

1. 표지

(뒷면) (옆면)

(앞면)

<p>2016101B 10-1919- AB02</p>	<p>Forest Science Technology R&D Report</p>	<p>보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 임업기술연구개발사업 최종보고서</p>
<p>산초유 효능 구명 및 산업화 기술 개발</p>		<p>R&D / 2016101B10-19 19-AB02</p>
<p>최 종 보 고 서</p>		<p>산초유 효능 구명 및 산업화 기술 개발 최종보고서</p>
<p>2019</p>		<p>2019 . 09. 28.</p>
<p>산 림 청 한 국 임 업 진 흥 원</p>		<p>주관연구기관 / 경남산림환경연구원 협동연구기관 / 한국한의학연구원 전북대학교산학협력단 영농조합법인 우보산초</p>
		<p>산 림 청 한국임업진흥원</p>

2. 제출문

제 출 문

산림청장(한국임업진흥원장) 귀하

‘산초유 효능 구명 및 산업화 기술 개발’(개발 기간 : 2016. 06. 29 - 2019. 06. 28) 과제의 최종 보고서 31부를 제출합니다.

2019. 09. 28.

주관연구기관명 : 경남산림환경연구원 (대표자) 유 재 원

협동연구기관명 : 한국한의학연구원 (대표자) 김 종 열

협동연구기관명 : 전북대학교산학협력단 (대표자) 조 재 영

협동연구기관명 : 영농조합법인 우보산초 (대표자) 손 명 진



주관연구기관책임자 : 유 찬

협동연구기관책임자 : 서 참

협동연구기관책임자 : 김 소

참여기업 대표 : 손 명

「산림과학기술 연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제27조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	2016101B10-1 919-AB02	총연구기간	2016.06.29~ 2019.06.28	단계구분	1/1
연구사업명	단위사업명	임업기술연구개발			
	세부사업명	응복합기반 임산업의 신산업화 기술개발(R&D)			
연구과제명	총괄과제명	산초유 효능 구명 및 산업화 기술 개발			
	세부과제명	<ul style="list-style-type: none"> - 산초유 표준화 및 기능성 원료 개별인정을 위한 기반 연구 - 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구 - 산초유 기관지 천식 효능구명 - 산초유 및 제품 표준 공정 pilot 적용 연구 			
연구책임자	유찬열	총 연구기간 참여 연구원 수	총: 11명 내부: 3명 외부: 8명	총 연구개발비	정부:510,000천원 기업:30,000천원 정부 외: 천원 계:540,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	경남산림환경연구원 산림연구과 한국한의학연구원 전북대학교산학협력단			참여기업명 : 우보산초	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명:			상대국 연구기관명: 연구책임자:	
본 연구는 산초유 표준화 및 기능성원료 개별인정을 위한 기반연구로 4개 과제로 구성되어 있음. 먼저 전통적인 산초유 효능에 대하여 자료 수집 정리하였고, 착유법, 저장법 등을 구명하였고, 피부감작성 시험 등을 통해 건기식 등재를 위한 기초자료를 마련함, 또한 산초유 기능성분 규격 및 원료특성 연구를 통하여 산초유의 지방산 규격기준 및 산초유 함유여부 등을 판정할 수 있는 진단 키트를 개발하였으며, 산초유 기관지 천식 효능 연구를 통해서도 산초유가 천식 해소를 위한 효능이 있음을 과학적으로 검증함. 또한 산초유 생산 표준공정 pilot scale 연구에서 엑스펠라 착유방법이 효과적임을 확인하여 현장에 적용할 수 있는 기반을 마련함. 전체적으로 본 연구과제는 목표대로 잘 수행되었고, 산초유 효능 구명 및 산업화 기술 개발에 기여할 것으로 판단됨				보고서 면수 : 166	

4. 국문 요약문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 연구배경 : 산초유는 오래전부터 민간에서 사용되어 왔지만 과학적 효능 검증 및 표준생산법이 마련되어 있지 않고, 건강기능성식품소재로 등재가 되어 있지 않아 산업으로 육성하기에 한계가 있어 이를 극복하기 위해 연구를 수행 - 연구목적 : 산초유 효능 구명 및 산업화 기술 개발 - 연구내용 : 산초유 기능성원료 개별인정 기반연구 및 산초유 효능 검증 산초유 기능성분 규격 및 시험방법 확립, 원료 특성 구명 				
<p>연구개발성과</p>	<p><주요 연구 결과></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 산초유 표준화 및 기능성 원료 개별 인정을 위한 기반 연구 <ul style="list-style-type: none"> ○ 산초유 표준공정 확립 및 원료 특성연구 및 자료 구축 ○ 착유법, 저장법 등을 통해 건기식 등재를 위한 기초자료를 마련 2) 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구 <ul style="list-style-type: none"> ○ 성분 규격 및 시험방법 확립 및 산초 유사종 신속·간편 감별을 위한 PCR 증폭용 유전자 마커 개발 ○ 산초원료 및 산초유 기원 감별용 유전자 감별 키트 시제품 개발 3) 산초유 기관지 천식 효능구명 <ul style="list-style-type: none"> ○ 기관지 폐포 세척액, 천식동물모델 등 시험을 통해 기관지 천식 효능구명 4) 산초유 및 제품 표준 공정 pilot 적용 연구 <ul style="list-style-type: none"> ○ 엑스펠러를 이용한 착유방식, 만생종 등 산초유 표준공정 확립 <p><논문></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 산초유 정제공정에 따른 물리화학적 변화 2. 산초유 산패방지를 위한 항산화물질과 혼합유의 영향 3. Development of conventional PCR and real-time PCR assays to discriminate the origins of Chinese pepper oil and herbal materials from <i>Zanthoxylum</i> <p><지적소유권></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 산초유 정제 및 저장성 연장방법 2. 산초유 치즈 및 그 제조 방법 3. 산초종자 정선장치 4. 곡물 착유기 5. 산초유를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 6. 산초나무, 초피나무, 개산초 및 화초의 감별용 프라이머 세트 및 이의 용도 7. 기능성 음료용 용기마개 8. 산초유 생산용 산초종자 저장 조성물 및 이를 이용한 저장 어셈블리 9. 종자 컨테이너 <p><학회 발표></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 2017 임학회 하계 학술발표(산초유 착유방법 및 저장방법이 산가 및 색도에 미치는 영향) 등 6건 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구의 결과를 바탕으로 건강 기능성 원료 인증 자료로 활용 ○ 기술이전 행정절차에 따라 관심기업에게 기술 이전을 수행할 계획 ○ 논문 게재를 통한 과학적 데이터 제시로 홍보 및 마케팅에 활용 ○ 연구결과를 바탕으로 작성된 매뉴얼은 산초유 관련 기술교육훈련용 교재로 활용 ○ 유능한 인력은 관련 산업체 등에 취업시켜 청년실업을 해소 ○ 산초유의 동물 실험에 대한 추가 연구가 필요 <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구에서 수행된 기관지 천식연구에 대한 결과가 매우 고무적이어서 이에 대한 좀 더 자세한 동물실험이 필요함 - 산초나무 대량 보급 및 산초나무 대량 보급을 위한 최적 재배지 구명에 대한 추가 연구가 필요 				
<p>핵심어 (5개 이내)</p>	<p>산초유</p>	<p>천식치료</p>	<p>엑스펠라</p>	<p>유전자</p>	<p>검사키트</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

<p>Purpose & Contents</p>	<p>-Background: Although sancho oil has been used in the private sector for a long time, it lacks scientific efficacy tests and standard production methods and is not listed as a health functional food material. Perform</p> <p>-Purpose: Sancho oil efficacy research and industrialization technology development</p> <p>-Research content: sancho oil, functional raw materials, sancho oil efficacy study, sancho oil functional ingredient specification and test method establishment,</p>				
<p>Results</p>	<p><Major Research Results></p> <p>1) Basic study for standardization of sancho oil and individual recognition of functional raw materials</p> <ul style="list-style-type: none"> ○Establishment of standard process of sancho oil and study of raw material characteristics and construction of data ○Provide basic data for dry type registration through milking method and storage method <p>2) Study on sancho oil functional ingredient specification and raw material characteristics</p> <ul style="list-style-type: none"> ○Development of genetic markers for PCR amplification for establishing the standard of composition and test method and for rapid and simple discrimination of sancho-like species ○Development of prototype of gene identification kit for discrimination of sancho raw material and sancho oil origin <p>3) Sancho oil bronchial asthma</p> <ul style="list-style-type: none"> ○Bronchoalveolar lavage fluid, asthma animal model, etc., <p>4) Application of sancho oil and product standard process pilot</p> <ul style="list-style-type: none"> ○Establishment of sancho oil standard process such as milking method and longevity using x-pellet <p><Articles></p> <p>1. Physico-chemical change according to Sancho oil purification process</p> <p>2. Sancho oil Effect of antioxidant and mixed oil to prevent rancidity</p> <p>3. Development of conventional PCR and real-time PCR assays to discriminate the origins of Chinese pepper oil and herbal materials from <i>Zanthoxylum</i></p> <p><Intellectual property rights></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sancho oil refining and preservation extension method 2. sancho oil cheese and production of sancho oil cheese 3. Sancho Seed Screen Screen Filter Device 4. grain oil press 5. A composition for preventing, improving or treating an inflammatory disease 6. comprising Sancho oil as an active ingredient 6. Primer set for discrimination of Sancho wood, early tree, gentian, and flower, and uses thereof 7. functionality cap for drink 8. composit of seed storage for sancho oil production and assembly 9. seed container <p><Presentation></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 2017 Seminar of Summer Session of the Society of Immunology (The effect of Sancho oil chilling method and storage method on acid value and color) 				
<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○Based on the results of this study, it is used as certification data of health functional ingredients. ○Plan to carry out technology transfer to interested companies according to technology transfer procedure ○Scientific data is presented through the publication of the thesis. ○Based on the results of the study, the manual was used as a textbook for technical education and training related to sancho oil. 				
<p>Keywords</p>	<p>sancho oil</p>	<p>asthma treatment</p>	<p>expella</p>	<p>gene</p>	<p>assay kit</p>

< **Table of Contents** >

1. An outline of a task.....	1
2. Status of Technology Development internal and external.....	12
3. R&D Contents and Results	14
4. Achievement of goals and contribution to relevant areas.....	126
5. Utilization Plan of Research Results.....	128
6. Conclusion.....	132
7. Information on overseas science and technology collected in the R&D process.....	135
8. Security rating of R & D achievement.....	136
9. Status of research facilities and equipment registered in the National Science and Technology Comprehensive Information System.....	137
10. Implementation of safety measures in laboratories based on R & D tasks.....	138
11. Representative research achievements of R & D tasks.....	139
11. ETC.....	141
12. Reference literature.....	142

7. 본문 목차

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
1. 연구개발 목적.....	1
2. 연구의 필요성.....	1
3. 연구개발범위.....	4
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	12
1. 산초관련 논문 동향.....	13
2. 산초관련 특허 동향.....	13
3. 산초관련 제품 동향.....	13
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	14
제 1 절 산초유 표준화 및 기능성원료 개별인정을 위한 기반연구	14
1. 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 자료수집.....	14
2. 최적 제조방법 확립.....	17
3. 원료의 특성 연구.....	20
4. 산초유 산패도 및 저장성 연구.....	26
5. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립.....	32
6. 원료의 특성에 관한 자료 구축.....	33
7. 섭취량, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 구축.....	34
8. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인.....	35
9. 산초유 산패도 및 저장성 연구.....	35
10. 안전성 연구.....	38
11. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립.....	39
12. 산초유의 피부감작성 시험.....	43
제 2 절 산초유 기능 성분 규격 및 원료특성 연구	47
1. 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립.....	47
2. 산초유 원료 감별을 위한 유전자 마커 개발.....	50
3. 2차년도 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구.....	54
4. 3차년도 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구.....	67
5. 4차년도 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구.....	84
제 3 절 산초유기관지 천식 효능 연구	103
1. 난황 알부민 유발 천식 마우스 모델에서 항천식 효과 확인.....	103
3. 예비연구에서 규명된 산초유항염증효과 기전에 대한 천식 동물 모델에서의 확인연구..	113
4. 산초유의 새로운 항염증 기전 발굴연구.....	120
5. 항산화제 및 새로운 기전 조절 양성 대조군과의 비교 연구.....	121
6. 스테로이드와의 항천식 효과 비교 연구.....	121

제 4 절 산초유 생산 표준공정 pilot scale 적용.....	123
1. 추출산초나무 품종별, 착유방법별 산초유 수율.....	123
2. 산초유 표준공정 확립.....	124
제 4 장 목표에 대한 달성도 및 관련분야에의 기여도.....	126
1. 목표에 대한 달성도.....	126
2. 관련분야 달성도.....	126
제 5 장 연구결과의 활용계획.....	128
제 1 절 기대효과.....	130
제 2 절 연구개발성과의 활용방안.....	130
제 3 절 추가연구의 필요성.....	131
결 론.....	132
1. 산초유 표준화 및 기능성원료 개별인정을 위한 기반연구.....	132
2. 산초유 기능성분 규격 및 원료특성 연구.....	133
3. 산초유기관지 천식 효능 연구.....	133
4. 산초유 생산 표준공정 pilot scale 적용.....	134
제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보.....	135
제 7 장 연구개발성과의 보안등급.....	136
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황.....	137
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전 조치 이행 실적.....	138
제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구 실적.....	139
제 11 장 기 타.....	141
제 12 장 참고 문헌.....	142

표 차례

표 1. 산초의 민간요법	2
표 2. 산초 원료 감별용 유전자 마커 개발을 위한 primer	8
표 3. 품종별, 착유방법별 산초유 수율	19
표 4. 조생종 저장온도별, 착유방법별 색도 분석	22
표 5. 만생종 저장온도별, 착유방법별 색도 분석	23
표 6. 한초 저장온도별, 착유방법별 색도 분석	23
표 7 혼합 저장온도별, 착유방법별 색도 분석	24
표 8. 생산자별, 착유방법별 산가 비교	24
표 9. 품종별, 착유방법별 점도 비교	25
표 10. 생산자별, 착유방법별 점도 비교	25
표 11. 품종별, 착유방법별 산초유의 산가 비교	26
표 12. 중금속(총수은, 카드뮴, 송비소, 납) 검출 여부	32
표 13. 산가 및 요오드가 확인	33
표 14. 에루스산 검출 여부	33
표 15. 혼합종 유압압착 산초유의 식품성분 분석	34
표 16. 혼합종 엑스펠러 착유 산초유의 식품성분 분석	34
표 17. 혼합종 유압압착 산초유의 식품표기	38
표 18. 혼합종 엑스펠러 산초유의 식품표기	39
표 19. 혼합종 유압압착 산초유의 기타식용유지 규격검사	40
표 20. 혼합종 엑스펠라 착유 산초유의 기타식용유지 규격검사	40
표 21. 2017년 생산 혼합(조생종+만생종+신품종) 엑스펠라 착유 시료의 58종 잔류농약 분석 결과	41
표 22. 2016년 생산 다양한 시료의 페니트로티온, 헥사코나졸 농약성분 분석 결과	41
표 23. 혼합종 유압압착 산초유의 식품 변패균 검사	42
표 24. 혼합종 엑스펠라 착유 산초유의 식품 변패균 검사	42
표 25. 피부반응 평가표 (Draize의 기준: 1959)	46
표 26. 피부자극정도의 분류 (Draize의 기준: 1959)	46
표 27. Sample information according to milking methods and roasting times in different races	47
표 28. GC-FID conditions	48
표 29. GC-MS conditions	48
표 30. Target conditions of each reference standard	48
표 31. Amount of the eight components in samples by GC-FID	49
표 32. Amount of the eight components in samples by GC-MS	49
표 33. 산초 및 유사종 유전자 감별법 개발에 사용한 분석용 시료	50
표 34. <i>ITS2</i> DNA 바코드 염기서열 비교를 통한 종 특이 marker nucleotide 발굴	51
표 35. <i>matK</i> DNA 바코드 염기서열 비교를 통한 종 특이 marker nucleotide 발굴	51

표 36. <i>rbcL</i> DNA 바코드 염기서열 비교를 통한 종 특이 marker nucleotide 발굴	51
표 37. 종 감별용 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer	52
표 38. Sample information according to milking methods and roasting times	53
표 39. Sample information according to milking methods and roasting times	54
표 40. Content of the seven compounds in sample	56
표 41. Sample information according to milking methods and roasting times	56
표 42. Calibration curvers, range, LOD, and LOQ of the five compounds	57
표 43. Reproducibility on peak area of each compound	58
표 44. Reproducibility on retention time of each compound	58
표 45. Recovery test of each compound	59
표 46. Intra- and inter-day precision of each compound	59
표 47. Content of the five components in samples	60
표 48. ITS 염기서열 기반 산초원료 및 산초유 종 감별용 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer	62
표 49. ITS 염기서열 기반 종 특이 SCAR 유전자 마커 이용 PCR 증폭 조성물 및 조건 정보	62
표 50. 유전자 감별에 이용된 산초유 시료별 상세 정보	65
표 51. Flow condition of mobile phase	67
표 52. LC-Q-TOF-MS profiling of sample	69
표 53. 생산연도별 시료 정보	71
표 54. Retention time, m/z, and MS spectrum of each component	73
표 55. Retention time, m/z, and MS spectrum of each component	74
표 56. Content (ug/mg) of the eight components in each sample	75
표 57. <i>Zanthoxylum</i> 4종 시료 목록 및 정보(3차년도 재 진행 대상종 및 시료)	76
표 58. 산초나무 및 유사종 4종의 <i>ITS2</i> DNA 바코드 종 특이 염기서열 정보	78
표 59. <i>ITS2</i> 종 특이 염기서열 기반 SCAR 유전자 마커 PCR 증폭용 primer 정보	79
표 60. <i>ITS2</i> 염기서열 기반 종 특이 SCAR 유전자 마커 이용 PCR 증폭 조성물 및 조건 정보	79
표 61. 개발 SCAR 마커를 이용한 real-time PCR 분석법 개발: 표준 정량선 분석	81
표 62. SCAR 마커를 이용한 산초유 기원검정의 conventional PCR 및 qPCR 분석 결과	83
표 63. Content of the six components in each sample	85
표 64. Content of the six components in each sample	86
표 65. Content of the five components in each sample using HPLC-ELSD	88
표 66. Calibration curvers, range, LOD, and LOQ of the five compounds	89
표 67. Reproducibility on peak area of each compound	89
표 68. Reproducibility on peak area of each compound	89
표 69. Recovery test of each compound	90
표 70. Intra- and inter-day precision of each compound	90

표 71. <i>ITS2</i> 종 특이 염기서열 기반 SCAR 유전자 마커 PCR 증폭용 primer 정보	91
표 72. <i>ITS2</i> 염기서열 기반 종 특이 SCAR 유전자 마커 이용률 이용한 Conventional PCR 증폭 및 Real-time PCR 조건	91
표 73. 산초 열매(한약재 산초) 시료를 이용한 유전자 감별법 재검증 및 결과	92
표 74. 산초유 품종별, 착유방법별 수율 비교	123
표 75. 착유방식과 원료 종류에 따른 산초유 수율	124

그림 차례

그림 1. 산초나무(<i>Zanthoxylum schinifolium</i>)	2
그림 2. 범용성 DNA Barcode 분석을 통한 기원 종 선별용 유전자 마커 부위 발굴	8
그림 3. DNA 바코드 기반 PCR 증폭용 유전자 마커 개발	9
그림 4. 산초원료 유전자 감별용 키트 개발	9
그림 5. 산초, 초피, 개산초 및 화초 등 4종 감별 가이드라인(안)	10
그림 6. 향 천식 모델 기반 산초유 유효성 연구 추진 체계	10
그림 7. 산초유 향 천식조절 세포기전 연구 체계	11
그림 8. 일본의 산초 활용현황	15
그림 9. 국내 산초 연구 및 특허등록현황	15
그림 10. 산초유 착유 전처리 공정	17
그림 11. 산초유 유압압착 최적생산 공정	18
그림 12. 산초유 스크롤(엑스펠라) 최적 생산공정	18
그림 13. 산초유 품종별, 착유방법별 수율	20
그림 14. 품종별 착유방법별, 로스팅유무에 따른 산초유의 점도	21
그림 15. 품종별, 착유방법별, 저장온도별 산초유의 색도 변화	22
그림 16. 25℃ 보관 6개월 후 정제공정별 산가 변화	26
그림 17. 4℃ 저온보관 6개월 후 정제공정별 산가 변화	27
그림 18. 저장온도별 산초유의 산가변화	28
그림 19. 산초유 착유 6개월 후 정제공정상 손실율	28
그림 20. 저장시간에 따른 미정제 산초유의 산가변화	29
그림 21. 품종별, 착유방법별 산초유의 산가	29
그림 22. 품종별, 착유방법별 산초유의 산가	31
그림 23. 껍질포함, 미포함 유압압착과 엑스펠라 착유의 저장온도별 산가변화	31
그림 24. 본 연구에서 보안된 병마개(우측 특허 출원)	36
그림 25. 본 연구에서 보안된 병마개(특허 출원; 중앙, 우측)	36
그림 26. 엑스펠라 착유기 (우보산초)	37
그림 27. 산초 돌배즙 시제품 (우보산초)	38
그림 28. 산초유의 토끼 피부감작성시험결과	46
그림 29. GC-FID chromatogram	48
그림 30. GC-MS chromatogram	49
그림 31. 산초 및 산초 유사품 종 감별 PCR 증폭용 SCAR 유전자 마커 개발	52
그림 32. 산초유 시료 DNA 추출 및 <i>ITS2</i> 부위 증폭	53
그림 33. 품종 및 착유방법에 따른 산초유의 지방산 분석 가스크로마토그래피 크로마토그램	55
그림 34. 품종 및 착유방법에 따른 산초유 지방산의 HPLC-CAD 크로마토그램	60
그림 35. ITS 염기서열 기반 산초원료 종 감별용 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer 탐색	63

그림 36. ITS 기반 산초원료 중 감별 PCR 증폭용 SCAR 유전자 마커 개발	63
그림 37. ITS 기반 산초원료 중 감별 real-time 분석 조건 확립	64
그림 38. 산초원료 중 감별용 real-time 분석법 중 특이성 검증	64
그림 39. 산초원료 기원 중 감별용 SCAR 유전자 마커를 이용한 산초유 기원 검증 및 유사종 혼입 여부 판별	66
그림 40. Real-time PCR 분석법을 이용한 산초유 기원 검증 및 유사종 혼입여부 판별	66
그림 41. LC-Q-TOF-MS를 이용한 산초 열매 추출물의 성분 프로파일	68
그림 42. LC-Q-TOF-MS/MS pattern	70
그림 43. TIC chromatogram (0.0-40.6 min)	72
그림 44. TIC chromatogram (12.0-30.0 min)	72
그림 45. <i>Zanthoxylum</i> 4종의 <i>ITS2</i> 구간 염기서열 분석	78
그림 46. <i>ITS2</i> 중 염기서열 기반 PCR 증폭용 중 특이 SCAR 유전자 마커 개발	80
그림 47. 개발 중 특이 SCAR 마커를 이용한 real-time PCR 분석법 개발	80
그림 48. 개발 SCAR 마커를 이용한 real-time PCR 분석법 개발: 표준 정량선 분석	81
그림 49. 개발된 SCAR 마커를 이용한 산초유 기원검정	82
그림 50. 산초유 유전자 감별 kit 시제품 개발	83
그림 51. GC-MS를 이용한 산초유의 SIM분석	85
그림 52. HPLC-PDA-ELSD를 이용한 산초유의 분석 검출기 비교	88
그림 53. Conventional PCR 분석을 통한 산초나무 열매(한약재 산초) 감별 결과	93
그림 54. 유지성 식물 및 식품원료를 이용한 유전자 감별법의 특이성 검정 결과	93
그림 55. 천식 마우스 모델 도식	103
그림 56. 산초유 조생종의 착유방법에 따른 염증 사이토카인 발현 양	103
그림 57. 산초유 조생종 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	104
그림 58. 산초유 만생종의 착유방법에 따른 염증 사이토카인 발현 양	104
그림 59. 산초유 만생종 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	105
그림 60. 산초유 품종 한초의 착유방법에 따른 염증 사이토카인 발현 양	105
그림 61. 산초유 품종 혼합 시료의 착유방법에 따른 염증 사이토카인 발현 양	106
그림 62. 산초유 품종 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	106
그림 63. 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	107
그림 64. 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	107
그림 65. 산초유 혼합 시료(조생종+엑스펠라)의 각 염증 사이토카인 발현 양	108
그림 66. 산초유 혼합 시료(조생종+엑스펠라)의 각 염증 사이토카인 발현 양	108
그림 67. 산초유 혼합 시료(한초, 3품종혼합+엑스펠라)의 각 염증 사이토카인 발현 양	109
그림 68. 산초유 혼합 시료(한초, 3품종혼합+엑스펠라)의 각 염증 사이토카인 발현 양	109
그림 69. BAL에서 총 세포 및 분화 세포 성분에 대한 산초 종자유 영향	110
그림 70. OVA로 유도 된 마우스의 사이토카인의 단백질 수준에 대한 산초 종자유 영향	111
그림 71. OVA 유발 쥐의 기도과 반응성에 대한 산초 종자유 효과	112

그림 72. 산초 종자유가 OVA 유발 마우스 폐 조직의 병리학 적 변화에 미치는 영향	113
그림 73. 탈검탈산 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	114
그림 74. 탈검탈산 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	114
그림 75. 탈검탈산된 각 품종에서 추출된 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	115
그림 76. 탈검탈산된 각 품종에서 추출된 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	115
그림 77. 탈검탈산된 각 품종에서 추출된 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	116
그림 78. 탈검탈산된 각 품종에서 추출된 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양	116
그림 79. BAL에서 총 세포 및 분화 세포 성분에 대한 산초 종자유의 영향	117
그림 80. OVA로 유도된 마우스의 사이토카인의 단백질 수준에 대한 산초 종자유의 영향	118
그림 81. OVA 유발 쥐의 기도과 반응성에 대한 산초 종자유의 효과	119
그림 82. 산초 종자유가 OVA 유발 마우스 폐 조직의 병리학 적 변화에 미치는 영향	120
그림 83. BAL에서 총 세포 및 분화 세포 성분에 대한 산초 종자유의 영향	120
그림 84. 산초유 항 천식조절 세포기전 연구 체계	121
그림 85. BAL에서 총 세포 및 분화 세포 성분에 대한 산초 종자유의 영향	121
그림 86. OVA로 유발 된 마우스의 사이토 카인의 단백질 수준에 대한 산초 종자유의 영향	122
그림 87. Pilot scale에서의 품종별, 착유방법별 산초유 수율 (ml/kg)	123
그림 88. Pilot scale에서의 산초유 착유 공정	124
그림 89. 원료 종류별 유압압착 산초유 수율	125
그림 90. 원료 종류별 엑스펠러 산초유 수율	125
그림 91. 후보산초에서 개발한 산초유 착유기	125

8. 본문

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목적

가. 연구개발의 최종목표

구분	내용
최종 목표	- 산초유 기능성원료 개별인정 기반연구 및 산업화 기술개발
세부 목표	- 산초유 기능성원료 개별인정 기반연구 및 산초유 효능 검증 - 산초유 기능성분 규격 및 시험방법 확립, 원료 특성 구명

2. 연구의 필요성

가. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

(1). 기술적 필요성

(가) 연구수종 : 산초나무

- 산초나무는 운향과에 속하는 낙엽관목으로 높이가 3m에 달하고 줄기와 가지에 탁엽이 변해서 된 가시가 호생하고 있어 대생하고 있는 초피나무와 구별하고 있으며, 소엽은 13~21개로 끝이 뾰족하고 특유의 향기가 있어 나무주변에 모기가 모이지 않는다고 함 또한 암수나무가 다른 자웅이주로서 종자결실은 암나무에서만 됨. 꽃은 8월~9월에 새 가지 끝에서 피며 열매는 10월 중순경에 성숙함
- 산초나무는 각종 신미, 정유성분 및 유지가 함유되어 있어 예부터 동북아시아에서 가장 오래된 전통적인 향신료, 약용, 제유용으로 널리 이용되어져 왔음.
- 특유의 향과 맛을 지닌 산초나무 종실에서 착유한 산초유(산초기름)는 에너지원이나 대사조절물질로서 뿐 아니라 식품의 맛이나 향 또는 포만감을 결정할 수 있는 중요한 지방질원임.
- 산초나무속의 생리활성에 관한 연구로는 항당뇨, monoamine oxidase(MAO) 억제활성, 지질과산화 억제활성 DPPH radical 소거 활성, 아질산염 소거 활성, inhibit hepatitis B virus(HBV) DNA application 저해활성, 항혈전 등의 활성이 보고되어 있음.
- 이처럼 산초나무 잎, 열매 추출물에 대한 생리활성 연구는 일부 이루어져 있으나, 산초유의 기관지, 천식에 대한 효능은 민간요법으로만 널리 이용되고 있으나, 과학적인 근거자료는 전무한 실정임.



그림 1. 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium*)

표 1. 산초의 민간요법

효능	민간요법
천식	- 아침저녁 공복에 찻 숟가락으로 한 숟갈씩 먹거나 뜨거운 밥에 비벼 먹는다.
위염	- 공복에 한 두 스푼씩 아침저녁으로 먹거나, 식사할 때 밥에 비벼 먹는다.
소화불량	- 산초주를 담아서 먹는다.
비염	- 산초가루를 국에 타서 꾸준히 먹는다. - 산초기름에 산초가루를 개어서 환으로 만들어 먹는다. - 산초기름 한 수저에 산초가루를 뿌려서 함께 먹는다. - 공복에 산초기름을 먹는다.
대장암	- 다시마를 산초기름에 튀겨서 부각으로 만들어 꾸준히 먹는다.
불면증	- 산초기름을 먹는다.
산후풍	- 공복에 하루 두 스푼씩 복용하면 충분하다.
안검연축	- 산초주를 담아서 수시로 먹는다. 2회 정도 담가 먹으면 낫는다.
변비	- 산초기름을 먹는다.

- 산초나무는 한국에 자생하는 식물로 산초열매에서 착유된 산초유가 민간요법으로 폐혈관, 기관지, 천식질환 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있어, 과학적 검증을 통한 산초유의 유효성 구명이 요구됨
- 산초의 유용자원화를 위해서는 식의약처 건강기능성 식품 원료로 등재하여야 하나 이에 대한 기초 자료는 미비하며, 본 연구를 통해 인정기반 구축

(2) 경제적 필요성

- 고소득 작목으로 발전 가능성 매우 높은 전통적 유지자원 발굴 및 안전성 검증을 통한 임가 소득 증대
 - 시중에서 산초유 1리터에 20~30만원으로 고가에 거래되고 있으나, 산초유를 단순히 복용하는 수준이어서 유지자원으로써 다양한 이용기술개발 필요함
 - 산초유는 불포화지방산이 풍부하여 건강에 매우 유익하며 안전성 검증을 통해 식용 유지자원으로써 가치 확립
- 품질기준 및 복용량 구명으로 산초유 산업화 기반 구축 필요
 - 산초유 복용량, 품질기준 등의 미 설정으로 산업화를 위한 품질기준, 산업화 공정(수확, 착유, 저장, 유통 등) 체계 확립이 필요

(2). 사회적 필요성

- 고령화 및 생활습관의 변화로 인한 폐혈관 질환의 발병 위험의 증가와 미세먼지, 황사 등으로 인해 기관지, 천식 등 호흡기 관련 환자가 늘어나고 있는 추세임
- 따라서 부작용이 적은 천연물 유래 기능성 원료(식품)의 개발이 필요함
- 국민복지 차원에서도 효능이 높은 천연물의 개발이 필요

3. 연구개발범위

세부과제	개발내용	주관 연구기관
산초유 표준화 및 기능성원료 개별 인정을 위한 기반 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 자료수집 ○ 최적 제조방법 확립 ○ 원료의 특성 연구 ○ 안전성 구명 ○ 산초유 산패도 및 저장성 연구 ○ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립 ○ 원료의 특성에 관한 자료 구축 ○ 섭취량, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 구축 ○ 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인 ○ 산초유 산패도 및 저장성 연구 ○ 안전성 연구 ○ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립 ○ 건강기능성 원료 인정을 위한 기반 보고서 작성 ○ 산초유 산패도 및 저장성 연구 	(1세부과제) 경남산림 환경연구원
산초유 기능성분 규격 및 원료특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립 ○ 원료의 특성 연구 ○ 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립 ○ 산초유 원료 유전자 감별법 평가 및 검증 ○ 기능성분에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 작성 ○ 산초유 원료 감별체계 확립 및 유전자 마커 실용화 	(2세부과제) 한국한의학 연구원
산초유 기관지 천식효능 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 난황 알부민 천식 마우스 모델에서 효능 연구 방법 확립 ○ 난황 알부민 유발 천식 마우스 모델에서 항천식 효과 확인 ○ 예비연구에서 규명된 산초유항염증효과 기전에 대한 천식 동물 모델에서의 확인연구 ○ 산초유의 새로운 항염증 기전 발굴연구 ○ 스테로이드와의 항천식 효과 비교 연구 ○ 항산화제 및 새로운 기전 조절 양성 대조군과의 비교 연구 	(3세부과제) 전북대학교 산학협력단
산초유 생산 표준 공정 pilot scale 적용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산초유 표준공정의 pilot연구 ○ 산초유 산업화 연구 	(4세부과제) 우보산초 (참여기업)

<1세부 과제 - 산초유 표준화 및 기능성 원료 개별인정을 위한 기반연구 >

- 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 자료수집
 - 국내외 고문헌, 논문 등 서지자료 수집
- 최적 제조방법 확립
 - 원재료부터 단위공정별 제조방법 구명
 - 건조, 정선, 전처리, 착유공정별 설명서 작성
 - 주요공정별 수율 변화 확인
 - 착유, 자연정지 여과후 등 공정별 수율 변화 비교
- 원료의 특성 연구
 - 원료를 특정지을 수 있는 성상, 물성 등 (점도, 색도, 과산화물가 등 분석)

산패도측정

Determination of Rancidity

KOH activity = $\frac{\text{Benzoic acid (g)} \times 1000}{0.1 \times 122.13 \times 0.1\text{N KOH (ml)}}$

Rancidity = $\frac{[V1-V0] \times 5.611 \times \text{KOH activity}}{\text{Sample (g)}}$

(1) Ether. Ethanol 2:1 solution
 (2) 0.1N KOH solution
 (3) 1% phenolphthalein-EtOH solution

- Determination 1g oil
- Input 20ml (1) solution
- Input 17ul (3) solution
- Neutralization by 0.1N KOH
- Calculate Rancidity

KOH의 측정



비중 측정

Specific gravity

- Compensation of pipet
- Calibration of electronic balance
- Determination of oil specific gravity



조지방 함량 측정

Determination of crude fat content

- Input 2g oil in the 50ml conical tube
- Input 25% ammonia water 1ml
- Input 95% EtOH 5ml
- Input 15ml ether
- Input Petroleum ether 15ml
- Wait the delamination
- Weight the 50ml conical tube
- Supernatant transfer into weighted tube
- Dry, 60 °C dryoven for 24hr

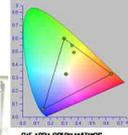
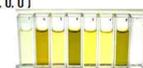
Vertexing

색도 및 색도의 변화 측정

Color change by treatment

- Raw material - Degummed oil - Deoxidized oil
- Picture oil in the cell (8500k white LED illumination)
- Calibration of LAB (White standard: 100. 0. 0)
- Determination of color difference
- CIE Chromaticity diagram calculate

$\sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$

CIE 1931 COLOR MATCHES

- 안전성 구명
 - 섭취근거 자료 수집
 - 고서, 산초유 섭취 관련 국내외 논문 자료 수집
 - 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안정성 검색 정보
- 산초유 산패도 및 저장성 연구
 - 공정별 산패도 비교, 산패 원인 탐색
 - 산패 원인 탐색 : 착유공정, 지방산함량 비율 등
 - 산초유 저장성 연구 및 유통기한 설정 자료 확보
 - 산초유 저장성 연구 및 유통기한 설정 자료 확보
- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립
 - 중금속(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거
 - 식약처 중금속 분석방법에 의거 분석
 - 산초유의 식의약처 식용유지 규격 검증
 - 산가, 요오드가, 에루수산 검출여부
 - 식약처 규정의 유해물질 검증
 - 벤조피렌 검출 여부 분석

- 원료의 특성에 관한 자료 구축
 - 영양성분 정보자료(건강기능식품의 영양성분 함량 기준 확인)
 - 식용유지류(포화지방20.g이하, 트랜스지방2.0g이하, 당류15.0g이하, 나트륨 400mg이하)
 - 식약처 인정 분석법 적용

- 섭취량, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 구축
 - 섭취량, 섭취방법 및 근거
 - 섭취량 관련 고문헌, 국내외 논문 자료 정리
 - 산초유 복용 경험자 대상 섭취량, 섭취방법 설문조사
 - 섭취시 주의사항 및 근거

- 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인
 - 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부 확인
 - 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부 확인

- 산초유 산패도 및 저장성 연구
 - 산초유 저장방법 제안(포장법, 저장법, 저장온도 등)
 - 산초유 유통기한 설정 제안

- 안전성 연구
 - 섭취량 평가 정보
 - 영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보

- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립
 - 유해물질규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료
 - 곰팡이독소, 미생물 시험성적서 및 분석자료

- 건강기능성 원료 인정을 위한 기반 보고서 작성
 - 건강기능성 원료 인정을 위한 기반 보고서 작성

- 산초유 산패도 및 저장성 연구
 - 공정별 산패도 비교, 산패 원인 탐색
 - 착유공정별(엑스펠라, 압착) 산패도, 지방산함량 비교 등
 - 산초유 저장성 연구 및 유통기한 설정 자료 확보
 - 소포장(캡슐, 진공소포장), 유리병 산초유 산패도 비교 등
 - 저장온도별(-17℃, -10℃, -4℃, 4℃) 산초유 산패도 비교 등
(1개월, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월)

○ 산초유의 피부감작성 시험

1) 엑스펠라 추출 산초유

- 2017년 혼합 엑스펠라 산초유

- 시험물질 2017년도 혼합 엑스펠라 산초유의 급성 피부자극성 및 부식성시험을 11주령의 수컷 NZW계 토끼 3마리를 사용해서 검토
- 패치제거 후 1, 24, 48 및 72시간에 ‘Draize의 피부반응 평가표1)’에 따라서 피부반응을 평가하고, 1차 피부자극지수 (Primary Skin Irritation Index, P.I.I.)를 구하여 시험물질의 피부자극성 및 부식성을 판정

- 2018년 혼합 엑스펠라 산초유

- 시험물질 2018년 혼합 엑스펠라 산초유의 급성 피부자극성 및 부식성시험을 11주령의 수컷 NZW계 토끼 3마리를 사용해서 검토함
- 별도의 2마리에 1개의 패치를 4시간 반폐색접촉하여 Confirmatory test를 실시함.
패치제거 후 1, 24, 48 및 72시간에 ‘Draize의 피부반응 평가표1)’에 따라서 피부반응을 평가하고, 1차 피부자극지수 (Primary Skin Irritation Index, P.I.I.)를 구하여 시험물질의 피부자극성 및 부식성을 판정

<2세부 과제 - 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구(한국한의학연구원)>

○ 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립

- 원료소재 지표성분 확보

- 원료소재(산초유 및 열매)의 주요 성분 검색 및 확보

○ 원료의 특성 연구

- 원료소재 품질평가를 위한 분석법 설정

- 원료소재의 품질평가를 위하여 후보 성분에 대한 물질의 특이성 및 HPLC 예비실험 결과에 따른 동시분리 및 정량 가능성 등을 고려한 후 지표성분 선정
- 원료소재 표준화를 위한 HPLC 및 GC-MS 등을 이용한 분석법 설정

○ 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립

- 설정된 분석법에 대하여 직선성, 정량한계, 검출한계, 정확성 및 정밀성 등을 통한 분석법 검증

○ 산초유 원료 유전자 감별법 평가 및 검증

- 산초 원료 감별을 위한 유전자 마커 개발

- 산초 및 산초 유사종 국내외 다양성 확보를 위해 국내에 분포하는 산초 및 산초유사종인

산초나무, 초피나무, 개산초나무 및 중국에서 재배되고 있는 화초 유전자 분석용 기원식물 지역별 다양성 확보

- 유전자 분석용 수집 시료 genomic DNA 추출 및 정제: 수집된 산초류 식물 시료를 이용하여 최적 genomic DNA 추출조건 확립
- 범용성 DNA 바코드 부위 증폭 및 염기서열 분석을 통한 종 특이 염기서열 발굴 : 기존 DNA 바코드 rDNA-ITS 부위, psbA-trnH, *matK*, *rbcL* 등 다양한 DNA 바코드 유전자 부위 증폭

표 2. 산초 원료 감별용 유전자 마커 개발을 위한 primer

Barcode Gene	Primer Name	Prime Sequences(5'- 3')	Reference
rDNA-ITS	<i>ITS1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> 1990
	<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTGATTGATATGC	
<i>ITS2</i>	<i>ITS2-S2</i>	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	Chen <i>et al.</i> 2010
	F		
<i>matK</i>	<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTGATTGATATGC	Chase <i>et al.</i> 2007
	<i>matK</i> AF	CTATATCCACTTATCTTTCAGGAG	
<i>rbcL</i>	<i>matK</i> 8R	AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGA	Cuenoud <i>et al.</i> 2002
	<i>rbcL</i> F	ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC	
psbA-trnH	<i>rbcL</i> R	TCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG	Guo <i>et al.</i> 2011
	psbA3	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	
	trnH05	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	

<DNA Barcode 후보 유전자 부위 증폭용 범용성 Primer Sequences>

- 증폭된 염기서열 기반 종 특이 marker nucleotide 발굴을 통한 DNA 바코드 부위별 종 감별능 확인 및 검증: rDNA-ITS 부위, psbA-trnH, *matK*, *rbcL* 등 증폭된 DNA 바코드 염기서열의 종간 비교 및 종내 비교를 통해 종 특이적인 염기서열 발굴을 통해 종 감별용 marker nucleotide 확보

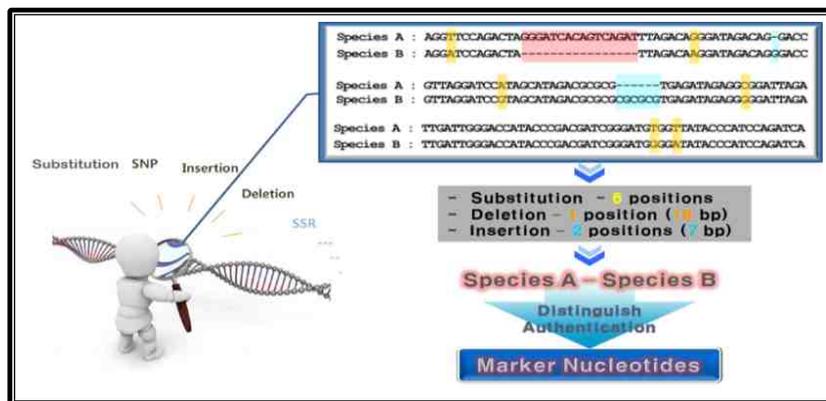


그림 2. 범용성 DNA Barcode 분석을 통한 기원 종 선별용 유전자 마커 부위 발굴

- 산초 및 산초 유사종 신속·간편 종 판별을 위한 DNA 바코드 기반 PCR 증폭용 유전자 마커 개발을 위해 PCR 증폭이 가능한 종 특이 primer 탐색 및 특이성 검증 : 산초 및 산초 유사종 DNA 바코드 염기서열 중간 비교를 통해 확인된 marker nucleotide 구간을 이용한 종 특이적 DNA 절편 증폭용 primer set 탐색 및 합성. 합성된 primer 조합들을 이용한 primer set별 종 특이성 검증

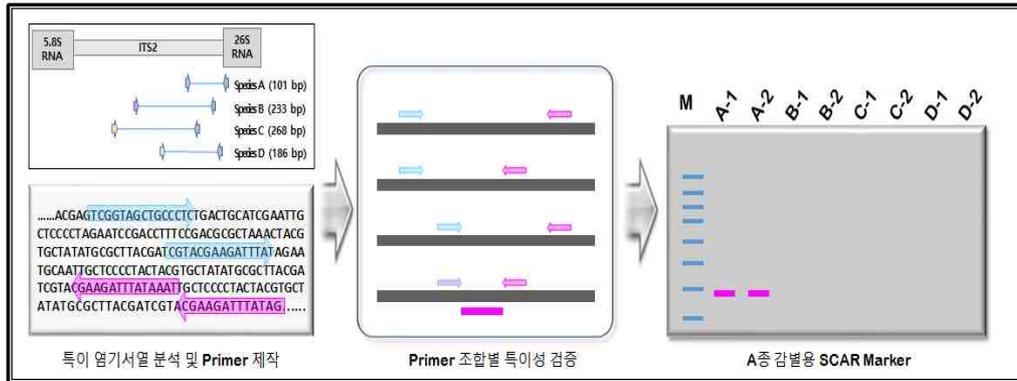


그림 3. DNA 바코드 기반 PCR 증폭용 유전자 마커 개발

○ 산초유 원료 감별체계 확립 및 유전자 마커 실용화

- 산초원료 유전자 검증 시스템 적용을 위한 키트 개발: 검증된 PCR 증폭용 유전자 마커를 기반으로 산초유 원료에 적용 가능한 PCR 증폭용 감별 Kit 개발



그림 4. 산초원료 유전자 감별용 키트 개발

- 산초원료 유사종 혼입 방지를 위한 형태학적 특성비교와 표준 유전자 감별 메뉴얼 작성을 통해 표준 기원 검증 기준(안) 작성

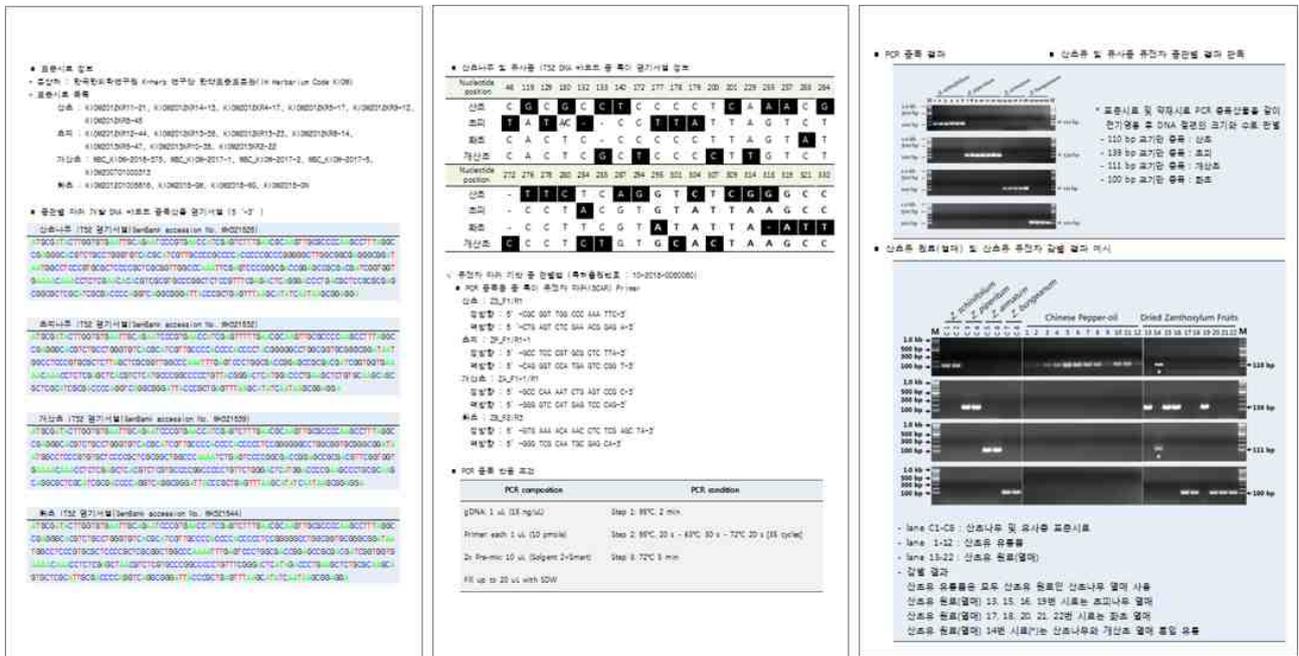


그림 5. 산초, 초피, 개산초 및 화초 등 4종 감별 가이드라인(안)

〈3세부 과제 - 산초유 기관지 천식 효능 연구(전북대학교산학협력단)〉

- 난황 알부민 유발 천식 마우스 모델에서 항천식 효과 확인
 - 난황 알부민 유발 천식 마우스 모델에서 항천식 효과 확인
 - BAL cell analysis 및 lung tissues Th2 cytokine 변화 확인
 - 기관지 과민성 변화 확인 (Flexivent 이용)
 - 조직검사를 통한 peribronchial&perivascular inflammation scoring 호전 여부 확인

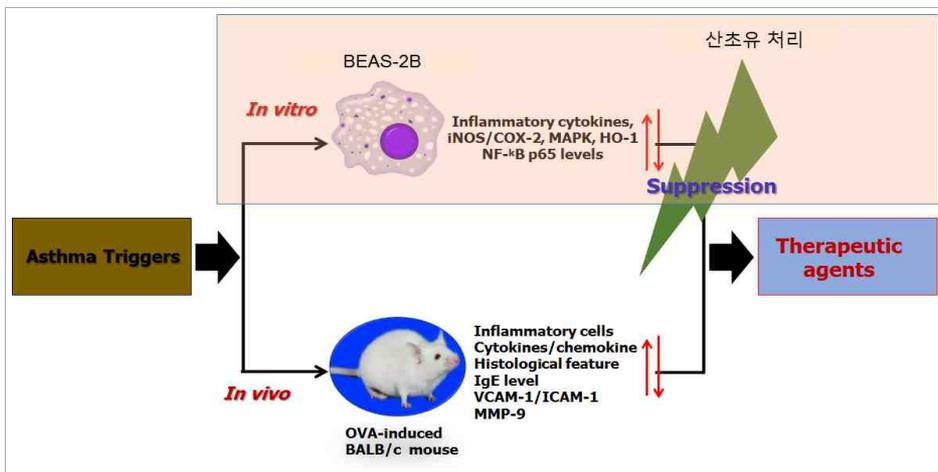


그림 6. 항 천식 모델 기반 산초유 유효성 연구 추진 체계

- 예비연구에서 규명된 산초유항염증효과 기전에 대한 천식 동물 모델에서의 확인연구
 - 천식 동물 모델에서 염증성 전사인자에 대한 효과 연구

- 천식 동물 모델에서 항산화 효과 확인 연구

- 산초유의 새로운 항염증 기전 발굴연구

○ 스테로이드와의 항천식 효과 비교 연구

- BAL cell analysis 및 lung tissues Th2 cytokine 변화 확인

- 기관지 과민성 변화 확인 (Flexivent 이용)

- 조직검사를 통한 peribronchial&perivascular inflammation scoring 호전 여부 확인

○ 항산화제 및 새로운 기전 조절 양성 대조군과의 비교 연구

- BAL cell analysis 및 lung tissues Th2 cytokine 변화 확인

- 기관지 과민성 변화 확인 (Flexivent 이용)

- 조직검사를 통한 peribronchial&perivascular inflammation scoring 호전 여부 확인

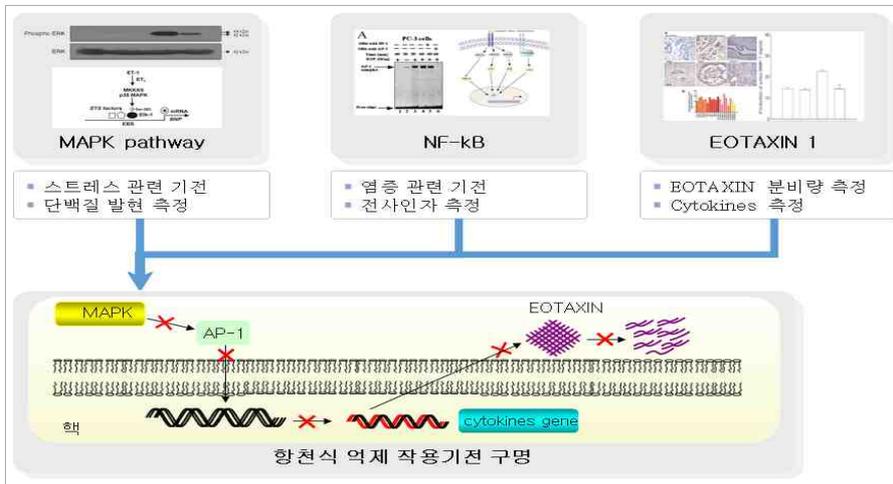


그림 7. 산초유 항 천식조절 세포기전 연구 체계

<4세부 과제 - 산초유 및 제품 표준공정 pilot 적용연구(우보산초)>

○ 산초유 표준공정의 pilot연구

- 연구실에서 구명된 최적조건을 pilot scale에 적용하여 수율 및 물리화학적성을 분석

- 2세부과제 표준공정 연구 재료 수급 및 원료 공급

○ 산초유 산업화 연구

- 산패에 안전한 산초유 캡슐 제조

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

- 산초 열매 추출물에 대한 생리활성, 기능성 연구는 일부 있으나 민간요법으로 널리 알려져 있는 기관지 천식에 대한 산초유의 효능 연구는 전무한 실정임
- 최근 일부 메스컴을 통해 산초유가 소개되어 민간에서 산초유 수요가 증가하는 추세임, 그러나 열매 수확부터 착유, 저장, 유통, 산초유에 대한 품질기준 등 규격화 및 산업화를 위한 표준공정은 전무한 상태임
- 우리나라에는 산초속 식물로 머귀나무류 2종(머귀나무, 쯤머귀나무)과 산초나무류 4종(산초나무, 초피나무, 왕초, 개산초) 1품종(민산초나무)이 서식하는 것으로 알려져 있으나, 민산초나무는 산초나무와 종내 품종관계이며 왕초피나무는 남해안 및 제주의 극히 제한된 지역에서 서식하여 개체수가 많지 않은 것으로 보고됨. 또한, 국내에서는 서식하지 않지만 중국으로부터 수입되는 산초(山椒) 열매의 상당수가 화초여서 유전자 감별 대상종으로 설정하는 것이 필요함.
- 산초유의 경우 기원종이 형태가 유사한 같은 속의 초피나무, 개산초 열매와 중국에서 한약재 천초로 사용하는 화초 등 유사한 기원종의 원료가 채취, 생산, 수입 등의 경로를 통해 산초로 혼·오용되어 산초유의 품질과 유효성에 영향을 미칠 가능성이 매우 높음
- 산초유는 식물성 유지에 많이 존재하는 것으로 알려진 불포화 지방산은 다양한 생리활성을 가지며, 특히 linoleic acid는 필수지방산으로 비타민 F로 불리어지며 γ -linolenic acid(18:3) 및 arachidonic acid(20:4)의 생합성 전구체로 알려져 있음. 또한 방광섬유종, 동맥경화를 비롯한 세포경화 방지, 피부염의 개선 및 당뇨 개선³⁴ 등 다양한 기능이 알려져 있으며, 또한 체내 지방을 연소시켜 체중을 감소시키는 기능이 탁월한 것으로 알려진 고 기능성 지방산임.
- 산초 정유성분이 식중독균에 대한 항균 활성 연구에서 gram 양성, 음성균 모두에 대해 탁월한 항균 효과가 있는 것으로 보고하였고, 또한 산초나무속 식물 성분들의 침파리에 대한 기피력 및 살충활성 연구도 이루어졌음. 산초나무 열매로부터 살충활성 물질의 분리연구도 수행되었음. 또한 산초나무 열매는 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있는데 산초나무 열매 추출물에 대한 페놀성 및 플라보노이드 성분 연구도 보고되어 있음.
- 산초 추출물은 사염화탄소를 투여한 마우스 간조직의 지질과산화 정도를 절반이상으로 감소시켰다는 보고가 있음. 또한 산초나무 뿌리, 줄기 및 잎의 분획물 중에서 잎의 ethyl acetate층이 지질과산화 억제효과 및 DPPH radical 소거 작용이 가장 높았으며, APTT의 측정의 경우 산초나무 뿌리의 n-butanol층에서 가장 높게 나타났음. 이상의 결과로 산초나무의 항산화 및 항응고의 생리적 작용을 검정할 수 있음.

- 최근에는 산초나무 종자에서 추출한 정유물질이 국부마취 및 진통작용이 있다고 보고되었고, 항균 효과는 대장균, 적리균, 구균류, 디프테리아균, 황색포도상균, 피부사상균 등에 억제작용이 있는 것으로 보고되고 있음 그러나 대부분의 선행연구들이 열매 추출물에 대한 성분분석과 생리활성 검정이 주를 이루고 있고 산초유 유지 자체에 대한 연구는 매우 미비함.
- 따라서 산초유의 기관지, 천식 효능에 대한 연구 및 산초유의 기능성분 발굴 등이 매우 필요한 실정임.

1. 산초관련 논문 동향

- 연구 과정에서 산초나무 및 산초유의 3P분석을 수행하여 논문 자료 등을 수집하였음. 산초나무 및 산초유의 3P분석을 수행한 결과 2007년부터 연구논문이 급증하였고, 농업 식품 잡지에서 발표가 됨. 연구자는 한국, 중국 과학자들이며 전남대, 카톨릭대, 강원대 순으로 논문 수가 많았음. 연구자는 한국이 압도적으로 많고 다음으로 중국이었음. 분야로는 생화학, 농학, 약리학, 화학들의 잡지에서 주로 게재되었음을 확인함

2. 산초관련 특허 동향

- 특허자료를 수집함. 산초나무 특허는 309건이 1998년부터 등록되었고, 2008년에 급증하였다가 이후 주춤하다가 2013년 이후부터 급감하는 경향을 보임. 특허출원 기관은 (주)LG생활건강이 압도적으로 많고, 한국식품연구원, 동국대 등의 순이었음.

3. 산초관련 제품 동향

- 산초나무의 제품에 대한 정보도 파악함. 산초나무의 제품은 주로 산초열매, 차원료, 기름 등의 형태였고, 이용부위는 열매가 주를 이루고 목부, 종묘도 일부 시판되고 있는 것으로 조사됨. 원산지는 국내산이 많았으나 중국산 종자도 있었음. 제품의 가격의 단위는 각기 다르지만 4500-43000으로 다양하였고, 단위로는 300g 그룹은 270ml로 유통되고 있었음. 용도는 차, 피부미용, 건강기능성 식품 등으로 다양하였음

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 산초유 표준화 및 기능성원료 개별인정을 위한 기반연구

1. 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 자료수집

가. 동의보감 자료

○ (원문) 力秦椒

-분디여름又云鏞되性溫味辛(一云苦)有毒主大風痺堅齒髮明目療腹中冷痛止痢○秦地所出者故言秦椒樹葉及莖子都似蜀椒但味短實細色黃黑八九月採《本草》○出四川謂之蜀椒川椒出關陝謂之秦椒《入門》

○ 특이사항 : 민간 효능이 자세히 기재되어 있음

-진초(秦椒, 분지) : 성질이 따뜻하며[溫] 맛은 맵고[辛](쓰다[苦]고도 한다) 독이 있음. 문둥병으로 감각이 아주 없는 것을 낮게 하며 이빨을 든든하게 하고 머리털을 빠지지 않게 함. 눈을 밝게 하고 냉으로 오는 복통과 이질을 낮게 함

-진나라 땅에서 나기 때문에 진초라고 함 나무의 잎, 줄기, 열매는 모두다 초피나무와 비슷한데 다만 맛이 좀 못하고 열매가 잘고 빛이 검누른 색임 음력 8-9월에 탄다[본초].

-사천성에서 나는 것을 촉초(蜀椒), 천초(川椒)라 하고 관중, 협서에서 나는 것을 진초(秦椒)라고 함

나. 일본 자료(池田약초주식회사)

○ 특이사항 : 산초의 유효 성분과 효능이 기재되어 있음

-유효성분: 디펜 텐, 시트로 넬라롭푸르 등 향수. 러스티올, 러스티 아미드의 매운 맛.

-민간효능: 러스티올, 러스티 아미드의 매운맛 성분은 대뇌를 자극 해 내장의 기능을 활성화함. 산초(三商)는 괴로움(쿠미) 텅크의 원료이기도 향수 매운맛 성 건위, 정장제 등을 사용함. 산초(三商) 성분의 러스티올이나 산초 아미드는 대뇌를 자극하여 내장 기관의 기능을 활발하게 하는 작용이 있다고 되어 있고, 위장 기능 약해진 소화 불량이나 소화 불량이 원인으로 알려져 있음. 명치의 사용, 복부 냉증, 복부 가스의 정체 그에 따른 복통에 효과가 있음

-식용자료: 1 일 용량은 2 ~ 5 그램에서 0.3 리터의 물을 약 반까지 달여 1일 3회로 나누어 식후에 복용. 민간에서의 이용도 많은 종자는 이뇨(利尿)제로 15 그램을 적당량 달여 식간에 1 일 3 회 복용. 과일 8 그램을 약 0.6 리터의 물에 달여 하루 3 번에 나누어 복용 (위장병, 위하수 증, 胃擴張증, 구충 등)



그림 8. 일본의 산초 활용현황

다. 위키페디아 (백과사전)

○ 특이사항 : 외국자료이지만 동의보감에 대한 자료가 인용되어 있음

-쓰임새[편집]열매는 기름을 만드는 원료로 쓰고 식용 또는 약용함

-동의보감에서는 진초(秦椒, 분지)라고 하며, 그 유래와 효능을 다음과 같이 설명하고 있음

“진나라 땅에서 나기 때문에 진초라고 함 사천성에서 나는 것을 촉초(蜀椒), 천초(川椒)라고 하고-초피나무를 의미함-, 관중, 협서에서 나는 것을 진초(秦椒)라고 함. 효능은 따뜻하며(溫). 맛은 맵고(辛), 독이 있음 문둥병으로 감각이 아주 없는 것을 낫게 하며 이빨을 든든하게 하고 머리털을 빠지지 않게 함. 눈을 밝게 하고 냉으로 오는 복통과 이질을 낫게 함 ”

중국 음식[편집]중국의 쓰촨 요리에서 매운맛을 내는 화자오의 일종임 쓰촨 요리에는 산초 (*Zanthoxylum schinifolium*) 외에도 다른 초피나무속 열매(*Zanthoxylum simulans*, *Zanthoxylum bungeanum*)가 쓰임

라. 한국전통지식포털

○ 특이사항 : 산초의 효능에 대해 잘 기재되어 있음

-효능은 살충, 구충, 온중산한(溫中散寒), 제습지통(除濕止痛)

-주치병증은 구토, 산통, 설사, 심복냉통, 음양, 이질, 적식정음, 치통, 풍한습비, 해수기역, 회애 등

마. 분석정보 : 산초나무 관련 화합물은 총 12건으로 대부분 추출물에 대한 것임.

○ 특허검색서비스 키프리스 검색 결과 2015년 이전에 산초유 관련 특허는 골다공증 예방 조성물과 아토피 개선용 화장품 조성물 특허 2건만 있고, 대부분 산초 추출물에 대한 특허였음.

○ 2015년부터 산초유 관련 특허가 출원되기 시작하여 현재 동맥경화 예방 조성물, 항비만용 조성물, 안구건조증 개선 조성물 특허가 등록된 상태로 산초유가 기능성 식품 및 원료로 인정받고 있는 추세임.

○ 문헌 수집 및 분석 결과 산초는 오래전부터 민간에서 매우 다양하게 이용되어 왔으며, 최근 기능성성분 등의 연구는 상당히 수행되어 향후에는 산초유의 추출기준, 유통상 안정성, 섭취 기준 등의 연구가 요망됨. 또한 민간의 다양한 효능을 과학적 구명을 통해 밝히는 것이 중요할 것으로 판단됨

특허명	출원일	등록일	출원인
산초 열매유를 함유하는 동맥경화 예방 또는 개선용 식품 조성물	15.02.24	16.04.06	주식회사 한빛탈료
효소 및 저온가온 기법을 이용한 산초기름의 제조방법 및 이를로부터 제조한 산초기름을 함유하는 항비만용 조성물	15.07.07	16.11.29	주식회사 한빛탈료
산초씨유를 함유하는 안구건조증 개선용 위한 약제학적 조성물	16.02.05	17.04.18	연북대학교 병원
산초유 함유를 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물	11.12.19	13.10.8	덕양여자대학교 산학협력단
산초유를 함유하는 아토피피부 개선용 화장용 조성물	08.10.17	11.08.05	한국국제대학교 산학협력단

그림 9. 국내 산초 연구 및 특허등록현황

2. 최적 제조방법 확립

가. 원료의 수급

- 연구에 사용한 산초종자는 경상남도 밀양시 무안면 삼화길 53-11에서 산초원료를 수급하여 사용함

나. 원재료부터 단위공정별 제조방법 작성(건조, 정선, 전처리, 착유공정별)

(1) 산초유 전처리 공정

- 산초종자는 과피와 종자가 10~20% 벌어졌을 때 수확하는 것이 적당하며, 수확한 열매는 양건 1~5일 정도 양건하고 양건 시간은 최소화 필요
- 착유시 종자는 과피를 완전히 제거하여야 하며, 과피 함유는 산가를 높이고 품질 저하시킴
- 산초유는 제조방법은 위에서 압력을 가하여 착유하는 유압압착법과 기계를 회전시켜 종자를 잘게 부수어 착유하는 스크롤(엑스펠라) 방법이 있음.
- 유압압착은 볶음 또는 찜 전처리 종자 2~3Kg의 종자 착유시 7~10min 소요, 생 산초종자 착유시 10~15 min 소요
- 스크롤(엑스펠라) 착유는 5~6kg 생 산초종자 착유 시 30min정도 소요되며, 일정량의 산초종자가 계속 투입되면 유압압착법과 달리 연속적인 착유가 가능하여 산업화 적용시 유리함.
- 스크롤(엑스펠라) 착유방법이 산가가 낮고 기관지 천식 효능이 높은 것으로 나타나 최적 공정으로 판단됨.



그림 10. 산초유 착유 전처리 공정

(2) 산초유 착유 공정표 작성

(가) 유압압착법으로 산초유 착유

- 산초종자를 밀판 250℃, 물체온도 90℃, 볶음시간 1-5분, 찌는시간 1-2분으로 종자 전처리를 수행하며, 유압압착을 행함 전처리 종자와 생종자의 착유는 시간을 달리하여 비연속적으로 착유함



그림 11. 산초유 유압압착 최적생산 공정

(나) 스크롤(엑스펠라)방법으로 산초유 착유



그림 12. 산초유 스크롤(엑스펠라) 최적 생산공정

다. 주요공정별 수율 변화 확인

- 산초유 착유방법에 따른 수율 비교 결과 엑스펠라 착유가 유압압착 방법보다 수율이 더 높게 나타났음.
- 조생종, 만생종, 한초, 혼합 시료별 산초유 수율 비교 결과 조생종 보다는 만생종인 만생종(숙기-10월 중하순), 한초(숙기-10월 10일)의 수율이 높게 확인됨.
- 그러나 산초유 수율은 종자 상태에 영향을 많이 받으므로 적정한 채취 시기 준수가 수율에 영향을 많이 미치는 것으로 판단됨.

표 3. 품종별, 착유방법별 산초유 수율

No.	종자종류	착유방법	겉질포함유무(%)	로스팅 유무
1	조생종	유압압착	10	유
2	조생종	유압압착	-	유
3	조생종	엑스펠라	-	
4	만생종	유압압착	10	유
5	만생종	유압압착	-	유
6	만생종	엑스펠라	-	
7	한초	유압압착	10	유
8	한초	유압압착	-	유
9	한초	엑스펠라	-	
10	혼합	유압압착	10	유
11	혼합	유압압착	-	유
12	혼합	엑스펠라	-	

- 본 연구를 통해 산패 등의 문제점을 근원적으로 방지 또는 낮출 수 있는 원료 전처리, 착유법 별 최적공정표를 작성하였고, 특히 스크롤(엑스펠라) 착유법이 산가가 낮고, 천식효능이 가장 우수한 방법임을 구명함.
- 또한 품종과 채취시기도 매우 중요한 인자임을 구명함

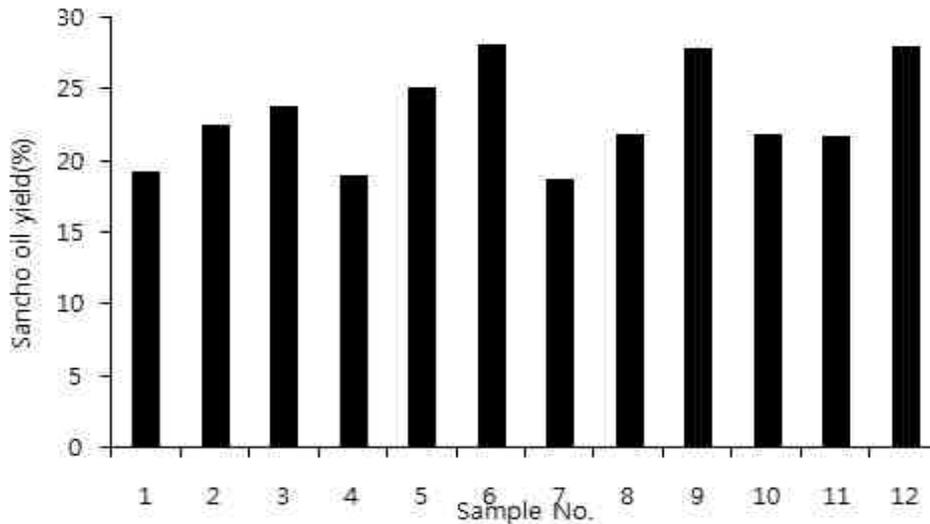


그림 13. 산초유 품종별, 착유방법별 수율

1: 조생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 2: 조생종 유압압착(로스팅), 3: 조생종 엑스펠라, 4: 만생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 5: 만생종 유압압착(로스팅), 6: 만생종 엑스펠라, 7: 한초 유압압착 10%(로스팅), 8: 한초 유압압착(로스팅), 9: 한초 엑스펠라, 10: 혼합 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 11: 혼합 유압압착(로스팅), 12: 혼합 엑스펠라

3. 원료의 특성 연구

가. 점도

(1) 4°C 저장 6개월 후 산초유 품종별, 착유방법별 점도 분석

- 4°C 저장 6개월 후 품종별, 착유방법별 산초유 점도분석결과 착유방법별 점도의 차이가 나타남. 1,4,7,10 샘플의 경우 과피가 10% 함유된 유압압착 착유법으로 점도가 가장 높게 나타나, 과피의 첨가가 품질을 저하시킨다는 것을 확인함.
- 유압압착법(2,5,8,11)과 스크롤(3,6,9,12) 착유법을 비교해보면 스크롤(엑스펠라) 착유법이 점도가 낮음을 확인
- 품종별 점도 비교 결과 조생종이 점도가 약간 높고 숙기가 늦은 만생종과 한초가 점도가 낮은 편이었음.
- 본 연구를 통해 조생종 및 만생종 산초유의 색도 및 점도 분석을 통해 품질 규격화, 고급화의 기초자료로 활용이 가능할 것으로 판단됨

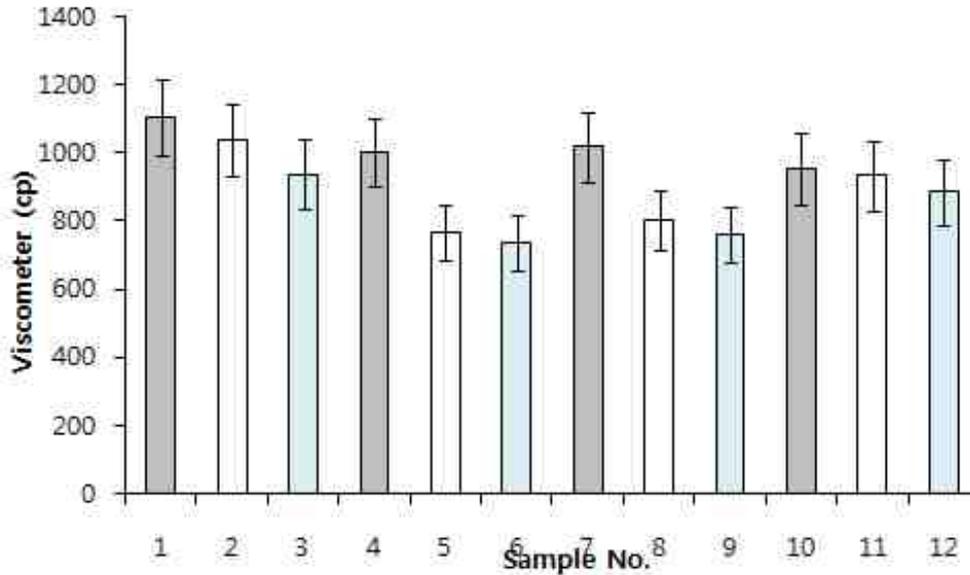


그림 14. 품종별 착유방법별, 로스팅유무에 따른 산초유의 점도

- 1: 조생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 2: 조생종 유압압착(로스팅), 3: 조생종 엑스펠라, 4: 만생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 5: 만생종 유압압착(로스팅), 6: 만생종 엑스펠라
7: 한초 유압압착 10%(로스팅), 8: 한초 유압압착(로스팅), 9: 한초 엑스펠라, 10: 혼합 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 11: 혼합 유압압착(로스팅), 12: 혼합 엑스펠라

나. 색도

(1) 품종별 산초유 저장온도별 색도변화 그래프

- 조생종, 만생종, 한초, 혼합 산초유는 저장온도가 4°C와 -17°C를 그룹으로 할 수 있는 유사한 색을 나타냈으며, 25°C 저장한 산초유는 산초유 색이 사라진 것을 확인함
- 조생종의 엑스펠라 착유와 유압압착은 밝기면에서 -17°C와 4°C의 저장 시 엑스펠라 착유가 더욱 높은 명도값이 유의미하게 나타났으나, 25°C에서 저장시 명도값은 유의적인 차이를 보이지 않음 a 값의 경우 -17도에 저장한 엑스펠라 산초유는 유압압착 산초유보다 유의미하게 낮은 결과를 보임 b값의 경우에는 -17°C, 4°C에서 유의미한 색차를 나타냈으며, -17°C의 경우 유압압착 산초유가 엑스펠라 산초유보다 높은 b값을 보인 반면, 4°C에서는 엑스펠라 산초유의 b값이 크게 증가하는 것으로 나타남
- 전체적인 색차는 -17°C가 4°C와 25°C를 비교하여 각각 69.44로 큰 차이를 보임 저장 온도가 낮을수록 색차는 증가하는 것으로 나타났으며, -17°C와 4°C의 색차가 4°C와 25°C의 색차보다 큰 것으로 나타남

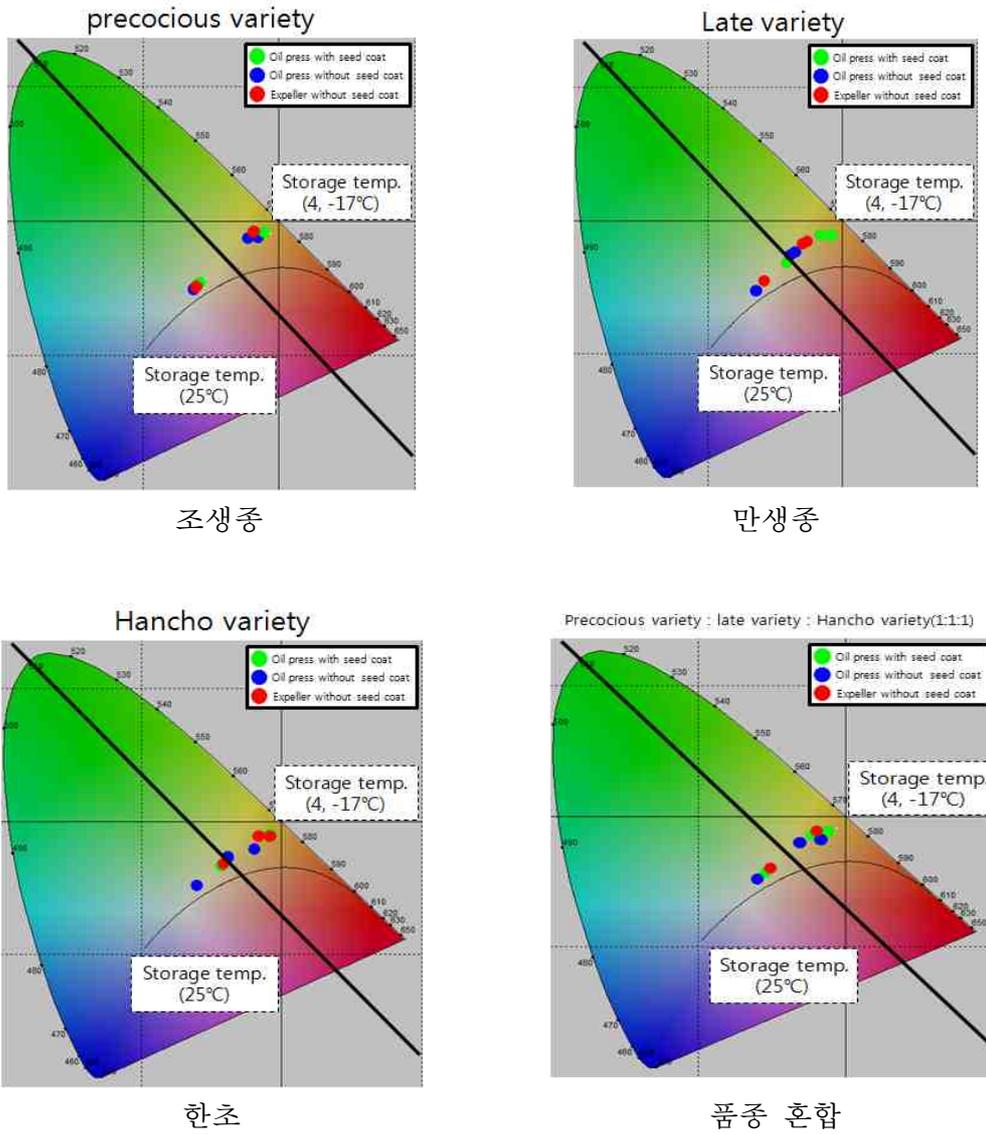


그림 15. 품종별, 착유방법별, 저장온도별 산초유의 색도 변화

표 4. 조생종 저장온도별, 착유방법별 색도 분석

Seed type	store temp.(°C)	Expression method	L	a	b	Color difference
	-17	Oil press	71.79 ± 1.64	4.85 ± 0.24	78.41 ± 3.73	69.44
		Expeller	84.36 ± 0.15	-2.39 ± 0.06	10.5 ± 0.04	
	4	Oil press	81.85 ± 0.51	-0.99 ± 0.4	79.1 ± 5.1	6.08
		Expeller	83.21 ± 0.06	-0.67 ± 0.04	85.02 ± 0.11	
	25	Oil press	91.82 ± 1.13	-0.05 ± 0.27	23.68 ± 3.2	0.82
		Expeller	92.22 ± 0.1	-4.78 ± 0.02	23.01 ± 0.28	

- 만생종의 저장온도별, 착유방법별 색도는 25℃에서 a값이 유의미한 차이를 보였고, b값은 -17℃, 4℃, 25℃에서 엑스펠라 착유방식이 유압압착보다 높은 수치를 나타내는 것으로 나타남
- 저장온도가 증가할수록 b 값은 감소하는 것으로 나타나 전체적인 색차는 -17℃는 13.48, 4℃에서는 7.84, 25℃에서는 6.54로 나타나 저장온도가 -17도가 4℃와 25℃보다 큰 것으로 나타남

표 5. 만생종 저장온도별, 착유방법별 색도 분석

Seed type	Storage temp. (°C)	Expression method	L	a	b	Color difference
	-17	Oil press	75.2±11.54	2.2±4.95	62.55±6.24	13.48
		Expeller	84.91±0.04	-1.61±0.02	71.09±0.03	
	4	Oil press	85.84±2.92	-3.48±0.6	60.73±7.32	7.84
		Expeller	87.17±0.02	-3.06±0.01	68.44±0.01	
	25	Oil press	92.88±1.19	-4.86±0.32	21.47±3.33	6.54
		Expeller	92.26±0.03	-6.17±0.01	27.85±0.04	

- 한초의 저장온도 및 착유방법에 따른 색차는 -17℃에서 유압압착과 엑스펠라 착유에서 유압압착이 엑스펠라 착유보다 유의미하게 높았으며, a값은 유압압착보다 엑스펠라 착유가 유의미하게 높은 것으로 나타남 b값은 25℃에서 유압압착보다 엑스펠라 착유가 높은 것으로 나타남 전체적인 색차는 4℃가 가장 높은 색차를 보임

표 6. 한초 저장온도별, 착유방법별 색도 분석

Storage temp. (°C)	Expression method	L	a	b	Color difference
-17	Oil press	64.18±0.83	7.1±0.06	66.81±10.59	6.44
	Expeller	60.43±0.12	7.47±0.03	72.03±0.09	
4	Oil press	79.72±7.38	0.42±3.24	63.94±12.65	14.16
	Expeller	74.34±0.17	2.89±0.08	76.8±0.01	
25	Oil press	84.6±7.69	-2.66±2.26	31.81±8.85	12.65
	Expeller	78.08±0.49	-0.94±0.2	42.51±0.22	

- 혼합 산초유의 저장온도 및 착유방법별 색도는 -17℃에서 유압압착방식과 익스펠라 착유방식이 Lab 값에서 모두 유의미한 차이를 보였으며, L값은 익스펠라착유가 유압압착보다 높았고, a값은 유압압착이 익스펠라 착유보다 높았으며, b값은 익스펠라착유가 유압압착보다 낮은 것으로 나타남 4℃의 경우 b값에서 익스펠라착유가 유압압착보다 유의미하게 높았으며, 25℃의 경우 L값에서 유압압착이 익스펠라 착유보다 높은 값을 보였고, b값에서 익스펠라착유가 유압압착보다 유의미하게 높았음
- 전체적인 색차는 -17℃에 저장한 산초유가 4℃나 25℃에 저장한 산초유보다 색차가 크게 나타남

표 7 혼합 저장온도별, 착유방법별 색도 분석

Storage temp. (°C)	Expression method	L	a	b	Color difference
-17	Oil press	67.82±1.95	6.64±0.49	69±7.74	62.45
	Expeller	87.27±0.06	-2.49±0.03	10.36±0.04	
4	Oil press	82.42±2.61	-0.28±1.04	67.03±5.25	11.26
	Expeller	80.18±0.13	0.62±0.05	78.03±0.01	
25	Oil press	89.34±2.55	-3.72±0.49	27.26±3.55	8.13
	Expeller	85.02±0.11	-3.34±0.02	34.14±0.11	

다. 과산화물가 (내용엔 산가)

- 생산자별, 착유방법별 산가를 착유 10일 후와 40일 후에 측정한 결과 유압압착방식의 하동 지리산산초가 우수함
- 산가변화가 가장 적은 생산자는 하동 지리산 산초로 유압압착식의 전처리를 하지 않은 생산초로 나타남

표 8. 생산자별, 착유방법별 산가 비교

	Acid value of 10days after oil extraction	Acid value of 40days after oil extraction
하동 ○○○산초(유압압착)	5.28±0	7.88±0.12
하동 ○○○산초(유압압착)	4.08±0.02	7.39±0.09
하동 ○○○(익스펠라)	5.06±0.01	8.95±0.37
하동 산초검은침전(익스펠라)	4.96±0.01	8.6±0.04
의령 유압압착(유압압착)	4.4±0	9.12±0.12

표 9. 품종별, 착유방법별 점도 비교

품종별, 착유방법	Viscosity(cp) of 40days after oil extraction
조생종 유압압착	87
만생종 유압압착	80.2
신품종 유압압착	90.1
혼합 유압압착	80.8
조생종 엑스펠라	74.8
만생종 엑스펠라	73.9
신품종 엑스펠라	91.1
혼합 엑스펠라	73.5

표 10. 생산자별, 착유방법별 점도 비교

산초유 원료	Viscosity(cp) of 40days after oil extraction
하동 지리산생산초(유압압착)	72.6
하동지리산산초(유압압착)	73.2
하동산초투명(엑스펠라착유)	75.6
하동산초검은침전(엑스펠라착유)	76.4
의령(유압압착)	75.2

- 착유 20일 후 산가가 가장 낮은 품종은 조생종 엑스펠라 착유로 나타났고, 50일 후 산가가 가장 낮은 품종은 만생종 엑스펠라로 나타남
- 가장 산가의 변화가 적은 산초유는 만생종 엑스펠라로 나타났으며, 산가의 변화량이 가장 큰 산초유는 신품종엑스펠라로 착유한 것으로 나타남

표 11. 품종별, 착유방법별 산초유의 산가 비교

	Acid value of 20days after oil extraction	Acid value of 50days after oil extraction
조생종 유압압착	8.43±0.02	11.27±0.06
만생종 유압압착	7.7±0.02	10.38±0.24
신품종 유압압착	5.4±0.01	12.08±0.06
혼합 유압압착	5.68±0.04	10.52±0.12
조생종 엑스펠라	3.82±0.01	7.95±0.07
만생종 엑스펠라	6.34±0.02	7.43±0.12
신품종엑스펠라	4.59±0.02	12.84±0.03
혼합 엑스펠라	5.3±0.01	7.25±0.16

4. 산초유 산패도 및 저장성 연구

가. 공정별 산패도 비교, 산패 원인 탐색

(1) 25°C 보관 6개월 후 정제공정별 산가 변화

- 정제공정을 거친 산초유의 산가는 Deoxidation과정에서 감소하는 것을 확인함 원료에서 탈검과정 까지는 산도의 변화가 없었으며, 탈산과정에서 산가는 더욱 낮아짐
- 가장 산도가 낮았던 품종과 방법은 10% 껍질포함한 종자를 로스팅하여 유압압착하는 방법이 산가가 가장 낮음

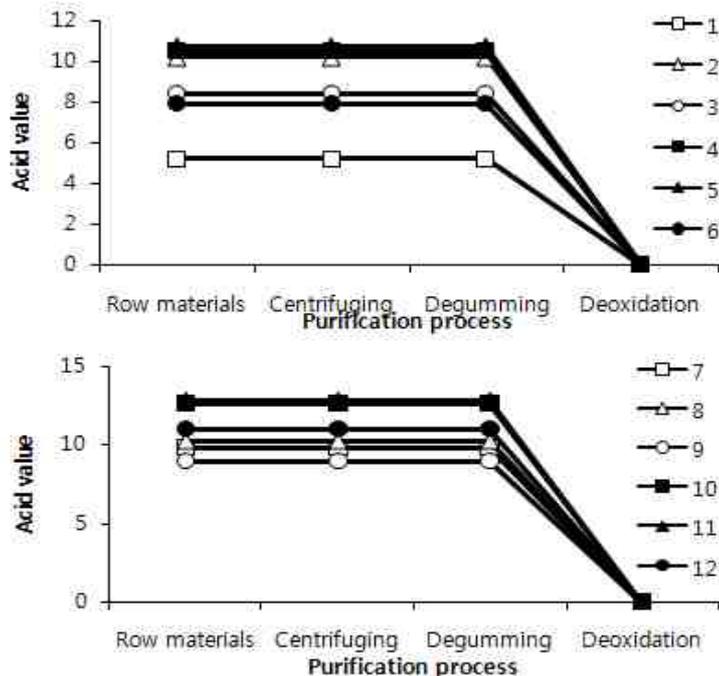


그림 16. 25°C 보관 6개월 후 정제공정별 산가 변화

1: 조생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 2: 조생종 유압압착(로스팅), 3: 조생종 엑스펠라, 4: 만생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 5: 만생종 유압압착(로스팅), 6: 만생종 엑스펠라, 7: 한초 유압압착 10%(로스팅), 8: 한초 유압압착(로스팅), 9: 한초 엑스펠라, 10: 혼합 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 11: 혼합 유압압착(로스팅), 12: 혼합 엑스펠라

(2) 4°C 저온보관 6개월 후 정제과정별 산가 변화

○ 4°C 저온보관한 산초유를 6개월 후 정제과정별 산가변화를 확인한 결과 Deoxidation 공정에서 착유방법이나 착유 전처리에 관계없이 산초유의 산가를 낮출 수 있음

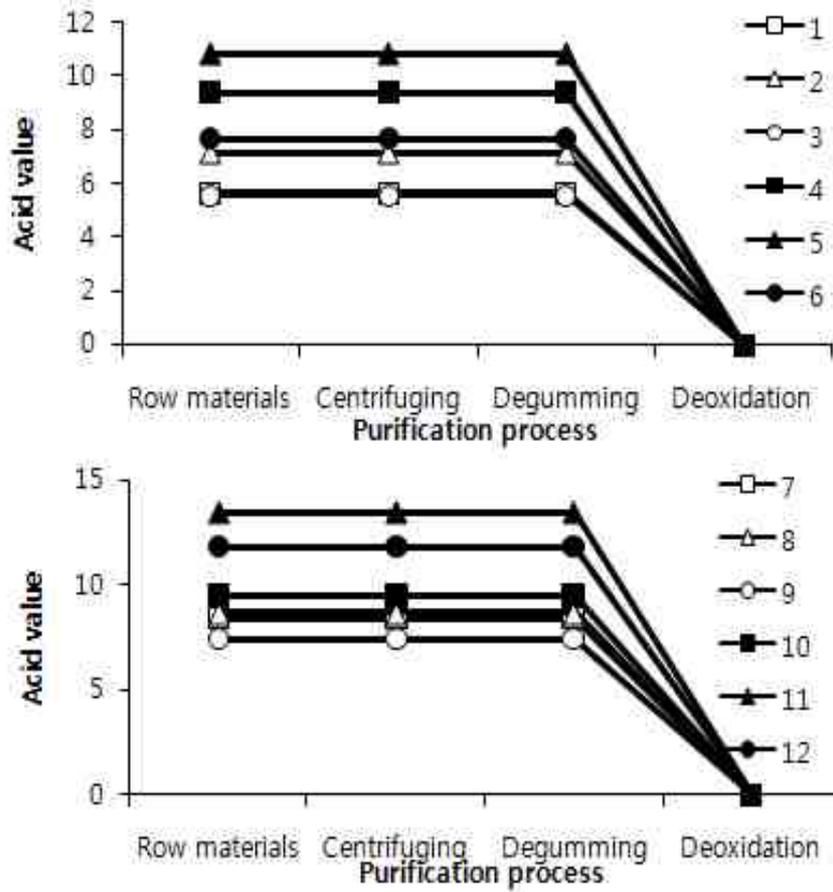


그림 17. 4°C 저온보관 6개월 후 정제과정별 산가 변화

1: 조생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 2: 조생종 유압압착(로스팅), 3: 조생종 엑스펠라, 4: 만생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 5: 만생종 유압압착(로스팅), 6: 만생종 엑스펠라, 7: 한초 유압압착 10%(로스팅), 8: 한초 유압압착(로스팅), 9: 한초 엑스펠라, 10: 혼합 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 11: 혼합 유압압착(로스팅), 12: 혼합 엑스펠라

나. 산초유 저장성 연구 및 유통기한 설정 자료 확보

(1) 산초유 저장성 연구

(가) 산초유 온도별 저장 6개월 후 산가 비교

- 산초유의 산가는 저장온도에 따라 민감하게 나타남
- 산초유의 산가는 온도가 높아질수록 증가하였고, 25°C 에서 가장 높게 나타남
- 산초유는 저장온도가 낮을수록 감소하는 것으로 나타남

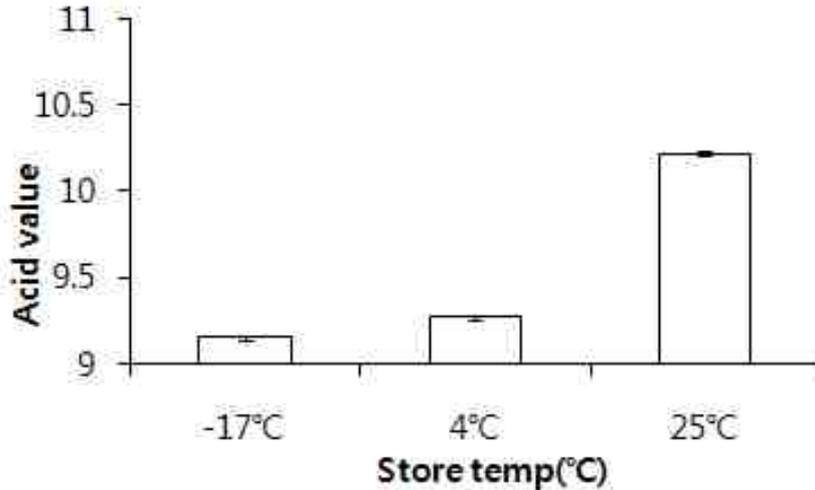


그림 18. 저장온도별 산초유의 산가변화

(나) 산초유 착유 6개월 후 정제과정상 손실을

- 산초유 공정별 산패도를 분석한 결과 품종별, 착유방법별 차이가 나는 샘플에서는 모두 원심분리, 탈검 과정은 산가를 낮추지는 못하지만 탈산 과정을 통해 산가를 낮출 수 있음을 확인함.
- 또한 미정제 산초유의 상온 저장 시 3~4개월부터 산가가 높아지기 시작하여 상온저장 6개월 후 산가 10 이상으로 상승함 그러나 정제과정상 산초유 손실율을 고려하면 원심분리, 탈검, 탈산 등의 정제공정의 필요성이 낮다고 판단됨
- 미정제산초유는 기관지 천식 효능 검증 결과 효능이 좋은 것으로 나타나 정제과정 유무에 따른 산초유 기관지 천식 효능 연구가 수반되어야 한다고 판단됨 제1세부과제에 구명된 결과는 산초유의 효율적 착유를 위한 최적원료, 저장성, 기관지천식 효능이 높은 추출방법, 저장성 향상을 위한 정제방법 등을 구명하여 산초유 생산의 표준화, 경제적 대량생산을 위한 기초자료를 확보하였다고 판단됨
- 현재 산초유의 유통기한은 생산초기 원료의 산패정도에 따라 달라지나 현재 기업의 기술로 생산된 산초유는 냉동유통 하였을 때, 최대 유통기한은 6개월로 판단됨
- 기존 기업의 기술로 생산된 산초유의 살균처리와 토크페롤과 같은 지용성 비타민 첨가 또는 발포비타민 제제를 사용할 경우 유통기한을 늘릴 수 있다고 판단됨

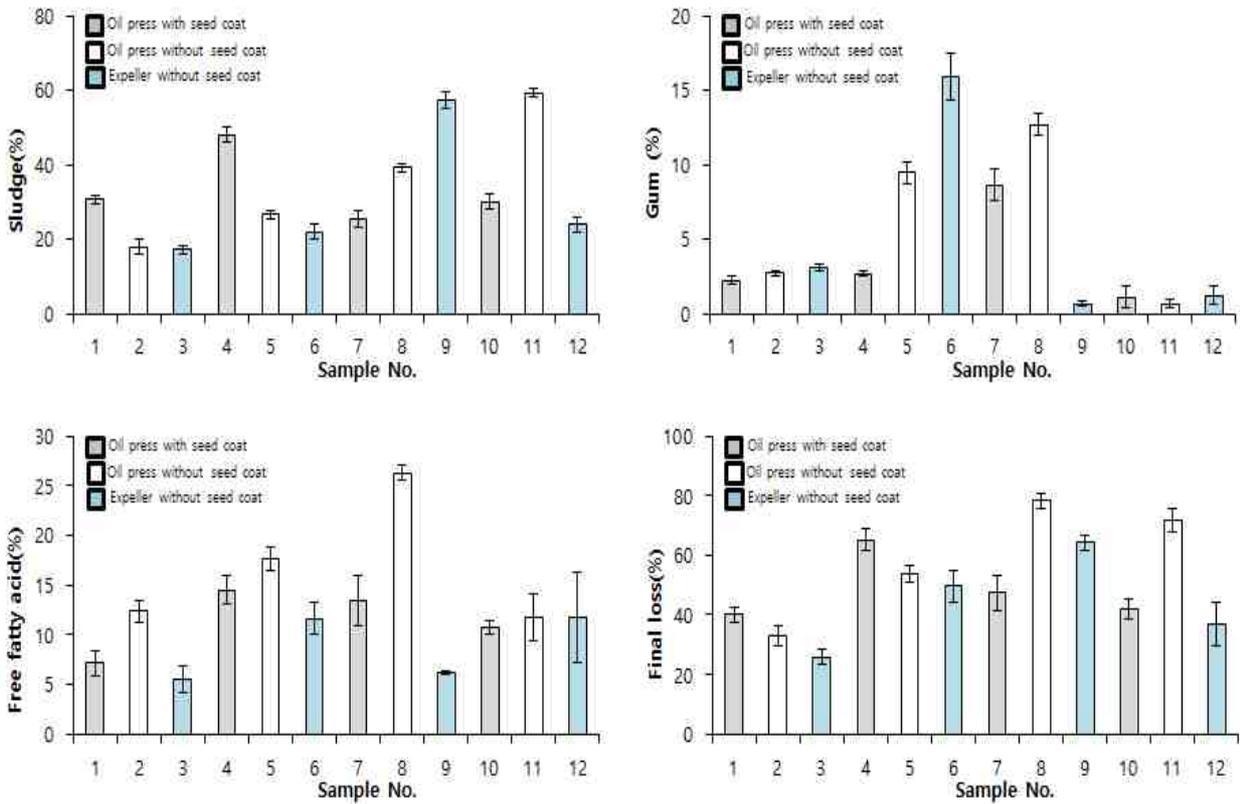


그림 19. 산초유 착유 6개월 후 정제공정상 손실율

(2) 유통기한 설정자료

- 미정제 산초유는 상온에 저장 시 2달 후부터 산가가 급격히 증가하기 시작하였고, 4개월 후에는 산가 10에 달함
- 산초유는 유통기한이 증가할수록 산화가 가속화됨

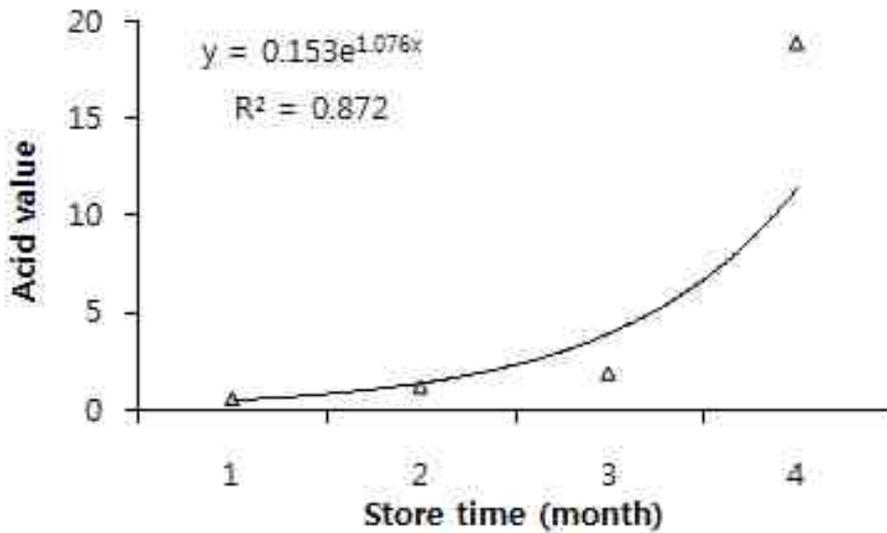


그림 20. 저장시간에 따른 미정제 산초유의 산가변화

(가) 착유 1주일 후 품종별, 착유방법별 산가 비교

- 착유 1주일 후 산가는 품종 간의 약간의 산가 차이를 보임 조생종의 경우 큰 차이가 없었고, 만생종의 경우 만생종 유압압착(로스팅)이 가장 산도가 높게 나타남
- 한초도 유압압착(로스팅)이 가장 산도가 높음 3품종이 혼합된 시료의 경우는 큰 차이를 보이지 않음

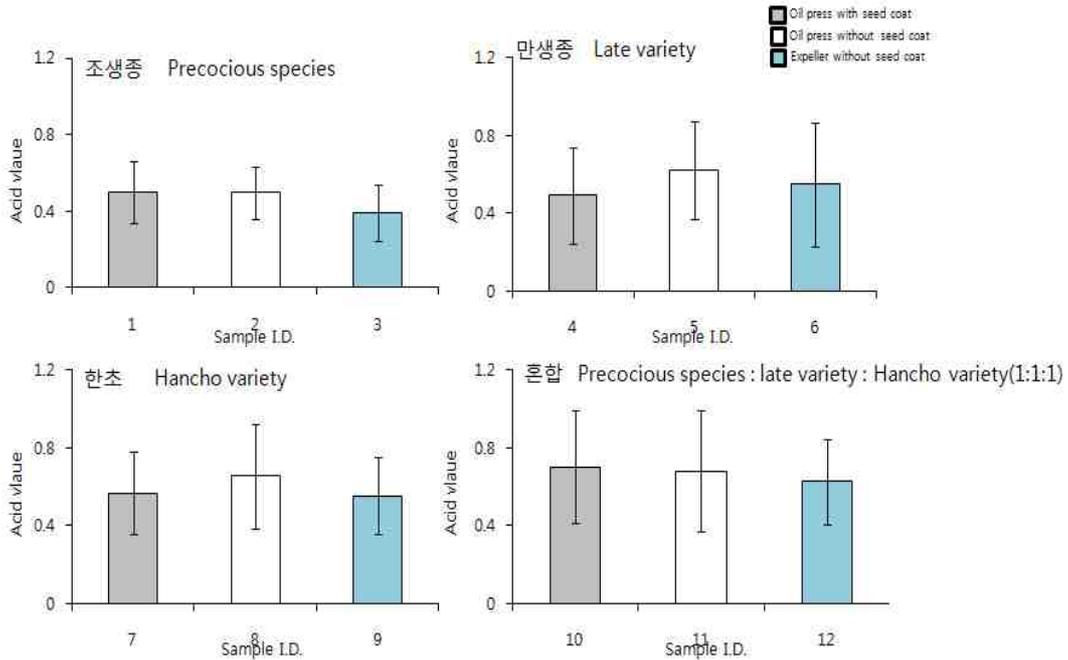


그림 21. 품종별, 착유방법별 산초유의 산가

- 1: 조생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 2: 조생종 유압압착(로스팅), 3: 조생종 엑스펠라,
 4: 만생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 5: 만생종 유압압착(로스팅), 6: 만생종 엑스펠라
 7: 한초 유압압착 10%(로스팅), 8: 한초 유압압착(로스팅), 9: 한초 엑스펠라, 10: 혼합 유압압착
 10% 껍질포함(로스팅), 11: 혼합 유압압착(로스팅), 12: 혼합 엑스펠라

(나) 착유 후 25℃ 6개월 저장 후 품종별, 착유방법별 산가 비교

- 착유 후 25℃에서 6개월 저장한 품종별, 착유방법별 산가 역시 약간의 차이를 보임
- 조생종의 경우 조생종 유압압착(로스팅)에서 가장 산도가 높았고, 나머지는 큰 차이가 없음
- 만생종의 경우에도 유압압착(로스팅)이 가장 높음 한초의 경우 추출방법에 따른 산가 차이가 없었고, 3종 혼합종도 혼합 유압압착(로스팅)이 가장 높음

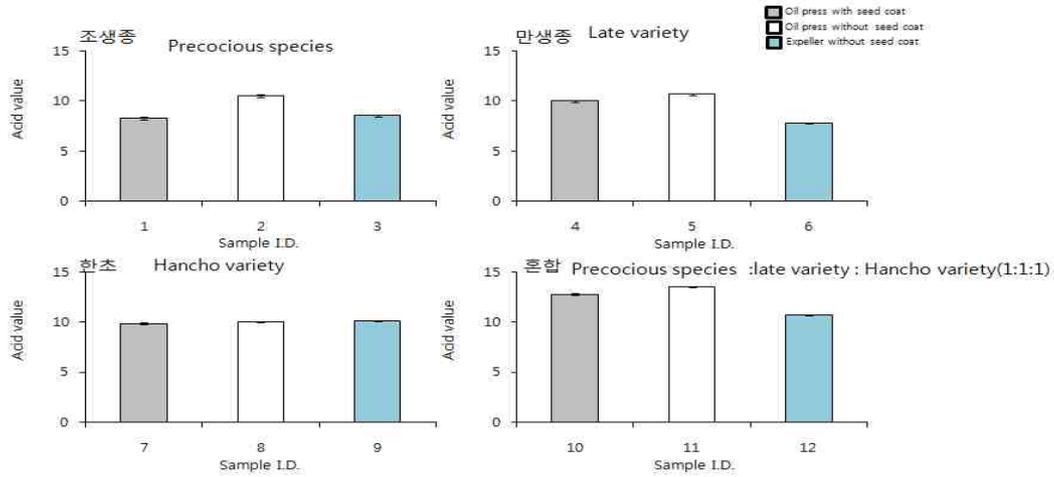


그림 22. 품종별, 착유방법별 산초유의 산가

1: 조생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 2: 조생종 유압압착(로스팅), 3: 조생종 엑스펠라, 4: 만생종 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 5: 만생종 유압압착(로스팅), 6: 만생종 엑스펠라, 7: 한초 유압압착 10%(로스팅), 8: 한초 유압압착(로스팅), 9: 한초 엑스펠라, 10: 혼합 유압압착 10% 껍질포함(로스팅), 11: 혼합 유압압착(로스팅), 12: 혼합 엑스펠라

(나) 저장온도별 산초유 산가 비교

- 본 연구를 통해 품종별, 착유방법별 산초유 산가 비교 결과 착유 후 1주에는 산가가 0.4~0.7 정도로 매우 낮았고, 조생종이 다른 품종에 비해 산가가 낮았음
- 착유 후 상온저장 시 6개월에 산가가 8~13 정도로 급변하였음을 확인하였고, 저장온도를 달리하여 저장기간별 산가를 분석해 본 결과 1주까지는 각기 다른 저장온도에서 산가의 변화가 낮았으나, 저장 13주~24주 사이에 급격히 산가가 높아지는 것을 구명함.
- 따라서 착유 및 유통과정 상 문제점을 최소화할 수 있을 것으로 판단됨.

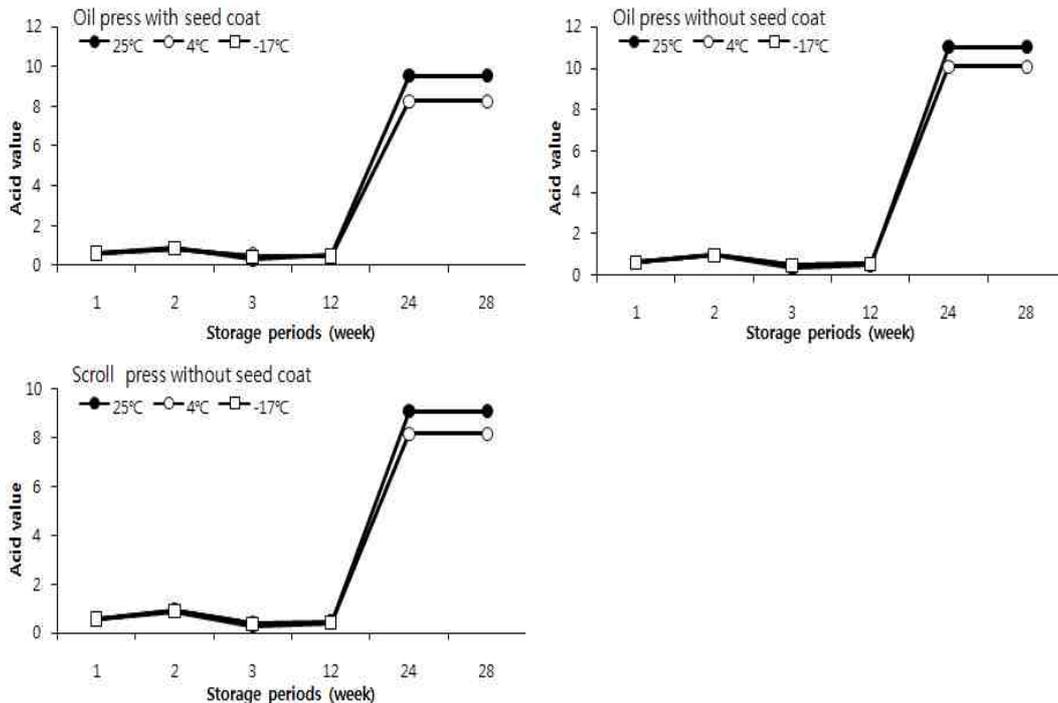


그림 23. 껍질포함, 미포함 유압압착과 엑스펠라 착유의 저장온도별 산가변화

5. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립

가. 중금속(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

- 중금속 검출 여부를 분석한 결과 혼합(조생종+만생종+신품종)시료의 유압압착된 시료의 경우 , 엑스펠라 착유 산초유, 신품종 엑스펠라(스크롤) 착유 산초유 모두 총 수은 함량은 검출되지 않음
- 그러나 모든 시료에서 카드뮴, 송비소, 납은 검출되지 않음

표 12. 중금속(총수은, 카드뮴, 송비소, 납) 검출 여부

시료명	총 수은 (mg/kg)	카드뮴 (mg/kg)	총 비소 (mg/kg)	납 (mg/kg)
혼합(조생종+만생종+신품종) 유압압착 착유	불검출	불검출	불검출	불검출
혼합(조생종+만생종+신품종) 엑스펠라(스크롤) 착유	불검출	불검출	불검출	불검출
신품종 엑스펠라(스크롤) 착유	불검출	불검출	불검출	불검출

나. 산초유의 식의약처 식용유지 규격 검증

(1) 산가 및 요오드가

- 요오드가를 확인한 결과 혼합(조생종+만생종+신품종)시료의 유압압착, 엑스펠라 착유 산초유, 신품종 엑스펠라(스크롤) 착유 산초유에서 각각 125.76, 123.58, 121.06으로 나타남
- 산가를 확인한 결과 착유 1개월후 산가가 혼합(조생종+만생종+신품종)시료의 유압압착, 엑스펠라 착유 산초유, 신품종 엑스펠라(스크롤) 착유 산초유에서 각각 6.78, 6.40, 6.43으로 매우 높게 나타남
- 2016년 생산 산초유의 경우 착유 2주부터 3개월까지는 산가가 매우 낮게 나타났으나, 2017년 산초유의 경우 산가가 4주 후에 매우 높게 나타나 산초유의 산가 균일성에 매우 어려움이 있을 것으로 판단됨 향후 산초유 생산을 위하여 탈검탈산 등 정제를 통한 산가조정 등이 필요할 것으로 판단됨

표 13. 산가 및 요오드가 확인

시료명	산가	요오드가
혼합(조생종+만생종+신품종) 유압압착 착유	6.78	125.76
혼합(조생종+만생종+신품종) 엑스펠라(스크롤) 착유	6.40	123.58
신품종 엑스펠라(스크롤) 착유	6.43	121.06

(3) 에루수산 검출여부

- 혼합(조생종+만생종+신품종)시료의 유압압착, 엑스펠라 착유 산초유 모두 에루스산 0.03g/100g 검출되었으며, 신품종 엑스펠라 착유 또한 에루스산 0.03g/100g 검출됨

표 14. 에루스산 검출 여부

시료명	에루스산 (g/100g)
혼합(조생종+만생종+신품종) 유압압착 착유	0.03
혼합(조생종+만생종+신품종) 엑스펠라(스크롤) 착유	0.03
신품종 엑스펠라(스크롤) 착유	0.03

다. .식약처 규정의 유해물질 검증

- 벤조피렌 검출 여부 분석
 - 벤조피렌은 불검출 되어 기타식용유지로 적합한 것으로 판단되었음(표 19)

6. 원료의 특성에 관한 자료 구축

가. 영양성분 정보자료(건강기능식품의 영양성분 함량 기준 확인)

- 혼합종 유압압착 산초유의 식품성분 분석한 결과 100g 당 열량이 897Kcal, 탄수화물, 당류는 함유되어 있지 않았으며, 지방 99.7g, 포화지방 16.6g, 포화지방 16.6g이었고, 트랜스지방은 미량검출되었음(표 3)

표 15. 혼합종 유압압착 산초유의 식품성분 분석

	분석결과(100g당)	단위
열량	897	Kcal
나트륨	6.7	mg
탄수화물	0	g
당류	0	g
지방	99.7	g
포화지방	16.6	g
트랜스지방	0.2	g
콜레스테롤	0.1	mg
단백질	0	g

○ 혼합종 엑스펠러 착유 산초유의 식품성분 분석한 결과 100g 당 열량이 896Kcal, 탄수화물, 당류는 함유되어 있지 않았으며, 지방 99.5g, 포화지방 16.1g이었고, 트랜스지방은 미량검출되었음

표 16. 혼합종 엑스펠러 착유 산초유의 식품성분 분석

	분석결과(100g당)	단위
열량	895.9	Kal
나트륨	7.8	mg
탄수화물	0	g
당류	0	g
지방	99.5	g
포화지방	16.1	g
트랜스지방	0.1	g
콜레스테롤	0.2	mg
단백질	0.1	g

7. 섭취량, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 구축

가. 섭취량, 섭취방법 및 근거

(1) 섭취량:

○ 민간에서 산초유를 천식에 사용하는 방법을 조사한 결과 ①껍질을 벗기고 뼈를 고른 명태 40g과 산초기름10g 의 비율로 섞어서, 2~3 개월간 두었다가 밥먹을때 밀반찬으로 한달동안 먹으면 충분한 효과가 있다고 하며, 소의 허파를 산초기름에 샤브샤브 해서 먹기도 함.

(2) 섭취량 관련 고문헌, 국내외 논문 자료 정리

동의보감 참고자료: 동의보감에는 촉초(蜀椒, 조피열매)라는 이름으로 속을 따뜻하게 하며 피부에 죽은 살, 한습비(寒濕痺) 등의 효과에 대해 언급하고 있음

十蜀椒

초피나모여름性熱味辛有毒(一云小毒)溫中主皮膚死肌寒濕痺痛除六府寒冷鬼 蠱毒殺盤魚毒除齒痛壯陽止陰汗煖腰膝逐小便下氣 在處有之樹高四五尺似茱萸而小有鍼刺葉堅而滑四月結子無花但生於葉間如小豆顆而圓皮紫赤色八月採實陰乾一名川椒一名巴椒一名漢椒 蜀椒皮肉厚腹裏白氣味濃烈凡使須去目及閉口者勿用合口者殺人微火熬之令汗出乃有勢力沃之取紅末用《本草》酒拌濕蒸入瓮陰乾勿見風《入門》 性寒味苦無毒(一云小毒)此藥只行滲道不行穀道所以下水最速 微炒用之《入門》 治奔豚伏梁氣及內外腎釣痛并譫亂轉筋蒸 《本草》

(3) 산초유 복용 경험자 대상 섭취량, 섭취방법 설문조사

- 천식 때 산초기름 4g을 생강차에 섞어 마신다고 하였음
- 한술갈(15g)을 가장 많이 섭취하는 것으로 조사됨
- 섭취방법: ① 식후 5분에서 10분후에 복용이 가장 많았음

8. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인

가. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부 확인

- 산초유는 식품공전에는 아직 건강기능성원료로 등재가 되어 있지 않음
- 그러나 오래전부터 민간에서 복용되어 왔고, 의서에도 식용한 것으로 기재되어 있어 추후 절차를 거쳐 건강기능성 식품 소재로 인증될 가능성이 높다고 판단됨

9. 산초유 산패도 및 저장성 연구

가. 산초유 저장방법 제안(포장법, 저장법, 저장온도 등)

(1) 포장법

- 빛은 가리고, 용기내 산초유는 가득 채워서 공기가 들어가지 않도록 포장하거나 산소제거 패치를 사용하여 산초유 포장 용기내 산소를 제거하여야 함
- 소비자는 산초유를 사용한 다음 소비자용 산초유 병마개를 사용하여 사용 후 병내부에 유입된 산소를 제거함으로써 산소에 의한 산초유의 산패를 방지할 수 있음

**산초유 탈산제 마개
(생산자용)**



**산초유 병 마개
(소비자용)**

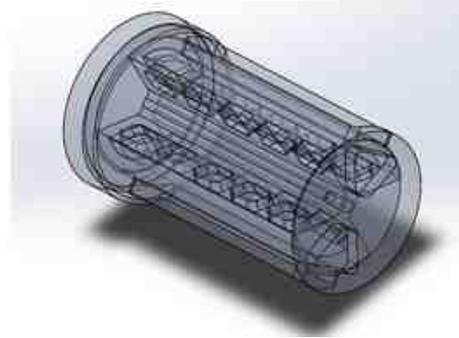
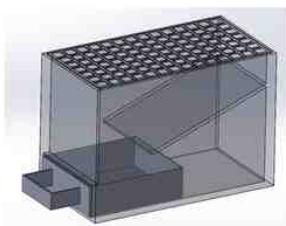


그림 24 본 연구에서 보안된 병마개(우측 특허 출원)

(2) 저장법

- 산초유를 생산하기 위한 종자는 종자가 탈각되었을 때, 빛과 열에 의한 종자표면의 산화를 방지하기 위하여 빠르게 회수해야 함
- 산초종묘를 생산하는 종자와 산초유를 생산하기 위한 종자는 용도에 맞게 따로 저장해야 하며, 산초유를 생산하기 위한 종자는 산소제거 패치를 사용하여 산소에 의한 종자의 산화를 방지해야 함 산초유를 생산하기 위한 종자는 -17도 압상태 저온저장하여야 함

**탈각된 종자회수를 위한
송이 건조대 (생산자용)**



**산초 종묘생산용
종자 저장 및 검사키트**



**산초유 생산을 위한
종자저장용 키트**



그림 25. 본 연구에서 보안된 병마개(특허 출원; 중앙, 우측)

본 연구를 통해 산초유 산패도 및 저장성 연구에 있어 산초유의 포장은 빛은 가리고 용기 내 산초유를 가득채워서 공기가 들어가지 않도록 포장해야하는 것으로 나타났고, 공기가 들어가 있다면 산소 저감패치를 사용하여 공기내 산소를 제거해야 하며, 소비자는 산초유를 사용한 다음 본 연구를 통해 출원한 산초유 병마개를 사용하여 사용후 유입된

산소를 제거하여 산가의 급등을 막을수 있음. 착유한 산초유는 저온저장하여야 하고, 착유 원료인 산초종자를 본 연구에서 제시한 산초종자 회수장치를 통해 관리한다면 산초유의 산가 급등문제를 억제할 수 있음.

(3) 착유법

기존의 엑스펠라 착유기는 이송 압축하는 과정에서 발생하는 압력이 격판 및 배출구를 통해 빠져 나감으로 착유기내의 압착력이 저하되어왔음. 곡물의 기름을 추출하는 착유부와 상기 추출된 기름이 배출되는 착유 배출부를 전방에 구성하여 곡물은 이송 스크류를 이용하여 후방으로 이송시켜 착유하여 압력을 발생시키고, 기름과 박을 분리할 수 있어 산초유의 생산에 필요한 착유압력을 증가시켜 저온압착이 가능하도록 개선하였음. 기존착유기의 문제점은 마찰열로 인한 온도상승으로 저온효과가 감소하며, 마력수와 스크류 종자끼임과정 선장치문제발생. 개선사항: 냉각기 설치로 저온효과유지, 마력수 상승 및 스크류교체, 정선장치 문제 해결함. 안전한 연속착유로 인한 산업화에 최적함 착유가능함

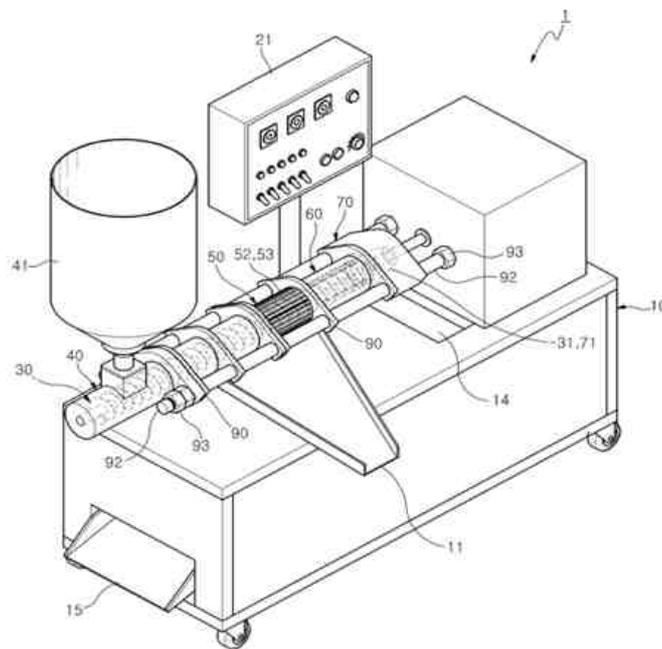


그림 26. 엑스펠라 착유기 (우보산초)

산초나무 신제품 시장가치 22백억, 기술가치 4백억, 파급효과 77백억으로 알려져 있음 ('17,민간경제연구소연구용역결과). 산초부산물(산초열매,산초피)을 활용하여 호흡기질환에 도움이 되는 식품들을 혼합한 산초돌배즙 액상차개발. 산초열매추출물에 관한 생리활성연

구가 일부 되어있고, 산돌배의 치료물질 및 항산화물질도 월등하게 나타나며, 동의보감에 기침과 갈증에 효능. 사계절 내내 미세먼지로 고통 받고 있는 요즘, 산초열매, 산초피, 산돌배의 유익한 성분으로 건강한 수분액상차가 홍보 및 마케팅에 지원을 받고 효능에 대한 추가연구가 진행된다면 경제적 파급효과는 높다고 판단함.



그림 27. 산초 돌배즙 시제품 (우보산초)

10. 안전성 연구

가. 섭취량 평가 정보

- 혼합종 유압압착 산초유의 식품성분 분석한 결과 100g 당 열량이900Kcal, 탄수화물, 당류는 함유되어 있지 않았으며, 지방 100g, 포화지방 17g이었고, 트랜스지방과 콜레스테롤은 검출되지 않았음(표 17)

표 17. 혼합종 유압압착 산초유의 식품표기

	표시방법에 의한 결과	단위	1일 영양성분기준치에 대한 비율(%)
열량	900	Kal	-
나트륨	5	mg	0
탄수화물	0	g	0
당류	0	g	0
지방	100	g	185
포화지방	17	g	113
트랜스지방	0	g	-
콜레스테롤	0	mg	0
단백질	0	g	0

- 혼합종 엑스펠러 착유 산초유의 식품성분 분석한 결과 100g 당 열량이 900Kcal, 탄수화물, 당류는 함유되어 있지 않았으며, 지방 100g, 포화지방 16g이었고, 트랜스 지방과 콜레스테롤은 검출되지 않았음(표 18)

표 18. 혼합종 엑스펠러 산초유의 식품표기

	표시방법에 의한 결과	단위	1일 영양성분기준치에 대한 비율(%)
열량	900	Kal	-
나트륨	10	mg	1
탄수화물	0	g	0
당류	0	g	0
지방	100	g	185
포화지방	16	g	107
트랜스지방	0	g	-
콜레스테롤	0	mg	0
단백질	0	g	0

나. 영양평가, 생물학적유용성, 인체적용시험 정보

- 산초유의 영양은 포화지방을 중심으로 한 지방으로서 약 54g을 섭취하였을 때, 1일 영양성분 기준치를 충족하는 것으로 나타났으며, 54g은 1큰술(8g 기준)으로 약 7큰술인 것으로 나타나 민간에서 사용하는 정도(10g 미만)는 과학적 근거를 토대로 사용해도 된다고 판단됨

11. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립

가. 유해물질규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

(1) 산초유 표준공정 확립 및 원료 특성연구 (기타식용유지에 대한 검사) 및 자료 구축

- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법을 확립하기 위해 혼합종 유압압착 및 혼합종 엑스펠라 착유 산초유에서 기타식용유지 규격검사를 행한 결과 에루스산 및 벤조피렌 및 중금속(납, 카드뮴, 비소, 수은) 등이 불검출 되어 기타식용유지로 적합한 것으로 판단되었음(표19, 20)

표 19. 혼합종 유압압착 산초유의 기타식용유지 규격검사

시험·검사 항목	시험·검사기준	시험·검사 결과	판정
산가	-	6.78	
요오드가	-	125.76	
에루스산	-	0.03	
총 수은	-	불검출	
카드뮴	-	불검출	
납	-	불검출	
총 비소	-	불검출	
벤조피렌($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2.0이하	불검출	적합
산화방지제(g/kg)	적합	불검출	적합

표 20. 혼합종 엑스펠라 착유 산초유의 기타식용유지 규격검사

시험·검사 항목	시험·검사기준	시험·검사 결과	판정
산가	-	6.40	
요오드가	-	123.58	
에루스산	-	0.03	
총 수은	-	불검출	
카드뮴	-	불검출	
납	-	불검출	
총 비소	-	불검출	
벤조피렌($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2.0이하	불검출	적합
산화방지제(g/kg)	적합	불검출	적합

- 산초유의 잔류농약 성분 분석결과 2017년 생산 혼합(조생종+만생종+신품종) 엑스펠라 착유 시료에서 농약 58종 중 페니트로티온을 제외한 성분은 57종 농약성분은 검출되지 않음.
- 페로티온 성분은 0.233mg/Kg 검출됨 2016년 생산 시료의 페니트로티온과 헥사코나졸 2종에 대하여 잔류농약 분석결과 헥시코나졸 성분은 불검출 되었음.
- 헥사코나졸은 산초나무 녹병 방제에 사용되는 약제로 녹병 예방 및 방제를 위한 농약사용은 잔류농약 검출되지 않음을 확인하였고, 페니트로티온 성분은 품종별 시료별 0.654~1.699mg/Kg 검출되어 산초나무 재배방법에 따라 페니트로티온 잔류농약 성분이 차이가 있음을 확인함

표 21. 2017년 생산 혼합(조생종+만생종+신품종) 엑스펠라 착유 시료의 58종 잔류농약 분석 결과

농약	분석결과 (mg/kg)
메톡시페노자이드, 보스칼리드, 아세타미프리드, 아즉시스트로빈, 아트라진, 아이소프로티올레인, 카바릴, 캡탄, 톨클로포스메칠, 트리플루무론, 티아메톡삼, 펜헥사미드, 프로페노포스, 플루벤디아마이드, 플루페녹수론, 파라클로스트로빈, 피리메타닐, 피리미포스메틸, 다이아지논, 디디티, 디코폴, 디클로르보스, 말라티온, 메토밀(티오디카브 포함), 비에치시, 비펜트린, 사이퍼메트린, 사이프로디닐, 사이할로트린, 에티온, 엔도설판, 이마자릴, 이프로디온, 카보퓨란, 퀴토젠, 클로로탈로닐, 클로르피리포스, 클로르피리포스-메틸, 클로르페나피르, 트리아디메폰, 트리아조포스, 트리플루미줄, 파라티온, 파라티온메틸, 파클로부트라졸, 페메트린, 페나리몰, 펜발러레이트, 펜토에이트, 펜프로파트린, 포스멧, 프로사이미돈, 프로클로라즈, 피리미카브, 플루디옥소닐, 메티다티온, 디메토에이트	불검출
페니트로티온	0.233

표 22. 2016년 생산 다양한 시료의 페니트로티온, 헥사코나졸 농약성분 분석 결과

분석 시료명	농 약	분석 결과 (mg/kg)
만생 압착	Fenitrothion	1.161mg/kg
	Hexaconazole	불검출
만생 스크롤	Fenitrothion	0.654mg/kg
	Hexaconazole	불검출
신품종 압착	Fenitrothion	1.699mg/kg
	Hexaconazole	불검출
신품종 스크롤	Fenitrothion	1.525mg/kg
	Hexaconazole	불검출
평균	Fenitrothion	1.259mg/kg
	Hexaconazole	불검출

나. 곰팡이독소, 미생물 시험성적서 및 분석자료

- 혼합종 유압압착 산초유의 식품 변패균을 검사한 결과 식품변패균인살모넬라, 장염비브리오, 리스테리아모노사이토제네스, 장출혈성대장균, 캄필로박터제주니/콜리, 여시니아엔테로콜리티카, 클로스트리디움퍼프린젠스 등이 검출되지 않았음
- 혼합종 엑스펠라 산초유의 식품 변패균을 검사한 결과 상기 언급한 식품변패균이 검출되지 않았음

표 23. 혼합종 유압압착 산초유의 식품 변패균 검사

시험항목	검출값	단위
세균수	5	(CFU/g)
대장균수	0	(CFU/g)
살모넬라	Negative	-
장염비브리오	Negative	-
리스테리아모노사이토제네스	Negative	-
장출혈성대장균	Negative	-
캄필로박터제주니/콜리	Negative	-
여시니아엔테로콜리티카	Negative	-
클로스트리디움퍼프린젠스	Negative	-
바실러스세레우스	0	(g당)
황색포도상구균	Negative	-
진균수	0	(CFU/g)

표 24. 혼합종 엑스펠라 착유 산초유의 식품 변패균 검사

시험항목	검출값	단위
세균수	240	(CFU/g)
대장균수	0	(CFU/g)
살모넬라	Negative	-
장염비브리오	Negative	-
리스테리아모노사이토제네스	Negative	-
장출혈성대장균	Negative	-
캄필로박터제주니/콜리	Negative	-
여시니아엔테로콜리티카	Negative	-
클로스트리디움퍼프린젠스	Negative	-
바실러스세레우스	0	(g당)
황색포도상구균	황색포도상구균	황색포도상구균
진균수	25	(CFU/g)

12. 산초유의 피부감작성 시험

가. 동물시료의 준비

(1) 시험계

(가) 종 및 계통 토끼, NZW(Yac:NZW(KBL)), SPF

(나) 생산자 YONAM COLLEGE, Yonam Laboratory Animal

(다) 구입처 ORIENTBIO INC., Republic of Korea

(라) 종 및 계통의 선택이유

NZW계 토끼는 자극성시험에 널리 사용되고 있으며, 축적된 시험자료가 풍부하므로 선택하였다.

(마) 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 5마리, 10주령, 1.77 ~ 1.87 kg

(바) 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 3마리, 11주령, 2.10 ~ 2.21 kg

(사) 검역·순화

- 입수시 모든 동물의 일반증상을 관찰하고, 체중을 측정하였다 (CP12001S, Sartorius, Germany). Initial test는 8일간, Confirmatory test는 10일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였음.

- 검역·순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태에 이상이 없는 것을 확인하였음.

(아) 개체 및 사육상자 식별

- 검역·순화기간 중에는 입수시에 적색유성펜으로 왼쪽 이개부 내측에 개체 식별하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중의 개체식별카드를 부착하여 식별하였음.

- 선별후에는 오른쪽 이개부 내측에 청색유성펜으로 개체식별하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하여 식별하였음.

(자) 피부상태 검사 및 선별

- 시험물질 투여 전날 전기제모기 (Oster 5-50C U.S.A., size: 40, 1/10 mm)로 토끼의 피모를 제모한 후 아일랜드 스킨(섬모양으로 털이 밀집되어 있는 부분)이 적고 상처나 찰과상이 없는 피부 상태가 양호한 동물을 종합적으로 판단하여 Initial test에는 1마리, Confirmatory test에는 2마리를 선별하여 시험에 사용하였음.

- 선별 후에는 피부를 보호하기 위하여 관찰종료시까지 엘리자베스 카라를 장착하였음. 단, 폐색접포 기간에는 엘리자베스 카라를 장착하지 않았음.

(차) 잔여동물의 처리

- 잔여동물은 잔여동물처리에 따라서 펜토탈소듐 (JW Pharmaceutical Co.,Ltd., Republic of Korea)으로 과다 마취하여 안락사 시켰음.

(2) 사육환경조건

(가) 동물실험번호 A227

(나) 사육상자의 종류, 크기 스테인레스 철망사육상자, 450W×600D×360H (mm)

(다) 사육상자당 마리수 1마리 (검역·순화기간 및 관찰기간)

(라) 온도 실측치: 19.1 ~ 21.1° C, 허용범위: 18.0 ~ 24.0° C

(마) 상대습도 실측치: 52.4 ~ 56.7%, 허용범위: 30.0 ~ 70.0%

(바) 환기횟수 10 ~ 15회/시간

(사) 명암주기 (조명시간) 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시)

(아) 조도 150 ~ 300 Lux

(자) 사육기재의 교환 및 세척

- 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세제 및 수돗물로 세척한 것을 사용하였음. 케이지는 1회/2주 빈도로 청소하고, 급이기 및 케이지 내부발판은 1회/2주의 빈도로 교환하였음.

(3) 사료

(가) 종류

- 실험동물용 고형사료 (Purina 실험동물용 토끼사료 38302AF)

(나) Lot No. KSN:18/10/31:YWH

(다) 제조자 Cargill Agri Purina Inc.

(라) 급이방법

- 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취시켰다.

(4) 음수

(가) 종류 및 급수방법

- 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하고, 자유섭취시켰다.

(5) 투여

(가) 투여경로

- 경피투여

(나) 투여구획 구성

- 제모한 토끼의 경배부 정중선을 대칭축으로 해서 1부위는 약 2.5×2.5 cm를 투여부위로 하였음. 그 중 1부위에는 무처리 대조부위로, 다른 1부위에는 시험물질투여 부위로 하였음

나. 엑스펠라 추출 산초유의 처리

(1) 2017년 혼합 엑스펠라 산초유

- Initial 및 Confirmatory test의 시험물질투여부위에서 패치제거 후 1시간 이후에 홍반 (평점 1)이 모든 동물에서 관찰되었으나, 투여 7일에 모두 소실됨 시험물질의 1차 피부 자극지수 (P.I.I.)는 ‘1.0’ 으로, 자극정도는 ‘약한 자극성 (Slightly irritant)’ 으로 분류됨
- 무처치대조부위에서 모든 관찰시간에 홍반, 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰 되지 않음
- 관찰기간 중, 모든 동물에 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않음
- 이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 시험물질 2017년도 혼합 엑스펠라 산초유는 토끼의 피부에 대해서 ‘약한 자극성’ 이 있는 것으로 판단됨

(2) 2018년 혼합 엑스펠라 산초유

- Initial test는 1마리의 토끼 등부위에 3개의 패치를 순차적으로 적용함. 시험물질원액 0.5 mL를 시험물질투여부위에 적용하고, 반폐색칩포를 실시함. 1번째 패치는 투여 후 3분에, 2번째 패치는 투여 후 1시간에, 3번째 패치는 투여 후 4시간에 제거한 결과, 모든 투여부위에서 부식성 및 심한 자극성이 확인되지 않았기 때문에, 별도의 2마리에 1개의 패치를 4시간 반폐색 칩포하여 Confirmatory test를 실시함. 패치제거 후 1, 24, 48 및 72시간에 ‘Draize의 피부반응 평가표1’) 에 따라서 피부반응을 평가하고, 1차 피부자극지수 (Primary Skin Irritation Index, P.I.I.)를 구하여 시험물질의 피부자극성 및 부식성을 판정함. Initial 및 Confirmatory test 모두 패치제거 후 72시간에 피부자극성이 관찰되었기 때문에, 투여 10일까지 관찰을 계속함
- Initial 및 Confirmatory test의 시험물질투여부위에서 패치제거 후 1시간 이후에 홍반 (평점 1 ~ 2)이 모든 동물에서 관찰되었으나, 투여 10일에 모두 소실됨. 또한, 인설 (Scale)이 투여 6일부터 투여 9일까지 모든 동물에서 관찰됨. 시험물질의 1차 피부자극 지수 (P.I.I.)는 ‘1.3’ 으로, 자극정도는 ‘약한 자극성 (Slightly irritant)’ 으로 분류됨
- 무처치대조부위에서 모든 관찰시간에 홍반, 부종등 의 피부반응은 모든 동물에서 관찰 되지 않음. 관찰기간 중, 모든 동물에 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않음
- 이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 시험물질 2018년 혼합 엑스펠라 산초유는 토끼의 피부에 대해서 ‘약한 자극성’ 이 있는 것으로 판단됨
- 2017년도, 2018년도 혼합 엑스펠라 산초유의 토끼 피부 감작성 시험결과 1년의 시기적 차이에 따른 1차 피부자극지수 (P.I.I.)는 1.0에서 1.3으로 미량 증가하였으나 피부반응 평가표상으로 보았을 때, 평점이 1로 동일하게 나타남. 이것은 산초유가 산패가 증가됨에 따라 피부자극성이 증가한다고 판단됨으로 산초유를 기능성 원료로 사용하기 위해서는 산초유의 변질을 막는 것이 필요하다고 판단됨. 그러나 산패가 진행된 산초유일지라도 피부반응에는 큰 차이가 없음으로 식용의 목적을 제외하고, 0.2%의 저농도의 첨가물 형태로 사용한다면 피부의 자극에 있어 문제가 없다고 판단됨

표 25. 피부반응 평가표 (Draize의 기준: 1959)

반응	평점
홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음.....	0
아주가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도).....	1
분명한 홍반.....	2
약간 심한 홍반.....	3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피.....	4

표 26. 피부자극정도의 분류 (Draize의 기준: 1959)

1차피부자극지수 (P.I.I.)	분류
0	비자극성 (Non irritant)
$0 < P.I.I. \leq 2$	약한 자극성 (Slightly irritant)
$2 < P.I.I. \leq 5$	중등도 자극성 (Moderately irritant)
$5 < P.I.I. \leq 8$	강한 자극성 (Severely irritant)

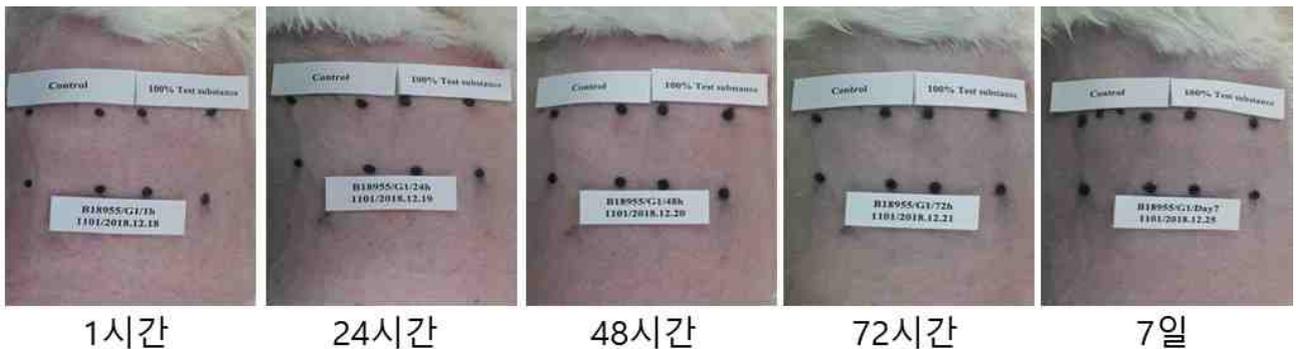


그림 28. 산초유의 토끼 피부감작성시험결과

제 2 절 산초유 기능 성분 규격 및 원료특성 연구

1. 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립

가. 산초유 분석을 위한 지표성분 선정 및 확보

- 산초유 함유 성분 중 지표성분 선정을 위해 oleic acid, linoleic acid, palmitoleic acid, myristic acid, α -linolenic acid, γ -linolenic acid, stearic acid 및 palmitic acid 등 8종의 성분 확보

나. 품질평가를 위한 분석법 설정

(1) 산초유 품질평가를 위한 GC-FID 및 GC-MS 분석법 설정

표 27. Sample information according to milking methods and roasting times in different races

시료 No.	품종	시료정보		
		과피함유	로스팅 시간	착유형태
1	조생종	-	60초	유압압착
2	조생종	10%	60초	유압압착
3	조생종	-	60초	엑스펠라
4	만생종	-	60초	유압압착
5	만생종	10%	60초	유압압착
6	만생종	-	60초	엑스펠라
7	한초품종	-	60초	유압압착
8	한초품종	10%	60초	유압압착
9	한초품종	-	60초	엑스펠라
10	시료1:시료4:시료7 = 1:1:1	-	60초	유압압착
11	시료2:시료5:시료8 = 1:1:1	10%	60초	유압압착
12	시료3:시료6:시료9 = 1:1:1	-	60초	엑스펠라

(2) 시료 전처리

- ① 반응시약 제조: Benzene-Methanol (1:3)에 황산 1~3% 첨가
- ② Glass vial에 시료 0.1~0.5 g씩 넣음
- ③ 반응시약 3.5 mL을 첨가하여 80°C에서 2시간 반응
- ④ n-Hexane으로 3~5회 추출
- ⑤ 추출액을 25 mL volumetric flask에 넣고 hexane으로 표정

(3) GC-FID 분석 조건

표 28. GC-FID conditions

Parameter	Condition
Manufacturer	SHIMADZU
Model	GC-2010 Plus
Column	DB-5MS
Column oven program	50°C (1min) → 10°C/min → 280°C (5min)
Injection Temp	290°C
Detector Temp	300°C

(4) GC-MS 분석 조건

표 29. GC-MS conditions

Parameter	Condition
Manufacturer	SHIMADZU
Model	GC-2010 Plus + QP2010 Ultra
Column	DB-5MS
Column oven program	40°C (2min) → 10°C/min → 230°C (10min)
Injection Temp	300°C
Ionsource Temp	200°C

5) GC-MS 분석을 위한 성분 검출 조건

표 30. Target conditions of each reference standard

No	Compound	Target		Reference
		MS(1st)	MS(2nd)	MS(3rd)
1	Linoleic acid	67	81	95
2	Myristic acid	74	87	143
3	Oleic acid	69	74	83
4	Palmitic acid	74	87	143
5	Palmitoleic acid	69	74	83
6	Stearic acid	74	87	143
7	α -Linolenic acid	79	93	67
8	γ -Linolenic acid	79	67	80

6) GC-FID를 이용한 성분 분석 결과

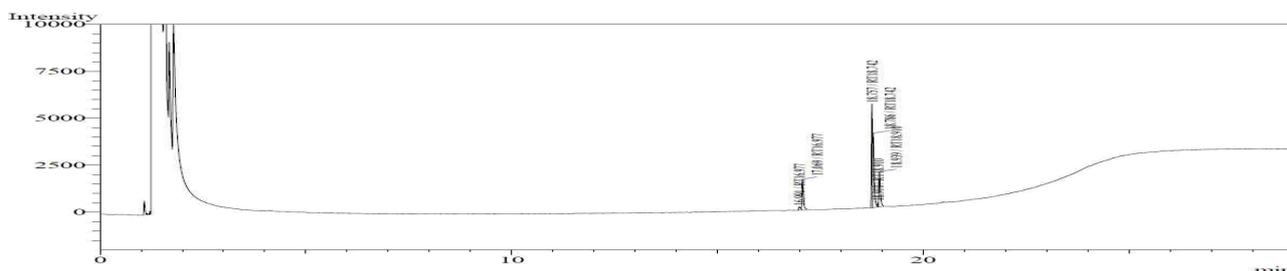


그림 29. GC-FID chromatogram

표 31. Amount of the eight components in samples by GC-FID

Compound	Content (mg/g), Sample											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linoleic acid	177.3	225.2	189.9	175.5	197.0	207.8	204.4	180.6	289.8	218.3	221.9	194.6
Oleic acid	140.3	142.3	134.4	138.6	146.0	143.9	145.8	142.7	218.0	178.1	170.9	156.3
Palmitic acid	33.7	26.3	37.0	28.5	43.6	33.2	45.3	37.6	38.9	46.5	49.6	37.2
Palmitoleic acid	12.9	14.0	13.9	13.8	15.4	12.6	14.6	15.1	20.3	18.5	17.2	15.2
Stearic acid	6.0	6.4	5.5	6.3	6.9	6.4	5.6	5.7	8.7	6.5	7.2	7.4
α -Linolenic acid	66.2	72.5	68.0	75.9	83.8	112.9	76.2	81.9	133.5	82.4	85.8	83.7
γ -Linolenic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Myristic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected

(7) GC-MS를 이용한 성분 분석 결과

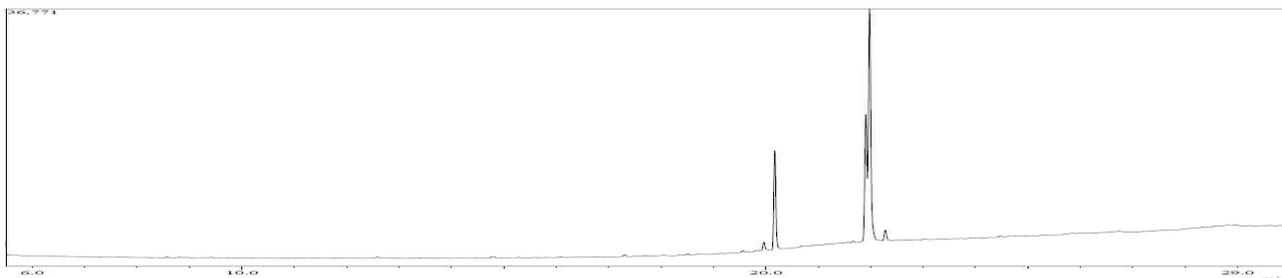


그림 30. GC-MS chromatogram

표 32. Amount of the eight components in samples by GC-MS

Compound	Content (mg/g), Sample											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linoleic acid	138.9	175.6	113.5	89.5	127.4	126.7	121.7	96.8	151.9	133.1	98.5	107.7
Oleic acid	119.6	149.3	96.0	85.9	118.1	111.0	117.2	100.3	140.2	131.2	97.0	101.8
Palmitic acid	55.7	70.5	44.5	37.8	52.3	46.2	52.0	43.7	59.0	58.6	43.9	43.8
Palmitoleic acid	9.7	13.4	7.9	7.2	10.2	7.2	9.3	7.5	7.8	12.4	6.9	7.1
Stearic acid	9.0	11.1	7.1	6.8	8.7	8.3	7.9	6.8	9.9	8.6	6.8	7.1
α -Linolenic acid	92.9	112.3	82.2	67.4	93.4	98.5	85.4	72.0	111.1	92.4	71.0	78.2
γ -Linolenic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Myristic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected

2. 산초유 원료 감별을 위한 유전자 마커 개발

가. 산초 및 산초 유사종 유전자 분석을 위한 기원식물 지역별 다양성 확보

(1) 산초유 원료인 산초나무와 유사 동속종인 초피나무, 개산초나무 및 왕초피나무 지역별 분석시료 확보 (표 33)

표 33. 산초 및 유사종 유전자 감별법 개발에 사용한 분석용 시료

식물명	학명	채집지	시료형태	채집일자	시료 번호
산초	<i>Zanthoxylum schinifolium</i> Siebold & Zucc.	강원 강릉시 성산면	생체	2012. 09. 19	1
		전남 해남군 계곡면 가학산	생체	2012. 10. 11	2
		경기도 양평군 단월면	생체	2012. 05. 29	3
		경남 사천시 곤양면 목곡리	생체	2012. 08. 22	4
		제주도 서귀포시 색달동1100고지	생체	2012. 08. 07	5
초피	<i>Zanthoxylum piperitum</i> (L.) DC.	경남 하동군 악양면	생체	2012. 10. 05	6
		충남 공주시 반포면	생체	2012. 10. 11	7
		충북 보은군 속리산면	생체	2012. 10. 11	8
		경남 함양군 안의면	생체	2012. 06. 13	9
		경북 울릉군 북면 나리	생체	2013. 06. 19	10
		대구 달성군 가창면 냉천리	생체	2013. 09. 04	11
		전남 광양시 옥룡면 동곡리	생체	2013. 05. 01	12
왕초피	<i>Zanthoxylum simulans</i> Hance	전남 완도군 군외면 대문리(완도수목원)	생체	2013. 04. 25	13
		전남 완도군 군외면 대문리(완도수목원)	생체	2013. 04. 25	14
		전남 완도군 군외면 대문리(완도수목원)	생체	2013. 04. 25	15
		제주 서귀포시 안덕면 화순리	생체	2013. 09. 11	16
		제주 서귀포시 안덕면 화순리	생체	2013. 09. 11	17
개산초	<i>Zanthoxylum armatum</i> DC.	제주 한경면 청수리	생체	2016. 12. 06	19
		경북 울진군 근남면 노읍리	생체	2017. 01. 18	20
		강원 삼척시 이로면	생체	2017. 01. 18	21
		경남 거제시 남부면 갈곶리	생체	2017. 01. 24	22
		경남 고성군 하이면 덕명리	생체	2017. 01. 25	23

나. 범용성 DNA 바코드 분석을 통한 종 감별용 marker nucleotide 발굴

범용성 DNA 바코드 부위인 *ITS2*, *matK* 및 *rbcl* 유전자 부위 증폭 및 염기서열 비교

*ITS2*로부터 산초나무, 초피나무, 왕초피나무 및 개산초 종 감별이 가능한 Marker nucleotide 각 19, 9, 3 및 6개 위치에서 확인 (표 34)

표 34. *ITS2* DNA 바코드 염기서열 비교를 통한 종 특이 marker nucleotide 발굴

Nucleotide Position	46	119	129	130	132	133	140	141	147	149	172	177-179	201	229	255	157	269	272	276	278	280	284	285	287	294	301	304	309	314	318	320
<i>Z. schinofolium</i>	C	G	C	G	C	C	T	T	C	A	C	CCC	C	A	A	A	G	-	T	T	C	T	C	A	G	T	C	C	G	G	-
<i>Z. piperitum</i>	T	A	T	A/C	-	-	C	T	T	C	C	TTA	T	T	G	T	T	-	C	C	T	A	C	G	T	T	A	T	A	A	-
<i>Z. simulans</i>	C	A	C	T	A	G	C	C	T	C	C	CCC	T	T	G	T	T	-	C	C	A	T	C	G	T	T	A	T	A	A	-
<i>Z. armantum</i>	C	A	C	T	C	G	C	T	T	C	T	CCC	T	T	G	T	T	C	C	C	T	C	T	G	T	C	A	T	A	A	G

matK 유전자로부터 산초나무, 초피나무, 개산초나무 종 감별이 가능한 marker nucleotide 각 23, 3 및 5개 위치 확인 (표 35)

표 35. *matK* DNA 바코드 염기서열 비교를 통한 종 특이 marker nucleotide 발굴

Nucleotide Position	69	79	151	161	170	171	211	233	268	301	303	306	308	408	443	463	497	541	549	570	659	687	790	799	985	1072	1118	1134	1192	1217	1226
<i>Z. schinofolium</i>	A	G	A	A	C	G	A	T	T	G	G	T	A	T	A	G	A	G	A	A	A	T	A	T	C	A	C	C	T	A	A
<i>Z. piperitum</i>	G	A	C	G	T	T	C	C	G	G	A	A	A	C	G	T	C	G	A	T	C	C	G	C	A	G	C	T	C	G	G
<i>Z. simulans</i>	G	A	C	G	C	T	A	C	G	G	A	A	A	C	G	T	C	G	A	T	C	C	G	C	A	G	C	C	C	G	G
<i>Z. armantum</i>	G	A	C	G	C	T	A	C	G	A	A	A	C	C	G	T	C	T	T	T	C	C	G	C	A	G	T	C	C	G	G

rbcl 유전자로부터 산초나무 및 초피나무 종감별이 가능한 marker nucleotide 각 12개 및 11개 위치 확인 (표 36)

표 36. *rbcl* DNA 바코드 염기서열 비교를 통한 종 특이 marker nucleotide 발굴

Nucleotide Position	60	84	89	129	204	256	276	741	747	780	785	813	1080	1149	1200	1338	1466-1462
<i>Z. schinofolium</i>	T	G	T	C	C	G	A	T	A	A	C	T	G	C	C	A	GTTGATT
<i>Z. piperitum</i>	C	C	C	G	T	A	C	C	C	G	T	A	C	T	A	G	-----
<i>Z. simulans</i>	C	C	C	C	T	A	A	C	A	G	T	A	C	C	A	G	GTTGATT
<i>Z. armantum</i>	C	C	C	C	T	A	A	C	A	G	T	A	C	C	A	G	GTTTATT

다. 산초 및 산초 유사종 신속·간편 감별을 위한 PCR 증폭용 유전자 마커 개발

ITS2, *matK* 및 *rbcl* 종 특이 염기서열 기반 SCAR 유전자 마커 PCR 증폭용 primer 탐색 및 확보 (표 37)

표 37. 종 감별용 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer

Primer name	Primer sequence(5' →3')	SCAR size (bp)	Specificity
ZS-M F3-1	ACT GGG TAA AGG ATG CCT CcG	365	<i>Z. schinifolium</i>
ZS-M R3-1	TGA AGC CAA AAT GGA TgT TCC		
ZS-M F4	AAT AGC TCG ATA ATT TCA TTG GA	113	<i>Z. schinifolium</i>
ZS-M R1-3	CGC AGC AAT ATT CAA ATT AAT CTG		
ZS-M F4	AAT AGC TCG ATA ATT TCA TTG GA	268	<i>Z. schinifolium</i>
ZS-M R4	TGG AAA TTT TGA GAT TTT TCA AAC TC		
ZS-M F5	CAG ATT AAT TTG AAT ATT GCT GCG	179	<i>Z. schinifolium</i>
ZS-M R4	TGG AAA TTT TGA GAT TTT TCA AAC TC		
ZP-R F1-1	CAT GTT TGG CAT gTG CCT GC	321	<i>Z. piperitum</i>
ZP-R R1	CCG AGT TTA ATT GAT AAT AAA CC		
ZP-R F2-1	TGT ACA AGC TCG TAA TGA cGG	187	<i>Z. piperitum</i>
ZP-R R1	CCG AGT TTA ATT GAT AAT AAA CC		
ZS-I2 F2	ACC CCC TCA GGG GGG CCC G	174	<i>Z. simulans</i>
ZS-I2 R2	GGT CCA TGA GTC CCG AAA CT		
ZA-M F1	TTT TTA GAA GGG AAA AAA TTA GC	134	<i>Z. armantum</i>
ZA-M R1-1	AAG AGG tAT CCT TTA CCC AGC		

ITS2, *matK* 및 *rbcl* 종 특이 염기서열 기반 PCR 증폭용 SCAR 유전자 마커 개발 (그림 31)

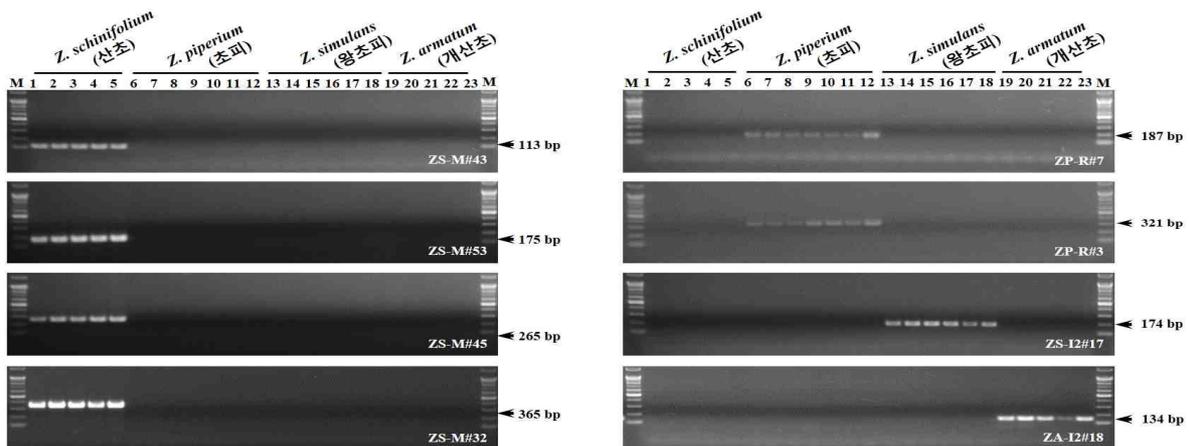


그림 31. 산초 및 산초 유사종 중 감별 PCR 증폭용 SCAR 유전자 마커 개발

라. 이화학 분석 및 효능 분석용 산초유 시료 기원 확인(표 38)

표 38. Sample information according to milking methods and roasting times

순번	Tube label	시료형태	시료정보			
			생육형	과피함유	로스팅 시간	착유형태
1	산초유 시료 #1	oil	조생종	-	60초	압착
2	산초유 시료 #2	oil	조생종	10%	60초	압착
3	산초유 시료 #3	oil	조생종	-	60초	엑스펠라
4	산초유 시료 #4	oil	만생종	-	60초	압착
5	산초유 시료 #5	oil	만생종	10%	60초	압착
6	산초유 시료 #6	oil	만생종	-	60초	엑스펠라
7	산초유 시료 #7	oil	한초품종	-	60초	압착
8	산초유 시료 #8	oil	한초품종	10%	60초	압착
9	산초유 시료 #9	oil	한초품종	-	60초	엑스펠라
10	산초유 시료 #10	oil	시료1+4+7: 동일비율 혼합	-	60초	압착
11	산초유 시료 #11	oil	시료2+5+8: 동일비율 혼합	10%	60초	압착
12	산초유 시료 #12	oil	시료3+6+9: 동일비율 혼합	-	60초	엑스펠라

산초유 시료 DNA 추출 및 *ITS2* 염기서열 분석을 통한 원료 기원종 확인: *ITS2* DNA 바코드 증폭 및 염기서열 분석 결과 산초유 시료 생산에 사용된 원료는 모두 산초나무 열매로 확인(그림 32)

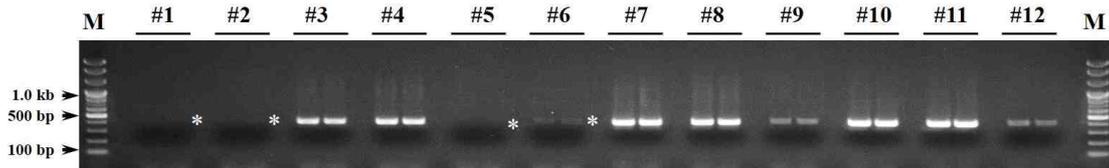


그림 32. 산초유 시료 DNA 추출 및 *ITS2* 부위 증폭

3. 2차년도 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구

가. 산초유 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립

(1) GC-FID를 이용한 산초유의 지방산 분석

(가) 품종 및 착유형태에 따른 산초유 분석시료

표 39. Sample information according to milking methods and roasting times

Sample No.	시료정보	
	품종	착유형태
1	조생종	유압압착
2	만생종	유압압착
3	한초	유압압착
4	혼합 (시료1 : 시료2 : 시료3 = 1: 1 : 1)	
5	조생종	엑스펠라
6	만생종	엑스펠라
7	한초	엑스펠라
8	혼합 (시료5 : 시료6 : 시료7 = 1: 1 : 1)	

(나) 실험방법

① Boron trifluoride(BF₃)-methanol을 이용한 유도체화

- 산초유 약 0.1 g을 test tube에 옮긴 후 내부표준물질로 heptadecanoic acid(C17:0)(1 mg/mL hexane)를 0.5 mL을 함께 첨가. 샘플은 2 mL의 0.5 N NaOH-methanol과 함께 약 110°C의 온도에서 Reacti-Therm III Heating/Stirring Module(Thermo Fisher Scientific Co., Rockford, IL, USA)을 이용하여 10분간 가열시킨 후 실온에서 충분히 방냉시킨 후 BF₃-methanol 4 mL을 첨가하여 혼합한 다음 110° C의 온도에서 1시간 가열. 가열 후 방냉시킨 유지 혼합액에 2 mL의 hexane을 첨가하여 1분간 vortex 시킨 다음 hexane 층을 수집. 2 mL의 hexane에 첨가 및 추출과정을 3회 반복하여 얻은 hexane층을 질소가스를 이용하여 용매를 제거한 다음 샘플을 다시 1 mL의 hexane에 녹여 지방산 분석을 위한 실험에 사용

② GC-FIC를 이용한 지방산 분석

- GC는 Agilent Technologies 6890N 장치(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, 지방산의 분리를 위해 SP-2560 capillary column(100 m × 0.25 mm i.d., 0.25-μm film thickness; Agilent Technologies)을 사용. Carrier gas로 nitrogen (2.7 mL/min)이 이용. 주입구와 검출기 온도는 모두 250°C, 주입구 시료 주입비율 10:1이고 검출기에서 불꽃이온을 위한 수소와 air는 검출기에서 분당 40 mL와 450 mL가 각각 사용. 오븐 온도 프로그램은 초기 130° C에서 5분간 머문 후 분당 4° C 증가시켜 240° C까지 상승시킨 다음 15분간 유지
- 분석된 결과는 상업적인 지방산 표준품(Supelco 37 FAME, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 각각의 머무름 시간을 이용하여 확인

(다) 실험결과

① GC-FID chromatogram

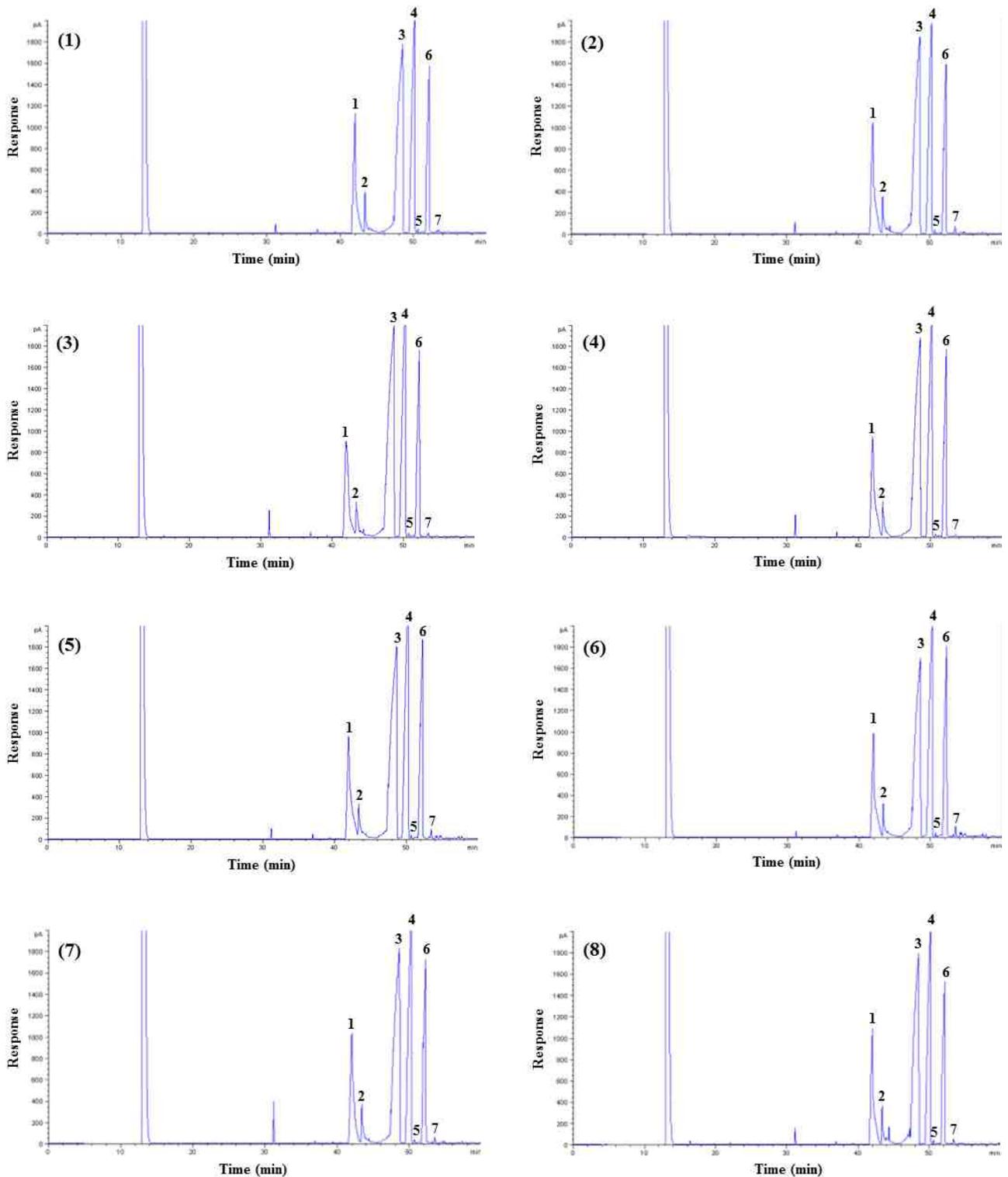


그림 33. 품종 및 착유방법에 따른 산초유의 지방산 분석 가스크로마토그래피 크로마토그램
피크 1: palmitic acid, 2: palmitoleic acid, 3: oleic acid, 4: linoleic acid, 5: eicosenoic acid, 6:
 α -linolenic acid, 7: eicosadienoic acid.

② 지방산 함량 분석 결과

표 40. Content of the seven compounds in sample

No.	Content (Mean±SD, % weight)						
	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α -Linolenic acid	Eicosenoic acid	Eicosadienoic acid
1	14.62±0.15	2.17±0.18	40.30±0.32	25.97±0.03	16.53±0.34	0.05±0.02	0.36±0.10
2	14.30±0.07	2.56±0.12	39.22±0.11	26.59±0.13	17.18±0.19	0.04±0.01	0.10±0.01
3	14.86±0.19	2.81±0.28	39.58±0.06	26.65±0.29	15.93±0.25	0.03±0.00	0.14±0.01
4	14.01±0.28	2.74±0.08	38.56±0.20	27.04±0.06	17.43±0.04	0.04±0.00	0.18±0.05
5	14.47±0.05	2.78±0.19	38.88±0.23	26.24±0.02	17.43±0.06	0.04±0.00	0.16±0.01
6	13.62±0.15	2.03±1.66	38.06±0.09	27.08±0.33	17.78±0.10	0.04±0.01	0.10±0.01
7	13.99±0.01	2.91±0.09	39.82±0.13	26.86±0.23	16.31±0.18	0.04±0.00	0.09±0.01
8	13.62±0.15	2.91±0.16	38.68±0.09	27.30±0.37	17.33±0.22	0.04±0.01	0.12±0.00

(2) HPLC-CAD (high-performance liquid chromatography-charged aerosol detector)를 이용한 산초유의 지방산 분석

(가) 품종 및 착유형태에 따른 산초유 분석시료

표 41. Sample information according to milking methods and roasting times

시료 No.	시료정보	
	품종	착유형태
1	조생종	유압압착
2	만생종	유압압착
3	한초	유압압착
4	혼합 (시료1 : 시료2 : 시료3 = 1: 1 : 1)	유압압착
5	조생종	엑스펠라
6	만생종	엑스펠라
7	한초	엑스펠라
8	혼합 (시료5 : 시료6 : 시료7 = 1: 1 : 1)	엑스펠라

(나) 실험방법

① HPLC-CAD 분석 조건

· 산초유의 지방산 분석을 위한 장비는 quaternary pump, auto-sampler, column compartment, diode array detector 및 charged aerosol detector로 구성된 Dionex Ultimate 3000 UHPLC⁺ system(Thermo Scientific, USA)을 이용하여 분석함

- 지방산의 분리는 23°C로 유지되는 Luna C8 칼럼(4.6×250 mm, 5 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용함
- 주입량은 10 μL이며, 유속은 분당 1 mL로 흘러줌
- 이동상은 0.05% formic acid가 함유된 물(A)과 0.05% formic acid가 함유된 acetonitrile(B)로 구성되어 다음과 같은 기울기 용리로 흘러줌: 0-30분, 72-100% B; 30-38분, 100% B; 38-39분, 100-72% B; 39-47분, 72% B

② 검량선 작성

- α-Linolenic acid, linoleic acid, palmitic acid, oleic acid 및 stearic acid 등 5종 표준품을 acetonitrile을 이용하여 1 mg/mL의 농도로 제조
- 5종 모두 7.81-125.00 μg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성함

③ 분석법 검증

- 검출한계(limit of detection; LOD) 및 정량한계(limit of quantification; LOQ)는 검량선을 이용하여 다음의 식을 이용하여 계산
 $LOD = 3.3 \times \sigma/S$, $LOQ = 10 \times \sigma/S$ (σ 는 y절편의 표준편차, S 는 검량선의 기울기)
- 재현성은 표준액을 이용하여 6회 주입한 후 상대표준편차로 평가함
- 회수율 및 정밀성을 통해 설정된 분석법을 검증

④ 분석 시료 전처리

- 품종 및 압착 방법에 따른 각각의 산초유 시료에 대하여 약 600 μL(730 μg)을 취하여 acetonitrile 5 mL을 넣고 상온에서 60분 동안 초음파 추출 후 30초간 vortexing함. 방치 후 acetonitrile 층을 취하여 0.2 μm membrane filter 후 분석에 사용

(다) 실험결과

① 검량선 작성 결과

- α-Linolenic acid, linoleic acid, palmitic acid, oleic acid 및 stearic acid 등 5종 표준품에 대한 검량선 작성결과 아래 표와 같음

표 42. Calibration curves, range, LOD, and LOQ of the five compounds

Fatty acid	Range (ug/mL)	Regression equation	Coefficient of determination	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
α-Linolenic acid	7.81-125.00	$y = 0.0792x + 0.0857$	0.9999	0.67	2.03
Linoleic acid	7.81-125.00	$y = 0.0577x + 0.0923$	0.9998	0.88	2.67
Palimtic acid	7.81-125.00	$y = 0.0891x - 0.1018$	0.9995	0.42	1.28
Oleic acid	7.81-125.00	$y = 0.0905x + 0.0119$	0.9999	0.14	0.43
Stearic acid	7.81-125.00	$y = 0.1425x + 0.4170$	0.9992	0.67	2.04

② 재현성 결과

· 피크면적에 대한 재현성

표 43. Reproducibility on peak area of each compound

No.	Peak area				
	α -Linolenic acid	Linoleic acid	Palmitic acid	Oleic acid	Stearic acid
1	9.89	7.21	11.10	11.33	18.18
2	9.99	7.39	11.15	11.44	18.13
3	9.98	7.27	11.08	11.31	17.96
4	9.96	7.28	11.09	11.42	17.91
5	9.95	7.27	11.13	11.40	17.94
6	9.99	7.25	10.72	11.04	17.93
Mean	9.96	7.28	11.05	11.32	18.01
SD	0.04	0.06	0.16	0.15	0.11
RSD (%)	0.35	0.83	1.49	1.30	0.63

· 피크 머무름 시간에 대한 재현성

표 44. Reproducibility on retention time of each compound

No.	Peak area				
	α -Linolenic acid	Linoleic acid	Palmitic acid	Oleic acid	Stearic acid
1	13.633	16.841	19.431	20.717	24.756
2	13.629	16.831	19.435	20.714	24.749
3	13.636	16.835	19.433	20.713	24.747
4	13.631	16.828	19.425	20.702	24.747
5	13.619	16.831	19.417	20.704	24.735
6	13.695	16.909	19.504	20.78	24.826
Mean	13.64	16.85	19.44	20.72	24.76
SD	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
RSD (%)	0.20	0.19	0.16	0.14	0.13

③ 회수율 결과

표 45. Recovery test of each compound

Compounds	Spiked conc. (ug/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
α -Linolenic acid	15.63	99.00	1.76
	31.25	99.60	1.07
	62.50	98.54	1.28
Linoleic acid	31.25	100.26	0.23
	62.50	101.57	0.44
	125.00	101.47	0.36
Palmitic acid	15.63	101.97	0.70
	31.25	100.26	0.48
	62.50	100.25	0.64
Oleic acid	31.25	101.50	0.61
	62.50	100.78	0.11
	125.00	100.86	0.38
Stearic acid	7.81	100.95	0.78
	15.63	101.21	0.68
	31.25	100.76	0.33

④ 정밀성 결과

표 46. Intra- and inter-day precision of each compound

Compounds	Spiked conc. (ug/mL)	Intra-day (n=3)			Inter-day (n=3)		
		Observed conc. (ug/mL)	Precision (RSD %)	Accuracy (%)	Observed conc. (ug/mL)	Precision (RSD %)	Accuracy (%)
α -Linolenic acid	15.63	15.53	0.05	99.37	15.53	1.61	99.36
	31.25	30.74	1.57	98.37	31.14	1.53	99.65
	62.50	62.23	0.09	99.57	62.85	1.48	100.55
Linoleic acid	15.63	15.47	0.48	99.02	15.55	0.85	99.49
	31.25	31.26	1.83	100.03	31.33	1.02	100.26
	62.50	63.27	0.38	101.23	63.15	0.82	101.05
Palmitic acid	15.63	15.92	0.67	101.86	16.04	1.19	102.66
	31.25	30.54	0.55	97.91	30.90	2.09	98.88
	62.50	61.33	0.42	98.13	62.10	0.96	99.36
Oleic acid	15.63	15.66	1.95	100.22	15.84	1.30	101.40
	31.25	32.07	0.58	102.61	32.06	0.41	102.59
	62.50	63.29	0.76	101.26	63.24	0.54	101.18
Stearic acid	15.63	15.85	0.62	101.43	15.92	0.50	101.86
	31.25	31.46	0.13	100.68	31.68	0.73	101.37
	62.50	64.23	0.51	102.77	64.12	0.34	102.59

⑤ HPLC-CAD chromatogram

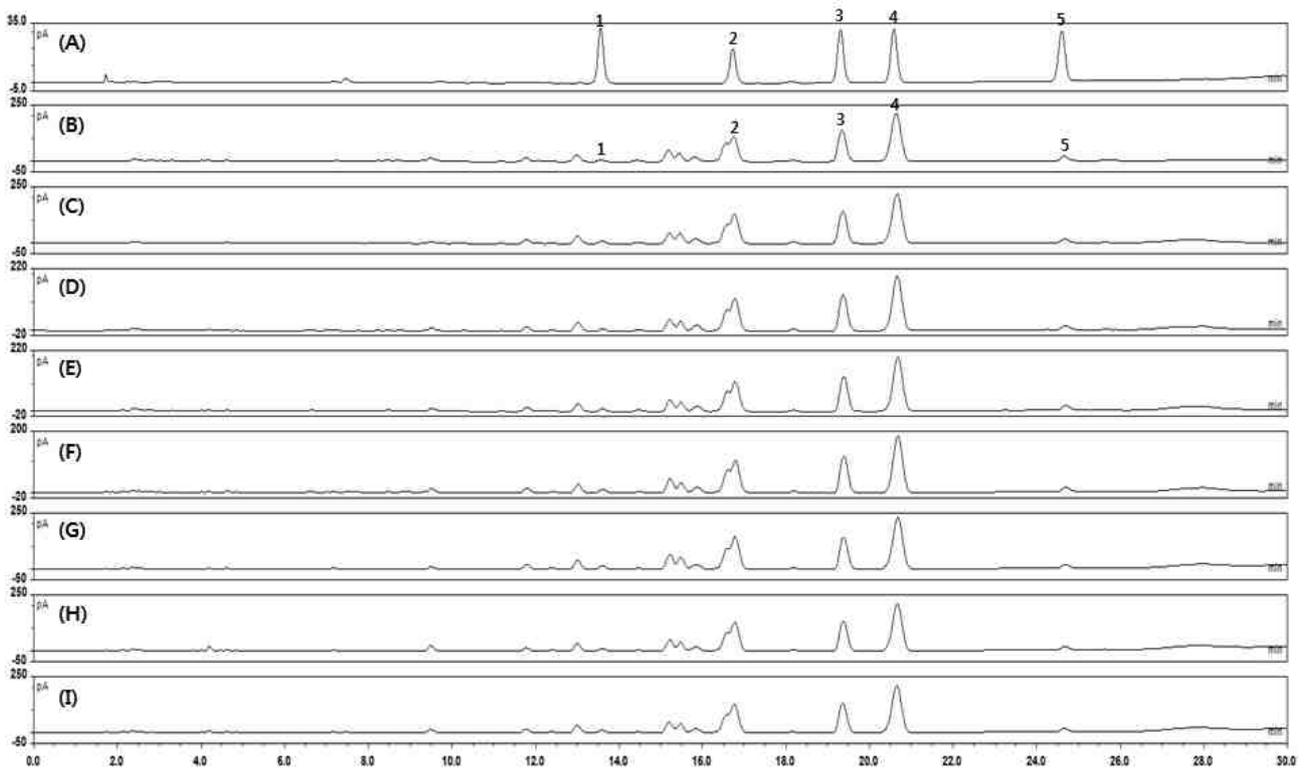


그림 34. 품종 및 착유방법에 따른 산초유 지방산의 HPLC-CAD 크로마토그램

Standard mixtures (A), sample 1 (B), sample 2 (C), sample 3 (D), sample 4 (E), sample 5 (F), sample 6 (G), sample 7 (H), sample 8 (I).

α -linolenic acid (1), linoleic acid (2), palmitic acid (3), oleic acid (4), and stearic acid (5)

⑥ HPLC-CAD를 이용한 지방산 함량 분석 결과

표 47. Content of the five components in samples

Sample No.	Content (Mean \pm SD, mg/g)				
	α -Linolenic acid	Linoleic acid	Palimtic acid	Oleic acid	Stearic acid
1	0.141 \pm 0.004	3.787 \pm 0.142	0.142 \pm 0.079	3.761 \pm 0.003	3.309 \pm 0.008
2	0.163 \pm 0.006	5.614 \pm 0.138	0.138 \pm 0.023	2.459 \pm 0.019	3.386 \pm 0.001
3	0.138 \pm 0.004	4.389 \pm 0.166	0.166 \pm 0.093	3.793 \pm 0.033	2.872 \pm 0.001
4	0.131 \pm 0.002	3.743 \pm 0.036	0.036 \pm 0.025	0.966 \pm 0.029	2.793 \pm 0.002
5	0.174 \pm 0.005	3.413 \pm 0.032	0.032 \pm 0.084	0.941 \pm 0.079	2.342 \pm 0.001
6	0.227 \pm 0.005	6.187 \pm 0.035	0.035 \pm 0.050	0.563 \pm 0.080	3.101 \pm 0.004
7	0.165 \pm 0.005	5.047 \pm 0.091	0.091 \pm 0.075	1.804 \pm 0.010	2.730 \pm 0.002
8	0.192 \pm 0.006	4.653 \pm 0.055	0.055 \pm 0.013	1.183 \pm 0.043	2.625 \pm 0.002

나. 산초유 원료 감별을 위한 유전자 마커 개발

(1) ITS 염기서열 기반 산초원료 기원 중 감별을 위한 PCR 증폭용 유전자 마커 개발 및 검증
2016년 (1차년도) *ITS2*, *matK* 및 *rbcL* DNA 바코드 부위를 이용하여 개발한 PCR 증폭용 SCAR 유전자 마커를 *ITS2* 염기서열 부위만 이용하여 산초나무, 초피나무, 왕초피나무 및 개산초를 구별할 수 있는 SCAR 유전자 마커 개발을 수행

(가) 실험방법

- 2016년(1차년도) 확보한 *ITS2*, *matK*, *rbcL* DNA 바코드 부위를 이용하여 개발한 PCR 증폭용 SCAR 유전자 마커를 Real-time PCR 분석법 등을 고려하여 *ITS2* 부위 한곳을 이용하여 4종 모두를 감별할 수 있는 SCAR 유전자 마커 개발을 통해 Conventional PCR과 Real-time PCR 분석 조건을 확립하기 위해 국내·외 다양한 지역에서 *Zanthoxylum* 4종 22점 시료로부터 확보한 *ITS2* 염기서열을 이용하여 신규 Primer 부위를 선정하고(Figure 3, Table 10) 종 특이성 검증 진행
- 선정된 신규 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer의 종 특이성 검증을 위해 생체시료 약 100 mg은 Lysing matrix ATM tube (MP biomedical, USA)에 담아 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA)의 extraction buffer 800 uL를 넣어 Precellys™ Grinder (Bertin technologies, France)를 이용하여 6,000 rpm에서 30초 동안 마쇄하였으며 이후 실험조건은 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) 제작자가 제공한 protocol에 따라 추출
- 추출한 DNA는 Eco-dye (Solgent, Korea)가 첨가된 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 UV light 상에서 DNA band를 확인하였으며, DS-11 spectrophotometer (DeNOVIX, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였음
- 생체시료로부터 추출한 DNA와 Figure 3. 및 Table 10에서 선정한 종 특이적 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer 조합을 이용하여 Table 10과 같은 조건으로 PCR 증폭용 반응물을 제조하고 Table 11에서 기술한 증폭 조건으로 Conventional PCR 증폭과 Real-time PCR 분석을 실시하여 종 특이성을 확인하고 그 결과를 판별
- 개발된 종 특이적 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer 조합을 이용하여 4종의 *Zanthoxylum* 생체시료 Control과 2016년 확보한 12개의 산초유 시료를 이용하여 Conventional PCR과 Real-time PCR 분석법을 통해 산초유의 기원을 정확하게 감별하는지 Table 10의 primer와 Table 11의 방법을 이용하여 종 판별능 확인

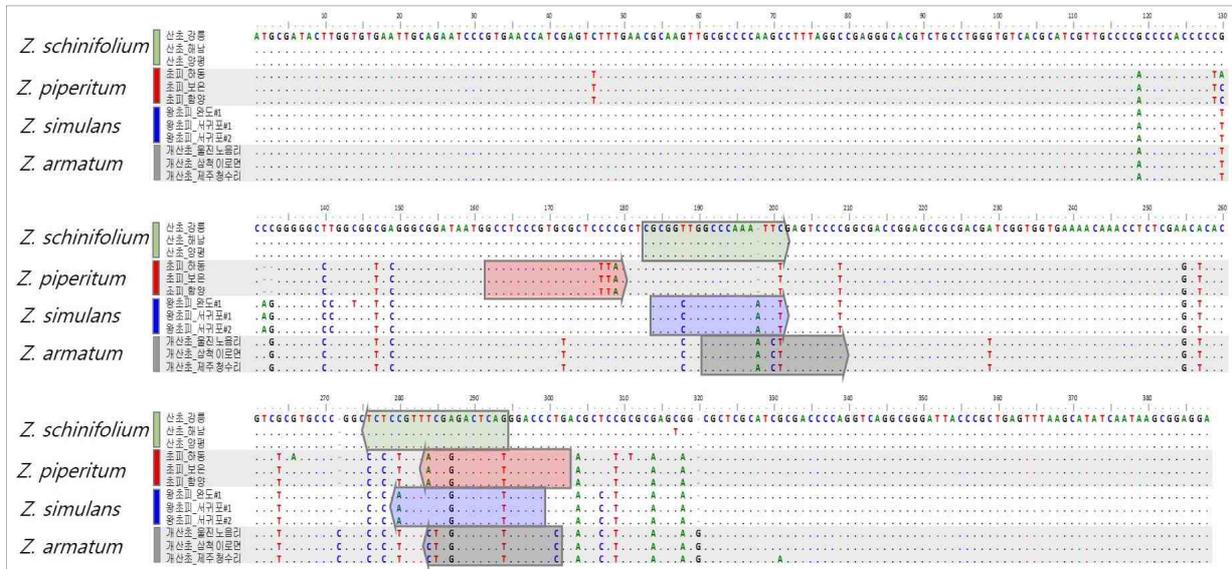


그림 35. ITS 염기서열 기반 산초원료 중 감별용 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer 탐색

표 48. ITS 염기서열 기반 산초원료 및 산초유 중 감별용 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer

Scientific name	Primer	Sequence (5'--->3')	Amplicon size(bp)	Note
<i>Z. schinifolium</i>	ZS_F1	CGC GGT TGG CCC AAA TTC	110	
	ZS_R1	CTG AGT CTC GAA ACG GAG A		
<i>Z. piperitum</i>	ZP_F1	GCC TCC CGT GCG CTC TTA	139	
	ZP_R1-1	CAG GGT CCA TGA GTC CgG T		
<i>Z. simulans</i>	ZX_F1	GCG GCT GGC CCA AAA TTT	115	
	ZX_R1	GGT CCA TGA GTC CCG AAA CT		
<i>Z. armatum</i>	ZA_F1	GCC CAA AAT CTG AGT CCC C	111	
	ZA_R1	GGG GTC CAT GAG TCC CAG		

표 49. ITS 염기서열 기반 중 특이 SCAR 유전자 마커 이용 PCR 증폭 조성물 및 조건 정보

PCR type	PCR composition (20 uL of total volume)	PCR condition
Conventional PCR	~15 ng template 0.5 umolL ⁻¹ primer Forward 0.5 umolL ⁻¹ primer Reverse Solg TM 2×Taq PCR Smart-Mix I	Step 1: 95°C, 2 min Step 2: 95°C, 20 s - 63°C, 30 s - 72°C 20 s [35 cycles] Step 3: 72°C 5 min
Real-time PCR	~15 ng template 0.5 umolL ⁻¹ primer Forward 0.5 umolL ⁻¹ primer Reverse QuantiNova TM SYBR Green PCR master Mix	Step 1: 95°C, 2 min Step 2: 95°C, 5 s - 60°C, 10 s [40 cycles] Step 3: stepwise melting from 75°C to 95°C with 1°C/5 s

· 이화학 분석과 타세부 효능연구에 사용된 산초유의 기원을 확인하기 위해 품종별, 착유방법에 따른 산초유 시료 다양성을 확보하여 SCAR 유전자 마커와 real-time 분석법을 이용하여 기원을 확인 및 유사종 혼입여부를 판별하고 개발된 유전자 마커의

감별능을 검증하고자 SCAR 마커를 이용한 Conventional PCR과 real-time 분석법을 이용하여 확인

(나) 실험결과

- *Zanthoxylum* 4종(산초, 초피, 왕초피 및 화초) 22점 시료의 *ITS2* 단일구간 염기서열 분석만을 통해 종 특이적으로 염기서열을 보이는 부위를 SCAR primer로 설계하였음. 설계된 종 특이 SCAR primer를 이용하여 산초나무, 초피나무, 왕초피 및 개산초 4종 각각을 구분하고 산초유 기원 감별을 보다 신속하게 검증할 수 있는 PCR 증폭용 유전자 마커로 개발하였음(그림 36)

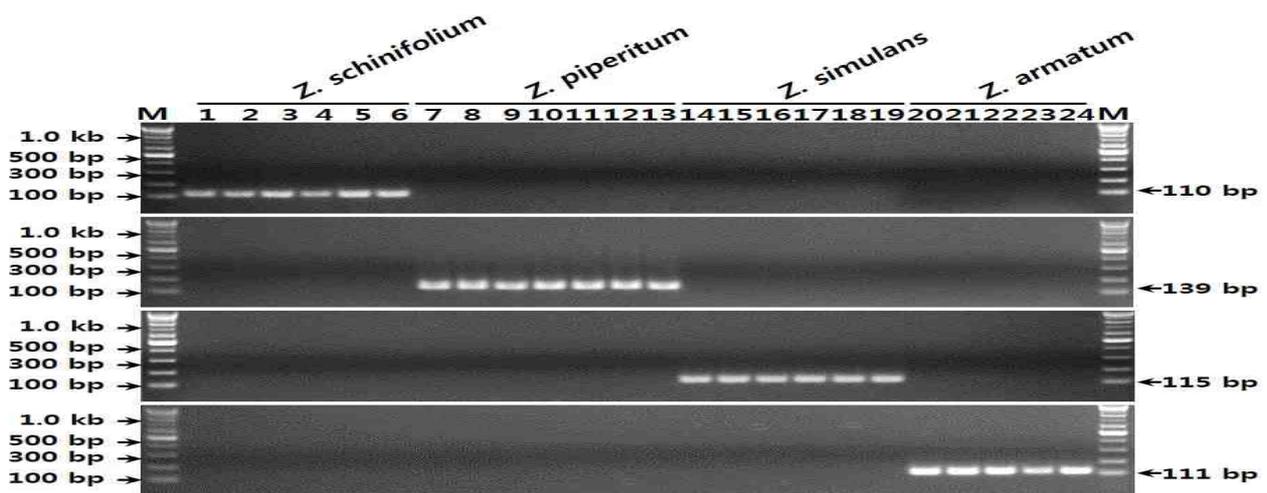


그림 36. ITS 기반 산초원료 종 감별 PCR 증폭용 SCAR 유전자 마커 개발

- 개발된 종 특이 SCAR 마커를 이용하여 정성분석만 가능한 conventional PCR 뿐만 아니라 정량분석까지 가능한 real-time PCR (qPCR) 분석법을 구축하였음. 표준검량선 결과 신뢰성 높은 수준의 PCR efficiency를 보였으며, 극소량의 정량분석이 가능함을 확인하였음. qPCR에서 SCAR 마커를 이용한 분석 결과에서도 종 특이성을 확인하였음 (그림 37, 38)

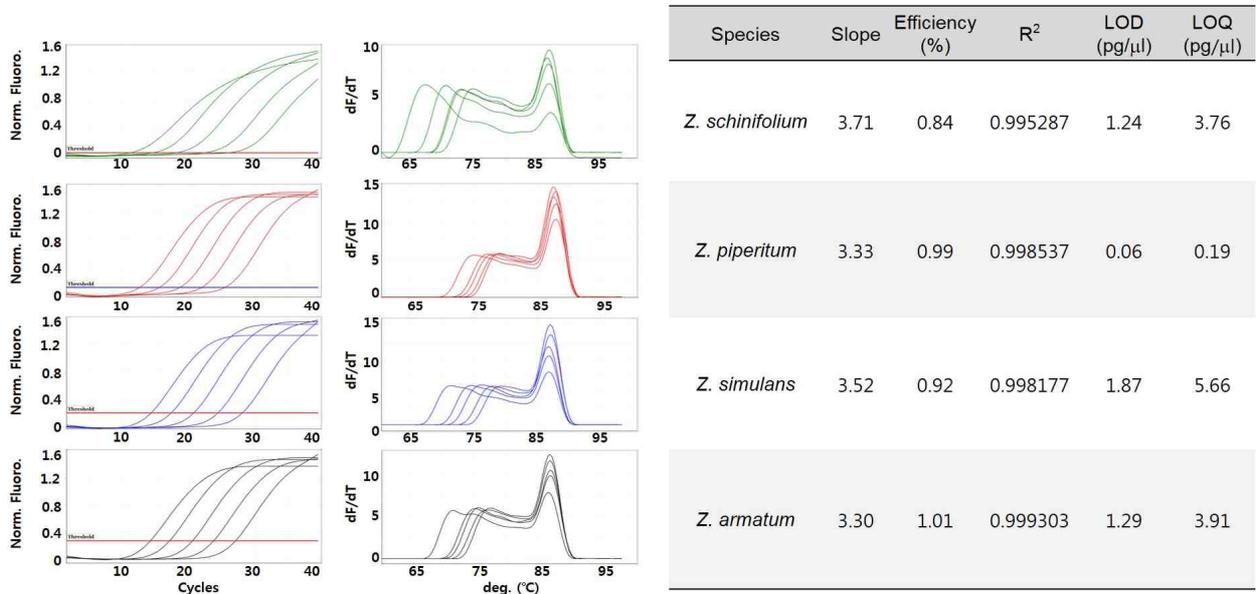


그림 37. ITS 기반 산초원료 중 감별 real-time 분석 조건 확립

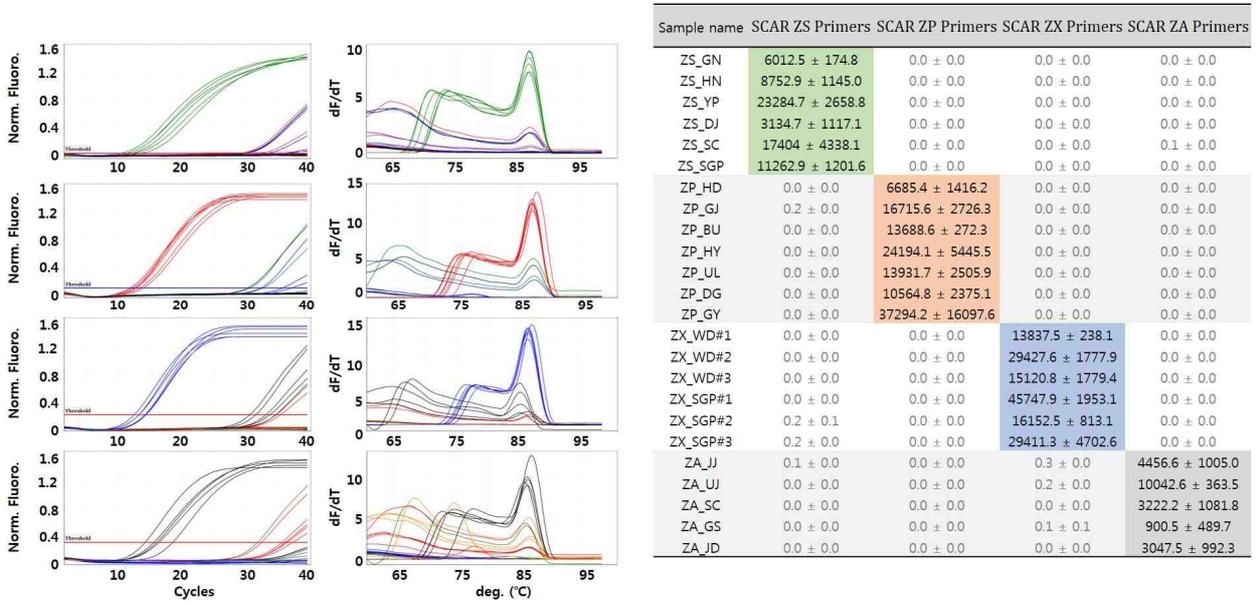


그림 38. 산초원료 중 감별용 real-time 분석법 중 특이성 검증

표 50. 유전자 감별에 이용된 산초유 시료별 상세 정보

순번	Tube label	시료형태	시료정보			
			생육형	과피함유	로스팅 시간	착유형태
1	산초유 시료 #1	oil	조생종	-	60초	압착
2	산초유 시료 #2	oil	조생종	10%	60초	압착
3	산초유 시료 #3	oil	조생종	-	60초	엑스펠라
4	산초유 시료 #4	oil	만생종	-	60초	압착
5	산초유 시료 #5	oil	만생종	10%	60초	압착
6	산초유 시료 #6	oil	만생종	-	60초	엑스펠라
7	산초유 시료 #7	oil	한초품종	-	60초	압착
8	산초유 시료 #8	oil	한초품종	10%	60초	압착
9	산초유 시료 #9	oil	한초품종	-	60초	엑스펠라
10	산초유 시료 #10	oil	시료1+4+7: 동일비율 혼합	-	60초	압착
11	산초유 시료 #11	oil	시료2+5+8: 동일비율 혼합	10%	60초	압착
12	산초유 시료 #12	oil	시료3+6+9: 동일비율 혼합	-	60초	엑스펠라

- 종 특이 SCAR 마커를 이용한 PCR 분석을 산초유에서의 적용가능여부를 확인하고자 표 50의 산초유 시료 12개로부터 gDNA를 추출하고, conventional PCR에서 품종(한초, 조생, 만생) 및 착유방법 (엑스펠라와 압착유)에 영향을 받지 않고 시료의 기원검정이 가능함을 확인한 결과, 두 가지 분석법 모두 산초유 기원 검증에 활용 가능하며 사용한 12개의 시료는 산초나무 열매에서 착유한 산초유로 확인되었음(그림 39, 40)

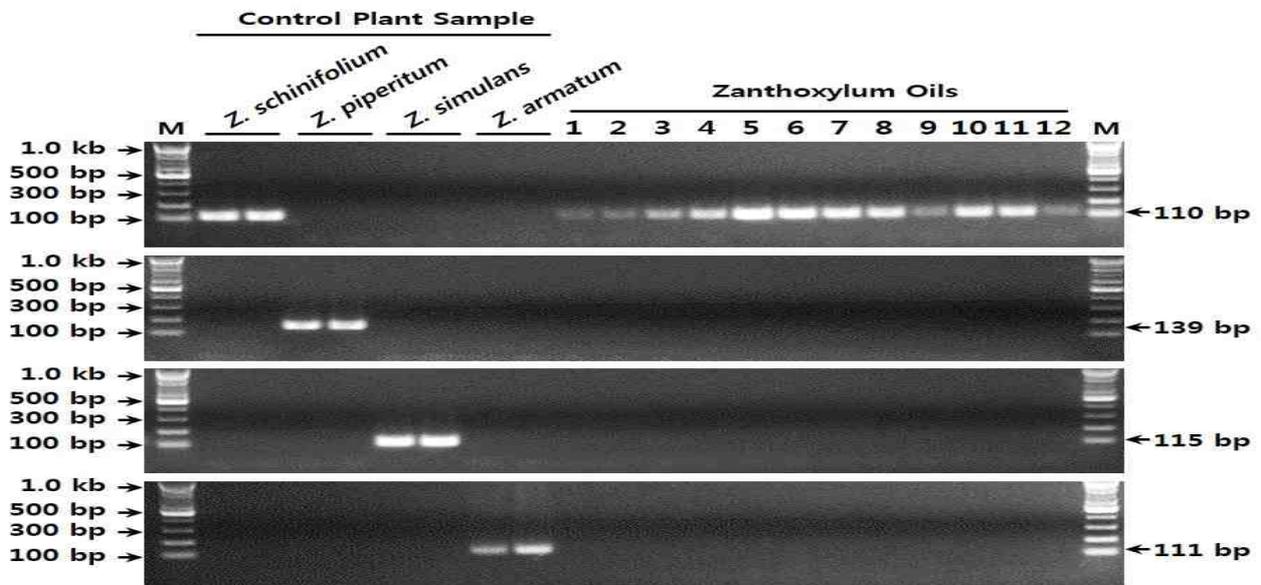


그림 39. 산초원료 기원 종 감별용 SCAR 유전자 마커를 이용한 산초유 기원 검증 및 유사종 혼입 여부 판별

Primer	SCAR ZS Primers SCAR ZP Primers SCAR ZX Primers SCAR ZA Primers			
Sample	SCAR ZS Primers	SCAR ZP Primers	SCAR ZX Primers	SCAR ZA Primers
Oil #1	3.1 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #2	1.4 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Oil #3	6.4 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #4	27.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Oil #5	4882.5 ± 1270.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #6	149.6 ± 34.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #7	105.9 ± 39.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #8	133.9 ± 23.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #9	5.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #10	24.4 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #11	15.7 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Oil #12	3.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

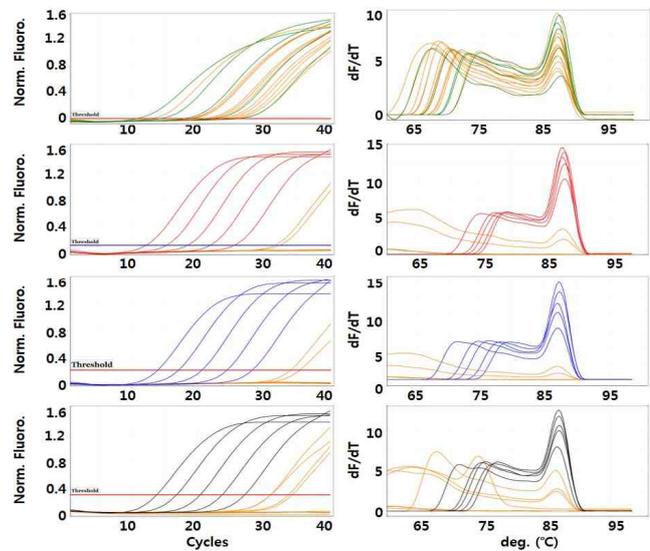


그림 40. Real-time PCR 분석법을 이용한 산초유 기원 검증 및 유사종 혼입여부 판별

4. 3차년도 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구

가. 산초유 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립

(1) LC-Q-TOF-MS를 이용한 산초 열매 추출물의 성분 프로파일

(가) 실험방법

- ① ACQUITY UPLC system(Waters)에 연결된 Impact HD Q-TOF Mass Spectrometry (Bruker)를 이용하여 70% EtOH 산초열매 추출물 분석
- ② Waters BEH C18(1.7um, 2.1x100mm) 컬럼을 이용하였으며 A용매에는 0.1% Formic acid 첨가한 water, B용매로는 0.1% Formic acid를 첨가한 ACN을 사용하였다. inject 볼륨은 3.0 uL, Flow rate는 0.35 mL/min, 컬럼 온도는 40도로 유지하였으며, 조성비는 아래 표의 Flow condition과 같이 진행

표 51. Flow condition of mobile phase

Time (min)	A (% , v/v)	B (% , v/v)
0	95	5
3	95	5
8	70	30
15	50	50
16	1	99
18	1	99
20	95	5

- ③ Mass spectrometry는 positive mode에서 mass range 50-1000을 측정하였으며, capillary voltage, +4500 V; end plate offset, 500 V; nebulizer gas, 1.5 bar; dry gas, 5 L/min at 250° C로 셋팅하였으며, Nitrogen 가스를 drying, nebulizing과 collision gas로 사용하였으며, MS/MS 분석은 3초 사이클로 fragmentation이 되도록 설정
- ④ Mass bank of North America databases의 표준품 데이터와 MS, MS/MS pattern을 비교하여 성분 동정

(나) 실험결과

① LC-Q-TOF-MS spectrum 및 성분 프로파일

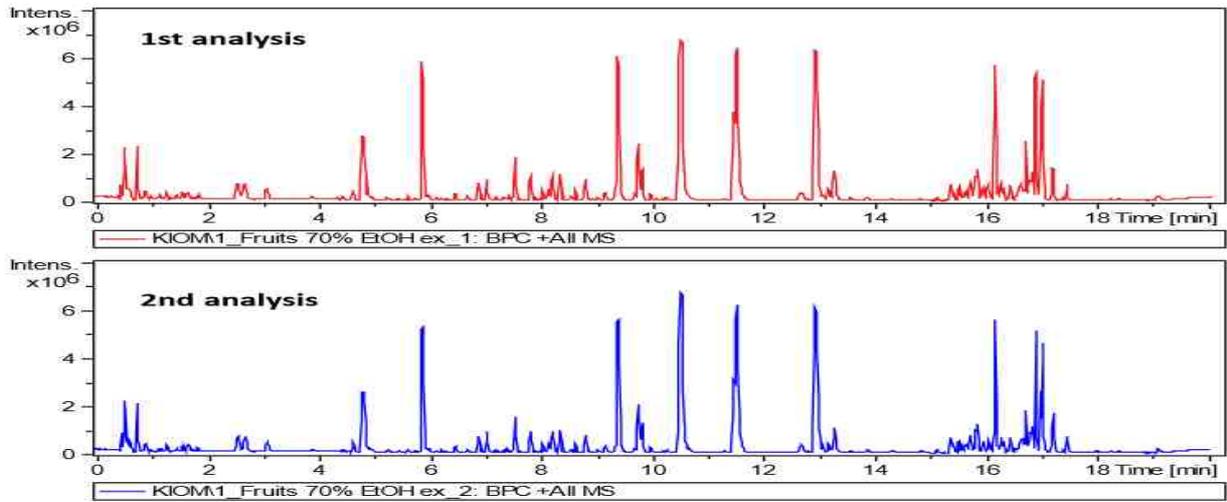


그림 41. LC-Q-TOF-MS를 이용한 산초 열매 추출물의 성분 프로파일

52. LC-Q-TOF-MS profiling of sample

RT	MS	Identified compounds	Mode
0.54	175.118	L-Arginine	[M+H] ⁺
0.64	130.0852	DL-Pipecolinic acid	[M+H] ⁺
0.81	130.0487	delta-Aminolevulinic acid	[M+H] ⁺
0.82	136.0607	Adenine	[M+H] ⁺
0.83	180.1003	Salsolinol	[M+H] ⁺
0.83	182.0796	L-TYROSINE	[M+H] ⁺
1.21	177.1011	Serotonin	[M+H] ⁺
1.63	166.085	Phenylalanine	[M+H] ⁺
2.62	151.0377	(R)-(-)-mandelic acid	[M+H] ⁺
2.88	165.0529	p-coumaric acid	[M+H] ⁺
3.14	205.0958	D-TRYPTOPHAN	[M+H] ⁺
3.94	190.0485	Kynurenic acid	[M+H] ⁺
4.33	209.1253	Pilocarpine	[M+H] ⁺
5.01	225.074	Sinapic acid	[M+H] ⁺
6.18	246.11	NCGC00160249-01!2,3-Dihydro-6-Methoxy-4-Methyl-2-Hydroxyethylfuro[3,2-c]quinoline	[M+H] ⁺
6.29	193.0483	Scopoletin	[M+H] ⁺
6.82	147.043	Coumarin	[M+H] ⁺
7.82	195.0638	trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate	[M+H] ⁺
8.13	288.1558	Etodolac	[M+H] ⁺
8.17	272.1616	Napropamide	[M+H] ⁺
8.21	197.0792	ortho-Chlorophenylpiperazine	[M+H] ⁺
8.51	246.0735	MLS001049015-01!4,8-dimethoxy-9H-furo[2,3-b]quinolin-7-one	[M+H] ⁺
8.8	177.0529	4-Methylumbelliferone	[M+H] ⁺
9.77	217.0478	Methoxsalen (Oxsoalene)	[M+H] ⁺
9.78	260.0896	Skimmianine	[M+H] ⁺
11.34	175.0367	4-Methylumbelliferone	[M+H] ⁺
12.59	223.059	Trinexapac	[M+H] ⁺
12.7	258.1827	MLS001401402-01!(+)-3-Hydroxy-N-methylmorphinan D-tartrate	[M+H] ⁺
13.35	242.1157	Mefenamic acid	[M+H] ⁺
15.51	193.0482	3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid	[M+H] ⁺
15.72	211.1083	Dihydrochalcone	[M+H] ⁺
15.72	267.1697	Triisobutyl phosphate	[M+H] ⁺
16.53	281.2447	Linoleic acid	[M+H] ⁺
17.99	221.1522	3-(8-hydroxyoctyl)phenol	[M+H] ⁺

② Figure 1과 Table 2의 후보 성분 물질 중에서 intensity가 20000이상인 후보 성분의 표준품과의 ms/ms pattern 일치 패턴은 아래와 같음

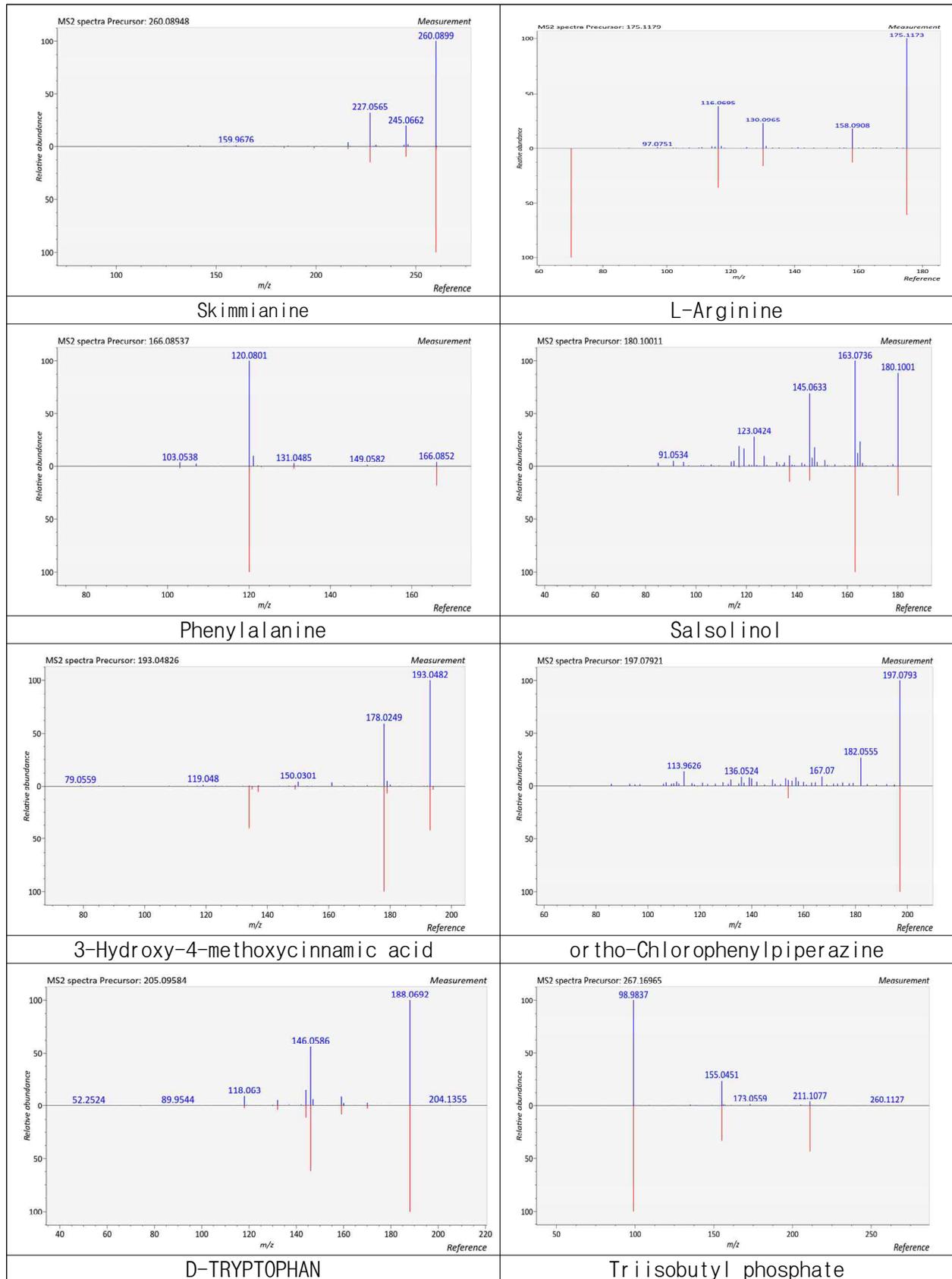


그림 42. LC-Q-TOF-MS/MS pattern

(2) GC-MS를 이용한 산초유 지방산 분석

(가) 실험방법

① 시료 정보

표 53. 생산연도별 시료 정보

생산연도	시료명	라벨명
2016 (1차년도)	조생종 유압압착	1-1
	만생종 유압압착	1-2
	신품종(한초) 유압압착	1-3
	혼합 유압압착	1-4
	조생종 엑스펠라착유	1-5
	만생종 엑스펠라착유	1-6
	신품종(한초) 엑스펠라착유	1-7
	혼합 엑스펠라착유	1-8
2017 (2차년도)	조생종 유압압착	2-1
	만생종 유압압착	2-2
	신품종(한초) 유압압착	2-3
	혼합 유압압착	2-4
	조생종 엑스펠라착유	2-5
	만생종 엑스펠라착유	2-6
	신품종(한초) 엑스펠라착유	2-7
	혼합 엑스펠라착유	2-8
2018 (3차년도)	조생종 유압압착	3-1
	만생종 유압압착	3-2
	신품종(한초) 유압압착	3-3
	혼합 유압압착	3-4
	조생종 엑스펠라착유	3-5
	만생종 엑스펠라착유	3-6
	신품종(한초) 엑스펠라착유	3-7
	혼합 엑스펠라착유	3-8

② 전처리

- 25 mg의 oil 시료+IS 1mL+0.5N NaOH(in MeOH) 1.5 mL → 100°C 5분 가열
- 냉각 후 14% BF₃ in MeOH(aq) 2 mL → 100°C 30분 가열
- 냉각 후 isooctane 1 mL 후 진탕 30초
- NaCl (Con. aq) 5 mL 후 진탕 30초
- 상층만 NaSO₄를 통과한 후 GC-MS분석
- STD MIX는 serial dilution (5~6개 농도)
- STD와 Sample농도를 비교하여 dilution

③ GC-MS 분석 조건

- 기체크로마토그래피 조건 지방산 분석시 C18:3 (Linolenic acid, n3 cis)과 C20:1 (Eicosenic acid) 및 C22:1 (Docosaenoic acid), C20:3 (Eicosatrienoic acid)와 C20:4

(Arachidonic acid)의 분리도는 1.0 이상으로 분석 조건 설정.

- 칼럼 : Agilent '112-88A7'
- 주입부온도 : 225°C
- 칼럼온도 : 100°C 에서 4분간 유지한 후 3°C/min의 비율로 240°C까지 온도를 상승시키고 이후 15분 이상유지

(나) 실험결과

① TIC chromatogram

- 12.4분, 19.3분, 20.6분, 23.3분, 24.4분, 26.1분, 28.3분, 28.6분대에서 estragole, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, cis-11-eicosenoic acid가 각각 검출
- TIC chromatogram (0.0-40.6 min)

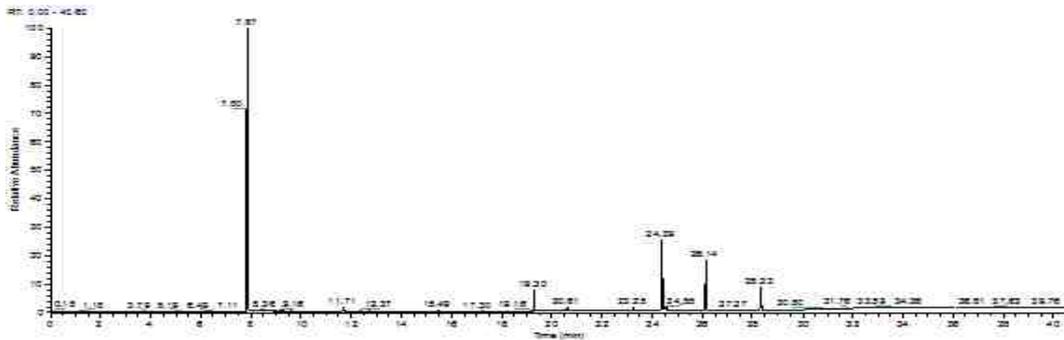


그림 43. TIC chromatogram (0.0-40.6 min)

- TIC chromatogram (12.0-30.0 min)

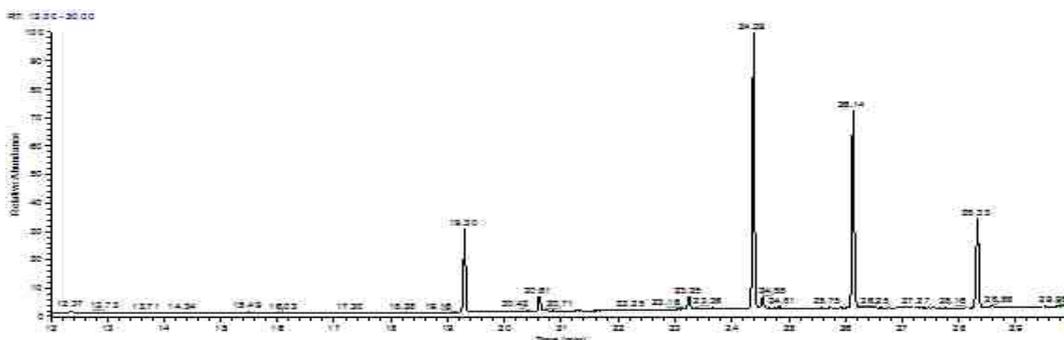


그림 44. TIC chromatogram (12.0-30.0 min)

② 표준품 MS spectrum (표 54, 55)

표 54. Retention time, m/z, and MS spectrum of each component

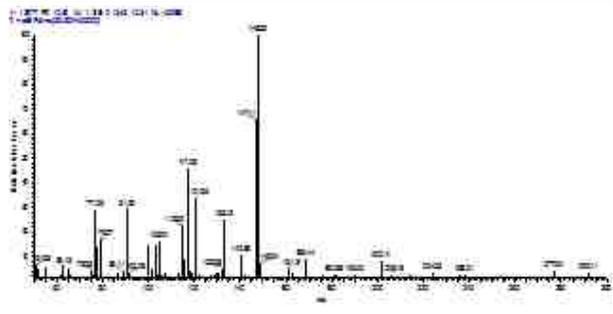
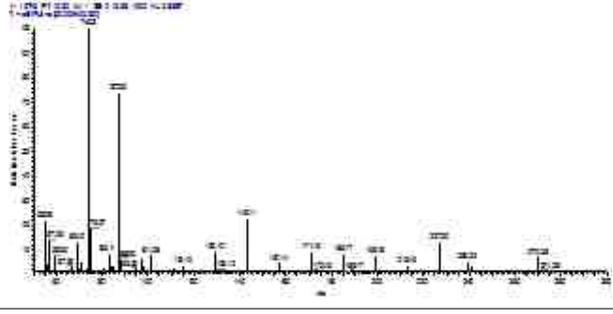
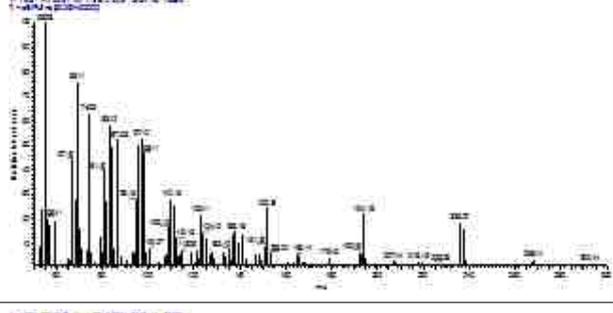
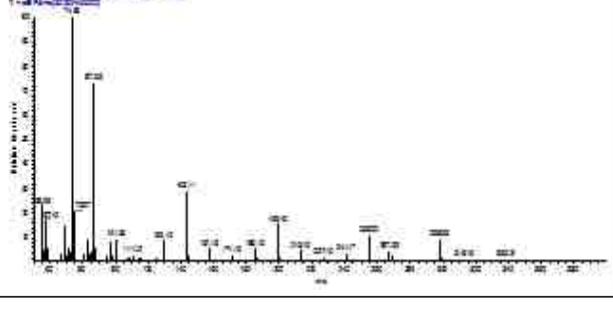
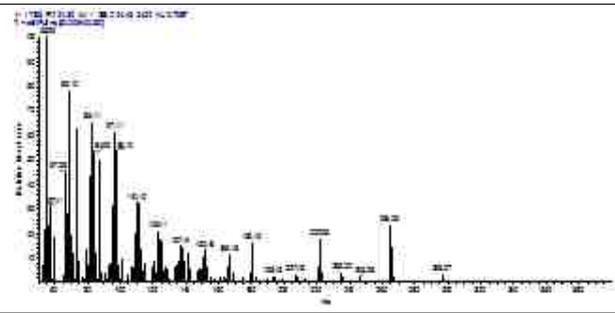
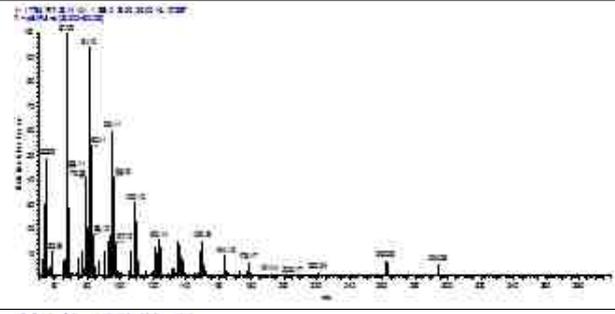
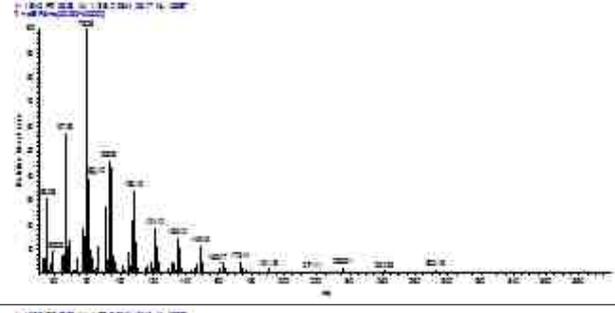
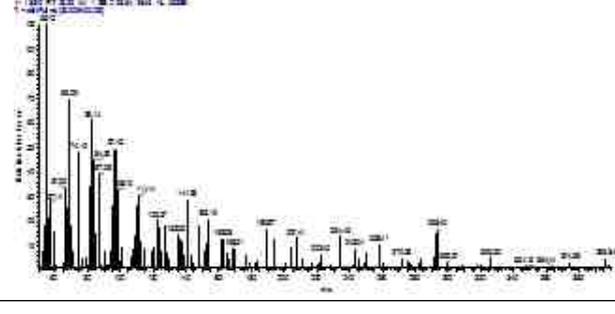
Retention time (min)	Compound	m/z	MS spectrum
12.4	Estragole	148.09	
19.4	Palmitic acid	270.24	
20.6	Palmitoleic acid	268.27	
23.3	Stearic acid	298.29	

표 55. Retention time, m/z, and MS spectrum of each component

Retention time (min)	Compound	m/z	MS spectrum
24.5	Oleic acid	296.29	
26.2	Linoleic acid	294.27	
28.4	Linolenic acid	292.23	
28.6	Cis-11-Eicosenoic acid	326.37	

③ 분석결과 (피크면적비)

- 시료 모두 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid가 약 80%가량을 차지함
- Estragole을 제외한 지방산의 함량을 보면, 포화지방산 (palmitic acid, stearic acid) 과 불포화지방산 (palmitoleic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, Cis-11-eicosenoic acid)의 비율은 대략 1:5 정도임

표 56. Content (ug/mg) of the eight components in each sample

Sample	Compound							
	Estragole	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid	cis-11-Eicosenoic acid
1-1	0.18	11.2	2.02	1.74	39.85	29.52	15.08	0.41
1-2	0.26	13.05	2.09	1.89	38.84	27.41	16.13	0.34
1-3	0.42	13.23	2.23	1.66	39.99	27.31	14.77	0.39
1-4	0.39	13.11	2.28	1.61	39.74	27.68	14.83	0.35
1-5	0.20	12.91	2.18	1.65	37.42	29.22	16.06	0.37
1-6	0.19	12.04	1.77	1.96	37.24	28.39	18.03	0.38
1-7	0.44	12.80	2.05	1.63	38.98	27.82	15.91	0.37
1-8	0.33	12.53	1.94	1.69	38.22	28.98	15.92	0.39
2-1	0.13	13.47	1.99	1.72	40.04	26.53	15.82	0.31
2-2	0.15	12.98	2.33	1.35	38.71	27.20	16.93	0.35
2-3	0.22	13.90	2.39	1.38	39.19	27.10	15.50	0.32
2-4	0.14	13.19	2.13	1.49	39.07	27.33	16.35	0.30
2-5	0.17	14.32	2.28	1.47	39.72	25.60	16.21	0.23
2-6	0.17	13.12	2.27	1.44	38.03	27.62	17.01	0.34
2-7	0.74	13.33	2.19	1.29	39.47	27.51	15.20	0.26
2-8	0.37	13.73	2.23	1.32	39.13	26.72	16.23	0.28
3-1	0.26	13.28	1.79	1.75	40.11	27.56	14.85	0.39
3-2	0.14	14.28	2.70	1.43	38.12	27.28	15.79	0.26
3-3	0.32	13.09	2.34	1.30	37.33	29.43	15.93	0.27
3-4	0.19	13.61	2.22	1.51	38.71	27.91	15.55	0.30
3-5	0.28	12.17	1.52	1.73	38.88	29.18	15.81	0.42
3-6	0.26	13.14	2.50	1.38	37.02	28.43	17.02	0.24
3-7	0.36	12.47	2.19	1.24	35.89	30.42	17.20	0.23
3-8	0.34	12.72	2.07	1.42	37.88	28.88	16.44	0.25

나. 산초유 원료 감별을 위한 유전자 마커 개발

(1) 산초원료 유사종 혼입여부 확인을 위한 유전자 감별법 평가 및 검증

(가) 산초 및 산초 유사종 신속·간편 감별을 위한 PCR 증폭용 유전자 마커 감별능 검증
 2017년(2차년도) 개발한 유전자 마커의 경우 국내에 극히 일부지역에만 자생하는 왕초피(*Zanthoxylum simulans* Hance)를 포함하여 산초나무, 초피나무, 왕초피나무, 개산초를 포함하는 4종에 대한 유전자 마커를 개발하였으나, 시중에 중국에서 산초로 이용하는 화초(*Z. bungeanum*)의 종자에서 착유한 기름을 화초유로 팔고 있어 원료로서 혼입될 가능성이 낮은 왕초피를 대신하여 중국의 화초를 포함한 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초 4종에 대한 유전자 감별 마커 개발을 재 수행하였으며, 개발된 SCAR 유전자 마커를 이용하여 Conventional PCR 분석법과 real-time 분석법에 대한 감별능 평가와 검증을 수행

① 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초 감별용 유전자 마커 개발(대상종 변경으로 재 진행)

㉞ 실험방법

- 2017년(2차년도) 유전자 마커 개발에 이용한 산초나무, 초피나무 및 개산초 3종과 중국산 화초의 유전자 감별법 개발을 위해 중국산 산초 한약재로부터 화초를 선별 하여 약재 약 100mg을 Lysing matrix A™ tube (MP biomedical, USA)에 담아

DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA)의 extraction buffer 800 uL를 넣어 Precellys™ Grinder (Bertin technologies, France)를 이용하여 6,000 rpm에서 30초 동안 마쇄하였으며 이후 실험조건은 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) 제작자가 제공한 protocol에 따라 추출하였음(Table 6)

- 추출한 DNA는 Eco-dye (Solgent, Korea)가 첨가된 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 UV light 상에서 DNA band를 확인하였으며, DS-11 spectrophotometer (DeNOVIX, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였음

표 57. *Zanthoxylum* 4종 시료 목록 및 정보(3차년도 재 진행 대상종 및 시료)

No.	Scientific name	Collection site	Voucher number	NCBI accession	Abbreviation
1		Seongsan, Gangneung, Gangwon-do	KIOM2012KR11-21	MH321526	ZS_GN
2		Gyegok, Haenam, Jeollanam-do	KIOM2012KR14-13	MH321527	ZS_HN
3	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	Danwol, Yangpyeong, Gyeonggi-do	KIOM2012KR4-17	MH321528	ZS_YP
4		Dongseo, Yuseong, Daejeon	KIOM2012KR5-17	MH321529	ZS_DJ
5		Gonyang, Sacheon, Gyeongsangnam-do	KIOM2012KR9-12	MH321530	ZS_SC
6		Saekdal, Seogwipo, Jeju-do	KIOM2012KR8-45	MH321531	ZS_SGP
7		Agyang, Hadong, Gyeongsangnam-do	KIOM2012KR12-44	MH321532	ZP_HD
8		Banpo, Gongju, Chungcheongnam-do	KIOM2012KR13-35	MH321533	ZP_GJ
9		Songnisan, Boeun, Chungcheongbuk-do	KIOM2012KR13-23	MH321534	ZP_BU
10	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Anui, Hamyang, Gyeongsangnam-do	KIOM2012KR6-14	MH321535	ZP_HY
11		Buk, Ulleung, Gyeongsangbuk-do	KIOM2013KR5-47	MH321536	ZP_UL
12		Gachang, Dalseong, Daegu	KIOM2013KR10-38	MH321537	ZP_DG
13		Ongnyong, Gwangyang, Jeollanam-do	KIOM2013KR2-22	MH321538	ZP_GY
14		Hangyeong, Jeju, Jeju-do	MBC_KIOM-2016-375	MH321539	ZA_JJ
15		Geunnam, Uljin, Gyeongsangbuk-do	MBC_KIOM-2017-1	MH321540	ZA_UJ
16	<i>Zanthoxylum armatum</i>	Miro, Samcheok, Gangwon-do	MBC_KIOM-2017-2	MH321541	ZA_SC
17		Hai, Goseong, Gyeongsangnam-do	MBC_KIOM-2017-5	MH321542	ZA_GS
18		Gogun, Jindo, Jeollanam-do	KIOM200701000313	MH321543	ZA_JD
19		Jiangjin, Chongqing, China	KIOM201201005616	MH321544	ZB_JK
20	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	Sichuan, China	KIOM2018-GM	MH321545	ZB_SC#1
21		Sichuan, China	KIOM2018-WG	MH321546	ZB_SC#2
22		Sichuan, China	KIOM2018-ON	MH321547	ZB_SC#3

- 화초 4개 시료의 *ITS2* 구간의 염기서열 정보를 확보하기 위해 1차년도와 같은 방법으로 *ITS2* 부위를 PCR 증폭을 하였으며, PCR 조성은 총 40 uL⁻¹으로 15 ng의 genomic DNA, 각 0.5 umolL⁻¹의 *ITS2*-S2F (5' ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT 3')와 *ITS4* (5' TCC TCC GCT TAT TTG ATA TGC 3') primer 그리고 Solg™ 2×Taq PCR Smart-Mix I (Solgent, Korea)를 혼합하여 반응액을 제조하였고, PCR 반응은 32×3 ProFlex™ PCR SYSTEM (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 95℃

- /2분 1회, 95°C/1분-53°C/40초-72°C/1분 35회 반복, 72°C/5분 1회 조건으로 하였음
- *ITS2* 유전자 부위의 증폭산물은 DNA 염기서열 분석을 위해 1.5% agarose gel 상에서 100 bp DNA ladder (Solgent, Korea) marker와 함께 전기영동하고 예상된 밴드 크기로 증폭된 유전자 PCR 증폭산물은 회수하여 Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 정제한 뒤 pGEM-T easy Vector Systems (Promega, USA)에 삽입하였음. 삽입된 증폭산물은 Hit blue competent cell(RBC science, USA)에 형질전환한 뒤 ampicillin과 X-gal/IPTG가 첨가된 LB agar 배지에 도말하여 약 18시간 배양한 후, 각 시료별로 선별된 white colony는 (주)솔젠트에 SP6 primer를 이용하여 염기서열 분석을 의뢰하여 염기서열 정보를 확보하였으며, 각 시료별로 분석된 colony의 염기서열을 비교하여 최종 확정하였음
 - 최종 확정된 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초 *ITS2*염기서열을 비교하여 1차년도와 같은 방법으로 종 특이 염기서열을 탐색하였음
 - Conventional PCR 증폭용 SCAR 유전자 마커 개발과 이를 이용한 Real-time 분석법 개발을 위해 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초 4종의 *ITS2* 염기서열을 비교하고 종 특이적 염기를 포함하는 SCAR 마커 증폭용 primer를 탐색하고 제작하였음
 - 선정된 신규 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer의 종 특이성 검증을 위해 생체시료 약 100 mg은 Lysing matrix A™ tube (MP biomedical, USA)에 담아 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA)의 extraction buffer 800 uL를 넣어 Precellys™ Grinder (Bertin technologies, France)를 이용하여 6,000 rpm에서 30초 동안 마쇄하였으며 이후 실험조건은 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) 제작자가 제공한 protocol에 따라 추출
 - 추출한 DNA는 Eco-dye (Solgent, Korea)가 첨가된 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 UV light 상에서 DNA band를 확인하였으며, DS-11 spectrophotometer (DeNOVIX, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였음
 - Table 6의 생체시료로부터 추출한 DNA와 염기서열 비교를 통해 탐색한 종 특이적 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer 조합을 이용하여 2차년도와 같은 조건과 방법으로 PCR 증폭용 반응물을 제조하고 Conventional PCR 증폭과 Real-time PCR 분석을 실시하여 종 특이성을 확인하고 그 결과를 판별

㉔ 실험결과

- *ITS2* 염기서열 분석결과 산초나무, 초피나무, 화초 및 개산초 종 감별이 가능한 Marker nucleotide 각 17, 7, 6 및 9개 위치에서 확인

표 58. 산초나무 및 유사종 4종의 *ITS2* DNA 바코드 종 특이 염기서열 정보

Nucleotide position	46	119	129	130	132	133	140	172	177	178	179	200	201	229	255	257	258	264
산초	C	G	C	G	C	C	T	C	C	C	C	T	C	A	A	A	C	G
초피	T	A	T	A/C	-	-	C	C	T	T	A	T	T	A	G	T	C	T
화초	C	A	C	T	C	-	C	C	C	C	C	T	T	A	G	T	A	T
개산초	C	A	C	T	C	G	C	T	C	C	C	C	T	T	G	T	C	T

Nucleotide position	272	276	278	280	284	285	287	294	295	301	304	307	309	314	318	319	321	330
산초	-	T	T	C	T	C	A	G	G	T	C	T	C	G	G	G	C	C
초피	-	C	C	T	A	C	G	T	G	T	A	T	T	A	A	G	C	C
화초	-	C	C	T	T	C	G	T	A	T	A	T	T	A	-	A	T	T
개산초	C	C	C	T	C	T	G	T	G	C	A	C	T	A	A	G	C	C

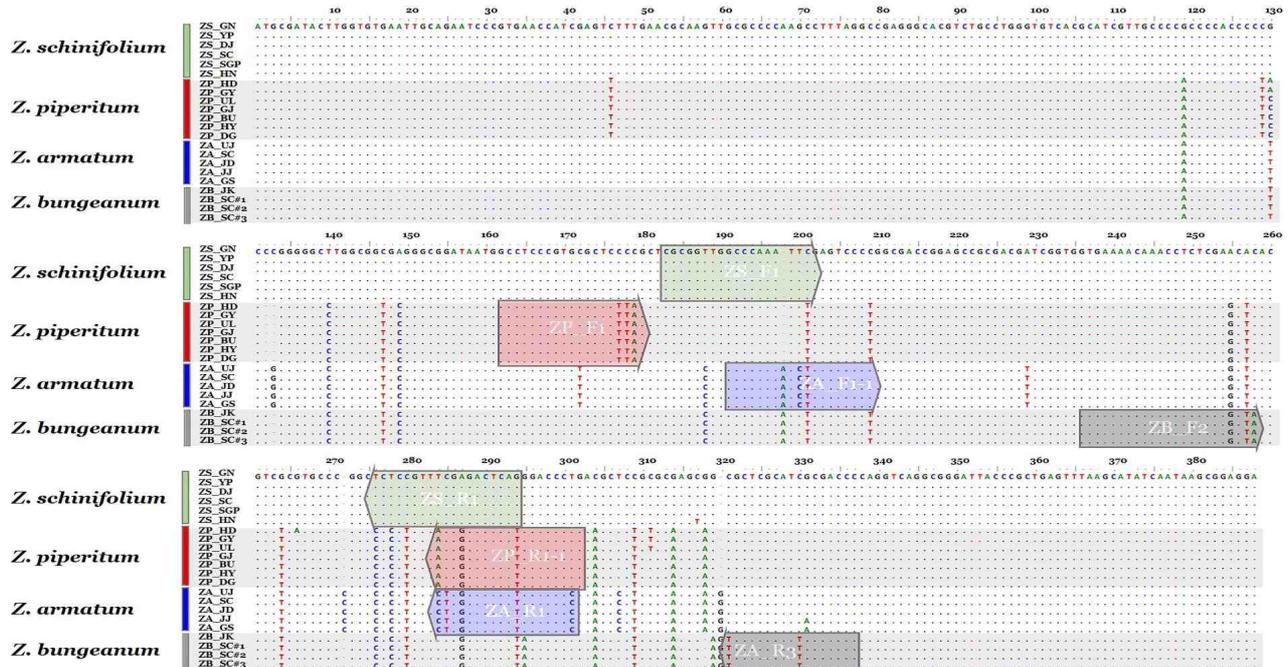


그림 45. *Zanthoxylum* 4종의 *ITS2* 구간 염기서열 분석

표 59. *ITS2* 종 특이 염기서열 기반 SCAR 유전자 마커 PCR 증폭용 primer 정보

Scientific name	Primer	sequence (5' -3')	Marker name	Amplicon size (bp)
<i>Z. schinifolium</i>	ZS_F1	CGC GGT TGG CCC AAA TTC	ZS#1	110
	ZS_R1	CTG AGT CTC GAA ACG GAG A		
<i>Z. piperitum</i>	ZP_F1	GCC TCC CGT GCG CTC TTA	ZP#2	139
	ZP_R1-1	CAG GGT CCA TGA GTC CGG T		
<i>Z. armatum</i>	ZA_F1-1	GCC CAA AAT CTG AGT CCG C	ZA#3	111
	ZA_R1	GGG GTC CAT GAG TCC CAG		
<i>Z. bungeanum</i>	ZB_F2	GTG AAA ACA AAC CTC TCG	ZB#21	100
		AGC TA		
	ZB_R3	GGG TCG CAA TGC GAG CA		

표 60. *ITS2* 염기서열 기반 종 특이 SCAR 유전자 마커 이용 PCR 증폭 조성물 및 조건 정보

PCR type	PCR composition (20 uL of total volume)	PCR condition
Conventional PCR	~15 ng template 0.5 umolL ⁻¹ primer Forward 0.5 umolL ⁻¹ primer Reverse Solg TM 2×Taq PCR Smart-Mix I	Step 1: 95°C, 2 min Step 2: 95°C, 20 s - 63°C, 30 s - 72°C 20 s [35 cycles] Step 3: 72°C 5 min
Real-time PCR	~15 ng template 0.5 umolL ⁻¹ primer Forward 0.5 umolL ⁻¹ primer Reverse QuantiNova TM SYBR Green PCR master Mix	Step 1: 95°C, 2 min Step 2: 95°C, 5 s - 60°C, 10 s [40 cycles] Step 3: stepwise melting from 75°C to 95°C with 1°C/5 s

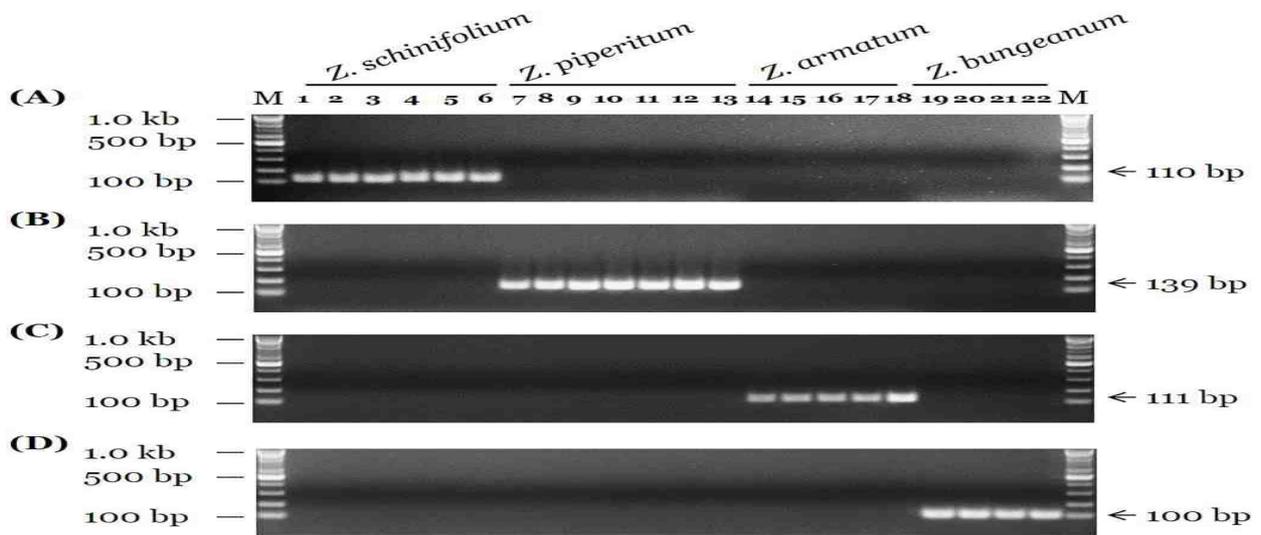


그림 46. *ITS2*종 염기서열 기반 PCR 증폭용 종 특이 SCAR 유전자 마커 개발
 (A) 산초, (B) 초피, (C) 개산초, (D) 화초

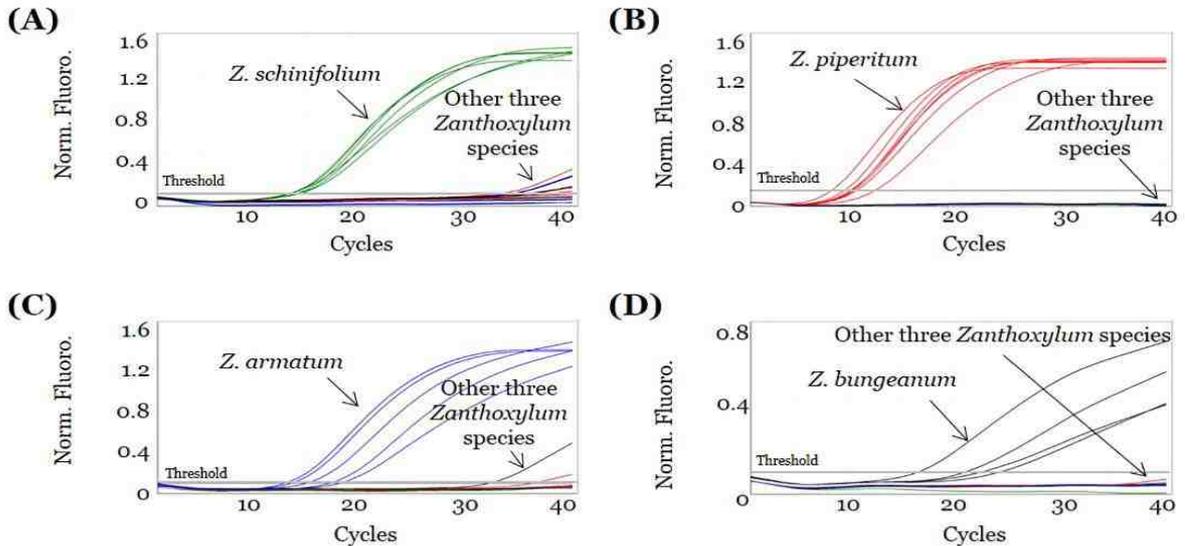


그림 47. 개발 종 특이 SCAR 마커를 이용한 real-time PCR 분석법 개발
 종특이성 확인. (A) 산초 특이 마커 ZS#1, (B) 초피 특이 마커 ZP#2, (C) 개산초 특이
 마커 ZA#3, (D) 화초 특이 마커 ZB#21

· 산초나무, 초피나무, 화초 및 개산초를 포함하는 *Zanthoxylum* 4종 22점 시료의 *ITS2* 단일구간 염기서열 분석만을 통해 종 특이적으로 염기서열을 보이는 부위를 SCAR primer로 설계하고, 이들 Primer조합을 이용하여 4종에 대한 종 특이성을 Conventional PCR 분석법으로 확인한 결과, SCAR primer는 산초나무, 초피나무, 화초 및 개산초 4종을 각각 종단위에서 구분함을 확인하였음

표 61. 개발 SCAR 마커를 이용한 real-time PCR 분석법 개발: 표준 정량선 분석

Marker name	Slope	Efficiency (%)	R ²
ZS#1	3.28 ± 0.03	101.3 ± 1.5	0.99629 ± 0.00065
ZP#2	3.35 ± 0.03	98.6 ± 1.1	0.99908 ± 0.00045
ZA#3	3.34 ± 0.01	99.0 ± 1.0	0.99485 ± 0.00516
ZB#21	3.35 ± 0.10	98.6 ± 4.1	0.99652 ± 0.00222

Mean values ± standard deviation (n=6)

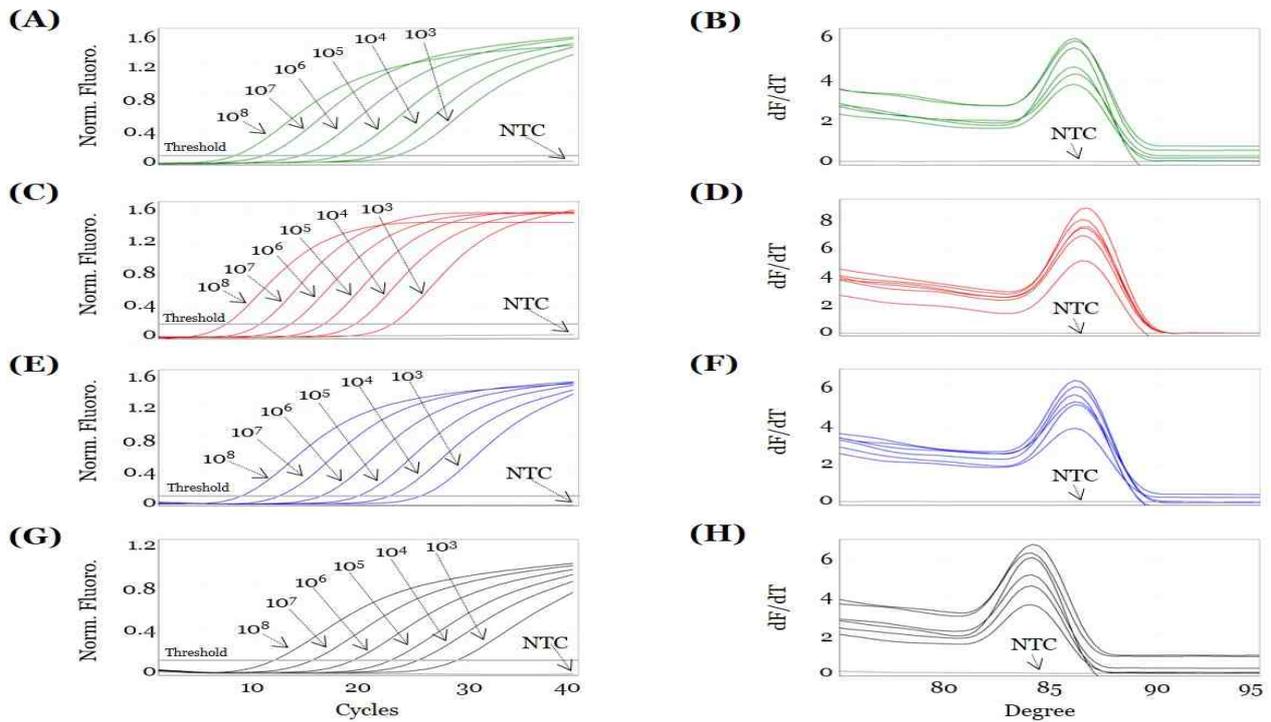


그림 48. 개발 SCAR 마커를 이용한 real-time PCR 분석법 개발: 표준 정량선 분석

(A, C, E, G) real-time PCR cycling, (B, D, F, H) melting curve analysis, (A, B) 산초, (C, D) 초피, (E, F) 개산초, (G, H) 화초.

- 개발된 산초나무, 초피나무, 화초 및 개산초 감별용 SCAR primer를 이용한 real-time 분석법의 정량분석을 위한 표준검량선을 확인한 결과 98.6~101.3%의 신뢰성 높은 수준의 분석값을 확인함으로써, 산초유에 극소량의 유사품이 혼입되어도 확인이 가능한 real-time 분석법을 개발

② 산초원료 유사종 혼입여부 확인을 위한 유전자 감별법 평가 및 검증(대상종 변경으로 개발된 신규 유전자 마커 검증 재 진행)

㉠ 실험방법

- 대상종을 달리하여 재 탐색한 종 특이적 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer 조합을 이용하여 4종의 *Zanthoxylum* 생체시료 Control과 2016년 확보한 12개의 산초유 시

료를 이용하여 Conventional PCR과 Real-time PCR 분석법을 통해 산초유의 기원을 정확하게 감별하는지 중 판별능 확인

㉔ 실험결과

- 중 특이 SCAR 마커를 이용한 PCR 분석을 산초유에서의 적용가능여부를 확인하였고, conventional PCR에서 품종(한초, 조생, 만생) 및 착유방법 (엑스펠라와 압착유)에 영향을 받지 않고 시료의 기원검정이 가능함을 확인하였음. 동일한 시료를 이용하여 qPCR 분석법을 이용한 검정결과도 동일하였으며, 극소량의 DNA함유 상태에서도 분석이 가능함을 확인하였음

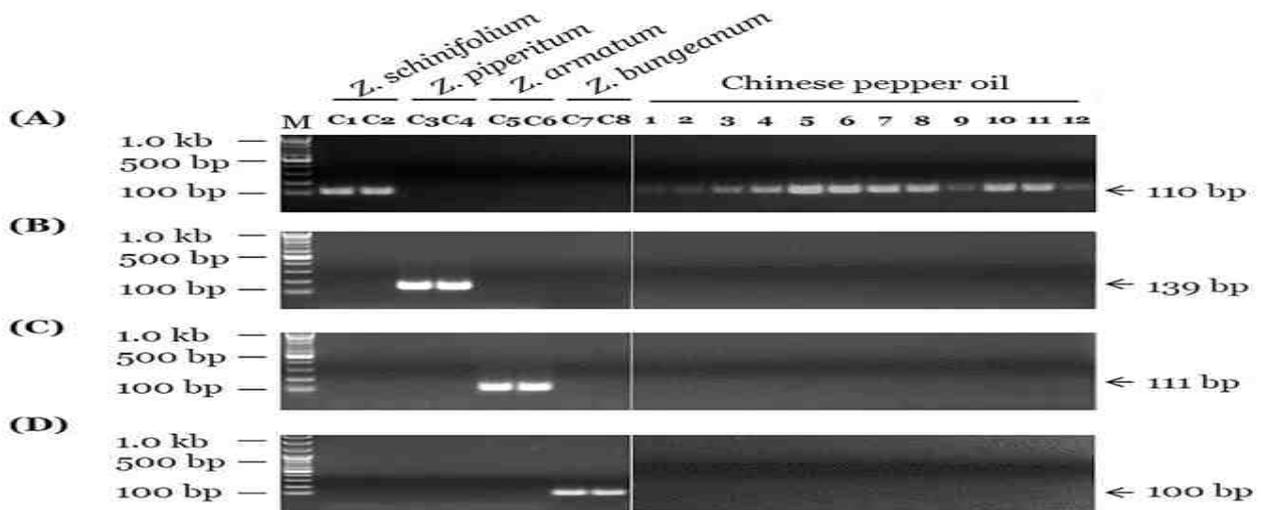


그림 49. 개발된 SCAR 마커를 이용한 산초유 기원검정

표 62. SCAR 마커를 이용한 산초유 기원검정의 conventional PCR 및 qPCR 분석 결과

No	Product form	Species identification result	
		Real-time PCR (quantification; copy number)	Conventional PCR
1	Expeller	<i>Z. schinifolium</i> (343 ± 45)	<i>Z. schinifolium</i>
2	Expeller	<i>Z. schinifolium</i> (265 ± 58)	<i>Z. schinifolium</i>
3	Expeller	<i>Z. schinifolium</i> (1,626 ± 230)	<i>Z. schinifolium</i>
4	Expeller	<i>Z. schinifolium</i> (7,538 ± 351)	<i>Z. schinifolium</i>
5	Oil press+10% pericarp	<i>Z. schinifolium</i> (3,372,712 ± 309,174)	<i>Z. schinifolium</i>
6	Oil press+10% pericarp	<i>Z. schinifolium</i> (45,663 ± 6,810)	<i>Z. schinifolium</i>
7	Oil press+10% pericarp	<i>Z. schinifolium</i> (29,508 ± 2,454)	<i>Z. schinifolium</i>
8	Oil press+10% pericarp	<i>Z. schinifolium</i> (39,185 ± 5,944)	<i>Z. schinifolium</i>
9	Oil press	<i>Z. schinifolium</i> (1,021 ± 89)	<i>Z. schinifolium</i>
10	Oil press	<i>Z. schinifolium</i> (6,608 ± 882)	<i>Z. schinifolium</i>
11	Oil press	<i>Z. schinifolium</i> (3,942 ± 282)	<i>Z. schinifolium</i>
12	Oil press	<i>Z. schinifolium</i> (725 ± 118)	<i>Z. schinifolium</i>

Mean values ± standard deviation (n=3)

다. 산초원료 및 산초유 기원 감별용 유전자 감별 키트 시제품 개발

개발된 *Zanthoxylum* 4종 (산초, 초피, 개산초 및 화초)의 종 특이적 SCAR 마커는 ‘산초유 유전자 감별 kit’ 로 제작하여 이용가능 한지 시제품 개발을 통해 확인하였으며, 개발된 유전자 감별법은 유전자 기원검정을 필요로 하는 국가기관, 연구소, 산업체에 제공 가능



그림 50. 산초유 유전자 감별 kit 시제품 개발

5. 4차년도 산초유 기능성분 규격 및 원료 특성 연구

가. 산초유 기능성분에 대한 규격 및 시험방법 확립

(1) GC-MS를 이용한 산초유의 지방산 분석

(가) 산초유의 전처리

- 25 mg의 oil 시료+IS 1mL+0.5N NaOH(in MeOH) 1.5 mL → 100°C 5분 가열
- 냉각 후 14% BF₃ in MeOH(aq) 2 mL → 100°C 30분 가열
- 냉각 후 isooctane 1 mL 후 진탕 30초
- NaCl (Con. aq) 5 mL 후 진탕 30초
- 상층만 NaSO₄를 통과한 후 GC-MS분석
- STD MIX는 serial dilution (5~6개 농도)
- STD와 Sample농도를 비교하여 dilution

(나) GC-MS분석조건

- 칼럼 : Agilent '112-88A7'
- 주입부온도 : 225°C
- 칼럼온도 : 100°C 에서 4분간 유지한 후 3°C/min의 비율로 240°C 까지 온도를 상승시키고 이후 15분 이상유지

(다) GC-MS를 이용한 산초유 지방산의 함량분석

- Selected ion mode (SIM)을 이용한 함량분석 실시
- Major성분 위주의 함량분석 실시
- Palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid가 각각 19.30, 20.62, 23.26, 24.39, 26.14분에서 검출

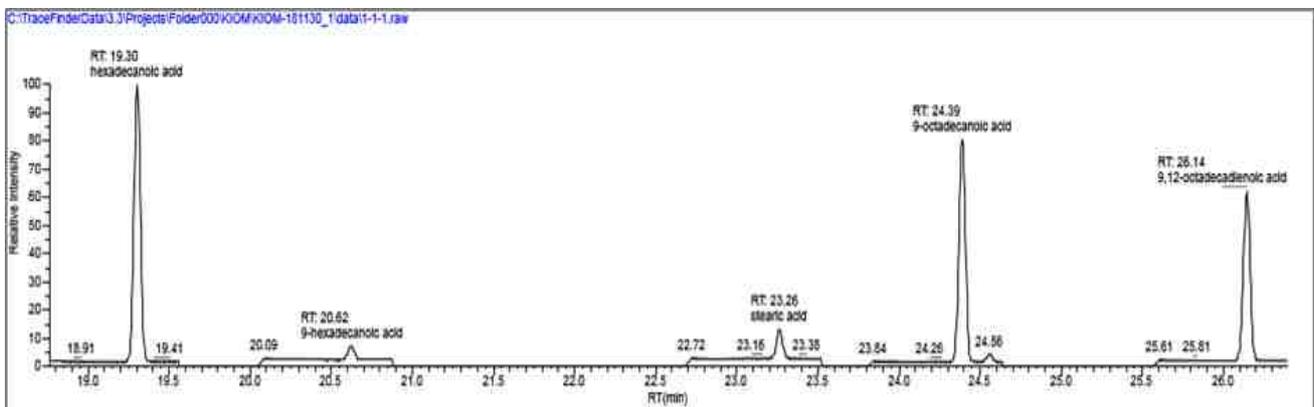


그림 51. GC-MS를 이용한 산초유의 SIM분석

표 63. Content of the six components in each sample

(Unit: $\mu\text{g}/\text{mg}$)

Sample	Compound (n=3)					
	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid
1-1	95.23(± 0.126)	22.45(± 0.018)	14.44(± 0.039)	287.48(± 0.262)	215.47(± 6.450)	124.28(± 0.244)
1-2	111.91(± 0.166)	24.47(± 0.076)	15.37(± 0.072)	279.11(± 0.236)	200.41(± 3.766)	152.34(± 0.141)
1-3	110.68(± 0.076)	23.63(± 0.001)	13.48(± 0.071)	290.16(± 0.235)	198.80(± 3.185)	124.97(± 0.200)
1-4	108.18(± 0.089)	24.23(± 0.024)	13.28(± 0.126)	290.91(± 0.243)	210.34(± 0.151)	139.96(± 0.250)
1-5	108.21(± 0.457)	20.63(± 0.010)	13.87(± 0.145)	264.92(± 0.225)	208.84(± 0.157)	149.55(± 0.251)
1-6	98.46(± 0.399)	20.26(± 0.024)	15.05(± 0.140)	266.93(± 10.206)	210.10(± 0.082)	160.49(± 0.010)
1-7	107.36(± 0.131)	22.88(± 0.020)	13.29(± 0.081)	275.10(± 0.088)	202.70(± 0.154)	145.98(± 0.185)
1-8	107.69(± 0.121)	24.23(± 0.013)	14.20(± 0.089)	283.03(± 0.345)	208.91(± 0.366)	162.14(± 0.244)
2-1	120.77(± 0.079)	20.08(± 0.024)	14.23(± 0.048)	274.27(± 0.142)	201.80(± 0.023)	140.79(± 0.037)
2-2	113.92(± 0.034)	22.62(± 0.002)	11.20(± 0.040)	269.74(± 0.091)	207.98(± 0.091)	156.86(± 0.039)
2-3	117.00(± 0.039)	22.64(± 0.015)	10.93(± 0.053)	264.80(± 0.260)	201.87(± 0.033)	126.19(± 0.072)
2-4	113.25(± 0.047)	20.98(± 0.010)	12.39(± 0.042)	256.88(± 0.231)	204.78(± 0.120)	146.16(± 0.120)
2-5	137.37(± 0.039)	25.35(± 0.019)	12.61(± 0.049)	281.57(± 0.131)	202.47(± 0.044)	148.11(± 0.073)
2-6	115.93(± 0.017)	21.90(± 0.009)	12.11(± 0.062)	280.65(± 0.233)	213.70(± 0.067)	141.80(± 0.124)
2-7	122.25(± 0.069)	22.21(± 0.002)	12.03(± 0.048)	289.64(± 0.203)	213.57(± 0.024)	143.46(± 0.101)
2-8	125.05(± 0.042)	22.03(± 0.001)	11.76(± 0.061)	290.67(± 0.158)	208.70(± 0.058)	134.13(± 0.108)
3-1	103.75(± 0.080)	18.43(± 0.012)	15.37(± 0.055)	243.55(± 0.043)	167.28(± 0.005)	128.53(± 0.324)
3-2	117.93(± 0.015)	24.86(± 0.021)	12.79(± 0.036)	224.18(± 0.243)	165.41(± 0.081)	139.82(± 0.131)
3-3	113.64(± 0.079)	27.85(± 0.028)	12.86(± 0.043)	234.90(± 0.148)	187.15(± 0.030)	137.79(± 0.145)
3-4	115.71(± 0.039)	25.95(± 0.011)	14.18(± 0.047)	243.14(± 0.196)	179.38(± 0.066)	136.69(± 0.103)
3-5	96.35(± 0.093)	15.75(± 0.008)	15.11(± 0.030)	232.97(± 0.149)	173.31(± 0.010)	137.77(± 0.086)
3-6	110.18(± 0.069)	24.27(± 0.024)	13.68(± 0.049)	235.75(± 0.113)	185.29(± 0.060)	145.87(± 0.060)
3-7	104.25(± 0.084)	23.43(± 0.023)	12.91(± 0.032)	213.59(± 0.110)	183.01(± 0.067)	142.27(± 0.040)
3-8	106.13(± 0.072)	19.15(± 0.025)	13.90(± 0.051)	239.89(± 0.065)	184.55(± 0.063)	143.01(± 10.291)

(2) HPLC-CAD를 이용한 산초유의 지방산 분석

(가) 산초유의 전처리

- ① 200 mg의 oil 시료+5 mL isooctane에 녹여 15분 초음파 추출
- ② HPLC분석 전에 0.2 μm syringe filter로 filter하여 분석
- ② External standard법을 이용하여 성분정량

(나) HPLC-CAD분석조건

- ① 칼럼 : Betasil C6 (250 \times 4.6 mm, 5 μm)
- ② 이동상 : 0.05% formic acid/D.W (A), Acetonirile (B)
- ③ 이동상 용매조건 : 28% A \rightarrow 9% A for 28min
- ④ 유속 : 1.0 mL/min
- ⑤ 주입량 : 10 μL
- ⑥ 검출기 : CAD

(다) HPLC-CAD를 이용한 함량분석

- ① Linolenic acid, palmitoleic acid, linoleic acid, palmitic acid, oleic acid, stearic acid
가 각각 9.3, 10.6, 11.5, 13.8, 14.6, 24분에서 검출

표 64. Content of the six components in each sample

Sample	Compound, Content ($\mu\text{g}/\text{mg}$, n=5)					
	Linolenic acid	Palmitoleic acid	Linoleic acid	Palmitic acid	Oleic acid	Stearic acid
1-1	0.58(\pm 0.034)	2.58(\pm 0.162)	8.81(\pm 0.401)	4.49(\pm 0.181)	12.08(\pm 0.477)	0.25(\pm 0.003)
1-2	0.59(\pm 0.063)	3.17(\pm 0.219)	9.79(\pm 0.641)	5.26(\pm 0.357)	15.13(\pm 1.070)	0.29(\pm 0.001)
1-3	0.53(\pm 0.005)	2.38(\pm 0.090)	9.25(\pm 0.111)	4.99(\pm 0.039)	15.91(\pm 0.128)	0.29(\pm 0.002)
1-4	0.78(\pm 0.005)	3.43(\pm 0.086)	11.63(\pm 0.205)	5.81(\pm 0.060)	19.22(\pm 0.189)	0.31(\pm 0.001)
1-5	0.73(\pm 0.010)	2.50(\pm 0.145)	7.88(\pm 0.197)	3.61(\pm 0.039)	10.47(\pm 0.063)	0.23(\pm 0.001)
1-6	0.98(\pm 0.003)	2.95(\pm 0.045)	10.52(\pm 0.137)	5.43(\pm 0.050)	14.98(\pm 0.086)	0.30(\pm 0.002)
1-7	0.60(\pm 0.016)	2.19(\pm 0.070)	9.66(\pm 0.106)	7.66(\pm 0.027)	16.92(\pm 0.051)	0.35(\pm 0.001)
1-8	0.89(\pm 0.007)	3.28(\pm 0.088)	11.62(\pm 0.138)	7.79(\pm 0.040)	18.16(\pm 0.091)	0.39(\pm 0.000)
2-1	0.33(\pm 0.003)	3.20(\pm 0.077)	9.04(\pm 0.176)	5.68(\pm 0.067)	14.71(\pm 0.225)	0.26(\pm 0.002)
2-2	0.59(\pm 0.039)	3.76(\pm 0.068)	10.43(\pm 0.149)	6.44(\pm 0.033)	16.08(\pm 0.062)	0.25(\pm 0.002)
2-3	0.39(\pm 0.038)	2.90(\pm 0.145)	8.46(\pm 0.411)	4.76(\pm 0.216)	13.03(\pm 0.485)	0.21(\pm 0.027)
2-4	0.32(\pm 0.017)	3.04(\pm 0.065)	8.40(\pm 0.102)	5.36(\pm 0.105)	15.13(\pm 0.136)	0.22(\pm 0.001)
2-5	0.44(\pm 0.025)	2.54(\pm 0.090)	7.99(\pm 0.155)	4.06(\pm 0.020)	11.89(\pm 0.074)	0.20(\pm 0.001)
2-6	0.81(\pm 0.031)	4.18(\pm 0.059)	11.84(\pm 0.043)	5.67(\pm 0.033)	16.62(\pm 3.406)	0.23(\pm 0.002)
2-7	0.57(\pm 0.021)	2.92(\pm 0.110)	9.72(\pm 0.264)	4.98(\pm 0.105)	14.80(\pm 0.281)	0.20(\pm 0.001)
2-8	0.63(\pm 0.059)	3.19(\pm 0.112)	9.75(\pm 0.306)	4.75(\pm 0.129)	14.74(\pm 0.433)	0.21(\pm 0.001)
3-1	0.80(\pm 0.010)	5.00(\pm 0.074)	13.89(\pm 0.247)	10.06(\pm 0.075)	24.54(\pm 0.154)	0.45(\pm 0.06)
3-2	0.84(\pm 0.010)	4.08(\pm 0.075)	11.18(\pm 0.091)	7.05(\pm 0.053)	17.40(\pm 0.118)	0.27(\pm 0.001)
3-3	0.29(\pm 0.019)	1.88(\pm 0.066)	7.79(\pm 0.825)	4.57(\pm 0.073)	10.65(\pm 0.084)	0.20(\pm 0.002)
3-4	0.75(\pm 0.007)	4.02(\pm 0.021)	11.84(\pm 0.090)	7.38(\pm 0.217)	20.02(\pm 0.173)	0.37(\pm 0.001)
3-5	0.78(\pm 0.035)	4.68(\pm 0.074)	13.79(\pm 0.107)	9.39(\pm 0.055)	24.19(\pm 0.260)	0.45(\pm 0.008)
3-6	0.62(\pm 0.026)	3.32(\pm 0.014)	10.37(\pm 0.085)	5.60(\pm 0.017)	14.98(\pm 0.175)	0.25(\pm 0.001)
3-7	tr*	0.85(\pm 0.042)	4.24(\pm 0.069)	1.58(\pm 0.013)	4.85(\pm 0.058)	0.11(\pm 0.001)
3-8	0.50(\pm 0.023)	3.33(\pm 0.191)	10.31(\pm 0.123)	6.39(\pm 0.269)	17.15(\pm 0.063)	0.32(\pm 0.007)

*tr: trace

(3) HPLC-PDA-ELSD를 이용한 산초유의 지방산 분석

(가) 산초유의 전처리

- ① 200 mg의 oil 시료+4 mL isoctane에 녹여 15분 초음파 추출
- ② HPLC분석 전에 0.2 μm syringe filter로 filter하여 분석
- ③ External standard법을 이용하여 성분정량

(나) HPLC-PDA-ELSD분석조건

- ① 칼럼 : Betasil C6 (250 \times 4.6 mm, 5 μm)
- ② 이동상 : 0.05% formic acid/D.W (A), Acetonirile (B)
- ③ 이동상 용매조건 : 28% A \rightarrow 9% A for 28min
- ④ 유속 : 1.0 mL/min

⑤ 주입량 : 10 μ L

⑥ 검출기 : PDA, ELSD

(다) HPLC-PDA-ELSD를 이용한 함량분석

① HPLC-PDA를 이용한 결과, 포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid는 검출되지 않았으며, linolenic acid, palmitoleic acid, linoleic acid, oleic acid 등 불포화 지방산만 UV 200 nm에서 12.5, 13.9, 15.4, 19.2분에서 각각 검출됨

② HPLC-ELSD를 이용한 결과, linolenic acid, palmitoleic acid, linoleic acid, palmitic acid, oleic acid가 각각 12.5, 13.9, 15.4, 17.8, 19.2분에서 검출, stearic acid는 불검출

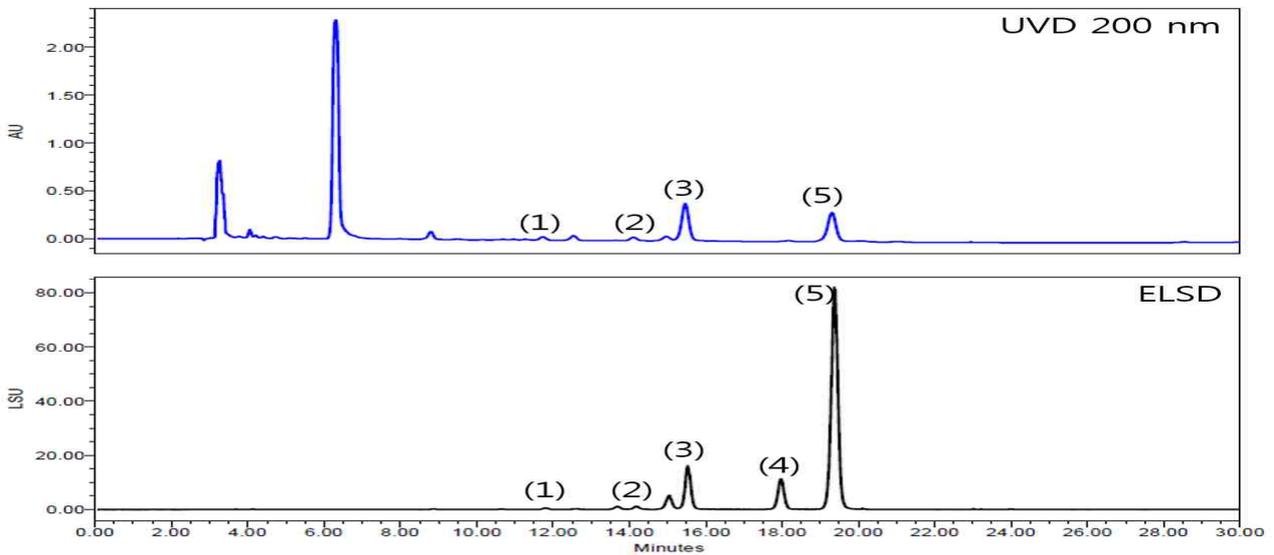


그림 52. HPLC-PDA-ELSD를 이용한 산초유의 분석 검출기 비교: linolenic acid(1), palmitoleic acid (2), linoleic acid(3), palmitic acid(4), oleic acid(5)

표 65. Content of the five components in each sample using HPLC-ELSD

Sample	Compound, Content ($\mu\text{g}/\text{mg}$, n=3)				
	Linoleic acid	Palmitoleic acid	Linoleic acid	Palmitic acid	Oleic acid
1-1	0.54(\pm 0.031)	1.07(\pm 0.066)	4.60(\pm 0.121)	4.26(\pm 0.118)	11.50(\pm 0.136)
1-2	0.61(\pm 0.015)	1.62(\pm 0.021)	5.61(\pm 0.063)	5.33(\pm 0.076)	15.74(\pm 0.179)
1-3	0.58(\pm 0.014)	1.66(\pm 0.010)	5.65(\pm 0.089)	4.99(\pm 0.223)	15.72(\pm 0.208)
1-4	0.69(\pm 0.063)	2.24(\pm 0.163)	6.58(\pm 0.049)	5.17(\pm 0.133)	17.72(\pm 0.135)
1-5	0.61(\pm 0.025)	0.94(\pm 0.084)	3.59(\pm 0.049)	3.40(\pm 0.145)	8.53(\pm 0.078)
1-6	0.91(\pm 0.053)	1.47(\pm 0.031)	5.23(\pm 0.056)	5.39(\pm 0.071)	13.90(\pm 0.091)
1-7	0.83(\pm 0.058)	1.55(\pm 0.102)	5.56(\pm 0.080)	6.86(\pm 0.152)	14.79(\pm 0.157)
1-8	0.75(\pm 0.021)	1.79(\pm 0.009)	6.04(\pm 0.081)	6.84(\pm 0.020)	16.21(\pm 0.146)
2-1	0.31(\pm 0.015)	1.34(\pm 0.123)	3.57(\pm 0.080)	5.24(\pm 0.169)	12.82(\pm 0.229)
2-2	0.43(\pm 0.009)	2.05(\pm 0.086)	5.10(\pm 0.021)	5.69(\pm 0.056)	14.61(\pm 0.068)
2-3	0.33(\pm 0.012)	1.38(\pm 0.037)	3.95(\pm 0.064)	4.65(\pm 0.091)	10.99(\pm 0.075)
2-4	0.37(\pm 0.021)	1.51(\pm 0.013)	3.90(\pm 0.035)	4.84(\pm 0.104)	12.02(\pm 0.080)
2-5	0.45(\pm 0.025)	1.09(\pm 0.037)	3.11(\pm 0.029)	3.62(\pm 0.034)	8.88(\pm 0.057)
2-6	0.57(\pm 0.014)	2.15(\pm 0.045)	5.55(\pm 0.077)	5.07(\pm 0.056)	14.87(\pm 0.123)
2-7	0.40(\pm 0.018)	1.35(\pm 0.049)	4.33(\pm 0.008)	4.49(\pm 0.004)	11.56(\pm 0.027)
2-8	0.40(\pm 0.012)	1.41(\pm 0.007)	4.19(\pm 0.028)	4.51(\pm 0.466)	11.63(\pm 0.044)
3-1	0.43(\pm 0.017)	2.15(\pm 0.025)	6.03(\pm 0.090)	6.36(\pm 0.082)	20.49(\pm 0.256)
3-2	0.48(\pm 0.034)	1.60(\pm 0.008)	4.54(\pm 0.007)	5.12(\pm 0.107)	12.10(\pm 0.201)
3-3	0.33(\pm 0.008)	0.72(\pm 0.013)	2.92(\pm 0.025)	3.47(\pm 0.056)	6.75(\pm 0.010)
3-4	0.44(\pm 0.013)	1.56(\pm 0.025)	4.68(\pm 0.019)	5.78(\pm 0.034)	14.00(\pm 0.153)
3-5	0.44(\pm 0.021)	1.99(\pm 0.024)	5.54(\pm 0.018)	6.54(\pm 0.111)	18.96(\pm 0.090)
3-6	0.38(\pm 0.044)	1.32(\pm 0.051)	3.74(\pm 0.055)	4.11(\pm 0.044)	10.25(\pm 0.174)
3-7	0.25(\pm 0.029)	0.28(\pm 0.034)	1.49(\pm 0.021)	1.42(\pm 0.024)	3.11(\pm 0.064)
3-8	0.33(\pm 0.019)	1.08(\pm 0.019)	3.67(\pm 0.022)	4.38(\pm 0.046)	11.30(\pm 0.079)

(라) HPLC-PDA를 이용한 분석법 검증

① 검량선 작성 결과

- HPLC-PDA에서는 포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid는 검출이 되지 않고 불포화지방산인 α -linolenic acid, palmitoleic acid, linoleic acid, oleic acid만 검출됨
- 불포화지방산은 PDA에서도 검출되고 HPLC에서 PDA가 보편적인 장비이므로 HPLC-PDA를 이용하여 분석법 validation을 실시함
- α -linolenic acid의 경우에는 함량이 낮아 함량이 높은 상위 3개 성분인 palmitoleic acid, linoleic acid, 및 oleic acid 3종 표준품에 대한 검량선 작성결과 아래 표와 같음

표 66. Calibration curves, range, LOD, and LOQ of the five compounds

Fatty acid	Range (ug/mL)	Regression equation	Coefficient of determination	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
palmitoleic acid	15.625-250	$y = 7789.0387x + 26361.8750$	0.9997	3.18	9.69
Linoleic acid	31.25-500	$y = 20871.5959 + 267502.8750$	0.9989	14.71	44.15
Oleic acid	62.5-1000	$y = 6221.6463 + 180363.8750$	0.9986	5.68	17.18

② 재현성 결과

· 피크면적에 대한 재현성

표 67. Reproducibility on peak area of each compound

No.	Peak area		
	Palmitoleic acid	Linoleic acid	Oleic acid
1	3738142	10605819	3409181
2	3722534	10648947	3416074
3	3780644	10759916	3463405
Mean	3747107	10671561	3429553
SD	30074.36	79498.46	29518.3
RSD (%)	0.81	0.75	0.86

· 피크 머무름 시간에 대한 재현성

표 68. Reproducibility on peak area of each compound

No.	Peak area		
	palmitoleic acid	Linoleic acid	Oleic acid
1	14.315	15.648	19.475
2	14.395	15.730	19.584
3	14.466	15.801	19.682
Mean	14.392	15.726	19.580
SD	0.076	0.077	0.104
RSD (%)	0.525	0.487	0.529

③ 회수율 결과

표 69. Recovery test of each compound

Compounds	Spiked conc. (ug/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Palmitoleic acid	142.5	100.50	0.53
	71.25	98.99	1.46
	35.625	96.01	0.95
Linoleic acid	616.25	104.1	0.51
	308.125	100.6	0.38
	154.0625	99.4	0.91
Oleic acid	1160	98.8	0.85
	580	101.3	1.32
	290	96.5	3.43

④ 정밀성 결과

표 70. Intra- and inter-day precision of each compound

Compounds	Spiked conc. (ug/mL)	Intra-day (n=3)			Inter-day (n=3)		
		Observed conc. (ug/mL)	Precision (RSD %)	Accuracy (%)	Observed conc. (ug/mL)	Precision (RSD %)	Accuracy (%)
Palmitoleic acid	71.25	74.26	1.03	104.23	76.11	2.20	106.82
	35.625	37.33	1.19	104.78	38.60	1.19	108.36
	17.8125	19.07	0.43	107.03	19.95	0.84	112.00
Linoleic acid	308.125	317.83	0.84	103.15	329.55	3.18	106.95
	154.0625	156.58	0.16	101.63	164.35	4.13	106.68
	77.03125	76.86	0.86	99.78	81.83	5.17	106.22
Oleic acid	580	564.59	0.35	97.34	588.04	3.43	101.39
	290	280.67	0.98	96.78	294.11	3.84	101.42
	145	135.74	2.09	93.61	145.50	5.70	100.34

나. 산초유 원료 감별을 위한 유전자 마커 개발

(1) 산초원료 유사종 혼입여부 확인을 위한 유전자 감별법 평가 및 검증

(가) 실험방법

- ① 산초유 원료로 사용 및 유통 될 수 있는 *Zanthoxylum* 4종 (산초, 초피, 개산초 및 화초)의 기원 감별을 보다 신속하고 정량적으로 검증하기 위해 PCR 증폭용 유전자 마커 개발을 통해 얻은 SCAR 유전자 마커를 이용하여 국내·외에서 유통되고 있는 한약재 산초(산초나무, 초피나무 또는 화초의 열매 껍질인 과피)를 구입하여 기원 검증에 사용
- ② 산초 유통품 약 5 g을 분쇄기로 곱게 마쇄한 후 분말 약 100 mg을 Lysing matrix ATM tube (MP biomedical, USA)에 담아 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA)의

extraction buffer 800 uL를 넣어 Precellys™ Grinder (Bertin technologies, France)를 이용하여 6,000 rpm에서 30초 동안 마쇄하였으며 이후 실험조건은 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) 제작자가 제공한 protocol에 따라 추출

- ③ 추출한 DNA는 Eco-dye (Solgent, Korea)가 첨가된 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 UV light 상에서 DNA band를 확인하였으며, DS-11 spectrophotometer (DeNOVIX, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량
- ④ 산초유 원료(한약재 산초)로부터 추출한 DNA와 Table 9의 종 특이적 SCAR 유전자 마커 증폭용 primer 조합을 이용하여 Table 10과 같은 조건으로 PCR 증폭용 반응물을 제조하고 Table 10에서 기술한 증폭 조건으로 Conventional PCR 증폭과 Real-time PCR 분석을 실시하여 그 결과를 판별

표 71. *ITS2* 종 특이 염기서열 기반 SCAR 유전자 마커 PCR 증폭용 primer 정보

Scientific name	Primer	sequence (5' -3')	Marker name	Amplicon size (bp)
<i>Z. schinifolium</i>	ZS_F1	CGC GGT TGG CCC AAA TTC	ZS#1	110
	ZS_R1	CTG AGT CTC GAA ACG GAG A		
<i>Z. piperitum</i>	ZP_F1	GCC TCC CGT GCG CTC TTA	ZP#2	139
	ZP_R1-1	CAG GGT CCA TGA GTC CGG T		
<i>Z. armatum</i>	ZA_F1-1	GCC CAA AAT CTG AGT CCG C	ZA#3	111
	ZA_R1	GGG GTC CAT GAG TCC CAG		
<i>Z. bungeanum</i>	ZB_F2	GTG AAA ACA AAC CTC TCG AGC TA	ZB#21	100
	ZB_R3	GGG TCG CAA TGC GAG CA		

표 72. *ITS2* 염기서열 기반 종 특이 SCAR 유전자 마커 이용를 이용한 Conventional PCR 증폭 및 Real-time PCR 조건

PCR type	PCR composition (20 uL of total volume)	PCR condition
Conventional PCR	~15 ng template 0.5 umolL ⁻¹ primer Forward 0.5 umolL ⁻¹ primer Reverse Solg™ 2×Taq PCR Smart-Mix I	Step 1: 95°C, 2 min Step 2: 95°C, 20 s - 63°C, 30 s - 72°C 20 s [35 cycles] Step 3: 72°C 5 min
Real-time PCR	~15 ng template 0.5 umolL ⁻¹ primer Forward 0.5 umolL ⁻¹ primer Reverse QuantiNova™ SYBR Green PCR master Mix	Step 1: 95°C, 2 min Step 2: 95°C, 5 s - 60°C, 10 s [40 cycles] Step 3: stepwise melting from 75°C to 95°C with 1°C/5 s

(나) 실험결과

- ① 산초유 원료의 유통현황을 확인하고 그 기원을 유전자 감별법을 이용하여 확인하고자 유통되는 산초유 원료를 구입하고자 하였으나 대부분의 산초유는 수확시기에 착유가 진행되어 2019년에는 원료를 구입할 수 없었음. 따라서 산초유 원료와 유사하게 유통되는 한약재 산초를 이용하여 유전자 감별법을 검증하고자 국내·외에서 유통되는 한약재 산초를 구입하여 Conventional SCAR PCR 분석과 Real-time PCR 분석을 통해 각각의 기원을 확인한 결과, Table 11과 Figure 3에서 보는 바와 같이 한약재 산초는 국산품의 경우 초피나무 열매가 주로 유통되었으며, 중국 수입품의 경우에는 주로 화초의 열매가 유통
- ② 한약재 산초를 이용하여 정품의 한약재와 유사품의 유통을 확인한 결과 대부분의 유통품은 기원이 정확한 정품으로 확인되었으나, Table 11의 2번 시료의 경우에는 산초나무 열매와 함께 한약으로 사용할 수 없는 유사품인 개산초 열매가 혼입되어 유통되고 있었음
- ③ 이상의 결과로부터 본 연구를 통해 개발한 산초유 및 산초유 원료 유전자 감별법 (Conventional PCR 분석법 및 Real-time PCR 분석법)은 산초유와 산초유의 원료로 사용될 수 있는 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초를 종단위에서 감별 할 수 있음을 확인하였음
- ③ 또한, 개발된 유전자분석법은 기원종인 산초나무와 이의 근연종에 대한 종특이성 뿐만 아니라 유지성 원료로 사용되는 식물(콩, 유채, 포도, 옥수수, 참깨, 들깨) 및 식품원료 (밀리타리스동충하초, 눈꽃동충하초, 상황버섯)를 이용한 검정능에서도 종 특이성을 확인 할 수 있었음

표 73. 산초 열매(한약재 산초) 시료를 이용한 유전자 감별법 재검증 및 결과

No	Sample type	Country	Product form	Species identification result	
				Real-time PCR (quantification; pg)	Conventional PCR
1	Herbal Medicine	Korea	Dried Fruits	<i>Z. piperitum</i> (524.1 ± 109.1)	<i>Z. piperitum</i>
2		China	Dried Fruits	<i>Z. schinifolium</i> (39332.3 ± 2754.2) + <i>Z. armatum</i> (135.3 ± 73.9) *	<i>Z. schinifolium</i> + <i>Z. armatum</i> *
3		China	Dried Fruits	<i>Z. piperitum</i> (22323.5 ± 15725.2)	<i>Z. piperitum</i>
4		Korea	Dried Fruits	<i>Z. piperitum</i> (2677.1 ± 537.7)	<i>Z. piperitum</i>
5		China	Dried Fruits	<i>Z. bungeanum</i> (1868.7 ± 487.3)	<i>Z. bungeanum</i>
6		China	Dried Fruits	<i>Z. bungeanum</i> (1000.6 ± 77.1)	<i>Z. bungeanum</i>
7		Korea	Dried Fruits	<i>Z. piperitum</i> (423.9 ± 268.4)	<i>Z. piperitum</i>
8		China	Dried Fruits	<i>Z. bungeanum</i> (1395.3 ± 110.8)	<i>Z. bungeanum</i>
9		China	Dried Fruits	<i>Z. bungeanum</i> (3280.1 ± 57.9)	<i>Z. bungeanum</i>
10		China	Dried Fruits	<i>Z. bungeanum</i> (1761.3 ± 75.6)	<i>Z. bungeanum</i>

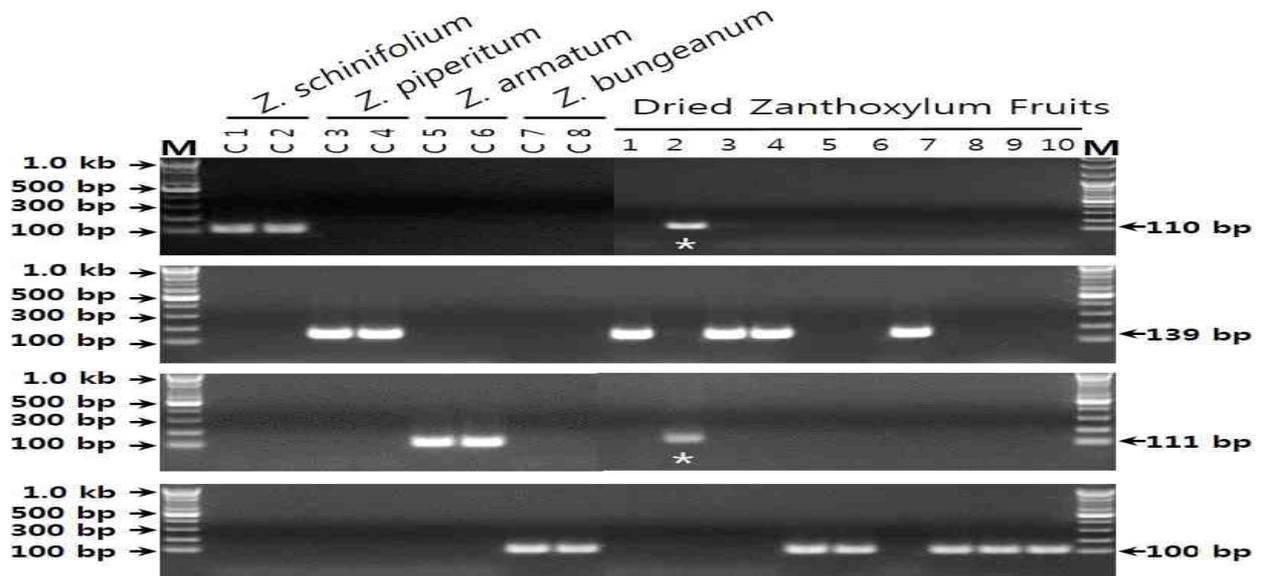


그림 53. Conventional PCR 분석을 통한 산초나무 열매(한약재 산초) 감별 결과

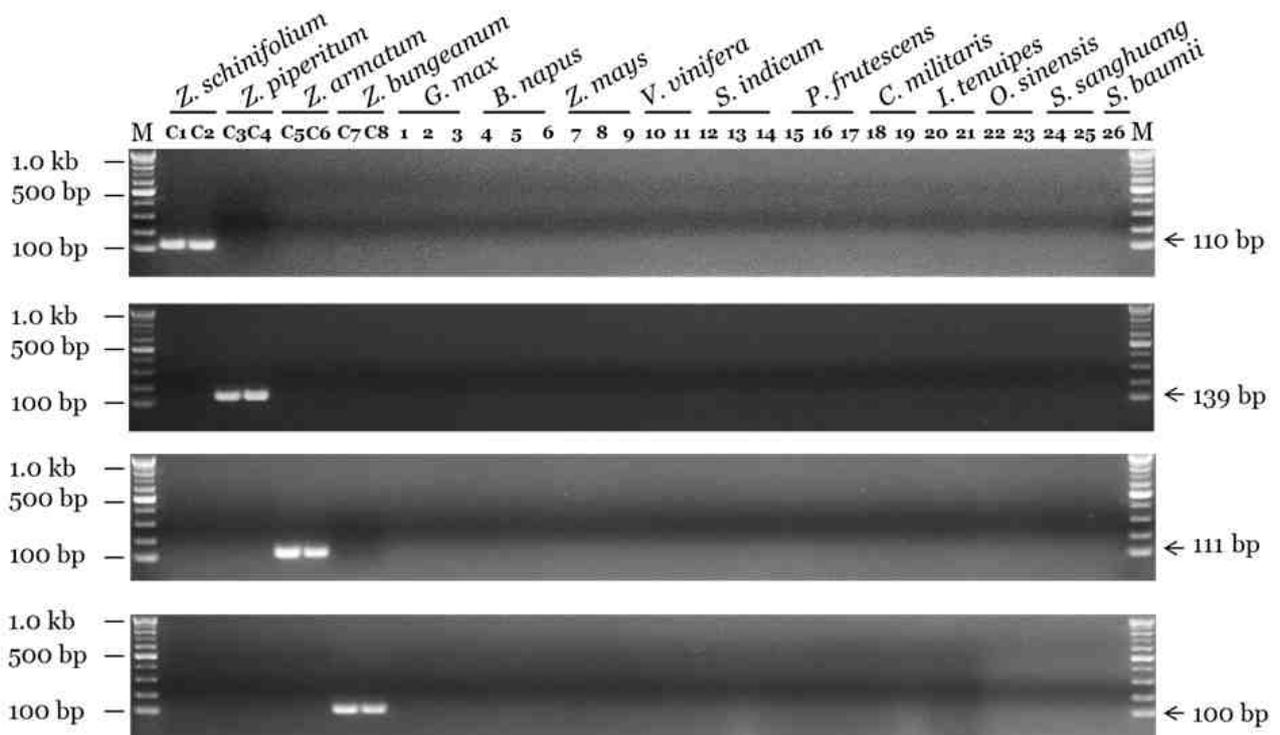


그림 54 유지성 식물 및 식품원료를 이용한 유전자 감별법의 특이성 검정 결과

(2) 산초유 및 산초유 원료 유전자 감별 가이드라인(안) 개발 (별첨자료 1)

- 산초유의 기원에 대한 정의 및 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초 4종에 대한 정·이명을 포함한 학명 등 분류학적 정보, 유전자 분석용 표준 시료 목록 및 분양처 수록
- 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초 4종 식물에 대한 식물 형태학적 특징, 열매 형태학적 특징 기술 및 형태학적 감별을 위한 검색표 작성
- 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초 4종 식물에 대한 DNA 바코드 염기서열 정보 및 GenBank 등록정보 수록
- 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초 4종 유전자 감별을 위한 실험 조건, 유전자 감별 결과의 판독 등 유전자 감별관련 정보 수록

(3) 산초유 유전자 감별 키트 개발 (별첨자료 2)

(가) 키트의 구성

① Control DNA

- Negative control : ntc
- Control DNA ZS : 산초나무 DNA
- Control DNA ZP : 초피나무 DNA
- Control DNA ZB : 화초 DNA
- Control DNA ZA : 개산초 DNA

(나) 종 감별용 primer sets

- ① ZS primer : 산초나무 감별용 SCAR primer set
- ② ZP primer : 초피나무 감별용 SCAR primer set
- ③ ZB primer : 화초 감별용 SCAR primer set
- ④ ZA primer : 개산초 감별용 SCAR primer set

(다) 2×PCR Pre-Mixture with loading dye

(라) 100 bp DNA ladder

(마) SDW

(바) User protocol

별첨 자료 1.

산초유 및 산초유 원료 유전자 감별 가이드라인(안)

√ 산초유(Chinese pepper oil)

- 정품 : 운향과(Rutaceae) 식물인 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc.)의 종자에서 얻은 기름
- 유사품 : 운향과(Rutaceae) 식물인 화초(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)의 종자에서 얻은 화초유, 초피나무(*Zanthoxylum piperitum* (L.) DC.) 또는 개산초(*Zanthoxylum armatum* DC.)의 종자에서 얻은 기름

√ 대상식물 일반명 및 학명의 정·이명

- 산초나무(=분지나무, 청화초) : *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc. [= *Fagara schinifolia* (Siebold & Zucc.) Engl.]
- 초피나무 : *Zanthoxylum piperitum* (L.) DC.
- 개산초(=죽엽화초) : *Zanthoxylum armatum* DC. [= *Z. armatum* var. *subtrifoliolatum* (Franch.) Kitam.]
- 화초 : *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.

√ 산초나무 및 유사종의 형태적 특징

- 대상종의 범위 : 산초나무, 초피나무, 화초, 개산초

- 산초나무 및 유사종 식물의 형태적 특징

- 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc.)

낙엽성 관목으로 작은 가지에 가시가 있고 가시가 어긋난다. 잎은 홀수 1회 우상복엽으로 소엽은 13~21개이고 피침형 또는 타원상 피침형이다. 꽃은 열매와 같이 담녹색 혹은 녹색이다.

- 초피나무(*Zanthoxylum piperitum* (L.) DC.)

낙엽성 관목으로 어린가지에 털이 있으나 자라면서 없어지고 가시가 마주난다. 잎은 홀수 1회 우상복엽으로 소엽은 9~10개이고 난형 또는 긴 난형, 난상피침형이며 엽맥이 뚜렷하다. 꽃은 총상화서로 엽맥에서 나오며 연한 황록색이다.

- 화초(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)

낙엽성 관목으로 작은 가지에 굵고 억센 털이 있고 가시가 어긋난다. 잎은 어긋나고 우상복엽이며 소엽은 7~13개이고 난형 또는 난상 피침형이다. 뒷면을 비비면 독특한 향기가 난다.

- 개산초나무(*Zanthoxylum armatum* DC.)

상록성 관목으로 가지에 가시가 마주나며 가시의 기부가 넓다. 잎은 어긋나고 소엽은 3~7개이며 난형 또는 난상 피침형이다. 잎의 엽병과 엽축에 넓은 날개가 붙어 있다.

■ 산초나무 및 유사종 식물형태 검색표

1. 가시가 마주난다.	
2. 상록성이고 엽축에 날개가 있다. -----	개산초
2. 낙엽성이고 엽축에 날개가 없다. -----	초피나무
1. 가시가 어긋난다.	
2. 낙엽성이고 소엽은 13~21개로 피침형이며 열매는 녹갈색이다. -----	산초나무
2. 낙엽성이고 소엽은 7~13개로 난형~난상 피침형이고 열매는 적갈색이다. -----	화초

■ 산초나무 및 유사종 열매의 형태적 특징

- 산초나무 열매

열매는 2~3개가 상부에서 이생하는 소골돌과로 작은 열매자루 위에 집생하고, 회녹색~녹갈색이고 많은 유점 및 망상으로 융기된 세밀한 주름이 덮여 있다. 종자는 검은색이다.

- 초피나무 열매

열매는 2~3분과로 이루어진다. 각 분과는 납작한 구형이고 2편으로 갈라진다. 열매의 외면은 암황적색~암적색으로 붉고 유실에 의한 오목한 작은 점이 많이 있다. 종자는 검은색이다.

- 화초 열매

열매는 1~2개의 골돌과가 대부분 단생하며 산초에 비해 크다. 자홍색 또는 홍갈색이며 많은 사마귀 모양으로 돌출된 유점이 덮여 있다. 종자는 검은색이다.

- 개산초 열매(형태적 특징 확인 필요)

열매는 2개의 분과로 갈라지는 1~2개의 골돌과가 상부에서 단생한다. 골돌은 적색 내지 적갈색이며, 표면에 사마귀 모양으로 돌출된 유점이 산생한다. 종자는 검은색이다.



산초나무열매



초피나무열매



화초열매



개산초열매

■ 산초나무 및 유사종 열매의 형태 검색표(화초와 개산초 열매 검색표 확인 필요)

- | | |
|--|------|
| 1. 외과피에 사마귀모양으로 돌기된 유점이 있다. | |
| 2. 사마귀 모양으로 돌출된 유점이 밀생하고, 간혹 선단에 작은 부리가 있다.----- | 화초 |
| 2. 사마귀 모양으로 돌출된 유점이 산생하고, 선단에 부리는 없다.----- | 개산초 |
| 1. 외과피에 선점이 세소하며 불규칙하게 배열되어 있고 사마귀 모양의 유점이 없다. | |
| 2. 홍갈색이며 유실에 의한 오목한 작은 점이 많으며, 맛이 맵다.----- | 초피나무 |
| 2. 녹색이며 유실에 의한 망상주름이 덮여 있고, 맛이 약간 달고 맵다.----- | 산초나무 |

√ 산초나무 및 유사종의 유전자 감별

■ 종판별 마커 개발 DNA 바코드 부위 : Nuclear rDNA *ITS2*

■ 종판별 마커 개발 DNA 바코드 증폭 Primer

ITS2-s2f Primer : 5' -ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT-3'

ITS4 Primer : 5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

■ 표준시료 정보

- 분양처 : 한국한의학연구원 K-herb 연구단 한약표준표본관(IH Herbarium Code KIOM)

- 표준시료 목록

산초 : KIOM2012KR11-21, KIOM2012KR14-13, KIOM2012KR4-17, KIOM2012KR5-17,
KIOM2012KR9-12, KIOM2012KR8-45

초피 : KIOM2012KR12-44, KIOM2012KR13-35, KIOM2012KR13-23, KIOM2012KR6-14,
KIOM2013KR5-47, KIOM2013KR10-38, KIOM2013KR2-22

개산초 : MBC_KIOM-2016-375, MBC_KIOM-2017-1, MBC_KIOM-2017-2, MBC_KIOM-2017-5,
KIOM200701000313

화초 : KIOM201201005616, KIOM2018-GM, KIOM2018-WG, KIOM2018-ON

■ 종판별 마커 개발 DNA 바코드 증폭산물 염기서열 (5 '-3')

산초나무 /ITS2 염기서열(GenBank accession No. MH321526)

ATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGC
CGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCGCCCCACCCCGCCCGGGGGCTTGGCGGCAGGGCGGAT
AATGGCCTCCCGTGCCTCCCCGCTCGCGGTTGGCCCAAATTCGAGTCCCCGGCGACCGGAGCCGCGACGATCGGTGGT
GAAAACAAACCTCTCGAACACACGTCGCGTGCCTGGCTCTCCGTTTCGAGACTCAGGGACCCGACGCTCCGCGCGAG
CGGCGCTCGCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

초피나무 /ITS2 염기서열(GenBank accession No. MH321532)

ATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGC
CGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCGCCCCACCCCTACGGGGGCTTGGCGGTGCGGGCGGATAAT
GGCCTCCCGTGCCTCTTAGCTCGCGGTTGGCCCAAATTTGAGTCCCTGGCGACCGGAGCCGCGACGATCGGTGGTGAA
AACAAACCTCTCGAGCTCACGTCTCATGCCCGGCCCCCTGTTACGGGACTCATGGACCCGTAAGCTCTGTGCAAGCAGC
GCTCGCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

개산초 /ITS2 염기서열(GenBank accession No. MH321539)

ATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGC
CGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCGCCCCACCCCTCCGGGGGGCTTGGCGGTGCGGGCGGATA
ATGGCCTCCCGTGTGCTCCCCGCTCGCGGCTGGCCCAAATCTGAGTCCCCGGCGACCGGAGCCGCGACGTTCCGTGGT
GAAAACAAACCTCTCGAGCTCACGTCTCGTGCCCGGCCCCCTGTTCTGGGACTCATGGACCCCGAAGCCCTGCGCAAG
CAGGCGCTCGCATCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

화초 /ITS2 염기서열(GenBank accession No. MH321544)

ATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTTAGGC
CGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCGCCCCACCCCTCCGGGGGCTTGGCGGTGCGGGCGGATAA
TGGCCTCCCGTGCCTCCCCGCTCGCGGCTGGCCCAAATTTGAGTCCCTGGCGACCGGAGCCGCGACGATCGGTGGTG
AAAACAAACCTCTCGAGCTAACGTCTCGTGCCCGGCCCCCTGTTTCGGGACTCATAGACCCGTAAGCTCTGCGCAAGCA
GTGCTCGCATTGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

■ 산초나무 및 유사종 *ITS2* DNA 바코드 중 특이 염기서열 정보

Nucleotide position	46	119	129	130	132	133	140	172	177	178	179	200	201	229	255	257	258	264
산초	C	G	C	G	C	C	T	C	C	C	C	T	C	A	A	A	C	G
초피	T	A	T	A/C	-	-	C	C	T	T	A	T	T	A	G	T	C	T
화초	C	A	C	T	C	-	C	C	C	C	C	T	T	A	G	T	A	T
개산초	C	A	C	T	C	G	C	T	C	C	C	C	T	T	G	T	C	T
Nucleotide position	272	276	278	280	284	285	287	294	295	301	304	307	309	314	318	319	321	330
산초	-	T	T	C	T	C	A	G	G	T	C	T	C	G	G	G	C	C
초피	-	C	C	T	A	C	G	T	G	T	A	T	T	A	A	G	C	C
화초	-	C	C	T	T	C	G	T	A	T	A	T	T	A	-	A	T	T
개산초	C	C	C	T	C	T	G	T	G	C	A	C	T	A	A	G	C	C

√ 유전자 마커 기반 중 판별법 (특허출원번호 : 10-2018-0080060)

■ PCR 증폭용 중 특이 유전자 마커(SCAR) Primer

산초 : ZS_F1/R1

정방향 : 5' -CGC GGT TGG CCC AAA TTC-3'

역방향 : 5' -CTG AGT CTC GAA ACG GAG A-3'

초피 : ZP_F1/R1-1

정방향 : 5' -GCC TCC CGT GCG CTC TTA-3'

역방향 : 5' -CAG GGT CCA TGA GTC CGG T-3'

개산초 : ZA_F1-1/R1

정방향 : 5' -GCC CAA AAT CTG AGT CCG C-3'

역방향 : 5' -GGG GTC CAT GAG TCC CAG-3'

화초 : ZB_F2/R3

정방향 : 5' -GTG AAA ACA AAC CTC TCG AGC TA-3'

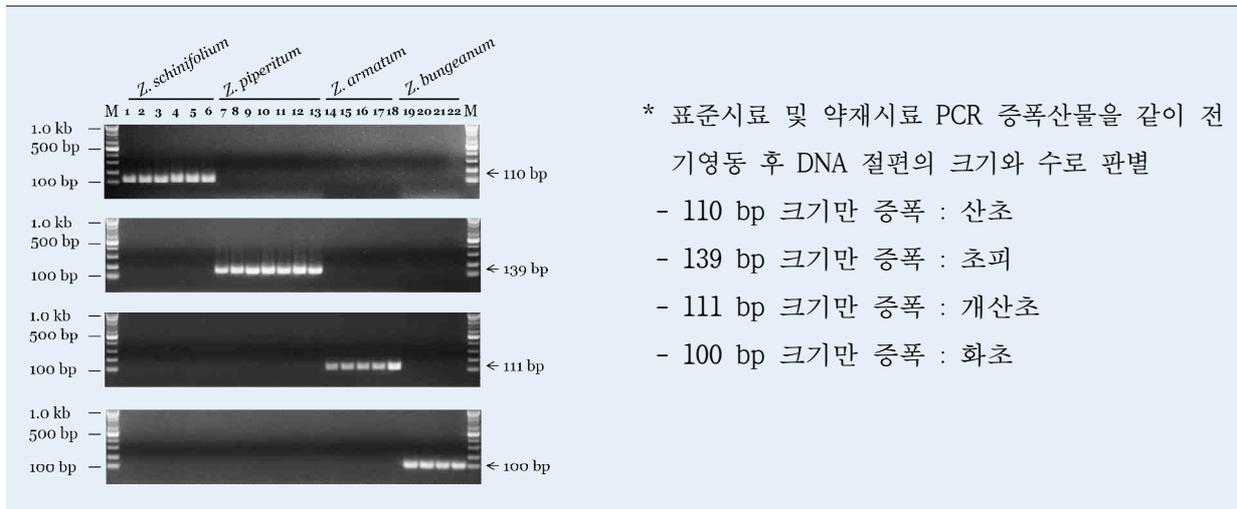
역방향 : 5' -GGG TCG CAA TGC GAG CA-3'

■ PCR 증폭 반응 조건

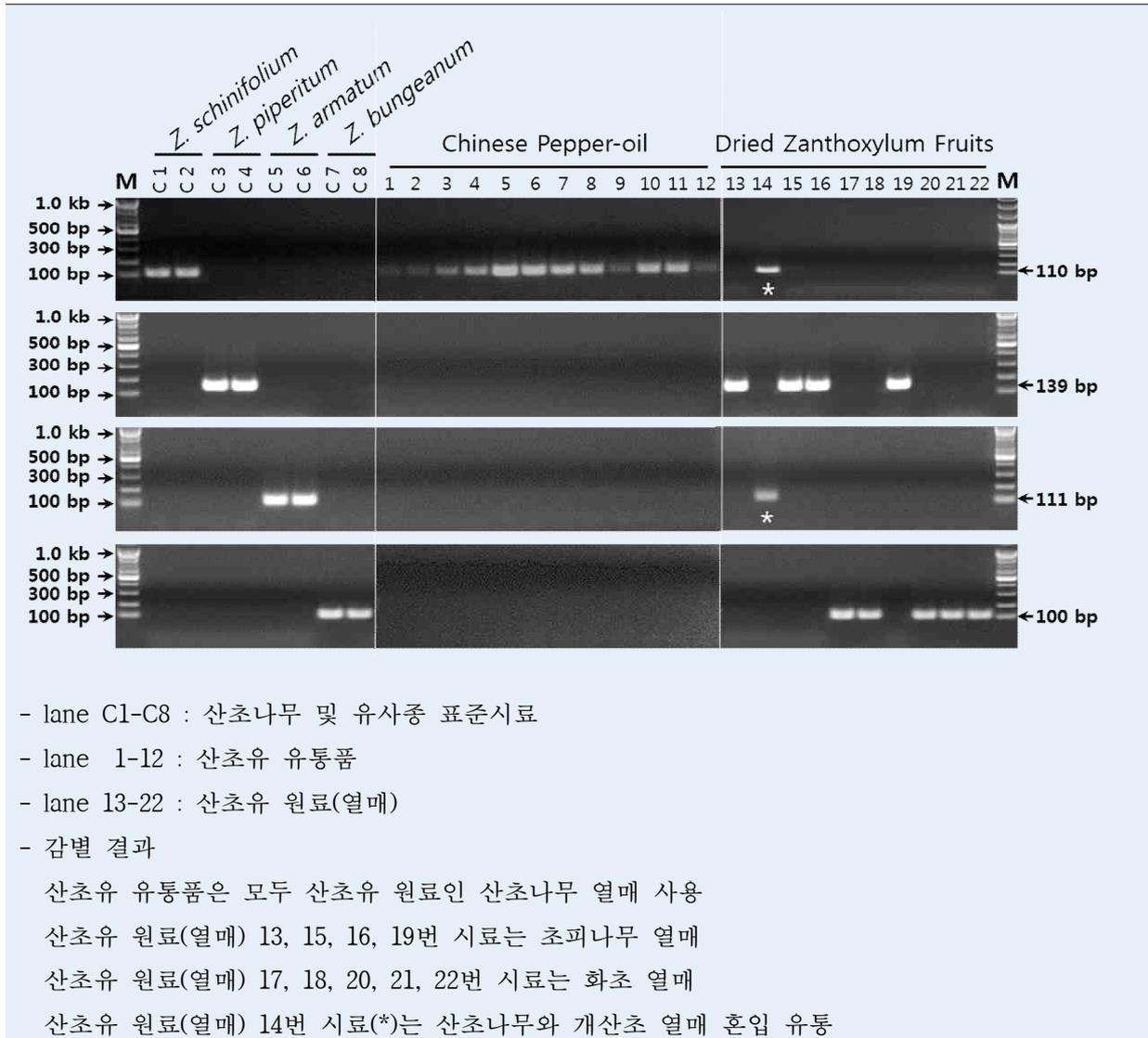
PCR composition	PCR condition
gDNA: 1 uL (15 ng/uL)	Step 1: 95°C, 2 min
Primer: each 1 uL (10 pmole)	Step 2: 95°C, 20 s - 63°C, 30 s - 72°C 20 s [35 cycles]
2x Pre-mix: 10 uL (Solgent 2×Smart)	Step 3: 72°C 5 min
Fill up to 20 uL with SDW	

■ PCR 증폭 결과

■ 산초유 및 유사종 유전자 종판별 결과 판독



■ 산초유 원료(열매) 및 산초유 유전자 감별 결과 예시



별첨 자료 2. 산초유 유전자 감별 키트 시제품 및 사용설명서



<산초유 유전자 감별 키트 시제품>

산초유 유전자 감별 kit manual

✓ 구성품 용량

Category	Reagents	concentration	Volume (uL)
Control DNA	ZS	15 ng/uL	50
	ZP	15 ng/uL	50
	ZX	15 ng/uL	50
	ZA	15 ng/uL	50
Primer	ZS primer F	10 pmole	100
	ZS primer R	10 pmole	100
	ZP primer F	10 pmole	100
	ZP primer R	10 pmole	100
	ZB primer F	10 pmole	100
	ZB primer R	10 pmole	100
	ZA primer F	10 pmole	100
	ZA primer R	10 pmole	100
Size marker	100 bp DNA ladder	-	50
SDW	SDW	-	500
PCR mixture	2x PCR Mixture with loading dye	-	1700

Guide 1

✓ Preparation

1. 유전자 감별 kit을 이용하는 DNA는 1.8~2.0의 순도 (A_{260/280})와 최소 1 ng/uL 이상 농도의 시료를 사용하는 것을 원칙으로 한다.
2. 기름 전용 DNA 추출용 kit을 이용하면 높은 감도의 감별 결과를 얻을 수 있다. ; Olive Oil DNA Isolation Kit (Norgen, Cat.#61700)

✓ Protocol

1. -20°C에서 보관 중인 시약 (control DNA, primer, SDW 및 PCR mixture)을 완전히 녹인 후, 짧게 원심분리하여 사용한다.
2. 녹인 시약은 4°C에서 보관하여 온도가 올라가지 않도록 주의하며, PCR 반응액을 아래 표와 같이 제조한다.

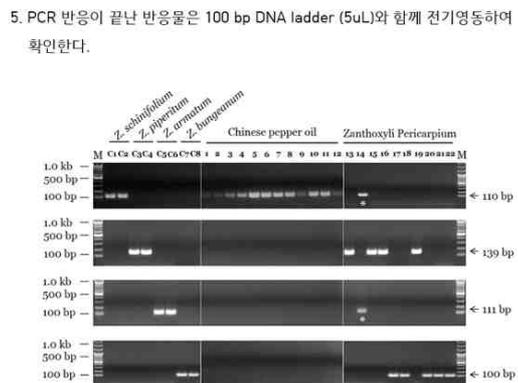
Guide 2

Reagents	Positive control	sample
Control DNA	1 uL	-
Sample DNA	-	1 uL
Species specific primer F	1 uL	1 uL
Species specific primer R	1 uL	1 uL
2x PCR Mixture with loading dye	10 uL	10 uL
SDW to a final volume of	20 uL	20 uL

3. Positive control에 해당하는 ZS(산초), ZP(초피), 화초(ZB) 및 개산초(ZA)는 각각의 tube에서 반응시킨다.
4. 제조된 PCR 반응액을 살짝 원심분리하여 아래와 같은 조건으로 PCR 증폭한다.

Step 1: 95°C, 2 min
 Step 2: 95°C, 20 s - 63°C, 30 s - 72°C 20 s [35 cycles]
 Step 3: 72°C 5 min

Guide 3



Guide 4

<산초유 유전자 감별 키트 사용설명서>

제 3 절 산초유기관지 천식 효능 연구

1. 난황 알부민 유발 천식 마우스 모델에서 항천식 효과 확인

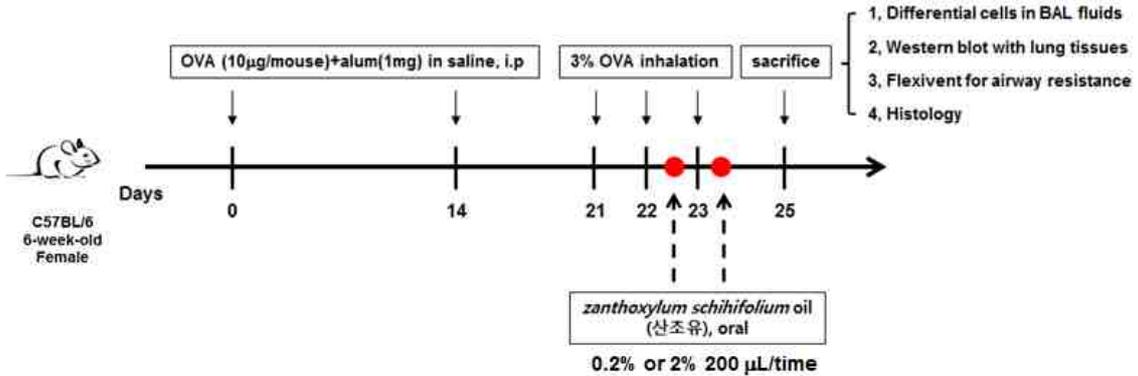


그림 55. 천식 마우스 모델 도식

가. 난황 알부민 유발 천식 마우스 모델에서 항천식 효과 확인

(1) LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현 양 확인

- (A, B, C) 조생종, 만생종, 한초에서 모두 유압압착 시료보다 엑스펠라 착유시료에서 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인

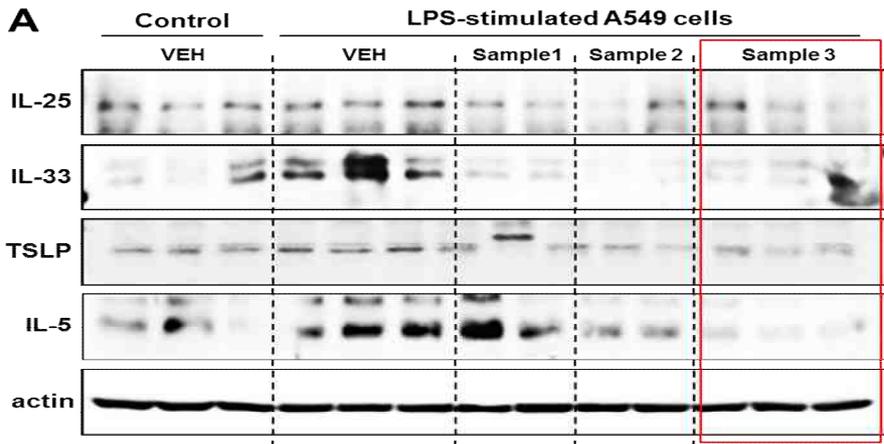


그림 56. 산초유 조생종의 착유방법에 따른 염증 사이토카인 발현 양

- sample 1: 조생종+유압압착 (껍질 10%), sample 2: 조생종+유압압착 (껍질 무)
- sample 3: 조생종+엑스펠라 착유 (껍질 무)

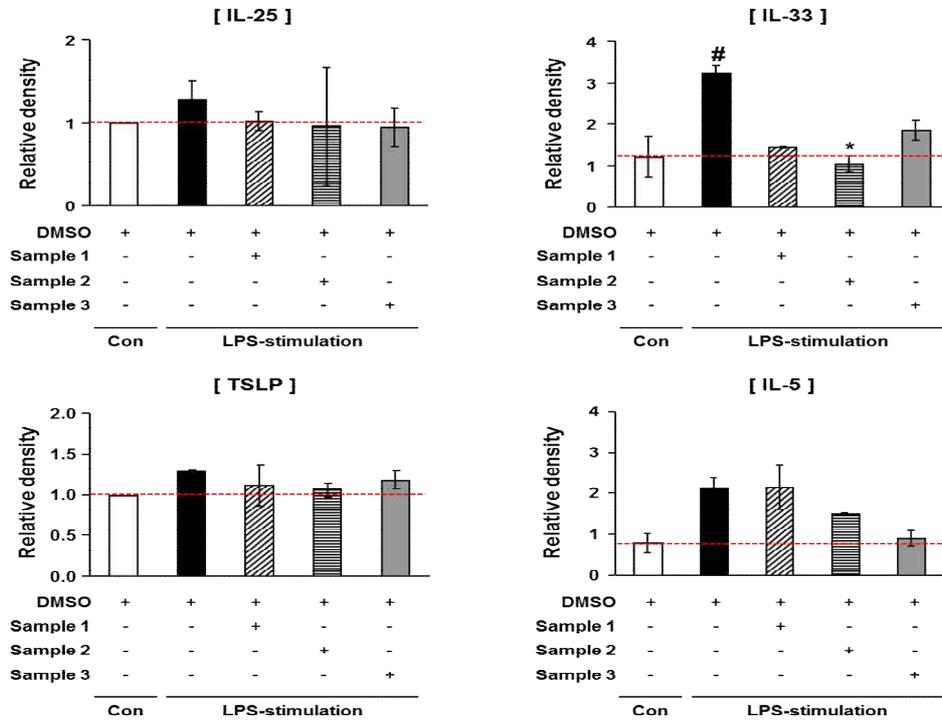


그림 57. 산초유 조생종 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

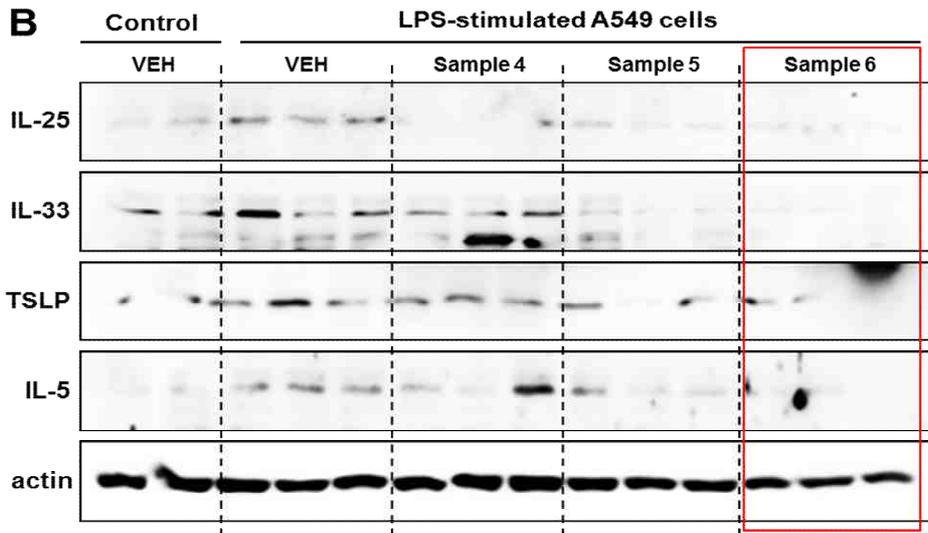


그림 58. 산초유 만생종의 착유방법에 따른 염증 사이토카인 발현 양

sample 4: 만생종+유압압착 (겉질 10%), sample 5: 만생종+유압압착 (겉질 무),
sample 6: 만생종+엑스펠라 착유 (겉질 무)

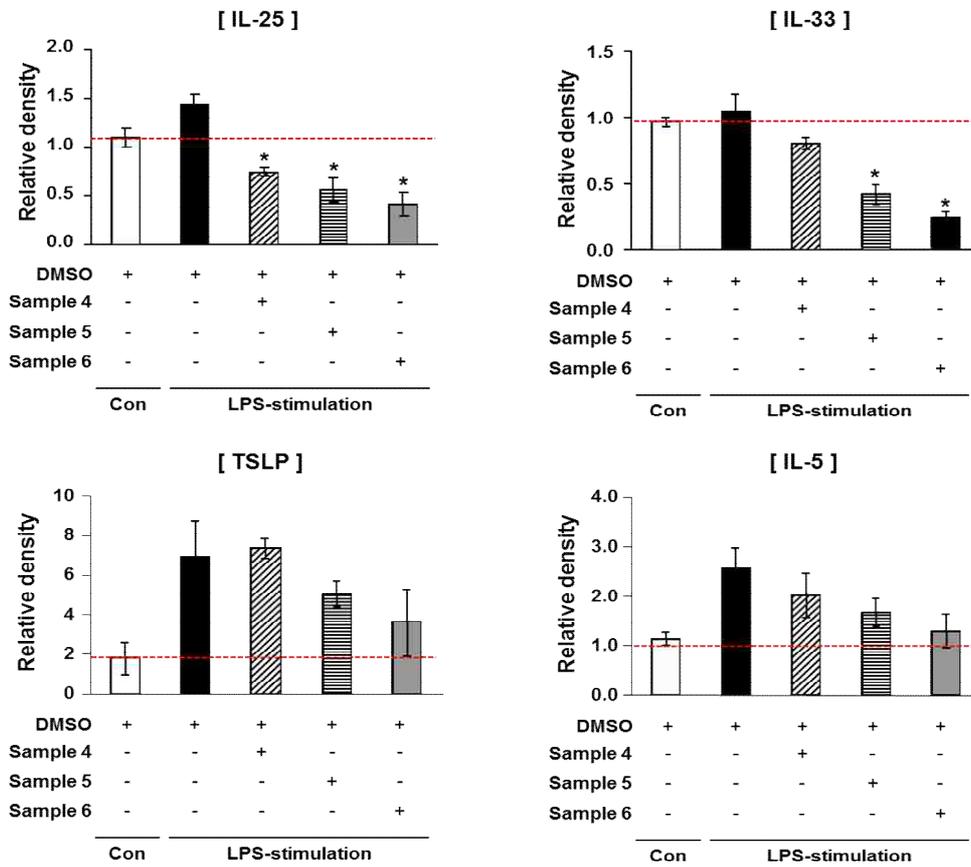


그림 59. 산초유 만생종 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

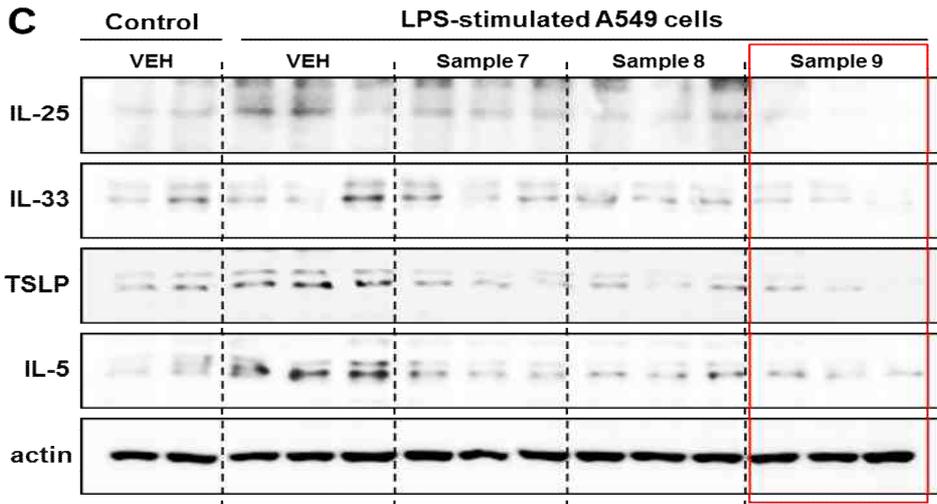


그림 60. 산초유 품종 한초의 착유방법에 따른 염증 사이토카인 발현 양

sample 7: 한초+유압압착 (껍질 10%), sample 8: 한초+유압압착 (껍질 무),
sample 9: 한초+엑스펠라 착유 (껍질 무)

- (D) 혼합시료에서도 엑스펠라 착유시료가 염증 사이토카인 발현양을 감소시킴
- (E) 혼합+엑스펠라 착유시료가 원심분리 유무에 상관없이 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인

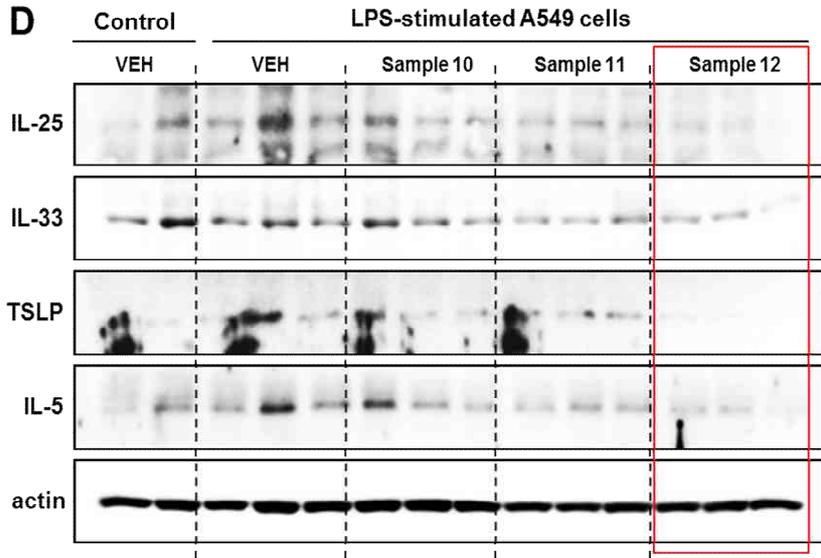


그림 61. 산초유 품종 혼합 시료의 착유방법에 따른 염증 사이토카인 발현 양

sample 10: 혼합(조생종+만생종+한초)+유압압착(겉질 10%), sample 11: 혼합(조생종+만생종+한초)+유압압착(겉질 무), sample 12: 혼합(조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유(겉질 무)

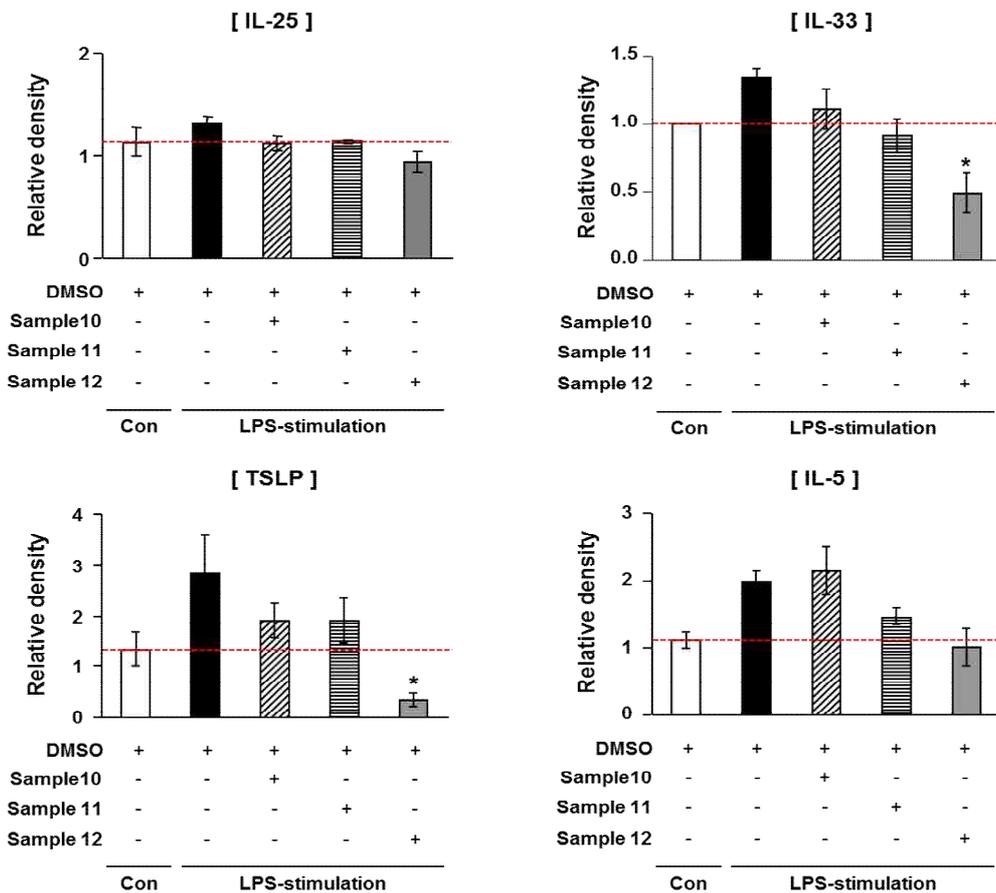


그림 62. 산초유 품종 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

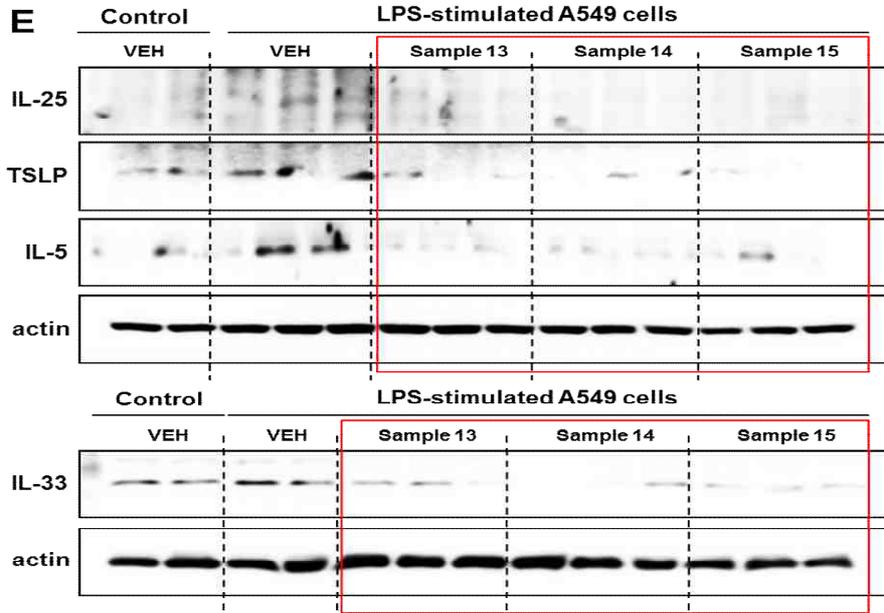


그림 63. 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

Sample 13: 혼합(조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유(원심분리 1차), sample 14: 혼합(조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유(원심분리 미실시), sample 15: 혼합+엑스펠라 착유(원심분리 하층액)

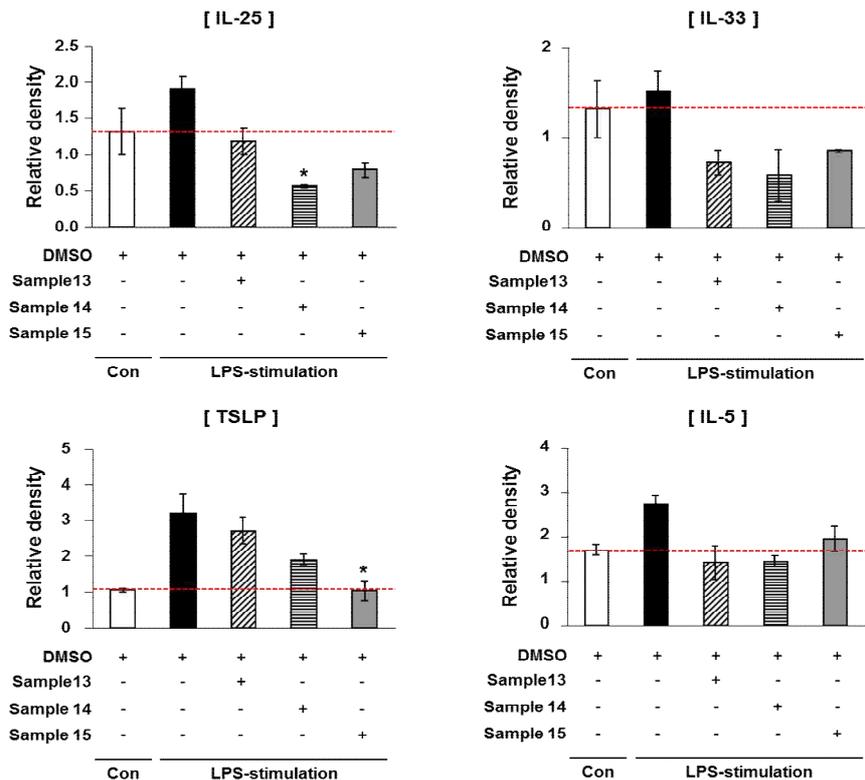


그림 64. 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

- (F) 엑스펠라 착유시료에서 만생종과 한초시료가 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인의 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었으며, 특히 한초시료가 증가된 염증사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인.

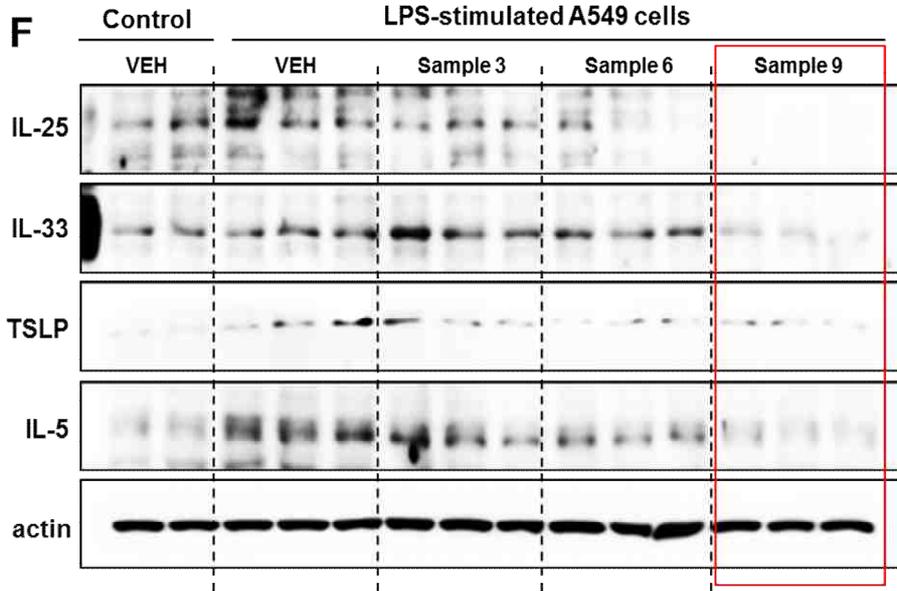


그림 65. 산초유 혼합 시료(조생종+엑스펠라)의 각 염증 사이토카인 발현 양

sample 3: 조생종+엑스펠라 착유 (껍질 무), sample 6: 만생종+엑스펠라 착유 (껍질 무), sample 9: 한초+엑스펠라 착유 (껍질 무)

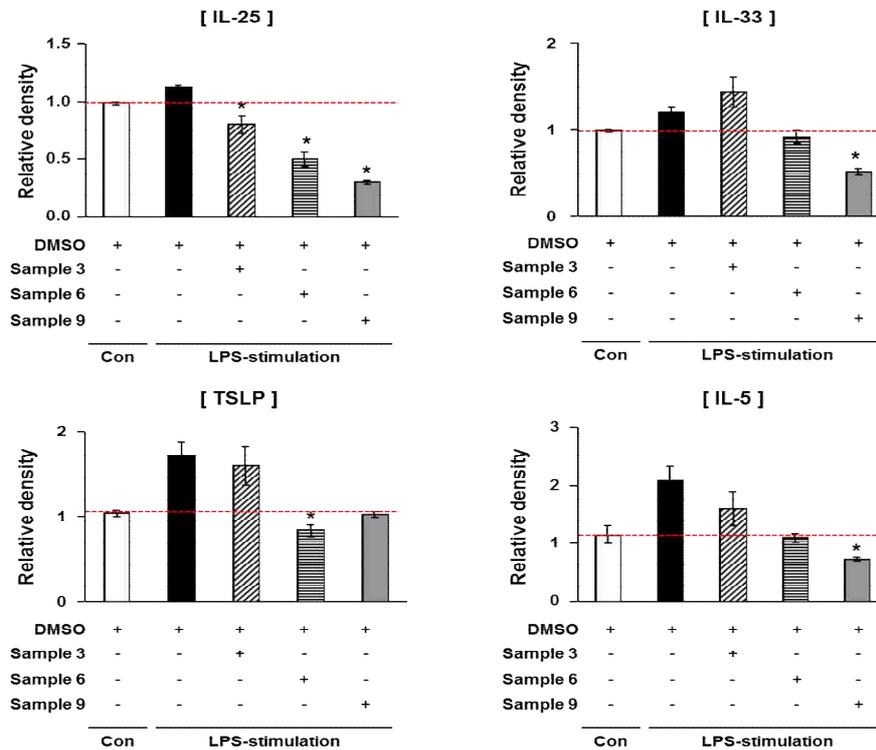


그림 66. 산초유 혼합 시료(조생종+엑스펠라)의 각 염증 사이토카인 발현 양

- (G) 한초와 혼합의 엑스펠라 착유 시료의 항염증정도를 비교함. 한초와 혼합의 엑스펠라 착유시료 모두가 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 사이토카인의 발현양을 감소시키는 것으로 확인. 특히 혼합시료는 증가된 TSLP의 발현을 현저히 감소시킴.

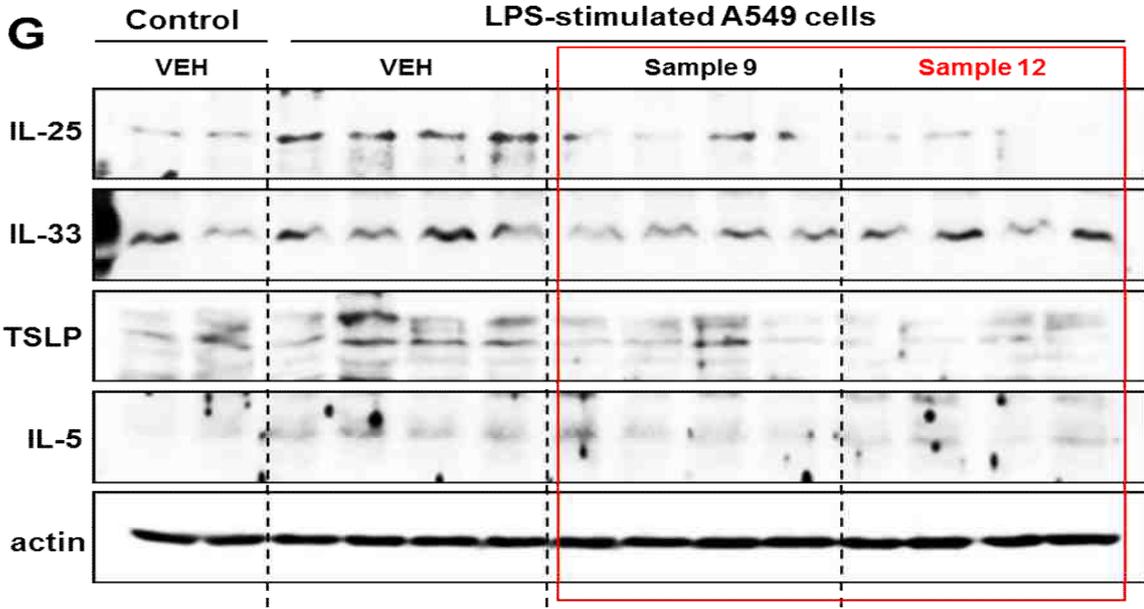


그림 67. 산초유 혼합 시료(한초, 3품종혼합+엑스펠라)의 각 염증 사이토카인 발현 양
 sample 9: 한초+엑스펠라 착유 (껍질 무), sample 12: 혼합 (조생종+만생종+한초)
 +엑스펠라 착유 (껍질 무)

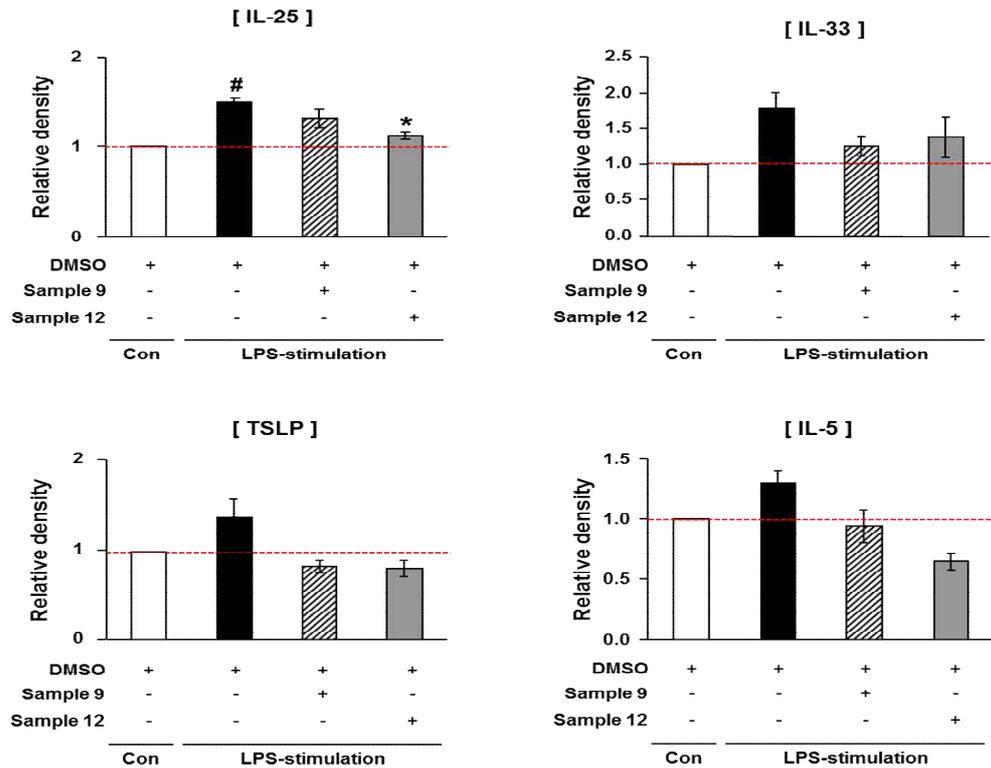


그림 68. 산초유 혼합 시료(한초, 3품종혼합+엑스펠라)의 각 염증 사이토카인 발현 양

나. BAL cell analysis 및 lung tissues Th2 cytokine 변화 확인

(1) 기관지 폐포 세척액 (BAL fluids)에서 염증 세포 분석

- BAL Fluids에서의 염증반응을 확인한 결과, 천식동물모델에서 총 세포수, eosinophils, 및 lymphocytes를 포함한 염증 세포가 유의하게 증가되었으며, 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%를 투여한 실험군에서 총 세포수와 eosinophils의 세포 수가 감소되는 것을 확인함
- 특히, 한초 2%와 혼합 2%은 유의성있게 총 세포수와 eosinophils의 세포 수가 감소되는 것을 확인함
- 천식동물모델의 BAL Fluids에서 염증반응에 효능이 보이는 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%의 폐 조직에서 염증 매개물질인 사이토카인을 확인하기 위하여 Western blot과 Densitometry 분석을 진행함. 천식동물모델의 폐 조직에서 IL-4, IL-5, 및 IL-13 단백질이 모두 유의하게 증가되는 것을 확인하였으며, IL-4의 발현에서는 혼합 0.2%과 혼합 2%를 투여한 실험군에서 유의하게 감소되는 것을 확인하였으며, IL-5의 발현에서는 혼합 0.2%와 혼합 2%를 투여한 실험군에서 감소하는 경향을 보임. IL-13의 발현에서는 한초 2%와 혼합 0.2%를 투여한 실험군에서 감소하는 경향을 보임.

X 10⁴ cells/ml

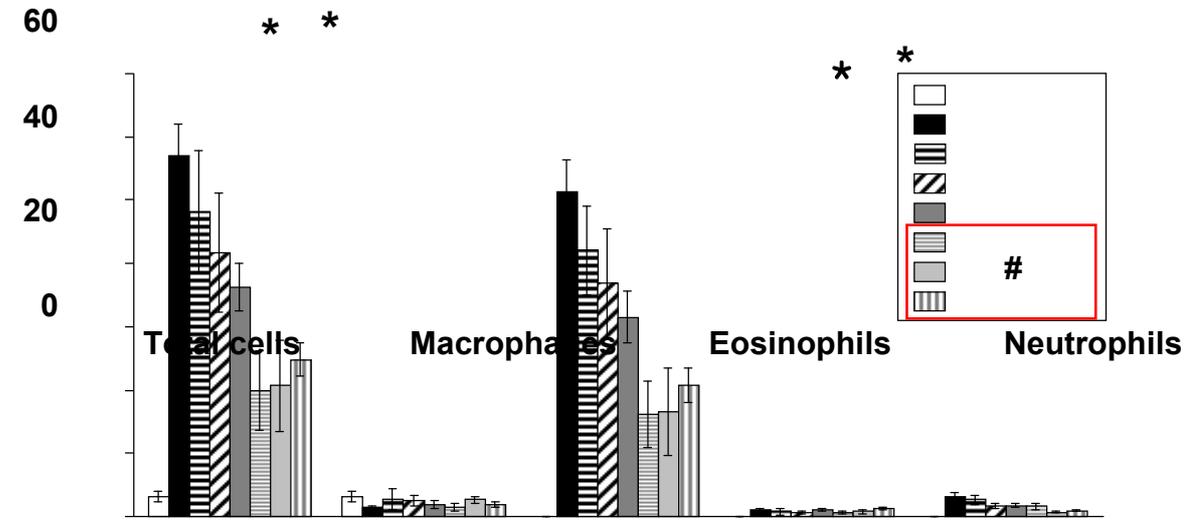


그림 69. BAL에서 총 세포 및 분화 세포 성분에 대한 산초 종자유 의 영향

샘플링은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 수행됨. 막대는 그룹당 n = 6 마우스의 평균 ± SEM, 데이터는 Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트를 사용하여 분석되었으며, 두 그룹 간의 통계적 비교는 Mann Whitney U 테스트를 사용함. SPSS 통계 소프트웨어 (버전 19.0, SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용 하였고, 데이터는 평균 ± SEM으로 나타냄.#p <0.00835 대 SAL + VEH; * p <0.0083 대 OVA + VEH.

(2) Western blot 및 Densitometry 분석

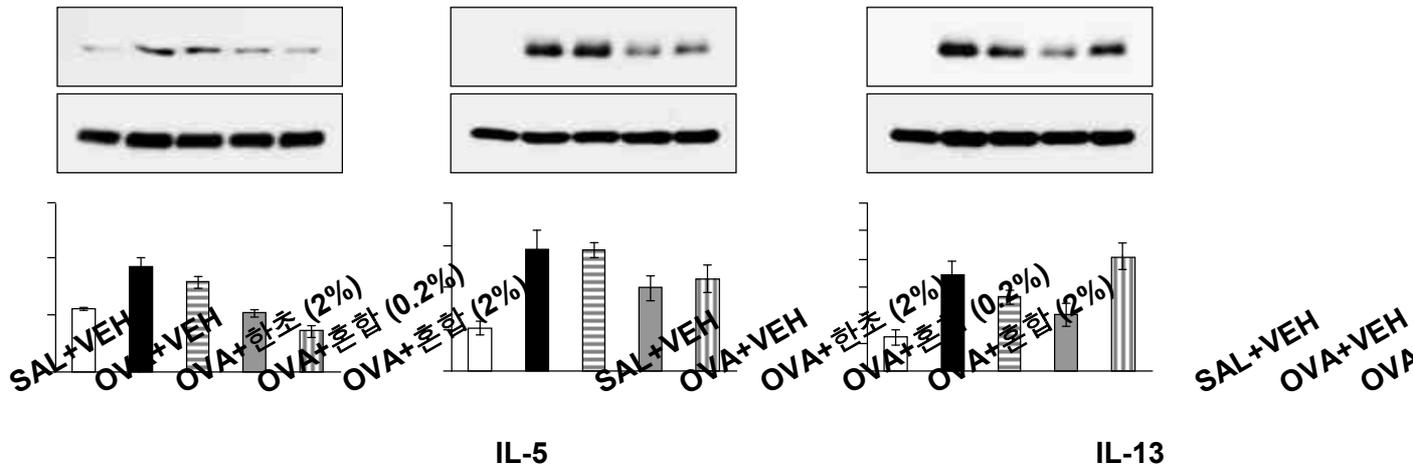
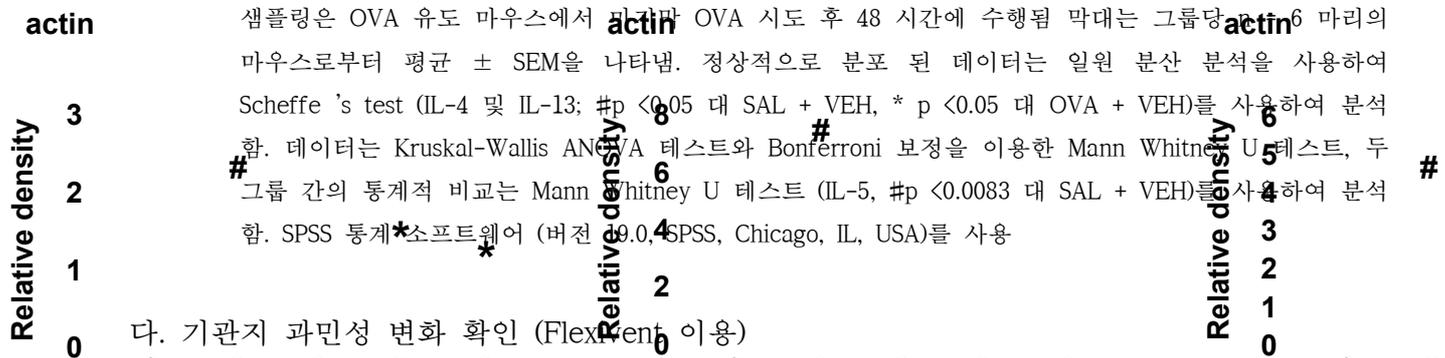


그림 70. OVA로 유도 된 마우스의 사이토카인의 단백질 수준에 대한 산초 종자유의 영향



샘플링은 OVA 유도 마우스에서 각각 OVA 시도 후 48 시간에 수행된 막대는 그룹당 6 마리의 마우스로부터 평균 ± SEM을 나타냄. 정상적으로 분포 된 데이터는 일원 분산 분석을 사용하여 Scheffe 's test (IL-4 및 IL-13; #p < 0.05 대 SAL + VEH, * p < 0.05 대 OVA + VEH)를 사용하여 분석함. 데이터는 Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트, 두 그룹 간의 통계적 비교는 Mann Whitney U 테스트 (IL-5, #p < 0.0083 대 SAL + VEH)를 사용하여 분석함. SPSS 통계 소프트웨어 (버전 9.0, SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용

다. 기관지 과민성 변화 확인 (Flexivent 이용)

기관지 과민성 변화 확인 분석
 ○ 천식동물모델의 BAL Fluids에서 염증반응에 효능이 보여 혼합 0.2% 및 혼합 2%에서의 기도 과민성에 대한 평가를 위하여 메타콜린의 농도에 따른 airway resistance (Rrs)값을 측정함. 실험 결과, 천식동물모델은 SAL+VEH군과 비교하였을 때, 메타콜린 10, 25, 및 50 mg/ml 농도에서 유의하게 기도 과민성의 증가를 보였으며, 증가된 기도 과민성은 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%를 투여한 실험군에서 감소되는 것을 확인함. 특히, 메타콜린 10과 25 mg/ml에서는 혼합 0.2%의 시료가 기도 과민성에서 감소시키는 것으로 확인하였고, 50 mg/ml의 메타콜린 농도에서 혼합 2%에 의해 기도 과민성이 감소되는 것을 확인함.

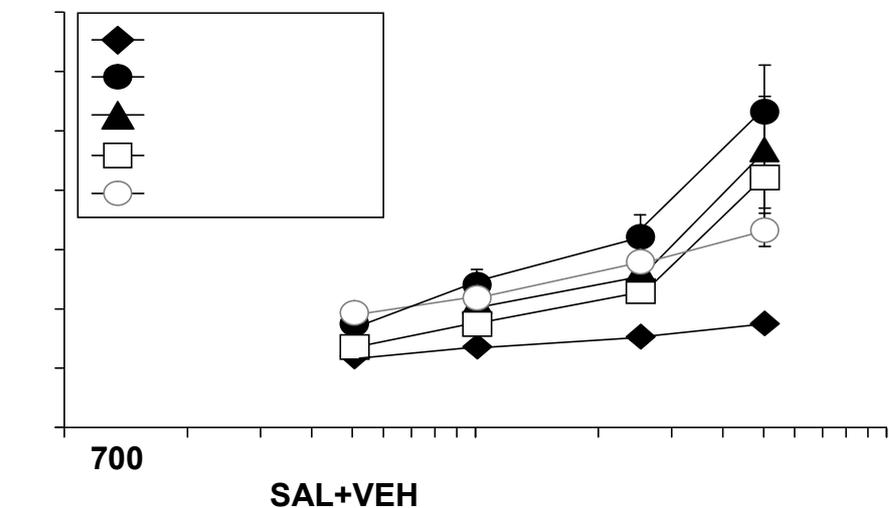


그림 71. OVA 유발 쥐의 기도과 반응성에 대한 산초 종자유의 효과

가이드 반응성은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 측정. 막대는 그룹당 n = 5 마우스의 평균과 표준편차를 나타냄. 정상적으로 분포 된 데이터는 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)을 사용하여 분석함. 비정상적으로 분포 된 데이터는 Kruskal-Wallis A 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann-Whitney U 테스트를 사용하여 분석하였고 두 그룹 간의 통계적 비교는 Mann-Whitney U 테스트 (25 mg / ml methacoline; #p < 0.05 vs SAL + VEH). SPSS 통계 소프트웨어 (버전 19.0, SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용함

라. 조직검사를 통한 peribronchial&perivascular inflammation scoring 호전 여부 확인

(1) 폐 조직의 조직형태학적 분석

○ 천식동물모델의 BAL Fluids에서 염증반응에 관여하는 인자는 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%에서의 병리학적 분석을 한 결과, 천식동물모델의 병리조직 검사에서 상피세포층이 두꺼워졌으며 기관지와 혈관 주위에 염증세포의 침윤의 증가가 유의하게 나타났으며, 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2% 시료를 처리한 실험군에서 병리적 변화가 유의하게 호전되는 것을 관찰함.

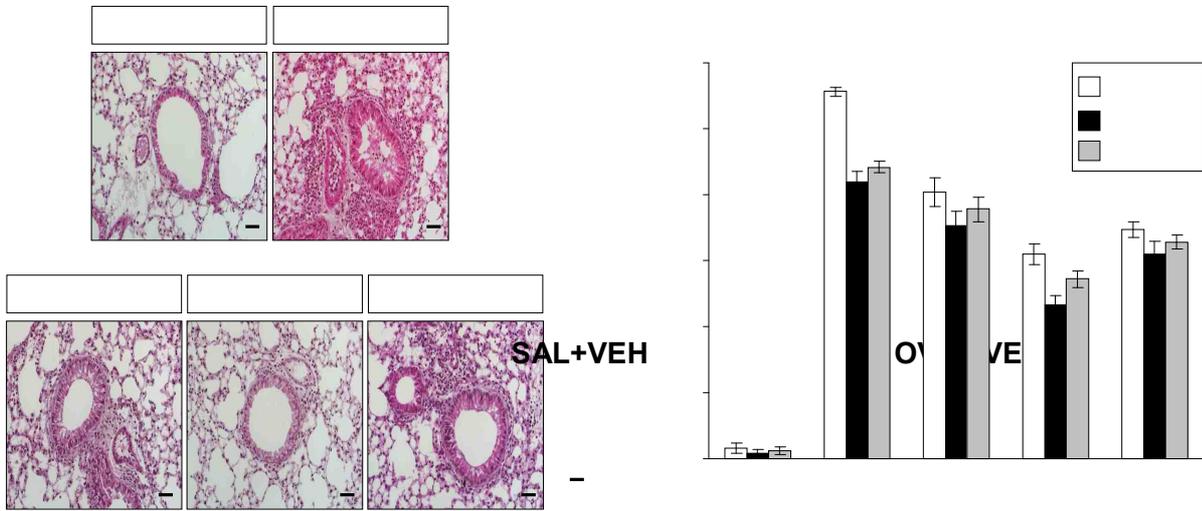


그림 72. 산초 종자유가 OVA 유발 마우스 폐 조직의 병리학 적 변화에 미치는 영향

대표적인 H & E로 염색 된 폐 절편. 샘플링은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 수행됨. 비정상적으로 분포 된 데이터는 Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트를 사용하여 분석되었으며, 두 그룹 간의 통계적 비교는 Mann Whitney U 테스트를 사용함. #p <0.00835 대 SAL + VEH; * p <0.0083 대 OVA + VEH.

- 본 연구 결과는 산초유의 추출 방식에 따라 항염증 효과가 다르며, 특히, 엑스펠라 착유로 얻은 산초유 시료의 항염증 효과를 관찰할 수 있었으며, 천식동물모델에서 엑스펠라 착유로 얻은 한초와 혼합시료가 천식증상을 완화시키는 것으로 확인됨. 본 연구 결과는 한초와 혼합시료의 산초유가 천식질환에 대한 예방 및 치료효과를 가질 수 있다는 하나의 근거를 제시한다고 할 수 있음.

3. 예비연구에서 규명된 산초유항염증효과 기전에 대한 천식 동물 모델에서의 확인연구
가. 천식 동물 모델에서 염증성 전사인자에 대한 효과 연구

(1) 품종 및 추출방식에 따른 BEAS-2B cells에서 염증 사이토카인 발현양

- EF 조생종, 만생종, 한초, 혼합의 유압압착과 엑스펠라착유에서 LPS-stimulated BEAS-2B cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현양이 감소되는 경향을 확인 하였고 그중에서도 한초 유압압착, 혼합 엑스펠라 착유에서 좀 더 호전시키는 결과를 확인함.
- 혼합(D)의 경우 껍질이 없는 엑스펠라 착유로 얻은 시료가 염증 사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인.

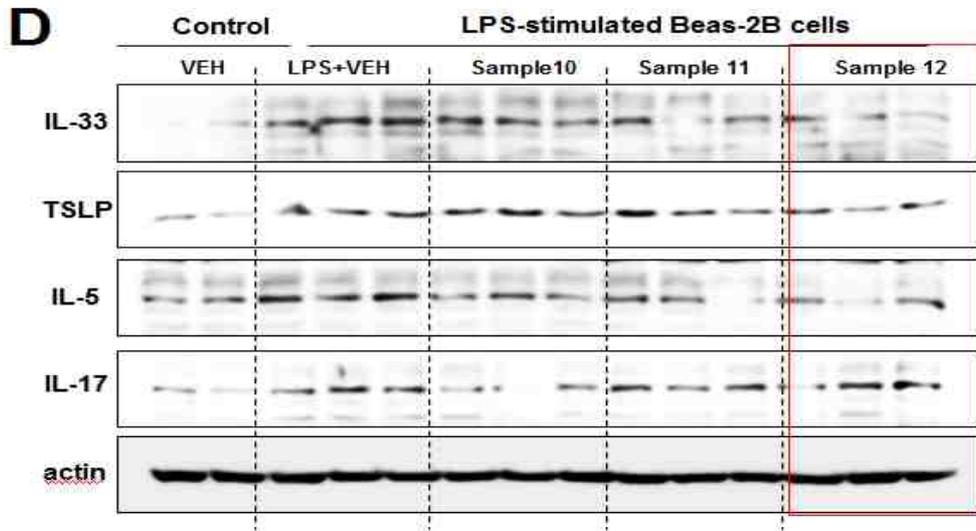


그림 73. 탈검탈산 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

sample 10: 혼합(조생종+만생+한초)+유압압착(겉질 10%) + 탈검탈산, sample 11: 혼합(조생종+만생종+한초)+유압압착(겉질 무) + 탈검탈산, sample 12: 혼합(조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유(겉질 무) +탈검탈산

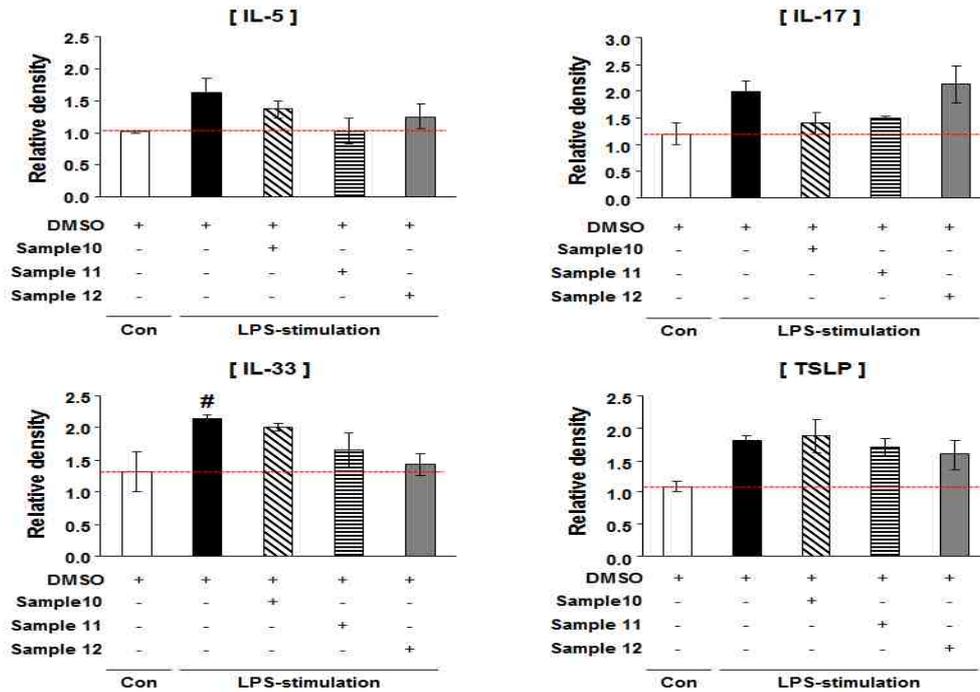


그림 74. 탈검탈산 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

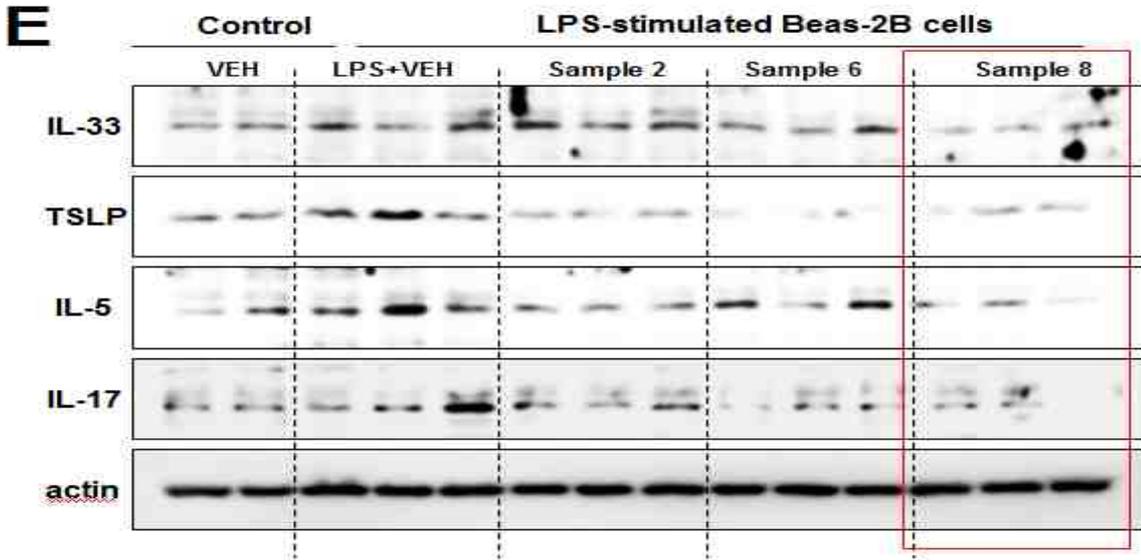


그림 75. 탈검탈산된 각 품종에서 추출된 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

sample 2: 조생종+유압압착 (껍질 무) +탈검탈산, sample 6: 만생종+엑스펠라 착유 (껍질 무) +탈검탈산, sample 8: 한초+유압압착 (껍질 무) +탈검탈산

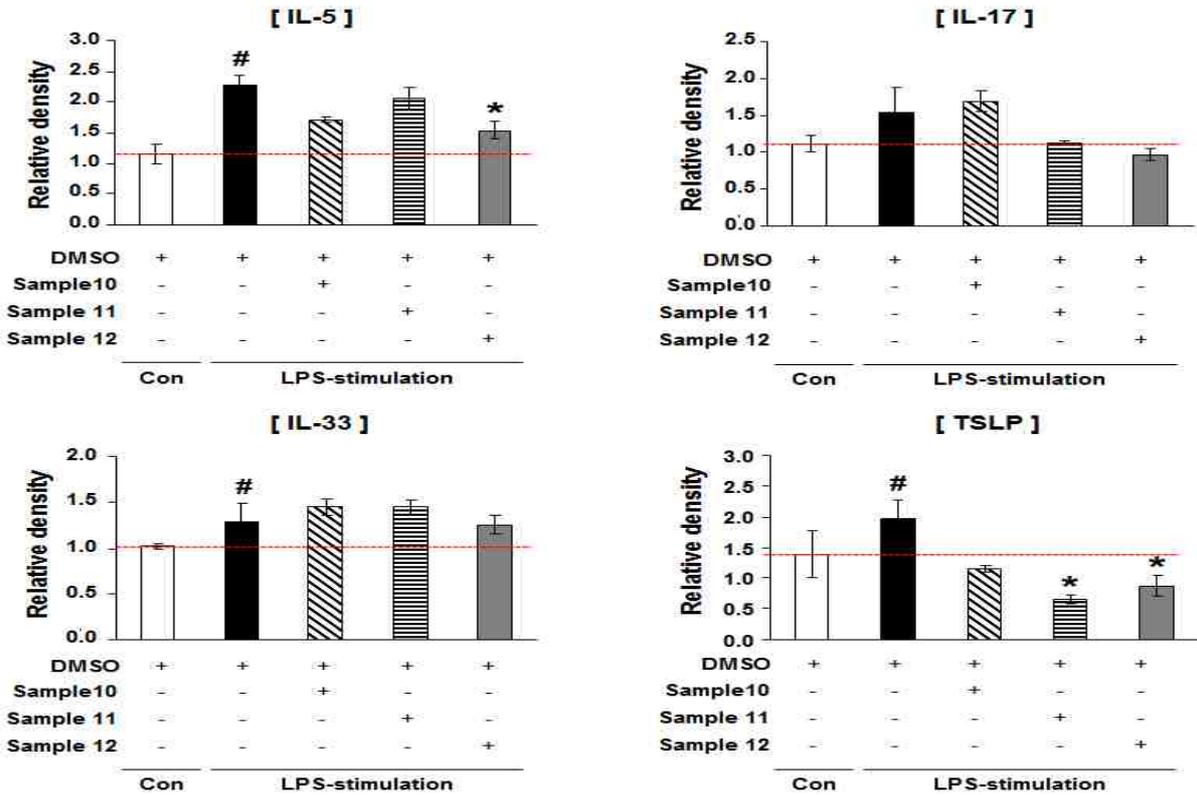


그림 76. 탈검탈산된 각 품종에서 추출된 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

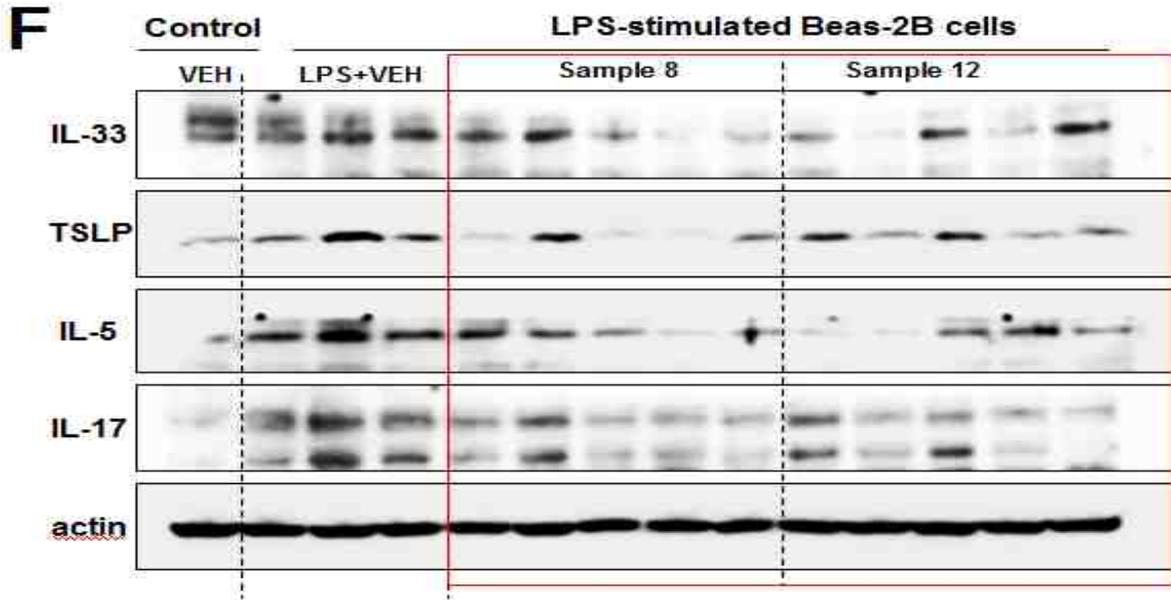


그림 77. 탈검탈산된 각 품종에서 추출된 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

sample 8: 한초+유압압착(껍질 무)+탈검탈산,

sample 12: 혼합(조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유(껍질 무)+탈검탈산

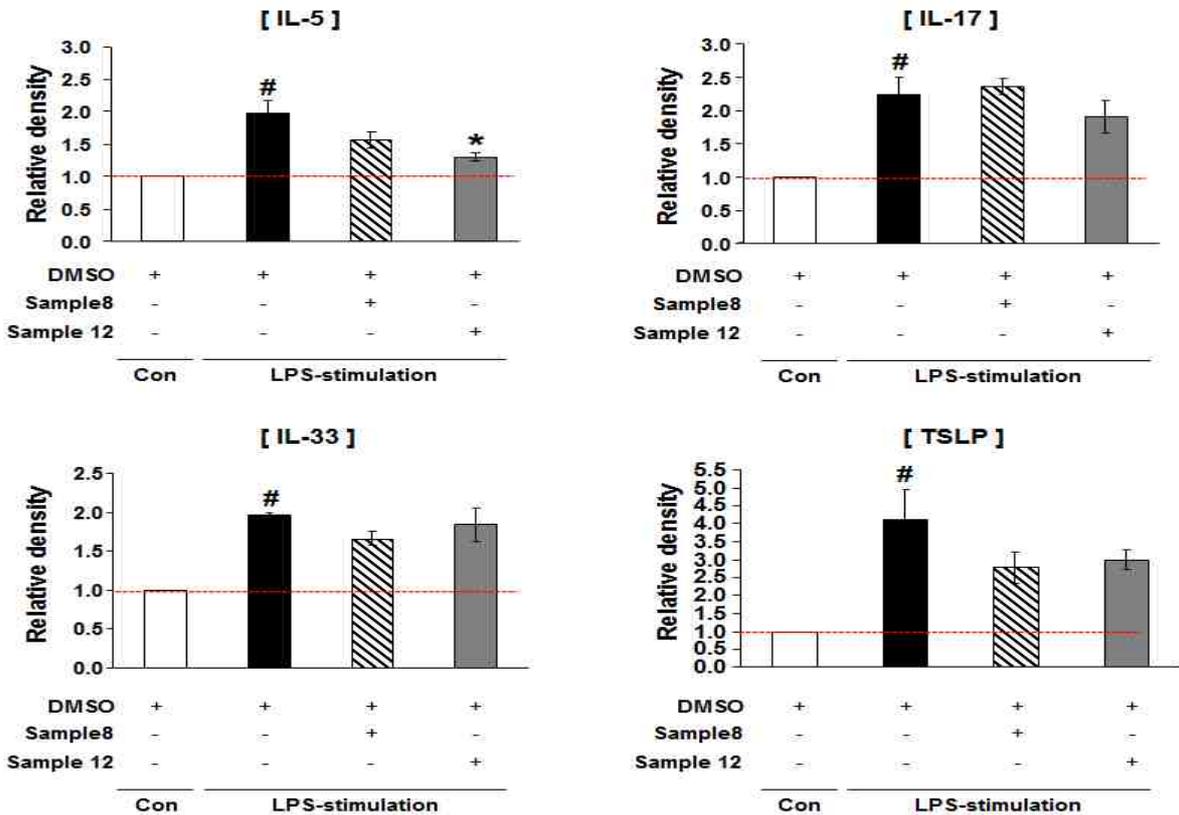


그림 78. 탈검탈산된 각 품종에서 추출된 산초유 혼합 시료의 각 염증 사이토카인 발현 양

나. 천식 동물 모델에서 항산화 효과 확인 연구

(혼합산초유 유압압착 및 엑스펠라 착유방식의 차이점 구명)

(1) 기관지 폐포 세척액 (BAL fluids)에서 염증 세포 분석

- BAL Fluids에서의 염증반응을 확인한 결과, 천식동물모델에서 총 세포수, eosinophils, 및 lymphocytes를 포함한 염증 세포가 유의하게 증가되었으며, 한초와 혼합 모든 투여 군에서 총 세포수와 eosinophils, lymphocytes의 세포 수가 감소되는 것을 확인함. 특히, 탈검탈산한 한초 유압압착과 혼합의 엑스펠라 착유에서 유의성있게 총 세포수와 eosinophils의 세포 수가 감소되는 것을 확인함

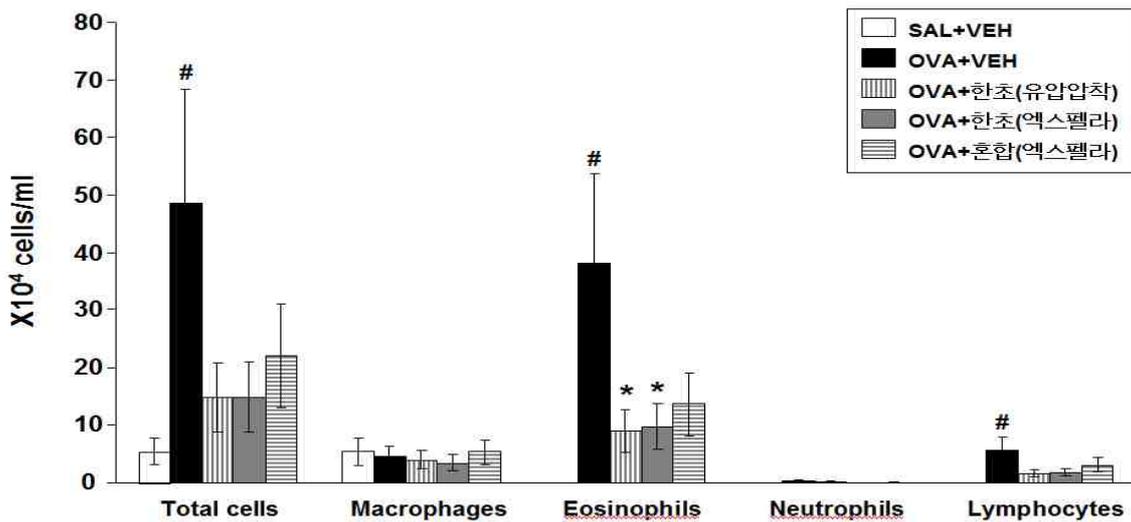


그림 79. BAL에서 총 세포 및 분화 세포 성분에 대한 산초 종자유의 영향

샘플링은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 수행되었으며, 막대는 그룹당 n = 6 마우스의 평균 ± SEM을 나타냄. 데이터는 Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트를 사용하여 분석되었으며, 두 그룹 간의 통계적 비교는 Mann Whitney U 테스트를 사용했음.

(2) Western blot 및 Densitometry 분석

- 천식동물모델에서 각각 2%의 산초유를 투여하였을 때 폐 조직에서 염증 매개물질인 사이토카인을 확인하기 위하여 Western blot과 Densitometry 분석을 진행함.
- 천식동물모델의 폐 조직에서 IL-4, IL-5, IL-13 및 NF-kB 단백질의 발현이 모두 유의하게 증가되는 것을 확인하였음.
- TH2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13의 발현에서는 공통적으로 한초 엑스펠라를 투여한 실험군에서 유의하게 감소되는 것을 확인함. 특히 산초유를 투여한 3개의 실험군 모두에서 IL-13의 발현이 유의성있게 감소되는 것을 확인함.
- 염증반응과 발생과정에 중요한 신호전달 단백질인 NF-kB의 발현 또한 감소하는 경향을 확인함.

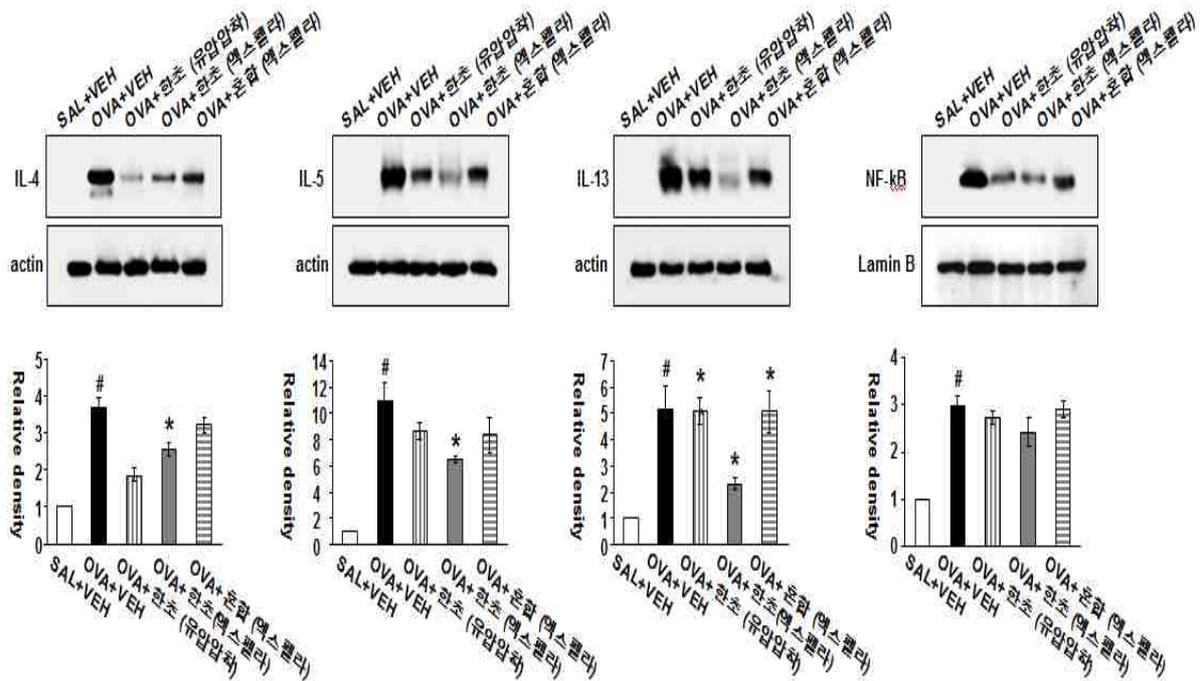


그림 80. OVA로 유도된 마우스의 사이토카인의 단백질 수준에 대한 산초 종자유 영향

샘플링은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 수행되었고, 막대는 그룹당 n = 6 마리의 마우스로부터 평균 ± SEM을 나타냄.

(3) 기도(기관지) 과민성에 대한 분석

- 천식동물모델의 기도 과민성에 대한 평가를 위하여 메타콜린의 농도에 따른 airway resistance (Rrs)값을 측정함. 실험 결과, 천식동물모델은 SAL+VEH군과 비교하였을 때, 메타콜린 5, 25, 및 50 mg/ml 농도에서 유의하게 기도 과민성의 증가를 보였으며, 증가된 기도 과민성은 한초, 혼합 산초유를 투여한 실험군 모두에서 감소되는 것을 확인함. 특히, 메타콜린 50mg/ml에서는 엑스펠라착유로 얻은 한초와 혼합 시료가 기도과민성에서 유의성 있게 감소시키는 것으로 확인함.

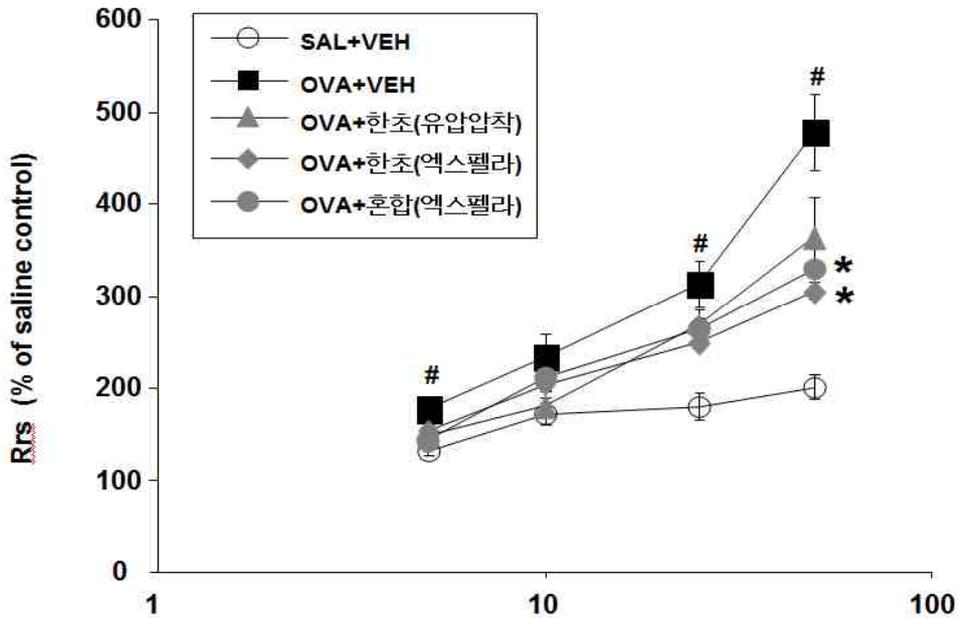


그림 81. OVA 유발 쥐의 기도과 반응성에 대한 산초 종자유의 효과

기도과 반응성은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 측정되었다고, 막대는 그룹당 n = 6 마우스의 평균 ± SEM을 나타냄. 데이터는 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)과 Scheffe 's, Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트를 사용하여 분석되었음.

(4) 폐 조직의 조직형태학적 분석

- 천식동물모델에서의 2%산초유를 투여하였을 때 병리학적 분석을 한 결과, 천식동물모델의 병리조직 검사에서 상피세포층이 두꺼워지고 기관지와 혈관 주위에 염증세포의 침윤의 증가가 유의하게 나타났으며, 한초(유압압착) 2%, 한초(엑스펠라)2% 및 혼합(엑스펠라)2% 시료를 처리한 실험군중에서 한초(엑스펠라)2%군에서 병리적 변화가 유의하게 호전되는 것을 관찰함.
- 본 연구 결과는 정제(탈검탈산)된 산초유 역시 항천식 효과를 그대로 보유하고 있다는 것을 확인할 수 있었음을 확인 했다는 것에 1차 의의가 있으며 2 가지 산초유 추출 방식 모두에서 항염증 효과가 확인 되었으나. 특히, 엑스펠라 착유로 얻은 산초유 시료의 항염증 효과가 보다 좋은 것으로 관찰할 수 있었음. 천식동물모델에서 엑스펠라 착유로 얻은 한초와 혼합시료가 천식증상을 완화시키는 것으로 확인이 되었고 그 중에서도, 엑스펠라 착유의 한초 실험군에서 의미있는 호전이 관찰됨. 본 연구 결과는 한초와 혼합시료의 산초유가 천식질환에 대한 예방 및 치료효과를 가질 수 있다는 하나의 근거를 제시한다고 할 수 있음. 추가적으로 이러한 항천식 효과의 기전으로 NF-kB 전사 인자 억제 효과를 통합을 확인하여 분자기전을 제시함.

x10⁴ cell/ml

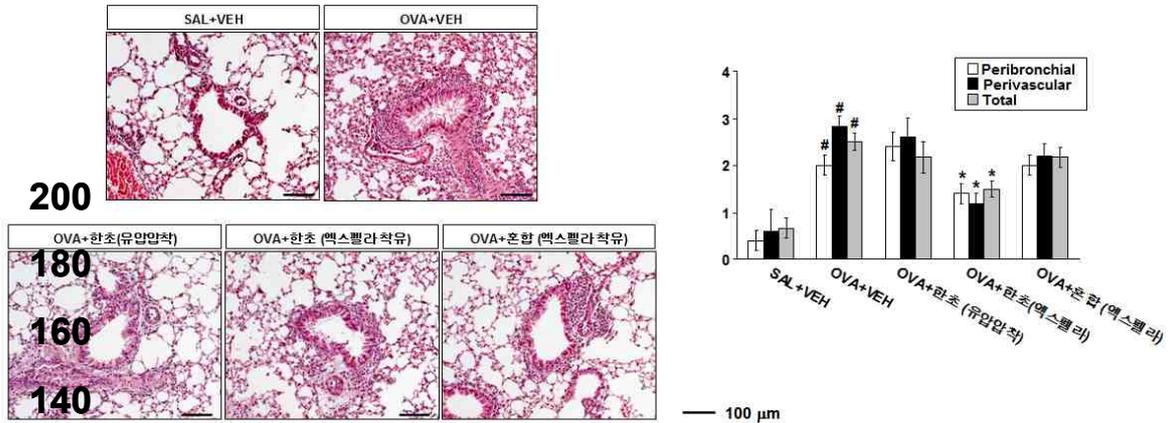


그림 82. 산초 종자유가 OVA 유발 마우스 폐 조직의 병리학 적 변화에 미치는 영향

표적인 H & E로 염색 된 폐 절편 샘플링은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 수행되었음. 스케일 바는 100 μm를 나타내며, Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트를 사용하여 분석되었으며, 두 그룹 간의 통계적 비교는 Mann Whitney U 테스트를 사용함

CONT
OVA
AF+한초
AF+혼합

4. 산초유의 새로운 항염증 기전 발굴연구

가. 선천 면역 인자에 대한 효과 확인 연구

(1) 기관지 폐포 세척액 (BAL fluids)에서 염증 세포 분석

○ 엑스펠라 착유로 만든 한초와 혼합세포의 효과를 오산무성 천식모델에 처리한 BAL Fluids에서의 염증반응을 확인한 결과, 천식동물모델에서 총 세포수, macrophages 및 eosinophils,의 염증 세포가 유의한 증가를 보였고, 한초와 혼합을 처리한 약물군에서는 효과를 보이지 않았음

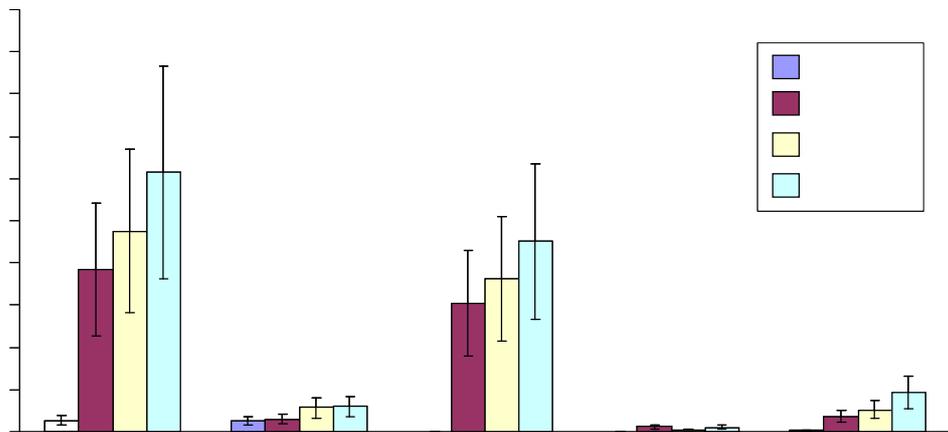
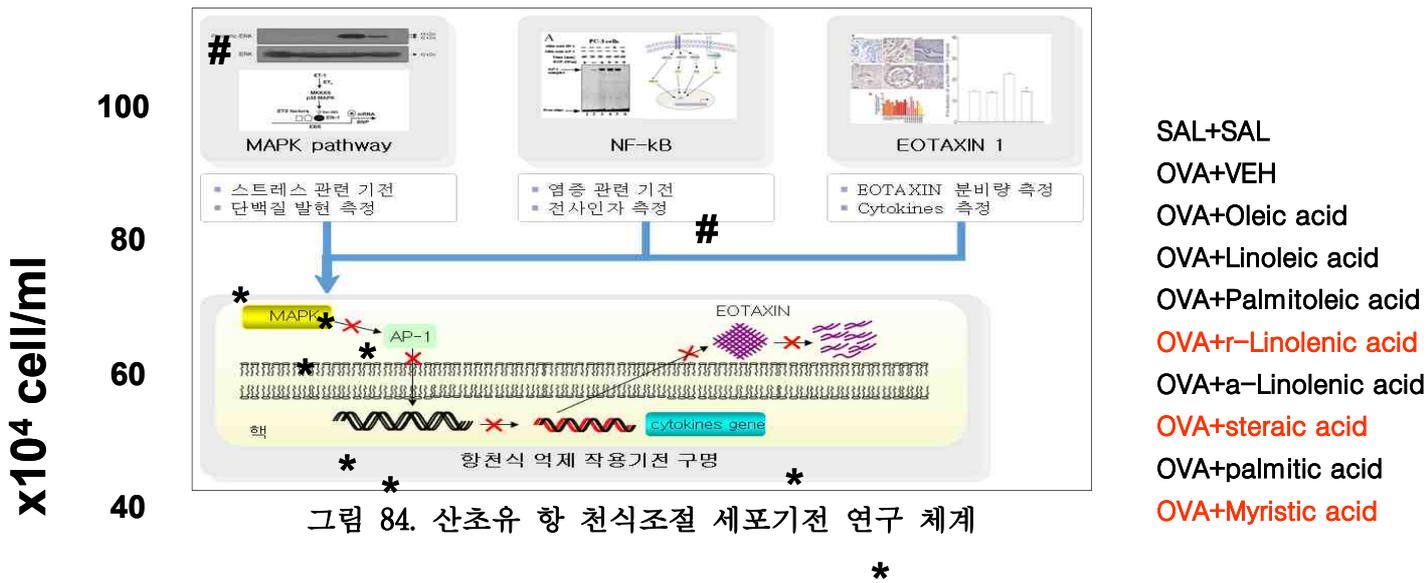


그림 83. BAL에서 총 세포 및 분화 세포 성분에 대한 산초 종자유의 영향

샘플링은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 수행되었고, 막대는 그룹당 n=6~ 8 마우스의 평균 ± SEM을 나타냄. 데이터는 Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트를 사용하여 분석되었으며, 두 그룹 간의 통계적 비교는 Mann Whitney U 테스트를 사용함

5. 항산화제 및 새로운 기전 조절 양성 대조군과의 비교 연구

- BAL cell analysis 및 lung tissues Th2 cytokine 변화 확인
- 기관지 과민성 변화 확인 (Flexivent 이용)
- 조직상을 통한 peribronchial&perivascular inflammation scoring 호전 여부 확인



6. 스테로이드와의 항천식 효과 비교 연구

가. BAL cell analysis 및 lung tissues Th2 cytokine 변화 확인

(1) 기관지 폐포 세척액 (BAL fluids)에서 염증 세포 분석

○ 산초유 표준물질을 처리한 BAL Fluids에서의 염증반응을 확인한 결과, 천식동물모델에서 총 세포수, eosinophils, 및 lymphocytes 염증 세포가 유의하게 증가되었으며, 그 중 r-Linolenic acid, stearic acid, Myristic acid 세 그룹에서 다른 그룹들에 비해 염증세포들의 두드러진 감소가 확인됨 특히, 통계적 유의에서는 OVA와 약물그룹인 두 그룹간의 비교에서 약물군은 대체적으로 통계적 유의성을 얻을 수 있었음.

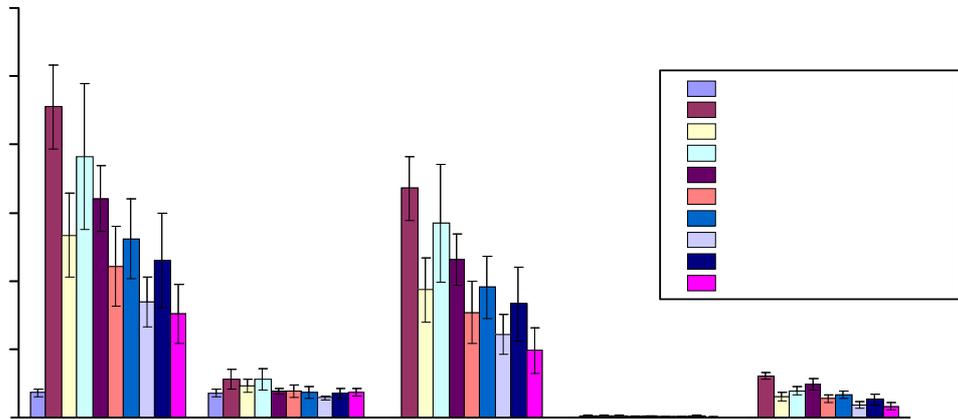


그림 85. BAL에서 총 세포 및 분화 세포 성분에 대한 산초 종자유의 영향

샘플링은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 수행되었고, Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트를 사용하여 분석되었으며 두 그룹 간의 통계적 비교는 Mann Whitney U 테스트를 사용하였음

(2) Western blot 및 Densitometry 분석

- 천식동물모델에서 산초유 표준물질을 투여하였을 때 폐 조직에서 염증 매개물질인 사이토카인을 확인하기 위하여 Western blot과 Densitometry 분석을 진행함.
- 천식동물모델의 폐 조직에서 IL-4, IL-5 및 IL-13 단백질의 발현이 모두 유의하게 증가되었으며, 약물그룹에서 대체로 감소하는 경향을 확인할 수 있었음.
- 특히, 통계적 유의에서는 OVA와 약물그룹인 두 그룹간의 비교에서 IL-4에서는 Myristic acid그룹이 유의성있게 감소하였고 IL-13에서는 r-Linolenic acid와 Myristic acid를 처리한 그룹에서 유의한 감소를 확인함.

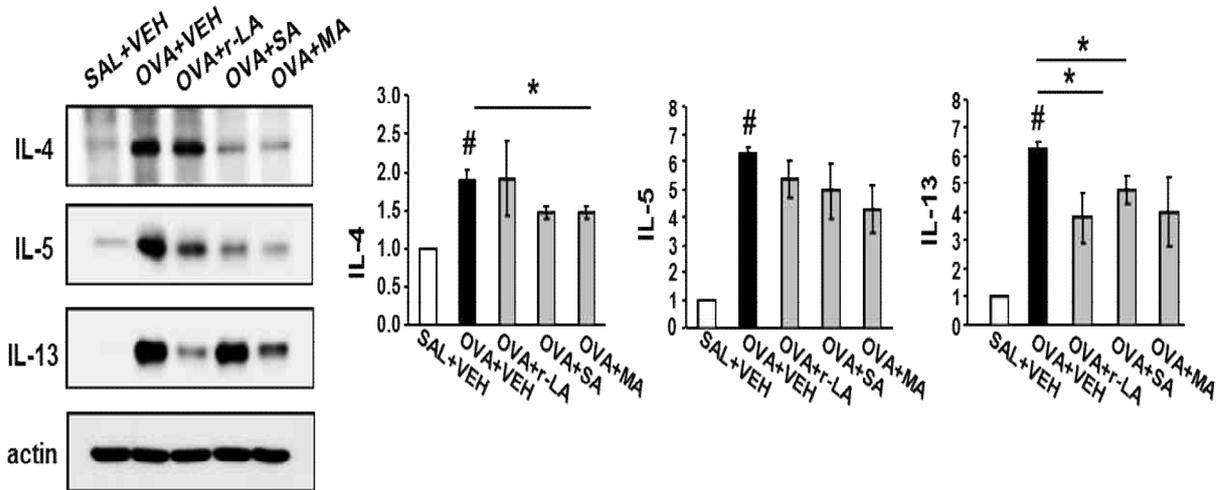


그림 86. OVA로 유발 된 마우스의 사이토 카인의 단백질 수준에 대한 산초 종자유의 영향

샘플링은 OVA 유도 마우스에서 마지막 OVA 시도 후 48 시간에 수행되었고, 막대는 그룹당 n = 5 ~ 6 마리의 마우스로부터 평균±SEM을 나타냄. 데이터는 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)과 Scheffe's test, Kruskal-Wallis ANOVA 테스트와 Bonferroni 보정을 이용한 Mann Whitney U 테스트를 사용하여 분석되었음

제 4 절 산초유 생산 표준공정 pilot scale 적용

1. 추출산초나무 품종별, 착유방법별 산초유 수율

산초나무 품종별, 착유방법별 산초유 수율을 비교한 결과, 유압압착법보다 스크롤(엑스펠라) 착유가 수율이 더 높은 것으로 나타남.

품종별로는 조생종보다는 숙기가 늦은 만생종, 한초가 수율이 높았음.

그러나 산초유 수율은 종자의 상태(열매 익음 정도)에 따라 수율 차이가 많은 편으로 채취 시기가 중요한 것으로 조사됨

표 74. 산초유 품종별, 착유방법별 수율 비교

No.	품종	착유방법	껍질포함유무(%)	로스팅 유무
1	조생종	유압압착	10	유
2	조생종	유압압착	-	유
3	조생종	엑스펠라	-	
4	만생종	유압압착	10	유
5	만생종	유압압착	-	유
6	만생종	엑스펠라	-	
7	한초	유압압착	10	유
8	한초	유압압착	-	유
9	한초	엑스펠라	-	
10	혼합	유압압착	10	유
11	혼합	유압압착	-	유
12	혼합	엑스펠라	-	

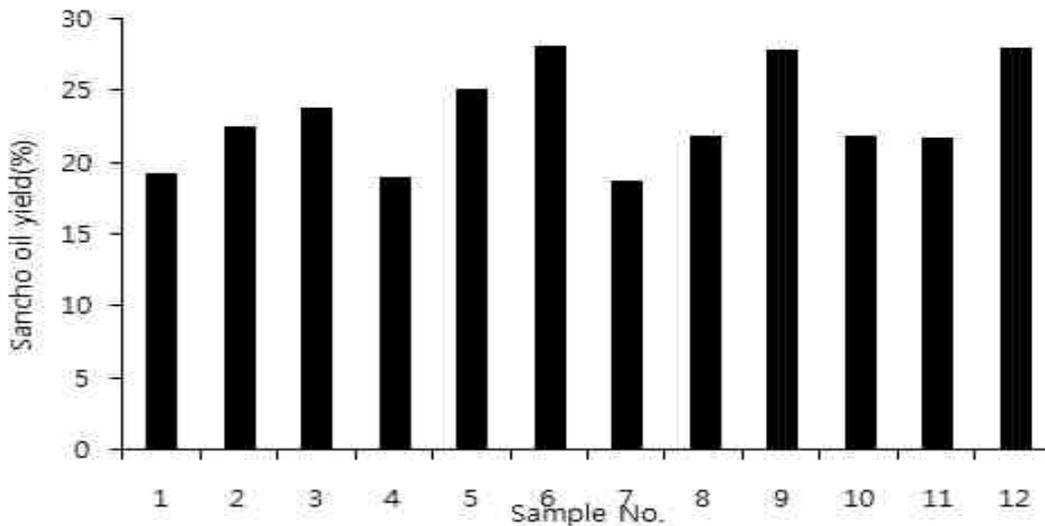


그림 87. Pilot scale에서의 품종별, 착유방법별 산초유 수율 (ml/kg)



그림 88. Pilot scale에서의 산초유 착유 공정

산초나무 종자 품종별, 착유방법별 산초유 수율을 비교한 결과, 유압압착법보다 스크롤(엑스펠라) 착유가 수율이 더 높은 것으로 나타남. 품종별로는 조생종보다는 숙기가 늦은 만생종, 한초가 수율이 높았음. 그러나 산초유 수율은 종자의 상태(열매 익음 정도)에 따라 수율 차이가 많은 편으로 채취 시기가 중요한 것으로 조사됨

2. 산초유 표준공정 확립

1) 착유방식과 원료 종류에 따른 산초유 수율

- 착유방식은 엑스펠러 방식이 수율이 높았음
- 원료 종류에 따른 산초유 수율을 조사한 결과 만생종이 가장 수율이 높았음

표 75. 착유방식과 원료 종류에 따른 산초유 수율

착유방식	원료종류	수율(ml)
유압압착	조생종	259.6±3.96 ^b
	만생종	290±14.14 ^{ab}
	혼합	291.3±0 ^{ab}
	신품종	277.6±0 ^{ab}
엑스펠러	조생종	287.4±43.27 ^{ab}
	만생종	316±1.41 ^a
	혼합	315 ^a
	신품종	313.5±0.71 ^a

※ 평균±표준편차, a:던킨 다변량 검정(p<0.05)

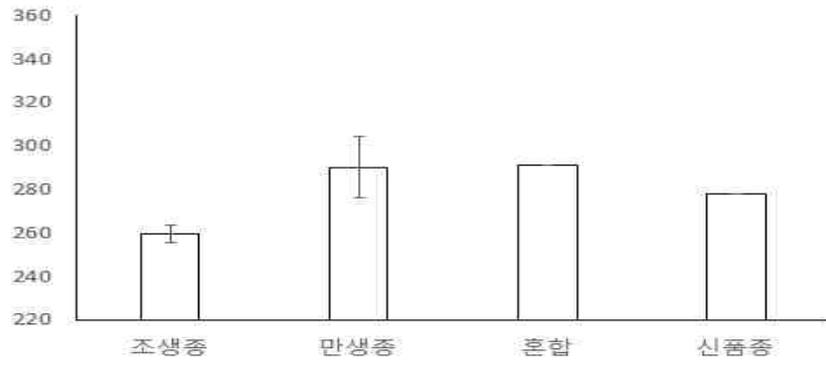


그림 89. 원료 종류별 유압압착 산초유 수율

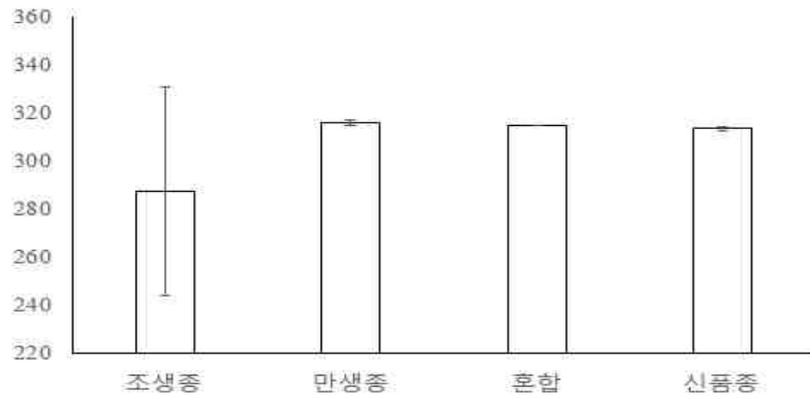


그림 90. 원료 종류별 엑스펠러 산초유 수율

○ (영농조합법인)우보산초에서 개발한 산초유 착유기

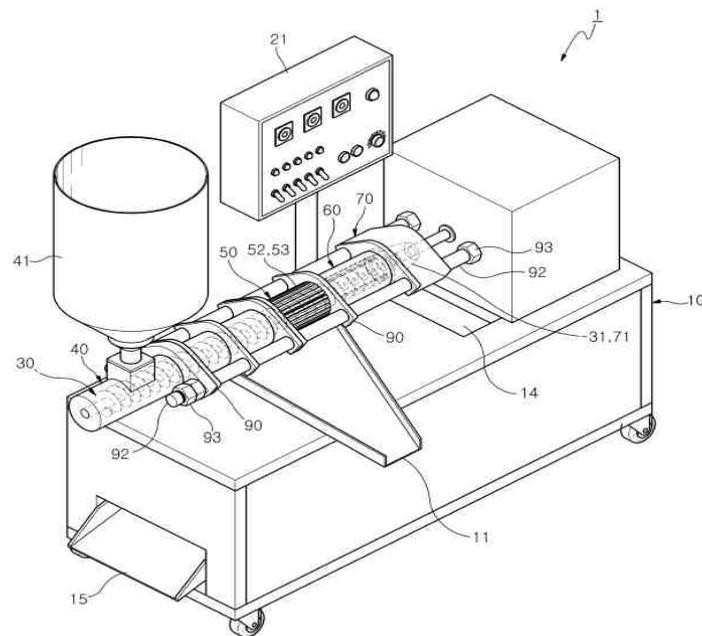


그림 91. 우보산초에서 개발한 산초유 착유기

제 4 장 목표에 대한 달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표에 대한 달성도

본 연구의 최종목표는 산초유 기능성원료 개별인정 기반연구 및 산업화 기술을 개발하는 것임. 이를 위해 본 연구는 산초유 기능성원료 개별인정 기반연구 및 산초유 효능을 검증하였고, 산초유 기능성분 규격 및 시험방법을 확립하였고, 원료 특성을 구명함

산초유 표준화 및 기능성원료 개별인정을 위한 기반연구에서는 고품질 산초유 생산에 유리한 착유방법을 구명함 기존 유압압착보다 엑스펠라 방식의 착유법 구명은 고품질 산초유 생산할 수 있고, 색을 통해 구별할 수 있어 고품질 산초유 유통의 선별기준으로 삼을 수 있는 지표를 설정함 또한 현재 생산 및 유통에서 문제점으로 지적되는 산패를 줄이기 위한 저장 조건을 구명함 천식에 효과적인 산초유를 기능성원료로 개별인정받기 위해 수행한 피부감작성 시험을 수행함 그 결과 산초유는 매우 낮은 자극성을 지니고 있음을 확인하였고, 건강기능식품에 사용할 수 있는 기반을 마련함

산초유 기능성분 규격 및 원료특성 연구에서는 산초유의 지방산 규격기준을 마련하였고, 종 특이 SCAR primer를 이용하여 산초유 기원 감별을 보다 신속하게 검증할 수 있는 PCR 증폭용 유전자 마커 개발함 이는 추후 국내산 및 국외산 산초유의 판별, 유통과정 등에 활용할 수 있는 데이터를 마련함 산초원료 및 산초유 기원 감별용 유전자 감별 키트 시제품 개발 완료하여, 고품질 산초유에 다른 식용유지의 혼입을 확인할 수 있는 과학적 분석법을 확립함

산초유의 기관지 천식 효능 연구는 기관지 폐포 세척액 에서 염증 세포가 증가하는 것을 확인하였고, 산초유는 염증세포 감소가 감소한다는 것을 확인함 천식 연구는 아직 시스템의 확립이 되어 있지 않으나 본 연구에서는 천식동물모델을 확립하였고, 사이토카인을 검정한 결과 산초유는 기관지천식을 완화시킴을 확인함

산초유 생산 표준공정 pilot scale 적용연구에서는 엑스펠러 방식이 수율이 높았으며, 최적 원료 종류도 구명하여 산업화를 위한 기본 자료를 구축함

따라서 본 연구는 본래 목표를 모두 달성하였다고 판단됨

2. 관련분야 달성도

산초유는 오래전부터 민간에서 이용되어 오고 있는 소재임 그러나 산초유는 일부 농가에서 착유되어 온라인을 통해 소량 유통되고 있는 실정임 산초유의 활성화를 위해서는 식의약처에 건강기능성소재로 인증을 획득하는 것이 절대적으로 필요하나 이에 대한 노력이 부족함. 본 연구에서는 산초유의 대량보급을 위한 원료의 표준 및 규격을 설정하고자 하였고, 산초유 판별을 위한 마커개발 및 분석법을 확립함 또한 세포 및 동물시험계를 이용한 산초유의 기관지 천식 효능 연구를 통해 민간에서 효능을 과학적으로 확인함 이는 건강기능성 소재로

인증을 위한 매우 중요한 자료가 됨 또한 산초유 생산은 농장마다 자기방식대로 착유하여 제품의 표준화가 어렵고 특히 산패가 큰 문제로 대두되는 바 본 연구에서는 보편적으로 연구실에서 하기 어려운 pilot scale의 연구를 수행하여 엑스펠러 방식이라는 효율성이 높은 추출방법을 구명함. 본 연구는 유용민속식물이면서 오래된 식의약 원료인 산초유의 대량생산 및 보급화 나아가 기능성식품 소재 개발의 자료로 크게 기여할 것으로 판단되며, 달성도가 높다고 판단됨

제 5 장 연구결과의 활용계획

제 1 절 기대효과

- 기술적 측면
 - 안전성과 생산성이 높은 산초유 생산
 - 산초유 품질기준 제시로 산업화 및 유통상 안전성 확보
 - 산초유 부산물 및 미활용 원료를 이용한 제품 개발 등 원천기술 확보
 - 기능성 원료 인증 자료로 활용

- 경제적·산업적 측면
 - 산림소득자원을 이용한 임가소득 증대 등 산업적 활용가치 극대화
 - 유효성 검증을 통하여 기능성 인증으로 산림자원의 신 소득원 창출

- 사회적 측면: 건강기능식품 개발로 질병 예방효과, 건강한 삶에 기여
 - 산초유의 안전한 건기성 식품 개발 및 보급에 기여

제 2 절 연구개발성과의 활용방안

- 건강 기능성 원료 인증 자료로 활용
 - 본 연구의 결과를 바탕으로 건강 기능성 원료 인증 자료로 활용

건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 (식품의약품안전처 고시 제 2019-69호 일부개정 2019. 8. 5)에 의거하여 산초유의 건강기능성 식품등록을 위하여 수행해야 될 과업자료는 다음과 같다.

- 신청절차
 1. 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서

 2. 제12조제1항 또는 제17조에서 정하는 제출자료 1부
 - 가. 제출자료 전체의 총괄 요약본
 - 나. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
 - 다. 제조방법에 관한 자료

라. 원료의 특성에 관한 자료

마. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서

바. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

사. 안전성에 관한 자료

아. 기능성 내용에 관한 자료

자. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

3. 제출자료를 수록한 저장매체(CD 등) 1개

4. 다음 각 목에 따른 원료, 제품 또는 시제품

국내 제조되는 기능성 원료 및 건강기능식품의 경우에는 법 제4조 및 같은 법 시행령 제2조에 따른 건강기능식품전문제조업소에서 3ロット 이상을 제조한 제품 중 무작위로 제출하여야 한다.

5. 표준품(기능성분 또는 지표성분)

6. 지표성분 규격 검사성적서

「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따른 식품의약품안전처장이 지정한 식품전문 시험·검사기관 또는 같은 법 제8조에 따른 국외시험·검사기관에서 검사를 받은 기능성 성분, 원재료의 기준 및 규격 등 시험성적서 또는 검사성적서(다만, 기능성분 또는 지표성분의 규격에 대하여는 건강기능식품 검사업무를 수행하는 시험·검사기관에서 발행한 것으로 한다)

건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서				처리기간	
				120일	60일
신청인	대표자				
	업체명		영업허가/ 신고번호	제조업	
				수입업	
	업체 소재지		(전화번호)		(Fax)
	수입건강 기능식품	수리번호			
수출국					
제조회사					
소재지					
원료명					
「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.					
년 월 일					
신청인 (서명 또는 인)					
식품의약품안전처장 귀하					
※ 구비서류 1. 제출자료 1부 2. 제출자료 수록 CD 1개 3. 제품 또는 시제품 4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 5. 국내·외 검사기관이 발행한 시험성적서				수수료	
				100,000원	
※ 제출자료 1. 제출자료 전체의 총괄 요약본 2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 3. 제조방법에 관한 자료 4. 원료의 특성에 관한 자료 5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 7. 안전성에 관한 자료 8. 기능성 내용에 관한 자료 9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료					

210mm×297mm[일반용지 60g/m²(재활용품)]

- 개발기술 및 기술이전 방안
 - 고품질 산초유 생산공정 최적조건, 산초원료 기원종 · 품질평가용 유전자 마커, 산초유 분석기술 확립, 산초유 효능 구명 데이터 확립
 - 개발기술은 우선적으로 지적재산권을 획득하는데 주력함
 - 기술이전 행정절차에 따라 관심기업에게 기술 이전을 수행할 계획
- 논문 게재
 - 과학적 데이터 제시로 홍보 및 마케팅에 활용
- 산초유 생산 표준 매뉴얼 활용
 - 연구결과를 바탕으로 작성된 매뉴얼은 산초유 관련 기술교육훈련용 교재로 활용
- 관련 연구 개발 인력
 - 유능한 인력을 양성한 후 관련 산업체 등에 취업시켜 청년실업을 해소

제 3 절 추가연구의 필요성

- 산초유의 동물 실험에 대한 추가 연구가 필요
 - 본 연구에서 수행된 기관지 천식연구에 대한 결과가 매우 고무적이어서 이에 대한 좀 더 자세한 동물실험이 필요함
 - 추가 연구는 현재 진행 중인 산초유의 표준화 및 일정한 성분 일정화의 기술이 완료 후 확보되는 시료로 진행하여 해당 결과를 보다 수준 있는 과학저널 (SCI급)에 발표할 수 있는 연구 결과를 도출하고자 함.
- 산초나무 대량 보급에 관한 추가 연구가 필요
 - 현재 우량 산초나무 선발 및 대량증식 연구는 매우 부족한 실정임. 따라서 우량개체 선발 및 전통적인 생명공학적인 대량 증식 연구가 필요함
- 산초나무 대량 보급을 위한 최적 재배지 구명에 대한 추가 연구가 필요
 - 그동안 산초나무 조림지 분석 결과 매우 까다로워 최적 재배지 구명에 대한 추가 연구 필요
- 민간에서 효능을 보인 생리활성에 대한 기능성에 대한 추가 연구가 필요
 - 민간에서 효능을 보인 생리활성에 대한 추가 연구가 필요

결론

1. 산초유 표준화 및 기능성원료 개별인정을 위한 기반연구

- 산초의 수율은 조생종보다 만생종이 높으나 산초유 품질은 종자 상태에 영향을 많이 받으므로 산초 송이의 수확 후 건조과정에서 탈각된 종자를 빠르게 수확하여 종자상태에서 유지의 산패가 일어나는 것을 방지해야 함 탈각된 종자를 착유하는 것이 고품질 산초유 생산에 유리하나 생산물량의 처리가 즉각적으로 어렵다면 본 연구를 통해 개발한 산소 제거 패치를 활용하여 종자를 저온 저장하는 것이 필요함
- 착유방법으로는 유압압착보다 엑스펠라 방식의 착유가 산초유의 산가 측면에서 보았을 때 고품질 산초유를 생산할 수 있고, 유압압착 방식과 엑스펠라 착유방식의 산초유는 색을 통해 구별할 수 있는 것으로 나타나 고품질 산초유 유통의 선별기준으로 삼을 수 있다고 판단됨. 또한 정제공정을 거치지 않은 산초유의 산패가 진행될수록 산초유의 색 또한 투명하게 변하는 것을 보았을 때, 시중에 유통중인 산초유의 품질과 생산방법을 추정할 수 있을 것으로 기대함
- 저장온도가 높을수록 산초유의 품질의 감소하는 속도는 빠른 것으로 나타났으므로 4℃ 이하로 유통하고 저장하는 것이 필요하고, 산초유의 포장 시 공기가 들어가지 않도록 포장하거나 본 연구에서 개발한 병 내부에 산소를 제거하는 뚜껑을 활용하여 유통 중 또는 산초유를 가정에서 사용하고 난 다음 산소에 의한 산패를 방지하여 고부가가치를 지닌 산초유의 변질을 막을 수 있음
- 산초유는 식용유지를 생산함으로 산초나무를 재배하는 데 있어 농약사용을 주의해야 하며, 사용하는 농약의 성상은 유효성분이 극성을 띠는 것을 사용하거나 천연물을 이용한 방제를 하는 것이 필요하다고 판단됨
- 산초유는 지방을 기준으로 약 54g 정도를 섭취하면 1일 권장섭취량을 충족하는데, 요리 스푼으로 환산하면 약 큰술에 해당함으로 민간에서 사용하는 하루 1큰술 정도의 양은 적절하다고 판단됨 다만 엑스펠라 방식으로 착유한 산초유는 유압압착 방식으로 착유한 산초유와 비교해서 세균과 곰팡이가 더 쉽게 번식 할 수 있는 환경임으로 살균과 소포장 방식을 활용하여 관리하는 것이 필요함 본 연구사업의 성과로 투고한 논문에서 산초유의 항균활성을 논하였는데, 산초유는 약6.4ul/cm²의 농도로 표면 도포하였을 때, 식품변패균의 생장이 확연히 억제되는 것을 확인함 따라서 산초유는 식품변패균의 증식을 억제하는 드레싱유로 활용할 수 있다고 판단됨
- 천식에 효과적인 산초유를 기능성원료로 개별인정받기 위해 수행한 난황알부민 유발 천식 동물 모델시험은 예비 실험을 통해 그 경구 투여 용량을 0.2% 또는 2%의 용액으로 사용하기로 결정하여 한번에 200uL 씩 2차례 투여하여 그 결과를 확인하였음. 천식치료에

사용되는 산초유의 농도는 0.2% 정도로 미량임으로도 그 항천식효과가 2%의 산초유가 비슷하게 나타날 수 있음을 확인함. (산가 2017년: 16.48, 2018년: 8.15, 혼합 엑스펠라 착유) 산초유는 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부를 확인하였을 때, 식품공전에는 아직 건강기능성 원료로 등재 되어 있지 않아 건강기능식품에 사용할 수 있도록 평가하는 것이 필요함

2. 산초유 기능성분 규격 및 원료특성 연구

- 산초유는 지방산(oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 등) 약 80% 차지하며 에스트라골 (향기성분, Estragole) 이외의 지방산의 함량을 보면, 포화지방산 (palmitic acid, stearic acid)과 불포화지방산(palmitoleic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, Cis-11-eicosenoic acid) 비율은 대략 1:5정도를 가져 산초유의 지방산 규격기준을 마련함
- 종 특이 SCAR primer를 이용하여 산초유 기원 감별을 보다 신속하게 검증할 수 있는 PCR 증폭용 유전자 마커 개발하여 유전자 마커를 이용한 정성분석만 가능한 conventional PCR 뿐만 아니라, 정량분석까지 가능한 real-time PCR (qPCR) 분석법 구축함. 극소량의 DNA함유 상태에서도 산초유 분석이 가능함을 확인하였고, 산초원료 및 산초유 기원 감별용 유전자 감별 키트 시제품 개발 완료함 따라서 고품질 산초유에 다른 식용 유지의 혼입을 확인할 수 있는 과학적 분석법을 확립에 성공함

3. 산초유기관지 천식 효능 연구

- 기관지 폐포 세척액 (BAL fluids)에서 염증 세포 분석을 통해 산초유가 천식동물모델(대조구)에서 염증 세포(eosinophils, 및 lymphocytes) 증가하는 것을 확인하였고, 산초유 그룹(r-Linolenic acid, stearic acid, Myristic acid) 염증세포 감소가 감소한다는 것을 확인함
- 천식동물모델에서 산초유 표준물질을 투여하였을 때 폐 조직에서 염증 매개물질인 사이토카인을 확인하기 위하여 단백질분리(Western blot) 및 골밀도검사(Densitometry)를 진행한 결과 천식동물모델(대조구)의 폐 조직에서 단백질(IL-4, IL-5 및 IL-13) 증가가 확인되었고, 산초유 그룹에서 대체로 감소하는 경향을 확인함 엑스펠라 착유로 얻은 한초와 혼합시료의 효과를 호산구성 천식모델에 처리한 BAL Fluids에서 염증반응을 유도하였을 때, 천식동물모델(대조구)에서 염증세포(macrophages 및 eosinophils) 증가하였으나 산초유 그룹에서는 염증세포 증가하지 않음 따라서 산초유는 기관지천식을 완화시키는데 도움이 된다고 판단됨

4. 산초유 생산 표준공정 pilot scale 적용

- Pilot scale의 산초유 착유방법은 그동안 고안된 바 없었으나 본 연구를 통해 산초유의 산초유의 착유방식은 엑스펠러 방식이 수율이 높음을 확인함. 또한 엑스펠러 방식에

적합한 원료 종류를 구명하여 만생종이 우수함을 구명함 따라서 산초유의 대량 추출 표준 공정 확립 등에 기여할 것으로 판단됨

- 종합적으로 본 연구는 유용 민속식물 자원인 산초유의 과학적 접근을 통해 건강기능성 식품소재로 인증 자료로 활용될 수 있을 것으로 보임 또한 뚜렷한 조림 권장 수종이 없는 시점에서 산주 및 임업 관련기업에게 활로를 모색해 줄 수 있을 것으로 기대한다,

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

○ 연구 논문 외 특별히 수집한 해외 과학기술 정보는 없음

제 7 장 연구개발성과의 보안등급

- 본 연구 결과는 건강기능성 인증 및 보급화를 위한 기술이어서 특별한 보안조치는 필요없을 것으로 판단됨

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

○ 연구기간 중 구입장비는 없음

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록 번호
-	해당	사항	없음	-	-	-	-	-

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전 조치 이행 실적

- 연구실은 안전수칙을 부착하여 관리하였음
- 연구실에는 폐액통을 비치하여 안전조치를 행하였음

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구 실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/ 기타	소속 기관명	역할	논문 게재지/ 특허 등록 국가	영향력 지수	논문 게재일 /특허 등록일	사사 여부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기 사항 (SCI 여부/인용 횟수 등)
1	논문	산초유 정제공정에 따른 물리화학적 변화	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국	0.99	2017.10.	단독	KCI
2	논문	산초유 산패방지를 위한 항산화물질과 혼합유의 영향	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국	0.99	2018.12.	단독	KCI
3	논문	Development of conventional PCR and real-time PCR assays to discriminate the origins of Chinese pepper oil and herbal materials from <i>Zanthoxylum</i>	한국한 의학연 구원	세부	미국	2.422	2019.3.	단독	SCI

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/ 기타	소속 기관명	역할	논문 게재지/ 특허 등록 국가	영향력 지수	논문 게재일 /특허 등록일	사사 여부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기 사항 (SCI 여부/인용 횟수 등)
4	특허	산초유 정제 및 저장성 연 장방법	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국		2015. 02.06	단독	
5	특허	산초유 치즈 및 그 제조 방 법	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국		2015. 02.26	단독	
6	특허	산초종자 정선 장치	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국		2017. 06.09	단독	
7	특허	곡물 착유기	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국		2017. 09.25	단독	
8	특허	산초유를 유효 성분으로 포함 하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치 료용 조성물	한국한 의학연 구원	세부	한국		2018. 05.11	단독	
9	특허	산초나무, 초 피나무, 개산 초 및 화초의 감별용 프라이 머 세트 및 이 의 용도	한국한 의학연 구원	세부	한국		2018. 07.10	단독	
	특허	기능성 음료용 용기마개	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국		2019. 06.28	단독	
10	특허	산초유 생산용 산초종자 저장 조성물 및 이 를 이용한 저 장 어셈블리	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국		2019. 06.28	단독	
11	특허	종자 컨테이너	경상남 도산림 환경연 구원	주관	한국		2019. 06.28	단독	

제 11 장 기 타

○ 기타 사항은 없음

제 12 장 참고 문헌

1. 이영노. 1998. 한국식물도감. 교학사. P438.
2. 경상남도산림환경연구원. 2005. 산초나무 재배기술.
3. 구관효. 2005. 고품질의 산초기름 생산보급을 위한 산초나무 재배기술. 산림정보. p49-53.
4. 김철우. 2004. 산초나무의 지역별 종자특성, 유무성 번식 및 RAPD방법에 의한 유전적 유연관계 분석. 강원대학교 대학원 임학과.
5. Lee, J. G., Jang, H. J., Kwang, J. J. 1999. Analysis of volatile components of Sancho(*Zanthoxylum schinifolium*) by solid phase microextraction. *Hanguk sikpum Yongyang Hakhoechi* 12(2) : 119-123.
6. Bae, S. M., Jin, Y. M., Jeong, E. H., Kim, M. B., and Shin, H. Y. 2011. Studies on proximate composition, fatty acids and volatile compounds of *Zanthoxylum schinifolium* Fruit According to Harvesting Time. *J. Medicinal. Crop. Sci.* 19(1) : 1-8.
7. Cha, J. Y., S. R. Shin, Cho, Y. S. 2000. Fatty acid composition of serum and liver in mice and sancho. (*Zanthoxylum schinifolium*) seed oil, *Korean J. Postharv. Sci. Technol.* 7 : 308-312.
8. Jo, Y. S., Huong, D. T. L., Bae. K. H. 2002. Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica* 68(1) : 84-85.
9. Chen, I. S., Lin, Y. C., Tsai, I. L., Teng, C. M., Ko, F. N., Ishikawa, T., and Ishii, H. 1995. Coumarins and Anti-Platelet Aggregation Constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry* 39(5) : 1091-1097.
10. Mun, S. I., Ryu, H. S., Lee, H. J., and Choi, J. S. 1994. Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* 23(3) : 466-471.
11. Tsai, I. L., Lin. W. Y. Teng C. M. 2000. Coumarins and antiplatelet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica* 66(7) : 618-623.
12. Liu, S. I., Wei, L. X., Wang D. 1991. Chemical constituents from the peel of *Zanthoxylum schinifolium* Sieb et Zucc. *Yaoxue Xuebao* 26(11) : 836-840.
13. 장미란. 서지은, 이재혁, 김건희. 2010. 산초 정유성분의 식중독균에 대한 항균활성. 한국식품조리과학회지. 26(2) : 206-213.
14. Hieu, T. T., S. I. Kim and Y. J. Ahn 2012. Toxicity of *Zanthoxylum piperitum* and *Zanthoxylum armatum*. *J. Med. Entomol.* 49(5) : 1083-1091.

15. Kim, K. W., Baek, J. K., and Kim, J. S. 2005. Isolation of herbicidal Compounds from the fruit of *Zanthoxylum schinifolium* S. et. Z. *Kor. J. Weed Sci.* 25(3) : 194-201
16. 오상미, 한웅, 왕명현. 2010. 산초(*Zanthoxylum schinifolium*) 열매 추출물의 항산화 및 α -Glucosidase 저해 활성. *한국생약학회지*. 41(2) : 130-135.
17. 문숙임. 류홍수. 최재수. 1997. 산초 및 그 활성성분이 사염화탄소를 투여한 Mouse에 있어서 지질과산화 및 간손상 억제에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*. 26(5) : 943-951.
18. Jang, M. J., Woo, M. H., Kim, Y. H., Jun, D. Y., and Rhee, S. J. 2005a. Effects of antioxidative, DPPH radical scavenging activity and antithrombogenic by the extract of Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J. Nutr.* 38(5) : 386-394.
19. 최해식 2012. 한국 산초나무속의 생육·유전적 특성 및 생리활성 연구. *순천대학교 대학원 임학과*. 박사논문
20. 구관효, 윤기식, 최재식 1993. 초피나무에 있어서 Pon-Pon 처리에 의한 종자 발아촉진(發芽促進)과 삽목(插木)에 의한 무성번식(無性繁殖) 개선. *Jour. Korean For. Soc.* 82(3) : 227-234.
21. Lee, J. W. 1998. Volatile flaver components of Korean sancho fruit and tree(*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J. Food Nutr.* 11 : 493-498.
22. Mun, S. I., Ryu, H. S. Lee, H. J. and Choi, J. S. 1994. Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23 : 466-471.
23. Kim, J., Cho, Y. S., Seo, K. I., Joo, O. S. and Shim, K. H. 2000. Antimicrobial activities of *Zanthoxylum schinifolium* and *Zanthoxylum piperitum* leaves. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 7(2) : 195-200.
24. Kim, S. I. and Han, Y. S. 1997. Isolation and identification of antimicrobial compound from Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J. Soc. Food Sci.* 13(1) : 56-63.
25. Kim, J. S., Koo, K. M., Jung, Y. H., Yang, J. G. and Lee, G. G. 2004. Antimicrobial activities of *Zanthoxylum schinifolium* extract against *Vibrio Parahaemolyticus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* 33(3) : 500-504.
26. Chen, I. S., Lin, Y. C. and Tsai, I. L. 1995. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry* 39(5) : 1091-1097.
27. Jia, M., Kim, H. J. and Wang, C. F., Yang, K., Zhang, H. M., Cao, J., Fang, R., Liu, Z. L., Du, S. S., Wang, Y. Y., Deng, Z. W., and Zhou, L. 2011. Components and Insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves. *Molecules*. 16(4) : 3077-3088.

28. Kim, S. I. and Han, Y. S. 1997. Isolation and identification of antimicrobial compound from Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J. Soc. Food Sci.* 13(1) : 56-63.
29. 장미진, 우미희, 김영호, 전도연, 이순재. 2005. 산초(*Zanthoxylum schinifolium*) 뿌리, 줄기 및 잎 추출물의 항산화, DPPH radical 소거 작용 및 항혈전 효과. *한국영양학회지*. 38(5) : 386 - 394.
30. 조영승. 2013. 구강암평편세포 KB에서 산초나무 추출물에 의한 세포치사 유도. *조선대학교 대학원 치의학과*. 박사논문

주 의

1. 이 보고서는 산림청(한국임업진흥원)에서 시행한 융복합 기반 임산업의 신산업화 기술개발 사업(R&D)의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 산림청(한국 임업진흥원)에서 시행한 융복합 기반 임산업의 신산업화 기술개발 사업 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.