주 의
(편집순서
6 기재)

2024 연구과제보고서 담수생물자원 추출물 유래 기능성 플라보노이드 탐색 연구 국립낙동강생물자원관

간행물 등록번호
NNIBR-2024-0000353-10

담수생물자원 추출물 유래 기능성 플라보노이드 탐색 연구(2차년도)

Functional Flavonoid Profiling of Freshwater Bioresource Extracts

생물소재연구부

국립낙동강생물자원관

주 의

1. 이 보고서는 국립낙동강생물자원관에서 시행한 연구과제 결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 국립낙동강생물자원관에서 시행한 연구과제의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.
4. 이 보고서와 관련된 문의사항은 국립낙동강생물자원관 생물소재연구부 (전화 054-530-0877)로 문의하시면 됩니다.

간행물 등록번호
NNIBR-2024-0000353-10

담수생물자원 추출물 유래 기능성 플라보노이드 탐색 연구 (2차년도)

Functional Flavonoid Profiling of Freshwater Bioresource Extracts

생물소재연구부

국립낙동강생물자원관

발간등록번호: NNIBR-2024-0000353-10

담수생물자원 추출물 유래 기능성 플라보노이드 탐색 연구 (2차년도)

담수생물연구본부 이용기술개발실 생물소재연구부

김태진, 신수영, 서민정, 김정호, 한국일, 김의진, 박석재, 박영진

Functional Flavonoid Profiling of Freshwater Bioresource Extracts

Tae Jin Kim, Su Young Shin, Min Jeong Seo, Jung Ho Kim, Kook il Han, Eui-jin Kim, Seokjae Park, Young Jin Park

Bio-resource Research Division
Using Technology Development Department
Nakdonggang National Institute of Biological Resources

2024

목 차

표 목차

그림 목차

초 록

생물다양성 협약 및 나고야 의정서 발효에 대응에 관련하여 자생생물 유래 천연물소재는 의약·건강기능식품·화장품 등 고부가가치 바이오산업의 핵심원료로 가치창출과 소재·정보의 해외 주권주장 대응을 위한 국가적 관리체계 구축이 필요하며 관계부처 합동 제4차 국가생물다양성 전략(2019년~2023년)에서 자원의 확보 뿐 아니라 '유용성'이 새롭게 강조되어 생물자원을 활용한 성장 동력 마련을 통해 과학적 신가치를 창출하는 것을 목표로 하고 있다. 현재 세계적으로 인구 고령화에 따라 천연소재 섭취(건강기능식품)를 통한 질병예방으로 지속적인 건강한 삶의 유지에 관심이 증대 하고 있다. 천연물 시장 규모는 2024년까지 약 8.1조원으로 연 평균 8.3% 전망되어 있고 있다. 천연물의 경우 개발에 복잡한 규제 및 연구 성공률이 낮은 합성의약품에 비해 전통의약품 또는 건강기능식품으로 비교적 제품 개발의 허들이 낮아 시장진입이 수월하며 플라보노이드의 경우 flavonol, flavone, isoflavone 등의 종류에 따라서 최근의 연구 결과가 암 예방이나 여성호르몬관련 질환, 다이어트(체중감소), 등에 효과를 나타내고 있는 것으로 밝혀져 있어 중요성이 더욱 강조되어 있고 있다. 본 과제는 이와 같은 천연물의 원료로 활용할 수 있는 국내 자생 소재의 확보하여 물질과 효능의 관계를 라이브러리화하고 산업화 진입이 가능한 활용소재로 개발하고자 하였다.

현재까지 국립낙동강생물자원관 보유 1500여개의 담수생물의 추출물에 대한 기초생리활성 결과를 활용하여 연구를 수행하였다. 생리활성 결과가 확보된 담수생물자원 추출물 150개를 분석하였다. 총 61종의 식물 추출물의 플라보노이드 데이터 확보(총8,550개의 데이터 포인트) 하였다. 이 중 20개가 플라보노이드를 고함량 함유한 것으로 파악되었으며, 특히 안토시아닌 중 Cyanidin과 플라보놀 중 Quercetin이 제일 높은 함량을 나타내었다. 또한, 생리활성 결과를 활용한 유효(지표)성분 예측 모델의 경우 면역, 항산화, 미백, 항당뇨를 대상으로 수행하였으며, 면역은 Peonidin이 함염증은 Quercetin, Delphinidin이, 미백은 Peonidin, Taxifolin이, 항당뇨는 Quercetin, Cyanidin으로 유효성분이 예측되었다. 2023~2024년도에 고함량으로 나타난 추출물에 대한 플라보노이드 배당체 분석을 위해 Quercetin 및 Cyanidin의 배당체 분석에 대한 표준시험법을 제정하였으며, 37개 추출물에 대한 분석 결과를 확보하였다. 또한 플라보노이드 고함량 추출물을 대상으로 항비만 생리활성 평가 수행하였다. 이를 통해, 식욕을 70%이상 억제 할 수 있는 당단풍나무 추출물을 도출하였으며, 이에 대한 유효성분이 Quercetin-3-O-glucoside임을 확인하였다.

2차년도(2024)에서는 플라보노이드 프로파일링 분석과 생리활성 정보 데이터의 통합정보 라이브러리 150건 구축 하였으며, 본 연구를 통해 도출된 상용화 후보소재들에 대한 산업화소재 가능성을 실증하여 특허출원(당단풍나무 추출물을 포함하는 시상하부의 식욕 촉진 신경 세포 및 식욕 억제 신경세포의 활성 조절용 조성물)까지 마무리하였다. 또한 25년 디딤돌과제 선정(대사체농업 기술 기반 담수생물자원 유래 활성성분 증진 연구)에 대한 기초자료로 활용되었다.

3차년도(2025) 연구까지 누적된 통합정보 라이브러리(405건 예정)를 공개하여 유용물질을 기반으로 한 신규 기능성 담수생물자원 후보 소재 탐색 자료 및 신규과제 제안에 대한 기초자료로 활용 될 것으로 기대한다.

본 문

I. 서론

1. 연구의 목적 및 필요성

가. 연구의 목적

본 연구는 담수생물자원 추출물의 기능성 플라보노이드 분석을 통해 산업적 가치가 있는 유용소재 후보를 도출하기 위한 플라보노이드 함량 및 생리활성 결과를 통합한 라이브러리를 구축하고자 한다. 또한 통합정보 라이브러리의 활용에 대한 실증을 위해 유용물질을 기반으로 한 기능성 담수생물소재 후보 도출하고 생리활성(항비만) 평가 수행하여 증명하고자 한다.

나. 연구의 필요성

1) 정책적 부합성

생물다양성 협약 및 나고야의정서 발효[1,2,3]에 따라 소재·정보의 해외 주권주장 대응을 위한 국가적 관리체계 구축이 필요하다. 이를 대응하기 위한 과학적 근거자료로 의약·건강기능식품·화장품 등 고부가가치 바이오산업의 핵심원료인 천연물소재를 자생생물 유래에서 찾는 가치창출이 필요하다. 또한 관계부처 합동,「제4차 국가생물다양성전략 (2019년~2023년)[4]에서 기존에 자생생물에 대한 확보에서 이제는 어떻게 활용 할 것 인가에 대한 '유용성'이 새롭게 강조되어 생물자원을 활용한 성장 동력 마련을 위한 과학적 新가치 창출이 강조되어졌다.

2) 사회/경제적 필요성[5]

세계적으로 인구 고령화가 진행되어 천연소재 섭취(건강기능식품)를 통한 질병 예방을 통해 지속적인 건강한 삶의 유지에 관심이 증대되어 지고 있으며, 천연물 시장규모는 2024년까지 약 8.1조원으로 연평균 8.3% 전망되고 있다. 천연물의 경우 개발에 복잡한 규제 및 연구 성공률이 낮은 합성의약품에 비해 전통의약품 또는 건강기능식품으로 비교적 제품 개발의 허들이 낮아 시장진입이 수월하다는 장점이 있어, 이에 따라 천연물 추출물에 대한 정부의 R&D 촉진 정책 추진으로 천연물에 대한 기초·응용연구 및 상용화 기술 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.

3) 기술적 필요성

식품에 널리 분포하는 플라보노이드 색소는 동물성보다는 식물성에 많이 분포하며 주로 당류와 결합하여 글루코시드 형태로 존재하기 때문에 그 종류가 다양하다.[6] 종류에 따라서 항균, 항암 등 생리활성을 나타내는 물질이 많고 독성은 없는 것으로 밝혀지고 있으나 일부 genistein 등은 내부교란물질로 알려져 있다.[7] Flavonol, flavone, isoflavone 등의 종류에 따라서 최근의 연구 결과가 암 예방이나 여성호르몬관련 질환, 다이어트(체중감

소), 등에 효과를 나타내고 있는 것으로 밝혀져 있어 중요성이 더욱 강조되어 지고 있다.[8] 이와 같은 천연물의 원료로 활용할 수 있는 국내 자생 소재의 확보하여 물질과 효능의 관계를 라이브러리화하고 산업화 진입이 가능한 활용소재로 개발하는 연구가 필요하다.

또한, 국립낙동강생물자원관 설립 이후 최근까지 담수생물을 유용소재로 발전시키기 위한 많은 연구가 진행되고 있으나 각각의 연구들의 연계 활용이 미흡 한 실정이다. 연구 사후 결과를 활용하는 방안 모색이 필요 하다.

현재 자원관 내 보유 특허 107개 중 3건 만이 추출물에서 단일 물질을 분리하여 제시하고 있다. 하지만 최신 동향은 추출물의 그 자체의 효능보다는 추출물의 특정 성분이 어떠한 과학적 기전으로 그 효능을 나타내는가에 대한 특허를 선호하고 있어 유효성분을 밝히는 연구가 필요하다.

2. 연구동향

가. 해외 동향

국외 기능성분 정보 DB는 대표적으로 캐나다의 FooDB가 있으며, 식품성분과 화학적·생물학적 데이터를 포괄하는 DB[9]를 구축하고 있다. 유럽에는 PhytoHub가 있으며, 폴리페놀, 터르페노이드, 알칼로이드 등 식물 2차대사산물 DB[10]가 구축되어 있다. 하지만 외국 DB를 통해 기능성 물질 추정은 가능하나 국내 자생생물의 기능성 물질의 분포와는 큰 차이가 있다. 기능성 성분 고함유 생물 소재를 선발하기 위해서는 타겟이 되는 활성성분에 대한 추가적인 실험적 구명이 필요하다.

나. 국내 동향

국내 기능성분 정보 DB는 대표적으로 농촌진흥청의 농산물 대상 플라보노이드, 페놀산 구조 및 함량 DB 구축이 있으며, 이에 대한 플라보노이드 data base 1.0 책자 발간(3,200여 건의 분석정보 공개)(그림1)[11]하여 국민 대상 공개를 하고 있다. 또한 농산물 112종에 대해 글루코시놀레이트(glucosinolates) 함량 DB를(2012) 추가로 구축하였으며. 계속해서 농식품자원의 기능성 평가 및 식품소재/기능성분 통합정보 구축(농진청'16-'18)[12] 등 확장해 나가고 있다. 또한 대표적으로 한국생명공학연구원 오창 분원의 천연물클러스터 중앙은행은 국가생명연구자원 선진화 사업일환으로 그간 산재되어 있던 국내의 274개의 소재자원은행을 통합 운영을 시작하였다.(그림2)

그림1. 농촌진흥청 플라보노이드 DB 발간 책자

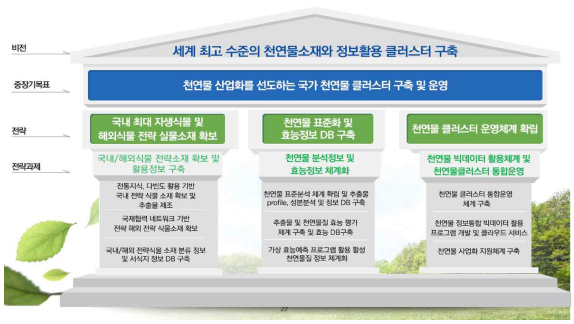


그림2. 천연물클러스터 중앙은행의 선진화 비전체계

3. 국내·외 및 자원관 내 연구들과의 차별성 및 독창성

가. 국내·외 및 자원관 내 연구들과의 차별성 및 독창성

담수생물의 경우 아직 미개척 분야로 기능성분에 대한 DB화가 진행되지 않았다. 현재까지 국립낙동강생물자원관에서 진행된 “담수생물 천연추출물기반 기능성 생물소재 개발”사업을 통해 약 1500여개의 담수생물의 추출물이 생성되었으며 이에 대한 3000건의 생리활성 평가가 진행되었다. 본 연구에서는 국립낙동강생물자원관에서 기 확보된 생리활성 데이터를 활용하여 앞으로 분석할 기능성 대사체 프로파일링 데이터와의 상관관계 분석을 통해 유효 기능성 단일물질을 예측하는 모델을 구축하고자 한다. 또한, 생리활성 정보와 천연물(대사체) 프로파일링 분석 데이터 통합정보를 구축을 하고자 한다.

기존 국립낙동강생물자원관에서 진행된 추출물 기반 유용 담수생물 탐색 연구의 경우 추출물의 생리활성 평가를 기반으로 하여 기능성이 나타나면 기능성 물질을 찾아 추적하는 방법으로 진행되고 있다. 장점으로는 확실한 기능성을 보이는 소재를 확보가 가능하지만, 기능성(생리활성) 평가의 경우 시간이 오래 걸리고 한번에 많은 양을 수행하기 어렵다는 단점이 있다.(그림3)

위의 단점을 극복하기 위해 신규 유용담수생물 탐색 방법을 다음과 같이 제안하고자 한다. 추출물의 유용물질 분석 결과를 기반으로 하여 기능성을 나타내는 물질이 고 함유 되어 있는 소재를 선별하여 생리활성 평가를 수행하는 방법으로 유용물질 분석의 경우 짧은 시간에 많은 양의 추출물을 분석이 가능하다는 장점이 있다. 반면, 유용 물질이 고 함유 되었더라도 생리활성을 꼭 나타내지 않을 수도 있다는 단점이 있다. 하지만, 생리활성 평가의 경우 비용뿐 아니라 시간과 노력이 많이 들어가는 작업이다. 유용물질 분석을 통해 후보 소재를 스크리닝하여 기능성 소재를 찾아가는 시간 및 비용을 많이 단축 할 수 있을 것으로 기대한다.

2번째 방법으로는 추출물의 유용물질 분석 데이터와 기 확보된 생리활성 데이터를 접목하여 생리활성을 나타내는 유효성분을 예측하는 통계모델 작성하여 활용하는 방법이다. 단일 성분을 추적하는 시간을 많이 단축할 수 있을 것으로 기대한다. 통계를 기반하여 후보 유효성분을 제시하기 때문에 많은 양의 데이터가 존재 할수록 신뢰도가 상승함으로 3년간의 과제 수행을 통해 빅데이터 구축이 필요하다.

담수생물자원 추출물의 유용물질 탐색을 통해 추출물에서 어떤 성분이 그 효능을 나타내는지에 대한 근거를 제시하고 특허 및 논문의 질을 향상하는데 기여하고자 한다.

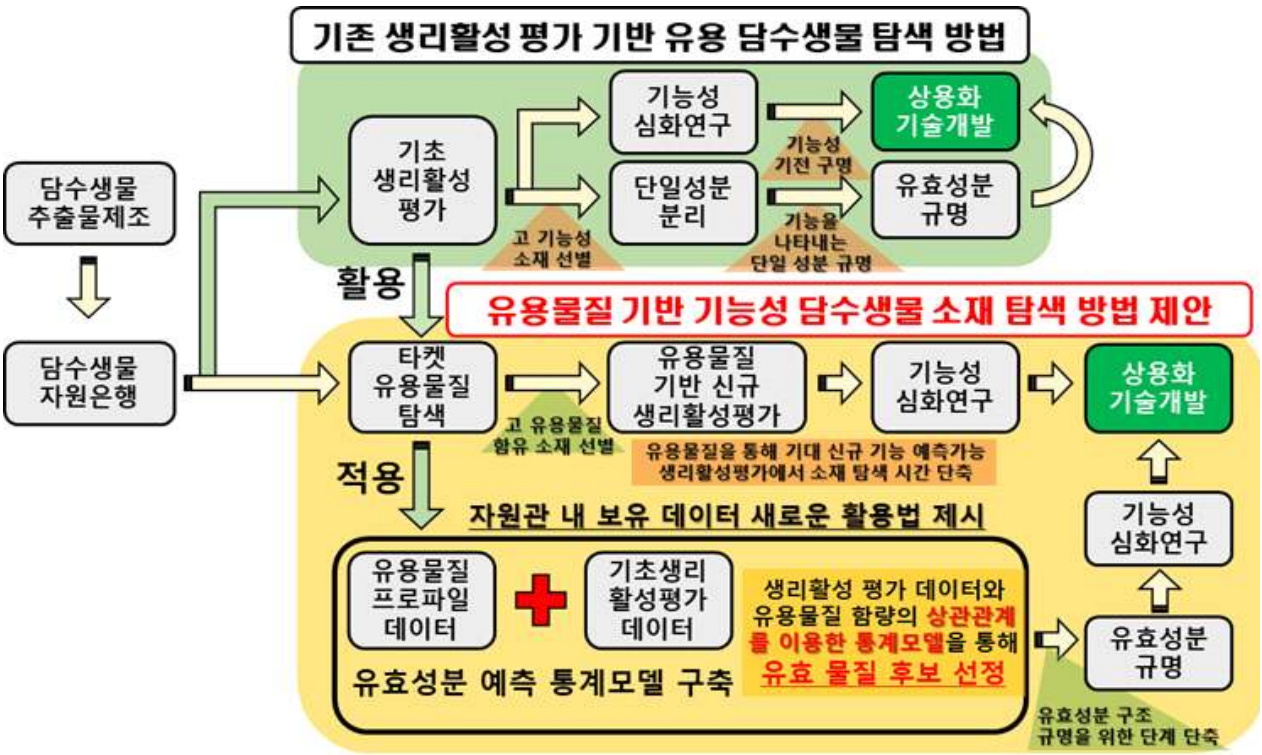


그림3. 유용물질 기반 기능성 담수생물 소재 탐색 방법 제안 시나리오

4. 연구의 추진체계

가. 현 연구 과제 수행의 한계점 및 극복방안

대부분의 플라보노이드의 경우 당류와 결합하여 배당체(glucoside) 형태로 존재한다. 배당체는 아글리콘(aglycone: 당류가 제거된 플라보노이드의 모(母) 구조) 형태에 어떤 당류가 결합하는가에 따라 그 종류가 매우 다양하다. 하지만, 특이적인 효능을 나타내는 유효성분은 대부분 배당체로 존재한다. 하지만 배당체를 분석하기 위해서는 배당체의 표준물이 있다면 쉽게 분석이 가능하나 표준물이 없는 경우가 많다. 최근에는 NMR분석 이전에 배당체를 시료에서 확인하는 방법으로는 텐덤질량분석기(tandem mass spectrometry)를 사용하여 각 물질의 고유한 이온 조각 패턴(상용 이온조각패턴 라이브러리)을 비교하여 확인이 가능하다. 하지만 자원관 내에 보유하고 있는 질량분석장비의 경우 분자량 측정의 한계가 소수점 1번째 자리까지만이 정확하게 측정되는 기기로 이온 조각패턴 라이브러리와의 비교를 통한 확인에 정확성이 떨어져 한계점이 명확하다. 현 연구과제에서는 배당체 분석에 대한 한계점을 극복하고자 추출물 내의 당류가 제거된 아글리콘 형태로 분석하여 플라보노이드 함량 여부 및 고함량 소재를 파악하고 생리활성 결과와 연계한 유효성분 예측 모델을 통해 플라보노이드 배당체 구조를 구명할 후보소재를 선별 후 외부기기(LC-QTOF-MS, NMR)를 활용하여 구조 구명을 하고자 한다.

나. 기능성 담수생물 소재 선발 및 지표(유효) 물질 선정을 위한 플라보노이드 탐색 추진체계(그림4, 5)

플라보노이드(아글리콘; aglycone) 동시 분석법을 통한 빅데이터 확보(1단계)를 한 후 유효성분 예측 모델을 활용한 아글리콘 형태의 플라보노이드 고함량 및 고생리활성 후보소재 선별하고자 한다(2단계). 배당체 형태의 플라보노이드 탐색은 많은 시간과 노력이 소모되기에 선별된 후보 소재를 대상으로 천연물(기능성 대사체) 질량분석패턴 라이브러리 비교 분석을 통한 플라보노이드 배당체 분석 및 기존에 알려진 배당체 표준물을 이용한 분석법 개발하고자 한다(3단계), 마지막으로 질량분석을 통해 선발된 기능성 플라보노이드 배당체 및 함유된 추출물에 대한 생리활성 검증을 하고자 한다(4단계).

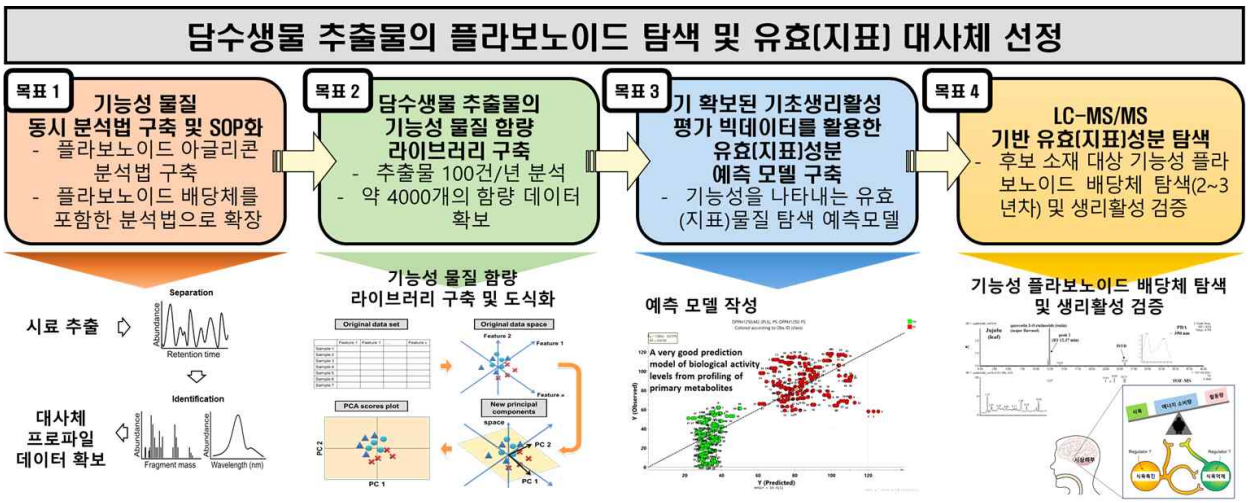


그림4. 담수생물 추출물의 플라보노이드 탐색 및 유효성분 도출 추진체계

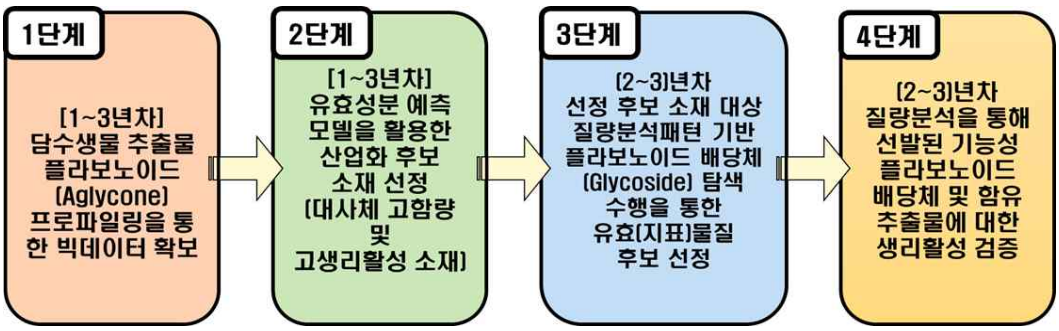


그림5. 담수생물자원 추출물 내 기능성 플라보노이드 탐색 추진체계

II. 연구내용 및 방법

1. 연구 내용

가. 플라보노이드 동시 분석법 배당체 확장 구축[13]

2023년 연구결과를 토대로 가장 많은 함량을 나타낸 Cyanidin과 Quercetin의 배당체를 중심으로 플라보노이드 배당체까지 확장한 LC-MS/MS기반 동시 분석법 구축하였다.

나. 추출물 대사체 프로파일링

생리활성 결과가 확보된 담수생물 추출물 150점(FBCC-EP1151~1342, EP846-927)을 선별하여 대사체 프로파일링 수행하였다.

다. PLS 기반 효능별 유효성분 예측 통계 모델링[14,15)]

SIMCA-P^{+} 통계프로그램을 이용하여 PLS(Partial Least Squares, 부분최소제곱 선형모델) 기반 유용성분 데이터와 효능평가 데이터의 상관도를 이용한 유효물질 예측 모델 작성하였다.

라. 플라보노이드 고함량 추출물에 대한 생리활성 평가

1) 대사 개선 및 항비만 활성 평가

플라보노이드 중 Cyanidin의 배당체 Cyanidine-3-glucoside나 Quercetin의 경우 당, 지질, 세포 내 면역체계 등을 조절하며 특정 단백질 AMPK, PPAR gamma, ERK 등을 조절하여 비만 마우스의 대사를 개선한다고 알려져 있으나 이 외의 배당체 후보군에 대해 알려진 바 없다.[(16-19)] Cyanidin과 Quercetin 플라보노이드의 새로운 배당체 후보군을 발굴하여 대사 개선에 대한 생리활성 평가 수행하였다.

뇌 시상하부에서의 신경세포 내 신경펩티드의 조절은 식욕 및 에너지 균형을 조절하는 중추 역할을 함으로써 최근 대사 개선 및 항비만 치료제의 효과적인 타겟으로 주목받고 있어 중개 연구가 필요하다(그림6).[(20, 21)]

현재까지 뇌 시상하부 신경세포에서 플라보노이드 배당체의 역할에 대해 보고된 바가 없으므로, 본 연구에서 플라보노이드 배당체 후보군 추출물에 대해 신경펩티드 조절 등의 대사 개선 생리활성을 평가하고 메커니즘을 탐색하고자 한다.

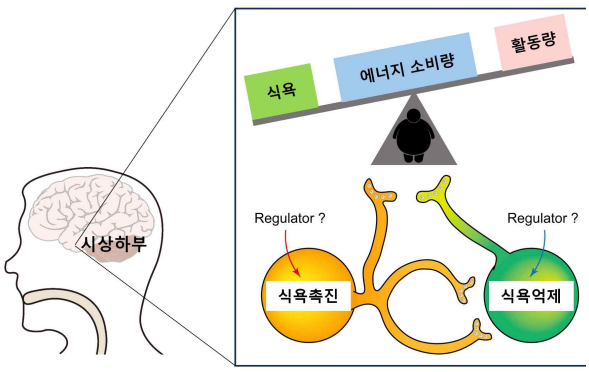


그림 6. 시상하부의 대사조절 메커니즘

2. 연구 방법

가. 플라보노이드 동시 분석법 배당체 확장 구축

1) 2023년도 플라보노이드 분석결과에서 도출된 우선 순위 플라보노이드 군부터 배당체 표준물을 구매 하여 라이브러리 확장하고자 하였다.(표2.) 시중에 판매하고 있는 플라보노이드 표준물(아글리콘 및 배당체)은 약 1,300여개이며 관련효능까지 연계하여 제공하고 있어 물질에 기반 한 기능성 예측 가능하다. (그림7, 그림8)

그림7. 플라보노이드 표준물

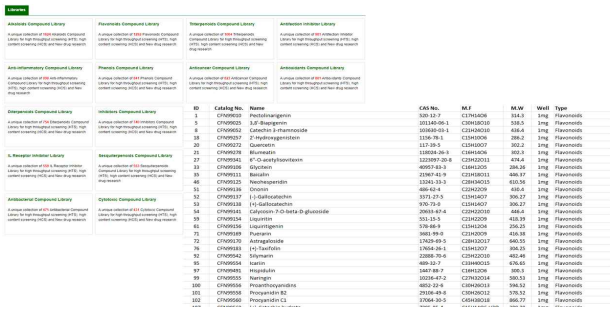


그림8. 플라보노이드 효능 리스트

플라보노이드	분석 대상	
Anthocyanins(안토시아닌)	Cyanidin	Cyanidin 3-O-glucoside
		Cyanidin 3-O-galactoside
		Cyanidin 3-O-sophoroside
		Cyanidin 3-O-arabinoside
		Cyanidin 3-O-rutinoside
		Cyanidin 3,5-O-diglucoside
Flavonol(플라보놀)	Quercetin	Quercetin 4’ -O- glucoside (spiraeoside)
		Quercetin 3-O- xyloside (reynoutrin)
		Quercetin 3-O- rutinoside (rutin)
		Quercetin 3-O- rhamnoside (quercitrin)
		Quercetin 3-O- glucoside (isoquercitrin)
		Quercetin 3-O- galactoside (hyperoside)
		Quercetin 3-O- arabinoside (Guaiaverin)
		Quercetin 3-O- arabinofuranoside (avicularin)
		Quercetin 3-O- (6’ ’ -O- malonyl)glucoside
	Kaempferol	Kaempferol 3-O- rutinoside (nicotiflorin)
		Kaempferol 3-O- rhamnoside (afzelin)
		Kaempferol 3-O- glucoside (astragalin)
		Kaempferol 3-O- galactoside (trifolin)
		Kaempferol 3,7-di-O- rhamnoside (kaempferitrin)
		Kaempferol 3,7-di-O- glucoside
Flavone(플라본)	Luteolin	Luteolin 8-C- glucoside (orientin)
		Luteolin 7-O- glucoside (Cynaroside)
		Luteolin 6-C- glucoside-8-C- arabinoside (carlinoside)
		Luteolin 6-C- glucoside (isoorientin)

표 2. 분석 목표 플라보노이드 배당체 예시

나. 추출물 대사체 프로파일링

1) 생리활성 결과가 확보된 추출물(FBCC-EP1151~1342, EP846-927) 150점을 선정하여 대사체 프로파일링 수행하였다.

2) 분석시료 제조

분석하고자 하는 FBCC 추출물은 DMSO에 녹아있는 상태로 DMSO는 질량분석기에서 물질의 이온화를 방해하여 분석의 질이 떨어지므로 동결건조를 하여 전 처리 한다. 동결건조된 추출물에 HCl 1.2M을 함유한 메탄올을 2mL를 넣어 1000ppm으로 희석한다. 희석한 추출물 1mL을 새로운 EP튜브로 옮긴 후 내부표준물질인 Galangin(100μg/mL)을 10μL를 넣는다. Thermomixer에서 30분 동안 70 ℃에서 1200rpm으로 교반하여 당 사슬과 연결된 구조의 플라보노이드의 결합을 깨기 위해 가수분해 반응을 시킨다. 가수분해가 완료된 추출물을 0.45 μM 주사기 필터를 이용하여 불순물을 제거하여 바이알에 담는다. UPLC-TQMS를 이용하여 분석을 수행하였다.

3) 초고성능 엑체크로마토그래피(UPLC) 조건

SCIEX사의 ExionLC-SCIEX QTRAP 4500에 LUNA OMEGA 16μm polar C18(150 x 2.1 mm) 컬럼을 장착하여 분석하였다. 이동상 용매는 A Line에는 개미산 0.5%를 첨가한 LC-MS용 물을 사용하고 B Line에는 개미산 0.5%를 첨가한 LC-MS용 아세토나이트릴을 사용하였다. 총 분석 시간은 40.00분이며 엑체크로마토그래피(LC) 조건은 유속은 0.25 mL/min, 컬럼온도는 상온을 유지하고 1 μL의 시료를 주입하였다. 이동상 조건은 표2와 같다

시간(분)	유속(mL/분)	A 용매(%)	B 용매(%)
0.00	0.25	90	10
1.00	0.25	90	10
35.00	0.25	5	95
39.00	0.25	5	95
39.10	0.25	90	10
40.00	0.25	90	10

표 2. 엑체크로마토그래피 이동상 조건

4) 질량분석기(TQMS) 조건

가) Electrospray ionization(ESI)를 이용하여 이온화 진행하였으며 이온소스(Ion source) 조건은 아래의 표3과 같다.

Curtain Gas	30.0 L/hr
IonSpray Voltage	-4500 kV
Temperature	600 ℃
Ion Source Gas	25 L/hr

표 3. 질량분석기 이온소스 분석 조건

나) 다중 반응 모니터링(Multiple reaction monitoring; MRM) 모드 조건은 표4와 같이 수행하였다.(그림9)

구분	Flavonoid	RT	MS1	MS2	DP	EP	CE	CXP
1	Gallocatechin	7.06	307.017	139.0	11	10	19	10
2	Epigallocatechin	8.32	307.024	139.1	81	10	21	10
3	Catechin	9.10	291.037	139.0	6	10	21	10
4	Epicatechin	9.99	291.047	139.0	76	10	23	10

5	Delphinidin	10.23	302.987	229	141	10	45	10
6	Gallocatechin 3-gallate	10.33	456.923	168.8	-85	-10	-22	-11
7	Epigallocatechin 3-gallate	10.71	458.970	139.1	91	10	33	10
8	Cyanidin	11.27	287.028	136	136	10	43	10
9	Petunidin	11.34	317.000	301.9	106	10	37	12
10	Catechin 3-gallate	11.90	440.961	168.0	-95	-10	-24	-7
11	Epicatechin 3-gallate	12.10	443.018	123.1	86	10	31	8
12	Pelargonidin	12.30	271.040	121.1	146	10	43	8
13	Peonidin	12.44	301.020	286.0	101	10	35	12
14	Taxifolin	12.59	305.011	153.0	76	10	23	8
15	Myricetin	13.87	319.021	153.0	11	10	41	12
16	Dihydrokeampferol	14.22	289.035	153.0	76	10	21	10
17	Daidzein	15.13	255.039	199.1	96	10	35	8
18	Glycitein	15.34	285.034	270.0	91	10	35	12
19	Eriodictyol	15.50	289.015	153.0	71	10	33	10
20	Luteolin	15.76	286.995	153.0	111	10	43	8
21	Quercetin	15.76	302.987	229.0	11	10	41	8
22	Naringenin	17.33	273.029	153.0	1	10	33	12
23	Apigenin	17.48	271.025	69.0	121	10	121	6
24	Genistein	17.48	271.013	153.0	106	10	39	10
25	Kaempferol	17.73	287.011	153.0	91	10	43	8
26	Galangin (내부표준물질)	21.27	271.023	153.0	61	10	43	8

표 4. 다중 반응 모니터링(Multiple reaction monitoring; MRM) 모드 조건

5) 정량 분석

가) 검량선 및 정량·검출한계는 아래의 표5와 같다.

구분	Flavonoid	기울기*	Y-절편**	결정계수***	검출한계****	검량한계*****
1	Gallocatechin	0.439	0.029	0.992	0.255	0.774
2	Epigallocatechin	0.370	0.047	0.999	0.508	1.539
3	Catechin	0.618	0.112	0.998	0.434	1.314
4	Epicatechin	0.766	0.082	0.999	0.315	0.954
5	Delphinidin	0.052	-0.024	0.985	0.113	0.341
6	Epigallocatechin 3-gallate	0.091	0.056	0.976	0.575	1.741
7	Gallocatechin 3-gallate	0.703	0.057	0.986	0.220	0.668
8	Cyanidin	0.012	-0.003	0.996	0.424	1.285
9	Petunidin	0.250	-0.059	0.992	0.325	0.984
10	Epicatechin 3-gallate	0.118	0.020	0.988	0.365	1.105
11	Catechin 3-gallate	0.822	0.000	0.988	0.159	0.481
12	Pelargonidin	0.174	-0.016	0.999	0.302	0.914
13	Peonidin	0.336	-0.077	0.992	0.400	1.212
14	Taxifolin	0.182	0.017	0.997	0.240	0.727
15	Myricetin	0.436	-0.074	0.988	0.165	0.499
16	Dihydrokeampferol	0.275	0.000	0.996	0.204	0.617
17	Daidzein	2.446	0.787	0.991	0.115	0.348
18	Eriodictyol	1.273	-0.142	0.987	0.239	0.724
19	Glycitein	4.388	1.561	0.991	0.184	0.558
20	Quercetin	0.363	-0.015	0.992	0.250	0.756
21	Luteolin	2.416	-0.011	0.995	0.196	0.593
22	Naringenin	2.413	-0.057	0.989	0.123	0.372
23	Apigenin	0.577	0.046	0.996	0.197	0.596
24	Genistein	3.575	0.232	0.996	0.184	0.558
25	Kaempferol	0.754	-0.070	0.990	0.154	0.467

표 5. 플라보노이드 정량을 위한 검량선 및 정량·검출한계

검량선 : Y=aX+b *기울기 : a, ** Y-절편 : b, *** 결정계수 : R^2,
**** 검출한계 : LOQ (Limited of quantification), ***** 검량한계 : LOD (Limited of detection)

나) 정량법은 (X-b)/a; (a: 기울기, b: Y-절편) 공식에 각 플라보노이드를 적분한 면적 값을 내부표준물질 면적값으로 나눈ratio (Std^{area}/IS^{area}) 값을 대입하여 정량하였다 (단위: ppm)

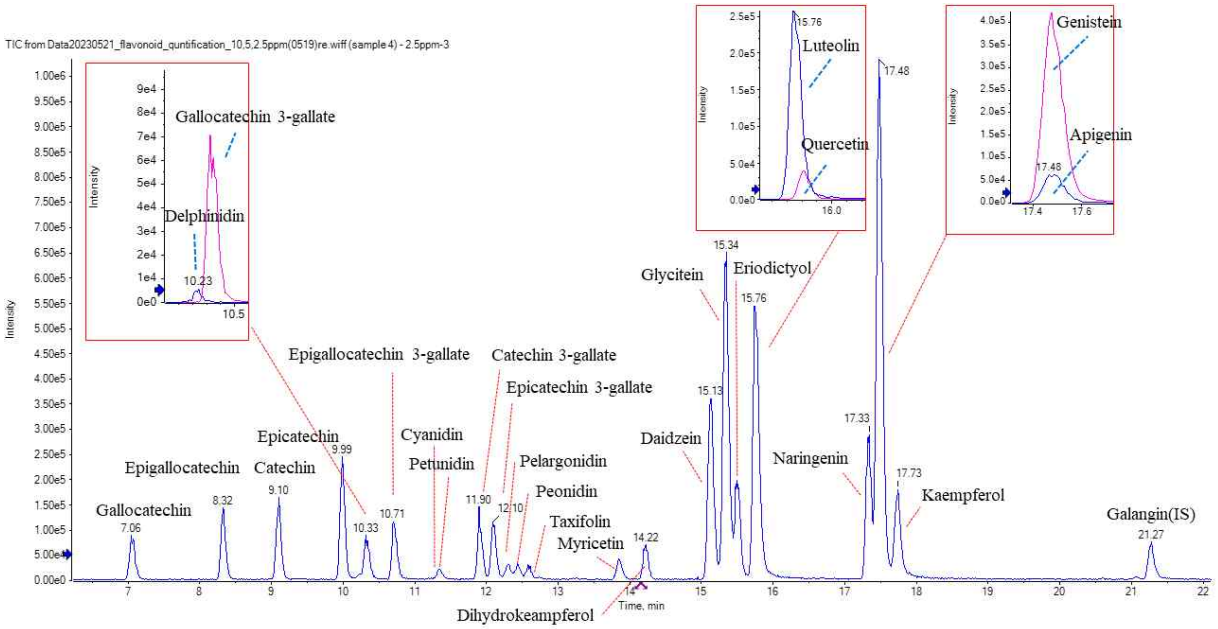


그림 9. 플라보노이드 크로마토그램

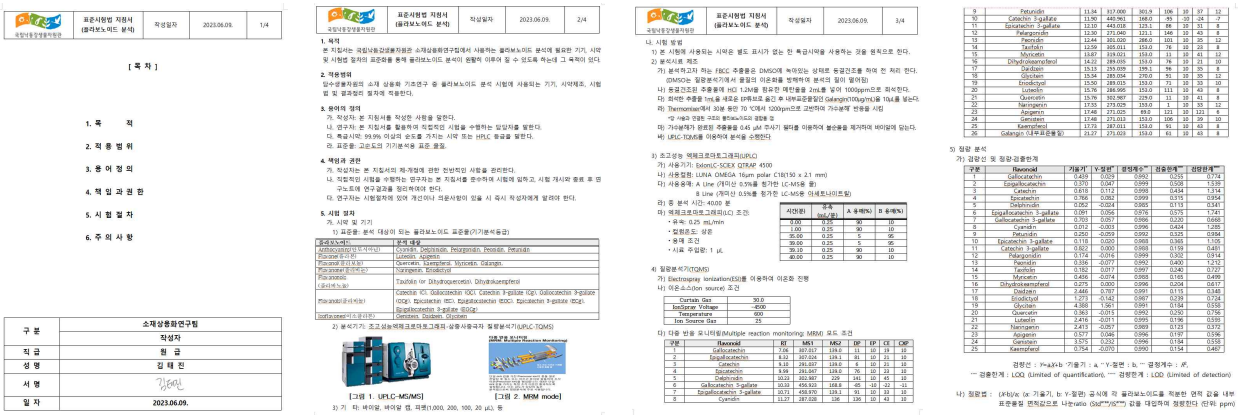


그림 10. 플라보노이드 동시 분석 표준시험법

다. PLS(Partial Least Squares, 부분최소제곱 선형모델) 기반 효능별 유효성분 예측 통계 모델링[14,15)]

SIMCA P+ 통계프로그램을 활용한 다변량통계 기법 중 부분최소제곱 선형모델을 기반으로 한 생리활성 결과와 대사체 프로파일 결과와의 상관관계 분석을 통한 기능성을 나타내는 유효성분 후보 도출하고자 하였다.(그림 11) 다부처 국가생명연구자원 선진화사업(담수야생생물 바이오소재 활용기반 구축 - 담수 생물소재 기능성 정보 구축)에서 확보된 생리활성 정보 활용하였다. (연구 책임자: 환경미생물연구팀 이미화 팀장, 연구 실무자: 황예지

전임연구원) 생리활성평가 항목인 면역증강, 항산화, 항염증, 항암(간암, 대장암), 항당뇨, 항비만, 미백, 주름개선, 간기능 개선, 퇴행성뇌질환보호, 중 하나를 선정하여 모델을 작성하였다.

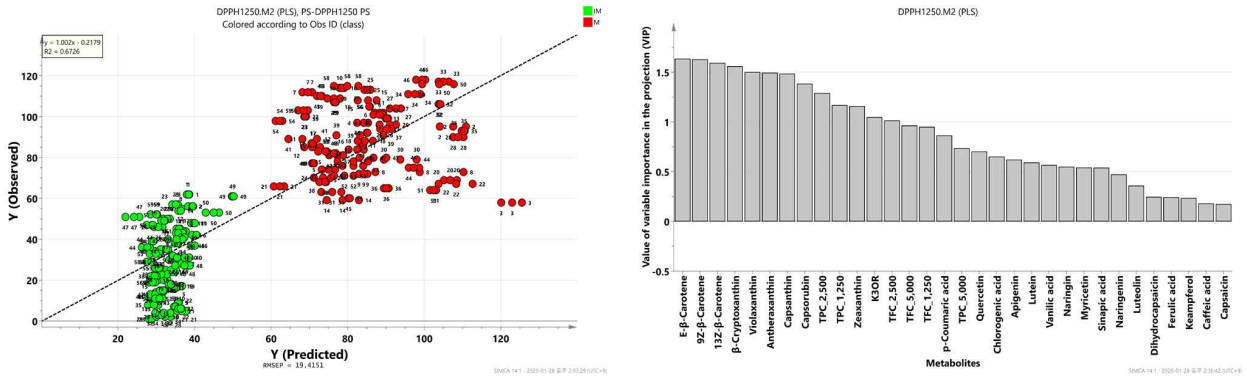


그림 11. PLS 기반 유효성분 예측 통계 모델링

라. 플라보노이드 고함량 추출물에 대한 생리활성 평가

플라보노이드 고함량 추출물을 대상으로 뇌 시상하부 신경세포 내 식욕조절 신경펩티드(식욕촉진: NPY, AGRP, 식욕억제: POMC)의 발현량을 확인하였다.

3. 기업 맞춤형 필요기술 지원

가. 제품 상용화 개발에 필요한 기업 맞춤형 필요기술 지원 수행

소재활용지원부의 필요기술지원 프로그램을 통한 전문기술 지원(SOP 제공, 분석 지원 등) 및 자문 실시하였다.

III. 연구결과 및 고찰

1. 플라보노이드 동시 분석법 배당체 확장 구축

가. 분석 대상 플라보노이드 배당체(표 6)

플라보노이드 종류	아글리콘	배당체
Anthocyanins(안토시아닌)	Cyanidin	Cyanidin 3-O-glucoside
		Cyanidin 3-O-galactoside
		Cyanidin 3-O-sophoroside
		Cyanidin 3-O-arabinoside
		Cyanidin 3-O-rutinoside
		Cyanidin 3,5-O-diglucoside
Flavonol(플라보놀)	Quercetin	Quercetin 4’-O- glucoside (spiraeoside)
		Quercetin 3-O- xyloside (reynoutrin)
		Quercetin 3-O- rutinoside (rutin)
		Quercetin 3-O- rhamnoside (quercitrin)
		Quercetin 3-O- glucoside (isoquercitrin)
		Quercetin 3-O- galactoside (hyperoside)
		Quercetin 3-O- arabinoside (Guaiaverin)
		Quercetin 3-O- arabinofuranoside (avicularin)
		Quercetin 3-O- (6’’-O- malonyl)glucoside

표 6. 분석 대상 플라보노이드 배당체

나. 플라보노이드 배당체 최적 분석 조건 탐색

이온화 모드에서 negative 및 positive ion mode 모두 확인해본 결과 Positive ion mode 시 더 높은 감도를 가지는 것을 확인하였다. (그림12) 또한 이동상의 경우 이온화를 시키기위한 매개체인 formic acid의 농도별 감도 확인 결과 0.5% formic acid에서 가장 높은 감도 및 분리도를 확인하였다. (그림13)

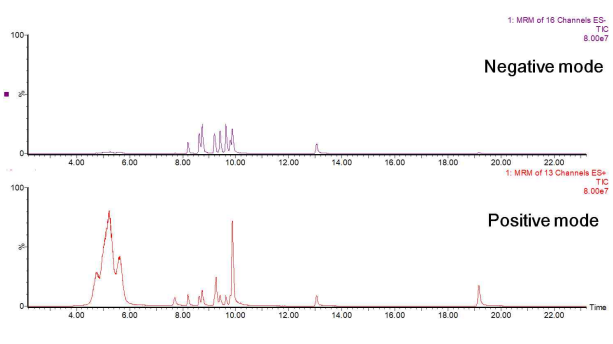


그림 12. MRM 이온화 모드에 따른 플라보노이드 LC-MS/MS 분석 크로마토그램

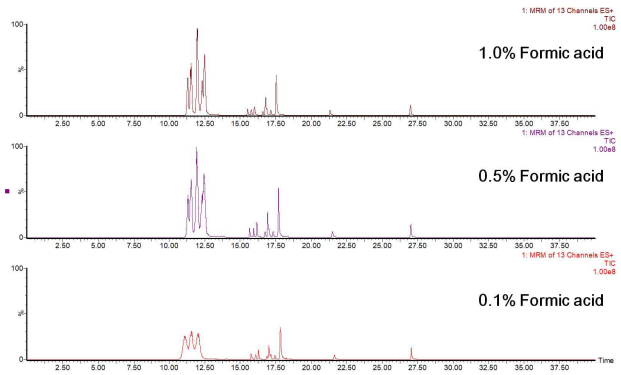


그림 13. 이동상 용매의 산 농도에 따른 플라보노이드 LC-MS/MS 분석 크로마토그램

플라보노이드 배당체 분석을 위한 LC-MS/MS 분석 조건은 아래와 같은 방법으로 확립하였다. 분석시료 제조의 경우 2023년도에 제정한 플라보노이드 분석 표준시험법에서 가수분해 과정을 생략하여 수행하였다. 분석하고자 하는 FBCC 추출물은 DMSO에 녹아있는 상태로 동결건조를 하여 전 처리 한다. 동결건조된 추출물에 0.5 ppm galangin을 함유한 메

탄올을 넣어 1,000ppm으로 희석한다. 희석한 추출물 1mL을 새로운 EP튜브로 옮긴 후 내부표준물질인 Galangin(100μg/mL)을 10μL를 넣는다. 가수분해가 완료된 추출물을 0.45 μM 주사기 필터를 이용하여 불순물을 제거하여 바이알에 담는다. UPLC-MS/MS를 이용하여 분석을 수행하였다.(그림14)

그림 14. UPLC-MS/MS

그림 15. MRM mode

Waters사의 ACQUITY UPLC I-Class PLUS System with Xevo TQ-S micro를 사용하였으며 초고성능 액체크로마토그래피(UPLC)(그림14)의 경우 Luna Omega 1.6μm Polar C18 (150mm*2.1mm, 00F-4748-AN, Phenomenex) 컬럼을 사용하였다. 이동상은 A Line에 개미산 0.5%를 첨가한 LC-MS용 물을 B Line에 개미산 0.5%를 첨가한 LC-MS용 아세토나이트릴을 사용하였다. 총 분석 시간은 40.00 분이고 유속은 0.3 mL/min, 컬럼온도는 40 ℃로 유지 하였으며 용매 조건은 표 7과 같이 수행하였다. 시료는 10 μL 주입하였다.

질량분석기(TQMS)의 경우 Electrospray ionization(ESI)를 이용하여 Positive 이온화 모드로 진행하였으며 이온소스(Ion source) 조건은 표 8과 같이 수행하였다.

이동상 용매 분석 조건			
시간(분)	유속(mL/분)	A 용매(%)	B 용매(%)
0	0.3	95	5
5	0.3	95	5
20	0.3	70	30
28	0.3	40	60
30	0.3	10	90
32	0.3	10	90
35	0.3	95	5
40	0.3	95	5

표 7. 엑체크로마토그래피 이동상 조건

이온소스 분석 조건	
Capillary voltage	2.5 kV
Source temp	150 ℃,
Desolvation Temp	600 ℃
N2 gas flow	1000 L/hr

표 8. 질량분석기 이온소스 분석 조건

위의 분석 조건을 바탕으로 각 플라보노이드 배당체 별 크로마토그래피 및 질량분석 최적 조건을 확인하고 이를 기반으로 다중 반응 모니터링(Multiple reaction monitoring; MRM) 모드 조건을 확립하였다. (표 9, 그림15. 16)

구분	성분	그룹	RT*	MS1**	MS2***	Cone (V)	Collision (V)
1	Cyanidin 3-O-sophoroside	Cyanidin	11.317	611	287	10	25
2	Cyanidin 3-O-glucoside (Asterin)	Cyanidin	11.533	449	287	10	20
3	Cyanidin 3-O-galactoside	Cyanidin	11.955	449	287	10	20
4	Cyanidin 3-O-diglucoside (Cyanin)	Cyanidin	11.961	611	287	10	25
5	Cyanidin 3-O-rutinoside	Cyanidin	12.31	595	287	10	25
6	Cyanidin 3-O-arabinoside	Cyanidin	12.471	419	287	10	20
7	Cyanidin	Cyanidin	15.052	287	137	10	30
8	Quercetin 3-O-rutinoside (Rutin)	Quercetin	15.657	611	303	20	25
9	Quercetin 3-O-galactoside (Hyperoside)	Quercetin	15.946	465	303	20	25
10	Quercetin 3-O-glucoside (Isoquercitrin)	Quercetin	16.190	465	303	20	25
11	Quercetin 3-O-xyloside (Reynoutrin)	Quercetin	16.745	435	303	20	35
12	6''-O-Malonylisoquercitrin	Quercetin	16.945	551	303	20	15
13	Quercetin 3-O-arabinoside (Guaiaverin)	Quercetin	17.033	435	303	20	35
14	Quercetin 3-O-arabinofuranoside (Avicularin)	Quercetin	17.311	435	303	20	35
15	Quercetin 3-O-rhamnoside (Quercitrin)	Quercetin	17.699	449	303	20	20
16	Quercetin 4'-O-glucoside (Spiraeoside)	Quercetin	17.722	465	303	20	25
17	Quercetin	Quercetin	21.479	303	153	10	30
18	Galangin	IS	26.996	271	153	20	30

표 9. 다중 반응 모니터링(Multiple reaction monitoring; MRM) 모드 조건

*RT : 머무름 시간 (retention time) , ** MS1 : precursor ion, *** MS2 : fragment ion

정량 분석을 수행하기 위해 각 플라보노이드 배당체에 대한 0.02ppm부터 최대 4.00ppm 까지 범위로 검량선을 작성하였다(표 10). 각 물질 별 검량선 및 정량·검출한계는 아래와 같다.

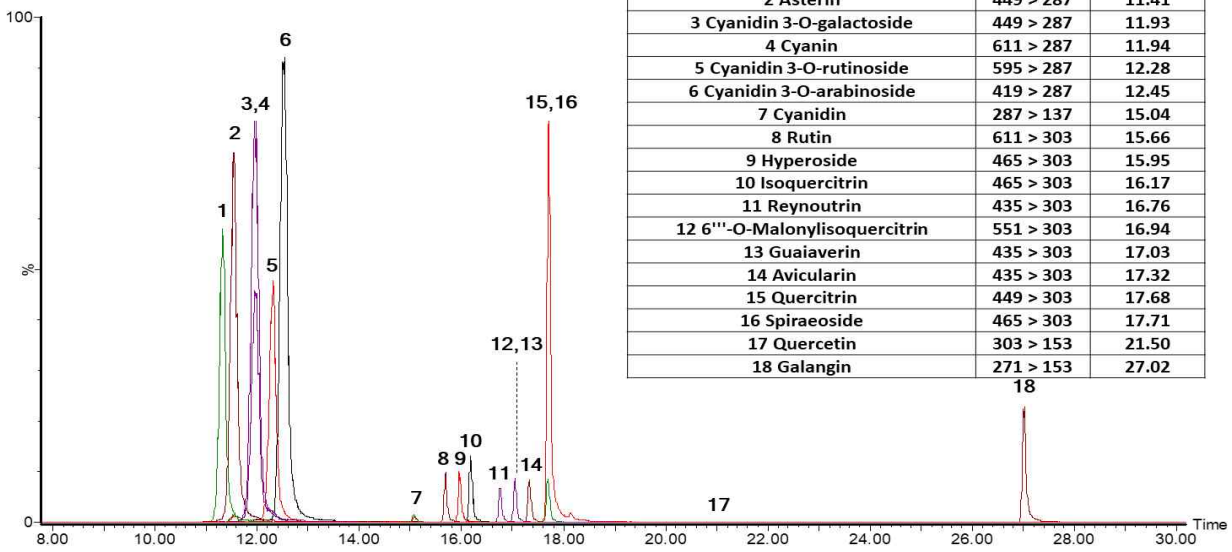
구분	Flavonoid	교정곡선		결정계수***	범위 (μg/mL)	검출한계***	검량한계****
		기울기*	Y-절편**				
1	Cyanidin 3-O-sophoroside	2.9654	0.0444	0.9992	0.02-4.00	0.0890	0.2698
2	Cyanidin 3-O-glucoside (Asterin)	3.7149	-0.0616	0.9997	0.02-4.00	0.0800	0.2425
3	Cyanidin 3-O-galactoside	7.6622	-0.2527	0.9995	0.02-4.00	0.0113	0.0343
4	Cyanidin 3-O-diglucoside (Cyanin)	0.0105	-0.0011	0.9997	0.25-4.00	0.1411	0.4276
5	Cyanidin 3-O-rutinoside	2.7872	-0.0771	0.9997	0.02-4.00	0.0644	0.1951
6	Cyanidin 3-O-arabinoside	4.6725	-0.0485	0.9993	0.02-4.00	0.0562	0.1703
7	Cyanidin	0.3230	-0.0104	0.9998	0.02-4.00	0.0090	0.0271
8	Quercetin 3-O-rutinoside (Rutin)	0.1017	0.0020	0.9997	0.02-4.00	0.1110	0.3364
9	Quercetin 3-O-galactoside (Hyperoside)	0.4653	-0.0013	0.9996	0.03-4.00	0.0893	0.2706
10	Quercetin 3-O-glucoside (Isoquercitrin)	0.3456	0.0029	0.9991	0.02-4.00	0.2867	0.8687
11	Quercetin 3-O-xyloside (Reynoutrin)	0.0270	0.0000	0.9976	0.03-4.00	0.3816	1.1562
12	6''-O-Malonylisoquercitrin	1.4247	0.0615	0.9980	0.02-4.00	0.0077	0.0232
13	Quercetin 3-O-arabinoside (Guaiaverin)	0.1374	0.0089	0.9990	0.06-4.00	0.1893	0.5736
14	Quercetin 3-O-arabinofuranoside (Avicularin)	0.0357	0.0025	0.9983	0.06-4.00	0.1525	0.4622
15	Quercetin 3-O-rhamnoside (Quercitrin)	0.0661	0.0039	0.9990	0.06-4.00	0.0417	0.1262
16	Quercetin 4'-O-glucoside (Spiraeoside)	3.6554	0.1573	0.9968	0.02-4.00	0.0756	0.2292
17	Quercetin	0.6232	-0.0081	0.9999	0.02-4.00	0.0803	0.2434

표 10. 플라보노이드 배당체 정량을 위한 검량선 및 정량·검출한계

검량선 : Y=aX+b *기울기 : a, ** Y-절편 : b, *** 결정계수 : R^2,

**** 검출한계 : LOQ (Limited of quantification), ***** 검량한계 : LOD (Limited of detection)

정량법은 실험법에 대한 보정을 위해 내부표준물질을 바탕으로 수행하였으며(X-b)/a; (a: 기울기, b: Y-절편) 공식에 각 플라보노이드를 적분한 면적 값을 내부표준물질 면적값으로 나눈ratio (Std^{area}/IS^{area}) 값을 대입하여 정량 하였다 (단위: ppm)



Name	Trace	RT
1 Cyanidin 3-O-sophoroside	611 > 287	11.31
2 Asterin	449 > 287	11.41
3 Cyanidin 3-O-galactoside	449 > 287	11.93
4 Cyanin	611 > 287	11.94
5 Cyanidin 3-O-rutinoside	595 > 287	12.28
6 Cyanidin 3-O-arabinoside	419 > 287	12.45
7 Cyanidin	287 > 137	15.04
8 Rutin	611 > 303	15.66
9 Hyperoside	465 > 303	15.95
10 Isoquercitrin	465 > 303	16.17
11 Reynoutrin	435 > 303	16.76
12 6'''-O-Malonylisoquercitrin	551 > 303	16.94
13 Guaiaverin	435 > 303	17.03
14 Avicularin	435 > 303	17.32
15 Quercitrin	449 > 303	17.68
16 Spiraeoside	465 > 303	17.71
17 Quercetin	303 > 153	21.50
18 Galangin	271 > 153	27.02

그림 16. 플라보노이드 아글리콘 및 배당체 LC-MS/MS 분석 크로마토그램

다. Cyanidin 및 Quercetin과 이들의 배당체에 대한 표준시험법 제정(그림17)

위의 최적분석조건 확립에 따라 표준시험법을 제정하였다. 분량 받은 FBCC 추출물을 (전처리)동결건조→(추출)메탄올→(희석)1,000ppm 과정을 거쳐 제조하며, 전처리된 추출물을 UPLC-MS/MS를 이용하여 다중 모니터링 반응(MRM) 모드로 분석을 수행하는 내용을 포함하였다. 또한 정량분석을 위해 10개 포인트(4~0.06ppm)로 3반복 이상 수행하여 검량선 작성한 내용 및 주의사항을 포함하였다. 생물소재연구부-1093(24.11.06.)호에 플라보노이드 배당체 동시 분석 표준시험법이라는 제목으로 문서를 생성하였다.

그림 17. 플라보노이드 배당체 동시 분석 표준시험법(생물소재연구부-1093(24.11.06.)호)

2. 담수생물 추출물 플라보노이드 프로파일링

가. 생리활성 결과가 확보된 추출물(FBCC-EP1151~1342, EP846-927) 150점 분석 수행

FBCC 추출물 150점 및 61종의 식물 추출물에서 총8,550개의 플라보노이드 데이터 확보하였다. 분석 완료된 추출물 중 20개의 플라보노이드 고함량(100㎍/㎖이상) 추출물 확인하였다.(표 11) Quercetin 고함량 추출물이 8개, Cyanidin 고함량 추출물이 13개, Kaempferol 고함량 추출물 2개로 확인되었다.

No.	배양콜렉션	생명체 국명	부위	추출액	Cyanidin	Quercetin	Kaempferol
1	FBCC-EP922	넓은잎미꾸리낚시	전초	70%에탄올	194.21	35.5	1.66
2	FBCC-EP923	낙지다리	지하부	70%에탄올	140.52	4.86	0.42
3	FBCC-EP1151	돌소리쟁이	지하부	70%에탄올	131.33	0.93	0.21
4	FBCC-EP1153	돌소리쟁이	지상부	70%에탄올	14.43	107.20	11.36
5	FBCC-EP1215	소리쟁이	지하부	70%에탄올	404.95	1.38	0.34
6	FBCC-EP1216	소리쟁이	지하부	증류수	331.18	0.40	0.15
7	FBCC-EP1217	소리쟁이	지상부	70%에탄올	280.22	74.19	14.12
8	FBCC-EP1218	소리쟁이	지상부	증류수	240.41	55.88	9.45
9	FBCC-EP1227	참소리쟁이	전초	70%에탄올	248.58	155.49	24.24
10	FBCC-EP1228	참소리쟁이	전초	증류수	268.28	106.37	14.22
11	FBCC-EP1233	갯버들	가지	70%에탄올	228.15	11.48	0.44
12	FBCC-EP1234	갯버들	가지	증류수	226.56	8.47	0.37
13	FBCC-EP1291	큰땅빈대	전초	70%에탄올	65.31	99.42	25.01
14	FBCC-EP1301	쥐손이풀	전초	70%에탄올	6.88	21.28	96.19
15	FBCC-EP1315	애기부들	전초	70%에탄올	326.72	2.56	4.05
16	FBCC-EP1316	애기부들	전초	증류수	136.26	4.13	4.66
17	FBCC-EP1327	광대싸리	잎	70%에탄올	46.66	241.27	4.51
18	FBCC-EP1328	광대싸리	잎	증류수	44.64	105.24	2.16
19	FBCC-EP1329	당단풍나무	가지	70%에탄올	7.08	135.70	7.07
20	FBCC-EP1331	당단풍나무	잎	70%에탄올	91.16	132.45	109.13

표 11. 주요 플라보노이드 고함량 추출물 목록

나. 생리활성 정보와 플라보노이드 프로파일링 분석 데이터의 통합정보 구축

FBCC-EP1151~1342, EP846-927까지 총 150개 추출물에 대한 통합정보를 구축하였다.(표 13) 표기 항목은 배양콜렉션, 학명, 국명, 추출부위, 추출방법, 건조방식, 크로마토그램, 플라보노이드 함량, 생리활성정보를 표기하였다. 생리활성(In Vitro) 결과 표기 기준은 아래 표와 같다.(표 12) 생물소재연구부-1133(2024.11.19.)호에 통합정보 라이브러리 150건을 부록으로 작성하여 열람 가능하다 (표 13)

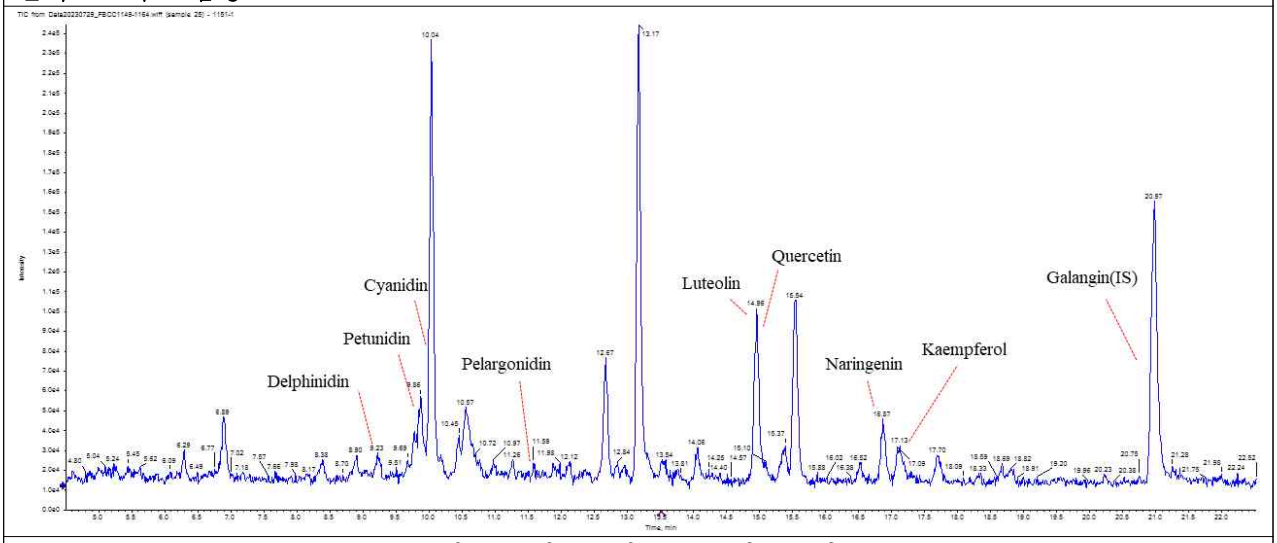
생리활성	측정방법	표기 기준 (+)
면역증강(NO)	NO production (uM) = Sample NO-control NO	5㎛ 이상
항산화	DPPH radical scavenging (%)	70% 이상
항암(간암, 대장암)	Cytotoxicity (%)	50% 이상 억제
항염	Lipoxygenase inhibition (%)	50% 이상
항당뇨	a-glucosidase inhibitor screening assay	80% 이상
항비만	Pancreatic lipase inhibitor screening assay	20% 이상(+), 40% 이상(++)
미백	Tyrosinase inhibition (%)	20% 이상(+), 40% 이상(++)
주름개선	Collagenase inhibitor screening assay	50% 이상
간기능 개선	Acetaldehyde dehydrogenase activator screening assay	200% 이상
퇴행성뇌질환보호	Acetylcholinesterase inhibitor screening assay	20% 이상

표 12. 생리활성 정보 표기 기준

표 13. 플라보노이드 프로파일링 분석과 생리활성 정보 데이터의 통합정보 라이브러리[별첨1]

배양콜렉션	FBCC-EP1151	학명	*Rumex obtusifolius* L.	국명	돌소리쟁이
추출 부위	지하부	추출방법	70% 에탄올, 용매추출	건조방식	감압농축

플라보노이드 함량



대표 플라보노이드 크로마토그램

분류	개별성분	함량(μg/g)
Anthocyanins(안토시아닌)	Delphinidin	1.23
	Cyanidin	131.33
	Petunidin	2.63
	Pelargonidin	0.59
	총 안토시아닌 함량	135.78
Flavonol(플라보놀)	Quercetin	0.93
	Keampferol	0.21
	총 플라보놀 함량	1.14
Flavanone(플라바논)	Naringenin	0.06
	총 플라바놀 함량	0.06
Flavone(플라본)	Luteolin	0.11
	총 플라본 함량	0.11
총 플라보노이드 함량		137.09

생리활성 (*In vitro*)

면역증강(NO)	항산화(DPPH)	항암(대장)	항암(간암)	항염
NO production (uM) = Sample NO-control NO	DPPH radical scavenging (%)	Cytotoxicity (%)	Cytotoxicity (%)	Lipoxygenase inhibition (%)
1.05	8.72	10.31	29.88	5.82
-	-	-	-	-

항당뇨	항비만	미백	주름개선	간기능개선	항퇴행성뇌질환
a-glucosidase inhibitor screening assay	Pancreatic lipase inhibitor screening assay	Tyrosinase inhibition (%)	Collagenase inhibitor screening assay	Acetaldehyde dehydrogenase activator screening assay	Acetylcholinesterase inhibitor screening assay
75.86	-1.85	-25.28	41.38	-157.14	0.00
-	-	-	-	-	-

3. 고함량 추출물을 대상으로 활성 플라보노이드(배당체) 탐색

플라보노이드 고함량 추출물 37개('23~'24년) 대상 배당체 분석 수행하였다. (표14, 그림18) Quercetin이 고함량이 였던 추출물의 경우 대부분 배당체가 고함량 있는 것으로 확인되었다.

No.	배양콜렉션	Reynoutrin	Rutin	Quercitrin	Iso quercitrin	Hyperoside	Guaiaverin	Avicularin	6'''-O-Malonyliso quercitrin
1	FBCC-EP1151	-	0.044	-	0.100	-	-	-	-
2	FBCC-EP1153	0.462	0.290	21.088	2.041	-	-	-	-
3	FBCC-EP1154	0.236	0.129	10.364	1.279	-	-	-	-
4	FBCC-EP1159	3.814	35.872	4.484	4.118	1.837	0.463	-	-
5	FBCC-EP1160	2.645	38.799	3.916	3.761	1.920	0.341	-	-
6	FBCC-EP1161	0.438	0.336	0.042	4.301	0.667	-	2.796	-
7	FBCC-EP1195	-	0.405	-	1.834	0.889	0.138	-	-
8	FBCC-EP1196	-	0.652	-	1.488	0.721	0.087	-	-
9	FBCC-EP1197	0.238	0.698	2.763	4.147	7.169	0.017	0.343	-
10	FBCC-EP1198	0.302	0.901	2.658	4.396	6.177	0.016	0.414	-
11	FBCC-EP1213	0.459	3.065	0.337	2.747	1.320	0.299	-	0.039
12	FBCC-EP1214	0.187	2.013	0.238	1.276	0.671	0.079	-	-
13	FBCC-EP1215	-	0.020	-	0.124	0.036	-	-	-
14	FBCC-EP1216	-	0.004	-	-	-	-	-	-
15	FBCC-EP1217	0.872	0.672	4.826	1.499	1.454	1.831	-	-
16	FBCC-EP1218	-	0.507	3.065	0.807	1.085	0.990	-	-
17	FBCC-EP1221	-	-	-	0.274	2.341	0.013	-	-
18	FBCC-EP1222	-	-	-	0.242	1.721	-	-	-
19	FBCC-EP1227	2.073	2.369	0.107	41.316	-	-	0.169	5.558
20	FBCC-EP1228	0.787	2.366	-	24.900	-	-	0.027	1.222
21	FBCC-EP1229	-	0.915	6.071	8.675	4.725	0.780	-	0.056
22	FBCC-EP1230	-	0.382	2.796	4.188	2.341	0.307	-	-
23	FBCC-EP1233	-	0.223	-	1.067	0.963	0.208	-	-
24	FBCC-EP1234	-	0.131	-	0.795	0.611	0.114	-	-
25	FBCC-EP1249	-	0.234	10.830	3.247	-	7.048	-	-
26	FBCC-EP1273	-	0.011	-	0.535	-	-	0.006	0.039
27	FBCC-EP1277	-	0.431	-	0.246	--	-	-	-
28	FBCC-EP1287	0.025	4.799	0.228	6.469	3.846	0	0	0.190
29	FBCC-EP1291	0.173	0.995	1.158	10.000	4.790	0	0	0
30	FBCC-EP1295	0.114	0.291	0	0.989	0.301	0	0	0
31	FBCC-EP1297	2.287	1.855	0	11.178	3.850	0.115	0	0.054
32	FBCC-EP1315	-	0.234	0	0.009	0.006	0	0	0
33	FBCC-EP1316	-	0.727	0	0.051	0.006	0	0	0
34	FBCC-EP1327	0.075	38.471	0	2.134	0	0	0	0
35	FBCC-EP1328	0.034	19.767	0	0.397	0	0	0	0
36	FBCC-EP1329	1.809	0.395	4.714	3.395	3.410	2.491	1.611	0
37	FBCC-EP1331	2.960	0.311	0.078	10.631	6.964	3.696	3.541	0.118

표 14. Quercetin 배당체 분석 결과

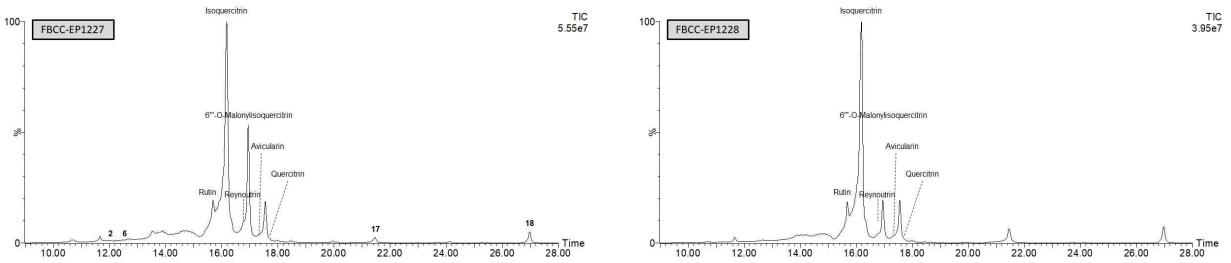


그림 18. Quercetin 배당체 분석 크로마토그램

4. 유효(지표) 성분 예측 모델 구축

가. 생리활성 결과를 활용한 유효(지표) 성분 예측 모델 구축

다부처 국가생명연구자원 선진화사업에서 담수 야생생물 바이오소재 활용기반 구축 - 담수 생물소재 기능성 정보 구축 2022년을 통해서 확보된 생리활성 정보 활용하였다.

플라보노이드 프로파일 결과와 생리활성 결과와의 유효성분 예측 통계 모델링 수행결과 면역 효능에 대해서 유효성분은 Peonidin으로 예측되었다.(그림19)

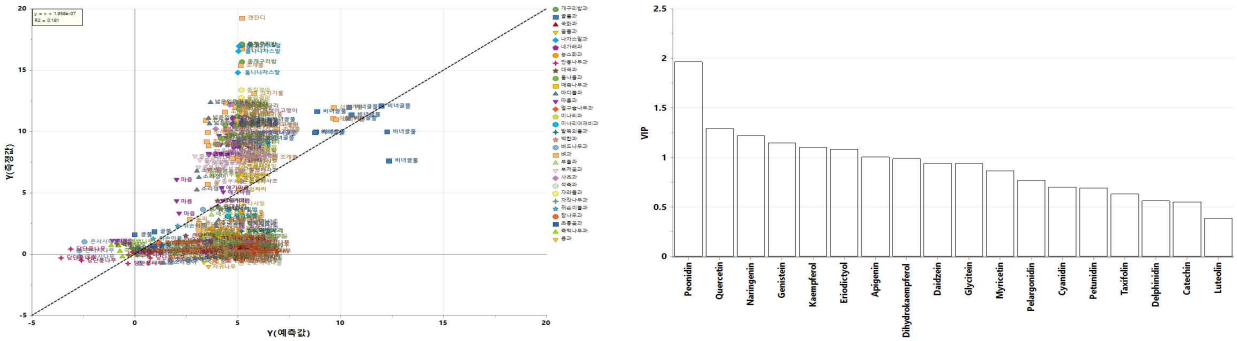


그림 19. 면역 효능에 대한 유효성분 예측 통계 모델링

항염 효능에 대한 예측된 유효성분은 Quercetin, Delphinidin으로 확인되었다.(그림20)

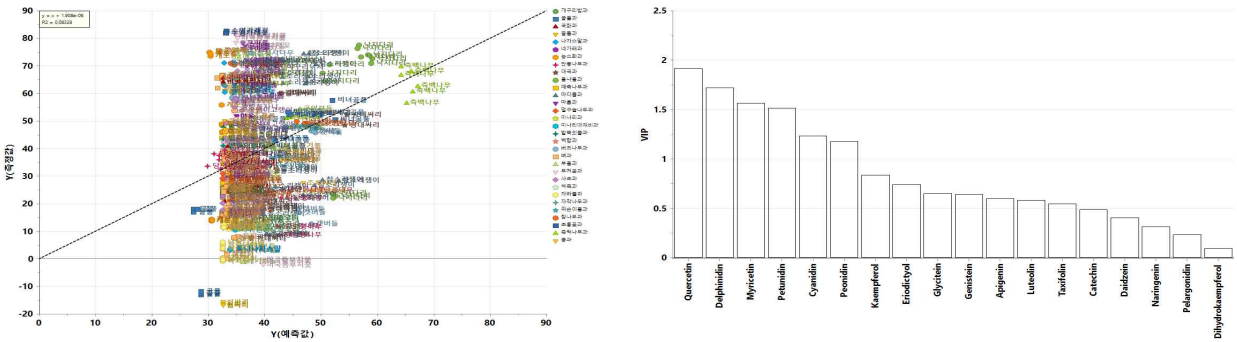


그림 20. 항산화 효능에 대한 유효성분 예측 통계 모델링

미백 효능에 대한 예측된 유효성분은 Peonidin, Taxifolin으로 확인되었다.(그림21)

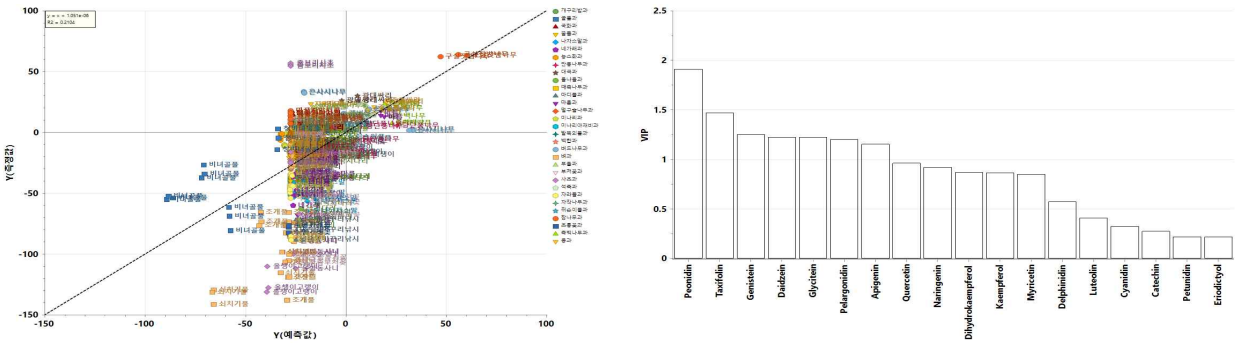


그림 21. 미백 효능에 대한 유효성분 예측 통계 모델링

항당뇨 효능에 대한 예측된 유효성분은 Quercetin, Cyanidin으로 확인되었다. (그림22)

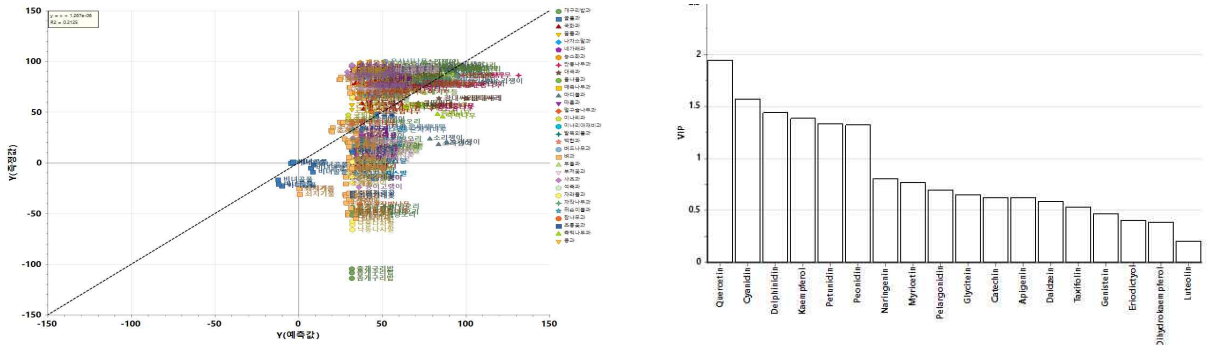


그림 22. 항당뇨 효능에 대한 유효성분 예측 통계 모델링

5. 플라보노이드 고함량 추출물에 대한 생리활성 평가

가. 대사개선 및 항비만 관련 상용화 후보 소재 실증

플라보노이드 고함량 추출물 37종 후보군 중 특허 (KIPRIS) 및 논문 (PUBMED)에서 각 학명에 대한 '비만', '신경세포'에서의 생리활성 등을 포함하는 유사물질을 제외한 플라보노이드 추출물 군 9종을 우선 선별하였다. (표 15)

구분	학명	국명	추출부위	추출용매	추출방법	건조방법	과명(영문)	과명(국문)
A	*Salix koriyanagi* Kimura ex Goerz	키버들	가지	70%에탄올	용매추출	감압농축	*Salicaceae*	버드나무과
B	*Salix koriyanagi* Kimura ex Goerz	키버들	가지	증류수	열수추출	감압농축	*Salicaceae*	버드나무과
C	*Persicaria senticosa*	며느리밑씻개	전초	70%에탄올	용매추출	감압농축	*Polygonaceae*	마디풀과
D	*Persicaria senticosa*	며느리밑씻개	전초	증류수	열수추출	감압농축	*Polygonaceae*	마디풀과
E	*Schoenoplectiella juncoides*	올챙이고랭이	전초	70%에탄올	용매추출	감압농축	*Cyperaceae*	사초과
F	*Ulmus pumila*	비술나무	가지	70%에탄올	용매추출	감압농축	*Ulmaceae*	느릅나무과
G	*Ulmus pumila*	비술나무	잎	70%에탄올	용매추출	감압농축	*Ulmaceae*	느릅나무과
H	*Acer pseudosieboldianum*	당단풍나무	가지	70%에탄올	용매추출	감압농축	*Aceraceae*	단풍나무과
I	*Acer pseudosieboldianum*	당단풍나무	잎	70%에탄올	용매추출	감압농축	*Aceraceae*	단풍나무과

표 15. 선정된 추출물 9종

플라보노이드 고함량 추출물에 대한 대사 개선 및 항비만 효능 측정을 위해 식욕촉진 신경펩티드 Neuropeptide Y (NPY)를 특이적 발현하는 뇌 시상하부 신경세포에 플라보노이드 고함량 추출물 9종을 처리 후 실시간 중합효소 연쇄반응 기법(real-time quantitative-PCR)을 통한 신경펩티드 NPY의 유전자 발현량을 정량 분석하였다.(그림 23)

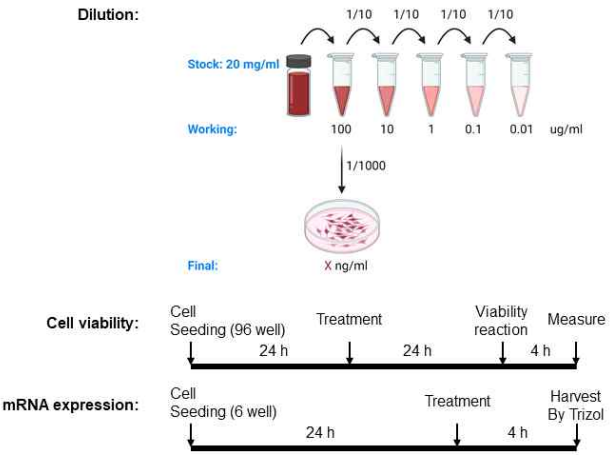


그림 23. 추출물 세포 처리 과정

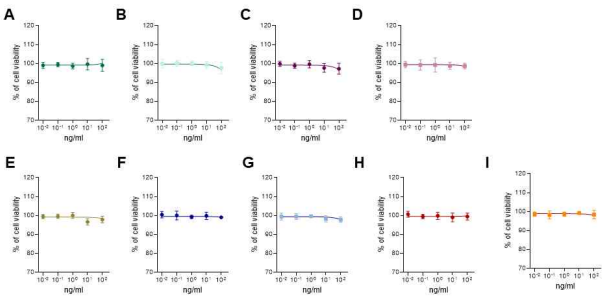


그림 24. 플라보노이드 추출물 처리 후 세포 생존률 (cell viability) 변화 확인

플라보노이드 고함량 추출물에 대한 세포독성 측정하기위해 24시간 동안 뇌 시상하부 신경세포에 각 플라보노이드 추출물 군 9종을 처리 하였다. Cell viability assay를 통해 각 농도에서 모두 세포독성에 영향이 없음을 확인하였다. (그림24)

식욕촉진 신경펩타이드 Neuropeptide Y (NPY) 및 Agouti-related peptide (AGRP) 측정하기위해 뇌 시상하부 신경세포에 최고 농도 100 ng/ml가 되도록 플라보노이드 추출물 군 9종을 4시간 동안 처리 후 NPY의 mRNA 발현량을 측정하였다. 식욕촉진 신경펩티드 NPY를 감소시키는 플라보노이드 추출물 군 4종을 동정했으며 H, I, B, A 순으로 NPY mRNA의 발현량이 감소함을 확인하였다 (표 16, 그림 25).

No	학명	국명	추출부위	추출용매	추출방법	과명(국문)	NPY 감소율 (%)
A	Salix koriyanagi Kimura ex Goerz	키버들	가지	70%에탄올	용매추출	버드나무과	↓ 24.13
B	Salix koriyanagi Kimura ex Goerz	키버들	가지	증류수	열수추출	버드나무과	↓ 38.31
H	Acer pseudosieboldianum	당단풍나무	가지	70%에탄올	용매추출	단풍나무과	↓ 72.46
I	Acer pseudosieboldianum	당단풍나무	잎	70%에탄올	용매추출	단풍나무과	↓ 50.61

표 16. NPY mRNA의 발현량을 감소시키는 추출물 4종

NPY 이외 대표적인 식욕촉진 신경펩티드 Agouti-related peptide (AGRP)의 mRNA 발현량을 추가적으로 확인하기 위해 후보물질 처리 하였다 (표 17. 그림 25).

A와 B의 100 ng/ml을 처리 시 AGRP mRNA 발현량에 전혀 영향을 미치지 않았으나, H와 I는 NPY mRNA 발현량과 유사하게 50% 이상 감소시키는 것을 확인하였다.

No	학명	국명	추출부위	추출용매	추출방법	과명(국문)	AGRP 감소율 (%)
H	Acer pseudosieboldianum	당단풍나무	가지	70%에탄올	용매추출	단풍나무과	↓ 66.34
I	Acer pseudosieboldianum	당단풍나무	잎	70%에탄올	용매추출	단풍나무과	↓ 50.44

표 17. AGRP mRNA의 발현량을 감소시키는 추출물 2종

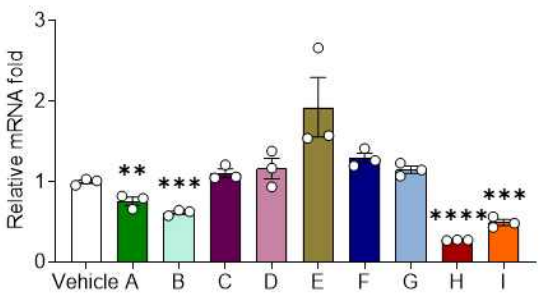


그림 25. 100 ng/ml 추출물 처리 후 식욕촉진 신경펩티드 NPY의 mRNA 발현량 변화

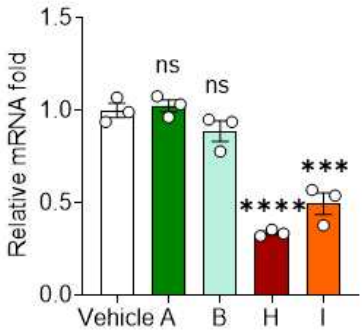


그림 26. 100 ng/ml 추출물 처리 후 식욕촉진 신경펩티드 AGRP mRNA 발현량 변화

식욕억제 신경펩타이드 Proopiomelanocortin (POMC) 측정을 위해 위의 식욕촉진 억제 효능을 보인 H 와 I의 100 ng/ml을 처리 하였다. 식욕을 억제하는 POMC의 mRNA 발현량이 I 추출물에서 40% 이상 증가함을 확인하였다.(표 18, 그림 26)

No	학명	국명	추출부위	추출용매	추출방법	과명(국문)	POMC 증가율 (%)
H	Acer pseudosieboldianum	당단풍나무	가지	70%에탄올	용매추출	단풍나무과	↑27.49
I	Acer pseudosieboldianum	당단풍나무	잎	70%에탄올	용매추출	단풍나무과	↑40.34

표 18. POMC mRNA의 발현량을 증가시키는 추출물 2종

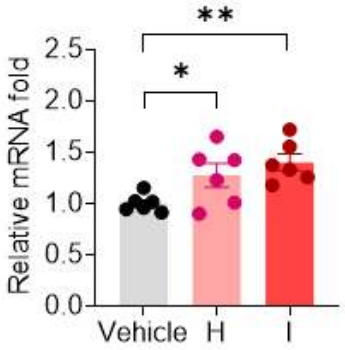


그림 27. 100 ng/ml 추출물 처리 후 식욕억제 신경펩티드 POMC의 mRNA 발현량 변화

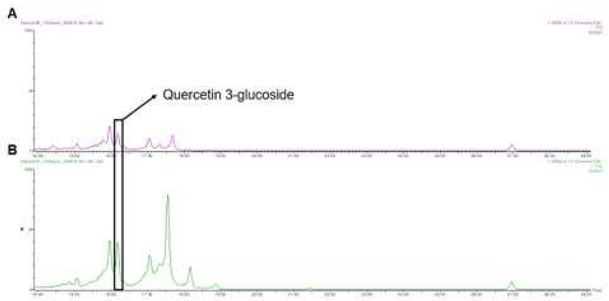


그림 28. LC-MS/MS를 이용한 당단풍나무 추출물의 성분 분석 (A: 가지, B: 잎)

식욕 조절 효능에 대한 유효 성분 도출을 위해 H 와 I에서 Quercetin 배당체를 분석하였으며 Quercetin 3-glucoside가 가장 많은 함량을 보이는 것으로 확인하였다. (그림.28) Quercetin 3-glucoside(100 ng/ml) 처리 시 세포독성이 없음을 확인하였다 (그림29). Quercetin 3-glucoside 단독 처리 시 에도 NPY를 억제하고 POMC를 촉진하는 것으로 확인되었다.(표 19, 그림 30) 따라서, H 와 I 추출물, 즉 당단풍나무 추출물이 시상하부의 식욕조절 신경펩티드를 억제하는 식욕감소 후보소재로 제안할 수 있었으며 유효성분을 밝혀 해당 연구결과를 특허 출원 하였다.

성분명	농도 (ng/ml)	NPY 감소율 (%)	POMC 증가율 (%)
Quercetin 3-glucoside (Isoquercitrin)	100	↓ 46.7	↑27.49
	10	↓ 33.1	↑40.34

표 19. Quercetin 3-glucoside에 의한 신경펩티드 조절율

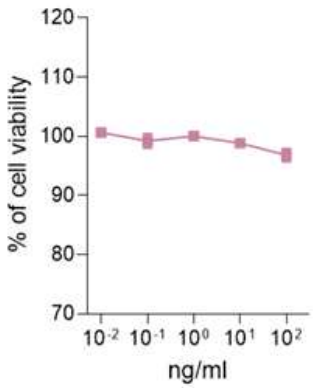


그림 29. Quercetin 3-glucoside 처리 후 시상하부 신경세포 생존율

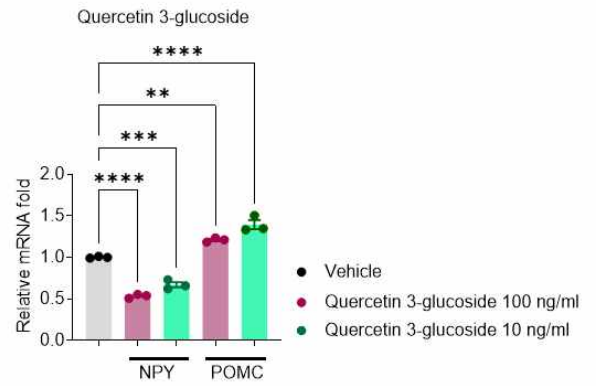


그림 30. Quercetin 3-glucoside에 의한 NPY와 POMC의 mRNA 발현 변화 (4 h 처리)

6. 기업 맞춤형 필요기술 지원

가. 제품 상용화 개발에 필요한 기업 맞춤형 필요기술 지원 수행(표20)

플라보노이드 분석 표준시험법을 활용하여 ㈜우당네트웍과 ㈜아이엔지알 기업을 대상으로 제품개발에 대한 산업계 애로기술 해결을 위한 필요기술 지원 수행하였다.

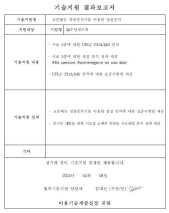
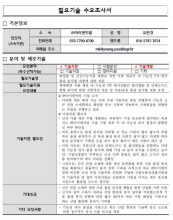
기업	필요기술 수요		기술지원 내용		
	요청기술	신청서	지원내용	결과서	표준시험법
㈜우당네트웍	건강기능식품 소재 개발을 위한 고분해능 질량분석기 활용 천연물 정성분석		건강기능식품 개발 목적 후보 소재 내 기능성분 확정 및 HPLC 기능성분 표준분석법 전달		
㈜아이엔지알	향장품 및 건강기능식품 개발을 위한 식물체 및 식물 세포주 내 사포닌 분석법 개발에 대한 자문		식물 세포주 내 기능성 2차 대사산물 분석법 개발 자문 및 표준분석법 전달		

표 20. 필요기술 지원 목록

5. 고찰

가. 연구 결과의 의의

담수생물자원 추출물 150개 중 20개가 플라보노이드 고함량을 함유한 것으로 파악되었으며 특히 안토시아닌 중 Cyanidin과 플라보놀 중 Quercetin이 제일 높은 함량을 나타내었다. (‘23년 결과와 동일) 기능성 담수생물자원 소재 후보제안을 위한 실증 연구로 수행한 항비만 생리활성 평가에서 플라보노이드 고함량 추출물 37종 후보군 중 FBCC-EP1329, 1331이 시상하부의 식욕조절 신경펩티드를 억제하는 강력한 식욕감소 후보소재로 도출되어 특허를 출원하였다(표 21.).

No	배양콜렉션	학명	국명	추출부위	추출용매	추출방법	과명(국문)
1	FBCC-EP1329	*Acer pseudosieboldianum*	당단풍나무	가지	70%에탄올	용매추출	단풍나무과
2	FBCC-EP1331	*Acer pseudosieboldianum*	당단풍나무	잎	70%에탄올	용매추출	단풍나무과

표 21. 식욕감소 후보소재

또한, 유용물질을 기반으로 한 신규 기능성 담수생물자원 후보 소재 탐색 자료로의 가치를 실증 연구를 통해 증명하여 다양한 연구에 활용 될 것으로 기대한다.

나. 연구 수행의 한계점 및 향후 계획

분석 물질의 종류가 현재 분석장비의 한계로 인해 플라보노이드로 한정되어 있어 24년 말 도입예정인 LC-TOF-MS를 활용한 다양한 물질 군 분석으로 26년 이후로 확장 할 계획이다.

IV. 결론

담수생물자원 추출물 유래 기능성 플라보노이드 탐색 연구 사업은 자원관이 보유한 약 1,500여개의 담수생물 추출물의 기능성 대사체 탐색을 통한 상용화 후보소재 선정 및 유효물질 확보를 목표로 진행되었다. 당해 연도 연구사업의 목표로 기능성 플라보노이드 배당체 분석법에 대한 표준시험법 제정 및 담수생물 추출물 150건 분석, 생리활성 결과를 활용한 유효(지표) 성분 예측 모델 4건, 플라보노이드 프로파일링 분석과 생리활성 정보 데이터의 통합정보 라이브러리 150건을 수행하였다. 기능성 플라보노이드 동시 분석법에 대해 최적화 및 다중 반응 모니터링(MRM) 모드 설정, 분량 받은 FBCC 분석시료 제조 방법, 10개 포인트(4~0.06ppm)로 3반복 이상 수행하여 검량선 작성을 통한 정밀한 정량분석 등을 포함하여 표준시험법을 제정하였다.

담수생물자원 추출물 150개를 분석하여 총 61종의 식물 추출물의 총8,550개의 플라보노이드 데이터 확보하였다. 이 중 20개가 플라보노이드 고함량을 함유한 것으로 파악되었으며, 특히 안토시아닌 중 Cyanidin과 플라보놀 중 Quercetin이 제일 높은 함량을 나타내었다. 이를 통해 고함량 추출물들을 상용화 후보소재로 제안 할 수 있었다. 생리활성 결과를 활용한 유효(지표) 성분 예측 모델의 경우 면역, 항염, 미백, 항당뇨를 대상으로 수행하였으며, 면역는 Peonidin이 함염증은 Quercetin, Delphinidin이, 미백은 Peonidin과 Taxifolin이, 항당뇨는 Quercetin과 Cyanidin이 유효성분으로 예측되었다.

담수생물자원 추출물에서 가장 높은 함량을 보였던 Cyanidin과 Quercetin에 대한 고함량 추출물 37종 후보군 중 특허성이 있는 9종에 대해서 대사 개선 및 항비만 관련 상용화 후보소재로 선별하였다. 물질분석에 기반 한 기능성 담수생물자원 소재 후보에 대한 실증 연구로 수행한 항비만 생리활성 평가에서 플라보노이드 고함량 추출물 37종 후보군 중 FBCC-EP1329, 1331이 시상하부의 식욕조절 신경펩티드를 억제하는 식욕감소 후보소재로 도출하여 특허를 출원하였다.

유용물질을 기반으로 한 신규 기능성 담수생물자원 후보 소재 탐색 자료로의 가치를 실증 연구를 통해 증명하여 다양한 연구에 활용 될 것으로 기대한다. 2024년도에 담수생물자원 유용정보 DB 내부 공개를 통한 유용소재 도출 및 신규과제 제안에 대한 기초자료 활용되었고, 24년 디딤돌과제로 (담수생물유래 플라보노이드 성분 활성 증진을 위한 복합 처리 연구) 제안되었으며, 25년 디딤돌과제로 대사체농업 기술 기반 담수생물자원 유래 활성성분 증진 연구가 선정 되었다.

V. 활용방안

담수생물자원 추출물 유래 기능성 플라보노이드 탐색 연구가 2023~2025년도(3년) 까지 수행 후 누적된 통합정보 라이브러리(405건 예정)를 공개하여 유용물질을 기반으로 한 신규 기능성 담수생물자원 후보 소재 탐색 자료 및 신규과제 제안에 대한 기초자료로 활용 될 것으로 기대한다. 또한 산업화를 위해서는 생리활성에 대한 유효성분 도출이 가장 핵심 사항이다. 식물 추출물의 경우 기능성 물질 중 플라보노이드가 가장 많은 부분을 차지하고 있다. 현재까지 분석된 담수생물자원 추출물의 플라보노이드 함량 분포를 기반으로 연구과제 종료 이후(2026년~) 산업화 진입이 가능할 것으로 기대되는 소재를 선별하여 심화연구를 수행하고 특허 출원 등 국내 자생식물의 지식재산권 확보에 기여 하고자 한다.

VI. 참고문헌

1. 환경부. 2020. 제1차 생물자원관 기본계획(안)(2021-2025)
2. CBD(Convention on Biological Diversity), 2006. Global Biodiversity Outlook 2 Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, 81
3. CBD(Convention on Biological Diversity), 2015. "Nagoya Protocol". 9 June 2015.
4. 관계부처 합동. 2018.「제4차 국가생물다양성전략 (2019년~2023년)
5. 한국과학기술기획평가원. 2022. 화이트바이오 산업 활성화를 위한 유망 분야 도출 및 정부지원 방안
6. Panche, A. N et al, 2016. Flavonoids: an overview. Journal of nutritional science, 5.
7. Karak, P, 2019. Biological activities of flavonoids: an overview. Int. J. Pharm. Sci. Res, 10(4), 1567-1574.
8. Middleton, Jr et al, 1996. Biological properties of plant flavonoids: an overview. International journal of pharmacognosy, 34(5), 344-348.
9. https://foodb.ca/, FooDB Version 1.0
10. https://phytohub.eu/, PhytoHub Version 1.4
11. 농촌진흥청. 2016. 플라보노이드 Data base 1.0 Ⅰ. 식품의 플라보노이드 함량
12. 농촌진흥청. 농식품올바로-기능성분검색 http://koreanfood.rda.go.kr/kfi/fct/fctCompSrch/list
13. Kim, T. J et al, 2022. Improved quantification of catechin and epicatechin in red rice (*Oryza sativa* L.) using stable isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry. Applied Biological Chemistry, 65(1), 1-7.
14. Jung, J. W et al, 2022. Metabolic profiling and antioxidant properties of hybrid soybeans with different seed coat colors, obtained by crossing β-carotene-enhanced (*Glycine max*) and wild (*Glycine soja*) soybeans. Plant Biotechnology Reports, 1-15.
15. Park, Y. J et al, 2019. Metabolic profiling of nine Mentha species and prediction of their antioxidant properties using chemometrics. Molecules, 24(2), 258.
16. Seo, M. J. et al, 2015. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. The Journal of Nutritional Biochemistry, 26(11), 1308-1316.
17. Guo, H. et al, 2012. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. The Journal of nutritional biochemistry, 23(4), 349-360.
18. Wei, X. et al, 2011. Cyanidin-3-O-β-glucoside improves obesity and triglyceride metabolism in KK-Ay mice by regulating lipoprotein lipase activity. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91(6), 1006-1013.
19. Jia, Y. et al, 2020. A dietary anthocyanin cyanidin-3-O-glucoside binds to PPARs to regulate glucose metabolism and insulin sensitivity in mice. Communications Biology, 3(1), 514.
20. Myers Jr, M. G., & Olson, D. P., 2012. Central nervous system control of metabolism. Nature, 491(7424), 357-363.
21. Myers Jr, M. G. et al, 2021. Central nervous system regulation of organismal energy and glucose homeostasis. Nature Metabolism, 3(6), 737-750.