Anti-cancer effect of ALA from perilla oil

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Growth inhibition rate (%)
5	1.14 \pm 5.13 ^a
25	30.97 \pm 2.97 ^d
50	12.88 \pm 3.61 ^b
100	17.97 \pm 2.54 ^c
5-FU ¹⁾	32.82 \pm 3.32

Values are mean \pm SD. ¹⁾5-FU(25 μM) was used as a positive control. ^{a~d}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(6) 신경세포 보호 효과 측정

(가) 세포 생존율 측정: ALA가 H_2O_2 에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 C6 glial에 대한 보호 효과를 측정한 결과, normal군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 H_2O_2 를 처리한 control군에서는 14.38%를 나타내어 산화적 스트레스에 의해 세포가 손상을 받은 것을 확인할 수 있었다. 반면 ALA를 처리한 군은 농도가 증가할수록 세포생존율이 증가하였으며, 특히 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 57.95%의 가장 높은 세포 생존율을 보여 ALA는 H_2O_2 에 의한 산화적 손상에 대하여 보호 효과가 있는 것을 알 수 있었다 (Figure 3).

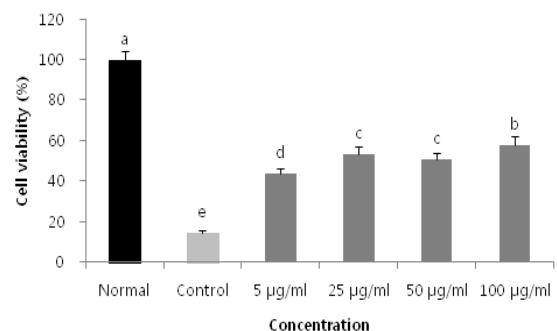


Figure 3. Effect of ALA from perilla oil on cell viability of C6 glial cells treated with H_2O_2 . Values are mean \pm SD. ^{a~e}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(나) ROS 생성을 측정: 시간이 지남에 따라 모든 군에서 ROS 생성량이 증가하는 것을 보였으며, 이를 통해 산화적 스트레스가 유발됨을 알 수 있었다. 60분 기준으로 control군을 100%로 하였을 때 ALA를 농도별로 처리한 결과 ROS 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 76.30%의 ROS 생성을 나타냈다. 따라서 ALA는 신경세포사멸 보호 효과가 세포 내 ROS 소거능과 상관관계가 있으며, 이러한 활성이 ROS에 의해 야기되는 세포 사멸에 대한 보호 작용의 역할을 할 것으로 사료된다 (Figure 4).

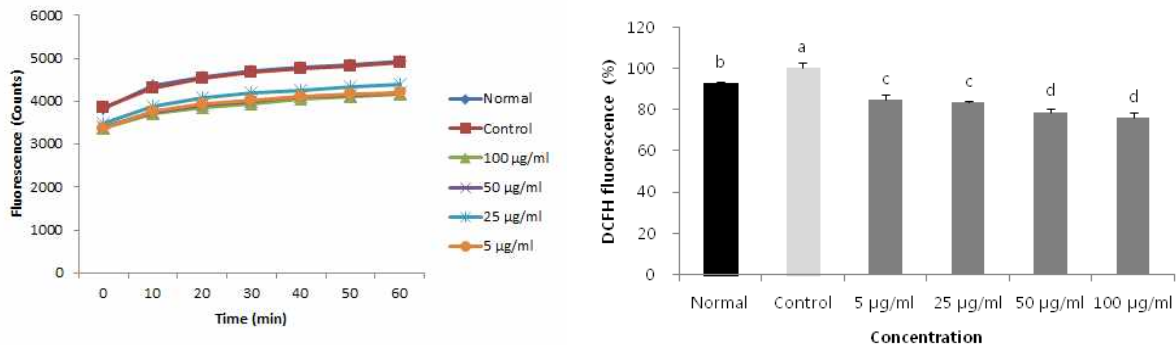


Figure 4. Effect of ALA from perilla on level of ROS in C6 glial cells treated with H_2O_2 . Values are mean \pm SD. ^{a-d}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

□ 2차년도: 들깨 리놀렌산의 인지능 개선 등 *in vivo* 건강 기능성 효과 탐색

가. 들기름의 인지능력 개선 효과

(1) ALT 및 AST 활성 측정: Vegetable oil의 투여가 간에 독성을 일으켰는지 알아보기 위하여 혈청에서 ALT 및 AST를 측정한 결과, 모든 실험 군에서 정상 범위 내에 있는 것으로 나타나 3가지의 vegetable oil의 위내 투여는 간 독성에 영향을 미치지 않은 것을 확인할 수 있었다 (Table 10).

Table 10. Activity of ALT and AST in the serum of mouse

Group	ALT (karmen/ml)	AST (karmen/ml)
Normal	27.23 \pm 2.20	39.08 \pm 0.61
Control	22.79 \pm 0.50	40.80 \pm 1.16
Olive oil	16.00 \pm 1.27	31.85 \pm 1.05
Corn oil	11.50 \pm 0.64	24.65 \pm 0.85
Perilla oil	45.55 \pm 0.65	63.78 \pm 1.22

Values are mean \pm SD. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

(2) T-maze test를 통한 공간 인지능력 측정: Mouse는 새로운 물체나 공간에 대해 호기심이 많은 동물임을 착안하여 단기 기억 능력을 측정하기 위해서 $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 injection한 후 지방산 조성이 다른 3가지 vegetable oils를 위내 투여한지 1주일째 되는 날 T-maze 실험을 수행하였다.

Mouse를 T-maze의 출발 지점에 놓고 두 팔 중에 한 구역을 막아 다른 한 구역에만 들어갈 수 있도록 훈련시킨 뒤 24시간 후 막았던 한 팔 장치를 치우고 새로운 구역에 들어가는 횟수를 기록하였다. 올리브유와 옥수수유를 위내 투여한 군은 기존의 길과 새로운 길에 대한 탐지 비율이 유의적인 차이가 없었으나, 들기름을 투여한 군은 기존의 길에 비해 새로운 길에 대한 탐지 비율이 유의적으로 증가하여 공간 인지능력이 향상된 것을 알 수 있었다. 그러므로 들기름의 투여가 손상된 공간 인지 능력에 대한 개선 효과가 있는 것으로 사료된다 (Figure 5).

(3) Novel object recognition test를 통한 물체 인지능력 측정: Mouse는 동일한 두 물체를 제시하면 자연스럽게 호기심이 유발되어 두 물체를 만지게 되고 이 때 통상적으로 두 물체를 만지는 횟수가 비슷하다. 이 때 두 물체 중 하나를 새로운 물체로 바꿔 놓으면 보통 mouse는 새로운 물체에 더 많은 호기심을 가져 만지는 횟수가 더 커지는 반면, 기억력이 손상된 mouse는 새로운 물체를 구분하지 못해 만지는 횟수의 증가가 나타나지 않는다. Normal군은 기존 물체와 새로운 물체의 탐지비율이 45.82%에서 60.59%로 유의적으로 증가하였으나, control군은 52.40%에서 57.32%로 유의적인 차이가 나타나지 않아 A β ₂₅₋₃₅에 의해 물체를 인지하는 능력이 손상되었음을 알 수 있었다. 그러나 올리브유, 옥수수유, 들기름을 투여한 군은 새로운 물체에 대한 접촉 빈도가 유의적으로 높아지는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 들기름을 투여한 군은 44.97%에서 63.30%로 가장 크게 접촉빈도가 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 6).

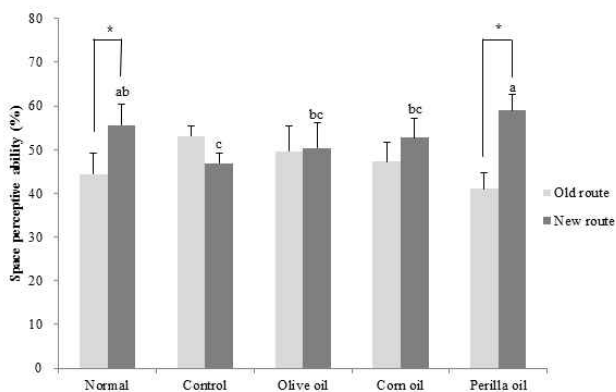


Figure 5. Spatial alteration test in the T-maze. Values are mean \pm SD. * P < 0.05 compared with old route. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different (P <0.05) by Duncan's multiple range test. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

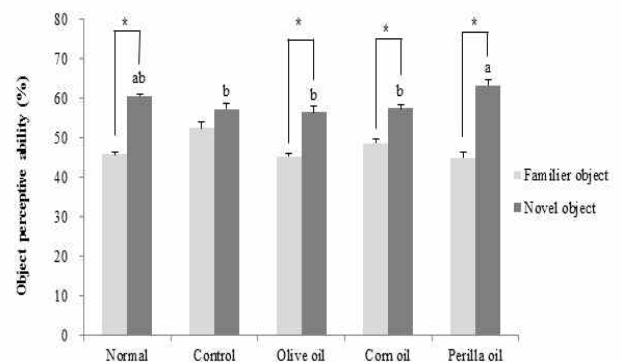


Figure 6. Percentage change of objective cognitive test scores. Values are mean \pm SD. * P < 0.05 compared with familiar object. ^{a-b}Means with the different letters are significantly different (P <0.05) by Duncan's multiple range test. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

(4) Morris water maze test를 통한 장기 기억 능력 측정: Mouse는 천부적으로 공간기억능력 및 수영능력이 상당히 뛰어난 것으로 알려져 있다. 또한, mouse의 해마는 다른 동물과 비교해

상대적으로 크므로, 해마 의존적 공간학습 능력을 평가하는 수중미로 실험을 실행하였다. Morris water maze test 결과는 Fig. 7-9에 나타내었다. Normal군은 훈련기간 3일 동안 도피대에 도달하는 시간이 줄어든 것을 확인할 수 있었지만 $A\beta_{25-35}$ 를 injection한 군은 도피대에 도달하는 시간이 다른 실험군에 비하여 가장 길었다. 반면 3가지의 vegetable oil중 들기름을 투여한 군에서는 마지막 날의 실험에서 도달시간이 가장 짧게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 들기름의 위내 투여가 $A\beta_{25-35}$ 에 의한 인지 능력 손상을 보호하여 mouse가 도피대의 위치를 인지하고 찾아가는 시간이 줄어든 것으로 보인다 (Figure 7).

도피대를 치우고 도피대가 있던 사분면에 머무르는 시간을 측정하였을 때, control군은 normal군보다 머무르는 시간이 짧아 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 뇌 손상을 받아 도피대가 있던 곳을 기억하지 못하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 들기름 투여군은 도피대를 치운 사분면에 머무는 시간이 control군보다 증가한 것을 확인할 수 있었으며 이로써, mouse가 도피대를 찾아가는 것은 숨겨진 도피대 인근의 표식을 인식하고 공간을 기억하여 찾아가는 것으로 여겨지고, 들기름은 $A\beta_{25-35}$ 로 유발된 알츠하이머 질환 동물의 장기 기억 능력 개선에 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 8).

마지막 날의 실험에서 mouse가 도피대를 찾아가는 것이 인지능력이 아닌 운동능력이나 시각능력으로 찾아가는 것인지를 알아보기 위해 숨겨진 플랫폼과 노출된 플랫폼으로 두 가지 실험을 실시하였다(Figure 9). 숨겨진 플랫폼을 실시하였을 때 들기름의 투여군은 control군보다 도피대를 찾아가는 시간이 유의적으로 빨랐고 노출된 플랫폼을 실시하였을 때는 모든 군이 도피대를 찾아가는 시간에 유의성이 없었다. 이로 인해 Morris water maze 실험 결과에서 mouse가 운동능력 차이나 시각능력 차이로 인한 문제가 아닌, 기억력 손상으로 인한 공간인지능력의 차이로 일어나는 것임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 들기름이 인지능력 손상에 대한 보호효과가 있고 학습과 기억능력에도 영향을 미친다고 사료된다.

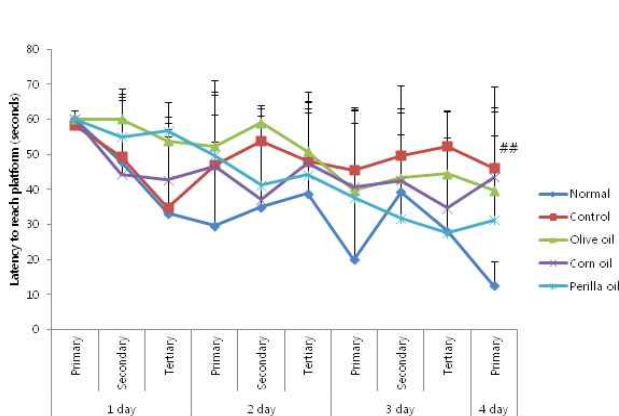


Figure 7. Spatial learning in the water maze test. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

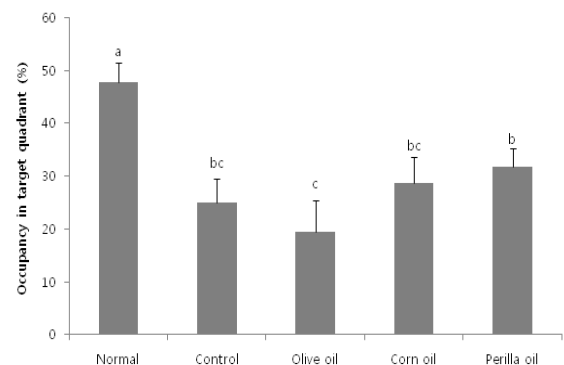


Figure 8. Effect of vegetable oils on memory impairment induced by $A\beta_{25-35}$. Values are mean \pm SD. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

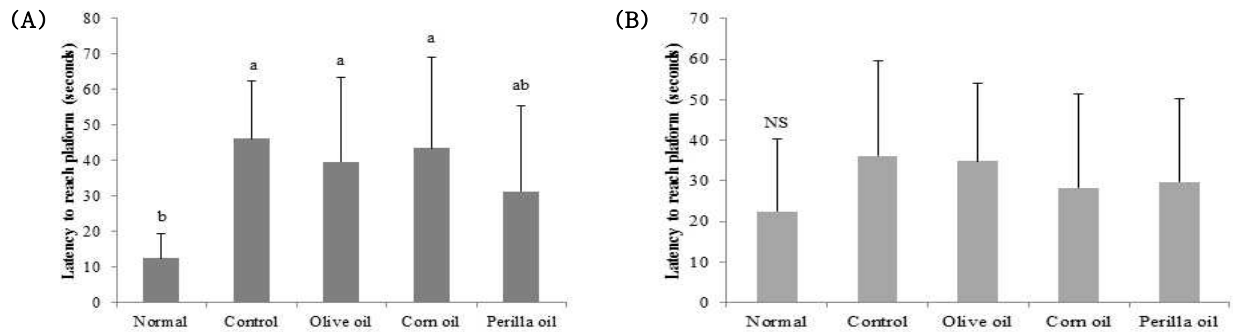


Figure 9. The latency to reach hidden (A) and exposed platform (B) in the water maze test. Values are mean \pm SD. ^{a-b}Means with the different letters are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{NS}No significant difference. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

(5) 조직에서의 NO 소거 효과: 뇌 내 $A\beta$ 가 비정상적으로 다량 만들어지면 뇌 조직에서 염증을 일으키는 pro-inflammatory cytokines 및 NO를 방출하여 염증 반응을 유발하게 되며, NO는 O_2 과 반응하여 더 독성이 강한 ONOO $^-$ 를 생성시킨다. 이는 단백질 및 지질의 과산화물을 유발하며 AD, Parkinson's disease등의 중추 신경계 질환을 유발한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 지방산 조성이 다른 3가지의 vegetable oils의 위내투여가 $A\beta_{25-35}$ 가 주입된 실험동물의 뇌, 간, 신장에서 생성된 NO radical 소거효과에 대해 미치는 영향을 검토해보았다 (Table 11).

Control군의 경우 뇌에서 NO 생성량이 13.25 $\mu\text{mol/L/mg protein}$, normal군이 8.92 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 을 나타내어 $A\beta_{25-35}$ 주입으로 인해 NO가 증가하는 것을 알 수 있었다. 반면 올리브유와 옥수수유군은 각각 12.80, 11.68 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 으로 나타나 $A\beta_{25-35}$ 군에 비해 뇌 조직에서의 NO 생성량이 감소함을 알 수 있었고 특히 들기름은 11.08 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 으로 가장 낮은 NO 생성량을 나타내었다.

신장에서 $A\beta_{25-35}$ 를 처리하지 않은 normal군은 11.13 $\mu\text{mol/L/mg protein}$, $A\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군에서는 12.69 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 로 나타났다. Vegetable oil을 경구 투여한 결과 올리브유, 옥수수유와 들기름 투여군에서 NaNO_2 수치가 각각 11.41, 11.29과 11.61 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 을 나타내었다.

간 조직에서의 NO 측정결과를 보면, normal군의 NaNO_2 수치가 23.84 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 인 반면 $A\beta_{25-35}$ 처리한 control군의 NaNO_2 는 33.30 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 으로 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 올리브유, 옥수수유와 들기름 투여군의 경우 NaNO_2 수치가 각각 26.01, 29.16 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 으로 나타났으며 특히 들기름 투여군에서 25.16 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 으로 NO 생성을 가장 크게 억제 시키는 것을 알 수 있었다.

위의 결과로 미루어 보아, 3가지의 vegetable oils중 들기름을 위내투여한 군에서의 뇌, 신장, 간 모두에서 NO생성 보호효과가 가장 뛰어난 것으로 사료된다.

Table 11. Effects of different kinds of vegetable oils on $A\beta_{25-35}$ -induced nitric oxide formation

Group	$\text{NaNO}_2(\mu\text{mol/L/mg protein})$		
	Brain	Kidney	Liver
Normal	8.92 \pm 1.89 ^b	11.13 \pm 0.67 ^a	23.84 \pm 2.56 ^c

Control	13.25 ± 1.34 ^a	12.69 ± 2.78 ^a	33.30 ± 4.06 ^a
Olive oil	12.80 ± 3.64 ^a	11.41 ± 2.37 ^a	26.01 ± 5.16 ^{bc}
Corn oil	11.68 ± 0.41 ^a	11.29 ± 0.84 ^a	29.16 ± 5.02 ^{ab}
Perilla oil	11.08 ± 0.28 ^{ab}	11.61 ± 0.24 ^a	25.16 ± 0.43 ^{bc}

Values are mean ± SD. ^{a-c}Different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

(6) 조직에서의 지질과산화 억제 효과: 지질과산화 반응은 활성산소종이 체내 구성분자의 변화를 일으키고, 세포막의 불포화 지방산과의 연쇄반응을 통하여 지질과산화 유발을 촉진하며, 그 결과 최종산물인 MDA 함량이 증가하게 된다. MDA는 지질과산화의 척도로 사용되어지며 A β 를 뇌 해마에 주입하게 되면 MDA의 양이 현저하게 증가한다. 본 연구에서는 A β_{25-35} 에 의해 유발된 지질과산화에 대한 3가지 vegetable oils의 보호 효과를 측정하였다 (Table 12).

뇌에서의 지질과산화 효과를 살펴보면 MDA 수치가 normal군은 20.85 nmol/mg protein 이었고 control군은 35.22 nmol/mg protein으로 A β_{25-35} 주입으로 인하여 지질과산화가 진행되었음을 알 수 있었다. 반면, 올리브유와 옥수수유 투여군은 각각 26.72 nmol/mg protein과 22.53 nmol/mg protein으로 나타났으며, 특히 들기름 투여군은 15.78 nmol/mg protein으로 A β_{25-35} 에 대하여 뇌에서의 지질과산화에 대한 보호효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

신장에서 지질과산화 효과를 보면 MDA 수치가 normal군에서는 10.48 nmol/mg protein 인 반면 control군에서는 21.52 nmol/mg protein으로 상승하여 A β_{25-35} 에 의해 뇌뿐만 아니라 간에도 지질과산화가 일어났음을 알 수 있었다. 반면, 올리브유와 옥수수유를 처리한 군에서는 각각 16.16, 17.47 nmol/mg protein을 나타내었고, perilla oil을 처리한 군은 14.18 nmol/mg protein로 가장 낮은 MDA 함량을 나타내었다.

간에서도 마찬가지로 A β_{25-35} 주입으로 인해 control군이 9.18 nmol/mg protein에서 19.51 nmol/mg protein로 증가하였으나 올리브유, 옥수수유 및 들기름을 투여한 군에서 각각 15.34, 14.80 과 12.17 nmol/mg protein의 MDA 함량을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 보아 3가지의 vegetable oil중 들기름이 뇌, 신장, 간에서 지질과산화에 대한 보호 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

Table 12. Effects of different kinds of vegetable oils on A β_{25-35} -induced MDA formation

Group	MDA (nmol/mg protein)		
	Brain	Kidney	Liver
Normal	20.85 ± 2.14 ^c	10.48 ± 1.85 ^d	9.18 ± 1.15 ^c
Control	35.22 ± 5.38 ^a	21.52 ± 2.84 ^a	19.51 ± 3.99 ^a
Olive oil	26.72 ± 5.02 ^b	16.16 ± 0.93 ^{bc}	15.34 ± 5.73 ^b
Corn oil	22.53 ± 2.69 ^{bc}	17.47 ± 1.95 ^b	14.80 ± 1.87 ^b
Perilla oil	15.78 ± 3.31 ^d	14.18 ± 2.94 ^c	12.17 ± 0.70 ^{bc}

Values are mean ± SD. ^{a-d}Different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

나. 들기름으로부터 분리한 ALA의 인지능력 개선 효과

서구화된 식생활에서 포화지방 위주의 섭취로 만성 질환이 증가하고 있는 대신 ω -3 지방산의 섭취는 그러한 질병의 위험을 줄인다는 보고가 제기 되면서 ω -3 지방산에 대한 관심이 증가하였다. EPA와 DHA는 어유에 풍부한 반면, ALA는 식물성 기름이 좋은 공급원이다. 이미 많은 연구들을 통해 EPA와 DHA의 항염증, 항암, 심혈관 예방 및 인지능력 개선 효과는 증명되었으나, 순수 ALA의 인지능력 개선 효과에 관한 연구는 전무한 실정이다. 우리나라에서는 ALA 급원으로 들기름에 함량이 가장 높아 많은 관심을 받고 있으며, 이 지방산은 체내에서 EPA와 DHA로 전환되므로 같은 생리적 효과, 혹은 ALA 자체로의 독립적인 생리 활성 효능을 나타낼 것이라고 생각되어진다. 따라서 본 연구팀에서는 들기름으로부터 분리한 ALA를 EPA/DHA와 비교하여 지방산 자체에 의한 인지능력개선 및 항우울 효과를 살펴보고자 한다. [ALA (isolated from *P. frutescens*, RDA, Miryang), EPA (EPA ethyl ester, Cayman, MI, USA), DHA (DHA ethyl ester, Cayman, MI, USA)]

(1) T-maze test를 통한 공간 인지능력 측정: 기존 길과 새로운 길로 들어가는 횟수를 비율로 나타낸 결과, normal군은 기존 길과 새로운 길로 들어가는 비율이 40.36%에서 59.64%로 유의적으로 증가하였으나, control군은 50.31%에서 46.69%로 유의적인 차이가 나타나지 않아 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 공간인지능력이 손상된 것을 확인할 수 있었다. EPA를 위내투여한 군은 기존 길과 새로운 길에 대한 탐지비율이 통계적으로 유의적인 차이가 없었으나, ALA와 DHA를 투여한 군은 새로운 팔로 들어가는 횟수가 유의적으로 높은 것으로 보아 들기름으로부터 분리한 ALA는 $A\beta_{25-35}$ 로 인해 손상된 공간 인지능력을 향상시키는 것을 알 수 있었다 (Figure 10).

(2) Novel object recognition test를 통한 물체 인지능력 측정: Normal군은 기존 물체와 새로운 물체의 탐지비율이 49.24%에서 62.88%로 증가하였으나, control군은 49.70%에서 51.01%로 유의적인 차이가 나타나지 않아 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 물체를 인지하는 능력이 손상되었음을 알 수 있었다. 그러나 들기름으로부터 분리한 ALA를 포함하여 EPA, DHA를 투여한 군은 새로운 물체에 대한 호기심으로 접촉 빈도가 유의적으로 높아지는 것을 확인하였으며, 이는 $A\beta_{25-35}$ 로 유도된 물체인지능력 손상에 대한 보호 효과를 가지는 것을 알 수 있었다 (Figure 11).

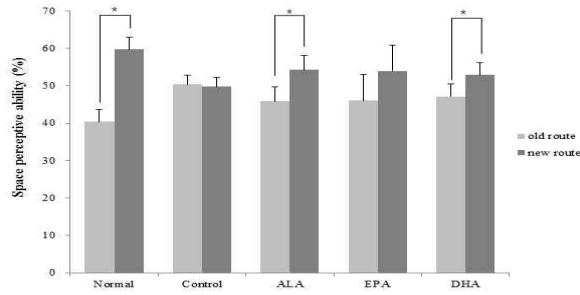


Figure 10. Spatial alteration test in the T-maze. Values are mean \pm SD. * P < 0.05 compared with old route. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

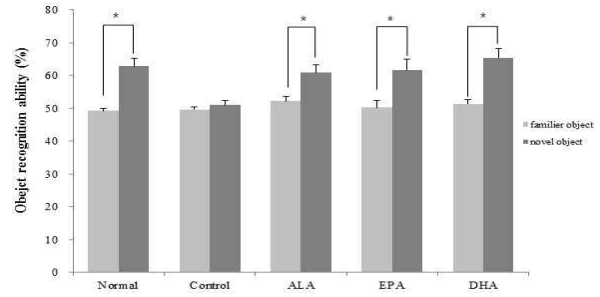


Figure 11. Percentage change of objective cognitive test scores. Values are mean \pm SD. * P < 0.05 compared with familiar object. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

(3) Morris water maze test를 통한 장기 기억 능력 측정: $A\beta_{25-35}$ 를 주입한 control군은 normal 군에 비해 상대적으로 도피대를 찾아가는 시간이 적게 감소하여 기억손상이 유도된 것을 확인할 수 있었다. 반면, ALA, EPA, DHA를 투여한 군은 control군과 비교하여 도피대를 찾아가는 시간이 점차 크게 감소하는 경향을 보여 인지 기억 손상을 개선하는 효과를 보였다 (Figure 12). 4일 째 되는 날, 도피대를 찾아가는 시간을 측정하였을 때 들기름으로부터 분리한 ALA를 투여한 군에서는 EPA와 DHA군과 비교하였을 때 상대적으로 찾아가는 시간이 길었으나, $A\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군에 비해 유의적으로 감소하였다 (Figure 13). 도피대를 제거한 뒤 처음 위치에 있던 도피대가 있던 사분면에 머무는 비율을 측정한 결과 $A\beta_{25-35}$ 를 처리한 control군 (25% 기준)에 비해 ALA, EPA, DHA를 위내투여한 군에서 각각 34.77%, 35.06%, 34.20%로 유의적으로 증가한 것을 확인함으로써 ALA는 장기기억 능력 손상에 대한 보호효과가 있는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 14).

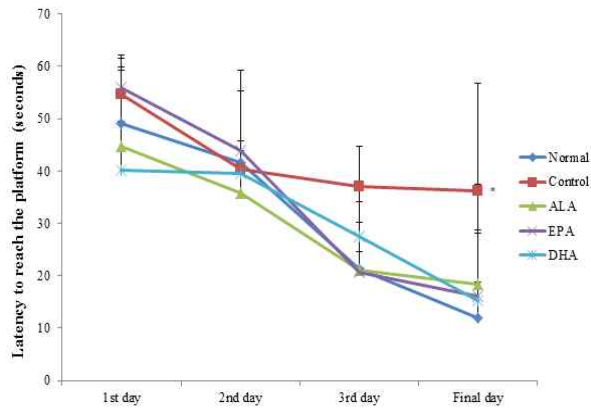


Figure 12. Spatial learning in the water maze test. Values are mean \pm SD. * $P < 0.05$ compared with normal group. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

(A)

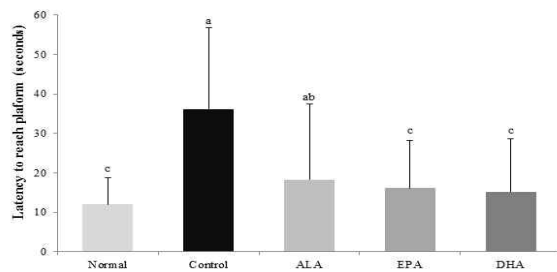


Fig. 14. The latency to reach hidden (A) and exposed platform (B) in the water maze test. Values are mean \pm SD. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ^{NS}No significant difference. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

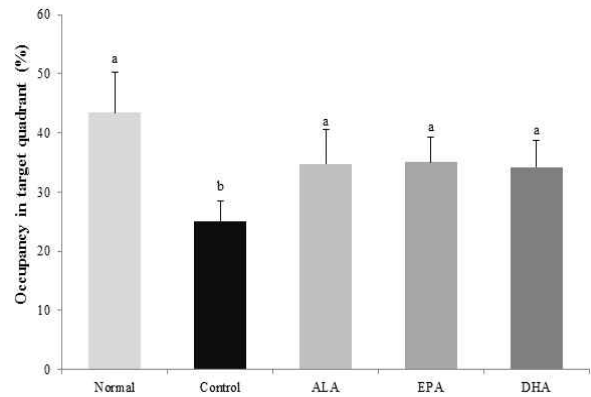
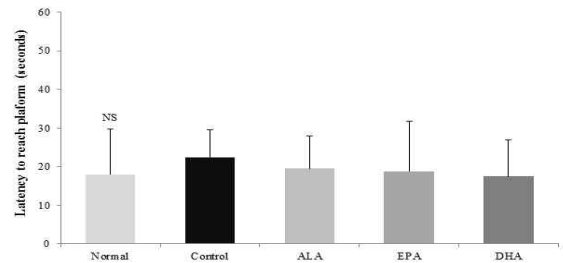


Figure 13. Effect of different kinds of ω -3 fatty acids on memory impairment induced by $A\beta_{25-35}$. Values are mean \pm SD. ^{a-b}Means with the different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

(B)



(4) 조직에서의 NO 소거 및 지질과산화 억제 효과: 뇌 조직에서 $A\beta_{25-35}$ 처리로 유도된 NO 생성에 대하여 ω -3 fatty acids의 소거 효과를 Table 13에 나타내었다. Control군의 경우 normal 군에 비해 16.74 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 에서 19.41 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 로 증가하여 $A\beta_{25-35}$ 주입

으로 인해 NO가 증가하는 것을 알 수 있었다. 반면 ALA, EPA DHA군은 각각 16.48, 16.30, 16.90 $\mu\text{mol/L/mg protein}$ 으로 나타나 $A\beta_{25-35}$ 군에 비해 뇌 조직에서의 NO 생성량이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이를 통해 들기름으로부터 분리된 ALA의 섭취는 EPA, DHA와 같이 $A\beta_{25-35}$ 로부터 유발된 NO생성을 저해시키는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

$A\beta_{25-35}$ 에 의한 산화적 손상을 알아보기 위하여 뇌조직의 지질과산화에 미치는 영향을 살펴본 결과, $A\beta_{25-35}$ 를 주입한 control군은 26.65 nmol/mg protein의 MDA수치를 나타낸 반면, normal군은 14.34 nmol/mg protein로 $A\beta_{25-35}$ 처리에 의해 산화적 스트레스가 증가한 것을 알 수 있었다. EPA를 처리한 군은 control군과 비교하여 유의적인 차이가 없었으나 ALA와 DHA의 위내투여는 각각 26.07과 19.58 nmol/mg protein로 MDA 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 들기름으로부터 분리한 ALA는 $A\beta_{25-35}$ 로 유도된 지질과산화를 억제시키는 효과를 가지는 것을 알 수 있었다.

Table 13. Effects of different kinds of ω -3 fatty acids on $A\beta_{25-35}$ -induced NO generation.

Group	NO ($\mu\text{mol/L/mg protein}$)	MDA (nmol/mg protein)
	Brain	Brain
Normal	16.74 \pm 1.04 ^b	14.34 \pm 0.28 ^d
Control	19.41 \pm 1.14 ^a	26.65 \pm 0.65 ^a
ALA	16.48 \pm 2.70 ^b	23.07 \pm 1.85 ^b
EPA	16.30 \pm 0.92 ^b	26.61 \pm 1.29 ^a
DHA	16.90 \pm 0.93 ^b	19.58 \pm 0.36 ^c

Values are mean \pm SD. ^{a-b}Different letters are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

다. 신경전달 물질 변화 탐색을 통한 ALA의 항우울 효과

(1) MAO-A 억제 효과: MAO-A 효소의 활성을 저해하면 우울증을 개선시킬 수 있다는 보고가 있다. 2주간의 ALA, EPA 그리고 DHA를 위내투여한 후 각 군 간의 MAO-A 효소 활성의 변화를 Figure 15에 나타내었다. Control군을 100% 기준으로 DHA를 처리한 군에서는 98.19%로 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, ALA와 EPA를 처리한 군에서는 각각 95.33%와 88.73%를 나타내어 MAO 효소의 활성을 저해한 것을 알 수 있었으며 이를 통해 우울증과 관련한 만성 스트레스 상태를 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

(2) 뇌 조직에서의 serotonin level 측정: 우울증은 serotonin 신경계의 기능 부조 때문에 생기며, serotonin 신경전달물질의 감소는 우울증과 관련된 행동을 예측할 수 있는 지표로서의 가능성이 시사된다고 하였다. Figure 16에서 각 군의 serotonin level을 측정한 결과, 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

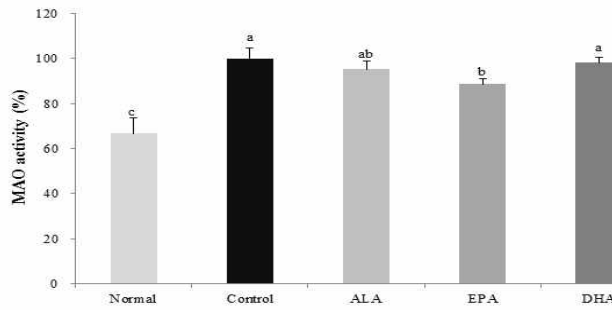


Figure 15. Effects of different kinds of ω -3 fatty acid on MAO activity. Values are mean \pm SD. ^{a-c}Different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day).

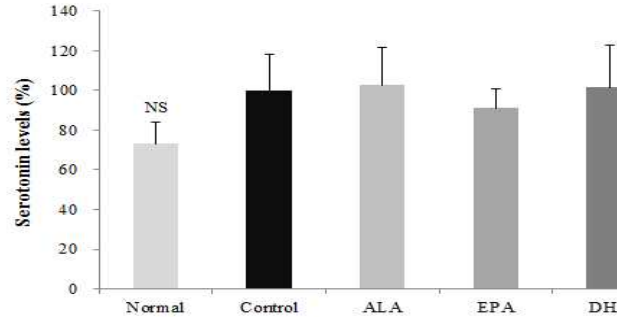


Figure 16. Effects of different kinds of ω -3 fatty acid on serotonin levels in mice brain. Values are mean \pm SD. ^{a-c}Different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day).

□ 3차년도: 들깨 리놀렌산의 작용 메카니즘 연구

가. H_2O_2 산화적 스트레스를 유발시킨 SH-SY5Y neuronal cell에서 들기름과 ALA의 신경세포 보호 효과

(1) 세포 생존율에 미치는 영향: H_2O_2 를 처리한 control군에서 normal군 100% 대비 63.37%로 낮은 세포 생존율을 보였으나, 들기름을 처리한 결과 control군보다 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다(Figure 17). 들기름으로부터 분리한 ALA를 처리한 군에서도 세포 생존율이 유의적으로 증가하였으며, 특히 25 μ g/ml 농도에서 74.27%의 가장 높은 세포 생존율을 나타냄으로써 들기름과 ALA는 산화적 스트레스로 유도된 신경세포손상을 보호하는 것을 확인할 수 있었다.

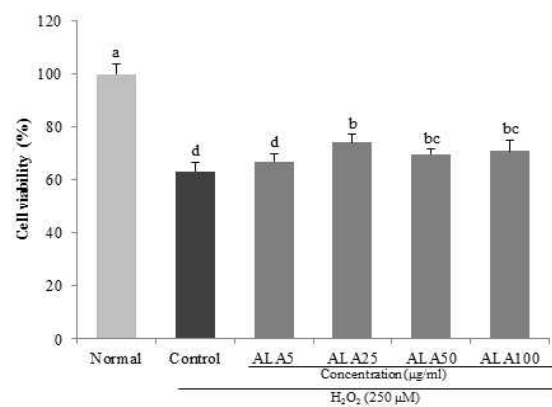
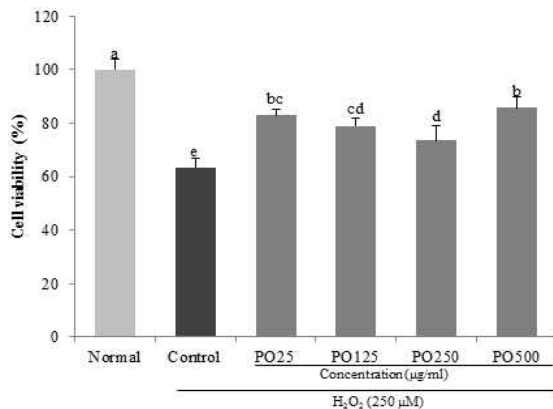


Figure 17. Effect of perilla oil (PO) and ALA on cell viability in H_2O_2 -treated SH-SY5Y cells. Values are mean \pm SD. ^{a-e}Different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(2) Lactate dehydrogenase (LDH) activity에 미치는 영향: Normal군의 LDH 방출량은 2.59%인데 비해 control군은 53.49%를 나타내었으나, 들기름과 ALA를 처리한 군에서는 농도가 증가하면서 LDH의 방출이 유의적으로 감소하였다. 특히 들기름 500 μ g/ml와 ALA 100 μ g/ml농도에서 각각 33.68%, 41.52%를 나타내어 우수한 LDH 저해 효과를 확인할 수 있었다 (Figure

18).

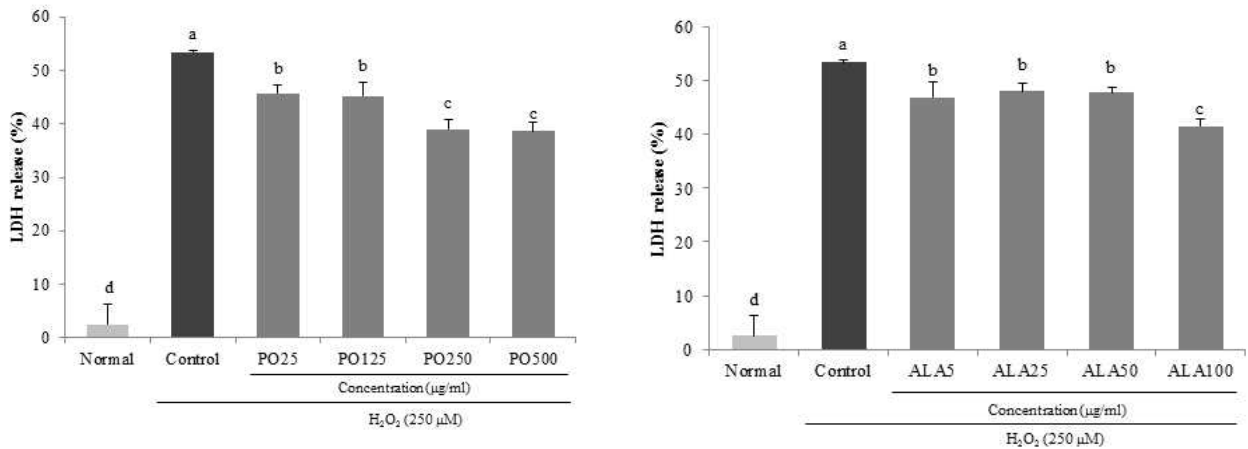


Figure 18. Effect of perilla oil (PO) ALA on LDH activity in SH-SY5Y cells treated with H_2O_2 . Values are mean \pm SD. ^{a-d}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(3) ROS 생성 억제 효과: 시간이 지남에 따라 normal군에 비해 H_2O_2 를 처리한 군에서 DCF로 염색된 세포가 많은 것을 보아 ROS 생성이 활발한 것을 알 수 있었다. 그러나 60분 기준으로 ROS생성량을 측정하였을 때 ALA를 처리한 군에서 control군에 비해 ROS생성량이 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다 (Figure 19).

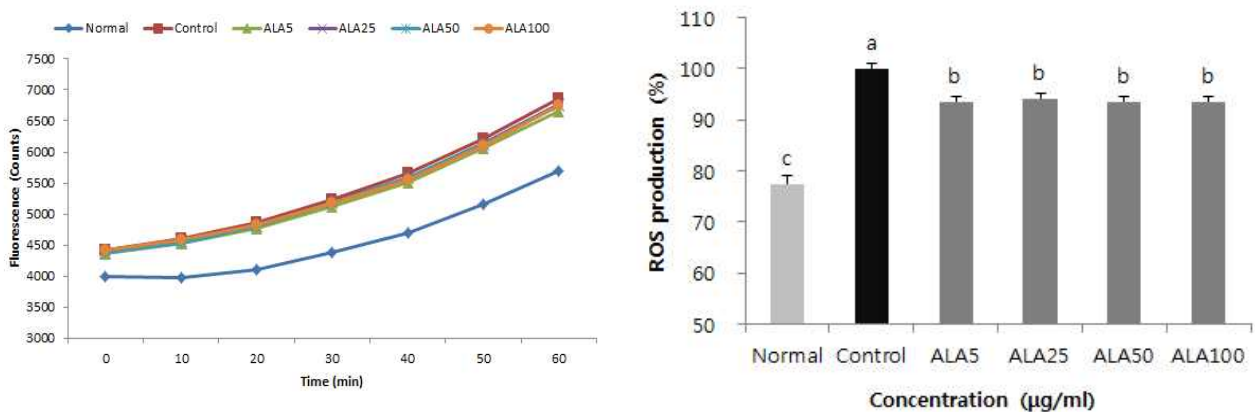


Figure 19. Effect of perilla oil (PO) ALA on ROS production in SH-SY5Y cells treated with H_2O_2 . Values are mean \pm SD. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(4) Hoechst 33342 staining을 통해 들기름과 ALA가 신경세포 사멸에 미치는 영향 확인: H_2O_2 -induced SH-SY5Y cell에서 Hoechst 33342 staining을 이용하여 세포 사멸 진행에 따른 핵의 DNA 응축을 관찰한 결과 Figure 20과 같이 apoptotic body를 가지는 세포의 비율이 control군에 비해 들기름 500 μg/ml군과 ALA 25 μg/ml를 처리한 군에서 현저히 감소하여 신경 세포 사멸에 대한 보호 효과가 있음을 보여주었다.

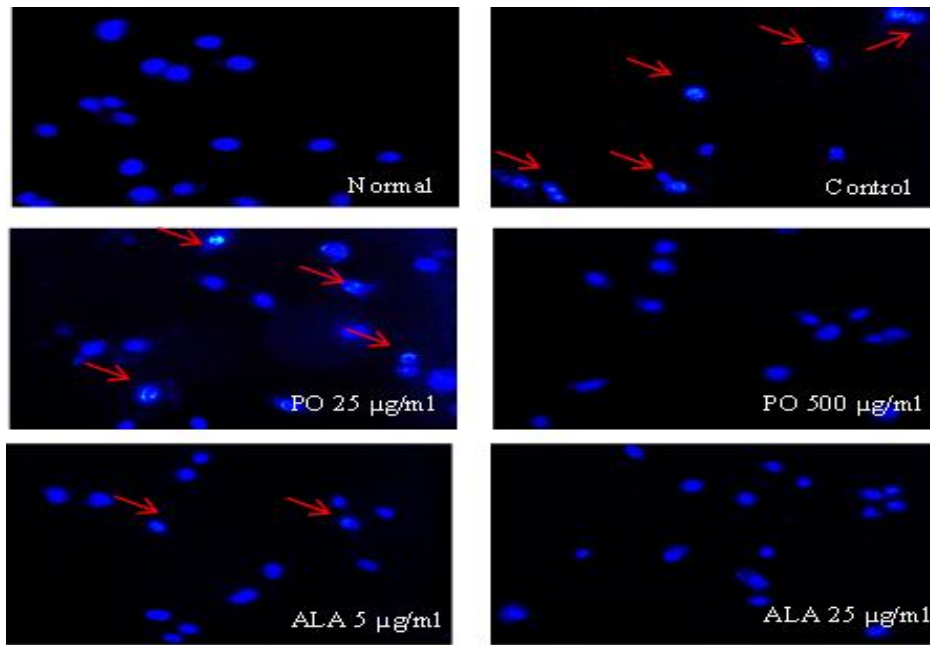
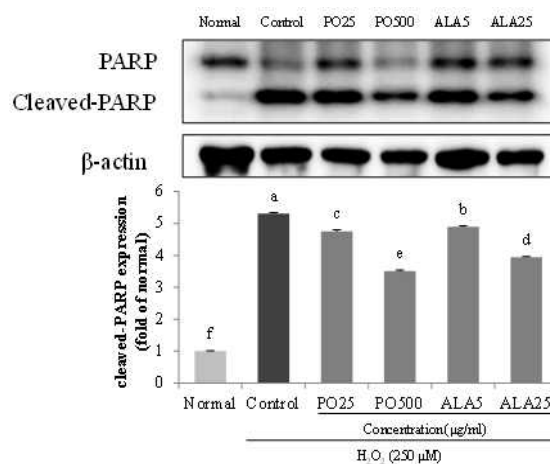


Figure 20. Effects of perilla oil (PO) and ALA on DNA condensation in SH-SY5Y cells treated with H_2O_2 . The nuclear morphology of cells was determined by Hoechst 33342 staining. The apoptotic bodies are indicated with arrows.

(5) Apoptosis에 관여하는 단백질 발현 관찰: SH-SY5Y cell에서 oxidative stress-induced apoptosis에 대한 들기름과 ALA의 보호 효과를 알아보기 위해 단백질 발현을 관찰한 결과, 세포 내 PARP 및 caspase activity가 control군에 비해 효과적으로 감소된 것을 확인할 수 있었으며, pro-apoptosis 인자인 bax의 발현은 down-regulation시키고 anti-apoptosis 인자인 bcl-2의 발현을 up-regulation시킴으로써 신경세포사멸에 대한 보호 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 21).



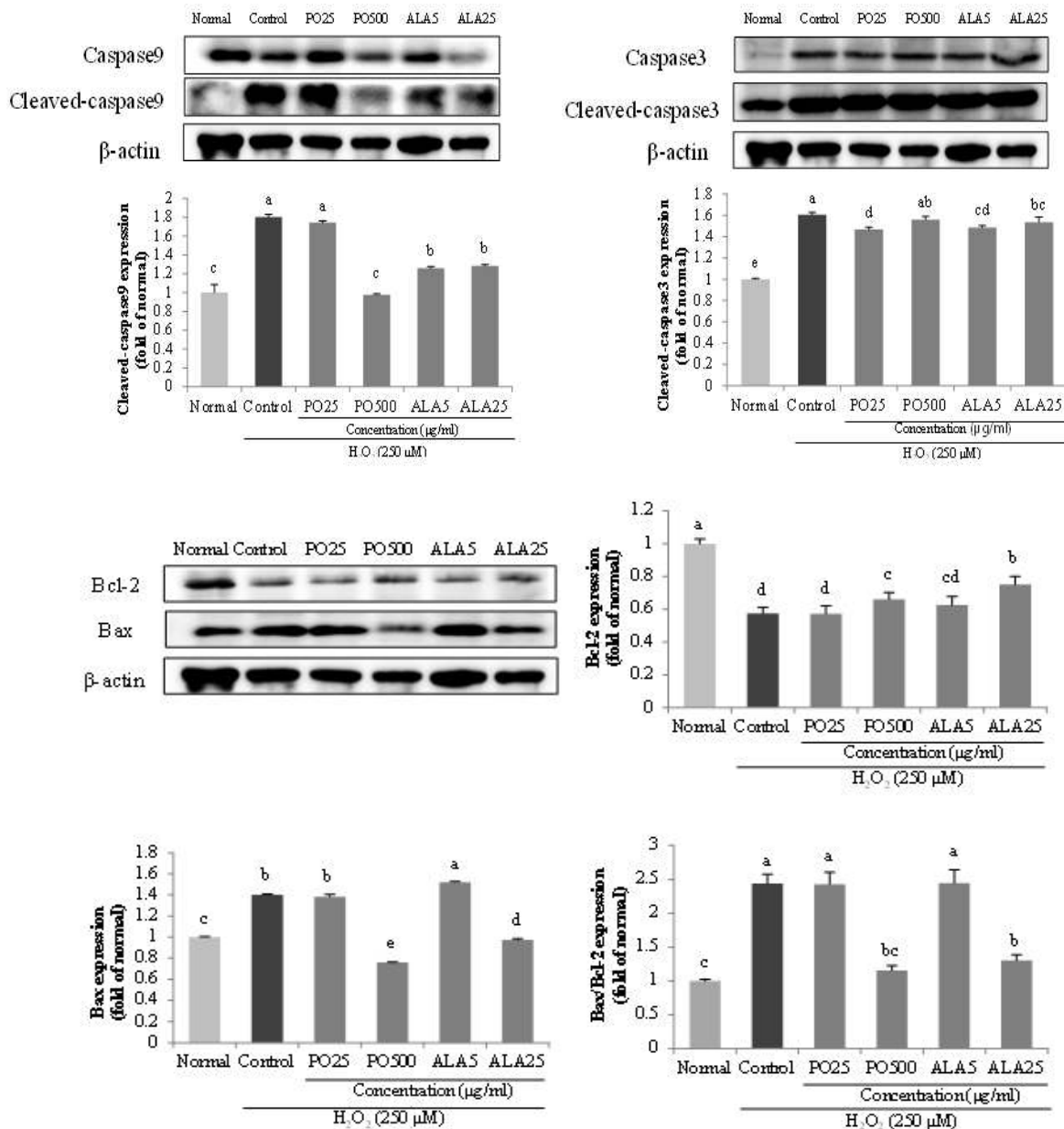


Figure 21. Effects of perilla oil (PO) and ALA on levels of cleaved-PARP, cleaved-caspase-3, -9, bcl-2 and bax protein expression in SH-SY5Y cells treated with H_2O_2 . Values are mean \pm SD.

^{a-f}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. β -actin was used as a loading control.

나. 마우스 뇌 조직에서 AChE 활성 측정

ACh는 뇌 조직 중에 존재하는 중요한 신경전달물질로 AChE 효소의 작용을 받아 acetate와 choline으로 분해되며, AD 질환 환자에게서 ACh 함량이 감소한다는 보고가 있다. AChE 효소 활성에 미치는 들기름의 효과를 비교해 본 결과 들기름의 AChE 효소 활성은 control군 100% 대비 90.75%로 유의적으로 감소하였다 (Figure 22). 따라서 들기름은 AChE 효소 활성을 저해 시킴으로써 ACh 농도를 증가시켜 신경전달이 원활하게 이루어질 수 있을 것으로 생각된다.

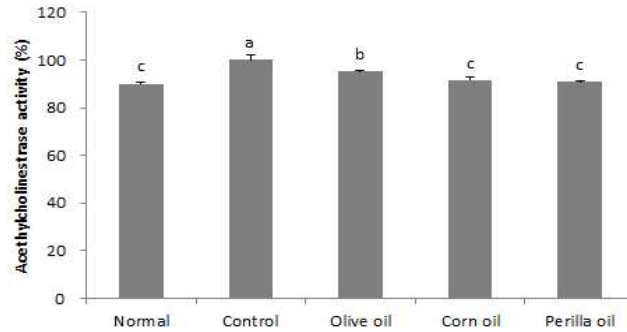


Figure 22. Effect of vegetable oils on acetylcholinesterase activity. Values are mean \pm SD. ^{a-f}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. β -actin was used as a loading control. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

다. 마우스 뇌 조직에서의 Western blot analysis를 통한 AD 및 염증 관련 단백질 발현 측정 (1) 들기름의 AD 관련 단백질 발현에 미치는 영향: 마우스 뇌 조직을 이용하여 $A\beta$ 를 형성하는 APP, CTF- β BACE와 신경영양인자인 BDNF 및 AD의 또 다른 병리학적 요인으로 작용하는 p-Tau 단백질 발현을 측정한 결과, control군에 비해 들기름을 투여한 군에서 APP, BACE, p-Tau 발현이 감소한 반면, 신경영양인자인 BDNF의 발현은 control군에서 감소하였으나, 들기름을 투여한 군에서 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 23).

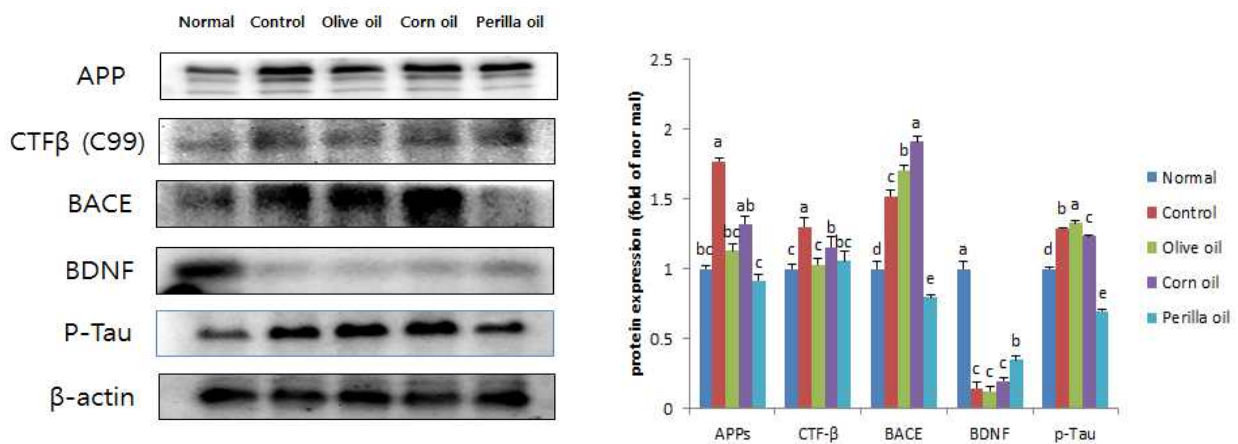


Figure 23. Effect of vegetable oils on APP, CTF- β , BACE, BDNF, p-Tau protein expressions. β -actin was used as a loading control. Values are mean \pm SD. ^{a-e}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

(2) 들기름의 염증 관련 단백질 발현에 미치는 영향: $A\beta_{25-35}$ 주입으로 인해 과발현된 염증 매개 인자(I κ - β , COX-2, iNOS)와 염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6)이 3가지 지방산 조성이 다른 식물

성 기름을 처리하였을 때 감소되는 것을 확인하였으며, 특히 들기름을 섭취한 군에서 IkB- α 의 발현이 가장 크게 증가하였고, COX-2, iNOS, IL-6, IL-1 β 의 발현양상이 가장 크게 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 24).

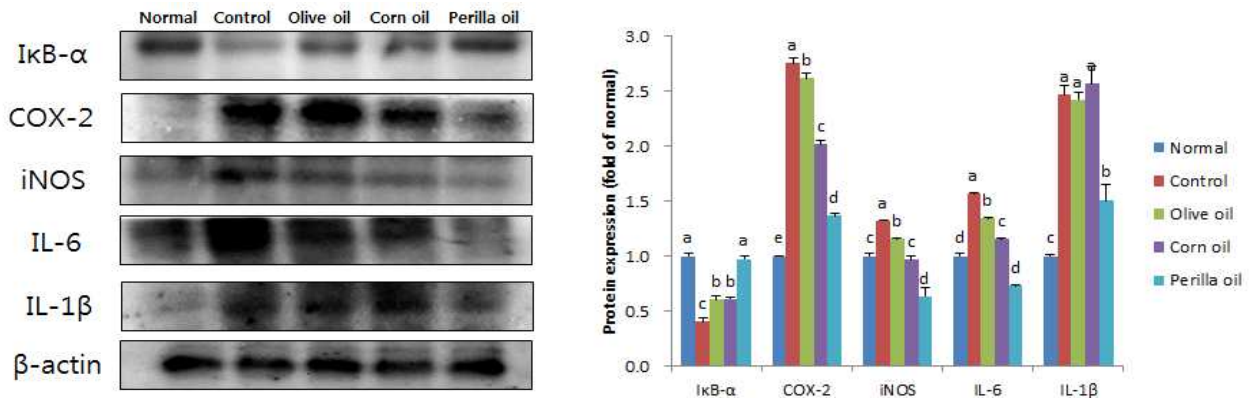


Figure 24. Effect of vegetable oils on IkB- α , COX-2, iNOS, IL-6, IL-1 β protein expressions. β -actin was used as a loading control. Values are mean \pm SD. ^{a-e}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Olive oil: Oral administration of olive oil (500 mg/kg/day); Corn oil: Oral administration of corn oil (500 mg/kg/day); Perilla oil: Oral administration of perilla oil (500 mg/kg/day)

(3) 들기름으로부터 분리한 ALA가 AD 관련 인자 발현에 미치는 영향: AD 마우스 뇌 조직을 이용하여 APP, CTF- β 와 BACE 단백질 발현을 측정한 결과, A β_{25-35} 에 의해 과발현 되었던 CTF- β 와 BACE 발현이 ALA, EPA, DHA를 투여한 군에서 발현이 감소한 경향을 나타내어 들기름으로 분리한 ALA 투여가 EPA와 DHA와 같이 A β 생성 저해 가능성을 나타내었다 (Figure 25).

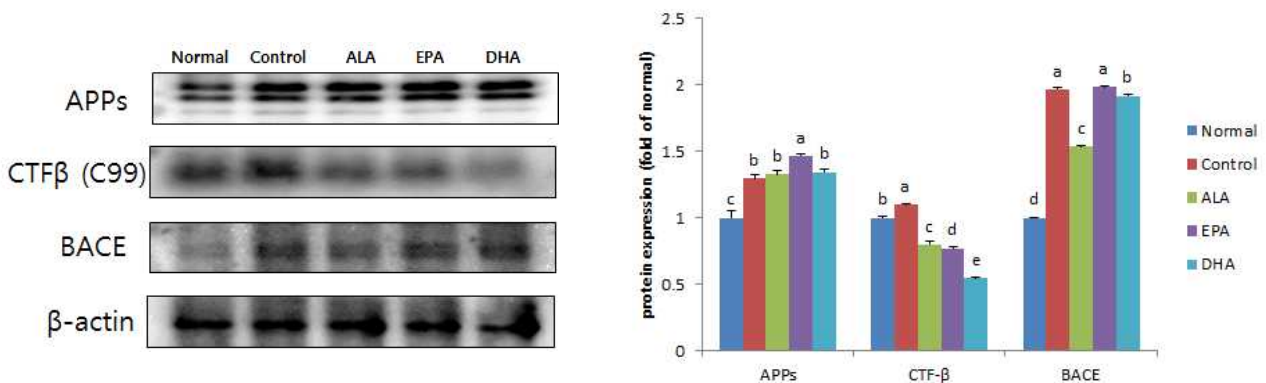


Figure 25. Effect of vegetable oils on APP, CTF- β , BACE protein expressions. β -actin was used as a loading control. Values are mean \pm SD. ^{a-e}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

라. 마우스 뇌 조직을 이용하여 RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정

A β_{25-35} -injected 마우스의 뇌 조직을 이용하여 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 측정한 결과, A β_{25-35} 에 의해 iNOS와 COX-2의 발현이 normal군과 비교하여 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 EPA와 DHA를 위내투여한 군의 뇌 조직에서는 그 발현이 감소하는 경향을 나타내었

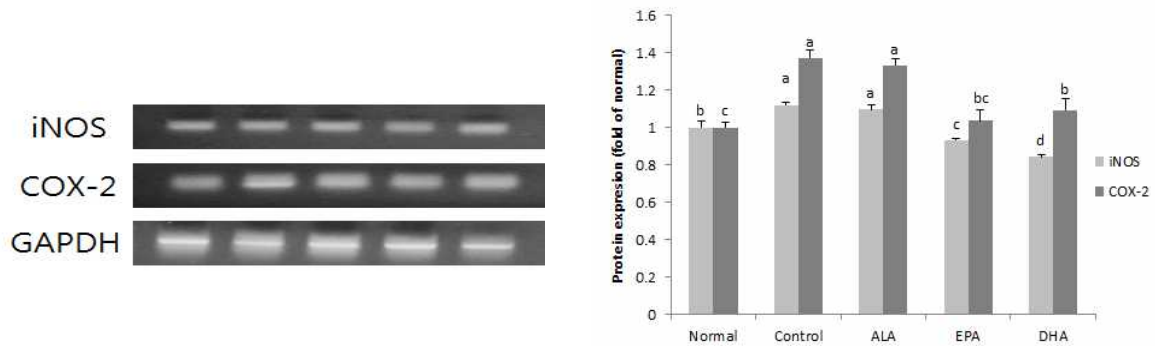


Figure 26. Effect of vegetable oils on iNOS, COX-2 expressions. GAPDH was used as a loading control. Values are mean \pm SD. ^{a-d}Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

으나 ALA는 control군과 발현 정도가 유의적인 차이가 나타나지 않았다. (Figure 26).

마. 뇌 조직에서 면역 조직화학 염색을 통한 APP 발현

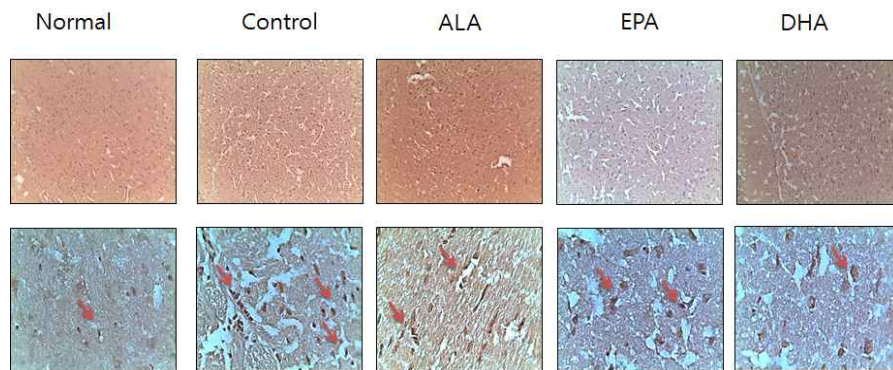


Figure 27. Representative photographs of omega-3 fatty acids on APP expression in brain of $A\beta_{25-35}$ induced AD mouse. ALA: Oral administration of α -linolenic acid isolated from perilla oil (100 mg/kg/day); EPA: Oral administration of eicosapentaenoic acid (100 mg/kg/day); DHA: Oral administration of docosahexaenoic acid (100 mg/kg/day)

들기름으로부터 분리한 ALA이 $A\beta$ 단백질의 생성 기전에 미치는 영향을 알아보기 위해 면역 조직화학염색을 통해 뇌 조직의 APP 발현을 관찰할 결과, $A\beta_{25-35}$ -injected control군에 비해 ALA, EPA, DHA를 투여한 군에서 비교적 낮은 APP 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 26).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여

제1절 : 목표대비 달성도

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
1) 들깨 및 근연종 자원 농업적 특성검정	30	1) 우량 들깨 및 근연종 자원 선발	100
2) 들깨 및 근연종 자원 지방산 조성 분석	30	2) 들깨 및 근연종 자원의 지방 및 지방산 조성 분석을 통한 리놀렌산 고/저 함유 자원 선발	100
3) 리놀렌산 고함유 자원과 저함유 자원의 산가 변이 분석	40	3) 품종 및 리놀렌산 고/저 함유 자원의 저장 온도 및 저장 기간별 산가 변이 분석	100
4) 기능성물질의 분리 및 동정	20	1) 6종의 기능성물질 분리 및 구조 동정 완료 2) 기능성물질의 효능, 함량 및 밸리테이션 연구	100
5) 리놀렌산의 정제기술	40	1) 들기름의 리놀렌산 정제기술개발 완료 2) 리놀렌산의 대량분리	100
6) 리놀렌산의 저장안전성	40	1) 추출방법에 따른 저장 안전성 2) 현장의 저장안전성 연구 3) 처리방법에 따른 저장 안전성	100
7) 들깨의 <i>in vitro</i> 건강 기능성 효과 탐색	20%	1) 항산화, 항균, 항염증, 항암 탐색 2) 신경세포 보호효과 측정	100%
8) 들깨 리놀렌산의 인지능 개선 등 <i>in vivo</i> 건강 기능성 효과 탐색	40%	1) 인지능 개선 효과 2) 항우울 효과	100%
9) 들깨 리놀렌산의 작용 메카니즘 연구	40%	1) 효소활성 측정 2) RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정 3) Western blot analysis를 통한 단백질 발현 측정	100%
	100%		

제2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

성과지표명 \ 연도		당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	4	4	100	30
	비SCI	8	2	20	15
산업재산권	출원	2	2	100	15
학술발표	국제	4	9	225	10
	국내	11	8	72	5
정책자료 기관제출		1	1	100	10
영농기술·정보 기관제출		1	1	100	10
홍보성과		30	143	476	5
계				-	

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

제1절 기대효과

1. 기술적 측면

- 우리 농작물인 들깨가 생물자원으로써 가지는 우수한 영양학적 가치를 과학적으로 규명
- 들깨 및 리놀렌산의 항산화, 항염증 및 인지능력 개선을 위한 고부가가치 기능성 식품의 가능성 제시

2. 경제적 · 산업적 측면

- 항산화, 항염증 및 인지능력 개선을 위한 건강 기능 식품개발로 고부가가치 창출
- 들깨의 재배 활성화를 통한 농가 소득 창출
- 염증 관련 만성 퇴행성 질환 및 각종 뇌세포 질환 치료를 효과적인 방향으로 이끌어 국민의 건강 증진을 꾀할 수 있을 뿐 아니라 치매 발병률을 감소시키며 이를 통한 의료비 절감이 예상

제2절 타 연구에서의 응용 및 추가 연구 필요성

- 들깨유와 ALA의 체내 산화적 손상방지를 비롯한 항염증, anti-apoptosis 효능을 확인하였으며, 이와 관련한 퇴행성 질환 관련 후속 연구들에 가이드라인을 제시할 수 있음
- 들깨유와 ALA의 인지능력 개선 및 AD 예방 연구를 토대로 임상 연구를 진행 한다면 건강기능식품 개발을 위한 보다 과학적인 근거를 마련할 수 있음

제3절 현재 추진 중인 추가적인 논문 게재 및 학술 발표 계획

- (논문투고예정) 산화처리에 따른 들깨 종자 활력 및 지방산 조성 변이, 지방산 조성 차이에 따른 들깨 저장 안전성, 들깨 유래 리놀렌산의 인지능력 개선 효과 및 작용 메커니즘
- (학술발표예정) 들기름 및 리놀렌산의 신경세포 보호 효과, 들깨 유래 리놀렌산의 인지능력 개선 효과 및 작용 메커니즘
- (기초자료 활용) 신규과제 ‘작부체계 적응 들깨 품종선발 및 들기름 품질유지 기술개발’(17~19)
- (홍보) 들기름 건강기능성 효능 및 안전 보관 방법에 대한 지속적인 홍보를 통해 대국민 신뢰 향상

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

- 들기름의 비알콜성 지방산 경감 효과가 생선 기름과 대등한 효과를 가지고 있음(Tian 등, 2016)
- 들깨는 식물성 오메가-3 지방산을 섭취할 수 있는 우수한 공급원으로 주목받고 있음(Asif, 2011)
- ALA가 advanced glycation end-products에 대한 inhibitor로 작용하여 당뇨 합병증을 예방할 수 있으며 anti-glycation과 ant-fibrillation효과를 가지고 있어 단백질 응집과 관련된 AD와도 상관관계가 있을 것이라는 연구가 보고 됨 (Prasanna and Saraswathi, 2017).
- 식물성 유지에 다량 함유되어 있는 ALA는 염증성 사이토카인 발현을 억제시킴으로써 염증성 질환을 개선시킬 수 있음 (Reifen et al., 2015).
- ALA의 섭취는 DHA를 합성하여 성인의 뇌에 필요한 DHA를 충분한 공급할 수 있다는 연구가 발표됨 (Domenichiello et al., 2015).

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

: 일반

제 8 장 국가과학기술지식정보서비스에 등록된 연구시설·장비 현황

: 해당없음

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

<제1세부과제> 본 연구 수행기관인 국립식량과학원의 연구실은 연구실 안전조치 이행계획에 따라 운영하고 있으며, 참여 연구원들은 분기별 집합 교육을 이수하였음. 연구실 안전점검은 미래창조과학부 고시 (제2013-109호)규정에 따라 일상점검과 자체점검을 통해 연구개발 활동에 사용되는 실험기자재와 실험재료의 이상 유무·보호 장비의 관리실태 등을 점검하였음. 또한, 전문 업체 및 시설과 담당자로부터 년 1회 연구실에 대한 전반적인 안전 점검을 받았음.

<제1협동과제>

<제2협동과제> 본 연구의 수행기관인 부산대학교는 연구실 안전조치 이행계획을 실천함. 참여 연구원들은 년 1회 정기 집합 교육 및 사이버 교육을 이수하였음. 미래창조과학부 고시 (제2013-109호)규정에 따라 일상점검과 자체점검을 통해 연구개발 활동에 사용되는 실험기자재와 실험재료의 이상 유무·보호 장비의 관리실태 등을 점검하였음. 또한, 전문 업체 및 시설과 담당자로부터 년 1회 연구실에 대한 전반적인 안전 점검을 받았음. 모든 연구 활동 종사자들은 연구실 안전 환경 조성에 관한 법률에 의거하여 보험 가입함. 참여 연구원들은 전문 의료진을 통해 건강검진을 실시하며 검사결과를 통보받음.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Comparative Study on Antioxidant Activity of Vegetable Oils under in vitro and Cellular System	부산대 학교	제1,교신	Journal of Agricultural Science	-	2016.03	단독사사	-/-
2	논문	Effects of Vegetable Oils with Different Fatty Acid Compositions on Cognition and Memory Ability in A β 25 - 35-Induced Alzheimer's Disease Mouse Model	부산대 학교	제1,교신	Journal of Medicinal Food	1.844	2016.10	단독사사	SCI/-
3	논문	Perilla frutescens var. japonica and rosmarinic acid improve amyloid- β 25-35 induced impairment of cognition and memory function	부산대 학교	제1,교신	Nutrition Research and Practice	1.416	2016.6	중복사사	SCIE/-
4	논문	The Neuro-Protective Effect of the Methanolic Extract of Perilla frutescens var. japonica and Rosmarinic Acid against H ₂ O ₂ -Induced Oxidative Stress in C6 Glial Cells	부산대 학교	제1,교신	Biomolecules & Therapeutics	2.127	2016.5.1	단독사사	SCIE/-
1	논문	High-yield methods for purification of alpha-linolenic acid from Perilla frutescens var. japonica oil	중앙대	책임	Appl. Biol. Chem.		2016.02.29	단독사사	SCIE
2	논문	Fatty acid content in	중앙대	주담	Nat. Prod.		2016.12.30	단독사사	Scopus

		perilla cultivars and commercial oils determined by GC analysis		당	Sci.				
5	특허	들깨유 유래 α -리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 조성물	부산대 학교	발명자	대한민국	-	2015.11.6	단독사사	-
3	특허	들기름 내 리놀렌산의 분리정제방법	중앙대	주담당	한국		2016.01.26		등록번호: 1590588
1	정책건의	농림축산식품 주요 통계집 들깨 통계자료 추가 요청	국립식량과학원	주담당					
2	영농활용	들기름 품질 유지를 위한 저장 기간 설정	국립식량과학원	주담당					

제 11 장 기타사항

: 해당없음

제 12 장 참고문헌

- 김영언, 김인환, 정숙영, 조재선(1996). 들깨의 볶음 조건에 따른 들기름의 성분 및 관능적 특성 변화, 한국농화학회. 39(2), 118~122.
- 김영언, 김인환, 이영철, 정숙영, 조재선(1996). 들깨의 볶음 조건에 따른 들기름의 산화안정성 변화. 한국농화학회. 39(5), 374~378.
- 김형열, 송대식(2008). 참기름과 들기름의 제조조건에 따른 벤초피렌 함량 변화. 한국식품저장유통학회. 15(4). 556~561.
- 박건용, 조성자, 정보경, 김태량, 이찬수, 조남준(2005). 들기름의 품질변화에 대한 위생적 고찰. 한국식품위생안전성학회. 20(3). 185~190.
- 이명희, 정찬식, 오기원, 박충범, 김대균, 최재근, 남상영(2011). 기름함량이 높은 종실용 들깨 신품종 '다유'. 한국육종학회. 43(6). 616~619.
- 정찬식, 권일찬, 김병주, 한원영, 곽용호, 임무상(1998). 단경 중대엽 고향산화 잎채소용 신품종 '남천들깨'. 한국육종학회. 30(4). 403.
- 조영심, 김범근, 박기재, 정진웅, 정승원, 임정호(2009). 가열산화가 냉압착 들기름의 품질특성에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회. 16(6). 884~892.
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. Plant Sci 196:67-76.
- Asif M, Kumar A (2010) Nutritional and functional characterizations of *Perilla frutescens* seed oil and evaluation of its effect on gastrointestinal motility. Malay J Pharm Sci 8:1-12.
- Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, Ukiya M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J, Nishino H (2004) Triterpene acid from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and anti-tumor promoting effects. BioSci Biotechnol Biochem 68:85-90.
- Brinkman MT, Karagas MR, Zens MS, Schned AR, Reulen RC, Zeegers MP (2011) Intake of alpha-linolenic acid and other fatty acids in relation to the risk of bladder cancer: results from the New Hampshire case-control study. Br J Nutr 106: 1070-1077.
- Calder, P.C. 2009. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. Biochimie, 91(6), pp.791-795
- Campos H, Baylin A, Willett WC (2008) Alpha-linolenic acid and risk of nonfatal acute myocardial infarction. Circulation 118:339-345.
- Carper DA, Hohman TC, Old SE (1995) Residues affecting the catalysis and inhibition of rat lens aldose reductase. Biochim Biophys Acta 1246:67-73.
- Cozzolino D., Murray I., Chree A., Scaife J.R. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. LWT- Food Science and Technology, 38 (2005), pp. 821 - 828
- Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Mašković, P., Savić, S. and Nikolić, L., 2015. Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds.

- Industrial Crops and Products, 65, pp.582-591.
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2012). Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 173 - 183.
- Domenichiello, AF., Kitson, AP., Bazinet, RP. 2015. Is docosahexaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain. *Progress in Lipid Research*, 59:54-66.
- Filippou, A., Berry, S.E., Baumgartner, S., Mensink, R.P. and Sanders, T.A.B., 2014. Palmitic acid in the sn-2 position decreases glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in healthy adults. *European journal of clinical nutrition*, 68(5), pp.549-554.
- Furusawa M, Tanaka T, Ito T, Nakaya K, Iliya I, Ohyama M, Inuma M, Murata H, Inatomi Y, Inada A, Nakanishi T, Matsushita S, Kubota Y, Sawa R, Takahashi Y (2005) Flavonol glycosides in leaves of two *Diospyros* species. *Chem Pharm Bull* 53:591-3.
- Gad, A.S. and Sayd, A.F., 2015. Antioxidant Properties of Rosemary and Its Potential Uses as Natural Antioxidant in Dairy Products-A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 6(1), p.179.
- Guan Z, Li S, Lin Z, Yang R, Zhao Y, Liu J, Yang S, Chen A (2014) Identification and quantitation of phenolic compounds from the seed and pomace of *Perilla frutescens* using HPLC/PDA and HPLC-ESI/QTOF/MS/MS. *Phytochem Anal* 25:508-13.
- Ha TJ, Lee JH, Lee MH, Lee BW, Kwon HS, Park CH, Shim KB, Kim HT, Baek IY, Jang DS (2012) Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase. *Food Chem* 135: 1397-403.
- Hirata, T., Kawai, T., Hirose, H., Tanaka, K., Kurosawa, H., Fujii, C., Fujita, H., Seto, Y., Matsumoto, H. and Itoh, H., 2016. Palmitic acid-rich diet suppresses glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and induces endoplasmic reticulum (ER) stress in pancreatic islets in mice. *Endocrine research*, 41(1), pp.8-15.
- Holman, R.T., 2009. Polyunsaturated fatty acids. *Methods of biochemical analysis*, 4, p.99.
- Jang JY, Kim TS, Cai J, Kim J, Kim Y, Shin K, Kim KS, Lee SP, Kang MH, Choi EK, Rhee MH, Kim YB (2014) *Perilla* oil improves blood flow through inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Lab Anim Res* 30: 21-27.
- Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M (1999) A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associated with diabetic retinopathy in adolescents with type 1 diabets. *Diabets* 48:1338-1340.
- Kim MK, Lee HS, Kim EJ, Won NH, Chi YM, Kim BC, Lee KW (2007) Protective effect of aqueous extract of *Perilla frutescens* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 45:1738-1744.
- Koletzko, B., Lien, E., Agostoni, C., Böhles, H., Campoy, C., Cetin, I., Decsi, T., Dudenhausen, J.W., Dupont, C., Forsyth, S. and Hoesli, I., 2008. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of

- current knowledge and consensus recommendations. *Journal of perinatal medicine*, 36(1), pp.5-14.
- Kubo E, Miyoshi N, Fukuda M, Akagi Y (1999) Cataract formation through the polyol pathway is associated with free radical production. *Exp Eye Res* 68:457-464.
- Lavie, C.J., Milani, R.V., Mehra, M.R. and Ventura, H.O., 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(7), pp.585-594.
- Lee AY, Chung SS (1999) Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *The FASEB J* 13:23-30.
- Lee JW, Kim YT, Park JW, Rhee C (2012) Antioxidation activity of oil extracts prepared from various seeds. *Food Sci Biotechnol* 21:637-643.
- Liu, X., Kris Etherton, P.M., West, S.G., Lamarche, B., Jenkins, D.J., Fleming, J.A., McCrea, C.E., Pu, S., Couture, P., Connelly, P.W. and Jones, P.J., 2016. Effects of canola and high oleic acid canola oils on abdominal fat mass in individuals with central obesity. *Obesity*, 24(11), pp.2261-2268.
- Makino T, Furuta Y, Wakushima H, Fujii H, Saito K, Kano Y (2003) Antiallergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytother Res* 17:240-243.
- Mohammad Asif(2011). Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: *Perilla frutescens* is a good example of plant oils. *Orient Pharm Exp Med*. 11. 51~59..
- Mok SY, Lee S (2013) Identification of flavonoids and flavonoid rhamnosides from *Rhododendron mucronulatum* for. *albiflorum* and their inhibitory activities against aldose reductase. *Food Chem* 136:969-974.
- Nishimura C, Graham C, Hohman TC, Nagata M, Robinson Jr. WG, Carper D (1988) Characterization of mRNA and genes for aldose reductase in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 153:1051-1059.
- Nitta M, Lee JK, Ohnishi O (2003) Asian *Perilla* crops and their weedy forms: Their cultivation, utilization and genetic relationships. *Econ Bot* 57: 245-253.
- Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Gut Dysbiosis. *Biomed research international*. 1~11.
- Oliveira TT, Nagem TJ, Miranda LCJ, Paula VF, Teixeira MA (1997) Inhibitory action on aldose reductase by soybean flavonoids. *J Braz Chem Soc* 8:211-213.
- Owen RW, Haunber R, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegallhader B, Bartsch H (2003) Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem Toxicol* 41:703-717.
- Pan MH, Lai CS, Ho CT (2010) Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Func* 1: 15-31.
- Park MH, Seol NG, Chang PS, Yoon SH, Lee JH (2011) Effects of roasting conditions on the physicochemical properties and volatile distribution in *Perilla* oils (*Perilla frutescens* var. *japonica*). *J Food Sci* 76:808-816.
- Poudyal, H., Kumar, S.A., Iyer, A., Waanders, J., Ward, L.C. and Brown, L., 2013. Responses to oleic, linoleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat

- diet-induced metabolic syndrome in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(7), pp.1381-1392.
- Prasanna, G., Saraswathi, NT. 2017. Linolenic acid prevents early and advanced glycation end-products(AGEs) modification of albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 95:121-125.
- Rapoport, S.I., Rao, J.S. and Igarashi, M., 2007. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 77(5), pp.251-261.
- Rashed K, Ciric A, Glamoclija J, Calhelha RC, Ferreira ICF, Sokovic M (2014) Antimicrobial and cytotoxic activities of *Alnus rugosa* L. aerial parts and identification of the bioactive components. *Ind Crop Prod* 59:189-196.
- Reifen, R., Karlinsky, A., Stark, AH., Berkovich, Z., Nyska, A. 2015. α -Linolenic acid (ALA) is an anti-inflammatory agent in inflammatory bowel disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 26:1632-1640.
- Roblová, V., Bittová, M., Kubáň, P. and Kubáň, V., 2015. Antioxidant properties and phytochemical composition of *Mentha* species and commercial peppermint teas.
- Sato S, Kador PF (1990) Inhibition of aldehyde reductase by aldose reductase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 40:1033-1042.
- Singh RB, Dubnov G, Niaz MA, Ghosh S, Singh R, Rastogi SS, Manor O, Pella D, Berry EM (2002) Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): A randomized single-blind trial. *Lancet* 360:1455-1461.
- Sinn, N. and Bryan, J., 2007. Effect of supplementation with polyunsaturated fatty acids and micronutrients on learning and behavior problems associated with child ADHD. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 28(2), pp.82-91.
- Varma SD, Mikuni I, Kinishita JH (1975) Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. *Science* 188:1215-1216.
- Yamamoto H, Ogawa T (2001) Antimicrobial activity of *Perilla* seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:921-924.
- Yeseul Cha, Ja Young Jang, Young-Hwan Ban, Haiyu Guo, Kyungha Shin, Tae-Su Kim, Sung-Pyo Lee, Jieun Choi, Eun-Suk An, Da-Woom Seo, Jung-Min Yon, Ehn-Kyoung Choi, Yun-Bae Kim(2016). Anti-atherosclerotic effects of perilla oil in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Laboratory animal research*. 32(3). 171~179
- Yu Tian, Hualin Wang, Fahu Yuan, Na Li, Qiang Huang, Lei He, Limei Wang, Zhiguo Liu. (2016). *Perilla Oil Has Similar Protective Effects of Fish Oil on High-Fat Diet-Induced*
- Asif M (2011) Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: *Perilla frutescens* is a good example of plant oils. *Orient Pharm Exp Med* 11: 51-59.
- Zhao H., Liu J., Lv J., Ye R., Bie X., Zhang C. (2014) Enzymatic synthesis of lard based ascorbyl esters in a packed-bed reactor: optimization by response surface methodology and evaluation of antioxidant properties *LWT-Food Science and*

Technology. 57 , pp. 393 - 399

Zhao, Q. and Jin, S.S., 2015. Extraction of lavender essential oil and its antioxidant activity. *Planta Medica*, 81(11), p.PX65

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「농축산물부가가치향상기술개발사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「농축산물부가가치향상기술개발사업」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.