

우리 농산물 중 건강기능성 식품소재 발굴  
및 건강기능식품 원료로 인정을 위한 연구

Registering of Health Functional Food Materials  
Screened from Domestic Agricultural Products  
as Raw Materials of Health Functional Foods

연 구 기 관  
한 국 식 품 연 구 원

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우리 농산물 중 건강기능성 식품소재 발굴 및 건강기능식품 원료로 인정을 위한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 홍석산(식품연)

세부연구책임자 : 홍석산(식품연/세부1)

세부연구책임자 : 김현구(식품연/세부2)

세부연구책임자 : 이명기(식품연/세부3)

위탁연구책임자 : 박영민(성균관대학교/위탁1)

협동연구책임자 : 장관식(서울산업대학교)

위탁연구책임자 : 유상호(세종대학교/위탁2)

<세부 및 협동 과제별 위탁연구기관 및 참여기업>

과제명	세부 및 협동 과제명	연구기관/ 연구책임자	위탁과제명 (위탁연구기관/연구 책임자)	참여기업
우리 농산물 중 건강기능성 소재 발굴 및 건강기능식 품 원료로 인정을 위한 연구	(세부1) 국산 생약재 중 건강기능성 소재 발굴 및 건강기능식품 원료로 인정을 위한 연구	식품연/ 홍석산		허브 메딕스
	(세부2) 국산 생약재 중 건강기능성 소재 발굴 및 건강기능식품 원료로 인정을 위한 연구	식품연/ 김현구		
	(세부3) 국산 버섯류 중 기능성 소재 발굴 및 건 강식품의 원료로 인정을 위한 연구	식품연/ 이명기	(위탁1) 버섯의 생리 활성 조사 (성균관대 /박영민)	
	(협동) 국산 종실류 중 건강기능성 소재 발굴 및 건강기능식품 원료로 인정을 위한 연구	서울산업대/ 장관식	(위탁2) 국산 종실류 에 함유된 건강기능 성 탄수화물 성분 탐 색 및 분석 (세종대/ 유상호)	

# 요 약 문

## I. 제 목

우리 농산물 중 건강기능성 식품소재 발굴 및 건강기능식품 원료로 인정을 위한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]들은 다양한 건강기능성 소재 원료로 활용될 수 있음에도 불구하고 기능성에 대한 과학적인 연구 및 자료 부족으로 인하여 그의 기능성 인정받지 못하고 있음. 따라서 우리 농산물의 건강기능성을 연구하여 우리 농산물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하여야 함

○ 수입 농산물에 대한 우리 농산물의 건강기능적 우수성을 입증하여야 함

○ 농업을 경쟁력 있는 산업으로 육성하기 위하여 국산 농산물로부터 고기능 생리활성물질을 탐색하여 부가가치를 향상시켜야 한다.

○ 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]의 다양한 건강기능성과 그 가공방법을 체계적으로 연구하여 우리 농산물 및 그 가공물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하여야 한다.

○ 농산물 소비촉진과 농가소득 증대를 위하여 국가차원에서 건강기능식품으로 활용 가능한 우리 농산물의 발굴과 그의 과학적 건강기능성 연구가 필요함

○ 국내 건강기능식품 시장규모는 2001년 1조5,000억원에서 2006년 4조원으로 크게 증가할 것으로 예상됨. 또한 건강기능식품의 세계시장 규모도 2000년 1,380억불에서 2005년에는 10배 이상 규모로 급격히 증가할 것으로 예상됨. 따라서 우리 농산물이 건강기능식품 원료로 활용될 수 있다면 우리 농산물 소비촉진과 농가소득 증대에 크게 기여할 수 있음.

○ 식생활 및 경제 여건의 발달로 식품의 영양으로 대표되는 제 1기능에 대한 관심과 맛과 조직감으로 대표되는 제 2기능에 대한 관심이 21세기에는 식품의 제 3기능인 생체조절기능에 대한 전 세계의 관심이 집중되고 있다. 97년 650억불 규모이던 세계 건강기능성식품 시장은 착실한 성장을 거듭해 그 시장이 점차 확산되고 있다. 건강기능식품 시장의 성장속도는 급격할 것으로 예상되어 2005년도에는 현재 시장의 10배 이상 증가되며 한국의 경우 수 조원 이상, 세계적으로 수 백조원 이상으로 예상되고 있다. 이런 경향은 미국식품과학회(IFIT)가 최근 미국의 100대 주요 식품기업체의 CRO를 대상으로 현재 연구개발영역에 대한 설문을 실시하여 분석, 발표한 결과로부터 충분히 입증된다. 즉 미국 굴지의 식품산업체 CRO(Chief Research Officers)들의 회사의 연구영역으로 중요하다고 응답한 분야 중 건강식품과 기능성식품이 수위를 차지하고 있었다. 결론적으로 건강기능식품 산업은 전세계적으로 성장기에 있는 유망 산업이라 할 수 있다.

○ 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]의 다양한 건강기능성과 그 가공방법을 체계적으로 연구하여 우리 농산물 및 그 가공물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하면 농촌소득 증대와 식품산업 발전에 크게 기여할 수 있다.

○ 현대 의학은 항생제, vaccine 및 정교한 외과적 수술 면에서 눈부시게 발전하여 인류의 평균 수명 연장에 크게 기여하였다. 반면 산업발달 및 인구증가에 따른 환경오염, 사회적 stress, 인구의 고령화, 농지의 지력(地力) 약화 및 편의·가공 식품 위주의 서구화된 식생활은 비만, 암, 관절염, 당뇨병, 고혈압, 발기부전 등의 만성 성인병의 발생을 크게 증가 시켰다. 여러 선진국의 경우 막대한 연구비를 암, 관절염, 고혈

압, 당뇨병, 발기부전, 비만 등과 같은 만성 성인병의 연구에 투자하고 있고 많은 의료비가 지출하고 있지만, 이들 질환의 치료와 예방이 잘 되지 못하고 주로 대중요법에 따른 치료로 인한 과도한 의료비 지출로 의료보험 재정의 악화가 심화되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 여러 선진국들은 지금까지 개발된 의약품들에 비하여 비교적 부작용이 적은 생약재 및 건강기능식품소재(nutraceuticals)를 이용한 성인병 치료에 대한 관심이 높아지고 있어 향후 건강기능식품 산업의 규모가 크게 증가할 것임. 우리 사회에는 식약동원(食藥同源)의 전통으로 인하여 식품의 건강기능에 대한 많은 본초학(本草學) 및 민간요법 분야의 정보가 축적되어 있음. 따라서 우리 농산물을 건강기능식품 원료로 활용하기 위한 연구가 절실히 요구되며 개발된 제품의 수출전망도 매우 밝음.

○ 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]의 다양한 건강기능성과 그 가공방법을 체계적으로 연구하여 우리 농산물 및 그 가공물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하면 국민건강 증진과 우리 식문화 발전에 크게 기여할 수 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

○ 기존 문헌, 민간요법 등의 조사를 통한 우리 농산물의 건강기능성과 안전성에 관한 근거 자료 확보

○ 과학적인 연구를 통한 농산물의 건강기능성에 대한 근거 자료 확보

○ 우리 농산물을 건강기능성 원료·성분으로 등록하기 위한 자료 획득 및 8종 이상의 우리 농산물 및 그 가공물의 건강기능성 원료 및 성분 인정을 위한 한국식품의약품안전청 제출 자료 작성

○ 우리 농산물을 건강기능성식품의 원료로 적극 활용하게 함으로써 외국산 건강기

농식품의 수입에 능동적으로 대응하고 국내 건강기능식품산업을 육성.

○ 우리 농산물의 건강기능성과 안전성을 수입 농산물와 비교 연구하여 우리 농산물의 우수성 발굴

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 가. 생약재 분야

#### 1) 홍화씨의 뼈 보호 효과

- 국산 홍화씨가 수입 홍화씨에 비하여 난소가 절제된 쥐의 뼈 손실을 크게 억제하였다.

- 국산 홍화씨의 총 phenolics 함량이 수입 홍화씨에 비하여 31 % 높았으며, osteoblast-like cell의 증식 효과 역시 국산 홍화씨가 수입 홍화씨에 비하여 14 % 높았다.

- 늑골 골절이 유도된 흰쥐에서 국산 홍화씨의 섭취가 파골세포 수와 요중 deoxypyridinoline 함량을 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰다.

- 국산 홍화씨의 섭취가 사람의 골밀도를 유의적으로 증가시켜 우수한 뼈 건강 기능성 식품소재로 활용될 수 있음을 보여주었다.

- 홍화씨를 섭취한 쥐의 혈액검사에서 독성 증상이 나타나지 않았다.

## 2) 솔잎의 건강기능성

- 국산 솔잎 투여군의 혈장 총항산화력이 대조군보다 34 % 증가하였다.
- 국산 솔잎의 총 엽록소 함량은 2.49 mg/g이었다.
- 7종의 유해 미생물에 대하여 솔잎은 0.06~0.15 mg/ml의 최소 저해농도를 보였다.
- 솔잎은 식이섬유의 함량이 높고 열량이 낮은 다이어트 식품소재의 특성을 보였다.
- 솔잎의 아미노산은 glutamic acid 함량이 가장 높았고, 성인이 필요로 하는 7종의 필수 amino acids를 함유하고 있었다.
- 솔잎의 지방산 중 불포화 지방산의 함량은 64.48%로 매우 높았다.
- 솔잎은 cafeteria diet로 유도된 흰쥐의 비만증을 효과적으로 억제하였다.
- 열처리와 건조가 솔잎의 비만억제 효과를 어느 정도 감소시켰으나 모든 처리구에서 모든 측정치가 비만 대조군에 비하여 작은 값을 나타내어 비만억제 효과가 인정되었다.
- 솔잎의 가용성 및 불용성 분획이 상승적으로 비만을 억제하였다.
- 솔잎 분말을 15 g씩 28일간 비만인에게 섭취시킨 결과 체중이 평균 3.6 kg 감소하고 체지방 함량이 18 % 감소하여 국산 솔잎이 우수한 체중조절용 기능성



식품소재로 활용될 수 있음을 보여주었다.

- 술있을 섭취한 쥐의 혈액검사에서 독성 증상이 나타나지 않았다.

## 나. 채소류 분야

### 1) 채소류의 생리활성 성분의 검색 및 유효성분 추출 기술 개발

가) 시판되는 한국산 마늘과 중국산 마늘을 물, 50% 에탄올 및 100% 에탄올 용매로 추출하여 생리활성을 검정하였다. 아질산염 소거작용은 한국산과 중국산 마늘 모두 pH 1.2에서 물로 추출했을 때 가장 높은 값을 나타내었다. 물이나 50% 에탄올에서 추출한 한국산과 중국산 마늘 추출물의 SOD 유사활성은 48.43~63.89%로 나타났다. 한국산 마늘의 SOD 유사활성이 중국산 마늘의 SOD 유사활성보다 더 높았다. 특히 물로 추출했을 때 가장 높은 값을 나타내었고, 한국산의 마늘 추출물에서 전자공여능을 측정한 결과는 32.51~43.74%로 중국산의 전자공여능 보다 더 높은 값을 보였다.

나) 시판되는 한국산 생강과 중국산 생강을 물, 50% 에탄올 및 100% 에탄올 용매로 추출하여 아질산염 소거작용, SOD 유사활성, 전자공여능을 측정하였다. 아질산염 소거작용은 한국산과 중국산 생강 모두 pH 1.2에서 50% 에탄올로 추출했을 때 가장 높은 값을 나타내었다. 물이나 50% 에탄올에서 추출한 한국산과 중국산 생강 추출물의 SOD 유사활성은 8.66~35.95%로 나타났다. 한국산 생강의 SOD 유사활성이 중국산 생강의 SOD 유사활성보다 더 높았고, 특히 물로 추출했을 때 가장 높은 값을 나타내었다. 한국산 생강 추출물에서 전자공여능을 측정한 결과 22.23~86.95%로 나타났고 이 값은 중국산의 전자공여능 보다 더 높았다.

2) 채소류의 최적추출조건 설정, 추출공정별 추출물의 특성 비교 및 *in vivo*에서 채소류의 지질 감소효과

가) 마늘의 최대 기능성 성분을 추출하기 위한 최적의 조건을 찾기 위하여 반응표면분석(response surface methodology)을 이용하였다. 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획을 사용하였으며 SAS(statistical analysis program)을 사용하여 회귀분석에 사용하였다. 실험계획은 에너지 용량별(30~150W), 에탄올 농도별(0~99%), 추출시간별(1~9분)에 따라 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하였다. 수율의 최대값은 26.41%이었고 이때의 요인변수 들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 146.2w, 에탄올 농도 63.31% 및 추출시간 5.8분 이었다. 전자공여능의 최대값은 72.86%로 나타났으며 이때의 추출조건은 에너지 용량 114.84W, 에탄올 농도 58.51% 및 추출시간 1.42분이었다. 총 폴리페놀 함량의 최대값은 61.56%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 112.43W, 에탄올 농도 5.752% 및 추출시간 6.11분으로 나타났다. 에너지 용량, 에탄올 농도, 시간이 각각 149.11W, 58.10% 및 5.06분일 때 tyrosinase 최대값은 42.98%로 나타났다. 아질산염의 최대값은 94.62%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 81.83W, 에탄올 농도 2.65% 및 추출시간 3.83분으로 나타났다. 에너지 용량, 에탄올 농도, 시간이 각각 34.23W, 33.11% 및 4.40분일 때 SOD 유사활성은 49.12%로 최대값을 나타내었다. 4차원 반응 표면에 의해 일치하는 최적범위는 에너지 용량, 에탄올 농도, 추출시간이 각각 0~100W, 40~70%, 2~8분으로 나타났다.

나) 양파의 최대 기능성 성분을 추출하기 위한 최적의 조건을 찾기 위하여 반응표면분석(response surface methodology)을 이용하였다. 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획을 사용하였으며 SAS(statistical analysis program)을 사용하여 회귀분석에 사용하였다. 실험계획은 에너지 용량별(30~150W), 에탄올 농도별(0~99%), 추출시간별(1~9분)에 따라 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하였다. 수율의 최대값은 44.02%이었고 이때의 요인변수 들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 143.13w, 에탄올 농도 61.77% 및 추출시간 3.39분 이었다. 전자공여능의 최대값은 45.85%로 나타났으

며 이때의 추출조건은 에너지 용량 143.55W, 에탄올 농도 27.52% 및 추출시간 4.86 이었다. 총 폴리페놀 함량의 최대값은 62.30%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 36.05W, 에탄올 농도 55.60% 및 추출시간 6.69분으로 나타났다. 에너지 용량, 에탄올 농도, 시간이 각각 132.49W, 36.47% 및 7.62분일 때 tyrosinase 최대값은 65.40%로 나타났다. 아질산염의 최대값은 81.23%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 109.09W, 에탄올 농도 31.91 및 추출시간 1.49분으로 나타났다. 에너지 용량, 에탄올 농도, 시간이 각각 99.41W, 8.471% 및 7.13분일 때 SOD 유사활성은 69.84%로 최대값을 나타내었다. 4차원 반응 표면에 의해 일치하는 최적범위는 에너지 용량, 에탄올 농도, 추출시간이 각각 0~120W, 70~90%, 2~10분으로 나타났다.

다) 생강의 최대 기능성 성분을 추출하기 위한 최적의 조건을 찾기 위하여 반응 표면분석(response surface methodology)을 이용하였다. 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획을 사용하였으며 SAS(statistical analysis program)을 사용하여 회귀분석에 사용하였다. 실험계획은 에너지 용량별(30~150W), 에탄올 농도별(0~99%), 추출시간별(1~9분)에 따라 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하였다. 수율의 최대값은 38.80%이었고 이때의 요인변수 들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 126.68w, 에탄올 농도 53.39% 및 추출시간 8.15분 이었다. 전자공여능의 최대값은 77.92%로 나타났으며 이때의 추출조건은 에너지 용량 58.25W, 에탄올 농도 91.87% 및 추출시간 5.54분 이었다. 총 폴리페놀 함량의 최대값은 105.59%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 81.82W, 에탄올 농도 99.52% 및 추출시간 5.06분으로 나타났다. 에너지 용량, 에탄올 농도, 시간이 각각 110.86W, 71.12% 및 8.34분일 때 아질산염의 최대값은 92.77%로 나타났다. Tyrosinase의 최대값은 79.39%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 106.08W, 에탄올 농도 2.06% 및 추출시간 4.61분으로 나타났다. 에너지 용량, 에탄올 농도, 시간이 각각 71.89W, 97.23% 및 5.51분일 때 SOD유사활성은 56.65%로 최대값을 나타내었다. 4차원 반응 표면에 의해 일치하는 최적범위는 에너지 용량, 에탄올 농도, 추출시간이 각각 0~80W, 0~40%, 3~7분으로 나타났다.

라) 동물실험에서 마늘의 지질 감소효과를 확인하기 위하여 대조군, 고지방 식이 대조군, 1% 혼합식이 투여군, 2% 혼합 식이 투여군으로 나누어 4주간 사육하였다. 희생 후 간, 신장, 비장을 적출하였고 혈액을 채취하여 혈장으로 분리하여 각각 분석 시료로 사용하였다. 마늘 추출물을 급여한 실험동물의 체중, 식이 효율은 대조군에 비하여 고지방 식이와 1%, 2% 혼합 식이를 급여한 군에서 증가하는 경향을 보여주었다. 혈청분석을 통하여 마늘 추출물이 간 기능에 미치는 영향을 알아본 결과 sGOT, sGPT는 감소하는 경향을 보여 주었고 콜레스테롤, 중성지방, 총지질 등 혈청 지질 수준 역시 마늘 추출물을 급여 시킴으로서 감소하는 경향을 볼 수 있었지만 유의적인 수준은 아니었다. 간의 지질 함량은 마늘 추출물 1%보다 2%에서 더 효과적으로 콜레스테롤과 중성지방이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 간 조직의 변화는 고콜레스테롤을 급여하였을 때 간에 지방이 많이 축적되어 지방간이 심하게 진행되었지만 마늘 추출물을 투여하였을 때 크기와 색이 정상군과 유사하게 작아지고 붉은 색으로 회복되었지만 완전하게 대조군의 간처럼 회복되지는 못했다.

마) 동물실험에서 생강의 지질 감소효과를 확인하기 위하여 대조군, 고지방 식이 대조군, 1% 혼합 식이 투여군, 2% 혼합 식이 투여군으로 나누어 4주간 사육하였다. 희생 후 간, 신장, 비장을 적출하였고 혈액을 채취하여 혈장으로 분리하여 각각 분석 시료로 사용하였다. 생강 추출물을 급여한 실험동물의 체중, 식이 효율은 대조군에 비하여 고지방 식이와 1%, 2% 혼합 식이를 급여한 군에서 증가하는 경향을 보여주었다. 특히 2% 생강 추출물을 급여한 실험군에서 유의적으로 체중이 증가하였다. 혈청분석을 통하여 생강 추출물이 간 기능에 미치는 영향을 알아본 결과 sGOT, sGPT는 감소하는 경향을 보여 주었고 콜레스테롤, 중성지방, 총지질 등 혈청 지질 수준 역시 생강 추출물을 급여 시킴으로써 감소하는 경향을 볼 수 있었지만 유의적인 수준은 아니었다. 마늘 추출물을 급여하였을 때 간의 지질 함량을 분석한 결과 혈청과 동일하게 마늘 추출물을 급여하였을 때 효과적으로 콜레스테롤과 중성지방이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 간 조직의 변화는 고콜레스테롤을 급여하였을 때 간에 지방이 많이 축적되어 지방간이 심하게 진행되었지만 생강 추출물을 투여하였을 때 크

기와 색이 정상군과 유사하게 작아지고 붉은 색으로 회복되었지만 완전하게 대조군의 간처럼 회복되지는 못했다.

### 3) 채소류 추출물의 기능성 소재화 및 가공식품의 개발

본 실험에서는 마늘 추출물과 국내산 생약재를 이용하여 마늘 타블렛과 마늘음료를 제조하고자 하였다. 마늘 타블렛 제품은 구연산 1~2% 중량, 팽이버섯 2~6% 중량, 자일리톨 2~4% 중량, 함수포도당 40~62% 중량, 스테아린산 마그네슘 0.5~1.5% 중량, 옥타코사놀 0.2~1% 중량, 비타민 C 0.2~0.5% 중량 및 마늘분말 10~20% 중량의 배합비로 제조하였다. 한편, 마늘음료 제품은 구연산 1~2% 중량, 팽이버섯 2~6% 중량, 자일리톨 2~4% 중량, 스테아린산 마그네슘 0.5~1.5% 중량, 옥타코사놀 0.2~1% 중량, 비타민 C 0.2~0.5% 중량 및 마늘 분말 10~20% 중량을 혼합 후 추출하여 제조하였다.

4) 채소류의 기능성과 안전성에 대한 자료수집 및 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료 작성을 하였다.

5) 본 연구를 통하여 채소류의 생리활성 성분의 검색 및 유효성분의 추출방법, 용매, 온도, 시간에 따라 비교하여 최적 추출조건을 설정하였고, 그에 따른 생리활성 성분을 비교 분석하였다. 또한 *in vivo*에서 마늘과 생강의 지질감소 효과를 확인하기 위하여 실험 동물을 4주간 사육하였으며, 마늘의 다양한 제품 개발을 위해 국내산 생약재를 선정하여 적절한 농도에서 다양한 종류의 음료와 타블렛 제품을 개발하였다.

마늘, 양파, 생강의 최적 추출조건 즉, 추출방법, 용매, 온도, 시간 등의 조건이나 마늘을 소재로 다양하게 개발된 제품들은 산업체나 농협 등에 기술 이전을 시도할 것이며, 이로 인한 국민의 식생활 개선과 보건 향상에 기여 할 수 있다. 이를 토대로 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료 작성을 하였다.

#### 다. 버섯류 분야

- 1) 버섯은 원료 및 추출물 모두에서 항균과 항산화 효과가 나타났다.
- 2) 버섯 추출물의 항균 효과는 느타리와 표고버섯의 에탄올 침전물에서 *Eubacterium limosum*을 제외한 미생물을 억제하였고 표고버섯보다 느타리가 우수하였으며 *Salmonella typhimurium*의 억제가 가장 컸다.
- 3) 버섯 추출물의 prebiotic effect는 *Eubacterium limosum*과 *B. bifidum*에서 우수하였고 나머지 균주에게는 약하게 생육 촉진을 하였다.
- 4) 버섯 추출물의 항산화 효과는 국산 표고버섯의 경우 아세톤 침전물이 가장 높은 활성을 보였으며, 중국산 표고버섯의 경우는 아세톤 침전물과 에탄올 침전물 모두 높은 활성을 나타냈으며, 느타리 버섯의 경우는 물 침전물이 높은 활성을 보였다. 실험한 모든 농도에서 국산 표고버섯이 중국산 표고버섯보다 더 높은 전자공여능을 보였다.
- 5) 버섯 추출물의 쥐 급여시 몸무게 변화에서는 표고가루를 배합한 사료를 먹인 실험군에서 가장 두드러지게 (6.6%) 몸무게 감소율을 보였고, 혈당 변화에서는 각 group별로 큰 차이는 나타나지 않았다. Total cholesterol의 경우에는 control이 가장 낮게 나타나고 표고액을 배합하여 먹인 실험군에서 cholesterol의 level을 가장 많이 낮춰주는 것으로 관찰되었다.
- 6) 시판버섯 추출물의 SOD활성은 느타리 버섯 추출물, 표고 버섯 추출물, 효모 추출물, 꽃송이 버섯 추출물 순으로 높았다. 전자공여능은 느타리 버섯 추출물, 꽃송이 버섯 추출물, 효모 추출물, 표고 버섯 추출물 순으로 높았다.
- 7) 고체 배지에서 시판버섯 추출물의 항균활성에서 느타리와 폴리칸이 *Listeria*

*monocytogenes*를, 표고는 *Escherichia coli* 0157 H7과 *Listeria monocytogenes*를, 꽃송이는 *Escherichia coli*와 *Listeria monocytogenes*를 억제하였다.

액체배지에서 *Escherichia coli*, *Eubacterium limosum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Bacteroides uniformis*는 표고에 의하여 가장 많이 억제되었으며 폴리칸은 가장 억제가 작았다. *Bacteroides fragilis*는 느타리가 가장 많이 억제시켰으며, *Bifidobacterium longum*과 *bifidum*은 버섯균 간에 큰 차이가 없었다.

8) 본 결과는 구체적인 고시형 항목 기준 인증으로 건강기능성 식품으로 구체적 표시가 가능하며, 버섯 첨가로 개발된 다 기능성 제품의 경우에 항산화와 항균에 대한 표시가 가능할 것이다.

#### 라. 종실류 분야

1) 본 연구는 국산 종실류에 존재하는 건강기능성 성분을 지방, 단백질, 탄수화물 성분으로 나누어 탐색, 분석하여 건강기능성 식품소재로 등재하는 데 그 목적이 있다.

2) 기능성 지방 성분의 효과를 규명하기 위해 검은깨의 항산화능력과 항암능력에 초점을 맞추었다. 국산 검은깨 메탄올 추출물의 유리라디칼 소거능은 검은깨 메탄올 추출물의 농도가 2.5, 5.0, 10.0 mg/mL로 증가할수록 DPPH의 흡광도는 각각 0.076, 0.114, 0.200으로 감소하였다. 검은깨 메탄올 추출물의 유리라디칼 소거능은  $0.154 \pm 0.032$  mmol BHT equivalent/mg BSME였으며 추출수율은 2.96%(w/w)였다. 국산 검은깨 메탄올 추출물의 첨가에 의한 결장암 세포의 생존율에 대한 결과는 검은깨 메탄올 추출물의 농도가 4.0, 5.0, 6.7, 10.0, 20.0 mg/mL로 증가할수록 24시간 반응 후의 생존율은 각각 대조구의  $98.3 \pm 4.0\%$ ,  $97.9 \pm 4.0\%$ ,  $77.4 \pm 4.0\%$ ,  $67.3 \pm 4.0\%$ ,  $14.4 \pm 2.0\%$ 였다. 즉 첨가한 검은깨 메탄올 추출물의 농도에 비례하여 생존율이 감소하였다. 또한 검은깨 메탄올 추출물 농도가 6.7-10.0 mg/mL만으로도 충분히 결장암 세포의 사멸을 유도할 수 있었다. 종실류에서 특이한 지방산인  $\Delta$ -5 polyenoic acid계

통이 은행유와 측백나무종자유에서 발견되었으며 이들의 기능성 성분에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

3) 기능성 단백질 소재를 선정하기 위해 국산 종실류의 효소활성을 확인한 결과, 표고버섯에서  $\beta$ -glucosidase의 활성이 높은 것으로 확인되었다.  $\beta$ -Glucosidase는 아이소플라본의 배당체 형태를 비배당체 형태로 전환시켜 아이소플라본의 체내 흡수율을 높여준다. 황산암모늄 침전법과 Hi trap Q HP anion-exchange column 등을 이용한 chromatography 기술을 이용하여  $\beta$ -glucosidase를 정제하였다.  $\beta$ -Glucosidase는 표고버섯으로부터 약 21.79배 정제되었으며, 정제된 효소의 비활성도는 105.26 unit/mg protein으로 나타났다. 표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 최적 pH를 측정한 결과 pH 7.0에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, pH 6.0의 저장 환경에서 안정하였다. 최적온도는 60°C로 판명되었으며, 70°C부터는 상대 활성도가 감소하였다. 90°C까지는 열에 대하여 대체적으로 안정하였으며, 또한, 30°C에서 하루가 경과한 후에도 효소활성이 감소하지 않고 안정한 것으로 보아 고온성 효소임을 확인할 수 있었다.

4) 효율적인  $\beta$ -glucan의 추출을 위해, 널리 이용되는 Wood 등의 방법, Aman 등의 방법, Micheal 등의 방법으로 보리 및 귀리에서  $\beta$ -glucan을 추출하고 비교 분석하였다.  $\beta$ -Glucan 추출수율은 Aman 등의 방법이 가장 높았으나, 매우 낮은 순도를 나타내는 결점이 확인되었다. 고순도의  $\beta$ -glucan을 추출하기 위해 Wood와 Micheal의 방법으로  $\beta$ -glucan을 추출하였다. Wood 등의 방법이 Micheal 등의 방법보다 수율 및 순도가 더 높으며, 사용되는 효소의 종류와 양이 적어, 다량의  $\beta$ -glucan을 추출할 때 보다 효율적이라고 할 수 있다.



# SUMMARY

## I . Herbs

### 1. Bone-Protecting Effect of Safflower Seeds

- Korean safflower seeds showed stronger bone-protecting effect than foreign safflower seeds in ovariectomized rats.
- Total phenolics content of Korean safflower seeds was 31% more than foreign safflower seeds. Osteoblast-like cell proliferation effect of Korean safflower seeds was 14% more than foreign safflower seeds.
- Korean safflower seeds increased the number of osteoclast cells and the levels of urinary deoxypyridinoline in rib-fractured rats significantly as compared to control.
- Korean safflower seeds increased bone mineral density significantly.
- Korean safflower seeds showed no toxicity in the blood analysis.

### 2. Pine Needles and Health

- Korean pine needles increased total plasma antioxidant status 34% more than that of control.

- Total chlorophyll content of pine needles was 2.49 mg/g.
- Minimum inhibitory concentrations of the ethanol extract of pine needles was 0.06–0.15 mg/ml for 7 harmful microorganisms.
- Pine needles had much dietary fiber and low calory.
- Glutamic acid was the most amino acid in pine needles which contained 7 essential amino acids of adult.
- The 64.48 % fatty acid was unsaturated in pine needles.
- Pine needles effectively inhibited obesity of rats fed cafeteria diets.
- The heat-treated and the dried pine needles also showed weight loss effect.
- Soluble and insoluble fractions of pine needles inhibited obesity synergistically.
- The 3.6 kg body weight and 18 % of body fat were decreased in obese patients taken 15 g/day pine needle powder for 28 days.
- Korean pine needles showed no toxicity in the blood analysis.

## II. Vegetables

### Objectives and Importance of the Project

Cultivation of vegetable has continuously increased due to its delicious, nutritious and health-stimulating properties. The processing of edible vegetable, however, has many difficulties since the vegetable generally contains 85~95% water. Therefore, consumption of vegetable is more efficient when developed as convenience food. The objective of this study was to develop the food materials and processing technology for vegetable and to study for being approved as materials of health functional foods.

### Results of the Project

#### *1. Development of Processed Foods and Food Materials from garlic and ginger*

Physiological activities of Korean grown garlic (GKG) and Chinese grown garlic (GCG) were examined. Nitrite-scavenging activity (NSA), superoxide dismutase (SOD)-like activity and electron-donating ability (EDA) of garlic extracted with water or with either 50% or 100% ethanol were measured. NSA was optimized at pH 1.2 and was highest in water and 50% ethanol extracts of both origins. SOD-like activities of water or 50% ethanol extracts from both Korea and China were 48.43~63.89% lower than those of 1 or 0.1% L-ascorbate solutions. SOD-like activities of GKG extracts were higher than GCG extracts, and water extracts of samples were highest. EDAs of GKG extracts were higher (32.51~43.74%) than GCG extracts, while those of both sample extracts were lower than 1 or 0.1% L-ascorbate solutions.

Physiological activities of Korean grown ginger (KG) and Chinese grown ginger (CG) extracts were examined. Ginger was extracted with water, 50% and 100% ethanol and nitrite-scavenging activity (NSA), superoxide dismutase (SOD)-like activity and electron-donating ability (EDA) of the extracts were investigated. NSA at pH 1.2 was the most effective in the 50% ethanol extracts of both origins. SOD-like activity of the water and 50% ethanol extracts of both samples was 8.66~35.95% lower than that of the 1 or 0.1% L-ascorbate solutions. SOD-like activity of the KG extracts was higher than the CG extracts, and the water extracts of the samples were the highest. EDA of the KG extracts was higher (22.23~86.95%) than the CG extracts, while of the extracts both samples extracts were lower than the 1 or 0.1% L-ascorbate solutions.

## ***2. Optimization Modelling of Extraction Conditions and Identification of extractive efficiencies for Effective Components of garlic, onion and ginger.***

The objective of this study was to establish microwave assisted extraction(MAE) conditions and optimization extraction conditions for effective components from garlic. The result of study plan was established with the variations of microwave power (30~120w), ethanol concentration (0~100%), and extraction time (1~9m). The results of study for optimization extraction conditions were as followed. A maximal yield of 26.41% was obtained when the microwave power, ethanol concentration, and extraction time were set at 146.2w, 63.31%, and 5.8m, respectively. A maximized electron donating ability of 72.80% was found under the following conditions: a microwave power of 114.84w, an ethanol concentration of 58.51%, and an extraction time 1.42m. A maximized polyphenol content of 61.56% was obtained when setting the microwave power, ethanol concentration, and extraction time at 112.43w, 5.75%, and 6.11m, respectively. When the microwave power, ethanol concentration, and temperature

time were set at 81.83w, 2.65%, and 3.83m, respectively, the maximum nitrite-scavenging ability was 94.62%. When the microwave power, ethanol concentration, and temperature time were set at 149.11w, 58.1%, and 5.06m, respectively, the maximum tyrosinase was 42.98%. A maximized SOD-like activity of 49.12% was obtained when setting the microwave power, ethanol concentration, and extraction time at 34.33w, 33.11%, and 4.40m, respectively. The optimum ranges of extraction conditions, superimposed by the response surface methodology, could predicate the microwave power of 0~100w, ethanol concentration of 40~70% and extraction time of 2~8m.

The objective of this study was to establish microwave assisted extraction(MAE) conditions and optimization extraction conditions for effective components from ginger. The result of study plan was established with the variations of microwave power (30~120w), ethanol concentrate (0~100%), and extraction time (1~9m). The results of study for optimization extraction conditions were as followed. A maximal yield of 38.80% was obtained when the microwave power, ethanol concentration, and extraction time were set at 126.68w, 53.39%, and 8.5m, respectively. A maximized electron donating ability of 77.92% was found under the following conditions: a microwave power of 58.25w, an ethanol concentration of 91.87%, and an extraction time 5.54m. A maximized polyphenol content of 105.59% was obtained when setting the microwave power, ethanol concentration, and extraction time at 81.82w, 99.52%, and 5.06m, respectively. When the microwave power, ethanol concentration, and temperature time were set at 110.86w, 71.12%, and 8.34m, respectively, the maximum nitrite-scavenging ability was 92.77%. A maximized tyrosinase content of 79.39% was obtained when setting the microwave power, ethanol concentration, and extraction time at 106.08w, 2.06%, and 4.61m, respectively. When the microwave power, ethanol concentration, and temperature time were set at 71.89w, 97.23%, and 5.51m, respectively, the maximum SOD-like activity was 56.65%. The

optimum ranges of extraction conditions, superimposed by the response surface methodology, could predicate the microwave power of 0~80w, ethanol concentration of 0~40% and extraction time of 3~7m.

In order to compare the effect of garlic and ginger on lowering a cholesterol, serum lipid level such as cholesterol, total lipid, and TG and liver lipid level were measured. 28 male rats were divided into 4 groups and fed with control diet or high cholesterol diet or 1% garlic supplementary diet or 2% garlic supplementary diet. Body weight gain and FER intended to increase in group fed diet mixed 1%, 2% garlic extract. But there were no significantly difference among total diet intake and organ weight of all groups fed supplementary diet. The effect of garlic on serum showed that garlic reduced sGOT and sGPT, and intended to decrease cholesterol, TG, and total lipid. Also, we investigated the effect of garlic on liver. Lipid content in liver was more decreased in rats fed 1%, 5% garlic than control.

In order to compare the effect of ginger on lowering a cholesterol, serum lipid level such as cholesterol, total lipid, and TG and liver lipid level were measured. 28 male rats were divided into 4 groups and fed with control diet or high cholesterol diet or 1% ginger supplementary diet or 2% ginger supplementary diet. Body weight gain and FER intended to increase in group fed diet mixed 1%, 2% ginger extract. Especially, body weight gain in group fed 2% ginger extract increased more significantly than other groups. The effect of ginger extract on serum showed that ginger extract reduced sGOT and sGPT, and intended to decrease cholesterol, TG, and total lipid. Also, we investigated the effect of ginger on liver. Lipid content in liver was more decreased in rats fed 1%, 5% ginger than control.

### **III. Mushrooms**

#### **Object and necessity of research**

Even though mushroom production technology to be excellent in Korea, the some mushroom value is slumping by excess competition.

Also, because of inexpensive imported mushrooms increases rapidly and the market shares of imports increase, domestic mushroom are suffering difficulty in engaging in agriculture.

Mushroom is food that consumer prefers because effect is high in living body defense that is the third function of food, aging inhibition, disease prevention and so on and is registered by health function food with the health claims under government law.

But, because the admitted mushroom health claim is not definite which are the physiology vitality material inclusion, health promotion and preservation, blood circulation harmoniously, it is required clear concreteness.

Wish to ease and help in consumption promotion that consumer approaches to mushroom with clear health claim.

#### **Content and scope of research**

For study of mushroom functionality, raw materials, extracts, commercial extracts were tested and analyzed content of indicator material.

1. Study of raw materials, extracts, commercial extracts for mushroom functionality

◦ Tested anti-oxidation and prebiotic effect and so on, of mushroom manufactured product

2. Proposal upload of mushroom data for health claim

### **Result and recommendation of application**

1. Mushroom appeared anti-bacterial and anti-oxidation effect in all of raw material and extract.

2. *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* extracts with ethanol controlled microorganism except *Eubacterium limosum*, and the biggest controlled strain was *Salmonella typhimurium*. *Pleurotus ostreatus* was superior than *Lentinus edodes* in ethanol extract.

3. Prebiotic effect of mushroom extract was superior for *B. bifidum* and *Eu. limosum*, and was promoted weakly to other strains.

4. Acetone extract showed the highest activity in case of domestic production *Lentinus edodes* mushroom. Case of *Lentinus edodes* mushroom come from China, acetone and ethanol extracts appeared high activity. Water extract showed high activity case of *Pleurotus ostreatus* mushroom. Home production *Lentinus edodes* mushroom showed higher electron donor ability than China mushroom in all extract contents.

5. When allow mouse of *Lentinus edodes* mushroom extract treatment, showed (6.6%) weight decrement mostly. Big difference did not appear by each group in blood sugar change. In the case of total cholesterol level, the control observed that lowest cholesterol's level, and *Lentinus edodes* appear reduced best for the cholesterol's level.



6. SOD activity of marketing mushroom extract is high by *Pleurotus ostreatus* mushroom extract, and followed *Lentinus edodes* mushroom extract, yeast(*Aureobasidium pullulans*) extract, *Sparassis crispa* mushroom extract.

Electron donor ability is high by *Pleurotus ostreatus* mushroom extract, and followed *Sparassis crispa* mushroom extract, yeast(*Aureobasidium pullulans*) extract, *Lentinus edodes* mushroom extract.

7. In anti-bacterial activity of marketing mushroom extract on the agar plate, *Pleurotus ostreatus* and *Aureobasidium pullulans* inhibited *Listeria monocytogenes*, and *Lentinus edodes* inhibited *Escherichia coli* 0157 H7 and *Listeria monocytogenes*.

In anti-bacterial activity of marketing mushroom extract in the broth, *Escherichia coli* 0157 H7, *Eubacterium limosum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Bacteroides uniformis* were inhibited strong by *Lentinus edodes*, on the contrary controlled weak by *Aureobasidium pullulans*. *Bacteroides fragilis* was controlled most by *Pleurotus ostreatus*, and *Bifidobacterium longum* and *bifidum* were no big difference among the mushroom groups.

8. That specific health claim expression of this result is available, and could be developed to mushroom manufactured product to be specific health ability food with specific item indication for the anti-oxidation and anti-bacterial standard certification.

### **Main research product**

o Congress publication

Lee, Myun-Ki et al. : Anti-oxidation study of raw and dry powder mushroom.

#### IV. Seeds

The ultimate goals of our research were to screen and identify healthy functional components out of lipid, protein, and carbohydrate materials in Korean domestic grain seeds and fruits, and to register them as functional food ingredients.

1. The first study focused on anti-oxidation, anti-cancer activity of black sesame seed for trying to find the effect of functional lipid. The free radical scavenging activity of methanol fraction for black sesame seed (BSME) was  $0.154 \pm 0.032$  mmol BHT equivalent/mg BSME, and as the concentration of methanol fraction increased, the absorbance of DPPH was decreased. The yield of methanol fraction was 2.96%(w/w). As the concentration of added methanol fraction increased from 4.0, 5.0, 6.7, 10.0, to 20.0 mg/mL, the viability of colon cancer cell lines, HT-29 cells were  $98.3 \pm 4.0\%$ ,  $97.9 \pm 4.0\%$ ,  $77.4 \pm 4.0\%$ ,  $67.3 \pm 4.0\%$ , and  $14.4 \pm 2.0\%$ , respectively. Concentration of 6.7–10.0 mg/mL BSME was enough to induce apoptosis in colon cancer cell lines.  $\Delta-5$  Polyenoic acids were found in ginkgo and *Thuja orientalis* oils and the functionality of those fatty acid are expected.

2. The second objectives of this study were to select a good source of  $\beta$ -glucosidase among various kinds of Korean domestic grain seeds or mushrooms, and to purify and characterize  $\beta$ -glucosidase from the selected Pyogo mushroom.  $\beta$ -Glucosidase is reported to function in phytohormone metabolism, defense against phytopathogens and herbivores, and lignification. Dialyzed and concentrated enzyme solution was treated with the following four sequential purification steps: ammonium sulfate fractionation, anion-exchange (Hi trap Q HP

1 mL), hydrophobic interaction (Hi trap phenyl HP 1mL) and gel filtration chromatography (Sephacryl S-100). Finally purified  $\beta$ -glucosidase fraction showed a specific activity of 105.26 unit/mg protein. The procedure described above resulted in 21.79-fold purification of  $\beta$ -glucosidase. The optimal pH and temperature for  $\beta$ -glucosidase activity were determined to be pH 7.0 and 60°C, respectively. The  $\beta$ -glucosidase was found to be stable in the storage condition of pH 6.0 and 30°C for 24 hr.

3. In order to find an efficient extraction method of water-soluble  $\beta$ -glucan from barley grains, three extraction methods (Wood's, Aman's, and Michael's methods) were compared from each other. The greatest extraction yield was obtained with Aman's method, but the purity of water-soluble  $\beta$ -glucan was inadequate. When Wood's and Micheal's methods were applied to extract barley  $\beta$ -glucan, greater purity and yield of water-soluble  $\beta$ -glucan were achievable from Wood's method. Thus, it is recommended that Wood's method should be used to extract barley  $\beta$ -glucan more efficiently and economically. Molecular structure of extracted barley  $\beta$ -glucan was also investigated.

# CONTENTS

Chapter 1. Herb Part .....	51
I. Outlines of Project .....	53
1. Objectives of Project .....	53
2. Necessities of Project .....	53
3. Scopes of Project .....	64
II. R&D Status in Domestic and Overseas .....	65
III. Aims and Contents of R&D .....	67
IV. Contents and Results of R&D .....	68
1. Bone-Protecting Effect of Safflower Seeds .....	68
2. Pine Needles and Health .....	84
V. References .....	104
Chapter 2. Vegetable Part .....	115
I. Aims and Contents of R&D .....	117
II. Introduction .....	118
III. Materials and Methods .....	119
1. Materials .....	119
2. Experimental Methods .....	121
A. Extraction Techniques of Active Components from Vegetables .....	121
1) Determination of Functions .....	121
A) Electron Donating Activity .....	121
B) SOD-like Activity .....	121
C) Tyrosinase Inhibition .....	122
D) Total Polyphenol Content .....	123
E) Total Thiosulfinate Content .....	123

F) ACE Inhibition Effect .....	124
G) Nitrite Scavenging Activity .....	125
H) Data Analysis .....	125
2) Information about Physiological Function and Safety of Vegetables ·	126
A) Garlic .....	126
B) Onion .....	133
C) Ginger .....	138
B. Characterization of Extraction Conditions and Cholesterol–	
Lowering Effect of Vegetables <i>in vivo</i> .....	148
1) Characterization of Extraction Conditions .....	148
A) Materials .....	148
B) MAE Equipment and Extraction Conditions .....	148
C) Central Composite Design for Optimization of Extraction Condition	149
D) Prediction and Substantiation of Optimum Extraction Condition .....	149
E) Determination of Yield .....	152
F) Determination of Functions .....	152
G) Data Analysis .....	155
2) Cholesterol–Lowering Effect of Vegetables <i>in vivo</i> .....	155
A) Materials and Experimental Diets .....	155
B) Rat Study .....	156
C) Serum Lipid Analysis .....	156
D) Lipid and Cholesterol in Liver .....	157
E) Liver Biopsy .....	157
F) Data Analysis .....	158
C. Development of Functional Foods .....	158
D. Data for Approval as Health–Functional Foods .....	158
IV. Results and Discussion .....	158
1. Extraction Technique of Active Compound from Vegetables .....	158

A. Determination of Functions of Garlic Extract .....	158
1) Electron–Donating Abilities .....	158
2) SOD–like Activity .....	161
3) Tyrosinase–inhibitory Effect .....	164
4) Total Polyphenol Content .....	166
5) Total Thiosulfinate Content .....	168
6) Nitrite Scavenging Activity .....	170
B. Determination of Functions of Onion Extract .....	172
1) Electron–Donating Abilities .....	172
2) SOD–like Activity .....	175
3) Tyrosinase–Inhibitory Effect .....	178
4) Total Polyphenol Content .....	180
5) Total Thiosulfinate Content .....	182
6) Nitrite Scavenging Activity .....	184
C. Determination of Activities of Ginger Extract .....	186
1) Electron–Donating abilities .....	186
2) SOD–like Activity .....	188
3) Tyrosinase–Inhibitory Effect .....	190
4) Total Polyphenol Content .....	192
5) Angiotensin–Converting Enzyme(ACE) Effect .....	194
6) Nitrite Scavenging Activity .....	196
2. Characterization of Extraction Conditions and Cholesterol–Lowering	
Effect of Vegetables <i>in vivo</i> .....	198
A. Optimum Extraction Condition of Vegetables .....	198
1) Optimum Extraction Condition of Garlic .....	199
A) Preliminary Establishment of Extraction Parameters .....	199
B) Optimization of Extraction Condition .....	211
C) Verification of Optimal Extraction Condition .....	213

2) Optimum Extraction Condition of Onion .....	214
A) Preliminary Establishment of Extraction Parameters .....	214
B) Optimization of Extraction Condition .....	225
C) Verification of Optimal Extraction Condition .....	227
3) Optimum Extraction Condition of Ginger .....	229
A) Preliminary Establishment of Extraction Parameters .....	229
B) Optimization of Extraction Condition .....	241
C) Verification of Optimal Extraction Condition .....	243
B. Cholesterol-Lowering Effect of Vegetables <i>in vivo</i> .....	245
1) Cholesterol-Lowering Effect of Garlic .....	245
2) Cholesterol-Lowering Effect of Ginger .....	248
3. Development of Functional Food from Vegetables .....	252
A. Development of Functional Food Materials .....	252
B. Development of Granulated Tea and Pill .....	269
4. Data for Approval as Health-Functional Foods .....	273
V. References .....	293
Chapter 3. Mushroom Part .....	297
I. Aims and Contents of R&D .....	299
II. Contents and Results of R&D .....	300
1. Materials and Methods .....	300
A. Materials and Reagents .....	300
1) Materials .....	300
2) Strains .....	300
3) Media .....	301
4) Instruments .....	302
B. Methods .....	303
1) Extraction Method .....	303

2) Antioxidant Effect .....	305
3) Antibiotics Effect .....	306
4) Prebiotic Effect .....	307
5) Glucan Assay .....	307
6) Animal Test .....	310
A) Animal .....	310
B) Functionality Assay .....	312
(1) Cholesterol Assay .....	312
(2) Blood Glucose Assay .....	313
2. Results and Discussion .....	313
A. Mushroom Functionality .....	313
1) Current Status of Mushroom Industry .....	313
A) Mushroom Industry in the World .....	313
B) Mushroom Industry in Korea .....	316
C) Mushroom Utilization .....	318
2) Survey of Mushroom Data for Health Claim .....	318
A) Mushroom Functionalities .....	318
B) Functionality and safety of Mushroom .....	320
3) Antioxidant Effect of Mushroom .....	333
4) Antibacterial Effect of Mushroom .....	337
5) Prebiotic Effect of Mushroom .....	338
6) Animal Test of Mushroom .....	345
A) Body Weight .....	345
B) Blood Glucose .....	346
C) Blood Cholesterol .....	347
D) Insulin Assay .....	349
E) Assay of GPT and GOT .....	350
B. Functionality Mushroom Extracts .....	352



1) Functional Material Contents in Selected Mushrooms .....	352
2) Antioxidant Effects of Mushroom Extracts .....	353
3) Antibacterial Effects of Mushroom Extracts .....	356
4) Prebiotic Effects of Mushroom Extracts .....	361
5) Animal Test of Mushroom Extracts .....	375
A) Body Weight .....	375
B) Blood Glucose .....	376
C) Blood Cholesterol .....	377
D) Insulin Assay .....	380
E) GOT Assay .....	381
C. Functionality Commercial Mushroom Extracts .....	383
1) Functional Material Contents .....	383
2) Antioxidant Effects .....	386
3) Antibacterial Effects .....	389
4) Prebiotic Effect .....	399
5) Animal Test .....	408
A) Body Weight .....	408
B) Blood Glucose .....	409
C) Blood Cholesterol .....	410
D) Insulin Assay .....	412
E) GOT Assay .....	413
6) Proposal for Health Claim of Mushroom .....	415
III. References .....	415
Chapter 4. Seed Part .....	423
I. Aims and Contents of R&D .....	425
II. Contents and Results of R&D .....	426
1. Functional Lipid Materials .....	426

2. Functional Protein Materials .....	469
3. Functional Carbohydrate Materials .....	497
III. References .....	543
Chapter 5. Achievement Research Objectives and Contribution to Research Area .....	553
Chapter 6. Application Plan of Results .....	555
Chapter 7. Foreign Information from Research .....	560

# 목 차

제1장 생약재 분야 .....	51
제1절 연구개발과제의 개요 .....	53
1. 연구개발의 목적 .....	53
2. 연구개발의 필요성 .....	53
가. 기술적 측면 .....	53
나. 경제·산업적 측면 .....	58
다. 사회·문화적 측면 .....	63
3. 연구개발의 범위 .....	64
제2절 국내외 기술개발 현황 .....	65
제3절 연구개발 목표와 내용 .....	67
제4절 연구개발수행 내용 및 결과 .....	68
1. 홍화( <i>Carthamus tinctorious</i> ) 씨의 뼈 보호 효과 .....	68
2. 솔( <i>Pinus densiflora</i> )잎의 건강기능성 .....	84
제5절 참고문헌 .....	104
제2장 채소류 분야 .....	115
제1절 연구개발의 목표와 내용 .....	117
제2절 서론 .....	118
제3절 재료 및 방법 .....	119
1. 실험 재료 .....	119
2. 실험 방법 .....	121
가. 채소류의 생리활성 성분의 검색 및 유효성분 대량 추출 기술 개발 .....	121
1) 생리활성 측정에 따른 추출효과 분석 .....	121
가) 전자공여 작용 측정 .....	121
나) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정 .....	121

다) Tyrosinase 저해효과 측정 .....	122
라) 총 polyphenol 함량 측정 .....	123
마) 총 thiosulfinate 함량 측정 .....	123
바) ACE 저해효과 측정 .....	124
사) 아질산염 소거작용 측정 .....	125
아) 통계처리 .....	125
2) 채소류의 기능성과 안전성에 대한 자료 수집 .....	126
가) 마늘 .....	126
(1) 머리말 .....	126
(2) 총설 .....	127
(가) 이름 .....	127
(나) 일반성분 .....	127
(다) 생산동향 .....	128
(3) 마늘의 기능성 .....	129
(가) Garlic and cardiovascular disease .....	130
① 협심증 .....	130
② 심근경색 .....	130
③ 혈전증 .....	131
(나) Garlic and cancer .....	131
(다) Garlic and diabetes mellitus .....	132
(라) Garlic and other anti-aging properties .....	132
나) 양파 .....	133
(1) 머리말 .....	133
(2) 총설 .....	134
(가) 이름 .....	134
(나) 일반성분 .....	134
(다) 생산동향 .....	135
(3) 양파의 기능성 .....	136

(가) Onion and cardiovascular disease .....	136
① 협심증 .....	137
② 심근경색 .....	137
③ 혈전증 .....	137
(나) Onion and cancer .....	137
(다) Onion and diabetes mullitus .....	138
(라) Onion and other anti-aging properties .....	138
다) 생강 .....	138
(1) 머리말 .....	138
(2) 총설 .....	141
(가) 이름 .....	141
(나) 일반성분 .....	142
(다) 생산동향 .....	143
(3) 생강의 기능성 .....	144
(가) 식욕증진 및 소화작용 .....	144
(나) 해열 및 두통해소 작용 .....	144
(다) 항균작용 .....	145
(라) 구토완화 작용 .....	145
(마) 체내 수분조절 작용 .....	146
(바) 체온조절 작용 .....	146
(사) Cholesterol 조절작용 .....	146
(아) 항염증 작용 .....	147
나. 채소류의 최적 추출조건 설정, 추출공정별 채소류 추출물의 특성 비교 및 <i>in vivo</i> 에서 채소류의 지질간소 효과 .....	148
1) 추출공정별 채소류의 특성 및 최적 추출조건 설정 .....	148
가) 실험재료 .....	148
나) MAE 장치 및 추출조건 .....	148
다) 추출조건 최적화를 위한 중심합성 실험계획 .....	149

라) 최적 추출조건의 예측 및 실증시험 .....	149
마) 수율측정 .....	152
바) 생리활성 성분 측정 .....	152
(1) 총 polyphenol 함량 측정 .....	152
(2) 전자공여 작용 측정 .....	152
(3) Tyrosinase 저해효과 측정 .....	153
(4) 아질산염 소거작용 측정 .....	154
(5) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정 .....	154
사) 통계처리 .....	155
2) 채소류 추출물의 동물 확인 실험 .....	155
가) 실험재료 및 실험식이 조제 .....	155
나) 실험동물 사육 및 시료 채취 .....	156
다) 혈청지질 분석 .....	156
라) 간조직 중의 지질함량 및 cholesterol 측정 .....	157
마) 간조직의 육안검사 .....	157
바) 통계처리 .....	158
다. 생리활성 추출물의 기능성 소재화 및 기능성 식품 개발 .....	158
라. 식약청 제출 자료 작성 .....	158
제4절 결과 및 고찰 .....	158
1. 채소류의 생리활성 성분의 검색 및 유효성분 대량 추출 기술 개발 .....	158
가. 마늘의 생리활성 성분 검색 .....	158
1) 전자공여 작용 .....	158
2) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 .....	161
3) Tyrosinase 저해효과 .....	164
4) 총 polyphenol 함량 .....	166
5) 총 thiosulfinate 함량 .....	168
6) 아질산염 소거작용 .....	170
나. 양파의 생리활성 성분 검색 .....	172

1) 전자공여 작용 .....	172
2) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 .....	175
3) Tyrosinase 저해효과 .....	178
4) 총 polyphenol 함량 .....	180
5) 총 thiosulfinate 함량 .....	182
6) 아질산염 소거작용 .....	184
다. 생강의 생리활성 성분 검색 .....	186
1) 전자공여 작용 .....	186
2) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 .....	188
3) Tyrosinase 저해효과 .....	190
4) 총 polyphenol 함량 .....	192
5) Angiotensin-converting enzyme (ACE) 활성 .....	194
6) 아질산염 소거작용 .....	196
2. 채소류의 최적 추출조건 설정, 추출공정별 채소류 추출물의	
특성 및 <i>in vivo</i> 에서 채소류의 지질간소 효과 .....	198
가. 채소류의 최적 추출조건 설정 .....	198
1) 마늘의 최적 추출조건 설정 .....	199
가) 마늘의 최적 추출조건 설정 .....	199
나) 마늘의 추출공정 최적화 시험 .....	211
다) 예측조건 실증 .....	213
2) 양파의 최적 추출조건 설정 .....	214
가) 양파의 최적 추출조건 설정 .....	214
나) 양파의 추출공정 최적화 시험 .....	225
다) 예측조건 실증 .....	227
3) 생강의 최적 추출조건 설정 .....	229
가) 생강의 최적 추출조건 설정 .....	229
나) 생강의 추출공정 최적화 시험 .....	241
다) 예측조건 실증 .....	243

나. 채소류 추출물의 동물 확인 실험 .....	245
1) 마늘 추출물의 동물 실험 .....	245
2) 생강 추출물의 동물 실험 .....	248
3. 추출물의 기능성 소재화 및 채소류를 이용한 가공식품 개발 .....	252
가. 채소류 추출물 활용 건강기능식품 원료 개발 .....	252
나. 채소류 과립차 및 환 제품 개발 .....	269
1) 채소류의 추출 및 농도 .....	269
2) 부형제 배합 .....	269
3) 과립화 및 건조 .....	270
4) 과립차 제조공정 .....	270
5) 채소류 환제품 개발 .....	271
4. 채소류의 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료 .....	273
가. 마늘타블렛BK21 .....	273
1) 기능효과 : 항산화 .....	273
2) 원료·성분 섭취가 국민건강증진에 기여한다는 근거 .....	273
3) 기원, 개발경위, 외국에서의 인정·사용현황 등에 관한 자료 .....	273
4) 제조방법 및 그에 관한 자료 .....	274
5) 원료·성분의 특성에 관한 자료 .....	274
6) 안전성에 관한 자료 .....	275
7) 기능성 내용 및 그에 관한 자료 .....	275
가) 한국산 마늘 성분들의 항암성에 관한 연구 .....	275
나) 마늘 추출물의 항균, 항고혈압 및 항암 활성 .....	276
다) 마늘 성분의 노화억제 작용에 관한 연구: 항산화 작용을 중심으로 ...	276
라) 생마늘즙과 열처리 마늘즙의 항균활성 비교 .....	276
마) 마늘 추출물과 vitamin C 혼합물에 의한 암세포 증식억제의 상승효과 .....	277
바) 처리법을 달리한 마늘첨가 식이가 자발성 고혈압 쥐의 혈액에 미치는 영향 .....	277



사) 가열된 마늘 농축액을 함유하는 항진균용 천연 보존료 .....	278
아) 마늘 추출물이 N-Nitrosodimethylamine의 생성에 미치는 영향 .....	278
자) 마늘-죽염 제제가 위장장애 유발 흰쥐의 항산화 효소 활성화 활성에 미치는 영향 .....	279
차) 마늘 성분과 항산화제 BHA의 aflatoxin 대사에 미치는 항암효과 비교 .....	279
카) 마늘 추출물과 vitamin C 혼합물에 의한 암세포 증식억제의 상승효과 .....	279
타) 처리법을 달리한 마늘첨가 식이가 자발성 고혈압 쥐의 혈압에 미치는 영향 .....	279
8) 섭취량 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 .....	281
가) 섭취량 및 섭취방법 .....	281
나) 섭취시 주의사항 .....	281
다) 섭취량의 설정근거 .....	281
9) 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품이 아니라는 확인자료 .....	281
가) 제2조 (의약품의 용도로만 사용되는 원료) 해당 여부 .....	282
나) 제3조 (의약품과 같거나 유사한 건강기능식품) 해당 여부 .....	282
나. 마늘음료BK22 .....	283
1) 기능효과 : 항산화 .....	283
2) 원료·성분 섭취가 국민건강증진에 기여한다는 근거 .....	283
3) 기원, 개발경위, 외국에서의 인정·사용현황 등에 관한 자료 .....	283
4) 제조방법 및 그에 관한 자료 .....	284
5) 원료·성분의 특성에 관한 자료 .....	284
6) 안전성에 관한 자료 .....	285
7) 기능성 내용 및 그에 관한 자료 .....	285
가) 한국산 마늘 성분들의 항암성에 관한 연구 .....	285
나) 마늘 추출물의 항균, 항고혈압 및 항암 활성화 .....	285
다) 마늘 성분의 노화억제 작용에 관한 연구: 항산화 작용을 중심으로 ...	286

라) 생마늘즙과 열처리 마늘즙의 항균활성 비교 .....	286
마) 마늘 추출물과 vitamin C 혼합물에 의한 암세포 증식억제의 상승효과 .....	287
바) 처리법을 달리한 마늘첨가 식이가 자발성 고혈압 쥐의 혈액에 미치는 영향 .....	287
사) 가열된 마늘 농축액을 함유하는 항진균용 천연 보존료 .....	288
아) 마늘 추출물이 N-Nitrosodimethylamine의 생성에 미치는 영향 .....	288
자) 마늘-죽염 제제가 위장장애 유발 흰쥐의 항산화 효소 활성화에 활성에 미치는 영향 .....	289
차) 마늘 성분과 항산화제 BHA의 aflatoxin 대사에 미치는 항암효과 비교 .....	289
8) 섭취량 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 .....	291
가) 섭취량 및 섭취방법 .....	291
나) 섭취시 주의사항 .....	291
다) 섭취량의 설정근거 .....	291
9) 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품이 아니라는 확인자료 .....	291
가) 제2조 (의약품의 용도로만 사용되는 원료) 해당 여부 .....	291
나) 제3조 (의약품과 같거나 유사한 건강기능식품) 해당 여부 .....	292
제5절 참고문헌 .....	293
제3장 버섯류 분야 .....	297
제1절 연구개발 목표와 내용 .....	299
제2절 연구개발수행 내용 및 결과 .....	300
1. 재료 및 방법 .....	300
가. 실험재료 .....	300
1) 재료 .....	300
2) 사용균주 .....	300
3) 사용배지 .....	301

4) 실험기구 .....	302
나. 실험방법 .....	303
1) 추출방법 .....	303
2) 항산화 측정 .....	305
3) 항균효과 .....	306
4) Prebiotic effect .....	307
5) Glucan 측정 .....	307
6) 동물실험 .....	310
가) 실험동물의 사육과 관리 .....	310
(1) 버섯 .....	310
(2) 버섯 추출물 .....	311
(3) 시판 버섯 추출물 .....	311
나) 기능성 분석 .....	312
(1) Cholesterol 측정 .....	312
(2) 혈당량 측정 .....	313
2. 실험결과 및 논의 .....	313
가. 버섯의 기능성 조사 .....	313
1) 버섯 산업 현황 조사 .....	313
가) 세계의 버섯 산업 .....	313
나) 우리 나라의 버섯 산업 .....	316
(1) 국내 재배 버섯 품목 .....	316
(2) 국내 버섯 생산 현황 .....	316
(3) 시판 버섯 추출물 .....	316
다) 국내 버섯 활용 제품 조사 .....	318
(1) 버섯을 이용한 식품 및 원료 품목수 .....	318
(2) 건강보조제로서 버섯 형태 .....	318
2) 버섯의 기능성과 안전성에 대한 인정자료 확보 .....	318
가) 버섯의 효능 .....	318

나) 국산 버섯 인정 자료 조사 .....	320
3) 버섯의 항산화성 .....	333
4) 버섯의 항균성 .....	337
5) 버섯의 prebiotic effect .....	338
6) 버섯의 동물실험 .....	345
가) 몸무게 측정 .....	345
나) 혈당량 측정 .....	346
다) 혈중 cholesterol 측정 .....	347
라) Insulin assay .....	349
마) GPT, GOT assay .....	350
나. 버섯 추출물의 기능성 조사 .....	352
1) 선정 버섯의 기능성 물질 함량 .....	352
2) 버섯 추출물의 항산화 효과 .....	353
3) 버섯 추출물의 항균성 .....	356
4) 버섯 추출물의 prebiotic effect .....	361
5) 버섯 추출물의 동물실험 .....	375
가) 몸무게 측정 .....	375
나) 혈당량 측정 .....	376
다) 혈중 cholesterol 측정 .....	377
라) Insulin assay .....	380
마) GOT assay .....	381
다. 버섯 가공물 (시판 버섯 추출물)의 기능성 조사 .....	383
1) 시판 버섯 추출물의 기능성 물질 함량 .....	383
2) 시판 버섯 추출물의 항산화 효과 .....	386
3) 시판 버섯 추출물의 항균성 .....	389
4) 시판 버섯 추출물의 prebiotic effect .....	399
5) 시판 버섯 추출물의 동물실험 .....	408
가) 몸무게 측정 .....	408

나) 혈당량 측정 .....	409
다) 혈중 cholesterol 측정 .....	410
라) Insulin assay .....	412
마) GOT assay .....	413
6) 기능성 인정 자료 작성 .....	415
제3절 참고문헌 .....	415
제4장 종실류 분야 .....	423
제1절 연구개발 목표와 내용 .....	425
제2절 연구개발수행 내용 및 결과 .....	426
1. 기능성 지방 소재 .....	426
가. 기능성 성분 선정을 위한 예비 후보 물질 선정 .....	426
1) 특유의 기능성 성분을 함유하는 국산 종실류 예비 후보 선정 .....	426
2) 국산 종실류에 존재하는 특유의 기능성 성분 예비 추출 및 분석법 탐색 .....	427
3) 지질 유래 기능성 물질 .....	428
나. 선정된 종실류의 기능성 성분 탐색 및 추출 분석 .....	434
1) 지방질 기능성 성분 탐색 및 추출 수율 .....	434
2) 선별된 검은콩과 검은깨 추출물의 항산화 및 항암 실험 분석 .....	434
가) 검은콩과 검은깨 methanol 추출물의 기능성 .....	434
(1) DPPH법을 이용한 수소공여능 측정법 확립 .....	434
(2) Methanol 추출물의 항암성 측정 .....	435
나) 종실류의 혼합 용매 추출물 .....	438
(1) 분획 .....	438
(2) 농축 및 spectrum 측정 .....	439
(3) 항산화 실험 .....	442
(4) 분획물의 지방산 조성 분석 .....	446
다. 국산 농산물 추출물의 항암성 측정 .....	449

라. 종실류 및 식품의 특이 지방산 분석 .....	455
2. 기능성 단백질 소재 .....	469
가. 기능성 성분 선정을 위한 예비 후보 물질 선정 .....	469
나. 표고버섯에서 유래한 $\beta$ -glucosidase의 분리·정제 .....	471
다. 효소 단백질 활성 측정법 확립 .....	495
3. 기능성 탄수화물 소재 .....	497
가. 탄수화물 유래 건강기능성 성분에 관한 문헌 정리 .....	497
나. 시료의 $\beta$ -glucan 함량 측정 및 최적 추출법 탐색 .....	517
다. $\beta$ -glucan 분석법 비교 .....	521
1) HPAEC를 이용한 $\beta$ -glucan 분석 .....	521
2) TLC를 이용한 $\beta$ -glucan 분석 .....	528
3) 개선된 HPAEC를 이용한 $\beta$ -glucan의 분석법 .....	532
라. 결론 .....	541
제3절 참고문헌 .....	543
제5장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	553
제6장 연구개발 결과의 활용 계획 .....	555
제7장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보 .....	560

## 제1장 생약재 분야

### Herb Part

주관연구기관명 : 한국식품연구원

세부연구책임자 : 홍석산

연 구 원 : 하태열

연 구 원 : 김현구

연 구 원 : 이용환

연 구 원 : 안지윤

참 여 기 업 명 : 허브메디스

연 구 원 : 황보재천

## 제1절 연구개발과제의 개요

### 1. 연구개발의 목적

우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]의 건강기능성을 연구하여 4종 이상의 우리 농산물을 건강기능식품의 원료로 인정받게 함

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 기술적 측면

○ 현재 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]들은 다양한 건강기능성 소재 원료로 활용될 수 있음에도 불구하고 기능성에 대한 과학적인 연구 및 자료 부족으로 인하여 그의 기능성 인정받지 못하고 있음. 따라서 우리 농산물의 건강기능성을 연구하여 우리 농산물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하여야 함

○ 수입 농산물에 대한 우리 농산물의 건강기능적 우수성을 입증하여야 함

○ 농업을 경쟁력 있는 산업으로 육성하기 위하여 국산 농산물로부터 고기능 생리활성물질을 탐색하여 부가가치를 향상시켜야 한다.

○ 미국 국립암연구소(NCI)의 Herbert Pierson 박사는 과일이나 채소 등에 함유된 phytochemicals의 암예방 기능 연구(1988 - 1992년 : 2,100만불 연구과제)에서 암의 예방에 부분적으로 효과가 있는 것으로 밝혀진 식품소재 40개를 선발하였는데 특히 마늘, 양배추, 감초, 대두, 생강, 당근, 셀러리, 파슬리가 암예방 효능이 컸다(그림 1). 이들 40개 품목중 우리에게 잘 알려져 있는 양파, 차, 감귤류, 통밀, 현미, 토마토, 가지, 고추, 귀리 등이 포함되어 있다.



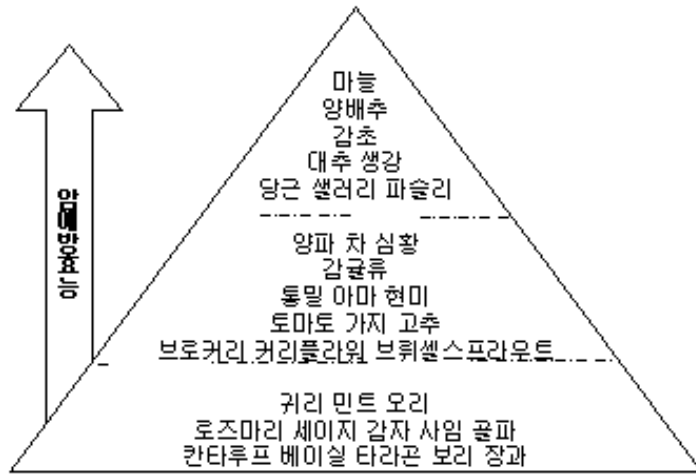


그림 1. 암 예방 식품

○ 우리나라에서 비교적 재배면적과 생산량이 많은 채소류는 배추, 시금치, 상추, 양배추 등 엽채류, 수박, 참외, 딸기, 오이, 호박, 토마토 등 과채류, 무, 당근 등 근채류, 고추, 파, 양파, 생강, 마늘 등 조미채소로 나눌 수 있다. 특히 조미채소는 우리 농민들의 환금작물로 중요할 뿐만 아니라 그 기능성도 우수하다는 연구결과가 많이 보고되고 있다. 마늘은 서부아시아 또는 중앙아시아 원산으로 고대에 이미 지중해 연안으로 전파되어 이집트 왕조 때 피라미트를 건축하는 노예들에게 마늘을 먹였다고 하며, 그리스와 로마시대에도 병사와 운동선수들이 많이 섭취하였다고 한다. 마늘은 백합과 식물(*Allium sativum* L.)로서 300가지 이상의 파속 식물중 한가지이다. 마늘의 활성물질인 allicin은 병원성인 그람양성 및 음성균에 대해 활성을 나타낸다. 마늘속의 alliin이 benzopyrene에 의해 발생된 동물실험결과 암세포 성장 억제효과가 있음이 밝혀졌다. 양파도 마늘과 마찬가지로 함유황 식물로서 고혈압, 심장병, 당뇨병 등의 각종 성인병에 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 양파의 민간요법으로 스테미너를 강화시킨다. 양파를 날로 먹으면 비타민 B<sub>1</sub>의 흡수가 좋아지므로 신진대사가 높아진다. 그 결과 피로회복이 빨라져서 스테미너가 증강된다. 또한 양파에는 인슐린 분비

를 촉진시켜 혈당을 내리는 효과가 있어 당뇨병의 예방과 치료에 도움을 준다. 고추는 대부분 건조 보관되면서 연중 소비하고 있는데 식품첨가물용 향신료로서 고추장, 김치 조미용 및 젓갈류뿐만 아니라 직접 조미료로서 광범위하게 이용되어 한국인의 식생활에 중요한 위치를 차지하고 있다. 고추에는 capsanthin 이라는 색소와 capsaicin 이라는 매운맛이 콜레스테롤 저하효과 등 많은 기능성이 있는 것으로 알려져 있다. 생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 citral, zingiberene, gingerol, shogaol 등의 독특한 향과 매운맛을 지니고 있어 유사 이전부터 전 세계적으로 애용되고 있는 향신료 중의 하나이다. 일반적으로 생강은 생생강, 건조생강, oleoresin, ginger oil 등의 형태로 가공 유통되어 의약품, 음료, 각종 식품첨가물 및 화장품 소재로서 다양하게 이용되고 있다. 파(*Allium fistulosum* L.)는 국내에서 재배 생산되는 조미채소의 하나로 종래에는 밭에서 수확한 다음 그대로 몇 뿌리씩 묶어 유통 판매되어 왔으나, 최근에는 일차 다듬질을 거친 후 단위 포장하여 유통하는 형태의 상품이 늘고 있다. 파는 자극성분인 황화 allyl을 함유하고 있어 살균, 살충의 효과가 있으며 칼슘, 인, 철분이 많고 비타민이 풍부한 것이 특색이다.

○ 지구상에는 약 15,000종의 버섯이 있으며 약 50%가 식용이 가능하다고 한다 (독버섯은 10%, 약용이 약 20%, 나머지는 밝혀지지 않은 상태이다.). 한국산 버섯은 약 990여종이 분류되어 있으며 100여종이 식용가능하다고 한다.

○ 전래되는 말에 버섯은 제 1 능이, 제 2 표고, 제 3 송이라고 한다. 이 중에 능이와 송이는 각각 참나무와 소나무뿌리에 활물기생을 하고 표고는 참나무류에 사물기생을 한다 (중국은 표고버섯, 일본은 송이버섯과 팽이버섯, 동남아 지역에서는 목이버섯을 애호함).

○ 영지버섯은 한방에서 건위, 건뇌, 강장, 강심, 이뇨, 해독, 항균, 면역, 진해, 진통, 급만성 간염, 위궤양, 혈압강화 등에 효과가 있고 상약으로 분류되며 triterpenoids 계통의 물질이 주요 약효 성분이다.

○ 표고버섯은 우리나라, 일본, 중국에서 활목재배가 왕성하여 대량생산되고 있고 고혈압, 동맥경화, 허혈성 심장질환, 혈액 순환질환에 효능이 있으며 erithadenine 등의 약효 성분이 보고되었다.

○ 능이버섯은 건조시키면 향기가 있어 ‘향이’라고도 하며 콜레스테롤 감소, 암 예방과 감기에 효능이 있다.

○ 동충하초는 인삼, 녹용 등과 함께 중국에서 3대 귀한 한방약제로 취급하고 있으며, 폐와 신장을 튼튼히 하고, 지혈을 막고 담을 삭히며 기침을 멎게하고, 면역력 증강, 염증억제, 체력증강, 산소 소비량 억제, 자연치유력을 높이는 효능이 있다.

○ 송이버섯은 동의보감에 의하면 위의 기능을 돕고, 식욕을 증진시키고 설사를 멎게하고 기를 더해준다고 하였다. 동맥경화, 심장병, 당뇨병, 고지혈증 및 항암 등에 효능이 있다.

○ 버섯은 저열량식품으로서 특유의 향과 맛 그리고 조직감이 좋은 식품으로 인기가 높다

○ 버섯을 이용한 건강음료의 원료로는 영지버섯이 가장 많이 이용되었고 (92품목) 다음이 구름버섯(11품목), 신령버섯(3품목)이었다. 가공식품으로는 표고버섯이 가장 많았다 (7품목).

○ 건강기능식품법상 버섯제품은 버섯자실체제품 [영지, 운지 또는 표고 버섯의 자실체의 건조물을 분말화하거나 추출한 것을 가공한 것으로 자실체 30% 이상(수분 7% 이하)인 것]과 버섯균사체제품 (영지, 운지 또는 표고 버섯의 균사체 배양물을 추출하여 가공한 것으로 균사체 배양물 50% 이상)으로 나누어진다.

○ 버섯에서 알려진 항암활성 등의 기능성은 주로 베타-글루칸의 면역기능 향상 효

과에 기인하는 것으로 알려져 있고 미국 식품의약국안전청(FDA)의 GRAS(general recognized as safe)로 승인을 얻어 식품첨가물로 널리 사용중이다.

○ 일본의 경우, 표고버섯으로부터 추출 정제된 eritadenin 성분은 생리기능의 과학적 분석이 이루어지면서 일본의 영양정보표준(JSD) 식품제도를 발족시키는데 결정적 역할을 하였다.

○ 일본의 버섯류 관련 건강식품 품목은 표고버섯가공식품과 영지버섯가공식품이다.

○ 버섯은 기능성과 기능성 물질의 함량이 각각 다르다. 가공시 함량 분석에 필요한 지표물질 등이 개발되어야 하는데 학자간 기능성 성분 관련 논란이 있고 구체적인 성분을 모르는 경우가 많다. 따라서 다양한 기능성을 지닌 버섯류의 산업적 이용을 위하여 버섯류의 기능성과 안전성을 재확인하고 지표물질을 탐색 등 버섯류의 건강식품 원료 인정을 위한 연구가 요구된다.

○ 종실에 함유된  $\beta$ -glucan은 식이섬유의 하나로 동물의 소화관내에서 흡수되지 않는 물질이며, 식이성 콜레스테롤과 결합하여 이의 배설을 증가시킴으로써 콜레스테롤 저하 효과를 나타낸다고 알려져 있다. 종실의  $\beta$ -glucan은 주로 세포벽에 존재하며 구조는  $\beta$ -1,3 결합과  $\beta$ -1,4 결합이 3:7의 비율로 이루어진 직쇄상의  $\beta$ -D-glucan이다. 이러한  $\beta$ -glucan은 귀리나 보리에 다량 함유 (3~7%)되어 있으며 수용성 부분과 비수용성 부분이 공존하고, 수용액상에서 colloid 형태가 되어 점액성을 띄게 된다.

○ Lecithin은 인지질의 일종으로 대두 등 종실의 배아에서 분리되는 특수 지방질에 속하는 영양성분이다. Lecithin은 동맥경화증, 심장병, 고콜레스테롤 혈증, 간기능 장애, 지방대사 이상, 지방 소화흡수 불량증 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Lecithin은 지방의 운반과 신진대사에 중요한 역할을 하며, 특유의 유화작용에 의해 동맥벽에 침착되기 쉬운 악성 LDL 콜레스테롤을 혈액에 용해시키고 침착을 방지하

여 혈액의 흐름을 원활하게 하고, HDL 콜레스테롤의 역할을 도와준다. 또한 lecithin은 아세틸콜린의 원료가 되는 물질로서 체내에 들어가 신체 각 기관의 활동을 통제 조정하는 신경의 정보전달 체계를 원활하게 하는 역할을 하며, 두뇌 신경세포의 30%가 lecithin으로 구성되어 있기 때문에 과로한 업무와 만성 피로, 스트레스가 많은 현대인에게 반드시 필요한 물질이라 할 수 있다. 그 외에도 노화방지나 항산화 작용을 하는 vitamin E의 체내흡수를 도와 준다.

○  $\gamma$ -Oryzanol은 종실 속에 함유된 성장촉진 물질로서, 쌀겨에서 주로 분리해낼 수 있으며 강력한 산화방지 효과를 지니고 있다. 방사선 노출이나 화학치료에 의한 손상을 예방하며, 각종 동물연구에서는 항암 효과도 나타냈다.  $\gamma$ -Oryzanol은 뇌혈류를 증가시켜 산소 공급량을 증가시키며 뇌세포 대사 기능을 개선시킴으로써 자율신경실조증과 중풍 및 치매 예방, 기억력 증진, 불면 등의 치료효과를 나타낸다. 뿐만 아니라, 혈관을 강화시키고 혈압을 저하시켜서 순환기 질환의 개선에도 탁월한 효과를 보이며, 간기능 활성화 및 알코올 대사촉진 기능이 있어 숙취제거 음료에 이용되기도 한다.  $\gamma$ -oryzanol은 현미 100g 발아시 295mg이 생성되는 것으로 보고되었다.

○ 따라서 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]의 다양한 건강기능성과 그 가공 방법을 체계적으로 연구하여 우리 농산물 및 그 가공물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하여야 한다.

#### 나. 경제·산업적 측면

○ 우리 나라의 경우 건강기능식품에 관한 법률의 시행으로 인하여 건강기능식품의 건강기능성 표시 및 광고가 허용됨에 따라 식품의약품안전청이 인정하는 건강기능식품의 생산·판매가 크게 증가할 것임

○ 따라서 농산물 소비촉진과 농가소득 증대를 위하여 국가차원에서 건강기능식품으로

활용 가능한 우리 농산물의 발굴과 그의 과학적 건강기능성 연구가 필요함

○ 국내 건강기능식품 시장규모는 2001년 1조5,000억원에서 2006년 4조원으로 크게 증가할 것으로 예상됨 (1). 또한 건강기능식품의 세계시장 규모도 2000년 1,380억불에서 2005년에는 10배 이상 규모로 급격히 증가할 것으로 예상됨 (2). 따라서 우리 농산물이 건강기능식품 원료로 활용될 수 있다면 우리 농산물 소비촉진과 농가소득 증대에 크게 기여할 수 있음.

○ 식생활 및 경제 여건의 발달로 식품의 영양으로 대표되는 제 1기능에 대한 관심과 맛과 조직감으로 대표되는 제 2기능에 대한 관심이 21세기에는 식품의 제 3기능인 생체조절기능에 대한 전 세계의 관심이 집중되고 있다. 97년 650억불 규모이던 세계 건강기능성식품 시장은 착실한 성장을 거듭해 그 시장이 점차 확산되고 있다. 건강기능식품 시장의 성장속도는 급격할 것으로 예상되어 2005년도에는 현재 시장의 10배 이상 증가되며 한국의 경우 수 조원 이상, 세계적으로 수 백조원 이상으로 예상되고 있다. 이런 경향은 미국식품과학회(IFT)가 최근 미국의 100대 주요 식품기업체의 CRO를 대상으로 현재 연구개발영역에 대한 설문을 실시하여 분석, 발표한 결과로부터 충분히 입증된다 (표 1-1). 즉 미국 굴지의 식품산업체 CRO(Chief Research Officers)들의 회사의 연구영역으로 중요하다고 응답한 분야 중 건강식품과 기능성식품이 수위를 차지하고 있었다. 결론적으로 건강기능식품 산업은 전세계적으로 성장기에 있는 유망 산업이라 할 수 있다.

표 1-1. 미국 식품회사 CRO들이 중요하다고 지적한 연구분야

순 위	연 구 분 야
1	건강식품 개발
2	Nutraceutical, medical food 개발
3	가공 관점에서의 식품안전
4	천연식품(natural food)
5	소재선택 관점에서의 식품안전
6	유기식품
7	저지방 또는 지방조성변형식품
8	ISO 및 QC 방법

자료: Food Technology vol. 54, no. 12 p. 42-46, 2000

○ 세계에서 가장 큰 건강기능식품시장을 확보하고 있는 미국은, 자연유기식품, 기능성식품, 식이보조제, 천연제품을 포함해 99년 총 445억불의 소비자 판매고를 기록하였다. 그러나 전 세계 건강기능식품시장에서 미국이 차지하는 비율은 34%이며 나머지 66%는 기타 다른 나라 시장이 차지하고 있다 (그림 2).

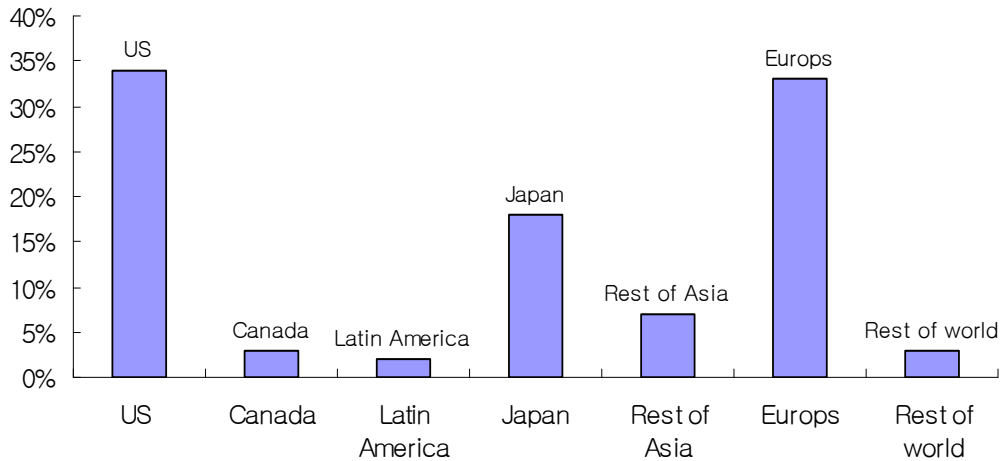


그림 1-2. 세계 건강기능식품 산업분포

자료: Nutrition Business Journal

○ 2000년 NBJ보고에 따르면 미국에 이어 유럽이 422억불, 일본이 231.5억불, 그리고 캐나다가 36.7억불의 소비자 판매를 보였다. 이는 식이보조제를 포함한 전 세계 기능성 식품 시장 규모인 947.5억불의 73%를 차지하고 있다. 지역적으로 차이는 있으나 세계 건강기능식품 시장은 97년부터 2000년 사이 착실한 성장을 계속하였다.

○ 식이보조제, 자연/유기식품, 천연용품 및 기능성식품은 지난 2년간 1,099억불에서 1,280억불로 성장하였다. 2000년대의 성장율은 전 세계적으로 7%가 되어 1,380억불 규모로 성장할 것이며, 미국, 유럽, 일본이 세계시장의 85%를 장악할 것이라고 예측되고 있다.

○ 조미 채소류의 연도별 생산량은 표 3에서 나타난 바와 같이 생강을 제외한 품목은 점진적으로 증가추세에 있어 과잉 생산에 따른 수급 불균형이 발생하여 재배농가



에서는 재정적으로 커다란 어려움에 직면할 우려가 있다. 이를 극복하기 위해서는 조미채소류로의 기능성 자료를 확보하고 더 나아가 생리기능성 활성을 탐색하고 생리활성 물질을 과학적으로 검증하여 건강식품으로서의 가치를 입증하여, 이를 토대로 다양한 가공식품을 개발함으로써 조미채소류의 건강기능식품으로 등록하고 건강기능식품 산업을 육성하고자 한다.

표 1-2. 조미채소류의 연도별 생산량

연도	종류	생산량(ton)				
		마늘	양파	생강	파	고추
1997		393,830	740,180	32,700	484,540	322,340
1998		393,900	872,140	47,200	500,490	288,100
1999		483,770	935,820	39,740	606,550	436,640
2000		474,380	877,510	16,380	657,880	391,290
2001		406,380	1,073,700	20,550	635,710	411,750

○ 산림벌채 소득은 20-100년에 한번 발생하나 버섯재배는 매년 소득을 발생시킬 수 있다.

○ 우리 나라 버섯산업 규모는 2만여 농가, 5,000억원 정도로 추정되고 있다.

○ 송이의 가격은 15-30만원/kg이고, 능이의 가격은 3-5만원/kg (50t/y 생산)이며, 표고의 가격은 2-4만원/kg로 고가이다. 이 중에 가장 많이 생산되는 것은 인공재배가 가능한 표고이고, 수출액이 많은 것은 송이로 (1995년 64,527,693달러)로 총 버섯류 수출의 80.3%를 차지하고 있다. 일본의 송이 수입량은 '92년에 2,244 M/T (한국

산 종이 점유율 33.4%)이었고 '94년에는 3,622 M/T (한국산 종이 점유율 3.8%)으로 증가하였으나 한국산 종이 점유율은 급격히 감소하여 중국과 북한산으로 대체되었다.

○ 버섯가공식품은 생산액이 6,381,855천원(2001)이고 수출액이 3,621,884달러(2001)이며 수입은 840,618달러(2001)이므로 수출이 4.3배 많다. 그러나 최근에는 저렴한 버섯류 수입 (중국으로부터 952,000달러 1999, 미국으로부터 15,000달러 1997)이 급증하여 수입품과의 경합 및 수입품의 점유율이 확대되고 있다.

○ 따라서 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]의 다양한 건강기능성과 그 가공 방법을 체계적으로 연구하여 우리 농산물 및 그 가공물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하면 농촌소득 증대와 식품산업 발전에 크게 기여할 수 있다.

#### 다. 사회·문화적 측면

○ 현대 의학은 항생제, vaccine 및 정교한 외과적 수술 면에서 눈부시게 발전하여 인류의 평균 수명 연장에 크게 기여하였다. 반면 산업발달 및 인구증가에 따른 환경오염, 사회적 stress, 인구의 고령화, 농지의 지력(地力) 약화 및 편의·가공 식품 위주의 서구화된 식생활은 비만, 암, 관절염, 당뇨병, 고혈압, 발기부전 등의 만성 성인병의 발생을 크게 증가 시켰다. 여러 선진국의 경우 막대한 연구비를 암, 관절염, 고혈압, 당뇨병, 발기부전, 비만 등과 같은 만성 성인병의 연구에 투자하고 있고 많은 의료비가 지출하고 있지만, 이들 질환의 치료와 예방이 잘 되지 못하고 주로 대증요법에 따른 치료로 인한 과도한 의료비 지출로 의료보험 재정의 악화가 심화되고 있다. 따라서 미국을 비롯한 여러 선진국들은 지금까지 개발된 의약품들에 비하여 비교적 부작용이 적은 생약재 및 건강기능식품소재(nutraceuticals)를 이용한 성인병 치료에 대한 관심이 높아지고 있어 향후 건강기능식품 산업의 규모가 크게 증가할 것임. 우리 사회에는 식약동원(食藥同源)의 전통으로 인하여 식품의 건강기능에 대한 많은

본초학(本草學) 및 민간요법 분야의 정보가 축적되어 있음. 따라서 우리 농산물을 건강기능식품 원료로 활용하기 위한 연구가 절실히 요구되며 개발된 제품의 수출전망도 매우 밝음.

- 버섯은 다양한 기능성과 건강에 대한 관심으로 최근 많이 활용되는 음식 재료임.
- 버섯은 식품의 대표적 3차 기능인 생체방어, 노화억제 및 질병예방 효과를 많이 지니고 있다.
- 따라서 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]의 다양한 건강기능성과 그 가공방법을 체계적으로 연구하여 우리 농산물 및 그 가공물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하면 국민건강 증진과 우리 식문화 발전에 크게 기여할 수 있다.

### 3. 연구개발의 범위

- 기존 문헌, 민간요법 등의 조사를 통한 우리 농산물의 건강기능성과 안전성에 관한 근거 자료 확보
- 과학적인 연구를 통한 농산물의 건강기능성에 대한 근거 자료 확보
- 우리 농산물을 건강기능성 원료·성분으로 등록하기 위한 자료 획득 및 8종 이상의 우리 농산물 및 그 가공물의 건강기능성 원료 및 성분 인정을 위한 한국식품의약품안전청 제출 자료 작성
- 우리 농산물을 건강기능성식품의 원료로 적극 활용하게 함으로써 외국산 건강기능식품의 수입에 능동적으로 대응하고 국내 건강기능식품산업을 육성.

○ 우리 농산물의 건강기능성과 안전성을 수입 농산물와 비교 연구하여 우리 농산물의 우수성 발굴

## 제2절 국내외 기술개발 현황

○ 우리 나라의 경우 건강기능성을 지닌 농산물이 한방(韓方)이나 민간요법에서 많이 활용되고 있으나, 건강기능성 원료성분으로 등록하기에는 그의 안전성과 기능성을 입증할 과학적 연구가 매우 단편적이거나 거의 없는 실정임.

○ 현재 건강기능식품 원료로 인삼, 식물 추출물 발효물, 버섯, 매실, 자라, 동충하초, 녹차 등이 사용되고 있으나 대부분이 수입되고 있다.

○ 현재 국내에서 시판되는 대부분의 건강식품이 우리 농산물보다는 외국에서 개발된 천연물을 사용하여 제조되고 있어 그 수입액이 1,600억원에 달함

○ 여러 선진국에서는 많은 농산물의 건강기능성을 연구하여 수출상품화하고 있음

○ 연구결과의 산업화 과정에서 국산과 수입 생약재 사이에 차별화가 되지 않아 값싼 수입 생약재가 생산 원료로 쓰이는 경향이 늘고 있다.

○ 국내 재배용 버섯은 12속 51종(2000)이며 품종은 167품종(1996) 이상이다.

○ 국내에서 생산되는 버섯은 대부분이 식용 버섯이며, 약용버섯으로는 영지, 뽕나무버섯, 동충하초 등이 있는데 이들의 항암, 항혈전, 항당뇨, 면역력 증강 등의 기능이 많이 보고되고 있다.

○ 혈전분해능을 갖고 있는 국내 자생버섯으로 때죽도장버섯, 기와웃솔버섯, 구름버

섯, 모래발버섯 등이 알려져 있고, 식용버섯으로는 할미송이버섯, 먹물버섯, 주름버섯, 민자주방망이버섯 등에서 단백질분해효소 및 혈진분해효소가 발견되었다.

○ 동충하초중 번데기동충하초(*Cordyceps militarius*)와 누에동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)에 대한 연구가 활발하고, 현재 이들의 자실체가 시판되고 있다. 이들은 면역력 증강, 항피로, 항노쇠 및 항암작용을 지님이 확인되었으나 구체적인 지표물질은 규명되지 않았다.

○ 따라서 가능성이 있는 국산 버섯이 많이 있으며, 지표물질 분석 등 건강식품 원료로 인증을 위한 과학적인 연구가 필요하다.

○ 버섯류의 항암작용에 관한 연구가 중국이나 일본에서 많이 진행되고 있다. Chihara(1992)는 종양저지율이 목질진흙버섯, 송이, 맛버섯, 팽이, 표고, 구름버섯, 느타리버섯, 붉은점박이광대버섯, 삼색도장버섯, 흰구름버섯 순으로 나타난다고 보고하였다. 최근에는 신령버섯(*Agaricus blazei*)에서 높은 종양저지 효과가 발견되었다.

○ 동충하초 *Cordyceps militarius*에서 cordycepin이 분리되었는데, 이 물질은 DNA와 RNA 합성을 저해하고 방광암, 대장암, 폐암 및 fibrosarcoma에 대한 항암효과를 지님이 알려지고 있다.

○ 따라서 건강기능성에 있어서 수입 농산물에 대한 우리 농산물[생약재, 채소, 버섯, 종실(種實) 등]의 우수성을 밝히면서 우리 농산물 및 그 가공물을 건강기능식품 원료로 인정받게 하는 연구가 꼭 필요하다.

○ 건강기능식품의 health claims를 인정하는 건강기능식품법의 발효와 함께 건강기능식품의 시장이 크게 증가할 것임. 따라서 우리 농산물이 건강기능식품 원료로 인정받을 경우 우리 농산물의 수요가 크게 증가하여 농가소득 증대를 기대할 수 있음

### 제3절 연구개발 목표와 내용

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004)	국산 생약재의 건강기능성과 안전성에 대한 자료 조사 및 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국산 생약재 중 건강기능식품으로의 개발 잠재력과 농가 소득증대에 미치는 영향이 큰 생약재를 중심으로 기존의 문헌이나 D/B, 한방, 민간요법 등을 이용하여 건강기능성 원료·성분 등록에 필수적인 건강기능성과 안전성에 대한 자료 조사</li> <li>○ 조사된 국산 생약재의 건강기능성을 최신 연구방법을 통한 확인 실험</li> <li>○ 국산 생약재의 건강기능성과 안전성을 수입 생약재와 비교 실험하여 국산 생약재의 장점 발굴</li> </ul>
2차년도 (2005)	1차년도에서 발굴된 국산 생약재의 건강기능성에 대한 보완 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ In vitro 및 in vivo 연구를 통하여 1차년도에서 발굴된 국산 생약재의 건강기능성 연구</li> <li>○ 국산 생약재의 건강기능성을 수입 생약재와 비교 연구하여 국산 생약재의 우수성 발굴</li> <li>○ 최적 섭취량, 활성분체, 지표물질, 부작용 관련 자료 연구</li> </ul>
3차년도 (2006)	연구된 국산 생약재 및 그 가공물의 건강기능성 원료·성분 인정을 위한 한국식품의약품안전청 제출 자료 작성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산지 및 가공방법별 건강기능성 조사</li> <li>○ 연구된 국산 생약재 및 그 가공물의 건강기능성 원료·성분 인정을 위한 한국식품의약품안전청 제출 자료 작성</li> </ul>

## 제4절 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 홍화(*Carthamus tinctorius*) 씨의 뼈 보호 효과

홍화씨는 민간요법에서 골절, 골다공증 및 osteodysplasia 같은 뼈 질환에 효과가 있다고 알려져 있다 (65). 또한 국산 홍화씨가 수입 홍화씨에 비하여 우수한 생리활성을 보인다고 알려져 있다.

개의 이에 상처를 만들고 홍화씨 추출물을 섭취시킨 결과 뼈 속의 cementum과 치조골 재생이 증가하였다 (66).

난소가 절제된 쥐에서 홍화씨의 섭취가 뼈 손실을 억제시켰으며, 홍화씨에 함유된 mixed polyphenolic compounds가 조골세포의 성장을 촉진시켰다 (67). 어린 쥐의 난소절제는 폐경후 골다공증 모형이다 (68).

실험에 사용된 흰쥐는  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 사육되었으며, 조명시간은 8-20시였다. 13주령의 자성 Sprague-Dawley 흰쥐를 penobarbital(40 mg/kg, ip)로 마취한 뒤 난소를 절제하고 홍화씨를 4주간, 하루 2회 경구투여하였다. 투여량은 사람의 1일 홍화씨 권장 섭취량을 21g으로 하고 사람과 흰쥐의 대사체중 비율로부터 환산하였는데 사람의 평균 체중은 65 kg으로 계산하였다. 사료 섭취량은 매일, 체중은 3일 간격으로 측정되었다. 4주간 홍화씨 시료 투여후, ether로 마취하여 cervical dislocation으로 죽인 뒤 우측 경골의 proximal portion을 paraffin에 고정하였다. 중앙 metaphysis를 5  $\mu\text{m}$  두께로 횡단하여 hematoxylin과 eosin으로 염색하였다. Digitizing tablet을 Macintosh 개인용 computer에 연결하여 NIH image software (version 1.60, public domain, NIH, Bethesda, MD)로 histomorphometry를 수행하였다.

그림 1-3과 표 1-3은 난소가 절제된 쥐에서 국산 홍화씨의 투여가 몸쪽 경골의 조직학적 형태와 histomorphometric parameter에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Ovariectomized(Ovx) rats는 sham-operated rats에 비하여 osteopenic 현상을 보였으며, Ovx는 몸쪽 경골의 trabecular bone volume을 86% 감소시켰다. 국산 홍화씨가 4주간 투여된 군의 뼈 부피는 sham 군에 비하여 45% 감소하여, 국산 홍화씨 투여가 Ovx rats의 뼈 손실을 현저히 감소시켰다. 국산 홍화씨 투여군의 trabecular bone volume은 Ovx 군의 3.8배였으나, cortical bone의 두께는 차이를 보이지 않았다. 수입 홍화씨 투여군의 trabecular bone volume은 국산 홍화씨 투여군의 36%로, 수입 홍화씨는 국산 홍화씨에 비하여 낮은 뼈 보호 효과를 보였다.



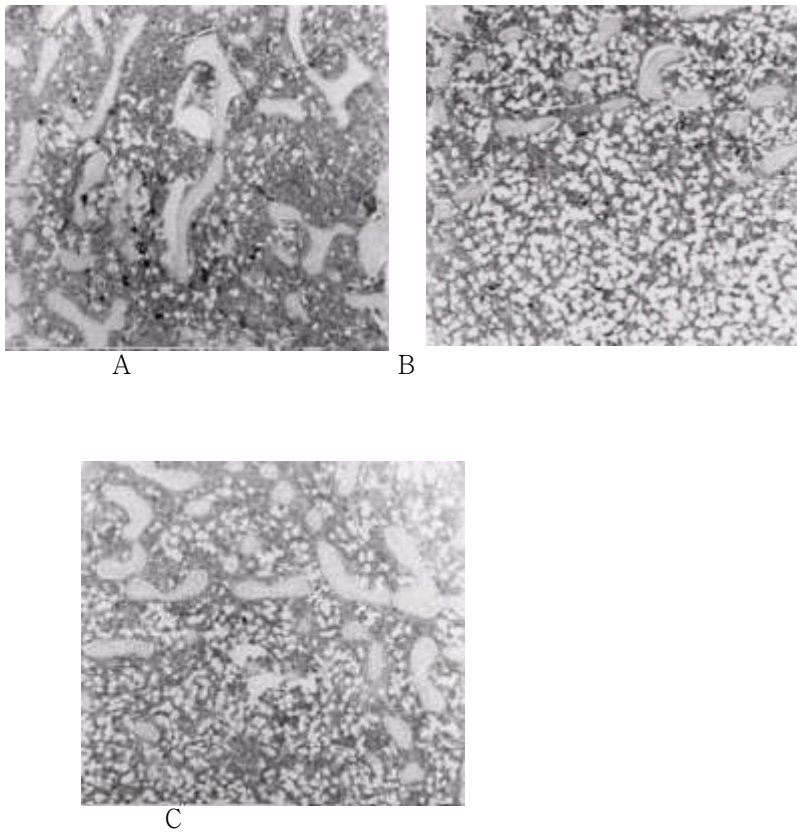


Fig. 1-3. Photomicrographs of proximal tibia metaphysis from sham-operated rats (A) and ovariectomized rats untreated (B) or treated with Korean safflower seeds (C) for 4 weeks. Sections are stained with Hematoxylin- Eosin. Magnification x58.

Table 1-3. Analysis of trabecular bone volume in the proximal metaphysis of the tibia<sup>1</sup>

	Sham <sup>2</sup>	Ovx <sup>3</sup>	Ovx + KSS <sup>4</sup>	Ovx + FSS <sup>5</sup>
TBV <sup>6</sup> (% control)	97 ± 2 <sup>a</sup>	14 ± 2 <sup>d</sup>	53 ± 3 <sup>b</sup>	19 ± 1 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10. Within a column, values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

<sup>2</sup>Sham-operated.

<sup>3</sup>Ovariectomized.

<sup>4</sup>Korean safflower seeds.

<sup>5</sup>Foreign safflower seeds.

<sup>6</sup>Trabecular bone volume.

실험기간중 체중증가율은 sham 26%, ovariectomized(Ovx) 48%, Ovx + Korean safflower seeds (KSS) 44% 및 Ovx + foreign safflower seeds (FSS) 40%였다 (표 1-4). Ovx 군이 sham 군에 비하여 큰 사료섭취량과 체중증가를 보였다. Sham 군에 비하여 Ovx 군에서 자궁 무게가 현저히 감소하였고, 홍화씨의 투여에 의하여 자궁 무게의 감소가 억제되었으며, 국산 홍화씨가 수입 홍화씨에 비하여 자궁 무게의 감소를 크게 억제하였다.

Table 1-4. Food intake and weights of body and uteus at the time rats were killed<sup>1</sup>

	Sham <sup>2</sup>	Ovx <sup>3</sup>	Ovx + KSS <sup>4</sup>	Ovx + FSS <sup>5</sup>
Food intake, g/day	16.5 ± 2.0	18.2 ± 2.7	18.8 ± 2.9	18.6 ± 3.1
Initial BW, g	230 ± 5.4	227 ± 6.1	232 ± 3.8	236 ± 5.8
Final BW, g	289 ± 12.1 <sup>b</sup>	337 ± 8.6 <sup>a</sup>	335 ± 9.0 <sup>a</sup>	331 ± 8.2 <sup>a</sup>
Uterus wt, mg	467 ± 32.9 <sup>a</sup>	79 ± 3.6 <sup>d</sup>	106 ± 3.9 <sup>b</sup>	91 ± 3.5 <sup>c</sup>
N	10	10	10	9

<sup>1</sup>Values are means ± SEM and those in the same row not sharing common letters are significantly different (P<0.05).

<sup>2</sup>Sham-operated.

<sup>3</sup>Ovariectomized.

<sup>4</sup>Korean safflower seeds.

<sup>5</sup>Foreign safflower seeds.

Ovx 쥐의 2차 spongiosa area의 지방조직은 허위 수술 쥐에 비하여 크게 증가하였다 (표 1-5). 홍화씨의 투여가 골수의 지방 축적을 Ovx 군에 비하여 유의성 있게 감소시켰으며, 특히 국산 홍화씨가 수입 홍화씨에 비하여 유의성 있게 골수 지방의 축적을 유의성 있게 억제하였다.

Table 1-5. Histomorphometrical analysis of adipose tissue content in the proximal metaphysis of the tibia<sup>1</sup>

	Sham <sup>2</sup>	Ovx <sup>3</sup>	Ovx + KSS <sup>4</sup>	Ovx + FSS <sup>5</sup>
AC <sup>6</sup> (% control)	100 ± 1 <sup>d</sup>	267 ± 2 <sup>a</sup>	223 ± 3 <sup>c</sup>	240 ± 1 <sup>b</sup>
N	10	10	10	9

<sup>1</sup>Values are means±SEM. Within a row, values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

<sup>2</sup>Sham-operated.

<sup>3</sup>Ovariectomized.

<sup>4</sup>Korean safflower seeds.

<sup>5</sup>Foreign safflower seeds.

<sup>6</sup>Adipose content.

표 1-6는 국산 홍화씨를 분획하여 trabecular bone volume과 골수 지방 축적을 조사한 것이다. 폐경후 골다공증 억제를 나타내는 지표인 trabecular bone volume 증가와 골수 지방 축적 억제 효과는 ethanol 분획군이 가장 컸으며, 물 분획과 불용성 분획에서도 유의성 있는 효과를 보였다.

Table 1-6. Analysis of trabecular bone volume and adipose tissue content in the proximal metaphysis of the tibia<sup>1</sup>

	Sham <sup>2</sup>	Ovx <sup>3</sup>	Ovx + RSS <sup>4</sup>	Ovx + IF <sup>5</sup>	Ovx + EF <sup>6</sup>	Ovx + AF <sup>7</sup>
TBV <sup>8</sup> (% control)	98 ± 2 <sup>a</sup>	13 ± 2 <sup>f</sup>	53 ± 3 <sup>b</sup>	19 ± 1 <sup>e</sup>	41 ± 1 <sup>c</sup>	29 ± 1 <sup>d</sup>
AC <sup>9</sup> (% control)	100 ± 1 <sup>f</sup>	268 ± 2 <sup>a</sup>	221 ± 3 <sup>e</sup>	255 ± 1 <sup>b</sup>	230 ± 1 <sup>d</sup>	241 ± 1 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10. Within a column, values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

<sup>2</sup>Sham-operated. <sup>3</sup>Ovariectomized. <sup>4</sup>Raw safflower seed.

<sup>5</sup>Insoluble fraction. <sup>6</sup>Ethanol fraction. <sup>7</sup>Aqueous fraction.

<sup>8</sup>Trabecular bone volume. <sup>9</sup>Adipose content.

홍화씨로부터 mixed polyphenolic compounds (평균 분자량: 약 350)를 추출하기 위하여 홍화씨를 200℃에서 5분간 볶아 30 mesh로 분쇄한 후 80% ethanol 용액을 10배량 가하고 환류 냉각기가 부착된 heating mantle에서 80℃로 2시간 반복 추출하였다. Whatman No. 5 여과지로 거르고 hexane으로 지질을 제거한 뒤 용량을 100 ml로 하였다.

시료의 고형분 함량은 일정량의 추출 용액을 취하여 40℃에서 진공건조하고 함량을 시료량에 대한 백분율로 나타내었다.

시료의 총 phenolic compounds 함량은 phenolic compounds가 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 것을 이용한 Folin-Denis 법으로 측정하였다. 즉 시료 추출 용액 50 ml을 취하여 40℃에서 진공건조후 80% ethanol 용액을 넣어 5

ml이 되게 했다. 이 시료액 3 ml과 Folin-Denis 시약 3 ml을 혼합하여 3분간 실온에 둔 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 3 ml을 가하여 혼합후 실온에 1시간 둔 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준검량곡선은 tannic acid를 이용하여 작성하였다.

홍화씨로부터 추출된 polyphenolic compounds에는 flavones(acacetin과 tilianine), lignans(matairesinol과 8'-hydroxyarctigenin) 및 serotoninins (N-feruloylserotonin과 N-(p-coumaroyl)serotonin과 같은 flavones가 함유되어 있었다.

ROS 17/2.8 osteoblast-like cells는 37°C의 가습 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>: 95% air)에서 10% FBS(HyClone Lab Inc.)와 1% antibiotic-antimycotic(Gibco BRL)이 함유된 Dulbecco's modified eagles medium (DMEM)에서 배양되었다. 세포 증식은 세포로의 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation을 측정하여 조사하였다. 세포는 24-well plates에 2x10<sup>3</sup> cells/well 농도로 접종하여 phenol-red free DMEM에서 24 시간 배양하고, 24 시간 0.5% FBS로 배양하여 휴면시켰다. 그리고 2.5% FBS가 첨가된 phenol-red free DMEM에 함유된 홍화씨 유래 polyphenolic compounds로 세포를 자극하였다. Polyphenolic extract는 ethanol에 녹였다. 다시 20 시간 배양후, [<sup>3</sup>H]thymidine(2-μCi/well)을 넣고 4 시간 배양하였다. Ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco BRL)로 세포를 두 번 씻고, ice-cold 5% trichloroacetic acid로 4°C에서 20 분 배양하였다. 세포는 ice-cold trichloroacetic acid와 ice-cold absolute ethanol로 각각 2회 씻었다. 세포를 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1 N NaOH로 용해하여 liquid scintillation counter (Wallac, 1409/1415, Finland)로 radioactivity를 측정하였다.

국산 홍화씨의 총 phenolics 함량이 수입 홍화씨에 비하여 31 % 높았으며, osteoblast-like cell의 증식 효과 역시 국산 홍화씨가 수입 홍화씨에 비하여 14 % 높았다 (표 1-7).

Table 1-7. Total phenolics contents of safflower seeds (SS) and the effects of total phenolics extracted from defatted SS on proliferation of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells<sup>1</sup>

	Korean SS	Foreign SS
Total phenolics content (mg/g, dry basis)	35.8 ± 2.4 <sup>b</sup>	27.4 ± 3.1 <sup>a</sup>
Cell proliferation effect (% control) of total phenolics extracted from 1mg SS per ml	136 ± 5 <sup>b</sup>	119 ± 6 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Values are means±SEM from 10 separate experiments. Within a row, values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

국산 홍화씨 ethanol 분획의 총 phenolics 함량이 물 분획에 비하여 7.4 배 높았으며, osteoblast-like cell의 증식 효과 역시 26 % 높았다 (표 1-8).

Table 1-8. Total phenolics contents of SS<sup>1</sup> and the effects of total phenolics of solvent fractions extracted from defatted SS on proliferation of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells<sup>2</sup>

	EF <sup>3</sup>	AF <sup>4</sup>
Total phenolics content (mg/g, dry basis)	36.1 ± 2.5 <sup>b</sup>	4.9 ± 1.1 <sup>a</sup>
Cell proliferation effect (% control) of total phenolics extracted from 1mg SS per ml	137 ± 5 <sup>b</sup>	109 ± 4 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Safflower seeds.

<sup>2</sup>Values are means±SEM from 10 separate experiments. Within a row, values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

<sup>3</sup>Ethanol fraction. <sup>4</sup>Aqueous fraction.

10주령의 Sprague-Dawley(SD) rat 수컷(체중 300~320 g)을 25°C±2, 습도 60%±2 및 12시간의 광주기에서 stainless wire cage에 한 마리씩 분리사육하였다.

홍화씨는 180°C에서 15~20분간 볶고 20 mesh 이하로 분쇄하였다. Ethanol 추출물을 제조하기 위하여 홍화씨 분말 600g에 80% ethanol 3,000ml을 가하여 85°C에서 6시간 추출한 후 Whatman No. 2 여과지로 감압여과하였다. 잔류물에 다시 80% ethanol 3,000ml을 가하여 반복추출한 후, Whatman No. 2 여과지로 감압여과한 추출액을 40°C에서 감압농축하여 용매를 제거하였다. 추출물은 -50°C에서 동결건조하여 분말화하였다. 홍화씨는 하루 2회 경구투여하였다. 투여량은 사람의 1일 홍화씨 권장 섭취량을 21g으로 하고 사람과 흰쥐의 대사체중 비율로부터 환산하였는데 사람의 평균 체중은 65 kg으로 계산하였다.



실험식이 11일째에 늑골의 골절을 유도하였다. 생후 12주령의 SD rat에 ketamine hydrochloride (유한양행)와 rompun[바이엘코리아(주)]을 각각 체중 100g당 0.3, 0.05 ml 근육주사하여 마취한 후 가슴의 털을 제거하고 수술대에 고정하여 10% Potadine 용액으로 수술 부위를 소독하였다. 가슴 피부의 일부를 개복하여 우측 제9번 늑골을 가위로 자르고 골절을 육안으로 확인후 수술사로 봉합하였다.

골절유도후 10일째 골절부위인 우측 9번 늑골을 절취하여 즉시 Bouin 액에 침지하여 24시간 이상 고정하였으며, 5~7 % 질산 용액에서 3일간 매일 질산 용액을 교환하면서 탈회하였다. 탈회후 5% sodium sulfate 수용액에 24시간 침지시키고 ethanol 계열로 탈수시킨 후 통상적 방법으로 paraffin에 포매하여 5~10  $\mu\text{m}$ 의 연속절편을 제작하고 hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 파골세포수는 조직 1mm<sup>2</sup>당 10군데를 counting하였다.

오줌은 도살전 2일간 수집되어 -60°C에서 보관되었다.

뼈 흡수의 한 지표인 오줌 속의 deoxypyridinoline(DPD) 함량 측정은 competitive enzyme immunoassay를 이용하는 Pyrilinks<sup>®</sup>-D kit를 사용하였다.

표 1-9은 늑골 골절이 유도된 흰쥐에서 홍화씨의 투여가 뼈 흡수에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 홍화씨 분말의 투여는 파골세포 수를 대조군에 비하여 증가시켰다. 특히 국산 홍화씨 분말 투여군의 파골세포 수 증가가 커서 대조군에 비하여 유의차를 보였다. 또한 홍화씨 ethanol 추출물의 투여는 오줌 속 DPD 함량을 대조군에 비하여 유의차 있게 증가시켰다. 특히 국산 홍화씨 ethanol 추출물 투여군의 오줌 DPD 함량 증가가 가장 컸다. 이 결과는 홍화씨가 뼈의 흡수를 촉진시켜 골절의 치유에 도움을 줄을 보여 주고 있다.

국산 홍화씨가 골밀도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 15인을 선발하고 홍화씨를 1일 21 g씩 45일간 섭취시켰다.

골밀도를 조사하기 위하여 정확도와 예민도가 높은 DEXA(dual-energy X-ray

absorptiometry, Lunar Radiation Corp., Madison, Wisconsin, U. S. A.)로 체중이 실리는 부위인 제 2, 3, 4 요추의 골밀도를 측정하고 이의 평균치를 계산하였다.

표 1-10에 나타난 바와 같이 홍화씨의 섭취가 골밀도를 유의적으로 증가시켰다.

이상의 결과들은 국산 홍화씨가 우수한 뼈 건강 기능성 식품소재로 활용될 수 있음을 보여주고 있다.

Table 1-9. Effects of powders of safflower seeds (SS) on numbers of osteoblast cells and of ethanol extracts of SS on levels of urinary deoxypyridinoline in rib-fractured rats<sup>1</sup>

	Control	Korean SS	Foreign SS
Numbers of osteoclast cells (count/mm <sup>2</sup> )	3.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.9 <sup>ab</sup>
Deoxypyridinoline (nM/mM creatine)	869.6 ± 38.7 <sup>a</sup>	2907.6 ± 141.5 <sup>c</sup>	1829.3 ± 96.7 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Values are means±SEM from 10 separate experiments. Within a row, values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 1-10. Effect of Korean safflower seed on bone mineral density (g/cm<sup>2</sup>)<sup>1</sup>

	Before eating	After eating	Difference
Placebo	1.07±0.10	1.08±0.09	0.01
Safflower seed	1.06±0.08	1.19±0.07*	0.13

<sup>1</sup>Mean±SEM.

\**P*<0.01 for the comparison with the values before eating.

Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 실험 시작전 1주일간 실험동물용 고형사료로 적응시킨 뒤 체중이 165.2±10.9 g인 동물을 시험에 사용하였다. 사육시험실은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10 %, 환기 횟수 12~13 회/hr, 조도 150~300 lux 조건을 유지하였다. Rat의 시험기간중에는 실험동물용 고형사료를 섭취시켰으며, 수돗물을 자유롭게 마시게 하였다.

사람에게 있어서 국산 홍화씨의 1일 섭취량은 21 g이 적당하다고 알려져 있다. 시험기간중 흰쥐의 체중을 1주일 간격으로 측정하고 사람과 흰쥐의 代謝체중 (체중<sup>3/4</sup>)의 비로부터 사람의 홍화씨 1일 섭취량 21 g에 상당하는 흰쥐의 홍화씨 1일 섭취량을 결정하였는데 사람의 평균 체중은 65 kg로 계산하였다. 국산 홍화씨의 투여량이 흰쥐에 미치는 독성을 조사하기 위하여 위에서 결정된 사람의 홍화씨 1일 섭취량 21 g에 상당하는 흰쥐의 홍화씨 1일 섭취량의 0.5배, 1배 및 2배에 해당하는 국산 홍화씨 분말 시료를 증류수와 혼합하고 1일 3회에 나누어 4주간 경구투여하였다. 대조군에는 동량의 생리식염수를 경구투여 하였다.

실험 종료전 5일동안 뇨를 채취하고 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 냉동보관하였다. 실험기간이 끝난 후 12시간 동안 굶긴 동물을

ethyl ether로 마취시켜 단두에 의해 희생시키고 혈액을 채취하였다. 혈액을 heparin 처리를 한 시험관에 받아 냉동보관하였다. 혈액 채취 후 바로 실험동물을 해부하여 육안으로 장기의 이상여부를 관찰하였다.

혈청의 urea nitrogen 함량은 urease 효소법에 의해 urea를 urease로 분해시킨 후 salicylate와 HClO<sub>3</sub>를 가하여 570 nm에서 비색정량하였다. 혈청의 creatinine 농도는 Jaffe 반응의 변형법을 이용한 kit(영동제약)을 사용하여 측정하였다. 이외의 혈액학적 및 혈청생화학적 조사는 Minos vet hematology analyzer (ABX, Levallois, France)와 550 express clinical chemistry analyzer (Ciba Corning, Oberlin, USA)를 사용하여 측정하였다.

모든 측정치는 Duncan's multiple range test로 분석되었으며 M±SE로 표시되었다.

시험기간 중에 폐사한 예는 없었으며, 투여시료에 의한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 체중변화의 결과는 표 1-11과 같다. 대조군과 비교하여 모든 군에서 특이한 체중변화가 없었다.

Table 1-11. Body weight gain<sup>1</sup>

	Control	0.5X <sup>2</sup>	1X	2X
Body weight gain	123.8±15.1	124.1±12.9	125.6±14.7	123.5±13.5

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10.

<sup>2</sup>X means the amount of administered safflower seed powder calculated from the recommended daily intakes of safflower seed for adult humans and the ratio of metabolic body weight (Wt<sup>3/4</sup>).

혈액학적 검사결과는 표 1-12과 같다. 대조군과 비교하여 모든 투여군에서 특이한 변화를 관찰할 수 없었다.

Table 1-12. Hematological values in rats treated orally with safflower seed<sup>1</sup>

	Control	0.5X <sup>2</sup>	1X	2X
WBC <sup>3</sup> (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.5±4.1	8.9±4.0	9.4±3.7	8.7±3.8
RBC <sup>4</sup> (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.89±0.43	6.49±0.57	5.95±0.40	5.91±0.53
Hemoglobin (g/dl)	12.8±0.7	13.5±1.0	13.1±0.5	12.7±0.4
Hematocrit (%)	36.7±1.9	35.3±1.3	38.5±2.1	37.0±3.1
MCV <sup>5</sup> (μm <sup>3</sup> )	62±1	62±2	62±1	62±1
MCH <sup>6</sup> (pg)	21.8±0.7	21.5±0.4	21.7±0.5	21.7±0.6
MCHC <sup>7</sup> (g/dl)	36.9±0.5	37.3±5.3	36.2±0.3	36.9±0.4
Platelet (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	514±158	499±162	602±160	575±169

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10.

<sup>2</sup>X means the amount of administered safflower seed calculated from the recommended daily intakes of safflower seed for adult humans and the ratio of metabolic body weight (Wt<sup>3/4</sup>).

<sup>3</sup>White blood cell. <sup>4</sup>Red blood cell. <sup>5</sup>Mean corpuscular volume.

<sup>6</sup>Mean corpuscular hemoglobin.

<sup>7</sup>Mean corpuscular hemoglobin concentration.

혈액생화학적 검사결과는 표 1-13과 같다. 대조군과 비교하여 모든 투여군에서 특이한 변화를 관찰할 수 없었다.

시험 종결 후 부검결과 모든 투여군에서 특이한 이상을 관찰할 수 없었다.

홍화씨 투여군에서 사망하는 동물이 관찰되지 않았고 혈액학 및 혈액생화학적 검사에서도 유의한 변화가 관찰되지 않아서 홍화씨는 독성 증상을 보이지 않았다.

Table 1-13. Blood biochemical values in rats treated orally with safflower seed<sup>1</sup>

	Control	0.5X <sup>2</sup>	1X	2X
Alkaline phosphatase (U/l)	425±137	351±102	327±101	394±124
Alanine aminotransferase (U/l)	20.3±3.4	22.7±3.9	19.8±2.2	21.0±2.7
Aspartate aminotransferase (U/l)	35.2±7.1	41.3±5.9	39.0±6.3	37.8±6.5
Blood urea nitrogen (mg/dl)	12.8±1.8	12.6±2.0	12.9±2.1	12.7±1.7
Cholesterol (mg/dl)	45±6	48±7	46±5	45±7
Creatine kinase (U/l)	110±41	145±28	137±16	121±33
Creatinine (mg/dl)	0.5±0.0	0.5±0.1	0.5±0.0	0.5±0.1
Glucose (mg/dl)	159±18	152±36	163±15	155±31
Lactate dehydrogenase (U/l)	59±14	102±57	83±29	75±40
Total protein (g/dl)	5.3±0.2	5.3±0.3	5.3±0.2	5.3±0.3
Triglycerides (mg/dl)	74±27	91±36	105±45	86±41

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10.

<sup>2</sup>X means the amount of administered safflower seed calculated from the recommended daily intakes of safflower seed for adult humans and the ratio of metabolic body weight (Wt<sup>3/4</sup>).

이상의 결과들은 국산 홍화씨가 부작용이 없이 안전하게 쓰일 수 있는 식품소재임을 입증하는 것이다.

## 2. 솔(*Pinus densiflora*)잎의 건강기능성

솔잎은 국내 시장에서 국산품만이 유통되는 생약재이다.

솔잎은 본초학에서 독성이 없고 많은 양을 오래 먹어도 몸에 해를 주지 않고 몸을 보하는 상품의 생약재로 분류되고 있으며 (69), 風濕瘡을 치료하고 모발을 나게 하며 五臟을 편안하게 하고 신체의 균형을 유지시키며 주리지 않게 하며 오래 살게 하고 惡疾을 치료하며 風痛과 脚痺를 없앤다고 기록되어 있다 (70).

솔잎의 methanol 추출물이 강한 항산화 활성을 보였으며, ethyl acetate 분획에서 강한 항산화 활성을 나타내는 lignan (+)-isolarisiresinol xylopyranoside와 두 개의 flavonoids (kaempferol 3-O- $\beta$ -galactopyranoside and its 6"-acetyl derivative)가 분리되었다 (71).

산소는 유기호흡을 하는 생물에게 필수적인 원소지만 에너지 대사과정중 불완전하게 환원될 때 발생하는 활성산소는 세포내의 거대분자를 변성, 파괴하여 세포의 항상성을 깨뜨려 세포를 사멸시킨다 (72). 활성산소는 담배, 매연 등의 요인에 의해 생성되어 단백질, DNA, 효소, T-cell 등의 생체 구성요소를 손상시켜 각종 질환을 일으키며, 특히 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화지질을 생성하여 노화 및 성인병을 일으킨다고 알려져 있다 (73-75).

5주령의 ICR mouse에게 솔잎을 4주간, 하루 2회 경구투여하였다. 투여량은 사람의

1일 솔잎 권장 섭취량을 15g으로 하고 사람과 흰쥐의 대사체중 비율로부터 환산하였는데 사람의 평균 체중은 65 kg으로 계산하였다. 4주간 솔잎 시료 투여후 mouse를 ether로 마취시키고 심장에서 혈액을 채취하여 항응고제가 들은 시험관에서 혈장을 분리하였다. 혈장 총산화력은 Randox사(U. K.)의 total antioxidant status 측정용 kit를 이용하여 측정되었다.

5주령의 ICR mouse에게 국산 솔잎 시료를 4주간 투여한 뒤 혈장을 분리하여 총항산화력(total antioxidant status)을 측정하여 표 14에 나타내었다.

Table 14. Total plasma antioxidant status in mouse after treatment of red pine needles during 4 weeks<sup>1</sup>

Relative Trolox <sup>2</sup> concentration (nmol/ml plasma)	
Control	1.21±0.05
Red pine needles	1.62±0.08*

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=8.

<sup>2</sup>Water-soluble vitamin E analogue.

\**P* <0.05 for the comparison with control group.

솔잎 투여군의 혈장 총항산화력이 대조군보다 34 % 증가하였으며 유의차가 있었다 (*p*<0.05). 혈장의 총항산화력은 체내 항산화력을 대표하는 값으로 생각될 수 있으며, 혈장 총항산화력의 증가는 솔잎의 투여에 의해 체내 항산화력이 증가하였음을 의미한다. 이러한 결과는 솔잎이 생체 항산화력을 증가시켜서 여러 요인에 의하여 발생하는 생체 산화적 손상에 의해 발생하는 여러 가지 질병 및 노화로부터 생체를 보호하는 우수한 건강기능성 식품소재로 사용될 수 있음을 보여주고 있다.



솔잎시료에 85% acetone 50ml을 가하고 해사를 첨가하여 잘 분쇄한 후 냉암소에서 하룻밤 방치한 후 3G-2 유리 여과기로 여과한다. 갈색 flask 내의 잔류물은 85% acetone 25ml을 가하여 10분간 유리병으로 저어 다시 여과한다. Acetone 액이 착색되지 않을 때까지 반복 조작한 후 acetone을 가하여 200ml로 한다. 이 액 20ml을 갈색 분획 깔때기에 넣고 ether 50ml 및 5% 황산나트륨 50ml을 가해 완만히 흔들어 진탕한 후 마개를 열어 ether 기체를 방출한 후 마개를 하여 1분간 진탕한다. 정치후 물층(하층)을 분리하고 ethyl ether 10ml을 가하여 추출하는 과정을 2회 반복한 후 ether 층을 합하여 5% 황산나트륨 용액 50ml로 3회 세척한다. 세척된 ether 층은 무수 황산나트륨을 통과 탈수시켜 여과한 후 갈색 분획 깔때기 및 여과지를 ether로 씻어 합하고 이에 ether를 가해 100ml로 하여 시험 용액으로 한다. 시험용액은 ether를 대조액으로 하여 액층 1cm cell을 사용하여 파장 642.5nm 및 660nm에 대하여 흡광도  $A_1$  및  $A_2$ 를 측정하고 다음 식에 의해 총엽록소 함량을 구한다.

$$\text{총엽록소(mg\%)} = C \times 100/1,000 \times 200/20 \times 100/S$$

$$C(\text{총엽록소 mg/l}) : 7.12 \times A_2 + 16.8 \times A_1$$

$$S : \text{검체 채취량 (g)}$$

국산 솔잎을 ether로 추출하고 파장 642.5nm 및 660nm에 대하여 흡광도를 측정하여 조사된 솔잎의 총엽소 함량은 2.49 mg/g이었다.

현재 한국식품의약품안전청에서 제정한 건강기능식품의 기준 및 규격에서 엽록소 함유 제품중 기타 식물류 엽록소 함유 제품은 총엽록소 함량이 60.0mg/100g 이상이어야 한다고 규정되어 있다. 또한 엽록소 함유 제품은 SOD 함유, 유해 산소 예방, 피부건강에 도움 및 건강 증진 및 유지라는 기능성을 표시할 수 있다. 따라서 국산 솔잎을 기타 식물류 엽록소 함유 제품의 주원료로 활용한다면 국산 솔잎의 수요와 생산이 크게 증가될 수 있다.

시료에 6배의 ethanol을 넣고 80°C에서 5시간 추출하여 추출액을 Whatman No. 2 여과지로 여과한 후 감압농축한 뒤, 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 최소 저해

농도를 측정하기 위하여, 사면배지에서 배양된 균주를 1 백금이 취하고 적중 가용성 고형물 함량으로 희석된 추출액에 혼합한 뒤 고체 배지에 접종하였다. 30℃에서 48 시간 배양후 육안으로 관찰하여 미생물이 증식되지 않은 농도를 최소 저해농도로 하였다.

매실 추출물 제품은 유해균의 번식 억제라는 가능성을 표시할 수 있다.

국산 솔잎과 매실 시료에 6배의 ethanol을 넣고 80℃에서 5시간 추출 및 감압 농축하여 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3899, *Escherichia coli* ATCC 15491, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Salmonella typhimurium* ATCC 7988 및 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 균주들에 대한 최소 저해농도를 측정한 결과를 표 15에 나타내었다.

Table 15. Minimum inhibitory concentrations (MIC, mg/ml) of ethanol extract of pine needle (PN) and mume fruit (MF) for harmful microorganisms

	SM	PA	EC	LM	SA	ST	VP
PN	0.15	0.09	0.12	0.06	0.09	0.15	0.09
MF	0.18	0.09	0.09	0.15	0.12	0.12	0.06

7종의 유해 미생물에 대하여 솔잎과 매실 추출물 모두 0.06~0.15 mg/ml의 최소 저해농도를 보였으며, 솔잎은 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 균주들에 대한 높은 항균활성을 보였고, 매실은 *Escherichia coli* ATCC 15491, *Salmonella typhimurium* ATCC 7988 및 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 균주들에 대한 높은 항균활성을 보였다.

이상의 결과는 솔잎의 유해 미생물 번식 억제 효과가 좀더 보완된다면 솔잎이 건강기능식품의 원료로 유해균의 번식 억제라는 기능성을 인정받을 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

수분은 105°C 상압가열건조법, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조단백질 함량은 semimicrokjeldahl법 (Kjeltec 1030 Autoanalyzer, Tecator, Sweden)으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조섬유 함량은 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-NaOH 분해법 (Fibertec System M 1020 Hot Extract, Tecator, Sweden)으로, 조회분은 직접 회화법으로 측정하였다. 또한 총량에서 조회분, 조단백질, 조지방 및 조섬유의 양을 뺀 값을 당질 양으로 나타내었다.

표 16은 솔잎의 일반 성분을 분석한 결과이다.

Table 16. General composition of red pine needles (unit: %)

Moisture	8.2
Ash	1.3
Protein	9.9
Lipid	8.5
Fiber	29.1
Carbohydrate	42.9
Energy	250kcal

건강식품의 원료로 많이 사용되는 다시마 분말과 비교할 때, 솔잎은 단백질, 지질 및 energy 함량이 높았으며, 회분과 섬유소 함량은 낮았고 당질 함

량은 비슷하였다. 대체적으로 솔잎은 식이섬유의 함량이 높고 열량이 낮은 다이어트 식품소재의 특성을 갖추고 있다고 할 수 있다.

각 원소의 표준용액 농도를 0.1 ppm, 1.0 ppm, 10.0 ppm의 3 수준으로 조제하여 표준 검량곡선을 작성하였으며 매 10개의 시료 측정 후 검량곡선을 재작성하여 실험하였다. 이 때 ICP-AES (Inductively coupled plasma, JY38 PLUS, ISA Instrument S.A., France)의 작동조건은 power: 1 KW for aqueous, nebulizer pressure: 3.5 bars for meinhard type C, aerosol flow rate: 0.3 l/min, sheath gas flow: 0.3 l/min, cooling gas: 12 l/min이었으며, 각 무기질의 검출 파장은 Ca: 393.366, Na: 588.995, K: 766.490, Fe: 238.204, P: 213.618 nm이었다.

솔잎의 무기질 함량을 측정한 결과가 표 17에 나타나 있다.

Table 17. Mineral composition of pine needles (mg %)

Ca	134
P	112
Fe	6.8
Na	53.9
K	1507

솔잎은 철 함량만이 다시마에 비하여 높았고, 다른 무기질 함량은 다시마에 비하여 낮았다.

비타민 B<sub>1</sub>의 분석을 위하여 시료 약 3 g을 25 ml 정용 플라스크에 넣고 여기에 이동상 용액 (1 mM hexanesulfonic acid sodium salt in 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.0) : MeOH = 98 : 2) 20 ml을 넣어 수욕조에서 초음파로 약 10분간 처리한 다음 정용하였다. 이를 10,000 x g로 10분간 원심분리하여 그 상등액을 0.45 µm membrane filter로 여과시킨 후 분석시료로 사용하였다. 분석에 사용한 칼럼은 µ-bondapak C<sub>18</sub>, 온도는 35°C, 이동상은 1 mM hexanesulfonic acid sodium salt in 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.0) : MeOH = 98 : 2, 유속은 1.0 ml/min이었으며, 검출기는 UV 250 nm를 사용하였고 시료 주입량은 10 µl였다.

비타민 B<sub>2</sub>의 분석은 시료 2 g에 증류수 80 ml을 넣어 80°C의 수욕상에서 30분간 추출한 후 100 ml로 정용하여 0.45 µm membrane filter로 여과시킨 뒤 HPLC로 분석하였다. 칼럼은 YMC-Pack polyamine II (4.6 mm i.d. x 250 mm), 칼럼 온도는 40°C, 용매는 MeOH : 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.5) = 35 : 65, 유속은 0.8 ml/min이었고, 형광검출기 (Ex.: 445 nm, Em.: 530 nm)를 사용하였으며 시료 주입량은 10 µl였다.

비타민 C의 분석은 추출용액 100 ml에 비타민 C의 함량이 1.5 - 2.5 mg이 되도록 시료를 취하여 5 %의 metaphosphoric acid로 저온에서 신속히 추출해서 분석시료를 제조하였다. 1, 2, 3 mg %의 ascorbic acid 용액을 제조하여 표준 검량곡선을 작성하였다. HPLC 칼럼은 YMC-Pack polyamine II (4.6 mm i.d. x 250 mm) 이었으며, 온도는 40°C, 용매는 acetonitrile/50 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 용매의 이동속도는 1.0 ml/min, 시료주입량은 20 µl였으며 검출기는 UV 254 nm를 사용하였다.

표 18은 솔잎의 비타민 함량을 나타낸 것이다. 솔잎의 비타민 B<sub>1</sub>와 비타민 C 및 β-carotene 함량이 다시마에 비하여 높았고, 비타민 B<sub>2</sub>와 niacin 함량은 다시마에 비하여 낮았다.

Table 18. Vitamin composition of pine needles (unit: mg %)

Vitamin B <sub>1</sub>	1.53
Vitamin B <sub>2</sub>	0.35
Niacin	0.4
Vitamin C	64
β-carotene	6.79

아미노산 조성은 pico-tag 방법에 따라 시료를 처리한 후 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 instrument: JASCO HPLC System, column: pico-tag, column temp.: 40°C, eluent: pico-tag eluent A & B, flow rate: 1.0 ml/min, chart speed 1.0 cm/min, detector: UV 254 nm, injection volume: 10 µl였다.

표 19는 솔잎의 아미노산량을 나타낸 것이다. Glutamic acid 함량이 가장 높았고, 성인이 필요로 하는 7종의 필수 amino acids를 함유하고 있었다. Glutamic acid가 총 아미노산 함량의 13.6%를 차지하였으며 aspartic acid, leucine 및 arginine의 함량도 높았다. Methionine과 cysteine의 함량은 각각 43.5, 2.4 mg %로 낮았다.

Table 19. Amino acid composition  
of pine needles (unit: mg%)

Asp	546.7
Glu	815.7
Ser	348.5
Gly	317.6
His	165.4
Arg	576.3
Thr	314.8
Ala	186.3
Pro	361.3
Tyr	183.2
Val	403.5
Met	43.5
Cys	2.4
Ile	324.5
Leu	647.5
Phe	375.2
Lys	402.6
Total	6015.0

지방산 분석을 위해 Soxhlet 법으로 지방을 추출하여 검화한 후 이를  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$ 로 처리하였다. GC는 Hewlett-Packard 5890II를 사용하였으며, column은 FFAP 25m x 0.32mm I.d. x 0.52 $\mu\text{m}$  film thickness, injection 온도

는 230℃, detector 온도는 250℃, oven 온도는 160℃(1min)~220℃(9min), 운반 gas는 He이었다.

표 20은 솔잎의 지방산 조성을 분석한 결과이다. Oleic acid가 35.39%로 가장 많았고, 다음이 linoleic acid로 20.18%를 차지하였다. 불포화 지방산의 함량이 64.48%로 매우 높아서, 솔잎이 성인병 억제에 좋은 식품임이 밝혀졌다.

Table 20. Fatty acid composition of pine needles (unit: %)

Lauric(C12:0)	11.27
Myristic(C14:0)	4.00
Palmitic(C16:0)	16.57
Stearic(C18:0)	2.48
Oleic(C18:1)	35.39
Linoleic(C18:2)	20.18
Arachidic(C20:0)	1.20
Gadolenic(C20:1)	0.99
Cis-11, 14-eico (C20:2)	1.61
Dihomo- $\gamma$ -linolenic (C20:3)	0.94
Arachidonic(C20:4)	0.95
Behenic(C21:1)	2.57
Erucic(C22:1)	1.85

사람에게서 가장 흔히 발생하는 비만증 유형과 가장 가까운 비만증을 유도한다고 알려진 cafeteria diet를 Sprague-Dawley 숫쥐에게 급여하여 비만



을 유도하며 솔잎 시료의 경구투여에 의한 비만억제 효과를 조사하였다. 4주령의 쥐를 구입하여 1주간 시판 pellet 사료를 급여한 뒤 10 마리씩 군을 나누었다. 정상 대조군은 계속 pellet 사료만 주고 나머지 모든 군은 pellet 사료와 함께 cafeteria diet를 급여하였으며, 모든 사료와 물을 자유섭취시켰다. Cafeteria diet를 2주간 급여한 후, 시료를 하루 2회 경구투여하였고, 대조군은 동량의 생리식염수를 투여하였다. 시료의 1일 투여량은 매주 쥐의 체중을 측정하여 사람의 1일 시료 섭취 허용량과 사람과 쥐의 평균 대사체중(체중<sup>3/4</sup>) 비율로부터 환산하였는데 사람의 평균 체중은 65 kg, 사람의 1일 솔잎 섭취 허용량은 15 g으로 하였다. 체중은 1주 간격으로 측정하였으며, 6주간 cafeteria diet를 급여하면서 시료를 경구투여하였다. Cafeteria diet로 cookies, biscuits, chocolate, peanuts, cheese, potato crisps, almonds, sausage 및 ham을 급여하였다. Cafeteria diet의 에너지 함량은 식품 성분표를 이용하여 계산하였다. 에너지 섭취량을 측정하기 위하여 사육실험 종료전 5일간 pellet 사료와 cafeteria diet의 섭취량을 조사해서 1마리당 하루 섭취량의 평균치를 구하였다. 시료를 6주간 경구투여한 후, 하룻밤 절식시키고 ether로 마취시켜 개복한 뒤 심장에서 혈액을 채취하여 4℃에서 1,500 x g로 15분간 원심분리해서 serum을 얻었다. 채혈 후 간, perirenal fat pad 및 epididymal fat pad를 잘라내어 냉각된 생리식염수에 씻고 물기를 제거한 뒤 무게를 측정했으며, 간은 중성지질 함량을 측정하기 위하여 -20℃에서 보관하였다. 간의 중성지질을 분석하기 위하여 간의 지질을 추출한 뒤, 효소법으로 중성지질을 정량하였다 (Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Japan). 혈청의 total cholesterol, HDL-cholesterol 및 포도당 함량은 dry chemistry system (Daiichi Co., Ltd, Kyoto, Japan, Spotchem Model SP-4410)을 이용하여 분석하였다. Atherogenic index는 (total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol 식으로 계산하였다.

측정치는 Duncan's multiple range test로 분석되었으며 M±SEM으로 표시되었다.

표 21은 흰쥐에게 cafeteria diet를 급여하여 비만을 유도하면서 솔잎 시료의 비만억제 효과를 조사한 결과이다. Cafeteria diet를 급여한 비만대조군은 시판 pellet 사료를 급여한 정상대조군에 비하여 에너지 섭취량이 30 % 증가하였고, 체중 증가량 또한 26 % 증가하였다. 또한 fat pad는 48 % 증가하였고 간의 중성지방과 혈당 역시 각각 29 %, 15 % 증가하였다. 그리고 혈청의 총 cholesterol 및 HDL-cholesterol 함량으로부터 계산된 atherogenic index도 57 % 증가하여 비만대조군의 동맥경화증의 발병 위험도가 크게 높아졌다. 이상의 결과는 cafeteria diet가 흰쥐의 비만증을 유발하였으며, 비만증이 지방간, 동맥경화 및 당뇨병과 연관되어 있음을 나타내고 있다. 솔잎 급여군은 모든 측정항목의 값이 비만대조군보다 낮아서 솔잎이 매우 우수한 비만증 억제 기능성 식품소재임이 입증되었다. 비만이 문제가 되는 대표적인 질병으로 당뇨병, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증, 협심증, 심근경색증, 뇌졸중 등이 있는데 비만이 이들 질환을 잘 일으킬 뿐 아니라 이미 질환이 있는 사람에게는 기존 질환을 악화시키는 데에도 한 몫을 한다. 따라서 이러한 질환이 있는 사람은 체중감소만으로도 현저한 치료효과를 볼 수 있다고 알려져 있다.

Table 21. Effects of pine needles on body weight gain (BWG), energy intake (EI), fat pads, liver triglycerides (LT), atherogenic index (AI) and blood glucose (BG) of rats fed experimental diets for 8 weeks<sup>1</sup>

	BWG, g	EI, kJ/day <sup>2</sup>	Fat pads, g	LT, mg/g	AI <sup>3</sup>	BG, mg/dl
Normal control	238±4 <sup>a</sup>	325±9 <sup>a</sup>	8.92±0.26 <sup>a</sup>	72.1±2.5 <sup>a</sup>	2.3±0.2 <sup>a</sup>	144±3 <sup>a</sup>
Obese control	301±5 <sup>c</sup>	421±20 <sup>c</sup>	13.16±0.35 <sup>c</sup>	92.8±5.3 <sup>c</sup>	3.6±0.3 <sup>c</sup>	165±5 <sup>c</sup>
Pine needles	254±4 <sup>b</sup>	369±15 <sup>b</sup>	9.86±0.29 <sup>b</sup>	81.9±4.3 <sup>b</sup>	2.8±0.1 <sup>b</sup>	154±4 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10. Within a column, values with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ).

<sup>2</sup>Values are calculated 5 days before the experiment.

<sup>3</sup>(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol.

표 22는 100°C에서 30분간의 열처리, 동결건조 및 70°C에서의 열풍건조가 솔잎의 비만억제 효과에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

열처리와 건조가 솔잎의 비만억제 효과를 어느 정도 감소시켰으나 모든 처리구에서 모든 측정치가 비만 대조군에 비하여 작은 값을 나타내어 비만억제 효과가 인정되었다. 동결건조가 열풍건조에 비하여 솔잎의 비만억제 효과를 작게 감소시켰다. 이 결과는 열처리 및 건조에 의하여 비만억제 효과를 지닌 솔잎 가공식품의 개발 가능성을 보여주는 것이다.

Table 22. Effects of heating and drying of pine needles on body weight gain (BWG), energy intake (EI), fat pads, liver triglycerides (LT), atherogenic index (AI) and blood glucose (BG) of rats fed cafeteria diets for 8 weeks<sup>1</sup>

Group	BWG, g	EI, kJ/day <sup>2</sup>	Fat pads, g	LT, mg/g	AI <sup>3</sup>	BG, mg/dl
Normal control	235±5 <sup>a</sup>	325±10 <sup>a</sup>	8.91±0.25 <sup>a</sup>	72.3±2.7 <sup>a</sup>	2.3±0.3 <sup>a</sup>	147±4 <sup>a</sup>
Obese control	298±6 <sup>c</sup>	423±17 <sup>c</sup>	13.15±0.31 <sup>c</sup>	92.7±5.4 <sup>d</sup>	3.5±0.2 <sup>c</sup>	170±5 <sup>c</sup>
RPN <sup>4</sup>	238±6 <sup>ab</sup>	362±15 <sup>b</sup>	9.12±0.23 <sup>ab</sup>	78.1±2.2 <sup>b</sup>	3.0±0.2 <sup>b</sup>	151±3 <sup>ab</sup>
HPN <sup>5</sup>	243±4 <sup>ab</sup>	367±12 <sup>b</sup>	9.41±0.28 <sup>ab</sup>	84.1±2.8 <sup>c</sup>	3.2±0.1 <sup>bc</sup>	155±3 <sup>b</sup>
FDPN <sup>6</sup>	241±5 <sup>ab</sup>	367±19 <sup>b</sup>	9.21±0.35 <sup>ab</sup>	82.4±4.1 <sup>bc</sup>	3.2±0.2 <sup>bc</sup>	154±2 <sup>b</sup>
HADPN <sup>7</sup>	250±6 <sup>b</sup>	370±14 <sup>b</sup>	9.47±0.28 <sup>b</sup>	85.6±3.8 <sup>cd</sup>	3.3±0.3 <sup>bc</sup>	157±3 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10. Within a column, values with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ).

<sup>2</sup>Values are calculated 5 days before the experiment. <sup>3</sup>(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol.

<sup>4</sup>Raw pine needles. <sup>5</sup>Heat-treated pine needles for 30 min at 100°C. <sup>6</sup>Freeze-dried pine needles.

<sup>7</sup>Hot air dried pine needles at 70°C.

술잎 분획의 비만억제 효과를 조사하기 위하여 술잎을 짙기어 생즙기로 갈아서 동결건조시켰다. 동결건조된 시료에 methanol을 4배 (v/w) 첨가하여 흔들면서 7시간씩 3번 추출하여 9,700×g에서 20분간 원심분리하였다. 침전물은 동결건조한 뒤 분말화하여 불용성 분획 시료로 사용하고, supernatant는 동결건조하여 hexane, butanol, 증류수 순으로 분획하고 감압농축 또는 동결건조하여 용매를 제거한 후 hexane, butanol 및 수용성 분획을 얻었다.

각 분획의 비만억제 효과를 조사한 결과를 표 23에 나타내었다. methanol 추출물을 급여한 군이 불용성 분획을 급여한 군보다 비만억제 효과가 컸다. methanol 추출물을 급여한 군의 비만억제 효과가 원료 술잎을 급여한 군보다 작고, 불용성 분획을 급여한 군의 모든 측정치가 유의차는 없었지만 비만 대조군에 비하여 작았다. 이 결과는 술잎의 비만억제 기능에서 두 분획이 상승작용을 하며 비만억제 기능을 최대화하려면 두 분획을 같이 사용하여야 함을 보여주는 것이다. 유의차는 없지만 hexane 분획의 측정치가 butanol 및 물 분획에 비하여 작으므로 가용성 분획 중 비극성 물질이 동아의 비만억제에 중요한 역할을 한다고 판단된다.

Table 23. Effects of fractionated samples of pine needles on body weight gain (BWG), energy intake (EI), fat pads, liver triglycerides (LT), atherogenic index (AI) and blood glucose (BG) of rats fed cafeteria diets for 8 weeks<sup>1</sup>

Group	BWG, g	EI, kJ/day <sup>2</sup>	Fat pads, g	LT, mg/g	AI <sup>3</sup>	BG, mg/dl
Normal control	238±6 <sup>a</sup>	331±8 <sup>a</sup>	8.97±0.23 <sup>a</sup>	72.2±2.5 <sup>a</sup>	2.3±0.3 <sup>a</sup>	144±4 <sup>a</sup>
Obese control	271±6 <sup>c</sup>	402±12 <sup>c</sup>	12.38±0.30 <sup>e</sup>	89.6±4.7 <sup>c</sup>	3.6±0.3 <sup>b</sup>	164±6 <sup>bc</sup>
Raw pine needles	239±7 <sup>ab</sup>	360±9 <sup>b</sup>	9.48±0.23 <sup>b</sup>	79.1±2.7 <sup>b</sup>	2.7±0.4 <sup>a</sup>	150±3 <sup>ab</sup>
Insoluble fraction	261±5 <sup>bc</sup>	387±12 <sup>c</sup>	11.83±0.29 <sup>de</sup>	86.5±3.6 <sup>c</sup>	3.4±0.3 <sup>b</sup>	159±4 <sup>bc</sup>
Methanol extract	252±7 <sup>b</sup>	371±10 <sup>bc</sup>	10.47±0.21 <sup>c</sup>	80.5±3.0 <sup>bc</sup>	2.9±0.4 <sup>ab</sup>	155±3 <sup>b</sup>
Hexane fraction	264±5 <sup>bc</sup>	387±11 <sup>c</sup>	11.68±0.27 <sup>d</sup>	86.4±4.1 <sup>c</sup>	3.4±0.2 <sup>b</sup>	163±5 <sup>bc</sup>
Butanol fraction	267±4 <sup>c</sup>	396±13 <sup>c</sup>	12.02±0.25 <sup>de</sup>	88.1±3.9 <sup>c</sup>	3.5±0.3 <sup>b</sup>	163±4 <sup>c</sup>
Aqueous fraction	267±6 <sup>c</sup>	395±14 <sup>c</sup>	12.05±0.24 <sup>de</sup>	87.4±2.4 <sup>c</sup>	3.5±0.4 <sup>b</sup>	160±4 <sup>bc</sup>

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10. Within a column, values with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ).

<sup>2</sup>Values are calculated 5 days before the experiment. <sup>3</sup>(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol.

생체 전위 임피던스를 측정하여 체지방 함량이 30 % 이상인 성인 여성 20 인을 선발하였다. 솔잎 분말을 15 g씩 28일간 섭취시킨 후 조사된 체형, 임상 및 생화학적 측정치를 섭취 전과 비교한 결과를 표 24에 나타내었다.

Table 24. Changes of anthropometric, clinical and biochemical data during the period of obesity treatment with pine needle powder<sup>1</sup>

	Pre-treatment	Post-treatment
Weight (kg)	67.3±2.1	63.7±2.0*
Body fat (%)	35.1±0.5	28.9±0.8*
Waist circumference (inch)	33.5±1.0	31.7±0.9*
Upper arm circumference (inch)	11.7±0.4	10.1±0.3*
Hip circumference (inch)	40.1±0.7	38.2±0.9*
Systolic pressure (mmHg)	113±6	111±5
Diastolic pressure (mmHg)	75±4	76±3
Fasting blood sugar (mg/dl)	85±8	76±3
Blood triglyceride (mg/dl)	142±19	144±18
Blood total cholesterol (mg/dl)	179±12	167±10*
HDL-Cholesterol (mg/dl)	40±4	45±5
LDL-Cholesterol (mg/dl)	147±20	97±6*

<sup>1</sup>Mean±S.E.

\*p < 0.05

술잎 분말을 28일간 섭취시킨 결과 체중이 평균 3.6 kg 감소하고 체지방 함량이 18 % 감소하였다. 또한 허리 둘레, 상박 둘레, 엉덩이 둘레, 혈당농도 및 혈청 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도가 섭취 전에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다. 특히 흥미있는 사실은 술잎 분말 섭취가 끝난 후 56일이 지난 뒤 측정된 체중의 증가량이 평균 0.4 kg에 불과하여 술잎 분말이 다이어트 후에 흔하게 일어나는 요요현상을 방지하고 있었다.

이상의 결과들은 국산 솔잎이 우수한 체중조절용 기능성 식품소재로 활용될 수 있음을 보여주고 있다.

Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 실험 시작전 1주일간 실험동물용 고형사료로 적응시킨 뒤 체중이  $165.2 \pm 10.9$  g인 동물을 시험에 사용하였다. 사육시험실은 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10$  %, 환기 횟수 12~13 회/hr, 조도 150~300 lux 조건을 유지하였다. Rat의 시험기간중에는 실험동물용 고형사료를 섭취시켰으며, 수돗물을 자유롭게 마시게 하였다.

사람에게 있어서 솔잎의 1일 섭취량은 15 g이 적당하다고 알려져 있다. 시험기간중 흰쥐의 체중을 1주일 간격으로 측정하고 사람과 흰쥐의 代謝체중(체중<sup>3/4</sup>)의 비로부터 사람의 솔잎 1일 섭취량 15 g에 상당하는 흰쥐의 솔잎 1일 섭취량을 결정하였는데 사람의 평균 체중은 65 kg로 계산하였다. 솔잎의 투여량이 흰쥐에 미치는 독성을 조사하기 위하여 위에서 결정된 사람의 솔잎 1일 섭취량 15 g에 상당하는 흰쥐의 솔잎 1일 섭취량의 0.5배, 1배 및 2배에 해당하는 솔잎 분말 시료를 증류수와 혼합하고 1일 3회에 나누어 4주간 경구 투여하였다. 대조군에는 동량의 생리식염수를 경구투여 하였다.

실험 종료전 5일동안 뇨를 채취하고 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 냉동보관하였다. 실험기간이 끝난 후 12시간 동안 굶긴 동물을 ethyl ether로 마취시켜 단두에 의해 희생시키고 혈액을 채취하였다. 혈액을 heparin 처리를 한 시험관에 받아 냉동보관하였다. 혈액 채취 후 바로 실험동물을 해부하여 육안으로 장기의 이상여부를 관찰하였다.

혈청의 urea nitrogen 함량은 urease 효소법에 의해 urea를 urease로 분해시킨 후 salicylate와  $\text{HClO}_3$ 를 가하여 570 nm에서 비색정량하였다. 혈청의 creatinine 농도는 Jaffe 반응의 변형법을 이용한 kit(영동제약)을 사용하여 측정하였다. 이외의 혈액학적 및 혈청생화학적 조사는 Minos vet hematology analyzer (ABX, Levallois, France)와 550 express clinical chemistry analyzer (Ciba Corning, Oberlin, USA)를 사용하여 측정하였다.

모든 측정치는 Duncan's multiple range test로 분석되었으며  $M \pm SE$ 로 표

시되었다.

시험기간 중에 폐사한 예는 없었으며, 투여시료에 의한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 체중변화의 결과는 표 25와 같다. 대조군과 비교하여 모든 군에서 특이한 체중변화가 없었다.

Table 25. Body weight gain<sup>1</sup>

	Control	0.5X <sup>2</sup>	1X	2X
Body weight gain	124.8±16.1	124.1±13.9	123.6±14.7	124.5±14.5

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10.

<sup>2</sup>X means the amount of administered pine needles powder calculated from the recommended daily intakes of pine needles for adult humans and the ratio of metabolic body weight ( $Wt^{3/4}$ ).

혈액학적 검사결과는 표 26과 같다. 대조군과 비교하여 모든 투여군에서 특이한 변화를 관찰할 수 없었다.



Table 26. Hematological values in rats treated orally with pine needles<sup>1</sup>

	Control	0.5X <sup>2</sup>	1X	2X
WBC <sup>3</sup> (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	9.5±4.1	8.9±4.0	9.4±3.7	9.7±3.8
RBC <sup>4</sup> (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.78±0.43	6.44±0.57	5.95±0.40	5.91±0.54
Hemoglobin (g/dl)	12.9±0.7	13.5±1.0	13.1±0.5	12.7±0.4
Hematocrit (%)	36.7±1.9	36.3±1.3	38.5±2.1	37.7±3.1
MCV <sup>5</sup> (μm <sup>3</sup> )	62±1	61±2	62±1	62±1
MCH <sup>6</sup> (pg)	21.8±0.7	21.5±0.4	21.7±0.6	21.5±0.6
MCHC <sup>7</sup> (g/dl)	35.9±0.5	37.3±5.5	36.4±0.3	36.6±0.4
Platelet (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	512±158	498±164	608±161	578±165

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10.

<sup>2</sup>X means the amount of administered pine needles calculated from the recommended daily intakes of pine needles for adult humans and the ratio of metabolic body weight (Wt<sup>3/4</sup>).

<sup>3</sup>White blood cell. <sup>4</sup>Red blood cell. <sup>5</sup>Mean corpuscular volume.

<sup>6</sup>Mean corpuscular hemoglobin.

<sup>7</sup>Mean corpuscular hemoglobin concentration.

혈액생화학적 검사결과는 표 27와 같다. 대조군과 비교하여 모든 투여군에서 특이한 변화를 관찰할 수 없었다.

시험 종결 후 부검결과 모든 투여군에서 특이한 이상을 관찰할 수 없었다.

술잎 투여군에서 사망하는 동물이 관찰되지 않았고 혈액학 및 혈액생화학적 검사에서도 유의한 변화가 관찰되지 않아서 술잎은 독성 증상을 보이지 않았다.

Table 27. Blood biochemical values in rats treated orally with pine needles<sup>1</sup>

	Control	0.5X <sup>2</sup>	1X	2X
Alkaline phosphatase (U/l)	425±138	352±102	327±101	394±124
Alanine aminotransferase (U/l)	20.6±3.4	22.7±3.9	19.8±2.2	21.0±2.7
Aspartate aminotransferase (U/l)	35.2±7.1	41.3±5.9	39.0±6.7	39.8±6.5
Blood urea nitrogen (mg/dl)	12.8±1.9	12.7±2.0	12.9±2.1	12.7±1.7
Cholesterol (mg/dl)	44±6	48±7	46±5	45±7
Creatine kinase (U/l)	113±41	145±29	137±16	121±33
Creatinine (mg/dl)	0.5±0.0	0.5±0.1	0.5±0.0	0.5±0.1
Glucose (mg/dl)	159±18	152±36	165±15	155±30
Lactate dehydrogenase (U/l)	59±14	101±57	84±28	76±42
Total protein (g/dl)	5.3±0.3	5.3±0.2	5.3±0.2	5.3±0.3
Triglycerides (mg/dl)	75±27	93±36	105±46	87±42

<sup>1</sup>Values are means±SEM, n=10.

<sup>2</sup>X means the amount of administered pine needles calculated from the recommended daily intakes of pine needles for adult humans and the ratio of metabolic body weight ( $Wt^{3/4}$ ).

이상의 결과들은 국산 솔잎이 부작용이 없이 안전하게 쓰일 수 있는 식품소재임을 입증하는 것이다.

## 제5절 참고문헌

- (1) 식품신문 '03. 1. 6
- (2) 장경원, 박상희, 하상도, “기능성 식품 시장 동향”, 식품과학과 산업 36(1) (2003): 17-25.
- (3) 박무현, 마늘 및 양파의 신제품 개발, 한국식품개발연구원, 1993.
- (4) 김현구, 극초단파 공정에 의한 양념채소류 Oleoresin 고효율 추출기술 개발, 한국식품개발연구원, 2000.
- (5) Lee, H. J. Joo, Y. J., Park, C. S., Lee, J. S., Park, Y. H., Ahn, J. S. and Mheen, T. I. : Fermentation patterns of green onion Kimchi and chinese cabbage kimchi, Korean J. Food Sci. Technol., 31(2), 488-494 (1999)
- (6) Hong, S. I., Jo, M. N. and Kim, D. M. : Quality attributes of fresh-cut green onions as affected by rinsing and packaging, Korean J. Food Sci. Technol., 32(3), 659-667 (2000)
- (7) Kim, K. N., Kim, S. J., Kim, S. H. and Park, I. S. : Characterization of acid phosphatase from welsh onion, Korean J. Food Sci. Technol., 28(4), 663-667 (1996)
- (8) Jeong, M. C., Jeong, S. W. and Lee, Y. C. : Quality of ginger power as affected by concentration and dehydration methods of ginger extracts, Korean J. Food Sci. Technol., 31(6), 1589-1595 (1999)

- (9) Jeong, M. C., Lee, S. E. and Lee, Y. C. : Yield and quality of ginger extracts produced by enzymatic hydrolysis, Korean J. Food Sci. Technol., 31(2), 391-398 (1999)
- (10) Chung, T. Y., Jeong, M. C., Namgung, B. and Lee, S. E. : Effect of pre-treatment methods on the quality of ginger during storage, Korean J. Postharvest Sci. Technol., 6(1), 1-6 (1999)
- (11) 한국식품과학회 : 건강기능식품의 기능성 표시 및 평가 방향, (2002)
- (12) 신현경 : 기능성 식품의 개발 및 연구동향. 식품과학과 산업. 30, 2-13(1997)
- (13) 신동화 : 천연 항산화제의 연구동향과 방향. 식품과학과 산업. 30, 14-21(1997)
- (14) Yamaguchi, N. : Studies on natural antioxidants: antioxidative activities of flavonoids and synergistic effects on tocopherol and melanoidin. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 22, 270(1975)
- (15) Nishibori, S. and Namiki, K.: Superoxide anion radical-scavenging ability of fresh and heated vegetable juices, Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 45(2), 144-148 (1998)
- (16) De Rosa, G. Duncan, D.S. Keen, C.L. and Hurley, L.: Evaluation of negative staining technique for determination of CN-insensitive superoxide dismutase activity. Biochem. Biophys. Acta, 566, 32 (1979)
- (17) Cao, G. Sofic, E. and Prior, R.L.: Antioxidant capacity of tea and common vegetables, J. Agric. Food Chem, 44, 3426-3431 (1996)

- (18) Tade, M. et al: Biosci. Biotech. Biochem., 60, 1093–1095 (1996)
- (19) Radioprotective effects of S-Methylmethionine(Vitamin U). Gessler, N.N., Kharchenko, L.I., Pavlovskaya, T.E., and Bykhovskill, V. Ya. *Applies Biochemistry and Microbiology* (1996) 32: 666–668
- (20) Metabolism of S-Methylmethionine(vitamin U) in animals. Gessler, N.N., Bezzubov, A.A., Podlepa, E.M. and Bykhovskii, V. Ya. *Applies Biochemistry and Microbiology* (1991) 27: 275–280
- (21) S-Methylmethionine(vitamin U) metabolism in plants. Gessler, N.N., Bezzubov, A.A., Podlepa, E.M. and Bykhovskii, V. Ya. *Applies Biochemistry and Microbiology* (1991) 27: 192–199
- (22) 2003년도 연합학술대회 : 건강기능식품의 발전 및 연구 방향, 이화여대 이화삼성교육문화관, (2003)
- (23) 2003 한림대 실버생물산업기술연구센터 심포지움 : 고령화사회에서의 건강기능식품 개발 방향, (200)
- (24) 박인선 : 혈당조절 기능성 식품의 실험적 평가. 건강기능식품의 유효성 평가. 한국식품영양과학회, 28–33(2003)
- (25) 최명숙 : 건강기능식품의 콜레스테롤 조절 관련 기능성 평가체계 (안). 건강기능식품의 유효성 평가. 한국식품영양과학회, 34–36(2003)
- (26) 성미경 : 암화과정에서 식이성 항산화물질의 효능평가. 건강기능식품의 유효성

평가. 한국식품영양과학회, 39-41(2003)

(27) 이찬, 배송환, 조승룡, 이석원, 송혁환, 강호식, 윤철식 : 백강균의 자실체 생산 및 생리활성물질 이용기술 개발. 농림부 연구보고서(2003)

(28) 김현구, 이부용, 김영언 : 버섯류의 부가가치 제고를 위한 가공식품의 개발. 농림부 연구보고서(1997)

(29) 김홍은, 조남석, 민용규, 박종문 : 능이 임지재배 기술 및 기능성 개발. 농림부 연구보고서(2002)

(30) 김성준, 김명곤 : 버섯에서 혈전분해효소 생산 및 유전자 크로닝. 농림부 연구보고서(2003)

(31) 김병각 : 영지의 약효성분. 균학회소식. 16-20(1990)

(32) 미즈노 다카시 : 영지의 생물활성 성분과 의학적 효과. 균학회소식. 27-29(1990)

(33) 조덕현 : 한국의 11개 주요 산지에서 채집한 송이의 형태적, 화학적, 생리적, 유전적 특성에 관한 연구. 서울대 박사학위논문, (1999)

(34) A. J. Buchala and K. C. B. Wilkie. The ratio of  $\beta(1\rightarrow3)$  to glucosidic linkages in non-endospermic hemicellulosic  $\beta$ -glucans from oat plant (avena tissues at different stages of maturity). *Phytochemistry*, 10, 2287-2291 (1971).

(35) Jung, E. B. and Lee, Y. S. 랫트의 실험적 동맥경화증에 대한  $\beta$ -Glucan의 예방효과. *Kor. J. Food Hygiene*, 1, 1~12 (1986).

(36) P. Aman and H. Graham. Analysis of Total and Insoluble Mixed-Linked (1→3),(1→4)-β-D-Glucans in Barley and Oats. *J. Agric. Food Chem*, 35, 704-709 (1987).

(37) F. L. Shinnick, M. J. Longacre, S. L. Ink and J. A. Marlett. Oat fiber: composition versus physiological function in rats. *American Institute of Nutrition*, 118, 144-151 (1988).

(38) J. M. Carr, S. Glatter, J. L. Jeraci, and B. A. Lewis. Enzymic Determination of β-Glucan in Cereal-Based Food Products. *Cereal Chem*, 67(3), 226-229 (1990).

(39) P. J. Wood, J. Weisz, and B. A. Blackwell. Molecular Characterization of Cereal β-D-Glucans I. Structural Analysis of Oat β-D-Glucan and Rapid Structural Evaluation of β-D-Glucans from Different Sources by High-Performance Liquid Chromatography of Oligosaccharides Released by Lichenase, *Cereal Chem*, 68(1), 31-39 (1991).

(40) P. J. Wood, J. Weisz, and W. Mahn. Molecular Characterization of Cereal β-Glucans. II. Size-Exclusion Chromatography for Comparison of Molecular Weight. *Cereal Chem*, 68(5) 530-536 (1991).

(41) J. Jaskari, K. Henriksson, A. Nieminen, T. Suortti, H. Salovaara, and K. Poutanen. Effect of Hydrothermal and Enzymic Treatments on the Viscous Behavior of Dry- and Wet-Milled Oat Brans. *Cereal Chem*, 72(6), 625-631 (1995).

(42) K. Henriksson, A. Teleman, T. Suortti, T. Reinikainen, J. Jaskari, O. Teleman and K. Poutaneu. Hydrolysis of barley (1→3),(1→4)-β-D-Glucan by a cellobiohydrolase II preparation from *Trichoderma reesei*. *Carbohydrate Polymers*,

26, 109-119 (1995)

(43) 이영택. 보리와 귀리의  $\beta$ -Glucans 및 가공에 의한 용해성의 변화. 한국농화학회지, 39(6), 482~487 (1996).

(44) 오희정, 이서래. 보리가루에서 분리한  $\beta$ -Glucan의 생리적 기능성. Korean J. Food Sci. Technol, 28(4), 689~695 (1996).

(45) Yun, C. H., A. Estrada, A. V. Kessel, A. Gajadhar, M. J. Redmond and B. Laarveld.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4) Oat Glucan Enhances Resistance to *Eimeria vermiformis* Infection in Immunosuppressed Mice. International Journal for Parasitology, 27(3), 329~337 (1997).

(46) A. M. Fearon, C. S. Mayne and C. Charlton. Effect of Naked Oats in the Dairy Cow`s Diet on the Oxidative Stability of the Milk Fat. J Sci Food Agric, 76, 546-552 (1998).

(47) A. F. Mustafa, D. A. Christensen and J. J. Mckinnon. Chemical Characterisation and Ruminant Nutrient Degradability of Hulled and Hull-less Oats. J Sci Food Agric, 77, 449-455 (1998).

(48) G. S. Chandra, M. O. Proudlove and E. D. Baxter. The structure of barley endosperm-An important determinant of malt modification. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 37-46 (1999).

(49) F. Grosjean, P. Marrie and F. Beaux. Variability of wheat and other cereal water extract viscosity. 2-Range and causes of variation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 123-130 (1999).



(50) R. H. Auerbach and D. A. Gray. Oat antioxidant extraction and measurement—towards a commercial process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 385–389 (1999).

(51) A. A. M. Andersson, C. Elfverson, R. Andersson, S. Regner and P. Aman. Chemical and physical characteristics of different barley samples, *J Sci Food Agric*, 79, 979–986 (1999).

(52) K. Maatta, A. M. Lampi, J. Petterson, B. M. Fogelfors, V. Piironen and A. K. Eldin. Pytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in sweden. *J Sci Food Agric*, 79, 1021–1027 (1999).

(53) 최희돈, 박용곤, 장은희, 석호문, 이철호. 메성 및 찰성보리  $\beta$ -Glucan의 리올로지 특성. *Korean J. Food Sci. Technol*, 32(3), 590~597 (2000)

(54) L. Y. Aktas, M. Adlard, M. Trevan, A. Guven and M. D. Briwnleader. A Novel and Direct Assay for Measuring Enzymatic Depolymerisation of  $\beta$ -1,3-Glucans. *Phytochemical Analysis*, 11, 301–303 (2000).

(55) S. F. Kianian, R. L. Phillips, H. W. Rines, R. G. Fulcher. Quantitative trait loci influencing  $\beta$ -glucan content in oat(*Avene sativa*,  $2n=6x=42$ ). *Theor Appl Genet*, 101, 1039–1048 (2000).

(56) W. Cui, P. J. Wood, B. Blackwell and J. Nikiforuk. Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat  $\beta$ -D-glucan—comparison with other cereal  $\beta$ -D-glucans. *Cabohydrate Polymers*, 41, 249–258 (2000).

(57) L. Johansson, L. Virkki, S. Maunu, M. Lehto, P. Ekholm and P. Varo. Structural characterization of water soluble  $\beta$ -glucan of oat bran. *Carbohydrate Polymers*, 42, 143–148 (2000).

(58) J. P. Roubroeks, R. Andersson and P. Aman. Structural features of (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. *Carbohydrate Polymers*, 42, 3–11 (2000).

(59) Pietta, P., Simouetti, P., Gardana, C., Brusamolino, A., and Borloradelli, E.: Relationship between rate and extent of catechine absorption and plasma antioxidant status. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 895–899, 1998.

(60) Sureda, O., R. M. Prieto, M. C. Dameto, and J. A. Tur. 1995. Effect of cafeteria diet on intestinal absorption of palmitic acid in rats. *J. Nutr. Biochem.* 6: 151–154.

(61) J. P. Pellitier, J. A. DiBattista, J. P. Raynauld et al., "The in Vivo Effects of Intraarticular Corticosteroid Injections on Cartilage Lesions, Stromelysin, Interleukin-1 and Oncogene Protein Synthesis in Experimental Osteoarthritis", *Lab Invest* 72 (1975): 578–86.

(62) H. J. Mankin, H. Dorfman, L. Lippiello et al., "Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-arthritic Human Hips, II. Correlation of Morphology with Biochemical and Metabolic Data", *J Bone Joint Surg* 53-A(3) (1971): 523–37.

(63) S. Chandrasekhar, M. A. Easterman, and H. A. Hoffman, "Microdetermination

of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride", *Anal Biochem* 161 (1987): 103-8.

(64) M. Lequesne, "Indices of Severity and Disease Activity of Osteoarthritis", *Sem Arthr Rheum* 20(6, Suppl 2) (1991): 48-54.

(65) 이인우, 최진규, *홍화씨 건강법*, 태일출판사, 서울, 1998.

(66) HY Kim et al., The effect of safflower seed extract on periodontal healing of 1-wall intrabony defects in beagle dogs, *J Periodontol* 73 (2002): 1457-66.

(67) HJ Kim et al., Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats, *Caclcif Tissue Int* 71 (2002): 88-94.

(68) Frost HM, Jee WSS (1992) On rat model of human osteopenias and osteoporosis. *Bone Miner* 18: 227-36.

(69) 과학백과사전출판사, *동의학사전*, 여강출판사, 서울, 1989.

(70) 이시진, *본초강목*, 고문사, 서울, 1987.

(71) Jung MJ et al. (2003) Antioxidant principles from the needles of red pine, *Pinus densiflora*, *Phytother Res* 17: 1064-8.

(72) Bulkley, G. B. 1983. The role of oxygen radicals in human disease process. *Surgery* 94: 407-411.

(73) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals,

transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1–14.

(74) Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527–605.

(75) Ames, B. M. and Saul, R. L. 1987. Oxidative DNA damage, cancer and aging. Oxygen and human disease. *Ann. Inter. Med.* 107: 536–539.

## 제2장 채소류 분야

### Vegetable Part

주관연구기관명: 한국식품연구원

세부연구책임자: 책임연구원 김현구

책임연구원 홍석산

책임연구원 손동화

책임연구원 한찬규

위촉연구원 임태수

위촉연구원 박선빈

## 제1절 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 기존 문헌이나 D/B를 이용하여 채소류의 기능성과 안전성에 대한 자료 수집</li> <li>◦ 국산 채소류의 생리활성 연구법 확립 및 국산 채소류의 생리활성 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 채소류의 기능성과 안전성에 대한 자료 수집</li> <li>◦ 국산 채소류의 생리활성 연구법 확립</li> <li>◦ 국산 채소류의 전처리별 생리활성 변화 검토</li> </ul>
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 채소류의 최적 추출 조건 설정 및 추출공정별 채소류 추출물의 특성 비교</li> <li>◦ 채소류 추출물의 동물 확인 실험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 국산 채소류의 최적 추출조건 설정 시험</li> <li>◦ 국산 채소류의 추출공정 최적화 시험</li> <li>◦ 국산 채소류 추출물의 특성 시험</li> <li>◦ 채소류 추출물의 동물 확인 실험</li> </ul>
3차년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 건강기능식품으로 인정받는 건강기능식품 원료 개발</li> <li>◦ 채소류를 이용한 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료 작성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 채소류 추출물 활용 건강기능식품 원료 개발</li> <li>◦ 채소류를 이용한 건강기능식품 원료 시제품 제조</li> <li>◦ 채소류를 이용한 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료 작성</li> </ul>

## 제2절 서론

산화는 살아있는 모든 생물체가 에너지를 생산하는 과정에 아주 필수적인 부분이다. 그러나 산화과정을 통해 산소를 함유하는 활성화 산소와 같은 산화적 대사산물을 생성하여 세포를 파괴하거나 조직을 손상시킨다. 이러한 활성산소에 의한 산화적 손상은 노화, 동맥경화, 당뇨병, 암, 간경변 등의 질병을 발생시킨다<sup>(1)</sup>. 본래 사람은 활성산소를 소거하는 효소계를 가지고 있어서 활성산소를 방어하고 활성산소에 의한 산화적 손상을 막아준다. 그러나 노화나 다른 요인에 의해 자기방어 기전이 부족하게 되면 항산화 활성을 가진 식품이나 항산화 성분을 함유하는 supplement를 섭취함으로써 산화적 손상을 줄여줄 수 있다.<sup>(2)</sup> 그 이유는 식물체에는 자외선 산화나 자동산화로부터 보호하기 위해 자체적으로 항산화물질을 세포내에 함유하기 때문이다. 특히 과일이나 채소에는 비타민 C, E,  $\beta$ -carotene, polyphenolics 같은 항산화 성분을 많이 함유하고 있다<sup>(3)</sup>. 또한 flavonoids는 polyphenolics 계통의 항산화물질이며 다양한 구조로 식물체에 존재한다. 특히 식물체는 quercetin glycosides가 가장 많이 존재하며 kaemferol, luteolin, apigenin 또한 존재한다<sup>(4)</sup>.

최근에는 *Allium* 속에 속하는 식물들은 항산화효과를 가지고 있다고 수많은 연구를 통해 알려졌다<sup>(6)</sup>. 특히 마늘과 마늘 추출물은 다양한 *in vitro* 실험을 통해서 항산화 활성을 갖는 것으로 나타났다. 마늘 추출물에는 여러 성분들을 함유하고 있지만 주요한 생리활성 물질은 sulfur를 함유하는 allicin 성분인 것으로 알려져 있다<sup>(7,8)</sup>. 그리고 마늘 추출물의 항산화효과는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, scavenging ROS 같은 세포의 항산화 효소를 증가시키므로써 항산화작용에 관여한다. 그래서 이런 항산화 효소에 의해 ROS를 제거하고 ROS에 의해 발생할 수 있는 질병을 예방하거나 치료하는 역할을 하는 것으로 알려졌다<sup>(5)</sup>. 또한 김 등<sup>(9)</sup>은 마늘에는 allicin, diallyl disulfide, diallyl trisulfide 같은 항산화물질이 존재한다고 보고하였다. 이중 마늘의 allicin(diallyl thiosulfinate)은 동물실험을 통해서 높은 농도뿐만 아니라 아주 낮은 농도에서도 항산화력을 나타낸다고 보고하였다. Allicin은 alliin에 의해 형성되는데 이것은 식물조직에 함유되어 있다가 세포가 파괴되면 alliin은 alliinase에 의해서 allicin, pyruvate, ammonium으로 형성된다<sup>(10)</sup>.

생강(*Zingiber officinale*)은 *Zingiberaceae* 속에 속하는 식물로써 근경을 이용한다. 생강의 약리적인 효과를 나타내는 주된 성분은 gingerol과 shogaol이다<sup>(6,7)</sup>. 생강에는 허브에서 추출되어진 gingerols, gingerones, shogaols 등 같은 생리활성 물질이 다량 함유하고 있다고 보고되어왔다<sup>(8-12)</sup>. 생강은 류마티스 관절염 증세를 완화시킨다고 보고되어왔다<sup>(13)</sup>. 특히 생강의 gingerol 성분은 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase 효소의 저해로 인한 leukotriene과 prostaglandin의 생합성 과정을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다고 보고되었다<sup>(14,15)</sup>. 6-gingerol, 6-shogaol은 해열제, 진통제, 진해제, 혈압 강하제 등과 같은 다양한 약리적인 효과를 갖는다<sup>(7)</sup>.

따라서 본 연구에서는 마늘과 생강 등 채소류를 선별하여 한국산과 중국산을 각각 선택한 후 항산화 능력과 같은 생리활성 성분을 검색하여 기능성 식품 소재 여부를 평가 하였다. 그리고 이를 바탕으로 추출공정별 채소류 추출물의 특성 비교 및 채소류의 최적 추출조건을 설정하였으며, 채소류의 기능성과 안전성에 대한 자료 분석과 건강기능식품 인정을 위한 식약청 제출 자료를 작성하였다.

### 제3절 재료 및 방법

#### 1. 실험 재료

본 실험에 사용된 마늘(*Allium sativum*), 양파(*Allium cepa*)는 2004년 7월에 수확된 마늘 한국산과 중국산, 양파 2품종 (white onion, red onion) 을 가락시장에서 구매하여 실험에 사용하였다. 생강(*Zingiber officinale R.*)은 한국(충남 서산)산과 중국산을 가락시장에서 구매하여 사용하였다. 시료는 실험 당일 깨끗이 수세한 후 0.5 mm의 크기로 세절하였으며, 추출 용매로는 water, 50% ethanol, 100% ethanol을 사용하였다. 첨가한 용매는 건물 중량의 10배에 해당하는 부피(w/v)를 사용하였다. 시료의 추출은 Fig. 2-1과 같은 방법으로 실시하였다.



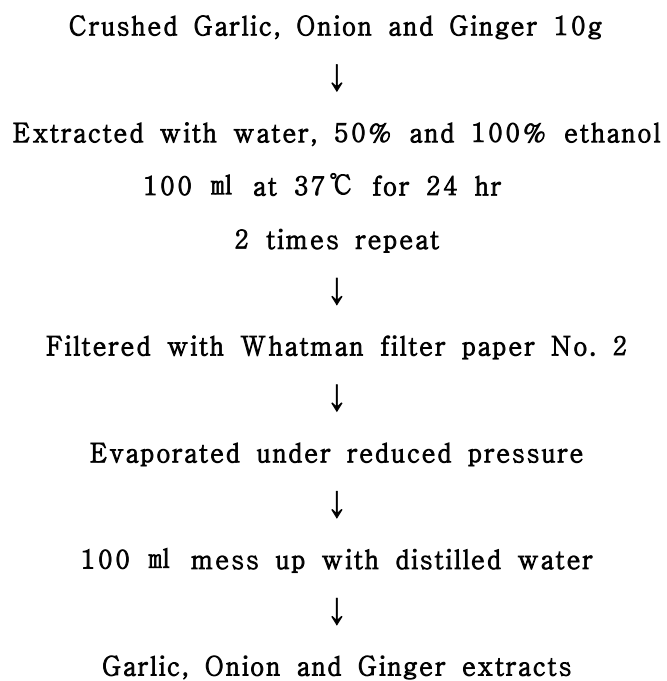


Fig. 2-1. Procedure to prepared garlic, onion and ginger extract for measuring physiological activities.

## 2. 실험 방법

가. 채소류의 생리활성 성분의 검색 및 유효성분 대량 추출기술 개발

1) 생리활성 측정에 따른 추출효과 분석

가) 전자공여작용의 측정

추출물의 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)은 강 등의 방법<sup>(21)</sup>을 변형하여 각각의 추출물에 대한 DPPH( $\alpha, \alpha$ -diphenyl-picrylhydrazyl)의 전자공여효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 추출물 1mL에  $4 \times 10^{-4}$ M DPPH용액(99.9% EtOH에 용해) 1mL을 가하여 총액의 부피가 2mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 30분 방치한 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여효과는 추출물의 첨가 전·후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

나) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법<sup>(22)</sup>에 따라 실시하였다. 즉, 각 추출물을 감압 농축한 후 tris-HCl buffer(50mM tris[hydroxymethyl] amino - methane + 10mM EDTA, pH 8.5)를 이용하여 pH 8.5로 조절된 시료액을 만들었다.

각 시료 0.2mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50mMtris [hydroxymethyl] amino-methane + 10mM EDTA) 3mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$SOD\text{유사활성}(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

#### 다) Tyrosinase 저해 효과 측정

Tyrosinase 저해 효과 측정은 Wong등의 방법<sup>(23)</sup>에 따라 측정하였으며 tyrosinase 조효소액은 mushroom tyrosinase(Sigma, T7755, 110units/mL)을 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 사용하였다. 효소활성의 측정은 10mM catechol 용액 2.8mL에 tyrosinase 조효소액 0.2mL, 추출액 0.1mL를 가하고 분광 광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 420nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. Tyrosinase에 대한 효소활성 저해 효과는 단위 시간당 변화된 초기 흡광도의 변화 값을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$Inhibitory\ effect(\%) = \{1 - (\frac{A-B}{C})\} \times 100$$

- A : 효소액 첨가구의 흡광도 변화값
- B : 효소액 대신 buffer 첨가구의 흡광도 변화값
- C : 추출물 대신 증류수 첨가구의 흡광도 변화값

라) 총 폴리페놀의 함량 측정

총 폴리페놀의 함량(total polyphenol content)은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis방법<sup>(24)</sup>으로 측정하였으며, 각각의 추출조건에 따라 제조된 추출물의 1/2 희석액을 사용하였다. 즉, 희석액 5mL에 Folin reagent 5mL을 가하고 3분간 정치한 다음 5mL의 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정치한 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 760nm에서 흡광도를 측정하고 (+)catechin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 mg%로 구하였다.

마) 총 thiosulfinate 함량의 측정

총 thiosulfinate 함량은 한등의 방법<sup>(25)</sup>에 의하여 측정하였다. 즉 2 mM cysteine 이 함유된 50mM HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethan sulfonic acid], pH 7.5) 용액 0.5mL를 첨가하고, 여기에 50mM HEPES 용액 4.4mL를 넣어 총 반응 용액의 부피를 5mL로 하였다. 이 반응 용액을 27°C에서 10분간 반응시킨 후, 1mL취하여 50mM HEPES buffer로 조제한 0.4mM DTNB [5,5'-dithio-bis(2-nitro benzoic acid)] 1mL를 가하여 잘 혼합한 다음 27°C에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계로 412nm에서 흡광도를 측정하고 standard curve를 이용하여 계산하였다. Standars curve는 50mM HEPES buffer(pH 7.5)로 조제한 0.05~

0.3mM의 cysteine용액 1mL에 0.4mM DTNB용액 1mL을 첨가하여 10분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 412nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다.

바) ACE 저해효과 측정

양배추 추출물의 ACE(angiotensin I-converting enzyme) 저해작용은 Crushman과 Cheung의 방법<sup>(20)</sup>을 변형하여 측정하였다. 추출물 50  $\mu$ L에 450 mM NaCl을 함유하는 100 mM sodium borate buffer(pH 8.3) 100  $\mu$ L를 가하고 5 mM hippuryl-histidyl-leucine(300 mM NaCl을 함유하는 100 mM sodium borate buffer(pH 8.3)에 용해) 50  $\mu$ L를 가한 후 37°C에서 10분간 전배양하였다. 이 반응액에 ACE 조효소액 50  $\mu$ L를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1.75 N HCl 100  $\mu$ L를 가하여 반응을 종료시켰다. 여기에 ethyl acetate 1 mL를 가하여 진탕 후 상등액 0.5 mL를 취하여 100°C에서 1시간가량 건조시켜 증류수 1 mL를 가하여 용해시킨 다음 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 이용하여 228 nm에서 흡광도를 측정한 후 아래와 같이 계산하였다. 이 때 공시험은 추출물 대신 증류수 50  $\mu$ L를 가하였고 대조구는 1.75 N HCl 100  $\mu$ L를 가한 후 ACE 조효소액 50  $\mu$ L를 첨가하여 반응시켰다. ACE 저해효과는 추출물의 첨가 전·후의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$ACE \text{ 저해율}(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

#### 사) 아질산염 소거작용의 측정

아질산염 소거효과(nitrite-scavenging effect)는 Gray 등의 방법<sup>(26)</sup>으로 측정하였다. 즉, 1mM 아질산나트륨 용액 1mL에 각각의 추출물을 2mL을 가하고 여기에 0.1N 염산(pH 1.2) 및 0.2 N 구연산 완충용액(pH 3.0, 4.2 및 pH 6.0)을 7mL 가하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 달리하여 반응 용액의 부피를 10mL로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응액을 1mL씩 취하고 여기에 2% 초산 5mL, Griess 시약(acetic acid에 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합 것으로 사용 직전에 제조) 0.4mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 분광 광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 그리고 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 추출액 첨가전후의 아질산염 백분율(%)로 표기하였다.

$$N(\%) = \left(1 - \frac{(A-C)}{B}\right) \times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B : 1mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

C : 시료 추출물 자체의 흡광도

#### 아) 통계처리

통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하여 각각의 시료에 대해 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 분산분석(ANOVA, analysis of variance)과 Duncan의 다중검증법(DMRT, Duncan's multiple range test)<sup>(27)</sup>으로 유의성을 검증하였다.

## 2) 채소류의 기능성과 안정성에 대한 자료 수집

마늘, 양파 및 생강에 대한 기존 자료를 수집하여 이를 채소류에 대한 일반 현황 및 기능성을 정리하였다.

### 가) 마늘

#### (1) 머리말

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과의 allium속에 속하는 식물로 그 원산지가 중앙 아시아 등지로 전해지며 우리의 건국 신화에도 마늘이 등장하였듯이 식품 및 의약품에 널리 애용되었고, 최근에는 전 세계적으로 sauce, 육가공 및 향신료와 약용으로 그 수요가 점차 증가되고 있다. 한편 고대 인도에서는 마늘이 피부염, 류머티즘, 복통, 식욕감퇴, 체중감소 등의 치료를 위하여 사용되었고, Hipocrates도 의약품으로서 마늘의 중요성을 인정하여 이뇨제, 동경제로서 또한 화농성 상처의 치료목적으로 사용하였다.

이와 같이 마늘이 식용 및 의약품으로 애용되게 된 것은 마늘의 함황 아미노산의 일종인 allin이 분해되면서 특유의 신미성분을 생성시키기 때문이며, 마늘의 유효성분은 마늘의 증류액에서 유상의 향균성 물질이 분리하여 allicin이라 하였고, 그 구조를 밝혀 diallyl thiosulfinate임을 확인하였다. 마늘의 methanol 추출액에서 결정상의 아미노산인 (+)-S-allyl-L-cysteine sulfoxide를 분리하여 allin이라 명칭하였으며, 이는 마늘 중에 존재하는 allinase의 작용으로 분리되어 allcin과 pyruvic acid 및 암모니아를 생성시킨다고 보고되고 있다. 마늘의 생리활성은 식물체내에서는 불활성인 전구체로부터 세포가 파괴되면서 효소적으로 생산된 allicin 때문이며 이 allicin은 항균작용, 항진균작용, 항암작용, 저혈당작용, 혈압강하작용, 동맥경화예방 등 각종 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있다.

마늘은 절임용과 건조가공용으로 일부가 소비되고 있고 90% 이상이 생체 조미료 부식용으로 사용되고 있어 대부분 저온저장 하다가 시장에 출하되어 소비되고 있다. 그러나 저장성이 약하여 저장 중 품질열화와 물량손실이 심하게 발생하므로 연중가

격의 진폭이 심하여 정부에서는 이를 비축물자로 지정하여 안정공급과 가격안정을 기하고 있는 바 이에 따른 대량 저장이 불가피한 실정이다. 저장의 한계시점이나 수확당시 적절한 수요가 없는 경우 일반적인 장기 비축의 목적으로 건조에 의한 저장이 현재로서는 기술과 소비면에서 큰 문제없이 가장 보편적으로 이용 될 수 있다.

최근 가정 주부의 사회 참여 증가와 생활이 복잡해짐에 따라서 인스턴트 식품의 소비는 증가하고 있다. 즉, 라면 스프와 중합 양념 등에 마늘 건조제품 소비는 연간 약 20~30%가 증가하고 있으며 특히 남북이 대치되어 있는 우리나라의 상황에서 군사적인 기동성을 고려하여 볼 때 건조식품의 중요성은 아무리 강조해도 지나치지 않다고 생각한다. 또한 농산물 수확 후 생체 그대로가 아닌 가공수출이란 면에서도 그 효과가 큰 것으로 사료된다.

## (2) 총설

### (가) 이름

- 학명 : *Allium sativum* L.
- 영명 : Garlic bulbs
- 한명 : 大蒜
- 일명 : にんにく

### (나) 일반성분

마늘의 수분함량이 60% 내외로서 100g 중 성분조성은 Table 2와 같다.



Table 2. 마늘의 성분조성(100g당)

성분	성분량		성분	성분량	
	생마늘	열풍건조		생마늘	열풍건조
에너지kcal	120	331	철 mg	1.0	6.5
수분 %	64	6	나트륨 mg	5	7
단백질 g	9.2	16.3	칼슘 mg	652	1937
지질 g	0.2	0.7	비타민A $\mu$ g	1	0
당질 g	24.2	72.8	베타카로틴 $\mu$ l	3	0
섬유소 g	0.8	0.5	비타민 B1 mg	0.20	0.52
회분 g	1.6	3.7	비타민 B2 mg	0.10	0.63
칼슘 g	14	18	나이아신 mg	0.5	0.9
인 g	199	182	비타민 C mg	9	39

자료: 농촌진흥청 농촌생활연구소 식품성분표(제 5개정판), 1996

(다) 생산동향

마늘의 연도별 생산동향을 보면 Table 3과 같다.

Table 3. 연도별 마늘 생산동향

연도별	재배면적(ha) Cultivated area	10a당 수량(kg) Yield per 10a	생산량(ton) Production
1997	36,292	1,085	393,834
1998	37,337	1,055	393,903
1999	42,416	1,141	483,778
2000	44,941	1,056	474,388
2001	37,118	1,095	406,385
2002	33,153	1,190	394,482

자료: 국립농산물품질관리원

(3) 마늘의 기능성

Allicin (diallyl thiosulfinate), methyl allyl, 1-propenyl allyl, allyl 1-propenyl, 1-propenyl methyl, dimethyl thiosulfinate 등의 thiosulfinate 화합물이 가장 큰 역할을 하며 이들은 항혈전작용, 항산화작용, 항암작용, 혈압강화작용, 콜레스테롤 저하 및 노화방지 작용 등이 있다. Thiosulfinate 화합물의 주요 성분인 alliin ( $C_3H_5-S-S(O)-C_3H_5$ ) 은 마늘이 갖는 항균작용, 세포대사 억제 등의 많은 중요한 생화학적 활성을 갖는 가장 잘 알려진 황화합물로서 총 thiosulfinate 중 60~80%를 차지한다. Allicin은 매우 불안정한 화합물로서, 마늘에는 직접 존재하지 않으나 마늘을 절단하거나 으갠때 alliinase라는 효소에 의해 전구체인 alliin (S-allyl-L-cysteine sulfoxide) 으로부터 만들어지고 다른 저급 sulfides 화합물들인 diallyl mono-, di-, 그리고 oligosulfides, vinylthiols, ajoenes 등 30여종으로 분해되고 이중 diallyl disulfide 와 diallyl sulfide 함량이 75%이상이라고 하였다.

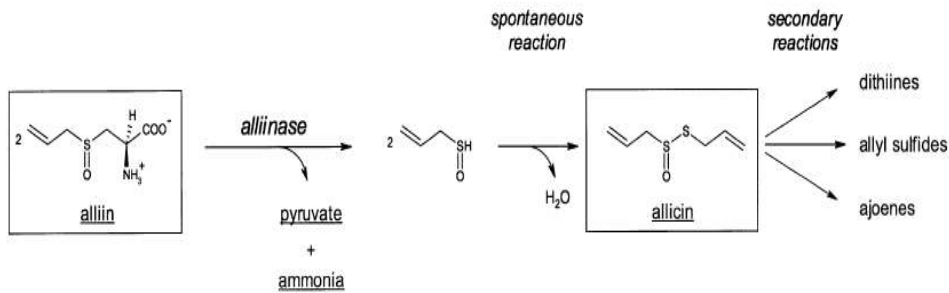


Fig. 2. Enzymatic reaction of alliinase from garlic

## (가) Garlic and cardiovascular disease

마늘의 섭취는 고지혈증 연구에서 혈장 콜레스테롤, TG와 LDL-콜레스테롤을 낮춰주는 효과를 보인다(Steiner et al., 1996). 마늘의 가장 중요한 생화학 특성 중 하나는 항산화 기능이다. 항산화 작용과 구성은 ROS를 소거하는 능력, 과산화지질 형성과 LDL 산화를 저해, 내분비성 항산화 체계에 의해서 확인되어진다. 마늘은 특히 reductase와 SOD (superoxide dismutase) 등의 활성으로 GSH redox cycle을 조절하여 혈중 GSH 함량을 증가시킨다. 이것은 SOD나 glutathione peroxidase(GSH-Px)에 의해서 개선되는 oxidative stress를 감소시킨다(Pedraza-Chaverri et al., 2000).

### ① 협심증

심장 관상동맥이 좁아져 피의 흐름이 정지됨에 따라 심근에 산소가 결핍되어 발작하는데 가슴을 쥐어짜는 듯한 통증이 5분가량 지속되다가 완화되곤 한다. 통증이 심해지면서 점차 심근경색으로 발전된다.

### ② 심근경색

관상동맥이 폐쇄되어 피의 흐름이 막혀 심근이 괴사되면서 통증이 격심하고 사망에 이르게 된다. 관상동맥 혈관 안에 엉겨 붙은 악성 콜레스테롤과 중성지방 때문이다. 1987년 미국 캘리포니아 로미런다 대학 벤 자민 나우 박사팀은 마늘 농축액을 1일 1g씩 6개월 정도 섭취한 결과 악성 콜레스테롤과 중성지방이 60%정도 감소되는 실험결과를 발표했다. 영국 옥스포드대학 연구에 의하면, 마늘 섭취 후 수 시간 내에 혈액의 섬유소 용해작용(피가 엉기고 굳어지게 하는 혈전을 막아주는 작용)이 일어나는 것으로 판명되었으며 이 효과는 마늘 섭취량에 비례하여 증가하며 2~4주 지속된다고 한다. 심근경색, 뇌경색등 대부분의 심장질환은 혈소판이 뭉치면서 혈관을 막기 때문에 생기며 기름진 음식을 먹고 나면, 다음날 아침에 혈류가 떨어지고 혈액이 끈적끈적해지는 혈소판 응집이 발생하는데 마늘의 대사과정에서 발생하는 ajoene은

이러한 혈소판 응집현상을 막아준다. (마늘은 현재 심장병치료 및 예방 목적으로 사용되는 아스피린과 동일한 작용을 한다.) 마늘은 혈류개선 효과도 있는데 마늘섭취 후 혈액의 비중과 혈액속의 적혈구 등 혈구 성분 비율을 조사한 결과 이것들이 모두 감소해 섭취 5시간 후 손톱에서 측정된 말초 혈류가 55% 증가하는 것으로 밝혀졌다. 국내에서도 마늘을 많이 소비하는 지역 사람들의 협심증, 심근경색 등 심장병 발생이 적다는 연구사례는 흔한데, 경북의성, 경남창영, 남해, 전남 고흥 등지는 인구 100명당 75세 이상 노인이 6.76명으로, 대도시의 1.76명보다 훨씬 높다(원광대 사회과학대 연구).

### ③혈전증

혈소판의 응집을 억제하는 피라진은 마늘 속에 많이 들어 있으며(마늘, 양파, 토마토 같은 향이 강한 채소에 많음) 혈전예방작용을 하는 EPA는 등푸른 생선(고등어, 정어리, 꽂치 등)에 다량 함유되어 있다.

#### (나) Garlic and cancer

유행성 질병의 연구에서 마늘의 섭취가 한국의 성인 사망원인 1위인 질병, 암을 줄인다는 연구결과를 보여준다(Bianchini and Vainio, 2001). 마늘은 인체 세포를 활성화시키므로 암 예방에 도움이 된다. 암은 세포의 병이므로 노화된 세포는 종양이 될 개연성이 농후하며 만약 악성종양이면 암으로 발전하게 된다. 종양이 된 세포는 독자세포 분열을 하기 때문에 증식을 지속하면서 정상세포를 파괴해 나간다. 마늘에는 항암작용을 가진 diallyl disulfide(oil-solution organosulfur compound), 유기성 게르마늄과 셀레늄이 풍부하다. 마늘은 또한 대장암, 폐암, 피부암 세포의 증식을 억제하고 세포내 칼슘농도의 증가로 인해 암세포에 독성효과를 주어 암세포의 자연사를 유도한다(Sundaram and Milner, 1996a, Sundaram and Milner, 1996b). 초기 암의 경우 자연치유도 가능할 수 있기에 이때부터 마늘을 꾸준히 상식하면 많은 도움이 될 것이다. 마늘을 상식 하는 한국에서 암환자가 서양보다 적다는 것은 이러한 마늘의

항암작용을 입증하는 것이다.

(다) Garlic and diabetes mellitus

당뇨병은 (1)유전적 요소 (2)미식습관 (3)췌장에서 분비되는 호르몬인 인슐린 부족으로 발병된다. 인슐린은 혈중 포도당을 근육이나 지방조직으로 흡수, 혈중 포도당 농도를 낮추는 작용을 하는데 이러한 인슐린이 부족하면 혈중 당분이 점증하여 당뇨병이 된다. 당뇨병 환자는 비만, 갈증으로 물을 많이 마셔서 소변량과 횟수가 증가하며 단 것을 선호하는데 피로해지고 시력 저하, 성욕 저하, 생리 이상, 가려움증, 화농 증상이 나타난다. 마늘에는 에너지 대사를 촉진하는 마늘 비타민 B<sub>1</sub>(thiamin)과 주성분인 마늘 allicin이 상호 결합, allithiamin으로 전환되어 비타민 B<sub>1</sub>보다 강력한 당질 대사를 촉진한다. 또한 마늘 allicin은 체내의 비타민 B<sub>6</sub> 와 결합, 췌장의 세포를 활성화시킨다.

(라) Garlic and other anti-aging properties

마늘은 인체의 면역력과 저항력을 향상시키는 식품이다. 그리고 모든 질병은 인체의 면역력과 저항력의 균형이 깨질 때 생기는 것이다. 마늘의 가장 중요한 기능은 체력 증진을 통해 노화를 지연시키고 현대인의 3대 질병인 심혈관 질환, 뇌혈관 질환, 암과 당뇨병 등의 억제 작용을 하며 이들 질환 인자를 가진 사람의 체질을 개선할 수 있다는 점이다. 노화는 인체의 신진대사 기능이 저하되고 건강하고 신선한 세포가 감소하면서 노쇠한 세포가 증가하는 현상인데 마늘은 인체의 기본 구성단위인 세포를 활성화하는 작용을 함으로써 스테미나 증진과 강장작용을 유발시킨다. 면역기능의 저하와 관련된 노화는 류머티즘, 악성, 그리고 전염성 질환의 높은 유병율을 가진다. 그것은 체내 흡수율이 떨어져 영양 결핍에 의해 감염율이 증가하는 것이다 (Castle, 2000). 또한 lipid peroxide, free radical의 생성을 차단하여 노화억제 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

## 나) 양파

### (1) 머리말

양파(*Allium cepa* L.)는 식품의 향신 조미료 외에 이집트, 인도, 로마, 중국 등에서 약재로 애용되어 왔다. 서아시아 또는 지중해 연안이 원산지라고 추측하고 있으나 아직 야생종이 발견되지 않아 확실하지 않다. 재배 역사는 매우 오래되어 기원전 3,000년 경의 고대 이집트 분묘의 벽화에는 피라미드를 쌓는 노동자에게 마늘과 양파를 먹였다는 기록이 있고, 그리스에서는 기원전 7~8세기부터 재배하였다고 한다. 품종은 비늘 줄기가 둥근 모양과 납작하게 둥근 모양, 비늘 줄기의 껍질이 붉은빛인 것과 노란 것, 그리고 흰 것 등으로 나뉜다. 또한 맛에 따라 단 양파와 매운 양파로 나뉜다. 한국에서 재배하는 품종으로는 찰황황·천주황·원예1호·원예2호·애지백·패총조생 등이 있다. 수확은 주로 6~7월에 잎이 쓰러지고 약간 녹색을 지닐 때 하는데, 비늘줄기가 크기 전에 뽑아서 잎을 식용하는 것도 있다. 양파는 주로 비늘 줄기를 식용으로 하는데, 비늘 줄기에서 나는 독특한 냄새는 이황화프로필·황화알릴 등의 화합물 때문이다. 이것은 생리적으로 소화액 분비를 촉진하고 흥분·발한·이뇨 등의 효과가 있다.

양파는 단맛과 매운맛이 조화를 이루고 있는 좋은 음식이다. 양파는 마늘과는 달리 열을 가하면 냄새가 없어져서 서양 요리에서도 없어서는 안 될 중요한 식품이다. 성질이 따뜻하고 맛이 달고 매워서 기운의 순환을 촉진하고 혈액 순환을 원활하게 한다. 해열 구충, 해독, 장염, 종양치료에 사용해 왔다(Block, 1986). 또한 양파는 심혈관계 질환예방 효과와 혈전증 치료 효과, 혈당 저하 효과, 지질에 대한 항산화 효과 등이 보고되고 있다. 또한 양파는 각종 대사 장애 조절효과 등이 있으며 양파의 성분 중 allicin이 항균 작용 및 항진균 작용도 있는 것으로 밝혀져 중요한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(Jurdi-H. et al, 1987). 또한 국내산 양파의 품질이 외국산에 비해 아주 우수한 것으로 평가되며(Park et al, 2000), Park 등 (1997)의 보고에 따르면 양파 내에 함유된 당 성분인 포도당, 설탕, 맥아당 등과 칼슘, 철분 등의

무기원소 등이 풍부하고 각종 비타민이 함유되어 있다고 하였다.

현재의 양파 재배는 콤롭보스에 의해 양파가 미국으로 전해졌으며 미국은 매우 양파에 대한 품종개량과 재배기술 개발로 인한 양파 재배산업이 발달하였다. 유럽에서도 양파 재배가 널리 이루어지는 반면 당도를 갖고 있는 양파가 주종을 이루었고 중동 유럽에서는 매우 양파 재배가 되었다. 일본에서도 양파에 대한 품종개량과 재배기술 개발로 인한 양파 판매 수익을 올리고 있다. 국내의 재배는 조선 말기에 미국과 일본으로부터 도입이 추측되며, 본격적인 재배는 해방 이후가 증가하기 시작하였고, 1970년대 하반기부터 급격히 증가 하였다.

## (2) 총설

### (가) 이름

- 학명 : *Allium cepa*.
- 영명 : Onion
- 한명 : 洋
- 일명 : タマネギ

### (나) 일반성분

양파 100g 중 성분조성은 Table 4와 같다.

Table 4. 양파의 성분조성(100g당)

성분	성분량		성분	성분량	
	국내산 양파	중국산 양파		국내산 양파	중국산 양파
에너지kcal	34	28	철 mg	0.4	0.3
수분%	90.1	91.8	나트륨 mg	2	2
단백질 g	1.0	0.9	칼슘 mg	144	59
지질 g	0.1	0.1	비타민A mg	0	0
당질 g	8.0	6.4	베타카로틴 µl	0	0
섬유소 g	0.4	0.6	비타민 B1 mg	0.04	0.06
회분 g	0.4	0.2	비타민 B2 mg	0.01	0.02
칼슘 g	16	10	나이아신 mg	0.1	0.1
인 g	30	25	비타민 C mg	8	17

자료: 농촌진흥청 농촌생활연구소 식품성분표(제 5개정판), 1996

(다) 생산동향

마늘의 연도별 생산동향을 보면 Table 5와 같다.

Table 5. 연도별 양파 생산동향

연도별	재배면적(ha) Cultivated area	10a당 수량(kg) Yield per 10a	생산량(ton) Production
1997	12,539	5,903	740,187
1998	14,806	5,890	872,143
1999	16,131	5,801	935,828
2000	16,773	5,232	877,514
2001	16,995	5,653	1,073,708
2002	15,314	6,093	933,095

자료: 국립농산물품질관리원



### (3) 양파의 기능성

양파는 백합과에 속하는 다년생 식물로 동서를 막론하고 야채와 향신 조미료로서 널리 상용되고 있으며, 항산화 작용을 나타내는 quercetin, quercitrin, rutin 등 flavonoid계 색소와 체내 지방수준 저하에 효과적인 allyl propyl disulfide 및 diallyl disulfide 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 양파에 대한 연구로는 중금속 해독능, 항균효과, 혈당 저하효과, 심혈관계 질환 예방효과, xanthine oxidase 저해 작용, 항산화작용, 항암효과에 대한 연구가 보고되어 있다. 마늘의 경우에는 냄새는 alliin이라는 성분이 alliinase 라는 효소에 의해 allicin이 되면서 발생한다고 알려져 있지만 양파의 경우에는 이 alliin 대신 구성은 같고 구조만 다른 물질인 trans - (+) - S -(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide가 allinase에 의해 1-propionylsulfenic acid를 생성한 후 최루성이 강한 propanethial S-oxide로 바뀌어 이와 같은 작용을 한다고 보고되고 있다. 이 같은 양파의 최루 성분은 최소 50개 이상의 다른 화학구조를 가지는 것으로 확인되었고, 일반적으로 dihydrogen sulfide, mercaptan, alcohol류, disulfide류(thiol methyl disulfide, allyl disulfide), trisulfide류, aldehyde류 등이 양파의 주요 향기성분으로 알려져 있다.

#### (가) Onion and cardiovascular disease

동맥경화와 고지혈증을 예방하고 혈관을 막는 혈전 형성을 방지함과 동시에 혈전을 분해해서 없애버린다. 그 결과 혈전이 심하면 사망에 이르는 순환기장애(협심증, 심근경색, 뇌연화증, 뇌졸중 등)의 질병을 예방, 치료한다. 가장 중요한 생화학 특성 중 하나는 항산화 기능이다. 항산화 작용과 구성은 ROS를 소거하는 능력, 과산화 지질 형성과 LDL 산화를 저해, 내분비성 항산화 체계에 의해서 확인되어진다. 특히 reductase와 SOD (superoxide dismutase) 등의 활성으로 GSH redox cycle을 조절하여 혈 중 GSH 함량을 증가시킨다. 이것은 SOD나 glutathione peroxidase(GSH-Px)에 의해서 개선되는 oxidative stress를 감소시킨다(Pedraza-Chaverri et al., 2000).

### ① 협심증

심장 관상동맥이 좁아져 피의 흐름이 정지됨에 따라 심근에 산소가 결핍되어 발작하는데 가슴을 쥐어짜는 듯한 통증이 5분가량 지속되다가 완화되곤 한다. 통증이 심해지면서 점차 심근경색으로 발전된다.

### ② 심근경색

관상동맥이 폐쇄되어 피의 흐름이 막혀 심근이 괴사되면서 통증이 격심하고 사망에 이르게 된다. 관상동맥 혈관 안에 엉겨 붙은 악성 콜레스테롤과 중성지방 때문이다.

### ③ 혈전증

혈소판의 응집을 억제하는 피라진은 양파 속에 많이 들어 있으며(마늘, 양파, 토마토 같은 향이 강한 채소에 많음) 혈전예방 작용을 하는 EPA는 등푸른 생선(고등어, 정어리, 꽂치 등)에 다량 함유되어 있다.

#### (나) Onion and cancer

유행성 질병의 연구에서 양파의 섭취가 한국의 성인 사망원인 1위인 질병, 암을 줄인다는 연구결과를 보여준다(Bianchini and Vainio, 2001). 양파는 인체 세포를 활성화시키므로 암 예방에 도움이 된다. 암은 세포의 병이므로 노화된 세포는 종양이 될 개연성이 농후하며 만약 악성 종양이면 암으로 발전하게 된다. 종양이 된 세포는 독자세포 분열을 하기 때문에 증식을 지속하면서 정상세포를 파괴해 나간다. 양파에는 항암작용을 가진 diallyl disulfide(oil-solution organosulfur compound), 유기성 게르마늄과 셀레늄이 풍부하다.

(다) Onion and diabetes mellitus

양파에는 에너지 대사를 촉진하는 마늘 비타민 B<sub>1</sub>(thiamin)과 주성분이 상호 결합하여 비타민 B<sub>1</sub>보다 강력한 당질대사를 촉진한다. 또한 췌장의 세포를 활성화시킨다.

(라) Onion and other anti-aging properties

노화는 인체의 신진대사 기능이 저하되고 건강하고 신선한 세포가 감소하면서 노쇠한 세포가 증가하는 현상인데 양파는 인체의 기본 구성 단위인 세포를 활성화하는 작용을 함으로써 스테미나 증진과 강장작용을 유발시킨다. 면역 기능의 저하와 관련된 노화는 류머티즘, 악성, 그리고 전염성 질환의 높은 유병율을 가진다. 그것은 체내 흡수율이 떨어져 영양 결핍에 의해 감염률이 증가하는 것이다(Castle, 2000). 또한 lipid peroxide, free radical의 생성을 차단하여 노화억제 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

다) 생강

(1) 머리말

생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 주로 열대 및 아열대 지역에서 재배되는 생강과에 속하는 다년생 식물의 뿌리이며, 국내 양념 채소류 중 수익성이 높은 고소득 작물이다. 근경(根莖)을 주로 식용하며, 그 특유한 향기와 매운맛으로 인하여 오랫동안 향신료로서 사용되어 왔으며, 또한 약리작용으로 인해 기능성 식품으로의 활용 등 이용 범위가 넓어지고 있다. 생강의 풍미성분인 정유 성분(essential oil)과 매운맛 성분을 함유하는 oleoresin으로 분류되며 특히, 매운맛 성분인 gingerol, zingerone 및 shogaol 등이 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 최근 들어 생강의

oleoresin, gingerol, shogaol fraction이 NK cell 용해를 활성화 시켜 면역능력 증진효과가 연구보고 되었다. 생강의 약리 효능에 관한 연구로는 생강 추출물의 DNA 손상 억제작용, 종양억제 및 소염작용, 생강의 essential oil을 이용한 감기, 두통, 관절염 및 정신적 피로 등을 치료한다는 연구와 체내 지질저하 효과, 항산화제로서의 작용 및 항균작용 등이 보고되어 있다.

생강의 주요성분(Fig. 3)은 gingerol, shogaol, zingerone 등의 독특한 향과 매운맛을 지니고 있어 전 세계적으로 애용되고 있는 향신료 중의 하나이다. 일반적으로 생강은 생 생강, 건조 생강, oleoresin, ginger oil 등으로 가공 유통되어, 의약품, 음료, 각종 식품 첨가물 및 화장품 소재로 다양하게 이용되고 있다. Ginger oil이나 oleoresin은 의약품, ginger ale, ginger soda 등의 탄산음료, 각종 식품 첨가물, 소스류, ginger candy, 잼류, marmalade 등의 과자류 가공소재 또는 화장품 소재로써 널리 이용되고 있다. 생강 중의 여러 성분에서는 항산화력이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 gingerol은 생강의 주된 항산화 성분으로 그동안 많은 연구가 수행되어 왔다. 한편 shogaol과 zingerone은 신선한 생강 중에는 존재하지 않으며 생강의 조제, 가공, 저장 중에 탈수와 retro-aldol 반응에 의하여 생기는 gingerol의 유도체로 gingerol보다 자극성이 떨어지므로 이 두 반응은 바람직하지 않으며 oleoresin 중에 이들의 함량이 증가될수록 품질이 저하된 것으로 간주된다. 이 반응을 자세히 살펴보면 먼저 gingerol은 retro-aldol 반응에 의해 zingerone과 aliphatic aldehyde로 되는데 이들은 oleoresin의 off-flavor 생성의 원인이 되며 대략 200℃ 이상에서 가열시 일어난다고 한다. 또한 gingerol은 탈수에 의해 shoganol이 되는데 이것은 pH와 온도에 영향을 받아 pH가 산성일수록 그리고 온도가 증가할수록 촉진되며 알칼리 조건에서는 실온에서도 급속히 일어나며 온도에 대한 영향은 대략 100~180℃ 범위에서 일어난다고 한다. 그러므로 pH가 산성일수록, 그리고 온도가 증가할수록 gingerol은 shogaol 및 zingerone으로 급속히 전환되므로 자극성이 감소뿐만 아니라 항산화력에도 변화가 있을 것으로 기대된다.

국내산 생강의 경우 oleoresin 추출 수율이 외국산에 비하여 매우 낮을 뿐만 아니라 원료비 측면에서도 대외 경쟁력이 낮은 관계로 국내에서 이용되는 oleoresin은 대부분이 수입에 의존하고 있는 실정이다. 생강에는 섬유질과 전분 함량이 다른 향신

료 보다 상당히 높기 때문에 착즙 수율이 낮을 뿐만 아니라 착즙 중 대부분의 전분이 착즙액으로 유입되어 여과와 농축공정을 저해하여 생강차와 소재성 가공원료로서의 활용을 제한하고 있다. 국내에서는 한국산 생강의 높은 원료비로 인하여 가공용 생강은 대부분 수입에 의존하고 있으며, 가공용 생강은 생 생강의 형태로 조리용 향신료에서만 이용되고 있다. 따라서 국내 생산된 생강의 수요처 및 소비량은 거의 한정된 수준이나 최근 생강의 재배 면적이 전국으로 확대되는 추세로서 생산량 증가에 따른 가격폭락 현상이 빈번히 발생하여 농가의 생산의욕 저하와 생산기피 현상을 유발하고 있다. 이에 따라 국내 생강 산지에서는 한국산 생강 산업의 보호와 유지발전을 위하여 새로운 소비 수요를 창출하고 활용도를 증대시킬 수 있는 새로운 소비 수요를 창출하고 활용도를 증대시킬 수 있는 새로운 가공 기술의 개발을 요구하고 있는 실정이다. 또한, 생강은 저장온도에 따라서 10℃이하에서는 생리적 장애를 입어 부패하게 되고 18℃이상에서는 발아하게 되므로 저장 관리가 어려워 가공 중에도 가식부분이 공기 중에 노출되었을 경우 쉽게 반응하여 착색, 향미, 영양가의 변화를 초래하므로 저장, 가공에 있어서 어려움을 안고 있다.

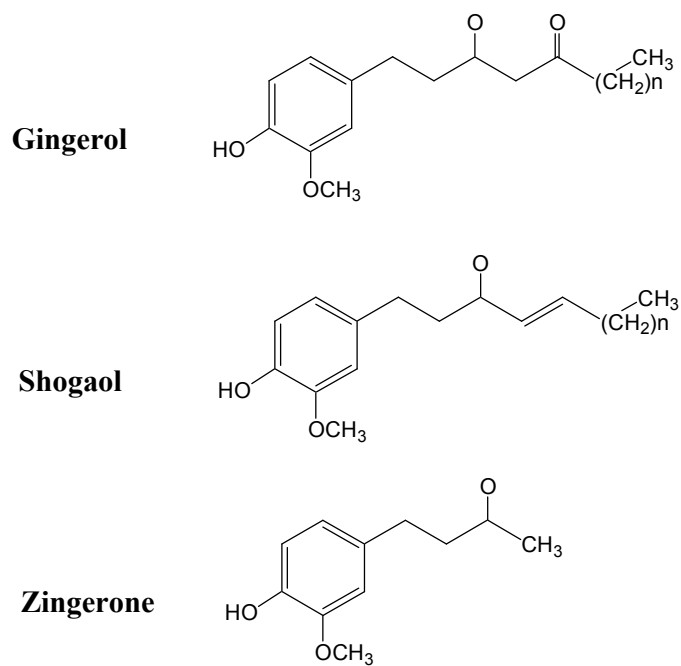


Fig. 3. 생강의 주요 활성성분의 구조

(2) 총설

(가) 이름

- 학명 : *Zingiber officinale* R.
- 영명 : ginger
- 한명 : 生薑
- 일명 : ツョウガ

(나) 일반성분

생강은 80% 이상이 수분으로 이루어져 있으며, 껍질을 포함하여 100g 중 성분조성은 Table 6 과 같다.

Table 6. 생강의 성분조성(100g당)

성분	성분량		성분	성분량	
	국내산 생강	중국산 생강		국내산 생강	중국산 생강
에너지kcal	53	33	철 mg	0.8	2.3
수분 %	83.3	89.0	나트륨 mg	5	11
단백질 g	1.5	1.3	칼슘 mg	344	294
지방 g	0.2	0.3	비타민A mg	0	2
당질 g	12.3	7.0	베타카로틴 µl	0	23
섬유소 g	1.6	1.4	비타민 B1 mg	0.03	0.09
회분 g	1.1	1.0	비타민 B2 mg	0.04	0.08
칼슘 g	13	8	나이아신 mg	1.0	0.6
인 g	28	38	비타민 C mg	5	4

자료: 농촌진흥청 농촌생활연구소 식품성분표(제 6개정판), 2001

생강은 전분이 전체의 40~60%를 차지하고 방향 신미성분, 수지 단백질, 섬유소, 펙토산, 무기질 등이 있으며, 생강의 매운 맛은 gingerone, gingerol, shogaol, dihydrogingerol, 방향성분은 citral, camphene 등의 40여종이 알려지고 있다. 생강은 별로 굵지 않고 색이 좋으며 신선하고 육질이 충실해서 섬유소가 발달하지 않아 씹는 맛이 좋은 것이 양호한 것이다. 생강은 조미료로 많이 쓰이며 생강 가공품으로는 생강 과자, 진저 에일, 진저 와인, 진저 브레드, 생강 가루, 생강 에센스 등이 있다.

(다) 생산동향

생강의 연도별 생산동향을 보면 Table 7과 같다.

Table 7. 연도별 생강 생산동향

연도별	재배면적(ha) Cultivated area	10a당 수량(kg) Yield per 10a	생산량(ton) Production
1997	3,625	902	32,708
1998	5,187	910	47,203
1999	4,255	934	39,745
2000	1,656	989	16,385
2001	1,926	1,067	20,550
2002	2,679	1,115	29,861
2003	1,710	1,122	19,188

자료: 국립농산물품질관리원

연간 생강 생산량은 2003년 약 2만 톤으로 충남 서산 지역과 전북 완주지역에서 대부분의 생산되고 있다. 우리나라에서 생강 재배가 일반화된 것은 완주 지역에서 점차 다른 지역으로 확대되면서이며, 서산지역에서는 1930년경부터 재배가 시작된 것으로 알려져 있다. 생강은 3~4년간 윤작 재배가 바람직하며, 연작은 2~3년 정도가 가능하며 그 이상 재배시 병충해 및 수확량이 급격히 감소하므로 재배면적이 감소 추세에 있으며 봉동에서 재배하던 농가들이 인근지역(익산, 김제, 정읍, 남원 등)으로 이동 재배하여 보관은 봉동 토굴을 이용하고 있다. 서산지역 재배 농가들도 연작 피해로 인해 인근지역(당진, 서천)으로 이동 재배하고 있다.

산지별로 생강의 특징을 보면, 완주군 봉동 생강은 단일 지역으로는 전국에서 가장 많은 양이 생산 및 출하되고 있으며, 특히 완주군 봉동읍 일대가 주산지화 되어 있는데 타 지역에 비해 재배 역사가 길고 생산이 전문화 되어 있으며 토질이 황토색



점질토로 생강 재배의 적지로 알려져 있다. 9월 중순부터 연중 출하되고 있는데, 완주군 봉동산 생강은 지역산 선호율이 매우 높고 밭(구군의 곁가지)이 굵고 밭 사이가 좁아 고유의 형태를 유지하고 있으며, 저장성이 높고 맛이 우수한 것이 특징이다. 또한 봉동 생강은 살이 연하고 통통하며 표피색은 회황색을 나타내며 육질이 좋고 매운 맛이 중간 정도로 김장 등 양념감으로 많이 이용되며 가공과 약용으로도 쓰이고 많이 출하되는 품종으로 황생강, 중생강, 토생강, 근강 등이 있다. 서산은 완주 지역과 함께 전국에서 가장 많은 양이 생산되며 외형적인 상품성은 완주산보다 떨어지지 않으나, 토질과 기후의 영향으로 고유의 매운맛과 향기가 다소 떨어지는 편이다. 서산 지역과 근접되어 있는 당진과 서천산은 품질과 맛, 향기, 거래 가격 등이 서산산과 동일하게 나타난다.

### (3) 생강의 기능성

#### (가) 식욕 증진 및 소화 작용

식욕을 돋워주고 소화를 돕는다. 생강은 구강과 위 점막을 자극하여 위산과 위액의 분비를 촉진하므로 식욕 증진 효과를 나타낸다. 동의보감에서 건강은 구풍, 소화제로서 심기를 통하고 양을 돋우며 오장육부의 냉을 제거하는데 쓴다고 기록되어 있는데, 생강에는 소화액의 분비를 자극하고 위장의 운동을 촉진하는 성분이 있어 식욕을 좋게 하고 소화 흡수를 돕는다. 생강에는 디아스타제와 단백질 분해효소가 들어 있어 생선회 등의 소화를 돕고 생강의 향미 성분은 소화기관에서의 소화 흡수를 돕는 효능도 있다. 따라서 생선회를 먹을 때 생강을 곁들여 먹는 것은 궁합에 잘 맞아 영양효과를 극대화 할 수 있다.

#### (나) 해열 및 두통해소 작용

췌고, 코가 막히고 두통이 나며 열이 있을 때 생강을 마시면 땀을 내고 가래를 삭히는 작용이 있다. 동의보감에는 생강이 담을 없애고 기를 내리며 구토를 그치게 하

고 풍한과 증기를 제거함과 동시에 천식을 다스린다고 하였다. 생강의 방향 신미성분은 혈액순환과 체온을 증가시키는 것으로 알려져 있어, 오래전부터 한방에서는 생강을 발한 해열약, 혈행장애(血行障害), 감기풍한(感氣風寒) 등에 이용하여 왔음을 알 수 있다. 민간요법에서는 감기와 기침에는 생강즙에 꿀을 넣고 데워서 복용하면 좋다고 알려져 있다.

#### (다) 항균 작용

생강은 식중독을 일으키는 균에 대해 살균, 항균 작용이 있다. 생강의 맵싸한 성분은 gingerol과 shogaol이 주성분이며, 향기 성분은 여러 가지 정유(精油) 성분인데 이 정유들이 매운 성분과 어울려 티푸스균이나 콜레라균 등 세균에 대한 살균력을 나타내는 것이다. 생강은 antibacterial과 antifungal 작용을 가지고 있다. *In vitro* 연구에서 생강의 주요 활성성분이 결장 박테리아의 증가를 억제함을 보여주었다. 또한, 박테리아는 탄수화물을 소화 작용을 억제하지만 생강은 소화를 용이하게 도와준다. 뿐만 아니라 *Escherichia Coli*, *Proteus sp*, *Staphylococci*, *Streptococci*와 *Salmonella*의 성장을 억제한다. 특히 gingerol과 shogaol은 여러 가지 병원성 균에 대해 강한 살균작용이 있다.

#### (라) 구토 완화 작용

속이 거북하거나 메스꺼움, 딸꾹질 등을 멈추는 작용이 있다. 생강의 주요성분인 gingerol과 shogaol은 중추신경계에 작용하는 대부분의 다른 항구토 약물과는 달리 국부 위장운동에 기인하여, 구토를 예방하고 치료하는 효과가 있다. 일반 멀미약보다 효과가 우수할 뿐만 아니라 졸음까지 없애는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 밝혀진 바에 의하면 멀미를 진정시키는데 흔히 사용하는 멀미약 드라마민(dramamin)보다 생강이 더 효과가 있는 것으로 증명됐다. 특히 생강은 뇌에 작용하지 않고 장에 작용하기 때문에 dramamin처럼 졸음을 가져오는 법이 없다. 식물약리학의 구문 의사인 앨버트 풍 박사에 따르면 동양에서는 수세기 전부터 생강이 멀미

에 효과가 있음을 알고 있었다고 밝히고 있다. 홍콩에서는 배를 타는 사람들이 절인 생강을 먹고 있는 것을 쉽게 볼 수 있다.

(마) 체내 수분조절 작용

몸의 컨디션이 좋지 않을 때는 체내의 수분조절이 잘 되지 않아 얼굴이 푸석하게 붓는데 생강은 땀을 내고 소변을 잘 나오게 하여 부기를 빼준다.

(바) 체온조절 작용

몸을 훈훈하게 하여 냉감증, 불감증, 생리불순 등을 고쳐준다. 따라서 산후의 혈체와 하복통에는 생강을 차를 달여 소주에 타서 마시면 효과가 크고, 월경시의 복통이나 사지가 찬 여성은 매일 식전에 생강차 한 잔을 마시면 효과가 크다고 알려져 있다.

(사) 콜레스테롤 조절 작용

생강은 혈중 콜레스테롤의 상승 효과를 강력하게 억제하고 밀미를 예방하고 혈액의 점도를 낮추며, 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추고 암을 예방한다. 날 생강과 가공한 생강은 모두 통증을 진정시키고 구토를 예방하며 위산 과다를 바로잡고 혈압을 낮추며 심장을 자극한다. 또한 민간에서 체했을 때 생강즙을 먹으면 생강의 매운맛이 위 점막을 자극하여 위액의 분비를 촉진시키기 때문에 소화가 잘 되며, 감기로 인한 발열에 혈액 순환과 체온을 증강시켜 땀이 나게 하며, 속을 따뜻하게 해주므로 복통, 설사 등에 달여 마시면 좋은 효과를 본다. 또한 생강이 관절염과 류머티즘의 통증을 완화하는데 효과가 있다.

#### (아) 항염증 작용

생강은 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase 효소의 저해로 인한 leukotriene과 prostaglandin의 생합성 과정을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다. 우리가 흔히 알고 있는 이러한 효능 이외에도 생강에 관한 연구는 활발하게 진행되어, 최근 덴마크 Odense대학의 Srivastava는 혈액 응고를 억제하는데 있어서 마늘이나 양파보다도 생강의 양이 증가할수록 그 효과가 높아지는데 특히 그 양이 적더라도 작용한다고 밝혔다<sup>(18)</sup>. 이러한 사실로부터 Srivastava는 “생강의 유효성분은 매우 강한 약효를 가지고 있든지 아니면 생강에 고농도로 농축되어 있든지 둘 중의 하나”라고 결론을 내리고 있다<sup>(18)</sup>. 생강에 함유된 gingerol은 다른 강력한 항응혈 화합물인 아스피린과 놀라울 정도로 비슷한 화학구조를 가지고 있음이 밝혀졌다. 또한 인도의 연구자들도 장기간에 걸친 연구에서 생강이 혈중 콜레스테롤의 상승효과를 강력하게 억제한다는 사실을 발견했다. 따라서 생강은 멀미를 예방하고 혈액의 점도를 낮추며, 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추고, 암을 예방한다고 정리할 수 있다.

최근에는 생강을 널리 연구하고 있는 일본의 과학자들이 날 생강과 가공한 생강은 모두 통증을 진정시키고 구토를 예방하며 위산 과다를 바로잡고 혈압을 낮추며, 심장을 자극한다는 것을 알아냈다. 일본 과학자들이 실시한 실험에서 생강은 발암으로 이어지는 세포의 돌연변이를 방해하는 돌연변이 억제 물질로서 뚜렷한 효과를 보였으며 쥐의 먹이에 생강을 섞어 주어도 암이 억제되었다고 보고 하였다.

나. 채소류의 최적 추출조건 설정, 추출공정별 채소류 추출물의 특성 비교 및 *in vivo*에서 채소류의 지질 감소효과

1) 추출공정 별 채소류의 특성 및 최적 추출 조건 설정

가) 실험 재료

본 실험에 사용된 마늘(*Allium sativum*), 양파(*Allium cepa*)와 생강(*Zingiber officinale R.*)은 가락시장에서 구입하여 사용하였다. 시료는 실험 당일 깨끗이 수세한 후 동결 건조하여 사용하였으며, 1차년도에서 선정된 채소류 3가지, 마늘(경북 의성), 양파(전남 무안), 생강(충남 서산)을 건조하여 분쇄기(Kaiser, KFN-400S, 킹스톤기전(주), 한국)를 사용하여 0.5 mm이하의 크기로 분쇄한 후 0.2 mm PE film에 밀봉 포장하여 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 추출 용매로는 water, 25%, 50%, 100% EtOH을 사용하였으며 마이크로웨이브 추출법(microwave-assisted extraction, MAE)으로 추출하였다.

나) MAE 장치 및 추출조건

마이크로웨이브 추출은 450MHz의 주파수에 programmable power(max. 250 watts), time control 등이 가능하고 환류 냉각관이 장치된 microwave(Soxwave, prolabo, USA)를 사용하였으며 에너지 용량(watts), 에탄올 농도(%) 및 추출시간(min)에 따른 추출을 실시하였다. 추출은 상압에서 실시하였으며 밀폐형 추출관을 사용하였다.

#### 다) 추출조건 최적화를 위한 중심합성 실험계획

추출공정별 채소류 추출물 특성의 최적화를 위하여 예비실험 조건을 바탕으로 반응표면분석법<sup>(28)</sup>을 실시하였다. 즉, 추출공정의 독립변수( $X_i$ )인 시료에 대한 에너지용량( $X_1$ ), 에탄올농도( $X_2$ ), 추출시간( $X_3$ )에 대한 실험범위를 선정하여 시료별로 각각 5단계로 부호화(Table 8)하여 중심합성계획<sup>(29)</sup>에 의해 16개 군의 추출조건을 각각 설계하였으며 Table 9에 나타내었다.

각 조건에서 얻어진 추출물의 추출특성(종속변수,  $Y_n$ )을 3회 반복으로 측정하여 각각 회귀분석을 실시하였다. 여기서 세 개의 독립변수와 종속변수들에 대한 2차 회귀모형식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \\ + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

이때  $Y$ 는 종속(반응)변수,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ 는 독립(요인)변수,  $b_0$ 는 절편,  $b_n$ 는 회귀계수이다. 회귀분석에 의한 최적조건의 예측은 SAS(statistical analysis system) program<sup>(27)</sup>을 이용하였고, 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 추출특성의 모니터링과 최적조건 범위 예측은 각 종속변수의 contour map과 3차원 반응표면을 이용하여 분석하였다.

#### 라) 최적 추출조건의 예측 및 실증시험

조건별 각 추출물의 최적 추출조건 예측은 추출 특성에 대한 contour map superimposing 했을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적 추출조건 범위를 설정하였다. 또한 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적 조건으로 예측하고 각 회귀식에 대입하여 예측 값의 신뢰도를 검증하기 위하여 실증 실험을 실시하였다.

Table 8. Level in extraction conditions of vegetable based on central composite design

Extraction conditions	Level				
	-2	-1	0	1	2
Microwave power(watt)	30	60	90	120	150
Ethanol concentration(%)	0	25	50	75	100
Extraction time(min)	1	3	5	7	9

Table 9. Central composite design for optimization of extraction conditions of vegetable

Experiment Number <sup>1)</sup>	Microwave power(watt)	Ethanol concentration(%)	Extraction Time(min)
1	60(-1)	25(-1)	3(-1)
2	60(-1)	25(-1)	7( 1)
3	60(-1)	75( 1)	3(-1)
4	60(-1)	75( 1)	7( 1)
5	120( 1)	25(-1)	3(-1)
6	120( 1)	25(-1)	7( 1)
7	120( 1)	75( 1)	3(-1)
8	120( 1)	75( 1)	7( 1)
9	90( 0)	50( 0)	5( 0)
10	90( 0)	50( 0)	5( 0)
11	30(-2)	50( 0)	5( 0)
12	150( 2)	50( 0)	5( 0)
13	90( 0)	0(-2)	5( 0)
14	90( 0)	100( 2)	5( 0)
15	90( 0)	50( 0)	1(-2)
16	90( 0)	50( 0)	9( 2)

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by central composite design.



#### 마) 수율 측정

수율(yield)은 추출액을 회전 감압 증발기(Rotavapor R-123, Buchi, Switzerland)로 감압 농축한 후 건조오븐(Forced convection oven, Jeico Tech, Korea)을 이용하여 105°C 상압 가열건조법을 적용하여 항량이 될 때까지 건조한 후 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 고형분 수율(% , d.b.)로 나타내었다.

#### 바) 생리활성 성분 측정

##### (1) 총 폴리페놀의 함량 측정

총 폴리페놀의 함량(total polyphenol content)은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis방법<sup>(24)</sup>으로 측정하였으며, 각각의 추출조건에 따라 제조된 추출물의 1/2 희석액을 사용하였다. 즉, 희석액 5mL에 Folin reagent 5mL을 가하고 3분간 정치한 다음 5mL의 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정치한 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 760nm에서 흡광도를 측정하고 (+)catechin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 mg%로 구하였다.

##### (2) 전자공여작용의 측정

추출물의 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)은 Kang등의 방법<sup>(21)</sup>을 변형하여 각각의 추출물에 대한 DPPH( $\alpha,\alpha$ -diphenyl-picrylhydrazyl)의 전자공여효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 추출물 1mL에  $4 \times 10^{-4}$ M DPPH용액(99.9% EtOH에 용해) 1mL을 가하여 총액의 부피가 2mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 30분 방치한 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여효과는 추출물의 첨가 전·후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

### (3) Tyrosinase 저해 효과 측정

Tyrosinase 저해 효과 측정은 Wong등의 방법<sup>(23)</sup>에 따라 측정하였으며 tyrosinase 조효소액은 mushroom tyrosinase(Sigma, T7755, 110units/mL)을 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 사용하였다. 효소활성의 측정은 10mM catechol 용액 2.8mL에 tyrosinase 조효소액 0.2mL, 추출액 0.1mL를 가하고 분광 광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 420nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. tyrosinase에 대한 효소활성 저해 효과는 단위시간당 변화된 초기 흡광도의 변화값을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$Inhibitory\ effect(\%) = \{1 - (\frac{A-B}{C})\} \times 100$$

A : 효소액 첨가구의 흡광도 변화값

B : 효소액 대신 buffer 첨가구의 흡광도 변화값

C : 추출물 대신 증류수 첨가구의 흡광도 변화값

#### (4) 아질산염 소거작용의 측정

아질산염 소거효과(nitrite-scavenging effect)는 Gray등의 방법<sup>(26)</sup>으로 측정하였다. 즉, 1mM 아질산나트륨 용액 1mL에 각각의 추출물을 2mL을 가하고 여기에 0.1N 염산(pH 1.2) 및 0.2 N 구연산 완충용액(pH 3.0, 4.2 및 pH 6.0)을 7mL 가하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 달리하여 반응용액의 부피를 10mL로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응용액을 1mL씩 취하고 여기에 2% 초산 5mL, Griess 시약(acetic acid에 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합것으로 사용 직전에 제조) 0.4mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 분광 광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 그리고 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 추출액 첨가전후의 아질산염 백분율(%)로 표기하였다.

$$N(\%) = \left\{ 1 - \left( \frac{A-C}{B} \right) \right\} \times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B : 1mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

C : 시료 추출물 자체의 흡광도

#### (5) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

SOD 유사활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법<sup>(22)</sup>에 따라 실시하였다. 즉, 양파, 마늘, 생강 각각의 추출물을 감압 농축한 후 tris-HCl buffer(50mM tris[hydroxymethyl]amino-methane+10mM EDTA, pH 8.5)를 이용하여 pH 8.5로 조

절된 시료액을 만들었다. 각 시료 0.2mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50mM tris[hydroxymethyl]amino-methane+10mM EDTA) 3mL와 7.2mM pyrogallol 0.2mL를 가하고 25℃에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$SOD \text{ 유사활성 (\%)} = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

#### 사) 통계처리

모든 실험은 SAS(statistical analysis system) program<sup>(27)</sup>에 의해 ANOVA검정과 요인분석을 이용하여 실험군의 평균값 간에 유의성을 검정하였다.

### 2) 채소류 추출물의 동물 확인 실험

#### 가) 실험 재료 및 실험 식이의 조제

본 실험에 사용된 채소류(마늘, 생강)는 가락시장에서 구입한 후에 깨끗이 수세하여 0.5 cm의 크기로 세절한 후 -70℃ 온도에서 급냉하여 동결건조 하였다. 건조된 시료는 분쇄기(Kaiser, KFN-400S, 킹스톤기전(주), 한국)를 사용하여 0.5 mm이하의 크기로 분쇄한 후 0.2 mm PE film에 밀봉 포장하여 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 본 시료의 성분을 고려하여 고품사료를 조제하였다. 본 실험에 사용한 실험식이 조성은 Table 10과 같다. 혈청 분석은 녹십자 의료재단에 의뢰하였다. 간의 지질 및

콜레스테롤 측정에 사용한 kit는 (주)신양화학으로부터 구입하여 사용하였으며 나머지 시약은 일급 이상의 것을 사용하였다.

#### 나) 실험동물의 사육 및 시료의 채취

실험동물은 4주령 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 중앙 실험동물(주)로부터 구입하여 사용하였으며, 1주일간 일반 고형사료로 적응기간을 시킨 후 체중에 따라 난괴법으로 정상대조군, hypercholesterol 대조군, 1% 혼합식이 투여군, 2% 혼합식이 투여 군으로 4군으로 나누어 4주간 사육하였다. 실험동물은 stainless steel wire cage에 두 마리씩 분리하여 환경 조절된 사육실(온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $65\pm 5\%$ , 조명 06:00~18:00)에서 분리 사육하였다. 체중과 사료 섭취량은 매주 1회 측정하였으며 물과 실험식은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

사육 4주간 후에 실험동물은 처치 전 12시간 동안 절식시킨 후 에테르 마취하에 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하고 간, 신장, 비장을 적출하여 생리식염수로 세척, trimming하여 무게를 측정한 후 측정 시까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈장을 분리하여 분석시료로 사용하였다.

#### 다) 혈청 지질 분석

혈장 중 sGOT, sGPT, cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride, total lipid 분석은 녹십자 의료재단에 의뢰하였다.

Table 10. Compositions of experimental diets (unit : g/kg diet)

(g/1000 g diet)

Component	Control	Hyper- cholesterol	Garlic or Ginger	
			1%	2%
Casein	200	200	200	200
Sucrose	500	500	500	500
Corn starch	150	140	130	120
Corn oil	50	50	50	50
Cholesterol	0	10	10	10
Cellulose(Fiber)	50	50	50	50
Mineral Mix	35	35	35	35
Vitamin Mix	10	10	10	10
Choline bitrartrate	2	2	2	2
DL-methionine	3	3	3	3
Gralic or Ginger	0	0	10	20

라) 간 조직 중의 지질 함량 및 콜레스테롤 측정

간 조직 중의 지질은 Folch법<sup>(31)</sup>으로 추출한 후 분석 kit을 사용하여 콜레스테롤과 triglyceride의 함량을 측정하였다.

마) 간 조직의 육안 검사

4주간 실험식으로 급여한 다음 절식시켜 에테르로 마취하여 개복한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간을 생리식염수로 세척하여 육안으로 간의 외형적 형태를 검사하였다.

#### 바) 통계처리

실험결과는 SAS(statistical analysis system)<sup>(27)</sup>를 이용하여 실험군당 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 실험은 SAS program에 의해 ANOVA검정과 요인분석을 이용하여 실험군의 평균값 간에 유의성( $p < 0.05$ )을 검정하였다.

#### 다. 생리활성 추출물의 기능성 소재화 및 기능성 식품 개발

Allium 속 채소 중 마늘에서 추출한 노화억제 물질의 항산화 효과 활용을 위해 마늘 타블렛 BK21 및 마늘음료 BK22를 제조하였다.

#### 라. 식약청 제출자료 작성

채소류의 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료를 작성하였다.

## 제4절 결과 및 고찰

### 1. 채소류의 생리활성 성분의 검색 및 유효성분 대량 추출기술 개발

#### 가. 마늘의 생리활성 성분의 검색

##### 1) 전자공여작용

산소가 에너지 획득반응의 말단에서 전자의 수여에 관여하므로써 산소는 1전자 환원된 superoxide를 생성하며 이렇게 생성된 superoxide는 계속 환원되어 H<sub>2</sub>O를 생성

한다. 이때 superoxide는 생체의 산화적 장애를 초래한다. 이러한 산화적 free radical을 소거·분해하는 항산화 물질의 검색 전단계로 전자공여 작용 조사가 요구된다. 전자공여능 측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 라디칼 소거법으로 측정하는데 DPPH는 분자 내 radical을 함유하여 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만들고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며 이때 DPPH의 고유의 청남색이 없어지는 특성이 있고 이 색차를 비색 정량하여 전자공여능력을 측정한다. 화학적으로 유도된 radical이지만, lipoxygenase에 의한 지방산화 반응계에서의 항산화 활성 측정과도 잘 부합한다.

Fig. 4, 5는 한국산, 중국산의 2가지 원산지별 마늘의 각 추출용매에 따른 전자공여작용을 나타낸 것이다. 한국산 및 중국산의 전자공여작용은 30~90% 내외의 활성을 나타내었는데, 특히 물 추출과 용매 추출구간의 큰 차이를 나타내었으며, 에탄올 농도에 따른 영향은 50% 에탄올 추출구가 100% 에탄올 추출구보다 효과가 좋았다. 항산화제의 일종으로 널리 사용되고 있는 L-ascorbic acid와 비교하기 위해 각각 1% 및 0.1%의 수준에서 전자공여능력을 측정한 결과, 각각 97.01% 및 79.88%로 높게 나타났다. 마늘의 전자공여능력은 L-ascorbic acid와 비슷한 영향을 보였으며, 어느 정도의 radical 포집능력이 보이고 있으므로 추출시의 시료량이나, 추출물의 농도를 좀 더 높여준다면 항산화 능력에 대한 이용 가능성을 높일 수 있을 것으로 판단되었다. 또한, 한국산 마늘이 중국산에 비해 높은 전자공여능력을 보여주었다. 추출용매에 의한 영향은 열수 추출과 50% 에탄올 추출구에서 효과적인 반면 100% 에탄올 추출물에서는 효과가 떨어짐을 볼 수 있었다. 즉, 전자공여작용이 높다는 의미는 인체 내에서 장애를 일으키는 활성 산소를 소거·제거할 수 있다는 기능이 높다는 뜻이다. 또한 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenolic 물질에 대한 항산화작용의 지표이며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였다.



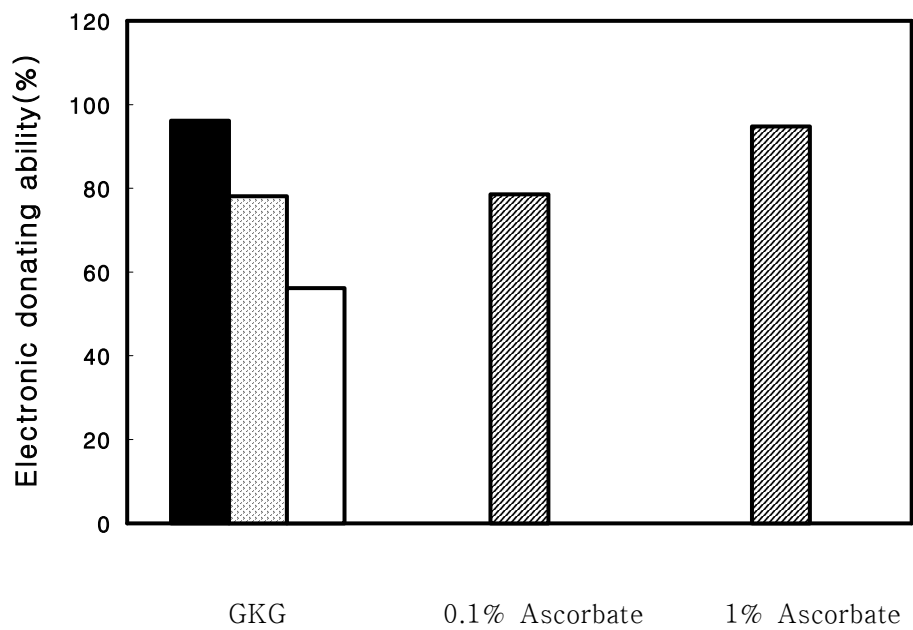


Fig. 4. Electron donating ability(EDA) of garlic of Korea growth (GKG) and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH)

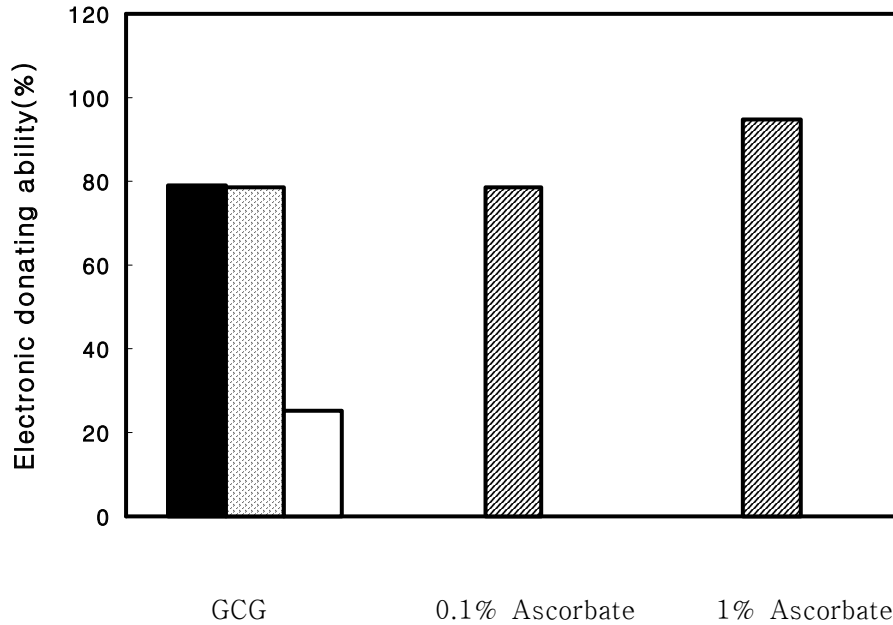


Fig. 5. Electron donating ability(EDA) of garlic of China growth (GCG) and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH)

## 2) SOD(Superoxide dismutase) 유사활성

Superoxide dismutase는 생체내 superoxide radical( $O_2^-$ )을 산소로 산화시켜 주는 천연 항산화제로서, 세포내 활성 산소를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매 하는 효소이다. SOD 유사활성 물질은 활성 산소의 시발 물질로, superoxide anion의 저해 물질로는 생체내 SOD라는 효소가 있지만, 이의 일종으로 SOD와 작용 기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성 물질이라 부른다. 일반적으로 과일, 채소류에는 비타민 C가 다른 식품 소재에 비해 풍부하게 함유되어 있으며 비타민 C는 그 자체가 높은 SOD 유사활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

추출용매 및 산지에 따른 마늘의 SOD 유사활성을 Fig. 6, 7에 나타내었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, 한국산의 경우 물 및 50% 에탄올 추출구에서는 50% 이상의 높은 활성이 나타났으나, 100% 에탄올 추출물에서는 17.34%의 활성을 보여주었다. 이에 반해 1% 및 0.1% L-ascorbic acid의 경우, 각각 97.01%, 79.88%로 매우 큰 활성이 나타나, 보고된 바와 같이 그 자체가 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. SOD 유사활성은 비교물질인 L-ascorbic acid에 비해서는 낮은 수준이지만 유사활성을 가지는 것으로 판단되었다.

본 실험에 사용된 두 가지 산지의 마늘에서 물 추출이 에탄올 용매로 추출할 때보다 SOD 유사활성이 높게 나타나는 것으로 보아 항산화 물질이 열수 추출 시 더 많이 추출되는 것으로 생각되었다. 이는 여러 가지 식물체를 대상으로 SOD 유사활성을 측정한 보고에서 에탄올 추출보다 열수추출물이 효과가 크다는 결과와 일치했다. 그러나 복분자 딸기의 SOD 유사활성에 대한 보고에서 80% 메탄올, 75% 아세톤 및 열수 등과 같은 추출 용매에 따른 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다. 따라서 pyrogallol의 자동 산화를 저해하는데 관여하는 물질은 식물체에 따라 추출 양상이나 항산화 활성이 다르며, 본 실험에 사용된 마늘의 경우 SOD 유사활성을 나타내는 물질이 물에 의해 추출되는 것으로 판단되었다. SOD 정제 시 열안정이 뛰어나고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하여 이를 SOD와 결합된 phenol류 물질인 것으로 보고한 바 있다.

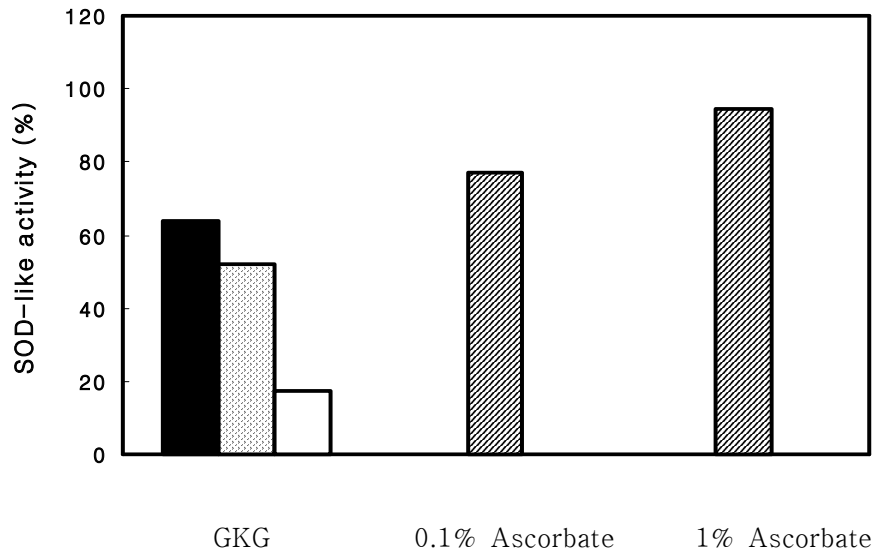


Fig. 6. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of garlic of Korea growth (GKG) and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH)

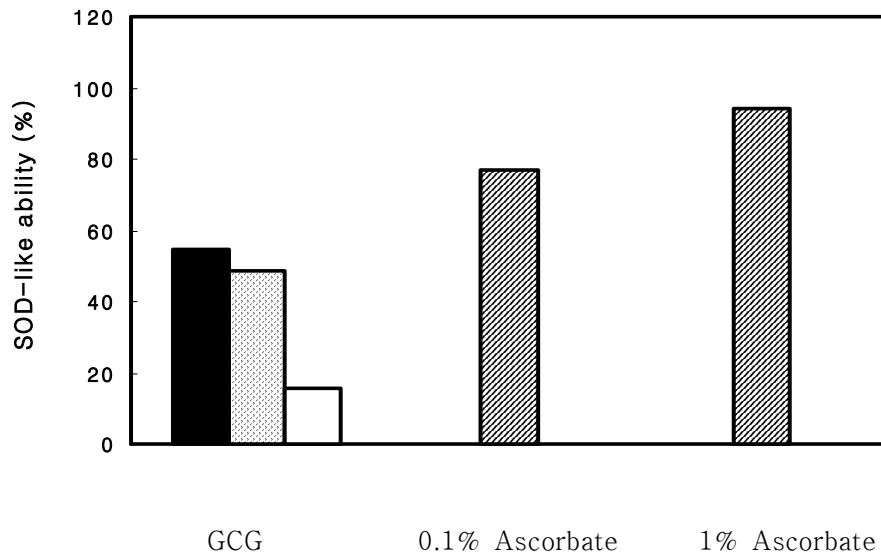


Fig. 7. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of garlic of China growth (GCG) and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH)

### 3) Tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase(Dihydroxy-L-phenylalanine oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 넓은 범위의 phenol 화합물을 기질로 이용하여 효소적 갈변화를 일으키는 효소로 페놀성 물질들이 가공이나 저장 중에 갈변화하는 원인이 된다. 이를 저해함으로써 식품의 색깔뿐만 아니라 향미 및 영양가 등에 직·간접적으로 영향을 준다. Tyrosinase의 저해제로는 인체의 hypopigmentation 치료에 이용되는 4-hydroxyanisole, hydroquinone, 4-hexyresorcinol tropolone, cinnamic acid, benzoic acid, kojic acid 등이 보고되고 있으나, 안전성, 경제성 등에 문제가 있다.

Fig. 8, 9는 산지별 마늘의 물 추출물, 에탄올 추출물로 tyrosinase의 catechol에 대한 산화 갈변화 억제 효과를 측정한 결과이다. 한국산 마늘의 경우 물 추출물에서 가장 높은 저해효과를 보였으며, 50% 및 100% 에탄올 추출구에서는 물 추출물보다 작은 저해작용을 나타내었다. 비교물질인 1% 및 0.1% L-ascorbic acid 용액은 각각 100%, 49.65%의 저해 효과를 나타내었는데, 물 추출물의 경우 0.1% L-ascorbic acid 보다 우수하고, 1% L-ascorbic acid의 저해 능력에 상응하는 수준으로 나타나 다른 품종에 비해 PPO 등에 의한 효소적 갈변화를 방지하는데 관여하는 phenol물질이 많이 함유한 것으로 판단되었다.

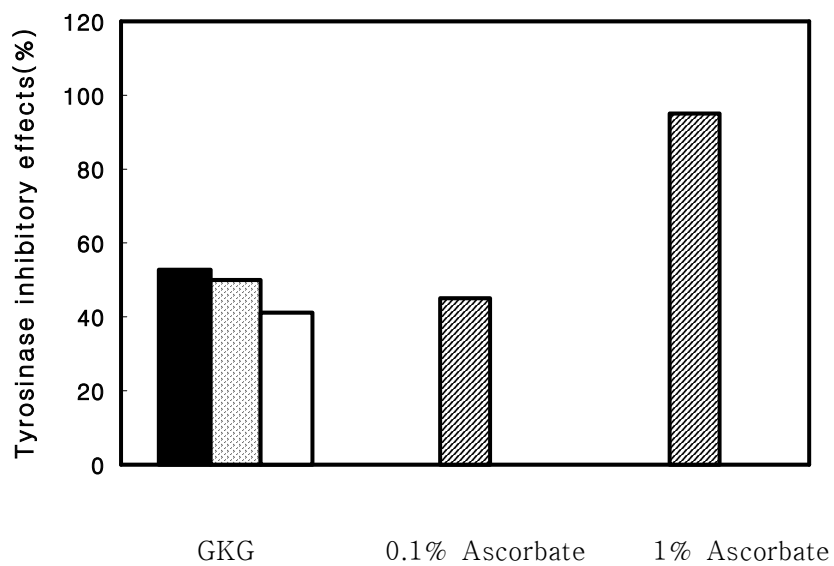


Fig. 8. Tyrosinase inhibition effects(%) garlic of Korea growth and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

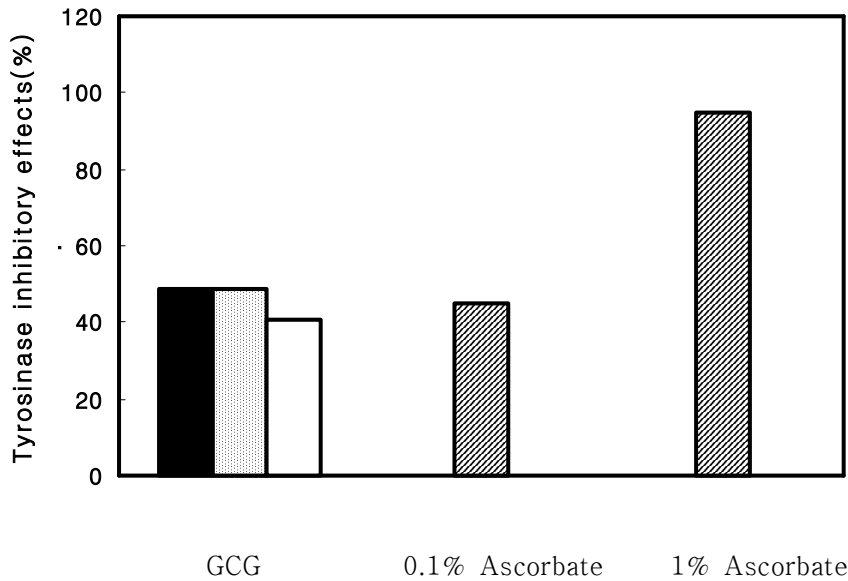


Fig. 9. Tyrosinase inhibition effects(%) of garlic of China growth and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

#### 4) 총 폴리페놀의 함량

Fig. 10은 두 가지 산지별 마늘의 물 추출물 및 에탄올 추출물에 함유된 total polyphenol 함량을 catechin을 기준물질로 하여 측정한 결과이다. 마늘의 polyphenol 함량은 물 추출물이 용매 추출보다 높은 함량을 나타냈으며, 추출용매에 따른 영향을 볼 수 없었다. 한국산 마늘의 경우, 중국산에 비해 polyphenol 함량이 매우 높게 나타났다. 한국산 마늘은 물 추출물에서의 함량이 에탄올 추출물에 비해 높게 나타나, 마늘의 phenol 물질은 용매보다는 물에 의해 더 많이 추출되는 것으로 판단되었다.

특히 한국산 마늘은 중국산에 비해 polyphenol 함량이 높았고, 이와 비례적으로 전자공여작용 및 SOD 유사활성에서 그 활성이 높아 생리적 기능상 우수한 것으로 판

단되었다. 이는 복분자 딸기의 antocyanin 색소를 활성탄에 의해 제거한 것이 제거하지 않은 경우보다 SOD 유사활성이 낮게 나온 것처럼 색소성분이 항산화성과 관련하여 여러 가지 기능적 역할을 하는 것으로 판단된다. 이에 뒷받침하여 품종별 고구마에탄올 추출물의 항산화 정도를 비교하였을 때 유색 고구마인 자색 고구마와 황색고구마가 다른 품종에 비하여 항산화성이 높은 것으로 보고된 바 있다.

Phenolic compound는 일반적으로 식물체에서 발견되는데, 이들은 항산화 활성을 포함한 다양한 생리적 효과를 가지는 것으로 보고되어 왔다. Phenolic 함량이 풍부한 과일, herb, 채소류, 곡류 등과 같은 식물체의 crude extract는 식품산업에서의 관심이 증대하고 있는데, 이들이 지질의 산화적 분해를 지연시켜 식품의 품질 및 영양가를 향상시키기 때문이다. 항산화성 물질의 근원은 채소, 과일, 잎, oilseed, 곡류, 나무 껍질 및 뿌리, spice류, herb 등과 같은 식물의 여러 형태에서 찾을 수 있다. Phenolic acid, stilbenes, tannins, lignans, lignin 등과 같은 flavonoid와 식물유래 phenol 들은 특히 잎과 꽃잎 조직, 줄기나 껍질과 같은 나무 부분에 일반적으로 존재한다. 이들은 식물체에서 성장 발달과 해충과 상처에 대한 방어 역할로 중요하며 flavonoid는 부분적으로 꽃, 열매와 잎에 색을 제공한다. Phenolic 성분들의 항산화적 활성은 주로 산화 환원 특성에 의한 것으로 그 자체가 reducing agent, hydrogen donators, singlet oxygen quencher의 역할을 하며 금속이온에 대해 chelation potential을 가지고 있다.

Caffeic, chlorogenic, ferulic, sinapic,  $p$ -coumaric acid 등의 phenolic acid들은  $p$ -hydroxybenzoic, vanillic and syringic acid 등과 같은 benzoic acid의 hydroxy 유도체보다도 항산화활성이 더 높은 것으로 나타나고 있다. 또한  $\alpha$ -tocopherol은 *in vitro* 상에서 chain-breaking antioxidants로 가장 우수한 활성을 보이며, carotenoids 역시 산화적 손상에 대한 보호역할을 가지고 있으며, singlet oxygen은  $\beta$ -carotene에 의해 매우 강하게 억제되는 것으로 알려져 있다.



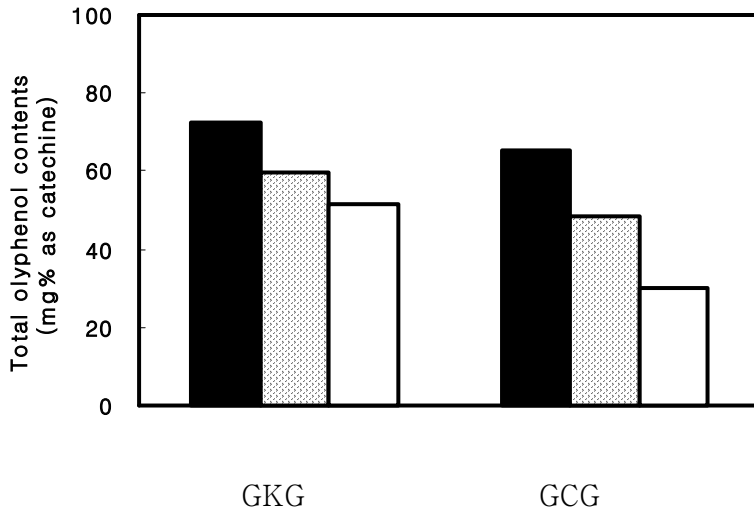


Fig. 10. Total polyphenol contents (mg%) of habitat and extraction solvents (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

#### 5) 총 치오설피네이트 함량

고혈압은 발생기작에서 renin-angiotensin system이 혈압 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 angiotensin converting enzyme(ACE)는 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I 으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로서 강력한 혈관 수축작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관 수축작용을 가지며, ACE는 또한 혈관 이완작용을 가진 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 작용을 가진다. Angiotensin II가 증가되면 catecholamine 값이 증가되고, 혈관이 수축되며 동시에 항이뇨 호르몬인 aldosterone의 분비가 촉진된다. 이에 따라  $\text{Na}^+$  및 수분 배설이 억제되어 순환 혈액량이 증가되어 혈압상승을 일으킨다. 따라서 ACE 작용억제는 혈관수축을 막고 체내 수분저류를 막아 혈압을 낮추는

효과를 나타낸다.

산지별 마늘에 대하여 추출용매에 따른 angiotensin I-converting enzyme 저해작용을 측정한 결과는 Fig. 11과 같다. 두 산지별 모두에서 50% 에탄올 추출물의 활성이 물과 에탄올 추출물보다 angiotensin 전환 효소에 대한 저해작용이 우수하였다. 즉, Angiotensin I-converting enzyme 저해작용에 관여하는 마늘의 기능성 물질은 용매에 의해서라기보다 물에서 더 많이 추출되는 것으로 생각되었다.

현재까지 Captopril, Enalapril과 같은 화학합성 ACE 저해제가 널리 상용되고 있지만, 높은 역가에 비해 각종 부작용이 많아 안전성 측면에서 가치가 더 높은 천연물질에 대한 탐색과 개발에 대한 더 많은 연구가 필요하다. 일반적으로 콩 단백질 유래 peptide 물질이 혈압 강하의 효과가 있는 것으로 많이 보고되고 있으며, 그 밖에 flavonoid, 탄닌류, 해조류, 장류 등에서 그 효과를 시험한 바 있다. 또한 본태성 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat)에 호박씨 투여시 혈압 강하 효과가 보고되어 있으며, 꿀 과피에서 분리한 플라보노이드에 대하여 천연 ACE 저해제로서의 가능성이 제시되고 있다.

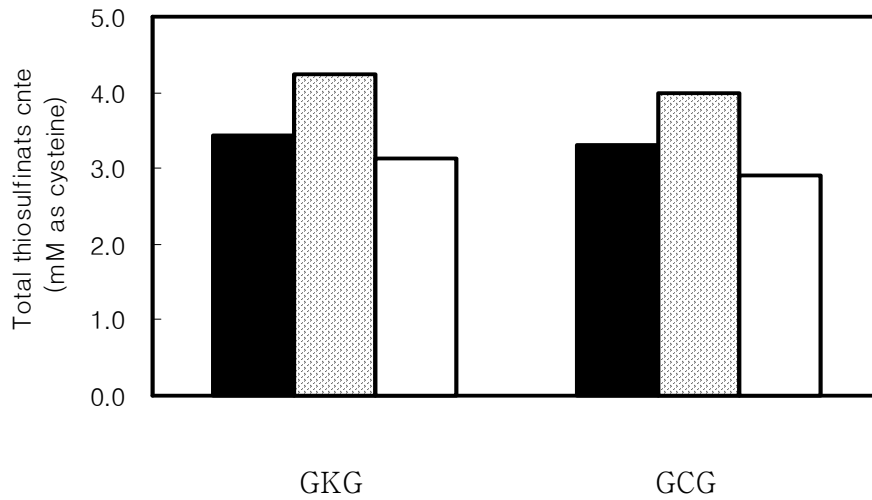


Fig. 11. Angiotensin I converting enzyme(ACE) inhibition effects(%) of habitat and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

#### 6) 아질산염 소거작용

발암에 관련된 물질로 알려진 nitrite는 독성을 가지고 있고, nitrate도 체내, 체외에서 효소작용에 의해 nitrite로 환원되기 때문에 일정농도 이상 섭취할 경우, 식품내의 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하고, 또한 혈액 중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 methemoglobin증 등을 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 아질산염을 소거·제거하여 그에 동반되는 질병을 억제할 수 있는 천연물 검색에 대한 연구가 필요하다. Ascorbate와 같은 환원물질이 아질산염과 반응하면 nitrosamine의 생성을 저해할 수 있으며, Gray등은 phenolic 화합물인 tannic acid 유도체를 식품 보존료 및 N-nitrosamine 형성 저해제로 사용하였다. 또한 야채류나 향신료 등의 추출물이 nitrite를 제거하여

그 위험성을 저하시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 알려져 있다.

산지별 마늘의 아질산염 소거작용은 Table 11과 같다. pH의 증가에 따라 감소하여 pH에 대해 의존적임을 알 수 있었다. 마늘 추출물은 pH 1.2 조건에서는 70% 내외로 비교물질로 사용된 0.1% 및 1% L-ascorbic acid 용액의 활성과 동등한 수준으로 나타났다. 위장 내의 낮은 pH 조건에서 nitrosamine이 쉽게 형성되므로 낮은 pH에서 아질산염 소거작용이 큰 것은 nitrosamine 형성을 효과적으로 억제하는데 능력이 있음을 의미한다. 한국산 마늘은 물 추출물의 경우 pH 1.2에서 아질산염 소거 능력이 90% 이상으로 매우 높게 나타났고, 1% L-ascorbic acid 용액보다도 우수하였다. 즉, 한국산 마늘은 다른 품종에 비해 polyphenol 함량이 매우 높게 측정되었으므로, 높은 함량의 polyphenol이 아질산염을 효과적으로 소거하는데 기여한 것으로 판단된다.

각종 phenol성 화합물은 산성조건에서 N-nitrosophenol 형성, 즉 nitroso화 반응을 강력하게 억제하며, dihydrophenol류가 nitrous acid에 의해 quinone으로 산화되고 nitrous acid는 무해한 nitric oxide로 변화된다. 따라서 이러한 phenol성 화합물은 amine류와 반응할 수 있는 nitrite를 nitrite oxide로 변환시키며, phenol성 화합물 또한 nitrosating agent에 의해 자신이 산화되어 quinone으로 산화되는 항산화제로 작용하게 되므로 결과적으로 phenol 가운데 free hydroxy group의 수는 중요하게 되며 이러한 phenol성 화합물의 촉매작용 기작은 C-nitrosate 후 quinone monooxine tautomer로 되어  $N_2O_3$ 와 반응하여 N-nitrosating agent를 생성한다. Phenol성 물질 중 caffeic acid, ferulic acid, catechol등이 아질산과 반응하여 nitrosamine의 생성을 억제한다고 보고된 바 있다.

Table 11. Nitrite scavenging ability of garlic for extract condition<sup>1)</sup>

unit : % (raw material)

Habitat	Et-OH conc.(%)	Nitrite scavenging ability (%)			
		pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.4
Korea	0	96.42	60.38	26.12	—
	50	78.11	55.62	19.82	—
	100	56.29	38.94	10.57	—
China	0	79.25	52.82	24.76	—
	50	78.50	50.00	17.42	—
	100	25.01	8.33	3.86	—
1 % L-ascorbic acid		73.79	72.25	75.02	—
0.1 % L-ascorbic acid		74.10	67.62	41.47	—

<sup>1)</sup>Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25 mL of ethyl alcohol.

<sup>2)</sup>Means are three replication.

#### 나. 양파의 생리활성 성분의 검색

##### 1) 전자공여작용

산소가 에너지 획득반응의 말단에서 전자의 수여에 관여하므로써 산소는 1전자 환원된 superoxide를 생성하며 이렇게 생성된 superoxide는 계속 환원되어 H<sub>2</sub>O를 생성한다. 이때 superoxide는 생체의 산화적 장애를 초래한다. 이러한 산화적 free radical을 소거·분해하는 항산화 물질의 검색 전단계로 전자공여 작용 조사가 요구된다. 전자공여능 측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 라디칼 소거법으로

측정하는데 DPPH는 분자 내 radical을 함유하여 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만들고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며 이때의 DPPH의 고유의 청남색이 옅어지는 특성이 있고 이 색차를 비색 정량하여 전자공여능력을 측정한다. 화학적으로 유도된 radical이지만, lipoxygenase에 의한 지방 산화 반응계에서의 항산화 활성 측정과도 잘 부합한다.

Fig. 12, 13은 일반 양파와 붉은 양파의 두 품종의 각 추출용매에 따른 전자공여작용을 나타낸 것이다. 일반 양파의 전자공여작용은 10~80% 내외의 활성을 나타내었는데, 특히 물 추출과 용매 추출구간의 큰 차이를 나타냈으며, 에탄올 농도에 따른 영향을 볼 수 있었다. 항산화제의 일종으로 널리 사용되고 있는 L-ascorbic acid와 비교하기 위해 각각 1% 및 0.1%의 수준에서 전자공여능력을 측정한 결과, 각각 100% 및 89.54%로 높게 나타났다. 양파는 어느 정도의 radical 포집 능력이 보이고 있으므로 추출시의 시료량이나, 추출물의 농도를 좀 더 높여준다면 항산화 능력에 대한 이용 가능성을 높일 수 있을 것으로 판단되었다. 또한, 붉은 양파 품종의 경우, 물, 50% 에탄올 추출구에서 우수한 전자공여능력을 나타내었으며 이들은 서로 유사한 수준을 나타내어 다른 품종과 마찬가지로 추출용매에 의한 영향은 볼 수 있었다. 또한 다른 품종에 비해 공여능력이 월등히 우수하며, 비교물질인 L-ascorbic acid의 작용과 거의 상승하는 수준으로 나타나 free radical에 대한 포집 능력이 우수한 것으로 판단되었다. 즉, 전자공여작용이 높다는 의미는 인체 내에서 장애를 일으키는 활성산소를 소거·제거할 수 있다는 기능이 높다는 뜻이다. 또한 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenol성 물질에 대한 항산화작용의 지표이며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였다. 따라서 일반 양파의 경우, 항산화효과를 나타내는 phenol성 물질이 다른 품종에 비해 많이 함유되어 있을 것으로 예상되며 이에 따라 전자공여능을 비롯한 여러 가지 항산화 활성이 높을 것으로 생각되었다.

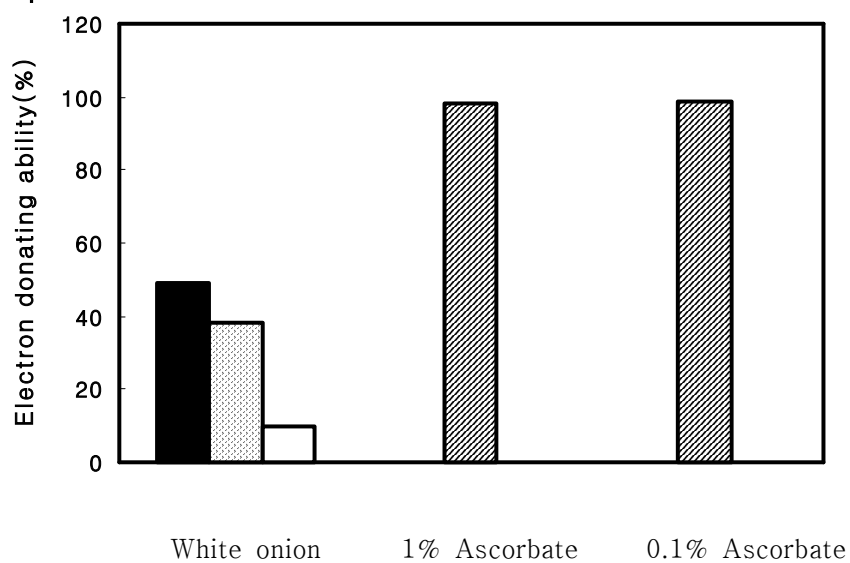


Fig. 12. Electron donating ability(EDA) of white onion and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

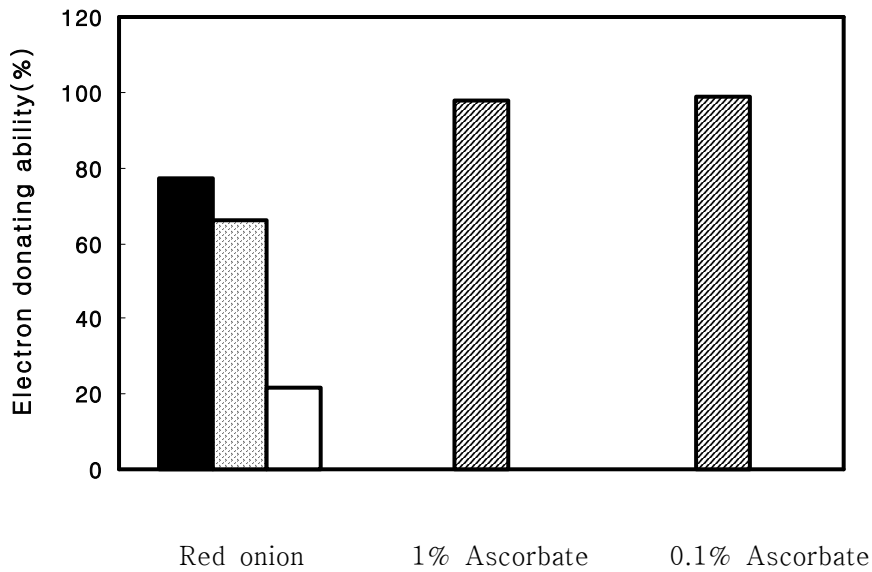


Fig. 13. Electron donating ability(EDA) of red onion and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

## 2) SOD(Superoxide dismutase) 유사 활성

Superoxide dismutase는 생체내 superoxide radical( $O_2^-$ )을 산소로 산화시켜 주는 천연 항산화제로서, 세포내 활성 산소를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. SOD 유사활성 물질은 활성 산소의 시발물질로, superoxide anion의 저해 물질로는 생체내 SOD라는 효소가 있지만, 이의 일종으로 SOD와 작용기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성 물질이라 부른다. 일반적으로 과일, 채소류에는 비타민 C가 다른 식품 소재에 비해 풍부하게 함유되어 있으며 비타민 C는 그 자체가 높은 SOD 유사활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

추출용매 및 품종에 따른 양파의 SOD 유사활성을 Fig. 14, 15에 나타내었다. Fig.



14에서 보는 바와 같이, 일반 양파의 경우 물 및 50% 에탄올 추출구에서는 활성이 나타났으며, 100% 에탄올 추출구에서는 약한 활성을 보여주었다. 이에 반해 1% 및 0.1% L-ascorbic acid의 경우, 각각 95.25%, 82.76%로 매우 큰 활성이 나타났으며, 일반적으로 보고된 바와 같이 그 자체가 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. 붉은 양파 품종의 경우 물 추출구에서는 활성이 높았으며, 50% 에탄올 추출구에서는 55.12%로, 100% 에탄올 추출구에서는 19.99%로 나타났으며 물 추출물에서 가장 우수하게 나타났다.

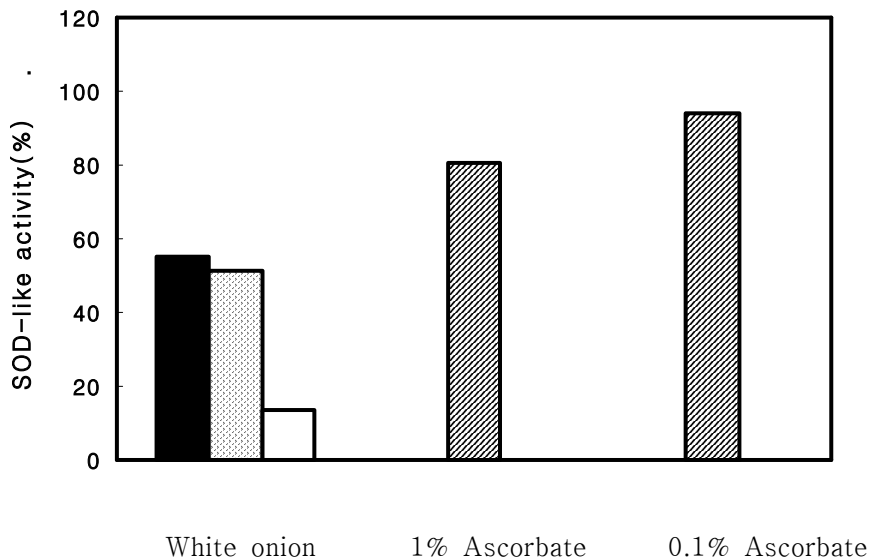


Fig. 14. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of white onion and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

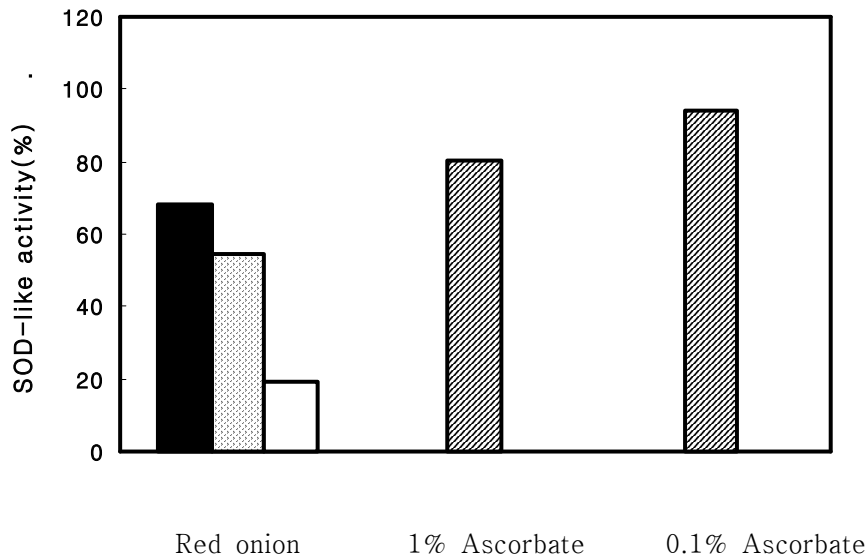


Fig. 15. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of red onion and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

본 실험에 사용된 두 가지 품종의 양파에서 고농도의 용매로 추출할 때보다 물 추출물이 SOD 유사활성이 높게 나타나는 것으로 보아 항산화 물질이 물 추출 시 더 많이 추출되는 것으로 생각되었다. 이는 여러 가지 식물체를 대상으로 SOD 유사활성을 측정된 보고에서 에탄올 추출보다 열수 추출물이 효과가 크다는 결과와 다르게 나타났다. 그러나 복분자 딸기의 SOD 유사활성에 대한 보고에서 80% 메탄올, 75% 아세톤 및 열수 등과 같은 추출 용매에 따른 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다. 따라서 pyrogallol의 자동산화를 저해하는데 관여하는 물질은 식물체에 따라 추출양상이나 항산화 활성이 다르며, 본 실험에 사용된 양파의 경우 SOD 유사활성을 나타내는 물질이 에탄올에 의해 추출되는 것으로 판단되었다. SOD 정제 시 열안정이 뛰어나고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하여 이를 SOD와 결합된 phenol류 물질인 것으로 보고한 바 있다.

### 3) Tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase(Dihydroxy-L-phenylalanine oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 넓은 범위의 phenol 화합물을 기질로 이용하여 효소적 갈변화를 일으키는 효소로 페놀성 물질들이 가공이나 저장 중에 갈변화 하는 원인이 된다. 이를 저해함으로써 식품의 색깔뿐만 아니라 향미 및 영양가 등에 직·간접적으로 영향을 준다. Tyrosinase의 저해제로는 인체의 hypopigmentation 치료에 이용되는 4-hydroxyanisole, hydroquinone, 4-hexyresorcinol tropolone, cinnamic acid, benzoic acid, kojic acid 등이 보고되고 있으나, 안전성, 경제성 등에 문제가 있다.

Fig. 16, 17은 두 가지 양파 품종의 물 추출물, 에탄올 추출물로 tyrosinase의 catechol에 대한 산화 갈변화 억제 효과를 측정한 결과이다. 일반 양파의 경우 물 추출물이 각각 60.12%, 62.03%로 에탄올 추출물에 비해 tyrosinase에 대한 저해 작용이 높게 나타났다. 100% 에탄올 추출물에서는 낮은 저해효과를 두 가지 품종 모두 비슷한 저해작용을 보였다.

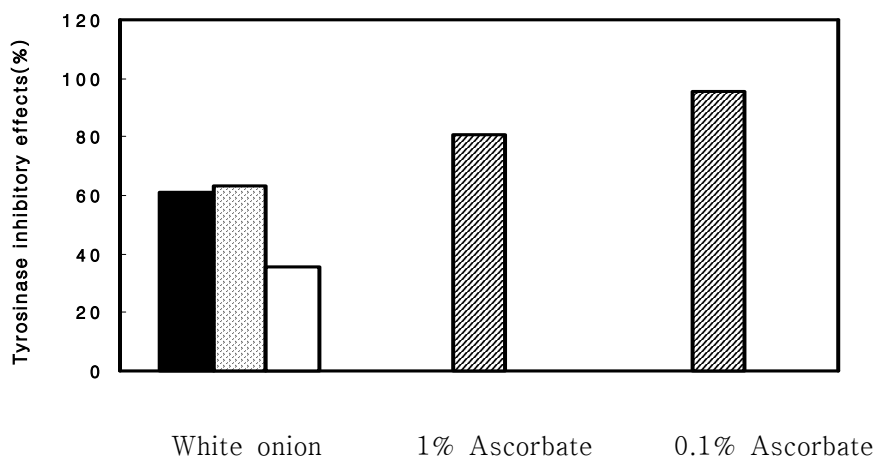


Fig. 16. Tyrosinase inhibition effects(%) of white onion and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

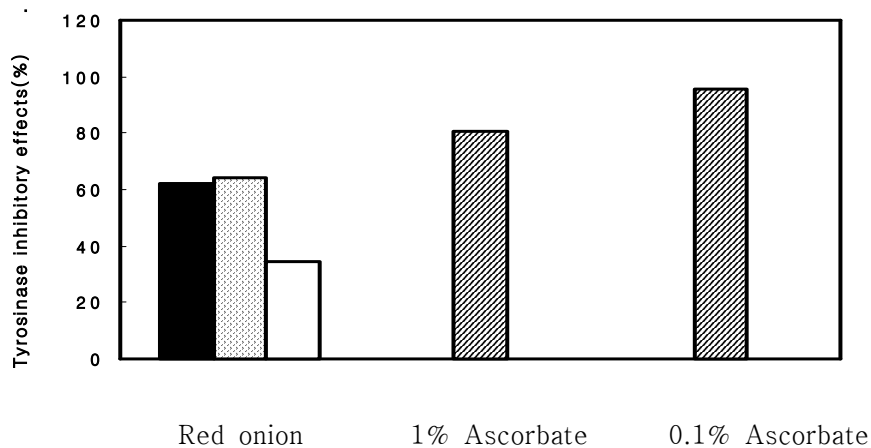


Fig. 17. Tyrosinase inhibition effects(%) of red onion and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

또한, 비교물질인 1% 및 0.1% L-ascorbic acid 용액은 각각 98.12%, 81.12%의 저해 효과를 나타내었는데, 물과 50% 에탄올 추출물의 경우 0.1% L-ascorbic acid보다 우수하고, 1% L-ascorbic acid의 저해 능력에 상응하는 수준으로 나타나 다른 품종에 비해 PPO 등에 의한 효소적 갈변화를 방지하는데 관여하는 phenol 물질이 많이 함유한 것으로 판단되었다.

#### 4) 총 폴리페놀의 함량

Fig. 18은 두 가지 양과 품종의 물 추출물 및 에탄올 추출물에 함유된 total polyphenol 함량을 catechin을 기준물질로 하여 측정한 결과이다. 일반 양과와 붉은 양과 품종의 polyphenol 함량은 물 추출물과 용매 추출구간의 함량이 비슷한 수준으로 나타나 추출 용매에 따른 영향을 볼 수 없었다. 50% 에탄올 추출물에서는 비교적 높은 함량을 보였다. 붉은 양과는 다른 품종과는 달리 50% 에탄올 추출물이 비교적 높게 나타내었다.

붉은 양과 품종은 다른 품종에 비해 polyphenol 함량이 높았고, 이와 비례적으로 전자공여작용 및 SOD 유사활성에서 그 활성이 높아 생리적 기능상 우수한 것으로 판단되었다. 이는 복분자 딸기의 antocyanin 색소를 활성탄에 의해 제거한 것이 제거하지 않은 경우보다 SOD 유사활성이 낮게 나온 것처럼 색소 성분이 항산화성과 관련하여 여러 가지 기능적 역할을 하는 것으로 판단된다. 이에 뒷받침하여 품종별 고구마 에탄올 추출물의 항산화 정도를 비교하였을 때 유색 고구마인 자색 고구마와 황색고구마가 다른 품종에 비하여 항산화성이 높은 것으로 보고된 바 있다.

Phenolic compound는 일반적으로 식물체에서 발견되는데, 이들은 항산화 활성을 포함한 다양한 생리적 효과를 가지는 것으로 보고되어 왔다. Phenolic 함량이 풍부한 과일, herb, 채소류, 곡류 등과 같은 식물체의 crude extract는 식품 산업에서의 관심이 증대하고 있는데, 이들이 지질의 산화적 분해를 지연시켜 식품의 품질 및 영양가를 향상시키기 때문이다. 항산화성 물질의 근원은 채소, 과일, 잎, oilseed, 곡류, 나무

껍질 및 뿌리, spice류, herb 등과 같은 식물의 여러 형태에서 찾을 수 있다. Phenolic acid, stilbenes, tannins, lignans, lignin 등과 같은 flavonoid와 식물 유래 phenol 들은 특히 잎과 꽃잎 조직, 줄기나 껍질과 같은 나무 부분에 일반적으로 존재한다. 이들은 식물체에서 성장 발달과 해충과 상처에 대한 방어 역할로 중요하며 flavonoid 는 부분적으로 꽃, 열매와 잎에 색을 제공한다. Phenolic 성분들의 항산화적 활성은 주로 산화 환원 특성에 의한 것으로 그 자체가 reducing agent, hydrogen donators, singlet oxygen quencher의 역할을 하며 금속이온에 대해 chelation potential을 가지고 있다.

Caffeic, chlorogenic, ferulic, sinapic, p-coumaric acid 등의 phenolic acid들은 p-hydroxybenzoic, vanillic and syringic acid 등과 같은 benzoic acid의 hydroxy 유도체보다도 항산화활성이 더 높은 것으로 나타나고 있다. 또한  $\alpha$ -tocopherol은 *in vitro* 상에서 chain-breaking antioxydants로 가장 우수한 활성을 보이며, carotenoids 역시 산화적 손상에 대한 보호역할을 가지고 있으며, singlet oxygen은  $\beta$ -carotene에 의해 매우 강하게 억제되는 것으로 알려져 있다.

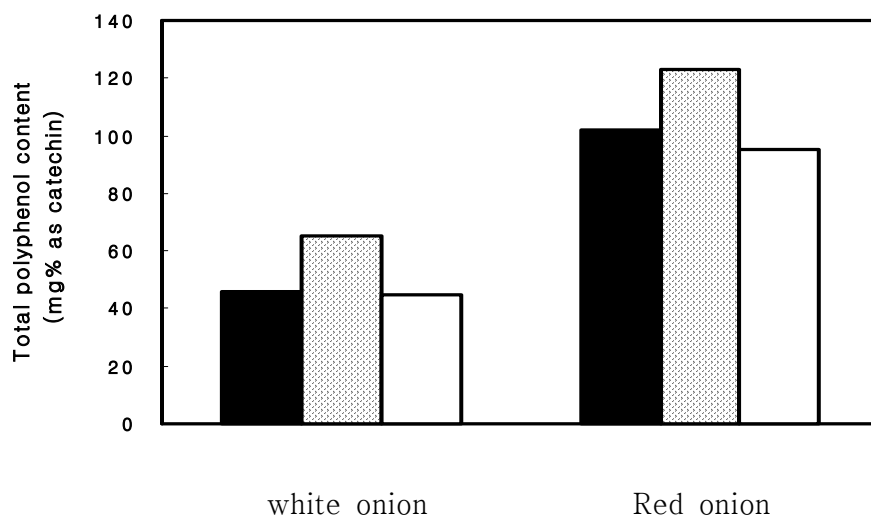


Fig. 18. Total polyphenol contents (mg%) of white and red onions and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

#### 5) 총 피오설피네이트 함량

고혈압은 발생기작에서 renin-angiotensin system이 혈압 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 angiotensin converting enzyme(ACE)는 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I 으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로서 강력한 혈관 수축작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관 수축작용을 가지며, ACE는 또한 혈관 이완작용을 가진 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 작용을 가진다. Angiotensin II가 증가되면 catecholamine 값이 증가되고, 혈관이 수축되며 동시에 항이뇨 호르몬인 aldosterone의 분비가 촉진된다. 이에 따라  $\text{Na}^+$  및 수분 배설이 억제되어 순환 혈액량이 증가되어 혈압상승을 일으킨다. 따라서 ACE 작용억제는 혈관 수축을 막고 체내 수분저류를 막아 혈압을 낮추는 효과를 나타낸다.

품종별 양파에 대하여 추출 용매에 따른 angiotensin I-converting enzyme 저해작용을 측정한 결과는 Fig. 19와 같다. 두 가지 품종 모두에서 50% 에탄올 추출물의 활성이 물과 에탄올 추출물보다 angiotensin 전환 효소에 대한 저해작용이 우수하였다. 즉, Angiotensin I-converting enzyme 저해작용에 관여하는 양파의 기능성 물질은 용매에 의해서라기보다 물에서 더 많이 추출되는 것으로 생각되었다.

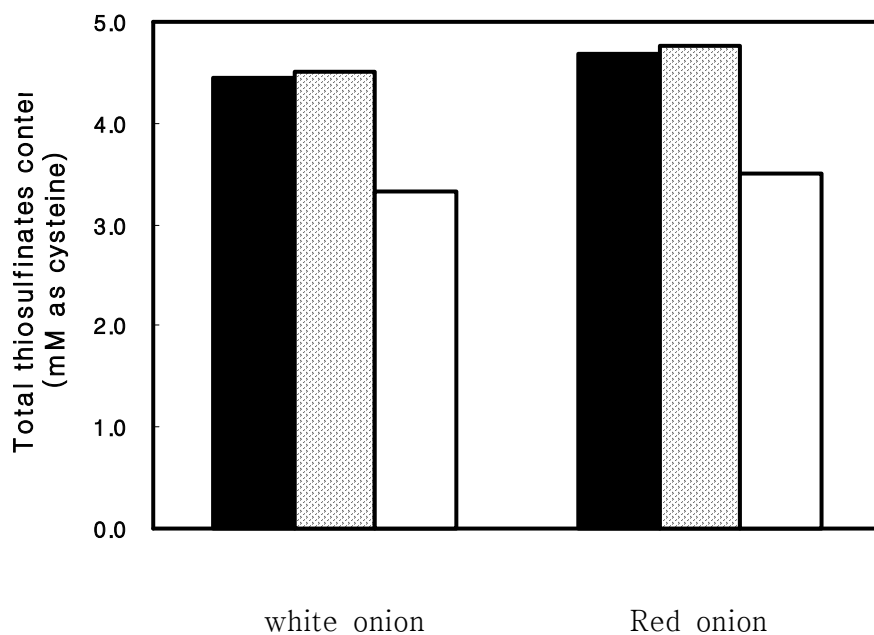


Fig. 19. Total polyphenol contents (mg%) of white and red onions and extraction solvents. (■: water, ▨: 50% Et-OH, □: 100% Et-OH, Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25mL of ethyl alcohol.)

현재까지 captopril, enalapril과 같은 화학합성 ACE 저해제가 널리 상용되고 있지만, 높은 역가에 비해 각종 부작용이 많아 안전성 측면에서 가치가 더 높은 천연물질에 대한 탐색과 개발에 대한 더 많은 연구가 필요하다. 일반적으로 콩 단백질 유래 peptide 물질이 혈압 강하의 효과가 있는 것으로 많이 보고되고 있으며, 그 밖에 flavonoid, 탄닌류, 해조류, 장류 등에서 그 효과를 시험한 바 있다. 또한 본태성 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat)에 호박씨 투여시 혈압 강하 효과가 보고되어 있으며, 굴 껍질에서 분리한 플라보노이드에 대하여 천연 ACE 저해제로서의 가능성이 제시되고 있다.



## 6) 아질산염 소거작용

발암에 관련된 물질로 알려진 nitrite는 독성을 가지고 있고, nitrate 도 체내, 체외에서 효소작용에 의해 nitrite 로 환원되기 때문에 일정농도 이상 섭취할 경우, 식품 내의 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하고, 또한 혈액 중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 methemoglobin증 등을 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 아질산염을 소거·제거하여 그에 동반되는 질병을 억제할 수 있는 천연물 검색에 대한 연구가 필요하다. Ascorbate와 같은 환원물질이 아질산염과 반응하면 nitrosamine의 생성을 저해할 수 있으며, Gray등은 phenol성 화합물인 tannic acid 유도체를 식품 보존료 및 N-nitrosamine 형성 저해제로 사용하였다. 또한 야채류나 향신료 등의 추출물이 nitrite를 제거하여 그 위험성을 저하시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 알려져 있다.

품종 및 용매별 양과 추출물의 아질산염 소거작용은 Table 12와 같다. 각 품종에서 아질산염 소거능력은 비교적 물 추출물이 높게 나타났으며, pH의 증가에 따라 감소하여 pH에 대해 의존적임을 알 수 있었다. 다만, pH 4.2에서 각 품종의 물 추출물은 에탄올 추출물에 비해 그 활성이 다소 높게 나타났다. 일반 양파와 붉은 양파는 소거능력이 서로 비슷하였으며, pH 1.2 조건에서는 70% 내외로 비교물질로 사용된 0.1% 및 1% L-ascorbic acid 용액의 활성과 동등한 수준으로 나타났다. 위장 내의 낮은 pH조건에서 nitrosamine이 쉽게 형성되므로 낮은 pH에서 아질산염 소거작용이 큰 것은 nitrosamine 형성을 효과적으로 억제하는데 능력이 있음을 의미한다. 양파 품종은 pH 1.2에서 아질산염 소거 능력이 90% 이상으로 매우 높게 나타났고, 1% L-ascorbic acid 용액보다도 낮게 나타났다.

각종 phenol성 화합물은 산성조건에서 N-nitrosopholine 형성, 즉 nitroso화 반응을 강력하게 억제하며, dihydrophenol류가 nitrous acid에 의해 quinone으로 산화되고 nitrous acid는 무해한 nitric oxide로 변화된다. 따라서 이러한 phenol성 화합물은 amine류와 반응할 수 있는 nitrite를 nitrite oxide로 변환시키며, phenol성 화합물 또한 nitrosating agent에 의해 자신이 산화되어 quinone으로 산화되는 항산화제로 작용하게 되므로 결과적으로 phenol 가운데 free hydroxy group의 수는 중요하게 되며

이러한 phenol성 화합물의 축매작용 기작은 C-nitrosate 후 quinone monoxine tautomer로 되어 N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>와 반응하여 N-nitrosating agent를 생성한다. Phenol성 물질 중 caffeic acid, ferulic acid, catechol등이 아질산과 반응하여 nitrosamine의 생성을 억제한다고 보고된 바 있다.

Table 12. Nitrite scavenging ability of white and red onions for extract condition<sup>1)</sup>

unit : % (raw material)

Species	Et-OH conc.(%)	Nitrite scavenging ability (%)			
		pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.4
White Onion	0	70.21	68.50	69.95	8.70
	50	76.64	65.55	51.47	7.01
	100	43.88	2.90	7.71	7.04
Red Onion	0	75.78	73.26	65.31	6.90
	50	76.29	61.00	51.70	7.28
	100	48.68	16.57	9.80	4.98
1 % L-ascorbic acid		99.68	65.37	55.34	27.88
0.1 % L-ascorbic acid		99.96	99.84	99.80	90.57

<sup>1)</sup>Extraction was performed for one hour at 50°C on mixture composed 1g and 25 mL of ethyl alcohol.

<sup>2)</sup>Means are three replication.

## 다. 생강의 생리활성 성분의 검색

### 1) 전자공여작용

산소가 에너지 획득반응의 말단에서 전자의 수여에 관여함으로써 산소는 1전자 환원된 superoxide를 생성하며 이렇게 생성된 superoxide는 계속 환원되어 H<sub>2</sub>O를 생성한다. 이때 superoxide는 생체의 산화적 장애를 초래한다. 이러한 산화적 free radical을 소거·분해하는 항산화 물질의 검색 전단계로 전자공여작용 조사가 요구된다. 전자공여능 측정은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazl) 라디칼 소거법으로 측정하는데 DPPH는 분자 내 radical을 함유하여 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만들고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며 이때의 DPPH의 고유의 청남색이 옅어지는 특성이 있고 이 색차를 비색 정량하여 전자공여능력을 측정한다. 화학적으로 유도된 radical이지만, lipoxygenase에 의한 지방 산화 반응계에서의 항산화 활성 측정과도 잘 부합한다.

Fig. 20, 21은 한국산, 중국산의 2가지 원산지별 생강의 각 추출용매에 따른 전자공여작용을 나타낸 것이다. 한국산 및 중국산의 전자공여작용은 20~90 % 내외의 활성을 나타내었는데, 특히 물 추출과 용매 추출구간의 큰 차이를 나타냈으며, 에탄올 농도에 따른 영향은 100% 에탄올 추출구가 50% 에탄올 추출구보다 효과가 좋았다. 항산화제의 일종으로 널리 사용되고 있는 L-ascorbic acid와 비교하기 위해 각각 1% 및 0.1%의 수준에서 전자공여능력을 측정한 결과, 각각 97.02% 및 96.75%로 높게 나타났다. 생강의 전자공여능력은 L-ascorbic acid의 공여능력에 비해 미흡하게 나타났으나 어느 정도의 radical 포집 능력이 보이고 있으므로 추출시의 시료량이나, 추출물의 농도를 좀 더 높여준다면 항산화 능력에 대한 이용가능성을 높일 수 있을 것으로 판단되었다. 또한, 한국산 생강이 중국산에 비해 높은 전자공여능을 보여주었다.

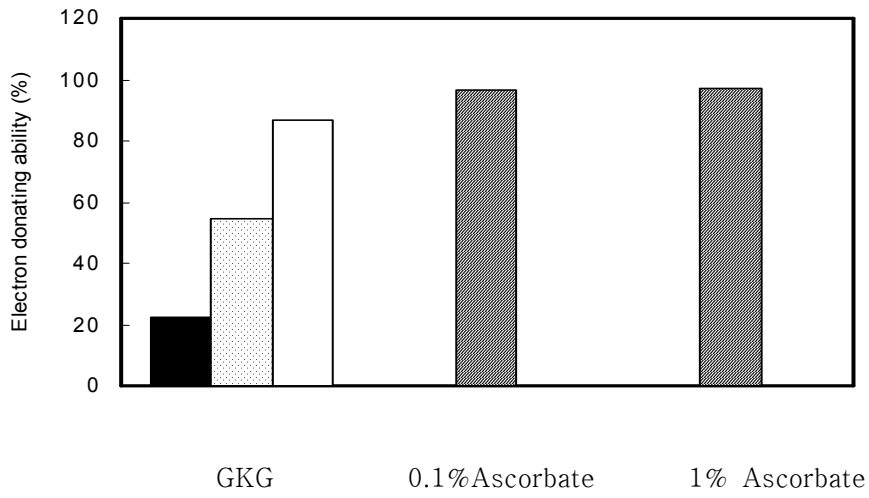


Fig. 20. Electron donating ability(EDA) of ginger of Korea growth (GKG) and extraction solvents. (■:water, ▨:50% Et-OH, □;100% Et-OH)

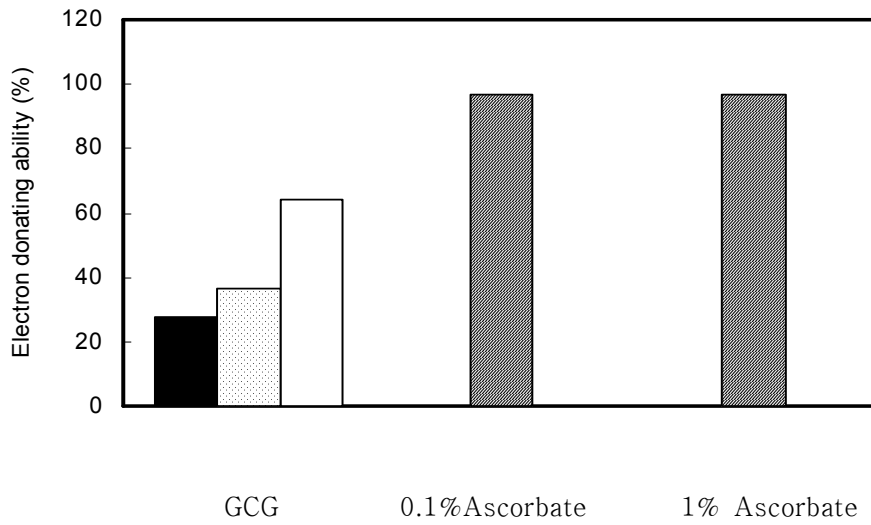


Fig. 21. Electron donating ability(EDA) of ginger of China growth (GCG) and extraction solvents. (■:water, ▨:50% Et-OH, □;100% Et-OH)

추출용매에 의한 영향은 50%와 100% 에탄올 추출구에서 효과적인 반면 물 추출물에서는 효과가 떨어짐을 볼 수 있었다. 즉, 전자공여작용이 높다는 의미는 인체 내에서 장애를 일으키는 활성산소를 소거·제거할 수 있다는 기능이 높다는 뜻이다. 또한 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenol성 물질에 대한 항산화작용의 지표이며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였다.

## 2) Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성

Superoxide dismutase는 생체내 superoxide radical( $O_2^-$ )을 산소로 산화시켜 주는 천연 항산화제로서, 세포내 활성 산소를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매 하는 효소이다. SOD 유사활성 물질은 활성 산소의 시발물질로, superoxide anion의 저해 물질로는 생체내 SOD라는 효소가 있지만, 이의 일종으로 SOD와 작용기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성 물질이라 부른다. 일반적으로 과일, 채소류에는 비타민 C가 다른 식품소재에 비해 풍부하게 함유되어 있으며 비타민 C는 그 자체가 높은 SOD 유사활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

추출용매 및 산지에 따른 생강의 SOD 유사활성을 Fig. 22, 23에 나타내었다. Fig. 22에서 보는 바와 같이, 한국산의 경우 50% 에탄올 추출구에서는 약 30% 활성이 나타났으나 100% 에탄올 추출물에서는 14.02%의 활성을 보여주었다. 이에 반해 1% 및 0.1% L-ascorbic acid의 경우, 각각 98.71%, 43.12%로 매우 큰 활성이 나타나, 보고된 바와 같이 그 자체가 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. SOD 유사활성은 비교 물질인 L-ascorbic acid에 비해서는 낮은 수준이지만 유사활성을 가지는 것으로 판단되었다.

본 실험에 사용된 두 가지 산지의 생강에서 에탄올 용매 추출이 물로 추출할 때보다 SOD 유사활성이 높게 나타나는 것으로 보아 항산화 물질이 에탄올 용매 추출시 더 많이 추출되는 것으로 생각되었다. 여러 가지 식물체를 대상으로 SOD 유사활

성을 측정된 보고에서 에탄올 추출보다 물 추출물이 효과가 크다는 결과가 일반적인 보고이다. 그러나 복분자 딸기의 SOD 유사활성에 대한 보고에서 80% 메탄올, 75% 아세톤 및 열수 등과 같은 추출용매에 따른 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다. 따라서 pyrogallol의 자동산화를 저해하는데 관여하는 물질은 식물체에 따라 추출 양상이나 항산화 활성이 다르며, 본 실험에 사용된 생강의 경우 SOD 유사활성을 나타내는 물질이 50% 에탄올에 의해 추출되는 것으로 판단되었다. SOD 정제 시 열안정이 뛰어나고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하여 이를 SOD와 결합된 phenol류 물질인 것으로 보고한 바 있다.

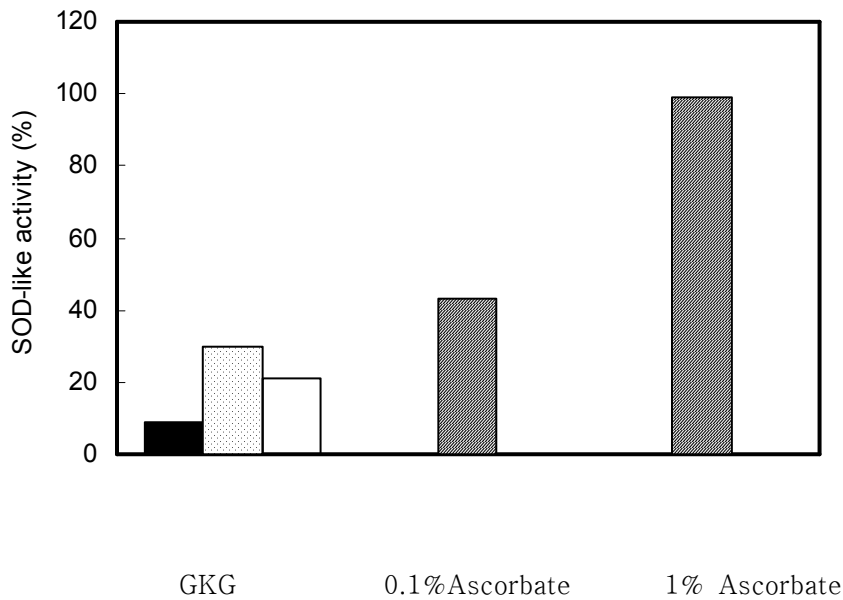


Fig. 22. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of ginger of Korea growth and extraction solvents. (■:water, ▨:50% Et-OH, □:100% Et-OH)

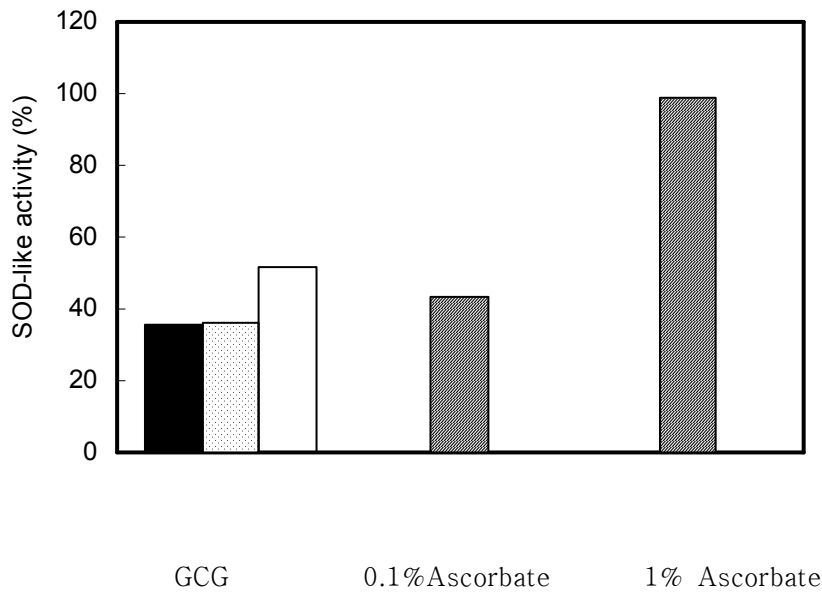


Fig. 23. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of ginger of China growth and extraction solvents. (■:water, ▨:50% Et-OH, □;100% Et-OH)

### 3) Tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase(Dihydroxy-L-phenylalanine oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 넓은 범위의 phenol 화합물을 기질로 이용하여 효소적 갈변화를 일으키는 효소로 폐놀성 물질들이 가공이나 저장 중에 갈변화하는 원인이 된다. 이를 저해함으로써 식품의 색깔뿐만 아니라 향미 및 영양가 등에 직·간접적으로 영향을 준다. Tyrosinase의 저해제로는 인체의 hypepigmentation 치료에 이용되는 4-hydroxyanisole, hydroquinone, 4-hexyresorcinol tropolone, cinnamic acid, bezoic acid, kojic acid 등이 보고되고 있으나, 안전성, 경제성 등에 문제가 있다.

Fig. 24, 25는 한국과 중국의 산지별 생강의 물 추출물과 50%, 100% 에탄올 추출물로 tyrosinase의 catechol에 대한 산화 갈변화 억제 효과를 측정된 결과이다. 한국산 생강의 경우 물 추출물이 중국산 생강의 물 추출 보다 tyrosinase에 대한 저해 작

용이 높게 나타났다. 50% 에탄올 추출물은 각각 40.97%, 39.92%로 40% 정도의 높은 저해효과를 나타내었다. 또, 에탄올 추출의 경우 한국산은 13.37%의 저해효과를 보였고, 한국산 생강의 경우 에탄올 추출물보다 물 추출물이 tyrosinase에 대한 저해 작용 우수한 것으로 나타났다.

비교물질인 1% 및 0.1% L-ascorbic acid 용액은 각각 93.41%, 34.65%의 저해 효과를 나타내었는데, 한국산 생강의 물 추출물의 경우 0.1% L-ascorbic acid보다 우수하고, 1% L-ascorbic acid의 저해 능력에 상응하는 수준으로 나타나 다른 품종에 비해 PPO 등에 의한 효소적 갈변화를 방지하는데 관여하는 phenol물질이 많이 함유한 것으로 판단되었다.

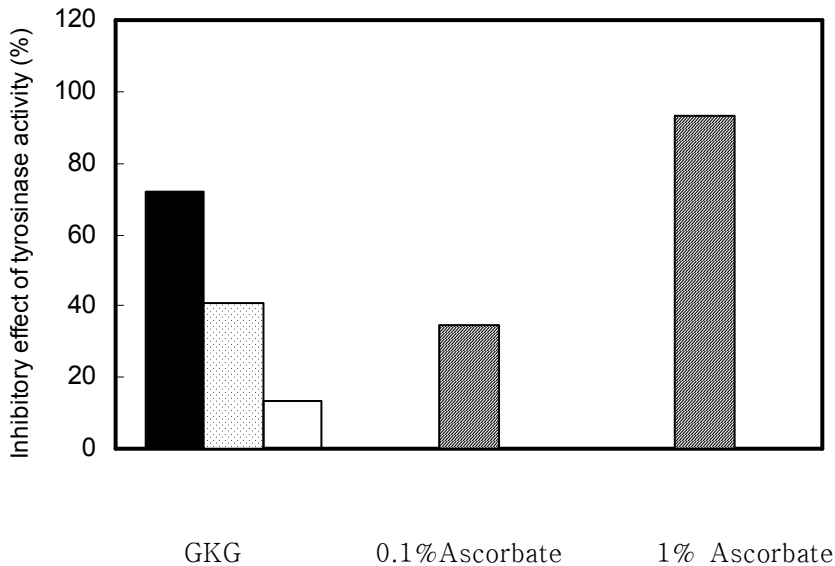


Fig. 24. Tyrosinase inhibition effects(%) of ginger of Korea growth and extraction solvents. (■:water, ▨:50% Et-OH, □;100% Et-OH)



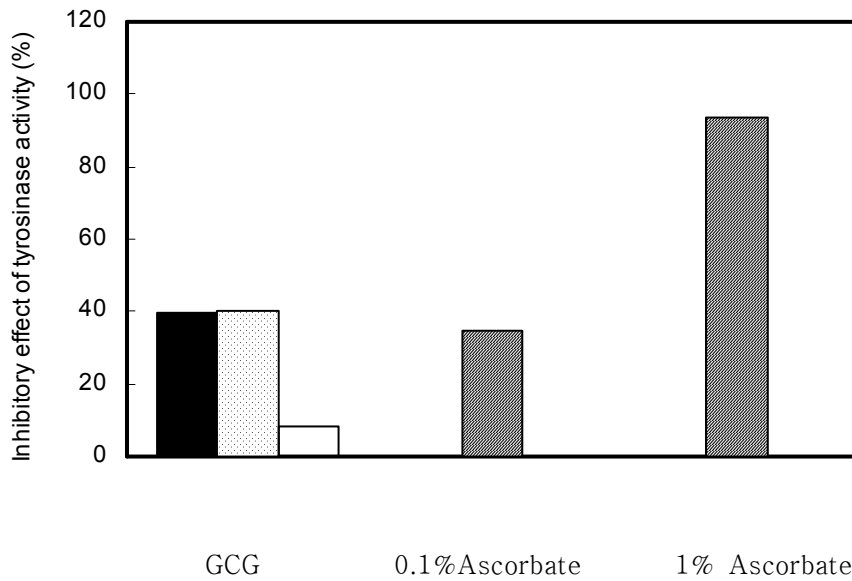


Fig. 25. Tyrosinase inhibition effects(%) of ginger of China growth and extraction solvents. (■:water, ▨:50% Et-OH, □;100% Et-OH)

#### 4) 총 폴리페놀 함량

Fig. 26은 산지별 생강의 물 추출물 및 50%, 100% 에탄올 추출물에 함유된 total polyphenol 함량을 catechin을 기준물질로 하여 측정한 결과이다. 한국산 생강의 에탄올 농도가 0, 50, 100% 일 때 추출된 polyphenol의 함량은 각각 37.69 mg%, 51.53 mg%, 149.08 mg%로 측정되었으며, 중국산 생강의 경우 각각 41.35 mg%, 44.16 mg%, 93.04 mg%로 나타났다. 산지별 생강의 polyphenol 함량은 물 추출물과 용매 추출구간의 함량이 크게 차이가 나타나 추출용매에 따른 영향을 알 수 있었다. 특히 한국산 생강의 경우 에탄올 추출이 높은 polyphenol 함량을 보였으며, 중국산 생강에 비해 polyphenol 함량이 매우 높게 나타났다. 생강은 에탄올 추출물에서의 함량이 물 추출물에 비해 높게 나타나, 한국산 생강의 phenol물질은 물보다는 에탄올에 의해 더 많이 추출되는 것으로 판단되었다.

특히 한국산 생강의 에탄올 추출물이 polyphenol 함량이 높았고, 이와 비례적으로 전자공여작용에서 그 활성이 높아 생리적 기능상 우수한 것으로 판단되었다. 이는 복분자 딸기의 antocyanin 색소를 활성탄에 의해 제거한 것이 제거하지 않은 경우보다 SOD 유사활성이 낮게 나온 것처럼 색소성분이 항산화성과 관련하여 여러 가지 기능적 역할을 하는 것으로 판단된다. 이에 뒷받침하여 품종별 고구마 에탄올 추출물의 항산화 정도를 비교하였을 때 유색 고구마인 자색 고구마와 황색고구마가 다른 품종에 비하여 항산화성이 높은 것으로 보고된 바 있다.

Phenolic compound는 일반적으로 식물체에서 발견되는데, 이들은 항산화 활성을 포함한 다양한 생리적 효과를 가지는 것으로 보고되어 왔다. Phenolic 함량이 풍부한 과일, herb, 채소류, 곡류 등과 같은 식물체의 crude extract는 식품산업에서의 관심이 증대하고 있는데, 이들이 지질의 산화적 분해를 지연시켜 식품의 품질 및 영양가를 향상시키기 때문이다. 항산화성 물질의 근원은 채소, 과일, 잎, oilseed, 곡류, 나무 껍질 및 뿌리, spice류, herb 등과 같은 식물의 여러 형태에서 찾을 수 있다. Phenolic acid, stilbenes, tannins, lignans, lignin 등과 같은 flavonoid와 식물유래 phenol들은 특히 잎과 꽃잎 조직, 줄기나 껍질과 같은 나무 부분에 일반적으로 존재한다. 이들은 식물체에서 성장 발달과 해충과 상처에 대한 방어 역할로 중요하며 flavonoid는 부분적으로 꽃, 열매와 잎에 색을 제공한다. Phenolic 성분들의 항산화적 활성은 주로 산화환원 특성에 의한 것으로 그 자체가 reducing agent, hydrogen donators, singlet oxygen quencher의 역할을 하며 금속이온에 대해 chelation potential을 가지고 있다.

Caffeic, chlorogenic, ferulic, sinapic,  $p$ -coumaric acid 등의 phenolic acid들은  $p$ -hydroxybenzoic, vanillic and syringic acid 등과 같은 benzoic acid의 hydroxy 유도체보다도 항산화활성이 더 높은 것으로 나타나고 있다. 또한  $\alpha$ -tocopherol은 *in vitro* 상에서 chain-breaking antioxidants로 가장 우수한 활성을 보이며, carotenoids 역시 산화적 손상에 대한 보호역할을 가지고 있으며, singlet oxygen은  $\beta$ -carotene에 의해 매우 강하게 억제되는 것으로 알려져 있다.

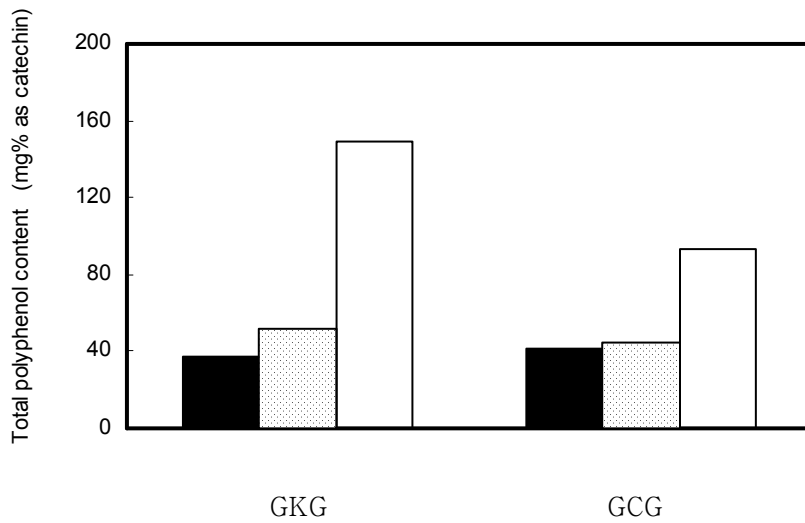


Fig. 26. Total polyphenol contents (mg%) of habitat and extraction solvents. (■:water, ▨:50% Et-OH, □:100% Et-OH)

#### 5) Angiotensin-converting enzyme(ACE) 활성

고혈압은 발생기작에서 renin-angiotensin system이 혈압 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 angiotensin converting enzyme(ACE)는 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I 으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해 시킴으로서 강력한 혈관 수축작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관 수축작용을 가지며, ACE는 또한 혈관 이완작용을 가진 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 작용을 가진다. Angiotensin II가 증가되면 catecholamine 값이 증가되고, 혈관이 수축되며 동시에 항이뇨 호르몬인 aldosterone의 분비가 촉진된다. 이에 따라  $\text{Na}^+$  및 수분배설이 억제되어 순환혈액량이 증가되어 혈압상승을 일으킨다. 따라서 ACE 작용억제는 혈관수축을 막고 체내 수분저류를 막아 혈압을 낮추는 효과를 나타낸다.

한국산과 중국산 생강의 추출용매에 따른 angiotensin I-converting enzyme 저해 작용을 측정한 결과는 Fig. 27과 같다. 생강의 물 추출물의 활성이 한국산과 중국산 각각 86.3%, 83.16%로 에탄올 추출물보다 angiotensin 전환 효소에 대한 저해작용이 우수하였다. 즉, Angiotensin I-converting enzyme 저해작용에 관여하는 생강의 기능성 물질은 용매에 의해서라기보다 물에서 더 많이 추출되는 것으로 생각되었다.

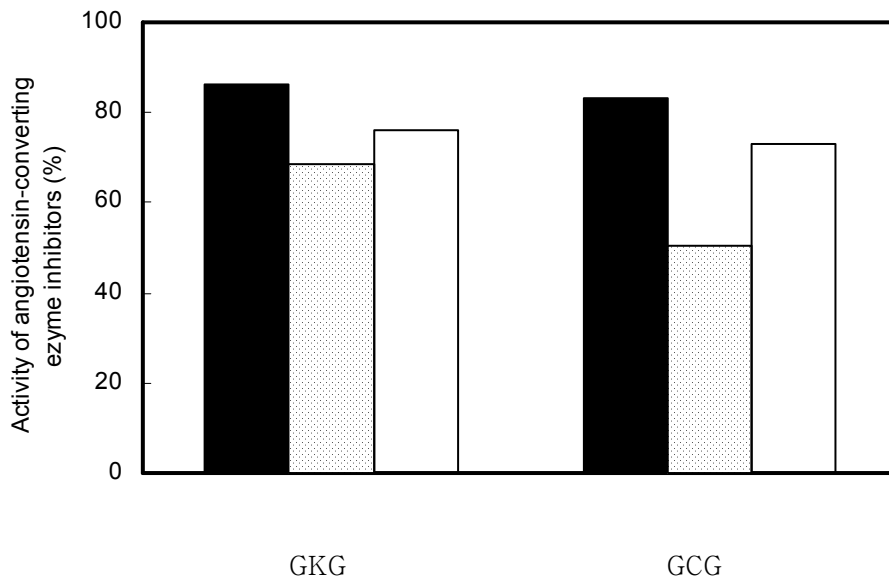


Fig. 27. Angiotensin I converting enzyme(ACE) inhibition effects(%) of habitat and extraction solvents. (■:water, ▨:50% Et-OH, □:100% Et-OH.)

현재까지 captopril, enalapril과 같은 화학합성 ACE 저해제가 널리 상용되고 있지만, 높은 역가에 비해 각종 부작용이 많아 안전성 측면에서 가치가 더 높은 천연물질에 대한 탐색과 개발에 대한 더 많은 연구가 필요하다. 일반적으로 콩 단백질 유래 peptide 물질이 혈압강하의 효과가 있는 것으로 많이 보고되고 있으며, 그 밖에 flavonoid, 탄닌류, 해조류, 장류 등에서 그 효과를 시험한 바 있다. 또한 본태성 고혈

압 쥐(spontaneously hypertensive rat)에 호박씨 투여시 혈압 강하 효과가 보고되어 있으며, 귤과피에서 분리한 플라보노이드에 대하여 천연 ACE 저해제로서의 가능성이 제시되고 있다.

#### 6) 아질산염 소거작용

발암에 관련된 물질로 알려진 nitrite는 독성을 가지고 있고, nitrate도 체내, 체외에서 효소작용에 의해 nitrite로 환원되기 때문에 일정 농도 이상 섭취할 경우, 식품내의 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하고, 또한 혈액 중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 methemoglobin증 등을 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 아질산염을 소거·제거하여 그에 동반되는 질병을 억제할 수 있는 천연물 검색에 대한 연구가 필요하다. Ascorbate와 같은 환원물질이 아질산염과 반응하면 nitrosamine의 생성을 저해할 수 있으며, Gray등은 phenolic 화합물인 tannic acid 유도체를 식품 보존료 및 N-nitrosamine 형성 저해제로 사용하였다. 또한 야채류나 향신료 등의 추출물이 nitrite를 제거하여 그 위험성을 저하시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 알려져 있다.

산지별 생강 추출물의 아질산염 소거작용은 Table 13과 같다. 각 산지에서 아질산염 소거능력은 추출용매에 따른 차이를 보였으며, pH의 증가에 따라 감소하여 pH에 대해 의존적임을 알 수 있었다. 한국산 생강의 경우 모든 pH에서 에탄올 추출물은 물 추출물에 비해 그 활성이 다소 높게 나타났다. pH 1.2 조건에서는 70% 내외로 비교물질로 사용된 0.1% 및 1% L-ascorbic acid 용액의 활성과 동등한 수준으로 나타났다. 위장 내의 낮은 pH조건에서 nitrosamine이 쉽게 형성되므로 낮은 pH에서 아질산염 소거작용이 큰 것은 nitrosamine형성을 효과적으로 억제하는데 능력이 있음을 의미한다.

각종 phenolic 화합물은 산성조건에서 N-nitrosopholine 형성, 즉 nitroso화 반응을 강력하게 억제하며, dihydrophenol류가 nitrous acid에 의해 quinone으로 산화되고 nitrous acid는 무해한 nitric oxide로 변화된다. 따라서 이러한 phenolic 화합물은 amine류와 반응할 수 있는 nitrite를 nitrite oxide로 변환시키며, phenolic 화합물 또

한 nitrosating agent에 의해 자신이 산화되어 quinone으로 산화되는 항산화제로 작용하게 되므로 결과적으로 phenol 가운데 free hydroxy group의 수는 중요하게 되며 이러한 phenol성 화합물의 촉매작용 기작은 C-nitrosate 후 quinone monoxine tautomer로 되어 N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>와 반응하여 N-nitrosating agent를 생성한다. Phenol성 물질 중 caffeic acid, ferulic acid, catechol등이 아질산과 반응하여 nitrosamine의 생성을 억제한다고 보고된 바 있다.

Table 13. Nitrite scavenging ability of ginger for extract condition

unit : % (raw material)

Habitat	Et-OH conc.(%)	Nitrite scavenging ability (%)			
		pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.0
Korea	0	41.97	30.52	21.62	18.83
	50	84.01	79.88	66.31	24.75
	100	77.82	85.53	54.19	17.11
China	0	89.91	49.95	18.47	13.44
	50	85.79	80.79	64.04	22.78
	100	83.74	78.62	64.86	25.55
0.1 % L-ascorbic acid		87.03	71.33	54.69	56.85
1 % L-ascorbic acid		99.99	99.94	99.74	96.94

\*Means are three replication.

## 2. 채소류의 최적 추출조건 설정, 추출공정별 채소류 추출물의 특성 및 *in vivo* 에서 채소류의 지질 감소효과

### 가. 채소류의 최적 추출조건 설정

본 실험에서는 반응표면 분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 추출물의 이화학적 특성을 모니터링 하였다. 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획을 사용하였으며, SAS(statistical analysis system) program을 사용하여 회귀분석에 사용하였다. 실험계획은 Table 8과 같이 시료(건조시료 2.5 g)에 대한 에너지용량별(30, 60, 90, 120, 150 w), 에탄올 농도별(0, 25, 50, 75, 100 %), 추출시간별(1, 3, 5, 7, 9 분)을 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화 하였다. Table 8에 나타난 독립변수( $X_i$ )는 중심합성계획에 따라 Table 9와 같이 16구간으로 설정하여 추출실험을 실시하였다. 또한 이들 독립변수에 영향을 받는 종속변수( $Y_i$ )는 수율, 총 폴리페놀 함량, 전자공여능, tyrosinase 저해효과, 아질산염 소거능과 SOD 유사활성으로 하였으며, 각 조건별 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 중심합성계획에 의한 16구간의 추출조건에 따라 추출실험을 실시하여 얻어진 결과는 Table 14에 나타내었다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면 회귀분석을 실시하고 각 반응변수에 대한 회귀식을 얻어 Table 15에 나타내었다. 또한 변수에 대한 추출조건의 영향과 최적 추출조건과 품질 특성값을 예측하여 Table 16, 17에 나타내었으며, 이들의 4차원 반응표면은 시료에 대한 에너지 용량과 에탄올농도 및 추출시간을 독립변수로 하여 Fig. 28~33에 각각 나타내었다. 최적 추출조건은 반응변수인 추출물의 특성 즉, 수율, 총 폴리페놀 함량, 전자공여능, tyrosinase 저해효과, 아질산염 소거능의 4차원 반응표면을 superimposing하여 중복되는 부분의 범위로 예측하여 Fig. 34 및 Table 16, 17에 나타내었다. 또한 예측된 범위에서 임의의 점을 설정한 후 회귀식에 대입하여 최적값들을 예측한 결과를 Table 19에 나타내었다.

## 1) 마늘의 최적추출조건 설정

### 가) 마늘의 최적 추출조건 설정

마늘의 경우, 중심합성계획에 의한 추출조건별 결과는 Table 14에 나타내었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 15에 나타내었다. 수율에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.9271이고 1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 실시한 결과, 수율의 최대값은 26.41%이었고, 이때의 요인변수들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 146.2w, 에탄올 농도 63.31% 및 추출시간 5.8분이었다(Table 16). 수율에 대한 반응표면은 Fig. 28에서와 같이 에탄올 농도비가 낮아질수록 증가되는 경향을 나타내었다. 수율에 대한 추출조건의 영향은 Table 17에서와 같이 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있었으며, 그 다음으로 에너지 용량이었다. 그러나 추출시간에 대해서는 영향을 적게 받는 것으로 나타났다. 총 폴리페놀 함량에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8449로 10% 이내의 유의성이 인정되었으며, 예측된 정상점은 안장점으로 최대 폴리페놀함량은 61.56%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 112.43w, 에탄올 농도 5.75% 및 추출시간 6.11분으로 Table 16과 같이 나타났으며, 총 폴리페놀 함량에 대한 반응표면은 Fig. 29에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량에 대한 추출조건의 영향은 Table 17에서와 같이 에너지 용량에 가장 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 그 다음은 추출시간에 영향을 받았다. 그러나 에탄올 농도에는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 전자공여능에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8999로 5% 이내에서 유의성이 인정되었으며, 예측된 정상점은 안장점으로 나타났으며 능선분석을 실시한 결과 전자공여능의 최대값은 72.86%로 나타났으며, 이때의 추출조건은 에너지 용량 114.84w, 에탄올 농도 58.51% 및 추출시간 1.42분이었다(Table 16). Fig. 30에서 보는 것과 같이 에탄올농도가 증가할수록 전자공여능이 증가되었다. 전자공여능에 대한 추출조건의 영향은 Table 17에서 보는 것과 같이 에탄올 농도에 가장 크게 영향을 받았고 추출 시간에도 적은 영향을 받았다. 그러나 에너지 용량에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Tyrosinase 저해효과에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8281로 10% 이내의 유의수준에서 유



의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 tyrosinase 저해효과는 42.98%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 149.11w, 에탄올 농도 58.1% 및 추출시간 5.06분으로 Table 16과 같이 나타났으며, tyrosinase 저해효과에 대한 반응표면은 Fig. 31에 나타내었다. Fig. 31에서 보는 바와 같이 tyrosinase 저해 효과는 추출 시간과 에탄올 농도에 가장 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 그러나 에너지 용량에 대해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. pH 1.2에 따른 아질산염 소거능에 대한 추출물의 회귀식의  $R^2$ 는 0.9614로 유의성이 1% 이내의 유의수준에서 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 실시하여 본 결과 최대값은 94.62%로 나타났다. 이때의 추출조건은 Table 16에서와 같이 시료에 대한 에너지 용량 81.83w, 에탄올 농도 2.65% 및 추출시간 3.83분이었다. 아질산염 소거능에 대한 반응표면은 Fig. 32에 나타내었다. 추출조건의 영향을 Table 17에서 보는 바와 같이 에너지 용량과 추출시간에 가장 큰 영향을 받았고 에탄올 농도에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. SOD 유사활성에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8551이고 10% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 실시한 결과, SOD 유사활성의 최대값은 49.12%이었고, 이때의 요인변수들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 34.23w, 에탄올 농도 33.11% 및 추출시간 4.40분이었다(Table 16). SOD 유사활성에 대한 반응표면은 Fig. 33에 나타내었다. SOD 유사활성에 대한 추출조건의 영향은 Table 17에서와 같이 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있었다. 그러나 에너지용량과 추출시간에 대해서는 영향을 적게 받는 것으로 나타났다.

Table 14. Experimental data on yield, polyphenol, electron donating ability, tyrosinase inhibition, nitrite-scavenging ability and superoxide dismutase(SOD)-like activity of garlic by central composite design for response surface analysis

No. <sup>1)</sup>	Yield	Polyphenol content	Electron donating ability	Tyrosinase inhibition	Nitrite-scavenging ability			SOD-like activity
					pH 1.0	pH 3.0	pH 4.2	
1	14.95	32.99	25.65	38.12	88.34	55.33	21.22	40.25
2	13.25	48.30	33.60	33.73	85.72	56.23	19.00	36.82
3	14.50	38.06	42.44	29.37	60.30	51.29	11.23	32.12
4	15.75	56.29	51.87	22.81	63.28	60.44	13.40	28.09
5	17.05	50.38	37.63	39.96	88.52	55.45	24.55	29.49
6	15.85	59.17	13.20	37.74	83.91	45.22	22.14	34.48
7	20.35	47.70	55.81	38.34	66.71	58.35	15.33	33.21
8	22.45	45.03	22.99	36.35	64.88	60.01	12.34	30.71
9	21.05	45.01	53.91	40.11	70.67	55.62	20.22	40.64
10	22.85	48.22	57.20	38.83	74.34	50.81	20.78	42.45
11	20.95	37.21	46.29	41.49	73.45	56.35	20.67	49.99
12	25.00	40.45	34.57	38.38	72.01	54.45	19.82	38.34
13	4.33	58.32	12.12	35.33	89.43	50.38	26.12	35.83
14	14.60	43.09	40.11	28.06	56.29	48.94	9.57	25.49
15	19.35	40.34	69.27	29.12	77.12	58.04	18.02	33.99
16	21.70	50.99	46.24	25.85	74.52	55.93	19.06	30.12

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by central composite design

Table 15. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of garlic

Response	Second order polynomial equations <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>	Significance
Yield	$Y_Y = 10.005 - 0.077917X_1 - 0.38475X_2 + 0.017188X_3 + 0.000285X_1^2 + 0.001308X_1X_2 - 0.004994X_2^2 + 0.002812X_1X_3 + 0.015625X_2X_3 - 0.089063X_3^2$	0.9271	0.0086
Polyphenol content	$Y_{PC} = -23.56375 + 0.992875X_1 - 0.0942X_2 + 8.7075X_3 - 0.002163X_1^2 - 0.00498X_1X_2 + 0.005636X_2^2 - 0.057125X_1X_3 - 0.02135X_2X_3 - 0.059375X_3^2$	0.8449	0.0652
Electron donating ability	$Y_{EDA} = -81.430938 + 1.494042X_1 + 1.66785X_2 + 10.796563X_3 - 0.004201X_1^2 - 0.001182X_1X_2 - 0.011776X_2^2 - 0.155479X_1X_3 - 0.017275X_2X_3 + 0.1375X_3^2$	0.8999	0.0205
Tyrosinase inhibition	$Y_{TI} = 35.612187 - 0.186167X_1 - 0.0132X_2 + 5.79125X_3 + 0.000129X_1^2 + 0.002777X_1X_2 - 0.003066X_2^2 + 0.014042X_1X_3 - 0.00485X_2X_3 - 0.749063X_3^2$	0.8281	0.0846
pH 1.0	$Y_{PH1} = 106.309062 - 0.013458X_1 - 0.65755X_2 - 2.196875X_3 + 0.0000625X_1^2 + 0.001607X_1X_2 + 0.000142X_2^2 - 0.014167X_1X_3 + 0.02095X_2X_3 + 0.207187X_3^2$	0.9614	0.0014
Nitrite scavenging ability 3.0	$Y_{PH3} = 69.5425 - 0.078083X_1 - 0.3349X_2 - 1.468125X_3 + 0.000607X_1^2 + 0.00292X_1X_2 - 0.001422X_2^2 - 0.038792X_1X_3 + 0.05035X_2X_3 + 0.235625X_3^2$	0.8060	0.1138
pH 4.2	$Y_{PH4} = 15.587187 + 0.113333X_1 - 0.05925X_2 + 1.646563X_3 - 0.000070833X_1^2 - 0.000572X_1X_2 - 0.001062X_2^2 - 0.011146X_1X_3 + 0.009525X_2X_3 - 0.1225X_3^2$	0.9141	0.0135
SOD-like activity	$Y_{SOD} = 40.377812 - 0.2345X_1 + 0.1904X_2 + 4.992188X_3 + 0.000728X_1^2 + 0.001135X_1X_2 - 0.004354X_2^2 - 0.000104X_1X_3 + 0.004775X_2X_3 - 0.593125X_3^2$	0.8551	0.0548

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub> : microwave power (%)

X<sub>2</sub> : ethanol concentration (watt)

X<sub>3</sub> : extraction time (min)

Table 16. Predicted levels of extraction condition for the maximum responses of variables by the ridge analysis in garlic

Responses	$X_1^{1)}$	$X_2^{2)}$	$X_3^{3)}$	Maximum	Morphology
Yield(%)	146.29	63.31	5.88	26.41	Saddle point
Polyphenol content(%)	112.43	5.75	6.11	61.56	Saddle point
Electron donating ability(%)	114.84	58.83	1.42	72.86	Saddle point
Tyrosinase inhibition(%)	149.11	58.51	5.06	42.98	Saddle point
Nitrite-scavenging ability(%) pH 1.2	81.83	2.65	3.83	94.62	Saddle point
SOD-like activity(%)	34.23	33.11	4.40	49.12	Saddle point

<sup>1)</sup> Microwave power(watt)

<sup>2)</sup> Ethanol concentration(%)

<sup>3)</sup> Extraction Time(min)

Table 17. Regression analysis for regression model of physiochemical properties in extraction condition of garlic

Extraction conditions	F-Ratio					
	Yield	Polyphenol content	Electron donating ability	Tyrosinase inhibition	Nitrite-scavenging ability (pH 1.2)	SOD-like activity
Microwave power (watt)	2.64	3.73*	4.13*	1.26	0.43	2.17
Ethanol concentration (%)	12.57***	2.34	6.80**	3.21	36.70***	4.48*
Extraction Time (min)	0.47	3.74*	4.51**	3.16	0.784	2.16

\*Significant at 10% level ; \*\*significant at 5% level ; \*\*\*significant at 1% level

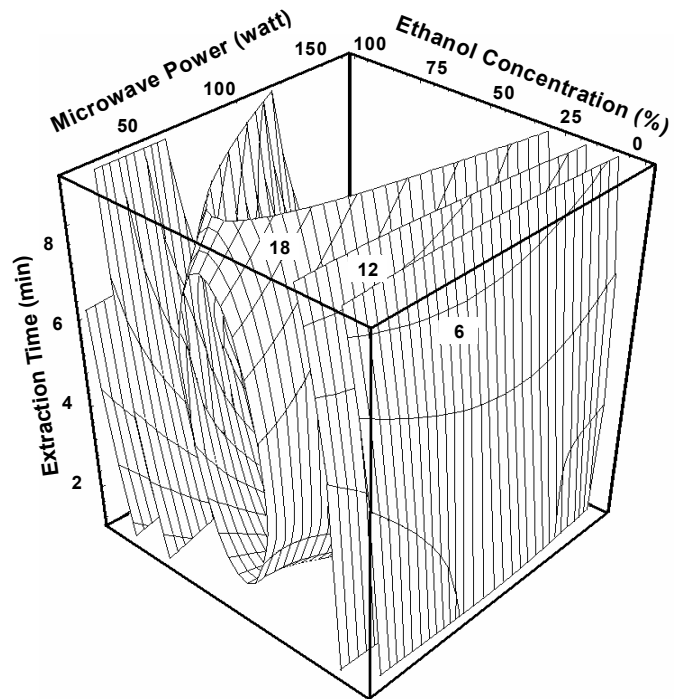


Fig. 28. Response surface for yield in garlic extract at constant values (yield: 6–12–18%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power

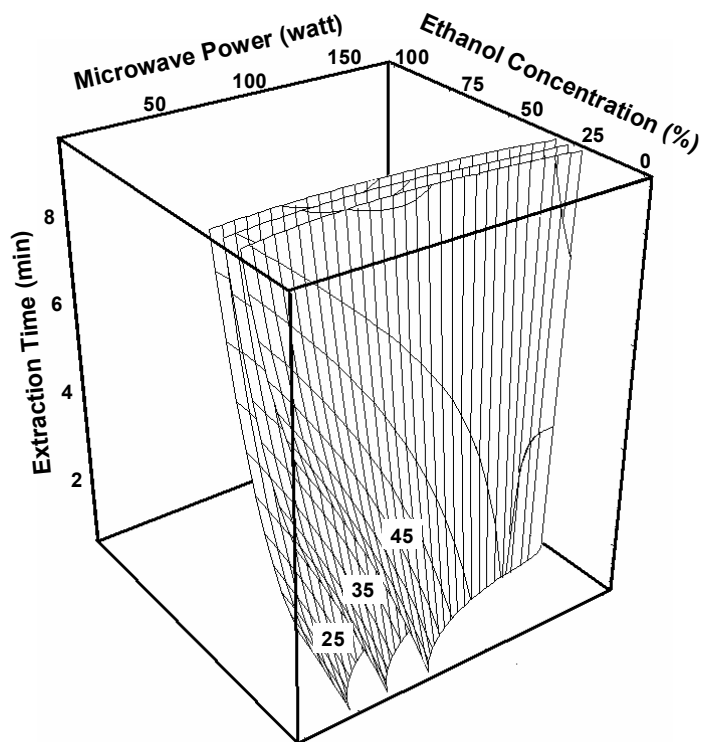


Fig. 29. Response surface for polyphenol content in garlic extract at constant values (electron donating ability: 25–35–45%) as a function ethanol concentration, extraction time and microwave power

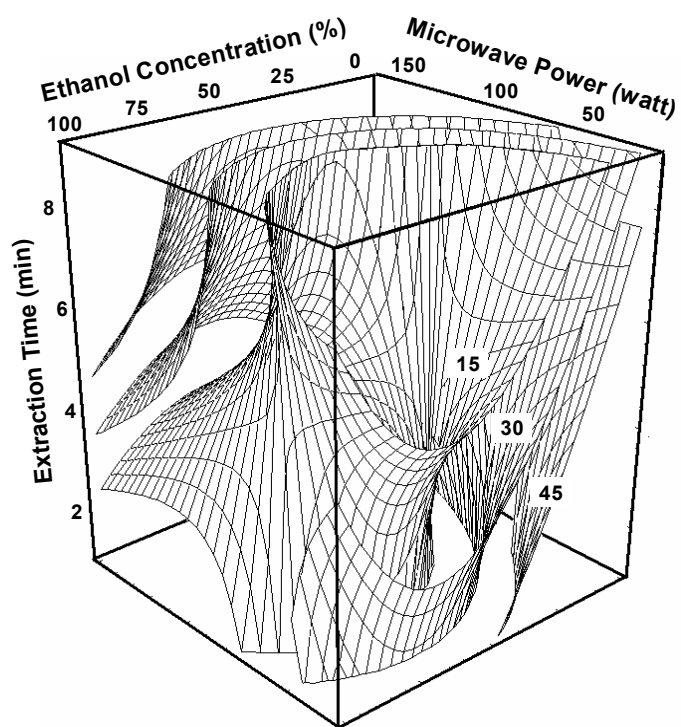


Fig. 30. Response surface for electron donating ability in garlic extract at constant values (electron donating ability: 15–30–45%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power



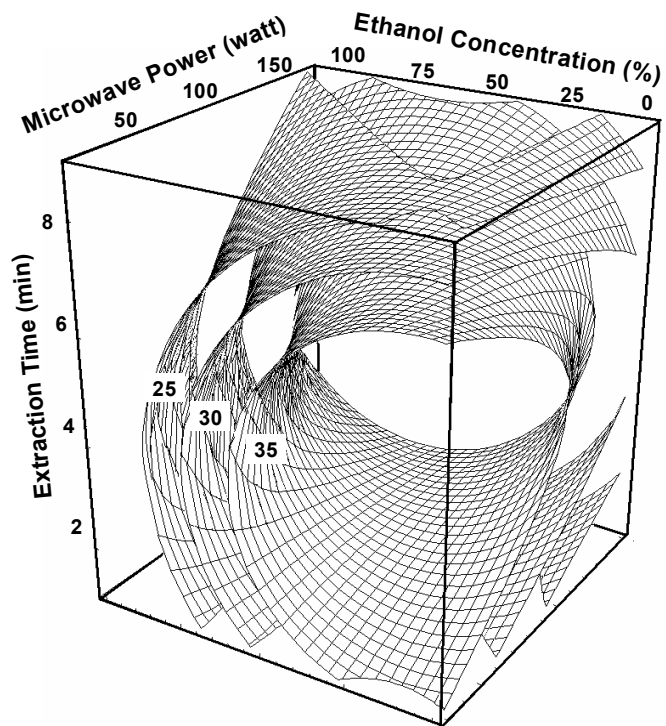


Fig. 31. Response surface for tyrosinase inhibition in garlic extract at constant values (tyrosinase inhibition: 25–30–35%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power

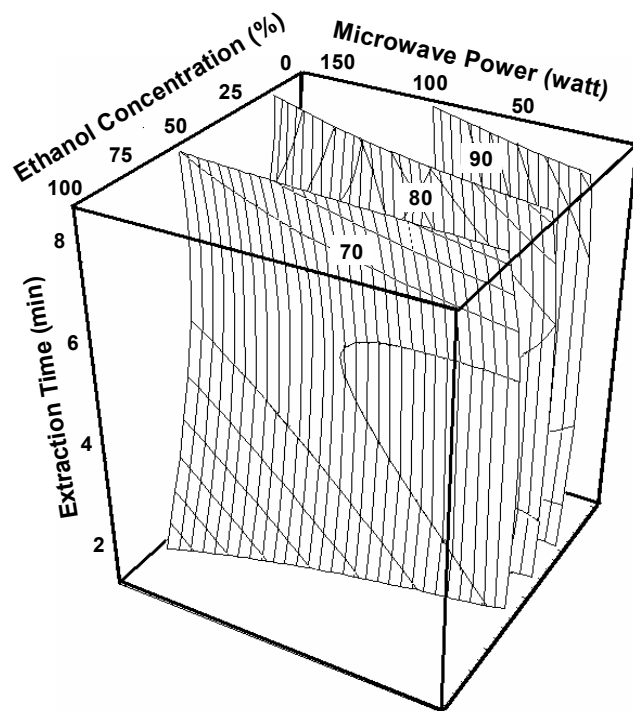


Fig. 32. Response surface for nitrite-scavenging ability (pH 1.0) in garlic extract at constant values (nitrite-scavenging ability, pH 1.0: 70–80–90%) as a function ethanol concentration, extraction time and microwave power

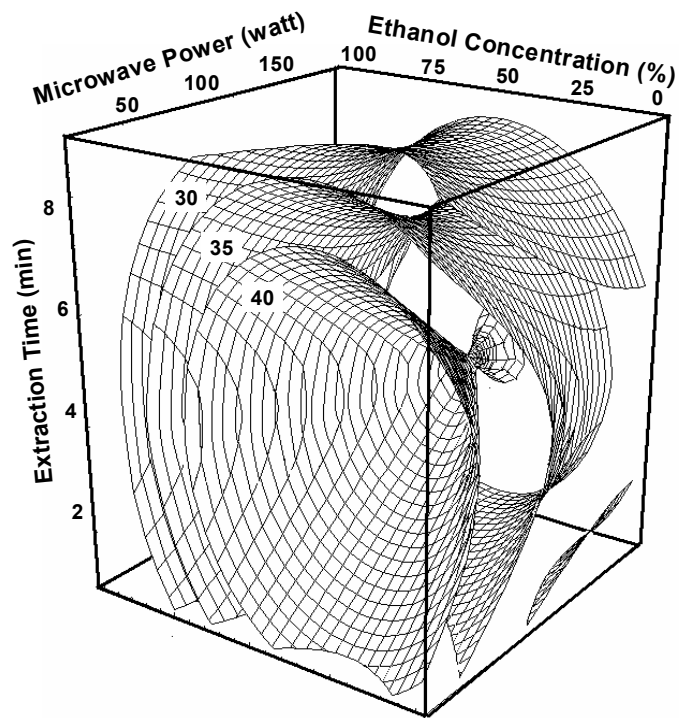


Fig. 33. Response surface for SOD-like activity in garlic extract at constant values (SOD-like activity: 30–35–40%) as a function ethanol concentration, extraction time and microwave power

나) 마늘의 추출공정 최적화 시험

마늘에서 기능성분을 최대화하는 추출조건을 설정하기 위해 조건별 추출물의 수율, 전자공여능, 총 폴리페놀 함량, tyrosinase 저해효과, 아질산염 소거능과 SOD 유사활성에 대한 4차원 반응표면을 superimposing하여 최적 추출조건 범위를 예측하여 Fig. 34에 어두운 부분으로 나타내었다. 마늘의 수율, 전자공여능, 총 폴리페놀 함량, tyrosinase 저해효과, 아질산염 소거능과 SOD유사활성이 일치하는 범위는 시료 2.5g에 대한 에너지 용량 0~100w, 에탄올 농도 40~70% 및 추출시간 2~8분 (Table 18)으로 나타났으며, 최적 추출조건에 의한 반응변수의 4차원 반응표면을 superimposing하여 중복되는 부분을 예측한 결과는 Fig. 34와 같이 나타났다. 마찬가지로 이와 같은 예측결과에 의한 최적조건을 확인하기 위하여 예측된 최적조건 범위 내에서 임의의 조건을 Table 18과 같이 결정하였다.

Table 18. Optimum extraction condition for maximum responses of yield, electron donating ability(EDA), total polyphenol content, tyrosinase inhibitory effect, nitrite-scavenging effect, and SOD-like activity of garlic by superimposing their contour maps

Extraction condition	Range of optimum condition	Optimum condition
Microwave power(watt)	0~100	50
Ethanol concentration(%)	40~70	55
Extraction Time(min)	2~8	5

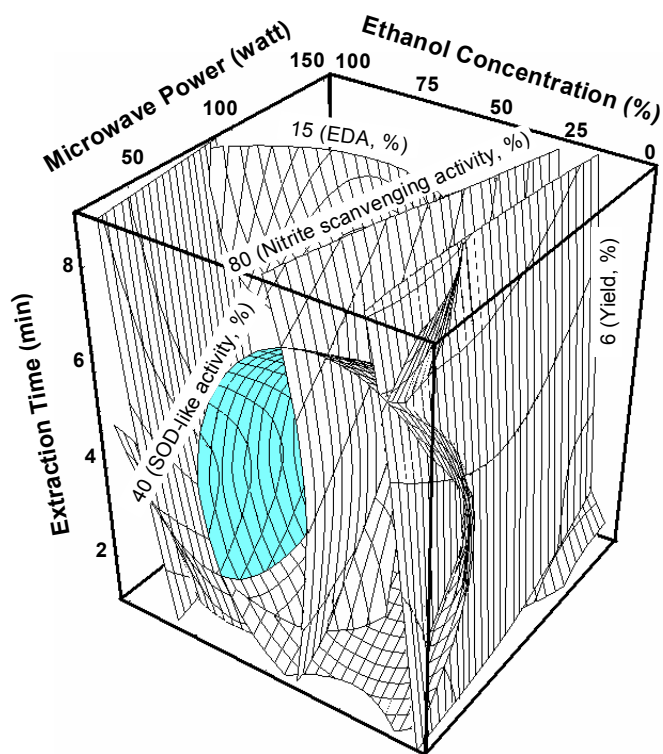


Fig. 34. Superimposed response surface for optimization of yield (6%), electron donating ability (15%), nitrite-scavenging ability (pH 1.2, 80%), and SOD-like activity (40%) of extract from garlic.

다) 예측조건의 실증

각 성분들의 반응표면이 중복된 부분의 범위 가운데서 임의 조건을 설정하여 각각 회귀식에 대입하여 예측값을 구하였다. 그리고 동일 조건에서 실제로 실험하여 얻은 실험치와 비교함으로써 회귀식의 신뢰성을 검증하였다. 이때 임의의 조건으로는 Table 18에 나타난 것과 같이 에너지 용량 50w, 에탄올 농도 55%, 추출시간 5분으로 설정하여 회귀식에 대입한 결과는 수율 22.99%, 폴리페놀 함량 40.74%, 전자공여능 49.72%, tyrosinase 저해작용 36.66%, pH 1.2에 있어서의 아질산염 소거능 70.73%와 SOD 유사활성은 41.31%를 얻었다. 임의의 조건과 동일한 조건으로 실험하여 얻은 값은 수율 23.74%, 폴리페놀 함량 42.30%, 전자공여능 49.80%, tyrosinase 저해작용 33.15%, pH 1.2에 있어서의 아질산염소거능 72.34%, SOD 유사활성은 42.52%의 값을 얻었다 (Table 19). 그래서 RSM기법에 의해 예측된 값과 동일조건에서 실제 실험하여 얻은 실험치를 비교했을 때 예측 범위와 유사한 값을 가지거나 조금 높은 값 또는 낮은 값을 나타내어 도출된 회귀식의 신뢰성을 검증할 수 있었다.

Table 19. Comparing between predicted and observed values of response variable for ethanol extracts from garlic at the given condition within the range of optimum condition

Response variable	Predicted values <sup>a)</sup>	Experimental values <sup>b)</sup>
Yield	22.99	23.74
Total polyphenol content	40.74	42.30
Electron donating ability	49.72	49.80
Tyrosinase inhibitory effect	36.66	33.15
Nitrite scavenging activity	70.73	72.34
SOD-like activity	41.31	42.52

<sup>a)</sup> Calculated using the predicted equations for response variables. Given conditions of independent variables: Microwave power 50 watt, Ethanol concentration 55%, and Extraction time 5 min.

<sup>b)</sup> Mean values of triplicate determinations.

## 2) 양파의 최적 추출조건 설정

### 가) 양파의 최적 추출조건 설정

양파의 경우, 중심합성계획에 의한 추출조건별 결과는 Table 20에 나타내었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 21에 나타내었다. 수율에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8835이고 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선 분석을 실시한 결과, 수율의 최대값은 44.02%이었고, 이때의 요인변수들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 143.13w, 에탄올 농도 61.77% 및 추출시간 3.39분이었다(Table 22). 수율에 대한 반응표면은 Fig. 35에 나타내었다. 수율에 대한 추출조건의 영향은 Table 23에서와 같이 에너지 용량과 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있었다. 그러나 추출시간에 대해서는 영향을 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 총 폴리페놀 함량에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.4007로 유의성이 인정되지 않았다. 전자공여능에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8759로 5% 이내에서 유의성이 인정되었으며, 예측된 정상점은 안장점으로 나타났으며 능선분석을 실시한 결과 전자공여능의 최대값은 45.85%로 나타났으며, 이때의 추출조건은 에너지 용량 143.55w, 에탄올 농도 27.52% 및 추출시간 4.86분이었다(Table 22). Fig. 36에서 보는 것과 같이 에너지용량이 증가할수록 전자공여능이 증가되었다. 전자공여능에 대한 추출조건의 영향은 Table 23에서 보는 것과 같이 에탄올 농도에 가장 크게 영향을 받았으나 에너지 용량과 추출 시간에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Tyrosinase 저해 효과에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8067로 15% 이내의 유의 수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 tyrosinase 저해 효과는 65.40%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 132.49w, 에탄올 농도 36.47% 및 추출시간 7.62분으로 Table 22와 같이 나타났으며, tyrosinase 저해 효과에 대한 반응표면은 Fig. 37에 나타내었다. Fig. 37에서 보는 바와 같이 tyrosinase 저해 효과는 에탄올농도에 가장 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 에너지 용량과 추출 시간에 대해서는 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. pH 1.2에 따른 아질산염 소거능에 대한 추출물의 회귀식의  $R^2$ 는 0.8858로 유의성이 5% 이내의 유의 수준에서

인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선 분석을 실시하여 본 결과 최대값은 81.23%로 나타났다. 이때의 추출 조건은 Table 22에서와 같이 시료에 대한 에너지 용량 109.09w, 에탄올 농도 31.91% 및 추출시간 1.49분이었다. 아질산염 소거능에 대한 반응 표면은 Fig. 38에 나타내었다. 추출 조건의 영향을 Table 23에서 보는 바와 같이 에너지 용량과 추출시간에 가장 큰 영향을 받았고 에탄올 농도에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. SOD 유사활성에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8926이고 5% 이내의 유의 수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선 분석을 실시한 결과, SOD 유사활성의 최대값은 69.84%이었고, 이때의 요인변수들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 99.41w, 에탄올 농도 8.47% 및 추출시간 7.13분이었다 (Table 22). SOD 유사활성에 대한 반응표면은 Fig. 39에 나타내었다. SOD 유사활성에 대한 추출조건의 영향은 Table 23에서와 같이 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있었다. 그러나 에너지 용량과 추출 시간에 대해서는 영향을 적게 받는 것으로 나타났다.



Table 20. Experimental data on yield, polyphenol, electron donating ability, tyrosinase inhibition, nitrite-scavenging ability and superoxide dismutase(SOD)-like activity of onion by central composite design for response surface analysis

No. <sup>1)</sup>	Yield	Polyphenol content	Electron donating ability	Tyrosinase inhibition	Nitrite-scavenging ability			SOD-like activity
					pH 1.0	pH 3.0	pH 4.2	
1	24.45	42.60	38.01	54.75	57.00	65.34	8.13	55.85
2	30.05	47.42	40.57	50.32	58.32	66.72	6.21	58.25
3	13.00	49.55	12.82	40.38	50.44	10.98	7.91	22.57
4	22.00	50.70	15.36	41.65	52.25	12.88	6.32	25.93
5	24.50	44.21	43.82	57.32	75.22	43.69	7.31	60.95
6	21.50	43.25	44.00	59.22	70.35	44.59	6.92	65.35
7	37.00	48.21	21.90	45.45	59.32	20.03	7.00	30.88
8	22.50	40.33	22.53	48.64	55.99	28.33	6.34	32.59
9	21.50	64.08	40.46	51.58	55.39	65.07	9.05	49.49
10	21.00	64.44	41.22	51.93	56.36	63.28	9.05	50.02
11	36.55	63.88	39.67	59.84	60.02	66.34	8.91	55.76
12	37.59	70.05	43.60	62.25	56.71	60.32	9.21	54.48
13	19.50	46.66	40.34	60.35	70.78	70.67	10.22	67.83
14	11.53	44.05	9.78	38.55	38.34	3.99	7.00	21.79
15	24.50	61.35	37.55	60.21	77.45	65.30	7.32	56.92
16	26.00	64.54	41.69	65.32	75.32	66.32	7.09	60.39

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by central composite design

Table 21. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of onion

Response	Second order polynomial equations <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>	Significance
Yield	$Y_Y = 26.405 - 0.443958X_1 - 0.0192X_2 + 7.659375X_3 + 0.003006X_1^2 + 0.0055X_1X_2 - 0.004294X_2^2 - 0.066875X_1X_3 - 0.02025X_2X_3 - 0.0625X_3^2$	0.8835	0.0309
Polyphenol content	$Y_{PC} = 18.555625 + 0.070417X_1 + 1.041050X_2 + 3.625937X_3 + 0.000751X_1^2 - 0.002358X_1X_2 - 0.007562X_2^2 - 0.020438X_1X_3 - 0.013975X_2X_3 - 0.082187X_3^2$	0.4007	0.8671
Electron donating ability	$Y_{EDA} = 33.884062 + 0.016X_1 + 0.1334X_2 + 1.956563X_3 + 0.000221X_1^2 + 0.001168X_1X_2 - 0.006312X_2^2 - 0.008938X_1X_3 + 0.001075X_2X_3 - 0.07625X_3^2$	0.8759	0.0365
Tyrosinase inhibition	$Y_{TI} = 100.754688 - 0.496292X_1 - 0.22675X_2 - 8.922188X_3 + 0.002581X_1^2 + 0.000098333X_1X_2 - 0.000922X_2^2 + 0.017188X_1X_3 + 0.017475X_2X_3 + 0.688125X_3^2$	0.8067	0.1129
Nitrite-scaven- ging 1.0 ability	$Y_{PHI} = 77.048437 + 0.215958X_1 + 0.02225X_2 - 11.239687X_3 + 0.000692X_1^2 - 0.002938X_1X_2 - 0.000526X_2^2 - 0.023604X_1X_3 + 0.005075X_2X_3 + 1.281875X_3^2$	0.8858	0.0293
SOD-like activity	$Y_{SOD} = 88.102812 - 0.243708X_1 - 0.3734X_2 - 4.824062X_3 + 0.00149X_1^2 + 0.0004625X_1X_2 - 0.001978X_2^2 + 0.000729X_1X_3 - 0.004325X_2X_3 + 0.55625X_3^2$	0.8926	0.0248

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub> : microwave power (%)

X<sub>2</sub> : ethanol concentration (watt)

X<sub>3</sub> : extraction time (min)

Table 22. Predicted levels of extraction condition for the maximum responses of variables by the ridge analysis in onion

Responses	X <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	X <sub>3</sub> <sup>3)</sup>	Maximum	Morphology
Yield(%)	143.13	61.77	3.39	44.02	Saddle point
Polyphenol content(%)	36.05	55.60	6.69	62.30	Saddle point
Electron donating ability(%)	143.55	27.52	4.86	45.85	Saddle point
Tyrosinase inhibition(%)	132.29	36.47	7.62	65.40	Saddle point
Nitrite-scavenging ability(%) pH 1.2	109.09	31.91	1.49	81.23	Saddle point
SOD-like activity(%)	99.41	8.47	7.13	69.84	Saddle point

<sup>1)</sup> Microwave power(watt)

<sup>2)</sup> Ethanol concentration(%)

<sup>3)</sup> Extraction Time(min)

Table 23. Regression analysis for regression model of physiochemical properties in extraction condition of oinon

Extraction conditions	F-Ratio					
	Yield	Polyphenol content	Electron donating ability	Tyrosinase inhibition	Nitrite-scavenging ability (pH 1.2)	SOD-like activity
Microwave power (watt)	5.79**	0.08	0.42	1.09	1.12	0.25
Ethanol concentration (%)	4.17*	0.62	9.47***	3.81*	5.99**	11.50***
Extraction Time (min)	1.99	0.04	0.09	1.09	3.45*	0.38

\*Significant at 10% level ; \*\*significant at 5% level ; \*\*\*significant at 1% level

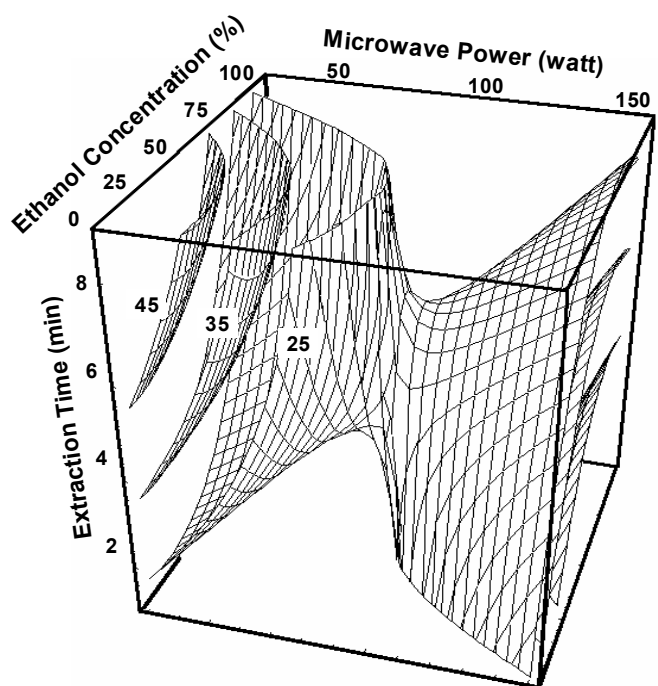


Fig. 35. Response surface for yield in onion extract at constant values (yield: 25–35–45%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power

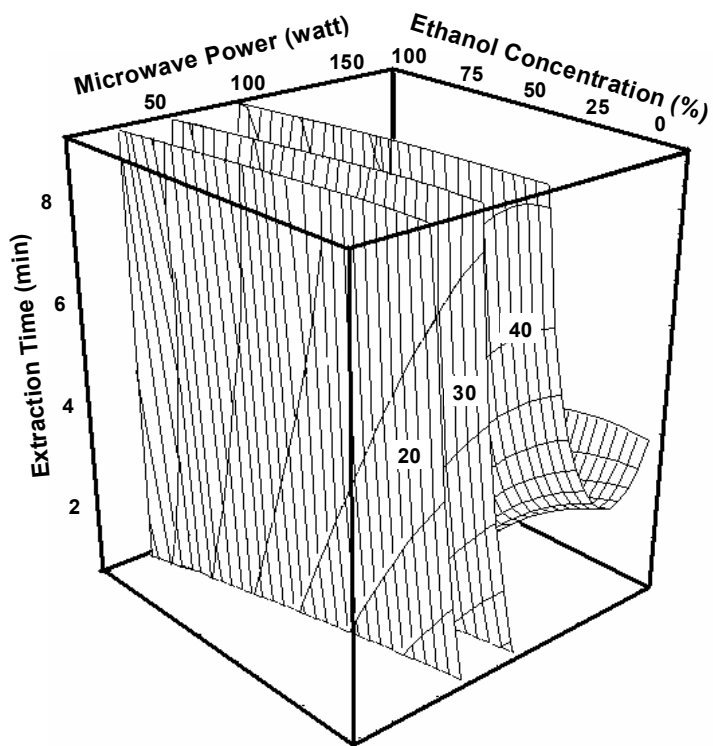


Fig. 36. Response surface for electron donating ability in onion extract at constant values (electron donating ability: 20–30–40%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power

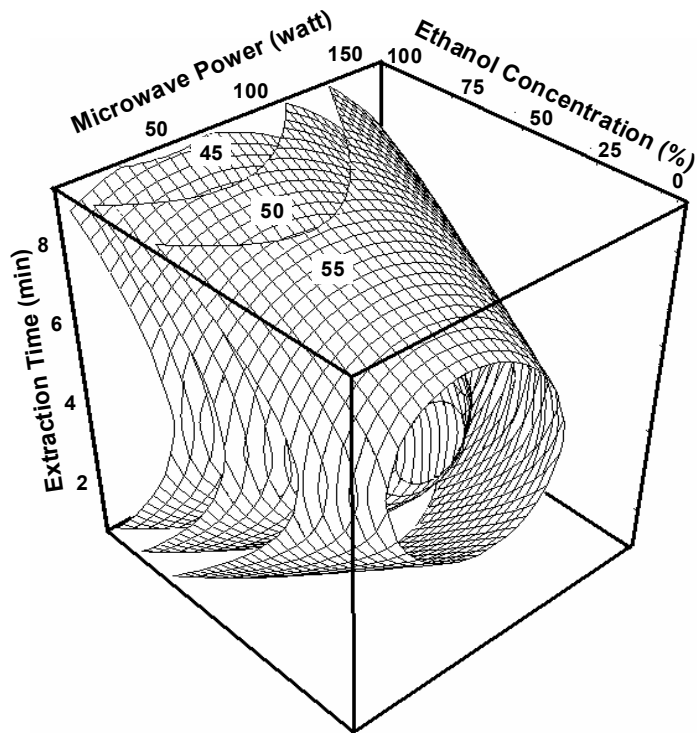


Fig. 37. Response surface for tyrosinase inhibition in onion extract at constant values (tyrosinase inhibition: 45–50–55%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power

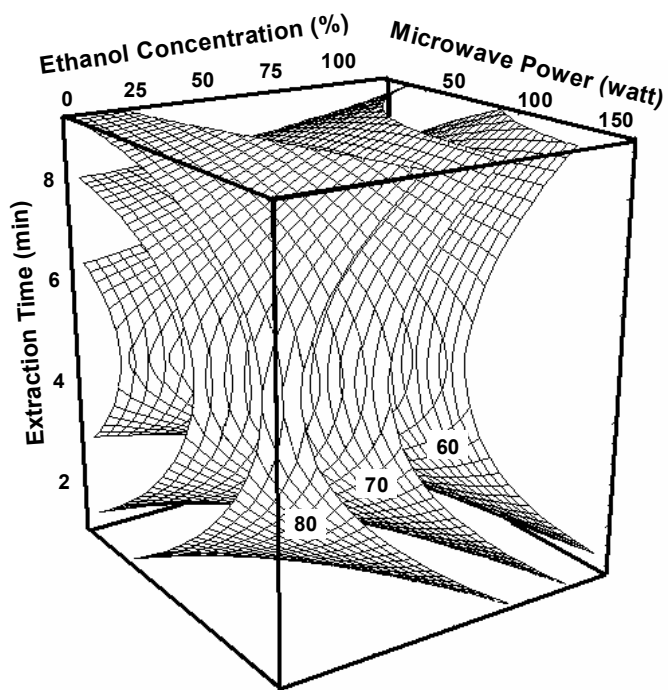


Fig. 38. Response surface for nitrite-scavenging ability (pH 1.0) in onion extract at constant values (nitrite-scavenging ability, pH 1.0: 60–70–80%) as a function ethanol concentration, extraction time and microwave power



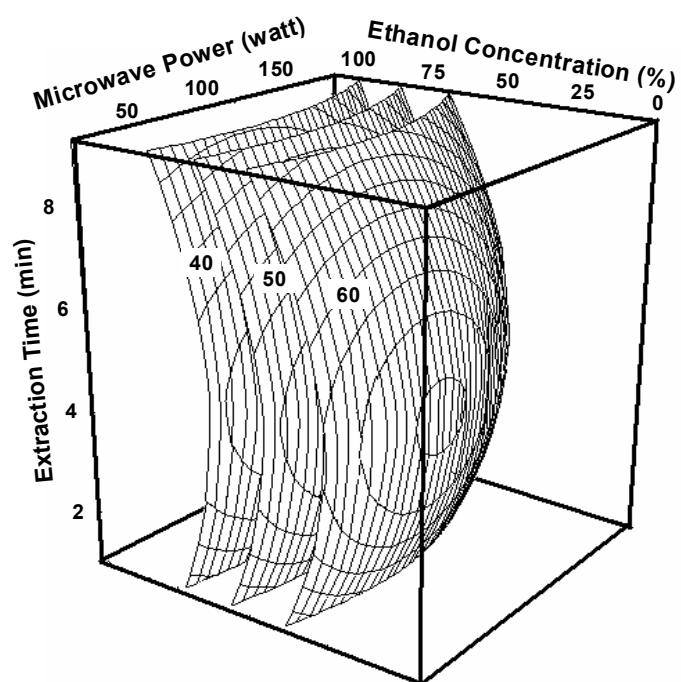


Fig. 39. Response surface for SOD-like activity in onion extract at constant values (SOD-like activity: 40–50–60%) as a function ethanol concentration, extraction time and microwave power

나) 양파의 추출공정 최적화 시험

양파에서 기능성분을 최대화하는 추출조건을 설정하기 위해 조건별 추출물의 수율, 전자공여능, 총 폴리페놀 함량, tyrosinase 저해효과, 아질산염 소거능과 SOD 유사활성에 대한 4차원 반응표면을 superimposing하여 최적 추출조건 범위를 예측하여 Fig. 40에 어두운 부분으로 나타내었다. 양파의 수율, 전자공여능, 총 폴리페놀 함량, tyrosinase 저해효과, 아질산염 소거능과 SOD 유사활성이 일치하는 범위는 시료 2.5g에 대한 에너지 용량 0~120w, 에탄올 농도 70~90% 및 추출시간 2~10분 (Table 24)으로 나타났으며, 최적 추출조건에 의한 반응변수의 4차원 반응표면을 superimposing하여 중복되는 부분을 예측한 결과는 Fig. 40과 같이 나타났다. 마찬가지로 이와 같은 예측결과에 의한 최적 조건을 확인하기 위하여 예측된 최적조건 범위 내에서 임의의 조건을 Table 24와 같이 결정하였다.

Table 24. Optimum extraction condition for maximum responses of yield, electron donating ability(EDA), total polyphenol content, tyrosinase inhibitory effect nitrite-scavenging effect, and SOD-like activity of onion by superimposing their contour maps

Extraction condition	Range of optimum condition	Optimum condition
Microwave power(watt)	0~120	60
Ethanol concentration(%)	70~90	80
Extraction Time(min)	2~10	6

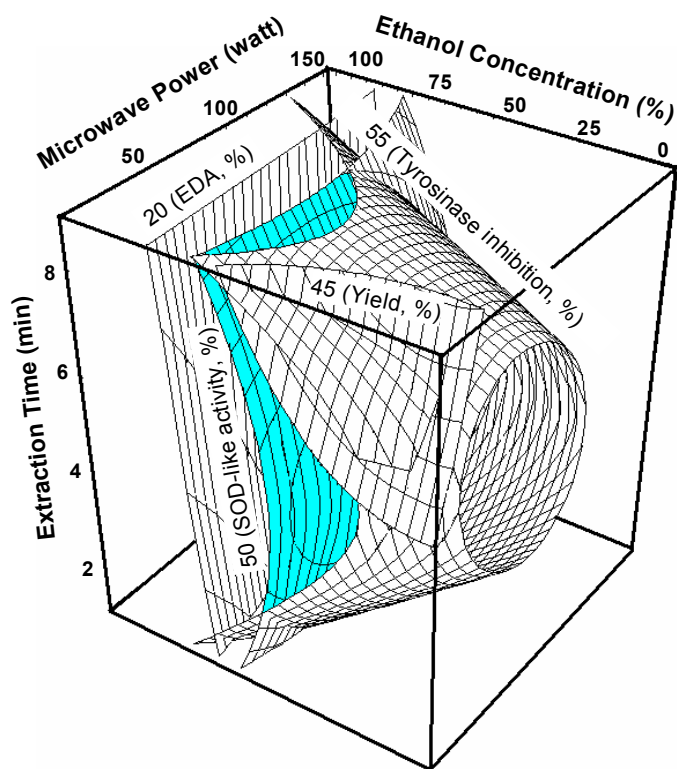


Fig. 40. Superimposed response surface for optimization of yield (6%), electron donating ability (15%), nitrite-scavenging ability (pH 1.2, 80%), and SOD-like activity (40%) of extract from onion

#### 다) 예측조건의 실증

각 성분들의 반응표면이 중복된 부분의 범위 가운데서 임의 조건을 설정하여 각각 회귀식에 대입하여 예측값을 구하였다. 그리고 동일 조건에서 실제로 실험하여 얻은 실험치와 비교함으로써 회귀식의 신뢰성을 검증하였다. 이때 임의의 조건으로는 Table 24에 나타난 것과 같이 에너지 용량 60w, 에탄올 농도 80%, 추출시간 6분으로 설정하여 회귀식에 대입한 결과는 수율 17.88%, 폴리페놀 함량 53.78%, 전자공여능 17.81%, tyrosinase 저해작용 42.51%, pH 1.2에 있어서의 아질산염소거능 49.45%, SOD 유사활성 27.28%를 얻었다. 임의의 조건과 동일한 조건으로 실험하여 얻은 값은 수율 18.90%, 폴리페놀 함량 55.05%, 전자공여능 18.93%, tyrosinase 저해작용 44.65%, pH 1.2에 있어서의 아질산염 소거능 48.91%, SOD 유사활성 27.35%의 값을 얻었다 (Table 25). 그래서 RSM기법에 의해 예측된 값과 동일조건에서 실제 실험하여 얻은 실험치를 비교했을 때 예측 범위와 유사한 값을 가지거나 조금 높은 값 또는 낮은 값을 나타내어 도출된 회귀식의 신뢰성을 검증할 수 있었다.

Table 25. Comparing between predicted and observed values of response variable for ethanol extracts from onion at the given condition within the range of optimum condition

Response variable	Predicted values <sup>a)</sup>	Experimental values <sup>b)</sup>
Yield	17.88	18.90
Total polyphenol content	53.78	55.05
Electron donating ability	17.81	18.93
Tyrosinase inhibitory effect	42.51	44.65
Nitrite scavenging activity	49.45	48.91
SOD-like activity	27.80	27.35

<sup>a)</sup> Calculated using the predicted equations for response variables. Given conditions of independent variables: Microwave power 60 watt, Ethanol concentration 80%, and Extraction time 6 min.

<sup>b)</sup> Mean values of triplicate determinations.

### 3) 생강의 최적 추출 조건

#### 가) 생강의 최적 추출조건 설정

생강의 경우, 중심합성계획에 의한 추출조건별 결과는 Table 26에 나타내었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 27에 나타내었다. 수율에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.9152이고 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점으로 능선분석을 실시한 결과, 수율의 최대값은 38.80%이었고, 이때의 요인변수들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 126.68w, 에탄올 농도 53.39% 및 추출시간 8.15분이었다(Table 28). 수율에 대한 반응표면은 Fig. 41에서와 같이 에탄올 농도비가 높아질수록 증가되는 경향을 나타내었다. 수율에 대한 추출조건의 영향은 Table 29에서와 같이 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있었으며, 그 다음으로 추출 시간이었다. 그러나 에너지용량에 대해서는 영향을 적게 받는 것으로 나타났다. 총 폴리페놀 함량에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.9057로 5% 이내의 유의성이 인정되었으며, 예측된 정상점은 최소점으로 최대 폴리페놀함량은 105.59%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 81.82w, 에탄올 농도 99.52% 및 추출시간 5.06 분으로 Table 28과 같이 나타났으며, 총 폴리페놀 함량에 대한 반응표면은 Fig. 42에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량에 대한 추출조건의 영향은 Table 29에서와 같이 에탄올 농도에 가장 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났으나 에너지 용량과 추출 시간에는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 전자공여능에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.9239로 1% 이내에서 유의성이 인정되었으며, 예측된 정상점은 안장점으로 나타났으며 능선분석을 실시한 결과 전자공여능의 최대값은 77.92%로 나타났으며, 이때의 추출조건은 에너지 용량 58.25w, 에탄올 농도 91.87% 및 추출시간 5.54분이었다(Table 28). Fig. 43에서 보는 것과 같이 에탄올 농도가 증가할수록 전자공여능이 증가되었다. 전자공여능에 대한 추출 조건의 영향은 Table 29에서 보는 것과 같이 에탄올 농도에 가장 크게 영향을 받았고 에너지 용량에도 적은 영향을 받았다. 그러나 추출 시간에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Tyrosinase 저해효과에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.9696로 1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점

은 안장점으로 tyrosinase 저해효과는 79.39%로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 시료에 대한 에너지 용량 106.08w, 에탄올 농도 2.06% 및 추출시간 4.61분으로 Table 28과 같이 나타났으며, tyrosinase 저해효과에 대한 반응표면은 Fig. 44에 나타내었다. Fig. 44에서 보는 바와 같이 tyrosinase 저해효과는 에탄올 농도에 가장 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 그러나 에너지 용량과 추출 시간에 대해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. pH 1.2에 따른 아질산염 소거능에 대한 추출물의 회귀식의  $R^2$ 는 0.9621로 유의성이 1% 이내의 유의수준에서 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 실시하여 본 결과 최대값은 92.77%로 나타났다. 이때의 추출조건은 Table 28에서와 같이 시료에 대한 에너지 용량 110.86w, 에탄올 농도 71.12% 및 추출시간 8.34분이었다. 아질산염 소거능에 대한 반응표면은 Fig. 45에 나타내었다. 추출조건의 영향을 Table 29에서 보는 바와 같이 에너지 용량과 추출시간에 가장 큰 영향을 보이지 않았고 에탄올 농도에는 영향을 받는 것으로 나타났다. SOD 유사활성에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.9601이고 1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 실시한 결과, SOD 유사활성의 최대값은 56.65%이었고, 이때의 요인변수들의 값은 시료에 대한 에너지 용량 71.89w, 에탄올 농도 97.23% 및 추출시간 5.51분이었다(Table 28). SOD 유사활성에 대한 반응 표면은 Fig. 46에 나타내었다. SOD 유사활성에 대한 추출 조건의 영향은 Table 23에서와 같이 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있었다. 그러나 에너지 용량과 추출 시간에 대해서는 영향을 적게 받는 것으로 나타났다.

Table 26. Experimental data on yield, polyphenol, electron donating ability, tyrosinase inhibition, nitrite-scavenging ability and superoxide dismutase(SOD)-like activity of ginger by central composite design for response surface analysis

No. <sup>1)</sup>	Yield	Polyphenol content	Electron donating ability	Tyrosinase inhibition	Nitrite-scavenging ability			SOD-like activity
					pH 1.0	pH 3.0	pH 4.2	
1	22.15	43.12	43.93	57.35	58.46	38.62	31.78	28.48
2	24.50	41.69	45.05	55.21	60.28	40.18	28.56	25.66
3	20.00	88.76	66.42	19.45	81.25	80.56	59.05	48.82
4	27.45	87.32	67.31	25.21	80.90	78.05	56.70	50.22
5	26.85	39.22	55.33	66.25	65.21	35.21	29.56	34.56
6	29.50	38.07	52.16	60.34	60.67	36.84	30.25	33.73
7	20.15	77.12	59.21	21.99	78.25	85.62	57.83	45.55
8	32.55	78.37	53.15	20.35	79.50	83.02	55.29	48.39
9	40.00	44.16	54.93	40.04	78.25	78.02	65.91	38.01
10	40.55	43.19	55.31	40.92	78.66	77.56	66.37	37.77
11	31.30	49.31	54.79	37.66	79.35	58.21	62.50	36.57
12	36.55	51.57	52.89	45.38	84.25	78.00	69.54	37.78
13	14.50	41.44	32.23	73.71	37.97	31.55	22.49	27.84
14	11.55	93.04	76.95	15.24	77.58	85.35	55.46	51.87
15	28.50	55.96	61.07	33.72	80.24	79.15	66.25	40.99
16	38.05	57.21	66.21	47.60	88.59	77.54	68.21	38.06

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by central composite design



Table 27. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of ginger

Response	Second order polynomial equations <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>	Significance
Yield	$Y_Y = -14.245313 + 0.352917X_1 + 0.94925X_2 + 2.907813X_3 - 0.001764X_1^2 - 0.000742X_1X_2 - 0.0109X_2^2 + 0.010937X_1X_3 + 0.037125X_2X_3 - 0.4375X_3^2$	0.9152	0.0130
Polyphenol content	$Y_{PC} = 71.102187 - 0.309417X_1 - 0.0942X_2 - 8.932812X_3 + 0.001879X_1^2 - 0.002178X_1X_2 + 0.009426X_2^2 + 0.006188X_1X_3 + 0.005975X_2X_3 + 0.806875X_3^2$	0.9057	0.0174
Electron donating ability	$Y_{EDA} = 5.274375 + 0.499542X_1 + 1.00605X_2 - 2.731875X_3 - 0.000356X_1^2 - 0.006647X_1X_2 - 0.000212X_2^2 - 0.023417X_1X_3 - 0.0078X_2X_3 + 0.5325X_3^2$	0.9239	0.0096
Tyrosinase inhibition	$Y_{TI} = 56.282812 + 0.257167X_1 - 0.7394X_2 + 1.205313X_3 + 0.000289X_1^2 - 0.002725X_1X_2 + 0.001598X_2^2 - 0.023271X_1X_3 + 0.030425X_2X_3 + 0.01125X_3^2$	0.9696	0.0007
Nitrite-scavenging ability	$Y_{PH1} = 56.309375 - 0.162042X_1 + 1.0913X_2 - 5.6325X_3 + 0.000929X_1^2 - 0.000257X_1X_2 - 0.008272X_2^2 + 0.010917X_1X_3 + 0.03405X_2X_3 + 0.3725X_3^2$	0.9621	0.0013
SOD-like activity	$Y_{SOD} = 18.76437 + 0.184333X_1 + 0.40805X_2 - 2.815938X_3 - 0.000199X_1^2 - 0.003208X_1X_2 + 0.000786X_2^2 + 0.007146X_1X_3 + 0.019725X_2X_3 + 0.102187X_3^2$	0.9601	0.0015

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub> : microwave power (%)

X<sub>2</sub> : ethanol concentration (watt)

X<sub>3</sub> : extraction time (min)

Table 28. Predicted levels of extraction condition for the maximum responses of variables by the ridge analysis in ginger

Responses	$X_1^{1)}$	$X_2^{2)}$	$X_3^{3)}$	Maximum	Morphology
Yield(%)	126.68	53.39	8.15	38.83	Maximum
Polyphenol content(%)	81.82	99.52	5.06	105.59	Minimum
Electron donating ability(%)	58.25	91.87	5.54	77.92	Saddle point
Tyrosinase inhibition(%)	106.08	2.06	4.61	79.39	Saddle point
Nitrite-scavenging ability(%) pH 1.2	110.86	71.12	8.34	92.77	Saddle point
SOD-like activity(%)	71.89	97.23	5.51	56.65	Saddle point

<sup>1)</sup> Microwave power(watt)

<sup>2)</sup> Ethanol concentration(%)

<sup>3)</sup> Extraction Time(min)

Table 29. Regression analysis for regression model of physiochemical properties in extraction condition of ginger

Extraction conditions	F-Ratio					
	Yield	Polyphenol content	Electron donating ability	Tyrosinase inhibition	Nitrite-scavenging ability (pH 1.2)	SOD-like activity
Microwave power (watt)	1.35	0.28	2.57	0.98	0.66	2.14
Ethanol concentration (%)	12.11***	14.18***	16.51***	46.78***	30.48***	35.43***
Extraction Time (min)	3.13	0.46	1.06	0.71	1.43	0.52

\*Significant at 10% level ; \*\*significant at 5% level ; \*\*\*significant at 1% level

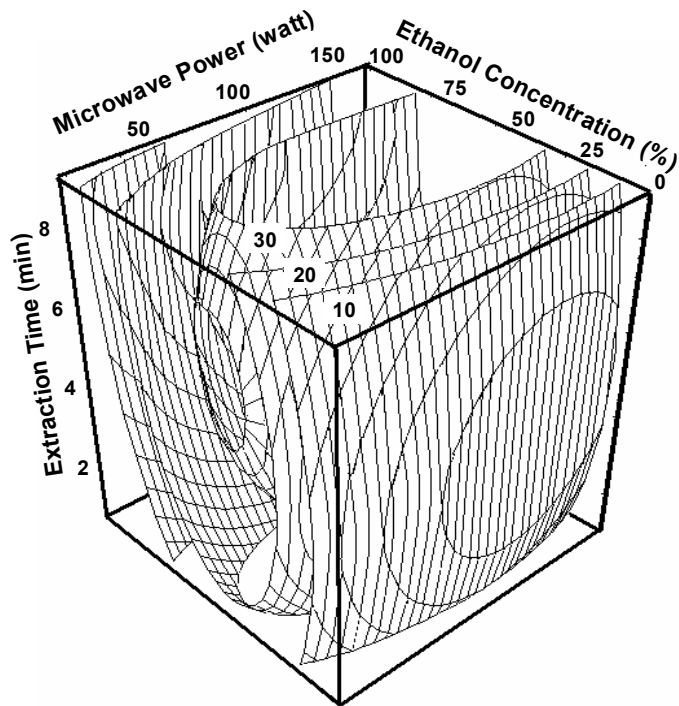


Fig. 41. Response surface for yield in ginger extract at constant values (yield: 10–20–30%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power

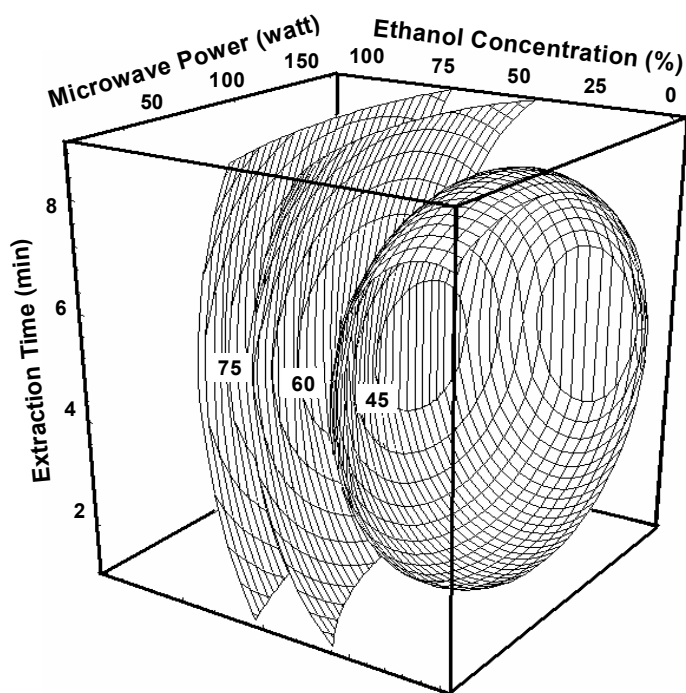


Fig. 42. Response surface for polyphenol content in ginger extract at constant values (electron donating ability: 45–60–75%) as a function ethanol concentration, extraction time and microwave power

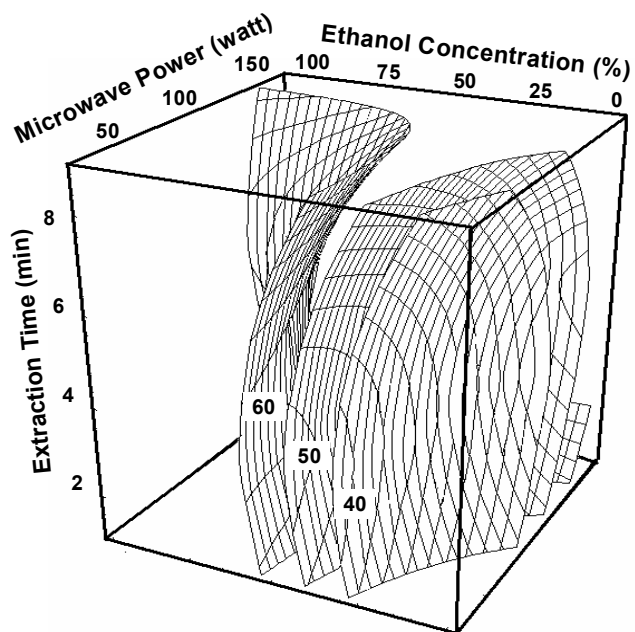


Fig. 43. Response surface for electron donating ability in ginger extract at constant values (electron donating ability: 40–50–60%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power

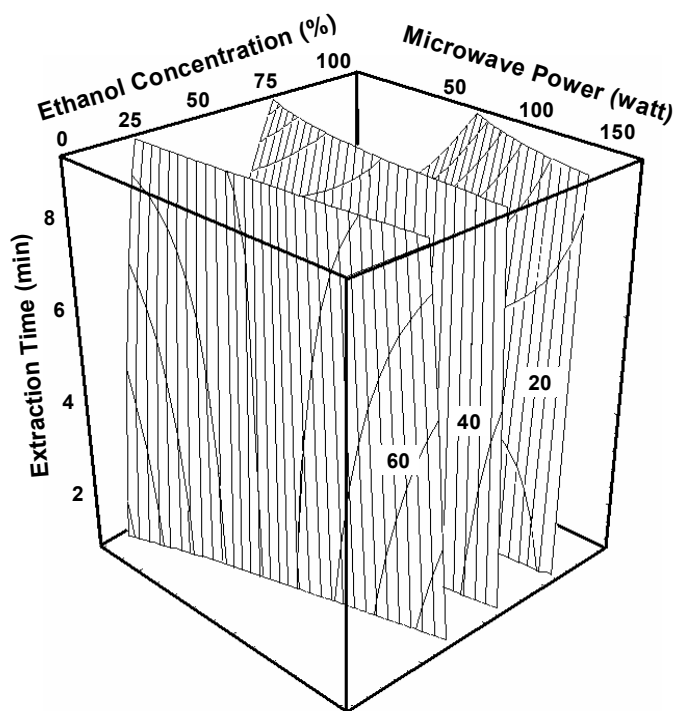


Fig. 44. Response surface for tyrosinase inhibition in ginger extract at constant values (tyrosinase inhibition: 20–40–60%) as a function of ethanol concentration, extraction time and microwave power

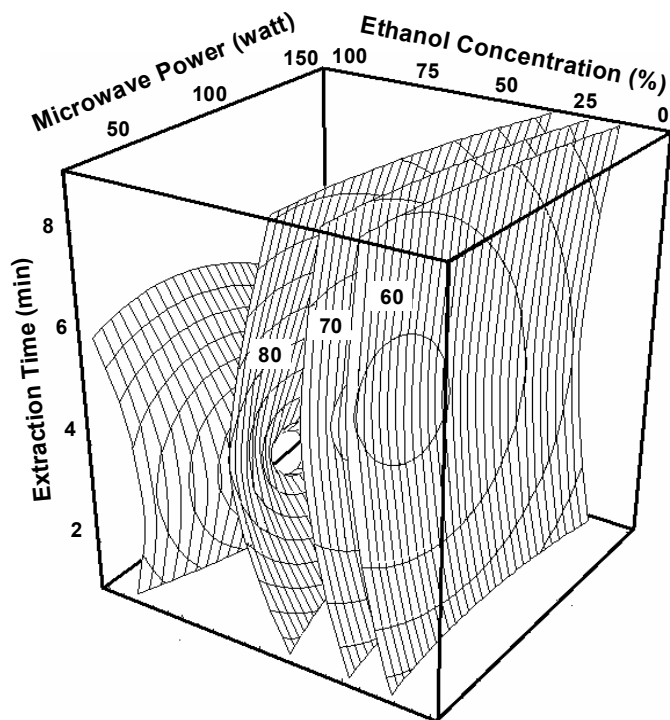


Fig. 45. Response surface for nitrite-scavenging ability (pH 1.0) in ginger extract at constant values (nitrite-scavenging ability, pH 1.0: 60–70–80%) as a function ethanol concentration, extraction time and microwave power



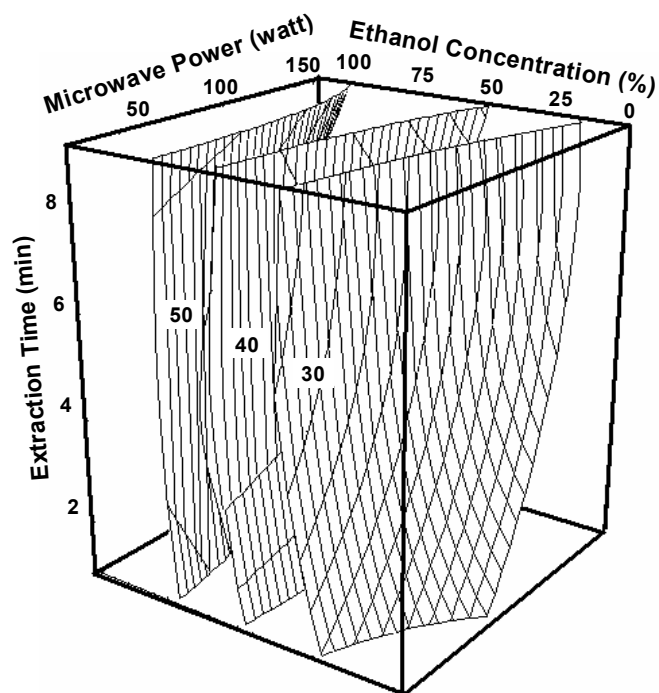


Fig. 46. Response surface for SOD-like activity in ginger extract at constant values (SOD-like activity: 30–40–50%) as a function ethanol concentration, extraction time and microwave power

나) 생강의 추출공정 최적화 시험

생강에서 기능성분을 최대화하는 추출조건을 설정하기 위해 조건별 추출물의 수율, 전자공여능, 총 폴리페놀 함량, tyrosinase 저해효과, 아질산염 소거능과 SOD 유사활성에 대한 4차원 반응표면을 superimposing하여 최적 추출조건 범위를 예측하여 Fig. 47에 어두운 부분으로 나타내었다. 생강의 수율, 전자공여능, 총 폴리페놀 함량, tyrosinase 저해효과, 아질산염 소거능과 SOD 유사활성이 일치하는 범위는 시료 2.5g에 대한 에너지 용량 0~80w, 에탄올 농도 0~40% 및 추출시간 3~7분(Table 30)로 나타났으며, 최적 추출조건에 의한 반응변수의 4차원 반응표면을 superimposing하여 중복되는 부분을 예측한 결과는 Fig. 47과 같이 나타났다. 마찬가지로 이와 같은 예측결과에 의한 최적조건을 확인하기 위하여 예측된 최적조건 범위 내에서 임의의 조건을 Table 30과 같이 결정하였다.

Table 30. Optimum extraction condition for maximum responses of yield, electron donating ability(EDA), total polyphenol content, tyrosinase inhibitory effect, nitrite-scavenging effect, and SOD-like activity of ginger by superimposing their contour maps

Extraction condition	Range of optimum condition	Optimum condition
Microwave power(watt)	0~80	50
Ethanol concentration(%)	0~40	20
Extraction Time(min)	3~7	5

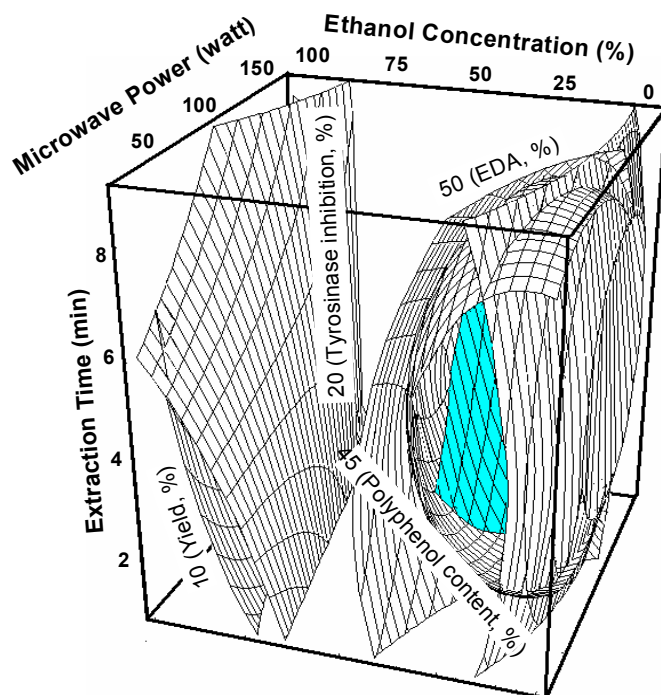


Fig. 47. Superimposed response surface for optimization of yield (10%), electron donating ability (50%), total polyphenol content (45%), and tyrosinase inhibition (20%) of extract from ginger.

#### 다) 예측조건의 실증

각 성분들의 반응표면이 중복된 부분의 범위 가운데서 임의조건을 설정하여 각각 회귀식에 대입하여 예측값을 구하였다. 그리고 동일조건에서 실제로 실험하여 얻은 실험치와 비교함으로써 회귀식의 신뢰성을 검증하였다. 이때 임의의 조건으로는 Table 30에 나타낸 것과 같이 에너지 용량 50w, 에탄올 농도 20 %, 추출시간 5분으로 설정하여 회귀식에 대입한 결과는 수율 22.92%, 폴리페놀 함량 37.68%, 전자공여능 35.76%, tyrosinase 저해작용 56.52%, pH 1.2에 있어서의 아질산염 소거능 56.07%, SOD 유사활성 24.98%를 얻었다. 임의의 조건과 동일한 조건으로 실험하여 얻은 값은 수율 21.79%, 폴리페놀 함량 36.53%, 전자공여능 35.34%, tyrosinase 저해작용 55.96%, pH 1.2에 있어서의 아질산염소거능 57.18%, SOD 유사활성 24.27%의 값을 얻었다 (Table 31). 그래서 RSM기법에 의해 예측된 값과 동일조건에서 실제 실험하여 얻은 실험치를 비교했을 때 예측 범위와 유사한 값을 가지거나 조금 높은 값 또는 낮은 값을 나타내어 도출된 회귀식의 신뢰성을 검증할 수 있었다.

Table 31. Comparing between predicted and observed values of response variable for ethanol extracts from ginger at the given condition within the range of optimum condition

Response variable	Predicted values <sup>a)</sup>	Experimental values <sup>b)</sup>
Yield	22.92	21.79
Total polyphenol content	37.68	36.53
Electron donating ability	35.76	35.34
Tyrosinase inhibitory effect	56.52	55.96
Nitrite scavenging activity	56.07	57.18
SOD-like activity	24.98	24.27

<sup>a)</sup> Calculated using the predicted equations for response variables. Given conditions of independent variables: Microwave power 50 watt, Ethanol concentration 20 %, and Extraction time 5 min.

<sup>b)</sup> Mean values of triplicate determinations.

나. 채소류 추출물의 동물 확인 실험

1) 마늘 추출물의 동물 실험

마늘 추출물이 첨가된 식이를 4주간 섭취한 실험동물의 식이섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율(FER: food efficiency ratio)은 Table 32와 같다. 또한, 마늘 추출물이 첨가된 식이를 섭취한 흰쥐의 간기능을 알아보기 위해 간기능 지표 효소인 sGOT와 sGPT 활성에 영향(Fig. 48)을 살펴보았다. 흰쥐의 혈청 지질함량에 미치는 영향을 알아보기 위기 위하여 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL 및 HDL-cholesterol치를 측정하였으며 그 결과는 Fig. 48과 같다.

체중 증가량은 대조군과 모든 실험군이 정상군에 비해 증가하는 경향을 보여주었다. 마늘 추출물을 급여한 실험군에서 대조군보다 체중이 증가한 경향을 보여주었다. 특히 1% 마늘 추출물을 급여한 실험군에서 유의적으로 체중이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 식이효율 역시 정상군 5.66과 비교하였을 때 대조군과 마늘 추출물군이 각각 6.00, 5.81, 5.96으로 증가하는 경향을 보여주었다.

Table 32. Food intake, body weight gain and food efficiency ratio

Groups	Food intake (g/day)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/4week)	FER*
Normal	20.95±1.26	138.59±2.38	345.80±14.12	207.21±11.75	5.66±0.19
Hypercholesterol	23.38±0.92	137.54±4.11	355.86±21.30	218.31±17.19	6.00±0.17
Garlic 1%	23.54±0.83	139.63±4.26	366.62±13.30	226.99± 9.06	5.81±0.34
Garlic 2%	23.18±1.12	140.70±6.67	358.41±26.49	217.71±19.82	5.96±0.15

\*FER : food efficiency ratio

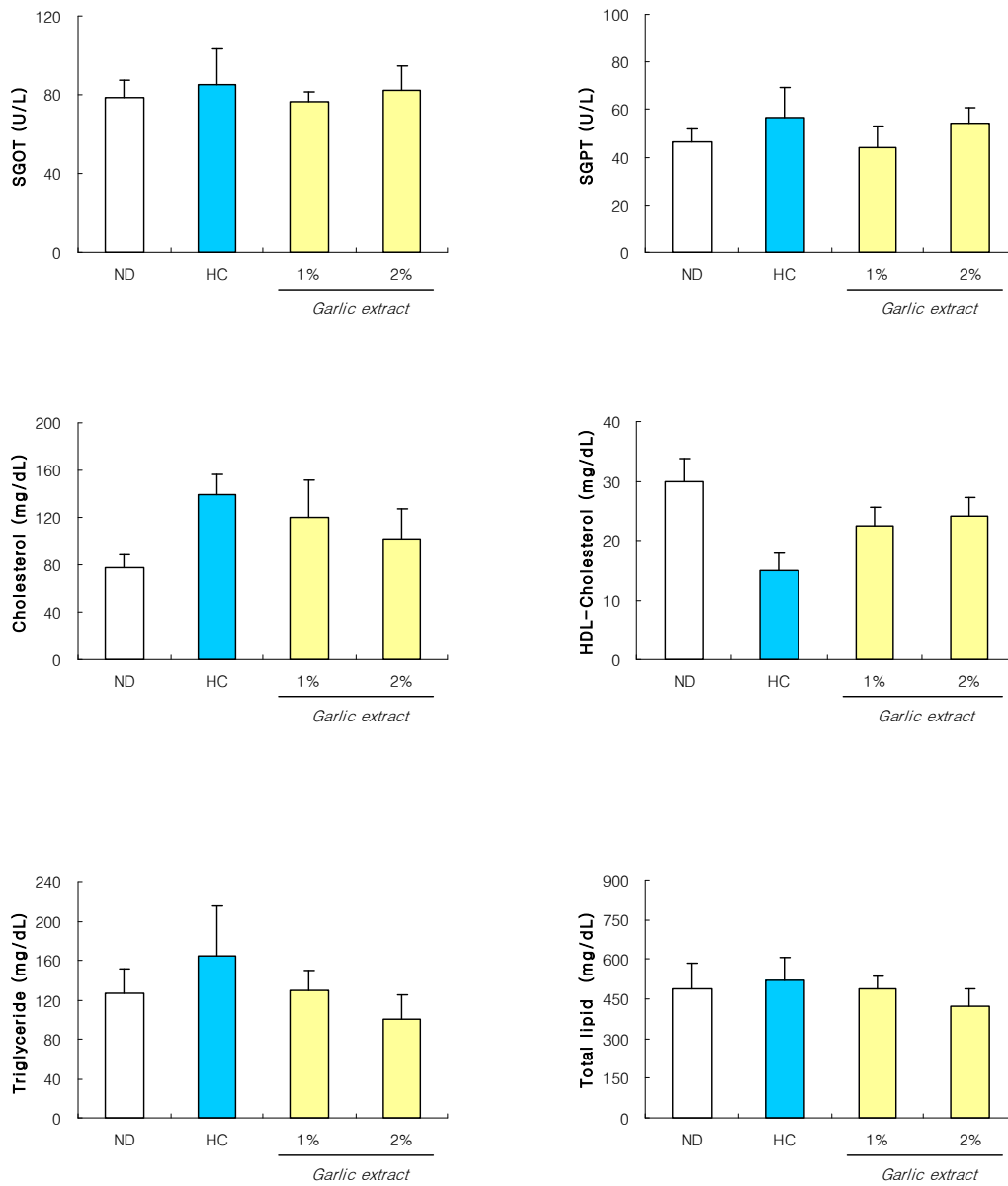


Fig. 48. The effect of garlic on the concentrations of plasma sGOT, sGPT, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride and total lipid in rats

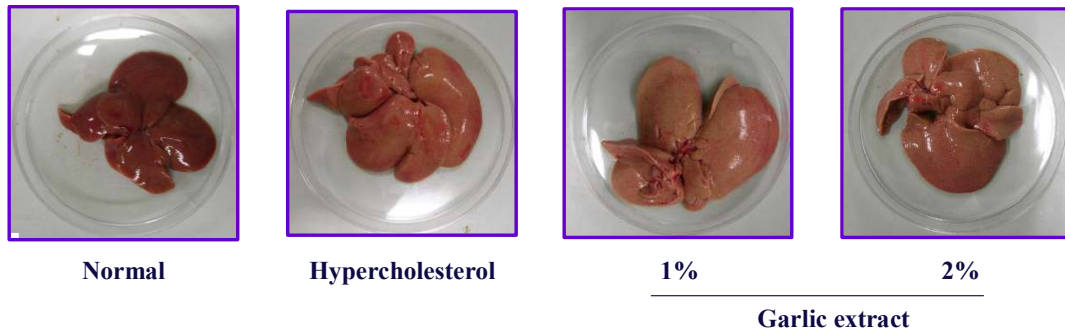


Fig. 49. The livers' features of rats fed garlic extract

고콜레스테롤을 급여한 후 마늘 추출물을 급여시킨 다음 쥐의 간의 변화를 관찰하기 위해 육안 검사를 실시하였고 그 결과는 Fig. 49와 같다. 육안으로 관찰하였을 때 간의 외형은 정상군에 비하여 고콜레스테롤을 급여한 대조군의 간은 지방이 많이 축적되어 지방산이 심하게 진행되어 있었다. 간은 비대해져 있었고 색깔도 하얗게 변해 있었다. 그러나 마늘 추출물을 급여한 쥐의 간은 지방간이 심한 대조군에 비해 크기가 작고 색 또한 정상군과 유사한 붉은색을 나타내었다. 특히 마늘 추출물을 1% 투여하였을 때 보다 2%를 투여하였을 때 붉은 색을 띄는 것을 볼 수 있었다.

간장 중의 지질 함량은 Table 33과 같다. 콜레스테롤 함량을 보면 정상군과 비교하여 고콜레스테롤군에서 약 1.5배 정도 증가하였으며 마늘추출물을 공급한 실험군에서는 콜레스테롤함량이 감소한 것을 볼 수 있었다. 또한 마늘 추출물 1%보다는 2%에서 더 효과적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이 수준은 정상군보다 높은 수치였다. 중성지방 함량 역시 콜레스테롤과 동일한 경향을 보여주었다. 즉, 정상군이 4.70이었으며 대조군은 21.21로 대조군이 정상군보다 유의적으로 증가하였는데 1% 와 2% 실험군에서 각각 12.38, 10.28로 마늘 추출물을 급여하였을 때 유의적으로 감소하였고 1% 마늘 추출물보다 2% 마늘 추출물에서 더 큰 차이를 보였다.



Table 33. The effect of garlic extract on the concentrations of total cholesterol and triglyceride in liver of experimental rats

Groups	Cholesterol	Triglyceride
Normal	10.71	4.70
Hypercholesterol	17.93	21.21
Garlic 1%	17.79	12.38
Garlic 2%	15.29	10.28

## 2) 생강 추출물의 동물 실험

생강 추출물이 첨가된 식이를 4주간 섭취한 실험동물의 식이섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율(FER: food efficiency ratio)은 Table 34와 같다. 또한, 생강 추출물이 첨가된 식이를 섭취한 흰쥐의 간기능을 알아보기 위해 간기능 지표 효소인 sGOT와 sGPT 활성에 영향(Fig. 50)을 살펴보았다. 흰쥐의 혈청 지질함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL 및 HDL-cholesterol치를 측정하였으며 그 결과는 Fig. 50과 같다.

체중 증가량은 대조군과 모든 실험군이 정상군에 비해 증가하는 경향을 보여주었다. 생강 추출물을 급여한 실험군에서 대조군보다 체중이 증가한 경향을 보여주었다. 특히 2% 생강 추출물을 급여한 실험군에서 유의적으로 체중이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 식이효율 역시 정상군 5.66과 비교하였을 때 대조군과 생강 추출물군이 각각 6.00, 5.77, 5.76으로 증가하는 경향을 보여주었다.

Table 34. Food intake, body weight gain and food efficiency ratio

Groups	Food intake (g/day)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/4week)	FER*
Normal	20.95±1.26	138.59±2.38	345.80±14.12	207.21±11.75	5.66±0.19
Hypercholesterol	23.38±0.92	137.54±4.11	355.86±21.30	218.31±17.19	6.00±0.17
Ginger 1%	22.21±1.24	142.17±4.46	357.75±13.95	215.58± 9.50	5.77±0.28
Ginger 2%	23.24±1.16	143.20±4.31	369.04±21.84	225.84±17.52	5.76±0.39

\*FER : food efficiency ratio

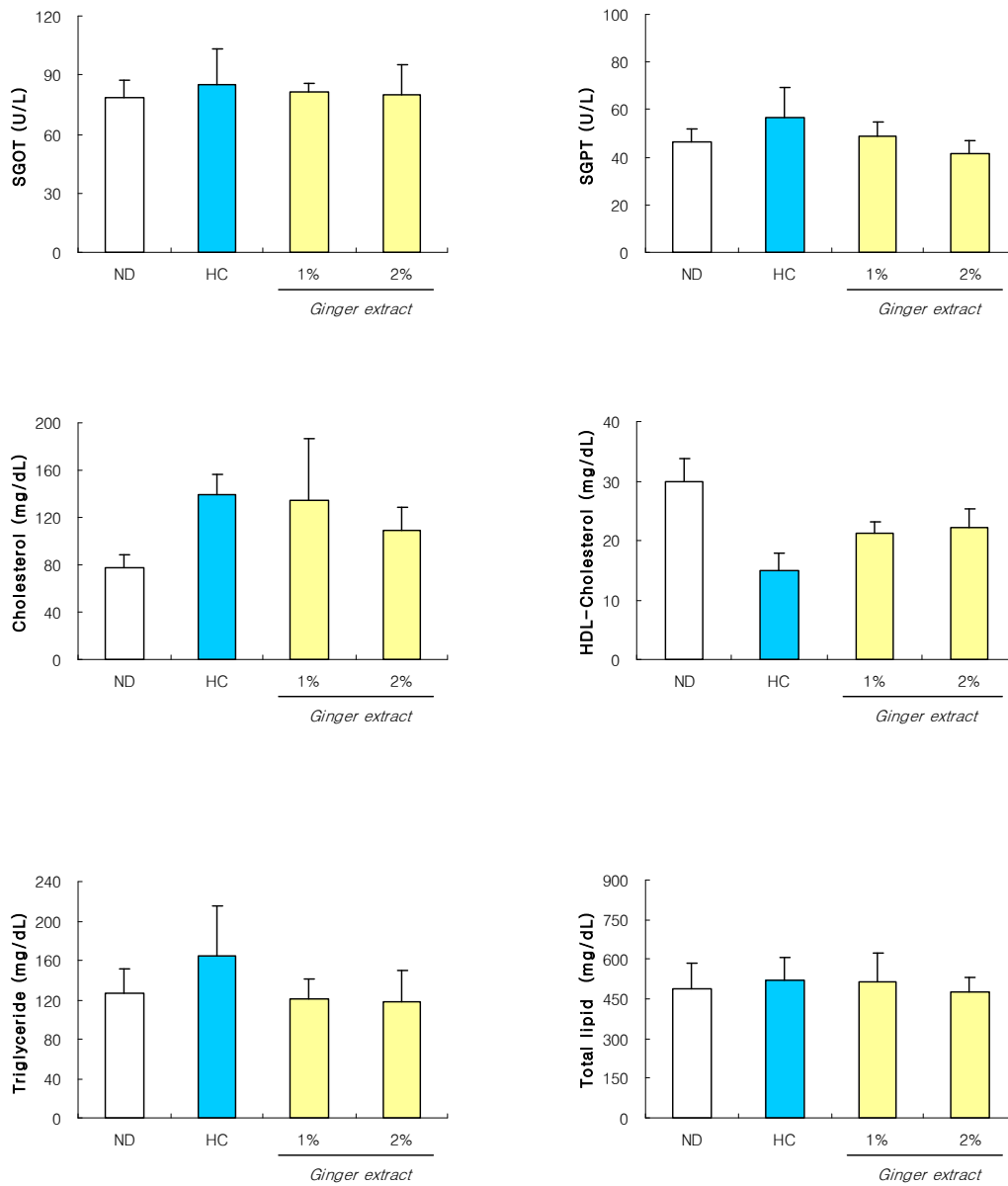


Fig. 50. The effect of ginger on the concentrations of plasma sGOT, sGPT, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride and total lipid in rats

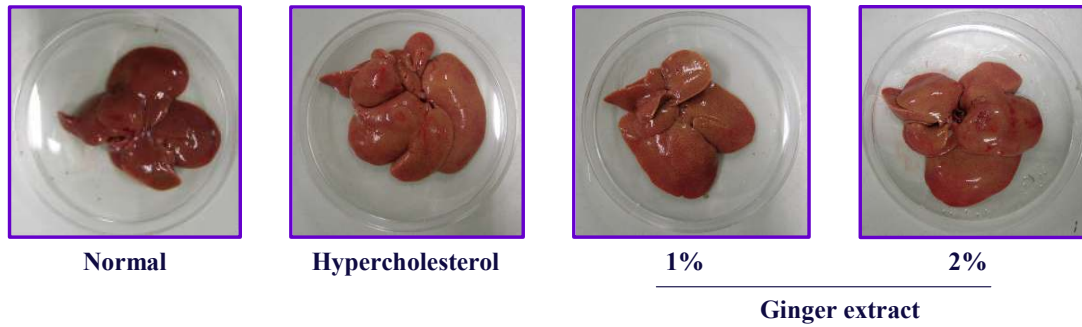


Fig. 51. The livers' features of rats fed ginger extract

고콜레스테롤을 급여한 후 생강 추출물을 급여시킨 다음 쥐의 간의 변화를 관찰하기 위해 육안 검사를 실시하였고 그 결과는 Fig. 51과 같다. 육안으로 관찰하였을 때 간의 외형은 정상군에 비하여 고콜레스테롤을 급여한 대조군의 간은 지방이 많이 축적되어 지방산이 심하게 진행되어 있었다. 간은 비대해져 있었고 색깔도 하얗게 변해 있었다. 그러나 생강 추출물을 급여한 쥐의 간은 지방간이 심한 대조군에 비해 크기가 작고 색 또한 정상군과 유사한 붉은색을 나타내었다. 특히 생강 추출물을 1% 투여하였을 때 보다 2%를 투여하였을 때 붉은 색을 띄는 것을 볼 수 있었다.

간장 중의 지질 함량은 Table 35와 같다. 콜레스테롤 함량을 보면 정상군과 비교하여 고콜레스테롤군에서 약 1.7배 정도 증가하였으며 생강 추출물을 공급한 실험군에서는 콜레스테롤함량이 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있었다. 또한 생강 추출물 1%보다는 2%에서 더 효과적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이 수준은 정상군보다 높은 수치였다. 중성지방 함량 역시 콜레스테롤과 비슷한 경향을 보여주었다. 즉, 정상군이 4.70이었으며 대조군은 21.21로 대조군이 정상군보다 유의적으로 증가하였는데 1% 와 2% 실험군에서 각각 5.01, 6.61로 생강 추출물을 급여하였을 때 유의적으로 감소하였고 2% 마늘 추출물보다 1% 마늘 추출물에서 더 많은 감소를 보여주었다. 특히 정상군과 비슷한 중성지방 함량을 보여주었다.

Table 35. The effect of garlic extract on the concentrations of total cholesterol and triglyceride in liver of experimental rats

Groups	Cholesterol	Triglyceride
Normal	10.71	4.70
Hypercholesterol	17.93	21.21
Garlic 1%	14.52	5.01
Garlic 2%	13.34	6.61

### 3. 추출물의 기능성 소재화 및 채소류를 이용한 가공식품의 개발

가. 채소류 추출물 활용 건강기능식품 원료 개발

#### 【요약서】

#### 【요약】

본 발명은 마늘 추출물을 포함하는 타블렛 및 그의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마늘로부터 생리활성 성분을 포함하는 유효성분을 추출하여 이를 주성분으로 하고, 팽이버섯, 구연산, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀 그리고 비타민 C를 첨가하여 다양한 영양소를 함유한 마늘 타블렛 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 의해 구연산, 팽이버섯, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀 그리고 비타민 C 및 마늘 분말이 포함된 관능적으로 매우 우수한 마늘 타블렛을 제조할 수 있다. 본 발명은 마늘 추출물의 생리활성 물질을 이용한 마늘 타

블렛을 제조함으로써, 항산화 물질의 식품 소재화 및 고품질 제품 다양화 기술 개발을 가능하게 한다.

**【대표도】**

도 1

**【색인어】**

마늘, 생리활성, 알약

**【명세서】**

**【발명의 명칭】**

마늘 추출물을 포함하는 마늘 타블렛 및 그의 제조 방법 {A method for manufacturing of tablet type garlic product tablet type garlic product}

**【도면의 간단한 설명】**

도 1은 본 발명에 따른 생리활성 기능성 소재로서 알약 식 마늘 제품의 제조공정도이다.

**【발명의 상세한 설명】**

**【발명의 목적】**

**【발명이 속하는 기술 분야 및 그 분야의 종래기술】**

본 발명은 마늘 추출물을 포함하는 타블렛 및 그의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마늘로부터 생리활성 성분을 포함하는 유효성분을 추출하여 이를 주성분으로 하고, 팽이버섯, 구연산, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀 그리고 비타민 C를 첨가하여 다양한 영양소를 함유한 마늘 타블렛 및 그 제조방법에 관한 것이다.

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과의 allium속에 속하는 작물로 그 원산지가 중앙 아시아 등지로 전해지며 우리의 건국신화에도 마늘이 등장하였듯이 식품 및 의약품에 널리 애용되었고, 최근에는 전 세계적으로 sauce, 육가공 및 향신료와 약용으로 그 수요가 점차 증가되고 있다. 고대 인도에서는 마늘이 피부염, 류머티즘, 복토, 식욕감퇴, 체중감소 등의 치료를 위하여 사용되었고, Hipocrates도 의약품으로서 마늘의 중요성을 인정하여 이뇨제와 화농성 상처의 치료목적으로 사용하였다. 마늘의 생리활성은 식물체내에서는 불활성인 전구체로부터 세포가 파괴되면서 효소적으로 생산된 allicin 때문이며 이 allicin은 항균작용, 항진균작용, 항암작용, 저혈당작용, 혈압강화작용, 동맥경화예방 등 각종 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있다.

마늘은 절임용과 건조가공용으로 일부가 소비되고 있고 90% 이상이 생체 조미료 부식용으로 사용되고 있어 대부분 저온저장 하다가 시장에 출하되고 소비되고 있다. 그러나 저장성이 약하여 저장 중 품질열화와 물량손실이 심하게 발생하므로 연중 가격의 진폭이 심하여 정부에서는 이를 비축물자로 지정하여 안정공급과 가격안정을 가하고 있는 바 이에 따른 대량 저장이 불가피한 실정이다. 저장의 한계시점이나 수확당시 적절한 수요가 없는 경우 일반적인 장기비축의 목적으로 건조에 의한 저장이 현재로서는 기술과 소비 면에서 큰 문제없이 가장 보편적으로 이용될 수 있다. 최근 가정주부의 사회참여 증가와 생활이 복잡해짐에 따라서 인스턴트(instant) 식품의 소비는 증가하고 있다. 즉, 라면스프, 종합양념 등에 마늘 건조제품 소비는 연간 약 20~30%가 증가 하고 있으며 또한, 농산물 수확 후 생체 그대로가 아닌 가공수출이란 면에서도 그 효과가 큰 것으로 사료된다.

국내의 마늘관련 특허로는 장기보존이 가능하고 위생적인 다진 마늘 제조방법, 마늘취가 감소된 마늘제재 및 마늘 음료, 마늘 건빵(마늘 크래커)의 제조 방법, 마늘, 양파를 이용한 조미료 제조 방법, 마늘로부터 분리 정제한 셀레늄 강화 마늘 추출물 및 그의 이용, 마늘을 이용한 건강식품 및 그의 제조 방법, 마늘을 주원료로 한 혼합 음료, 마늘 성분을 함유한 식염의 제조 방법, 가열된 마늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료, 마늘 추출물의 전립선 암 및 방광암 예방 및 치료제로서의 용도, 마늘 분말과 이를 이용한 조성물 및 그 제조 방법, 발효마늘로 숙성된 합성종합 영양 식과 이의 제조 방법 등이 있으나, 본 발명의 구성과 다르다.

**【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】**

본 발명의 목적은 관능적인 특성이 우수하여 기호성이 좋고, 항 노화활성이 우수하여 기능성이 좋은 천연소재를 이용한 생리활성 소재를 제공하고 제조 방법을 제공하는 것에 있다. 따라서 본 발명의 목적은 인체에 필요한 성분을 함유하고 있는 마늘을 쉽게 섭취하기 위하여 마늘 추출물에 팽이버섯, 구연산, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀 그리고 비타민 C의 적정 배합 비율을 결정하고 배합, 타정하여 포장함으로써 마늘 소재의 제품 및 그의 제조방법을 제공하는데 있다.

**【발명의 구성】**

상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 구연산, 팽이버섯, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀, 비타민 C 및 마늘 분말이 포함된 마늘 타블렛을 제공한다.

상기에서 마늘 타블렛은 구연산 1~2중량%, 팽이버섯 2~6중량%, 자일리톨 2~4중량%, 함수포도당 40~62중량%, 스테아린산 마그네슘 0.5~1.5중량%, 옥타코사놀 0.2~1중량%, 비타민 C 0.2~0.5중량% 및 마늘 분말 10~20중량%를 함유하는 것이 바람직하다.

본 발명은 구연산, 팽이버섯, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀, 비타민 C 및 마늘 분말을 배합하는 단계, 5~13℃에서 4시간 숙성 시키는 단계, 정제기를 이용하여 알약을 제조하는 단계, 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로오스 용액으로 코팅하는 단계를 포함하는 마늘 타블렛의 제조방법을 제공한다.

이하 마늘의 소재 검색을 실시하고 이를 첨가한 마늘 타블렛의 제조공정을 상세하게 설명한다.

- 1) 원료 : 주원료는 36~38℃에서 20~24시간 동안 2~3회 열수 추출하여 건조한 마늘 분말을 사용하며, 부 원료는 팽이버섯, 구연산, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀 그리고 비타민 C 등을 식용재료로서 사용한다.
- 2) 혼합 : 상기 원료 중에 부원료인 팽이버섯, 구연산, 자일리톨, 함수포도당, 스테아



린산 마그네슘, 옥타코사놀 그리고 비타민C 등을 1차로 혼합한 다음 2차로 마늘분말을 첨가하여 혼합한다.

상기에서, 마늘 타블렛을 제조하기 위하여 구연산 1~2중량%, 팽이버섯 2~6중량%, 자일리톨 2~4중량%, 합수포도당 40~62중량%, 스테아린산 마그네슘 0.5~1.5중량%, 옥타코사놀 0.2~1중량%, 비타민 C 0.2~0.5중량% 및 마늘 분말 10~20중량%를 혼합하는 것이 바람직하다.

3) 숙성 : 상기 혼합한 원료를 5~13℃에서 4시간 동안 숙성하여 원료의 수분평형이 되게 한다.

4) 정제 제조 : 상기 혼합한 원료로 정제 제조기를 이용하여 0.15~2g의 알약식 마늘 제품을 제조한다.

5) 코팅 : 마늘 분말을 주원료로 만든 정제 제품은 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로오스(hydroxy prophyll methyl cellulose) 용액으로 코팅한다.

6) 포장 : 산소 및 수분 투과도가 낮은 포장 용기를 사용하여 일정량씩 포장하여 마늘 타블렛 제품을 완성한다.

이하 본 발명의 내용을 실시 예에 의해 보다 상세하게 설명하기로 한다. 다만 이들 실시 예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

#### [실시예 1]

37℃에서 24시간 동안 2회 열수 추출한 마늘 추출물을 여과 착즙하여 -20℃에서 냉동시킨 후, 50℃에서 24시간 동안 건조시키고 미분쇄하여 마늘 분말을 얻어낸다. 이를 25중량% 취하고 구연산 2중량%, 팽이버섯 2.7중량%, 자일리톨 5중량%, 합수포도당 60중량%, 스테아린산 마그네슘 1.3중량%, 옥타코사놀 0.7중량% 그리고 비타민 C 0.3중량%를 잘 배합하여 알약을 제조하였다. 그리고 알약에 hydroxy prophyll methyl cellulose(HPMC) 3중량% 용액으로 코팅하여 알약 식 마늘 제품을 제조하였다.

[실시예 2]

37℃에서 24시간 동안 2회 열수 추출한 마늘 추출물을 여과 포착증하여 -20℃에서 냉동시킨 후, 50℃에서 24시간동안 건조시키고 미분쇄하여 마늘 분말을 얻어낸다. 이를 20중량% 취하고 구연산 2중량%, 팡이버섯 3.7중량%, 자일리톨 4중량%, 합수포도당 65.3중량%, 스테아린산 마그네슘 1.2중량%, 옥타코사놀 0.5중량% 그리고 비타민C 0.3중량%를 잘 배합하여 알약을 제조하였다. 그리고 알약에 hydroxy prophyll methyl cellulose(HPMC) 3중량% 용액으로 코팅하여 알약 식 마늘 제품을 제조하였다.

[실시예 3]

37℃에서 24시간 동안 2회 열수 추출한 마늘 추출물을 여과 포착증하여 -20℃에서 냉동시킨 후, 50℃에서 24시간동안 건조시키고 미분쇄하여 마늘 분말을 얻어낸다. 이를 15중량% 취하고 구연산 2중량%, 팡이버섯 4.7중량%, 자일리톨 3.5중량%, 합수포도당 69.9중량%, 스테아린산 마그네슘 1.2중량%, 옥타코사놀 0.4중량% 그리고 비타민C 0.3중량%를 잘 배합하여 알약을 제조하였다. 그리고 알약에 hydroxy prophyll methyl cellulose(HPMC) 3중량% 용액으로 코팅하여 알약 식 마늘 제품을 제조하였다.

표 1. 관능검사

처리구	맛	향	색	기호도
실험예 1	7.9(0.3)	7.6(0.6)	7.6(0.6)	7.8(0.4)
실험예 2	8.8(0.4)	8.4(0.4)	8.3(0.4)	8.7(0.5)
실험예 3	8.2(0.3)	8.2(0.5)	8.1(0.5)	8.4(0.5)

\* ( )는 표준편차임.

상기 실험은 원료 배합 비율을 달리 하여 제조한 알약 식 마늘제품의 관능검사를 9점(매우 우수) 평점 법으로 시행한 결과이다. 시험 예1과 시험 3의 경우에도 관능검

사 결과 우수하였으나 시험 예 2의 경우, 마늘 향과 맛에서도 매우 우수하게 평가되었다.

#### **【발명의 효과】**

이상에서 살펴본 바와 같이 본 발명에 의해 구연산, 팡이버섯, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀 그리고 비타민 C 및 마늘 분말이 포함된 관능적으로 매우 우수한 마늘 타블렛을 제조할 수 있다. 본 발명은 마늘 추출물의 생리활성 물질을 이용한 마늘 타블렛을 제조함으로써, 항산화 물질의 식품 소재화 및 고품질 제품 다양화 기술 개발을 가능하게 한다.

#### **【특허청구범위】**

##### **【청구항 1】**

구연산, 팡이버섯, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀, 비타민 C 및 마늘 분말이 포함된 마늘 타블렛.

##### **【청구항 2】**

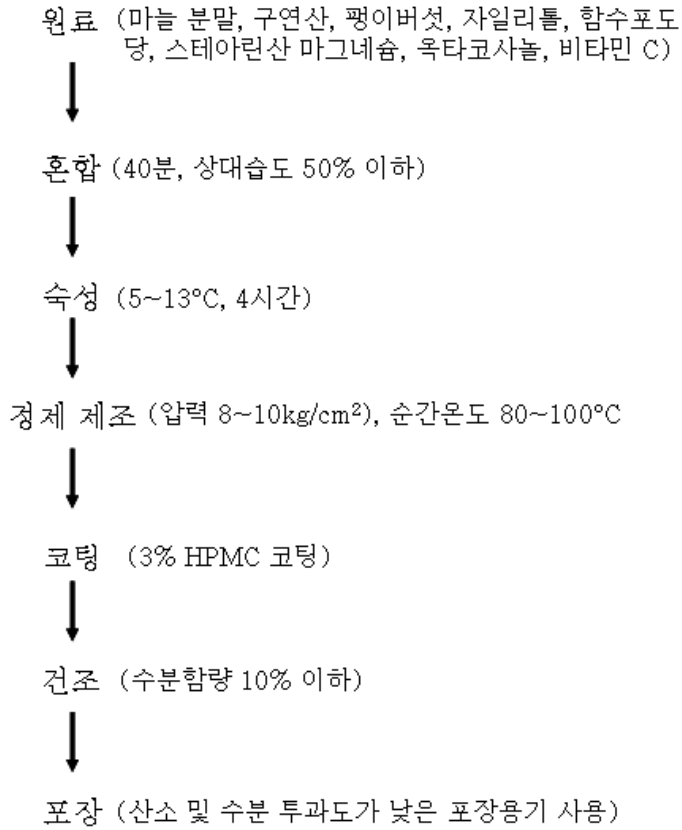
제1항에 있어서, 구연산 1~2중량%, 팡이버섯 2~6중량%, 자일리톨 2~4중량%, 함수포도당 40~62중량%, 스테아린산 마그네슘 0.5~1.5중량%, 옥타코사놀 0.2~1중량%, 비타민 C 0.2~0.5중량% 및 마늘 분말 10~20중량%를 함유하는 것을 특징으로 하는 마늘 타블렛.

##### **【청구항 3】**

구연산, 팡이버섯, 자일리톨, 함수포도당, 스테아린산 마그네슘, 옥타코사놀, 비타민 C 및 마늘 분말을 배합하는 단계, 5~13℃에서 4~5시간 숙성 시키는 단계, 정제기를 이용하여 알약을 제조하는 단계, 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로오스 용액으로 코팅하는 단계를 포함하는 마늘 타블렛의 제조방법.

【도면】

【도 1】



## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 마늘 추출물을 포함하는 마늘 음료 및 그의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마늘의 생리활성 성분을 포함하는 유효성분을 주성분으로 하고, 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추, 설탕 그리고 구연산을 첨가하여 다양한 영양소를 함유한 마늘 음료 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 의해 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추 및 마늘의 열수추출물을 함유하는 관능적으로 매우 우수한 마늘 음료를 제조할 수 있다. 본 발명은 마늘 추출물의 생리활성 물질을 이용한 음료 음료를 제조함으로써, 항산화 물질의 식품 소재화 및 고품질 제품 다양화 기술 개발을 가능하게 한다.

### 【대표도】

도 1

### 【색인어】

마늘, 생리활성, 음료

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

마늘 추출물을 포함하는 마늘 음료 및 그의 제조 방법 {A method for manufacturing of drink type garlic product and drink type garlic product}

### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 따른 생리활성 기능성 마늘 음료제품의 제조공정도이다.

**【발명의 상세한 설명】**

**【발명의 목적】**

**【발명이 속하는 기술 분야 및 그 분야의 종래기술】**

본 발명은 마늘 추출물을 포함하는 마늘 음료 및 그의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마늘의 생리활성 성분을 포함하는 유효성분을 주성분으로 하고, 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추, 설탕 그리고 구연산을 첨가하여 다양한 영양소를 함유한 마늘 음료 및 그 제조방법에 관한 것이다.

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과의 allium속에 속하는 작물로 그 원산지가 중앙 아시아 등지로 전해지며 우리의 건국신화에도 마늘이 등장하였듯이 식품 및 의약품에 널리 애용되었고, 최근에는 전 세계적으로 sauce, 육가공 및 향신료와 약용으로 그 수요가 점차 증가되고 있다. 고대 인도에서는 마늘이 피부염, 류머티즘, 복토, 식욕감퇴, 체중감소 등의 치료를 위하여 사용되었고, Hipocrates도 의약품으로서 마늘의 중요성을 인정하여 이뇨제와 화농성 상처의 치료목적으로 사용하였다. 마늘의 생리활성은 식물체내에서는 불활성인 전구체로부터 세포가 파괴되면서 효소적으로 생산된 allicin 때문이며 이 allicin은 항균작용, 항진균작용, 항암작용, 저혈당작용, 혈압강화작용, 동맥경화예방 등 각종 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있다.

마늘은 절임용과 건조가공용으로 일부가 소비되고 있고 90% 이상이 생체 조미료 부식용으로 사용되고 있어 대부분 저온저장 하다가 시장에 출하되고 소비되고 있다. 그러나 저장성이 약하여 저장 중 품질열화와 물량손실이 심하게 발생하므로 연중 가격의 진폭이 심하여 정부에서는 이를 비축물자로 지정하여 안정공급과 가격안정을 가하고 있는 바 이에 따른 대량 저장이 불가피한 실정이다. 저장의 한계시점이나 수확당시 적절한 수요가 없는 경우 일반적인 장기비축의 목적으로 건조에 의한 저장이 현재로서는 기술과 소비 면에서 큰 문제없이 가장 보편적으로 이용될 수 있다. 최근 가정주부의 사회참여 증가와 생활이 복잡해짐에 따라서 instant 식품의 소비는 증가하고 있다. 즉, 라면스프, 종합양념 등에 마늘 건조제품 소비는 연간 약 20~30%가 증가 하고 있으며 또한, 농산물 수확 후 생체 그대로가 아닌 가공수출이란 면에서도 그 효과가 큰 것으로 사료된다.

국내의 마늘관련 특허로는 장기보존이 가능하고 위생적인 다진 마늘 제조방법,

마늘취가 감소된 마늘제제 및 마늘 음료, 마늘 건빵(마늘 크래커)의 제조 방법, 마늘, 양파를 이용한 조미료 제조 방법, 마늘로부터 분리 정제한 셀레늄 강화 마늘 추출물 및 그의 이용, 마늘을 이용한 건강식품 및 그의 제조 방법, 마늘을 주원료로 한 혼합 음료, 마늘 성분을 함유한 식염의 제조 방법, 가열된 마늘 추출액을 함유하는 항진균 용 천연 보존료, 마늘 추출물의 전립선 암 및 방광암 예방 및 치료제로서의 용도, 마늘 분말과 이를 이용한 조성물 및 그 제조 방법, 발효마늘로 숙성된 합성종합 영양 식과 이의 제조 방법 등이 있으나 본 발명의 구성과 다르다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 목적은 관능적인 특성이 우수하여 기호성이 좋고, 항 노화활성이 우수하여 기능성이 좋은 천연소재를 이용한 생리활성 소재를 제공하고 제조 방법을 제공하는 것에 있다. 따라서 본 발명의 목적은 인체에 필요한 성분을 함유하고 있는 마늘을 쉽게 섭취하기 위하여 마늘에 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추, 설탕 그리고 구연산을 적정 배합 비율을 결정하고 배합하여 추출하여 포장함으로써 마늘의 유효 성분을 함유한 음료 및 그의 제조 방법을 제공하는데 있다.

#### 【발명의 구성】

상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추 및 마늘의 추출물을 포함하는 마늘 음료를 제공한다.

상기에서, 추출물은 숙지황 2~6중량%, 오미자 2~4중량%, 구기자 1~3중량%, 천궁 0.5~2중량%, 감초 0.5~3중량% 및 마늘 70~90중량%를 혼합하여 추출하는 것이 바람직하다.

본 발명은 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추 및 마늘 혼합물을 물에 담근 후 5~13℃에서 4~5시간 동안 숙성하는 단계, 상기 숙성된 원료를 95~100℃에서 30~40분 동안 열수 추출하는 단계, 상기 추출액을 90℃에서 1~2분 동안 열 교환기를 통과시킨 후 밀봉하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 마늘 음료의 제조방법을 제공한다.

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 *Allium* 속 채소 중 마늘에서 추출한 노화억제 물질의 활용을 위하여 기능성 중간 소재화 개발을 목적으로 시도되었다. 본 발명에서 채소류(마늘)의 생리활성 성분을 검색하고 유효성분을 추출하기 위해 전처리 및 추출방법에 따른 대량 추출기술을 검토하였으며, 유효성분의 최적 추출조건 예측 및 실증을 통해 추출조건의 최적화를 모델링하였다.

본 발명을 위하여 마늘 한국산으로부터 생리활성 성분을 추출할 수 있다. 상기 시료는 깨끗이 수세한 후  $1\pm 0.5\text{mm}$ 의 크기로 세절하여 사용하는 것이 바람직하고, 추출 용매로는 물 또는 50~100% 에탄올을 사용하는 것이 바람직하다. 용매는 건물 중량의 10~12배에 해당하는 부피(w/v)를 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 실시 예에서 마늘의 생리활성 물질을 물 또는 에탄올 추출하여 생리활성 측정에 따른 추출효과를 분석하였다. 상기 추출물의 전자공여 작용, Superoxide dismutase(SOD) 유사활성을 측정하여 비교하였을 때, 마늘의 열수 추출물은 에탄올로 추출된 것에 비해 생리활성 능력이 우수하다.

본 발명은 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추 및 마늘의 추출물을 함유하는 마늘 음료를 제조할 수 있다.

상기에서 추출물은 숙지황 2~6중량%, 오미자 2~4중량%, 구기자 1~3중량%, 천궁 0.5~2중량%, 감초 0.5~3중량%, 마늘 70~90중량%를 혼합하여 추출하는 것이 바람직하다.

본 발명의 마늘 음료는 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추 및 마늘 혼합물을 물에 담근 후 5~13°C에서 4~5시간 동안 숙성하는 단계, 상기 숙성된 원료를 95~100°C에서 30~40분 동안 열수 추출하는 단계, 상기 추출액을 90±0.5°C에서 1~2분 동안 열 교환기를 통과시킨 후 밀봉하는 단계를 통하여 제조할 수 있다.

본 발명의 마늘 음료를 제조하기 위하여 상기 원료 중에 부원료인 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추, 당 그리고 구연산 등을 1차로 혼합한 다음 2차로 마늘을 첨가하여 물과 혼합한다.

상기에서 혼합한 원료를 5~13°C에서 4~5시간 동안 숙성하여 원료의 수분평형이 되게 한 후, 상기 숙성된 원료를 95~100°C에서 30~40분간 열수 추출한다.

상기 추출액을 90±0.5°C에서 1~2분 동안 열 교환기를 통과시켜 밀봉하고 뒤집어



1분 정도 방치한다.

상기 제조된 마늘 음료를 50℃ 이하로 냉각시킨다.

본 발명에 따른 음료는 상기 재료 이외에 통상의 음료에 첨가되는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등, 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 크실리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 있다. 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기한 추가 성분 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 구연산, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

이하 본 발명의 내용을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명하기로 한다. 다만 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

## 실시예

### 실시예 1

본 발명은 마늘의 생리활성 물질 추출을 위하여 마늘 시료 10g을 물, 50%와 100% 에탄올 100ml로 37℃에서 24시간 동안 추출하기를 2회 반복하였다. whatman filter paper No. 2로 필터하고, 감압 하에 증발시킨 후, 증류수로 100ml를 채워 마늘 추출물을 얻었다 생리활성 측정에 따른 추출효과를 분석하기 위하여 상기 추출물의 전자공여 작용, Superoxide dismutase(SOD) 유사활성을 측정하였다.

표 1. 생리활성 측정

처리구	마늘			0.1% Ascorbate	1% Ascorbate
	water	50% EtOH	100% EtOH		
전자공여작용 (%)	97.1(0.3)	77.9(0.2)	58.2(0.4)	79(0.1)	98.7(0.2)
SOD-like ability (%)	66.3(0.1)	56.2(0.3)	17.8(0.2)	78.5(0.3)	99.2(0.1)

\* ( )는 표준편차임.

상기 표 1은 추출용매별 마늘의 생리활성을 측정한 결과이다. 표 1에서와 같이 Ascorbate를 대조군으로 하여 생리활성 능력을 비교하였을 때 마늘의 열수 추출물에는 탄올로 추출된 것에 비해 생리활성 능력이 우수하다고 평가되었다.

## 실험예

### 실험예 1

부원료인 숙지황 5.8중량%, 오미자 3.48중량%, 구기자 2.14중량%, 천궁 1.91중량%, 감초 2.01중량%, 대추 1.6중량%, 설탕 6중량% 그리고 구연산 0.25중량%를 1차로 혼합한 다음 2차로 마늘 76.81중량%를 첨가하고 전체 부피의 8배의 물과 혼합한다. 5~13℃에서 4시간 동안 숙성하여 원료의 수분평형을 맞춘 후, 상기 숙성된 원료를 100℃에서 30분간 열수 추출한다. 제조된 추출액을 90℃에서 약 1분 동안 열 교환기를 통과시켜 밀봉하고 뒤집어 1분 정도 방치한 후, 50℃ 이하로 냉각시켜 마늘 음료제품을 제조하였다.

### 실험예 2

부원료인 숙지황 4.46중량%, 오미자 2.87중량%, 구기자 1.34중량%, 천궁 0.94중량%, 감초 1.34중량%, 대추 0.94중량%, 설탕 6중량% 그리고 구연산 0.25중량%를 1차로 혼합한 다음 2차로 마늘 81.86중량%를 첨가하고 전체 부피의 8배의 물과 혼합한다. 5~13℃에서 4시간 동안 숙성하여 원료의 수분평형을 맞춘 후, 상기 숙성된 원료를 100℃에서 30분간 열수 추출한다. 제조된 추출액을 90℃에서 약 1분 동안 열 교환기

를 통과시켜 밀봉하고 뒤집어 1분 정도 방치한 후, 50℃ 이하로 냉각시켜 마늘 음료 제품을 제조하였다.

실험예 3

부원료인 숙지황 2.42중량%, 오미자 2.01중량%, 구기자 0.66중량%, 천궁 0.43중량%, 감초 0.68중량%, 대추 0.32중량%, 설탕 6중량% 그리고 구연산 0.25중량%를 1차로 혼합한 다음 2차로 마늘 87.23중량%를 첨가하고 전체 부피의 8배의 물과 혼합한다. 5~13℃에서 4시간 동안 숙성하여 원료의 수분평형을 맞춘 후, 상기 숙성된 원료를 100℃에서 30분간 열수 추출한다. 제조된 추출액을 90℃에서 약 1분 동안 열 교환기를 통과시켜 밀봉하고 뒤집어 1분 정도 방치한 후, 50℃ 이하로 냉각시켜 마늘 음료 제품을 제조하였다.

상기 실험예 1~3에 의해 제조한 마늘 음료에 대하여 관능검사를 실시하였다.

표 2. 관능검사

처리구	맛	향	색	기호도
실험예 1	8.3(0.2)	7.9(0.3)	8.3(0.6)	8.1(0.4)
실험예 2	8.6(0.2)	8.2(0.3)	8.0(0.3)	8.6(0.3)
실험예 3	7.2(0.3)	8.1(0.4)	7.8(0.2)	7.8(0.2)

\* ( )는 표준편차임.

표 2는 원료 배합 비율을 달리하여 제조한 마늘 음료의 관능검사를 9점(매우 우수) 평점 법으로 시행한 결과이다. 실험예1과 실험예 3의 경우에도 관능검사 결과 우수하였으나 실험예 2의 경우, 마늘 향과 맛에서도 매우 우수하게 평가되었다.

**【발명의 효과】**

이상에서 살펴본 바와 같이 본 발명에 의해 숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추 및 마늘의 열수추출물을 함유하는 관능적으로 매우 우수한 마늘 음료를 제조할 수

있다. 본 발명은 마늘 추출물의 생리활성 물질을 이용한 음료 음료를 제조함으로써, 항산화 물질의 식품 소재화 및 고품질 제품 다양화 기술 개발을 가능하게 한다.

#### 【특허청구범위】

##### 【청구항 1】

숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추 및 마늘의 추출물을 포함하는 마늘 음료

##### 【청구항 2】

제1항에 있어서, 추출물은 숙지황 2~6중량%, 오미자 2~4중량%, 구기자 1~3중량%, 천궁 0.5~2중량%, 감초 0.5~3중량% 및 마늘 70~90중량%를 혼합하여 추출한 것을 특징으로 하는 마늘 음료.

##### 【청구항 3】

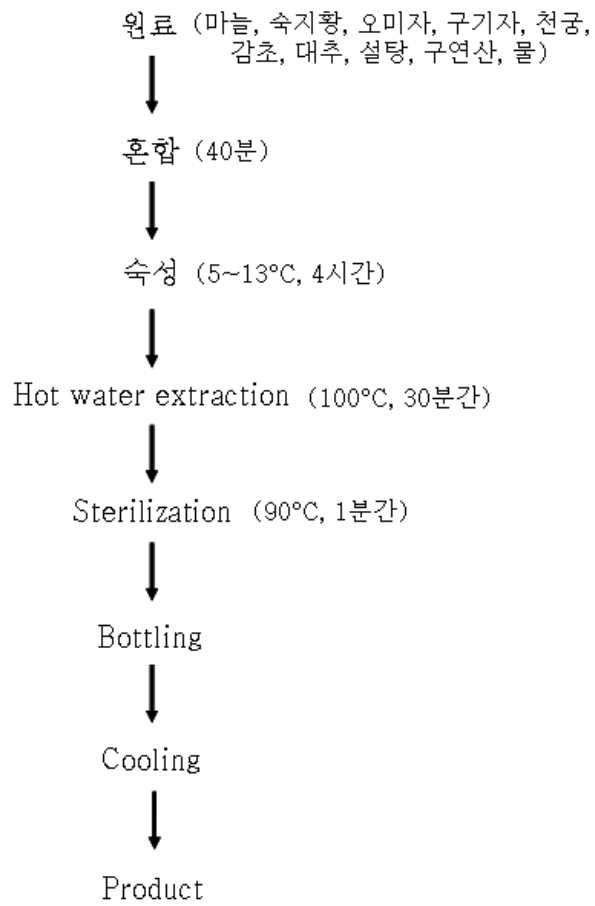
숙지황, 오미자, 구기자, 천궁, 감초, 대추 및 마늘 혼합물을 물에 담근 후 5~13℃에서 4~5시간 동안 숙성하는 단계

상기 숙성된 원료를 95~100℃에서 30~40분 동안 추출하는 단계

상기 추출액을 90℃에서 1~2분 동안 열 교환기를 통과시킨 후 밀봉하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 마늘 음료의 제조방법.

【도면】

【도 1】



나. 채소류 과립차 및 환 제품의 개발

1) 채소류의 추출 및 농도

선별, 세척하여 40mesh 크기로 세절한 생 버섯에 2배의 50% 에탄올을 가하여, 상온에서 1시간 동안 3회 반복 추출한다. 추출액은 환류 냉각장치가 부착된 감압농축기에서 60.0 Brix까지 농축하여 시료로 사용하였다.

2) 부형제의 배합

60Brix로 농축된 각각의 채소류 농축액에 무수포도당을 잘 섞는다. 구연산, 비타민 C 및 기타 부형제를 첨가하여 포도당과 잘 배합한다. 최종 배합 비는 Table 36과 같다.

Table 36. Combination ratio for vegetable grannulated tea

Unit : (%)

Ingredient	Content
Garlic ext. <sup>1)</sup>	10.0
<i>Lycium chinense</i> ext.	0.70
Jujube ext.	0.30
Mushroom ext.	0.40
Citric acid	1.00
Vitamin C	0.60
Sum	100.00

<sup>1)</sup> Garlic ext. : 6.0 °brix

### 3) 과립화 및 건조

부형제와 잘 배합된 원료를 15~20 mesh 정도의 크기로 과립화를 시킨 뒤, 50~55℃에서 수분함량이 8% 내외가 되도록 건조시킨다.

### 4) 과립 차의 제조 공정

최종적인 과립 차 제조 공정은 다음 Fig. 52와 같다.

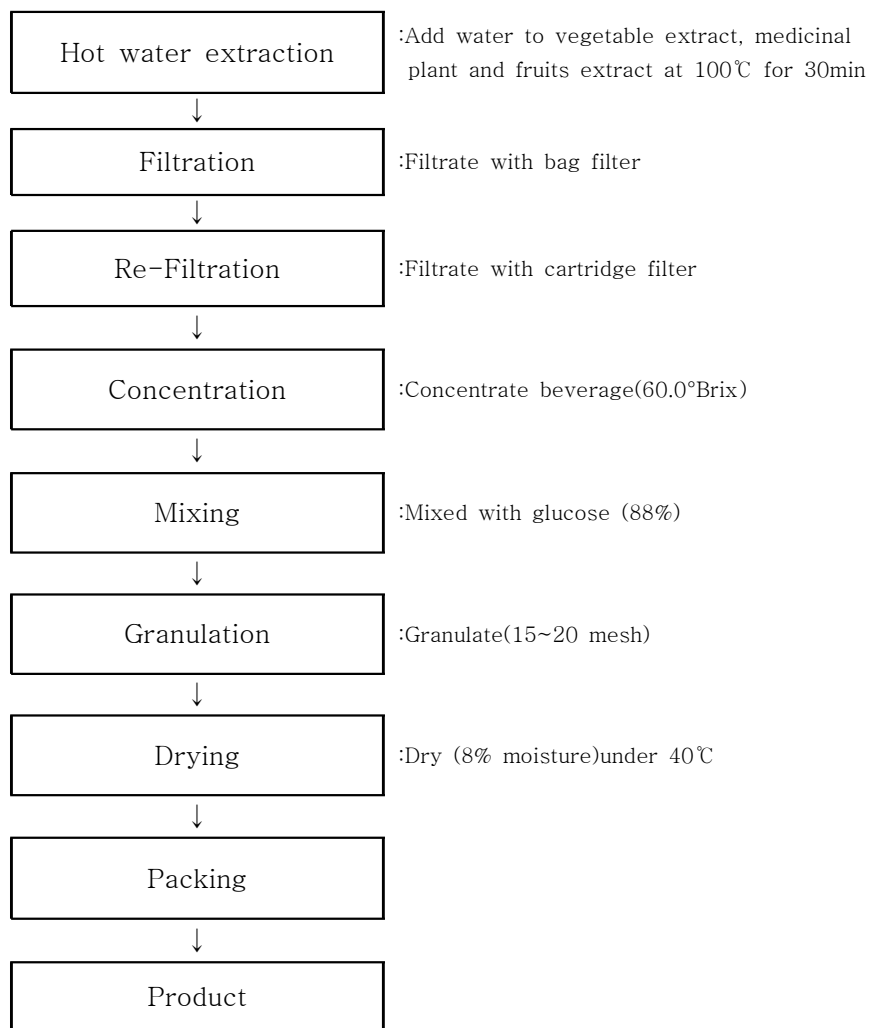


Fig. 52. Preparation process for granulated teas of vegetable

##### 5) 채소류 환 제품의 개발

채소류 환 제품의 제조 배합비율은 Table 37과 같다. 마늘 이외에 구기자 추출물, 대추 추출물, 버섯 추출물 등을 각각 0.70%, 0.30%, 0.40% 정도 첨가하여 채소류



환 제품의 맛을 더했으며 또한 구연산 1.00% 및 비타민 0.60%를 첨가하여 기능성 환 제품으로서의 가치를 높였다. 위의 배합비로 얻어진 채소류 환 제품은 표면은 매끄럽고 단단해서 외관상 문제가 전혀 없었으며 또한 성형이 쉽게 이루어져 정제기에 서 환 제품이 빠져나올 때 완성된 제품의 모양이 그대로 유지되었다.

Table 37. Combination ratio for vegetable pills

Unit : (%)

Ingredient	Content
Garlic powder <sup>1)</sup>	10.0
<i>Lycium chinense</i> ext.	0.70
Jujube ext.	0.30
Mushroom ext.	0.40
Citric acid	1.00
Vitamin C	0.60
Sum	100.00

<sup>1)</sup> Garlic ext. : 6.0 °brix

#### 4. 채소류의 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료

##### 가. 마늘타블렛BK21

###### 1) 기능효과 : 항산화

###### 2) 원료·성분의 섭취가 국민건강증진에 기여한다는 근거

마늘 타블렛BK21의 원재료인 마늘은 우리의 단군신화에도 마늘이 등장하였듯이 식품 및 의약품에 널리 애용되어왔고, 지금도 사용되고 있으며 수요도 점차 증가되고 있다. 이처럼 마늘이 식용 및 의약품으로 애용하게 된 것은 마늘의 함황 아미노산의 일종인 alliin이 분해되면서 특유의 신미성분을 생성시키기 때문이다. 또한, 생리활성은 식물체내에서는 불활성인 전구체로부터 세포가 파괴되면서 효소적으로 생산된 allicin 때문이며 이 allicin은 항균작용, 항진균작용, 항암작용, 저혈당작용, 혈압강하작용, 동맥경화예방 등 각종 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있다. 또한, 마늘을 각종 식품에 첨가하여 기능성을 높인 여러 가지 상품들을 섭취한 많은 사람들의 사례와 실험적 검증을 통하여 마늘 섭취가 국민건강에 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

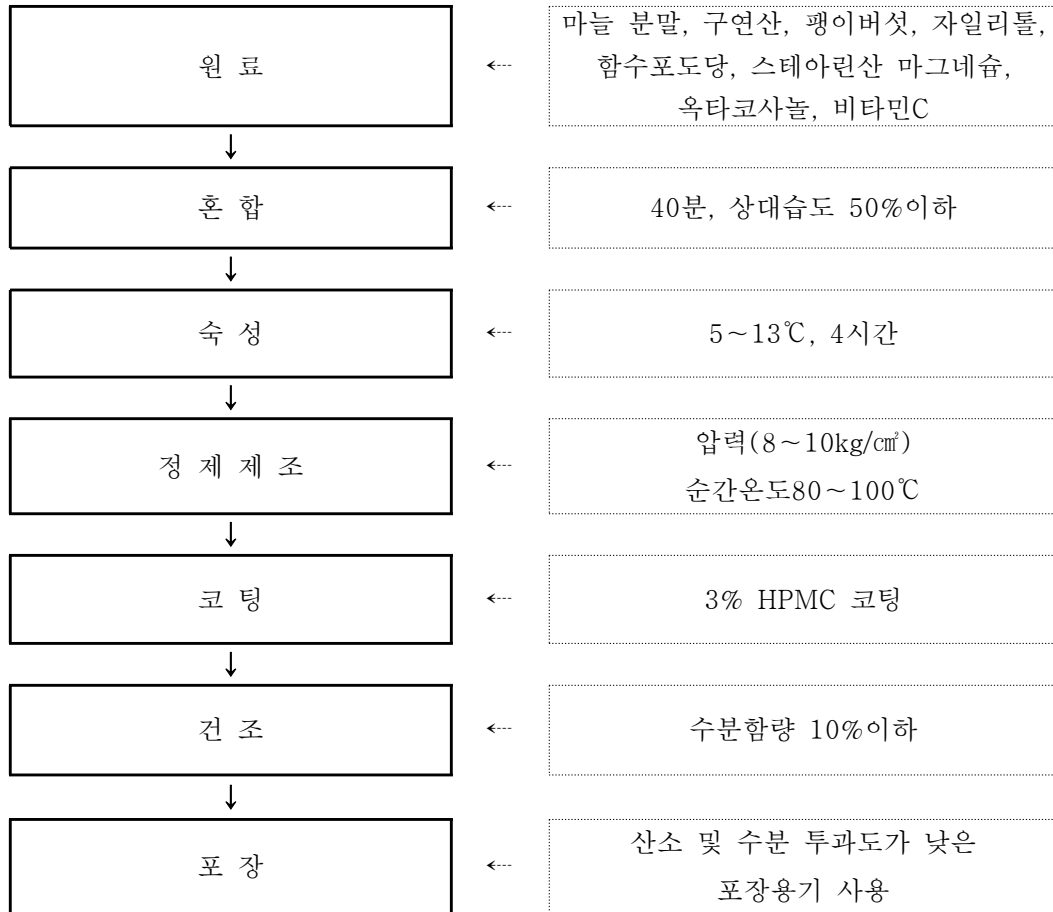
###### 3) 기원, 개발경위, 외국에서의 인정·사용현황 등에 관한 자료

최근 건강 기능성 마늘에 대한 관심이 높아지면서 마늘이 각광을 받고 있으며 건강 식품소재로서 사용되어 오고 있다. 이러한 건강 기능성 마늘을 이용한 마늘 타블렛BK21을 제조하였으며 항산화 효과를 입증하고자 마늘의 생리활성 실험 및 동물 확인 실험을 통한 기능성 연구를 하였다. 이에 관련 연구 동향으로는 한국산 마늘 성분들의 항암성에 관한 연구를 비롯하여 마늘 추출물의 항균, 항고혈압 및 항암활성, 생마늘즙과 열처리 마늘즙의 항균활성 비교 등 많은 연구가 이루어지고 있다. 전체 EU 회원국 중에서 독일에서 마늘 보충제가 의약품으로 분류하고 있고, 뉴질랜드에서는 고농축 마늘(Odourless Garlic)이 개발되었으며, 현재 여러 가지 식품에 첨가되어 건강식품으로서 인정받으며, 우리나라에서도 그 원료를 수입 또는 제조하여 식

품소재로 이용하고 있다. 생리활성 실험 및 동물 확인 실험을 통한 기능성 연구를 하였다.

4) 제조방법 및 그에 관한 자료

표. 마늘 타블렛BK21 제조공정



5) 원료·성분의 특성에 관한 자료

마늘은 항균작용, 세포대사 억제 등의 많은 중요한 생화학적 활성을 갖는 가장 잘 알려진 항산화 효과가 뛰어난 식품이다. 마늘 타블렛BK21은 관능적인 특성이 우

수하여 기호성이 좋고, 항 노화활성이 우수하여 기능성이 좋은 천연소재를 이용하였다. 또한, 인체에 필요한 마늘성분을 쉽게 섭취하기 위하여 구연산 1~2%중량, 팽이버섯 2~6%중량, 자일리톨 2~4%중량, 스테아린산 마그네슘 0.5~1.5%중량, 옥타코사놀 0.2~1%중량, 비타민 C 0.2~0.5%중량 및 마늘 분말 10~20%중량을 혼합 후 추출 하여 제조하였다.

#### 6) 안전성에 관한 자료

마늘은 ‘건강기능식품 원료 및 성분인정에 관한 규정’의 건강기능식품원료 또는 성분의 분류 중 “가. 동식물 원료, 미생물 원료 자체가 국내에서 식용으로 사용한 경험이 있고, 알려진 부작용이 없는 것, 독성이 없다고 보고되어 있는 것 또는 식품 원료로 인정된 것”에 해당하기 때문에 안전성시험의 적용은 필요하지 않다고 판단되어 독성실험은 필요 없다고 사료된다.

#### 7) 기능성내용 및 그에 관한 자료

마늘의 항산화 효과에 대한 검증 내용으로 마늘 추출액이 첨가된 식이를 4주간 섭취한 실험동물을 이용하여 측정하였다.

##### 가) 한국산 마늘 성분들의 항암성에 관한 연구

한국산 마늘에 있어서 마늘의 각 성분들의 항암 효과에 대한 연구로서 본 실험에서는 인체 장암 세포 유래의 HCT-15세포를 사용하여 특이적인 항암 활성을 *in vitro*에서 측정하고자, 마늘의 성분 중에서 alliin의 알려진 alliin 및 70% 에탄올추출물을 사용하였으며, 측정방법으로는 Immuno assay 방법을 사용하였고, 아울러 암세포의 성장저해정도를 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 4.7배 순도로 정제시킨 allinase의 경우 13.7units을 첨가하였을 때 95.0%의 암세포 성장저해를 보였으며, alliin과 에탄올 추출물의 경우에는 각각 50mg을 첨가하였을 때 각각 97.5%와 88.0%의 암세포성장저해를 나타내었다. 또한 allinase, alliin 및 에탄올 추출물의 암세포 HCT-15에 대한 IC<sub>50</sub>은 각각 1.37units, 13.5mg 및 2.5mg이었다.

나) 마늘 추출물의 항균, 항고혈압 및 항암활성

국내산 마늘과 중국산 마늘을 methanol, ethyl acetate, chloroform, hexane으로 추출하여 항균, 항 곰팡이, 항암, 항고혈압 활성을 조사하였다. 그 결과 추출수율은 methanol추출물이 7.9-8.8 brix의 농도로 가장 높은 추출수율을 보였다, 마늘 용매 추출물을 *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Paeruginasa* 및 *S. typhimurium* 균주에 대해 항균활성을 조사한 결과, ethyl acetate와 chloroform추출물이 *B. subtilis*, *P. aeruginasa*에 대해 8-16mm의 clear zone 으로 강한 항균활성을 나타내었다. ACE 저해 활성은 완도 65.6%, 단양 60.4%, 서산 55.3% 및 중국산 70.1%로 methanol 추출물이 다른 추출물에 비해 높은 활성을 나타내었다.

다) 마늘성분의 노화억제작용에 관한 연구; 황산화작용을 중심으로

강장·장수효과가 있는 것으로 구전(口傳)되고 있는 마늘 (*Allium Stivum* L.)의 황산화작용에 의한 생체노화억제작용을 Harman의 유기설(free radical theory)을 중심으로 구명하였으며 지금까지 밝혀진 마늘의 유효 성분, 즉 alliin(S - allyl - L - cysteine sulfoxide), scordinin (oxoamidin), gralic oil, ethanol 및 nonkaolin 확분을 분리하였다. 이들 마늘성분과 저자 등이 분리한 인삼사포닌을 in vitro에서 전자공여능(electron donating ability)은 DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhy-drazyl)법으로, 과산화지질생성 억제작용은 TBA value 로, 또 과산화지질생성 초기의 유도기간은 peroxide value (POV)로 측정 비교하였으며, 과산화지질생성 억제작용을 가진 superoxide dismutase (SOD) 및 peroxidase 의 활성은 pyrogallol 자동산화법과 초속도 ( $\Delta A$  420/min) 로서 측정, 비교하였다. in vitro 실험은 SD rat ( $\sigma$ , 220g) 11마리씩을 1군으로 하여 마늘성분과 인삼사포닌을 매일 1회씩 4주간 경구투여 (p.o.)하여 in vitro와 같은 방법으로 POV, TBA, SOD, peroxidase등을 측정, 생체에 미치는 마늘 성분과 인삼사포닌의 영향을 분석, 비교하였다.

라) 생마늘즙과 열처리 마늘즙의 항균활성 비교

식중독 세균과 젖산균에 대한 생마늘의 항균력과 마늘에 열처리를 하여 항균력을 측정함으로써 마늘이 이들 균의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결

과 생마늘의 경우, 식중독 세균은 0.5%(w/v)이상, 젖산균은 1.5%(w/v)이상에서 많은 집락 감소를 보였다. 특히, 식중독 세균 중에서 *S. flexneri* 가 마늘에 대하여 가장 영향을 많이 받는 것으로 나타났다. 따라서 생마늘 농도 1%(w/v) 가 마늘을 식품에 첨가하거나 보존제로 사용할 때 가장 효과적임을 알 수 있었으며 열처리 마늘의 경우, 전반적으로 생마늘이 보였던 항균력보다는 낮은 항균력을 나타냈다. *bifidobacteria*의 경우 열처리 마늘을 첨가시 낮은 마늘 농도에서 일시 증가하는 경향을 보여주었다.

마) 마늘 추출물과 비타민 C 혼합물에 의한 암세포증식억제의 상승효과

HepG2, HT-29 및 HRT-18 암세포는 정도의 차이는 있으나 마늘성분과 비타민 C에 의해서 세포증식이 억제 또는 사멸되는 현상을 나타내었다. HepG2, HT-29 및 HRT-18에서 모두 마늘성분 및 비타민 C를 단독으로 첨가할 때보다 혼합물의 투여시에 세포 증식억제 및 사멸 효과가 현저히 상승됨을 보여주었다. HepG2의 세포주기 분석 결과, 마늘과 비타민 C의 혼합물의 첨가 배양시 G2/M 단계 세포가 증가되고 S단계 세포가 감소되는 것으로 나타나, 세포주기의 진행이 G2/M 단계에서 지체됨으로써 암세포 증식억제 효과를 보이는 것으로 여겨진다. Sarcoma-180 접종 동물에 마늘과 비타민 C의 혼합물의 경구 투여시 암을 가진 동물의 수명이 연장되는 효과를 나타내었다. 따라서 마늘과 비타민 C의 병용 투여는 *in vitro*에서 항암 작용의 상승효과를 보일 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 항암 효과를 가짐을 알 수 있었다.

바) 처리법을 달리한 마늘 첨가식이 자발성 고혈압쥐의 혈액에 미치는 영향

본 연구에서는 사람의 본태성 고혈압과 가장 유사한 증상을 나타내는 SHR을 이용하여 고혈압의 악성 기에 해당하는 6개월간의 장기간 동안 생마늘과 익힌 마늘 첨가식을 급여함으로써 마늘의 열처리가 혈청지질과 혈액 응고에 미치는 효과를 비교 관찰하였다. 실험 결과는 식이 섭취량은 익힌 마늘 3% 첨가군이 다소 낮았으며, 체중 증가량 및 식이 효율은 마늘 첨가군과 대조군간이 차이는 없었다. 총 콜레스테롤 수준은 마늘 첨가군이 대조군에 비해 현저히 저하되었으며, 특히 익힌 마늘군이 생마늘군 보다 낮게 나타났다. 중성 지질 수준은 마늘 첨가군들이 대조군에 비해 낮

았다. 혈장 prothrombin time은 마늘 첨가군들이 대조군 보다 길었으며, 마늘 열처리  
에 따른 차이는 없었다. Fibrinogen 농도는 익힌 마늘군이 대조군이나 생마늘군 보다  
낮았다. Fibrinogen과 prothrombin time은 유의한 부의 상관관계를 나타내었다. 이상  
을 종합하여 살펴보면, 익힌 마늘 3%와 생마늘 3%첨가군 모두 체중이나 식이 섭취  
량 및 식이 효율에서 대조군과 큰 차이가 나타나지 않은 것으로 보아 일상 식이 섭  
취 수준으로서 섭취할 수 있는 농도로 여겨진다. 열처리 효과를 비교해 보면, 익힌  
마늘의 생리 효과가 생마늘에 비해 낮다고 보고된 타 연구 결과와는 달리, 본 실험  
에서는 익힌 마늘과 생마늘의 효과가 유사한 것으로 나타났다

사) 가열된 마늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료

본 발명은 가열된 마늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료(natural  
preservative)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 a) 마늘에 포함되어 있는 알리나제를  
불활성화시키는 단계 b) 상기 알리나제가 불활성화된 마늘을 추출하는 단계 및 c)  
상기 마늘 추출액을 가열하는 단계를 포함하는 방법 또는 a) 마늘을 가열하는 단계  
및 b) 상기 가열된 마늘을 추출하는 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 가열된 마  
늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료에 관한 것이다. 본 발명에 따른 가열된  
마늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료는 높은 항진균 활성(antifungal  
activity)을 가질 뿐만 아니라, 상기 항진균 활성의 저장 안정성 및 pH에 대한 안정  
성이 우수하고, 화학 보존료가 갖는 인체 부작용의 문제를 발생시키지 않는다. 따라  
서, 본 발명에 따른 항진균용 천연 보존료는 효과적인 항진균용 보존료로서 다양한  
제품에 유용하게 사용될 수 있다.

아) 마늘 추출물이 N-Nitrosodimethylamine의 생성에 미치는 영향

본 연구는 마늘 추출물 중의 총 페놀함량, 전자공여능, 아질산염 소거능을 측정  
하고 NDMA 생성억제에 미치는 영향을 검색하였다. 총 페놀함량은 ethyl acetate  
>hexane >butanol >chloroform >water 순으로 많았으며, 전자공여능은 추출물의 농  
도증가에 따라 유의적으로 증가하였으며 ethyl acetate와 butanol추출물을 10 mg/mL  
의 butanol추출물 첨가 시 각각  $96.9 \pm 0.75\%$  및  $68.6 \pm 1.15\%$ 로 가장 높게 나타났다.

Butanol 추출물을 prep-LC로 5개의획분으로 분획하여 아질산염 소거능 및 NDMA 생성 억제효과를 측정한 결과, fraction III에서 효과가 가장 뛰어났으며, 이를 prep-LC로 재분획하여 얻은 3개의 subfraction (III-a, III-b 및 III-c)에서는 subfraction III-c의 효과가 가장 우수하였다. 따라서 마늘 부탄올 추출물은 NDMA 생성 억제에 효과적인 저해제인 것으로 판단된다.

자) 마늘-죽염 제제가 위장 장애 유발 흰쥐의 항산화 효소활성에 미치는 영향

본 연구는 식품 의약의 효능을 규명하고자 alc-NSAID(salicylate)를 사용, 위장 장애 동물모델을 만들고 free radical scavenging enzyme을 중심으로 활성변화를 관찰한 결과, 마늘-죽염이 위장 손상을 방지하고, 대표적인 free radical scavenging enzyme인 SOD의 활성을 높이며, 해독 작용을 나타내는 생체의 방어기전인 GSH의 함량을 높이는 것은 물론 GSH 의존성 항산화 효소들인 GPx, GR의 활성을 유의성 있게 회복시킴으로써 위점막의 방어기전에 기여하는 것으로 나타났다. 또, 마늘-죽염의 위장장애에 대한 효과는 방어효과와 치료효과를 나타내며 위장 질환의 발병자체를 억제하는 효과가 더욱 큰 것으로 나타났다. 위점막의 빠른 세포신생과 짧은 점막 세포의 수명을 감안하면 위장 점막의 방어기전이 손상되기 전에 마늘-죽염이 공급되어 방어기전의 유지를 가능케 하는 것이 좋은 대응법이라 사료된다. 죽염은 수용액의 pH가 10부근으로 알칼리성이며 생체에 유용한 금속원소를 골고루 적정비율로 가지고 있어 각종 보조효소의 활성화가 예상된다. 마늘자체가 살균작용을 나타낸다는 점, 마늘-죽염이 모두 독성이나 부작용이 거의 없다는 점을 감안하면 새로운 제제로서의 개발가능성이 높은 것으로 사료된다.

차) 마늘성분과 항산화제 BHA의 아플라톡신 대사에 미치는 항암 효과의 비교

1982년 미국 NCI(National Cancer Institute)에서 chemoprevention program의 임상적 시도에 역점을 둔 이래 수많은 기초 및 임상 실험연구를 통하여 수백 종의 화합물이 암을 예방시킬 수 있다고 보고되었는데 그 중 특히 우리나라 음식물과 관련이 깊은 것으로 콩류와 마늘을 들 수 있다. 특히 마늘은 우리 음식에는 거의 필수적인 향신료로서 단순한 향신료라기보다는 오히려 micronutrient로서 간주될 만치 자



주 그리고 많이 사용되는 것으로 이 속에 아직 성분을 확실히 알 수는 없지만 수종의 항암요소가 함유되어 있으리라는 보고는 우리 국민 전반에 대단히 의미 있는 희소식이 아닐 수 없고 이에 대한 연구 결과는 국민 건강 생활에 직접적인 도움을 줌으로서 학계의 보고가 실생활에 바로 응용될 수 있는 드문 현상의 실현이기도 하다. 더구나 아무리 좋은 암 예방 약이라도 대부분이 강력한 부작용 현상으로 인해 함부로 쓸 수 없는 약점이 있는 데 반하여 마늘은 생체에 부작용이 전혀 없을 뿐 아니라 오히려 한방에서도 잘 평가된 생약적 의의와 가치를 갖는 향신료라는 점에서 마늘의 항암 효과는 기대가 크다. 또 oltipraz, tamoxifen, piroxicam 등 현재 활발히 연구되고 있는 합성제제들이 비록 현 단계의 항암 작용은 좋다고 해도 장기간 투여 후에 나타날지 모르는 다른 부작용의 두려움 때문에 긴 duration study (장기 연구 과정)가 필요하다는 약점이 있는데 마늘은 이미 우리나라 국민이 수백 년간 사용해서 부작용이 보고 된 바가 없음을 감안 할 때 safety 와 toxicity(안전성과 부작용) 문제도 없음은 더욱 특기할 만 한 사실이다. 이들의 작용기작에 대해서는 추후 추구해 나갈 중요한 과제들이지만 대부분의 다른 chemopreventive agent와 마찬가지로 발암물질의 체내 흡수 과정이나 대사시 활성화 과정의 저해 또 DNA수복 기전 방해 및 암 세포의 proliferation 차단 등을 들 수 있다. 그러나 무엇보다 먼저 알아내야 할 중요한 사실은 우리가 현재 음식물 속에서 사용되는 용량 그 자체가 항암 효과를 불러 올 것이 아니라면 대부분의 실험결과가 그렇듯이 인체가 사용하는 양의 수백 배에서 수천 배를 쓸 때만 이러한 효과가 기대되는 지를 밝히는 일이 무엇보다도 먼저 알아야 할 중요한 사실이다. 본 연구는 이미 사람에게 강력한 감암 유발물로서 널리 알려진 맹독소인 아플라톡신으로 전처치한 간세포의 성장에 미치는 마늘의 저해 효과와 다른 확립된 암세포주들의 성장 저해 효과를 관찰하였고 그 결과는 별첨한 도표와 같다. 연구결과는 세단계로 나누어 졌다. 1) 연구비 신청 시 제안했던 아플라톡신 대사에 미치는 항산화제 BHA의 저해효과 2) 마늘 (우리들 음식물에 사용되는 용량 수준에서 생마늘즙과 조리된 상태의 마늘 효과를 알기위해 물에서 30분간 끓여낸 수용액 추출물)이 아플라톡신을 처치한 간세포의 성장에 미치는 작용 3) 생마늘과 조리된 상태의 마늘이 확립된 간암 세포 주성장에 미치는 저해 작용으로 나누어 보고하는 바이다.

8) 섭취량 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

가) 섭취량 및 섭취방법

마늘 타블렛BK21의 경우 성인 1일 3회로 섭취한다.

나) 섭취시 주의사항

식품으로 사용되는 소재이므로 부작용은 없으나 임신부나 수유부는 의사와 상담 후 복용하십시오.

다) 섭취량의 설정근거

본 마늘 섭취 실험동물의 콜레스테롤 함량을 보면 마늘추출물 공급한 실험동물의 콜레스테롤함량이 감소한 것을 볼 수 있었다.

최대 일일 섭취량을 기준으로 하여 계산한 결과 성인 60kg을 기준으로 하였을 때, 일일 최대섭취허용량은 147.6g/60kg이었으며, 마늘 타블렛BK21은 식품으로서 부작용이나 독성을 나타내지 않으므로 본 마늘 타블렛BK21을 섭취한 실험동물의 섭취량을 기준으로 사람에게 적용하여 1일 3회 섭취 시 1회 복용량을 1.5g이상으로 하고 제형 등을 감안하여 일일 섭취량을 5.0g이내로 하였다.

9) 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품이 아니라는 확인자료

본 원료는 '의약품의 용도로만 사용되는 원료 등에 관한 규정'에서 정한 의약품과 같거나 유사한 건강식품에 포함되지 않으므로 건강기능식품원료로 사용이 가능하다고 판단되며 제 2조 의약품의 용도로만 사용되는 원료 해당 여부, 제 3조 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품의 해당 여부의 조항을 명시하였다.

가) 제 2조(의약품의 용도로만 사용되는 원료)해당 여부

1항

갈라타민 또는 그 염류, 건조갑상선 및 갑상선호르몬, 겔세민, 견우자 등의 84항목에 포함되는 의약품의 용도로만 사용되는 원료에 포함되지 않는다.

2항

섭취방법 또는 섭취량에 대한 전문적인 지식을 필요로 하는 것, 원료의 특성상 심각한 독성이나 부작용이 있는 것으로 알려진 것, 인체의 구조 및 기능에 위해를 가할 우려가 있는 것 등의 3항목은 건강기능성 식품원료로 사용할 수 없는데 본 원료는 해당되지 않는다.

나) 제 3조(의약품과 같거나 유사한 건강기능식품)해당 여부

1항

‘기성한약서에 대한 잠정규정(보건복지부 예규)에서 정한 기성한약서(방약합편, 동의보감, 향약집성방, 광제비급, 제중신편, 약성가, 사상의학, 경약전서, 수세보원, 본초강목)와 ’한약처방의 종류 및 조제방법에 관한 규정(보건복지부고시)에서 정한 한약제조지침서에서 수재되어 있는 품목(처방을 가감할 수 있는 한약서의 근거에 따라 가감한 것 포함)과 원료 및 그 함량이 동일한 것인데 본 원료는 여기에 포함되지 않는다.

2항

기성한약서와 한약조제지침서에 수재되어 있는 품목(처방을 가감할 수 있는 한약서의 근거에 따라 가감한 것 포함)과 원료(물 또는 주정추출물 포함)의 종류가 동일한 것도 의약품과 유사한 것으로 취급하는데 여기에도 포함되지 않는다.

따라서 본 원료 마늘 타블렛BK21은 마늘 추출액을 이용한 기능성 식품으로서 ‘의약품의 용도로만 사용되는 원료 및 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품’에 포함되지 않으므로 건강기능식품 원료에 해당된다.

## 나. 마늘음료BK22

### 1) 기능효과 : 항산화

#### 2) 원료·성분의 섭취가 국민건강증진에 기여한다는 근거

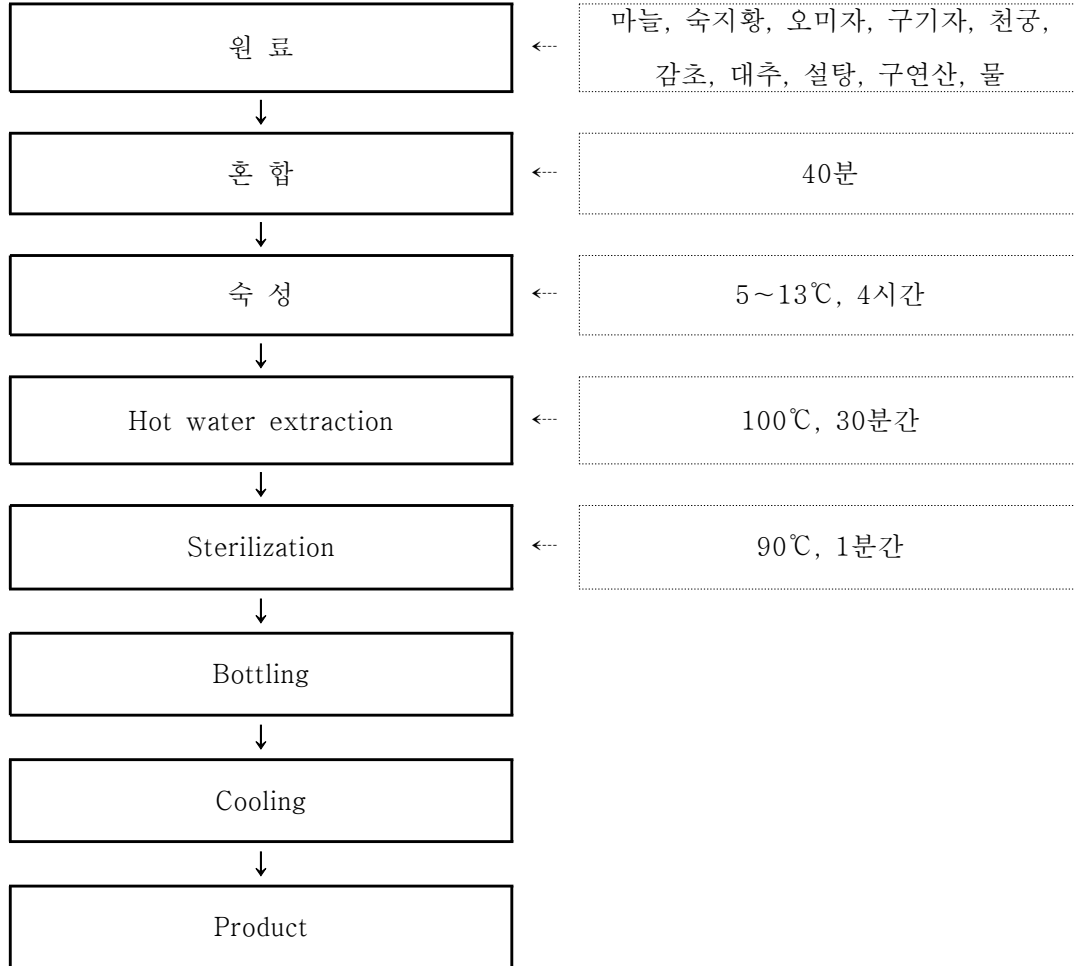
마늘 음료BK22의 원재료인 마늘은 우리의 단군신화에도 마늘이 등장하였듯이 식품 및 의약품에 널리 애용되어왔고, 지금도 사용되고 있으며 수요도 점차 증가되고 있다. 이처럼 마늘이 식용 및 의약품으로 애용하게 된 것은 마늘의 함황 아미노산의 일종인 alliin이 분해되면서 특유의 신미성분을 생성시키기 때문이다. 또한, 생리활성은 식물체내에서는 불활성인 전구체로부터 세포가 파괴되면서 효소적으로 생산된 allicin 때문이며 이 allicin은 항균작용, 항진균작용, 항암작용, 저혈당작용, 혈압강화작용, 동맥경화예방 등 각종 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있다. 또한, 마늘을 각종 식품에 첨가하여 기능성을 높인 여러 가지 상품들을 섭취한 많은 사람들의 사례와 실험적 검증을 통하여 마늘 섭취가 국민건강에 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

#### 3) 기원, 개발경위, 외국에서의 인정·사용현황 등에 관한 자료

최근 건강 기능성 마늘에 대한 관심이 높아지면서 마늘이 각광을 받고 있으며 건강 식품소재로서 사용되어 오고 있다. 이러한 건강 기능성 마늘을 이용한 마늘 음료BK22를 제조하였으며 항산화 효과를 입증하고자 마늘의 생리활성 실험 및 동물 확인 실험을 통한 기능성 연구를 하였다. 이에 관련 연구 동향으로는 한국산 마늘 성분들의 항암성에 관한 연구를 비롯하여 마늘 추출물의 항균, 항고혈압 및 항암활성, 생마늘즙과 열처리 마늘즙의 항균활성 비교 등 많은 연구가 이루어지고 있다. 전체 EU 회원국 중에서 독일에서 마늘 보충제가 의약품으로 분류하고 있고, 뉴질랜드에서는 고농축 마늘(Odourless Garlic)이 개발되었으며, 현재 여러 가지 식품에 첨가되어 건강식품으로서 인정받으며, 우리나라에서도 그 원료를 수입 또는 제조하여 식품소재로 이용하고 있다.

#### 4) 제조방법 및 그에 관한 자료

표. 마늘음료 BK22 제조과정



#### 5) 원료·성분의 특성에 관한 자료

마늘은 항균작용, 세포대사 억제 등의 많은 중요한 생화학적 활성을 갖는 가장 잘 알려진 항산화 효과가 뛰어난 식품이다. 마늘 음료BK22는 관능적인 특성이 우수하여 기호성이 좋고, 항 노화활성이 우수하여 기능성이 좋은 천연소재를 이용하였다. 또한, 인체에 필요한 마늘성분을 쉽게 섭취하기 위하여 숙지황 2~6%중량, 오미자

2~4%중량, 구기자 1~3%중량, 천궁 0.5~2%중량, 감초 0.5~3%중량 및 마늘의 추출물 70~90%중량을 혼합하여 마늘음료를 제조한 것이다.

#### 6) 안전성에 관한 자료

마늘은 '건강기능식품 원료 및 성분인정에 관한 규정'의 건강기능식품원료 또는 성분의 분류 중 "가. 동식물 원료, 미생물 원료 자체가 국내에서 식용으로 사용한 경험이 있고, 알려진 부작용이 없는 것, 독성이 없다고 보고되어 있는 것 또는 식품 원료로 인정된 것"에 해당하기 때문에 안전성시험의 적용은 필요하지 않다고 판단되어 독성실험은 필요 없다고 사료된다.

#### 7) 기능성내용 및 그에 관한 자료

마늘의 항산화 효과에 대한 검증 내용으로 마늘 추출액이 첨가된 식이를 4주간 섭취한 실험동물을 이용하여 측정하였다.

##### 가) 한국산 마늘 성분들의 항암성에 관한 연구

한국산 마늘에 있어서 마늘의 각 성분들의 항암 효과에 대한 연구로서 본 실험에서는 인체 장암 세포 유래의 HCT-15세포를 사용하여 특이적인 항암 활성을 *in vitro*에서 측정하고자, 마늘의 성분 중에서 alliin의 알려진 alliin 및 70% 에탄올추출물을 사용하였으며, 측정방법으로는 Immuno assay 방법을 사용하였고, 아울러 암세포의 성장저해정도를 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 4.7배 순도로 정제시킨 allinase의 경우 13.7units을 첨가하였을 때 95.0%의 암세포 성장저해를 보였으며, alliin과 에탄올 추출물의 경우에는 각각 50mg을 첨가하였을 때 각각 97.5%와 88.0%의 암세포성장저해를 나타내었다. 또한 allinase, alliin 및 에탄올 추출물의 암세포 HCT-15에 대한 IC<sub>50</sub>은 각각 1.37units, 13.5mg 및 2.5mg이었다.

##### 나) 마늘 추출물의 항균, 항고혈압 및 항암활성

국내산 마늘과 중국산 마늘을 methanol, ethyl acetate, chloroform, hexane으로 추출하여 항균, 항 곰팡이, 항암, 항고혈압 활성을 조사하였다. 그 결과 추출수율은

methanol추출물이 7.9-8.8 brix의 농도로 가장 높은 추출수율을 보였다, 마늘 용매 추출물을 *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Paeruginasa* 및 *S. typhimurium* 균주에 대해 항균활성을 조사한 결과, ethyl acetate와 chloroform추출물이 *B. subtilis*, *P. aeruginasa*에 대해 8~16mm의 clear zone 으로 강한 항균활성을 나타내었다. ACE 저해 활성은 완도 65.6%, 단양 60.4%, 서산 55.3% 및 중국산 70.1%로 methanol 추출물이 다른 추출물에 비해 높은 활성을 나타내었다.

다) 마늘성분의 노화억제작용에 관한 연구; 황산화작용을 중심으로

강장·장수효과가 있는 것으로 구전(口傳)되고 있는 마늘 (*Allium Stivum* L.)의 황산화작용에 의한 생체노화억제작용을 Harman의 유기설(free radical theory)을 중심으로 구명하였으며 지금까지 밝혀진 마늘의 유효 성분, 즉 alliin(S - allyl - L - cysteine sulfoxide), scordinin (oxoamidin), gralic oil, ethanol 및 nonkaolin 화합물을 분리하였다. 이들 마늘성분과 저자 등이 분리한 인삼사포닌을 in vitro에서 전자공여능(electron donating ability)은 DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhy-drazyl)법으로, 과산화지질생성 억제작용은 TBA value 로, 또 과산화지질생성 초기의 유도기간은 peroxide value (POV)로 측정 비교하였으며, 과산화지질생성 억제작용을 가진 superoxide dismutase (SOD) 및 peroxidase 의 활성은 pyrogallol 자동산화법과 초속도 ( $\Delta A$  420/min) 로서 측정, 비교하였다. in vitro 실험은 SD rat ( $\sigma$ , 220g) 11마리씩을 1군으로 하여 마늘성분과 인삼사포닌을 매일 1회씩 4주간 경구투여 (p.o.)하여 in vitro와 같은 방법으로 POV, TBA, SOD, peroxidase등을 측정, 생체에 미치는 마늘 성분과 인삼사포닌의 영향을 분석, 비교하였다.

라) 생마늘즙과 열처리 마늘즙의 항균활성 비교

식중독 세균과 젖산균에 대한 생마늘의 항균력과 마늘에 열처리를 하여 항균력을 측정함으로써 마늘이 이들 균의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 생마늘의 경우, 식중독 세균은 0.5%(w/v)이상, 젖산균은 1.5%(w/v)이상에서 많은 집락 감소를 보였다. 특히, 식중독 세균 중에서 *S. flexneri* 가 마늘에 대하여 가장 영향을 많이 받는 것으로 나타났다. 따라서 생마늘 농도 1%(w/v) 가 마늘을 식품에

첨가하거나 보존제로 사용할 때 가장 효과적임을 알 수 있었으며 열처리 마늘의 경우, 전반적으로 생마늘이 보였던 항균력보다는 낮은 항균력을 나타냈다. *bifidobacteria*의 경우 열처리 마늘을 첨가시 낮은 마늘 농도에서 일시 증가하는 경향을 보여주었다.

마) 마늘 추출물과 비타민 C 혼합물에 의한 암세포증식억제의 상승효과

HepG2, HT-29 및 HRT-18 암세포는 정도의 차이는 있으나 마늘성분과 비타민 C에 의해서 세포증식이 억제 또는 사멸되는 현상을 나타내었다. HepG2, HT-29 및 HRT-18에서 모두 마늘성분 및 비타민 C를 단독으로 첨가할 때보다 혼합물의 투여시에 세포 증식억제 및 사멸 효과가 현저히 상승됨을 보여주었다. HepG2의 세포주기 분석 결과, 마늘과 비타민 C의 혼합물의 첨가 배양시 G2/M 단계 세포가 증가되고 S단계 세포가 감소되는 것으로 나타나, 세포주기의 진행이 G2/M 단계에서 지체됨으로써 암세포 증식억제 효과를 보이는 것으로 여겨진다. Sarcoma-180 접종 동물에 마늘과 비타민 C의 혼합물의 경구 투여시 암을 가진 동물의 수명이 연장되는 효과를 나타내었다. 따라서 마늘과 비타민 C의 병용 투여는 *in vitro*에서 항암 작용의 상승효과를 보일 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 항암 효과를 가짐을 알 수 있었다.

바) 처리법을 달리한 마늘 첨가식이 자발성 고혈압쥐의 혈액에 미치는 영향

본 연구에서는 사람의 본태성 고혈압과 가장 유사한 증상을 나타내는 SHR을 이용하여 고혈압의 악성 기에 해당하는 6개월간의 장기간 동안 생마늘과 익힌 마늘 첨가식을 급여함으로써 마늘의 열처리가 혈청지질과 혈액 응고에 미치는 효과를 비교 관찰하였다. 실험 결과는 식이 섭취량은 익힌 마늘 3% 첨가군이 다소 낮았으며, 체중 증가량 및 식이 효율은 마늘 첨가군과 대조군간이 차이는 없었다. 총 콜레스테롤 수준은 마늘 첨가군이 대조군에 비해 현저히 저하되었으며, 특히 익힌 마늘군이 생마늘군 보다 낮게 나타났다. 중성 지질 수준은 마늘 첨가군들이 대조군에 비해 낮았다. 혈장 prothrombin time은 마늘 첨가군들이 대조군 보다 길었으며, 마늘 열처리에 따른 차이는 없었다. Fibrinogen 농도는 익힌 마늘군이 대조군이나 생마늘군 보다 낮았다. Fibrinogen과 prothrombin time은 유의한 부의 상관관계를 나타내었다. 이상



을 종합하여 살펴보면, 익힌 마늘 3%와 생마늘 3%첨가군 모두 체중이나 식이 섭취량 및 식이 효율에서 대조군과 큰 차이가 나타나지 않은 것으로 보아 일상 식이 섭취 수준으로서 섭취할 수 있는 농도로 여겨진다. 열처리 효과를 비교해 보면, 익힌 마늘의 생리 효과가 생마늘에 비해 낮다고 보고된 타 연구 결과와는 달리, 본 실험에서는 익힌 마늘과 생마늘의 효과가 유사한 것으로 나타났다

#### 사) 가열된 마늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료

본 발명은 가열된 마늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료(natural preservative)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 a) 마늘에 포함되어 있는 알리나제를 불활성화시키는 단계, b) 상기 알리나제가 불활성화된 마늘을 추출하는 단계 및 c) 상기 마늘 추출액을 가열하는 단계를 포함하는 방법; 또는 a) 마늘을 가열하는 단계 및 b) 상기 가열된 마늘을 추출하는 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 가열된 마늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료에 관한 것이다. 본 발명에 따른 가열된 마늘 추출액을 함유하는 항진균용 천연 보존료는 높은 항진균 활성(antifungal activity)을 가질 뿐만 아니라, 상기 항진균 활성의 저장 안정성 및 pH에 대한 안정성이 우수하고, 화학 보존료가 갖는 인체 부작용의 문제를 발생시키지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 항진균용 천연 보존료는 효과적인 항진균용 보존료로서 다양한 제품에 유용하게 사용될 수 있다.

#### 아) 마늘 추출물이 N-Nitrosodimethylamine의 생성에 미치는 영향

본 연구는 마늘 추출물 중의 총 페놀함량, 전자공여능, 아질산염 소거능을 측정하고 NDMA 생성억제에 미치는 영향을 검색하였다. 총 페놀함량은 ethyl acetate > hexane > butanol > chloroform > water 순으로 많았으며, 전자공여능은 추출물의 농도증가에 따라 유의적으로 증가하였으며 ethyl acetate와 butanol추출물을 10 mg/mL의 butanol추출물 첨가 시 각각  $96.9 \pm 0.75\%$  및  $68.6 \pm 1.15\%$ 가 가장 높게 나타났다. Butanol 추출물을 prep-LC로 5개의획분으로 분획하여 아질산염 소거능 및 NDMA 생성 억제효과를 측정한 결과, fraction III에서 효과가 가장 뛰어났으며, 이를 prep-LC로 재분획하여 얻은 3개의 subfraction (III-a, III-b 및 III-c)에서는

subfraction III-c의 효과가 가장 우수하였다. 따라서 마늘 부탄올 추출물은 NDMA 생성 억제에 효과적인 저해제인 것으로 판단된다.

자) 마늘-죽염 제제가 위장 장애 유발 흰쥐의 항산화 효소활성에 미치는 영향

본 연구는 식품 의약의 효능을 규명하고자 alc-NSAID(salicylate)를 사용, 위장 장애 동물모델을 만들고 free radical scavenging enzyme을 중심으로 활성변화를 관찰한 결과, 마늘-죽염이 위장 손상을 방지하고, 대표적인 free radical scavenging enzyme인 SOD의 활성을 높이며, 해독 작용을 나타내는 생체의 방어기전인 GSH의 함량을 높이는 것은 물론 GSH 의존성 항산화 효소들인 GPx, GR의 활성을 유의성 있게 회복시킴으로써 위점막의 방어기전에 기여하는 것으로 나타났다. 또, 마늘-죽염의 위장장애에 대한 효과는 방어효과와 치료효과를 나타내며 위장 질환의 발병자체를 억제하는 효과가 더욱 큰 것으로 나타났다. 위점막의 빠른 세포신생과 짧은 점막 세포의 수명을 감안하면 위장 점막의 방어기전이 손상되기 전에 마늘-죽염이 공급되어 방어기전의 유지를 가능케 하는 것이 좋은 대응법이라 사료된다. 죽염은 수용액의 pH가 10부근으로 알칼리성이며 생체에 유용한 금속원소를 골고루 적정비율로 가지고 있어 각종 보조효소의 활성화가 예상된다. 마늘자체가 살균작용을 나타낸다는 점, 마늘-죽염이 모두 독성이나 부작용이 거의 없다는 점을 감안하면 새로운 제제로서의 개발가능성이 높은 것으로 사료된다.

차) 마늘성분과 항산화제 BHA의 아플라톡신 대사에 미치는 항암 효과의 비교

1982년 미국 NCI(National Cancer Institute)에서 chemoprevention program의 임상적 시도에 역점을 둔 이래 수많은 기초 및 임상 실험연구를 통하여 수백 종의 화합물이 암을 예방시킬 수 있다고 보고되었는데 그 중 특히 우리나라 음식물과 관련이 깊은 것으로 콩류와 마늘을 들 수 있다. 특히 마늘은 우리 음식에는 거의 필수적인 향신료로서 단순한 향신료라기보다는 오히려 micronutrient로서 간주될 만치 자주 그리고 많이 사용되는 것으로 이 속에 아직 성분을 확실하게 알 수는 없지만 수종의 항암요소가 함유되어 있으리라는 보고는 우리 국민 전반에 대단히 의미 있는 희소식이 아닐 수 없고 이에 대한 연구 결과는 국민 건강 생활에 직접적인 도움을 줌

으로서 학계의 보고가 실생활에 바로 응용될 수 있는 드문 현상의 실현이기도 하다. 더구나 아무리 좋은 암 예방 약이라도 대부분이 강력한 부작용 현상으로 인해 함부로 쓸 수 없는 약점이 있는 데 반하여 마늘은 생체에 부작용이 전혀 없을 뿐 아니라 오히려 한방에서도 잘 평가된 생약적 의의와 가치를 갖는 향신료라는 점에서 마늘의 항암 효과는 기대가 크다. 또 oltipraz, tamoxifen, piroxicam 등 현재 활발히 연구되고 있는 합성제제들이 비록 현 단계의 항암 작용은 좋다고 해도 장기간 투여 후에 나타날지 모르는 다른 부작용의 두려움 때문에 긴 duration study (장기 연구 과정)가 필요하다는 약점이 있는데 마늘은 이미 우리나라 국민이 수백 년간 사용해서 부작용이 보고 된 바가 없음을 감안 할 때 safety 와 toxicity(안전성과 부작용) 문제도 없음은 더욱 특기할 만 한 사실이다. 이들의 작용기작에 대해서는 추후 추구해 나갈 중요한 과제들이지만 대부분의 다른 chemopreventive agent와 마찬가지로 발암물질의 체내 흡수 과정이나 대사시 활성화 과정의 저해 또 DNA수복 기전 방해 및 암 세포의 proliferation 차단 등을 들 수 있다. 그러나 무엇보다 먼저 알아내야 할 중요한 사실은 우리가 현재 음식물 속에서 사용되는 용량 그 자체가 항암 효과를 불러 올 것이 아니라면 대부분의 실험결과가 그렇듯이 인체가 사용하는 양의 수백 배에서 수천 배를 쓸 때만 이러한 효과가 기대되는 지를 밝히는 일이 무엇보다도 먼저 알아야 할 중요한 사실이다. 본 연구는 이미 사람에게 강력한 감암 유발물로서 널리 알려진 맹독소인 아플라톡신으로 전처치한 간세포의 성장에 미치는 마늘의 저해 효과와 다른 확립된 암세포주들의 성장 저해 효과를 관찰하였고 그 결과는 별첨한 도표와 같다. 연구결과는 세단계로 나누어 졌다. 1) 연구비 신청 시 제안했던 아플라톡신 대사에 미치는 항산화제 BHA의 저해효과 2) 마늘 (우리들 음식물에 사용되는 용량 수준에서 생마늘즙과 조리된 상태의 마늘 효과를 알기위해 물에서 30분간 끓여낸 수용액 추출물)이 아플라톡신을 처치한 간세포의 성장에 미치는 작용 3) 생마늘과 조리된 상태의 마늘이 확립된 간암 세포 주성장에 미치는 저해 작용으로 나누어 보고하는 바이다.

8) 섭취량 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

가) 섭취량 및 섭취방법

마늘 음료BK22의 경우 하루 한 컵씩 음용한다.

나) 섭취시 주의사항

식품으로 사용되는 소재이므로 부작용은 없으나 임신부나 수유부는 의사와 상담 후 복용하십시오.

다) 섭취량의 설정근거

본 마늘 섭취 실험동물의 콜레스테롤 함량을 보면 마늘추출물 공급한 실험동물의 콜레스테롤함량이 감소한 것을 볼 수 있었다.

최대 일일 섭취량을 기준으로 하여 계산한 결과 성인 60kg을 기준으로 하였을 때, 일일 최대섭취허용량은 147.6g/60kg이었으며, 마늘 음료BK22는 식품으로서 부작용이나 독성을 나타내지 않으므로 본 마늘 음료BK22를 섭취한 실험동물의 섭취량을 기준으로 사람에게 적용하여 하루 섭취량을 200ml로 하고 제형 등을 감안하여 일일 섭취량을 5.0g이내로 하였다.

9) 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품이 아니라는 확인자료

본 원료는 '의약품의 용도로만 사용되는 원료 등에 관한 규정'에서 정한 의약품과 같거나 유사한 건강식품에 포함되지 않으므로 건강기능식품원료로 사용이 가능하다고 판단되며 제 2조 의약품의 용도로만 사용되는 원료 해당 여부, 제 3조 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품의 해당 여부의 조항을 명시하였다.

가) 제 2조(의약품의 용도로만 사용되는 원료)해당 여부

1항

갈라타민 또는 그 염류, 건조갑상선 및 갑상선호르몬, 겔세민, 견우자 등의 84 항목에 포함되는 의약품의 용도로만 사용되는 원료에 포함되지 않는다.

2항

섭취방법 또는 섭취량에 대한 전문적인 지식을 필요로 하는 것, 원료의 특성상 심각한 독성이나 부작용이 있는 것으로 알려진 것, 인체의 구조 및 기능에 위해를 가할 우려가 있는 것 등의 3항목은 건강기능성 식품원료로 사용할 수 없는데 본 원료는 해당되지 않는다.

나) 제 3조(의약품과 같거나 유사한 건강기능식품)해당 여부

1항

‘기성한약서에 대한 잠정규정(보건복지부 예규)에서 정한 기성한약서(방약합편, 동의보감, 향약집성방, 광제비급, 제증신편, 약성가, 사상의학, 경약전서, 수세보원, 본초강목)와 ‘한약처방의 종류 및 조제방법에 관한 규정(보건복지부고시)에서 정한 한약제조지침서에서 수재되어 있는 품목(처방을 가감할 수 있는 한약서의 근거에 따라 가감한 것 포함)과 원료 및 그 함량이 동일한 것인데 본 원료는 여기에 포함되지 않는다.

2항

기성한약서와 한약조제지침서에 수재되어 있는 품목(처방을 가감할 수 있는 한약서의 근거에 따라 가감한 것 포함)과 원료(물 또는 주정추출물 포함)의 종류가 동일한 것도 의약품과 유사한 것으로 취급하는데 여기에도 포함되지 않는다.

따라서 본 원료 마늘 음료 BK22는 마늘 추출액을 이용한 기능성 식품으로서 ‘의약품의 용도로만 사용되는 원료 및 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품’에 포함되지 않으므로 건강기능식품 원료에 해당된다.

## 제5절 참고문헌

1. Halliwell B, Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *J Biochem.*, 219:1-4 (1984).
2. Simic MG: Mechanisms of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.*, 202:377-386 (1988)
3. Diploc AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vinã-Ribes J: Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.*, ;80S:S77-S112.(1998)
4. Hertog MG, Hollman PC: Potential health effects of dietary flavonol quercetin. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50:63-7(1996).
5. Borek C: Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr.*, 131:1010S-1015S(2001)
6. Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem.*, 44:3426-3431(1996)
7. Kim SM, Kubota K, Kobayashi A: Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61:1482-1485(1997)
8. Lampe JW: Health effects of vegetables and fruits: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70:475S-490S(1999)

9. Lawson LD: Garlic: A Review of Its Medicinal Effects and Indicated Active Compounds. In: *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*, ACS Symposium Series #691. Lawson LDBauer, R. Eds. American Chemical Society: Washington DC,.176–209 (1998)
10. Lancaster JE, Colin HA: Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Sci Lett.*,22:169–176(1981)
11. Tang W, Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin. Chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine, Springer–Verlag, Berlin 160 (1992)
12. Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo K, Aburada M,Hosoya E. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)–gingerol and (6)–shogaol. *J. Pharmacobiodyn* 7: 836–848 (1984)
13. Uehara SI., Yasuda I, Akiyama K, Morita H, Takeya K, Itokawa H. Diarylheptanoids from rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* and *Alpinia officinarum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 35: 3298–3304 (1987)
14. Kikuzaki H, Kobayashi M, Nakatani N. Diarylheptanoids from rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry*, 30: 3647–3651 (1991)
15. Kikuzaki H, Usuguchi J, Nakatani N. Constituents of Zingiberaceae I. Diarylheptanoids from the rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 120–122 (1991)

16. Endo K, Kanno E, Oshima Y. Structures of antifungal diarylheptenones, gingerenones A, B, C and isogingerenone B, isolated from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry* 29: 797-799 (1990)
17. Yu Z, Wu H, Ding J. The volatile chemical components of fresh *Zingiber officinale*. *Acta Botanica Yunnanica* 20: 113-118 (1998)
18. Srivastava KC, Mustafa T. Ginger (*Zingiber officinale*) in rheumatism and musculoskeletal disorders. *Med. Hypotheses*, 39: 342-348 (1992)
19. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem. Pharm. Bull.*, 40: 387-391 (1992)
20. Srivas KC. Effects of aqueous extracts of onion, garlic and ginger on platelet aggregation and metabolism of arachidonic acid in the blood vascular system: *in vitro* study. *Prostaglandins Leuko. Med.*, 13: 227-235 (1984)
21. Kang YH, Park YK, Lee GD: The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* ., 28:232-239 (1996)
22. Kim SM, Cho YS, Sung SK: The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol.*, 33:626-632(2001)
23. Wong TC, Luh BS, Whitaker JR: Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isozymes of Clingstone Peach. *Plant Physiol.*, 48:19-23 (1971)
24. Folin O, Denis W: On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color



reagents. *J. Biol. Chem.*, 12:239–243 (1912)

25. Han J, Lawson L, Han G, Han P: A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. *Analytical Biochem.*, 225:157–160 (1995)

26. Gray JI, Dugan Jr. LR: Inhibition of N–nitrosamine formation in model food system. *J. Food Sci.*, 40:981–984 (1975)

27. SAS institute Inc. *SAS User's Guide*. Statistical Analysis Systems Institute, 1990, Cary, NC, USA.

31. Gontard N, Guilbert S, Cuq B. Edible wheat gluten films : Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.*, 57: 190–196(1992)

32. Lee GD, Lee JE, Kwon JH. Application of response surface methodology in food industry. *Food and Industry*. 33: 33–45(2000)

33. SAS Institute, Inc. *SAS User's Guide*. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1990)

34. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226(1): 497–509(1957)

## 제3장 버섯류 분야

### Mushroom Part

주관연구기관명 : 한국식품연구원

세부연구책임자 : 이 명 기

연 구 원 : 구 경 형

연 구 원 : 김 영 진

연 구 원 : 박 완 수

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 전 향 숙

위 축 연 구 원 : 강 문 회

위 축 연 구 원 : 손 주 현

위탁연구기관명 : 성균관대학교

위탁연구책임자 : 박 영 민

연 구 원 : 강 나 나

## 제1절 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004)	○ 국산 버섯의 기능성과 안전성 자료 확보  ○ 국산버섯의 기능성 조사	○ 버섯의 기능성과 안전성에 대한 인정자료 확보 (기존 문헌과 D/B 이용)  ○ 버섯의 건강기능성 연구 (위탁연구기관) 버섯의 생리활성 조사
2차년도 (2005)	○ 1차년도에서 발굴된 2종 이상의 국산 버섯의 기능성 연구  ○ 국산버섯 지표물질의 기능성 조사	○ 생리활성을 나타내는 유용성분의 탐색 (기존 문헌에 언급된 물질을 중심으로)  ○ 유용성분을 추출 및 분리 농축하여 지표물질로 활용  ○ 지표물질의 건강기능성 연구 (위탁연구기관) 지표물질의 생리활성 조사
3차년도 (2006)	○ 국산 버섯 가공물의 기능성 조사  ○ 2종 이상의 국내산 버섯 및 그 가공물의 건강기능성 원료 및 성분 인정을 위한 자료 작성	○ 산지별 버섯 가공물의 기능성 지표물질 함량 조사  ○ 버섯 가공물의 건강기능성 연구  (위탁연구기관) 버섯 가공물의 생리활성 조사

## 제2절 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 실험재료

##### 1) 재료

일반버섯은 농협 하나로 마트에서, 중국산 표고는 성남시 모란시장에서, 중국산 송이는 대구시 청림상사에서 구입하였고 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*), 표고(*Lentinus edodes*), 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*) 추출물은 하나바이오텍, 효모(*Aureobasidium pullulans*)추출물인 폴리칸은 (주)글루칸에서 구입하였다.

$\beta$ -glucan 분석은 Megazyme사의 Mushroom & yeast  $\beta$ -glucan assay kit를, cholesterol, insulin, GOT 분석 kit는 Wako사 제품 사용 하였다.

##### 2) 사용균주

항균 및 prebiotic effect 조사를 위해 9개 균주를 사용하였다(표 1).

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial and prebiotic experiment

Strain		Media used	Temp. (°C)	
<i>Escherichia coli</i>	KCTC 1682	TSB & TSA <sup>1)</sup>	37	Aerobic
<i>Escherichia coli</i> 0157 H7	ATCC 43895	TSB & TSA	37	Aerobic
<i>Eubacterium limosum</i>	KFRI 753	TSB & TSA	37	Aerobic
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KFRI 743	RCM <sup>2)</sup>	37	Anaerobic
<i>Bifidobacterium longum</i>	KFRI 747	RCM	37	Anaerobic
<i>Bacteroides fragilis</i>	KCTC 3688	CMA <sup>3)</sup>	37	Anaerobic
<i>Bacteroides uniformis</i>	KCTC 5204	EG <sup>4)</sup>	37	Anaerobic
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	TSB & TSA	37	Aerobic
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	TSB & TSA	37	Aerobic

<sup>1)</sup> TSB & TSA: Tryptic soy broth & Tryptic soy agar

<sup>2)</sup> RCM: Reinforced clostridial medium

<sup>3)</sup> CMA: Chopped meat agar

<sup>4)</sup> EG

### 3) 사용배지

실험에 사용한 배지는 일반 증균 배지로 TSA배지를, 일반 장내세균은 RGM(Merck사)배지를 사용하였고 기타, Chopped meat medium과 EG medium을 사용하였다 (표 2, 3).

Table 2. Chopped meat medium

Chopped meat medium	1L	200mL
Cooked meat medium	125g	25g
yeast extract	5g	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5g	1g
Cystein	0.5g	0.1g
Agar	15g	3g

Table 3. EG medium

EG medium	1L	200mL	use
Lemco meat extract	2.4g	0.48g	
proteose peptone	10g	2g	
yeast extract	5g	1g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4g	0.8g	
Glucose	1.5g	0.3g	
soluble starch	0.5g	0.1g	
L-cystine	0.2g	0.04g	
L-cysteines	0.5g	0.1g	
10% silicone	5mL	1mL	not use
Blood	50mL	10mL	

#### 4) 실험기구

Anaerobic jar, Anaerocult A(Merck 사), Spectrophotometer(Jasco)를 사용하였다.

## 나. 실험방법

### 1) 추출방법

버섯의 단백다당체 추출은 열수추출방법을 이용하여 추출하였다. 버섯은 건조된 분말버섯으로 15kg을 물 360 L에 용해하여 (수분함량 96%) 100℃에서 4시간 동안 추출하고 여과, 감압농축(원액의 10배까지 농축)하고, 극성용매인 에탄올을 3배가한 후 4℃에서 1일간 (24hr)방치한다. 방치 후 발생된 침전물을 8000rpm에서 10분간 원심분리하고 침전물을 회수한다. 회수된 침전물을 다시 물에 용해시켜 100℃에서 4시간 추출, 여과, 감압농축 하여 에탄올 3배가한 후 4℃에서 1일간(24hr)방치하여 2차 침전을 시킨 후 8000rpm에서 10분간 원심분리하여 -70℃에서 보관하였다 (Fig.1). 에탄올 2차침전후 원심분리후의 버섯의 무게는 표고가 22.3g/초기 100g(수분함량 47.26%), 느타리가 11.6g/초기 100g(수분함량 39.74%) 비율로 추출 되었다.





## 2) 항산화 측정

추출물의 전자공여작용(electron donating abilities, EDA)은 Kang등의 방법을 변형하여 각각의 추출물에 대한 DPPH( $\alpha,\alpha$ -diphenyl-picrylhydrazyl)의 전자공여효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 추출물 1mL에  $4 \times 10^{-4}$ M DPPH용액(99.9% EtOH에 용해) 1mL을 가하여 총액의 부피가 2mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 30분 방치한 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여효과는 추출물의 첨가 전·후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

SOD 유사활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 각 추출물을 감압 농축한 후 tris-HCl buffer(50mM tris[hydroxymethyl]amino-methane + 10mM EDTA, pH 8.5)를 이용하여 pH 8.5로 조절된 시료액을 만들었다. 각 시료 0.2mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer 3mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Japan)를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$SOD \text{ 유사활성} (\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

### 3) 항균효과

항균효과는 고체상과 액상에서 조사하였다.

고상배지에서 Paper disc method를 사용하였다.

TS배지에 1.5% agar를 12ml 부어 배지를 균화시킨 뒤 0.75% agar배지에 *Escherichia coli*, *Eubacterium limosum*, *salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*를 RCM배지에 1.5% agar를 12ml 부어 배지를 균화시킨 뒤 위에 0.75% agar배지에 *Bifidobacterium bifidum*, *B.longum*를 각각 1%씩 접종한 후 약 7ml을 분주 하였고, 분주한 후 각각의 분획물을 50 $\mu$ l씩 접종하였다. 균주배양은 37 $^{\circ}$ C에서 *Escherichia coli*, *Eubacterium limosum*, *salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*은 6-12시간, *Bifidobacterium bifidum*, *B.longum*은 1일간 Anaerocult A system을 이용한 혐기 조건하에서 배양한 후 저해 부위의 크기를 측정하였다.

- 항균활성 시험 평판배지의 조제

각각의 생육배지를 멸균하여 기층용 배지(1.5% agar)를 petridish에 응고시킨 후, 각 균주를 1% 접종하여 혼합한 중층용 배지(0.75% agar)를 이에 분주하여 제조한다.

- 버섯 추출물을 1, 10, 50mg/mL의 농도로 제조하여, paper disc( $\phi$  8mm, Advactec, Toyo, Japan)에 30 $\mu$ l 첨가한 후 배지 위에 올려 놓는다.

- 37 $^{\circ}$ C incubator에 18~24시간동안 배양한 후, 억제환(mm) 직경으로 항균활성을 측정하였다.

액상배지에서 성장 억제는 다음과 같이 하였다.

- 균을 배양한 액체 배지에서 100 $\mu$ l를 취해 10mL 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 이 배양액 0.1mL를 다시 10mL 액체 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서

24시간 배양한 후 균체 배양액을 만들었다.

- 버섯추출물(50mg/mL)은 dw에 완전히 용해시켜, membrane filter(0.45 $\mu$ m)로 제균하여 액체배지 10mL에 100 $\mu$ l 첨가하였다.

- 이 배지에 균체 배양액 25 $\mu$ l를 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30시간 동안 배양하면서 2시간 간격으로 생균수를 측정하여 증식억제 효과를 측정하였다.

#### 4) Prebiotic effect

- 균의 활력증가를 위해 2차 계대배양 하였고, 배지 10ml에 약 25 $\mu$ l씩 0.25% 되게끔 위의 각 균을 접종하였다.

- 혐기배양을 하기 위해 Anaerobic jar에 위의 접종한 배지의 cap tube와 petridish를 넣었다. 이때 cap tube는 뚜껑이 꼭 닫히지 않게 하였고, Anaerobic 촉매로 gas 생성 봉지에서 H<sub>2</sub>gas 생성 봉지에서 H<sub>2</sub>gas와 CO<sub>2</sub>gas가 발생되며, 발생된 H<sub>2</sub>gas는 촉매작용으로 산소와 반응하여 물이 되도록 하기 위해 Anaerocult A를 사용시 D.W 35ml을 분주한 후 jar에 넣어서 뚜껑을 잘 닫아 37 $^{\circ}$ C에서 2~3일간 배양하였다.

- 각 균주들에 대한 prebiotic effect를 조사하기 위하여 처리구를 4종류로 하였다. 즉, positive 대조구로 RCM배지를 사용하였고, RCM배지에 각 버섯을 첨가한 배지(RCM +mushroom), negative 대조구로 RCM 배지 성분 중 dextrose, starch를 생략한 배지를 사용하였다. 버섯첨가 배지는 중국표고, 국산표고, 느타리 버섯의 에탄올 침전 단백다당체액을 filter에서 무균 여과하여 각 배지의 2%를 첨가하였다. 위의 4종류의 배지에 각각 *Escherichia coli*, *Eubacterium limosum*, *Bifidobacterium bifidum*, *B.longum*를 접종하여 0시간, 24시간, 48시간, 72시간마다 0.85% NaCl로 10단계 계단 희석하여 pour plate method 으로 생균수를 측정하였다.

#### 5) Glucan 측정

Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan assay (Megazyme assay) kit를 사용하였다.

A. 시약 및 재료

- ① Conc. HCl
- ② 2N KOH
- ③ glucose standard (10mg/mL in 0.2%(w/v) benzoic acid)
- ④ Standardised barley flour control
- ⑤ Standardised oat flour control
- ⑥ GOPOD reagent enzymes
  - glucose oxidase(>12000U), peroxidase(>650U), 4-aminoantipyrine(80mg)
- ⑦ Glucose oxidase-peroxidase-buffer
- ⑧ 200mM Sodium acetate buffer, pH 5.0
- ⑨ [exo-1,3- $\beta$ -glucanase(20U/mL)+ $\beta$ -glucosidase(4U/mL)] mixture
- ⑩ 1.2M sodium acetate buffer, pH 3.8
- ⑪ amyloglucosidase(1630U/mL)+invertase(500U/mL) 용액

B. 실험방법

- ① Oligosaccharide, sucrose와 free D-glucose에서 total glucan( $\alpha$ -glucan+ $\beta$ -glucan)과 D-glucose의 측정
  - a. Oligosaccharide, sucrose과 free D-glucose에서 total glucan과 D-glucose의 Solubilisation과 부분적인 가수분해
    - a) milled sample 100mg에 37% HCl, 1.5mL을 넣어 격렬하게 교반한 후 30°C에서 45분간 15분마다 vortexing하면서 incubation 한다.
    - b) dw, 10mL 가한후 끓는물에서 2시간 가열한다.
    - c) 실온에서 냉각시킨 후 2N KOH, 10mL을 가한 후 100mL vol. flask로 옮긴다.
    - d) 200mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 volume을 맞춘 후 filtering하여 고형분을 제거하여 준비한다.
  - b. Measurement of total glucan + D-glucose in sucrose and free D-glucose
    - a) Aliquots, 0.1mL과 [exo-1,3- $\beta$ -glucanase(20U/mL)+ $\beta$ -glucosidase(4U/mL)]

- mixture 0.1mL을 vortexing 후 40°C에서 1시간 incubation한다.
- b) GOPOD reagent, 3mL를 첨가한 후 40°C에 20min incubation 한다.
- c) 510nm에서 흡광도를 측정한다.
- ② sucrose와 free D-glucose에서 α-glucan(phytoglycogen and starch)과 D-glucose의 측정
- a) milled sample, 100mg에 2M KOH 2mL을 가해 현탁시킨 후 ice/water bath에서 20min간 stirring하면서 incubation한다.
- b) 1.2M sodium acetate buffer(pH 3.8) 8mL을 가한후 stirring한다.
- c) amyloglucosidase(1630U/mL)+invertase(500U/mL) 용액을 0.2mL 넣은 후 40°C에서 30min incubation한다.
- d) α-glucan 함량이 >10% sample의 경우 dw로 100mL로 맞춘 후 filter paper로 여과하고, α-glucan 함량이 <10% sample의 경우 1500g에서 10min간 원심분리하여 상등액을 얻는다.
- e) aliquots(duplicate), 0.1mL에 GOPOD reagent, 3mL을 넣은 후 40°C에 20min incubation 한다.
- f) 510nm에서 흡광도를 측정한다.

### C. 함량계산

$$\begin{aligned} \text{Total glucan (\%, w/w)} &= \Delta A \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 \\ &= \Delta A \times F/W \times 90 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \alpha\text{-glucan (\%, w/w)} &= \Delta A \times F \times 1000(\text{or } 103) \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180 \\ &= \Delta A \times F/W \times 90 \text{ (final vol. 100mL)} \\ &= \Delta A \times F/W \times 9.27 \text{ (final vol. 10.3mL)} \end{aligned}$$

$$\beta\text{-D-glucan (\%, w/w)} = \text{Total glucan} - \alpha\text{-glucan}$$

$\Delta A = \text{reaction abs} - \text{blank abs}$

F = a factor to convert abs to  $\mu\text{g}$  of D-glucose, 100/100ug glucose의 abs

100/0.1 = volumn correction factor (0.1mL/100mL)

103 = volumn correction factor; for  $\alpha$ -glucan (0.1mL/10.3mL)

1/1000 = ug에서 mg으로의 conversion

100/W = 100mg sample로의 conversion

W = sample weight, mg

162/180 = free glucose에서 anhydroglucose( $\beta$ -D-glucan)로의 convert factor

## 6) 동물 실험

### 가) 실험동물의 사육과 관리

#### (1) 버섯

실험에 사용된 흰쥐는 7-8주 가량된 Sprague Dawley Strain male을 주문하여 사용하고 있다. 1차분으로, 쥐는 10마리씩 4개의 group으로 나누어 관리하고 있으며 group I은 정상사료를 공급받는 대조군, group II는 고지방식을 위해 cholesterol이 2% 함유되도록 만든 사료를 공급받는 실험군, group III와 IV는 버섯의 효능을 알아보기 위해 cholesterol과 표고버섯, 느타리버섯(5%)을 조합하여 만든 사료를 공급받는 실험군으로 설정하였다. 실험동물에게 사용된 사료는 1차적으로 분말 형태로 이용을 테스트하였으나 쥐가 섭취하는데 문제가 있어, 정상 사료와 비율별로 배합하여 새로운 형태의 pellet으로 만들어 건조하여 제조한 뒤 공급하는 형태를 취하였다. 또한 일정한 사료 공급을 위해 12시간은 사료가 충분히 있는 조건으로 나머지 12시간은 사료가 없는 조건으로 설정을 하였고 실험을 위한 조건은 충분히 공복을 유지한 상태에서 실시하였다.

## (2) 버섯추출물

실험에는 3주령, 70g의 Sprague Dawley Strain male 흰 쥐를 주문하여 사용하였다. 쥐는 다음과 같이 10마리씩 6개의 group으로 나누어 관리하였다.

Group I은 정상사료를 공급받는 대조군, group II는 고지방식을 위해 cholesterol이 2% 함유된 사료를 공급받는 실험군, group III는 cholesterol과 느타리버섯의 H<sub>2</sub>O soluble fraction을 건조시킨 powder(느타리 가루-1%)가 포함된 사료를 공급받는 실험군, group IV는 cholesterol과 느타리버섯의 H<sub>2</sub>O insoluble fraction을 추출한 액상성분(느타리액-5%)이 포함된 사료를 공급받는 실험군, group V는 cholesterol과 표고버섯의 H<sub>2</sub>O soluble fraction을 건조시킨 powder(표고가루-1%)가 포함된 사료를 공급받는 실험군, group VI는 cholesterol과 표고버섯의 H<sub>2</sub>O insoluble fraction을 추출한 액상성분(표고액-5%)이 포함된 사료를 공급받는 실험군으로 하였다. 각 group은 정상사료와 cholesterol과 버섯 추출물을 비율별로 배합하여 새로운 형태의 pellet으로 만들어 건조하여 제조한 뒤 12시간은 사료가 충분히 있는 조건으로 나머지 12시간은 사료가 없는 조건으로 설정을 하였으며, 어린 시기부터 시작하여 장기적인 effect를 확인하고자 3주령 된 흰 쥐를 사육하기 시작하였다. 3주령의 쥐를 한 달간 계획에 따라 꾸준히 사료를 공급하고 9주령 정도부터 버섯의 투여효과를 확인하는 실험을 실시하였다. 식이섭취에 따른 몸무게 변화, 혈당의 변화, total cholesterol level, HDL의 level, 간독성을 확인하기 위한 GOT level, insulin 양의 변화를 측정하였다.

## (3) 시판버섯 추출물

어린 시기부터 시작하여 장기적인 effect를 확인하고자 4주령 된 흰 쥐를 사육하기 시작하였다. 4주령의 쥐를 한 달간 계획에 따라 꾸준히 사료를 공급하고 9주령 정도부터 버섯의 투여효과를 확인하는 실험을 실시하였다. 쥐는 다음과 같이 12마리씩 6개의 group으로 나누어 관리하였다

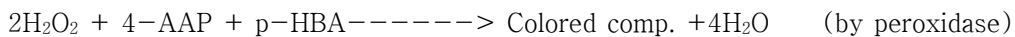
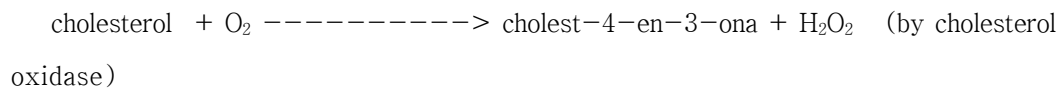
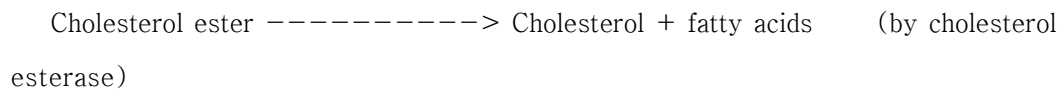
Group I은 정상사료를 공급받는 대조군, group II는 고지방식을 위해 cholesterol (2%) 함유된 사료를 공급받는 실험군, group III는 cholesterol과 느타리버섯 (1%)이 포함된 사료를 공급받는 실험군, group IV는 cholesterol과 꽃송이버섯 (1%)이 포함된 사료를 공급받는 실험군, group V 는 cholesterol과 폴리칸 (1%)이 포함된 사료를 공급받는 실험군, group VI는 cholesterol과 표고버섯 (1%)이 포함된 사료를 공급받는 실험군으로 하였다. 각 group은 정상사료와 cholesterol과 버섯 추출물을 비율별로 배합하여 새로운 형태의 pellet으로 만들어 건조하여 제조한 뒤 free feeding이 가능토록 공급하였다. 혈액 시료를 얻는 실험군의 경우 전날 절식을 시킨 후 채혈 2시간전에 1시간 동안 사료를 공급하는 방식을 취하였다

#### 나) 기능성 분석

##### (1) Cholesterol 측정

실험동물을 이용하여 대조군과 고지방식, 고지방식에 버섯을 배합한 사료를 공급하였을 경우 각 실험군에 따른 cholesterol 변화를 확인하였다. 공복시의 쥐에서 blood를 얻어 이 중 serum만을 분리하여 가수분해 반응을 유도하여 serum내에 존재하는 total cholesterol이 양을 측정하였다.

Cholesterol ester는 가수분해 되어 cholesterol을 생성하고 이 cholesterol은 산화되어 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 만들게 된다. 이 hydrogen peroxide가 peroxidase에 의해 붉은 색으로 반응이 나타난다.





## (2) 혈당량 측정

혈중 glucose의 농도는 혈당계를 이용하여 측정할 수 있다. 고지방식을 지속적으로 유지하였을 경우 생체 내 대사과정에서의 무리가 생기므로 이에 따라 혈당에서도 변화가 초래될 것이라고 보여진다. 쥐에서 blood를 얻은 즉시 혈당계의 strip을 이용하여 각 실험군의 혈당을 측정한 결과, 실험을 진행할수록 안정된 수치를 보여, 모든 실험군에서 평균적으로 100mg/dl 내외의 수치를 보였고 group별로 별 차이를 보이지 않았다. 실제로 고지방식을 유지한다고 하더라도 이에 대해 regulation할 수 있는 능력을 지니기 때문에 혈중 glucose농도가 점차적으로 올라가는 형태로 나타나지 않을 수 있다.

## 2. 실험결과 및 논의

### 가. 버섯의 기능성 조사

#### 1) 버섯 산업 현황 조사

우리나라에서 경쟁력이 있는 버섯을 선정하기 위하여 버섯산업 현황을 조사하였다.

#### 가) 세계의 버섯산업

세계 버섯 총생산량은 1965년의 35만 톤에서 1994년의 2백9십만 9천 톤으로 지난 30년간 14배 이상 증가했다. 사실상 이 증가는 지난 10년간 일어났다.

또하나 주목할만한 사실은 생산되는 버섯의 종류에도 상당한 변화가 일어났다는 점이다. 1979년의 경우, 한 해 동안 양송이(Agricus bisporus)가 세계 버섯 생산의 70%를 차지했었다. 그러나 1994년에는 세계 버섯 생산량의 겨우 38%만이 양송이 버섯이었다. 특산버섯의 세계 총생산량이 그만큼 증가한 것이다.

#### - 표고버섯

표고의 전세계 생산량은 양송이 다음으로 많아 특산버섯 중 1위이다. 이 버섯은 일본인들이 가장 좋아하는 버섯이기도 한데, 일본 외에 중국, 타이완, 우리나라 등이 주된 산지이다.

미국은 1972년에 미국 농산부(USDA)가 처음으로 표고 종자를 허가한 이후, 표고의 생산은 다른 어떤 특산버섯 보다도 빨리 증가하여, 1997~98년의 경우 2808톤의 표고가 생산되었다.

미국 현지에서 표고의 도매가격은 계절과 시장에 따라 다양하다. 가을과 봄의 경우엔 실외재배자들도 수확할 수 있기 때문에 수확량이 많아 가격이 낮고, 여름과 겨울의 경우엔 온도조절이 가능한 실내재배를 통해서만 수확하기 때문에 수확량이 적어 가격이 높다.

미국농업통계서비스(NASS)에 의하면, 지난 1991~92년의 미국 전지역 평균 표고가격은 파운드당 4.11달러(약 5천원)였다. 1994년의 경우엔 그 질과 크기에 따라 3.5달러에서 8달러(약 4천~9천7백원)정도였다.

#### - 느타리버섯

느타리 버섯의 생산은 지난 몇 년간 세계적으로 감소추세에 있다. 1990년에서 94년까지 세계 느타리 생산은 90만톤에서 79만 9천톤으로 11.4% 감소했다. 미국의 경우 1995년 생산량은 전년도에 비해 12% 감소한 777톤이었다. 일본에서의 느타리 생산은 1989년에 약 3만6천톤으로 최고점에 다다랐었다. 1993년 생산량은 2만4천톤이었는데, 이는 4년만에 33% 감소한 양이다. 주된 생산지는 중국으로 전세계 느타리 생산량의 82%를 생산한다.

느타리는 표고와 달리, 원목, 종이, 짚, 옥수수자루 등등 다양한 배지에서 재배할 수 있고 배지당 생산량이 많다. 뿐만 아니라 배지를 멸균할 필요가 없어서 보통 저온살균이면 충분하다. 그러나 느타리는 많은 사람들에게 알레르기를 일으키는 포자를 많이 만들고, 수확후 저장가능기간이 1주일로 비교적 짧으며, 해충이 많다.

- 팡이버섯

팡이의 세계 생산량은 1990년의 14만3천톤에서 1994년의 23만톤으로 4년동안 61% 증가했다.

팡이의 주요 생산지인 일본은 1986년 7만4천3백87톤을 생산했고 91년에는 9만5천1백23톤, 1993년에는 10만 3천3백57톤을 생산했다. 약 8%의 증가이다. 이 자료를 볼 때 총 생산량의 관점에서 다른 나라들의 생산량이 일본보다 더 빠른 성장률을 나타내고 있음이 분명하다.

미국의 경우 팡이의 생산은 지난 4년간 매년 25%이상의 성장을 보여왔다.

- 맛버섯

맛버섯의 일본이름인 나메코는 ‘끈끈한 버섯’이라는 의미를 갖고 있다. 이 버섯은 젤라틴의 점착성과 향으로 인해 높이 평가받고 있으며, 주로 미소국(일본 된장국)에 쓰이거나 잘게 간 무와 함께 생으로 요리하거나 작은 냄비에 찌서 요리한다.

일본은 1994년에 1990년보다 1800톤(8%)증가한 2만2천6백톤을 생산하여 전세계 맛버섯 생산량의 약 83%를 생산했다. 같은 기간에 맛버섯의 전세계 생산량은 평균 27% 증가했다.

- 잎새버섯

일본은 잎새버섯의 주요 생산지이자 소비지이다. 일본에서 잎새버섯의 상업재배가 시작된 것은 1981년이었는데, 그해 325톤이 생산되었다. 1986년의 생산량은 2203톤이었고 1991년에는 7,950톤으로 증가했다. 1993년 생산은 9617톤에 이르렀다. 작년 9월에 우리나라에서 잎새버섯의 톱밥재배가 성공한 바 있다.

- 목이버섯

가장 먼저 재배가 시작된 것으로 알려진 목이버섯의 1994년 총 생산량은 42만2천톤을 넘었다. 이것은 1990년보다 0.5%(2만톤)가 증가한 것이다. 목이의 생산량은 현재 전세계 버섯 생산량의 8.5%를 차지한다.

- 느티만가닥버섯

일본은 느티만가닥버섯의 주요 생산지이자 소비지이다. 이 버섯의 생산량은 지난 몇년간 꾸준한 증가를 보였는데, 1990년 전세계 생산량은 2만2천6백톤이었고, 1994년에는 5만4천8백톤으로 142% 증가했다.

- 비단털버섯

비단털 버섯은 영어로 짚버섯(straw mushroom)이라 불리는데, 이는 이 버섯이 처음 재배된 배지의 이름에서 비롯된 것이다. 비단털 버섯의 재배는 1822년 중국에서 시작되었다고 알려져 있으며 1930년대에 필리핀, 말레이시아 등의 동남아 국가에서 재배가 시작되었다.

전세계 생산량은 1990년의 2십만 7천톤에서 1994년 29만9천톤으로 44%의 증가율을 보였으며, 전세계 식용버섯 생산량의 약 6%를 차지한다.

나) 우리나라의 버섯산업

(1) 국내버섯 재배 품목

우리 나라에서 재배되고 있는 버섯은 14개 품목으로 일본의 25개에 비하여 다양하지 못하지만 5~6년 전에 비해서는 크게 늘어난 수치이다. 그러나 앞에서 지적하였듯이 현재 보급되고 있는 우량품종도 느타리, 표고가 각각 16품종이 보급되어 있을 뿐 기타 양송이, 팽이, 새송이, 영지, 상황, 잣버섯 등 12품목은 많아야 1~3품종으로 우량품종 개발이 미흡함을 알 수 있다.

(2) 국내버섯 생산현황

- 국내 버섯생산량은 느타리, 팽이, 표고, 양송이, 새송이 순이다(표 4).
- 느타리는 전국에서, 표고는 부여, 영동, 장흥, 진안 지역에서, 양송이는 부여 일대와 경주지역에서 주로 생산되고 팽이는 전국에서 골고루 생산 됨, 최근 약용버섯과 새송이 버섯의 생산이 늘어나고 있음

- 버섯 농가 마다 생산량을 정확하게 보고(세금 때문에 소득 노출을 꺼려함)되는 상황이 아니고 소요자재 등으로 환산된 경우도 많음
- 팽이버섯은 생산량은 많으나 소비가 안돼서 가격이 저렴하고 타종으로 재배 전환 중이다. (느타리 버섯 보다 약리성분이 많고 젓갈에 적용 등 가공적성이 좋다)
- 느타리버섯은 국내생산량이 가장 많다.
- 큰양송이버섯은 원주부근에서 일부재배, 미국등지에서 소비가 많으나 국내는 소량으로 수출 가능성 높음
- 표고는 값이 비싸고 중국이 최대 생산국이라서 수입이 많이 됨
- 노루궁뎅이 버섯은 재배 기술을 보급 중이나 생체 저장성이 떨어짐
- 새로운 약용 버섯으로 개발된 잎새버섯, 잣버섯은 재배농가가 없음
- 송이: 국내 송이시장은 생산량 감소와 국내 소비량이 증가 중에 있음  
생산량: 10년간 300톤 내지 1,300톤까지 풍년과 흉년을 반복함  
(소나무의 솔잎혹파리, 산불 등의 영향으로 생산량이 불규칙함)
- 수출: 일본 수입 중에 최근 중국이 2/3, 나머지 북한, 한국, 캐나다, 미국이고  
년도별 기록이 심함(한국은 1993년 136톤, 1995년 641톤)
- 수입: 2001년 228톤, 2002년 29톤

Table 4. 국내생산 버섯의 생산자수와 생산량 (2002년)

버섯별	생산자수	생산량(M/T)
느타리	7,088	72,348
양송이	993	21,277
팽이	174	38,072
영지	223	531
상황	207	728
새송이 등	400	8,669
건표고	약 8,000(기록 없음)	2,230(15,610)
생표고		21,545
자연송이		373
버섯 공식기록 총합	9,085	141,625

다) 버섯 활용한 국내 제품 조사

(1) 버섯을 이용한 식품 및 원료 품목수

버섯을 이용한 식품 및 원료는 영지가 가장 많았고 다음이 구름 버섯이었다 (표 5).

Table 5. 버섯을 이용한 식품 및 원료 품목수

버섯의 종류	품목 수
영지	92
구름	11
신령	3
표고	7

(2) 건강 보조제로서 버섯 형태

버섯건강보조제는 주로 버섯균사체나 자실체로부터 유효성분을 추출해낸 것으로 캡슐이나 정제, 추출액 형태로 이용되고 있다.

대부분의 버섯 건강 보조제는 자연산이거나 인공재배된 자실체, 혹은 고체배양하거나 침전배양한 균사체를 말리거나 추출한 것이다.

2) 버섯의 기능성과 안전성에 대한 인정자료 확보

가) 버섯의 효능

버섯은 대부분이  $\beta$ -glucan 및 다양한 기능성 물질을 함유하고 있으며 표 6은 기능성 뛰어난 20종의 버섯을 나타내었다.

Table 6. 버섯의 종류에 따른 효능

버섯의 종류	학 명	효능	주요 약효 성분
운지	<i>Coriolus versicolor</i>	이노, 해독, 항균, 면역증강, 진해, 진통, 위궤양, 혈압강하, 급만성간염	tripernoid, krestin
표고	<i>Lentinus edodes</i>	항암, 고혈압, 동맥경화, 허혈성 심장질환, 혈액순환 질환	erithadenine, lentinan
영지	<i>Ganoderma lucidum</i>	고혈압, 기관지염, 당뇨, 동맥경화, 진해	
동충하초	<i>Cordyceps militarius</i>	진해, 면역증강, 체력증강, 염증억제, 산소 소비량 억제, DNA, RNA합성 저해, 방광암, 대장암, 폐암에 대한 항암	cordycepin
송이	<i>Tricholoma matsutake</i>	식욕 증진, 지사제, 동맥경화, 심장병, 당뇨, 고지혈증, 항암	
때죽도장, 기와웃술, 모래밭, 먹물, 주름, 민자주방망이		단백질 분해효소, 혈진분해	
목질진홍(상황)	<i>Phellinus linteus</i>	항암, 면역증강, 자궁출혈, 대하, 월경불순, 장출혈	
신령	<i>Agaricus blazei</i>	항암, 혈당강하, 혈압강하, 콜레스테롤 저하	
치마	<i>Schizophyllum commune</i>	항암	schizophyllan
	<i>Calvatia gigantea</i>	항암	calvaine
자작나무	<i>Piptoporus betrinus</i>	항암	
풀	<i>Volvariella volvacea</i>	항암	volvatoxin
팽나무	<i>Flammulina velutipes</i>	항암	volvatoxin
흰비단털		항암	proteoglycan
아까시재목	<i>Fomitella fraxinae</i>	항암	
등갈색미로	<i>Daedalea dickinsii</i>	항암	
노루궁뎅이	<i>Hericium erinaceus</i>	항암	hercenine, erinacine
	<i>Grifora frondosa</i>	면역증강	grifolan
	<i>Lyophyllum decastes</i>	항암	lyophyllan
	<i>Nocardia rubra</i>	항암	세포벽 성분

특히,  $\beta$ -glucan의 경우 미국 식품의약국안전청(FDA)의 승인을 받아 식품첨가제로 사용 중이다.

#### 나) 국산 버섯 인정 자료 조사

FSTA, Medline 등을 이용한 버섯의 기능성과 안전성을 조사하였다. 국내에 고시형 기능성 식품으로 등재된 버섯은 영지, 운지, 표고버섯이므로 이 들과 국내에서 식용으로 많이 사용하는 느타리버섯 위주로 분석하였다. 가장 많이 나타난 기능성은 항암 및 항종양으로 14.4%으로 나타났으며 그러나, 의학 분야에 속하므로 5개의 참고 문헌만 나타내었다. 본 연구에 사용된 느타리와 표고의 위해성은 거의 나타나지 않았으며 혈전과 연관된 분야에 일부 위해성이 나타났지만 추출물이 농축된 경우에 나타났으므로 원재료 버섯은 위해성이 없을 것으로 생각되었다. 그 다음으로 많이 나타나는 문헌은 항산화와 항균(바이러스 포함)이었으며 표에 10개씩 나타내었다.



Table 7. 버섯의 항산화 효과

순서	저자	문헌	논문종류	연구대상	연구방법	연구결과	논문평가	문헌번호
1	Cheung, LM and Cheung PCK	Food Chemistry 89(3): 403-409 (2005)	동물실험	표고 및 Volvariella volvacea의 버섯의 methanol과 물 추출물의 lipid peroxidation 억제	추출분획물을 쥐 뇌 분쇄물에서 지방과산화 억제 조사 및 사람 LDL 산화 조사	Phenolic content와 항산화 상관관계 나타남	표고 및 Volvariella volvacea의 항산화 효과 증명	1
2	Sun, jie and et al.	J. Agricultural and Food Chemistry 52(21): 6646-6652 (2004)	동물실험	영지버섯의 항산화	기존 항산화제와 항산화 비교 하였고 쥐 간조직과 미토콘드리아 막의 과산화 및 쥐 적혈구의 자가분해 조사	영지버섯 peptide 분획물이 쥐 적혈구의 자가분해 저해	영지버섯 peptide가 항산화 효과 나타냄	2
3	Yen, Gow-Chin and Jun-Yi Wu	Food Chemistry 65(3): 375-379 (1999)	동물실험	영지버섯의 methanol 추출물 산화 및 free radical에 의한 DNA 손상 등	linolenic acid와 쥐 간 peroxidation system에서 조사	영지버섯 중에서 <i>G. tsugae</i> 는 가장 강한 항산화 효과가 있었고 alpha-tocopherol 보다 강한 항산화 효과 가짐	영지버섯의 항산화 효과 증명	3
4	Li, L, et al.	App. Microbiol. Biotechnol. 9: Epub ahead of print (2007)	동물실험	<i>Pleurotus abalonus</i> 의 포자 항산화	생쥐의 간, 신장, 뇌에서 real time PCR을 이용하여 SOD, CAT, GPx의 변화 조사	<i>Pleurotus abalonus</i> 의 polysaccharide-peptide complex 처리후에 SOD, CAT, GPx 효과 크게 증가	<i>Pleurotus abalonus</i> 의 포자 항산화 효과 나타냄	4
5	Jayakumar T, et al.	Exp. Gerontol. 42(3): 183-191 (2007)	동물실험	양송이 ( <i>Pleurotus ostratus</i> )의 늙은 쥐와 젊은 쥐에서 항산화 효과 조사	버섯 추출물을 늙은 쥐와 젊은 쥐에 Vitamin C 등의 항산화 물질을 같이 투여하고 CAT, SOD, GPx 의 활성 측정	Vitamin C 등의 항산화 물질의 활성에 도움을 주고 항산화 활성이 떨어졌던 늙은 쥐도 젊은 쥐 같이 항산화 효과 나타남	양송이 노화 방지에 효과 나타냄	5

순서	저자	문헌	논문종류	연구대상	연구방법	연구결과	논문평가	문헌번호
6	Jayakumar T, et al.	Food Chem. Toxicol. 44(12): 1989-1989 (2006)	동물실험	양송이 ( <i>Pleurotus ostratus</i> ) 추출물의 수컷 쥐 간에서 항산화 효과 조사	쥐에 CCl <sub>4</sub> 를 투여하여 간에 손상을 주면서 버섯의 항산화 효과 glutamic pyruvate transaminase, oxalate transaminase의 활성 측정	양송이 처리구는 CCl <sub>4</sub> 투여에 의한 쥐간에서 독성이 나타나지 않음	양송이 항산화 효과 나타냄	6
7	Hu, SH, et al.	J. Agric. Food Chem., 54(6): 2103-10 (2006)	동물실험	<i>Pleurotus cltrinopiileatus</i> 추출물의 햄스터에서 고지혈 완화 조사	건조 자실체의 열수 및 유기용매 추출물을 고지혈증 쥐에 투여하여 중성지질과 콜레스테롤, glutachion peroxidation, SOD 활성 측정	농도 의존적으로 투여하여 중성지질과 콜레스테롤 함량은 낮아지고 glutachion peroxidation, SOD 활성은 높아짐	<i>Pleurotus cltrinopiileatus</i> 항산화 효과 나타냄	7
8	Lai, KN, et al.	Nephrol. Dial Transplant 21(5): 1188-97	세포주 실험	영지 추출물의 산소독성 방지	사람의 proximal tubular 포피세포를 사용하여 DNA 손상을 주면서 첨가물 효과 조사	영지버섯 추출물의 분자량에 따라 각각 다른 산화 방지 효과 있음	영지버섯의 항산화 효과 나타냄	8
9	Won, KL et al.	Phytother. Res., 18(12): 1024-6(2004)	동물실험	생쥐에서 acute ethanol-induced heart toxicity 조사	생쥐 심장 균질체의 cytochrome C reduction 방법으로 superoxide anion을 분석	농도 의존적으로 superoxide 손상 방지	영지버섯의 항산화 효과 나타냄	9
10	Sun, J. et al.	Phytother. Res., 18(12): 1024-6(2004)	동물실험	영지버섯 peptide의 항산화 조사	lightproof soybean oil과 lard system에서 lipid peroxidation value 측정	쥐 간조직에서 항산화 효과와 적혈구의 auto-hemolysis가 농도 의존적으로 superoxide 손상 방지	영지버섯의 항산화 효과 나타냄	10

Table 8. 버섯의 항균 및 항바이러스 효과

순서	저자	문헌	논문 종류	연구대상	연구방법	연구결과	논문평가	문헌 번호
1	Li, YQ. and Wang SF1.	Biotechnol. Lett 28(11): 873-41 (2006)	세포주 및 동물 실험	생쥐 간에서 virus 손상 조사	HepG2215 세포에서 영지 추출물에 의하여 Hepatitis B virus 억제 조사와 사염화탄소에 의한 간손상 조사	Garnodermic acid가 hepatitis 바이러스 복제 억제와 간손상 방지	영지의 바이러스 및 화학물에 의한 간손상 방어 효과 나타냄	1
2	Li, YQ. et al.	Am. J. Clin. Med., 34(2): 341-9 (2006)	동물 실험	생쥐 간에서 virus 손상 조사	액체 배양 영지 추출물에 의하여 생쥐 간에서 Hepatitis B virus 억제 조사	영지버섯의 hepatitis 바이러스에 의한 간손상 방지	영지의 바이러스에 의한 간손상 방어 효과 나타냄	2
3	Kuznetsov , Olu. et al.	Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol., Jan-Feb(1): 80-2(2005)	<i>In vitro</i>	표고버섯의 위해세균 등의 항미생물 효과 조사	식중독 및 장관관 세균 배양액에 버섯 추출물 5% 첨가하여 성장 조사	표고버섯 추출물 5%에서 <i>Bifidobacteria</i> 와 <i>Lactococcus</i> 를 제외하고 억제 나타남	버섯의 항미생물 효과 나타냄	3
4	Guo, FC. et al.	Br. Poult Sci., 45(5): 684-94(2004 )	동물 실험	닭에서 표고버섯 다당체 추출물의 항생물질 효과 조사	닭에서 표고버섯 다당체 추출물을 투여하여 항생물질 투여 처리구와 조직 및몸무게 등을 비교	항생물질 virginalmycin을 제외하고 버섯추출물이 보다 증체율이 높음	버섯의 항미생물의 대체효과 나타냄	4
5	van Novel CJ. et al.	Arch. Tierernahr. 57(6): 399-412	동물 실험	표고버섯 추출물의 돼지에서 항미생물 대체 효과 조사	식이에 버섯 균사체 첨가 급여하고 장관 등을 조사	건표고버섯 5% 처리구가 1-2승의 균수 감소효과 나타남	표고버섯의 항균효과 나타냄	5

순서	저자	문헌	논문 종류	연구대상	연구방법	연구결과	논문평가	문헌 번호
6	Ngai, PH and Ng, TB	Life Sci., 73(26): 3363-74	<i>in Vitro</i>	표고버섯 단백질인 lentin의 곰팡이	버섯 추출물의 곰팡이 배지 첨가에 의하여 균사 성장 방해 조사	곰팡이 성장이 저해 됨	표고버섯의 곰팡이 억제 효과 나타냄	6
7	Hatvani, N..	Int. J. Antimicrob Agents 17(1): 71-4(2001)	<i>In vitro</i>	표고버섯의 위해세균 등의 항미생물 효과 조사	식중독에 버섯 배양물 첨가하여 성장 조사	분자량 10,000의 황함유 화합물에서 항미생물 효과 나타남	버섯의 항미생물 효과 나타냄	7
8	Shouji, N. et al.	Caries Res., 34(1): 94-8	동물 실험	표고버섯의 plaque 생성 억제	쥐에 충치생성 식사 및 표고버섯 섭취 후에 <i>Streptococcus mutans</i> 가 생성하는 plaque 생성조사	plaque 생성 감소	plaque 생성 감소로 항미생물 효과 나타냄	8
9	Yoon, SY. et al.	Arch. Pharm. Res., 17(8): 438-42	<i>In vitro</i>	영지버섯의 항미생물 효과	배양액에 영지 추출물을 순서적으로 희석하여 다른 항생물질과 상승적인 미생물 억제 농도 조사	대부분 처리구에서 상승효과 나타남	영지버섯의 항미생물 효과 나타냄	9
10	Bianco Coletto Ma.	G. Bacteriol. Virol. Immunol., 74(7-12): 267-74(1981)		표고버섯 등의 담자균 34개의 <i>E. coli</i> 등에 대한 항미생물 효과 조사	Mycellium 배양액의 disk test와 cylinder plate method를 사용하여 억제 조사	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> 등을 강하게 억제	버섯의 항미생물 효과 나타냄	10

Table 9. 버섯의 항콜레스테롤 및 혈류개선 효과

순서	저자	문헌	논문종류	연구대상	연구방법	연구결과	논문평가	문헌번호
1	Yamada, T. et al.	J. Atherosclerotic Thromb., 9(3): 149-56(2002)	동물실험	표고버섯 항동맥경화	수컷 토끼에 콜레스테롤 투여로 동맥경화를 유발하고 버섯 투여군과 atherosclerotic index 비교함	버섯 투여군에서 atherosclerotic index가 유의적으로 낮아짐	표고버섯에 의하여 동맥경화가 낮아짐	1
2	Fukushima M. et al.	Exp. Biol. Med., 26(8): 758-65 (2001)	동물실험	표고버섯 항콜레스테롤 효과	수컷 토끼에 콜레스테롤 투여로 동맥경화를 유발하고 버섯 투여군과 LDL-receptor mRNA 비교함	버섯 투여군에서 hepatic LDL-receptor mRNA와 콜레스테롤 분비가 유의적으로 높음	표고버섯에 의하여 콜레스테롤 함량 낮아짐	2
3	Berne S. et al.	Biochem Biophys. Acta, 1570(3): 153-9	In vitro	양송이와 <i>Agrocybe aegerita</i> 의 hemolysin	버섯에서 포자생성시에 hemolysin 생성 조사	포자 생성시에 버섯 hemolysin의 분자량과 등전점, 아미노산 sequence 등을 조사	버섯의 용혈성 나타냄	3
4	Bobek P. & Galhavy S.	Ceska. Slov. Farm, 48(5): 226-30	동물실험	양송이의 동맥경화 예방효과	양송이포자 식이 투여군과 동맥경화 plaque 발생 및 크기 비교	동맥경화 plaque 발생 및 크기 감소	버섯에 의한 혈전 감소	4
5	Rebolj K. et al.	Toxicon., Feb 12: Epub ahead of print (2007)	동물실험	양송이에 의하여 생성된 ostreolysin (cardiotoxic cytolyisin)의 독성 조사	ostreolysin의 쥐의 aortic ring에서 tention 조사, 사람 배동맥 표피세포와 햄스터의 폐섬유낭세포에서 세포 독성 조사	ostreolysin의 농도 의존적으로 aortic ring에서 tention 증가, 사람 배동맥 표피세포, 햄스터의 폐섬유낭세포에서 세포 독성 나타남	양송이 버섯, 혈관 장력 증가로 유연성이 증가할 수 있으나 세포 독성의 가능성도 있으므로 사용농도량 조사 필요함	5

Table 10. 버섯의 면역조절 효과

순서	저자	문헌	논문종류	연구대상	연구방법	연구결과	논문평가	문헌번호
1	Zhu XL. et al.	J. Enteropharmacol., 111(2): 219-26 (2007)	동물실험	면역억제시킨 생쥐에게 영지버섯 투여로 면역증가 조사	영지버섯 다당체를 면역억제제를 투여한 생쥐에게 농도별로 투여하여 bone narrow cell, natural killer T cell 등을 조사	낮은 농도(2.5 mg/kg) 투여로 면역 관련 세포수 증가	영지버섯의 면역력 증가 나타냄	1
2	Yue GG. et al.	J. Altern. Complement Med., 12(8): 777-89(2006)	In Vitro	생쥐 비장 세포(splenic lymphocyte)	영지버섯 종별 추출물 투여로 면역관련 splenic lymphocyte 수 측정	버섯 추출물 투여로 면역관련 세포수 증가	영지버섯의 면역력 증가 나타냄	2
3	Jeong SC. et al.	J. Med. Food, 9(2): 175-81(2006)	In Vitro	Turkey Tall Mushroom 다당체의 Macrophage - stimulating 조사	버섯 다당체와 interfeon-gamma의 복합투여에 의한 Macrophage 활성화 측정	Macrophage 7.2배 증가	Turkey Tall Mushroom의 면역력 증가 나타냄	3
4	Lin YL. et al.	Mol. Pharmacol., 70(2): 637-44(2006)	In Vitro	영지버섯 다당체의 면역관련 유전자 증폭	사람 monocyte-derived dendritic cell에서 Human Genom U133 plus GeneChip을 사용한 microarray 분석	Proinflammatory chemokines 관련 유전자 증가로 monocyte-derived dendritic cell의 성숙과 활성화 촉진	영지버섯의 면역력 증가 나타냄	4
5	Zheng R. et al.	Int. Immunopharmacol., 5(5): 811-20(2005)	동물실험	표고버섯 다당체의 sarcoma 180-bearing mice에 대한 세포면역 반응 조사	sarcoma 180-bearing mice에 표고버섯 다당체를 투여하여 macrophage의 phagocytosis, splenocytes ploliferation 조사	spleen과 thamus 무게 증가, tumor 감소, TNF-alpha, INF-gamma 증가	표고버섯의 면역력 증가 나타냄	5

Table 11. 버섯의 항암, 항돌연변이 효과

순서	저자	문헌	논문종류	연구대상	연구방법	연구결과	논문평가	문헌번호
1	Bae, Man-jong et al.	J. Korean Society of Korean Society and nutrition (2007)	세포주 실험	표고버섯의 암세포주 및 암발생세포주의 억제조사	Cancer cell line(Hep3B, MCF-7 and Hela)의 in vitro 실험 성장억제 및 sarcoma cells의 쥐에서 in vivo 성장억제	Cancer cell line (Hep3B, MCF-7 and Hela)의 65.7%, 69.23% 성장억제 및 sarcoma cells의 쥐에서 항종양 효과	항암 효과 나타냄	1
2	Frank, JA et al.	Nutrition research 26(3): 138-135 (2006)	동물 실험	표고버섯의 Mid colon에서 항종양효과 조사	쥐에 표고 1~4% 급여	Mid colon에서 항종양효과	항암 효과 나타냄	2
3	Wang G. et al.	Int. Immunopharmacol., 7(6): 864-70(2007)	세포주 실험	영지버섯의 항종양 관련 면역력 증가 조사	Eliza와 RT-PCR에 의한 interukin-2와 interferon-gamma expression 측정	IL-2와 IFN-gamma 증가	항종양 효과 나타냄	3
4	Maruama S. et al.	Gan. To. Kagaku Ryoho., 33(12): 1726-9	동물 실험	종양생성 생쥐에서 표고버섯 추출물 lentinan과 micellapist 활성 조사	종양생성 생쥐에게 표고버섯 추출물 lentinan과 micellapist 식이를 급여하고 종양 조사	종양생성 감소 및 생존력 증가	항종양 효과 나타냄	4
5	Tang W. et al.	Life Sci., 80(3): 205-11	세포주 실험	영지버섯 추출물의 폐암세포 apoptosis 조사	영지버섯 추출물 ganoderic acid T를 lung cancer cell line (95-D) 투여하여 성장 조사	미토콘드리아 기능을 저해하여 암세포 사멸 시킴	항암 효과 나타냄	5

Table 12. 버섯의 항당뇨 효과

순서	저자	문헌	논문 종류	연구대상	연구방법	연구결과	논문평가	문헌 번호
1	Jung KH, et al.	Acta Biochem. Pol., 53(3): 597-601 (2006)	세포주 실험	영지버섯에 의한 쥐 skeletal muscle cell에서 당 흡수 조사	skeletal muscle cell에 버섯 추출물 투여하고 phosphatidyl inositol 3-kinase 활성 측정	phosphatidyl inositol 3-kinase 활성 7배 증가하고 glucose 흡수 2배 증가	당대사 활성 증가로 당뇨 감소 예측 됨	1
2	Hu SH. et al.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 70(1): 107-113 (2006)	동물 실험	<i>Pleurotus citrinopilianu</i> s의 다당체 투여에 의한 혈당 조사	streptozotocin 투여로 당뇨를 유발한 쥐에 다당체 투여하여 혈당 및 insulin조사	다당체 투여로 혈당 44% 감소	Insulin 활성 증가로 당뇨 감소 예측 됨	2
3	Zang HN. and Lin ZB.	Acta Pharmacol. Sin., 25(2): 191-5 (2004)	동물 실험	영지버섯에 의한 생쥐에서 혈당 및 insulin 조사	생쥐에 버섯 추출물 투여하여 혈당을 측정하고 pancreatic islets을 추출하여 glucose 첨가 배양하면서 insulin 측정	혈당 감소 및 insulin 분비 증가	Insulin 활성 증가로 당뇨 감소 예측 됨	3
4	Yang BK. et al.	Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(5): 937-42 (2002)	동물 실험	액체 배양한 표고버섯이 분비한 다당체 투여에 의한 혈당 조사	streptozotocin 투여로 당뇨를 유발한 쥐에 다당체 투여하여 혈당 및 insulin조사	혈장 glucose를 감소시켰고 insulin을 증가 시킴	Insulin 활성 증가로 당뇨 감소 예측 됨	4
5	Chorvathova V. et al.	Physiol. Res. 42(3): 175-9 (1993)	동물 실험	<i>Pleurotus ostreatus</i> 의 다당체 투여에 의한 혈당 조사	streptozotocin 투여로 당뇨를 유발한 쥐에 다당체 투여하여 혈당 및 insulin조사	다당체 투여로 혈당 감소	Insulin 활성 증가로 당뇨 감소 예측 됨	5



Table 13. 버섯 기능성 참고문헌

<p>(항산화)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cheung, LM and Cheung PCK, Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. <i>Food Chemistry</i> 89(3): 403–409 (2005)</li> <li>2. Sun, jie, Hui He, Bi Jun Xie, Novel antioxidant peptides from fermented mushroom <i>Ganoderma lucidum</i>. <i>J. Agricultural and Food Chemistry</i> 52(21): 6646–6652 (2004)</li> <li>3. Yen, Gow–Chin and Jun–Yi Wu, Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from <i>Ganoderma tsugae</i>. <i>Food Chemistry</i> 65(3): 375–379 (1999)</li> <li>4. Li, L., Ng TB, Song M, Yuan F, Liu ZK, Wang CL, Jiang Y, Fu M, Liu F., A polysaccharide–peptide complex from abalone mushroom (<i>Pleurotus abalonus</i>) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence–accelerated mice. <i>App. Microbiol. Biotechnol.</i> 9: Epub ahead of print (2007)</li> <li>5. Jayakumar T., Thomas PA, Geraldine P., Protective effect of an extract of the oyster mushroom, <i>Pleurotus ostreatus</i>, on antioxidants of major organs of aged rats. <i>Exp. Gerontol.</i> 42(3): 183–191 (2007)</li> <li>6. Jayakumar T., Ramesh E, Geraldine P., Antioxidant activity of the oyster mushroom, <i>Pleurotus ostreatus</i>, on CCl(4)–induced liver injury in rats. <i>Food Chem. Toxicol.</i>, 44(12): 1989–1989 (2006)</li> <li>7. Hu, SH., Liang ZC, Chia YC, Lien JL, Chen KS, Lee MY, Wang JC., Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from <i>Pleurotus citrinopileatus</i>. <i>J. Agric. Food Chem.</i>, 54(6): 2103–10 (2006)</li> <li>8. Lai, KN., Chan LY, Tang SC, Leung JC., <i>Ganoderma</i> extract prevents albumin–induced oxidative damage and chemokines synthesis in cultured human proximal tubular epithelial cells. <i>Nephrol. Dial Transplant</i> 21(5): 1188–97 (2006)</li> <li>9. Wong, KL., Chao HH, Chan P, Chang LP, Liu CF., Antioxidant activity of <i>Ganoderma lucidum</i> in acute ethanol–induced heart toxicity. <i>Phyther. Res.</i>, 18(12): 1024–6 (2004)</li> <li>10. Sun, J., He H, Xie BJ., Novel antioxidant peptides from fermented mushroom <i>Ganoderma lucidum</i>. <i>Phyther. Res.</i>, 18(12): 1024–6 (2004)</li> </ol>
--

(항균 및 항바이러스)

1. Li, YQ. and Wang SFl., Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*. Biotechnol. Lett 28(11): 873-41 (2006)
2. Li, YQ., Yang Y, Fang L, Zhang Z, Jin J, Zhang K., Anti-hepatitis activities in the broth of *Ganoderma lucidum* supplemented with a Chinese herbal medicine. Am. J. Clin. Med., 34(2): 341-9 (2006)
3. Kuznetsov, Olu., Mil'kova EV, Sosnina AE, Sotnikova NIu., Antimicrobial action of *Lentinus edodes* juice on human microflora. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol., Jan-Feb(1): 80-2 (2005)
4. Guo, FC., Kwakkell RP, Williams BA, Li WK, Li HS, Luo JY, Li XP, Wei YX, Yan ZT, Verstegen MW., Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on growth performance of broilers. Br. Poultry Sci., 45(5): 684-94 (2004)
5. van Novel CJ., Decuypere JA, Dierick N, Molly K., The influence of *Lentinus edodes* (Shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets. Arch. Tierernahr. 57(6): 399-412 (2003)
6. Ngai, PH and Ng, TB, Lentin, a novel and potent antifungal protein from shiitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. Life Sci., 73(26) 3363-74 (2003)
7. Hatvani, N., Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. Int. J. Antimicrob Agents 17(1): 71-4 (2001)
8. Shouji, N., Takada K, Fukushima K, Hirasawa M., Anticaries effect of a component from shiitake (an edible mushroom). Caries Res., 34(1): 94-8 (2000)
9. Yoon, SY., Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS., Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. Arch. Pharm. Res., 17(8): 438-42 (1994)
10. Bianco Coletto Ma., Basidiomycetes in relation to antibiosis. II. Antibiotic activity of mycelia and culture liquids. G. Bacteriol. Virol. Immunol., 74(7-12): 267-74 (1981)

**(항콜레스테롤 및 혈류개선)**

1. Yamada, T., Oinuma T, Niihashi M, Mitsumata M, Fujioka T, Hasegawa K, Nagaoka H, Itakura H., Effects of *Lentinus edodes* mycelia on dietary-induced atherosclerotic involvement in rabbit aorta. *J. Atheroscler Thromb.*, 9(3): 149-56 (2002)
2. Fukushima M., Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K, Nakano M., Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. *Exp. Biol. Med.*, 26(8): 758-65 (2001)
3. Berne S. et al. *Biochem Biophys. Acta*, 1570(3): 153-9
4. Bobek P. and Galhavy S., The oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) effectively prevents the development of atherosclerosis in rabbits. *Ceska. Slov. Farm*, 48(5): 226-30 (1999)
5. Reboli K, Batista U, Sepcic K, Cestnik V, Macek P, Frangez R., Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cell viability in vitro. *Toxicol.*, Feb 12: Epub ahead of print (2007)

**(면역조절)**

1. Zhu XL., Chen AF, Lin ZB., *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *J. Enteropharmacol.*, 111(2): 219-26 (2007)
2. Yue GG., Fung KP, Tse GM, Leung PC, Lau CB., Comparative studies of various *Ganoderma* species and their different parts with regard to their antitumor and immunomodulating activities in vitro. *J. Altern. Complement Med.*, 12(8): 777-89 (2006)
3. Jeong SC., Yang BK, Kim GN, Jeong H, Wilson MA, Cho Y, Rao KS, Song CH., Macrophage-stimulating activity of polysaccharides extracted from fruiting bodies of *Coriolus versicolor* (Turkey Tail Mushroom). *J. Med. Food*, 9(2): 175-81 (2006)
4. Lin YL., Lee SS, Hou SM, Chiang BL., Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1 immune response in BALB/c mice. *Mol. Pharmacol.*, 70(2): 637-44 (2006)
5. Zheng R., Jie S, Hanchuan D, Moucheng W., Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int. Immunopharmacol.*, 5(5): 811-20 (2005)

**(항암, 항돌연변이)**

1. Bae, Man-jong, Kwang-Joong Kim, Soo-Jung Kim and Eun-Ju Ye, Effect of mycelia extracts from *Lentinus edodes* mushroom-cultured *Astragalus membranaceus* Bunge on anti-cancer and anti-allergy activities. J. Korean Society of Nutrition, 36(1): 8-13 (2007)
2. Frank, JA, Rijin Xiao, Shangong Yu, Ferguson, M, Hennings, LJ, Simpson, PM, Ronis, MJJ, Nianbai Fang, Badger TM and Simmen FA, Effect of shiitake mushroom dose on colon tumorigenesis in azoxymethane-treated male Sprague-Dawley rats.. Nutrition research 26(3): 138-135 (2006)
3. Wang G, Zhao J, Liu J, Huang Y, Zhong JJ, Tang W., Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo. Int. Immunopharmacol., 7(6): 864-70(2007)
4. Maruyama S, Sukekawa Y, Kaneko Y, Fujimoto S., Anti tumor activities of lentinan and micellapist in tumor-bearing mice. Gan. To. Kagaku Ryoho., 33(12): 1726-9
5. Tang W., Liu JW, Zhao WM, Wei DZ, Zhong JJ., Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. Life Sci., 80(3): 205-11

**(항당뇨)**

1. Jung KH, Ha E, Kim MJ, Uhm YK, Kim HK, Hong SJ, Chung JH, Yim SV., *Ganoderma lucidum* extract stimulates glucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. Acta Biochem. Pol., 53(3): 597-601 (2006)
2. Hu SH, Wang JC, Lien JL, Liaw ET, Lee MY., Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70(1): 107-13 (2006)
3. Zang HN. and Lin ZB., Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. Acta Pharmacol. Sin, 25(2): 191-5 (2004)
4. Yang BK., Kim DH, Jeong SC, Das S, Choi YS, Shin JS, Lee SC, Song CH., Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exo-polymer produced from a submerged mycelial culture. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(5): 937-42 (2002)
5. Chorvathova V., Bobek P, Ginter E, Klvanova J., Effect of the oyster fungus on glycaemia and cholesterolaemia in rats with insulin-dependent diabetes. Physiol. Res. 42(3): 175-9 (1993)

### 3) 버섯의 항산화성

8종의 생 버섯(팽이, 느타리, 노랑꽃, 맛 느타리, 국산 표고, 큰송이, 새송이, 양송이 버섯)의 에탄올 추출물로 전자공여능을 측정한 결과 노랑꽃, 양송이, 국산 표고는 16, 12, 11%로 높은 값을 나타내었고, 맛 느타리가 4%로 가장 작은 값을, 그 다음으로 새송이, 팽이, 느타리, 큰송이가 낮은 값을 나타내었다(Fig. 2).

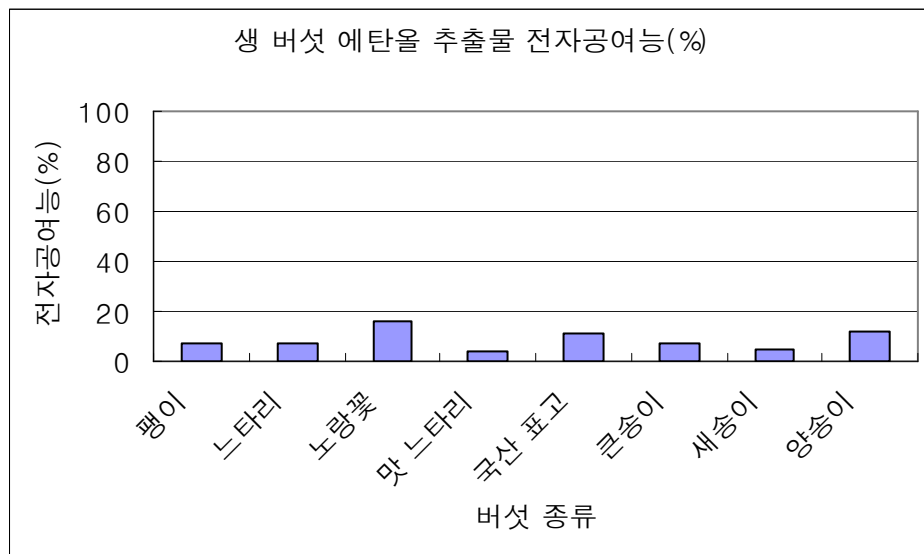


Fig. 2. 생 버섯 에탄올 추출물 전자공여능(%)

4°C 물 추출물로 전자공여능을 측정한 결과 국산 표고가 22% , 큰송이가 20%으로 높은 값을 나타내었고, 맛 느타리가 3% 그 다음으로 새송이, 느타리가 낮은 값을 나타내었다(Fig. 3).

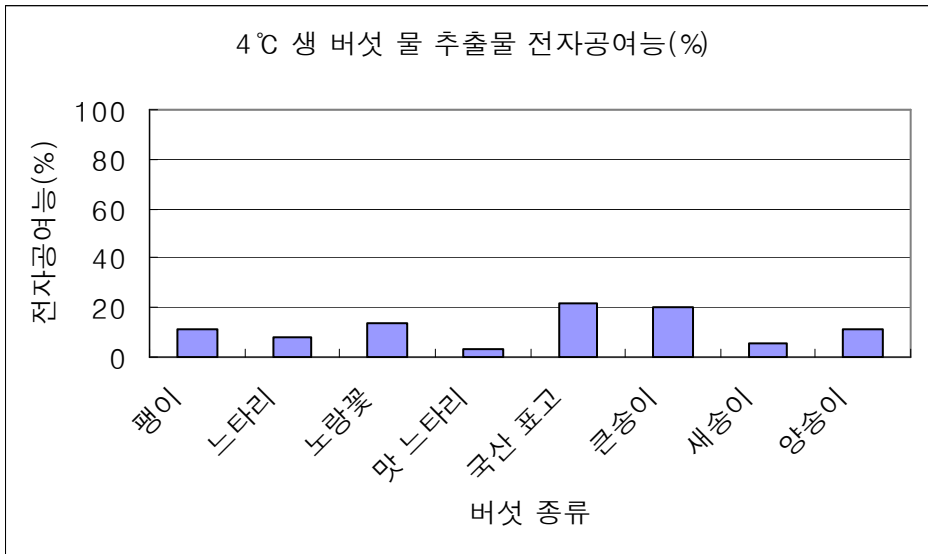


Fig. 3. 생 버섯 4°C 물 추출물 전자공여능(%)

50°C 물 추출물로 전자공여능을 측정한 결과 국산 표고가 15%로 가장 높은 값을 나타내었으며, 그 다음으로 노랑꽃, 큰송이가 14, 13%을 나타내었고, 맛 느타리와 새송이가 1, 2%로 낮은 값을 나타내었다(Fig. 4).

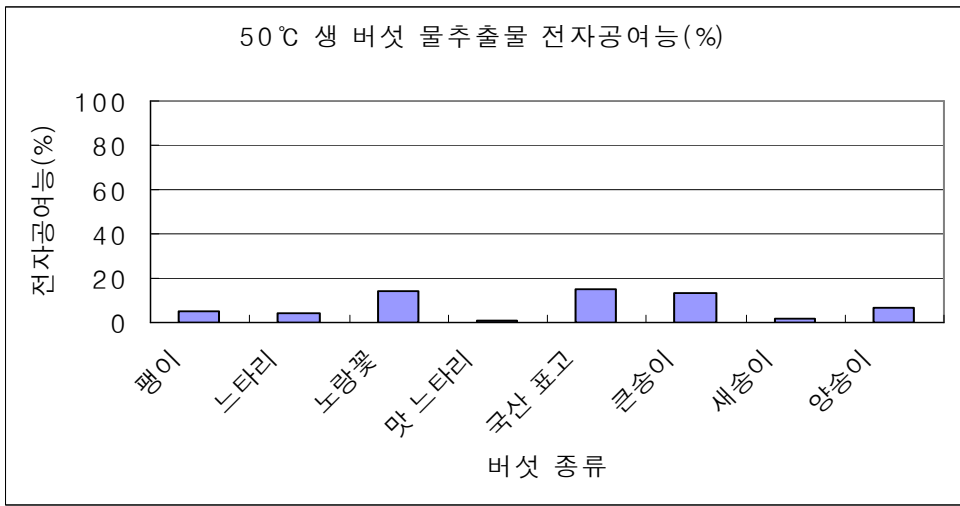


Fig. 4. 생 버섯 50°C 물 추출물 전자공여능(%)

에탄올 추출물로 SOD유사활성도를 측정한 결과 큰송이가 15%로 가장 높은 값을 나타내었고, 팽이, 노랑꽃, 양송이, 느타리의 순으로 높은 값을 나타내었다. 국산표고와 맛 느타리는 3, 8%로 낮은 값을 나타내었다(Fig. 5)

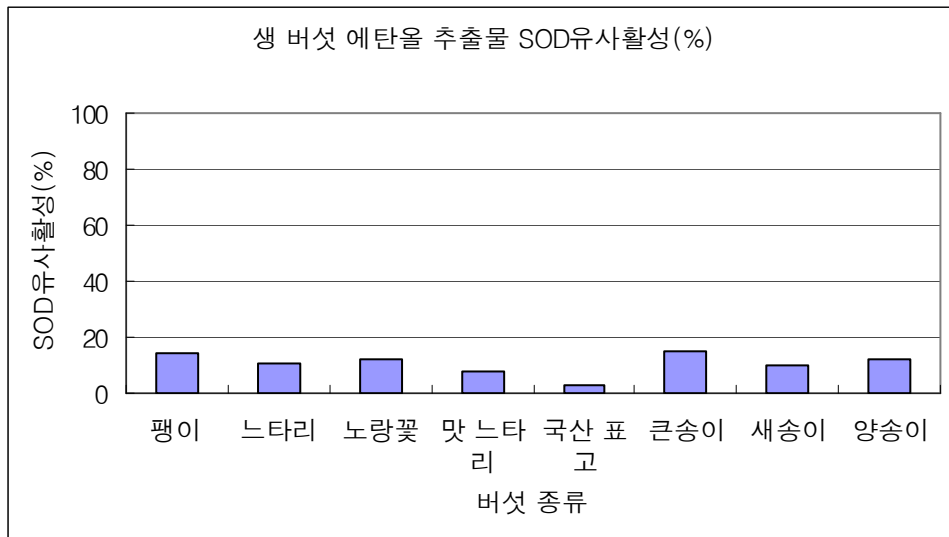


Fig. 5. 생 버섯 에탄올 추출물 SOD유사활성도(%)

4°C 물 추출물로 SOD유사활성도를 측정한 결과 맛 느타리와 노랑꽃이 14, 11%로 높은 값을 나타내었고, 새송이, 큰송이, 양송이는 0.2, 0.4, 0.5로 낮은 값을 나타내었다(Fig. 6)

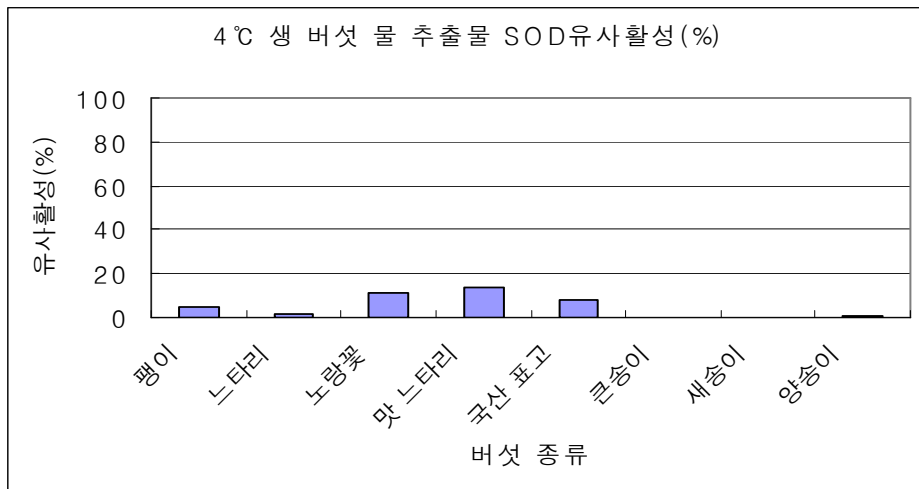


Fig. 6. 4°C 생 버섯 물 추출물 SOD유사활성도(%)

50°C 물 추출물로 SOD유사활성도를 측정한 결과 핑이, 맛 느타리, 노랑꽃, 느타리의 순으로 높은 값을 나타내었고, 세송이가 16%로 가장 낮은 값을 나타내었다 (Fig. 7).

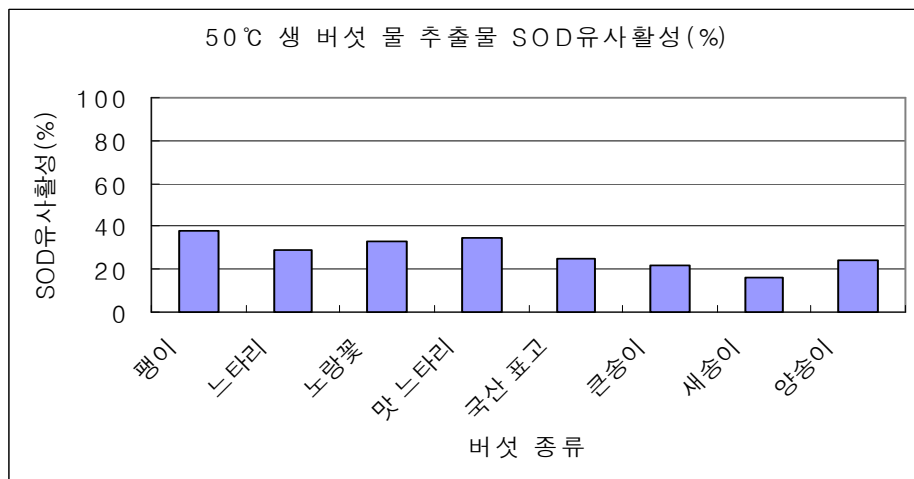


Fig. 7. 50°C 생 버섯 물 추출물 SOD유사활성도(%)



생 버섯과 분말 버섯의 에탄올 추출물의 전자공여능과 SOD 유사활성은 물 추출물 보다 낮은 값을 보였는데, 이로 미루어 보아 에탄올에서 보다 물에서 추출이 더 잘되는 것으로 보여 졌다. 이는 버섯의 전자공여능 효과 물질과 SOD 유사활성 효과 물질이 물처럼 극성이 더 강한 용매에서 잘 녹는 것으로 생각되어졌다.

생 버섯의 SOD 유사활성은 50℃ 팽이, 50℃ 맛 느타리가 38%, 35%로 가장 높은 값을 나타내었고, 전자공여능은 4℃ 국산표고가 22%로 가장 높았다.

#### 4) 버섯의 항균성

국산 송이 버섯의 50℃ 열수 추출물에서 *E. coli*는 지름 1.1cm, *E. limosum*은 지름 1.8cm, 중국산 송이 버섯의 50℃ 열수 추출물에서 *E. limosum*은 지름 1.2 cm, 중국산 표고버섯에서 4℃ 냉수 추출물에서 *E. coli*는 지름 1.8cm, *E. limosum*은 지름 1.4cm 50℃ 열수 추출물에서 *E. limosum*은 지름 1cm의 저해 효과를 보였다(표 14). 따라서, 버섯의 항균효과는 송이에서는 국산이, 표고에서는 중국산이 우수하였다.

Table 14. 버섯의 장내 균주들에 대한 항균효과

	<i>E. coli</i>	<i>E. limosum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i>
<b>국산 송이</b>				
4℃ 냉수 추출물	-	-	-	-
50℃ 열수 추출물	<b>+(1.1cm)</b>	<b>+(1.8cm)</b>	-	-
에탄올 추출물	-	-	-	-
<b>중국산 송이</b>				
4℃ 냉수 추출물	-	-	-	-
50℃ 열수 추출물	-	<b>+(1.2cm)</b>	-	-
에탄올 추출물	-	-	-	-
<b>국산 표고</b>				
4℃ 냉수 추출물	-	-	-	-
50℃ 열수 추출물	-	-	-	-
에탄올 추출물	-	-	-	-
<b>중국산 표고</b>				
4℃ 냉수 추출물	<b>+(1.8cm)</b>	<b>+(1.4cm)</b>	-	-
50℃ 열수 추출물	-	<b>+(1.0cm)</b>	-	-
에탄올 추출물	-	-	-	-
<b>느타리</b>				
4℃ 냉수 추출물	-	-	-	-
50℃ 열수 추출물	-	-	-	-
에탄올 추출물	-	-	-	-
<b>팽이</b>				
4℃ 냉수 추출물	-	-	-	-
50℃ 열수 추출물	-	-	-	-
에탄올 추출물	-	-	-	-

5) 버섯의 prebiotic effect

인체의 대장 내에 존재하는 균주들에 대한 버섯의 prebiotic effect를 조사하고자 하였다.

버섯 무첨가 대조군에 비하여 느타리, 표고, 새송이 버섯 첨가시 상대적으로 이 균주의 활력이 하루가 지나서는 높게 나타났으나 이틀이 지나서는 점차 활력이 낮아졌으며 목이버섯 첨가시 균의 활력이 더 낮았다. 즉, 표고, 느타리, 새송이는 생육을 촉진하고 목이는 억제하였다(Fig. 8).

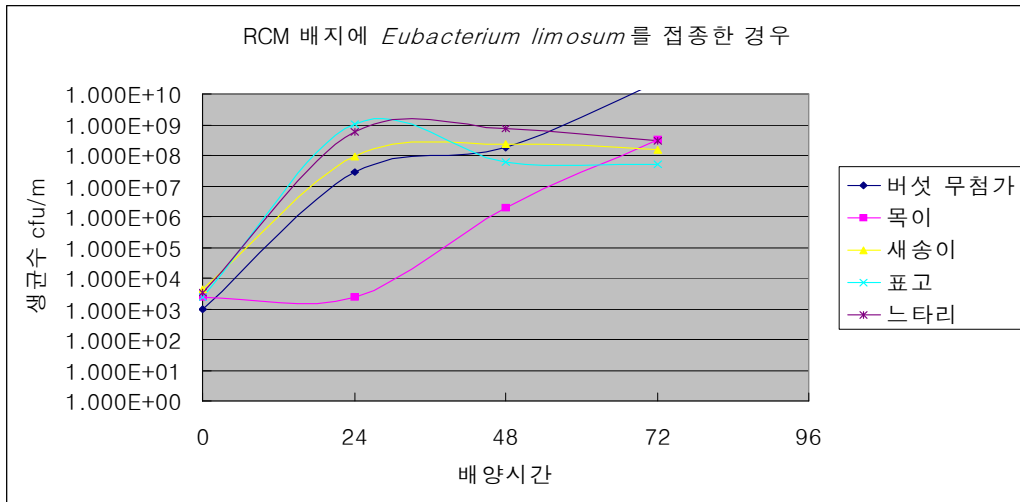


Figure 8. RCM 배지에 *Eubacterium limosum*를 접종한 경우.

버섯 무첨가 대조구에 비하여 목이, 새송이, 표고, 느타리 버섯 첨가시 이 균주의 활력이 높게 나타났으며 특히 목이 버섯이 균주의 활성화에 상대적으로 활력 증진에 도움을 주는 것으로 보였다. 모든 버섯이 생육을 촉진하였으며 특히 목이가 우수하였다(Fig. 9).

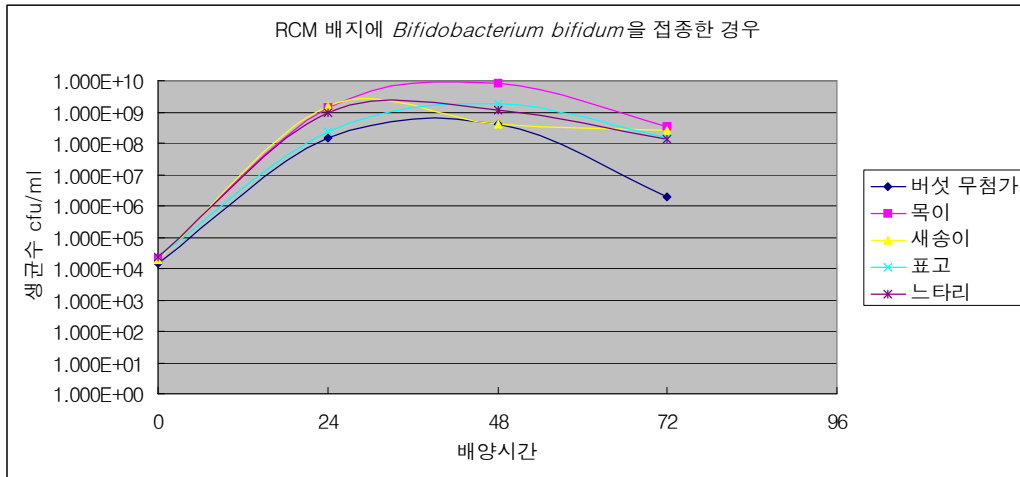


Figure 9. RCM 배지에 *Bifidobacterium bifidum*을 접종한 경우

버섯 무첨가군의 대조군에 비하여 목이, 새송이 버섯을 첨가하였을 때 상대적으로 이 균주의 활성이 높았으나 72시간째 활력이 떨어졌으며 표고, 느타리 버섯은 72시간까지 꾸준히 증가하는 것으로 보였다. 모든 버섯이 생육을 촉진하였으며 특히 목이가 우수하였다(Fig. 10).

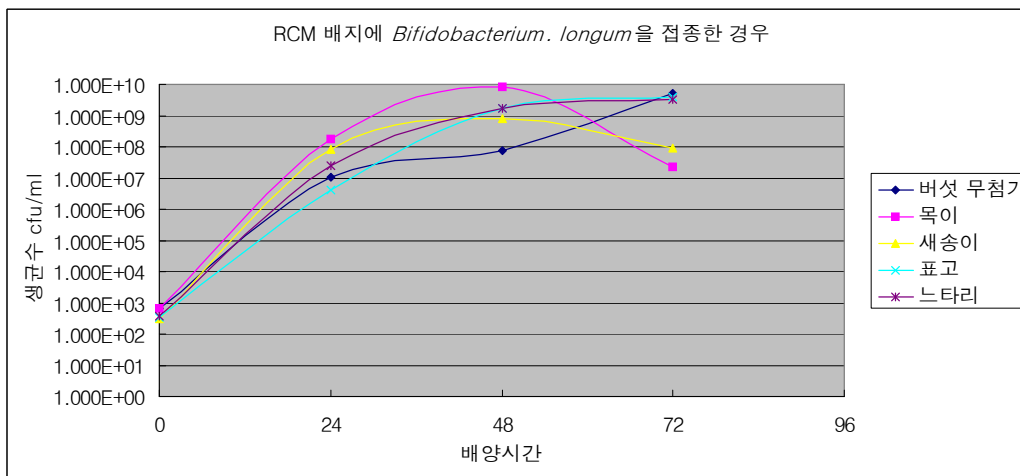


Figure 10. RCM 배지에 *B. longum*을 접종한 경우

버섯 무첨가 대조군에 비하여 새송이, 느타리, 목이 버섯의 활성도는 다소 높았고 표고 버섯의 활성도는 48시간 후에 계속 높은 증가율을 보였다. 발효 초기에 표고를 제외한 버섯 들이 생육 촉진이 나타났으며, 표고는 생육을 억제하고 후기에 촉진하였다(Fig. 11).

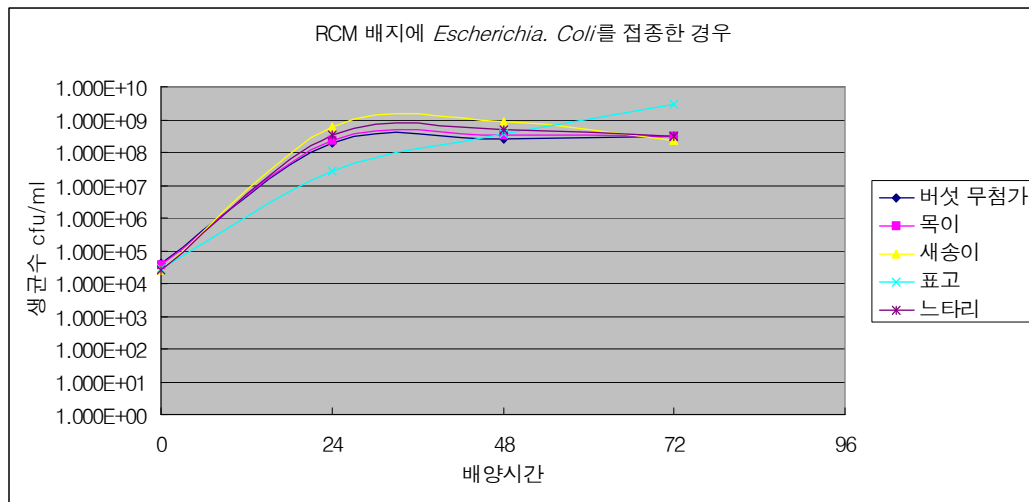


Figure 11. RCM 배지에 *Escherichia coli*를 접종한 경우

버섯 무첨가군의 대조군에 비하여 표고, 새송이, 느타리, 목이 버섯 첨가시 활성도가 높았으며 위의 RCM 배지에서의 표고, 새송이, 느타리 버섯에서 이 균주의 활성도가 높았던 결과와 유사한 결과를 얻어 새송이, 표고,느타리 버섯에서 이 균주의 활성도가 높아진다고 보여 졌다. 초기에 표고를 제외하고 생육을 촉진하였으며 목이는 대조구와 유사한 발효 형태를 보였다(Fig. 12).

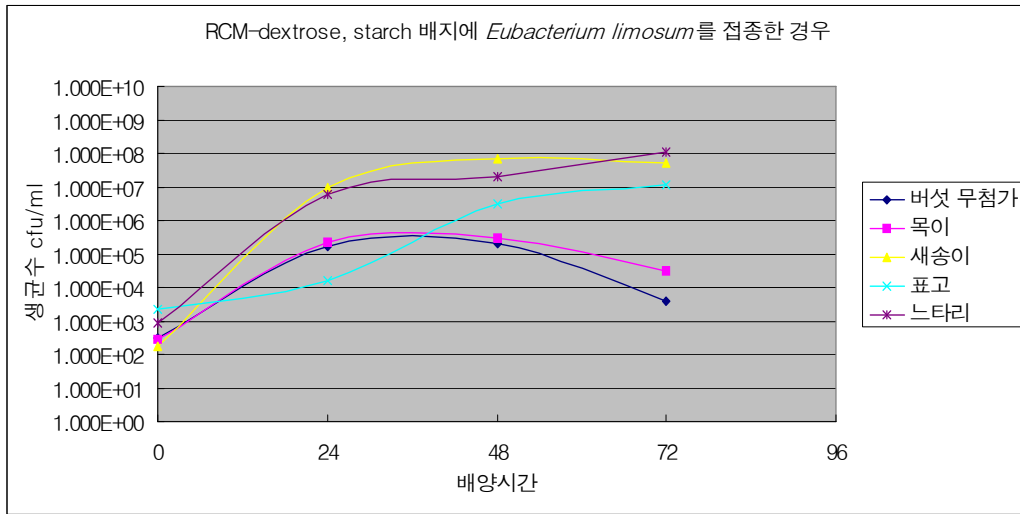


Figure 12. RCM-dextrose, starch 배지에 *Eubacterium limosum*를 접종한 경우

버섯 무첨가군의 대조군에 비해 느타리 버섯을 첨가했을 시 상대적으로 균주의 활성도가 높게 나타났으며 위의 RCM 배지에서 목이 버섯에서 높은 활성도를 나타내었던 결과와 비교 했을 때 이 실험에서도 목이버섯이 균주 활성효과를 보여 이 버섯들은 이 균주의 생육 촉진 효과에 영향을 주고 있는 것으로 판단되었다. 모든 버섯이 생육을 촉진하였고 느타리가 우수하였다(Fig. 13).

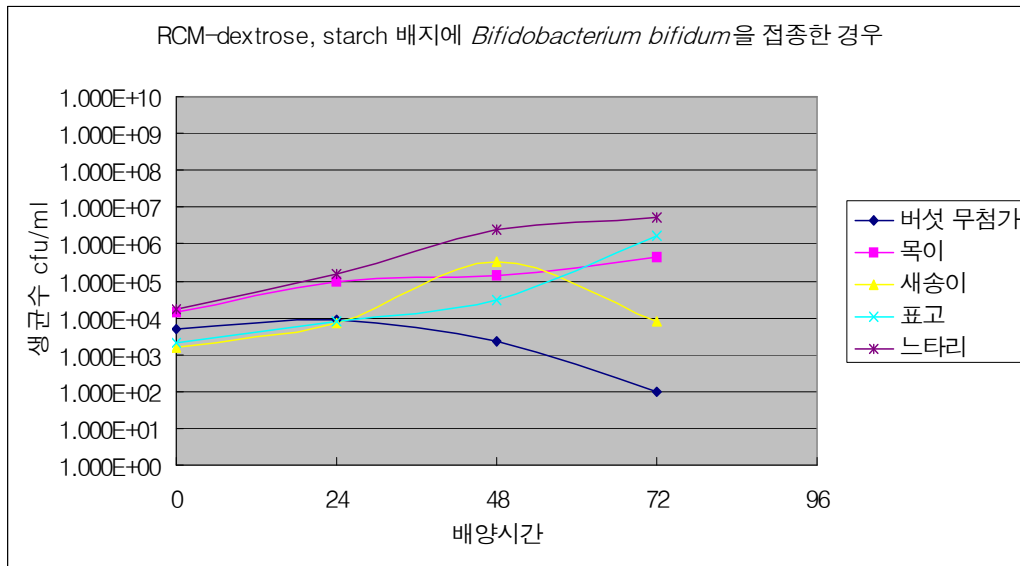


Figure 13. RCM-dextrose, starch 배지에 *Bifidobacterium bifidum*를 접종한 경우

버섯 무첨가군의 대조군에 비하여 표고, 느타리, 새송이, 목이 버섯에서의 이 균주의 활성도가 다소 높게 나타났으며 위의 RCM배지의 결과에서 목이 버섯에서의 활성도를 보였던 결과와 다소 비슷한 결과가 나타났고 전반적으로 위 버섯들이 이 균주의 생육 촉진 효과에 영향을 준다고 판단되었다. 발효 초기에 목이에 의하여 생육이 촉진되었으나 배양 2일 부터는 사멸이 빨랐으며 새송이, 표고, 느타리에 의하여 발효 후기에 생육이 촉진되었다(Fig. 14).

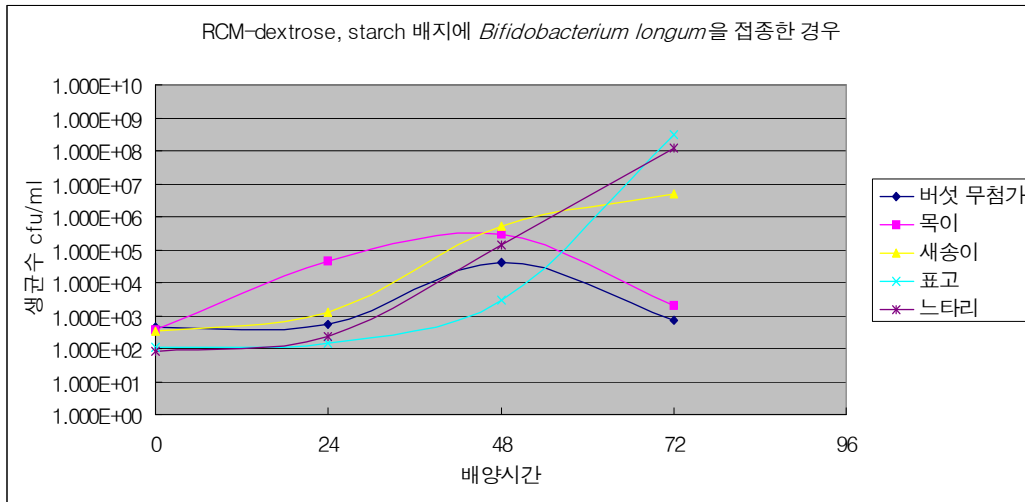


Figure 14. RCM-dextrose, starch 배지에 *Bifidobacterium longum*를 접종한 경우

버섯 무첨가균의 대조군에 비하여 표고 버섯에서 상대적으로 균주의 활성도가 높게 나타났으며 위의 RCM 배지에서의 4가지 버섯들에서 대부분 활성이 높게 나왔던 것과 비교 했을 때 이번 결과에서도 느타리, 새송이, 표고 버섯에서 균의 활성도가 증진 되었으며 목이 버섯에서는 활력이 상대적으로 낮았으나 전반적으로 버섯이 이 균주의 생육 억제에 큰 도움을 주지 못 하는 것으로 판단되었다. 대부분의 버섯에서 생육이 촉진되었으나 목이에 의하여 발효 2일째에 억제되었다(Fig. 15).



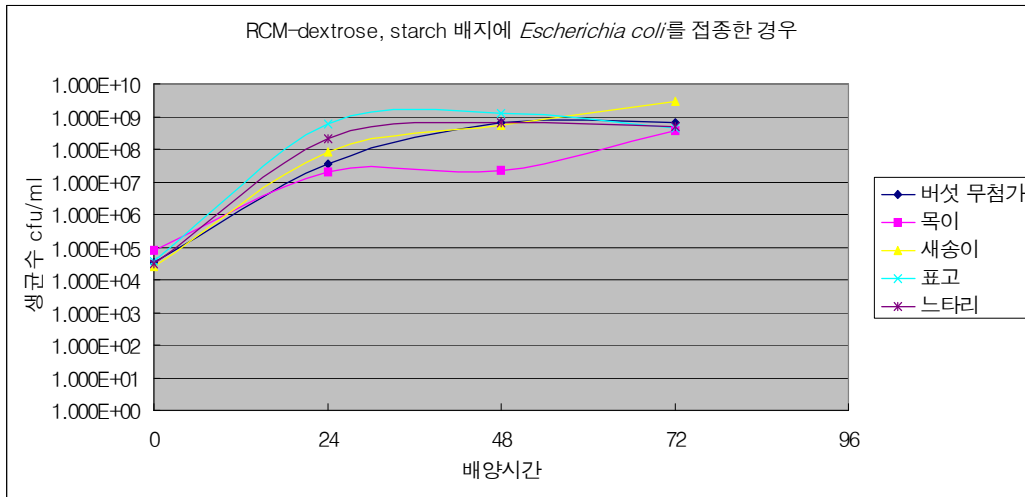


Figure 15. Table 8.RCM-dextrose, starch 배지에 *Escherichia coli*을 접종한 경우

## 6) 버섯의 동물실험

### 가) 몸무게 측정

실험 기간동안 rat의 body weight을 측정하였다. 성장기의 쥐이기 때문에 정상인 경우 시간이 지날수록 몸무게의 증가가 나타날 것이 예상되고 실험군별로 body weight의 변화를 관찰함으로써 고지방식의 체중 증가 효과와 더불어 버섯의 첨가로 나타나는 효과를 확인하고자 하였다 (Fig. 16).

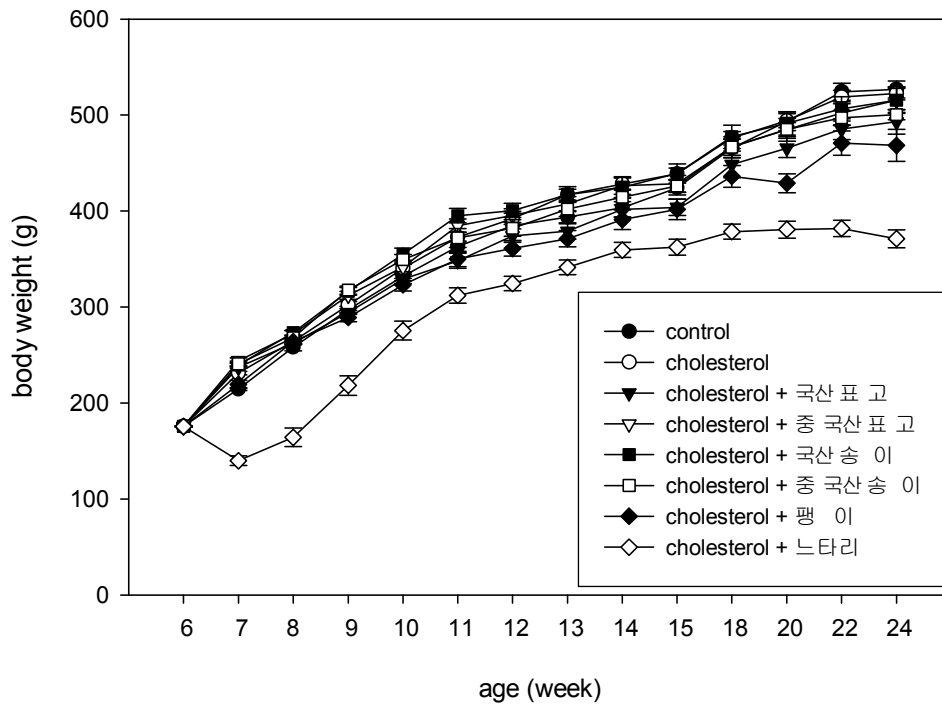


Fig. 16. 고콜레스테롤 버섯 사료에 따른 쥐의 몸무게

결과 그래프에서도 나타나듯이 control을 기준으로 하여 봤을 때 팽이를 cholesterol과 같이 섭취한 group에서 몸무게 증가율이 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이 중 느타리를 섭취한 group은 초반에 사료의 섭취가 제대로 되지 않아 다른 group에 비해 상대적으로 낮게 나온 결과로 판단된다.

#### 나) 혈당량 측정

혈중 glucose의 농도는 혈당계를 이용하여 측정하였다. 고지방식을 지속적으로 유지하였을 경우 생체 내 대사과정에서의 무리가 생기므로 이에 따라 혈당에서도 변화가 초래될 것이라고 보여진다. 쥐에서 blood를 얻은 즉시 혈당계를 이용하여 각 실험군

의 혈당을 측정하였다. 실험을 진행할수록 안정된 수치를 보여, 모든 실험군에서 평균적으로 100-120mg/dl 내외의 수치를 보였고 group별로 별 차이를 보이지 않았다. 이는 아직 특이할만한 병적 상태에 도달하지 않은 것으로 보여진다(Fig. 17).

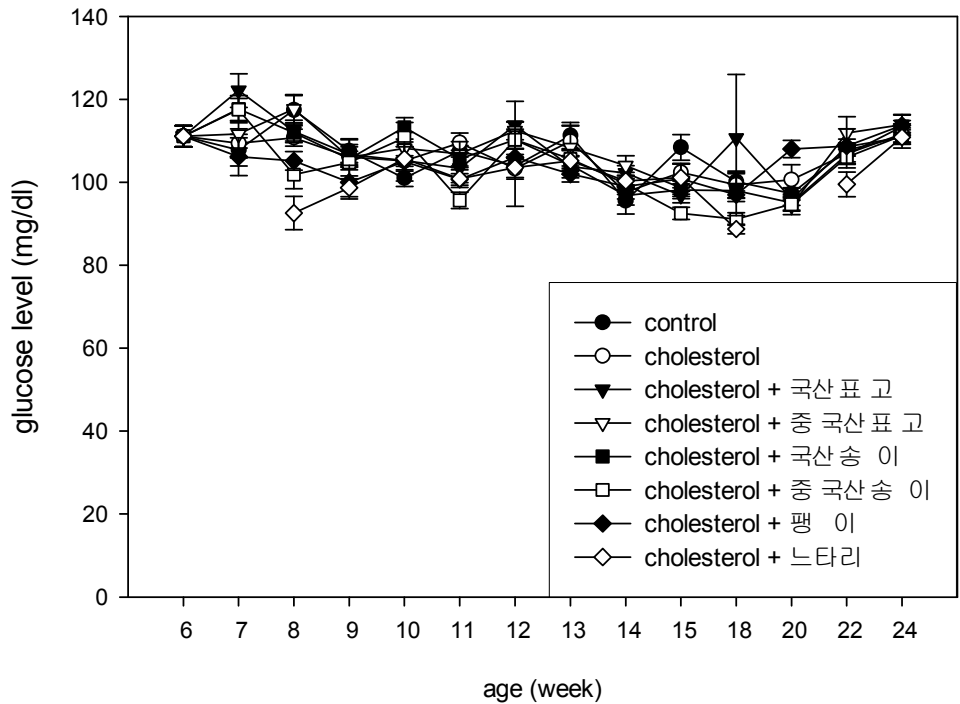


Fig. 17. 고콜레스테롤 버섯 사료에 따른 쥐의 혈당

#### 다) 혈중 cholesterol 측정

실험동물을 이용하여 대조군과 고지방식, 고지방식에 버섯을 배합한 사료를 공급하였을 경우 각 실험군에 따른 혈중 cholesterol 변화를 확인하였다. 공복시의 쥐에서 blood를 얻어 이 중 serum만을 분리하여 가수분해 반응을 유도하여 serum내에 존재하는 total cholesterol이 양을 측정하였다.

각 age별로 serum내 total cholesterol level을 측정 한 결과 버섯을 cholesterol과 같이 섭취한 경우 serum내 total cholesterol level은 cholesterol만을 섭취한 group에 비해 낮아짐을 확인할 수 있었다. 버섯별로 control에 가까운 수준까지 떨어지는 group도 보임을 알 수 있었다. 이와 같이 버섯이 cholesterol level을 낮추는 결과를 나타내는 것으로 보아 버섯을 고지혈증의 예방이나 치료에 있어 기능성 식품으로써 사용할 수 있는 가능성이 크다고 판단된다 (Fig. 18).

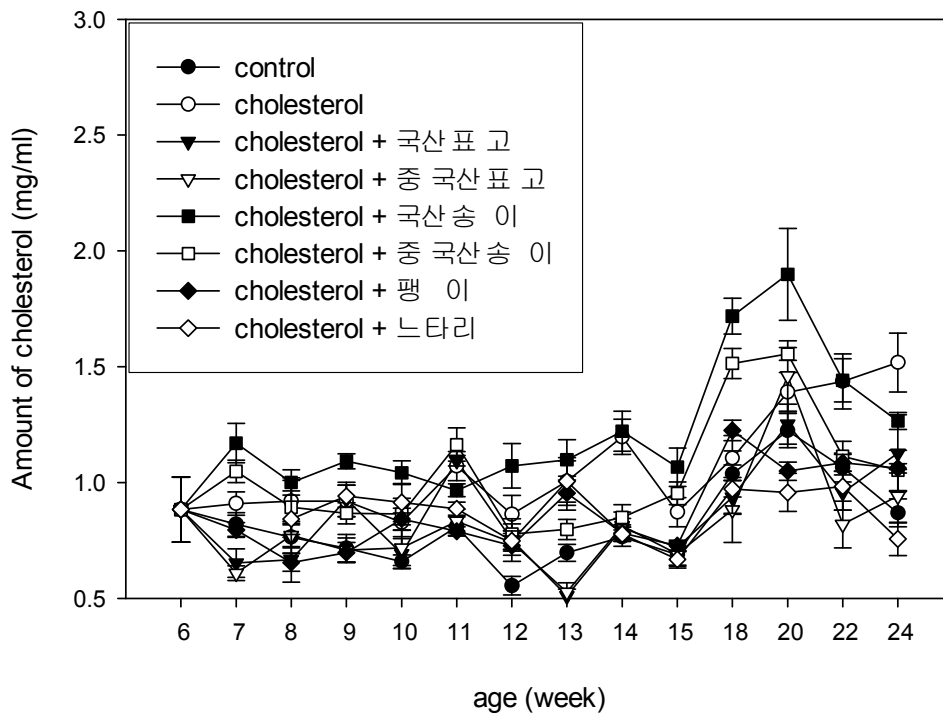


Fig. 18. 고콜레스테롤 버섯 사료에 따른 쥐의 콜레스테롤.

라) Insulin assay

각 실험군에서 blood를 얻어서 이 중 serum만을 분리한 sample에서 insulin의 양을 측정하였다. 고지방식을 통해 cholesterol의 변화나 혈당의 변화를 확인하는 것과 더불어 생체 내 insulin의 양에서의 변화를 확인하였다.

Insulin level을 확인한 결과, age별 variation이 심하게 나타나기는 하지만 15주까지는 국산 표고, 국산 송이, 중국산 송이, 팽이를 먹인 실험군에서 insulin level이 상대적으로 높게 나타나는 것으로 보인다. 특히 송이를 먹인 실험군에서 그 분비 효과가 크게 나타나는 것으로 보아 2형 당뇨 치료에 관련된 보조식품으로써의 이용 가능성을 제시해주고 있다. 하지만 그 이후 관찰한 결과에서는 각 group별로 별 차이가 없는 듯 보이고 느타리를 섭취한 실험군에서는 insulin양의 감소가 나타났다. 상기한 버섯들이 insulin 분비를 자극하는 효능을 가지고 있는지의 가능성을 확인하기 위해서는 다른 종류의 실험이 필요할 것으로 판단되었다 (Fig. 19).

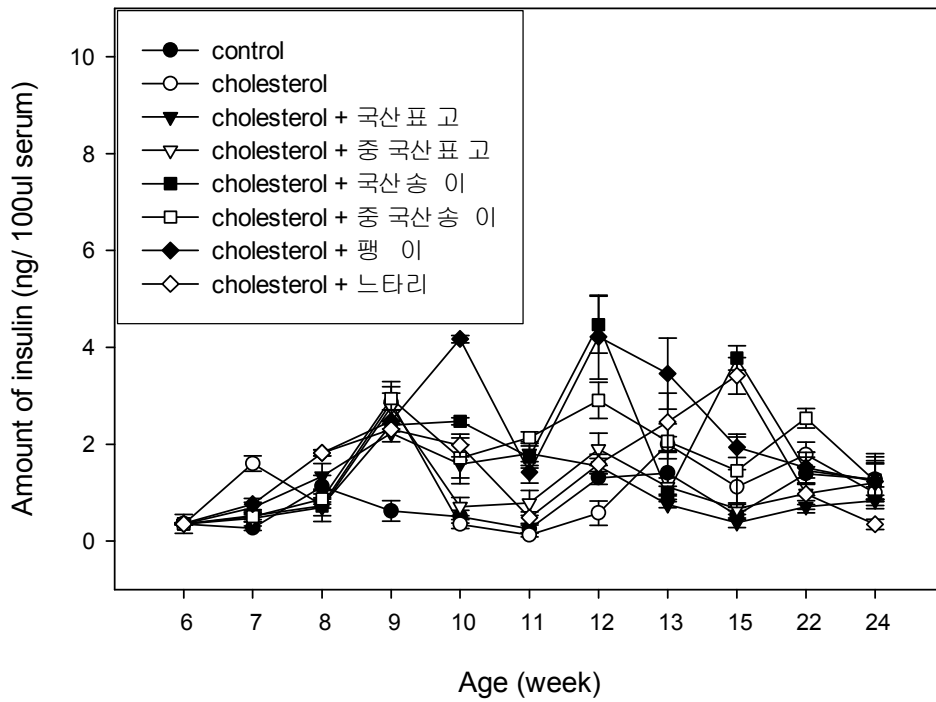


Fig. 19. 고콜레스테롤 버섯 사료에 따른 쥐의 insulin.

마) GPT, GOT assay

본 연구는 고지방식에서의 버섯의 기능적인 효과를 확인하고자 한 동물실험 결과로써 6주령의 male SD rat을 사용하였다. 24주령까지 실험을 진행하였는데, 각 group별로 rat의 variation이 심하게 나타나고 쥐의 상태의 변화가 나타나는 것 같으나 22주까지는 처리구별 차이가 크지 않았다 (Fig. 20)

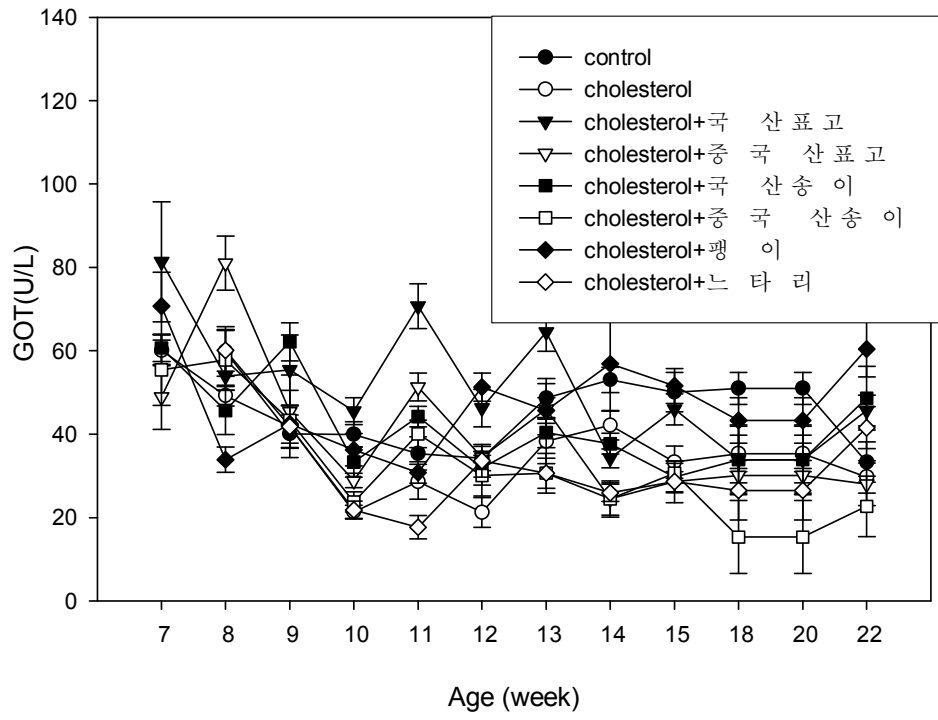


Fig. 20. 고콜레스테롤 버섯 사료에 따른 쥐의 GOT.

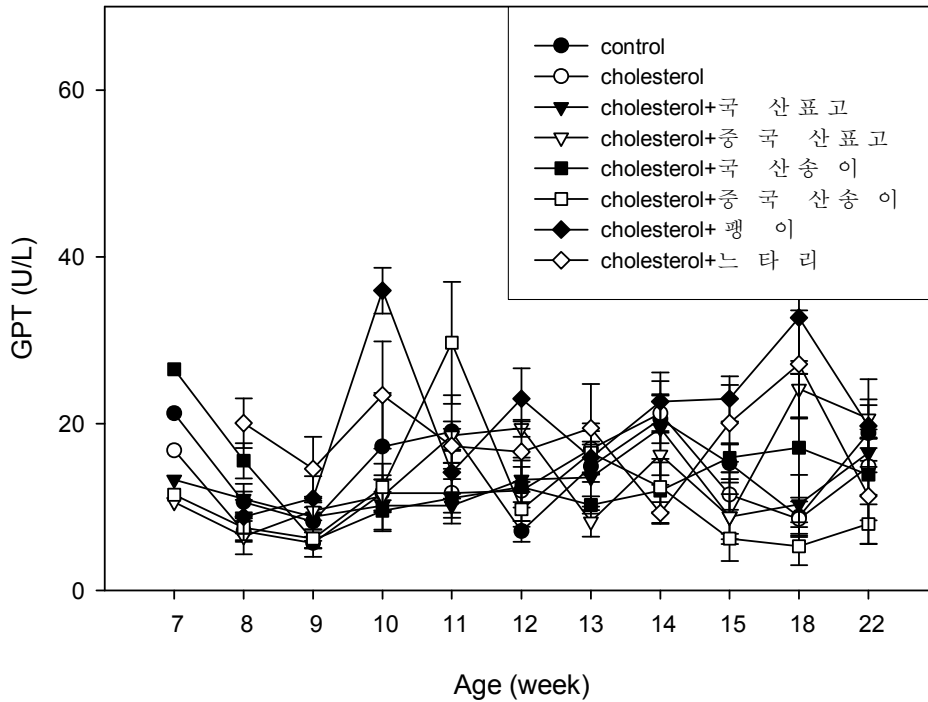


Fig. 21. 고콜레스테롤 버섯 사료에 따른 쥐의 GPT.

#### 나. 버섯추출물의 기능성 조사

##### 1) 선정 버섯의 기능성 물질 함량

여러버섯 중에서 우리나라에서 많이 생산되고 항산화 기능이 우수한 기능성식품으로서 흔히, 다루어지는 표고, 느타리를 선정하였으며 이들은 수천년 섭취로 안전성이 입증되었으므로 추가 안전성에 대한 보완 연구가 필요하지 않을 것으로 생각되었다. 또한, 항암 및 항돌연변이 기능성은 약의 효능에 속하므로 기능성이 많이 보고된 항산화와 항균의 기능을 중심으로하여 콜레스테롤 저하능, prebiotic activity 등의 새



로운 기능성의 가능성이 있는 기능성을 조사하고자 하였으며 먼저 기능성물질인 glucan의 함량을 측정하였다. Glucan의 함량은 acetone 침전물이 가장 높았고 느타리가 표고 보다 높았다 (표 15).

Table 15. 버섯과 효모의 glucan 측정 kit에 의한 버섯 추출물 fraction의 glucan 함량

	Sample	Glucan content(% , w/w)		
		Total glucan	$\alpha$ -glucan	$\beta$ -glucan
느타리	acetone 침전물	4.76	0.39	4.37
	acetone 상등액	—	—	—
	EtOH 상등액	0.66	0.57	0.09
	EtOH 2차 상등액	—	—	—
	EtOH 침전물	1.84	0.86	0.98
표고	acetone 침전물	3.29	0.22	3.07
	acetone 상등액	—	—	—
	EtOH 2차 상등액	—	—	—
	EtOH 침전물	1.29	0.45	0.84

## 2) 버섯 추출물의 항산화 효과

표고버섯과 느타리 버섯 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과 모두 dose-dependent하게 활성이 증가함을 보였다.

국산 표고버섯의 경우 아세톤 침전물이 가장 높은 활성을 보였으며, 중국산 표고버섯과 느타리 버섯의 경우는 에탄올 침전물이 높은 활성을 보였다. 특히 국산 표고버섯의 경우는 아세톤과 에탄올 침전물 모두에서 높은 활성을 나타냈다(표 16).

Table 16. 버섯 추출물의 항산화 효과

sample	Conc. (mg/mL)	SOD 유사활성(%)
	0.06	0.52
Acetone 침전물	0.6	11.97
	3	79.48
	0.06	-0.67
표고버섯(국산) EtOH 침전물	0.6	22.19
	3	53.71
	0.06	-3.19
물 침전물	0.6	6.53
	3	23.19
	0.06	-1.80
Acetone 침전물	0.6	11.01
	3	16.74
	0.06	3.09
표고버섯(중국산) EtOH 침전물	0.6	23.91
	3	51.74
	0.06	5.10
Acetone 침전물	0.6	7.06
	3	-3.07
	0.06	5.81
느타리 버섯 EtOH 침전물	0.6	20.10
	3	48.42
	0.06	26.74
물 침전물	0.6	11.13
	3	1.32

표고버섯과 느타리 버섯 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과 모두 dose-dependent하게 활성이 증가함을 보였다.

국산 표고버섯의 경우 아세톤 침전물이 가장 높은 활성을 보였으며, 중국산 표고버섯의 경우는 아세톤 침전물과 에탄올 침전물 모두 높은 활성을 나타냈으며, 느

타리 버섯의 경우는 물 침전물이 높은 활성을 보였다. 실험한 모든 농도에서 국산 표고버섯이 중국산 표고버섯보다 더 높은 전자공여능을 보였다(표 17).

Table 17. 버섯 추출물의 전자 공여능 조사

sample	Conc. (mg/mL)	전자공여능 (%)
	0.02	1.44
Acetone 침전물	0.2	12.08
	1	51.83
	0.02	0.64
표고버섯(국산) EtOH 침전물	0.2	5.58
	1	24.91
	0.02	-0.78
Dw 침전물	0.2	3.42
	1	19.57
	0.02	0.98
Acetone 침전물	0.2	9.59
	1	40.14
	0.02	-0.48
표고버섯(중국산) EtOH 침전물	0.2	7.51
	1	38.76
	0.02	-0.21
Acetone 침전물	0.2	1.04
	1	8.02
	0.02	0.62
느타리 버섯 EtOH 침전물	0.2	7.04
	1	23.64
	0.02	0.39
Dw 침전물	0.2	6.79
	1	31.27

3) 버섯 추출물의 항균성

표고, 느타리버섯의 분획물에 대한 *E. coli* 성장저해효과를 조사하였다. 그 결과 표고에탄올 추출물 3차실험에 15mm의 clear zone이 나타났다. 추출물을 엮인 뒤 1 시간동안 배지를 상온에서 방치해 두었음에도 불구하고, 3차실험에 만 clear zone이 생긴 것으로 보아 1시간보다 더 오래 방치해두어야 추출물이 제대로 배지에 흡수되었을 것이라고 예측된다. 느타리 에탄올 추출물 1차실험에 6mm, 2차 실험에는 18mm, 3차실험에는 16mm의 clear zone이 나타났다. 또한 느타리 하등액 분획물의 2차실험은 7mm, 3차실험은 6mm의 clear zone이 나타났다. 이 느타리 하등액 추출물에 대한 저해작용은 추출물을 엮인 자리에만 생장이 저해를 받았다. 1차실험에서는 추출물이 흡수되기전 균이 성장한 것으로 예측된다. 따라서 느타리 에탄올 추출물은 장내 유해균인 *E. coli*의 성장 억제 작용이 가장 우수하였다. 또 느타리 하등액 분획물에는 성장 저해효과가 나타났지만 표고 하등액 분획물에는 저해효과 나타나지 않았다(표 18).

Table. 18. *E. coli* 의표고, 느타리버섯의 각 분획물의 Clear zone 측정

(mm)

<i>E.coli</i> ②	표고				느타리			
	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액, 아세톤 침전 상등액	에탄올 침전, 상등액	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액	상등액
1	-	-	-	-	6	-	-	-
2	-	-	-	-	18	-	7	-
3	15	-	-	-	16	-	6	-

\*(-): Clear zone이 안 생김

\*(+): 균이 더 잘 자람

\*(상등액): 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)

표고, 느타리버섯의 분획물에 대한 *Sal. typhimurium* 성장저해효과를 조사하였다. 그 결과 표고에탄올 추출물에 1차실험에는 12.5mm, 3차실험에는 12mm의 clear zone이 나타났다. 표고 아세톤 추출물에 1차, 2차, 3차 실험에 6mm씩 clear zone이 나타났다. 표고 하등액 분획물 1차실험에 6mm의 clear zone이 나타났다. 느타리 에탄올 추출물에 1차 실험에 6mm, 2차실험에 29.5mm, 3차실험에 24.5mm의 clear zone이 나타났다. 따라서 표고 에탄올추출물보다 느타리 에탄올 추출물이 장내 유해균인 *Sal. typhimurium*에 대한 성장저해효과가 더 우수하였다. 또한 표고아세톤 추출물에만 성장저해효과가 나타났고, 느타리 아세톤추출물은 성장저해효과 나타나지 않았다. 표고, 느타리 하등액 분획물의 1차실험에만 성장저해효과가 나타났다(표 19).

Table. 19. *Sal. typhimurium*의 표고, 느타리버섯의 각 분획물의 Clear zone 측정

(mm)

<i>Sal. typhimurium</i> ②	표고				느타리			
	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액, 아세톤 침전 상등액	에탄올 침전, 상등액	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액	상등액
1	12.5	6	6	-	6	-	6	-
2	-	6	-	-	29.5	-	-	-
3	12	6	-	-	24.5	-	-	-

\*(-): Clear zone이 안 생김

\*(+): 균이 더 잘 자람

\*(상등액): 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)

표고, 느타리버섯의 분획물에 대한 *Lis. monocytogenes* 성장저해효과를 조사하였다. 그 결과 표고 에탄올, 아세톤 추출물에 1차, 2차, 3차 실험의 clear zone이 6mm

씩 나타났고, 표고 하등액 분획물에 1차실험에서 clear zone 6mm가 나타났다. 느타리 에탄올, 아세톤, 하등액 분획물에 1차,2차,3차 실험의 clear zone이 6mm씩 나타났다. 따라서 표고, 에탄올, 아세톤 추출물은 생장 저해율이 같게 나타났고, 표고하등액 분획물보다 느타리 하등액 분획물이 생장 저해효과가 더 우수하게 나타났다. 표고 에탄올, 아세톤,느타리 에탄올, 아세톤, 하등액 분획물은 장내 유해균인 *Lis. monocytogenes*의 생장이 억제된 것으로 본 결과 분획물의 농도가 최소농도일 수도 있을 것으로 예측된다(표 20).

Table. 20. *Lis. monocytogenes*의 표고, 느타리버섯의 각 분획물의 Clear zone 측정 (mm)

<i>Lis. monocytogenes</i>	표고				느타리			
	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액, 아세톤 침전 상등액	에탄올 침전, 상등액	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액	상등액
1	6	6	6	-	6	6	6	-
2	6	6	-	-	6	6	6	-
3	6	6	-	-	6	6	6	-

\*(-): Clear zone이 안 생김

\*(+): 균이 더 잘 자람

\*(상등액): 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)

표고, 느타리버섯의 분획물에 대한 *Eu. limosum*생장저해효과를 조사하였다. 그 결과 표고,느타리 아세톤추출물은 clear zone이 생기지않고, 균이 더 많이 자랐다. 느타리 에탄올 추출물은 1차, 2차, 3차실험의 clear zone이 6mm가 나타났다. 느타리 아세톤 추출물은 clear zone이 생기지 않고, 균이 더 많이 자랐다. 따라서 *Eu. limosum*은 표고 에탄올, 아세톤 느타리 아세톤 추출물에 대해서는 생장 저해효과가 나타나지 않고 더 많이 성장하였다. 그러나 느타리 에탄올 추출물은 생장저해효과가 나타

났다. 표고에탄올, 아세톤, 느타리아세톤 추출물은 아직 유해세균인지 유익균인지 밝혀지지 않은 *Eu. limosum*의 성장을 촉진시켜주었다. 그러나 느타리 에탄올 추출물은 추출물을 었인 자리에만 clear zone이 생긴 것으로 보아서는 균을 억제하는 최적농도 일 것이라는 것으로 예측된다(표 21).

Table. 21. *Eu. limosum*의 표고, 느타리버섯의 각 분획물의 Clear zone 측정

(mm)

<i>Eu. limosum</i>	표고				느타리			
	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액, 아세톤 침전 상등액	에탄올 침전, 상등액	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액	상등액
1	+	+	-	-	6	+	-	-
2	+	+	-	-	6	+	-	-
3	+	+	-	-	6	+	-	-

\*(-): Clear zone이 안 생김

\*(+): 균이 더 잘 자람

\*(상등액): 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)

표고, 느타리버섯의 분획물에 대한 *B. longum* 성장저해효과를 조사하였다. 그 결과 표고 에탄올 1차실험에는 clear zone이 9mm 나타났고, 2차 3차 실험에서는 6mm씩 나타났다. 표고 아세톤 1차, 2차, 3차실험에는 clear zone이 6mm씩 나타났고, 표고 하등액 분획물 1차실험에서 9mm, 2차실험에서 10.5mm, 3차실험에서 10mm의 clear zone이 나타났다. 느타리 에탄올 추출물 3차실험에서 clear zonem이 6mm이 나타났다. 느타리 에탄올추출물에 1차 2차 실험의 결과는 clear zone이 생기지않고, 균이 자랐다. 이는 에탄올 추출물이 *B. longum*이 성장하는데 약간의 영향을 미치지 만 크게 영향을 미친다고는 볼 수 없다고 예측된다. 따라서 표고 에탄올, 아세톤 추

출물보다 하등액 분획물이 *B. longum* 성장 저해효과가 더 우수하게 나타났다. 표고 에탄올, 아세톤, 하등액 추출물은 장내 유익균인 *B. longum*의 성장을 억제하였다(표 22).

Table. 22. *B. longum* 의 표고, 느타리버섯의 각 분획물의 Clear zone 측정

(mm)

<i>B. longum</i>	표고				느타리			
	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액, 아세톤 침전 상등액	에탄올 침전, 상등액	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액	상등액
1	9	6	9	-	-	-	-	-
2	6	6	10.5	-	-	-	-	-
3	6	6	10	-	6	-	-	-

\*(-): Clear zone이 안 생김

\*(+): 균이 더 잘 자람

\*(상등액): 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)

표고, 느타리버섯의 분획물에 대한 *B.bifidum* 성장저해효과를 조사하였다. 그 결과 표고 아세톤, 하등액, 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)분획물의 1차,2차,3차 실험에 대한 생기지 않고 균이 더 많이 자랐다. 느타리 아세톤, 하등액, 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)분획물의 1차, 2차, 3차실험에 대한 clear zone이 생기지 않고, 균이 더 많이 자랐다. 따라서 표고 느타리 아세톤 하등액, 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)분획물은 *B.bifidum* 성장 저해효과를 나타나지 않고, 더 잘 자랐다. 표고아세톤, 하등액, 상등액추출물, 느타리아세톤, 하등액, 상등액추출물이 장내유익균인 *B.bifidum*의 성장을 촉진시켜주는 역할을 하는 것으로 예측된다(표 23).



Table. 23. *B.bifidum* 표고, 느타리버섯의 각 분획물의 Clear zone 측정

(mm)

<i>B. bifidum</i>	표고				느타리			
	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액, 아세톤 침전 상등액	에탄올 침전, 상등액	에탄올 침전물	아세톤 침전물	하등액	상등액
1	-	+	+	+	-	+	+	+
2	-	+	+	+	-	+	+	+
3	-	+	+	+	-	+	+	+

\*(-): Clear zone이 안 생김

\*(+): 균이 더 잘 자람

\*(상등액): 상등액의 건조물 재현탁(100mg/10ml)

#### 4) 버섯 추출물의 prebiotic effect

버섯에탄올 추출물의 장내의 prebiotic effect를 조사하기 위해 *Eubacterium limosum*, *E. coli*, *B.bifidum*, *B.longum*를 RCM배지를 사용하여 버섯 무첨가 대조군과 버섯 첨가군에서 배양하였다. 배지의 당원인 dextrose, starch의 영향을 받아 이 균주들의 증식이 촉진될 것으로 생각되어 dextrose, starch를 제외시킨 배지에도 위 균주들을 배양시켜서 당원을 제외시킨 버섯만의 영향을 조사하였다.

*Eubacterium limosum*과 *B.bifidum*이에서 우수하였고 나머지 균주에게는 약하게 생육 촉진을 하였다(중국표고는 참고로 자료 첨가 하였으며 국산 표고 보다 우수 하였다(Fig. 22-35)).

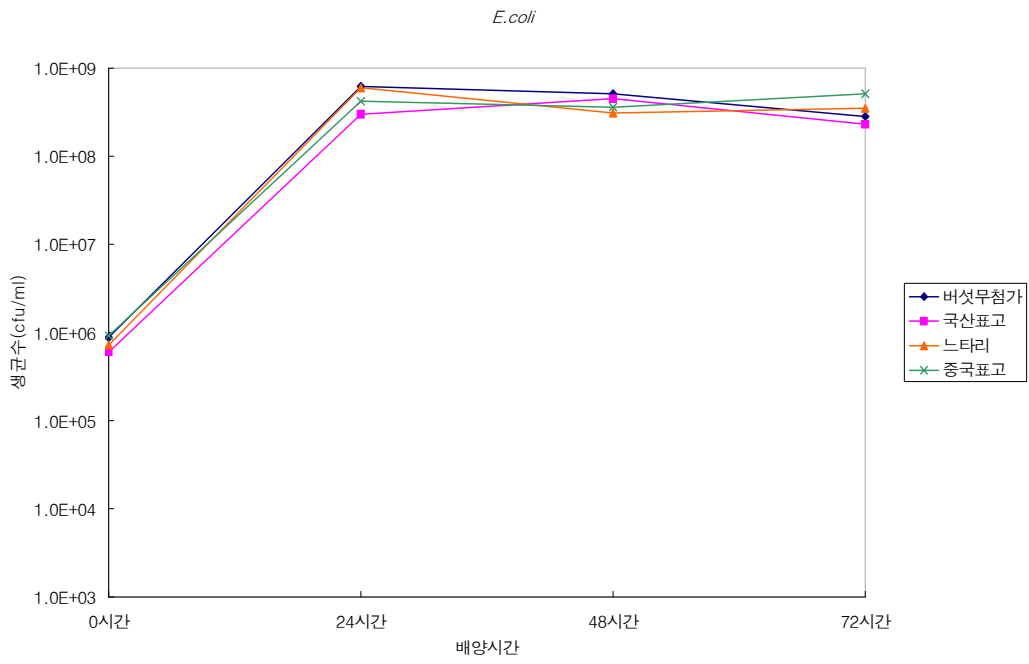


Fig. 22. RCM배지에서 버섯 첨가에 따른 *E. coli* 균수변화

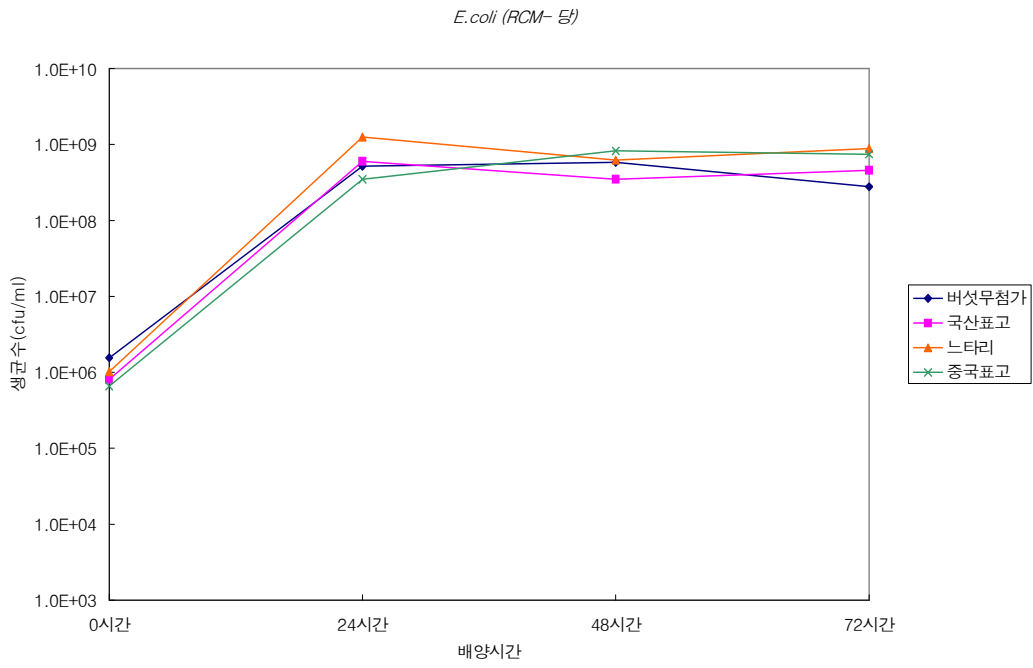


Fig. 23. RCM-당원 배지에서 버섯 첨가에 따른 *E. coli* 균수변화

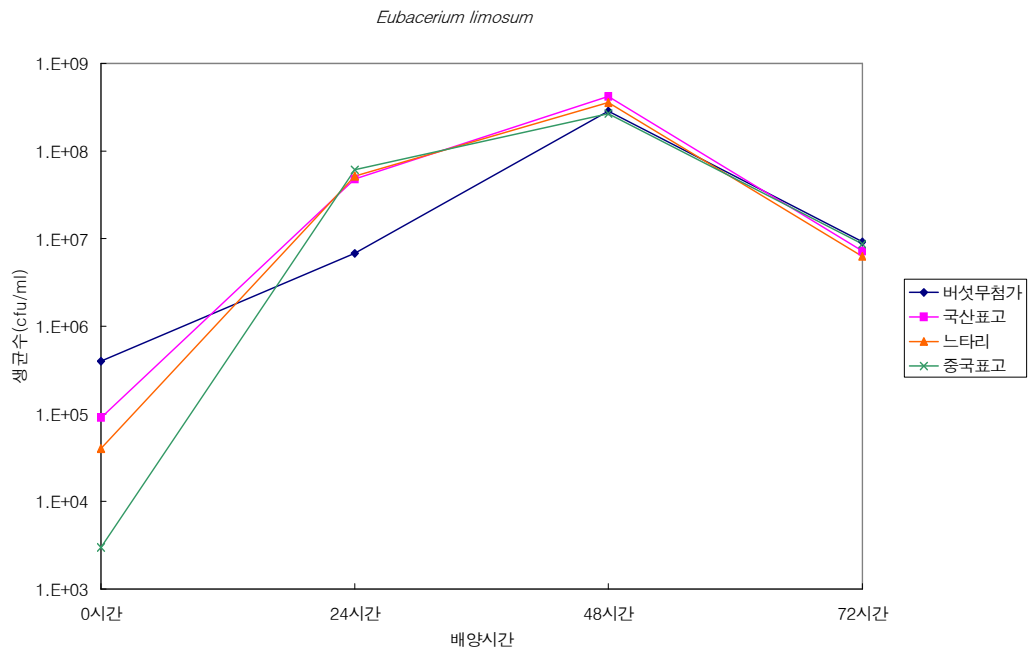


Fig. 24. RCM배지에서 버섯 첨가에 따른 *E. limosum* 균수변화

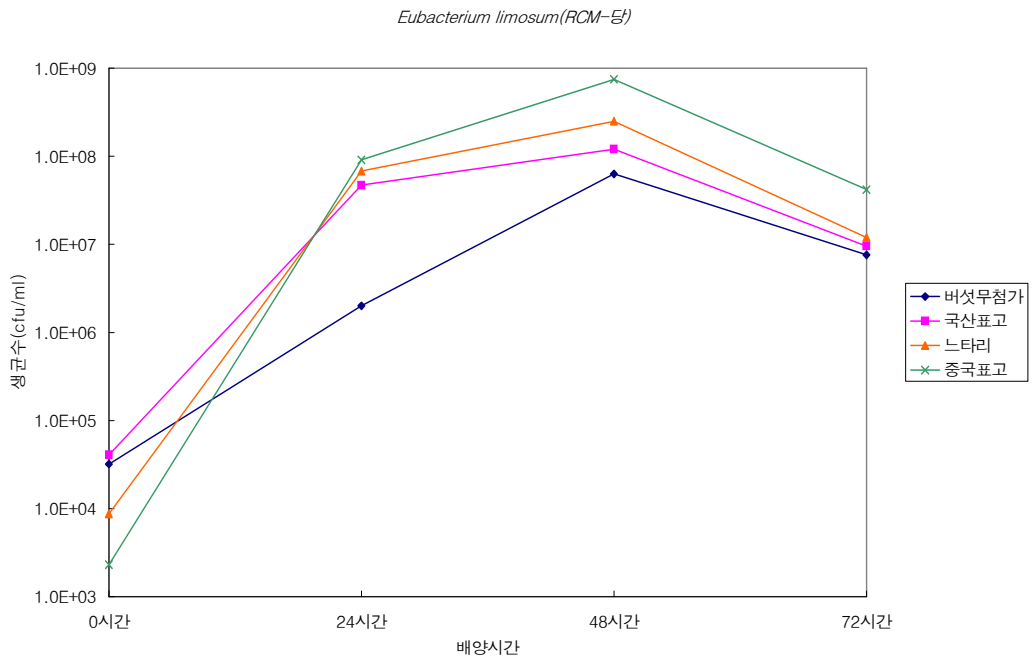


Fig. 25. RCM-당원 배지에서 버섯 첨가에 따른 *E. imosum* 균수변화

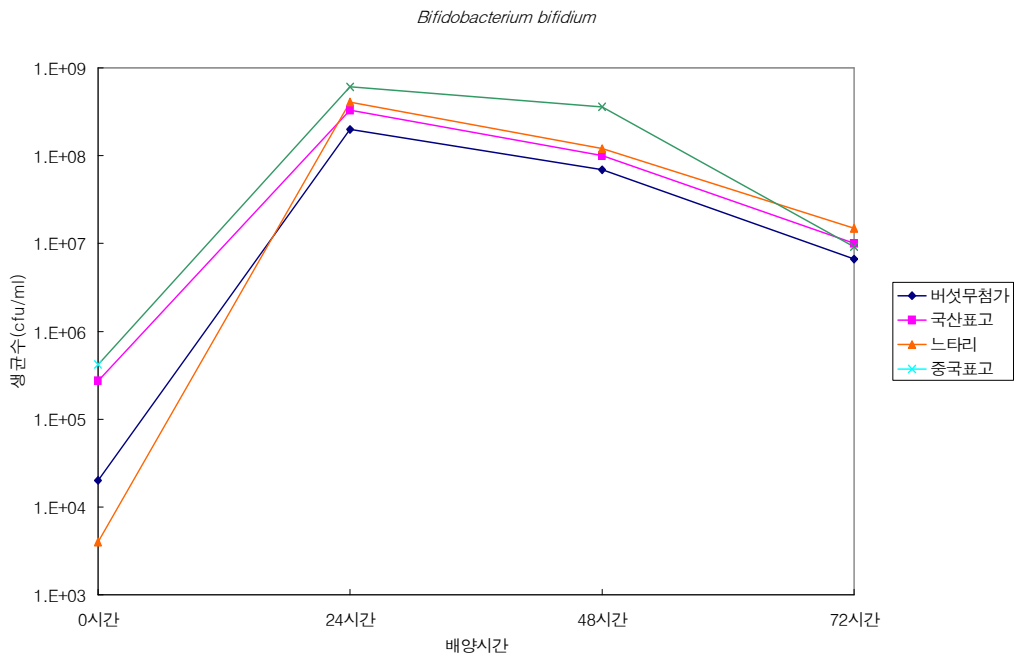


Fig. 26. RCM배지에서 버섯 첨가에 따른 *B. bifidium* 균수변화

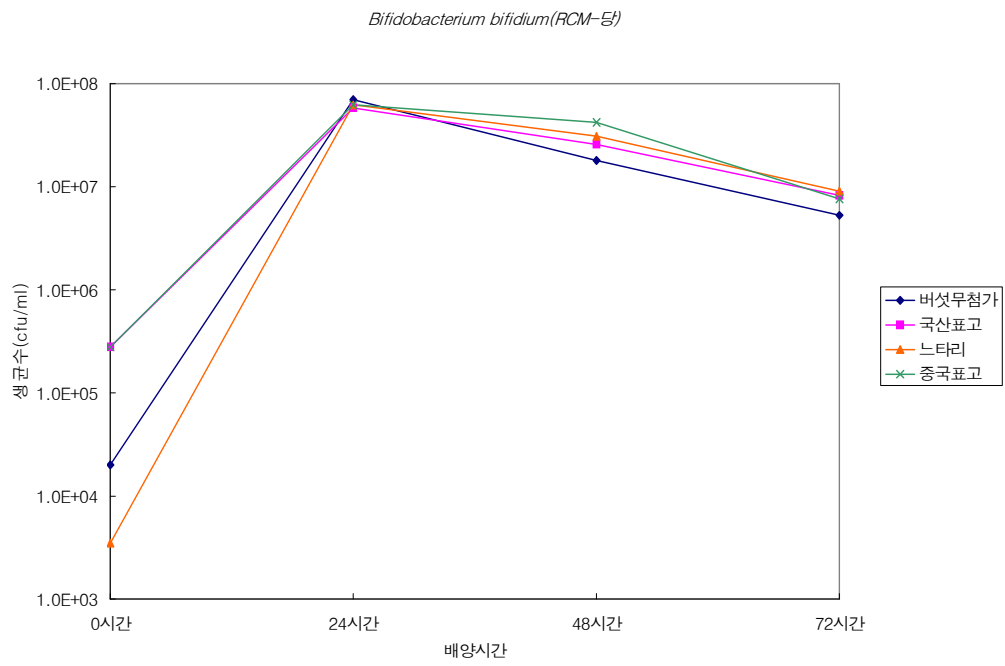


Fig. 27. RCM-당원 배지에서 버섯 첨가에 따른 *B. bifidum* 균수변화

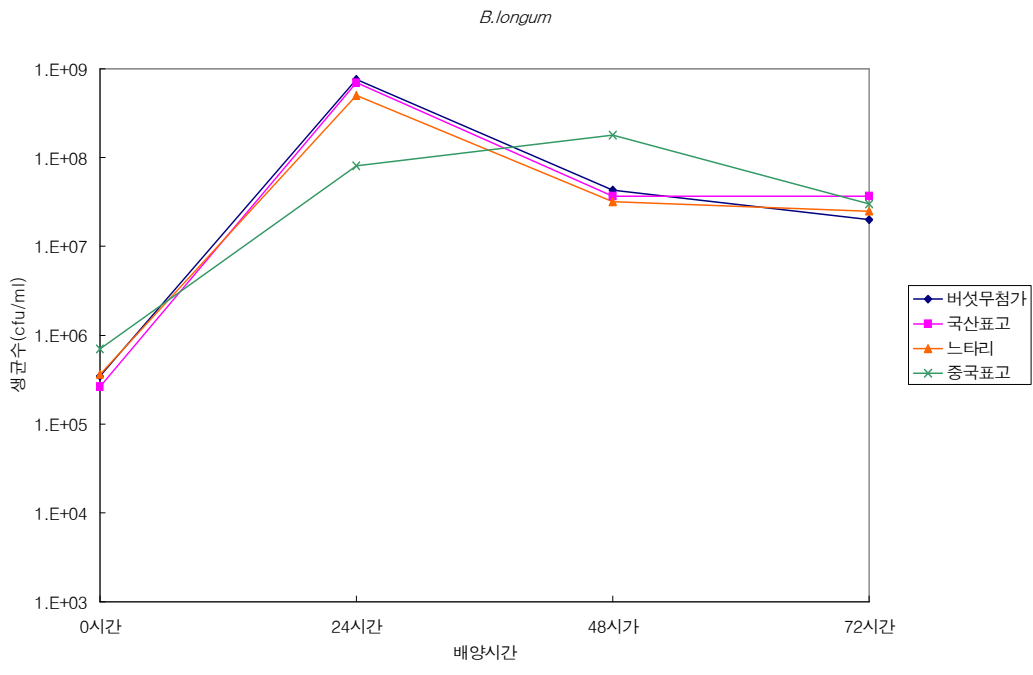


Fig. 28. RCM배지에서 버섯 첨가에 따른 *B. longum* 균수변화



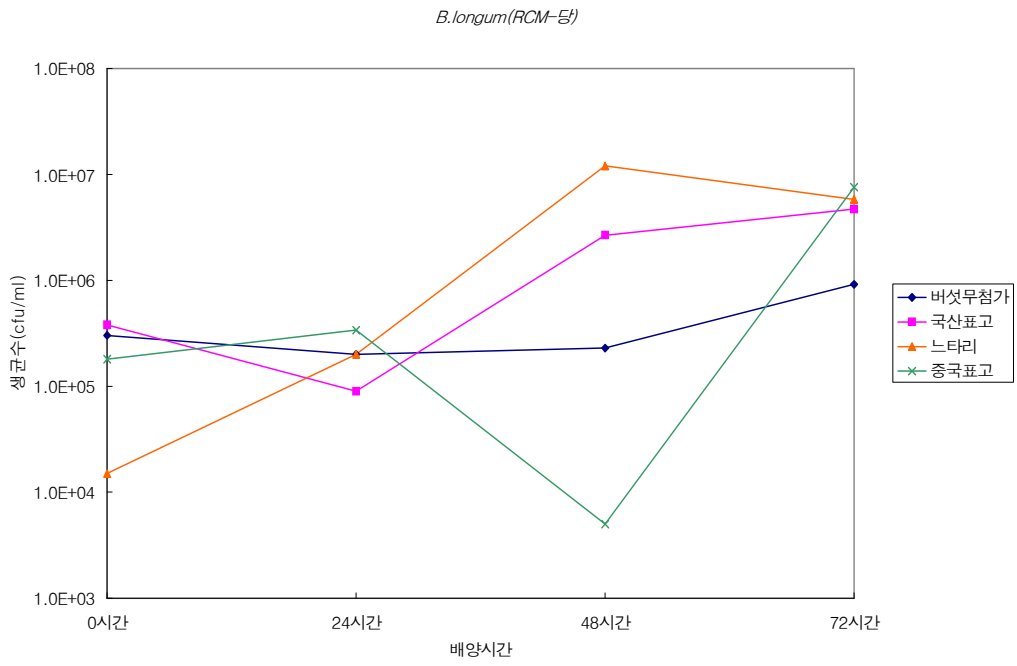


Fig. 29. RCM-당원 배지에서 버섯 첨가에 따른 *B. longum* 균수변화

RCM배지와 RCM-당원 배지에 버섯 농축물을 첨가하여 0시간, 24시간, 48시간, 72시간 배양하여 그 균수의 변화를 보았다.

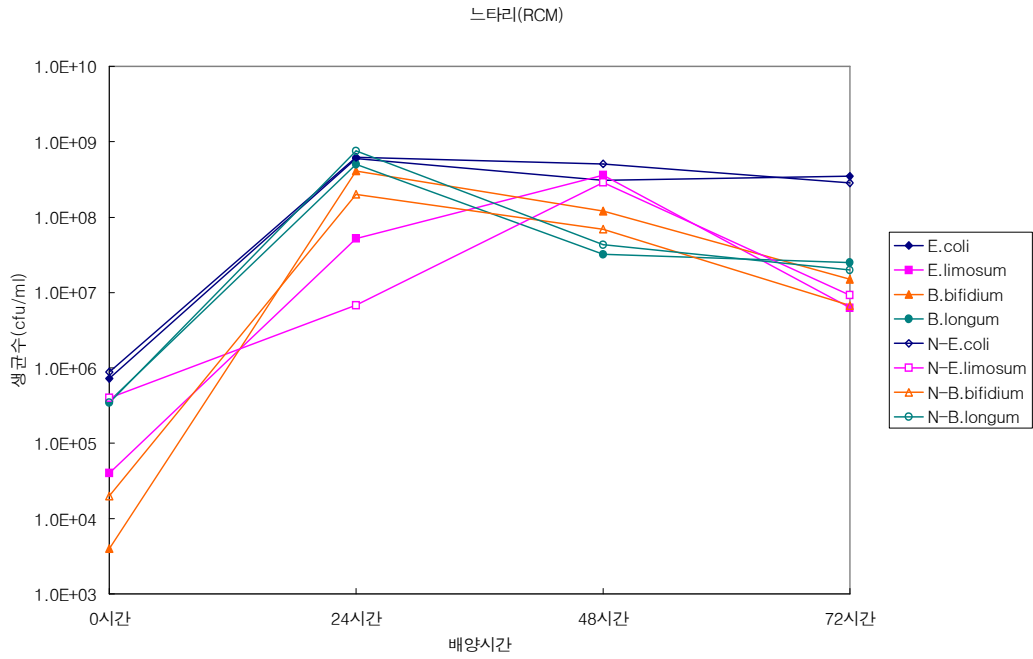


Fig. 30. RCM 배지에서 느타리버섯 첨가에 따른 장내미생물의 균수변화

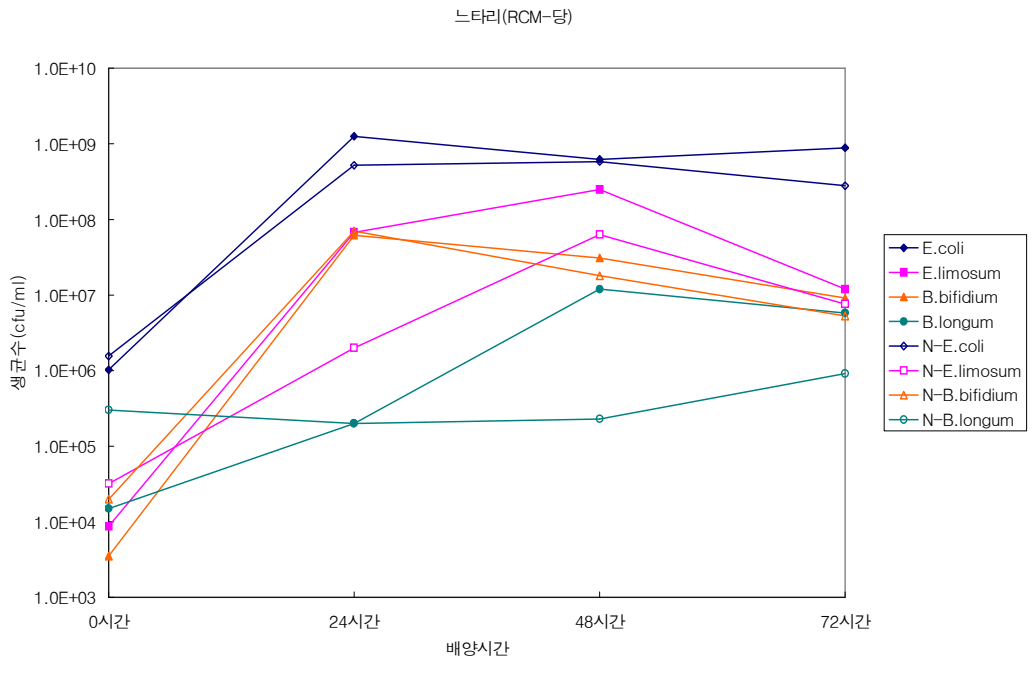


Fig. 31. RCM-당 배지에서 느타리버섯 첨가에 따른 장내미생물의 균수변화

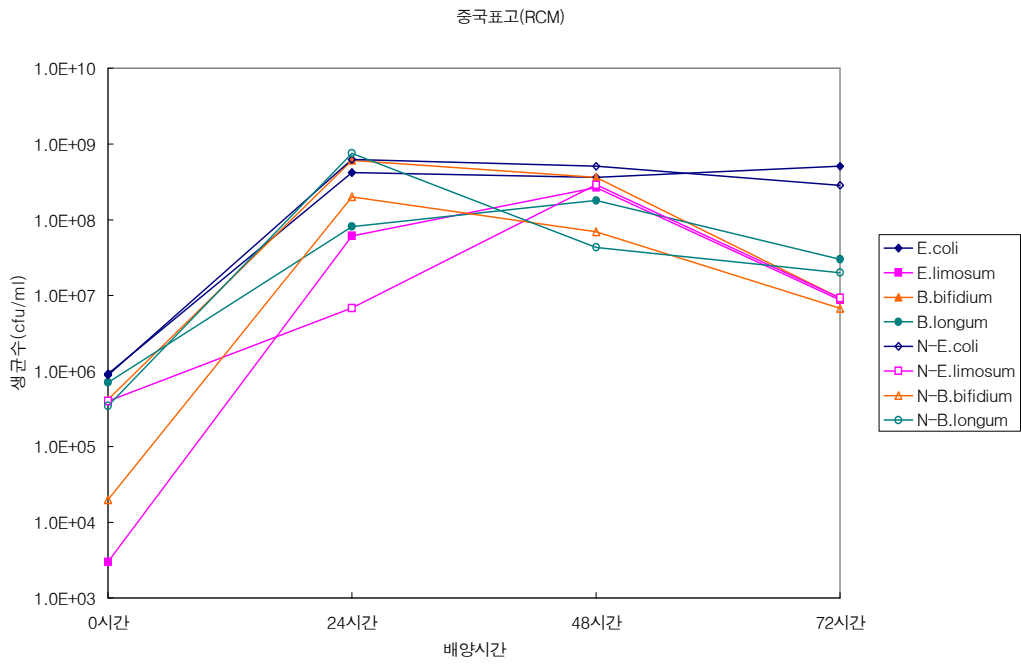


Fig. 32. RCM 배지에서 중국표고버섯 첨가에 따른 장내미생물의 균수변화

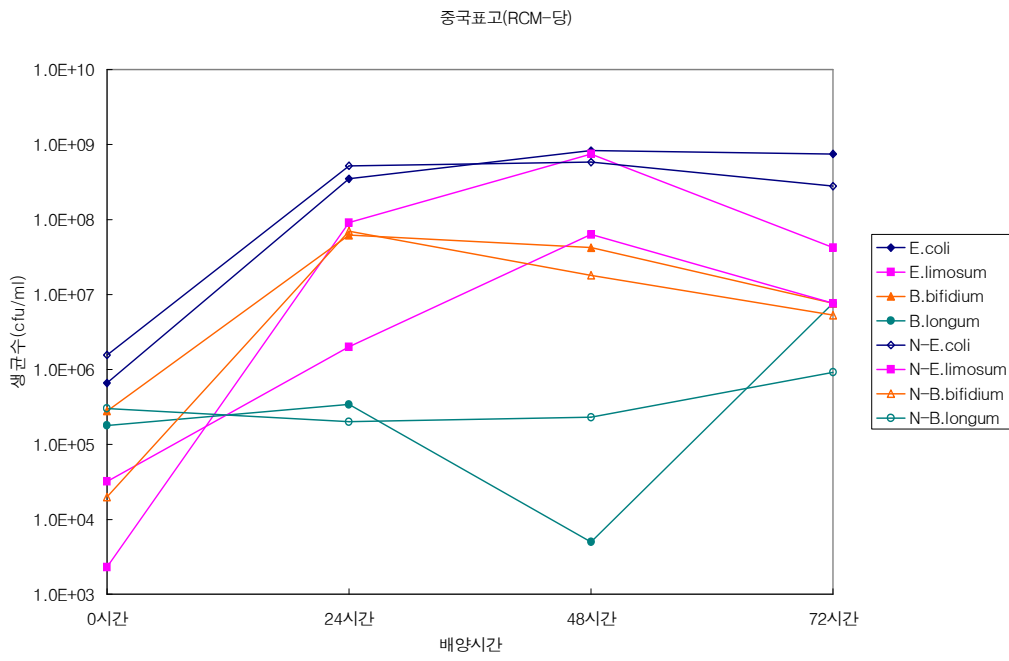


Fig. 33. RCM-당 배지에서 중국표고버섯 첨가에 따른 장내미생물의 균수변화



Fig. 34. RCM 배지에서 국산표고버섯 첨가에 따른 장내미생물의 균수변화

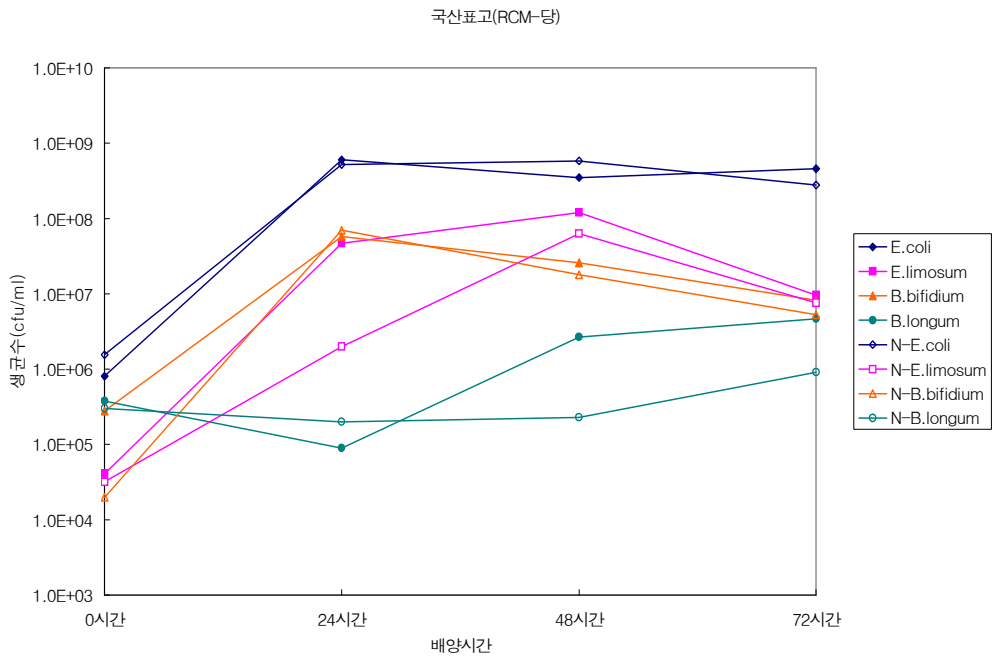


Fig. 35. RCM-당 배지에서 국산표고버섯 첨가에 따른 장내미생물의 균수변화

### 5) 버섯 추출물의 동물실험

#### 가) 몸무게 측정

동물에서 버섯추출물의 기능성을 조사하였으며, 열수 추출 후에 에탄올 추출하여 건조시킨 버섯 가루와 에탄올 상등 농축액을 첨가하여 비교하였다.

실험이 진행되는 기간동안 rat의 body weight를 측정하였다. 성장기의 쥐이기 때문에 정상의 경우 기간이 지날수록 몸무게의 증가가 나타날 것이 예상되고 실험군 별로 body weight의 변화를 관찰함으로써 고지방식이 미치는 효과와 더불어 버섯의 첨가로 나타나는 효과를 확인하고자 하였다.

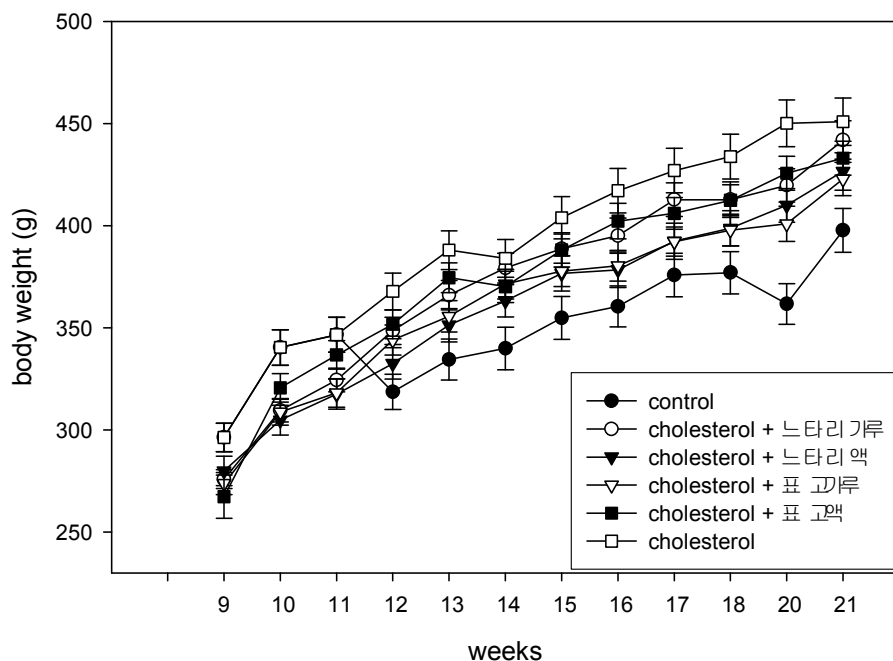


Fig. 36. 고콜레스테롤 식이에 버섯을 첨가한 처리구의 쥐의 무게

그 결과 그래프에서도 나타나듯이 cholesterol이 몸무게 증가가 가장 크게 나타났고 cholesterol과 각각의 버섯 성분을 배합한 사료를 먹인 실험군에서의 몸무게 증감을 살펴 보면 cholesterol만식이 섭취한 대조군에 비해 느타리 가루와 함께 먹인 실험군에서는 2%, 표고액 4.1%, 느타리액 5.7%, 표고가루 6.6%의 몸무게 감소 효과를 보이는 것을 알 수 있다.

#### 나) 혈당량 측정

혈중 glucose의 농도는 혈당계를 이용하여 측정할 수 있다. 고지방식을 지속적으로 유지하였을 경우 생체 내 대사과정에서의 무리가 생기므로 이에 따라 혈당에서도 변화가 초래될 것이라고 보여진다. 쥐에서 blood를 얻은 즉시 혈당계의 strip을 이용하여 각 실험군의 혈당을 측정하였다. 실험을 초기에서 상대적으로 높은 혈당이 측



정되었으나 실험을 진행할수록 안정된 수치를 보여, 모든 실험군에서 평균적으로 100-115 mg/dl 내외의 수치를 보였고 group별로 큰 차이를 보이지 않았다.

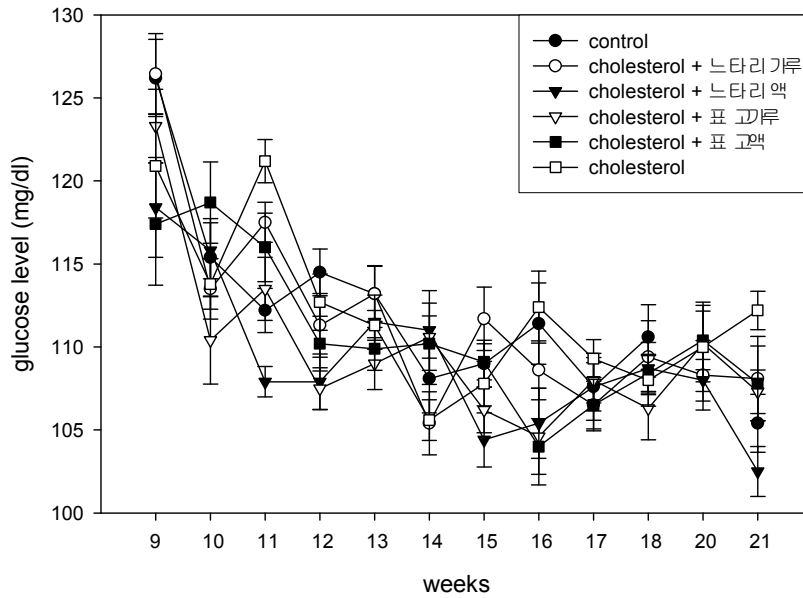


Fig. 37. 고콜레스테롤 식이에 버섯을 첨가한 처리구의 쥐의 혈당

#### 다) 혈중 cholesterol 측정

실험동물을 이용하여 대조군과 고지방식, 고지방식에 버섯을 배합한 사료를 공급하였을 경우 각 실험군에 따른 혈중 total cholesterol 변화를 확인하였다.

Cholesterol로 고지방식을 통해 고지혈증이나 생체 내 대사의 balance가 파괴되거나

불균형을 초래시켰을 때 버섯의 효과를 보고자 한 실험이다. 실험동물을 이용하여 대조군과 고지방식, 고지방식에 각 버섯의 성분을 배합한 사료를 공급하였을 경우 각 실험군에 따른 cholesterol 변화를 확인하였다. 공복시의 쥐에서 blood를 얻어 이 중 serum만을 분리하여 가수분해 반응을 유도하여 serum내에 존재하는 total cholesterol이 양을 측정하였다.

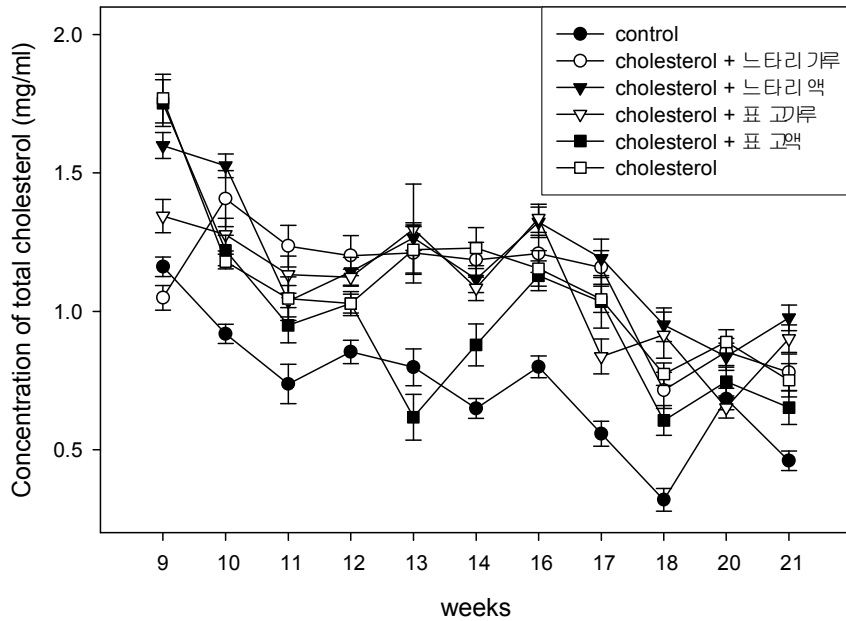


Fig. 38. 고콜레스테롤 식이에 버섯을 첨가한 처리구의 쥐의 total cholesterol

실험 결과를 확인한 결과 control에서의 total cholesterol은 예상대로 가장 낮은 양이 측정되었고, cholesterol 대조군과 cholesterol과 각 버섯의 성분을 배합하여 먹인 실험군에서는 느타리액, 표고가루와 cholesterol을 먹인 group에서는 cholesterol 단독 실험군보다 높은 양이 관찰되었다. 느타리가루를 먹인 group에서는 cholesterol 대조군과 비슷하였고 표고액과 배합한 group에서는 total cholesterol의 양을 약간 감소시켜 주는 효과가 나타났다. 1차년도 실험 결과에서도 표고버섯은 cholesterol level을 낮춰주는 결과를 얻은 바 있는데 이 효과가 표고버섯의 insoluble fraction으로부터 추출한 물질에서 나타난 효과라고 유추할 수도 있겠다.

혈중 HDL cholesterol level 측정은 그림 39에 나타내었다.

Cholesterol 조절이란 체내 cholesterol 수준을 적절한 범위로 조절하여 혈장과 조직(특히 혈관)에 cholesterol 축적이 일어나지 않게 함을 말한다. 체내 cholesterol이

축적될 경우 고콜레스테롤혈증이 나타나면 장기간에 걸쳐 cholesterol이 조절되지 않을 경우 동맥경화증으로 이어진다. 이 중 HDL (high density lipoprotein) cholesterol은 고콜레스테롤혈증 뿐만 아니라 동맥경화위험 감소에 주요한 역할을 하게 된다. HDL 입자는 동맥혈관 벽으로부터 잉여의 cholesterol을 제거하며 혈관의 플라그 형성을 억제해 주고 혈관에 형성된 플라그도 안정화 시켜 더 이상의 플라그의 형성을 막아준다. 또한 HDL 입자 자체에 항산화 효소(paraoxonase)가 결합되어 있어 혈장과 동맥벽 내부의 LDL이 산화되어 변화는 것을 막고 PAFAH(platelet activation factor acetylhydrolase)는 혈장과 동맥 벽에 존재하는 산화 지단백입자를 분해시켜 산화된 지단백입자를 제거하는 역할도 해준다.

따라서 고지방식에서 각 버섯 성분의 역할을 좀 더 구체적으로 확인하게 위해 HDL level을 측정하였다. total cholesterol과 마찬가지로 방법으로 assay kit를 이용하여 570nm에서 그 흡광도를 측정함으로써 control과 각 실험군을 비교하였다. 실험결과 control에서 HDL-cholesterol의 수치가 가장 높게 나타났다. 그 다음으로 나타난 것이 cholesterol 대조군이다. 각 버섯의 성분을 배합하여 먹인 실험군에서는 cholesterol만 먹인 대조군보다 HDL-cholesterol level이 낮게 나타나고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 total cholesterol level과 같이 분석을 해보면 표고버섯의 insoluble fraction으로부터 추출한 액상성분이 포함된 사료를 먹인 group은 total cholesterol level은 낮춰 주지만 HDL-cholesterol level 역시 낮추어 줌을 알 수 있다.

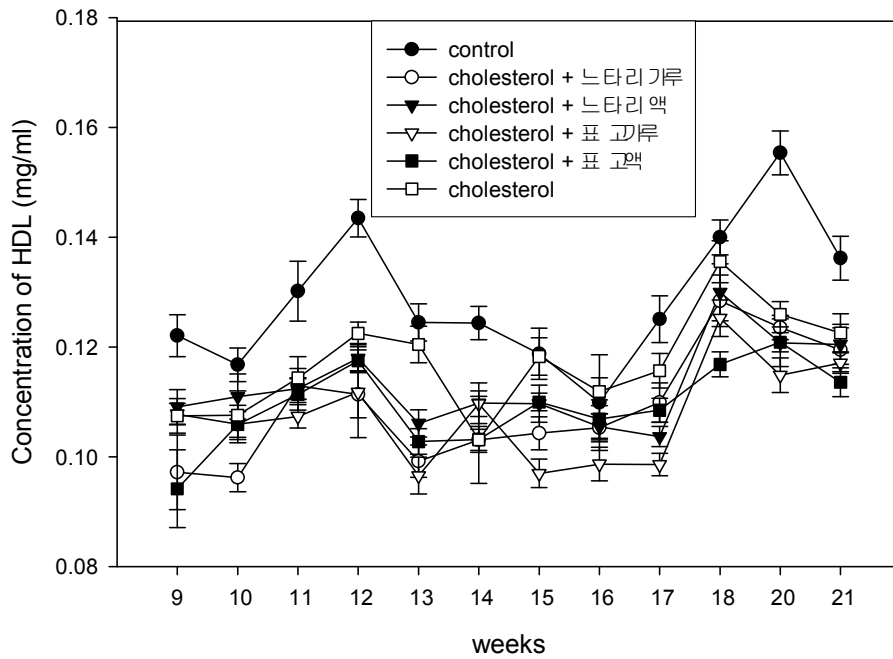


Fig. 39. 고콜레스테롤 식이에 버섯을 첨가한 처리구의 쥐의 HDL

라) Insulin assay

각 버섯 성분을 cholesterol과 함께 배합한 사료를 먹인 쥐에서 혈중 insulin level을 확인해본 결과 큰 수준에서 차이는 나타나지 않음을 알 수 있었다. 이는 insulin 분비와 관련된 세포들의 신호전달 기작이나 실제 insulin을 분비시키는 췌장의 기능등에는 지속적인 cholesterol의 섭취가 크게 영향을 미치지 않고 있음을 알 수 있었다.

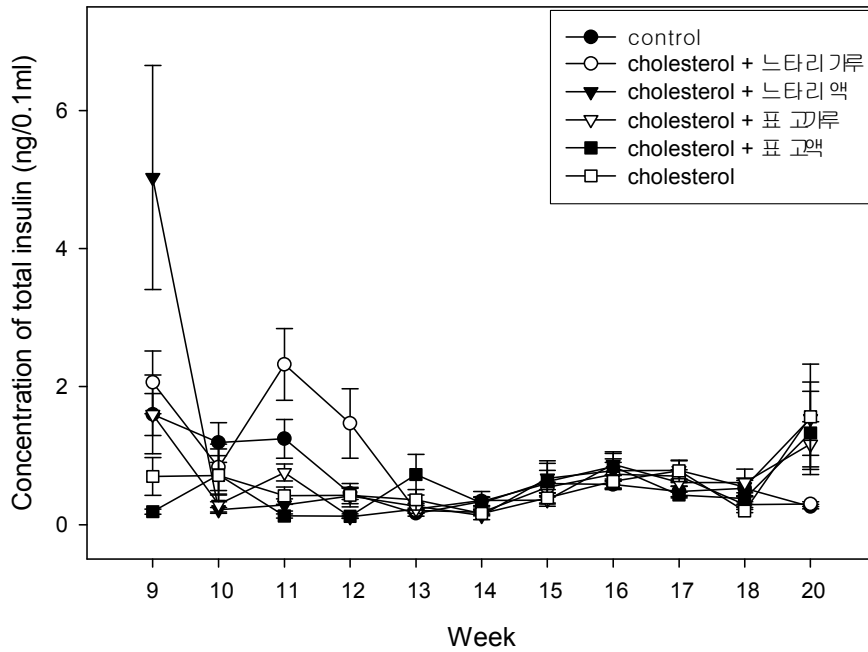


Fig. 40. 고콜레스테롤 식이에 버섯을 첨가한 처리구의 쥐의 insulin

마) GOT assay

GOT는 간에 존재하고 있을 뿐만 아니라 심장, 신장, 뇌, 근육 등에 포함되어 있는 효소로써 세포가 파괴되면 혈중 농도의 증가가 나타난다. 심근, 골격근, 적혈구에 많이 존재하기 때문에 심근경색, 용혈 등을 진단하는 데 이용된다. GPT는 주로 간세포내부에 존재하는 효소로써 일반적인 경우 간세포의 재생하는 과정 중에 아주 소량이 혈중에서 측정될 뿐 평소 혈액내의 GPT의 양은 매우 적게 관찰된다. 하지만 간에 염증이 생기거나 다른 이유로 간세포가 손상을 입어 파괴가 되게 되면 간세포내 효소인 GPT의 혈액 내 농도가 증가된 상태로 관찰되게 된다. 하지만 다시 간세포가 정상으로 돌아오게 되면 다시 혈중 농도가 낮아지게 된다. 다시 말해 간세포가 정상인 경우보다 더 많이 파괴되고 있으면 GPT의 양이 증가하고 파괴되는 세

포가 많을수록 그 수치는 커지게 된다. GPT는 주로 간에 분포하기 때문에 간장질환의 중요한 지표가 된다. 따라서 이 두 지표는 간의 질환을 예측하는 지표가 되고, GOT의 경우는 앞서 말한 것과 같이 심근이나 골격근의 이상에서도 증가하게 된다.

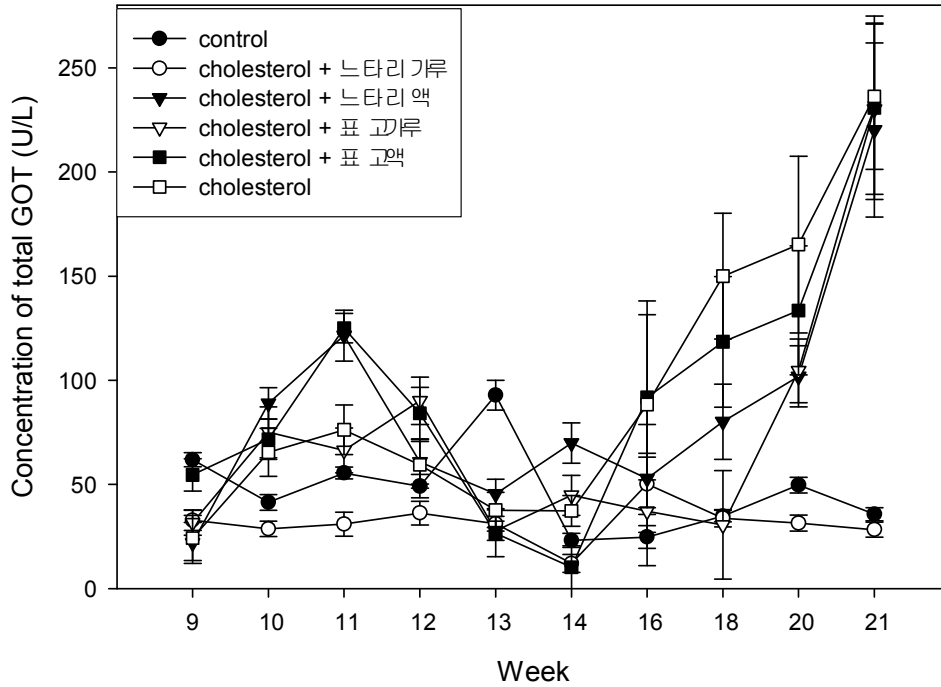


Fig. 41. 고콜레스테롤 식이에 버섯을 첨가한 처리구의 쥐의 GOT.

그러나 간경변증, 만성 비활동성 간염 등에서는 이런 수치가 거의 증가하지 않거나 조금 증가 하는 경우가 많다. 건강한 사람의 경우 GOT 가 GPT보다 높는데 질병의 종류나 시기에 따라 역전되기도 하는데, 일반적으로 간에 질병이 있으면 GPT가 상승하고 GOT는 심장 질환의 경우에 주로 상승한다고 알려져 있다. Cholesterol을 통한 고지방식과 버섯의 혼합 사료의 공급이 쥐에게 미치는 전반적인 vital response를 확인코자 GOT level을 측정을 해 보았다.

실험 결과 초반에는 별 차이가 없으나 cholesterol을 먹인 group에서 높은 GOT

level을 보이고 느타리액이나 표고가루 표고액을 배합한 사료를 먹인 실험군에서도 마찬가지로의 결과를 보였다. 하지만 느타리가루를 배합하여 먹인 실험군에서는 control수준으로 GOT가 계속 유지됨을 확인할 수가 있었다. GOT는 간에 존재하고 있을 뿐만 아니라 심장, 신장, 뇌, 근육 등에 포함되어 있는 효소로써 세포가 파괴 되면 혈중 농도의 증가가 나타난다고 알려져 있고 특히나 심장질환의 지표로도 많이 사용되고 있는데 위의 결과로 미뤄봤을 때 생후 3주령 된 쥐에게 지속적으로 먹인 결과 장기간의 cholesterol 섭취로 인해 생체 리듬이 깨지는 결과를 초래하고 느타리가루를 제외한 각 버섯의 성분이 그 효과를 완화시키지 못한 결과라고 볼 수 있겠다.

다. 버섯가공물(시판버섯 추출물)의 기능성 조사

#### 1) 시판버섯 추출물의 기능성 물질 함량

버섯은 풍미가 뛰어나고 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등의 각종 영양소를 다양하게 함유하고 있을 뿐만 아니라 다양한 생리활성 물질들을 생산함으로써 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 온 자연건강 식품이다. 특히 식용 및 약용 버섯류로부터 생산되는 기능성 생리활성 물질들은 부작용이 적고 독성면에서 비교적 안전할 뿐만 아니라 인체 면역계의 기능을 증강시켜 항암효과를 검증하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 버섯의 유효 성분을 이용하여 기능성 식품 또는 질병의 예방이나 치료를 위한 가공 개발이 필요하며, 원료에서부터 제품에 이르기까지 버섯의 기능성과 안전성을 밝히는 연구가 선행되어야 한다. 특히 버섯의 종류에 따른 기능성 연구는 많이 이루어져 왔으나, 각 버섯의 지표 물질의 성분과 함량 연구에 대한 과학적 자료가 부족한 실정이다.

$\beta$ -glucan은 보리나 귀리 같은 일부 곡류와 효모, 곰팡이 세포벽에 존재하는 것으로 알려져 있으며 glucose가 연결되어 있는 구조에 따라 효능 및 물성에서 조금씩 차이를 보인다. 곡류의  $\beta$ -glucan은  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4) 구조인데 비해 효모나 곰팡이의 세포벽  $\beta$ -glucan은  $\beta$ -(1-3) 결합이 backbone을 이루고 작은  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 결합분자가  $\beta$

-(1→6) 결합으로 분지된 형태를 갖는다(Mullins, 1990).

$\beta$ -glucan의 측정은  $\beta$ -glucan 추출용액에 ammonium sulfate를 20~30% 첨가하여 선택적으로  $\beta$ -glucan을 침강시켜 분석하는 침강법(Preece et al., 1952),  $\beta$ -glucanase 역가를 갖는 효소를 사용하여  $\beta$ -glucan만을 특이적으로 가수분해 한 후 유리된 glucose 함량을 측정하여  $\beta$ -glucan 함량을 계산하는 효소적 방법(McCleary et al., 1985), 고분자  $\beta$ -glucan에만 특이적으로 결합하는 염색제를 부착시켜 그 발광 농도로부터  $\beta$ -glucan 함량을 측정하는 FIA(Flow-injection analysis) 방법(Jorgensen, 1988) 등이 있다. 하지만 이들 방법중 효소적 방법과 FIA-Calcofluore 방법 만이 European Brewery Convention에 의해 공인된 방법으로 채택되어 있다.

효소적 방법은 잘 확립되어 있어서  $\beta$ -glucan의 추출 분해와 분해된 glucose를 측정할 수 있는 Kit 형태(Megazyme, Megazyme International Ireland Ltd)의 시약이 상품으로 판매되고 있으며, 실제로  $\beta$ -glucan을 측정하는데 대부분의 연구자가 이 방법(AOAC Method 995.16, AACC Method 32-33, EBC Methods 3.11.1, 4.16.1)을 사용하고 있다.

Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan assay에 의한 glucan 함량은 버섯추출물 시판 회사 제품중에서 효모(*Aureobasidium pullulans*)의 추출물의  $\beta$ -glucan이 29.06%로 가장 높았고 느타리가 20.31%로 다음이었다(표 24).

Table 24. 버섯과 효모의 glucan 측정 kit에 의한 버섯 열수추출물의 glucan 함량

Sample		Glucan content(% , w/w)		
		Total glucan	$\alpha$ -glucan	$\beta$ -glucan
<i>Pleurotus ostreatus</i>	dry powder	20.10	7.82	12.28
	extract	20.76	0.45	20.31
<i>Lentinus edodes</i>	dry powder	29.30	7.76	21.54
	extract	7.37	0.44	7.37
<i>Sparassis crispa</i>	extract	14.41	2.46	11.95
<i>Aureobasidium pullulans</i>	extract-Polycan	39.32	10.26	29.06



산지별 버섯 가공물의 기능성 지표물질 함량 조사는 자연산의 경우는 같은 품종이라도 기후에 따른 특성 차이가 있으나 표고와 느타리는 버섯 재배상에서 주로 재배하므로 표고는 채취 형태에 따라 시판되므로 형태적 차이에 따른  $\beta$ -glucan 함량 조사를 하였고 느타리는 다양한 종이 시판되고 있으므로 종별 분석을 하였다(표 25-26).

Table 25. 실험에 사용한 버섯

	Sample		Source
표고버섯	일반표고	fresh	국산
	동고	dry powder	국산
	화고	dry powder	국산
	흑화고	dry powder	북한산
	백화고	dry powder	북한산
느타리	일반느타리	fresh	국산
	췌느타리	fresh	음성
	참느타리	fresh	광주
	새송이	fresh	입장

Table 26. 버섯과 효모의 glucan 측정 kit에 의한 버섯의 glucan 함량

Sample		Glucan content(% , w/w)			
		Total glucan	$\alpha$ -glucan	$\beta$ -glucan	
표고버섯	일반표고	fresh	4.68	0.12	4.57
		dry powder	49.35	1.15	48.20
	동고	dry powder	42.35	3.93	38.43
	화고	dry powder	45.37	5.55	39.82
	흑화고	dry powder	35.67	4.16	31.50
	백화고	dry powder	38.25	3.99	34.25
느타리	일반느타리	fresh	1.24	0.04	1.20
		dry powder	24.67	0.82	23.84
	췌느타리	fresh	1.02	0.03	0.99
		dry powder	21.38	1.00	20.38
	참느타리	fresh	1.66	0.03	1.63
		dry powder	26.00	1.05	24.95
	새송이	fresh	2.26	0.26	2.00
		dry powder	23.48	0.77	22.71

## 2) 시판버섯 추출물의 항산화

최근에는 식품분야에서 효소는 아니지만 활성 산소의 반응성을 감소 또는 무력화할 수 있는 물질의 발굴과 이용에 관한 연구가 큰 관심이 되고 있으며, 특정 물질이 생체의 산화 반응 또는 radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제하지는 못하기 때문에 활성 산소의 종류나 radical source와 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화 물질의 연구가 필요하다.

버섯은 당질, 단백질, 비타민, 무기질과 같은 영양소를 골고루 함유하고 있으며, 또한 항암활성, 면역증강 효과 및 항산화 효과 등의 약리 효과 때문에 최근에는 건강식품 및 의약품 소재로 많이 이용되고 있다. 구름버섯에서 분리한 krestin, 표고버섯으로부터 분리한 lentinan이 항암 및 항암보조제로 시판되고 있다. 최근에는 활성 다당류의 구조 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항종양 활성과 감염 방어 효과, 항보

체 활성, 식세포 활성화 등 면역계에 대한 조절 활성, 소염활성, 혈당강하 활성 및 항산화 활성 등에 관한 많은 연구가 진행 중이다.

담자균류에 대한 항산화 효과는 큰비단 그물버섯의 아세톤 추출물중 에탄올 분획의 bolegrevilol의 항산화 활성(Hayashi et al., 1989)과 느타리 버섯 자실체 및 균사체 추출물의 항산화능(정 등, 1996)과 영지, 양송이, 표고버섯의 전자공여능을 측정 한 결과 영지버섯의 diethylether 및 butanol 추출물이 높은 활성을 보였다(이 등, 1997)는 연구 결과 등이 있다. 버섯의 항산화 효과가 보고된 보고서의 대부분은 polyphenol 물질이 항산화 활성을 보인 것으로 나타났으며(이 등, 1997), 이 등은 (2000) 목질진흠버섯의 배양 균사체에서 추출한 다당류의 DPPH radical 소거능이 있음을 보고하였다.

Pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 Fig. 1과 같이 버섯 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과 10mg/mL의 농도 이상에서 농도에 의존하여 SOD 유사활성을 나타내었다. 느타리와 표고버섯 추출물에서 높은 활성을 보였으며,  $\beta$ -glucan인 polycan의 경우 항산화 활성이 다른 버섯 추출물에 비해 SOD 활성이 미미한 것으로 나타났다. SOD유사활성 물질인 활성산소의 시발물질이라 할 수 있으며, superoxide anion의 저해물질로는 생체 superoxide dismutase라는 효소가 있지만 이의 일종으로 SOD와 작용기작은 다르지만 인체 내에서 역할이 유사하여 통상적으로 SOD유사활성 물질이라 하고 있다. 김 등(2001)은 팽이버섯 추출물의 SOD 유사활성을 측정한 결과 활성을 보였다고 보고하였다.

Free radical인 DPPH를 이용한 유리기 소거능을 측정한 결과, 처리 농도에 의존적으로 소거능이 증가하는 경향을 보였으며(Table 26, Fig. 37), 느타리 버섯 추출물이 다른 버섯 추출물에 비해 높게 나타났으나, 항산화제인 ascorbic acid에 비해 free radical 소거능이 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 36-37).

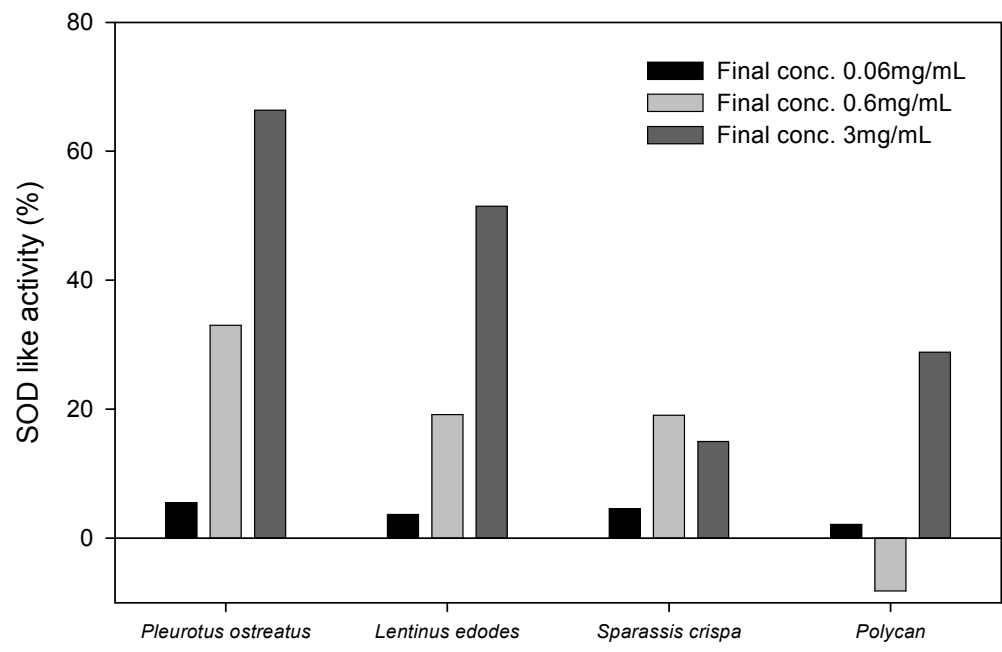


Fig. 36. SOD like activity(%) of the extracts of mushrooms at different concentrations

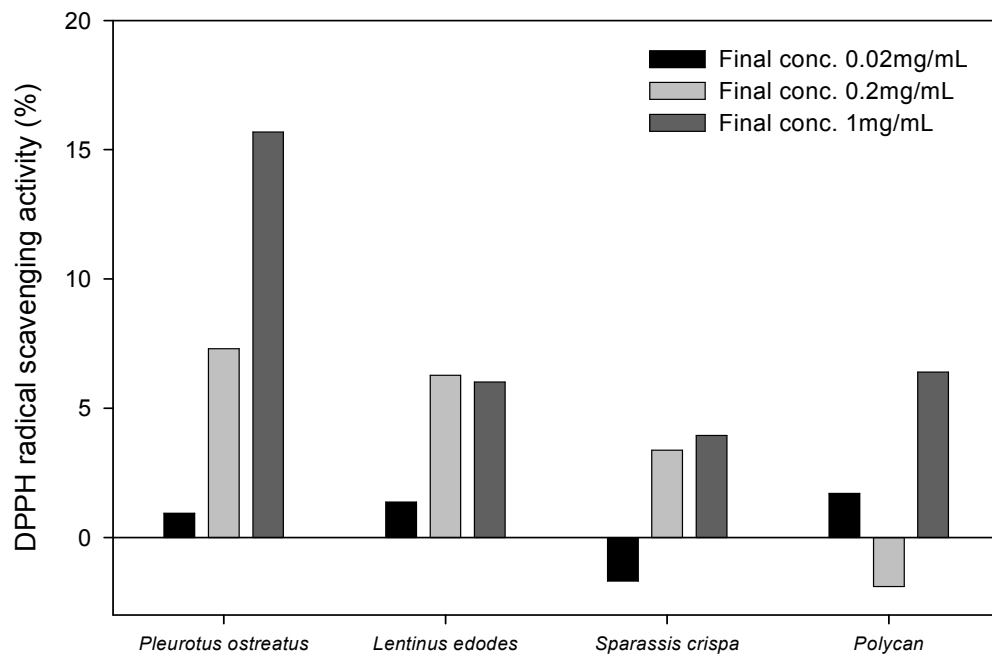


Fig. 37. Scavenging activity(%) of DPPH radical of the extracts of mushrooms at different concentrations

### 3) 시판버섯 추출물의 항균성

다양한 병원성 미생물을 지시균으로 하여 각 지시균별 배양배지 및 배양조건을 사용하여 동일한 방법으로 생육저지환을 관찰하여 항균활성을 조사하였다. 고체상에서 항균 활성은 뚜렷한 clear zone을 관찰할 수 없었으나, *Listeria monocytogenes* 균주에 대해 버섯 추출물이 약간의 항균 활성이 있을 가능성이 엿보였다(표 27).

Table 27. Antimicrobial activities of mushroom extracts by paper disc method

	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Sparassis crispa</i>	Polycan
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> 0157 H7	-	+	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i>	△	△	△	△

+: clear zone이 있음

△: disc를 중심으로 균이 등글게 모여 있음

액체상에서 항균활성은 *E. coli*를 배양한 TSB 배지에서 100 $\mu$ l를 취해 10mL 액체 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 이 배양액 0.1mL를 다시 10mL 액체 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 균체 배양액을 만들어 이 균체 배양액의 균수를 측정한 결과  $1.4 \times 10^9$ 이었으며, 이 균체 배양액을 배지 10mL 당 25 $\mu$ l를 접종하여 균수를 측정한 결과  $4.0 \times 10^6$ 이었다. 이를 초발균수로 하여 여기에 각각의 버섯 추출물(50mg/mL)을 100 $\mu$ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 2시간 간격으로 10진 희석법으로 평판배지에 도말하여 생균수를 측정하였다.

*E. coli*에서 polycan을 제외한 느타리, 표고, 버섯 추출물은 배양 8시간까지는 균의 생육을 저지하는 것으로 나타났으나, 배양 16시간에는 control보다 약간 낮은 수준을 보여 그 이후의 배양에서는 항균활성을 보이지 않을 것으로 예상되며, 표고버섯, 느타리 버섯, 꽃송이 버섯의 순으로 항균활성이 높았다. polycan의 경우 배양 4시간에서는 control과 비슷한 수준으로 증식하였으나, 배양 6시간째는 약간 증가하다가 8시간에 급격히 증가하여 배양 16시간에 약간의 항균 활성이 있음을 보였다(Fig. 38).

*Eubacterium limosum*에 대한 버섯 추출물의 항균 활성은 다음과 같다. 배양 8시간까지 항균활성을 보였으며, 16시간에서는 control과 비슷한 수준을 보였다. 표고버

섯 추출물이 가장 항균활성이 높은 것으로 나타났으며, 느타리 버섯, 꽃송이 버섯, polycan의 순으로 활성이 높게 나타났다(Fig. 39).

*Listeria monocytogenes*에 대한 항균력은 배양 4시간까지는 균의 증식이 느렸으나 그 이후 급격한 증식을 나타냈으며, 표고 버섯의 경우 배양 초기 균의 제균력은 없는 것으로 나타났으나 그 이후 균의 증식이 거의 이루어지지 않아 버섯 추출물 중 가장 높은 항균활성을 보였다. 느타리 버섯과 꽃송이 버섯은 배양시간 내내 control보다 균의 증식이 낮아 항균 활성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 40).

버섯 추출물의 *Salmonella typhimurium*에 대한 항균 활성은 *Eubacterium lomosum*에 대한 항균력과 비슷한 양상을 보여, 표고버섯, 느타리 버섯, 꽃송이 버섯, polycan의 순으로 항균활성을 보였다(Fig. 41).

버섯 추출물은 *Bifidobacterium bifidum*에서 배양 초기에는 균의 증식을 억제하는 것으로 나타났으나, 배양 16시간 이후에 균을 증식시키는 것으로 나타났다(Fig. 5).

*Bifidobacterium longum*, *Bacteroides fragilis*와 *Bactroides uniformis*도 *B. bifidum*과 비슷한 양상을 보였다(Fig. 43-45).

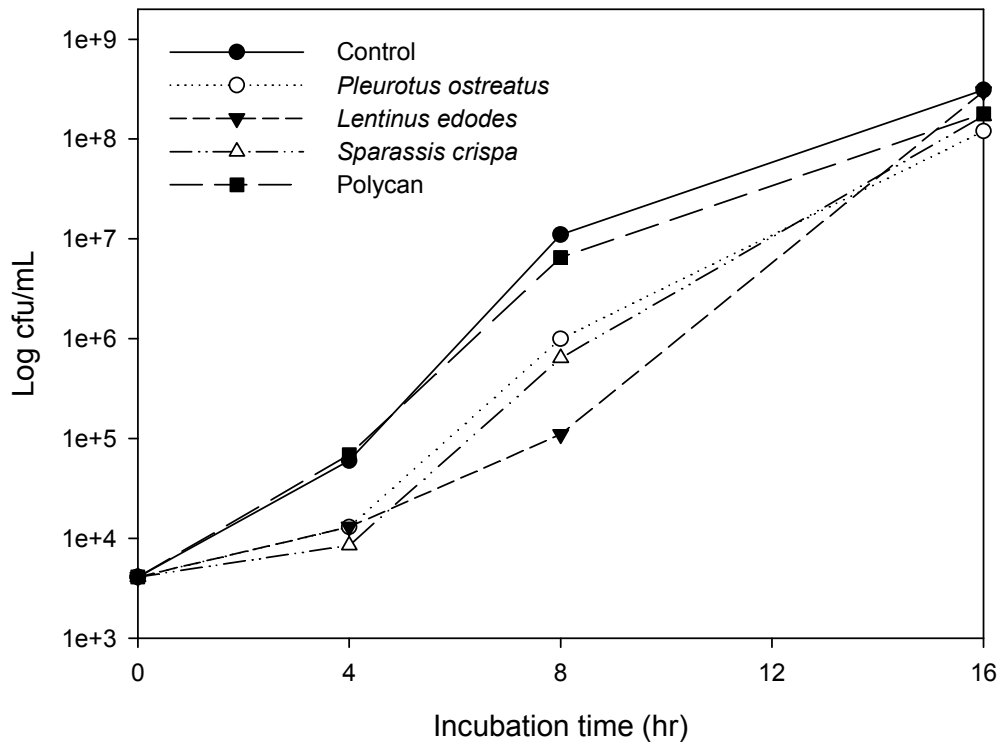


Fig. 38. Growth inhibition of *E. coli* by mushroom extracts



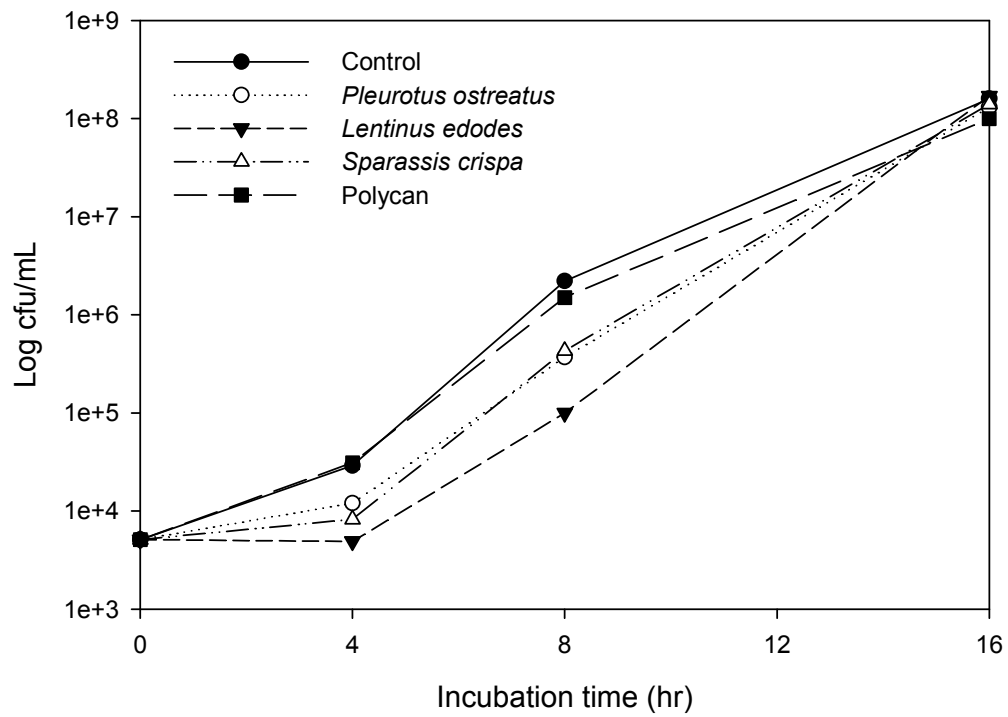


Fig. 39. Growth inhibition of *Eubacterium limosum* by mushroom extracts

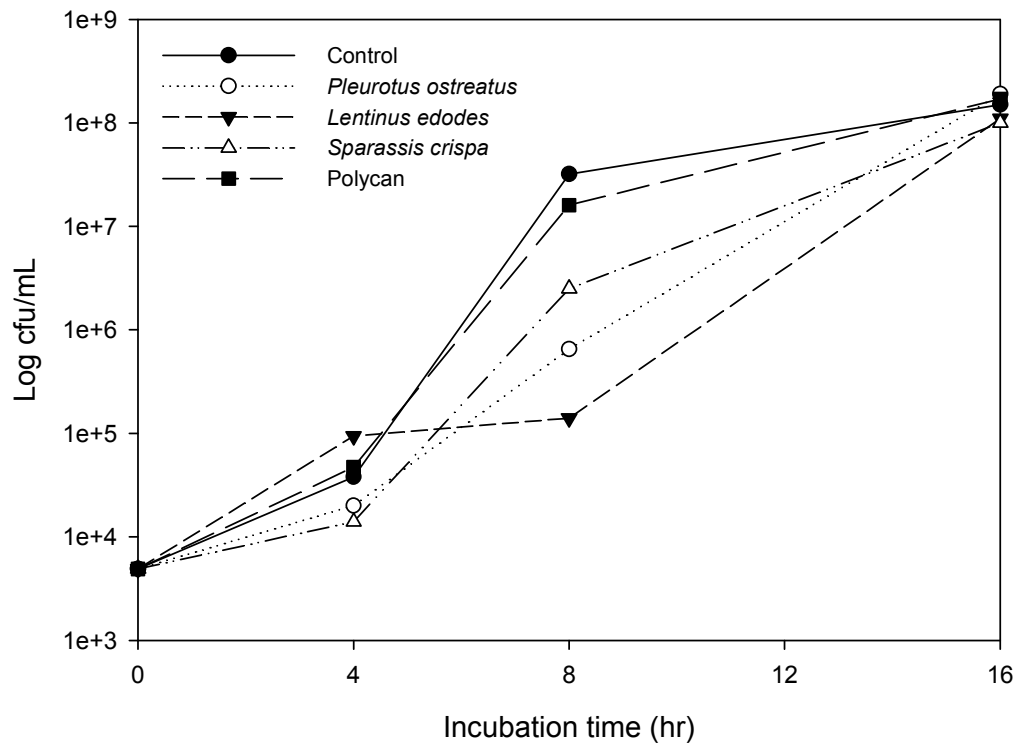


Fig. 40. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by mushroom extracts

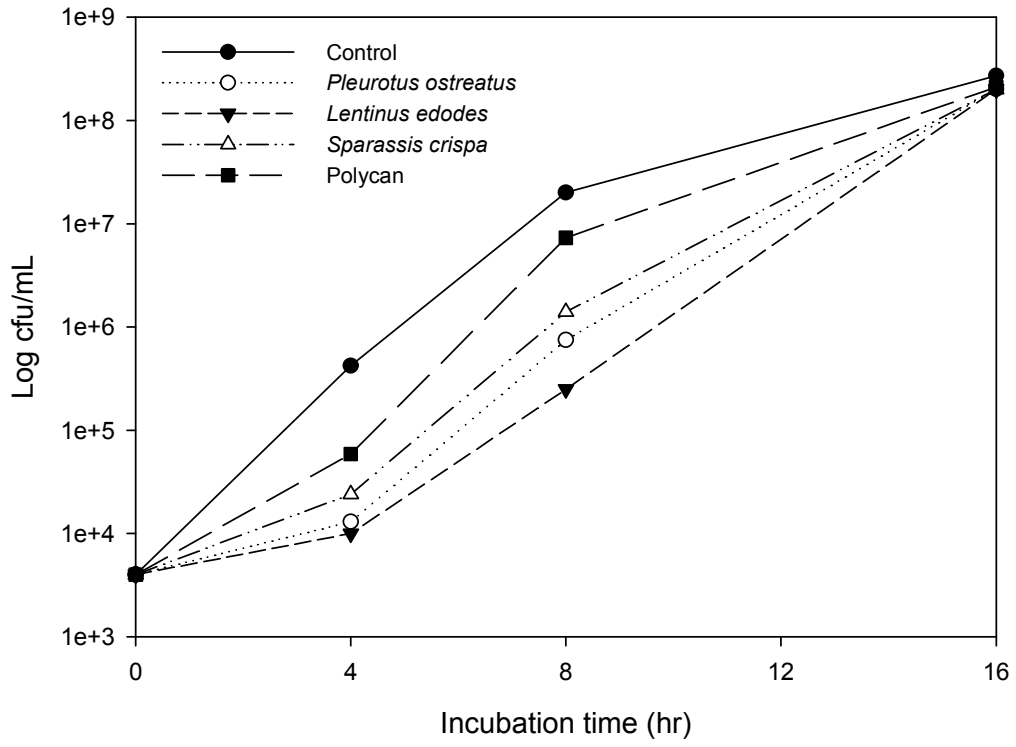


Fig. 41. Growth inhibition of *Salmonella typhimurium* by mushroom extracts

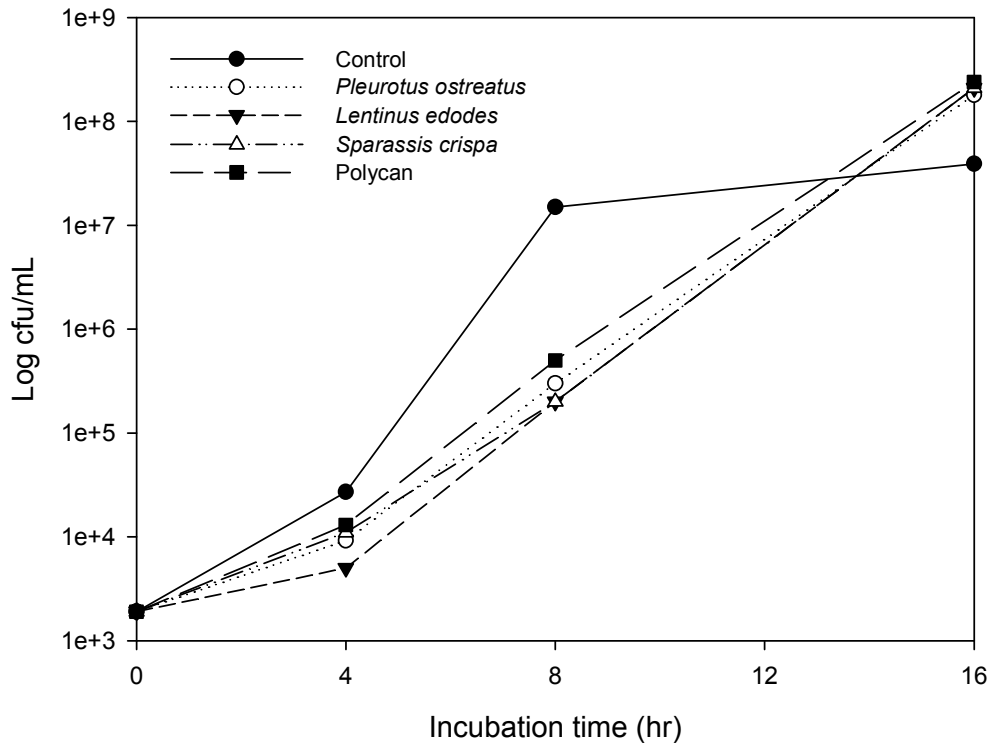


Fig. 42. Growth inhibition of *Bifidobacterium bifidum* by mushroom extracts.

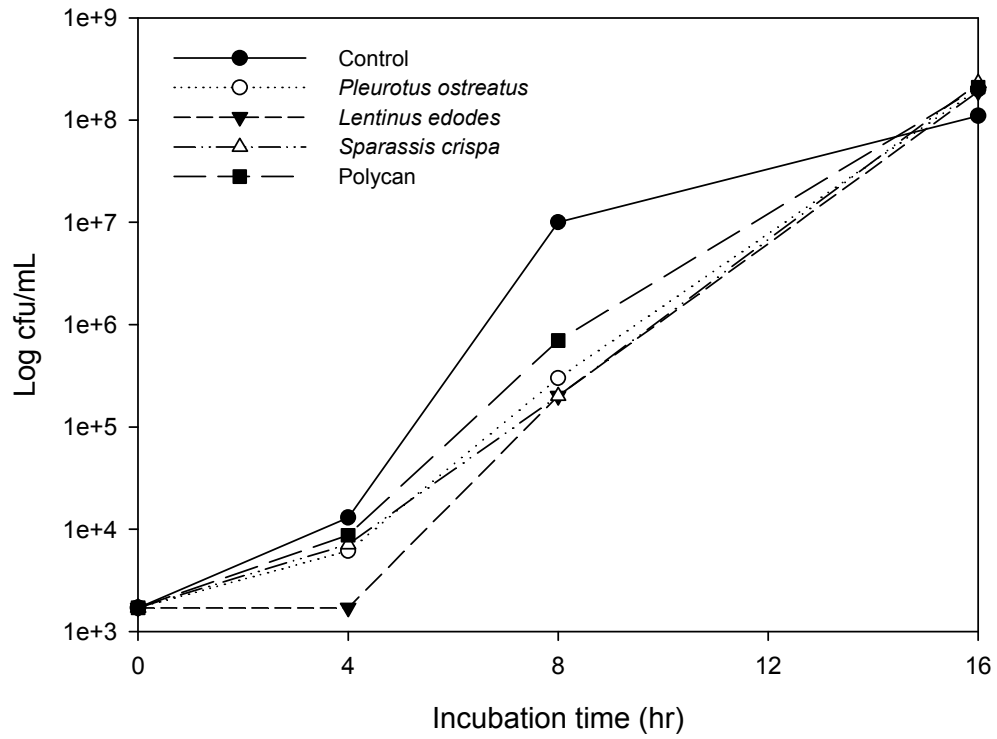


Fig. 43. Growth inhibition of *Bifidobacterium longum* by mushroom extracts.

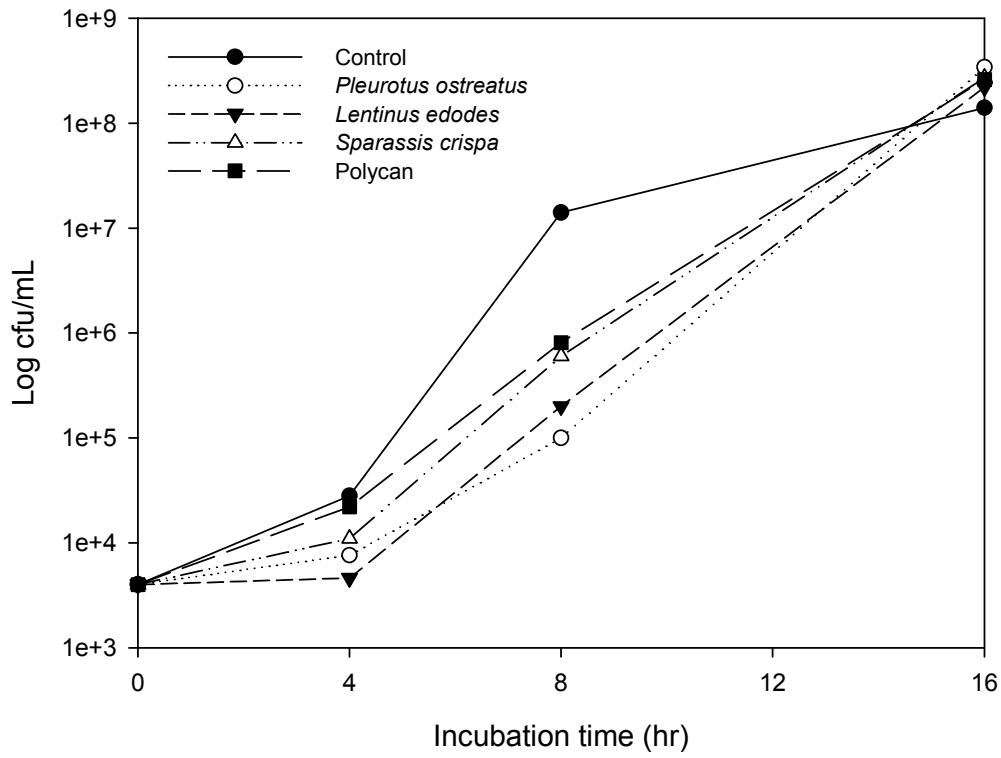


Fig. 44. Growth inhibition of *Bacteroides fragilis* by mushroom extracts.

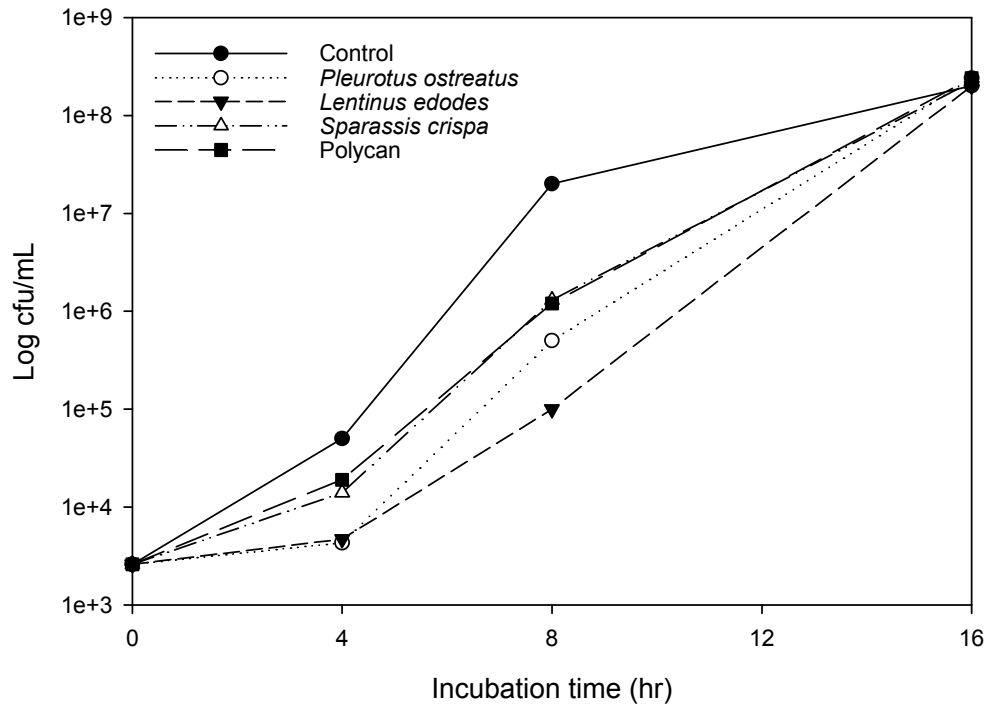


Fig. 45. Growth inhibition of *Bacteroides uniformis* by mushroom extracts.

#### 4) 시판버섯 추출물의 prebiotics effect

인체의 장내에는 100조의 세균이 존재하며 분변 고형물의 약 30%를 차지하고 있으며 종류는 약 400여종에 달하며 이들은 서로 공생 또는 길항 관계를 유지하며 장내 균총을 유지한다. 장내 균총의 대사 활성은 인체의 영양, 약효, 생리 기능, 노화, 발암 등 질병의 발생에 지대한 영향을 미친다. *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 등과 같은 젖산균은 젖산과 초산 등의 유기산을 생산하고 유해한 물질의 생산이 거의 없기 때문에 인체에 유익한 균주로 여겨지고 있다. *Bacteroides*는 암모니아, 인돌, 아민 등을 생산하고 *Eubacterium*은 2차 담즙산 등의 해로운 물질을 생산하는 것으로 보고되고 있어 유해균주로 분리되고 있다. 따라서 인체의 건강 증진을 고려해 볼때 유익균의 장내 증식을 촉진하고 유해균의 증식을 억제하는 것이 바람직하다. 그러나

각 균총들의 유익성과 유해성에 대한 이해는 더욱 연구가 필요한 상황이다.

Prebiotics는 대장내에서 인간의 건강 증진에 도움을 주는 제한된 수의 세균 성장 및 활성을 선택적으로 촉진하는 비소화성 식품 성분으로 정의되고 있다. 식물 유래의 inulin과 fructooligosaccharide(FOS), soyaoligosaccharide, lactulose, isomaltooligosaccharide, lactosucrose, galactooligosaccharide(GOS), 팔라티노오스, 식이섬유, 난소화성 전분 등이 있으며, 최근에는 식이와 질병간의 상관성에 대한 인지도 향상 및 건강 유지에 대한 관심의 증가, 건강 유지 비용의 상승 등을 배경으로 식품 소재로서의 활용도가 크게 증가하고 있다. 이에 버섯의 다당류 성분인  $\beta$ -glucan이 prebiotics로서의 가능성을 실험해 보고자 하였다.

버섯 추출물의 prebiotic effect를 조사하기 위해 *E. coli*, *Eubacterium lomosum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thypimurium*와 *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides uniformis* 균주를 glucose와 starch를 제거한 RCM 배지에 배양하여 실험하였다. 버섯 추출물의  $\beta$ -glucan이 배지의 탄소원인 glucosae와 starch를 대체하여 균주가 이용할 수 있는 지를 알아보았다.

*E. coli*에 대해 버섯 추출물과 polycan이 배양 8시간까지는 균의 생육을 저지하는 것으로 나타났으나, 배양 16시간에는 control보다 약간 낮은 수준을 보였다 (Fig. 46), 표고버섯, 느타리 버섯, 꽃송이 버섯, polycan의 순으로 증식억제 활성이 높았다.

*Eubacterium limosum*에 대한 버섯 추출물의 균증식 억제 효과는 다음과 같다. 배양 8시간까지 항균활성을 보였으며, 16시간에서는 control과 비슷한 수준을 보였다. 표고버섯 추출물이 가장 항균활성이 높은 것으로 나타났으며, 느타리 버섯, 꽃송이 버섯, polycan의 순으로 활성이 높게 나타났으나(Fig. 47), 느타리버섯의 경우 배양 8시간까지는 균증식 억제 효과가 가장 높았으나, 16시간 배양에서는 오히려 control보다 균증식이 더 활발하였다.

*Listeria monocytogenes*에 대한 균 증식 억제효과는 배양 8시간까지는 느타리, 표고, 꽃송이 버섯, polycan의 순으로 높았으나 배양 16시간에서는 모든 균이 control보다 균의 증식이 더 많이 이루어졌다(Fig. 48).

버섯 추출물의 *Salmonella typhimurium*에 대한 항균 활성은 표고버섯, 느타리 버섯,



꽃송이 버섯, polycan의 순으로 항균활성을 보였으며, 배양 16시간에서는 꽃송이 버섯을 제외한 모든 균이 control보다 오히려 높았다(Fig. 49).

*Bifidobacterium bifidum*과 *Bifidobacterium longum*에서 버섯 추출물은 배양 초기에는 균의 증식을 억제하는 것으로 나타났으나, 배양 16시간 이후에는 균을 증식시키는 것으로 나타났다(Fig. 50, 51).

*Bacteroides fragilis*와 *Bacteroides uniformis*도 *Bifidobacterium*과 비슷한 양상을 보였다(Fig. 52, 53).

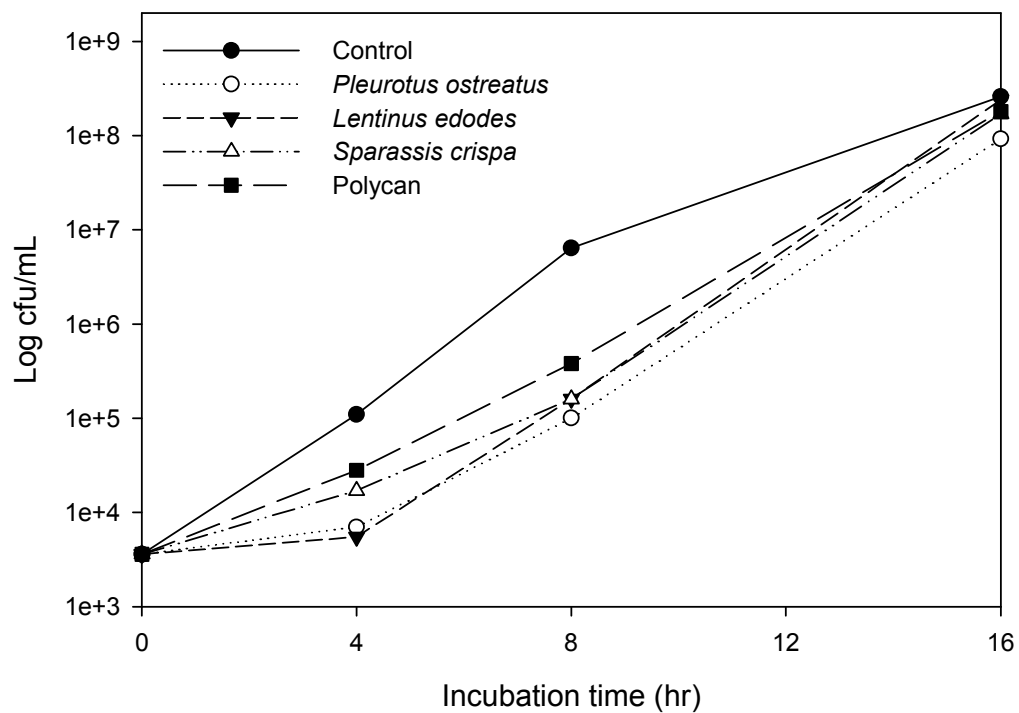


Fig. 46. Prebiotics effect of mushroom extracts on *E. Coli*.

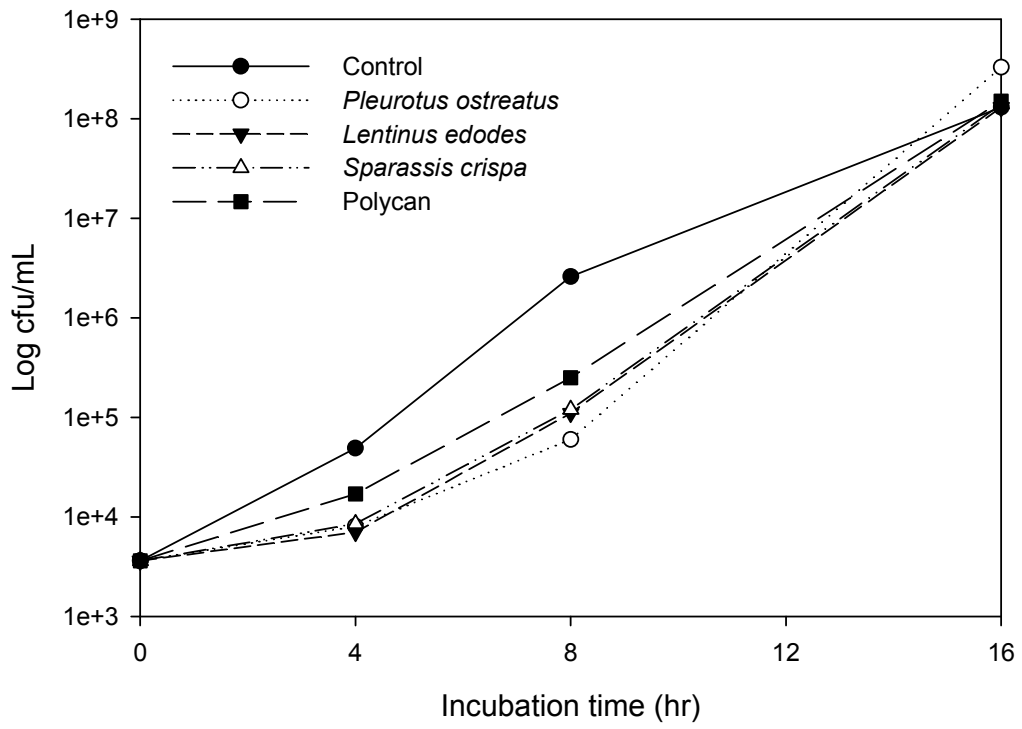


Fig. 47. Prebiotics effect of mushroom extracts on *Eubacterium limosum*.

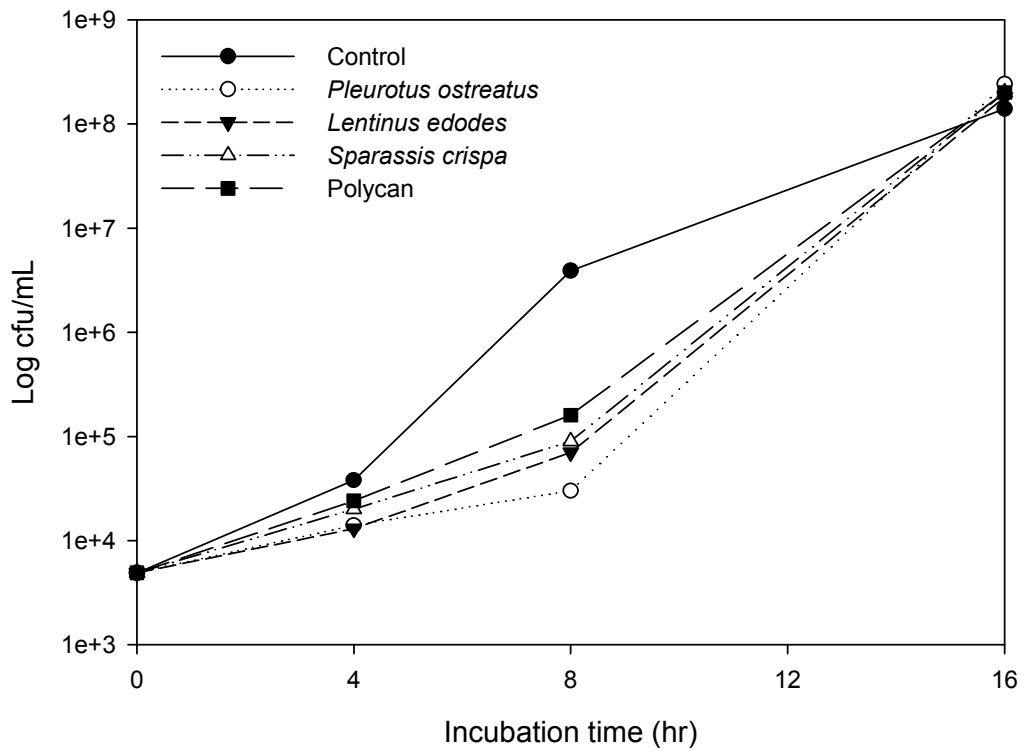


Fig. 48. Prebiotics effect of mushroom extracts on *Listeria monocytogenes*.

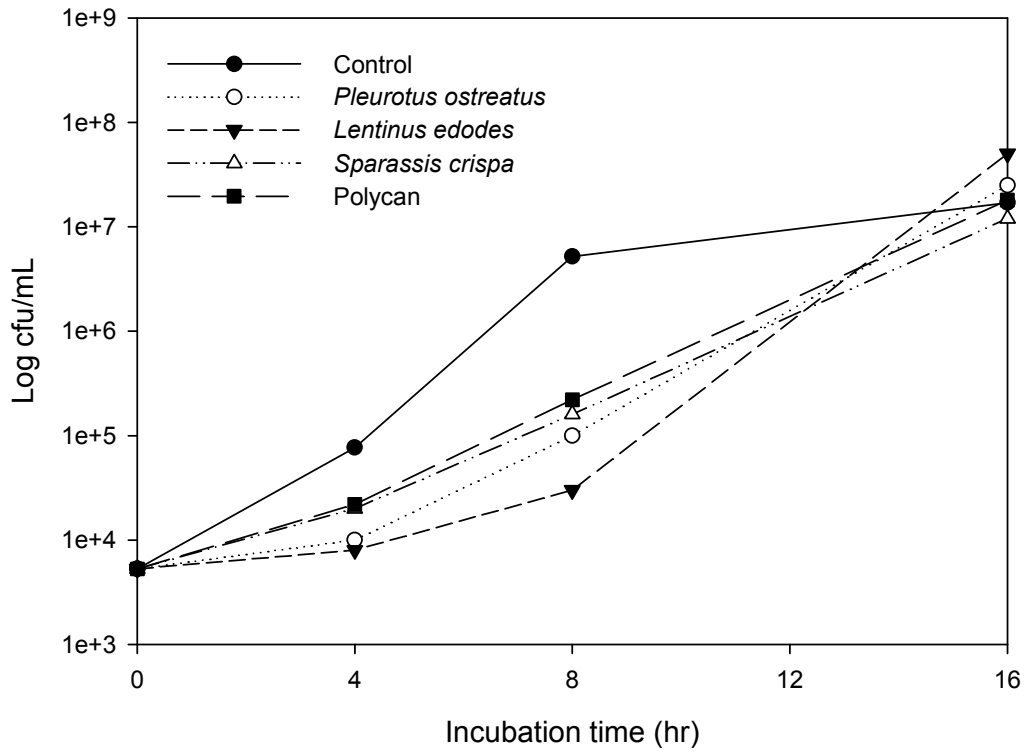


Fig. 49. Prebiotics effect of mushroom extracts on *Salmonella typhimurium*.

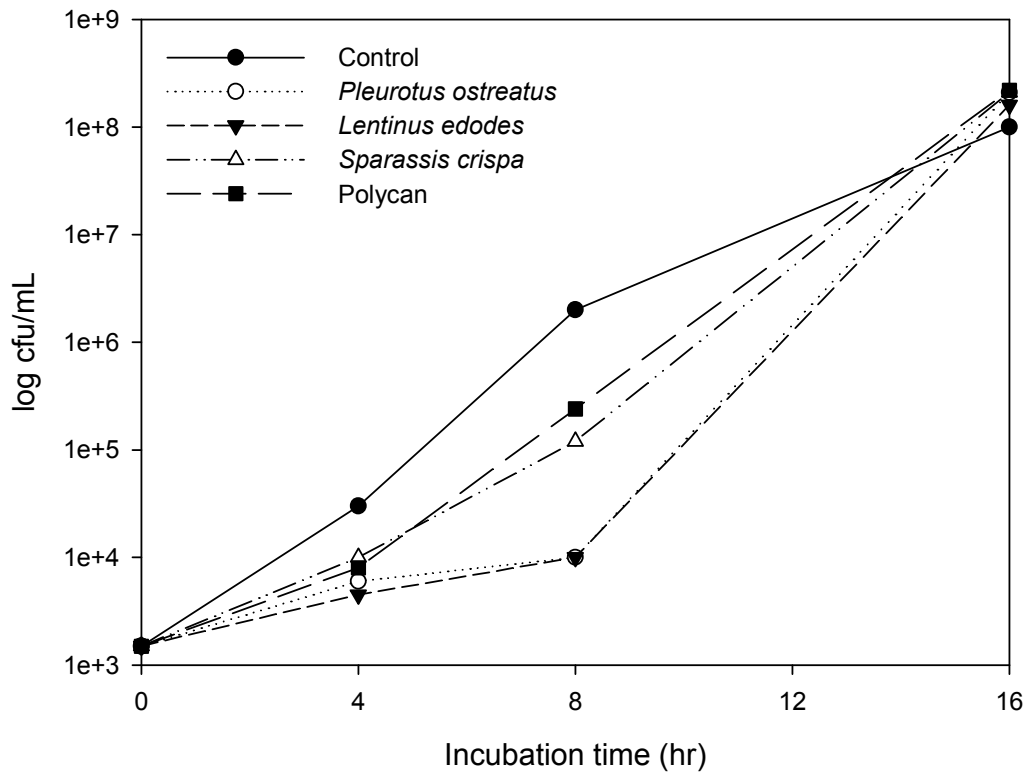


Fig. 50. Prebiotics effect of mushroom extracts on *Bifidobacterium bifidum*.

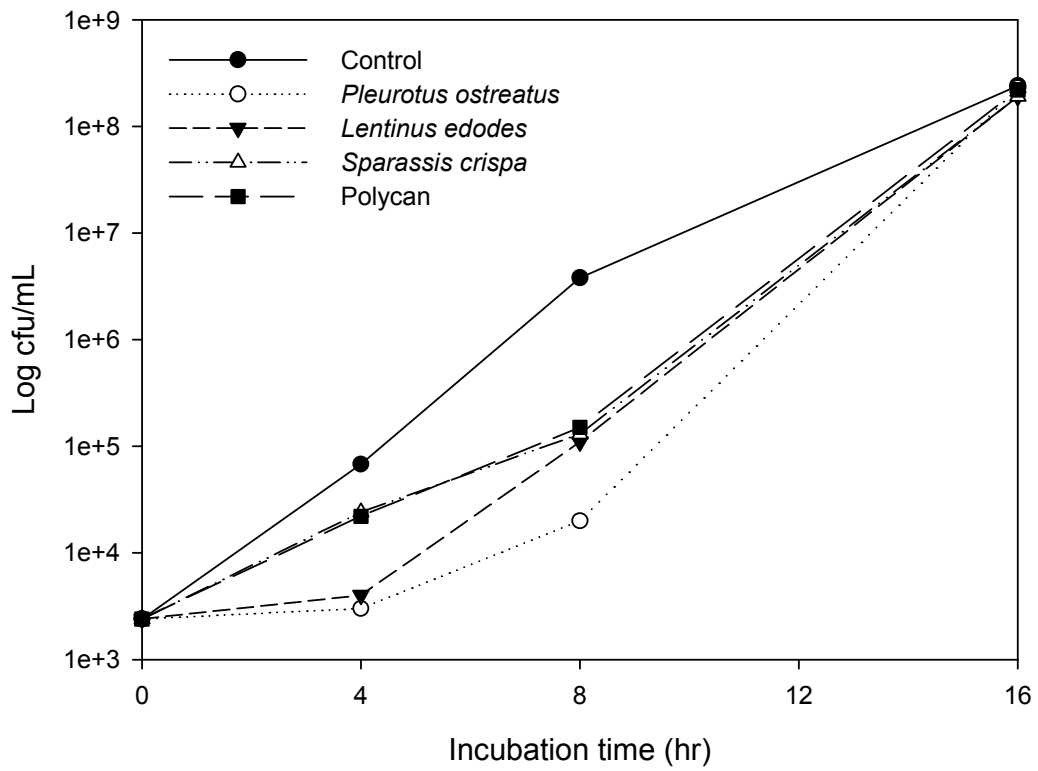


Fig. 51. Prebiotics effect of mushroom extracts on *Bifidobacterium longum*.

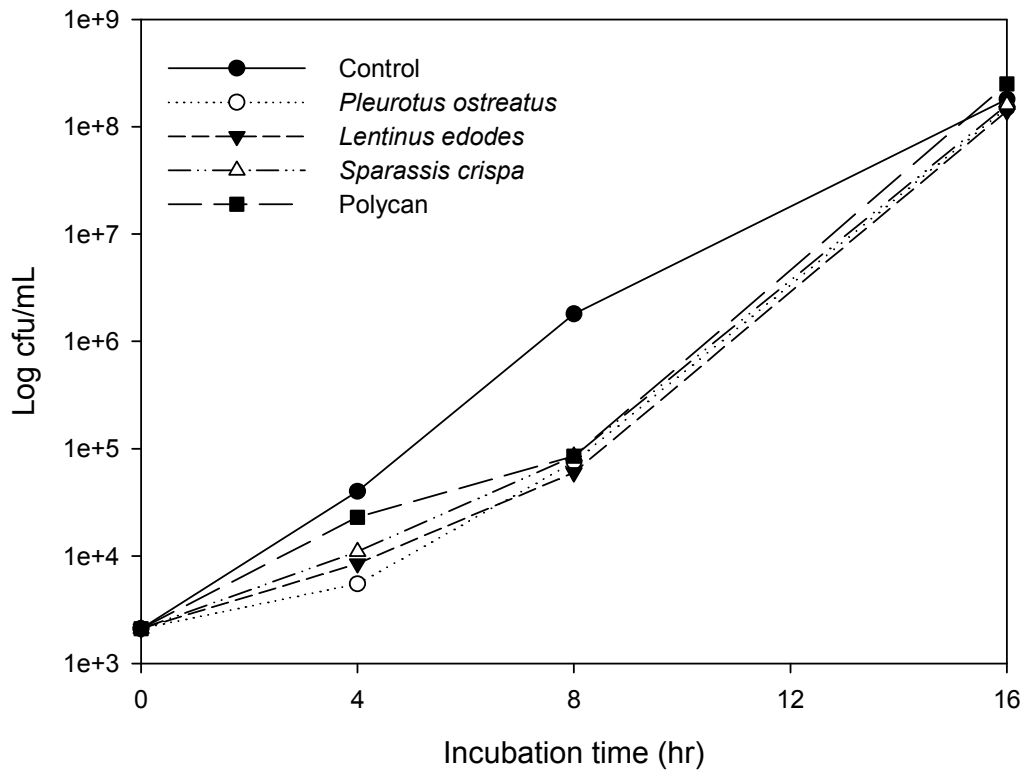


Fig. 52. Prebiotics effect of mushroom extracts on *Bacteroides fragilis*.

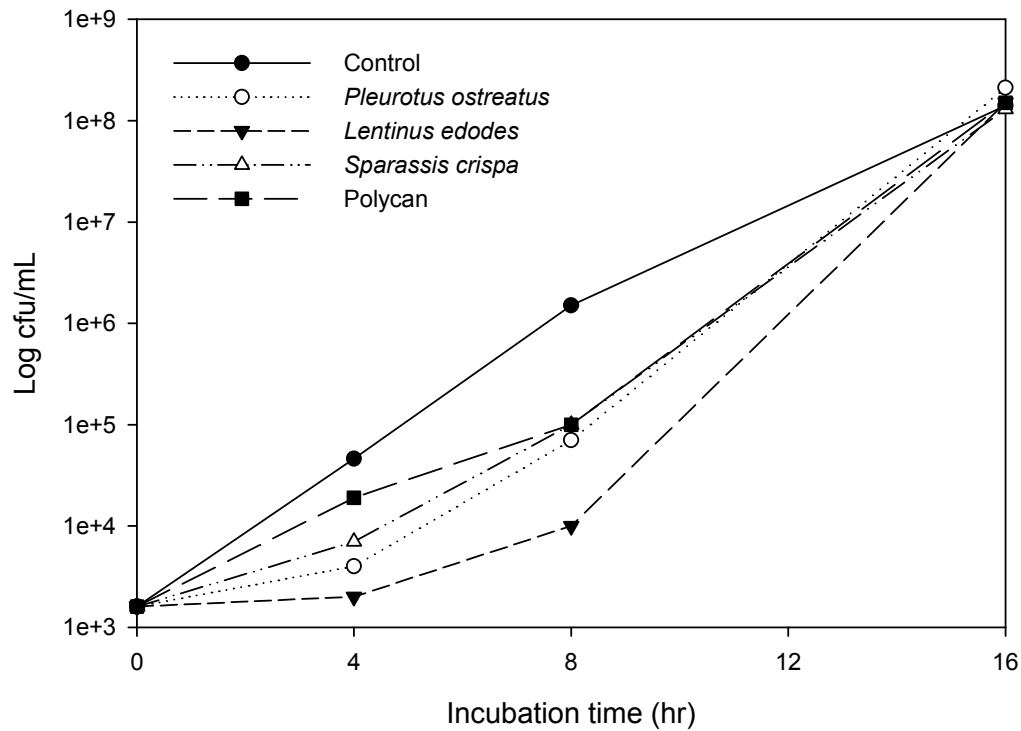


Fig. 53. Prebiotics effect of mushroom extracts on *Bacteroides uniformis*.

#### 5) 시판버섯 추출물의 동물실험

##### 가) 몸무게 측정

실험이 진행되는 기간 동안 rat의 body weight를 측정하였다. 성장기의 쥐이기 때문에 정상의 경우 시간이 지날수록 몸무게의 증가가 나타날 것이 예상되고 실험군 별로 body weight의 변화를 관찰함으로써 고지방식이 미치는 효과와 더불어 버섯의 첨가로 나타나는 효과를 확인하고자 하였다.

시간이 지남에 따라 점차적으로 몸무게가 증가하는 패턴을 보였다. 각 group별로 비슷한 수준으로 몸무게의 증가를 보였고 느타리를 먹인 group을 제외하고는



control보다 몸무게 증가가 적게 나타났다(Fig. 54).

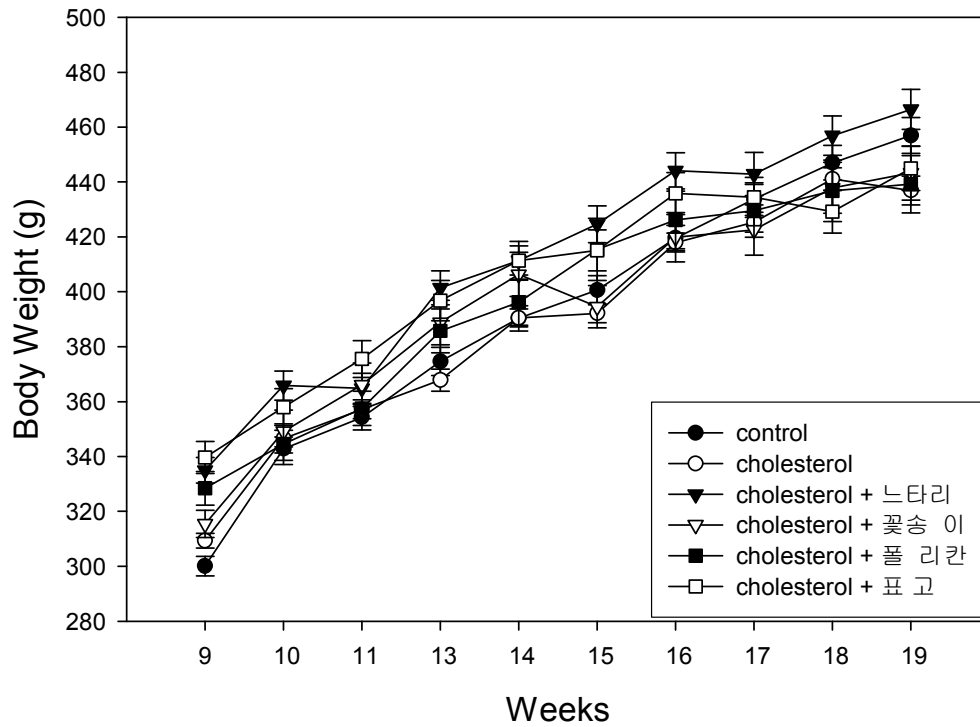


Fig. 54. 고콜레스테롤 식이에 시판버섯 추출물을 첨가한 처리구의 쥐의 무게

#### 나) 혈당량 측정

혈중 glucose의 농도는 혈당계를 이용하여 측정할 수 있다. 고지방식을 지속적으로 유지하였을 경우 생체 내 대사과정에서의 무리가 생기므로 이에 따라 혈당에서도 변화가 초래될 것이라고 보여진다. 쥐에서 blood를 얻은 즉시 혈당계의 strip을 이용하여 각 실험군의 혈당을 측정하였다. 실험을 초기에서 상대적으로 높은 혈당이 측정되었으나 실험을 진행할수록 안정된 수치를 보여, 모든 실험군에서 평균적으로 100-130 mg/dl 내외의 수치를 보였고 group별로 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 55).

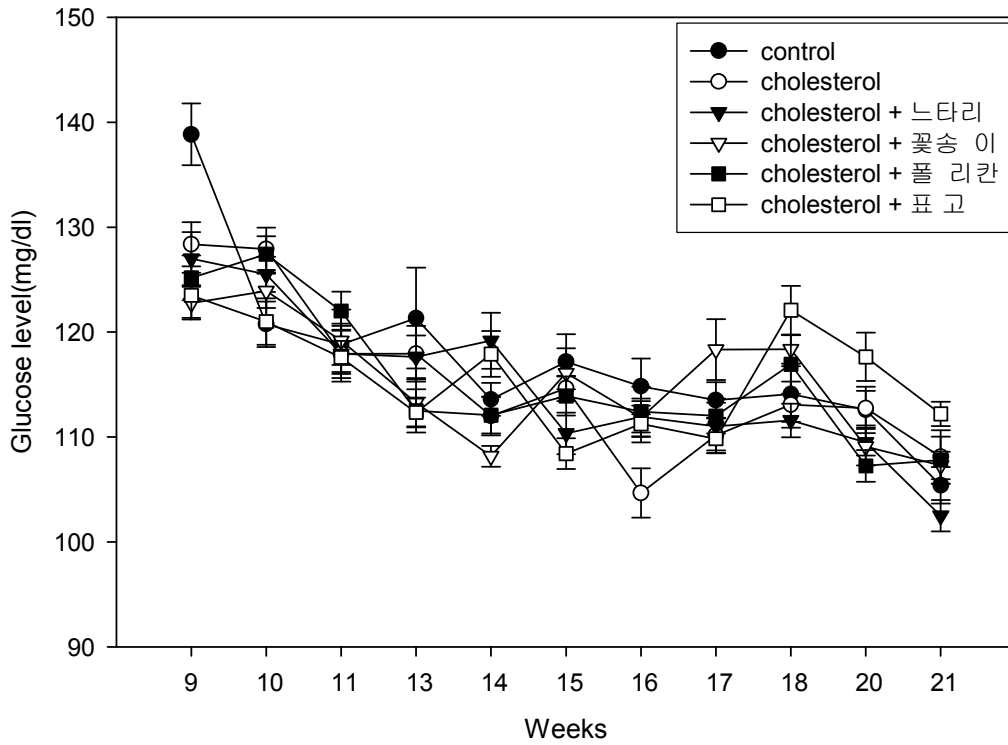


Fig. 55. 고콜레스테롤 식이에 시판버섯 추출물을 첨가한 처리구의 쥐의 혈당

#### 다) 혈중 cholesterol 측정

실험동물을 이용하여 대조군과 고지방식, 고지방식에 버섯을 배합한 사료를 공급하였을 경우 각 실험군에 따른 혈중 total cholesterol 변화를 확인하였다.

Cholesterol로 고지방식을 통해 고지혈증이나 생체 내 대사의 balance가 파괴되거나 불균형을 초래시켰을 때 버섯의 효과를 보고자 한 실험이다. 실험동물을 이용하여 대조군과 고지방식, 고지방식에 각 버섯의 성분을 배합한 사료를 공급하였을 경우 각 실험군에 따른 cholesterol 변화를 확인하였다. 쥐에서 blood를 얻어 이 중 serum만을 분리하여 가수분해 반응을 유도하여 serum내에 존재하는 total

cholesterol이 양을 측정하였다(Fig. 56).

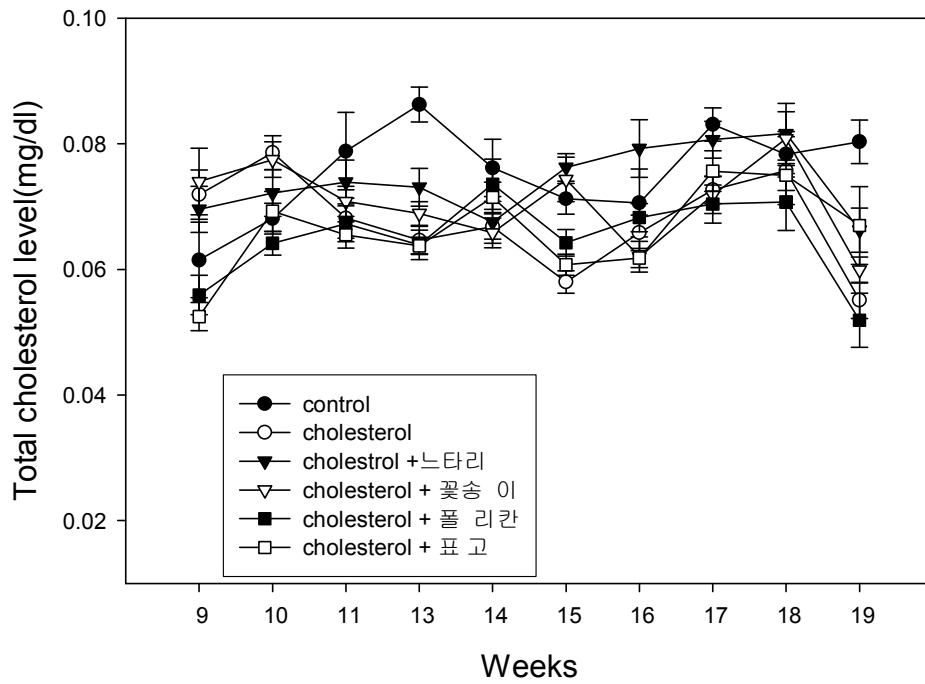


Fig. 56. 고콜레스테롤 식이에 시판버섯 추출물을 첨가한 처리구의 쥐의 total cholesterol.

고지방식에서 각 버섯 성분의 역할을 좀 더 구체적으로 확인하게 위해 HDL level을 측정하였다. total cholesterol과 마찬가지로 assay kit를 이용하여 570nm에서 그 흡광도를 측정함으로써 control과 각 실험군을 비교하였다(Fig. 57).

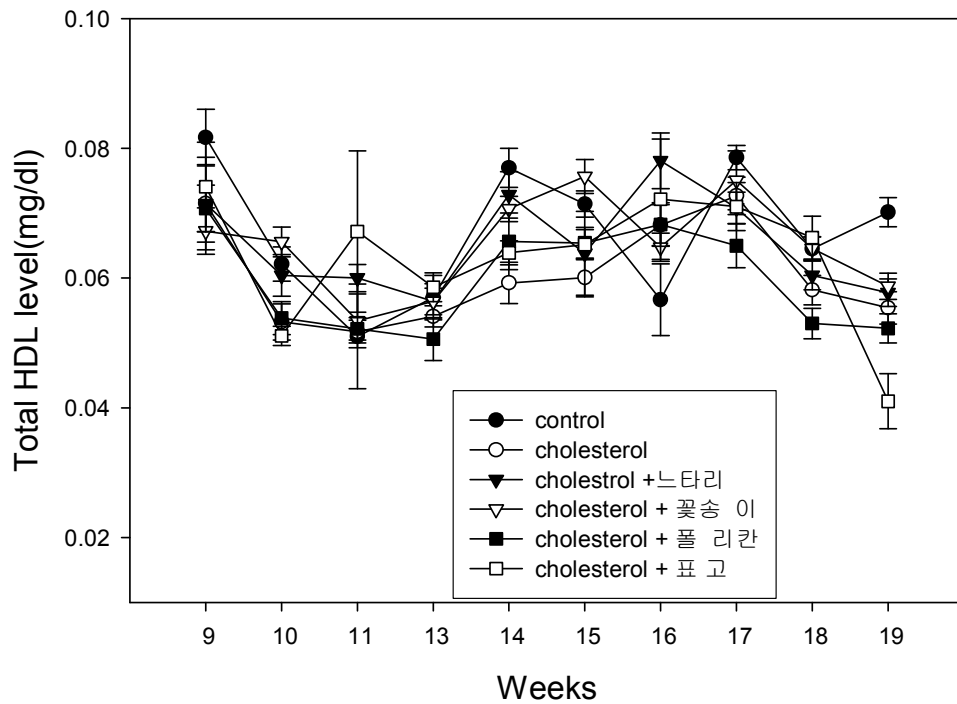


Fig. 57. 고콜레스테롤 식이에 시판버섯 추출물을 첨가한 처리구의 쥐의 HDL.

라) insulin assay

각 버섯 성분을 cholesterol과 함께 배합한 사료를 먹인 쥐에서 혈중 insulin level을 확인해본 결과 큰 수준에서 차이는 나타나지 않음을 알 수 있었다. 이는 insulin 분비와 관련된 세포들의 신호전달 기작이나 실제 insulin을 분비시키는 췌장의 기능 등에는 지속적인 cholesterol의 섭취가 크게 영향을 미치지 않고 있음을 알 수 있었다(Fig. 58).

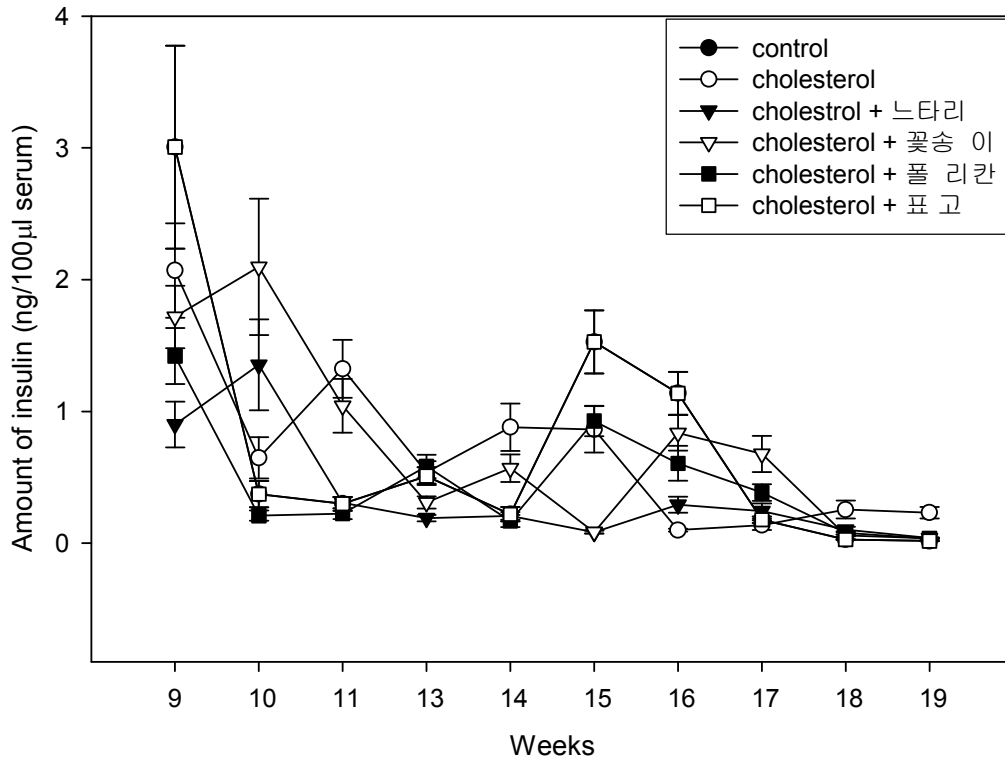


Fig. 58. 고콜레스테롤 식이에 시판버섯 추출물을 첨가한 처리구의 쥐의 insulin.

마) GOT assay

GOT는 간에 존재하고 있을 뿐만 아니라 심장, 신장, 뇌, 근육 등에 포함되어 있는 효소로써 세포가 파괴되면 혈중 농도의 증가가 나타난다. 심근, 골격근, 적혈구에 많이 존재하기 때문에 심근경색, 용혈 등을 진단하는 데 이용된다.

그러나 간경변증, 만성 비활동성 간염 등에서는 이런 수치가 거의 증가하지 않거나 조금 증가 하는 경우가 많다. 건강한 사람의 경우 GOT 가 GPT보다 높는데 질병의 종류나 시기에 따라 역전되기도 하는데, 일반적으로 간에 질병이 있으면 GPT

가 상승하고 GOT 는 심장 질환의 경우에 주로 상승한다고 알려져 있다. Cholesterol 을 통한 고지방식과 버섯의 혼합 사료의 공급이 쥐에게 미치는 전반적인 vital response를 확인코자 GOT level을 측정을 하였으나 처리구간 차이가 적었다.

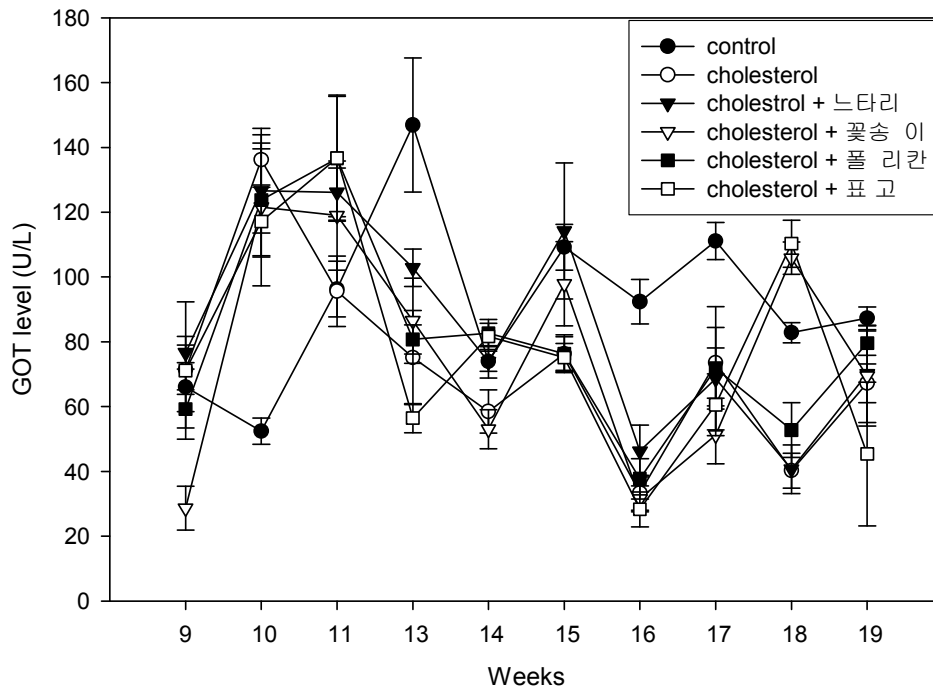


Fig. 59. 고콜레스테롤 식이에 시판버섯 추출물을 첨가한 처리구의 쥐의 GOT.

버섯의 기능성 지표물질을 찾기 위해 느타리버섯, 꽃송이버섯, 표고버섯과 더불어 폴리칸이 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물을 이용해 혈당이나 cholesterol의 변화, body weight 증가율 등을 계속 관찰하였다. 그 결과 몸무게나 혈당의 변화는 각 group별로 큰 차이를 나타나지 않았다. total cholesterol이나 HDL의 경우에는 control이 다른 group에 비해 높게 나타남을 보이지만 실험을 진행한 시기에서 보이는 variation의 범위에 포함되고 있는 수준이어서 차이를 말하기는 힘들다. 혈중

insulin level역시 각 group별로 크게 차이를 보이고 있지는 않았다. 또한 간독성의 지표가 되는 GOT level을 측정한 결과 다른 결과들과 마찬가지로 각 group별로의 수치들이 실험기간동안의 variation범위에 포함되는 수준으로 나타나고 있다.

#### 6) 기능성 인정자료 작성

2종 이상의 국내산 버섯 및 그 가공물의 건강기능성 원료 및 성분 인정을 위한 자료 작성(보고서 제출후 자료작성하여 식약청 제출 예정)

### 제3절 참고문헌

1. Cheung, LM and Cheung PCK, Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry* 89(3): 403-409 (2005)
2. Sun, jie, Hui He, Bi Jun Xie, Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J. Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6646-6652 (2004)
3. Yen, Gow-Chin and Jun-Yi Wu, Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 65(3): 375-379 (1999)
4. Li, L., Ng TB, Song M, Yuan F, Liu ZK, Wang CL, Jiang Y, Fu M, Liu F., A polysaccharide-peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice. *App. Microbiol. Biotechnol.* 9: Epub ahead of print (2007)

5. Jayakumar T., Thomas PA, Geraldine P., Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp. Gerontol.* 42(3): 183–191 (2007)
6. Jayakumar T., Ramesh E, Geraldine P., Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl(4)–induced liver injury in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 44(12): 1989–1989 (2006)
7. Hu, SH., Liang ZC, Chia YC, Lien JL, Chen KS, Lee MY, Wang JC., Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *J. Agric. Food Chem.*, 54(6): 2103–10 (2006)
8. Lai, KN., Chan LY, Tang SC, Leung JC., *Ganoderma* extract prevents albumin–induced oxidative damage and chemokines synthesis in cultured human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol. Dial Transplant* 21(5): 1188–97 (2006)
9. Wong, KL., Chao HH, Chan P, Chang LP, Liu CF., Antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* in acute ethanol–induced heart toxicity. *Phytother. Res.*, 18(12): 1024–6 (2004)
10. Sun, J., He H, Xie BJ., Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Phytother. Res.*, 18(12): 1024–6 (2004)
11. Li, YQ. and Wang SFl., Anti–hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol. Lett* 28(11): 873–41 (2006)
12. Li, YQ., Yang Y, Fang L, Zhang Z, Jin J, Zhang K., Anti–hepatitis activities in the broth of *Ganoderma lucidum* supplemented with a Chinese herbal medicine.



Am. J. Clin. Med., 34(2): 341–9 (2006)

13. Kuznetsov, Olu., Mil'kova EV, Sosnina AE, Sotnikova NI., Antimicrobial action of *Lentinus edodes* juice on human microflora. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol., Jan–Feb(1): 80–2 (2005)

14. Guo, FC., Kwakkel RP, Williams BA, Li WK, Li HS, Luo JY, Li XP, Wei YX, Yan ZT, Verstegen MW., Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on growth performance of broilers. Br. Poult Sci., 45(5): 684–94 (2004)

15. van Novel CJ., Decuypere JA, Dierick N, Molly K., The influence of *Lentinus edodes* (Shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets. Arch. Tierernahr. 57(6): 399–412 (2003)

16. Ngai, PH and Ng, TB, Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus–1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. Life Sci., 73(26) 3363–74 (2003)

17. Hatvani, N., Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. Int. J. Antimicrob Agents 17(1): 71–4 (2001)

18. Shouji, N., Takada K, Fukushima K, Hirasawa M., Anticaries effect of a component from shiitake (an edible mushroom). Caries Res., 34(1): 94–8 (2000)

19. Yoon, SY., Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS., Antimicrobial activity of

*Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. Arch. Pharm. Res., 17(8): 438–42 (1994)

20. Bianco Coletto Ma., Basidiomycetes in relation to antibiosis. II. Antibiotic activity of mycelia and culture liquids. G. Bacteriol. Virol. Immunol., 74(7–12): 267–74 (1981)

21. Yamada, T., Oinuma T, Niihashi M, Mitsumata M, Fujioka T, Hasegawa K, Nagaoka H, Itakura H., Effects of *Lentinus edodes* mycelia on dietary–induced atherosclerotic involvement in rabbit aorta. J. Atheroscler Thromb., 9(3): 149–56 (2002)

22. Fukushima M., Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K, Nakano M., Cholesterol–lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. Exp. Biol. Med., 26(8): 758–65 (2001)

23. Berne S. et al. Biochem Biophys. Acta, 1570(3): 153–9

24. Bobek P. and Galhavy S., The oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) effectively prevents the development of atherosclerosis in rabbits. Ceska. Slov. Farm, 48(5): 226–30 (1999)

25. Reboli K, Batista U, Sepcic K, Cestnik V, Macek P, Frangez R., Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cell viability in vitro. Toxicol., Feb 12: Epub ahead of print (2007)

26. Zhu XL., Chen AF, Lin ZB., *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the

function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *J. Enteropharmacol.*, 111(2): 219–26 (2007)

27. Yue GG., Fung KP, Tse GM, Leung PC, Lau CB., Comparative studies of various *Ganoderma* species and their different parts with regard to their antitumor and immunomodulating activities in vitro. *J. Altern. Complement Med.*, 12(8): 777–89 (2006)

28. Jeong SC., Yang BK, Kim GN, Jeong H, Wilson MA, Cho Y, Rao KS, Song CH., Macrophage–stimulating activity of polysaccharides extracted from fruiting bodies of *Coriolus versicolor* (Turkey Tail Mushroom). *J. Med. Food*, 9(2): 175–81 (2006)

29. Lin YL., Lee SS, Hou SM, Chiang BL., Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1 immune response in BALB/c mice. *Mol. Pharmacol.*, 70(2): 637–44 (2006)

30. Zheng R., Jie S, Hanchuan D, Moucheng W., Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int. Immunopharmacol.*, 5(5): 811–20 (2005)

31. Bae, Man–jong, Kwang–Joong Kim, Soo–Jung Kim and Eun–Ju Ye, Effect of mycelia extracts from *Lentinus edodes* mushroom–cultured *Astragalus membranaceus* Bunge on anti–cancer and anti–allergy activities. *J. Korean Society of Korean Society and nutrition*, 36(1): 8–13 (2007)

32. Frank, JA, Rijin Xiao, Shangong Yu, Ferguson, M, Hennings, LJ, Simpson,

PM, Ronis, MJJ, Nianbai Fang, Badger TM and Simmen FA, Effect of shiitake mushroom dose on colon tumorigenesis in azoxymethane-treated male Sprague-Dawley rats.. Nutrition research 26(3): 138-135 (2006)

33. Wang G, Zhao J, Liu J, Huang Y, Zhong JJ, Tang W., Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo. Int. Immunopharmacol., 7(6): 864-70(2007)

34. Maruyama S, Sukekawa Y, Kaneko Y, Fujimoto S., Anti tumor activities of lentinan and micellapist in tumor-bearing mice. Gan. To. kagaku Ryoho., 33(12): 1726-9

35. Tang W., Liu JW, Zhao WM, Wei DZ, Zhong JJ., Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. Life Sci., 80(3): 205-11

36. Jung KH, Ha E, Kim MJ, Uhm YK, Kim HK, Hong SJ, Chung JH, Yim SV., *Ganoderma lucidum* extract stimulates glucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. Acta Biochem. Pol., 53(3): 597-601 (2006)

37. Hu SH, Wang JC, Lien JL, Liaw ET, Lee MY., Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70(1): 107-13 (2006)

38. Zang HN. and Lin ZB., Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. Acta Phamacol. Sin, 25(2): 191-5 (2004)

39. Yang BK., Kim DH, Jeong SC, Das S, Choi YS, Shin JS, Lee SC, Song CH.,

Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exo-polymer produced from a submerged mycelial culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(5): 937-42 (2002)

40. Chorvathova V., Bobek P, Ginter E, Klvanova J., Effect of the oyster fungus on glycaemia and cholesterolaemia in rats with insulin-dependent diabetes. *Physiol. Res.* 42(3): 175-9 (1993)

41. 김수민, 조영석, 성삼경, 식물체 추출물의 항산화성 및 아질산염 소거작용, *한국식품과학회지*, 33(5):626-632, 2001

42. 이기동, 장학길, 김현구, 버섯류의 항산화성 및 아질산염 소거작용, *한국식품과학회지*, 29(3):432-436, 1997

43. Liu, F., Ooi, V.E.C., and Chang, S.T. Free radical scavenging activities of mushroom polycassharide extracts, *Life Sciences*, 60(10):764-771, 1997

44. 정인창, 박신, 박경숙, 하효철, 김선희, 권용일, 이재성, 느타리버섯 자실체 및 균사체 추출물의 항산화 효과, *한국식품과학회지*, 28(3):464-469, 1996

45. 이준우, 백성진, 방광웅, 강신욱, 강상모, 김병용, 하익수, 목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체 유래  $\beta$ -glucan성 다당류의 생리활성, *한국식품과학회지*, 32(3):726-735, 2000

46. 이승현, 임환미, 김태영, 조남석, 박준성, 유연유, 김무성, *Agaricus blazei* 균사체 배양기술을 통한 효율적인  $\beta$ -glucan의 생산, *한국미생물학회지*, 40(1):54-59, 2004

47. Megazyme International Ireland Ltd. Mixed-linkage  $\beta$ -glucan: assay procedure(McCleary method), 2006

48. Megazyme International Ireland Ltd. Mushroom and yeast  $\beta$ -glucan: assay procedure, 2006
49. Mullins, J.T. Regulatory mechanism of  $\beta$ -glucan synthetases in bacteria, fungi and plants, *Physiological Plantarum*, 78:309-314, 1990
50. McCleary, B.V. and Holmes, M.G. Enzymatic quantification of (1-3),(1-4) $\beta$ -glucan in barley and malt, *J. Institu. Brewing*, 91:285-295, 1985
51. Manzi, P. and Pizzoferrato, L. Beta-glucans in edible mushrooms, *Food Chemistry*, 68: 315-318, 2000
52. Dallies, N., Francois, J. and Paquet, V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 14:1297-1306, 1998
53. Preece, J.A. and McKenzie, K.G. *J. Inst. Brew.*, 58:253, 1952
54. Johansson, L., Virkki, L., Anttila, H., Esselström, H., Tuomainen, P. and Sontag-Stromhn, T. Hydrolysis of  $\beta$ -glucan, *Food Chemistry*, 97:71-79, 2006
55. 김기주, 도정룡, 조진호, 김영명, 김병삼, 임상동, 강석남, 식품부패세균에 대한 가자 추출물의 항균활성, *한국식품과학회지*, 37(3):498-503, 2005
56. 한지숙, 신동화, 식중독 미생물에 대한 큰까치수영의 항균활성, *한국식품과학회지*, 33(6):774-783, 2001

## 제4장 종실류 분야

### Seed Part

협동연구기관명 : 서울산업대학교

협동연구책임자 : 장 판 식

연 구 원 : 이 재 환

연 구 원 : 이 중 혁\*

연 구 원 : 김 철 한\*

연 구 원 : 김 상 우\*

연 구 원 : 신 혜 경\*

위탁연구기관명 : 세종대학교

위탁연구책임자 : 유 상 호

연 구 원 : 성 창 현\*

연 구 원 : 이 병 호\*

## 제1절 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004년)	1. 국산 종실류 내에 존재하는 기능성 성분 탐색	1. 국산 종실류 성분을 <b>탄수화물(위탁연구)</b> , 지방질, 단백질로 구분하여 기능성을 고찰·탐색 2. 기능성 성분 선정을 위한 예비후보 물질 선정
	2. 특유의 기능성 성분을 함유하는 국산 종실류 예비 후보 선정	1. 예비 선정된 기능성 성분을 함유하는 국산 종실류 고찰 및 탐색 2. 특유의 기능성 성분을 함유하는 국산 종실류 후보 선정 3. 선정된 후보 종실류의 수입 농산물과의 차별점 확인
	3. 국산 종실류에 존재하는 특유의 기능성 성분 예비 추출 및 분석	1. 선정된 후보 종실류로부터 기능성 성분 예비 추출 2. 선정된 후보 종실류로부터 기능성 성분 예비 분석
2차년도 (2005년)	1. 예비 선정된 기능성 성분 분석을 위한 기존의 국내외 규격 확인	1. 예비 선정된 기능성 성분 추출을 위한 국내외 기준규격의 확인 2. 예비 선정된 기능성 성분 분석을 위한 국내외 기준규격의 확인 3. 본 실험에서 적용할 추출 및 분석 조건의 선정
	2. 예비 선정된 성분의 기존 기준규격에 의한 추출 및 분석 (생리활성 포함)	1. 선정된 기준 규격에 의한 기능성 성분 추출 (본 실험) 2. 선정된 기준 규격에 의한 기능성 성분 분석 (본 실험) 3. 추출 및 분석시의 단점 탐색 및 trouble shooting 예비조건 확립
	3. 기존의 추출 및 분석 조건의 단점 보완 (생리활성 포함)	1. 선정된 기준 규격에 의한 기능성 성분 추출시 trouble shooting 조건 규명 및 확립 2. 선정된 기준 규격에 의한 기능성 성분 정량분석시의 trouble shooting 조건 규명 및 확립 3. 기능성 성분 추출 및 분석을 위한 기존의 규격을 보완하는 방안의 완성
3차년도 (2006년)	1. 단점을 보완한 새로운 기준 예비 규격안을 확립	1. 국산 종실류 특유의 기능성 성분 추출을 위한 새로운 기준 예비 규격안 확립 2. 국산 종실류 특유의 기능성 성분 정량분석을 위한 새로운 기준 예비 규격안 확립
	2. 생리활성 확인을 통한 새로운 기준 규격안 확립	1. 국산 종실류 특유의 기능성 성분 추출을 위한 새로운 기준 규격안 확증을 위한 보충실험 2. 국산 종실류 특유의 기능성 성분 정량분석을 위한 새로운 기준 규격안 확증을 위한 보충실험 3. 추출 및 분석을 위한 새로운 기준규격안 완성
	3. 특유의 기능성을 가진 국산 종실류 가공물의 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료 작성	1. 특유의 기능성을 가진 국산 종실류 가공물 제시 2. 수입 농산물과 차별화된 기능성 성분을 함유한 국산 종실류 가공물의 건강기능식품 원료 인정을 위한 식약청 제출 자료 작성



## 제2절 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 기능성 지방 소재

#### 가. 기능성 성분 선정을 위한 예비후보 물질 선정

전문서적, 인터넷, 관련 국내·외 학술논문, 전문가와의 토론 등을 거쳐 국산 종실류에 존재하는 기능성 성분을 검색하였다.

#### 1) 특유의 기능성 성분을 함유하는 국산 종실류 예비 후보 선정

##### 가) 기능성 성분 함유 우리 농산물 종류 선정

국산 농산물의 선정은 위에서 선정된 기능성 물질을 함유하면서 동시에 국내의 농가에서 재배하는 농산물을 위주로 선정하였다. 선정기준은 다음과 같다.

- (1) 기능성 물질의 함유여부
- (2) 국내 생산 여부
- (3) 식용의 안전성
- (4) 가공식품 응용 가능성
- (5) 산업·경제적 파급효과
- (6) 문화적 파급효과

##### 나) 선정된 후보 종실류의 수입 농산물과의 차별점 확인

선정 종실류의 주요 수입국으로부터의 수입현황을 농림부 통계자료를 통해 파악하였다.

## 2) 국산 종실류에 존재하는 특유의 기능성 성분 예비 추출 및 분석법 탐색

### 가) 선정된 후보 종실류로부터 기능성 성분 예비 추출

#### (1) 기능성 성분 예비 추출 방법 탐색 및 선정

(2) 선정 종실류로부터 다양한 극성도를 갖는 용매 추출법으로 선정 기능성 물질 추출 시도

### 나) 선정된 후보 종실류로부터 기능성 성분 예비 분석

선정된 후보 종실류로부터 예비 추출된 물질에서 노화 및 질병을 막을 수 있는 기능성을 탐색을 위해 다음과 같은 예비 분석 실험을 수행하였다.

#### (1) DPPH에 대한 전자공여능 측정을 통한 극성 물질의 항산화능 검정

DPPH는 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl로서 자유라디칼(free radical)의 일종이다. DPPH는 질소원자가 라디칼로 존재하며 515-517 nm의 빛에너지를 흡수한다. 주로 페놀계통의 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 비라디칼(non-radical)이 되면 515-517 nm의 흡광도가 비례하여 감소하게 되며 이를 측정하면 전자공여능을 알 수 있다. 전자공여능은 산화기작 중 수소공여의 항산화 기작으로 이용될 수 있어 간접적인 항산화능 측정법으로 사용될 수 있다.

#### (2) 리놀레산(linoleic acid)을 이용한 비극성 물질의 항산화능 검정

기존 기능성 물질은 대부분 극성을 갖고 있으며 물(water)이나 메탄올(methanol)을 이용하여 추출된다. 이들의 항산화성은 기존의 DPPH법에 의해 측정 가능하나 비극성을 띠는 물질의 항산화성을 측정하기에는 DPPH법은 한계가 있다. 이를 극복하기 위해 식물성 기름에 많이 존재하며 필수지방산인 linoleic acid를 이용한 새로운 비극성 물질의 항산화능 측정법을 개발하여 본 연구에 적용하였다. Linoleic acid를 일정시간(18시간) 및 고온의 일정온도(93℃)아래에 유지하면 비공액형(non-conjugated structure)이 공액형 이중결합(conjugated diene structure)으로 변한다. CDA(conjugated dienoic acid) 수치를 측정할 수 있다.

(3) 암세포주를 이용한 항암 기능성 검정법 탐색

- (가) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay
- (나) 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining
- (다) Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) assay
- (라) RT-PCR
- (마) Caspase-3 enzyme assay

3) 지질 유래 기능성 물질

가) 지방질은 탄수화물, 단백질과 더불어 식품을 구성하는 가장 중요한 3대 영양성분 중 하나이다. 지방질을 정의하는 것은 쉽지 않으나 일반적으로 물에는 거의 녹지 않으나 유기용매인 아세톤(acetone), 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 석유에테르(petroleum ether), 사염화탄소(carbon tetrachloride) 등에 녹는 소수성(hydrophobicity)이 강한 물질을 의미한다. 지방질에는 지방산(fatty acids) 및 지방산의 유도체(derivatives), 스테로이드(steroids), 터어핀(terpenes) 및 카로티노이드(carotenoids)까지도 포함되며 이들은 탄소와 수소를 주로 많이 갖고 있으며 극성기를 유도하는 전자음성도가 큰 원자들은 상대적으로 적은 수를 갖고 있다. 예를 들어 동식물성 유지에서 발견되는myristic acid(14:0), palmitic acid(16:0), stearic acid(18:0)의 경우 각각 14, 16, 18개의 탄소를 갖고 있으며 산소의 수는 2개에 불과하므로 전체적으로 비극성을 띠게 되어 물에 녹지 않는다. 반면에 일부 지질성분은 극성기를 많이 갖고 있는데 인지질(phospholipid)과 당지질(glycolipid)을 예로 들 수 있다. 이들은 소수성과 친수성이 동시에 존재하는 양친매성 분자로서 표면 활성력이 있어 계면활성제 등으로 사용 가능하다.

지질의 특징을 기본으로 갖는 물질 중 기능성을 나타내는 소재로 각광을 받고 있는 물질로는 다가 불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA), 공액리놀레산(conjugated linoleic acid, CLA), 레시틴(lecithin) 및 식물스테롤(phytosterol)등을 예

로 들 수 있다. 이밖에 구조지질(structured lipid)과 지방대체물(fat substitutes)도 저칼로리 조절 지방소재 기능성 물질로서 연구되고 있다.

PUFA에는  $\omega$ -3 PUFA에 속하는 docosahexaenoic acid(DHA), eicosapentaenoic acid(EPA) 그리고  $\alpha$ -linolenic acid를 들 수 있고  $\omega$ -6 PUFA로서는 arachidonic acid,  $\omega$ -linolenic acid(GLA) 및 linoleic acid 등을 예로 들 수 있다. 기능성 지질소재는 일반적으로 지방이 관련된 질병에 긍정적인 예방효과를 보이는데 대표적인 생리활성 효과로는 혈중 콜레스테롤 수치저하, 동맥경화 및 심혈관질환 예방 등을 들 수 있고 또한 혈전 예방, 항염증, 항암 등의 작용을 하는 기능성 지질소재도 알려지고 있다.

나) 특유의 기능성 성분을 함유하는 국산 종실류 예비 후보 선정

(1) 연구대상 종실류 및 건강기능성 지방성분 선정

최근 유리라디칼(free radical)이나 기타 산화생성물이 지방질, 단백질, 핵산 등에 산화적 변화를 유발하여 궁극적으로 노화, 각종 암이나 관절염 등의 질병을 유발한다는 과학적 연구결과들이 밝혀지고 있다. 이들 산화물들을 제거하는 물질로 색소를 지닌 식물유래 물질들, 예를 들어 flavones, anthocyanins, isoflavones, catechins, epicatechin 등의 phytochemicals이 peroxy radical을 제거하여 산화적 유해를 감소시킬 수 있음이 보고되고 있다.

최근 검은색 안토시아닌(anthocyanins) 식품이 각광받고 있다. 안토시아닌(anthocyanins)은 일반적으로 식물체의 액포 또는 세포질에 배당체 형태로 존재하나, 가수분해 되면서 당이 제거된 aglycone인 안토시아닌으로 생성된다. 알려진 생리활성기능으로는 콜레스테롤 저하, 시력개선 효과, 혈관보호, 심장병 예방, 항산화, 항궤양, 항암, 항염증, 동맥경화, 심장병 예방, 당뇨억제 등의 효과가 있다. 검은깨에는 리그난(lignan)의 일종인 세사몰(sesamol)과 세사민(sesamin)이란 물질이 항산화성을 나타내면서 천연 항산화제로서의 효능을 가지는 것으로 알려져 있고 검은콩에는 아이소플라본(isoflavone) 성분에 의해 항산화작용 및 노화억제, 콜레스테롤 저하, 골다공증 예방효과와 피트산(phytic acid)에서는 심혈관질환 예방의 효과를 볼 수 있다. 또한 레시틴(lecithin)의 유화능, 항산화, 보습성의 기능으로 건강보조식품, 영양강화

식품, 화장품 등의 산업적인 용도로도 쓰이고 있다. 대두나 깨 속에는 다량의 plant sterol이 함유되어 있으며 이들 phytosterol은 콜레스테롤과 유사한 구조를 갖고 있어 섭취 시 체내의 콜레스테롤 수치를 낮추어 주는 기능이 있는 것이 보고되고 있다.

검은콩의 실험쥐를 대상으로 한 연구에서 대장암(colon cancer) 발생을 억제한다는 연구결과가 발표되었고 실험용 쥐의 연골과 말초피세포에서 DNA damage를 억제하는 역할을 하는 것으로도 보고되었다. 깨 속에는 항산화물질 등이 존재하며 검은깨가 항산화 활성물질을 함유하고 있다는 것이 확인되었다. 또한 볶은 깨나 볶지 않은 깨 속에 free phytosterol 및 esterified phytosterol의 함량이 다량 포함되어 있다.

이와 같은 탐색 결과를 통해 검은콩(*Phaseolus vulgaris*)과 검은깨(*Sesamun indicum L.*)를 선별하였으며 땅콩씨(peanut seed), 너트류(nuts)를 추가로 선정하여 각각의 lysolecithin, phytochemicals에 대한 기능성 물질의 탐색을 연구하였다.

다) 국산 종실류에 존재하는 특유의 기능성 성분 예비 추출 및 분석

(1) 지방질 기능성 성분 탐색 및 예비추출·분석

(가) 다양한 극성도를 갖는 용매 추출법으로 선정된 기능성 물질의 추출 시도

문헌을 참조하여 용매의 종류를 결정하였다. 극성 용매, 비극성 용매 및 이들의 mixture를 통해 극성도를 달리한 용매를 제조하여 추출물에서 기능성 성분이 최대로 추출될 수 있도록 연구하였다. 극성 용매로는 methanol을 이용하여 극성 기능성 물질의 추출을 시도하였으며, 비극성 용매로는 *n*-hexane을 이용하였고, 극성을 갖는 비극성 용매 혼합물로는 chloroform:methanol(2:1, v/v)을 이용하여 극성을 갖는 지질을 추출하고자 하였다.

① 극성용매로는 methanol을 이용하여 극성 기능성 물질의 추출

국산 검정콩과 검은깨(창동 농협, 하나로마트)과 중국산 검은콩(경동시장)과 중국산 검정깨(가락시장)를 구입하였다. 마쇄한 시료 100 g에 methanol 400 mL를 첨가 후 25°C에서 stirring 12시간 처리하였다. 처리 후 filter paper를 이용하여 추

출액을 분리한 후 rotary evaporator를 이용하여 60℃에서 1시간 건조 후 25℃에서 질소가스 아래 1시간 동안 건조 시켰다. 각 시료는 3회 반복 하였다.

② Chloroform:methanol(2:1, v/v) mixture 용매 추출

마쇄한 시료 100 g에 chloroform:methanol(2:1, v/v) mixture 400 mL를 섞은 후, Soxhlet 기구를 이용하여 70℃에서 10시간 처리 후 rotary evaporator를 이용하여 60℃에서 1시간 건조 후 25℃에서 질소가스 아래 1시간 동안 건조 시켰다. 각 시료는 3회 반복 하였다.

③ *n*-Hexane 용매 추출

Chloroform:methanol(2:1, v/v) mixture 용매 추출 방법과 동일한 방법을 이용하였다. 각 시료는 3회 반복 하였다.

(나) 선별된 검은콩과 검은깨 추출물의 항산화성 측정

① DPPH법을 이용한 수소공여능 측정법 확립

DPPH를 methanol에 용해시켜 0.05 mM 농도로 제조한 후 3.75 mL DPPH 용액에 측정하고자 하는 methanol 추출물 0.25 mL 섞은 후 암실에서 30분간 반응 시켰다. 반응된 시료를 UV-Vis spectrometer를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 잘 알려진 합성 항산화제인 BHT의 calibration curve (Fig. 2)를 이용하여 methanol 추출물의 수소공여능을 나타내었다.

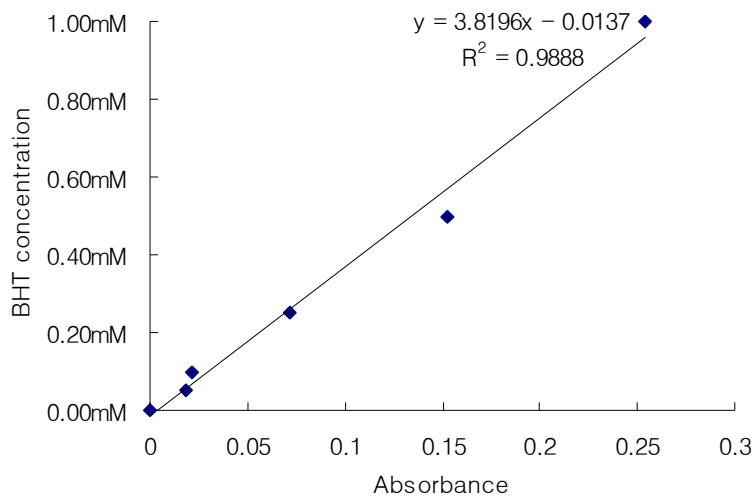


Fig. 2. BHT-calibration curve on DPPH free radical scavenging.

② 용매 추출물의 항암 기능성 측정법 확립

용매 추출물의 항암능을 탐색하기 위하여 암세포 종류를 대장암 세포, human colon cancer cells SNU-C4와 위암세포, human gastric cancer cells SNU-688 등을 선정하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay, 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) staining 및 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) assay, RT-PCR, caspase-3 enzyme assay 등을 선별하였다.

㉔ MTT assay의 원리

세포의 세포독성 및 세포생존율을 알 수 방법으로, MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)라는 염색액을 세포에 처리하면 살아있는 세포에 파란색으로 염색이 되고, DMSO(dimethylsulfoxide)로 염색된 세포의 염색액을 추출하여 ELISA reader로 540 nm에서 측정하면, 세포의 생존율을 알 수 있다. 이러한 방법은 암세포의 항

암능을 관찰할 때 처리한 약물의 세포 내의 독성을 관찰하여 세포주가 50-60% 정도 생존하는 약물의 농도를 취하여 약물의 apoptosis 관련실험을 수행한다.

㉔ DAPI staining의 원리

4,6-Diamidino-2-phenylindole(DAPI)라는 형광물질을 이용하여 암세포의 apoptosis시에 나타나는 DNA 변형을 관찰한다.

㉕ TUNEL assay의 원리

Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) assay는 apoptosis 관련 실험시에 자주 이용되는 방법으로 apoptosis가 일어난 세포에 dUTP에 label하여 diaminobenzidine(DAB)이라는 발색제를 이용하여 발색한다.

㉖ RT-PCR의 원리

Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)은 세포주에서 total RNA를 추출하여 역으로 상보적인 cDNA을 얻어 apoptosis에 관련된 유전자들을 PCR을 이용하여 증폭하여 이들의 발현정도를 비교한다.

㉗ Caspase-3 enzyme assay의 원리

항암능을 이루는 주요 경로인 caspase-3 pathway 연구를 위하여 세포주로부터 단백질을 추출하여 그 단백질 내의 caspase-3 효소발현을 ELISA reader로 측정한다.



## 나. 선정된 증실류의 기능성 성분 탐색 및 추출 분석

### 1) 지방질 기능성 성분 탐색 및 추출 수율

가) Methanol, chloroform:methanol(2:1, v/v) 혼합용매, *n*-hexane 용매에 의한 추출 수율은 Table 2에 나타내었다. 검은콩의 경우 methanol과 chloroform:methanol(2:1, v/v) 혼합 추출용매의 추출수율이 중국산 검은콩보다 높았으나 *n*-hexane 추출물의 수율은 중국산이 높았다. 검은깨의 경우 모든 용매 추출물의 수율이 중국산이 높았다.

Table 2. 국산과 중국산 검은콩과 검은깨의 용매 추출수율(단위: %)

	국산 검은콩	중국산 검은콩	국산 검은깨	중국산 검은깨
Methanol	6.72	6.40	2.96	3.41
Chloroform:methanol (2:1, v/v)	15.19	12.22	40.23	41.06
<i>n</i> -Hexane	7.18	12.18	34.2	35.82

### 2) 선별된 검은콩과 검은깨 추출물의 항산화, 항암 실험 및 분석

#### 가) 검은콩과 검은깨 메탄올 추출물의 기능성

##### (1) DPPH법을 이용한 수소공여능 측정법 확립

DPPH를 methanol에 용해시켜 0.05 mM 농도로 제조한 후 3.75 mL DPPH 용액에 측정하고자 하는 methanol 추출물 희석액을 0.25 mL를 섞은 후 암실에서 30분간 반응시킨다. 반응된 시료를 UV/VIS-spectrometer를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정한다. 잘 알려진 합성 항산화제인 BHT의 수소공여능을 이용하여 methanol 추

출물의 수소공여능을 나타내었다.

DPPH free radical scavenging activity 측정 결과를 추출물 1 mg과 추출수율에 따라 환산하여 100 g의 종실이 가지고 있는 소거능을 BHT당량으로 환산하여 Table 3에 나타내었다.

Table 3. 국산과 중국산 검은콩과 검은깨 메탄올 추출물의 자유기 소거능

	자유기 소거능(mM BHT)	
	추출물 1 mg 당량	종실 100 g 당량
국산 검은콩	0.297	19.956
중국산 검은콩	0.187	12.000
국산 검은깨	0.317	9.375
중국산 검은깨	0.207	7.045

검은콩의 경우 추출물 1 mg 당 국산이 중국산에 비하여 158% 높은 활성을 나타내었고, 100 g 종실의 경우에는 166% 높았다. 검은깨의 경우 추출물 1 mg 당 국산이 중국산에 비하여 153% 높은 활성을 나타내었고, 100 g 종실의 경우에는 133% 높았다.

#### (2) 메탄올 추출물의 항암성 측정

용매 추출물의 항암성을 탐색하기 위하여 암세포 종류를 유방암세포(MCF-7), 위암세포(SNU-688), 전립선암세포(PC-3) 그리고 결장암세포(HT-29) 등을 선정하여 3-(4, 5-dimethylthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 통하여 기능성을 확인하였다.

각 암세포의 배지에 각 추출물의 농도를 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/250로 희석하여 배양한 후 결과를 측정하였다. 추출물이 1/50(20 mg/mL)의 농도로 희석된

배지의 세포생존율을 Table 4에 나타내었다. HT-29에서는 중국산 검은콩과 검은깨가, PC-3에서는 국산 검은콩과 국산 중국산 검은깨가, MCF-7에서는 국산 중국산 검은콩과 검은깨가, SNU-688에서는 중국산 검은콩과 국산 중국산 검은깨가 cell viability에 효과적인 것으로 나타났다.

Table 4. 메탄올 추출물 20 mg/mL 농도의 배지에서 세포 생존율 단위(%)

	국산 검은콩	중국산 검은콩	국산 검은깨	중국산 검은깨
HT-29	77.3	47.4	58.1	14.4
PC-3	65.4	71.9	33.2	10.8
MCF-7	35.0	52.1	3.5	8.8
SNU-688	80.8	27.0	12.5	45.9

그 밖에 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/250의 농도로 추출물이 희석된 배지의 세포독성실험결과는 Fig. 3에 나타내었다. 각 추출물들은 농도에 따라 세포에 미치는 영향이 다르다. 그렇기 때문에 각각의 세포에 따라 생존율이 50-60%정도 되는 농도를 기준으로 MTT assay 이외의 항암실험이 필요하다.

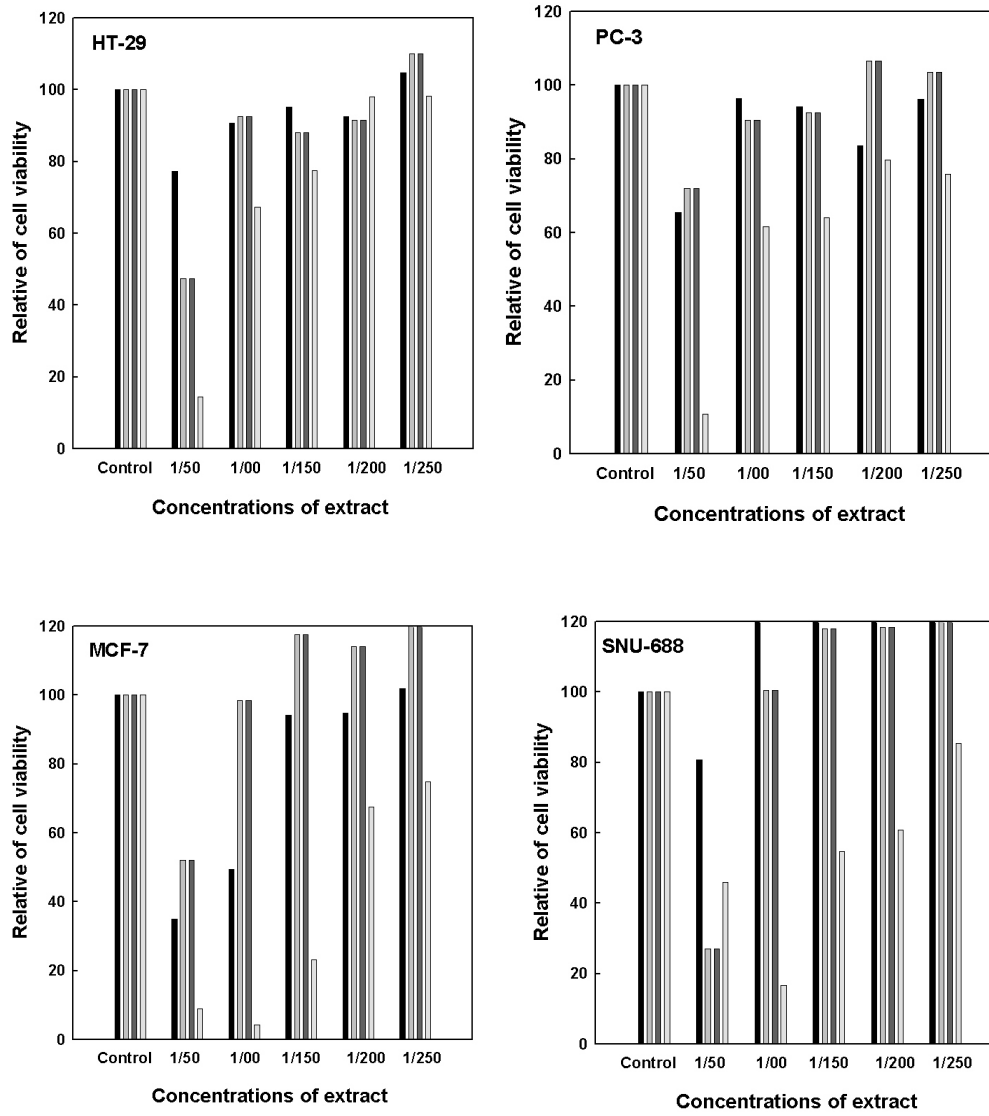


Fig. 3. 세포생존율에 대한 추출물의 영향.

(■: 국산 검은콩, ■: 중국산 검은콩, ■: 국산 검은깨, ■: 중국산 검은깨)

## 나) 종실류의 혼합용매 추출물

혼합용매 추출물의 극성은 완전 극성이거나 비극성이 아닌 중극성으로 다양한 물질이 혼재되어 있다. 이 물질들을 극성에 따라 분획을 하여 얻은 분획 추출물을 이용하여 그 중 기능성이 있는 분획을 중심으로 종실류의 기능성을 규명하려 한다.

### (1) 분획

혼합용매 추출물의 분획실험은 용매의 극성을 이용한 liquid chromatography fraction method를 사용하였다. 20 mm 지름의 30 cm 유리 컬럼에 실리카겔 충전제 Kieselgel 60(Merck, Darmstadt, Germany) 15 g을 *n*-hexane으로 적시어 기포가 발생하지 않도록 충전한 후 분획할 시료를 검은콩 추출물은 4 g, 검은깨 추출물은 5 g을 *n*-hexane 10 mL로 녹여 loading 하였다. *n*-Hexane 30 mL로 한번 전개시킨 후 Table 5와 같은 순서로 용매를 30 mL씩 순서대로 전개시켜 분획을 회수하였다.

Table 5. Solvent for fraction

Order	전개 용매
1	<i>n</i> -Hexane
2	<i>n</i> -Hexane:butanol=1:1(v/v) mixed solvent
3	Butanol
4	Butanol:ethylacetate=1:1(v/v) mixed solvent
5	Ethylactate
6	Ethylactate:methanol=1:1(v/v) mixed solvent
7	Methanol

## (2) 농축 및 스펙트럼 측정

위 과정을 통해 얻은 분획을 10배(v/v) 희석하여 UV/VIS spectrometer을 이용하여 200-900 nm에서의 스펙트럼을 측정했다. 스펙트럼 측정 후 nitrogen gas flow를 이용하여 용매를 날려 버려 농축한 후 수율과 회수율을 알아보았다. 이 분획들의 수율과 회수율 이름은 Table 6과 같다. 이중 스펙트럼 양상과 peak의 위치가 같은 분획들은 같은 물질로 보아 이를 합쳤으며, 별다른 peak가 없는 분획들은 특정 물질이 없는 것으로 가정한 결과, 검은콩의 경우는 1, 2번 분획, 3번 분획, 4, 5, 6번 분획, 그리고 7번 분획으로 정리할 수 있었으며, 검은깨의 경우는 1번 분획, 2, 3번 분획, 4, 5, 6번 분획, 그리고 7번 분획으로 정리할 수 있었으며 분획의 분류는 Table 7에 정리하였고 각각 분획의 수율은 Table 8에 나타내었다. Fig. 4는 국산 검은콩의 분획의 스펙트럼을 나타낸 것이다.

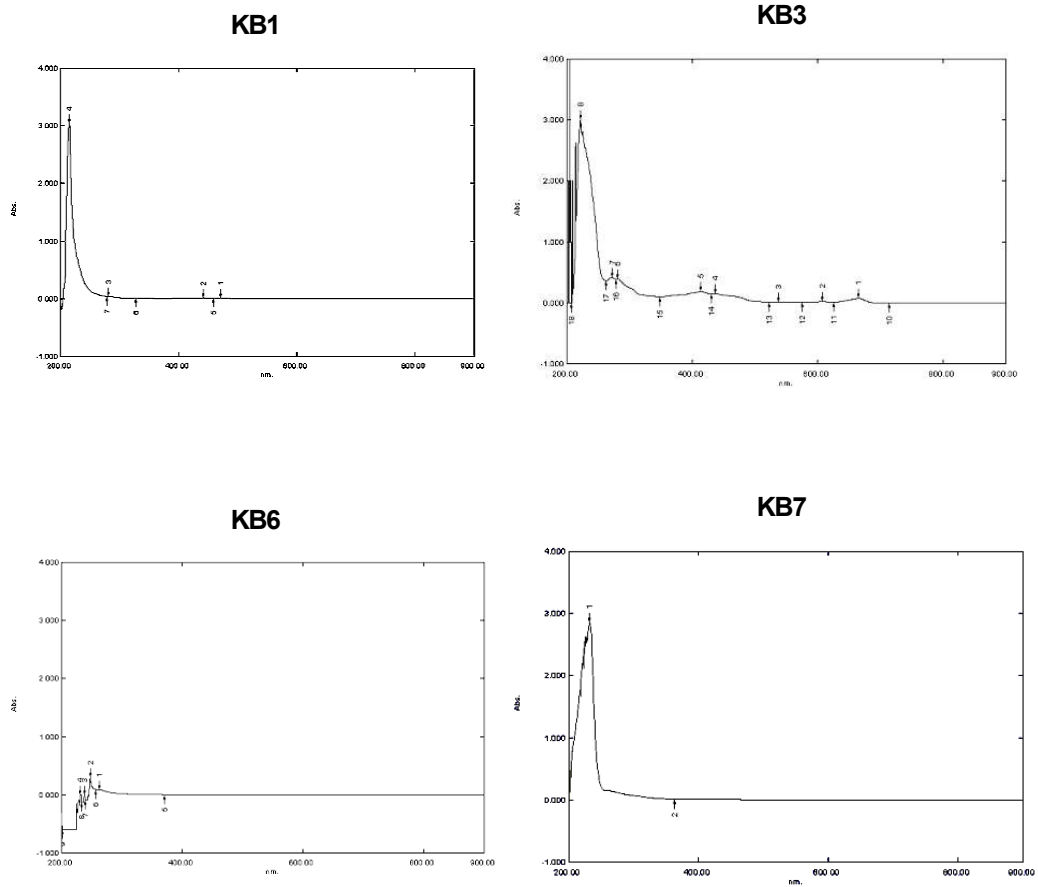


Fig. 4. UV/VIS–spectrums of KB fractions.

Table 6. 검은콩 및 검은깨의 유기용매 분획 수율과 회수율

Seed type	Black soybean				Black sesame seed			
	Korea		China		Korea		China	
Fraction number								
1	KB1	1.043	CB1	1.102	KS1	1.711	CS1	1.601
2	KB2	0.201	CB2	0.165	KS2	1.960	CS2	2.146
3	KB3	2.513	CB3	2.433	KS3	0.010	CS3	0.011
4	KB4	0.002	CB4	0.001	KS4	0.005	CS4	0.005
5	KB5	0.000	CB5	0.000	KS5	0.033	CS5	0.00
6	KB6	0.012	CB6	0.001	KS6	0.064	CS6	0.113
7	KB7	0.056	CB7	0.013	KS7	0.022	CS7	0.023
Total(g)	3.827		3.715		3.805		3.899	
Retrieval rate(w/w)	95.68%		92.88%		76.10%		77.98%	



Table 7. 검은콩 및 검은깨의 유기용매 분획 분류

Seed type	Black soybean				Black sesame seed			
	Korea		China		Korea		China	
The place of origin								
1	<b>FKB</b> <b>1</b>	KB1,2	<b>FCB1</b> CB1,2	<b>FKS1</b> KS1		<b>FCS</b> <b>1</b>	CS1	
2	<b>FKB</b> <b>2</b>	KB3	<b>FCB2</b> CB3	<b>FKS2</b> KS2,3		<b>FCS</b> <b>2</b>	CS2,3	
3	<b>FKB</b> <b>3</b>	KB4,5,6	<b>FCB3</b> CB4,5,6	<b>FKS3</b> KS4,5,6		<b>FCS</b> <b>3</b>	CS4,5,6	
4	<b>FKB</b> <b>4</b>	KB7	<b>FCB4</b> CB7	<b>FKS4</b> KS7		<b>FCS</b> <b>4</b>	CS7	

Table 8. 검은콩 및 검은깨의 유기용매 분획 수율

Kind of Seed	Black soybean				Black sesame seed			
	Korea		China		Korea		China	
The place of origin								
1	<b>FKB</b> <b>1</b>	1.244	<b>FCB1</b> 1.267	<b>FKS1</b> 1.711		<b>FCS</b> <b>1</b>	1.601	
2	<b>FKB</b> <b>2</b>	2.513	<b>FCB2</b> 2.433	<b>FKS2</b> 1.970		<b>FCS</b> <b>2</b>	2.157	
3	<b>FKB</b> <b>3</b>	0.014	<b>FCB3</b> 0.002	<b>FKS3</b> 0.102		<b>FCS</b> <b>3</b>	0.118	
4	<b>FKB</b> <b>4</b>	0.056	<b>FCB4</b> 0.013	<b>FKS4</b> 0.022		<b>FCS</b> <b>4</b>	0.023	
Total (g)		<b>3.827</b>	<b>3.715</b>	<b>3.805</b>		<b>3.899</b>		
Retrieval rate (w/w)		<b>95.68%</b>	<b>92.88%</b>	<b>76.1%</b>		<b>77.98%</b>		

(3) 향산화 실험

분획들의 향산화력은 CDA value 측정을 통해 측정하였다. 60% 리놀레산(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 1 g에 FKB1, 2, FCB1, 2, FKS1, 2, FCS1, 2를

각각 40,000 ppm의 농도로, FKB4, FCB4, FKS4, FCS4는 500 ppm을 희석한 후 93℃에서 3시간 동안 열산화를 유도한 후에 CDA를 측정하였다. 결과를 Fig. 5의 BHT standard curve를 이용하여 BHT 당량으로 표현하여 Fig. 5, Fig. 6과 Table 9에 나타내었다. 전체적으로 1번 분획물은 약간의 항산화력을 가지고 있거나 미약하였고, 2번 분획물은 강한 항산화력을 가졌다. 그리고 4번 분획물은 경우에 따라 항산화력의 차이가 크게 나타났으며, 중점적으로 연구하고 있는 지용성 물질과는 다소 거리가 있기 때문에 이 물질을 제외하고, 가장 강한 항산화력을 보인 2번 분획물을 중심으로 연구하기로 한다.

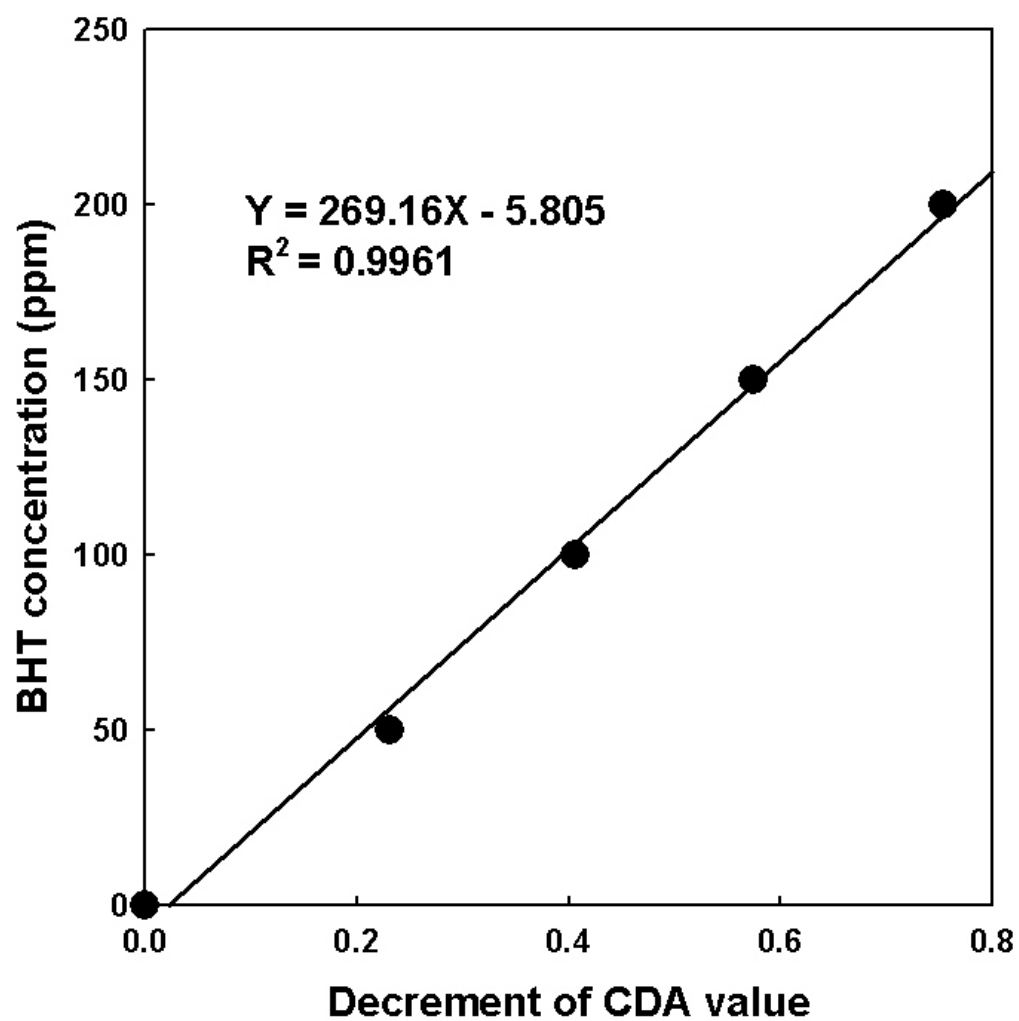


Fig. 5. CDA를 이용한 BHT standard curve.

Table 9. 검은콩 및 검은깨의 유기용매 분획들의 항산화력

Fraction number	Amount of fraction in 100 g seed (g)	Antioxidant activity of 100 g seed (ppm BHT)
FKB1	4.724	5,626
<b>FKB 2</b>	<b>9.543</b>	<b>21,480</b>
FKB4	0.213	2,446
FCB1	3.871	951
<b>FCB2</b>	<b>7.433</b>	<b>22,110</b>
FCB4	0.040	965
FKS1	13.767	3,895
<b>FKS2</b>	<b>15.851</b>	<b>42,158</b>
FKS4	0.177	16,213
FCS1	13.147	22,451
<b>FCS2</b>	<b>17.713</b>	<b>56,053</b>
FCS4	0.189	55,214

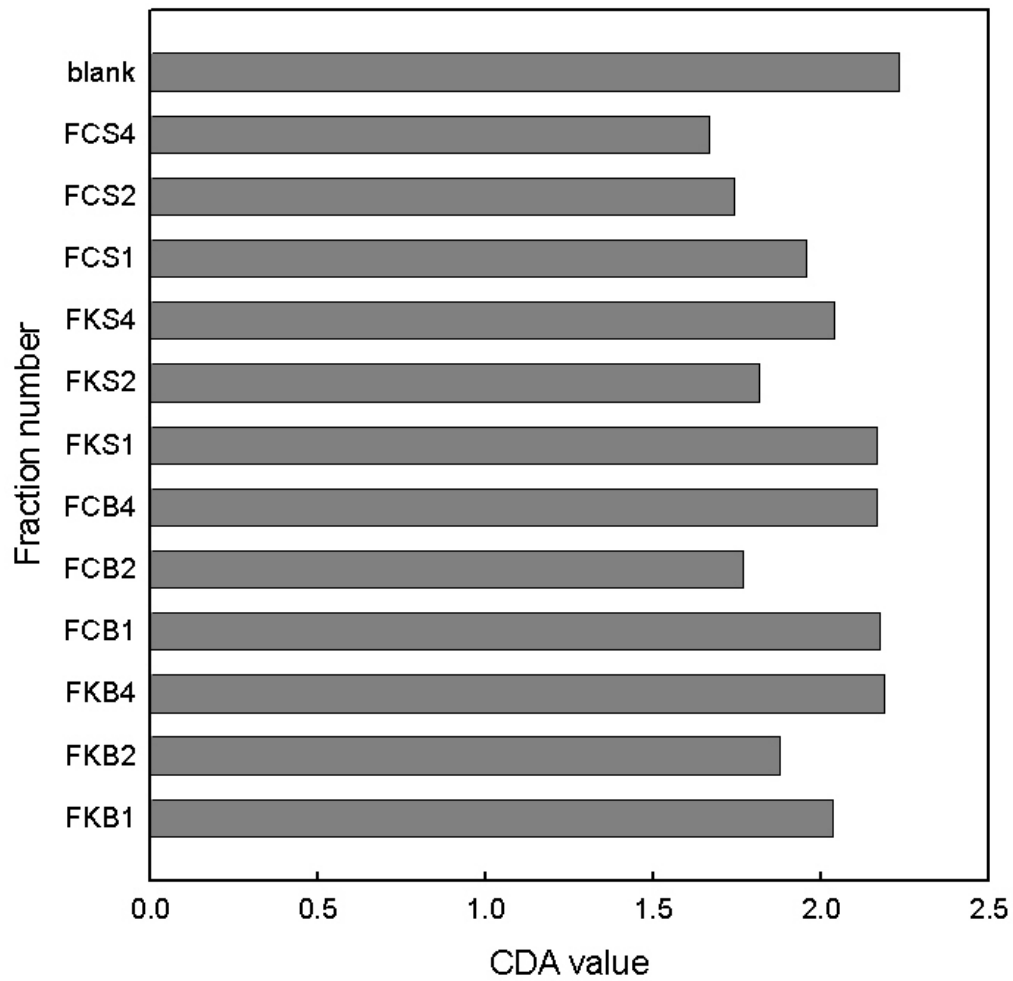


Fig. 6. 검은콩 및 검은깨의 유기용매 분획물의 향산화도.

#### (4) 분획물의 지방산 조성 분석

혼합용매 추출물 분획의 지방산 조성을 알아보았다. 극성이 비교적 높은 1, 2번 분획들을 중심으로 지방산을 분석하였다. 지방산 분석은 FAME(fatty acid methyl ester)방법(AOAC 969. 33)으로 시료를 전처리 후에 가스크로마토그래피를 통하여 분

석하였다. 즉, 20 mL vial에 100 mg의 oil을 넣고 0.5 N NaOH(in MeOH) 4 mL를 섞어 hot plate를 이용하여 15분간 중탕한 20°C의 water bath에서 냉각하였다. 이후 시료에 14% BF<sub>3</sub> 용액을 섞어 다시 10분간 중탕한 후 냉각하였다. 여기에 saturated NaCl(in D.W.) 6 mL를 가하고, 다시 3 mL의 *n*-hexane을 이용하여 메틸에스터화 시료를 추출하였다. 이 시료는 syringe를 통하여 gas chromatography에 1 µL 주입하였다. GC 조건은 다음과 같았다. GC는 HP 5890 plus 2를 사용하였고 detector는 flame ionization detector를 이용하였다. Column은 HP-Innowax(30 m × 0.25 mm)를 사용하였다. Injector와 detector는 260°C였다. Carrier gas는 helium을 사용하였고 column flow는 1 mL/min이었다. Split ratio는 split mode로 1:40이었다. Fig. 7은 FKB2의 GC-chromatogram으로 각 peak의 fatty acid를 표기하였다. Fatty acid 조성은 chemstation software를 이용하여 각 peak의 면적을 계산하였다.

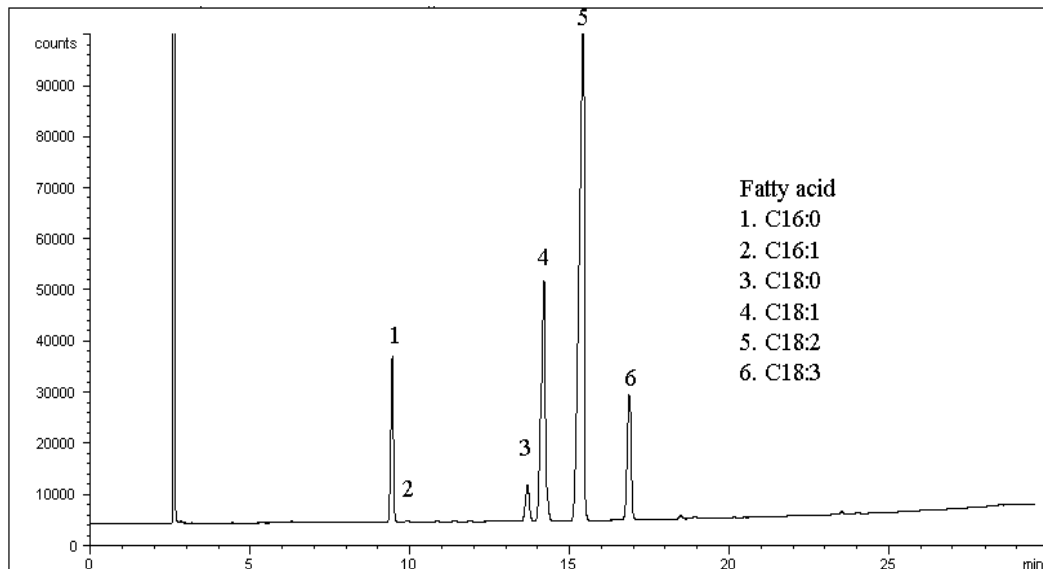


Fig. 7. FKB2의 지방산 분석 GC chromatogram.

검은콩 및 검은깨의 유기용매 추출물의 대표적인 GC chromatogram은 Fig. 7에 나타내었으며 지방산 분석결과는 Table 10에 나타냈다. 대체적으로 종실 추출물의 지방산 조성은 국산 중국산 간에 2%이내 정도의 차이를 제외하고는 동일한 경향을 보였다. 우선 검은콩의 경우는 국산이 중국산에 비하여 불포화지방산의 비율이 1-8%정도 높았다. 검은깨의 경우도 국산이 중국산에 비하여 불포화 지방산이 1.5% 정도 높은 조성을 보였다. 그리고 F1 분획에 비해 F2는 포화지방산과, C18:1의 조성이 1-5%정도 감소하는 경향이 있었고, 그 외의 불포화지방산의 함량이 2-5%정도 높아지는 경향을 보였다.

Table 10. 검은콩 및 검은깨의 유기용매 분획물의 지방산 조성

	FKB1	FCB1	FKB2	FCB2	FKS1	FCS1	FKS2	FCS2	Pattern (F1→F2)
C16:0	11.68	12.17	9.19	8.98	9.18	9.32	8.93	9.55	decrease
C16:1	0.12	0.11	0.12	0.10	0.14	0.14	0.16	0.18	-
C18:0	5.33	5.58	3.02	2.92	6.09	6.77	4.27	4.89	decrease
C18:1	31.00	31.80	20.62	19.11	44.08	43.65	35.86	36.76	decrease
C18:2	45.93	44.01	55.05	49.69	38.07	37.89	49.14	47.07	increase
C18:3	3.73	4.10	9.32	9.61	0.27	0.25	0.54	0.44	increase
U/S	4.75	4.51	6.97	6.60	5.45	5.09	6.49	5.85	

1) unsaturated fatty acid/ saturated fatty acid

다. 국산 농산물 추출물의 항암성 측정

1) 검은깨 메탄올 추출물의 Apoptotic 효과

국산 검은깨 메탄올 추출물의 apoptotic 효과는 apoptosis와 관련된 *BCL-2* 및 *BAX* 유전자의 RT-PCR을 활용한 발현을 통해 결정하였다. Colon 암세포주에 검은깨 메탄올 추출물(BSME)를 6.7과 10.0 mg/mL씩 처리 후 24 h incubation 시켰다. 시료의 total RNA를 추출 후 RT-PCR을 시도하였다. *BCL-2*, *BAX*와 *CYCLOPHILIN* gene의 annealing 온도는 각각 62, 56 및 56°C였다. 증폭된 *BCL-2*, *BAX*, *CYCLOPHILIN*의 염기크기는 476-bp, 249-bp, 300-bp며 사용된 프라이머 (primer) 염기서열은 Table 11과 같다. RT-PCR 처리 결과는 1.5% 아가젤을 이용하여 전기영동하였고 ethidium bromide로 염색하였다.

Table 11. Primer sequence for RT-PCR of *BCL-2* and *BAX*

Gene name		Sequence
<i>BCL-2</i>	Sense	5'-CCTCTGTTTGATTTCTCCTGGCTGT-3'
	Antisense	5'-TGGAAAGCGCAATCTATGTTTACAGG-3'
<i>BAX</i>	Sense	5'-AACATGGAGCTGCAGAGGATGATT-3'
	Antisense	5'-CTGGTCTTGGATCCAGCCAGCCCAACAG-3'
<i>CYCLOPHILIN</i>	Sense	5'-ACCCACCGTGTCTTCGAC-3'
	Antisense	5'-CATTTGCCATGGACAAGATG-3'

2) 국산 검은깨 메탄올 추출물의 free radical scavenging activity

국산 검은깨 메탄올 추출물의 유리라디칼 소거능은 Fig. 8에 나타내었다. 검은깨 메탄올 추출물의 농도가 2.5, 5.0, 10.0 mg/mL로 증가할수록 DPPH의 흡광도는 각각 0.076, 0.114, 0.200으로 감소하였다. 검은깨 메탄올 추출물의 유리라디칼 소거능은  $0.154 \pm 0.032$  mmol BHT equivalent/mg BSME였으며 추출수율은 2.96%(w/w)였다.



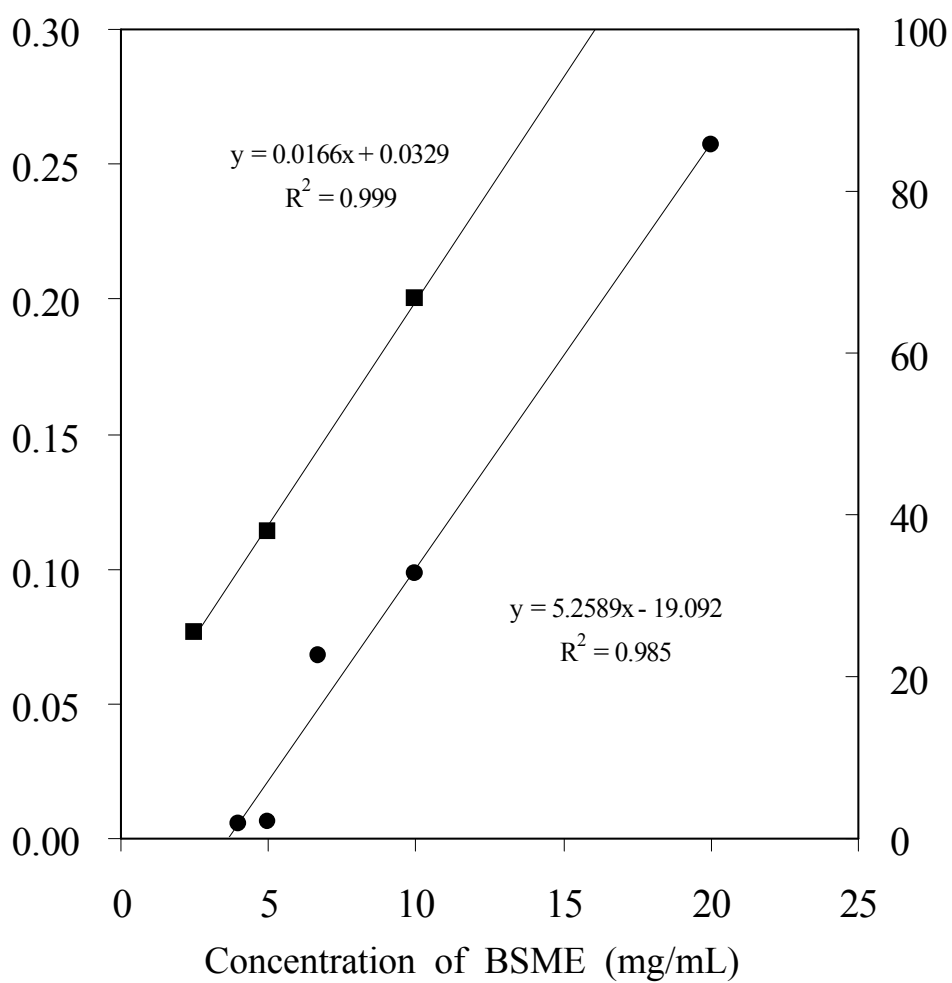


Fig. 8. Free radical scavenging activity of BSME on DPPH and relative colon cancer cell death induced by BSME. (■ and ● represent free radical scavenging activity and relative cell death rate, respectively.)

### 3) MTT assay에 의한 검은깨 메탄올 추출물의 세포사멸성

국산 검은깨 메탄올 추출물 첨가에 의한 HT-29 cells에 대한 생존율에 대한 결과는 Fig. 9와 같다. 검은깨 메탄올 추출물의 농도가 4.0, 5.0, 6.7, 10.0, 20.0 mg/mL로 증가할수록 24시간 반응 후의 생존율은 각각 대조구의  $98.3 \pm 4.0\%$ ,  $97.9 \pm 4.0\%$ ,  $77.4 \pm 4.0\%$ ,  $67.3 \pm 4.0\%$ ,  $14.4 \pm 2.0\%$ 였다. 즉 첨가한 검은깨 메탄올 추출물의 농도에 비례하여 생존율이 감소하였다. 또한 검은깨 메탄올 추출물 농도가 6.7-10.0 mg/mL만으로도 충분히 HT-29 cells의 사멸을 유도할 수 있음을 의미한다.

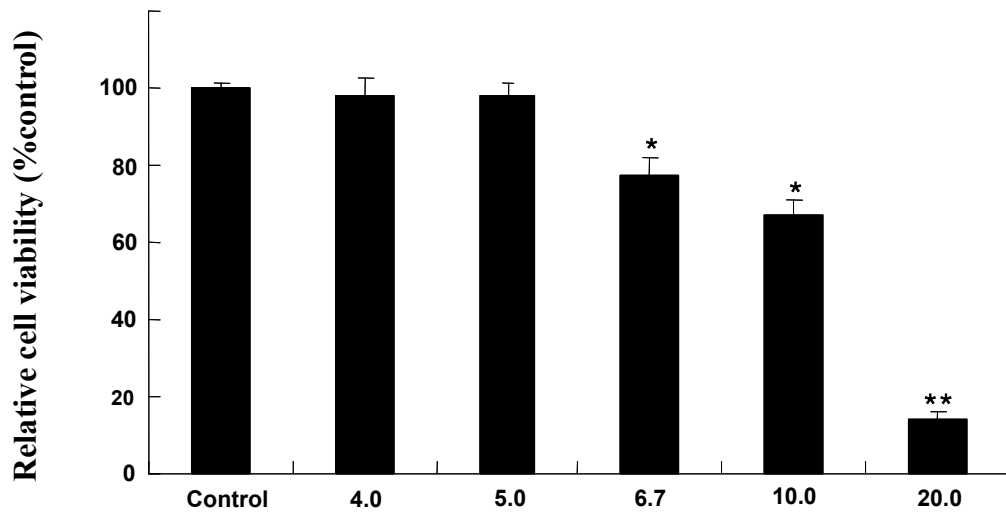


Fig. 9. Dose-dependent effect of BSME on viability of human colon cancer cells HT-29 for 24 h.

(Viability was determined with MTT assay. The experiments were done triplicate.

\*, \*\* represent  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$  compared to the control.)

#### 4) 국산 검은깨 메탄올 추출물의 apoptotic 형태학적 변화

Apoptosis 과정에 있는 세포들은 특징적인 형태학상의 변화를 보이며 그 예로는 cytoplasmic blebbing, nuclear shrinkage, chromatin condensation, 및 부정기적인 형태 및 수축 등을 예로 들 수 있다. 검은깨 메탄올 추출물을 사람의 결장암세포에 처리한 경우인 Fig. 10-B 및 10-E의 경우 대조구인 정상 암세포인 Fig. 10-A 및 10-D와 비교하였을 때 전형적인 apoptosis 특징을 보여주고 있다. 검은깨 메탄올 추출물 6.7 mg/mL 처리 시료는 Fig. 10-B 및 10-E 이며, 10.0 mg/mL 처리 시료의 사진은 Fig. 10-C 및 10-F이다. 고농도로 처리한 세포시료에서 세포의 apoptosis 특징을 명백히 확인할 수 있다. 본 실험결과는 전형적인 TUNEL 기법에 의한 apoptosis를 확인하는 방법이다.

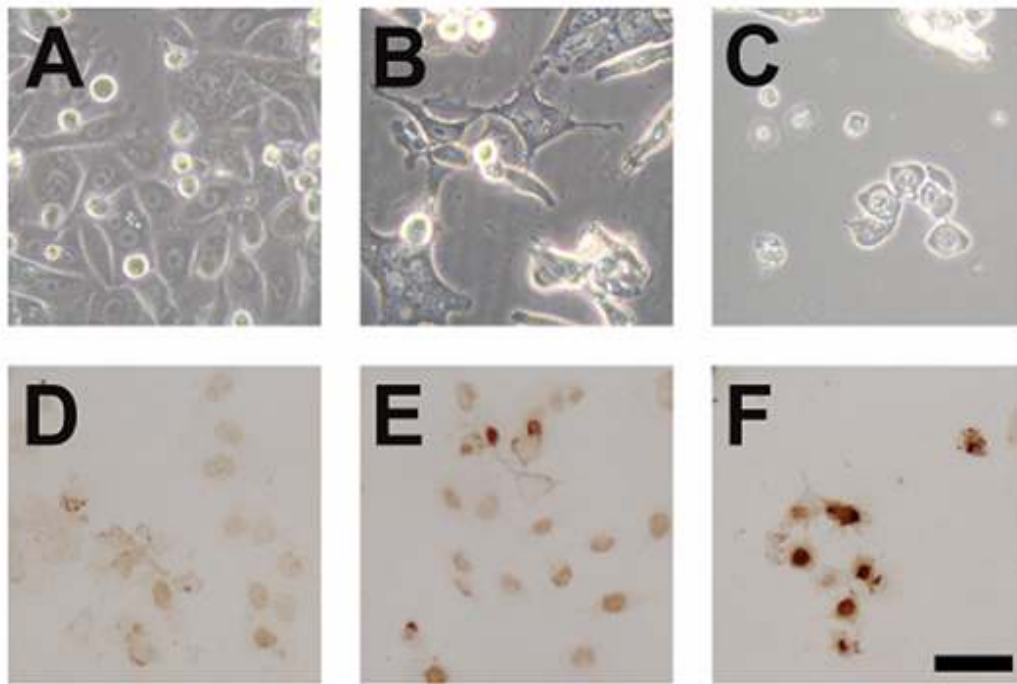


Fig. 10. Characterization of BSME-induced cell death in human colon cancer cells using TUNEL method.

A and D are cells cultured without BSME, B and E are cells with 6.7 mg/mL BSME and C and F are cells with 10.0 mg/mL BSME.

Morphology (top): phase-contrast microscopy showed cell shrinkage, irregularity in shape and cellular detachment in black sesame-treated cultures (B and C).

Morphology (bottom): Condensed and margined chromatin showed to be stained dark brown (E and F). The experiments were done triplicate. Scale bar, 100  $\mu$ m.

##### 5) 국산 검은깨 메탄올 추출물의 apoptosis 발현 관련 유전자 발현에 대한 영향

RT-PCR로 분석된 결과는 Fig. 11과 같다. 검은깨 메탄올 추출물이 첨가된 경우 발현된 *BCL-2*의 mRNA 수준은 감소한 반면에 *BAX*의 mRNA 수준은 증가하였다.

BCL-2는 apoptosis의 발현 및 조절에 관련된 cytoplasmic proteins의 일종으로 apoptosis에 의한 세포의 사멸을 저해하고 protease activation을 저해하는 것으로 알려져 있다. 본 연구결과 검은콩 메탄올 추출물의 apoptosis를 유발할 가능성이 있음을 알 수 있었다.

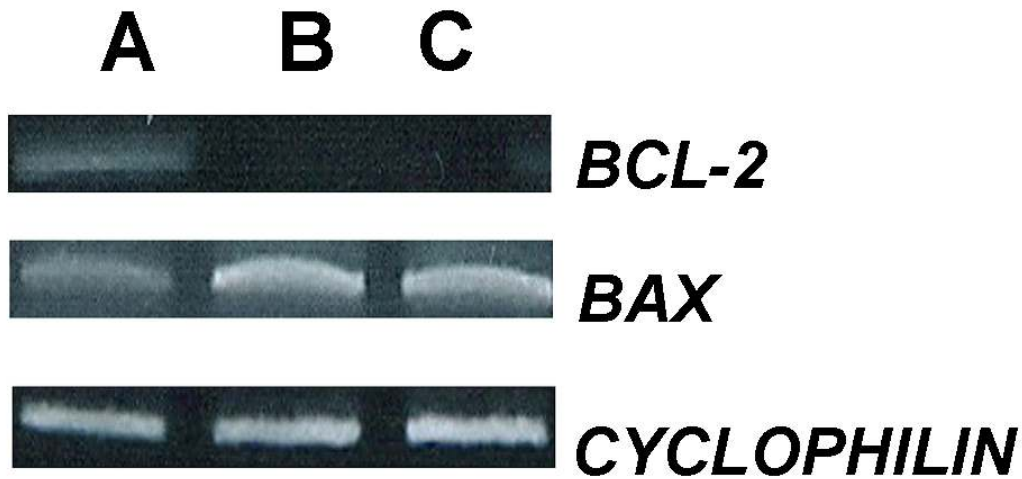


Fig. 11. RT-PCR analysis of *BCL-2* and *BAX*. As the internal control, CYCLOPHILIN mRNA was also reverse-transcribed.

(A), (B), and (C) are control, 6.7 mg/mL BSME and 10.0 mg/mL BSME treated groups, respectively. The experiments were done triplicate.

국산 검은깨 메탄올 추출물은 사람의 결장암세포에 대한 apoptosis를 유발할 수 있으며 이는 MTT, TUNEL, RT-PCR 시험법에 의해 확인되었다.

## 라. 종실류 및 식품의 특이 지방산 분석

### 1) 연구 목적

특이한 성질을 보유한 지방산을 선별하여 향후 기능성 원료로서의 가능성을 타진하고 새로운 기능성 원료개발을 목적으로 하였다.

### 2) 분석 대상

홍화, 은행, 탕자, 조, 수수, 오미자, 복분자, 사과, 주목나무, 말밤나무, 측백나무, 탕자 등 총 12종의 종실류 및 전통식 제조된장을 사용하였다. 종실들은 시장에서 구입하였으며 전통된장의 경우 경기도 이천 Y사(1, 2, 4, 5 년 숙성: 총 4개)에서 제공받았다.

### 3) 분석방법

#### 가) 종실류 및 된장의 조지방 추출

종실 1-10 g을 60°C dry oven에서 5시간 동안 건조하여 수분을 제거한 후 막자와 막자사발을 이용하여 마쇄 후 soxhlet과 *n*-hexane을 이용하여 3시간 동안 조지방을 추출하였다. 추출물은 50°C hot plate에서 질소가스를 이용하여 용매를 제거하면서 농축하였고, 농축된 시료는 메틸에스터 전처리후에 gas chromatography(GC)를 이용하여 분석하였다.

#### 나) 지방산 메틸에스터화

유지시료의 지방산 분석을 위해 AOAC의 fatty acid methyl ester(FAME)방법을 이용하였다. 시료 30-100 mg을 25 mL 시약병에 넣고 0.5 N NaOH(99.5% methanol) 4 mL에 희석하여 vortex mixer로 30초 동안 혼합한 후, 10분간 중탕하여 비누화하였다. 냉각한 시료에 14% BF<sub>3</sub>(99.5% methanol) 4 mL를 넣고 교반기로 30초 동안 교반한 후, 10분간 중탕하여 메틸에스터화 하였다. 시료에 saturated sodium chloride 용액 6 mL와 *n*-hexane 3 mL을 넣고 30초 동안 교반하였다. FAME가 녹아있는

*n*-hexane층을 회수한 후, sodium thiosulfate anhydrous로 탈수하고 이를 GC에 주입하였다.

#### 다) 지방산 분석을 위한 GC 조건

GC는 flame ionization detector(FID)가 장착된 Hewlett-Packard 5890-II(Palo alto, CA, USA)를 사용하였고, column은 J&W Scientific(Folsom, CA, USA)의 DB-23(60 m × 0.25 mm ID, 0.25 μm film)을 사용하였다. GC-mass spectrophotometer는 Agilent GC-6890N, 5975B MSD를 사용하였다. 주입구와 검출기의 온도는 각각 260°C이었고, column의 이동상은 헬륨으로 유속 1.1 mL/min, split ratio는 1:50, 시료 주입량은 1 μL였다. Oven은 초기 1분간 100°C에서 머문 뒤, 15°C/min으로 195°C까지, 1°C/min으로 210°C까지, 5°C/min으로 240°C까지 승온시킨 후 7.5분간 유지하였다. 정성 분석을 위한 GC-MS 기기설정 조건은 GC와 동일하였고, ion source는 230°C, 70eV이었다.

### 4) 연구 결과

#### 가) 종실류의 지방산 분석

종실류로부터 지방산 분석한 결과는 Table 12와 같고 대표적인 chromatogram은 Fig. 12에 나타내었다.

(1) 칠엽수나무 종실인 말밤나무(Horsechestnut)에서는 상대적으로 높은 C20:1, C22:1, C24:1이 각각 9.5, 8.7, 3.3% 검출되었다.

(2) 사과 종실의 지방산 조성은 linoleic>oleic>palmitic acids 순으로 존재하였으며 특이 지방산 peak는 검출되지 않았다.

(3) 복분자 종실은 linoleic>linolenic>oleic acids로 linolenic acid가 23.4%로 상당히 많이 검출되었으며 특이 지방산 peak는 검출되지 않았다.

(4) 오미자씨의 경우 73.3%의 linoleic acid가 가장 많이 검출 되었으며 vaccenic acid 인 C18:1(n-7)가 1.3% 검출되었다.

- (5) 동백의 경우 84.12%의 oleic acid가 주요 지방산이었으며 비교적 단순한 지방산 profile을 보였다. 분석된 시료 중 가장 큰 oleic acid 함량을 보였다.
- (6) 주목나무 종실에서는 2.4%의 pinolenic acid가 검출되었다. Pinolenic acid (Fig. 13)는 잣류에서 검출되는 linolenic acid의 positional isomer로서 그 기능성에 대한 연구가 진행되고 있다. 또한 linoleic acid의 cis  $\Delta$ 5, 9 positional isomer형태가 19.5%로 상당히 높은 양이 검출되었으며 eicosatrienoic acid(cis  $\Delta$ 5, 11, 14) 지방산이 1.7% 검출되었다.
- (7) 측백나무 종실에서는 특이한 지방산이 다량 검출되었다. Eicosatrienoic acid (cis  $\Delta$ 5, 11,14) 지방산이 4.4%, eicosatetraenoic acid(cis  $\Delta$ 5, 11,14,17) 지방산이 9.5% 검출되었다. 이들 peak는 m/s spectrum을 이용하여 동정되었으며 기존의 문헌보고와 비교하였다.
- (8) 탕자종실의 경우 oleic(46.9%), linoleic(26.8%), linolenic acids(5.1%)의 주요 지방산을 보였으며 추출수율은 100 g 당 8.6 g 이었다.
- (9) 은행의 경우 타 종실에 비해 특이한 지방산 함량이 높았다. C18:2(cis  $\Delta$ 5, 9) 및 C18:1의 이성질체 지방산인 vaccenic acid가 각각 3.5 및 12.6% 검출되었다. Eicosatrienoic acid(cis  $\Delta$ 5, 11,14) 지방산이 4.7% 검출되었으며 palmitoleic acid(C16:1)도 3.41% 가 검출되어 은행열매의 지방산 조성이 기타 다른 종실과는 상이한 것을 알 수 있었다. 추출수율은 100 g 당 4.4 g 이었다.
- (10) 조의 경우 약 1.6 g/100 g의 지방을 갖고 있으며 linoleic>oleic>palmitic acids 순으로 검출되었다. 특히 linoleic acid가 62.2%로 많은 양이 존재하였다.
- (11) 수수의 주요지방산의 평균함량은 palmitic acid 12%, stearic acid 1.33%, oleic acid 38.5%, linoleic acid 43.7% 그리고 linolenic acid 1.9%로 나타내었다. 수수의 지방함량은 비교적 낮으나, 구성하는 불포화지방산 함량은 전체의 85% 이상을 차지하고 있었다.
- (12) 홍화씨의 지방산 조성은 palmitic acid(16:0), stearic acid(18:0), oleic acid(18:1), linoleic acid(18:2) 및 linolenic acid(18:3)가 각각 6.15, 8.78, 80.3, 0.13%로 분석되었다. 혈관계질환 원인물질인 콜레스테롤 농도 저하 효과를 가지는 linoleic acid가 80.3%로 다른 식물성 유지들과 비교하여 현저하게 높게 나타났다. 또한 총 불포화지

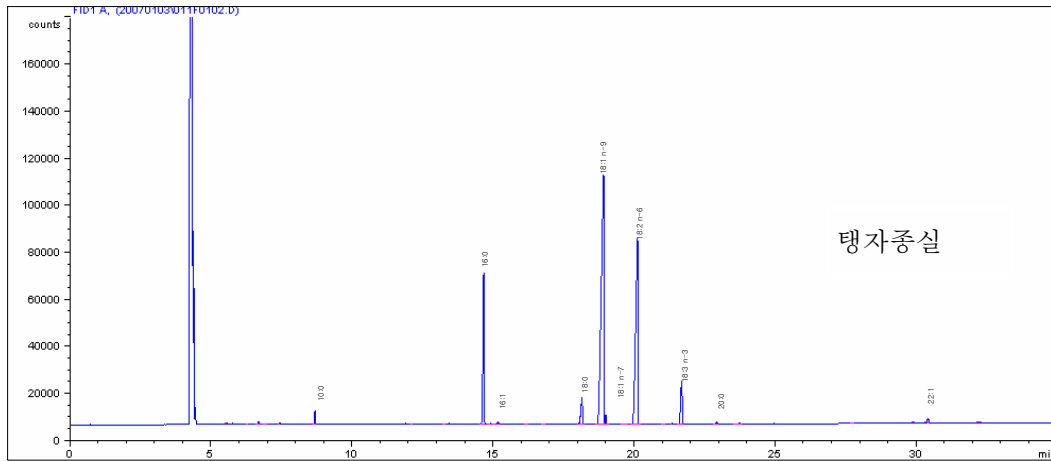
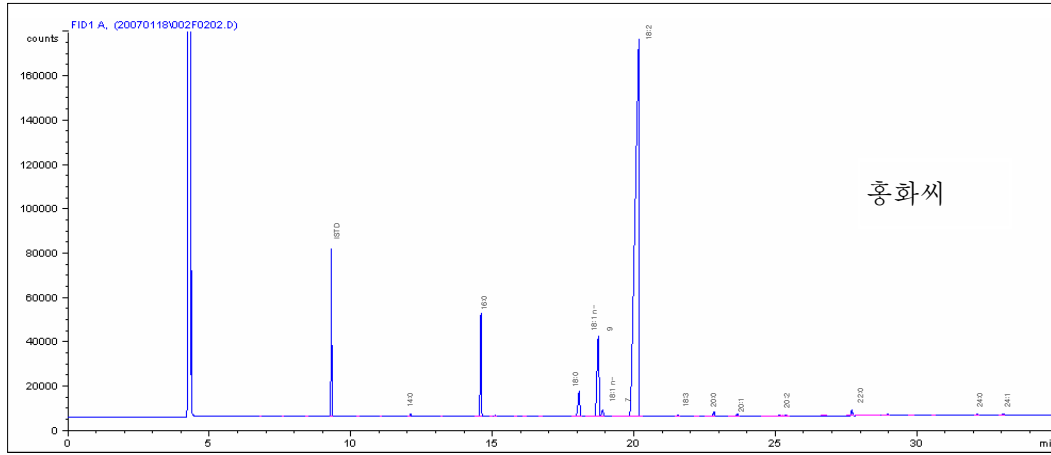


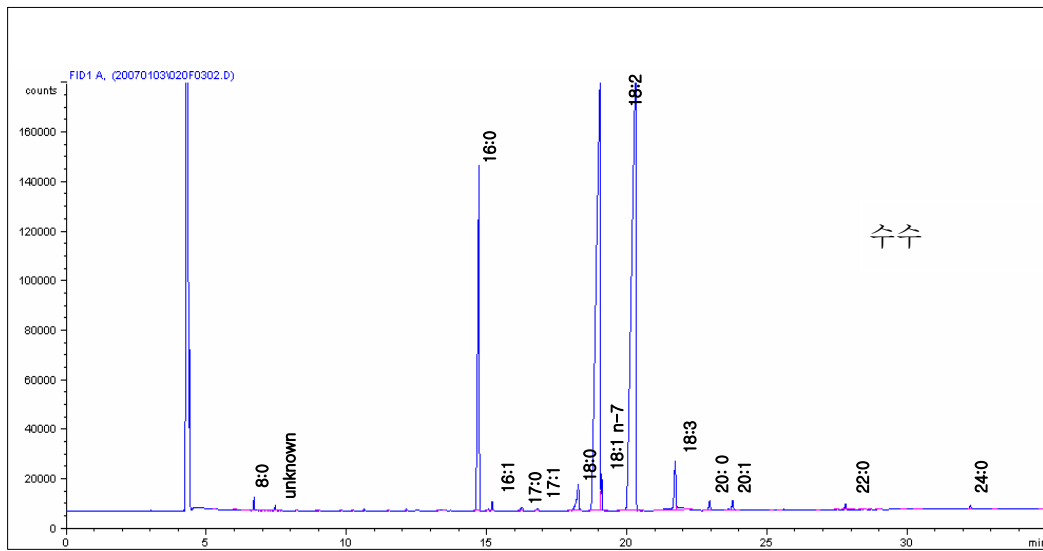
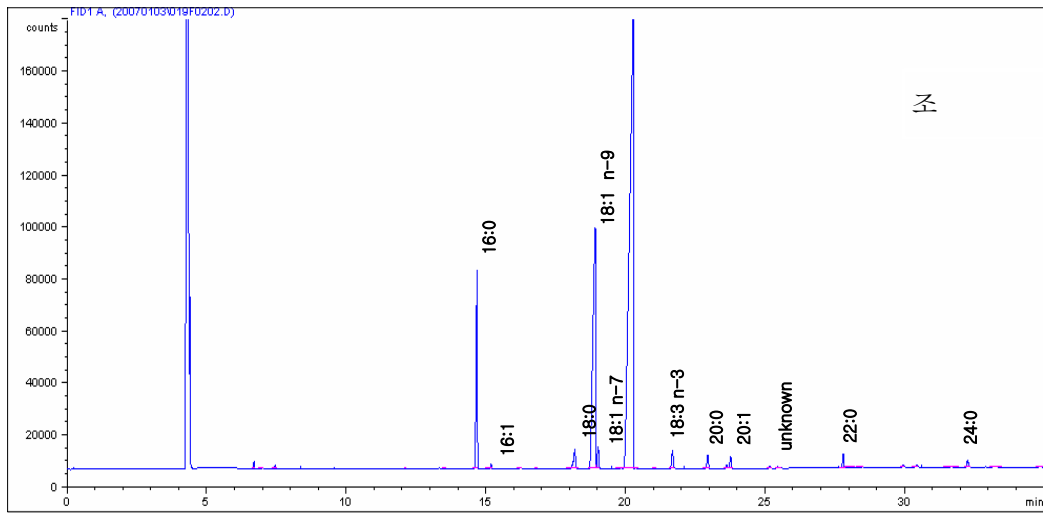
방산의 함량은 90.31%로 매우 높은 것으로 분석되었으며 추출수율은 100 g 당 9.2 g 이었다. 홍화씨의 경우 최근 다이어트식품으로 개발되어 시판되고 있다.

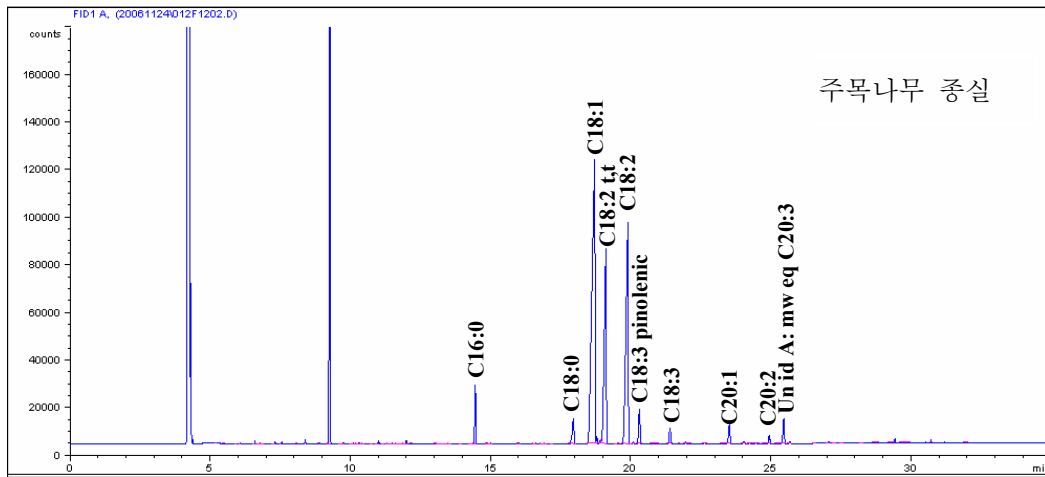
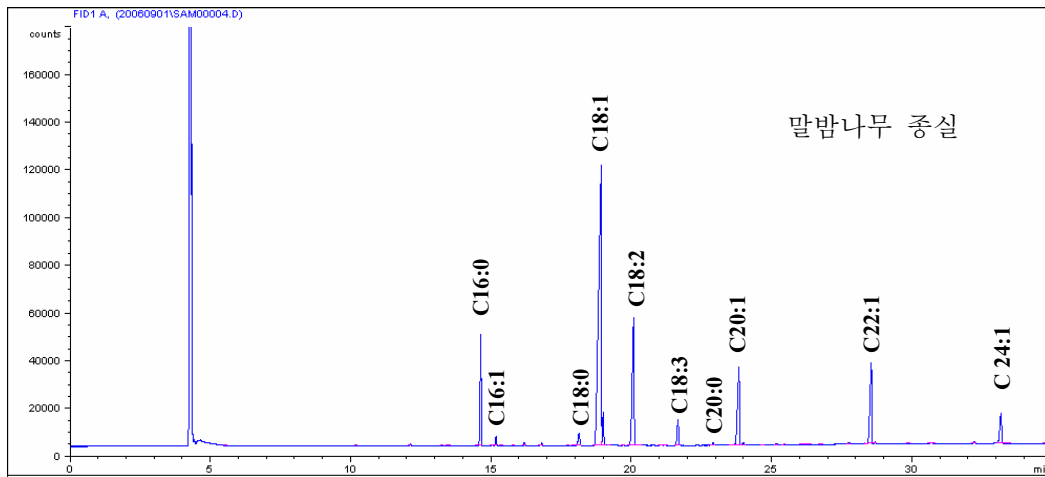
Table 12. Fatty acid compositions of oils from 12 samples

	Fatty acid	Sample number <sup>1)</sup>											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Myristic	14:0	0.1			0.7								0.1
Palmitic	16:0	7.5	7.3	4.6	3.1	8.0	2.9	5.3	12.2	6.2	8.6	12.0	6.2
Palmitoleic	16:1	0.7							0.1	3.4	0.2	0.2	
Margaric acid	17:0	0.2										0.1	
Margaroleic acid	17:1	0.2										0.1	
Stearic	18:0	1.3	2.1	1.8	0.6	2.1	2.3	4.3	3.3	0.9	1.3	1.3	2.5
Oleic (cis, n-9)	18:1	51.2	27.2	9.5	13.9	84.1	42.5	13.4	46.9	12.6	23.2	38.6	8.9
Vaccenic (cis, n-7)	18:1		0.4	0.6	1.3	1.2		0.3	0.7	17.8	1.1	0.8	0.6
Octadecadienoic acid (cis $\Delta$ 5,9)	18:2						19.5			3.5			
Linoleic	18:2	14.7	59.4	54.0	73.3	4.5	25.5	24.6	26.8	40.5	62.2	43.7	80.3
Pinolenic acid ( $\Delta$ 5,9,12)	18:3						2.4			0.8			
$\gamma$ -Linolenic acid ( $\Delta$ 6,9,12)	18:3						1.2						
$\alpha$ -Linolenic acid ( $\Delta$ 9,12,15)	18:3	2.4		23.4	1.0			34.7	5.1	2.3	1.0	2.0	0.1
Arachidic	20:0	0.2	1.5	1.3				0.2	0.5	1.1	0.7	0.5	0.4
Gardoleic	20:1	9.5	0.4	0.4	0.6		1.5	0.7			0.7	0.3	0.2
Eicosadienoic	20:2						0.6	0.7					0.1
Eicosatrienoic ( $\Delta$ 5, 11, 14)(?)	20:3						1.7	4.4		4.7			
Eicosatrienoic (?)	20:3							0.8					
Eicosatetraenoic (cis $\Delta$ 5, 11,14,17)(?)								9.5					
Behenic	22:0			0.5						1.1	0.6	0.2	0.4
Erucic	22:1	8.7							0.5				
Lignoceric	24:0									0.2	0.4	0.1	0.1
Tetracosanoic	24:1	3.3											0.2
U/S		9.8	8.0	10.7	20.4	8.9	18.1	7.6	5.0	8.6	7.6	6.0	9.3

<sup>1)</sup>1:말밤(horse chestnut seed), 2:사과종실(apple seed), 3:복분자(wild berry), 4: 오미자 (*Schizandra chinensis*), 5:동백 종실(camellia seed), 6: 주목나무(*Taxus cuspidata*)종실, 7:측백나무종실(*Thuja orientalis*), 8:탱자(trifoliate orange seed), 9:은행(ginkgo nut), 10:조(millet,amillet seed), 11:수수(sorghum,african millet), 12:홍화(safflower seed)







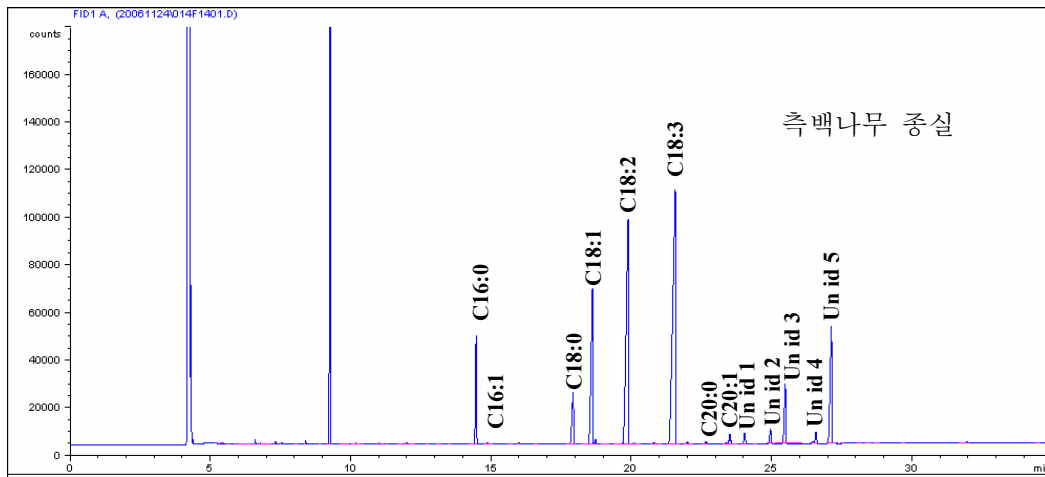


Fig. 12. GC-chromatograms of fatty acid methyl esters from selected seed oil.

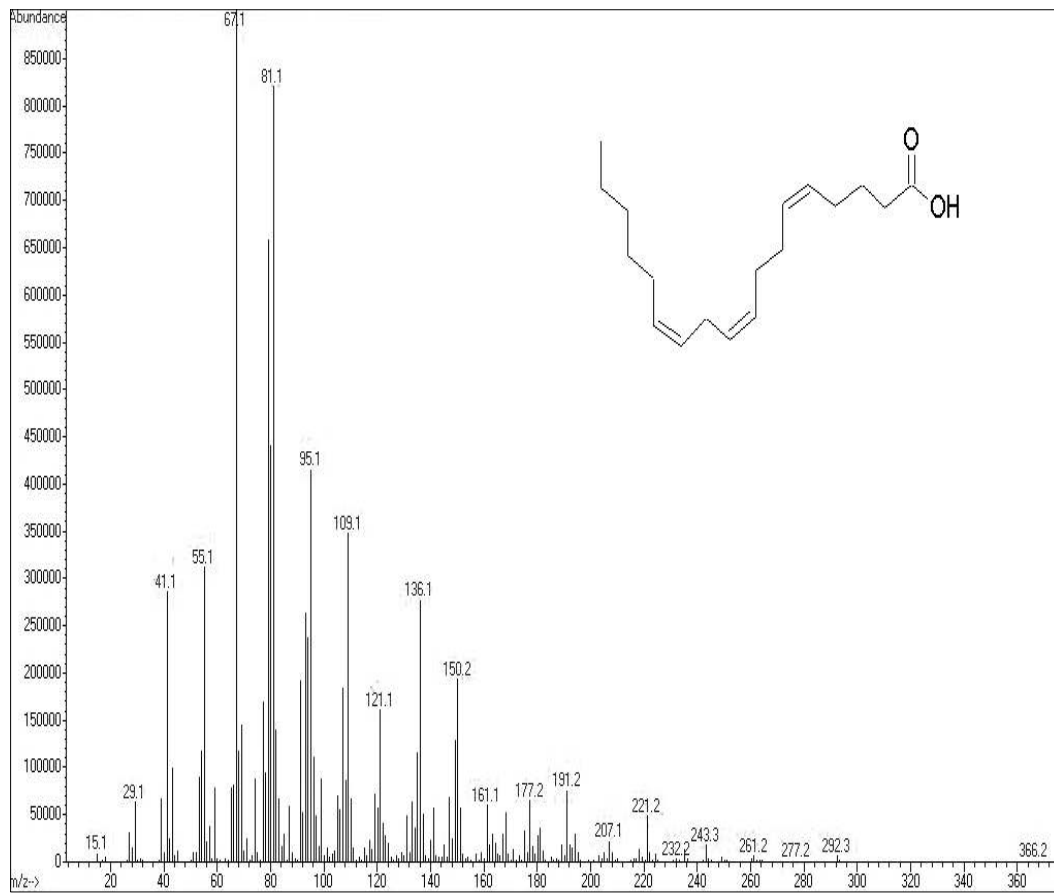


Fig. 13. GC/MS spectrum of pinolenic acid from *Taxus cuspidata* seed.

#### 나) 전통된장의 지방산 분석

전통된장으로부터 분석한 지방산 결과는 Table 13과 Fig. 14에 나타내었다. 발효기간이 증가할수록 특정 지방산의 일관된 증가 혹은 감소는 관찰되지 않았다. 제조 시 동일한 원료를 사용해도 제작 방법 및 정량적으로 동일하지 않을 수 있기에 시료간의 절대적인 변화를 비교하는 것은 쉽지 않았다. 대두로부터 유래한 식품이기에 대두의 지방산 조성과의 유사한 결과를 얻었으며 특이하게 conjugated linoleic acid(CLA)가 검출되었다. 4년 된 전통된장의 지방산 분석 및 CLA 동정에서 CLA는

표준품을 사용하여 retention time을 비교하여 동정하였다(Fig. 13). CLA는 다른 전 통된장에서는 발견되지 않는 성분으로 이는 된장 제조 시 CLA 함유 원료를 사용했을 것으로 판단된다.



Table 13. 전통된장의 지방산 조성

Fatty acids	Retention Time (min)	Fermentation time (year)			
		1	2	4	5
<b>C14:0</b>	12.10	0.10	0.12	0.12	0.12
<b>C16:0</b>	14.65	13.34	13.50	13.60	13.69
<b>C16:1</b>	15.04	0.05	0.04	0.07	0.05
<b>C16:1</b>	15.17	0.28	0.23	0.30	0.23
<b>C17:0</b>	16.18	0.12	0.11	0.11	0.11
<b>C17:1</b>	16.80	0.08	0.08	0.13	0.07
<b>C18:0</b>	18.16	3.41	3.10	2.93	3.14
<b>C18:1t n9</b>	18.61	0.11	0.11	0.08	0.14
<b>C18:1c n9</b>	18.89	24.41	26.20	24.07	25.57
<b>C18:1 n7</b>	18.99	1.84	1.87	1.97	2.06
<b>C18:2</b>	20.22	46.74	45.95	46.73	45.90
<b>C18:2 trans</b>	20.85	0.06	0.14	0.08	0.12
<b>C18:3 n6</b>	21.06	0.04	0.04	0.03	0.04
<b>C18:3 n3</b>	21.74	7.06	5.93	5.31	6.26
<b>CLA</b>	22.42	0.09	0.24	1.29	0.09
<b>C18:2 trans</b>	22.59	0.05	0.04	0.05	0.09
<b>C20:0</b>	22.94	0.42	0.40	0.38	0.40
<b>C20:1</b>	23.57	0.08	0.13	0.51	0.07
<b>C20:1</b>	23.79	0.24	0.29	0.27	0.28
<b>un id</b>	24.59	0.02	0.03	0.11	0.05
<b>un id</b>	24.69	0.03	0.02	0.08	0.05
<b>un id</b>	24.98	0.03	0.00	0.04	0.00
<b>C20:2</b>	25.21	0.06	0.08	0.11	0.10
<b>u/s</b>		4.45	4.49	4.52	4.42

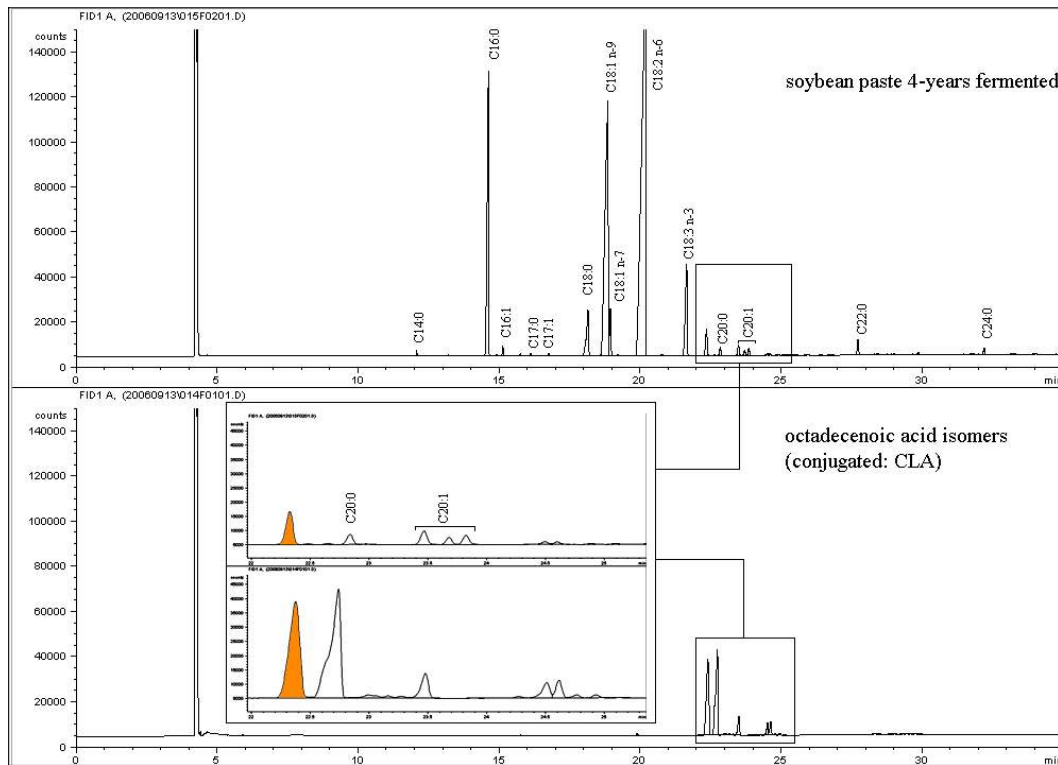


Fig. 14. GC-MS-spectrums of 4-years fermented soybean paste and CLA isomers.

## 5) Discussion

종실 12종 및 전통된장 4종 분석 결과 각 종실들은 특유의 지방산 profile을 갖고 있었다. 은행, 주목나무, 측백나무의 종실류에서는 특이 지방산으로 동정될 수 있는 새로운 peak들이 검출되었다. 은행과 주목에서는 pinolenic acid가 검출되었고 은행에서는 특이한 지방산 peak가 검출되었다. 가장 oleic acid 함량이 높은 종실은 동백으로 지방의 84.12%를 차지하였고 linoleic acid 함량이 가장 높은 유지는 홍화종실유로 80.3%의 함량을 가진 것으로 분석되었다. 가장 불포화도가 높은 유지는 오미자로부터 검출되었으며 가장 불포화도가 낮은 유지는 탕자였다. 일부  $\Delta 5$  지방산인( $\Delta 5,9$ -C18:2,  $\Delta 5,11,14$ -C20:3,  $\Delta 5,11,14,17$ -C20:4)등은 한약재로 사용되었으며 콜레스테롤

저하, 인지질농도감소 등의 효능이 있음이 보고되어 있다.

된장의 지방산 조성은 발효시간과는 연관성을 찾을 수 없었다. 이는 전통된장 제조 시 두류의 침지 후 열처리 과정 중 효소시스템의 변성이 발생하였고 발효 기간 중 미생물 유래 지방분해 효소의 활성이 충분히 활발하지 못한 것으로 예상된다. 따라서 된장의 지방조성은 발효기간이 증가한다고 변화하지 않으며 된장 제조시 첨가되는 원료물질에 의해 주로 좌우되는 것으로 판단된다.

#### 마. 결론

검은깨 및 검은콩에의 여러 유기용매 분획물에서 지방산 조성과 항산화능 그리고 항암활성-세포사유도능에 대해서 탐색하였다. 지방산 조성분석에서는 기존에 알려진 조성들이 있는 것으로 분석되었고 새로운 특이 지방산의 발견은 없었다.

각 시료의 추출물들이 가지는 항산화력은 추출물의 극성에 따라 메탄올 추출물은 DPPH free radical scavenging 활성도를, 혼합용매 추출물은 지방산에 첨가시 열산화 조건에서의 CDA 수치를 이용하여 항산화능을 알아보았다. 메탄올 추출물의 항산화능은 검은콩이 검은깨에 비하여 283-127% 높은 항산화능을 나타내었고, 혼합용매 추출물에서는 검은깨 추출물이 384-210% 높은 항산화능을 나타내었다. 이는 검은콩에는 수용성 항산화 성분이 검은깨에는 지용성 항산화성분이 각각 높게 존재하는 것을 알 수 있었으며, 기존 연구와 비교해 볼 때 검은콩은 안토시아닌계통의 수용성 색소성분이, 검은깨에는 세사몰, 세사몰린, 세사민 그리고 토코페롤 등의 항산화 성분에 의한 항산화능으로 판단되어진다.

항암성실험을 위하여 MTT, TUNEL, RT-PCR을 이용하였다. MTT assay에서 검은깨 추출물이 대장암세포에서 6.7mg/mL의 농도에서부터 apoptotic 효과를 나타내었다. 또한 결장암 세포주에 대해서도 대조군에 비하여 TUNEL과 RT-PCR 두 실험 모두에서 apoptotic 효과를 나타냄을 확인하였다. Apoptosis의 발현 및 조절에 관련된 cytoplasmic proteins의 일종으로 apoptosis에 의한 세포의 사멸을 저해하고 protease activation을 저해하는 것으로 알려져 있는 BCL-2 단백질의 발현에는 영향을 끼치지 않았고 반면에 apoptosis에 의한 세포의 사멸을 촉진하는 BAX 단백질의 발현을 촉진시키는 것을 규명하였다.

종실류의 지방산 분석에서 특이한 지방산은 주로  $\Delta$ -5 polyenoic acid 계통인 C18:2(cis  $\Delta$ 5, 9), eicosatrienoic acid(cis  $\Delta$ 5, 11, 14) 및 eicosatetraenoic acid(cis  $\Delta$ 5, 11, 14, 17)가 은행유와 측백나무종자유에서 발견되었다. 이 지방산들은 인체 지질대사에 유익하다고 보고되어 있으나, 이들을 이용한 기능성 원료에 관한 연구는 미비한 실정이다.

전통 발효식품인 된장의 발효 기간에 따른 지방산 조성 분석에서는 발효기간에 의한 특이 지방산의 생성은 발견하지 못하였다. 그러나 제조시 첨가된 원료에 따라 기능성 지방소재인 CLA가 발견되었고 이는 원료-황태의 첨가에 의한 것으로 추정된다. 특이 원료 첨가에 의한 효소적 반응이나 지방대사 생성에 관한 가능성을 주제로 추가적인 연구가 진행된다면 전통발효식품과 CLA라는 기능성 지방소재의 새로운 급원으로 제시될 수 있을 것으로 예상된다.

## 2. 기능성 단백질 소재

### 가. 기능성 성분 선정을 위한 예비후보 물질 선정

#### 1) $\beta$ -Glucosidase의 활성 물질 탐색

단백질 기능성 성분을 추출하기 위해 국내산 종실류 및 버섯류에서  $\beta$ -glucosidase의 활성을 Fig. 15와 같은 방법으로 탐색하였다.

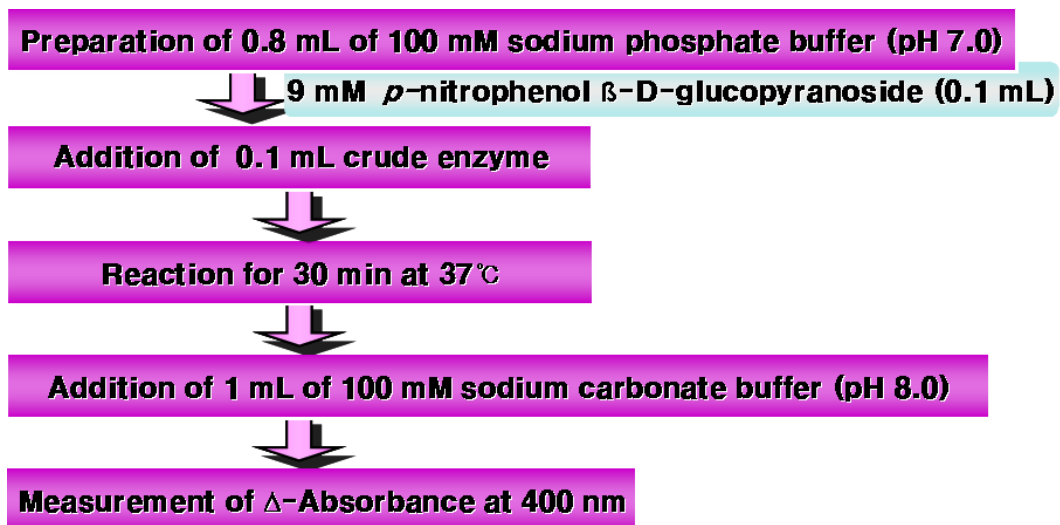


Fig. 15. Schematic procedure for  $\beta$ -glucosidase assay.

## 2) $\beta$ -Glucosidase의 활성물질 선정

표고버섯, 아몬드, 대두류, 땅콩 등 18종의 국내산 종실류 및 버섯에서의 효소활성을 확인한 결과, 표고버섯에서의  $\beta$ -glucosidase specific activity가 가장 높은 것으로 확인되었다. 그 결과는 Fig. 16에 나타내었다.

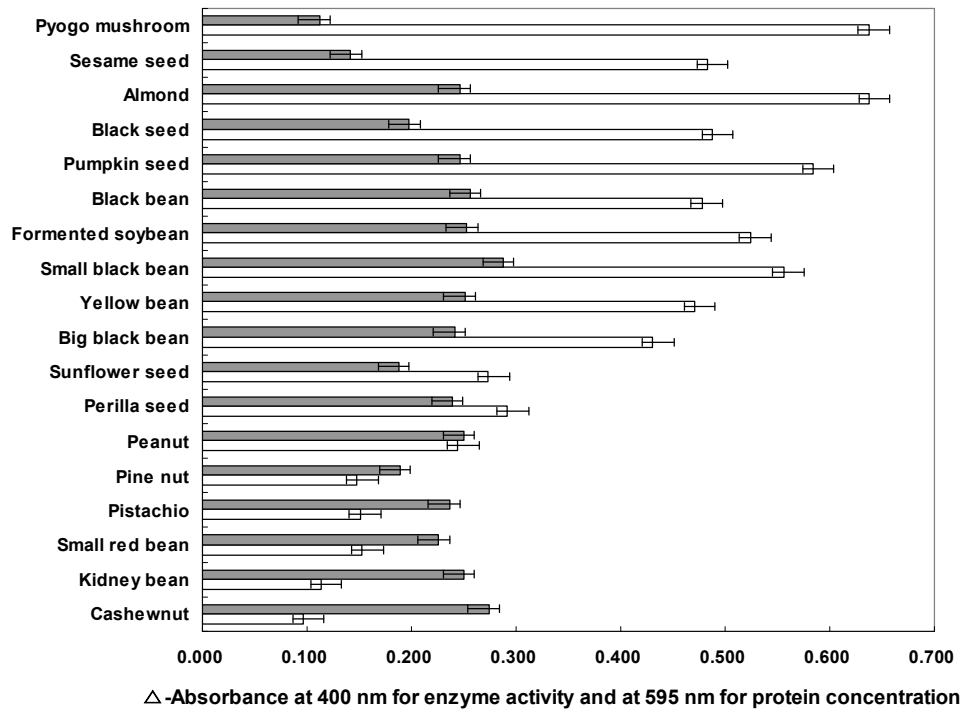


Fig. 16. Comparison of protein concentration and  $\beta$ -glucosidase activity in eighteen kinds of plant foods.

( : Protein concentration, :  $\beta$ -glucosidase activity)

나. 표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 분리·정제

1) 표고버섯으로부터의  $\beta$ -Glucosidase 분리 정제

$\beta$ -Glucosidase의 활성에 대해 탐색한 결과, 표고버섯에서 specific activity가 가장 높았다. 건표고버섯을 마쇄하여 1 g 취한 후 증류수 15 mL를 넣고, 3분 vortexing 후 30분 정치를 시킨다. 정지 후 10,000 rpm, 4°C, 20분 동안 원심분리를 하여

상등액을 얻어낸다. Crude enzyme을 가지고 Fig. 17과 같은 방법으로 분리 정제를 시행하였다.

Preparation of *Lentinus edodes* powder



Ammonium sulfate fractionation (30 to 80%)



Centrifugation (8,800×g for 30 min at 4°C)



Precipitate

Supernatant



Dissolving in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)  
Dialysis against 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)

Ion exchange chromatography (Hi trap Q HP column)



Hydrophobic interaction chromatography  
(Hi trap phenyl HP column)



Gel filtration chromatography (Sephacryl S-100)

Fig. 17. Schematic representation for the purification of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes*.



## 2) 표고버섯에서 ammonium sulfate 분획 최적화

$\beta$ -Glucosidase 조효소 분리를 위한 ammonium sulfate 침전실험을 수행하되, ammonium sulfate의 농도를 달리함으로써 최적의 첨가 농도 분획을 결정하기 위한 Fig. 18의 결과를 얻을 수 있었다. Ammonium sulfate 첨가량을 40-60%로 포화시켰을 때 침전되는 단백질의 농도가 최고에 달하였고,  $\beta$ -glucosidase 활성은 60% 농도로 ammonium sulfate를 첨가한 분획에서 가장 높았다. 즉,  $\beta$ -glucosidase 조효소에 대한 specific activity는 60% 농도의 분획에서 가장 높게 나타났다. 60% 미만의 구간에서는 specific activity가 낮았으며, 70% 이상의 구간에서는 단백질 침전량 및  $\beta$ -glucosidase 효소활성 모두 가장 낮게 나타났다. 따라서 ammonium sulfate를 첨가하되 60%의 농도로 첨가하여 단백질을 침전·원심분리한 후 얻어지는 조효소액을 탈염 및 농축하여 이후의 실험에서 사용하였다.

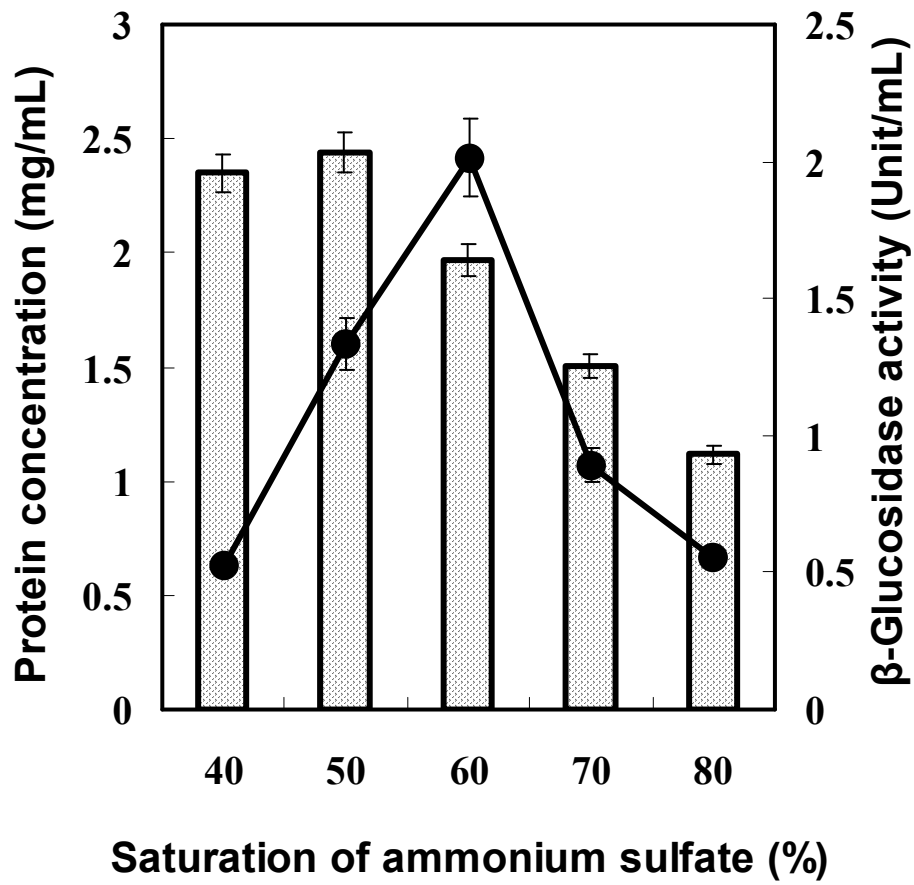


Fig. 18. Ammonium sulfate fractionation of  $\beta$ -glucosidase from Pyogo mushroom.  
 (Vertical bar: protein concentration, ●:  $\beta$ -glucosidase activity)

3) 표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 chromatography를 통한 정제

가) Anion-exchange chromatography(Hi Trap Q column)에 50 mM Tris(pH 7) buffer를 이용하여 gradient를 걸고, 50 mM Tris와 1 M NaCl(pH 7) buffer로 elution을 하였다. Flow rate은 5 mL/min, fraction volume은 0.5 mL로 진행하였다. 이렇게 얻어진 fraction을 가지고 specific activity를 확인한 결과는 Fig. 19(a), 19(b)와 같다.

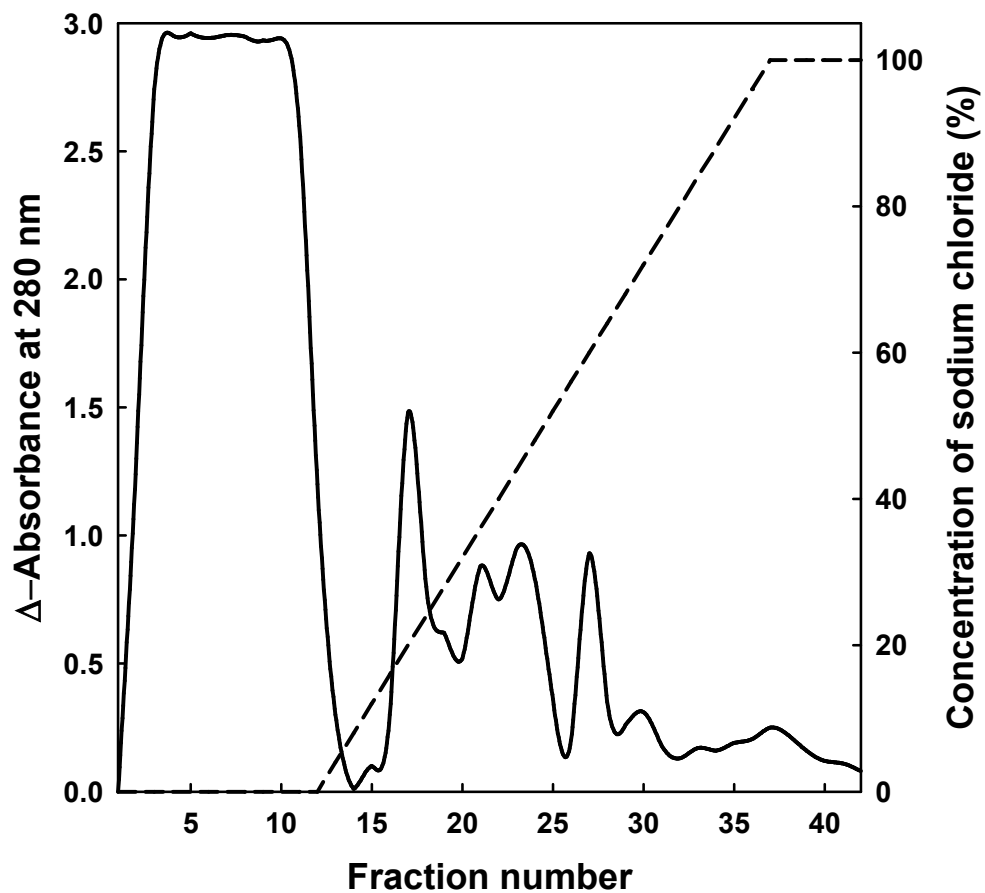


Fig. 19(a). Anion-exchange chromatography of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes* on Hi trap Q HP (1 mL) column.

(Flow rate: 1.0 mL/min, fraction volume: 0.5 mL, — : absorbance at 280 nm, ..... : sodium chloride gradient)

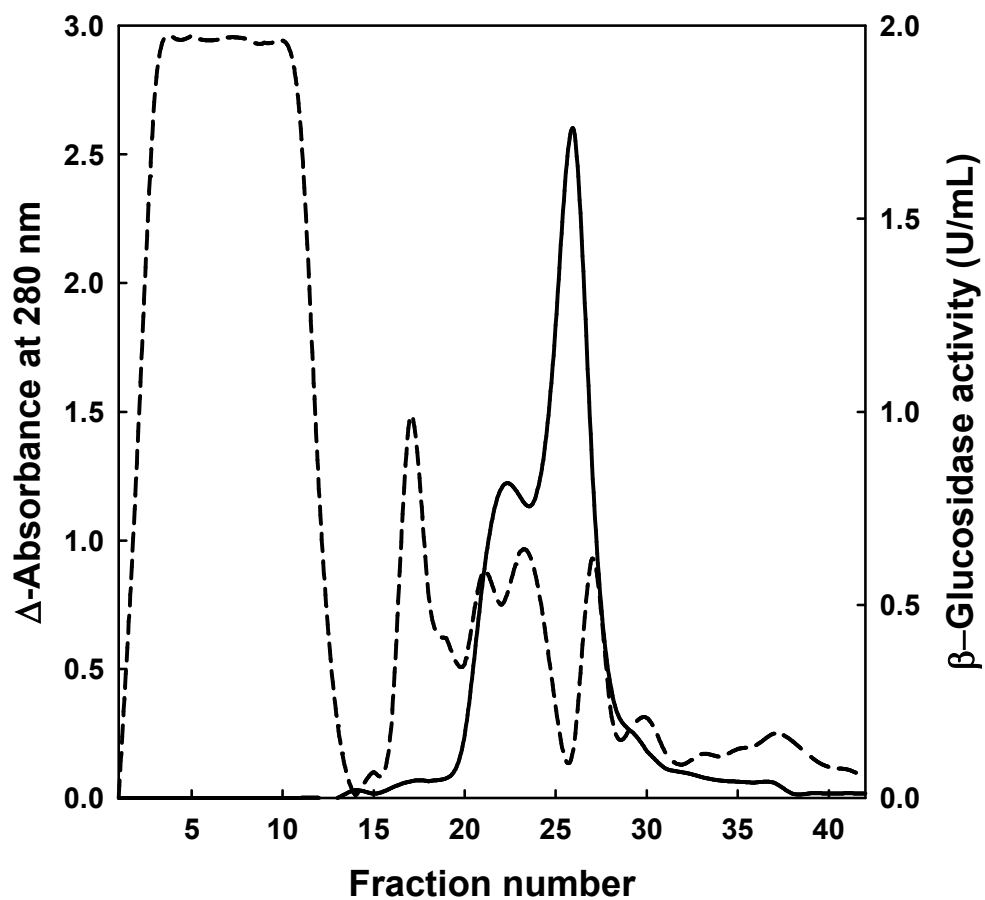


Fig. 19(b). Anion-exchange chromatography of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes* on Hi trap Q HP(1 mL) column.

(Flow rate : 1.0 mL/min, fraction volume : 0.5 mL, — :  $\beta$ -glucosidase activity, .... : absorbance at 280 nm)

나) Fraction No. 20-30번을 모아서 hydrophobic interaction chromatography를 실시하였다. 그 결과 Fig. 20(a), 20(b)에 나타내었다.

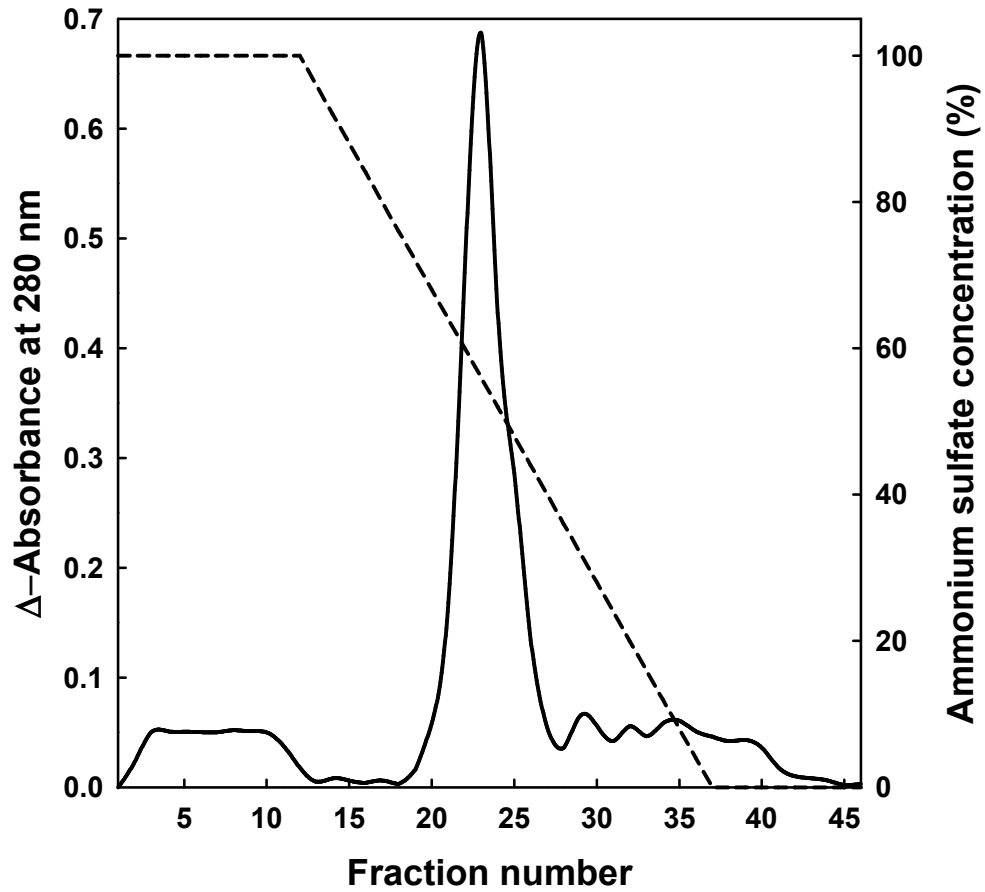


Fig. 20(a). Hydrophobic interaction chromatography of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes* on Hi trap Phenyl HP(1 mL) column.

(Flow rate : 1.0 mL/min, fraction volume : 0.5 mL, — : absorbance at 280 nm, .... : ammonium sulfate gradient)

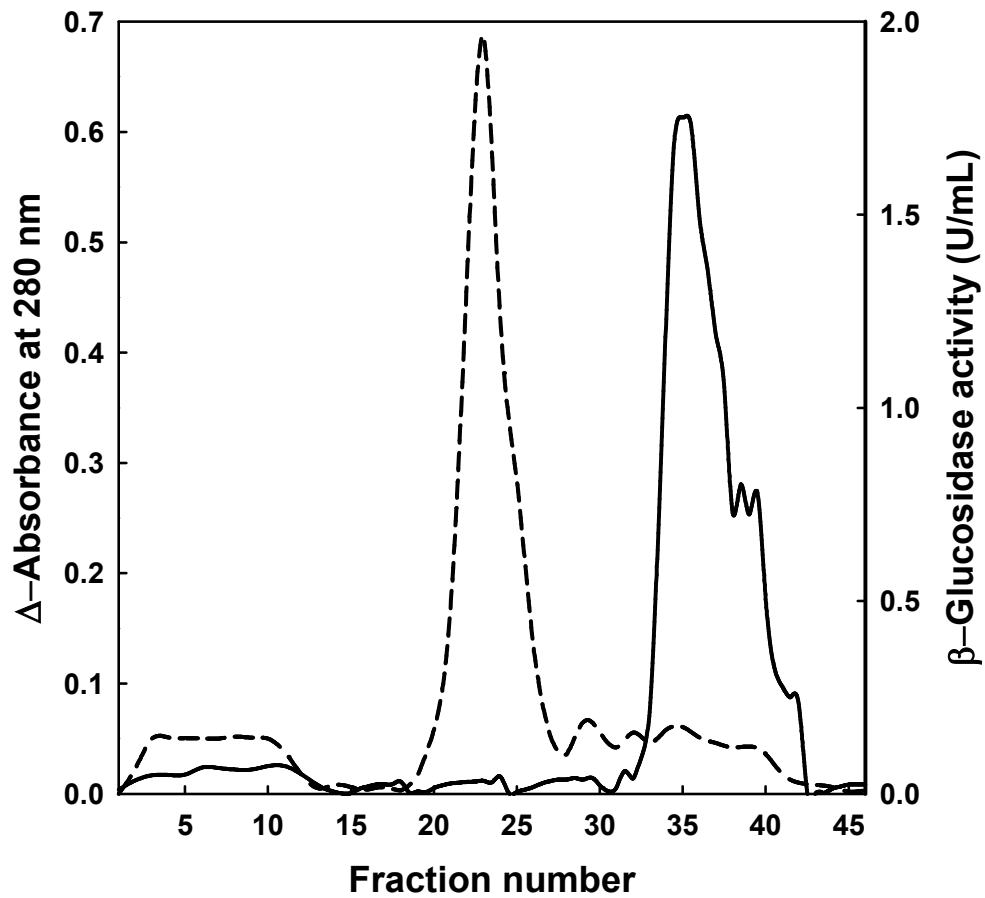


Fig. 20(b). Hydrophobic interaction chromatography of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes* on Hi trap Phenyl HP(1 mL) column.

(Flow rate : 1.0 mL/min, fraction volume : 0.5 mL, — :  $\beta$ -glucosidase activity, ....: absorbance at 280 nm)

다) 사용된 컬럼은 Hi trap Phenyl HP 컬럼이었으며, flow rate은 1.0 mL/min, fraction volume은 0.5 mL이었다. 활성이 있는 fraction No. 33-43을 모아서 농축 후 gel filtration chromatography를 실시하였다. Purification fold는 처음 조효소액에서

마지막 단계인 gel filtration까지 21.79로 증가되었음을 확인할 수 있었고, specific activity 역시 105.26 unit/mg으로 증가되었음을 확인할 수 있었다.

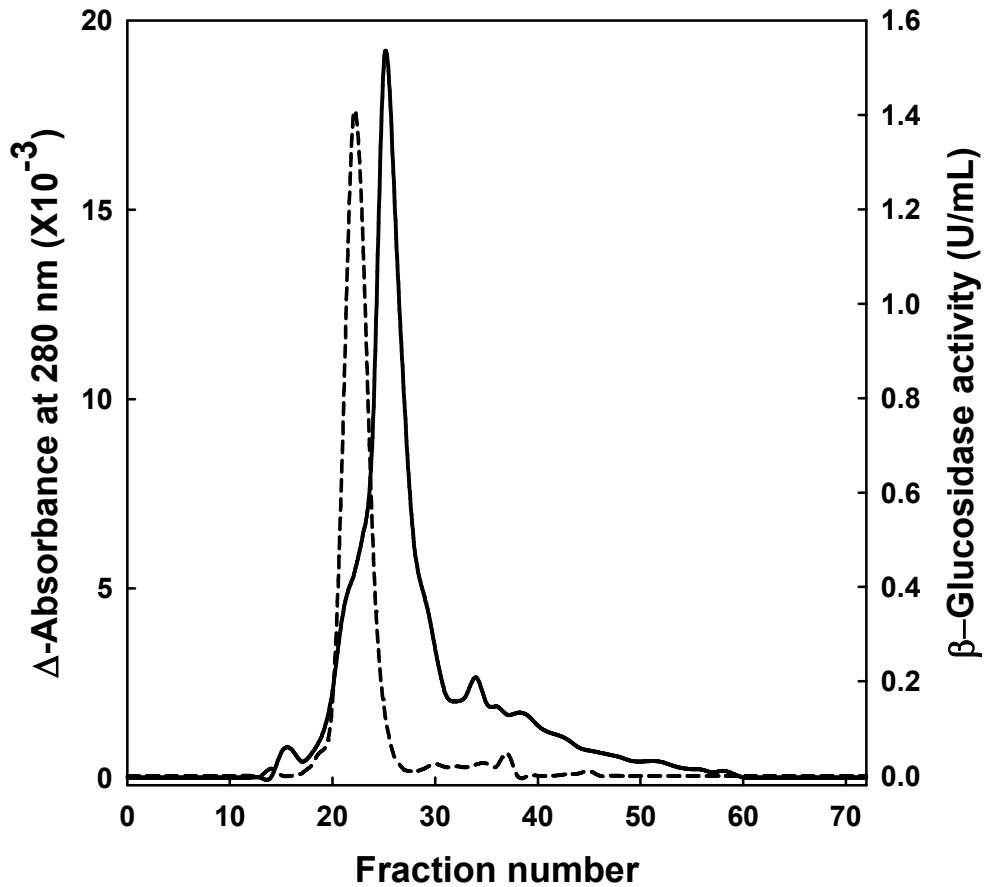


Fig. 21. Gel filtration chromatography of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes* on Superose 12 HR 10/30 column.

(Flow rate : 1.0 mL/min, fraction volume : 0.5 mL, — :  $\beta$ -glucosidase activity, ....: absorbance at 280 nm)



라) 분자량

정제과정에서의 정제도는 전기영동으로 확인할 수 있었으며, 결과는 Fig. 23에 나타났다.

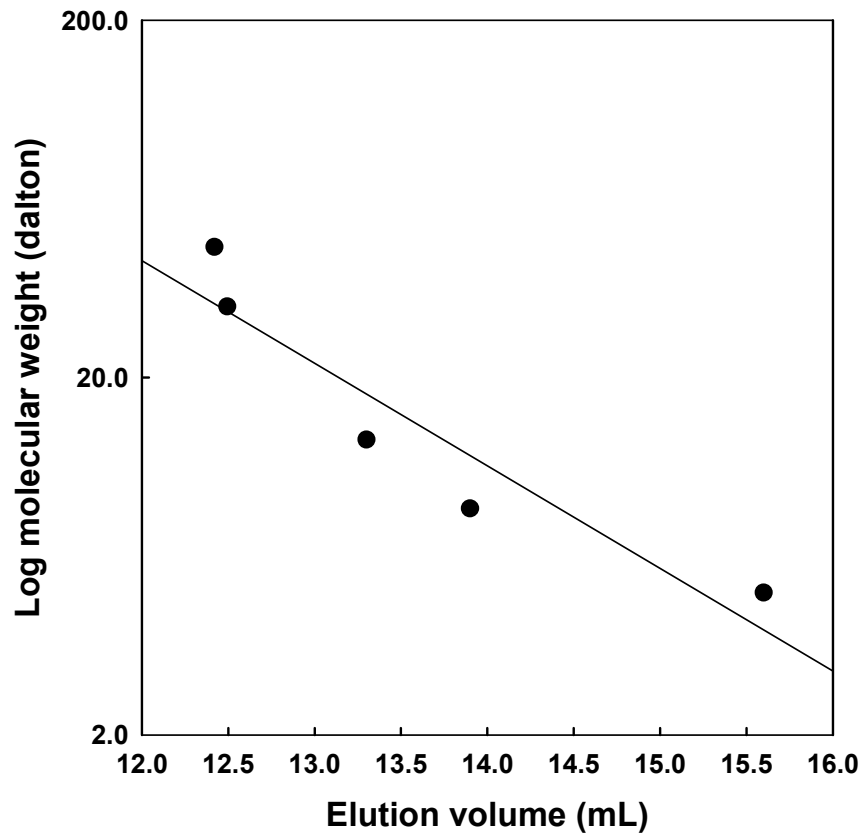


Fig. 22. Molecular mass estimation of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes* by Sephacryl S-100 column.

(C: catalase (232,000), A: aldolase (158,000), L: albumin (67,000), O: ovalbumin (43,000), H: chymotrysinogen (25,000))

kDa

211

121

100

54

38

29

20

7

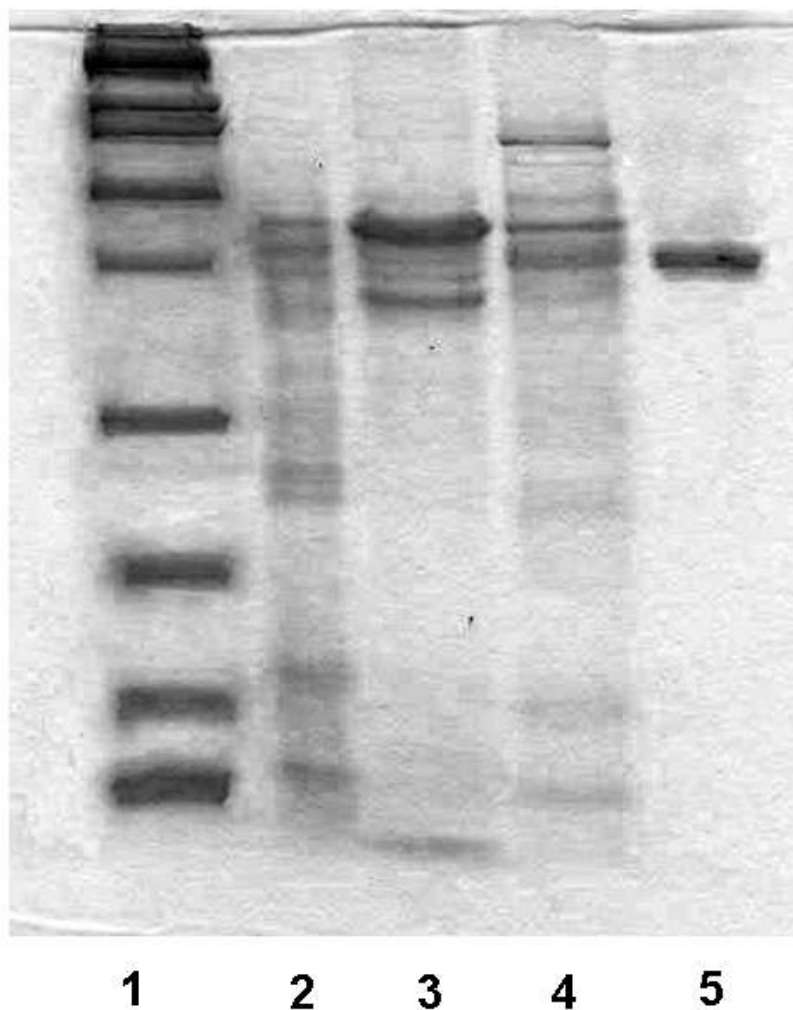


Fig. 23. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes*.

(Lane 1 : molecular marker, Lane 2 : crude enzyme of *Lentinus edodes*, Lane 3 : after anion-exchange, Lane 4 : after hydrophobic interaction, Lane 5 : after gel filtration)

마) 본 정제 과정에서의 정제도를 확인한 결과는 다음 Table 14에 나타냈다.

Table 14. Purification of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes*

Step	Total Protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Recovery (%)	Purification fold
Extract of <i>Lentinus edodes</i>	103.60	500.72	4.83	100.00	1.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation	71.05	186.92	2.63	37.33	0.50
Anion-exchange chromatography	5.30	21.89	4.13	4.37	0.85
Hydrophobic interaction chromatography	0.16	3.20	20.00	0.64	4.14
Gel filtration chromatography	0.0076	0.80	105.26	0.16	21.79

바) 효소반응속도

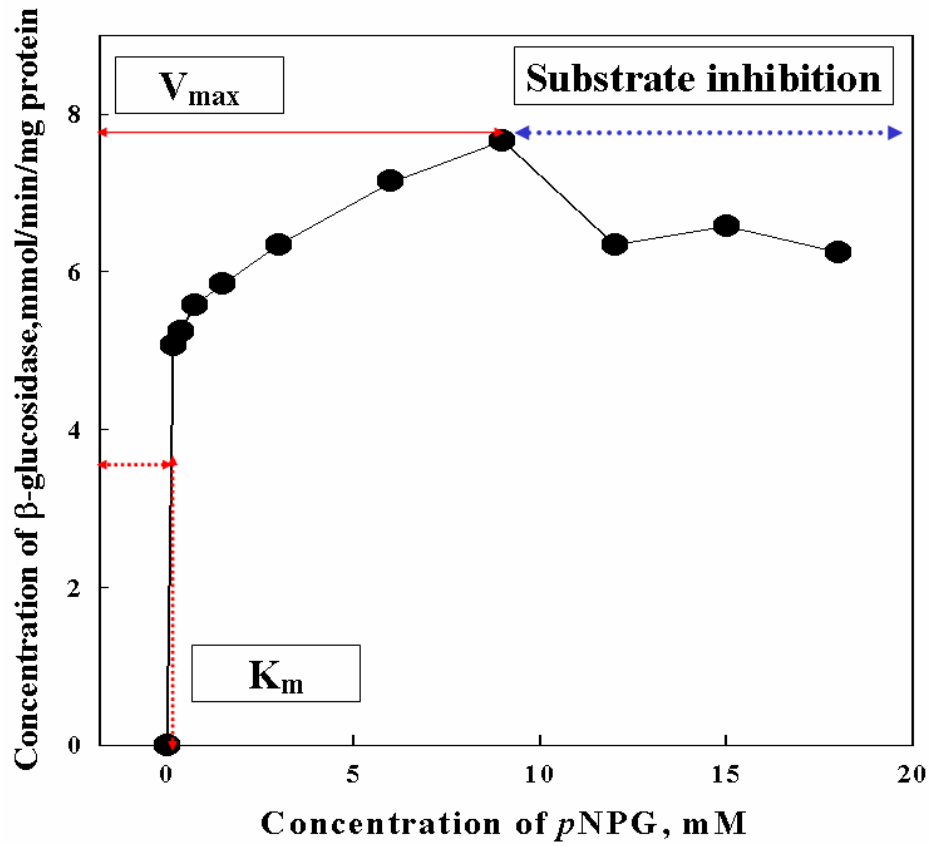


Fig. 24. Michaelis-Menten curve of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes*.

### 3) 표고버섯에서 유래한 $\beta$ -glucosidase의 안정성 규명

#### 가) $\beta$ -Glucosidase의 효소반응을 위한 pH 최적화

표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 활성에 영향을 미치는 효소-기질 반응액 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 4.0-6.0에서는 citric acid buffer, pH 6.0-8.0에서는 sodium phosphate buffer, pH 8.0-10.0에서는 Clark & Lubs buffer를 사용하여 효소 활성도를 측정된 결과, Fig. 25를 완성할 수 있었다. pH 7.0에서  $\beta$ -glucosidase의 활성이 가장 높게 나타났고, pH 4.0, 5.0, 9.0 및 10.0에서는 상대적으로 활성이 낮게 나왔으며, pH 6.0, 8.0에서는 활성이 높게 나타났다. 즉, 산성 pH와 염기성 pH에서는 효소활성이 상대적으로 낮으며, 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 중성 pH에서 매우 높은 활성을 보였다

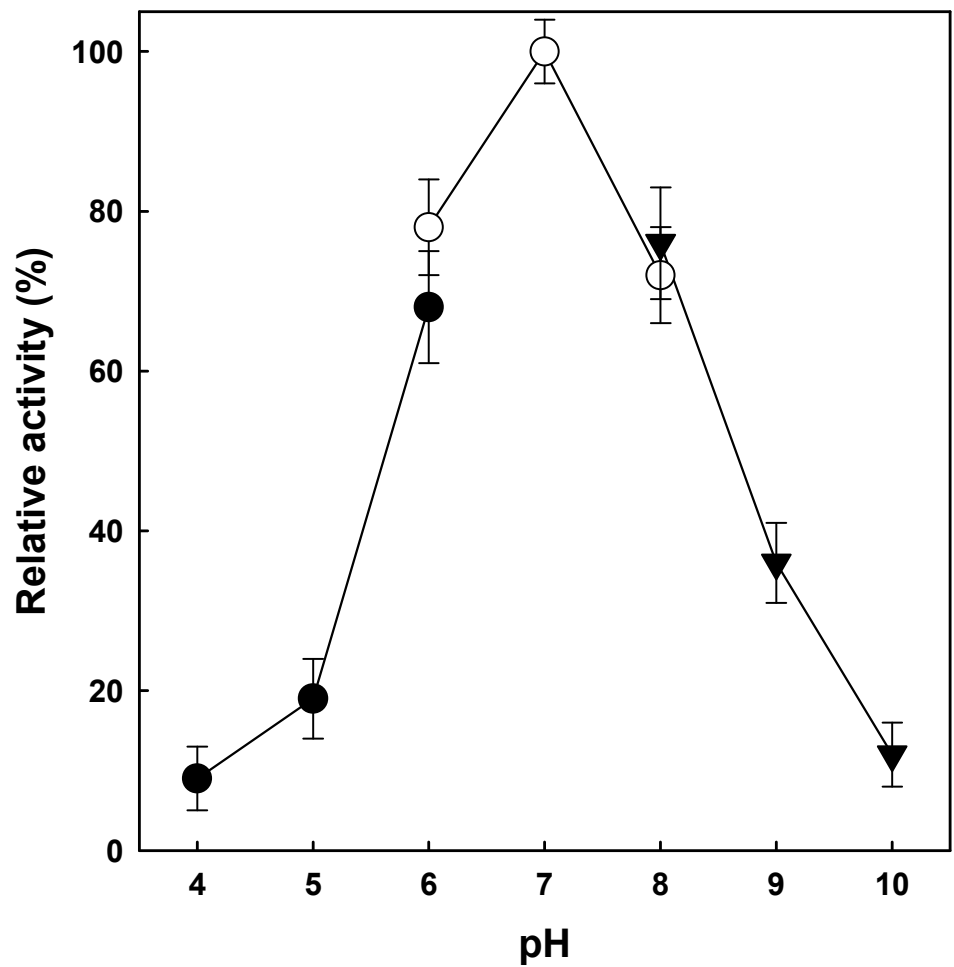


Fig. 25. Optimum pH of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes*.

(●: citric acid buffer, ○: sodium phosphate, ▼: Clark and Lubs buffer)

나)  $\beta$ -Glucosidase의 저장안정성에 대한 pH의 영향

표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 활성을 pH 4.0-10.0까지의 범위에서 pH에 대한 안정성을 측정하여 Fig. 26의 결과로 나타내었다. pH 6.0에서 저장하였을 때  $\beta$ -glucosidase의 활성은 매우 안정하였다. 그러나 pH 7.0-10.0까지의 범위에서 효소를 저장하여 실험한 결과 산성 pH에 비해 활성이 감소하는 경향을 보였다.

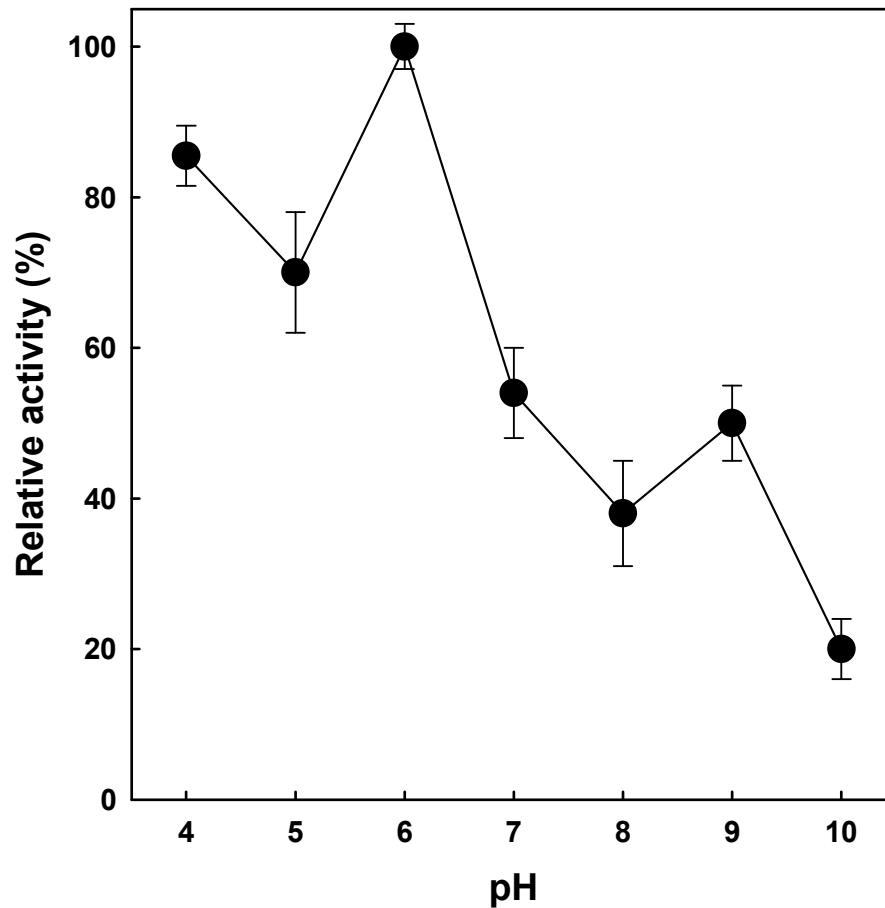


Fig. 26. Effect of pH on the storage stability of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes* after one day incubation of the enzyme at 5°C of the storage temperature.

다)  $\beta$ -Glucosidase의 효소반응을 위한 온도 최적화

표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 활성에 영향을 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 반응액의 온도를 30-70°C까지의 범위에서 10°C 간격으로 효소활성을 측정한 결과, Fig. 27을 완성할 수 있었다.  $\beta$ -Glucosidase의 효소활성 발현을 위한 최적온도는 60°C로 나타났고, 70°C부터는 활성이 떨어지는 것으로 판명되었다. 따라서, 표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 효소-기질 반응을 위한 최적 온도는 60°C로서 본 연구에서 분리한 효소는 thermophilic한 고온성 효소임이 확인되었다.



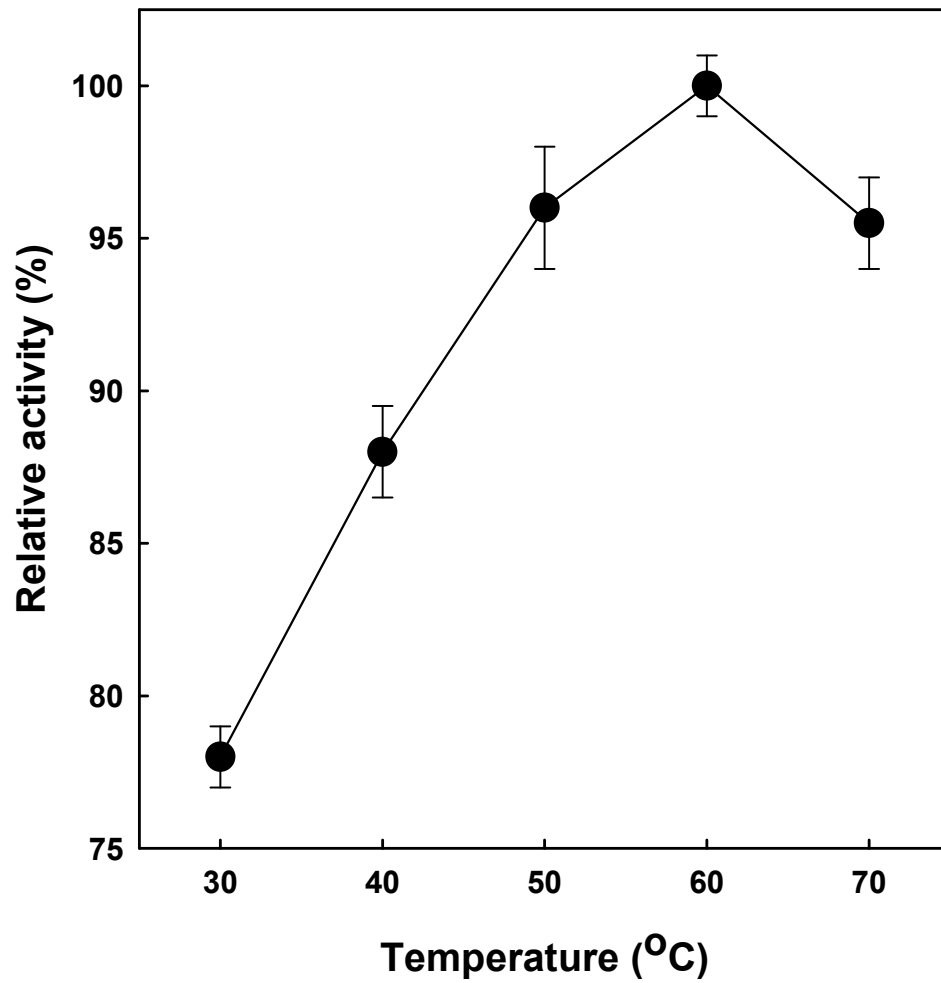


Fig. 27. Optimum temperature for the reaction of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes*.

라)  $\beta$ -Glucosidase의 저장안정성에 대한 온도의 영향

표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 활성에 영향을 미치는 저장 온도의 영향을 알아보기 위하여, 30-80°C까지 10°C 간격으로 각 온도에서 24시간 동안 항온수조에서

온도에 대한 안정성을 측정한 결과를 Fig. 28에 나타내었다. 30℃에서 저장하여 실험한 결과 효소의 활성이 90%이상으로 매우 안정하게 유지되는 것으로 판명되었다. 40-60℃에서는 30℃보다는 효소의 활성이 감소하였으나 60% 이상, 70℃와 80℃에서는 20% 미만의 활성이 잔존함을 확인할 수 있었다. 따라서, 표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase는 30℃에서 하루 동안 저장해도 효소가 실활 되지 않지만 하루 이상 장기적으로 저장하기 위해서는 30℃ 이하에서 저장하는 것이 요구되는 것으로 확인되었다.

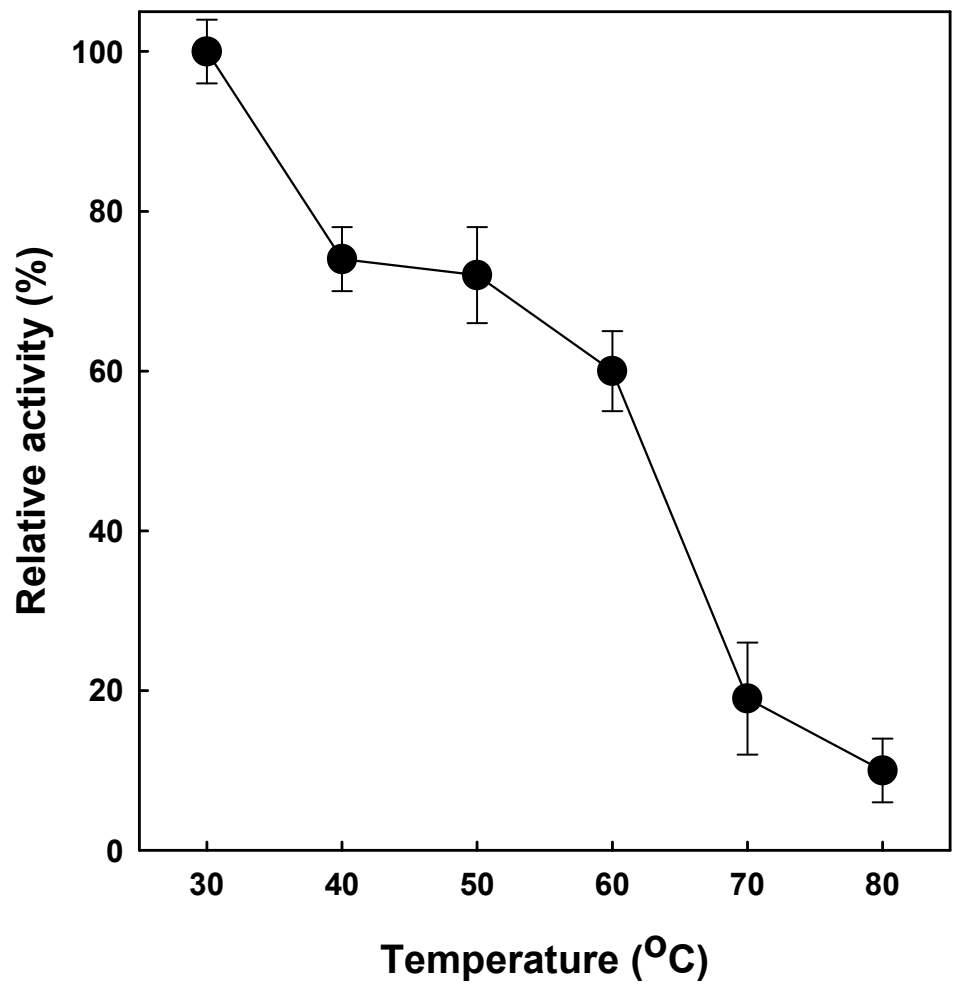


Fig. 28. Effect of temperature on the storage stability of  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes* after one day incubation of the enzyme at various of kinds of storage temperature and 6.0 of pH.

마)  $\beta$ -Glucosidase의 열 안정성 측정

$\beta$ -Glucosidase를 5°C 및 40-90°C까지 10°C간격으로 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분간 항온수조에서 열에 대한 안정성을 측정하여 Fig. 29의 결과로 나타내었다. 5°C에서 60분간 효소활성이 거의 변화를 나타내지 않았으나, 40-50°C에서 10분 동안의 열처리에 의하여 효소활성이 감소하는 경향을 보였으며, 60-90°C에서는 효소활성의 감소정도가 급격하게 감소하였으며 이후 효소활성이 일정하게 유지되는 경향을 보였다. 이상의 결과로부터,  $\beta$ -glucosidase의 내열성 pattern은 60°C를 경계로 하여 확연히 구분되는 경향을 나타내었다.

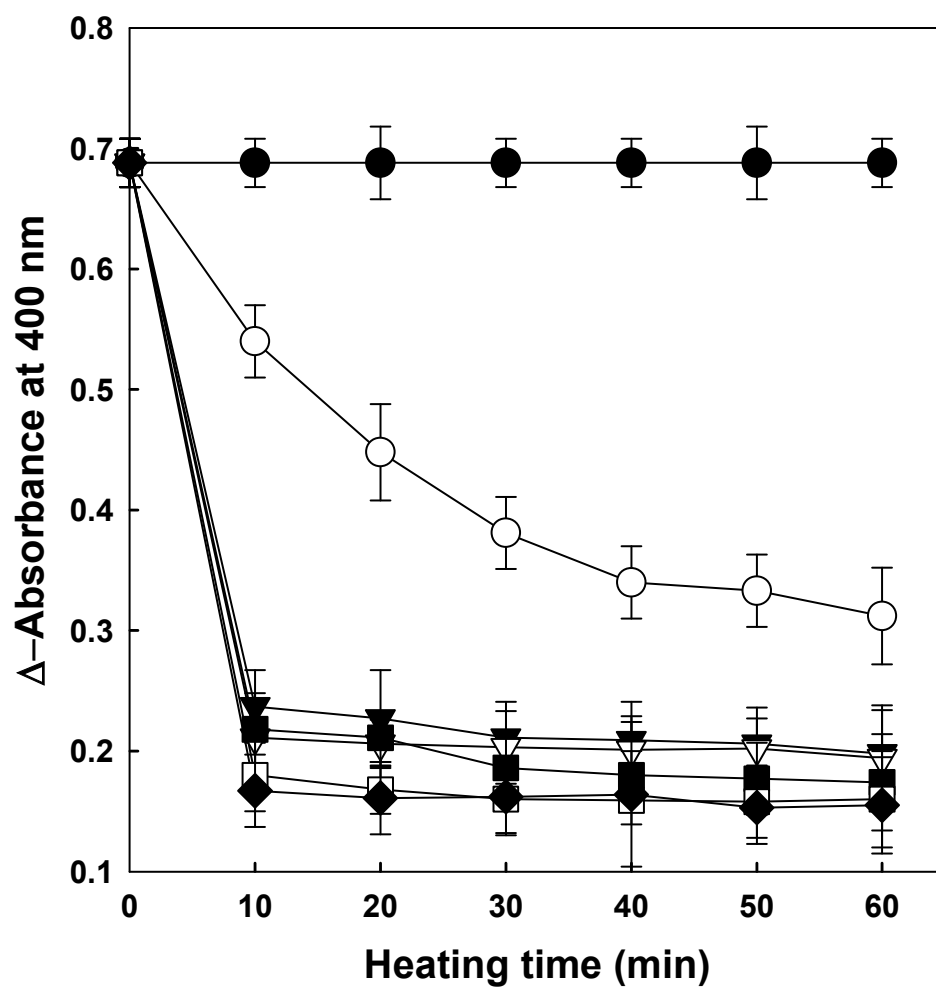


Fig. 29. Heat inactivation of the  $\beta$ -glucosidase from *Lentinus edodes*.  
 (●: 5°C, ○: 40°C, ▼: 50°C, ▽: 60°C, ■: 70°C, □: 80°C, ◆: 90°C)

다. 효소단백질 활성 측정(fibrin plate assay)법의 확립

효소단백질 활성 측정(fibrin plate assay)법을 확립하였으며, 국산 청국장 제조 시 사용하는 국내산 발효대두에서의 fibrinase 활성을 조사할 필요가 있으며, 이를 통한 국내 농가의 소득증대 가능성을 타진할 필요가 있다.

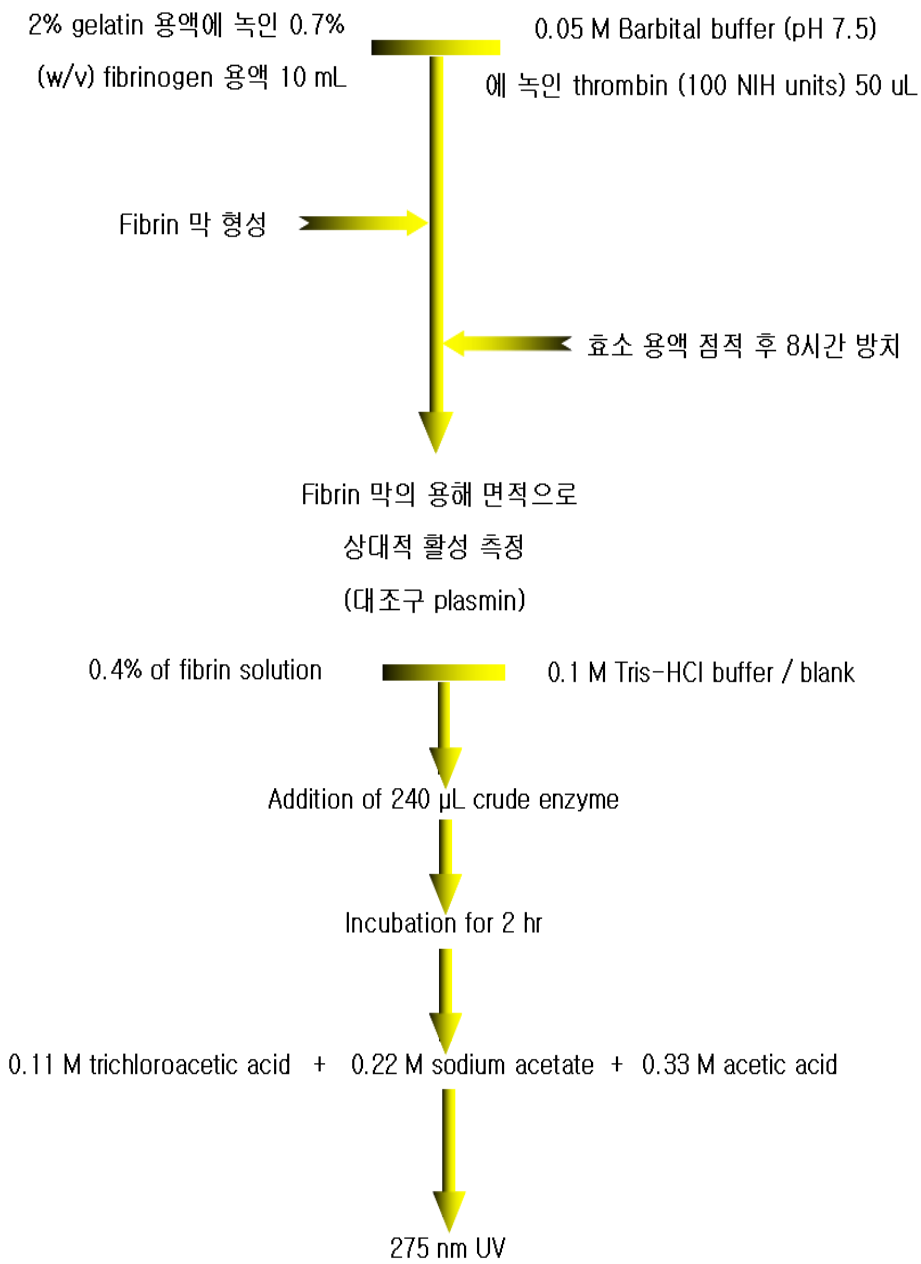


Fig. 30. Fibrinolytic enzyme assay.

마. 결론

$\beta$ -Glucosidase는 disaccharidase의 일종으로 maltose, sucrose, turanose 같은 glucoside를 분해하는 효소로서 콩에 존재하는 주요 식물성 호르몬인 아이소플라본(isoflavones)의 배당체(glycones) 형태를 비배당체 형태로 전환시켜주는 역할을 한다. 황산 암모늄 침전법과 Hi trap Q HP anion-exchange column, Hi trap phenyl hydrophobic interaction column, Sephacryl S-100 size exclusion column 등을 이용한 chromatography 기술을 이용하여  $\beta$ -glucosidase를 정제하였다.  $\beta$ -Glucosidase 효소는 표고버섯으로부터 약 21.79배 정제되었으며, 정제된 효소의 비활성도는 105.26 unit/mg protein으로 나타났다.  $\beta$ -Glucosidase는 SDS-PAGE에 의해 정제도가 확인되었으며, 98 kDa의 분자량을 가짐을 확인하였다.

또한 표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase를 분리·부분정제한 후, 효소적 저장 안정성에 대한 특성을 규명하였다. 표고버섯에서 유래한  $\beta$ -glucosidase의 최적 pH를 측정된 결과 pH 7.0에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었으며, pH 6.0의 저장 환경에서 안정하였다. 또한, 본 효소의 활성을 위한 최적온도는 60°C로 판명되었으며, 70°C부터는 상대 활성도가 감소하였다. 90°C까지는 열에 대하여 대체적으로 안정하였으며, 또한, 30°C에서 하루가 경과한 후에도 효소 활성이 감소하지 않고 안정한 것으로 보아 고온성 효소임을 확인하였다.

### 3. 기능성 탄수화물 소재

가. 탄수화물 유래 건강기능성 성분에 관한 문헌 정리

#### 1) 기능성 다당류

보리와 귀리는 대표적으로  $\beta$ -glucan이라는 수용성식이섬유를 다량 함유하고 있다. 화곡류의 종실, 특히 보리와 귀리의 배유 세포벽에 다량 축적되어 있는  $\beta$ -glucan은 일종의 저장물질로서 종자의 발아와 밀접하게 관련되어 있는 물질로 알려져 있



다. 보리, 귀리 등의 세포벽에는  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)과  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucoside 결합이 약 3:7의 비율로 이루어진 mixed linked  $\beta$ -D-glucan이 많이 함유되어 있는데 다른 곡류와 비교해 볼 때 특히 보리의 배유 세포벽에 그 함량이 비교적 높으며 그 함량이 3.0-6.9%에 이른다.  $\beta$ -Glucan에는 수용성과 불용성 성분이 공존하는데 그 중 수용성 부분은 38-69%이다. 또한 귀리의 경우  $\beta$ -glucan은 다당체가 단백질과 공유결합 되어 있거나 비탄수화물 성분과 결합되어 있어 화학적으로 다양한 성분과 크기를 가지고 있다. 귀리의  $\beta$ -glucan 함량은 품종과 부위에 따라 차이가 있으나 일반적으로 귀리에는 약 4% 가량이 함유되어 있으며 시판되고 있는 귀리 겉겨(oat bran)에는 약 7-10% 정도가 함유되어 있고, 특별한 공정으로 처리된 경우에는 19% 이상이 되는 것도 있다. 귀리  $\beta$ -glucan은 약 80%가 수용성으로 수용성이 차지하는 비중이 높으며, 생리 활성의 측면에 있어서도 수용성과 불용성  $\beta$ -glucan은 차이가 있는 것으로 알려져 있는데, 특히 수용성  $\beta$ -glucan은 혈중 콜레스테롤 감소효능에서 매우 우수한 것으로 알려져 있다.

Arabinoxylan은 곡류 안의 식이섬유의 주요한 구성 물질로 우리 식이의 큰 부분을 차지하고 있다. 그러나 아직까지 arabinoxylan의 생리적 효과는 크게 알려져 있지 않지만 식후의 glucose와 insulin 반응은 arabinoxylan이 풍부한 섬유의 섭취에 따라 증가하는 것이 보고되었다. 게다가 두 가지 형태의 당뇨병에 대한 효과가 있는지에 대한 연구도 주목되고 있다. 밀은 전 세계적인 주요 작물 중 하나이며 전체 곡류 생산 중 거의 30%를 차지하는 주요한 에너지 급원으로써, 밀가루뿐만 아니라 밀 부산물의 생리활성에 대한 관심이 높아지고 있다. 밀 배아 세포의 주된 다당류는 pentosan인 arabinoxylan으로 이는 5탄당인 arabinose와 xylose로 구성되어 있다. 밀 배아의 arabinoxylan은  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)와  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)으로 연결된 arabinose의 매우 짧은 곁가지로 분지된  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-xylan 골격을 가진 고도로 분지된 구조를 보이며 곁가지의 말단 비환원 위치에 glucuronic acid와 이의 4-O-methyl ether도 존재한다. 한편 미강에서 추출된 arabinoxylan이 NK(natural killer) cell의 암세포 독성 효과를 증가시킨다고 보고되었으므로 밀에서 분리된 arabinoxylan도 이와 같은 활성화 작용을 가질 것으로 기대해 볼 수 있다.

Fructan은 fructose에 기초를 둔 이당류와 다당류의 공통적인 구조적으로 다양한

종류이다. 식물류에서는 일부 종만이 fructan을 형성할 수 있으며, fructan은 starch나 대신할 수 있는 것을 저장하는 탄수화물로써 중요한 역할을 하고, 건조와 동결에 대한 내성에 기인한다고 보고 있다. 식물의 fructan은 3개에서 수백 개의 fructose 단위 내에서, 다양한 구조와 사슬 길이를 가지고 있다. 가장 간단한 fructan 중 하나는  $\alpha$ -(1→2) 결합을 하고 있는 fructose로 구성되어 있는 선상 inulin인데, 주로 *Asterales*(치커리)에 속하는 식물에 존재한다. *Lilaceae* 목 안에는 다른 형태의 inulin이 존재하며, 이를 inulin neo-series라고 부른다. 식물에서 fructan 구조가 왜 다양한 지에 대한 이유는 아직 잘 알려져 있지 않지만, 다양한 물리적 필요에 의한 것이거나, 다른 과(科) 안에서 fructan 생합성의 다양한 진화의 결과일 수도 있다고 추측하고 있다. Fructan은 인체에서 소화 될 수 없는, 가용성 식이섬유이며 유익한 장내 세균에 의해 발효될 수 있기 때문에 인체건강에 이로운 영향을 주는 기능성 식품으로 여겨진다. Fructan은 우리가 먹는 양파, 부추, 엉겅퀴와 같은 식물에 자연적으로 존재하기 때문에 일상적인 식이의 한 부분이다. 또한 chicory inulin은 현재 식품 첨가제로 사용하는 fructan이다. 물에서 유화될 때, inulin은 지방과 비슷한 구조를 가지는 gel을 형성하지만, 칼로리는 훨씬 낮다. 이것은 지방을 대신할 수 있는 물질로 요구르트, 스프레드, 아이스크림에 사용되고 있다. Fructan은 다양한 면으로 건강을 증진시키는데 이용되고 있는데, 장에 이로운 *Lactobacilli*와 비피도 bacteria의 성장을 촉진시키고, 그로 인해 병원성 박테리아를 덜 풍부하게 하는 방법으로 장의 bacterial flora를 대체한다. 최근 fructan은 상업적으로 이용 가능한 chicory inulin보다 이로운 균 성장에 더 좋은 전구체인 neokestose로 보여져 왔으며 neokestose는 주로 양파에서 발견된다. 또한 fructan은 칼슘 흡수를 도와줌으로써 골다공증 방지에 유용하다. 게다가, high-fructan diet의 결과로 혈액 안에서 insulin, cholesterol, triacylglycerol과 phospholipid의 농도는 낮춰진다. 이러한 모든 효과는 일반적으로 건강을 증진시켜 주는데 도움을 주는 것으로, 현재 발견된 중요한 기능성 식품 요소 중 하나로 여겨지고 있다.

Pectin은 식물 세포조직의 일차 세포벽(primary cell wall)이나 세포 사이의 중간층(middle lamellae)에서 발견되는 다당류로서 식물세포의 기계적 강도 및 세포간의 결합에 관계하며, 식물 세포벽의 구성 다당류 중 가장 복잡한 형태로 존재하고 있다.

또한 세포벽 내에 존재하는 수분의 분산과도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. Pectin은 야채나 과일의 숙성 중 조직의 단단함(firmness), 응집성(cohesiveness) 및 이들 가공제품의 texture, 점도에 큰 영향을 미친다. 최근 식품재료 및 생약의 열수추출물 중 고분자 회분에서 다양한 약리 활성이 관찰되고 있다. 특히 pectin류에서 높은 활성이 보고되어 이들을 의약품 내지는 건강 유지 목적의 기능성 식품으로써의 응용이 가능할 것으로 생각되고 있다. Pectin은 적당한 산과 당의 존재 하에서 gel과 film을 형성할 수 있다는 점 때문에 식품 가공 분야에 있어 중요한 역할을 담당해 왔으며 식이 섬유로서의 생리 효과가 기대되어 식품공업이 있어 수요가 높은 재료이다.

## 2) 기능성 소당류

올리고당의 특성 및 종류에 대해 살펴보면, 설탕으로 인한 비만, 당뇨 등 부정적인 결과가 강조됨으로써 이에 대한 대응책의 하나로서 새로운 당류로 부각되고 있는 것이 올리고당으로 이것은 소화가 잘 안 되는 난소화성으로써 저칼로리를 나타내며, 충치 예방효과 및 장내 유용 미생물인 비피더스균에 의해 선택적으로 이용되는 장점 등의 연구 결과가 보고되고 있다. 올리고당도 여러 가지가 존재하며 올리고당마다 약간씩 다른 생리 활성기능이 있는데 연구 논문에 발표된 자료에 의하면 저칼로리에 의한 비만 방지, 충치 예방 등이 대부분의 올리고당의 생리 활성 기능이고, chitin 올리고당은 면역증진, 항암성을 가지고 있다는 보고가 있다. 올리고당은 크게 4종류로 나눌 수 있는데 프락토 올리고당, 대두 올리고당, 말토 올리고당, 갈락토 올리고당 등으로 나눌 수 있다. 실제로 대부분의 이용되고 있는 올리고당 류는 자연에 존재하는 거라고 보기 보다는 특정한 미생물 효소에 의하여 생성되는 경우가 더 많다.

첫 번째로 프락토 올리고당은 설탕을 과당 전이효소로 처리하여 제조하며, 소화 흡수되기 어려우나 장내에 도달하여 비피더스균의 먹이가 되고 웰츠 균의 생육억제 등으로 내부 부패 물질을 감소시키며 장내 세균 총의 개선 효과가 있으며, 난충치성으로 주로 음료, 건강보조식품, 과자류, 제빵 등에 이용되고 있으며 일본의 경우 생산량의 50%를 사료용으로 쓰이고 있다. 두 번째로 대두 올리고당은 농축 대두 단백질 제조시에 대두 유청을 추출, 정제하여 제조하므로 생산 단가가 높다. 감미도는 설탕

당의 70%정도이며, 청량감이 있고 비피더스균의 증식 효과와 열과 산에 강하여 가공상 장점이 많으므로 음료에 주로 이용된다. 특히 비피더스균에 대한 증식효과는 다른 올리고당보다 수배의 효과가 있어 유아 식품 및 분유에 첨가할 목적으로 수요가 늘고 있다. 콩 함유 올리고당 중 raffinose는 sucrose의 glucose말단 부분에 galactose가  $\alpha$ -(1→6)으로 결합된 삼당류(trisaccharide)이며, stachyose는 tetrasaccharide로서 raffinose의 galactose 말단 부분에 1개의 galactose가  $\alpha$ -(1→6)으로 결합된 구조를 갖고 있다. Raffinose와 stachyose는 식물체의 저장당으로 다양한 식물체에서 발견되고, 두류는 올리고당의 풍부한 공급원이며 특히 콩에는 많은 양의 raffinose와 stachyose가 함유되어 있다. 인체에서 콩 올리고당의 생리적 특성을 본다면 raffinose와 stachyose는 포유류의 소화효소에 의해서 소화되지 않는 난소화성으로 알려져 있으며, 콩으로부터 추출한 raffinose와 stachyose를 대상으로 소화율을 검정한 결과 인간의 타액에 존재하는 amylase에 의해서는 가수분해 되지 않는다는 것이 증명되었다. 또한 인체 내에 유익하다고 알려진 비피도 박테리아의 생육을 증식한다. 그 결과 부패균에 의한 대사산물 생성을 억제하고, 배변 활동의 증가를 유도하며, 혈장 내 총 지방, 콜레스테롤 및 중성 지방 함량을 감소시켜 만성적 성인병의 유발을 억제하는 건강 기능성을 나타낸다. 세 번째로 말토 올리고당은 옥수수 전분을  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase 등의 효소로 가수 분해하고 이를 chromatography로 분리하여 얻는다. 최근에는 일정한 크기의 올리고당으로 분해하는 효소가 미생물로부터 발견되어 공업적으로 이용되고 있으며, 감미는 낮고, 열기 쉬우며, 잘 분해되지 않고 점도가 높고, 보습 효과가 있다. 음료, 아이스크림, 빙과류, 카라멜, 분말음료, 분말스프 등의 제조에 이용된다. 네 번째로 갈락토 올리고당은 유당을  $\beta$ -galactosidase로 전이하여 제조하며 올리고당 중 유일하게 동물성 소재를 이용한 것으로 모유 중에서도 존재가 확인되었으며, 특히 열과 산에 강하다.

### 3) 연구대상 종실류 및 건강기능성 탄수화물 성분 선정

위와 같은 내용을 종합하여 볼 때 식물체로부터 유래한 다당류의 기능이 다양하며,  $\beta$ -glucan의 경우 국내·외로 많이 연구가 이루어진 가운데 생리기능이 유용하다고 판단되어  $\beta$ -glucan에 대한 연구 가치는 크다고 할 수 있겠다. 하지만 현재 국내

에서 진행되고 있는  $\beta$ -glucan에 대한 대부분의 연구는 버섯 균사체나 효모를 대상으로 하고 있으나 생산성이 비교적 낮으며 제품 개발 시 가격이 매우 높아 경쟁력이 낮은 단점을 가지고 있다. 그러므로 우리는 주변에서 쉽게 얻을 수 있는 곡류에서  $\beta$ -glucan에 대한 연구가 필요하다고 생각한다.

그러면,  $\beta$ -glucan의 생리적 기능에 대해 좀 더 자세히 알아보도록 하자. 보리, 귀리 등의 세포벽에는  $\beta$ -(1, 3)과  $\beta$ -(1, 4) glucoside 결합이 3:7의 비율로 이루어진 혼합 결합된  $\beta$ -D-glucan이 많이 함유되어 있는데 다른 곡류와 비교해 볼 때 특히 보리와 귀리의 배유 세포벽에 그 함량이 비교적 높다고 알려져 있다.

보리의 특징에 대해 살펴보면, 보리는 맥주용의 겉보리를 제외하고, 도정 과정을 거친 입식 형태의 취반용 도정 보리(pealed barely)나 빵, 국수, 과자, 술 등 가공용 보리 가루로 생산되는데 이 때 양산된 보리겨는 전곡립의 30-35%로써 전국 규모 생산량이 약 13만여 톤 정도이나 거의 사료로 이용되고 있는 실정이다. 그러나 보리겨는 단백질, 지방, 무기질 및 비타민 등이 풍부하며, 더욱이 식이섬유인  $\beta$ -glucan과 polyphenol 화합물 등 영양 생리학적인 기능성 물질이 상당량 함유된 것으로 알려진 바, 최근 간장, 제빵 등 가공 활용 방안이 연구 보고되고 있다. 보리에는 품종에 따라 약 3-8%의  $\beta$ -glucan이 함유되어 있으며 찰보리는 메보리 보다 비교적 함량이 많다. 한편  $\beta$ -glucan의 분리 기술은 건조 분쇄 및 체질과 용매 추출법 등이 있는데 가루입자크기, 추출온도 pH 등에 따라  $\beta$ -glucan의 추출수율, 점성, 순도가 다르다.

귀리는 벼과에 속하며 일반적으로 냉습한 날씨에서 잘 자라는 대표적인 곡류로서 과거에는 사료로 많이 사용되어 왔으나 근래에는 혈중 콜레스테롤 강하 등의 생리활성이 알려지면서 기능성 식품소재로서 관심을 끌고 있는 품종이다.

$\beta$ -Glucan은 처음에 양조 산업 및 가축 사료와 관련하여 많은 연구가 이루어졌으나 최근 인체 건강에 미치는 생리적 효과에 관심을 끌기 시작했다. 콜레스테롤은 인체 내에서 탄수화물 대사, 비타민 합성, 성호르몬 합성, 혈액순환 조절 등 중요한 작용을 하는 물질이지만 과다하게 생성되거나 섭취되어 체내에 콜레스테롤 함량이 높으면 동맥 경화를 비롯한 심장질환, 고혈압, 당뇨병 등의 성인병을 유발시키게 된다. 현대인의 성인병에는 식이요법이 중요하여 포화 지방산이나 콜레스테롤이 많은 음식을 피하고 식이섬유소가 풍부한 음식을 많이 섭취함으로써 혈관이나 간의 콜레스테

를 함량을 줄이고 고혈압 등 성인병을 예방할 수 있다. 최근에  $\beta$ -glucan을 섭취함으로써 간의 콜레스테롤 생합성을 저해함은 물론 음식물로 섭취된 포화지방산 등을 흡착 배설시킴으로써 콜레스테롤의 축적을 억제 시킨다는 연구가 많이 보고되고 있다. 수용성 식이섬유( $\beta$ -glucan)가 풍부한 식이는 사람에게 있어서 hypocholesterolemic 효과를 나타내어 serum low lipoprotein cholesterol을 감소시키고, 대변으로 담즙산을 증가시키는 것으로 알려져 있고, 동시에 high density lipoprotein cholesterol(HDL)을 증가시킨다. 또한  $\beta$ -glucan이 glycemic index를 낮추는 효과도 나타내어 blood glucose tolerance가 낮은 사람에게 유용한 것으로 보고되어 있다. 즉, 동물 실험과 인체 실험에서 수용성 식이섬유가 풍부한 보리와 귀리의 섭취는 혈중 cholesterol의 함량을 낮출 수 있다는 보고가 있고 이러한 효과는  $\beta$ -glucan에 기인하는 것으로 알려져 있다. 또한, 장관 내용물의 점도를 높여 glucose의 흡수를 저해함으로써 혈당치를 낮추고 insulin 반응을 저하시킨다.

또한 효모나 식물들에서 추출한  $\beta$ -glucan의 경우는 순수하게  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 결합을 하고 있으며 항종양 효과나 항미생물 효과가 나타나는 것으로 연구되고 있다. 세포 표면 수용체는  $\beta$ -glucan, lectin, natural killer(NK) cell, 다양한 임파구 아군 등과 다양하게 결합해 있다.  $\beta$ -Glucan에 의한 이러한 수용체들의 결합은 감염에 저항할 수 있고 항종양 작용 특성을 leukocytes, 식세포작용, 염증을 일으키는 cytokine의 생산, chemokine, 항미생물작용, 면역 적응들과 관련하여 일으킬 수 있다.

이와 같이  $\beta$ -glucan은 영양학적으로 또는 생리적 기능성이 높아  $\beta$ -glucan을 이용한 다양한 가공제품이 모색되고 있으며 생리적으로 유효한 식이섬유 성분인  $\beta$ -glucan을 분리하여 인위적으로 식품에 첨가할 필요성이 대두되고 있다.

#### 4) 선정된 종실류 유래 $\beta$ -glucan 추출법 정리

$\beta$ -Glucan은 보리 및 귀리 등 곡류의 세포벽에 다량 존재하지만 전분, 단백질 및 소량의 섬유소와 복잡하고 단단하게 결합되어 있어 추출 조건에 따라 추출 수율이 달라지므로 최적화된 추출방법의 확립이 필요하다. 따라서 기존에 보고된 추출 및 정제법을 정리하고 문제점 및 개선점을 살펴볼 필요성이 대두되었다. 또한, 현 실험실에서 다양한 방법의 비교, 검토를 통하여 효율적인 추출법을 제시해 보고자 한다.

가) 추출법 I - Wood 등의 방법

보리의  $\beta$ -glucan은 Wood 등의 방법을 보완한 Lee의 방법에 따라 조제한다.

(1) 보리가루를 증류수에 현탁시키고 20%(w/v) sodium carbonate로 pH 10으로 조정 한 후  $\beta$ -glucan을 추출하고 원심 분리하여 상정액은 모으고 침전물에 대하여 위 의 알칼리 추출을 2회 반복한다.

(2) 2 M HCl로 상정액의 pH를 4로 조정하여 단백질을 침전시킨 다음 상정액에 isopropyl alcohol을 50%가 되도록 첨가하여 방치한 후 원심 분리하여 침전물을 회수 하고 건조하여 crude  $\beta$ -glucan을 얻는다.

(3) 분리한 crude  $\beta$ -glucan을 증류수에 0.3%(w/v) 되도록 분산시키고 가열(100°C이 상)하여 용해시킨 후 원심 분리하고 상정액에 ammonium sulfate를 30%(w/v)가 되 도록 첨가한다. 이 용액을 원심 분리하여 얻은 침전물을 증류수로 가열 용해시킨 후 투석의 과정(MWCO 6,000-8,000, Spectrum Medical Industry, USA)을 거친다.

(4) 이를 pH 6.9로 조정하고  $\alpha$ -amylase(1,013 U/100 mL  $\beta$ -glucan solution)를 첨가 하여 40°C에서 1시간 반응시키고, pH를 다시 7.5로 조정 한 후 pronase(70 U/100 mL  $\beta$ -glucan solution)를 첨가하여 40°C에서 1시간 반응 시킨다.

(5) 반응 후 가열하여 효소를 불활성화 시키고 원심 분리로 상정액 만을 분리해 증 류수에 대하여 투석을 실시하였으며, 투석액을 동결 건조하여 정제된  $\beta$ -glucan을 얻 는다. 투석은 MWCO 6,000-8,000(Spectrum Medical Industry, USA)의 막을 사용한 다.

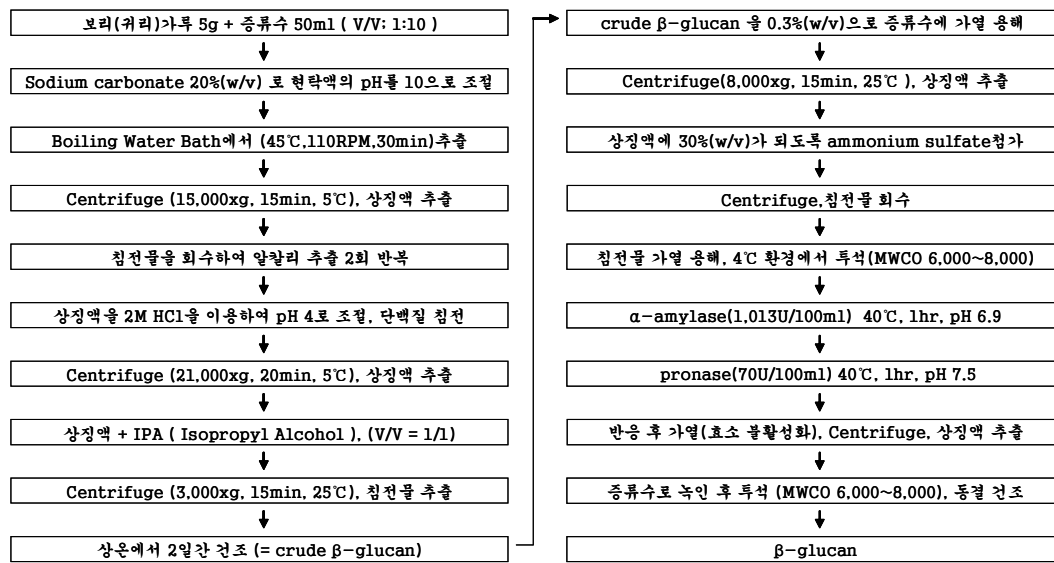


Fig. 31. Wood 등의 방법.

#### 나) 추출법 II - Aman 등의 방법

Aman 등, 차 등의 분석 방법을 변형시켜 다음과 같이 β-glucan을 추출한다.

- (1) 보리가루 5 g을 증류수 25 mL에 분산시켜 pH 10으로 조정하여 실온에서 20시간 방치하여 부드럽게 만든다.
- (2) pH 6으로 조정하고 termamyl 2.5 mL를 가하여, 95°C water bath에서 2시간 동안 75 rpm으로 반응시킨다.
- (3) 이것을 다시 pH 4.5로 조정하고 amyloglucosidase 0.75 mL를 가하여 60°C에서 2시간 동안 흔들며 반응시킨 다음, 끓는 물에서 30분간 가열하여 효소를 불활성화시킨다.
- (4) 이것을 냉각시킨 다음 4,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상청액만을 취하여 에탄올 농도가 80%가 되도록 알코올을 가하고 원심 분리하여 침전물을 얻는다.
- (5) 이와 같이 얻은 crude β-glucan에 증류수를 가하여 에탄올 농도가 10% 이하가 되도록 한 다음 pH 6으로 조정하고 termamyl 2.5 mL를 가하여 95°C water bath에



서 2시간 동안 75 rpm으로 반응시킨다.

(6) 이것을 다시 pH 4.5로 조정하고 amyloglucosidase 0.75 mL를 가하여 60°C에서 2시간 동안 흔들며 반응시킨 다음, 끓는 물에서 30분간 가열하여 효소를 불활성화시킨다.

(7) 이것을 냉각시킨 다음 에탄올 농도 80%가 되도록 에탄올을 가하여 원심 분리시킨다.

(8) 원심 분리하여 얻은 침전물에 다시 증류수를 가하여 termamyl 및 amyloglucosidase 효소처리를 반복한다.

(9) 여기에서 얻은 침전물에 다시 증류수를 가한 다음 pH 4.5로 조정하고 amyloglucosidase 0.75 mL를 가하여 60°C에서 2시간 동안 흔들며 반응시킨다.

(10) 이것을 pH 7.5로 재조정하고 protease 0.025 g을 가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 다음 끓는 물에서 30분간 가열하여 효소를 불활성화시킨다.

(11) 이를 냉각시킨 후 에탄올 농도 80%가 되도록 알코올을 가하고 원심 분리하여 얻은 침전물을 동결 건조하여 순수한  $\beta$ -glucan 제품을 얻는다.

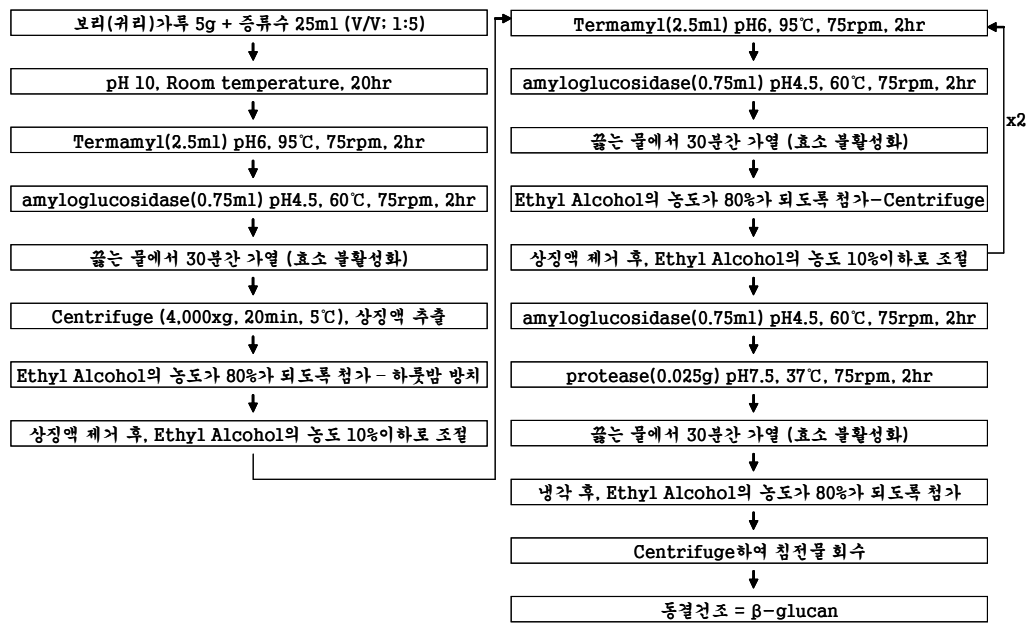


Fig. 32. Aman 등의 방법.

다) 추출법 III - Physiological Extraction - Micheal 등의 방법

- (1) 5 g의 sample을 100 mL의 sodium phosphate buffer(pH 6.9)에 넣고 37°C에서 15분간 서서히 stirring 해준다.
- (2) 250  $\mu$ L의  $\alpha$ -amylase를 넣어주고(5 mg/mL  $\text{CaCl}_2$ ) 37°C에서 15분간 저어준다.
- (3) 6M과 1M의 HCl로 pH를  $2.0 \pm 0.1$ 가 되도록 맞추어 준다.
- (4) 625  $\mu$ L의 pepsin(0.9% NaCl 0.5 mg/mL)을 넣어주고 37°C에서 30분간 섞어준다.
- (5) 3M의 NaOH를 가지고 pH  $6.9 \pm 0.1$ 로 맞추어 준다.
- (6) 25 mL의 pancreatin(10 mM NaCl이 포함되어 있는 20 mM의 pH 6.9 sodium phosphate buffer 0.5 mg/mL)을 넣고 37°C에서 90분간 섞어 준다.
- (7) 원심 분리( $7,000 \times g$ , 10분)하고 침전물을 얻는다.
- (8) 추출법 I과 같은 정제 단계를 실시한다.

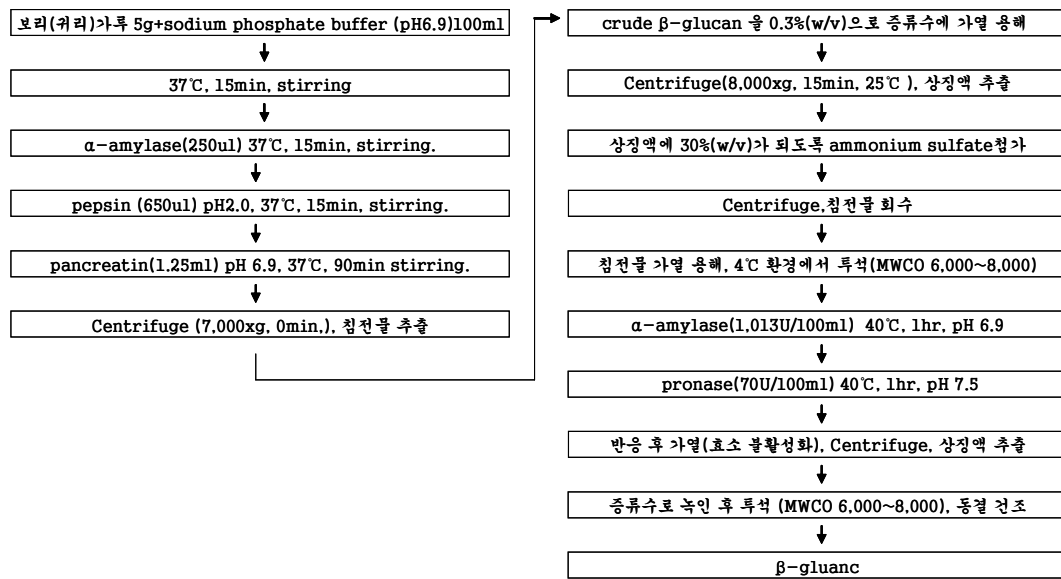


Fig. 33. Micheal 등의 방법.

#### 5) 선정된 종실류 유래 β-glucan 탄수화물 성분 분석법 정리

Sample의 β-glucan 함량은 종류에 따라 영향을 많이 받기도 하지만 지역과 기후에 대한 영향도 많이 받는다. 이러한 β-glucan을 검정할 수 있는 몇 가지 방법이 개발되어 있는데, 대표적인 방법으로는 β-glucan 추출 용액에 ammonium sulfate를 20-30%를 첨가하여 선택적으로 β-glucan을 침강시켜 분석하는 침강법, β-glucan의 산분해에 의한 방법, β-glucanase 역가를 갖는 효소를 사용하여 β-glucan만을 특이적으로 가수분해한 후, 유리된 포도당 함량을 측정하여 β-glucan 함량을 측정하여 β-glucan 함량을 계산하는 효소적 방법, 고분자 β-glucan에만 특이적으로 결합하는 염색제를 부착시켜 그 발광농도로부터 β-glucan 함량을 검정하게 되는 flow-injection analysis(FIA) 방법 등이 있다. 하지만 이들 방법 중에서 앞의 두 방법의 경우 수용성 β-glucan만 측정할 수 있고 유리된 glucose도 β-glucan으로 측정되는 등 정확성이 떨어지므로 효소적 방법과 flow injection analysis(FIA) 방법 만이

European brewery convention에 의해 공인된 방법으로 채택되어 있다. 이 외에도 분석 기기의 기술적인 수준이 많이 증가함에 따라 여러 가지 NMR이나 ELISA 같은 발전된 분석법이 계속 나오고 있다.

고분자 수분, 회분, 조지방, 조단백질 정량은 AACC방법에 의하여 분석한다. 효소적 방법은 잘 확립되어 있어서  $\beta$ -glucan의 추출분해와 분해된 glucose를 측정할 수 있는 kit형태(megazyme, megazyme International Ireland Ltd)의 시약이 상품으로 판매되고 실제로  $\beta$ -glucan을 검정하는데 대부분의 연구진들이 이 방법을 사용한다. 효소적 방법에 대해 간단히 설명하면, 먼저 시료 안의 모든 효소를 불활성화 시키고, 일차로  $\beta$ -glucan 추출이 용이하도록 lichenase를 처리하게 되는데, 이것은  $\beta$ -(1, 4) 결합만을 분해하는 효소로서 그 절단 부위는 모든  $\beta$ -(1, 4) 결합 부위가 아니고,  $\beta$ -glucan 분자의 환원 말단 쪽으로  $\beta$ -(1, 4) 결합이 인접되고 비환원 말단 쪽으로  $\beta$ -(1, 3) 결합이 인접된  $\beta$ -(1, 4) 결합 만이 해당된다. 따라서 lichenase의 분해 산물은 환원 말단에  $\beta$ -(1, 3) 결합을 갖는 다양한 크기의  $\beta$ -gluco-oligosaccharide이나 다음 단계에서 처리되는  $\beta$ -glucosidase에 의해 유리 상태의 glucose로 완전하게 분해된다. 유리 상태의 glucose는 glucose oxidase/peroxidase/4-amino-antipyrine(GOPOD)에 의해 특이적 반응을 이루어 510 nm 파장에서 최대 흡광도를 나타나게 된다. 이 중에는 원래 시료 내 들어있던 glucose 함량을 배제시켜야 하는데, 그렇게 하기 위하여 매 시료마다 blank를 두고  $\beta$ -glucan 분해 시료의 흡광도에서 blank의 것을 빼 준 흡광도를 적용하여  $\beta$ -glucan 함량을 산출하게 된다.

가). 효소적 방법에 의한 분석

- (1) Mill barely를 0.5 mm의 screen에 통과 시킨다.
- (2) 수분의 함량을 정확히 알고 있는 barley sample을 poly propylene(PP) tube에 넣는다.
- (3) 50% 에탄올 1 mL를 tube에 가하면 sample이 분산되기 시작한다.
- (4) Sodium phosphate buffer(20 mM, pH 6.5) 5 mL를 가한 후 vortex mixer에서 혼합해준다.

- (5) 끓는 물에 대략 2분간 tube를 넣어주고 강하게 vortex에서 섞어준다. 끓는 물에 tube를 3분간 더 넣어준다.
- (6) 40°C에서 tube를 냉각시키고 0.2 mL의 lichenase(10 U)를 넣어준다. Tube의 cap을 막아주고 stir를 1시간 동안 해준다.
- (7) 30 mL의 volume이 되도록 증류수를 넣어준다.
- (8) Whatman No. 41 filter circle을 통해 filter 해주거나 1,000 x g에서 10분간 원심 분리 해준다.
- (9) 0.1 mL씩 각각의 여과액을 세 개의 tube로 옮긴다.
- (10) 한 tube에는 acetate buffer(50 mM, pH 4.0) 0.1 mL를 넣어주고(blank), 다른 tube에는 50 mM acetate buffer(pH 4.0)안에 녹인  $\beta$ -glucosidase(0.2 U) 0.1 mL를 넣어준다. 이 tube들은 40°C에서 15분간 둔다.
- (11) Glucose oxidase/oxidase(GOPOD) reagent(3.0 mL)를 각각 넣어주고 40°C에서 20분간 둔다.
- (12) 각각의 샘플을 510 nm에서의 흡광도를 측정한다.

#### 나) FIA(Flow injection analysis)

- (1) 뚜껑이 있는 튜브에 시료 100 mg과 증류수 10 mL를 넣고 vortex mixer로 혼합한다.
- (2) 100°C의 항온 수조에서 1시간 가열하여 보리 자체의  $\beta$ -glucanase를 불활성시키고 가용성  $\beta$ -glucan을 용출시킨다.
- (3) 상온으로 식힌 후 내용물이 고루 분산될 때까지 vortex mixer로 강하게 섞어 준다.
- (4) 100 mM의 HCl 10 mL을 가하고 항온 수조에서 10분 동안 더 가열하여 불용성  $\beta$ -glucan을 용출시킨다.
- (5) 반응이 끝난 직후 전체 내용물을 섞어주고 상온으로 식힌 다음 원심 분리(4,000 rpm, 10분)하여 상등액만 HPLC 분석 시료로 사용한다.
- (6) HPLC는 scanning fluorescence detector를 이용하여 확인하며 이동상은

calcoflour solution(100 mM의 pH 9 glycine buffer 25 ppm)을 0.1 mL/min의 속도로 흘려준다.

(7)  $\lambda_{ex}$ (exciting wave length) 300 nm,  $\lambda_{em}$ (emanation wave length) 500 nm의 파장에서  $\beta$ -glucan 과 calcoflour 결합에 의한 발색 반응의 최대 흡광도를 측정한다.

(8) 표준물질인  $\beta$ -glucan과 각  $\beta$ -glucan 추출액의 흡광도 값을 얻어 샘플의 총  $\beta$ -glucan 함량을 계산할 수 있다.

#### 다) NMR에 의한 $\beta$ -glucan의 함량 측정

NMR의 분광은 5-mm NMR tube를 사용하여 80°C에서 수집한다. 물 공명 구조의 화학적 이동이 내부 standard의 aromatic proton의 화학적 이동과 너무 가까울 경우에는, 물 공명구조 아래쪽으로 옮기기 위해 dimethyl terephthalate, trifluoroacetic acid-*d*(99.8%)을 몇 방울을 넣어준다. 화학적 이동의 기준은 2.50 ppm의 dimethyl sulfoxide(DMSO-*d*6)의 남은 proton의 상대적인 기준에 의해 결정된다.  $\beta$ -D-Glucan의 proton 화학적 이동의 표시는 다른 경우에도 기록된다.

#### (1) Sample의 준비

(가) 15 mg의 standard, dimethyl terephthalate와 DMSO-*d*6 1 mL를 3 dram의 병에 넣는다(1 dram=1.772 g).

(나) 기준 시료는 glucan이 포함된 각각의 set에서 측정된다. 분석 샘플은 sample, glucan의 분자량과 dimethyl terephthalate 15.0 mg을 포함한 15.0-30 mg을 3 dram의 병에 넣고 DMSO-*d*6 1 mL를 넣어준다.

(다) 만일 순수한 glucan을 가지고 실험한다면 15 mg이면 충분하지만, 추출물의 glucan 함량이 낮을 경우 샘플을 30 mg 이상으로 올릴 필요가 있다. 샘플과 blank 병은 잘 막아서 80°C의 hot plate에서 잘 섞어준다.

(라) 만약에 안 녹는 물질은 filter가 있는 NMR tube로 옮겨준다.

## (2) NMR data의 수집

NMR 분광은 80C, 64 scans, 15초의 recycle delay, 32768 complex data points, 15 ppm spectral window (5.0 ppm에서 중심)에서 모아진다. 분광은 기하급수적인 apodization으로 진행된다. 온도의 증가는 용액의 점도를 낮추는데 사용하고 공명 라인의 폭과 실험 민감도를 증가시키는데 사용된다.

## (3) Calculation

Blank 샘플, HOD(blank, mmol)의 HOD에 따른 물의 농도는

$$\text{mmol of HOD (blank)} = \frac{4W_{\text{DMT}} I_{\text{HOD}}}{191.14I_{\text{DMT}}} \quad (1)$$

에 따라 계산한다.  $W_{\text{DMT}}$ =dimethyl terephthalate의 무게(mg),  $I_{\text{HOD}}$ =HOD proton resonance의 완전한 area, 194.14=dimethyl terephthalate의 분자량,  $I_{\text{DMT}}$ =dimethyl terephthalate의 8.05 ppm에서의 4개의 aromatic proton의 단일 공명의 적분 넓이. HOD는 NMR time scale 안의 blank에서 TFA-*d* deuteron과 H<sub>2</sub>O 사이의 신속한 H/D 교환 평형으로부터 우선적으로 증가한다.

Glucan이 혼합되어있는 샘플, HOD(mM)에서 HOD에 따른 물의 농도는 식 1을 이용하여 결정한다. TFA-*d*와 glucan의 hydroxyl proton, 다른 탄수화물의 존재, 신속한 H/D 교환 평형 또한 HOD 공명 세기의 원인이 된다.

Sample의 glucan의 농도(mM)는 식 1에서  $I_{\text{HOD}}$ 를  $I_{\text{glucan}}$ 으로 바꾼 후 사용한다.  $I_{\text{glucan}}$ 은 glucan anhydroglucose repeat unit(AGRU) anomeric proton, H1, 4.52에서 resonance의 integral area이다. HOD(blank)와 HOD(sample) mM의 양은 wtH<sub>2</sub>O(blank)와 wtH<sub>2</sub>O(sample)로 바꾸고, blank와 glucan이 포함되어 있는 sample의 상대적인 수분의 무게는 다음 식을 사용한다.

$$\text{wtH}_2\text{O} = \frac{(\text{mM of HOD} \times 18.02)}{2} \quad (2)$$

18.02는 물 분자의 무게이고 2는 H<sub>2</sub>O에서 proton의 수이다.

$$\text{wt3H}_2\text{O}(\text{glucan}) = \frac{(3 \times \text{mM of glucan} \times 18.02)}{2} \quad (3)$$

3개의 교환 가능한 AGRU hydroxyl protons, wt3OH(glucan)으로부터 온 water resonance에 기여하는 무게는 다음 식에 의해 결정된다.

$$\text{wtH}_2\text{O} = \text{wtH}_2\text{O}(\text{sample}) - \text{wtH}_2\text{O}(\text{blank}) - \text{wt3OH}(\text{glucan}) \quad (4)$$

Water-wet glucan 추출물 안의 물, wtH<sub>2</sub>O의 무게는 다음 식을 이용한다.

$$\text{dry wt of glucan} = \text{wt of glucan} - \text{wtH}_2\text{O} \quad (5)$$

Glucan이 포함된 추출물의 건조중량은 다음 식을 사용한다.

건조 중량에 기준한 glucan 추출물 안의 무게는 다음 식에 의한다.

162.15 = glucan AGRU의 표준 무게

400은 dimethyl terephthalate의 aromatic proton의 4개의 생성물을 의미 100은 전환 되는 비율을 나타낸다.



#### 라) ELISA

시료를 분석하는데 있어 문제가 되는 것들 중에 하나가 시료의 준비 과정과 비용이다. 하지만, 비용에 관한 문제는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)의 방법을 이용하여 크게 줄일 수 있다. 또한 ELISA의 다른 장점이라면 96-well array에서 실험할 수 있어서 시료의 준비가 용이하다는 장점이 있다. 최근 immuno transmission electron microscopy에 의하여 시료의 세포 안에 있는  $\beta$ -glucan을 찾을 수 있는 monoclonal antibody를 만들어내는데 성공해서, ELISA는 곡류 시료의  $\beta$ -glucan 추출수율을 높이는 데 점점 적합한 방법이 되어가고 있다. 무엇보다도  $\beta$ -glucan을 assay하기 위한 방법 중의 하나는 총  $\beta$ -glucan의 정확한 추출을 하는 방법을 만드는 것인데 이것은 수용성이거나 불용성인  $\beta$ -glucan의 종류에 따른 다양한 비율에 대해 많은 관련이 있다. 게다가  $\beta$ -glucan의 항원결정기를 보호하기 위해 ELISA 실험을 위한  $\beta$ -glucan의 추출방법이 바뀌면 안된다. 그러므로 효소적 방법의 측정 핵심인 lichenase와  $\beta$ -glucanase 같은 효소는 사용할 수 없다.

현재의 연구는 최적의 monoclonal antibody를 고르고, ELISA condition을 최적화시키고 적은 비용과 적은 노동으로 시간을 줄이는데 초점이 맞춰져왔다. ELISA를 이용한  $\beta$ -glucan의 추출방법은 많이 연구되어 왔고, 또한 ELISA를 이용한 추출방법은 가용성, 불용성  $\beta$ -glucan의 추출이 최적화되어 많이 알려져 있다.  $\beta$ -Glucan의 ELISA를 이용한 측정의 data 비교는 McCleary와 Codd의 추출법에 의해 비교할 수 있다.

#### 마) MALDI-MS와 HPLC 정량

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry(MALDI-MS)는 처음에 단백질 같은 거대 분자의 무게를 측정하기 위해 사용되었다. 또한, MALDI-MS는 분자의 크기나 탄수화물의 정량을 위해 사용되었다.

연구에 따르면, 전분에서 잘라진 순수한 말토 올리고당(DP 7)의 부가에 의한 standard addition method가 무게와 농도의 관계를 이용하여 말토 올리고당이나 다당류의 상대적이거나 절대적인 양을 측정하는데 사용할 수 있다. 말토 올리고당 또는 다당류의 예를 들면 모든 MALDI-MS 이온 반응물의 합

( $[M+Na]^+ + [M+K]^+ + [M-H_2O+Na]^+$ )은 weight basis에 매우 좋은 직선상의 상관관계를 보여준다. 이 방법은 신속하고 매우 민감하게 반응하며 기술적으로도 최소한의 순수한 샘플을 요구한다. 이 실험을 통해 lichenase에 의해 가수분해된 수용성  $\beta$ -glucan으로부터 유리된 올리고당의 정성과 정량을 위한 MALDI-MS의 사용을 확인할 수 있다. 올리고당의 비율에 따라 여러 sample로부터  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-D-glucan의 주요한 구조적 특징을 확인할 수 있다.

#### (1) General method

Sample을 만드는 과정은 Megazyme kit로 분석하는 과정과 유사하다. Lichenase(EC 3.2.1.73, *Bacillus subtilis*)와 pullulanase(EC 3.2.1.41, *Bacillus acidopullulyticus*)는 Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Ireland)것을 사용한다. Glucose, maltose, maltotriose(DP3), maltotetraose(DP4), maltopentaose(DP5), maltohexaose(DP6), maltoheptaose(DP7),  $\alpha$ -amylase는 Sigma Chem. Co.(St. Louis, MO)것을 사용하며, 2, 5-dihydroxybenzoic acid(DHB)는 Aldrich Chemical Co. Inc.(Milwaukee, WI)를 사용한다. 우선 보리를 0.5 mm screen을 통하여 갈아준다. 보리의 수분함량은 AACCC(1982)의 공식 방법에 따라 측정하며 분말로로부터 보리 전분의 추출과 amylose 함량의 계산은 Vasanthan, Bhattya와 Chrastil의 방법에 의해 결정된다. 보리분말 내의 총  $\beta$ -glucan 함량의 측정과 수용성  $\beta$ -glucan의 추출은 Megazyme International Ireland Ltd.(Wicklow, Ireland)에서 제공한 방법에 따라 kit를 이용한다.

#### (가) $\beta$ -Glucan hydrolysates

- ① 정제된  $\beta$ -glucan 300 mg, 50%(v/v) ethanol 1.0 mL, sodium phosphate buffer(20 mM, pH 6.5) 12 mL를 더하고 stirring하여 끓는 물에서 5분간 둔다.
- ② 상온에서 냉각시킨 후 volume이 27 mL가 되도록 증류수를 넣어주면서 희석시키고 3 mL의 lichenase(150 U)를 넣어주고 40°C에서 1시간 30분 동안 반응시킨다.

③  $\beta$ -Glucan hydrolysate는 효소 활성을 없애기 위해 끓는 물에서 5분간 가열해 주고 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리 해준다.

④ 상징액(1 mL)은 DP3와 DP4를 확인하기 위한 HPLC 분석에 사용된다. 상징액 (25 mL)은 DP 5-7을 확인하기 위해 거의 건조한 상태가 되도록 회전 증발시킨 후 3 mL로 희석한다.

⑤ 원래 상징액(2 mL)은 염을 제거하기 위해 Sephadex G10 column(1.8 × 13 cm)으로 흘려준다. Flow rate는 0.7 mL/min을 유지하면서 1 mL씩 모을 수 있도록 유지한다. 10-17번째 모은 것을 합쳐서 8 mL이 되도록 한다. 이 시료는 별다른 정제 없이 MALDI-MS 분석을 위해 사용할 수 있다.

#### (나) HPLC

Jordi Gel DV 13polyamine(250 mm length-4.6 mm i.d.) column(Bellingham, MA), evaporative light scattering detector(Alltech. 500 ELSD, Mandel Scientific Co. Ltd., Guelph, ON, Canada)이 장착된 HPLC system이 올리고당 분석을 위해 사용된다. Eluents A와 B 는 증류수와 acetonitrile이 사용된다. 용매의 gradient 조건은 시작은 A 10%(v/v)와 B 90%(v/v)로 해주고 25분에서는 A 40%(v/v)와 B 60%(v/v), 26분에서는 A 0%(v/v)와 B 100%(v/v), 30분에서는 A 10%(v/v)와 B 90%(v/v)의 조건으로 해준다. Detector의 온도는 125°C로 맞추어 주고 flow rate 는 1.0 mL/min으로 유지해준다. Standard로 glucose, maltose, DP3, DP4, DP5, DP6, DP7를 사용한다. 각각의 피크의 계산은 주어진 피크와 total 피크의 비율에 따라 계산한다.

#### (다) MALDI-MS

MALDI-MS는 Bruker Proflex III linear mode를 사용하면서 Bruker Analytical Systems Inc.(Billerica, MA)이 사용된다. 용매를 증발시켜 입자로 만든 올리고당은 질소 레이저 pulse(337 nm)를 흡수하고 이온화되고 time-of-flight mass spectrometer에 들어가기 전에 time-delayed extraction의 20 kV에서 가속된다. DHB(2, 5-dihydroxybenzoic acid)가 matrix로 사용된다. 레이저의 세기는 좋은

signal 비율을 얻기 위해 올리고당의 DP를 기준으로 선택하도록 한다. Laser pulse의 수는 최종 MALDI-MS spectrum의  $3 \times 60$ 이나 180의 laser pulse를 받는다. MALDI-MS를 이용한 올리고당의 정량은 standard addition method가 주로 사용된다. Maltoheptaose(DP 7, 32.096100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )는 첨가된 standard로 사용된다. Lichenase-hydrolyzed barely  $\beta$ -glucan로부터 나온 salt가 제거된 올리고당의 윗 부분은 증류수나 위의 standard DP 7(2:1, v/v)의 비율로 섞어 준다. Sample(DP 7이 없는 것)과 standard addition sample은 matrix와 잘 섞어준다(1:1, v/v). 각각의 말토 올리고/다당류에 있어서 모든 ion의 감응은  $([M+\text{Na}]^+ + [M+\text{K}]^+ + ([M-\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+))$ 로 무게에 기준을 두고 정확히 일직선의 상관 관계를 나타낸다.

#### (라) $\beta$ -glucan의 분자량 측정

분자량 측정을 위해서 HPLC를 사용하되, 컬럼은 YMC-Pack Diol-300 size exclusion 컬럼( $300 \times 8.00$  mm I. D.)으로, 이동상은 증류수로 하며 유속은 0.6 mL/min로 조절한다. 표준 pullulan의 분자량은 P-800(M.W. 788,000), P-400(M.W. 404,000), P-200(M.W. 212,000), P-100(M.W. 112,000)을 사용하며 RI detector(waters 410)로 측정한다.

#### 나. 시료의 $\beta$ -glucan 함량 측정 및 최적의 추출 방법 탐색

시료는 재래시장에서 구입한 보리와 농촌 진흥청 작물 과학원에서 분양 받은 올귀리를 이용하였다. 시료 분말 안의 총  $\beta$ -glucan의 함량의 측정 및 추출물의 순도 검사는 Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Ireland)의 Megazyme  $\beta$ -glucan(mixed linkage) assay kit를 이용하여 효소적 방법으로 측정하였다. 추출수율은 각 방법을 이용하여 얻은 추출물의 동결건조 후 무게를 측정하여 구하였다.

##### 1) 보리/귀리 분말 시료의 $\beta$ -glucan 함량 측정 - 효소적 방법

가) 보리와 귀리 분말을 0.5 mm의 screen에 통과 시킨다.

나) 수분의 함량을 정확히 알고 있는 sample 0.5 g을 poly propylene(PP) tube에 넣는다.

다) 50% 에탄올 1 mL를 tube에 가하면 sample이 분산되기 시작한다.

라) Sodium phosphate buffer(20 mM, pH 6.5) 5 mL를 가한 후 vortex mixer에서 혼합해준다.

마) 끓는 물에 대략 2분간 tube를 넣어주고 강하게 vortex mixer에서 섞어준다. 끓는 물에 tube를 3분간 더 넣어준다.

바) 40°C에서 tube를 냉각시키고 0.2 mL의 lichenase(10 U)를 넣어준다. Tube의 cap을 막아주고 stirring을 1시간 동안 해준다.

사) 30.0 mL의 volume이 되도록 증류수를 넣어준다.

아) Whatman No. 41 filter circle을 통해 filter 해주거나 1,000 × g에서 10분간 원심 분리 해준다.

자) 0.1 mL씩 각각의 여과액을 세개의 tube로 옮긴다.

차) 한 tube에는 acetate buffer(50 mM, pH 4.0) 0.1 mL를 넣어주고(blank), 다른 tube에는 50 mM acetate buffer(pH 4.0) 안에 녹인 β-glucosidase(0.2 U) 0.1 mL를 넣어준다. 이 tube들은 40°C에서 15분간 둔다.

카) Glucose oxidase/oxidase(GOPOD) reagent(3.0 mL)를 각각 넣어주고 40°C에서 20분간 둔다.

타) 각각의 샘플을 510 nm에서의 흡광도를 측정한다.

## 2) 보리/귀리 분말 시료에서의 β-glucan 추출 및 수율 측정

β-Glucan 추출은 상기에 제시된 Wood 등의 방법, Aman 등의 방법, Micheal 등의 방법의 3 가지 방법을 이용하였으며, 각 방법에 따른 추출수율을 구하고자 하였다. 추출은 5 g의 시료를 가지고 실험 하였으며, 두 번의 반복 실험으로 평균값을 구해 수율을 측정하였다. 추출수율은 최종 추출물을 동결건조 한 후, 무게를 측정하여 원 시료의 무게와 비교 하였다.

## 3) 추출물에 함유된 β-glucan의 분석

- 가) 10 mg의  $\beta$ -glucan을 5 mL의 pH 6.5, 20 mM sodium phosphate buffer에 가열하여 녹인다.
- 나) 8 unit의 lichenase를 첨가한 후 sodium phosphate buffer로 최종 부피를 100 mL로 맞춘다.
- 다) 50°C 에서 90분간 반응시킨다.
- 라) 적당한 양의 용액을 Whatman No. 41 filter paper로 여과한다.
- 마) 한 tube에는 acetate buffer(50 mM, pH 4.0) 0.1 mL를 넣어주고(blank), 다른 tube에는 50 mM acetate buffer(pH 4.0) 안에 녹인  $\beta$ -glucosidase(0.2 U) 0.1 mL를 넣어준다. 이 tube들은 40°C에서 15분간 둔다.
- 바) Glucose oxidase/oxidase(GOPOD) reagent(3.0 mL)를 각각 넣어주고 40°C에서 20분간 둔다.
- 사) 각각의 샘플을 510 nm에서의 흡광도를 측정한다.

Table 15. 보리/귀리 유래  $\beta$ -glucan의 함량<sup>i)</sup>

품종	%
일반보리 <sup>ii)</sup>	6.19% ( $\pm 0.03$ )
울귀리	2.33% ( $\pm 0.05$ )

<sup>i)</sup>Megazyme eta-glucan Assay Kit을 사용한 결과

<sup>ii)</sup>지역 market에서 구입한 품종

Table 16. 추출 방법에 따른 곡류 유래  $\beta$ -glucan의 수율<sup>1)</sup> 및 순도<sup>ii)</sup> 비교

품종	추출법I	추출법II	추출법III
일반보리 <sup>iii)</sup>	88.7 mg ( $\pm$ 4.1)	115.0 mg ( $\pm$ 8.0)	48.4 mg ( $\pm$ 0.6)
	1.69% ( $\pm$ 0.08)	2.30% ( $\pm$ 0.16)	0.96% ( $\pm$ 0.01)
$\beta$ -glucan의 순도	67.4% ( $\pm$ 0.4)	42.1% ( $\pm$ 0.2)	61.9% ( $\pm$ 0.4)
울귀리	50.1 mg ( $\pm$ 0.0)	110.5 mg ( $\pm$ 3.1)	42.6 mg ( $\pm$ 1.0)
	1.00% ( $\pm$ 0.00)	2.21% ( $\pm$ 0.06)	0.86% ( $\pm$ 0.02)
$\beta$ -glucan의 순도	65.6% ( $\pm$ 0.6)	45.4% ( $\pm$ 0.3)	63.3% ( $\pm$ 0.7)

<sup>i)</sup>Sample 5 g당 수율

<sup>ii)</sup>Megazyme Beta-glucan Assay Kit을 사용한 결과

<sup>iii)</sup>지역 market에서 구입한 품종

추출수율은 Aman 등의 방법(추출법 II)이 높게 나타났으나, Aman 등의 방법은  $\alpha$ -결합을 가진 당류를 amyloglucosidase와 termamyl 등의 효소를 사용하여 제거하는 방법으로, 불용성  $\beta$ -glucan 및 다른  $\beta$ -결합을 가지는 난분해성 탄수화물이 존재할 가능성이 높아, 고순도의  $\beta$ -glucan의 추출에 어려움이 있다. 이에 반해 Wood 등의 방법(추출법I)과 Micheal 등의 방법(추출법III)은 30% ammonium sulfate를 이용하여, 수용성  $\beta$ -glucan을 침전시키므로 고순도의  $\beta$ -glucan을 추출하기에 유리하다. Wood 등의 방법이 Micheal 등의 방법보다 수율이 더 높으며, 사용되는 효소의 종류와 양이 적어, 다량의  $\beta$ -glucan을 추출할 때 좀 더 경제적이므로, 좀 더 효율적이라고 할 수 있다.

작물 과학원에서 분양 받은 강보리, 울보리, 광안보리를 시료로 하여 최종적으로 선정된 Wood 등의 방법으로  $\beta$ -glucan 추출을 실시하였다.

Table 17. Wood 등의 방법에 의한 보리 시료 추출물의 추출 수율<sup>1)</sup> 및  $\beta$ -glucan 순도<sup>ii)</sup>

품종	추출 수율 (%)	$\beta$ -glucan 순도 (%)
강보리	1.80 ( $\pm 0.02$ )	62.04 ( $\pm 3.85$ )
올보리	2.00 ( $\pm 0.01$ )	67.98 ( $\pm 0.51$ )
광안보리	1.49 ( $\pm 0.03$ )	70.32 ( $\pm 0.51$ )

i) Sample 5 g당 수율

ii) Megazyme Beta-glucan Assay Kit을 사용한 결과

#### 다. $\beta$ -Glucan 분석법의 비교

High-performance anion-exchange chromatography(HPAEC) 방법과 Thin-layer chromatography(TLC) 방법의 장단점 비교 실험을 실시하였다. 재래시장에서 구입한 보리와 농촌 진흥청 작물 과학원에서 분양 받은 올귀리, 강보리, 올보리, 광안보리를 시료로 하여 Wood 등의 방법으로 추출한 추출물을 분석에 사용하였다.

#### 1) HPAEC를 이용한 $\beta$ -glucan의 분석

##### 가) HPAEC를 이용한 분석 원리

HPAEC를 이용하여  $\beta$ -glucan의 lichenase에 의한 가수분해산물을 분석하는 방법은 널리 이용되고 있는 방법 중의 하나이다. Lichenase는  $\beta$ -(1, 4) 결합만을 분해하는 효소로서 그 절단 부위는 모든  $\beta$ -(1, 4) 결합 부위가 아니고,  $\beta$ -glucan 분자의 환원 말단 쪽으로  $\beta$ -(1, 4) 결합이 인접되고 비환원 말단 쪽으로  $\beta$ -(1, 3) 결합이 인접된  $\beta$ -(1, 4) 결합만이 해당된다(Fig. 34.). Glucose 3개 분자가 결합된 3-O- $\beta$ -cellobiosyl-D-glucose(DP3)와 glucose 4개 분자가 결합된 3-O- $\beta$ -cellotriosyl-D-glucose(DP4)가 전체의 약 90%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 즉 DP3와 DP4를 측정하여 glucose의 구조를 분석하는데 그 목적이 있다. DP3와 DP4를



glucose, maltose, maltotriose(malto3), maltotetraos(malto4), maltopentaos(malto5), maltohexaose(malto6), maltoheptaose(malto7)과 비교하게 되며, 각각의 피크는 주어진 피크와 total 피크의 비율에 따라 계산한다.

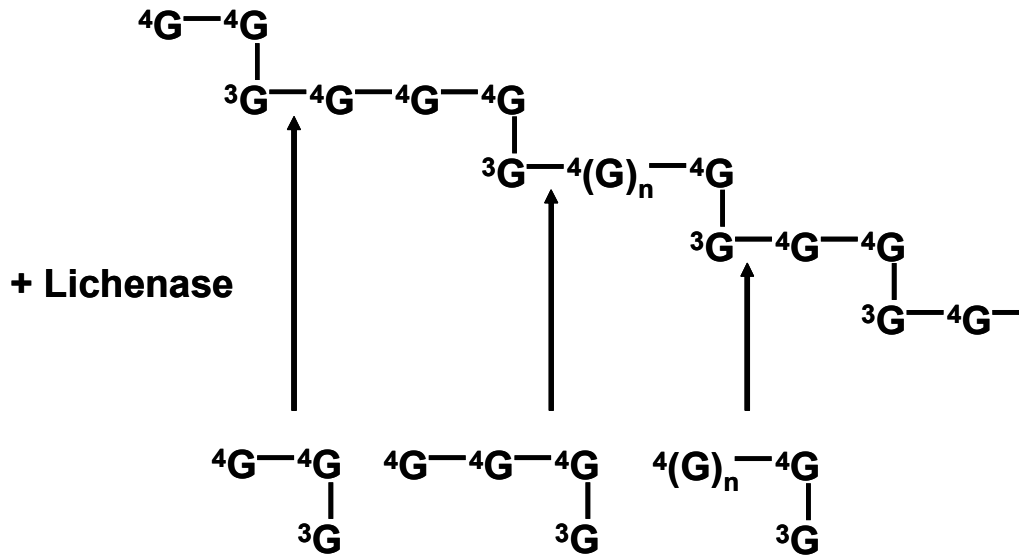


Fig. 34. Lichenase 반응 기작.

나) Sample 제조

- (1) 10 mg의 β-glucan을 5 mL의 pH 6.5, 20 mM sodium phosphate buffer에 가열하여 녹인다.
- (2) 8 unit의 lichenase를 첨가한 후 sodium phosphate buffer로 최종부피를 100 mL로 맞춘다.
- (3) 50°C에서 90분간 반응 시킨다.
- (4) 100°C에서 30분간 반응 시킨다.
- (5) HPAEC로 분석

다) HPAEC 분석 조건

Column은 Carbobac PA1(4 × 250 mm)을 사용하였으며, 용매 A(Eluent A)는 150 mM sodium hydroxide를, 용매 B(Eluent B)는 150 mM sodium hydroxide와 600 mM sodium acetate를 사용하였다. Pulse potentials(E), durations(t)값은 E1=0.05 v, t1=300 ms, E2=0.6 v, t2=120 ms, E3=-0.15 v, t3=300 ms로 주었다.

Table 18. 용매의 농도 구배

Time(min)	Eluent A(%)	Eluent B(%)
0 ~ 0.01	100	0
0.01 ~ 50	100 ~ 50	0 ~ 50
50.01 ~ 55.00	0	100
55.01 ~ 65.00	100	0

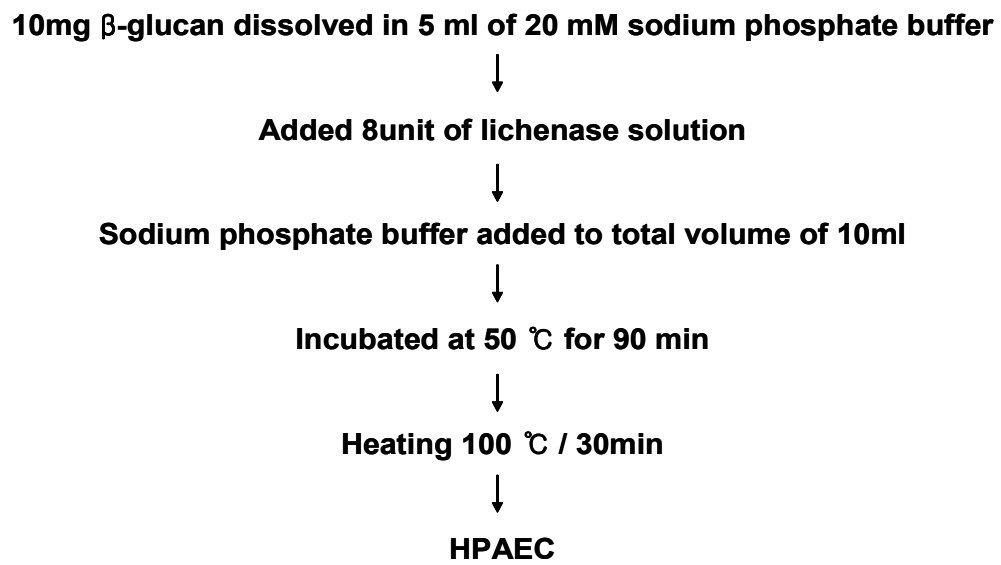
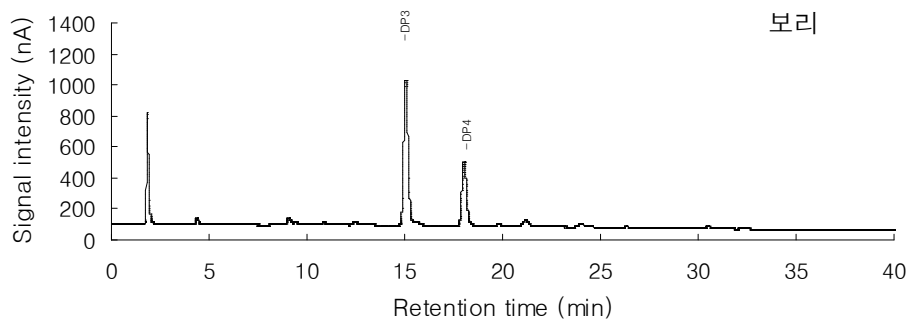
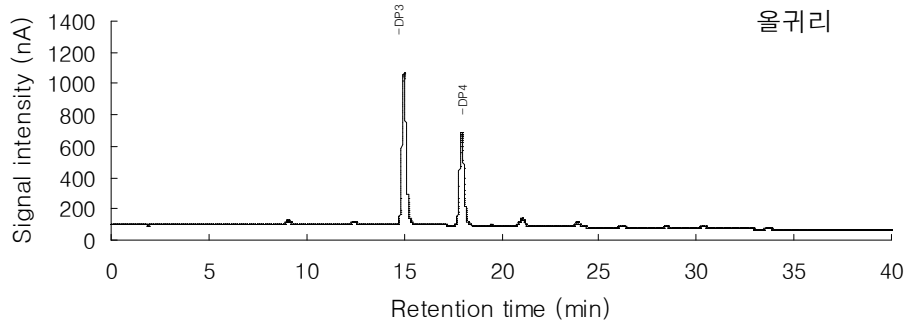
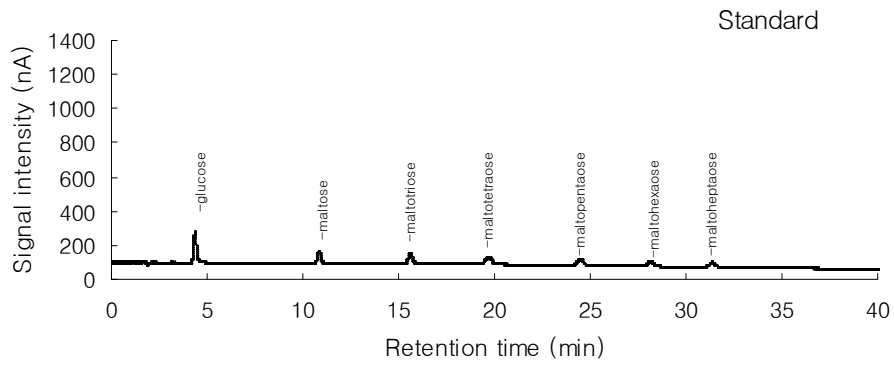


Fig. 35. HPAEC method.



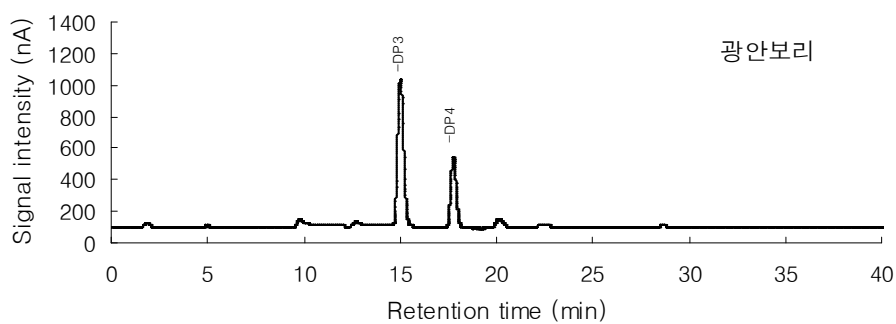
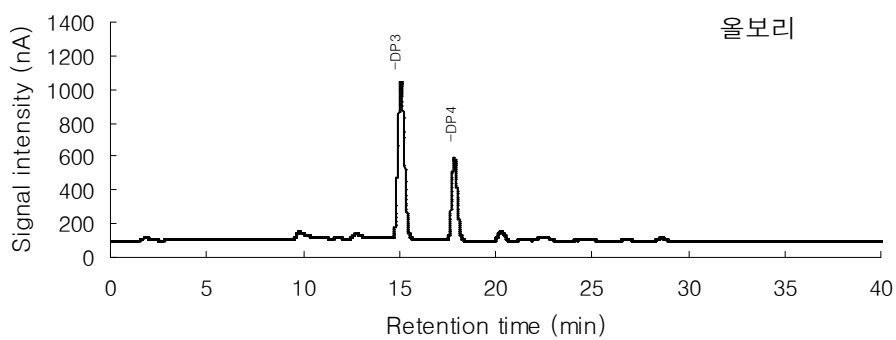
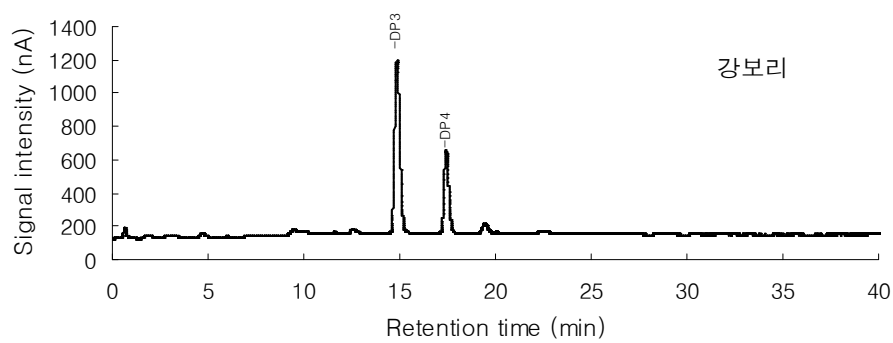


Fig. 36. HPAEC data.

DP3와 DP4로 추정되는 peak가 나타났으나, Internal standard의 maltotriose와 maltotetraose와는 retention time에서 차이가 나타났다. 이는  $\beta$ -glucan에서 분해된 DP3와 DP4가 maltotriose와 maltotetraose와의 결합 양식의 차이로 인한 것으로 보인다. 이를 확인하기 위하여 DP3와 DP4의 MALDI-MS 분석을 실시하였다.

라) 보리/귀리 시료 추출물의 Lichenase 가수분해물의 MALDI-MS 분석을 통한 분자량 측정

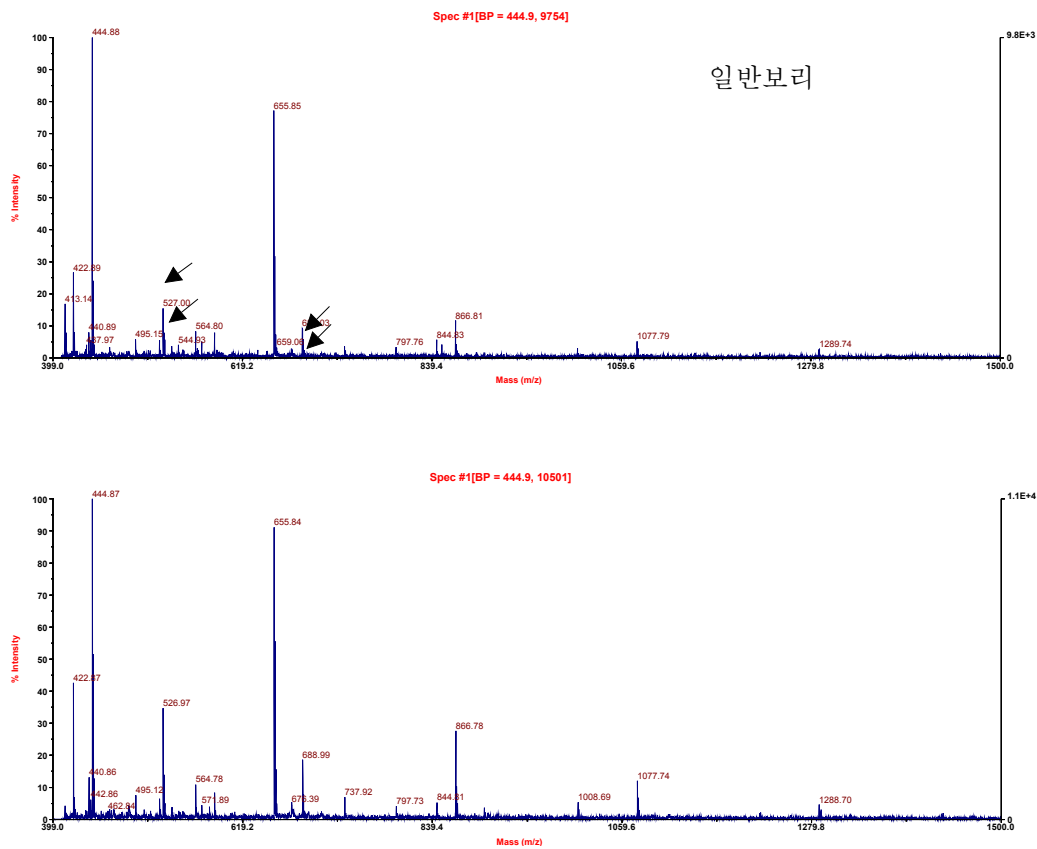


Fig. 37. MALDI-MS 분석 결과.

MW. 527(DP3)와 MW. 689(DP4)가 나타났다. 분자량이 DP3(MW. 504)와 DP4(MW. 666)가 차이가 나는 것은 sodium(MW. 23)과 DP3, DP4가 이온화 과정 중에 결합되었기 때문이다.

HPAEC 분석법은  $\beta$ -glucan의 간단한 전처리를 통해 DP3와 DP4의 비를 구할 수 있는 장점이 있다. 하지만 Internal standard의 maltotriose와 maltotetraose와의 구조적 차이로 인한 peak intensity가 다르기 때문에 각각의 절대 정량 값을 구함에 있어서 한계를 나타내고 있다.

## 2) TLC를 이용한 $\beta$ -glucan의 분석

TLC를 이용한 분석법은 각 구성당 간의 결합되어 있지 않고 노출된 hydroxyl(OH)기의 수소를 methyl기로 치환한 다음 단당류로 산분해하여, 구성당을 비교함으로써 다당체의 구조를 분석하는 방법이다.

### 가) Sample 및 standard 제조

Standard는 dextran enzymatic synth(Fluka 31394),  $\alpha$ -cyclodextrin(Sigma C4642), 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucose(Sigma S960225),  $\beta$ -1,3-glucan(Fluka 89862)을 사용하였으며, 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucose를 제외하고 모두 methylation과 TFA를 이용한 산분해를 실시하였다. 용기는 10 mL의 vial(Teflon screw cap)을 사용하였으며, 습기에 민감하므로, 실험 전 모든 용기는 24시간 정도 드라이 오븐에서 건조시켜서 사용하였다. 그리고 NaH는 흡입하지 않도록 주의하며, 모든 실험은 후드에서 실시하였다. 또한 NaH는 흡습성이 강하므로 desiccator에 보관하였다.

- (1) 1 mL의 DMSO에 25 mg의 NaH를 첨가하고 90°C에서 30 min간 반응시킨다.
- (2) 소량의 반응액에 triphenyl methane 을 가하여 적색반응 확인.
- (3) Sample(10 mg)을 첨가하고 25°C에서 3 hr 간 반응시킨다.
- (4) 0.8 mL의 iodomethane을 20분 동안 0°C의 온도 하에서 서서히 첨가한 후 room temperature에서 overnight 시킨다.

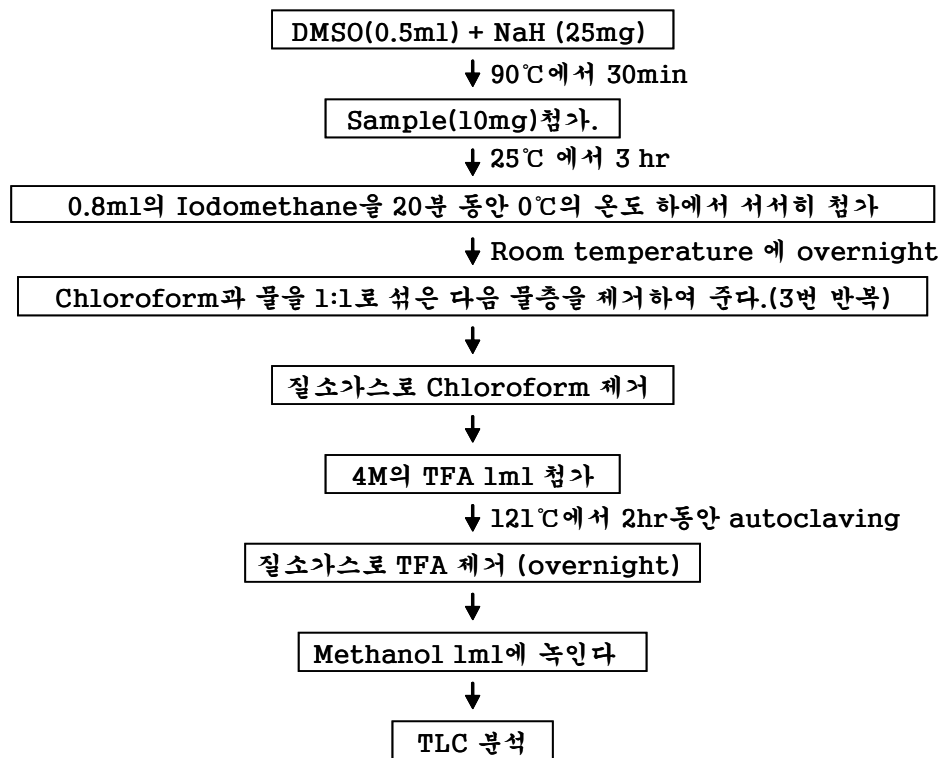
- (5) Chloroform과 물을 1:1로 섞은 다음, 3번 반복하여 물 층을 제거하여 준다.
- (6) 질소가스로 chloroform 제거.
- (7) 4 M의 TFA 1 mL 첨가한 후 121°C에서 2 hr 동안 autoclaving.
- (8) 질소가스로 TFA 제거(overnight).
- (9) Methanol 1 mL에 녹인다.
- (10) TLC 분석.
- (11) TLC 분석 조건.

Plate는 Whatman K6 TLC plate(20 × 20 cm)를 사용하였으며, 10 × 10 cm 사이즈로 절개하여 사용하였다. 용매는 acetonitrile(MeCN), chloroform(CHCl<sub>3</sub>), methanol(MeOH)을 각각 3:9:1(v/v/v)의 비율로 섞어서 사용하였다. 발색제는 1 L의 methanol에 *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine 3 g과 sulfuric acid(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50 mL를 첨가하여 사용하였다. TLC plate는 사용 전 65°C의 드라이 오븐에서 2 hr 건조하였으며 TLC 분석 시 2번 전개하여 발색제를 뿌린 뒤 121°C에서 10 min 가열(오븐사용)하였다. Grease로 TLC chamber를 봉하였으며, grease가 chamber 안으로 들어가지 않게 주의하였다.

#### 나) Image analysis

Bio-Rad Gel-Doc system(BIO-RAD Laboratories, Segrate(Milan), Italy)을 이용하여 2, 3, 6-trimethyl-glucose와 2, 4, 6-trimethyl-glucose의 spot intensity 값의 합에 대한, 2, 3, 6-trimethyl-glucose( $\beta$ -1, 4 결합), 2, 4, 6-trimethyl-glucose( $\beta$ -1, 3 결합)의 각 spot의 intensity 비를 구하였다.





Whatman K6 TLC plate (20 x 20cm),  
 solvent : MeCN-CHCl<sub>3</sub>-MeOH : 3:9:1(v/v/v),  
 spray : 1L MeOH( with *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine 3g +  
 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50ml )

Fig. 38. TLC 분석법.

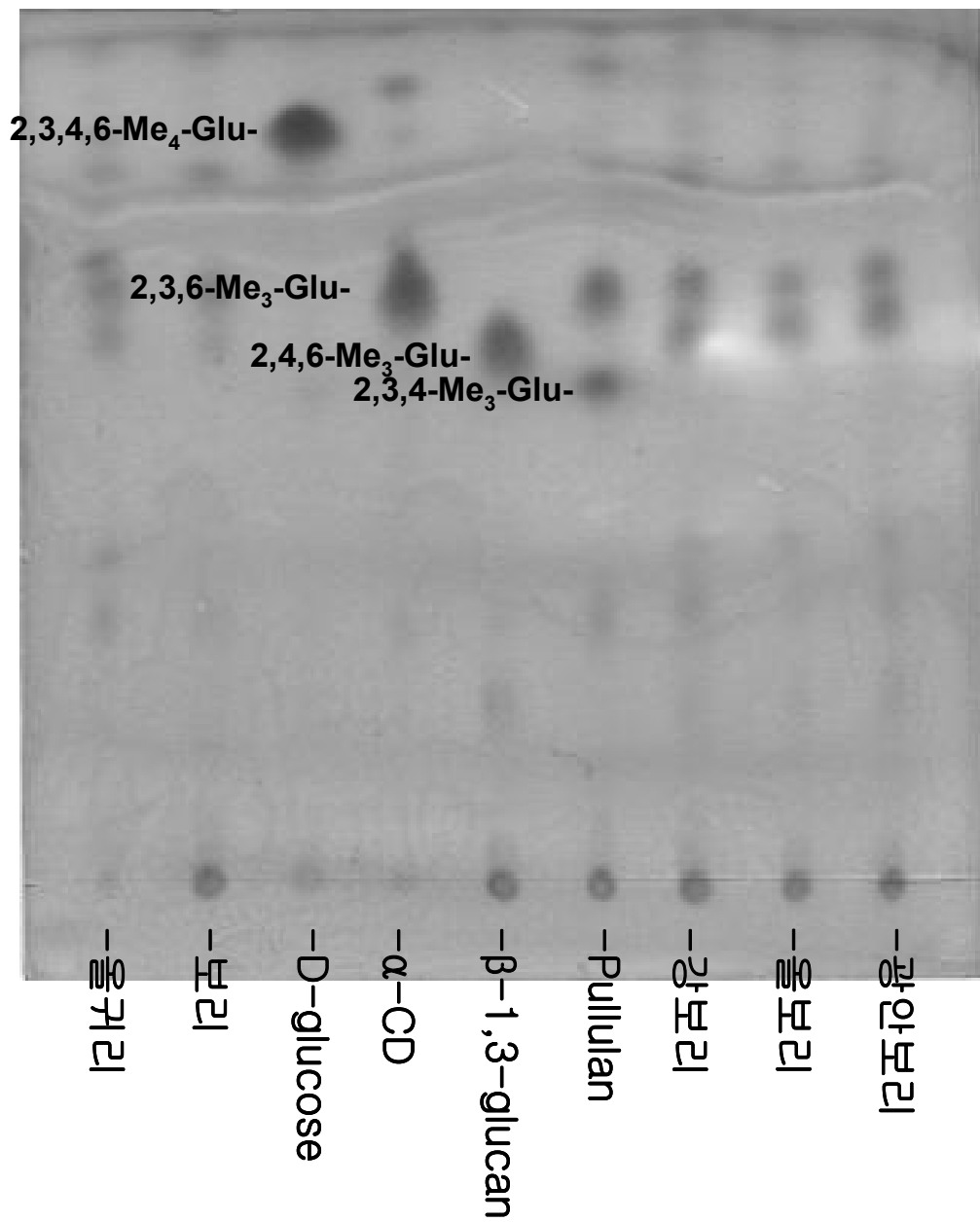


Fig. 39. 메틸화된 β-glucan의 산분해물의 TLC 분석.

Table 19. Image analyzer<sup>1)</sup> 분석

Name	Linkage	% Adj. Vol.	(1, 3)/(1, 4)
일반보리	1, 4	74.27	1/2.89
	1, 3	25.73	
울귀리	1, 4	71.18	1/2.47
	1, 3	28.82	
강보리	1, 4	60.80	1/1.55
	1, 3	39.20	
울보리	1, 4	70.23	1/2.36
	1, 3	29.77	
광안보리	1, 4	65.75	1/1.92
	1, 3	34.25	

TLC 분석법은 여러 시료를 한 번에 분석할 수 있다는 점과 적은 양의 시료도 분석이 가능하며, GC-MS보다 시료의 전처리가 간편하며, 전개 되지 않고 남은 잔사의 정량도 가능하다는 장점이 있지만. 다른 분석법에 비해 전처리가 오래 걸리며, standard 물질을 구하기가 어렵고, methylation 정도에 따라 spot intensity가 다르기 때문에 image analyzer를 활용한 정량분석에는 한계점을 나타내고 있다.

### 3) 개선된 HPAEC를 이용한 $\beta$ -glucan의 분석법

앞서 실시한 HPAEC 실험 방법에서 제시한 문제점을 해결하기 위해 recycling preparative HPLC 기술을 이용하여 고순도의 DP3(3-O- $\beta$ -cellobiosyl-D-glucose)와 DP4(3-O- $\beta$ -cellotriosyl-D-glucose)를 정제하여 표준물질로 사용하고자 하였다. 고순도로 정제한 DP3와 DP4의 순도 및 구조 동정을 실시하였으며, 이를 이용하여 농촌진흥청 작물 과학원에서 분양 받은 강보리, 울보리, 광안보리 시료의 Wood 등의 방법으로 추출한 추출물과 새로 분양 받은 울귀리, 삼한귀리, 동한귀리, 찰보리 시료

i) Bio-Rad Gel-Doc system (BIO-RAD Laboratories, Segrate (Milan), Italy)

의 Wood 등의 방법으로 추출한 추출물의 분석을 실시하였다.

Table 20. Wood 등의 방법에 의한 보리/귀리 시료 추출물의 추출 수율<sup>i)</sup> 및  $\beta$ -glucan 순도<sup>ii)</sup>

품종	추출 수율 (%)	$\beta$ -glucan 순도 (%)
울귀리	1.48 ( $\pm 0.14$ )	67.74 ( $\pm 2.90$ )
삼한귀리	0.94 ( $\pm 0.09$ )	65.90 ( $\pm 5.63$ )
동한귀리	1.17 ( $\pm 0.17$ )	59.74 ( $\pm 1.24$ )
찰보리	1.94 ( $\pm 0.12$ )	56.56 ( $\pm 3.65$ )

<sup>i)</sup> Sample 5 g당 수율

<sup>ii)</sup> Megazyme Beta-glucan Assay Kit을 사용한 결과

가) Recycling preparative HPLC를 이용한 DP3와 DP4의 정제

(1) Lichenase를 이용한 sample의 가수분해

시료는 농촌진흥청 작물 과학원에서 분양 받은 강보리를 사용하였다. 시료 50 g을 250 mL의 3차 증류수에 섞은 다음 3 M의 sodium carbonate를 이용하여 현탁액의 pH를 10으로 맞췄다. 현탁액을 room temperature에서 24시간 방치시킨 후, 250 mL의 isopropyl alcohol을 첨가하고, 15,000  $\times$  g로 15분간 원심분리 하고 상정액은 버렸다. 침전물에 250 mL의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 5.0)를 첨가한 다음 40 U의 lichenase를 첨가하고, 50  $^{\circ}$ C에서 72시간 반응 시켰다. 시료액에 250 mL의 isopropyl alcohol을 첨가한 다음 10,000  $\times$  g로 15분간 원심 분리하여 상정액만 따로 모은다. 상정액을 최종적으로 rotary evaporator를 이용하여 40  $^{\circ}$ C에서 농축시켰다.

(2) Recycling preparative HPLC(Model LC-9104 JAI Ltd, Tokyo, Japan)를 이용한 DP3와 DP4의 정제

Prep column인 JAIGEL W-251과 W-252(20Φ×500 mm)에 RI detector를 연결하여 분석하였다. 용매는 HPLC grade water를 3 mL/min의 속도로 흘려주었다.



Fig. 40. Recycling preparative HPLC를 이용한 DP3와 DP4의 분리 정제.

(3) 정제된 DP3와 DP4의 수율, 순도 및 retention time 측정

수율은 각각의 preparative한 sample을 동결 건조하여, 무게를 측정하였다. 그 결과 50 g의 원시료 대비 DP3(3.5 mg), DP4(8.9 mg)으로 나타났다. 순도 및 retention time은 상기의 HPAEC 분석법[3, 가, 3)]을 이용하여 측정하였다. DP3와 DP4의 PAD detector상의 peak 면적을 total peak 면적에 비하여, 순도를 측정하였으며 그 결과 모두 92%의 높은 순도가 나타났다. Retention time 측정대조군으로 추출시료의 lichenase 가수분해물, maltose와 maltotriose, cellobiose와 cellotriose를 사용하여, retention time을 비교하였다. 그 결과 추출시료 내의 DP3와 정제된 DP3의 retention time이 각각 14.99와 14.75, 추출시료 내의 DP4와 정제된 DP4의 retention time이 17.80과 17.68로 유의적 차이가 나타나지 않았다.

Table 21. 올리고당의 retention time의 비교

Sample	Retention Time (min)
DP3 (Sample)	14.99 ( $\pm 0.09$ )
Maltotriose	15.42 ( $\pm 0.04$ )
Cellotriose	12.31 ( $\pm 0.05$ )
3-O- $\beta$ -cellobiosyl-D-glucos	14.75 ( $\pm 0.33$ )
DP4 (Sample)	17.80 ( $\pm 0.23$ )
Maltotetraose	19.53 ( $\pm 0.04$ )
Cellotetraose	15.57 ( $\pm 0.09$ )
3-O- $\beta$ -cellobiosyl-D-glucos	17.68 ( $\pm 0.32$ )

(4) 정제된 DP3와 DP4의 liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS)를 통한 분자량 분석

LC-MS는 Agilent 1100 series MSD(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, column을 제거한 상태로 positive electrospray mode에서 분석을 실시하였다. Electrospray의 유속은 800 L/min, 시료의 주입량은 10  $\mu$ L으로 하였으며, 분석 용매는 50%(v/v)의 acetonitrile 수용액을 사용하였다. Fragmentor voltage는 150 V, capillary voltage는 4 kV값을 주었으며, 온도는 350 $^{\circ}$ C로 설정하였다. Drying gas의 유속은 11.5 L/min로 주었으며, 검출범위는 100-1,500 m/z로 주었다. LC-MS 분석 결과 분자량(m/z)이 각각 527.0(DP3+Na<sup>+</sup>)과 689.0(DP4+Na<sup>+</sup>)으로 나타났다.

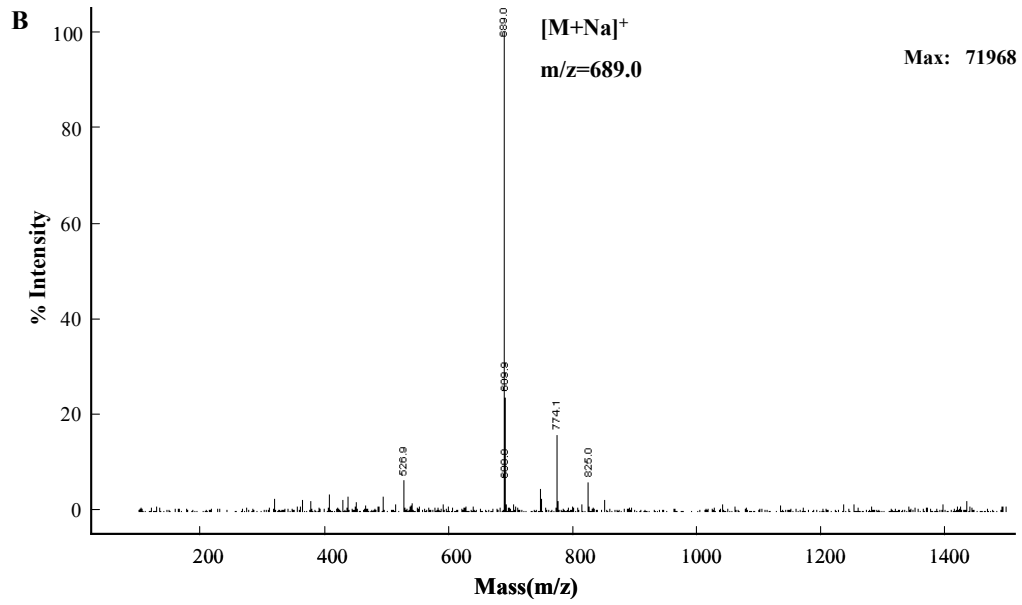
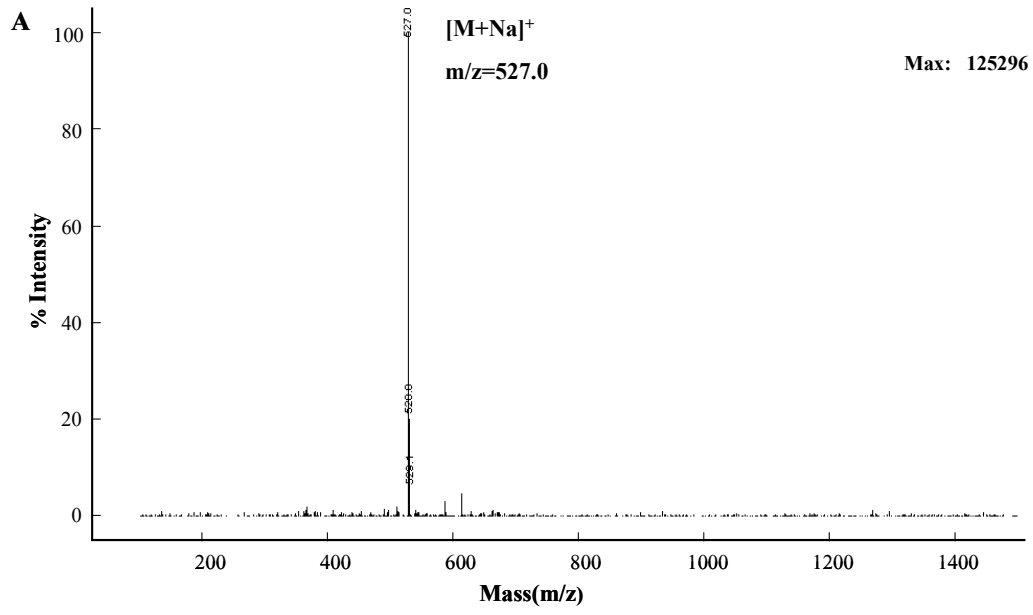


Fig. 41. LC-MS를 이용한 고순도의 DP3와 DP4의 분자량 분석.

(5) 정제된 DP3와 DP4의 TLC를 이용한 구조 분석

정제된 DP3와 DP4를 Hakomori의 방법을 이용하여 methylation시키고, 산분해하여, TLC 상에서 분석함으로써 각각의 구조 규명을 실시하였다. 분석 조건은 상기의 TLC 분석법(3, 나, 2)와 3))과 같은 방법으로 실시하였다. Bio-Rad Gel-Doc system [BIO-RAD Laboratories, Segrate(Milan), Italy]를 이용하여 2, 3, 4, 6-tetramethyl-glucose와 2, 3, 6-trimethyl-glucose, 2, 4, 6-trimethyl-glucose의 spot intensity값의 합에 대한, 2, 3, 4, 6-tetramethyl-glucose(비환원성 말단)와 2, 3, 6-trimethyl-glucose( $\beta$ -1, 4 결합), 2, 4, 6-trimethyl-glucose( $\beta$ -1, 3 결합)의 각 spot의 intensity 비를 구하였다.

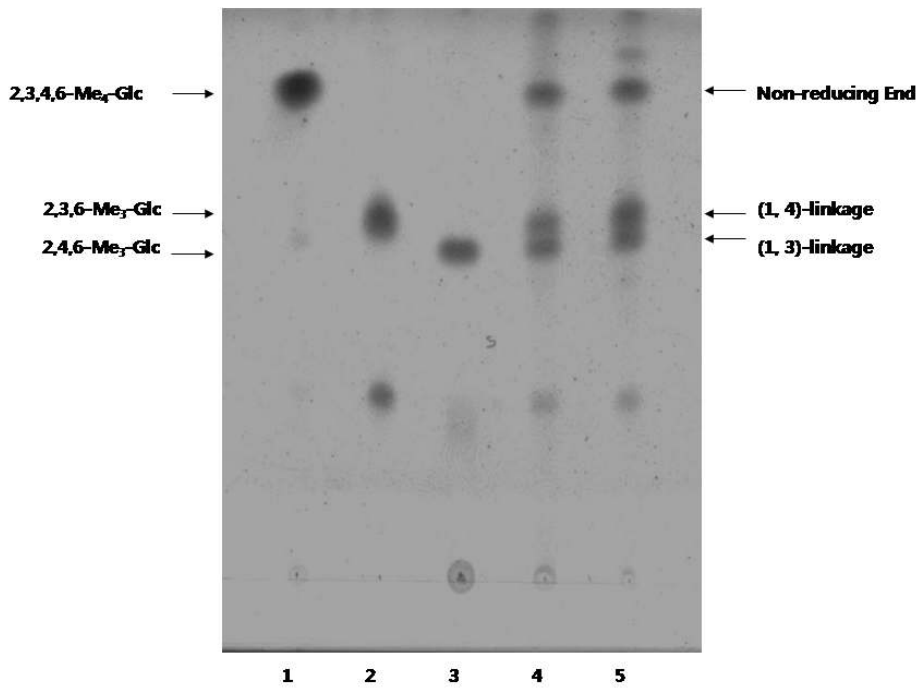


Fig. 42. 메틸화된 고순도로 분리 정제된 DP3와 DP4의 산분해물의 TLC 분석.

(1. D-glucose, 2.  $\alpha$ -CD 3.  $\beta$ -1,3-glucon 4. DP3 5. DP4)



Table 22. Image analyzer로 분석한 고순도로 분리 정제된 DP3와 DP4의 결합비

	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc (%)	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc (%)	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc (%)	End <sup>i</sup> :(1,4) <sup>ii</sup> :(1,3) <sup>iii</sup>
DP3 <sup>iv</sup> )	35.03	33.58	31.38	1 : 0.96 : 0.90
DP4 <sup>v</sup> )	23.01	50.20	26.79	1 : 2.18 : 1.16

i) 비환원성 말단의 잔기. ii) 정제된 β-glucan의 β-(1,4) 결합. iii) 정제된 β-glucan의 β-(1,3) 결합. iv) 3-O-β-cellobiosyl-D-glucose. v) 3-O-β-celotriosyl-D-glucose.

실험 결과 비환원성 말단의 잔기:β-glucan의 β-1, 4 결합:β-glucan의 β-1, 3 결합의 비가 DP3는 1:0.96:0.90, DP4는 1:2.18:1.16로 나타나, 각각 이론상의 1:1:1과 1:2:1과 유사하게 나타남을 알 수 있었다.

(6) 정제된 DP3와 DP4의 HPAEC를 이용한 standard curve의 완성 및 보리, 귀리 추출물의 β-glucan 분석

정제된 DP3와 DP4를 HPAEC 분석에 활용하기 위하여 standard curve를 만들었으며, peak intensity에 대한 대조군으로 maltose와 maltotriose, cellobiose와 cellotriose를 사용하여, retention time을 비교하였다. 각각의 시료는 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%로 농도를 달리하여 3회 반복 실시하였다. HPAEC 분석은 상기의 3, 가, 3)과 같은 조건으로 실시하였다. 완성된 standard curve를 이용하여 보리, 귀리 추출물의 β-glucan 분석을 실시하였다. 추출물의 DP3, DP4의 절대값은 standard curve를 이용하여 구하였으며, 추출물의 질량 대비로 나타낸 값이다.

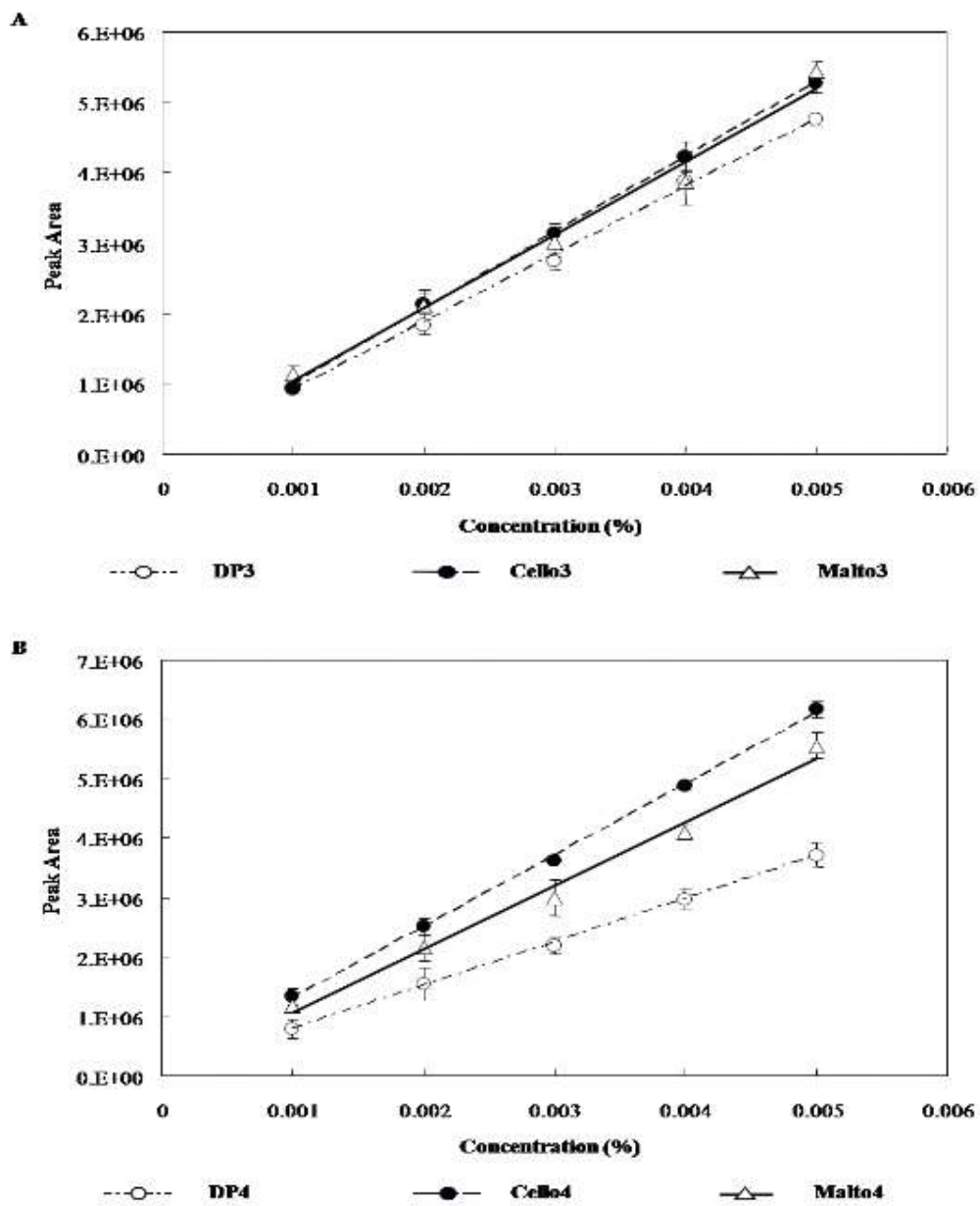


Fig. 43. Glucose로 3개와 4개로 이루어진 올리고당의 standard curve 비교.

정제된 DP3와 DP4에 대해서 각각의 standard 물질의 response factor를 구할 수 있었다. 정제된 DP3에 대해서 maltotriose는 1.11, cellotriose는 1.07의 값을 나타냈으며, DP4에 대해서 maltotetraose는 1.65, cellotetraose는 1.47의 값을 나타내었다. 즉 기존의 internal standard를 이용하여 절대 값을 구하는 방법은 신뢰성이 떨어짐을 알 수 있었다.

Table 23. 수용성  $\beta$ -glucan을 lichenase로 가수분해하여 생성된 올리고당의 구성

	DP3 (%)	DP4 (%)	Total amount of DP3 & DP4 (%)	Weight ratio of DP3/DP4	Molar ratio of DP3/DP4	(1,4)/(1,3)	
강보리	46.47	26.82	73.29	1.73	2.29	2.37	
Stdev	0.79	1.17	1.96	0.05	0.06	-	
올보리	45.73	26.73	72.47	1.71	2.26	2.37	
Stdev	0.42	0.99	1.41	0.05	0.06	-	
보리	광안 보리	45.74	25.67	71.41	1.78	2.35	2.36
Stdev	0.58	0.63	1.21	0.02	0.03	-	
찰보리	44.89	21.68	66.56	2.07	2.74	2.33	
Stdev	0.24	0.21	0.41	0.02	0.02	-	
올귀리	44.05	37.84	81.89	1.16	1.54	2.46	
Stdev	0.05	0.02	0.07	0.00	0.00	-	
귀리	삼한 귀리	41.29	32.80	74.09	1.26	1.66	2.44
Stdev	0.09	0.09	0.17	0.00	0.00	-	
동한 귀리	37.30	30.81	68.12	1.21	1.60	2.45	
Stdev	0.11	0.21	0.23	0.01	0.01	-	

개선된 HPAEC 분석을 통하여 보다 정확한  $\beta$ -glucan 분석이 이루어질 수 있었다. 정제된 DP3와 DP4를 이용하여  $\beta$ -glucan의 lichenase로 인한 가수분해물의 절대값을 구할 수 있었으며, 이를 이용하여 각 결합비 및  $\beta$ -glucan 안의 3-O- $\beta$ -cellobiosyl-D-glucose, 3-O- $\beta$ -celotriosyl-D-glucose기의 절대 함량을 구할 수 있었다.

#### 라. 결론

본 연구에서는 국산 종실류에 함유된 건강기능성 탄수화물 성분을 탐색하여, 선정하고, 그에 따른 추출 방법 및 분석 방법에 대한 연구를 실시하였다. Arabinoxylan, fructan, pectin,  $\beta$ -glucan, 기타 기능성 소당류 등을 문헌을 통하여 연구 하였으며, 그 중 혈중 콜레스테롤 감소 효능에서 매우 우수한 것으로 알려져 있는 곡류 유래  $\beta$ -glucan을 실험 대상으로 선정하게 되었다. 곡류 유래  $\beta$ -glucan의 경우 국내·외로 많은 연구가 이루어졌으며, 그 결과 생리 기능이 유용하다고 판단되어  $\beta$ -glucan에 대한 연구 가치는 크다고 할 수 있겠다. 현재 국내에서 진행되고 있는  $\beta$ -glucan에 대한 대부분의 연구는 버섯 균사체나 효모를 대상으로 하고 있으며, 생산성이 비교적 낮아 제품 개발 시 가격이 매우 높아 경쟁력이 낮은 단점을 가지고 있다. 그러므로 우리는 주변에서 쉽게 얻을 수 있는 곡류에서 유래된  $\beta$ -glucan에 대한 연구가 필요하다고 생각한다.

효율적인  $\beta$ -glucan의 추출을 위해, 기존부터 널리 이용되어온 Wood 등의 방법(추출법 I), Aman 등의 방법(추출법II), Micheal 등의 방법(추출법III) 등, 3가지 방법으로 보리 및 귀리에서  $\beta$ -glucan을 추출하고 비교 분석하였다.  $\beta$ -Glucan 추출수율은 Aman 등의 방법(추출법 II)이 가장 높게 나타났으나,  $\beta$ -glucan 순도를 측정한 결과 Aman 등의 방법으로 추출한 추출물의  $\beta$ -glucan이 가장 낮게 나타났다. 이는 Aman 등의 방법이  $\alpha$ -결합을 가진 당류를 amyloglucosidase와 termamyl 등의 효소를 사용하여 제거하는 방법으로, 불용성  $\beta$ -glucan 및 다른  $\beta$ -결합을 가지는 난분해성 탄수화물이 존재할 가능성이 높기 때문인 것으로 보인다. 고순도의  $\beta$ -glucan의 추출에 어려움이 있다. 이에 반해 Wood 등의 방법(추출법I)과 Micheal 등의 방법(추출법III)

은 30% ammonium sulfate를 이용하여, 수용성  $\beta$ -glucan을 침전시키므로 고순도의  $\beta$ -glucan을 추출하기에 유리하다. Wood 등의 방법이 Micheal 등의 방법보다 수율 및 순도가 더 높으며, 사용되는 효소의 종류와 양이 적어, 다량의  $\beta$ -glucan을 추출할 때 좀 더 경제적이므로, 좀 더 효율적이라고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 Wood 등의 방법을 가장 경제적인  $\beta$ -glucan 추출법으로 결론지었으며, 분석 실험에서의 모든 시료는 Wood 등의 방법을 이용하여 추출하였다.

분석법 비교 실험은 HPAEC를 이용하는 방법과 TLC를 이용하는 방법을 비교 하였다. HPAEC를 이용하여  $\beta$ -glucan의 lichenase에 의한 가수분해산물을 분석하는 방법은 널리 이용되고 있는 방법 중의 하나이다. lichenase는  $\beta$ -(1, 4) 결합만을 분해하는 효소로서 그 절단 부위는 모든  $\beta$ -1, 4 결합 부위가 아니고,  $\beta$ -glucan 분자의 환원 말단 쪽으로  $\beta$ -1, 4 결합이 인접되고 비환원 말단 쪽으로  $\beta$ -1, 3 결합이 인접된  $\beta$ -1, 4 결합만이 해당된다. 이때 생성되는 가수 분해물 중 Glucose 3개 분자가 결합된 3-O- $\beta$ -cellobiosyl-D-glucose(DP3)와 glucose 4개 분자가 결합된 3-O- $\beta$ -cellotriosyl-D-glucose(DP4)가 전체의 약 88-90%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 즉 DP3와 DP4를 측정하여 glucose의 구조를 분석하는데 그 목적이 있다. DP3와 DP4를 glucose, maltose, maltotriose(malto3), maltotetraos(malto4), maltopentaos(malto5), maltohexaose(malto6), maltoheptaose(malto7)과 비교하게 되며, 각각의 피크는 주어진 피크와 total 피크의 비율에 따라 계산한다. 실험 결과 DP3와 DP4가 가수 분해물의 대부분이라는 것과, MALDI-TOF MS를 이용하여, 각각의 분자량을 비교 확인할 수 있었다. 전처리 과정이 단순하다는 장점이 있지만, internal standard 중 malto3, malto4와 DP3, DP4가 서로 동일한 구조를 갖고 있지 않음으로, peak의 분석만으로 정확한 구조를 구하는 것이 불가능하다는 것을 알 수 있었다.

TLC를 이용한 분석법은 각 구성당 간의 결합되어 있지 않고 노출된 hydroxyl(OH)기의 수소를 methyl기로 치환한 다음 단당류로 산분해하여, 구성당을 비교함으로써 다당체의 구조를 분석하는 방법이다. TLC 분석법은 여러 시료를 한번에 분석할 수 있다는 점과 적은 양의 시료도 분석이 가능하며, GC-MS 보다 시료의 전처리가 간편하며, 전개되지 않고 남은 잔사의 정량도 가능하다는 장점이 있지

만. 다른 분석법에 비해 전처리가 오래 걸리며, standard 물질을 구하기가 어렵고, methylation 정도에 따라 spot intensity가 다르기 때문에 image analyzer를 활용한 정량분석에는 한계점을 나타내고 있다.

마지막으로 효과적인 앞서 실시한 HPAEC 실험 방법에서 제시한 문제점을 해결하기 위해 recycling preparative HPLC 기술을 이용하여 고순도의 DP3(3-O- $\beta$ -cellobiosyl-D-glucose)와 DP4(3-O- $\beta$ -cellotriosyl-D-glucose)를 정제하여 표준물질로 사용하고자 하였다. 고순도로 정제한 DP3와 DP4의 순도 및 구조 동정을 실시하였으며, 이를 이용하여 농촌 진흥청 작물 과학원에서 분양 받은 강보리, 올보리, 광안보리 시료의 Wood 등의 방법으로 추출한 추출물과 새로 분양받은 올귀리, 삼한귀리, 동한귀리, 찰보리 시료의 Wood 등의 방법으로 추출한 추출물의 분석을 실시하였다. 순수 분리한 DP3와 DP4는 HPAEC, TLC, LC-MS 등을 이용한 분석을 통하여, 그 구조에 대하여 증명할 수 있었다. 또한 명확한 standard를 구함으로 인해, 구성당 중의 DP3와 DP4의 절대량을 구할 수 있었으며, 이를 이용하여  $\beta$ -1, 4 결합과  $\beta$ -1, 3 결합, DP3와 DP4의 정확한 비율을 구할 수 있다. 이 방법을 이용함으로써 GC-MS와 TLC에 비하여 간편한 전처리를 통하여, 그 결합 양식에 대한 분석이 가능할 수 있음을 시사할 수 있었다.

### 제3절 참고문헌

[1] 식품신문 2003년 1월 6일

[2] 장경원, 박상희, 하상도. 기능성 식품 시장 동향. 식품과학과 산업. 36(1): 17-25 (2003)

[3] 박무현. 마늘 및 양파의 신제품 개발. 한국식품개발연구원. (1993)

[4] 김현구. 극초단파 공정에 의한 양념채소류 Oleoresin 고효율 추출기술 개발. 한국

식품개발연구원. (2000)

[5] Lee HJ, Joo YJ, Park CS, Lee JS, Park YH, Ahn JS, Mheen TI. Fermentation patterns of green onion Kimchi and chinese cabbage kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 31(2): 488-494 (1999)

[6] Hong SI, Jo MN, Kim DM. Quality attributes of fresh-cut green onions as affected by rinsing and packaging. Korean J. Food Sci. Technol. 32(3): 659-667 (2000)

[7] Kim KN, Kim SJ, Kim SH, Park IS. Characterization of acid phosphatase from welsh onion. Korean J. Food Sci. Technol. 28(4): 663-667 (1996)

[8] Jeong MC, Jeong SW, Lee YC. Quality of ginger power as affected by concentration and dehydration methods of ginger extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 31(6): 1589-1595 (1999)

[9] Jeong MC, Lee SE, Lee YC. Yield and quality of ginger extracts produced by enzymatic hydrolysis. Korean J. Food Sci. Technol. 31(2): 391-398 (1999)

[10] Chung TY, Jeong MC, Namgung B, Lee SE. Effect of pre-treatment methods on the quality of ginger during storage. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 6(1): 1-6 (1999)

[11] 한국식품과학회. 건강기능식품의 기능성 표시 및 평가 방향. (2002)

[12] 신현경. 기능성 식품의 개발 및 연구동향. 식품과학과 산업. 30: 2-13 (1997)

- [13] 신동화. 천연 항산화제의 연구동향과 방향. 식품과학과 산업. 30: 14-21 (1997)
- [14] Yamaguchi N. Studies on natural antioxidants: antioxidative activities of flavonoids and synergistic effects on tocopherol and melanoidin. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 22: 270 (1975)
- [15] Nishibori S, Namiki K. Superoxide anion radical-scavenging ability of fresh and heated vegetable juices. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 45(2): 144-148 (1998)
- [16] De Rosa, G. Duncan, D.S. Keen, C.L. and Hurley, L.: Evaluation of negative staining technique for determination of CN-insensitive superoxide dismutase activity. Biochem. Biophys. Acta, 566, 32 (1979)
- [17] Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. J. Agric. Food Chem. 44: 3426-3431 (1996)
- [18] Tade M, et al. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 1093-1095 (1996)
- [19] Gessler NN, Kharchenko LI, Pavlovskaya TE, Bykhovskii VY. Radioprotective effects of S-Methylmethionine(vitamin U). Appli. Biochem. Microbiol. 32: 666-668 (1996)
- [20] Gessler NN, Bezzubov AA, Podlepa EM, Bykhovskii VY. Metabolism of S-Methylmethionine(vitamin U) in animals. Appli. Biochem. Microbiol. 27: 275-280 (1991)
- [21] Gessler NN, Bezzubov AA, Podlepa EM, Bykhovskii VY.



S-Methylmethionine(vitamin U) metabolism in plants. Appli. Biochem. Microbiol. 27: 192-199 (1991)

[22] 2003년도 연합학술대회. 건강기능식품의 발전 및 연구 방향. 이화여대 이화삼성 교육문화관. (2003)

[23] 2003 한림대 실버 생물 산업 기술 연구 센터 심포지움 : 고령화 사회에서의 건강기능식품 개발 방향. (2003)

[24] 박인선. 혈당조절 기능성 식품의 실험적 평가. 건강기능식품의 유효성 평가. 한국식품영양과학회. 28-33 (2003)

[25] 최명숙. 건강기능식품의 콜레스테롤 조절 관련 기능성 평가체계 (안). 건강기능식품의 유효성 평가. 한국식품영양과학회. 34-36 (2003)

[26] 성미경. 암화과정에서 식이성 항산화 물질의 효능평가. 건강기능식품의 유효성 평가. 한국식품영양과학회. 39-41 (2003)

[27] 이찬, 배송환, 조승룡, 이석원, 송혁환, 강호식, 윤철식. 백강균의 자실체 생산 및 생리활성물질 이용기술 개발. 농림부 연구보고서. (2003)

[28] 김현구, 이부용, 김영언. 버섯류의 부가가치 제고를 위한 가공식품의 개발. 농림부 연구보고서. (1997)

[29] 김홍은, 조남석, 민용규, 박종문. 능이 임지재배 기술 및 기능성 개발. 농림부 연구보고서 (2002)

[30] 김성준, 김명곤. 버섯에서 혈전분해효소 생산 및 유전자 크로닝. 농림부 연구보

고서. (2003)

[31] 김병각. 영지의 약효성분. 균학회소식. 16-20 (1990)

[32] 미즈노 다카시. 영지의 생물활성 성분과 의학적 효과. 균학회소식. 27-29 (1990)

[33] 조덕현. 한국의 11개 주요 산지에서 채집한 송이의 형태적, 화학적, 생리적, 유전적 특성에 관한 연구. 서울대 박사학위논문. (1999)

[34] Buchala AJ, Wilkie KCB. The ratio of  $\beta(1\rightarrow3)$  to glucosidic linkages in non-endospermic hemicellulosic  $\beta$ -glucans from oat plant(avena tissues at different stages of maturity). Phytochem. 10: 2287-2291 (1971)

[35] Jung EB, Lee YS. 랫트의 실험적 동맥경화증에 대한  $\beta$ -glucan의 예방효과. Kor. J. Food Hygiene. 1: 1-12 (1986)

[36] Aman P, Graham H. Analysis of total and insoluble mixed-linked (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucans in barley and oats. J. Agric. Food Chem. 35: 704-709 (1987)

[37] Shinnick FL, Longacre MJ, Ink SL, Marlett JA. Oat fiber: Composition versus physiological function in rats. American Institute of Nutrition. 118: 144-151 (1988)

[38] Carr JM, Glatter S, Jeraci JR, Lewis BA. Enzymic determination of  $\beta$ -glucan in cereal-based food products. Cereal Chem. 67(3): 226-229 (1990)

[39] Wood PJ, Weisz J, Blackwell BA. Molecular characterization of cereal  $\beta$ -D-glucans I. Structural analysis of oat  $\beta$ -D-glucan and rapid structural

evaluation of  $\beta$ -D-glucans from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal chem.* 68(1): 31-39 (1991)

[40] Wood PJ, Weisz J, Mahn W. Molecular characterization of cereal  $\beta$ -glucans II. Size-exclusion chromatography for comparison of molecular weight. *Cereal Chem.* 68(5): 530-536 (1991)

[41] Jaskari J, Henriksson K, Nieminen A, Suortti T, Salovaara H, Poutanen K. Effect of hydrothermal and enzymic treatments on the viscous behavior of dry- and wet-milled oat brans. *Cereal Chem.* 72(6): 625-631 (1995)

[42] Henriksson K, Teleman A, Suortti T, Reinikainen T, Jaskari J, Teleman O, Poutaneu. K. Hydrolysis of barley 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4- $\beta$ -D-glucan by a cellobiohydrolase II preparation from *trichoderma reesei*. *Carbohydrate Polymers*, 26: 109-119 (1995)

[43] 이영택. 보리와 귀리의  $\beta$ -glucans 및 가공에 의한 용해성의 변화. *한국농화학회지*. 39(6): 482-487 (1996)

[44] 오희정, 이서래. 보리가루에서 분리한  $\beta$ -glucan의 생리적 기능성. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28(4): 689-695 (1996)

[45] Yun CH, Estrada A, Kessel AV, Gajadhar A, Redmond MJ, Laarveld B.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4) Oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. *International Journal for Parasitology*. 27(3): 329-337 (1997)

[46] Fearon AM, Mayne CS, Charlton C. Effect of naked oats in the dairy cow`s

diet on the oxidative stability of the milk fat. *J. Sci Food Agric.* 76: 546–552 (1998)

[47] Mustafa AF, Christensen DA, Mckinnon JJ. Chemical characterisation and ruminal nutrient degradability of hulled and hull-less oats. *J. Sci Food Agric.* 77: 449–455 (1998)

[48] Chandra GS, Proudlove MO, Baxter ED. The

structure of barley endosperm—an important determinant of malt modification. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 79: 37–46 (1999)

[49] Grosjean F, Marrie P, Beaux F. Variability of wheat and other cereal water extract viscosity 2–range and causes of variation. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 79: 123–130 (1999)

[50] Auerbach RH, Gray DA. Oat antioxidant extraction and measurement—towards a commercial process. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 79: 385–389 (1999)

[51] Andersson AAM, Elfverson C, Andersson R, Regner S, Aman P. Chemical and physical characteristics of different barley samples. *J. Sci. Food Agric.* 79: 979–986 (1999)

[52] Maatta K, Lampi AM, Petterson J, Fogelfors BM, Piironen V, Eldin AK. Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden. *J. Sci Food Agric.* 79: 1021–1027 (1999)

[53] 최희돈, 박용곤, 장은희, 석호문, 이철호. 메성 및 찰성보리  $\beta$ -glucan의 리올로

지 특성. Korean J. Food Sci. Technol, 32(3): 590-597 (2000)

[54] Aktas LY, Adlard M, Trevan M, Guven A, Briwnleader MD. A novel and direct assay for measuring enzymatic depolymerisation of  $\beta$ -1,3-glucans. Phytochemical Analysis. 11: 301-303 (2000)

[55] Kianian SF, Phillips RL, Rines HW, Fulcher RG. Quantitative trait loci influencing  $\beta$ -glucan content in oat (*Avena sativa*,  $2n=6x=42$ ). Theor. Appl. Genet. 101: 1039-1048 (2000)

[56] Cui W, Wood PJ, Blackwell B, Nikiforuk J. Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat  $\beta$ -D-glucan-comparison with other cereal  $\beta$ -D-glucans. Carbohydrate Polymers. 41: 249-258 (2000)

[57] Johansson L, Virkki L, Maunu S, Lehto M, Ekholm P, Varo P. Structural characterization of water soluble  $\beta$ -glucan of oat bran. Carbohydrate Polymers. 42: 143-148 (2000)

[58] Roubroeks JP, Andersson R Aman P. Structural features of (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. Carbohydrate Polymers. 42: 3-11 (2000)

[59] Pietta, P, Simouetti P, Gardana C, Brusamolino A, Borloradelli E. Relationship between rate and extent of catechine absorption and plasma antioxidant status. Biochem. Mol. Biol. Int. 46: 895-899 (1998)

[60] Sureda O, Prieto RM, Dameto MC, Tur JA. Effect of cafeteria diet on

intestinal absorption of palmitic acid in rats. *J. Nutr. Biochem.* 6: 151–154 (1995)

[61] Pellitier JP, DiBattista JA, Raynauld JP. The in vivo effects of intraarticular corticosteroid injections on cartilage lesions, stromelysin, interleukin-1 and oncogene protein synthesis in experimental osteoarthritis. *Lab Invest.* 72: 578–586 (1975)

[62] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips, II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg.* 53-A(3): 523–537 (1971)

[63] Chandrasekhar S, Easterman MA, Hoffman HA. Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Anal Biochem.* 161: 103–108 (1987)

## 제5장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	달성도(%)
1차년도 (2004)	○ 우리 농산물 중 건강기능식품으로의 개발 잠재력과 농가 소득증대에 미치는 영향이 큰 8종 이상의 농산물의 건강기능성 원료·성분 등록에 필수적인 건강기능성과 안전성에 대한 자료 조사 결과	100
	○ 조사된 우리 농산물의 건강기능성을 최신 연구방법을 통한 확인 실험 결과	100
	○ 우리 농산물의 건강기능성과 안전성을 수입 농산물과 비교 실험하여 장점을 발굴한 결과	100
2차년도 (2005)	○ In vitro 및 in vivo 연구를 통하여 1차년도에서 발굴된 8종 이상의 우리 농산물의 건강기능성 연구 결과	100
	○ 우리 농산물의 건강기능성을 수입 농산물과 비교 연구하여 우수성 발굴 결과	100
	○ 최적 섭취량, 활성본체, 지표물질, 부작용 관련 자료 연구 결과	100
3차년도 (2006)	○ 산지 및 가공방법별 건강기능성 조사 결과	100
	○ 연구된 8종 이상의 우리 농산물 및 그 가공물의 건강기능성 원료·성분 인정을 위한 한국식품의약품안전청 제출 자료 작성 결과	100
최종평가	○ 연구된 8종 이상의 우리 농산물 및 그 가공물의 건강기능성 원료·성분 인정을 위하여 작성된 한국식품의약품안전청 제출 자료의 우수성	100
	○ 우리 농산물의 건강기능성을 높일 수 있는 가공방법의 산업화 가능성	100

버섯의 기능성으로 고시된 항목은 ①혈행을 원활히 하는데 도움, ②생리활성물질 함유, ③건강증진 및 유지의 기능성 내용에 관한 3개항이 있다. 이 것들은 막연하고 주관적인 요소가 개입될 여지가 많으므로 구체적인 기능성 기준 고시가 요구되고 있다.

또한, 국내에는 해외에서 수입되는 많은 버섯으로 버섯농가가 어려움을 겪고 있다.

본 실험은 국산을 보호하기 위하여 국내 수입되는 일부중국산과 국산버섯의 기능성을 비교하였으며 표고는 중국산이 향균등의 일부 항목이, 송이는 전반적으로 국내산이 우수하였다. 그러나, 국내산이 우수한 송이는 자연에서 채집함으로서 생산량 및 수량 공급이 한정되어 있고 예측이 어려워져서 본 연구에서는 재배로 가장 많이 생산되는 느타리와 표고 등의 2종의 국내버섯을 선정하여 기능성을 조사하였다. 그것은 기능성 구명으로 전체 수요가 증가하면 일부 수입품이 들어오더라도 전반적인 농가 소득이 증가할 수 있을 것으로 판단되었다. 실험 결과, 버섯 자체, 버섯 추출물, 시판버섯추출물 등에서 일관적으로 항산화 및 항균 기능이 우수하여 구체적인 건강 기능식품의 기능항목으로 2개항의 제시가 가능할 것으로 판단되어 목표에 달성된 것으로 생각되었다. 고시형으로 항산화 및 항균 기능이 등재되면 버섯을 이용한 항균과 항산화관련 제품이 다량 생산되어 버섯 수요가 증대되고 관련산업도 증대 될 것이다.

현재 본 세부과제는 계획 대비 100%의 연구목표를 달성하였다. 국산 종실류의 기능성 성분의 탐색을 위해 전문서적, 인터넷, 논문, 전문가와의 토론 등을 통해 종실류 유래 기능성 물질에 대한 스크리닝을 수행하였다. 지방질 유래 기능성 물질 선별을 위해 검은콩, 검은깨, 땅콩씨, 너트류 등의 종실류가 선별되었으며 단백질 근간 기능성 물질로는 항 혈전 단백질 등이 탐색되었다. 보리, 귀리 등에서 유래한 탄수화물 기능성물질인  $\beta$ -glucan의 효율적인 기능성 측정법 개발에 대한 문헌 연구를 수행하였다. 종실류 유래 기능성 물질의 탐색 및 중국 수입 종실류와 국산 종실류 간의 효능차이를 비교하기 위해 예비 추출 및 분석법이 선정되었다.



## 제6장 연구개발 결과의 활용계획

- 우리 농산물의 건강기능성과 안전성을 높일 수 있는 가공방법을 연구하여 그 기술에 관한 특허를 출원하도록 한다.
- 우리 농산물 및 그 가공물의 최적 섭취량, 활성분체, 지표물질, 부작용 등이 종합적으로 연구되어, 연구 종료 시 건강기능성 원료성분 인정을 위한 자료가 식품의약품 안전청에 제출되고 관련 업체에 개발된 기술이 이전되어 상품화되도록 한다.
- 본 연구에서 개발되는 기술은 우리 채소류를 건강기능성 원료성분으로 등록시키는데도 활용할 수 있도록 한다.
- 구체적인 고시형 항목 기준 인증으로 건강기능성 식품으로 구체적 표시가 가능하며, 버섯 첨가로 개발된 다 기능성 제품의 경우에 항산화와 항균에 대한 표시가 가능할 것이다.
- 버섯관련학회지에 본 연구결과를 발표하고 홍보할 수 있다.
- 본연구에서는 열수, 알콜과 아세톤으로 분획하여 항산화와 항균에 대한 조사가 이루어졌고 글루칸으로 지표하여 함량 결정이 이루어졌으므로 항산화 및 항균 부분에 집중하여 분획하고 분리하여 개별인정형 제품을 위한 연구가 확대될 수 있을 것이다.  
또한 항암 및 면역분야는 의약 분야라서 다루지 못하였으므로 보다 수요 증대 차원에서 장기적으로 기능성 식품으로서 인증항이 될 수 있는지의 연구가 필요하다.
- 기존 문헌을 통한 자료 확보와 과학적인 연구를 통하여 우리 농산물을 건강기능성 원료성분으로 등록시키기 위한 안전성 및 건강기능성 입증 자료 확보

- 우리 농산물을 건강기능성 원료·성분으로 등록 수행
  
- 본 연구는 우리 농산물 고유의 생리활성 성분을 분리하는 방법을 확립하고, 대량 생산을 위한 기초 자료를 제공한다. 또한 기능성 성분의 분자량 및 구조를 확인하는 방법을 통하여 다양한 종류의 새로운 기능성 성분의 탐색을 가능하게 할 것이다. 또한 물리화학적 처리에 의한 다양한 기능성 성분의 추출 및 분석은 새로운 분야의 학문적 기초 자료를 제공할 수 있다.
  
- 농업에 미치는 영향이 큰 8종 이상의 우리 농산물을 건강기능성 원료·성분을 등록시킴으로써 농업육성 및 농가의 소득증대에 기여함.
  
- 우리 농산물의 기능성과 안전성에 대한 과학적인 연구를 통하여 국산 원료를 사용한 건강기능식품에 대한 소비 확대와 부가가치 제고
  
- 건강기능성을 가진 우리 농산물을 건강기능식품 생산에 적극 활용함으로써 수입 건강기능식품에 대한 능동적인 대응 및 국내 건강기능식품 산업 육성
  
- 개발기술의 특허화 및 산업화를 통하여 시장 전망이 밝은 국내 및 세계 기능성 식품시장으로의 진출 기대된다.
  
- 기능성 생리활성 물질의 대량 생산으로 연간 150억원 규모의 농가소득 증대
  
- 우리 농산물의 건강기능성과 안전성을 높일 수 있는 가공방법을 연구하여 그 기술에 관한 특허가 국내외에 출원되도록 한다.
  
- 8종 이상의 우리 농산물 및 그 가공물의 최적 섭취량, 활성본체, 지표물질, 부작용 등이 종합적으로 연구되어, 연구 종료 시 건강기능성 원료·성분 인정을 위한 자료

가 한국 식품의약품안전청에 제출되고 관련 단체에 개발된 기술이 이전되어 상품화 되도록 한다.

- 본 연구에서 개발된 기술의 산업화에 필요한 우리 농산물은 전국 단위 농협에서 계약 재배 되도록 유도한다.

- 농수산물 가공산업 육성법에 의하여 설립되고 우리 농산물을 원료로 이용하는 전국 약 1,400여개의 전통 식품업체 및 산지 가공업체의 활성화에 이용될 수 있음

- 본 연구개발의 결과를 이용하여 우리 농산물의 건강기능성 원료·성분으로 등록 수행 할 예정이다. 검은 콩 및 검은깨 추출물의 항산화성 및 항암성을 활용하여 제품이 개발되고 있으며 시중에서 이들 제품이 함유된 가공식품이 이미 수종 시판되고 있음.

- 새로운 기능성 제품을 생산하기 위한 과학적인 토대를 제공하였고 대당 우리 농산물을 전국 단위 농협에서 계약 재배되도록 유도하여 농가육성 및 농가에 연간 150억 원 규모의 추가 소득증대에 기여할 것으로 기대됨.

- 본 연구는 우리 농산물 고유의 생리활성 성분을 분리하는 방법을 확립하고, 대량 생산을 위한 기초 자료를 제공하고 기능성 성분의 분자량 및 구조를 확인하는 방법을 통하여 다양한 종류의 새로운 기능성 성분의 탐색을 가능하게 할 것임. 또한 물리화학적 처리에 의한 다양한 기능성 성분의 추출 및 분석은 새로운 분야의 학문적 기초 자료를 제공할 수 있음.

- 우리 농산물의 기능성과 안전성에 대한 과학적인 연구를 통하여 국산 원료를 사용한 건강기능식품에 대한 소비 확대와 부가가치 제고를 시키고 소비자들의 건강기능성 식품에 대한 긍정적인 인식의 확대가 가능.

- 본 연구결과를 바탕으로 국내 농산물의 건강기능성과 안전성을 높일 수 있는 가공 방법 개발에 활용하여 특허가 국내외에 출원되도록 함. 8종 이상의 우리 농산물 및 그 가공물의 최적 섭취량, 활성분체, 지표물질, 부작용 등이 종합적으로 연구되어, 연구 종료 시 건강기능성 원료성분 인정을 위한 자료가 한국식품의약품안전청에 제출되고 관련 단체에 개발된 기술이 이전되어 상품화 되도록 함.

○ 연구 결과 및 결과별 활용 가능 영역

1) 국내외 관련 학회 논문 게재

· Physiological activities of garlic extracts as affected by habit and solvents. J. Medicinal Food, 8(4), 476-481 (2005)

· Physiological activities of ginger extracts originated from different habit. Food Sci. Biotechnol., 15(1),143-147 (2006)

· 반응표면분석을 이용한 양파의 추출효율 및 기능성에 대한 모니터링, 한국식품영양과학회지, 제 36권 1호,105-110(2007)

Yang SO, Chang PS, Lee JH. Isoflavone distribution and  $\beta$ -glucosidase activity in *Cheonggukjang*, a traditional Korean whole soybean-fermented food. Food Sci. Biotechnol. 15(1): 96-101 (2006)

· 반응표면분석을 이용한 생강의 추출효율 및 기능성에 대한 모니터링, 한국식품영양과학회지, 투고중 (2007)

2) 국내외 관련 학회 논문 발표

· Physiological activities of garlic of garlic extracts as affected by habits and solvents, IFT 2005 Annual Meeting, Morial convention center, New Orleans, Louisiana, July 16-20, 2005

· Physiological activities of garlic extracts as affected by habit and solvents, 2005년도 한국식품영양과학회 국제 심포지엄 및 학술회의, 강원도 용평 리조트 (2005.10.19-10.21)

· Monitoring on extraction yields and functional properties of onion(*allium cepa*) extracts by using RSM. 한국식생활문화학회 제41차 춘계학술대회, 연세대학교 (2006. 5. 12)

· Monitoring on extraction yields and functional properties of garlic extracts by using RSM, IUFoST 13th World Congress of Food Science and Technology, Nantes France, September 17-21, 2006

· Monitoring on extraction yields and functional properties of ginger extracts by using RSM, 2006년도 한국식품영양과학회 국제 심포지엄 및 학술회의, 경주 교육문화회관 (2006. 10. 18-10. 20)

- 이명기, 이지영, 성기승, 전향숙: 생 버섯 및 분말건조 버섯의 항산화성 조사. (한국식품과학회, 2005, 6)

## 제7장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1. Diploc AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vinä-Ribes J: Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.*, 1998;80S:S77-S112.
2. Kim SM, Kubota K, Kobayashi A: Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997;61:1482-1485.
3. Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo K, Aburada M, Hosoya E. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J. Pharmacobiodyn* 7: 836-848 (1984)
4. Kikuzaki H, Usuguchi J, Nakatani N. Constituents of Zingiberaceae I. Diarylheptanoids from the rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 120-122 (1991)
5. Endo K, Kanno E, Oshima Y. Structures of antifungal diarylheptenones, gingerenones A, B, C and isogingerenone B, isolated from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry* 29: 797-799 (1990)
6. Srivas KC. Effects of aqueous extracts of onion, garlic and ginger on platelet aggregation and metabolism of arachidonic acid in the blood vascular system: *in vitro* study. *Prostaglandins Leuko. Med.*, 13: 227-235 (1984)
7. Folin O, Denis W: On phosphotungastic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, 1912;12:239-243.

8. Gontard N, Guilbert S, Cuq B. Edible wheat gluten films : Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.*, 57: 190-196(1992)

버섯의 향균물질 중에서 주 화합물은 폴리아세틸렌 화합물(3중 결합을 갖음), 테르페노이드류 및 방향족 화합물이다. 이들 화합물들은 버섯 특유의 것으로 다른 미생물이나 식물에서는 발견되지 않는다. 그리고 이들은 대부분 중성물질이며, 산성물질은 적고, 염기성물질은 알려져 있지 않다. 버섯이 생산하는 향균물질은 같은 종류라 하여도 채집장소나 배지에 따라 다른 것으로 알려져 있다.

Table 28. 버섯유래 폴리아세틸렌 향균 화합물

화합물	구조식	항균성
agrocybin	$\text{HOCH}_2-(\text{C}\equiv\text{C})_3-\text{CONH}_2$	그램양성균,
		그램음성균,
		곰팡이
lentinamycin A	$\text{HC}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}=\text{C}=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$	곰팡이
lentinamycin B		곰팡이
nemotin	$\text{HC}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}=\text{C}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_2)-\text{CO}$	세균, 곰팡이
nemotinic acid	$\text{HC}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}=\text{C}=\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	세균, 곰팡이

네덜란드는 자신들이 개발한 첨단 버섯 재배법을 통해 버섯을 싼 값으로 대량 생산하여 주변 국가에 수출하는 바람에 유럽 각국의 영세한 버섯 재배자들이 큰 타격을 입었다고 한다. 세계 최대 수출국은 중국이지만 네덜란드는 첨단 기술을 활용하고 중국은 싼 노동력을 활용했다는 점이 다르다. 네덜란드 버섯 재배자 연합'(CNC)은 세계 최대의 퇴비(양송이 배지)제조 시설로서 네덜란드 양송이 배지의 85%를 공급하고 있으며 유럽 각국으로도 수출하고 있다. 네덜란드의 버섯 재배농가

는 네덜란드 버섯 재배자 연합(CNC)으로부터 편의에 따라 두 종류의 양송이 배지를 구입하여 버섯을 재배한다. 첫째 방법은 네덜란드 버섯 재배자 연합(CNC)에서 야외 퇴적된 신선퇴비를 구입하여 농장내의 터널에서 후발효와 균사활착을 시킨 후, 채취실로 옮기면서 복토작업을 동시에 하는 방법이고, 두 번째 방법은 CNC의 터널에서 후발효한 퇴비 또는 활착까지 시킨 퇴비를 구입하여 채취실로 옮기면서 복토작업이 동시에 이루어지는 방법이다. 최신 시설로 새로 건설한 농가는 첫째 방법을 택하고 있으나 재래식 재배사만을 가진 농가는 두 번째 방법으로 버섯을 재배한다. 재래식 재배사를 가지고 있는 농가에서도 둘째방법의 작업이 가능하도록 재배사를 개조한다. 또한, 1970년대 이후 실내 발효 기술이 급속도로 발전하였는데, 이는 차고(병커), 터널, 압축 공기 시스템에서 시작하여 컴퓨터로 제어하는 발효 시스템으로 발전하였다. 그러나 이러한 시스템을 실제로 적용하는데는 아직도 풀어야 할 문제가 있다—UFO (Unidentified Fermentation Obstacles, 미확인 발효 장애요소). 공기 주입식 병커/터널의 장점에도 불구하고 농가 실증 실험을 통한 구체적인 '발효 규칙'을 새로 제정할 필요성은 계속 제기되고 있다.

버섯 품질관리를 위한 악취 측정 방법(미네소타 대학의 Larry Jacobson)은 olfaction(후각, 사람의 후각은 10,000종 이상의 냄새를 구별할 정도로 정밀하다), scentometer(야외측정기, 정확도가 떨어짐) 그리고 olfactometer를 사용하는 세가지 방법이 있다. 세번째 방법은 훈련된 참가자에 의해 표준화된 과정으로 진행되며, 25-50%의 정확도를 나타낸다. 악취를 제어하는 방법은 '악취 발생원의 분산, 악취원의 냄새 발산을 억제, 악취 발생 자체를 감소'시키는 세가지 유형이 있다. 대표적으로 바이오필터를 설치하는 방법과 투과성 커버를 덮는 방법이 있다.



## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.