

발간등록번호

11-1543000-000148-01

**국내외 신수요 창출을 위한 고품질 흑마늘 및 바이오  
푸드의 상품화**

(Commercialization of high quality black garlic and  
biofoods to create new market for domestic and export)

**경상대학교**

**농림축산식품부**

**국내외 신수요 창출을 위한 고품질 흑마늘 및 바이오  
푸드의 상품화**

(Commercialization of high quality black garlic and  
biofoods to create new market for domestic and export)

**경상대학교**

**농림축산식품부**

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내외 신수요 창출을 위한 고품질 흑마늘 및 바이오 푸드의 상품화” 과제

(제 1 세부과제 “흑마늘 및 개똥썩 혼합물의 생리활성 규명”

제 1 협동과제 “개발 바이오제품의 품질특성 및 생리활성 평가”

제 2 협동과제 “흑마늘과 썩 혼합 면역증진용 음료의 테스트 마케팅”)의 최종보고서로 제출합니다.

2013년 7월 29일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 성 낙 주

협동연구기관명 : (재)남해마늘연구소

협동연구책임자 : 신 정 혜

협동연구기관명 : 남해보물섬마늘영농조합법인

협동연구책임자 : 류 홍 건

# 요 약 문

## I. 국내외 신수요 창출을 위한 고품질 흑마늘 및 바이오 푸드의 상품화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

현대인의 식품섭취 성향은 식품 가공산업의 발달로 다양화되고, 바쁜 일상생활로 편의주의 식품에 대한 선호도가 높고 자연식품보다는 가공식품에 대한 의존도가 증가되고 있는데, 정제된 간편식의 애용은 고지혈증, 심장질환, 암, 당뇨병 및 고혈압성 질환 등과 같은 만성질환의 발생 증가로 사회문제로까지 대두되고 있다. 인체는 산화 촉진물질과 억제물질이 균형을 이루고 있으나, 산화적 스트레스 강도가 클 경우 생체의 균형이 상실되어 충분한 방어기능을 기대하기 어려우므로 생체 내 산화작용을 효율적으로 예방하기 위해서는 지속적인 항산화 물질의 섭취가 필요하다.

인체의 생명유지를 위한 호기성 에너지 대사에는 반드시 산소가 관여하는데, 호흡과정에 유입된 산소의 일부가 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 전환되어 조직 세포가 산화적 스트레스를 유발하게 된다. 즉, 산화적 스트레스의 직접적인 원인이 되는 활성산소종은 불안정하고 반응성이 높아 생체 내 여러 가지 물질과 쉽게 반응하여 체내 조직을 공격하므로써 비가역적인 손상을 유발하게 되며, 활성산소종은 염증반응 시 대식세포 호중구 및 다른 면역세포의 면역반응으로 생산되는데 이때 활성 산소종도 함께 생성된다. 이러한 염증반응은 매우 복잡하므로 이러한 과정 중에 다량의 nitric oxide나 cytokine등이 생성된다. 따라서 식물체의 유용성분은 이러한 물질의 생성을 억제시킴으로써 인체 내에서 항체 생성 촉진, 체내 생화학적 수치의 정상화 등으로 질병이나 외부자극에 대한 방어활성을 증가시켜 만성질환의 예방과 치료에 대한 면역기능을 안정화시키게 된다.

따라서 인체가 섭취하는 식품은 건강과 직결되므로 식품을 통하여 항산화, 면역, 체력증진 등의 긍정적인 효과를 얻기 위하여 우리나라 뿐만아니라 전세계적으로 건강 증진을 위한 생리활성 물질 탐색과 기능성 식품 개발에 관한 연구로 식물체에 대한 연구가 오래전부터 수행되어 오고 있다. 특히 생약 및 식용식물은 우리 주변에서 쉽게 찾을 수 있으며, 안전한 천연물질이므로 여러 질병의 예방이나 치료에 유용자원으로서의 그 가치를 찾고자하는 시도가 많이 이루어지고 있다. 즉, 여러 가지 생리적 효능이 있는 식물류로부터 그 기능성 성분을 추출하여 건강 기능향상에 도움이 되는 다양한 가공품의 개발이 시도되고 있는데, 최근에는 이러한 생리조절 기능을 부여한 기능성 제품의 개발이 확대되고 있으며, 단일 식물소재보다는 여러 가지

식물의 추출물을 혼합한 제품을 개발함으로써 추출 혼합물에 의한 기능성의 극대화를 꾀하고 있다.

마늘에 관한 연구는 오래전부터 상당히 수행되어져 왔으나, 마늘로부터 기능성을 얻기 위하여 다량 섭취는 매우 어렵다. 따라서 마늘의 기능성을 유지하면서 섭취량을 상승시킬 수 있는 방안으로 홍마늘이나 흑마늘이 개발되었으며, 이를 원료로 한 제품이 생산되고 있다. 특히 흑마늘은 다양한 제조공정에 의해 여러 유형의 제품으로 생산되고 있으며, 그 생리활성 또한 여러 연구자들에 의해 유용하다는 것이 밝혀져 있다. 하지만 현재까지 흑마늘에 함유되어 있는 각종 유용물질의 분석 및 분리에 대한 연구는 의외로 적다. 심지어 이미 개발된 각종 흑마늘 제품 중 품질의 지표로 활용될 수 있는 물질에 대한 정보도 전무한 실정이다. 또한 흑마늘은 장기간의 열처리로 인하여 탄화를 유발하거나 이로 인한 위해성 물질의 생성, 탄 맛 및 탄화향 등이 잔류할 수 있어 안전성과 품질의 고급화가 요구되므로 전처리법, 숙성 시간 및 온도 조건을 조절함으로써 기존의 흑마늘에 비해 당도가 높고 탄 맛이나 탄화 향이 적은 고품질 흑마늘의 생산 공정의 개발이 필요하다.

현재 인구의 고령화, 노동력 부족 등으로 인하여 마늘을 비롯한 주요 농산업을 점차 위축되고 있다. 따라서 마늘산업의 육성을 위해서는 산업화를 통한 고부가가치 창출의 돌파구 마련이 절실히 요구되고 있으며, 특히 마늘은 우리의 주요 양념채소류로서 국제적인 경쟁력 강화가 요구되고 있는 작물이므로 마늘을 이용한 바이오푸드 개발 연구가 더욱 절실하다. 더욱이 마늘과 속은 과거로부터 다양한 생리활성이 인정되어 민간요법으로 활용되어 온 안전성이 입증된 식품으로 이를 활용한 건강증진용 식품은 소비자에게 접근이 용이하며, 전세계적으로 섭취되고 있으므로 해외시장 개척에도 유리한 소재인 바, 이를 잘 활용할 경우 국내외 시장을 타겟으로 하는 바이오푸드를 개발이 가능하리라 판단된다.

따라서 본 연구에서는 흑마늘을 주원료로 하고, 개똥썩 및 천연식물유를 첨가함으로써 기능성이 강화된 고품질의 바이오푸드를 개발함에 있어 항산화와 면역증진 기능성을 중심으로 생리활성을 평가하였다. 이를 근거로 하여 추출물의 최적 추출조건 및 조성물의 혼합비율을 설정하였다. 나아가 개발 제품의 *in vivo* 및 *in vitro* 실험으로 생리활성을 규명하였다. 즉, 동물실험을 통해 기능적 효능을 분석함으로써 최종제품의 생리활성과 안전성 확보를 위한 신뢰성 있는 기초 자료를 확보하였다. 또한 개발된 제품들의 품질을 과학적으로 규명하여 기업의 기술력 향상과 상품화를 통해 국내외 시장 개척을 위한 홍보 자료로 활용코져 하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### □ 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 생리활성 규명

- 개똥쑥의 이화학적 성분, 생리활성 측정 및 유효물질의 분리
  - 개똥쑥의 부위별 영양성분 비교, 생리활성 측정 및 페놀 화합물의 분리·분석
- 흑마늘 및 개똥쑥 추출물의 추출 조건별 생리활성 스크리닝
  - 흑마늘 및 개똥쑥을 대상으로 온도, 시간 및 에탄올 농도비를 달리한 조건으로 추출하여 항산화활성 및 유효물질 함량 분석
- 남해산 시판 흑마늘의 생리활성 비교 분석
  - 남해산 마늘을 이용한 시판 흑마늘 중 유효성분 함량 및 생리활성의 비교 분석
- 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 *in vivo*상 생리활성 및 적정 섭취량 분석
  - 강제운동 부하에 의한 산화적 스트레스에서 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 급이가 간기능 지표효소 활성, 지질과산화물 함량, 체내 지질성분 변화 및 항산화계에 미치는 영향 분석
- 흑마늘 복합조성물 제조를 위한 천연식물류의 검색
  - 문헌조사를 통한 천연식물류의 스크리닝
- 동물실험을 통한 흑마늘, 개똥쑥 및 천연식물 복합조성물 음료의 생리활성 효능 검증 및 적정 섭취량 설정
  - 흑마늘과 개똥쑥 추출물을 베이스로 한 개발 제품에 대해 *in vivo*에서 체내 지질성분 변화 및 항산화계에 미치는 영향을 분석하여 적정 섭취량 산출
  - 개발된 흑마늘 복합물의 *in vitro*에서 유효성분의 함량 및 항산화 활성 분석
  - 흑마늘 복합물을 급이한 후 강제운동 시킨 흰쥐의 간기능 지표효소 활성, 지질과산화물 함량, 체내 지질성분 변화 및 항산화계에 미치는 영향 분석

#### □ 개발 바이오제품의 품질특성 및 생리활성 평가

- 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 영양성분 및 유용물질 분석
  - 타 품종 쑥과 개똥쑥의 생리활성 비교
  - Pilot 규모에서 흑마늘과 개똥쑥의 최적 추출 조건 설정
- 흑마늘 및 개똥쑥 열수 추출물의 생리활성 규명
  - 항산화, 요산, 항당뇨, 항고혈압에 대한 활성 실험
  - 면역활성 측정
- 개발 바이오제품의 품질특성 규명
  - 제품의 유리당, 유기산 및 페놀화합물의 함량 분석
- 면역증진 음료 개발을 위한 복합조성물 개발 및 바이오 식품의 품질특성 규명
  - 복합조성물 개발을 위한 천연식물류의 생리활성 검색
  - 개발된 복합조성물의 항산화 활성 및 생리활성 분석

- 복합조성물 함유 음료 및 타블렛 개발을 위한 유효농도 설정
- 개발된 복합조성물의 항산화, 요산, 항당뇨, 항고혈압 및 면역에 대한 활성
- 개발된 복합조성물 함유 음료 및 타블렛의 품질특성 규명
- 제품의 유리당, 유기산 및 페놀화합물의 분석
- 항산화, 요산, 항당뇨, 항고혈압 및 면역에 대한 활성 실험
- 흑마늘과 개똥쑥 함유 시제품의 제조 배합비 설정
- 개발 시제품의 영양성분과 관련된 특성 분석
  - 유리당 및 유기산의 분석
- 개발 시제품의 생리 활성 및 면역활성 검증

#### □ 흑마늘과 쑥 혼합 면역증진용 음료의 테스트 마케팅

- 고품질 흑마늘의 제조조건 설정 및 산업화
  - 고품질 흑마늘 생산 조건의 최적화 및 이에 기초한 대량 생산 공정 확립
  - 개발 기술에 기반한 상품화 추진 및 지적재산권 확보
- 흑마늘과 쑥 혼합 면역증진용 음료의 테스트 마케팅
  - 성공적인 시장 진입을 위한 테스트 마케팅용 제품 생산 및 소비자 선호도 조사
  - 선호도 조사를 반영한 최종 상품화 조건 확정
  - 대량생산공정 확립 및 상품화
  - 개발음료의 상품화를 위한 포장 디자인 개발
- 흑마늘 쑥, 및 천연식물류 추출물을 함유한 면역증진용 제품의 상품화
  - 흑마늘, 쑥 및 천연식물 추출물 함유 시제품의 소비자 선호도 조사
  - 개발 시제품의 유통기간 설정 및 상품화 추진
  - 대량생산공정 확립
  - 개발음료의 상품화를 위한 포장 디자인 개발

## IV. 연구개발 결과

### □ 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 생리활성 규명

#### ■ 개똥쑥의 이화학적 성분, 생리활성 및 유효물질의 분리

개똥쑥(*Artemisia annua* L.)의 잎과 줄기의 영양성분 및 생리활성을 측정하였으며, 수분, 조지방 및 조단백질 함량은 잎에서 높았으며, 총 페놀과 플라보노이드 함량은 잎이 줄기에 비해 약 2배 정도 높았다. DPPH라디칼 소거능, 환원력과 tyrosinase 저해활성이 잎에서 줄기에 비해 높았으며,  $\alpha$ -glucosidase저해활성은 줄기에서 활성이 높았다. 인체 유방암 세포인 MCF-7, MDA-MB-231, 인체 자궁경부 상피암 세포(HeLa) 및 위암세포(AGS)에 대한 증식억제 활성도 잎 추출물에서 유의적으로 높았다.

HPLC를 이용하여 페놀 화합물을 분석한 결과, phenolic acid 및 catechin류는 줄기에 비해 잎 추출물에서 월등히 높게 정량되었으며, flavonol류는 잎에서만 동정되었다. 개똥쑥 추출물의 항산화 및 암세포 증식억제 활성은 페놀 화합물에 대한 의존도가 높아 개똥쑥 추출물의 생리활성이 섬유소, 페놀 및 플라보노이드 함량에 의존적이라는 결론과 함께 미지의 활성 물질이 관여하는 것으로 추정하였다.

#### ■ 흑마늘 및 개똥쑥 추출물의 추출 조건별 생리활성 스크리닝

반응표면 분석에 의해 흑마늘 추출물의 생리활성을 최적화할 수 있는 추출 조건을 설정하고자 중심합성계획(온도: 50~90°C 시간: 3~15시간: 용매의 에탄올 농도비: 0~100%)에 따라 15가지 조건으로 실험하였다. 흑마늘 추출물의 총 페놀, 플라보노이드 및 thiosulfinate 함량과 항산화 활성은 J 조건(90°C, 9시간, 50%의 에탄올농도비)에서 가장 높았음. 반응표면분석 결과 흑마늘 추출물은 평균적으로 89.68°C, 9.79시간 및 55.72% 에탄올농도비에서 최적화될 것으로 예상되었다.

개똥쑥 추출물의 항산화 활성 및 그 유효물질의 함량을 최적화할 수 있는 추출 조건을 확립코져 반응표면 분석법에 의한 중심합성계획에 따라 15가지의 추출 조건(온도: 50~90°C, 시간: 3~15시간, 에탄올 농도: 0~100%)에서 실험하였다. 개똥쑥 추출물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력은 J 조건(90°C, 9시간, 50%의 에탄올 농도)에서 가장 높았으며, NO 라디칼 소거활성은 H 조건(80°C, 12시간, 75%의 에탄올 농도)에서 가장 높았다. 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량은 J 조건에서 가장 많았고, 개똥쑥의 최적 추출조건은 평균 89.37°C, 8.55시간 및 에탄올 농도는 56.77%였다.

#### ■ 남해산 시판 흑마늘의 생리활성 비교 분석

시판되는 남해산 흑마늘 4개사 제품(A, B, C 및 D)을 이용하여 항산화 활성, 아질산염 소거 및 nitrosodimethylamine(NDMA) 생성억제 활성을 비교하였다. 마늘의 유효 성분 및 항산화 활성이 생마늘보다 흑마늘에서 높았으며, 아질산염 소거활성과 NDMA 생성억제 활성은 항산



화 활성과 비슷한 경향이였다. 흑마늘 제품간에는 대차를 보이지 않았으며, 전반적으로 A와 B 사 제품이 유사한 경향이였다. 흑마늘의 NDMA 생성억제 활성이 항산화 활성과 유사한 패턴을 보여 흑마늘이 생체 내 암 발생의 억제에도 영향을 줄 것으로 예상되였다.

■ 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥썩 추출물을 급이시킨 흰쥐의 생리활성 및 적정 섭취량 분석  
생리활성이 증강된 흑마늘 음료 개발을 위하여 흑마늘(BG), 개똥썩(GS) 추출물 및 2종의 혼합물(MBS-I, 흑마늘 추출물 7 brix:개똥썩 추출물 0.7 brix=93:7; MBS-II, 흑마늘 추출물 14 brix:개똥썩 추출물 1.4 brix=93:7, v/v)을 트레드밀에 의해 강제운동 시킨 실험쥐에게 급이하여 4주간 사육하였다.

AST 및 ALP 활성은 대조군에 비하여 실험 식이 급이군에서 유의적으로 감소하였다. 혈청의 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 흑마늘과 개똥썩의 혼합물 급이군에서 유의적으로 감소하였으나 혈청과 간조직의 지질 함량은 MBS-I 군과 MBS-II 군 간에 유의차가 없었다. 지질과 산화물 함량은 대조군에 비하여 모든 시료 급이군에서 유의적으로 감소되었으며, 혈청에서는 MBS-I 군, 간조직에서는 MBS-II 군에서 가장 낮았다. 간조직의 catalase 활성은 대조군에 비해 GS군과 혼합물 급이군에서 1.8~2.3배 증가, SOD 및 GSH-px 활성은 대조군에 비해 시료 급이군에서 각각 1.3~1.5배, 1.2~1.7배 정도 증가하였다. 혼합물 급이군이 흑마늘이나 개똥썩의 단독 급이군에 비해 활성이 높았으며, 이들 혼합물이 체내 산화적 스트레스 완화에 효과적일 것으로 판단되였다.

흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물 중 효과적인 MBS-I 을 선정하여 섭취량을 달리하여 동일조건에서 급이한 결과 AST, ALT 활성, 혈액 및 간 조직의 항산화 활성은 MBS-400군이 대조군이나 여타 실험군에 비해 그 효과가 유의적인 차이로 우수하였다. 체내 지질 개선의 측면에서는 MBS-200군 및 MBS-400군이 유사한 경향을 보였다. Catalase, SOD 및 GSH-px 등의 항산화 효소 활성도 MBS-400군이 여타 실험군에 비해 유의적으로 상승되어, 산화적 스트레스 시 MBS-I 의 효과적인 적정 섭취량은 성인 체중 60 kg을 기준으로 계산하면 200~400 mL/day인 것으로 추정된다.

■ 흑마늘과 개똥썩 추출물을 베이스로 한 개발 제품의 *in vivo* 생리활성 평가

흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물(MBS-I)을 베이스로 하여 개발된 제품의 생리활성을 비교한 결과, 산화적 스트레스에 대해 개발 제품을 300 mL/day 급이하였을 때 식이효율은 대조군과 유의차가 없었으며, 장기의 중량에도 유의차를 보이지 않았다. 혈중 지질 성분 중 총 지질과 총 콜레스테롤 함량은 대조군에 비해 유의적으로 감소되었으나, 그 외 지질 성분이나 간 조직의 지질 개선에는 대조군과 유의차를 보이지 않았다. 혈액 및 간 조직의 항산화 활성, 지질과 산화물 함량, 간 조직 중 항산화 효소의 활성은 개발 제품 급이군이 대조군에 비해 유의적으로 감소되였다.

■ 흑마늘 복합조성물 음료 제조를 위한 천연식물류의 선정

흑마늘 복합조성물 음료를 제조하기 위하여 항산화 및 면역활성 측면에서 기 연구된 천연식물류를 문헌조사로 스크리닝한 결과, 총 82건의 연구 보고와 100여종의 천연식물류가 스크리닝되었으며, 이 중 여러 연구자들을 통해 사용 빈도 및 활성이 우수한 식물류로 인지된 11종을 선정하였다. 선정된 11종의 천연식물류는 구기자, 황금, 오가피, 감국, 산약, 작약, 단삼, 뽕잎, 생강, 상황버섯 및 옥수수수염이었다.

■ 흑마늘 복합물과 개똥썩 추출물의 첨가에 따른 *in vitro* 생리활성의 평가

흑마늘 추출물과 5종의 천연식물류 추출물의 혼합(흑마늘 복합물), 흑마늘 복합물과 개똥썩 추출물의 혼합에 의한 생리활성을 비교한 결과 시료의 농도가 높을수록 유효물질의 함량이 높고 항산화 활성이 증가되어 흑마늘 복합물을 1일 1회 이상 섭취할 경우 체내 생리활성 향상에 도움이 될 것으로 추정되었다. 또한 흑마늘 복합물에 개똥썩을 첨가한 경우 항산화 활성이 유의적으로 증가되었으나, 흑마늘 복합물의 농도에 따른 유의차는 보이지 않았다.

■ 강제운동 부하에 의한 흑마늘 복합물의 *in vivo* 생리활성 평가

흑마늘 추출물과 천연식물류 5종의 복합물(BM1, BM2)을 이용하여 강제운동시킨 흰쥐에게 5주간 급여하여 체내 지질 성분 변화 및 항산화계에 미치는 영향을 측정하였다. 간헐적인 운동부하에 의해 산화적 스트레스가 작았기 때문에 운동부하의 유무에 따른 산화적 스트레스의 발생차이는 크지 않았다. 흑마늘 복합물의 급여로 인한 간기능 지표효소 활성의 변화에는 유의차를 보이지 않았다. 시료의 농도가 높은 BM2 급여군에서 BM1급여군에 비해 체내 총지질, 중성지방 및 LDL-콜레스테롤 수치가 유의적으로 감소되었으며, 간조직의 항산화효소 활성이 유의적으로 증가되었다. 따라서 본 연구가 간헐적인 운동에 의한 운동 강도가 낮은 것을 고려해 본다면, 흑마늘 복합물 개발 음료는 운동 뿐만아니라 현대인의 일상생활속의 스트레스 방어에도 도움이 될 것으로 예상되며, 흑마늘 음료의 1일 3회 섭취도 가능한 것으로 평가되었다.

■ 품종별 썩의 생리활성 비교

개똥썩, 강화약썩, 약썩 및 인진썩 열수 추출물을 제조한 다음 항산화 및 항암활성을 비교 분석한 결과 5종의 썩 추출물 중 총 페놀 함량은 인진썩에서 유의적으로 가장 높았으며, 다음으로 개똥썩, 약썩 및 강화약썩 순이었다. 플라보노이드 함량도 인진썩이 가장 높았다. 추출물의 농도를 달리하여 항산화능을 측정한 결과, NO 라디칼 소거능은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 약썩, 강화약썩 및 개똥썩이 약 50% 이상의 활성을 나타내었으며, 이들 시료간에 유의차는 없었다. FRAP법에 의한 항산화능은 인진썩에서 높게 나타났으며,  $\beta$ -carotene 존재 하에서의 항산화능 또한 인진썩이 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 50% 이상의 높은 활성을 보였다. 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 인체 자궁경부 상피암 세포인 HeLa의 증식억제 활성은 인진썩이 80% 이상으로 활성이 높았고, 유방암 세포인 MCF-7의 대해서는 강화약썩이 80% 이상의 증식억제 활성을 보였다. 이상의 결

과, 썩 추출물은 높은 항산화 활성과 암세포 증식억제 활성을 나타내었으며, 특히 항산화 활성은 ascorbic acid 이상의 높은 활성을 나타내어 천연 기능성 식품 소재로써 활용 가치가 높다고 판단된다.

■ Pilot 규모에서 흑마늘과 개똥썩의 최적 추출 조건

흑마늘과 개똥썩을 반응표면분석법에 따른 중심합성계획에 의하여 110~130℃와 2~4시간 범위의 11가지 조건(A~K)에서 각각 열수추출하여 총 페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성이 최대화되는 추출조건을 모니터링 하였다. 항산화 활성의 정도에 따라 흑마늘 추출조건 3종(130℃, 4시간; 120℃, 3시간; 130℃, 3시간)과 개똥썩의 최적 추출조건 1종(120℃, 3시간)을 선정하였다. 흑마늘 추출물에 대한 개똥썩 추출물의 혼합비율을 1:0.5, 1:1, 1:1.5 및 1:2(w/w)로 조절하여 총 페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성을 측정한 결과, 120℃, 3시간에서 추출된 흑마늘 추출물과 개똥썩 추출물을 혼합한 시료에서 그 활성이 우수하였으며, 최적의 혼합비율은 흑마늘과 개똥썩 추출물에서 1:1.5(w/w)인 것으로 판단되었다.

■ 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합조성물의 생리활성 및 면역활성 검증

흑마늘과 개똥썩의 제품 개발을 위한 최적의 혼합 비율을 알아보기 위하여 흑마늘과 개똥썩의 비율을 달리한 혼합물의 항산화 활성, nitric oxide 라디칼 소거능 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 실험한 결과 nitric oxide 라디칼 소거능과  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 제외한 모든 실험에서 흑마늘과 개똥썩을 99.3 : 0.7의 비율로 혼합 하였을 때 항산화 활성이 가장 우수하였다. 흑마늘과 개똥썩 혼합물의 생리활성을 분석한 결과 혼합물의 농도가 높아질수록, 개똥썩의 혼합비율이 증가시킴에 따라 항산화 활성도 유의적으로 증가하였는데 이는 개똥썩의 높은 항산화력과 흑마늘의 갈변물질에 의한 상승효과로 해석된다.

흰쥐의 비장세포 증식을 통하여 면역세포 증식효과를 측정한 결과 품종별 썩 추출물 중 개똥썩이 가장 우수하였으며, 흑마늘과 혼합할 때 개똥썩 추출물의 첨가비율이 높아질수록 활성도 더 증가하였다.

생리활성에 대한 연구와 관능평가 결과를 종합하여 흑마늘과 개똥썩 추출물의 최적 혼합 비율은 99.3:0.7비로 하여 농도에 따른 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine의 생성량을 시험한 결과 대조군에 비해 유의적으로 높은 수준의 cytokine이 생성됨을 확인할 수 있었다.

■ 흑마늘과 개똥썩 함유 시제품의 최적 배합비

흑마늘과 개똥썩 추출물의 혼합 비율 설정에 따라 관능평가를 통하여 식품 첨가물을 최소화 하면서 음료의 기호도를 향상시키는 최적 조건을 시험하였다.

흑마늘 추출물은 7 brix 농도를 90.2%, 썩 추출물은 0.7 brix 농도를 6.8%, 배추출 농축액은 시판되는 60 brix 제품을 2%, 결정과당을 1% 혼합하여 음료 시제품을 제조하였다.

#### ■ 개발 시제품의 영양성분 분석

설정 배합비에 따라 음료 시제품을 제조하였으며, 고형분 함량의 기준은 8% 이상으로 하였는데, 개발된 음료 중 총 페놀 화합물은 플라보노이드 함량에 비해 약 3.7배 정도 높은 함량으로 정량되었다.

유리당 함량은 fructose가 14.76 mg/mL로 가장 높았고, 유기산은 citric acid가 82.2 mg/100 g으로 가장 높은 함량이었으며, 유기산은 총 7종이 12 mg/100 g 이상이였다.

#### ■ 개발 시제품의 생리활성 및 면역활성 분석

DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력, FRAP법에 의한 항산화 활성,  $Fe^{+2}$  chelating 활성을 측정하였으며, 10% 희석액에서 DPPH 라디칼 소거활성은 51.7%, 환원력은 2.6이었으며, 6~10% 희석액에서 ABTS 라디칼 소거활성은 95%,  $Fe^{+2}$  chelating 활성은 41.8~43.7%범위였다. 아질산염 소거활성은 10% 농도의 시료가 63.8%였고, 농도 증가와 더불어 활성도 증가하였다.  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성도 비슷한 경향이었으나, 최고 활성은 28.3%였으며, xanthine oxidase 저해활성은 63.8%였다.

Raw 264.7 세포를 이용한 면역활성 평가의 적정 농도를 설정하고자 CCK-8 assay를 실시한 결과 20% 농도까지는 세포독성을 나타내지 않았음을 확인하였으며, 시제품은 Raw 264.7 세포에서 NO 생성량이 시료의 농도가 높을수록 유의적으로 감소하여 20% 희석액에서 20  $\mu$ M 이하였다. 면역반응의 대표적인 cytokine인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 는 시료의 농도가 높을수록 생성량이 유의적으로 증가하였다.

#### ■ 흑마늘 복합물 제조를 위한 천연식물의 생리활성 및 면역활성 검증

문헌조사를 통해 선별된 11종의 천연식물(구기자, 황금, 오가피, 감국, 산약, 작약, 단삼, 뽕잎, 생강, 상황버섯 및 옥수수수염)를 대상으로 항산화 및 대식세포를 이용한 면역 활성을 측정한 결과 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 상황버섯이 가장 높았다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성에서  $EC_{50}$ 값은 단삼이 100  $\mu$ g/mL 이하였으며, 환원력은 상황버섯이 가장 높았고,  $Fe^{+2}$  킬레이팅 활성은 뽕잎이 가장 높았다.

추출물의 세포독성은 LPS 처리 후 세포 생존율이 오가피를 제외한 모든 시료에서 50  $\mu$ g/mL처리 시 80% 이상이었으며, LPS의 처리 후 NO 생성량은 대조구에 비해 12배 증가되었으며, 황금은 100  $\mu$ g/mL 첨가 시 NO 생성을 72% 정도 감소시켰다. 황금, 상황버섯, 단삼, 뽕잎, 작약이 항산화와 면역활성이 높아 항산화 및 면역 증강용 기능성 음료 제조를 위한 부재료로써 선별가치가 있는 것으로 판단되었다.

#### ■ 흑마늘 복합물 제조를 위한 천연식물 5종의 혼합조건별 생리 활성 검증

천연식물류 5종 혼합물의 제조 시 혼합 조건별(MHE-1, 각 시료를 추출하여 동량으로 혼합; MHE-2, 추출 수율에 따른 배합비로 혼합하여 추출) 생리활성을 비교한 결과 유효물질인 총 페

놀 화합물 및 플라보노이드 함량이 MHE-2에서 유의적으로 많았다. 시료의 농도를 달리한 조건에서 항산화 활성을 측정한 결과 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성은 25~250 µg/mL농도범위에서 MHE-2의 활성이 유의적으로 높았으며, 500~1000 µg/mL농도범위에서는 시료간의 유의차가 없었다. Superoxide anion 라디칼 소거 및 Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성은 25 µg/mL 농도에서 활성이 나타나지 않았으며, Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성의 경우 라디칼 소거활성과 다소 상이한 경향이였다. 환원력 25~50 µg/mL농도범위에서 시료간의 유의차가 없었으나 그 이상의 농도에서는 MHE-2의 활성이 유의적으로 높아 천연식물류 5종 혼합물의 제조시 MHE-2의 추출 방법이 적절하리라 판단되어 흑마늘 복합물의 제조에 활용하였다.

상황버섯, 황금, 단삼, 뽕잎 및 작약을 각각 추출하여 동량씩 혼합하였을 때(MHE-1)와 추출물의 수율을 고려하여 동일한 수율을 가지도록 원재료를 혼합한 후 동시 추출하였을 때(MHE-2) 항산화 활성은 시료간에 차이를 나타내었으나, 면역활성과 관련된 제인자들을 분석한 결과에서는 추출 방법의 차이에 따른 활성의 차이는 없었다. 그러나, 두 시료 모두 LPS만 처리한 대조군에 비해 더 효과적으로 농도의존적인 면역활성을 보여 이들 추출물이 면역활성 증강에 기여할 것으로 기대된다.

■ 고품질 흑마늘 생산 조건의 최적화 및 이에 기초한 대량 생산 공정 확립

마늘의 제조공정을 온도 변화에 따라 4단계로 나누어 각 단계마다 시료를 채취하고 이화학적 성분의 변화를 비교한 결과 흑마늘의 조직감은 숙성이 진행됨에 따라 수분 함량의 감소와 더불어 증가하였고, pH도 점차 산성화되었다.

숙성 중 당도, 총당 및 환원당 등의 탄수화물의 함량은 증가하였고, 최종 숙성 4단계에서 유효성분의 함량이 가장 높은 통마늘로 제조한 흑마늘에서 총 페놀화합물은 약 4.6배, total pyruvate 및 thiosulfinate의 함량은 각각 2.2배 및 25.1배가 증가하였다.

■ 개발 기술에 기반한 상품화 추진 및 지적 재산권 확보

흑마늘의 제조방법 및 이에 따라 생산된 흑마늘을 이용한 고농축액의 제조 조건을 최적화하여 특허출원하였다. 특허기술은 가온과 냉각을 반복하여 제조된 흑마늘을 원료로 하고 열수 추출물 및 그 잔사를 동결건조한 분말을 활용해 저점도, 고영양, 고농축액을 만들기 위하여 열수 추출물을 농축시킨 농축액과 잔사 분말을 혼합해 제품을 완성하여 소비자가 원하는 농도로 조절하여 섭취할 수 있도록 하는 제조방법이다. 참여기업에서는 이 기술을 활용하여 고농축액 제품인 ‘신의’를 출시하여 판매 중에 있다.

■ 성공적인 시장 진입을 위한 테스트 마케팅용 제품 생산 및 소비자 선호도 조사

연구결과에 기반하여 흑마늘과 썩을 혼합한 음료를 개발한 제품명을 ‘오천년에’로 선정하였다. 선호도 조사를 실시한 결과 응답자의 78%가 맛에 대해 긍정적인 반응을 보였으며, 부정적인 반응은 22%, 또한 기존의 흑마늘 음료에 비해 첨가된 썩의 향미 성분으로 인해 마늘 냄새

새는 현저히 감소되었다.

제품 출시 후의 시장성에 대한 예측을 분석한 결과 47.6%가 구매 계획이 있으며 음료로써 만족한다는 응답을 하였으며, 24.4%는 매우 좋다고 응답해 ‘오천년에’ 흑마늘 음료가 출시되면 기존의 흑마늘 음료보다 선호도가 더 높을 것으로 예견된다.

#### ■ 선호도 조사를 반영한 최종 상품화 조건 설정

흑마늘에 썩을 농도별로 첨가하여 맛과 향미에 대해 관능평가를 실시한 결과 썩 추출물을 1% 이상 첨가한 제품은 썩의 향이 너무 강하여 기호도가 감소되었다.

따라서 썩 추출물을 0.7% 미만으로 첨가한 제품의 관능평가 결과를 근거로 하여 흑마늘 추출물, 썩 추출물, 배추출 농축액, 결정과당의 농도를 90.2:6.8:2:1로 선정하고 기존의 흑마늘에 제형의 고급화를 추구하기 위해 병음료로 개발하고자 하였다.

#### ■ 대량 생산 공정 확립 및 상품화

소비자 선호도 조사 결과에 기초하여 개발 제품의 시장성을 확인 후, 대량생산을 위한 제조공정을 확립하고 상품화를 위한 제품 포장 디자인을 개발하였다.

#### ■ 개발음료의 상품화를 위한 포장 디자인 개발

흑마늘과 썩을 혼합한 음료의 포장은 기존 생산라인에 적합한 디자인으로 확정하였다.

#### ■ 흑마늘, 썩 및 천연식물 추출물 함유 음료 및 타블렛의 테스트 마케팅용 제품제작

2차년도에 개발된 흑마늘 음료 ‘오천년에’는 1세부과제 및 1협동과제의 연구 결과를 종합하여 흑마늘, 썩, 천연식물류를 혼합 추출한 최적 배합비율을 확정하여 면역증진용 흑마늘 음료 ‘오천년에 프리미엄’을 제조하였다.

흑마늘 액상제품은 물류비가 높고 부피가 커 보관이 불편한 단점을 개선하기 위하여 흑마늘 액상 추출물을 분말화하여 타블렛 형태의 공정을 확립하고 시제품화 하였으며 제품명은 ‘오천년에 파워’로 정하였다.

#### ■ 개발 시제품의 유통기간 및 상품화 추진

흑마늘 음료인 ‘오천년에 프리미엄’ 제품의 물성을 시험한 결과 제조일로부터 1년의 유통기간을 정하였다.

#### ■ 제품개발 2종 상품화

기술개발 및 소비자 선호도 조사 결과에 기초하여 ‘오천년에 프리미엄’과 ‘오천년에 파워’ 제품의 대량생산을 위한 제조공정을 확립하고 상품화를 위한 제품 포장 디자인을 확정하였다.

■ 수출을 위한 해외시장 분석

국내 건강식품 시장 현황 및 면역 제품의 비율, 주요 원료에 대한 조사를 실시하였으며, 미국, 일본, 중국을 대상으로 건기식 생산 현황과 면역 제품을 시장조사 하였다.

해외시장을 공략하기 위해서는 타블렛 제품이 적합할 것으로 판단되어 본 과제를 통해 개발한 ‘오천년에 파워’를 중심으로 시장을 개척할 예정이다.

## V. 연구성과 및 성과 활용계획

### 1) 연구성과

#### (1) 지적 재산권 확보

- 본 과제를 통하여 흑마늘을 이용한 고농축액 제조방법에 관한 특허 1건 출원됨.
- 이를 근거로 하여 제조된 흑마늘 고농축액과 썩을 혼합한 면역 증강용 음료 및 항산화 효능을 갖는 기능성 음료제조에 대한 특허 1건이 등록되었으며, 1건이 출원되었음.
  
- **흑마늘 및 저점도 흑마늘 고농축액 제조방법(10-2011-0030967, 출원, 2011)의 특허내용**
  - 흑마늘 제조방법 및 흑마늘 고농축액 제조방법에 관한 것으로서 보다 구체적으로는 가온 및 냉각조건을 반복 실시하여 숙성시킨 후 후숙성을 함으로써 별도의 가수(加水)과정 없이도 조직감이 우수하고 유효성분이 다량 함유된 흑마늘을 제조할 수 있는 방법이며 이러한 방법에 의해 제조된 흑마늘을 이용하여 진액을 추출하고 진액 추출과정에서 남은 흑마늘 잔사물을 분쇄하여 진액에 첨가함으로써 섬유소나 불용성 영양성분 등과 같은 영양성분이 풍부하면서도 탄맛이나 쓴맛을 최소화할 수 있는 흑마늘 고농축액을 제조하는 방법에 관한 것임.
  - 또한, 썩, 헛개나무, 느릅나무, 시무나무, 상백피, 상지, 오가피, 산수유, 구기자, 감초 및 대추 등과 같은 천연재료 중 적어도 하나와 흑마늘을 이용하여 천연재료 성분이 첨가된 흑마늘 진액을 제조하고, 이 과정에서 남은 흑마늘 잔사물을 건조하여 분쇄한 초미립 분쇄물을 흑마늘 진액에 첨가하여 소정 농도로 농축시킴으로써, 항산화 화합물 함량이 보다 증가하고 라디칼 소거활성이 우수하여 항산화성이 보다 향상된 흑마늘 고농축액 제조방법을 제공하고자 함.
  - 흑마늘 고농축액 제조시 천연재료를 첨가하여 농축함으로써, 항산화 활성 발현물질인 페놀 화합물 함유량이 보다 많아지고 라디칼 소거활성이 보다 우수하여 전체적으로 항산화 활성이 매우 향상된 흑마늘 고농축액을 제조하므로써 바이오푸드 개발에 활용할 것임.
  
- **흑마늘과 개똥썩을 이용한 면역증강용 음료의 제조방법(10-1028155, 특허등록, 2011)의 특허내용**
  - 면역증강에 높은 효과를 나타내는 흑마늘과 개똥썩을 주재료로 한 음료의 개발에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 편리하게 음용할 수 있도록 흑마늘과 개똥썩의 자극적인 맛과 향을 개선하여 기호성을 향상시킨 음료와 그 제조방법이며, 나아가 프로폴리스 분말, 홍삼 추출물, 상황버섯 추출물, 사과농축액, 배농축액, 자일리톨, 효소스테비아 분말 중에서 하나 이상 선택된 첨가제가 더 포함되는 것을 특징으로 하는 면역증강용 음료조성물의 제공방법에 대한 것임.
  - 흑마늘 추출액(7brix)과 개똥썩 추출액(0.7brix)의 혼합 비율별 시료의 흰쥐 비장 세포에 대한 면역증강 활성을 분석한 결과에 기초하여 최종 혼합 비율을 설정하고, 효능이 유지되는 수준에서 첨가물을 통해 관능특성을 개선한 음료의 개발 조건을 제시한 특허로, 음료개발을 위한 레시피로 활용 가능함.



■ **항산화 효능을 가진 흑마늘과 쑥 혼합음료의 제조방법(10-2012-0027252, 출원, 2012)의 특허 내용**

• 항산화 효능을 가진 흑마늘과 쑥 혼합음료의 제조방법에 관한 것으로서, 관능적 특성 및 생체 내 항산화 효능이 최대화 되는 비율을 제공함과 더불어 쑥의 쓴맛을 제거할 수 있도록 전처리 공정을 거치는 것을 특징으로 하는 항산화 효능을 가진 흑마늘과 쑥 혼합음료의 제조방법에 관한 것임.

• 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 고안된 것으로서, 흑마늘과 쑥은 단독 추출 음료만으로도 항산화 효능이 있으나 이들의 추출조건에 따라 그 활성에 차이가 있으므로, 최적의 추출조건을 제공함과 동시에 이들을 혼합함에 있어 관능적 특성 및 생체 내 효능이 최대화 되는 비율을 제공하여 생체 내에서 시너지 효과를 지니는 항산화 효능을 가진 흑마늘과 쑥 혼합음료의 제조방법을 제공하는데 있음.

• 또한, 쑥의 추출물을 음료로 제조하였을 때, 관능적 효능이 좋도록 쑥의 쓴맛을 제거하기 위한 전처리 공정을 제공하는데 있으며, 항산화 효능을 가진 흑마늘과 쑥 혼합음료의 제조방법은 흑마늘과 쑥의 최적 추출조건을 제공함과 동시에 이들을 혼합함에 있어 관능적 특성 및 생체 내 항산화 효능이 최대화 되는 비율을 제공하며, 또한, 쑥의 추출물을 음료로 제조하였을 때, 관능적 효능이 좋도록 쑥의 쓴맛을 제거할 수 있는 방법을 제공하므로써 향후 흑마늘 바이오푸드 제조에 활용 예정임.

(2) 연구논문

■ 국내 연구논문 9편 출간, 학회 발표 10건이 완료됨.

■ **개똥쑥의 영양적 특성 및 생리활성(2011, 한국식품영양과학회지)**

• 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)의 개똥쑥 잎과 줄기의 영양성분 및 생리활성을 다양한 측면에서 분석한 연구 결과로 개똥쑥을 이용한 제품 개발에 기초자료로 활용할 것임.

■ **개똥쑥의 항산화 및 항암활성과 기능성 물질의 탐색 (2011, 한국식품영양과학회지)**

• 개똥쑥의 항산화 활성 및 항암활성 측정과 유효성분으로 페놀 화합물을 분석한 연구결과로 개똥쑥 첨가 제품에 대한 과학적인 근거자료로 활용할 것임.

■ **시판 흑마늘의 항산화 및 Nitrosodimethylamine의 생성억제 (2012, 농업생명과학연구)**

• 시판되는 남해산 흑마늘 제품에 대해 항산화 활성, 아질산염 소거 및 N-nitrosodimethylamine (NDMA) 생성억제 활성을 비교한 연구 결과임.

• 남해산 흑마늘 제품의 인지도 향상을 위한 홍보용 자료로 활용할 것임.

■ **반응표면분석을 이용한 흑마늘과 개똥쑥 혼합음료 개발을 위한 추출조건의 최적화 (2012, 농업생명과학연구)**

- 흑마늘과 개똥썩을 반응표면분석법에 따른 중심합성계획에 의하여 고온(110~130℃)에서 2~4시간 범위의 11가지 조건(A~K)에서 각각 열수 추출하여 유효 성분 및 항산화 활성을 측정한 연구임.
  - 흑마늘과 개똥썩을 이용한 제품 개발을 위한 제조공정에 활용할 것임.
- **국내산 품종별 썩의 생리활성 (2012, 한국생명과학회지)**
- 섬애약썩, 인진썩, 약썩, 강화사자발썩 및 개똥썩 열수 추출물을 대상으로 항산화 및 항암 활성을 비교 분석하였음.
  - 개똥썩과 타 썩의 활용 비교와 개똥썩을 이용한 제품에 대한 인지도 및 제품의 활성에 대한 과학적인 근거자료로 활용할 것임.
- **반응표면분석을 이용한 흑마늘의 항산화 활성 최적화를 위한 추출조건 확립(2012, 한국식품저장유통학회지)**
- 반응표면 분석에 의해 흑마늘 추출물의 생리활성을 최적화할 수 있는 추출 조건을 설정하고자 중심합성계획(온도: 50~90℃ 시간: 3~15시간; 용매의 에탄올 농도비: 0~100%)에 따라 15가지 조건으로 실험하였음.
  - 흑마늘 추출물의 유효성분 극대화를 위한 에탄올 추출과정으로 제품 개발을 위한 제조공정에 활용할 것임.
- **반응표면분석에 의한 개똥썩의 항산화 활성을 위한 최적 추출 조건 확립(2013, 농업생명과학연구)**
- 개똥썩 추출물의 항산화 활성 및 그 유효물질의 함량을 최적화할 수 있는 추출 조건을 확립코져 반응표면 분석법에 의한 중심합성계획에 따라 15가지의 추출 조건(온도: 50~90℃, 시간: 3~15시간, 에탄올 농도: 0~100%)에서 실험하였음.
  - 개똥썩 추출물의 유효성분 극대화를 위한 에탄올 추출과정으로 제품 개발을 위한 제조공정에 활용할 것임.
- **흑마늘 및 개똥썩 추출물의 급이가 강제운동 시 흰쥐의 체내 지질 성분 및 간조직의 항산화 효소 활성에 미치는 영향 (2013, 한국식품영양과학회지)**
- 생리활성이 증강된 흑마늘 음료 개발을 위하여 흑마늘(BG), 개똥썩(GS) 추출물 및 2종의 혼합물(MBS-I, 흑마늘 추출물 7 brix:개똥썩 추출물 0.7 brix=93:7; MBS-II, 흑마늘 추출물 14 brix:개똥썩 추출물 1.4 brix=93:7, v/v)을 트레드밀에 의해 강제운동 시킨 실험쥐에게 급이하여 4주간 사육한 후, 체내 지질 변화, 항산화계에 미치는 영향을 분석하였음.
  - 개발 음료를 이용한 *in vivo* 실험결과로 개발 제품의 홍보 및 인지도 향상을 위한 과학적 근거 자료로 활용할 것임.

■ **항산화 및 면역 활성 증강을 위한 생약재의 탐색(2013, 생명과학회지)**

- 문헌조사를 통해 선별된 11종의 생약재(구기자, 황금, 오가피, 감국, 산약, 작약, 단삼, 빙이, 생강, 상황버섯 및 옥수수수염)를 대상으로 항산화 및 대식세포를 이용한 면역활성을 측정한 연구 결과임.
- 흑마늘 음료의 기능성 향상을 위하여 첨가되는 부재료로 활용하고, 개발 제품의 생리활성 향상에 대한 과학적인 근거 자료로 활용 가능함.

**(3) 학술발표**

- Physicochemical properties and biological activity of gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.)  
2010-10-21, 한국생명과학회
- Antioxidant and anticancer activities of gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.)  
2010-10-27, 한국식품영양과학회
- Immune cell activities from Artemisia of five species  
2011-11-01, 한국식품영양과학회
- Optimization of high temperature water extraction conditions for antioxidant properties of black garlic and gaeddongssuk composite by response surface methodology  
2011-06-09, 한국식품과학회
- Optimization of the extraction condition for antioxidative components of gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.) by response surface methodology  
2011-11-01, 한국식품영양과학회
- Optimization of ethanol extraction conditions for high-functionality of black garlic by response surface methodology  
2011-11-01, 한국식품영양과학회
- Effect for supplementation of black garlic and gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.) composites on the hepatic lipid profiles and antioxidative defense system  
2012-11-02, 한국식품영양과학회
- Supplementation effect of black garlic and gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.) on blood components in rats run on treadmill  
2012-11-02, 한국식품영양과학회
- The effect of black garlic extract on lipid metabolism in immobilization stressed rats  
2012-11-02, 한국식품영양과학회
- Effects of black garlic and mugwort extract on the restraint stress in rats  
2012-11-02, 한국식품영양과학회

## 2) 성과 활용계획

- 3건의 특허 기술을 참여기업이 직접 활용하여 실시함으로서 고품질의 흑마늘 제품을 생산하고, 마케팅하는데 활용하고자 함.
- 참여기업의 대량 생산 체계를 바탕으로 제품의 산업화를 통한 국내 건강기능식품 시장의 진출과 해외 수출을 위한 제품 생산이 가능할 것으로 예상됨.
- 흑마늘에 생리활성이 우수한 천연식물류를 첨가하여 항산화 및 면역 활성이 증강된 제품을 개발하여 향후 기능성 식품으로서의 보다 심도있는 연구를 통하여 제품 개발 기술의 업그레이드화에도 기여할 수 있음.

## SUMMARY

This study was conducted by research project “Commercialization of high quality black garlic and biofoods to create new market for domestic and export”.

- (1) The nutritional properties, antioxidant and anticancer activities from leaves and stems of Gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.) were investigated. And phenolic compounds from *A. annua* were identified through quantitative analysis by HPLC. Contents of moisture, crude lipid and crude protein were significantly higher in the leaves. Contents of total phenols and flavonoids of leaves were about 2 times higher than those of stems. Antioxidant activity was significantly increased in a dose-dependent manner, water and ethanol extracts of leaves were stronger than those of stems. Especially, DPPH radical scavenging activity, reducing power and tyrosinase inhibition activity were significantly higher in leaves extracts than stems extracts of Gaeddongssuk.
- (2) In MTT assay by human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 and MDA-MB-231, ethanol extracts of leaves showed the highest anticancer activity, the rates of growth inhibition were 76.26% and 52.59% on MCF-7 and MDA-MB-231 cells, at the concentration of 250 µg/mL, respectively. Growth inhibition activity of leaves extracts on HeLa and AGS cells was higher than that of stems extracts. Especially, growth inhibition activity of ethanol extract made from leaves were 61.07% and 57.24% on HeLa and AGS cells, at the concentration of 500 µg/mL, respectively, which were the highest of all extracts. Phenolic acid and catechin contents of *A. annua* extracts were higher in leaves than stems. Flavonol was identified only in leaves. Biological activities of extracts from Gaeddongssuk were dependent on the fiber, phenolic and flavonoid content.
- (3) For establish the extraction conditions for the optimization of the biological activities of black garlic and Gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.) using the response surface methodology (RSM). The extraction conditions were based on the central composite design, with 15 kinds of variations in the extraction temperature (50–90°C), extraction time (3–15 hrs), and ethanol concentration (0–100%).
- (4) In black garlic, the total phenol, flavonoids, thiosulfinate contents, and anti-oxidant activity of black garlic extract were significantly higher at the J condition (90°C for 9 hrs with a

50% ethanol concentration). In this condition, the biological activities such as DPPH radical scavenging (66.10%), ABTS radical scavenging activity (75.02%), and reducing power by of FRAP (375.4  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) were excellent. Overall, the extraction conditions for the optimized biological activities of black garlic via RSM were expected to be at 89.68°C for 9.79 hrs with a 55.72% ethanol concentration. The actual values were 96.4–114.8% of the predicted values.

- (5) In Gaeddongssuk, reducing power by FRAP, DPPH and ABTS radical scavenging activities of Gaeddongssuk extract were significantly higher at J condition (90°C for 9 hr with 50% ethanol concentration). On the other hand, NO radical scavenging activity was significantly higher at H condition (80°C for 12 hr with 75% ethanol concentration). Total phenol and flavonoids contents were the highest in the extract of J condition, followed by H condition. Overall, we expected that the extraction conditions for optimized antioxidative activities of Gaeddongssuk extract by RSM were at 89.37°C for 8.55 hr with 56.77% ethanol concentration. And the actual values were 89.88~115.54% of the predicted.
- (6) Black garlic and Gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.) were extracted using central composite design by response surface methodology (RSM) in 11 conditions (A~K) with 110~130°C and 2~4 hr, and then each extracts were monitored for the total phenol, flavonoid contents and antioxidant activities. The optimum extraction conditions for black garlic and Gaeddongssuk are selected 3 conditions (130°C, 4 hr; 120°C, 3 hr; 130°C, 3 hr) and 1 condition (120°C, 3 hr), respectively. They were mixed according to the following ratio; 1:0.5, 1:1, 1:1.5 and 1:2 (black garlic: Gaeddongssuk extract, w/w), and then these composites were tested to the total phenol, flavonoid contents and antioxidant activities. Antioxidant activities of black garlic and Gaeddongssuk extracts by 120°C, 3 hr condition were higher. And the optimal mixture ratio of black garlic and Gaeddongssuk was 1:1.5 (w/w).
- (7) Four kinds of marketing black garlics (A, B, C and D products) from Namhae were analysed the antioxidant, nitrite scavenging activities and inhibition of N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation. Total pyruvate and thiosulfate contents were higher in the black garlics than fresh garlic, and their contents were the highest in B product. Total phenol and flavonoids contents in the water and 80% ethanol extracts from black garlics were higher in water than ethanol extract, and all black garlics were higher than fresh garlic. And these contents of A product were somewhat higher compared to

the others. Antioxidant activities, such as DPPH, ABTs, hydroxyl and nitric oxide radical scavenging showed stronger in water than ethanol extracts. And their activities in all products of black garlic were higher than the extracts of fresh garlic, and their activities of A and B products were similar to each other. In pH 2.5, nitrite scavenging activity and inhibition of NDMA formation were stronger in the black garlicks than fresh garlic, and A product was the highest. Moreover, inhibition of NDMA formation from black garlic showed similar trends compared to the antioxidant activities. Therefore, we expect that the black garlic will contribute to the inhibition of carcinogenesis *in vivo*.

(8) Antioxidant and cancer cell growth inhibition activity of hot water extract from 5 different varieties of artemisia (*A. Argyi* H., *A. iwayomogi* Kitamura, *A. Princeps* Var *Orien talis* HARA, *A. princeps* Pampanini and *A. annua* L.) in Korea were studied. Total phenol and flavonoid contents were the highest in *A. iwayomogi* Kitamura followed by *A. Argyi* H. DPPH radical scavenging activity was the highest in *A. Argyi* H. at 50 µg/mL concentration, NO radical scavenging activity was more than 50% in *A. Princeps* Var *Orien talis* HARA, *A. princeps* Pampanini, and *A. annua* L. at 200 µg/mL concentration. FRAP was higher in *A. Argyi* H. and *A. iwayomogi* Kitamura. Antioxidant activity in the β-carotene linoleic acid system was also higher in *A. Argyi* H. and *A. iwayomogi* Kitamura by 60.50% and 56.90% at 100 µg/mL concentration, respectively. In cancer cell growth inhibition activities at 400 µg/mL concentration, *A. iwayomogi* Kitamura showed higher than 80% on HeLa cell. *A. princeps* Pampanini and *A. Argyi* H. extract had growth inhibition activities higher than 80% on MCF cell. The antioxidant and anticancer activities in various artemisia are a promising source of functional food ingredients.

(9) To develop functional products based on black garlic, a black garlic extract (BG) of 7 brix, a Gaeddongssuk extract (GS) of 0.7 brix and two types of mixtures (MBS-I; black garlic 7 brix: Gaeddongssuk 0.7 brix, MBS-II; black garlic 14 brix: Gaeddongssuk 1.4 brix, 93:7, v/v) were supplemented to rats training on a treadmill for 4 weeks. Body weight from the training did not decrease during the experimental period. Serum albumin content significantly increased in the groups fed an experimental diet compared to the control. The BUN content significantly decreased in BG and MBS-II groups compared to the control. AST and ALP activities significantly decreased in the groups fed an experimental diet compared to the control. Serum triglyceride and total cholesterol levels in MBS-I and MBS-II groups significantly decreased compared to the control. Lipid levels of the serum and liver tissue were not significantly different between the MBS-I and MBS-II groups.

The contents of lipid peroxide in the serum and liver tissue were significantly reduced in the groups fed all extracts compared to the control, the serum and liver lipid contents were the lowest in the MBS-I and MBS-II groups, respectively. Activity of hepatic catalase in the GS and MBS groups increased by 1.8~2.3 times compared to the control. SOD and GSH-px activities significantly increased from treatment with the extracts by 1.3~1.5 times and 1.2~1.7 times, respectively.

- (10) These results indicate that a mixture of BG and GS extracts has higher biological activity than a single supplementation of BG or GS extract. Therefore, the addition of Gaeddongssuk to black garlic (MBS-I and MBS-II) is effective as a defense material against oxidative stress. MBS-I may be especially effective for its biological activities.
- (11) To development of bio-product based on black garlic, medicinal plants were screened by the literature search. And then selected over 100 kinds of materials. More frequent use of 11 kinds of samples were selected. Eleven medicinal plant materials were tested for antioxidant capacity and inhibitory activity on lipopolysaccharide (LPS) induced nitric oxide (NO) production in the RAW264.7 cells. Yields from hot water extracts of the materials were the highest in the *Lycii fructus* by 52.10%, *Phellinus linteus* was the lowest by 5.7% and yields of another were 14.50~42.47%. Total phenol and flavonoids contents were the highest in the *Phellinus linteus*. EC<sub>50</sub> value of *Salvia miltiorrhiza* was lower than 100 µg/mL, but the values of *Phellinus linteus*, *Scutellaria baicalensis* and *Paeonia lactiflora* were 100~200 µg/mL in the DPPH and ABTS radical scavenging activities. EC<sub>50</sub> values of all extracts in the superoxide anion radical scavenging activity were higher than 300µg/mL. *Phellinus linteus* for the reducing power was shown the highest activity. Fe<sup>+2</sup> chelating activity was the highest in the *Morus alba* extract. Cell viability by MTT against the LPS induced RAW264.7 cell showed above 80% at the 50 µg/mL, and above 77% at the 100 µg/ml concentration, except for *Acanthopanax sessiliflorum*. NO production in the LPS induced RAW264.7 cell was 12 fold increased compared to the control. Its NO production level was 6.86~26.18 µM for all extracts, especially 100 µg/mL of *Scutellaria baicalensis* extract decreased 72% of NO production than the control. These results suggest that *Scutellaria baicalensis*, *Phellinus linteus*, *Salvia miltiorrhiza*, *Morus alba* and *Paeonia lactiflora* are potential candidates of functional material because of their potent antioxidant and anti-inflammatory activities.



- (12) Selected 5 kinds of medicinal plants were mixed under two condition. After 5 kinds of medicinal plants were extracted and dried, individually, and then each of the mixture (1:1:1:1:1) were tested biological activity (MHE-1). On the other hand, the mixture to same extraction yields from each of raw material was tested biological activity (MHE-2). Above samples were analysed on the nutritional components, antioxidant and immune activity. The result was more effective in MHE-2 sample.
- (13) Free sugar was detected 3 kinds, contents of fructose and glucose in *Phellinus linteus* was the highest. MHE-1 and MHE-2 were similar content. Organic acid was determined 11 kinds, *Morus alba* was the highest, followed *Paeonia lactiflora*. The content of MHE-1 was higher than MHE-2. In the biological activities of mixture(MHE-1, MHE-2), xanthin oxidase inhibitory activity was increased significantly to the does-dependent manner, activity of two mixture is similar.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity was higher MHE-2 than MHE-1, in the 500~5000  $\mu\text{g/mL}$  concentration. Total phenol and flavonoids contents were significantly higher than MHE-2. Antioxidant activity was significantly increased to the its concentration, and MHE-2 was significantly higher than MHE-1.
- (14) Cell viability by MTT against the LPS induced RAW 264.7 cell showed above 80% at the 50  $\mu\text{g/mL}$ , and above 77% at the 100  $\mu\text{g/ml}$  concentration of all except, *Acanthopanax sessiliflorum*. NO production in the LPS induced RAW 264.7 cell was 12 fold increased compared to the control. Its NO production level was 6.86~26.18  $\mu\text{M}$  for all extracts, especially 100  $\mu\text{g/mL}$  of *Scutellaria baicalensis* extract decreased 72% of NO production than the control. These results suggest that *Scutellaria baicalensis*, *Phellinus linteus*, *Salvia miltiorrhiza*, *Morus alba* and *Paeonia lactiflora* are potential candidates of functional material because of their potent antioxidant and anti-inflammatory activities.
- (15) In immune activity of the mixture, cell viability by MTT was 84~91% in the 100  $\mu\text{g/mL}$  concentration, was less than 50% in the 10000  $\mu\text{g/mL}$  concentration. NO production in the LPS induced RAW264.7 cell was over than 10 fold increased compared to the control. But two mixture (MHE-1, MHE-2) was decreased to 50% of NO production in the 500  $\mu\text{g/mL}$  concentration. In the two mixture,  $\text{PGE}_2$  level was similar.  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-2}$ ,  $\text{IL-6}$  level were decreased by mixture adding. These results suggest that medicinal plant and their mixture were expected to effective in the prevention of inflammatory diseases. Therefore bio-products from black garlic composite were expected to improve.

(16) To develop of bio-product, black garlic and MHE-2 were mixed, intake amount for 1 day on adult was decided. To decide of optimal intake amount on 1 day, bio-product based on the black garlic composite of different volume were tested by *in vivo* animal experiment on treadmill running exercise. AST, ALT activities were decreased in groups fed bio-products. The lipid peroxide content in the serum and liver tissue was significantly decreased in the groups fed bio-products. Hepatic catalase, SOD and GSH-px activities significantly increased from treatment with 3 times intake amounts on 1 day the bio-products. The bio-product is effective as a functional products against oxidative stress from exercise or daily life.

(17) Manufacture condition of high-concentration extract from black garlic was optimized, and patented. "Ochunnunae" as drinks was developed. And composed to black garlic, mugwort and medicinal plants containing black garlic drink product was named "Ochunnunae premium" and "Ochunnunae gold". After design of the products, commercialization was prompted. "Ochunnunae power" as tablet products was established packaging design to promote the commercialization.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the research project .....	92
Chapter 2. Status of technology development in domestic and abroad .....	1· 3
Chapter 3. Results of research project .....	23
<b>Section 1. Biological activity of black garlic and Gaeddongssuk mixture .....</b>	<b>3</b>
1. Objective and results of research .....	23
2. Materials and methods .....	33
3. Results and discussion .....	54
1) Biological activity and component analysis from Gaeddongssuk .....	5· 4
2) Biological activity screening by extraction condition in black garlic .....	0· 6
3) Biological activity screening by extraction condition in Gaeddongssuk .....	9· 6
4) Biological activity marketing black garlics from Namhae .....	5· 7
5) <i>In vivo</i> biological activity of black garlic and Gaeddongssuk mixture on running exercise .....	82
6) Optimal intake analysis of black garlic and Gaeddongssuk mixture on running exercise .....	93
7) <i>In vivo</i> biological activity of bio-products from black garlic and Gaeddongssuk mixture .....	9
8) Screening of medicinal plants for black garlic composite drinks .....	501
9) <i>In vitro</i> biological activity of black garlic composite and Gaeddongssuk mixture .....	7·11
10) <i>In vivo</i> biological activity of black garlic composite on interval running exercise .....	2·21
<b>Section 2. Biological activity and quality characteristics of bio-product .....</b>	<b>8</b>
1. Objective and results of research .....	8
2. Materials and methods .....	8
3. Results and discussion .....	9
1) Antioxidant activity of various mugwort extracts .....	931
2) Extraction condition optimization from biological activity screen of black garlic extract by various condition .....	14
3) Screening of optimal extraction condition from Gaeddongssuk hot water extract .....	051
4) Antioxidant activity by mixing ratio in black garlic and Gaeddongssuk mixture .....	6·51
5) Physicochemical property of bio-product .....	61
6) Antioxidant activity of bio-product .....	91

7) Biological activity of bio-product .....	41
8) Immune activity of bio-product .....	71
9) Biological activity in eleven kinds of medicinal plants .....	81
10) Nutritional properties of five kinds of medicinal plants and its mixture .....	191
11) Biological activity by mixture condition in five kinds of medicinal plants .....	391
12) Anti-inflammation in the RAW 264.7 cells by mixture condition in five kinds of medicinal plants .....	18

**Section 3. Test marketing drinks for enhanced immune activity from black garlic and mugwort mixture .....** 204

1. Objective and results of research .....	2
2. Materials and methods .....	6
3. Results and discussion .....	9
1) Optimization of high quality black garlic processing condition and establish of mass production process .....	29
2) Low-viscosity and high-concentration black garlic extract processing condition establishment .....	216
3) Quality properties of low-viscosity and high-concentration black garlic extract processed by this project .....	217
4) Test marketing drinks for enhanced immune activity from black garlic and mugwort mixture .....	218
5) Bio-product commercialization for enhanced immune activity composed with black garlic, mugwort and medicinal plants .....	22
6) Analysis of international markets for bio-product export .....	342

**Chapter 4. Accomplished degree and contribution in related fields .....** 6

**Chapter 5. Results of the study and application plan .....** 2

**Section 1. Necessity of additional research and improvement .....** 22

**Section 2. Application in other fields and post-effects .....** 32

**Section 3. Research achievement .....** 4

**Chapter 6. International science and technology information gathered in the process of study .....** 277

**Chapter 7. Research facilities and equipment plan status .....** 2

**Chapter 8. References .....** 277

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	29
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	31
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	32
<b>제 1 절 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 생리활성 규명 .....</b>	<b>23</b>
1. 연구개발의 목표 및 주요결과 .....	32
2. 재료 및 방법 .....	35
3. 결과 및 고찰 .....	45
1) 개똥쑥의 생리활성 분석 및 유효물질의 규명 .....	45
2) 흑마늘의 추출조건별 생리활성 스크리닝 .....	60
3) 개똥쑥의 추출조건별 생리활성 스크리닝 .....	69
4) 남해산 시판 흑마늘의 생리활성 비교 .....	75
5) 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 <i>in vivo</i> 생리활성 .....	88
6) 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 적정 섭취량 분석 .....	93
7) 흑마늘과 개똥쑥 혼합에 의한 개발 제품의 <i>in vivo</i> 생리활성 .....	99
8) 흑마늘 복합조성물 음료 제조를 위한 천연식물류의 선정 .....	105
9) 흑마늘 복합물과 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 <i>in vitro</i> 생리활성의 평가 .....	117
10) 간헐적 운동부하에 의한 흑마늘 복합물의 <i>in vivo</i> 생리활성 평가 .....	122
<b>제 2 절 개발 바이오제품의 품질특성 및 생리활성 평가 .....</b>	<b>131</b>
1. 연구개발의 목표 및 주요결과 .....	130
2. 재료 및 방법 .....	132
3. 결과 및 고찰 .....	139
1) 개똥쑥, 강화약쑥, 약쑥 및 인진쑥 추출물의 항산화 활성 .....	139
2) 다양한 조건에서 제조된 흑마늘 추출물의 생리활성 스크리닝을 통한 추출조건의 최적화 .....	144
3) 개똥쑥 고온 열수 추출물의 최적 추출조건의 스크리닝 .....	150
4) 혼합 비율을 달리한 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 항산화 활성 .....	156
5) 개발 제품의 이화학적 특성 분석 .....	166
6) 개발 제품의 항산화 활성 규명 .....	169

7) 개발 제품의 생리활성 규명 .....	174
8) 개발 제품의 면역활성 규명 .....	177
9) 흑마늘과 천연식물류 복합물 제조를 위해 선정된 천연식물류의 생리활성 평가 .....	180
10) 선정된 천연식물류 5종 및 혼합물의 영양성분 분석 .....	191
11) 선정된 천연식물류 5종의 혼합조건에 따른 생리활성 비교 .....	193
12) 선정된 천연식물류 5종의 혼합조건에 따른 RAW 264.7 대식세포에 대한 염증활성 측정 .....	198

**제 3 절 흑마늘과 썩 혼합 면역증진용 음료의 테스트 마케팅 .....** 204

1. 연구개발의 목표 및 주요 결과 .....	204
2. 재료 및 방법 .....	206
3. 결과 및 고찰 .....	209
1) 고품질 흑마늘의 제조 조건의 최적화 및 이에 기초한 대량 생산 공정 확립 .....	209
2) 저점도 고농축 흑마늘 진액의 제조 조건 설정 .....	216
3) 본 연구를 통하여 개발된 저점도 고농축 흑마늘 진액의 품질특성 .....	217
4) 흑마늘과 썩 혼합 면역증진 음료의 테스트 마케팅 .....	218
5) 흑마늘, 썩 및 천연식물 추출물을 함유한 면역증진용 제품의 상품화 .....	229
6) 개발 제품의 수출을 위한 해외 시장분석 .....	243

**제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....** 266

**제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....** 272

**제 1 절 연구개발 결과의 활용방안 .....** 272

**제 2 절 기대성과 .....** 273

**제 3 절 연구성과 .....** 274

**제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....** 277

**제 7 장 연구시설·장비 현황 .....** 277

**제 8 장 참고문헌 .....** 277

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

- 마늘은 우리나라 국민의 90.7%가 1일 1회 이상 섭취하여 백미 다음으로 섭취빈도가 높은 식품이며, 일일 섭취량은 6.5 g에 달하는 주요 향신 조미채소임(2005년도 국민건강영양조사, 보건복지부·한국보건산업진흥원).
- 2005년 전국의 마늘 생산량은 31,800 ha에서 375천톤으로 재배 농가수는 전체 농가의 39.7%를 차지하고 있으며, 2001년 기준 국내 채소류 중 재배면적은 4위이며 생산액은 5,382억원으로 전체 농산물 생산액 중 8위를 차지하는 주요 농산채소임.
- 남해군의 마늘산업은 군 전체 농업 생산액의 36%를 차지하고 2010년 현재 6,400여호 농가가 참여하고 있는 주요 산업으로 2009년의 생산량은 18,090톤으로 2008년대비 2,171톤 정도가 감소하여 지역의 주요 농산업의 육성 및 고부가가치 창출을 통한 지역산업 안정화가 요구되고 있음.
- 마늘은 식품으로서의 가치뿐만 아니라 안전성이 이미 확보되어 있으며 다양한 약리적 효능이 잘 알려져 있어 건강지향적인 현대인의 성향과 대체의학과 자가 치료에 대한 관심이 증대되고 있는 사회적인 경향에 부합하는 기능성 식품임.
- 마늘 중에 함유되어 있는 주요 황화합물인 alliin, diallyl disulfide, S-allyl-L-cysteine 등은 강력한 살균작용, 정장작용, 피로회복, 이노작용, 말초혈행개선, 항동맥경화, 항고혈압, 항산화작용, 항노화, 면역기능 조절 및 항암 등 다양한 생리활성을 발현하며, 비 황화합물인 spirostanol 형의 saponin, fructan, F-4 등의 기능성 발현물질은 생마늘, 열수 및 용매 추출, 가열처리 등 다양한 형태와 방법으로 가공이 가능하므로 마늘은 식품소재산업, 의약산업 등에 활용가능하고 타 산업과도 융합이 가능한 우수한 기능성 식품임.
- 흑마늘은 마늘을 일정 온도와 습도 하에서 숙성시킴에 따라 마늘의 자체 성분에 의하여 갈변반응이 진행됨으로서 제조되는 가공식품으로서 생마늘 섭취 시 거부 요인이 되는 강한 향과 매운 맛이 감소되고 당도와 산미가 증가하며, 적절한 물성을 가지게 됨.
- 흑마늘로 가공되면서 생성되는 갈변물질에 의한 항산화, 항고지혈증 및 항암 효능 등의 활성이 증가되고, 섭취가 용이해 짐에 따라 파우치 및 환 등으로 3차 가공되어 건강기능성 식품으로 최근 인기가 높아지고 있음.
- 본 과제에서 흑마늘과 함께 바이오 식품 개발에 활용할 쑥은 기후나 토양에 잘 적응하는 광역성 식물로 전 세계적으로 널리 분포하고 있으며, 지구북반구에 약 200~300여종이 있고, 쑥이라는 이름은 어디서나 쑥쑥 자라는 놀라운 생명력 때문에 붙여진 이름이며, 뛰어난 약효 때문에 의초(醫草)라고도 함.
- 한방에서 주로 이용하는 쑥으로 참쑥(*Artemisia mongolica*), 약쑥(*Artemisia vulgaricus*), 인진쑥(*Artemisia capillaries*) 및 개똥쑥(*Artemisia annua*) 등을 들 수 있으며, 쑥은 동일 속의 쑥이라 할지라도 생육 환경에 따라 그 특성 및 약효가 매우 다른데, 민간요법에서는 쑥의 전초를 말려 진정제, 경련, 마비, 전신강직 등의 치료에 사용되어 왔으며 한방에서는 지혈, 한

습, 이담 등의 효과가 있어서 복통, 토혈, 만성간염, 식욕부진 및 만성 위장염 등에 이용하였고, 이 외에도 피부병, 호흡기 및 신경계 질환 등의 치료에도 이용되어 왔음.

- 건강에 대한 관심 증대, 평균수명의 연장, 생활수준의 향상과 더불어 현대인은 건강장수를 기원하게 되었고, 이러한 차원에서 이미 발생된 질병의 치료 보다는 질병의 예방에 더 집중하게 되었는데 약물보다는 천연식품의 섭취를 통하여 건강을 증진시키고자함.
- 각종 질병에 대해 인체는 자기방어를 위한 기본 기작을 가지고 있으므로 외부 요인으로부터 자신을 방어할 수 있는 능력을 강화시키는 것만으로도 건강 증진을 도모할 수 있음. 이러한 측면에서 볼 때 외부로부터 유입된 유해물질을 제거 및 방어하는 항산화작용을 제 1차 기작으로 볼 수 있고, 생체의 면역기능 증진은 인체 방어를 위한 제 2차 기작으로 여겨짐.
- 현재까지 밝혀진 바에 의하면 산화적 스트레스는 발암, 심장병, 류마티스성 관절염, 신경퇴화성 질병, 파킨슨병, 감염, 노화, 고혈압, 알러지 등의 질환발생과 관련한 것으로 보고되어 있음.
- 여러 연구 결과 superoxide ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$ , OH 등의 활성산소의 유도체들로 이들은 반응성이 강하여 케양이나 발암 등의 원인이 될 뿐만 아니라 생체 내 모든 분자들을 무차별 공격하여 암을 비롯한 난치 질환을 유발하며, 생성된 위치에서, 또는 이동하면서 주요 세포 구성물질인 지질, 단백질, DNA 나아가 전사인자 등을 파괴함.
- 면역기능 증진식품은 저하된 인체의 면역기능을 증진시키는데 기여하는 식품을 의미하고, 정상 면역 기능을 증진시키는 경우도 포함되고 있는데, 최근 사스나 신종인플루엔자 등 대규모 유행 질병으로 인하여 면역기능증진 식품에 대한 관심은 더욱 증대되고 있으며, 고령화로 인한 면역력 저하 인구의 급증과 함께 면역력 저하로 잠복기에 있던 질병들의 발병 위험도가 함께 높아지므로 면역기능증진에 대한 관심과 필요성은 더 증폭되고 있음.
- 건강기능식품 개발과 관련하여 소비자와 기업의 공통적인 관심사는 면역기능 증진, 비만조절, 관절건강 등이 지목되고 있으나, 흑마늘을 이용하여 이들 질환에 대한 효능과 관련한 연구는 전무함.
- 현재 남해군을 중심으로 마늘산업을 육성하기 위한 다양한 노력과 군 전체 지역을 광역 친환경단지로 육성하기 위한 사업이 추진되고 있어 고품질 원료 마늘의 확보가 용이하고 감염성 질환의 유행으로 면역활성 증진 식품에 대한 수요가 증가하고 있으므로 기업의 국내외 경쟁력을 강화하고 신수요를 창출할 수 있는 기술 및 제품의 개발이 요구되고 있음.
- 흑마늘의 경우 탄 맛이나 혹은 잔존한 자극취로 인해 흑마늘 및 그 가공품 시장의 지속적인 성장을 저해하고 있는 바, 유해성 물질의 생성여부에 대한 규명 및 이를 최소화 시킬 수 있는 새로운 가공방법의 개발이 시급한 실정임.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

1970년 이후 마늘과 관련된 국내 연구 보고는 총 815건으로 많으나, 흑마늘과 관련한 연구는 본 연구자들에 의한 연구결과 외에는 거의 없다.

본 연구과제의 수행에 앞서 선행 연구결과 중 흑마늘과 관련하여 흑마늘의 제조 과정 중 주요 성분의 변화를 비교하고 열수추출물을 제조하여 항산화활성을 비교 분석한 결과 공정의 진행과 더불어 갈변물질의 생성량이 증가하였고 항산화활성도 증가하였으며, 생마늘 및 찢마늘과 주요 영양성분의 비교에서 흑마늘은 수분 함량이 낮고 당의 함량이 높았으며 fructose가 주요 유리당이었고, 마늘 특유의 성분인 total pyruvate 및 total thiosulfinate의 함량도 흑마늘이 가장 높았다. 생마늘, 찢마늘 및 흑마늘의 열수 및 에탄올 추출물의 농도별 시료에서 항산화 활성은 흑마늘의 항산화활성이 생마늘 및 찢마늘에 비하여 더 우수하였음을 확인한 바 있다. 또한 열처리 공정에 의하여 제조되는 마늘 가공품의 품질특성에 대한 기초 자료를 확보하고자 통마늘을 60, 70, 80 및 90°C에서 저장하면서 저장기간에 따른 갈변도, 색 및 주요성분의 변화와 항산화활성의 변화를 비교 분석한 결과, 고지방 식이에 3%의 마늘 분말 혼합급이는 지질 개선 효과가 있었는데, 흑마늘의 경우 혈중 총 지질의 함량을 유의적으로 감소시키는 등 지질 개선 효과가 있었다는 보고를 한 바 있다. 개뿔쑥에 관한 연구로서는 이화학적인 성분, 생리활성에 관한 선행 연구결과가 있다.

쑥(*Artemisia montana* pampan)은 우리나라 전역에 걸쳐 자생하는 번식력이 강한 다년생 식물로서 분류학상으로 엉거시과(*Arduaceae*)에 속하고, 약 2,000여 종이 되며, 쑥의 주요성분으로는 alkaloid류, 비타민류, 정유류(精油類), 무기질 등이 알려져 있으며, 쑥의 효과로서 항균, 항염, 혈액 응고, 자궁 수축, 기관지 확장, 해열 작용 등이 기록되어 있고 민간요법 및 한약재로 이용되어 왔으며, 혈중 LDL-콜레스테롤을 감소시키는 효과가 있음도 보고되어 있다. 쑥은 국내에서 인진쑥, 참쑥에 대한 연구보고가 많아 참쑥(*Artemisia vulgaris*)의 페놀류 화합물인 flavonoid가 분리 동정되었고, 이러한 flavonoid들은 효소적 또는 비효소적으로 지질과산화물 효과적으로 억제하며 비타민 E보다 높은 항산화 효과를 나타냄이 밝혀져 있다. 개뿔쑥은 주 성분인 artemisinin이 말라리아 치료 효과가 있다는 보고 외에 국내에서 연구된 결과는 거의 전무한 실정이며, 본 연구진은 마늘과 접목하여 기능성을 강화할 수 있는 식품으로 쑥을 선정하였다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 생리활성 규명 (제 1세부과제)

### 1. 연구개발의 목표 및 주요결과

#### 1) 세부과제 목표

- 흑마늘을 주원료로 하고, 개똥쑥 및 천연식물류를 첨가함으로써 기능성을 강화한 바이오 푸드를 개발코저 항산화와 면역증진 기능을 중심으로 생리활성을 평가하여 추출물의 최적 추출조건 및 조성물의 혼합비율을 설정함.
- 흑마늘과 개똥쑥 혼합 추출물 음료의 면역기능을 강화하기 위하여 천연식물류 추출물을 혼합하여 복합조성물을 제조하고 *in vitro*상에서 항산화 활성을 측정함으로써 복합조성물에 대한 기능성 규명의 기초 자료를 확보함.
- 개발 제품의 *in vitro* 및 *in vivo*상에서 생리활성을 규명하고, 동물실험을 통한 효능의 분석 및 적정섭취량을 분석함으로써 최종제품의 생리활성과 안전성 확보를 위한 신뢰성 있는 기초 자료를 얻고자 함.

#### 2) 주요 내용

- 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)의 이화학적 성분을 분석함으로써 영양적 기능성을 확인하고, 생리활성에 관한 기초 연구로서 부위별 및 용매별 생리활성에 관하여 *in vitro*에서 항산화 활성, tyrosinase와  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 및 암세포 증식억제 활성을 통해 측정하였음.
  - 개똥쑥의 수분, 조지방 및 조단백질 함량은 잎에서 높았으나 회분, 조섬유 및 무기물 함량은 줄기에서 유의적으로 높았음. 총 페놀과 플라보노이드 함량은 잎이 줄기에 비해 약 2배 정도 높았으며, 라디칼 소거능, 환원력 및 tyrosinase 저해활성은 모든 농도에서 잎이 줄기에 비해 유의적으로 높았으나,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 줄기 추출물에서 활성이 더 높았음. 인체 암세포주(MCF-7, HeLa 및 AGS)에 대한 증식억제 활성은 잎 추출물에서 유의적으로 활성이 높았음.
  - 개똥쑥의 생리활성과 관련한 유효물질로 추정되는 페놀 화합물을 HPLC로 분석·동정한 결과 phenolic acid 및 catechin류는 줄기에 비해 잎에서 월등히 높았으며, flavonoid류는 잎에서만 동정되었으며, rutin 및 kaempferol은 잎의 에탄올 추출물에서만 동정되었음.
- 개똥쑥 물 및 에탄올 추출물의 생리활성 분석결과에 기초하여 물과 에탄올 혼합비를 달리한 조건에서 제조된 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 생리활성을 비교함으로써 흑마늘을 주원료로 한 생리활성 기능이 강화된 바이오 푸드 개발의 최적 추출조건 및 조성물의 혼합비율을 설정하고자 함.
  - 흑마늘을 에탄올 비율, 추출온도 및 시간을 달리한 조건에서 추출하여 반응표면분석법

(RSM)을 통해 생리활성을 평가한 결과, 최적 추출 조건은 55.72%의 에탄올 농도로 89.68°C에서 9.79시간 추출한 경우 생리 활성이 극대화 될 것으로 판단됨.

- 개똥썩의 에탄올 비율, 추출온도 및 시간을 달리한 조건에서 추출하여 생리활성을 반응표면분석법(RSM)으로 평가한 결과, 53.70%의 에탄올 농도에서 89.68°C에서 8.46시간 동안 추출한 경우 생리 활성이 극대화 될 것으로 예상되었음.

● 이상의 연구결과를 통하여 아직까지 연구가 미흡한 개똥썩의 부위별 활성과 성분에 대한 데이터 확보를 통하여 잎 부위의 이용도를 높일 것을 제안하며, 제 2협동 과제를 통한 산업화 및 차년도 연구를 위한 최적의 추출 및 상품 제조조건을 제시함.

● 1차년도 연구결과를 바탕으로 트레드밀을 이용한 강제운동에 의해 산화적 스트레스를 유발한 흰쥐에서 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물의 *in vivo* 생리활성을 알아보고, 적정 섭취량 및 이를 이용한 개발 제품의 활성을 분석하였음.

● 흑마늘의 기능성을 증대시키고자 개똥썩을 첨가하는 연구로서 기본 물질이 되는 흑마늘의 시판 제품에 대한 생리활성을 알아보고자 남해산 마늘을 이용하여 제조된 흑마늘을 대상으로 생리활성을 비교분석함으로써 향후 개발 제품의 기능성을 일정하게 유지시키고자 함.

- 시판 남해산 흑마늘 (4제품; A, B, C 및 D)을 이용하여 항산화 및 아질산염 소거활성을 비교한 결과 마늘 중 total pyruvate 및 thiosulfate 함량은 B제품에서 가장 높은 함량이었음.

- 시판 흑마늘의 항산화 활성으로 DPPH, ABTS, hydroxyl 및 nitric oxide 라디칼 소거활성을 비교한 결과 A와 B제품간의 항산화 활성은 비슷한 패턴이었음.

● 트레드밀을 이용하여 흰쥐를 강제운동으로 산화적 스트레스를 유발시켜 흑마늘과 개똥썩의 추출 혼합물을 흰쥐에 급이시킨 후 *in vivo*에서 생리활성의 변화를 관찰함. 식이 조건으로는 흑마늘과 개똥썩 혼합물 2종[MBS-I; 흑마늘 7 brix+개똥썩 0.7 brix (93:7, v/v), MBS-II; 흑마늘 14 brix+개똥썩 1.4 brix (93:7, v/v)]을 사용하였음. 흑마늘 추출물 7 brix(BS) 및 개똥썩 추출물 0.7 brix(GS)로 총 4군으로 구성하였음.

- 대조군에 비하여 흑마늘, 개똥썩 및 혼합물 급이군에서 전반적으로 체내 지질 저하 효과가 관찰되었는데, 특히, BS군 및 GS군보다 MBS군의 효과가 두드러지게 나타났음. 간기능 이상 유무를 나타내는 지표로 사용되는 AST 및 ALT 활성, 신장 기능 이상 유무를 나타내는 지표인 ALP의 활성과 혈중 요소질소를 측정된 결과에서는 대조군과 실험군간에 유의차가 없거나 오히려 실험군이 더 낮은 경향을 보였음.

- 혈청과 간조직의 DPPH 라디칼 소거에 의한 항산화 활성, 간 조직의 항산화 효소 활성을 측정된 결과 대조군에 비해 실험군에서 유의적으로 활성이 높았으며, 지질과산화물의 함량도 이에 비례적으로 감소되는 결과를 보였음. 특히 MBS-II군이 유의적으로 항산화 활성 및 항산화 효소의 활성이 높았음.

● 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물 중 효과적인 MBS-I 을 선정하여 섭취량을 달리하여 동일조건에서 급이한 결과 AST, ALT 활성과 혈액 및 간 조직의 항산화 활성은 MBS-400군이 대조

군이나 여타 실험군에 비해 그 효과가 유의적인 차이로 우수하였음. 체내 지질 개선의 측면에서는 MBS-200군 및 MBS-400군이 유사한 경향을 보였음.

- Catalase, SOD 및 GSH-Px 등의 항산화 효소 활성화도 MBS-400군이 여타 실험군에 비해 유의적으로 상승되어, 산화적 스트레스시 MBS-I의 효과적인 적정 섭취량은 성인 체중 60 kg을 기준으로 할 때 200~400 mL/일인 것으로 추정됨.

- 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물(MBS-I)을 베이스로 하여 개발된 제품의 생리활성을 비교한 결과, 산화적 스트레스에 대해 개발 제품을 300 mL/일 급이하였을 때 식이효율은 대조군과 유의차가 없었으며, 장기의 중량에도 유의차를 보이지 않았음. 혈중 지질 성분 중 총 지질과 총 콜레스테롤 함량은 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰으나, 그 외 지질 성분이나 간 조직의 지질 개선에는 대조군과 유의차를 보이지 않았음. 혈액 및 간 조직의 항산화 활성, 지질과산화물 함량, 간 조직 중 항산화 효소의 활성화는 개발 제품 급이군이 대조군에 비해 유의적으로 감소되었음.
- 흑마늘과 개똥썩 추출물의 혼합물 및 개발제품을 바탕으로 하여 기능성이 높은 활성 물질을 보완함으로써 개발 제품의 시너지 효과를 얻고자 흑마늘을 베이스로 한 음료 개발의 자료를 탐색함. 수종의 천연식물류를 첨가하므로써 흑마늘 음료의 맛과 향 등의 기호성 증진 뿐만아니라 항산화 및 면역활성 증대가 가능하다고 판단됨. 이를 위하여 문헌 조사를 통하여 생리활성이 높은 식물류를 탐색한 결과 총 82건의 연구보고로부터 100여종의 천연식물류를 스크리닝하였음. 그 중 항산화 및 면역 활성 테스트에 사용 빈도수가 높은 식물류를 11종(구기자, 황금, 오가피, 감국, 산약, 작약, 단삼, 뽕잎, 생강, 상황버섯 및 옥수수수염) 선정하였음.
- 흑마늘 추출물과 5종의 천연식물류 추출물의 혼합(흑마늘 복합물), 흑마늘 복합물과 개똥썩 추출물의 혼합에 의한 생리활성을 분석한 결과 시료의 농도가 높고 개똥썩이 첨가된 시료 구에서 항산화 활성이 우수하였음.
- 상기의 흑마늘에 천연식물류를 첨가한 복합물의 항산화 활성 및 면역 증진 음료로써의 가능성을 알아보기 위하여 강제적인 운동부하를 간헐적으로 수행시킨 흰쥐에게 급이함으로써 체내 지질성분의 변화 및 항산화 효소 활성을 분석하였음.
- 흑마늘 복합물은 성인 기준 1일 1회 복용량(BM1)과 3회 복용량(BM2)으로 구분하여 흰쥐에게 급이하였으며, BM2급이군에서 지질 개선 및 항산화 효소 활성이 우수하였는데, 간헐적인 운동에 의한 운동 강도가 낮은 것을 고려해 본다면, 흑마늘 복합물 개발 음료는 운동 뿐만 아니라 현대인의 일상생활속의 스트레스 방어에도 도움이 될 것으로 예상되며, 흑마늘 음료의 1일 3회 섭취도 가능한 것으로 평가되었음.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 실험재료 및 시료의 제조

#### (1) 실험재료

본 실험에 사용한 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)은 2009년 7월경 경상남도 하동군에서 재배한 것을 채취하였으며, 이물질 제거하고 그늘에서 15~20일간 자연건조한 후 잎과 줄기로 구분하여 실험에 사용하였다(Fig. 1). 건조된 개똥쑥 잎과 줄기는 증류수 및 80% 에탄올을 가하여 60°C 수욕상에서 12시간씩 2회 반복 추출한 후 회전식 진공증발 농축기로 완전 건조시켰다. 흑마늘은 남해보물섬마늘영농조합법인(제 2협동기관)으로부터 제공받았다.

#### (2) 시판 흑마늘의 생리활성 측정용 시료의 제조

경남 남해군에서 재배된 마늘을 원료로 사용하여 남해군에 소재한 흑마늘 가공업체 4곳(A, B, C 및 D)에서 제조된 것을 제공받았으며, 남해산 생마늘을 대조로 하여 비교 분석하였다. 흑마늘과 생마늘은 껍질을 제거한 후 물 및 80% 에탄올로 실온에서 12시간씩 3회 반복 추출한 후 회전식 진공증발기로 완전 건조시켜 실험에 사용하였다.

#### (3) 중심합성계획에 의한 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 제조

흑마늘은 껍질을 제거하였으며, 개똥쑥은 잎과 줄기를 1:3(w/w)의 비율로 혼합하여 총 20 g 을 물과 에탄올의 혼합비율을 달리한 용매 200 mL를 사용하여 추출온도와 시간을 달리하여 Table 1과 같은 조건에서 추출하였다.

Table 1. Central composite design for optimization of ethanol extraction using a response surface methodology

Exp No.	Temperature (°C)		Time (hr)		Concentration of ethanol (%)	
1	60	-1	6	-1	25	-1
2	60	-1	6	-1	75	+1
3	60	-1	12	+1	25	-1
4	60	-1	12	+1	75	+1
5	80	+1	6	-1	25	-1
6	80	+1	6	-1	75	+1
7	80	+1	12	+1	25	-1
8	80	+1	12	+1	75	+1
9	50	-2	9	0	50	0
10	90	+2	9	0	50	0
11	70	0	3	-2	50	0
12	70	0	15	+2	50	0
13	70	0	9	0	0	-2
14	70	0	9	0	100	+2
15	70	0	9	0	50	0
16	70	0	9	0	50	0
17	70	0	9	0	50	0

#### (4) 흑마늘과 개똥쑥 혼합물의 제조

흑마늘과 개똥쑥의 고온 열수 추출 시 최적 조건은 120°C에서 3 시간이었으며, 이 조건에서 흑마늘과 개똥쑥을 각각 추출하여 혼합비율을 조절하여 생리활성을 분석한 결과(제1 협동기관), 최적의 혼합비율로 제조된 시료를 제 1협동기관으로부터 제공받았다.

흑마늘 복합물과 개똥쑥의 혼합에 따른 생리활성 변화를 알아보기 위하여 상기의 흑마늘 복합물(BM1, BM2)에 개똥쑥 추출물(1년차 과제 결과에 따라 *in vitro* 생리활성이 우수한 열수 추출물을 사용)을 각각 0.4% 농도로 첨가하여 BM1G, BM2G를 제조하였다.

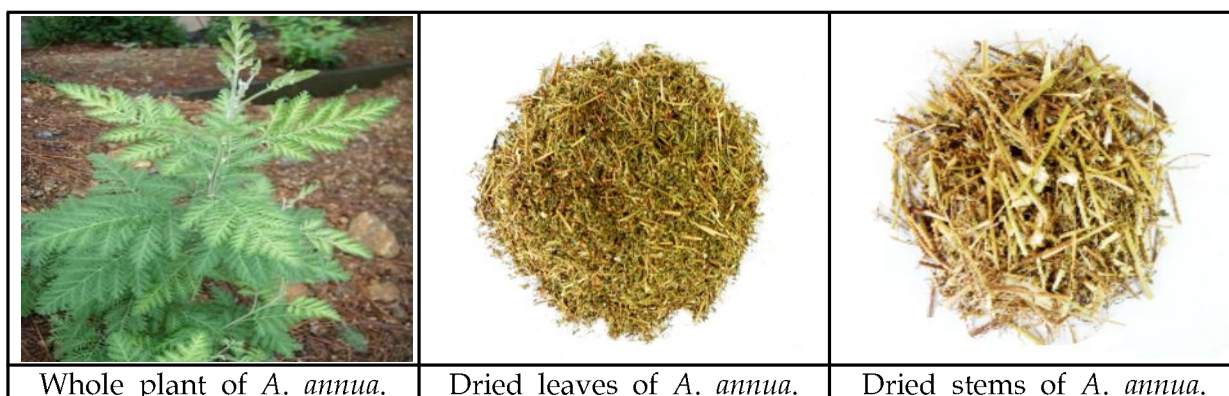


Fig. 1. Photograph of *A. annua*.

## 2) 영양성분 분석

### (1) 일반성분 분석

개똥쑥 잎과 줄기의 수분 함량은 105°C 상압가열건조법, 회분은 550°C 직접회화법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법, 조섬유는 AOAC법에 따라 정량하였다.

### (2) 무기물 정량

무기물의 분석은 분해용 플라스크에 시료 2 g을 취하여 진한 황산과 진한 질산을 각각 10 mL씩 차례로 가한 다음 hot plate상에서 무색으로 변할 때까지 분해하여 100 mL로 정용·여과한 후 Inductively Coupled Plasma(ICP, Optima 3300DV, Perkin-Elmer Co., NY, USA)로 분석하였다.

## 3) Total pyruvate 및 thiosulfate의 정량

분쇄한 마늘 시료 0.5 g에 10% trichloroacetic acid 5 mL를 가하여 실온에서 1시간 반응시켜 여과한 여액 1 mL에 동량의 0.0125% dinitriphenylhydrazine을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 여기에 0.6 N NaOH용액 5 mL를 가하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium pyruvate (Sigma Co., St Louis, MO, USA)를 사용하여 얻은 표준검량곡선으로부터 산출하였다.

Thiosulfate는 분쇄한 마늘 0.1 g에 2 mM의 cysteine이 함유된 pH 7.5의 50 mM HEPES [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid] 용액 0.5 mL, 50 mM HEPES를 차례로

첨가하여 총 반응액의 부피를 5 mL로 한 다음 27°C에서 10분간 반응시켰다. 이를 1 mL 취하여 0.4 mM DTNB[5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)]용액 1 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 다시 27°C에서 10분간 반응시켜 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-cysteine(Sigma Co., St Louis, MO, USA)을 표준물질로 하여 작성된 표준검량선에 따라 thiosulfate 함량을 계산하였다.

#### 4) 항산화 활성 측정

##### (1) 방향족 화합물 및 갈색도 측정

시료 중의 방향족 화합물의 함량은 280 nm, 갈색도는 420 nm에서 분광광도계로 각각 측정하여 흡광도 값으로 나타내었다.

##### (2) 총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 함량은 시료 추출물 1 mL에 Foline-Ciocalteau 시약 및 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 각각 1 mL씩 차례로 가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드는 시료 추출물 1 mL에 10% aluminum nitrate 및 1 M potassium acetate 0.1 mL, ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 개똥쑥 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 표준물질로 각각 caffeic acid 및 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용한 검량선에 의해 계산하였다.

##### (3) 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여 활성으로 나타내었다. 즉, 일정농도의 시료 추출물과 DPPH 용액(5 mg/100 mL methanol)을 동량으로 혼합한 다음 실온에서 20분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도비로 나타내었다. ABTS[2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)] 라디칼 소거활성은 7 mM의 ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정된 ABTS 용액 3 mL에 추출물 1 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO(nitric oxide) 라디칼 소거활성은 추출물 0.5 mL에 5 mM sodium nitroprusside 용액 0.5 mL 및 20 mM phosphate 완충용액 2 mL를 혼합한 후 25°C의 수욕상에서 150분간 반응시켰다. 여기에 griess reagent [2% sulfanilamide- 4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : 0.2% naphthylethylenediamide = 1:1(v/v)] 0.5 mL를 가하여 542 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거활성은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비로 계산하였다. Hydroxyl 라디칼 소거활성은 1 mM FeSO<sub>4</sub>/EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 시료 추출물 0.2 mL, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 mL 및 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL를 차례로 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2.8% TCA 용액을 가하여 반응을 정지시키고 95°C의 수욕상에서 10분간 가열하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

##### (4) 아질산염 소거활성 측정

아질산염 소거활성은 1 mM의 NaNO<sub>2</sub> 용액 1 mL에 시료 추출액 1 mL를 가한 후 0.2 M

citrate buffer (pH 2.5)을 가하여 반응용액의 총 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 1 mL를 취하여 2% 초산용액 3 mL 및 Griess 시약 (1% sulfanilic acid: 1% naphthylamine = 1:1) 0.4 mL를 가하여 15분간 실온에서 반응시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거활성은 시료 무첨가구의 활성에 대한 백분율(%)로 계산하였다.

#### (5) 환원력 측정

시료 추출물, 200 mM의 phosphate buffer(pH 6.6) 및 1% potassium ferricyanide 용액을 동량씩 혼합하여 50°C의 수욕상에서 20분간 반응시킨 후 10% TCA 용액 1 mL를 가하여 반응을 정지시키고, 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상정액을 1 mL 취하여 증류수 및 0.1% ferric chloride 용액을 동량으로 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (6) FRAP법에 의한 항산화 활성 측정

FRAP(ferric reducing antioxidant power)법에 의한 항산화 활성은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 용액 및 20 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 37°C의 수욕상에서 가온한 것을 FRAP 기질액으로 사용하였다. 시료액 40  $\mu\text{L}$ , FRAP 기질액 100  $\mu\text{L}$  및 증류수 40  $\mu\text{L}$ 를 차례로 혼합하여 37°C에서 4분간 반응시켜 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 에 의한 표준검량선으로부터 계산하였다.

#### (7) $\text{Fe}^{2+}$ 킬레이팅 활성 측정

$\text{Fe}^{2+}$  킬레이팅 활성은 시료 추출물 0.2 mL, methanol 0.8 mL, 2 mM  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  용액 0.05 mL 및 5 mM ferrozine 용액 0.2 mL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의  $\text{Fe}^{2+}$  킬레이팅 활성은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비로 나타내었다.

### 5) Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성은 0.2 M phosphate 완충용액(pH 6.5) 2.3 mL에 2 mM L-tyrosine 용액 0.4 mL, 시료 추출물 0.2 mL 및 tyrosinase(220 unit/mL, Sigma Co.) 0.1 mL를 차례로 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 470 nm에서 흡광도( $S_{OD}$ )를 측정하고 효소액을 첨가하지 않은 실험구의 흡광도( $B_{OD}$ )값을 뺀 값에서 무첨가구의 흡광도( $C_{OD}$ )에 대한 저해활성을 계산하였다.

### 6) $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 측정

$\alpha$ -Glucosidase 활성 저해활성은 2.5 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 첨가하여 반응기질로 하고  $\alpha$ -Glucosidase와 시료 추출물을 차례로 가한 후 효소액을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 0.1 M NaOH 100  $\mu\text{L}$ 로 반응을 정지시켰다. 이때 반응 생성물인 p-nitrophenol을 405 nm에서 분광광도계로 측정하여  $\alpha$ -Glucosidase 활성의 저해정도로 나타내었다.



### 7) 암세포 증식억제 활성 측정

인체 암세포에 대한 시료 추출물의 증식억제 활성은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]방법에 따라 수행하였으며, 인간 암세포주로 유방암 세포(MCF-7), 자궁경부 상피암 세포(HeLa) 및 위암세포(AGS)를 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받았다. 10% FBS, penicillin(100 units/mL), streptomycin(50 µg/mL)를 첨가한 RPMI-1640 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 즉, 세포 배양용 96 well plate에 세포수를 5×10<sup>4</sup> cells/mL로 100 µL씩 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 시료 추출물을 배지에 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL 농도로 조절하여 100 µL씩 접종하였다. 이를 24시간 배양한 다음 5 mg/mL의 MTT 용액을 10 µL씩 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 이때 생존하는 세포와 MTT와의 반응으로 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 µL에 녹여 plate shaker (MX2, FINEPCR, Seoul, Korea)에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비(%)로 계산하였다.

### 8) HPLC에 의한 페놀 화합물의 분석

개똥쑥의 물 및 80% 에탄올 추출물의 페놀 화합물은 phenolic acid, flavonol 및 catechin류로 구분하여 Table 2와 같은 조건하에서 HPLC에 의해 표준물질(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하 머무름 시간의 비교로 동정한 후 표준 검량선으로부터 정량하였다.

Table 2. Analytical conditions of HPLC for phenolic acid, flavonol and catechin in *A. annua* extracts

Items	Phenolic acid and flavonol	Catechin
Instrument	Agilent 1200 series (Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)	Agilent 1200 series (Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)
Detector	UV-DAD detector (Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)	UV-DAD detector (Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Vic, Australia)
Wavelength	270 nm	270 nm
Column	XTerra <sup>TM</sup> RP C8 (4.6×250 mm, 5 µm, Waters Co., Milford, MA, USA), 30°C	TSKgel ODS-100Z (4.6×250 mm, 5 µm, Tosoh Co., Tokyo, Japan), 40°C
Mobile phase	A: 0.5% glacial acetic acid, B: methanol 0~10 min : B(15%) 10~20 min : B(15-20%), 20~30 min : B(30-40%), 40~50 min : B(40-60%), 50~55 min : B(60-80%), 55~60 min : B(80-100%)	A: 0.5% glacial acetic acid, B: acetonitrile 0~10 min : B(15%) 10~20 min : B(15-20%), 20~25 min : B(20-60%), 25~30 min : B(60-100%)
Flow rate	1 mL/min	1 mL/min
Injection volume	20 µL	20 µL

### 9) 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 *in vivo* 생리활성 측정

#### (1) 실험동물의 사육 및 식이조성

실험동물은 평균체중이 90~110 g인 Sprague-Dawley계 3주령 수컷 흰쥐를 (주)샘타코 (Osan, Korea)로부터 분양받아 온도(22±2°C), 습도(50±5%) 및 명암주기(12시간, 07:00~19:00)가 자동설정된 동물사육실(DJ1-252-2, Daejong Instrument Industry Co. Ltd., Seoul, Korea)에서 기본식이(normal diet, AIN-93G)로 1주간 예비사육하여 난괴법에 의해 각 군의 체중이 비슷하도록 각 그룹당 5~7마리씩 나누어 4주간 실험 사육하였다.

1차적으로 흑마늘과 개똥쑥의 혼합비율에 따른 활성을 알아보기 위하여 흑마늘과 개똥쑥 혼합물 2종[MBS-I; 흑마늘 7 brix+개똥쑥 0.7 brix (93:7, v/v), MBS-II; 흑마늘 14 brix+개똥쑥 1.4 brix (93:7, v/v)]을 사용하였으며, 흑마늘 7 brix(BS) 및 개똥쑥 0.7 brix(GS)와 비교하였고, 대조군(Control)은 시료대신 물을 급이하였다(Table 3).

Table 3. Diet composition by mixture of black garlic and gaeddongssuk

Sample code	Composition
Control	Water
BG	Black garlic 7 brix
GS	Gaeddongssuk 0.7 brix
MBS-I	Black garlic (7 brix) 93 : Gaeddongssuk (0.7 brix) 7
MBS-II	Black garlic (14 brix) 93 : Gaeddongssuk (1.4 brix) 7

2차 실험에서는 1차 실험의 결과, 선정된 혼합물의 효과적인 적정 섭취비율을 얻기 위하여 흑마늘과 개똥쑥 혼합물(MBS-I)을 성인 체중 60 kg에 대한 섭취량으로 계산할 때 1일 100 mL 섭취군(MBS-100), 200 mL 섭취군(MBS-200) 및 400 mL 섭취군(MBS-400)으로 구분하였다(Table 4). 시료는 매일 일정시간에 경구투여 하였으며, 사육기간 동안 물과 식이는 일정량씩 공급하여 자유 급이하도록 하였다. 시료는 1일 1회 경구투여 하였다.

Table 4. Diet composition of animal experiment for establishment administration concentration of black garlic and Gaeddongssuk mixture(MBS-I)

Sample code	Composition
Control	Water
MBS-100	Supplementation of 100 mL/day based on adult 60 kg body weight
MBS-200	Supplementation of 200 mL/day based on adult 60 kg body weight
MBS-400	Supplementation of 400 mL/day based on adult 60 kg body weight

3차 실험에서는 1차 및 2차의 실험 결과를 바탕으로 흑마늘과 개뽕속 혼합물(MBS-I)이 음료로써 이용하기 적절하도록 배추출 농축액, 결정과당 등을 배합하여 개발 제품을 제조하여, 이를 상기의 실험과정과 동일한 조건에서 분석하였다(Table 5).

Table 5. Diet composition for *in vivo* activity of developed product(MBS-p) from MBS-I

Sample code	Composition
Control	Water
MBS-p	300 mL/day based on adult 60 kg body weight

(2) 유산소성 강제운동의 실시

산화적 스트레스 유발을 위한 운동 프로그램은 주 5회 일정한 시간(오전 10시)에 소동물용 트레드밀을 이용하여 유산소성 운동부하 훈련을 4주간 실시하였다. 운동을 시작한 첫 1주는 적응 시기로 15 m/min의 속도로 실시하였으며, 2주째에는 주행 속도와 시간 및 경사 각도를 증가시켰으며, 최종적으로 3~4주째에는 15°의 경사도에서 25 m/min의 속도로 30분씩 주 5회 실시하였다. 25 m/min의 운동 강도는 Sprague-Dawley계 흰쥐에 있어 최대산소 섭취량의 약 70%에 해당하는 운동강도로 알려져 있다(Dudley GA et al, 1982).

10) 강제운동 부하시 흑마늘 복합물의 *in vivo* 생리활성 측정

(1) 실험동물의 사육 및 식이조성

평균 체중이 90~100 g의 Sprague-Dawley계 3주령 수컷 흰쥐를 (주)샘타코(Osan, Korea)로부터 분양받아 상기와 동일한 조건에서 사육하여 1주간 적응시킨 후 난괴법에 따라 각 군에 8마리씩 4군으로 비운동군(Control), 운동대조군(Ex-con), 운동+BM1 급이군(Ex-BM1), 운동+BM2 급이군(Ex-BM2)으로 구분하였다(Table 6).

Table 6. Experimental groups for in exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

Sample code	Experimental groups
Control	Non exercised group with normal diet administration
Ex-con	Exercised group by interval training with normal diet administration
Ex-BM1	Exercised group with BM1 supplementation
Ex-BM2	Exercised group and BM2 supplementation

(2) 간헐적 운동부하 조건

간헐적 운동부하는 2일 간격으로 일정한 시간(오전 10시)에 소동물용 트레드밀(Pro-jog

EJ36GLE, Korea Hi-Tech, Siheung, Korea)로 5주간 실시하였으며, 운동을 시작한 1주에는 경사도 없이 15 m/min의 속도로 주행을 실시하였으며, 2~5주동안 15°의 경사도에서 20 m/min의 속도로 1회 20분씩 규칙적으로 실시하였다.

### (3) 체중 변화, 식이 섭취량 및 식이효율의 측정

실험 사육기간 동안 식이는 매일 오후 5시에 급여하였고 다음날 오전 10시경에 잔량을 조사하여 1일 식이섭취량을 계산하였으며, 물은 수도수를 매일 신선하게 공급하였다. 체중은 1주일에 1회 일정시간에 측정하였다. 실험사육 4주간의 총 식이섭취량(g)을 총 실험일수(day)로 나누어 1일 평균 식이섭취량을 산출하였으며, 식이효율(food efficiency ratio, FER)은 동일 기간 내의 체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

### (4) 실험동물의 처리

실험 최종일에 16시간 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취하여 심장 채혈법으로 혈액을 얻었으며, 약 30분간 빙수 중에 정치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리(Mega 17R, HANIL, Korea)하여 혈청을 얻었다. 간장, 신장, 심장, 지라, 고환 및 폐 등의 장기 조직은 채혈 직후 적출하여 생리식염수로 혈액을 충분히 씻은 다음 흡수지로 물기를 제거하고 중량을 측정하였다. 간 조직은 지질 분석 및 항산화 효소 활성 측정을 위하여 적출한 직후 액체 질소로 급냉동 시킨 후 -70°C에 보관하였다.

### (5) 혈액 성분 분석

혈중 당 함량, 총 단백질, 알부민 함량의 측정은 Asan kit시약으로 각각 측정하였다. Globulin 함량은 총 단백질 함량에서 알부민 함량을 뺀 값으로 계산하였다. 혈중 요소질소(BUN, blood urea nitrogen) 활성도는 시판 AM kit(Asan, Korea) 시약으로 각각 측정하였다.

### (6) 간기능 지표효소 활성 측정

간기능 측정을 위한 혈중 지표로써 혈중 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) 및 ALP(alkaline phosphatase) 활성도는 시판 AM kit (Asan, Korea) 시약으로 각각 측정하였다.

### (7) 혈액 지질성분 분석

혈중 총 지질(total lipid) 함량은 혈청 20  $\mu$ L에 phospho-vanillin 시약을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 시료 무첨가구를 대조로 하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의해 산출하였다. 중성지방(triglyceride), 총 콜레스테롤(total cholesterol) 및 HDL-C(high density lipoprotein cholesterol)함량은 시판 AM kit 시약(Asan, Korea)을 사용하여 각각 측정하였다. LDL-C(low density lipoprotein cholesterol) 함량은 혈청 total cholesterol-(HDL-C + triglyceride/5)의 계산식에 의해 산출하였고, VLDL-C(very low density lipoprotein cholesterol) 함량은 혈청 total cholesterol-(HDL-C + LDL-C)의 계산식을 사용하였다.

### (8) 간장 중의 지질 성분 분석

간장 중의 지질 함량은 간조직 0.5 g을 취하여 chloroform과 methanol 혼합액(2:1, v/v)을 가하여 Potter-Elvehjem tissue grinder(DAIHAN WOS01010, Korea)로 마쇄하여 지질 성분을 추출

하였다. 이를 여과한 후 일정량을 취하여 건고시킨 다음 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량 분석을 위한 시료로 사용하였으며, 상기의 kit시약으로 분석하였다.

#### (9) 혈청 및 간조직의 항산화 활성 측정

혈청의 항산화 활성은 혈청 100 $\mu$ L에 tris-HCl buffer(100 mM, pH 7.4) 1 mL를 가하여 혼합한 다음 0.5 mM DPPH 용액을 가한 후 37°C의 암실에서 15분 동안 반응시켰다. 여기에 chloroform 2 mL를 가하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 하층부의 chloroform을 취하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 항산화 활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 비로 나타내었다. 간조직의 항산화활성은 간 조직 1 g을 1.5% KCl 용액으로 10% 균질액을 제조한 후 이를 100  $\mu$ L 취하여 상기와 동일한 방법에 따라 측정하였다.

#### (10) 혈청 및 간조직의 지질과산화물 함량 측정

혈청 중 지질과산화물 함량은 혈청 100  $\mu$ L에 1/12 N 황산용액과 10% phosphotungstic acid를 혼합하고 4,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 다음 침전물에 증류수 및 thiobarbituric acid(TBA) 시약을 각각 1 mL씩 가하여 95°C 수욕상에서 1시간 동안 반응시킨 후 생성된 지질과산화물을 butanol에 이행시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간조직의 지질과산화물 함량은 간 조직 1 g에 1.5% KCl 용액을 가하여 10% 균질액으로 만든 다음, 이를 0.5 mL를 취하여 3 mL의 1% phosphoric acid 및 1 mL의 0.6% TBA를 넣어 잘 혼합하였다. 이것을 95°C 수욕상에서 45분간 반응시킨 후 butanol를 가하여 발색물질을 추출한 다음 흡광도(OD<sub>535-520</sub>)를 측정하였다. 지질과산화물 함량은 1,1,3,3-tetraethoxypropane(TEP)을 이용하여 작성한 검량선으로부터 산출하였다.

#### (11) 간조직의 항산화 효소원 제조

간 조직 중 항산화효소 활성을 측정하기 위한 전처리 과정으로 액체 질소로 급냉동된 간 조직 2 g은 ice bath상에서 0.25 M sucrose와 0.5 mM EDTA를 포함하는 50 mM 인산 완충용액(pH 7.4) 10 mL를 가하여 Potter-Elvehjem tissue grinder로 마쇄한 후 10%(w/v) 균질액을 만들어 centrifuge(Mega 17R, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Inchun, Korea) 및 ultracentrifuge(Optima™ XL-100K, Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 효소원(mitochondria, cytosol 및 microsome 분획)을 분리하였다. 분리한 mitochondria와 microsome 분획물은 catalase 활성 측정, SOD(superoxide dismutase) 및 glutathione peroxidase(GSH-px)의 활성은 cytosol 분획물로 측정하였다.

#### (12) 항산화 효소 활성 측정

Catalase 활성은 0.1 mL의 간 효소원, 기질인 10.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mL 및 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 2.89 mL를 혼합하여 총 부피가 3 mL가 되도록 하였다. 이를 25°C의 수욕상에서 5분동안 반응시켰으며, 240 nm에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 흡광도 변화로 효소 활성을 측정하였고, 효소활성은 1분간 1  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시키는데 요구되는 효소량( $\mu$ mol/min/mg protein)으로 나타내었다.

SOD 활성은 추출한 시료액 0.05 mL에 Tris-HCl buffer(50 mM Tris+10 mM EDTA, pH 8.6)

1.4 mL와 15 mM pyrogallol 0.05 mL를 첨가하여 25°C에서 10분 동안 반응시킨 후 0.05 mL의 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 반응 용액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 효소원을 넣지 않고 반응시킨 15 mM pyrogallol 용액의 자동산화율 50% 억제하는 효소 활성(U/min/mg protein)으로 나타내었다.

GSH-px 활성은 1 mM EDTA를 함유한 100 mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.5 mL에 3 mM GSH, 20 mM  $\text{NaN}_3$ , GSSH reductase 0.72 U, NADPH 0.45 mM과 조효소 용액 0.04 mL를 넣어 37°C에서 5분간 반응시킨 후 0.45 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 가하여 340 nm에서 1 분동안 감소하는 흡광도를 측정하였으며, 비효소적 반응은 상기의 조건에서 0.45 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 가하지 않고 반응시켜 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 비효소적 반응에 의해 변화되는 흡광도를 감한 값으로 계산하였다.

### 11) 통계처리

반복 실험하여 얻은 결과는 SPSS 12.0 package를 사용하여 분산분석 하였으며, 결과는 평균  $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 각 시료의 분석결과에 대한 유의성 검정은 분산분석을 한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 개똥쑥의 생리활성 분석 및 유효물질의 규명

##### (1) 개똥쑥의 영양성분

개똥쑥 잎과 줄기의 영양성분을 분석한 결과는 Table 7과 같다. 수분, 조지방 및 조단백질 함량은 잎에서, 회분과 조섬유는 줄기에서 유의적으로 높은 함량이었다. 조단백질은 잎이 줄기에 비해 약 2배 정도 높았다.

개똥쑥을 꽃, 잎, 줄기 및 뿌리로 구분하여 일반성분을 분석한 보고(Brisibe EA et al, 2009)에서 수분, 회분 및 조단백질 함량은 잎에서 가장 높았으며, 특히 조지방은 잎이 줄기에 비해 약 3.2배 정도 높아 본 실험 결과와 비슷한 경향이었으나, 회분 함량은 줄기에 비해 잎에서 약 3배 정도 높게 측정되어 본 실험과는 다소 상반된 경향이였다. Lee와 Park(2001)은 참쑥과 강화약쑥에서 회분 함량이 9.4~11.8%, 조지방은 4.3~6.2%, 조단백질은 14.2~16.4%, 조섬유는 13.7~19.9%로 쑥의 일반적인 영양성분 중 조섬유의 함량이 대체로 높은 비율을 차지하는 것으로 보고하여 본 실험과도 일치하였다. 또한 Brisibe EA et al(2009)은 개똥쑥의 부위별 섬유소 함량을 분석한 결과 줄기 및 뿌리는 잎과 꽃보다 섬유소 함량이 높으며, 특히 소화성 섬유소의 비율이 높아 가축의 사료로써 이용가치가 있는 것으로 보고한 바 있다.

Table 7. Nutritional composition of *A. annua*

(%, dry basis)

Used part	Moisture	Ash	Crude lipid	Crude protein	Crude fiber
Leaves	12.53±0.59 <sup>*1)</sup>	11.23±0.13	11.23±0.22 <sup>*</sup>	9.36±0.12 <sup>*</sup>	23.31±1.49
Stems	10.27±0.13	13.31±0.18 <sup>*</sup>	6.80±0.63	4.71±0.13	30.18±1.16 <sup>*</sup>

<sup>1)</sup>Each value represents mean±SD, n=3

<sup>\*</sup>This superscripts are significantly different among the different sample by Student t-test at  $p < 0.05$ .

##### (2) 무기물

개똥쑥 잎과 줄기의 무기물 함량은 Table 8과 같으며, 잎에서 9종, 줄기에서 6종의 무기물이 검출되었다. 무기물 총량은 잎이 4,476.21 mg%, 줄기는 5,235.09 mg%로 줄기가 잎에 비해 약 1.2배 정도 높았는데, 이같은 데이터는 칼륨이 잎(2,910.38 mg%)에 비해 줄기(4,274.30 mg%)에서 약 1.5배 정도 높게 정량된 결과 때문이라 판단된다. 그 외 모든 무기물은 모두 잎에서 높은 함량을 보였으며, 영양학적으로 중요시 되는 칼슘은 잎과 줄기에서 각각 588.44 mg%, 390.24 mg%로 무기물 총량의 13.15% 및 7.45%를 차지하였다.

개똥쑥 중 12종의 무기물을 분석한 보고에서 잎이 줄기보다 무기물 함량이 높았으며(Brisibe EA et al, 2009), 이는 본 실험과 다소 상이한 결과로 가장 많은 비율을 차지한 칼륨의 함량이

본 실험 결과 줄기에서 상당히 높게 정량되었기 때문인 것으로 사료된다.

Table 8. Mineral contents of *A. annua*

Mineral	Leaves		Stems	
	Contents (mg%)	(%) <sup>1)</sup>	Contents (mg%)	(%)
K	2,910.38±52.59 <sup>2)</sup>	65.02	4,274.30±131.42	81.65
Ca	588.44±10.36	13.15	390.24±7.66	7.45
Mg	241.71±6.52	5.40	104.08±3.66	1.99
Na	83.14±3.53	1.86	51.77±2.81	0.99
Fe	95.47±1.48	2.13	ND <sup>3)</sup>	—
Mn	0.39±0.12	0.01	ND	—
Al	107.10±2.77	2.39	ND	—
P	447.44±5.55	9.99	413.17±4.59	7.89
Se	2.14±2.22	0.05	1.53±1.51	0.03
Total	4,476.21±85.14		5,235.09±151.65*	

<sup>1)</sup>Ratio to the total mineral contents

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3

<sup>3)</sup>ND: not detected

\*This superscripts are significantly different among the different sample by Student t-test at  $p < 0.05$ .

### (3) 방향족 화합물 함량 및 갈색도

개똥썩을 물 및 에탄올로 추출하였을 때, 추출 수율은 잎이 각각 7.94%와 15.00%, 줄기는 23.01%와 27.69%로 줄기에서 높았으며, 물보다 에탄올 추출시 수율이 더 높았다. 개똥썩 잎과 줄기 추출물의 방향족 화합물 함량(at 280 nm) 및 갈색도(at 420 nm)를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

각 추출물을 500 µg/mL 농도로 하여 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과, 잎 에탄올 추출물이 1.17로 가장 높았으며, 그 외 추출물에서는 0.37~0.54의 범위였다. 420 nm에서도 이와 유사한 경향으로 잎 에탄올 추출물에서 2.13으로 가장 높았으며, 그 외 추출물에서는 1.00 이하의 흡광도 값이었다. 본 실험에서 잎 에탄올 추출물의 흡광도 값이 유의적으로 높았으며 줄기 에탄올 추출물에서 가장 낮아 항산화능도 이와 같은 경향일 것으로 예상되나, 썩과 솔잎의 열수 및 70% 아세톤 추출물은 280 nm에서 갈색도와 전자공여능의 관계가 역상관관계인 것으로 보고된 바 있으므로(Kang YH et al, 1995) 시료 중의 방향족 화합물의 함량이나 갈색도가 항산화능과 일치하지는 않을 것으로 생각된다.



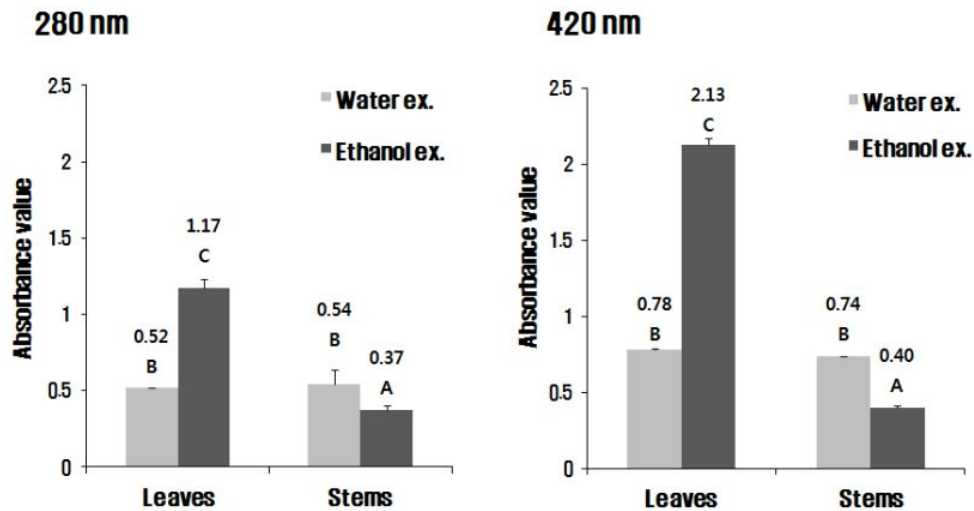


Fig. 2. Aromatic compounds index and browning intensity of *A. annua* extracts.

Each value represents mean $\pm$ SD, n=3.

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (4) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

개똥쑥 잎과 줄기 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 총 페놀 함량은 잎의 물 및 에탄올 추출물에서 각각 88.19 mg/g과 99.98 mg/g이었으며, 줄기에서는 각각 45.03 mg/g, 41.44 mg/g으로 줄기에 비해 잎에서 약 2배 정도 높은 함량이었다. 플라보노이드 함량은 총 페놀 함량과 유사한 경향으로 잎의 에탄올 추출물에서 51.86 mg/g으로 가장 높았으며, 줄기 에탄올 추출물에서는 18.55 mg/g이었다. 개똥쑥의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 잎의 경우 에탄올 추출물이 유의적으로 높았으나, 줄기는 물 추출물에서 다소 높았다.

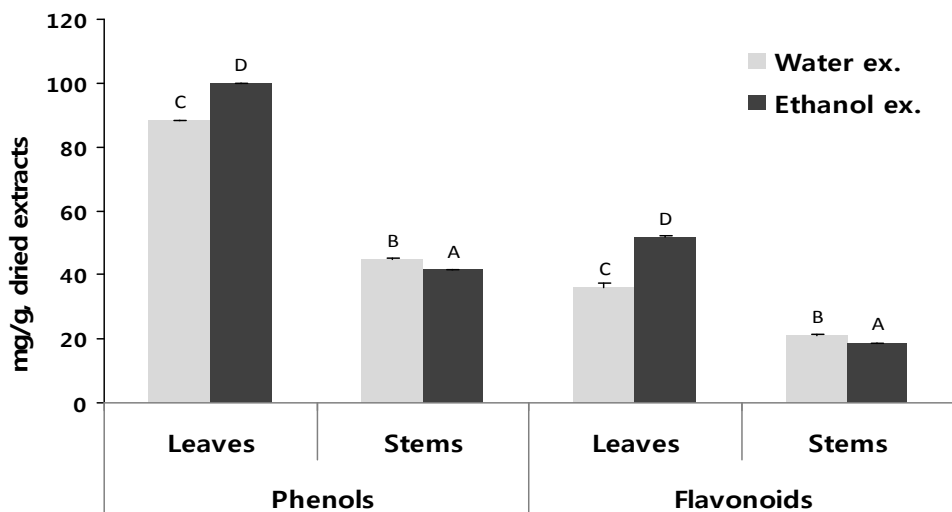


Fig. 3. Phenols and flavonoids contents of *A. annua* extracts.

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same item are significantly different at  $p < 0.05$ .

Choi SR et al(2008)은 사철쭉의 잎, 종실 및 줄기에서 총 페놀 함량을 측정한 결과, 잎 > 종실 > 줄기의 순으로 많았으며, 개똥쭉의 부위별 총 페놀 함량은 꽃대에서 가장 높았고 뿌리에서 가장 낮았으나, 잎은 줄기에 비해 약 2.7배 높은 함량을 보여(Brisibe EA et al, 2009) 본 실험 결과와 유사한 경향이였다.

(5) 라디칼 소거능

개똥쭉 추출물을 125, 250, 500, 1,000 및 2,000 µg/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 9와 같다. 반응액에 첨가된 시료의 농도가 증가됨에 따라 소거능은 유의적으로 상승하였다. 잎의 물 추출물(LW) 및 에탄올 추출물(LE)은 줄기 추출물(SW, SE)에 비해 모든 농도에서 높은 소거능을 보였으며, 잎 추출물은 250 µg/mL 농도에서 60% 이상이었고, 줄기 추출물은 1,000 µg/mL 농도에서 50%이상의 소거능을 보였다. 특히, 개똥쭉 잎 에탄올 추출물(LE)의 IC<sub>50</sub> 값은 147.15 µg/mL로 DPPH 라디칼 소거능이 가장 높았으며 줄기 에탄올 추출물이 776.92 µg/mL로 소거능이 가장 낮았다.

Table 9. DPPH radical scavenging activity of *A. annua* extracts

Sample code <sup>1)</sup>	Concentration (µg/mL)					IC <sub>50</sub> values (µg/mL)
	125	250	500	1,000	2,000	
LW	44.00±2.45 <sup>aC2)</sup>	63.03±1.64 <sup>bC</sup>	86.28±0.70 <sup>cB</sup>	88.81±0.53 <sup>dC</sup>	92.52±1.95 <sup>eD</sup>	170.91±4.27
LE	45.68±0.73 <sup>aC</sup>	69.98±1.88 <sup>bD</sup>	87.77±1.71 <sup>cB</sup>	87.71±1.99 <sup>cC</sup>	87.41±2.53 <sup>cC</sup>	147.15±2.23
SW	22.70±1.92 <sup>aB</sup>	22.65±3.72 <sup>aA</sup>	44.08±5.18 <sup>bA</sup>	60.13±0.92 <sup>cB</sup>	74.59±2.31 <sup>dA</sup>	585.98±10.97
SE	19.39±3.06 <sup>aA</sup>	25.92±0.79 <sup>bB</sup>	41.77±2.55 <sup>cA</sup>	57.13±1.17 <sup>dA</sup>	77.78±1.37 <sup>eB</sup>	776.92±12.95

<sup>1)</sup>LW: water extract from leaves of *A. annua*, LE: ethanol extract from leaves of *A. annua*, SW: water extract from stems of *A. annua*, SE: ethanol extract from stems of *A. annua*

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

Choi SR et al(2008)은 사철쭉 잎, 종실 및 줄기 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 결과 잎 추출물이 종실 및 줄기 추출물보다 높은 소거능을 보였는데, 잎 추출물에서 페놀함량이 높았기 때문이라고 추정된 바 있다. 이러한 결과는 약쭉의 용매별 분획물 중 페놀 및 플라보노이드 함량이 높았던 ethyl acetate 분획물이 여타 분획물에 비해 항산화능 및 지질과산화 억제능이 높았다는 보고(Hong JH et al, 2007)와도 잘 일치한 결과였다. 또한 쭉의 물 및 에탄올 추출물의 전자공여능이 에탄올 추출물에서 더 우수하였다는 보고(Park CS et al, 2002)는 본 실험

과도 잘 일치한 결과였다.

개똥쑥 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성 측정 결과는 Table 10과 같다. ABTS 라디칼 소거활성은 첨가된 시료의 농도가 증가됨에 따라 유의적으로 상승하였다. 개똥쑥 잎의 물 추출물(LW) 및 에탄올 추출물(LE)은 개똥쑥 줄기의 물 추출물(SW) 및 에탄올 추출물(SE)에 비해 모든 농도에서 유의적으로 높은 소거활성을 나타내었으며, 2,000 µg/mL 농도에서는 LW, LE 및 SW 간에 유의차를 보이지 않아 활성이 유사한 것으로 보였다. 반면에, IC<sub>50</sub>값을 비교할 경우 잎 에탄올 추출물(LE)은 줄기 물 추출물(SW)에 비해 약 66.8%정도로 라디칼 소거활성이 높았다.

NO 라디칼 소거활성은 Table 11에 나타낸 바와 같이 추출물의 첨가농도에 따라 증가하는 경향이었으나, 줄기 물 추출물(SW)은 125 µg/mL 농도에서 LW 및 LE에 비해 유의차를 보이지 않았으며, 250~500 µg/mL 농도에서는 유의적으로 높은 소거활성을 보였다. 또한 1,000~2,000 µg/mL 농도에서는 LE와 활성이 유사하였다.

Choi YM et al(2006)은 여러 종류의 쑥으로부터 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 많은 시료에서 소거활성이 높았다고 보고하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼 소거활성과 상관성이 높으며 그 유효 물질이 페놀 화합물에 연유된다는 보고(Choi YM et al, 2003)로 볼 때, 본 실험 결과의 라디칼 소거활성도 총 페놀 및 플라보노이드 함량에 의존적일 것으로 판단된다. 또한 서로 다른 라디칼을 이용한 항산화 활성의 측정에서 소거활성의 차이는 시료의 산화환원 및 라디칼의 화학 구조적 차이에 의한 것으로 알려져 있는데(Gardner PT et al, 1998), 개똥쑥 추출물의 NO 라디칼 소거활성은 ABTS 라디칼 소거활성과 유사한 기작에 의해서 일어나며, 활성의 차이는 반응기질의 조건이나 라디칼의 종류에 기인하는 것으로 생각된다.

Table 10. ABTS radical scavenging activity of *A. annua* extracts

(%)

Sample code <sup>1)</sup>	Concentration (µg/mL)					IC <sub>50</sub> values (µg/mL)
	125	250	500	1,000	2,000	
LW	36.32±2.59 <sup>aC2)</sup>	55.69±1.71 <sup>bC</sup>	83.83±1.91 <sup>cC</sup>	96.83±1.18 <sup>dD</sup>	97.71±1.06 <sup>dB</sup>	224.41±1.73
LE	38.20±2.60 <sup>aC</sup>	64.62±0.79 <sup>bD</sup>	84.44±1.22 <sup>cC</sup>	92.72±1.13 <sup>dC</sup>	95.97±1.91 <sup>eB</sup>	179.25±3.49
SW	25.33±1.62 <sup>aB</sup>	30.12±1.31 <sup>bB</sup>	47.84±1.59 <sup>cB</sup>	66.28±1.80 <sup>dB</sup>	96.30±1.76 <sup>eB</sup>	540.61±10.55
SE	16.60±2.50 <sup>aA</sup>	25.83±3.51 <sup>bA</sup>	32.91±1.96 <sup>cA</sup>	50.91±0.53 <sup>dA</sup>	74.02±3.80 <sup>eA</sup>	974.40±9.98

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

IC<sub>50</sub> values were defined as the concentration which inhibits 50% of biological activity.

Table 11. NO radical scavenging activity in of *A. annua* extracts

(%)

Sample code <sup>1)</sup>	Concentration (µg/mL)					IC <sub>50</sub> values (µg/mL)
	125	250	500	1,000	2,000	
LW	25.91±1.74 <sup>aB2)</sup>	31.85±1.15 <sup>bB</sup>	33.27±1.96 <sup>bB</sup>	38.57±1.24 <sup>cB</sup>	48.27±1.02 <sup>dB</sup>	2,000 < <sup>3)</sup>
LE	26.42±1.76 <sup>aB</sup>	28.22±1.06 <sup>aA</sup>	30.85±0.86 <sup>bB</sup>	40.65±1.29 <sup>cBC</sup>	50.54±1.18 <sup>dC</sup>	1937.56±16.44
SW	28.74±1.30 <sup>aB</sup>	37.10±0.85 <sup>bC</sup>	39.31±0.75 <sup>cC</sup>	42.58±0.48 <sup>dC</sup>	49.95±1.27 <sup>eBC</sup>	2,000 <
SE	22.76±1.68 <sup>aA</sup>	27.19±0.63 <sup>bA</sup>	27.02±1.83 <sup>bA</sup>	29.46±1.78 <sup>bA</sup>	33.50±0.68 <sup>cA</sup>	2,000 <

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>3)</sup>50% inhibition was not appeared at concentrations(125~2,000 µg/mL) of *A. annua* extracts.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

#### (6) 환원력

개똥쑥의 잎과 줄기 추출물의 환원력은 Fig. 4와 같이 모든 시료에서 농도 의존적으로 환원력이 증가하였다. 잎은 줄기에 비해 흡광도 값이 2배 이상 높게 측정되었는데, 흡광도 값이 0.5에 이르는 추출물의 농도는 잎 에탄올 추출물에서 284.60 µg/mL, 물 추출물에서 355.00 µg/mL이었으며, 줄기 추출물은 1,000 µg/mL이상으로 LE > LW > SE > SW의 순으로 환원력이 높았다.

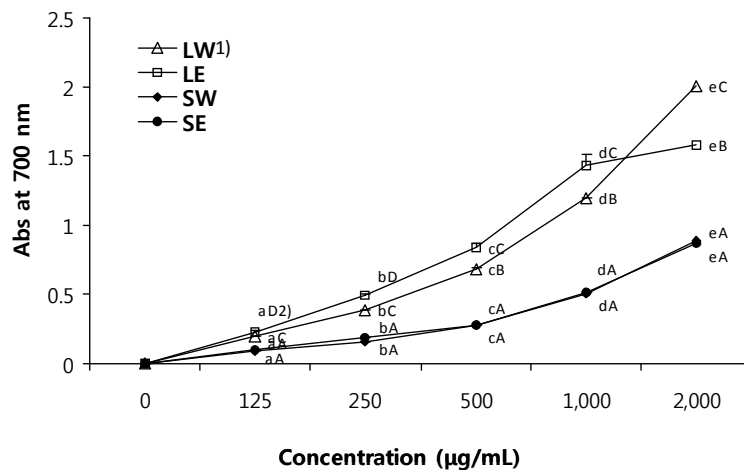


Fig. 4. Reducing power of *A. annua* extracts.

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 5.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same extract are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same concentration are significantly different at  $p<0.05$ .

시료의 환원력은 전자공여를 통한 라디칼의 소거능과 관련성이 높기 때문에 DPPH 라디칼 소거능이 높은 시료가 환원력도 높으며(Gordon MF, 1990), 이 또한 시료 중의 페놀 화합물의 함량에 의존적이라고 알려져 있다(Tabart J et al, 2009).

(7) FRAP법에 의한 항산화 활성

개똥썩 추출물의 FRAP 측정 결과를 FeSO<sub>4</sub> 당량으로 나타낸 결과는 Table 12와 같다. 첨가된 추출물의 농도에 의존적으로 활성이 유의적으로 증가하였으나, 잎 에탄올 추출물(LE)의 경우에는 1000~2000 µg/mL의 농도에서 133.58~136.96 µM로 유의차를 보이지 않았다. 1000 µg/mL 이상의 농도에서 FRAP 활성은 줄기 물 추출물(SW)이 유의적으로 가장 높았고, 다음으로 잎 에탄올 추출물(LE)이었으나, 그 차이가 작아 LE는 SW와 FRAP 활성이 비슷한 것으로 여겨진다.

FRAP법에 의한 항산화 활성은 산화반응의 촉매제로 작용하는 금속이온을 환원시키는 효력을 의미하는데, 시료의 환원력은 전자공여를 통한 라디칼의 소거활성결과도 관련이 높으며(Gordon MF, 1990), 시료 중에 함유된 페놀 화합물의 함량에 대한 의존도가 높은 것으로 보고되어 있다(Tabart J et al, 2009). 또한 Lee HR et al(2008)은 시판 포도주스에서 총 페놀 함량과 FRAP법에 의한 항산화 활성과의 상관계수가 0.97이상으로 총 페놀 함량이 많을수록 항산화 활성이 높다고 보고한 바 있는데, 비름과 식물류 추출물의 경우에는 총 페놀 함량과 FRAP법에 의한 항산화 활성과의 상관관계가 0.48, DPPH 라디칼 소거활성과의 상관관계는 0.20으로 총 페놀 함량과 항산화 활성과의 관련성이 낮다는 보고(Nsimba RY et al, 2008)도 있다. 이러한 결과는 시료의 총 페놀 함량이 높더라도 ascorbic acid, phytic acid, sterol, saponin, carotenoid 등의 비 페놀성 물질이 항산화 활성의 주된 물질로 작용되기 때문이라고 보고되어 있는데(Nsimba RY et al, 2008), 본 실험 결과도 이와 관련성이 있을 것으로 추정된다.

Table 12. Ferric reducing antioxidant power of *A. annua* extracts

(FeSO<sub>4</sub> eq µM)

Sample code <sup>1)</sup>	Concentration (µg/mL)					IC <sub>50</sub> values (µg/mL)
	125	250	500	1,000	2,000	
LW	16.87±0.37 <sup>aA2)</sup>	24.90±0.15 <sup>bA</sup>	37.09±0.17 <sup>cA</sup>	54.53±0.71 <sup>dA</sup>	71.73±8.68 <sup>eA</sup>	2,000 < <sup>3)</sup>
LE	34.88±0.91 <sup>aC</sup>	58.51±1.08 <sup>bC</sup>	99.64±0.83 <sup>cD</sup>	133.58±0.66 <sup>dC</sup>	136.96±0.50 <sup>dC</sup>	1937.56±16.44
SW	35.31±1.63 <sup>aC</sup>	58.84±2.19 <sup>bC</sup>	92.88±1.05 <sup>cC</sup>	136.48±0.71 <sup>dD</sup>	143.59±1.41 <sup>eD</sup>	2,000 <
SE	19.40±0.19 <sup>aB</sup>	30.20±0.10 <sup>bB</sup>	49.87±28.09 <sup>cB</sup>	78.76±0.74 <sup>dB</sup>	124.06±0.96 <sup>eB</sup>	2,000 <

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at *p*<0.05.

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at *p*<0.05.

### (8) Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성

체내 세포에서 지질 및 단백질의 산화를 촉진하는 Fe<sup>+2</sup>과 같은 금속이온 인자에 대하여 개똥쭉 추출물의 킬레이팅 활성을 측정한 결과는 Table 13과 같다. 모든 시료에서 추출물의 첨가 농도에 의존적으로 활성이 증가하였으며, 잎과 줄기의 물 추출물은 에탄올 추출물에 비해 월등히 높았는데, IC<sub>50</sub>값은 잎 물 추출물(LW)에서 265.98 µg/mL, 줄기 물 추출물(SW)에서 785.60 µg/mL이었으나, 잎과 줄기의 에탄올 추출물(LE, SE)은 1,000 µg/mL이상으로 물 추출물에서 Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성이 다소 높았다.

항산화성 물질에 의한 Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성은 활성산소종의 생성을 억제하여 세포의 산화적 손상을 막고, 지질 과산화물의 생성에 촉매 역할을 하는 전이 금속의 농도를 낮추므로 금속 이온의 킬레이팅 활성은 중요한 항산화 기작으로 알려져 있는데(Duh PD et al, 1999), 이는 금속 이온을 제거하는 물질과 라디칼을 소거하는 물질이 다르며, 유리 라디칼을 소거할 수 있는 페놀 화합물의 함량은 높으나, 금속이온을 포집할 수 있는 물질의 함량이 낮기 때문이라고 추정된 바 있다(Woo JH et al, 2010). 이는 본 연구결과에서 개똥쭉 추출물의 ABTS 및 NO 라디칼 소거활성이 여타 추출물에 비해 높은 반면, Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성이 낮았던 점과 유사한 결과라 사료된다.

Table 13. Fe<sup>+2</sup> chelating activity of *A. annua* extracts

(%)

Sample code <sup>1)</sup>	Concentration (µg/mL)					IC <sub>50</sub> values (µg/mL)
	125	250	500	1,000	2,000	
LW	20.45±1.10 <sup>aC)2)</sup>	55.32±0.10 <sup>bD</sup>	87.44±0.46 <sup>cC</sup>	96.29±0.78 <sup>dD</sup>	98.73±0.49 <sup>eD</sup>	265.98±1.57
LE	0.27±0.00 <sup>aA</sup>	4.00±0.08 <sup>bA</sup>	8.65±0.92 <sup>cA</sup>	28.99±1.42 <sup>dB</sup>	52.47±0.92 <sup>eA</sup>	1868.45±39.29
SW	11.20±2.21 <sup>aB</sup>	34.88±1.33 <sup>bC</sup>	46.37±0.76 <sup>cB</sup>	61.32±0.57 <sup>dC</sup>	94.21±1.07 <sup>eC</sup>	785.60±15.10
SE	2.30±0.69 <sup>aA</sup>	9.01±2.01 <sup>bB</sup>	9.31±1.85 <sup>bA</sup>	20.35±0.09 <sup>cA</sup>	82.52±1.37 <sup>dB</sup>	1382.45±10.55

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at *p*<0.05.

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at *p*<0.05.

### (9) Tyrosinase 저해활성

개똥쭉의 미백효과를 간접적으로 측정하기 위한 일환으로 개똥쭉 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 개똥쭉의 부위별 에탄올 추출물(LE, SE)은 물 추출물(LW, SW)에 비해 높은 저해활성을 보여 2000 µg/mL 농도에서 각각 71.30%와 61.76%이었으나, 물 추출물의 활성은 50% 미만에 불과하였다. IC<sub>50</sub> 값은 잎과 줄기 에탄올 추출물에서 각각 338.17

µg/mL 및 448.36 µg/mL이었으며, 물 추출물은 2000 µg/mL 이상이였다.

생숙은 건조숙에 비해 tyrosinase 저해활성이 높았으며, 생숙의 hexane 및 chloroform 분획물은 10,000 µg/mL 농도에서 각각 96.7%와 98.9%의 저해활성을 보였다는 보고가 있다(Kwak JH et al, 2001). Hyun SH et al(2007)은 비숙 70% 메탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 10,000 µg/mL 농도에서 33.40%의 활성을 보였다고 보고하였다.

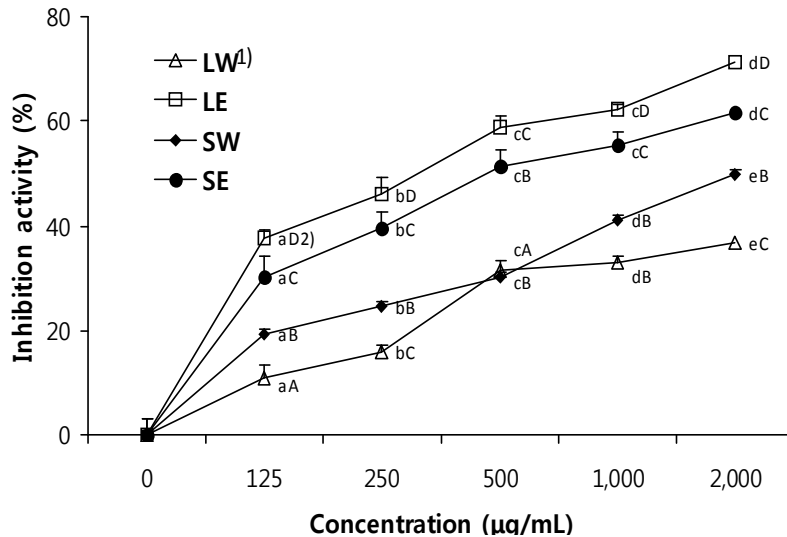


Fig. 5. Tyrosinase inhibition activity of *A. annua* extracts.

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same extract are significantly different at  $p < 0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same concentration are significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (10) α-Glucosidase 저해활성

개똥숙 잎과 줄기의 α-glucosidase 저해활성은 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 농도 의존적으로 저해활성이 증가하였다. 줄기 에탄올 추출물(SE)은 모든 실험 농도에서 56.25~86.49%의 범위로 가장 활성이 높았고, 다음으로 줄기 물 추출물(SW)이 43.00~84.13%의 저해활성을 보여 항산화능 및 tyrosinase 저해활성의 결과와는 달리 줄기 추출물이 잎 추출물에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내어 IC<sub>50</sub> 값은 줄기 물 추출물이 220.56 µg/mL이었으며, 줄기 에탄올 추출물은 125 µg/mL 미만에서도 50%이상의 저해활성을 보였다. 따라서 개똥숙 줄기 추출물은 탄수화물의 소화과정에서 α-glucosidase에 의한 당당류 생성을 저해함으로써 식후 혈당이 급격히 상승하는 작용을 효과적으로 감소시킬 수 있을 것으로 예측된다.

식물류의 페놀 및 플라보노이드 물질은 구조적 특징에 따라 항당뇨 활성에 차이를 보이는 것으로 알려져 있다(Sharma B et al, 2008). 더욱이 당뇨 쥐에게 썩 추출물을 급이함으로써 나타난 혈당강하와 체중감소 저해효과는 시료에 의해 말초조직에서 당 이용성이 증가되었기 때

문으로 보고된 바 있는데(Tastekin D et al, 2006), 본 실험결과 개똥쑥의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 생체 내 항당뇨 활성에도 유효할 것으로 예상되며, 이는 개똥쑥 줄기에 함유된 섬유소의 함량과도 관련성이 높을 것으로 생각된다.

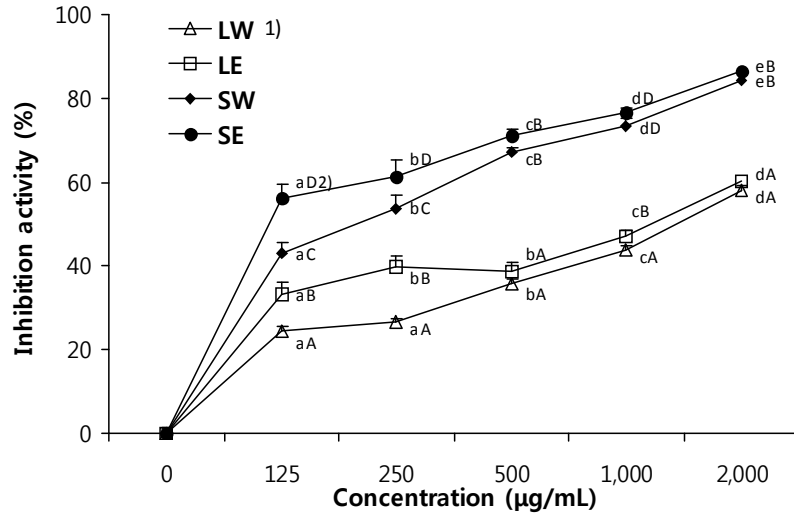


Fig. 6.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition activity of *A. annua* extracts.

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean $\pm$ SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same extract are significantly different at  $p < 0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same concentration are significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (11) 암세포 증식억제 활성

개똥쑥 물 및 에탄올 추출물의 암세포 증식억제 활성을 알아보기 위하여 유방암 세포 (MCF-7), 자궁경부 상피암 세포 (HeLa) 및 위암세포 (AGS)를 이용하여 MTT assay를 하였으며, 추출물을 첨가하지 않은 대조구에 대한 개똥쑥 추출물이 암세포의 증식에 미치는 영향을 Table 14, 15 및 16에 나타내었다. 또한 대조군과 실험군의 암세포 모양 변화를 관찰하기 위하여 위상차 현미경으로 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

##### ① MCF-7 cell에 대한 증식억제 활성

개똥쑥 잎과 줄기 추출물이 인체 유방암 세포인 MCF-7의 증식억제 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출물의 농도를 62.5, 125, 250 및 500  $\mu\text{g/mL}$ 로 달리하여 MTT assay를 하였다 (Table 14). 개똥쑥의 MCF-7 세포에 대한 증식억제 활성은 추출물의 첨가 농도가 증가함에 따라 유의적으로 상승하였으며, 250  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 잎 에탄올 추출물 (LE)은 70% 이상, 줄기 에탄올 추출물은 51.97%의 활성을 보였는데, 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 잎 과 줄기 에탄올 추출물 모두 70% 이상의 활성을 보였다. 반면에 물 추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서도 50% 미만의 활성이었으며, 잎과 줄기 추출물간에 유의적인 차이가 없었다.



Table 14. Growth inhibition rates of *A. annua* extracts on MCF-7 human breast adenocarcinoma cell

(%)

Sample code <sup>1)</sup>	Concentration (µg/mL)				IC <sub>50</sub> values (µg/mL)
	62.5	125	250	500	
LW	24.65±2.76 <sup>aA2)</sup>	27.26±2.73 <sup>aA</sup>	47.07±2.78 <sup>bB</sup>	49.00±0.17 <sup>bA</sup>	453.35±8.68
LE	26.92±0.73 <sup>aA</sup>	30.20±4.91 <sup>aA</sup>	76.26±1.48 <sup>bD</sup>	76.44±0.03 <sup>bC</sup>	209.12±0.50
SW	20.36±5.32 <sup>aA</sup>	28.18±2.91 <sup>bA</sup>	38.83±1.46 <sup>cA</sup>	49.09±0.14 <sup>dA</sup>	500 < <sup>3)</sup>
SE	25.05±2.85 <sup>aA</sup>	43.24±1.14 <sup>bB</sup>	51.97±0.93 <sup>cC</sup>	72.68±0.30 <sup>dB</sup>	256.68±5.90

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>3)</sup>50% inhibition was not appeared at concentrations(62.5~500 µg/mL) of *A. annua* extracts.

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

### ② HeLa cell에 대한 증식억제 활성

인체 자궁경부 상피암 세포인 HeLa에 대한 증식억제 활성은 Table 15와 같이 첨가된 시료의 농도가 증가됨에 따라 활성이 유의적으로 증가하였다. 개똥쑥의 부위별 에탄올 추출물(LE, SE)은 물 추출물(LW, SW)에 비해 모든 농도에서 증식억제 활성이 높았으며, 잎 에탄올 추출물(LE)은 250 µg/mL 농도에서 50% 이상의 활성을 보였고 500 µg/mL 농도에서는 60% 이상의 활성을 보였으나, 여타 추출물의 활성은 500 µg/mL에서도 50% 미만이었다. IC<sub>50</sub> 값은 잎 에탄올 추출물(233.64 µg/mL)을 제외한 나머지 추출물에서 500 µg/mL 이상으로 확인되었다.

### ③ AGS cell에 대한 증식억제 활성

인체 위암 세포인 AGS에 대한 증식억제 활성은 Table 16와 같다. 시료의 첨가 농도에 증가할수록 활성은 유의적으로 상승하였으며, 개똥쑥 부위별 에탄올 추출물(LE, SE)은 물 추출물(LW, SW)에 비해 높은 증식억제 활성을 보였다. 특히, 잎 에탄올 추출물(LE)은 모든 농도에서 활성이 가장 높아 IC<sub>50</sub> 값이 368.00 µg/mL인 반면, 여타 추출물은 500 µg/mL 이상이었다.

Jung MJ et al(2008)은 인진쑥 메탄올 추출물이 300 µg/mL 농도에서 인체 위암세포 NCI-N87 및 결장암 세포 HT-29에 대하여 각각 67.15%와 48.72%의 증식억제 활성을 보였으며, 항암제인 paclitaxel(5 µg/mL)은 37.96% 및 68.02%의 억제활성 보였다고 보고하였다. Xu Q et al(1989)은 쑥의 수용성 추출물이 종양 괴사인자를 활성화시킨다고 하였으며, 이러한 효과는 시료 중에 함유된 페놀 화합물에 의한 것으로 보고된 바 있다. Singh와 Lai(2001)는 개똥쑥의 artemisinin이 유방암 세포를 선택적으로 괴사시킨다고 하였다.

Table 15. Growth inhibition rates of *A. annua* extracts on HeLa human cervix epitheloid carcinoma cell

(%)

Sample code <sup>1)</sup>	Concentration (µg/mL)				IC <sub>50</sub> values (µg/mL)
	62.5	125	250	500	
LW	31.07±0.95 <sup>aA2)</sup>	36.48±0.47 <sup>bB</sup>	41.57±1.06 <sup>cB</sup>	44.37±0.42 <sup>dB</sup>	500 < <sup>3)</sup>
LE	37.10±4.02 <sup>aB</sup>	49.71±1.04 <sup>bD</sup>	54.59±1.61 <sup>cD</sup>	61.07±1.38 <sup>dD</sup>	233.64±6.69
SW	28.64±1.00 <sup>aA</sup>	31.85±0.02 <sup>bA</sup>	33.78±0.84 <sup>cA</sup>	40.66±0.54 <sup>dA</sup>	500 <
SE	31.57±0.82 <sup>aA</sup>	41.75±0.57 <sup>bC</sup>	44.06±1.13 <sup>cC</sup>	49.22±0.94 <sup>dC</sup>	500 <

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>3)</sup>50% inhibition was not appeared at concentrations(62.5~500 µg/mL) of *A. annua* extracts.

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at *p*<0.05.

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at *p*<0.05.

Table 16. Growth inhibition rates of *A. annua* extracts on AGS human stomach adenocarcinoma cell

(%)

Sample code <sup>1)</sup>	Concentration (µg/mL)				IC <sub>50</sub> values (µg/mL)
	62.5	125	250	500	
LW	14.00±0.67 <sup>aA2)</sup>	23.19±3.75 <sup>bB</sup>	29.10±0.54 <sup>cB</sup>	35.10±1.84 <sup>dA</sup>	500 < <sup>3)</sup>
LE	27.76±1.12 <sup>aB</sup>	38.74±0.60 <sup>bC</sup>	43.52±1.19 <sup>cC</sup>	57.24±0.40 <sup>dC</sup>	368.00±2.60
SW	13.93±2.38 <sup>aA</sup>	16.72±0.57 <sup>bA</sup>	24.11±1.59 <sup>cA</sup>	33.58±3.54 <sup>cA</sup>	500 <
SE	13.14±0.81 <sup>aA</sup>	22.29±1.92 <sup>bB</sup>	27.85±1.29 <sup>cB</sup>	41.75±0.57 <sup>dB</sup>	500 <

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>3)</sup>50% inhibition was not appeared at concentrations(62.5~500 µg/mL) of *A. annua* extracts.

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at *p*<0.05.

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at *p*<0.05.

또한 쑥의 물 및 에탄올 추출물은 500 µg/mL의 농도에서 인체 폐암세포인 A549에 대해 22% 및 22.5%, 유방암 세포인 MDA에서는 30% 및 27%로 물 추출물에서 증식억제 활성이 다소

높은 것으로 보고되어 있다(Park CS & Kim ML, 2006). 본 실험 결과와는 다소 상이한 경향이었는데, 이는 시료의 종류에 따른 차이로 해석된다. 본 연구에서도 개똥쑥 추출물이 암세포 증식 억제 효과가 높게 나타나는 것으로 보아 비록 암세포주의 종류는 다르나 국화과 식물이 인체 암세포주에 강한 활성이 있는 것으로 추정된다.

(12) 암세포의 형태학적 변화

개똥쑥 잎과 줄기 추출물 중 암세포 증식억제 활성이 가장 높게 나타난 잎 에탄올 추출물(LE)을 MCF-7, HeLa 및 AGS 세포에 125 및 500  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하여 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 7, 8 및 9와 같다.

무처리군의 암세포는 배양용기에 안정적으로 부착되어 조밀하게 증첩되어 증식이 이루어진 모습이였다. 반면, 개똥쑥 잎 에탄올 추출물(LE)을 첨가 하였을 경우 세포의 결속력이 감소되어 일정한 모양을 잃고 세포가 배양용기에서 떨어져 배지에 부유하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 무처리군에 비하여 세포의 밀도와 수가 시료 처리구에서 급격히 감소하였다.

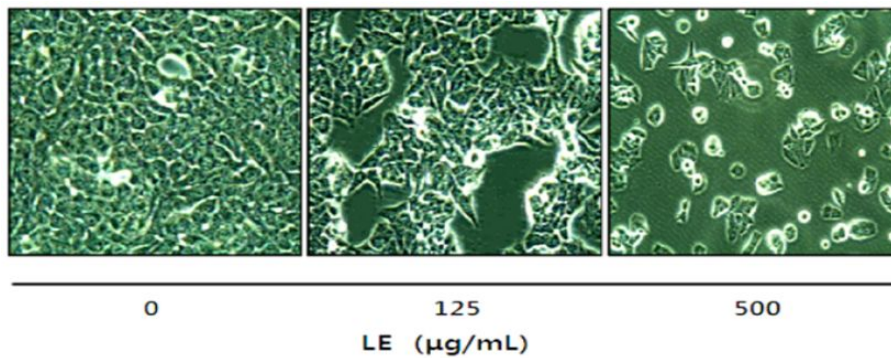


Fig. 7. Morphological changes of MCF-7 human breast adenocarcinoma cell by ethanol extract of leaves in *A. annua* treatment.

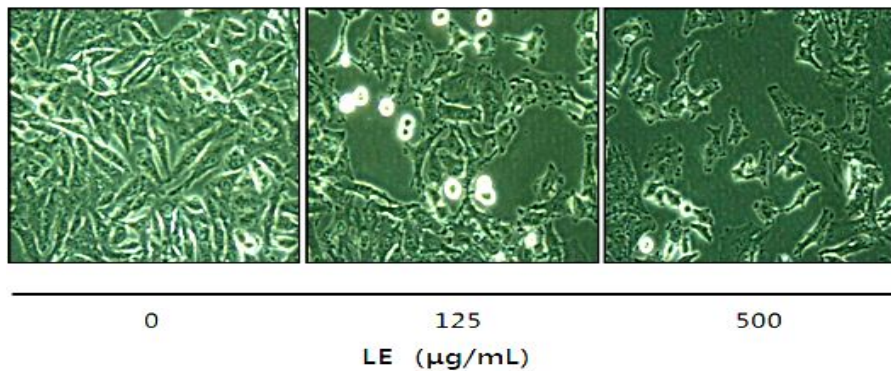


Fig. 8. Morphological changes of HeLa human cervix epitheloid carcinoma cell by ethanol extract of leaves in *A. annua* treatment.

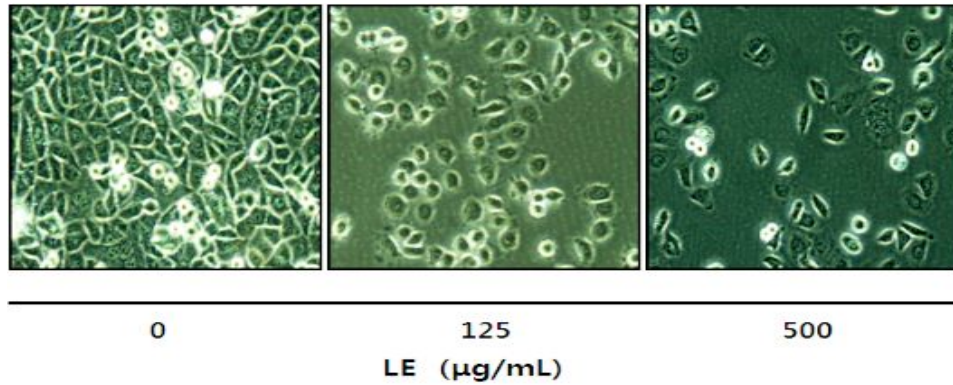


Fig. 9. Morphological changes of AGS human stomach adenocarcinoma cell by ethanol extract of leaves in *A. annua* treatment.

(13) HPLC에 의한 페놀 화합물의 분석·동정

HPLC를 이용하여 개똥쭉 추출물의 페놀 화합물을 phenolic acid, flavonol 및 catechin류로 분류하여 분석한 결과는 Table 16, 17 및 18과 같다. Phenolic acid는 Table 16과 같이 12종의 화합물이 동정되었으며, 줄기(SW, SE)에 비해 잎 추출물(LW, LE)에서 총량이 2,857.36 mg/kg, 2,327.66 mg/kg으로 약 5.4~6.7배 정도 높게 정량되었다.

Table 16. The contents of phenolic acid compounds in *A. annua* extracts

(mg/kg, dry basis)

Phenolic acids	LW <sup>1)</sup>	LE	SW	SE
Gallic acid	59.93	— <sup>2)</sup>	25.72	18.98
Protocatechuic acid	238.87	215.48	56.79	60.21
Gentisic acid	50.20	—	—	—
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	103.35	77.44	25.42	45.48
Vanillic acid	241.84	148.92	55.00	87.99
Caffeic acid	102.13	207.97	45.82	150.60
Chlorogenic acid	884.59	129.54	46.99	—
Salicylic acid	669.31	597.10	—	—
<i>p</i> -Coumaric acid	113.56	44.04	19.84	—
Sinapic acid	392.58	839.87	152.11	—
Ferulic acid	—	62.11	—	60.97
<i>t</i> -Cinnamic acid	—	7.19	—	—
Total	2,857.36	2,327.66	427.69	424.23

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Table 9.

<sup>2)</sup>Not detected.

Table 17. The contents of flavonol compounds in *A. annua* extracts

(mg/kg, dry basis)

Flavonols	LW <sup>1)</sup>	LE	SW	SE
Rutin	– <sup>2)</sup>	266.21	–	–
Quercetin	202.11	106.89	–	–
Kaempferol	–	21.84	–	–
Total	201.11	394.94	–	–

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Fig. 2.

<sup>2)</sup>Not detected.

Flavonol류는 총 3종을 동정하였는데, 잎 에탄올 추출물(LE)에서 3종 모두 검출되었으며, 잎의 물 추출물(LW)에서는 quercetin만이 확인되었다. 반면에 줄기 추출물에서는 검출되지 않았다(Table 17). Catechin류는 7종을 동정하였으며, 잎 에탄올 추출물(LE)은 타 시료에 비해 1.7~2.7배 정도 높게 정량되었으며, 물 추출물은 잎과 줄기에서 비슷한 함량이었다. 특히, 잎 에탄올 추출물(LE)에서 epicatechin gallate, catechin 및 gallic acid의 함량이 타 시료에 비해 월등히 높았으며, epicatechin gallate는 총량의 약 48.6%를 차지하였다(Table 18).

녹차의 항산화 활성은 catechin류 함량에 의존적이며, catechin 성분 중 epicatechin, epicatechin gallate 및 epigallocatechin gallate 등이 항산화 활성에 영향을 주는 주요 성분으로 보고된 바 있는데(Lee MJ et al, 2007), 개똥쑥 추출물의 항산화 활성도 이들 catechin류와 관련성이 높은 것으로 판단된다.

Table 18. The contents of catechin compounds in *A. annua* extracts

(mg/kg, dry basis)

Catechins	LW <sup>1)</sup>	LE	SW	SE
Epigallocatechin	416.72	327.29	217.24	–
Catechin	2083.59	3704.16	544.07	1675.18
Epicatechin	3014.29	1201.39	439.48	457.15
Epigallocatechin gallate	– <sup>2)</sup>	252.30	151.09	263.58
Gallic acid	881.30	1272.48	349.40	618.94
Epicatechin gallate	–	7930.79	1074.90	4982.66
Catechin gallate	30.13	1625.77	3264.81	1377.84
Total	6,425.03	16,314.18	6,040.99	9,375.35

<sup>1)</sup>Refer to the comment in Fig. 2.

<sup>2)</sup>Not detected.

쑥속의 식물은 다양한 플라보노이드를 함유하고 있으며, 참쑥 전초의 에탄올 추출물은 21가지의 플라보노이드 성분이 분리·동정된 바 있는데, 이들 물질은 쥐 간의 마이크로솜에 대하여 지질과산화 억제효과를 나타내었으며, 비타민 E보다 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다(Lee SJ et al, 1999). 사철쑥의 용매별 생리활성을 분석한 결과에서도 메탄올 추출물이 여타 추출물보다 항산화 활성이 높았는데, 시료 중의 페놀 화합물에 의존적이며 chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid 및 3,4-dicaffeoylquinic acid 등의 페놀 화합물이 동정되었다고 보고되어 있다(Seo HC et al, 2003).

본 연구에서 개똥쑥 추출물은 항산화 및 암세포 증식억제 활성이 높은 것으로 확인되었으며, 이들의 활성은 시료 중의 페놀 화합물에 대한 의존성이 높으나, 그 외 미지의 물질도 관여하는 것으로 추정되며, 향후 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

## 2) 흑마늘의 추출조건별 생리활성 스크리닝

### (1) 흑마늘 추출물의 수율

Fig. 10은 흑마늘을 에탄올의 농도를 달리하고 추출 온도 및 시간을 달리한 조건에서 추출한 후 추출 수율을 측정한 결과는 Fig. 10과 같다. No. 10 추출물(90°C, 9시간, 50% EtOH)에서 수율이 157%로 가장 높았는데 반하여 No. 14 추출물(70°C, 9시간, 100% EtOH)은 32%로 가장 낮았다. No. 14 추출물은 추출 용매 100% 에탄올로 수율이 낮은 것으로 추정된다.

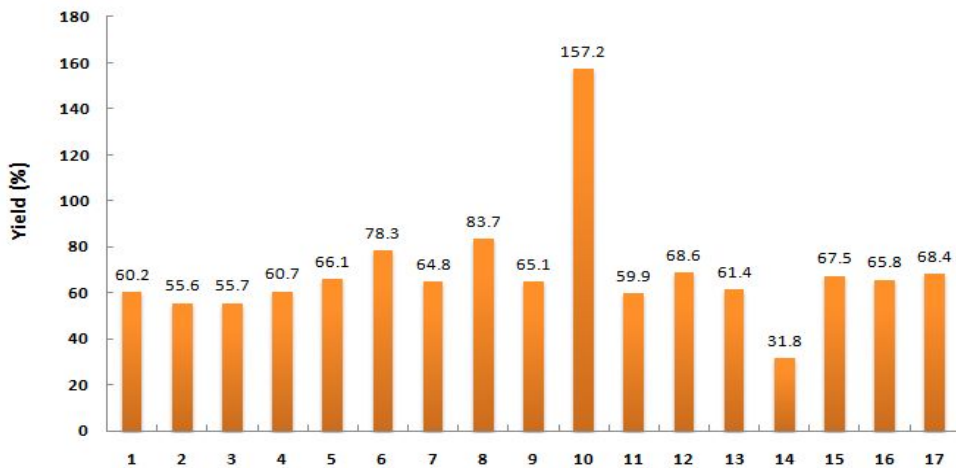


Fig. 10. Extraction yield of black garlic extract under different conditions.

### (2) 흑마늘 추출물의 pH 및 당도

흑마늘 추출물의 pH를 측정한 결과는 Fig. 11에 나타난 바와 같이 모든 추출조건에서 4.43~5.90 범위의 산성 성격을 띠었다. 상대적으로 용매의 에탄올 비율이 커질수록 pH는 증가하였고 물의 비율이 커질수록 pH가 감소하는 양상을 보였다. 가열처리된 마늘에서 pH의 변화는 고온일 경우 가열초기부터 산성화가 진행되며, pH가 산성화될수록 갈변반응이 촉진되는 것으로 보고되어 있다(Choi JH et al, 1981).

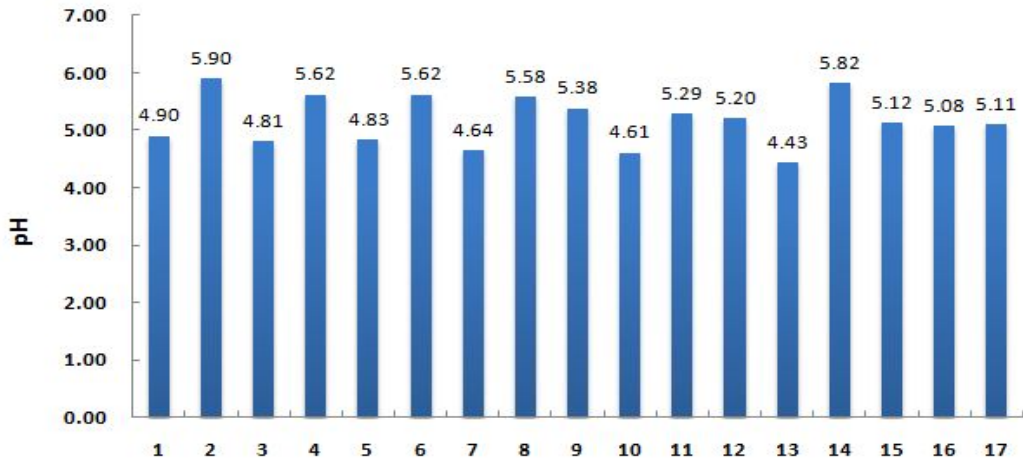


Fig. 11. pH of black garlic extract under different conditions.



Fig. 12. Sugar contents of black garlic extract under different conditions.

Fig. 12는 추출물의 당도를 측정한 결과로 70°C에서 9시간 동안 100% 물로 추출한 No. 13 추출물이 2.8 brix로 가장 값이 낮았으며 상대적으로 용매의 에탄올 비율이 커질수록 당도가 높아지는 경향을 보여 에탄올이 물보다 당의 용출이 크기 때문이라 생각된다.

### (3) 흑마늘 추출물의 갈색도

흑마늘 추출물의 갈색도를 알아보하고자 각기 다른 파장인 490 nm와 660 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Table 19와 같다. No. 10 추출물(90°C, 9시간, 50% EtOH)이 490 nm와 660 nm에서 각각 3.000, 1.659로 흡광도가 가장 높았다. 3.000, 1.527의 값을 보인 No. 8 추출물(80°C, 12시간, 75% EtOH)이 그 다음으로 흡광도가 높았다. 반면에 70°C에서 9시간 동안 100% 에탄올로 추출한 No. 14 추출물이 0.123, 0.022의 흡광도 값을 보여 다른 추출물의 갈색도와 비교되었다. 마늘의 갈변화 반응은 가열 초기에 주로 발생되며, 90°C의 고온에서는 급격한 변화를 보이는데, polyphenol oxidase가 50~70°C에서 활성을 잃기 때문에 흑마늘의 갈변과정은 비효소적 반응

이라고 보고된 바 있다(Bae Sk & Lim MR, 2002).

Table 19. Browning intensity in 490 and 660 nm of black garlic extract under different conditions

Exp No.	Condition			490 nm	660 nm
	°C	hr	EtOH (%)		
1	-1	-1	-1	1.457	0.229
2	-1	-1	+1	1.085	0.438
3	-1	+1	-1	1.409	0.247
4	-1	+1	+1	1.245	0.519
5	+1	-1	-1	2.176	0.575
6	+1	-1	+1	2.753	1.190
7	+1	+1	-1	2.400	0.706
8	+1	+1	+1	3.000	1.257
9	-2	0	0	1.440	0.271
10	+2	0	0	3.000	1.659
11	0	-2	0	2.148	0.594
12	0	+2	0	2,849	0.914
13	0	0	-2	1.325	0.191
14	0	0	+2	0.123	0.022
15	0	0	0	2.238	0.615
16	0	0	0	2.389	0.656
17	0	0	0	2.246	0.654

#### (4) 흑마늘 추출물의 항산화 활성

흑마늘 추출물을 에탄올의 비율, 추출온도 및 시간을 달리한 조건에서 추출물의 항산화활성을 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP법에 따라 실험한 결과는 Table 20과 같다. ABTS와 DPPH는 라디칼의 일종이나 DPPH는 자유 라디칼이며 ABTS는 양이온 라디칼이라는 점에서 차이가 나며 항산화 물질의 종류에 따라 각각의 라디칼에 대한 각각의 라디칼에 대한 결합정도가 다르므로 항산화능에 차이를 보이게 된다(Wang et al, 1998). FRAP법은 DPPH법과 마찬가지로 전자공여 능력을 통해 항산화 활성을 검증하는 방법 중 하나로 산화제로 작용하는  $Fe^{+3}$ 와 항산화제와의 반응을 통해 생성된  $Fe^{+2}$ 을 흡광도를 통해 정량을 할 수 있는 방법이다.

No. 10 추출물(90°C, 9시간, 50% EtOH)의 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP법에 의한 항산화 활성결과는 각각  $66.1 \pm 0.7\%$ ,  $75.0 \pm 0.4\%$ ,  $375.4 \pm 4.8 \mu\text{mol/g}$ 으로 가장 활성이 높았다. 반면에 No. 14 추출물(70°C, 9 시간, 100% EtOH)은 각각  $9.6 \pm 0.5\%$ ,  $20.6 \pm 0.3\%$ ,  $67.1 \pm 1.1 \mu\text{mol/g}$ 의 값으로 다른 조건들에 비해 활성이 낮았다. No. 10 추출물의 경우 추출 온도가 모든 조건 중에서 가장 높아 추출 온도가 높을수록 흑마늘의 항산화물질 용출이 더 용이한 것으로 사료된다. 또한, No. 14 추출물은 추출온도와 시간이 중심 조건이었음에도 불구하고 항산화 활



성이 모든 조건들과 비교해 볼 때 가장 낮았는데 이는 추출용매에서 기인된 것으로 생각된다. 따라서 에탄올과 물이 적정 비율로 혼합되었을 경우에는 시료의 추출시 생리활성을 증가시킬 수 있으나 때는 에탄올 100%로 시료를 추출했을 때에는 오히려 물 추출물보다 활성이 저하되는 것으로 확인되었다.

Table 20. Antioxidant activity of black garlic extract under different conditions

Exp No.	Condition			DPPH (%)	ABTS (%)	FRAP ( $\mu\text{M/g}$ )
	$^{\circ}\text{C}$	hr	EtOH(%)			
1	-1	-1	-1	44.4 $\pm$ 0.6	52.8 $\pm$ 0.7	166.3 $\pm$ 3.2
2	-1	-1	+1	26.3 $\pm$ 0.3	42.2 $\pm$ 0.4	146.0 $\pm$ 1.1
3	-1	+1	-1	31.7 $\pm$ 0.4	46.2 $\pm$ 0.3	156.1 $\pm$ 0.7
4	-1	+1	+1	27.4 $\pm$ 0.3	44.4 $\pm$ 0.2	156.5 $\pm$ 1.5
5	+1	-1	-1	37.8 $\pm$ 0.6	55.4 $\pm$ 0.5	212.8 $\pm$ 1.3
6	+1	-1	+1	39.1 $\pm$ 0.2	61.7 $\pm$ 0.3	270.3 $\pm$ 1.4
7	+1	+1	-1	38.8 $\pm$ 0.6	55.9 $\pm$ 0.7	219.0 $\pm$ 4.2
8	+1	+1	+1	42.7 $\pm$ 0.2	63.8 $\pm$ 0.9	297.2 $\pm$ 3.1
9	-2	0	0	33.1 $\pm$ 0.3	47.4 $\pm$ 0.4	170.8 $\pm$ 1.3
10	+2	0	0	66.1 $\pm$ 0.7	75.0 $\pm$ 0.4	375.4 $\pm$ 4.8
11	0	-2	0	34.2 $\pm$ 0.3	48.1 $\pm$ 0.7	201.3 $\pm$ 3.2
12	0	+2	0	33.9 $\pm$ 0.2	52.2 $\pm$ 0.4	232.3 $\pm$ 1.9
13	0	0	-2	32.7 $\pm$ 0.3	46.4 $\pm$ 0.2	158.2 $\pm$ 4.5
14	0	0	+2	9.6 $\pm$ 0.5	20.6 $\pm$ 0.3	67.1 $\pm$ 1.1
15	0	0	0	32.8 $\pm$ 0.5	48.0 $\pm$ 0.3	199.7 $\pm$ 0.9
16	0	0	0	34.0 $\pm$ 0.4	45.5 $\pm$ 0.4	206.5 $\pm$ 2.1
17	0	0	0	32.3 $\pm$ 0.3	45.3 $\pm$ 0.4	194.1 $\pm$ 1.6

(5) 흑마늘 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량

흑마늘 추출물에 존재하는 총 페놀 화합물과 플라보노이드의 함량을 정량한 결과는 Table 21과 같다. 항산화 활성이 가장 높았던 No. 10 추출물이 총 페놀과 플라보노이드 화합물의 함량 또한 가장 많았으며, No. 8 추출물(80 $^{\circ}\text{C}$ , 12시간, 75% EtOH)이 그 다음이었다. 반면에 100% 에탄올에서 추출한 No. 14 추출물의 함량이 가장 적어 항산화 결과와 유사한 경향을 보여 추출물의 항산화 활성에 페놀성 화합물이 직접적으로 관여하는 것으로 사료된다. 또한 추출 온도가 높을수록, 극성과 비극성 용매가 공존할 때 시료의 추출이 극대화되는 것으로 확인되었다. 흑마늘의 용매별 분획물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과에서 총 페놀 화합물은 클로로포름 분획물에서 가장 높았으며, 물 분획물에서 가장 낮았다. 플라보노이드 함량도 이와 같은 경향으로 물 분획물의 함량은 클로로포름 분획물 함량의 10% 수준인 것으로 보고되어 흑마늘 중의 생리활성 유효 물질은 비극성 용매에 용출성이 큰 것으로 보고된 바 있다(Shin JH et al, 2010a).

Table 21. Contents of total phenol and flavonoid of black garlic extract under different conditions

Exp No.	Condition			Total Phenol (mg/g)	Flavonoids (mg/g)
	°C	hr	EtOH(%)		
1	-1	-1	-1	225.9 ± 2.0	75.8 ± 2.7
2	-1	-1	+1	204.5 ± 1.6	43.6 ± 2.7
3	-1	+1	-1	226.8 ± 1.0	68.8 ± 0.9
4	-1	+1	+1	214.7 ± 3.3	49.3 ± 2.3
5	+1	-1	-1	264.8 ± 1.8	99.9 ± 1.7
6	+1	-1	+1	318.3 ± 2.0	112.5 ± 5.2
7	+1	+1	-1	275.0 ± 2.3	104.5 ± 1.8
8	+1	+1	+1	364.2 ± 2.4	142.9 ± 1.7
9	-2	0	0	240.0 ± 1.6	63.7 ± 1.5
10	+2	0	0	562.7 ± 3.4	266.3 ± 1.6
11	0	-2	0	258.3 ± 3.6	98.9 ± 2.2
12	0	+2	0	293.6 ± 2.1	123.6 ± 1.1
13	0	0	-2	245.7 ± 1.0	71.6 ± 2.5
14	0	0	+2	122.5 ± 1.4	8.4 ± 0.5
15	0	0	0	265.6 ± 1.0	108.5 ± 1.6
16	0	0	0	286.4 ± 4.4	121.2 ± 2.2
17	0	0	0	270.5 ± 1.7	103.1 ± 0.5

(6) 흑마늘 추출물의 thiosulfinate 함량

흑마늘 추출물 중의 thiosulfinate 함량을 분석한 결과는 Table 22와 같다. Thiosulfinate 역시 총 페놀 화합물과 마찬가지로 No. 10 추출물이 149.9±0.7 mmol/g으로 다른 조건에서 추출된 시료에 비해 월등히 많았으며 다음으로 No 8 추출물(80°C, 12시간, 75% EtOH)이었는데, No. 2 추출물(60°C, 6시간, 75% EtOH)은 No. 8 추출물과 비교해 볼 때 동일한 용매 조건에서 추출시간과 온도가 낮은 것으로 이에 따른 thiosulfinate 함량은 상당히 차이가 나는 것으로 확인되어, 식물류의 추출시, 추출시간과 온도는 상당히 관련성이 큰 것으로 판단되었다. 그 외의 추출물에서는 10~60 mmol/g 범위였으며, No. 2 추출물(60°C, 6시간, 75% EtOH)의 경우 thiosulfinate 함량이 10 mmol/g 이하로 가장 낮았으며, 그 외 추출물은 10~60 mmol/g 범위였다.

Thiosulfinate는 생마늘 중 alliinase에 의해 cysteine sulfoxide가 분해되어 생성되는 황화합물로, 60~80%가 allicin인 것으로 알려져 있다(Lawson LD et al, 1991). 더욱이 전화 속도가 상당히 빨리 진행되어 매우 불안정하고 용매, 온도 및 농도에 의존력이 큰 성분이다. 또한 흑마늘 제조시 가공공정의 진행과 더불어 thiosulfate의 함량은 유의적으로 증가하는 경향을 보이는데, 이는 저급 황화합물의 생성증가와 수분의 감소에 따른 상대적인 고형분 증가에 의한 것으로 추정되고 있다(Shin JH et al, 2008a).

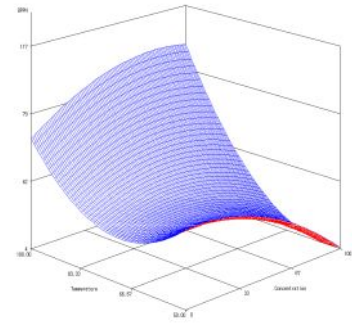
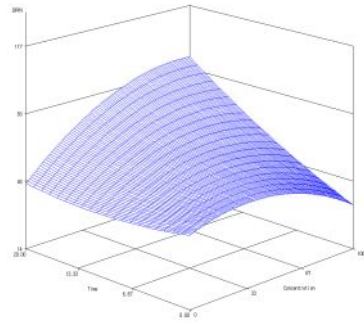
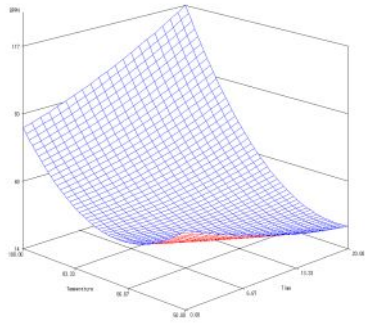
Table 22. Contents of Thiosulfinate of black garlic extract under different conditions

Exp No.	Condition			Thiosulfinate (mmol/g)
	°C	hr	EtOH(%)	
1	-1	-1	-1	52.4 ± 0.2
2	-1	-1	+1	7.0 ± 0.6
3	-1	+1	-1	46.2 ± 0.3
4	-1	+1	+1	10.8 ± 0.8
5	+1	-1	-1	57.3 ± 0.9
6	+1	-1	+1	47.3 ± 0.7
7	+1	+1	-1	55.7 ± 0.5
8	+1	+1	+1	59.9 ± 0.7
9	-2	0	0	41.1 ± 0.1
10	+2	0	0	149.9 ± 0.7
11	0	-2	0	43.4 ± 0.3
12	0	+2	0	56.4 ± 0.6
13	0	0	-2	46.9 ± 0.1
14	0	0	+2	29.8 ± 0.0
15	0	0	0	46.7 ± 0.3
16	0	0	0	47.1 ± 0.4
17	0	0	0	47.1 ± 0.7

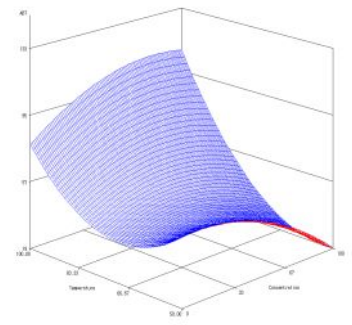
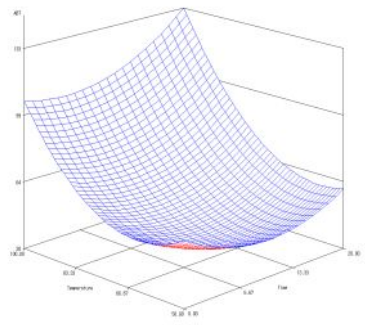
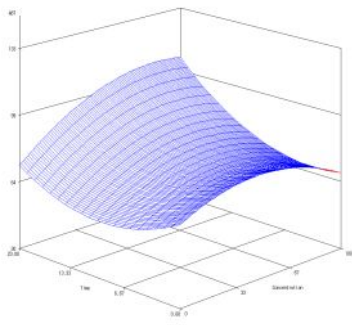
(7) 반응표면분석(RSM)에 따른 흑마늘 추출 조건의 최적화

Fig. 13 및 14는 반응표면분석을 이용하여 흑마늘 추출물의 항산화 활성, 총 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량과 thiosulfinate 함량을 추출 온도, 시간 및 용매의 특성을 기초로 하여 분석한 결과이다. 이 그래프를 바탕으로 반응회귀식을 도출하여(Table 23) 흑마늘의 생리활성이 극대화 되는 추출 조건을 추정하였다(Table 24). 흑마늘은 평균적으로 89.68°C에서 9.79시간 동안 55.72%의 에탄올로 추출하였을 때 생리활성이 극대화될 것으로 추정되었으며, 실험을 시행한 조건 중에서는 No. 10 추출물(90°C, 9시간, 50% EtOH)이 이와 가장 비슷한 조건이었다. 결과를 종합해볼 때 극성의 용매와 비극성의 용매가 균형을 이루면서 고온에서 추출할 때 흑마늘 추출물의 생리활성이 우수할 것으로 생각된다.

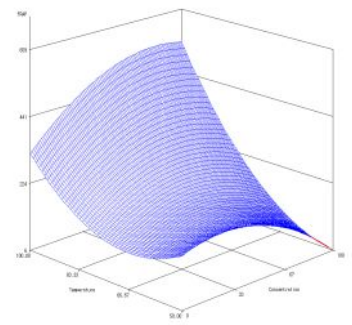
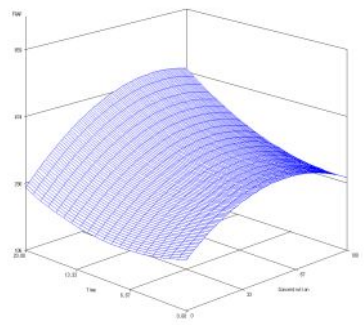
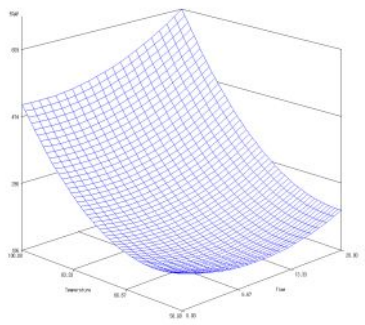
흑마늘은 제조과정 중 열처리 과정을 통하여 마늘의 자체성분에 의한 갈변 반응으로 갈변을 거쳐서 서서히 흑변하여 이루어진 것으로 이러한 과정이 효소적 갈변 반응의 온도 범위를 벗어난 고온에서 이루어지는 것으로 고려해 볼 때 마늘의 흑변은 비효소적 갈변반응이며, 주된 성분은 당과 아미노산인 것으로 추정된 바 있다(Choi DJ et al, 2008). 따라서 흑마늘은 제조과정 중 고온 열처리과정을 거친 바 흑마늘의 유효 생리활성 물질은 고온에서 안정적인 것으로 판단된다.



[DPPH radical scavenging activity]

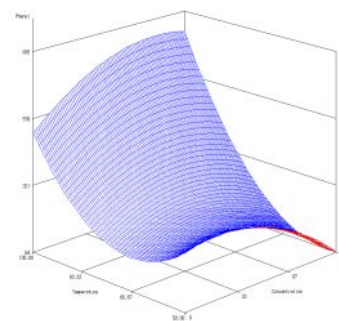
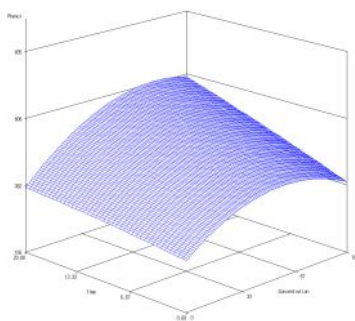
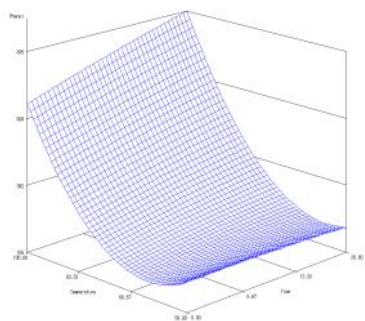


[ABTS radical scavenging activity]

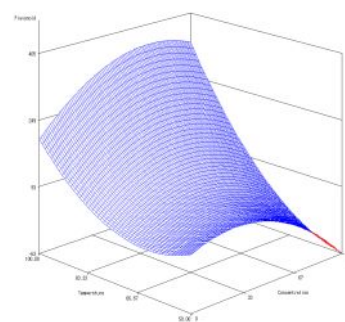
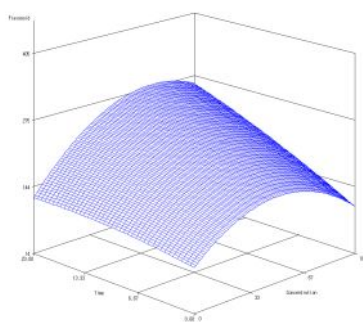
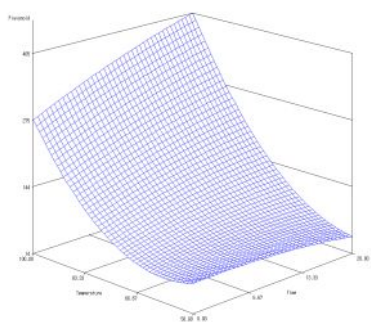


[FRAP assay]

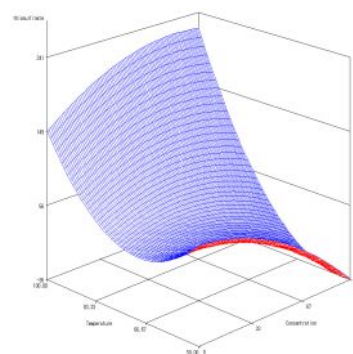
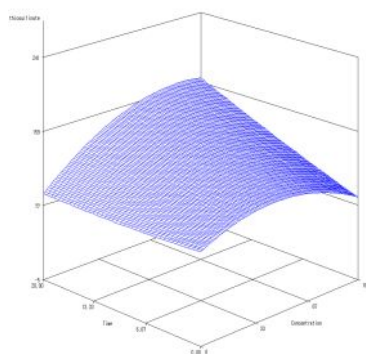
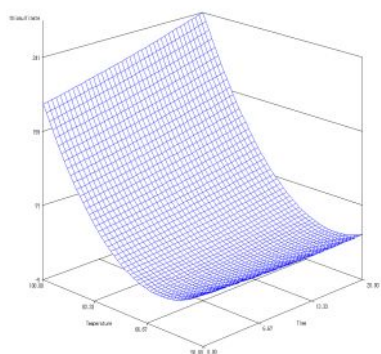
Fig. 13. Response surface plot for antioxidant activities of black garlic extract.



[Total Phenol content]



[Total Flavonoid content]



[Thiosulfinate content]

Fig. 14. Response surface plot for total phenol and flavonoid contents, thiosulfinate contents of black garlic extract.

Table 23. Polynomial equation calculate by RSM for extraction conditions of black garlic

Items	Second order polynomial equations	R <sup>2</sup>	Significance
DPPH radical scavenging activity	$y=33.578261+5.912500x_1-0.475000x_2-3.962500x_3$ $+4.209783x_1^2+0.322283x_2^2-2.902717x_3^2+2.025000x_1x_2$ $+2.050000x_1x_3+3.450000x_2x_3$	0.9136	0.0223
ABTS radical scavenging activity	$y=48.013043+6.650000x_1+0.400000x_2-3.112500x_3$ $+3.951630x_1^2+1.189130x_2^2-2.973370x_3^2+0.875000x_1x_2$ $+1.300000x_1x_3+3.325000x_2x_3$	0.8542	0.0371
FRAP assay	$y=200.921739+48.975000x_1+5.962500x_2-4.150000x_3$ $+18.352717x_1^2+4.277717x_2^2-21.759783x_3^2$ $+4.100000x_1x_2+5.175000x_1x_3+19.450000x_2x_3$	0.9228	0.0330
Total phenol content	$y=266.445043+62.235125x_1+8.607375x_2-8.580125x_3$ $+30.849755x_1^2-0.515745x_2^2-23.470870x_3^2$ $+5.638750x_1x_2+5.611500x_1x_3+22.011000x_2x_3$	0.8811	0.0373
Flavonoid content	$y=104.089826+39.211375x_1+5.192750x_2-7.961625x_3$ $+12.666603x_1^2-0.768022x_2^2-18.583397x_3^2$ $+4.544250x_1x_2+4.801250x_1x_3+12.838750x_2x_3$	0.8990	0.0853
Thiosulfinate	$y=42.841913+20.097688x_1+2.163313x_2-11.274938x_3$ $+11.617614x_1^2+0.210614x_2^2-6.399386x_3^2+1.674875x_1x_2$ $+3.027625x_1x_3+9.361875x_2x_3$	0.9123	0.0001

$x_1$ : Temperature (°C),  $x_2$ : Time (hr),  $x_3$ : EtOH (%)

Table 24. Optimal conditions of black garlic extract based on response surface methodology

Items	Temperature (°C)	Time (hr)	EtOH (%)
DPPH radical scavenging activity	89.61	10.02	54.88
ABTS radical scavenging activity	89.72	9.77	55.34
FRAP assay	89.54	9.82	58.09
Total phenol content	89.72	9.65	56.28
Flavonoids content	89.63	9.93	55.53
Thiosulfinate content	89.85	9.53	54.17

### 3) 개똥쑥의 추출조건별 생리활성 스크리닝

#### (1) 개똥쑥 추출물의 수율

추출 온도, 시간 및 에탄올 비율을 달리한 조건에서 개똥쑥을 추출하였을 때 추출 수율은 Fig. 15와 같다. 다른 추출 조건에 비하여 90°C에서 9시간 동안 50% 에탄올로 추출한 No. 10 추출물이 56.7%로 가장 높았으며, 다음으로 No. 8 추출물(80°C, 12시간, 75% EtOH)이었으며, 70°C에서 15시간 동안 100% 에탄올로 추출한 No. 14 추출물은 10.2%로 가장 수율이 낮았다. 그 외 추출물은 15.6~24.9%의 범위였다.

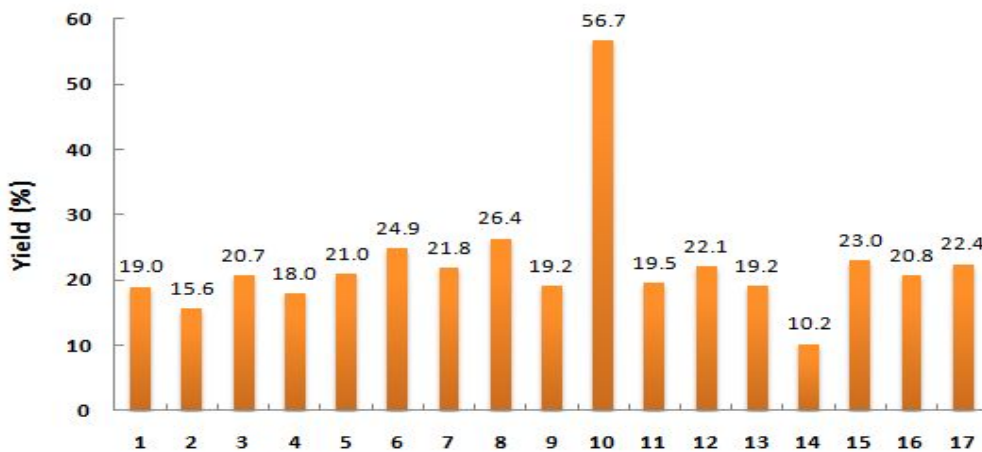


Fig. 15. Extraction yield of Gaeddongssuk extract under different conditions.

#### (2) 개똥쑥 추출물의 pH 및 당도

개똥쑥 추출물의 pH와 당도를 측정한 결과는 Fig. 16과 17에 나타내었다. 추출물의 pH는 모두 산성을 띠었으며 No. 10 추출물이 5.26으로 가장 낮았고 그 외 추출물은 5.6~6.56의 범위였다.

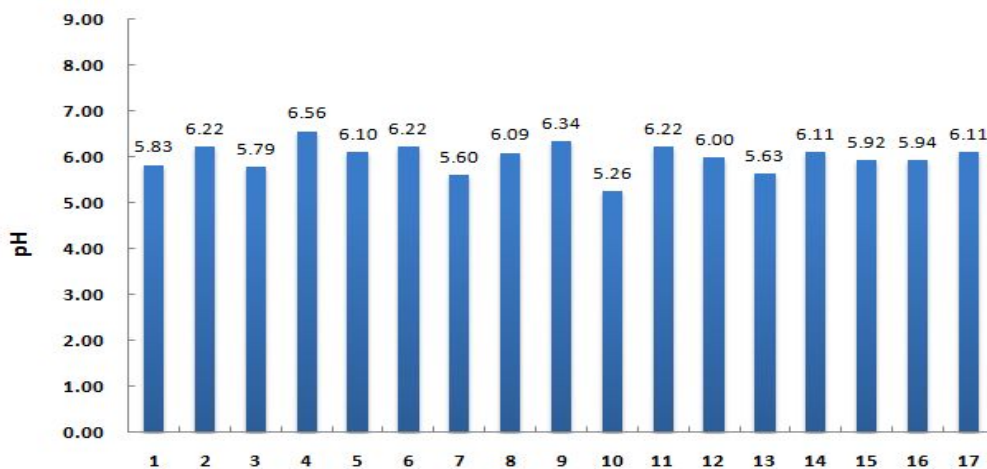


Fig. 16. pH of gaeddongssuk extract under different conditions.

당도는 No. 13 추출물(70°C, 9시간, 50% EtOH)이 0.1이하로 낮아 측정되지 않았으며, 시료간 편차가 커 6.0~8.6 brix의 범위인 시료들이 있는 반면 일부 추출조건에서는 16.4~20.4 brix로 당도가 높았다. pH와 당도의 상관관계를 살펴보면 전반적으로 pH가 높은 추출물에서 높은 당도 값을 보였다. 이들은 추출 온도와 시간 및 용매의 특성에 따라 복합적인 영향을 받는 것으로 생각되나, 특히 물과 에탄올의 혼합비에 의한 영향이 가장 클 것으로 추정된다.

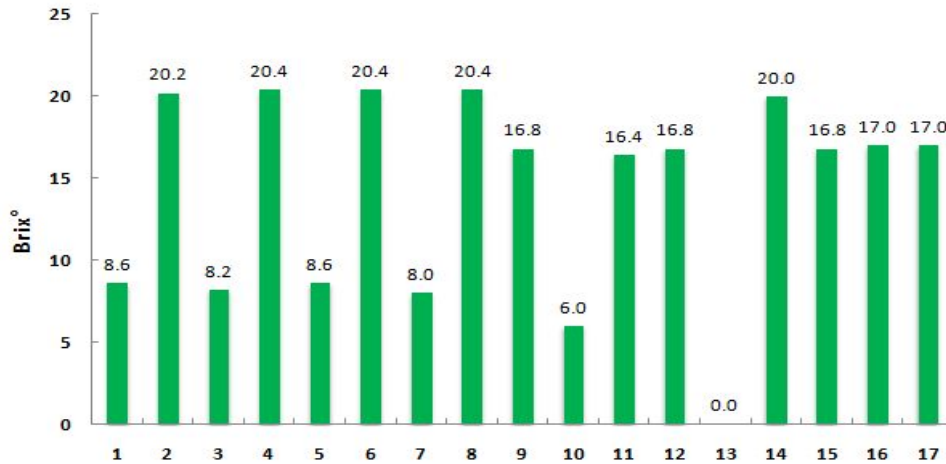


Fig. 17. Sugar contents of Gaeddongssuk extract under different conditions.

### (3) 개똥쑥 추출물의 갈색도

Table 25는 개똥쑥 추출물의 갈색도를 490 nm와 660 nm에서 측정하여 흡광도 값으로 나타낸 결과이다. 추출물의 갈색도는 No. 10 추출물이 가장 높았으며 490 nm와 660 nm에서 갈색도는 전반적으로 차이는 있었지만 물과 에탄올의 혼합비율의 차이가 클수록 상대적인 흡광도 값이 낮았으며, 물과 에탄올 혼합비율이 1:1의 균형을 이룰 때 갈색도가 다소 높은 값을 보였다.

갈색도는 갈색화 반응물의 생성정도를 측정하는 척도로 이들 물질은 항산화 활성과 상호관련이 있어 No. 14 추출물에서 흡광도 값이 가장 높은 것으로 볼 때 이 추출물의 생리활성도 높을 것으로 추정된다.

### (4) 개똥쑥 추출물의 추출물의 항산화 활성

Table 26은 추출물의 항산화 활성을 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP법을 이용하여 측정한 결과이다. 모든 추출 조건 중 No. 10 추출물이  $76.4 \pm 0.7\%$ ,  $83.4 \pm 0.1\%$ ,  $737.3 \pm 11.3 \mu\text{mol/g}$ 의 값으로 모든 항목에서 가장 높은 활성을 가졌으며 No. 14 추출물이 각각  $13.5 \pm 0.5\%$ ,  $12.0 \pm 0.5\%$ ,  $264.8 \pm 4.9 \mu\text{mol/g}$ 의 값을 보여 가장 활성이 낮았다.

쑥 수식 종의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 높았던 시료에서 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다고 보고된 바 있으며(Choi YM et al, 2006), 식물체의 DPPH 라디칼 소거능은 플라보노이드를 비롯한 페놀성 화합물에 연유되며(Kim EY et al, 2004), 시료의 ABTS 라디칼 소거활성은 페놀 화합물에 기인된다는 것으로 볼 때



(Choi YM et al, 2003), 개똥쑥 추출물의 항산화 활성은 시료 중의 총 페놀 화합물의 함량에 의존적인 것으로 판단된다.

Table 25. Browning intensity in 490 and 660 nm of Gaeddongssuk extract under different conditions

Exp No.	Condition			490 nm	660 nm
	°C	hr	EtOH (%)		
1	-1	-1	-1	0.922	0.317
2	-1	-1	+1	0.466	0.508
3	-1	+1	-1	1.174	0.378
4	-1	+1	+1	0.610	0.614
5	+1	-1	-1	1.638	0.596
6	+1	-1	+1	1.107	0.681
7	+1	+1	-1	1.945	0.664
8	+1	+1	+1	1.109	0.957
9	-2	0	0	0.795	0.527
10	+2	0	0	3.000	2.812
11	0	-2	0	1.169	0.618
12	0	+2	0	1.555	0.711
13	0	0	-2	0.905	0.259
14	0	0	+2	0.583	1.067
15	0	0	0	1.654	0.778
16	0	0	0	1.305	0.595
17	0	0	0	1.660	0.812

Table 26. Antioxidant activity of Gaeddongssuk extract under different conditions

Exp No.	Condition			DPPH (%)	ABTS (%)	FRAP (μM/g)
	°C	hr	EtOH (%)			
1	-1	-1	-1	50.1 ± 0.9	45.6 ± 0.4	423.3 ± 5.6
2	-1	-1	+1	45.1 ± 0.3	44.7 ± 0.7	478.4 ± 5.1
3	-1	+1	-1	60.4 ± 0.8	57.8 ± 0.6	464.7 ± 5.8
4	-1	+1	+1	48.9 ± 0.6	46.5 ± 0.3	472.6 ± 4.0
5	+1	-1	-1	71.4 ± 1.0	69.9 ± 0.3	582.0 ± 4.9
6	+1	-1	+1	72.7 ± 1.0	73.4 ± 1.2	661.6 ± 6.6
7	+1	+1	-1	67.6 ± 0.9	68.4 ± 0.5	565.0 ± 3.7
8	+1	+1	+1	72.9 ± 0.9	74.0 ± 0.3	664.3 ± 3.9
9	-2	0	0	46.3 ± 0.8	46.6 ± 0.9	406.7 ± 5.5
10	+2	0	0	76.4 ± 0.7	83.4 ± 0.1	737.3 ± 11.3
11	0	-2	0	60.9 ± 0.7	59.3 ± 0.5	516.0 ± 3.5
12	0	+2	0	63.1 ± 0.4	64.0 ± 0.8	563.8 ± 4.3
13	0	0	-2	30.7 ± 0.6	33.5 ± 0.7	335.9 ± 3.1
14	0	0	+2	13.5 ± 0.5	12.0 ± 0.5	264.8 ± 4.9
15	0	0	0	63.5 ± 0.3	66.9 ± 0.3	564.5 ± 6.0
16	0	0	0	58.0 ± 0.7	61.7 ± 0.4	532.1 ± 5.7
17	0	0	0	67.0 ± 1.0	64.8 ± 0.5	551.7 ± 3.9

이상의 결과를 추출 조건(온도, 시간, 용매 비율)을 고려하여 분석한 결과 전체적으로 개똥썩 추출물의 항산화활성은 추출 온도가 높고 추출 시간이 길어질수록, 추출 용매 중 물과 에탄올의 혼합비율에서 1:1의 균형이 이루어질 때 증가하는 양상을 보였다.

(5) 추출물의 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량

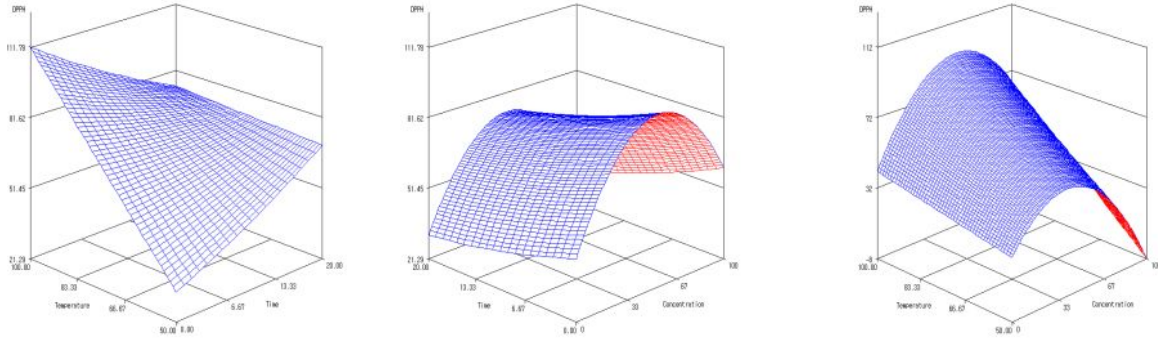
Table 27은 추출물의 페놀 및 플라보노이드 화합물을 정량한 결과이다. No. 10 추출물이 1322.1±11.0 mg/g, 650.9±8.9 mg/g으로 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 많았으며, 301.4±2.7 mg/g, 125.0±2.7 mg/g으로 No. 14 추출물의 함량이 가장 적었다. 이들 함량 역시 온도가 높고 추출시간이 길수록, 추출 용매의 비율에서도 물과 에탄올의 혼합비율에 균형을 이룰 때(1:1) 생리활성 물질의 함량이 증가하는 결과를 보여 전술한 항산화 활성의 결과와 유사한 경향이였다. 썩의 주된 항산화 활성은 페놀 및 플라보노이드 함량에 의존 적인 것으로 알려져 있어(Hong JH et al, 2007) 본 연구의 결과와 상응하였다.

Table 27. Contents of total phenol and flavonoid of Gaeddongssuk extract under different conditions

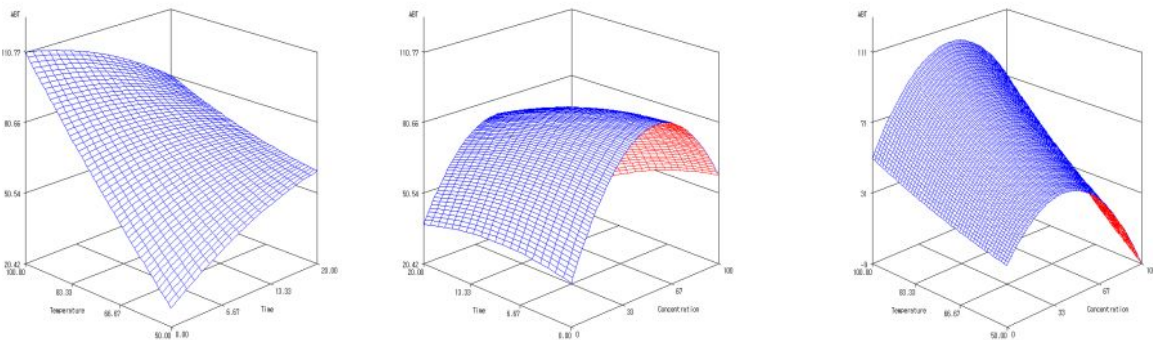
Exp No.	Condition			Total phenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)
	°C	hr	EtOH (%)		
1	-1	-1	-1	458.2 ± 3.7	140.5 ± 0.4
2	-1	-1	+1	470.6 ± 4.0	164.9 ± 1.1
3	-1	+1	-1	523.1 ± 3.9	187.9 ± 2.2
4	-1	+1	+1	505.4 ± 3.5	175.0 ± 2.3
5	+1	-1	-1	584.7 ± 6.7	240.0 ± 3.8
6	+1	-1	+1	701.9 ± 5.5	271.0 ± 2.8
7	+1	+1	-1	640.9 ± 7.1	230.0 ± 1.6
8	+1	+1	+1	755.6 ± 7.3	304.4 ± 2.1
9	-2	0	0	483.8 ± 5.4	178.7 ± 1.9
10	+2	0	0	1322.1 ± 11.0	650.9 ± 8.9
11	0	-2	0	577.2 ± 4.8	204.9 ± 3.3
12	0	+2	0	600.7 ± 6.0	234.2 ± 2.7
13	0	0	-2	437.2 ± 4.3	125.9 ± 1.9
14	0	0	+2	301.4 ± 2.7	125.0 ± 2.7
15	0	0	0	643.5 ± 3.2	253.7 ± 8.9
16	0	0	0	592.3 ± 5.8	214.1 ± 2.0
17	0	0	0	636.4 ± 5.7	264.3 ± 1.5

식물 기원의 시료에서 페놀 화합물은 그 함량은 많을수록 항산화 활성이 높으며, 식물 시료의 변색에 주된 영향을 미치는 인자로 알려져 있다(Choi KS & Lee HY, 1999). 플라보노이드류는 polyphenolic substance로서 화학구조에 따라 flavonols, flavones, catechins, isoflavones 등으로 분류되며, 물과 에탄올에 대한 용해도가 다르고 이들의 구조적 차이에 따라 과산화지질 생성억제 등의 생리활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Middleton EJ & Kandaswami C, 1994).

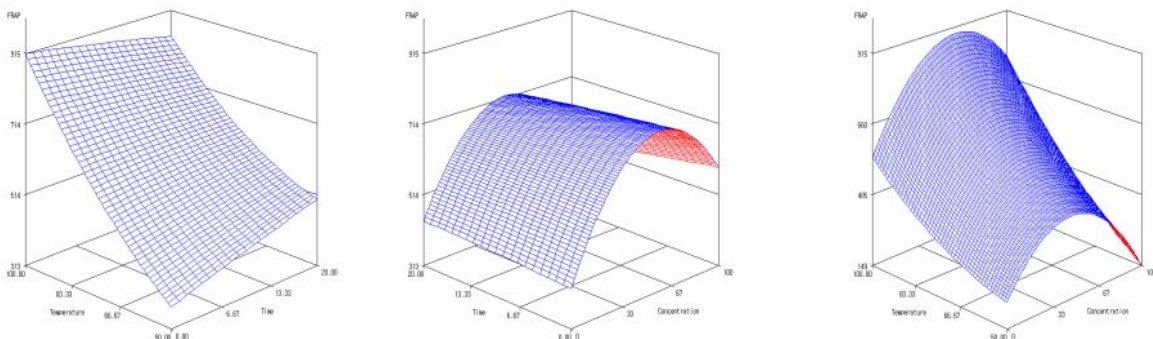
(6) 반응표면분석(RSM)에 따른 개똥쑥 추출 조건의 최적화  
 반응표면분석법을 이용하여 개똥쑥 추출물의 항산화 활성, 총 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량을 추출 온도, 시간 및 용매의 성질을 바탕으로 분석한 결과는 Fig. 18 및 19와 같다.



[DPPH radical scavenging activity]

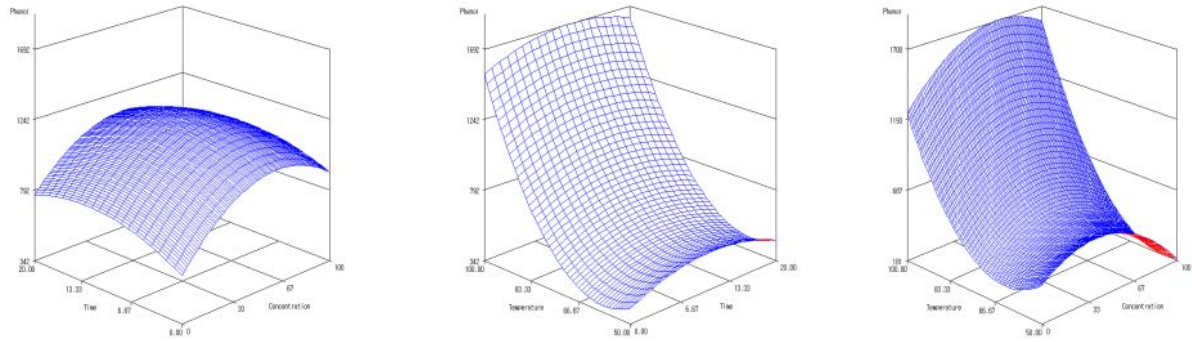


[ABTS radical scavenging activity]

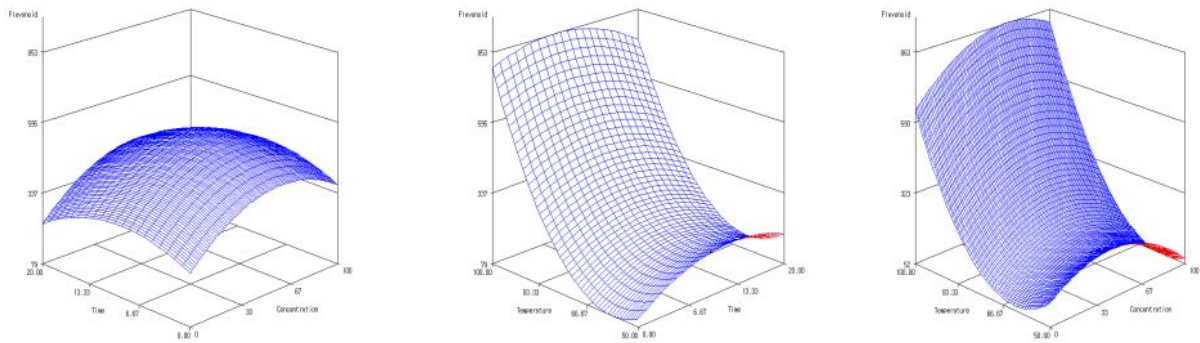


[FRAP assay]

Fig. 18. Response surface plot for antioxidant activity of gaeddongssuk extract.



[Total phenol content]



[Flavonoid content]

Fig. 19. Response surface plot for total phenol and flavonoid contents of Gaeddongssuk extract.

반응표면분석 결과로부터 반응회귀식을 도출하여(Table 28), 개똥쑥의 생리활성이 극대화되는 추출 조건을 예측하였다(Table 29). 그 결과, 평균적으로 개똥쑥은 89.68℃에서 8.46시간 동안 53.70%의 에탄올로 추출하였을 때 생리활성이 극대화될 것으로 예상되며, 본 실험을 수행한 조건 중에서는 No. 10 추출물(90℃, 9시간, 50% EtOH)이 가장 비슷한 조건인 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해볼 때 흑마늘 추출물과 마찬가지로 극성의 용매와 비극성의 용매가 균형을 이루면서 고온에서 추출할 때 개똥쑥 추출물의 생리활성이 우수한 것으로 확인되었다.

#### (7) 흑마늘 및 개똥쑥 추출물의 생리활성에 대한 전반적인 평가

흑마늘과 개똥쑥을 이용하여 50~90℃의 범위에서 물과 에탄올의 용매비율, 추출 시간을 달리한 조건을 설정하여 생리활성을 분석하였다. 그 결과, 흑마늘과 개똥쑥 추출물은 각각 평균적으로 89.68℃에서 9.79시간 동안 55.72%의 에탄올과 89.68℃에서 8.46시간 동안 53.70%의 에탄올로 추출하였을 때 생리활성이 극대화 될 것이라는 결과를 반응표면분석(RSM)을 통하여 얻을 수 있었다.

Table 28. Polynomial equation calculate by RSM for extraction conditions of gaeddongssuk

Items	Second order polynomial equations	R <sup>2</sup>	Significance
DPPH radical scavenging activity	$y=65.986958+8.768750x_1+0.931250x_2-2.768750x_3$ $+0.023370x_1^2+0.185870x_2^2-9.789130x_3^2-2.212500x_1x_2$ $-0.312500x_1x_3+2.887500x_2x_3$	0.8938	0.2078
ABTS radical scavenging activity	$y=66.752174+10.2937500x_1+1.406250x_2-2.881250x_3$ $+0.419022x_1^2-0.418478x_2^2-10.143478x_3^2-1.862500x_1x_2-1.037$ $500x_1x_3+2.662500x_2x_3$	0.9315	0.0996
FRAP assay	$y=566.326087+80.943750x_1+7.306250x_2+6.231250x_3+7.75326$ $1x_1^2-0.271739x_2^2-60.159239x_3^2-6.237500x_1x_2-3.437500x_1x_3+$ $14.487500x_2x_3$	0.9095	0.0635
Total phenol content	$y=609.723739+150.163062x_1+16.032687x_2-2.826062x_3+67.9$ $20592x_1^2-10.571283x_2^2-65.489783x_3^2$ $+1.277375x_1x_2-4.076125x_1x_3+29.646875x_2x_3$	0.8890	0.0460
Flavonoid content	$y=231.253565+82.587625x_1+8.709000x_2+7.190375x_3+41.0970$ $71x_1^2-7.722929x_2^2-31.239304x_3^2$ $-4.264000x_1x_2+0.782750x_1x_3+11.740500x_2x_3$	0.8736	0.1172

x<sub>1</sub>: Temperature (°C), x<sub>2</sub>: Time (hr), x<sub>3</sub>: % EtOH

Table 29. Optimal conditions of gaeddongssuk extract based on Response Surface Methodology

Items	Temperature (°C)	Time (hr)	EtOH(%)
DPPH radical scavenging activity	88.94	7.10	52.88
ABTS radical scavenging activity	89.71	8.03	52.52
FRAP assay	89.88	8.70	54.96
Total phenol content	89.92	9.23	54.06
Flavonoid content	89.93	9.23	54.09

#### 4) 남해산 시판 흑마늘의 생리활성 비교

(1) 시판 흑마늘 중 total pyruvate 및 thiosulfate의 함량

시판 흑마늘과 생마늘의 total pyruvate 및 thiosulfate 함량을 생마늘과 비교한 결과는 Table 30과 같이 생마늘보다 흑마늘에서 유의적으로 높았으며, total pyruvate 함량은 흑마늘의 종류에 따라 194.09~255.86 mM/100 g의 범위였으며, thiosulfate 함량은 496.71~565.97 mM/100 g이었다.

Table 30. Contents of total pyruvate and thiosulfate in fresh and black garlics  
(mM/100 g raw garlic)

Samples	Total pyruvate	Thiosulfate
Fresh garlic	177.26±2.70 <sup>A</sup>	178.33±4.49 <sup>A</sup>
A	243.09±6.46 <sup>D</sup>	544.05±4.98 <sup>D</sup>
B	255.86±2.00 <sup>E</sup>	565.97±4.99 <sup>E</sup>
Black garlics	194.09±1.92 <sup>B</sup>	496.71±12.25 <sup>B</sup>
C	218.01±9.70 <sup>C</sup>	514.15±10.29 <sup>C</sup>

<sup>A-E</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

Total pyruvate와 thiosulfate 함량은 서로 비례적으로 total pyruvate 함량이 유의적으로 높았던 B제품에서 thiosulfate의 함량도 가장 높았으며, total pyruvate이 가장 낮았던 C제품에서 thiosulfate 함량도 유의적으로 낮았다.

Pyruvate는 alliin이 allinase에 의하여 allicin 및 암모니아와 함께 생성되는 것으로, 상온보다 높은 온도에 저장할 경우 생성량이 증가된다고 보고되어 있다(Hwang JB et al, 2004). Thiosulfate는 생마늘 내의 allinase에 의하여 cysteine sulfoxide가 분해되어 생성되는 것으로 매우 불안정하고 용매, 온도 및 농도에 매우 의존적인 성분으로(Ross ZM et al, 2001) 마늘의 총 thiosulfate 함량은 숙성 온도에 따라 큰 차이를 보인다고 보고된 바 있다(Byun PH et al, 2001).

## (2) 흑마늘 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량

흑마늘의 물 및 에탄올 추출물 중 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 31과 같이 생마늘에 비해 흑마늘에서 유의적으로 높았으며, 물 추출물이 에탄올 추출물에 비해 더 높게 정량되었다. 흑마늘의 총 페놀 화합물은 물 추출물에서 157.11~179.04 mg/g, 에탄올 추출물은 60.03~77.57 mg/g으로 A제품의 함량이 가장 높았다. 플라보노이드 함량의 경우 에탄올 추출물은 5.90~6.36 mg/g으로 시료간에 유의차를 보이지 않았으나, 물 추출물에서는 A제품이 27.08 mg/g으로 유의적으로 높은 함량이었다.

흑마늘은 제조과정이 진행될수록 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 생마늘에 비해 약 7배 및 16배정도 증가되는데(Kwon OC et al, 2006), 고온 처리에 의해 생마늘의 여러 화합물이 유용성의 폴리페놀 화합물로 전환되었거나, 수분 감소에 따른 고형분 함량이 증가하였기 때문에 상대적인 함량이 증가된 것으로 해석된 바 있다(Shin JH et al, 2008a).

식물류의 페놀성 화합물은 일반적으로 물보다는 에탄올에서 용출되기 쉬운데, 에탄올 추출물의 경우에는 추출 온도가 높을수록 수율, 플라보노이드 및 전자공여 활성이 증가되는 것으로 보고되어 있다(Jeong JE et al, 2011). 본 연구결과 흑마늘은 에탄올 추출물보다 물 추출물에서 유용물질의 용출이 더 높았는데 이는 흑마늘 중에 수용성 페놀성 물질의 함량이 더 높으며, 실

온에서 장시간의 추출과정에 의해 물 추출물의 유용물질 용출이 높아진 결과로 해석된다.

Table 31. Contents of total phenol and flavonoids in the extracts of fresh and black garlics (mg/g extract)

Samples	Total phenol		Flavonoids	
	Water extract	Ethanol extract	Water extract	Ethanol extract
Fresh garlic	108.63±6.57 <sup>A</sup>	47.40±0.81 <sup>A</sup>	7.29±0.71 <sup>A</sup>	1.70±0.18 <sup>A</sup>
A	179.04±5.77 <sup>C</sup>	77.57±4.79 <sup>D</sup>	27.08±0.77 <sup>D</sup>	6.11±0.27 <sup>B</sup>
Black garlics	174.47±1.44 <sup>C</sup>	60.03±0.44 <sup>B</sup>	24.88±0.53 <sup>C</sup>	5.90±0.39 <sup>B</sup>
B	157.11±2.93 <sup>B</sup>	68.51±0.80 <sup>C</sup>	18.72±1.26 <sup>B</sup>	6.26±0.77 <sup>B</sup>
C	171.32±0.80 <sup>C</sup>	70.56±2.06 <sup>C</sup>	19.95±0.53 <sup>B</sup>	6.36±1.43 <sup>B</sup>
D				

<sup>A-D</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

### (3) 항산화 활성

흑마늘의 물 및 에탄올 추출물의 DPPH, ABTs, hydroxyl 및 nitric oxide 라디칼 소거활성을 생마늘 추출물과 비교한 결과는 Table 32~35와 같다. 시료의 첨가농도를 100, 250, 500 및 1000 µg/mL로 달리하였을 때 모든 시료에서 첨가 농도가 높아질수록 소거활성은 유의적으로 증가하였으며, 생마늘 추출물에 비해 흑마늘 추출물에서 라디칼 소거활성이 더 높았다.

Table 32에서 흑마늘 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 250 µg/mL 농도에서는 50% 이상, 1000 µg/mL 농도에서는 60.75~71.48%로 활성이 증가하였으며 B제품에서 유의적으로 소거활성이 높았다. 에탄올 추출물의 활성은 물 추출물보다는 낮아 1000 µg/mL의 농도에서도 대부분의 활성이 50% 미만이었으며, B제품이 52.35%로 다소 높은 활성을 보였다.

Table 32. DPPH radical scavenging activity of water and 80% ethanol extracts made from fresh and black garlics

(%)

Sample extracts		Sample concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		100	250	500	1000	
Water extract	Fresh garlic	$33.00 \pm 2.06^{aA}$	$45.37 \pm 0.23^{bA}$	$49.93 \pm 0.39^{cA}$	$51.90 \pm 0.25^{cA}$	
	A	$49.82 \pm 0.47^{aC}$	$56.10 \pm 0.06^{bD}$	$62.83 \pm 0.42^{cD}$	$69.98 \pm 0.23^{dD}$	
	Black garlics	B	$50.61 \pm 0.25^{aC}$	$56.27 \pm 0.90^{bD}$	$63.53 \pm 0.68^{cD}$	$71.48 \pm 0.59^{dE}$
		C	$47.38 \pm 0.41^{aB}$	$50.66 \pm 0.49^{bB}$	$55.33 \pm 0.51^{cB}$	$62.11 \pm 0.29^{dC}$
		D	$49.96 \pm 0.77^{aC}$	$55.16 \pm 0.28^{bC}$	$58.89 \pm 0.97^{cC}$	$60.75 \pm 0.25^{dE}$
Ethanol extract	Fresh garlic	$27.45 \pm 0.36^{aA}$	$33.02 \pm 0.22^{bA}$	$34.11 \pm 0.12^{cA}$	$35.29 \pm 0.28^{dA}$	
	A	$39.82 \pm 0.93^{aB}$	$43.42 \pm 0.29^{bB}$	$46.64 \pm 1.00^{cB}$	$49.82 \pm 1.08^{dC}$	
	Black garlics	B	$39.71 \pm 0.30^{aB}$	$45.28 \pm 0.47^{bD}$	$46.44 \pm 0.28^{cB}$	$52.36 \pm 0.22^{dD}$
		C	$43.83 \pm 0.26^{aC}$	$44.62 \pm 0.14^{bC}$	$46.48 \pm 0.45^{cB}$	$47.38 \pm 0.31^{dE}$
		D	$43.18 \pm 0.19^{aC}$	$44.19 \pm 0.15^{bC}$	$46.09 \pm 0.17^{cB}$	$46.97 \pm 0.17^{dE}$

Means with different superscripts in the same row(a-d) and column(A-E) are significantly different at  $p < 0.05$ .

ABTS 라디칼 소거활성은 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 흑마늘 물 추출물이 65.04~86.15%, 에탄올 추출물은 46.42~58.41%로 모든 농도의 물 추출물은 B제품의 활성이 유의적으로 높았으며, 에탄올 추출물에서는 A제품의 활성이 다소 높았다(Table 33).

Hydroxyl 라디칼 소거활성은 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 흑마늘 물 추출물은 51.51~61.91%, 에탄올 추출물은 45% 미만이었으나, A제품의 소거활성이 타 제품에 비해 유의적으로 높았다(Table 34).

Nitric oxide 라디칼 소거활성은 흑마늘 물 추출물이 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 49.54~58.33%였으며, 에탄올 추출물이 26.62~33.80%로 C제품에서 유의적으로 활성이 낮았다(Table 35).

흑마늘은 숙성이 진행됨에 따라 추출 수율이 높아지며, 특히 에탄올보다 물 추출시 수율이 더 높는데, 열처리에 의한 가용성 성분의 용출이 증가되었기 때문으로 이는 시료의 DPPH 라디칼 소거활성이나 환원력과 일치한다는 보고가 있다(Shin JH et al, 2008a,b). 더욱이 DPPH 라디칼 소거활성의 경우, 생마늘은 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 소거활성이 높았으나, 흑마늘은 오히려 열수 추출물에서 더 높은 소거활성을 보였으며, hydroxyl 라디칼 소거활성은 생마늘 및 흑마늘 모두 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 높았다는 보고도 있다(Shin JH et al, 2008b).

흑마늘의 순차용매별 분획물에서 항산화 활성이 물 추출물에 비해 chloroform 및 ethyl acetate 획분에서 유의적으로 높았다는 보고(Shin JH et al, 2010a)는 본 연구결과와는 상이하나, 시료 추출물을 얻기 위한 전처리 공정인 추출시간, 방법, 농축 또는 건조방법 등이 잔존하는 활성 성분의 함량에 주된 영향을 끼치는 것으로 추정된다.



Table 33. ABTS radical scavenging activity of water and 80% ethanol extracts made from fresh and black garlics

(%)

Sample extracts		Sample concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		100	250	500	1000	
Water extract	Fresh garlic	10.95 $\pm$ 0.45 <sup>aA</sup>	13.12 $\pm$ 0.75 <sup>bA</sup>	17.79 $\pm$ 0.45 <sup>cA</sup>	23.71 $\pm$ 0.45 <sup>dA</sup>	
	A	25.13 $\pm$ 0.69 <sup>aD</sup>	44.52 $\pm$ 0.31 <sup>bD</sup>	68.03 $\pm$ 0.92 <sup>cD</sup>	83.13 $\pm$ 0.36 <sup>dD</sup>	
	Black garlics	B	26.55 $\pm$ 0.47 <sup>aE</sup>	46.21 $\pm$ 0.29 <sup>bE</sup>	69.54 $\pm$ 0.09 <sup>cE</sup>	86.15 $\pm$ 0.15 <sup>dE</sup>
		C	14.92 $\pm$ 0.67 <sup>aB</sup>	26.41 $\pm$ 0.18 <sup>bB</sup>	42.42 $\pm$ 0.14 <sup>cB</sup>	65.04 $\pm$ 0.37 <sup>dB</sup>
		D	20.81 $\pm$ 0.36 <sup>aC</sup>	36.27 $\pm$ 0.46 <sup>bC</sup>	58.26 $\pm$ 0.09 <sup>cC</sup>	79.66 $\pm$ 0.09 <sup>dC</sup>
Ethanol extract	Fresh garlic	6.39 $\pm$ 0.39 <sup>aA</sup>	9.15 $\pm$ 0.32 <sup>bA</sup>	10.74 $\pm$ 0.41 <sup>cA</sup>	12.29 $\pm$ 0.46 <sup>dA</sup>	
	A	10.66 $\pm$ 0.41 <sup>aC</sup>	20.16 $\pm$ 0.44 <sup>bC</sup>	33.06 $\pm$ 1.48 <sup>cC</sup>	58.41 $\pm$ 0.14 <sup>dD</sup>	
	Black garlics	B	9.47 $\pm$ 0.40 <sup>aB</sup>	19.18 $\pm$ 1.96 <sup>bC</sup>	31.41 $\pm$ 2.40 <sup>cC</sup>	46.42 $\pm$ 1.35 <sup>dB</sup>
		C	9.65 $\pm$ 0.31 <sup>aB</sup>	16.84 $\pm$ 0.72 <sup>bB</sup>	26.70 $\pm$ 0.49 <sup>cB</sup>	46.45 $\pm$ 0.86 <sup>dB</sup>
		D	9.53 $\pm$ 0.31 <sup>aB</sup>	20.72 $\pm$ 0.95 <sup>bC</sup>	33.84 $\pm$ 0.63 <sup>cC</sup>	51.71 $\pm$ 1.17 <sup>dC</sup>

Means with different superscripts in the same row(a–d) and column(A–E) are significantly different at  $p < 0.05$ .

Table 34. Hydroxyl radical scavenging activity of water and 80% ethanol extracts made from fresh and black garlics

(%)

Sample extracts		Sample concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		100	250	500	1000	
Water extract	Fresh garlic	26.81 $\pm$ 0.60 <sup>aA</sup>	30.54 $\pm$ 0.46 <sup>bA</sup>	38.70 $\pm$ 1.00 <sup>cA</sup>	44.45 $\pm$ 0.57 <sup>dA</sup>	
	A	32.73 $\pm$ 0.46 <sup>aD</sup>	35.81 $\pm$ 1.45 <sup>bC</sup>	47.21 $\pm$ 0.79 <sup>cC</sup>	61.91 $\pm$ 0.65 <sup>dD</sup>	
	Black garlics	B	30.89 $\pm$ 0.86 <sup>aC</sup>	33.17 $\pm$ 0.53 <sup>bB</sup>	44.49 $\pm$ 0.40 <sup>cB</sup>	59.98 $\pm$ 0.95 <sup>dC</sup>
		C	29.40 $\pm$ 0.55 <sup>aB</sup>	31.90 $\pm$ 0.46 <sup>bAB</sup>	37.43 $\pm$ 1.22 <sup>cA</sup>	51.51 $\pm$ 1.12 <sup>dB</sup>
		D	34.75 $\pm$ 0.77 <sup>aE</sup>	37.96 $\pm$ 0.79 <sup>bD</sup>	47.39 $\pm$ 2.10 <sup>cC</sup>	59.32 $\pm$ 1.14 <sup>dC</sup>
Ethanol extract	Fresh garlic	21.81 $\pm$ 0.92 <sup>aA</sup>	23.52 $\pm$ 0.39 <sup>bA</sup>	28.83 $\pm$ 0.86 <sup>cA</sup>	34.27 $\pm$ 0.93 <sup>dA</sup>	
	A	28.48 $\pm$ 0.46 <sup>aD</sup>	32.43 $\pm$ 0.27 <sup>bD</sup>	37.52 $\pm$ 1.40 <sup>cD</sup>	43.18 $\pm$ 0.46 <sup>dD</sup>	
	Black garlics	B	27.29 $\pm$ 0.72 <sup>aCD</sup>	30.14 $\pm$ 0.42 <sup>bC</sup>	33.22 $\pm$ 0.75 <sup>cBC</sup>	37.34 $\pm$ 1.27 <sup>dB</sup>
		C	24.35 $\pm$ 0.88 <sup>aB</sup>	28.78 $\pm$ 0.82 <sup>bB</sup>	31.72 $\pm$ 0.27 <sup>cB</sup>	33.04 $\pm$ 0.88 <sup>cA</sup>
		D	26.24 $\pm$ 0.53 <sup>aC</sup>	30.85 $\pm$ 0.55 <sup>bC</sup>	33.61 $\pm$ 0.72 <sup>cC</sup>	39.84 $\pm$ 0.66 <sup>dC</sup>

Means with different superscripts in the same row(a–d) and column(A–D) are significantly different at  $p < 0.05$ .

Table 35. Nitric oxide scavenging activity of water and 80% ethanol extracts made from fresh and black garlics

(%)

Sample extracts		Sample concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		100	250	500	1000	
Water extract	Fresh garlic	13.19 $\pm$ 2.08 <sup>aA</sup>	26.39 $\pm$ 1.84 <sup>bA</sup>	37.27 $\pm$ 1.06 <sup>cA</sup>	43.75 $\pm$ 0.69 <sup>dA</sup>	
	A	24.77 $\pm$ 2.81 <sup>aD</sup>	37.73 $\pm$ 1.45 <sup>bC</sup>	49.54 $\pm$ 1.75 <sup>cC</sup>	58.33 $\pm$ 1.84 <sup>dD</sup>	
	Black garlics	B	18.75 $\pm$ 1.20 <sup>aBC</sup>	33.56 $\pm$ 3.50 <sup>bBC</sup>	46.30 $\pm$ 2.12 <sup>cC</sup>	55.09 $\pm$ 1.75 <sup>dC</sup>
		C	15.74 $\pm$ 0.40 <sup>aAB</sup>	28.94 $\pm$ 1.45 <sup>bAB</sup>	42.82 $\pm$ 0.40 <sup>cB</sup>	49.54 $\pm$ 1.06 <sup>dB</sup>
		D	20.37 $\pm$ 2.12 <sup>aC</sup>	37.50 $\pm$ 3.61 <sup>bC</sup>	48.61 $\pm$ 2.41 <sup>cC</sup>	56.94 $\pm$ 2.50 <sup>dCD</sup>
Ethanol extract	Fresh garlic	10.42 $\pm$ 0.69 <sup>aA</sup>	15.28 $\pm$ 0.69 <sup>bA</sup>	17.82 $\pm$ 0.80 <sup>cA</sup>	22.22 $\pm$ 0.69 <sup>dA</sup>	
	A	16.44 $\pm$ 0.80 <sup>aC</sup>	21.06 $\pm$ 1.06 <sup>bC</sup>	29.17 $\pm$ 1.39 <sup>cD</sup>	33.80 $\pm$ 2.44 <sup>dD</sup>	
	Black garlics	B	14.81 $\pm$ 1.45 <sup>aC</sup>	18.29 $\pm$ 0.80 <sup>bB</sup>	21.99 $\pm$ 1.06 <sup>cB</sup>	29.63 $\pm$ 2.23 <sup>dBC</sup>
		C	12.73 $\pm$ 1.06 <sup>aB</sup>	17.59 $\pm$ 1.06 <sup>bB</sup>	21.30 $\pm$ 1.06 <sup>cB</sup>	26.62 $\pm$ 2.12 <sup>dB</sup>
		D	16.44 $\pm$ 1.45 <sup>aC</sup>	20.37 $\pm$ 1.06 <sup>bC</sup>	26.62 $\pm$ 0.80 <sup>cC</sup>	32.64 $\pm$ 2.41 <sup>dCD</sup>

Means with different superscripts in the same row(a-d) and column(A-D) are significantly different at  $p < 0.05$ .

흑마늘의 항산화 활성이 생마늘보다 높은 것은 장시간의 고온처리로 마늘 중 아미노산, 펩타이드, 단백질 등의 amino기와 당의 반응으로 비효소적 갈변반응을 일으켜 갈변물질을 생성하기 때문이다(Bas SK & Kim MR, 2002). 이로써 새로이 생성된 melanoidin과 흑마늘에서 발견되는 S-allylcysteine과 같은 함황 화합물이 항산화 활성을 증가시키게 된다(Ide N et al, 1999). 또한 열처리에 의해 생성된 물질은 열에 안정하여 열수 추출시 유효 물질의 추출이 용이하고, 또 thiosulfate 함량의 증가와도 밀접한 관련이 있다고 판단된다(Lawson LD, 1998).

본 연구 결과, 흑마늘과 생마늘 추출물에서 DPPH, ABTS, hydroxyl 및 nitric oxide 라디칼 소거활성의 차이는 라디칼의 종류에 따라 시료와의 반응기전이 다르기 때문이라고 생각된다(Lee SO et al, 2005). 또한 지역별 흑마늘 제품간의 항산화 활성의 차이도 제조공정 및 항산화 반응의 기작에 따른 것으로 보고되어 있는데(You BR et al, 2011), 이는 본 연구에서도 마찬가지로 흑마늘 제품에 따른 항산화 활성은 원료가 동일하더라도 각 가공업체마다 고유의 숙성 온도와 시간을 달리한 제조공정을 채택하고 있으므로 이에 따른 차이로 판단된다.

#### (4) 아질산염 소거활성

시판 흑마늘의 물 및 에탄올 추출물에 대한 아질산염 소거활성을 생마늘 추출물과 비교한 결과는 Table 36과 같다. pH 2.5의 반응계에서 각 추출물을 1, 2.5 및 5 mg/mL 농도로 첨가하

였을 때 시료의 첨가농도에 의존적으로 아질산염 소거활성은 유의적으로 증가하였다. 흑마늘 추출물은 생마늘 추출물보다 소거활성이 높았으며, 물 추출물이 에탄올 추출물보다 높은 활성이었다. 특히 5 mg/mL 농도에서 흑마늘 물 추출물은 75.49~87.50%의 범위로 C제품을 제외한 3종의 제품에서는 80% 이상이였다. 에탄올 추출물의 경우에는 63.04~67.35%로 제품간의 유의차가 없었다.

Table 36. Nitrite scavenging activity of water and 80% ethanol extracts made from fresh and black garlics at pH 2.5

Sample extracts		Sample concentrations (mg/mL)			
		1	2.5	5	
Water extract	Fresh garlic	45.26±1.82 <sup>aA</sup>	53.16±2.41 <sup>bA</sup>	60.00±3.65 <sup>cA</sup>	
	A	52.08±3.61 <sup>aA</sup>	62.50±0.00 <sup>bA</sup>	87.50±0.00 <sup>cD</sup>	
	Black garlics	B	65.69±1.70 <sup>aB</sup>	84.31±3.40 <sup>bB</sup>	83.33±4.49 <sup>bCD</sup>
		C	47.06±2.94 <sup>aA</sup>	61.76±2.94 <sup>bA</sup>	75.49±3.40 <sup>cB</sup>
		D	50.67±3.05 <sup>aA</sup>	60.00±4.00 <sup>bA</sup>	81.33±2.31 <sup>bC</sup>
Ethanol extract	Fresh garlic	18.67±2.31 <sup>aA</sup>	37.33±2.31 <sup>bA</sup>	46.67±4.62 <sup>cA</sup>	
	A	40.82±12.74 <sup>aB</sup>	61.22±3.53 <sup>bC</sup>	67.35±3.53 <sup>bB</sup>	
	Black garlics	B	48.84±2.01 <sup>aC</sup>	61.63±0.00 <sup>bC</sup>	66.28±5.33 <sup>bB</sup>
		C	52.63±3.16 <sup>aC</sup>	53.68±1.82 <sup>aB</sup>	64.21±6.57 <sup>bB</sup>
		D	46.74±8.21 <sup>aBC</sup>	58.70±6.79 <sup>bBC</sup>	63.04±4.98 <sup>bB</sup>

Means with different superscripts in the same row(a-d) and column(A-D) are significantly different at  $p < 0.05$ .

아질산염은 햄, 소세지 등의 식육 가공시에 첨가되어 육색의 고정이나 독소 생성 및 산패 방지에 널리 이용되고 있으며 섭취시 생체 내에서 발암성 물질인 nitrosamine의 생성을 초래할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(Im KJ et al, 2000). 반면에 당과 아미노산의 가열반응으로 생성되는 멜라노이딘은 아질산염을 효과적으로 분해하는데(Kim SB et al, 1988) 본 연구에서 흑마늘의 아질산염 소거활성은 페놀성 화합물과 알릴 화합물, 특히 가공 중 생성되는 갈변물질의 상호작용이라는 Jang EK et al (2008)의 보고와 유사한 결과로 해석된다.

### 5) 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 *in vivo* 생리활성

강제운동 부하에 의해 산화적 스트레스가 발생하는 과정에서 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 급이가 생리기능에 미치는 영향을 측정하므로써 기능성 증강 음료 개발을 위한 기초자료를 확보하였고, 이때 흑마늘 및 개똥쑥의 추출물도 각각 비교하였다.

#### (1) 체중변화, 식이섭취량 및 식이효율

트레드밀을 이용한 강제운동에 의해 산화적 스트레스를 유발시킨 흰쥐에게 흑마늘 추출물 (BG), 개똥쑥 추출물(GS) 및 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물(MBS-I, II)을 경구투여 하였다. 이때 흰쥐의 체중변화, 식이섭취량, 식이효율을 측정한 결과는 Table 37과 같다. 초기 체중은 143.33~150.00 g이었으며, 4주간의 운동과 식이 섭취후 실험 최종일의 체중은 283.33~306.67 g으로 모든 실험군간에 유의적인 차이는 낮았고, 체중 증가량도 유사한 경향을 보였다. 식이섭취량은 모든 실험군간에 유의차를 보이지 않았으나, 식이효율은 대조군에 비해 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물 급이군(MBS-I)에서 유의적으로 증가하였으며, 그 외 실험군에서는 유의차가 작았다.

Table 37. Changes of body weight, food intake and FER by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Total body weight gain (g/4 weeks)	Food intake (g/day)	FER
Control	148.33±7.53 <sup>1)NS</sup>	295.00±10.49 <sup>AB2)</sup>	146.67±8.16 <sup>AB</sup>	18.89±0.05 <sup>NS</sup>	0.24±0.20 <sup>AB</sup>
BG	143.33±21.60	293.33±17.51 <sup>AB</sup>	150.00±16.73 <sup>AB</sup>	18.91±0.00	0.25±0.29 <sup>BC</sup>
GS	145.00±5.48	283.33±10.33 <sup>A</sup>	138.33±7.53 <sup>A</sup>	18.90±0.03	0.22±0.20 <sup>A</sup>
MBS-I	150.00±8.94	306.67±8.16 <sup>B</sup>	156.67±5.16 <sup>B</sup>	18.89±0.05	0.26±0.10 <sup>C</sup>
MBS-II	146.67±12.11	296.67±5.16 <sup>AB</sup>	150.00±8.94 <sup>AB</sup>	18.73±0.44	0.23±0.18 <sup>AB</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=7)

<sup>2)</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p < 0.05$

<sup>NS</sup>Not significant

FER: Food efficiency ratio.

#### (2) 장기 중량

Table 38은 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 급이하여 4주간 강제운동한 후 체내 장기의 중량을 측정한 결과이다. 간장, 신장, 심장, 지라, 고환 및 폐의 중량을 측정하여 단위 체중 100g에 대한 중량으로 표시하였다. 신장과 폐 조직을 제외한 장기의 중량은 시료군간에 유의적 차

이가 없었다. 신장의 중량은 0.77~0.83 g/100 g bw로 개똥쑥 추출물 급이군(GS)의 중량이 유의적으로 가장 높았고 MBS-I 군이 가장 작았다. 폐의 중량은 0.37~0.44 g/100 g bw의 범위로 모든 실험군간에 유의차는 작았으나, 흑마늘 추출물 급이군(BG)은 개똥쑥 추출물 급이군(GS) 및 혼합물 급이군(MBS-I, -II)에 비해서 다소 낮았다.

Table 38. Changes of weight of liver, kidney, heart, spleen, testis and lung by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats  
(g/100 g body weight)

Organs	Control	BG	GS	MBS-I	MBS-II
Liver	2.66±0.13 <sup>1)NS</sup>	2.87±0.43	2.73±0.08	2.84±0.17	2.74±0.12
Kidney	0.79±0.50 <sup>AB2)</sup>	0.80±0.36 <sup>AB</sup>	0.83±0.20 <sup>B</sup>	0.77±0.40 <sup>A</sup>	0.79±0.42 <sup>AB</sup>
Heart	0.35±0.03 <sup>NS</sup>	0.33±0.02	0.34±0.01	0.35±0.01	0.35±0.03
Spleen	0.19±0.02 <sup>NS</sup>	0.19±0.04	0.20±0.01	0.22±0.01	0.20±0.02
Testis	1.09±0.02 <sup>NS</sup>	1.00±0.37	1.11±0.04	1.10±0.08	1.12±0.05
Lung	0.40±0.05 <sup>AB</sup>	0.37±0.06 <sup>A</sup>	0.44±0.02 <sup>B</sup>	0.44±0.05 <sup>B</sup>	0.44±0.01 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=7)

<sup>2)</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p < 0.05$

<sup>NS</sup>Not significant.

### (3) 혈당 함량

흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 농도를 달리하여 강제운동한 흰쥐에게 4주간 급이한 후 혈당을 측정된 결과는 Fig. 20과 같다. 대조군이 157.18 mg/dL로 유의적으로 가장 낮은 함량을 보였다. 실험군에서는 흑마늘 추출물 급이군(BG)이 210.36 mg/dL로 유의적으로 가장 높았으며, 개똥쑥 추출물 급이군(GS)은 158.80 mg/dL로 대조군과 유사한 수준이었다. 혼합물의 경우에는 MBS-II 군이 MBS-I 군에 비해 유의적으로 낮았으며, 이는 대조군 및 GS군과 유사하였다. 본 연구의 결과에서는 흑마늘 추출물 급이군(BG)이 대조군 및 여타의 실험군에 비하여 유의적으로 높은 혈당 수준을 보였는데, Jain AK et al (1993) 및 Ali M과 Thomson M (1995)은 임상실험 결과에서 마늘 투여로 인한 혈당의 증가는 관찰할 수 없다고 보고하였으며, Chang ML과 Johnson MA (1980)는 고당질 식이를 섭취했을 때 마늘 및 양파 등과 같은 allium속 식물류는 인슐린의 분비를 증가시켜 혈당을 감소시킨다고 고찰한 바 있어 본 연구와는 다소간 상이한 점이 있었다. 반면에 마늘 중 유리당을 분석한 결과에서 생마늘은 4종, 흑마늘은 6종이 검출된 바 있으며, 흑마늘은 생마늘에 비해 sucrose 함량은 약 1.6배, glucose 함량은 약 2배, fructose의 함량은 무려 32배 정도 높았다는 보고가 있다(Choi DJ et al, 2008). 더욱이 생마늘이 흑마늘

로 제조되는 과정 중 마늘 내의 이당류는 점차 분해되고 상대적으로 단당류의 함량이 증가됨으로써 이러한 단당류가 흑마늘의 갈변반응에 관여하는 것으로 추정된다는 보고도 있다(Shin JH et al, 2008a). 본 연구에서 흑마늘 추출물 급이군(BG)에서 혈당이 유의적으로 높았던 것도 시료 중 당의 함량과 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다. 개똥썩은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높은 것으로 보고된 바 있는데(Ryu JH et al, 2011a), 폴리 페놀성 물질은 당뇨병 산화적 스트레스로 생성된 유리 라디칼을 효과적으로 소거하여 혈당의 정상화에 기여할 수 있다고 보고되어 있다(Ashok Kumar BS et al, 2011). 따라서 MBS-I 및 MBS-II 군은 흑마늘과 개똥썩의 상호작용에 의해 흑마늘 추출물 급이군에 비해 유의적으로 혈당을 감소시킬 수 있는 것으로 판단된다. 이로써 개똥썩은 흑마늘에 첨가됨으로써 흑마늘의 당 성분에 의한 혈당 상승의 저해 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

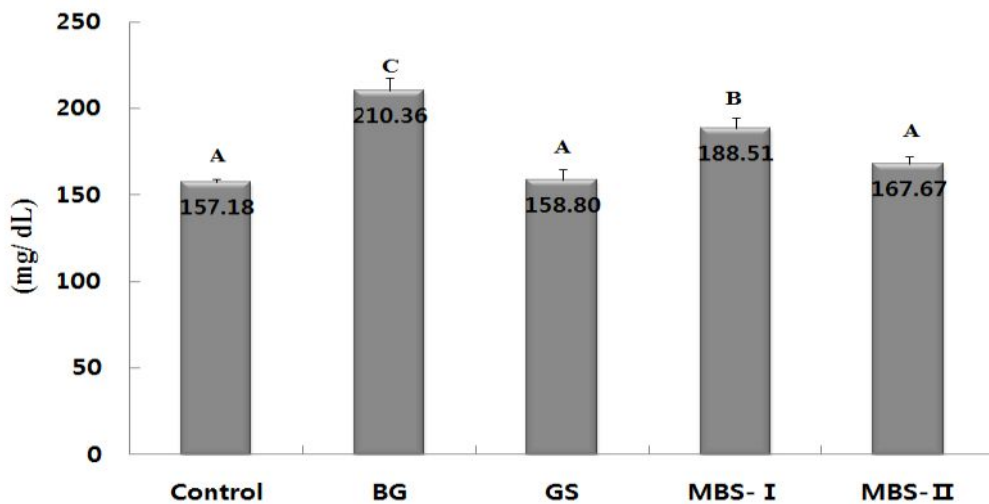


Fig. 20. Serum glucose level by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats.

Values are mean±SD (n=7)

<sup>A-C</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p<0.05$ .

#### (4) 혈청 총 protein, albumin 및 globulin 함량

Table 39는 강제운동과 함께 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물을 4주간 흰쥐에게 급이하였을 때 혈액 내 단백질 영양상태에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈청 총 단백질, 알부민 및 글로불린 함량을 측정된 결과이다. 총 단백질 함량은 6.35~7.21 g/dL 범위로 실험군간에 유의차가 없었다. 알부민 함량은 대조군에서 4.42 g/dL였으며, 개똥썩 추출물 급이군(GS)이 5.57 g/dL로 유의적으로 높았으며, 그 외 실험군은 5.00~5.30 g/dL로 비슷한 함량으로 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물의 농도에 따른 유의적 차이는 보이지 않았다. 글로불린 함량은 1.52~2.21 g/dL의 범위로 실험군간에 유의차가 없었다.

혈청 총 단백질 함량은 체내의 아미노산 요구량과 각 단백질의 합성율을 반영하여 체내 단백질 상태를 평가하는데 유효한 지표로 이용된다(Hwang EH et al, 2001). 혈청 알부민은 혈청 총 단백질의 50~70%를 차지하며 혈장 교질 삼투압의 유지와 각종 영양소 등의 운반에 중요한 기능을 담당하며, 일반적으로 총 단백질의 농도와 상관관계를 가지며 체내 단백질 대사의 좋은 지표로 이용되고 있다(Lee CU et al, 2007).

Table 39. Serum total protein, albumin and globulin level by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

Groups	Total protein	Albumin	Globulin
Control	6.35±0.28 <sup>1)NS</sup>	4.42±0.27 <sup>A2)</sup>	1.90±0.50 <sup>NS</sup>
BG	7.21±1.07	5.00±0.16 <sup>B</sup>	2.21±1.09
GS	7.09±0.41	5.57±0.13 <sup>C</sup>	1.52±0.52
MBS- I	6.85±0.11	5.30±0.10 <sup>B</sup>	1.54±0.18
MBS- II	7.11±0.52	5.16±0.42 <sup>B</sup>	1.95±0.81

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=7)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$

<sup>NS</sup>Not significant.

#### (5) 혈청 BUN 함량

강제운동시 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물을 급이하여 혈액 내 요소 질소 함량을 측정한 결과는 Table 40과 같다. BUN(Blood urea nitrogen)은 혈중 요소질소로서 단백질 대사 이상을 나타내는 지표로 사용되고 있으며 고단백질 식이, 체단백질의 분해, 신장의 배설기능 장애, 췌뇨, 약물 등에 의한 신장 장애시에 증가되며, 중증, 간부전, 선천성 요소 cycle의 결손 등에 의해 감소된다. 더욱이 흰쥐의 BUN 정상범위는 5~21 mg/dL 수준으로 알려져 있다(Baker HJ et al, 1984). 본 연구에서 대조군의 BUN 함량은 19.34 mg/dL로 흑마늘 추출물 급이군(17.47 mg/dL)과 MBS-II군(16.74 mg/dL)은 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, 대조군을 비롯한 모든 실험군의 BUN 수준은 흰쥐의 정상범위에 속하는 것으로 확인되었다. 고지방 식이에 생마늘즙을 첨가급이한 경우 1% 급이군에서는 대조군에 비해 BUN 함량의 증가가 보이지 않았으나, 2% 급이군에서 유의적으로 증가되어 BUN 함량의 증가가 마늘에 의해 영향을 받는다는 보고도 있다(Sheo HJ 1999). 이와같이 생마늘의 다량 복용은 신장이나 간 조직의 기능에 독성을 유발할 수 있다는 지적이 있는데, 흑마늘은 생마늘과 달리 고온에서 숙성과정을 거침으로써 폴리페놀 화합물이나 플라보노이드 물질이 증가되며, 무기물 및 아미노산의 함량도 훨씬 높은 것으로 보고되고 있다(Choi DJ et al, 2008). 따라서 본 연구결과 흑마늘 추출물 급이군이 대조군에 비해 BUN 함

량이 유의적으로 낮은 것도 상기의 보고와 관련이 있을 것으로 추정된다.

Table 40. BUN content on serum by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

Groups	BUN (mg/dL)
Control	19.34±0.96 <sup>B1,2)</sup>
BG	17.47±0.33 <sup>A</sup>
GS	18.81±0.37 <sup>B</sup>
MBS-I	18.72±0.14 <sup>B</sup>
MBS-II	16.74±0.28 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=7)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (6) 혈청 AST, ALT 및 ALP 활성

강제운동에 의한 산화적 스트레스의 유발시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 4주간 급여하였을 때 흑마늘 추출물 및 개똥쑥 추출물 급여군과 비교하여 AST, ALT 및 ALP 활성을 측정 한 결과는 Table 41과 같다.

Table 41. AST, ALT and ALP activities by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

Groups	AST (U)	ALT (U)	ALP (U)
Control	82.33±2.08 <sup>1)B2)</sup>	23.00±1.00 <sup>NS</sup>	22.10±1.93 <sup>B</sup>
BG	70.00±7.00 <sup>A</sup>	21.33±2.08	18.20±0.46 <sup>A</sup>
GS	74.00±3.46 <sup>A</sup>	22.00±1.73	17.67±1.89 <sup>A</sup>
MBS-I	73.67±0.58 <sup>A</sup>	21.00±0.00	17.58±1.74 <sup>A</sup>
MBS-II	74.02±3.00 <sup>A</sup>	20.67±2.89	16.69±2.35 <sup>A</sup>

AST and ALT ; Karmen unit/mL, ALP ; K-A unit

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=7)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$

<sup>NS</sup>Not significant.

혈중 AST 및 ALT의 활성은 산화적 스트레스를 받게 될 경우 활성이 현저히 증가된다. 이는 간 조직 중 주로 세포 내에 존재하다가 간세포의 손상 시 간세포의 막투과성이 항진되어 혈액



중으로 유출되어 혈액 내에 증가되는 것으로 두 효소의 활성을 측정해 봄으로써 간 손상의 정도를 알아볼 수 있다. 특히 간염이나 알콜성 간질환 및 일반 간질환을 판정하는데 지표로 이용되기도 한다(Lee EH & Chyun JH, 2007). ALP는 여러 가지 인산에스터 화합물을 가수분해시키는 효소로 골질환, 간질환, 담도질환, 악성종양 등에서 활성치가 상승하는 것으로 보고된 바 있다(Moon YH et al, 2006). 본 실험 결과 AST 활성도는 대조군에서 82.33 Karmen unit/mL로 시료 급이군에 비해 유의적으로 높았으며, 실험군에서는 70.0~74.0 Karmen unit/mL의 범위로 유의차가 없었다. ALT 활성도는 모든 실험군간에 유의차가 없었다. ALP 활성은 AST 활성과 비슷한 경향이었으며, 실험군에서는 17.58~18.20 K-A unit의 범위였다.

(7) 혈청 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤의 함량

강제운동에 의한 산화적 스트레스가 유발된 흰쥐에게 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 급이한 후 혈청의 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤의 함량을 측정한 결과는 Table 42와 같다.

Table 42. Total lipid, triglyceride and total cholesterol level on serum by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

(mg/dL)			
Groups	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
Control	182.58±2.89 <sup>1)B2)</sup>	37.48±3.82 <sup>B</sup>	70.28±6.54 <sup>B</sup>
BG	179.25±4.33 <sup>B</sup>	34.92±3.15 <sup>AB</sup>	66.07±4.01 <sup>AB</sup>
GS	170.92±3.82 <sup>A</sup>	39.88±3.94 <sup>C</sup>	65.56±1.08 <sup>AB</sup>
MBS-I	166.97±2.96 <sup>A</sup>	31.35±0.98 <sup>A</sup>	62.02±0.72 <sup>A</sup>
MBS-II	165.50±2.20 <sup>A</sup>	32.97±0.52 <sup>AB</sup>	61.00±0.52 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=7)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at *p* <0.05

흑마늘 추출물 급이군(BG)을 제외한 실험군에서는 대조군에 비하여 혈청 중의 총 지질 함량이 유의적으로 낮은 경향이였다. 중성지방은 개똥쑥 추출물 급이군(GS)이 39.88 mg/dL으로 유의적으로 가장 높은 함량이였으며, 이는 대조군보다 높은 수치였다. 총 콜레스테롤은 대조군이 70.28 mg/dL로 모든 실험군은 대조군에 비해 유의적으로 낮은 수준이였다.

Kang MJ et al(2008)은 고지혈증이 유발된 쥐에게 각각 생마늘, 찌마늘 및 흑마늘을 급이시킨 결과, 흑마늘을 급이한 실험군에서 생마늘과 찌마늘을 급이한 군에 비해 유의적으로 높은 지질개선 효과를 보였으며, Kim SH와 Baek YH(2011)은 유산소운동을 수행한 흰쥐에 흑마늘을

급이한 결과, 중성지방과 총 콜레스테롤 함량이 시료 무첨가군에 비해 유의적으로 감소된 경향이 있었다고 보고한 바 있는데, 이는 본 연구결과와 유사하였다.

혈청 지질 성분을 분석한 결과, 전반적으로 대조군이 실험군에 비하여 지질함량이 높은 경향을 보였으며, 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 급이한 실험군이 흑마늘 및 개똥쑥 단일 추출물 급이군보다 총 지질, 중성지방, 총 콜레스테롤의 모든 항목에서 지질함량이 유의적으로 낮은 경향이였다. 또한, 혼합물간의 비교에서 MBS-I 군과 MBS-II 군간의 유의차는 보이지 않았다. 일반적으로 혈청 콜레스테롤 농도의 상승은 사람을 비롯한 동물에서 순환기계 질환 발생의 위험인자로 알려져 왔으며, 식이지방은 지질농도의 중요한 조절인자임이 밝혀져 왔다(Grundy SM, 1986; Gurr MI et al, 2002). 따라서 생체가 산화적 스트레스를 받을 경우 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 섭취는 흑마늘의 생리활성을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

#### (8) 혈청 HDL, LDL 및 VLDL-콜레스테롤 함량

산화적 스트레스를 받은 흰쥐에게 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 급이에 따른 혈청 HDL-, LDL- 및 VLDL-콜레스테롤 수준의 변화는 Table 43과 같다. HDL-콜레스테롤 함량은 모든 실험군간에 유의차가 적었으나, 개똥쑥 추출물 급이군이 다소 낮았다. LDL-콜레스테롤 함량은 대조군이 39.28 mg/dL로 유의적으로 높았으며, MBS-I 군 및 -II 군이 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다. VLDL-콜레스테롤 함량은 대조군에 비해 MBS-I 군이 유의적으로 감소된 경향이였다.

HDL-콜레스테롤은 항동맥경화의 지표로 이용되며, 콜레스테롤을 말초혈관에서 간 조직으로 수송을 촉진함으로써 동맥경화의 진행을 억제시키거나 경감시키는 작용을 하며(Gordon T et al, 1977), 일반적으로 “좋은 콜레스테롤”로 널리 알려져 있다. 개똥쑥 추출물 급이군은 흑마늘 추출물 급이군에 비해 HDL-콜레스테롤의 함량이 유의적으로 낮았으나, 이들 흑마늘과 개똥쑥의 추출 혼합물의 급이시에는 개똥쑥 단일 추출물의 급이보다 HDL-콜레스테롤의 함량이 상승하여 흑마늘 추출물 급이군과 유사한 수준이었다. 혈관 내에 콜레스테롤을 축적하여 동맥경화증과 심장질환의 발병을 증가시키며(Lichtenstein AH et al, 2006; Rosamond W et al, 2008), 일명 “나쁜 콜레스테롤”로 통하는 LDL-콜레스테롤의 함량은 대조군과 흑마늘 또는 개똥쑥 단일 추출물 급이군간에 유의적인 차이가 없었다. 반면에 혼합물의 급이시에는 유의적으로 감소되는 결과였는데, 특히 혼합물의 농도가 높을수록 LDL-콜레스테롤의 감소는 더욱 효과적이었다.

전반적으로 혼합물의 경우 농도에 따른 콜레스테롤 수준에 대차를 보이지는 않았으며, 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 급이시 이들의 단일 추출물의 급이보다 HDL-콜레스테롤의 함량은 증가하고 LDL- 및 VLDL-콜레스테롤의 함량은 감소할 것으로 예측되었다. 즉, 체내 지질개선의 약물요법으로 사용되는 합성 의약품들은 LDL-콜레스테롤이나 중성지방을 감소시키는 반면 복통, 소화불량, 고혈당, 망막병증, 불면증, 근육병증 등의 부작용이 따르기도 하는데(Cha BY, 2001), 이러한 부작용을 최소화 할 수 있고 체내 지질개선 효과가 뛰어난 천연소재의 개발이

절실히 필요한 현재의 상황에서 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물은 충분히 매력적인 소재가 될 수 있을 것으로 생각된다.

Table 43. HDL-, LDL- and VLDL-cholesterol level on serum by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

(mg/dL)

Groups	HDL	LDL	VLDL
Control	23.45±2.18 <sup>1)AB2)</sup>	39.28±7.83 <sup>C</sup>	7.69±0.81 <sup>B</sup>
BG	26.88±5.97 <sup>B</sup>	35.23±3.41 <sup>BC</sup>	6.88±0.73 <sup>AB</sup>
GS	19.44±5.02 <sup>A</sup>	36.48±3.24 <sup>BC</sup>	7.62±0.42 <sup>B</sup>
MBS-I	25.98±2.08 <sup>B</sup>	30.92±1.56 <sup>AB</sup>	6.24±0.24 <sup>A</sup>
MBS-II	29.23±3.33 <sup>B</sup>	25.15±0.48 <sup>A</sup>	6.72±0.28 <sup>AB</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=7)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$

#### (9) 간조직의 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤의 함량

강제운동으로 산화적 스트레스가 유발된 흰쥐에게 흑마늘 및 개똥쑥 추출 혼합물의 급이시 간 조직의 지질 성분 변화에 미치는 영향을 측정한 결과는 Table 44에 나타내었다.

총 지질은 26.98 mg/g인 대조군에 비하여 실험군에서는 22.40~25.21 mg/g으로 대조군에 비해 유의적으로 낮은 함량이었다. 특히 흑마늘 추출물 급이군(BG)과 MBS-I 군에서 가장 낮았다. 중성지방 함량은 대조군에 비해 흑마늘 추출물 급이군에서 유의적으로 낮았으며, 개똥쑥 추출물 급이군은 대조군과 비슷한 수준이었다. 또한 MBS-I 군과 MBS-II 군은 시료의 농도에 따른 유의차를 보이지 않았다. 총 콜레스테롤 함량도 대조군에 비해 흑마늘 추출물 급이군에서 유의적으로 가장 낮은 함량이었다. 개똥쑥 추출물 급이군은 대조군과 비슷한 수준이었다. 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 급이군은 시료의 농도에 따른 유의차를 보이지 않았다.

식물류 중에 존재하는 페놀성 화합물은 동물체의 혈액(Woo MN et al, 2009) 및 간 조직(Jain AK et al, 1993)의 지질함량을 감소시키는 것으로 알려져 있으며, 마늘 생리활성의 주요인자인 allicin 역시 체내 지질 함량을 낮추는 주된 물질로 보고되어 있다(Yu YY & Shaw MY, 1994). 본 연구에서는 대조군에 비하여 실험군에서 흑마늘이나 개똥쑥의 추출물 급이시 체내 지질 수준이 감소되는 경향이었는데, 개똥쑥 추출물의 급이시 총 지질 함량에는 유의적인 감소를 보였으나, 중성지방과 총 콜레스테롤 함량은 대조군과 유의적 차이를 보이지 않아 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 지질개선 효과는 흑마늘 중의 allicin이나 갈변 물질 등의 항산화 물질에 의한 영향이 크게 작용할 것으로 생각된다.

Table 44. Total lipid, triglyceride and total cholesterol level on liver tissue serum by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

(mg/g liver tissue)

Groups	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
Control	26.98±0.73 <sup>1)C2)</sup>	11.11±0.77 <sup>B</sup>	2.94±0.06 <sup>C</sup>
BG	23.13±0.78 <sup>A</sup>	8.66±0.12 <sup>A</sup>	2.26±0.08 <sup>A</sup>
GS	25.21±0.42 <sup>B</sup>	11.40±0.69 <sup>B</sup>	2.86±0.05 <sup>C</sup>
MBS- I	22.40±1.43 <sup>A</sup>	8.96±0.74 <sup>A</sup>	2.48±0.07 <sup>B</sup>
MBS- II	22.79±1.49 <sup>A</sup>	9.53±1.18 <sup>A</sup>	2.39±0.08 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (*n*=7)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at *p* <0.05

(10) 혈청 및 간 조직의 항산화 활성

흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 급이가 강제운동에 의한 산화적 스트레스 유발시 흰쥐의 혈청 및 간 조직의 항산화 활성에 미치는 영향을 측정된 결과는 Table 45와 같다.

Table 45. Antioxidant activity by DPPH radical scavenging on serum by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

Groups	Antioxidant activity by DPPH radical scavenging (%)	
	In serum	In liver
Control	29.86±0.66 <sup>1)A2)</sup>	49.63±1.64 <sup>A</sup>
BG	33.81±2.44 <sup>B</sup>	53.42±0.71 <sup>B</sup>
GS	36.84±2.42 <sup>C</sup>	55.77±0.84 <sup>CD</sup>
MBS- I	38.00±2.34 <sup>C</sup>	53.75±0.65 <sup>BC</sup>
MBS- II	39.43±1.24 <sup>C</sup>	57.09±2.55 <sup>D</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (*n*=7)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at *p* <0.05

시료 추출물을 급이한 실험군에서 항산화 활성은 대조군보다 유의적으로 높았으며, 개똥쑥 추출물 급이군은 흑마늘 추출물 급이군보다 유의적으로 높은 활성이었다. 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물은 농도에 따른 항산화 활성의 유의적인 차이는 없었으나, 흑마늘 추출물 급이군에 비해서는 혼합물에서 유의적으로 활성이 높았다.

간 조직의 항산화 활성은 혈청에 비해 전반적으로 높았으며, 혈청의 항산화 활성과 마찬가지로

로 실험군의 활성이 대조군보다 유의적으로 높았다. 더욱이 흑마늘 추출물 급이군에 비해 개똥썩 추출물 급이군과 MBS-II 군에서 유의적으로 높은 활성을 보였다. 특히, 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물에서도 농도가 높은 MBS-II 군이 57.09%로 MBS-I 군(53.75%)보다 유의적으로 항산화 활성이 높았다.

양파와 마늘과 같은 allium속 식물류에 함유된 플라보노이드와 항산화 활성은 밀접한 관련이 있으며(Haenen GR et al, 1997), Cavar S et al(2012)과 Ryu JH et al(2011a,b)은 개똥썩의 항산화 활성이 시료 중의 페놀성 화합물에 의존적이라고 한 점을 미루어 볼 때 흑마늘 및 개똥썩 추출물의 섭취는 산화적 스트레스시 흰쥐의 혈액 및 간 조직의 항산화 활성 유지 또는 증가에 대한 기여도가 높을 것으로 사료된다. 따라서 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물은 생체내 산화적 스트레스시 높은 유리 라디칼 소거능력을 가짐으로써 산화적 스트레스를 완화시킬 수 있을 것으로 생각된다.

#### (11) 혈청 및 간 조직의 TBARS 함량

흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물이 강제운동에 의한 산화적 스트레스를 유발한 흰쥐에서 체내 지질과산화물의 변화에 미치는 영향은 Table 46과 같다. 지질과산화물은 TBARS 함량으로 나타내었으며, 혈청 및 간 조직 모두 대조군에 비하여 실험군의 지질과산화물 함량이 유의적으로 감소되었다. 혈청의 경우에는 31.16~34.67 mmol/mL로 실험군간에 유의차가 작았으나 간 조직의 경우에는 205.17~218.60 mmol/g으로 실험군간에 유의적인 차이를 보였다. 특히, 실험군 중 항산화 활성이 가장 낮았던 흑마늘 추출물 급이군에서 지질과산화물 함량이 가장 많았으며, 항산화 활성이 가장 높았던 MBS-II 군에서는 지질과산화물의 함량이 오히려 낮은 경향을 보여 시료 추출물의 항산화 활성과 지질과산화물의 생성간에는 음(-)의 상관관계가 성립되었다.

Table 46. TBARS contents on serum and liver tissue by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

Groups	TBARS contents	
	In serum (mmol/mL)	In liver (mmol/g)
Control	41.60±2.30 <sup>1)C2)</sup>	238.72±4.40 <sup>D</sup>
BG	33.11±2.17 <sup>AB</sup>	218.60±5.31 <sup>C</sup>
GS	34.67±2.38 <sup>B</sup>	210.33±4.13 <sup>AB</sup>
MBS-I	31.16±1.81 <sup>A</sup>	214.73±2.88 <sup>BC</sup>
MBS-II	31.78±1.05 <sup>AB</sup>	205.17±5.37 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=7)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at p <0.05

산화적 스트레스는 체내의 활성 산화물과 항산화 물질 사이의 불균형으로 일어나며 (Gutteridge JMC & Halliwell B, 1994), 운동으로 인한 지질과산화물이나 malondialdehyde 함량의 증가에 대한 많은 선행연구를 볼 때 (Kanter MM et al, 1993; Alessio HM, 1993), 본 연구결과 강제운동을 통하여 체내에 축적된 활성 산화성물질이 흑마늘과 개똥쑥 추출물 중에 존재하는 페놀성 물질을 비롯한 여러 항산화 인자에 의해 제거됨으로써 산화적 스트레스가 감소되는 것으로 추정된다. Haenen GR et al (1997)은 allium속 식물류에 함유된 플라보노이드는 항산화 효소의 활성 증가 및 직접적인 유리 라디칼의 제거제로 작용하여 체내 과산화지질의 생성을 억제함으로써 조직을 보호한다고 보고한 바 있다.

(12) 간 조직의 항산화 효소 활성

산화적 스트레스가 유발된 흰쥐에게 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 급이하였을 때 간 조직의 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 측정된 결과는 Table 47과 같다. 세포질의 항산화계 (cytosolic antioxidant system)는 복잡한 기전으로 이루어지며, catalase는 과산화수소를 주로 제거하고 superoxide dismutase(SOD)는 superoxide 라디칼을 제거한다. Glutathione peroxidase (GSH-px)는 과산화수소 제거, 해독작용, 손상된 세포의 복구 등 다양한 역할에 관여하는데 특히, DNA의 파괴 또는 변형과 같은 손상을 복구하는 역할도 신속하게 진행시킨다(Niess AM et al, 1999).

Table 47. Catalase, SOD and GSH-px activities by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk extract in exercised rats

Groups	Catalase		SOD	GSH-px
	mitochondrial fr.	microsomal fr.	cytosolic fr.	cytosolic fr.
Control	0.66±0.08 <sup>1)A2)</sup>	1.17±0.13 <sup>A</sup>	32.89±2.96 <sup>A</sup>	193.92±26.46 <sup>A</sup>
BG	0.74±0.08 <sup>A</sup>	1.28±0.07 <sup>A</sup>	41.07±2.30 <sup>B</sup>	230.12±11.78 <sup>B</sup>
GS	1.20±0.06 <sup>B</sup>	1.24±0.05 <sup>A</sup>	48.19±1.50 <sup>D</sup>	281.76±14.22 <sup>C</sup>
MBS-I	1.54±0.11 <sup>C</sup>	2.17±0.05 <sup>B</sup>	42.38±4.21 <sup>BC</sup>	278.69±19.30 <sup>C</sup>
MBS-II	1.41±0.06 <sup>C</sup>	2.32±0.30 <sup>B</sup>	47.37±2.88 <sup>CD</sup>	319.25±7.43 <sup>D</sup>

Catalase;  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein, SOD;  $\text{U}/\text{min}/\text{mg}$  protein, GSH-px;  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  protein

<sup>1)</sup>Values are mean±SD ( $n=7$ )

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$

본 실험 결과 모든 항산화계 효소의 활성이 대조군에 비해 실험군에서 높았는데, 특히 microsome 분획물에서 catalase 활성을 제외하고는 개똥쑥 추출물 급이군이 흑마늘 추출물 급이군보다 유의적으로 높은 경향을 보여 이는 DPPH 라디칼 소거에 의한 항산화 활성 (Table 45)

과도 유사한 경향이였다. 또한 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물은 흑마늘과 개똥쑥 단일 추출물보다 활성이 높았으나, 혼합물(MBS-I, II)에서 농도에 따른 활성의 차이는 작았다.

생체내의 산화작용의 주된 요인으로 작용하는 활성산소는 탈진 운동에 관계된 대사에서 발생한다는 보고가 있으며(Davies KJ et al, 1982), 또한 인간의 근육운동은 운동시와 회복기에 라디칼을 발생시키고 특히 강도 높은 운동시 활성산소의 생성이 증가된다는 학설이 광범위하게 받아들여지고 있다(Davies KJ et al, 1982; Jenkins RR, 1988; Parker L, 1998).

강제운동을 통하여 산화적 스트레스를 유발시킨 흰쥐에게 흑마늘 또는 개똥쑥 추출물 및 이들의 혼합물을 급이한 결과 catalase, SOD 및 GSH-px 등의 항산화 효소 활성도가 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 흑마늘과 개똥쑥의 추출 혼합물 급이군은 단일 추출물의 급이군에 비해 활성이 높아지는 것으로 볼 때 이들 추출물들을 혼합함으로써 시너지 효과가 나타나는 것을 예상할 수 있었다.

Yoon GA (2007)은 운동을 통하여 스트레스를 유발시킨 흰쥐에 마늘을 급이시켜 catalase 및 SOD의 활성을 측정된 결과, 마늘 급이군의 catalase 활성이 마늘을 급이하지 않은 운동군보다 높았고, SOD 활성의 경우에는 운동군 뿐만 아니라 정상군보다 높은 결과를 보인다고 하였으며, 제 2형 당뇨병을 대상으로 동결 건조한 마늘과 흑마늘을 섭취시킨 결과 또한 항산화 효소 활성이 증가하였다는 보고도 있다(Lee YM et al, 2009). Allicin을 함유하고 있는 물질을 섭취시켰을 때 malondialdehyde와 같은 지질과산화물의 생성은 억제되고 SOD, catalase, GSH-px 등의 항산화 효소의 활성은 증가되었다는 보고(Lee YM et al, 2009)와 흑마늘과 개똥쑥의 항산화 활성에 관여하는 주요 물질이 플라보노이드와 폴리페놀성 물질이라는 연구 결과(Haenen GR et al, 1997; Cavar S et al, 2012)로 미루어 볼 때, 본 연구에서 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 급이시 생체내 항산화 효소계의 활성을 높일 수 있을 것으로 해석된다. 상기의 결과로부터 흑마늘과 개똥쑥의 혼합물은 흑마늘이나 개똥쑥의 단일 추출물보다 활성이 우수하였으나 추출물의 농도에 따른 차이는 작았기 때문에 적정 농도는 추출물 제조에 따른 경제성을 고려해 볼 때 MBS-I 이 효과적일 것으로 판단되었다.

## 6) 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 적정 섭취량 분석

강제운동 부하에 의해 산화적 스트레스가 발생하는 과정에서 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 급이시 생리기능 증대에 효과적인 혼합비율로 MBS-I 을 선정하였으며, 이에 따른 적정 섭취량을 알아보하고자 하였다.

### (1) 체중변화, 식이섭취량, 및 식이효율

트레드밀에 의한 강제운동으로 산화적 스트레스를 유발할 때 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물(7 brix+ 0.7 brix, 93:7, MBS-I)의 급이는 흑마늘이나 개똥쑥 단일 추출물의 급이보다 효과적으로 체내 지질저하 및 항산화계의 활성을 나타내었다. 이어서 혼합물의 급이량을 달리하여 섭취시킬 때 생체 내 산화적 스트레스에 미치는 영향을 알아보하고자 MBS-I 의 섭취량을 체중 60 kg

인 성인을 기준으로 하여 1일 100 mL, 200 mL 및 400 mL의 섭취량으로 조절하여 흰쥐에게 급이하였다. 이때 체중변화, 식이섭취량 및 식이효율은 Table 48에 나타내었다. 실험 사육 4주 후 최종 체중은 276.00~288.00 g으로 대조군과 비교해 볼 때 MBS-100과 MBS-200군은 유의차가 없었으나, MBS-400군은 유의적으로 감소되었다.

Table 48. Changes of body weight, food intake and FER by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Groups	Final body weight (g)	Body weight gain (g/4 weeks)	Food intake (g/day)	FER
Control	288.00±8.37 <sup>B1,2)</sup>	146.00±8.94 <sup>B</sup>	18.88±0.06 <sup>B</sup>	23.50±1.84A <sup>AB</sup>
MBS-100	282.00±5.70 <sup>AB</sup>	139.00±8.94 <sup>AB</sup>	18.73±0.17 <sup>B</sup>	24.00±0.71 <sup>AB</sup>
MBS-200	281.00±9.62 <sup>AB</sup>	134.00±5.48 <sup>A</sup>	18.65±0.16 <sup>AB</sup>	24.20±0.84 <sup>B</sup>
MBS-400	276.00±4.13 <sup>A</sup>	135.00±5.00 <sup>A</sup>	18.46±0.28 <sup>A</sup>	22.40±1.14 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=5)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

이러한 현상은 체중 증가량에서도 볼 수 있었는데, 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 급이로 전반적인 체중의 증가가 대조군에 비해 작은 것으로 나타났다. 식이 섭취량은 MBS-200과 MBS-400군에서만 대조군에 비해 유의적으로 감소되었으며, MBS-100군의 경우에는 식이섭취량의 조절에 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었다. 식이효율은 MBS-200군에서 다소 높았으며, 이는 대조군과 유의차는 없었으나, MBS-400군에 비해서는 유의적으로 높았다. 따라서 MBS-400군에서 볼 수 있듯이 1일 400 mL의 섭취량은 체중 증가는 감소시킬 수 있으나, 식이섭취량 및 식이효율을 저하시키므로 이러한 관점에서 볼 때 200 mL/day의 섭취량이 적절하리라 생각된다.

## (2) AST 및 ALT 활성

강제운동에 의한 산화적 스트레스 시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물(MBS-I)의 급이에 따른 간기능 지표인 AST 및 ALT 활성은 Table 49와 같다. AST 활성은 MBS-400군이 여타의 실험군에 비해 유의적으로 감소된 경향이였으며, 그 외의 실험군에서는 유의차가 없었다. ALT 활성도 AST 활성과 유사한 경향이였다.

20%의 알코올을 4주간 급이함으로써 간 손상에 따른 스트레스 유발 시 마늘과 한약재 추출물의 혼합급이는 AST 및 ALT 활성도를 감소시키는데, 마늘 추출물의 농도가 0.5%인 경우보다 1%일 때 유의적인 차이를 보였다는 보고가 있다(Lee SJ et al, 2009). 한약재를 비롯한 식물류의 조성물은 알코올을 섭취한 흰쥐에 급이시킬 때 AST 및 ALT 활성도를 감소시킴으로써 간 손상 억제 효과가 있다는 보고도 있다(Zheng CX et al, 2004).



반면에 생마늘, 찌마늘 및 흑마늘의 동결건조 분말을 고콜레스테롤 혈증 유발 흰쥐에 급이시 AST 및 ALT 활성도가 시료간에 유의차를 보이지 않았는데(Kang MJ et al, 2008), 본 연구결과에서 흑마늘 추출물은 대조군에 비해 유의적으로 AST 활성을 감소시켰으나, ALT 활성의 감소에는 영향을 주지 않았다. 흑마늘의 진한 흑색을 완화시켜 제조한 적갈색의 홍마늘 추출물을 비만 유도 흰쥐에 농도별로 급이한 결과 AST 활성은 3% 이상 급이시, ALT 활성은 1% 이상 급이시 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다고 보고된 바 있다(Lee SJ et al, 2011). 이러한 결과는 AST 및 ALT 활성이 시료의 항산화 활성과 관련이 있으므로 홍마늘의 비만쥐에 대한 AST 및 ALT 활성의 감소는 시료중의 페놀 화합물이나 갈변 물질 등에 기인한다고 보고되어 있다.

Table 49. AST and ALT activities by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Groups	(Karmen unit/mL)	
	AST	ALT
Control	82.33±2.08 <sup>B1,2)</sup>	23.00±1.00 <sup>B</sup>
MBS-100	81.50±1.32 <sup>B</sup>	23.75±0.44 <sup>B</sup>
MBS-200	80.33±1.53 <sup>B</sup>	23.50±1.32 <sup>B</sup>
MBS-400	74.17±1.04 <sup>A</sup>	20.67±0.58 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=5)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

### (3) 혈중 지질성분

강제운동에 의한 산화적 스트레스 시 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물(MBS-I)의 급이에 따른 혈중 지질성분은 Table 50과 같다. 혈중 총 지질 함량은 대조군이 182.58 mg/dL로 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물의 급이군보다 유의적으로 높았으며, MBS-100과 MBS-200군은 대조군에 비해 유의차는 있으나, 감소폭이 낮았다. MBS-400군은 대조군에 비해 약 7% 감소하였다. 중성지방 함량은 대조군에 비해 MBS-100군은 유의차를 보이지는 않았으나, 다소 상승된 경향이였다. MBS-200 및 MBS-400군은 대조군과 유의차는 적었으나, 다소 감소된 경향이였으며, MBS-100군과 비교해 보아 유의적으로 감소된 수준이였다. 총 콜레스테롤 함량은 대조군의 경우 73.62 mg/dL로 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물의 급이군에 비해 유의적으로 높았으며, MBS-100군에서는 유의차를 보이지 않았으나, 시료의 급이량이 많아짐에 따라 유의적인 차이로 감소되는 경향이였다.

마늘의 황화합물 함량은 양파나 브로컬리의 약 4배에 이르며 마늘의 효과에 대한 90% 이상의 연구결과가 황화합물을 중심으로 수행되어 있다(Wood D, 2001). 마늘의 지질 저하작용은 이

미 알려진 바 있으며(Sheo HJ, 1999; Kang MJ et al, 2008), 마늘과 식물류의 복합 처방시 혈중 콜레스테롤 수준은 대조군에 비해 약 20%정도, 중성지방은 약 15%정도 감소되었으나 마늘의 첨가량에 따른 유의차는 없는 것으로 보고되어 마늘과 식물류의 상호작용때문이라고 보고되어 있다(Shin JH et al, 2010b).

Table 50. Total lipid, triglyceride and total cholesterol level on serum by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

(mg/dL)

Groups	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
Control	182.58±2.89 <sup>C1,2)</sup>	37.48±3.82 <sup>AB</sup>	73.62±1.71 <sup>C</sup>
MBS-100	177.63±2.88 <sup>B</sup>	39.88±3.94 <sup>B</sup>	72.28±0.87 <sup>C</sup>
MBS-200	175.53±1.30 <sup>B</sup>	35.10±0.80 <sup>A</sup>	69.34±0.98 <sup>B</sup>
MBS-400	169.53±0.65 <sup>A</sup>	34.95±0.73 <sup>A</sup>	65.20±1.07 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=5)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (4) 간 조직 중의 지질성분

산화적 스트레스를 유발한 흰쥐에 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물(MBS-I)의 함량을 달리하여 4주간 급여한 후 간 조직의 지질 성분을 분석한 결과는 Table 51과 같다.

Table 51. Total lipid, triglyceride and total cholesterol level on liver tissue by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

(mg/g liver tissue)

Groups	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
Control	27.14±1.01 <sup>B1,2)</sup>	12.04±0.33 <sup>NS</sup>	2.94±0.06 <sup>B</sup>
MBS-100	27.25±0.70 <sup>B</sup>	11.90±0.48	2.96±0.03 <sup>B</sup>
MBS-200	24.78±0.46 <sup>A</sup>	11.95±0.77	2.90±0.02 <sup>AB</sup>
MBS-400	23.70±1.07 <sup>A</sup>	11.23±0.24	2.83±0.02 <sup>A</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=5)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

총 지질 함량은 대조군이 27.14 mg/g 이었으며, MBS-100군은 대조군과 유의차가 없었다.

MBS-200 및 MBS-400군은 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다. 중성지방 함량은 대조군에 비해 시료 급이시 다소간 감소되기는 하였으나, 전 실험군간에 유의차가 없었다.

총 콜레스테롤 함량은 대조군이 2.94 mg/g이었으며, MBS-100 및 MBS-200군은 대조군과 유의차가 없었으나, MBS-400군은 2.83 mg/g으로 대조군에 비해 유의적으로 낮은 함량이었다. 따라서 산화적 스트레스를 감소하기 위한 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물(MBS-I)의 적정 섭취량은 200~400 mL/일의 범위가 적정 수준이라고 생각된다.

마늘은 간 지방 합성 효소를 억제함으로써 간 조직에 지방 축적을 감소시키고, 혈중 콜레스테롤을 개선시키는 효과가 있다. 고콜레스테롤 식이성 흰쥐에 마늘과 한약재의 복합 처방시 간 조직의 총 지질 함량은 대조군에 비해 유의적으로 감소되어졌으며, 마늘 추출물의 첨가량이 총 식이량에 대해 0.3%, 0.5% 및 0.7%로 증가되어졌을 때 0.7%의 농도로 첨가될 경우 유의적인 효과를 보이는 것으로 보고된 바 있다(Lee SJ et al, 2009). 이러한 현상은 간 조직의 총 콜레스테롤 및 중성지방의 함량에서도 유사한 경향으로 나타났다. 따라서 마늘이 식이 중에 첨가되어질 때 유효 효과를 내기 위한 섭취량에는 한계량이 있을 것으로 추정된다. 본 연구에서도 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 경우 성인 60 kg 체중을 기준으로 할 때 200~400 mL/일의 범위가 산화적 스트레스에 의한 체내 지질 개선에 유효 섭취량인 것으로 생각된다.

#### (5) 혈청 및 간 조직의 항산화 활성

흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물(MBS-I)의 급이가 강제운동에 의한 산화적 스트레스를 유발한 흰쥐에서 혈청 및 간 조직의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거에 의해 측정한 결과는 Table 52와 같다. 혈청의 항산화 활성은 대조군에서 29.86%였으며, MBS-100군은 대조군과 유사한 수준이었다. MBS-200군은 32.13%였으며, MBS-400군은 39.55%로 200 mL/일 이상 급이시 항산화 활성에 유의적인 증가현상을 볼 수 있었다. 간 조직의 항산화 활성은 대조군에서 49.01%였으며, MBS-100 및 MBS-200군은 대조군과 유의차를 보이지 않았다. MBS-400군에서 57.01%로 400 mL/일 이상 급이시 비로소 간 조직의 항산화 활성이 유의적으로 증가되는 현상이었다.

Table 52. Antioxidant activity with DPPH radical scavenging on serum by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Groups	Antioxidant activity by DPPH radical scavenging (%)	
	In serum	In liver
Control	29.86±0.66 <sup>A1,2)</sup>	49.01±1.56 <sup>A</sup>
MBS-100	29.83±0.67 <sup>A</sup>	49.52±0.68 <sup>A</sup>
MBS-200	32.13±1.75 <sup>B</sup>	50.03±0.40 <sup>A</sup>
MBS-400	39.55±0.73 <sup>C</sup>	57.01±0.75 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=5)

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

Chung ST et al(2000)은 흰쥐의 최대 운동시 복합 항산화제를 급이한 결과 비급이군에 비해 지질과산화물의 함량이 유의적으로 감소되었으며, 체내 지질과산화물의 함량은 운동의 유무보다는 이러한 항산화제의 섭취유무에 더욱 의존적인 것으로 보고된 바 있다. 인체를 대상으로 한 경우에도  $\beta$ -카로틴, 비타민 C, 비타민 E 등의 항산화 복합제제를 5주간 섭취시킨 후 최대 산소 섭취량의 60% 및 90% 수준의 운동을 수행하였을 때 혈액 중 지질과산화물 함량은 운동의 강도와는 관계없이 항산화제 급이군에서 모두 유의적인 효과를 보였으나, 65%의 운동강도에서는 항산화제 급이에 따른 차이가 없었다고 보고되어 있다(Kanter MM et al, 1993). 따라서 항산화제의 섭취는 운동 방법이나 강도에 따라서는 상이한 결과를 보일 수 있으나, 이들 물질의 장기적인 섭취는 산화적 손상으로부터 생체 보호에 긍정적인 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

#### (6) 간 조직의 항산화 효소 활성화

강제운동에 의한 산화적 스트레스 유발시 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물(MBS-I)의 급이가 흰쥐의 간 조직 중 항산화 효소 활성화에 미치는 영향을 측정한 결과는 Table 53과 같다. Catalase, SOD 및 GSH-px 활성화는 대조군에 비해 MBS-I 을 급이한 실험군에서 효소 활성이 증가하는 현상을 보였다. 그러나 MBS-100군은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않아 100 mL/일의 혼합물 급이는 산화적 스트레스의 감소에 두드러진 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. MBS-200 및 MBS-400군은 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 급이량에 따른 (+)의 관계를 보였다.

썩 추출물을 환경오염 물질의 일종인 벤조피렌을 투여한 흰쥐에게 급이시 대조군에 비해 약 20% 정도로 항산화 효소 활성이 증가되었다는 보고가 있다(Nam SM et al, 1999). 특히 썩의 에탄올 추출물은 glutathione sulfur transferase(GST)를 활성화 시켜 활성화된 친전자성 외부 물질에 glutathione을 포함시켜 물에 용해성이 증가된 물질로 변화시켜 배설되기 용이하도록 하여 벤조피렌으로부터 간 손상을 방어하는 것으로 간주되고 있다(Kitahara A et al, 1984). SOD 활성화는 생체내 효소적 방어기구의 일종으로 superoxide radical을  $H_2O_2$ 로 환원시키므로 산소독으로부터 생체를 보호하는데, 본 연구 결과 강제운동에 의해 발생된 생체내 산화적 스트레스 현상이 가속화되어 대조군에서는 효소 활성이 감소되었으나, 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물의 급이로 산화적 손상이 다소간 완화되는 것으로 짐작된다.

이러한 산화적 스트레스로부터 생체 내 대사과정에서 유리 라디칼이나 지질과산화물이 지속적으로 생성되는데, 생체내에서는 이들의 축적을 저해하는 SOD, GSH-px 등의 산화적 방어체계가 있으나, 산화적 스트레스가 과도할 경우에는 방어체계를 보완할 수 있는 생리 기능성 물질이 요구되어진다. 따라서 상기의 결과로 볼 때 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물의 200~400 mL/일의 급이는 대조군에 비해 전반적으로 유의적인 효과를 나타내어 산화적 스트레스에 의한 생체 방어 시스템의 유지 또는 보강을 위한 적절한 섭취량인 것으로 판단된다.

Table 53. Catalase, SOD and GSH-px activities by supplementation of black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Groups	Catalase	SOD	GSH-px
	mitochondrial fr.	cytosolic fr.	cytosolic fr.
Control	0.66±0.06 <sup>A1,2)</sup>	33.57±2.77 <sup>A</sup>	196.92±6.70 <sup>A</sup>
MBS-100	0.72±0.03 <sup>A</sup>	35.36±0.80 <sup>A</sup>	203.38±7.68 <sup>A</sup>
MBS-200	0.95±0.13 <sup>B</sup>	40.79±2.76 <sup>B</sup>	213.38±3.62 <sup>B</sup>
MBS-400	1.27±0.03 <sup>C</sup>	48.63±1.29 <sup>C</sup>	250.65±4.40 <sup>C</sup>

Catalase ;  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein, SOD ;  $\text{U}/\text{min}/\text{mg}$  protein, GSH-px ;  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  protein

<sup>1)</sup>Values are mean±SD ( $n=5$ )

<sup>2)</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

### 7) 흑마늘과 개똥쑥 혼합에 의한 개발 제품의 *in vivo* 생리활성

강제운동 부하에 의해 산화적 스트레스를 발생시키는 과정에서 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물(MBS-I)의 효과적인 적정 섭취량을 구명하였으며, 이를 베이스로 하여 개발된 제품이 동일 조건에서 *in vivo* 생리활성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

#### (1) 식이섭취량, 식이효율 및 장기 중량

강제운동에 의한 산화적 스트레스 유발시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물(MBS-I)의 생체 내 항산화 체계 활성화에 유효한 섭취량은 200~400 mL/일인 것으로 나타났다. 따라서 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 베이스로 하여 배추출농축액과 결정과당 등을 첨가하여 제조한 개발 제품을 1협동기관으로부터 제공받아 300 mL/일을 기준으로 급이하여 상기와 동일한 조건에서 실험사육하였다.

식이섭취량, 체중 증가량, 식이효율 및 장기 중량을 측정한 결과는 Table 54와 같다. 강제운동에 따른 1일 식이 섭취량, 4주간의 총 체중 증가량 및 식이효율은 대조군과 개발 제품(MBS-p) 급이군간에 유의차가 없었다. 장기 중량은 간장, 신장, 심장 및 고환의 중량에서 대조군과 개발 제품(MBS-p) 급이군간에 유의차가 없었으나, 비장의 중량은 개발 제품 급이군에서 다소 높았다.

Table 54. Food intake, body weight gain, FER and organ weight by supplementation of product(MBS-p) based on the black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Analytical items	Control	MBS-p
Food intake (g)	18.81±0.15 <sup>NS1)</sup>	18.82±0.22
Body weight gain (g/4 weeks)	149.17±2.04 <sup>NS</sup>	148.33±2.58
FER	23.72±1.73 <sup>NS</sup>	23.62±0.91
Organ weight (g/100 g body weight)		
Liver	2.70±0.07 <sup>NS</sup>	2.72±0.03
Kidney	0.78±0.07 <sup>NS</sup>	0.79±0.03
Heart	0.34±0.03 <sup>NS</sup>	0.34±0.01
Spleen	0.19±0.01	0.21±0.02*
Testis	1.09±0.02 <sup>NS</sup>	1.08±0.10

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=9)

\*Mean compared between control and MBS-p are significantly different by student t-test at  $p < 0.05$ .

NS : Not significant.

## (2) 혈중 단백질 성분 및 간 기능 효소 활성

산화적 스트레스를 유발한 흰쥐에 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 개발 제품을 급이하여 혈액 내 단백질 성분을 측정된 결과는 Table 55에 나타내었다. 총 단백질과 알부민 함량은 대조군과 실험군간에 유의차가 없었다. 혈중 요소질소 함량은 개발 제품 급이군에서 유의적으로 높았다. 간 기능 지표 효소로 알려진 AST 활성은 대조군에 비해 개발 제품 급이군에서 유의적으로 낮았으나, ALT 활성은 두 군간에 유의차가 없었다(Table 55).

Table 55. Total protein, albumin, BUN contents and AST, ALT activities by supplementation of product(MBS-p) based on the black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Analytical items	Control	MBS-p
Total protein (g/dL)	6.13±0.20 <sup>NS1)</sup>	6.24±0.10
Albumin (g/dL)	3.95±0.09 <sup>NS</sup>	3.59±0.20
BUN (mg/dL)	10.67±0.79	13.03±1.10*
AST (Karmen unit/mL)	70.25±3.77*	64.50±2.38
ALT (Karmen unit/mL)	24.25±1.71 <sup>NS</sup>	22.50±0.58

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=9)

\*Mean compared between control and MBS-p are significantly different by student t-test at  $p < 0.05$ .

NS : Not significant.

Albumin은 혈청 단백질의 대부분을 차지하는데, 유리기와 전이 금속 이온의 소거물질로 알려져 있다(Soriani M et al, 1994). 본 연구결과 산화적 스트레스시 MBS-p의 급이는 혈액 내 단백질 성분의 함량 변화에는 두드러진 영향을 주지 못하는 것으로 판단된다. 본 연구에서 흑마늘 추출물은 고콜레스테롤 식이성 흰쥐의 AST 활성을 유의적으로 감소시키지 못하였으나(Kang MJ et al, 2008), 본 연구 결과에서 흑마늘과 개똥쑥의 추출 혼합물은 400 mL/일 급이시 산화적 스트레스가 유발된 흰쥐의 AST 활성을 유의적으로 감소시켰다(Table 49).

Table 55에서 보는 바와 같이 흑마늘과 개똥쑥의 추출 혼합물을 베이스로 한 개발 제품의 경우에도 300 mL/일 급이시 AST의 활성 감소에 유의적인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 시료 중에 함유된 개똥쑥에 기인된 것으로 추정되어진다. 이는 마늘과 한약재의 혼합물이 알코올성 산화적 스트레스에서 AST 활성을 감소시켰다는 보고(Lee SJ et al, 2009)로 미루어 짐작해 볼 수 있다.

### (3) 혈청 및 간 조직의 지질성분

강제운동에 의한 산화적 스트레스 시 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물의 개발 제품 급이에 따른 흰쥐의 혈청 및 간 조직의 지질 성분을 측정된 결과는 Table 56과 같다. 혈청 내 총 지질 및 총 콜레스테롤 함량은 개발 제품 급이군이 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다. 중성지방 및 HDL-콜레스테롤 함량은 대조군과 유의차가 없었다. 간 조직의 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 대조군과 개발 제품 급이군간에 유의차가 없었다.

Table 56. The lipids profiles on serum and liver tissue by supplementation of product(MBS-p) based on the black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Lipid profiles	Control	MBS-p
In serum (mg/dL)		
Total lipid	267.83±4.07 <sup>*1)</sup>	251.52±4.09
Triglyceride	38.14±3.34 <sup>NS</sup>	36.21±3.13
Total cholesterol	71.53±4.54 <sup>*</sup>	64.55±1.15
HDL-cholesterol	24.67±2.39 <sup>NS</sup>	27.13±2.56
In liver (mg/g)		
Total lipid	27.75±1.15 <sup>NS</sup>	26.11±1.48
Triglyceride	13.50±1.68 <sup>NS</sup>	11.86±0.18
Total cholesterol	2.71±0.20 <sup>NS</sup>	2.30±0.21

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=9)

<sup>\*</sup>Mean compared between control and MBS-p are significantly different by student t-test at p <0.05.

NS : Not significant.

운동은 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 감소시키는데, 더욱이 고에너지 식이를 한 흰쥐에서 인슐린 감수성을 상승시키고, glucose 내성을 개선시키는 것으로 알려져 있다(Kibenge MT & Chan CB, 2002). 따라서 운동은 에너지 소비로 인한 체중 감량뿐만 아니라 지질과 glucose의 이용을 향상시키게 된다. 인체를 대상으로 장시간의 유산소성 운동에서 마늘의 섭취는 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수준을 유의적으로 감소시키며, 특히 HDL-콜레스테롤의 유의적인 증가 경향을 보였다는 보고가 있다(Baek YH, 1995). 또한 흰쥐에서 운동으로 산화적 스트레스를 유발한 경우 마늘의 섭취는 혈액내 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량이 다소간 낮아지기는 하였으나 대조군과 유의차는 없는 것으로 보고된 바 있다(Yoon GA, 2007).

마늘이나 마늘 조제품이 혈중 지질 성분 변화에 영향을 주는 명확한 기작은 알려져 있지 않으나, 간 조직 중 지질 합성 및 콜레스테롤 합성에 관여하는 효소의 활성을 억제하는데(Yeh YY & Liu L, 2001), 특히 황화합물을 포함하는 마늘 추출물이 효과적으로 혈중 콜레스테롤 수준을 저하시키며, allicin, ajoene, S-allylcysteine, diallyl disulfide 등이 효능을 내는 주요 물질로 알려져 있다(Yeh YY & Liu L, 2001). 따라서 이들 황화합물은 생마늘에 비해 흑마늘에 그 함량이 높기 때문에 본 연구결과 흑마늘은 개똥쑥과 함께 혼합될 경우 흑마늘의 황화합물과 개똥쑥의 페놀성 화합물(Ryu JH et al, 2011a,b)에 의해 그 생리기능을 상승시키는데 효과적일 것으로 생각된다.

#### (4) 항산화 활성 및 지질과산화물 함량

흑마늘과 개똥쑥의 추출 혼합물을 베이스로 한 개발 제품을 산화적 스트레스 유발 흰쥐에게 급이하여 혈청 및 간 조직의 항산화 활성과 지질과산화물의 함량을 측정하였다(Table 57). 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거활성으로 측정하였는데, 대조군이 26.10%였으며, 개발 제품 급이군에서는 39.72%로 유의적인 증가를 보였다. 간 조직도 이와 유사한 경향으로 대조군이 48.16%였으며, 개발 제품 급이군이 54.29%로 흑마늘과 개똥쑥의 추출 혼합물을 베이스로 개발된 제품의 섭취시 생체내 항산화체계의 유지나 증강에 유효할 것으로 추정되었다.

지질과산화물의 함량은 대조군이 47.98 mmol/mL였으며, 개발 제품 급이군에서는 31.54 mmol/mL로 약 34% 정도가 감소된 것으로 나타났다. 간 조직의 지질과산화물의 함량도 대조군에서 유의적으로 높았는데, 개발 제품 급이시 대조군에 비해 약 21% 정도 감소되었다.

생체의 지질과산화 반응은 여러 종류의 독성 화합물이나 약물에 의한 간 손상 기전으로 세포내 산화적 스트레스로 유리 라디칼의 생성 증가, 항산화적 방어능력의 감소로 초래된다. 더욱이 이는 생체내 대사이상을 일으키고 DNA 손상, 발암, 돌연변이, 유전자의 손실, 및 노화 기전으로도 알려져 있다(Halliwell B & Gutteridge JM, 1984). 이러한 조직의 과산화적 손상의 지표가 되는 간 조직의 과산화물 함량이 MBS-p의 급이로 유의적인 감소를 보여 흑마늘과 개똥쑥은 일상 생활에서의 산화적 스트레스로 동반될 수 있는 과산화적 손상의 방지를 위한 우수한 기능성 식품으로 이용될 수 있을 것으로 보여진다.



Table 57. Antioxidant activity and TBARS content on serum and liver tissue by supplementation of product(MBS-p) based on the black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Analytical items	Control	MBS-p
Antioxidant activity		
In serum (%)	26.10±1.24 <sup>1)</sup>	39.72±1.91*
In liver (%)	48.16±1.22	54.29±1.33*
Lipid peroxide content		
In serum (mmol/mL)	47.98±2.50*	31.54±5.24
In liver (mmol/g)	191.87±3.20*	151.41±1.85

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=9)

\*Mean compared between control and MBS-p are significantly different by student t-test at  $p < 0.05$ .

#### (5) 간 조직의 항산화 효소 활성

흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 베이스로 한 개발 제품의 급이가 산화적 스트레스를 유발한 흰쥐의 간 조직 중 항산화 효소 활성을 측정된 결과는 Table 58과 같다. Catalase, SOD 및 GSH-px 활성 모두 MBS-p의 급이로 대조군에 비해 유의적으로 증가되었다.

세포에 존재하는 활성 산소에 대한 항산화 방어체계로 알려진 이들 효소는 활성 산소에 대한 연소반응의 개시를 저해하게 된다. 마늘에 함유량이 높은 S-allylcystein은 마늘의 주요 효능과 관련된 물질이며 과산화수소를 제거하는 작용이 있는 것으로 보고된 바 있다(Peng Q et al, 2002). 당뇨로 인한 산화적 스트레스시 S-allylcystein의 급이는 간 및 신장 조직의 지질과산화물 함량의 감소에 유의적이었으며, 더욱이 catalase, SOD 및 GSH-px 등의 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 당뇨병이 만성적인 합병증으로 진행의 예방에 효과적인 것으로 보고되어 있다(Shin CH & Ihm J, 2008).

Glutathion(GSH)은 glutamic acid, cysteinem glycine으로 된 tripeptide로 cysteine의 -SH기에 기인되어 환원성을 가진 GSH로 된다. 이러한 GSH는 심한 운동시 유산소성 조직의 산소 소비가 증가함에 따라 활성 산소종의 생성이 증가될 때 매우 중요하게 작용된다(Ji LL, 1995). Kim MJ & Lee SJ (2002)는 유산소 운동시 녹차를 급이한 흰쥐에서 정상군에 비해 20% 정도의 GSH-px 활성이 증가된 것은 녹차 중의 catechine이 항산화제로 작용하여 세포막의 소기관들을 과산화로부터 방어하여 이들 효소활성의 최적 구조를 유지시켜 주는데 기여한 것으로 추정하였다. 따라서 본 연구 결과에서도 흑마늘과 개똥쑥의 추출 혼합물 및 이를 베이스로 한 개발 제품에서 항산화 효소 활성이 대조군에 비해 증가된 것도 시료에 함유된 폴리페놀, 플라보노이드, 흑마늘 중의 갈변 물질 등과 같은 항산화 물질에 의한 항산화 효과에 의한 것으로 사료된다.

Table 58. Catalase, SOD and GSH-px activities by supplementation of product(MBS-p) based on the black garlic and Gaeddongssuk composite in exercised rats

Antioxidant enzyme activities	Control	MBS-p
Catalase (microsomal fr.)	1.15±0.05 <sup>1)</sup>	1.47±0.11*
SOD (cytosolic fr.)	31.66±1.54	45.68±1.32*
GSH-px (cytosolic fr.)	223.92±9.53	261.51±12.78*

Catalase;  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein, SOD;  $\text{U}/\text{min}/\text{mg}$  protein, GSH-px;  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  protein

<sup>1)</sup>Values are mean±SD ( $n=9$ )

\*Mean compared between control and MBS-p are significantly different by student t-test at  $p < 0.05$ .

### 8) 흑마늘 복합조성물 음료 제조를 위한 천연식물류의 선정

흑마늘 복합조성물 음료를 제조하기 위하여 항산화 및 면역활성 측면에서 기 연구된 천연식물류를 문헌조사로 스크리닝하였으며, 결과는 Table 59와 같이 총 82건의 연구 자료와 100여종 이상의 천연식물류가 스크리닝되었으며, 이 중 여러 연구자들을 통해 사용 빈도 및 활성이 우수한 식물류로 인지된 11종을 선정하였다. 선정된 11종의 천연식물류는 구기자, 황금, 오가피, 감국, 산약, 작약, 단삼, 뽕잎, 생강, 상황버섯 및 옥수수수염이다(Table 60).

Table 59. Screening of functional plant materials for antioxidant and immune enhancement

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
1	삼지구엽초 ( <i>Epimedium koreanum</i> NaKai)	뿌리, 줄기, 잎	T세포 (Molt-4) B세포 (Rhamos)	hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, water/단일	1.삼지구엽초 용매별 분획 추출물의 면역관련 활성, 2012, Korean J Food Preserv, 19(9) 110-115 2. Icariin 함량에 따른 삼지구엽초 추출물의 항돌연변이 및 면역활성, 2011, Korean J Food Preserv, 18(6) 938-945(열수 및 70% 에탄올 추출물/단일)	
2	팽이버섯 ( <i>Flammulina velutipes</i> )		비장세포	70% ethanol /단일	폐 한방슬러지로 배양한 팽이버섯( <i>Flammulina velutipes</i> ) 추출물의 면역세포 활성화 효과, 2012, J Life Sci, 22(6) 828-836	
3	포도	열매	RAW 264.7	50% Methanol /단일	포도 품종별 메탄올 추출물로부터 면역활성 분석, 2007, Korean J Food Preserv, 14(4), 419-424	
4	외톨개모자반 ( <i>Myagropsis myagroides</i> )		비장세포	물 추출물 /단일	외톨개모자반 물추출물의 면역활성 및 이화학적 특성에 미치는 감마선 조사의 영향, 2011, Korean J Fish Aquat Sci 44(1) 50-57	
5	고삼	뿌리	RAW 264.7	열수 추출물 /단일	고삼 발효 추출물의 면역활성에 관한 연구, 2011, Korean J Herbology, 26(2) 17-23	
6	승마 ( <i>Cimicifugae Rhizoma</i> )		RAW 264.7	물 추출물 /단일	Immunomodulatory effects of <i>Cimicifugae rhizoma</i> extracts in macrophages, 2006, J Food Sci Nutr 11: 268-272	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
7	별불가사리 ( <i>Asterina pectinifera</i> )		RAW 264.7	PBS 추출물 /단일	별불가사리 추출물의 면역세포 활성화 효과, 2007, J Korean Soc Food Sci Nutr 36(3): 269-275	
8	해당화 ( <i>Rosa rugosae</i> )	뿌리	T세포 (Molt-4) B세포 (Rhamos)	물 및 ethanol 추출물/단일	1. 해당화 뿌리 추출물의 면역 증진효과, 2003, Korean J Medicinal Crop Sci, 11(1) 13-18 2. 해당화의 과육 및 종자 추출물이 골형성 관련 세포에 미치는 영향, 2010, Korean J Plant Res, 23(2) 157-164	
9	월계화 ( <i>Rosa Chinensis</i> Jacq)	꽃	비장세포	열수추출물/단일	월계화 추출물의 면역억제 효능 연구, 2011, Korean J Oriental Physiology, Pathology 25(3) 459-465	
10	더덕 ( <i>Codonopsis lanceolata</i> )	뿌리	비장세포 및 RAW 264.7	열수추출물/단일	1. 림포사이트 및 클로널 마이크로파지계를 모델로 한 더덕열수추출물의 면역증강작용, 2002, Korean J Food Sci Technol, 34(4) 732-736 2. 더덕추출물이 면역세포에 미치는 영향, 1996, Korean J Food Nutr, 9(4) 379-384 3. 더덕추출물이 마우스 면역세포 증식에 미치는 영향, 2008, Korean J Food Nutr, 21(3) 263-268 4. 더덕 물추출물의 경구투여가 마우스 면역 세포 활성화에 미치는 효과. Korean J Nutr, 2009, 42(3), 207-212.	
11	큰갯버섯 ( <i>Lepiota procera</i> )		대식세포	물추출물/단일	큰갯버섯 추출물의 면역자극 활성화에 의한 항암 증진 효과, 2010, Korean J Pharmacogn, 41(2) 115-121	
12	고들빼기, 돌미나리, 메밀, 톳, 생강		비장세포	물 및 에탄올 추출물/혼합	1. 식물 혼합(고들빼기, 돌미나리, 메밀, 톳, 생강) 추출물이 마우스 면역세포 활성화에 미치는 영향, 2007, Korean J Food Nutr, 20(1) 74-78 2. 5가지(고들빼기, 돌미나리, 메밀, 톳, 생강) 혼합식품물 추출물의 마우스 면역세포 활성화 효과, 2008, Korean J Nutr, 41(2) 141-146	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
13	와송 ( <i>Orostachys japonicus</i> A. Berger)	줄기	비장 및 홍선세포	90% methanol/단일	와송 추출물이 면역체계에 미치는 영향, 2004, Korean J Medicinal Crop Sci, 12(4) 315-320	
14	복분자 ( <i>Rubus coreanus</i> )	열매	T세포 (Molt-4) B세포 (Rhamos)	물 추출물	나노 입자화 한 복분자 저온 추출물의 면역 활성화 증진, 2009, 17(1) 54-60	
15	영경귀 ( <i>Cirsium japonicum</i> var. <i>ussuriense</i> )	뿌리, 줄기, 잎	대식세포	물 추출물/단일	1. 영경귀 추출물이 중앙면역에 미치는 영향, Korean J. Oriental Medicine, 2006, 27(4) 30-47 2. 영경귀 70% 에탄올 추출물의 RAW264.7 세포에서 Heme oxygenase-1 발현을 통한 항염증 효과, 2012, Korean J Pharmacogn 43(1) 39-45 3. 영경귀 부위별 추출물의 항산화, 항염증효과. Kor J Herbology 2011, 26(4), 39-47	
16	곰의말채 ( <i>Cornus macrophylla</i> Wall.)	수피, 목부, 잎	T세포 (Molt-4) B세포 (Rhamos)	메탄올 추출물	곰의말채 부위별 추출물의 항암 및 면역증진 효과, 2008, Korean J Medicinal Crop Sci, 16(5), 349-355	
17	유자( <i>Citrus junos</i> ), 탕자( <i>Poncirus trifoliata</i> )	과피	비장세포	80% 에탄올 추출물	유자와 탕자 과피 추출물의 항산화 및 면역활성 효과, 2008, J Life Sci, 18(3) 403-408	
18	귀리		대식세포	0, 5, 10, 15, 20% ethanol 추출물	추출조건에 따른 귀리 추출물의 면역활성, 2005, Korean J Food Sci Technol, 37(1) 103-107	
19	함초 ( <i>Salicornia herbacea</i> )		비장세포	열수추출물	함초추출물의 마우스 면역증강 활성화, 2008, Korean J Microbiol Biotechnol, 36(2) 135-141	
20	인삼(백삼 및 홍삼)	뿌리	대식세포	70% 에탄올	1. 백삼 및 홍삼 추출물의 사상체질별 면역세포 활성화 효과, 2009, J Ginseng Res, 33(1) 33-39 2. 백삼이 포함된 이중탕약침액의 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 및 hydrogen peroxide생성에 미치는 영향. 2011. Korean J Acupuncture 28(1), 61-69	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
21	황금 ( <i>Scutellariae Radix</i> )	뿌리	비장세포	열수 추출물	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 알코올 침취한 생쥐에서 황금 열수추출물이 생쥐의 면역기능에 미치는 영향, 2006, J Korean Soc Food Sci Nutr, 35(5), 536-542.</li> <li>2. 사염화탄소로 간 손상이 유발된 흰쥐에서 황금 열수 추출물이 면역작용에 미치는 효과, 2009, Korean J Medicinal Crop Sci, 17(4) 273-279</li> <li>3. 황금 뿌리 추출물의 화학적 매개인자 방출과 면역반응에 대한 억제 효과, Korean J Medicinal Crop Sci, 2007, 15(2) 132-137.</li> <li>4. 황금 물추출물이 마우스 대식세포의 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. 2011. Kor J Herbology 26(1), 53-58</li> <li>5. 황금이 LPS로 유발된 Raw 264.7 cells의 염증인자에 미치는 영향. Kor J Herbology 26(2), 75-81.</li> </ol>	
22	시라자 ( <i>Anethum graveolens</i> L.)	과실	대식세포	열수추출물/단일	<p>시라자 추출물을 함유하는 면역질환의 치료 및 예방을 위한 면역증강용 조성물, 2007, Korean J Oriental Physiology, Pathology, 21(3) 700-704</p>	
23	오가피 ( <i>Acanthopanas Cortex</i> )	잎, 줄기, 뿌리	대식세포	50% 에탄올 추출물/단일	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 오가피 50% 에탄올 추출물이 면역, 항암, 뇌혈류 및 혈압에 미치는 영향, 2005, Korean J Oriental Physiology, Pathology, 19(5) 1213-1219</li> <li>2. 가시오가피 추출물의 알코올 분해 및 항염증 효과. 2010. Korean J Food &amp; Nutr 23(4), 542-548</li> </ol>	
24	울무( <i>Job's Teal</i> )		비장세포	물 및 에탄올 추출물/단일	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 울무 추출물이 마우스 면역세포 활성화에 미치는 영향, 2005, J Korean Diet Associ, 11(1) 44-50</li> <li>2. 4주동안의 울무 추출물 투여가 사이토카인 IL-1<math>\beta</math>, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>생성과 비장세포 증식에 미치는 영향, 2006, Korean J Food Nutr, 19(2) 201-206</li> </ol>	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
25	생강	뿌리	대식세포 및 비장세포	물 및 에탄올 추출물/단일	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포 활성화에 미치는 영향, 2004, Korean Nutr Soc, 37(1) 23-30</li> <li>2. 생강 분획에 따른 추출물이 마우스 비장세포와 Cytokine (IL-1, IL-6, TNF-)의 생성량에 미치는 영향, 2007, Korean J Food Nutr, 20(2) 125-133</li> <li>3. 생강추출물 투여에 의한 마우스 비장세포 및 대식세포 활성화 효과. 2004. Korean J Nutr 37(9), 780-785</li> </ol>	
26	상황버섯	균사체 (뿌리)	비장세포	열수 추출물/단일	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 상황버섯 균사체 추출물의 면역증진 효능, 2012, Korean J Pharmacogn, 43(2) 157-162</li> <li>2. 상황버섯 추출물이 정상 마우스와 cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역 기능에 미치는 영향, 2001, J Applied Pharmacology, 9 194-200</li> <li>3. 바우미 상황버섯 추출물의 항염증 효과에 관한 연구, 2010, Korean J Mycol, 38(2) 179-183</li> </ol>	
27	초적삼 ( <i>Stachys Sieboldii</i> MIQ)	뿌리	대식세포	75% 에탄올 추출물/단일	초적삼 추출물의 항암 및 면역 효과, 2002, Korean J Biotechnol Bioeng, 17(6) 520-524	
28	죽제비싸리 ( <i>Amorpha fruticosa</i> L.)	열매, 수피, 목부, 잎, 뿌리	T세포 (Molt-4) B세포 (Rhamos)	에탄올 및 메탄올 추출물/단일	죽제비싸리 부위별 추출물의 항암 및 면역활성, 2005, Korean J Medicinal Crop Sci, 13(1) 41-47	
29	차가버섯	균사체 (뿌리)	비장세포	열수추출물/단일	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 차가버섯 열수 추출물이 비장세포 증식과 cytokine 생성능에 미치는 영향, 2010, Yakhak Hoeji, 54(3) 179-183</li> <li>2. 차가버섯의 균사체 및 세포외다당체의 생산조건과 면역활성, 2009, J Life Sci, 19(11) 1617-1622</li> </ol>	
30	인진쑥	잎	비장세포	메탄올 추출물/단일	인진쑥 methanol 추출물이 암이 유발된 마우스의 비장세포 유래 cytokine 함량에 미치는 영향, 2009, J Vet Clin, 26(5) 408-412	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
31	팔손이나무 ( <i>Fatsia japonica</i> Decne. et Planch)	근피, 수피, 목부, 잎	T세포 (Molt-4) B세포 (Rhamos)	물 및 에탄올 추출물/단일	팔손이 용매별 추출물의 항 암 및 면역 활성화 탐색, 2005, Korean J Medicinal Crop Sci, 13(3) 87-92	
32	구기자 ( <i>Lycium chinense</i> Mill.)	과실, 잎, 뿌리	비장세포	열수추출물	구기자 부위별 추출물이 흰 쥐 비장세포의 증식에 미치는 영향, 2000, Korean J Medicinal Crop Sci, 8(4) 291-296	
33	인삼, 당귀		비장세포, 대식세포	열수추출물	인삼, 당귀 혼합추출물 경구 투여가 생쥐 비장포 및 대식 세포 활성화에 미치는 영향, 2007, Korean J Oriental Physiology Pathology, 2007, 21(2) 479-484	
34	옥수수		비장세포, 대식세포	물 및 에탄올 추출물	4주 동안의 옥수수 추출물 투여가 마우스 비장세포와 대식세포 생성에 미치는 영 향, 2011, Korean J Food Nutr, 24(1) 65-70	
35	흑대두 ( <i>Glycine Max</i> Merr.), 감초 ( <i>Glycyrrhiza</i> <i>Uralensis</i> )		비장세포, 대식세포	열수 추출물	흑대두·감초 혼합추출물이 생 쥐의 비장세포 및 대식세포 의 활성화에 미치는 영향, 2009, Korean J Oriental Physiology Pathology, 23(6) 1385-1391	
36	여지초 ( <i>Salvia plebeia</i> R. Br.)		비장세포	열수추출물 및 60% 에탄올 추 출물	여지초의 in vitro항암효과 및 면역세포 활성화에 미치는 영향, 2007, J Korean Soc Food Sci Nutr, 36(4) 377-392	
37	동충하초 ( <i>Cordyceps</i> <i>militaris</i> )		비장세포	50% 에탄올 추 출물	1. 밀리타리스 동충하초 에탄 올 추출물의 면역억제 마 우스 면역활성에 미치는 영향, 2012, J Korean Soc Food Sci Nutr, 41(4) 494-500 2. 중앙 면역에 미치는 동충 하초 추출물의 효과, 2006, Korean J Ori Med, 27(4) 12-29	
38	뽕 나무 버섯 ( <i>Armillaria</i> <i>mellea</i> )		대식세포	열수 추출물	대식세포와 자연살해(NK)세 포 활성화에 대한 뽕나무버섯 ( <i>Armillaria mellea</i> ) 추출물의 영향, 2004, Korean J Ori Med, 25(4) 161-170	
39	상기생		대식세포	물 추출물	상기생 물추출물이 대식세포 활성화와 Th1 반응에 미치는 효과, 2008, Korean J Oriental Physiology, Pathology, 22(1) 171-175	



번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
40	감태 ( <i>Ecklonia cava</i> )		비장세포	물 추출물/단일	식품 알레르기 마우스 모델에서 감태 물 추출물의 IgE 분비 억제 효과, 2010, J Korean Soc Food Sci Nutr, 39(12) 1776-1782	
41	어성초 ( <i>Houttuynia cordata</i> )		비장세포, 대식세포	methanol, hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, water 추출물/단일	어성초 추출물 첨가가 마우스 면역능 증진에 미치는 영향, 2005, J Korean Soc Food Sci Nutr, 34(2) 167-175	
42	큰 느타리 버섯 ( <i>Pleurotus eryngii</i> )	자실체	비장세포	열수추출물/단일	큰느타리버섯 ( <i>Pleurotus eryngii</i> ) 조다당체의 면역세포 활성화 효과, 2004, J Korean Soc Food Sci Nutr, 33(7) 1092-1097	
43	향부자 ( <i>Cyperus Rotundus</i> )		비장세포, 대식세포	열수추출물/단일	향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향, 2003, Korean J Oriental Physiology Pathology, 17(3) 771-776	
44	백림 ( <i>Ampelopsis japonica</i> )	뿌리	비장세포	물 추출물/단일	백림 추출물이 종양면역에 미치는 영향, 2005, Korean J Ori Med, 11(2) 113-140	
45	치콘 ( <i>Cichorium endivia</i> L.)	잎	T세포 (Molt-4) B세포 (Rhamos)	물 및 에탄올 초음파 추출물/ 단일	초음파 추출물을 이용한 치콘의 면역활성 증진, 2008, Korean J Medicinal Crop Sci, 16(1) 9-15	
46	미강( <i>Rice Bran</i> )		대식세포	에탄올 추출물	미강 에탄올 추출물의 RAW264.7 세포에서 항염증 효과, Yakkak Hoeji, 2011, 55, 456-461.	
47	갯쭉 ( <i>Artemisia fukudo</i> Makino)	잎	대식세포	메탄올 추출물 및 열수추출물	갯쭉( <i>Artemisia fukudo</i> Makino) 추출물의 LPS와 Interferon- $\gamma$ 로 자극한 RAW264.7 세포주의 NO 생성 저해효과, 2008, J East Asian Soc Dietary Life, 18(2) 198-206	
48	일엽추 ( <i>Securinega suffruticosa</i> )	잎	대식세포	에탄올 추출물	일엽추 추출물이 RANKL 유도 RAW264.7 Cell의 유전자 발현에 미치는 영향, 2010, Korean J Ori Pre Med Soc, 14(3) 13-26	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
49	강활 ( <i>Ostericum Koreaum</i> )		대식세포	물 추출물/단일	LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 강활 추출물의 염증성세포활성물질의 억제효과, 2008, Korean J Herbology, 23(3) 127-134	
50	큰비쭉 ( <i>Artemisia fukudo</i> )	잎, 줄기	대식세포	80% 에탄올, 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 추출물/단일	큰비쭉( <i>Artemisia fukudo</i> ) 추출물의 murine macrophage RAW 264.7 세포에서 <i>in vitro</i> 항염효과, 2007, Korean J Food Sci Technol, 39(4) 464-469	
51	김 ( <i>Callophyllis japonica</i> )		대식세포	70% 에탄올 추출물	김의 에탄올 추출물의 생쥐 대식세포주 RAW 264.7 세포에서의 산화질소와 종양 괴사 인자 -알파 생성 작용에 관한 연구, 2007, Ori Phar Exper Med, 7(4) 341-347	
52	고마리 ( <i>Persicaria thunbergii</i> )	잎	대식세포	메탄올 추출물	Lipopolysaccharide로 처리된 RAW264.7 세포에서 고마리 추출물의 항염증 효과, 2011, J Life Sci, 21(12) 1689-1697	
53	홍삼( <i>Red Ginseng</i> )	뿌리	대식세포	70% 에탄올 추출물/단일	Lipopolysaccharide로 유도된 RAW264.7 세포에서 MAPK에 의한 홍삼추출물의 항염증 효과, 2012, oean J Oriental Physiology Pathology, 26(3) 293-300	
54	회향 ( <i>Foeniculum vulgare</i> )	열매	대식세포	메탄올, 클로로포름, 부탄올, 물 추출물	LPS로 자극한 RAW264.7 대식세포주에서 회향 추출물에 의한 염증성 매개물의 생성 억제, 2004, Korean J Soc Food Cookery Sci, 20(3) 505-510	
55	개망초	꽃	대식세포	메탄올 추출물	RAW264.7 대식세포에서 Heme Oxygenase-1의 유도에 의한 개망초( <i>Erigeron annuus</i> L.) 꽃 Methanol 추출물의 항염증 효과, 2011, Korean Soc Food Sci Nutr, 40(11) 1507-1511	
56	곰취, 미역취, 삼나물		대식세포	물 추출물	곰취( <i>Ligularia fischeri</i> ), 미역취( <i>Solidago virgaurea</i> ), 삼나물( <i>Aruncus dioicus</i> ) 복합 추출물의 항염증 효과, 2011, J Life Sci, 21(5) 678-683	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
57	상엽 ( <i>Mori Folium</i> )	잎	대식세포	에탄올 추출물	1. 桑葉 추출물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효과, 2012, Korean J Herbology, 27(3) 31-38 2. 청목노상( <i>Morus alba</i> L.) 추출물에 의한 Lipopoly-saccharide로 유도된 Raw 246.7 cell에서 염증 억제 효과, 2008, J Korean Soc Appl Biol Chem, 51(1) 44-48	
58	독활 ( <i>Angelicae Pubescentis Radix</i> )	잎	대식세포	열수 추출물	독활 물 추출물이 대식세포 면역 활성화에 미치는 영향, 2011, J Korean Ori Med, 32(1) 175-184	
59	싸리나물줄기 ( <i>Lespedeza bicolor</i> )	줄기	대식세포	acetone, 75%EtOH, MeOH, 열수 추출물 -NO생성억제능	싸리나물줄기 추출물의 추출용매에 따른 항산화활성과 nitric oxide 생성억제활성. 2011, J Medicinal Crop Sci 19(5), 368-372	
60	하고초		대식세포	열수 추출물 -NO생성억제능 -cytokine 생성 측정	하고초 열수추출물이 대식세포 면역반응에 미치는 영향. 2010, J Oriental Obstetrics & Gynecology 23(3), 91-100	
61	툇		비장세포	에탄올, 물추출물의 경구투여 -비장세포증식능 -cytokine 생성 측정	2주동안의 툇 추출물 투여가 마우스의 비장세포와 cytokine의 생성량에 미치는 영향. 2007. 한국영양학회지, 40(7), 624-629	
62	도토리 ( <i>Acorn</i> )		경구투여 후 복강 대식세포	에탄올, 열수 추출물 -cytokine 생성 측정	도토리 추출물의 경구투여가 마우스 면역 세포 활성화에 미치는 효과. 2010, Korean J Food & Nutr 23(2), 135-140	
63	섬쭈부쟁이 ( <i>Aster glehni</i> Fr. Schm.)		대식세포	순차용매 추출 -NO생성억제능 -HAase저해능 -라디칼 소거	섬쭈부쟁이 분획물의 항산화 및 항염증 활성. 2010. Kor J Microbiol Biotechnol 38(4), 434-441	
64	작약	뿌리	대식세포	메탄올추출물 -NO생성억제능	작약메탄올 추출물 및 분획물의 NO 생성 억제 효과와 피부질환 원인균에 대한 항균활성. 2010, Kor J Pharmacogn 43(2). 173-178	
65	송절 (소나무 가지의 마디)	줄기	대식세포	에탄올추출물 -NO생성능 -cytokine, COX-2, HO-1 발현	RAW 264.7 세포에서 HO-1 발현 유도를 통한 송절 약침액의 항염증 효능. 2012, Korean J Acupuncture, 29(1), 37-46.	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
66	적작약		대식세포	열수 추출물 -NO생성측정 -PGE <sub>2</sub> 생성 측정	적작약 추출물이 대식세포에서 NO 및 PGE <sub>2</sub> 생성에 미치는 영향. 2011, J Korean Acupuncture & Moxibustion Soc 28(1), 77-84	
67	육계 ( <i>Cinnamomum cassia</i> Presl)		대식세포	에탄올, 열수추출물 -NO생성측정 -PGE <sub>2</sub> 생성 측정	육계약침액이 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에 미치는 영향. 2012, J Korean Acupuncture & Moxibustion Soc 29(1), 15-24	
68	황련 (황금, 황련, 황백, 치자)		알레르기 비염 유발 흰쥐의 대식세포	열수추출물 -iNOS mRNA발현	황련해독탕 약침액의 iNOS 생성억제를 통한 항염증효과가 알레르기성 비염 유발 생쥐의 치료에 미치는 영향. 2012, J Korean Acupuncture & Moxibustion Soc 29(1), 89-101	
69	배추추출물+구기자 배+의이인 배+택사 배+황기		대식세포	- TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6측정 -지질대사 분석	배추추출물과 구기자, 의이인, 택사, 황기 배합이 고지방식이로 유발된 비만 흰쥐의 체중, 지질대사 및 면역기능에 미치는 영향(I). 2012, Kor J Herbology 27(3), 7-13	
70	생약재 40종			95% 에탄올 추출물, 순차용매 추출물 -HAase저해능 OH, DPPH 라디칼소거	생약재 추출물이 HAase 저해 및 라디칼 소거 활성 검색. 2003, Korean J Biotechnol Bioeng 18(4), 282-288 (황기>두충>오미자>황금>오가피)	
71	국내산 약용식물 163종		대식세포	80% 메탄올추출물 -in vitro 대식세포 활성 측정 -정상세포(L929)	육계약침액이 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에 미치는 영향. J Korean Acupunctu식용식물자원으로부터 활성 물질의 탐색-X X V.식용식물 추출물의 면역증강 효과. 2007, Korean J Food Sci Technol 39(6), 708-714  (마>회향>골파>유채씨>자두>금귤>딸기>매생이>등글레>녹차>차조기>질경이>후추>흑향미)	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
72	식물체 33종		대식세포	-NO생성억제능 - TNF- $\alpha$ , IL-6 측정 -I $\kappa$ -Ba, iNOS, COX-2	약용식물자원 추출물의 항염 증활성. 2011, Korean J Medicinal Crop Sci 19, 217-226 (생강, 느릅나무수피, 취나물, 금불초)	
73	감국, 영경귀		대식세포	열수, 에탄올 추 출물 -T cell, B cell -암세포생육저 해능 Hep3B, AGS, MCF7, A549, 정 상세포(인체 폐 세포, 293)	국화과 약용 식물의 면역증 진활성 검색. 2002, Korean J Medicinal Crop Sci 10, 51-57	
74	단삼	뿌리	대식세포	100% methanol 추출물 -MTT -assay -세포배양액 내 cytokines 측정 -NO 생성량측정 -부착분자 발현을 측정	단삼 메탄올 추출물의 항염 증 효과 2007, Kor J Herbology 22(4) 65-73	
75	작약	뿌리		작약감초탕 추 출물 -LPS처리 -혈액 및 간장 채취 -Cytokines 정량  -Paeoniflorigeno ne(PFG) -C. albicans 세 포벽의 분리 -PEG의 NO생성 억제 검색 -CACW 유발성 염증에 대한 PFG 의 항염효과 검색 -PFG의 T-임파구 증식에 대한 효과	1. 작약감초탕의 항염증효과 2010, Korean J. Orient Int Med 31(2) 365-371  2. Paeoniflorigenone 작약성 분의 항염효과 2012, Yakhak Hoeji 56(1) 20-25	
76	애엽	잎, 어린줄 기	대식세포	열수추출물 -세포독성검사 -H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> assay -NO생성측정 -Cytokines에 대한 Bio-plex cytokine assay	애엽 발효 추출물의 면역활 성에 관한 연구 2008, Kor J Herbology 23(3) 103-112	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
77	산약	뿌리줄기	대식세포	산약발효물 및 메탄올 추출물 -세포독성 측정 -NO 측정 -Enzyme Linked Immunosorbent Assay - HPLC 분석	LPS로 유도된 대식세포 활성화에서 발효 산약 추출물의 억제 효과 2011, Yakhak Hoeji 55(5)	
78	구기자	열매		열수추출물 -혈청중의 AST, ALT 와 LDH 활성 측정 -간 조직의 단백질 정량 -간 조직 중 malon-dialdehyde의 정량 -간 조직 내 mitochondria 분획의 SOD 활성 측정 -간 조직 중 catalase 활성 측정 -간 조직 중 GPx의 활성 측정  생약재 추출혼합물 -동물 및 식이, 당뇨 유발 -Immunoblotting을 이용한 cytokines 측정 -NO 생산량 측정 -ELISA을 이용한 IgE 항체 측정	1. LPS로 유도된 급성 간독성에 대한 구기자 추출물의 보호 효과 2007, Yakhak Hoeji 51(5) 296-300  2. Treptozotocin으로 유발한 당뇨병성 쥐에서의 당뇨병성 백내장과 망막병증에 대한 구기자와 황기 혼합 추출물 등의 면역 조절 및 예방 효과 2010, Korean J Medicinal Crop Sci 18(1) 15-21	
79	천초 ( <i>Zanthoxyli Pericarpium</i> )		RAW 264.7	물 추출물 /단일	천초 추출물의 면역조절 효과, 2008 Korean J. Oriental Physiology & Pathology, 22(2) 410-414	
80	옥수수수염		지방전구 세포	열수추출물 -3T3-L1 지방전구세포의 분화유도 -세포독성 -Oil Red O 염색 -지방분해능 -Western blot 분석 -체중, 식이섭취량 및 수분섭취량 측정 -총콜레스테롤, 중성 지방, 당화 헤모글로빈, 인슐린의 측정 -복부 총지방량과 조직의 형태학적 분석	3T3-L1지방세포와 db/db 마우스에서 옥수수수염 물 추출물의 지방생성 억제 및 혈당 저하효과 2011, Kor J Pharmacogn 42(2) 201-208	

번호	천연물 명칭	사용 부위	사용 세포주	추출용매	참고문헌	비고
81	산약		지방세포	열수, 80%에탄올 추출물 -체중측정 -FBS 및 OGTT측정 -지질 및 당대사 측정 -혈청 랩틴 측정 -지방 및 간무게 측정 -지방 세포 크기 측정	산수유 산약 지각 상업으로 구성된 복합지방투여가 고지방, 고탄수화물 식이로 유발된 비만형 당뇨병 동물모델의 대사인자 및 지방세포 염증반응 조절에 미치는 영향 2012, J Korean Oriental Med 33(3) 184-199	
82	팔선초 ( <i>Galium aparine</i> L.)	잎	RAW 264.7	물 추출물 /단일	팔선초 물 추출물의 면역 자극 및 항종양 활성, 2005, Korean J Pharmacogn 36(4) 332-337	

Table 60. List of functional plant materials used in this study

Sample code	Korean name	Plant parts used	Scientific name
A	구기자	Fruit	<i>Lycii fructus</i>
B	황금	Root	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi
C	오가피	Fruit	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman
D	감국	Flower	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.
E	산약	Root	<i>Dioscorea rhizoma</i>
F	작약	Root	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.
G	단삼	Root	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge
H	뽕잎	Leaves	<i>Morus alba</i> L.
I	생강	Root (dried)	<i>Zingiber officinale</i>
J	상황버섯	Fruiting body	<i>Phellinus linteus</i>
K	옥수수수염	Flower	<i>Zea mays</i> L.

### 9) 흑마늘 복합물과 개뽕썩 추출물의 첨가에 따른 *in vitro* 생리활성의 평가

흑마늘과 천역식물류 5종을 혼합하므로써 흑마늘 복합음료를 개발함에 있어서 1일 1회 섭취와 3회 섭취에 따른 항산화 활성을 비교하였으며, 또한 흑마늘 복합음료에 개뽕썩 추출물의 첨가 유무에 따른 차이를 함께 비교하였다.

(1) 흑마늘 복합물과 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 총 페놀 및 플라보노이드 함량

흑마늘 추출물과 상황버섯, 황금, 단삼, 뽕잎 및 작약의 혼합 추출물로 제조한 흑마늘 복합물에서 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 비교한 결과 Table 61과 같다. 농도를 달리한 2종의 흑마늘 복합물에서 총 페놀화합물 함량은 BM1에서 179.75 mg/100 mL, BM2는 324.30 mg/100 mL이었으며, 플라보노이드 함량은 16.87 mg/100 mL 및 20.51 mg/100 mL로 농도 의존적이었다. 개똥쑥 추출물이 첨가된 BM1G, BM2G에서 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 유의적으로 증가되었다.

Table 61. Total phenol and flavonoids contents in mixture of black garlic formulas and Gaeddongssuk extract

Sample code	Total phenol content (caffeic acid mg/100 mL)	Flavonoids (quercetin mg/100 mL)
BM1	179.75±0.45 <sup>A</sup>	16.87±0.80 <sup>A</sup>
BM2	324.30±1.79 <sup>B</sup>	20.51±0.06 <sup>B</sup>
BM1G	337.17±2.05 <sup>C</sup>	49.38±2.76 <sup>C</sup>
BM2G	463.07±1.55 <sup>D</sup>	64.23±0.80 <sup>D</sup>

<sup>A-D</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

**BM1** is mixed black garlic extract and MHE-2 (70:30, v/v)

**BM2** is mixed black garlic extract and MHE-2 (210:90, v/v) and then concentrated to the 100 mL

**BM1G** is mixed BM1 and Gaeddongssuk extract(0.4%)

**BM2G** is mixed BM2 and Gaeddongssuk extract(0.4%)

(2) 흑마늘 복합물과 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 DPPH 라디칼 소거활성

흑마늘 복합물과 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 DPPH 라디칼 소거활성은 Table 62와 같이 모든 시료군에서 시료의 농도(S1~S4)가 증가됨에 따라 소거활성은 유의적으로 상승하였다. 성인의 1일 1회 섭취량 기준인 BM1은 31.26~81.64%의 범위였으며, BM2는 S2이상의 농도에서 50% 이상의 소거활성을 보여 BM1보다 유의적으로 높은 소거활성이었다. 개똥쑥 추출물을 첨가한 BM1G와 BM2G는 S1~S3의 농도범위에서는 개똥쑥의 첨가 유무에 따른 차이가 두드러진 것으로 나타났으나, S4의 농도에서는 그 차이가 다소 작았다.

Kim KB et al(2006)은 국내 유통 중인 식용식물 추출물 중에서 개똥쑥 추출물이 50 ppm에서 50.1±1.2%의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었고, 50%의 소거활성을 띄는 시료의 농도로 53.96±0.81 ppm인 것으로 보고한 바 있다.



Table 62. DPPH radical scavenging activity in mixture of black garlic formulas and Gaeddongssuk extract

(%)

Sample code	Concentration condition*			
	S1	S2	S3	S4
BM1	31.26±1.85 <sup>aA</sup>	41.42±1.32 <sup>bA</sup>	60.79±1.58 <sup>cA</sup>	81.64±1.48 <sup>dA</sup>
BM2	39.43±2.46 <sup>aB</sup>	52.70±2.05 <sup>bB</sup>	74.96±2.69 <sup>cB</sup>	90.01±3.59 <sup>dB</sup>
BM1G	53.31±3.46 <sup>aC</sup>	77.55±1.66 <sup>bC</sup>	91.76±1.00 <sup>cC</sup>	92.05±1.22 <sup>cB</sup>
BM2G	56.62±1.57 <sup>aC</sup>	77.07±1.35 <sup>bC</sup>	93.18±1.73 <sup>cC</sup>	96.58±3.09 <sup>dC</sup>

\*Concentration condition :

S4 : raw material(100 mL) was diluted to 2.5% concentration with DW

S3 : raw material(100 mL) was diluted to 1.25% concentration with DW

S2 : raw material(100 mL) was diluted to 0.625% concentration with DW

S1 : raw material(100 mL) was diluted to 0.3125% concentration with DW

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

<sup>A-C</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

Sample code refer to the comment in Table 61

### (3) 흑마늘 복합물과 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 ABTS 라디칼 소거활성

Table 63은 흑마늘 복합물과 개똥쑥의 혼합에 따른 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 것으로 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 흑마늘 복합물에 개똥쑥의 첨가에 따라 농도의존적으로 유의적으로 소거활성이 증가하였다. 흑마늘 복합물에서는 S2 이상의 농도에서 BM1과 BM2간에 유의적인 차이를 보였다. 개똥쑥 추출물이 첨가된 실험구에서는 가장 낮은 농도인 S1에서부터 50%이상의 소거활성을 보였는데, 이는 DPPH 라디칼 소거활성과도 유사한 경향이었으며, 흑마늘 복합물에 개똥쑥의 첨가로 라디칼 소거활성을 상당히 증가시킬 수 있을 것으로 확인되었다.

Ryu JH et al(2011b)은 개똥쑥의 잎 추출물이 줄기 추출물에 비해 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 이는 잎 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 더 높았기 때문인 것으로 보고한 바 있는데, 흑마늘 복합물에 개똥쑥의 첨가로 라디칼 소거활성이 상승된 것도 시료 중의 총 페놀 함량에 의존적인 것으로 판단된다.

Table 63. ABTS radical scavenging activity in mixture of black garlic formulas and Gaeddongssuk extract

(%)

Sample code	Concentration condition*			
	S1	S2	S3	S4
BM1	32.94±2.29 <sup>aA</sup>	43.55±0.63 <sup>bA</sup>	59.36±1.41 <sup>cA</sup>	86.40±2.01 <sup>dA</sup>
BM2	33.96±3.51 <sup>aA</sup>	51.93±1.17 <sup>bB</sup>	72.92±2.79 <sup>cB</sup>	95.09±2.94 <sup>dB</sup>
BM1G	54.87±1.16 <sup>aB</sup>	77.20±0.46 <sup>bC</sup>	95.20±1.01 <sup>cC</sup>	97.41±0.91 <sup>dBC</sup>
BM2G	56.01±0.77 <sup>aB</sup>	82.08±0.69 <sup>bD</sup>	97.76±1.60 <sup>cC</sup>	99.15±0.49 <sup>cC</sup>

\*Refer to the comment in Table 62

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

<sup>A-D</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

Sample code refer to the comment in Table 61

(4) 흑마늘 복합물과 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 FRAP법에 의한 환원력

흑마늘 복합물과 개똥쑥 추출물의 FRAP 측정 결과를 FeSO<sub>4</sub> 당량으로 나타낸 결과는 Table 64와 같다. 흑마늘 복합물의 첨가 농도가 증가함에 따라 Fe<sup>+3</sup>를 Fe<sup>+2</sup>로 환원시키는 환원력이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 개똥쑥 추출물을 첨가한 BM2G의 환원력이 가장 높았고 그 다음은 BM1G였다.

Table 64. Ferric reducing antioxidant power in mixture of black garlic formulas and Gaeddongssuk extract

(FeSO<sub>4</sub> eq μM)

Sample code	Concentration condition*			
	S1	S2	S3	S4
BM1	23.61±1.64 <sup>aA</sup>	43.35±8.89 <sup>bA</sup>	81.00±3.13 <sup>cA</sup>	174.48±9.82 <sup>dA</sup>
BM2	36.91±5.82 <sup>aB</sup>	59.70±1.52 <sup>bB</sup>	121.35±5.04 <sup>cB</sup>	241.96±6.00 <sup>dB</sup>
BM1G	68.57±5.03 <sup>aC</sup>	140.91±6.09 <sup>bC</sup>	273.52±5.65 <sup>cC</sup>	510.30±11.84 <sup>dC</sup>
BM2G	82.83±2.62 <sup>aD</sup>	156.22±3.53 <sup>bD</sup>	287.26±10.32 <sup>cD</sup>	553.35±13.23 <sup>dD</sup>

\*Refer to the comment in Table 62

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

<sup>A-D</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

Sample code refer to the comment in Table 61

Lee HH et al(2010)은 흑마늘의 첨가 농도가 많아짐에 따라 흑마늘 발효주의 FRAP 활성은 증가되는 것으로 보고하였는데, 이는 본 연구와 유사한 결과였으며, 흑마늘의 함량이 많아짐에 따라 FRAP 활성이 증가되는 것으로 판단된다. 따라서 FRAP법에 의한 항산화 활성이 산화반응의 촉매제로 작용하는 금속이온의 환원 효력을 의미하는 것으로 볼 때(Gordon MF, 1990) 흑마늘 복합물 뿐만아니라 개똥쑥의 첨가로 음료를 개발함에 있어서 생리활성에 대한 시너지 효과를 충분히 발휘할 수 있을 것으로 여겨진다.

(5) 흑마늘 복합물과 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성

흑마늘 복합물에 개똥쑥 추출물의 첨가에 따른 Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성을 측정한 결과는 Table 65와 같다. Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성은 다른 항산화 활성 결과와 유사한 경향을 보였다. S1의 농도에서 BM1과 BM2는 유의적인 차이가 없었으며, BM1G의 활성이 가장 높았지만, S1보다 높은 농도에서는 흑마늘 복합물의 함유의 증가와 개똥쑥의 혼합에 의해 활성이 증가하여 BM2G에서 유의적으로 활성이 높았다.

여러 한약재 혼합물의 항산화 활성은 한약재간의 시너지 작용에 의한 결과(Cho HS et al, 2007)로 식물류는 단일 성분보다는 혼합되어 있을 경우 활성이 높아진다고 보고되어 있다(Lee JM et al, 2000). 마늘에 한약재가 첨가되므로써 항산화 활성이 상승하였으며, 이를 급이한 흰 쥐에서 알코올성 간 기능 개선에 효과적인 것으로 보고되어 있다(Lee SJ et al, 2009). 본 연구에서 사용된 5종의 생약재 추출물은 항산화 활성이 상당히 우수한 시료로써(Lee SJ et al, 2013), 흑마늘과 혼합한 복합물도 높은 항산화 활성을 나타내므로 이 복합물은 생체 내에서 발생하는 산화적 스트레스에 대한 라디칼 소거에도 효과적일 것으로 생각된다.

Table 65. Fe<sup>+2</sup> chelating activity in mixture of black garlic formulas and Gaeddongssuk extract (%)

Sample code	Concentration condition			
	S1	S2	S3	S4
BM1	9.66±0.88 <sup>aA</sup>	10.51±0.57 <sup>aA</sup>	17.80±0.71 <sup>bA</sup>	28.69±0.28 <sup>cA</sup>
BM2	10.42±0.43 <sup>aA</sup>	13.54±0.33 <sup>bB</sup>	23.96±0.43 <sup>cB</sup>	39.58±0.16 <sup>dB</sup>
BM1G	14.77±1.78 <sup>aC</sup>	24.15±0.28 <sup>bC</sup>	44.60±0.28 <sup>cC</sup>	63.73±1.08 <sup>dC</sup>
BM2G	12.50±0.49 <sup>aB</sup>	24.62±0.66 <sup>bC</sup>	45.17±0.57 <sup>cC</sup>	62.03±1.62 <sup>dC</sup>

\*Refer to the comment in Table 62

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

<sup>A-D</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

Sample code refer to the comment in Table 61

## 10) 간헐적 운동부하에 의한 흑마늘 복합물의 *in vivo* 생리활성 평가

### (1) 체중변화 및 식이효율

트레드밀을 이용하여 5주간의 강제적인 간헐적 운동부하를 받은 흰쥐에서 흑마늘 복합물의 급이에 따른 체중변화 및 식이효율을 측정된 결과는 Table 66과 같다. 모든 실험군에서 최종 체중은 흑마늘 복합물 급이군(Ex-BM1, Ex-BM2)이 운동대조군(Ex-con)에 비해 유의적으로 증가하였는데, 적절한 운동과 흑마늘 복합물의 맛과 향미에 의해 식이 섭취량이 다소 높았기 때문이라 생각된다. 식이효율도 운동군이 비운동군에 비해 다소간 높았으며, 흑마늘 복합물의 농도에 따른 유의차는 적었다.

흑마늘 및 썬 추출물, 이들의 혼합물을 흰쥐에게 급이하였을 때 흑마늘 추출물 급이군의 식이섭취량이 여타의 실험군에 비해 유의적으로 높았던 것이 흑마늘 자체의 단맛 때문이라는 보고가 있는데(Lee SJ et al 2013) 본 연구 결과도 유사한 경향이었다. 1일 30분씩 매일 강제운동을 한 흰쥐에서 개똥썬 추출물 급이군보다 흑마늘과 개똥썬의 혼합물 급이군에서 식이 섭취량이 유의적으로 증가된 것(Kang JR et al 2013)도 본 연구 결과와 유사하였다. 본 연구에서 2일에 1회씩의 간헐적인 운동에 의한 체중 감소는 미미할 것으로 예상되는데, Ex-BM2군에서 Ex-BM1군보다 체중증가량이 다소간 낮은 것은 흑마늘 복합물을 장기적으로 섭취할 경우 체중 감소 효과를 발휘할 수 있을 것으로 예상된다.

Table 66. Changes of body weight, food intake and FER in exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

Sample code	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Total body weight gain (g/5 weeks)	Food intake (g/day)	FER
Control*	133.33±10.00 <sup>NS1)</sup>	337.14±12.54 <sup>A</sup>	200.00±5.77 <sup>A</sup>	20.54±0.71 <sup>AB</sup>	26.85±0.61 <sup>A</sup>
Ex-con	133.33±10.00	351.43±15.74 <sup>A</sup>	214.29±17.18 <sup>A</sup>	20.29±0.65 <sup>A</sup>	29.31±2.44 <sup>AB</sup>
Ex-BM1	135.56±8.82	378.57±22.68 <sup>B</sup>	241.43±25.45 <sup>B</sup>	20.87±0.28 <sup>B</sup>	32.57±3.26 <sup>C</sup>
Ex-BM2	135.56±8.82	372.86±9.51 <sup>B</sup>	235.71±7.87 <sup>B</sup>	20.89±0.49 <sup>B</sup>	30.82±0.49 <sup>BC</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=8)

NS: Not significant.

FER: Food efficiency ratio

<sup>a-c</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

\*Control : Non exercised group with normal diet administration

Ex-con : Exercised group by interval training with normal diet administration

Ex-BM1: Exercised group with BM1 supplementation

Bx-BM2: Exercised group and BM2 supplementation

### (2) 장기 중량

흑마늘과 천연식물류 혼합물을 흰쥐에게 급이하여 4주간 사육한 후 장기 중량을 측정된 결과는 Table 67과 같다. 간, 신장 및 고환의 중량은 정상군, 대조군 및 실험군간에 유의차가 없어 이들 혼합물의 섭취가 장기 중량에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 심장은 운동군에서 정상군에 비해 다소 작았으나, 실험군에서는 유의차가 없었다. 지라는 정상군에 비해 운동군에서 유의적으로 작았으며, 운동대조군과 실험군간에는 유의차가 없었다.

Lee SJ et al(2013)은 비장의 중량이 비구속 정상군에서 가장 컸으며, 흑마늘과 쑥 추출물의 혼합물을 급이한 실험군에서 정상군에 비해 유의적으로 작았으나, 그 외 실험군에서는 유의차를 보이지 않았다는 보고는 본 연구와 일치하는 결과였다. 흑마늘과 천연식물류 혼합물의 섭취에 따라 정상군에 비해 실험군의 장기 중량이 다소 낮았다. 실험군간의 결과를 비교해 볼 때 흑마늘 천연식물류의 급이가 장기 중량에 큰 영향을 미치지 않았다.

Table 67. Organ weight in exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

(tissue g/bw 100 g)

Sample code	Liver	Heart	Kidney	Spleen	Lung	Testis
Control*	2.62±0.08 <sup>NS</sup>	0.35±0.02 <sup>B</sup>	0.76±0.06 <sup>NS</sup>	0.22±0.03 <sup>C</sup>	0.40±0.06 <sup>B</sup>	1.05±0.10 <sup>NS</sup>
Ex-con	2.57±0.16	0.32±0.03 <sup>A</sup>	0.77±0.13	0.19±0.02 <sup>AB</sup>	0.39±0.03 <sup>AB</sup>	0.99±0.09
Ex-BM1	2.64±0.23	0.33±0.02 <sup>AB</sup>	0.72±0.03	0.20±0.03 <sup>BC</sup>	0.39±0.03 <sup>AB</sup>	0.98±0.08
Ex-BM2	2.49±0.07	0.33±0.02 <sup>AB</sup>	0.74±0.02	0.17±0.02 <sup>A</sup>	0.36±0.03 <sup>A</sup>	0.97±0.05

\*Refer to the comment in Table 66

<sup>a,b</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p < 0.05$ .

NS; Not significant.

### (3) 혈중 단백질, 알부민, 글로불린 함량

간헐적 운동부하 시 흑마늘 복합물을 급이한 흰쥐에서 혈중 총 단백질, 알부민 및 글로불린 함량은 Table 68과 같다. 총 단백질 함량은 운동 유무에 따른 유의차가 없었으나, 급이한 흑마늘 복합물의 농도가 높았던 Ex-BM2군이 Ex-BM1군보다 유의적으로 높았다. 알부민 함량은 운동대조군에 비해 흑마늘 복합물 급이군에서 다소 높았으며, 복합물의 농도에 따른 유의차는 적었다. 글로불린 함량은 정상군에 비해 운동군에서 다소 낮았는데, Ex-BM2군은 정상군과 비슷한 수준이었다.

체내 대사과정에서 에너지원으로써 단백질이 이용될 경우 체단백질의 분해나 체중이 감소되는데(Koh JB & Kim JY 2002), 운동군에서 비운동군에 비해 체중 증가량이 많았으며(Table 65),

Ex-BM1군의 혈중 단백질 함량이 높은 것으로 볼 때 본 연구에서 수행한 간헐적인 운동에 의한 체단백질의 분해는 없는 것으로 사료되며, 흑마늘 복합물의 급이는 혈중 알부민 함량 증가로 적절한 영양상태 유지와 관련되는 것으로 여겨지므로 흑마늘 복합물의 1회 3회 섭취가 무방하리라 생각된다.

Table 68. Total protein, albumin and globulin contents in exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

Sample code	Total protein	Albumin	Globulin
Control*	7.01±0.46 <sup>AB</sup>	4.19±0.31 <sup>A</sup>	3.04±0.23 <sup>B</sup>
Ex-con	7.18±0.31 <sup>AB</sup>	4.32±0.56 <sup>AB</sup>	2.80±0.76 <sup>AB</sup>
Ex-BM1	6.89±0.33 <sup>A</sup>	5.07±0.87 <sup>BC</sup>	1.83±1.02 <sup>A</sup>
Ex-BM2	7.37±0.60 <sup>B</sup>	5.15±0.70 <sup>C</sup>	2.48±1.13 <sup>AB</sup>

\*Refer to the comment in Table 66

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=8)

<sup>A-C</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (4) AST, ALT 및 ALP 활성

트레드밀에 의한 간헐적인 운동을 수행한 흰쥐에서 흑마늘 복합물의 급이에 따른 혈중 AST, ALT 및 ALP 활성을 측정된 결과는 Table 69에 나타난 바와 같다. AST 활성은 운동대조군(70.17 Karmen unit/mL)이 정상군(54.50 Karmen unit/mL)에 비해서 약 1.3배 높았으며, 흑마늘 복합물 급이군은 운동 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다. ALT 활성도 AST 활성과 유사한 경향이었으며, ALP 활성은 흑마늘 복합물 급이군이 정상군보다 유의적으로 낮은 수준까지 감소되었다.

흑마늘 음료를 4주간 급이시킨 후 24시간의 1회성 구속에 따른 흰쥐의 혈청 AST, ALT 활성은 유의적으로 증가하였으며, 흑마늘 음료 급이군은 정상군과 유사한 수준까지 회복되었는데, 이는 시료의 항산화 활성과 관련이 있으며, 항산화 활성이 높은 식물의 보충급이는 일시적인 스트레스에 의한 간기능 지표 효소활성의 증가를 제어할 수 있는 것으로 보고되어 있다(Lee SJ et al 2013). 1%의 마늘 추출물 급이군은 수영부하 스트레스 직후 유의적으로 증가된 AST 활성도를 정상수준으로 회복시켰는데(Kang MJ 2011), 마늘의 알리신 성분에 기인된 결과로 보고된 바 있다(Lee SJ et al 2009). 본 연구에서 운동의 강도는 낮으나, 강제적인 수행에 따른 스트레스에 의해 간 기능 지표효소 활성이 상승된 것으로 추정되므로, 흑마늘 복합물 급이로 이들 효소활성도가 감소되었다는 것은 일상생활 속의 스트레스에 대한 완화효과도 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

Table 69. AST, ALT and ALP activities in exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

Sample code	AST (Karmen unit/mL)	ALT (Karmen unit/mL)	ALP (K-A unit)
Control*	54.50±2.35 <sup>A</sup>	9.17±0.68 <sup>A</sup>	16.78±1.80 <sup>B</sup>
Ex-con	70.17±4.17 <sup>B</sup>	17.00±2.90 <sup>B</sup>	21.99±2.46 <sup>C</sup>
Ex-BM1	58.00±2.97 <sup>A</sup>	11.32±1.77 <sup>A</sup>	14.44±1.66 <sup>A</sup>
Ex-BM2	55.17±3.54 <sup>A</sup>	9.42±0.38 <sup>A</sup>	13.77±1.92 <sup>A</sup>

\*Refer to the comment in Table 66

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=8)

<sup>A-C</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (5) 혈중 지질 성분 변화

5주동안 흑마늘 복합물의 급이와 간헐적인 운동부하를 병행한 흰쥐에서 혈중 지질성분을 분석한 결과는 Table 70과 같다. 운동부하에 따른 지질 성분의 변화에는 유의차를 보이지는 않았다. 총 지질과 중성지방 함량은 운동대조군에 비해 흑마늘 복합물 급이군에서 유의적으로 감소되었으며, 특히 Ex-BM2군은 13.9% 및 9.2%의 감소를 보였다. 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량에서 Ex-BM1군은 운동대조군과 유의차를 보이지 않았으나, Ex-BM2군은 유의적으로 감소되었다. HDL-콜레스테롤 함량은 정상군 및 운동대조군에 비해 Ex-BM1군은 유의차가 없었으며, Ex-BM2군만 유의적으로 증가되었다. LDL-콜레스테롤 함량은 흑마늘 복합물 급이군이 정상군보다 유의적으로 감소되었는데, 특히 Ex-BM2에서 14% 감소되었다. HDL-콜레스테롤에 대한 총 콜레스테롤의 함량 비(HTR)는 심혈관질환의 위험정도를 나타내는 것으로 운동군에서 정상군보다 다소간 감소되기는 하였으나 통계적인 유의차는 없었으며, Ex-BM2군이 운동대조군에 비해 유의적으로 감소되어, 운동의 강도가 낮고, 흑마늘 복합물의 섭취량이 1일 3회 정도일 때 체내 지질 수준의 변화로 심혈관질환의 예방에 도움이 될 것으로 사료된다.

4주동안 자양강장 기능성 식품의 급이와 주 2회의 강제수영 훈련에 따른 체중 감소현상은 운동보다는 기능성 식품에 의한 효과이며, 혈청 중성지방 함량의 변화에서 강제 수영시간을 90분으로 제한한 경우 운동대조군과 기능성 식품 급이군간에 유의차를 보였으나, 탈진때까지의 운동을 수행한 경우에는 기능성 식품의 급이에 따른 유의차를 보이지 않았다고 보고된 바 있다(Song TC et al 2005).

운동과 청국장 분말의 급이는 운동대조군에 비해 혈중 총 콜레스테롤 및 중성지방의 유의적인 감소를 보였는데, 청국장의 유효성분과 유산소 운동에 의한 시너지 효과인 것으로 보고되어 있다(Kim SW et al 2013). 또한 트레드밀을 이용한 지구성 운동을 수행한 실험쥐에서 매실, 오가피 및 맥문동 음료의 급이는 혈중 중성지방 수준을 다소간 감소시켰는데 단일 추출물보다

혼합 추출물 급이군에서 운동수행 시간을 유의적으로 증가시켰으나, 피로 관련인자로서 혈중 암모니아, 젖산 및 무기인산의 함량에는 유의차가 없는 것으로 보고되어 있다(Kim YJ et al, 2012).

반면에 고지방 식이로 비만이 유도된 흰쥐에서 운동과 마늘의 병행 급이는 혈중 지질성분의 변화에 유의차를 보이지 못하였다(Lee HM et al, 2010). 이처럼 식이와 운동과의 상관관계에서는 다양한 결과들이 존재하는데 운동 강도가 크고 시간이 길수록 규칙적인 유산소 운동은 혈중 콜레스테롤 수준을 감소시키는데 효과적인데(Park JY et al, 1999), 본 연구와 같은 간헐적인 운동은 운동 강도가 낮아 흑마늘 복합물 급이군에서 혈중 지질 수준의 감소는 흑마늘과 천연식물류의 페놀 화합물(Kang JR et al, 2013)에 의존적인 것으로 판단된다.

Table 70. Serum lipids level in exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

Sample code	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol			HTR
			HDL-C	LDL-C	(mg/dL)	
Control*	217.52±3.10 <sup>C</sup>	39.89±1.74 <sup>B</sup>	68.33±1.16 <sup>B</sup>	24.52±1.40 <sup>A</sup>	35.83±1.33 <sup>C</sup>	2.79±0.14 <sup>B</sup>
Ex-con	213.50±5.57 <sup>C</sup>	39.71±1.34 <sup>B</sup>	67.15±2.33 <sup>B</sup>	25.07±1.63 <sup>A</sup>	34.13±1.77 <sup>BC</sup>	2.68±0.14 <sup>B</sup>
Ex-BM1	204.33±10.52 <sup>B</sup>	38.28±1.73 <sup>B</sup>	66.11±0.79 <sup>AB</sup>	25.03±0.89 <sup>A</sup>	33.43±1.08 <sup>B</sup>	2.65±0.11 <sup>B</sup>
Ex-BM2	183.91±4.68 <sup>A</sup>	36.06±0.97 <sup>A</sup>	64.70±2.57 <sup>A</sup>	26.70±1.07 <sup>B</sup>	30.79±2.24 <sup>A</sup>	2.43±0.10 <sup>A</sup>

\*Refer to the comment in Table 66

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=8)

<sup>A-C</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (6) 간조직의 지질성분

흑마늘 복합물을 급이한 흰쥐의 간조직에서 지질 성분은 Table 71과 같다. 운동의 유무에 따른 간조직 중 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤의 함량 변화에는 유의차가 없었다. 총 지질 함량은 흑마늘 복합물 급이군이 정상군보다는 유의적으로 낮았으나, 운동대조군과는 유의차가 적었다. 중성지방 함량은 Ex-BM2군이 타 실험군에 비해 유의적으로 낮아 흑마늘 복합물의 농도에 따른 유의차를 보였다. 총 콜레스테롤 함량은 정상군 및 운동대조군보다 흑마늘 복합물 급이군에서 유의적으로 감소하였다.

수영부하 스트레스에 대하여 마늘 추출물의 단독 급이는 수영부하 여부에 따른 간조직의 지질성분 변화에 유의차를 보이지 않았으나, 비타민 B<sub>1</sub>의 혼합급이 시 대조군에 비해 간조직의 중성지방 함량을 효과적으로 감소시켰다는 보고(Kang MJ et al, 2011)는 본 연구 결과와도 유



사한 경향이였다.

반면에 흑마늘과 개똥쑥 추출물이 강제운동한 흰쥐의 간조직 중 지질성분 변화에는 흑마늘 추출물 급이군과 혼합물 급이군간에 유의차가 적었으며, 혼합물의 농도에 따른 유의차가 없었는다고 보고도 있다(Kang JR et al, 2013). 흑마늘과 쑥 추출물의 혼합급이는 구속스트레스를 받은 흰쥐의 간조직 중 지질성분을 흑마늘 추출물 급이군에 비해 유의적으로 감소시킨 것으로 보고된 바 있다(Lee SJ et al, 2013). 따라서 본 연구에서 간헐적인 운동과 같은 낮은 수준의 스트레스에서 Ex-BM2군에서 중성지방의 감소가 유의적인 것으로 볼 때 흑마늘 복합물의 지속적인 섭취가 일상생활로부터 초래되는 스트레스 완화에 도움이 될 것으로 짐작된다.

Table 71. Lipids level in the liver of the exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

Sample code	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
Control*	23.79±0.56 <sup>B</sup>	13.75±0.48 <sup>B</sup>	2.74±0.09 <sup>B</sup>
Ex-con	22.68±0.91 <sup>AB</sup>	13.50±0.97 <sup>B</sup>	2.70±0.08 <sup>B</sup>
Ex-BM1	21.50±1.47 <sup>A</sup>	12.91±0.93 <sup>B</sup>	2.58±0.06 <sup>A</sup>
Ex-BM2	21.20±1.38 <sup>A</sup>	11.39±1.09 <sup>A</sup>	2.49±0.11 <sup>A</sup>

\*Refer to the comment in Table 66

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=8)

<sup>A,B</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (7) 혈액 및 간조직의 지질과산화물 함량

간헐적인 유산소 운동과 함께 흑마늘 복합물을 급이한 흰쥐의 혈액 및 간조직의 지질과산화물 함량은 Table 72와 같다. 체내 지질과산화물은 운동대조군이 정상군에 비해 유의적으로 높았으며, 흑마늘 복합물 급이군은 운동 대조군보다 유의적으로 낮았다. 특히 혈중 지질과산화물 함량은 흑마늘 복합물의 급이 농도에 따라 유의적인 차이를 보였으나, 간조직에서는 유의차가 적었다.

수영부하 스트레스를 받은 흰쥐의 간조직 중 지질과산화물 함량은 유의적으로 상승하였으며, 마늘이나 비타민 B<sub>1</sub>의 단일 물질 급이군보다는 이들의 혼합 급이군에서 유의적으로 감소되었다(Kang MJ et al, 2011). 4주간의 강제운동과 함께 흑마늘과 개똥쑥의 혼합물을 급이한 흰쥐의 혈액과 간조직의 지질과산화물 함량은 운동대조군에 비해 유의적으로 감소되었는데 시료 중 페놀 화합물에 의한 항산화 활성에 기인된 결과로(Kang JR et al, 2013) 체내 지질과산화에 의한 malondialdehyde의 생성이 식물류의 페놀 화합물에 의해 저해된다는 보고(Azuma K et al, 1999)와 일치하는 결과였다. 즉, 생체는 강제적이거나 부적절한 탈진 운동에 의한 산화적 스트

레스의 유발로 체내 면역계 손상을 초래하는데(Davies KJA et al, 1982), 이때 항산화 활성이 높은 식이 보충제의 급이로 생체 방어기능의 향상이 가능하리라 생각된다.

또한 고지방 식이로 비만이 유도된 흰쥐에서 운동과 함께 마늘을 급이한 경우에도 혈중 지질과산화물 함량은 운동보다는 오히려 마늘 급이에 의해 유의적인 감소를 보여 비만쥐에서도 지질과산화물의 감소는 운동보다 식이 성분에 의한 효과가 더 큰 것으로 보고된 바 있다(Lee HM et al 2010). 본 연구에서도 식이 중 흑마늘 복합물의 함량이 높았던 Ex-BM2군에서 지질과산화물의 함량이 유의적으로 낮은 것으로 볼 때 일상생활로부터 초래되는 산화적 스트레스를 경감을 위한 식이 보충제로써 흑마늘 복합물이 적절할 것으로 기대된다.

Table 72. Lipid peroxide contents in exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

Sample code	Serum (mmol/dL)	Liver (mmol/g)
Control*	37.62±1.53 <sup>B</sup>	185.05±11.36 <sup>B</sup>
Ex-con	49.55±5.27 <sup>C</sup>	201.67±8.68 <sup>C</sup>
Ex-BM1	38.01±0.51 <sup>B</sup>	174.44±7.08 <sup>AB</sup>
Ex-BM2	30.10±0.93 <sup>A</sup>	165.70±8.75 <sup>A</sup>

\*Refer to the comment in Table 66

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=8)

<sup>A-C</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

#### (8) 조직의 항산화 효소 활성

5주간의 간헐적인 유산소 운동과 함께 흑마늘 복합물을 급이한 흰쥐의 간조직 중 항산화 효소활성을 측정된 결과는 Table 73과 같다. 운동부하에 의해 catalase와 GSH-px 활성은 유의차가 없었으나, SOD활성이 유의적으로 증가되었다. 흑마늘 복합물 급이시 Ex-BM1군은 운동대조군과 유의차를 보이지 않았으나, Ex-BM2군은 유의적으로 증가되었다.

적절한 강도의 유산소 운동은 생체 내 항산화 효소 수준을 증가시키며 지속적인 지구성 훈련은 산화적 스트레스에 대한 방어능력을 증대시키나(Kawanaka K et al, 1997), 탈진적 운동은 오히려 항산화 효소 활성을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Guie CA et al, 1993). 특히 대사과정에서 생성된 활성 산소종은 생체 내에서 자연적으로 소거되나, 외부로부터 항산화 물질이 유입될 경우 체내 항산화계는 더욱 활성화 될 수 있다(Sen CK et al, 1994).

강제운동에 의한 산화적 스트레스가 유발된 흰쥐에서 흑마늘과 개뽕썩 혼합물의 급이는 체내 항산화 효소 활성을 증가시켰는데 시료 자체의 항산화 활성과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다(Kang JR et al, 2013). 유산소 운동을 한 운동선수들에서 상황버섯 추출물의 섭취는 젖산 생성을 감소시켜 피로회복에 효과적이었는데 단시간의 최대 운동에서 주 에너지원이 당질

인 것으로 볼 때 시료 중의 다당류에 기인된 효과로 보고되어 있다(Seo JH, 2008). 상황버섯은 사염화탄소에 의한 간손상에 대한 항염증 활성이 있어 체내 면역력 증강에 효과적이며, 흡연이나 스트레스에 의한 산화적 스트레스의 해소에도 도움이 된다고 알려져 있다(An CS et al, 2009). 더욱이 상황버섯 열수추출물의 라디칼 소거활성이 상당히 높았다는 보고(Kwoen DJ et al, 2006)는 본 연구의 선행결과(Lee SJ et al, 2013)와도 잘 일치하였기 때문에 흑마늘 복합물의 급이 시 항산화 효소 활성이 증가된 것도 시료의 항산화 활성때문인 것으로 판단된다.

본 연구결과 간헐적인 운동의 유무에 따른 catalase와 GSH-px 활성에 차이가 없는 것으로 보아 운동 강도는 낮으나, 강제운동 시 흑마늘 복합물 급이에 의해 항산화 효소 활성이 증가된 것은 현대인의 일상생활로부터 초래될 수 있는 여러 가지의 육체적, 정신적 스트레스에 있어서 흑마늘 복합물의 효과를 기대할 수 있으리라 생각된다.

Table 73. Hepatic catalase, SOD and GSH-px activities in exercised rats by interval training administered with black garlic and herbal formulas

Sample code	Catalase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	SOD (U/mg protein)	GSH-px (nmol/min/mg protein)
Control*	$0.62 \pm 0.05^{1)A}$	$53.48 \pm 2.32^B$	$449.82 \pm 9.92^A$
Ex-con	$0.64 \pm 0.02^A$	$44.85 \pm 1.53^A$	$438.18 \pm 16.04^A$
Ex-BM1	$0.74 \pm 0.04^A$	$51.96 \pm 2.72^B$	$472.37 \pm 15.74^B$
Ex-BM2	$1.12 \pm 0.18^B$	$58.80 \pm 1.26^C$	$497.10 \pm 7.89^C$

\*Refer to the comment in Table 66

<sup>1)</sup>Values are mean $\pm$ SD ( $n=8$ )

<sup>A-C</sup>Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

## 제 2 절 개발 바이오제품의 품질특성 및 생리활성 평가(제 1협동과제)

### 1. 연구개발의 목표 및 주요결과

#### 1) 세부과제 목표

- 흑마늘의 생리활성은 항산화, 항고지혈증, 혈행개선 등을 중심으로 추진되고 있어 아직까지 면역활성 등에 다양한 생리활성에 대한 연구는 미진한 실정이므로 본 연구를 통하여 흑마늘 및 천연식물류가 첨가된 융복합 제품을 개발하고자 함.
- 흑마늘과 쑥 등 추출물을 활용하는 가공품에 있어 추출 온도 및 시간은 추출물 중의 유효 성분이나 생리활성에 영향을 미칠 것으로 추정되나 대부분 추출조건에 대한 과학적 검증이나 최적화 설정없이 통상적인 방법들이 활용되고 있음.
- 본 연구에서는 개똥쑥의 생리활성을 타 품종 쑥과 비교 분석하고, 흑마늘 추출물과 개똥쑥 추출물을 서로 혼합함에 있어 최적의 혼합비율을 실험실 규모에서 1차 설정하고, 반응표면 분석법에 기초하여 pilot 규모에서 최적의 추출조건을 확립함으로써 기능성이 향상된 면역증강 바이오 제품을 개발하기 위한 최적의 배합비율을 설정하고자 함.

#### 2) 주요 내용

- 개똥쑥과 타 품종쑥과의 생리활성을 비교하고자 개똥쑥, 강화약쑥, 약쑥 및 인진쑥의 항산화 활성을 시험한 결과 인진쑥의 총 페놀 함량 및 플라보노이드의 함량이 타 쑥에 비하여 약 1.5배 높았으며, DPPH를 비롯한 3종의 라디칼 소거능 및 환원력이 가장 높았고 다음으로 개똥쑥의 활성이 높았음.
- Pilot 규모에서 흑마늘과 개똥쑥 추출물 각각의 생리 활성이 최적화되는 추출 조건을 설정을 하고자 대용량 농축기를 이용하여 고온(110~130℃) 및 시간(2~4시간)을 달리한 조건에서 반응표면분석법의 조건에 따라 열수 추출물을 제조하고 pH 및 갈변도를 측정하였으며, 항산화 활성과 그 유효 물질로서 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였음.
- 흑마늘 및 개똥쑥 열수 추출물의 반응표면분석법을 통한 분석결과, 흑마늘은 134℃에서 3.61시간, 개똥쑥은 121.86℃에서 2.80시간 추출한 결과 항산화 활성이 가장 높은 것으로 예측되어 흑마늘의 경우 고온 추출과정에서도 생리활성의 감소현상이 생기지 않는 것으로 추정됨.
- 흑마늘과 개똥쑥의 제품 개발을 위한 최적의 혼합 비율을 알아보하고자 흑마늘과 개똥쑥의 비율을 달리한 혼합물의 항산화 활성 및 면역 활성을 실험한 결과 nitric oxide 라디칼 소거능과  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 제외한 모든 실험에서 흑마늘과 개똥쑥의 비율을 99.3 : 0.7로 하였을 때 항산화 활성이 월등히 좋았음.
- 혼합물의 농도가 높아질수록, 개똥쑥의 혼합비율이 증가함에 따라서 항산화 활성도 유의적으로 증가하여, 혼합물의 항산화 활성이 개똥쑥의 높은 항산화력과 흑마늘의 갈변물질에 의한 항산화능에 기인한 결과라고 판단됨.

- ◎ 면역세포 증식효과는 쑥 추출물 중 개똥쑥이 가장 우수하였으며, 흑마늘과 혼합할 때 개똥쑥 추출물의 첨가비율이 높아질수록 활성화도 더 증가하였음.
- ◎ 생리활성에 대한 연구결과와 관능평가 결과를 종합하여 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 최적 혼합 비율은 99.3:0.7의 비로 하였으며, 또 농도별로 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine의 생성량을 확인한 결과 대조군에 비해 유의적으로 높은 수준의 cytokine을 생성함을 확인하였음.
- ◎ 흑마늘과 개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물의 혼합 비율에 따라 음료 베이스를 제조하고, 관능평가를 통하여 베이스와 첨가물간의 최적 혼합비율을 정하여 최종 제품을 위한 재료 혼합비율을 설정하였음.
  - 개발된 제품의 품질기준을 설정하고, 특성을 확인하고자 이화학적 성분을 분석함으로써 영양적 기능성을 확인하였으며, 생리활성을 확인하고자 *in vitro*에서 항산화 활성,  $\alpha$ -glucosidase, xanthine oxidase 저해활성 및 면역 활성을 분석하였음.
  - 개발된 제품의 가용성 고형분 함량은 8.4%, pH는 5.23, 산도는 0.42%였으며, 총 페놀 화합물 및 플라보노이드의 함량은 각각 1866.08  $\mu\text{g/mL}$  및 500.00  $\mu\text{g/mL}$ 로 정량되었음.
  - 항산화 활성 분석을 위하여 개발 제품에 증류수로 희석하여 2, 4, 6, 8 및 10% 농도로 조절한 후 분석한 결과 농도가 높을수록 활성은 유의적으로 증가하였는데, 특히 ABTS 라디칼 소거 활성은 6% 시료 첨가물이 95.3%로 매우 높은 소거활성을 나타내었으며, Fe<sup>+2</sup> chelating 활성을 제외한 모든 실험항목에서 시료 농도의 상승과 함께 그 활성 역시 증가하였음.
  - 여타 생리 기능성을 확인하고자 아질산염 소거활성,  $\alpha$ -glucosidase 및 xanthine oxidase 저해활성을 측정하였으며,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 10% 농도에서 28.3%로 그 절대값은 항산화 활성에 비해서는 낮았고, XO 저해 활성은 시료의 농도가 증가할수록 유의적으로 증가하는 경향으로 10% 농도에서는 2% 농도 시료에 비해 약 4.3배 증가한 63.8%의 저해 활성을 보였음.
- ◎ RAW 264.7 세포를 이용하여 세포독성을 평가한 결과 개발 음료를 20%까지 희석하였을 때 세포독성을 나타내지 않아 1, 2, 5, 10, 20% 농도로 희석하여 NO 생성량을 확인한 결과 음료의 처리 농도가 높을수록 생성량은 감소하였음.
  - 개발 음료의 면역활성을 평가하고자 RAW 264.7에 LPS로 유도된 cytokine 생성량을 측정한 결과 시료의 처리 농도가 높을수록 IL-1 $\beta$  생성량이 유의적으로 증가하였으며, 최대 20% 농도에서는 272.34 pg/mL로 양성 대조군이 LPS 처리구(40.93 pg/mL)에 비해 생성량이 증가하였으며, TNF- $\alpha$ 의 생성도 비슷한 경향인 바, 개발음료는 면역기능 증강에 효과적으로 작용할 것으로 사료됨.
  - 개발 음료는 강력한 항산화 활성을 지니고 있으며, 생체 내에서 항산화 활성과 관련된 여러 생리활성에 긍정적인 영향을 미친다고 생각되며, 이를 심층적으로 연구·개발한다면 기능성 식품의 개발에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 판단됨.

- 문헌조사 결과에 기초하여 선정된 11종의 천연식물류 열수 추출물에 대해 항산화 및 면역 활성을 측정한 결과 상황버섯에서 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 높았고 라디칼 소거활성이 우수하였으며, 황금 추출물은 LPS처리로 생성된 NO 생성을 72%정도 감소시켜, 활성이 우수한 황금, 상황버섯, 단삼, 뽕잎 및 작약 등 5종을 최종적으로 선택하였음.
- 5종의 천연식물류와 이들의 추출 조건별 영양성분(유리당, 유기산) 및 생리 활성을 비교하기 위하여 추출 후 혼합한 시료(MHE-1)와 5종을 혼합 추출한 시료(MHE-2)의 항산화 활성을 비교하였음. 유리당은 3종이 검출되었으며, 상황버섯에서 fructose와 glucose의 함량이 가장 높았음. 혼합물의 경우 시료간에 차이가 작았음. 유기산은 총 11종이 검출되었으며, 뽕잎에서 가장 높은 함량이었으며, 다음으로 작약이었음. 혼합물의 유기산 함량은 MEH-1의 함량이 더 높았음.
  - 혼합물(MHE-1, MHE-2)의 생리활성을 비교한 결과 xanthin oxidase 저해활성은 시료의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 상승하였으며, 시료간에 대차는 보이지 않았음.  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 500~5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도범위에서 MHE-2의 활성이 더 높았음.
  - 혼합물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 MHE-2에서 유의적으로 높았으며, 항산화 활성은 시료의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 상승하였는데, 유효성분의 함량이 높은 MHE-2이 MHE-1보다 유의적으로 높았음.
- 혼합물의 면역 활성을 측정한 결과 시료의 농도별 세포독성은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 84~91%였으며, 10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 50% 미만이었다. RAW264.7 세포에 LPS 처리로 NO 생성은 무처리에 비해 10배 증가하였으나 2종의 혼합물 모두 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 NO 생성을 50% 감소시켰음. PGE<sub>2</sub>의 농도는 시료군간에 차이가 작았다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6와 같은 전염증성 cytokine의 발현량도 시료처리로 감소되어 본 연구결과 천연식물류의 혼합물은 염증성 질환의 예방에 효과적일 것으로 예상되어 흑마늘 복합물을 이용한 제품 개발 시 생리활성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대됨.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 종류별 쑥 추출물의 특성 및 생리활성 비교

#### (1) 재료

개똥쑥(*Artemisia annua* L.)은 경남 하동군악양면 일원에서 생육하는 것을 제공받아 이물질을 제거하고 그늘에서 20일간 자연건조 하였고, 강화약쑥(*Artemisia princeps* Pampanini), 약쑥(*Artemisia Princeps* var *Orientalis* HARA) 및 인진쑥(*Artemisia iwayomogi* Kitamura)은 건조된 것을 구입하여 재료로 사용하였다.

#### (2) 재료의 열수추출물 제조

개똥쑥, 강화약쑥, 약쑥 및 인진쑥 각 100 g에 20배의 증류수를 가하여 60°C 수욕상에서 12시간씩 2회 반복하여 추출한 후 동결건조하여 4°C에서 냉장 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

개똥썩을 비롯한 썩 4종은 62.5, 125, 250, 500 및 1000 µg/mL 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

## 2) Pilot 규모에서 흑마늘 및 개똥썩 추출물 제조조건의 최적화

흑마늘 중량에 대하여 15배의 물을 가하여 Table 1의 온도 및 시간에서 추출하였으며, 개똥썩은 중량에 대하여 30배의 물을 가하여 동일한 방법으로 추출하였다. 각 추출물은 동결건조하여 -20°C에 보관해 두었으며, 실험 직전에 2000 µg/mL의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Levels of extraction conditions in experimental design for extraction from black garlic and Gaeddongssuk

No.	Temperature (°C)	Time (hr)
1	110	2
2	110	4
3	130	2
4	130	4
5	120	3
6	110	3
7	130	3
8	115	2.134
9	115	3.866
10	125	2.134
11	125	3.866

## 3) 흑마늘 및 비율별 개똥썩 추출물의 생리활성 비교

흑마늘은 참여기업인 남해보물섬마늘영농조합법인의 흑마늘 제조공정에 따라 제조된 것을 사용하였으며, 추출물의 제조는 상기 2)에서 설정된 최적의 조건에서 제조된 흑마늘 및 썩 추출물의 제조 조건에 따라 실시하였다. 동결 건조된 흑마늘과 개똥썩 추출물은 각각 100:0, 99.9:0.1, 99.5:0.5, 99.3:0.7, 99.0:1.0 및 90:10(v/v)의 비율로 혼합하여 일정농도(125, 250, 500 및 1000 µg/mL)로 조절된 것을 시료로 하였다.

## 4) 흑마늘과 개똥썩 함유 시제품의 제조

1차년도 연구결과에 따라 생리 활성이 가장 우수한 흑마늘과 개똥썩 추출물의 혼합 비율과 관능평가 결과 선정된 최종 농도 비율에 따라 7 brix 농도의 흑마늘 추출물과 0.7 brix 농도의 썩 추출물을 93:7로 혼합한 것을 베이스로 하여 제품을 제조하였다. 흑마늘과 썩은 시료 무게에 대해 10배의 물을 가하여 감압 추출·농축기를 이용하여 120°C에서 3시간동안 추출한 후 여과한 것을 농축하여 원하는 농도로 조절하여 사용하였다.

자연식품으로서의 이미지 강화를 위하여 인공 식품 첨가물의 사용을 최소화 하고자 사과추

출농축액, 배추출 농축액, xylitol, 효소 스테비아 및 결정과당을 첨가 부재료로 사용하였으며, 관능평가를 통해 적정 혼합 비율을 설정하였다. 최종 선정된 시제품 제작을 위한 재료의 농도 및 혼합비율은 흑마늘 추출물을 7 brix, 90.2%, 쑥 추출물은 0.7 brix, 6.8%, 배추출농축액은 60 brix, 2.0%, 결정과당은 1%로 하였다.

### 5) 천연식물류 추출물 및 그 혼합물의 제조

#### (1) 천연식물류 추출물의 제조

문헌조사 결과 스크리닝된 한약재 11종(구기자, 황금, 오가피, 감국, 산약, 작약, 단삼, 뽕잎, 생강, 상황버섯 및 옥수수수염)을 구입하여 90°C의 진탕배양기(JSSB-50T, JSR, Gongju, Korea)에서 60 rpm으로 회전시키면서 12시간씩 3회 반복하여 열수 추출하였다. 추출된 시료는 모두 모아 여과한 후 진공 동결 건조시킨 후 -40°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 각 추출물은 항산화 및 면역 활성 측정에 사용하였다.

#### (2) 흑마늘과 천연식물류 추출물의 혼합물 제조

선정된 5종의 천연식물류로 상황버섯(*Phellinus linteus*), 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi), 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge), 뽕잎(*Morus alba* L.) 및 작약(*Paeonia lactiflora* Pall.)은 각 시료를 추출하여 동량으로 혼합한 것(MHE-1), 5종의 시료를 각각의 수율을 고려하여(Table 2) 각각 100 g, 13.5 g, 13.4 g, 21.2 g 및 37.6 g씩 혼합한 후 총 시료량에 10배의 물을 가하고 90°C에서 12시간씩 3회 반복하여 열수 추출하였다. 추출물은 동결건조 후 분말화하였으며, 이때 천연식물류 혼합물의 추출 수율은  $20.03 \pm 0.87\%$ 였다(MHE-2).

흑마늘 및 천연식물류 5종 추출물(흑마늘 복합물)은 각각 물에 용해하여 5% 및 1%로 조절하였으며, 맛과 향을 기준으로 한 관능평가에 의해 70:30 (v/v)의 비율로 혼합하여 최종 부피를 100 mL로 하여 성인(70 kg)의 1일 1회 섭취량으로 하였으며(BM1), BM2는 1일 3회 섭취량을 기준으로 하여 농축한 후 최종 부피를 100 mL로 하였으며, 제 1세부기관에 제공하여 *in vivo* 실험에 사용하였다.

Table 2. The combined ratio for mixture of 5 kinds of medicinal plants

Sample name	상황버섯 ( <i>Phellinus linteus</i> )	황금 ( <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi)	단삼 ( <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge)	뽕잎 ( <i>Morus alba</i> L.)	작약 ( <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.)
Yield (%)	5.7	42.13	42.47	26.92	15.17
Yield ratio to <i>P. linteus</i>	1	7.39	7.45	4.72	2.66
Weight (g)	100	13.5	13.4	21.2	37.6



## 6) 성분의 분석

### (1) 고형분 함량, pH 및 산도

고형분 함량은 적외선 수분측정기로 수분을 측정하여 100에서 값을 제한 나머지로 부터 산출하였다. pH는 추출 시료를 취하여 pH meter(Model 720, Thermo Orion, Waltham, MA, USA)로 측정하였으며 산도는 자동적정기를 이용하여 측정하였다.

### (2) 추출물의 갈색도 측정

흑마늘과 개똥쑥 추출물의 갈색도는 동일한 농도로 희석한 시료액을 대상으로 측정하였다. 갈색도는 spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서 증류수를 대조로 하여 측정한 흡광도 값으로 나타내었다.

### (3) 유리당 분석

시료액 3 g에 3차 증류수를 가하여 진탕 혼합한 다음 100 mL로 정용하여 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리시켰다. 상층액을 취하여 0.45  $\mu$ m membrane filter 및 sep-pak C<sub>18</sub> cartridges에 차례로 통과시킨 것을 HPLC(Agilent 1260 infinity, Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. 이때 분석 조건은 Table 3과 같으며 유리당 표준물질(Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 농도별로 동일한 조건에서 분석한 결과로부터 확인·정량하였다.

Table 3. Conditions for free sugar analysis of garlics

Items	Conditions
Instrument	1260 Infinity (Agilent)
Column	YMC-pack Polyamine II (4.6×250 mm, YMC)
Column temperature	35°C
Mobile phase	H <sub>2</sub> O, Acetonitril
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	ELSD

### (4) 유기산 분석

시료액에 10배의 정제수를 가하여 진탕혼합한 후 추출·여과 한 여액을 sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 통과시킨 다음 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 IC(ICS-2100, Dionex, Salt lake city, USA)로 분석하였다. 이때 분석용 column은 IonPac ICE-AS6 analytical column (9×250 mm), detector는 suppressed conductivity를 이용하였고, 이동상은 0.4 mM heptafluorobutyric acid를 1.0 mL/min의 속도로 이동시켰으며, 칼럼 온도는 19°C로 유지하였다. 유기산 표준품은 oxalic acid, tartaric acid, citric acid, maleic acid, formic acid, lactic acid, acetic acid, succinic acid, fumaric acid, propionic acid 및 glutaric acid(Sigma chemical Co.)를 사용하였다.

### (5) 총 페놀 및 플라보노이드 정량

총 페놀 함량은 홍마늘 용매 분획물 1 mL에 Foline-Ciocalteau 시약 및 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 각각 1 mL씩 차례로 가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드는 추출물 1 mL에 10% aluminum nitrate 및 1 M potassium acetate 0.1 mL, ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 표준물질로 각각 caffeic acid 및 quercetin (Sigma Co.)을 이용한 검량선에 의해 계산하였다.

## 7) 항산화 및 생리활성 평가

### (1) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여 효과로 측정하였다. 96 well plate에 10 mg/100 mL 농도로 ethanol에 용해한 DPPH 용액 100 µL에 일정농도의 시료액 50 µL를 가한 후 상온에서 10초간 plate shaker(MX2, FINEPCR, Seoul, Korea)로 혼합한 후 30분간 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 비(%)로 나타내었다.

### (2) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 7 mM ABTs 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시킨 후 이를 415 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정하여 사용하였다. 96 well plate에 ABTS 용액 200 µL를 분주한 후 일정농도의 시료액 50 µL를 가하여 상온에서 10초간 plate shaker(MX2, FINEPCR, Seoul, Korea)로 혼합한 다음 ELISA reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ABTS 라디칼 소거능은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비(%)로 나타내었다.

### (3) FRAP법에 의한 항산화능

홍마늘 용매별 분획물에 대한 FRAP(ferric reducing antioxidant power)측정은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 용액 및 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 미리 혼합한 다음 37°C의 수욕상에서 5분 동안 가온한 뒤 FRAP 측정용 기질로 사용하였다. 즉, 96 well plate에 시료액 40 µL, FRAP 기질액 100 µL 및 증류수 40 µL를 차례로 혼합하여 37°C에서 4분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며, FeSO<sub>4</sub>로 작성한 검량선식에 대입하여 환산하였다.

### (4) 환원력 측정

추출물 1 mL에 200 mM의 인산 완충액(pH 6.6) 및 1%의 potassium ferricyanide 1 mL를 차례로 가한 다음 50°C의 수욕상에서 20분간 반응시켰다. 여기에 10% TCA용액 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 다음 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 얻은 상정액 1 mL에 증류수 및 ferric chloride 용액을 각 1 mL씩 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 환원력은 흡광도의 값으로 나타내었다.

#### (5) Nitric oxide 소거능 측정

Nitric oxide 소거능은 시료 1 mL에 10 mM sodium nitroprusside 용액 0.5 mL와 20 mM 인산 완충액(pH 7.4) 2 mL를 각각 가하여 상온에서 150분간 반응시켰다. 여기에 0.3 mL의 Griess reagent (1% sulfanilamide를 함유하는 5% 인산용액 + 0.1% naphthylethylenedi- amide 용액, 1:1)를 가한 후 542 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide 소거능은  $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} - \text{시료 대조구의 흡광도}/\text{무첨가구의 흡광도})] \times 100$ 으로 나타내었다.

#### (6) Fe<sup>+2</sup> chelating 활성 측정

Fe<sup>+2</sup> chelating 활성은 시료 추출물 0.2 mL, methanol 0.8 mL, 2 mM FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 용액 0.05 mL 및 5 mM ferrozine[3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4,4"-disulfonic acid] 용액 0.2 mL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비로 나타내었다.

#### (7) 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 0.1 mL에 시료액 0.3 mL를 가하고 0.1 N HCl과 0.2 M 구연산 완충액으로 pH 2.5로 조정된 다음, 완충액 2 mL를 가하였다. 이 용액을 37°C에서 1 시간 반응시킨 후 2% 초산용액 2 mL와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid 1% naphthylamine = 1:1) 0.3 mL를 차례로 가한 후 진탕 혼합하여 실온에서 15분간 정치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거활성은 시료 무첨가구에 대한 시료첨가구의 흡광도 비(%)로 나타내었다.

#### (8) α-Glucosidase 저해활성 측정

α-Glucosidase 활성 저해능은 5 mM p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside를 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 첨가하여 반응기질로 하고 0.7 unit/mL α-Glucosidase와 시료 추출물을 차례로 가한 후 효소액을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 반응 생성물인 p-nitrophenol을 405 nm에서 분광광도계로 측정하여 α-glucosidase 활성의 저해정도로 나타내었다.

#### (9) Xanthine oxidase(XO) 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해 활성 측정은 일정 농도로 희석한 시료 0.3 mL에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 3 mL를 첨가하였다. 여기에 0.2 U/mL (Sigma Co., USA) 농도의 XO 0.3 mL를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 20% TCA (trichloroacetic acid) 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후, 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하였다. 시료에 대한 xanthine oxidase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다.

### 8) 마우스 비장세포를 이용한 면역활성 측정

#### (1) 마우스 비장세포의 분리 및 배양

마우스 비장세포를 분리하기 위하여 경추 탈골법으로 마우스를 희생시킨 후 비장을 무균으

로 적출하여 RPMI 1640 배양액으로 씻은 후 멸균 유리병으로 가볍게 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 배양액으로 2번 세척하고, RBC lysis buffer에 상온에서 5분간 처리하여 적혈구를 제거하였다. 적혈구가 제거된 비장세포는 다시 RPMI 1640 배양액에 분산시켜, trypan blue solution으로 염색한 후 hemocytometer를 이용하여 그 세포수를 측정하였다. 세포 농도  $5.0 \times 10^4$  cell/mL로 분산시킨 다음 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주한 후 세포 증식능 측정에 사용하였다.

### (2) 면역세포 증식능 측정

마우스 비장 면역세포의 증식능을 알아보기 위하여 CCK-8을 이용한 발색 분석법을 사용하였다. 세포농도를  $5.0 \times 10^4$  cell/mL로 분산시킨 다음 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주하고 24시간 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 RPMI 1640 배양액에 시료의 최종농도가 10, 25, 50, 100, 200 및 400  $\mu$ g/mL가 되도록 조절된 배지로 교체하여 다시 24시간 동안 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 여기에 CCK-8 용액을 10  $\mu$ L씩 분주한 다음 3시간 동안 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 각 실험은 독립적으로 3회 반복 실행하여 평균치를 구하였다.

### (3) Cytokine 측정

비율별 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물 중 항산화활성 및 면역세포 증식능을 종합적으로 볼 때 가장 활성이 우수한 99.3 : 0.7 비율의 혼합 추출물의 cytokine 생성능을 측정하였다. 마우스 비장세포 농도를  $5.0 \times 10^4$  cell/mL로 분산시킨 다음 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주하고 24시간 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어 주었다. Lipopolysaccharide(LPS) 단독 혹은 배지에 농도별로 조절된 시료를 각 well에 처리한 후 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 ELISA kit(Cayman Co., USA)를 이용해 각 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 농도를 측정하였다.

즉, 배양 상층액을 cytokine으로 coating된 96 well plate에 50  $\mu$ L씩 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시킨 후 washing buffer로 4회 세척하였다. 여기에 100  $\mu$ L의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척한 다음 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxy benzalmonate(TMB) substrate를 100  $\mu$ L씩 처리하여 30분간 반응시킨 후 100  $\mu$ L의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다

## 9) 대식세포를 이용한 개발 제품의 면역활성 측정

### (1) 세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

### (2) 대식세포 생존율 측정

마우스 대식세포에 대한 독성 측정은 CCK-8 assay(Cell Counting Kit 8, (Dojindo Molecular

Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA)를 이용한 발색 분석법을 사용하였다. 세포농도를  $5 \times 10^4$  cells/mL로 분산시킨 다음 세포 배양용 96 well plate에 80  $\mu$ L씩 분주하여 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 농도를 달리한 시료액을 20  $\mu$ L씩 접종하였다. 이를 다시 24시간 배양한 후 CCK-8 용액 10  $\mu$ L씩 분주한 다음 37°C에서 3시간 배양하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (3) Cytokine 측정

마우스 대식세포 농도를  $5 \times 10^4$  cells/mL로 분산시킨 다음 96 well plate에 80  $\mu$ L씩 분주하고 24시간 동안 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, 농도를 달리한 시료액을 20  $\mu$ L씩 처리하고 1시간 후 Lipopolysaccharide(LPS)를 처리하였다. 이를 다시 18시간 배양 후 상층액만을 취하여 ELISA kit(Cayman co., USA)로 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 농도를 측정하였다.

## 10) 통계처리

각 실험은 3~5회 이상 반복실험한 결과에 대하여 SPSS 12.0을 사용하여 통계처리 하였으며, 각각의 시료에 대해 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 각 시료군에 대한 유의차 검정은 분산분석을 한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 1) 개똥쭉, 강화약쭉, 약쭉 및 인진쭉 추출물의 항산화 활성

#### (1) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

식물계에 널리 분포되어 있는 페놀성 화합물은 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지므로 단백질 및 거대분자들과 쉽게 결합하여, 항산화 및 항암과 같은 다양한 생리활성을 나타낸다(Choi SY et al, 2005; Lee JH & Lee SR, 1994).

개똥쭉을 비롯한 쭉 4종의 물추출물에 대한 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 후 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 인진쭉의 총 페놀 함량은  $183.27 \pm 2.77$  mg/g, 플라보노이드 함량은  $27.92 \pm 1.88$  mg/g으로 가장 높았다. 다음으로 개똥쭉에서 총페놀 함량은  $175.14 \pm 0.33$  mg/g, 플라보노이드 함량은  $24.36 \pm 0.43$  mg/g으로 높았다. Ryu JH et al(2011b)은 개똥쭉의 잎과 줄기의 페놀 함량이 각각 88.19 mg/g과 45.03 mg/g 이라고 보고한 바 있는데 이는 본 실험의 결과와 상이한 결과로 쭉의 채취시기에 따라 그 함량에 차이가 있기 때문으로 판단된다.

#### (2) 전자공여능

DPPH 용액을 기질로 하여 측정한 개똥쭉, 강화약쭉, 약쭉 및 인진쭉 물추출물의 전자공여능은 Table 5와 같다. 반응액에 첨가된 시료의 농도가 증가됨에 따라 소거능은 유의적으로 상승하였다. 개똥쭉, 강화약쭉 및 약쭉은 250  $\mu$ g/mL, 인진쭉은 125  $\mu$ g/mL 농도에서 50% 이상의 라

디칼 소거능을 보였으며, 특히 인진쑥은 타 쑥 3종에 비해 62.5~500 µg/mL 농도에서 유의적으로 라디칼 소거능이 높았다. 반면에 1000 µg/mL의 고농도에서는 83.98±2.29~88.87±0.27%로 쑥 4종의 DPPH 라디칼 소거능은 유의차가 없었다.

Table 4. Total phenol and flavonoids contents of water extract from various *Artemisia* (mg/g)

Kinds of <i>Artemisia</i>	Phenol	Flavonoid
Gaeddongssuk	175.14±0.33 <sup>B</sup>	24.36±0.43 <sup>B</sup>
Ganghwayakssuk	146.13±0.22 <sup>A</sup>	12.71±0.55 <sup>A</sup>
Yakssuk	172.86±0.19 <sup>B</sup>	22.64±0.48 <sup>B</sup>
Injinssuk	183.27±2.77 <sup>C</sup>	27.92±1.88 <sup>C</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>A-E</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

Hong JH et al(2007)의 연구에서는 약쑥 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 약 IC<sub>50</sub> 52.71~321.95 µg/mg의 우수한 소거활성을 보였으며, 이 중 에탄올 분획 층이 가장 소거활성이 높았다. 일반적으로 쑥은 다양한 플라보노이드를 함유하고 있으며 6-methoxy flavonoid의 공통적인 구조를 가지고 있고 플라보노이드는 항산화 효과가 대단히 커서, 효소적 또는 비효소적으로 지질과산화물을 효과적으로 억제한다고 알려져 있다(Kang YH et al, 1997).

Table 5. Electron donating activity of water extract from various *Artemisia* (%)

Kinds of <i>Artemisia</i>	Concentration (µg/mL)				
	62.5	125	250	500	1000
Gaeddongssuk	25.78±2.40 <sup>aA</sup>	42.63±1.71 <sup>bB</sup>	60.51±2.91 <sup>cC</sup>	77.34±2.73 <sup>dB</sup>	88.82±1.14 <sup>eB</sup>
Ganghwayakssuk	25.14±0.88 <sup>aA</sup>	36.27±0.40 <sup>bA</sup>	51.93±2.40 <sup>cA</sup>	69.41±2.02 <sup>dA</sup>	83.98±2.29 <sup>eA</sup>
Yakssuk	24.41±0.37 <sup>aA</sup>	42.05±0.81 <sup>B</sup>	57.92±1.62 <sup>cBC</sup>	75.54±0.29 <sup>dB</sup>	88.40±0.12 <sup>eB</sup>
Injinssuk	30.66±1.50 <sup>aB</sup>	58.44±1.14 <sup>bC</sup>	84.10±0.36 <sup>cD</sup>	89.17±0.19 <sup>dC</sup>	88.84±0.46 <sup>eB</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

### (3) ABTS 라디칼 소거능

ABTS법은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된  $ABTS\cdot^+$ 이 시료 중의 항산화성 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용한 항산화력의 측정법이다. ABTS 라디칼 소거능은 DPPH 라디칼 소거능과 상관관계가 높는데 DPPH는 유리라디칼이고, ABTS는 양이온 라디칼이라는 점에서 차이가 있으며 항산화성 물질의 정도에 따라 두 라디칼과 결합하여 제거되는 능력에도 차이가 있어(Wang MF et al, 1998) ascorbic acid의 경우 DPPH법에 의한 항산화력은 29%, ABTS법은 45%로 ABTS법에 의한 경우가 항산화력이 다소 높게 측정된다는 보고가 있다(Jeong JW et al, 1994).

4종의 쑥으로부터 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 6에 나타내었다. 4종의 쑥 모두 반응액에 시료의 첨가농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거능이 유의적으로 상승하였다. DPPH 라디칼 소거능과 유사한 경향으로 인진쑥이 다른 3종의 쑥에 비해 모든 농도에서 유의적으로 높은 라디칼 소거능을 보였지만, 1000  $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서는 인진쑥이  $97.75\pm 0.08\%$ , 강화약쑥이  $98.20\pm 0.21\%$ 로 강화약쑥이 인진쑥에 비해 더 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다. 또한 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 모든 시료가 90% 이상의 높은 라디칼 소거능을 보였다.

Table 6. ABTS radical scavenging activity of water extract from various *Artemisia*

(%)

Kinds of <i>Artemisia</i>	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	62.5	125	250	500	1000
Gaeddongssuk	$24.09\pm 0.20^{aB}$	$42.04\pm 0.33^{bB}$	$75.16\pm 3.52^{cB}$	$95.39\pm 0.28^{dA}$ B	$97.85\pm 0.16^{dB}$
Ganghwayakssuk	$22.94\pm 0.47^{aB}$	$39.96\pm 0.74^{bA}$	$69.88\pm 1.08^{cA}$	$95.62\pm 0.27^{dB}$	$98.20\pm 0.21^{eC}$
Yakssuk	$19.06\pm 0.73^{aA}$	$39.70\pm 0.92^{bA}$	$73.74\pm 0.69^{cB}$	$95.08\pm 0.13^{dA}$	$97.35\pm 0.06^{eA}$
Injinssuk	$26.91\pm 0.22^{aC}$	$55.12\pm 0.86^{bC}$	$89.87\pm 0.46^{cC}$	$96.21\pm 0.03^{dC}$	$97.75\pm 0.08^{eB}$

Each value represents mean $\pm$ SD (n=3)

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-E</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

### (4) FRAP value 측정

FRAP 방법은 비교적 최근에 개발된 총 항산화능을 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine( $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine( $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 것으로 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안되어진 방법이다.

4종의 쑥을 FRAP법으로 측정한 결과를  $\text{FeSO}_4$  당량으로 환산하여 Table 7에 나타내었다.

Table 7. FRAP(ferric-reducing antioxidant potential) value of water extract from various *Artemisia* (FeSO<sub>4</sub> eq μM)

Kinds of <i>Artemisia</i>	Concentration (μg/mL)				
	62.5	125	250	500	1000
Gaeddongssuk	72.21±4.94 <sup>aB</sup>	125.16±2.53 <sup>bC</sup>	226.86±0.83 <sup>cC</sup>	403.34±4.43 <sup>dB</sup>	854.25±3.75 <sup>eB</sup>
Ganghwayakssuk	56.30±4.00 <sup>aA</sup>	100.73±2.05 <sup>bA</sup>	189.14±4.51 <sup>cA</sup>	345.96±5.18 <sup>dA</sup>	618.00±5.41 <sup>eA</sup>
Yakssuk	94.14±2.60 <sup>aA</sup>	102.66±3.09 <sup>bB</sup>	197.09±4.21 <sup>cB</sup>	475.50±4.85 <sup>dC</sup>	986.86±4.50 <sup>eD</sup>
Injinssuk	89.02±3.26 <sup>aC</sup>	166.18±2.12 <sup>bD</sup>	393.57±2.47 <sup>cD</sup>	748.34±4.74 <sup>dD</sup>	977.77±1.82 <sup>eC</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-E</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

FRAP value는 타 실험결과와 유사한 경향으로 모든 시료의 농도가 증가함에 따라 FRAP value도 유의적으로 증가하였다. 62.5 μg/mL 농도에서 약쑥이 94.14±2.60 FeSO<sub>4</sub> eq μM로 가장 높았으며 125~500 μg/mL 농도 범위에서는 인진쑥이 166.18±2.12~748.34±4.74 FeSO<sub>4</sub> eq μM 농도로 가장 높았고, 1000 μg/mL 농도에서는 약쑥이 986.86±4.50 FeSO<sub>4</sub> eq μM로 가장 높은 FRAP value를 나타내었다. Sanchez-Gonzalez I et al(2005)은 총 페놀 함량과 FRAP value는 높은 상관관계가 있다고 보고하였는데 본 연구 결과와 비교해보았을 때 총 페놀 함량과 FRAP value가 유사한 경향을 나타내었다.

#### (5) 환원력

개똥쑥, 강화약쑥, 약쑥 및 인진쑥 물 추출물의 환원력을 측정하여 흡광도 값으로 나타낸 결과는 Table 8같다. 모든 시료에서 시료 첨가 농도가 높아질수록 환원력도 유의적으로 증가하였으며, 4종의 쑥의 모든 농도에서 인진쑥이 0.35±0.00~1.89±0.03범위의 흡광도로 가장 높은 환원력을 나타내었고, 1000 μg/mL 농도에서는 인진쑥, 약쑥, 개똥쑥 및 강화약쑥 순서였다. 인진쑥 메탄을 추출물의 환원력은 50~500 μg/mL 농도에서 0.058~0.627 범위의 흡광도를 보여 시료의 첨가 농도에 의존적으로 증가하였으나, 동일농도의 tocopherol 보다는 활성이 낮았다고 보고된 바 있다(Jung MJ et al, 2008).

시료의 환원력은 전자공여를 통한 라디칼의 소거능과 관련성이 높기 때문에 DPPH 라디칼 소거능이 높은 시료인 경우 환원력이 높은 것으로 알려져 있으며(Gordon MF 1990), 이 또한 시료 중의 페놀 화합물의 함량에 의존적인 것으로 알려져 있다(Tabart J et al 2009).



Table 8. Reducing power of water extract from various *Artemisia*

(Absorbance at 700 nm)

Kinds of <i>Artemisia</i>	Concentration (µg/mL)				
	62.5	125	250	500	1000
Gaeddongssuk	0.31±0.00 <sup>aA</sup>	0.42±0.00 <sup>bB</sup>	0.61±0.01 <sup>cB</sup>	0.84±0.01 <sup>dA</sup>	1.31±0.02 <sup>eB</sup>
Ganghwayakssuk	0.33±0.00 <sup>aB</sup>	0.41±0.01 <sup>bA</sup>	0.53±0.00 <sup>cA</sup>	0.82±0.00 <sup>dA</sup>	1.23±0.01 <sup>eA</sup>
Yakssuk	0.31±0.00 <sup>aA</sup>	0.44±0.01 <sup>bC</sup>	0.61±0.00 <sup>cB</sup>	0.97±0.01 <sup>dB</sup>	1.53±0.02 <sup>eC</sup>
Injinssuk	0.35±0.00 <sup>aC</sup>	0.51±0.00 <sup>bD</sup>	0.78±0.02 <sup>cC</sup>	1.15±0.05 <sup>dC</sup>	1.89±0.03 <sup>eD</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-E</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

(6) Nitric oxide 라디칼 저해능

개똥쑥을 비롯한 쑥 4종의 nitric oxide 라디칼 저해능을 측정한 결과이다(Table 9). Table 9에 나타낸 바와 같이 모든 시료에서 시료의 농도가 증가함에 따라 nitric oxide 라디칼 소거능은 상승하였다. 62.5~250 µg/mL농도에서는 인진쑥이 54.56±4.61~62.39±2.11%의 범위로 타 쑥에 비해 라디칼 소거능이 높았지만 500 µg/mL 농도에서는 개똥쑥(64.52±1.59%)과 유사하였고, 1000 µg/mL 농도에서는 오히려 개똥쑥(74.95±0.63%)이 인진쑥(71.08±0.73%)보다 라디칼 소거능이 높았다. 또한 시료 농도 250 µg/mL에서 모든 시료의 nitric oxide 라디칼 소거능이 50% 이상이었다.

Table 9. Nitric oxide radical scavenging of water extract from various *Artemisia*

(%)

Kinds of <i>Artemisia</i>	Concentration (µg/mL)				
	62.5	125	250	500	1000
Gaeddongssuk	45.74±2.86 <sup>aC</sup>	53.99±1.67 <sup>bB</sup>	57.63±2.49 <sup>bB</sup>	64.52±1.59 <sup>cC</sup>	74.95±0.63 <sup>dD</sup>
Ganghwayakssuk	32.98±3.07 <sup>aA</sup>	43.68±3.15 <sup>bA</sup>	50.49±2.62 <sup>cA</sup>	55.35±1.91 <sup>cdA</sup>	56.60±2.49 <sup>dA</sup>
Yakssuk	39.92±1.08 <sup>aB</sup>	50.02±0.68 <sup>bB</sup>	54.10±2.33 <sup>cAB</sup>	60.28±2.03 <sup>dB</sup>	67.57±1.36 <sup>eB</sup>
Injinssuk	54.56±4.61 <sup>aD</sup>	58.14±1.74 <sup>abC</sup>	62.39±2.11 <sup>bcC</sup>	64.73±1.92 <sup>cC</sup>	71.08±0.73 <sup>dC</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

Hong JH et al(2007)은 약쑥 분획 추출물의 NO 라디칼 소거능을 측정한 결과 헥산 분획물의 IC<sub>50</sub>값이 98.40 µg/mg, 클로로포름 분획물이 81.85 µg/mg, 부탄올 분획물이 76.34 µg/mg, 물추출물이 71.66 µg/mg이라고 보고하였다.

(7) α-glucosidase 저해능

개똥쑥, 강화약쑥, 약쑥 및 인진쑥 물 추출물의 α-glucosidase 저해활성은 Table 10에 나타난 바와 같이 농도 의존적으로 저해활성이 증가하였다. 타 항산화 실험에서 인진쑥 추출물의 활성이 높았던 것과는 달리 모든 농도에서 강화약쑥과 약쑥이 14.70±1.09~53.61±1.99% 범위로 높은 저해활성을 보였다.

Ryu JH et al(2011)의 연구에서는 개똥쑥의 줄기 에탄올 추출물이 모든 실험 농도에서 56.25~86.49% 범위로 가장 활성이 높았고, 다음으로 줄기 물 추출물이 43.00~84.13%의 저해활성을 나타낸다고 보고하였다. 식물류의 페놀 및 플라보노이드 물질은 구조적 특징에 따라 항당뇨 활성에 차이를 보이는 것으로 알려져 있는데(Sharma B et al, 2008), 본 연구결과도 이에 기인한 결과라 사료되며, 강화약쑥과 약쑥 추출물이 개똥쑥과 인진쑥에 비하여 생체 내 항당뇨 활성에 유효할 것으로 예상된다.

Table 10. α-Glucosidase inhibition activity of water extract from various *Artemisia*

(%)

Kinds of <i>Artemisia</i>	Concentration (µg/mL)				
	62.5	125	250	500	1000
Gaeddongssuk	9.23±2.22 <sup>aA</sup>	20.05±1.32 <sup>bA</sup>	21.10±1.71 <sup>bA</sup>	29.63±2.61 <sup>cA</sup>	41.57±0.62 <sup>dA</sup>
Ganghwayakssuk	14.70±1.09 <sup>aB</sup>	25.60±1.49 <sup>bB</sup>	36.88±1.10 <sup>cC</sup>	44.39±3.94 <sup>dB</sup>	52.97±1.83 <sup>eC</sup>
Yakssuk	21.88±0.81 <sup>aC</sup>	21.69±3.22 <sup>aA</sup>	27.20±2.04 <sup>bB</sup>	32.93±3.27 <sup>cA</sup>	53.61±1.99 <sup>dC</sup>
Injinssuk	9.94±3.46 <sup>aA</sup>	19.78±1.37 <sup>bA</sup>	21.26±0.92 <sup>bA</sup>	33.76±0.22 <sup>cA</sup>	47.08±0.90 <sup>dB</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-C</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

2) 다양한 조건에서 제조된 흑마늘 추출물의 생리활성 스크리닝을 통한 추출조건의 최적화

(1) 흑마늘 고온 열수 추출물의 pH

각각의 온도 및 시간을 달리한 추출조건에서 추출한 흑마늘 열수 추출물의 pH를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

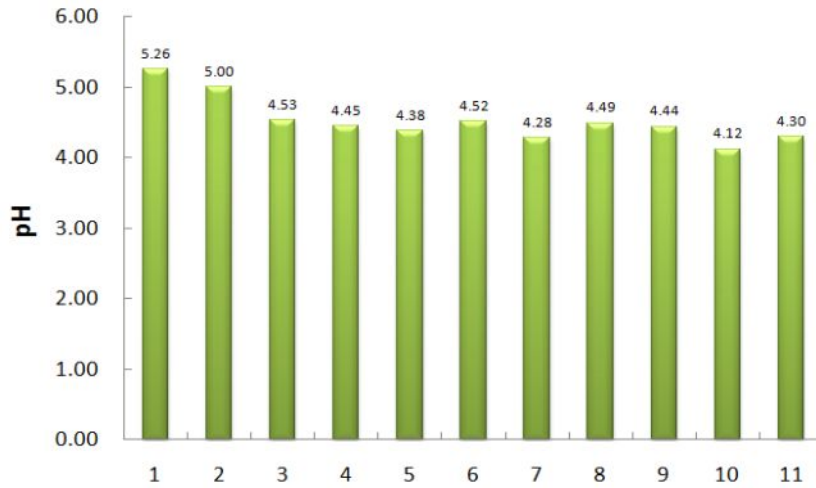


Fig. 1. pH in black garlic extract under different conditions.

모든 조건에서 pH는 4.12~5.26의 범위로 다소 산성을 띠는 경향이였다. 흑마늘의 경우 갈변 물질의 생성 증가와 함께 pH가 저하하는 경향인데, 본 연구 결과 흑마늘이 고온에서 추출되었기 때문에 pH가 낮은 것으로 생각된다.

(2) 흑마늘 고온 열수 추출물의 갈변물질 함량

온도와 시간을 달리하여 추출한 흑마늘 열수 추출물의 갈변물질 함량을 280 nm에서 측정한 결과(Fig. 2) 흡광도 값은 0.194~0.278 범위로 시료간의 대차를 보이지는 않았다. 특히 110°C 및 130°C에서 2시간 추출한 시료에서 갈변물질의 함량이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 이들은 동일동온도에서 4시간 추출한 것 보다 갈변 물질의 함량이 높은 것으로 나타났다.

반응표면분석법에 의해 흑마늘 추출물의 갈변물질 함량이 극대화되는 조건을 분석한 결과(Fig. 3) 124.10°C에서 3.30시간 추출할 때 최고값 0.25를 가졌다. 이는 이 조건에서 벗어나 시간 및 온도가 낮아지거나 높아질수록 갈변도의 최적 조건에서 멀어지는 것을 의미한다.

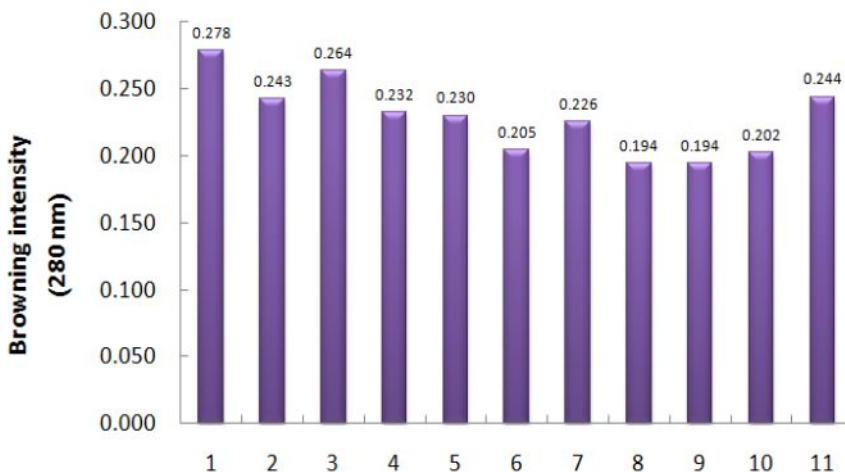


Fig. 2. Browning intensity in 280 nm of black garlic extract under different conditions.

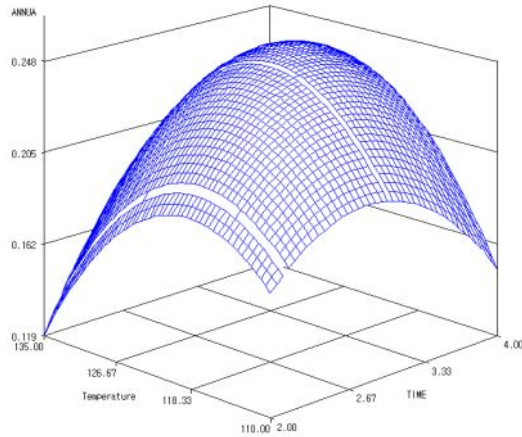


Fig. 3. Response surface plot for browning intensity in 280 nm of black garlic extract.

(3) 흑마늘 고온 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성

흑마늘 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Fig. 4와 같다. 130°C에서 3시간 추출한 시료(7번)에서 활성이 가장 컸으며 4번(130°C, 4시간) > 5번(120°C, 3시간) 순으로 높은 활성을 보였으며, 110°C에서 2시간 추출된 시료(1번)에서 소거 활성이 가장 낮아 흑마늘 추출물의 경우, DPPH 라디칼 소거활성은 추출온도와 비례적인 것으로 사료된다.

DPPH 라디칼 소거활성을 반응표면분석법에 의해 분석한 결과는 Fig. 5와 같다. 144.53°C에서 3.21시간 추출하였을 때 정상점(stationary point) 중 최고값 67.90%를 가졌다. 144.53°C는 최대 온도인 130°C를 벗어난 값으로 ABTS 소거활성 역시 DPPH와 마찬가지로 추출조건의 최대 온도인 130°C를 벗어나더라도 그 활성은 증가할 것으로 생각된다.

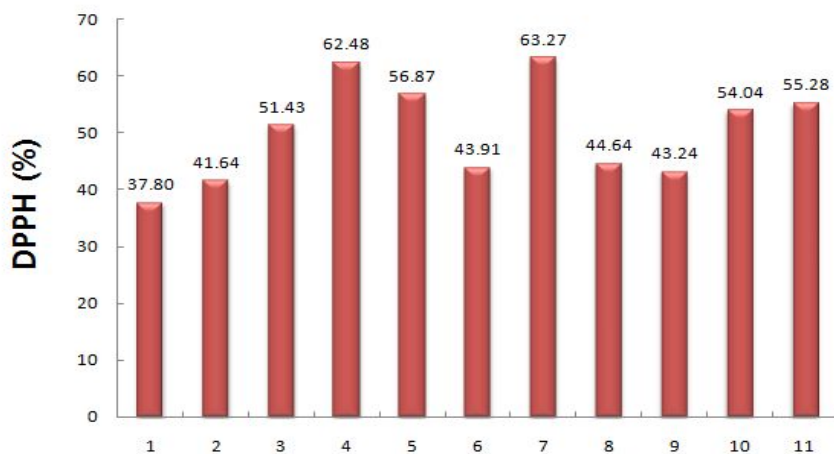


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of black garlic extract under different conditions.

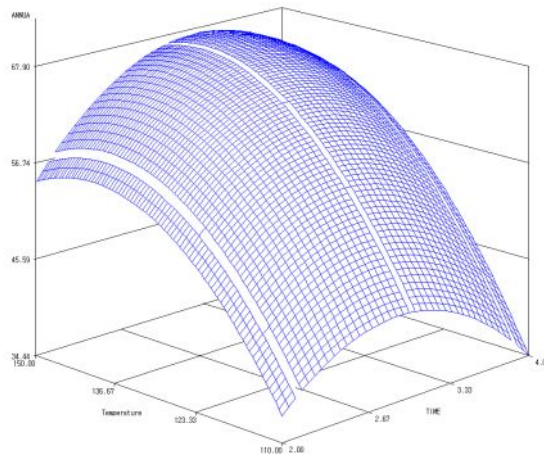


Fig. 5. Response surface plot for DPPH radical scavenging activity of black garlic extract.

#### (4) 흑마늘 고온 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성

흑마늘 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같이, DPPH 라디칼 소거 활성과 유사한 경향이였다. 130°C에서 4시간 추출한 4번 시료의 활성이 36.53%로 가장 높았으며, 다음으로 7번(130°C, 3시간) 시료가 31.30%였다. 그 외의 시료는 모두 30% 미만의 활성을 보였다. 6번 시료(110°C, 3시간)의 경우 가장 낮은 온도에서 추출된 것으로 항산화 활성은 추출 시간 보다는 추출온도에 더욱 의존적인 것으로 판단된다.

ABTS 라디칼 소거활성을 반응표면분석법을 이용하여 분석한 결과 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 143.12°C에서 3.48시간 추출하였을 때 정상점(stationary point) 중 최고값 33.19를 보였는데, 이는 본 연구에서 설정한 온도 범위를 벗어가는 하였으나, 본 실험결과를 통하여 흑마늘은 고온의 추출조건에서도 생리활성 물질의 안정도가 높은 것으로 예상되어 뜻밖의 결과를 얻었다.

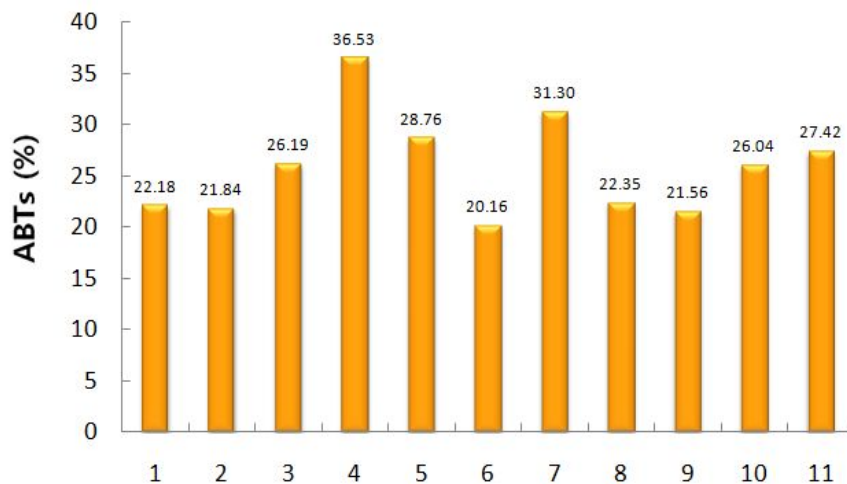


Fig. 6. ABTS radical scavenging activity of black garlic extract under different conditions.

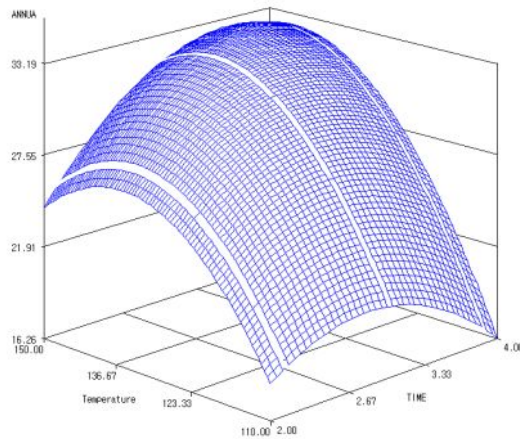


Fig. 7. Response surface plot for ABTS radical scavenging activity of black garlic extract.

(5) 흑마늘 고온 열수 추출물의 FRAP법에 의한 항산화 활성

흑마늘 추출물의 FRAP를 측정한 결과 Fig. 8과 같이 130°C에서 4시간 추출한 4번 시료의 활성이 36.86  $\mu\text{mol/g}$ 으로 가장 높았으며, 3번 시료(130°C, 2시간)는 28.53  $\mu\text{mol/g}$ , 7번 시료(130°C, 3시간)는 27.47  $\mu\text{mol/g}$ 이었다. FRAP 활성이 높았던 상위 4번, 3번 및 7번 시료는 모두 추출 최대온도인 130°C에서 2~4시간 동안 추출한 것으로 흑마늘의 FRAP법에 의한 항산화 활성도 추출시간보다는 추출온도의 관련성이 더 큰 것으로 판단된다.

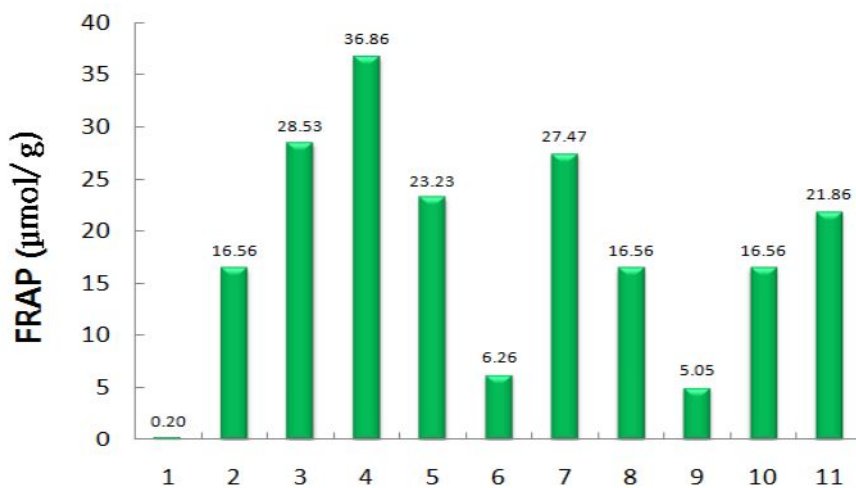


Fig. 8. FRAP assay of black garlic extract under different conditions.

FRAP법에 의한 항산화 활성을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 9와 같다. 129.90°C에서 3.42시간 추출하였을 때 정상점(stationary point) 중 최고값을 가졌다. 이는 130°C에서 4시간 추출한 시료에서 가장 높은 활성을 보인 FRAP의 결과와 일치하였으며, 최고점이 본 실험 계획의 실험 영역 범위 내에 존재함을 알 수 있었다.

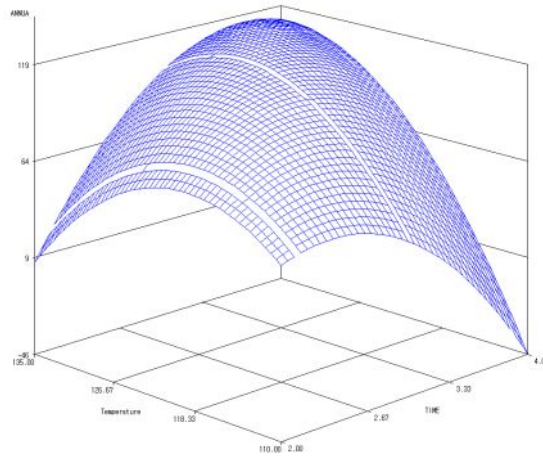


Fig. 9. Response surface plot for FRAP assay of black garlic extract.

(6) 흑마늘 고온 열수 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량

흑마늘 추출물의 총 페놀과 플라보노이드 화합물 함량을 측정한 결과는 Fig. 10과 같다. 4번 시료(130℃, 4시간) > 7번 시료(130℃, 3시간) > 11번 시료(125℃, 3.87시간)의 순으로 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 높았다. 흑마늘은 상기에 기술된 항산화 활성이 높은 시료에서 항산화 유효물질인 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량이 높은 것으로 나타나, 이들 물질이 흑마늘의 항산화 활성과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

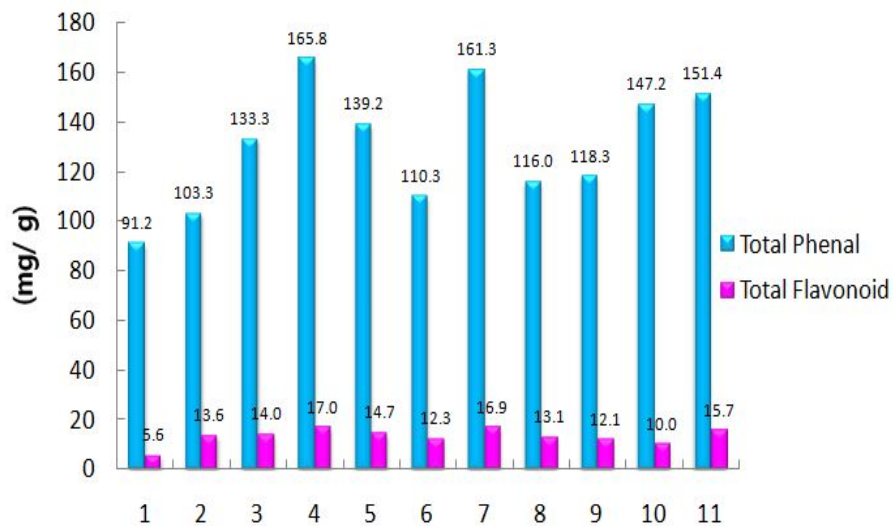


Fig. 10. Total phenol and flavonoid contents of black garlic extract under different conditions.

반응표면분석법을 통하여 총 페놀과 플라보노이드 화합물의 함량이 극대화되는 흑마늘 추출 조건을 분석하였다(Fig. 11). 흑마늘 추출물의 페놀 화합물의 경우 174.43℃에서 3.714시간 추출

했을 때 최고값 214.55 mg/g으로 그 함량이 가장 클 것으로 예상된다. 174.43°C는 이번 실험에서 실행한 최대 추출 온도인 130°C를 크게 벗어난 것으로 흑마늘의 경우 추출조건이 130°C 이상으로 높아지더라도 생리활성에 유효물질로 인지되는 페놀 화합물 함량이 높은 것으로 분석되었다. 이는 흑마늘이 이미 고온에서 가공되는 것으로 보아 고온의 추출조건에서도 이들 물질의 활성이 감소되지는 않는 것으로 생각된다. 반면에 플라보노이드 화합물의 경우 108.335°C에서 1.60시간 추출할 경우 12.74 mg/g의 최적 값을 보였는데 이는 보는 관점에 따라 최소점이 되기도 하고 최대점이 되기도 하는 안부 값으로 나타났다.

흑마늘 추출물은 전체적으로 130°C에서 4시간 추출한 경우에 항산화 활성이 가장 높았으며, 총 페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량 또한 가장 많았다. 이는 고온에서 장시간 동안 추출할 수록 흑마늘에 있는 페놀 및 플라보노이드 화합물의 용출이 많아지면서 항산화 활성이 높아진 것으로 판단된다. 또한, 추출물의 갈변도, 항산화활성, 그 유효 물질로서 페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량을 반응표면분석(RSM)을 통하여 분석한 결과 평균적으로 137.40°C에서 3.12시간 추출했을 때 흑마늘의 활성을 극대화 할 수 있을 것으로 예상된다.

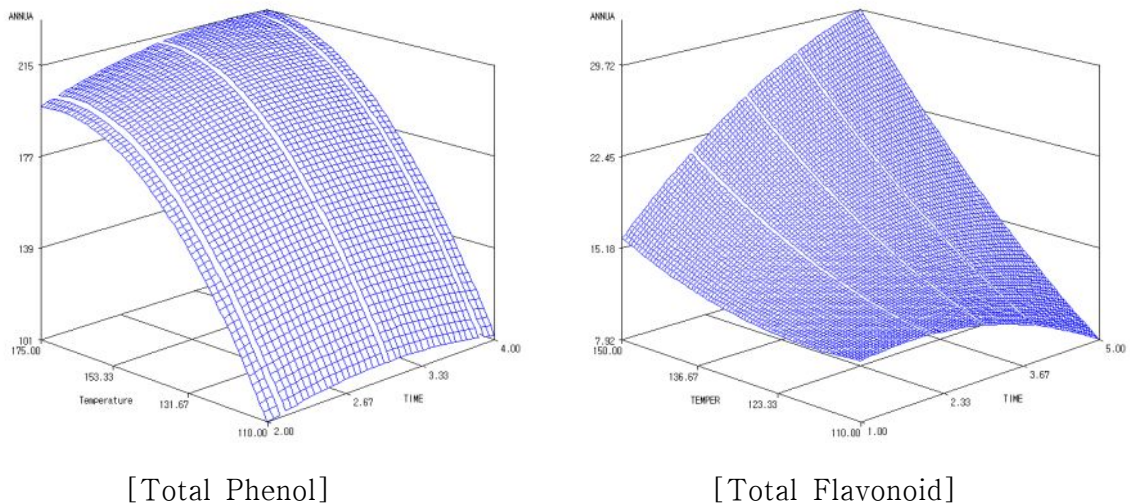


Fig. 11. Response surface plot for total phenol and flavonoid contents of black garlic extract.

### 3) 개뿔쑥 고온 열수 추출물의 최적 추출조건의 스크리닝

#### (1) 개뿔쑥 고온 열수 추출물의 pH

개뿔쑥 추출물의 pH를 측정한 결과 모든 추출물이 산성을 띠고 있었으며 그 중에서 5번(12°C, 3시간 추출)의 pH가 가장 낮았는데(Fig. 12) 이 역시 흑마늘 추출물과 마찬가지로 고온에서 추출한 영향으로 생각된다.



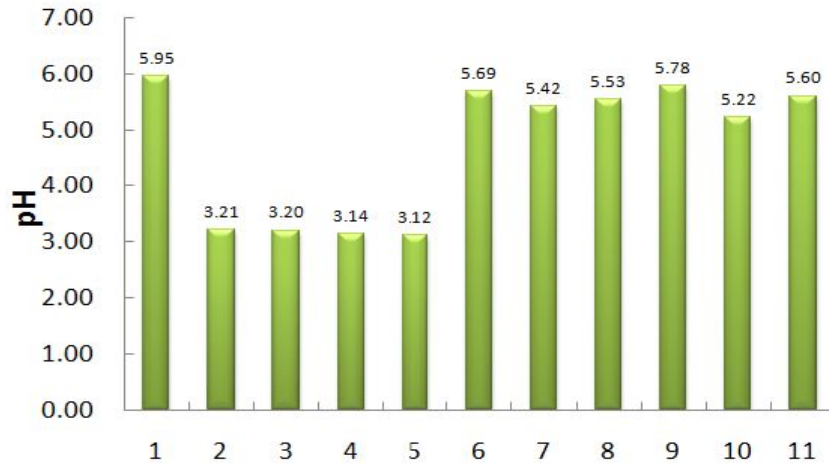


Fig. 12. pH of Gaeddongssuk extract under different conditions.

(2) 개똥쑥 고온 열수 추출물의 갈변물질 함량

Fig. 13은 280 nm에서 개똥쑥 추출물의 갈변도를 측정된 결과로 흡광도 값이 0.212로 다른 추출물의 50% 밖에 되지 않는 3번(130°C, 2시간)을 제외한 모든 추출조건의 흡광도 값은 0.400 이 넘는 높은 값을 가졌다.

280 nm에서 측정된 갈변도를 반응표면분석을 통하여 분석한 결과(Fig. 14) 130.98°C에서 3.35 시간 추출할 때 최소 흡광도값 0.434를 가져 온도와 시간이 각각 131.00°C, 3.35보다 커질수록 갈변도는 증가할 것으로 생각된다.

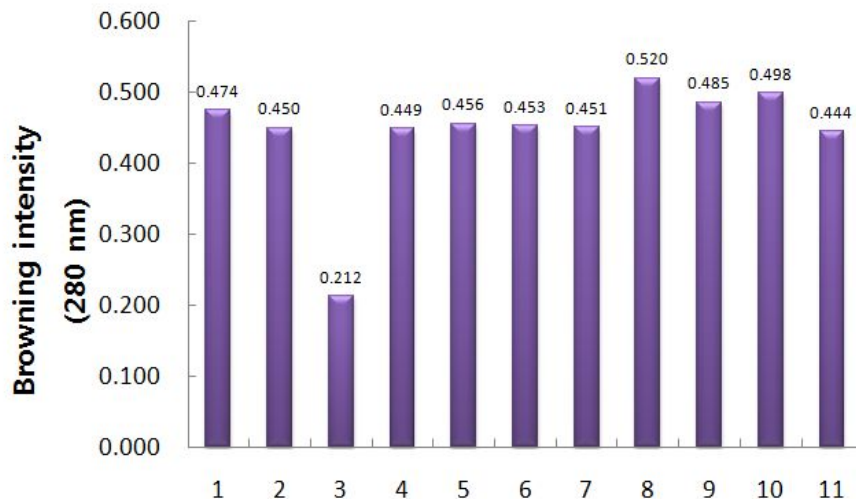


Fig. 13. Browning intensity in 280 nm of Gaeddongssuk extract under different conditions.

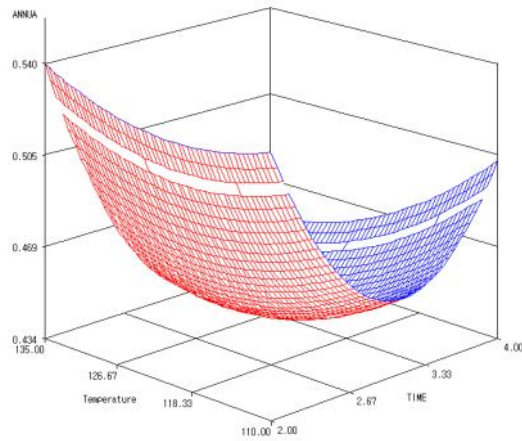


Fig. 14. Response surface plot for browning intensity in 280 nm of Gaeddongssuk extract.

(3) 개똥쑥 고온 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

개똥쑥 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 결과(Fig. 15) 120°C에서 3시간 추출한 5번의 활성이 72.06%를 보여 다른 조건들에 비해 활성이 월등히 좋았다.

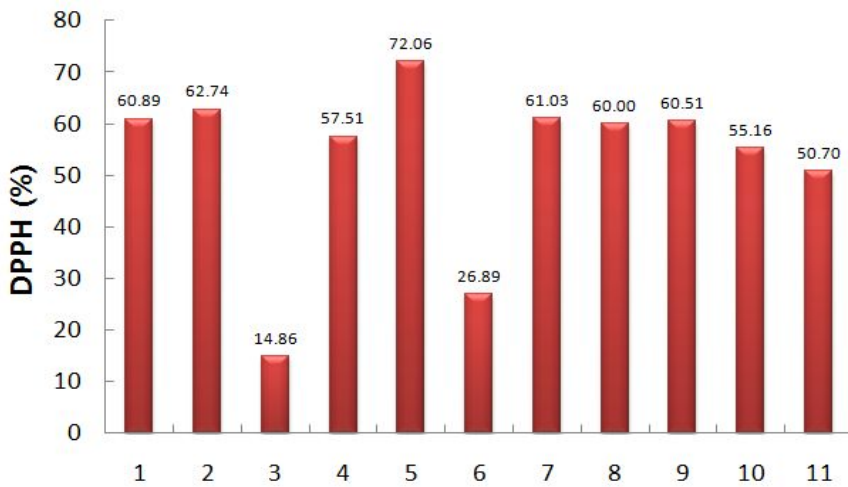


Fig. 15. DPPH radical scavenging activity of Gaeddongssuk extract under different conditions.

Fig. 16은 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 결과를 바탕으로 DPPH 라디칼 소거활성을 반응 표면분석을 통하여 분석한 결과이다. 121.01°C에서 2.91시간 추출했을 때 DPPH 라디칼 소거활성이 최고 값 65.32%에 이를 것으로 추정된다. 이는 Fig. 15의 결과와도 상통하는 것으로 실험을 시행한 추출조건 중 120°C에서 3시간 추출할 때 개똥쑥 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성이 최고조에 달할 것으로 생각되며 이 범위를 벗어날수록 활성이 떨어질 것으로 사료된다.

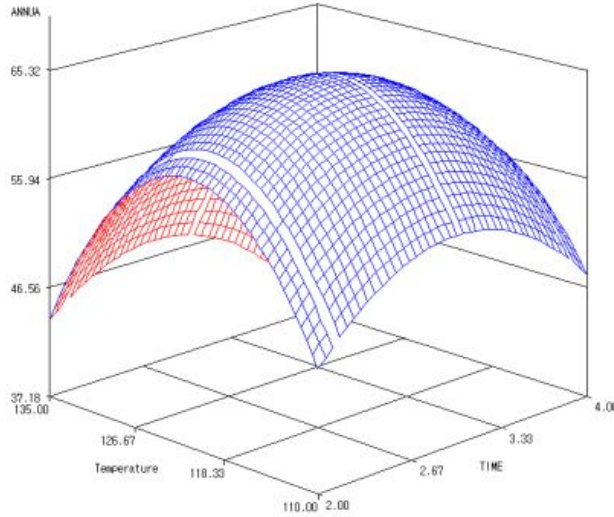


Fig. 16. Response surface plot for DPPH radical scavenging activity of Gaeddongssuk extract.

(4) 개똥쑥 고온 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성

Fig. 17은 개똥쑥 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 결과로 모든 조건에서 50%가 넘는 높은 활성을 보였으며, 대부분의 추출 조건에서 70%가 넘는 비슷한 값을 보여 DPPH의 활성과는 차이를 보였다.

ABTS 라디칼 소거활성을 반응표면분석을 통하여 분석한 결과(Fig. 18), 개똥쑥을 119.85°C에서 3.06시간 추출할 때 최소 값이 68.25%로 이 이상의 조건일 때 ABTS 라디칼 소거활성이 증가할 것으로 생각된다. 실험을 시행한 추출조건 중 120°C에서 3시간 추출하는 조건이 이와 가장 비슷한 조건으로 120°C 이상의 온도에서 3시간 이상 추출을 할 때 개똥쑥의 ABTS 라디칼 소거활성은 증가할 것으로 판단된다.

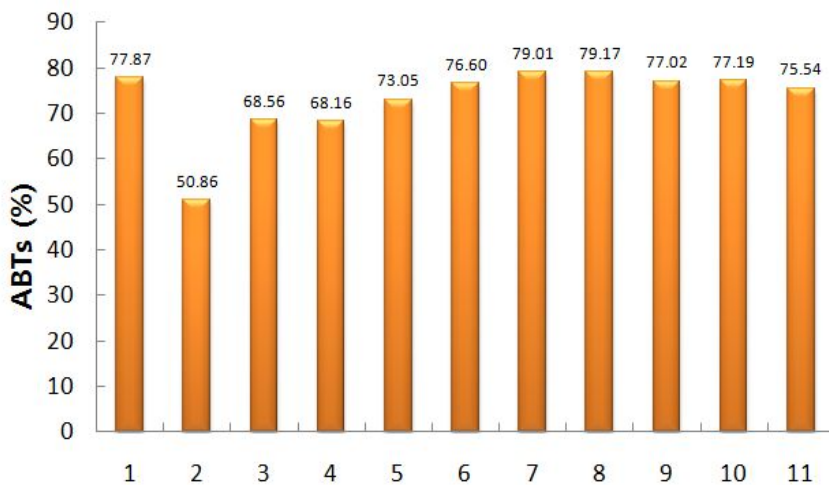


Fig. 17. ABTS radical scavenging activity of Gaeddongssuk extract under different conditions.

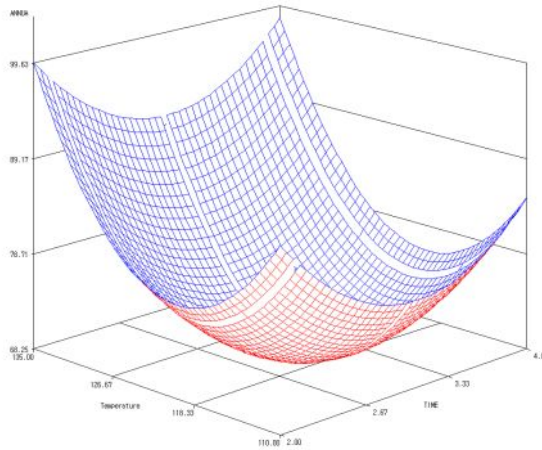


Fig. 18. Response surface plot for ABTS radical scavenging activity of Gaeddongssuk extract.

(5) 개똥쑥 고온 열수 추출물의 FRAP법에 의한 항산화 활성

Fig. 19는 개똥쑥 추출물을 FRAP법에 따라 항산화 활성을 측정된 결과로 120°C에서 3시간 추출한 5번이 활성이 높았고, 130°C에서 4시간 추출한 4번이 그 다음으로 높은 값을 보였다. 다른 추출 조건에서도 238.83~288.98  $\mu\text{mol/g}$ 으로 높은 값을 보였는데 반하여 130°C에서 2시간 추출한 3번은 20.80  $\mu\text{mol/g}$ 으로 다른 추출조건과 비교하여 매우 낮은 값을 보였다.

Fig. 20은 추출물의 FRAP법에 의한 항산화 활성을 반응표면분석을 통하여 분석한 결과이다. 그 결과, 120.38°C에서 2.98시간 추출할 때 활성이 가장 높을 것으로 추정된다. 이는 DPPH 및 ABTs 라디칼 소거활성과 비슷한 조건이며 실험을 시행한 추출조건 중에서는 120°C, 3시간 추출하는 조건과 가장 가까운 조건이다. DPPH 및 ABTs 라디칼 소거활성 및 FRAP 결과 모두 120°C에서 3시간 추출하는 조건과 가까운 범위에서 그 활성이 높아 이 조건에서 가장 항산화 활성이 활발할 것으로 생각되며 이 범위를 벗어날수록 활성은 감소할 것으로 예상된다.

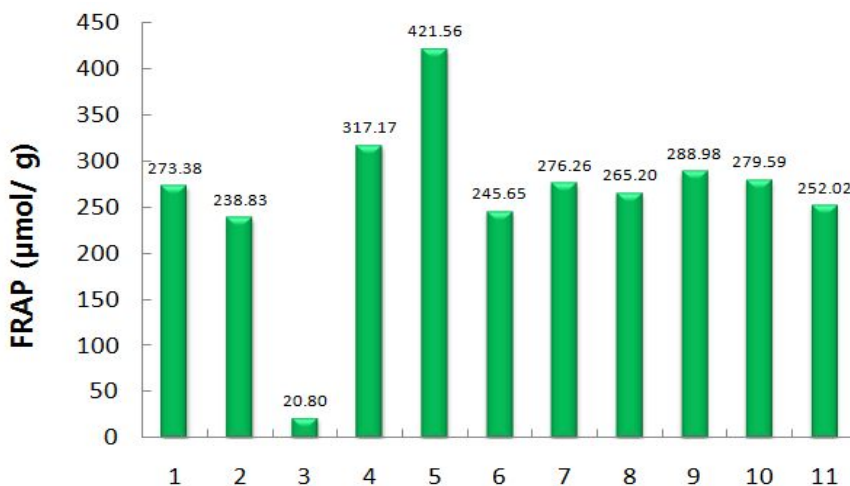


Fig. 19. FRAP assay of Gaeddongssuk extract under different conditions.

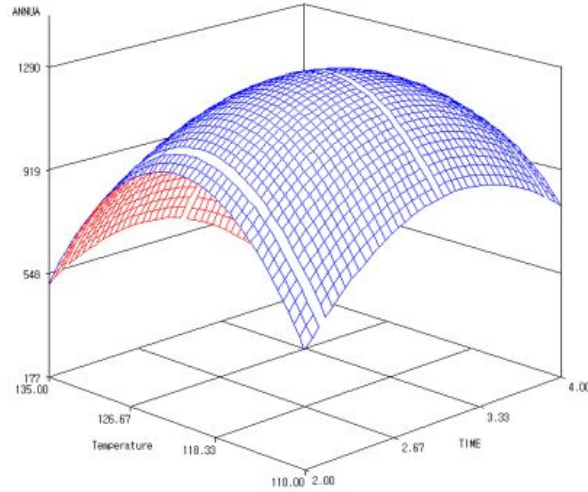


Fig. 20. Response surface plot for FRAP assay of Gaeddongssuk extract.

(6) 개똥쑥 고온 열수 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량

개똥쑥 추출물의 페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량(Fig. 21)은 130°C에서 2시간 추출하는 3번을 제외하고는 전체적으로 높은 함량을 보였다. 그 중에서도 120°C에서 3시간 추출하는 5번이 가장 페놀과 플라보노이드 화합물의 함량이 높았다.

개똥쑥 추출물의 페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량을 반응표면분석을 통하여 분석한 결과(Fig. 22) 페놀 화합물의 경우 119.91°C에서 2.35시간 추출할 때 120.31 mg/g의 함량으로 안부 점을 가질 것으로 예상되며, 120.91°C에서 1.79시간 추출할 때 플라보노이드 화합물의 함량이 가장 높을 것으로 추정된다. 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량의 경우 앞선 항산화 결과와 비교하여볼 때, 추출시간이 다소 짧은 점에서 최적 값을 보였다.

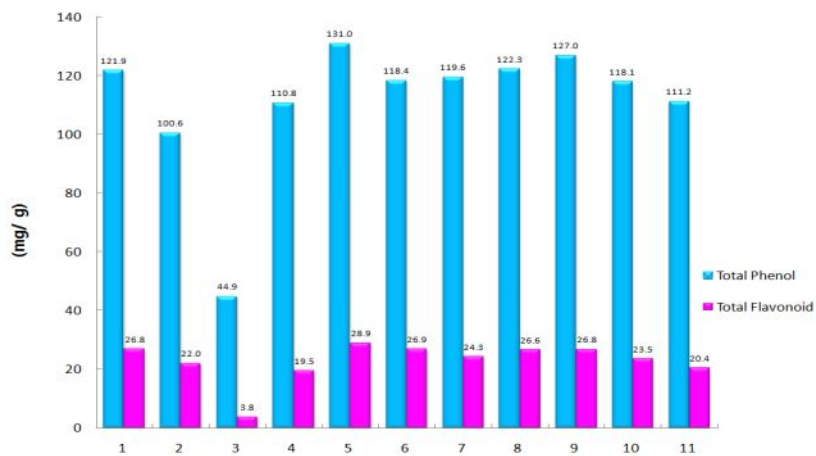
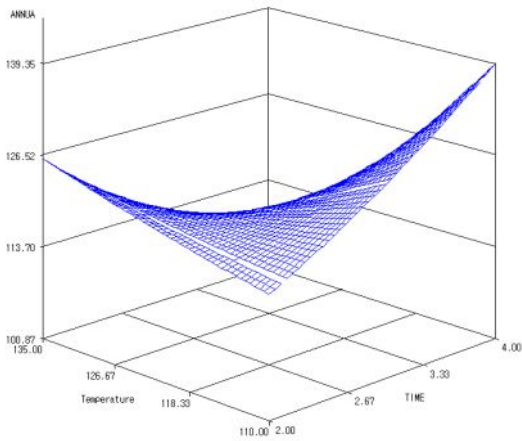
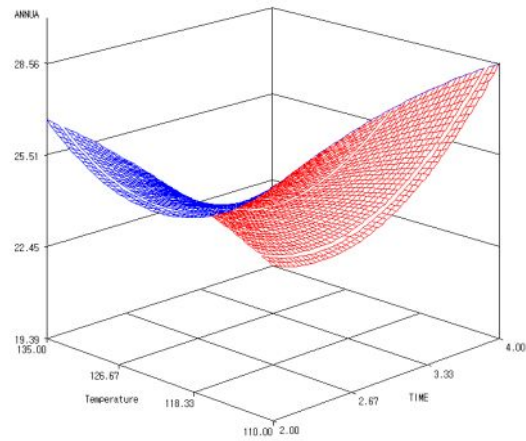


Fig. 21. Total phenol and flavonoid contents of Gaeddongssuk extract under different conditions.



[Total Phenol]



[Total Flavonoid]

Fig. 22. Response surface plot for total phenol and flavonoid contents of Gaeddongssuk extract.

개똥쑥 추출물은 전체적으로 120°C에서 3시간 추출한 것이 항산화활성이 가장 높았으며 페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량 또한 가장 많았다. 이 범위에서 벗어날수록 항산화활성이 상대적으로 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 추출물의 항산화활성과 페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량을 반응표면분석(RSM)을 통하여 분석한 결과 평균적으로 122.17°C에서 2.74 시간 추출했을 때 개똥쑥의 활성이 극대화 될 것으로 판단된다.

#### 4) 혼합 비율을 달리한 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 항산화 활성

##### (1) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

혼합 비율을 달리한 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 11과 같다.

개똥쑥의 비율이 높아질수록 총 페놀과 플라보노이드 함량이 다소 증가하는 경향을 나타내었지만 플라보노이드 함량은 흑마늘 추출물에 혼합한 개똥쑥 추출물의 비율 0~1% 범위에서는 유의적인 차이는 없었다. 개똥쑥을 10% 비율로 혼합하였을 때 총 페놀 함량은  $41.54 \pm 1.02$  mg/g, 플라보노이드 함량은  $5.35 \pm 1.68$  mg/g 타 시료에 비하여 월등히 높았다. 이 결과로 보아 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 총 페놀과 플라보노이드의 함량 증가는 개똥쑥의 비율에 기인한 결과라고 판단된다.

Kwon JW et al(2008)은 흑마늘의 총 페놀과 플라보노이드 함량은 고온고압 처리조건에 따라 다소 상이하기는 하지만 생마늘에 비해 각각 7배와 16배 정도 증가하는데 이는 고온고압 처리에 의해 여러 화합물이 폴리페놀 화합물로 전환되었거나, 추출이 더 용이해졌기 때문이라고 보고하였다.

Table 11. Total phenol and flavonoids contents of the composites by water extract of black garlic and Gaeddongssuk

(mg/g)		
Black garlic : Gaeddongssuk (v/v)	Total phenol	Flavonoids
100 : 0	23.22±0.49 <sup>A</sup>	0.28±0.06 <sup>A</sup>
99.9 : 0.1	25.0±0.50 <sup>BC</sup>	0.66±0.49 <sup>A</sup>
99.5 : 0.5	24.17±0.64 <sup>AB</sup>	0.90±0.58 <sup>A</sup>
99.3 : 0.7	26.14±0.42 <sup>C</sup>	1.42±0.57 <sup>A</sup>
99.0 : 1.0	26.18±0.83 <sup>C</sup>	0.94±0.37 <sup>A</sup>
90.0 : 10.0	41.54±1.02 <sup>D</sup>	5.35±1.68 <sup>B</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

## (2) DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH는 짙은 자색을 띄는 비교적 안정한 자유 라디칼로서 cystein, glutathion과 같은 함황아미노산과 L-ascorbic acid 및 BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 자유 라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 자유 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다 (Kim HK et al, 1995).

흑마늘 및 개똥쑥의 혼합물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Table 12와 같다. 모든 시료에서 DPPH 용액에 첨가된 시료농도가 증가함에 따라 유의적으로 소거활성이 증가한 반면에 혼합물 중 개똥쑥의 비율이 0~1% 범위에서는 큰 유의차가 없었으며, 개똥쑥을 10% 첨가하였을 때 15.49±1.36~60.27±0.69%의 범위로 전자공여능이 월등히 높아지는 것을 알 수 있었다. 식물체 추출물의 DPPH 라디칼 소거에 의한 전자 공여능이 페놀류나 플라보노이드 물질에 기인하여 항산화 활성을 나타내는 것으로 볼 때(Kang YH et al, 1996), 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물 중 개똥쑥의 비율이 증가할수록 전자공여능이 증가하는 것도 개똥쑥의 높은 함량의 총 페놀 및 플라보노이드에 기인한 것으로 판단된다.

Shin JH et al(2008a)은 흑마늘 물추출물 및 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 열수 추출물 10 mg/mL 농도에서 69.40%의 활성을 나타내었으나 에탄올 추출물은 15 mg/mL 농도에서도 50.55%의 활성을 나타내었다.

Table 12. Electron donating activity of the composites by water extract of black garlic and Gaeddongssuk

Black garlic : Gaeddongssuk (v/v)	Concentration (µg/mL)			
	125	250	500	1000
100 : 0	9.55±0.90 <sup>aA</sup>	14.35±0.60 <sup>bAB</sup>	21.16±1.08 <sup>cA</sup>	33.90±1.03 <sup>dA</sup>
99.9 : 0.1	12.42±5.31 <sup>aAB</sup>	17.04±0.78 <sup>aBC</sup>	25.03±0.32 <sup>bBC</sup>	41.06±2.29 <sup>cB</sup>
99.5 : 0.5	8.48±1.94 <sup>aA</sup>	15.50±0.95 <sup>bABC</sup>	21.72±1.14 <sup>cA</sup>	33.61±2.89 <sup>dA</sup>
99.3 : 0.7	12.89±1.88 <sup>aAB</sup>	15.32±0.77 <sup>aABC</sup>	22.05±2.27 <sup>bAB</sup>	34.68±0.95 <sup>cA</sup>
99.0 : 1.0	9.78±0.67 <sup>aA</sup>	14.86±1.83 <sup>aA</sup>	27.14±2.76 <sup>bC</sup>	36.07±0.33 <sup>cA</sup>
90.0 : 10.0	15.49±1.36 <sup>aB</sup>	20.30±1.53 <sup>bC</sup>	37.71±1.74 <sup>cD</sup>	60.27±0.69 <sup>dC</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-C</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

### (3) ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼 소거활성과 상관성이 높으며 그 유효 물질은 페놀 화합물인 것으로 보고되어 있다(Choi YM et al, 2003). 또한 서로 다른 라디칼을 이용한 항산화 활성 측정에서 소거활성의 차이는 시료의 산화환원 및 라디칼의 화학 구조적 차이에 기인된다고 알려져 있다(Gardner PT et al, 1998).

흑마늘 및 개똥쑥의 혼합비율을 달리한 후 125, 250, 500 및 1000 µg/mL 농도로 조정하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과를 Table 13에 나타내었다. DPPH 라디칼을 이용한 전자공여능과 유사한 경향으로 시료농도가 증가할수록 라디칼 소거능이 높아졌고, 개똥쑥의 혼합비율을 10%로 첨가한 혼합물의 라디칼 소거능이 높았다. 1000 µg/mL 농도에서 개똥쑥의 비율 0~1% 범위의 시료는 30% 이상의 라디칼 소거활성을 보였으며, 10% 혼합시료는 라디칼 소거활성이 약 59%로 가장 높았다.

### (4) FRAP value

혼합비율을 달리한 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 FRAP value를 측정하여 FeSO<sub>4</sub>로 환산하여 Table 14에 나타내었다. 개똥쑥이 포함되지 않은 흑마늘 추출물이 모든 농도에서 9.14±0.74~84.93±1.30 FeSO<sub>4</sub> eq µM로 가장 낮은 활성을 나타내었고, 개똥쑥의 비율이 증가함에 따라 유의적이지는 않지만 FRAP value가 증가하는 경향을 나타내었다. 시료 농도 500 µg/mL에서는 개똥쑥 10% 혼합물만이 FRAP value가 100 FeSO<sub>4</sub> eq µM 이상이었고, 1000 µg/mL 농도에서는 모든 시료가 100 FeSO<sub>4</sub> eq µM 이상을 나타내었다.



Table 13. ABTS radical scavenging activity of the composites by water extract of black garlic and Gaeddongssuk

Black garlic : Gaeddongssuk (v/v)	Concentration (µg/mL)			
	125	250	500	1000
100 : 0	8.48±0.25 <sup>aA</sup>	13.31±0.20 <sup>bA</sup>	22.09±0.17 <sup>cA</sup>	36.44±0.51 <sup>dAB</sup>
99.9 : 0.1	8.25±0.21 <sup>aA</sup>	14.18±0.20 <sup>bAB</sup>	24.19±0.30 <sup>cBC</sup>	35.03±0.71 <sup>dA</sup>
99.5 : 0.5	10.65±1.63 <sup>aB</sup>	15.93±0.92 <sup>bC</sup>	23.63±0.73 <sup>cB</sup>	35.45±0.74 <sup>dAB</sup>
99.3 : 0.7	8.76±0.18 <sup>aA</sup>	14.49±0.23 <sup>bB</sup>	23.94±1.11 <sup>cB</sup>	37.03±0.48 <sup>dBC</sup>
99.0 : 1.0	8.39±0.10 <sup>aA</sup>	14.71±0.45 <sup>bB</sup>	25.17±0.43 <sup>cC</sup>	38.24±0.78 <sup>dC</sup>
90.0 : 10.0	13.38±0.39 <sup>aC</sup>	22.52±0.61 <sup>bD</sup>	39.41±0.17 <sup>cD</sup>	59.10±1.51 <sup>dD</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

Table 14. FRAP (ferric-reducing antioxidant potential) value of the composites by water extract of black garlic and Gaeddongssuk

(FeSO<sub>4</sub> eq µM)

Black garlic : Gaeddongssuk (v/v)	Concentration (µg/mL)			
	125	250	500	1000
100 : 0	9.14±0.74 <sup>aA</sup>	21.41±2.13 <sup>bA</sup>	41.87±3.26 <sup>cA</sup>	84.93±1.30 <sup>dA</sup>
99.9 : 0.1	25.50±1.17 <sup>aD</sup>	34.82±8.40 <sup>bBC</sup>	54.82±1.41 <sup>cB</sup>	104.71±3.31 <sup>dC</sup>
99.5 : 0.5	19.48±5.89 <sup>aC</sup>	37.32±7.45 <sup>bC</sup>	61.18±1.55 <sup>cC</sup>	102.43±1.76 <sup>dBC</sup>
99.3 : 0.7	13.91±0.59 <sup>aAB</sup>	26.64±1.72 <sup>bA</sup>	56.64±1.60 <sup>cB</sup>	109.82±1.20 <sup>dD</sup>
99.0 : 1.0	15.61±3.74 <sup>aBC</sup>	28.57±0.68 <sup>bAB</sup>	55.96±1.34 <sup>cB</sup>	100.39±1.63 <sup>dB</sup>
90.0 : 10.0	32.77±4.50 <sup>aE</sup>	77.20±4.46 <sup>bD</sup>	111.30±5.83 <sup>cD</sup>	194.03±3.04 <sup>dE</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-E</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

일반적으로 페놀성 물질은 수소공여체나 금속이온의 킬레이터로 작용함으로써 항산화능을 나타내며, 페놀 화합물의 함량이 높을수록 항산화능이 증가하는 것으로 보고되어 있다. 식물로부터 추출된 페놀 화합물은 항산화능을 포함한 다양한 생물학적 효능을 나타낸다고 하였으며,

이들의 효능이 주로 산화 환원력에 기인된다는 것으로 볼 때, 흑마늘과 개똥쑥 혼합물의 항산화능도 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 관련성이 높은 것으로 판단된다. 따라서 본 실험 결과 흑마늘과 개똥쑥의 혼합 비율을 달리한 혼합물간에 총 페놀 및 플라보노이드의 함량에 유의적인 차이를 보이는 것으로 보아 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 항산화능은 이들 물질의 상호작용에 기인된 결과인 것으로 판단된다.

(5) 환원력

흑마늘 및 개똥쑥의 혼합비율을 달리하여 농도를 125~1000 µg/mL로 달리하였을 때 Fe 이온을 환원시키는 환원력을 흡광도 값으로 나타낸 결과는 Table 15와 같다.

Table 15. Reducing power of the composites by water extract of black garlic and Gaeddongssuk

Black garlic : Gaeddongssuk (v/v)	Concentration (µg/mL)			
	125	250	500	1000
100 : 0	0.20±0.01 <sup>aA</sup>	0.23±0.00 <sup>bA</sup>	0.27±0.01 <sup>cNS</sup>	0.36±0.01 <sup>dAB</sup>
99.9 : 0.1	0.21±0.00 <sup>NSAB</sup>	0.23±0.01 <sup>A</sup>	0.38±0.18	0.35±0.01 <sup>A</sup>
99.5 : 0.5	0.22±0.01 <sup>aB</sup>	0.2±40.01 <sup>bA</sup>	0.28±0.00 <sup>c</sup>	0.36±0.00 <sup>dAB</sup>
99.3 : 0.7	0.22±0.00 <sup>aC</sup>	0.23±0.01 <sup>aA</sup>	0.28±0.01 <sup>b</sup>	0.38±0.01 <sup>cC</sup>
99.0 : 1.0	0.21±0.00 <sup>aAB</sup>	0.23±0.01 <sup>bA</sup>	0.29±0.01 <sup>c</sup>	0.37±0.00 <sup>dB</sup>
90.0 : 10.0	0.23±0.01 <sup>aD</sup>	0.27±0.01 <sup>bB</sup>	0.35±0.01 <sup>c</sup>	0.48±0.01 <sup>dD</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>NS</sup>Not significantly

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

흑마늘과 개똥쑥의 혼합비율이 99.9 : 0.1인 시료를 제외한 나머지 비율에서는 시료의 농도가 증가함에 따라 환원력도 유의적으로 증가하였다. 특히 1000 µg/mL 농도에서 90 : 10 비율의 혼합물은 0.50에 가까운 환원력을 나타내었다. 흑마늘의 환원력은 흑마늘 제조 과정 중에 마이알 반응에 의해 생성된 갈색물질의 세포 기질내의 hydroxy기와 수소 원자를 공격함으로써 라디칼 반응을 조절할 수 있는 환원성 물질에 의해 환원력을 나타내는 것으로 알려져 있으므로 (Lertittikul W et al, 2007) 흑마늘의 항산화능은 흑마늘 중의 갈변 물질 함량과도 관련성이 있을 것으로 사료된다.

(6) Nitric oxide 라디칼 소거능

Nitric oxide (NO·)는 생체 내에서 NO synthase의 촉매작용에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유 라디칼로 세포독성이 강하며 다량 생성될 경우 염증반응, 면역 체계 이상 등의 산화반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Ding AH et al, 1988).

흑마늘 및 개똥쑥의 혼합물의 NO 라디칼 소거능을 측정한 결과(Table 16) 개똥쑥이 혼합되지 않은 흑마늘 추출물은 농도 증가에 따라 유의차가 없었지만, 1000 µg/mL 농도에서 다소 증가하였다. 또한 타 실험과 달리 개똥쑥을 첨가한 혼합물보다 첨가하지 않은 흑마늘 추출물의 NO 라디칼 소거능이 34.89±5.79~42.58±8.73% 범위로 모든 농도에서 가장 높은 활성이었다. 반면에 흑마늘과 개똥쑥의 비율이 99 : 1인 혼합물은 1.58±0.63~32.38±1.84% 범위로 가장 활성이 낮았다.

Table 16. Nitric oxide radical scavenging of the composites by water extract of black garlic and Gaeddongssuk

Black garlic : Gaeddongssuk (v/v)	Concentration (µg/mL)			
	125	250	500	1000
100 : 0	34.89±5.79 <sup>NSC</sup>	35.86±0.31 <sup>D</sup>	34.96±4.13 <sup>D</sup>	42.58±8.73 <sup>B</sup>
99.9 : 0.1	28.07±3.36 <sup>abB</sup>	24.05±3.19 <sup>aC</sup>	29.15±1.74 <sup>bBCD</sup>	38.67±0.86 <sup>cAB</sup>
99.5 : 0.5	24.27±2.00 <sup>aB</sup>	27.23±2.94 <sup>aC</sup>	24.05±3.25 <sup>aB</sup>	33.42±1.83 <sup>bA</sup>
99.3 : 0.7	27.05±3.54 <sup>aB</sup>	24.95±6.21 <sup>aC</sup>	31.01±6.21 <sup>aCD</sup>	45.67±5.26 <sup>bB</sup>
99.0 : 1.0	1.58±0.63 <sup>aA</sup>	2.96±2.06 <sup>aA</sup>	14.40±1.17 <sup>bA</sup>	32.38±1.84 <sup>cA</sup>
90.0 : 10.0	4.18±0.92 <sup>aA</sup>	9.90±1.50 <sup>bB</sup>	25.88±1.03 <sup>cBC</sup>	40.70±1.56 <sup>dAB</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>NS</sup>Not significantly

<sup>a-c</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-C</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

Lee SJ et al(2010)은 생마늘, 홍마늘 및 흑마늘의 NO 라디칼 소거능을 측정한 결과 흑마늘의 소거능이 가장 높았으며, 이들의 소거능은 2000 µg/mL 농도에서도 50% 미만이라고 보고하였다. 식물류의 NO 라디칼 소거능은 페놀 화합물이나 플라보노이드류의 함량에 의존적인 것으로 보고되고 있는데, 흑마늘과 개똥쑥 혼합물에서도 같은 경향을 보였다. 또한 마늘 추출물의 산소라디칼 저해능은 시료의 갈색도와 양의 상관관계가 있는 것으로 보고되어(Moreno FJ et al, 2006) 본 실험에서 흑마늘과 개똥쑥 혼합물의 NO 라디칼 소거능은 페놀 화합물 및 갈색 물질의 함량에 기인된 것으로 추정된다.

(7) α-Glucosidase 저해능

흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 α-glucosidase 저해능을 측정한 결과(Table 17) 타 실험 결과와 달리 시료의 농도가 증가함에 따라 개똥쑥 혼합비율 0, 0.1 및 10%만이 저해능이 유의적으로 증가하였으며 개똥쑥의 첨가비율 증가와 저해능과는 상관관계가 없었다. 흑마늘과 개똥쑥을 90 : 10으로 혼합한 추출물이 125 µg/mL 농도에서 1.09±1.10%로 가장 낮은 저해활성을 나타내었고, 99.3 : 0.7으로 혼합한 추출물이 250 µg/mL 농도에서 19.16±0.42%로 가장 저해활성이 높았다.

α-Glucosidase는 당질 분해속도를 조절하는 효소로 작용함으로써 소장에서 탄수화물의 흡수 저해 및 혈당 상승을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 마늘 중의 성분은 가공조건에 따라 달라지며, 마늘 중 diallyl trisulfide와 같은 유기 황화합물이 혈당 강하에 효과적인 것으로 보고된 바 있다(Lee SJ et al, 2010). 또한 생마늘, 홍마늘 및 흑마늘의 α-glucosidase 저해활성을 측정한 결과 2000 µg/mL 농도에서 19.68~30.37%의 저해활성을 나타내었으며, 흑마늘의 저해활성이 가장 높았다고 보고하였다.

Table 17. α-Glucosidase inhibition activity of the composites by water extract of black garlic and Gaeddongssuk

Black garlic : Gaeddongssuk (v/v)	Concentration (µg/mL)			
	125	250	500	1000
100 : 0	8.01±0.95 <sup>aB</sup>	8.50±1.68 <sup>aA</sup>	15.68±4.23 <sup>bB</sup>	7.93±1.97 <sup>aA</sup>
99.9 : 0.1	7.08±1.50 <sup>aB</sup>	13.02±3.76 <sup>bB</sup>	13.86±2.31 <sup>bB</sup>	18.77±2.21 <sup>cB</sup>
99.5 : 0.5	13.30±0.85 <sup>aC</sup>	18.70±2.27 <sup>bC</sup>	17.65±3.56 <sup>abB</sup>	16.22±2.37 <sup>abB</sup>
99.3 : 0.7	18.61±0.71 <sup>bD</sup>	19.16±0.42 <sup>bC</sup>	14.77±1.19 <sup>aB</sup>	13.90±1.40 <sup>aB</sup>
99.0 : 1.0	6.31±2.19 <sup>aB</sup>	8.13±2.46 <sup>aA</sup>	7.72±2.70 <sup>aA</sup>	15.47±1.74 <sup>bB</sup>
90.0 : 10.0	1.09±1.10 <sup>aA</sup>	8.71±2.13 <sup>bA</sup>	15.31±2.07 <sup>cB</sup>	16.81±4.59 <sup>cB</sup>

Each value represents mean±SD (n=3)

<sup>a-c</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

<sup>A-D</sup>Means with different superscript in the same column are significantly different at  $p<0.05$ .

(8) 면역활성 측정

흑마늘 및 품종별 쑥 추출물의 면역활성 비교를 위하여 농도별 추출물이 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향을 검색하기 위한 지표로 CCK-8 발색법을 이용하여 측정하였다. 본 실험에서 시료로 사용된 흑마늘 물 추출물의 비장세포 증식능을 알아본 결과는 Fig. 23과 같다. 흑마늘 추출물의 농도가 증가할수록 면역세포 증식능도 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었는데 10 µg/mL의 농도에서는 증식능이 미미하였으나 실험된 최고 농도인 400 µg/mL에서는 158%로 증식율이 증가하였다.

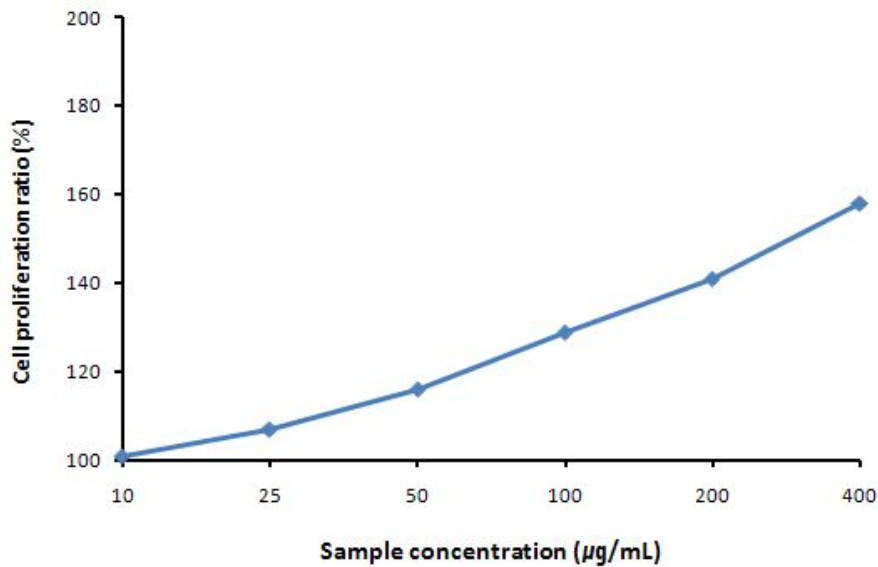


Fig. 23. Effect of water extract from black garlic on viability of mouse splenocytes.

마우스 비장세포에 4종류 쑥의 물 추출물을 투여한 결과 면역세포 증식능(Fig. 24)은 10~50 µg/mL의 낮은 농도에서는 100~130% 범위로 쑥의 종류에 관계없이 면역세포 증식률이 유사하였으나, 100 µg/mL의 농도에서부터 개똥쑥의 면역세포 증식률이 다른 쑥 추출물에 비해 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, 모든 쑥 추출물은 흑마늘 추출물에 비해 면역세포 증식능이 더 우수하여 100 µg/mL 이상의 농도부터는 활성이 월등히 더 높음을 확인할 수 있었다.

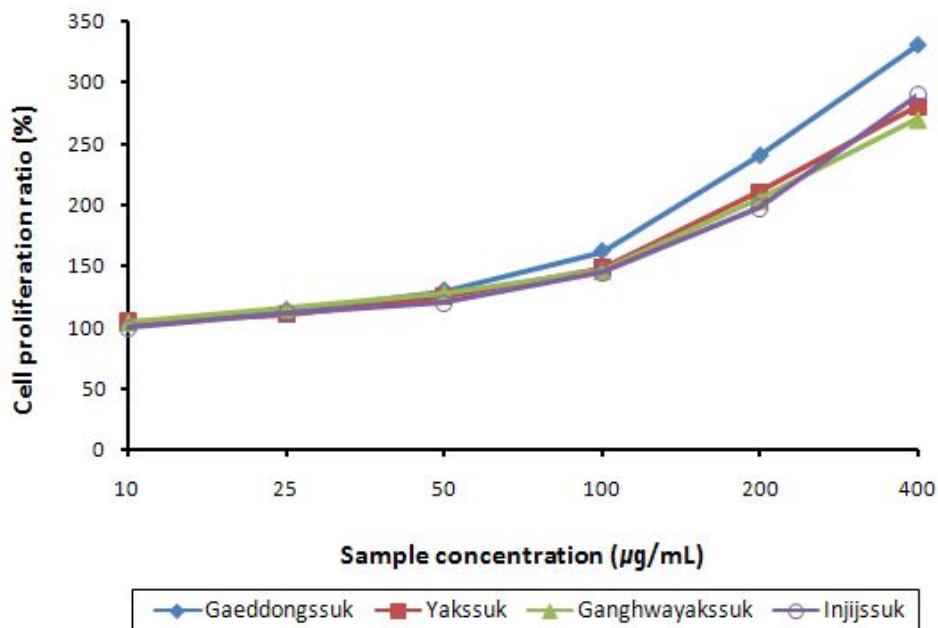


Fig. 24. Effect of water extract from 4 kinds ssuk on viability of mouse splenocytes.

흑마늘과 개똥썩 물 추출물을 99.9 : 0.1, 99.5 : 0.5, 99.3 : 0.7 및 99.0 : 1.0의 비로 혼합하여 비장세포에 투여한 후 면역세포 증식능을 측정한 결과는 Fig. 25에 나타내었다. 시료를 투여하지 않은 군에 비해서 흑마늘과 개똥썩 추출물 혼합물을 투여한 군에서 면역세포 증식능이 증가하였는데, 개똥썩 추출물의 혼합 비율이 증가할수록 면역세포 증식이 더 증가하였다. 이는 흑마늘에 비해 썩 추출물의 면역세포 증식능이 상대적으로 더 우수하기 때문으로 판단되며, 관능평가 결과 개똥썩 추출물을 99.0 : 1.0 정도로 첨가할 경우 썩에 기인하는 쓴맛이 강하여 기호도가 낮았다.

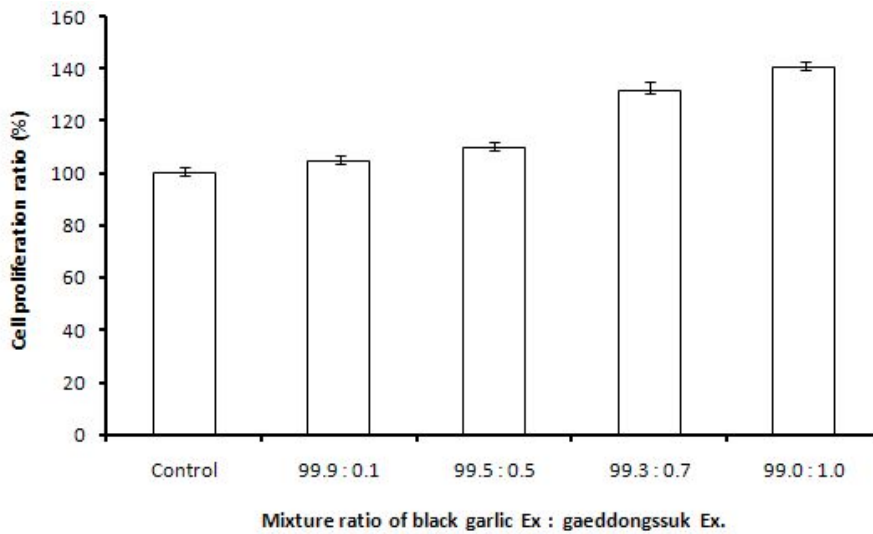


Fig. 25. Effect of water extract mixture from black garlic and Gaeddongssuk on viability of mouse splenocytes.

IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ 와 같은 여러 가지 cytokine은 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 물질로 제시되어 왔으며, 그 중에서도 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 는 초기 염증 반응에서 세포 간 신호전달을 수행함으로써 면역 반응에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 분비량을 측정하였고, 양성 대조군으로는 LPS(15 mg/mL)로 비장세포를 자극하여 분비된 cytokin를 측정하여 비장세포의 활성화에 대한 지표로 삼았다.

상기의 항산화 실험결과, 비장세포에 대한 증식능 실험결과 및 관능평가를 종합하여 흑마늘과 개똥썩 추출물이 상호 시너지 효과를 나타내는 최적의 비율로 99.3 : 0.7을 설정하였으며 이 혼합비로 제조된 추출 혼합물을 125, 250, 500, 1000  $\mu$ g/mL로 농도를 조절하여 IL-1 $\beta$  생성량에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 26에 나타내었다. 흑마늘 및 개똥썩 추출 혼합물을 처리하였을 때 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ 의 생성량이 증가되었음을 확인하였으며, 흑마늘 및 개똥썩 추출 혼합물의 처리농도가 증가할수록 IL-1 $\beta$ 의 생성량 또한 증가함을 확인할 수 있었다.

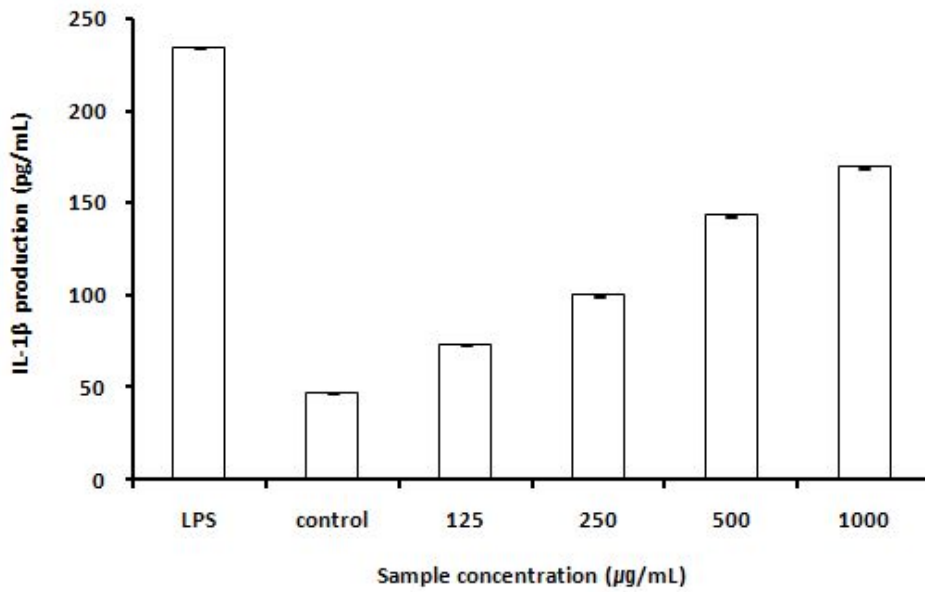


Fig. 26. IL-1 $\beta$  production by activated mouse splenocytes cultured with water extract mixture from black garlic and Gaeddongssuk (99.3 : 0.7).

IL-6 생성량을 ELISA kit를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 27에 나타내었다. 대조군은 80.28 pg/mL의 IL-6를 생성하였으며, mytogen인 LPS를 투여한 경우에는 570.48 pg/mL의 IL-6 생성하여 대조군에 비해 생성량의 상승을 확인할 수 있었다. 흑마늘 및 개똥쑥 추출 혼합물의 농도를 증가시킬수록 IL-6의 생성량 또한 증가함을 확인할 수 있었다.

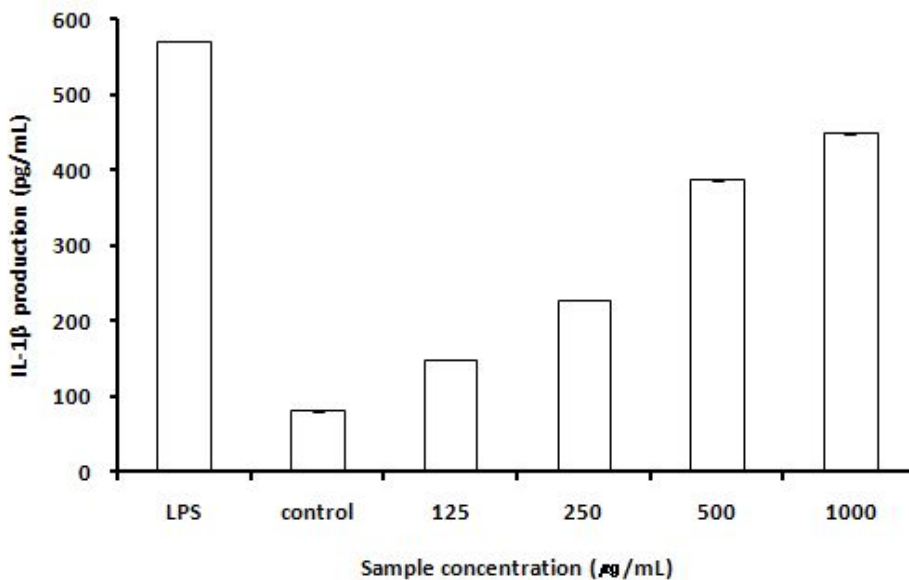


Fig. 27. IL-6 production by activated mouse splenocytes cultured with water extract mixture from black garlic and Gaeddongssuk (99.3 : 0.7).

TNF- $\alpha$ 는 T 림프구의 활성화와 성장을 조절하고 암세포의 세포 용해를 유도함으로써 직접적인 항암 작용을 일으키기도 하며, 염증 및 면역 반응에 관여한다고 알려져 있다. TNF- $\alpha$  생성량을 ELISA kit를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 28에 나타내었다. mytogen인 LPS를 투여하였을 때 TNF- $\alpha$ 의 생성량은 81.45 pg/mL 였는데 흑마늘 및 개똥쑥 추출 혼합물의 농도를 증가 시킬수록 대조군에 비해 TNF- $\alpha$  생성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 같은 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성량 증가는 외부항원의 자극 시 흑마늘 및 개똥쑥 추출 혼합물이 면역 반응을 증진시킬 가능성이 있음을 보여주는 결과로 사료된다.

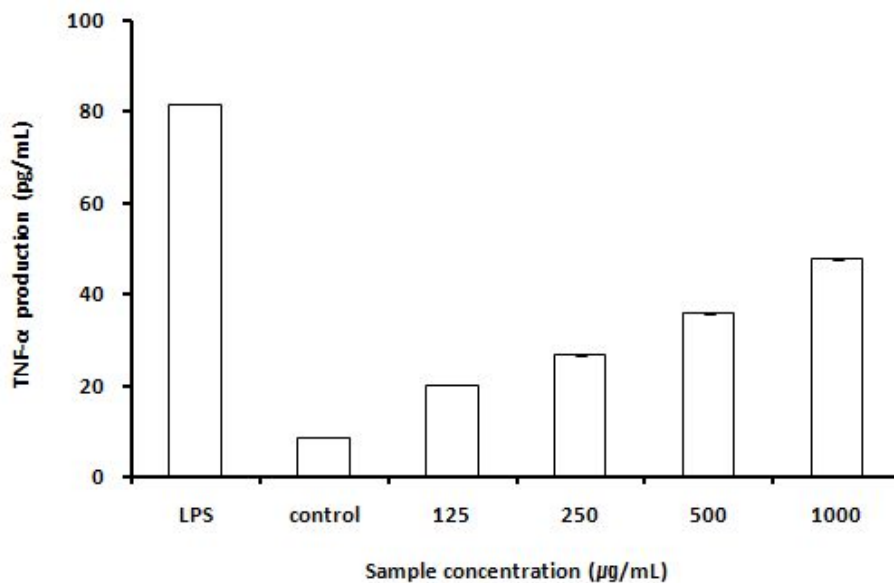


Fig. 28. TNF- $\alpha$  production by activated mouse splenocytes cultured with water extract mixture from black garlic and Gaeddongssuk (99.3 : 0.7).

## 5) 개발 제품의 이화학적 특성 분석

### (1) 고형분 함량, pH 및 산도

개발 제품의 기초 품질특성을 확인하고자 가용성 고형분 함량, pH 및 산도를 측정한 결과는 Table 18과 같다. 개발된 제품의 가용성 고형분 함량은 8.4%, pH는 5.23, 산도는 0.42%로 향후 개발 제품은 동등 또는 5% 이내의 오차 범위의 품질을 유지하도록 관리하는 기준으로 활용할 계획이다.

Table 18. Soluble solid, pH and acidity of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk

Analysis item	Soluble solid (%)	pH	Acidity (%)
Contents	8.40 $\pm$ 0.01	5.23 $\pm$ 0.25	0.42 $\pm$ 0.04



## (2) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

일반적으로 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사 산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 갖는 것으로 알려져 있는데, 이는 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질을 비롯한 다른 거대 분자들과 쉽게 결합하여 항산화, 항염증, 항암 등의 다양한 생리적 기능을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Kim EY et al, 2004).

Fig. 29는 개발 시제품의 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량을 정량한 결과로 그 함량은 각각 1866.08  $\mu\text{g/mL}$  및 500.00  $\mu\text{g/mL}$ 로 페놀 화합물의 함량이 플라보노이드 함량에 비해 약 3.7배 더 높게 정량되었다.

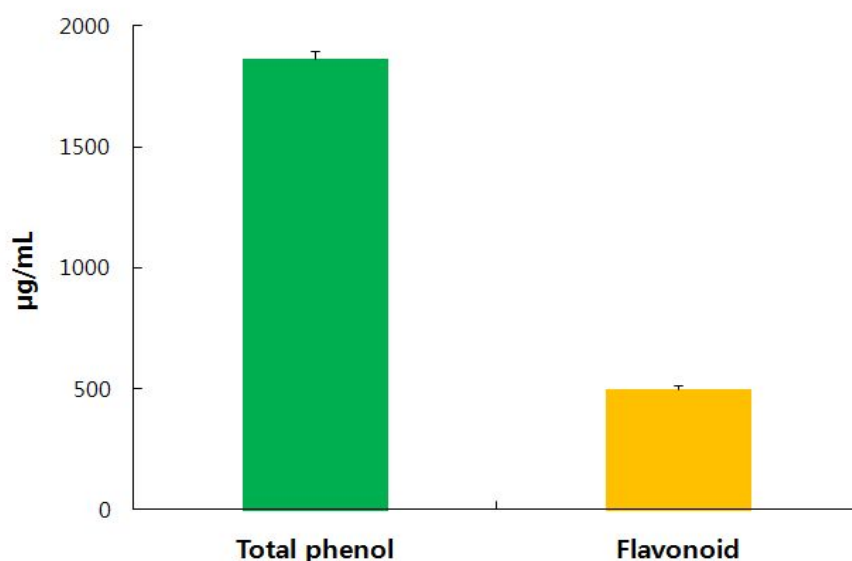


Fig. 29. Total phenol and flavonoid contents in drink product made from black garlic and Gaeddongssuk.

마늘 중의 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 관련하여 생마늘, 찢마늘 및 흑마늘의 총 페놀 화합물과 플라보노이드의 함량을 측정된 결과, 생마늘과 찢마늘은 페놀 화합물의 함량이 시료 간에 유의차가 없었으나, 흑마늘은 1.56 mg/100 g으로 이들 마늘에 비해 약 2.6배 더 높게 정량되었고, 플라보노이드의 함량 역시 흑마늘 > 생마늘 > 찢마늘 순으로 높았다는 Choi DJ et al(2008)의 보고가 있다. 개똥쑥의 경우에는 페놀 화합물의 함량이 잎은 88.19 mg/g, 줄기에서는 45.03 mg/g으로 보고된 바 있는데(Ryu JH et al, 2011a), 이는 상기 Choi DJ et al(2008)의 보고에 의한 흑마늘 중의 페놀 화합물보다 월등히 높은 함량이었다. Cai et al(2004)은 개똥쑥의 대표적 페놀성 화합물로 chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, coumarin, 6,7-dimethoxy-coumarin, luteolin-7-glucoside, rutin, quercetin, luteolin 및 kaempferol 등을 분리·동정하였고, Ryu JH et al(2011b)은 catechin류를 분리·동정한 바 있다.

선행연구의 결과와 본 연구의 결과를 종합해볼 때 개발된 음료 중의 총 페놀 화합물과 플라

보노이드 함량은 흑마늘 보다는 썩 추출물에서 기인하는 것으로 추정되며, 생마늘에 비해서는 함량이 높으나 썩에 비해서는 상대적인 함량이 낮은 흑마늘 추출액에 썩을 혼합함으로써 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 증가시킴으로서 항산화 활성을 비롯한 생체 내 활성에 더욱 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대된다.

### (3) 유리당의 함량

개발된 제품 중의 주요 성분인 유리당의 함량을 분석한 결과는 Table 19와 같다. 흑마늘과 개똥썩 추출 혼합물이 베이스이며, 당류가 가미된 음료이므로 베이스가 된 흑마늘과 개똥썩 추출물 중의 유리당 함량을 함께 분석하였다. 개똥썩 추출물에서는 fructose, glucose 및 sucrose가 검출되었으며 흑마늘과 제품에서는 sucrose가 검출되지 않았다. 흑마늘에는 fructose가  $40.02 \pm 0.71$  mg/mL로 가장 함량이 높으며, 개똥썩 추출물에 비해서도 약 2배 정도 더 높았다. Fructose는 흑마늘 중의 주요 유리당으로써 흑마늘 자체가 지니는 감미에 기여하는 것으로 판단된다. 개똥썩 추출물 중에 sucrose가  $11.03 \pm 0.07$  mg/mL 함유되어 있었으나 음료에서는 검출되지 않았는데, 이는 혼합되는 비율을 고려할 때 상대적인 함량이 낮았기 때문으로 생각된다.

Table 19. Free sugar contents of extracts powder made from Gaeddongssuk, black garlic and drink product

	(mg/mL)		
Sample	Fructose	Glucose	Sucrose
Gaeddongssuk extract powder	$26.42 \pm 0.63$	$5.54 \pm 0.07$	$11.03 \pm 0.07$
Black garlic extract powder	$40.02 \pm 0.71$	$2.10 \pm 0.05$	—
Drink product	$14.76 \pm 0.29$	$1.15 \pm 0.00$	—

### (4) 유기산의 함량

흑마늘과 개똥썩 함유 음료를 제조하여 유기산 함량을 분석하고, 원재료인 개똥썩과 흑마늘 중의 유기산 함량과 비교한 결과는 Table 20과 같다.

유기산은 시료마다 차이를 보이면서 7~8종이 검출되었는데, 개똥썩 추출물에서는 lactic acid가 검출되지 않았으며, 흑마늘과 개발 제품에서는 tartaric acid와 succinic acid가 검출되지 않았다. 개똥썩 추출물은 흑마늘 추출물에 비해 유기산의 총량이 약 8.7배 더 높았으며, 유기산 중 oxalic acid의 함량이 가장 높았고, 다음으로 citric acid, malic acid의 순이었고, 이들 유기산을 제외한 나머지 유기산의 함량은 200 mg/100 g 미만이었다. 흑마늘 추출물에서는 citric acid의 함량이 가장 많았고 다음으로 oxalic acid, malic acid의 순으로 절대 함량의 차이는 있었으나 상대적으로 함량이 높은 유기산의 종류는 비슷한 경향이였다. 제품 중의 유기산 총량은 217.7 mg/100 g이었고, 유기산의 대소 함량 패턴은 흑마늘 추출물과 동일하였다.

Lactic acid는 흑마늘 추출물에서 20.6 mg/100 g, 개발 제품에서는 15.8 mg/100 g의 농도로 검출되었다. 함량이 높았던 유기산도 개발 제품에서는 단일 추출물 중의 함량에 비해 상대적으로 더 적게 검출된 것을 고려해 볼 때 제품 중의 lactic acid는 첨가된 배추출 농축액과 결정과당으로부터 유래된 것으로 생각된다.

Table 20. Organic acid contents of extracts powder from Gaeddongssuk, black garlic and drink product

	(mg/100 g)		
	Gaeddongssuk extract powder	Black garlic extract powder	Product
Oxalic acid	4241.6	217.4	23.9
Tartaric acid	22.6	—	—
Citric acid	2411.4	339.9	82.2
Malic acid	1145.7	131.9	53.6
Glycolic acid	110.6	65.1	15.1
Formic acid	179.9	105.8	14.7
Lactic acid	—	20.6	15.8
Acetic acid	184.8	85.9	12.4
Succinic acid	135.7	—	—
Total	8,432.3	966.6	217.7

## 6) 개발 제품의 항산화 활성 규명

### (1) DPPH 라디칼 소거활성

개발된 제품은 흑마늘과 썩 추출물 자체의 색으로 인하여 원액을 그대로 항산화 활성 측정에 사용할 수 없으므로 증류수를 가하여 2, 4, 6, 8, 및 10% 농도로 희석하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 30과 같다. 2% 희석액에서 라디칼 소거활성은 22.9%였으며, 시료의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성도 유의적으로 증가하였다. 최고 농도인 10% 희석액의 DPPH 라디칼 소거활성은 51.7%로 2% 희석액에 비해 활성이 약 2.3배 더 높은 활성을 보였다.

DPPH에 의한 항산화 측정법은 비교적 간단하고 실제 항산화활성과 관련성이 높아 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 탐색할 때 널리 이용되고 있다(Choi SY et al, 2006). Shin JH et al (2008b)은 흑마늘 추출물의 항산화 활성은 생마늘 및 전마늘보다 높았으며, DPPH 및 환원력 등의 일부 항목에서는 흑마늘 열수추출물의 활성이 에탄올 추출물보다도 높았는데, 이는 생마

늘과 비교하여 흑마늘을 고온에서 장시간 숙성시키는 과정에서 amino-carbonyl 반응에 의해서 새로 생성된 갈변물질에 의하여 항산화활성이 높아졌기 때문으로 추정하였다.

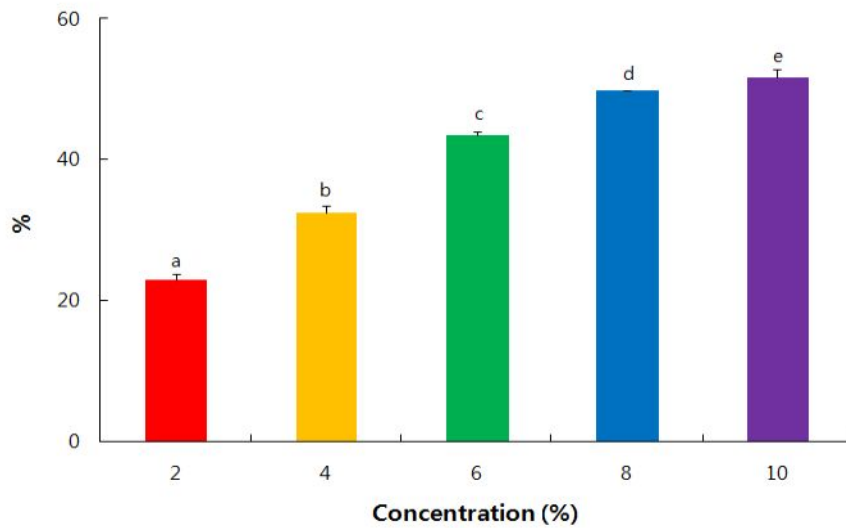


Fig. 30. DPPH radical scavenging activity of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk.

Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

반면, 개똥쑥은 항산화 활성이 높은 약용식물 중의 하나로 이는 페놀성 화합물에 의한 것으로 보고된 바 있으며(Zheng W & Wang SY, 2001; Hong JH et al, 2007; Brisibe EA et al, 2009), 페놀성 화합물 중에서도 항산화 활성에 영향을 주는 주요성분으로 알려진 catechin류가 주로 항산화 활성에 기여하는 것으로 추측된다(Ryu JH et al, 2011b).

DPPH 라디칼 소거활성에 따른 항산화 활성은 페놀성 화합물에 의하며(Kim EY et al, 2004; Lee HR et al, 2008), 이러한 페놀성 물질은 전자공여체 또는 금속이온의 chelator로 작용하여 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Rice-Evans CA et al, 1996).

## (2) ABTS 라디칼 소거활성

개발 음료 희석액의 ABTS 라디칼 소거활성은 시료의 함유 비율이 증가함에 따라 그 활성 역시 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 31). 2% 희석액의 라디칼 소거활성은 24.1% 였으나 농도가 2배 증가된 4% 희석액에서는 활성이 약 3.1배 증가하여 76.3%로 가장 큰 폭으로 활성이 증가하였다. 6% 희석액의 활성은 4% 희석액에 비해 1.2배 증가하여 95.3%에 달하는 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 보였다. 또한 8%와 10% 희석액의 농도에서는 거의 100%에 근접하는 라디칼 소거활성을 보였는데, 그 차이는 크지 않아 90% 이상의 활성을 나타내는 농도 이상에서는 시료의 농도 증가에 따른 활성 증가폭이 완화된 것을 확인할 수 있었다.

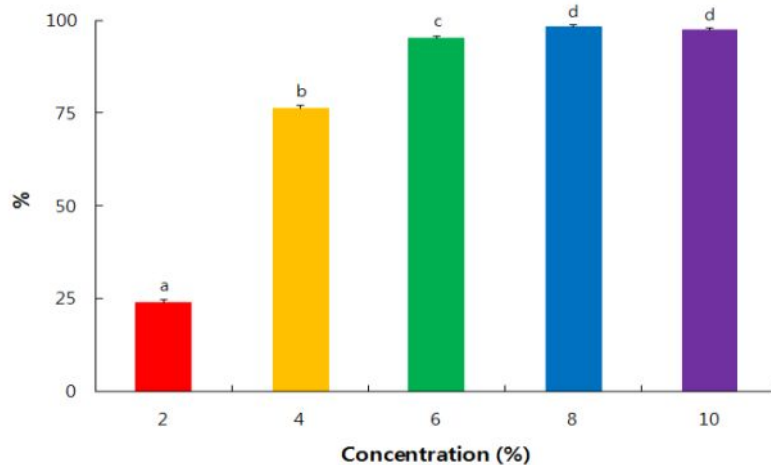


Fig. 31. ABTS radical scavenging activity of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk.

Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

ABTS 라디칼과 DPPH 라디칼 모두 체내의 산화 원인 물질로 ABTS 라디칼은 양이온 라디칼인 반면, DPPH 라디칼은 자유 라디칼로 기질의 성질이 다르며, 추출물 중 항산화 물질의 특성에 따라 결합정도가 다를 수 있어(Shin JH et al, 2008a), 추출물의 항산화 활성을 측정할 때에는 두 종류의 라디칼 소거활성을 모두 측정하여 비교할 필요가 있다고 보고되어 있다(Woo JH et al, 2010a,b).

Kim HY et al(2008)은 사과를 0~150°C로 가열추출한 결과, 열처리를 하지 않은 시료에 비해 열처리를 한 시료가 ABTS 라디칼 소거활성이 크게 증가하였다고 하였고, 또 Choi YM et al(2003)은 시료 중의 ABTS 라디칼 소거활성이 페놀 화합물에 의한다고 보고한 바 있다. 이와 같은 선행연구의 보고를 미루어볼 때, 본 연구에서 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의 높은 ABTS 라디칼 소거활성은 시료를 고온에서 열수 추출함에 따라 페놀 화합물의 용출이 상대적으로 증가하여 ABTS 라디칼 소거활성 또한 증가된 것으로 생각된다.

### (3) 환원력

환원력은 reductions이 제공하는 수소 원자가 자유 라디칼 사슬을 분해함으로써 시작되는데, 이때 흡광도의 값 자체가 시료의 환원력을 나타내게 된다(Gordon MF, 1990). 시료의 환원력은 항산화 활성과 관련성이 높기 때문에 DPPH 라디칼 소거능이 높은 시료인 경우 환원력이 높은 것으로 알려져 있고, 이 또한 시료 중의 페놀 화합물의 함량에 의존적인 것으로 알려져 있다(Gordon MF, 1990).

흑마늘과 개똥쑥을 혼합한 개발 제품을 2, 4, 6, 8 및 10% 농도로 희석하여 환원력을 측정하여 흡광도 값으로 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 환원력은 모든 시료에서 첨가 농도가 증가함

에 따라 유의적으로 상승하였으며 2% 희석액에서 흡광도 값은 0.8이었으나 10% 희석액에서는 2.6으로 약 3.25배정도 활성이 증가함을 알 수 있었다.

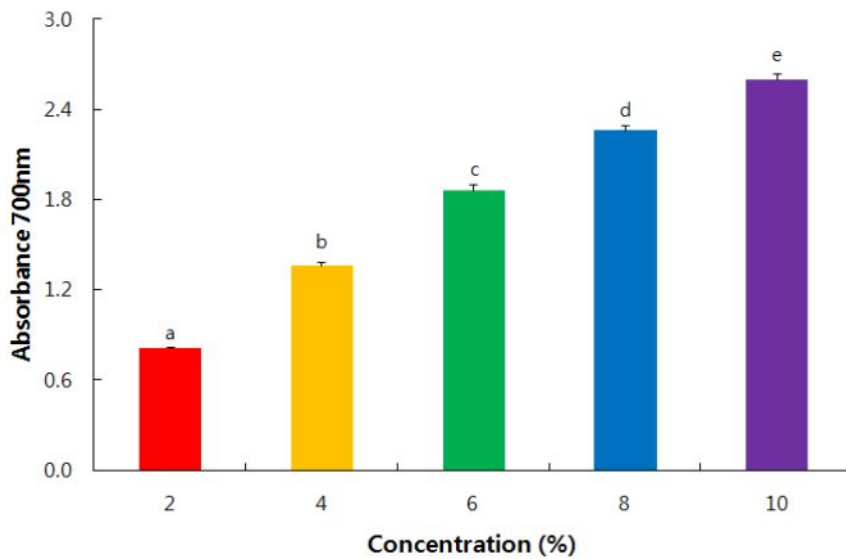


Fig. 4. Reducing power of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk. Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

흑마늘은 장시간 고온에서 가공되는 과정 중 amino-carbonyl 반응에 의해 갈변화되고(Choi DJ, 2008), 이 때 기질 내 hydroxyl기와 수소 원자를 공여함으로써 라디칼 반응을 제어할 수 있는 환원물질이 생성되기 때문에 생마늘에 비해 환원력이 더 높게 나타난다고 보고되어 있다(Lertittikul W et al, 2007). 이러한 보고들로 미루어 볼 때 흑마늘 및 개똥쑥 혼합 음료의 환원력은 이들 음료 중에 함유되어 있는 페놀 화합물과 흑마늘의 숙성과정 중 생성된 환원물질이 주된 인자인 것으로 사료된다.

#### (4) FRAP법에 의한 항산화 활성

대부분의 항산화제가 환원력을 갖는다는 측면에서 고안된 방법으로, 산성 pH의 영역에서 ferric tripyridyltriazine( $Fe^{+3}$ -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine( $Fe^{+2}$ -TPTZ) 으로 환원되는 원리를 이용한 FRAP법에 의한 시료의 항산화 활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. FRAP법에 의한 항산화 활성 역시 다른 항산화 실험의 결과와 마찬가지로 시료의 농도가 높아질수록 그 활성 역시 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 즉, 2% 시료 첨가 농도에서는 FRAP값은 214.8  $\mu$ M/mL이었으나 10% 농도에서는 599.7  $\mu$ M/mL로 활성이 2.8배 정도 증가하였다.

일반적으로 열처리 과정을 거치면서 시료의 FRAP 활성은 감소하는데, 흑마늘은 열처리 숙성을 통하여 제조되었음에도 불구하고 일정 수준 이상의 환원력에 의한 FRAP 활성을 가지는 것으로 알려져 있는데(Jastrzebski Z et al, 2007), 남해, 의성 및 창녕산 통흑마늘의 항산화력을

FRAP법으로 측정된 결과, 각각 1.7, 1.4, 1.7 M/mL의 값으로 보고된 바 있다(You BR et al, 2011).

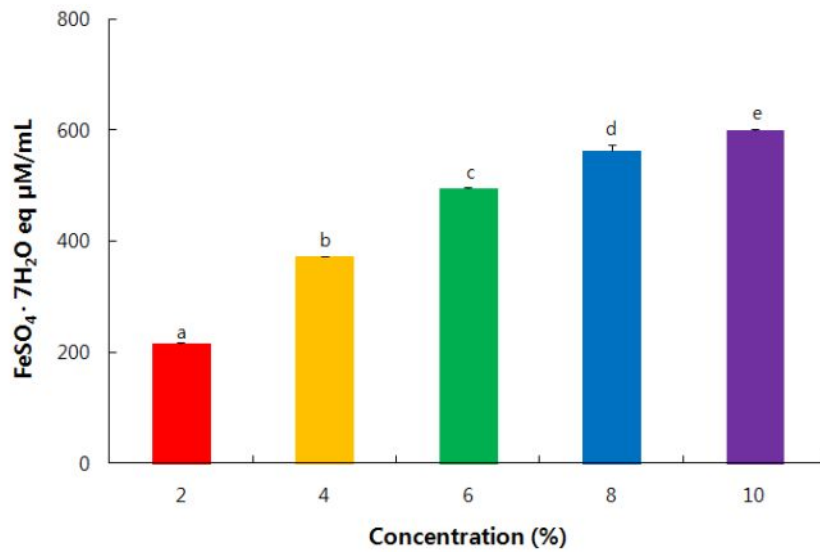


Fig. 33. Ferric-reducing antioxidant potential ability (FRAP) of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk.

Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

본 연구 결과 FRAP를 비롯한 흑마늘 및 개뽕쑥 혼합물의 항산화 활성이 높은 것은 페놀 화합물의 함량이 높기 때문이며, 이를 뒷받침하는 근거로 Holasova M et al (2002)의 보고를 들 수 있다. 또, Kim HK et al (2010)은 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량에 따른 밀원별 벌꿀의 항산화 활성을 측정된 결과, FRAP 활성과 페놀 및 플라보노이드 함량의 상관관계를 비교했을 때 플라보노이드( $r^2=0.84$ ) 보다 총 페놀 함량이( $r^2=0.95$ ) 더 높은 상관관계가 있다고 보고하였다. Moon GS et al (2003)은 FRAP 법에 의한 항산화 활성과 DPPH 라디칼 소거활성은 높은 상관관계를 나타낸다고 보고한 바 있다.

#### (5) Fe<sup>+2</sup> chelating 활성 측정

체내 세포에서 지질 및 단백질의 산화를 촉진하는 Fe<sup>+2</sup>과 같은 금속이온 인자(Decker EA & Hultin HO, 1992)에 대하여 시료의 chelating 활성을 측정된 결과는 Fig. 34와 같다. 시료의 Fe<sup>+2</sup> chelating 활성은 6% 희석액까지는 농도 의존적으로 활성이 증가하였으나 8%와 10% 희석액에서는 6% 희석액과 비교할 때 유의적인 활성의 차이가 없었다. 즉, 본 실험에서 가장 저농도인 2% 희석액의 chelating 활성은 22.6%였으나 6% 희석액의 활성은 약 1.8배 상승한 41.8%로 증가한 반면 8%와 10% 희석액에서는 평균 44.0% 및 43.7%의 활성을 나타내었다.

항산화성 물질에 의한 Fe<sup>+2</sup> chelating 활성은 활성산소종의 생성을 억제하여 세포의 산화적 손상을 막고, 지질 과산화물의 생성에 촉매 역할을 하는 전이 금속의 농도를 낮추므로 금속 이

은의 chelating 활성은 중요한 항산화 기작으로 알려져 있다(Duh PD et al, 1999).

Ryu JH et al (2011b)이 개똥썩의 물 추출물과 에탄올 추출물의  $Fe^{+2}$  chelating 활성을 측정한 결과, 잎과 줄기의 물 추출물은 에탄올 추출물에 비해 월등히 높았다고 보고하였으며, 가압·열처리가 톱풀과 울릉미역취 어린잎의  $Fe^{+2}$  chelating에 미치는 효과를 분석한 결과(Woo JH et al, 2010b)에서도 두 종 모두 가압·열처리에 의하여  $Fe^{+2}$  chelating 효과가 증가되었음이 보고되어 있다. 따라서 흑마늘 및 개똥썩 혼합 음료의 높은 chelating 활성도 이들 추출물의 제조 과정을 통하여 향상되는 것으로 추정된다.

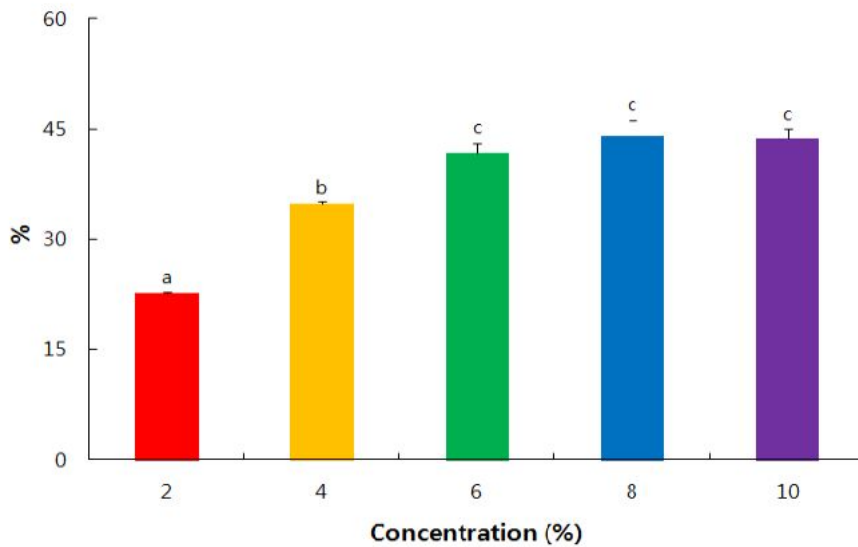


Fig. 34. Ferrous ion ( $Fe^{+2}$ ) chelating activity of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk.

Each value represents mean $\pm$ SD, n=3.

<sup>a-c</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

## 7) 개발 제품의 생리활성 규명

### (1) 아질산염 소거활성

Fig. 35는 흑마늘과 개똥썩 혼합물을 이용하여 식품중의 대표적인 발암성 물질인 N-nitrosamine의 생성 전구체로 작용하는 아질산염에 대한 소거활성을 측정한 결과이다. 시료의 아질산염 소거활성은 농도 의존적으로 증가하였는데, 2, 4, 6, 8 및 10% 희석액에서 각각 평균적으로 18.8, 32.8, 46.6, 55.1 및 63.8%의 활성을 보였다. 실험에 사용된 10% 희석액의 경우, 2% 희석액의 시료와 비교할 때 약 3.4배 더 높은 아질산염 소거활성을 나타내었으며, 농도의 증가와 더불어 소거활성 또한 지속적으로 유의성 있게 증가하는 점을 미루어 보아 10% 희석액 이상의 농도로 섭취되었을 때도 지속적으로 그 활성의 증가될 가능성이 높을 것으로 예측된다.



다류 소재로 애용되고 있는 감잎, 뽕잎, 두충잎 및 등글레 차 등의 아질산염 소거활성은 시료의 첨가 농도를 높일수록 비례적으로 증가하여 시료 농도 50~200 mg/100 g일 경우, 그 활성은 약 1.8~5배 증가된다고 보고되어 있다(Lee JM & Ahn MS, 1997). Lee JW et al (2001)은 홍삼의 수용성 갈변물질에 대한 아질산염 소거활성은 15.9~38.7%의 범위이며, 갈변물질의 분자량이 높을수록 소거능이 증가되는데 주된 성분은 비효소적 갈변물질인 melanoidin이라고 보고한 바 있다. 또한 열처리된 마늘은 nitric oxide와 산소의 반응으로 생성되는 peroxyxynitrite에 대한 소거활성이 있는데, 유효 물질은 열에 안정적이고 allinase의 활성보다는 thiosulfinate의 생성과 관련이 있다고 보고되어 있다(Lawson LD, 1998). 이들 보고를 미루어 볼 때 혼합물의 아질산염 소거활성은 열에 안정적인 갈변물질 및 흑마늘 속에 존재하는 합황 화합물에 의한 것으로 추정된다.

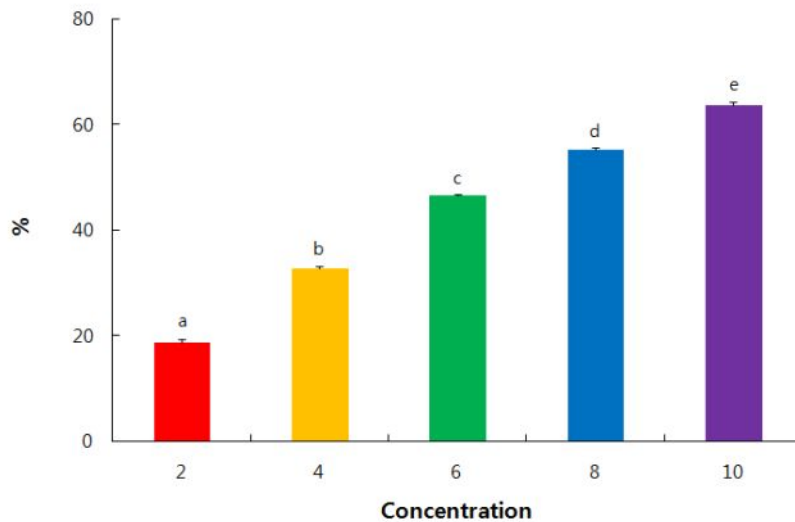


Fig. 35. Nitrite scavenging activity in drink product made from black garlic and Gaeddongssuk. Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

## (2) α-Glucosidase 저해활성 측정

흑마늘 및 개똥쑥 혼합 음료의 당 분해 억제 활성의 존재 여부를 확인함으로써 기능성을 탐색하고자 항당뇨 효과의 지표로 가장 널리 활용되는 α-glucosidase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 36과 같다. 2, 4, 6, 8 및 10% 희석액의 농도에서 각각 10.1, 13.5, 18.5, 22.8 및 28.3%의 α-glucosidase 저해활성이 있었으며, 시료의 농도 증가와 더불어 활성이 증가하였으나 그 절대값은 30% 미만으로 항산화 활성에 비해서는 활성이 낮았다.

Yin Y et al(2009)의 보고에 따른 약재인 6년근 황기의 경우 α-glucosidase 활성억제 효과는 0.5 mg/mL의 농도에서 14.62%, 1 mg/mL의 농도에서 49.71%로 시료 첨가 농도가 높아지면서 그 활성 또한 증가하는 경향이였다. 마전자 추출물 중 페놀 성분은 DPPH 라디칼 소거활성과

$\alpha$ -glucosidase의 저해활성에 상관관계가 있다고 보고되어 있으며(Lee JM et al, 2010), Xu ML et al(2010)은 토후박 추출물에서 총 페놀 화합물의 함량과 DPPH 라디칼 소거활성이 높을수록  $\alpha$ -glucosidase의 활성이 높다고 하였다.

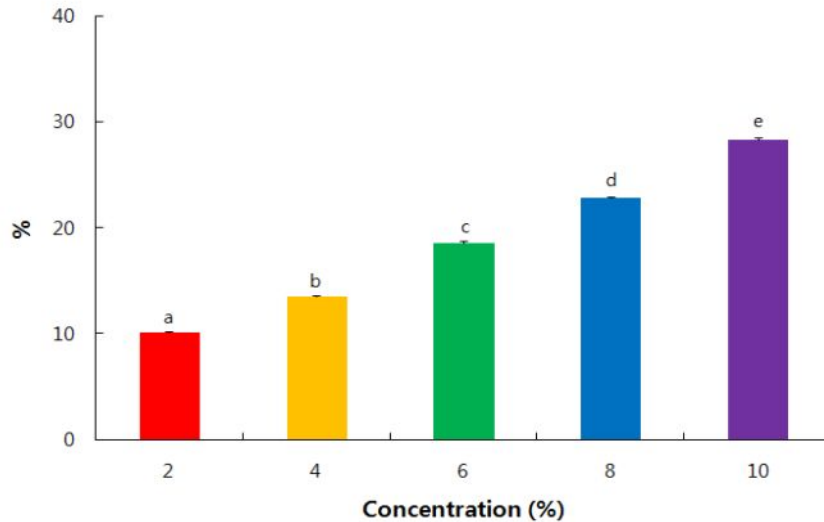


Fig. 36.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk. Each value represents mean $\pm$ SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

본 연구 결과 흑마늘 및 개똥쑥 혼합물의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 역시 시료 중의 페놀화합물 및 플라보노이드 함량이 높고, DPPH 라디칼 소거활성과 비슷한 경향으로 활성이 증가하여 상기 연구결과들과 일치하는 결과였다. 또한 시료의 첨가 농도에 따라 저해활성은 농도 증가와 더불어 계속적으로 상승하는 결과로 미루어볼 때 10% 희석액 이상의 고농도 시료 첨가 농도에서도 이들 혼합물의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 더욱 증가할 수 있을 것으로 기대된다.

$\alpha$ -Gglucosidase 저해활성은 탄수화물의 섭취 후 혈당상승을 억제할 수 있어 항당뇨 활성의 측정법으로 이용되는데(Gua J et al, 2006), 흑마늘과 개똥쑥 혼합 음료는 탄수화물의 소화 과정에서  $\alpha$ -glucosidase에 의한 단당류 생성을 저해함으로써 식사 후 혈당이 급격히 상승하는 등의 증상에도 효과적으로 이용될 수 있음을 예측할 수 있었다.

### (3) Xanthine oxidase 저해 활성 측정

Xanthine oxidase (XO)는 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine의 산소를 떼어내면서 과산화수소( $H_2O_2$ )를 생성하게 되고, 나머지 골격이 uric acid를 형성하여 혈장 내에 과량 존재하게 되면 골절에 축적되어 심한통증을 유발하는 통풍과 신장에 침착되어 신장 질환을 일으키는 효소로 알려져 있으며, 일종의 항산화 활성을 측정하는 방법으로도 사용되고 있다(Cho HE et al, 2010).

흑마늘 및 개똥쑥 혼합물이 XO 저해 활성을 측정한 결과(Fig. 37), 시료의 농도가 증가할수

록 그 활성 또한 유의적으로 증가하는 경향을 보였는데, 특히 10% 희석액에서는 2% 희석액에 비해 약 4.3배 증가한 63.8%의 저해활성을 보였다.

Yeo SG et al (1995)은 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물과 같은 차류의 xanthin oxidase 저해능을 측정한 결과, 녹차는 10 mg/mL에서 89.2~93.2%, 오롱차는 10 mg/mL에서 88.8% 그리고 홍차는 10 mg/mL에서 78.7%의 저해능을 가진다고 보고하였다. 또한 Kim MH et al (2007)은 차조기 잎 물 추출물에서 46.9%의 XO 저해활성을 보고하였다. 이들 결과와 본 연구결과를 비교하여 보면 흑마늘과 개똥썩 혼합 음료의 XO 저해활성도 XO 저해제로서 효과를 나타내기에 충분함을 알 수 있다. 따라서 개발 제품은 XO 저해활성에 효과가 있다고 생각되는 바, 심층적으로 연구·개발한다면 기능성식품의 개발에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

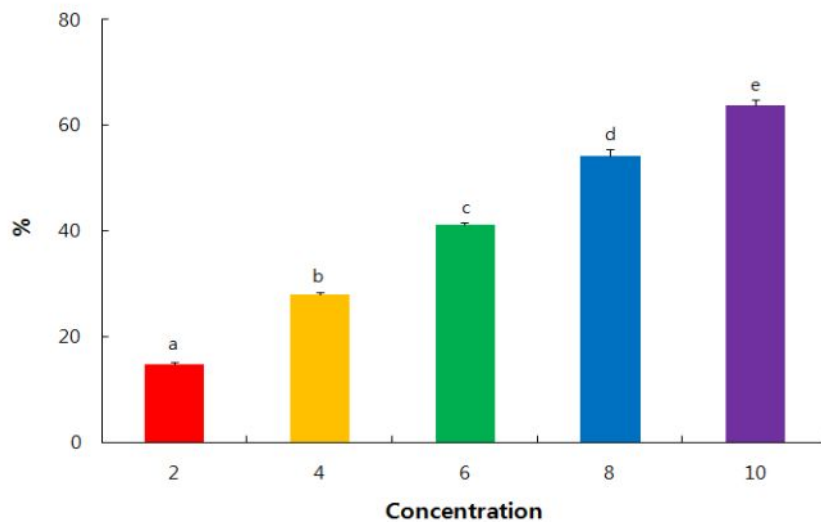


Fig. 37. Xanthine oxidase inhibition activity of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk.

Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

## 8) 개발 제품의 면역활성 규명

### (1) 썩 혼합물이 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향

대식세포인 RAW 264.7은 체액성 면역과 세포 매개성 면역의 효과세포로, NADPH oxidase와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 superoxide anion( $O_2^-$ )과 nitric oxide(NO)를 합성하고, 면역반응과 관련된 Interleukin(IL), interferon(IFN), tumor necrosis factor(TNF)과 같은 사이토카인의 생성에 영향을 미친다.

RAW 264.7에 대한 썩 혼합물의 세포독성을 알아보기 위하여 CCK-8 assay를 수행하였다. 썩 혼합물을 농도별(1, 2, 5, 10, 20 %)로 처리한 결과(Fig. 38), 99~106% 범위로 독성을 나타내지 않았다. 따라서 썩 혼합물이 RAW 264.7의 생존율에 영향을 주지 않는 것으로 판단하고 면역활성 검증을 위한 농도로 설정해 다음 실험을 진행하였다.

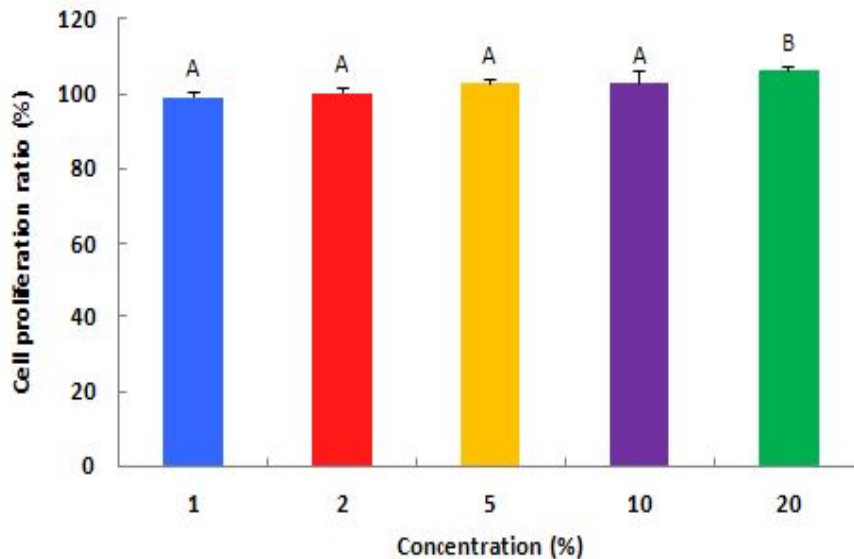


Fig. 38. Effect of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk on RAW 264.7 cells viability.

Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>A-B</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

(2) 쑥 혼합물이 RAW 264.7 세포내의 nitric oxide(NO) 생성에 미치는 영향

NO는 고도의 반응성을 가진 과산화 질소로 과도한 NO의 분비는 정상 숙주의 조직을 손상시켜 염증을 유발하게 된다.

쑥 혼합물이 LPS로 처리된 RAW 264.7의 NO의 생성량에 미치는 영향을 Fig. 39에 나타내었다. 대조군과 비교할 때 쑥 혼합물을 처리 농도가 증가할수록 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타났다.

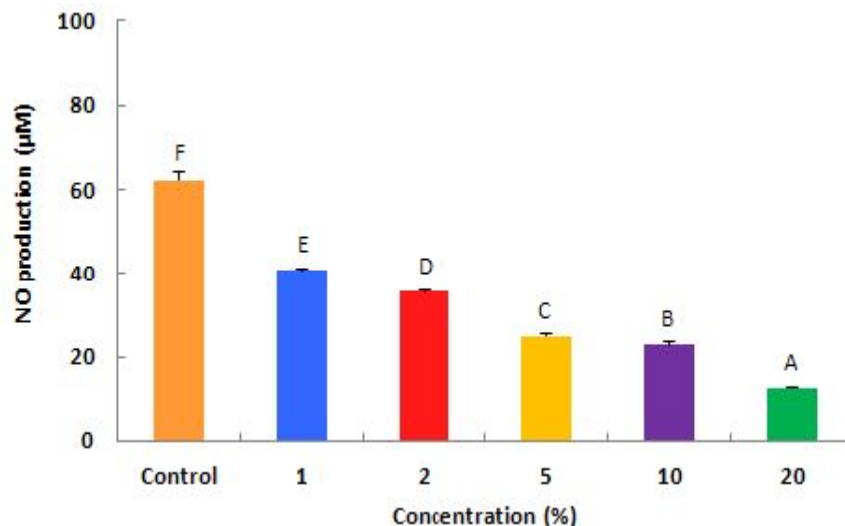


Fig. 39. Effect of drink product made from black garlic and Gaeddongssuk on NO production in RAW 264.7 cells.

Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>A-F</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

(3) 썩 혼합물이 RAW 264.7 세포내의 사이토카인(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) 생성량에 미치는 영향 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ 와 같은 여러 가지 사이토카인은 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 물질로 제시되어 왔으며, 그 중에서도 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 는 초기 염증 반응에서 세포 간 신호전달을 수행함으로써 면역반응에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다.

본 연구에서는 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 분비량 측정하였고, LPS로 자극한 대식세포로부터 분비된 사이토카인을 측정하여 대식세포의 활성화에 대한 지표로 삼았다.

IL-1 $\beta$ 의 함량을 ELISA kit를 이용하여 측정한 결과(Fig. 40), 썩 혼합물의 첨가 농도에 의존적으로 IL-1 $\beta$  생성량이 유의하게 증가하였으며, 최대 20% 농도에서는 272.34 pg/mL로 양성 대조군이 LPS 처리구(40.93 pg/mL)에 비해 높은 생성량이 증가하였다.

TNF- $\alpha$ 의 함량을 측정한 결과(Fig. 41), IL-1 $\beta$ 의 함량과 유사한 경향으로 시료의 농도가 증가할수록 대조군에 비해 TNF- $\alpha$ 의 생성량이 증가하였다. 따라서 썩 혼합물은 외부로부터의 항원에 대항하여 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진시킴으로써 면역기능 증강에 효과적으로 작용할 것으로 사료된다.

TNF- $\alpha$ 는 면역반응의 초기에 분비되는 전염증기 cytokine으로 천식이나 류마티스 관절염 등 여러 가지 질환에서의 염증반응 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. TNF- $\alpha$ 는 생체내에서 단독으로 또는 다른 cytokine들과 협력 작용하여 일부 종양에 대해서는 혈관을 손상시킴으로써 종양 괴사를 유발시키거나 말라리아 또는 레지오넬라에 의한 감염, 바이러스 혹은 기생충에 의한 감염에 대하여 숙주의 저항성을 유도시키기도 한다.

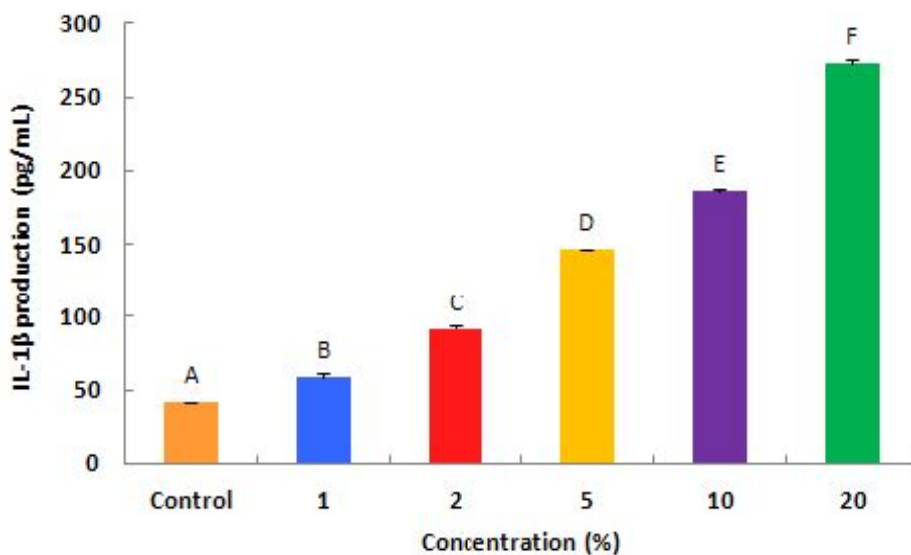


Fig. 40. IL-1 $\beta$  production by RAW 264.7 cells cultured with drink product made from black garlic and Gaeddongssuk.

Each value represents mean $\pm$ SD, n=3.

<sup>A-F</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

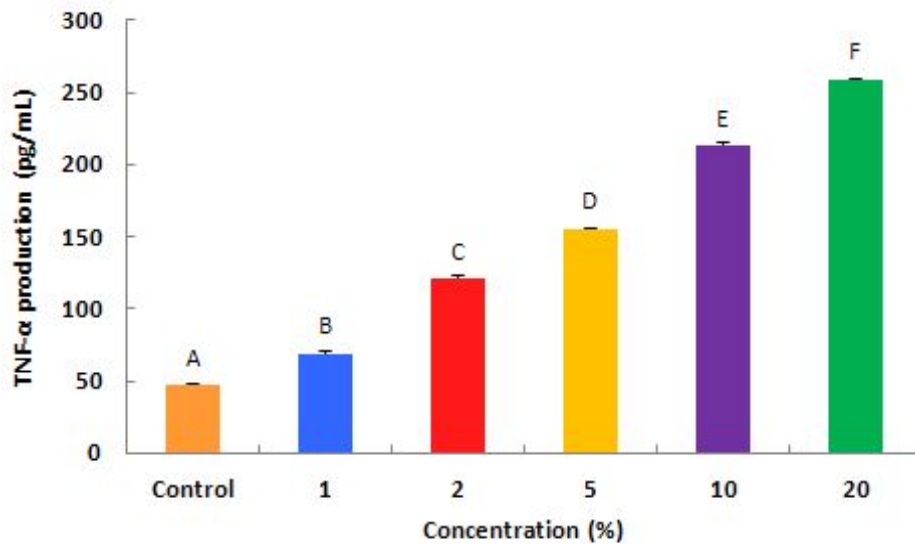


Fig. 41. TNF- $\alpha$  production by RAW 264.7 cells cultured with drink product made from black garlic and Gaeddongssuk.

Each value represents mean $\pm$ SD, n=3.

<sup>A-F</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

또한, TNF- $\alpha$ 는 중요한 염증매개인자 중 하나로서, 경우에 따라서는 오히려 생체에 해로운 영향을 미칠 수도 있는데, 이러한 유해 작용 중 특히 중요한 것은 내피세포에서 항응고성을 상실하게 하여 fibrin 침착을 증가시킴으로써 혈관 내 응고 현상을 유발시킬 수 있으며, ICAM-1을 발현시켜 염증세포의 부착력을 증대시켜 염증세포가 염증부위를 빠져나가는 것을 촉진시킨다. 이로 인하여 TNF- $\alpha$ 는 순환장애 및 광범위한 조직괴사를 유발할 수 있는 주요 매개인자로 간주되고 있으며 만성 염증성 질병 상태에서 지방세포의 lipoprotein lipase의 활성을 억제시켜 cachexia를 유발시키기도 한다.

## 9) 흑마늘과 천연식물류 복합물 제조를 위해 선정된 천연식물류의 생리활성 평가

### (1) 추출 수율 및 갈색도

11종의 천연식물류 열수 추출물의 추출 수율 및 갈색도는 Table 21과 같다. 추출 수율은 상황버섯이 5.70%로 가장 낮았고, 열매 부위를 사용한 구기자 수율이 52.10%로 가장 높았으며, 그 외 시료에서는 14.50~42.47%였다. 뿌리 부위를 사용한 시료 중 황금 및 단삼의 수율은 40% 이상으로 높았으나 산약, 작약 및 생강의 수율은 14.50~18.53%에 불과하였다.

본 실험 결과는 Ju JC et al(2006)이 보고한 95°C에서 3시간동안 환류 추출한 감국(9.25%), 단삼(36.49%), 뽕잎(15.48%) 및 옥수수수염(11.82%) 열수 추출물의 수율과 비교해 볼 때 높게 정량되어, 추출 시간의 차이와 추출 과정 중 진탕배양기의 사용에 의한 것으로 사료된다. 다류 소재로 이용되는 천연식물류의 물 추출물은 시료의 종류에 따라 1.38~33.20%의 수율로 시료 간에 차이가 큰 것으로 보고된 바 있는데(Kim MH et al, 2001), 본 실험에서 사용한 시료 중 상황버

섯을 제외한 대부분의 시료에서 추출 수율이 높아 식품 가공에 적용할 경우 산업적 활용도가 높을 것으로 예상된다.

Table 21. Yields and browning intensity from hot water extracts in the medicinal plant materials

Sample code	Korean name	Yields (%)	Browning intensity in 420 nm
A	구기자	52.10±1.65 <sup>F</sup>	0.085±0.001 <sup>D</sup>
B	황금	42.13±2.73 <sup>E</sup>	0.251±0.002 <sup>H</sup>
C	오가피	34.76±3.82 <sup>D</sup>	0.522±0.003 <sup>I</sup>
D	감국	31.47±2.82 <sup>D</sup>	0.046±0.001 <sup>B</sup>
E	산약	18.53±1.05 <sup>B</sup>	0.051±0 <sup>C</sup>
F	작약	15.17±2.37 <sup>B</sup>	0.039±0.001 <sup>A</sup>
G	단삼	42.47±2.80 <sup>E</sup>	0.084±0.001 <sup>D</sup>
H	뽕잎	26.92±2.27 <sup>C</sup>	0.218±0.002 <sup>G</sup>
I	생강	14.50±2.04 <sup>B</sup>	0.103±0.001 <sup>E</sup>
J	상황버섯	5.70±0.53 <sup>A</sup>	0.903±0.001 <sup>J</sup>
K	옥수수수염	16.07±0.47 <sup>B</sup>	0.180±0.001 <sup>F</sup>

Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>A-I</sup>Means with different superscripts in the column are significantly different at  $p<0.05$ .

420 nm에서 증류수를 대조로 하여 1,000 µg/mL 농도로 제조한 시료 추출물의 갈색도는 상 황버섯이 0.903으로 가장 높았다. 다음으로 오가피가 0.522였으며, 황금, 뽕잎, 생강 및 옥수수 수염은 0.1~0.3의 범위였고, 그 외 시료는 0.1 이하의 흡광도를 나타내었다.

420 nm에서 시료 추출물의 흡광도값은 시료의 추출 과정 중 갈색화 반응생성물의 함량의 추정에 적용되며, 시료 중 갈색 물질의 함량과 항산화 활성과의 관계를 예측할 수 있는 지표로 이용된다(Kang YH et al, 1995). 16종의 한약재 열수 추출물에서 갈변물질의 함량은 0.040~1.312의 흡광도값을 보였는데, 감국, 단삼 및 옥수수수염 열수 추출물에서 각각 0.445, 0.240 및 0.917의 흡광도값을 보여 본 실험결과보다는 상당히 높았으나, 뽕잎은 0.302로 비슷한 수준이었다. 또한 시료 중 갈변물질의 함량이 많을수록 항산화 활성이 높았다고 보고되어(Ju JC et al, 2006), 본 실험 결과에서도 갈색도가 높은 시료에서 생리활성이 높을 것으로 예상된다.

## (2) 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량

11종의 천연식물류 열수 추출물의 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량은 Table 22와 같다.

총 페놀 함량은 38.01~78.53 mg/g이었으며, 상황버섯이 가장 높았고 산약(38.01 mg/g)이 가장 낮은 함량으로 시료의 종류에 따라 유의적인 함량차를 보였다. 플라보노이드 함량은 상황버섯이 41.02 mg/g으로 가장 높았고, 다음으로 황금(31.65 mg/g), 뽕잎(21.30 mg/g)의 순으로, 그 밖의 시료에 비해 월등히 높은 함량이었으며, 구기자, 산약 및 작약은 1 mg/g 미만이었다.

페놀성 화합물은 화학적 구조 내의 phenolic hydroxyl기에 의해 항산화 활성의 정도나 2가 금속이온과의 결합이 결정되며(Jo DH et al, 2007), 이들 작용기에 의한 유리 라디칼의 소거효과도 높아 생체 내에서 항암이나 면역 증진 활성과도 관련이 크다(Lee YS, 2007). 따라서 황금, 오가피, 단삼, 뽕잎 및 상황버섯 등은 총 페놀이나 플라보노이드 함량이 높아 생체에 적용 시 생리활성의 증대를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

### (3) 천연식물류 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성

11종의 천연식물 열수 추출물을 100~1,000 µg/mL의 농도 범위에서 DPPH 라디칼 소거활성과 50%의 소거활성을 나타내는 시료의 농도인 EC<sub>50</sub>값을 산출한 결과는 Table 23과 같다. 모든 시료에서 시료의 첨가 농도가 많아짐에 따라 소거활성이 유의적으로 증가되었다. 본 실험에 사용된 추출물의 농도범위에서 시료들의 EC<sub>50</sub>값을 확인한 결과, 단삼이 100 µg/mL 이하로 시료 중 활성이 가장 높았으며, 상황버섯, 황금 및 작약이 각각 113.38, 124.73 및 130.51 µg/mL였으며, 그 외 시료의 EC<sub>50</sub>값은 200 µg/mL 이상이었다.

Table 22. Total phenol and flavonoids contents in the medicinal plant materials (mg/g dried extracts)

Sample code	Total phenol	Flavonoids
A	43.51±0.19 <sup>B</sup>	0.53±0.13 <sup>A</sup>
B	68.82±1.32 <sup>G</sup>	31.65±0.36 <sup>H</sup>
C	69.08±0.30 <sup>G</sup>	12.05±0.46 <sup>E</sup>
D	56.78±0.22 <sup>F</sup>	16.71±0.34 <sup>F</sup>
E	38.01±0.40 <sup>A</sup>	0.42±0.08 <sup>A</sup>
F	47.40±0.34 <sup>D</sup>	0.33±0.17 <sup>A</sup>
G	75.42±0.59 <sup>H</sup>	8.36±0.80 <sup>C</sup>
H	53.16±0.49 <sup>E</sup>	21.30±0.36 <sup>G</sup>
I	45.07±0.51 <sup>C</sup>	11.13±0.36 <sup>D</sup>
J	78.53±0.11 <sup>I</sup>	41.02±0.34 <sup>I</sup>
K	47.73±1.07 <sup>D</sup>	6.76±0.10 <sup>B</sup>

Refer to the sample code in Table 21.

Each value represents mean±SD, n=3.

<sup>A-I</sup>Means with different superscripts in the column are significantly different at  $p < 0.05$ .



Table 23. DPPH radical scavenging activity in the medicinal plant materials

Sample code	Concentration (µg/mL)				EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	100	250	500	1000	
A	2.04±0.80 <sup>aA</sup>	5.83±0.74 <sup>bA</sup>	10.93±0.89 <sup>cB</sup>	19.35±0.16 <sup>dB</sup>	1000 <
B	45.65±0.89 <sup>aD</sup>	71.94±0.28 <sup>bG</sup>	72.20±0.28 <sup>bH</sup>	74.82±0.70 <sup>cI</sup>	124.73±4.56
C	26.30±2.83 <sup>aB</sup>	43.43±2.67 <sup>bC</sup>	48.80±0.69 <sup>cD</sup>	50.37±1.63 <sup>cC</sup>	828.55±87.15
D	26.02±0.89 <sup>aB</sup>	55.09±2.64 <sup>bD</sup>	72.32±0.80 <sup>cH</sup>	73.16±1.55 <sup>cHI</sup>	224.43±11.37
E	2.09±0.66 <sup>aA</sup>	5.52±0.16 <sup>bA</sup>	8.00±0.50 <sup>cA</sup>	14.28±1.59 <sup>dA</sup>	1000 <
F	44.48±1.44 <sup>aD</sup>	71.34±1.00 <sup>bG</sup>	68.48±2.22 <sup>cG</sup>	71.67±0.95 <sup>cH</sup>	130.51±5.36
G	57.57±1.24 <sup>aF</sup>	71.35±0.47 <sup>bG</sup>	71.62±0.81 <sup>bH</sup>	71.98±0.16 <sup>bH</sup>	< 100
H	25.53±1.08 <sup>aB</sup>	58.19±1.08 <sup>bE</sup>	65.90±1.08 <sup>cF</sup>	62.67±2.22 <sup>dE</sup>	212.40±4.45
I	32.64±0.32 <sup>aC</sup>	43.40±1.07 <sup>bC</sup>	58.47±0.48 <sup>cE</sup>	69.44±0.60 <sup>dG</sup>	358.94±13.06
J	48.37±2.84 <sup>aE</sup>	62.16±1.40 <sup>bF</sup>	65.68±0.27 <sup>cF</sup>	67.03±0.47 <sup>cF</sup>	113.38±24.24
K	26.39±1.03 <sup>aB</sup>	32.33±1.91 <sup>bB</sup>	38.56±3.69 <sup>cC</sup>	53.41±1.34 <sup>dD</sup>	879.48±64.54

Refer to the sample code in Table 21.

Each value represents mean±SD, n=3.

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-I) are significantly different at  $p < 0.05$ .

약용식물류 32종의 DPPH 라디칼 소거활성을 검색한 연구에서 단삼 및 황금이 가장 우수하였다는 보고(Kwon JW et al, 2007)는 본 연구 결과와도 유사하였다. 단삼의 경우 과산화수소에 의한 산화적 스트레스에 대한 방어활성은 상당히 높으나, 감마선에 의한 산화적 스트레스에 대한 방어활성은 상반된 결과를 보여 동일 식물체라도 산화적 스트레스의 유형에 따라 방어능에 차이가 있다는 보고도 있다(Kim JH et al, 2000). Park YS(2002)은 8종의 한약재 추출물 중 총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거활성과의 관계에서 구기자과 작약은 상호 반비례 관계였으나 국화는 비례 관계였으며, 대다수의 식물체가 항산화 활성을 지니나, 시료 중 활성 성분의 종류 및 함량 차이에 따라 활성 차이가 큰 것으로 보고한 바 있다.

#### (4) 천연식물류 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성

11종의 천연식물류 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 EC<sub>50</sub>값으로 나타낸 결과는 Table 24와 같다. ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼의 소거활성과 같은 경향으로 단삼에서 EC<sub>50</sub> 값이 100 µg/mL 이하로 가장 활성이 높았고, 황금(115.68 µg/mL), 상황버섯(149.57 µg/mL) 및 작약(167.29 µg/mL)은 200 µg/mL 이하였다. 특히, 오가피는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활

성을 비교해 볼 때 EC<sub>50</sub>값이 각각 828.55, 238.36 µg/mL로 라디칼의 종류에 따른 활성 차이가 상당히 큰 것으로 나타났다.

Table 24. ABTS radical scavenging activity in the medicinal plant materials

Sample code	Concentration (µg/mL)				EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	100	250	500	1000	
A	5.17±1.63 <sup>aAB</sup>	13.92±1.34 <sup>bB</sup>	23.83±1.06 <sup>cB</sup>	44.40±0.87 <sup>dB</sup>	1000 <
B	46.33±3.05 <sup>aE</sup>	80.03±0.73 <sup>bI</sup>	83.23±2.11 <sup>cG</sup>	85.41±0.59 <sup>cF</sup>	115.68±12.02
C	20.44±6.22 <sup>aC</sup>	52.37±1.29 <sup>bF</sup>	72.03±1.77 <sup>cE</sup>	74.65±2.29 <sup>cD</sup>	238.36±6.21
D	18.16±1.22 <sup>aC</sup>	42.72±1.29 <sup>bE</sup>	71.14±4.39 <sup>cE</sup>	77.94±3.90 <sup>dE</sup>	315.52±18.83
E	1.92±0.94 <sup>aA</sup>	10.25±0.45 <sup>bA</sup>	16.23±0.37 <sup>cA</sup>	29.79±2.45 <sup>dA</sup>	1000 <
F	32.84±1.96 <sup>aD</sup>	71.02±0.94 <sup>bH</sup>	83.98±1.43 <sup>cG</sup>	84.11±2.55 <sup>cF</sup>	167.29±4.70
G	53.98±2.12 <sup>aE</sup>	82.44±4.07 <sup>bI</sup>	83.52±1.17 <sup>bG</sup>	84.57±1.60 <sup>bF</sup>	< 100
H	20.90±1.59 <sup>aC</sup>	51.70±1.65 <sup>bF</sup>	78.06±2.28 <sup>cF</sup>	79.11±1.30 <sup>cE</sup>	242.12±7.73
I	8.92±1.08 <sup>aB</sup>	31.67±1.72 <sup>bD</sup>	55.68±2.33 <sup>cD</sup>	78.43±0.44 <sup>dE</sup>	441.48±23.11
J	42.79±5.91 <sup>aE</sup>	62.05±1.80 <sup>bG</sup>	74.14±1.12 <sup>cE</sup>	74.52±1.44 <sup>cD</sup>	149.57±32.18
K	7.09±1.81 <sup>aB</sup>	18.69±1.56 <sup>bC</sup>	33.18±2.49 <sup>cC</sup>	57.63±1.20 <sup>dC</sup>	842.77±29.78

Refer to the sample code in Table 21.

Each value represents mean±SD, n=3.

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-I) are significantly different at  $p < 0.05$ .

식물체에 함유된 페놀 성분은 종류에 따라 라디칼 소거활성이 다양하게 발휘되는데, 한약재를 대상으로 한 라디칼 소거활성 결과에서 ABTS라디칼 소거활성은 시료의 페놀 화합물의 함량에 관계없이 우수한 것으로 보고된 바 있다(Chae JW et al, 2012). Joo SY(2013)은 약용식물류 10종의 DPPH 및 ABTS라디칼 소거활성은 라디칼의 종류에 따라 서로 다르며, DPPH 라디칼 소거활성이 다소 높게 측정되었다고 보고한 바 있는데 본 연구 결과도 이와 유사한 경향이였다.

#### (5) 천연식물류 열수 추출물의 superoxide anion 라디칼 소거활성

천연식물류 열수 추출물의 superoxide anion 라디칼 소거활성은 Table 25와 같다. 구기자, 산약 및 뽕잎 추출물을 제외한 시료에서 EC<sub>50</sub>값은 348.16~918.16 µg/mL로 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성에 비해 대부분의 시료에서 활성이 낮았다. 하지만, 단삼의 superoxide anion 라디칼 소거활성이 가장 높았던 것은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성과도 일치하는 경향이였다.

Table 25. Superoxide anion radical scavenging activity in the medicinal plant materials

Sample code	Concentration (µg/mL)				EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	100	250	500	1000	
A	6.34±1.98 <sup>aA</sup>	10.93±0.65 <sup>bA</sup>	13.23±3.06 <sup>bA</sup>	35.48±2.66 <sup>cAB</sup>	1000 <
B	17.65±1.19 <sup>aBCD</sup>	28.17±1.02 <sup>bE</sup>	53.80±3.95 <sup>cE</sup>	76.54±1.27 <sup>dD</sup>	467.08±32.52
C	20.45±2.73 <sup>aD</sup>	23.87±1.79 <sup>bD</sup>	50.33±1.96 <sup>cE</sup>	76.50±2.12 <sup>dD</sup>	488.99±6.54
D	18.20±3.77 <sup>aBCD</sup>	20.41±1.90 <sup>aC</sup>	38.06±1.55 <sup>bD</sup>	56.30±3.73 <sup>cC</sup>	837.00±85.95
E	16.11±1.13 <sup>aBC</sup>	23.71±1.58 <sup>bD</sup>	24.67±2.33 <sup>bB</sup>	32.43±2.67 <sup>cA</sup>	1000 <
F	14.94±2.15 <sup>aB</sup>	18.32±2.38 <sup>bC</sup>	32.72±1.98 <sup>cC</sup>	52.42±2.04 <sup>dC</sup>	918.16±31.83
G	20.28±1.94 <sup>aD</sup>	37.52±2.44 <sup>bF</sup>	69.28±2.75 <sup>cG</sup>	89.86±2.83 <sup>dF</sup>	348.16±13.92
H	17.62±1.27 <sup>aBCD</sup>	19.57±1.52 <sup>aC</sup>	24.71±2.08 <sup>bB</sup>	39.19±3.91 <sup>cB</sup>	1000 <
I	19.95±3.06 <sup>aD</sup>	29.72±2.82 <sup>bE</sup>	61.10±4.78 <sup>cF</sup>	83.72±2.36 <sup>dE</sup>	413.35±26.35
J	18.66±2.07 <sup>aCD</sup>	18.99±2.80 <sup>aC</sup>	53.30±3.11 <sup>bE</sup>	78.84±2.67 <sup>cD</sup>	468.51±18.48
K	8.85±1.52 <sup>aA</sup>	13.98±1.34 <sup>bB</sup>	29.13±1.44 <sup>cC</sup>	55.09±0.76 <sup>dC</sup>	902.07±14.83

Refer to the sample code in Table 21.

Each value represents mean±SD, n=3.

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-F) are significantly different at  $p < 0.05$ .

약용식물 추출물의 superoxide anion 라디칼 소거활성 연구에서 오가피와 황금 추출물의 활성이 상당히 높았으며, 이들 시료에서 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성과의 상관관계가 각각 0.695, 0.851로써 유의적으로 높은 관계가 성립되는 것으로 보고되어 있다(Joo SY et al, 2013). 또한 맨드라미 꽃의 메탄올 추출물에서도 상기의 라디칼 소거활성 간에 0.9 이상의 상관관계가 보고된 바 있다(Kim HY et al, 2012). 본 연구에서 사용된 천연식물류 추출물 중 단삼, 황금 및 상황버섯은 다양한 라디칼에 대한 소거활성이 우수하여 생체 내 산화적 스트레스에 대한 항산화성 물질로써 효과가 클 것으로 사료된다.

#### (6) 천연식물류 열수 추출물의 환원력

천연식물류 열수 추출물의 환원력은 Table 26에 나타내었다. 시료의 환원력은 700 nm에서 측정한 흡광도 값으로 나타내었으며(Gordon MF, 1990), 흡광도 값이 0.5에 도달하는데 소요되는 시료의 양을 EC<sub>0.5</sub>값으로 나타내었다. 시료의 첨가량이 증가됨에 따라 환원력은 유의적으로 상승하였으며, 구기자, 산약 및 옥수수수염의 EC<sub>0.5</sub>값은 1000 µg/mL 이상인 것으로 추정되었다. 상황버섯, 단삼 및 황금의 EC<sub>0.5</sub>값은 500 µg/mL 이하로 특히 상황버섯의 환원력이 가장 높

왔는데, 이는 시료의 총 페놀 화합물 함량과 일치하는 경향이였다.

Table 26. Reducing power in the medicinal plant materials

Sample code	Concentration (µg/mL)				EC <sub>0.5</sub> (µg/mL)
	100	250	500	1000	
A	0.09±0.00 <sup>aB</sup>	0.13±0.00 <sup>bB</sup>	0.22±0.00 <sup>cD</sup>	0.42±0.00 <sup>dC</sup>	1000 <
B	0.13±0.00 <sup>aEF</sup>	0.27±0.00 <sup>bG</sup>	0.52±0.00 <sup>cI</sup>	0.96±0.00 <sup>dI</sup>	482.67±6.73
C	0.13±0.00 <sup>aF</sup>	0.26±0.00 <sup>bF</sup>	0.44±0.00 <sup>cH</sup>	0.74±0.00 <sup>dH</sup>	591.11±6.84
D	0.11±0.00 <sup>aC</sup>	0.21±0.00 <sup>bD</sup>	0.34±0.00 <sup>cE</sup>	0.61±0.00 <sup>dE</sup>	834.00±18.33
E	0.07±0.00 <sup>aA</sup>	0.10±0.00 <sup>bA</sup>	0.14±0.00 <sup>cB</sup>	0.24±0.00 <sup>dA</sup>	1000 <
F	0.12±0.01 <sup>aD</sup>	0.21±0.00 <sup>bD</sup>	0.37±0.00 <sup>cF</sup>	0.67±0.00 <sup>dF</sup>	718.89±15.12
G	0.22±0.00 <sup>aH</sup>	0.47±0.00 <sup>bH</sup>	0.85±0.00 <sup>cK</sup>	1.44±0.02 <sup>dK</sup>	270.00±8.08
H	0.12±0.00 <sup>aE</sup>	0.23±0.00 <sup>bE</sup>	0.40±0.00 <sup>cG</sup>	0.70±0.00 <sup>dG</sup>	684.83±12.82
I	0.11±0.00 <sup>aC</sup>	0.18±0.00 <sup>bC</sup>	0.05±0.00 <sup>cA</sup>	0.50±0.01 <sup>dD</sup>	940.00±38.44
J	0.21±0.01 <sup>aG</sup>	0.53±0.01 <sup>bI</sup>	0.80±0.01 <sup>cJ</sup>	1.36±0.04 <sup>dJ</sup>	230.70±4.32
K	0.09±0.00 <sup>aB</sup>	0.14±0.00 <sup>bB</sup>	0.22±0.00 <sup>cC</sup>	0.37±0.00 <sup>dB</sup>	1000 <

Refer to the sample code in Table 21.

Each value represents mean±SD, n=3.

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-I) are significantly different at  $p < 0.05$ .

또한 본 실험에 사용된 천연식물류 중 감국, 단삼 및 뽕잎의 환원력은 1,000 µg/mL의 농도에서 Ju JC et al(2006)이 보고한 결과에 비해 2배 이상 높았으나, 오가피는 비슷한 수준이었다.

식물류에서 환원력은 전자공여를 통한 라디칼의 소거활성과 상관성이 높은 것으로 알려져 있는데(Gordon MF, 1990), 본 실험 결과도 이와 잘 일치하였다. 환원력 측정을 통한 여러 식물체의 항산화 활성비교에서 16종의 한약재 열수 추출물(Ju JC et al, 2006), 10종의 약용식물에 대한 70% 에탄올 추출물(Joo SY, 2013)의 비교 연구가 있으나, 상황버섯 추출물의 환원력이 라디칼 소거활성과 유사한 경향으로 나타난 것은 본 연구에서 처음으로 확인된 결과라 생각된다.

#### (7) 천연식물류 열수 추출물의 Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 활성

천연식물류 열수 추출물에서 금속이온인 Fe<sup>+2</sup>에 대한 킬레이팅 활성은 Table 27에 나타낸 바와 같이 시료의 첨가 농도가 증가됨에 따라 유의적으로 상승하였다. 오가피와 감국은 EC<sub>50</sub>값이 1,000 µg/mL 이상이였으며, 그 외 9종의 시료에서 214.72~550.05 µg/mL의 범위로 구기자과 생강을 제외한 시료에서 EC<sub>50</sub>값은 500 µg/mL 이하였다. 특히 뽕잎의 킬레이팅 활성이 가장 높았으며, 다음으로 옥수수수염이었다.

Table 27. Fe<sup>+2</sup> chelating activity in the medicinal plant materials

Sample code	Concentration (µg/mL)				EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	100	250	500	1000	
A	37.54±1.92 <sup>aGH</sup>	39.53±1.90 <sup>aCD</sup>	50.66±2.16 <sup>bD</sup>	52.83±3.15 <sup>bC</sup>	550.06±59.13
B	13.93±2.11 <sup>aC</sup>	38.75±1.17 <sup>bC</sup>	64.25±2.44 <sup>cG</sup>	85.75±3.68 <sup>dG</sup>	360.94±16.35
C	9.32±1.35 <sup>aB</sup>	21.95±2.93 <sup>bB</sup>	31.58±1.44 <sup>cB</sup>	44.66±2.06 <sup>dB</sup>	1000 <
D	6.23±1.07 <sup>aA</sup>	10.47±0.22 <sup>bA</sup>	16.30±2.59 <sup>cA</sup>	23.10±2.42 <sup>dA</sup>	1000 <
E	36.57±1.26 <sup>aG</sup>	42.15±1.34 <sup>bDE</sup>	55.13±3.62 <sup>cE</sup>	68.19±3.49 <sup>dE</sup>	407.91±47.92
F	27.50±0.95 <sup>aF</sup>	44.42±1.12 <sup>bE</sup>	68.47±2.61 <sup>cH</sup>	89.97±3.10 <sup>dGH</sup>	308.03±10.57
G	19.96±1.87 <sup>aE</sup>	38.07±3.22 <sup>bC</sup>	56.40±1.45 <sup>cE</sup>	74.00±5.11 <sup>dF</sup>	411.79±25.91
H	25.00±1.54 <sup>aF</sup>	57.71±1.52 <sup>bG</sup>	87.93±1.53 <sup>cJ</sup>	94.87±2.23 <sup>dI</sup>	214.72±6.16
I	25.54±0.73 <sup>aF</sup>	39.25±3.81 <sup>bCD</sup>	46.82±0.90 <sup>cC</sup>	91.11±1.44 <sup>dHI</sup>	535.68±8.31
J	17.29±2.43 <sup>aD</sup>	37.57±0.76 <sup>bC</sup>	74.14±1.68 <sup>cI</sup>	87.75±3.30 <sup>dGH</sup>	335.03±5.82
K	39.11±2.24 <sup>aH</sup>	51.72±2.57 <sup>bF</sup>	60.25±1.57 <sup>cF</sup>	62.34±3.81 <sup>cD</sup>	235.50±36.37

Refer to the sample code in Table 21.

Each value represents mean±SD, n=3.

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-I) are significantly different at  $p < 0.05$ .

본 실험에서 사용한 11종 천연식물류는 라디칼 소거활성과 환원력이 비슷한 경향을 보였는데, Fe<sup>+2</sup>킬레이팅 활성은 다소 상이한 양상으로 특히 옥수수수염의 경우 라디칼 소거활성은 낮았으나 Fe<sup>+2</sup>킬레이팅 활성은 타 시료에 비해 유의적으로 높았다.

개똥쑥 추출물은 ABTS 및 NO 라디칼 소거활성이 높았으며(Ryu JH et al, 2011b), Gordon MF, 1990), 마가렛, 국화 및 낙동구절초 추출물은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성이 높아 시료 중의 총 페놀 함량과 비례적이었으나(Woo JH et al, 2010a), 이들 시료는 모두 Fe<sup>+2</sup>킬레이팅 활성이 낮은 것으로 보고된 바 있다(Ryu JH et al, 2011b; Woo JH et al, 2010a). 이처럼 라디칼 소거활성과 Fe<sup>+2</sup>킬레이팅 활성은 서로 상반된 결과를 나타내기도 하는데, 이러한 현상은 식물류의 성분 중 금속이온의 제거와 라디칼 소거에 관여하는 물질의 종류가 상이하거나(Seo SJ et al, 2008) 시료 중 금속이온을 포집할 수 있는 물질의 함량이 낮기 때문이라고 추정되고 있다(Woo JH et al, 2010a). 본 실험에서도 황금, 상황버섯은 라디칼 소거활성은 우수한 반면, Fe<sup>2+</sup>킬레이팅 활성에서 EC<sub>50</sub>값이 335.03, 360.94 µg/ml로 라디칼 소거활성이 낮았던 옥수수수염 및 뽕잎에 비해 활성이 낮게 측정되어 라디칼 소거활성과 Fe<sup>+2</sup>킬레이팅 활성간의 상관관계가 작다는 상기의 보고[(Ryu JH et al, 2011b; Seo SJ et al, 2008; Woo JH et al, 2010a)]와 유사한 결과

였다.

이상의 보고들에서와 같이 시료의 환원력만으로  $Fe^{+2}$ 킬레이팅 활성 정도를 평가할 수는 없으며(Chu YH et al, 2000), 시료의 라디칼 소거활성에 관여하는 유효물질의 대부분이 페놀화합물 및 플라보노이드 성분이라고 보고(Ju JC et al, 2006; Park HJ et al, 2012)로 미루어 볼 때 본 연구에서  $Fe^{+2}$ 킬레이팅 활성과 라디칼 소거활성의 동시 분석은 시료의 라디칼 소거활성에 관여하는 다른 phytochemicals의 존재를 짐작케하는 결과로써 가치가 있다고 판단된다.

#### (8) 천연식물류 열수 추출물이 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향

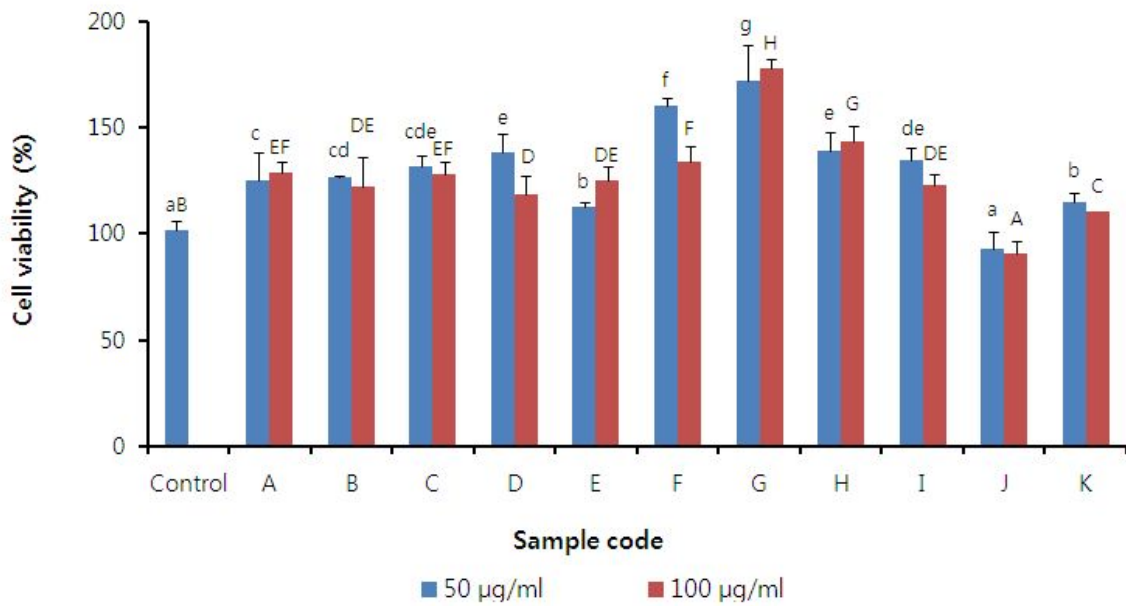
마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용한 면역활성 평가에 앞서 천연식물류 추출물의 세포 독성을 확인하기 위하여 시료 자체의 세포독성 및 LPS를 병용 처리하였을 때 MTT assay를 수행한 결과는 Fig. 42에 나타내었다.

시료 자체의 세포독성 결과(Fig. 42A)에 기초하여 LPS로 산화적 스트레스를 유발한 후 천연식물류 추출물을 50  $\mu$ g/mL 농도로 처리하였을 때 대부분의 시료에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였으나, 오가피에서 세포 생존율은 72.97%로 다소간의 세포 독성이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 42B). 시료 추출물을 100  $\mu$ g/mL 처리구에서는 황금, 오가피, 생강, 상황버섯 및 옥수수수염에서 세포 생존율이 80% 이하였으나, 오가피(71.76%)를 제외한 황금, 생강, 상황버섯 및 옥수수수염의 세포 생존율이 77.53~79.93%의 범위로 100  $\mu$ g/mL의 시료 처리구에서도 천연식물류에 대한 세포 독성이 그다지 높지는 않은 것으로 확인되었다.

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후 천연식물류 추출물을 첨가하였을 때 NO 생성에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 43과 같다. LPS 무처리구에 비해 LPS 처리 후 NO 생성량은 12배 증가되었으며, 11종의 천연식물류 추출물을 50 및 100  $\mu$ g/mL 첨가시 NO 생성량은 12.89~26.18  $\mu$ M, 6.86~26.11  $\mu$ M로 산약 및 옥수수수염을 제외한 시료에서 LPS 처리구보다 낮은 함량이었다. 특히 100  $\mu$ g/mL의 황금 및 감국의 처리는 LPS 처리구에 비해 각각 72% 및 58.6%, 황금(50  $\mu$ g/mL) 및 상황버섯(50 및 100 $\mu$ g/mL)은 각각 47.3% 및 32.0~36.4%로 LPS 처리구에 비해 유의적으로 NO 생성을 감소시켰다( $p < 0.05$ ).

NO는 산화적 스트레스 상태에서 증가되는 물질로(Yun HY et al, 1996), RAW264.7 세포에 LPS 처리로 증가된 NO의 함량은 천연식물류 추출물의 처리로 감소되었는데, 특히 황금과 상황버섯의 활성이 가장 우수하였다. 황금은 flavonoid류인 baicalin, baicalein, wogonin 및 skullcapflavone 등을 함유하고 있으며, 이들 성분들에 의한 항염증 및 항산화 작용이 보고되어 있다(Chi TS et al, 2003; Gao D et al, 1998). 이들 물질 중 baicalin, baicalein은 화학적 구조 중 *O*-di-hydroxyl기를 가지므로 wogonin보다 활성이 높으며, 이는 DPPH 라디칼 소거와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Gao Z et al, 1999).

(A)



(B)

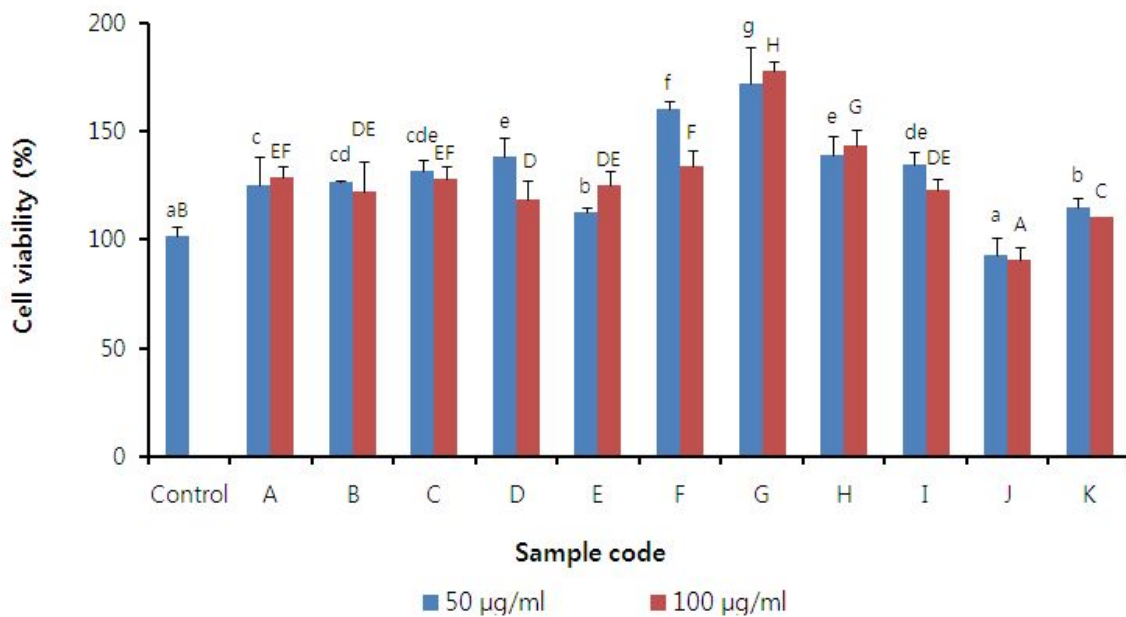


Fig. 42. Effects of the medicinal plant materials on cell viability of RAW 264.7 macrophages without(A) and with(B) LPS.

Refer to the sample code in Table 21.

Results are presented as mean±SD of three independent experiments.

<sup>a-g</sup>Values with different letters in the each bars are significantly different among control and 50 µg/mL sample treated group at  $p < 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

<sup>A-G</sup>Values with different letters in the each bars are significantly different among control and 100 µg/mL sample treated group at  $p < 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

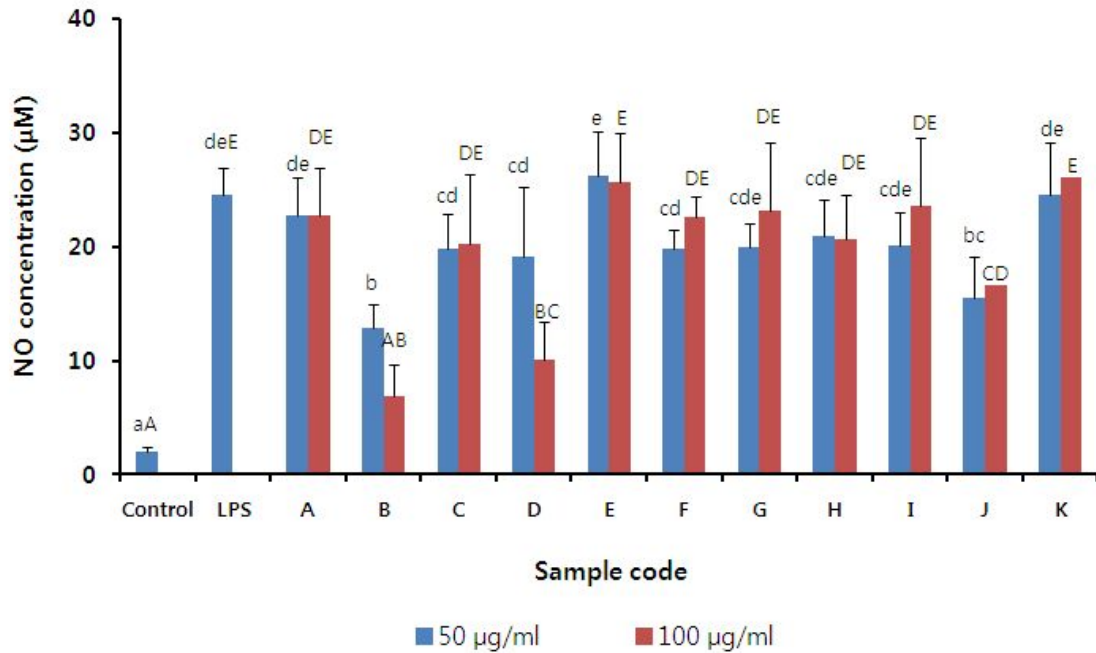


Fig. 43. Effects of the medicinal plant materials on NO synthesis in LPS-induced RAW264.7 macrophages.

Refer to the sample code in Table 21.

Results are presented as mean±SD of three independent experiments.

<sup>a-e</sup>Values with different letters in the each bars are significantly different among control and 50 µg/mL sample treated group at  $p < 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

<sup>A-E</sup>Values with different letters in the each bars are significantly different among control and 100 µg/mL sample treated group at  $p < 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

2%의 상황버섯 추출물을 4~8주간 급이는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적 스트레스를 받은 림프구에서 DNA 손상에 대한 방어 효과가 29~33% 정도였다는 보고가 있다(Kim JH et al, 2008). 이는 상황버섯에서 분리한 phellinisin A가 체내에서 superoxide anion을 생성하는 xanthine oxidase의 활성을 강하게 억제한다는 보고와도 유사하며(Hwang EI et al, 2006), 생체 내 glutathione, glutathione reductase 및 GSH-px 활성을 증가시키므로써 세포 내 ROS의 생성을 억제시키게 된다고 보고되어 있다(Ye SF et al, 2007).

본 연구에서 11종의 천연식물류는 세포 독성이 낮으며, 총 페놀 화합물의 함량이 높아 항산화 활성이 높고 LPS 처리에 의한 NO 생성을 감소시켰는데, 그 중 황금, 상황버섯, 단삼, 뽕잎, 작약 등 5종의 활성이 전반적으로 우수하여 항산화 및 면역 증강용 기능성 음료 제조를 위한 부재료로써 이들을 선별하는 것이 적절하리라 판단된다.



## 10) 선정된 천연식물류 5종 및 혼합물의 영양성분 분석

### (1) 유리당 함량

상황버섯, 황금, 단삼, 뽕잎 및 작약 추출물 중의 유리당 함량을 분석한 결과는 Table 28과 같으며, 이들 5종의 천연식물류 추출물 동량 혼합물(MHE-1)과 원재료를 수율이 동일하도록 혼합한 후 추출한 추출물(MHE-2) 중의 유리당 함량을 함께 분석하였다.

황금, 단삼, 뽕잎, 작약 추출물에서 fructose, glucose 및 sucrose가 검출되었으며, 상황버섯 추출물에서는 sucrose가 검출되지 않았다. 그러나 상황버섯 추출물에서 fructose와 glucose는 각각 34.86 g/100 g 및 31.33 g/100 g으로 가장 함량이 높으며, 5종의 천연식물류 혼합물인 MHE-1, MHE-2에 비해서도 높았다. Sucrose의 함량은 작약과 황금과 작약 추출물에서 각각 42.24 g/100 g 및 41.67 g/100 g으로 여타 천연식물류 추출물에 비해 높았다. 5종의 천연식물류 혼합물의 경우 MHE-2보다는 추출물을 동량 혼합한 MHE-1에서 glucose와 sucrose의 함량이 더 높았다. 각각의 천연식물류 추출물과 천연식물류 혼합물 중의 유리당 함량에 있어 큰 차이가 없었는데, 이는 혼합되는 비율을 고려할 때 상대적인 함량이 낮았기 때문으로 생각된다.

Table 28. Free sugar contents in the medicinal plant materials

Samples	Free sugar contents (g/100 g)		
	Fructose	Glucose	Sucrose
상황버섯 ( <i>Phellinus linteus</i> )	34.86±0.62	31.33±0.17	ND*
황금 ( <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi)	21.47±0.08	27.89±0.33	41.67±2.89
단삼 ( <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge)	22.33±0.10	28.11±0.00	30.89±0.01
뽕잎 ( <i>Morus alba</i> L.)	23.19±0.06	28.63±0.04	39.10±0.03
작약 ( <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.)	24.44±0.14	29.29±0.15	42.24±0.07
MHE-1	23.55±0.12	29.65±0.06	37.06±0.58
MHE-2	23.20±0.10	28.85±0.09	33.77±0.22

ND : not detected

**Extract MHE-1** is mixed by same weight from each hot water extracts of *Phellinus linteus*, *Scutellaria baicalensis*, *Salvia miltiorrhiza*, *Morus alba*, and *Paeonia lactiflora*

**Extract MHE-2** is extracted with hot water of mixture by 100 g, 13.5 g, 13.4 g, 21.2 g and 37.6 g for *Phellinus linteus*, *Scutellaria baicalensis*, *Salvia miltiorrhiza*, *Morus alba*, and *Paeonia lactiflora*

### (2) 유기산 함량

상황버섯, 황금, 단삼, 뽕잎 및 작약 추출물의 유기산 함량을 분석하고, 이들 천연식물류 5종의 추출물 동량 혼합물(MHE-1)과 추출전 혼합 추출물(MHE-2) 중의 유기산 함량을 분석한 결

과는 Table 29와 같다. 유기산은 추출물에 따라 차이를 보였는데, 천연식물류 중 뽕잎 추출물의 총 유기산 함량이 8938.7 mg/L로 가장 높았고, 다음으로 작약 추출물이 5671.5 mg/L 였다.

Table 29. Organic acid contents in the medicinal plant materials

Organic acids	(mg/L)						
	상황버섯 ( <i>Phellinus linteus</i> )	황금 ( <i>Scutellaria baicalensis Georgi</i> )	단삼 ( <i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i> )	뽕잎 ( <i>Morus alba</i> L.)	작약 ( <i>Paeonia lactiflora Pall.</i> )	MHE-1	MHE-2
Oxalic acid	1213.4	318.0	1925.4	351.7	1580.6	1128.7	368.9
Maleic acid	ND	54.8	ND	ND	ND	ND	ND
Tartaric acid	ND	174.3	91.7	21.8	18.2	38.7	65.9
Citric acid	239.7	1384.8	1190.8	2645.2	3312.3	1807.7	1594.2
Malic acid	575.5	640.3	1260.7	3950.8	660.7	1447.1	1186.7
Glycolic acid	78.5	20.4	ND	41.6	ND	34.0	37.4
Formic acid	ND	21.4	30.5	88.4	ND	ND	68.8
Lactic acid	200.6	41.6	ND	ND	ND	45.7	31.9
Acetic acid	49.3	43.1	64.8	499.0	99.7	138.6	155.8
Succinic acid	27.7	ND*	83.6	178.7	ND	61.5	48.6
Fumaric acid	43.7	ND	ND	1161.5	ND	231.5	164.8
Total	2428.4	2698.6	4647.5	8938.7	5671.5	4933.7	3723.0

ND : not detected

Sample code refer to the foot note of Table 28.

유기산 중 oxalic acid, citric acid, malic acid, acetic acid의 경우 모든 추출물에서 검출되었는데, oxalic acid의 함량은 단삼 추출물에서 가장 많았고, citric acid의 함량은 작약 추출물에서 가장 많았다. Malic acid와 acetic acid의 함량은 뽕잎 추출물에서 가장 많았다. Maleic acid의 경우 황금 추출물에서만 검출되었으며, lactic acid는 상황버섯 추출물에서 가장 많은 함량이었고, fumaric acid는 뽕잎 추출물에서 가장 많았다.

5종의 천연식물류 혼합물의 총 유기산 함량은 MHE-1은 4933.7 mg/L이었고, MHE-2는 3723.0 mg/L였다. 혼합물 중의 유기산 중 oxalic acid, citric acid 및 malic acid의 함량이 대체적으로 높게 검출되었으며, formic acid의 경우 혼합물 중 MHE-2에서만 검출되었다. Oxalic acid, citric acid 및 malic acid의 함량은 각각의 한약재를 추출하여 동량 혼합할 때(MHE-1) 더 높은 것으로 나타났다.

### (3) 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량

천연식물류 5종의 혼합조건에 따른 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 30과 같다. 총 페놀 함량은  $131.35 \pm 9.64$  mg/g로 MHE-2가 더 높게 나타났으며, 플라보노이드 함량 역시  $28.77 \pm 1.52$  mg/g로 MHE-1보다 MHE-2가 유의적으로 높은 결과를 보였다.

Table 30. Total phenol and flavonoids contents in different condition for mixture of 5 kinds of medicinal plants

(mg/g dried extract)

Sample code	Total phenol	Flavonoids
MHE-1	$109.82 \pm 1.71$	$20.29 \pm 1.34$
MHE-2	$131.36 \pm 9.64^*$	$28.77 \pm 1.52^*$

Sample code refer to the foot note of Table 28

Each value represents mean $\pm$ SD (n=3)

\*This superscripts are significantly different among the different sample by Student t-test at  $p < 0.05$ .

## 11) 선정된 천연식물류 5종의 혼합조건에 따른 생리활성 비교

항산화 및 면역활성 측정을 통해 선별된 5종의 천연식물류(상항버섯, 황금, 단삼, 뽕잎 및 작약)의 혼합물(MHE-1, 5종의 천연식물류를 각각 추출한 후 얻은 추출물 건조물을 동량으로 혼합; MHE-2, 5종 천연식물류의 각 추출수율을 고려한 배합조건으로 혼합하여 추출)의 생리활성을 비교하였다.

### (1) $\alpha$ -Glucosidase 저해활성

$\alpha$ -Glucosidase는 소장 상피세포의 brush-border membrane에 존재하는 효소로서 소장에서 음식물 중의 전분을 포도당과 같은 단당으로 분해하여 흡수시킨다. 즉  $\alpha$ -Glucosidase의 저해는 당질의 가수분해와 흡수를 지연시킴으로 식후 혈당 상승을 제한할 수 있다(Kim MJ et al, 2006).

황금, 작약, 단삼, 뽕잎, 상항버섯을 각각 추출하여 동량으로 혼합한 군(MHE-1)과 이들 5종의 천연식물을 추출전에 혼합하여 추출한 군(MHE-2)의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정한 결과는 Table 31과 같다. 250, 500, 1000, 2000 및 5000  $\mu$ g/mL 농도로 처리한 결과, 모든 시료에서 농도가 증가함에 따라 그 활성이 증가하는 경향이였다. 1000  $\mu$ g/mL 농도에서 MHE-1은 36.99% 인데 비해 MHE-2는 51.98%로 더 높았다. MHE-2는 2000  $\mu$ g/mL 농도에서 70% 이상의 저해활성을 나타낸 반면, MHE-1은 5000  $\mu$ g/mL 농도에서 70% 이상이었다.

Ji ST et al(2002)는 작약 용매분획물의  $\alpha$ -Glucosidase 저해능을 측정한 결과, 20  $\mu$ g/mL 농

도에서 에틸아세테이트 추출물이 77~85%의 높은 활성을 나타내는 것으로 보고하였다. Park et al(2004)는 뽕잎에는  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성을 갖는  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)와 1-deoxynojirimycin(DNJ)이 함유되어 있어 이들 성분에 의해 강력한 혈당강화 효과가 나타나는 것으로 보고하였다. 또 Cho HS et al(2010)는 상황버섯 열수 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 저해능 측정결과, 3000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 약 50% 정도의 활성을 나타낸 것으로 보고하였다.

Table 31.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition activity in different condition for mixture of 5 kinds of medicinal plants

Sample code	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	250	500	1000	2000	5000
MHE-1	27.83 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	32.39 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	36.99 $\pm$ 1.20 <sup>c</sup>	56.49 $\pm$ 2.24 <sup>d</sup>	71.33 $\pm$ 1.01 <sup>e</sup>
MHE-2	27.70 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	40.34 $\pm$ 2.40 <sup>b</sup>	51.98 $\pm$ 0.86 <sup>c</sup>	72.11 $\pm$ 1.73 <sup>d</sup>	84.64 $\pm$ 2.45 <sup>e</sup>

(%)

Sample code refer to the foot note of Table 28

Each value represents mean $\pm$ SD (n=5)

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

## (2) Xanthine oxidase 저해활성

XO는 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine의 산소를 떼어내면서 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 생성하게 되고, 나머지 골격이 uric acid를 형성하여 혈장 내에 과량 존재하게 되면 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍과, 신장에 침착되어 신장질환을 일으키는 효소로 알려져 있으며 일종의 항산화 활성을 측정하는 방법으로도 사용되고 있다(Cho HE et al, 2010).

5종의 한약재 추출물 MHE-1 및 MHE-2의 XO 저해 활성을 측정한 결과(Table 32), 시료의 농도가 증가할수록 그 활성 또한 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 250~1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 MHE-1과 MHE-2 시료군 모두 50% 미만이었으며, 2000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 60% 이상이었으나, 시료간에 큰 차이가 없었다. 5000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 MHE-1군이 93.40%로 MHE-2보다 높게 나타났다.

건조뽕잎과 발효뽕잎 추출물의 XO 저해능 측정 결과, 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 각각 51.82% 및 46.36%의 저해능을 가진다고 보고되어 있다(Lee SI et al, 2012). 단삼, 두충 및 진피 중에서는 단삼이 79.3%로 XO 저해활성이 가장 높았다고 보고되어 있다(Kim SH & Kim IC, 2008).

Cho YC et al(1993)은 XO의 저해물질로 다양한 탄닌류 및 관련 페놀성 물질이라 보고하였으며, 그 중 플라보노이드류는 hydroxy기의 수와 위치에 따라 각종 효소의 저해효과가 다르게 나타나는 것으로 보고되어 있다(An BJ et al, 1998). 황금의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측

정한 결과, 각각 103.53 mg/g 및 101.98 mg/g이었으며(Joo SY, 2013), 단삼의 페놀함량은 414 mg/g으로 16종의 약용식물 중 가장 높았으며(Ju JC et al, 2006), 상황버섯 에탄올 추출물의 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 432.42 mg/g 및 42.61 mg/g이었다는 보고가 있다(Kim JO et al, 2008). 이러한 보고들을 토대로 본 실험의 천연식물류 혼합물 중에는 XO의 억제 메커니즘에 작용하는 또 페놀성 화합물들이 다량 존재하는 것으로 추정되며, 이러한 물질의 상호작용에 의한 상승효과라 생각된다.

Table 32. Xanthine oxidase inhibition activity in different condition for mixture of 5 kinds of medicinal plants

Sample code	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	250	500	1000	2000	5000
MHE-1	8.57 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	17.38 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>	29.79 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	64.04 $\pm$ 1.95 <sup>d</sup>	93.40 $\pm$ 2.45 <sup>e</sup>
MHE-2	10.57 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	20.07 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	30.38 $\pm$ 0.70 <sup>c</sup>	64.75 $\pm$ 0.25 <sup>d</sup>	87.66 $\pm$ 0.21 <sup>e</sup>

Sample code refer to the foot note of Table 28

Each value represents mean $\pm$ SD (n=5)

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

### (3) DPPH 라디칼 소거활성

천연식물류 5종의 혼합조건에 따른 DPPH 라디칼 소거활성의 결과는 Table 33과 같다.

Table 33. DPPH radical scavenging activity in different condition for mixture of 5 kinds of medicinal plants

Sample code	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	25	50	100	250	500	1000
MHE-1	37.79 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	51.43 $\pm$ 2.69 <sup>b</sup>	68.07 $\pm$ 4.08 <sup>c</sup>	87.64 $\pm$ 1.42 <sup>d</sup>	89.71 $\pm$ 1.91 <sup>dNS</sup>	90.36 $\pm$ 0.89 <sup>d</sup>
MHE-2	40.29 $\pm$ 1.25 <sup>a*</sup>	56.47 $\pm$ 2.44 <sup>b*</sup>	76.18 $\pm$ 3.63 <sup>c*</sup>	91.18 $\pm$ 0.64 <sup>d*</sup>	91.55 $\pm$ 1.21 <sup>d</sup>	92.50 $\pm$ 0.62 <sup>d*</sup>

Sample code refer to the foot note of Table 28

Each value represents mean $\pm$ SD (n=3)

NS: not significant

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

\*This superscripts are significantly different among the different sample by Student t-test at  $p<0.05$ .

25~1000 µg/mL의 농도 범위에서 두 시료 모두 농도가 증가됨에 따라 DPPH 라디칼 소거활성이 유의적으로 높아졌다. 그러나 두 시료 모두 250 µg/mL의 이상의 농도에서는 시료의 농도가 1000 µg/mL까지 증가하여도 활성에는 유의적인 차이가 없었다.

MHE-1와 MHE-2를 비교해봤을 때 모든 농도에서 MHE-1보다 MHE-2가 더 높은 소거활성을 보였으며, 500 µg/mL의 농도에서는 그 차이가 적어 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 본 연구 결과 천연식물류를 각각 추출하여 혼합한 시료보다 천연식물류를 모두 섞어서 추출한 시료에서 DPPH 라디칼 소거활성이 높은 것으로 나타났다. 이는 천연식물류의 항산화 효과는 추출 조건에 따라 달라질 수 있으며, 실험에 쓰인 시료의 항산화 기능성이 높은 것으로 사료된다.

#### (4) ABTS 라디칼 소거활성

천연식물류 5종 혼합물에 대한 ABTS 라디칼 소거활성은 Table 34와 같다. MHE-1의 라디칼 소거능은 17.39~98.35%이었고, MHE-2는 28.18~99.55%이었다. 25~250 µg/mL 농도에서 혼합하여 추출한 추출물인 MHE-2가 각각 추출하여 혼합한 MHE-1보다 활성이 더 뛰어나다는 것을 알 수 있었다. 하지만 500 µg/mL 이상에서는 두 추출물 간의 유의차는 없었다.

Table 34. ABTS radical scavenging activity in different condition for mixture of 5 kinds of medicinal plants

Sample code	Concentration (µg/mL)					
	25	50	100	250	500	1000
MHE-1	17.39±1.41 <sup>a</sup>	27.53±1.54 <sup>b</sup>	40.08±1.30 <sup>c</sup>	82.18±0.88 <sup>d</sup>	97.64±0.68 <sup>eNS</sup>	98.35±0.86 <sup>eNS</sup>
MHE-2	28.18±3.74 <sup>a*</sup>	31.91±2.53 <sup>b*</sup>	50.60±1.27 <sup>c*</sup>	95.26±2.04 <sup>d*</sup>	97.87±1.14 <sup>de</sup>	99.55±0.29 <sup>e</sup>

Sample code refer to the foot note of Table 28

Each value represents mean±SD (n=3)

NS: not significant

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

\*This superscripts are significantly different among the different sample by Student t-test at  $p<0.05$ .

#### (5) Superoxide anion 라디칼 소거활성

천연식물류 5종 혼합물에 대한 superoxide anion 라디칼 소거활성은 Table 35와 같다. MHE-1, MHE-2 추출물 모두 농도가 증가할수록 유의적으로 증가하였다. 하지만 저농도인 25 µg/mL에서는 라디칼 소거활성이 나타나지 않았다. 1000 µg/mL의 농도에서 MHE-1은 68.91%이었지만, MHE-2는 94.61%의 소거활성을 보였는데, superoxide anion 라디칼 소거활성 또한 MHE-1 추출물보다 MHE-2 추출물의 활성이 더 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

Table 35. Superoxide anion radical scavenging activity in different condition for mixture of 5 kinds of medicinal plants

(%)

Sample code	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	25	50	100	250	500	1000
MHE-1	-	1.68 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	11.09 $\pm$ 1.59 <sup>bNS</sup>	28.53 $\pm$ 3.40 <sup>c</sup>	52.10 $\pm$ 3.06 <sup>d</sup>	68.91 $\pm$ 3.32 <sup>e</sup>
MHE-2	-	7.48 $\pm$ 1.60 <sup>a*</sup>	13.03 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup>	48.90 $\pm$ 4.21 <sup>c*</sup>	70.04 $\pm$ 3.26 <sup>d*</sup>	94.61 $\pm$ 4.79 <sup>e*</sup>

Sample code refer to the foot note of Table 28

Each value represents mean $\pm$ SD (n=3)

NS: not significant

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

\*This superscripts are significantly different among the different sample by Student t-test at  $p < 0.05$ .

#### (6) Fe<sup>+2</sup> 킬레이팅 소거활성

추출물 MHE-1, MHE-2의 Fe<sup>+2</sup>킬레이팅 소거활성을 나타낸 결과는 Table 36과 같다. 농도가 증가함에 따라 추출물 MHE-1, MHE-2의 Fe<sup>+2</sup>킬레이팅 소거활성은 의존적으로 높아졌으며, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 추출물 간의 유의적인 차이는 없었다. 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도에서는 MHE-2의 활성이 더 높았으나, 그 이상의 고농도에서는 MHE-1의 활성이 유의적으로 더 높아 시료의 농도도 생리활성의 발현에 영향을 미치는 주요 인자임을 알 수 있었다.

Table 36. Fe<sup>+2</sup> chelating activity in different condition for mixture of 5 kinds of medicinal plants

(%)

Sample code	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	25	50	100	250	500	1000
MHE-1	-	11.25 $\pm$ 1.74 <sup>aNS</sup>	21.10 $\pm$ 1.61 <sup>b</sup>	62.93 $\pm$ 2.46 <sup>c*</sup>	86.43 $\pm$ 1.02 <sup>d*</sup>	95.70 $\pm$ 1.10 <sup>e*</sup>
MHE-2	-	12.99 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>	24.35 $\pm$ 2.82 <sup>b*</sup>	53.49 $\pm$ 1.96 <sup>c</sup>	77.05 $\pm$ 2.40 <sup>d</sup>	89.92 $\pm$ 1.65 <sup>e</sup>

Sample code refer to the foot note of Table 28

Each value represents mean $\pm$ SD (n=3)

NS: not significant

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

\*This superscripts are significantly different among the different sample by Student t-test at  $p < 0.05$ .

(8) 환원력

추출물 MHE-1, MHE-2의 환원력을 나타낸 결과는 Table 37과 같다. 두 가지 추출물은 농도가 높아짐에 따라 환원력 또한 높아졌으며, 25~50 µg/mL의 농도에서 추출물 사이에 유의적인 차이는 없었고, 100~1000 µg/mL의 농도에서 추출물 MHE-2는 추출물 MHE-1보다 높은 환원력을 나타내었다.

Joo SY(2013)는 1 mg/mL의 농도에서 황금 추출물이 1.69의 흡광도를 나타낸다고 보고한 바 있으며, 본 실험에서 다른 식물체와 혼합하여 추출했을 때 환원력은 높게 나타났다. 여러 천연 식물류를 각각 추출하는 것보다 함께 추출하여 사용함으로써 천연식물류간의 시너지 효과를 만들어 항산화 활성이 높은 것으로 보인다.

Table 37. Reducing power in different condition for mixture of 5 kinds of medicinal plants (Absorbance value at 700 nm)

Sample code	Concentration (µg/mL)					
	25	50	100	250	500	1000
MHE-1	0.087 ±0.004 <sup>aNS</sup>	0.115 ±0.006 <sup>bNS</sup>	0.162 ±0.002 <sup>c</sup>	0.325 ±0.004 <sup>d</sup>	0.581 ±0.007 <sup>e</sup>	1.038 ±0.014 <sup>f</sup>
MHE-2	0.087 ±0.001 <sup>a</sup>	0.120 ±0.001 <sup>b</sup>	0.179 ±0.005 <sup>c*</sup>	0.363 ±0.006 <sup>d*</sup>	0.599 ±0.004 <sup>e*</sup>	1.107 ±0.022 <sup>f*</sup>

Sample code refer to the foot note of Table 28

Each value represents mean±SD (n=3)

NS: not significant

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

12) 선정된 천연식물류 5종의 혼합조건에 따른 RAW 264.7 대식세포에 대한 염증 활성 측정

(1) 세포 생존율

CCK assay를 이용하여 RAW 264.7 대식세포에서 5종의 한약재 추출물 MHE-1 및 MHE-2의 세포독성을 확인하였다. MHE-1 및 MHE-2를 농도별(0, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 µg/mL)로 처리한 결과(Fig. 44), 50 µg/mL 농도에서는 대조군과 비교하여 100% 이상의 생존율을 보여 어떠한 독성도 없는 것으로 확인되었으며, 100 µg/mL 농도로 처리시에는 84~91% 범위의 생존율을 나타내었다. 500 µg/mL와 1000 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 62~73% 범위의 생존율을 보였고, 5000 µg/mL로 처리시에는 60% 미만이었다. 최고농도인 10000 µg/mL로 처리시 50% 미만으로 생존율이 크게 감소하였다.



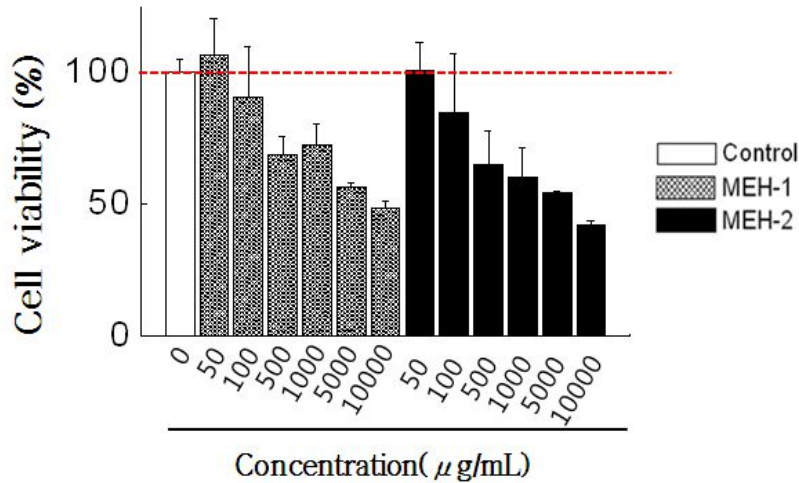


Fig. 44. Effect of medicinal plant extracts on cell viability in RAW 264.7 cells.

Sample code refer to the foot note of Table 28

MEH-1 and MEH-2 were treated with various concentrations in RAW 264.7 cells for 24 hr. Each value represents the mean±SD of determinations made in triplicate experiments.

## (2) NO 함량

NO는 NO 합성효소에 의해 생성되는 무기 유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 생물학적인 과정에 관여하며 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다(Kim JY et al, 2004). 특히 NO는 염증 유발에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Weisz A et al, 1996), 매우 불안정하여 NO<sup>2-</sup>의 형태로 바로 전환되기 때문에 NO<sup>2-</sup>의 형태로 Griess 시약을 이용하여 NO의 농도를 정량할 수 있다(Lee MH et al, 2007).

RAW 264.7 세포에 LPS(1 μg/mL)를 처리 하였을 때, 생성된 NO의 함량은 78.86 μM로 무처리군에 비해 약 10배 정도 증가하였다(Fig. 45). 그러나 100, 500, 1000 μg/mL 농도의 MHE-1 과 MHE-2를 처리 시 LPS 처리군에 비해 농도 의존적으로 NO의 양이 감소되었다. 500 μg/mL 농도로 처리시 MHE-1과 MHE-2 모두 NO의 생성을 약 50% 정도 감소시켰다.

Yoon SB et al(2011)은 RAW 264.7 세포주에 대하여 황금 추출물의 NO 생성 저해효과를 측정한 결과, 농도 의존적으로 NO의 생성이 감소되었으며, 작약 에틸아세테이트 추출물의 경우 100 μg/mL의 농도에서 LPS 처리군에 비해 50% 이상의 NO 생성 억제 효과를 보였으며(Im DY & Lee KI, 2012), 단삼의 메탄올 추출물도 LPS로부터 유도된 NO의 생성에 상당한 억제효과를 보였는데, 특히 300 μg/mL에서 90% 이상의 억제 활성을 나타낸 것으로 보고되어 있다(Yun HJ et al, 2007).

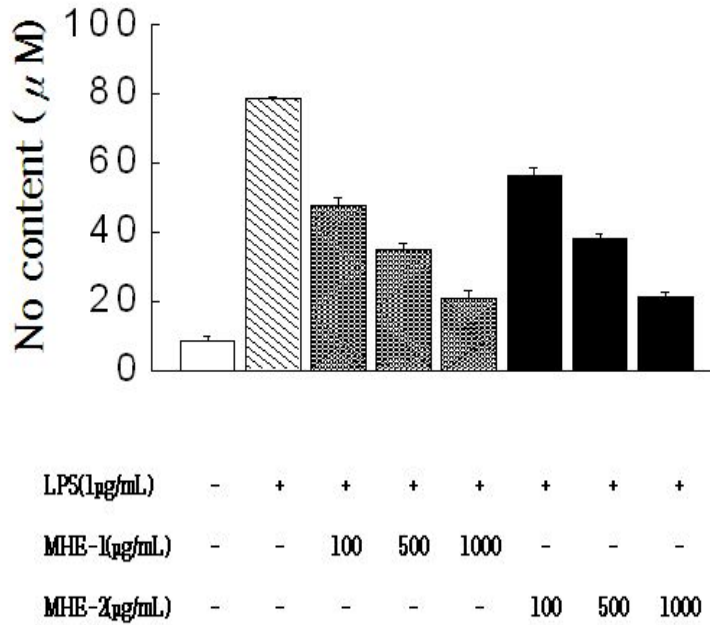


Fig. 45. Effect of medicinal plant extracts on NO production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7( $2 \times 10^5$  cells/mL) were pre-treated for 2 h with the induced MEH-1 and MEH-2(100, 500, 1000 µg/mL) before being stimulated with LPS(1 µg/mL) for 24 h. Each value represents the mean±SD of determinations made in triplicate experiments.

Sample code refer to the foot note of Table 28

### (3) PGE<sub>2</sub> 함량

PGE<sub>2</sub>는 세포의 분열이나 증식을 조절함으로써 각종 인체 질병과 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되어 있다. 특히 염증반응을 유도하는 중요한 인자로서 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase(COX)의 작용에 의해 합성되어진다. MHE-1과 MHE-2을 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리 후 PGE<sub>2</sub>의 농도를 측정된 결과는 Fig. 46에 나타내었다. LPS로 활성화된 처리군의 PGE<sub>2</sub> 생성량은 755.54 pg/mL 수준으로 증가하였으며, MHE-1과 MHE-2를 각각 100, 500, 1000 µg/mL 농도로 처리하였을 때 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다. 100 µg/mL 농도에서 MHE-1과 MHE-2는 각각 646 pg/mL 및 673 pg/mL, 500 µg/mL 농도에서는 각각 400 pg/mL 및 465 pg/mL로 정량되었다.

Kim YJ & Son DY(2012)은 산양삼 추출물의 LPS로 부터 유도된 PGE<sub>2</sub> 생성 억제효과를 측정 한 결과, 염증이 유도된 세포에서 983.4 pg/mL로 증가하였으나 100 µg/mL 농도의 산양삼 추출물을 처리시 정상군과 유사한 수준을 나타낸 것으로 보고하였다. Pang L & Hoult JRS(1997)은 PGE<sub>2</sub> 생성 억제제 COX-2 효소의 발현억제 및 NO의 생성억제를 통해 조절되는 것으로 보고하였으며, 배암차즈기 잎 추출물의 PGE<sub>2</sub> 저해효과 또한 NO의 생성량이 감소함에 따라 동일한 경향으로 감소한다고 하였는데, 이는 본 연구 결과와도 일치하였다.

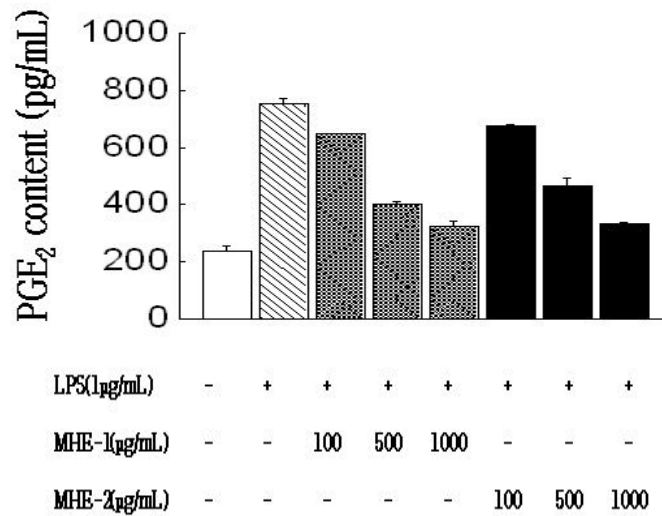


Fig. 46. Effect of medicinal plant extracts on PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells.

Sample code refer to the foot note of Table 28

RAW 264.7( $2 \times 10^5$  cells/mL) were pre-treated for 2 h with the induced MEH-1 and MEH-2(100, 500, 1000  $\mu$ g/mL) before being stimulated with LPS(1  $\mu$ g/mL) for 24 h. Each value represents the mean $\pm$ SD of determinations made in triplicate experiments.

#### (4) Cytokine 함량

Cytokine은 염증을 나타내는 중요한 지표로서 LPS 자극에 의해 염증반응이 활성화된 세포는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6와 같은 전염증성 cytokine을 생산하게 된다.

MHE-1과 MHE-2을 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리 후 cytokine 농도를 측정한 결과 (Fig. 47), LPS의 처리는 RAW 264.7 대식세포의 TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6의 생성량을 유의적으로 증가시켰다. MHE-1과 MHE-2를 농도별(100, 500, 1000  $\mu$ g/mL)로 처리하여 TNF- $\alpha$  생성량을 측정한 결과(Fig. 47A), LPS 처리군(214 pg/mL)에 비해 농도 의존적으로 TNF- $\alpha$  생성량이 감소하였다. 그러나 MHE-1과 MHE-2간에는 유의적인 차이가 없었다.

Fig. 47B는 MHE-1과 MHE-2의 IL-2 생성량을 측정한 결과로, LPS 무처리군의 IL-2 생성량은 8.7 pg/mL이었으나 LPS를 처리함으로써 76 pg/mL로 유의하게 증가되었다. RAW 264.7 cell에 MHE-1과 MHE-2 처리한 결과 농도 의존적으로 IL-2 생성량 감소하였는데, 이는 TNF- $\alpha$ 의 생성 억제효과와 같은 결과였다.

IL-6는 면역반응 및 조혈작용에 관여하는 cytokine으로서 B와 T 림프구 기능을 조절하는 급성기 반응의 유도물질이다. RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때(Fig. 47C), 앞서 IL-2의 경우와 유사하게 LPS 무처리군에 비해 IL-6의 생성량이 급격하게 증가하였으며, 100, 500, 1000  $\mu$ g/mL 농도로 MHE-1과 MHE-2를 처리한 결과 모든 시료에서 LPS 처리군에 비해 IL-6의 생성이 억제되었다.

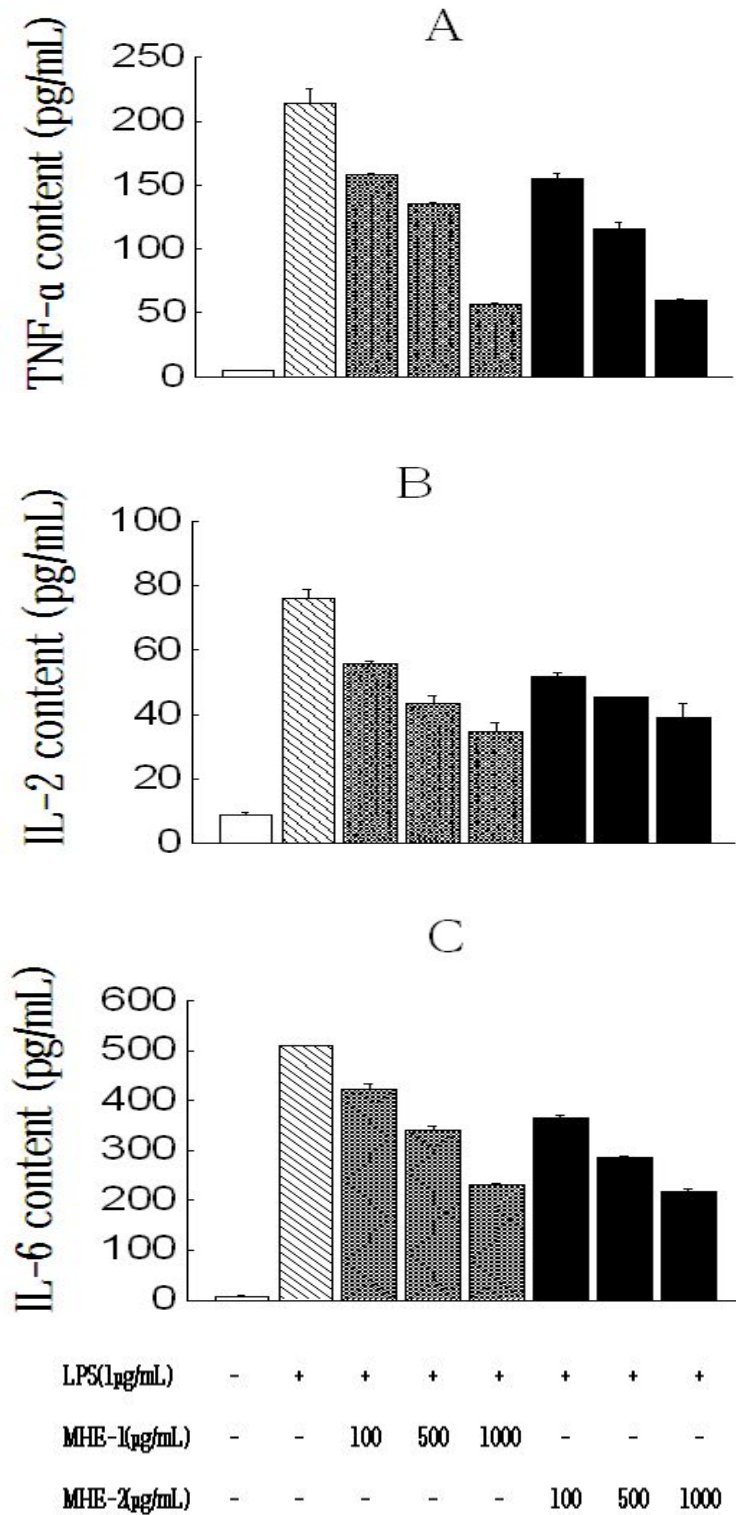


Fig. 4. Effect of medicinal plant extracts on TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 production in RAW 264.7 cells. Sample code refer to the foot note of Table 28  
 RAW 264.7( $2 \times 10^5$  cells/mL) were pre-treated for 2 h with the induced MEH-1 and MEH-2(100, 500, 1000  $\mu$ g/mL) before being stimulated with LPS(1  $\mu$ g/mL) for 24 h. Each value represents the mean $\pm$ SD of determinations made in triplicate experiments.

면역활성에 대한 결과를 요약하면, 상황버섯, 황금, 단삼, 뽕잎 및 작약을 각각 추출하여 동량씩 혼합하였을 때(MHE-1)와 추출물의 수율을 고려하여 동일한 수율을 가지도록 원재료를 혼합한 후 동시 추출하였을 때(MHE-2) 항산화 활성은 시료간에 차이를 나타내었으나, 면역 활성화와 관련된 제인자들을 분석한 결과에서는 추출 방법의 차이에 따른 활성의 차이는 없었다. 그러나, 두 시료 모두 LPS만 처리한 대조군에 비해 더 효과적으로 농도 의존적인 면역 활성을 가지고 있어 이들 추출물이 면역 활성 증강에 기여할 것으로 기대된다.

# 제 3 절 흑마늘과 쪽 혼합 면역증진용 음료의 테스트 마케팅

## (제 2협동과제)

### 1. 연구개발의 목표 및 주요 결과

#### 1) 세부과제 목표

- 흑마늘의 제조 조건의 최적화를 통한 고품질 흑마늘 생산 조건 설정 및 이에 기초한 대량 생산 공정을 확립하고자 하였음.
- 개발 기술에 기반한 상품화 추진 및 지적 재산을 확보하여 기업의 기술 경쟁력을 확보하고자 하였음.
- 1차년도에 개발된 흑마늘을 활용하여 면역증강에 효능이 있는 음료를 개발하고자 1세부과제 및 1협동 과제의 연구 결과에 기초하여 면역증진용 음료의 테스트 마케팅을 통한 최적 공정 확립 및 상품화 추진.
- 흑마늘, 쪽 및 천연식물류 추출물을 함유한 면역증진용 제품의 상품화 추진을 위한 소비자 선호도 조사, 대량 생산 공정 확립 및 국내외 시장조사 자료 확보.

#### 2) 주요내용

- 통마늘, 쪽분리 피마늘, 깎마늘로 마늘의 전처리 형태를 달리하여 고온에서 장시간 저장 및 숙성시키는 과정 중 성분의 변화를 파악하여 기존의 흑마늘 가공시 가장 적합한 가공형태를 확립하고 그 결과를 활용하여 특허출원 함.
- 국내외 흑마늘 관련연구가 아직 미흡한 실정으로 흑마늘 가공과정 중 이화학적 성분 변화와 기능성 물질의 생성 등을 분석하여 흑마늘의 최적가공 적성을 밝히고 설정된 조건에 의해 생산된 흑마늘의 상품화를 추진함.
- 흑마늘의 제조공정을 온도 변화에 따라 1회 반복 사이클을 각 단계로 하여 3회 및 최종 숙성단계인 4단계로 나누어 각 단계마다 시료를 채취하고 이화학적 성분의 변화를 비교하였음.
  - 흑마늘의 조직감은 숙성이 진행됨에 따라 수분 함량의 감소와 더불어 증가하였고, pH도 점차 산성화되어 4단계 시료에서  $4.14 \pm 0.01 \sim 4.32 \pm 0.01$ 의 범위로 산도( $2.81 \pm 0.01 \sim 3.58 \pm 0.05\%$ )와 반비례하는 경향이었음.
  - 숙성 중 당도, 총당 및 환원당 등의 탄수화물의 함량은 증가하였으며, 최종 숙성 4단계에서 유효성분의 함량이 가장 높은 통마늘로 제조한 흑마늘에서 총 페놀화합물은 약 4.6배, total pyruvate 및 thiosulfinate의 함량은 각각 2.2배 및 25.1배가 증가하였는데 연구 결과를 종합하여 볼 때 깎마늘과 쪽분리 통마늘에 비하여 통마늘에서 부드러운 조직감과 함량 보존에 용이한 경향을 나타내어 통마늘을 최적의 전처리 형태로 확정하였음.
- 흑마늘의 숙성 조건 설정에 따른 성과활용 및 향후 가공품에 적용하고자 흑마늘의 제조방법 및 이에 따라 생산된 흑마늘을 이용한 고농축액의 제조 조건을 최적화하고 특허출원하였음.

- 특허기술은 가온 및 냉각을 반복하여 흑마늘을 제조하고 이를 활용하여 저점도, 고영양 흑마늘 고농축액을 제조하기 위한 것으로 액상 추출물을 고농축하여 제조되는 제품의 경우 소비자가 원하는 농도로 조절하여 섭취할 수 있는 장점과 더불어 제품의 성분함량 대비 부피가 감소하고, 고농도로 인하여 저장기간이 더 증가한다는 장점이 있음.
- 고농축물을 제조하기 위해서 직화로 계속하여 가열할 경우 지나친 가열에 의해 휘발성 유효성분의 소실, 탄맛이나 쓴맛이 증가하고 수율이 낮음. 따라서 종래 기술의 단점을 보완하고 기호에 맞게 농도 조절하여 섭취할 수 있는 흑마늘 고농축액을 제조코져 잔사의 초미립 분말을 첨가함. 이렇게 제조한 제품은 일정량을 취하여 희석시키기에 적당한 점성이 유지되고, 수율이 높고, 영양성분이 강화된 제품, 즉 흑마늘 고농축액을 얻을 수 있음.
- ◎ 제 1협동과제의 연구성과에 기초하여 면역증강에 효능이 있는 음료를 개발하고 개발 공정을 최적화하여 발명특허를 출원하였음.
- ◎ 흑마늘과 썩은 단근신화에서부터 같이 등장하는 식품이며, 기존의 흑마늘이 중장년층 남성들이 주로 선호하였던 것에 주목하여 여성이 즐길 수 있는 흑마늘 음료를 개발하고자 하였으며, 제품명은 ‘오천년에’로 선정하였음.
- ◎ 썩추출물이 첨가된 흑마늘음료 오천년의 소비자 선호도 조사결과 맛에 대한 응답자의 78%가 긍정적인 반응을 보였으며 부정적인 반응은 22% 정도였음.
  - 오천년에는 기존의 흑마늘 음료에 비해 첨가된 썩의 향미로 인해 마늘 냄새는 감소되었으며 맛이 한층 더 부드러워져 기존 흑마늘 음료에 비해 여성들에게 선호도가 높았으며, 기존 흑마늘 음료의 주 소비층인 남성의 선호도도 높았음.
  - 제품 출시 후 시장성 조사 결과 47.6%가 구매 계획이 있으며 음료로써 만족한다는 응답을 하였으며, 24.4%는 매우 좋다고 응답해 오천년에 흑마늘 음료가 출시되면 기존의 흑마늘 음료보다 선호도가 더 높을 것으로 예견됨.
- ◎ 기술개발 결과 및 소비자 선호도 조사 결과에 기초하여 개발 제품의 시장성을 확인하고, 대량생산을 위한 제조공정을 확립하고 상품화를 위한 제품 포장 디자인을 개발하였음.
- ◎ 2차년도에 개발된 흑마늘 음료 ‘오천년에’에 1세부과제 및 1협동 과제의 연구 결과를 종합하여 흑마늘에 썩, 한약재를 혼합 추출후 최적 배합비율을 선정하여 면역증진용 흑마늘 음료 ‘오천년에 프리미엄’을 제조하고 선호도 조사를 실시하였으며 병음료의 단점을 보완하여 생산비용을 줄일수 있는 스파우트 파우치 음료로 제형을 다변화하고 제품명을 ‘오천년에 파워’로 선정하였음.
  - ‘오천년에 프리미엄’의 선호도 조사결과 40대 남성의 선호도가 높았고 시장성 조사에서 여성의 선호도가 높아 ‘오천년에 프리미엄’의 개발은 시장성이 밝다고 판단됨.
- ◎ 흑마늘 액상제품은 물류비가 높고 부피가 커 보관이 불편한 점을 개선하기 위하여 흑마늘 액상 추출물을 분말화하여 타블렛 형태로 제조하여 정제제품의 공정을 확립하고 시제품화하였으며 제품명은 ‘오천년에 파워’로 선정하였음.
  - ‘오천년에 파워’의 시제품을 제조후 액상제품과 정제제품의 선호도를 비교한 결과 액

상제품보다 정제제품이 선호도가 높아 향후 흑마늘 액상제품에서 다른 제형으로 다변화하는 것은 시장 확보에 도움이 될 것으로 판단됨.

- 흑마늘 음료 ‘오천년에’, 면역증강에 효능이 있는 ‘오천년에 프리미엄’, ‘오천년에 골드’ 및 흑마늘 타블렛 ‘오천년에 파워’ 등 4종류의 시제품에 대한 선호도 조사 후 최적 공정을 확립하였으며 이에 대한 포장 디자인을 개발하여 상품화를 추진하였음.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 마늘의 처리 형태에 따른 흑마늘의 제조조건 설정을 위한 시료의 제조

#### (1) 실험재료

본 실험에 사용된 마늘은 경남 남해군에서 재배, 수확하여 예건처리된 것을 뿌리를 절단하고 줄기는 마늘구 위쪽으로 2~3 cm 남기고 절단하여 시료로 사용하였으며, 마늘의 전처리 조건은 인편을 분리한 후 껍질을 완전히 제거한 깎마늘, 껍질은 그대로 두고 인편만을 분리한 쪽분리 피마늘, 뿌리와 줄기만 제거한 통마늘의 세 가지로 구분하여 실험에 사용하였다.

#### (2) 흑마늘의 제조 조건

상기의 실험재료를 각각 스테인레스 스틸용기에 4 kg을 담아서 뚜껑을 덮고 가열 숙성기에서 온도를 상온에서 75~95℃까지 70~75시간에 걸쳐 순차적으로 상승시키면서 숙성하는 단계(1단계), 승온 후 0~10℃까지 급속하게 냉각시켜 20~28시간동안 유지하는 단계(2단계), 1단계와 2단계를 190~210시간 동안 3회 반복(3단계)한 후 40~60℃에서 190~210시간 동안 숙성시키는 단계(4단계)를 거쳐 흑마늘을 제조한 후 각 시료는 외피를 모두 제거하여 믹서(HMF-1000, Hanil, Seoul, Korea)로 완전히 분쇄하여 폴리에틸렌 팩에 넣어 -70℃ 이하에서 보관해 두고 실험에 사용하였다.

#### (3) 시료액의 제조

각각 마쇄한 흑마늘 1 g에 탈이온수 50 mL를 가하여 1시간 동안 진탕추출한 후 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 분석용 시료 용액으로 사용하였다.

### 2) 저점도 고농축 흑마늘 진액 제조를 위한 시료의 제조

#### (1) 고농축액의 제조

가공 성상이 가장 우수한 통마늘을 숙성하여 만든 흑마늘에 4~8배의 물을 가하여 70~90℃, 22~26시간 동안 가열 또는 65~75 mmHg에서 80~100℃, 5~7시간 동안 감압 농축하여 흑마늘 추출액을 제조한 후 압착하여 착즙하고 남은 잔사는 진공 동결건조기로 완전 건조시킨다. 이것을 초미립 분쇄기로 분쇄한 후 150메쉬 이상의 체에 걸러 흑마늘 진액 농축시 25~35 brix의 농도가 되었을 때, 흑마늘 진액량 대비 10~15%의 초미립분말(중량비)을 첨가하여 60 brix로 농도 조절하여 흑마늘 고농축액을 제조하였다. 상기와 동일한 조건으로 고농축액 제조시 흑마늘 진액량 대비 8% 및 20% 중량의 초미립 분말을 첨가하여 제조한 시료와 비교분석 하였다.



### 3) 마늘의 처리 형태에 따른 흑마늘 숙성 중 특성변화

#### (1) 숙성 기간별 흑마늘 조직감의 측정

숙성기간별 흑마늘의 조직감은 Texture analyzer(TA-XT Express 20140, Stable micro systems, Vienna Court, UK)로 측정하였다.

#### (2) 수분 및 당도의 측정

숙성기간별 흑마늘의 수분은 시료 1 g을 취하여 수분측정기(MB45, OHAUS, Switzerland), 당도는 시료액 1 mL를 취해 당도측정기(PR-201a, Atago, Japan)로 측정하였다.

#### (3) pH, 산도 및 갈변도의 측정

pH는 시료액 10 mL를 취하여 pH meter(Model 720, Thermo Orion, Beverly, USA)로 측정하였고, 산도는 시료액 10 mL에 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.4가 될 때 까지 소모되는 양을 젖산계수로 환산하여 나타내었다. 갈변반응에 의한 갈색화 물질은 420 nm에서 흡광도(GB/UV310, Biochrom, Cambridge, UK)를 측정하였다.

#### (4) 총당 및 환원당의 정량

총당은 phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법에 따라 시료액 1 mL를 취하여 5% phenol과 진한 황산을 각 1 mL씩 첨가하고, 30분간 방치한 뒤 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당의 함량은 DNS법에 따라 시료액 1 mL에 1% dinitrosalicylic acid 3 mL를 가하여 끓는 물에서 15분간 중탕하고, 찬물에 냉각시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. D-glucose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)를 이용하여 작성된 표준검량곡선으로부터 시료중의 총당 및 환원당의 함량을 산출하였다.

#### (5) 총 페놀 화합물의 정량

총 페놀 화합물은 시료액 1 mL에 Foline-Ciocalteau 시약 및 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 각각 1 mL씩 차례로 가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흑마늘의 총 페놀 화합물은 caffeic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용한 검량선에 의해 계산하였다.

#### (6) Total pyruvate 및 total thiosulfinate의 정량

Total pyruvate는 시료액 1 mL를 취해 10% TCA 10 mL를 첨가하고 1시간 방치한 뒤, 2 N HCl에 용해한 0.0125% DNPH와 0.6 N NaOH 5 mL를 혼합하여 420 nm에서 흡광도를 측정한 후 sodium pyruvate(Sigma-Aldrich Co.)를 0~100 µg/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준검량곡선으로부터 시료 중의 total pyruvate의 함량을 산출하였다.

McBreen의 방법에 따라 total thiosulfinate는 시료액 1 mL를 취해 10% TCA 10 mL를 첨가하고 1시간 방치한 뒤, 0.4 mM DTNB 1 mL를 혼합하여 412 nm에서 흡광도를 측정한 후 L-cysteine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)을 0~100 µg/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준검량곡선으로부터 시료 중의 total thiosulfinate 함량을 산출하였다.

### 4) 통계처리

각 처리별 평균치간의 통계처리 및 유의성 검정은 SPSS 18.0(Statistical Package for Social

Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software를 이용하였고, 평균간 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

### 5) 개발 제품의 소비자 선호도 조사

#### (1) ‘오천년에’의 흑마늘 음료의 소비자 선호도 조사 개요

- ‘쭈 혼합 흑마늘 음료(오천년에) 시제품 선호도 조사’는 (재)남해마늘연구소의 지원을 받아 실시하였다.
- ‘쭈 혼합 흑마늘 음료(오천년에) 시제품 선호도 조사’는 2012년 4월 남해군농업기술센터 및 장평 소류지 주변에서 개최된 튜울립 축제 기간 중 보물섬남해마늘영농조합법인을 방문한 관광객 및 제품을 구입한 소비자 250명을 대상으로 실시하였다.
- ‘쭈 혼합 흑마늘 음료(오천년에) 시제품 선호도 조사’는 흑마늘 음료에 대한 고객 평가 및 선호도를 파악하고 조사결과를 바탕으로 고부가가치가 높은 상품을 제조하기 위해 실시하였다.
- ‘오천년에’에 대한 선호도 조사는 성별, 연령층으로 구분하여 맛, 향, 상품화 되었을 때의 시장성에 대하여 조사하였다.

구분	조사 내용		
조사영역	남해마늘 인지도		1
	흑마늘 인지도		1
	쭈 혼합 흑마늘 음료 ‘오천년에’	맛에 대한 선호도	3
		향미에 대한 선호도	
상품화 되었을 때 시장성			
통계변수	성별, 연령, 거주지역		3

#### (2) ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘 음료의 소비자 선호도 조사 개요

- ‘쭈 및 천연식물 혼합 흑마늘 음료(오천년에 프리미엄) 시제품 선호도 조사’는 2013년 4월 남해군농업기술센터 및 장평 소류지 주변의 튜울립 축제를 기간 중 보물섬남해마늘영농조합법인을 방문한 관광객 및 제품을 구입한 소비자 250명을 대상으로 실시하였다.
- ‘쭈 및 천연식물 혼합 흑마늘 음료(오천년에 프리미엄) 시제품 선호도 조사’는 흑마늘 음료에 대한 고객 평가 및 선호도를 파악하고 조사결과를 바탕으로 면역력이 증강되어 고부가가치가 한층 업그레이드 된 상품을 제조하기 위해 실시하였다.
- 또한 이번 조사는 기존의 음료에 천연식물을 첨가함으로써 음료의 맛, 향의 개선과 함께 기능성 향상을 위하여 향후 중장년층 여성·남성의 체력증진 및 과도한 스트레스에 노출된 젊은 소비층을 타겟으로 공략하기 위한 기초 자료로 사용하고자 하였다.

- ‘오천년에 프리미엄’의 선호도 조사는 2차년도에 실시한 항목과 같은 조건으로 성별, 연령층으로 나누고 맛, 향, 상품화 되었을 때의 시장성에 대하여 조사하였다.

구 분	조 사 내 용		
조사영역	남해마늘 인지도		1
	흑마늘 인지도		1
	썩, 한약재 혼합 흑마늘 음료 ‘오천년에 프리미엄’	맛에 대한 선호도	4
		향미에 대한 선호도	
		상품화 되었을 때 시장성	
전반적인 기호도			
통계변수	성별, 연령, 거주지역		3

(3) ‘오천년에 파워’ 타블렛 제제의 소비자 선호도 조사 개요

- 음료 제조는 추출의 한가지 공정으로 유효성분의 변화를 최소화할 수 있고, 공정이 비교적 간편한 제품이나, 다량의 수분으로 인해 부패할 가능성이 높고, 부피가 크며 물류비용이 높은 단점이 있으며, 소비자도 간편하게 섭취하기 불편한 점이 있어 액상제품 보다는 분말제품, 정제 제품의 선호도가 높아지는 추세이다.
- 흑마늘에 썩, 천연식물 5종을 첨가하여 추출 후 분말화하여 타블렛 형태의 제형으로 개발하여 소비자의 선호도를 조사하였다.
- ‘오천년에 파워’의 선호도 조사는 오천년에 흑마늘 음료와 비교하였을 때 맛, 상품화 되었을 때의 시장성에 대하여 조사하였다.

구 분	조 사 내 용		
조사영역	흑마늘 액상제품과 정제 제품과의 비교		1
	오천년에 파워의 선호도	맛에 대한 선호도	2
		상품화 되었을 때 시장성	

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 고품질 흑마늘의 제조 조건의 최적화 및 이에 기초한 대량 생산 공정 확립

##### (1) 숙성기간별 흑마늘의 조직감 측정

흑마늘 제조 공정의 진행과 더불어 1단계에서 3단계로 숙성이 진행될수록 전단가(Table 1)는 점차 증가하여 3단계에서  $188.81 \pm 18.81 \sim 233.83 \pm 22.66$  g로 가장 높았다. 숙성 4단계에서는 오히려 감소하여 생마늘에 비해 조직감이 더 낮은  $158.73 \pm 10.58 \sim 188.90 \pm 11.62$  g의 범위였고, 깎마늘로 제조한 흑마늘의 조직감이 가장 높았다.

마늘이 흑마늘로 가공되는 과정 중 수분의 증발로 인해 조직감이 단단해 지는 것이 일반적

인데(Shin JH et al, 2008) 깎마늘로 흑마늘을 가공할 경우 가장 단단하였으며, 외피가 존재하는 쪽분리 피마늘과 통마늘에서는 마늘의 외피가 마늘의 수분을 보호해주어 부드러운 조직감을 유지해 주므로서 결과적으로 식감을 좋게 하였음을 알 수 있다. 따라서 흑마늘 특유의 부드러운 조직감을 유지하기 위해서는 깎마늘보다 외피가 있는 쪽분리 피마늘 및 통마늘로 흑마늘을 제조하는 것이 유리함을 알 수 있다.

Table 1. Changes of shearing strength during aging of black garlic

(g)

Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	171.13±2.81 <sup>a</sup>	178.40±30.57 <sup>a</sup>	233.83±22.66 <sup>c</sup>	188.90±11.62 <sup>b</sup>
Separated peel garlic	124.13±7.29 <sup>a</sup>	136.45±12.27 <sup>a</sup>	233.37±32.23 <sup>c</sup>	158.73±10.58 <sup>b</sup>
Whole bulb garlic	176.10±45.02 <sup>b</sup>	168.53±45.61 <sup>a</sup>	188.81±18.81 <sup>c</sup>	162.67±11.14 <sup>a</sup>

<sup>a~d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$

Shearing strength of fresh garlic : 361.60±26.16 g.

## (2) 수분 함량 및 당도

흑마늘의 수분을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 흑마늘 제조과정 중 수분은 지속적으로 감소하여 숙성초기 1단계에서는 55.75~56.05%의 범위였는데 숙성이 진행됨에 따라 점차 감소하였다. 최종단계에는 초기단계에 비하여 약 20% 가량의 수분 손실이 이루어졌으며, 깎마늘로 제조한 흑마늘의 수분은 숙성 4단계에서 38.32%였는데 비해 쪽분리 피마늘 및 통마늘에서는 42% 이상으로 더 높게 유지되었다. Shin JH et al(2008)은 흑마늘 제조 숙성 초기 65.24±0.24 g/100 g이었던 수분 함량이 숙성 후기 58.48±0.41 g/100 g으로 보고한 바 있는데 그 절대값에서는 차이가 있으나 숙성과 함께 마늘의 수분 함량이 감소됨은 본 실험 결과와도 동일한 경향이였다.

Table 2. Changes of moisture content during aging of black garlic

(%)

Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	56.03±0.49 <sup>d</sup>	50.82±1.50 <sup>c</sup>	47.86±1.88 <sup>b</sup>	38.32±0.81 <sup>a</sup>
Separated peel garlic	55.75±0.25 <sup>d</sup>	52.54±1.08 <sup>c</sup>	49.80±0.89 <sup>b</sup>	43.26±1.60 <sup>a</sup>
Whole bulb garlic	56.05±0.23 <sup>c</sup>	51.56±0.56 <sup>b</sup>	50.57±0.01 <sup>b</sup>	42.32±1.63 <sup>a</sup>

<sup>a~d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$

Moisture content of fresh garlic : 55.29±1.59%

흑마늘의 숙성 중 당도의 변화(Table 3)는 초기단계에 비하여 최종단계로 진행될수록 증가하였다. 이는 수분함량감소에 따른 상대적인 당도 증가와 함께, 갈변화가 진행되면서 마늘 자체의 당이 점차 분해되고 쉽게 유리되기 때문이다. 숙성 전 2.6~2.7 brix의 범위이던 당도는 숙성과 더불어 점차 증가하였는데, 마늘의 전처리 상태에 따라 증가 경향이 서로 상이하여 피마늘의 경우 3단계에서 4단계로 될 때 가장 큰 폭으로 증가하였으며, 쪽분리 피마늘과 통마늘의 경우 숙성 2단계까지는 당도에 변화가 없다가 그 이후에 큰 폭으로 증가하였다. 최종 4단계에서 통마늘의 당도는  $6.10 \pm 0.00$  brix로 깎마늘( $5.13 \pm 0.06$  brix) 및 쪽분리 피마늘( $5.23 \pm 0.93$  brix)에 비하여 더 높았다.

Table 3. Changes of sugar content during aging of black garlic

(brix)

Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	$2.70 \pm 0.00^a$	$3.30 \pm 0.00^b$	$3.80 \pm 0.00^c$	$5.13 \pm 0.06^d$
Separated peel garlic	$2.60 \pm 0.00^a$	$2.60 \pm 0.00^b$	$3.87 \pm 0.06^c$	$5.23 \pm 0.93^d$
Whole bulb garlic	$2.60 \pm 0.00^a$	$2.60 \pm 0.00^a$	$4.20 \pm 0.00^a$	$6.10 \pm 0.00^a$

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$

Sugar content of fresh garlic :  $2.97 \pm 0.06$  brix.

### (3) pH, 산도 및 갈변도의 측정

흑마늘 숙성 과정 중 pH 및 산도의 변화는 Table 4 및 Table 5와 같다. 흑마늘의 제조 중 pH는 점차 산성화 되는 경향이었는데 생마늘은  $6.57 \pm 0.01$ 인데 비하여 숙성 1단계에서는 pH가  $6.20 \pm 0.01 \sim 6.84 \pm 0.01$ 이던 것이 마지막 단계에서는  $4.14 \pm 0.01 \sim 4.32 \pm 0.01$ 로 산성화되었다.

Table 4. Changes of pH during aging of black garlic

Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	$6.84 \pm 0.01^d$	$5.49 \pm 0.01^c$	$4.98 \pm 0.01^b$	$4.32 \pm 0.01^a$
Separated peel garlic	$6.36 \pm 0.02^d$	$5.28 \pm 0.01^c$	$4.85 \pm 0.01^b$	$4.21 \pm 0.01^a$
Whole bulb garlic	$6.20 \pm 0.01^d$	$5.06 \pm 0.01^c$	$4.62 \pm 0.01^b$	$4.14 \pm 0.00^a$

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$

pH of fresh garlic :  $6.57 \pm 0.01$

홍삼 제조시에도 갈변 물질의 생성과 더불어 pH가 저하하는데 온도가 높을수록 pH는 더 많이 감소하며(Lee JW et al, 1998), 열처리한 홍삼 엑기스에서도 pH는 온도가 높을수록 저장 시간이 경과할수록 산성화 된다는 보고(Choi JH et al, 1981)는 본 실험의 결과와 잘 일치하였다.

흑마늘의 산도(Table 5)는 숙성 1단계에서  $0.41\pm 0.03\sim 0.67\pm 0.01\%$  범위였는데 숙성과정이 진행됨에 따라 점차 증가하여 pH의 변화와는 상반되는 경향이였다. 깎마늘로 제조된 흑마늘의 숙성 최종 단계에서 pH는  $2.81\pm 0.01\%$ 로 가장 낮았고, 쪽분리 피마늘과 통마늘의 경우 숙성 2단계까지는 쪽분리 피마늘의 산도 증가폭이 더 컸으나 그 이후부터는 통마늘의 산도가 더 높아져 최종 4단계에서는 쪽분리 피마늘의 산도는  $3.38\pm 0.04\%$  였고, 통마늘은  $3.58\pm 0.05\%$ 로 증가하였다.

Table 5. Changes of titrable acidity during aging of black garlic

(%)

Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	$0.48\pm 0.03^a$	$0.95\pm 0.01^b$	$1.17\pm 0.02^c$	$2.81\pm 0.01^d$
Separated peel garlic	$0.59\pm 0.04^a$	$1.05\pm 0.01^b$	$1.90\pm 0.01^c$	$3.38\pm 0.04^d$
Whole bulb garlic	$0.67\pm 0.01^a$	$0.71\pm 0.01^a$	$2.04\pm 0.01^a$	$3.58\pm 0.05^a$

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$

Acid content of fresh garlic :  $0.44\pm 0.01\%$

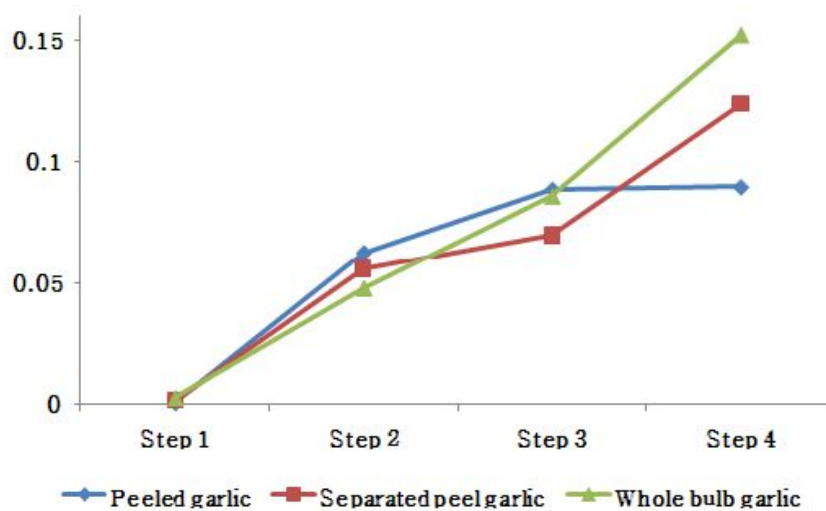


Fig. 1. Browning intensity(OD value) of black garlic during aging at 420 mn.

갈변물질의 함량을 예측할 수 있는 흡광도 수치(Fig. 1)는 제조 공정의 진행과 더불어 유의적으로 상승하여 2단계에 비하여 3단계에서는 약 1.80배 증가하였으며, 마지막 4단계에서는 2단

계에 비하여 약 3배 증가하였다. Kim MH와 Kim BY(1990)은 마늘의 열풍건조 중 갈변화 물질 생성율과 관련한 온도의 영향은  $Q_{10}$  값과도 상관성이 있으며, 온도가 높을수록 갈변화 반응은 촉진된다고 보고한 바 있다.

(4) 총당 및 환원당의 함량

흑마늘의 가공형태 및 숙성기간별 총당 및 환원당의 함량을 분석한 결과는 Table 6 및 Table 7과 같다. 총당의 함량은 흑마늘로 숙성이 진행됨에 따라 점차 증가하였다. 최종 4단계에서 통마늘의 총당 함량은  $22.34 \pm 0.37$  mg/100 g로 깎마늘과 쪽분리 피마늘에 비하여 높은 함량이었다. 환원당은 총당과 유사하게 숙성과 더불어 그 함량이 증가하였으며 통마늘에서  $3.96 \pm 0.05$  mg/100 g으로 가장 높은 함량이었다.

Table 6. Changes of total sugar content during aging of black garlic

(mg/100 g)				
Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	$15.36 \pm 3.82^a$	$16.71 \pm 2.21^a$	$19.03 \pm 2.00^b$	$20.89 \pm 0.46^c$
Separated peel garlic	$15.26 \pm 3.60^a$	$16.77 \pm 2.26^b$	$18.67 \pm 1.41^b$	$20.31 \pm 0.83^c$
Whole bulb garlic	$12.78 \pm 1.14^a$	$19.12 \pm 0.35^b$	$21.89 \pm 0.59^c$	$22.34 \pm 0.37^d$

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$

Total sugar content of fresh garlic :  $16.06 \pm 0.57$  mg/100 g

Table 7. Changes of reducing sugar content during aging of black garlic

(mg/100 g)				
Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	$2.42 \pm 0.03^a$	$3.27 \pm 0.03^b$	$3.25 \pm 0.05^c$	$3.47 \pm 0.06^d$
Separated peel garlic	$2.41 \pm 0.03^a$	$2.92 \pm 0.03^b$	$3.69 \pm 0.20^b$	$3.74 \pm 0.06^c$
Whole bulb garlic	$2.47 \pm 0.03^a$	$3.29 \pm 0.12^b$	$3.82 \pm 0.06^c$	$3.96 \pm 0.05^d$

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$

reducing sugar content of fresh garlic :  $2.41 \pm 0.03$  mg/100 g.

(5) 총 페놀 화합물의 함량

흑마늘의 가공형태 및 숙성기간별 총 페놀 화합물의 함량을 분석한 결과는 Table 8과 같다.

흑마늘 숙성 1단계에서 총 페놀 화합물의 함량은 모든 시험군에서 28 mg/100 g으로 차이가 없었으나 제조 공정이 진행됨에 따라 지속적으로 증가하였으며, 숙성 4단계에서는 통마늘에서  $131.72 \pm 0.88$  mg/100 g으로 가장 높았는데, 이는 깎마늘 및 쪽분리 피마늘에 비하여 약 30% 더 높은 함량이었다.

Kwon OC et al(2006)은 마늘의 총 페놀과 플라보노이드 함량은 고온고압 처리조건에 따라 다소 상이하기는 하지만 생마늘에 비하여 각각 7배와 16배 정도 증가하는데 이는 고온고압 처리에 의해 여러 화합물이 폴리페놀 화합물로 전환되었거나 추출이 더 용이해졌기 때문이라고 고찰하였다. 본 실험의 결과에서도 흑마늘로 숙성되면서 페놀화합물의 유리가 용이해 졌기 때문에 함량이 증가하였으며, 페놀 화합물들은 수용성 물질로서 수분 또는 장시간 고열 노출 등 외부의 영향에 의해 쉽게 파괴될 수 있는데, 통마늘 가공시 마늘 외피 및 내피의 보호작용으로 인하여 페놀화합물의 보존이 더 용이했기 때문에 피마늘에서 그 함량이 더 높게 정량된 것으로 판단된다.

Table 8. Changes of total phenol content during aging of black garlic

Processing stage	(mg/100 g)			
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	$28.14 \pm 0.13^a$	$62.59 \pm 1.65^b$	$91.68 \pm 2.04^c$	$102.76 \pm 0.55^d$
Separated peel garlic	$28.22 \pm 0.13^a$	$68.19 \pm 0.50^b$	$93.65 \pm 0.34^c$	$114.44 \pm 0.55^d$
Whole bulb garlic	$28.80 \pm 0.34^a$	$77.24 \pm 1.78^b$	$101.31 \pm 0.71^c$	$131.72 \pm 0.88^d$

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

Total phenol content of fresh garlic :  $31.28 \pm 0.13$  mg/100 g.

#### (6) Total pyruvate 및 total thiosulfinate의 함량

Total pyruvate와 total thiosulfinate의 함량은 생마늘에서 각각  $611.18 \pm 16.52$  mg/100 g과  $0.99 \pm 0.06$   $\mu$ g/100 g이었는데, 흑마늘로 숙성이 진행되면서 유의적으로 함량이 증가하였다. Total pyruvate와 total thiosulfinate의 두 성분 모두 깎마늘에 비해 피마늘에서 그 함량이 더 높았으며, 숙성 단계를 거치면서 이러한 경향은 더 두드러졌으며, 최종 4단계에서는 통마늘에서 가장 높은 함량이었다.

숙성 4단계에서 통마늘에서의 total pyruvate(Table 9) 함량은  $1478.69 \pm 39.10$  mg/100 g으로 숙성 1단계에 비해 약 2.2배 더 증가하여 각각 1.4배와 1.5배가 증가한 깎마늘 및 쪽분리 피마늘로 제조한 흑마늘에 비해 더 높은 함량이었다.

마늘 중의 total pyruvate는 alliinase에 alliin이 분해되면서 allicin, 암모니아와 더불어 생성되는 것으로 알려져 있는데(Miron TI et al, 2002), 본 실험에서 total pyruvate의 함량이 증가한



것은 제조 과정 중 90℃까지 승온 시킨 것을 고려할 때 alliinase의 작용만으로 보기는 어려우며, 고온에 의한 당의 분해산물이 더해진 것으로 추정되나 이에 대한 정확한 메커니즘을 규명하기 위하여서는 관련 성분들에 대한 더 심도깊은 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

Table 9. Changes of total pyruvate content during aging of black garlic

(mg/100 g)				
Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	631.12±6.01 <sup>a</sup>	646.62±10.23 <sup>b</sup>	690.51±20.91 <sup>c</sup>	887.97±46.01 <sup>d</sup>
Separated peel garlic	692.62±7.20 <sup>a</sup>	720.89±3.35 <sup>b</sup>	896.41±12.68 <sup>c</sup>	1057.59±31.62 <sup>d</sup>
Whole bulb garlic	662.66±4.56 <sup>a</sup>	719.62±8.30 <sup>b</sup>	987.97±1.27 <sup>c</sup>	1478.69±39.10 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

Total pyruvate content of fresh garlic : 611.18±16.52 mg/100 g.

Table 10은 마늘의 전처리를 달리하였을 때 흑마늘로 숙성 중 total thiosulfinate의 함량은 변화를 분석한 결과이다. 숙성 초기 마늘 중 total thiosulfinate의 함량은 1.64±0.04~1.93±0.00 µg/100 g이었으나 숙성과 더불어 큰 폭으로 증가하여 숙성 최종 4단계에서 깎마늘은 26.92±0.02 µg/100 g으로 약 14.7배, 쪽분리 피마늘은 32.23±0.13 µg/100 g으로 약 16.7배 증가하였고, 통마늘은 약 25.1배 증가하여 41.21±0.05 µg/100 g이었다.

Table 10. Changes of total thiosulfinate content during aging of black garlic

(µg/100 g)				
Processing stage	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Peeled garlic	1.83±0.01 <sup>a</sup>	9.92±0.03 <sup>b</sup>	14.53±0.02 <sup>c</sup>	26.92±0.02 <sup>d</sup>
Separated peel garlic	1.93±0.00 <sup>a</sup>	10.17±0.05 <sup>b</sup>	19.48±0.12 <sup>c</sup>	32.23±0.13 <sup>d</sup>
Whole bulb garlic	1.64±0.04 <sup>a</sup>	10.56±0.08 <sup>b</sup>	22.00±0.02 <sup>c</sup>	41.21±0.05 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup>Means with different superscripts in the same row are significantly different at  $p<0.05$ .

Total thiosulfinate content of fresh garlic : 0.99±0.06 µg/100 g.

이상의 연구결과를 종합하여 흑마늘 숙성을 위한 최적의 온도 조건 및 마늘의 전처리 조건을 확인하였으며, 그 결과를 활용하여 상품화한 흑마늘은 다음의 사진과 같다.



### 연구결과에 따라 제조된 흑마늘의 상품화

기업 고유의 흑마늘 제조 조건에 따라 흑마늘 제조방법을 특허출원 함에 있어 기존의 방법들과 차별화하고, 새로운 개발 제품의 아이디어를 반영하고자 흑마늘 및 저점도 고농축액의 제조에 대한 연구를 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

#### 2) 저점도 고농축 흑마늘 진액의 제조 조건 설정

흑마늘을 이용한 고농축액의 제조시 마늘 자체의 높은 당분으로 인하여 60 brix 이상으로 고농축하기 위해서는 간접가열, 회전식 농축기 사용 등의 조건이 요구되며, 고압, 장시간 고온가열 등 상대적으로 높은 에너지 소비가 필요하다. 또, 이렇게 제조된 60 brix 이상의 고농축액도 상대적으로 점도가 낮아 소량씩 덜어 소비하기에 불편함이 있다. 따라서 고농도를 유지하면서 상대적으로 점도가 낮아 소량씩 덜어 소비할 때 번거러움을 감소시킬 수 있는 제품을 개발하고자 하였다.

또한, 본 연구를 통하여 타 기업의 제품대비 상대적으로 관능적 특성이 우수한 흑마늘의 제조가 가능한 조건을 설정하였으나 최근 흑마늘 제조방법에 관한 특허가 30여개 이상으로 증가하여 본 연구의 성과를 활용한 지적재산권의 확보가 용이하지 않으므로 이를 보완하고, 기업의 상품 개발력을 더 향상시키고자 하였다.

본 과제를 통하여 다양한 조건에서 흑마늘 고농축액을 제조한 결과의 최적 제조방법은 Fig. 2와 같다.

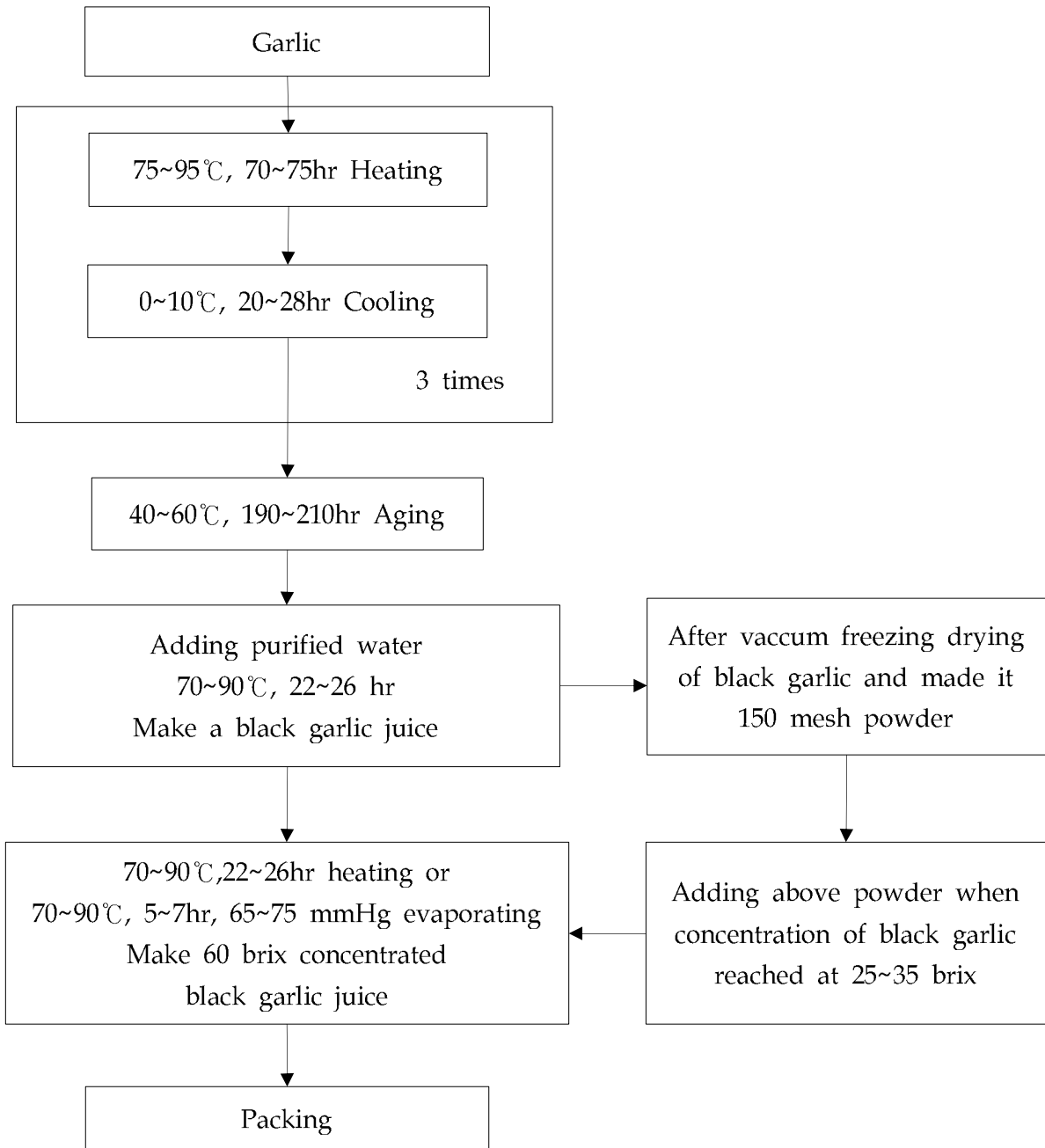


Fig. 2. Procedure to make black garlic extracts of high quality from its residue.

### 3) 본 연구를 통하여 개발된 저점도 고농축 흑마늘 진액의 품질특성

흑마늘 잔사를 첨가하여 흑마늘 고농축액을 완성한 후 점도계(VISCO STAR plus, FUNGILAB. S.A., Korea)를 이용하여 점도를 측정하였다. 흑마늘 잔사 건조물의 첨가량을 달리한 후 동일하게 농도를 60 brix로 맞추어 제조한 고농축액의 점도를 측정한 결과(Table 11) 흑마늘 잔사 건조물의 함량이 8%인 시료(A)는 점도가 너무 낮고 20%인 시료(C)는 점도가 너무 높아 성상이 적합하지 않았다.

Table 11. Changes in viscosity of black garlic extracts (60brix) by adding powder made from its residue

(CPs)

Sample code	Immediately after	After 30 minute
A	13.40±0.22	19.20±1.40
B	17.74±0.51	34.44±4.00
C	54.60±4.10	61.71±0.40

A : black garlic residue 8% added concentrate

B : black garlic residue 10% added concentrate

C : black garlic residue 20% added concentrate

Fig. 3은 직화로 추출액을 농축하여 제조한 60 brix의 흑마늘 진액(A)과 본 특허에 명시된 방법으로 제조한 흑마늘 고농축액(B)의 점도를 비교한 사진이다. 흑마늘로부터 추출한 잔사의 분말을 10% 중량비로 첨가할 경우(B) 첨가 초기 점도는 낮으나 30분 정도 경과하면 분말이 충분히 고루 분산되면서 적당한 농도를 가지므로(Fig. 3-B) 원하는 성상의 흑마늘 고농축액을 제조할 수 있다.

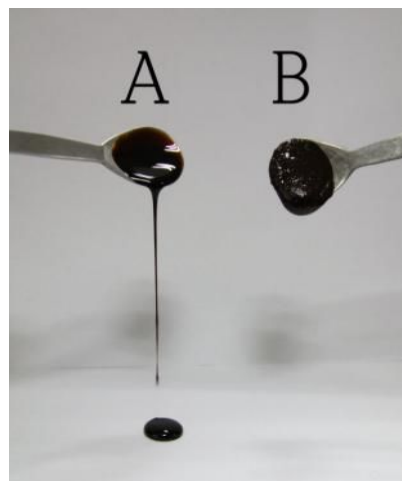


Fig. 3. High concentrated black garlic juice added black garlic residue.

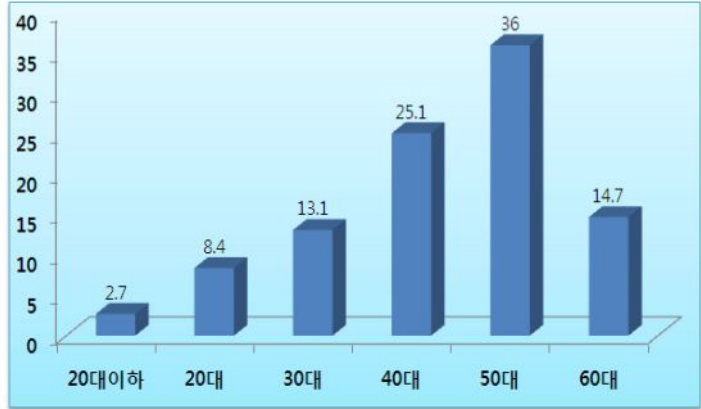
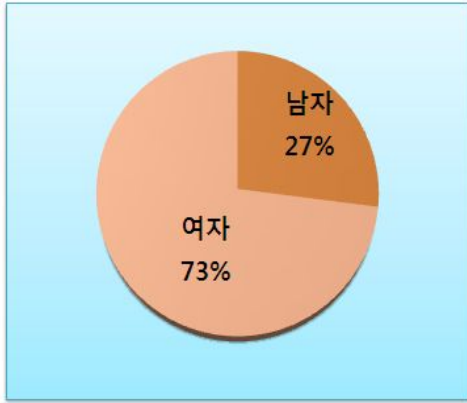
#### 4) 흑마늘과 섞 혼합 면역증진 음료의 테스트 마케팅

##### (1) 개발 상품의 소비자 선호도 조사

##### ① 조사표본의 특징

- 성별 특징을 살펴보면, 전체 설문 응답자 200명 중 남자가 68명으로 전체의 27%, 여자는 182명으로 73%로 조사되었다.

□ 연령대별 특징을 보면 20대 미만이 전체의 2.7%로 가장 적었고, 20대가 8.4%, 30대는 13.1%, 40대가 25.1%, 50대가 36%, 60대 이상이 14.7%로 조사되었으며 그중 50대의 응답율이 36%로 가장 높았다.



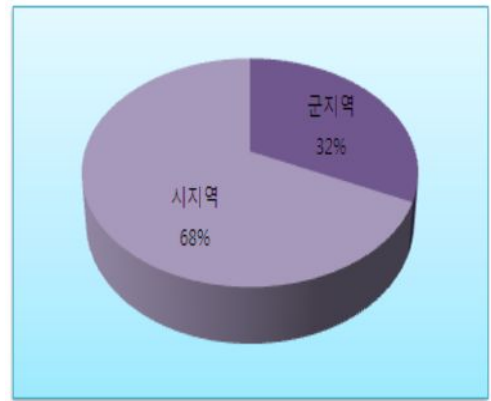
< 남녀 성별비 >

< 연령대별 응답율 >

그림 4. 조사표본의 남녀 성별비 및 연령.

□ 지역별 특징을 살펴보면, 응답자 중 경남지역의 거주자가 전체의 82.4%로 가장 많았고, 수도권 거주자가 5.2%, 경남 외 영남지역 거주자가 8.0%, 기타지역 거주자가 4.4% 였다.

□ 설문 응답자의 거주 지역별 특징을 분석한 결과, 시 지역 거주자가 전체의 68%, 군 지역 거주자가 32%였다.



< 지역별 응답율 >

< 시도 지역별 응답율 >

그림 5. 조사표본의 지역별 구성 비율.

② 남해마늘 및 흑마늘에 대한 인지도 조사 결과

▶ 남해마늘에 대한 인지도

□ 남해마늘의 인지도에 대해 조사한 결과는 표 12와 같으며 남해마늘에 대한 인지도는 들어 본적이 있다에 응답 빈도가 43%로 가장 높았고 매우 잘 안다가 35%, 잘 모른다가 11%, 전혀 모른다가 1%로 조사되었다.

□ 조사분석 결과 응답자 10명중 8명 이상이 남해마늘에 대해 들어 보았거나 알고 있는 것으로 조사되어 남해마늘에 대한 인지도는 매우 높은 편이었다.

표 12. 남해마늘에 대한 인지도 조사 결과

조사 항목	남해마늘 인지도					안다	모른다
	안다			모른다			
	매우잘안다	들어 본 적이 있다	조금안다	잘 모른다	전혀 모른다		
빈도	85	108	32	23	2	225	25
(%)	(34)	(43)	(13)	(11)	(1)	(90)	(12)

▶ 흑마늘에 대한 인지도

□ 마늘을 숙성시켜 만든 흑마늘에 대한 선호도를 조사한 결과, 매우 잘 안다가 20%였으며, 들어 본적이 있다가 35.6%로 가장 높은 빈도를 보였고, 조금 안다가 29.6%였다. 반면에 흑마늘에 대해 모른다가 14.8%로 나타났으며, 흑마늘에 대해 알고 있는 사람은 10명중 8.5명으로 조사되어 흑마늘에 대한 인지도 역시 상당히 높은 것으로 평가되었다(표 13).

표 13. 흑마늘에 대한 인지도 조사결과

조사 항목	흑마늘에 대한 인지도					안다	모른다
	안다			모른다			
	매우잘안다	들어 본 적이 있다	조금안다	잘 모른다	전혀 모른다		
빈도	50	89	74	22	15	213	37
(%)	(20)	(35.6)	(29.6)	(8.8)	(6)	(85.2)	(14.8)

③ 썩 혼합 흑마늘 음료(오천년애)에 대한 선호도 조사

▶ ‘오천년애’ 흑마늘 음료의 맛에 대한 선호도

□ 음료의 맛에 대한 선호도는 78%가 긍정적인 반응을 보였으며 부정적인 반응은 22% 정도였다. 그중 빈도가 가장 높은 것은 좋다가 36%로 가장 많았고, 매우 좋다는 16.8%, 매우 나쁘다는 6.8%로 조사되어 10명중 9명은 썩 혼합 추출물에 대해 긍정적인 반응을 보였다(그림 6).

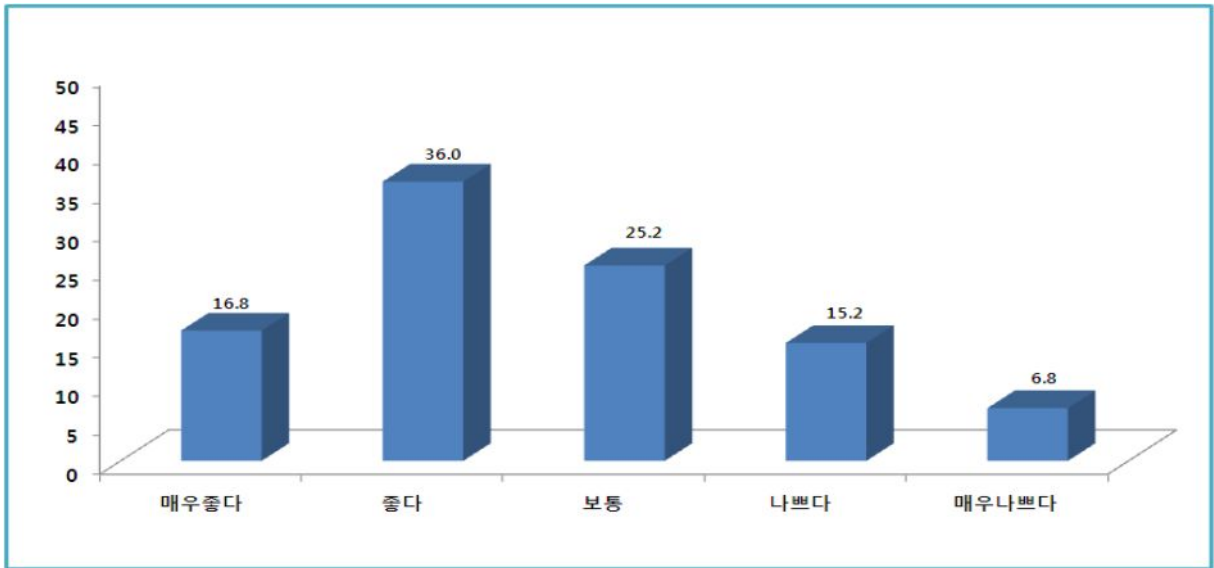


그림 6. '오천년애' 흑마늘 음료의 맛에 대한 선호도.

표 14. '오천년애' 흑마늘 음료의 성별 및 연령층에 따른 맛에 대한 선호도

(명/(%))

구분	오천년애의 선호도					
	매우좋다	좋다	보통	나쁘다	매우나쁘다	
성별	남자	12 (17.9)	32 (47.8)	15 (22.4)	6 (9.0)	2 (3.0)
	여자	30 (16.4)	58 (31.7)	48 (26.2)	32 (17.5)	15 (8.2)
연령	20대미만	0 (0)	1 (16.7)	1 (16.7)	1 (16.7)	3 (50)
	20대	0 (0)	1 (4.8)	6 (28.6)	5 (23.8)	9 (42.9)
	30대	4 (11.8)	14 (41.2)	6 (17.6)	7 (20.6)	3 (8.8)
	40대	15 (23.1)	26 (40.0)	20 (30.8)	3 (4.6)	1 (1.5)
	50대	12 (13.3)	43 (47.8)	19 (21.1)	15 (16.7)	1 (1.1)
	60대이상	11 (32.4)	5 (14.7)	11 (32.4)	7 (20.6)	0 (0.0)

□ '오천년애' 흑마늘 음료의 성별 및 연령층에 따른 선호도 조사는 표 14와 같으며, 섞은 흑마늘 음료의 선호도는 여자보다 남자가 높았고, 매우 좋다고 응답한 비율이 남자

는 17.9% 여자는 16.4%였다. 부정적인 반응(나쁘다, 매우나쁘다)은 여자가 25.7%로 남자(11.0%)에 비해 높았다. 여성에서 부정적인 반응이 높은 것은 흑마늘 냄새와 강한 맛에 의한 것으로 판단되나 기존의 흑마늘 음료를 섭취해 본 경험이 있는 사람은 ‘오천년에’ 흑마늘 음료에 대해 긍정적인 평가를 하였다.

□ 맛에 대한 선호도를 연령대별로 조사한 결과 응답 비율이 높은 50대에서 매우좋다가 13.3%, 좋다가 47.8%로 선호도가 높아 타 연령층에 비해 부정적인 반응을 보인 비율이 낮았다. 20대에서는 매우 나쁘다가 42.9%, 보통이다가 28.6% 순으로 조사되었다. 맛에 대한 선호도는 20대 이하와 30대 이상에서 상반된 결과를 보였는데 30대 이상에서 맛에 대한 선호도가 긍정적이었다(표 14).

▶ ‘오천년에’ 흑마늘 음료의 향에 대한 선호도

□ ‘오천년에’ 흑마늘 음료 음료의 향에 대한 선호도 조사 결과는 그림 7, 8 및 표 15와 같다. 매우좋다가 18.4%, 좋다가 35.6%, 보통이 32.0%로 조사되었으며 부정적인 반응은 14%로 낮았다. ‘오천년에’의 긍정적인 반응으로 향에 대한 선호도가 높게 조사되었는데 이는 기존의 흑마늘 음료에 썩을 첨가함에 따라 흑마늘 냄새는 감소되고 향긋한 썩의 향이 부가되었기 때문으로 판단된다.

□ 그림 8에 나타낸 썩의 향미에 대한 선호도 조사는 매우 좋다가 10.5%, 좋다가 48.5% 및 보통이 30.2%로 썩 향에 대한 선호도는 매우 높은 것으로 조사되었다.

□ ‘오천년에’ 음료는 기존의 흑마늘 음료에 썩을 첨가함에 따라 진한 흑마늘 냄새를 감소시키고 거부감 없이 접근할 수 있는 음료에 컨셉을 맞춘 결과로 기존의 흑마늘 음료 보다 선호도가 높았다.

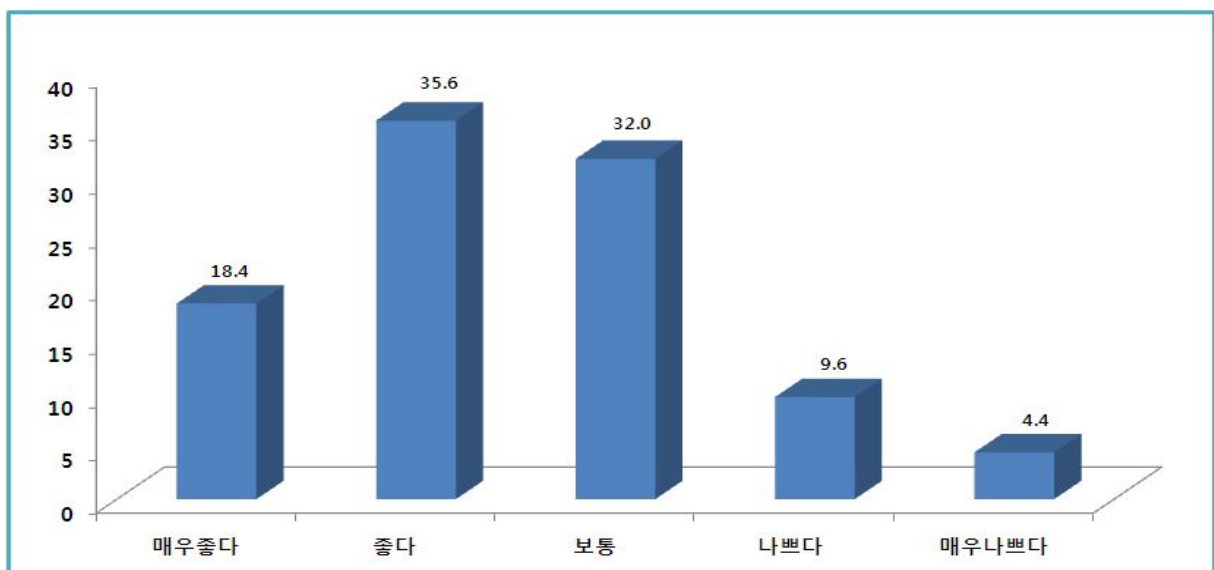


그림 7. ‘오천년에’흑마늘 음료의 향에 대한 선호도.



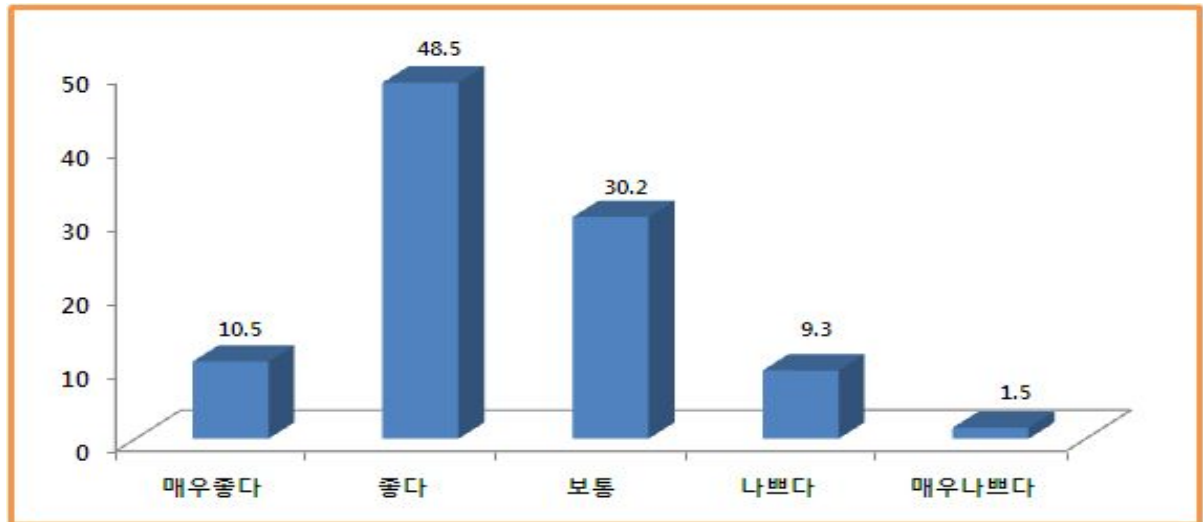


그림 8. '오천년에' 흑마늘 음료의 향에 대한 선호도 중 썩 향에 대한 선호도.

표 15. '오천년에' 흑마늘 음료의 성별 및 연령층에 따른 향에 대한 선호도

(명/(%))

구분	'오천년에'의 선호도					
	매우좋다	좋다	보통	나쁘다	매우나쁘다	
성별	남자	10 (14.9)	39 (58.2)	13 (19.4)	3 (4.5)	2 (3.0)
	여자	21 (11.5)	62 (33.9)	54 (29.5)	33 (18.0)	13 (7.1)
연령	20대미만	0 (0)	0 (0.0)	3 (50.0)	2 (33.3)	1 (16.6)
	20대	0 (0)	3 (14.3)	6 (28.6)	8 (38.1)	4 (19.0)
	30대	4 (11.8)	12 (35.0)	15 (44.1)	1 (2.9)	2 (5.9)
	40대	10 (15.4)	22 (33.8)	27 (41.5)	3 (4.6)	3 (4.6)
	50대	25 (27.8)	43 (47.8)	16 (17.2)	5 (5.6)	1 (1.1)
	60대이상	7 (20.6)	9 (26.5)	13 (38.2)	5 (14.7)	0 (0.0)

□ '오천년에'의 향에 대한 선호도 조사 결과 남자는 92.5%가 긍정적으로 응답한 반면에, 여자는 74.9%가 긍정적인 응답을 하였다.

- 연령에 따른 선호도는 20대 미만에서는 50%가 보통이며 나머지는 부정적이었으나 연령대가 높아짐에 따라 긍정적인 선호도를 보였다. 특히 40대에서는 보통이 41.5%, 좋다가 33.8% 매우좋다가 15.4%로 조사되어 90.7%의 비율로 10명중 9명은 긍정적인 반응을 보였고 50대에서도 92.8%로 긍정적인 반응을 보였다.
- ‘오천년애’ 흑마늘 음료는 기존의 흑마늘 음료에 썩을 첨가하여 제조함에 따라 기존의 흑마늘 음료보다 맛과 향이 증강되고 기능성이 배가된 개발음료로 소비자의 선호도가 높을 것으로 예상된다.

▶ ‘오천년애’가 상품화 되었을 때 시장성에 대한 조사

- 흑마늘 음료 ‘오천년애’가 상품화 되었을 때 제품을 구매하거나 시장성을 조사한 결과 그림 9와 같이 매우 좋다가 24.4%, 좋다가 47.6%로 매우 긍정적인 반응으로 조사되었고(72%), 보통은 24.8%였으며 3.2%만이 부정적으로 응답하여 ‘오천년애’의 제품화에 따른 시장성은 긍정적일 것으로 예상된다.
- 응답자 중 ‘오천년애’에 대해 보통 이상으로 긍정적인 응답을 한 연령층의 빈도는 20대가 85.7%로 타 연령층에 비해 낮았고 30대는 100%, 40대는 95.4%, 50대는 98.9%였고, 60대 이상에서는 97%였다(표 16).

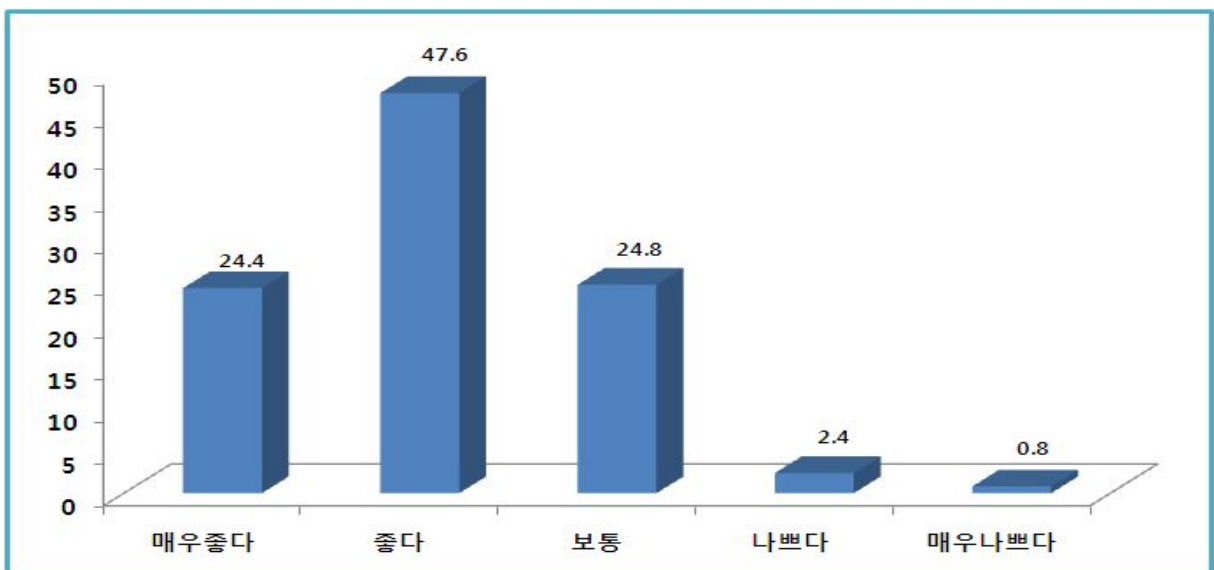


그림 9. ‘오천년애’ 흑마늘 음료의 상품화에 따른 시장성 조사.

표 16. ‘오천년에’ 흑마늘 음료의 상품화에 따른 시장성 조사

(명/(%))

구분		오천년에에 대한 선호도				
		매우좋다	좋다	보통	나쁘다	매우나쁘다
성별	남자	10 (14.9)	43 (64.2)	14 (20.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
	여자	31 (16.9)	78 (42.6)	54 (29.5)	11 (6.0)	9 (4.9)
연령	20대이하	0 (0)	1 (16.7)	5 (83.3)	0 (0.0)	0 (0)
	20대	5 (23.8)	7 (33.3)	6 (28.6)	2 (9.5)	1 (4.8)
	30대	16 (47.1)	13 (38.2)	5 (14.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	40대	10 (15.4)	35 (53.8)	17 (26.2)	3 (4.6)	0 (0.0)
	50대	25 (27.8)	48 (53.3)	16 (17.8)	0 (0.0)	1 (1.1)
	60대이상	5 (14.7)	15 (44.1)	13 (38.2)	1 (2.9)	0 (0.0)

④ 종합결과

- 썩 혼합 흑마늘 음료 ‘오천년에’의 시제품에 대해 음료의 맛, 향, 제품화 되었을 때의 시장성에 대하여 조사한 결과, 음료의 맛은 78%가 긍정적인 반응을 보였으며, 부정적인 반응은 약 22%였다. 성별에 따른 선호도는 여성보다는 남성이 더 높았는데, 이는 남성들의 경우 맛이 강한 기존의 흑마늘 음료에 익숙한 반면 상대적으로 여성들은 흑마늘 음료에 대한 친밀도가 낮기 때문으로 생각된다.
- 썩을 첨가하여 흑마늘 음료를 제조할 경우 기존의 흑마늘 음료보다 썩의 향미로 인해 마늘냄새가 감소되면서 제품의 전체적인 맛이 한층 더 부드러워져 남성뿐만 아니라 여성들에서도 선호도가 높아졌다.
- 제품이 출시되었을 때 시장성에 대한 조사는 47.6%가 좋다는 응답이었으며, 24.4%는 매우 좋다고 응답을 하여 ‘오천년에’ 흑마늘 음료가 출시되면 기존의 흑마늘 음료보다 선호도가 높을 것으로 판단된다.
- 더욱이 썩 추출물 함유 흑마늘 음료 오천년에는 기존의 흑마늘 음료보다 항산화, 면역증진 등의 부가적인 효능이 한층 업그레이드 된 제품으로써 시장성이 기대된다.

### 썩 혼합 흑마늘 음료 “오천년애” 시제품 선호도 조사

안녕하십니까?

흑마늘 음료 오천년애의 시장성 조사를 위해 여러분의 의견을 듣고자 합니다.  
 “오천년애” 흑마늘 음료는 (재)남해마늘연구소와 보물섬마늘영농조합법인에서 개발 중에 있는 흑마늘음료로 기존의 흑마늘 음료에 썩을 첨가하여 강한 냄새를 감소시키고 동시에 기능성이 증강된 흑마늘 음료입니다.

오천년애를 시음하시고 맛, 향, 시장성에 대해 답변해주시면 감사하겠습니다.

1. 통계 분류를 위한 질문입니다.

성 별	남( ), 여( )	거주지역	( )시 도
연령대	①20대 미만 ②20대 ③30대 ④40대 ⑤50대 ⑥60대이상		

2. 귀하는 남해군에서 생산된 남해마늘에 대하여 얼마나 알고 있습니까?

①매우 잘 안다 ②들어본 적이 있다. ③조금 안다. ④잘 모른다. ⑤전혀모른다.
--

3. 흑마늘에 대하여 얼마나 알고 있습니까?

①매우 잘 안다 ②들어본 적이 있다. ③조금 안다. ④잘 모른다. ⑤전혀모른다.
--

4. 썩 혼합 흑마늘 음료를 시식한 후 응답을 해주시면 감사하겠습니다.

1) 흑마늘 음료의 맛에 대한 호감도는 어느 정도입니까?

① 매우좋다. ②좋다. ③보통이다. ④나쁘다. ⑤매우 나쁘다.
------------------------------------

2) 흑마늘 음료의 향미에 대한 호감도는 어느 정도입니까?

① 매우좋다. ②좋다. ③보통이다. ④나쁘다. ⑤매우 나쁘다.
------------------------------------

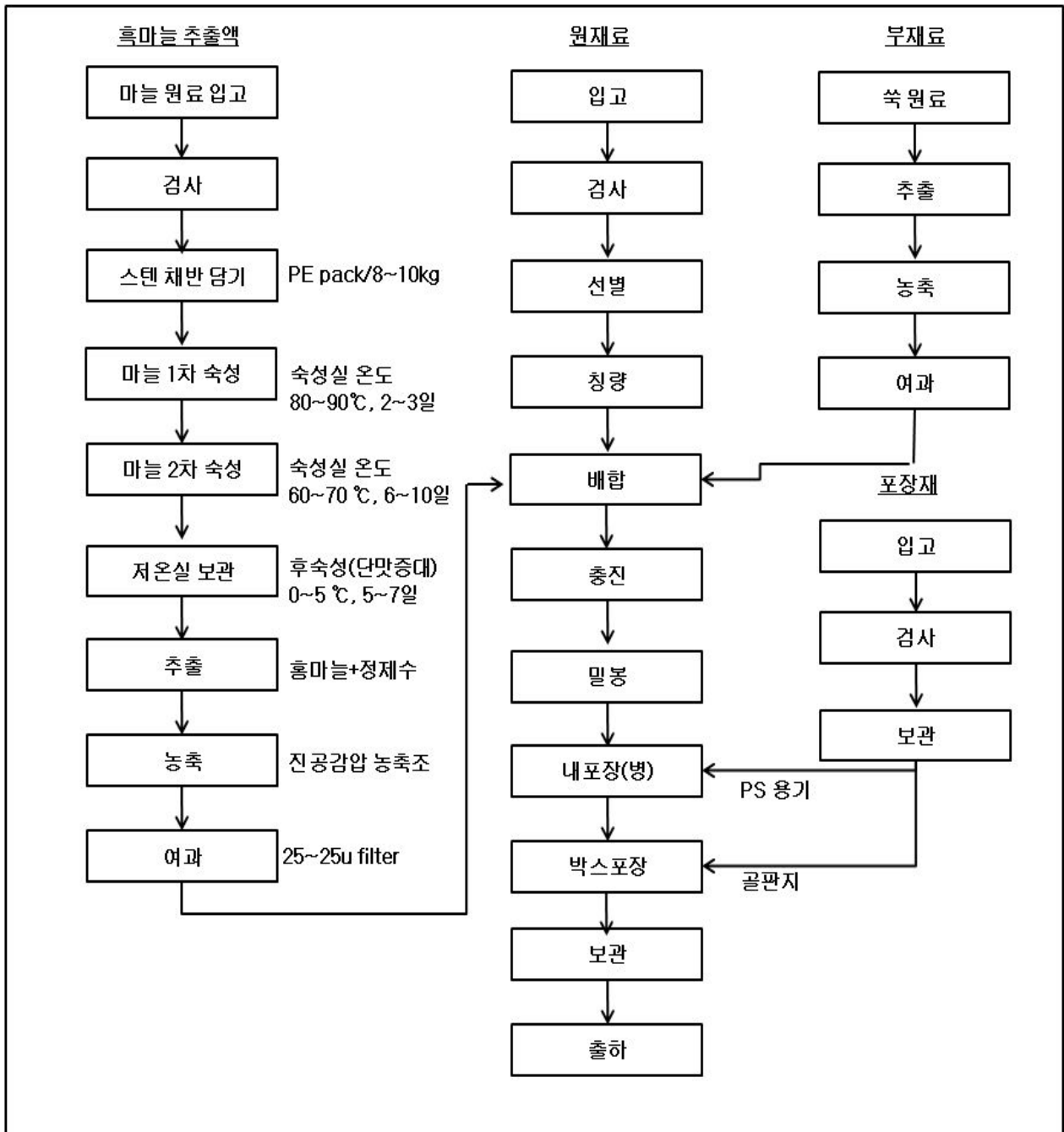
2-1) 흑마늘 음료에 썩 향에 대한 호감도는 어느 정도입니까?

① 매우좋다. ②좋다. ③보통이다. ④나쁘다. ⑤매우 나쁘다.
------------------------------------

3) 썩 함유 흑마늘 음료가 상품화 되었 때 시장성에 대하여 어떻게 생각십니까?

① 매우좋다. ②좋다. ③보통이다. ④나쁘다. ⑤매우 나쁘다.
------------------------------------

(2) 썩 혼합 흑마늘 음료 '오천년에' 흑마늘 음료의 제조 공정도



(3) 썩 혼합 흑마늘 음료 '오천년에'의 상품화를 위한 포장 디자인 개발



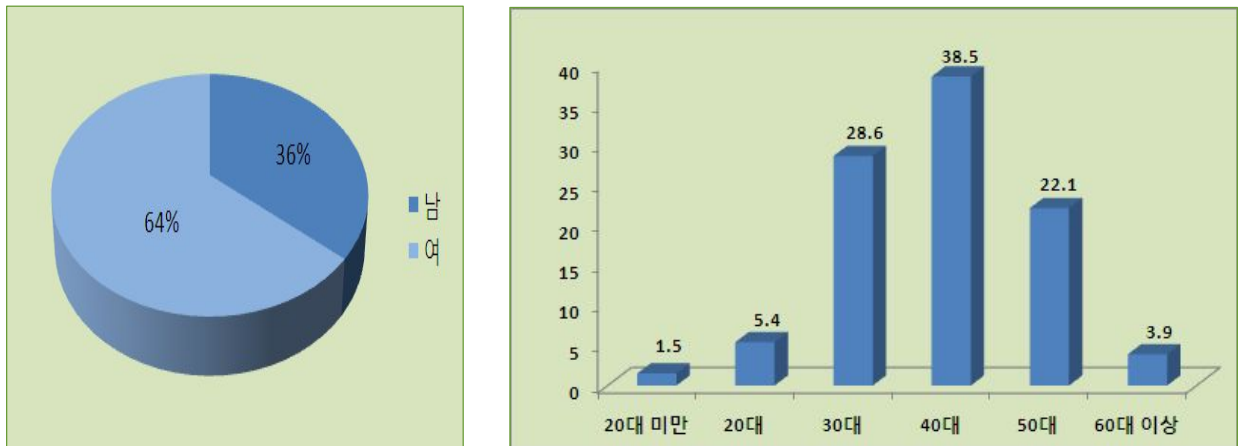
5) 흑마늘, 썩 및 천연식물 추출물을 함유한 면역증진용 제품의 상품화

(1) ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘 음료 개발 상품의 소비자 선호도 조사

① 조사표본의 특징

□ ‘오천년에 프리미엄’의 조사를 위한 표본의 특성을 조사는 아래와 같으며 성별 특징은 전체 설문 응답자 250명 중 남자가 90명으로 전체의 36%, 여자는 160명으로 64%로 조사되었으며 여성이 남성보다 훨씬 높은 비율이었다. 음료의 실질적인 소비층은 남성의 피로회복을 위해 섭취하지만 제품의 구매 성향에서 여성의 구매 비율이 높기 때문에 여성의 비율이 높은 것은 조사자료에 대한 긍정적인 영향을 미칠 것으로 판단된다.

□ 연령대별 특징을 살펴보면 20대 미만이 전체의 1.5%로 가장 적었고, 20대가 5.4%, 30대 28.6%, 40대 38.5%, 50대 22.1%, 60대 이상이 전체의 3.9%로 조사되었으며 그중 40대의 응답율이 38.5%로 가장 높았다.



<남녀 성별비>

<연령별 응답율>

그림 10. 조사표본의 남녀 성별비 및 연령.

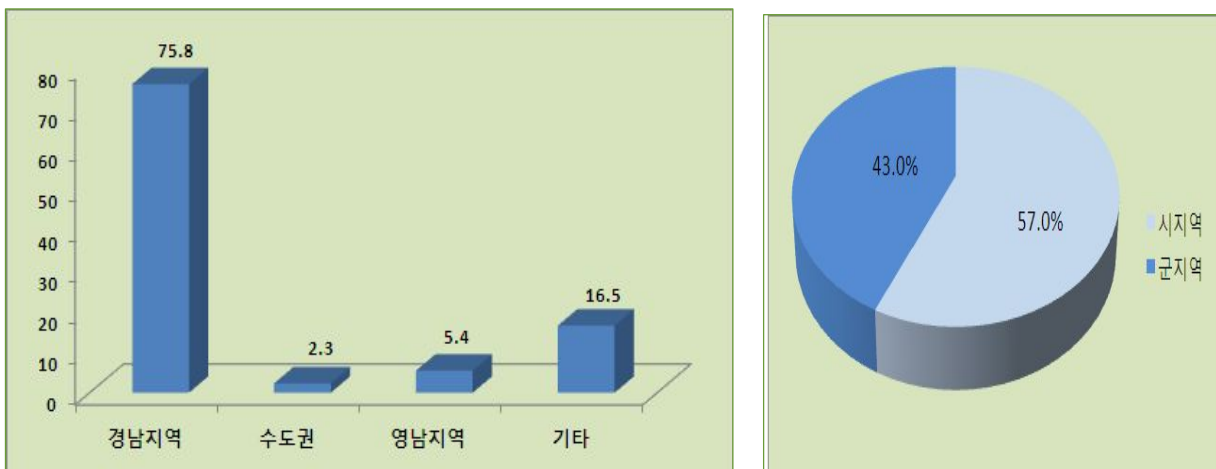


그림 11. 조사표본의 지역별 구성 비율.

- 지역별 특징을 살펴보면, 응답자 중 경남지역의 거주자가 전체의 75.8%로 가장 많았고, 기타가 16.5%, 영남지역이 5.4%, 수도권이 2.3%로 가장 낮았다. 봄철 남해군을 관광하는 관광객을 중심으로 조사하다보니 경남지역이 가장 많았고 그 외 호남지역에서의 방문객이 늘어 기타가 다수 있었다.
- 설문 응답자의 거주 지역별 특징을 분석한 결과, 시 지역 거주자가 전체의 57%, 군 지역 거주자가 전체의 43%를 차지하였다.

② 남해마늘 및 흑마늘에 대한 인지도 조사 결과

▶ 남해마늘에 대한 인지도

- 남해마늘의 인지도에 대해 조사한 결과는 표 17과 같으며 남해마늘에 대한 인지도는 들어 본적이 있다에 응답 빈도가 48%로 가장 높았고, 매우 잘 안다가 32%, 잘 모른다가 0.8%, 전혀 모른다가 0%로 조사되었다. 2012년 조사분석 결과에서는 매우잘안다가 34%, 들어본적이 있다가 43%, 잘 모른다가 11%였으나 이번조사에서는 잘모른다가 0.8%로 조사되어 지난해보다는 남해마늘의 인지도가 향상된 것으로 조사되었다.

표 17. 남해마늘에 대한 인지도 조사 결과

조사 항목	남해마늘 인지도					안다	모른다
	안다			모른다			
	매우잘안다	들어 본적이있다.	조금안다	잘모른다	전혀 모른다		
빈도	120	80	48	2	0	248	2
(%)	(48)	(32)	(19.2)	(0.8)	(0)	(99.2)	(0.8)

- 또한 남해마늘의 인지도가 지난 해에는 응답자 10명중 8명 이상이 남해마늘에 대해 들어 보았거나 알고 있는 것으로 조사된 반면 2013년에는 안다가 99.2% 모른다가 0.8%로 2명만이 잘 모른다고 응답해 남해마늘에 대한 인지도가 한층 향상된 것으로 조사되었다.

▶ 흑마늘에 대한 인지도

- 흑마늘에 대한 인지도는 꾸준히 증가하는 경향으로 조사되었다. 이번 조사에서 매우잘안다가 23.2%, 들어 본적이 있다가 39.2%, 조금안다가 28.8%로, 안다가 92.2%로 지난해조사에서 안다(85.2%)에 비해 인지도 상당히 높아진 경향이었다. 남해마늘 및 흑마늘에 대한 다양한 정보제공, 홍보효과에 의해 인지도가 상당히 증가되고 있으며 이에 흑마늘 음료의 시장도 한층 확대될 것으로 기대된다.



표 18. 흑마늘에 대한 인지도 조사결과

조사 항목	흑마늘에 대한 인지도					안다	모른다
	안다			모른다			
	매우잘안다	들어 본 적이있다.	조금안다	잘모른다	전혀 모른다		
빈도 (%)	58 (23.2)	98 (39.2)	72 (28.8)	17 (6.8)	5 (2)	228 (91.2)	22 (8.8)

③ 흑마늘 음료 ‘오천년에 프리미엄’에 대한 선호도 조사

▶ ‘오천년에 프리미엄’ 음료의 맛에 대한 선호도

□ ‘오천년에 프리미엄’의 맛에 대한 선호도는 좋다가 33.2%로 가장 높았고, 매우좋다가 20.3%로 좋다가 53.5%로 과반수 이상이었으며, 매우나쁘다가 5.5%로 낮았다. 2차년도에 개발된 ‘오천년에’는 매우좋다가 16.8%, 좋다가 36.0%로 좋다가 52.8%였으나 ‘오천년에 프리미엄’은 이보다 더 좋은 반응이었다.

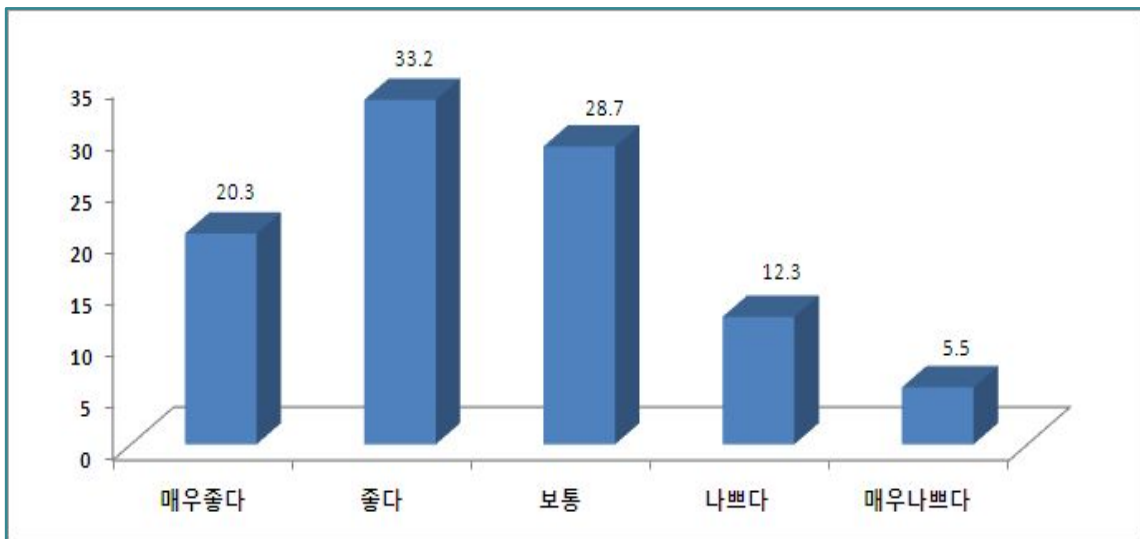


그림 12. ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘 음료의 맛에 대한 선호도.

□ 2차년도에 개발된 ‘오천년에’선호도 조사 시에 기존의 흑마늘 음료에 썩 추출물을 함유하여 마늘냄새를 저감시키는 효과가 있어 소비자의 선호도가 높았는데 ‘오천년에 프리미엄’은 썩 이외에 황금, 작약, 단삼, 뽕잎, 상황버섯의 추출물을 동량 혼합하여 제조한 결과 천연식물의 다양한 풍미에 의해 맛에 대한 선호도가 더 높게 측정되었으며 천연식물 추출물을 첨가해도 마늘의 단맛에 의해 쓴맛은 거의 없어 썩, 천연식물 5종의 첨가는 기능성의 효과에 더하여 맛에도 상당한 영향을 준 것으로 조사되었다.

□ 특히 나쁘다와 매우나쁘다의 의견은 개선해야 되는 점으로 젊은 층에서의 기피현상이

있었다. 젊은 소비층은 기존의 맑은 음료, 기능성 음료, 탄산음료를 선호하고 한약에 대한 기호도가 본 조사 결과 선호도가 낮은 것으로 나타난 것으로 생각된다. 이는 향후 개발될 제품에서 젊은 층을 공략할 수 있는 감각적인 음료의 개발이 필요할 것으로 판단된다.

표 19. ‘오천년에 프리미엄’ 음료의 성별 및 연령층에 따른 맛에 대한 선호도

(명/(%))

구분	‘오천년에 프리미엄’의 선호도					
	매우좋다	좋다	보통	나쁘다	매우나쁘다	
성별	남자	34 (13.6)	42 (16.8)	13 (5.2)	1 (0.4)	0 (0)
	여자	16 (6.4)	41 (16.4)	59 (23.6)	30 (12)	14 (5.6)
연령	20대미만	0 (0)	0 (0)	2 (0.8)	1 (0.4)	1 (0.4)
	20대	0 (0)	3 (1.2)	5 (2)	4 (1.6)	1 (0.4)
	30대	12 (4.8)	24 (9.6)	27 (10.8)	7 (2.8)	2 (0.8)
	40대	22 (8.8)	38 (15.2)	24 (9.6)	9 (3.6)	3 (1.2)
	50대	10 (4)	15 (6)	14 (5.6)	5 (2)	7 (2.8)
	60대이상	6 (2.4)	3 (1.2)	0 (0)	2 (0.8)	0 (0)

▶ ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘 음료의 향에 대한 선호도

□ ‘오천년에 프리미엄’ 음료의 향에 대한 선호도 조사 결과는 그림 13 및 표 20과 같다. 매우좋다가 12.5%, 좋다가 41.3%, 보통이 25.8%로 조사되었으며 부정적인 반응은 20.4%로 낮았다. ‘오천년에 프리미엄’의 향에 대해 긍정적인 반응으로써의 선호도가 높게 조사되었는데 이는 기존의 흑마늘 음료에 여러 가지 천연식물을 첨가함에 따라 흑마늘 냄새는 감소되고 천연식물의 향이 부가되어 좋은 반응을 얻은 것으로 판단되었다.

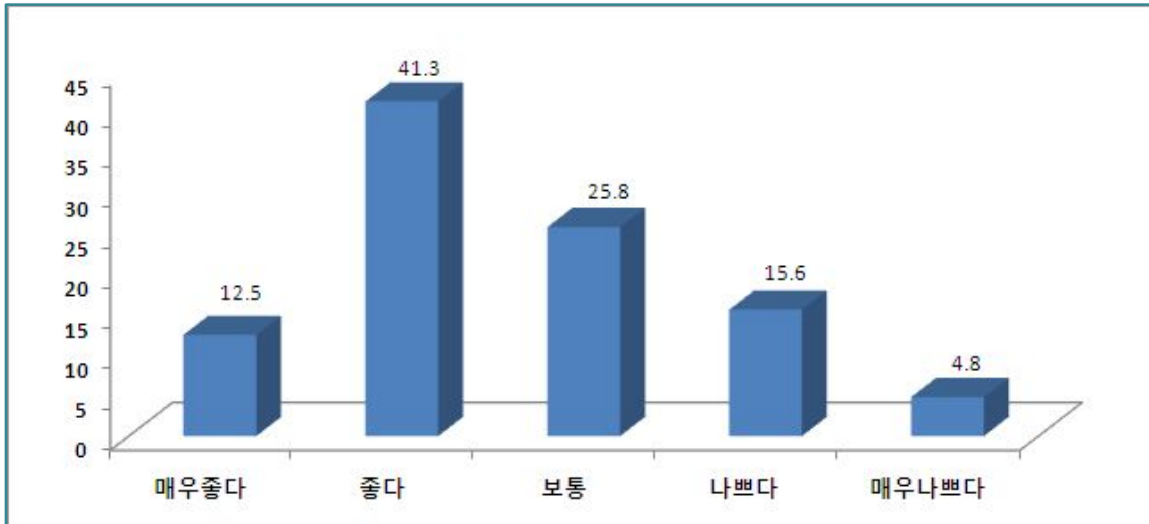


그림 13. '오천년에 프리미엄' 흑마늘 음료의 향에 대한 선호도.

표 20. '오천년에 프리미엄' 음료의 성별 및 연령층에 따른 향에 대한 선호도

(명/(%))

구분	'오천년에 프리미엄'의 선호도					
	매우좋다	좋다	보통	나쁘다	매우나쁘다	
성별	남자	18 (7.2)	28 (15.2)	15 (6)	12 (4.8)	7 (2.8)
	여자	6 (1.6)	67 (26.8)	52 (20.8)	29 (11.6)	8 (3.2)
연령	20대미만	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0.8)	2 (0.8)
	20대	0 (0)	3 (1.2)	3 (1.2)	5 (2)	2 (0.8)
	30대	8 (3.2)	18 (7.2)	31 (12.4)	12 (4.8)	3 (1.2)
	40대	5 (2)	50 (20)	30 (12)	9 (3.6)	2 (0.8)
	50대	4 (1.6)	30 (12)	3 (1.2)	12 (4.8)	6 (2.4)
	60대이상	5 (2)	4 (16)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)

□ '오천년에 프리미엄'음료는 2차년도에 출시한 '오천년에'음료에 천연식물이 더 첨가됨에 따라 일반적인 흑마늘 음료에 비해 더 좋은 반응으로 조사되었으며 진한 흑마늘의 향 이외에 다양한 천연식물의 향이 어우러짐으로써 음료의 풍미가 한층 높아졌다.

- 연령층에 따라 선호도를 조사(표 20)를 보면 40대 및 50대의 선호도 높았는데 이는 젊은 소비층보다 연령이 높은 층에서 식물류의 향미를 더 선호한 것으로 조사되었다.
- 음료의 향은 제품의 맛에 중요한 영향을 미치는 것으로 제품의 성분, 기능성, 효능과 무관하게 소비자를 끄는 힘이 있는데 ‘오천년에 프리미엄’ 음료의 향미는 53.8%가 좋고 25.8%도 보통으로 조사되어 시장성이 있으리라 기대된다.

▶ ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘 음료가 상품화 되었을 때 시장성에 대한 조사

- 흑마늘 음료 ‘오천년에 프리미엄’ 이 상품화 되었을 때 제품을 구매할 의사가 있거나 판매가 잘 될 것 같고 반응성이 좋을 것인지에 대해 질의한 시장성에 조사 결과 그림 14 와 같이 매우 좋다가 15.5%, 좋다가 50.1%로 매우 긍정적인 반응으로 조사되었고(65.6%), 보통은 25.8%였으며 8.6%만이 부정적으로 응답하여 ‘오천년에 프리미엄’ 제품화에 따른 시장성은 매우 긍정적일 것으로 보인다.
- 응답자 중 ‘오천년에 프리미엄’에 대해 보통 이상의 긍정적인 응답을 한 연령층의 빈도는 40대에서 52명(20.8%)이 좋다고 하여 50대에서 선호도가 가장 높아 중장년층을 타겟팅하는 것이 마케팅에 유리할 것으로 판단되며 다음으로 30대에서 38(15.2%)명이 좋다고 응답해 건강에 관심을 가지는 30대에서도 좋은 시장이 형성될 것으로 판단된다.
- 매우나쁘다고 응답한 사람은 20대 미만으로 어린 학생은 감미가 높고 칼로리가 높은 식품을 선호하는 것으로 ‘오천년에 프리미엄’에 맛과 향을 젊은 소비층이 선호할 수 있는 제품으로 수정 보완한다면 보다 우수한 제품이 될 수 있을 것으로 판단된다.

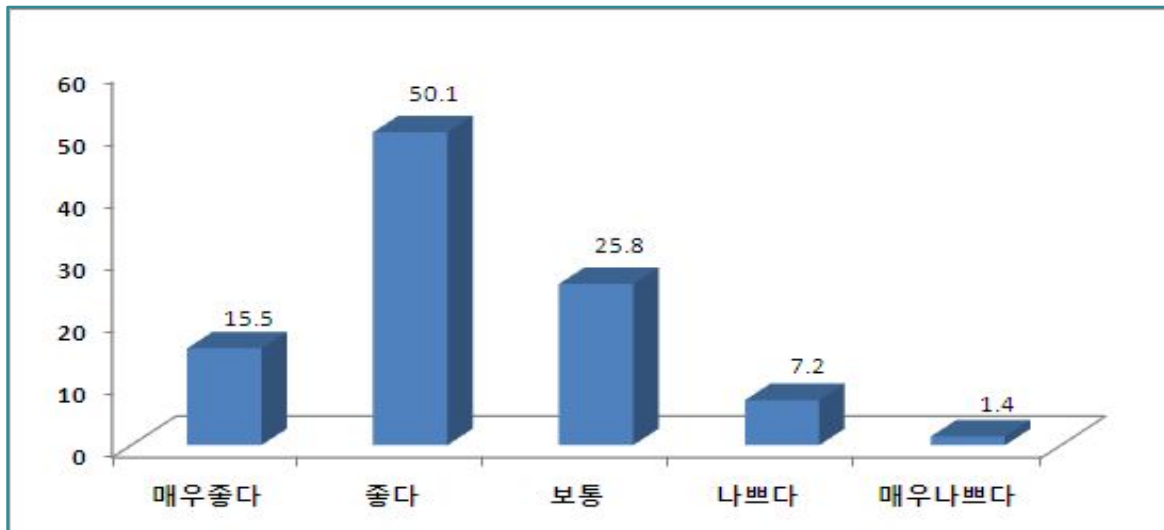


그림 14. ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘 음료의 상품성에 대한 기호도.

표 21. ‘오천년에 프리미엄’의 성별 및 연령층에 따른 시장성에 대한 선호도

(명/(%))

구분	‘오천년에 프리미엄’의 선호도					
	매우좋다	좋다	보통	나쁘다	매우나쁘다	
성별	남자	15 (6)	45 (18)	22 (8.8)	5 (2)	3 (1.2)
	여자	24 (9.6)	80 (32)	42 (16.8)	13 (5.2)	1 (0.4)
연령	20대미만	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.4)	1 (0.4)	1 (0.4)
	20대	3 (1.2)	5 (2)	4 (1.6)	1 (0.4)	0 (0)
	30대	15 (6)	38 (15.2)	14 (5.6)	4 (1.6)	1 (0.4)
	40대	16 (6.4)	52 (20.8)	24 (9.6)	5 (2)	2 (0.8)
	50대	5 (2)	26 (10.4)	16 (6.4)	5 (2)	0 (0)
	60대이상	0 (0)	3 (1.2)	5 (2)	2 (0.8)	0 (0)

▶ ‘오천년에 프리미엄’의 전반적인 기호도에 대한 조사

□ ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘의 음료의 전반적인 기호도는 좋다가 52.5%로 가장 높고 매우좋다가 10.3%, 보통이 27.6%로 90.4%가 긍정적으로 응답했다. 이는 기존의 흑마늘 음료보다 높은 기호도이며, 2차년도에 개발한 썬을 첨가한 시료보다 좋은 반응이었다.

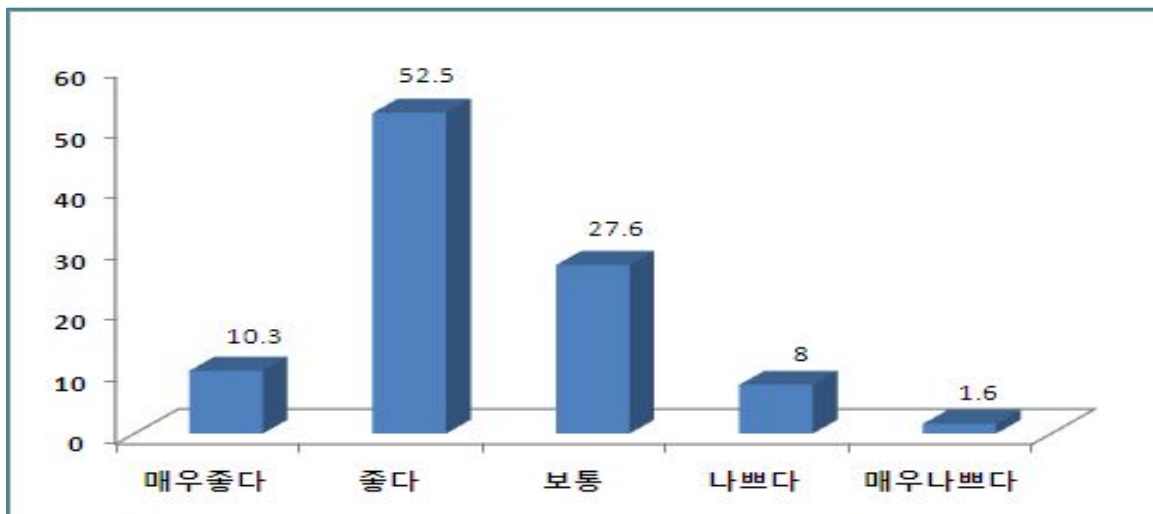


그림 15. ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘 음료의 전반적인 기호도.

표 22. ‘오천년에 프리미엄’의 성별 및 연령층에 따른 시장성에 대한 기호도

(명/(%))

구분	오천년에 프리미엄의 기호도					
	매우좋다	좋다	보통	나쁘다	매우나쁘다	
성별	남자	20 (8)	40 (16)	27 (10.8)	5 (2)	0 (0)
	여자	6 (2.4)	91 (36.4)	44 (17.6)	15 (6)	4 (1.6)
연령	20대미만	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0.8)	2 (0.8)
	20대	3 (1.2)	6 (2.4)	4 (1.6)	0 (0)	0 (0)
	30대	8 (3.2)	44 (17.6)	16 (6.4)	4 (1.6)	0 (0)
	40대	5 (2)	59 (23.6)	22 (8.8)	5 (3.2)	0 (0.8)
	50대	6 (2.4)	22 (8.8)	22 (8.8)	5 (2)	0 (0)
	60대이상	2 (0.8)	0 (0)	5 (2)	3 (1.2)	0 (0)

- 여성과 남성의 선호도를 비교해보면 나쁘다가 2%미만으로 선호도가 높고 여성은 7.6%가 부정적이었으며 그 외는 모두 긍정적이었다.
- 연령대별의 선호도를 비교해보면 40대가 선호도가 높고 다음으로 50대, 30대의 순으로 흑마늘 음료가 피로회복, 체력증진을 위해 선호되는 결과로 조사되었다.
- 흑마늘의 음료의 맛과 향미를 개선하기 위하여 2차년도에는 썩을 첨가시 개선 효과가 있었으며 3차년도에서 개발된 ‘오천년에 프리미엄’은 맛과 향미 이외에 면역증강 기능성을 부가하기 위하여 천연식물 5종을 첨가한 결과 맛과 향미도 우수하며 면역증진의 효과를 기대한 소비자의 반응이 배가되어 ‘오천년에 프리미엄’은 시장성에 있어서 40대 남성을 타겟으로 할 때 시장성이 클 것으로 기대된다.

④ ‘오천년에 프리미엄’의 선호도 조사 종합 결과

- 흑마늘 음료 제조시 썩, 천연식물 5종을 첨가하여 제조한 ‘오천년에 프리미엄’의 맛, 향, 제품화 되었을 때의 시장성에 대하여 조사한 결과, 음료의 맛은 82.2%가 긍정적인 반응으로 조사되었고 17.8% 만이 부정적으로 답하였다. 성별에 따른 선호도는 남성은 응답자 90명중 1명만이 부정적인 응답이었으며 매우좋다와 좋다가 대부분이었으며 여성은 보

통이 59명으로 가장 많았다. ‘오천년에 프리미엄’은 남성의 선호도가 높으며 여성에게서 극선호도는 많지는 않지만 대부분이 맛이 좋다는 반응이었다.

- 2차년도에 개발된 흑마늘 음료에 썩을 첨가함으로써 맛이 부드러워 졌다는 반응이 있었는데 3년차에 개발된 ‘오천년에 프리미엄’은 천연식물의 향이 어우러져 흑마늘 음료의 마늘 냄새를 상당히 저감시킬 수 있는 음료로 개발된 것으로 조사되었다.
- ‘오천년에 프리미엄’은 기존제품에 천연식물을 첨가함으로써 면역증진 효과가 높아진 제품으로 중장년층, 스트레스 과다 노출인 만성피로인 등에 효과가 있을 것으로 기대된다.
- 개발제품은 같은 배합비라도 포장방법에 따라 생산비의 차이가 발생하게 되는데 2차년도에 개발된 ‘오천년에’는 병음료로 출시되어 고품격 소비층을 겨냥한 제품이었으며 이번에 천연식물을 포함하여 면역증진에 도움이 되는 ‘오천년에 프리미엄’도 병음료로 출시하여 제품의 고품격을 추구하고자 하였다.
- 병음료는 제품의 고급화 및 음료의 안전성이 있지만 고가의 물류비와 운반의 불편함이 있어 이를 개선한 포장방법으로 스파우트 파우치 팩을 활용하고자 하였으며 ‘오천년에 프리미엄’의 배합비에 음료의 농도를 조금 낮추어 여성 및 다양한 소비층을 공략할수 있는 제품으로 ‘오천년에 골드’를 개발하여 다양한 소비층을 확보하고자 하였다.

(2) ‘오천년에 파워’ 흑마늘 타블렛 제제 개발 및 소비자 선호도 조사

① 흑마늘 액상제품과 정제제품과의 비교

- ‘오천년에’의 액상제품과 정제제품의 선호도를 비교해본 결과 55명중 18명은 액상제품을 선호했으며 37명은 정제제품을 선호했다.
- 액상제품의 선호 이유는 정제제품은 약품으로 느껴진다는 것과, 액상으로 섭취시 포만감을 준다는 분이 가장 많았고 분말제품의 선호 이유는 간편하게 섭취할 수 있고 휴대가 편리한 점이 많았다.

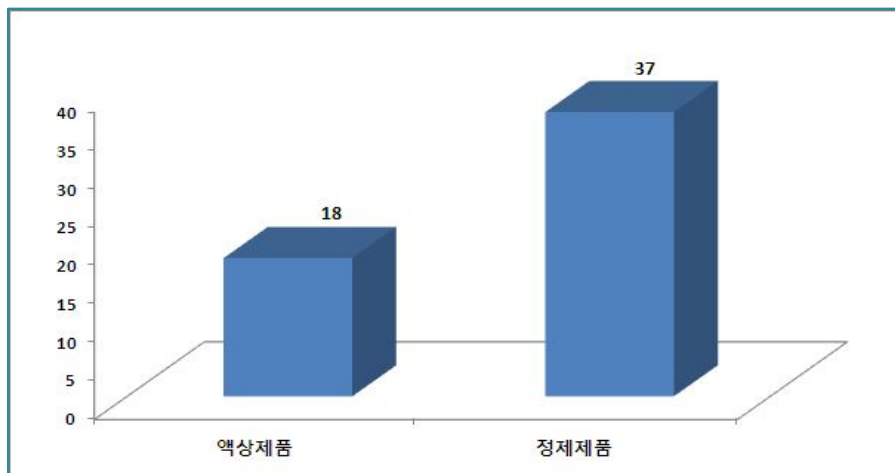


그림 16. 액상제품 및 정제제품의 선호도 조사.

② ‘오천년에 파워’의 맛에 대한 선호도

- 맛에 대한 선호도는 씹었을때의 맛과 향미에 대한 느낌으로 조사되었다.
- ‘오천년에 파워’의 맛에 대한 선호도는 매우 긍정적으로 조사되었는데 매우좋다가 15%, 좋다가 56.4%로 좋다는 반응이 71.4%로 반응이 좋았으며 나쁘다가 3.6%로 낮게 조사되었다.

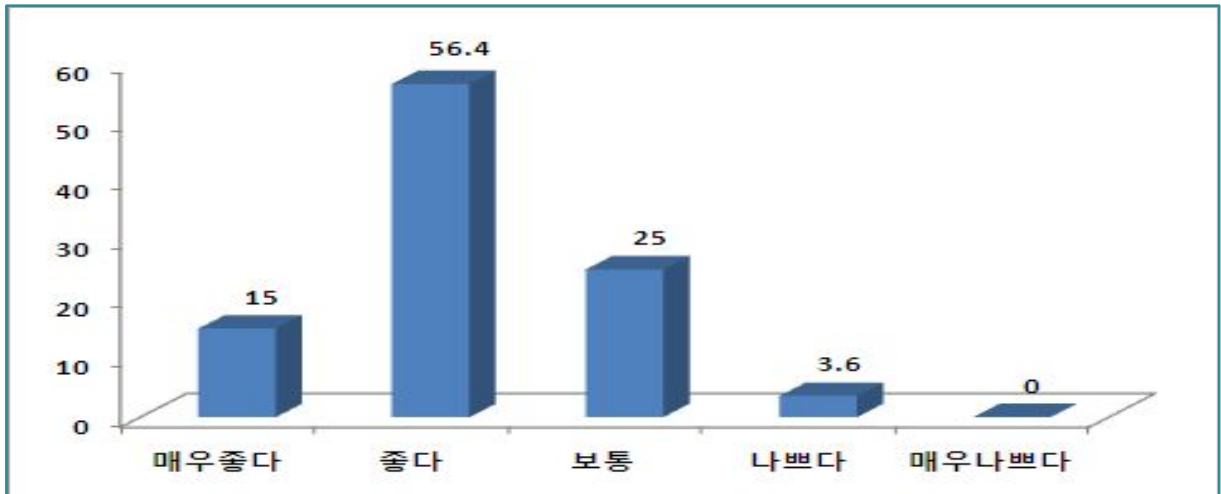


그림 17. ‘오천년에 파워’ 제품의 맛에 대한 선호도.

③ ‘오천년에 파워’가 상품화되었을 때의 시장성

- ‘오천년에 파워’가 상품화되었을 때의 시장성에 대한 조사는 매우좋다가 21.8%, 좋다가 52.7%로 긍정적으로 조사되었다. 나쁘다고 응답한 부분에서는 액상제품의 선호도가 더높아 부정적으로 응답을 한 것으로 조사되었다.

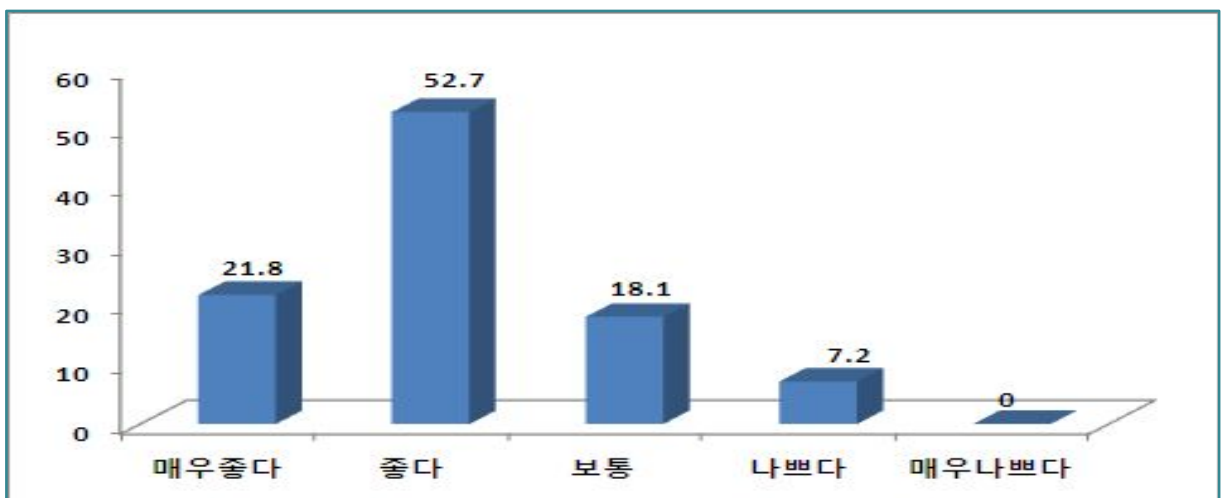


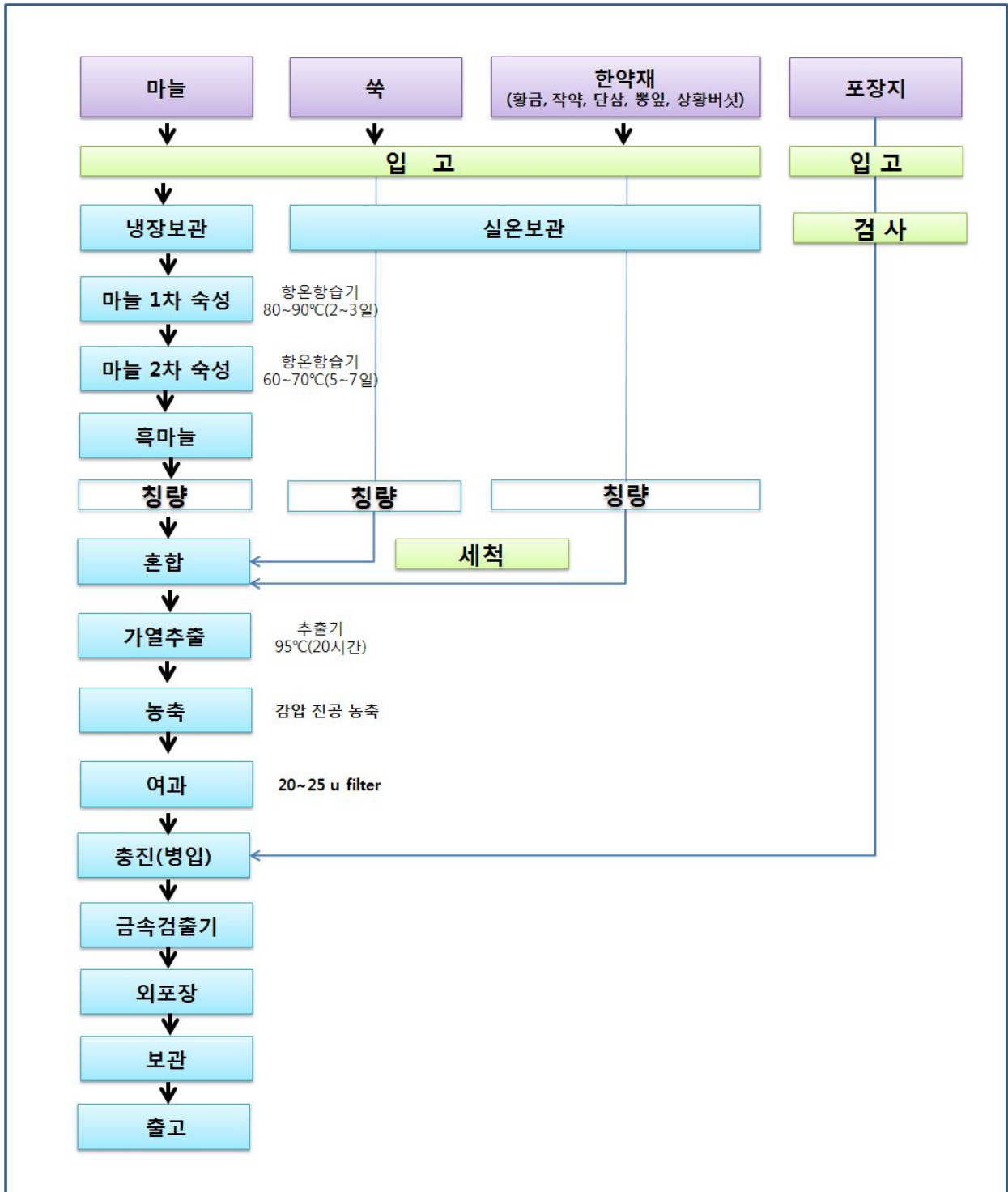
그림 18. ‘오천년에 파워’제품이 상품화되었을 때의 시장성.



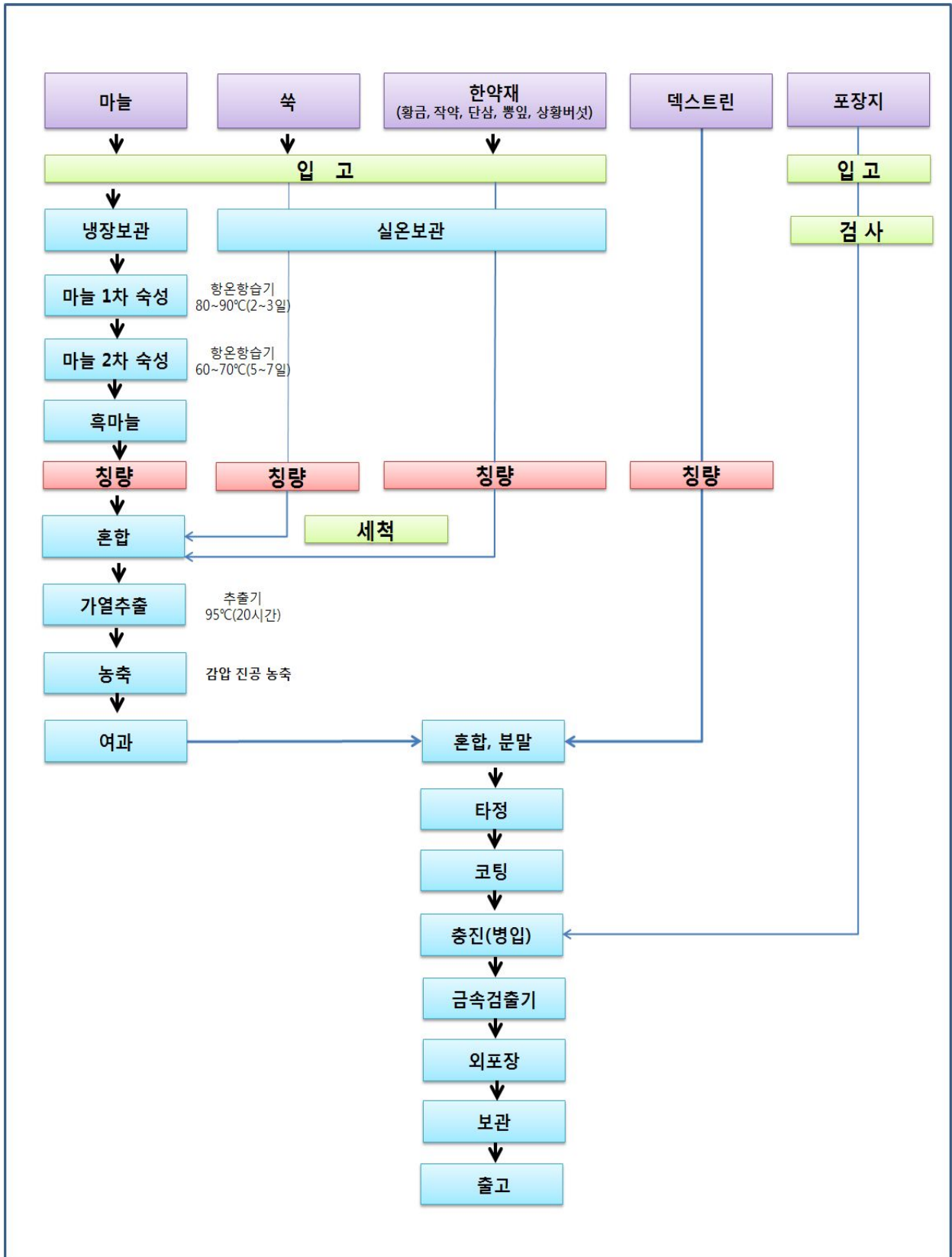
- 기타 의견으로 흑마늘 음료만 접하다가 타블렛으로 된 정제품이 출시된다면 간편하게 섭취할 수 있는 제품으로 기대된다고 응답하였다.
- 위의 조사 결과를 종합해볼 때 흑마늘 음료의 타블렛 출시는 소비자의 좋은 반응을 일으키리라 기대된다.

(3) 개발 제품의 제조 공정도

① ‘오천년에 프리미엄’ 흑마늘 음료의 제조 공정도



② ‘오천년에 파워’ 타블렛의 제조 공정도



(4) 개발 제품의 유통기간 설정

① 유통 중인 유사제품의 유통기간

	
<ul style="list-style-type: none"> <li>· 포장재 : 차광유리병</li> <li>· 원재료 : 흑마늘추출액100%(고형분 11%)</li> <li>· 유통기간 : 제조일로부터 1년</li> <li>· 보관방법 : 상온</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 포장재 : 차광유리병</li> <li>· 원재료 : 흑마늘추출액100%(고형분 16%)</li> <li>· 유통기간 : 제조일로부터 1년</li> <li>· 보관방법 : 상온</li> </ul>

② 개발 제품 ‘오천년애 프리미엄’의 유통기간 설정 : 제조일로부터 1년

- 포장재 : 차광유리병
- 원재료 : 흑마늘 추출액 5%, 천연식물 추출액 1%(7:3)의 비율로 혼합
- 보관방법 : 상온
- 유통기간 설정 : 차광유리병으로 외부공기와 접촉이 없으며 상기 유사제품과 포장 및 재료가 유사하므로 본 개발제품인 ‘오천년애 프리미엄’의 유통기간을 제조일로부터 1년으로 설정

(5) 상품화를 위한 포장 디자인 개발

① ‘오천년에 프리미엄’ 및 ‘오천년에 골드’ 흑마늘 음료의 디자인



② ‘오천년에 파워’ 타블렛의 디자인



## 6) 개발 제품의 수출을 위한 해외 시장분석

### (1) 국내 제형 및 유통채널별 건강기능식품 시장구조

- 국내 건강식품은 알약형 제형의 구입율이 가장 높고, 약상이나 음료 형태의 제품이 그 다음을 차지하는데, 구입율은 2010년 대비 약 2.5% 증가한 상태이며, 연질캡슐도 유사한 범위로 구입율이 증가하였음.
- 이상에서 언급한 제형을 제외한 제형들의 구입율은 10% 미만으로 매우 낮아 국내 건강식품은 다양한 제형으로 제조 가능함에도 불구하고, 주요 2~3가지 제형에 대한 선호도가 매우 높음을 알 수 있음.
- 13가지 이상의 유통채널을 가지고 있으나 20% 이상의 구입율을 가지는 유통 채널은 전문판매점과 방문판매임.
- 다음으로 약국, 다단계 판매, 대형할인점에서의 구입율이 10% 이상이었고, 2010년 대비 다단계 판매점, 약국, 드럭스토어를 통한 판매가 증가하고 있고, 우선순위 1, 2위에 있는 건강기능식품판매점과 방문판매 구입율은 오히려 감소하였음.

제형별 시장구조 (2010년 vs 2012년)				유통 채널별 시장구조 (2010년 vs 2012년)			
	2010 구입률	2012 구입률	금액 구성비		2010 구입률	2012 구입률	금액 구성비
(base)	551명	583명	%	(base)	551명	583명	%
액상/ 음료형태	39.0	41.5	42.5 (39.4%)	건강기능식품 전문판매점	26.3	22.5	26.4 (29.6%)
알약형	57.7	59.9	30.8 (33.2%)	방문판매	33.4	24.4	22.4 (23.9%)
연질 캡슐	21.8	23.8	11.6 (11.0%)	다단계 판매	12.9	14.1	11.8 (11.0%)
분말형/ 과립형	6.4	8.6	4.7 (5.1%)	대형 할인점	8.7	13.4	10.0 (5.8%)
하드 캡슐	5.6	4.1	3.6 (2.8%)	인터넷 쇼핑몰에서 주문	8.2	9.8	8.7 (5.9%)
젤리, 카라멜 형태	6.5	2.6	3.0 (5.6%)	백화점	7.1	6.5	5.8 (5.7%)
환	2.5	2.4	2.2 (2.5%)	약국	15.8	16.1	5.7 (5.1%)
기타	0.9	1.7	1.6 (0.4%)	TV 홈쇼핑	11.8	9.9	4.6 (8.5%)
				제조/판매회사 홈페이지	1.8	1.0	0.8 (2.6%)
				드럭스토어	0.0	0.9	0.2 (-)
				병원	0.0	0.3	0.1 (-)
				광고 보고 전화 주문	0.0	0.0	0.0 (0.1%)
				기타	3.4	4.8	3.4 (1.9%)

(2) 국내 건강관련 식품시장 현황 및 면역활성 제품이 차지하는 비중

- 국내 건강기능식품의 시장은 건강관심 고조, 서구식 식생활, 인구 고령화 등의 원인에 의해 매년 큰 폭으로 성장하고 있다. 식품의약품안전처는 2011년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과 총 생산액은 1조 3천 682억원으로 2010년(1조 671억원) 대비 28.2% 증가하였음.
- 이는 건강기능식품 연평균 성장률(27.4%)과 비슷한 수준으로 국내 식품시장의 다른 업종(일반식품, 기구용기 포장지, 식품첨가물)의 평균 성장률(11.7%)보다 2배 이상의 증가추세이며, 국내 총생산(GDP)의 5.9%, 제조업(GDP)의 7.8%보다 높은 성장률을 보이고 있음.
- 식품의약품안전처에서는 면역기능 향상에는 면역력 증진 및 과민 면역반응 완화에 도움을 주는 원료로 크게 구분하여 고시하였음. 그 기능성이 인정된 원료로는 게르마늄 효모, 금사상황버섯, 당귀혼합추출물, 클로렐라, 표고버섯 균사체, *Enterococcus faecalis* 가열처리 건조분말, L-글루타민, 다래추출물, 소엽추출물, 피카오프레토 분말 등 복합물, 구아바잎 추출물 등 복합물, 스피루리나 청국장균 배양 정제물 등록되어 있으며 고시형 원료로는 인삼, 홍삼, 알코시글리세롤 함유 상어간유, 알로에겔이 등록되어 있음.

표 23. 건강기능식품 생산 현황('04~'11)

구 분	총 생산액 (억원)	총 생산량 (톤)	내수용		수출용	
			생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)	생산량(톤)
2004	2,506	4,764	2,263	4,250	242	514
2007	7,235	10,578	6,888	10,239	346	339
2008	8,031	13,687	7,516	12,990	514	697
2009	9,598	19,885	9,184	19,293	415	592
2010	10,671	25,361	10,211	24,994	460	367
2011	13,682	40,258	13,126	39,611	556	647
비율(%) ('11/'10)	28.2	58.7	28.5	58.5	21.0	76.3

- 건강기능식품의 연도별, 품목별 상위품목은 생산액은 홍삼제품이 7,1791억원으로 전체의 52.6%를 점유하며 최고의 생산액을 달성하였고, 그 다음으로 비타민 및 무기질(1,561억원), 개별인정형 제품(1,413억원), 알로에 제품(691억원), 오메가-3제품(509억원)의 순이었으며 특히 감마리놀렌산 제품은 223억원의 생산액을 보여 전년대비 139.8% 늘어나 괄목할만한 성장세를 보였음.

표 24. 상위 10 품목 건강기능식품 생산 현황('07~'11)

구 분	총 생산액					증가율 ('11/'10, %)
	2007	2008	2009	2010	2011	
총 액	7,235	8,031	9,598	10,671	13,682	28.2
1 홍삼	3,284	4,184	4,995	5,817	7,191	23.6
2 비타민 및 무기질	604	531	761	991	1,561	57.5
3 개별인정형(밀크씨슬 등)	249	416	800	1,129	1,435	27.1
4 알로에	797	639	648	584	691	18.4
5 오메가-3 지방산 함유 유지	142	266	334	348	509	46.2
<b>누계 (5품목)</b>	<b>5,076</b>	<b>6,036</b>	<b>7,538</b>	<b>8,869</b>	<b>11,387</b>	<b>28.4</b>
6 프로바이오틱스	174	190	254	317	405	27.8
7 인삼	348	413	364	341	381	11.7
8 감마리놀렌산	187	145	108	93	223	139.8
9 가르시니아캄보지아 추출물 <sup>1)</sup>	-	-	-	208	207	△0.5
10 식이섬유	3	1	99	117	116	△0.9
<b>누계 (10품목)</b>	<b>5,788</b>	<b>6,785</b>	<b>8,363</b>	<b>9,945</b>	<b>12,719</b>	<b>27.9</b>
11 기타품목	1,447	1,246	1,235	726	963	32.6

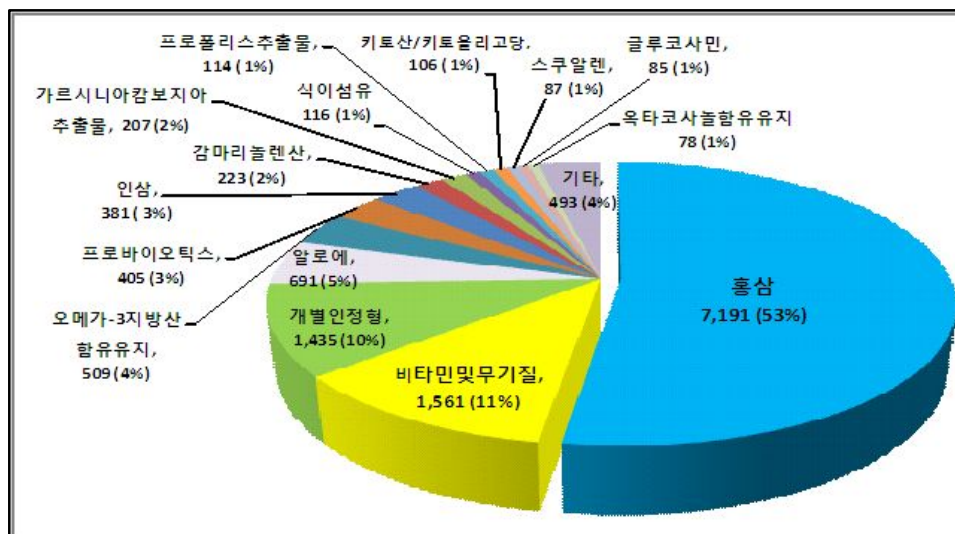


그림 19. 건강기능식품 품목별 시장 현황('11년/억원).

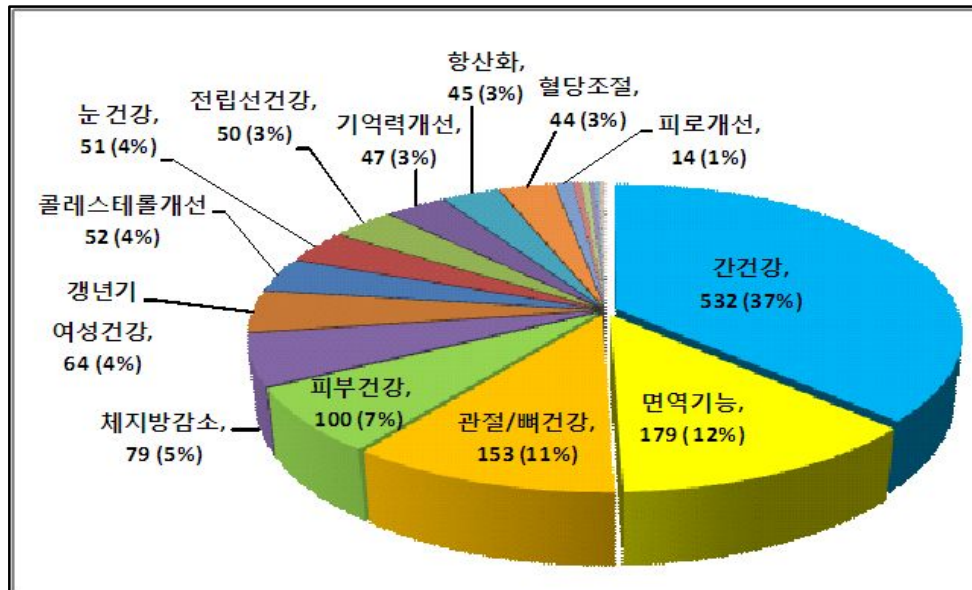


그림 20. 개별인정형 제품 기능성 내용별 현황('11년/억원).

- 전체 개별인정형 제품의 기능성을 분석해 보면 장건강을 위한 제품이 가장 많고, 다음을 면역기능 제품이 12%로 2위를 차지하고 있음. 이와 비슷한 비율로 관절/뼈건강 제품에 대한 제품의 비율도 높음.
- 면역기능에 도움을 주는 건강기능식품의 총생산액과 그 구성비를 살펴보면 역시 그 중 홍삼제품이 대부분을 차지하고 있으며 알로에 및 인삼제품이 그 뒤를 따르고 있고, 개별인정형 제품은 1.1%에 그쳐 국내에서 인삼 및 홍삼제품이 면역력 강화 제품으로 절대적인 생산량을 차지하고 있음.

표 25. 국내 건강기능식품 중 면역활성 증대 제품비('11년/억원)

구분	총 생산액	금액 구성비 (%)
총액	13,682	100
1 홍삼	7,191	52.6
2 알로에	691	5.2
3 인삼	381	2.8
4 개별 인정형 제품	179	1.1
5 총계	8442	61.7

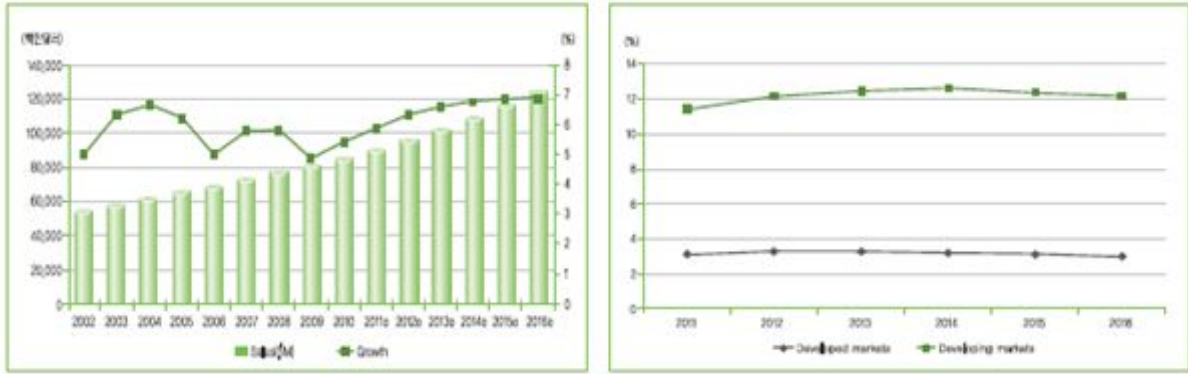


표 26. 국내 개별인정형 면역력 강화 제품

소재	제품	제형	특징
게르마늄 효모		캡슐, 게르마늄 효모 복합추출물	면역력강화
금사상황버섯		홍삼, 녹용, 산수유 및 금사상황버섯을 혼합한 환	면역력강화
당귀혼합추출물		당귀, 천궁, 백작약 및 정제수, 벌꿀, 비타민 B군의 혼합용액	면역력강화
클로렐라		클로렐라 원말	면역력강화
표고버섯균사체		액상 및 분말 형태	면역력강화
스피루리나		스피루리나 원말	면역력강화
L-글루타민		타블렛	면역력강화
소엽 추출물		화장품 원료	면역과민반응개선
피카오프레토분 말등복합물		타블렛	면역과민반응개선
구아바잎추출물 등복합물		타블렛	면역과민반응 개선
다래 추출물		타블렛	면역과민반응 개선
구아바잎추출물 등복합물		타블렛	면역과민반응 개선

(3) 해외 건강관련 식품시장에서 면역활성 제품이 차지하는 비중

□ 2011년 세계 건강기능식품 시장규모는 89십억달러이며, 향후 2016년에는 120십억달러를 상회할 것으로 예상되며, 특히 개발도상국의 성장률이 향후 2016년까지 약 12%를 유지할 것으로 예상됨. 국가별로 보면 미국이 29,242백만 달러로 가장 높으며 다음으로 서유럽이 15,657백만달러임.



<A>

<B>

그림 21. 건강기능식품 세계시장 규모 및 성장률(A), 건강기능식품 시장규모 성장률 추세(B).

자료1 : Nutrition Business Journal estimates(\$mil., consumer sales).

자료2 : 'NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report', Nutrition Business Journal

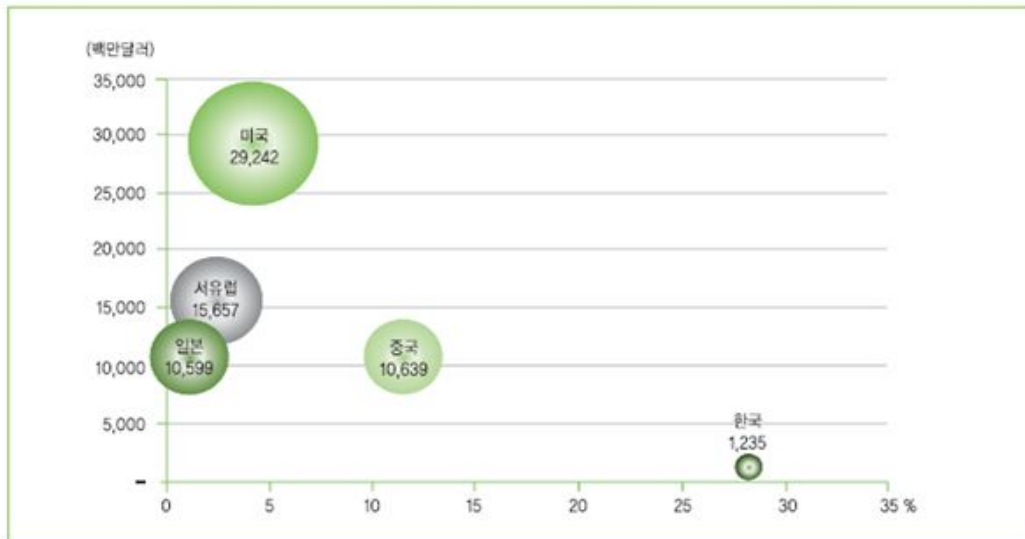


그림 22. 국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률(2011)

주) 한국은행 경제통계시스템(ECOS), 2011년도 원/달러 평균환율 적용

자료1 : 식약청, '11년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표', 보도자료(2012. 5. 9)

자료2 : 'NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report', Nutrition Business Journal(2012)

### ① 미국시장

- 미국내 기업들은 건강기능식품 연구개발 역사가 오래된 관계로 과학적 수준이 상당히 높으며, 미국식품과학회(IFIT)에 따르면 최근 가장 인기를 끌고 있는 품목은 프로바이오틱스, 비타민, 오메가-3 제품을 들 수 있음.
- 프로바이오틱스는 미국 식이보충제 시장의 23%를 차지하고 있는데, 이는 고령화 추세에 따른 노인질병 증가와 질병예방의 중요성 인식 등에 따른 것으로 추정되며, 비타민은 종합비타민이 46억불, 단일제 비타민이 40억불 정도의 규모를 형성하고 그중 비타민 B가 가장 많이 판매되며 비타민 C, 비타민 D가 뒤를 잇고 있음. 오메가-3 제품 역시 해마다

가파른 성장세를 보이고 있음.

- 국내 시장에서 가장 인기가 높은 홍삼 제품의 경우 미국에서는 그 점유율이 미미한 것으로 조사 되어 있음. 현재 국내기업 중 미국에서 현지 판매를 하고 있는 회사를 살펴보면 한국 담배 인삼공사, 대상, NH 한삼인이 기 진출하여 홍삼 및 인삼제품을 통해 면역력 강화 제품 판매를 하고 있음.

< 2006~2010년 건강기능식품 성분 별 판매량 >

(단위: 백만 달러, %)

구분	2006	2007	2008	2009	2010	CAGR
식이보조제품	8,579.6	9,219.6	9,768.3	10,231.2	10,722.7	5.9
-복합 식이보충용제품	1,093.2	1,238.6	1,325.3	1,371.70	1,408.8	7.2
-허브/전통 식이보충용제품	2,989.0	3,145.2	3,248.2	3,265.60	3,281.0	3.0
복합 허브/전통 식이보충용제품	555.3	611.1	650.1	669.4	677.6	5.9
에키나시아	126.3	123.2	121.7	126.2	129.7	-3.2
달맞이꽃 종자유	33.6	31.6	29.5	29.9	29.5	-4.8
마늘	154.7	140	129	119.8	112.4	-7.3
은행잎 추출물	103	104.6	99.3	97.8	95.6	-2.1
인삼	97	98	90.3	86.3	83.4	-2.2
서양고추나무(세인트존스워트)	57.8	56.6	55.6	54.4	55.8	-1.7
기타 허브/전통 보조제	1,861.3	1,980.1	2,072.8	2,081.9	2,096.9	4.3
-비 허브 식이보충용제품	5,590.6	6,074.4	6,520.1	6,965.6	7,441.7	7.4
칼슘보충제	1,070.9	1,090.2	1,133.8	1,189.8	1,253.7	3.2
코엔자임 Q10	361.7	416.3	443.3	503.2	543.4	10.7
비허브 식이보충용제품 혼합물	538	627.5	675.3	702.3	731.2	8.5
안구건강보조제품	158.2	182.9	204.6	231.4	260.4	14.0
심해어유	241	290.8	342.3	411.5	460.7	19.6
글루코사민	820.2	853.1	871.8	852.6	871.4	1.5
미네랄 보충제	778.8	835.4	891.8	961.5	1,050.6	7.2
오메가 3-6-9	93	123.6	160.7	224.2	280.5	33.2
프로바이오틱스 보충제	292.9	375.8	434.1	501.7	566.9	19.1
단백질 분말	-	-	-	-	-	-
로알젤리	91.2	94.8	101.9	101.4	100	2.8
Sam-E	92.4	93.8	103.7	116.3	127.6	7.2
기타 비허브 식이보충용제품	1,052.50	1,090.4	1,156.90	1,169.6	1,195.4	4.1
기능성 음료	31.1	42.9	70.8	95.6	117.2	51.7
비타민	6,912.3	7,205.8	7,645.8	8,059.8	8,593.0	5.1
-멀티비타민	3,977.6	4,093.0	4,305.8	4,396.2	4,635.8	3.5
-단일비타민	2,934.7	3,112.8	3,340.0	3,663.5	3,957.2	7.2
비타민 A	292.2	322.8	342.9	351.4	369.8	8.8
비타민 B	976.8	1,046.1	1,184.20	1,355.9	1,494.2	10.4
비타민 C	833.8	871.7	919.7	947.2	990.4	4.2
비타민 D	152.8	183.5	248	368.3	451	26.2
비타민 E	361.2	339.9	316.1	299.7	293.1	-6.2
기타 단일비타민	318	348.8	329.2	341.1	358.8	4.1
어린이용 비타민 및 식이보충용제품	361.6	388.3	415.1	448.7	481.1	5.7
총합계	15,884.6	16,856.6	17,900.0	18,835.3	19,914.0	

출처 : Official statistics, Trade associations, Company research, Euromonitor International estimates

② 일본시장

- 일본의 건강 기능식품 시장의 경우 2005년까지 계속적으로 증가하여 1조 9,000억엔에 달하였으나 이후 경기침체로 인해 시장이 정체하는 경향을 나타내면서 2008년 기준 1조 6,800억엔의 시장규모를 형성하고 있음.
- 보건용도 별 시장규모와 특성은 다음과 같다.
  - 정상작용 : 유산균 관련 품목은 소비자가 저가격 지향에 따라 일반상품의 특별 판매가 증가하였고 소비자의 소식화 및 다양화에 따라 상품의 용량이 소형으로 변하면서 시장 규모가 조금 축소됨.
  - 콜레스테롤 : 콜레스테롤 제품은 생활습관병과 관련이 깊어 2007년의 시장규모를 약간 웃도는 수준을 기록함
  - 혈압 : 펩타이드를 주 성분으로 한 품목이 앞으로 크게 성장할 것으로 전망
  - 뼈 미네랄 : 미용과 관절이 강력한 키워드로 인식되며 콜라겐, 히알루론산, 글루코사민의 성장률이 가파른 추세임. 일본 건강산업신문이 기능성식품 주문자 생산방식(OEM)기업을 대상으로 2011년 상반기 인기소재와 하반기 예상인기소재를 조사한 결과, 콜라겐과 글루코사민이 6년 연속 상반기 인기소재 투톱체제를 고수한 것으로 나타났음.

< 보건용도별 시장규모 추이 >

(단위: 억엔)

		1997	1999	2001	2003	2005	2007		2009	
								'05대비%		'07대비%
정 장	올리고당	103.7	91.1	56.2	66.8	58.9	71.8	121.9	34.0	47.4
	유산균	978.8	1863.0	3171.1	3420.8	3516.8	3249.3	92.4	2925.6	90.0
	식이섬유	119.1	115.5	128.1	141.8	129.9	152.5	117.4	104.6	68.6
	소계	1201.6	2069.6	3355.4	3629.4	3705.6	3473.6	93.7	3064.2	88.2
	콜레스테롤	0.3	4.3	27.9	113.6	228.0	230.3	101.0	234.4	101.8
	혈당	13.8	71.6	100.0	88.1	147.7	250.5	169.6	208.2	83.1
	뼈/미네랄	92.0	44.9	113.9	120.1	143.3	73.3	51.2	192.6	262.8
	치아	0.0	3.7	186.7	804.8	961.0	954.0	99.3	512.0	53.7
	혈당	6.7	5.2	184.3	277.4	232.9	210.5	90.4	215.9	102.6
	중성/체지방	0.0	70.0	152.4	635.4	880.7	1606.0	182.4	1067.1	66.4
	합계	1314.4	2269.3	4120.6	5668.8	6299.2	6798.2	107.9	5494.4	80.8

출처 : 일본 건강영양식품협회, 2010

- 일본 역시 면역 증진에 대한 보건용도가 지정되어 있지 않아서 국내 기능성원료로 인정된 원료별로 살펴보면 인삼 관련제품 0.75%, 프로바이오틱스 보충제 2.7%를 차지하고 있음. 국내에서의 건강 기능식품으로서 홍삼 및 인삼이 차지하는 비율에 비해 일본 또한 그 점유율이 미미한 것으로 조사 되었음.

< 2004~2009년 건강기능식품 성분 별 판매량 >

(단위: 십억 원)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	CAGR
식이보조제품	572.2	607.6	608.0	615.0	616.1	620.1	1.6
-복합 식이보조제품	72.1	72.0	72.7	74.0	73.4	72.6	0.1
-허브/전통 식이보조제품	229.2	233.8	230.5	231.8	232.3	233.2	0.3
복합 허브/전통 식이보조제품	34.6	36.7	37.5	38.9	38.9	39.2	2.5
에키나시아	4.5	5.4	6.2	6.3	6.3	6.3	6.7
달맞이꽃 종자유	3.7	4.4	5.0	5.2	5.4	5.6	8.4
마늘	11.0	11.1	11.4	11.7	12.0	12.3	2.3
은행잎 추출물	4.1	4.3	4.6	4.8	4.9	5.1	4.7
인삼	9.1	9.4	9.8	10.2	10.5	10.9	3.7
서양고추나무(세인트존스워트)	3.7	3.8	4.0	4.0	4.0	3.9	1.2
기타 허브/전통 보조제	158.6	158.6	152.1	150.8	150.3	150.0	-1.1
-비 허브 식이보조제품	343.0	373.8	377.5	383.2	383.8	386.8	2.4
칼슘보충제	32.6	33.9	34.6	35.3	36.2	37.0	2.6
코엔자임 Q10	20.0	42.0	30.7	29.1	26.5	26.0	5.4
비허브 식이보조제품 혼합물	37.5	35.3	35.3	35.2	34.5	33.4	-2.3
안구건강보조제품	21.6	24.8	29.1	29.8	30.5	31.2	7.7
심해어유	17.4	17.6	18.5	19.7	21.0	22.3	5.1
글루코사민	23.3	26.1	28.2	29.1	30.2	31.6	6.2
미네랄 보충제	25.5	27.3	29.5	31.7	32.7	33.4	5.5
프로바이오틱스 보충제	36.3	38.0	39.6	41.5	40.7	40.0	2.0
단백질 분말	11.1	11.7	12.4	12.8	13.1	13.5	3.9
로알젤리	36.6	36.2	38.1	38.4	38.9	39.5	1.5
기타 비허브 식이보조제품	81.1	80.7	81.7	80.5	79.4	78.9	-0.5
기능성 음료	284.2	275.3	265.0	238.5	236.1	230.2	-4.1
비타민	485.0	515.6	548.0	562.5	570.8	579.6	3.6
-멀티비타민	234.5	257.0	281.1	289.5	291.4	293.1	4.6
-단일비타민	250.5	258.7	266.9	273.0	279.5	286.5	2.7
비타민 A	1.9	2.0	2.0	2.0	2.1	2.1	1.6
비타민 B	133.1	136.0	139.4	140.8	142.5	144.5	1.7
비타민 C	65.8	70.5	74.7	78.6	82.7	87.0	5.7
비타민 D	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.2
비타민 E	48.8	49.3	49.9	50.5	51.2	52.0	1.3
어린이용 비타민 및 식이보조제품	19.7	19.9	20.1	19.8	19.0	18.7	-1.0
총합계	1,361.1	1,418.4	1,444.1	1,435.8	1,442.1	1,448.6	

출처 : Official statistics, Trade associations, Company research, Euromonitor International estimates

③ 중국시장

□ 중국의 2010년 기준 건강기능식품 규모는 1,330억위안이며, 매해 전년대비 30% 성장하여 2015년에는 4,500억위안 규모가 될 것으로 예상됨. 인구의 급격한 노령화와 식습관 및 생활습관의 변화, 비만, 당뇨 등과 관련된 질병의 증가가 보건식품 시장 성장의 주요 요인이 되고 있음.

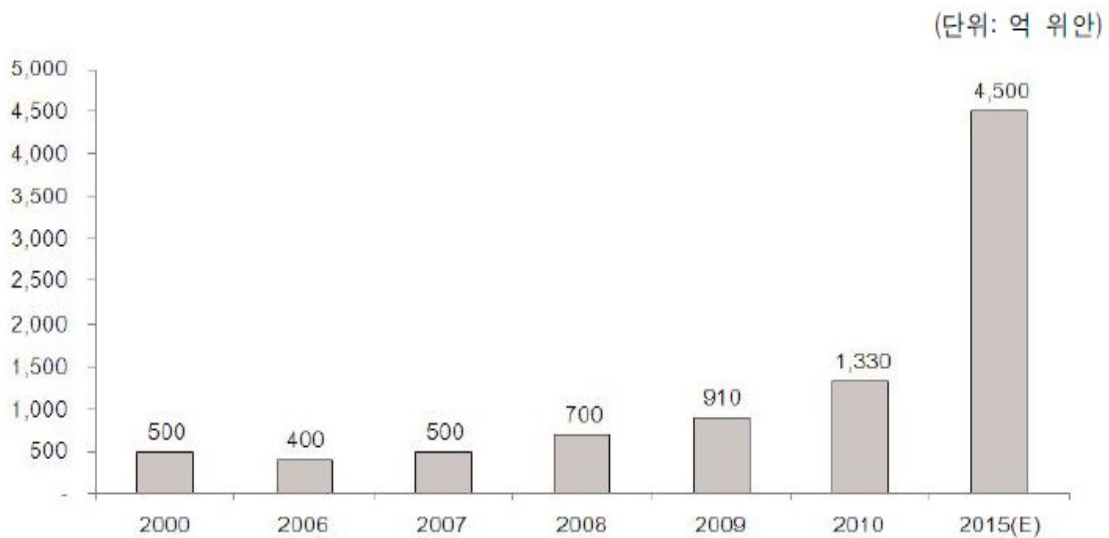
< 중국인민공화국위생부가 규정한 보건식품의 27가지 기능>

1	면역력강화기능	15	비만 조절 기능
2	혈 지질 감소기능	16	기억력 개선 보조 기능
3	혈당 감소 기능	17	인후 상쾌 기능
4	산소결핍 시 인내력 제고 기능	18	영양성 빈혈 개선 기능
5	생장 발육 개선 기능	19	화학성 간손상 보조보호 기능
6	시각피로 완화 기능	20	여드름 제거 기능
7	납 배출 촉진 기능	21	기미 제거 기능
8	골밀도 증가 기능	22	피부 수분 개선 기능
9	혈압 감소 보조 기능	23	내장균 조절 기능
10	수면 개선기능	24	피부 유분 개선 기능
11	유량 분비 촉진 기능	25	소화 촉진 기능
12	체력 피로 완화 기능	26	변비 개선 기능
13	산소결핍 시 인내력 제고 기능	27	위점막 손상 보조 보호 기능
14	방사선 피해 보조 기능		

\* 영양 보충 기능(별도로 분류되는 특정 기능은 아님)

출처 : 중국인민공화국위생부

<중국 건강기능식품 시장 규모>



출처: China Health Care Association

□ 중국의 경우 중국인민공화국 위생부에서 고시한 보건식품의 기능성에 대해 면역력 강화 기능이 존재하며 동물실험만을 통해 제품으로 등록이 가능함. 인삼 관련제품 5.5%, 프로바이오틱스 보충제 0.36%를 차지하고 있어 미국과 일본에 비해 인삼관련 제품에 대한 선호도가 훨씬 큼.

□ 전체 보건의식품 중 면역력 강화에 대한 매출액이 37.3%, 혈액지질 조절이 13.8%, 피로회복 기능의 보건의식품이 10.8%의 순으로 나타났음.

< 2004~2009년 건강 제품 판매량 >

(단위: 백만 위안)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009
OTC	21,842.8	24,160.6	26,637.9	29,317.4	32,338.8	35,384.2
운동 보조제	112.3	117.6	141.6	162.8	189.2	222.4
비타민 및 식이보충용 제품	42,373.8	46,059.0	50,445.2	54,710.4	57,708.4	62,929.0
체중관리제품	4,568.2	5,100.3	5,254.5	5,397.2	5,468.8	5,784.5
허브/전통 의약품	19,047.9	20,985.6	22,992.1	25,138.3	27,134.8	29,835.9
알러지케어	420.1	458.9	507.2	565.5	628.2	695.4
유아용 건강제품	3,800.5	4,386.5	5,015.0	5,695.8	6,253.0	6,932.9
건강 제품 전체 시장 규모	69,264.2	75,826.4	82,894.2	90,032.8	96,184.9	104,835.0

출처 : Official statistics, Trade associations, Company research, Euromonitor International estimates

비고: 각 제품의 총합이 건강 제품 전체 시장규모보다 크게 나타나는 이유는 4개의 알러지케어 하부 분류기준 군에 속하는 항목들이 알러지케어, 기침 및 감기약, 스킨케어 제품, 눈 건강 보조제의 매출액과 중복되어 합산되었기 때문임

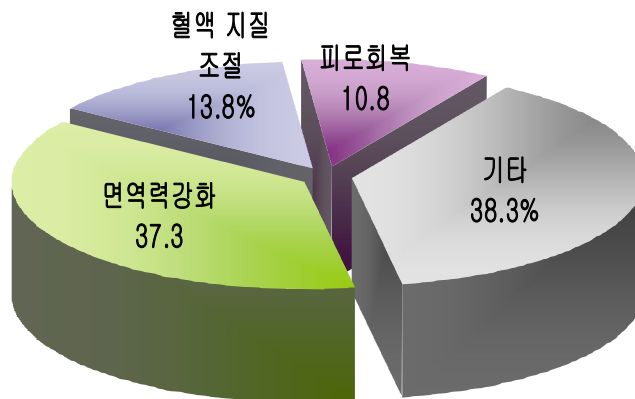


표 27. 중국내 주요 면역활성 제품

제품 사진	제품표시사항
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 베이징벌꿀</li> <li>○ 주요기능 : 인체면역기능 증강, 소화 및 신경계통양생</li> <li>○ 판매가격 : 198원</li> <li>○ 간략소개 : 베이징시장에서 2위를 차지하는 보건의식품임</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 완지충차오왕(万基虫草王)</li> <li>○ 주요성분 : 동충하초</li> <li>○ 시장가격 : 95원</li> <li>○ 주요기능 : 면역력 증강, 중앙 저항력 및 병원균 저항력 제고</li> <li>○ 간략소개 : 광저우시장에서 8위를 차지하고 있는 보건의식품임</li> </ul>

< 2005~2010년 건강기능식품 성분 별 판매량 >

(단위: 백만 위안)

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	CAGR
식이보조제품	27,964.8	30,731.3	33,597.0	36,494.6	38,360.2	41,889.0	8.4
-복합 식이보조제품	4,791.7	5,424.9	5,883.0	6,344.9	6,485.4	7,172.6	8.4
-허브/전통 식이보조제품	9,511.2	10,677.4	11,570.9	12,513.9	13,100.3	14,651.8	8.6
복합 허브/전통 식이보조제품	3,593.8	4,068.7	4,353.4	4,695.2	4,812.2	5,329.3	8.2
에키나시아	-	-	-	-	-	-	-
달맞이꽃 종자유	-	-	-	-	-	-	-
마늘	390.8	470.0	530.4	586.6	637.8	723.9	13.1
은행잎 추출물	416.8	484.7	559.1	641.9	711.6	772.1	13.1
인삼	2,622.7	2,868.9	3,034.2	3,180.9	3,276.9	3,434.1	5.5
서양고추나무(세인트존스워트)	-	-	-	-	-	-	-
기타 허브/전통 보조제	2,487.2	2,785.2	3,093.8	3,409.3	3,661.8	4,092.4	10.5
-비 허브 식이보조제품	18,453.6	20,053.9	22,026.0	23,980.6	25,259.9	27,537.2	8.3
칼슘보충제	7,553.9	8,381.1	8,805.1	9,307.0	9,599.3	10,463.4	6.7
코엔자임 Q10	-	-	-	-	-	-	-
비허브 식이보조제품 혼합물	1,197.9	1,356.2	1,529.6	1,649.7	1,673.2	1,843.4	9.0
안구건강보조제품	-	-	-	-	-	-	-
심해어유	936.5	1,067.9	1,184.0	1,275.5	1,410.1	1,525.0	10.2
글루코사민	-	-	-	-	-	-	-
미네랄 보충제	726.5	790.9	844.0	895.1	913.5	971.1	6.0
프로바이오틱스 보충제	132.0	134.5	138.4	169.0	196.0	227.9	11.5
단백질 분말	3,048.3	2,548.5	2,735.8	3,068.4	3,579.3	4,055.3	5.9
로알젤리	166.0	174.0	181.5	188.7	193.9	202.8	4.1
Sam-E	-	-	-	-	-	-	-
기타 비허브 식이보조제품	4,692.4	5,600.9	6,607.6	7,427.3	7,694.5	8,248.3	11.9
기능성 음료	5,042.8	4,868.5	5,197.7	5,481.4	5,920.1	6,458.9	5.1
비타민	6,800.2	7,422.4	8,131.8	8,732.9	9,081.7	9,765.1	7.5
-멀티비타민	5,053.2	5,519.7	6,061.9	6,483.5	6,677.6	7,138.6	7.2
-단일비타민	1,747.0	1,902.7	2,069.8	2,249.4	2,404.1	2,626.5	8.5
비타민 A	51.1	54.7	59.2	63.6	67.0	72.0	7.1
비타민 B	547.1	580.5	622.0	677.0	721.8	776.7	7.3
비타민 C	611.6	665.9	724.5	788.5	845.7	933.7	8.8
비타민 D	-	-	-	-	-	-	-
비타민 E	537.3	601.6	664.1	720.4	769.5	844.2	9.5
기타 단일비타민	-	-	-	-	-	-	-
어린이용 비타민 및 식이보조제품	2,556.0	3,036.7	3,518.8	4,001.5	4,346.4	4,815.9	13.4
총합	42,373.8	46,059.0	50,445.2	54,710.4	57,708.4	62,929.0	

출처 : Official statistics, Trade associations, Company research, Euromonitor International estimates



④ 서유럽시장

- 서유럽의 경우 웰빙트렌드의 꾸준한 확산과 영국인의 3분의 1수준이 과체중인 것으로 조사되었으며 20% 정도가 위험한 비만 수준인 것으로 나타나서 비만억제 효과의 기능성 식품이 확대될 가능성이 높은 것으로 조사되었음.
- 독일 역시 비타민과 무기질, 허브요법 제품들이 각광 받고 있음. 또한 주로 해외에서는 인삼을 타블렛 형태로 많이 판매가 되고 있으며 특히 다국적 제약회사 베링거 인겔하임의 자회사인 파마톤사가 인삼 사포닌으로 만든 캡슐 `진사나 (Ginsena)` 단일 품목만 30억달러 이상의 매출을 올려 세계 인삼가공식품 분야에서 점유율 1위를 기록하고 있음.

(4) 면역활성 강화 제품의 주요 소재

- 해외에서 제품의 면역력 증진 효과 연구를 통한 산업적으로 다양한 형태의 제품들이 출시되고 있으며 빠른 산업화를 위한 효능 평가방법의 신기술 개발을 위해 적극적으로 투자하고 있음.
- 국내 건강한 면역기능 유지에 도움을 주는 대표적인 건강기능식품 소재로는 인삼 홍삼 알콕시글리세롤 등이 고시되어 있으며 최근 다양한 면역증강소재에 대한 관심이 높아지면서 연구 및 기술 개발의 속도가 증가하고 있음.

표 28. 주요 국내 면역활성 강화 소재

소재	특 징
알콕시글리세롤	베틸알콜(Batyl-Alcohol), 키밀알콜(Chimyl Alcohol), 셀라킬알콜(Selachyl Alcohol)등을 주성분으로 하며 골수 비장 및 면역기능을 관장하는 조직과 모유 등에 분포. 이를 이용한 다양한 면역기능강화 기능성 제품들이 유통
해조류	해조류 추출 당단백질의 면역증진 활성을 보기 위해 혈중 백혈구 수, 총 복강 세포수 증진을 확인
버섯류	버섯 다당체의 대식세포 면역기능 증진, IL-2수용체의 발현능, 세포활성물질 분비능 등이 확인됨
인삼 및 홍삼	인삼 및 홍삼다당체의 면역기능 증진 작용은 림프구 증식능 효과, LAK(lymphokine activated killer)세포 생성능 효과 확인
Gandoderma lucidum IY009	유래 단백다당류의 분자량 차이에 따른 면역기능증진 작용은 항보체 활성, 혼합첨가에 따른 산화질소 생성 등에 대한 연구결과 확인

표 29. 주요 해외 면역활성 강화 소재

소재	특징
MGN3™	면역증강 복합체, T림프구, B림프구, 자연살해세포의 활성화
키틴-키토산 (Chitin-Chitosan)	면역글로불린 생성, 보강활성, 세포활성물질 생성, 폐 대식세포의 초회 항원자극을 통한 면역능 증진효과
초유 (Colostrum)	스타미너 증강효과 및 항피로효과와 면역증진 기능
에키네시아 (Echinacea)	감기그리고 감염증을 치료하기 위해 사용되어 온 북미의 자생식물, 대식세포에서 세포활성물질의 발현증가, 면역관련세포수의 증가

< 건강기능식품 조사대상 5개 업체 >

주요취급품목	업체명	브랜드	주요 수출대상국가
인삼, 홍삼 및 홍삼제품	(주)한국인삼공사	정관장	미국, 중국
	동원F&B	천지인	중국(미국 수출계획중)
기타 건강기능식품	(주)남양		미국, 유럽, 아시아 등
	아모레 퍼시픽	오설록	중국, 유럽, 중동
	한국야쿠르트	브이푸드	수출계획중

출처 : PwC 재정리

- 국내 건강기능식품 수출은 총 42개 국가에 수출하고 있으며 수출 국가별 비중은 EU, 미국, 일본, 중국 순으로 나타났으며 품목별로 살펴보면 인삼 및 홍삼이 전체의 70% 이상을 차지하고 있으며, 이들의 해외 수요는 주로 해외 거주 교민들에 의한 구매분인 것으로 나타났음.
- 한국인삼공사는 전세계 홍삼 거래량의 70%가 거래되는 홍콩에서 정관장은 중국삼의 10배, 미국 삼의 5배 높은 가격으로 판매되고 있으며 2010년 중국 등 60개국에 765억원 수출했음. 남양알로에는 미국 현지를 비롯한, 유럽, 아프리카, 아시아 기업에 알로에 원료를 수출, 전 세계 수요량의 40%를 공급하고 있음.

< 국내건강기능식품업체 국가별 수출현황 >

수출국가	수출업체개수(개)	비율(%)
EU	23	14.0
미국	19	11.6
일본	18	11.0
중국	8	4.9
대만	7	4.3
캐나다	7	4.3
홍콩	6	3.7
말레이시아	5	3.0
필리핀	5	3.0
호주	5	3.0
기타	61	37.2
<b>총합계</b>	<b>164(*)</b>	<b>100.0</b>

출처 : 보건산업진흥원 행정간행물, PwC 재정리

(\*) 중복응답허용

< 국내건강기능식품업체 품목별 수출현황 >

수출국가	수출업체개수(개)	비율(%)
인삼	68	41.5
홍삼	49	29.9
유산균	17	10.4
비타민	4	2.4
미네랄	4	2.4
선삼정	4	2.4
기타	18	11.0
<b>총합계</b>	<b>164(*)</b>	<b>100.0</b>

출처 : 보건산업진흥원 행정간행물, PwC 재정리

(\*) 중복응답허용

표 30. 연도별 생산실적 10대 업체

(단위 : 백만원)

	2007년		2008년		2009년		2010년	
	업체명	금액	업체명	금액	업체명	금액	업체명	금액
1	(주)한국인삼공사	248,473	(주)한국인삼공사	31,3652	(주)한국인삼공사	366,172	(주)한국인삼공사	429,804
2	(주)마임	67,177	(주)마임	58,283	(주)마임	54,564	(주)마임	53,898
3	(주)남양	33,715	(주)남양	34,158	(주)남양	31,175	(주)한국아쿠르트	34,562
4	(주)태평양제약	22,709	(주)렉스진바이오텍	20,317	종근당건강(주)_	19,763	(주)남양	30,755
5	(주)렉스진바이오텍	20,382	풀무원건강생활(주)	18,196	일진제약(주)	19,359	(주)태평양제약	24,844
6	(주)세모	16,653	(주)세모	17,732	(주)세모	19,295	(주)서흥잡셀	24,517
7	대상(주)군산공장	16,110	(주)일화	16,916	(주)렉스진바이오텍	17,488	(주)아모레퍼시픽	22,526
8	풀무원건강생활(주)	14,398	종근당건강(주)	16,121	풀무원건강생활(주)	17,247	종근당건강(주)	21,948
9	(주)서흥잡셀	13,875	일진제약(주)	15,779	(주)서흥잡셀	15,962	(주)셀바이오텍	16,843
10	일화(주)	13,392	대상(주)군산공장	14,507	(주)아모레퍼시픽	14,140	풀무원건강생활(주)	16,649

※ 자료 : 식품의약품안전청

표 31. 연도별 수입실적 상위 10대 업체

(단위 : 백만원)

	2007년		2008년		2009년		2010년	
	업체명	금액	업체명	금액	업체명	금액	업체명	금액
1	한국암웨이(주)	82,760	한국암웨이(주)	97,223	한국암웨이(주)	71,105	한국암웨이(주)	84,275
2	(주)남양	7,733	(주)코스트코코리아	12,681	(주)코스트코코리아	10,966	에센무역	48,713
3	(주)메나테크코리아	5,736	(주)남양	10,663	(주)남양	9,287	(주)코스트코코리아	20,007
4	뉴스킨코리아(주)	5,648	(유)메나테크코리아	8,331	(유)메나테크코리아	6,442	한국허벌라이프(주)	12,714
5	(주)코스트코코리아	5,544	뉴스킨코리아(주)	8,230	한국허벌라이프(주)	5,673	(주)동원에프앤비	9,451
6	센라이더코리아(주)	4,735	텍스라이프코리아	6,201	뉴스킨코리아(주)	4,995	뉴스킨코리아(주)	8,398
7	(주)아모레퍼시픽	4,681	(주)아모레퍼시픽	6,073	(주)동원에프앤비	4,815	(주)아모레퍼시픽	6,457
8	에스에취컴퍼니(주)	4,240	센라이더코리아(주)	5,766	(주)아모레퍼시픽	4,759	(주)남양	5,844
9	비타민하우스(주)	3,052	(주)동원에프앤비	5,158	남양유업(주)공주공장	3,507	씨제이제일제당(주)	3,067
10	(주)태성뉴트라테크	2,836	남양유업(주)공주공장	4,507	주영엔에스(주)	2,779	(유)메나테크코리아	2,994

※ 자료 : 식품의약품안전청

(5) 주요 소재별 제품 개발현황

① 홍삼 및 인삼 음료 제품

- 노년층을 위해서 씹살한 맛을 그대로 살린 인삼 및 홍삼농축액만을 사용한 제품이 많이 출시되고 있으며 여성 소비자를 위해 홍삼에 블루베리를 첨가한 제품 및 중장년층을 위해 다른 기능성이 함유된 원료(꿀, 호박, 헛개나무 등)를 첨가시켜 면역강화 이외의 기능을 부여한 음료 제품이 많이 출시되고 있음.
- 홍삼의 쓴맛에 거부감이 있는 청소년 및 어린이를 위해 홍삼에 감귤, 사과, 포도 등 감미료 대신 천연 과일농축액을 첨가함으로 홍삼의 쓴맛을 제거한 제품도 출시되고 있음.
- 해외에서는 홍삼보다는 인삼 고유의 원료를 사용한 제품이 많이 출시되고 있으며 주로 타블렛 형태의 제품이 많이 출시되고 있는데, 특히 다양한 식물원료를 첨가함으로 다양한 기능을 부여한 제품이 생산되고 있음.
- 한편 많은 종류의 타블렛 제품이 한국인삼공사에서 생산하고 있으며 중장년층을 위한 제품들이 많으며, 한편 어린이용으로 발효홍삼에 비타민 및 해조류를 첨가한 제품이 생산되고 있음.
- 주로 해외에서는 인삼을 타블렛 형태로 많이 판매되고 있으며 특히 스위스 파마톤사에서 생산되는 Ginsana는 매년 30억 달러 이상의 매출을 올려 세계 인삼가공식품 분야에서 점유율 1위를 기록하고 있음.

표 32. 해외 홍삼 및 인삼음료




제품명	사진	첨가형태	주요 특징
Honey lemon ginseng green tea		꿀, 레몬 인삼차	인공 감미료를 사용하지 않으며 녹차의 효능에 꿀, 레몬 그리고 인삼의 효능을 가미한 제품 항산화, 면역기능
Red Ginseng		홍삼, 대추, 및 블루베리 추출물	홍삼의 쓴맛을 줄이기 위해 대추와 블루베리를 첨가했으며 비타민 C, 와 B <sub>2</sub> 를 더하였다 항산화, 면역력 증진
GREEN TEA		인삼추출물이 포함된 녹차 음료	인공 색소와 감미료를 첨가하지 않은 제품 항산화 및 면역력 증진

표 33. 국내 홍삼 및 인삼 음료

제품명	사진	첨가형태	주요 특징
원비디		인삼 및 구기자 추출물	40년 간 인삼음료의 대표적인 제품 자양강장 및 육체피로
수앤비		홍삼, 수박 및 호박 추출물 천연 5종 베리혼합물	GAP 인증 인삼을 이용 저온진공건조기술로 만들어 유효 사포닌 추출의 효율성을 높임 육체 피로 면역력 증진 혈액 흐름 개선
홍삼 한뿌리		홍삼	4년근 홍삼을 통째로 갈아 사포닌 이외의 기능성물질을 다양하게 포함 면역력 증진 혈액 흐름 개선
아이키커		홍삼농축액 및 사과, 감귤, 오렌지 및 포도 과즙	홍삼 농축액에 사과, 감귤, 오렌지, 포도 과즙을 첨가해 소비자의 취향을 다양하게 맞춤 면역력 증진
리튬키즈홍삼 플러스		홍삼농축액, 비타민, 유산균, 아미노산 및 딸기 배 농축액	홍삼농축액에 비타민B1, B2가 1일일 섭취기준 대비 100% 들어있으며 유산균, 아미노산 등도 골고루 함유 면역력 증진

표 34. 해외 홍삼 및 인삼 타블렛 제품



제품명	사진	첨가형태	특징
진사나		인삼추출물(G115)	고려인삼 추출물을 표준화 한 피로회복제, 세계 1위 인삼가공품
파마톤		인삼추출물(G115), 종합비타민, 미네랄, 및 미량원소	고려인삼 추출물을 위주로 한 종합영양제 정신 및 육체 피로회복

표 35. 국내 홍삼 및 인삼 타블렛 제품

제품명	사진	첨가형태	주요 특징
홍삼타블렛		6년근 홍삼분말을 타블렛 형태로 가공	면역력증진, 피로개선, 혈소관음집억제를 통한 혈액흐름개선, 기억력 개선에 도움
홍삼정타블렛골드		홍삼 및 해조류분말 첨가한 타블렛	면역력증진, 피로개선, 혈소관음집억제를 통한 혈액흐름개선, 기억력 개선에 도움
홍삼왕		발효 홍삼농축액 및 비타민, 해조류 첨가	발효를 통해 유익한 진세노사이드의 다량생성, 면역력 증진

② 알로에

- 알로에겔은 식용 알로에 품종 중 '베라'라는 종의 외피를 걷어내면 나오는 것으로, 기초 면역력 증진에 효과적이다. 최근에는 알로에 관련 제품의 성장세가 눈에 띈다.
- 2010년 알로에 시장의 총 생산액은 584억원에서 2011년 691억원으로 약 18.4% 증가하며 커다란 성장세를 보였다.
- 알로에는 4000년 전 고대부터 임상치료와 미용제로 사용됐을 만큼 건강에 탁월한 효과를 주는 식물이며 최근에는 면역력, 장 건강 증진 등에 효능이 입증되어 식약처로부터 면역 증대 기능성이 인정되었음.

표 36. 해외 알로에 음료 제품

제품명	사진	첨가형태	특징
Organic certified Aloe Vera		알로에 및 과일추출물 희석액	면역기능 강화
Canned Aloe Vera Juice with Plus		알로에 희석액, 꿀 포도 추출물	면역기능 강화
Aloe Vera Juice		알로에 희석액, 사과 추출물	면역기능 강화

표 37. 국내 알로에 음료 제품

제품명	사진	첨가형태	특징
자연은 790일		알로에 희석액	790일 동안 키운 알로에 사용, 알로에 음료시장 1위
가야알로에농장		알로에 및 비타민C 희석액	알로에와 비타민 C를 복합하여 만든 음료
알로에겔		알로에베라겔, 배, 한천 자몽종자 추출물	5년이상 숙성된 유기농 알로에를 사용

표 38. 해외 알로에 타블렛 제품

제품명	사진	첨가형태	특징
Aloe Vera Softgel Soft Capsules		알로에추출물	면역기능 강화
Essential Aloe Vera		알로에 추출물	면역기능 강화
AloePlus		알로에 추출물	면역기능 강화

표 39. 국내 알로에 타블렛 제품

제품명	사진	첨가형태	특징
애플트리 알로에 100		알로에 추출물	제주산 알로에 면역기능 및 장건강 증진
알로에센스정		알로에 추출물	제주산 알로에 면역기능 및 장건강 증진
아보민플러스		알로에 추출물	면역 및 장건강 증진




③ 흑마늘

- 흑마늘은 아직 면역활성에 대한 연구가 충분히 이루어지지 않은 관계로 면역강화 제품이 많이 출시되고 있지 않은 실정이며 대부분이 홍삼 등과 같은 다른 면역활성을 가지는 제품의 첨가물 형태로 판매되어지고 있음.
- 한국인삼공사에서는 ‘홍삼담은 자연흑마늘 후레쉬’액은 홍삼과 흑마늘 농축액을 사용하여 면역활성 강화 제품으로 출시되었음. 풀무원의 그린체 활력보감 및 다른 제품들 역시 흑마늘과 홍삼을 혼합함으로써 효능을 극대화 할려는 시도를 보였음. 흑마늘 제품의 경우 해외에서 타블렛 형태로 출시되고 국내에서는 추출액 형태의 제품이 출시되는 경향을 보였음.

표 40. 국내 흑마늘 음료 제품

제품명	사진	첨가형태	특징
홍삼담은 자연흑마늘 후레쉬		홍삼 및 흑마늘 농축액	면역기능 강화
그린체 활력보감		남해 흑마늘, 홍삼 및 동충하초 추출액	면역기능 강화
홍삼 진액 플러스		홍삼, 흑마늘, 등글레, 황기, 영지 추출액	면역기능 강화
흑마늘 진액프리미엄		발효 흑마늘, 홍삼, 헛개나무 추출액	면역기능 강화

표 41. 해외 숙성 마늘 타블렛 제품

제품명	사진	첨가형태	특징
Kyolic Formular 103		숙성마늘 추출물, 비타민 C, 5종의 벚섯 및 올리브 잎 추출물	심혈관 강화

④ 쑥

- 쑥은 우리나라의 역사 시작과 함께 등장하는 오랜 식물로써 약용식물로 알려져 왔음을 단군신화에서 알 수 있음. 동의 보감에는 ‘쑥은 오래된 여러 가지 병과 부인의 하혈을 낮게 하여 안태를 시키며, 복통을 멎게 하며 적리와 백리를 낮게 한다. 오장치루로 피를 쏟는것과 하부의 의창을 낮게 하며 살을 살어나게 하고 풍한을 헤치며 임신하게 한다’고 기록되어 있음.
- 쑥은 폴리페놀인 유과틸린(1.2~3 mg/g) 및 자세오시딘을 다량 함유하고 있으며 이를 이용한 위염치료제 스티렌(애엽 에탄올 추출물)을 출시하여 연간 900억원의 대형 신약을 탄생시킨 천연물임.
- 이러한 유과틸린, 자세오시딘 등 다양한 폴리페놀을 함유하는 쑥은 항산화, 항암 등 다양한 생리활성 효과를 보여 천연물 의약품 개발에 많은 제약회사들이 관심을 보이고 있지만 독특한 향 때문에 음료 및 식품으로서 개발은 의약품 개발에 비해 활발하지 않은 실정이며, 쑥을 이용한 식품의 대부분이 환, 차, 또는 다른 식품의 첨가 형태로 사용되어 지고 있음.

표 42. 국내 쑥 음료 제품

제품명	사진	첨가형태	특징
월		유산균 및 강화약쑥 농축액	강화 약쑥을 이용해 위 위 보호
3년강화사자발쑥		강화사자발쑥 추출액, 대추 결명자, 숙지황 당귀, 계피, 갈근 추출액	3년 숙성한 쑥 사용
휴림 헛개나무		헛개나무 추출액(KTG075), 지구자, 매실, 갈근 및 인진쑥	헛개나무 추출액(KTG075)을 표준화 하여 만든 제품
3년강화사자발쑥 환		강화약쑥, 은행잎 추출물	3년 숙성한 쑥 및 은행추출물을 사용

⑤ 기타 면역강화 천연식물류 보강 제품

- 농심은 충청지역 뉴질랜드산 녹골에서 추출한 강글리오사이드를 고급 원두커피에 접목한 제품을 만들었는데 이 강글리오사이드는 면역력을 증가시키는 활성물질로 잘 알려져

있음.

- 한국야쿠르트에서 허브인 엘더플라워 추출물을 첨가한 제품을 출시하였으며 이는 비타민이 풍부하고 면역력을 증가시키며 알러지를 예방하는 것으로 영국에서는 민간요법으로 많이 사용되어지고 있음.
- 양배추와 브로콜리는 미국 타임지 선정 세계 10대 슈퍼푸드로 십자화과 채소에 많은 설폰라판을 풍부하게 함유하고 있음. 설폰라판(sulforaphane)은 식물이 함유하고 있는 천연 기능성 물질로서 면역활성, 항돌연변이 등에 대한 효능이 알려져 있음. 위러브 양배추 & 브로콜리 한 병에는 설폰라판이 100 $\mu$ g(120 mL기준) 이상 함유돼 면역 및 항암 효과를 증대시켰음.

표 43. 기타 면역강화 천연식물류 보강 제품

제품명	사진	첨가형태	특징
강글리오 커피		커피 및 강글리오사이드 첨가	모유와 녹골의 강글리오사이드를 첨가하여 면역력 강화
7EVEN		유산균 발효유 및 엘더플라워 추출물	알러지 예방 및 비타민 보강
위러브 양배추&브로콜리		양배추 및 브로콜리 추출물	면역 및 항암 효능의 설폰라판 함유

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### - 1차년도

세부연구목표	평가 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 개똥쭉의 이화학적 성분, 생리활성 분석 및 유효물질의 분리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 개똥쭉의 이화학적 성분 정량 및 유효물질의 확인 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개똥쭉의 잎과 줄기의 수분, 회분, 조지방, 조단백, 조섬유 및 무기물을 분석하였으며, K과 Ca의 함량이 높은 것으로 확인됨.</li> <li>▶ 개똥쭉의 부위별(잎과 줄기)로 물과 에탄올 추출물의 생리활성을 항산화 및 항암활성 측면에서 측정하였으며, 그 유효물질을 분석한 결과 잎에서 생리활성이 우수하였으며, 유효물질의 함량도 유의적으로 높았음.</li> <li>▶ HPLC로 유효물질을 동정한 결과 phenolic acid, catechin 및 flavonoid류가 확인되었으며, 생리활성은 이들 물질에 기인한 것으로 추정됨.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 흑마늘 및 개똥쭉 추출물의 추출 조건별 생리활성 스크리닝</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 흑마늘과 개똥쭉의 추출조건별 생리활성 비교 및 생리활성의 극대화를 위한 추출 조건의 확립 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 흑마늘 및 개똥쭉의 최적 추출 조건을 설정하기 위하여 반응표면분석법을 이용하였으며, 에탄올 용매의 혼합비(0, 25, 50, 75, 100%), 추출온도(50~90℃) 및 추출시간(6~15시간)에 따른 생리활성을 비교 분석하였음.</li> <li>▶ 흑마늘은 89.68℃에서 9.79시간, 55.72%의 에탄올비, 개똥쭉은 잎과 줄기의 혼합물에 대해 89.68℃에서 8.46시간, 53.70%의 에탄올비로 추출하였을 때 생리활성의 극대화를 얻을 수 있었음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 타 품종 쭉과 개똥쭉의 생리활성 비교</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 개똥쭉과 품종별 쭉의 성분 및 생리활성 비교 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개똥쭉과 타 품종쭉과의 생리활성을 비교하고자 개똥쭉, 강화약쭉, 약쭉 및 인진쭉의 항산화 활성을 시험한 결과 총 페놀 함량 및 플라보노이드의 함량은 인진쭉에서 가장 높았고 다음으로 개똥쭉이었으며, DPPH를 비롯한 3종의 라디칼 소거능 및 환원력도 인진쭉 추출물이 가장 높았고 다음으로는 개똥쭉의 순임.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Pilot 규모에서 흑마늘과 개똥쭉의 최적 추출 조건 설정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 흑마늘과 개똥쭉 열수 추출조건의 확립 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 대용량 농축기를 이용하여 흑마늘 및 개똥쭉을 고온(110~130℃) 추출하여 얻은 추출물의 생리활성을 측정한 결과, 흑마늘은 130℃에서 4시간 추출, 개똥쭉은 121.86℃에서 2.80시간 추출했을 때 생리활성이 가장 우수하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 흑마늘과 개똥쭉 추출 혼합조성물의 생리활성 및 면역활성 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 흑마늘과 개똥쭉의 혼합에 따른 항산화 활성 극대화를 위한 최적의 혼합비율 설정 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 흑마늘과 개똥쭉의 제품 개발을 위한 최적의 혼합 비율을 알아보고자 흑마늘과 개똥쭉의 비율을 달리한 혼합물의 항산화 활성 및 면역활성을 실험한 결과 nitric oxide 라디칼 소거능과 α-glucosidase 저해활성을 제외한 모든 실험에서 흑마늘과 개똥쭉을 99.3 : 0.7의 비율로 혼합하였을 때 항산화 활성이 월등히 좋았음.</li> </ul>

세부연구목표	평가 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<p>■ 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합조성물의 생리 활성 및 면역 활성 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 혼합에 따른 생리활성과 면역 활성의 변화 비교 여부</li> <li>- 활성 증대 및 관능 평가를 통한 혼합 비율 설정 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 또한 혼합물의 농도가 높아질수록, 개똥쑥의 혼합비율이 증가함에 따라서 항산화 활성도 유의적으로 증가하여, 혼합물의 항산화 활성이 개똥쑥의 높은 항산화력과 흑마늘의 갈변물질에 의한 항산화능에 기인한 결과라고 판단됨.</li> <li>▶ 흰쥐의 비장세포 증식능을 통하여 면역 세포 증식효과를 측정된 결과 품종별 쑥 추출물 중 개똥쑥이 가장 우수하였으며, 흑마늘과 혼합할 때 개똥쑥 추출물의 첨가비율이 높아질수록 활성도 더 증가하였음.</li> <li>▶ 생리활성에 대한 연구결과 및 관능평가 결과를 종합하여 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 최적 혼합 비율은 99.3 : 0.7로 하여 농도에 따른 IL-1β, IL-6 및 TNF-α와 같은 cytokine의 생성량을 확인한 결과 대조군에 비해 유의적으로 높은 수준의 cytokine을 생성함을 확인하였음.</li> </ul>
<p>■ 고품질 흑마늘 생산 조건의 최적화 및 이에 기초한 대량 생산 공정 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고품질 흑마늘생산을 위한 기초 공정 차이에 따른 성분 비교 여부</li> <li>- 흑마늘의 유효성분의 함량을 최적화할 수 있는 공정 확립 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 깎마늘, 쪽분리 피마늘 및 통마늘을 시료로 하여 제조공정을 온도 변화에 따라 1회 반복 싸이클을 3회 및 최종 숙성단계인 4단계로 나누고 각 단계마다 시료를 채취하고 이화학적 성분의 변화를 비교하였음.</li> <li>▶ 숙성이 진행됨에 따라 조직감은 숙성이 진행됨에 따라 수분 함량의 감소와 더불어 증가하였고, pH도 점차 산성화되었으며, 산도, 당도, 총당 및 환원당 등의 탄수화물의 함량은 증가하였음.</li> <li>▶ 최종 숙성 4단계에서 유효성분의 함량이 가장 높은 통마늘로 제조한 흑마늘에서 총 페놀화합물은 약 4.6배, total pyruvate 및 thiosulfinate의 함량은 각각 2.2배 및 25.1배가 증가하였음.</li> <li>▶ 본 연구 결과를 종합하여 유효성분의 함량이 유의적으로 높은 통마늘을 최적의 전처리 형태로 확정하고 최적 숙성 온도 조건을 설정하였음.</li> </ul>
<p>■ 개발 기술에 기반한 상품화 추진 및 지적재산권 확보</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지적재산권 확보 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 연구결과로 설정된 조건에 따라 제조된 흑마늘을 상품화하였음</li> <li>▶ 흑마늘의 제조 및 이를 이용한 2차 개발 상품에 대한 지적재산권을 확보하고자 관련 실험을 실시한 결과를 활용하여 특허출원하였음.</li> </ul>

- 2차년도

세부연구목표	평가 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<p>■ 남해산 시판 흑마늘의 생리활성 비교 분석</p>	<p>- 남해산 시판 흑마늘 제품의 특성 및 생리활성 비교 여부</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 흑마늘을 이용한 제품을 개발하기 위해 지역내 시판 흑마늘 4종의 특성을 비교하였음.</li> <li>▶ 총 pyruvate, thiosulfate 함량은 B제품, 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 A제품에서 우수하였음.</li> <li>▶ DPPH, ABTs, hydroxyl 및 nitric oxide 라디칼 소거활성은 A 및 B제품이 유사한 범위로 C, D 제품보다 활성이 높았음.</li> </ul>
<p>■ 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 <i>in vivo</i>상에서 생리활성 및 적정 섭취량 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험동물을 통한 강제운동 부하시 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 급이에 따른 생리활성의 비교 여부</li> <li>- 일일 적정섭취량의 산출 여부</li> </ul>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 1차년도 결과에서 설정된 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 혼합비율을 이용하여 실험동물용 트레이드밀에서 흰쥐를 운동시킴으로써 생체내 산화적 스트레스를 발생시키고, 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 급이하여 시료의 <i>in vivo</i> 활성을 측정하였음.</li> <li>▶ 4주간 동물실험 수행 후 식이 섭취량, 혈액 및 간 조직의 지질 성분 변화, AST 및 ALT 활성, 항산화 활성, 지질과산화물의 생성, 생체 내 항산화 효소 활성 등을 측정하여 흑마늘과 개똥쑥의 각 추출물과 비교하였음.</li> <li>▶ 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 rat에 대해 섭취량을 성인 체중 60 kg을 기준으로 100, 200 400 mL/일을 섭취하도록 환산하여 급이한 후 산화적 스트레스에 대한 이들 혼합물의 적정 섭취량을 분석한 결과 200~400 mL/일 범위에서 항산화 활성 및 항산화 효소 활성이 우수하였음.</li> </ul>
<p>■ 흑마늘과 개똥쑥 추출물을 베이스로 한 개발 제품의 <i>in vivo</i> 생리활성 평가</p>	<p>- 개발 제품에 대한 생리활성의 비교 여부</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 흑마늘과 개똥쑥 추출 혼합물을 바탕으로 하여 개발된 제품을 동일한 조건에서 산화적 스트레스에 대한 생리활성을 측정하였음.</li> <li>▶ 성인 체중 60 kg에 대해 300 mL/일의 개발 제품급이군은 대조군(비섭취군)에 비해 항산화 활성, 지질과산화물 함량 및 항산화 효소 활성에 유의적인 증가를 보였음.</li> <li>▶ 흑마늘에 개똥쑥을 혼합함에 따라 흑마늘의 활성에 시너지 효과가 있음이 확인됨.</li> </ul>
<p>■ 흑마늘과 개똥쑥 함유 시제품의 제조 배합비 설정</p>	<p>- 시제품 제조를 위한 시료의 배합비 설정 여부</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 1차년도 연구결과를 활용하여 음료 베이스인 흑마늘과 개똥쑥 추출물의 혼합 비율을 확정하고, 관능평가를 통해 음료의 최종 배합비를 확정함(흑마늘 추출물:쑥 추출물:배추출농축액: 결정과당, 90.2:6.8:2:1).</li> </ul>

세부연구목표	평가 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
■ 개발 시제품의 영양성분 분석	- 시제품의 영양성분 확인 및 품질 기준 설정 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 고형분 함량, pH, 산도를 측정하여 개발 시제품의 기초 품질기준을 설정하였음.</li> <li>▶ 개발된 음료 중 총 페놀 화합물, 플라보노이드, 유리당 및 유기산 함량을 측정함으로써 개발 음료의 주요 영양성분의 특성을 분석하였으며, 유리당은 fructose와 glucose가 검출되었고, 유기산은 7종으로 총 217.7 mg/100 g이었음.</li> </ul>
■ 개발 시제품의 항산화 활성 분석	- 시제품의 항산화 활성 평가 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개발 음료 자체의 진한 색으로 인하여 직접적인 항산화 활성 시험이 불가능하여 증류수로 10% 미만의 농도로 희석하여 항산화 활성을 측정하였음.</li> <li>▶ DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력, FRAP법에 의한 항산화 활성, Fe<sup>+2</sup> chelating 활성은 시료의 농도가 높아질수록 유의적으로 활성이 증가되었음.</li> </ul>
■ 개발 시제품의 생리활성 및 면역활성 검증	- 시제품의 면역활성 평가 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개발 음료의 항산화 활성 이외의 생리활성 규명을 위하여 아질산염 소거활성, α-glucosidase 및 xanthine oxidase 저해활성을 분석하였으며, 시료의 농도증가에 따라 활성이 증가되었음.</li> <li>▶ CCK-8 assay를 통하여 Raw 264.7 세포를 이용한 면역활성 평가를 위한 시료의 희석 농도를 1, 2, 5, 10, 20%로 설정하였음.</li> <li>▶ LPS 처리된 Raw264.7 세포에서 NO 생성을 및 cytokine IL-1β와 TNF-α의 농도 측정을 통하여 평가한 농도별 음료 시제품의 면역활성은 시료의 농도증가에 따라 상승하였음.</li> </ul>
■ 연구성과를 활용한 지적 재산권 확보	- 지적 재산권 확보 여부	100	▶ 1세부과제와 1협동 과제의 연구 성과를 종합하여 특허 출원함.
■ 개발음료의 소비자 선호도 조사	- 소비자 선호도 조사 여부	100	▶ 개발 시제품을 2012년 4월 중 남해군 관광객 250명을 대상으로 남해 마늘과 흑마늘에 대한 인지도, 개발 음료의 맛과 향미에 대한 선호도 및 상품 시장성에 대한 설문조사를 실시하였으며, 여성층의 선호도가 높고 상품시장성 좋다는 반응을 얻었음.
■ 개발음료의 대량 생산 공정 개발	- 대량 생산 공정 개발 여부	100	▶ 1차년도 연구 결과에 따라 설정된 추출 조건과 2차년도 연구결과를 통해 제 1 협동과제에서 제시한 결과를 종합하여 기업에서 활용할 생산 공정을 개발하였음.
■ 개발음료의 상품화를 위한 포장 디자인 개발	- 포장 디자인 개발 여부	100	▶ 흑마늘과 썩을 혼합한 음료의 제품명은 '오천년에'로 하고, 기존 제품 생산라인에 적합한 병음료로 제조하기 위하여 포장 디자인을 확정하였음.

- 3차년도

세부연구목표	평가 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 흑마늘과 개똥쑥의 복합조성물 제조를 위한 천연식물류의 선정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연식물류의 선정 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶면역활성 강화를 위한 복합조성물 제조 재료를 선정하기 위하여 82건의 문헌조사를 통해 100여종의 식물체 중 사용빈도가 높은 11종(구기자, 황금, 오가피, 감국, 산약, 작약, 단삼, 뽕잎, 생강, 생황버섯, 옥수수수염)을 선정하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 복합조성물을 이용한 개발 음료의 <i>in vitro</i>에서 생리활성 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vitro</i>에서 생리활성 평가 항목의 적합성</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 제1협동과제에서 선정한 5종의 천연식물류 조성물과 흑마늘과 개똥쑥 추출물이 첨가된 음료 조성물을 제조하여 실험하였음.</li> <li>▶ 페놀과 플라보노이드 화합물의 함량, 항산화활성(DPPH, ABTS 라디칼 소거능, FRAP법에 의한 환원력, Fe<sup>+2</sup> chelating 활성을 평가한 결과 흑마늘 복합물에 개똥쑥을 혼합하였을 때 가장 활성이 높았음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 복합조성물을 이용한 개발 음료의 흰쥐에 대한 강제 운동 부하시 <i>in vivo</i>에서 생리활성 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i>에서 생리활성 평가항목의 적절성</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 트레드밀을 이용하여 5주간 강제적으로 간헐적인 운동부하를 가한 흰쥐에 흑마늘과 천연식물류 5종을 혼합한 복합조성물을 급이하고, 관련 인자를 분석하였음.</li> <li>▶ 복합물의 급이농도가 높을수록 혈청내 총단백질 함량이 높았으며, 글로불린 함량은 정상군과 비슷한 수준으로 회복되었음.</li> <li>▶ ALT와 AST 활성은 흑마늘 복합물 급이군이 정상군보다 유의적으로 낮은 수준까지 감소되었음.</li> <li>▶ 혈청내 지질성분은 흑마늘 복합물의 농도가 높을수록 효과적으로 개선되었으며, 이는 간 조직에서 동일한 경향이었음.</li> <li>▶ 혈청 지질과산화물의 함량은 흑마늘 복합물의 급이 농도에 따라 유의적인 차이가 있었으나 간조직에서는 유의차가 적었음.</li> <li>▶ 운동부하에 따른 catalase, SOD, GSH-px 활성은 흑마늘 복합물의 농도가 높을 때 유의적으로 그 활성이 높았음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 천연식물류 조성물 선정을 위한 생리활성 스크리닝</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정 식물류의 활성 검증 및 최종 대상 시료 선정 여부</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 제1세부과제에서 선정한 11종의 시료를 대상으로 열수추출물을 제조하고, 총 페놀 화합물과 플라보노이드 함량을 측정된 결과 상황버섯에서 가장 높은 함량이었음.</li> <li>▶ 항산화 활성과 Raw264.7 세포에서 NO 생성 억제 활성이 우수한 황금, 상황버섯, 단삼, 뽕잎, 작약의 5종을 선정하였음.</li> </ul>



세부연구목표	평가 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<p>■ 천연식물류 조성물의 품질특성 분석</p>	<p>- 선정 식물류의 주요 영양성분 분석 여부</p>	100	<p>▶ 천연식물류 5종의 주요 성분인 유리당과 유기산을 분석하고 항산화 활성과 면역활성을 비교함.</p> <p>▶ 유리당은 3종이 검출되었으며, 황금과 작약에서 sucrose의 함량이 높았으며 fructose나 glucose 함량은 시료간의 차이가 적었음.</p> <p>▶ 천연식물류 중 뽕잎 추출물의 총 유기산 함량이 가장 높았고, 다음으로 작약 추출물이었음.</p>
<p>■ 복합조성물 함유 바이오 식품의 품질특성 및 생리활성 연구</p>	<p>- 효율적인 추출방법 선정여부</p> <p>- 추출물의 다양한 생리활성 검증여부</p>	100	<p>▶ 5종의 천연식물류 혼합물의 생리활성 검증결과 α-glucosidase 활성은 5종을 추출하여 동량으로 혼합한 시료보다 혼합 후 추출한 시료에서 활성이 더 높았음.</p> <p>▶ Xanthine oxidase 저해활성은 추출방법에 따른 유의적인 차이는 없었음.</p> <p>▶ DPPH, ABTS, superoxide anion 라디칼 소거활성은 시료를 혼합하여 동시 추출할 때 더 활성이 높았음.</p> <p>▶ Fe<sup>+2</sup> chelating 활성은 개별 추출물을 혼합한 시료에서, 환원력은 시료 혼합물을 동시 추출하였을 때 활성이 더 높았음.</p> <p>▶ Raw264.7 세포를 이용하여 NO 생성능, cytokine 생성을 통해 면역활성을 평가한 결과 추출방법에 따른 활성의 차이는 없었음.</p> <p>▶ 이상의 연구 결과와 시료 제조법의 효율성을 고려할 때 선정된 재료를 모두 혼합하여 동시 추출하는 방법이 더 효율적임을 확인하였음.</p>
<p>■ 흑마늘, 개뽕쭉 및 천연식물 추출물 함유 시제품의 소비자 선호도 조사</p>	<p>- 소비자 선호도 조사 여부</p>	100	<p>▶ 개발 시제품인 오천년에 프리미엄을 2013년 4월 중 남해군의 관광객 250명을 대상으로 개발 음료의 맛과 향미, 제품의 선호도, 시장성에 대한 설문조사를 실시한 결과 40대 남성에서 선호도가 가장 높았고 여성은 시장성이 좋다는 응답자가 많아 시장성이 좋을 것이라는 결과를 얻었음.</p>
<p>■ 개발 시제품의 유통기한 설정 및 상품화 추진</p>	<p>- 유통기간 설정여부 및 상품화 추진 여부</p>	100	<p>▶ 개발 시제품 중 오천년에 프리미엄의 유통기간은 유사제품을 검색한 결과에 기반하여 차광유리병으로 외부의 공기와 차단이 되고 성상에 변화가 없어 유통기한을 제조일로부터 1년으로 선정하였음.</p>
<p>■ 대량 생산공정 확립</p>	<p>- 대량생산 공정도 확립 여부</p>	100	<p>▶ 주관기관 및 제1협동의 연구결과에 근거하여 흑마늘 음료 오천년에 프리미엄 및 오천년에 파워 2종의 대량 생산 공정도를 확립하였음.</p>
<p>■ 상품화 2종</p>	<p>- 상품화 여부</p>	100	<p>▶ 흑마늘 음료는 오천년에프리미엄 및 오천년에 골드 2종류로 네이밍하고 제품디자인한 후 상품화 추진을 하였으며, 타블렛 제품으로 오천년에 파워에 대한 포장디자인을 확정하여 상품화를 추진하고자 함.</p>

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 연구개발 결과의 활용방안

### 1. 특허, 논문 등의 지식재산권 확보

‘흑마늘 및 저점도 흑마늘 고농축액 제조방법’특허 1건이 현재 출원 중에 있으며, 이를 근거로 하여 흑마늘과 쑥의 생리활성을 분석한 연구 결과에 따른 ‘흑마늘과 개똥쑥을 이용한 면역증강용 음료의 제조방법’, ‘항산화 효능을 가진 흑마늘과 쑥 혼합음료의 제조방법’특허로 특허 1건, 출원 1건이 있으며, 국내 연구논문 8편 투고, 학계 세미나 발표 10건이 완료된 상태이며, 연구논문 1편이 게재 예정(2013년 7월, 생명과학회지)이며, 그 외 연구논문이 투고 준비 중에 있음.

### 2. 천연물 소재를 활용한 기능성 제품의 개발

생리활성이 알려진 흑마늘과 쑥을 이용하여 기능성 식품의 제조에 있어서 생리활성이 우수한 천연식물류를 첨가함으로써 기능성 및 기호성을 향상시킬 수 있었으며, 기존의 흑마늘 단일 음료에 비해 항산화 및 면역 활성 증진효과를 얻을 수 있을 것으로 예상되므로 향후 생리활성을 발현할 수 있는 제품으로서 보다 안전하고, 기능성이 확보된 상품으로 활용할 수 있음.

### 3. 지역특화 작물을 활용한 가공품의 다변화 및 시장 확대에 기여

생마늘 및 흑마늘의 단일 소재에 치중하고 있던 기존의 마늘 가공품에 대하여 쑥을 비롯한 천연식물류를 첨가하여, 기능성이 향상된 다변화된 제품의 개발이 가능해질 것으로 확인하였음. 본 과제를 통하여 건강기능식품시장 개척을 위한 새로운 마늘 가공품의 개발과 품질 및 기능성을 규명하였음. 나아가, 항산화 활성과 함께 면역활성에 대한 연구결과를 토대로 현대인의 만성적인 스트레스를 방어할 수 있는 기능성 식품으로 제품의 다변화가 기대되며, 타겟 소비층을 확대할 수 있는 새로운 마늘 가공품의 상품화를 위한 자료로 활용하고자 함.

### 4. 개발 기술의 기업 이전

본 연구의 참여기업이 가공공정 개발, 대량생산 공정확립, 시장성 확인에 적극 참여함으로써 개발된 기술의 기업 활용이 용이하며, 이를 기반으로 기업은 상품화를 위한 연구개발 경쟁력을 확보함으로써 개발 기술을 적극적으로 활용한 새로운 가공품의 상품화가 가능하며, 나아가 지역 경제 활성화에도 기여할 것임.

### 5. 참여기업의 제품개발 및 홍보 자료로 활용

참여기업은 흑마늘 음료 제품을 주로 생산하는 기업으로서 본 과제를 통하여 개발된 제품

으로 기능성이 향상된 흑마늘 음료를 상품화하기 위한 계획을 가지고 있으므로, 본 과제의 결과를 상품화를 위한 주요 자료로 활용될 것임.

흑마늘 제품에 천연식물의 생리활성을 부가한 기능성 음료로 개발하여 제품 홍보에 활용하고 병음료는 국내 흑마늘 가공품 시장에 신수요를 창출하고, 타블렛 제품은 해외시장 개척용 중점 상품으로 육성하여 국내외 시장 개척에 활용함.

## 제 2 절 기대성과

1. 여러 연구결과로부터 기능성과 안정성이 입증된 흑마늘에 생리활성이 인지된 쑥을 비롯한 천연식물류를 첨가하여 개발하므로써 마늘의 강한 자극취를 완화시켜 기호성이 향상되었으며, 흑마늘 단일제품에 비해 기능성이 강화된 제품으로써 기능성과 기호 측면에서 확연히 차별화 된 제품으로 부각될 가능성이 높음.
2. 기존의 생마늘과 흑마늘 제품에 대한 인지도와 쑥 및 천연식물류(황금, 상황버섯, 단삼, 뽕잎, 작약)에 대한 인지도로 인하여 기존 흑마늘 제품에 대한 건강식품으로서의 이미지 구축이 유리할 것으로 판단되며, 과학적 연구 결과에 의한 제품의 효능 규명은 소비자로부터 신뢰를 확보할 수 있는 주 인자로 작용하여 신수요 창출이 가능한 바이오푸드가 될 것으로 기대됨. 따라서 기존의 흑마늘과 차별화된 고품질 흑마늘 개발과 개똥쑥 혼합 제품의 지적재산권 확보로 기업의 기술 경쟁력 확보와 상품화 기간단축 및 비용절감이 예상됨.
3. 흑마늘, 개똥쑥 및 천연식물 추출물을 함유한 항산화 및 면역증진 효능이 있는 복합조성물의 제조와 제품개발로 출원된 특허와 연구보고는 본 과제에서 개발된 제품의 홍보 및 이미지 제고에 기여하여 기존 제품과 차별화된 마케팅전략용 자료로써의 활용이 가능함. 또한 마늘과 쑥은 단군신화에서부터 같이 등장한 식품으로 두 식품에 기초한 제품의 개발은 제품의 효능증진 뿐만아니라 홍보 및 마케팅에서도 시너지 효과를 창출할 것으로 기대됨
4. 최근 지속적인 유행성 질환의 만연으로 인해 면역력 증진에 대한 관심이 높아 자가면역을 증진시킬 수 있는 식품의 요구가 증가하고 있는데, 본 연구과제 결과는 *in vitro* 뿐만아니라 동물실험을 통한 *in vivo* 실험 결과에 기초하여 개발된 제품으로 기존의 흑마늘 제품과 건강기능식품간의 틈새시장을 새로이 개척하는 효과 뿐만아니라 흑마늘 개발 제품의 판매시 홍보 효과를 증진시킬 수 있을 것으로 판단됨. 또한 생체내 유해물질에 대한 1차 방어기작을 강화할 수 있는 제품으로 산업화함으로써 국민건강 증진에 기여함과 동시에 마늘의 건강증진 기능성을 부각시킨 마케팅으로 추진 가능성이 높으며, 국내 신수요 창출 및 해외 시장 개척에 용이함.

### 제 3 절 연구 성과

#### 1. 특허 성과

출원된 특허의 경우					특허등록의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2011	흑마늘 및 저점도 흑마늘 고농축액 제조방법	남해보물섬마늘영농조합법인	대한민국	10-2011-0030967	2011	흑마늘과 개똥쑥을 이용한 면역증강용 음료의 제조방법	(재)남해마늘연구소	대한민국	10-1028155
2012	항산화 효능을 가진 흑마늘과 쑥 혼합음료의 제조방법	남해보물섬마늘영농조합법인	대한민국	10-2012-0027252					

#### 2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	개똥쑥의 영양적 특성 및 생리활성	류지현	성낙주	김라정 이수정 김인수 이현주	한국식품영양과학회지	40(2)	국내	비SCI
2011	개똥쑥의 항산화 및 항암활성과 기능성 물질의 탐색	류지현	성낙주	이수정 김미주 신정혜 강신권 조계만	한국식품영양과학회지	40(4)	국내	비SCI
2012	시판 흑마늘의 항산화 및 N-nitrosodimethylamine의 생성억제	차지영	성낙주	이수정 신정혜	농업생명과학연구	46(2)	국내	비SCI
2012	반응표면분석을 이용한 흑마늘과 개똥쑥 혼합음료 개발을 위한 추출조건의 최적화	강재란	성낙주	이수정 황조롱 신정혜 강민정	농업생명과학연구	46(2)	국내	비SCI

계제연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	국내산 품종별 쑥의 생리활성	김라정	신정혜	황초롱 강민정 정우재	생명과 학회지	22(6)	국내	비SCI
2012	반응표면분석을 이용한 흑마늘의 항산화 활성 최적화를 위한 추출조건 확립	강재란	성낙주	이수정 권효진 권민혜	한국식품 저장유통 학회지	19(4)	국내	비SCI
2013	반응표면분석에 의한 개똥쑥의 항산화 활성을 위한 최적 추출 조건 확립	이수정	성낙주	강재란 김정균 강신권	농업생명 과학연구	47(2)	국내	비SCI
2013	흑마늘 및 개똥쑥 추출물의 급이가 강제운동 시 흰쥐의 체내 지질 성분 및 간조직의 항산화효소 활성에 미치는 영향	강재란	성낙주	이수정 황초롱 김인성	한국식품영 양과학회지	42(6)	국내	비SCI
2013	항산화 및 면역 활성 증강을 위한 생약재의 탐색	이수정	성낙주	신정혜 이혜진 탁현민 강민정	생명과 학회지	23(7)	국내	비SCI

### 3. 학술발표 성과

발표날짜	논문명	저자			학술대회명	국내외 구분
		주저자	교신저자	공동저자		
2010-10-21	Physicochemical properties and biological activity of gaeddongssuk ( <i>Artemisia annua</i> L.)	류지현	-	강재란 김라정 신정혜 성낙주	2010한국생명과학회	국내
2010-10-27	Antioxidant and anticancer activities of gaeddongssuk ( <i>Artemisia annua</i> L.)	류지현	-	김라정 황초롱 이수정 성낙주	한국식품영양과학회 2010 International Symposium and Annual Meeting	국내
2011-06-09	Optimization of high temperature water extraction conditions for antioxidant properties of black garlic and Gaeddongssuk composite by response surface	강재란	-	이수정 권효진 신정혜 강민정 성낙주	2011 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology Food Bioscience: Promise&Challenges in the Future	국내

발표날짜	논문명	저자			학술대회명	국내외 구분
		주저자	교신저자	공동저자		
2011-11-01	Immune cell activities from artemisia of five species	김윤아	-	김라정 신정혜 강민정 성낙주	2011 한국식품영양과학회 40th Anniversary Functional Fusion and Systemic Approaches to Future Foods	국내
2011-11-01	Optimization of the extraction condition for antioxidative components of Gaeddongssuk ( <i>Artemisia annua</i> L.) by response surface methodology	강재란	-	이수정 권효진 권민혜 정보영 성낙주	2011 한국식품영양과학회 40th Anniversary Functional Fusion and Systemic Approaches to Future Foods	국내
2011-11-01	Optimization of ethanol extraction conditions for high-functionality of black garlic by response surface methodology	권민혜	-	이수정 강재란 권효진 문수경 성낙주	2011 한국식품영양과학회 40th Anniversary Functional Fusion and Systemic Approaches to Future Foods	국내
2012-11-02	Effect for supplementation of black garlic and Gaeddongssuk ( <i>Artemisia annua</i> L.) composites on the hepatic lipid profiles and antioxidative defense system	권효진	-	이수정 강재란 권민혜 성낙주	2012 KFN International Symposium and Annual Meeting	국내
2012-11-02	Supplementation effect of black garlic and Gaeddongssuk ( <i>Artemisia annua</i> l.) on blood components in rats run on treadmill	권민혜	-	이수정 강재란 권효진	2012 KFN International Symposium and Annual Meeting	국내
2012-11-02	The effect of black garlic extract on lipid metabolism in immobilization stressed rats	신정혜	-	강민정 정성훈 김경민 황초롱	2012 KFN International Symposium and Annual Meeting	
2012-11-02	Effects of black garlic and mugwort extract on the restraint stress in rats	강민정	-	신정혜 정성훈 윤환식	2012 KFN International Symposium and Annual Meeting	국내

#### 4. 학위논문 성과

발표연도	논문명	저자	학위명
2011	개똥쑥의 생리활성과 기능성 물질의 탐색	류지현	석사
2012	흑마늘 및 개똥쑥 추출물의 투여가 강제운동을 한 흰쥐의 지질조성 및 항산화계에 미치는 영향	강재란	석사

### 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

### 제 7 장 연구시설 · 장비 현황

- 해당사항 없음

### 제 8 장 참고문헌

- Ali M, Thomson M. 1995. Consumption of a garlic clove a day could be beneficial in prevention thrombosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 53: 211-212.
- Allessio HM. 1993. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25: 218-224.
- An BJ, Lee JT, Bae MJ. 1998. Isolation of a novel polyphenol from oolong tea and its effective prevention of the gout. *Korean J Food Sci Technol* 30: 970-975.
- An CS, Choi SY, Jin HL, Jeon YH, Hur SJ, Kim IH, Park GD, Jeung YJ, Lim BO. 2009. Immunomodulatory effects of *Phellinus linteus* extracts on liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *Korean J Medicinal Sci* 17: 217-222.
- Ashok Kumar BS, Lakshman K, Nandeesh R, Arun Kumar PA, Manoj B, Kumar V, Sheshadri Shekar D. 2011. *In vitro* alpha-amylase inhibition and *in vivo* antioxidant potential of *Amaranthus spinosus* in alloxan-induced oxidative stress in diabetic rats. *Saudi J Biol Sci* 18: 1-5.
- Azuma K, Nasayoshi M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamauchi Y, Ito H, Higashio H. 1999. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric*

- Food Chem 47: 3963–3966.
- Bae SK, Lim MR. 2002. Effects of sodium metabisulfite and adipic acid on red of garlic juice concentrate during storage. Korean J Soc Food Cookery Sci 18: 73–80.
- Baek YH. 1995. Effect of garlic intake on the antifatigue and fatigue recovery during prolonged exercise. J Korean Soc Food Nutr 24: 970–977.
- Baker HJ, Lindsey JRR, Weisbroth SH. 1984. The laboratory rats. Academic press Inc., NY, vol II, pp. 123–127.
- Brisibe EA, Umoren UE, Brisibe F, Magalhães PM, Ferreira JFS, Luthria D, Wu X, Prior RL. 2009. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. Food Chem 115: 1240–1246.
- Brisibe EA, Umoren UE, Brisibe F, Magalhães PM, Ferreira JFS, Luthria D, Wu X, Prior RL. 2009. Nutritional characterization and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. Food Chem 115: 1240–1246.
- Byun PH, Kim WJ, Yoon SK. 2001. Changes of functional properties of garlic extracts during storage. Korean J Food Sci Technol 33: 301–306.
- Ćavar S, Maksimović M, Vidic D, Parić A. 2012. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. Industrial Crops and Products 37: 479–485.
- Cha BY. 2001. Drug therapy of dyslipidemia. J Korean Med Assoc 44: 772–782.
- Chae JW, Jo BS, Joo SH, Ahn DH, Chun SS, Cho YJ. 2012. Biological and antimicrobial activity of *Vaccinium oldhami* fruit. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 1–6.
- Chang ML, Johnson MA. 1980. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. J Nutr 110: 931–963.
- Chi TS, Lim H, Park H, Kim HP. 2003. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix* on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. Biochem Pharmacol 66: 1271–1278.
- Cho HE, Choi YJ, Cho EK. 2010. Antioxidant and nitrite scavenging activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of water extract from *Schzandra chinensis* Baillon. J Korean Soc Food Sci Nutr 39: 481–486.
- Cho HS, Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Cho HS, Lee HJ, Sung NJ. 2007. Antioxidative activity and nitrite scavenging effect of the composites containing medicinal plant extracts. J Life Sci 17: 1135–1140.
- Cho YC, An BJ, Choi C. 1993. Isolation and enzyme inhibition of tannins from Korean green tea. Korean Biochem J 26: 216–223.
- Choi DJ, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ, Shin JH. 2008. Physicochemical characteristics of



- black garlic (*Allium sativum* L.). J Korean Soc Food Sci Nutr 37: 465–471.
- Choi DJ, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ. 2008. Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). Korean Soc Food Sci Nutr, 37: 465–471.
- Choi DJ. 2008. Studies of functional compounds and biological activities of black garlic. Gyungsang Univ. Ph D. thesis.
- Choi JH, Kim WJ, Yang JW, Sung HS, Hong SK. 1981. Quality changes in red ginseng extract during high temperature storage. J Korean Agric Chem Soc 24: 50–58.
- Choi JH, Kim WJ, Yang JW, Sung HS, Hong SK. 1981. Quality changes in red ginseng extract during high temperature storage. J Korean Agric Chem Soc 24: 50–58.
- Choi KS, Lee HY. 1999. Characteristics of useful components in the leaves of Baechohyang(*Agastache rugosa*, O. Kuntze). J Korean Soc Food Sci Nutr 28: 326–332.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Ryu J, Kim DH, Eun JS. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of *Artemisia capillaris* Thunberg. Korean J Medicinal Crop Sci 16: 112–117.
- Choi SY, Cho HS, Kim HJ, Ryu CH, Lee JO, Sung NJ. 2006. Physicochemical analysis and antioxidative effects of wild grape (*Vitis coignetiea*) juice and its wine. J Korean Food & Nutr 19: 311–317.
- Choi SY, Lin SH, Ha TY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK. 2005. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plant. Korean J Food Sci Technol 37: 549–556.
- Choi YM, Chung BH, Lee JS, Cho YG. 2006. The antioxidant activities of *Artemisia* spp. collection. Korean J Crop Sci 51: 209–214.
- Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of some commercial teas. J Korean Soc Food Sci Nutr 32: 723–727.
- Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. J Korean Soc Food Sci Nutr 32: 723–727.
- Chu YH, Chang CL, Hsu HF. 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. J Sci Food Agric 80: 561–566.
- Chung ST, Jun TW, Yoo Sm, Lee WL, Kim YS, Jung DJ, Park JY, Kim JS. 2000. The effect of a long-term antioxidants supplementation on MDA product of heat immediately after maximal exercise in rats. Exercise Science 9: 299–308.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Parker L. 1982. Free radical and tissue damage produced by exercise. Biochem Biophys Res Commun 107: 1198–1205.
- Decker EA, Hultin HO. 1992. Lipid oxidation in muscle foods via redox iron. In Lipid Oxidation in Food. St. Angelo AJ, ed. ACS Symposium Series 500, Washington, DC, USA. p 33–54.

- Ding AH, Nathan CF, Stuhr DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141: 2407–2412.
- Droge W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47–95.
- Duh PD, Tu YY, Yen GC. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT–Food Sci Technol* 32: 269–277.
- Duh PD, Tu YY, Yen GC. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT–Food Sci Technol* 32: 269–277.
- Freeman GG, Mcbreen F. 1973. A rapid spectrophotometric methods of determination of thiosulfinate in onion and its significance in flavor studies. *Biochem Soc Trans* 1: 1150–1154.
- Gao D, Tawa R, Masaki H, Okano Y, Sakurai H. 1998. Protective effects of baicalein against reactive oxygen species. *Chem Pharm Bull* 46: 1383–1387
- Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. 1999. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta* 1472: 643–650.
- Gardner PT, McPahil DB, Duthie GG. 1998. Electron spin resonance assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *J Sci Food Agric* 76: 257–262.
- Gardner PT, McPhail DB, Duthie GG. 1998. Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *J Sci Food Agric* 76: 257–262.
- Gordon MF. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In *Food antioxidants*. Hudson BJB, ed. Elsevier Applied Science, London, UK, p 1–18.
- Gordon MF. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In *Food Antioxidants*. Hudson BJB, ed. Elsevier Applied Science, London, UK. p 1–18.
- Gordon T, Casgelli WP, Hjortland MC, Kennel WB, Dawher TR. 1977. Hight density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease, the framingham study. *Am J Med* 62: 707–714.
- Grundy SM. 1986. Cholesterol and coronary heart disease—A new era. *J Am Med Assoc* 256: 2849–2858.
- Gua J, Jin YS, Han W, Shim TH, Sa JH, Wang MH. 2006. Studies for component analysis, antioxidative activity and  $\alpha$ -glucosidase. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 77–81.
- Guie CA, Frei B and Shigenaga MK. 1993. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* 75: 566–572.
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *JAOC* 58: 966–967.

- Gutteridge JMC, Halliwell B. 1994. Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University press, Oxford, UK.
- Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Bioph Res Co* 236: 591–593.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1–14.
- Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S. 2002. Buckwheat the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res Int* 35: 207–211.
- Hong JH, Jeon JL, Lee JH, Lee IS. 2007. Antioxidative properties of *Artemisia princeps* Pamp. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 657–662.
- Hong JH, Jeon JL, Lee JH, Lee IS. 2007. Antioxidative properties of *Artemisia princeps* Pamp. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 657–662.
- Hwang EH, Kang BG, Kim BR, Lee HJ. 2001. Protein quality evaluation and effect of plasma lipid contents of acid hydrolysates of cocoon in rats fed by high cholesterol, high triglyceride and high sucrose diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1004–1009.
- Hwang JB, Ha JH, Park WS, Lee YC. 2004. Changed of component on green discolored garlic. *Korean J Food Sci Technol* 36: 1–8.
- Hyun SH, Jung SK, Jwa MK, Song CK, Kim JH, Lim SB. 2007. Screening of antioxidants and cosmeceuticals from natural plant resources in Jeju island. *Korean J Food Sci Technol* 39: 200–208.
- Ide N, Lau BAS, Ryu K, Matsuura H, Itakura Y. 1999. Antioxidant effects of fructosyl arginine, a maillard reaction product in aged garlic extract. *J Nutr Biochem* 10: 372–376.
- Im DY and Lee KI. 2012. Nitric oxide production inhibitory effect and antibacterial activity of the extract and fractions from *Paeoniae Radix*. *Korean J Pharmacogn* 42: 173–178.
- Im KJ, Lee SK, Park DK, Rhee MS, Lee JK. 2000. Inhibitory effects of garlic extracts in the nitrosation. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 110–115.
- Jain AK, Vargas R, Cotzkowsky, McMahon FG. 1993. Can garlic reduce levels of serum lipids? A controoed clinical study. *Am J Med* 94: 632–635.
- Jang EK, Seo JH, Lee SP. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean J Food Sci Technol* 40: 443–448.
- Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M. 2007. The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown *in vitro* and *in vivo* studies on rats. *Food Chem Toxicol* 45: 1626–1633.
- Jenkins RR. 1988. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 5: 156–170.
- Jeong HR, Sung MS, Kim YH, Ham HM, Choi YM, Lee JS. 2012. Anti-inflammatory activity of

- Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 888-894.
- Jeong JE, Shim SP, Jeong YS, Jung HK, Kim YC, Hong JH. 2011. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Citrus unshiu* peel by response surface methodology. Korean J Food Preserv 18: 755-763.
- Ji LL. 1995. Exercise and oxidative stress: Role of the cellular antioxidant system. Gerontology 37: 317-325.
- Ji ST, Lee SJ, Kang EL, Son YT, Chung YK. 2002. Inhibitory effect of extracts from *Paeoniae radix* on postprandial hyperglycemia. J Korean Soc Food Sci Nutr 31: 131-135.
- Jin SY. 2011. Study on Antioxidant activities of extracts from different parts of Korean and Iranian pomegranates. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 1063-1072.
- Jo DH, Min KJ, Cha CG. 2007. The antioxidant and antitumor effects of the extract of *Bulnesia sarmientia*. J Food Hyg Safety 22: 120-126
- Joo SY. 2013. Antioxidant activities of medicinal plant extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 42: 512-519
- Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. J Korean Soc Food Sci Nutr 34: 7-14.
- Jung MJ, Yin Y, Heo SI, Wang MH. 2008. Antioxidant and anticancer activities of extract from *Artemisia capollaries*. Kor J Pharmacogn 39: 194-198.
- Jung MJ, Yin Y, Heo SI, Wang MH. 2008. Antioxidant and anticancer activities of extract from *Artemisia capollaries*. Kor J Pharmacogn 39: 194-198.
- Kang JR, Lee SJ, Hwang CR, Kim IS, Sung NJ. 2013. Effect of black garlic and gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.) extracts on the lipids profile and hepatic antioxidant enzyme activities of aerobic exercised rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 42: 869-876.
- Kang MJ, Lee SJ, Shin JH, Kang SK, Kim JG, Sung NJ. 2008. Effect of garlic with different processing on lipid metabolism in 1% cholesterol fed rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 37: 162-169.
- Kang MJ, Shin JH, Sung NJ. 2011. Recovery effect of garlic extract and vitamin B group enhanced diet on swimming fatigue. J Life Sci 21: 875-883.
- Kang YH, Cha HS, Kim HM, Park YK. 1997. The nitrite scavenging and electron donating ability of pumpkin extracts. Korean J Food & Nutr 10: 31-36.
- Kang YH, Oark YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. Korean J Food Technol 27: 978-984.
- Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J Food Sci Technol 28: 232-239.

- Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Technol* 27: 978–984.
- Kanter MM, Nolte LA, Holloszy JO. 1993. Effect of antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol* 74: 965–969.
- Kawanaka K, Tabata I, Higuchi H. 1997. More tetanic contractions are required for activating glucose transport maximally in trained muscle. *J Appl Physiol* 83: 429–433.
- Kibenge MT, Chan CB. 2002. The effect of high-fat diet on exercise-induced changes in metabolic parameters in Zucker fa/fa rats. *Metabolism* 51: 708–715.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333–338.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333–338.
- Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci* 27: 80–86.
- Kim HK, Lee MY, Hong IP, Choi US, Kim NS, Lee ML, Lee SC. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral honey correlation with phenolic and flavonoid contents. *Korean J Apiculture* 25: 275–282.
- Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Kor J Food Sci Technol* 40: 166–170.
- Kim JH, Lee EJ, Shin DO, Hong SE, Kim JK. 2000. Protective effect against oxidative stress in medicinal plant extracts. *J Korean Assoc Radiat Prot* 25: 37–43.
- Kim JH, Son IS, Kim JS, Kim KH, Kwon CS. 2008. Lipase-inhibitory and anti-oxidative activity of the methanol extract and the powder of *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 154–161.
- Kim JO, Jung MJ, Choi HJ, Lee JT, Lim AK, Hong JH, Kim DI. 2008. Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 684–690.
- Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* 569: 321–326.
- Kim JY, Kwon O. 2012. Management strategy for health functional food containing several functional ingredients. *J Fd Hyg Safety* 27: 395–400.
- Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. 2006. Antioxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 328–333.
- Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kwoen DJ, Choi UK. 2007. Antioxidant activities of extract with water and ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta kudo* leaf. *J Korean Soc Appl Biol*

Chem 50: 327–333.

- Kim MH, Kim BY. 1990. Development of optimum processing conditions in air dried garlics using response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 19: 234–238.
- Kim MH, Kim MC, Park JS, Kim JW, Lee JO. 2001. The antioxidative effects of the water-soluble extracts of plants used tea materials. *Korean J Food Technol* 33: 12–18.
- Kim MJ, Ahn JH, Choi KH, Lee YH, Hong EK, Chung YS. 2006. Effects of pine needle extract oil on blood glucose and serum insulin levels in db/db mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 321–327.
- Kim MJ, Lee SJ. 2002. Effects of green tea on hepatic antioxidative defense system and muscle fatigue recovery in rat after aerobic exercise. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1058–1064.
- Kim SB, Lee DH, Yeum DM, Park JW, Do JR, Park YH. 1988. Nitrite scavenging effect of maillard reaction products derived from glucose – amino acids. *Korean J Food Sci Technol* 20: 453–458.
- Kim SH, Baek YH. 2011. Effects of aerobic exercise and black garlic intake on blood lipids, lipid peroxidation and BAP in rats. *J Life Sci* 21: 1025–1031.
- Kim SH, Kim IC. 2008. Antioxidative properties and whitening effects of the *Eucommiae cortex*, *Salviae miltiorrhizae* Radix, *Aurantii nobilis* Pericarpium and *Cnidii rhizoma*. *J East Asian Soc Dietary Life* 18: 618–623.
- Kim YJ, Son DY. 2012. Antioxidant and inhibitory effects of Korean *Panax ginseng* extract on pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1371–1377.
- Kitahara A, Saton K, Nishimura K, Ishikawa T, Ruike K, Sato K, Tsuda H, Ito N. 1984. Change in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 44: 2698–2703.
- Koh JB, Kim JY. 2002. Effect of Okcheonsan on blood glucose, lipid and protein levels in streptozotocin-induced diabetic female rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 284–289.
- Kwak JH, Seo UK, Han YH. 2001. Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J Biotechnol Bioeng* 16: 220–223.
- Kwoen DJ, Youn SJ, Cho JG, Choi UK, Kang SC. 2006. Antioxidant activities and biological properties of *Phellinus linteus* extracts according to different extraction methods. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 91–96.
- Kwon JW, Lee EJ, Kim YC, Lee HS, Kwon TO. 2008. Screening of antioxidant activity from medicinal plant extracts. *Kor J Pharmacogn* 39: 155–163.
- Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical

- characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. Korean J Food Sci Technol 38: 331–336.
- Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. Korean J Food Sci Technol 38: 331–336.
- Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical characteristics of garlic(*Allium Sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. Korean J Food Sci Technol 38: 331–336.
- Lawson LD, Wood SG, Hughes BG. 1991. HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic glove homogenates. Planta Med 57: 263–270.
- Lawson LD. 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compound. In *Phytomedicines of Europe: Chemistry and biological activity*. (Lawson LS, Bauer R, eds.) ACS symposium series, 691. Washington DC, pp. 176–209.
- Lawson LD. 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compound. In *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*. Lawson LS, Bauer R, eds. ACS Symposium Series, 691. American Chemistry Society, Washington, DC, USA. p 176–209.
- Lee CU, On JH, Koh JB. 2007. Effect of feeding eggs on levels of serum lipid, protein, and enzyme activities in rats. J Life Sci 17: 529–534.
- Lee EH, Chyun JH. 2007. Effects of chongkukjang intake on lipid metabolism and liver functional in ethanol consumed rats. Korean J Nutr 40: 684–692.
- Lee HH, Kim IJ, Kang ST, Kim YH, Lee JO, Ryu CH. 2010. Development of black garlic *yakju* and its antioxidant activity. Korean J Food Sci Technol 42: 69–74.
- Lee HM, Seo DY, Lee SH, Baek YH. 2010. Effects of exhaustive exercise and aged garlic extract supplementation on weight, adipose tissue mass, lipid profiles and oxidative stress in high fat diet induced obese rats. J Life Sci 20: 1889–1895.
- Lee HR, Jung BR, Park JY, Hwang IW, Kim SK, Choi JU, Lee SH, Chung SK. 2008. Antioxidant activity and total phenolic contents of grape juice products in the Korean market. Korean J Food Preserv 15: 445–449.
- Lee HR, Jung BR, Park JY, Hwang IW, Kim SK, Choi JU, Lee SH, Chung SK. 2008. Antioxidant activity and total phenolic contents of grape juice products in the Korean market. Korean J Food Preserv 15: 445–449.
- Lee JH, Lee SR. 1994. Analysis of phenolic substances content in Korean plants foods. Korean J Food Sci Technol 26: 310–316.
- Lee JM, Ahn MS. 1997. A study on nitrite scavenging ability of tea extracts. Korea J Dietary

Culture 12: 567–572.

- Lee JM, Lee SH, Kim HM. 2000. Use of oriental herbs as medical food. Food Industry and Nutrition 5: 50–56.
- Lee JM, Park JH, Park HR, Park EJ. 2010. Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity of *Strychnos nux-vomica* extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 39: 1243–1248.
- Lee JW, Bae YI, Shim KH. 2001. Biofunctional characteristics of the water soluble browning reaction products isolated from Korean red ginseng—Study on the antimutagenic and nitrite scavenging activities. J Ginseng Res 25: 118–121.
- Lee JW, Lee SK, Do JH, Shim KH. 1998. Characteristics of the water soluble browning reaction of Korean red ginseng as affected by heating treatment. J Ginseng Res 22: 193–199.
- Lee MH, Lee JM, Jun SH, Lee SH, Kim NW, Lee JH, Ko NY, Mun SH, Kim BK, Lim BO, Choi DK, Choi WS. 2007. The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production. J Ethnopharmacol 112: 49–54.
- Lee MJ, Kwon DJ, Park OJ. 2007. The comparison of anti-oxidant capacities and catechin contents of Korean commercial green, oolong, and black teas. Korean J Food Culture 22: 449–453.
- Lee SD, Park HH. 2001. Effect of feeding basal diet supplemented with mugwort powder on the serum components in growing rat. Korean J Food & Nutr 13: 411–417.
- Lee SI, Lee YK, Choi JK, Yang SH, Lee IA, Suh JW, Kim SD. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of mulberry leaf tea fermented by *Monascus pilosus*. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 706–713.
- Lee SJ, Chung HY, Lee IK, Yoo ID. 1999. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. Korean J Food Sci Technol 31: 815–822.
- Lee SJ, Kang MJ, Shin JH, Kim JG, Kang Sk, Sung NJ. 2009. The effect of garlic and medicinal plants extracts on the liver function and lipid metabolism of rats administered with alcohol. J Korean Soc Food Nutr 38: 561–568.
- Lee SJ, Kim RJ, Ryu JH, Shin JH, Kang MJ, Kim IS, Sung NJ. 2011. Effects of the red garlic extract for anti-obesity and hypolipidemic in obese rats induced high fat diet. J Life Sci 21: 211–220.
- Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Jung WJ, Ryu JH, Kim RJ, Sung NJ. 2010. Antioxidant activity of aged red garlic. Korea J Life Sci 20: 775–781.
- Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Yang Sm, Ju JC, Sung NJ. 2009. Effect of garlic and medicinal



- plants compositions on antioxidant activity and lipid levels of liver in hypercholesterolemic rats. *J Life Sci* 19: 1769–1776.
- Lee SJ, Shin JH, Lee HJ, Tak HM, Kang MJ, Sung NJ. 2013. Screening of functional plant materials for the antioxidant and anti-inflammatory enhancement. *J Life Sci* 23: (in printed).
- Lee SO, Kim MJ, Kim DG, Choi HJ. 2005. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 139–147.
- Lee YM, Gweon OC, Seo YJ, Im JE, Kang MJ, Kim MJ, Kim JI. 2009. Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res Pract* 3: 156–161.
- Lee YS. 2007. Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. *Korean J Food Preserv* 14: 78–86.
- Lertittikul W, Benjakul S, Tanaka M. 2007. Characteristics and antioxidative activity of maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chem* 100: 669–677.
- Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon Daniels MS, Franch HA. 2006. Diet and lifestyle recommendations revision 2006. *Circulation* 114: 82–96.
- Middleton EJ, Kandaswami C. 1994. Potential health promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol* 48:115.
- Miron TI, Shin G, Feigenblat L, Weiner D, Mirelman M, Wilcheck, Ravinkov A. 2002. A spectrophotometric assay for allicin, alliin and allinase with a chromogenic thiol: Reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. *Anall Biochem* 307: 76–83
- Moon GS, Ryu BM, Lee MJ. 2003. Components and antioxidative activities of buchu (Chinese chives) harvested at different times. *Korean J Food Sci Technol* 35: 493–498.
- Moon YH, Yang SJ, Jung IC, Yang YH, Koh JB. 2006. Effect of diet with meat for crossbred pig fed with tangerine peel on lipid metabolism, protein level and enzyme activities in rats. *Korean J Food Sci Ani Resour* 26: 58–63.
- Moreno FJ, Corzo–martinez M, Castillo MD, Villamiel M. 2006. Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage. *Food Res Int* 39: 891–897.
- Nam SM, Kim JG, Ham SS, Kim SJ, Chung ME, Chung CK. Effects of *Artemisia iwayomogi* extracts on antioxidant enzymes in rats administered benzo(a)pyrene. *J Korean Soc Food Nutr* 28: 199–204.
- Niess AM, Dickhuth HH, Northoff M, Fehrenbach E. 1999. Free radical and oxidative stress in exercise–immunological aspects. *Human Kinetics Publishers Inc* 5: 22–56.
- Nsimba RY, Kikuzaki H, Konishi Y. 2008. Antioxidant activity of various extracts and fractions

- of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. Food Chem 106: 760–766.
- Pang L, Hoult JRS. 1997. Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages. Biochem Pharmacol 53: 493–500.
- Park CS, Kim ML. 2006. Functional properties of mugwort extracts and quality characteristics of noodles added mugwort powder. Korean J Food Preserv 13: 161–167.
- Park HJ, Kang SA, Lee JY, and Cho YJ. 2012. Antioxidant activities of extracts from medicinal plants. Korean J Food Preserv 19: 744–750.
- Park JY, Kim MJ, Kim YK, Jin YS, Lee HJ. 1999. The effect of exercise pattern and antioxidant supplement on antioxidant enzymes and total antioxidant status. Korean J Phy Edu 38: 451–460.
- Park YS. 2002. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. J East Asian Soc Dietary Life 12: 23–31.
- Parker L. 1998. Oxidants antioxidant nutrients and the athlete. J Sports Sci 15: 353–363.
- Peng Q, Buz'Zard AR, Lau BH. 2002. Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis *in vitro*. Med Sci Monit 8: BR328–BR337.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med 20: 933–956.
- Rim YS, Park YM, Park MS, Kim KY, Kim MJ, Choi YH. 2000. Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. Korean J Medicinal Crop Sci 8: 342–350.
- Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenland K, Haase N. 2008. Heart disease and stroke statistics. Circulation 117: 25–146.
- Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV, Maslin DJ. 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. Appl Environ Microbiol 67: 475–480.
- Ryu JH, Kim RJ, Lee SJ, Kim IS, Lee HJ, Sung NJ. 2011a. Nutritional properties and biological activities of *Artemisia annua* L. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 163–170.
- Ryu JH, Lee SJ, Kim MJ, Shin JH, Kang SK, Cho KM, Sung NJ. 2011b. Antioxidant and anticancer activities of *Artemisia annua* L. and determination of functional compounds. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 509–516.
- Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. 2005. In vitro, antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). Food Chem 90: 133–139.
- Schwimmer S and Weston WJ. 1961. Onion flavor and odor, Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. JAF 9: 301–304.

- Sen CK, Atalay M, Hanninen O. 1994. Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J Appl Physiol* 77: 2177–2187.
- Seo HC, Suzuki M, Kameyama MO, Oh MJ, Kim HR, Kim JH, Nagata T. 2003. Extraction and identification of antioxidant components from *Artemisia capillaris herba*. *Plant Foods Hum Nutr* 58: 1–12.
- Seo JH. 2008. The effects of *Phellinus linteus* extract administration on aerobic exercise ability and blood lactate concentration the during the supramaximal progressive loaded exercise by athletes. *Korean J Phy Edu* 47: 499–505.
- Seo SJ, Choi YM, Lee SM, Kong SH, Lee JS. 2008. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 129–135.
- Sharma B, Balomajumder C, Roy P. 2008. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 46: 2376–2383.
- Sharma B, Nalomajumder C, Roy P. 2008. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rts. *Food Chem Toxicol* 46: 2376–2383.
- Sheo HJ. 1999. Effects of garlic on the blood lipids and other serum components in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1339–1348.
- Shin CH, Ihm J. 2008. Effects of S-allylcysteine on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean Endocrine Society* 23: 129–136.
- Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Kim JG, Sung NJ. 2008a. Changes of physicochemical components and antioxidant activity of garlic during its processing. *J Life Sci* 18: 1123–1131.
- Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Kim JK, Sung NJ. 2008. Changes of physicochemical compounds and antioxidant activity of garlic during its processing. *J Life Sci* 18: 1123–1131.
- Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Kwon OC, Cha JY, Sung NJ. 2008b. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 965–971.
- Shin JH, Lee HG, Kang MJ, Lee SJ, Sung NJ. 2010a. Antioxidant activity of solvent fraction from black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 933–940.
- Shin JH, Lee SJ, Jung WJ, Seo JK, Sung NJ. 2010b. Effect of the plants mixture and garlic composition on serum lipid level of hypercholesterol rats. *J Life Sci* 20: 396–402.
- Singh NP, Lai H. 2001. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferin toward human breast cancer cells. *Life Sci* 70: 49–56.
- Song TC, Han D, Lee CH, Kim YE, Jung KA, Kim HY. 2005. Effect of dietary supplementation

- of two tonic formula on the forced-swimming capacity of rats. *Korean J Food Sci Technol* 37: 648–655.
- Soriani M, Pietratorre D, Minetti M. 1994. Antioxidant potential of anaerobic human plasma : role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Archives of Biochem Biophys* 312: 180–188.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J. 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem* 113: 1226–1233.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J. 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem* 113: 1226–1233.
- Tastekin D, Atasever M, Adiguzel G, Keles M, Tastekin A. 2006. Hypoglycemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycemic rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 50: 235–238.
- Wang MF, Shao Y, Yi JG, Zhu NQ, Rngarajan M, Lavoic EJ, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869–4873.
- Wang MF, Shao Y, Yi JG, Zhu NQ, Rngarajan M, Lavoie EJ, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage(*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 43: 4869–4873.
- Watanabe J, Kawabata J. 1997. Isolation and identification of a-glucosidase inhibitors from Tochu-Cha. *Biosci Biotech Biochem* 61:: 177–178.
- Weisz A, Cicatiello I, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209–215.
- Woo JH, Shin SL, Jeong HS, Lee CH. 2010. Antioxidant effect of extracts obtained from three *Chrysanthemum* species. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 631–636.
- Woo JH, Shin SL, Jeong HS, Lee CH. 2010a. Antioxidant effect of extracts obtained from three *Chrysanthemum* species. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 631–636.
- Woo JH, Shin SL, Jeong HS, Lee CH. 2010b. Influence of applied pressure and heat treatment on antioxidant activities of young leaves from *Achillea alpina* and *Solidago virgaurea* subsp. *gigantea*. *Korean J Plant Res* 23: 123–130.
- Woo MN, Bok SH, Choi MS. 2009. Hypolipidemic and body fat-lowering effects of fatclean in rats fed a high-fat diet. *Food Chem Toxi* 47: 2076–2082.
- Wood D. 2001. Established and emerging cardiovascular risk factors. *American Heart Journal* 141: 49–57.
- Xu ML, Hu JH, Wang L, Kim HS, Jin CW, Cho DH. 2010. Antioxidant and anti-diabetes activity of extracts from *Machilus thunbergii* S. et Z. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18: 34–39.

- Xu Q, Mori H, Sakamoto O, Uesugi Y, Koda A. 1989. Immunological mechanism of antitumor activity of some kinds of crude drugs on tumor necrosis factor production. *Int J Immunopharmacol* 11: 607–614.
- Ye SF, Hou ZQ, Zhang QQ. 2007. Protective effects of *Phellinus linteus* extract against iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Phytother Res* 21: 948–953.
- Yeh YY, Liu L. 2001. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: Human and animal studies. *J Nutr* 131: 989–993.
- Yeo SG, Park YB, Kim IS, Kim SB, Park YH. 1995. Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 24: 154–159.
- Yin Y, Heo SI, Jung MJ, Wang MH. 2009. Antioxidant and antidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus*. *Korean J Pharmacogn* 40: 1–5.
- Yoon GA. 2007. Antioxidant effect of garlic supplement against exercise-induced oxidative stress in rats. *Korean J Nutr* 40: 701–707.
- Yoon SB, Han HS, Lee YJ. 2011. Effect of *Scutellariae Radix* extract on the proinflammatory mediators in Raw 264.7 cells induced by LPS. *Korean J Herbology* 26: 75–81.
- You BR, Kim HR, Kim MJ, Kim MR. 2011. Comparison of the quality characteristics and antioxidant activities of the commercial black garlic and lab-prepared fermented and aged black garlic. *J Korean Soc Food Nutr* 40: 366–371.
- You BR, Kim HR, Kim MJ, Kim MR. 2011. Comparison of the quality characteristics and antioxidant activities of the commercial black garlic and lab-prepared fermented and aged black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 366–371.
- Yu YY, Shaw MY. 1994. Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. *Lipids* 29: 189–193.
- Yun HJ, Heo SH, Yun HJ, Park WH, Park SD. 2007. Anti-inflammatory effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix*. *Korean J Herbology* 24: 65–73.
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10: 291–316.
- Zheng CX, Yim DS, Lee SY. 2004. The effects of Ka-Mi-Chung-Gan-Tang on rat with alcoholic fatty liver. *Kor J Pharmacogn* 35: 229–232.
- Zheng W, Wang SY. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49: 5165–5170.

[별첨 2]

## 자체평가 의견서

연구개발분야		과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	
연구과제명	국내의 신수요 창출을 위한 고품질 흑마늘 및 바이오 푸드의 상품화				
주관연구기관	경 상 대 학 교				
연구담당자	주관연구책임자	성 낙 주			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	경상대학교(식품영양학과)	성 명	성낙주
		기관(부서)	남해마늘연구소	성 명	신정혜
		기관(부서)	남해보물섬마늘영농조합법인	성 명	류홍건
연구기간	총 기 간	2010. 7. 1. ~ 2013. 6. 30.	당해년도기간	2012. 7. 1. ~ 2013. 6. 30.	
연구비(천원)	총 규 모	330,000	당해년도규모	110,000	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행     
  계획대로 진행     
  계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음     
  어느 정도 얻음     
  얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음     
  현재로서 불투명함     
  그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음                       현재로서 불투명함                       그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과

- 기술료 등 수익                      수 익 :  
 기업 등예의 기술이전              기업명 :  
 기술지도 등                      기업명 :

5-2 산업·지식재산권 등

- 국내출원/등록                      출원 2 건,                      등록 1 건  
 해외출원/등록                      출원    건,                      등록    건

5-3 논문게재·발표 등

- 국내 학술지 게재                      8 건  
 해외 학술지 게재                      건  
 국내 학·협회 발표                      10 건  
 국내 세미나 발표                      건  
 기 타                      건

5-4 인력양성효과

- 석 사                      2 명  
 박 사                      명  
 기 타                      명

5-5 수상 등

- 있 다                      상 명칭 및 일시 :  
 없 다

5-6 매스컴 등의 PR

- 있 다                      건  
 없 다

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다                       약간 감소되었다                       크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다                       약간 조정필요                       전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족                       보통                       미흡

(근거 : \_\_\_\_\_ )

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성고가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 연구성고가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분



3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

충분                       보통                       불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

충분                       고려 중                       중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

확대                       동일                       축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능     수년 내 기업화 가능     기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	경상대학교	교 수	성 낙 주 (인)
참여기업대표	남해보물섬마을영농조합법인	대 표	류 홍 건 (인)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품연구개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.