

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001506-01

쌀가공식품 유통기한 연장용  
항진균성 천연소재 및 공정개발

(Development of Natural Antifungal Materials and Process of  
Critical Control Point for Rice-based Processed Food)

(주)에스앤티

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “쌀가공식품 유통기한 연장용 항진균성 천연소재 및 공정개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 6월 28일

주관연구기관명 : (주)에스엔텍  
주관연구책임자 : 최 태 호  
수 석 연 구 원 : 윤 태 미  
책 임 연 구 원 : 최 정 미  
책 임 연 구 원 : 정 동 채  
선 임 연 구 원 : 조 준 영  
연 구 원 : 김 셋 별  
협동연구기관명 : 한국식품연구원  
협동연구책임자 : 이 호 준  
책 임 연 구 원 : 김 동 만  
책 임 연 구 원 : 정 문 철  
선 임 연 구 원 : 최 정 희  
연 구 원 : 신 은 정  
협동연구기관명 : 안동대학교  
협동연구책임자 : 손 호 용  
연 구 원 : 김 미 선  
연 구 원 : 안 선 미  
연 구 원 : 권 경 진

# 요 약 문

## I. 제 목

쌀가공식품 유통기한 연장용 항진균성 천연소재 및 공정개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구과제의 목표는 쌀가공식품의 유통과정의 신선도 및 안전성을 확보하기 위해, 식품용 항진균성 천연보존료를 개발 및 제품화하고 이를 적용한 떡 포장기술을 개발하는 것이다. 본 연구는 초기 소재 연구 뿐 만 아니라 산업화 공정개발 및 안전성 연구를 통하여 식품용 천연 보존료를 제품화하여 즉각적인 판매가 가능한 실용화 연구이다.

사회·문화적으로 안전한 먹거리에 대한 요구가 증대되고, 식약청의 2010년도 5대 핵심과제가 안전 지향적인 과제이며 소비자의 의식 수준 향상으로 식품용 천연보존료의 필요성이 증대되고 있다. 경제·산업적으로 떡볶이를 포함하는 떡에 적용 가능한 보존제 종류가 주정 외에는 전무하며, 주정의 보존 효능도 냉장보관에서 2개월 동안 보존이 어려운 실정이다. 또한 한식세계화를 위한 떡볶이 유통기한 연장의 필요성이 절실하며, 곰팡이 문제 해결로 떡볶이 수출을 년 1500억까지 증대가 가능하다. 기술적 측면에서는 주정 외에는 효능이 확보된 곰팡이 제어용 천연보존료가 없으므로, 본 과제의 개발이 여러 측면에서 꼭 필요하다.

또한, 무방부제 식품을 선호하는 세계적인 수요로 인하여, 본 과제는 안전성이 확보된 식용 식물을 이용하여 항진균활성을 갖는 천연 보존료를 개발하여 화학 합성보존제를 대체함으로써 안전한 먹거리 생산을 촉진하고 한식세계화에 기여하여 식품의 부가가치를 높이하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 제1세부과제 : 항진균물질 동정 및 천연보존료 제품화

- ▷ 선별 소재의 활성 안정성 평가
- ▷ 항진균물질의 분리 정제
- ▷ 항진균물질의 구조 동정
- ▷ 최적 추출공정 시스템 설정
- ▷ 천연보존료의 제형화 및 관능 평가
- ▷ 원료의 대량 확보 및 추출
- ▷ 천연보존료의 시제품 제조

## 2. 제1협동과제 : 천연보존료의 떡 처리 조건 확립 및 포장기술 개발

- ▷ 유통 떡볶이용 떡제품 유통기간 조사
- ▷ 6개월 이상 보존을 위한 처리 조건 확립
- ▷ 떡볶이에 대한 천연보존료의 application test
- ▷ 떡볶이 장기보존용 포장기술 개발
- ▷ 떡 포장기술 manual화

## 3. 제2협동과제 : 천연물소재의 항진균 활성 DB 구축 및 안전성 평가

- ▷ 천연물 추출물 라이브러리 구축
- ▷ 구축 천연물 추출물 라이브러리로부터 항진균 소재 선발
- ▷ 항균스펙트럼 확보
- ▷ 원료 유용성 평가
- ▷ 천연보존료 안전성 평가
- ▷ 원료의 항균물질 분석

## IV. 연구개발결과

본 연구개발은 당초 연구계획을 충실히 수행하였으며, 요약하면 제1세부와 제2협동기관이 보유한 식물추출물 라이브러리를 이용하여 항진균 및 항세균활성 DB를 구축하고, 항균활성과 경제성 평가를 통하여 단계적으로 소재를 선발하였으며, 최종적으로 식물 3종인 상백피, 감초, 기린초를 선발하였으며, 3종 식물추출물 각각에 대하여 식품용 수용성 제형화 개발을 완료하였으며, 쌀가공식품을 포함한 다양한 식품에 적용 가능한 형태로 제품화하였다(제품명:복합허브추출물F1). 또한 천연보존료의 안전성 평가 및 적용 떡제품의 포장공정 개발로 실용화 가능성을 극대화 하였다. 그리고, 1차년 심사의견에 따라서 항세균 소재도 보완 개발하였다.

1. 제1세부와 제2협동기관이 보유하고 있는 2300종의 식물추출물 라이브러리로 항진균활성을 스크리닝한 결과, 항균 효능과 경제성 평가를 통하여 최종적으로 3종 식물 상백피, 감초, 기린초를 선발하고, 선발된 식물추출물의 항균활성의 pH안정성 & 온도안정성이 우수함을 확인하였다.
2. 선발된 상백피, 감초, 기린초 3종 식물의 주정추출물을 제형화공정 개발을 통하여 물에 가용성인 형태로 제형화 하여(특히 등록: 제 10-1007869호), 식품용 천연보존료로 제품화(복합허브추출물F1)하였으며, 이를 적용한 떡볶이로 포장공정 개발을 완료하였다.
3. 기린초추출물로부터 항균 물질을 분리정제하여 2,6-di-galloylarbutin(SK-1)으로 구조동정하였으며, SK-1물질 외에도 항균활성이 우수한 다양한 minor물질이 기린초에 함유되어 있는 것으로 판단된다.



4. 6개월 이상 보존을 위한 처리조건을 확립하기 위해서 상백피추출물과 감초추출물을 처리한 떡볶이를 상온(20℃) 및 냉장(10℃) 보관하면서 떡볶이의 미생물 변화양상 및 품질변화를 조사한 결과 상백피추출물과 감초추출물을 혼합 처리한 떡볶이의 보존효과가 가장 우수하였다.

5. 시제품(복합허브추출물 F1)을 적용한 떡볶이의 저장 효과를 확인한 결과 주정처리구에 비해 시제품을 처리한 떡볶이의 보존 기간이 10℃에서 30일 이상 연장되는 효과를 나타내었다.

6. 천연보존료의 처리방법별 시험에서 혼합보다는 침지에 의한 보존효과가 더욱 우수하였다. 또한, 천연보존료의 농도별 시험에서는 0.1% 이상에서는 보존 효과가 유사하였으며, 천연보존료의 항진균활성(MIC)를 고려하여 0.4~1%로 처리농도(dosage)를 결정하였다.

7. 떡볶이 장기보존용 포장기술 개발에서 기체조성을 달리한 실험구에서는 처리구에 따른 기체 농도의 차이는 없었으며, 색도변화와 경도변화(응집성, 씹힘성, 부착성, 경도변화) 테스트 결과 대조구와 천연보존료 처리구 및 기체농도를 달리한 포장구간의 차이는 미미하였다. 단지, CO<sub>2</sub>의 농도가 80% 이상일 때 경도측정값이 낮아서 노화저해 효과가 있었다. 미생물 억제 효과는 천연보존료4(복합허브추출물 F1)를 처리구 중에서 CO<sub>2</sub> 농도가 80% 이상의 변형기체 포장구의 떡 변패방지효과가 가장 우수하였다.

8. 개발제품(복합허브추출물 F1)의 항균 활성은 산처리, 열처리, 혈장처리 소화효소 처리에서도 안정하게 유지되며, 단백질 분해효소(pepsin, chymotrypsin, trypsin)에 대한 저해활성을 나타내지 않았으며, 전분계 분해효소(endo α-amylase, exo α-amylase, α-glucosidase)에 대해서는 500 ug/ml 농도에서 약한 저해활성이 있었으므로, 적용농도 및 섭취량을 고려하였을 때 정상인의 소화효소 저해는 매우 미미하였다.

9. 개발제품(복합허브추출물 F1)의 마우스 단회 독성 평가에서, 4,000 mg/kg 농도까지 독성을 나타내지 않으므로, 등급1무독성 그룹(practically non-toxic)으로 구분되었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

본 연구과제 수행을 통하여, 논문 2편, 특허등록 1건, 특허 출원 1건, 기술이전 1건, 제품화 1건, 제형화 기술 5건, 물질구조 규명 1건, 포장공정 개발 1건의 성과를 올렸다.

특히 개발된 제조공정에 따라 원물 500kg 단위 대량생산을 완료하였고, 최종 시제품을 제조하였으며, 제품 판매를 위한 선영업을 진행 중에 있다.

### 2. 성과 활용 계획

**식품용 천연보존료 적용:** 본 과제를 통하여 개발된 식품용 천연보존료는 1차적인 과제 목적에 맞는 쌀가공식품(떡볶이, 떡국 등)에 적용하여 유통 안전성을 확보할 예정이며, 실제 떡 유통에서 보존기간을 실온에서 2일만 연장하여도 매우 우수한 효과이다. 또한, 곰팡이 및 효모에 의한 변패 비율이 높은 식품인 면류, 육포, 빵, 음료수 등 여러 가지 식품에 즉시 적용이 가능한 식품용 천연보존료이다.

**화장품용 천연방부제 적용(글로벌 제품화 가능):** 개발된 복합허브추출물F1에서 부형제를 첨가하지 않은 keybase인 상백피/감초 복합추출물은 내분비계교란과 유방암발생 이슈가 빈번한 파라벤과 마취작용을 하는 페녹시에탄올을 포함하는 화장품용 합성방부제를 대체할 수 있는 천연소재로 확대 적용이 가능하다. 특히, 상백피와 감초는 이미 미백 원료로 화장품에 사용되고 있다. 본 제품은 항균물질 추출을 최적화하여 개발하였으므로, 화장품용 천연방부제로 적용이 가능하며, 기린초추출물도 함께 적용한다면, 화장품용 방부제가 요구하는 5종 미생물(*S. aureus*, *P.aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*)에 대한 제어능이 우수하다고 판단된다. 실제로 무방부제 화장품에 적용한 방부력테스트에서 진균류는 90% 제어하였으며, 세균류는 99% 이상 생육을 저해하였다. 따라서 식품 시장을 넘어서 화장품시장에서 글로벌 진출이 가능하다고 판단된다.

**사료용·수산물 천연보존료 적용:** 특히, 제품 생산 및 판매가 안정적으로 이루어져서 제품 생산원가가 저하되면, 상대적으로 단가가 싼 제품을 원하는 축산용 사료에도 적용이 가능하다. 애완동물 사료에는 축산을 비롯한 애완동물의 사료에는 BHA, BHT, EQ와 같은 화학방부제 및 항산화제들이 사용되고 있으며, 이들은 암 유발 가능성이 제기되고 있으므로 사료 방부제도 독성이 없는 천연 소재를 필요로 하고 있다. 또한 수산물 양식에서는 현재는 발암물질로 의심되어 사용이 금지된 말라카이트그린과 항생제를 대체할 천연 항균제를 제공함으로써 경제적 효과를 창출할 뿐 만 아니라 수산 양식 업계의 요구를 충족시키고 국민 건강 증진에 크게 기여할 것으로 기대된다.

## SUMMARY

(영문요약문)

### I. Title

**Development of Natural Antifungal Materials and Process of Critical Control Point for Rice-based Processed Food**

### II. The Objectives and necessities of the research

The objective of research project is the development of natural antifungal preservative and optimal application of it on manufacturing process of rice-based processed food for the food safty. These studies is carried out according to plan and sectional research divisions. Furthermore, Our research on the practicality of the natural preservative for foods is available for immediate sales because we completed the whole research process from basic screening of antimicrobial plants with extract-library to manufacturing and application of natural preservative on Tteokbokki.

The needs of natural preservative are increasing in socio-cultural aspects because of demands rises for healthier and safe foods, safety-oriented government's policy direction and the increase of people's living standards. In economic and technical aspects, natural preservative for rice-based processed food is only edible alcohole whose effect is not enough to preserve Tteokbokki for 2 months at 4°C. Therefore, it is necessary to augment in the self life of rice-based processed food for "Globalization Strategy of Korean Food" and export increase of Tteokbokki reaching 150 billion dollars.

Consequently, these research project can contribute to manufacture safe foods without chemical preservatives and make added value of foods higher by assisting "Globalization Strategy of Korean Food".

### III. Results and their application

#### 1. Results

1) Among about 2300 plant extract libraries, *Morus alba* L., *Glycyrrhiza glabra* and Herb-ST were finally screened by antifungal and antibacterial test and the economic evaluation and identified their pH and thermal stabilities.

2) The ethanol extracts of selected *Morus alba* L., *Glycyrrhiza glabra* and Herb-ST were formulated to water-soluble powder forms, respectively(Patent No; 제 10-1007869

제, registration) and developed to antifungal natural preservative for food. In addition, we completed package development of Tteokbokki containing natural preservative.

3) The structure of purified antimicrobial compound from kirincho(*Sedum kamtschaticum* Fischer) was elucidated as 2,6-di-galloylarbutin(SK-1) by analysis of <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and Mass data. We estimate that Herb-ST contain many minor antimicrobial and antioxidant compounds in purification process.

4) For the establishment of preservative treatment, Tteokbokki containing the developed natural preservative(Complex Herb Extract F1) were stored at different 20°C and 10°C and identified microbial and quality change. Tteokbokki treated with Complex Herb Extract F1 was stored freshly more than 2 months at 10°C.

5) The preservative effect was better on Tteokbokki treated with the developed natural preservative(Complex Herb Extract F1) by dipping method than mixing method and similar in the concentration above 0.4%. Therefore, the concentration between 0.4% and 1% was determined to be the optimum dosage.

6) The developed natural preservative(Complex Herb Extract F1) extended storage period of Tteokbokki by 30 days at 10°C.

7) The changes in gas, color and texture between Tteokbokkis treated with the Complex Herb Extract F1 and different gas compositions were tenuous for a storage period. The texture value was low only when the concentraion of CO<sub>2</sub> is over 80%. The inhibition of spoilage was most effective in Tteokbokkis treated with the Complex Herb Extract F1 and above 80% CO<sub>2</sub> concentration.

8) The developed natural preservative(Complex Herb Extract F1) was stable by acid, heat, plasma and digestive enzyme treatment. Especially protease(pepsin, chymotrypsin, trypsin) were not inhibited by the developed natural preservative and glucosidase(endo α-amylase, exo α-amylase, α-glucosidase) were inhibited slightly. However, there is no effect on normal people at 500 ug/ml concentration.

9) The developed natural preservative was not toxic at 4,000 mg/kg on the Mouse Single Oral Dose Toxicity Test and classified as practically non-toxic group.

## 2. Applications

The developed product can be applied to various industry like food, cosmetics, fish farming and livestock feed as natural preservative.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1. General introduction .....	11
Chapter 2. Information of oversea science and technology .....	15
Chapter 3. Contents and results of research .....	18
Section 1. Objectives and achievement rate of project .....	18
Section 2. The 1st unit research project .....	21
Section 3. The 1st cooperative research project .....	46
Section 4. The 2nd cooperative research project .....	79
Chapter 4. Achievement and contribution .....	96
Chapter 5. Application plan of results .....	100
Chapter 6. References .....	104

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b>	11
1.	과 제 명	11
2.	연구개발의 목적	11
3.	연구개발의 필요성	11
	(1) 사회·문화적 측면의 필요성	11
	(2) 경제·산업적 측면의 필요성	12
	(3) 기술적 측면의 필요성	13
4.	연구개발 범위	14
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b>	15
1.	국내	15
2.	국외	16
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b>	18
<b>제 1 절:</b>	<b>연구 목표 및 과제별 연구 달성도</b>	18
1.	최종연구목표	18
2.	세부 연구과제별 목표 대비 달성도	18
<b>제 2 절:</b>	<b>제 1 세부과제</b>	21
	항진균물질 동정 및 천연보존료 제품화	
1.	연구 개발 목표	21
2.	최종 연구결과 요약	21
3.	연구 수행방법 및 결과	22
가.	항진균소재 선정	22
	(1) 항진균소재 스크리닝	22
	(2) 항진균소재 항균활성 평가	23
나.	활성 안정성 평가	25
	(1) pH 안정성평가	25
	(2) 열 안정성 평가	27
	(3) 농축배수에 따른 안정성 평가	28
다.	항진균물질의 분리정제	28
	(1) 상백피추출물로부터 항진균물질의 분리정제	28
	(2) 기린초 추출물로부터 항진균물질의 분리 정제	30
	(3) 기린초로부터 분리한 물질(SK-1)의 구조 동정	31
라.	상백피추출물의 제형화	33

(1) 최적 추출공정 시스템 설정 .....	33
(2) 유화제 및 유화제 최적 농도 선정 .....	34
(3) 제형화 .....	35
마. 감초추출물의 제형화 공정 개발 .....	36
바. 기린초추출물의 제형화 .....	37
(1) 최적 추출공정 시스템 설정 .....	39
(2) 기린초 추출물의 탈색 .....	39
(3) 기린초 추출물의 제형화 .....	40
사. 제품생산을 위한 복합추출물 제형 .....	41
(1) 상백피와 감초 복합추출물 제형 .....	41
(2) 상백피, 감초, 기린초 복합추출물 제형 .....	42
아. 시제품 제조 .....	43
자. 관능 평가 .....	43
차. 시제품(복합허브추출물 F1)의 떡 보존효과 .....	44

### 3 절: 제 1 협동과제 .....

#### 천연보존료의 떡 처리 조건 확립 및 포장기술 개발

1. 연구 개발 목표 .....	46
2. 최종 연구결과 요약 .....	46
3. 연구 수행방법 및 결과 .....	47
가. 시중 유통 떡볶이용 떡 제품의 유통기간 조사 .....	47
(1) 떡볶이 떡 제품 종류 .....	47
(2) 포장 재질 및 처리 .....	47
나. 상온 6개월 이상 보존을 위한 처리조건 확립 .....	48
(1) 포장재질에 따른 떡볶이 보존 효과 .....	48
(2) 항균소재 및 항균추출물 처리에 따른 떡볶이 보존 효과 .....	49
다. 천연보존료 처리 떡볶이의 포장기술 개발 .....	53
(1) 재료 및 방법 .....	53
(2). 품질특성 측정 방법 .....	55
(3) 포장기술 개발 결과 .....	56
라. 기존 주정 처리 방법과 항진균 소재 사용에 따른 경제적 타당성 조사 .....	77
마. 떡 제조 시 CCP 관리 매뉴얼화 .....	78

### 제 4 절: 제 2 협동과제 .....

#### 천연물소재의 항진균활성 DB구축 및 안정성평가

1. 연구 개발 목표 .....	79
2. 최종 연구결과 요약 .....	79
3. 연구 수행방법 및 결과 .....	80

가. 항진균소재 선정	80
(1) 기존 구축된 874 종의 천연물 추출물을 대상으로 한 항진균 활성 검토	80
(2) 신규 조제된 680 종 시료 천연물 추출물로부터 항 <i>Aspergillus niger</i> 활성 평가	81
나. 선정된 천연물의 항진균 활성 검토	84
(1) 황금	84
(2) 참나물	85
(3) 기린초	87
다. 천연보존료의 유용성 평가	88
(1) 천연보존료(복합허브추출물 F1)의 성분 및 생리활성	88
(2) 천연보존료(복합허브추출물 F1)의 항산화능 평가	89
(3) 천연보존료(복합허브추출물 F1)의 항균 활성 평가	90
(4) 천연보존료(복합허브추출물 F1)의 산, pH, 혈장, 효소처리 안정성 평가	92
라. 천연보존료(복합허브추출물 F1) 안전성 평가	92
(1) 소화, 흡수 장애 평가	92
(2) 인간 RBC의 용혈독성 평가	93
(3) Mouse 경구투여를 통한 단회 독성 및 단기 독성 평가에 의한 안전성 확인	94

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 96

1. 연구개발 목표 달성도	96
가. 최종연구목표	96
나. 세부 연구과제별 목표 대비 달성도	96
2. 관련분야에의 기여도	98

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 100

1. 연구개발 성과	100
2. 성과활용 계획	102
가. 식품용 천연 보존료 적용	102
나. 쌀가공식품인 떡볶이 유통기한 연장 적용	102
다. 화장품용 천연방부제 적용	102
라. 사료용·수산용 천연보존료 적용	102

## 제 6 장 참고문헌 104



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 과 제 명 : 쌀가공식품 유통기한 연장용 항진균성 천연 소재 및 공정 개발

### 2. 연구개발의 목적

무방부제 식품을 선호하는 세계적인 수요로 인하여, 본 과제는 안전성이 확보된 식용 식물을 이용하여 항진균활성을 갖는 천연 보존료를 개발하여 화학합성 보존제를 대체함으로써 안전한 떡거리 생산을 극대화하고 식품의 부가가치를 높이며 식품 및 화장품업체의 절실한 요구를 충족시키고자 한다. 떡류의 부패 원인균인 효모와 곰팡이의 제어는 떡류의 품질보증과 유통에서 매우 중요한 과정이며 필수불가결한 사항이다. 따라서 본 과제에서 떡 보존용 천연 항진균제를 개발하고 이를 이용한 떡 제조 공정을 확립함으로써 떡볶이의 한식세계화 촉진에 기여하고 식품의 부가가치를 높이고자 한다.

### 3. 연구개발의 필요성

#### (1) 사회·문화적 측면의 필요성

식품 보존제는 식품의 선도와 품질을 보존하기 위해서 사용되는 소재로서 오염 미생물의 종류, 식품의 종류 및 성분, 식품 제조 시의 가열 온도에 따라서 다양한 종류가 있으며, 안식향산, 소르빈산 및 프로피온산 등의 화학합성 보존제 혹은 식초산, 젖산, 구연산 등의 유기산들이 주로 사용되고 있다. 그러나 유기산은 유해 미생물의 생육저해능이 약해서 식품 보존 효과를 나타내기 위해 식품에 과량 첨가 시 식품 고유의 맛과 물성을 변화시킴으로 사용이 용이하지 않으며, 소르빈산과 같은 화학합성 보존제들은 방부력이 뛰어나며 사용량의 규제가 있기는 하지만, 사회적으로 안전한 떡거리에 대한 요구가 커지고 웰빙을 지향하는 사회적인 관심이 증대되면서 이들 화학합성 방부제의 유해성 및 부작용이 끊임없이 논란이 되고 있어 그 사용량이 매년 감소할 뿐만 아니라, 이를 대체할 수 있는 천연 보존료의 개발이 요구되고 있다.

실제로 천연보존료에 대한 필요성으로 인하여 ‘천연방부제 갈비의 성공’ (2010년 2월 20일 머니투데이 뉴스), ‘화장품 논란’ (천연방부제를 사용한 화장품: 2010년 3월 13일 메디컬 투데이 뉴스속보)과 같은 이슈가 끊임없이 제기되고 있다. 또한 최근의 국내 농림수산식품부의 우수식품정보시스템 구축 정보제공 ([www.goodfood.go.kr](http://www.goodfood.go.kr))으로 인해 소비자, 생산자의 전문지식 향상 및 의식 변화의 가속화를 통해서도 안전 식품에 대한 사회·문화적인 필요성을 알 수 있다.

최근 식약청에서 보건복지부와 함께 선정한 ‘10년도 정책방향과 5대 핵심 과제’ 중 3개가 ‘국민이 체감하는 안전’ ‘소비자와 함께하는 안전’ ‘녹색성장과 어린이의 안전한 식생활 환경’과 같은 안전한 식품과 관련된 주제였으며, 또한 “녹색식품 인증제”를 도입하여 합성첨가물을 사용하지 않은 제품에 적용할 계획을 발표하였다. 따라서 이러한 식약청의 정책은 안전한 떡거리 생산이 사회적으로 중요한 문제이며 강한 필요성이 있음을 시사한다. 따라서

천연 보존료는, 이제까지의 식품 생산, 유통에서의 편리함보다는 사회적 웰빙 분위기의 고조 및 소비자의 의식 수준 향상 및 변화에 기인하여 피할 수 없는 시대적 요구이다.

## (2) 경제·산업적 측면의 필요성

식품의 생산, 유통, 저장 단계에서 다양한 미생물에 의한 생물학적 부패, 변질이 수반되며, 이러한 부패, 변질은 제품의 품질 악화는 물론 제품 생산 자체를 불가능 하게 하기도 한다. 실제 농산물의 경우 부패 변질에 의한 손실은 전체 산업의 약 40%를 상회하며, 따라서 효율적인 부패, 변질의 방지는 특정 제품의 생산성을 2배 정도 증가시키는 효과를 나타낸다.

곰팡이는 식품 전반에 걸쳐서 오염되어 제품의 품질을 저하 시키며, 제어가 어려운 동시에 다른 미생물에 비해서 특히 천연 보존료로 제어하기가 힘든 미생물로서 막대한 경제적인 손실을 입힌다. 따라서 여러 식품회사와 화장품회사들이 화학합성 보존료 대체제를 위한 항진균 천연 보존료 개발을 절실히 필요로 하고 있다.

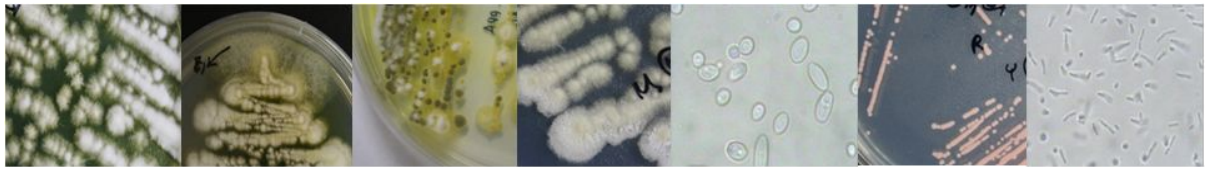
특별히 곰팡이 제어가 요구되는 대표적인 식품으로는 떡류, 면류, 육포, 빵 등으로 건조 혹은 반건조 식품에서 더욱 문제가 심각하다. 그 중에서도 떡볶이는 현재 한식세계화 사업의 일환으로 선정된 음식으로서, 수출 단계에서 해결해야 할 중요한 관건은 곰팡이가 생육되지 않도록 보존성을 높이는 것이다. 현재 떡볶이는 소금 첨가, 알콜처리 및 탈산소재로 보존력을 높이고 있으나, 여전히 곰팡이로 인한 클레임이 전체 클레임의 47%에 이른다. 떡볶이의 수출은 현재 약 12억원(년) 정도이나, 이 중 곰팡이로 인한 클레임이 1.7%(일본)에 달하며, 이는 떡볶이의 수출을 막는 주된 장애요인이며, 수출 바이어들은 ‘곰팡이 문제가 해결되면 수출 시장 규모가 1,500억원(년) 이상이 가능하다’ 는 의견이다. 따라서 곰팡이 오염을 해결하기 위한 제조공정 개선 뿐 만 아니라 보존료의 개발 또한 시급한 실정이다.

또한 국내 떡류, 빵류 및 면류 전체 생산량에 천연 보존료를 0.05% 적용할 때 예상 국내 시장규모는 년 190억에 이르며, 예상 세계 시장 규모는 년 1조 3천억에 이른다(식품의약품안전청 & Euromonitor International 자료 참조).

그리고 부가적으로 양산빵의 반품 폐기율이 3%에 달하는데 이는 년 150억에 이른다. 그러므로 천연 보존료로 곰팡이에 의한 변패를 지연시킴으로 유통기한을 1일 더 연장한다면 약 50억에 이르는 빵류 생산 경비 절감효과로 추가적인 부가가치가 기대되며, 화장품 천연 방부제로 확장 적용 된다면 더 큰 기대효과가 있을 것으로 예상된다.



<떡류와 빵의 주요 클레임 사진>



<떡류 클레임 원인균>

- Mold : Aspergillus 속, Penicillium 속
- Yeast : Candida krusei(피사제품 분리균 동정 결과)
- Bacteria : Brevibacillus laterosporus(피사제품 분리균 동정 결과)

(3) 기술적 측면의 필요성

국내 식품 업계와 소비자의 요구에 부응하여 국내에서도 천연 보존제의 개발 시도가 쇠비름, 솔잎, 정향나무, 선학초, 봉선화, 산초 및 고추냉이, 녹차 등의 식물추출물이나, 포도, 산수유, 매실 및 모과 등 과일추출물, 그리고 유산균을 이용하거나 이들이 생산하는 박테리오신 등을 소재로 하여 이루어졌다. 그러나 이러한 많은 연구 개발에도 불구하고 식품산업에서 실제로 적용되어 상용화된 사례는 극히 희박하다.

이는 단지 실험실 내의 제한된 환경이나 소규모의 제조 환경에서는 그 효과를 볼 수 있으나 대량생산에 따른 제조공정의 문제점 및 원가 상승과 품질의 향상성, 물리적 성상의 안정화 및 제형화의 실패로 이 모든 성과가 단지 학술적인 의미만을 얻는 결과를 나타내었다. 따라서 천연 보존료에 대한 기초연구에만 그치지 않고, 폐사와 같이 보존료 제품을 전문적이고 성공적으로 개발한 경험이 있는 회사의 적극적인 시도가 필요하다.

폐사는 기업부설연구소로 천연소재과학연구소를 운영하고 있으며, 이미 순수 자체 기술력으로 개발한 화분발효물을 주성분으로 한 천연 식품보존료로서 파이오렌, 파이오렌-디, BBP, 지세스-K 등을 개발하여 2009년에 천연보존료만 15억의 매출을 달성하였고, 현재도 천연 생약 성분을 이용한 천연 보존료 개발로 3가지 제품을 4월에 런칭 예정이다.

국내에서 사용되고 있는 천연 식품 보존료로서는 자몽종자 추출물이 가장 많이 사용되고 있으며, 이 외에도 키토산, 폴리리신, 유카추출물, 프로폴리스, 화분발효물, 복합황금추출물 등이 있으나 폐사에서 개발한 화분발효물 및 겨자 정유를 이용한 천연 보존료와 바이오스킨테크가 개발한 복합황금추출물을 제외한 모두가 전량 외국에서 수입된 제품으로, 안정적인 공급이 확보되지 못함과 동시에 국가 식품산업의 자생력 강화에 역행하고 기술력 강화 및 품질 경쟁에 매우 부정적인 영향을 초래할 뿐만 아니라, 효모와 바실러스속 미생물, 곰팡이에 대해서는 매우 약한 항균력을 나타내는 중요한 단점들이 있다. 더우기 현재까지 효과적인 곰팡이 제어용 천연 식품보존료는 전무한 실정이다.

하지만 폐사에서 절임식품에 흰막을 형성하고 포장용기의 팽창을 일으켜 제품의 품질을 저하시키는 효모(곰팡이류)를 비롯한 부패성 미생물을 탁월하게 제어하는 ‘식물정유를 이용한 천연 보존료’인 BBP를 개발하여 제품화하고 현재 년 매출 3억4천을 달성한 성공 사례가 있다. 그러나 BBP가 국내에서 유일하게 개발된 천연 항진균 보존료이지만 머스타드 고유의 향으로 절임식품 외에는 적용이 어려우므로 다른 여러가지 식품에도 적용 가능한 항진균 보존료의 개발이 절실히 요구된다.

부가적으로 떡류의 제조공정과 포장기술 또한 천연보존료 사용 보다 떡류의 유통기한 연장에 더 중요한 역할을 함으로 폐사에서 개발한 천연보존료를 적용한 떡 제조공정 개발과 떡 포장 기술의 개발도 반드시 병행함으로 보존 기술력을 높여야 한다.

#### 4. 연구개발 범위

- 식물 추출물 라이브러리로부터 항진균소재 스크리닝
- 천연 식물 소재로부터 항진균물질의 분리정제 및 구조동정
- 천연 보존료의 산업적 추출공정 및 제형화 공정 확립
- 원료확보, 공정 안정화, 시제품 제조
- 장기보존용 떡 포장기술 개발
- 천연 보존료의 제품 적용 테스트 및 떡제조 공정 매뉴얼화
- 천연보존료의 안전성 평가

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내

천연의 식품보존제를 개발하기 위한 지금까지의 연구개발은 주로 쇠비름(대한민국 발명특허 출원번호 10-1999-0025609), 솔잎(대한민국 발명특허 출원번호 10-1999-0002040), 정향나무(대한민국 발명특허 출원번호 10-1996-0005898), 선학초(대한민국 발명특허 출원번호 10-1996-0055244), 봉선화(대한민국 발명특허 등록번호 1002193060000), 산초 및 고추냉이(한국식품위생안전성학회지, 16권, 37-40, 2001), 녹차(대한민국 발명특허 출원번호 10-2002-0079673) 등의 식물이나, 포도(대한민국 발명특허 공고번호 1994-0003990), 산수유(농산물저장유통학회지, 6권, 99-103, 1999), 매실(한국식품저장유통학회지, 9권 292-297, 2002), 겨자(한국식품위생안전성학회지, 16권, 37-40, 2001) 및 모과(대한민국 발명특허 출원번호 10-2000-0068733) 등 과일의 추출물에 대하여, 갑각류의 키토산(대한민국 발명특허 출원번호 10-1997-0078820, 등록번호 1002622530000, 등록번호 1001649230000) 그리고 미생물이 분비하는 박테리오파지(대한민국 발명특허 등록번호 10-0273742, 10-0123946, 1996-0015891, 1993-0001383) 등에 대하여 이루어져 왔다.

그러나 이와 같은 천연 식품보존제의 소재를 개발하기 위한 수많은 연구에도 불구하고 식품산업에서 실제로 적용되어 상용화된 사례는 찾아 볼 수 없다. 이는 단지 실험실 내의 제한된 환경, 또는 소규모의 제조 환경에서는 그 효과를 볼 수 있었으나 대량생산에 따른 제조공정의 문제점 및 원가의 상승과, 품질의 향상성, 물리적 성상의 안정화 및 제형화의 실패로 이 모든 성과가 단지 학술적인 의미만을 얻는 결과를 나타내었다.

국내의 기술력에 의해 개발된 천연 식품보존제의 용도로 사용될 수 있는 성분 또는 제품으로는 키토산, 복합황금추출물, 프로폴리스 및 화분발효물, 등이 있으나,

① 키토산은 약 8년전부터 자광 및 (주)벤스랩 등 국내 5~6개의 중소기업 혹은 벤처기업에서 개발되었으나 항균력이 매우 미약하고 난용성인 단점 때문에 키토산 자체로는 식품산업에 이용되지 못하고 다른 화학합성 보존제 또는 주정과 혼합하여 시판되고 있으며 소비량 또한 극히 소량으로 조사되었다.

② 프로폴리스는 역겨운 고유의 향, 매우 쓴맛, 짙은 흑색의 색상, 난용성으로 침전물의 형성뿐만 아니라 가격이 비싸서 식품보존제로는 거의 이용되지 못하며, 오히려 건강보조식품의 소재로 이용되고 있다.

③ 복합황금추출물은 항균물질인 바이칼린성분과 감초추출물, 젖산을 함유하는 제품으로 증성차음료의 보존료로 사용되고 있으나, 항효모활성을 포함한 항진균 활성은 매우 미약한 실정이다.

④ 국내에서 순수한 자체 기술로 천연 식품보존제의 개발 성공사례는 폐사의 자체 기술력으로 개발한 화분발효물을 주성분으로 한 천연 식품보존제인 파이오렌, 파이오렌-디 등으로서 2009년에는 약 2억 4천만원의 매출을 달성한 천연 식품보존제라고 할 수 있다. 뿐만 아니라 “항균활성을 갖는 화분발효물의 항균원인물질”로 발명특허를(대한민국 발명특허 등록번호 제 10-0570469) 취득하여 독창적인 천연의 항균성 선구물질을 보유하고 있다.

그러나 이러한 천연의 식품보존제 또는 항 미생물 소재들은 모두가 세균류에 대해서는 그나마 항균력을 나타내고 있으나, 효모를 포함하는 곰팡이와 같은 미생물에 대해서는 거의 효능을 나타내지 못하고 있다.

⑤ 하지만 2008년 폐사에서 항효모활성이 뛰어난 ‘식물정유를 이용한 천연 식품보존제’인 BBP를 개발하였다. BBP는 겨자정유 중에서도 가장 항효모활성이 뛰어난 겨자정유를 사용하였으며, 이는 항세균활성 뿐만 아니라 효모를 포함하는 곰팡이를 제어하는 활성이 뛰어나다. 또한 BBP는 국내 개발의 유일한 항효모활성이 뛰어난 천연보존료이기도 하다. 그러나 겨자정유 특유의 머스터드 향으로 인하여 절임식품류에만 한정적으로 적용이 가능하다.

폐사는 기업부설연구소로 천연소재과학연구소를 운영하고 있으며, 이미 순수 자체 기술력으로 개발한 화분발효물을 주성분으로 한 천연 식품보존료로서 파이오렌, 파이오렌-디, BBP, 지세스-K 등을 개발하여 2011년에 천연보존료만 65억의 매출을 달성하였고, 현재도 식용 식물 및 미생물 유래의 다양한 항균소재 개발에 주력하고 있다.

## 2. 국외

세계적으로 천연의 항균소재 또는 식품보존제의 개발 및 제조기술은 상업화를 거쳐 이미 오래전에 기술 안정화의 단계에 도달하였다고 생각된다.

대표적으로는 자몽종자 추출물, 폴리리신, 유카 추출물 및 용균효소 등으로서,

① 자몽종자추출물은 미국의 플로리다 대학의 Jakob Harich 박사에 의해 개발되어 미국의 Bio/Chem Research 사에서 (상표명 ; Citricidal), 미국의 Chemie Research & Manufacturing사와 브라질의 Quinabra-Quimica Natural Brasileira사에서 (상표명 ; DF-100) 각각 제조, 판매되고 있으며, 우리나라에서는 식품위생법상 천연식품첨가물로 등재되어 식품에 가장 많이 사용되고 있으나 외국에서는 식품 보다는 주로 화장품, 비누, 치약 등의 생활용품에 주로 사용되고 있다. 이는 자몽종자추출물에서 검출되어서는 안되는 benzethonium chloride, trichlosan 등과 같은 화학합성 방부제가 과량 검출되고 있기 때문으로 생각되며, 안전성의 결여 및 매우 강한 쓴맛과 비릿한 냄새로 식품의 향과 맛에 큰 부의 영향 주어서 최근에는 이의 사용량이 급감하고 있다.

② 아미노산 제제인 폴리리신은 L-lysine의 아미노기와 카르복실기를 펩타이드 결합시킨 중합도가 25~35 정도인 폴리아미노산으로 일본의 와 박사에 의해 개발되어 Chisso사에서 공업적 제조방법을 확립하고 개발한 소재로서 매우 약한 항균력에 비하여 가격이 너무 비싼 편이며 (약 75만원/kg), 침전물이 형성되며 항균 스펙트럼이 매우 좁은 단점들을 내포하고 있어서 일본 이외의 나라에서는 거의 사용하고 있지 않다.

③ 유카의 사포닌을 주성분으로 한 유카추출물은 남미에서 자생하는 유카나무의 추출물로서 미국의 Grotec사에서 개발, 생산하고 있으나, 진한 흑갈색의 강한 쓴맛, 침전물의 형성, 난용성과 함께 약한 항균활성으로 유카추출물 자체만으로는 식품보존제의 역할을 수행하기에는 단점을 갖고 있으며, 제품의 균질성이 매우 결여되어 식품산업에 이용하기에는 단점이 너무 많은 항균소재라 할 수 있다.

④ 난백을 수지 정제하여 얻는 용균효소는 세균의 세포벽에 작용하여 용균현상을 일으키기 때문에 붙여진 명칭으로 물에 잘 녹고, 무색, 무취이기 때문에 식품에의 이용에 이상적인 것 같으나 특성의 그람 음성균에만 항균력을 나타내어 항균 스펙트럼이 매우 좁고, 열에 대하여 매우 약하며, 알긴산이나 펙틴 등의 산성다당류, 한천, 탄닌 등에 의해 항균활성이 저해되어 일본에서 비 가열식품의 제조에만 극히 제한적으로 사용되고 있다.

⑤ 이 밖에도 허브식물을 이용한 미국의 Bio-Botanica사의 Biopein 및 Neopein, A&B Ingredients사의 Mirenat-M, 미생물 대사물을 이용한 Danisco사의 Natamax, 중국, 일본 유럽 및 미국 등 세계 각국에서 생산하는 박테리오신의 일종인 Nisin 등이 있으나 이들은 우리나라의 식품위생법상 식품

원료로 사용할 수 없는 소재를 사용하여 제조한 것이어서 식품에 적용하기는 불가능한 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절: 연구 목표 및 과제별 연구 달성도

#### 1. 최종연구목표

- 쌀가공식품의 유통기한 연장을 위한 항진균성 천연보존료 개발
- 천연 식물 소재로부터 항진균물질의 동정
- 천연보존료의 제형화 및 식품 적용 기술 개발
- 유통기한 연장을 위한 포장기술 개발

#### 2. 세부 연구과제별 목표 대비 달성도

세부·협동 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제1세부 항진균물질 동정 및 천연보존료 제품화	활성 안정성 평가	100	열과 pH에 대한 안정성을 확인하기 위하여, 각 추출물을 80~121℃, pH 2~11 범위에서 처리하여 활성 안정성을 확인, 상백피추출물, 감초추출물, 기린초추출물에 대한 열과 pH에 대한 항균 안정성 우수함을 확인, 농축배수에 대한 항균안정성 확인
	항진균물질의 분리정제	100	활성물질을 메탄올로 추출한 다음, 용매분배 분획, RP-18 open column chromatography, RP-18 prep-HPLC, Sephadex LH20 방법으로 활성물질을 순수분리 -상백피추출물의 분리정제 수행 -기린초 추출물의 분리정제 수행
	항진균물질의 구조동정	80	기린초유래의 물질 SK-1을 <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR, MS 자료를 바탕으로 구조 결정 -SK-1; 2,6-di-O-galloylarbutin으로 구조결정
	최적 추출공정 시스템 설정	100	생산공정에 적용하기 위해 대량 제형화 공정세팅을 위한 최적 추출공정 시스템 설정, 주정 추출과 활성탄 처리법을 이용하여 식품용 상백피추출물을 제조하는 최적 추출공정 확립, 추출 효율과 추출단가 최적화 -상백피추출물; 95%주정추출 후 1%SX Plus탈색 -감초추출물; 열수추출 및 여과 후 50%주정추출 -기린초추출물; 50%주정추출 후 4%KBB탈색
	천연보존료의 제형화	100	지용성의 상백피추출물 및 감초추출물을 식품에 적용하기 용이한 형태인 수용성 수용성 분말 및 액상으로 제형화 함. -상백피추출물; 유화제를 이용한 비천연 제형화 & 감초추출물을 이용한 천연 분말제형화 -감초추출물; 100% 천연 분말제형화 -기린초추출물; glycerin을 이용한 액상제형화
	천연보존료 시제품 제조	100	대량 추출 및 제형화공정을 적용한 시제품 제조 -원물 500 kg 단위의 시제품 제조 -시제품을 적용한 떡볶이의 저장 기간을 주정처리구에 비해 30일 이상 연장함



세부·협동 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제1협동 천연보존료 의 떡 처리조건 확립 및 포장기술 개발	시중 유통 떡볶이용 떡제품의 유통기간 조사	100	시중에 유통 중인 각종 떡볶이용 가래떡의 유통기간, 처리제조사 -유통기한; 1~2개월 -처리제; 주정, 탈산소제
	6개월 이상 보존을 위한 처리 조건 확립 및 떡볶이에 대한 기초 application test	100	항진균소재를 처리를 위한 처리조건 확립 -포장재질; NYPE재질에 탈산소제 추가 시 보존 효과가 가장 우수 -상백피추출물과 감초추출물 (제형화 전 시료 율 혼합 처리한 떡볶이의 보존 효과가 가장 우수 -포장개발은 아래에 표기
	떡볶이에 대한 천연보존료 의 Challenge test	100	상백피추출물과 감초추출물의 식품용 수용성 제형 화 시료를 떡볶이에 처리하여 보존 효과 확인 -처리 방법에 따른 효과; 혼합보다는 침지 처리 시 보존효과가 더욱 양호 -부형제 효과; 식물혼합농축분말 (건강, 유카, 녹차 혼합 추출물)과 10% 초산나트륨을 함유한 시료 처리 시 보존효과가 우수함
	떡볶이 장기보존용 포장기 술 개발	100	기체조성을 달리한 포장 기술 개발 -미생물 성장과 함께 CO <sub>2</sub> 농도 증가됨 -포장구 CO <sub>2</sub> 농도가 높을수록 경도가 느리게 증가 -CO <sub>2</sub> 농도가 높을수록 부착성이 낮음 -CO <sub>2</sub> 농도가 높을수록 미생물제어가 효과적 -천연보존료4(복합허브추출물F1) 처리와 80% CO <sub>2</sub> 농도 이상의 변형기체 포장구에서 떡볶이의 미 생물 변패방지 효과가 가장 우수
	떡 제조 시 CCP 관리 매뉴 얼화	100	떡 제조 단계에서 본 과제에서 개발된 천연보존 료 적용과 포장기술을 적용한 CCP관리 기준을 설정하였으며 매뉴얼화 함

세부·협동 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제2협동 천연물소재 의 항진균활성 DB구축 및 안전성 평가	천연물 추출물 소재의 항진 균 활성 DB 구축 및 항진 균 소재 선별	100	-다양한 천연물 추출물의 DB 구축 : 확보 천연물 추출물 874종 및 신규 제조 천연물 추출물 680 종에 시료 준비 (다양한 용매 추출물) 하였으며 전체 1550 여종 천연물에 대한 유기용매 추출물 을 조제하고 이에 대한 분획물을 얻음 -구축된 천연물 DB로부터 <i>Aspergillus niger</i> 계 어 활성 검색 : 항균활성이 인정되는 천연물중 경제성과 상업성이 인정되는 시료를 선택하여 항균 활성을 검정하였으며, 전체 1550 여종 시료 중 경제성, 안전성, 신규성, 상업성을 기준으로 기린초, 참나물, 황금, 뽕나무, 단삼 통후추의 6 종을 최종 선별하여 1세부과제의 합
	항균스펙트럼 확보	100	활성 조추출물 및 활성 정제물질, 최종제품인 복 합허브추출물 F1의 항균스펙트럼 결정 : 다양한 곰팡이와 세균에 대한 MIC, MFC, MBC 결정
	원료 유용성 평가	100	-선정 천연물중 기린초, 참나물, 황금에 대해서는 순차적 유기용매 분획 및 활성물질 정제를 통해 항진균 활성을 검증하였으며, 부가적인 항산화 활성, 인간 적혈구에 대한 용혈 활성 등을 평가 하여 실제적 적용 가능성을 확인함. -제1세부과제에서 개발된 제품 (복합허브추출물 F1)의 경우, 우수한 항세균 및 항진균 활성이 검 증되었으며, 이들은 항산화 및 발암 억제 활성도 부분적으로 확인됨
	천연보존료 안전성 평가	100	-복합허브추출물 F1의 항균 활성은 산처리, 열처 리, 혈장처리 소화효소 처리에서도 안정하게 유 지 - 인간 적혈구에 대해 용혈활성 없음 - 소화효소에 대한 저해현상이 미약하므로 소화 흡수장애 없음 - 마우스의 단회 독성 평가에서는 4,000 mg/kg 농도까지 독성이 나타나지 않아, 등급 1 무독성 그룹 (practically non-toxic)으로 구분됨 - 따라서 복합허브추출물 F1은 안전상 문제를 야 기하지 않을 것으로 판단됨

## 제 2 절: 제 1 세부과제

### 항진균물질 동정 및 천연보존료 제품화

#### 1. 연구 개발 목표

- ▷ 천연 항진균소재 스크리닝 및 선발
- ▷ 항진균물질 분리정제 및 구조동정
- ▷ 항진균물질 안정성 평가 및 최적 추출공정 시스템 설정
- ▷ 천연보존료 제형화 및 관능평가
- ▷ 천연보존료 시제품 제조

#### 2. 최종 연구결과 요약

▶ 800 여 종의 식물추출물 라이브러리로 항진균활성을 스크리닝한 결과, 항균활성과 경제성 평가를 통하여 최종적으로 3종 식물 상백피, 감초, 기린초를 선발하고, 선발된 식물추출물의 항균활성의 pH안정성 & 온도안정성이 우수함을 검증함

\* 기린초추출물 관련 특허출원 완료(출원번호: 10-2011-0058500, 특허명: 기린초류 추출물을 유효성분으로 하는 항균 및 항산화 조성물, 출원일: 2011.06.16)

▶ 기린초추출물로부터 항균 물질을 분리정제하여 2,6-di-galloylarbutin(SK-1)으로 구조동정하였으며, SK-1물질 외에도 항균활성이 우수한 다양한 minor물질이 기린초에 함유되어 있는 것으로 판단됨 .

▶ 상백피, 감초, 기린초의 항균물질의 최적 추출공정을 확립하였으며, 물에 비수용성인 주정추출물을 제형화공정 개발을 통하여 물에 가용성인 형태로 제형화하였으며, 이는 식품 적용이 용이한 형태로 제품화가 가능함. 제형화 소재는 탈색 및 탈향을 통하여 식품 관능에 영향을 주지 않음(특허 등록:제 10-1007869호, 식품보존성이 우수한 수용성 감초추출물의 제조방법, 출원일: 2010-07-15)

▶ 항균 효능 및 제품생산 공정의 용이성을 고려하여, 상백피/감초 복합추출물 형태의 시제품을 제조하였으며, 원물 500 kg 단위로 개발된 제형화 및 생산공정에 따라서 추출, 탈색, 농축, 분무 건조 과정을 거쳐서 keybase제조하였으며, 최종적으로 부형제를 혼합하여 복합허브추출물 F1(제품명)을 생산하였으며, 제1협동과제의 포장공정 개발용 천연보존료로 제공함

▶ 시제품(복합허브추출물 F1)을 떡볶이에 처리하여 10℃에서 저장 기간별 균수 확인 및 육안 관찰 결과, 주정 처리에 비해서 저장 기간을 30일 이상 연장하여 주었다.



## (2) 향진균소재 항균활성 평가

### A. 상백피 추출물의 향진균활성 평가

1차 스크리닝으로 선발된 추출물들을 2차 broth microdilution method에 의하여 향진균활성을 평가하였다. 상백피추출물(EtOAc 분획)은 96 well plate 상에서 현탁이 심하여 *Aspergillus niger* 균사의 생육이 명확히 확인되지 않으므로, PDA(Potato dextrose agar)고체배지에서 MBC방법으로 균사의 생육을 다시 확인하였다. 그 결과 500 ppm이상의 농도에서 곰팡이 균사의 생육억제가 비교적 양호하였다(Fig. 1-3). 더욱이 agar dilution method에서는 MIC 500ppm임을 다시 한 번 확인하였다(Fig. 1-4). 지금까지의 스크리닝 결과로는 MIC 500ppm을 갖는 식용 가능한 소재는 매우 희박하였다. 대조구는 상용화된 제품인 자몽종자추출물(Desfan-100, 에스엔텍 제품)을 사용하였으며, 이는 200~300ppm의 MIC값을 나타낸다.

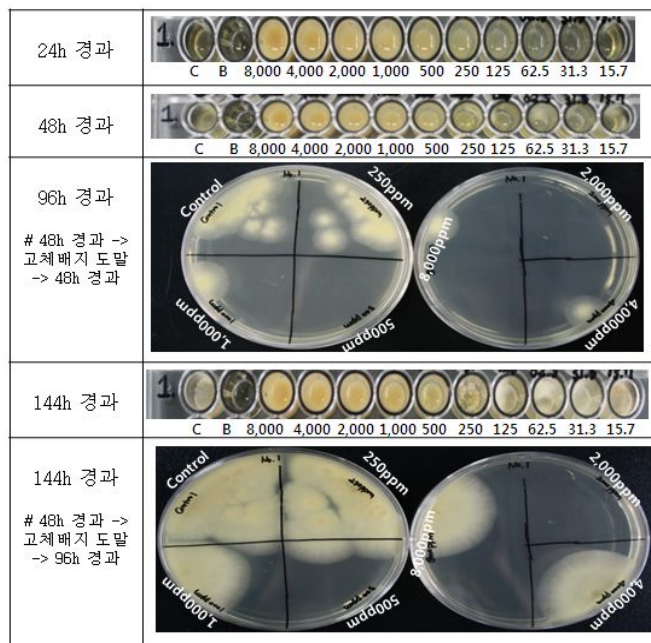


Fig. 1-3. 상백피 추출물의 MIC test 결과(broth microdilution method)

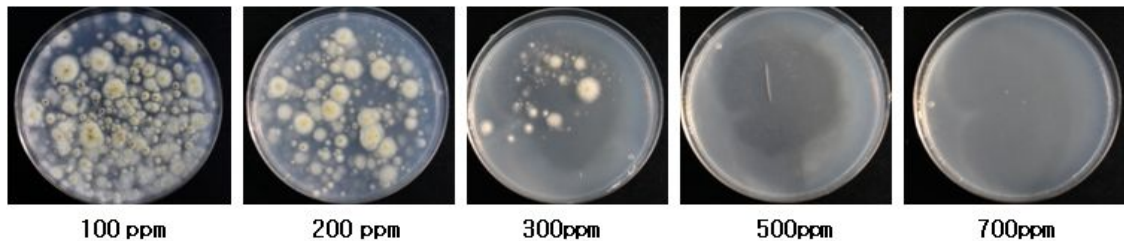


Fig. 1-4. 상백피 추출물의 추출물의 MIC test 결과(agar dilution method)

### B. 감초 추출물의 향진균활성 평가

감초 추출물(methylene chloride층)의 broth microdilution method에 의한 MIC를 측정한 결과 MIC값이 1,000ppm 이었으며, 500ppm 이상의 농도에서 *Aspergillus niger*의 균사 생육이 억제됨을 MBC로 재확인 하였다. 따라서 식용 소재로서 감초 추출물은 상백피 추출물과 비슷

한 항진균 활성이 있음이 확인되었다(Fig. 1-5, Fig. 1-6).

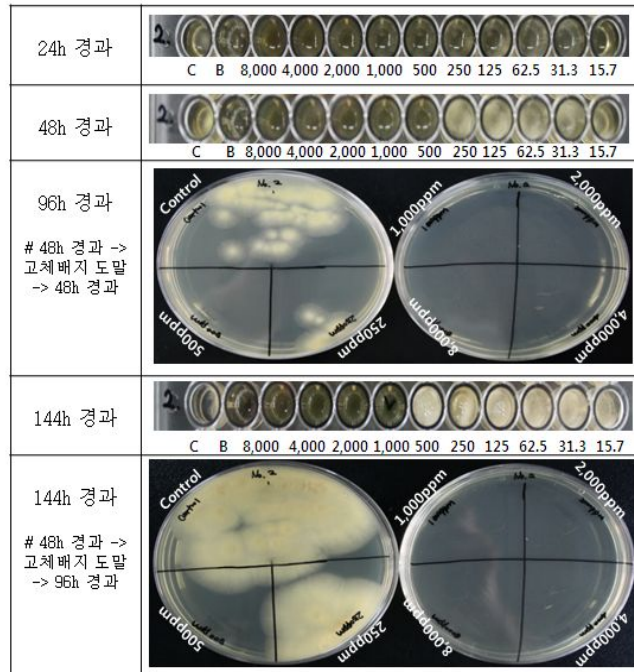


Fig. 1-5. 감초 추출물의 MIC test 결과(broth microdilution method)

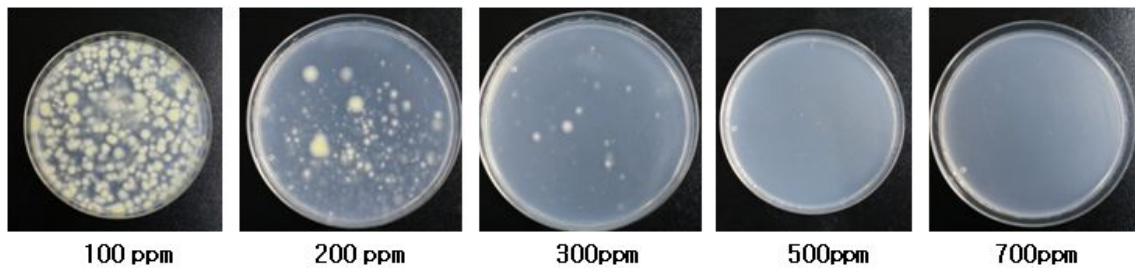


Fig. 1-6. 감초 추출물의 MIC test 결과(agar dilution method)

### C. 기린초추출물의 항균활성 평가

기린초 추출물(MeOH추출물)의 broth microdilution method에 의한 MIC를 측정한 결과 곰팡이에 대한 항균활성은 MIC값이 6,000ppm으로 다소 활성이 강하지 않았으나, 항세균활성을 동시에 나타내었다. 기린초의 항세균 및 항산화활성관련 1차 특허는 1차년에 출원하였다(출원번호: 10-2011-0058500, 특허명: 기린초류 추출물을 유효성분으로 하는 항균 및 항산화 조성물, 출원일: 2011.06.16)

특히 기린초관련 연구는 1차년도 과제 평가 시, 심사위원의 평가 의견인 ‘적용되는 제품의 안전성을 더욱 확보하기 위해서 진균 뿐 만 아니라 식중독균, 병원성균 등에 대한 항균활성에 대한 실험도 병행하는 것이 좋음’에 대해 2차년도에 적용하여 연구를 보완하였다.

기린초추출물의 Broth microdilution method에 의한 MIC값을 측정하였다. 96 well plate 상에서 시료에 의한 혼탁으로 육안으로 MIC값이 판별되지 않아서 고체배지에 streaking하여



MBC값을 확인한 결과, 6,000ppm(*Escherichia coli*), 6,000ppm(*Pseudomonas aeruginosa*), 375ppm(*Staphylococcus aureus*), 6,000ppm(*Aspergillus niger*), 375ppm(*Bacillus cereus*, 대조구 대비 우수)이었다. 1차 조추출물로서는 상당한 항균활성을 나타내었으며, G(-) 세균보다 G(+) 세균에 대한 항균활성이 더욱 우수하였다. 특히, 기린초추출물이 G(-)세균에 대한 항균활성이 다소 약한 편이지만 타 식물추출물에 비해 in vivo 항균활성이 우수하였다(Fig. 1-7).

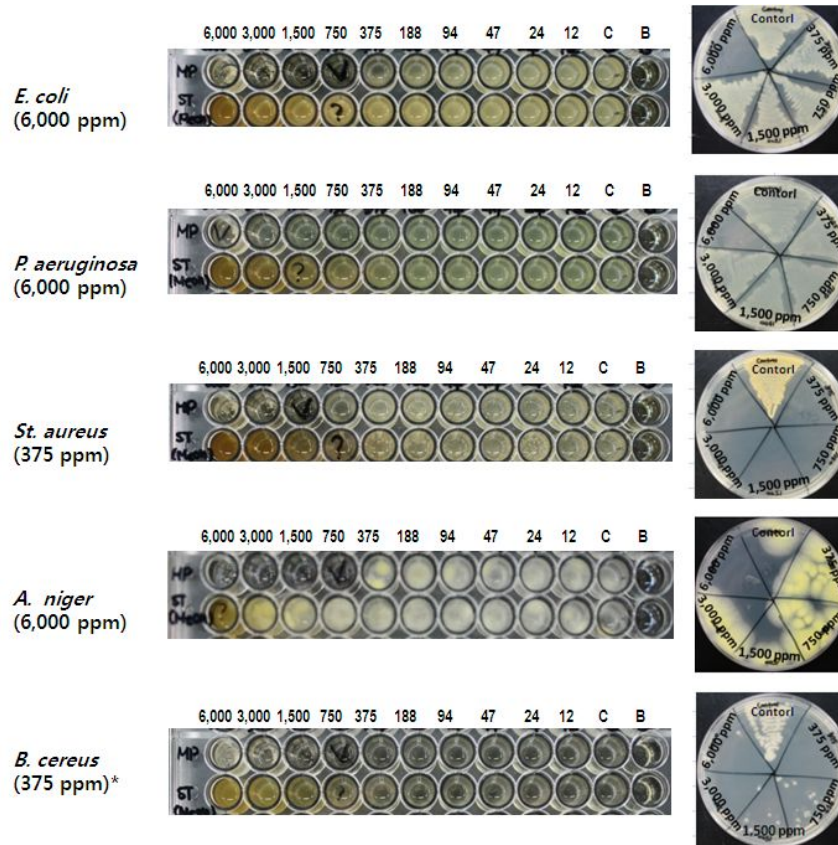


Fig. 1-7. 기린초추출물의 MIC & MBC test 결과(broth microdilution method)

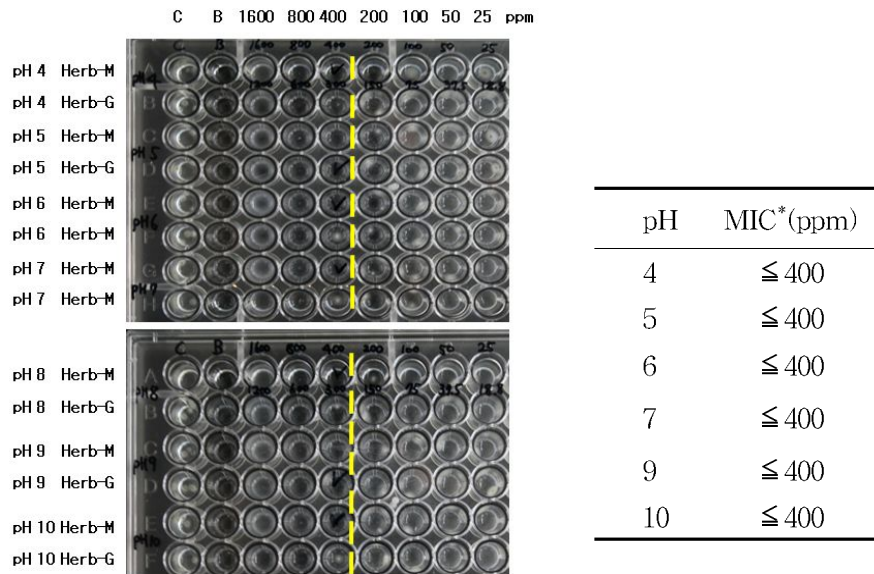
기린초는 한국, 일본, 사할린, 중국 등지에 분포하며, 산지의 바위곁에서 자라며, 다년생 초본으로 대량재배에도 적절한 식물이다. 특히, 기린초는 어린잎이 식용이며, 전초는 식품공전에 등재되지 않았지만, 안전성결과 확보로 식품공전에 등재할 필요성이 있는 소재이다.

## 나. 활성 안정성 평가

### (1) pH 안정성평가

#### A. 상백피, 감초추출물의 pH 안정성평가

상백피 추출물(Herb-M)과 감초 추출물(Herb-G)을 pH 4~10 처리 후에 *Aspergillus niger*에 대한 항진균활성을 확인함으로써 시료의 안정성을 평가하였다. 기존 추출물의 pH는 중성이지만 pH 4~10을 24시간 동안 처리한 후에도 MIC 400ppm의 항진균 활성을 동일하게 나타냄으로(Fig. 1-8), 상백피 추출물과 감초 추출물이 pH변화에 안정한 것으로 나타났다.



\* MIC against *Aspergillus niger*

Fig. 1-8. 상백피 추출물과 감초 추출물의 pH 안정성 테스트 결과

### B. 기린초추출물의 pH안정성평가

기린초의 MeOH추출물을 10% solution으로 만든 다음 pH 3, pH 7, pH 10로 pH를 맞춘 후 24시간 후에 증화한 다음 *E. coli*에 대한 항균활성을 확인하였으며, 테스트 시 배지가 현탁되어 균생육 판별이 육안으로 어려우므로, MBC로 균생육 여부를 판별하였다. 기린초추출물은 pH 7~10의 중성 및 알칼리성일 때 보다 pH3의 산성에서 활성이 더욱 안정적이고, pH 변화에 따른 현저한 항균활성 차이는 없었다(Fig. 1-9).

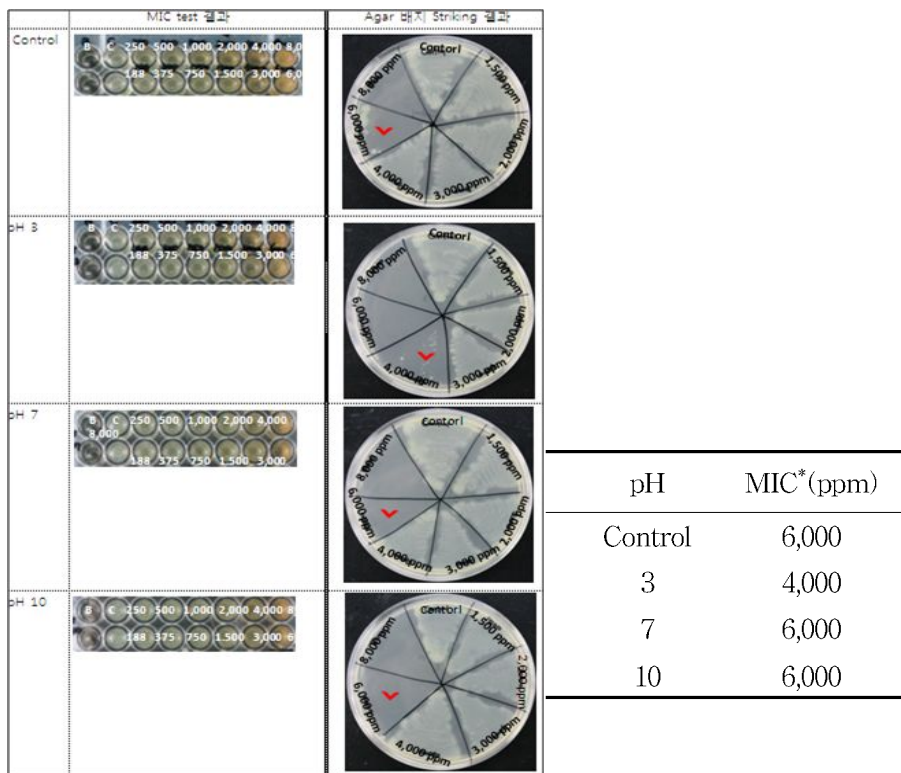


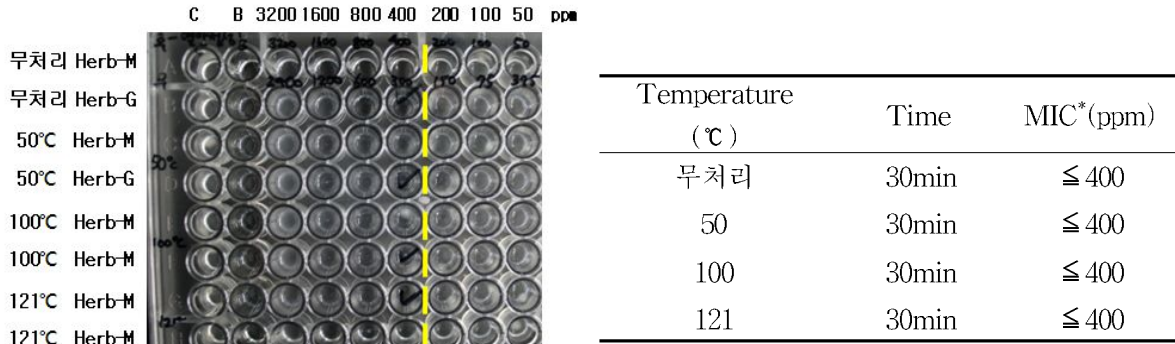
Fig. 1-9. 기린초추출물의 pH 안정성 테스트 결과



## (2) 열 안정성 평가

### A. 상백피, 감초추출물의 열안정성평가

상백피 추출물과 감초 추출물을 각각 30분 열처리 후에 *Aspergillus niger*에 대한 항진균활성을 확인함으로써 시료의 안정성을 평가하였다. 그 결과 온도 변화에 대해서 항진균 활성의 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 1-10). 이는 상백피와 감초 추출물의 항진균 물질이 열에 안정함을 나타낸다.



\* MIC against *Aspergillus niger*

Fig. 1-10. 상백피 추출물과 감초 추출물의 열 안정성 테스트 결과

### B. 기린초추출물의 열안정성평가

기린초의 MeOH추출물을 10% solution으로 만든 다음 80°C, 100°C, 121°C 순서로 30분 온도 처리 한 후 *E. coli*에 대한 항진균활성을 확인하였다. 결과적으로 121°C의 고온처리에 도 항진균 활성이 감소되지 않았으며, 열처리에 매우 안정하였다(Fig. 1-11).

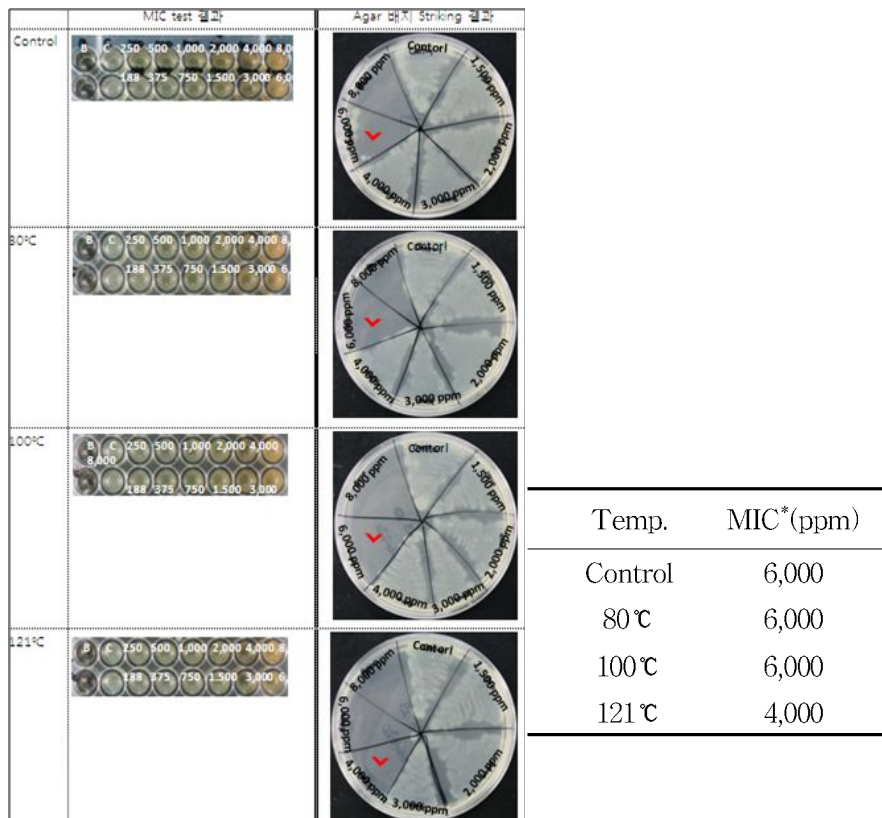
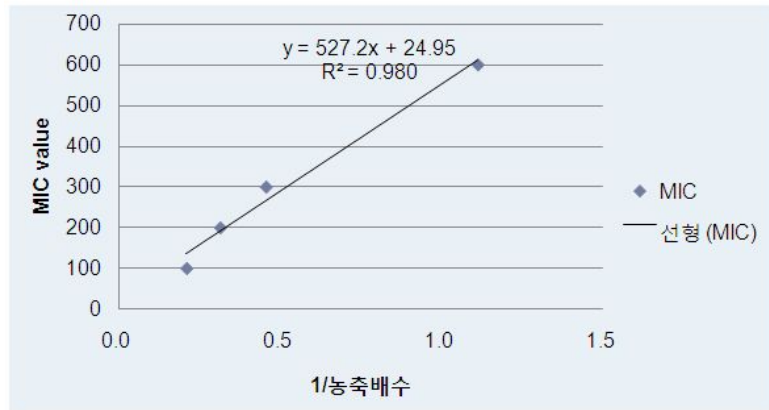


Fig. 1-11. 기린초추출물의 열 안정성 테스트 결과

### (3) 농축배수에 따른 안정성 평가

상백피 추출물의 농축 배수에 따른 항진균활성 안정성을 확인한 결과, 농축에 따른 항진균 활성이 비례적으로 증가하며, 항진균 활성에는 영향이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1-12).



Sample No.	농축배수	1/농축배수	MIC*(ppm)
1	0.9	1.11	600
2	2.2	0.45	<300
3	3.2	0.31	200
4	4.8	0.20	<100

Fig. 1-12. 상백피 추출물의 농축에 따른 항진균 안정성 평가

### 다. 항진균물질의 분리정제

#### (1) 상백피추출물로부터 항진균물질의 분리정제

건조된 상백피를 경동시장의 한약재료상에서 구매하여, 미세분쇄기로 분쇄한 다음, 9배 중량비의 methanol로 추출하였다. 감압건조한 methanol 추출물을 다시 methanol이 10% 함유된 증류수에 녹여 Diaion HP-20을 수행한 결과 100% methanol로 용출한 분획에서 항진균 활성이 가장 강하게 나타났다. 이를 다시 RP-18 flash column chromatography를 거쳐 조추출물을 얻었으며 다음으로 2회에 걸친 prep-HPLC로 최종 정제된 항진균물질을 얻었다. 1차 Preparative HPLC(YMC-ODS-A, 5ul, 10X250mm, Acetonitrile:Water=55:45, 1.5ml/min, UV360nm detection)에서는 가장 강한 활성물질이 12-13분 사이에 용출되었으며(peak 10), 5, 21, 38분 피크에서도 항진균 활성이 나타났다(Fig. 1-13, 1-14).

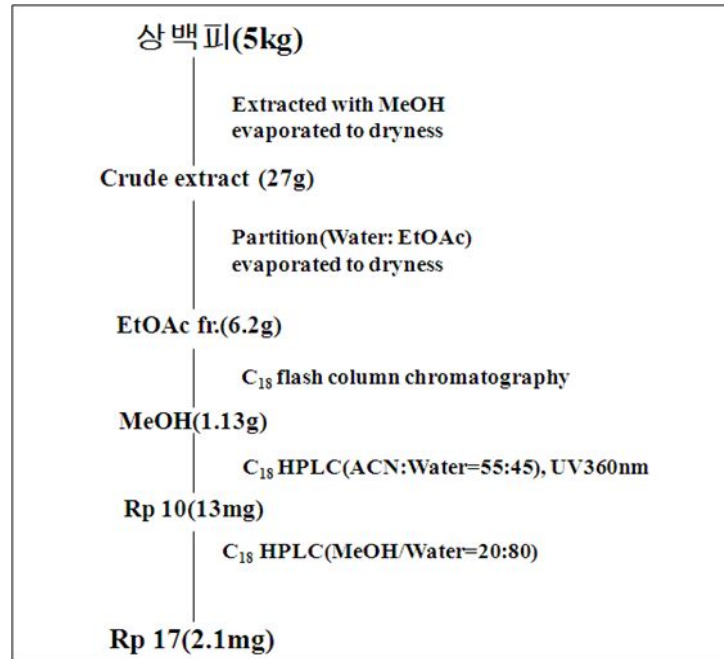


Fig. 1-13. 상백피 추출물로부터 항진균물질 분리정제 flowchart

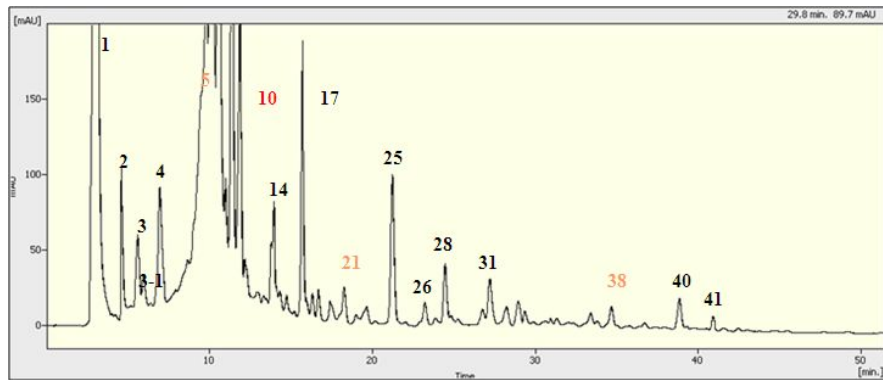


Fig. 1-14. 상백피 추출물의 HPLC chromatogram(Acetonitrile:Water=55:45)

1차 HPLC에서 분리된 항진균물질에 불순물이 포함되어 있어서 80% aqueous MeOH조건으로 2차 HPLC를 수행하여 15분에서(peak 17) 최종적으로 순수정제된 활성물질을 얻었다(Fig. 1-15). 분리된 물질은 현재 구조분석을 위한 정제 물질의 양이 부족하여 재분리를 진행 중에 있다.

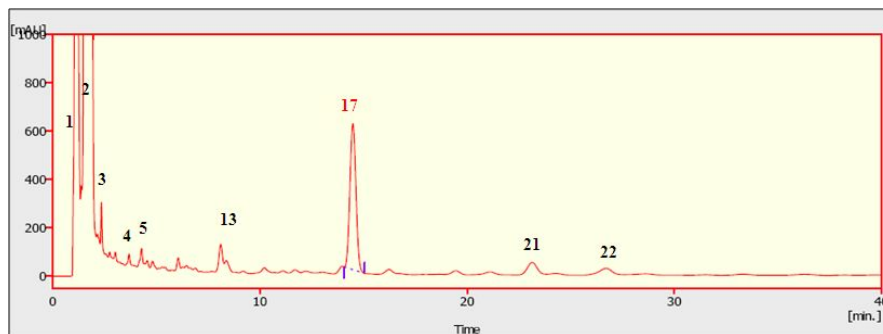


Fig. 1-15. 상백피 추출물의 re-HPLC chromatogram(MeOH:Water=20:80)

## (2) 기린초 추출물로부터 항균물질의 분리 정제

기린초 추출물로부터 항세균활성 물질을 분리하기 위하여 methanol 추출물 11.5 g을 취하여 400 ml의 물로 용해한 다음 동량의 ethyl acetate 와 butanol을 이용하여 순차적으로 각각 2회 분획하였다. 이와 같이 얻어진 3개의 분획을 감압농축하였다. 5.06 g의 ethyl acetate층을 용해한 다음 실리카겔 컬럼으로 분리하였으며, chloroform:methanol:water:acetic acid(55:36:8:1)로 용출하였다. 이 컬럼을 통하여 9개의 분획(F1~F9)을 얻었으며 이들 중에서 F3~F7이 활성을 보였다. F3(2,550 mg)으로부터 활성물질을 분리하기 위하여 Sephadex LH20 컬럼 크로마토그래피를 3회 실시하였으며, 용출용매로는 methanol을 사용하였다. 이러한 과정을 통하여 SK-1 물질이라 명명한 활성물질(998.7 mg)을 분리하였다.

F6와 F7의 분획을 합한 다음(1,212 mg) 실리카겔 컬럼에 가한 다음 chloroform:methanol:water:acetic acid(55:36:8:1)로 용출하였다. TLC분석 후에 3개의 분획으로 나눈 다음 항진균활성 및 항세균활성을 조사한 결과 모든 분획이 활성을 보였다. F61과 F62 두 분획을 합하여(353.7 mg) Sephadex LH20 컬럼에 가한 다음 methanol로 용출하여 활성물질을 분리하였다. 이로부터 획득한 5개의 분획 중에 F614(33.5 mg)와 F615(79.5 mg)가 활성을 보였다. 또한 F63(610.0 mg)을 Sephadex LH20 컬럼크로마토그래피를 실시하여 한 개의 활성 분획(F634)을 획득하였으며, 현재 이들 분획으로부터 활성물질을 분리하고 있다. Fig. 1-16는 SK 추출물로부터 항진균 및 항세균활성물질의 분리과정을 나타낸다.

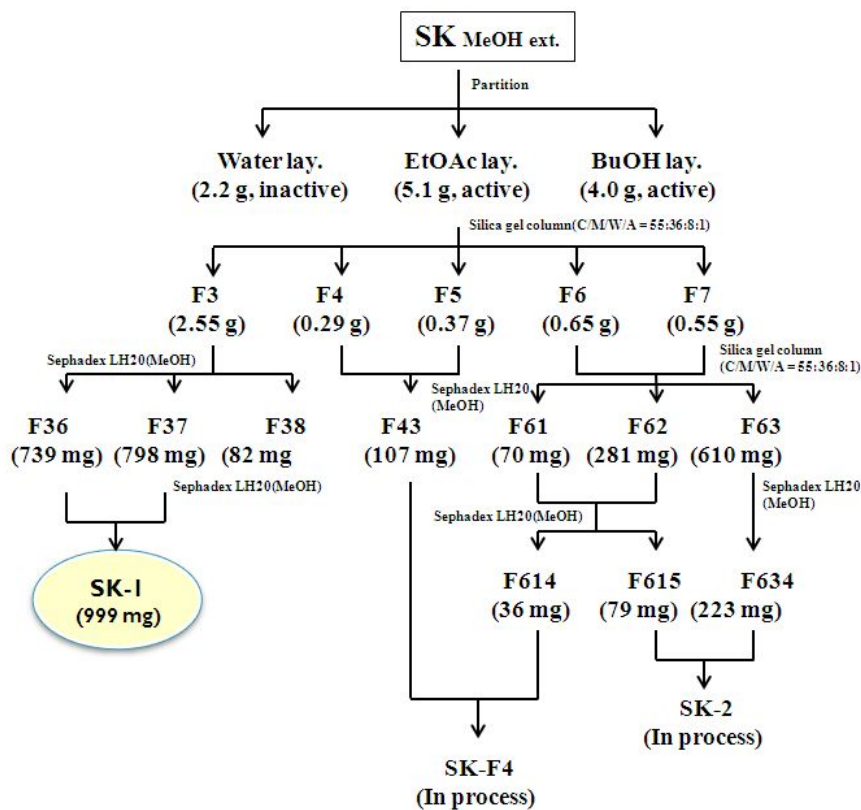


Fig. 1-16. 기린초추출물로부터 항균물질 분리정제 flow chart

### (3) 기린초로부터 분리한 물질(SK-1)의 구조 동정

#### A. SK-1의 질량분석

상기와 같이 분리한 두 개의 활성물질의 구조를 동정하기 위해 LC-MS분석과 핵자기공명분석을 실시하였다. Negative ion mode로 LC-MS 분석을 실시한 결과 SK-1 물질은  $[M-H]^-$  ion을  $m/z$  575.2에서 보임에 따라 분자량이 576인 것으로 나타났다(Fig. 1-17).

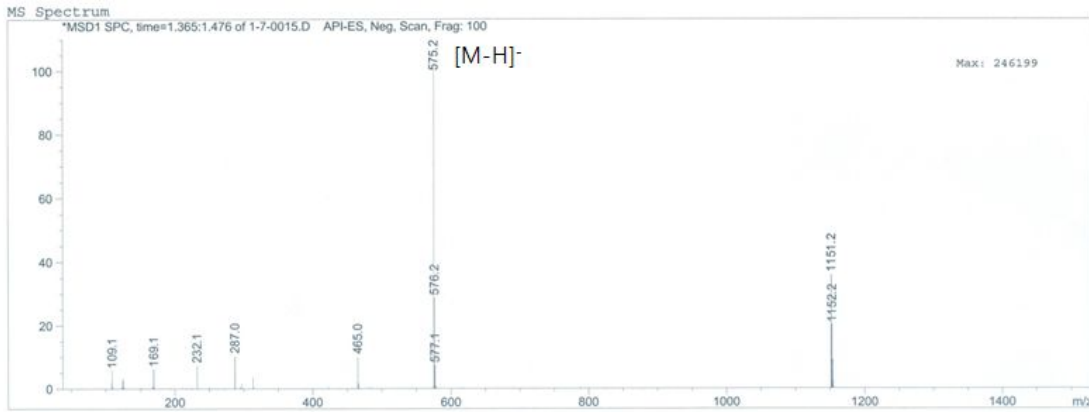


Fig. 1-17. Negative ion LC-MS spectrum of SK-1 compound.

#### B. SK-1의 핵자기공명분석

분리한 두 물질의 정확한 구조 동정을 위하여  $^1H$ 과  $^{13}C$ -핵자기공명분석을 실시하였다. 그 결과 SK-1 물질은 표 2와 같이  $^1H$ -NMR data가 정리되었으며(Table 1-1), 이 물질은 Fig. 1-18과 같이 SK-1 물질은 2,6-di-O-galloylarbutin으로 동정되었다.

Table 1-1.  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR data of SK-1 compound

Position	$\delta^{13}C$	$\delta^1H$
1	102.6	4.85(1H, <i>d</i> ,7.9)
2	75.7	5.13(1H, <i>dd</i> ,8.1,9.5)
3	75.3	3.75(1H, <i>t</i> ,9.2)
4	71.9	3.59(1H, <i>t</i> ,9.4)
5	76.1	3.79(1H, <i>m</i> )
6	64.7	4.62(1H, <i>dd</i> ,2.0,11.9) 4.48(1H, <i>dd</i> ,6.6,11.9)
1'	152.2	
2', 6'	119.8	6.77(2H, <i>d</i> ,9.0)
3', 5'	116.7	6.56(2H, <i>d</i> ,9.0)
4'	154.2	
1'', 1'''	121.4, 121.3	
(2'', 6''), (2''')	110.3, 110.2	7.14(2H, <i>s</i> )
(3'', 5''), (3''')	146.5, 146.6	7.11(2H, <i>s</i> )
4'', 4'''	139.9	
COO	168.2, 167.6	

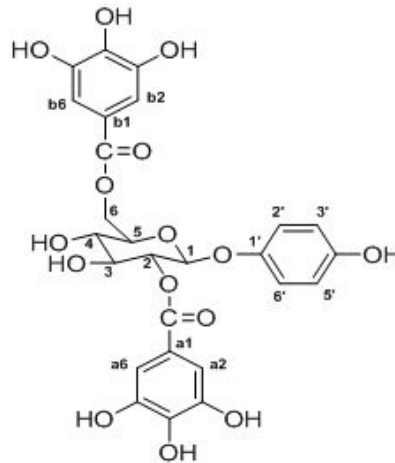


Fig. 1-18. Chemical structure of SK-1 compound.

### C. SK-1의 항균활성

분리한 두 개의 물질의 항균활성을 조사하기 위하여 *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성을 확인하였다. 3개의 세균에 대하여 96 well plate를 사용하여 실험을 수행하였다. SK-1을 DMSO로 용해한 다음 TSB(Tryptic soy broth)배지에서 double dilution method로 MIC테스트를 수행하였다. TSB배지에는 각각의 세균이  $1 \times 10^5$  cfu/ml 포함되어 있으며, 각각의 세균은 TSB배지에 1일간 진탕배양 한 배양체를 이용하였다. SK-1이 처리된 96-well plate는 30°C에서 24시간 배양한 후 육안으로 관찰하였으며, TSA(Tryptic soy agar)배지에 도말하여 MBC(Minimum bactericidal concentration)를 확인하였다. 된 후 600 nm에서 OD값을 측정하였다. 무처리구에는 1% DMSO가 포함되어 있는 배지를 이용하였다. 그 결과, Fig. 1-19에서 보는 바와 같이 SK-1(2,6,-di-O-galloylarbutin)은 6,000 ppm(*E. coli*), 6,000 ppm(*P. aeruginosa*), 500 ppm(*S. aureus*) MIC값을 나타내었으며, SK-1 물질이 G(-) 세균보다 G(+)세균에 대한 항균활성이 더욱 우수함을 확인하였다.

SK-1은 기린초가 생산하는 major물질로서 MeOH추출물의 항균활성과 유사하였으며 순도가 높아짐에 따른 항균활성 증가가 나타나지 않았다. 따라서 기린초 유래의 다른 major 물질 혹은 minor물질 중에서 항균활성이 더욱 우수한 물질이 존재할 것으로 예상됨으로, 향 후 기린초에 포함된 전체 항균물질의 분리 및 규명이 필요할 것으로 사료된다.

특히, 대부분의 약용식물유래의 항균물질은 G(+)세균에만 항균활성을 나타내는 반면, SK-1을 포함하는 기린초추출물은 G(-)세균에도 상당한 항균활성을 보이므로, 천연항균제 개발 가능성이 높다고 판단된다.

Compound	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
SK-1	6,000 ppm	6,000 ppm	500 ppm *

\* Control 대비 제어 효능 있음

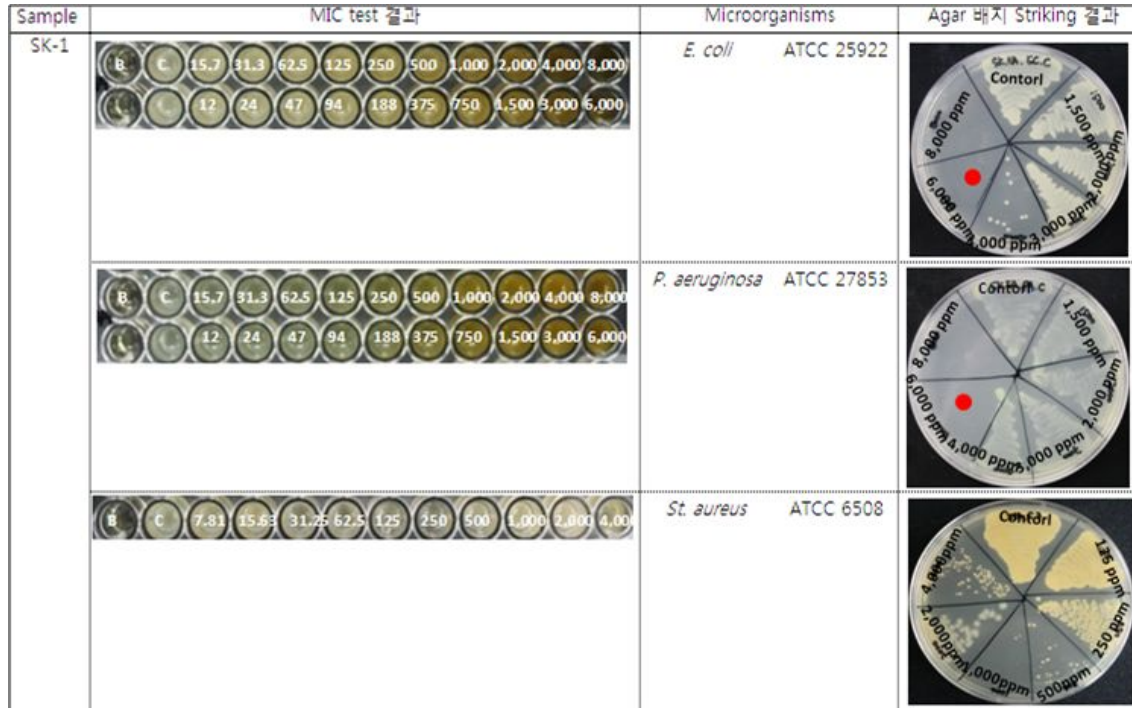


Fig. 1-19. SK-1 물질의 MIC & MBC test 결과(broth microdilution method)

## 라. 상백피추출물의 제형화

### (1) 최적 추출공정 시스템 설정

수분함량 5%미만의 건조원물을 1 mesh이하로 분쇄하여, 분쇄물 대비 발효 주정(94~95% ethanol)을 5배수 첨가하였다. 주정이 첨가된 추출탱크 내 온도를 50℃로 올려서 2시간 동안 원물 내 유효성분을 추출하였다. 유효성분의 수율을 높이기 위해 추출공정을 2회 추가 진행하며, 이때 주정을 3배수씩 첨가하여 50℃, 2시간 추출하였다. 추출공정을 마친 후 여과포(pore size 5 μm이하)를 이용하여 여과액을 회수하고 여과박은 폐기하였다. 회수된 여과액의 색상개선(탈색) 및 탄닌, 섬유질 등을 제거하기 위해 wood base로 제조된 활성탄 SX Plus(Norit사)를 액량 대비 1% 적용하여 30℃에서 30분간 반응시켰으며, 이때 활성탄과의 반응 효율을 증대시키기 위해 300 ~ 400 RPM의 속도로 교반 시킨 후, 탈색공정을 마친 추출물은 여과하여 50 Brix까지 농축 시킨 후 진공건조를 이용하여 연한 갈색의 비수용성 정제분말을 제조하였다. 이 추출 공정을 통하여 제조된 추출 분말의 항균력은 *Aspergillus niger*에 대하여 MIC 500ppm의 항진균활성을 나타내었다(Fig. 1-20).





Fig. 1-20. 상백피 추출물의 최적 추출공정

## (2) 유화제 및 유화제 최적 농도 선정

상백피의 수용화를 위한 유화제를 선택하기 위하여, 유화 후 침전을 일으키지 않는 유화제를 선정하였다. 글리세린을 포함한 여러 가지 유화제 중에서 침전이 형성되지 않는 유화제는 자당지방산에스테르(sucrose fatty acid ester)였다(Table 1-2). 한편 상백피 추출물 분말 중량의 1.5배 양의 유화제를 적용하였을 때 침전이 형성되지 않았다. 최적 배합비율은 상백피 추출물 : 자당지방산에스테르 : 물 = 10 : 15 : 75 (wt %)일 때였으며, 상백피 추출물을 이 혼합비로 처리한 제형에서 침전이 형성되지 않았다(Table 1-3).

Table 1-2. 상백피 추출물의 수용화를 위한 유화제 선정 테스트

Emulsifier	Precipitation*
Glycerin	++
Glycerin fatty acid ester	+++
Propylene glycol ester of fatty acid	+++
Sorbitan fatty acid ester	+
Sucrose fatty acid ester	-
Polysorbate	+
Organic acid esters of fatty acid	++

\*Precipitation; +++: over 20%, ++: 10~20%, +: 1~10%, -: 0~1%



Table 1-3. 상백피 추출물과 유화제(자당지방산에스테르)의 혼합 최적비 테스트

Samples	Contents(%)			Precipitation **
	Mulberry root bark P.E.	Sucrose fatty acid ester	Water	
Sample A	10	5	85	++
Sample B	10	10	80	+
Sample C	10	15	75	-

\* ++: Strong precipitation , +: Precipitation, -: No precipitation

### (3) 제형화

비 수용성 상백피 추출분말과 유화제를 동일한 양으로 칭량한 후 정제수를 추출분말 대비 10배수 첨가하여 혼합한 다음, 400~500RPM 속도의 호모믹서로 균일하게 섞어주었다.

이 혼합물을 75℃, 60분, 4,000RPM으로 균질화함으로써 유화액을 제조한 후 상온에서 10시간 정치하여 유효성분의 유화를 유도하였다. 다음으로 유화액의 온도를 낮춰 불순물의 응집 및 침전시켰다. 냉각된 유화물은 여과포(< pore size 5 μm 이하)를 이용하여 고형분을 제거한 후 여과액을 회수하였다. 이 때, 여과액 내 침전물 및 응집물 검사를 진행하여 부적합일 경우 재여과를 진행하였다. 제형을 분말화하기 위하여 부형제인 malto-dextrin을 첨가하여 액의 당도를 20 Brix로 조절한 후 분무건조를 이용하여 수용화가 가능한 상백피 추출분말을 제조한다. 이와같은 방법으로 제조된 상백피 분말을 1% 농도로 증류수에 용해하였을 때 100% 수용화되며, 항균력은 *Aspergillus niger*에 대하여 MIC 2,000ppm이었다.

처음에는 수용성 액상 제형을 만들고자 하였으나, 여러 번의 실험을 거쳐 유화제와 유화제 농도의 적절한 선정으로 물성이 더욱 개선된 수용성 분말을 제조하였으며, 이는 모든 식품 유형에 적용이 용이하며, 유통 및 보관이 편리하고, 활성 안정성이 우수한 장점이 있는 뛰어난 제형이라고 판단된다(Fig. 1-20).

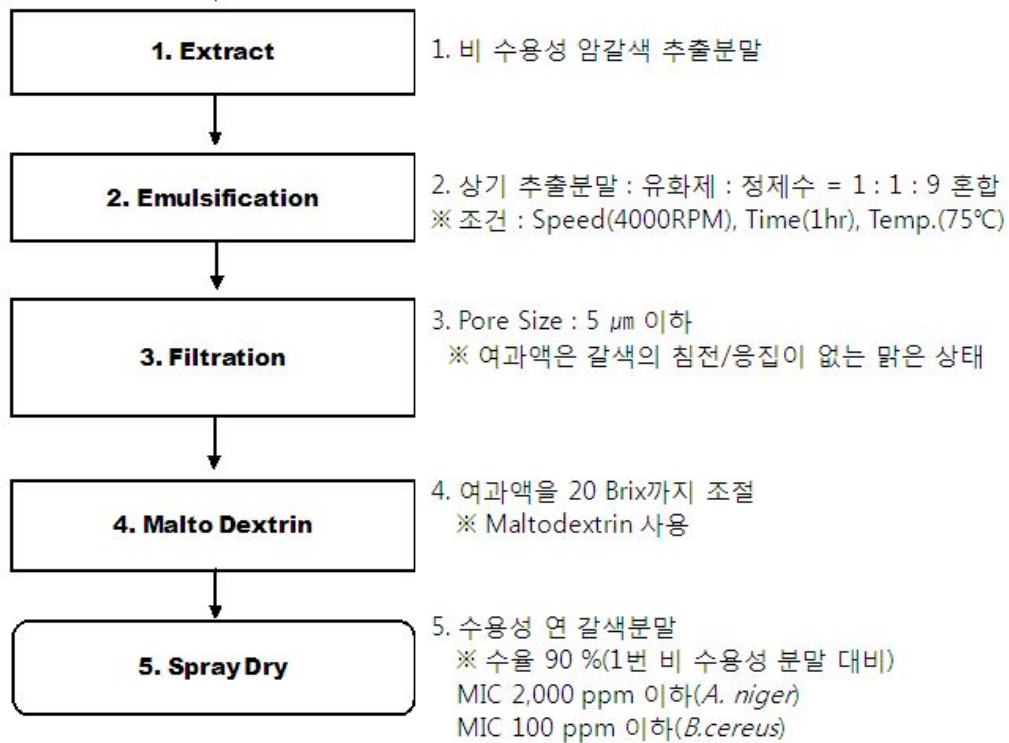


Fig. 1-20. 상백피 추출물의 수용성 제형 개발

#### 마. 감초추출물의 제형화 공정 개발

건조된 감초원물을 2 mesh 이하로 분쇄한 원물에 정제수를 9배수 첨가하여 80°C에서 1시간 동안 열수추출을 진행하였다. 이 후 여과 공정(pore size >15 mesh)을 통해 여과액을 폐기하고 여과박을 회수하였다. 이는 열수로 감초 특유의 감미성분과 비 항균성 물질을 제거하는 과정이다. 회수한 여과박에 50% 농도의 주정을 9배수로 첨가해 65°C에서 2시간 동안 균질시키면서 항균 활성 성분을 최대로 추출한 후, 주정 추출물은 여과포(pore size < 5  $\mu$ m)를 사용하여 여과박을 완벽하게 제거하며, 이 때 여과액은 갈색의 투명한 액상으로 침전물 또는 응집물이 없는 상태로 최종 제형 후 용해에 문제가 없도록 하였다. 이 후 여과액은 농축을 진행하면서 감초 내 당을 이용한 당 매트릭스를 형성시켜 소수성 항균활성 성분을 수용화시켰다. 최종적으로 당 매트릭스가 형성된 수용액을 동결건조하여 수용성 감초추출분말을 제조하였다. 특히 감초 추출물은 상백피 추출물과는 다르게, 유화제를 사용하지 않고 수용성 분말로 제조하였다. 이는 100% 천연 식품소재로서 뛰어난 식품 제형이며, 특히 출원과 우선심사청구로 특허 등록(특허등록번호: 10-1007869)을 완료하였다(Fig. 1-21).

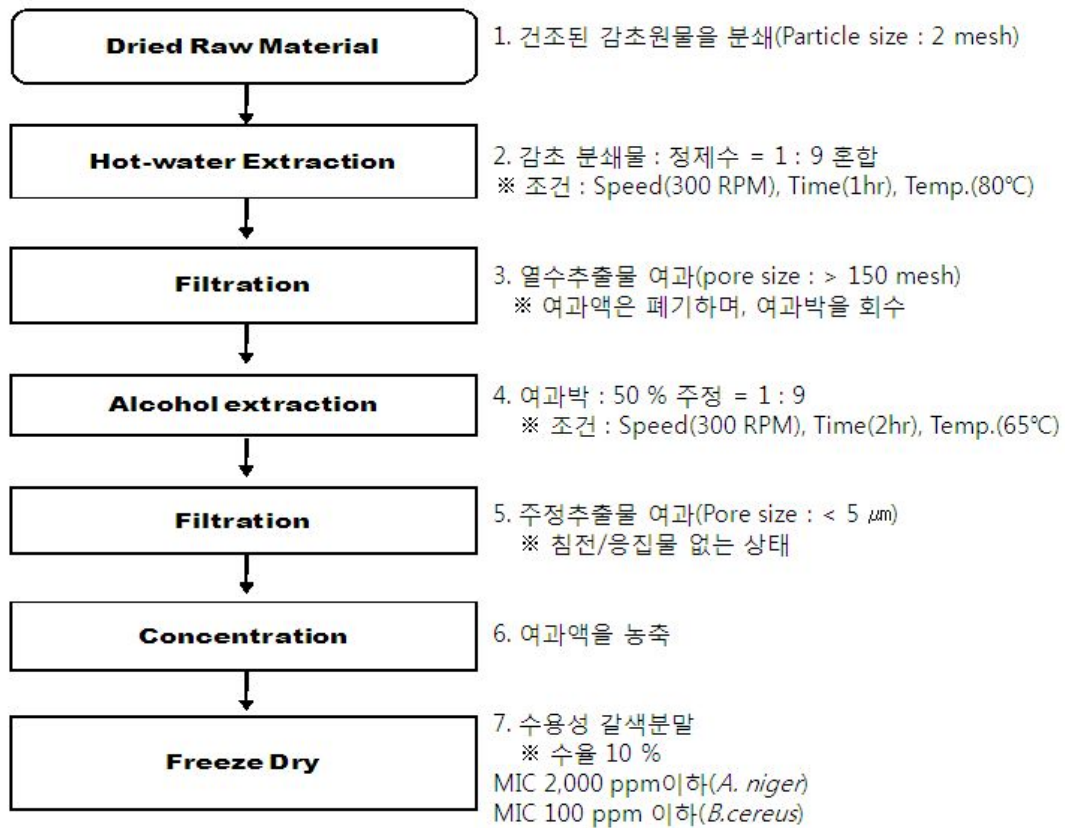


Fig. 1-21. 감초 추출물의 수용성 제형 개발

#### 바. 기린초추출물의 제형화

##### (1) 최적 추출공정 시스템 설정

기린초 생물을 100°C에서 2일 간 건조한 건조 기린초원물에 농도별 주정(100%, 70%, 50%)을 1:9로 첨가하여 24시간 추출한 후 필터 한 추출액을 감압건조 한 후, DMSO에 용해하여 항균활성을 테스트 하였다. 식품원료용으로 사용 가능한 추출용매는 주정만 가능하므로 농도별 ethanol추출물로만 테스트 하였다. 참고로 주정 이 외의 최적 추출 용매는 methanol이었다 (data not shown).

추출 용매로 *E. coli*에 대한 항균활성이 100% 주정보다는 70%와 50% ethanol추출물이 더욱 우수하였으며, 기린초 외의 다른 원료의 추출 조건과 일치하는 50% ethanol(주정)을 최적 추출 용매로 결정하였다(Table 1-4, Fig. 1-22)

Table 1-4. 주정 농도별 기린초추출물의 항균활성

Sample	MIC	Remark
100E -1	8,000 ppm	100% Ethanol 추출물
100E -2	8,000 ppm	100% Ethanol 추출물
70E -1	5,000 ppm	70% Ethanol 추출물
70E -2	5,000 ppm	70% Ethanol 추출물
50E -1	4,000 ppm	50% Ethanol 추출물
50E -2	5,000 ppm	50% Ethanol 추출물

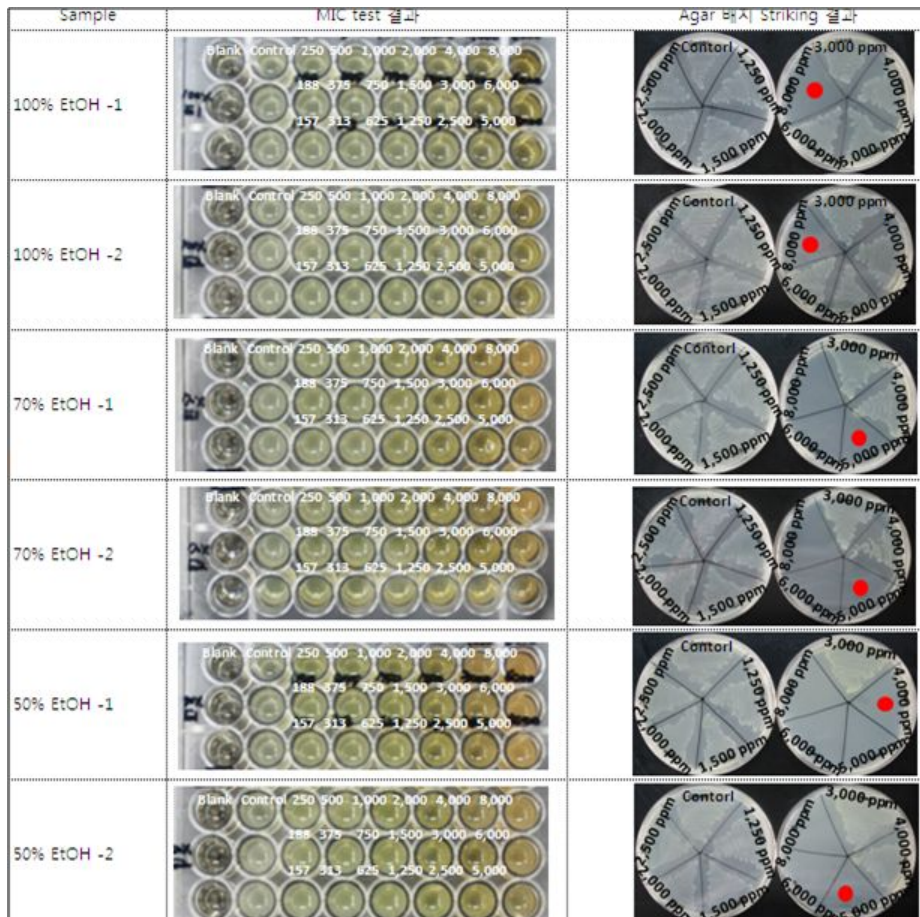


Fig. 1-22. 기린초의 주정 농도별 추출물의 MIC & MBC test 결과

또한, 기린초 메탄올 추출물 및 이의 유기용매 분획물의 항균 활성 평가결과, ethylacetate 분획에서 매우 우수한 후 항세균 활성이 나타났으며, 활성성분 분석 결과는 Table. 1-5와 같다. 현재 항진균 활성에 대한 연구가 진행 중이며, 우수한 항산화 효과와 함께 천연물 첨가제로 개발이 가능하다고 판단된다.

Table. 1-5. 기린초 메탄올 추출물 및 순차적 유기용매 분획물의 항균 활성

Samples (500ug/disc)	Antimicrobial activity vs Clear zone (mm)									
	Gram positive				Gram negative				Fungi	
Ex./fr.	B.s	L.m	S.e	S.a	E.c	P.v	P.a	S.t	C.a	S.c
M ex	10.0	-	12.0	10.0	-	8.0	-	-	-	-
H. fr.	7.5	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-
EA fr.	8.0	11.0	18.0	16.0	-	12.0	-	11.0	-	-
B fr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W res.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amp/Mic	10.0	-	12.0	10.0	-	8.0	-	-	-	-

\* Abbreviation

- 용매 및 시약; M: methanol, H: Hexane, MC: methylene chloride. EA: Ethylacetate, B: butanol, W: water, Amp: ampicillin (1ug/disc), Mic : miconazole (1ug/disc). The concentration of the

sample used were 500 ug/disc, respectively

- 시험균주; *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Sacchromyces cerevisiae*,

## (2) 기린초 추출물의 탈색

기린초의 주정추출물은 색깔이 암청색으로 매우 진하여 탈색을 통하여 색과 향을 제거하였다. Norit사 활성탄 12종으로 탈색 및 탈향 정도를 테스트한 결과 Norit 활성탄 SX 1G와 KBB의 탈색도가 우수하였으며, 제형화 공정에서는 경제성을 고려하여 활성탄 KBB를 사용하였다(Table 1-6, Fig. 1-23).

Table 1-6. 기린초추출물의 활성탄 종류별 탈색 샘플의 항균활성

Samples	MIC(ppm)	탈색 정도
Control 1(50EtOH)	8,000	-
Control 2(DMSO)	6,000	-
No.1(SXULTRA)	> 8,000	+
No.2(SA4PAHHF)	8,000	-
No.3(CGSP)	> 8,000	+++
No.4(SX1G)	8,000	+++
No.5(PK1-3)	8,000	-
No.6(DRACOS51HF)	8,000	+
No.7(CA-1)	8,000	+
No.8(A-51)	8,000	+
No.9(GAS1240PLUS)	8,000	-
No.10(KBB)	8,000	+++
No.11(CSAP)	> 8,000	++
No.12(SXPLUS)	8,000	+

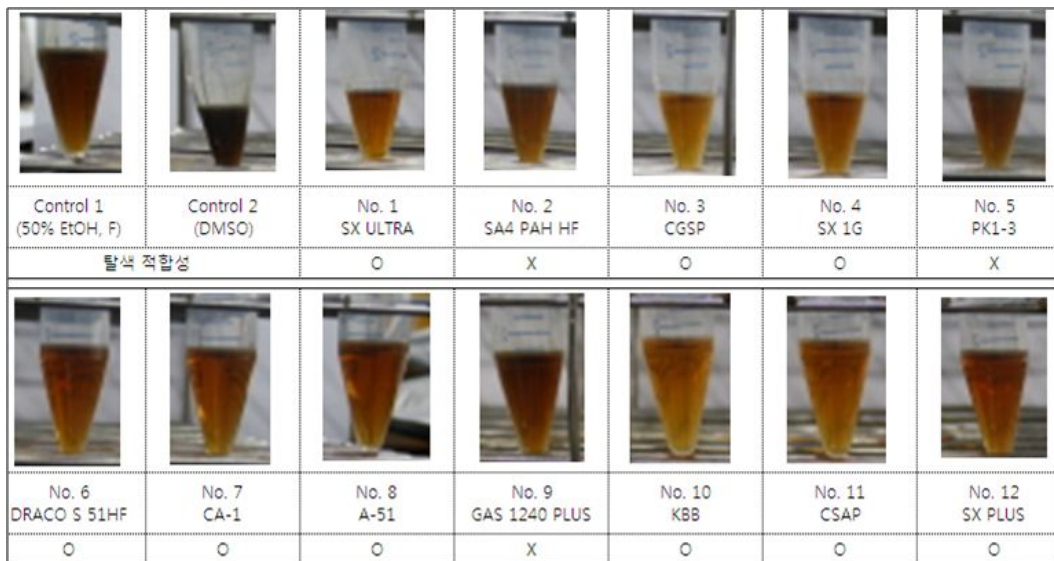


Fig. 1-23. 기린초추출물의 활성탄 종류별 탈색테스트 결과



### (3) 기린초 추출물의 제형화

앞의 최적 추출 및 탈색 조건을 반영하여 기린초추출물을 식품에 사용하기 적합한 물성으로 제형화하였다. 기린초 건조원물을 1 mesh 이상으로 분쇄한 다음, 50% 주정(1:9)으로 65°C, 5시간 추출한 다음 여과포로 여과하였다. 여과액에 4% KBB를 혼합하여 진탕하면서 1시간 동안 탈색 및 탈향 한 다음 건조원물 대비 1/5무게로 농축하였다. 농축액에 60% glycerin(1:1)을 혼합한 다음 90°C에서 1시간 동안 처리한 다음 0.45 um 필터하여 제형화를 완료하였다. 제형화 샘플은 물에 10% 농도로 용해시켰을 때 침전이 발생하지 않았다.

제형화 샘플의 항균력은 *E. coli*에 대해서 1차 50% 주정추출물의 항균력과 유사하였으므로 제형화에 의한 항균활성 저하가 일어나지 않았다(Fig. 1-24, Fig. 1-25).

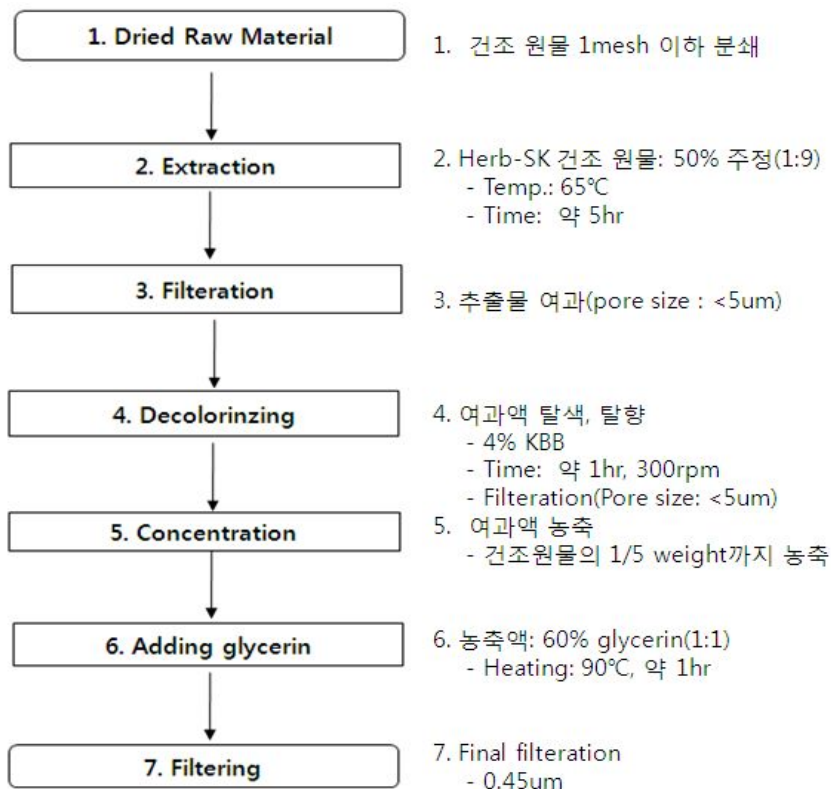


Fig. 1-24. 기린초추출물의 수용성 제형 개발

Samples	MIC test	MIC	Agar Striking
Control		4,000ppm	
샘플 ④ (제형화샘플)		4,000ppm	

Fig. 1-25. 기린초 수용성 제형화 샘플의 MIC & MBC test 결과

사. 제품생산을 위한 복합추출물 제형

(1) 상백피와 감초 복합추출물 제형

상백피와 감초 원물을 각각 분쇄한 다음 1:1로 혼합한 후, 70% 주정으로 65°C, 5시간동안 추출하였다. 추출액은 5 um이하 여과포를 사용하여 필터한 후 2% KBB 활성탄을 첨가하여 탈색하였다. 탈색액은 여과포로 재여과 한 후 40~50 Brix로 농축한 다음 분무건조하여 갈색 분말(keybase)를 얻었으며, 이 분말에 부형제를 혼합하여 최종시제품을 만들었다. 이 과정에서 상백피추출물은 단독 제형에서 사용한 자당지방산에스테르를 사용하지 않았으며, 개발한 감초 추출물의 단독 제형화공정 기술을 응용하여, 감초를 첨가하여 혼합 추출하였을 때 수용성분말 제형화가 가능하였다. 아래 스킴에 의해 제도된 keybase 추출물로 제1협동과제에서 진행한 포장공정개발에 적용한 천연보존료4(복합허브추출물 F1)를 제조하였으며, 또한 시제품도 하기 스킴에 따라서 제조하였다(Fig. 1-26, Fig. 1-27).

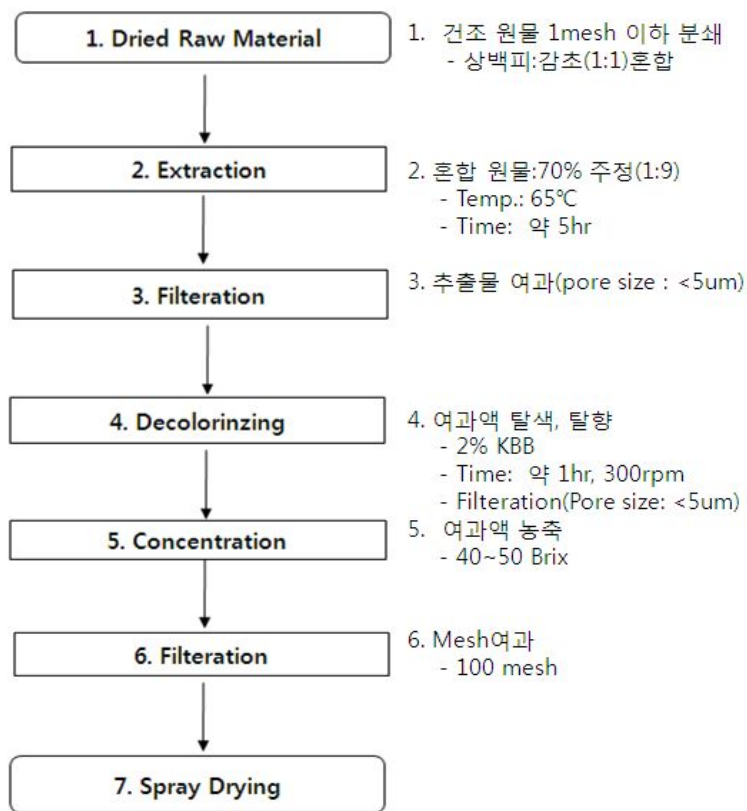


Fig. 1-26. 상백피/감초 복합추출물의 수용성 제형 개발

시료	상백피-감초 복합 제형
<i>Aspergillus niger</i>	2,000 ppm
<i>Bacillus cereus</i>	100 ppm



Fig. 1-27. 상백피/감초 복합제형화 샘플의 MIC & MBC test 결과

(2) 상백피, 감초, 기린초 복합추출물 제형

상기 상백피와 감초 복합추출물 제형 5번째 농축 단계를 거친 추출물과 기린초 제형화의 5번째 농축 단계를 거친 추출물을 혼합하여 전체 건조원물의 1/5 무게까지 농축한 다음 60% glycerin을 1:1 무게비로 혼합 후 90℃, 1시간 가온하였다. 최종적으로 0.45um필터를 통하여 침전물을 제거하였다. 3종 혼합추출물은 액상 제형이며 10% 수용액 상태에서 침전이 일어나지 않았다(Fig. 1-28, Fig. 1-29). 이 제형은 상백피, 감초, 기린초 식물추출물로 이루어진 액상 제형으로서 항진균활성과 항세균활성을 동시에 가지는 광범위한 항균스펙트럼을 가지는 천연 보존료이며, 식품 적용이 용이한 형태이다. 하지만 기린초는 자생식물로서 원물의 대량공급이 어려우므로 대량제형화 및 시제품생산은 진행하지 못하였다.

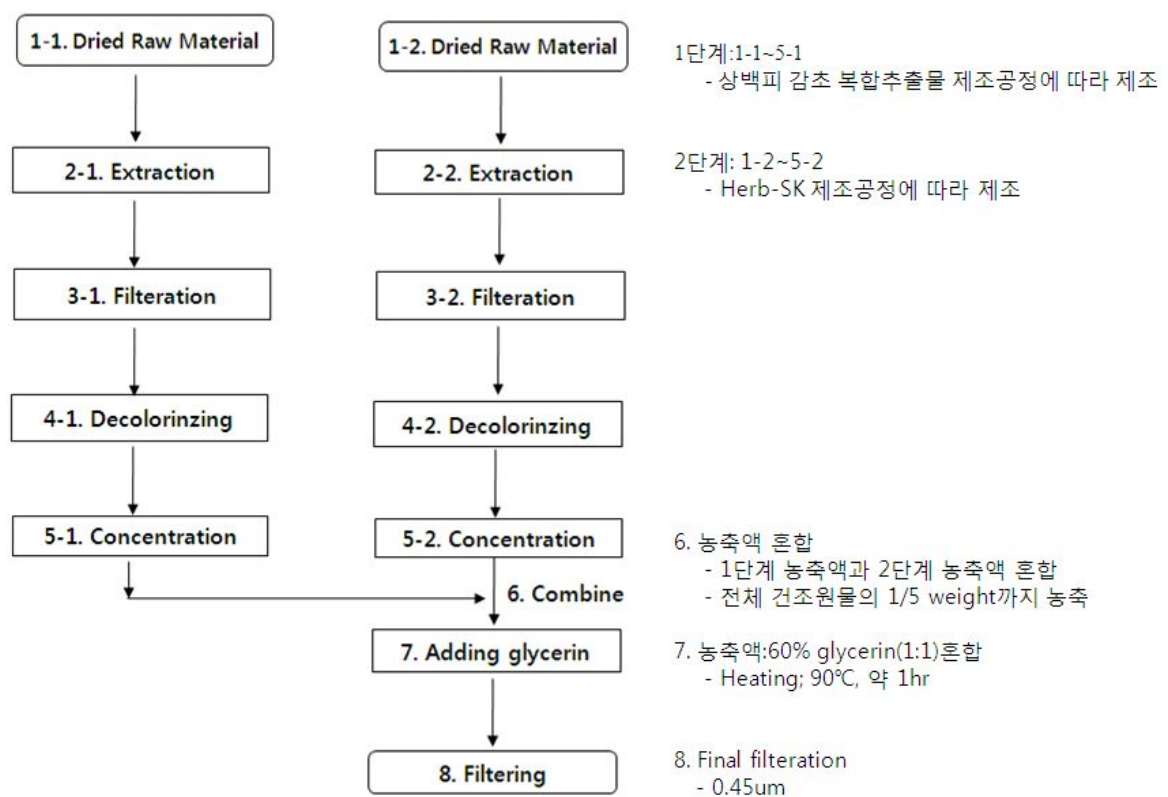


Fig. 1-28. 상백피/감초/기린초 복합추출물의 수용성 제형 개발

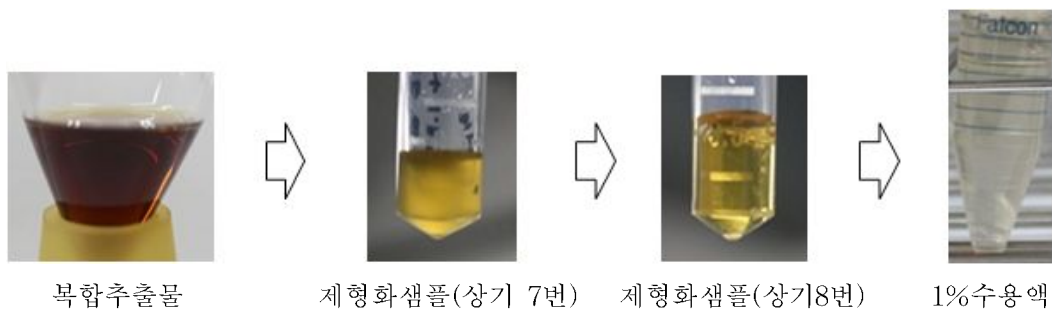


Fig. 1-29. 상백피/감초/기린초 복합제형화 샘플의 단계별 성상



### 아. 시제품 제조

상기 제형화 공정 개발을 통해 확립된 제조공정에 따라서 원물 500 kg 단위의 시제품을 제조하였다. 기린초는 자생식물이므로 아직 원물이 공급되지 않아서 시제품 제조에 이용하지 못하였으며, 차 후 대량 원물 확보가 가능할 때 대량제조를 진행할 예정이다. 상백피 250 kg과 감초 250 kg을 분쇄하여 상백피/감초 복합추출물의 수용성 제형화공정(Fig. 1-26)에 따라 복합추출물 keybase를 제조하였다. 제조된 항진균성 상백피/감초 복합추출물 keybase에 항균활성 상승효과 및 자체 보존을 위하여 허브추출물 3종이 혼합된 식물혼합농축분말(건강추출물, 유카추출물, 녹차추출물)을 첨가하여 균일하게 혼합하였다. 이 후 분말의 품질개선을 위해 부형제로 말토덱스트린 및 초산나트륨을 혼합하여 최종적으로 연노랑색 분말을 제조하였다(제품명:복합허브추출물 F1). 포장은 500 kg, 1 kg, 2 kg, 5 kg 단위로 하였으며, 주 생산 단위는 2 kg이다(Fig. 1-26).

아래 표는 제1협동과제의 포장공정 개발을 위해 적용한 천연보존료의 종류 및 그 성분함량이며, 최종적으로 떡보존효과가 가장 우수한 천연보존료4(복합허브추출물 F1)로 최적화하였다(Table 1-6).

Table 1-6. 포장공정 개발에 적용된 천연보존료의 성분 함량

성분	배합비			
	천연보존료 1	천연보존료 2	천연보존료 3	천연보존료 4 (복합허브추출물 F1)
처리 방법	침지	혼합	침지	침지
상백피추출물 (제형화원료, keybase)	10%	10%	20%	20%
감초추출물 (제형화원료, keybase)	10%	10%		
식물혼합농축분말 (건강,유카,녹차)	-	-	5%	5%
초산나트륨		-	-	10%
말토덱스트린	80%	80%	75%	65%
Dosage/침지 시간	0.4%	0.4%	0.4%/3분	0.4%/3분
계	100%	100%	100%	100%

### 자. 관능 평가

항진균성 천연보존료 시제품은 연한 노랑색 수용성 분말이며, 약간의 쓴맛과 허브향이 있다. 그러나 떡 적용량인 0.4~1% 농도에서는 무색, 무맛, 무취의 관능을 나타내었다. 하지만 과량인 2% 농도에서도 매우 연한 노랑색, 약간의 쓴맛, 무취의 관능을 나타내었다. 하지만 더욱 과량이 10% 농도에서 일주일 이상 보관하여도 침전이 일어나지 않았다(Fig.1-30). 또한 0.4% 복합허브추출물 F1을 직접 적용한 떡볶이의 관능을 확인한 결과 색, 맛, 향의 변화가 나타나지 않았으므로, 본 연구에서 개발한 복합허브추출물 F1은 식품첨가물로서 적합하다고 사료된다(Table 1-7).



시제품(2kg pack) 시제품(복합허브추출물F1) 0.5% soln. 2% soln. 10% soln.  
 Fig.1-30. 시제품 및 시제품의 농도별 현탁액

Table 1-7. 복합허브추출물F1시제품을 첨가한 떡볶이의 관능평가

Days	Quality parameters	Dosage(%)		
		주정	0.4%	1%
0	Taste	-	-	-
	Color change	-	-	-
	Odor	-	-	-
3	Fungal growth*	+	-	-
	Color change	+	-	-
	Odor	+	-	-
7	Fungal growth	++	-	-
	Color change	++	-	-
	Odor	++	-	-
14	Fungal growth	+++	-	-
	Color change	+++	-	-
	Odor	+++	-	-
28	Fungal growth	+++	-	-
	Color change	+++	-	-
	Odor	+++	+	-

\* Fungal growth; 육안으로 관찰되는 곰팡이 발생 여부  
 -; no change, +; weak change, ++; moderate change, +++; severe change  
 \* 저장 온도: 25℃

#### 차. 시제품(복합허브추출물 F1)의 떡 보존 효과

개발된 복합허브추출물 F1의 떡 보존효과를 확인하기 위해서 떡볶이에 제조 시 침지수에 0.4% 적용한 후, 3분 간 침지한 후 겉물을 건조한 다음 포장하여 보존 효과를 확인하였다. 먼저 1협동과제에서 명시한 떡볶이 제조 방법에 따라서 떡볶이를 제조한 다음, 1협동과제에서는 포장기술 개발 실험을 수행하였으며(가속 실험을 위하여 25℃에서 진행), 본 과제(1세부과제)에서는 가스 처리 없이 일반 NYPE필름 포장으로 탈산소제를 첨가한 후 유통조건을 고려하여 10℃에 보관하면서 균 증식 정도를 육안 및 균수 확인으로 관찰하였다.

총 37일차까지 균 증식을 관찰한 결과 주정 처리구는 무처리구에 비해서 약간의 균수가 적게 나타났으며, 큰 차이는 없었다. 하지만, 복합허브추출물F1을 처리한 실험구에서는 일반세균은 무처리구 및 주정 처리구와 유사하게 7로그값으로 나타났으며, 효모 수는 주정 처리구에 비해서 약간 높게 나타났으나, 곰팡이 수는 10°C, 저장 37일차까지 곰팡이 균의 증식이 일어나지 않았으며 육안으로도 관찰되지 않았다. 앞으로 2~3개월 더 관찰하면서 균수를 확인할 예정이다. 즉 복합허브추출물 F1은 무처리 및 주정 처리구에 비해서 저장기간을 30일 이상 연장하여 주었다. 결과적으로 복합허브추출물 F1은 항효모활성만 일부 보완한다면 매우 우수한 항진균성 천연보존료로 사료된다.

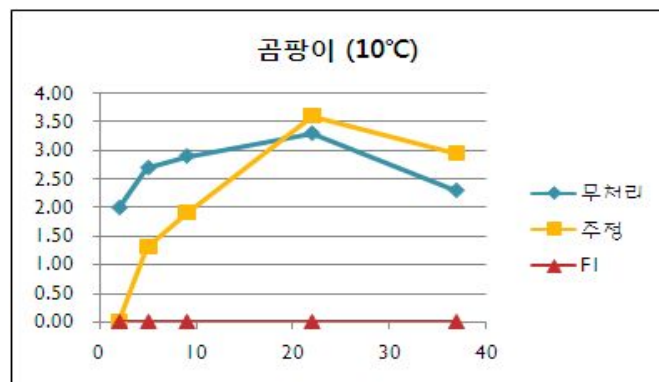
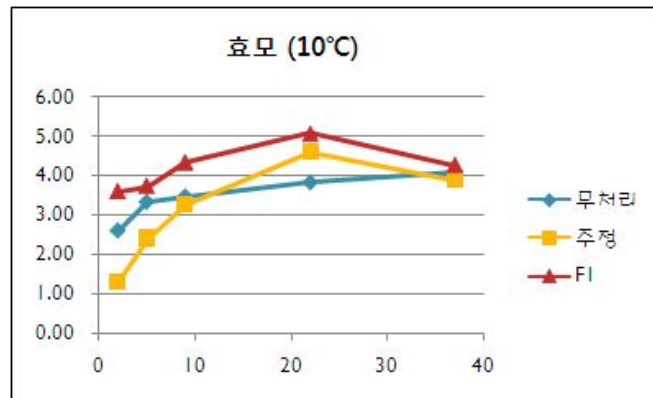
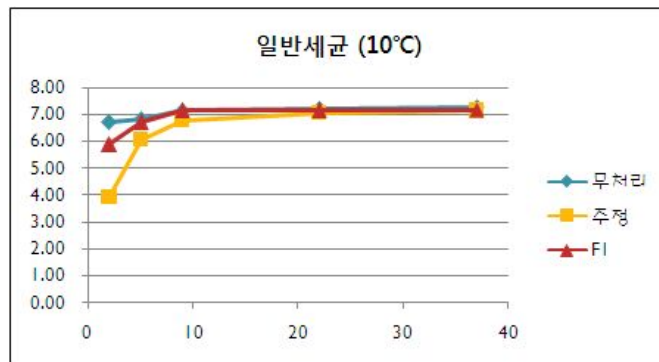


Fig.1-30. 복합허브추출물F1을 처리한 떡볶이의 저장효과

## 제 3 절: 제 1 협동과제

### 천연보존료의 떡 처리 조건 확립 및 포장기술 개발

#### 1. 연구 개발 목표

- ▷ 6개월 이상 보존을 위한 처리 조건 확립
- ▷ 떡볶이에 대한 천연보존료의 application test
- ▷ 떡볶이에 대한 천연보존료의 challenge test
- ▷ 떡볶이 장기보존용 포장기술 개발
- ▷ 떡 포장기술 manual화

#### 2. 최종 연구결과 요약

▶ 시중유통 떡볶이용 떡 제품의 유통기한 조사; 유통기간은 제조사 마다 차이가 있었으나, 유통기한은 1~2개월이었으며, 보존 기능을 하는 성분으로는 주정을 사용하였다.

▶ 떡볶이 장기보존을 위한 처리조건을 확립하기 위해서 상백피추출물과 감초추출물을 처리한 떡볶이를 상온(20℃) 및 냉장(10℃) 보관하면서 떡볶이의 미생물 변화양상 및 품질변화를 조사한 결과 상백피추출물과 감초추출물을 혼합 처리한 떡볶이의 보존효과가 가장 우수하였으며, 10℃에서 2개월 이상 보존이 가능하였다.

▶ 떡볶이 보존 효과 시험(application test); 포장 재질별 보존효과를 확인한 결과 NYPE포장 재질의 보존효과가 가장 우수하였다.

▶ 천연보존료의 처리방법 및 처리 농도별 가래떡의 보존 효과 시험; 천연보존료의 처리방법별 시험에서 혼합보다는 침지에 의한 보존효과가 더욱 우수하였다. 또한, 천연보존료의 농도별 시험에서는 0.1% 이상에서는 보존 효과가 유사하였으며, 천연보존료의 항진균활성(MIC)를 고려하여 0.4%로 처리농도(dosage)를 결정하였다.

▶ 떡볶이 장기보존용 포장기술 개발; 기체조성을 달리한 실험구에서는 처리구에 따른 기체농도의 차이는 없었으며, 색도변화와 경도변화(응집성, 씹힘성, 부착성, 경도변화) 테스트 결과 대조구와 천연보존료 처리구 및 기체농도를 달리한 포장구간의 차이는 미미하였다. 단지, CO<sub>2</sub>의 농도가 80% 이상일 때 경도측정값이 낮아서 노화저해 효과가 있었다. 미생물 억제 효과는 천연보존료4(복합허브추출물 F1)를 처리구 중에서 CO<sub>2</sub> 농도가 80% 이상의 변형기체 포장구의 떡 변패방지효과가 가장 우수하였다.

▶ 떡 제조 시 CCP관리 manual화 ; 떡 제조 단계에서 본 과제에서 개발된 천연보존료 적용과 포장기술을 적용한 CCP관리 기준을 설정하였으며 매뉴얼화 하여 떡볶이의 유통기한을 연장함

### 3. 연구 수행방법 및 결과

#### 가. 시중 유통 떡볶이용 떡 제품의 유통기간 조사

##### (1) 떡볶이 떡 제품 종류

시장조사에 따르면 6개의 제조 회사에서 총 11개의 제품이 냉장 유통 중이며 A마트에서 총 7종의 제품을 구입하였으며, B마트에서 나머지 4종을 구입하였다. 포장형태는 떡볶이 떡만을 포장한 4종과 떡과 소스가 함께 첨가된 7종으로 조사되었다. 용량기준은 2~3인용으로 약 360g의 떡이 사용되었으며, 약 120g의 소스가 첨가되었다.

시중 유통 떡볶이용 떡 제품의 제조사로는 미정, 덕산식품, 운정, 신세계푸드, 송학식품, 삼오식품 등이 있었으며, 판매사로는 씨제이제일제당, 풀무원식품, 신세계이마트, 송학식품, 삼오식품이 있었으며, 유통기한은 제조사마다 차이는 있었으나, 전체적으로 1~2개월 이었다(Fig. 2-1). 모든 제품에 보존 기능을 하는 성분으로는 주정을 사용하였으며, 마트 판매 이 외에도 떡볶이의 많은 양이 식당 납품용으로 생산되고 있었다.

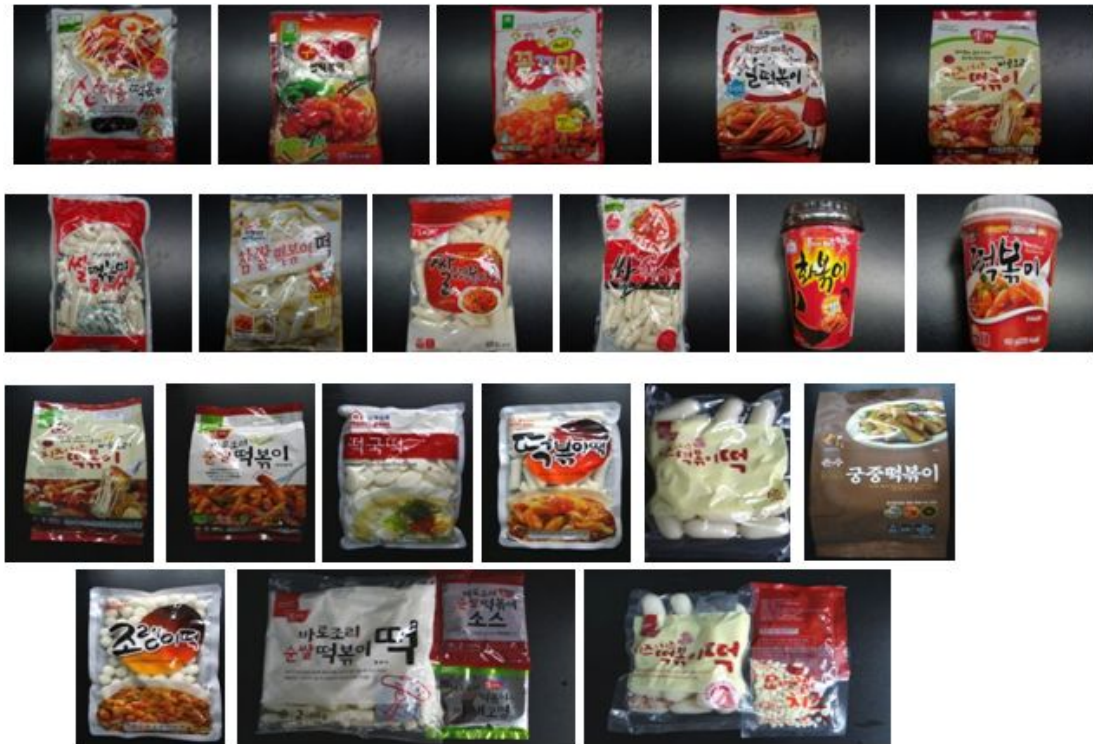


Fig. 2-1. 시중 유통 떡볶이용 떡제품 현황

##### (2) 포장 재질 및 처리

포장 재질 및 처리는 용기, 외포장, 내포장, 소스, 건더기로 나뉘고 있는데 용기포장재질은 폴리프로필렌을 사용하였고, 외포장은 폴리에틸렌을 대부분 사용하였으며 제조사 중 한 곳은 나이론과 폴리에틸렌을 함께 사용하고 있었다. 내포장 역시 폴리에틸렌을 사용하였으며, 소스와 건더기포장 재질로는 폴리에틸렌을 사용하고 있었다. 떡볶이 보존료 처리는 11종 모두 주정처리 후 탈산소제를 첨가하였다(Table 2-1).

Table 2-1. 시중 유통 떡볶이 및 포장재질 조사

판매사	제조사	제품명	용량 (g)	포장재질/처리
송학식품	송학식품	콩꼬미 쌀떡볶이	600	폴리에틸렌(내외포장)/주정, 탈산소제
송학식품	송학식품	꼬마쌀떡볶이	600	폴리에틸렌(내외포장)/주정, 탈산소제
신세계이마트	(주)운정	쌀떡볶이	500	폴리에틸렌(내외포장)/주정, 탈산소제
신세계이마트	신세계푸드	별난 쌀떡볶이떡	500	폴리에틸렌(내외포장)/주정, 탈산소제
씨제이제일제당	(주)미정	참쌀떡볶이	360	폴리에틸렌(내외포장)/주정, 탈산소제
씨제이제일제당	(주)미정	학교앞 떡볶이맛이 그리울 때 쌀떡볶이	360	폴리에틸렌(내외포장)/주정, 탈산소제
송학식품	송학식품	졸면꼬마쌀떡볶이	573	폴리에틸렌(내외포장)/주정, 탈산소제
풀무원식품	덕산식품	바로조리 순쌀떡볶이	480	폴리에틸렌(내외포장)/주정, 탈산소제
삼오식품	삼오식품	쌀떡볶이	500	나이론 + 폴리에틸렌(외포장) /주정, 탈산소제

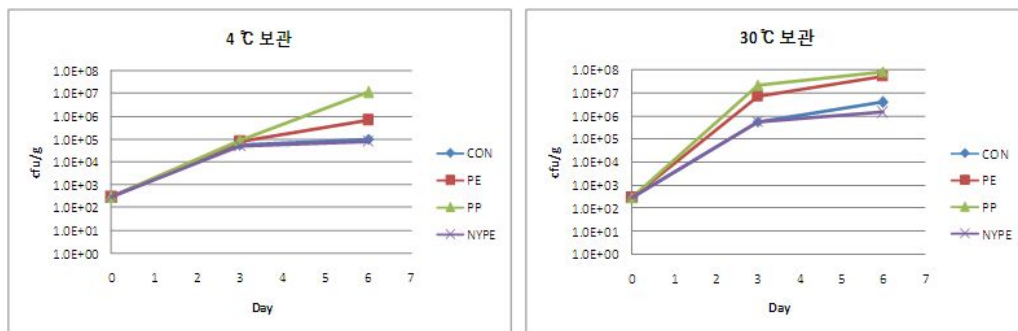
나. 상온 6개월 이상 보존을 위한 처리조건 확립

(1) 포장재질에 따른 떡볶이 보존 효과

A. 포장재질에 따른 총균수 변화

떡볶이 떡의 저장실험으로는 떡을 PE, NYPE, PP재질의 포장지에 담아 질소치환과 주정처리를 하여 탈산소제를 넣어 포장하여 실시하였다.

포장재질에 따른 총균수는 4℃저장 0일차에선  $2.8 \times 10^2$ 으로 측정되었으며, 3~6일차에는 NYPE포장 재질 시료가 가장 적게 검출되었다. 특히 PP와 PE재질의 포장시료가 대조구와 NYPE포장 시료에 비해 많은 양의 균수가 검출되었다. 냉장상태가 30℃ 보관보다 총균수가 1 log 차이로 약간 적게 검출되었다. 30℃저장 실험군에서도 NYPE 포장 재질을 사용하였을 때 총균수가 가장 적게 검출되었다(Fig. 2-2).



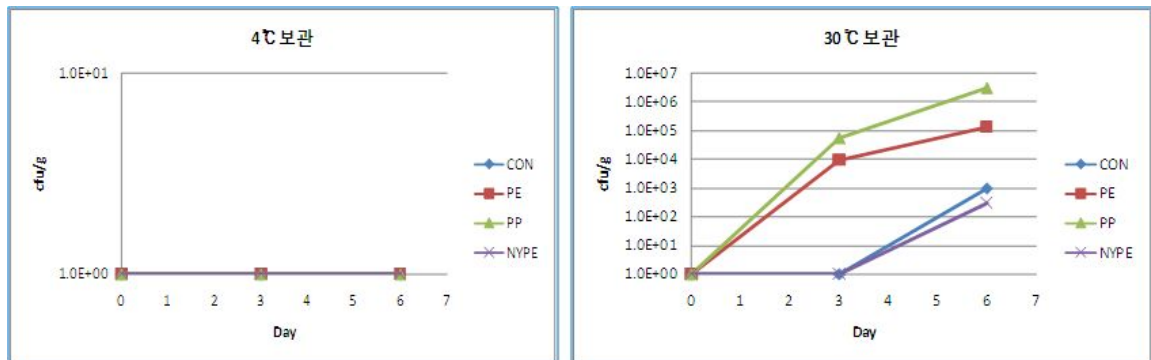
- CON(control); PE + 주정,
- PE(polyethylene); PE + 주정 + 질소치환 + 탈산소제
- PP(polypropylene); PP + 주정 + 질소치환 + 탈산소제
- NYPE(nylon polyethylene); NYPE + 주정 + 질소치환 + 탈산소제

Fig. 2-2. 포장재질에 따른 떡볶이의 총균수 변화

## B. 포장재질에 따른 효모 및 곰팡이 균수 변화

포장재질에 따른 효모 및 곰팡이는 4℃저장된 시료에서는 3일차 6일차 모두 불검출 되었으나 30℃ 저장된 시료는 대조구와 NYPE포장 저장된 시료가 6일차에서 검출된 반면 PE와 PP 재질 시료는 3일차에 검출 되었다.

미생물 검사결과 시간이 흐를수록 검출되는 양이 많아졌으며 특히, pp재질의 경우 균수가 크게 증가하였다. 냉장상태의 포장이 30℃ 보관보다 효모 및 곰팡이 증식을 억제하는 효과가 현저히 컸다(Fig. 2-3).



- CON(control); PE + 주정,
- PE(polyethylene); PE + 주정 + 질소치환 + 탈산소제
- PP(polypropylene); PP + 주정 + 질소치환 + 탈산소제
- NYPE(nylon polyethylene); NYPE + 주정 + 질소치환 + 탈산소제

Fig. 2-3. 포장재질에 따른 떡볶이의 효모 및 곰팡이 균수 변화

## (2) 향균소재 및 향균추출물 처리에 따른 떡볶이 보존 효과

### A. 젖산과 키토산의 떡볶이 보존 효과

상은 6개월 이상 보존을 위한 처리 조건을 확립하기 위하여, 향균 소재를 검토하였다. 먼저 현재 시중 떡볶이 제품에 사용되고 있는 주정 처리구를 대조구로 하였으며, 일반적인 향균 소재로 이용되고 있는 젖산과 키토산을 단일 혹은 혼합하여 사용하였다. 젖산과 키토산(수용성)은 물에 1% 농도로 녹인 현탁액을 침지액으로 사용하였으며 30초 침지 처리하였으며, 주정은 95% 주정 원액을 spray 한 다음 주정이 건조된 후 포장하였다. 처리된 떡은 25℃에 보관하면서 저장효과를 육안 및 균수 측정으로 확인하였다.

주정 처리구, 젖산 처리구, 젖산과 키토산 혼합 처리구 모두에서 보관 3일부터 곰팡이가 발생되기 시작하였다. 육안으로 관찰되는 곰팡이 발생정도는 젖산 > 젖산+키토산 > 무처리(주정) 순서로 높았으며, 젖산과 키토산은 떡볶이에 대한 보존 효과가 없음을 확인하였다. 또한 효모와 곰팡이 균수를 확인한 결과 3개의 실험구 모두에서 7 log 정도의 균수가 확인 되었으며, 이는 육안 관찰 결과와 유사하였다(Fig. 2-4, Fig. 2-5).



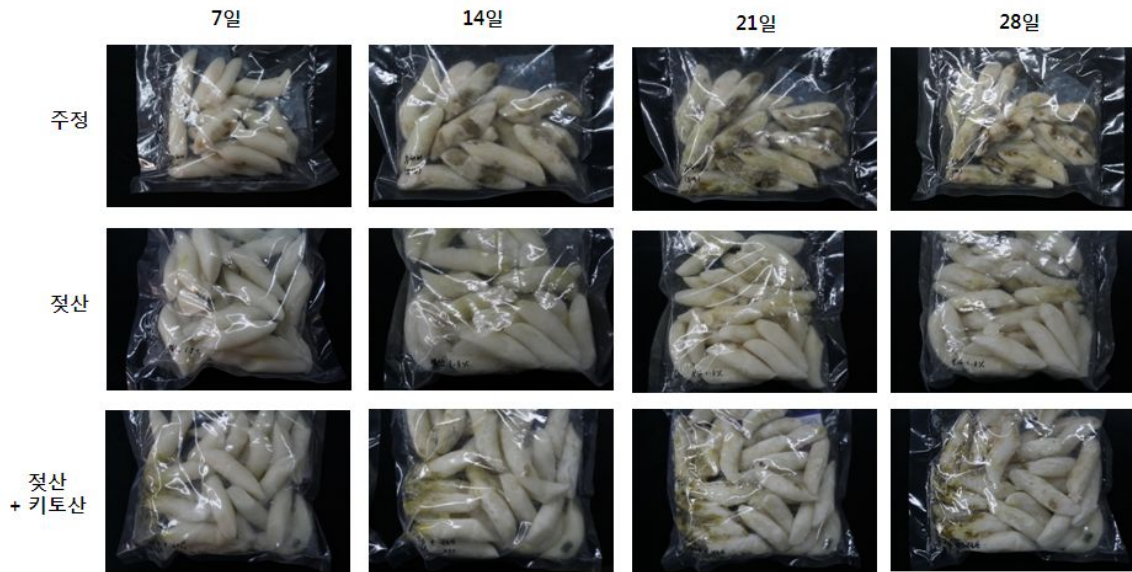


Fig. 2-4. 주정, 젖산, 키토산의 떡볶이 보존 효과

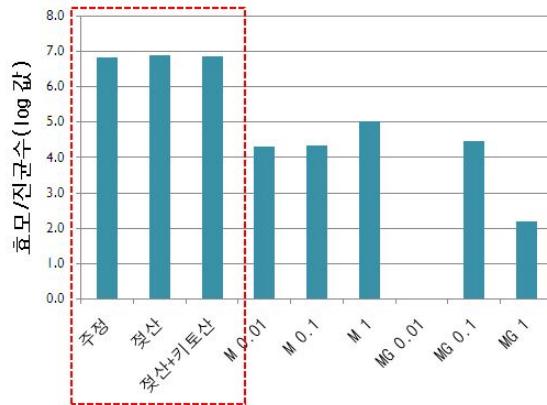


Fig. 2-5. 떡볶이의 주정, 젖산, 키토산 처리에 의한 효모 및 곰팡이 균수 변화

#### B. 상백피 추출물의 떡볶이 보존 효과

상백피를 주정으로 추출한 상백피추출물(Herb-M)을 0.01%, 0.1%, 1% 농도로 떡볶이에 30초 침지 처리하였다. 상백피 추출물은 제형화 전 단계의 샘플이므로 Tween20으로 용해한 다음 최종농도에 맞추어 물에 현탁하여 침지액으로 사용하였다. 30초 침지 처리하였으며, 처리된 떡은 25°C에 보관하면서 저장효과를 육안 및 균수 측정으로 확인하였다.

1개월 동안 전체 처리 구에서, 처리 농도에 상관없이 곰팡이 발생이 주정 처리구에 비해서 현저히 저하되었다. 주정을 처리한 실험구에서는 보관 3일 차에 곰팡이가 발생하기 시작한 반면, 0.01~1% 상백피 추출물(Herb-M)을 처리한 실험구에서는 18일 차부터 육안으로 곰팡이가 관찰되기 시작하였을 뿐만 아니라, 대조구에 비해서 곰팡이의 생육이 왕성하지 않고 부분적으로 관찰되었다. 처리 28일 차에 효모와 곰팡이 균수를 측정한 결과 주정을 처리한 대조구에 비해서 약 2 log 이상 균수가 감소한 결과를 나타내었다. 따라서 상백피 추출물이 떡볶이의 보존 효과를 상당히 증가시키는 것으로 사료된다(Fig 2-6, Fig 2-7).





Fig. 2-6. 상백피 추출물의 떡볶이 보존 효과

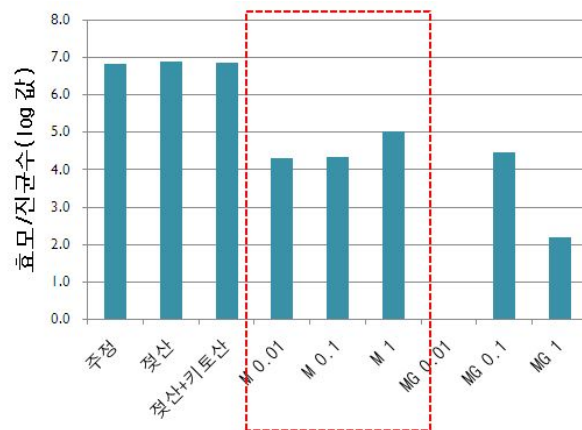


Fig. 2-7. 상백피 추출물 처리에 의한 효모 및 곰팡이 균수 변화

### C. 상백피추출물과 감초추출물의 떡볶이 보존 효과

상백피를 주정으로 추출한 0.01%, 0.1%, 1% 농도의 상백피추출물(Herb-M)과 0.1% 감초 추출물을 섞은 혼합물을 떡볶이에 30초 침지 처리하였다. 이 실험에서도 상백피추출물과 감초 추출물은 제형화 전 단계의 샘플이므로 Tween20으로 용해한 다음 최종농도에 맞추어 물에 현탁하여 침지액으로 사용하였다. 30초 침지 처리하였으며, 처리된 떡은 25℃에 보관하면서 저장효과를 육안 및 균수 측정으로 확인하였다.

1개월 동안 전체 처리 구에서, 처리 농도에 상관없이 곰팡이 발생이 주정처리구에 비해서 현저히 저하되었다. 주정을 처리한 실험구에서는 보관 3일 차에 곰팡이가 발생하기 시작하였고(Fig 2-8, Fig 2-9), 상백피 추출물(Herb-M)을 처리한 실험구에서는 2 log 이상 균수가 감소하였고 부분적으로 곰팡이 발생이 육안으로 관찰된 현상에 비해서(Fig 2-7, Fig 2-8), 상백피 추출물(Herb-M)과 0.1% 감초 추출물을 혼합 처리한 실험구에서는 1개월 동안 육안으로 곰팡이가 관찰되지 않았다(Fig 2-8, Fig 2-9). 처리 28일 차에 효모와 곰팡이 균수를 측정한다

결과 주정을 처리한 대조구에 비해서, 0.01% 처리한 실험구에서는 3개의 반복 실험구 모두 균이 관찰되지 않았으며, 0.1%와 1% 처리구에서도 각각 2 log와 4 log 이상 균수가 감소한 결과를 나타내었다. 결과적으로 0.01%에서 결과가 농도 비례적이지 않지만, 처리구의 진균류의 감소가 현저하였다.



Fig. 2-8. 상백피 추출물과 감초 추출물의 떡볶이 보존 효과

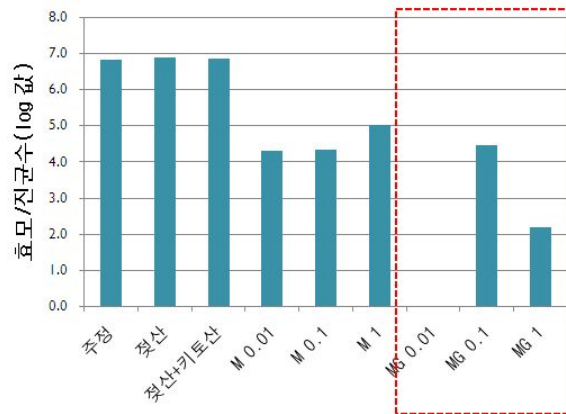


Fig. 2-9. 상백피 추출물과 감초 추출물 처리에 의한 효모 및 곰팡이 균수 변화

따라서 상백피 추출물과 감초 추출물을 혼합 처리할 경우 상백피 추출물 단독으로 처리할 때 보다 떡볶이의 보존 효과가 더욱 높은 것으로 판단되며, 1개월 동안 육안으로 곰팡이가 관찰되지 않았다. 곰팡이 균수가 항진균제의 농도에 비례하여 제어 되지 않는 현상은 곰팡이 포자가 발아된 후에는 곰팡이의 빠른 증식이 진행되기 때문으로 판단되며, 곰팡이 발아 억제능을 보완한다면 매우 탁월한 항진균 보존료가 될 것으로 판단된다.

#### D. 향균소재 및 향균추출물을 처리한 떡볶이의 저장기간별 품질 변화

상백피 추출물과 감초 추출물을 혼합 처리한 떡볶이를 28일 간 보관하면서 곰팡이의 생육 뿐 만 아니라 색깔의 변화와 이취를 관찰 하였다. 전체적으로 곰팡이의 생육정도에 비례하여 품질 변화가 심하게 일어났으며, 상백피 추출물과 감초 추출물의 혼합물을 처리한 떡볶이에서는 곰팡이의 생육은 육안으로 관찰되지 않았으나, 품질 변화로 인해 부분적으로 약한 변색이 있었으며, 보관 2주부터는 산취가 발생하기 시작하여, 4주째는 산취가 중간 정도의 강도로 나타났다(Table. 2-2)

Table 2-2. 향균 소재를 처리한 떡볶이의 저장기간별 품질 변화

Days	Quality parameters	Dosage(%)					
		주정	젖산	젖산 + 키토산	Herb-MG 1	Herb-MG 0.1	Herb-MG 0.01
3	Fungal growth*	+	-	+	-	-	-
	Color change	+	-	+	-	-	-
	Odor	+	-	+	-	-	-
7	Fungal growth	++	+	++	-	-	-
	Color change	++	+	++	-	-	-
	Odor	++	+	++	-	-	-
14	Fungal growth	+++	++	+++	-	-	-
	Color change	+++	++	+++	-	-	-
	Odor	+++	++	+++	+	+	+
28	Fungal growth	+++	++	+++	-	-	-
	Color change	+++	++	+++	-	±	±
	Odor	+++	+++	+++	++	++	++

\* Fungal growth; 육안으로 관찰되는 곰팡이 발생 여부

-; no change, +; weak change, ++; moderate change, +++; severe change

#### 다. 천연보존료 처리 떡볶이의 포장기술 개발

##### (1) 재료 및 방법

##### A. 천연보존료를 처리한 떡 제조 방법

본 실험에 사용된 떡볶이 떡은 (주)에스엔텍에서 당일 제조한 것을 제공하였으며, 총 4차에 걸쳐 떡 보존 실험을 수행하였으며, 각 천연보존료의 구성성분의 함량을 Table 2-3에 나타내었다.

천연보존료를 혼합 처리하는 방법으로는 3시간 이상 침지하여 불린 쌀을 1차 분쇄 후 천연보존료를 쌀 무게 대비 0.4% 혼합한 다음, 2차 분쇄한 후 스팀(4kgf/cm<sup>2</sup>, 15min)으로 찐 후 떡볶이로 성형하였다. 소금은 최종 1% 농도로 투여하였으며, 소금액에 제형화한 수용성 천연보존료를 녹여서 투여하였으며, 최종 수분은 떡 제조 후 48~50% 가수 되었다(Fig. 2-10).

천연보존료를 침지 처리하는 방법으로는 3시간 이상 침지하여 불린 쌀을 1차, 2차 분쇄 후 스팀으로 찐 후 떡볶이로 성형하였으며 소금 함량은 동일하게 1%이다. 성형이 완료된 떡볶이

를 물에 냉침한 다음, 0.4% 천연보존료 침지액에 3분 침지 처리 하였다. 이 때 대조구로 사용한 주정처리구는 95% 주정을 분무 살포 처리 혹은 2분 침지 처리 하였다.



쌀 침지 --> 2회 분쇄 --> Steaming(4kgf/cm<sup>2</sup>, 15min) --> 성형

Fig. 2-10. 떡볶이 제조 과정

### B. 포장공정 개발에 사용한 천연보존료 종류

떡보존용 포장공정 개발에 사용한 천연보존료 구성성분(Specification)은 아래 표와 같으며, 천연보존료1에서 천연보존료4까지 단계적으로 최적화하였으며, 최종적으로 천연보존료4(복합 허브추출물 F1)의 떡볶이 보존효과가 가장 우수하였다(Table 2-3).

Table 2-3.. 떡볶이에 처리한 천연보존료 구성성분

성분	배합비			
	천연보존료 1	천연보존료 2	천연보존료 3	천연보존료 4 (복합허브추출물 F1)
처리 방법	침지	혼합	침지	침지
상백피추출물 (제형화원료, keybase)	10%	10%	20%	20%
감초추출물 (제형화원료, keybase)	10%	10%		
식물혼합농축분말 (건강,유카,녹차)	-	-	5%	5%
초산나트륨		-	-	10%
말토덱스트린	80%	80%	75%	65%
Dosage/침지 시간	0.4%	0.4%	0.4%/3분	0.4%/3분
계	100%	100%	100%	100%

### C. 포장처리 및 저장 방법

대조구는 무침가구에 주정(99%)을 분무살포한 후 건조시켜 사용하였으며, 처리구는 천연보존료 1과 2를 첨가한 떡을 사용하였다. 시료의 포장은 PP tray 상부에 50 $\mu$ m PE film을 hot sealing하여 사용하였으며 일반 포장구와 포장내의 기체조성(CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=5:5, 7:3, 9:1)을 달리한 변형기체포장구((Modified atmosphere packaging(MAP))로 포장 후 20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 저장 중 포장내 기체농도 및 떡의 품질특성을 처리구당 3개씩 분석하였다.

위 실험결과를 바탕으로 변형기체포장구의 기체농도를 조정하여 2차 실험을 진행하였다. 무침가구, 주정(99%, 2분 침지)처리구를 대조구로 사용하였으며 처리구는 천연보존료 3을 첨

가한 떡을 사용하였다. 시료의 포장은 PP tray 상부에 50 $\mu$ m PE film을 hot sealing하여 사용하였으며 일반 포장구와 포장내의 기체농도(CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=6:4, 7:3, 8:2, 9:1)를 달리한 변형기체포장구(Modified atmosphere packaging(MAP))로 포장 후 20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 저장 중 3일 간격으로 떡의 품질특성을 처리구당 3개씩 분석하였다.

3차 실험은 1, 2차 실험을 보완하여 진행하였으며 무첨가구와 주정(99%)처리구를 대조구로 사용하였으며 처리구로 천연보존료 4를 첨가한 떡을 사용하였다. 시료의 포장은 PP tray 상부에 20 $\mu$ m OPP film을 hot sealing하여 사용하였으며 일반 포장구와 포장내의 기체농도(CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=6:4, 7:3, 8:2, 9:1)를 달리한 변형기체포장구(Modified atmosphere packaging(MAP))로 포장 후 20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 저장 중 3일 간격으로 떡의 품질특성을 처리구당 3개씩 분석하였다.

## (2). 품질특성 측정 방법

### A. 가스조성 변화

저장 중 포장 내부의 산소와 이산화탄소 농도는 Gas chromatography(Model GC-14A, Shimadzu, Japan)에 포장재내의 기체를 200 $\mu$ l 취하여 주입하여 다음의 분석조건에서 측정하였다. column: CRT-1(Altech Associates Inc., USA), detector : TCD, column temp.: 35 $^{\circ}$ C, detector temp.:60 $^{\circ}$ C, carrier gas: He(50ml/min).

### B. Texture

시료의 위, 아래를 편편하게 절단한 후(1cm $\times$ 1cm) Texture analyzer(TA-XT2, Stable Micro System Ltd, UK)를 이용하여 지름 25mm의 끝이 편편한 probe를 사용하여 Table 2-4. 조건으로 측정하였다. TPA(texture profile analysis) 방법으로 총 10회 측정하여 평균값으로 경도(hardness), 탄성(springiness), 응집성(cohesiveness), 씹힘성(chewiness) 및 부착성(adhesiveness) 값을 구하였다.

Table 2-4. Texture analyzer conditions for texture properties of Tteokbokki

Parameter	Operating condition
Distance format	25% strain
Test speed	1.0 mm/sec
Pre-test speed	3.0 mm/sec
Post-test speed	1.0 mm/sec
Trigger force	5 g

### C. 색도

떡의 색도는 표준 백색판(Y: 93.60, x: 0.3131, y: 0.3191)으로 보정된 Colorimeter(CR-400, Konica. Japan)를 이용하여 떡의 표면을 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 10회씩 측정하였으며 색차는  $\Delta E$ 값으로 나타내었다.

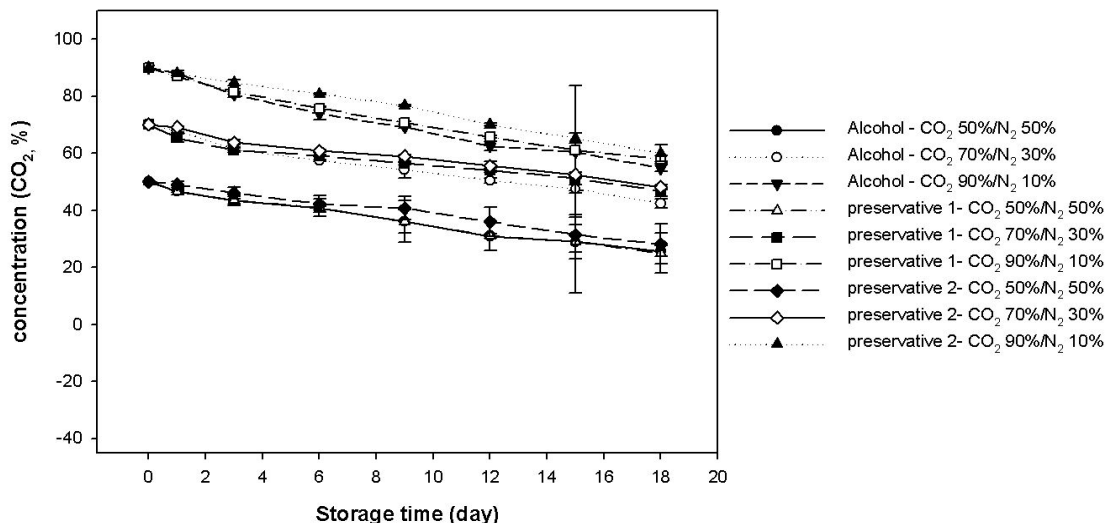
### D. 총균수 및 곰팡이

무균적으로 시료 10g을 채취한 뒤 중량의 9배에 해당하는 멸균된 0.85% Saline 용액을 가하여 stomacher (Bagmixer<sup>®</sup>400, Interscience, France)로 1분간 균질화 시킨 후의 시료액을 1ml 취하여 9ml의 멸균된 0.85% Saline 용액으로 단계 희석하였다. 보존료 1, 2, 3을 첨가한 실험(1, 2차 실험)의 총균수는 Aerobic Count Plate (3M Petrifilm<sup>™</sup>, St. Paul, USA) 에서 37°C에서 2일 동안 배양하였고, 곰팡이는 Yeast and Mold Count Plate (3M Petrifilm<sup>™</sup>, St. Paul, USA)에서 25°C에서 3일 배양하여 colony forming unit (log CFU/g)로 계수하여 나타내고 미생물 측정은 3반복의 평균치로 나타내었다. Petrifilm을 사용하여 실험한 결과 곰팡이보다 효모의 계수가 더 많이 측정되어 효모와 곰팡이를 구분하여 계수해야할 필요성이 나타났다. 이러한 이유로 보존료 4(3차 실험)를 사용한 실험에서는 효모와 곰팡이의 분리하여 계수하였다. 보존료 4의 총균수는 Aerobic Count Plate (3M Petrifilm<sup>™</sup>, St. Paul, USA) 에서 37°C에서 2일 동안 배양하였고, 곰팡이는 Potato Dextrose Agar (Difco, Detroit, USA)를 사용하여 25°C에서 4일 배양하여 colony forming unit (log CFU/g)로 계수하여 나타내고 미생물 측정은 3반복의 평균치로 나타내었다.

### (3) 포장기술 개발 결과

#### A. 가스조성 변화

기체조성을 달리한 포장구의 기체농도 변화는 Fig. 2-11과 같다. 모든 포장구에서 저장기간에 따라 CO<sub>2</sub>의 농도가 서서히 감소되는 경향을 보였으며 처리구에 따른 기체농도 차이는 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Moon(2010)등의 호박설기떡의 저장성에 미치는 변형기체 포장 영향연구에서 저장기간 중 100% CO<sub>2</sub> 포장 조건을 제외한 모든 포장조건에서 미생물 성장과 함께 분명한 CO<sub>2</sub> 농도 증가가 나타났다는 결과와 다른 결과를 보였으며, 60% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 40% 및 100% CO<sub>2</sub> 포장에서는 저장 직후 헤드스페이스 CO<sub>2</sub> 용해로 인한 CO<sub>2</sub> 농도의 감소가 나타났다는 보고와는 유사한 경향을 보였다. CO<sub>2</sub> 기체는 수분과 지방에 잘 용해되는 성질을 가지므로 고농도의 CO<sub>2</sub> 로 치환된 변형기체포장에서는 포장이 수축하는 문제가 발생하기도 한다(2)는 보고와 같은 현상을 보였다.



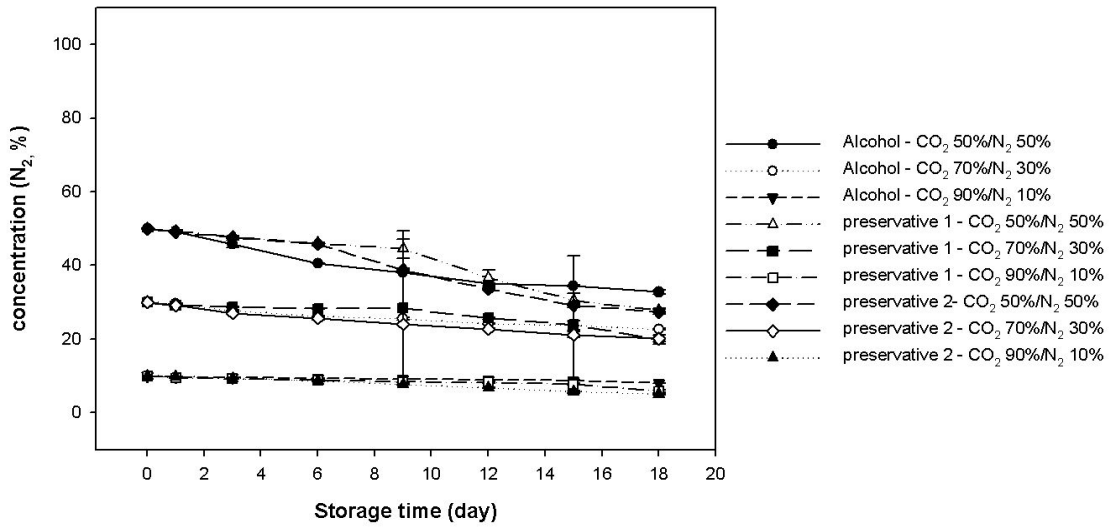
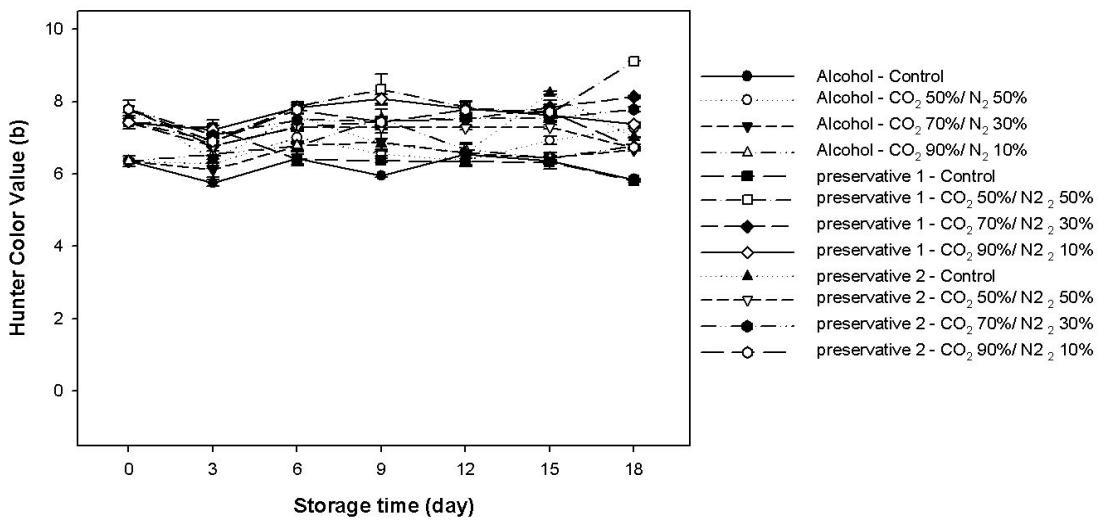
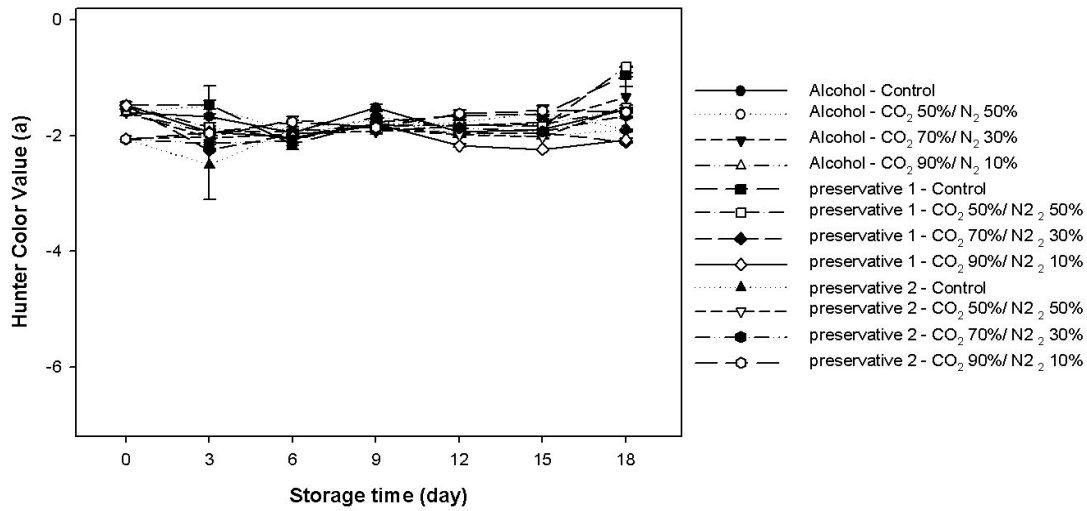
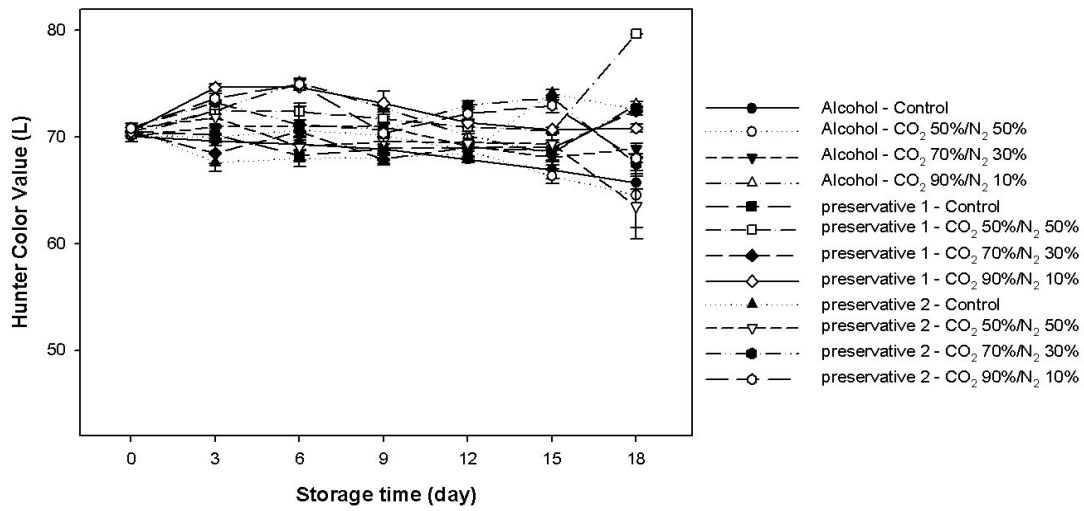


Fig. 2-11. Changes in gas concentration(CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) of Tteokbokki packaging during storage at 20°C after various treatments

### B. 색도변화

떡 색택은 소비자의 구매를 결정하는 중요한 인자이며 CO<sub>2</sub> 기체는 고농도에서 일부 식품의 퇴색에 기여할 수 있는 것으로 일부 보고된 바 있다(6). 기체농도를 달리한 포장구의 저장기간에 따른 떡의 색도 변화의 결과는 Fig. 2-12, Fig. 2-13, Fig. 2-14에 나타난 바와 같다. 천연보존료 1, 2를 사용한 1차 실험결과, 대조구와 천연보존료 1, 2 처리구 및 기체농도를 달리한 포장구간의 차이는 미미하였으며 저장기간 동안 천연보존료 처리구의 L, b값은 감소하였고 a값은 증가하였다. ΔE값의 경우 15일 저장 후 무처리구 및 천연보존료 1, 2의 CO<sub>2</sub> 50%포장 처리구가 타 처리구에 비하여 급격히 증가하였다. 이러한 결과는 저장 중 발생한 미생물적 변화가 색택에 크게 영향을 미친 것(2)으로 판단된다.

천연보존료 3, 4 처리구 실험결과 또한 1차 실험결과와 같이 모든 처리구, 포장구간의 차이가 미미하였으며 저장 기간 동안 L값은 일정하게 감소하였고 b값은 변화가 없었으며 a값은 증가하였다. Moon(2010)등의 호박 설기떡의 저장성이 미치는 변형기체포장 영향연구에서 저장 5일까지 포장구간의 차이가 없었으나, 저장 7일 이후에 stretch wrap 포장에서 밝기와 황색도가 감소하였고 a값에서도 - 값으로 치우쳐 약간의 녹색도가 증가된 것으로 나타났다는 보고와 유사한 경향을 보였다. 또한 허용 가능한 미생물적 품질수준에 있는 호박 설기떡의 표면 색택에서 포장구간의 차이가 없었다는 결과와도 일치하는 결과를 보였다.





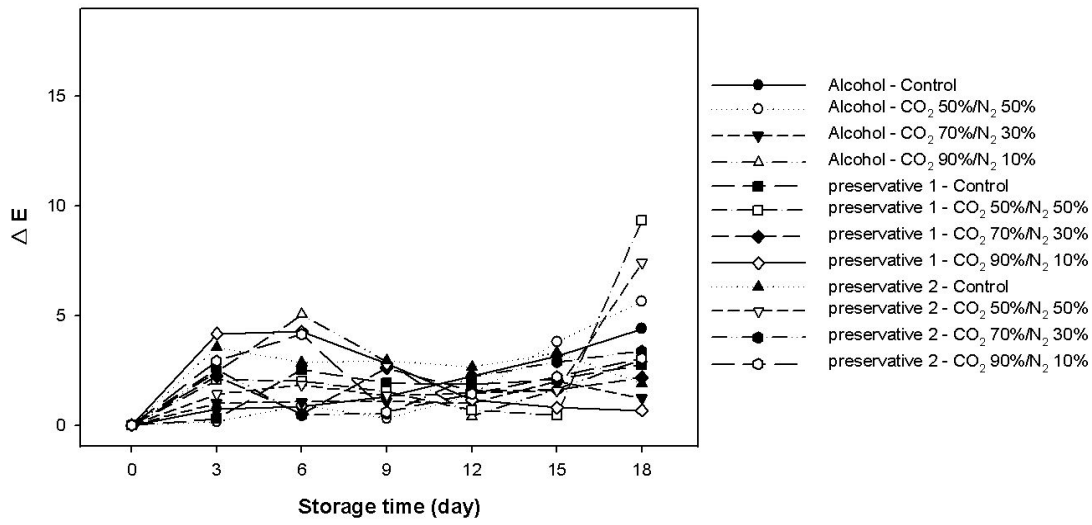
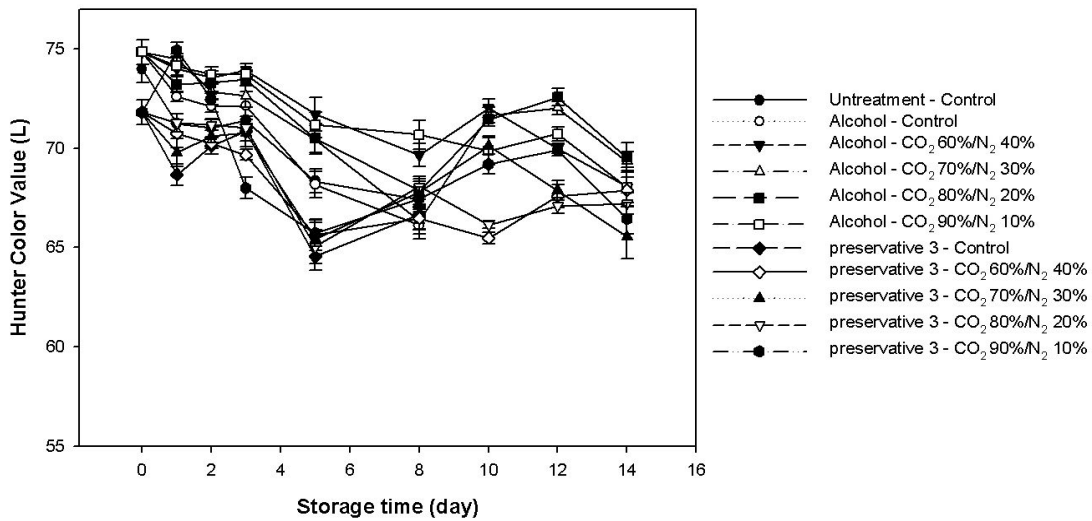
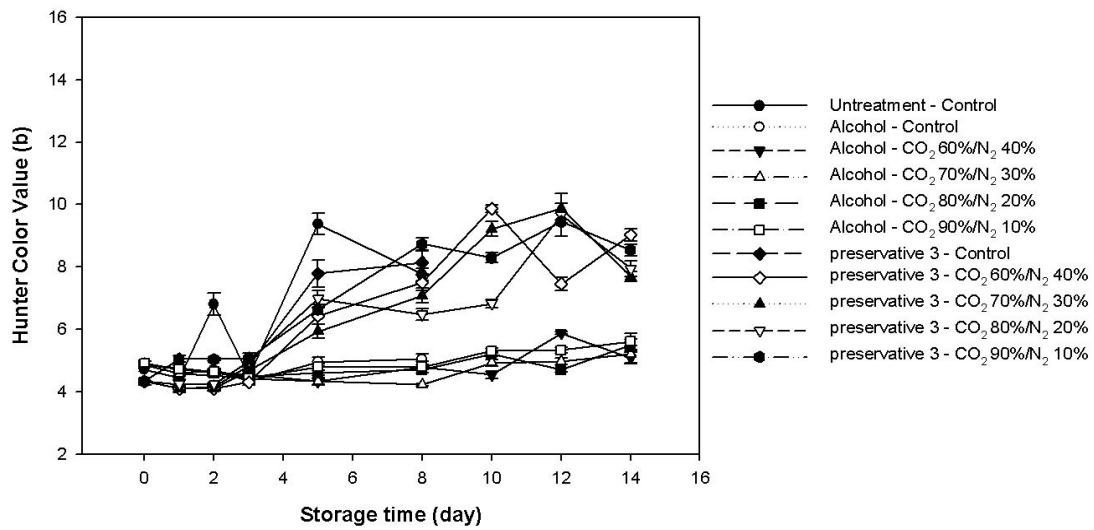
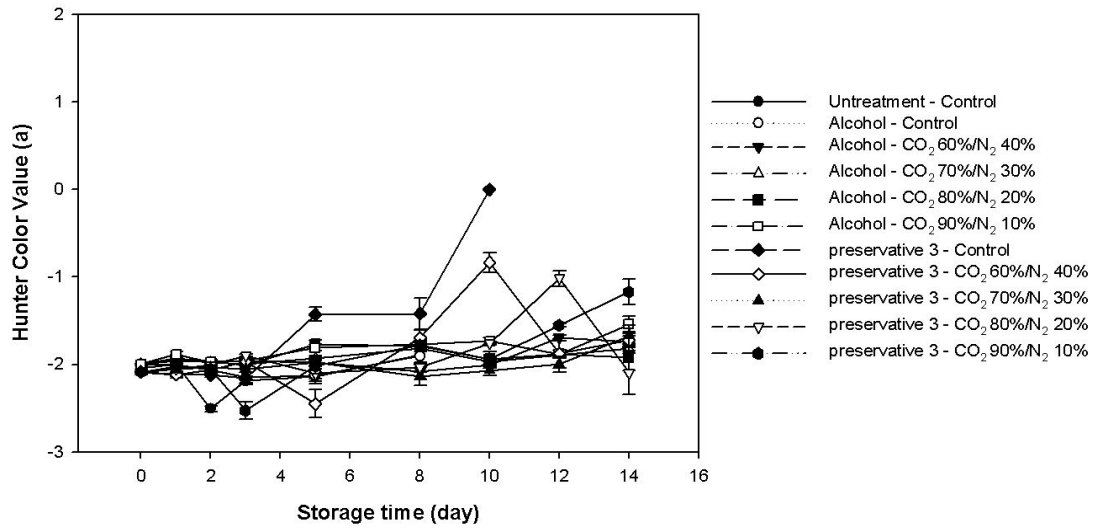


Fig. 2-12. Changes in color of Tteokbokki during storage at 20°C after treatments of natural preservatives 1, 2





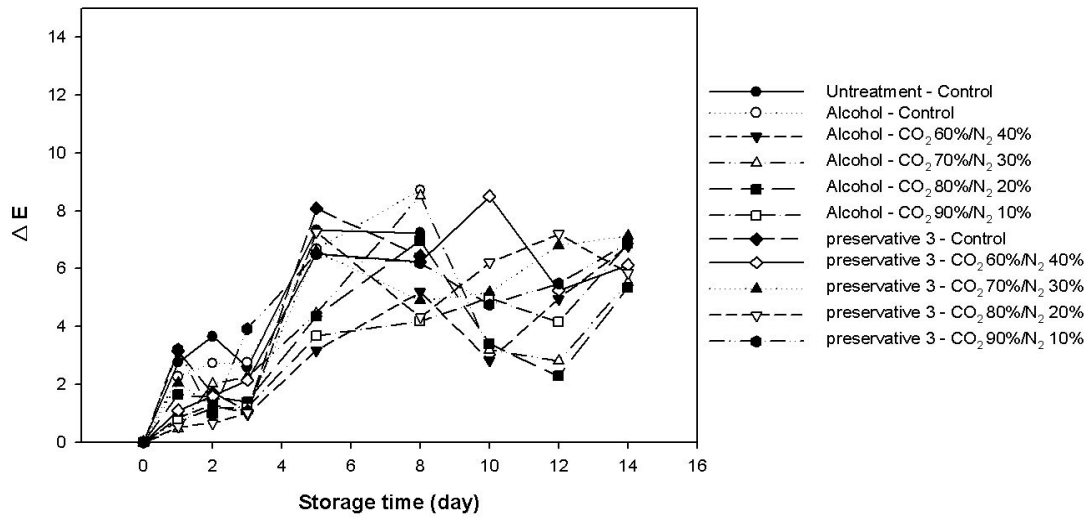
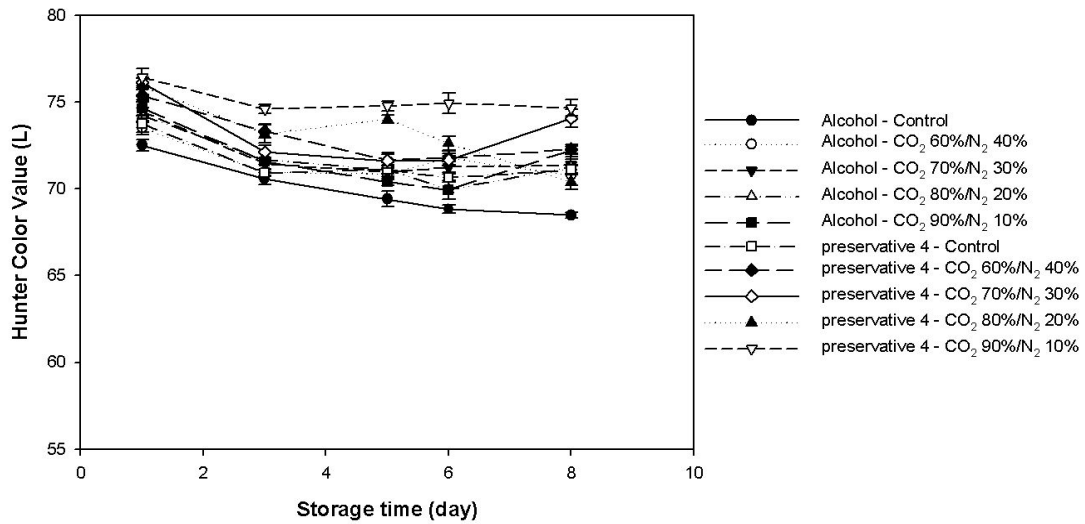
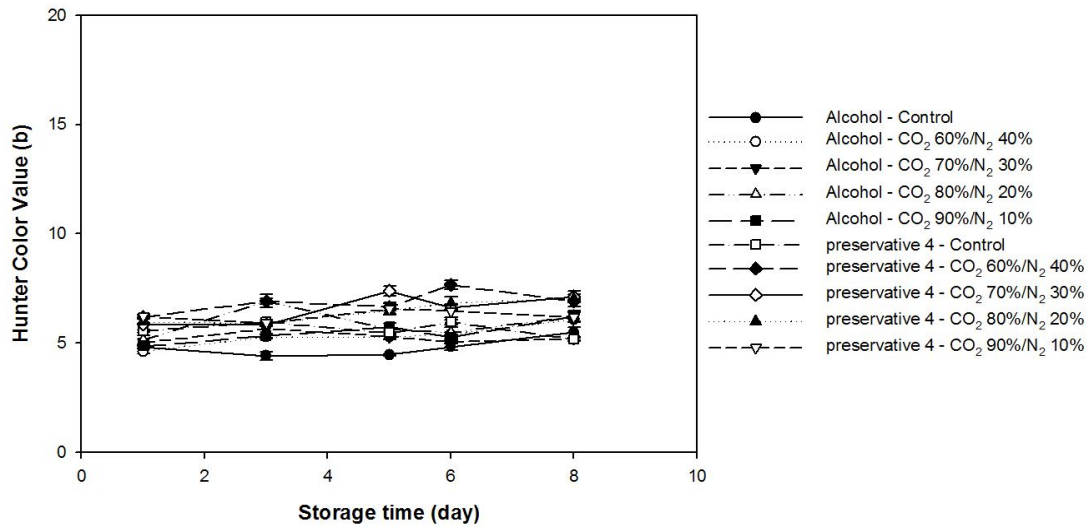
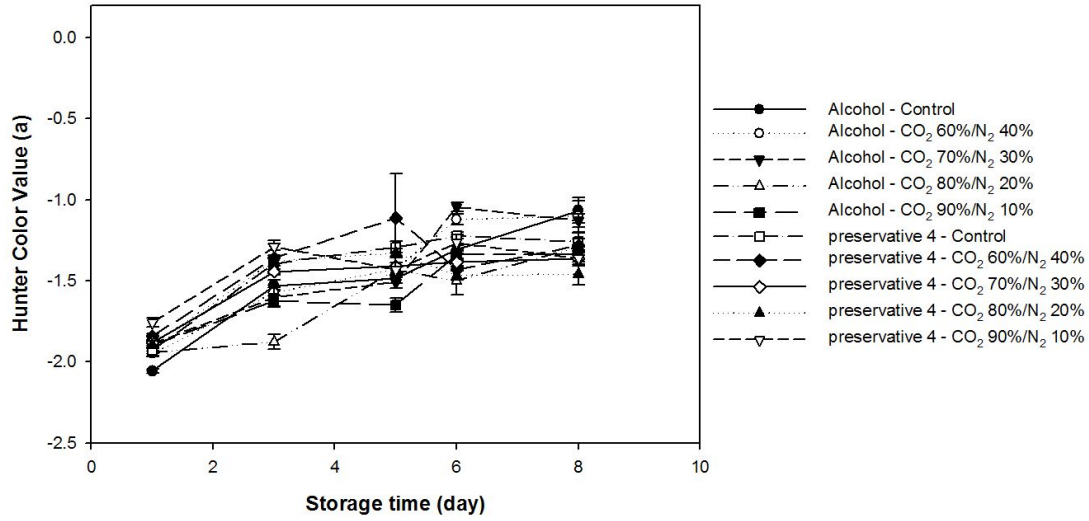


Fig. 2-13. Changes in color of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 3





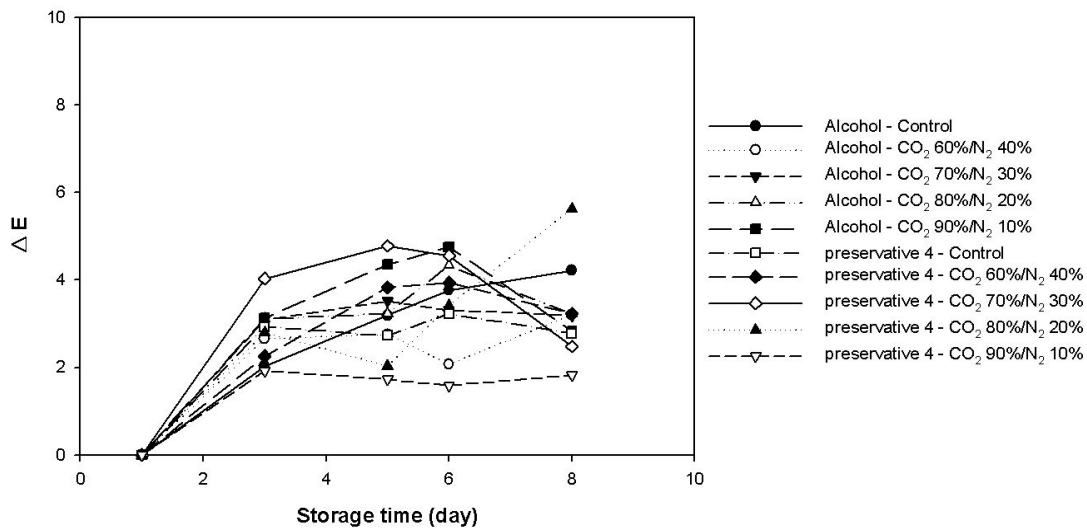


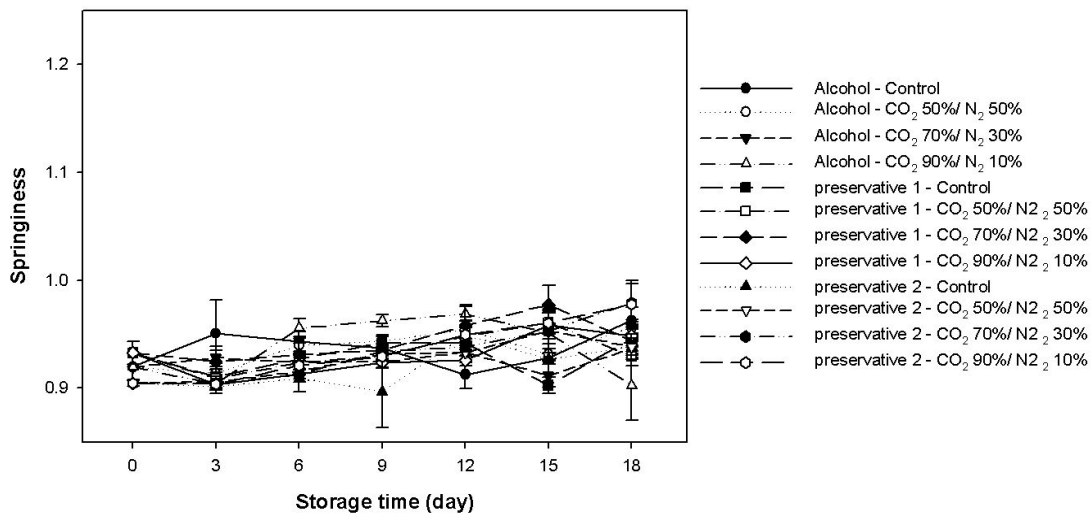
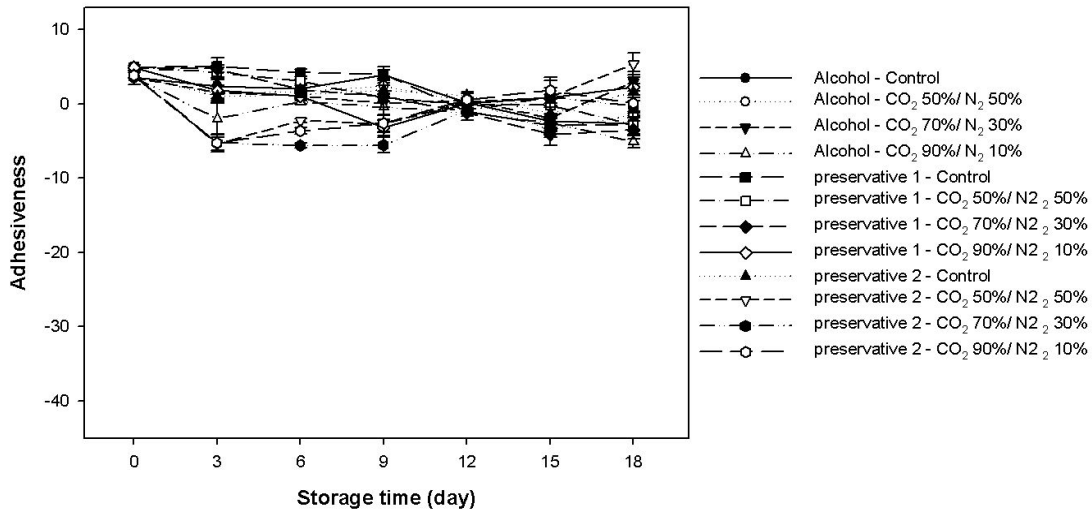
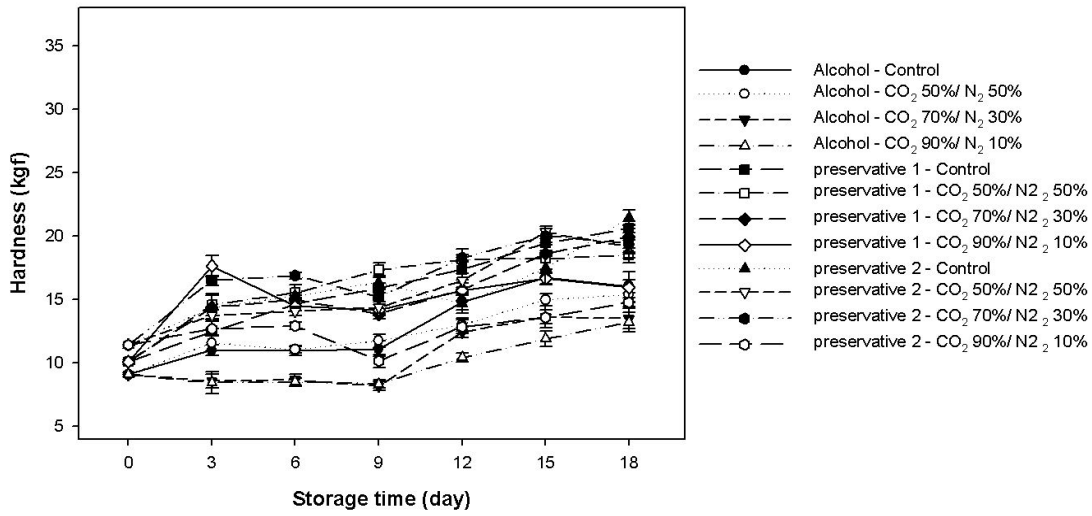
Fig. 2-14. Changes in color of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 4

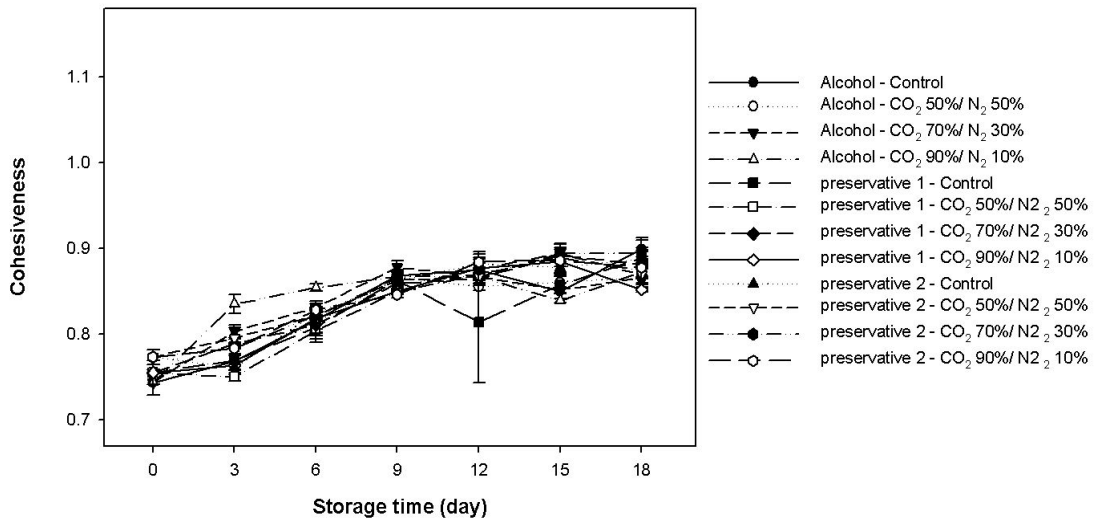
### C. 경도 변화

떡의 노화는 떡의 품질을 저하시키며 저장기간이 경과됨에 따라 전분 내의 amylopectin 분자간의 재결정의 melting으로 인해 흡열곡선 내의 면적(엔탈피)이 증가되고 엔탈피의 증가는 떡조직이 단단해지는 속도와 일치(3)하므로 떡의 노화가 진행된다. 그리고 경우에 따라서는 이러한 변형기체포장의 이들 식품의 노화 억제 기능이 일부 보고되고 있다(4).

노화 억제 효과 및 조직감을 측정하기 위해 TPA(texture profile analysis)로 탄성, 응집성, 씹힘성, 부착성 및 경도의 변화를 측정한 결과는 Fig. 2-15, 2-16, 2-17에 나타난 바와 같다.

천연보존료 1, 2를 첨가한 처리구와 대조구로 사용한 주정 처리구를 비교 실험한 1차 실험 결과는 Fig. 2-15와 같다. 경도는 저장기간에 따라 점차 증가하였으며 포장구의 CO<sub>2</sub> 농도가 높을수록 느리게 증가하였으며 저장기간이 지날수록 차이가 감소하는 경향을 보였다. 부착성은 저장 기간 동안 점차 감소하였고 모든 실험구간의 차이가 미미하였으며 탄성은 저장 기간 동안 변화가 없었다. 응집성 및 씹힘성은 저장 기간 동안 점차 증가하였으며 처리구간의 차이 또한 미미하였다.





]

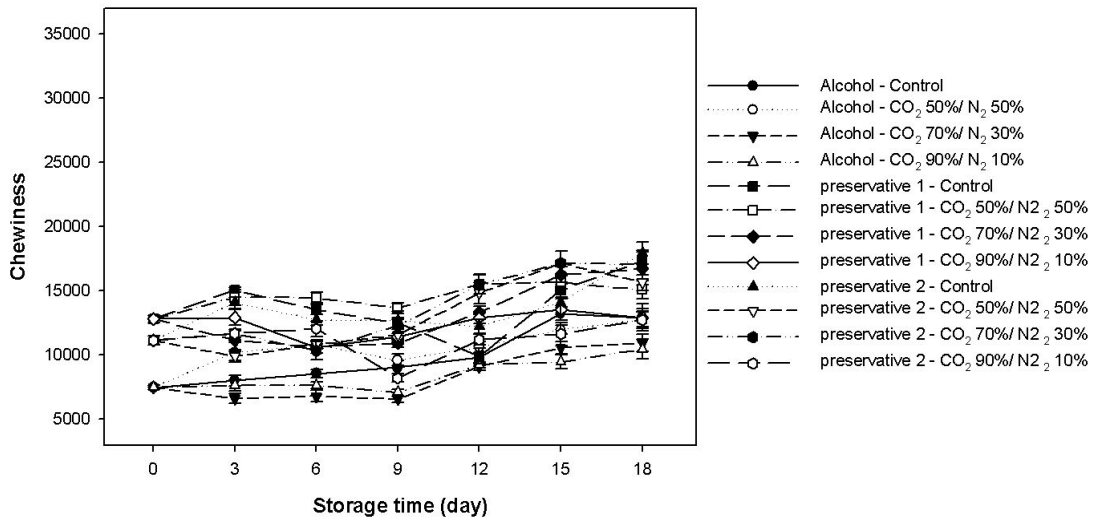
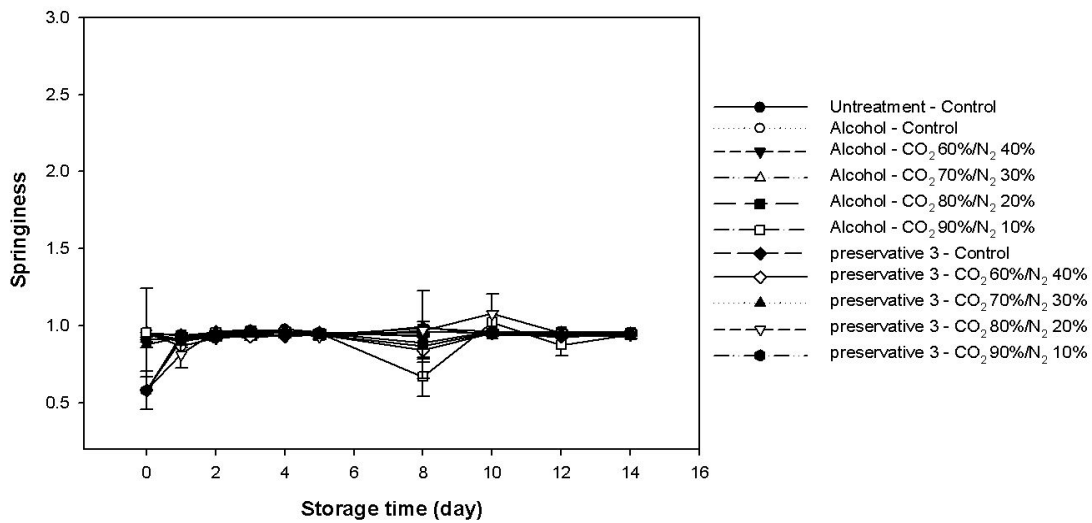
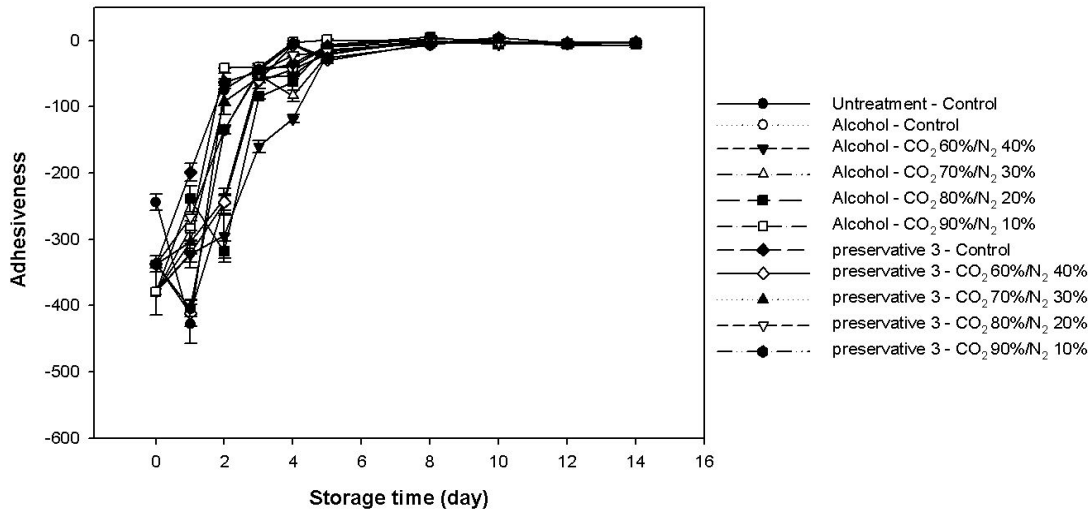
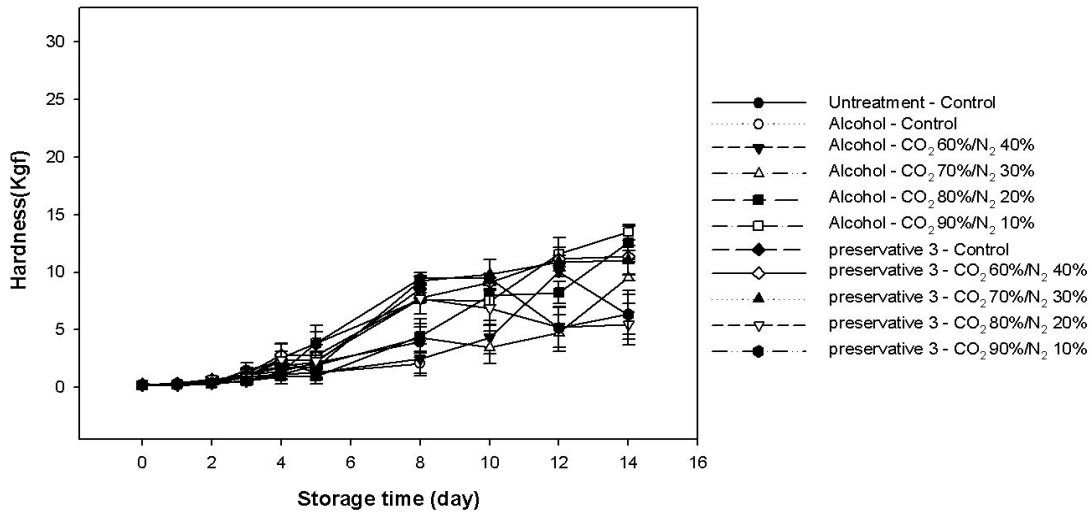


Fig. 2-15. Changes in texture of Tteokbokki during storage at 20°C after treatments of natural preservative 1, 2





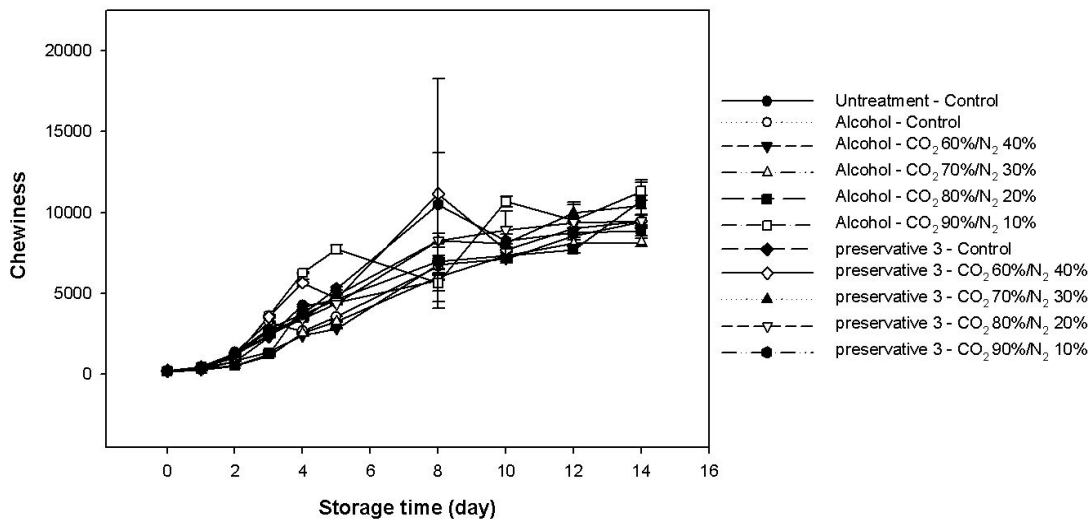
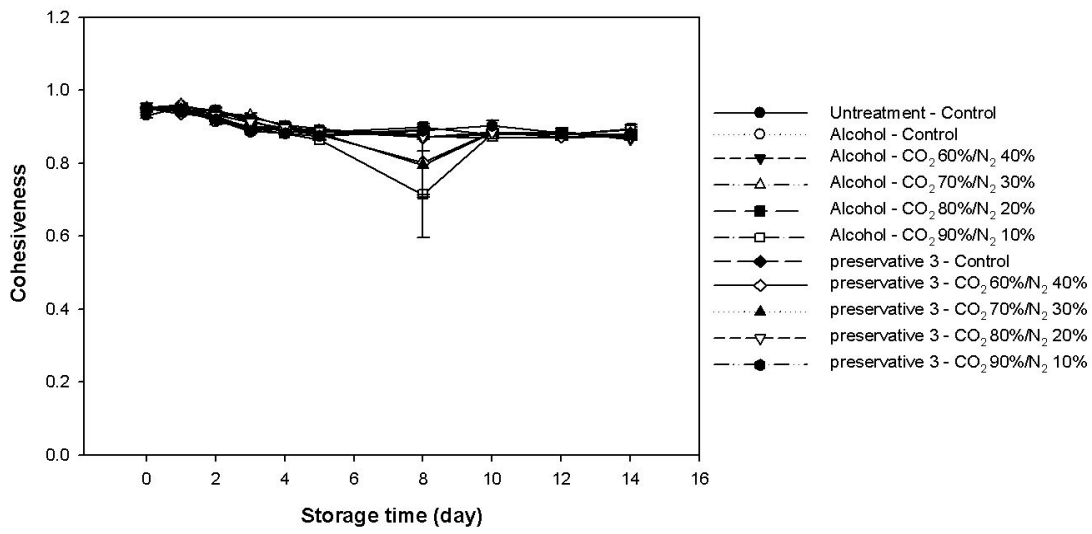
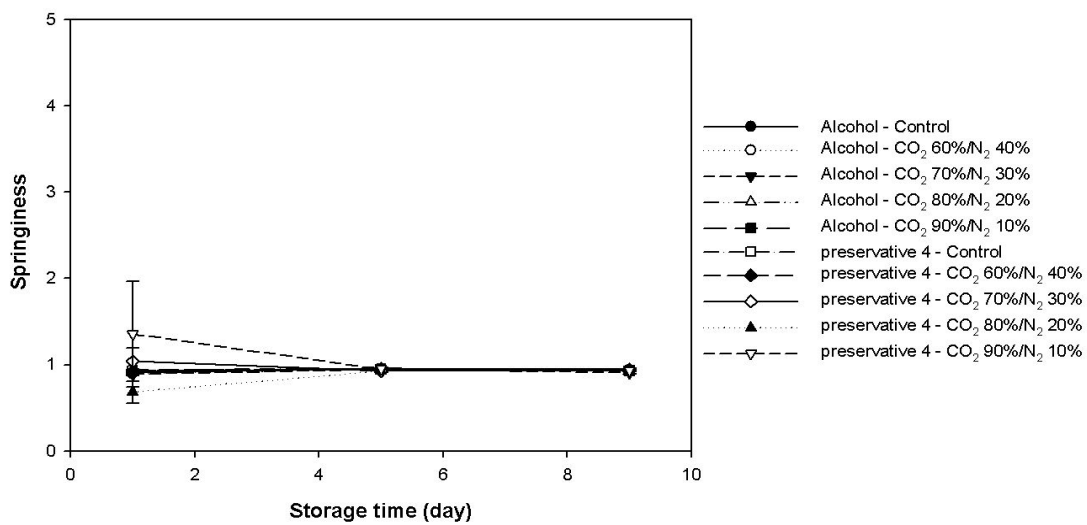
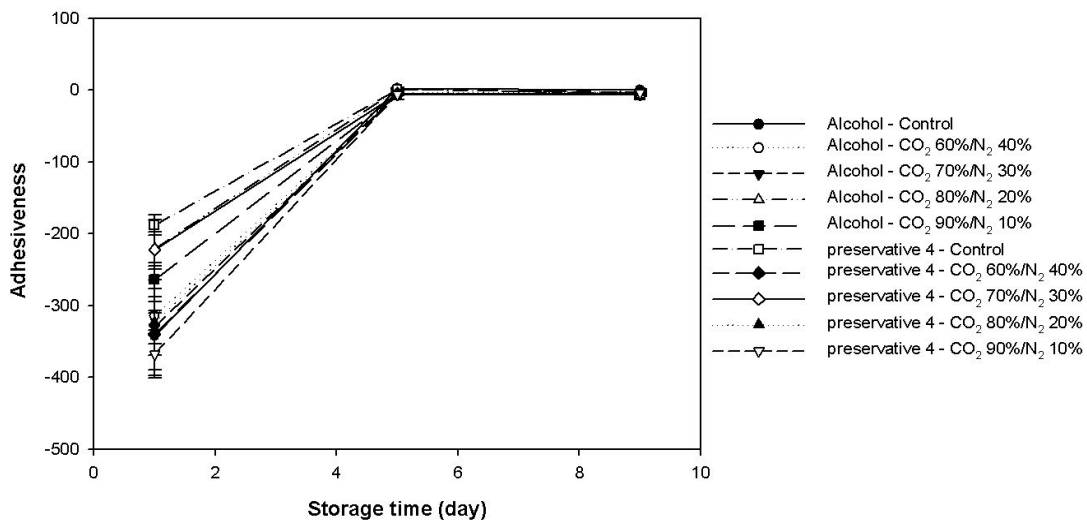
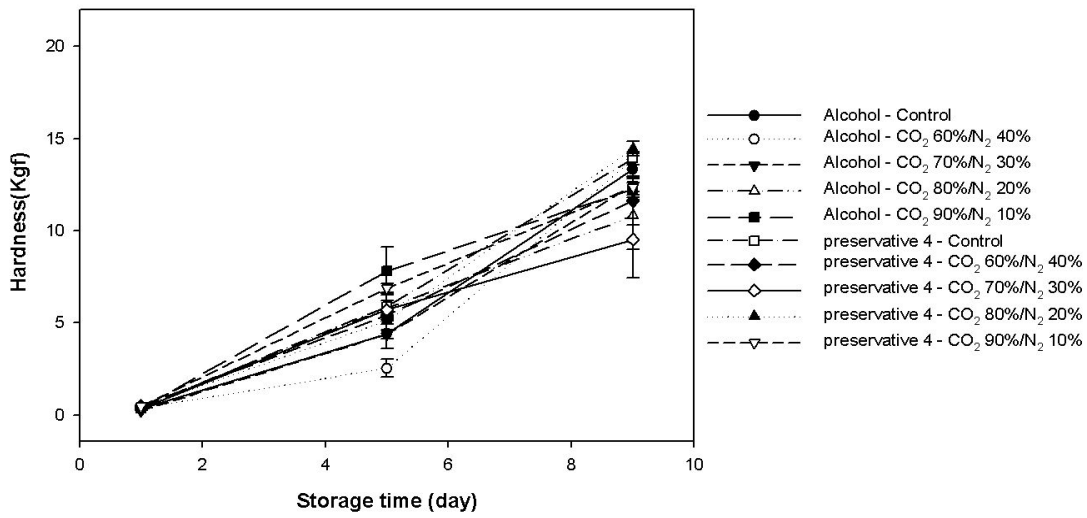


Fig. 2-16. Changes in texture of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 3



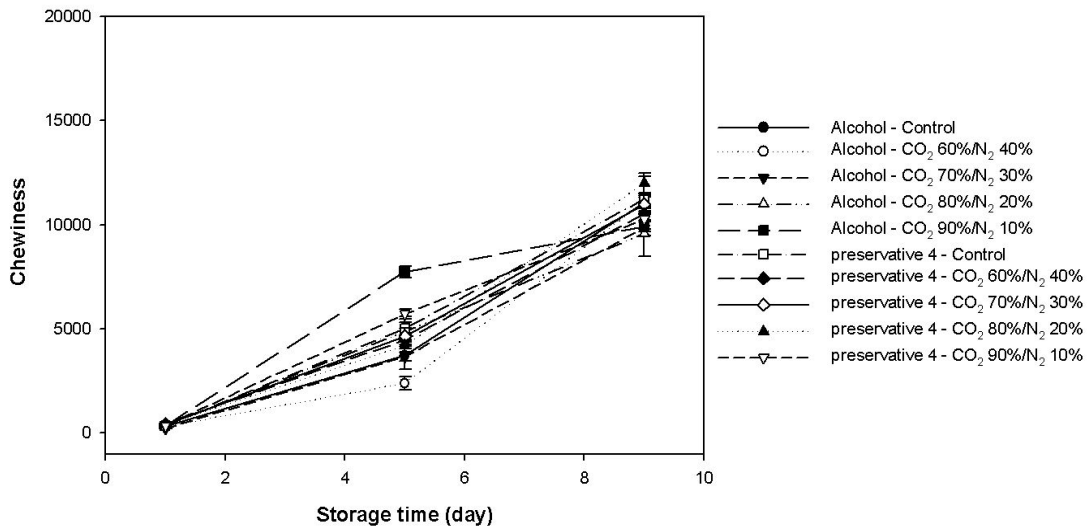
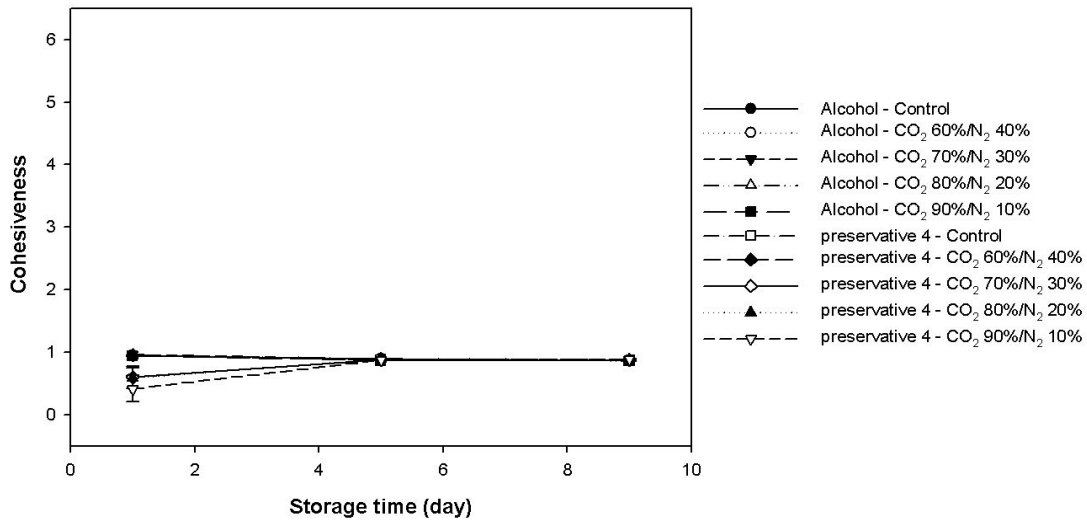


Fig. 2-17. Changes in texture of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 4

천연보존료 3을 첨가하여 제조한 떡의 TPA 측정결과는 Fig. 2-16과 같다. 경도는 저장기간에 따라 점차 증가하였으면 저장 5일 이후 급격히 증가하였다. 또한 CO<sub>2</sub>의 농도가 높을수록

경도측정값이 낮게 측정되어 CO<sub>2</sub>의 농도가 80% 이상일 때 다른 가스농도 처리구보다 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과로 CO<sub>2</sub>의 농도가 80% 이상일 때 미미하게 노화저해 효과가 있는 것으로 판단된다. 부착성은 저장초기 차이가 미미하게 나타났지만 저장기간이 지날수록 실험구간의 차이는 없어졌다. 탄성 응집성은 저장초기부터 저장후반까지 변화가 없었고 씹힘성은 저장일이 경과할수록 점차 증가되는 경향을 보였다. 주정처리 CO<sub>2</sub> 70% 포장구가 가장 낮은 값을 나타냈고 주정처리 CO<sub>2</sub> 90% 포장구가 가장 높은 값을 나타내었나 실험구간의 차이는 미미하였다.

천연보존료 4를 첨가하여 제조한 떡의 texture 변화는 Fig. 2-17과 같이 나타났다. 경도는 저장기간이 지날수록 점차 증가하였고 부착성은 저장초기 보존료처리 CO<sub>2</sub> 90% 포장구가 가장 낮게 측정되었으며 저장초기 대조구보다 보존료 처리구들이 더 낮게 측정되었으나 저장기간에 따라 그 차이가 점점 줄어들어 모든 처리구가 비슷한 값을 나타내었다. 대조구는 각 포장구마다 차이가 나타나지 않았지만 보존료 4를 처리한 포장구에서는 CO<sub>2</sub> 농도가 높을수록 부착성이 낮게 나타났다. 탄성 및 응집성은 저장 기간 동안 변화가 없었으며 씹힘성은 저장기간이 지날수록 점차 증가하였으나 저장 기간 동안 실험구들의 차이가 미미해져 저장 9일째는 각 처리구들의 차이가 미미한 것으로 나타났다. 위와 같은 실험결과로 기체포장이 노화억제에 긍정적 효과를 수반하지 못한다고 사료되며 Moon(2010)등의 호박설기떡의 노화를 억제시키는 데 변형기체포장이 긍정적 효과를 갖지 못하는 것으로 보인다는 연구결과와 일치하는 결과를 나타내었다.

#### D. 미생물 변화

전분식품에서는 이산화탄소와 질소를 적절한 비율로 함유한 기체조성이 주로 사용되어 미생물적 변패를 억제하는데 도움을 주고(1) 떡의 저장수명을 결정하는 중요 인자이며(2) 포장중의 고농도의 이산화탄소가 미생물의 성장을 억제하는 것은 주지의 사실로서 이러한 특성이 변형기체 포장에 의한 신선도 유지와 저장수명 연장에 광범위하게 이용되고 있다.(1,4,6) 특히 이산화탄소는 곰팡이와 Gram 음성 세균의 성장을 억제하는데 효과적인 것으로 알려져 있으며, 떡과 같이 곰팡이와 호기성 세균이 자라는 식품의 저장에 효과적으로 사용될 수 있다.(6)

천연보존료 1, 2를 사용한 1차 실험에서 총세균을 살펴보면 모든 실험구에서 7.01~8.78 log CFU/ml 측정되었으며 처리구 CO<sub>2</sub> 90%에서 7.01±0.01log CFU/ml로 미생물저해 효과를 보였다. 곰팡이·효모는 무처리구 CO<sub>2</sub> 50%, 보존료 1, 2는 CO<sub>2</sub> 90%에서 저해 효과를 보였다. 보존료 3을 사용하여 제조한 떡의 미생물 실험 결과 대조구는 저장 1일차부터 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었으나 주정침지 처리 및 변형기체 포장 처리구는 서서히 증가하는 것을 볼 수 있었다. 대조구의 효모, 곰팡이는 저장 8일째 8.08±0.07 log CFU/ml가 측정되었으나 주정처리 일반포장구는 5.08±0.07 log CFU/ml, 주정처리 변형기체포장구 4.0~4.7 log CFU/ml, 보존료 일반포장구 7.74±0.19 log CFU/ml, 보존료 변형기체포장구 5.8~6.3 log CFU/ml 로 측정되었다. 총세균은 저장 8일 대조구는 저장 8일째 대조구 8.99±0.04 log CFU/ml, 주정처리구 일반포장은 7.63±0.07 log CFU/ml, 주정처리 변형기체포장구는 7.1~7.5 log CFU/ml, 보존료 일반포장구 9.40~0.00 log CFU/ml, 보존료 변형기체포장구 5.8~6.3 log CFU/ml로 측정되었다. 위 결과로 보존료의 효과보다 주정처리가 더 효과적인 것으로 나타났으며, 변형기체포장이 미생물 억제에 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 3일 이후 모든 처리구에서 육안으로 미생물 오염이 관찰되어 상품가치가 없다고 사료된다. 위 결과 보존료 1, 2, 3의 효과가 없거나 필름

의 오염 및 낙하세균에 대한 오염으로 이러한 경향이 나타난 것으로 사료된다.

보존료 4를 사용한 실험에서 총세균은 대조구, 처리구 모두 CO<sub>2</sub> 농도가 높을수록 저해되는 것으로 나타났으며, 효모, 곰팡이 또한 같은 결과를 나타내었다. 효모, 곰팡이를 분리하여 살펴본 결과, 저장 5일부터 육안으로 효모가 관찰되었으나 곰팡이는 관찰되지 않았으며 저장 7일부터 관찰되었다. 곰팡이는 대조구보다 보존료 처리구한 포장구에서 저해되는 것으로 측정되었으나 효모는 대조구보다 보존료 처리구의 실험구에서 더 많이 측정되었으며 CO<sub>2</sub>의 농도가 높을수록 저해되었다. 이러한 실험결과로 보아 CO<sub>2</sub> 농도가 높을수록 총세균, 곰팡이, 효모 등의 미생물 제어에 효과적일 것으로 사료된다. Moon등의(2010) 60% CO<sub>2</sub>/40% N<sub>2</sub>, 100% CO<sub>2</sub>의 변형기체 포장조건은 곰팡이/효모의 성장을 완전히 억제하였고, 총균수로 본 호기성 세균은 다른 포장조건에 비하여 지연되고 늦은 성장을 보여주었다는 보고와 유사한 결과를 보였다. Jung등의(2001) PE 포장한 떡은 저장 6일 후부터 쌀떡과 콩떡 둘다 곰팡이가 생성되기 시작했으나 CMP포장한 쌀떡과 콩떡은 육안으로 보았을 때 12일 후까지 곰팡이가 발생하지 않았고 CO<sub>2</sub>는 박테리아와 곰팡이의 생육을 억제시키고 노화를 억제한다는 보고와 유사한 경향을 보였다.

따라서 천연보존료 4를 이용한 처리구와 CO<sub>2</sub> 농도 80%이상의 변형기체 포장구가 떡볶이의 미생물학적 변패 방지에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

Table 2-5. Changes in viable cell count of Tteokbokki during storage at 2 0°C after treatment of natural preservative 1, 2

	Viable cell count (log CFU/ml)						
	0	3	6	9	12	15	18
A	7.35±0.03	6.08±0.08	7.41±0.37	7.25±0.37	7.29±0.09	7.32±0.12	7.81±0.08
A-50 <sup>1)</sup>	7.35±0.03	6.23±0.19	6.99±0.05	6.99±0.05	7.08±0.05	7.05±0.02	7.88±0.04
A-70 <sup>2)</sup>	7.35±0.03	6.27±0.06	7.34±0.29	7.34±0.29	7.59±0.09	8.45±0.07	8.78±0.14
A-90 <sup>3)</sup>	7.35±0.03	5.75±0.13	7.2±0.04	7.32±0.04	7.08±0.08	6.65±0.02	7.01±0.01
1	5.92±0.06	6.90±0.08	7.31±0.10	7.31±0.10	7.06±0.06	6.97±0.04	7.65±0.08
1-50 <sup>4)</sup>	5.92±0.06	6.29±0.15	7.18±0.03	7.18±0.03	7.20±0.07	7.22±0.11	7.80±0.02
1-70 <sup>5)</sup>	5.92±0.06	6.44±0.10	6.57±0.08	6.57±0.08	6.80±0.08	6.62±0.05	7.27±0.02
1-90 <sup>6)</sup>	5.92±0.06	5.91±0.06	6.51±0.01	6.51±0.01	7.20±0.05	7.31±0.16	8.10±0.19
2	6.29±0.07	6.96±0.04	7.30±0.07	7.30±0.07	6.81±0.04	7.01±0.01	7.75±0.08
2-50 <sup>7)</sup>	6.29±0.07	6.84±0.14	7.22±0.02	7.22±0.02	7.50±0.10	7.65±0.02	8.20±0.16
2-70 <sup>8)</sup>	6.29±0.07	6.90±0.12	7.28±0.02	7.28±0.02	7.51±0.08	7.83±0.06	8.29±0.07
2-90 <sup>9)</sup>	6.29±0.07	6.91±0.00	7.06±0.01	7.06±0.01	7.12±0.04	7.22±0.12	7.96±0.05

- 1) A-50 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 50%/N<sub>2</sub> 50%  
 2) A-70 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 70%/N<sub>2</sub> 30%  
 3) A-90 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 90%/N<sub>2</sub> 10%  
 4) 1-50 : preservative 1 - CO<sub>2</sub> 50%/N<sub>2</sub> 50%  
 5) 1-70 : preservative 1 - CO<sub>2</sub> 70%/N<sub>2</sub> 30%  
 6) 1-90 : preservative 1 - CO<sub>2</sub> 90%/N<sub>2</sub> 10%  
 7) 2-50 : preservative 2 - CO<sub>2</sub> 50%/N<sub>2</sub> 50%  
 8) 2-70 : preservative 2 - CO<sub>2</sub> 70%/N<sub>2</sub> 30%  
 9) 2-90 : preservative 2 - CO<sub>2</sub> 90%/N<sub>2</sub> 10%

Table 2-6. Changes in mold/yeast count of Tteokbokki during storage at 2 0°C after treatment of natural preservative 1, 2

Mold/yeast count (log CFU/ml)							
	0	3	6	9	12	15	18
A	1.62±0.10	3.42±0.06	4.20±0.03	4.41±0.01	4.95±0.05	5.47±0.03	5.82±0.00
A-50	1.62±0.10	1.69±0.17	1.89±0.07	2.81±0.15	3.05±0.04	3.44±0.07	3.91±0.00
A-70	1.62±0.10	1.73±0.10	2.05±0.06	3.01±0.03	4.35±0.08	4.70±0.44	4.77±0.06
A-90	1.62±0.10	1.78±0.05	1.85±0.03	2.64±0.03	3.42±0.04	3.96±0.08	4.38±0.08
1	1.86±0.33	3.10±0.09	3.96±0.02	3.92±0.06	4.68±0.07	5.08±0.04	5.76±0.16
1-50	1.86±0.33	1.65±0.13	1.73±0.20	4.21±0.03	4.21±0.05	4.22±0.01	4.81±0.16
1-70	1.86±0.33	3.35±0.02	3.93±0.03	4.20±0.01	4.83±0.06	5.14±0.00	5.73±0.14
1-90	1.86±0.33	1.17±0.35	1.58±0.06	2.26±0.04	2.74±0.05	3.33±0.13	5.37±0.14
2	1.86±0.38	3.26±0.09	3.92±0.09	4.99±0.19	5.67±0.08	6.55±0.25	6.37±0.14
2-50	1.86±0.38	1.68±0.16	1.93±0.11	3.94±0.01	4.19±0.03	4.50±0.08	5.06±0.09
2-70	1.86±0.38	2.29±0.06	2.65±0.01	2.91±0.02	3.84±0.05	4.31±0.11	5.09±0.15
2-90	1.86±0.38	1.56±0.26	1.45±0.08	2.19±0.06	3.81±0.05	4.66±0.09	5.00±0.09

Table 2-7. Changes in viable cell count of Tteokbokki during storage at 2 0°C after treatment of natural preservative 3

Viable cell count (log CFU/ml)											
	0	1	2	3	4	5	6	8	10	12	14
con <sup>10)</sup>	3.10±0.11	4.45±0.04	6.47±0.05	8.55±0.04	8.58±0.12	8.78±0.07	8.82±0.06	8.99±0.04			
A <sup>11)</sup>	3.09±0.08	4.14±0.03	5.13±0.03	6.73±0.02	6.77±0.07	7.26±0.09	7.42±0.08	7.63±0.08			
A-60 <sup>12)</sup>	3.09±0.08	3.92±0.20	4.95±0.14	6.73±0.02	6.97±0.03	6.99±0.06	7.09±0.05	7.16±0.06	7.29±0.05	7.41±0.14	7.60±0.09
A-70 <sup>13)</sup>	3.09±0.08	3.80±0.14	4.78±0.14	6.56±0.03	6.80±0.00	7.01±0.00	7.26±0.03	7.57±0.06	7.77±0.12	7.46±0.20	7.69±0.03
A-80 <sup>14)</sup>	3.09±0.08	3.09±0.08	6.59±0.13	4.63±0.09	6.31±0.07	6.57±0.09	7.06±0.04	7.24±0.05	7.95±0.00	7.23±0.08	7.60±0.06
A-90 <sup>15)</sup>	3.09±0.08	3.87±0.12	5.00±0.05	6.61±0.03	6.67±0.10	6.88±0.06	6.96±0.08	7.10±0.02	7.25±0.15	7.40±0.07	7.45±0.04
3	3.30±0.08	4.15±0.04	7.21±0.01	7.38±0.16	8.28±0.09	9.19±0.12	9.22±0.01	9.40±0.00			
3-60 <sup>16)</sup>	3.30±0.15	4.13±0.02	6.22±0.04	7.36±0.01	8.12±0.05	8.47±0.06	8.49±0.05	8.56±0.04	8.58±0.08	8.70±0.03	8.76±0.04
3-70 <sup>17)</sup>	3.30±0.15	4.10±0.02	6.28±0.14	7.33±0.04	8.26±0.00	8.44±0.03	8.36±0.03	8.37±0.04	8.28±0.07	8.38±0.09	8.43±0.08
3-80 <sup>18)</sup>	3.30±0.15	3.91±0.07	6.17±0.08	7.17±0.00	8.35±0.00	8.50±0.01	8.54±0.03	8.56±0.02	8.46±0.03	8.53±0.04	8.60±0.04
3-90 <sup>19)</sup>	3.30±0.15	4.18±0.06	6.25±0.03	7.63±0.00	7.75±0.06	8.54±0.03	8.59±0.05	8.67±0.03	8.57±0.03	8.69±0.09	8.60±0.06

10) con : untreated - control

11) A : Alcohol - control

12) A-60 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 60%/N<sub>2</sub> 40%

13) A-70 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 70%/N<sub>2</sub> 30%

14) A-80 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 80%/N<sub>2</sub> 20%

15) A-90 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 90%/N<sub>2</sub> 10%

16) 3-60 : preservative 3 - CO<sub>2</sub> 60%/N<sub>2</sub> 40%

17) 3-70 : preservative 3 - CO<sub>2</sub> 70%/N<sub>2</sub> 30%

18) 3-80 : preservative 3 - CO<sub>2</sub> 80%/N<sub>2</sub> 20%

19) 3-90 : preservative 3 - CO<sub>2</sub> 90%/N<sub>2</sub> 10%

Table 2-8. Changes in mold/yeast count of Tteokbokki during storage at 2 0°C after treatment of natural preservative 3

Mold/yeast count (log CFU/ml)											
	0	1	2	3	4	5	6	8	10	12	14
con	0.99±0.09	4.19±0.03	5.08±0.02	6.28±0.08	7.99±0.02	7.47±0.03	7.89±0.06	8.08±0.07			
A	0.71±0.07	1.70±0.15	3.08±0.05	3.32±0.06	1.33±0.19	4.56±0.06	4.89±0.02	5.08±0.07			
A-60	0.71±0.07	2.11±0.09	2.95±0.03	2.99±0.01	3.41±0.06	3.82±0.07	4.07±0.04	4.47±0.05	4.98±0.12	5.16±0.06	5.36±0.04
A-70	0.71±0.07	5.03±0.02	2.17±0.04	2.70±0.47	3.60±0.09	3.83±0.05	4.05±0.08	4.26±0.26	4.37±0.15	4.50±0.07	4.76±0.06
A-80	0.71±0.07	0.82±0.05	1.22±0.05	1.86±0.05	3.87±0.17	4.19±0.02	4.60±0.10	4.82±0.30	5.20±0.04	5.39±0.01	5.49±0.06
A-90	0.71±0.07	0.52±0.02	1.13±0.04	1.56±0.02	3.69±0.13	3.79±0.05	3.90±0.03	4.02±0.05	5.04±0.04	5.22±0.05	5.32±0.04
3	1.45±0.94	4.27±0.02	5.05±0.02	6.16±0.04	7.69±0.07	7.59±0.05	7.62±0.05	7.71±0.19			
3-60	1.45±0.94	2.56±0.12	4.41±0.01	4.86±0.05	5.93±0.06	5.76±0.06	5.80±0.06	5.82±0.60	6.59±0.25	6.75±0.05	6.83±0.01
3-70	1.45±0.94	2.38±0.07	5.07±0.02	4.97±0.00	5.57±0.10	5.68±0.04	5.80±0.06	0.94±0.12	6.43±0.00	6.56±0.01	6.71±0.02
3-80	1.45±0.94	1.98±0.11	3.88±0.12	4.74±0.08	5.19±0.19	5.58±0.09	6.01±0.06	6.35±0.01	6.65±0.22	6.89±0.02	7.02±0.02
3-90	1.45±0.94	2.83±0.05	4.06±0.03	4.59±0.09	5.11±0.06	5.49±0.05	5.89±0.02	6.02±0.02	6.41±0.06	6.68±0.01	6.95±0.06

Table 2-9. Changes in viable cell count of Tteokbokki during storage at 2 0°C after treatment of natural preservative 4

Viable cell count (log CFU/ml)										
	0	1	2	3	5	6	7	8	9	
A	3.10±0.11	4.46±0.04	6.47±0.05	5.92±0.05	6.66±0.01	7.52±0.04	7.58±0.02	7.70±0.10	7.86±0.08	
A-60 <sup>20)</sup>	3.10±0.11	4.14±0.04	5.13±0.02	5.75±0.04	6.86±0.17	7.68±0.20	7.87±0.01	8.11±0.06	8.18±0.02	
A-70 <sup>21)</sup>	3.10±0.11	3.92±0.20	4.95±0.14	5.93±0.07	6.22±0.12	7.66±0.19	7.81±0.15	7.83±0.16	8.29±0.04	
A-80 <sup>22)</sup>	3.10±0.11	3.80±0.14	4.87±0.14	6.15±0.05	5.97±0.12	7.68±0.04	7.82±0.28	8.09±0.12	8.27±0.07	
A-90 <sup>23)</sup>	3.10±0.11	3.60±0.13	4.63±0.09	5.79±0.02	5.66±0.08	7.49±0.09	7.75±0.12	8.12±0.15	8.23±0.07	
4	3.09±0.09	3.87±0.11	5.00±0.05	5.59±0.08	6.70±0.09	7.46±0.05	7.57±0.01	7.79±0.02	7.81±0.16	
4-60 <sup>24)</sup>	3.09±0.09	4.15±0.03	7.21±0.01	5.54±0.06	7.49±0.08	7.55±0.10	7.60±0.04	8.13±0.07	8.26±0.08	
4-70 <sup>25)</sup>	3.09±0.09	4.13±0.02	6.22±0.04	5.51±0.10	6.59±0.02	7.27±0.03	7.53±0.03	7.96±0.07	8.19±0.06	
4-80 <sup>26)</sup>	3.09±0.09	4.09±0.03	6.28±0.13	5.42±0.12	6.29±0.12	7.37±0.08	7.66±0.08	7.82±0.16	8.47±0.06	
4-90 <sup>27)</sup>	3.09±0.09	3.83±0.00	6.17±0.08	5.24±0.22	5.56±0.03	7.25±0.14	7.50±0.04	7.80±0.07	7.99±0.12	

20) A-60 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 60%/N<sub>2</sub> 40%

21) A-70 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 70%/N<sub>2</sub> 30%

22) A-80 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 80%/N<sub>2</sub> 20%

23) A-90 : Alcohol - CO<sub>2</sub> 90%/N<sub>2</sub> 10%

24) 4-60 : preservative 4 - CO<sub>2</sub> 60%/N<sub>2</sub> 10%

25) 4-70 : preservative 4 - CO<sub>2</sub> 70%/N<sub>2</sub> 10%

26) 4-80 : preservative 4 - CO<sub>2</sub> 80%/N<sub>2</sub> 10%

27) 4-90 : preservative 4 - CO<sub>2</sub> 90%/N<sub>2</sub> 10%

Table 2-10. Changes in yeast count of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 4

<b>Yeast count (log CFU/ml)</b>									
	0	1	2	3	5	6	7	8	9
A	3.13±0.07	3.49±0.08	4.54±0.06	4.62±0.14	5.88±0.24	6.14±0.04	7.29±0.05	7.66±0.15	8.20±0.01
A-60	3.13±0.07	3.69±0.12	4.54±0.05	4.70±0.22	5.88±0.05	6.01±0.12	7.39±0.10	8.27±0.15	8.49±0.03
A-70	3.13±0.07	3.54±0.06	3.92±0.19	4.69±0.23	5.24±0.05	5.99±0.08	7.38±0.08	8.22±0.23	8.31±0.20
A-80	3.13±0.07	3.50±0.04	3.57±0.05	4.67±0.22	5.68±0.09	6.07±0.13	7.37±0.11	7.91±0.03	8.20±0.01
A-90	3.13±0.07	3.47±0.07	3.22±0.11	4.66±0.22	5.56±0.13	5.94±0.21	7.27±0.02	7.72±0.05	7.97±0.02
4	3.58±0.13	4.15±0.11	4.52±0.12	4.57±0.12	6.24±0.11	6.34±0.02	7.16±0.14	8.04±0.08	8.48±0.12
4-60	3.58±0.13	4.06±0.18	4.60±0.11	4.51±0.27	5.51±0.12	6.05±0.06	7.61±0.09	8.23±0.05	8.55±0.08
4-70	3.58±0.13	4.04±0.13	4.54±0.09	4.61±0.26	5.37±0.00	5.92±0.08	7.60±0.12	8.08±0.13	8.51±0.05
4-80	3.58±0.13	3.87±0.02	4.27±0.10	4.60±0.12	4.68±0.13	5.78±0.13	7.47±0.00	7.90±0.16	8.49±0.06
4-90	3.58±0.13	3.65±0.04	3.78±0.16	4.52±0.06	4.45±0.06	5.79±0.06	7.40±0.06	7.68±0.10	8.17±0.21

Table 2-11. Changes in mold count of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 4

<b>Mold count (log CFU/ml)</b>									
	0	1	2	3	5	6	7	8	9
A	2.34±0.04	2.74±0.12	3.40±0.19	4.23±0.02	5.04±0.15	5.36±0.25	5.56±0.13	6.08±0.29	7.03±0.12
A-60	2.34±0.04	2.61±0.06	2.80±0.10	4.64±0.13	5.61±0.17	5.84±0.02	5.79±0.02	6.36±0.19	7.12±0.29
A-70	2.34±0.04	2.38±0.04	2.48±0.03	4.58±0.11	5.24±0.02	5.12±0.03	5.71±0.17	6.46±0.04	7.36±0.03
A-80	2.34±0.04	2.16±0.21	2.21±0.07	4.50±0.04	4.82±0.15	4.96±0.03	5.69±0.30	6.38±0.23	7.17±0.09
A-90	2.34±0.04	1.91±0.07	1.97±0.20	4.18±0.00	4.80±0.16	4.88±0.35	5.59±0.19	5.76±0.19	7.02±0.13
4	2.19±0.03	2.50±0.11	2.64±0.10	4.07±0.02	5.33±0.22	5.34±0.12	5.72±0.17	6.38±0.01	7.31±0.03
4-60	2.19±0.03	2.41±0.10	2.87±0.07	4.21±0.05	5.12±0.24	5.11±0.09	5.95±0.33	6.77±0.25	7.42±0.05
4-70	2.19±0.03	2.34±0.25	2.71±0.07	3.78±0.11	4.89±0.14	4.93±0.08	5.78±0.27	6.59±0.27	6.99±0.08
4-80	2.19±0.03	2.23±0.00	2.34±0.24	3.59±0.11	4.65±0.14	4.73±0.08	5.86±0.22	6.52±0.07	6.79±0.14
4-90	2.19±0.03	2.25±0.10	2.24±0.11	3.47±0.08	4.58±0.05	4.62±0.16	5.66±0.23	6.32±0.09	6.44±0.01



Fig. 2-18. Changes in shape of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 1, 2

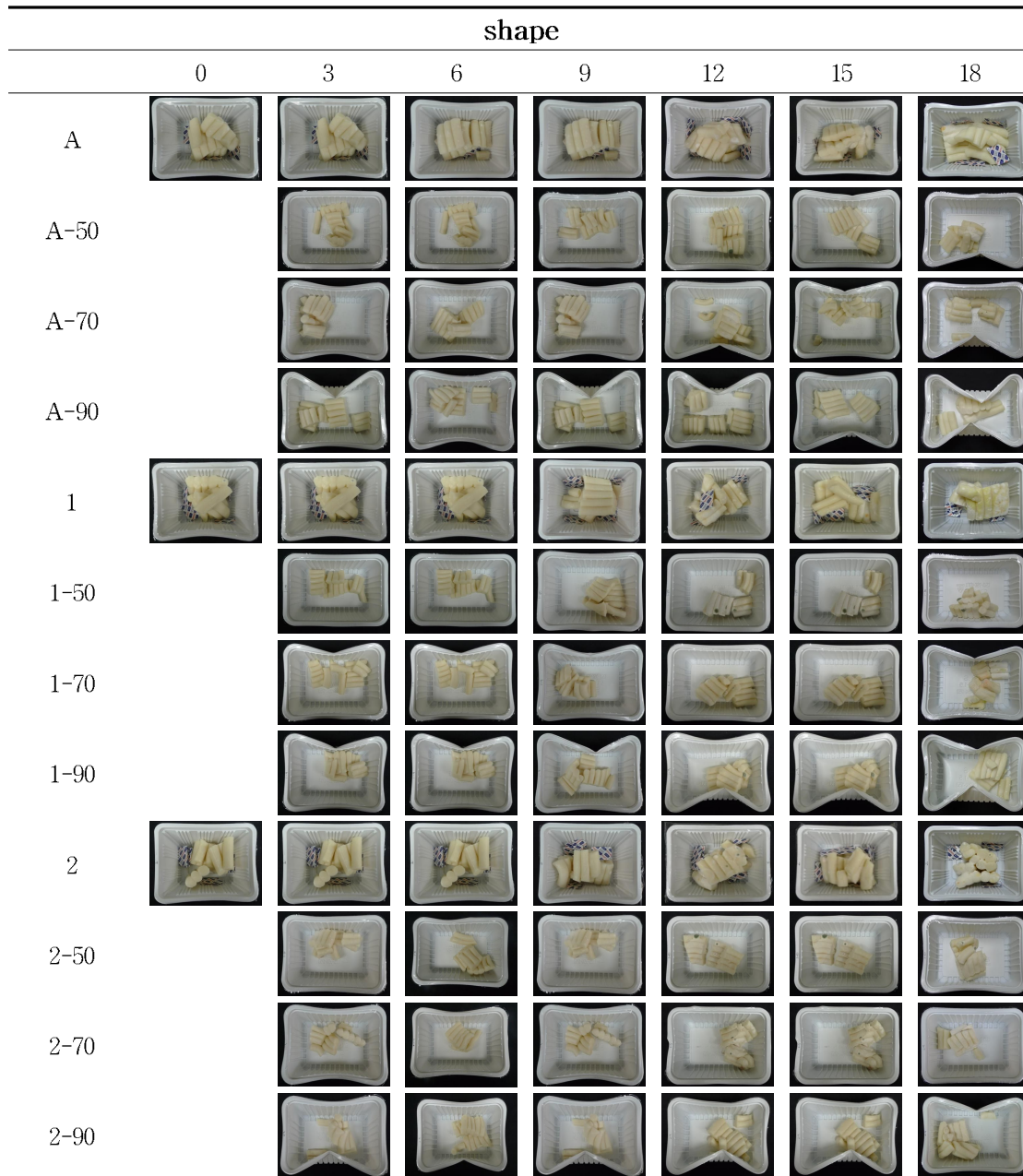


Fig. 2-19. Changes in shape of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 3

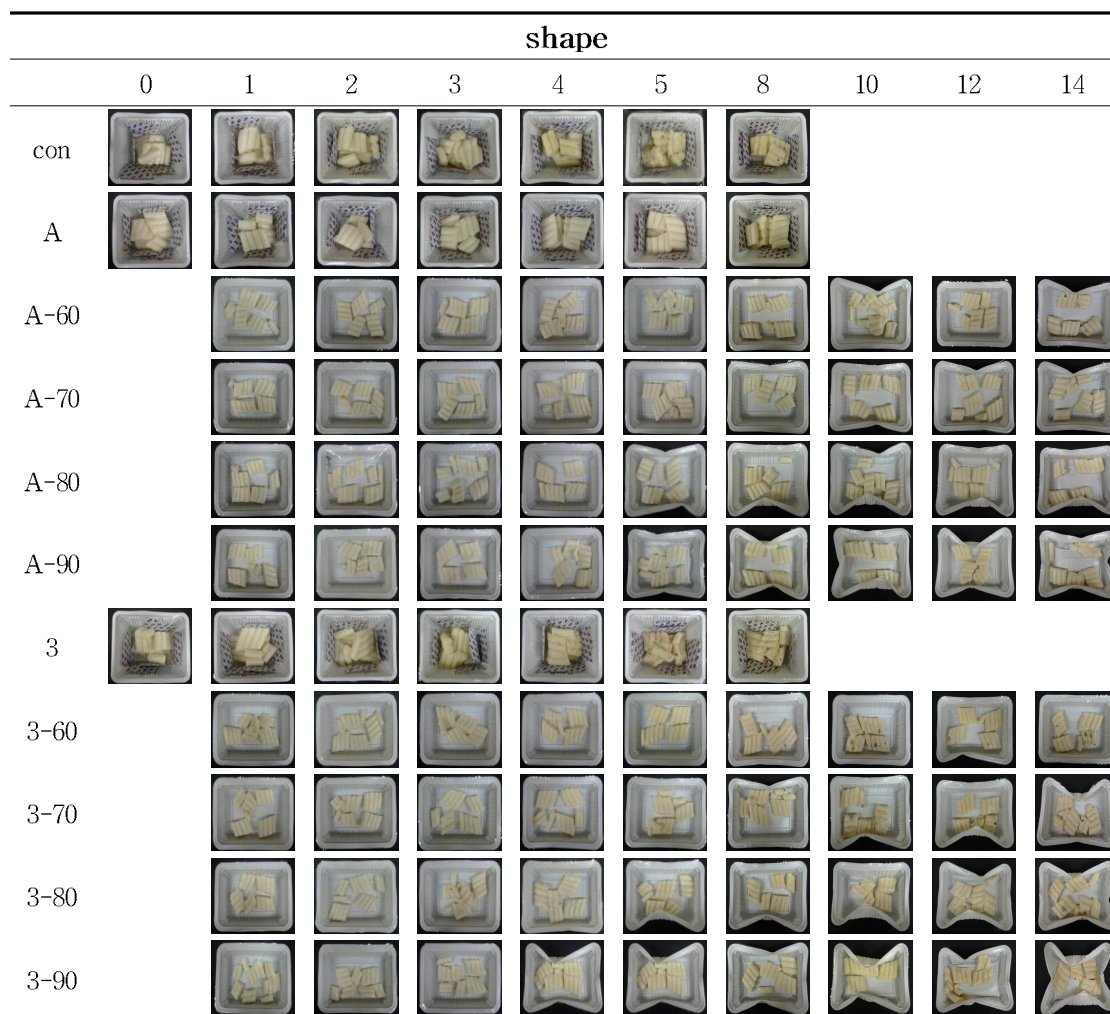
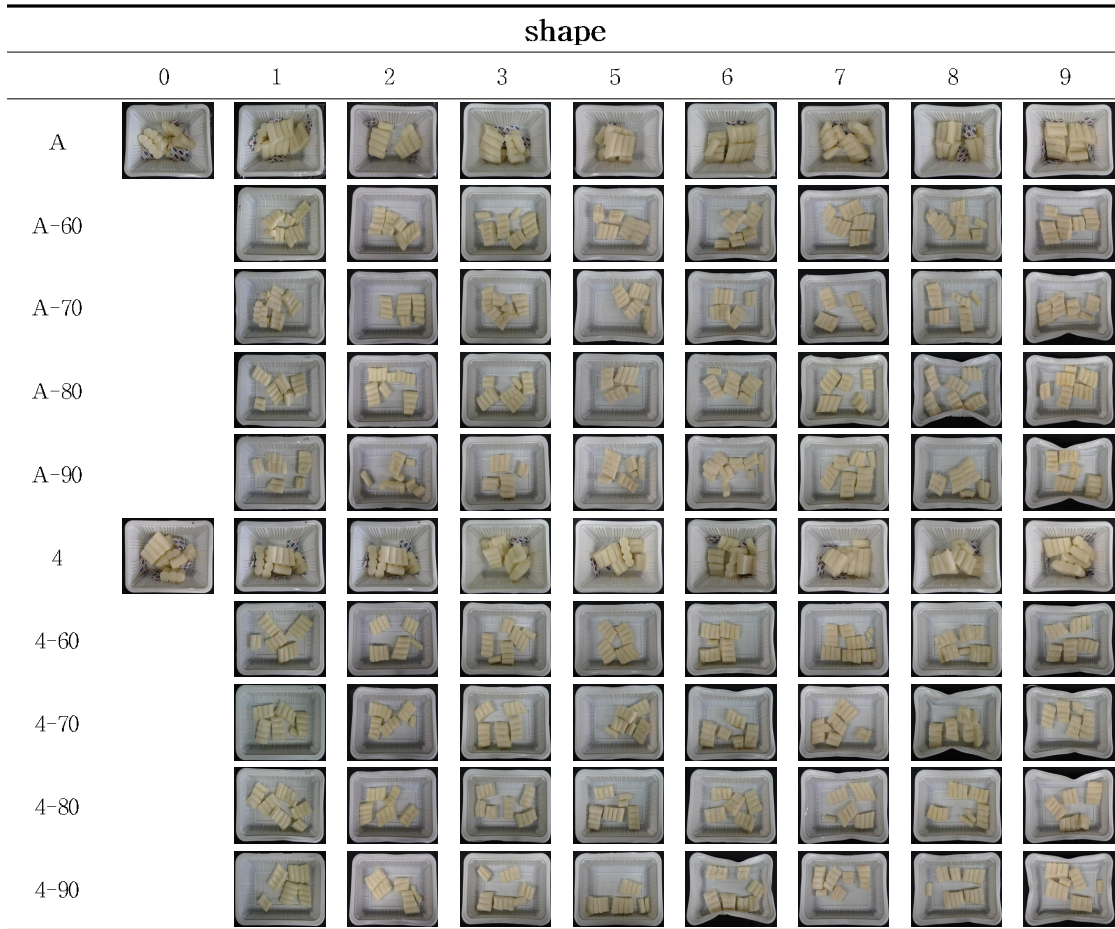


Fig. 2-20. Changes in shape of Tteokbokki during storage at 20°C after treatment of natural preservative 4



라. 기존 주정 처리 방법과 항진균 소재 사용에 따른 경제적 타당성 조사

기존 떡볶이 제조 공정 마지막 단계에서 분무 처리하는 주정의 사용량은 떡량의 약 1% 소요되고 있다. 주정의 가격은 1,540원/kg 인 것에 비해서, 본 과제에서 개발한 항진균 보존료 (복합허브추출물F1)는 80,000원/kg 이지만 적용 농도가 0.4% 이하이므로 주정보다 저렴한 경제성이 높은 보존료이다(Table 2-12).

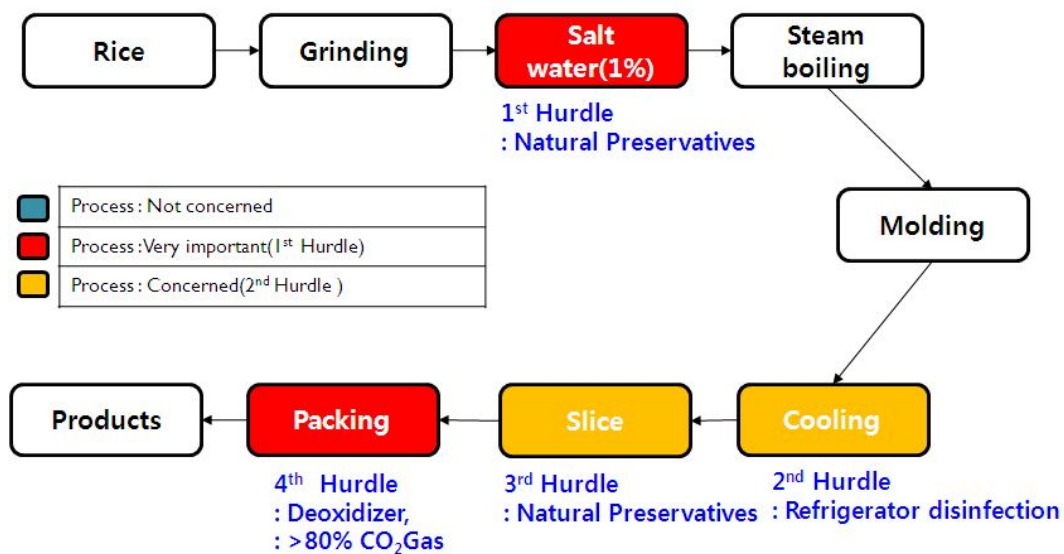
Table 2-12. 항진균 보존료와 주정의 단가 및 원료단가 상승액 비교

보존료 종류	단가(원)	분무액 적용 농도	분무량	원료 단가 상승(원)/떡1kg
주정	1,540/kg	100%	1%	₩15.4/kg
항진균 보존료	80,000/kg	0.4%	1%	₩3.2/kg

마. 떡 제조 시 CCP 관리 매뉴얼화

기존 떡볶이 제조 공정에서는 주정처리, 냉각, 탈산소제를 처리로 CCP(Critical Control Point)관리가 이루어지지만, 천연보존료를 적용하는 떡 제조공정은 아래 그림에서와 같이 CCP가 관리된다. 먼저 1차 허들에서 분쇄된 쌀가루에 천연보존료 처리는 선택적으로 처리할 수 있으며 이 포인트에서 천연보존료 처리는 떡 관능에 영향을 주지 않는 범위에서 0.2%에서 처리함이 적합하다. 그리고, 2차 허들에서는 기존 공정에서와 같이 냉각이 이루어지며, 3차 허들에서 0.4% 천연보존료 액을 알콜 대신 분사한 후 걸물을 충분히 말려준다. 포장공정에서는 80% 이상의 CO2 gas와 탈산소제를 주입하며, NYPE 포장필름을 사용함으로써 떡의 유통기한은 기존 제조공정보다 늘릴 수 있다.

▪ 떡류 CCP 분석: 각 point별로 관리 조건 설정(1st-4th)



## 제 4 절: 제 2 협동과제

### 천연물소재의 항진균활성 DB구축 및 안정성평가

#### 1. 연구 개발 목표

- ▷ 천연물 추출물 라이브러리 구축 및 항진균 소재 선별
- ▷ 선정 항진균 소재 항균스펙트럼 확보
- ▷ 개발제품의 안정성 평가 및 제품개발 지원

#### 2. 최종 연구결과 요약

▶ 다양한 천연물 추출물의 DB 구축 : 확보 천연물 추출물 874종 및 신규 제조 천연물 추출물 680종에 시료 준비 (다양한 용매 추출물)하였으며, 전체 1550 여종 천연물에 대한 유기용매 추출물을 조제하고 이에 대한 분획물을 얻음.(이 경우, 유기용매 추출에는 주로 methanol, ethanol을 사용하였으며, 분획물로는 hexane, ethylacetate, chloroform, butanol, water fraction으로 구분함)

▶ 구축된 천연물 DB로부터 *Aspergillus niger* 제어 활성 검색 : 항균활성이 인정되는 천연물중 경제성과 상업성이 인정되는 시료를 선택하여 항균 활성을 검정하였으며, 전체 1550 여종 시료중 경제성, 안전성, 신규성, 상업성을 기준으로 기린초, 참나물, 황금, 뽕나무, 단삼, 통후추의 6종을 최종 선별함.

▶ 선정 천연물 중 기린초, 참나물, 황금에 대해서는 순차적 유기용매 분획 및 활성물질 정제를 통해 항진균 활성을 검증하였으며, 부가적인 항산화 활성, 인간 적혈구에 대한 용혈 활성 등을 평가하여 실제적 적용 가능성을 확인함.

▶ 제 1세부과제에서 개발된 제품인 복합허브추출물 F1의 경우, 우수한 항세균 및 항진균 활성이 검증되었으며, 이들은 항산화 및 발암 억제 활성도 부분적으로 확인됨.

▶ 복합허브추출물 F1의 항균 활성은 산처리, 열처리, 멸균처리, 소화효소 처리에서도 안정하게 유지되며, 단백질 분해효소(pepsin, chymotrypsin, trypsin)에 대한 저해활성을 나타내지 않았으며, 전분계 분해효소(endo  $\alpha$ -amylase, exo  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase)에 대해서는 500ug/ml 농도에서 약한 저해활성이 있었으므로, 적용농도 및 섭취량을 고려하였을 때 정상인의 소화효소 저해는 매우 미미함

▶ 복합허브추출물 F1의 마우스 단회 독성 평가에서, 4,000 mg/kg 농도까지 독성을 나타내지 않으므로, 등급1무독성 그룹(practically non-toxic)으로 구분되었다. 따라서 복합허브추출물 F1의 실제적인 사용은 안전상 문제를 야기하지 않을 것으로 판단된다.

### 3. 연구 수행방법 및 결과

#### 가. 항진균소재 선정

##### (1) 기존 구축된 874 종의 천연물 추출물을 대상으로 한 항진균 활성 검토

세부사업팀에서 이미 확보한 874종 천연물(약용, 식용, 한약제의 천연식물)추출물을 대상으로 항진균활성을 평가하였으며, 평가는 disc diffusion assay 및 broth microdilution method로 측정하였다. 그 결과 하기의 7종을 선별하였으며(Table 3-1), 실험에 사용된 874종의 시료 리스트는 기존의 publish된 논문에 표시되어 있다(Table 3-2).

Table 3-1. 1차 선정된 항진균 활성 천연물 시료

일련번호	식물명	생약명	추출부위	edible part	추출법	활성
1	<i>Rubus parvifolius</i>	명석딸기	전초	fruit	EtOAc	3+
2	<i>Hosta longipes</i>	비비추	전초	shoot	MeOH	3+
3	<i>Oenothera odorata</i>	달맞이꽃	전초	seed	MeOH	3+
4	<i>Allium thunbergii</i>	산부추	전초	leaf	MeOH	3+
5	<i>Aralia continentalis</i>	독활 씨	seed	shoot	MeOH	2+
6	<i>Aster ageratoides</i>	까실쑥부쟁이	전초	shoot	MeOH	2+
7	<i>Nepeta cataria</i>	개박하	전초	-	MeOH	3+

그러나 1차 선정된 항진균 활성 천연물 중 명석딸기, 비비추, 달맞이꽃 전초, 산부추, 독활 씨, 까실쑥부쟁이, 개박하 추출물 7종은 주관연구기관(제1세부)에서 경제성 평가 및 상업적 활용성 검토 결과 상업화에 문제가 있다고 판단하였다(활성 추출물 및 분획물을 주관연구기관에서 활성 재검정 및 경제성 평가함).

Table 3-2 기존 확보된 874종의 시료리스트 참고문헌(본 연구팀에서 발표한 논문)

Ryu et al., 2010. Antimicrobial and hemolytic activity of oriental medicinal herbs. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 38, 190-197.
Ryu et al., 2010. Evaluation of in-vitro anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. J. Life Sci. 20, 922-928.
Sohn et al., 2006. Screening of anti-acne activity of natural products against <i>Propionibacterium acnes</i> . Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 34, 265-272.
Kim et al., 2005. Screening of antibacterial agent against <i>Streptococcus mutans</i> from natural and medicinal plants. J. Life Sci. 15, 715-725.
Sohn et al., 2005. Screening of thrombin inhibitors from medicinal and wild plants (II) Kor. J. Pharmacogn. 36, 263-272.
Kwon et al., 2004. Inhibitory activities of edible and medicinal herbs against human thrombin. J. Life. Sci. 14, 509-513.
Sohn et al., 2004. Screening of thrombin inhibitors from medicinal and wild plants. Kor. J. Pharmacogn. 35, 52-61.
Sohn et al., 2003. Screening of anti-candidosis agent from medicinal and wild plants. J. Life Sci. 13, 604-617.



(2) 신규 조제된 680 종 시료 천연물 추출물로부터 항 *Aspergillus niger* 활성 평가 실험에 사용한 시료는 2010년 - 2011년 신규로 조제한 천연물 추출물 및 이의 유기용매 분획물로 리스트는 Table 3-3과 같다.

Table 3-3. 신규 조제된 천연물 리스트 (예시: 73종으로부터 분획물 680종 조제)

Scientific name	Korean name
<i>Acer ginnala.</i>	sinnamu
<i>Ailanthus altissima (Mill.) Swingle</i>	sobakpi
<i>Ajuga multiflora BUNGE</i>	jogaenamul
<i>Allium fistulosum L</i>	pa
<i>Alnus japonica (Thunberg) Steudel</i>	orinamu
<i>Aloe Perryi</i>	aloe
<i>Anemarrhena asphodeloides Bunge</i>	jimo
<i>Angelica decursiva (Miq.) Franch. et Savat.</i>	badinamul
<i>Angelica gigas Nakai</i>	danggwi
<i>Areca catechu L.</i>	binrangja
<i>Atractylis chinensis</i>	changchul
<i>Atractylodes ovata (Thunb.) DC.</i>	bakchul
<i>Broussonetia kazinoki Sieb.</i>	daknamu
<i>Buddleja officinalis Maximowicz</i>	milmonghwa
<i>Canavalia gladiata (Jacq.) DC.</i>	jakdukong
<i>Cimicifuga heracleifolia Kom.</i>	seungma
<i>Cirsium japonicum var. maackii (Maxim.) Matsum.</i>	eonggeongkwi
<i>Citrus unshiu S.Marcov</i>	cheongpi
<i>Coix lacryma-jobi L. var. mayuen Stapf</i>	yulmu
<i>Cuscuta japonica Choisy</i>	saesam
<i>Dioscorea batatus Decne.</i>	ma
<i>Dioscorea nipponica Makino</i>	buchaema
<i>Dioscorea quinqueloba Thunberg</i>	danpungma
<i>Dioscorea tokoro Makino</i>	bihae
<i>Epimedium koreanum Nakai</i>	samjiguyeopcho
<i>Eugenia aromaticum</i>	jeonghyang
<i>Forsythiae Fructus</i>	yeongyo
<i>Geranium thunbergii Siebold &amp; Zucc.</i>	hyeonjicho
<i>Ginkgo biloba L.</i>	eunhaeng
<i>Glycine max</i>	kong
<i>Ipomoea batatas (L.) Lam.</i>	goguma
<i>Ligularia fischeri (Ledeb.) Turcz.</i>	gomchwi
<i>Liriope platyphylla Wang et Tang</i>	maekmundong
<i>Lonicera japonica Thunberg</i>	indong
<i>Lycium chinense MILL</i>	gugija
<i>Lycotconum loczyanum (R. Raym.) Nakai</i>	jingyo

Scientific name	Korean name
<i>Lycoris squamigera Maximowicz</i>	sangсахwa
<i>Magnolia denudata Desrousseaux</i>	sini
<i>Morus alba L.</i>	sangbakpi
<i>Nelumbo nucifera Gaertn.</i>	yeongеun
<i>Perilla frutescens Britton var. japonica Hara</i>	deulggaе
<i>Persicaria filiforme</i>	geumseoncho
<i>Phellinus linteus (Berk. &amp; M.A. Curtis) Teng</i>	sanghwangbeoseot
<i>Phlomis umbrosa Turcz.</i>	sokdan
<i>Phyllostachys nigra Munro var. henonis</i>	jukryeok
<i>Pimpinella brachycarpa Nakai</i>	chamnamul
<i>Pinus densiflora Siebold &amp; Zucc.</i>	sonamu
<i>Piper nigrum L.</i>	tonghuchu
<i>Polygonum multiflorum Thunberg</i>	hasuo
<i>Polymnia sonchifolia Poepp. &amp; Endl.</i>	yakon
<i>Poncirus trifoliata Rafin</i>	taengja
<i>Prunus persica Batsch</i>	doin
<i>Pueraria lobata (Willd.) Ohwi</i>	galgeun
<i>Pueraria thunbergiana</i>	gwacho
<i>Pulsatilla cernua,</i>	halmikkot
<i>Rubus parvifolius Linne</i>	meongsukddalgi
<i>Salix gracilistyla Miquel</i>	Ketbudeul
<i>Salix koreensis Anderss</i>	budeunamu
<i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i>	dansam
<i>Saururus chinensis Baill</i>	sambakcho
<i>Scutellaria baicalensis Georgi</i>	hwanggeum
<i>Sedum aizoon</i>	ganeungirincho
<i>Sedum kamtschaticum Fischer</i>	ginrincho
<i>Sedum takesimense Nakai</i>	seomginrincho
<i>Selaginella tamariscina Spring</i>	gwanbaek
<i>Smilax china L.</i>	tobokryeong
<i>Solanum melongena L.</i>	gaji
<i>Solanum nigrum L.</i>	kamajung
<i>Solidago virga-aurea var. gigantea Miq.</i>	miyeokchi
<i>Synurus deltoides (Aiton) Nakai</i>	surichi
<i>Torilis japonica (Houtt.) DC.</i>	sasangja
<i>Trichosanthes kirilowii Maxim</i>	gwalrugeun
<i>Zanthoxylum schinifolium Siebold &amp; Zucc.</i>	sancho



항진균활성은 상기와 동일하게 disc diffusion assay 및 broth microdilution method로 평가하였으며, 그 결과 뽕나무, 참나물, 기린초, 황금, 단삼, 통후추 6종을 최종 선별하였다. 이들 중 우수한 항진균활성이 나타나는 황금의 경우 이미 상업화되어 있으며, 나머지 5종의 경우 아직 상업화되지 않았고, 평가 결과 사업성이 있다고 판단되었다(Table 3-4).

Table 3-4. 2차 선정된 5종의 항진균활성 천연물

Korean name	Scientific name	Common name	식용가능
뽕나무	<i>Morus alba</i> L.	ppongnamu	가능
참나물	<i>Pimpinella brachycarpa</i> Nakai	chamnamul	식용(어린잎)
기린초	<i>Sesum Kamtschaticum</i> Fisher	kirincho	식용(어린잎)
단삼	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	dansam	가능
통후추	<i>Piper nigrum</i> L.	tonghuchu	가능

*Aspergillus niger*에 대한 항진균활성은 아래 표에 나타내었다(Table 3-5, Table 3-6).

Table 3-5. 균사체 생육저해

생육정도	Sample No.	시료 정보
△	B266	Morus EtOAc
-	B506	참나물 MeOH 열추출 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
-	B512	참나물 EtOH 열추출 EtOAc
-	B517	황금 70% EtOH 열추출물 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
△	B145	기린초 MeOH 열추출 EtOAc
-	B530	단삼 EtOH 열추출 Hexane
△	B554	통후추 MeOH 추출물
△	B556	통후추 MeOH 추출물 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
△	B576	통후추 MeOH 추출물

Table 3-6. 포자 생육저해

생육정도	Sample No.	시료 정보
-	B506	참나물 MeOH 열추출 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
-	B512	참나물 EtOH 열추출 EtOAc
-	B517	황금 70% EtPH 열추출물 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
-	B518	황금 70% EtPH 열추출물 EtOAc
△	B519	황금 70% EtPH 열추출물 BuOH

\* Concentration; 500, 250 ug/ml(100 ul scale), 30℃ culture

\* 배양시간; 3 day/균사체, 4 day/균사 후 육안관찰

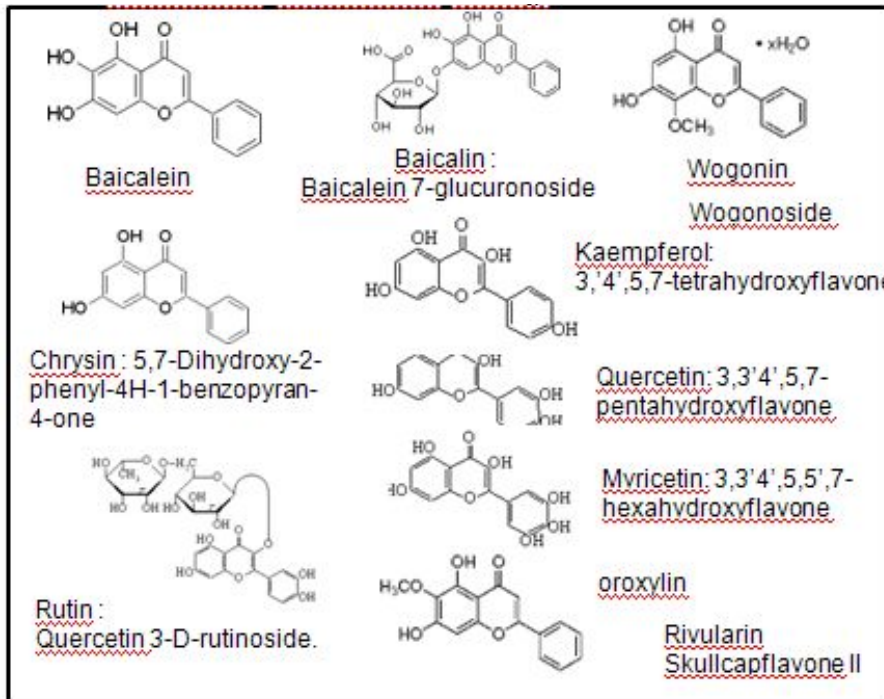
## 나. 선정된 천연물의 항진균 활성 검토

### (1) 황금

황금은 강력한 항진균 활성이 있는 것으로 확인되어, 황금의 다양한 분획물을 조제하고, ethylacetate 및 methylene chloride 분획으로부터 19종의 화합물을 분리하였으며, 이들에 대한 항진균 활성을 평가한 결과 baicalein 이 *Aspergillus niger* 곰팡이에 대해 12.5~25.0 ug/ml 의 MIC를 나타냄을 확인하였다.

먼저 황금 20 Kg을 80 °C에서 70% 에탄올 (30 l)로 12시간씩 3회추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 70% EtOH extract 약 6kg을 얻었다. 이중 5.9kg을 물 20 l에 녹여 여기에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(15 l)를 가하여 분획칼대기로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 와 수층으로 분획한 다음 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 감압농축하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract(300g)을 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 EtOAc (15 l), n-BuOH (15 l)순으로 추출하여 EtOAc extract 120g, n-BuOH extract 2.2kg 과 H<sub>2</sub>O extract 1.6kg을 얻었다. 이들 중 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract 일부(30.5g)을 silica gel column으로 분리하였다. column(길이 80cm, 지름 7cm)에 silica gel(0.063-0.200 mm)을 25cm 채우고 용매는 Hexane 100% mobile phase의 elution을 시작하여 n-Hexane: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> =1:1순으로 극성을 높이면서 fraction 1~10을 얻었다. fraction 1, 2, 3을 각각 재결정하여 compound 1, 2, 3을 분리하였다. 또한 fraction 4를 재결정하여 compound 4를 얻었고 fraction 5는 silica gel (0.063 mm 이하) column chromatography를 이용하여 용매 Hexane : EtOAc =10:1~4:1로 용리시켜 총 5-1 ~ 5-6까지 6개의 소분획을 만들었다. 이 중 5-4를 재결정하여 compound 5를 얻었고 5-5를 재결정하여 compound 6과 7을 얻었다. EtOAc extract 또한 일부(120g)를 silica gel column으로 아래와 같이 분리하였다. column(길이 75cm, 지름 12cm)에 silica gel(0.063-0.200 mm)을 20cm 채우고 n-Hexane용매로 elution 시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후, EtOAc extract 120g을 silica gel (0.063-0.200 mm)180g에 흡착시켜 column에 loading시켰다. 이후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100 %로 mobil phase의 elution을 시작하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 100:1:0.1, 95:1:0.1, 90:1:0.1, 80:1:0.1의 순으로 극성을 높이면서 각각 elution 시켜 fraction 1~14를 얻었다. 상기 분획 중 fraction 1을 MeOH로 재결정하여 compound 8을 얻었고 fraction 7, 8을 MeOH을 이용해 재결정하여 compound 9를 얻었다. 상기 분획 중 fraction 6은 다시 RP-18 column chromatography 법으로 분리하였다. H<sub>2</sub>O 100%로 elution시켜 stationary phase를 균일하게 만든 후 fraction 6을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH 혼합용매에 완전히 녹인 후 column에 완전히 흡착시킨 후 MeOH의 비율을 단계적으로 높이면서 elution 시켰다. 그 결과 compound 10, 11을 얻었다. 또 상기분획 중 fraction 10를 다시 flash column chromatography법으로 분리하였다. column에 silica gel(0.040-0.063mm)을 약 20cm 정도 채우고 CHCl<sub>3</sub>-MeOH 혼합용매에 완전히 녹인 후 silica gel column에 loading시켰다. 그리고 MeOH의 비율을 단계적으로 높이면서 elution시켰다. 결과 compound 12, 13, 14를 얻었다. fraction 12를 재결정하여 얻은 결정부분을 MeOH에 용해시켜 sephadex LH-20 column에 완전히 흡착시킨후 75% H<sub>2</sub>O로 elution시켰다. 그 결과 compound 15를 분리하였고 fraction 10을 재결정 후 앞의 방법과 같은 방법으로 분리한 결과 compound 16을 분리하였다.

또 BuOH extract 중 50g을 silica gel column으로 분리하였는데 용매는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% mobile phase의 elution을 시작하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> :MeOH =9 : 1순으로 극성을 높이면서 용리하였고 그 결과 compound 17, 18, 19를 얻었다.



얻어진 19종 화합물 중 충분한 양이 확보된 상기의 9종에 대해 항진균 활성을 평가한 결과는 다음과 같다.

Table 3-7. 황금에서 분리한 물질들의 항진균활성

Samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MIC (ug/ml)	>200	>200	>200	12.5~25.0	>200	>200	>200	>200	>200

1: oroxylin A, 2: chrysin, 3: wogonin. 4: **baicalein**, 5: skullcapflavone II, 6: rivularin, 7: wogonoside, 8: rutin (quercetin-3-D-rutinoside), 9: baicalin

**Sample4 (Compound 9)** (baicalein); (IUPAC name : 5,6,7-trihydroxyflavone), (이명 : noroxylin);  $C_{15}H_{10}O_5$  (M.W. 270); mp : 260~262°C; yellow prisms; IR  $V_{max}$   $cm^{-1}$  3411(OH), 1658(C=O), 1620, 1585(C=C); UV  $\lambda_{max}$  MeOH nm (log  $\epsilon$ ) 323(4.27), 274(4.50), 215(4.59); EI-MS  $m/z$  : 270[M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 250MHz)ppm: 6.62(1H, s, H-3), 6.92(1H, s, H-8), 7.51~7.62(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.03~8.07(2H, m, H-2', 6')

<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 62.5MHz)ppm: 182.4 (C-4), 163.1(C-2), 153.9(C-7), 150.1 (C-9), 147.2(C-5), 132.1(C-4'), 131.2 (C-1'), 129.6(C-6), 129.4(C-3', C-5'), 126.5(C-2', C-6'), 104.7(C-10), 104.5 (C-3), 94.2(C-8)

## (2) 참나물

참나물 methanol 추출물의 경우 항진균 활성이 인정되지 않으나, 이의 methylene chloride 분획에서는 우수한 *Aspergillus niger* 생육억제 및 포자발아 억제를 나타내었다. 참나물의 알려진 화합물은 Cnidilide, Ligustilide, Neocnidilide, Butylphthalide 등이 있으며, 효능은 Anti-oxidant, Anti-cancer, Anti-apoptosis on hypoxic-Ischemic brain injury 등이 있다. 참나물의 methanol 추출물 및 이의 분획물의 성분 분석결과는 다음과 같다(Table 3-8). 또한 각 분획물의 항균활성을 확인한 결과 항세균 및 항진균활성을 포함하는 광범위한 항균스펙트럼

을 나타내었다(Table 3-9)

Table 3-8. 참나물 추출물 및 분획물의 성분 분석결과

Solvent	Ext or Frac ratio (%)	Contents(mg/g-extract)			
		TF	T P	TS	RS
M	26.9	48.38±6.34	36.97±0.16	340.47±41.32	181.63±3.18
H	20.69	28.98±2.90	29.66±0.48	108.79±11.92	43.81±0.64
MC	1.41	126.09±0.69	70.27±4.28	166.18±17.08	79.62±1.27
EA	2.16	113.02±0.97	79.18±2.99	85.55±9.83	34.13±0.32
B	18.67	33.17±1.10	32.28±0.65	74.49±8.84	28.16±1.43
W	57.07	3.54±0.55	39.08±1.70	112.70±12.28	22.19±0.64

Abbreviation; M:methanol, H:Hexane, MC:methylene chloride. EA:Ethylacetate, B:butanol, W:water, TF; Total flavonoid, TP; Total polyphenol, TS; Total Sugar, RS; Reduing Sugar

Table 3-9. 참나물 추출물 및 분획물의 항균 활성 평가 결과

Solvent	Growth inhibition zone (mm)										
	Gram positive				Gram negative				Fungi		
	S.a	L.m	B.s	S.e	E.c	P.a	P.v	S.t	C.a	S.c	A.n
M	10	-	10	12	-	-	ND	11	-	-	-
H	9	-	9	11	-	-	ND	8	-	-	-
MC	8	-	8	9	-	7	ND	8	7	7	15
EA	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
W	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
Amp/Mic	22	18	27	18	8	10	36	14	24	30	-

Abbreviation: M:methanol, H:Hexane, MC:methylene chloride. EA:Ethylacetate, B:butanol, W:water, Amp:ampicillin (1ug/disc), Mic:miconazole (1ug/disc). The concentration of the sample used were 500 ug/disc, respectively

*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhymirium*. *Candida albicans*, *Sacchromyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*.

항균 활성이 우수한 methylene chloride 분획을 대상으로 *Aspergillus. niger* 에 대한 균사 생육 억제 및 포자발아 억제에 대한 MIC를 측정하였다. 그 결과 250ug/ml 농도에서 균사 생육 억제 및 포자발아 억제가 가능함을 확인하였다(Fig. 3-1).

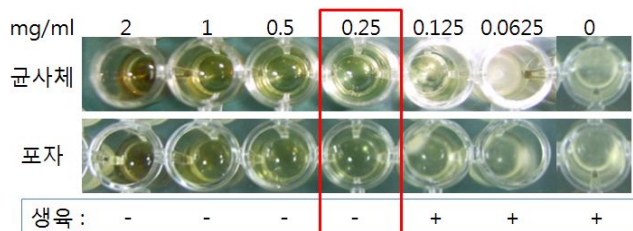


Fig. 3-1. 참나물 methylene chloride 분획물의 항진균 활성 평가 결과

또한 참나물 추출물 및 이의 분획물들은 모두 인간 적혈구 용혈 급성 독성은 나타나지 않아 사용에 안전함을 확인하였다. 한편 참나물의 methanol 추출물 및 이의 분획물의 인간 적혈구 용혈 활성 평가 결과 급성 용혈독성이 없음을 확인하였다.

Table 3-10. 참나물 추출물 및 분획물의 용혈독성 평가 결과

Solvent	Hemolytic activity (%)
M	1.10±4.48
H	0.93±2.89
MC	0.08±0.26
EA	3.96±2.31
B	0.47±1.47
W	0.27±3.66

한편 참나물의 methanol 추출물 및 이의 분획물의 인간 대장암 세포 생육억제 평가 결과 대장암 세포 생육 억제 활성은 ethylacetate 분획에서 50~100 ug/ml 농도에서 나타나는 것으로 확인되었으나, 200 ug/ml의 고농도에서는 무처리구와 거의 동일한 생육저해를 나타내었다. 이는 ethyl acetate 내의 여러 물질들이 혼존함을 고려할 때, 순수 물질 정제 시에는 대장암 저해 활성이 우수할 것으로 예상된다..

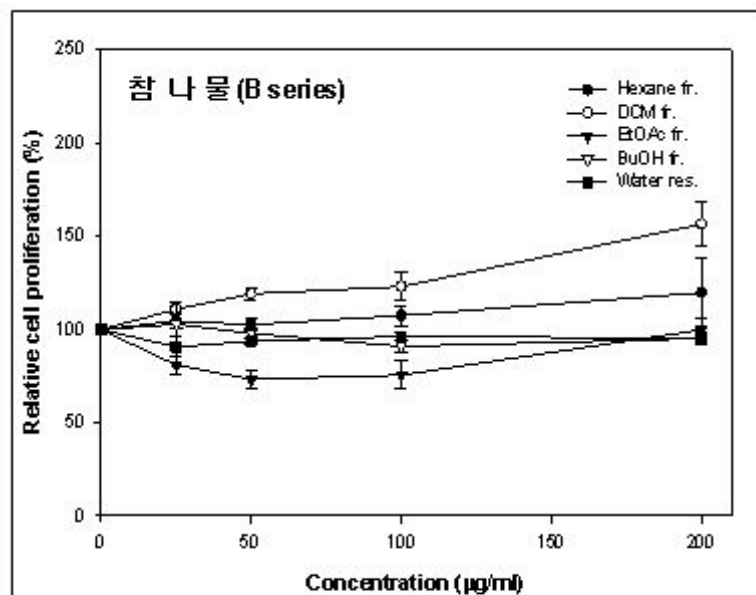


Fig. 3-2. 참나물 methylene chloride 분획물의 인간 대장암 세포 생육억제 평가 결과

### (3) 기린초

기린초의 경우, 신규 조제된 680 여종의 시료중 기린초는 항진균 활성이 우수한 것으로 확인되었다. 기린초는 돌나무과 (Crassulaceae) 식물로서, 산지의 바위 등 척박한 환경에서 자라는 다육식물이다. 잎은 어긋나고 거꾸로 선 달걀 모양 또는 긴 타원 모양으로 톱니가 있으며 잎자루는 거의 없고 육질(肉質)이며, 6~7월에 노란꽃이 취산꽃차례[聚繖花]로 꼭대기에 많이

핀다. 꽃잎은 바소꼴로 5개이며 끝이 뾰족하다. 그 잎은 식용(어린잎, 현재 한정식집의 쌈채소로도 판매됨) 가능하며, 진통제, 항염증제, 혈액순환촉진제(anodyne, antiphlogistic and circulation), 출혈 억제 (treatment of bleeding) 활성이 알려져 있다.

한편 기린초 메탄올 추출물 및 이의 유기용매 분획물은 매우 강력한 항산화 활성 (DPPH anion and AABTS cation scavenging activity)을 나타내어 식품소재로 사용 시 항균 활성 이외의 추가적인 효과를 나타낼 것으로 판단된다(Table 3-11, Fig. 3-3).

Table 3-11. 기린초 메탄올 추출물 및 순차적 유기용매 분획물의 항산화 활성

Samples	IC <sub>50</sub> (ug/ml)	
	DPPH 소거능	ABTS 소거능
MeOH ex.	111.35	39.20
Hexane fr.	355.86	120.19
EtOAc fr.	21.48	6.96
BuOH fr.	102.01	33.57
Water res.	228.21	93.18
Vit.C	11.30	10.63

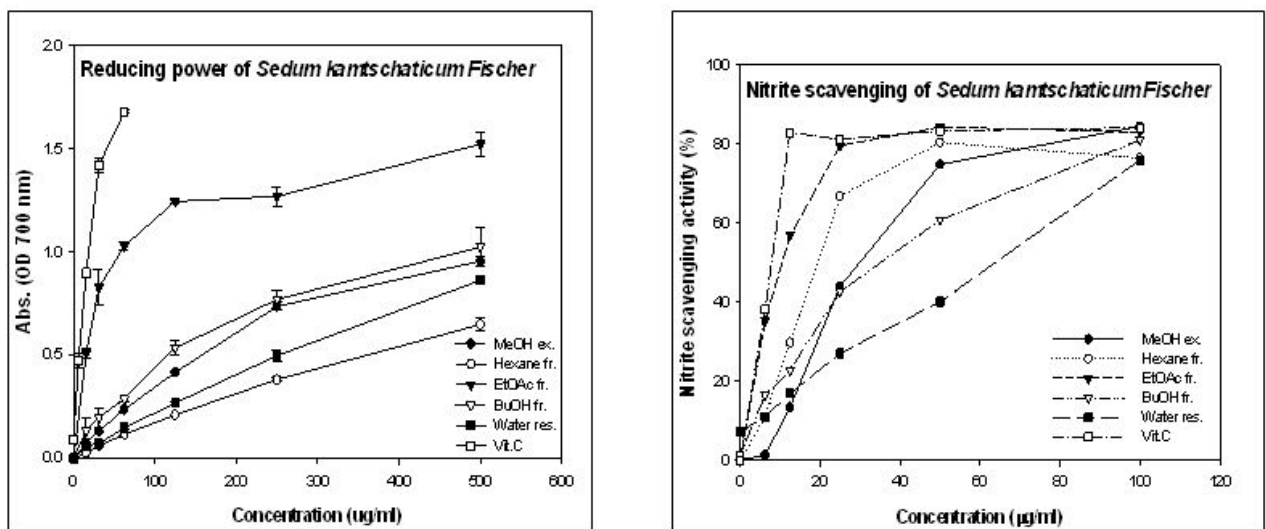


Fig. 3-3. 기린초 메탄올 추출물 및 이의 유기용매 분획물의 강력한 항산화 활성 (reducing power 및 nitrite scavenging activity)

#### 다. 천연보존료의 유용성 평가

##### (1) 천연보존료(복합허브추출물 F1)의 성분 및 생리활성

제 1세부과제에서 식품용 천연보존료로 개발된 제품 복합허브추출물 F1(상백피/감초 복합추출물제형인 keybase에 부형제를 혼합한 최종 제품 형태)의 생리활성을 평가하였다. 각각의 시료들의 total flavonoid, total polyphenol, total sugar 및 reducing sugar는 기존 보고와 동일한 방법으로 분석하였다.

총 플라보노이드의 함량 측정은 시료를 5 mg/ml 농도가 되도록 조제한 후 18시간 메탄올 교반 추출하고 여과한 추출 검액 400 µL에 90% diethylene glycol 4 mL를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 µL를 넣고 37 °C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. 총 폴리페놀 함량은 추출 검액 400 µL에 50 µL의 Folin-ciocalteau, 100 µL의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 한편 총당은 phenol-sulfuric acid법을 이용하여 정량하였으며, 환원당은 dinitrosalicylic acid 변법을 사용하여 측정하였다. 분석 결과는 다음의 표에 나타내었다.

Table 3-12. 개발제품의 성분분석

시료	성분분석(mg/g)			
	TF	TP	TS	RS
복합허브추출물 F1	2.94±0.71	5.53±0.02	486.82±5.69	9.7±0.7

\* TF; Total flavonoid, TP; Total polyphenol, TS; Total Sugar, RS; Reduing Sugar

즉 복합허브추출물 F1은 총당을 함유하고 있었으며, 매우 적은 환원당과 total flavonoid, total polyphenol을 포함함을 알 수 있었다.

## (2) 천연보존료(복합허브추출물 F1)의 항산화능 평가

복합허브추출물 F1의 항산화능을 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 음이온 소거능과 ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonate)] 양이온 소거능을 측정하였다. 먼저 DPPH 음이온 소거능 측정의 경우(DPPH scavenging activity: DSA), 다양한 농도로 희석한 시료 20 µL에 99.5% 에탄올에 용해시킨 2×10<sup>-4</sup>M DPPH용액 380 µL를 넣고 혼합하여 37 °C에서 30분 동안 반응시킨 후, 516 nm에서 microplate reader(Asys Hitech, Expert96, Asys Co., Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. DPPH 음이온 소거능은 시료첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였다.

ABTS 양이온 소거능 측정의 경우(ABTS scavenging activity: ASA), 7 mM ABTS (Sigma Co., USA) 5 ml와 140 mM potassium persulfate 88 ml를 섞은 후 상온에서 16시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰으며, 이후 이 용액을 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 에탄올로 희석하였다. 조제된 희석용액 190 ml와 참나물 시료 10 ml를 혼합한 후 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 ASA를 결정하였다.

$$ASA (\%) = [(C-S)/C] \times 100, C: \text{DMSO 첨가시 흡광도}, S: \text{시료 첨가시 흡광도}.$$

한편 nitrite 소거능 측정의 경우, 아질산염 용액(1 mM)에 시료용액을 가하고 여기에 0.1 N HCl을 가해 pH 1.2로 조정 한 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Griess reagent (Sigma Co., USA)를 가하고 혼합하였다. 이후 15분간 실온에서 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여

잔존 nitrite 양을 측정하였다. NSA(%)는 다음의 식에 의해 계산하였다.

$NSA (\%) = [1 - (A - C) / B] \times 100$ , A: 1 mM nitrite 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도, B: 1 mM nitrite 용액의 흡광도, C: 복합허브추출물 F1 시료의 흡광도.

Table 3-13. 개발제품의 항산화활성

시료	소거능 IC50 (ug/ml)		
	DPPH <sup>1)</sup>	ABTS <sup>2)</sup>	Nitrite <sup>3)</sup>
복합허브추출물 F1	2,155	289	272
Vitamin. C	16.4	4.9	15.9

1)DSA;DPPH scavenging activity: 2)ASA;ABTS scavenging activity, 3)NSA;nitrite scavenging activity

개발제품인 복합허브추출물 F1을 평가한 결과 약한 항산화능이 확인되었다(Table 3-13).

### (3) 천연보존료(복합허브추출물 F1)의 항균 활성 평가

개발제품인 복합허브추출물 F1의 항균 활성을 평가하기 위해 그람 음성균으로 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186, *Proteus vulgaris* KCTC 2433, *Salmonella typhimurium* KCTC 1926을, 그람 양성균으로는 *Bacillus subtilis* KCTC 1924, *Listeria monocytogenes* KACC 10550, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916을 사용하였다. 한편 항진균 활성 평가를 위해서는 *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0233 및 *Candida albicans* KCTC 1940를 사용하였다. 먼저, 항세균 활성 평가의 경우, Nutrient broth (Difco Co., USA)에 각각의 세균을 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 각 균주를 OD값이 0.1이 되도록 조정하여 Nutrient agar (Difco Co., USA) 배지를 포함하는 멸균 petri dish에 100 µL 도말하고, 각각의 시료 5 µL를 멸균 disc-paper (지름 6.5 mm, Whatman No.2)에 가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, 진균의 경우에는 Sabouraud dextrose 배지(Difco Co. USA)를 이용하여 동일한 방법으로 30°C에서 24시간 동안 배양 후 생육저지환의 크기를 측정하여 항균활성을 평가하였다. 대조구로는 항세균제인 ampicillin과 항진균제인 miconazole (Sigma Co., USA)을 각각 1 µg/disc 농도로 사용하였으며, 생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다. 한편 항진균성이 인정되는 경우 microbroth dilution법을 이용하여 MIC (최소생육억제농도)를 평가하였다. 개발제품인 복합허브추출물 F1의 항균활성은 다음의 표에 나타내었다(Table 3-14).



Table 3-14. 개발제품의 항세균 및 항진균 활성 평가

Samples	Conc. (ug/disc)	Antimicrobial activity (Clear zone; mm)								
		Gram negative				Gram positive			Yeast	
		S.t	E.c	P.v	P.a	S.a	B.s	L.m	S.c	C.a
복합허브추출물 F1	500	10	16	ND	-	14.5	15	ND	19	15.5
Ampicillin/Miconazole	1	20	11	ND	12	26	28	ND	31	8

*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*. *Candida albicans*, *Sacchromyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*.

복합허브추출물 F1은 수용성으로 disc-diffusion법으로 실험 시 강한 활성을 나타내리라 추측되었으며, 실제 *C. albicans* 에 대한 강력한 항진균 활성과 *P. aeruginosa*를 제외한 기타 세균에 대한 우수한 항세균 활성을 나타내어 식품보존료로 광범위한 항균스펙트럼을 나타냄을 확인하였다(Table 3-15.)

한편 복합허브추출물 F1은 *Candida albicans* KACC 30062 기존의 진균세포막 파괴활성을 가진 항진균제인 amphotericin B 의 약 1/125 ~ 1/250의 활성을 나타내었다(Fig. 3-4).

Table 3-15. 복합허브추출물 F1과 amphotericin B의 농도별 항균력 비교

Concentration(ug/disc)	Clear zone (mm)	paper disc번호 (agar diffusion assay)	
복합허브추출물 F1	500	15.0	1
	250	15.0	2
	125	12.0	3
	62.5	12.0	4
	61.2	12.0	5
	15.6	10.0	6
	7.8	9.0	7
	3.9	8.0	8
	1.9	7.5	9
	1.0	-	10
Amphotericin B	1	15.0	11
Miconazole	1	28.0	12

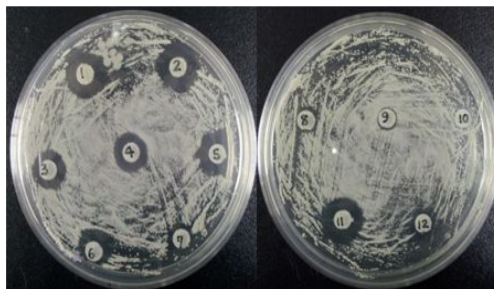


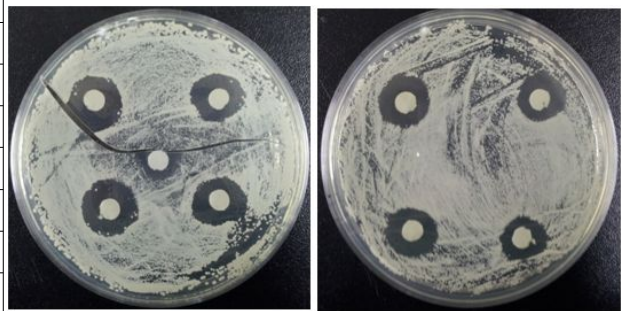
Fig. 3-4. 복합허브추출물F1과 amphotericinB의 농도별 항균력 비교  
(disc diffusion assay)

#### (4) 천연보존료(복합허브추출물 F1)의 산, pH, 열장, 효소처리 안정성 평가

복합허브추출물 F1의 실제적 이용 가능성을 검토하기 위해, 먼저 개발제품을 다양한 peptidase와 단백가수분해효소를 비롯한 α-amylase, α-glucosidase, lipase 등의 분해효소, pH 2, 및 가열조건, 열장 처리를 하고 각각의 조건에서 항진균 활성물질의 활성안정성을 검토하였다. 그 결과 하기 표에 나타내 바와 같이 항진균 활성은 가열처리, 산 처리, 열장처리에 안정하였으며, 전분분해효소 처리에서도 안정함을 확인하였다(Table 3-16).

Table 3-16. 다양한 산, 열, 열장 및 효소처리에 의한 복합허브추출물 F1의 *Candida albicans* KACC 30062 에 대한 항진균 활성 평가

Sample	Treatment	Clear zone(mm)
복합허브 추출물 F1 (500ug/disc)	None	15
	100°C (30 min)	10
	pH2 (1 hr)	15
	FBS (3hr)	15
	BAN (240 U)	15
	BAN (24 U)	15
	AMG (0.3 U)	15
	AMG (0.03 U)	14.5
Miconazole (1ug/disc)	None	28



\* BAN: α-amylase, AMG: α-glucosidase

#### 라. 천연보존료(복합허브추출물 F1) 안전성 평가

##### (1) 소화, 흡수 장애 평가

복합허브추출물 F1의 소화흡수장애는 단백질 분해효소 (pepsin, chymotrypsin, trypsin) 및 전분질 분해효소 (α-amylase (endo 형), α-amylase (exo 형), 및 α-glucosidase) 에 대하여 측정하였고 전분질 분해효소 저해활성 대조구로는 acarbose를 사용하였다.

각각의 효소활성 측정은 기존의 보고된 방법으로 측정하였으며, 특히 α-Amylase (endo형) 저해활성은 먼저 다양한 농도의 천연물 시료 2.5 μL와 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)로 희석한 α-amylase (0.25 U/ml) 25 μL를 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 한 후, 0.5% soluble starch (Samchun Chemicals Co., Korea) 25 μl 를 가하여 37°C에서 10분간 반응하였다. 이후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰으며, 반응액에 150 μL의 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid, Sigma Co., St. Louis, USA) 용액을 가하여 100°C에서 5분간 가열하여 발색한 후 상온에서 방냉하였다. 발색액은 96 well microplate reader (Sunrise-BAS/C, Tecan Co., USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 실험은 3반복한 후 평균값을 구하여 다음의 식으로 저해율을 계산하였다. 각각의 효소활성은 unit로 환산하여 나타내었으며, α-amylase 활성을 50% 저해하는 농도를 IC<sub>50</sub>으로 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = [1 - (\text{시료 첨가구 효소활성} / \text{대조구 첨가구 효소활성})] \times 100.$$

한편  $\alpha$ -Amylase (exo형) 저해활성은 starch 대신 maltose를 사용하여 동일한 방법으로 효소반응시켜 유리되는 포도당을 DNS 법으로 정량하였으며, 각각의 실험은 3반복한 후 평균값을 구하여 다음의 식으로 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = [1 - (\text{시료 첨가구 효소활성} / \text{대조구 첨가구 효소활성})] \times 100$$

$\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 다양한 농도의 천연물 시료 2.5  $\mu\text{L}$ 와 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.6)로 희석한  $\alpha$ -glucosidase (0.68 U/mL) 25  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 한 후, 0.5% soluble starch 25  $\mu\text{L}$ 를 가하여 60°C에서 10분간 반응하였다. 이후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰으며, 생성된 포도당을 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 용액을 가하여 동일한 방법으로 발색한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 실험은 3반복한 후 평균값을 구하여 저해율을 계산하였다. 한편 pNPG (p-nitrophenol glucoside; Sigma Co., USA)를 이용한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 다양한 농도의 천연물 시료 2.5  $\mu\text{L}$ 와 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.6)로 희석한  $\alpha$ -glucosidase (0.25 U/mL) 25  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 37 °C에서 10분간 preincubation 하고 1 mM pNPG 용액 25  $\mu\text{L}$ 를 가하여 60°C에서 10분간 반응하였다. 이후 1M NaOH 25  $\mu\text{L}$ 를 가하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였다.

실험결과 복합허브추출물 F1이 500 ug/ml 농도에서  $\alpha$ -amylase(exo형)는 5% 미만의 저해를 나타내었고,  $\alpha$ -amylase(endo형)는 18%의 저해를 나타내었고,  $\alpha$ -glucosidase는 0 %의 저해를 나타내었다(Table 3-17). 한편 단백질 분해효소에 대한 저해활성은 나타내지 않았다.

본 결과를 바탕으로, 복합허브추출물 F1의 소화효소 저해활성을 평가하면 다음과 같다. 만약 식품에 0.2% 개발첨가물을 첨가한 제품을 1회 500 g을 섭취하였을 경우에도 정상인의 소화효소 저해는 매우 미미하며, 혈액내 최고 250 ug/ml 농도 이하가 되므로, 안전성에도 문제가 없는 것으로 판단된다(개발제품의 소화 분해는 없는 것으로 가정하고, 흡수는 100% 이루어진다는 극단적인 가정하에서도 안전함을 알 수 있다).

Table 3-17. 개발제품의 전분계 분해효소의 저해활성 평가

Concentration : 500 ug/ml			
시료	$\alpha$ -amylase(exo) 저해율 (%)	$\alpha$ -amylase(endo) 저해율 (%)	$\alpha$ -glucosidase 저해율 (%)
복합허브추출물 F1	3.42±0.40	18.11±0.58	-1.25±0.68

## (2) 인간 RBC의 용혈독성 평가

복합허브추출물 F1의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다. 먼저 PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100  $\mu\text{L}$ 를 96-well microplate에 가하고 각각 0.5 mg/ml 농도의 시료를 가한 다음 37 °C에서 30분간 반응시켰으며, 이후 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100  $\mu\text{L}$ 를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤

모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다. 시료의 용매 대조구로는 DMSO (2 %), 적혈구의 100 % 용혈을 위한 실험 대조구로는 triton X-100 (0.1 %)을 사용하였다. 용혈활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Hemolysis (\%)} = [(\text{Abs. S} - \text{Abs. C}) / (\text{Abs. T} - \text{Abs. C})] \times 100$$

그 결과, 복합허브추출물 F1의 경우 인간 적혈구 용혈활성은 500 ug/ml 농도까지 전혀 나타나지 않았다(Table 3-18).

Table 3-18. 복합허브추출물 F1과 Amphotericin B(양성대조구)의 농도별 용혈활성

Sample	ug/ml	Average	STDEV
복합허브추출물 F1	500	-5.3	0.2
Amphotericin B	100	89.3	0.8
	50	92.7	0.3
	25	93.8	0.2
	12.5	95.0	0.4
	6.25	70.2	9.3
	3.125	26.6	2.2
	0	0.0	1.2
Triton X 100		100.0	0.1

### (3) Mouse 경구투여를 통한 단회 독성 및 단기 독성 평가에 의한 안전성 확인

4주령의 흰쥐 (Slc ICR mouse)를 (주) 중앙실험동물로부터 공급받아 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 150~300 Lux의 조도로 12시간 간격 (오전 8시~오후 8시)으로 조절되는 동물실험실에서 14일간 순화시킨 후, 복합허브추출물 F1의 단회경구독성을 평가하였다. 동물실험은 안동대학교 동물실험윤리위원회의 사전승인을 받아 진행되었으며 (산학연구지원과-2132, 2012. 5. 18), 먼저 복합허브추출물 F1의 경우 증류수에 녹인 후, 4개 실험구(각 실험구당 3마리)에게 각각 4,000 mg/kg, 3,500 mg/kg, 3,000 mg/kg, 2,500 mg/kg, 2,000 mg/kg, 1,500 mg/kg, 800 mg/kg, 400 mg/kg, 200 mg/kg의 농도로 각각 경구투여 후, 일주일간 생존여부와 병적 이상 증후를 관찰하였다. 그 결과 생존율은 전 시험구에서 100%이었으며, 병적 이상 징후나 장기 출혈이 관찰되지 않았으며, GPT, GOT의 혈청 생화학적 검사 역시 대조구와 비교하여 유의점은 확인되지 않았다. 따라서 복합허브추출물 F1은 4,000 mg/kg의 농도에서도 별 다른 독성을 나타내지 않아 등급 1 무독성 그룹 (practically non-toxic)으로 구분되었다. 따라서 상기의 결과로 볼 때 복합허브추출물 F1의 실제적 사용은 안전상 문제를 야기하지 않을 것으로 판단된다(Table 3-19, Table 3-20).

Table 3-19. 독성의 구분

등급	구분	사람에 대한 경구치사량	예
1	무독성(practically nontoxic)	> 15 g/kg	glucose
2	저독성(slightly toxic)	5~15 g/kg	ethanol
3	보통독성(moderately toxic)	0.5~5 g/kg	sodium chloride
4	고독성(very toxic)	50~500 mg/kg	phenobarbital sodium
5	극독성(extremely toxic)	5~50 mg/kg	nicotine
6	맹독성(supertoxic)	< 5 mg/kg	tetrodotoxin

\* 독약 : LD<sub>50</sub>(경구) 30 mg/kg 이하, 극약 : 30~300 mg/kg, 보통 약 : 300 mg/kg 이상

Table 3-20. 개발제품의 단회투여 독성평가

Samples	mg-samples/kg	Dead/test	Death ratio(%)
복합허브추출물 F1	4,000	0/3	0.0
	3,500	0/3	0.0
	3,000	0/3	0.0
	2,500	0/3	0.0
	2,000	0/3	0.0
	1,500	0/3	0.0
	800	0/3	0.0
	400	0/3	0.0
	200	0/3	0.0
	0	0/3	0.0
	Corn oil	0/3	0.0
	Water	0/3	0.0

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구개발 목표 달성도

#### 가. 최종연구목표

- 쌀가공식품의 유통기한 연장을 위한 항진균성 천연보존료 개발
- 천연 식물 소재로부터 항진균물질의 동정
- 천연보존료의 제형화 및 식품 적용 기술 개발
- 유통기한 연장을 위한 포장기술 개발

#### 나. 세부 연구과제별 목표 대비 달성도

세부·협동 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제1세부 항진균물질 동정 및 천연보존료 제품화	활성 안정성 평가	100	열과 pH에 대한 안정성을 확인하기 위하여, 각 추출물을 80~121 ℃, pH 2~11 범위에서 처리하여 활성 안정성을 확인, 상백피추출물, 감초추출물, 기린초추출물에 대한 열과 pH에 대한 항균 안정성 우수함을 확인, 농축배수에 대한 항균안정성 확인
	항진균물질의 분리정제	100	활성물질을 메탄올로 추출한 다음, 용매분배 분획, RP-18 open column chromatography, RP-18 prep-HPLC, Sephadex LH20 방법으로 활성물질을 순수분리 -상백피추출물의 분리정제 수행 -기린초 추출물의 분리정제 수행
	항진균물질의 구조동정	80	기린초유래의 물질 SK-1을 <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR, MS 자료를 바탕으로 구조 결정 -SK-1; 2,6-di-O-galloylarbutin으로 구조결정
	최적 추출공정 시스템 설정	100	생산공정에 적용하기 위해 대량 제형화 공정세팅을 위한 최적 추출공정 시스템 설정, 주정 추출과 활성탄 처리법을 이용하여 식품용 상백피추출물을 제조하는 최적 추출공정 확립, 추출 효율과 추출단가 최적화 -상백피추출물; 95%주정추출 후 1%SX Plus탈색 -감초추출물; 열수추출 및 여과 후 50%주정추출 -기린초추출물; 50%주정추출 후 4%KBB탈색
	천연보존료의 제형화	100	지용성의 상백피추출물 및 감초추출물을 식품에 적용하기 용이한 형태인 수용성 수용성 분말 및 액상으로 제형화 함. -상백피추출물; 유화제를 이용한 비천연 제형화 & 감초추출물을 이용한 천연 분말제형화 -감초추출물; 100% 천연 분말제형화 -기린초추출물; glycerin을 이용한 액상제형화
	천연보존료 시제품 제조	100	대량 추출 및 제형화공정을 적용한 시제품 제조 -원물 500 kg 단위의 시제품 제조 -시제품을 적용한 떡볶이의 저장 기간을 주정처리구에 비해 30일 이상 연장함

세부·협동 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제1협동 천연보존료 의 떡 처리조건 확립 및 포장기술 개발	시중 유통 떡볶이용 떡제품의 유통기간 조사	100	시중에 유통 중인 각종 떡볶이용 가래떡의 유통기 간, 처리제조사 -유통기한; 1~2개월 -처리제; 주정, 탈산소제
	6개월 이상 보존을 위한 처리 조건 확립 및 떡볶이에 대한 기초 application test	100	항진균소재를 처리를 위한 처리조건 확립 -포장재질; NYPE재질에 탈산소제 추가 시 보존 효과가 가장 우수 -상백피추출물과 감초추출물 (제형화 전 시료 율 혼합 처리한 떡볶이의 보존 효과가 가장 우수
	떡볶이에 대한 천연보존료 의 Challenge test	100	상백피추출물과 감초추출물의 식품용 수용성 제형 화 시료를 떡볶이에 처리하여 보존 효과 확인 -처리 방법에 따른 효과; 혼합보다는 침지 처리 시 보존효과가 더욱 양호 -부형제 효과; 식물혼합농축분말 (연강, 유카, 녹차 혼합 추출물)과 10%조산나트륨을 함유한 시료 처리 시 보존효과가 우수함
	떡볶이 장기보존용 포장기 술 개발	100	기체조성을 달리한 포장 기술 개발 -미생물 성장과 함께 CO <sub>2</sub> 농도 증가됨 -포장구 CO <sub>2</sub> 농도가 높을수록 경도가 느리게 증가 -CO <sub>2</sub> 농도가 높을수록 부착성이 낮음 -CO <sub>2</sub> 농도가 높을수록 미생물제어가 효과적 -천연보존료4(복합허브추출물F1) 처리와 80%CO <sub>2</sub> 농도 이상의 변형기체 포장구에서 떡볶이의 미 생물 변패방지 효과가 가장 우수
	떡 제조 시 CCP 관리 매뉴 얼화	100	떡 제조 단계에서 본 과제에서 개발된 천연보존 료 적용과 포장기술을 적용한 CCP관리 기준을 설정하였으며 매뉴얼화 함

세부·협동 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제2협동 천연소재의 항진균활성 DB구축 및 안정성 평가	천연물 추출물 소재의 항진균 활성 DB 구축 및 항진균 소재 선별	100	-다양한 천연물 추출물의 DB 구축 : 확보 천연물 추출물 874종 및 신규 제조 천연물 추출물 680종에 시료 준비 (다양한 용매 추출물) 하였으며 전체 1550 여종 천연물에 대한 유기용매 추출물을 조제하고 이에 대한 분획물을 얻음 -구축된 천연물 DB로부터 <i>Aspergillus niger</i> 제어 활성 검색 : 항진균성이 인정되는 천연물중 경제성과 상업성이 인정되는 시료를 선택하여 항진균 활성을 검정하였으며, 전체 1550여종 시료중 경제성, 안전성, 신규성, 상업성을 기준으로 기린초, 참나물, 황금, 뽕나무, 단삼 통후추의 6종을 최종 선별함
	항진균스펙트럼 확보	100	활성 조추출물 및 활성 정제물질, 최종제품인 복합허브추출물 F1의 항진균스펙트럼 결정 : 다양한 곰팡이와 세균에 대한 MIC, MFC, MBC 결정
	원료 유용성 평가	100	-선정 천연물중 기린초, 참나물, 황금에 대해서는 순차적 유기용매 분획 및 활성물질 정제를 통해 항진균 활성을 검증하였으며, 부가적인 항산화 활성, 인간 적혈구에 대한 용혈 활성 등을 평가하여 실제적 적용 가능성을 확인함. -제1세부과제에서 개발된 제품 (복합허브추출물 F1)의 경우, 우수한 항세균 및 항진균 활성이 검증되었으며, 이들은 항산화 및 발암 억제 활성도 부분적으로 확인됨
	천연보존료 안전성 평가	100	-복합허브추출물 F1의 항진균 활성은 산처리, 열처리, 멸균처리 소화효소 처리에서도 안정하게 유지 - 인간 적혈구에 대해 용혈활성 없음 -소화효소에 대한 저해현상이 미약하므로 소화흡수장애 없음 - 마우스의 단회 독성 평가에서는 4,000 mg/kg 농도까지 독성이 나타나지 않아, 등급 1무독성 그룹 (practically non-toxic)으로 구분됨 - 따라서 복합허브추출물 F1은 안전상 문제를 야기하지 않을것으로 판단됨

## 2. 관련분야에의 기여도

본 연구과제의 궁극적인 목적은 쌀가공식품의 유통과정의 신선도 및 안전성을 확보하기 위해, 식품용 항진균성 천연보존료를 개발 및 제품화하는 것이다. 본 연구진은 이러한 연구목적에 맞게 연구를 성공적으로 수행하여 논문, 특허 및 실용화하였으며, 떡 적용결과를 바탕으로 과제 최종 평가 후에 바로 매출이 일어날 가능성이 매우 높다.

본 과제에서는 2,500 여 종의 식물추출물 라이브러리를 이용하여 항진균활성을 스크리닝 및 소재를 선정하고, 최적 추출 및 제형화공정을 확립한 다음, 최종적으로 식품용 수용성 제형으



로 제품화(복합허브추출물F1) 하였으며, 떡 적용을 통하여 보존능을 확인하였다. 특히, 마우스 경구투여 및 소화효소저해 현상 등의 평가를 통하여 식품 소재로서 안전성을 확보하였다. 본 연구 과정에서 논문 2편, 특허등록 1건, 특허 출원 1건, 기술이전1건, 제품화 1건, 제형화 기술 5건, 물질구조 규명 1건, 포장공정 개발 1건의 성과를 올렸다.

위와 같은 연구결과는 초기 소재선정에서부터 판매용 제품화까지 산업화 개발을 완료하여 식품회사를 대상으로 즉각적인 매출이 일어날 수 있을 뿐 만 아니라, 폐사의 구축된 영업력을 바탕으로 미리 영업을 진행하고 있으며, 과제 종료 후에 판매가 가능한 상태이다. 특히 쌀가공식품 이외에도, 곰팡이가 주요 변패 원인인 식품(빵, 어묵, 육포 등)에 적용이 가능하며, 개발된 향균소재는 초기 테스트 결과에 의하면 화장품 및 농용까지 확대 가능성이 매우 높으며, 현재 타 산업 분야에 적용 테스트를 진행 중이다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구개발 성과

#### 가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

##### (1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1						1	1	-
	달성	1	1						1	2
2차년도	목표	1						1	2	
	달성								1	2
계	목표	2	0					2	3	-
	달성	1	1						2	4

##### (2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1			-
	달성	1	1			3

1. 기술실시 1건
2. 복합허브추출물 F1상품화 1건
3. 2010.10.19; 2010 벤처코리아 지식경제부 장관상 표창
4. 2010.10.22; 한국생명과학회 우수포스터상(사단법인 한국생명과학회에서 항균관련 연구 수상)
5. 2010.7.20; KJMB 우수논문상(사단법인 한국미생물생명공학회에서 항균관련 우수연구로 수상)

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Antimicrobial activity of <i>Pimpinella brachycarpa</i> NAKAI	Seon-Mi Ahn	Ho-Yong Sohn	In-Sook Kwun, Tae-Ho, Choi	Kor. J. Microbiol. Biotechnol.	2011. 39 (2)	국내	비 SCI
2011.	Antibacterial, antioxidative and anti-proliferative activity against colorectal cell of <i>Pimpinella brachycarpa</i>	Seon-Mi Ahn	Ho-Yong Sohn	Mi-Seon Kim, In-Chang Jung,	Kor. J. Food Preserv.	2011. 18(4)	국내	비 SCI
2011	Antifungal activity of medicinal herbs and baicalin from the root of <i>Scutellaria baicalensis</i> against <i>Aspergillus niger</i>	Seon-Mi Ahn	Ho-Yong Sohn	Mi-Sun Kim, Ye-Seul Lee	Kor. J. Microbiol. Biotechnol.	2011. 한국미생물, 생명공학학회 학술대회 2011. 2. 18-19.	국내	비 SCI (학술대회 발표)
2011	Antifungal activity of <i>Pimpinella brachycarpa</i> NAKAI against <i>Aspergillus niger</i>	Tae-Ho, Choi	Ho-Yong Sohn	Tae-Mi Yoon, Seon-Mi Ahn	Kor. J. Microbiol. Biotechnol.	2011. 한국미생물, 생명공학학회 학술대회 2011. 2. 18-19.	국내	비 SCI (학술대회 발표)
2012	Anti-oxidation, anti-microbial activity and anticoagulation activity of <i>Aruncus dioicus</i> (Walt.) Fern. var. <i>kamtschaticus</i> Hara	Mi-Sun Kim	Ho-Yong Sohn	Ye-Seul Lee, Jang, Min-Seon, Su-Hee Son,	Kor. J. Microbiol. Biotechnol.	2012. 한국미생물, 생명공학학회 학술대회 2012. 6. 27-29.	국제학술대회	비 SCI (학술대회 발표)
2012	Evaluation of Antimicrobial Activity of <i>Hippophae rhamnoides</i> L. against pathogenic bacteria and <i>Candida</i> sp.	Mi-Sun Kim	Ho-Yong Sohn	Seon-Mi AHN	Kor. J. Microbiol. Biotechnol.	2012. 한국미생물, 생명공학학회 학술대회 2012. 6. 27-29.	국제학술대회	비 SCI (학술대회 발표)

## 다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011.06.16	기린초 추출물을 유효성분으로 하는 향균 및 항산화 조성물	(주)에스엔텍	대한민국	10-2011-0058500	2011.01.06	식품보존성이 우수한 수용성 감초추출물의 제조방법	(주)에스엔텍	대한민국	10-1007869

## 2. 성과활용 계획

### 가. 식품용 천연 보존료 적용

사회 전반에 걸친 웰빙 분위기에 따른 안전한 먹거리에 대한 요구로 인해, 자연에 존재하는 동식물로부터 천연 식품 보존료를 개발하기 위하여 수많은 연구노력에도 불구하고 성공한 사례는 폐사의 화분발효물과 자몽종자추출물 그리고 바이오스킨테크의 복합황금추출물 밖에 없다. 그러나 이들 보존료들은 효모와 곰팡이에 대한 제어능이 매우 약하므로 폐사에서 절임식품류에 적용되는 겨자정유를 이용한 향진균성 식품보존료로 BBP를 유일하게 개발하였으나 이 제품도 겨자고유의 향으로 모든 식품에 적용되지 못하는 단점이 있다. 따라서 절임식품 외의 다른 식품에도 광범위하게 적용 가능한 곰팡이 제어용 보존료인 복합허브추출물 F1을 개발하였으며, 떡류, 면류, 육포, 빵, 음료수 등 여러 가지 식품에 즉시 적용이 가능하다.

### 나. 쌀가공식품인 떡볶이 유통기한 연장 적용

떡볶이의 한식세계화로 인한 수출과정에서 가장 장애요인이 되는 곰팡이 제어에 적용함으로써 클레임 비율을 저하시키고 수출증대 뿐만 아니라 외국에서 한국 식품에 관한 좋은 이미지를 확립할 수 있다.

### 다. 화장품용 천연방부제 적용

천연 화장품의 급격한 수요에 따른 천연 화장품 방부제의 개발도 또한 절실히 요구되고 있지만, 현재는 주로 화합합성 방부제인 파라벤류가 사용되고 있으며 이들은 피부알러지를 일으킬 뿐만 아니라 내분비계장애 유발 가능성이 제기되고 있어 이들의 사용이 점차 줄어들고 있다. 따라서 식품에 사용할 수 있는 향균 보존료 개발 시, 화장품 적용에도 문제가 없을 것으로 사료 되며, 피부 자극과 같은 안전성 테스트 후 화장품방부제로 적용 확대함으로써 더욱 부가가치를 높일 수 있다.

### 라. 사료용·수산물 천연보존료 적용

축산을 비롯한 애완동물의 사료에는 BHA, BHT, EQ와 같은 화학방부제 및 항산화제들이 사용되고 있으며, 이들은 암 유발 가능성이 제기되고 있으므로 사료 방부제도 독성이 없는

천연 소재를 필요로 하고 있다. 또한 수산물 양식에서는 현재는 발암물질로 의심되어 사용이 금지된 말라카이트그린과 항생제를 대체할 천연 항균제를 제공함으로써 경제적 효과를 창출할 뿐 만 아니라 수산 양식 업계의 요구를 충족시키고 국민 건강 증진에 크게 기여할 것으로 기대된다.

## 제 7 장   참고문헌

### 참고문헌

1. Galic K, Curic D, Gabric D. (2009) Shelf life of packaged bakery good: A review. *Crit. Rev. Food sci. Nutr.* 49. 405-426
2. Hong H. J. Choi J. H. Cho K. H. Choi S. W. Rhee Sj. (1999) Quality changes of sulgiduk added green tea powder during storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28, 1064-1068
3. Jung H. S. and Kim K. J. (2001) Changes in rheological properties of packaged Kongdduck prepared with soybean flour and peanut flour during storage periods. *Korean J. Food cookery sci.* 17(3). 204-210
4. Jung H. S. and Kim K. J. (2001) Studies on Storage Stability of Soybean Cake by Pakaging Method. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 11. 190-195
5. Lee D. S. and Yam K. L. (2008) Food packaging science and technology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 550-553
6. Moon K. B., Kim H. K., An D.S. and Lee D. S. (2010) Effect of Modified Atmosphere Packaging on Preservation of Pumpkin Rice Cake. *Korean J. Food preserv.* 17(6), 908-913
7. Parry RT. (1993) Introduction In: Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods, parry RT (Editor), Blackie academic & professional, London, UK. 1-18

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.