

최 중
연구보고서

민들레, 녹차, 갓, 황기 및 버섯 등의 특성을 이용한 wellbeing 제품의 개발

Development of wellbeing products with characteristics
of dandelion, greentea, brasica, whanggi and mushrooms

연구기관

전남대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “민들레, 녹차, 갓, 황기 및 버섯 등의 특성을 이용한 wellbeing 제품의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 김 종 덕

세부연구책임자 : 김 종 덕

신 태 선

강 소 영

연 구 원 : 김 민 용,

김 은 옥

김 종 완

도 화 자

조 상 래

김 동 익

김 상 용

요 약 문

I. 제 목

민들레, 녹차, 갓, 황기 및 버섯 등의 특성을 이용한 wellbeing 제품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

삶의 질이 향상되어 갈수록 사람들을 건강하고 오래 살 수 있기를 기대한다. 이는 사회가 복잡해지고 안정된 삶을 영위하기 위해서는 누구나 삶에 열중하지 않으면 안 된다. 이에 따라 많은 스트레스를 받아 다양하고 복잡한 질병들이 생겨나고, 이를 극복하지 못하면 일생을 마감하게 될 것이다. 따라서 살아가는데 기본적으로 갖추어야 하는 건강, 즉 wellbeing에 대해서 생각 생각하게 될 것이다. 사회 생활을 하면서 쉽게 지치지 않고 질병을 예방할 수 있으며, 피부의 트라블을 막아주며, 술자리가 많은 생활에서 건강을 지킬 수 있는 방법들을 제시하고자하는 것이 본연구의 목적이다. oxidative stress에 의하여 생체의 많은 부분이 손상을 입고 이에 따라 많은 질병들이 생겨남으로써 이를 막아 줄수 있는 제제의 개발이 필요하게 됨으로써 부작용이 없는 천연산물로부터 항산화력이 강한 물질을 선별하고, 면역을 향상시킬 수 있고, 비만을 예방하거나 치료할 수 있으면서, 간의 기능 향상을 도와 줄 수 있고, 항혈전효과, 항콜레스테롤 효과 그리고 testosterone 유도효과를 가지는 천연산물의 복합체를 개발하여 실생활에 도움이 되고자하는 것이다. 특히 신생혈관형성 억제 작용을 갖는 성분을 선별함으로써 암의 예방 및 비만의 예방에도 도움이 되도록 하였다. 또한 사회가 복잡 다양해짐으로써 많은 공해가 발생하고, 직접 피부에 닿음으로써 피부질환으로 많은 고생을 하고 있다. 대부분의 피부질환 치료제로서 steroid가 많이 사용됨으로써 관절염, 부종, disuse atrophy등 많은 질병의 원인이 되고 있다. 따라서 천연산물로부터 비스테로이드성 소염제제, 아토피 치료제제, 미백치료제제, 특히 UV에 의한 손상된 피부의 재생 care등이 요구되어지고 있는 시점에서 천연산물로부터의 부작용이 없는 치료제제의 개발은 현대 생활에 필수품이 되어 가고 있다.

그리고 사회생활에서 뺄 수 없는 것이 사람 사이의 벨트형성이 될 것이다. 인간관계는 혼자서 살 수 없음을 말하고 이를 해결하는데 필수적인 것이 술이 될 것이다. 대부분의 술은 건강을 해치는 것임에 틀림없다. 그러나 술의 중요성을 알고 있으나 술의 독성을 해결 수 있는 방법은 별로 없다. 따라서 술을 마시더라도 천연산물의 작용에 의하여 알콜의 대사를 촉진하거나 간의 기능을 향상시켜 손상을 덜 입히게 하는 발효주의 개발은 현대의 wellbeing에 아주 적합하다고 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

생체의 기능향상을 위한 차의 개발도 다양한 기능을 검증한 후 이들로부터 한방의 원리에 따라 쉽게 섭취가 가능하도록 제조할 것이며, 기능성 화장품의 개발은 기존에 사용되는 재료와는 다르며 피부 친화성의 제재로 그 작용 기전을 규명하여 신뢰성 있는 제품을 개발한다. 발효주도 생체에 유익하며 간의 기능을 개선하고 생체의 면역 향상 및 생체의 기능을 향상시킬 수 있는 제재를 그 작용기전으로부터 선택할 것이다. 본 과제는 원료의 효능을 검정한 후 제재의 응용으로 다양한 제품의 형태로 개발 될 것이다. 기능성 차 및 발효주의 개발은 우리나라의 고유한 방법으로 수행이 가능하며 재료의 특성에 따라 개발 될 것이며, 피부 보호용 기능성 화장품과 차 경우에도 기존에 사용되고 있는 재료로부터 벗어나 실험을 통하여 그 효과를 검증한 후에 다양한 방법으로 제품을 개발 할 예정이며, 이러한 목적을 달성하기 위하여 ①항산화 실험, ②신생혈관 생성 억제 실험, ③보습효과, ④tyrosinase 억제 시험, ⑤균사체 분리 배양, ⑥면역 향상 실험, ⑦세포독성 억제 효과, ⑧자외선 차단 효과, ⑨중성지방 분해억제시험, ⑩혼합제제의 독성 실험, ⑪GOT 및 GPT 시험, ⑫항혈전 효과, ⑬항 콜레스테롤 효과, ⑭testosteron 유도 효과등의 효과를 갖는 천연산물을 선별하였고, 더불어 녹차, 민들레, 황기, 버섯의 특성을 이용하여 3종류의 과제, 즉,

제 1 세부과제 : 생체의 기능 향상을 위한 wellbeing tea의 개발

제 2 세부과제 : 피부의 기능 향상을 위한 wellbeing 화장품의 개발

제 3 세부과제 : 생체의 활력 증진을 위한 wellbeing 발효주의 개발

를 수행하고자하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

천연산물의 이용 기술은 생체에 여러 분야에 적용될 수 있는 특성을 가지고 있다. 독성이 합성물질보다 약하거나 없는 관계로 생체에 투여 할 수 있는 약물의 개발에 사용될 수 있으며, 물질의 추출방법에 따라 수액제나 주사제 등으로의 개발도 가능성을 가지고 있다. 또한 만성 질환의 치료제로써 투여 제제를 다양화 할 수 있으며, 건강 보조 식품 등으로의 개발도 가치 있는 분야이며, 천연산물 자체로서도 FREE RADICAL을 제거 할 수 있는 제재로서도 활용 할 수 있다. 또한 식품 첨가물로서도 중요한 역할을 할 수 있다. 의약품으로서의 개발은 천연산물 그 자체가 의약품이 될 수 있으나 장내세

균의 불 균형에서 오는 장암, 치매, 노인성질환 등은 천연산물의 배합으로 원인균을 제어함으로써 좋은 치료제가 될 수 있으며, 추출 및 정제 방법의 고도화로써 합성제품보다는 부작용이 적은 주사제로서의 개발도 큰 의미가 있다. 또한, 세계적인 추세로 활성산소의 제거제재를 개발하여 차의 형태로 개발하면 필요시에 푸근한 마음으로 여유 속에서도 free radical을 제거 할 수 있는 좋은 제재가 될 수 있다. 또한 목적과 효용이 있는 천연산물의 추출제재 등은 캔 음료나 기호성 음료등으로의 개발도 가능하다. 이러한 천연산물의 응용 분야는 중소기업으로의 기술이전이 용이하고, 큰 자본이 없이 상품화 할 수 있는 부가가치가 높은 부분이라 할 수 있으며, 목적에 따라 다양한 부분으로 개발 할 수 있는 소재이기도 하다. 본 연구가 활성화되면 녹차의 떫은 맛을 마스킹 할 수 있는 기술의 개발, 아토피성 피부염, 알러지 계열, 피부건조증등의 피부 개선효과를 위한부분에도 이용될 수 있고, 발효주에서는 발효의 연장과 단축에 활용될 수 있을 것이다.

이러한 기술들의 이전을 활성화하기 위하여 중소기업의 특징, 생산품, 원하는 기술 등을 Database화하여 연구자나 개발자가 쉽게 연결될 수 있도록 하는 Web page의 활성화를 건의하고 싶다.

SUMMARY

Development of wellbeing products with characteristics of dandelion, greentea, brasica, whanggi and mushrooms

As increasing quality of life, anyone expects good health and long life without any disease. For that, anyone should concentrate their work for life, and stress should be followed with various diseases. Health is basic condition for stressed life, therefore agents for "Keeping Health" will be required for elevated wellbeing life. Oxidative stress is the most important things for controlling health.

Our research is based on developing wellbeing products for health keeping tea, skin care agents, and fermented alcohol with natural product bearing ① antioxidative capacity, ② Anti-angiogenic effect, ③moisturing effect, ④tyrosinase inhibition effect, ⑤ immune increasing effect, ⑥ anti-cytotoxic effect, ⑦ UV blocking effect, ⑧anti-obesity effect, ⑨controlling effect for GOT and GPT,⑩ anti-coagulation effect, ⑪anti-cholesterol effect, and ⑫testosterone induction effect. Our project is composed of 3 kinds of sub-theme for wellbeing life,

- 1) Development for wellbeing tea for increasing physiological function for the body
- 2) Development for wellbeing skin care agents for elevating skin function
- 3) Development for wellbeing fermented alcohol for increasing body activities

Wellbeing tea bear a good function for elevating liver function, anti-cancer, anti-obesity, scavenging free radicals, anti-cholesterol, and induction of testosterone as a "Health Keeping" agent.

Wellbeing skin care agents shows recovery activity form UV damaged skin and controlling atopic dermatitis based on air pollution, and whitening effect. Most of skin care agent includes steroids which caused rheumatoid, edema, and disused atrophy. But Wellbeing skin care agent is non-steroidal agent which just from natural products with less side effects.

Correlationship between us is very important for social life, alcohol is a belt for connecting us, in this case, alcohol should be less damage to body.

Wellbeing fermented alcohol can assist liver function with lowering GOT and GPT and promote alcohol metabolism.

Skill of natural products utilization can apply development of new type drug such as aliquotes and injections with less toxic and side effects. And also can apply a

healthy food like free radical scavenger and food additives.

It is very merit points for preparing process at middle size company for atopic care agent or allergic agents or functional tea or traditional fermented alcohol for healthy body. It is basic necessary for constructing web page for connection between the researcher and the user(company) which require new skill and products.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	11
Section 1. Object and necessity of this study.....	11
Section 2. Research contents and methods.....	18
Section 3. Research object and contents.....	31
Chapter 2. State of Technology Development	36
Section 1. Present state of technology of the inside and outside of the country	36
Section 2. Prospect of technology.....	37
Section 3. Validity of technology import.....	37
Chapter 3. Research contents and Results	38
Section 1. Selection of materials with functionality	38
Section 2. Development of Wellbeing tea.....	61
Section 3. Development of Wellbeing skin care product.....	79
Section 4. Development of Wellbeing fermented alcohol.....	109
Section 5. Development of design for Wellbeing products.....	185
Chapter 4. Achievement and Contribution	188
Section 1. Annual achievement.....	188
Section 2. Contribution for related area.....	191
Chapter 5. Scheme for Application of the Results	193
Section 1. Necessity of additional research.....	193
Section 2. Application for another research.....	193
Section 3. Driving plan for the industrialization	194
Section 4. Research planning business.....	195
Chapter 6. Information of Scientific Technology from Abroad	196
Chapter 7. References	198

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성.....	11
1. 연구개발의 필요성.....	11
가. 연구개발의 필요성	11
제 2 절 연구내용 및 방법.....	18
1. 제 1 세부과제.....	18
2. 제 2 세부과제.....	23
3. 제 3 세부과제.....	28
제 3 절 연구개발 목표와 내용.....	31
1. 연구개발 목표.....	31
2. 연차별 연구개발 목표와 내용.....	31
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	36
제 1 절 국내·외 관련기술의 현황	36
제 2 절 앞으로의 전망	37
제 3 절 기술도입의 타당성.....	37
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	38
제 1 절 기능성에 따른 원료의 선별.....	38
1. 원료의 기능성 시험.....	38
가. 항산화 효과(FRAP).....	38
나. 신생혈관 생성 억제 실험.....	39
다. 보습 효과.....	40
라. tyrosinase 억제 시험.....	41
마. 항아토피 시험.....	42
바. 면역 향상 실험	44
사. 세포독성 억제 효과.....	45
아. 자외선 차단 효과.....	46
자. 항비만 시험(3T3-L1 세포).....	48
차. 항혈전 효과	51
카. testosterone 유도 효과의 측정.....	52
타. cell adhesion 억제 효과(Elisa 법).....	53

과. 동물시험.....	55
하. 재제별 개발 가능 천연산물.....	60
제 2 절 Wellbeing 기능성차의 개발.....	61
1. 선별된 원료로부터 배합 재료의 결정 및 masking 기법의 연구..	61
가. 원료의 분쇄 방법의 연구.....	61
나. 원료의 masking 기법의 연구.....	61
다. 배합방법 및 배합비에 관한 연구.....	61
라. 散制 방법의 연구.....	69
2. 추물(배합물)의 기능성 시험	69
가. 항산화력 측정 (FRAP 법).....	69
나. Anti-angiogenesis 효과	70
다. in vivo test.....	71
라. 면역 향상 실험	72
마. Toxicity 시험	72
바. Obesity 시험	73
사. 혈액 시험	74
아. testosterone 효과.....	75
자. 항혈전 효과	76
3. 제제의 형태	77
가. encapsulation type.....	77
나. 과립형.....	78
제 3 절 Wellbeing 기능성 화장품의 개발.....	79
1.효과 향상을 위한 배합구성.....	79
2. UV-blocking에 관한 배합구성.....	81
3. 혼합을 위한 essential oil 배합 및 W/O, O/W 제제 배합.....	81
4. 보습 효과	84
5. atophy효과.....	84
6. 기능성물질의 배합에 의한 UV-손상 피부의 회복.....	85
가. atopy 효능	86

나. UV 손상피부의 회복.....	87
다. CAM assay.....	107
제 4 절 Wellbeing 발효주의 개발.....	109
1. 생체 기능향상을 위한 원료의 배합.....	109
가. 예비 담금.....	109
나. 1차 담금	109
다. 2차 담금.....	111
라. 3차 담금.....	112
2. 보당제제의 연구.....	113
3. 누룩의 제조 및 보리 소주의 제조.....	114
4. 기능성 시험.....	114
5. 시제품의 제조.....	114
6. 시제품의 성분 분석.....	114
가. 휘발성 물질 추출.....	114
나. GC/MS분석 조건.....	115
다. 분석 결과.....	116
라. 기초담금의 방향성분 비교.....	148
마. 개선한 담금의 방향성분.....	149
7. 4차 담금.....	150
1) 휘발성 물질 추출.....	151
2) GC/MS분석 조건.....	151
3) 개발한 발효주의 향미성분의 분석	161
가) 1번 발효주의 향미성분.....	161
나) 2번 발효주의 향미성분.....	162
다) 3번 발효주의 향미성분.....	163
라) 최적 발효주의 선별.....	164
4) Ethanol 분석	168
5) 유기산 분석.....	168
6) 환원당 분석조건.....	178
제 5절 Wellbeing 제품의 디자인 개발.....	185
1. Wellbeing Tea.....	185

2. Skin Care	186
3. Fermentative Alcohol	187
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	188
제 1 절 연차별 목표 달성도.....	188
1. 제 1차년도.....	188
2. 제 2차년도.....	188
3. 제 3차년도.....	190
제 2 절 관련분야에의 기여도.....	191
1. wellbeing tea의 제조.....	191
2. wellbeing skin care 제제의 제조.....	192
3. wellbeing 발효주의 개발	192
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	193
제 1 절 추가연구의 필요성.....	193
제 2 절 타 연구에의 응용.....	193
제 3 절 기업화 추진방안.....	194
제 4 절 연구기획 사업.....	195
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	196
제 7 장 참고문헌.....	198

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 필요성

노화의 과정은 신기허쇠(腎氣虛衰)-면역기능 감퇴(免疫機能 減退) -노쇠(老衰)로 이어지며 이는 신기-면역-수명(腎氣 -免疫-壽命)을 의미한다. 이것은 면역의 기능을 향상시키는 것이 노화 및 수명을 연장하는 법칙이라고 한의학에서는 말한다. 그리고 항암의 효과는 부작용이 많은 화학적 합성제재보다는 **신생혈관의 생성을 억제함으로써 크나 큰 부작용없이 사용하고자** 하는 시도들이 일어나고 있다. 따라서 암의 예방적인 측면에서 확실하게 그 기전을 밝히고, 면역의 향상을 시킬 수 있는 기전을 밝힘으로써 신뢰를 확보할 수 있고 판매하는 일이 가능할 것으로 보여진다. 이러한 기능을 이용한 신뢰성 있는 wellbeing제품으로 다가가는 방법으로써 **주위에서 간단히 준비할 수 있는 기능성차 종류의 개발, 피부의 기능을 향상시킬 수 있는 기능성 화장품, 면역을 향상시키며 즐거움을 배가시킬 수 있는 은은한 주류등의 개발**을 들 수 있다. 본 연구 팀이 이용하고자 하는 천연산물은 후술하는 선행연구에서 밝혀졌지만 먼저 자연의 어느 곳에서나 채취할 수 있는 **민들레**를 사용한다. 민들레는 생약명으로는 **포공영**(浦公英, *Taraxam coreanum*, *Compositae*)으로 국화과의 다년생초본이다. 일반명으로는 dandelion라고하며 백수의 왕이라는 뜻으로부터 효과를 알 수 있고 뿌리, 잎, 꽃, 꽃줄기 등 식물의 전체를 약용으로 사용하며, 학명에서 보듯이 *Taraxacum*은 taraxis(불안)과 aceomi(치료)의 합성으로 되어 있어 **간, 담낭, 신장**에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(1). 국내에는 좀민들레(*T.hallaisanense*), 산민들레(*T.ohwianum*), 흰민들레(*T.coreanum*), 서양민들레(*T.officinale*)와 키가 작은 우리나라의 토종 등으로 구분된다. 우리나라의 토종 민들레는 성장 후 꽃이 피기까지 몇 년이 걸리고 꽃도 봄에 피며, 자가 수정이 되지 않기 때문에 이용하기에 어려운

점이 많다. 우리 주변에서 많이 보는 민들레는 대부분이 귀화 식물로 **서양민들레** (*T.officinale*)가 많으며 강한 생명력과 번식력을 갖고 있어 연중 채집 및 재배가 가능하며, 뿌리가 직근성이고 굵고 10-15일이면 재수확할 수 있어 매우 경제적인 식물이며 특히 김치를 담그는데는 아주 효과적이다. 그리고 독성에 있어서도 미국에서 **GRAS(generally recognized as safe)** 10등급(2)으로 인정받고 있어 그 사용에 한계가 없다. 주요성분으로는 **비타민과 무기질이 풍부하고, 지방 함량과 칼로리가 낮아(3) wellbeing 식품으로 적당하며, 고미성분인 taraxin, inulin이 많고, carotenoid 성분인 taraxathin, triterpene인 taraxerol, taraxasterol, β -sitosterol, 그리고 caffeic acid, taraxacine등과 vitamin A, vitamin C, tocopherol Ca, Fe, K등이 풍부하다(4,5).** 잎의 성분은 저 칼륨 혈증을 일으키지 않는 이뇨제 성분을 갖고 있으며, 고미성분은 소화선을 자극하여 소화를 도우며 타우린의 간기능 향상(解毒), 담즙분비를 촉진시켜 지방의 소화를 증진시킨다(1). 그리고 한방에서는 열을 내리고(清熱), 해독(解毒), 이뇨(利尿), 최유(젖이 잘나오게함, 催乳), 울결을 풀어주고(散結) 염증을 삭히며((消腫), 간염(肝炎)에 사용된다고 하였고(6), 구미 유럽에서는 잎을 샐러드로 이용하며, 꽃은 술을 담그는데도 사용하였다(1). 그리고 민들레의 생리활성은 민들레의 열수 및 에탄올 추출물이 **항산화 활성(7), hydroxyl radical 소거 활성(8)**을 가지고 있고, 또한 **식중독 균에 대한 항균활성(9), 염증을 일으키는 포도상 구균에 대한 항균활성, 피부 진균에 대한 억제 작용(10)**은 있으나 김치 발효균주에 대해서는 그 영향력이 없다(11)고 보고된 바 있다. 그리고 열수 추출물이 **항종양 효과(12)**가 뛰어나며, sarcoma 180 **고형암에 대해서도 강력한 항암활성**을 지닌다(13)고 알려져 있다. 또한 **체내 지질대사의 개선효과(14), 항염증 효과(15)**도 아울러 가지고 있는 것으로 알려져 **민들레를 이용하여 wellbeing tea를 개발, skincare, 간기능 개선을 위한 발효주등을 개발** 하는데 중요한 원료로 사용함에 부족함이 없는 것을 알 수 있다.

다음으로는 **전남의 특산물로써 녹차**를 들 수 있다. 녹차는 flavonoids를 다량 함

유한 식품으로 purine 염기, catechins, 그 외 다양한 성분을 함유하고 있으므로 암세포의 증식억제, 혈압강하 효과, 콜레스테롤 상승 억제 효과, 혈소판응집 억제 효과, 혈당상승 억제 효과, 지방간 억제 효과, 항균작용, 장내 유용세균 성장 촉진 작용, 그리고 신생혈관 억제 작용 및 미백 효과를 지니고 있다. 그리고 다음으로는 갓을 사용한다. 갓(*Brassica juncea*)은 십자화과에 속하는 채소로써 전남의 들산의 특산물로써 많이 재배되며 대부분은 김치의 재료로 사용되고 있다. 그리고 함유 성분인 allylisothiocyanate(AIT)를 가지고 있어 특유한 향기를 발하기도 한다. 갓에 대하여는 항균활성, 항암활성 및 일반 성분에 대하여 연구되어 있다. 뿐만아니라 갓은 isoquercetin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol 등의 flavonoids와 carotenoid 등의 성분을 함유하며, 통폐(通肺), 이격(利膈), 개위(開胃), 안중(安中), 하기(下氣), 이구구(利九竅), 명이목(明耳目), 거냉기(去冷氣)의 효능을 가지고 있어 다양하게 사용되어질 수 있는 식물이다. 그리고 다음은 황기(*Astragal radix*)를 사용한다. 황기는 기를 보하며 양을 올리고, 방어력을 더해주며 피부를 튼튼하게 하고, 부스럼을 없애며 새살을 돋게하고 종기를 다스린다고 한다. 기를 보하는 약중에 가장 으뜸이 황기라고 하였다. 그래서 황기는 백혈구의 생성을 향상시켜 면역을 증강시키는 역할을 하며, 망상내피계의 대식세포의 탐식작용을 증가시킨다. 또한 인터페론의 유도를 증가시키고, c-AMP 및 c-GMP의 조절작용을 가져 면역을 조절하기도 한다. 신장에 작용하여 결핵성 신장염과 단백뇨를 회복시키며 B형간염을 향상시키고, 위축성 위염을 호전시키며, 감기를 호전시키는 다양한 효과를 가지고 있다.

다음으로는 필요에 따라 지방 특산물인 표고버섯, 느타리버섯, 새송이, 신령버섯, 노루궁뎅이 버섯, 동충하초 등의 자실체나 그 균사체(mycellium)를 사용한다. 표고버섯은 단백다당체(protein bound polysaccharide, PBP), β -glucan(lentinan)이 항암효과를 가지며, 체내의 보체계 활성화, macrophage 활성화, 인터페론 생성촉진 등과 같이 면역 활성화 효과가 있는 것으로 알려져 있다(16). 느타리버섯은 육질이

백색이고 유연하며 영양학적으로도 우수하며, 면역 조절기능, 항산화 활성 및 항암효과를 지니고 있으며 우리나라에서 많이 생산되고 있는 버섯 중의 한가지이다(17). **운지버섯**은 건강보조식품, 민간 치료약으로 이용되어 왔고 핵산, 아미노산, 다당류, 스테로이드 등의 성분을 지니며, 항암작용, 항바이러스, 항박테리아, 항종양, 항응고작용을 지니고 있어 성인병 예방 등에 많이 사용되고 있는 버섯이다(18). **새송이 및 양송이버섯**에는 비환원당인 trehalose, mannitol등을 함유하며 항종양활성을 지니고 있으며(19), **아가리쿠스**는 겉모양은 양송이버섯과 비슷하나 버섯대가 두텁고 길며 향기가 강한 것이 특징이고, 혈당, 혈압강하 효과와 콜레스테롤 저하, 항종양, 암예방 및 제암효과가 있고 함유되어 있는 단백다당체는 인터페론을 활성화하여 암세포를 제어하는 것으로 알려져 있다(20). 또한 **노루궁뎅이 버섯**은 항암 및 면역기능을 증대시키며, 치매 억제에 관한 기능성 성분이 밝혀져(21) 다양하게 생체의 건강유지 및 면역활성 증가의 wellbeing 제재로 사용이 가능함을 알 수 있다.

이러한 다양한 효과를 가지고 있는 재료의 특성을 잘 이해하고, 응용함으로써 현대인이 만족하지 못하고 있는 부분을 이 제재를 생산하는 농민과 중소기업과 함께 개발을 함으로써 모두에게 만족을 줄 수 있는 wellbeing 제품을 개발하려고 하는 것이다.

개발하고자 하는 분야로서는 녹차, 민들레, 갓, 황기, 및 버섯 등의 특성과 필요에 따라 중요한 특성을 갖는 천연산물을 이용하여

제 1 세부과제 : 생체의 기능 향상을 위한 wellbeing tea의 개발 :

(주) 보성신옥로제다

제 2 세부과제 : 피부의 기능 향상을 위한 wellbeing 화장품의 개발 :

(주) 도울헬스케어

제 3 세부과제 : 생체의 활력 증진을 위한 wellbeing 발효주의 개발 :

(주) 보성올포주가

등으로 과제를 각각의 참여 업체와 구성하고자 한다.

1) 기술적 측면

본 과제에서 수행하고자 하는 것은 여러가지의 특성을 가지고 있는 천연산물을 이용하여 wellbeing 제품을 개발하는 것이며, 다음의 사항이 필수적이라고 본다. 현대의 생활이 윤택해져감으로써 사람들은 무병장수의 희망이 드높아지고 있다. 노화 현상은 생명의 활기가 줄고 모든 기능이 저하 되면서 특히 면역의 기능이 저하하여 질병에 잘 걸리는 현상이라고 할 수 있으며, 일반적으로 신체근육조직의 감소, 골밀도의 감소, 단백질 합성의 감소, 조직기능관 순환기계 기능의 감퇴, 면역기능의 저하, 뇌와 신경기관의 감소, 내분비기능의 감퇴, 소화흡수율의 저하, 영양소섭취의 저하, 체내 항상성의 저하 등을 수반하며 이에 관련된 질병으로서는 암, 심장혈관질환, 신경통, 당뇨, 치매, 면역 관련질환 등 그 종류가 다양하다. 이러한 증상 중 골다공증 및 퇴행성 관절염인 골관절염 등은 염증을 동반하여 노화를 촉진시키고, 더구나 질병에 대한 저항력의 감소는 오래 살고 싶어하는 사람들의 희망을 좌절케 하는 요소들이다. 이러한 면역 저하를 위해서는 표고버섯, 느타리버섯, 운지버섯, 상황버섯, 신령버섯, 노루궁뎅이 버섯 등과 황기, 당삼, 인삼, 백출, 오미자 등이 활성화시킬 수 있다. 활성산소에 의한 프리라디칼 발생이 노화 및 질병의 발생을 촉진한다는 이론에 입각하여 세포내 항산화 효과에 대한 연구들이 행하여지고 있으며 비타민 E 및 비타민 C가 대표적인 물질로 알려져 있다. 대표적인 항산화 물질을 함유한 식물들로서는 녹차, 갓, 감잎, 포도씨, 마, 노간주나무, 매실, 적채, 대나무, 메밀, 수수, 가장, 울피, 솔잎, 콩, 연꽃, 헛개나무 등을 들 수 있다. 그리고 본 연구팀은 생체내의 유용세균과 유해세균의 성장을 촉진 및 저해하여 노화에 따른 생체내의 유산균등의

유용세균의 감소를 막고 유해 세균의 성장을 억제하는 천연산물의 조성과 처방을 도출한 바도 있다(22-29). 이처럼 노화 및 질병을 예방하는데 필요로 하는 제제는 많으나 이들을 부작용이 없이 조합하여 현대인이 섭취하기 쉬우며 생체에 효과를 나타내는 작용기전에 대해서는 알려져 있는 것은 그다지 많지 않다. 본 과제에서는 앞에서 사용할 천연산물의 효능을 언급한 바와 같이 지방의 특산물을 이용하고, 이들의 효과 및 작용기전을 밝혀 소비자에게 신뢰감을 줄수 있는 제품을 개발하고자 한다. 이에 따른 생체에서의 작용기전은 ①항산화 실험, ②신생혈관 생성 억제 실험, ③보습효과, ④tyrosinase 억제 시험, ⑤균사체 분리 배양, ⑥면역 향상 실험, ⑦세포독성 억제 효과, ⑧자외선 차단 효과, ⑨중성지방 분해억제시험, ⑩혼합제제의 독성 실험, ⑪GOT 및 GPT 시험, ⑫항혈전 효과, ⑬항 콜레스테롤 효과, ⑭testosterone 유도 효과 등을 밝히도록 한다. 이러한 작용기전의 규명을 위하여 wellbeing 제품의 증가에 따라 신뢰적인 측면에서도 기술개발이 필요하다고 사료된다.

2) 경제·산업적 측면

연구자가 속하고 있는 지역은 전국에서 농토의 비율이 최고로 높으나 소득 수준은 최하위에 머무르고 있다. 이것은 아직도 농업경영을 바탕으로 한 좋은 상품의 개발, 판로의 개척이 미흡하기 때문으로 본다. 마케팅은 홍보도 중요하지만 시대의 요구에 맞추어 개발된 상품을 제공할 수 있어야 한다. 요즈음은 고객의 필요에 맞추어 제품을 출시할 필요가 있고, 또한 그 지방의 고유한 특성을 반영할 수 있어야 상품에 대한 지명도가 높아질 것으로 판단된다. 본 연구팀은 이러한 의미를 중요하게 생각하며 지방의 특산물의 상품화하기 위하여 노력하는 것이다. 녹차, 잣, 버섯(동충하초)은 우리지방의 특산물이며 생체에 아주 좋은 기능성을 가지고 있으며, 민들레는 자연에 너무도 많이 존재하여 수매를 한다면 영세한 가정에게도 많은 도움을 줄 수 있다. 그리고 황기는 생체의 기능을 향상시키는데 아주 중요한 제재이며, 이것은 사용 용도가 아주 다양하고, 콩과의 식물이므로 농가에서 쉽게 재배할 수 있는 품목이다. 그리고 제품의 개발을

위하여 필요로 하는 천연산물은 자연으로부터 채취가능한 것을 이용함으로써 농가의 도움이 되겠끔 노력하고자 한다. 뿐만아니라, 이러한 wellbeing 제품의 시장은 2003년을 기준으로 세계시장은 500,000억원이며 국내의 시장은 3,000억원을 넘었으며, 2007년에는 6,000억원 규모의 시장이 될것으로 판단되고 있다. 이에 대응하기 위한 제품의 개발은 다양해야 하고 효과가 있어야 하며 그 기전을 data로 제시 할 수 있어야 할 것이다. 이를 위하여 본 연구팀은 성실하고도 소비자의 취향에 맞게 제품을 준비하고자 한다.

3) 사회·문화적 측면

무병장수는 현대인의 욕구이며 이를 충족하기 위해서 사람들은 나름대로의 노력을 다하고 있다. 건강을 위한 health club의 등록이나 조깅, 등산, 하이킹, 인라인 동호회 등 우리 주위에서 수많은 사람이 건강을 위하여 노력하고 있는 사실을 인지한다. 더구나 가장의 경우는 집안을 책임지는 자리이기 때문에 집에서는 어떻게든 건강 유지를 위해 노력하고 있다. 특히 40-50대의 경우에는 사회적 및 가정적인 스트레스로 쓰러져 가는 사람들이 많으며 이 시기는 가정으로 볼 때 자녀의 대학 진학이나 부모의 봉양 등 어려운 시기에 도달되어지고 그 만큼 건강의 중요도는 큰 부분을 차지할 것이다. 따라서 이러한 요소에 대하여 걱정을 들게 하는 것이 Wellbeing이라고 할 수 있을 것이다. 이러한 부분은 약품만으로는 해결하기 힘들다. 음식속에, 주변의 환경속에, 가까운 곳에, 어려움 없이 섭취할 수 있는 것이라야 한다. 이런 부분에 생체의 기능과 면역을 증강시키며 자연 친화적인 제제는 설득력이 있을 것이다.

대화의 문화를 이끌어 나가면서 생체의 기능을 향상 시킬 수 있는 차 문화, 복잡한 사회 환경으로부터의 아토피성 질환 및 거친 피부등에 의한 사회 생활의 불편을 덜어 줄수 있는 보호제재로서의 skin care 제제, 스트레스뿐만 아니라 자신의 자리를 지키기 위한 힘든 음주 문화에서도 자신을 지키기 위한 노력으로 가볍게 다가오는 생체 보호 기능의 발효주는 현대사회를 살아가기 위한 필수적 사항이라 할수 있다.

제 2절 연구내용 및 방법

본 연구에 사용하고자 하는 재료, 민들레, 녹차, 황기, 갓, 그리고 여러 가지의 버섯 (새송이, 운지, 표고, 느타리, 아가리쿠스, 노루궁뎅이 버섯)에 대하여 ①항산화 실험, ②신생혈관 생성 억제 실험, ③섬유소 함량 시험, ④보습효과, ⑤tyrosinase 억제 시험, ⑥균사체 분리 배양 시험등은 과제별 필요에 따라 선행 연구가 실시되었으나 보다 기능성의 확보를 위하여 과제별로 수행해야 할 중요한 시험 ①면역 향상 실험, ②혼합제제의 독성 실험, ③GOT 및 GPT 시험, ④항혈전 효과, ⑤항 콜레스테롤 효과, ⑥testosterone 유도 효과 등은 재료 및 과제의 필요성에 따라 수행하고자 한다.

제 1 세부과제 : 생체의 기능 향상을 위한 wellbeing tea의 개발 참여기업 : (주) 보성 신옥로제다

차는 세계적으로 그 향과 맛으로서 **정신적인 문화의 형성**에 크게 기여해 왔다. 우리나라에서도 조선시대 중기정도로부터 선비들의 마음을 달래는 기호 식품으로서 그 역할과 위치를 다져왔다. 특히 초의선사나 다산 정약용 등의 시대에 이 차의 의미는 더욱 그 향을 질게 맴돌아 왔다. 현대에 들어와 외래의 커피 등의 기호식품이 차츰 우리의 주위에서 안으로 파고들어 세대의 구별을 짓고 말았다. 녹차는 구세대의 기호식품으로, 커피 등은 신세대의 기호 식품과 멋으로 자리를 잡아왔다. 그 이유를 살펴보면 녹차는 그 고유의 맛에서 벗어 나보려고 노력을 해오지 않았다는 것이다. 시기에 따라 입에 맞는 식품이 변하고 있는데 대한 대책이 없었다는 것이다. 또 다른 한가지는 커피에 비하여 값이 너무 비싸다는 것이다. 따라서 언젠가 부터는 녹차는 귀족의 의미로 변해가 누구든지 쉽게 접할 수 있는 것이 되지 못하고, 차를 마시는 절차 또한 복잡하여 대중의 입으로부터 멀어져 버리고 말았다. 이제 차를 다시금 우리의 것으로 되돌리기 위한 정서가 서서히 일어나고 있다. 그것은 커피가 가지고 있는 기능 보다 녹차가 가지고 있는 기능의 다양성(30,31)에

서부터 출발되고 있다. 이 의미는 차가 가지고 있는 항산화성으로부터 항암기능, 세포의 기능 향상, 동맥경화, 간염, 당뇨병, 치매, 주름 등 여러 가지의 성인병의 예방에 기여 할 수 있다는 것에 기인된다. 그러나 차의 짧은 맛은 젊은 세대로 하여금 커피를 대신하게 하기는 힘겨운 일이 될 수 있다. 따라서 **차의 맛도 변해야 한다.** 차의 고유의 기능성에다 항산화력이 강하며 향과 맛이 월등한 천연산물을 배합하여 기능과 효과를 살리면서 맛이 좋은 항산화 차를 복잡하지 않고 언제나 쉽게 마실 수 있도록 개발하고, 이를 값싸게 공급함으로써 새로운 차 문화를 우리들의 주변으로부터 일으킬 수 있도록 이끌어가야 될 것으로 판단된다. 앞에서 언급한 바와 같이 사용할 재료 **민들레, 녹차, 잣, 황기 및 버섯(동충하초) 등과 생체의 기능을 향상시킬 수 있는 천연산물을 첨가하여** 맛, 향, 차의 색 등이 현대인의 스트레스와 마음의 안정을 가져올 수 있는 wellbeing 차를 개발하고자 한다. 이 개발할 차의 기능성으로는 ① 항산화 효과, ②anti-angiogenesis 효과, ③ 면역 향상 효과, ④GOT 및 GPT 조절 효과, ⑤항혈전효과, ⑥콜레스테롤 저해효과 등을 가질 수 있도록 한다.

1. 원료의 기능성 평가

민들레, 녹차, 황기, 잣, 버섯(동충하초) 그리고 특성있는 재료를 이용하여 ① 항산화 효과, ②anti-angiogenesis 효과, ③ 면역 향상 효과, ④GOT 및 GPT 조절 효과, ⑤항혈전효과, ⑥콜레스테롤 저해효과 를 갖는 원료를 선별한다.

2. 버섯 자실체의 배양 및 기능성 평가

새송이, 느타리, 아가리쿠스, 노루궁뎅이, 동충하초 및 그 외의 기능성이 강한 버섯의 **자실체의 배양**의 조건을 구성하고 선행연구에서처럼 기능성을 평가하고 특히 혈전 용해 효과, 콜레스테롤 저해 효과, 면역기능 향상 효과, GOT 억제 효과에 대하여 집중적으로 실험하여 향과 맛 그리고 효과가 좋은 자실체를 동결건조하여 적당한 입자로 분쇄하여 사용한다.

3. 원료에 따른 masking 기법 개발

민들레, 녹차, 황기, 갓, 버섯(동충하초) 그리고 특성있는 재료들은 나름대로의 특성이 있는 맛을 가지고 있기 때문에 **맛을 제어 할 수 있는 방법의 개발**이 필요하다. 민들레의 경우, 다양한 장점과 생체의 기능을 향상시키는 다양한 효과를 지니고 있으나 쓴 맛이 강하므로 이 맛을 제어해야하며, 녹차의 경우에는 떫은 맛이 강하여 짙은 층으로 다가가기 위해서는 이 맛을 줄일수 있는 방법, 갓의 경우에도 다양한 기능을 가지나 풀잎 냄새(생취)를 갖고 있으므로 이러한 맛을 제어 할 수 있는 방법을 개발한다.

4. 원료의 특성에 따른 배합비의 개발

민들레, 녹차, 황기, 갓, 버섯 그리고 특성있는 **재료의 배합 비율**에 따른 기능성 및 맛, 향을 제어한다.

5. 생체기능향상을 위한 차의 완성

완성된 차에 대하여 ① **항산화 효과**, ② **anti-angiogenesis 효과**, ③ **면역 향상 효과**, ④ **GOT 및 GPT 조절 효과**, ⑤ **항혈전효과**, ⑥ **콜레스테롤 저해효과** 등을 전술한 시험방법에 따라 실시한다.

가. 항산화 효과(32)

1) FRAP법

철 반응물인 TPTZ(2,4,6-tri(2-[pyridyl]-s-triazine)에 산화물질 Ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)와 Acetate buffer와 증류수를 혼합하여 FRAP solution을 제조한 후 항산화물질을 첨가하고 FRAP solution이 violet 색으로 변하는 정도를 철이 가장 잘 흡수되는 593 nm에서 측정한다.

2) ORP system value(33)

ORP-pH meter를 사용하여 본 연구실에서 개발한 ORP system value 방법으로 사용한다

나. Anti-angiogenesis 효과

24 well culture plate에 250 μ l/well의 matrigel 로 coating 한 후 고체화를 위하여 37°C에서 30분 동안 배양하고 EBM-2배지 1.5ml을 넣는다. 배양한 HUVECs를 trypsin-EDTA를 사용하여 well로부터 분리한 다음 coating 된 matrigel plate 당 20,000 cells/well 이 되도록 재 현탁 시킨 후 37°C에서 1시간 30분간 배양한다. 이 후 배양액에서 200 μ l를 덜어내고 민들레-녹차 김치의 추출액을 투여하여 37 °C의 5% CO₂환경에서 4시간동안 배양한다. 형성된 tube 망의 길이는 현미경하에서 well을 불규칙적으로 5 분야로 나누어 디지털 카메라 (Nikon,Coolpix)로 촬영하여 그 영상을 pixel로 전환시킨 후 NIH image 프로그램으로 분석한다.

다. 면역 향상 효과 (34)

인간 면역세포 T cell을 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640배지에서 5% CO₂, 37°C 배양하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay) 방법으로 생육증진효과를 측정한다. 즉, T cell을 5x10⁵ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900ul 씩 첨가하여 24시간 배양하고 시료를 100 μ l 첨가하여 48시간 동안 다시 배양한다. 여기에 100 μ l의 MTT(50mg/ml)용액을 첨가하여 4시간동안 다시 배양하고 formazan을 형성시킨 후 DMSO 900 μ l를 첨가하여 formazan을 녹인다. 이후 각 well에서 100 μ l 취하여 96well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정한다. cell density는 24well plate에 세포를 2.0 x10⁴ cells/ml의 농도로 조절 한 후 시료를 넣고 8일동안 배양시켜 각 well의 cell 수를 hematocytometer를 이용하여 1일 간격으로 측정한다.

라. GOT, GPT 억제 효과(35-36)

GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT(glutamicpyruvic transaminase)는 간이나 심장 근육에 많이 존재하고, 혈청중에는 보통 미량 존재하나 간세포 상해시 간세포의 막투과성이 항진된 결과 혈중으로 유출된다. GOT의 기질로써 aspartic acid, α -ketoglutaric acid 용액, 그리고 GPT의 기질로써 alanine, α -ketoglutaric acid 용액에

각각 혈청을 가하여 37°C에서 60분, 30분간 각각 효소반응시키고 이때 형성되는 oxaloacetic acid, pyruvic acid 생성물에 2,4-dinitrophenyl hydrazine color reagent를 가하여 hydrazone을 만든 다음 0.1N-NaOH를 넣어 발색되는 적갈색을 505nm에서 비색 정량한다.

마. 항 혈전 효과(37)

Fibrolytic activity를 측정하여 항혈전효과를 규명하려고 하며 그 내용은 다음과 같다. 0.2 M borate 완충액(pH 7.8)-0.15 M NaCl에 녹여진 0.8%의 fibrinogen 용액 15ml에 0.5 ml의 트롬빈(10NIH U/ml)을 넣고 혼합한 후 fibrin clot이 형성되도록 상온에서 30분간 방치하고, 이렇게 만들어진 fibrin plate에 민들레-녹차 김치의 추출물을 첨가하고 37°C에서 40시간 방치후 lysis zone의 직경을 측정하여 항혈전효과를 규명한다.

바. 콜레스테롤 저해효과(38) : Total testosterone을 kit(Coat-A-Count Total testosterone)을 사용하여 측정한다.

제 2 세부과제 : 피부의 기능 향상을 위한 wellbeing 기능성 화장품의 개발 참여기업 : (주) 도울헬스케어

피부는 생체의 제1차 방어선으로써 물리적, 화학적, 환경적인 인자들로부터 내부의 기관을 보호하는 기능을 가지고 있다. 현대 사회의 구조가 복잡 다양해짐에 따라 환경적인 변화인자, 대기오염, 자외선, 오존 등에 의하여 피부는 혹사되고 있으며 특히나 식생활의 변화로부터 많은 free radical을 접하게 됨으로써 피부의 보호기능은 점차 무너져가고 있는 실정이다. 특히 요즘의 어린이에게 나타나는 아토피성 질환은 그 정도나 발생이 극도로 증가되어 가고 있다. 따라서 피부의 건강을 위하여 항산화 효과, 보습효과, free radical 소거기능, 피부세포 활성 촉진효과, 탄력성 증진효과, 피부 자극의 방지 및 감각성의 최소화 등의 기능이 더욱 요구되어지고 있다. 뿐만아니라 자유로운 시간이 많아짐에 따라 피부의 노출도 증가 되고 자외선이나 유해환경에 자주 접하게됨으로써 가벼운 경우의 피부홍반, 화상, 색소의 침착으로 등으로 그치지않고, 보통의 자외선은 피부의 노화나 피부암등을 유발하기도 한다. 따라서 자외선을 차단 할 수 있는 물질이나 피부의 보습을 위한 물질의 개발이 더욱 요구되어 지고 있다. 따라서 본연구에서는 일부의 선행연구를 통하여 보습효과가 뛰어난 물질, 항산화효과, 미백효과, anti-angiogenesis 효과, 자외선 차단 효과 등을 갖는 원료를 이용하여 피부를 보호할 수 있는 기능성의 화장품원료를 개발하고자한다.

1. 보습효과 측정

선행 연구의 결과로부터 **갈대의 보습효과**는 아주 높은 것으로 나타나 이 재료들을 주원료로 사용할 수도 있으나, **황기,녹차, 갓, 버섯(동충하초)** 등의 보습효과를 측정하고 또한 이 재료들의 혼합비율에 따른 보습효과를 실험하여야 적절한 화장품의 원료로 완성될 수 있을 것으로 판단된다.

2. 항산화 효과

FRAP법이나 ORP system value를 이용하여 **갈대, 황기, 녹차, 잣 및 버섯(동충하초)의 항산화력**을 화장품의 원료로 개발될 수 있는 조성물의 항산화력을 측정한다.

3. Tyrosinase test

이 색소는 멜라닌 세포의 melanosome에서 합성되어 아미노산과 L-tyrosine이 3,4-dihydroxyphenylalanine(L-dopa)으로 전환됨으로써 이 기전이 시작된다. tyrosinase는 멜라닌 세포 내에서 tyrosinase에 의해 DOPA, DOPAquinone으로 산화된다. 그 후 DOPA quinone이 DOPA chrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone이 되고, 이어서 indole-5,6-quinone으로의 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다 (39-42). **Tyrosinase의 저해활성**의 측정은 Takagi, K(43-48)등의 방법을 이용하여 측정한다. 1.66mM의 L-Tyrosine용액 1ml과 조성물 용액 1ml 그리고 30mM의 sodium phosphate 1ml을 넣는다. 37℃ 항온수조에서 10분간 가열하고, 37℃가 된 혼합액에 0.01ml의 tyrosinase를 넣어 mix한 후 다시 37℃ 항온수조에서 정확히 10분간 반응시킨 후 꺼내어 즉시 얼음에 넣어 반응을 멈추고 475nm에서 흡광도를 측정한다. 시료용액 1ml 대신 증류수 1ml을 넣은 sample을 A, 시료용액도 넣고 enzyme도 넣은 sample을 B, enzyme 0.01ml 대신 증류수 0.01ml을 넣은 sample을 C로 하여 계산을 해서 결과 값을 구한다.

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100$$

4. 독성 시험

갈대, 황기, 녹차, 잣 및 버섯(동충하초) 등 이 자체적으로 독성을 가지고 있는가를, 그리고 이 재료들을 사용하여 제조한 천연 화장품 조성물의 독성유무를 시험한다. 마우스유래 **섬유아세포**를 DMEM 배지에서 배양하여 2×10^6 /well plate에 200 μ l씩 96well plate에 주입하고 제조된 천연 화장품 조성물을 농도에 따라 첨가하고 24시간

배양한 다음, hemacytometer로 실체의 균수를 측정하여 대조군과 비교하여 독성의 여부를 판단한다.

5. 세포독성 억제 효과

과산화수소(H_2O_2)로 유도된 세포독성에 대한 조성물의 **독성억제 효과**를 시험한다. 과산화수소는 세포내에서 free radical을 생성하여 세포에 치명상을 입히므로 첨가하는 조성물이 제어할 수 있는가를 다음과 같이 실험한다. 마우스 유래 **섬유아세포** (fibroblast, NIH/3T3)을 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지에 배양하여 96 well에 2×10^6 되게 200 μ l로 분주하고 24시간 배양한 후 배지중의 과산화수소의 최종농도가 50 μ M이되게 첨가한다. 동시에 조성물의 최종농도가 0, 10, 50, 100, 250, 500 μ g/ml이 되도록 가하고 24시간 배양후에 MTT용액 (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)을 10 μ l씩 첨가하고 4시간 방치후 배지를 버리고 각 well당 100의 DMSO를 가하여 20분간 교반 후 microplate reader로써 570nm에서 흡광도 측정한다.

6. 자외선 차단 효과

태양광선은 자외선(UV: Ultraviolet ray), 가시광선(Visible light), 적외선(Infra red)로 구분되며, 도달량은 자외선 10, 가시광선 40, 적외선 50정도이다. 태양광선에 의한 피부의 손상은 200-400nm인 자외선에 의하여 일어나며, **UVA(320-400nm)는 피부의 진피층까지 침투하여 선뎨현상을 일으키고 피부의 탄력을 감소시키고 주름 및 노화를 촉진시킨다.** 그리고 **UVB(280-320nm)는 표피층에 침투하여선뎨(sunburn)현상을 일으키고 기미와 피부 건조, 홍반 및 물집의 생성원인**이 된다. UVB에 의한 표피세포 비정상적인 활성화에 따른 피부의 염증은 phosphorylaseA2의 활성화로 인한 prostaglandin E2의 생성에 기인되며 이를 위해서도 자외선의 차단이 중요한 것을 알 수 있다. 자외선을 차단하는 방법은 자외선을 차단하는 물질을 피부에 도포하거나, 자외선에 의하여 생성된 free radical을 제거하는 것이며, free radical에 의하여 공격받아

변화된 피부세포를 정상적으로 회복시키는 방법 등을 들수 있다. 따라서 free radical을 제거할 수 있는 항산화 기능을 가져야 하고, 자외선을 차단할 수 있는 효과를 가져야 한다. 조성물의 자외선 흡수효과를 관찰하기 위하여 자외선 영역의 scanning, 그리고 UVB와 UVA영역에서 흡광도를 비교한다. UVB는 피부염증 유발영역으로 308nm에서 최대치를 나타내어 이 과정에서 차단효과를 분석하며, UVA(320-400)에서는 350 nm에서 흡광도로 분석한다.

7. UVA에 대한 조성물의 독성효과

마우스 유래 섬유아세포(fibroblast, NIH/3T3)을 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지에 배양하여 96 well에 1×10^6 되게 200 μ l로 분주하고 24시간 배양한 후 배지중의 조성물의 농도가 100 μ g/ml이 되도록 첨가하고 **UVA(365nm)를 0-5.0J/cm²의 강도로 조사한 후** 24시간 추가 배양후에 MTT용액 (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)을 10 μ l씩 첨가하고 4시간 방치후 배지를 버리고 각 well당 100의 DMSO를 가하여 20분간 교반 후 microplate reader로써 570nm에서 흡광도 측정한다.

8. 중성지방 분해 억제시험

Triglyceride는 bile salt와 micell을 형성하여 소화기관으로 흡수 되거나, lipase에 의하여 분해되어 monoglycerides 와 2개의 fatty acids가 생성되어 enterocyte속으로 이동한다. Lipase는 수용성으로 triglyceride를 emulsion 시켜 chylomicron으로 되어 지방 조직으로 분배된다. 따라서 **lipase를 억제시키면 triglyceride가 분해되지 못하므로 지방 조직으로 이행되는 확률이 낮아 질 수 있다.** 본 연구팀은 tripalmitate와 lipase를 사용하여 유리되는 지방산의 량으로부터 lipase의 활성 정도를 판단하고자 한다.

① 3개의 튜브에 각각 B(blank), S(standard), T(test)로 표시하고 tripalmitate를 test tube에 각각 1ml 씩 넣는다.

② control은 증류수로하고, S에는 검화시킨 tripalmitate를, T에는 tripalmitate를 시료

를 각 200 μ l씩 넣는다.

③ 25 $^{\circ}$ C water base에서 30분간 반응 시킨다.

④ 1%의 Na metaperiodate 가 함유된 2M-acetate buffer를 각 test tube에 1ml 씩 넣는다.

⑤ 2M-ammonium acetate를 2ml 씩 넣는다.

⑥ acetyl acetone을 1ml 씩 넣는다.

⑦ 잘 섞어서 30분간 65-70 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후, 실온으로 냉각시킨다.

⑧ 450nm에서 흡광도를 측정한다.

중성지방의 농도(mg/dl) = $\frac{T-B}{S-B}$ 으로부터 유리된 fatty acid를 측정한다.

S-B

⑨ lipase의 억제율을 구한다.

9. 섬유소

식이섬유는 인체 내의 소화효소로 가수분해 되지 않으며, 수용성 식이 섬유소에는 헤미셀룰로오스, pectin, gums, mucilage가 있으며, 불용성 식이 섬유소에는 cellulose, lignin, insoluble non cellulose polysaccharide가 있다(49). 식이 섬유소는 **배설물의 보수성을 향상 시켜 정장작용을 도와주고 혈청 cholesterol을 감소시키며 당뇨병, 비만 등의 성인병 예방과 치료에 효과**가 있다고 보고되고 있다(50-51). 또한 식이 섬유소의 구성성분인 pentose fraction, cellulose, non starch polysaccharide, uronic acid 등에 의해 결장암이 방지된다고 보고되고 있다(52).

제 3 세부과제 :생체의 활력 증진을 위한 wellbeing 발효주의 개발

참여업체 : (주) 보성을포주가

녹차가 유명한 **보성의 회천면**은 보성주에서 지대가 가장 낮은 곳으로 연평균 3℃내외로 따뜻하며, 주위의 일림산을 타고 내려온물이 회천으로 집결하며, 물이 모인다는 뜻의 회천(會泉)이 있다. 이 지역의 물맛은 독특하며 200여년의 **전통주인 강하주가 제조**되었던 곳이며, 지금은 그 비법을 전수 받아 전라남도로부터 전통민속주의 전수자로 지정받아 강하주의 맥을 잇고 있는 도화자(여, 56)씨가 강하주를 재현하며 제조하고 있다. 강하주는 **용안육, 강활, 대추, 생강, 계피** 등이 들어있어 노르스름한 암갈색의 특쓰는듯한 맛의 특징을 가지고 있다. 생강의 매콤한 맛, 강활의 쓴맛, 용안육의 단맛 등이 어우러져 독특한 맛을 낸다. 특히 보성지방은 녹차가 많이 생산되므로 녹차의 맛과 강하주의 특성, 그리고 생체의 기능을 향상시키며 면역을 증강시킬 수 있는 특징있는 발효주를 도화자씨와 함께 보성지역의 특산물로 개발하기로 하였다. 강하주의 원료로는 국내에서는 생산되지 않는 용안육, 독성이 강한 강활 등을 사용함으로써 현대의 wellbeing 제품으로서는 적합하지 않는 부분이 많다. 따라서 현대적인 감각에 맞고, wellbeing의 효력을 가지는 재료를 선별하여 제조한다면 더욱 현대생활에 가깝게 접근할 수 있을 것으로 판단된다. 즉, **민들레, 녹차, 황기, 갓, 동충하초, 버섯의 균사체**, 그리고 현대인의 건강 증진을 위하여 **필요로 하는 제재를 첨가**하여 발효시킴으로써 향, 맛, 색 등을 현대에 맞게 제조할 수 있을 것으로 생각한다.

1. 원료의 기능성 평가

민들레, 녹차, 황기, 갓, 동충하초 그리고 특성있는 재료를 이용한 발효주가 간의 기능성에 어떠한 영향을 미치는가, **혈전 용해 효과, 콜레스테롤 저해 효과, 면역기능 향상 효과, GOT 억제 효과 및 정력 강화 효과** 등을 측정하여 원료를 선별한다.

2. 버섯 균사체의 배양 및 기능성 평가

표고, 새송이, 느타리, 동충하초 및 그 외의 기능성이 강한 버섯의 **균사체의 액체배양**의 조건을 구성하고 생산된 균사들에 대하여 선행연구에서처럼 기능성을 평가하고 특히 **혈전 용해 효과, 콜레스테롤 저해 효과, 면역기능 향상 효과, GOT 억제 효과**에 대하여 집중적으로 실험하여 향과 맛 그리고 효과가 좋은 균사체를 혼합하여 사용한다.

3. 누룩의 제조

우리의 밀을 이용하여 밀기울을 만들고 누룩균을 종균시켜 누룩을 만든다.

4. 보리 소주의 제조

보리를 정선하여 삶고, 보리알이 낱알이 흩어질 정도로, 보리의 끈기가 없어 질 정도로 수회 세척한다. 그리고 누룩을 넣어 일주일 발효시킨 다음 증류하여 **45%정도의 술**을 내린다.

5. 밀술의 제조

참쌀과 누룩을 배합하여 **20℃에 3일간 배양**하여 제조한다.

6. 덧술의 제조

맥아를 이용하여 **버섯의 균사**를 배양하고, 고두밥과 대추를 같이 찐후에 여기에, **민들레, 녹차, 황기, 갓, 동충하초** 그리고 **특성있는 재료**를 비율을 정하여 넣고 밀술과 합쳐 발효시키며, 적당한 발효시간을 정한다.

7. 발효주의 완성

보리술과 덧술을 적당한 비율로 배합하고 완전히 밀봉한 상태에서 보름정도의 발효를 거쳐 필요한 %의 발효주를 완성한다.

8. 완성된 발효주의 효능 검증

완성된 발효주에 대하여 기능성을 다음과 같이 실험하여 검증한다.

① **항산화 효과** : 제 1 세부과제의 “항산화 효과”의 시험법을 따른다.

- ② 신생혈관억제 시험 : 제 1 세부과제의 “ 신생혈관 생성억제시험”의 시험법을 따른다.
- ③ 중성지방분해 억제시험 : 제 2 세부과제의 “중성지방분해억제시험”의 시험법을 따른다.
- ④ 면역기능 향상 효과 : 제 1 세부과제의 “ 면역 향상 효과”의 시험법을 따른다.
- ⑤ GOT, GPT 억제효과(35,36) :제1세부과제의 “GOT, GPT 억제 효과”의 시험법을 따른다.
- ⑦ 정력 강화 효과(38) : Total testosteron을 kit(Coat-A-Count Total testosteron)을 사용하여 측정한다.
- ⑧ 항 혈전 효과 : 제 1 세부과제의 “항 혈전효과”의 시험법을 따른다.
- ⑨ 콜레스테롤 저해 효과 : cholesterol의 량은 kit로 측정하여 그 량을 비교한다.

제 3절 연구개발 목표 및 내용

1. 연구개발 목표

제1 세부과제에서는 항상 곁에두고 쉽게 마실 수 있도록 하며, **녹차의 짙은 맛을 민들레, 황기, 갓, 버섯(동충하초)등을 이용하여 또 다른 향기를 가지도록 하며, 유해산소제거효과, 면역 향상 효과, 간 기능 향상 효과등** 녹차의 효과에 여러 가지 천연산물의 기능을 더하여 현대인의 욕구에 다가가고자 한다.

제2세부과제인 **기능성 화장품의 개발은 황기의 생진효과 및 면역 향상효과와 민들레, 갓 및 갈대의 미백효과, 녹차의 유해산소제거 효과(선행연구 참조), 버섯의 균사체(선행연구)를 이용한 항균효과, 그리고 민들레 및 톳의 보습효과등과** 각각의 식물이 지니고 있는 약리작용을 이용하여 아토피성 피부염, 피부건조, 보습등의 효과를 가져 현대인의 피로운 부분을 해결하고자 한다.

제3세부과제인 **발효주의 개발은** 간의 기능을 향상시키는 것으로 알려진 **민들레, 황기, 버섯의 균사체, 해독작용을 갖는 황기, 혈전 용해 효과를 갖는 버섯 균사체, 항암효과, 면역 향상효과 및 녹차의 유해산소제거기능 및 항균효과등을** 이용하여 순하면서 간의 기능에 크게 부담이 가지 않는 온화한 발효주를 개발하고자한다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

가. 1차 년도

구 분	연구 개발 목표	세부 과제	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2005년)	사용원료(민들레, 녹차, 황기, 갓, 갈대 등), 여러 가지의 버섯(새송이, 느타리, 아가리쿠스, 노루궁뎅이,동충하초 등)에 대하여 기능성 시험(①~⑭)을 실시함 ①항산화 실험, ②신생혈관생성억제 실험 ③보습효과, ④tyrosinase 억제 시험 ⑤균사체 분리 배양 ⑥면역 향상 실험 ⑦세포독성 억제 효과 ⑧자외선 차단 효과 ⑨중성지방 분해억제시험 ⑩혼합제제의 독성 실험	제1세 부과제	1) 사용원료 및 1차 배합에 따른 기능성시험 (①②⑩⑫⑬)
		제2세 부과제	1) 사용원료 및 1차 배합에 따른 기능성시험 (③④⑦⑧⑨)
		제3세 부과제	1) 사용원료 및 1차 배합에 따른 기능성시험 (⑤⑥⑪⑭)

	①GOT 및 GPT 시험 ②항혈전 효과 ③항 콜레스테롤 효과 ④testosteron 유도 효과 등은 재료 및 과제의 필요성에 따라 수행하고자 한다.		
--	--	--	--

나. 2차년도

구 분	세부과제	연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2006년)	제1 세부과제 (Functional wellbeing TEA)	선별된 원료 (DAD,HWG, Greentea,DC HC,KAP 및 DOL)로부터 배합 재료의 결정 및 masking 기법 의 연구	1) 원료의 분쇄 방법의 연구 : HWG, DCHC, KAP 2) 원료의 masking 기법의 연구 ① 초(炒) : KAP, DAD, HWG, Greentea, DCHC, DOL ② 밀구 : HWG ③ 의의인 처리:DCHC ④ 포(炮) :KAP, HWG ⑤ 동결건조 : DCHC 3) 散制 방법의 연구 : HWG, KAP, DCHC ① 부형제의 연구: 전분, 의의인, 유당, 박하뇌 4) 배합방법에 대한 연구 5) 배합비에 관한 연구 6) 추출방법에 관한연구 7) 추출물의 기능성 시험 : FRAP,Anti-angiogenesis, Immunity, Toxicity,Obesity, Antidifferentiate, Anti-coagulating, Testestron, Anticell adhesion 8) 제제형태의 연구 9) 시제품의 제조

2차년도 (2006년)	제2 세부과제 (Wellbeing Skin Care)	선별된 원료 (H W G , Greentea, DAD, KAP 및 WGS) 로부터 배합재료 의 결정 및 기능 성 조성물 연구	1) 미백 효과 향상을 위한 배합구성 : Greentea, WGS, P.rhizoma 2) 아토피 효과 향상을 위한 배합구성 : HWG, WGS, Greentea, DAD 3) 보습효과 향상을 위한 배합구성 : AGA, JCW, CJJ 4) 여드름억제 효과 향상을 위한 배합구성 : DAD, HWG, CJJ 5) UV-blocking 향상을 위한 배합구성 : AGA, HWG, Greentea,WGS 6) Triglyceride 억제기능 향상을 위한 배합구성 : NRM, DAD,HWG, DCHC 7) 혼합을 위한 essential oil 배합 연구(기초제제) 8) W/O, O/W 제제 배합의 구성 연구 9) 기능성 시험 : Moisture, Tyrosine, Atophy, Toxicity, UV-blocking, Obesity, Antidifferentiate 10) 시제품의 제조
-----------------	--	--	---

	제3 세부과제 (Wellbeing Fermentati ve ALC)	선별된 원료 (D C H C , DAD,HWG,KA P,DOL,WGS 및 NRM)로부터 배 합재료의 결정 및 발효조건 연구	1) 생체 기능향상을 위한 원료의 배합 연구 - FRAP : WGS - Anti-angiogenesis:KAP, DAD,(Greentea) - Atophy : HWG, WGS - Immunity : HWG, DAD - Anti-obesity : KAP, DAD - Anti-coagulating : DOL - Testosterone : KAP - Anti-cell adhesion : KAP, DAD - GOT : HWG, DCHC - GTP : DAD, WGS - Triglyceride : NRM, DAD - Cholesterol : DAD,KAP - Anti-Weight : DAD, NRM
--	---	---	--

			2) 보당제제의 연구: 의의인, 찹쌀 3) 누룩의 제조 4) 보리소주의 제조 5) 1차 발효주의 제조 : - 다양한 배합비에 따른 1차 발효주 제조 6) 후숙성 7) 여과 8) 맛, 향, 색깔의 연구 9) 원료 배합비의 결정 10) 기능성 시험 : FRAP, Anti-angiogenesis, Immunity, Toxicity, Obesity, Antidifferentiate, Anti-coagulating, Testestron, Anticell adhesion 11) 시제품의 제조
--	--	--	---

다. 3차 년도

구 분	세부과제	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2007년)	제1 세부과제 (Functional wellbeing TEA 개발)	시제품의 in vivo 시험 및 기능성의 보 완	1) 시제품의 in vivo 시험 ① anti-angiogenesis : Chorioallantonic membrane(CAM) 방법 -계란 수정란 ② anti-obesity, anti-weight 시험 : male Sprague-Dawley rat ③ 항 atrophy 시험: male Sprague-Dawley rat 가. scratching 횟수 측정 나. Swelling thickness 측정 ④ 면역 향상시험 : TNF α , IL-6 : ELISA ⑤ GOT, ⑥GTP, ⑦LDH,----- ⑧Glucose, ⑨Triglyceride, (혈액자동 ⑩Cholesterol, 분석기 사용) ⑪LDL-cholesterol : ----- 2) 시제품의 보완
	제2 세부과제 (Wellbeing Skin Care)	시제품의 in vivo 시험 및 기능성의 보 완	1) 피부자극성(Skin irritation) male Sprague-Dawley rat 이용 ① 일반증상 및 폐사동물의 관찰 ② 체중측정 ③ 도포부위의 피부반응 평가 및 자극성 관정

	개발)	완	④ 병리조직 검사 2) 감작성(알레르기성)(Sensitization, Allergenicity), 광독성(photo-toxicity) - 흥반 및 광독성 판정 3) 시제품의 보완
	제3 세부과제 (Wellbeing Fermentati ve ALC 개 발)	시제품의 in vivo 시험 및 기능성의 보 완	1) 시제품의 in vivo 시험 ① anti-angiogenesis : Chorioallantonic membrane(CAM) 방법 -계란 수정란 ② anti-obesity, anti-weight 시험 : male Sprague-Dawley rat ③ 항 atrophy 시험: male Sprague-Dawley rat 가. scratching 횟수 측정 나. Swelling thickness 측정 ④ 면역 향상시험 : TNF α , IL-6 : ELISA ⑤ GOT, ⑥GTP, ⑦LDH, ----- ⑧Glucose, ⑨Triglyceride, (혈액자동 ⑩Cholesterol, 분석기 사용) ⑪LDL-cholesterol : ----- 2) 시제품의 보완

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 · 외 관련기술의 현황과 문제점

현재 시중에서의 기능성 차는 고대로 부터의 한방의 처방에 기인된 차들이 많다. 십전대보차(보양차), 방풍통성산(살빼는 차)등과 같은 차들이 많이 나와 있다. 본 연구에서와 같이 ①항산화 실험,②신생혈관 생성 억제 실험, ③면역 향상 실험, ④항비만 효과, ⑤GOT 및 GPT 시험, ⑥항혈전 효과, ⑦항 콜레스테롤 효과, ⑧ testosterone 유도 효과등의 실험을 거쳐 다양한 효과를 나타내는 기능성 차는 보이지 않는다.

기능향상을 위한 wellbeing 차의 개발은 다양한 기능을 검증한 후 이들로 부터 한방의 원리에 따라 쉽게 섭취가 가능하도록 제조한다. 본 과제는 원료의 효능을 검증한 후 제제의 응용으로 다양한 제품의 형태로 개발될 것이며, **기능성 화장품**의 개발은 기존에 사용되는 재료와는 다르며 피부 친화성의 제제로 그 작용 기전을 규명하여 신뢰성있는 제품을 개발한다. 기능성화장품의 제제로서는 ①미백 효과 향상을 위한 배합구성, ② 아토피 효과 향상을 위한 배합구성, ③ 보습효과 향상을 위한 배합구성, ④ 여드름억제 효과 향상을 위한 배합구성, ⑤ UV-blocking 향상을 위한 배합구성, ⑥ Triglyceride 억제기능 향상을 위한 배합구성, ⑦ 혼합을 위한 essential oil 배합 연구(기초제제), ⑧ W/O, O/W 제제 배합의 구성 연구등을 통하여 필요한 제제를 구성할 수 있도록 한다. 발효주도 ① 항산화 실험(FRAP), ② 신생혈관형성 억제작용, ③ 항아토피 작용, ④ 면역 향상 효과, ⑤항비만 작용, ⑥ 항혈액응고작용, ⑦ Testosterone 유도 효능, ⑧ 세포부착억제 작용, ⑨ 간기능 향상 효과(GPT, GOT), ⑩ Cholesterol 저하 효과, ⑪ 체중감소 효과 등의 실험을 통하여 생체에 유익하며 **간의 기능을 개선하고 생체의 면역 향상 및 생체의 기능을 향상시킬 수 있는 제제**를 그 작용 기전으로 부터 선택할 것이다. 발효주의 개발은 우리나라의 고유한 방법으로 수행이 가능하고, 재료의 특성에 따라 개발 될 것이며, 피부 보호용 기능성 화장품과 차 경우에도 기존에 사용되고있는 재료로부터 벗어나 실험을 통하여 그 효과를 검증한 후에 다양한 방법으로 제품을 개발 할 것이므로 국내외의 기술과는 무관하게 기술이 축적 될 것이고 특허를 획득 할 것으로 판단된다.

제 2 절 앞으로 전망

Wellbeing 제품은 **항노화, 질병예방, 건강유지, 기능성 식품** 등으로 개발 및 발전 될 것이다. 이 분야는 우리가 고대로부터 행하여오던 한방을 바탕으로 다른 나라보다 효율적으로 개발 할 수 있는 분야라고 판단된다. 그리고 **기전 규명**을 통한 효과의 검증은 새로운 물질의 개발이 가능하게 되고, 다양한 품목의 개발로 수요자를 이끌어 낼 수 있을 것이다. 더구나 노화에 따른 퇴행성 질환을 감소시키는 제재의 개발은 현대인의 욕구와 더불어 더 많은 시장의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

제 3 절 기술도입의 타당성

본 과제가 수행하고자하는 Wellbeing 제품의 분야에서는 기존의 기술과 특허, 그리고 선행연구에서 필요 분야를 정립하였기에 기술 도입이 없어도 가능할 것으로 판단다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 기능성에 따른 원료의 선별

1. 원료의 기능성 시험

사용할 시료의 생리 활성시험을 ①항산화 실험, ②신생혈관 생성 억제 실험, ③보습효과, ④tyrosinase 억제 시험, ⑤항아토피 시험, ⑥면역 향상 실험, ⑦세포독성 억제 효과, ⑧자외선 차단 효과, ⑨항비만 시험, ⑩ GOT 및 GPT 시험, ⑪항 콜레스테롤 효과 ⑫항혈전 효과, ⑬testosteron 유도 효과의 측정을 하였다. 먼저 1차 선별된 녹차, 민들레, 황기, 갓 그리고 버섯등을 비롯하여, 16 종류의 천연산물을 필요에 따른 생리활성 시험을 하였다.

가. 항산화 효과(FRAP)

Free radical의 생성이 급격히 증가하거나 산소 라디칼을 제거하는 방어능력이 저하 되면 생체는 산소 라디칼에 의한 손상되어 oxidative stress를 나타내며, 인체에 손상을 입히는 것으로는 superoxide anion(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($\cdot OH$), singlet oxygen(1O_2)등의 ROS(Reactive oxygen species)와 ONOO⁻등의 RNS(Reactive nitrogen species)가 생체의 질병 및 노화의 원인이 되므로 이들을 제거하기 위해서는 항산화제의 투여가 불가피하다. 측정은 철 반응물인 TPTZ(2,4,6-tri(2-[pyridyl]-s-triazine)에 산화물질 Ferric chloride ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)와 Acetate buffer와 증류수를 혼합하여 FRAP solution을 제조한 후 항산화물질을 첨가하고 FRAP solution이 violet 색으로 변하는 정도를 철이 가장 잘 흡수되는 593 nm에서 측정하였다. FRAP 용액을 구성에 따라 제조한 후 eppendorf tube에 각각 1mL 씩을 분주하고 여기에 30uL의 시료를 넣고 상온에서 40분간 반응 시킨 후 593 nm에서 측정하였다. 시료는 0.5%를 사용하였으며, positive control로써 EGCG는 최종 농도가 10uM 이 되도록 하였다.

녹차(green tea)의 항산화력이 가장 강한 것으로 나타났고, 과피(KAP), 금은화(KEW), 머루씨앗(WGS), 민들레(DAD), 돌외(DOL)등의 천연산물의 추출물도 높은 항산화력을 나타내어(Fig. 1) 본 연구를 수행하는데 중요한 여러 가지의 원료가 될 수 있음을 보였다.

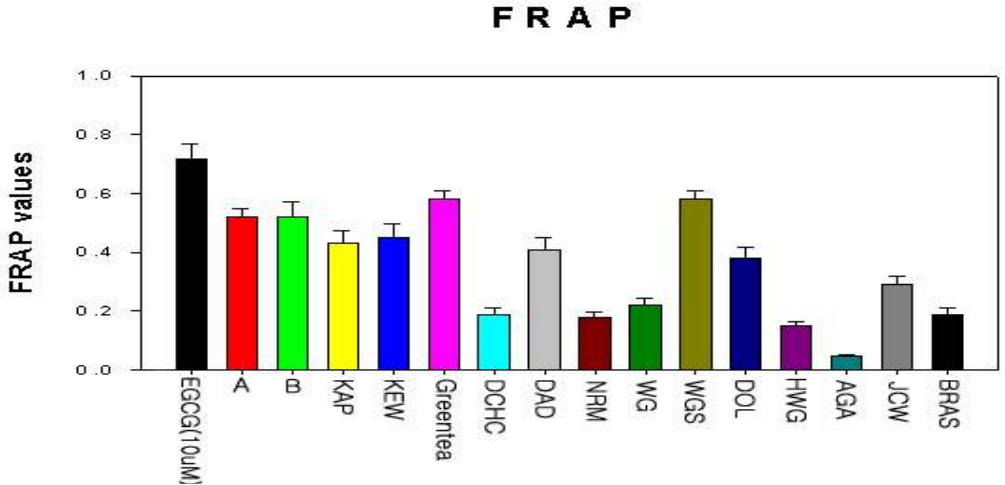


Fig. 1. Comparison of the antioxidative capacity of each material.

나. 신생혈관 생성 억제 실험

24 well culture plate에 250 µl/well의 matrigel 로 coating 한 후 고체화를 위하여 37°C에서 30분 동안 배양하고 EBM-2배지 1.5ml을 넣고, 배양한 HUVECs를 trypsin-EDTA를 사용하여 well로부터 분리한 다음 coating 된 matrigel plate 당 20,000 cells/well 이 되도록 재 현탁 시킨 후 37°C에서 1시간 30분간 배양하였다. 이후 배양액에서 200 µl를 덜어내고 천연산물의 추출액을 투여하여 37 °C의 5% CO₂환경에서 4시간동안 배양한 후, 형성된 tube 망의 길이는 현미경하에서 well을 불규칙적으로 5 분야로 나누어 디지털 카메라 (Nikon,Coolpix)로 촬영하여 그 영상으로부터 생성된 tube의 길이를 NIH image 프로그램으로 분석하였다.

대조군에 비교하여 과피(KAP), 머루씨앗(WGS), 근은화(KEW), 동충하초(DCHC),민들레(DAD) 및 장춘화(JCW)등은 아주 현저한 신생혈관 저해 효과를 나타내어(Fig. 2) 다양한 방면으로의

응용을 기대 할 수 있게 되었다.

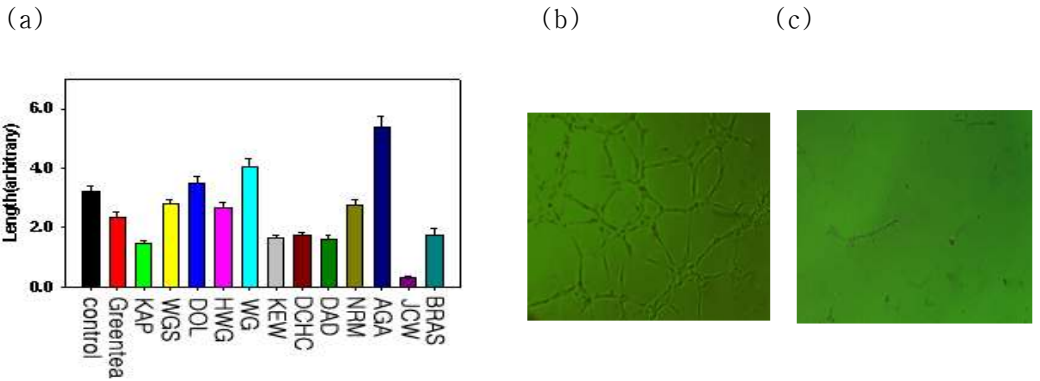


Fig. 2. Anti-angiogenesis effect of natural products (a), control of angiogenesis(b), and anti-angiogenesis with *T.officinale*(c).

다. 보습 효과

250 ml 비커에 NaCl, (NH₄)₂SO₄, KNO₃을 각 각 5 g씩 넣고, 항량이된 50 ml 비커 5개의 무게를 측정하고 각 각의 비커에 각각의 시료를 1 g 넣고, 250 ml 비커에 증류수 5 ml을 넣어 시약을 녹인 다음, 시료가 든 50 ml 비커를 250 ml 비커에 하나씩 넣고, desiccator에 넣어 vaccum pump를 사용하여 desiccator을 진공으로 한 후, 25 °C incubator에 2시간동안 반응 시키고 무게를 측정하였으며,

$$\text{흡습성(\%)} = \frac{\text{반응 후 (비커+뚝)무게} - (\text{항량한비커+뚝)무게}}{\text{시료(뚝)무게}} \times 100$$

으로 구하였다.

녹차와 비슷한 보습효과를 갖는 천연산물들을 검색하여 보습효과를 측정하였는데 과피 (KAP), 머루씨앗(WGS), 돌외(DOL), 동충하초(DCHC), 아가리쿠스(AGA), 장춘화 (JCW) 및 갈대(*P.rhizoma*) 등이 좋은 효과를 나타내어(Fig. 3) 그 응용도를 높일 수 있을 것으로 본다.

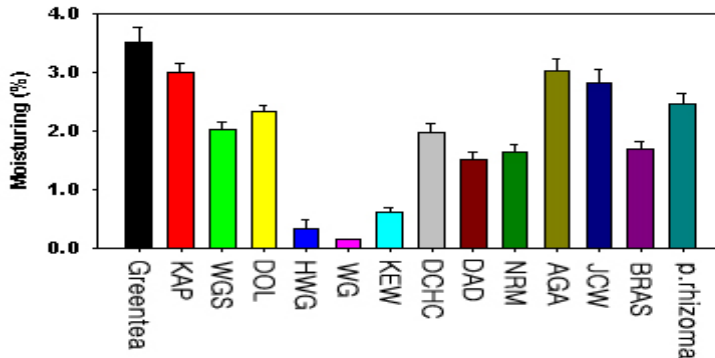


Fig. 3. Moisturing effects of natural products.

라. tyrosinase 억제 시험

색소는 멜라닌 세포의 melanosome에서 합성되어 아미노산과 L-tyrosine이 3,4-dihydroxyphenylalanine(L-dopa)으로 전환됨으로써 이 기전이 시작된다. tyrosinase 은 멜라닌 세포 내에서 tyrosinase에 의해 DOPA, DOPAquinone으로 산화된다. 그 후 DOPA quinone이 DOPA chrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone이 되고, 이어서 indole-5,6-quinone으로의 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다. Tyrosinase의 저해활성의 측정은 Takagi. K등의 방법을 이용하여 측정하였다. 1.66mM의 L-Tyrosine용액 1ml과 조성물 용액 1ml 그리고 30mM의 sodium phosphate 1ml을 넣은 후, 37°C 항온수조에서 10분간 가열하고, 37°C가 된 혼합액에 0.01ml의 tyrosinase를 넣어 mix한 후 37°C 항온수조에서 정확히 10분간 반응 시킨 후 꺼내어 즉시 얼음에 넣어 반응을 멈추고 475nm에서 흡광도를 측정한다. 시료용액 1ml 대신 증류수 1ml을 넣은 sample을 A, 시료용액도 넣고 enzyme도 넣은 sample을 B, enzyme 0.01ml 대신 증류수 0.01ml을 넣은 sample을 C로 하여 계산을 해서 결과 값을 구하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100$$

0.1%의 kojic acid를 positive control로 하여 비교해 볼 때 본 연구에서 큰 성과를 얻

은 것은 녹차를 대신 할 좋은 재료를 얻었다는 것이다. kojic acid가 발암의 경향이 있어 대체 물질이 있어야 하는데 이에 대한 좋은 물질이 될 수 있을 것으로 본다. 머루씨앗(WGS), 금은화(KEW), 동충하초(DCHC), 노루궁뎅이버섯(NRM), 갈대(*P.rhizoma*) 등을 정제하면 좋은 미백제가 될 수 있을 것으로 사료(Fig. 4)되며, 또한 다른 특성과 더불어 필요한 제제로 이용할 수 있을 것으로 본다.

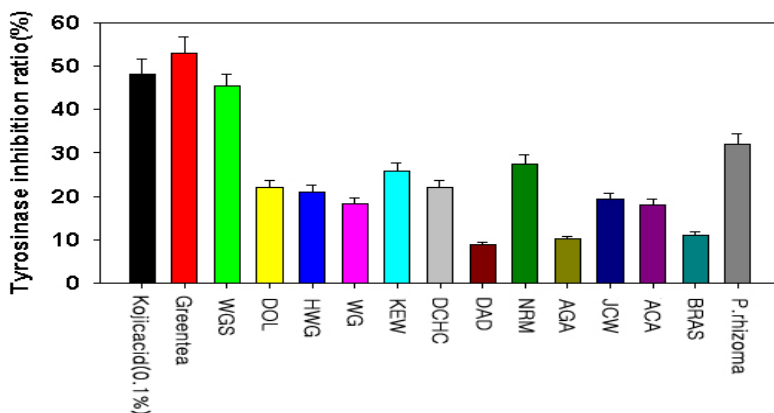


Fig. 4. Tyrosinase inhibition rate of each material.

마. 항아토피 시험

1) scratching 횟수 측정

compound 48/80이 가려움을 유도하는 물질이며 이 물질을 목 뒤의 어깨부분에 0.5%의 물질을 주사하여 시간당 얼마나 뺨다리가 등을 긁는가하는 실험을 행하였다. 시료는 0.5% 용액으로 제조하여 compound48/80을 주사하기 한시간 전에 경구 투여하였고, 긁는 횟수를 비교하였다.

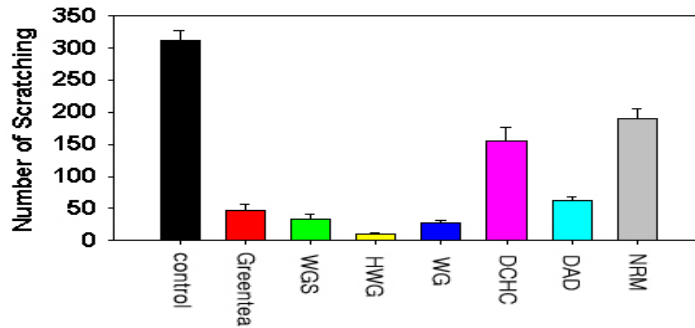


Fig. 5. Anti-itching effect of natural products.

atophy는 피부의 건조나 면역 시스템의 문제로 일어난다고 생각되며 위의 결과에서 보듯이 머루씨앗(WGS), 황기(HWG), 머루(WG) 및 민들레(DAD)등은 가려움의 횟수를 현저히 감소시켜(Fig. 5), atophy 치료에 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각되며, 또한 이들의 응용은 또 다른 피부의 치료제를 개발 할 수 있을 것으로 사료된다.

2) Swelling thickness 측정

시료를 희석하여 쥐의 귀 등쪽면과 안쪽면을 약간 흘러 내릴 정도로 충분히 바르고, 도포 40분후 ether 로 마취한 생쥐의 양쪽 귀등면을 microsyringe를 사용하여 희석한 compound 48/80을 20 ul(100ug/site)씩 각각 피내 주사하였다. control 군은 compound 대신 생리식염수 20ul 피내주사 한다. 40분후 다시 ether로 마취하여 diamagnetic micrometer를 이용하여 귀의 부종 부분의 두께를 측정하였다. 머루씨앗(WGS), 황기(HWG) 및 과피(KAP) 등이 부종을 억제 시키는데 좋은 효과를 보였다(Fig. 6).

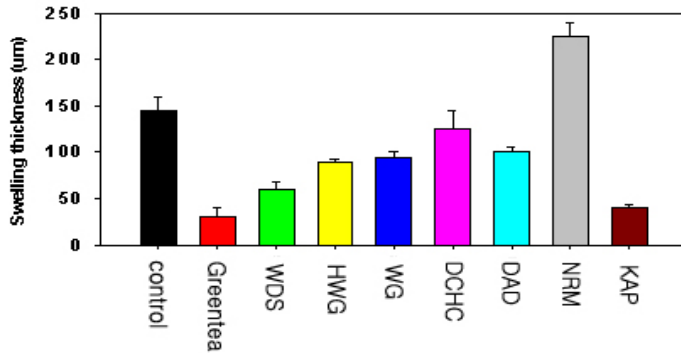


Fig. 6. Anti-swelling effects of natural products with compound 48/80.

바. 면역 향상 실험

인간 면역세포 T cell을 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640배지에서 5% CO₂, 37°C 배양하여 생육증진효과를 측정한다. 즉, T cell을 5x10⁵ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900ul 씩 첨가하여 24시간 배양하고 시료를 100 µl 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하여 haematocytometer를 사용하여 세포수를 세어 대조군과 비교하였다.

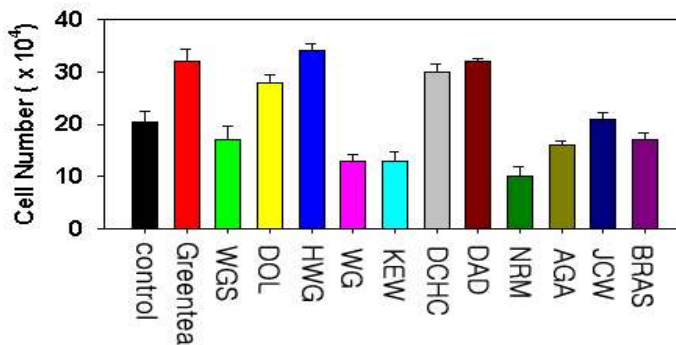


Fig. 7. T-cell growth promoting effects of natural products.

녹차, 돌외(DOL), 황기(HWG), 동충하초(DCHC), 민들레(DAD)등의 천연산물에서 면역세포의 증

식을 활성화 시켰으며(Fig. 7), 이들은 기능성 차, 화장품, 발효주 이외에도 다양한 방면으로 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

사. 세포독성 억제 효과

과산화수소(H_2O_2)로 유도된 세포독성에 대한 조성물의 독성억제 효과를 시험한다. 과산화수소는 세포내에서 free radical을 생성하여 세포에 치명상을 입히므로 첨가하는 조성물이 제어할 수 있는가를 다음과 같이 실험한다. 마우스 유래 섬유아세포(fibroblast, NIH/3T3)을 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지에 배양하여 24 well에 2×10^5 되게 1mL로 분주하고 24시간 배양한 후 배지중의 과산화수소의 최종농도가 50uM이되게 첨가한다. 동시에 조성물의 최종농도가 0.05%가 되도록 가하고 24시간 배양후에 haematocytometer를 사용하여 세포수를 세어 대조군과 비교하였다(Fig. 8). 과피(KAP), 금은화(KEW), 동충하초(DCHC), 민들레(DAD), 돌외(DOL), 황기(HWG) 및 갓(BRAS)등에서 세포독성억제효과가 좋은 것으로 나타났다.

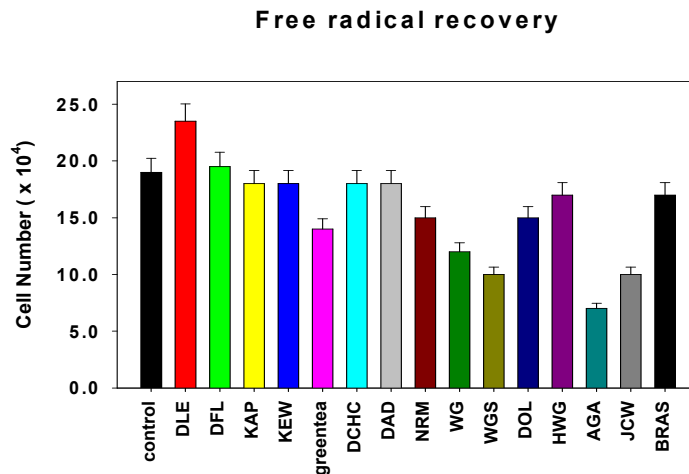


Fig. 8. Recovery function of natural products exposed with free radical(H_2O_2) on NIH/3T3.

아. 자외선 차단 효과

1) UV-scanning에 의한 차단효과 선별

태양광선은 자외선(UV: Ultraviolet ray), 가시광선(Visible light), 적외선(Infra red)로 구분되며, 도달량은 자외선 10, 가시광선 40, 적외선 50정도이다. 태양광선에 의한 피부의 손상은 200-400nm인 자외선에 의하여 일어나며, UVA(320-400nm)는 피부의 진피층까지 침투하여 선뎀현상을 일으키고 피부의 탄력을 감소시키고 주름 및 노화를 촉진시킨다. 그리고 UVB(280-320nm)는 표피층에 침투하여 선뎀(sunburn)현상을 일으키고 기미와 피부 건조, 홍반 및 물집의 생성원인이 된다. UVB에 의한 표피세포 비정상적인 활성화에 따른 피부의 염증은 phosphorylaseA2의 활성화로 인한 prostaglandin E2의 생성에 기인되며 이를 위해서도 자외선의 차단이 중요한 것을 알 수 있다. 자외선을 차단하는 방법은 자외선을 차단하는 물질을 피부에 도포하거나, 자외선에 의하여 생성된 free radical을 제거하는 것이며, free radical에 의하여 공격받아 변화된 피부세포를 정상적으로 회복시키는 방법 등을 들 수 있다. 따라서 free radical을 제거할 수 있는 항산화 기능을 가져야 하고, 자외선을 차단할 수 있는 효과를 가져야 한다. 조성물의 자외선 흡수효과를 관찰하기 위하여 자외선 영역의 scanning, 그리고 UVB와 UVA영역에서 흡광도를 비교한다. UVB는 피부염증 유발영역으로 308nm에서 최대치를 나타내어 이 파장에서 차단효과를 분석하며, UVA(320-400)에서는 350 nm에서 흡광도로 분석한다.

천연산물들을 UV 영역에서 scanning하여 280-320 nm, 320-400 nm 영역에서 흡수대가 높은 천연산물을 찾았다. scan1에서는 녹차와 황기(HWG), 민들레(DAD)가, scan2에서는 갓(BRAS), 돌외(DOL), 노루궁뎅이버섯(NRM)이, scan3에서는 장춘화(JCW), 금은화(KEW)등이 DW(증류수)에 비교하여 자외선 영역에서 차단효과가 큰 것으로 나타나(Fig. 9), 스킨케어의 용도로 사용할 수 있는 좋은 재료가 될 수 있음을 보였다.

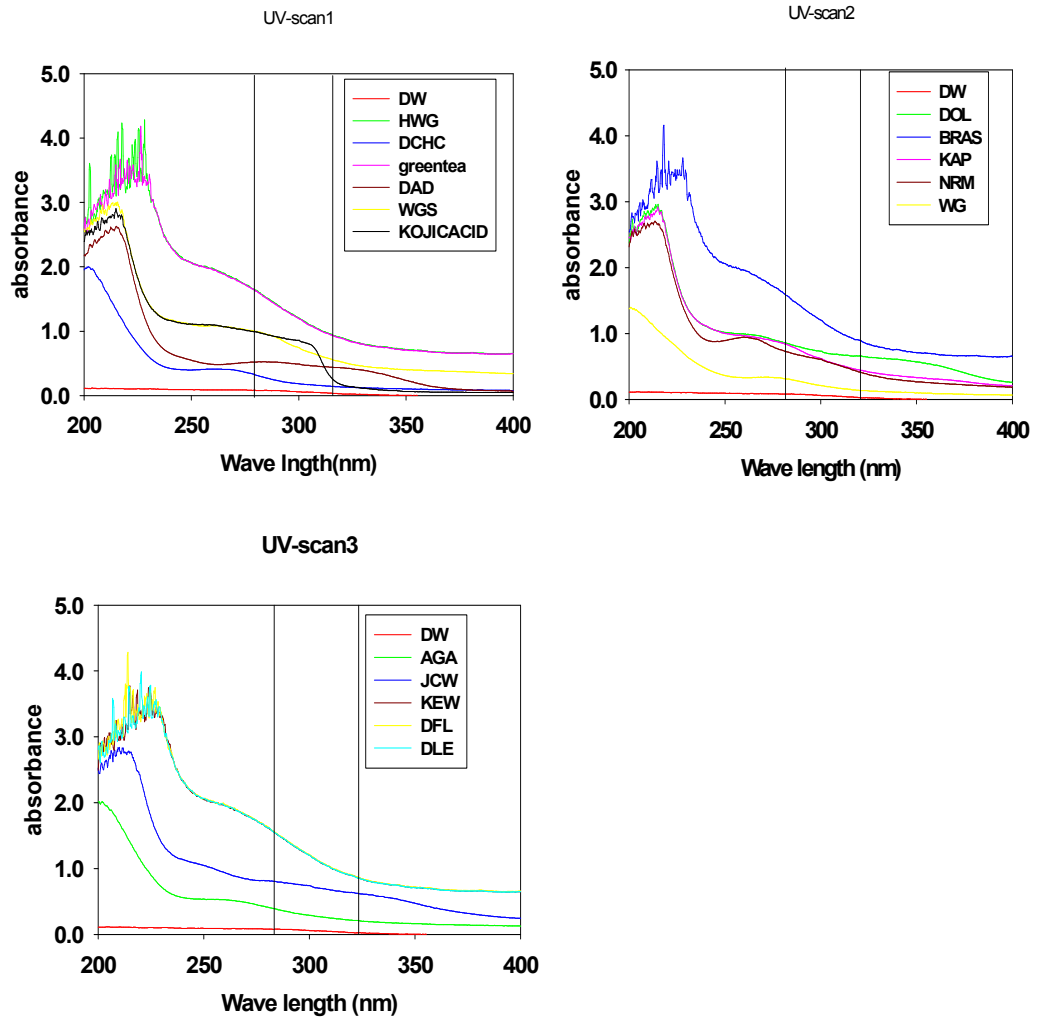


Fig. 9. Scanning chart of natural products at UV reagon.

2) UV 노출후 천연산물에 의한 회복효과

마우스 유래 섬유아세포(fibroblast, NIH/3T3)을 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지에 배양하여 24 well에 2×10^6 되게 1 ml되게 분주하고 24시간 배양한 후 배지중의 조성물의 농도가 0.05% 되도록 100ul를 첨가하고 UVA(365nm)를 0-5.0J/cm²의 강도로 조사한 후 24시간 추가 배양후에 cell의 수를 측정하여, 대조군과 비교하였을 때 생존율을 구하여 시료별 회복 효과를 보았다.

UV를 조사후 회복율을 보면, 녹차, 머루씨앗(WGS), 머루(WG), 황기(HWG), 동충하초(DCHC) 및 아가리쿠스버섯(AGA) 등이 좋은 효과를 나타내어(Fig. 10), 스킨케어의 중요한 재료로 사용가능함을 보였다.

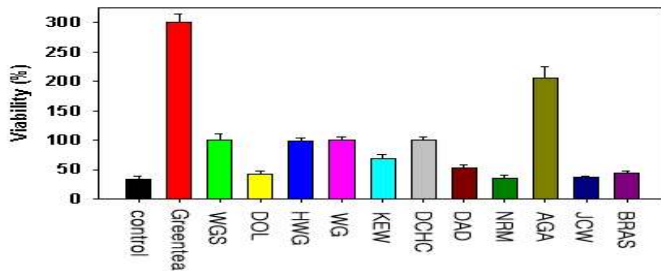


Fig. 10. Recovering viability of NIH/3T3 with natural products after UV-exposure.

자. 항비만 시험(3T3-L1 세포)

1) 항비만 시험

가) 세포의 배양

① DMEM으로 배양 + 10% FBS, and PC 10^5 U/L, SM 100mg/L

② trypsinize : 계대배양

나) 세포증식의 측정

①trypsinize : cell counting

② 5×10^5 cell/ml로 조정하여 96 well plate에 200 uL씩 분주, 37C, 5% CO2배양

③24시간 후 medium을 교체하고 시료를 넣고 37C, 5% CO2에서 48시간 배양

④배양후 cold trichloroactic acid(TCA)의 최종농도가 10%가되도록 50% TCA를 50uL 씩 well에 분주하여 단백질을 침전시켜 세포를 고정한 후 4C에서 1 hr 방치한다. 증류수로 5회 세척한 후 건조시킨다.

⑤ 건조된 각 well에 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB 용액 50uL씩을 가하여 상

온에서 20분동안 염색한 후 1% acetic acid로 4회 세척하여 세포에 부착하지 않은 SRB를 제거한다.

⑥plate를 잘 건조하여 150uL의 10mM/L의 unbuffered Tris base[Tris(hydroxy-methyl) aminoethan]을 가하여 bounded protein stain을 녹여 낸다.

⑦각 well의 O.D.는 510 nm에서 측정한다.

⑧검액의 효과는 대조군의 흡광도에대한 실시군의 백분율로 환산한다.

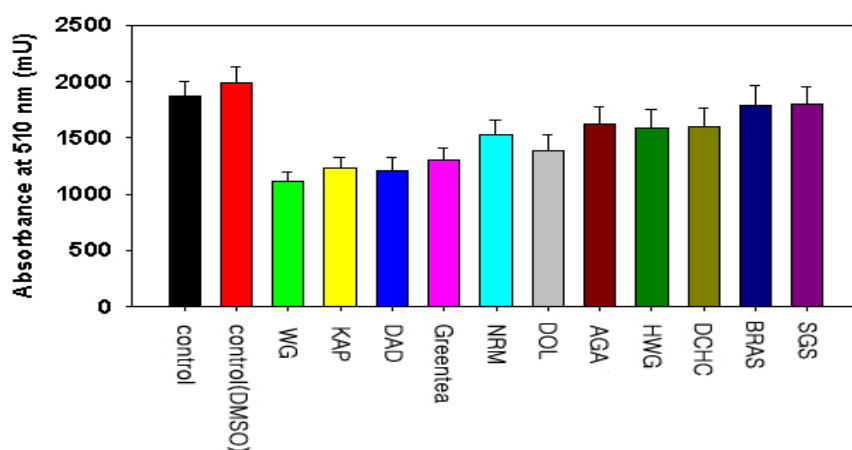


Fig. 11. Anti-obesity effects with natural products by 3T3-L1 cell.

비만세포의 성장을 억제하는 천연산물로서는 머루(WG),과피(KAP), 민들레(DAD) 및 녹차 등이 좋은 효과를 보여 (Fig. 11), 기능성 차를 제조하는 좋은 원료가 될 것으로 판단된다.

2) 3T3-L1 세포의 분화 측정

① 3T3-L1 세포의 배양

② Trypsinize and 30,000 cell/mL을 DMEM(pH 7.75)+10% FBS 배지를 사용하여 24 well plate에 2mL 씩 재분배 한다. 몇 개의 well은 염색을 위하여 비워둔다.

③ confluent에 도달 하도록 1-2일 배양한다.

- ④(1차 배지 교환) :1.8mL을 제거하고 2mL의 배지를 첨가하여 배지를 교환한다.
이 때의 배지는 0.25uM의 DEXAMETHASONE, 0.5 mM의 MIX (1-methyl-3-isobutylxanthine), INSULINE 1ug/mL를 함유한 DMEM으로 교환한다.
- ⑤ control 군도 배지 교환, 배지 교환시 monolayer가 파손되지 않도록 하면서 시료첨가.
- ⑥48시간동안 37C, 5% CO2에서 배양한다.
- ⑦(2차 배지 교환): 2 mL의 배지를 제거하고, 2mL의 배지를 첨가한다. 1차배지 교환시의 배지를 사용한다. 배지 교환시 monolayer가 파손되지 않도록 아주 주의를 기울여야 한다.
- ⑧48시간동안 37C, 5% CO2에서 배양한다.
- ⑨(3차 배지 교환): 2mL의 배지를 제거하고, 2mL의 배지를 첨가한다. 이때에는 지방조직의 유지를 위해서 DMEM+10FBS만 사용하고 유도제제(DEX, MIX, Insulin)은 사용하지 않는다. 그리고, ②에서 비워둔 well에도 배지를 넣는다.
- ⑩적어도 48시간동안 37C, 5% CO2에서 배양한다.
- ⑪그리고 이후 매 48-72시간마다 배지를 교환한다. Lipid drop이 최소 5일 동안 계속 유지될 것이다.
- ⑫배지를 제거하고 PBS로 2번 세척하며, 이때 PBS를 아주 조심하여 첨가하도록 한다. (monolayer 유지)
- ⑬ 0.5 mL OIL-Red-O용액을 well에 가한다. cell이 들어 있지 않은 well에도 가하여 차후 염색 control로 사용할 수 있도록 한다.
- ⑭15분간 실온에서 반응시킨다.
- ⑮ 염색용액을 제거하고 1mL의 wash solution(아마도 PBS)를 사용하여 3회 세척한다. NOTE: washing이 끝난후 염색되어진 plates는 사진을 찍도록한다.
- ※ 0.25mL의 Dye extraction solution(색소추출 용액 : isopropanol)넣어 추출한다.
- ※ orbital shaker에서 15-30분간 반응시킨다.

※ 염색액을 cubette이나 96-well plate에 옮겨서 520nm에서 측정한다.

※ cell이 없는 곳의 염색액의 흡광도(plate에 비특이적으로 결합한 염색의 흡광도)는 실험한 흡광도에서 빼어야 한다.

이러한 프로토콜을 중심으로 실험을 행하여 그 결과를 도출하였다.

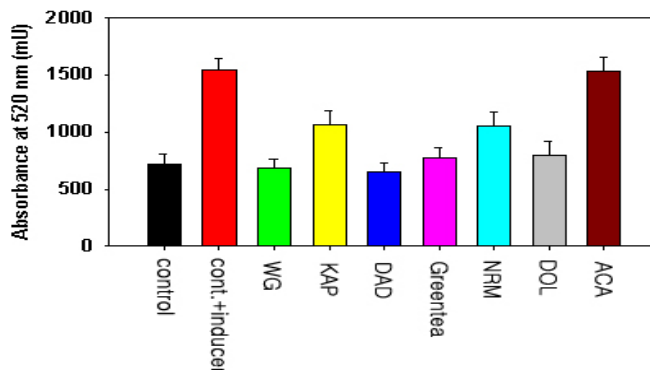


Fig. 12. Anti-differentiating effect of 3T3-L1 cell with natural products.

머루(WG), 민들레(DAD), 녹차, 돌외(DOL)의 천연산물에서 비만세포의 분화를 억제 하는 능력이 뛰어나 항 비만의 제제로서 사용할 수 있음을 보였다(Fig. 12).

차. 항혈전 효과

식품의약품안전청 독성연구소의 혈전용해제의 효능검색 프로토콜을 따라 실험하였다.

직경 90mm petridish에 50unit/ml thrombin 용액 200 μ l를 pipet으로 먼저 방울 방울 찍어 흩어 놓는다. 0.5% fibrinogen 용액 10ml을 thrombin이 들어있는 petridish상에 5ml pipet 을 이용하여 넣는다. 이때, bubble 생기지 않도록 조심하며 만약 bubble이 생겼을 경우에는 petridish 가장자리로 보낸다. 0.5% fibrinogen 용액을 넣고 잘 흔들어 thrombin 과 잘 섞이게 하며 평평한 plate가 형성 되도록 한다. 잠시후 (10분-30분 경과) thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 되면서 gel상 의 fibrin plate가 형성된다. 각 plate 에 시료 점적 위치를 표시한다.

- 위에서 제조한 농도별 시료를 20 μ l씩 각 표시한 위치에 점적한다.

- 위 plate를 37℃에서 17시간 반응시킨후 fibrin이 용해된 면적을 측정하여 IZD values로 나타내었다.

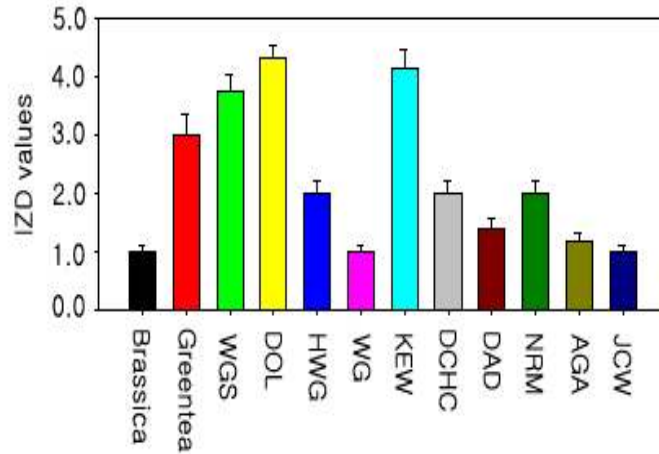


Fig. 13. Anti-clotting effect of natural products.

항혈전의 효과가 녹차 보다도 나은 천연산물, 머루씨앗(WGS), 돌외(DOL), 금은화(KEW)등을 선택할 수 있었으며, 황기(HWG), 동충하초(DCHC), 노루궁뎅이버섯(NRM) 등도 좋은 효과를 보여 (Fig. 13), 항혈전의 재제로서 다양한 분야에 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

카. testosterone 유도 효과의 측정

K-28을 (Leydig cell)을 DMEM 배지에 10%의 FBS를 첨가한 배지에 2×10^5 의 cell을 24 well plate에서 24시간 배양하여 confluency에 도달했을 때 각각의 시료를 처리한 후 48시간 더 배양하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 그 상등액을 RIA로 testosterone 생합성량을 측정하였다(Fig. 14).

대조군 보다 특징있게 증가시키는 물질을 발견하였으며 이의 응용도도 많을 곳으로 보인다.

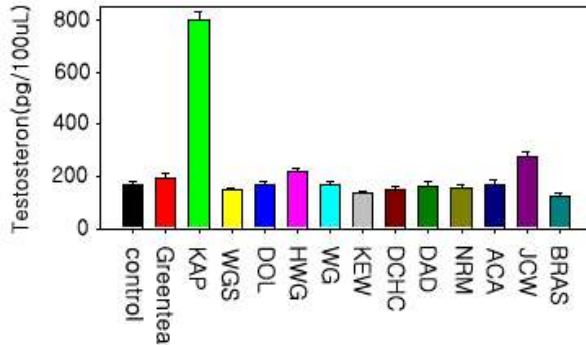


Fig. 14. Sterodogenesis increasing effects of natural products.

남성 호르몬을 유도하는 효과는 과피(KAP)가 탁월한 효과를 보였고, 황기(HWG), 장춘화(JCW)도 대조군에 비교하여 현저한 유도 효과를 보여, 기능성 차 및 발효주 제조에 좋은 재료가 될 수 있을 것으로 판단된다.

타. cell adhesion 억제 효과(Elisa 법)

HUVECs을 96well에 well당 5×10^3 개의 cell 이 되도록 분주하여 2% FBS첨가 EBM-2배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂-incubator에서 배양하여 confluence에 도달하도록 배양하였다. Sample을 농도별(200, 100, 50, 25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)로 넣어서 20시간 배양한다. 20시간 후 PBS(phosphate buffered saline)로 세척 후 IL-1 β 를 5 ng/ml의 농도로 첨가하여 6시간 동안 반응시킨다. 배지 제거 후 1% paraformaldehyde(200 μl)로 30분간 RT(Room Temperature)에서 세포고정 시킨다. 30분뒤 PBS+0.5% Tween 20으로 두 번 세척한다. 단일 클론 항체(ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin)를 10%FBS의 PBS에 각각 2, 5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 녹여 2시간동안 37°C에서 배양 후 PBS+0.5% Tween 20 으로 세 번씩 세척한다. Secondary anti-body(Donkey anti-mouse IgG-HRP)는 10% FBS의 PBS에 1000배 희석하여 RT에서 1시간 반응 시킨다. 반응 시킨 후 PBS+0.5% Tween 20 으로 세 번 세척한다. 발색시약(western blotting luminol reagent)으로 200 μl 이용

하여 1시간동안 반응 시킨 후 plate reader(UVM 340)기 405 nm에서 측정하였다.

1) 민들레(DAD)

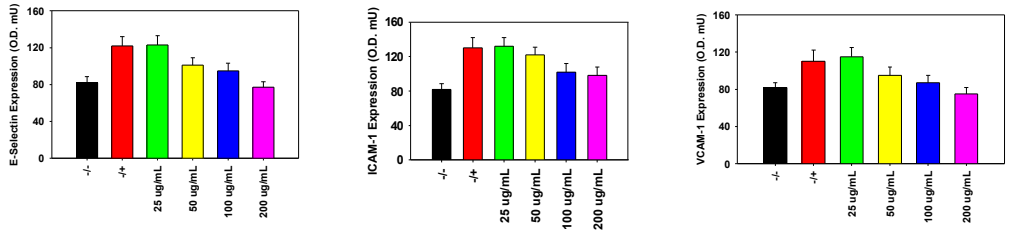


Fig. 15. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by DAD extraction at different doses, E-selectin(a), ICAM-1(b), and VCAM-1(c).

2) 머루(WG)

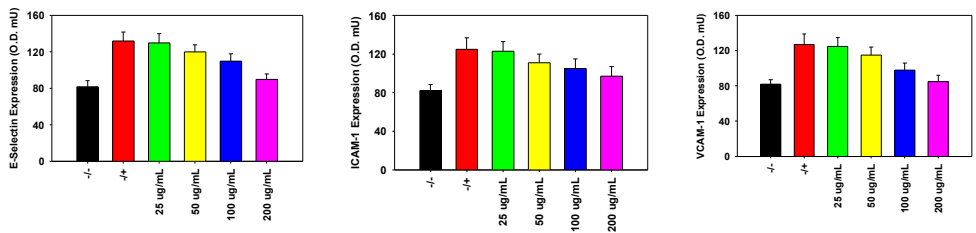


Fig. 16. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by WG extraction at different doses, E-selectin(a), ICAM-1(b), and VCAM-1(c).

3) 과피(KAP)

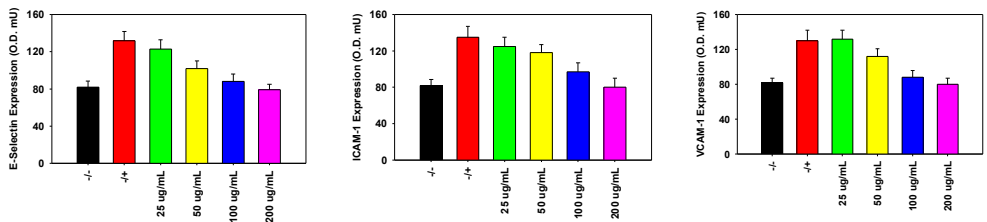


Fig. 17. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by KAP extraction at different doses, E-selectin(a), ICAM-1(b), and VCAM-1(c).

민들레(DAD), 머루(WG) 및 과피(KAP)는 ELISA에 의한 cell adhesion에 관계하는 분자의 발현

을 억제함 (Fig. 15-17)으로써 항암작용 및 항비만의 효과를 나타낼 수 있을 것으로 본다.

파. 동물시험

1) 실험동물 및 식이

실험동물은 체중이 121.4 ± 4.5 g인 male Sprague-Dawley rat를 난괴법(randomized complete block design)으로 각 군당 8마리씩 9개군으로 나누어 3주간 wire bottomed cage에 한 마리씩 넣어 사육하였다. 즉 고지방식이(DIO Series Diets, D12451, Research Diets Inc, USA)에 총 콜레스테롤 함량이 0.5%가 되도록 실험식이를 배합하였다(Table 1). 1주간 고형배합사료로 적응시키고, 민들레, 노루, 머루, 황기, 동충하초, 녹차, 머루씨, 과피 추출물 100mg/kg을 2주 동안 매일 경구투여하였다. 사육실의 온도는 $21 \pm 1.5^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 10\%$, 명암은 12시간 주기로 일정하게 유지시켰다.

Ingredient	Weight%	Kcal%
Casein, 80Mesh	23.3	19.7
L-Cystine	0.3	0.3
Corn Starch	8.5	7.2
Maltodextrin 10	11.6	9.9
Sucrose	20.1	17.0
Cellulose, BW200	5.8	0.0
Soybean oil	2.9	5.5
Lard	20.4	39.4
Cholesterol	0.5	0.0
Mineral Mix S100026	1.2	0.0
Dicalcium phosphate	1.5	0.0
Calcium carbonate	0.6	0.0
Potassium citrate, 1 H ₂ O	1.9	0.0
Vitamin Mix V10001	1.2	1.0
Choline Bitartrate	0.2	0.0
FD&C Red Dye #40	0.0	0.0
Total	100.0	100.0
Protein	24.0	20.0
Carbohydrate	41.0	35.0
Fat	24.0	45.0
Total	100.0	100.0

2) 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균치와 표준오차로 계산하였고 각 실험군의 평균치간의 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 SAS 통계프로그램 (v. 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC)을 이용하여 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

3) 식이섭취량, 체중증가량 및 식이 효율

사료 섭취량과 체중은 격일로 오전 중에 측정하였고 물과 식이는 자유로이 섭취시켰다. 식이효율(feeding efficiency ratio, FER)은 3주간의 총 체중증가량을 같은 기간 동안의 총 섭취량으로 나누어 계산하였다.

4) 혈액분석

실험식이를 3주간 급여 후 16시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취하여 심장에서 채혈하고 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 4°C, 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 시료로 사용전까지 액체질소에 급속냉도시켜 -80°C에서 보관하였다. 혈액은 혈액자동분석기(Automatic Chemistry Analyzer, CHIRON EXPRESS PLUS, CHIRON, USA)를 이용하여 AST(U/L,GOT), ALT(U/L, GPT), cholesterol(mg/dL), glucose(mg/dL), LDH(U/L), Triglyceride(mg/dL), LDL-cholesterol(mg/dL)을 측정하였다. 간은 채혈 후 즉시 적출하여 0.9% 생리식염수로 씻은 후 여과지로 수분을 제거하고 무게를 측정하였다.

Table 1. The activities of ALT, AST, and LDH in serum of rats administered natural plant extracts

	control	DAD	NRM	WG	HWG	DCHC	Green tea	WGS	KAP
AST(U/L) [GOT]	169.4± 9.8 ^{bc2)}	156.9± 9.1 ^{ab}	177.4± 13.2 ^{ab}	163.3± 14.5 ^{cd}	143.9± 9.2 ^{abc}	151.7± 8.5 ^a	156.1± 9.1 ^d	153.2± 9.6 ^{abc}	155.6± 10.0 ^d
ALT(U/L) [GPT]	42.4± 3.2 ^c	30.4± 3.4 ^c	41.3± 3.8 ^{cd}	37.8± 2.7 ^{abc}	38.0± 2.6 ^d	38.0± 4.6 ^a	49.3± 4.0 ^{ab}	35.6± 4.0 ^{ab}	35.8± 4.1 ^b
LDH(U/L)	334.5± 32.1 ^c	294.8± 45.7 ^a	489.9± 54.0 ^a	307.5± 39.6 ^b	321.0± 36.0 ^c	324.6± 42.6 ^b	284.2± 26.6 ^d	325.8± 29.9 ^c	256.7± 24.3 ^d

1)AST, asparate aminotransferase ALT, alanine aminotransferase LDH, lactate ehydrogenase

2)Values are mean±SE of 8 rats per each group. values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Duncan's multiple range test.

민들레(DAD), 황기(HWG), 녹차(greentea), 과피(KAP)등이 탁월하게 GOT, GPT를 낮게하는 효과를 보였으며, 머루(WG), 동충하초(DCHC), 머루씨앗(WGS)등도 좋은 간기능 향상 효과를 보였다.

Table 2. Effects of extracts of natural plants on serum glucose, triglyceride, cholesterol, LDL-cholesterol in rats fed high cholesterol and fat diets.

	control	DAD	NRM	WG	HWG	DCHC	Green tea	WGS	KAP
Glucose (mg/dL)	122.1±9.2 ^{cd1)}	126.7±8.9 ^c	160.8±15.6 ^b	188.8±12.8 ^a	190.7±18.4 ^a	121.3±8.9 ^{cd}	129.5±8.4 ^c	131.0±11.7 ^c	111.9±9.4 ^d
Triglyceride (mg/dL)	69.9±6.0 ^b	30.2±2.8 ^a	24.1±2.0 ^a	29.3±2.8 ^a	39.4±2.2 ^d	57.9±4.1 ^c	93.2±6.5 ^a	90.7±7.1 ^a	56.5±6.2 ^b
Cholesterol (mg/dL)	103.9±6.2 ^{cd}	93.4±5.4 ^a	102.5±7.9 ^{cd}	97.6±8.0 ^{de}	94.7±5.2 ^{bc}	122.8±8.5 ^a	112.5±9.6 ^b	112.9±9.4 ^b	93.9±9.6 ^{de}
LDL-Cholesterol (mg/dL)	36.9±2.6 ^d	35.7±3.0 ^d	42.1±2.8 ^c	38.0±1.9 ^d	37.8±3.0 ^d	44.3±2.8 ^{bc}	46.5±2.6 ^b	52.4±2.7 ^a	34.5±3.2 ^{bc}

1)Values are mean±SE of 8 rats per each group. values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Duncan's multiple range test.

중성지방의 저해 효과는 민들레(DAD), 노루궁뎅이버섯(NRM), 머루(WG), 황기(HWG), 동충하초(DCHC), 과피(KAP)에서 상당히 좋은 효과를 나타내었으며, cholesterol 저해 효과는

민들레(DAD), 머루(WG), 황기(HWG), 과피(KAP)에서 나은 효과를 보였다.

Table 3. Effect of natural extracts on body weight gain, food intake, and food efficiency in high cholesterol diet fed rats

	control	DAD	NRM	WG	HWG	DCHC	Green tea	WGS	KAP
Initial Body weight (g)	119.9 ±4.5 ^{a1)}	123.3 ±4.8 ^a	120.2 ±5.9 ^a	121.2 ±4.7 ^a	123.4 ±5.6 ^a	122.4 ±4.5 ^a	120.4 ±3.8 ^a	121.6 ±3.6 ^a	120.4 ±3.9 ^a
Final Body weight (g)	266.7 ±12.3 ^b	239.0 ±16.5 ^d	253.2 ±18.3 ^{bcd}	250.6 ±16.4 ^{cd}	255.7 ±11.4 ^{bc}	288.9 ±12.8 ^a	283.7 ±13.1 ^a	297.6 ±10.0 ^a	256.3 ±12.1 ^a
Weight gain(g)	146.9 ±17.2 ^b	109.7 ±13.6 ^d	132.6 ±15.1 ^c	128.8 ±17.7 ^c	131.8 ±11.2 ^c	166.5 ±12.5 ^a	163.4 ±13.0 ^a	176.1 ±10.8 ^a	135.9 ±13.4 ^a
Intake (g)	658.7 ±77.2 ^b	506.3 ±62.5 ^d	576.4 ±65.8 ^c	562.3 ±77.2 ^{cd}	572.8 ±48.6 ^c	690.8 ±52.0 ^{ab}	682.4 ±54.3 ^{ab}	733.2 ±45.2 ^a	715.1 ±57.6 ^a _b
FER ²⁾	0.23 ±0.04 ^a	0.22 ±0.05 ^a	0.23 ±0.04 ^a	0.23 ±0.04 ^a	0.23 ±0.03 ^a	0.24 ±0.02 ^a	0.24 ±0.02 ^a	0.24 ±0.03 ^a	0.20 ±0.03 ^a
Liver weight (g)	8.7 ±0.9 ^a	9.0 ±0.9 ^a	9.4 ±0.8 ^a	8.8 ±0.7 ^a	8.7 ±1.0 ^a	9.4 ±0.8 ^a	9.2 ±0.5 ^a	9.3 ±0.7 ^a	9.6 ±0.7 ^a

1) Values are mean±SE of 8 rats per each group. values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Duncan's multiple range test.

2) Feed efficiency ratio(FER) of each experimental group calculated by dividing total body weight increase by the total feed intake for the period

체중 감소 효과는 민들레(DAD), 노루궁뎅이버섯(NRM), 머루(WG), 황기(HWG), 과피(KAP)에서 좋은 효과가 나타났다.

Table 4. Various effects and ranking of each natural product

순위 효과	1	2	3	4	5	6	7
FRAP	WGS	Greentea	KEW	KAP	DAD	DOL	JCW
Anti-angiogenesis	JCW	KAP	DAD	KEW	DCHC	BRAS	
Moisture	KAP	AGA	JCW	P.rhizoma	DOL	WGS	DCHC
Tyrosine	Greentea	WGS	P.rhizoma	NRM	KEW	DOL	
Atrophy(1)	HWG	WG	WGS	Greentea	DAD		
(ear)	Greentea	WGS	HWG	WG	DAD		
Immunity	Greentea	HWG	DAD	DCHC	DOL		
Toxicity	KAP	KEW	DCHC	DAD	HWG	BRAS	
UV-recovery	Greentea	AGA	WGS	HWG	DCHC	WG	
UV-blocking	Greentea	HWG	BRAS	WGS	KAP	NRM	
Obesity	WG	KAP	DAD	Greentea	DOL	NRM	
Anti-differentiate	WG	DAD	Greentea	DOL	KAP	NRM	

순위 효과	1	2	3	4	5	6	7
Anti-coagulating	DOL	KEW	WGS	Greentea	HWG		
Testosterone	KAP	JCW	HWG	DOL			
Anti-cell adhesion	KAP	WG	DAD				
AST[GOT]	HWG	DCHC	WGS	KAP	Greentea	DAD	WG
ALT[GPT]	DAD	WGS	KAP	WG	HWG	DCHC	NRM
LDH	KAP	Greentea	DAD	WG	HWG	DCHC	WGS
Glucose	KAP	DCHC					
Triglyceride	NRM	WG	DAD	HWG	KAP	DCHC	
Cholesterol	DAD	KAP	HWG	WG	NRM		
LDL-Ch	KAP	DAD					
Anti-Weight gain	DAD	WG	HWG	NRM	KAP		

여러 가지의 기능성 실험에서 효과가 있는 천연산물을 나열하면 Table 5와 같으며, 이 들의 결과로부터 조합에 의하여 목적에 맞는 제품의 개발이 유용할 것으로 판단된다.

하. 재제별 개발 가능 천연산물

1) Functional wellbeing TEA

WGS, Greentea, JCW, KAP, HWG, WG,DAD,DOL,DCHC
(DAD+HWG+Greentea+DCHC+KAP+DOL)

2) Wellbeing Skin Care

KAP, Greentea, WGS, HWG, DAD, AGA,DOL, KEW
(HWG+Greentea+DAD+KAP+WGS)

3) Wellbeing Fermentative ALC

KAP, DOL, Greentea, HWG, DAD,DCHC, WGS, JCW
(DCHC+DAD+HWG+KAP+DOL)

제 2절 Wellbeing 기능성차의 개발

1. 선별된 원료(DAD, HWG, Greentea, DCHC, KAP, DOL 및 WGS)로부터 배합 재료의 결정 및 masking 기법의 연구

가. 원료의 분쇄 방법의 연구

천연산물	사용부위	특성	처리
DAD	전초	있는 분쇄가 잘되나 줄기는 분쇄가 잘 되지 않음	masking 후, 고온처리 한 후 파쇄, 분쇄 또는 액상응용 방향
HWG	주피를 벗긴 뿌리	목질부가 많고, 당을 많이 함유하기 때문에 분쇄가 잘 되지 않고 분쇄기계에 무리가 많이 감	masking 후, 열풍건조 후 마쇄, 또는 액상응용 방향
Greentea	잎	분쇄가 잘 됨	분쇄
DCHC	균사, 자실체	의이인에 균사를 배양하여 열풍건조, 동결건조 한 후 분쇄하며 비교적 분쇄가 잘됨	동결건조 : 분쇄 열풍건조 : 분쇄
KAP	과피	과피이며 매우 두텁고 습기가 많고, 스펀지 형태이며 파쇄하기가 아주 어려움	masking 후, 고온 열풍건조 하여 분쇄 또는 액상응용 방향
DOL	줄기, 잎	일부분은 분쇄가 녹차 같이 잘 되나 줄기 부분은 어려움	열풍건조후 분쇄
WGS	씨앗	씨앗은 분쇄가 쉬워 사용용이함	분쇄후 볶아서 사용함

나. 원료의 masking 기법의 연구

DAD, DOL, HWG 및 KAP를 천연물 중에서 향을 나타내는 감초, 계지, 계피 및 곽향에 침지시키고 타지 않게 볶아서 각 천연산물의 쓴맛, 떫은 맛 등을 소거하고, 판넬들에게 맛을 보게한 후 최대 10점 최소 0점을 주게 하여 각 천연산물이 어떠한 masking이 좋은 역할을 하는지를 찾았다.

그 결과 DAD는 감초(DADGC)에, DOL은 계피(DOLGP)에, HWG는 계피(HWGGP)에, 그리고 KAP는 계피(KAPGP)의 추출물에 침지시켜 볶은 것이 맛이 나은 것으로 나타났다(Fig. 1).

다. 배합방법 및 배합비에 관한 연구

1) 먼저 5가지의 masking 한 시료들의 배합비를 제조하여 맛 시험을 하였다.

천연산물 배합비(명칭)	DADGC	DOLGP	HWGGP	WGS	KAPGP
A	1	1	1	1	1
B	2	1	1	1	1
C	2	2	1	1	1
D	2	2	2	2	1
E	1	2	1	1	1
F	1	1	2	1	1
G	1	1	1	1	2

배합 비율별로 관별의 맛시험에서 D의 DAD : DOL : HWG : WGS : KAP = 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 0.5의 비율이 맛이 가장 나은 것으로 나타났다(Fig. 2).

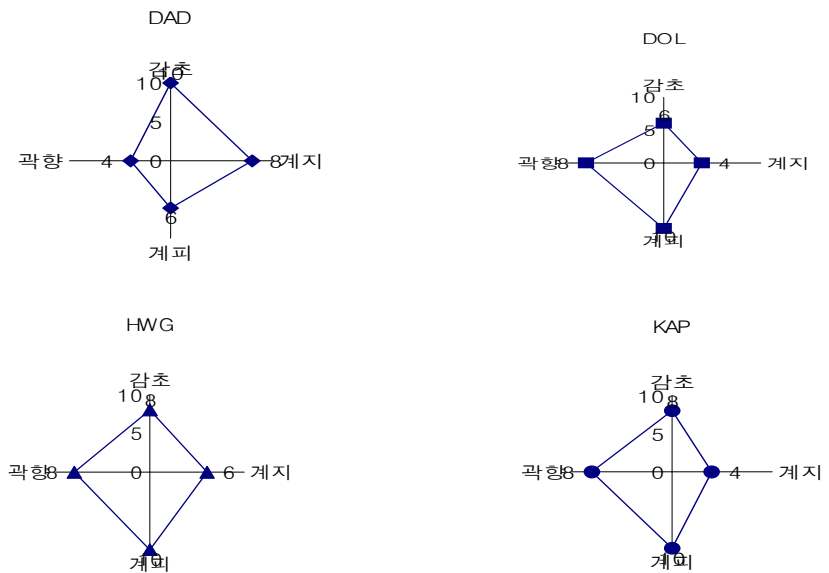


Fig. 18. Developme of masking method for natural products with various natural flavor.

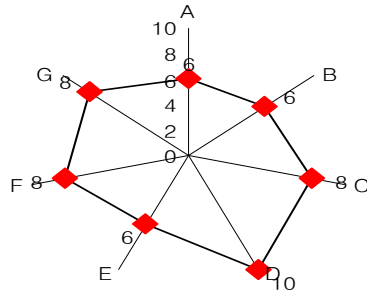


Fig. 19. Various combination ratio for comfort taste functional tea.

2) 이 비율에 녹차를 비율별로 넣어서 맛의 시험을 하였다.

천연산물 배합비(명칭)	DADGC	DOLGP	HWGGP	WGS	KAPGP	GreenTe a
A	1	1	1	1	0.5	0.5
B						1.0
C						1.5
D						2.0

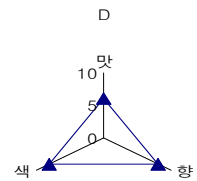
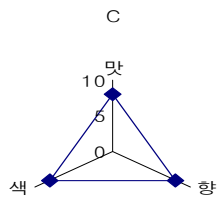
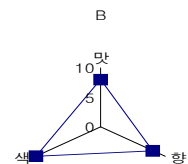
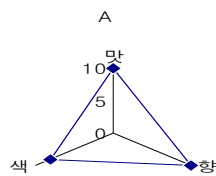


Fig. 20. Various combination ratio of greentea for comfort taste functional tea.

- A의 배합은 민들레향이 나타나지 않았다.
- B의 배합은 맛이 쓰지 않고 민들레향을 보유하는 것으로 나타났다.
- C의 배합은 녹차의 향이 강하여 뚝은 맛을 나타내었고 독특한 향이 없었다.
- D의 배합은 강한 녹차맛과 뚝은 맛을 나타내었다.

따라서 최적의 배합은 DADGC : DOLGP : HWGGP : WGS : KAPGP : GreenTea = 1 : 1 : 1 : 1 : 0.5 : 1.0으로 하였다.

3) 동충하초의 첨가 : 동충하초(DCHC)의 균사체와 자실체를 배양하여 동결건조와 열풍건조의 두가지를 제조하고 이들을 볶아서 준비한 시료등 4가지를 준비하여 ②에서 결정된 비율에 첨가하여 시험하였다. 차의 맛을 증가 시키기 위하여 다른 성분보다 배합을 많게 하였다.

- a. 상기의 A 배합 + 열풍건조한 동충하초
- b. 상기의 A 배합 + 동결건조한 동충하초
- c. 상기의 A 배합 + 열풍건조한 동충하초를 볶은 것
- d. 상기의 A 배합 + 동결건조한 동충하초를 볶은 것

천연산물 배합비(명칭)	DADGC	DOLGP	HWGGP	WGS	KAPGP	Green Tea	DCHC
a	1	1	1	1	0.5	1.0	5(열풍건조)
b							5(동결건조)
c							5(열풍건조, 볶음)
d							5(동결건조, 볶음)

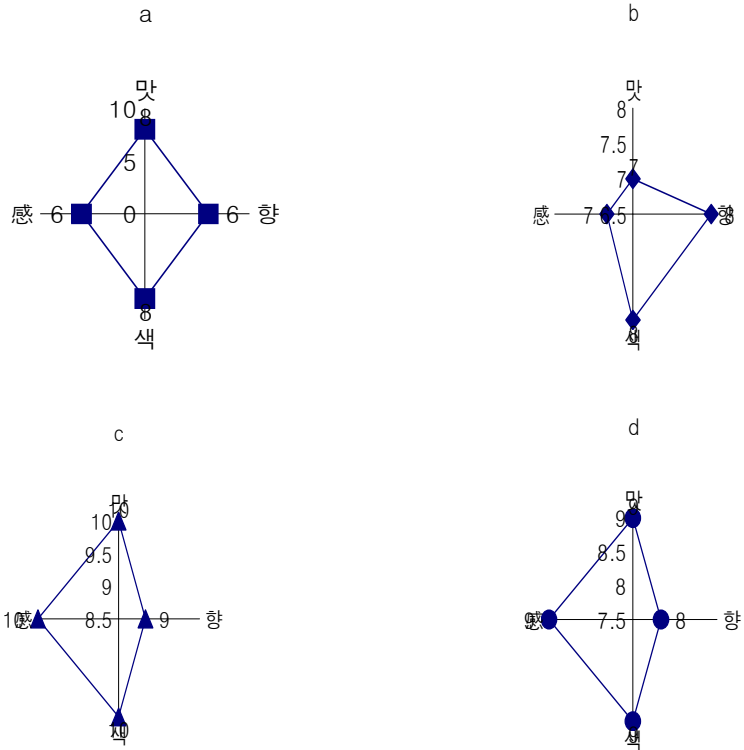


Fig. 21. Various combination ratio of DCHC for comfort taste functional tea.

- 동결 건조한 동충하초는 자체의 향으로서 좋은 향을 나타내었으나 다른 배합원료와 혼합하였을 경우에 독특한 향을 나타내지 못하였다.

- 열풍건조의 동충하초는 향을 나타내지 못하였으나 제조과정이 동결건조보다 시간과 에너지가 적게들어가는 장점이 있다.

- 동결건조의 동충하초는 볶을 시 아주 잘 타버려 탄화의 냄새가 많이 났다.

- 열풍건조의 동충하초는 볶는 시간에 따라 다양한 향을 나타내었다.

따라서 전반적으로는 먼저 결정된 배합을 기반으로 열풍건조한 동충하초의 볶는 것(c)을 첨가하였을 때 아주 좋은 결과를 보였다.

4) KAPGP의 배합비의 조정 : KAP는 세포실험에서 steroidgenesis가 타의 성분에 비교하여 4

배이상 강하게 나타나 성분의 조정이 필요하였다.

천연산물 배합비(명칭)	DADGC	DOLGP	HWGGP	WGS	KAPGP	Green Tea	DCHC
a	1	1	1	1	0.5	1.0	5
b	1	1	1	1	1.5	1.0	5
c	1	1	1	1	3.0	1.0	5
d	1	1	1	1	5.0	1.0	5

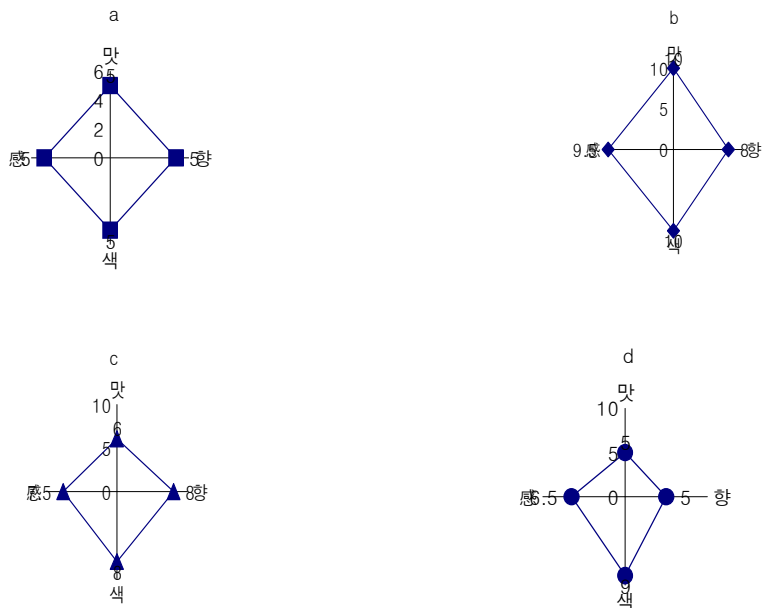


Fig. 22. Various combination ratio of KAP for comfort taste functional tea.

- a의 배합은 과피가 적게 들어가서 색과 맛이 아주 약하여 그 첨가의 의미가 없었다.
 - b의 배합은 색과 향, 그리고 맛이 좋게 나타났다.
 - c 및 d의 경우에는 과피가 많아 색이 둔탁하고 맛이 탁하였으며 너무 향이 강하여 다른 성분의 첨가 의미가 없었다.
- 따라서 KAP는 타의 성분과 비교할 때 1.5배의 경우가 좋은 것으로 나타났다.

5) DAD의 배합비 조정 : 민들레의 다양한 특성의 조정과 맛의 조절 등으로 배합의 조정이 필요하다.

천연산물 배합비(명칭)	DADGC	DOLGP	HWGGP	WGS	KAPGP	Green Tea	DCHC
a	1	1	1	1	1.5	1.0	5
b	2	1	1	1	1.5	1.0	5
c	3	1	1	1	1.5	1.0	5
d	4	1	1	1	1.5	1.0	5

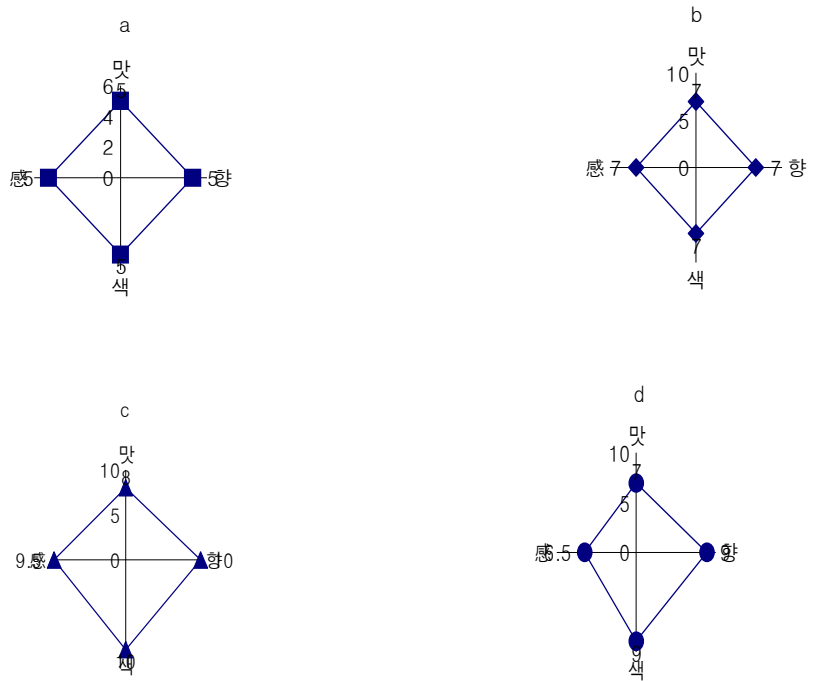


Fig. 23. Various combination ratio of DAD for comfort taste functional tea.

- a의 배합의 경우 민들레의 향이 존재하지 않고 색도 특징이 없는 것으로 나타났다.
- b의 경우에 a 보다는 나으나 낮이나 향이 미치지 못하였다.
- c의 배합의 경우에는 민들레의 맛과 향이 살아났고 색도 좋은 편이었다.
- d의 배합의 경우에는 너무 쓴 맛을 나타내어 색도 검은색이어서 그다지 좋은 편은 아니었다.

따라서 민들레의 혼합량은 다른 성분에 비교하여 3.0으로 하였다.

6) 최종 맛의 조율 : KAP, DOL, DAD 및 HWG의 성분의 중요함에 비추어 맛을 다시 한번 조율할 필요가 있어 그 배합비를 조정하였다. 각 성분은 비율별로 조정하고 물을 400 mL을 첨가하여 우려낸 차를 시험에 사용하였다.

천연산물 배합비(명칭)	Green Tea	DADGC	DCHC	HWGGP	DOLGP	WGS	KAPGP
a	1	2	3	3	1	1	2
b	1	2	5	2	1	1	1
c	1	2	1.5	2	1	1	1.5
d	1	3	1.5	2	1	1	1.5

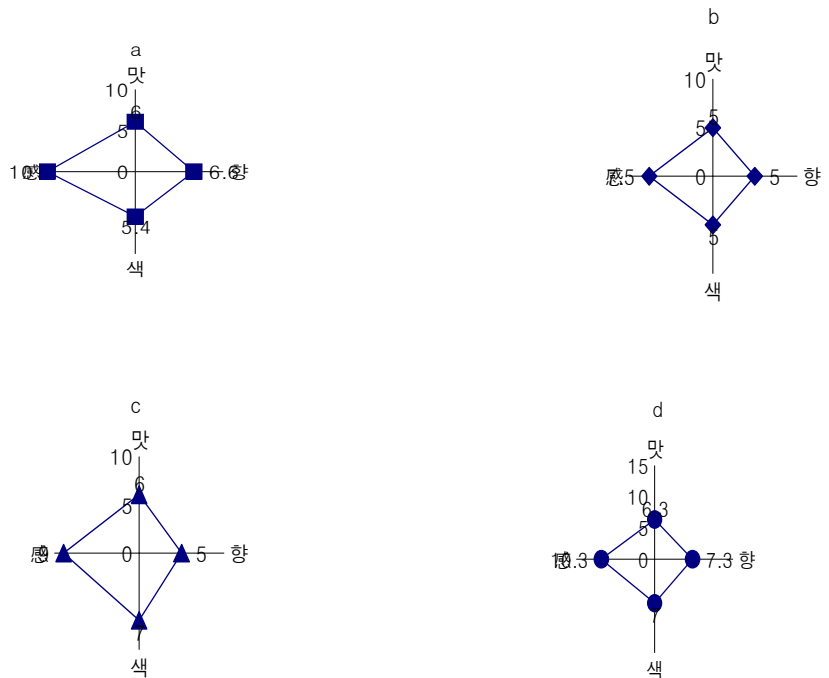


Fig. 24. Final adjustment of combination ratio for comfort taste functional tea.

- 전반적으로 성분들의 고른 향과 맛을 나타내고 색도 온화한 경우를 나타내는 (d)의 배합을 택하기로 하였다.

라. 散制 방법의 연구

기능성 차의 제조방법은 masking 한 후 재료를 분쇄하여 tea pack하여 열수로 추출하는 방법이 일반적인 방법이다. 또 한 천연산물을 적당한 배합비로 배합한 위 열수 추출하여 부형제를 넣어 과립으로 만드는 방법이 있다. 이것은 한방 과립제를 만들 때 사용하는 방법이다. 이 방법은 섭취할 때 물과 같이 먹어야 하는 불편한 방법이다. 다음은 비스킷 제제를 바탕으로 향과 맛을 더하여 물없어도 먹을 수 있는 상쾌한 제제를 제조하는 방법이다. 그리고 초콜릿 형태로도 개발이 가능할 것으로 본다.

2. 추출물(배합물)의 기능성 시험

최종 배합비를 완성(위의 (d) 배합)하고, 이를 각 g으로 취하고 400mL의 물을 넣어 추출한 액을 사용하여 기능성을 시험하였다.

가. 항산화력 측정 (FRAP 법)

철 반응물인 TPTZ(2,4,6-tri(2-[pyridyl])-s-triazine)에 산화물질 Ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)와 Acetate buffer와 증류수를 혼합하여 FRAP solution을 제조한 후 항산화물질을 첨가하고 FRAP solution이 violet 색으로 변하는 정도를 철이 가장 잘 흡수되는 593 nm에서 측정하였다. FRAP 용액을 조성에 따라 제조한 후 eppendorf tube에 각각 1mL 씩을 분주하고 여기에 30uL의 시료를 넣고 상온에서 40분간 반응 시킨 후 593 nm에서 측정하였다. 시료는 0.5%를 사용하였으며, positive control로써 EGCG는 최종 농도가 10uM이 되도록 하였다.

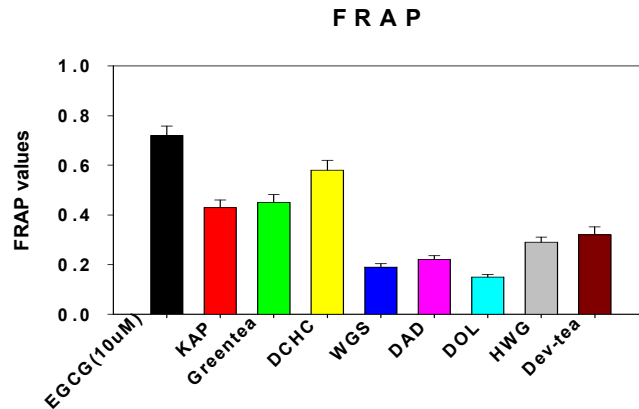


Fig. 25. Antioxidative capacity of new-developed tea(Dev-tea) and its components, EGCG as a positive control.

개발한 차의 항산화력(Dev-tea)은 0.5%의 황기 추출물과 비슷한 항산화력을 나타내었다(Fig. 25).

나. Anti-angiogenesis 효과

24 well culture plate에 250 μ l/well의 matrigel 로 coating 한 후 고체화를 위하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하고 EBM-2배지 1.5ml을 넣고, 배양한 HUVECs를 trypsin-EDTA를 사용하여 well로부터 분리한 다음 coating 된 matrigel plate 당 20,000 cells/well 이 되도록 재 현탁 시킨 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분간 배양하였다. 이후 배양액에서 200 μ l를 덜어내고 천연산물의 추출액을 투여하여 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂환경에서 4시간동안 배양한 후, 형성된 tube 망의 길이는 현미경하에서 well을 불규칙적으로 5 분야로 나누어 디지털 카메라 (Nikon,Coolpix)로 촬영하여 그 영상으로부터 생성된 tube의 길이를 NIH image 프로그램으로 분석하였다.

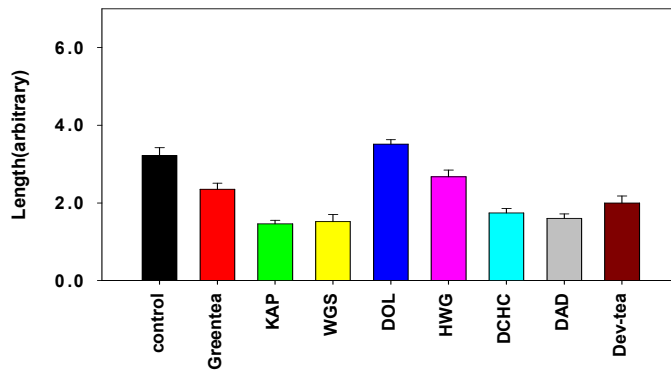


Fig. 26. Antiangiogenesis effect of new-developed tea(Dev-tea) and its components.

- 개발차(Dev-tea)의 신생혈관 억제 효과는 민들레와 동충하초의 5% 추출물과 비슷하게 나타났다(Fig. 26).

다. in vivo test ⑨

이것을 CAM(chorioallantoic membrane) assay를 행한 결과는 다음과 같다.

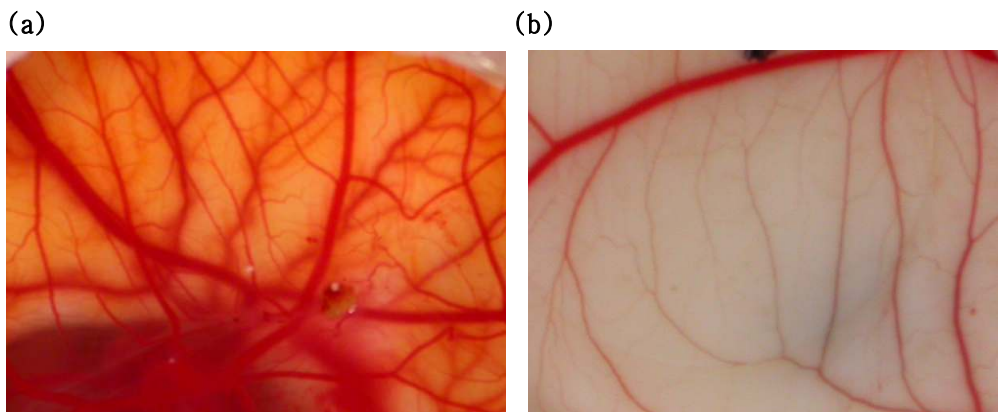


Fig. 27. Anti-angiogenesis effect of control (a) and developed tea (b) with CAM(chorioallantoic membrane) assay

Fig. 27에서 control 은 혈관의 형성이 아주 많이 일어난 것을 볼 수 있고, 개발차는 신생혈관의 형성이 형저히 줄어든 것을 볼 수 있다. 따라서 개발차의 성분은 항암 및 항비만에 좋은 효과가 있을 것으로 판단된다.

라. 면역 향상 실험

T cell을 5×10^5 cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900ul 씩 첨가하여 24시간 배양하고 시료를 100 μ l 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하여 haematocytometer를 사용하여 세포수를 세어 대조군과 비교하였다. 녹차(green tea), 황기(HWG), 동충하초(DCHC), 민들레(DAD)의 효과와 비슷하거나 나은 것으로 나타났다.(Fig. 28)

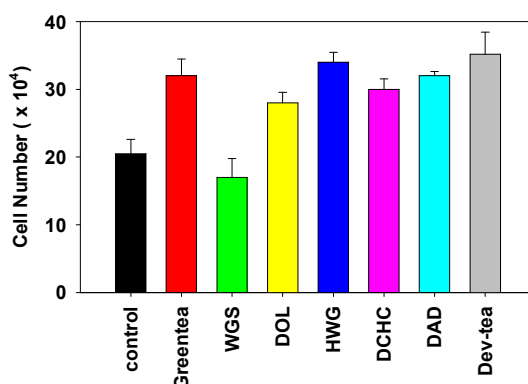


Fig. 28. Growth promoting effect of T-cell with new-developed tea(Dev-tea) and its components.

마. Toxicity 시험

과산화수소(H_2O_2)로 유도된 세포독성에 대한 조성물의 독성억제 효과를 시험한다. 과산화수소는 세포내에서 free radical을 생성하여 세포에 치명상을 입히므로 첨가하는 조성물이 제어할 수 있는가를 다음과 같이 실험한다. 마우스 유래 섬유아세포(fibroblast, NIH/3T3)을 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지에 배양하여 24 well에

2x10⁵ 되게 1mL로 분주하고 24시간 배양한 후 배지중의 과산화수소의 최종농도가 50uM이되게 첨가한다. 동시에 조성물의 최종농도가 0.05%가 되도록 가하고 24시간 배양후에 haematocytometer를 사용하여 세포수를 세어 대조군과 비교하였다.

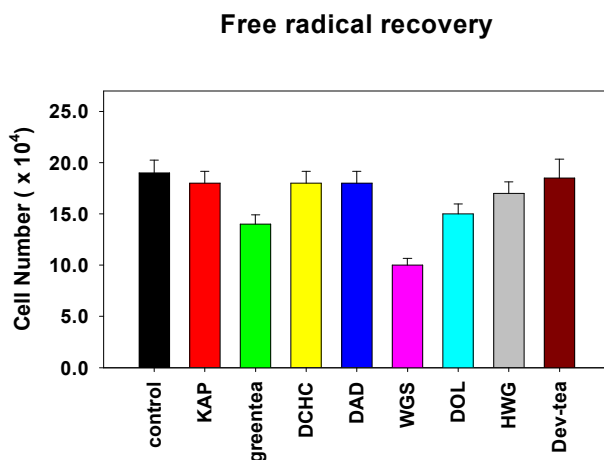


Fig. 29. Recovery function of new-developed tea(Dev-tea) and its components exposed with free radical(H₂O₂) on NIH/3T3.

- 개발한 차의 세포독성 억제효과는 동충하초(DCHC) 및 민들레(DAD) 보다 세포독성 저지효과가 나은 것으로 나타났다(Fig. 29).

바. Obesity 시험

Sprague-Dawley rat 5마리를 2 주일간 고지방 식이를 투여한 후 개발한 차와 고지방 식이를 다시 2주간 투여하였을 때 체중의 감소를 보았다(Fig. 30).

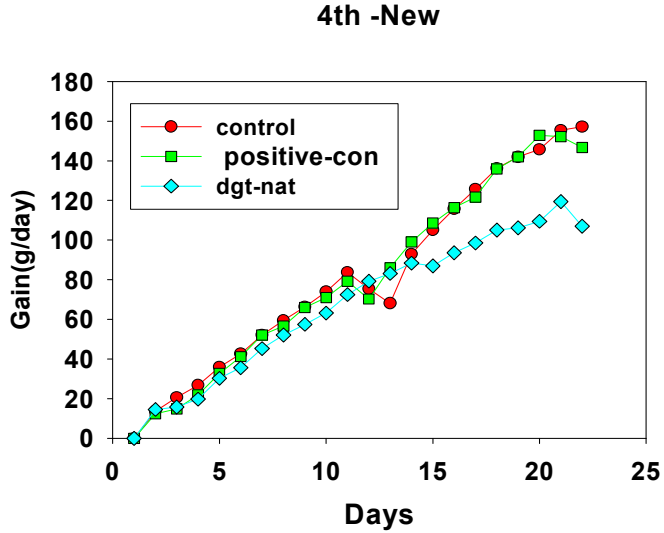


Fig. 30. Anti-obesity effect of new-developed tea(Dev-tea) with S.G-rat after culturing 15 days.

사. 혈액 시험

Sprague-Dawley rat 5마리를 7일간 고지방 식이를 시킨 후 각 sample 별로 생리식염수, silymaline, 개발차등을 15일간 매일 투여하고 마지막 날 식이를 투여하고 30분 뒤에 D-galctosamine(GalN. 400mg/kg)을 복강 주사하고, GalN 투여후 24시간후에 동물을 처치하였으며 처치전 8시간동안은 물만 섭취케 하였으며, silymarine은 100mg/kg으로 투여하였다. 혈액으로 GOT, GPT, Cholesterol, Glc, Triglyceride 등을 정량하였다.

항목	AST(U/L)	ALT(U/L)	Choestero	Glucose	LDH	Triglyceride	HDL
Sample	GOT	GPT	l(mg/dL)	(mg/dL)	(U/L)	(mg/dL)	Cholesterol
A	169.0	34.6	138.7	214.7	1765.0	100.7	49.3
B	324.3	86.8	103.0	165.5	1198.8	137.0	29.0
C	359.0	71.3	78.0	154.8	1456.3	93.25	25.5
D	217.5	38.3	105.0	180.0	1195.0	61.5	36.0

A : 생리식염수를 투여하였고 GalN은 처리하지 않음.

B : Positive control로써 silymarine(100mg/kg)을 투여하고 GalN을 처리.

C : 생리식염수를 투여하고 GalN을 처리함

D : 개발차를 투여하고 GalN을 처리함

- GOT 및 GPT는 GalN을 처리한 그룹에서 개발차가 GOT 및 GPT를 현저히 저하시키는 것을 볼 수 있었으며 GPT는 GalN을 처리하지 않았던 control 그룹과 비슷한 수준으로 회복된 것을 볼 수 있다. Cholesterol 수치는 silymarine의 positive control과 비슷한 수준으로 저하시키는 것을 볼 수 있으며, LDH 수치도 control 보다 낮으며 positive control과 비슷한 것으로 볼 때 개발된 차는 간의 기능향상에 큰 도움을 주는 것을 볼 수 있고, 특히 Triglyceride는 아주 현저히 줄어드는 것으로 나타나 체중이 감소하는 것이 지방인 triglyceride의 감소에 기인하는 것으로 보여 항 비만제로서도 그 가능성을 보였다.

아. testosterone 효과

K-28(Leydig cell)을 KAP의 추출물로써 배양하였을 때 남성호르몬을 유도하는 효과가 탁월하여 쥐의 생식기를 해부하여 생리식염수, 개발차의 주성분인 KAP의 동결건조물을 0.0005%, 0.025%, 0.05%의 용액에 1분간 침지하고 그 차이를 electric caliper로 측정하였다(Fig. 31, Fig. 32).

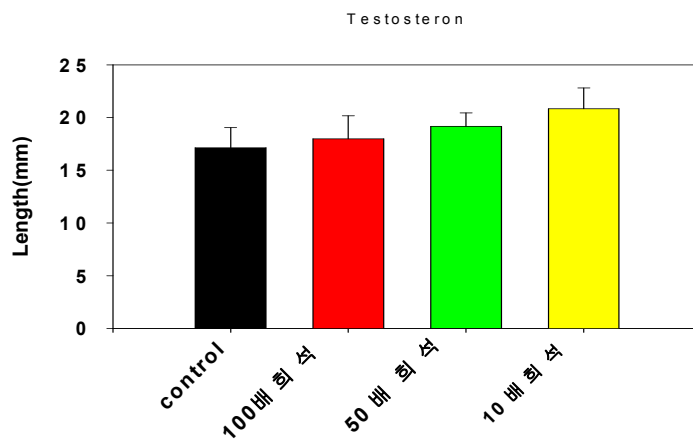


Fig. 31. Rat penis expansion effect with KAP which is composition of new-developed tea.

Rat	control	100배 희석액 (0.0005%)	50배희석액 (0.025%)	10배 희석액 (0.05%)
1				
2				
3				
4				

Fig. 32. Expanded Rat penis measured with electric caliper treated with KAP which is composition of new-developed tea.

- control보다는 생식기의 팽창효과가 있는 것으로 판단되어 좀더욱 세세한 연구가 필요할 것으로 본다.

자. 항혈전 효과

식품의약품안전청 독성연구소의 혈전용해제의 효능검색 프로토콜을 따라 실험하였다. 0.5% fibrinogen/thrombin plate위에 시료를 점적하고 형성되는 clear zone을 37℃에서 17시간 반응시킨 후 fibrin이 용해된 면적을 측정하여 IZD values로 나타내었다(fig. 33).

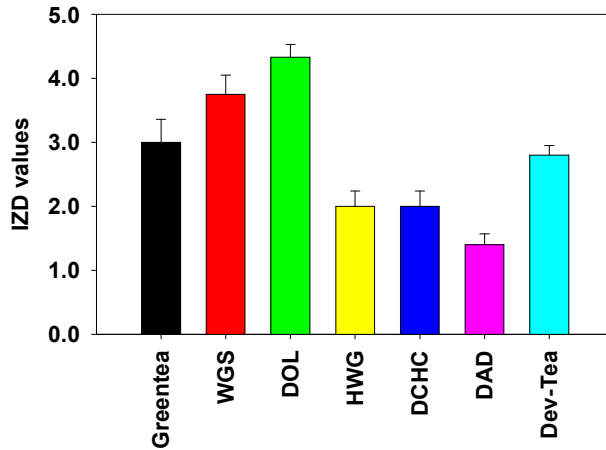


Fig. 33. Anti-clotting effect of new developed tea and its components.

- 개발차의 항혈전효과는 녹차 정도의 효과를 나타내어 간기능 향상효과와 더불어 좋은 기능을 나타내었다.

3. 제제의 형태

가. encapsulation type.

1) Zein 0.5g을 90%의 EtOH 50 ml에 녹인 후 30분간 반응 시킨 후 기능성차 50 ml을 넣어 반응시킨다.

2) Limonene 10 ml에 lecittin 1g을 넣어 반응 시킨다

3) 1)을 2)에 천천히 점적하면서 반응시킨다.

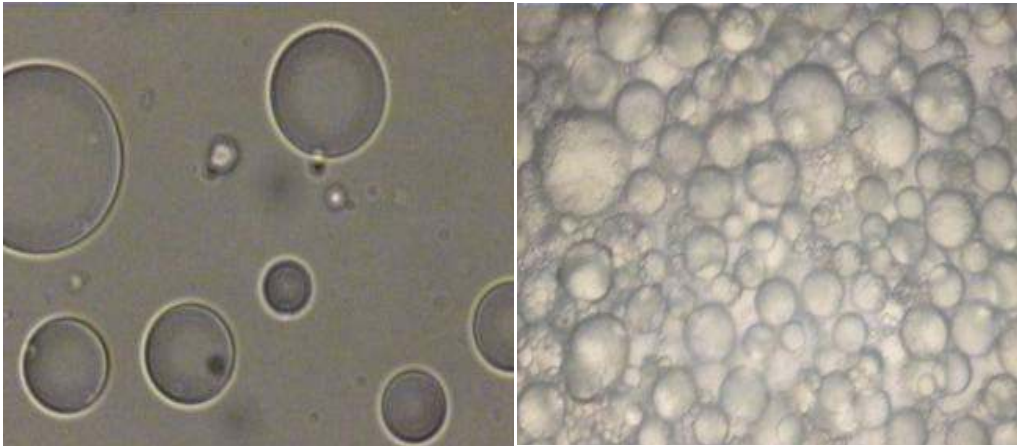


Fig. 34. Microencapsulation type of functional tea.

나. 과립형

- 1) 녹차 : 민들레 : 동충하초 : 황기 : 돌외 : 과피: 머루씨앗 = 1 : 3: 1.5 : 2: 1: 1.5 : 1
비율로서 약탕기에서 달인다.
- 2) 유당 400g에 기능성 차 100 ml을 넣어 흡수시킨다.
- 3) 과립화 한다.

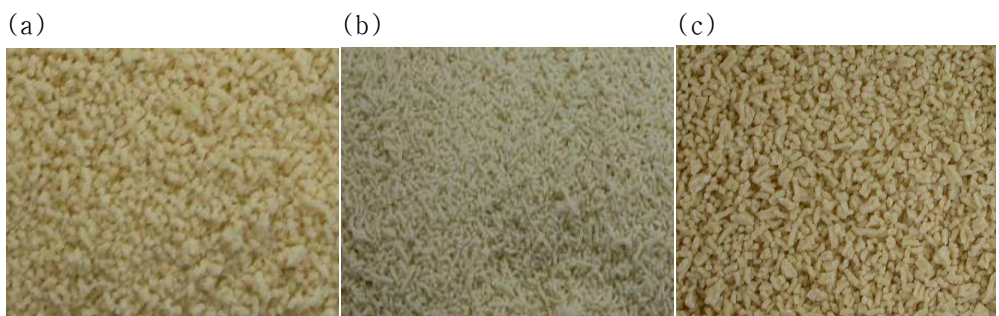


Fig. 35. Granule type with concentration of functional tea

제 3절 Wellbeing 기능성 화장품의 개발

선별된 원료(HWG, Greentea, DAD, KAP 및 WGS)로부터 배합재료의 결정 및 기능성 조성물 연구

1. 미백 효과 향상을 위한 배합구성












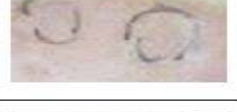


천연산물	control	도포후
DDW		
218		
448		
control		
333		
443		
DAD		
221		
396		
HWG		
224		
399		
WGS		
225		
460		
AGA		
228		
353		
SSGE		
231		
355		

Fig. 36. Whitening effect of each natural product(1) with each natural product using dehaired SD-rat of the abdominal region.

Sprague-Dawley의 측면의 털을 제모하고 난 후 천연산물을 표식부위에 도포하고 24시간 후에 사진을 촬영하였다.










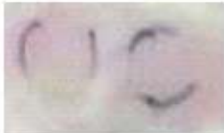




천연산물	control	도포후
SSGEH 234 468		
SSGW 256 427		
GT 242 485		
GSE 240 479		
HGG 259 430		
CHIL 264 502		
SUK 274 515		

Fig. 37. Whitening effect of each natural product(2) with each natural product using dehaired SD-rat of the abdominal region.

- 이 실험에서 황기(HWG), 머루씨앗(WGS), 쌀겨에탄올 추출물(SSGE), 쌀겨물추출물(SSGW),

녹차씨앗(GSE) 및 황금(HGG)에서 효과가 뚜렷하였으며 이중에서도 쌀겨물추출물(SSGW) 및 녹차씨앗 추출물(GSE)는 현저한 효과를 보여 활용가능성을 보였다(Fig. 36, Fig 37).

- SSGW 및 GSE를 혼합하여 본 결과는 다음과 같다.

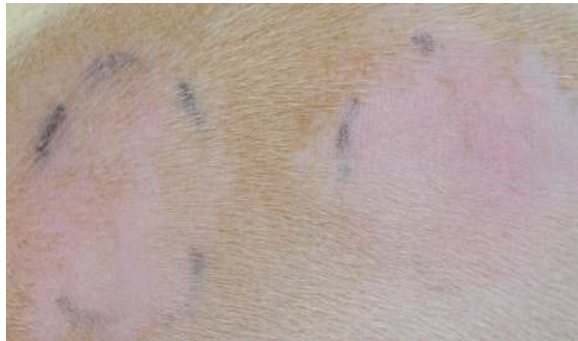


Fig. 38. Whitening effect of each GSE+SSGW using dehaired SD-rat of the abdominal region.

2. UV-blocking에 관한 배합구성

Nude mouse에 UVB(280-320 nm)를 2시간 씩 2시간 간격으로 2번 쪼이고 피부가 거칠고 벗겨지는등 손상을 입힌다음 천연산물을 도포하고 24시간 후에 피부의 상태를 촬영하였다.

- 처리한 sample 모두 UV 처리후 피부가 회복되는데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 사용한 천연산물 모두 피부가 원상대로 회복되는 것을 볼 수 있었다. DAD, HWG, AGA, GSE 및 DCHC에서 좋은 효과를 보였다.

3. 혼합을 위한 essential oil 배합 및 W/O, O/W 제제 배합

가. 제제의 배합을 위하여 각 천연산물 추출 동결건조물의 용해 정도를 검토하였다.

Natural Product	Water sol	Organic sol	비고
GT	×	○	
WGS	△	○	
HWG	○	△	
DAD	○	△	
AGA	○	×	
JCW	×	○	
CJJ	○	×	
NRM	○	×	
DCHC	○	×	
HANS	○	×	
GEOJ	×	○	
CHIL	×	○	
SUK	○	×	
HGG	○	×	
GSE	○	×	

(○ : soluble, △ : nearly soluble, × : non-soluble)

민들레(DAD), 황기(HWG), 아가리쿠스(AGA), 녹차(GT), 동충하초(DCHC), 녹차씨앗추출물(GSE) 등이 UV-손상된 피부를 회복시키는데 중요한 제제가 될 수 있음을 보였다(Fig. 39).

나. 기초제제의 제조

Phase	Ingredient	INCI Designation	Wt%
A	Deionized Water	Water	62.80
A	Carbopol 980 (2% Soln)	Carbomer	20.00
A	Disodium EDTA	Disodium EDTA	0.10
A	Propylene Glycol	Propylene Glycol	2.00
B	Promulgen D	Cetearyl Alcohol (and) Cetareth-20	2.00
B	Emollient Mix (see grid below)	Various Products	10.00
B	Arlacel 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	1.50
C	Triethanolamine 99% to pH 6.5-7.0	Triethanolamine	0.60
D	Germaben II	Propylene Glycol (and) Diazolidinyl Urea (and) Methylparaben (and) Propylparaben	1.00
	Total		100.00

Blending Procedure

1. Heat phase A to 70°C.
2. Heat phase B to 70°C.
3. Add phase B to phase A.
4. Add phase C. Cool to 50°C and add phase D.

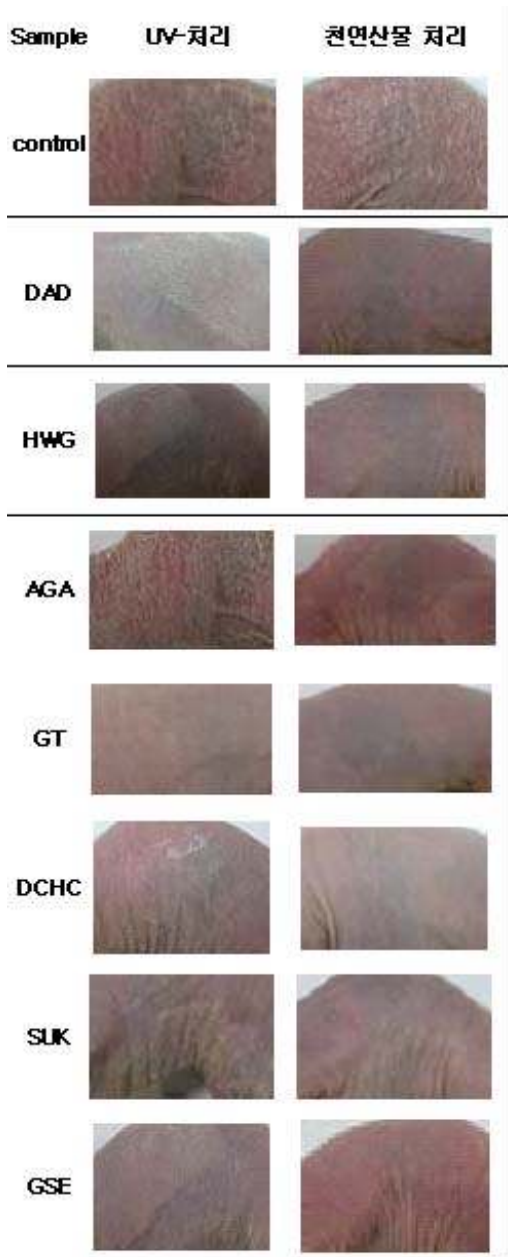


Fig. 39. Recovery effect of each natural product from nude-mouse destructed skin with UVB.

- 수용성 성분은 A의 phase(W - phase)에 넣어 용해시키고, 지용성 성분은 B phase(O-phase)에 녹인다음 두 phase를 섞어서 제조한다.

사용용도에 따라 W- 및 O- phase를 조절하고 점도를 측정하여 용도에 맞는 액상으로 조절한다.

4. 보습 효과

plate에 1.5% agar가 든 한천배지를 만들어 동일량을 넣은 후 무게를 재고, 그 위에 gelatin을 이용해 3번 이상 코팅한 후, 특정 제조 화장품 1ml씩을 첨가하고 도말하여 37°C, 18hr 경과 후 무게를 달아 그 줄어든 비율로써 보습효과를 측정하였다.

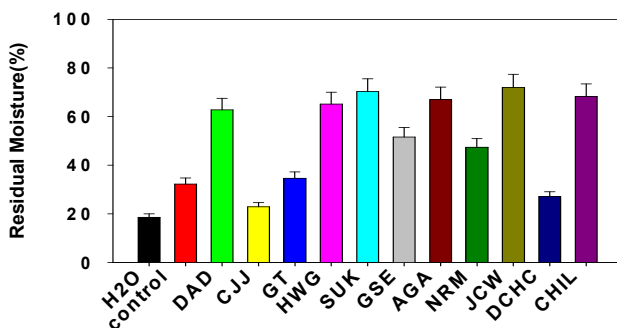


Fig. 40. Moisturing effects of natural products.

- 민들레(DAD), 황기(HWG), 석이(SUK), 아가리쿠스(AGA), 장춘화(JCW) 및 칠엽담(CHIL)등의 성분이 보습을 유지하는 효과가 높은 것으로 나타났다(Fig. 40).

5. atophy 효과

compound 48/80이 가려움을 유도하는 물질이며 이 물질을 목 뒤의 가슴에서 등부위에 제모를하고 0.5%의 compound48/80을 피부에 도포하고 시간당 얼마나 뒷다리가 등을 긁는가하는 실험을 행하였다. 24시간 후에 compound 48/80과 시료를 1:1로 혼합한 것을 같은 자리에 도포하여 1시간동안 긁는 횟수를 횟수를 비교하였다. compound48/80을 바른 후의 긁는 회수를 100으로 보았을 때 시료와 compound를 혼합하였을때 긁는 횟수로 환산하여 나타내었다.

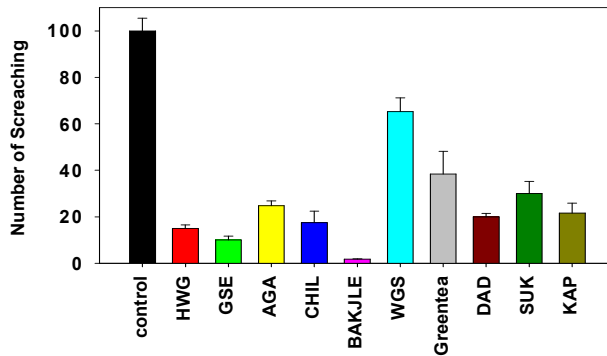


Fig. 41. Anti-atophy effects of natural products.

아토피를 억제하는 천연산물로서는 박주가리(BAKJLE), 녹차씨앗(GSE), 황기(HWG), 민들레(DAD), 아가리쿠스(AGA), 칠엽담(CHIL), 석이(SUK)등이 좋은 효과를 보였다(Fig. 41).

6. 기능성물질의 배합에 의한 UV-손상 피부의 회복

한가지 성분에 의한 피부 손상 및 atopy 제제를 복합성분에 의하여 더욱 더 그 효과를 실험해 보았다. 각각의 성분을 혼합하여 20가지의 처방을 만들고 이에 따른 atopy 실험과 UV손상피부의 회복에 대하여 살펴보았다.

- 1) GSSGW : 녹차+쌀겨
- 2) GSSGWHG : 녹차+쌀겨 + 황기
- 3) GSBA : 녹차 + 박주가리
- 4) GSBAHW : 녹차 + 박주가리 + 황기
- 5) GSSGWBA : 녹차 + 쌀겨 + 박주가리
- 6) GSSGWBAHW : 녹차 + 쌀겨 + 박주가리 + 황기
- 7) GSSGDADCHW : 녹차 + 민들레 + 동충하초 +쌀겨 + 황기
- 8) GSHW : 녹차 +황기
- 9) GSHWGG : 녹차 +황기 + 황금
- 10) GSHWGGBA : 녹차 +황기 + 황금 +박주가리
- 11) GSDAHWGG : 녹차 +민들레 + 황기 + 황금
- 12) GSDADCHW : 녹차 +민들레 + 황기 +동충하초
- 13) GSDASSG : 녹차 +민들레 + 쌀겨
- 14) GSSEHWDA : 녹차 +쌀겨 +황기 + 민들레

- 15) GSSBADAHW : 녹차 +박주가리 + 민들레 +황기
- 16) GSSGWDABA : 녹차 +민들레 + 쌀겨 + 박주가리
- 17) GSSGWDABAHW : 녹차 +민들레 + 쌀겨 + 박주가리 + 황기
- 18) GSHWDA : 녹차 +황기 +민들레
- 19) GSHWDAHGG : 녹차 +황기 +민들레 + 황금
- 20) GSDAHGGBA : 녹차 +민들레 +황금 + 박주가리

가. atopy 효능

Nude mouse에 compound 48/80을 처리한 후 20가지의 처방을 도포하고 긁는 횟수를 측정하였을 때 그 결과는 다음과 같이 나타났다.

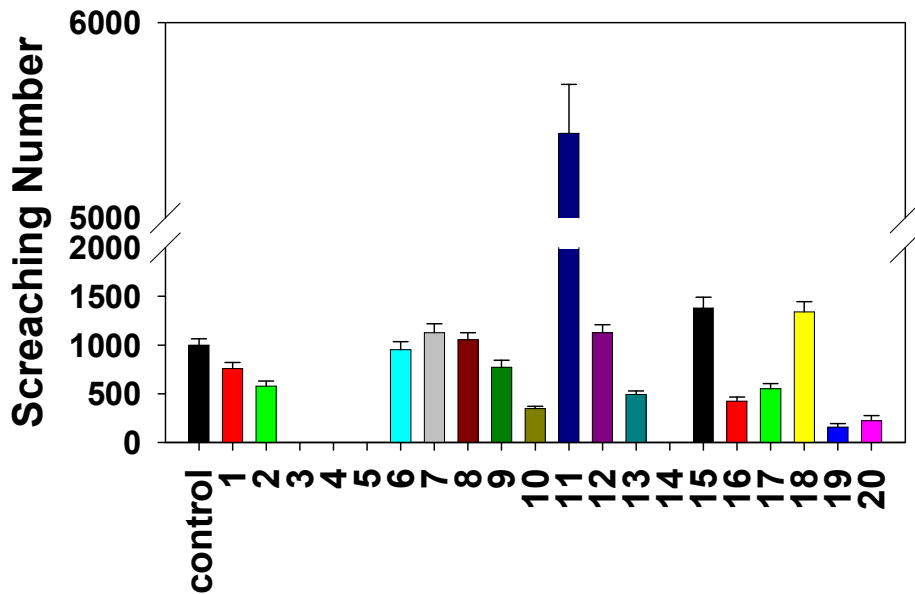


Fig. 42. Anti-atopy effects of combined natural products.

control을 1000으로 하였을 때 각 시료의 효능을 보면, 3,4,5,14번의 시료는 거의 완벽하게 atopy를 제어하였으며, 19, 20, 10, 13 및 2번의 시료도 좋은 효과를 나타내었다(Fig. 42).

나. UV 손상피부의 회복



UV 처리하지 않은 피부

UV 처리한 피부(1)

UV 처리한 피부(2)

treatment after 1 day

treatment after 2 day



treatment after 3 day

treatment after 4 day

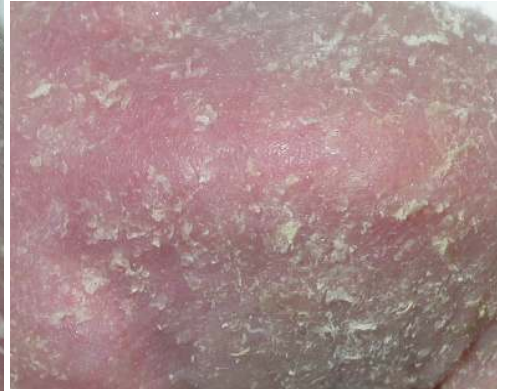


Fig. 43. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.1(GSSGW) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



treatment after 4 day



Fig. 43. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.2 (GSSGWHG) prescription.



Fig. 44. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.3 (GSBA) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



treatment after 4 day



Fig. 45. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.4 (GSBAHW) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day

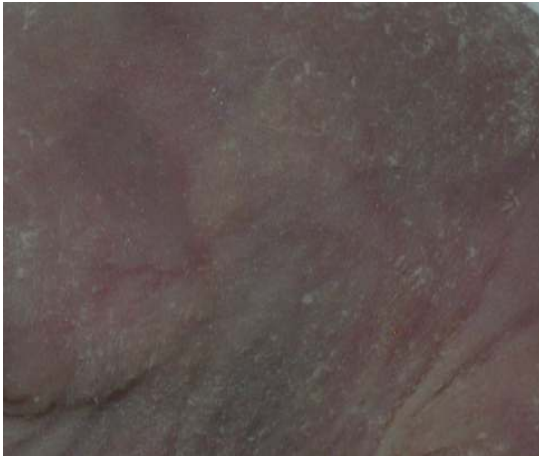


treatment after 4 day



Fig. 46. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.5 (GSSGWBA) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



treatment after 4 day



Fig. 47. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.6 (GSSGWBAHW) prescription.

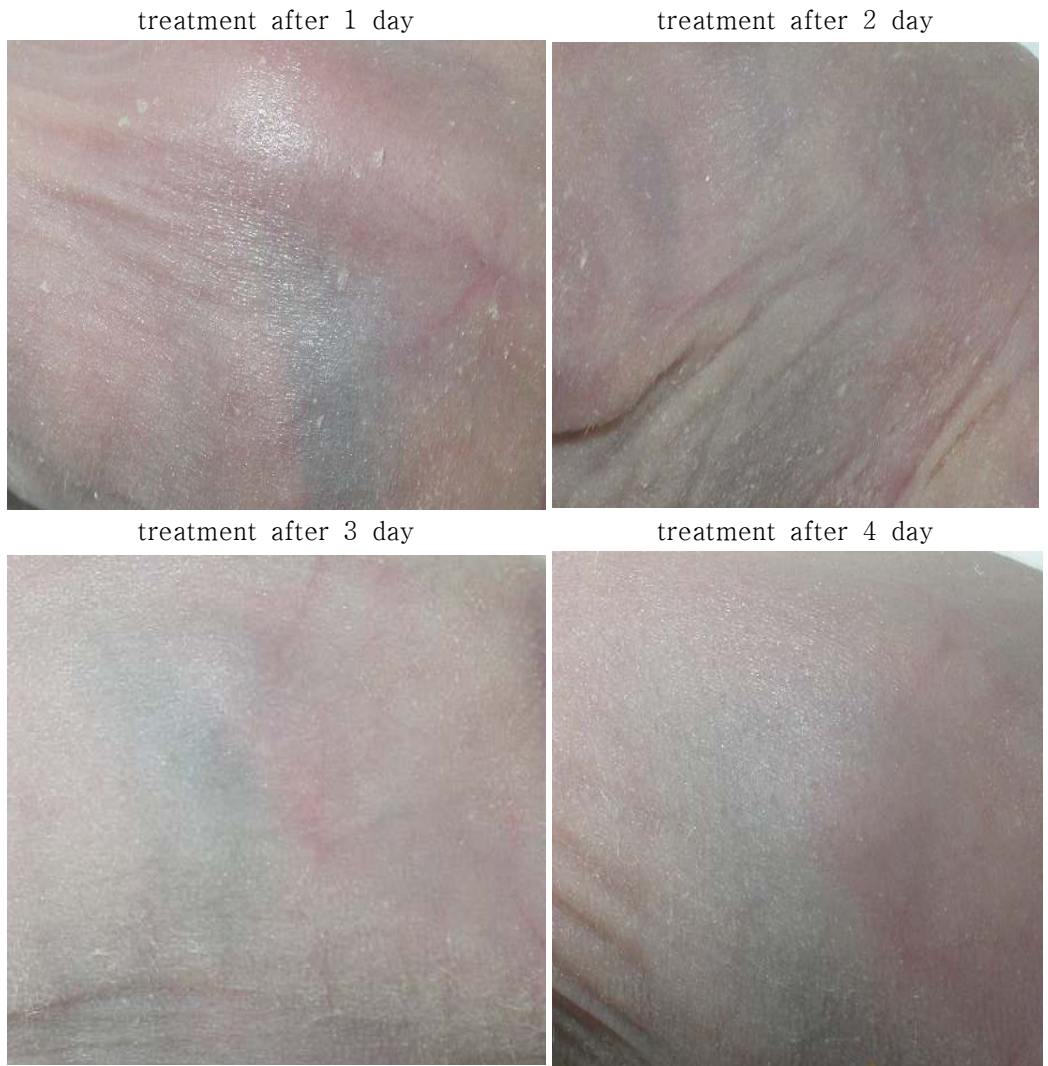


Fig. 48. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.7 (GSSGWDADCHW) prescription.



Fig. 49. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.8 (GSHW) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



treatment after 4 day



Fig. 50. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.9 (GSHWGG) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day

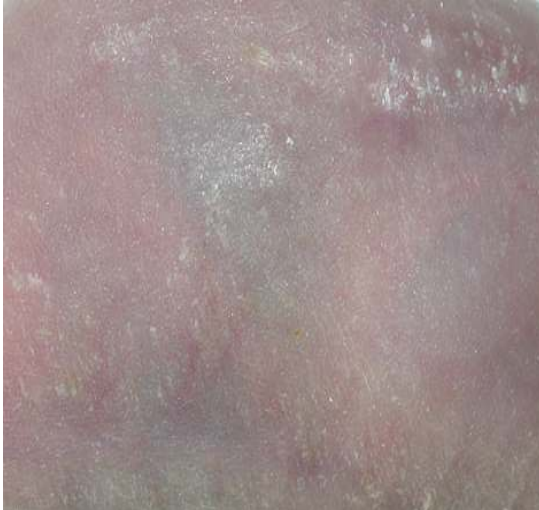


treatment after 4 day



Fig. 51. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.10 (GSHWGGBA) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



treatment after 4 day



Fig. 52. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.11 (GSDAHWGG) prescription.

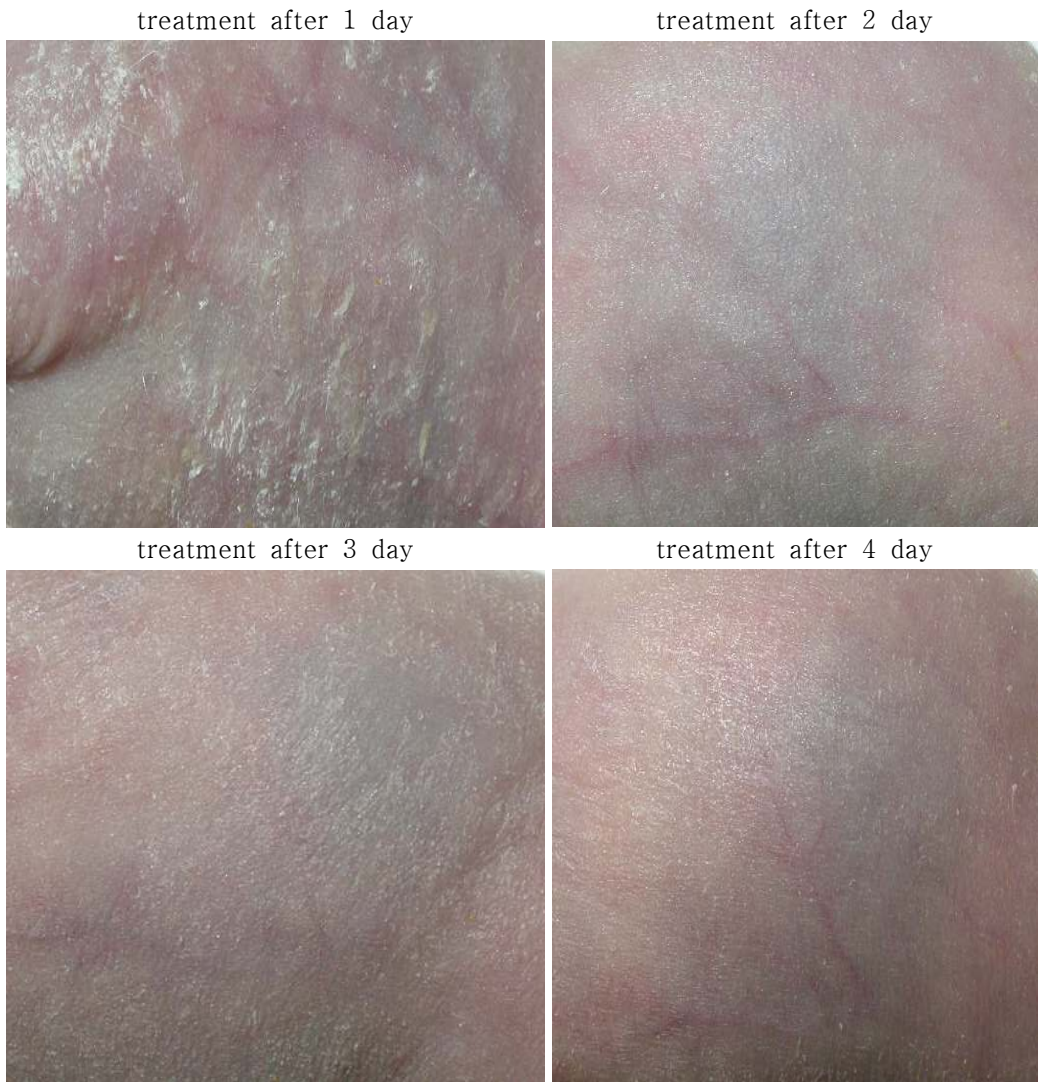
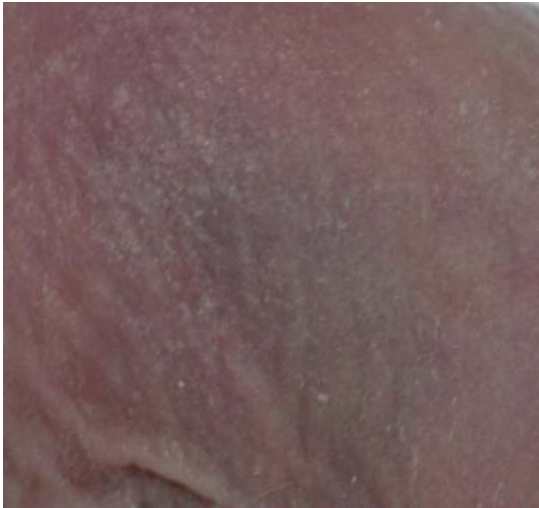


Fig. 53. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.12 (GSDADCHW) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day

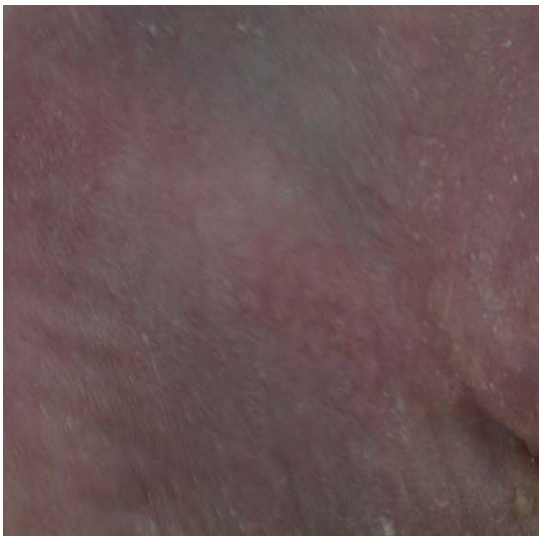
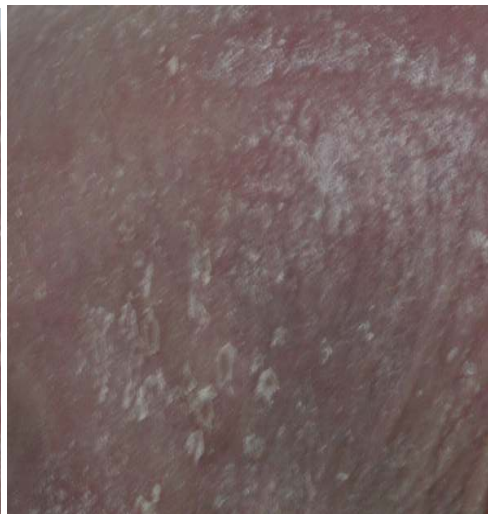


Fig. 54. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.13 (GSDASSG) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



Fig. 55. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.14 (GSSEWHWDA) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day

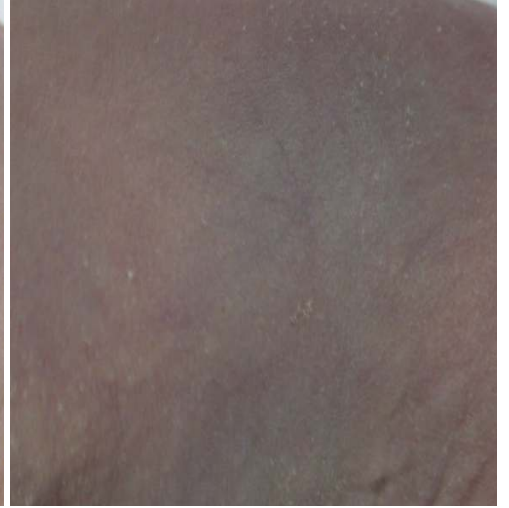


Fig. 56. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.15 (GSSBADAHW) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



Fig. 57. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.16 (GSSGWDABA) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day

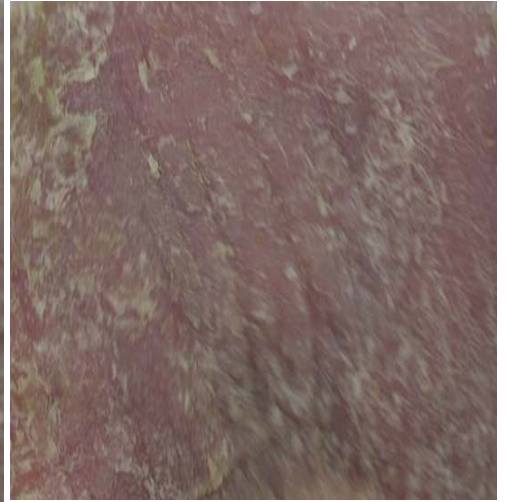


Fig. 58. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.17 (GSSGWDABAHW) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day

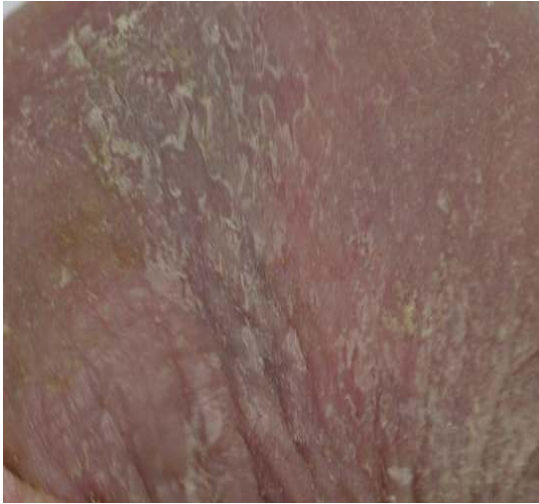


treatment after 3 day



Fig. 59. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.18 (GSHWDA) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



Fig. 60. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.19 (GSHWDAHGG) prescription.

treatment after 1 day



treatment after 2 day



treatment after 3 day



Fig. 61. Recovery effect from UV-damaged skin with combination of No.20 (GSDAHGGBA) prescription.

다. CAM assay

또한, 구성성분의 자극성의 여부를 판단하기 위하여 CAM assay를 행하여 그 정도를 살펴 보았다.

계란의 수정란을 배양하고 창문을 낸다음 시료를 첨가하고 30분 지난 후에 다시 촬영하여 혈관이 자극을 받아 굵어지거나 출혈이 있거나할 경우에는 자극성이 있는 것으로 판단가능하다. 아토피 및 UV 손상회복에 탁월한 효과를 보인 5 종류의 시료에 대하여 CAM assay를 응용한 자극성의 정도를 살펴본 결과 이 시료들에 대해서는 자극성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 62).

7. Skin care를 위한 최적의 조합구성

각 기능성의 분야에서 가장 좋은 효과를 보인 천연산물은 다음과 같다.

- 1) 보습효과 : 민들레, 황기, 아가리쿠스
- 2) 미백효과 : 쌀겨 + 녹차씨앗
- 3) 항-Atopy 효과 : 녹차씨앗 + 민들레 + 쌀겨 + 박주가리 + 황기
- 4) UV 손상 회복효과 : 녹차씨앗 + 민들레 + 쌀겨 + 박주가리 + 황기

이상의 결과로써 skin care에 가장 적합한 조합구성은

“녹차씨앗 + 민들레 + 쌀겨 + 박주가리 + 황기”로 구성하였다.

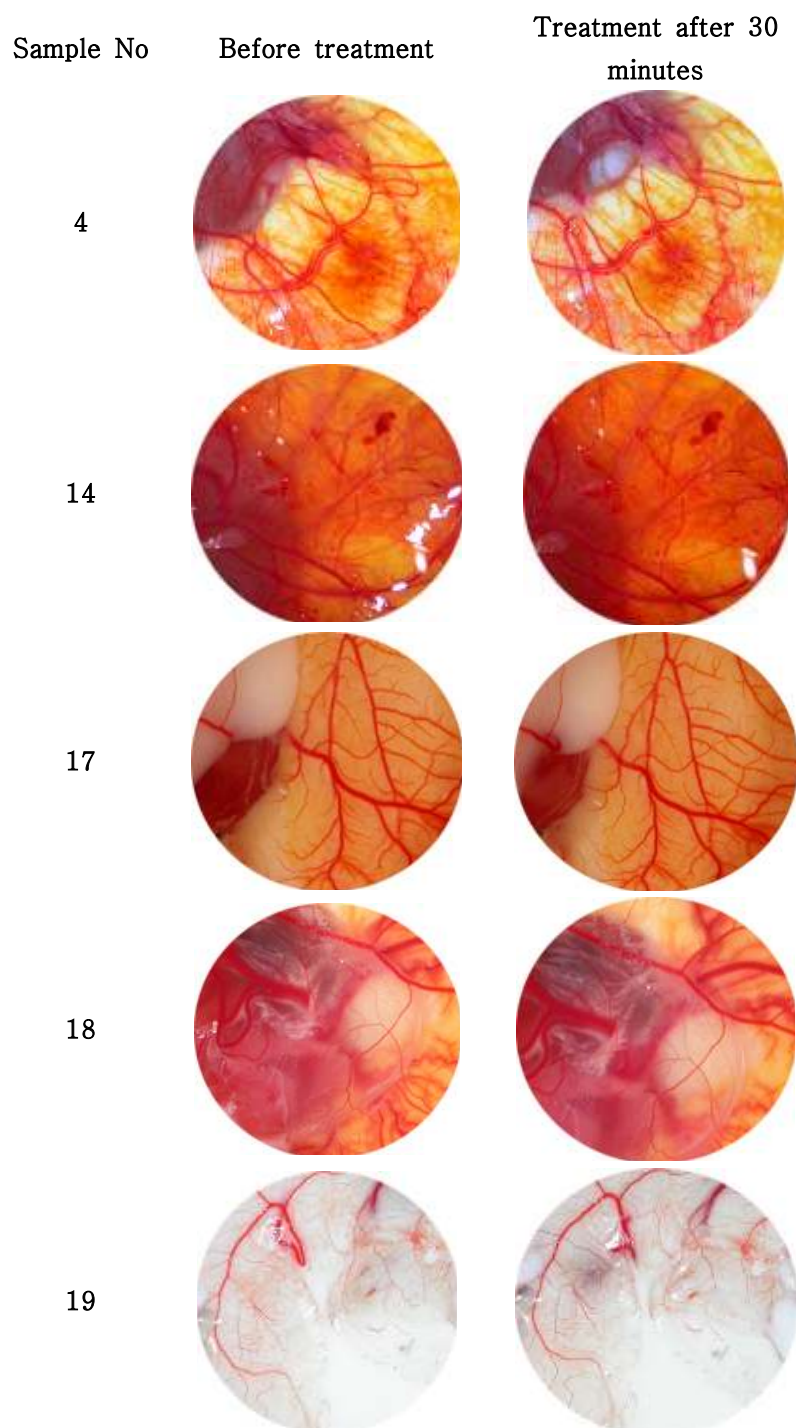


Fig. 62. Skin stimulation test of developed skin care products with CAM assay.

제 4절 Wellbeing 발효주의 개발

선별된 원료(DCHC, DAD,HWG,KAP,DOL,WGS 및 NRM)로부터 배합재료의 결정 및 발효 조건 연구

1. 생체 기능향상을 위한 원료의 배합

가. 예비 담금(06.04.22)

잡쌀	누룩	효모	물	증류주	DCHC	DAD	WGS	HWG	WG	DOL	KAP	GT	비고
10kg	1kg	10g	10L	최종 30%	5.7Kg	250g	120g	350g	400g	250g	150g	80g	

- 담금 3일째에 특별한 향이 없었다. 동충하초의 향이 다른 천연산물에 의하여 상쇄되었다.
- 잡쌀을 너무 많이 사용하여 향과 색에 이상이 생겼다.
- 단맛이 나지 않았다. 누룩의 기능 저하, 천연산물이 해당을 억제하는 것 같음
- 주정을 첨가하고 20일 동안 밀봉하여 발효시켰다.
- 60일 후에 세작차 80g을 첨가하였더니 모든 향이 사라져 녹차의 넣는 시기가 중요함을 느낌
- 천연산물의 배합 조정이 중요한 포인트임을 느낌

나. 1차 담금(06.06.27)

제 1 세부과제에서 확인된 다양한 기능성을 이용하여 발효주를 제조하기 위하여 재료별 배합을 구성하였다.

No	잡쌀	누룩	효모	물	증류주	DCHC	DAD	WGS	HWG	DOL	KAP	GT	비고
1		150g	10.7g	7.5L	최종 30%	1.5	50	10	35	10	10	5	
2		150g	11.0g	7.5L	최종 30%	1.5	100	50	50	10	50	1	
3		150g	11.5g	7.5L	최종 30%	1.5	200	100	50	20	30	-	
4		150g	11.0	7.5L	최종 30%	1.5	100	50	100	20	20	1	
5		150g	12.0	7.5L	최종 30%	1.5	100	50	50	20	10	2	
6	2.7kg	200g	1.7g	7.5L	최종 30%	1.5	50	10	35	10	10	5	
7	2.0kg	150g	11.0g	7.5L	최종 30%	1.5	100	50	50	10	50	1	
8	1.3kg	100g	11.0g	7.5L	최종 30%	1.5	200	100	50	20	30	-	
9	1.3kg	100g	11.0g	7.5L	최종 30%	1.5	100	50	100	20	20	1	

10	2.7kg	200	12.0g	7.5L	최종 30%	1.5	100	50	50	20	10	2	
----	-------	-----	-------	------	-----------	-----	-----	----	----	----	----	---	--

- 누룩은 증미의 10%를 사용하였고, 증미를 사용하지 않은 담금은 의이인을 동충하초의 배지로 사용하였기 때문에 의이인을 원료로하여 10%의 누룩을 사용하였다.
- 5일간 발효시 발효가 진행되었고 증미가 수면위로 떠올라 증류주를 최종 농도가 30%가 되도록 첨가하고 밀봉하여 후발효를 시작하였음
- 10일 째에 3, 6, 10 번의 맛이 좋은 것 같았음
- 20일째에 여과하여 후숙성 시킴(6, 7번의 맛이 향상됨)
- 35일 째에 천연산물의 향이 나기 시작하며 10번의 맛이 향상됨
- 65일 째에 맛을 점검함

담금 번호	맛	향	색	비고
1	++	++	+++	쓴맛, 생취
2	+	++	++	쓴맛
3	++	++	++	
4	+++	+	+++	
5	+++	+	++	
6	+++++	+++++	+++++	부드러움
7	++++	++++	++++	맛이 강함
8	++++	+++	+++	맛이 강함
9	++++	++++	+++	맛이 강함
10	+++++	+++++	+++++	부드러움

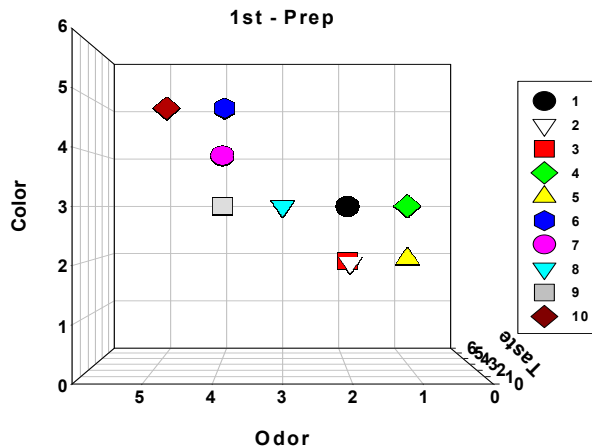


Fig. 63. Sensory test of various cominated components with color, order and taste.

- 70일 째 6,7,8,9,10번의 500mL에 녹차(곡우차)를 0.125%, 0.25%, 0.5%되게 첨가함
- 77일째 맛을 점검하였을 때 0.5%는 너무 강한 녹차 맛을 나타내었고, 0.125%는 너무 옅은 맛을 0.25%가 아주 좋은 맛을 나타냄. 특히 6, 10번의 담금주아 좋은 맛을 나타냄
- 이후 4℃에서 후숙시킴
- 255일째 성분 분석을 시작함

다. 2차 담금(2006.09.16)

1차담금을 바탕으로 맛이 좋은 것으로 나타났던 10번 담금주의 비율을 중심으로 비율을 변화시켜 담금을 하였다.

No	찹쌀	누룩	효모	물	증류주	DCHC	DAD	WGS	HWG	DOL	KAP	GT	비고
1	2.0kg	150g	30g	10L	최종 30%로 맞춤	1.0kg	50g	10g	35g	10g	10g		
2	2.0kg	150g	30g	10L	최종 30%로 맞춤	1.0	60	10	60	20	20		
3	2.0kg	150g	30g	10L	최종 30%로 맞춤	1.0	40	10	50	30	30		

- 찹쌀은 2Kg으로 한다. 처음 실험때 울무에 동충하초 균사를 배양한 그 자체로서 원료(전분)으로 하려고 하였으나, 찹쌀을 쓴 것보다 맛이 좋지않아서 찹쌀을 사용하기로 하였다.
- 그리고 동충하초 배양근 1kg을 합하여 원료량은 찹쌀과 함께 3kg으로 하기로 하였다.
- 첫 실험때 도화자씨(참여업체)의 배합으로 쌀을 기준으로 1/10의 누룩을 사용하였는데 누룩이 많이 들어가 좋지 않은 냄새가 났다. 그리고 배상면의 배합은 원료(쌀 1kg):누룩 20g, 효모 7g이었다. 또한 전문가인 이순모이사는 원료의 5%의 누룩과 5%의 효모를 사용하라고 권하여 최종 변경한 배합은 원료에 대하여 누룩 5%, 효모 1%로 하기로하였다.
- 전 실험에서 원료 3.5kg(쌀 2kg+동충하초 배양울무 1.5kg)에 효모 10g을 사용하였으나 적은 양으로 판단되어 효모의 양을 늘리기로 한다. 원료(3kg): 누룩(신곡-황국균:150g) : 효모(30g)으로 한다.
- 물은 전 실험에서 천연산물이 물을 흡수하기 때문에 10L로 하는 것이 적당한 것으로 판단되었다.
- 녹차는 후발효때 넣으며 0.25%가 되도록 넣는다.

- 구연산을 넣어 pH 4.0 이하로 맞추어 발효한다.
- 3일째 주정을 첨가하여 30%로 맞춤
- 20일째 천연산물을 걸러내고 4℃에 후숙시킴(Stainless 담금조)
- 50일째 술덧을 여과하여 1000mL의 병에 넣고 계속 4℃에 후숙시킴, No1의 담금주가 좋은 맛을 나타내었다.
- 170일째 성분 분석 함

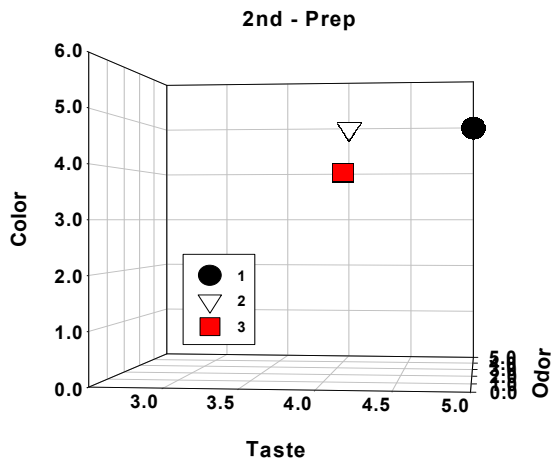


Fig. 64. Sensory test of various combined components with color, order and taste.

라. 3차 담금(2006.11.15)

No	참쌀	누룩	효모	물	증류주 최종	DCHC	DAD	WGS	HWG	DOL	KAP	GT	비고
1	2.0kg	150g	30g	10L	30%로 맞춤	1.0kg	50g	20g	50g	20g	30g		
2	2.0kg	150g	30g	10L	30%로 맞춤	1.0	50	40	30	30	50		

- 2차 담금을 바탕으로 2차담금의 1번 담금을 기준으로하여 천연산물의 기능을 향상시키기 위하여 DAD, WGS, HWG, DOL 및 KAP의 량을 변화시켜 배합하였다.
- 나머지 과정은 2차 담금에 준하였다.
- 7일째 천연산물을 제거하고 주정을 넣어 30%로 조절하였다.
- 21일째 여과하여 1000mL의 병에 넣고 4℃에 후숙성하였다.
- 90일째 관능 검사 및 성분 분석을 실시함

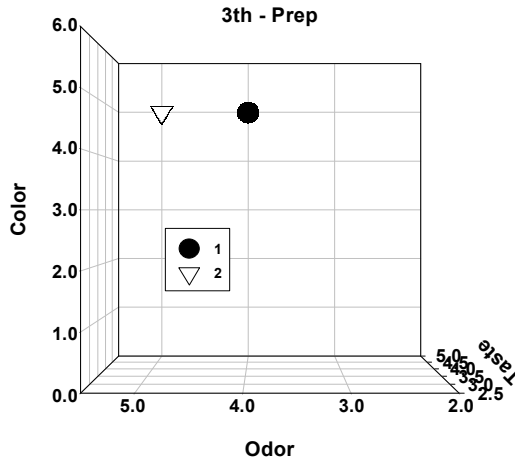


Fig. 65. Sensory test of final combination with color, order and taste.

- No2의 담금조가 No1의 담금조보다 좋은 결과를 나타내었다.

2. 보당제제의 연구

【생 약 명】 의이인(薏苡仁)

【라 틈 명】 Coicis Semen

【과 명】 Gramineae

【한 국 명】 염주

【효 능】 건비(健脾), 익위(益胃), 보폐(補肺), 청열(淸熱), 이습(利濕), 배농(排膿), 소종(消腫), 하기(下氣), 행수(行水), 거풍(祛風), 보폐청열(補肺淸熱), 건비(健脾), 익위(益胃), 삼습(滲濕)], 구복(久服): 경신(輕身), 익기(益氣)

【주치병증】 습비구련(濕痺拘攣), 폐옹(肺癰), 비허설사(脾虛泄瀉), 장옹(腸癰), 후옹(喉癰), 체수(涕垂), 소갈(消渴), 냉기(冷氣), 수사(水瀉), 수종(水腫), 각기(脚氣), 산기(疝氣), 용저불합(癰疽不合), 임탁(淋濁), 백대(白帶)

【화학성분】

- 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4(2H)-benzoxazin-3-one
- 2-Hydroxy-7-methoxy-1,4(2H)-benzoxazin-3-one
- 2-O-beta-D-Glucopyranosyl-7-methoxy-1,4(2H)-benzoxazin-3-one
- 2-{2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4(2H)benzoxazin-3(4H)-on}-beta-D-glucopyranoside
- 2-{2-Hydroxy-7-methoxy-1,4(2H)benzoxazin-3(4H)-on}-beta-D-glucopyranoside
- Adenosine

- Coixol
- Friedelin
- Rancinamycin IV
- Stigmasterol
- alpha-Tocopherol
- beta-Sitosterol

- 의이인은 다양한 성질과 성분을 가지고 있으며, 또한 전분을 가지는 씨앗으로써 쌀의 대용으로 발효를 할 수 있는 대상 물질이다. 의이인을 사용하여 동충하초의 균사를 받아시키고 자실체를 형성하게 하여 동충하초의 여러 가지 유용성분을 동시에 이용하고자 하였다.

3. 누룩의 제조 및 보리 소주의 제조

누룩은 술의 맛을 좌우하는 아주 중요한 당화 역할을 하는 것으로서 제조법에 따라 그 맛이 다를 수 있으나 최근 누룩에서 대장균이 발견되고 당화과정 중에서도 대장균이 성장함으로써 당화액에 좋지 못한 냄새를 부여하기 때문에 아주 예민한 부분이다. 따라서 이 과제에서의 누룩은 단일 황국균으로 제조된 신곡을 구하여 사용하기로 하였다. 또한 주정의 첨가로써 천연산물을 침출하는 과정에서도 중요한 역할을 하는 주정은 참여업체에서 만드는 보리소주로 사용하기로 하였다. 일반적으로 주정에는 술을 마신 후에 머리를 아프게하는 고가알콜이 들어 있는데 이 다가 알콜을 없애기 위해서는 양질의 원료로써 완전한 발효를 하고 이를 증류함으로써 다가알콜을 줄일 수 있고 보리를 사용함으로써 그 맛또한 증가 시킬 수 있으므로 보리조주를 사용하는 것이 좋은 제품을 만드는데 중요한 역할을 할 것으로 본다.

4. 기능성 시험

FRAP, Anti-angiogenesis, Immunity, Toxicity, Obesity, Antidifferentiate, Anti-coagulating, Testestron 및 Anticell adhesion의 실험은 제1세부과제에서 실행하였다.

5. 시제품의 제조

시제품을 제조하여 시험 분석 하였다.

6. 시제품의 성분 분석

가. 휘발성 물질 추출

시료 100mL을 분액깔때기에 넣고 10% NaCl 50mL과 혼합한 다음 혼합 추출용매 (pentane: diethyl ether=1:1, v/v) 50mL을 가하여 격렬하게 흔든 다음 10분 정지후 pasture pipette을 이용하여 3회 반복 추출하였다. 추출물은 혼합하고 질소 가스를 이용

하여 5mL로 농축한 다음 무수 Na_2SO_4 를 이용하여 물을 제거하였다. 다시 질소 가스를 이용하여 0.5mL로 농축하여 GC/MS의 시료로 사용하였다.

나. GC/MS분석 조건

술의 휘발성 추출물의 성분 확인을 위한 GC/MS조건은 Supelcowax-10 capillary column(50m x 0.25mm x 0.25 μm)을 이용하여 column 유속을 0.8ml/min, linear velocity는 21.6, column pressure를 46.9 kPa로 설정하고 oven 온도는 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 머무른 후, 220 $^{\circ}\text{C}$ 까지 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 승온하고 60분간 유지시켰다. MS 분석조건은 capillary direct interface 온도는 230 $^{\circ}\text{C}$; ion source 온도는 230 $^{\circ}\text{C}$; mass range는 35~350 a.m.u.; electron multiplier voltage는 1.00V 그리고 scan rate는 1/sec로 하였다

다. 분석 결과

처음 담근 시료 인 N07, No8, No9, No10, 그리고, No8 및 No10에 0.25%의 녹차를 가하여 발효시킨것과 No10을 더욱 향상시킨 S-No(2)와 이를 더 발전시킨 SS-No(2)시료의 공통적인 향기성분을 분석 성분을 분석하였다. 그리고 이 peak들의 특성을 규명하였다.

8종의 술에서 공통적으로 확인된 총 86성분으로 종류들은 다음과 같다. acid류 :8, aldehyde류: 3, alcohol류: 15, hydrocarbon류: 36, ketone류: 1, ester류: 15, 그 외 다른 화합물; 14종이 확인되었다. 술의 휘발성분으로 가장 많이 포함하고 있는 화학종은 hydrocarbon이었다. 그러나 일반적으로 hydrocarbon은 solvent 냄새를 내며 또는 무취로서 술의 향미에 크게 기여하지 않는다. aldehyde와 ketone류는 적게 확인된 성분으로 일반적으로 wine, whisky 등 발효주에서도 다른 성분들에 비해 적게 포함되어 있다고 발표되었다. alcohol은 역치가 높아 많은 양을 포함하지 않으면 향에 적게 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. 술의 향에 가장 많이 영향을 미치는 성분은 과일향, 달콤한 향 및 꽃향 등을 내는 ester류이다.

다음의 성분은 wine, 증류주 등에서 흔히 발견되며 좋은 영향을 주는 향기 성분을 보면 아래와 같다.

- 1) acetaldehyde: 사과향, 톳쓰는 향
- 2) ethyl formate: rum의 술에서 향미 성분
- 3) ethyl acetate: 파인애플 향
- 4) 3-Pentanone: 지방산, butter 향(좋지 않은 향)
- 5) butyl acetate: 달콤한 과일 향 --술에 향미성분으로 아주 중요한 성분으로 밝혀짐
- 6) hexanal: 풀(green)향을 내는 성분으로 일반적으로 나쁜영향을 준다
- 7) 3-Pentanol: 특징적인 향이 없어 술의 향에 별로 영향을 주지 않는다

- 8) 2-Pentanol: 약한 wine 좋은 향기
- 9) 1-Butanol: 약(medicinal)냄새가 나며 대부분의 술에 함유함(좋지 않음)
- 10) 3-Methyl-1-butanol: 일반적으로 술에 많이 포함되어 있으나 본 연구술에는 적게 함유함(none),
- 11) ethyl lactate: buttery, scotch향, 술에서 아주 주요한 향 성분으로 작용됨
- 12) 1-Hexanol: 허브향으로 대부분의 술에서 주요한 향미성분
- 13) 3-Octanol: 다른 술에서는 잘 발견되지 않는 성분
- 14) Acetic acid: 발효주에서 일반적으로 함유하면서 신맛을 주는 성분
- 15) Furfural: 딸기나 꽃의 향을 주는 성분으로 일반적으로 술에 많이 함유함
- 16) Propanoic acid: 많이 함유할때는 과일향을 주나 적을 때는 향에 영향을 주지 못함
- 18) Isobutanoic acid: 산패 버터향으로 술의 향에 나쁜영향을 줌
- 19) 2,3-butanediol: 일반적으로 술에 많이 함유된 성분으로 과일향을 냄
- 20) 2-Furanmethanol: caramel, woody, sweet등 다양한 향을 내며 술에 좋은 영향을 줌
- 21) 3-Methylbutanoic acid: 많은 술에서 발견되며 달콤한 향을 냄
- 22) Hexanoic acid: 산패된 지방 냄새로 술의 품질에 악영향을 줌
- 23) Benzenemethanol: 술에서 거의 발견되지 않았으며 풀(grass)향을 냄
- 24) Benzothiazole: 황을 함유하는 성분으로 드물게 술에서 발견되는 화합물로 차잎(tea leaves)에서 추출된 향기임.(good)
- 25) 1-Octadecanol: 멜론에서 확인된 휘발성 성분이나 분자량이 크기 때문에 향에는 영향이 거의 없음(영향이 적음)
- 26) Tetradecanoic acid: rose wine에서 확인되었으나 향이 영향력이 적음
- 27) Hexadecanoic acid: 많은 술에서 발견되었으나 향보다는 맛에 영향력이 높음.

Peak번호로 74번이상은 휘발성이 약해서 향에는 영향이 적음.

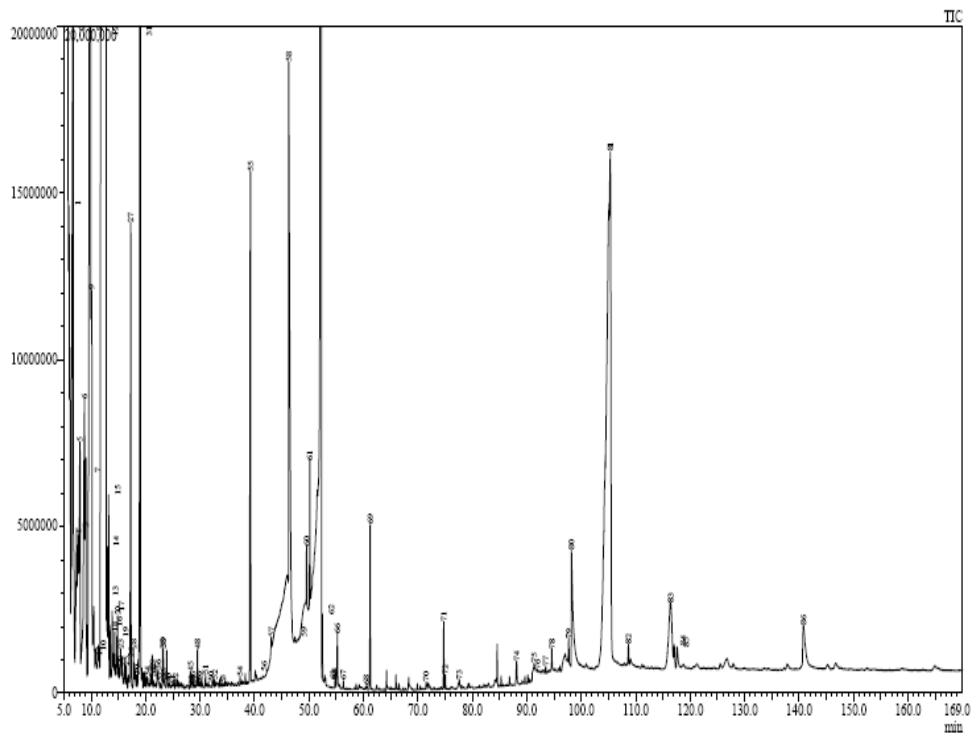


Fig. 66. Total ion chromatogram of sample No-7 fermentative alcohol.

Table I. Major volatile compounds of sample No-7 fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area (1.0×10^6)	Identification method
1	5.94	Acetaldehyde	94.56	MS, RI
2	6.67	2,2,5-Trimethylpentane	531.20	MS, RI
3	7.34	Ethoxybutane	14.56	MS, RI
4	7.71	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	10.03	MS, RI
5	7.94	Ethyl formate	209.30	MS, RI
6	8.77	2,2,4-Trimethylhexane	263.60	MS, RI
7	9.53	1,3,5-Trimethylcyclohexane	20.64	MS, RI
8	9.86	Ethyl acetate	620.03	MS, RI
9	10.06	1,1-Diethoxyethane	32.41	MS
10	10.61	3-Methyloctane	26.68	MS, RI
11	11.49	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	39.76	MS
12	12.77	Ethanol	1360.95	MS, RI
13	12.84	2,3-Dimethyloctane	37.98	MS, RI
14	12.95	2,5-Dimethyloctane	49.94	MS, RI
15	13.21	2,2,3-Trimethylheptane	64.21	MS, RI
16	13.53	1,2-Diethylcyclohexane	13.57	MS, RI
17	13.87	3-Pentanone	31.29	MS, RI
18	14.31	2,6-Dimethyloctane	11.22	MS, RI
19	14.71	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	5.11	MS
20	14.87	5-Methyldecane	15.23	MS, RI
21	15.08	4-Methyldecane	2.45	MS, RI
22	15.29	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	5.10	MS
23	15.40	3-Methyldecane	7.82	MS, RI
24	15.69	4,6-Dimethylnonane	6.18	MS, RI
25	16.44	n-Butyl acetate	6.98	MS, RI
26	16.57	3,8-Dimethylnonane	4.94	MS, RI
27	17.27	Toluene	131.17	MS, RI
28	17.79	2-Methyldecane	19.52	MS, RI
29	18.05	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	8.38	MS
30	18.38	5-Ethyl-2-methyloctane	5.15	MS, RI
31	18.99	1,2-Dichloroethane	460.33	MS, RI
32	19.65	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	1.41	MS
33	20.10	Hexanal	3.08	MS, RI
34	20.31	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	4.95	MS
35	22.02	3,7-Dimethylnonane	1.95	MS, RI
36	22.30	3-Pentanol	13.24	MS, RI
37	22.48	2,8-Dimethyldecane	2.34	MS, RI

38	23.14	5-propylnonane	1.42	MS, RI
39	23.24	2-Pentanol	14.18	MS, RI
40	24.14	o-Xylene	3.43	MS, RI
41	24.91	1-Butanol	1.49	MS, RI
42	25.48	3,8-Dimethyldecane	5.08	MS, RI
43	26.73	1-Penten-3-ol	1.92	MS, RI
44	26.94	3-Methylundecane	1.99	MS, RI
45	28.23	2,2,6-Trimethyldecane	8.16	MS
46	28.69	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	5.54	MS
47	28.91	3-Methyl-1-butanol	14.23	MS, RI
48	29.52	5-(2-Methylpropyl)nonane	2.73	MS
49	30.09	5-Methyl-5-propylnonane	4.04	MS
50	30.36	2,2,5-Trimethyldecane	5.23	MS, RI
51	30.99	1-Pentanol	2.52	MS, RI
52	32.67	3,9-Dimethylundecane	1.70	MS
53	34.21	3-Methyldodecane	2.25	MS, RI
54	37.36	Methyl lactate	1.31	MS, RI
55	39.25	Ethyl lactane	3.40	MS
56	40.14	1-Hexanol	4.36	MS, RI
57	43.07	3-Octanol	6.38	MS
58	46.28	Acetic acid	284.21	MS, RI
59	47.44	Furfural	1.49	MS, RI
60	49.56	3-Pentyl hydroperoxide	7.78	MS
61	50.15	2-Hydroperoxy-pentane	6.77	MS
62	52.47	2-Ethoxy-3-chlorobutane	12.00	MS
63	52.79	Propanoic acid	1.24	MS, RI
64	53.05	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	1.53	MS
65	54.78	Isobutanoic acid	3.31	MS, RI
66	55.20	2,3-butanediol	14.58	MS, RI
67	56.31	Hexadecane	2.49	MS, RI
68	60.55	2-Furanmethanol	0.60	MS, RI
69	61.23	3-Methylbutanoic acid	61.83	MS, RI
70	71.51	Hexanoic acid	2.75	MS, RI
71	74.74	Butylated Hydroxytoluene	26.13	MS
72	75.01	Benzenemethanol	6.58	MS, RI
73	77.60	Benzothiazole	4.16	MS, RI
74	88.12	Ethyl 4-ethoxybenzoate	1.80	MS
75	91.33	4-Methyloctanoic acid	2.44	MS, RI
76	91.97	Ethyl hexadecanoate	2.84	MS, RI
77	93.47	Ethyl	4.44	MS

		2-hydroxy-3-phenylpropanoate		
78	94.58	2,4-Di-tert-butylphenol	1.28	MS
79	97.69	n-Pentadecanol	0.85	MS, RI
80	98.19	Ethyl hydrogen succinate	153.16	MS
81	105.33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	1.34	MS
82	108.67	1-Octadecanol	1.93	MS, RI
83	116.40	Hexadecanamide	3.33	MS
84	117.06	Dibutyl phthalate	23.83	MS
85	117.58	Tetradecanoic acid	19.80	MS, RI
86	140.78	Hexadecanoic acid	77.45	MS, RI

MS, RI was identified with mass spectral data and retention indices (RI) of an authentic compound; MS, LRI was identified with mass spectral data and retention indices of published literatures; MS was identified with only mass spectral data of published literatures.

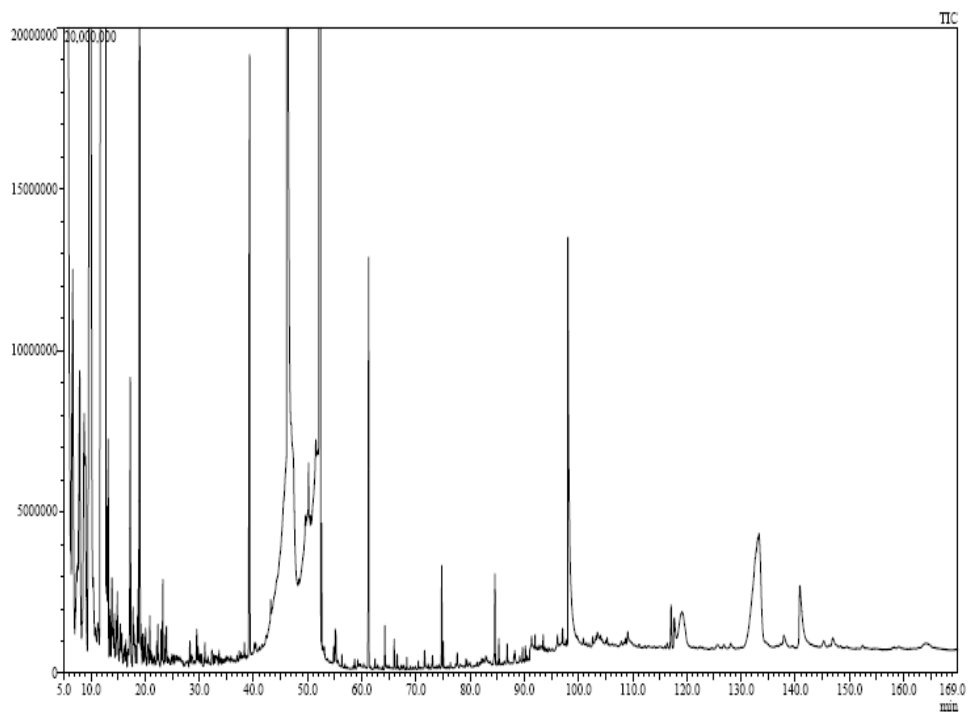


Fig. 67. Total ion chromatogram of sample No-8 fermentative alcohol.

Table II. Major volatile compounds of sample No-8 fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area (1.0×10^6)	Identification method
1	5.94	Acetaldehyde	54.98	MS, RI
2	6.67	2,2,5-Trimethylpentane	213.02	MS, RI
3	7.34	Ethoxybutane	34.47	MS, RI
4	7.71	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	33.46	MS, RI
5	7.94	Ethyl formate	159.07	MS, RI
6	8.77	2,2,4-Trimethylhexane	118.93	MS, RI
7	9.53	1,3,5-Trimethylcyclohexane	34.46	MS, RI
8	9.86	Ethyl acetate	535.25	MS, RI
9	10.06	1,1-Diethoxyethane	241.67	MS
10	10.61	3-Methyloctane	4.70	MS, RI
11	11.49	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	9.05	MS
12	12.77	Ethanol	1921.39	MS, RI
13	12.84	2,3-Dimethyloctane	27.36	MS, RI
14	12.95	2,5-Dimethyloctane	15.42	MS, RI
15	13.21	2,2,3-Trimethylheptane	44.88	MS, RI
16	13.53	1,2-Diethylcyclohexane	6.84	MS, RI
17	13.87	3-Pentanone	17.44	MS, RI
18	14.31	2,6-Dimethyloctane	8.49	MS, RI
19	14.71	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	7.82	MS
20	14.87	5-Methyldecane	15.93	MS, RI
21	15.08	4-Methyldecane	1.56	MS, RI
22	15.29	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	1.98	MS
23	15.40	3-Methyldecane	6.56	MS, RI
24	15.69	4,6-Dimethylnonane	6.02	MS, RI
25	16.44	n-Butyl acetate	4.64	MS, RI
26	16.57	3,8-Dimethylnonane	2.28	MS, RI
27	17.27	Toluene	81.43	MS, RI
28	17.79	2-Methyldecane	10.98	MS, RI
29	18.05	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	9.24	MS
30	18.38	5-Ethyl-2-methyloctane	5.38	MS, RI
31	18.99	1,2-Dichloroethane	278.11	MS, RI
32	19.65	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	4.59	MS
33	20.10	Hexanal	9.03	MS, RI
34	20.31	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	8.17	MS
35	22.02	3,7-Dimethylnonane	6.02	MS, RI
36	22.30	3-Pentanol	6.66	MS, RI
37	22.48	2,8-Dimethyldecane	1.40	MS, RI

38	23.14	5-propylnonane	8.68	MS, RI
39	23.24	2-Pentanol	19.51	MS, RI
40	24.14	o-Xylene	7.00	MS, RI
41	24.91	1-Butanol	2.10	MS, RI
42	25.48	3,8-Dimethyldecane	2.47	MS, RI
43	26.73	1-Penten-3-ol	0.43	MS, RI
44	26.94	3-Methylundecane	0.56	MS, RI
45	28.23	2,2,6-Trimethyldecane	7.14	MS
46	28.69	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	1.69	MS
47	28.91	3-Methyl-1-butanol	0.48	MS, RI
48	29.52	5-(2-Methylpropyl)nonane	9.51	MS
49	30.09	5-Methyl-5-propylnonane	3.26	MS
50	30.36	2,2,5-Trimethyldecane	4.33	MS, RI
51	30.99	1-Pentanol	1.83	MS, RI
52	32.67	3,9-Dimethylundecane	1.88	MS
53	34.21	3-Methyldodecane	2.02	MS, RI
54	37.36	Methyl lactate	1.72	MS, RI
55	39.25	Ethyl lactane	193.37	MS
56	40.14	1-Hexanol	3.81	MS, RI
57	43.07	3-Octanol	3.67	MS
58	46.28	Acetic acid	714.92	MS, RI
59	47.44	Furfural	0.19	MS, RI
60	49.56	3-Pentyl hydroperoxide	42.10	MS
61	50.15	2-Hydroperoxy-pentane	47.63	MS
62	52.47	2-Ethoxy-3-chlorobutane	12.71	MS
63	52.79	Propanoic acid	1.20	MS, RI
64	53.05	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	1.18	MS
65	54.78	Isobutanoic acid	4.07	MS, RI
66	55.20	2,3-butanediol	5.80	MS, RI
67	56.31	Hexadecane	1.75	MS, RI
68	60.55	2-Furanmethanol	0.76	MS, RI
69	61.23	3-Methylbutanoic acid	79.91	MS, RI
70	71.51	Hexanoic acid	4.44	MS, RI
71	74.74	Butylated Hydroxytoluene	18.86	MS
72	75.01	Benzenemethanol	5.65	MS, RI
73	77.60	Benzothiazole	2.73	MS, RI
74	88.12	Ethyl 4-ethoxybenzoate	1.43	MS
75	91.33	4-Methyloctanoic acid	2.12	MS, RI
76	91.97	Ethyl hexadecanoate	2.96	MS, RI
77	93.47	Ethyl	2.38	MS

		2-hydroxy-3-phenylpropanoate		
78	94.58	2,4-Di-tert-butylphenol	3.67	MS
79	97.69	n-Pentadecanol	0.83	MS, RI
80	98.19	Ethyl hydrogen succinate	0.78	MS
81	105.33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	197.11	MS
82	108.67	1-Octadecanol	3.71	MS, RI
83	116.40	Hexadecanamide	1.15	MS
84	117.06	Dibutyl phthalate	2.51	MS
85	117.58	Tetradecanoic acid	16.95	MS, RI
86	140.78	Hexadecanoic acid	19.74	MS, RI

MS, RI was identified with mass spectral data and retention indices (RI) of an authentic compound; MS, LRI was identified with mass spectral data and retention indices of published literatures; MS was identified with only mass spectral data of published literatures.

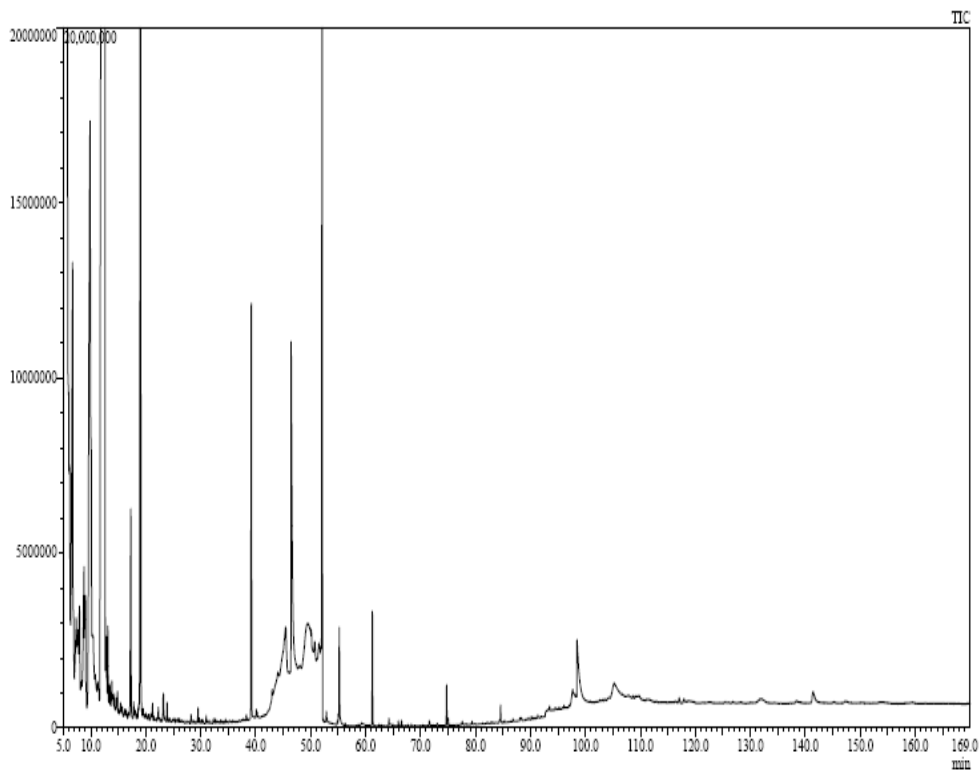


Fig. 68. Total ion chromatogram of sample No-9 fermentative alcohol.

Table III. Major volatile compounds of sample No-9 fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area (1.0×10^6)	Identification method
1	5.94	Acetaldehyde	11.81	MS, RI
2	6.67	2,2,5-Trimethylpentane	152.11	MS, RI
3	7.34	Ethoxybutane	22.68	MS, RI
4	7.71	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	8.21	MS, RI
5	7.94	Ethyl formate	9.85	MS, RI
6	8.77	2,2,4-Trimethylhexane	25.77	MS, RI
7	9.53	1,3,5-Trimethylcyclohexane	48.00	MS, RI
8	9.86	Ethyl acetate	41.61	MS, RI
9	10.06	1,1-Diethoxyethane	336.31	MS
10	10.61	3-Methyloctane	4.26	MS, RI
11	11.49	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	1.74	MS
12	12.77	Ethanol	1449.81	MS, RI
13	12.84	2,3-Dimethyloctane	9.20	MS, RI
14	12.95	2,5-Dimethyloctane	9.05	MS, RI
15	13.21	2,2,3-Trimethylheptane	15.70	MS, RI
16	13.53	1,2-Diethylcyclohexane	1.23	MS, RI
17	13.87	3-Pentanone	2.32	MS, RI
18	14.31	2,6-Dimethyloctane	5.76	MS, RI
19	14.71	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	3.68	MS
20	14.87	5-Methyldecane	2.50	MS, RI
21	15.08	4-Methyldecane	2.20	MS, RI
22	15.29	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	3.49	MS
23	15.40	3-Methyldecane	1.33	MS, RI
24	15.69	4,6-Dimethylnonane	0.83	MS, RI
25	16.44	n-Butyl acetate	2.39	MS, RI
26	16.57	3,8-Dimethylnonane	0.80	MS, RI
27	17.27	Toluene	49.55	MS, RI
28	17.79	2-Methyldecane	3.37	MS, RI
29	18.05	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	2.31	MS
30	18.38	5-Ethyl-2-methyloctane	1.15	MS, RI
31	18.99	1,2-Dichloroethane	315.47	MS, RI
32	19.65	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	2.50	MS
33	20.10	Hexanal	0.63	MS, RI
34	20.31	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	0.74	MS
35	22.02	3,7-Dimethylnonane	1.58	MS, RI
36	22.30	3-Pentanol	2.17	MS, RI
37	22.48	2,8-Dimethyldecane	1.55	MS, RI

38	23.14	5-propylnonane	2.51	MS, RI
39	23.24	2-Pentanol	4.04	MS, RI
40	24.14	o-Xylene	2.51	MS, RI
41	24.91	1-Butanol	0.09	MS, RI
42	25.48	3,8-Dimethyldecane	0.47	MS, RI
43	26.73	1-Penten-3-ol	0.25	MS, RI
44	26.94	3-Methylundecane	0.45	MS, RI
45	28.23	2,2,6-Trimethyldecane	1.42	MS
46	28.69	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	1.99	MS
47	28.91	3-Methyl-1-butanol	0.69	MS, RI
48	29.52	5-(2-Methylpropyl)nonane	0.53	MS
49	30.09	5-Methyl-5-propylnonane	0.58	MS
50	30.36	2,2,5-Trimethyldecane	0.93	MS, RI
51	30.99	1-Pentanol	0.71	MS, RI
52	32.67	3,9-Dimethylundecane	0.23	MS
53	34.21	3-Methyldodecane	0.47	MS, RI
54	37.36	Methyl lactate	0.33	MS, RI
55	39.25	Ethyl lactane	83.11	MS
56	40.14	1-Hexanol	1.16	MS, RI
57	43.07	3-Octanol	1.36	MS
58	46.28	Acetic acid	129.44	MS, RI
59	47.44	Furfural	0.74	MS, RI
60	49.56	3-Pentyl hydroperoxide	1.19	MS
61	50.15	2-Hydroperoxy-pentane	4.79	MS
62	52.47	2-Ethoxy-3-chlorobutane	0.26	MS
63	52.79	Propanoic acid	1.28	MS, RI
64	53.05	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	0.39	MS
65	54.78	Isobutanoic acid	1.12	MS, RI
66	55.20	2,3-butanediol	20.11	MS, RI
67	56.31	Hexadecane	0.24	MS, RI
68	60.55	2-Furanmethanol	0.11	MS, RI
69	61.23	3-Methylbutanoic acid	18.87	MS, RI
70	71.51	Hexanoic acid	0.91	MS, RI
71	74.74	Butylated Hydroxytoluene	6.62	MS
72	75.01	Benzenemethanol	1.30	MS, RI
73	77.60	Benzothiazole	0.51	MS, RI
74	88.12	Ethyl 4-ethoxybenzoate	0.87	MS
75	91.33	4-Methyloctanoic acid	0.20	MS, RI
76	91.97	Ethyl hexadecanoate	0.55	MS, RI
77	93.47	Ethyl	0.69	MS

		2-hydroxy-3-phenylpropanoate		
78	94.58	2,4-Di-tert-butylphenol	0.58	MS
79	97.69	n-Pentadecanol	2.93	MS, RI
80	98.19	Ethyl hydrogen succinate	34.90	MS
81	105.33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	15.00	MS
82	108.67	1-Octadecanol	0.34	MS, RI
83	116.40	Hexadecanamide	0.74	MS
84	117.06	Dibutyl phthalate	1.43	MS
85	117.58	Tetradecanoic acid	1.62	MS, RI
86	140.78	Hexadecanoic acid	8.90	MS, RI

MS, RI was identified with mass spectral data and retention indices (RI) of an authentic compound; MS, LRI was identified with mass spectral data and retention indices of published literatures; MS was identified with only mass spectral data of published literatures.

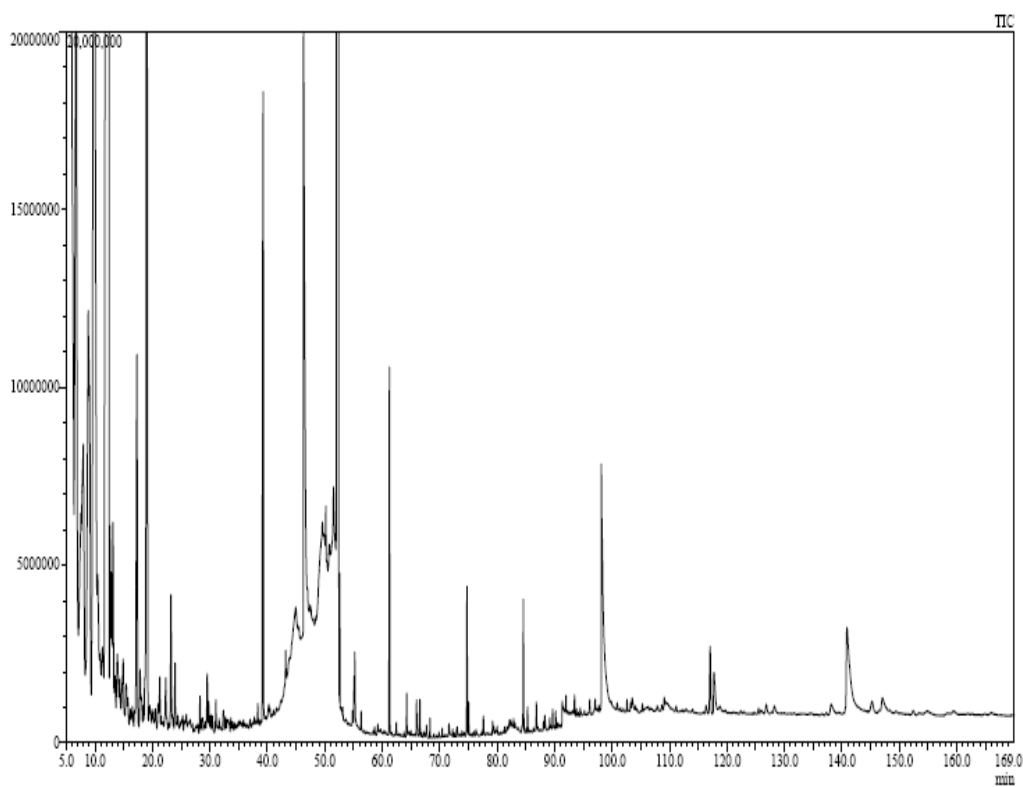


Fig. 69. Total ion chromatogram of sample No-10 fermentative alcohol.

Table IV. Major volatile compounds of sample No-10 fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area (1.0×10^6)	Identification method
1	5.94	Acetaldehyde	12.82	MS, RI
2	6.67	2,2,5-Trimethylpentane	777.72	MS, RI
3	7.34	Ethoxybutane	140.40	MS, RI
4	7.71	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	183.75	MS, RI
5	7.94	Ethyl formate	81.92	MS, RI
6	8.77	2,2,4-Trimethylhexane	547.72	MS, RI
7	9.53	1,3,5-Trimethylcyclohexane	21.15	MS, RI
8	9.86	Ethyl acetate	317.22	MS, RI
9	10.06	1,1-Diethoxyethane	233.89	MS
10	10.61	3-Methyloctane	100.77	MS, RI
11	11.49	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	29.48	MS
12	12.77	Ethanol	2596.16	MS, RI
13	12.84	2,3-Dimethyloctane	88.31	MS, RI
14	12.95	2,5-Dimethyloctane	160.36	MS, RI
15	13.21	2,2,3-Trimethylheptane	8.07	MS, RI
16	13.53	1,2-Diethylcyclohexane	22.99	MS, RI
17	13.87	3-Pentanone	102.62	MS, RI
18	14.31	2,6-Dimethyloctane	26.07	MS, RI
19	14.71	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	10.38	MS
20	14.87	5-Methyldecane	32.11	MS, RI
21	15.08	4-Methyldecane	5.54	MS, RI
22	15.29	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	33.99	MS
23	15.40	3-Methyldecane	5.31	MS, RI
24	15.69	4,6-Dimethylnonane	16.05	MS, RI
25	16.44	n-Butyl acetate	4.16	MS, RI
26	16.57	3,8-Dimethylnonane	15.77	MS, RI
27	17.27	Toluene	43.06	MS, RI
28	17.79	2-Methyldecane	25.44	MS, RI
29	18.05	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	20.75	MS
30	18.38	5-Ethyl-2-methyloctane	12.58	MS, RI
31	18.99	1,2-Dichloroethane	1099.12	MS, RI
32	19.65	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	7.84	MS
33	20.10	Hexanal	4.59	MS, RI
34	20.31	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	8.37	MS
35	22.02	3,7-Dimethylnonane	15.74	MS, RI
36	22.30	3-Pentanol	6.55	MS, RI
37	22.48	2,8-Dimethyldecane	3.55	MS, RI

38	23.14	5-propylnonane	61.06	MS, RI
39	23.24	2-Pentanol	10.31	MS, RI
40	24.14	o-Xylene	2.91	MS, RI
41	24.91	1-Butanol	2.01	MS, RI
42	25.48	3,8-Dimethyldecane	5.03	MS, RI
43	26.73	1-Penten-3-ol	2.55	MS, RI
44	26.94	3-Methylundecane	2.96	MS, RI
45	28.23	2,2,6-Trimethyldecane	1.04	MS
46	28.69	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	46.47	MS
47	28.91	3-Methyl-1-butanol	7.18	MS, RI
48	29.52	5-(2-Methylpropyl)nonane	6.73	MS
49	30.09	5-Methyl-5-propylnonane	12.77	MS
50	30.36	2,2,5-Trimethyldecane	5.75	MS, RI
51	30.99	1-Pentanol	3.00	MS, RI
52	32.67	3,9-Dimethylundecane	1.76	MS
53	34.21	3-Methyldodecane	4.20	MS, RI
54	37.36	Methyl lactate	1.46	MS, RI
55	39.25	Ethyl lactane	389.00	MS
56	40.14	1-Hexanol	10.90	MS, RI
57	43.07	3-Octanol	18.37	MS
58	46.28	Acetic acid	569.75	MS, RI
59	47.44	Furfural	9.85	MS, RI
60	49.56	3-Pentyl hydroperoxide	3.04	MS
61	50.15	2-Hydroperoxy-pentane	1.04	MS
62	52.47	2-Ethoxy-3-chlorobutane	3.08	MS
63	52.79	Propanoic acid	7.51	MS, RI
64	53.05	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	6.26	MS
65	54.78	Isobutanoic acid	14.54	MS, RI
66	55.20	2,3-butanediol	64.78	MS, RI
67	56.31	Hexadecane	1.48	MS, RI
68	60.55	2-Furanmethanol	1.91	MS, RI
69	61.23	3-Methylbutanoic acid	205.80	MS, RI
70	71.51	Hexanoic acid	9.10	MS, RI
71	74.74	Butylated Hydroxytoluene	17.76	MS
72	75.01	Benzenemethanol	20.38	MS, RI
73	77.60	Benzothiazole	3.09	MS, RI
74	88.12	Ethyl 4-ethoxybenzoate	1.16	MS
75	91.33	4-Methyloctanoic acid	35.75	MS, RI
76	91.97	Ethyl hexadecanoate	7.04	MS, RI
77	93.47	Ethyl	13.31	MS

		2-hydroxy-3-phenylpropanoate		
78	94.58	2,4-Di-tert-butylphenol	9.90	MS
79	97.69	n-Pentadecanol	7.57	MS, RI
80	98.19	Ethyl hydrogen succinate	7.31	MS
81	105.33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	3.97	MS
82	108.67	1-Octadecanol	345.09	MS, RI
83	116.40	Hexadecanamide	0.07	MS
84	117.06	Dibutyl phthalate	1.89	MS
85	117.58	Tetradecanoic acid	2.16	MS, RI
86	140.78	Hexadecanoic acid	2.34	MS, RI

MS, RI was identified with mass spectral data and retention indices (RI) of an authentic compound; MS, LRI was identified with mass spectral data and retention indices of published literatures; MS was identified with only mass spectral data of published literatures.

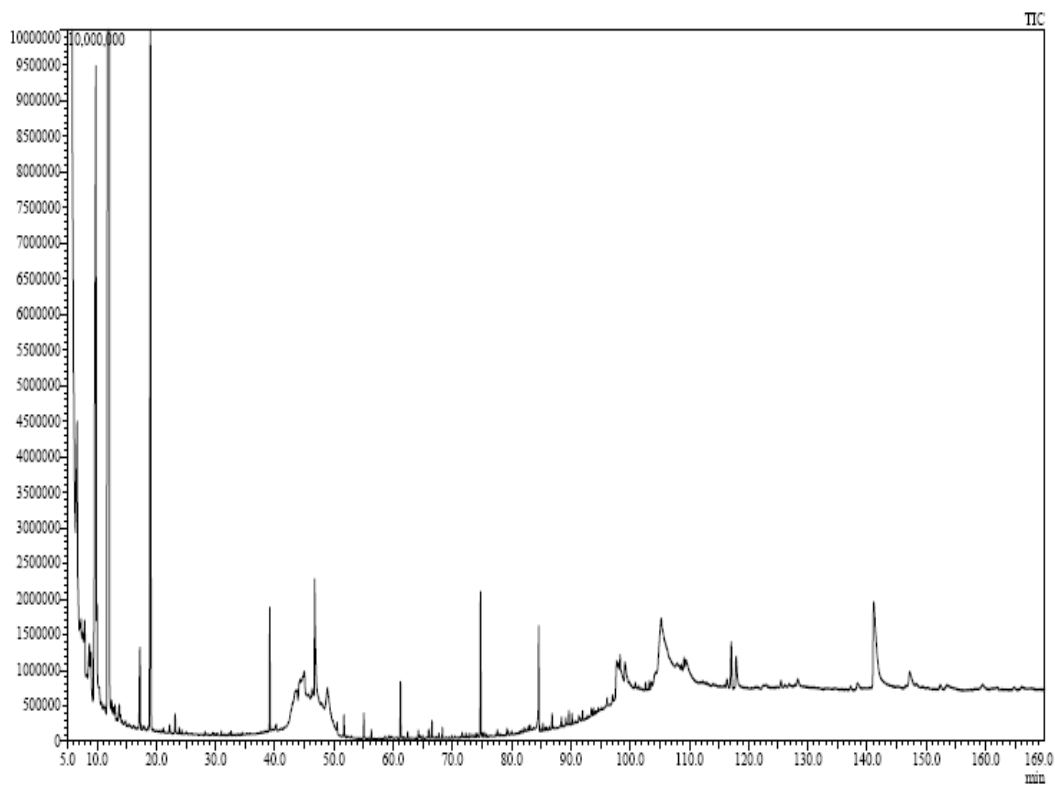


Fig. 70. Total ion chromatogram of sample No-8 fermentative alcohol with added 0.25% greentea.

Table IV. Major volatile compounds of sample No-8 fermentative alcohol with added 0.25% greentea.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area (1.0×10^6 .)	Identification method
1	5.94	Acetaldehyde	1447.11	MS, RI
2	6.67	2,2,5-Trimethylpentane	1236.48	MS, RI
3	7.34	Ethoxybutane	203.47	MS, RI
4	7.71	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	280.49	MS, RI
5	7.94	Ethyl formate	197.90	MS, RI
6	8.77	2,2,4-Trimethylhexane	620.65	MS, RI
7	9.53	1,3,5-Trimethylcyclohexane	338.00	MS, RI
8	9.86	Ethyl acetate	558.68	MS, RI
9	10.06	1,1-Diethoxyethane	150.96	MS
10	10.61	3-Methyloctane	57.12	MS, RI
11	11.49	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	53.82	MS
12	12.77	Ethanol	2253.98	MS, RI
13	12.84	2,3-Dimethyloctane	49.10	MS, RI
14	12.95	2,5-Dimethyloctane	102.46	MS, RI
15	13.21	2,2,3-Trimethylheptane	150.68	MS, RI
16	13.53	1,2-Diethylcyclohexane	28.33	MS, RI
17	13.87	3-Pentanone	81.94	MS, RI
18	14.31	2,6-Dimethyloctane	31.22	MS, RI
19	14.71	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	26.62	MS
20	14.87	5-Methyldecane	38.32	MS, RI
21	15.08	4-Methyldecane	5.07	MS, RI
22	15.29	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	4.64	MS
23	15.40	3-Methyldecane	14.99	MS, RI
24	15.69	4,6-Dimethylnonane	20.14	MS, RI
25	16.44	n-Butyl acetate	11.10	MS, RI
26	16.57	3,8-Dimethylnonane	11.28	MS, RI
27	17.27	Toluene	95.71	MS, RI
28	17.79	2-Methyldecane	31.26	MS, RI
29	18.05	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	23.91	MS
30	18.38	5-Ethyl-2-methyloctane	14.59	MS, RI
31	18.99	1,2-Dichloroethane	1223.09	MS, RI
32	19.65	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	10.14	MS
33	20.10	Hexanal	6.35	MS, RI
34	20.31	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	15.86	MS
35	22.02	3,7-Dimethylnonane	5.70	MS, RI
36	22.30	3-Pentanol	16.14	MS, RI

37	22.48	2,8-Dimethyldecane	8.37	MS, RI
38	23.14	5-propylnonane	54.75	MS, RI
39	23.24	2-Pentanol	11.14	MS, RI
40	24.14	o-Xylene	3.13	MS, RI
41	24.91	1-Butanol	11.00	MS, RI
42	25.48	3,8-Dimethyldecane	5.89	MS, RI
43	26.73	1-Penten-3-ol	3.26	MS, RI
44	26.94	3-Methylundecane	3.27	MS, RI
45	28.23	2,2,6-Trimethyldecane	7.65	MS
46	28.69	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	3.59	MS
47	28.91	3-Methyl-1-butanol	18.12	MS, RI
48	29.52	5-(2-Methylpropyl)nonane	5.64	MS
49	30.09	5-Methyl-5-propylnonane	16.10	MS
50	30.36	2,2,5-Trimethyldecane	4.39	MS, RI
51	30.99	1-Pentanol	4.79	MS, RI
52	32.67	3,9-Dimethylundecane	1.77	MS
53	34.21	3-Methyldodecane	3.11	MS, RI
54	37.36	Methyl lactate	11.13	MS, RI
55	39.25	Ethyl lactane	339.35	MS
56	40.14	1-Hexanol	7.15	MS, RI
57	43.07	3-Octanol	6.85	MS
58	46.28	Acetic acid	644.48	MS, RI
59	47.44	Furfural	9.21	MS, RI
60	49.56	3-Pentyl hydroperoxide	21.30	MS
61	50.15	2-Hydroperoxy-pentane	53.18	MS
62	52.47	2-Ethoxy-3-chlorobutane	2.06	MS
63	52.79	Propanoic acid	2.99	MS, RI
64	53.05	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	4.14	MS
65	54.78	Isobutanoic acid	5.96	MS, RI
66	55.20	2,3-butanediol	11.30	MS, RI
67	56.31	Hexadecane	11.39	MS, RI
68	60.55	2-Furanmethanol	1.42	MS, RI
69	61.23	3-Methylbutanoic acid	194.20	MS, RI
70	71.51	Hexanoic acid	7.78	MS, RI
71	74.74	Butylated Hydroxytoluene	25.73	MS
72	75.01	Benzenemethanol	13.96	MS, RI
73	77.60	Benzothiazole	1.37	MS, RI
74	88.12	Ethyl 4-ethoxybenzoate	1.53	MS
75	91.33	4-Methyloctanoic acid	34.30	MS, RI
76	91.97	Ethyl hexadecanoate	12.94	MS, RI

77	93.47	Ethyl 2-hydroxy-3-phenylpropanoate	8.45	MS
78	94.58	2,4-Di-tert-butylphenol	0.67	MS
79	97.69	n-Pentadecanol	0.85	MS, RI
80	98.19	Ethyl hydrogen succinate	505.32	MS
81	105.33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	7.57	MS
82	108.67	1-Octadecanol	1.83	MS, RI
83	116.40	Hexadecanamide	1.99	MS
84	117.06	Dibutyl phthalate	18.97	MS
85	117.58	Tetradecanoic acid	12.46	MS, RI
86	140.78	Hexadecanoic acid	48.11	MS, RI

MS, RI was identified with mass spectral data and retention indices (RI) of an authentic compound; MS, LRI was identified with mass spectral data and retention indices of published literatures; MS was identified with only mass spectral data of published literatures.

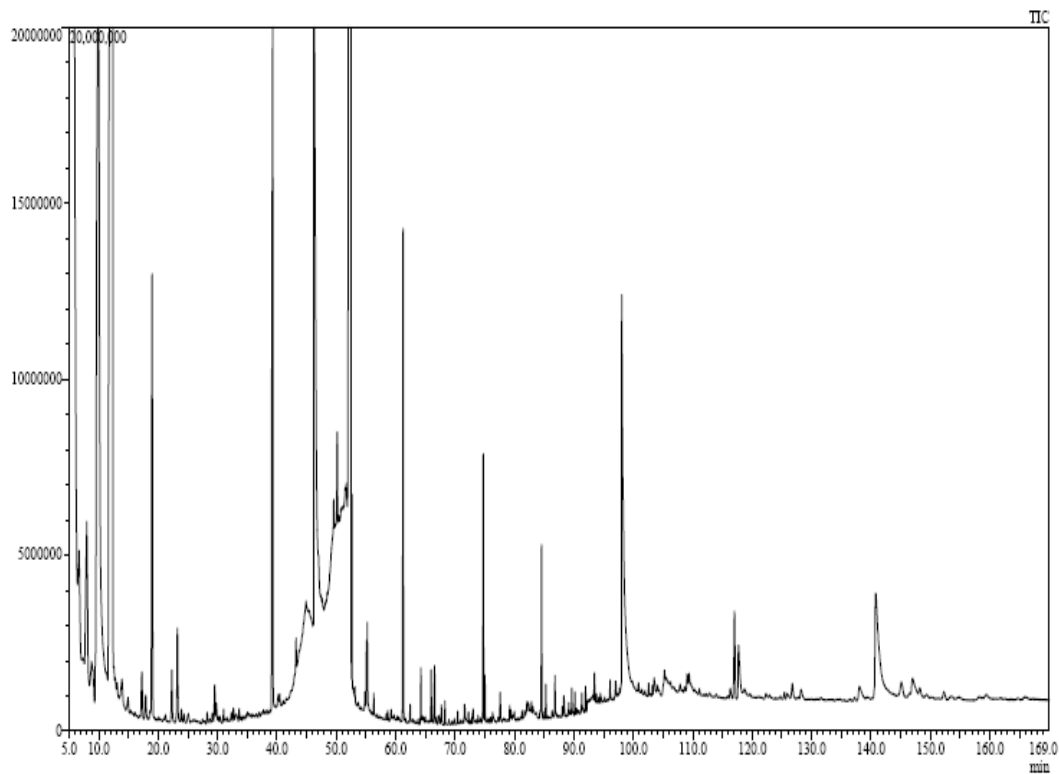


Fig. 71. Total ion chromatogram of sample No-10 fermentative alcohol with added 0.25% greentea.

Table V. Major volatile compounds of sample No-10 fermentative alcohol with added 0.25% greentea.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area (1.0×10^6 .)	Identification method
1	5.94	Acetaldehyde	12.82	MS, RI
2	6.67	2,2,5-Trimethylpentane	777.72	MS, RI
3	7.34	Ethoxybutane	140.40	MS, RI
4	7.71	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	183.75	MS, RI
5	7.94	Ethyl formate	81.92	MS, RI
6	8.77	2,2,4-Trimethylhexane	547.72	MS, RI
7	9.53	1,3,5-Trimethylcyclohexane	21.15	MS, RI
8	9.86	Ethyl acetate	317.22	MS, RI
9	10.06	1,1-Diethoxyethane	233.89	MS
10	10.61	3-Methyloctane	100.77	MS, RI
11	11.49	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	29.48	MS
12	12.77	Ethanol	2596.16	MS, RI
13	12.84	2,3-Dimethyloctane	88.31	MS, RI
14	12.95	2,5-Dimethyloctane	160.36	MS, RI
15	13.21	2,2,3-Trimethylheptane	8.07	MS, RI
16	13.53	1,2-Diethylcyclohexane	22.99	MS, RI
17	13.87	3-Pentanone	102.62	MS, RI
18	14.31	2,6-Dimethyloctane	26.07	MS, RI
19	14.71	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	10.38	MS
20	14.87	5-Methyldecane	32.11	MS, RI
21	15.08	4-Methyldecane	5.54	MS, RI
22	15.29	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	33.99	MS
23	15.40	3-Methyldecane	5.31	MS, RI
24	15.69	4,6-Dimethylnonane	16.05	MS, RI
25	16.44	n-Butyl acetate	4.16	MS, RI
26	16.57	3,8-Dimethylnonane	15.77	MS, RI
27	17.27	Toluene	43.06	MS, RI
28	17.79	2-Methyldecane	25.44	MS, RI
29	18.05	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	20.75	MS
30	18.38	5-Ethyl-2-methyloctane	12.58	MS, RI
31	18.99	1,2-Dichloroethane	1099.12	MS, RI
32	19.65	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	7.84	MS
33	20.10	Hexanal	4.59	MS, RI
34	20.31	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	8.37	MS
35	22.02	3,7-Dimethylnonane	15.74	MS, RI
36	22.30	3-Pentanol	6.55	MS, RI

37	22.48	2,8-Dimethyldecane	3.55	MS, RI
38	23.14	5-propylnonane	61.06	MS, RI
39	23.24	2-Pentanol	10.31	MS, RI
40	24.14	o-Xylene	2.91	MS, RI
41	24.91	1-Butanol	2.01	MS, RI
42	25.48	3,8-Dimethyldecane	5.03	MS, RI
43	26.73	1-Penten-3-ol	2.55	MS, RI
44	26.94	3-Methylundecane	2.96	MS, RI
45	28.23	2,2,6-Trimethyldecane	1.04	MS
46	28.69	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	46.47	MS
47	28.91	3-Methyl-1-butanol	7.18	MS, RI
48	29.52	5-(2-Methylpropyl)nonane	6.73	MS
49	30.09	5-Methyl-5-propylnonane	12.77	MS
50	30.36	2,2,5-Trimethyldecane	5.75	MS, RI
51	30.99	1-Pentanol	3.00	MS, RI
52	32.67	3,9-Dimethylundecane	1.76	MS
53	34.21	3-Methyldodecane	4.20	MS, RI
54	37.36	Methyl lactate	1.46	MS, RI
55	39.25	Ethyl lactane	389.00	MS
56	40.14	1-Hexanol	10.90	MS, RI
57	43.07	3-Octanol	18.37	MS
58	46.28	Acetic acid	569.75	MS, RI
59	47.44	Furfural	9.85	MS, RI
60	49.56	3-Pentyl hydroperoxide	3.04	MS
61	50.15	2-Hydroperoxy-pentane	1.04	MS
62	52.47	2-Ethoxy-3-chlorobutane	3.08	MS
63	52.79	Propanoic acid	7.51	MS, RI
64	53.05	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	6.26	MS
65	54.78	Isobutanoic acid	14.54	MS, RI
66	55.20	2,3-butanediol	64.78	MS, RI
67	56.31	Hexadecane	1.48	MS, RI
68	60.55	2-Furanmethanol	1.91	MS, RI
69	61.23	3-Methylbutanoic acid	205.80	MS, RI
70	71.51	Hexanoic acid	9.10	MS, RI
71	74.74	Butylated Hydroxytoluene	17.76	MS
72	75.01	Benzenemethanol	20.38	MS, RI
73	77.60	Benzothiazole	3.09	MS, RI
74	88.12	Ethyl 4-ethoxybenzoate	1.16	MS
75	91.33	4-Methyloctanoic acid	35.75	MS, RI
76	91.97	Ethyl hexadecanoate	7.04	MS, RI

77	93.47	Ethyl 2-hydroxy-3-phenylpropanoate	13.31	MS
78	94.58	2,4-Di-tert-butylphenol	9.90	MS
79	97.69	n-Pentadecanol	7.57	MS, RI
80	98.19	Ethyl hydrogen succinate	7.31	MS
81	105.33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	3.97	MS
82	108.67	1-Octadecanol	345.09	MS, RI
83	116.40	Hexadecanamide	0.07	MS
84	117.06	Dibutyl phthalate	1.89	MS
85	117.58	Tetradecanoic acid	2.16	MS, RI
86	140.78	Hexadecanoic acid	2.34	MS, RI

MS, RI was identified with mass spectral data and retention indices (RI) of an authentic compound; MS, LRI was identified with mass spectral data and retention indices of published literatures; MS was identified with only mass spectral data of published literatures.

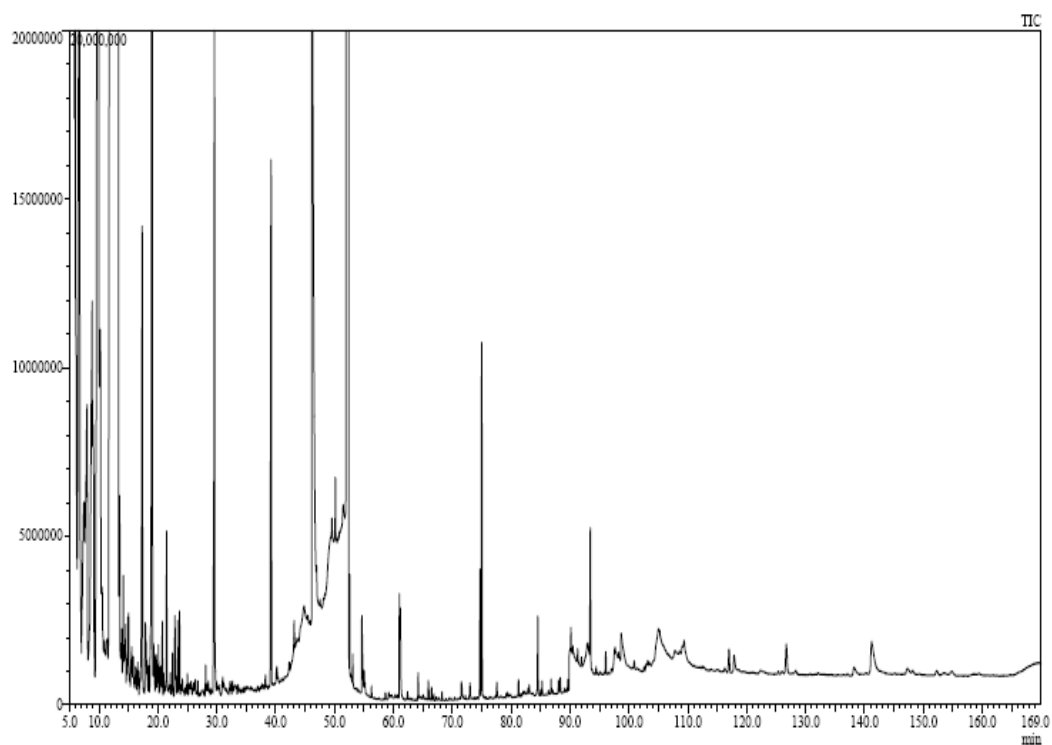


Fig. 72. Total ion chromatogram of sample S-NO₂(1) fermentative alcohol.

Table VI. Major volatile compounds of sample S-NO2(1) fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area (1.0×10^6)	Identification method
1	5.94	Acetaldehyde	52.31	MS, RI
2	6.67	2,2,5-Trimethylpentane	379.57	MS, RI
3	7.34	Ethoxybutane	72.59	MS, RI
4	7.71	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	51.68	MS, RI
5	7.94	Ethyl formate	93.19	MS, RI
6	8.77	2,2,4-Trimethylhexane	193.63	MS, RI
7	9.53	1,3,5-Trimethylcyclohexane	317.82	MS, RI
8	9.86	Ethyl acetate	373.39	MS, RI
9	10.06	1,1-Diethoxyethane	163.53	MS
10	10.61	3-Methyloctane	16.00	MS, RI
11	11.49	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	5.87	MS
12	12.77	Ethanol	3223.07	MS, RI
13	12.84	2,3-Dimethyloctane	41.10	MS, RI
14	12.95	2,5-Dimethyloctane	2.44	MS, RI
15	13.21	2,2,3-Trimethylheptane	4.88	MS, RI
16	13.53	1,2-Diethylcyclohexane	16.07	MS, RI
17	13.87	3-Pentanone	9.98	MS, RI
18	14.31	2,6-Dimethyloctane	3.26	MS, RI
19	14.71	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	13.26	MS
20	14.87	5-Methyldecane	12.74	MS, RI
21	15.08	4-Methyldecane	1.64	MS, RI
22	15.29	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	13.61	MS
23	15.40	3-Methyldecane	2.51	MS, RI
24	15.69	4,6-Dimethylnonane	4.88	MS, RI
25	16.44	n-Butyl acetate	5.72	MS, RI
26	16.57	3,8-Dimethylnonane	1.97	MS, RI
27	17.27	Toluene	137.72	MS, RI
28	17.79	2-Methyldecane	12.36	MS, RI
29	18.05	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	5.43	MS
30	18.38	5-Ethyl-2-methyloctane	4.27	MS, RI
31	18.99	1,2-Dichloroethane	509.55	MS, RI
32	19.65	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	6.47	MS
33	20.10	Hexanal	6.76	MS, RI
34	20.31	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	8.76	MS
35	22.02	3,7-Dimethylnonane	1.40	MS, RI
36	22.30	3-Pentanol	3.84	MS, RI

37	22.48	2,8-Dimethyldecane	6.36	MS, RI
38	23.14	5-propylnonane	13.31	MS, RI
39	23.24	2-Pentanol	3.09	MS, RI
40	24.14	o-Xylene	1.47	MS, RI
41	24.91	1-Butanol	3.35	MS, RI
42	25.48	3,8-Dimethyldecane	1.25	MS, RI
43	26.73	1-Penten-3-ol	1.86	MS, RI
44	26.94	3-Methylundecane	0.69	MS, RI
45	28.23	2,2,6-Trimethyldecane	2.95	MS
46	28.69	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	2.08	MS
47	28.91	3-Methyl-1-butanol	165.15	MS, RI
48	29.52	5-(2-Methylpropyl)nonane	0.79	MS
49	30.09	5-Methyl-5-propylnonane	0.52	MS
50	30.36	2,2,5-Trimethyldecane	1.67	MS, RI
51	30.99	1-Pentanol	1.16	MS, RI
52	32.67	3,9-Dimethylundecane	1.04	MS
53	34.21	3-Methyldodecane	2.26	MS, RI
54	37.36	Methyl lactate	1.20	MS, RI
55	39.25	Ethyl lactane	2.95	MS
56	40.14	1-Hexanol	6.08	MS, RI
57	43.07	3-Octanol	5.88	MS
58	46.28	Acetic acid	416.03	MS, RI
59	47.44	Furfural	1.14	MS, RI
60	49.56	3-Pentyl hydroperoxide	6.73	MS
61	50.15	2-Hydroperoxy-pentane	10.78	MS
62	52.47	2-Ethoxy-3-chlorobutane	9.39	MS
63	52.79	Propanoic acid	0.56	MS, RI
64	53.05	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	4.57	MS
65	54.78	Isobutanoic acid	22.76	MS, RI
66	55.20	2,3-butanediol	2.03	MS, RI
67	56.31	Hexadecane	1.51	MS, RI
68	60.55	2-Furanmethanol	0.72	MS, RI
69	61.23	3-Methylbutanoic acid	22.14	MS, RI
70	71.51	Hexanoic acid	4.66	MS, RI
71	74.74	Butylated Hydroxytoluene	2.72	MS
72	75.01	Benzenemethanol	22.18	MS, RI
73	77.60	Benzothiazole	75.16	MS, RI
74	88.12	Ethyl 4-ethoxybenzoate	3.24	MS
75	91.33	4-Methyloctanoic acid	2.61	MS, RI
76	91.97	Ethyl hexadecanoate	1.63	MS, RI

77	93.47	Ethyl 2-hydroxy-3-phenylpropanoate	27.69	MS
78	94.58	2,4-Di-tert-butylphenol	0.94	MS
79	97.69	n-Pentadecanol	5.51	MS, RI
80	98.19	Ethyl hydrogen succinate	10.48	MS
81	105.33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	1.60	MS
82	108.67	1-Octadecanol	2.56	MS, RI
83	116.40	Hexadecanamide	1.15	MS
84	117.06	Dibutyl phthalate	8.05	MS
85	117.58	Tetradecanoic acid	6.56	MS, RI
86	140.78	Hexadecanoic acid	24.43	MS, RI

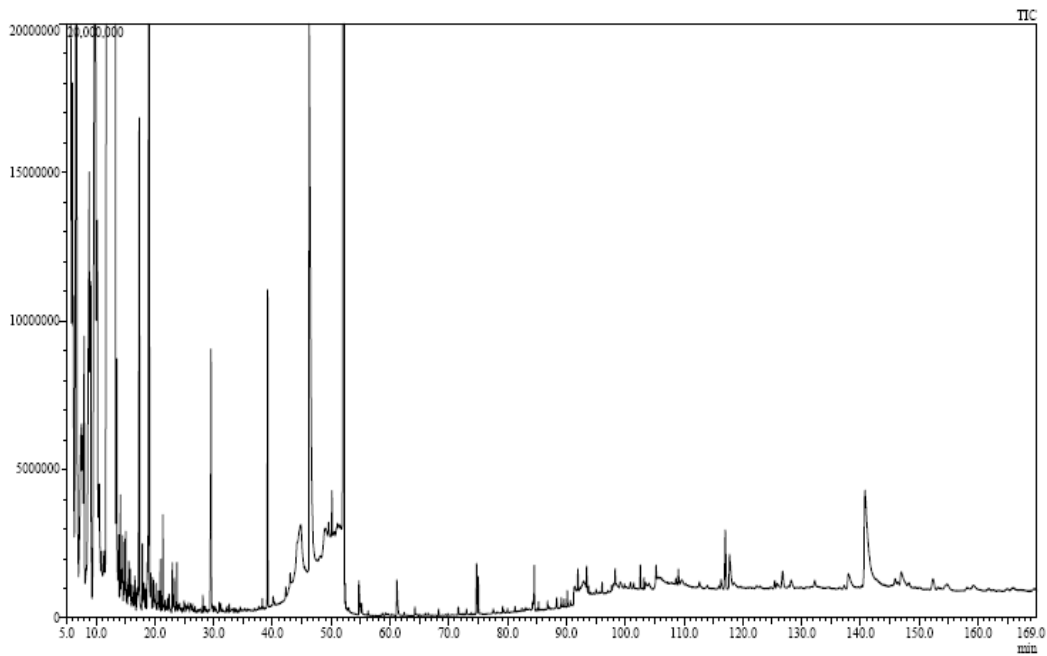


Fig. 73. Total ion chromatogram of sample SS-NO₂(1) fermentative alcohol.

Table VII. Major volatile compounds of sample SS-NO2(1) fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area (1.0×10^6)	Identification method
1	5.94	Acetaldehyde	167.60	MS, RI
2	6.67	2,2,5-Trimethylpentane	435.68	MS, RI
3	7.34	Ethoxybutane	72.32	MS, RI
4	7.71	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	34.64	MS, RI
5	7.94	Ethyl formate	84.53	MS, RI
6	8.77	2,2,4-Trimethylhexane	207.78	MS, RI
7	9.53	1,3,5-Trimethylcyclohexane	263.86	MS, RI
8	9.86	Ethyl acetate	277.89	MS, RI
9	10.06	1,1-Diethoxyethane	191.32	MS
10	10.61	3-Methyloctane	55.11	MS, RI
11	11.49	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	25.09	MS
12	12.77	Ethanol	3181.75	MS, RI
13	12.84	2,3-Dimethyloctane	69.43	MS, RI
14	12.95	2,5-Dimethyloctane	6.15	MS, RI
15	13.21	2,2,3-Trimethylheptane	9.94	MS, RI
16	13.53	1,2-Diethylcyclohexane	18.29	MS, RI
17	13.87	3-Pentanone	5.33	MS, RI
18	14.31	2,6-Dimethyloctane	5.93	MS, RI
19	14.71	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	12.33	MS
20	14.87	5-Methyldecane	11.46	MS, RI
21	15.08	4-Methyldecane	1.94	MS, RI
22	15.29	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	4.19	MS
23	15.40	3-Methyldecane	6.84	MS, RI
24	15.69	4,6-Dimethylnonane	6.35	MS, RI
25	16.44	n-Butyl acetate	5.57	MS, RI
26	16.57	3,8-Dimethylnonane	2.47	MS, RI
27	17.27	Toluene	133.45	MS, RI
28	17.79	2-Methyldecane	10.97	MS, RI
29	18.05	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	4.11	MS
30	18.38	5-Ethyl-2-methyloctane	2.92	MS, RI
31	18.99	1,2-Dichloroethane	440.09	MS, RI
32	19.65	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	4.72	MS
33	20.10	Hexanal	1.45	MS, RI
34	20.31	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	3.66	MS
35	22.02	3,7-Dimethylnonane	2.66	MS, RI
36	22.30	3-Pentanol	1.08	MS, RI
37	22.48	2,8-Dimethyldecane	3.33	MS, RI

38	23.14	5-propylnonane	2.52	MS, RI
39	23.24	2-Pentanol	6.27	MS, RI
40	24.14	o-Xylene	1.61	MS, RI
41	24.91	1-Butanol	2.68	MS, RI
42	25.48	3,8-Dimethyldecane	0.78	MS, RI
43	26.73	1-Penten-3-ol	0.61	MS, RI
44	26.94	3-Methylundecane	1.01	MS, RI
45	28.23	2,2,6-Trimethyldecane	1.38	MS
46	28.69	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	1.20	MS
47	28.91	3-Methyl-1-butanol	59.51	MS, RI
48	29.52	5-(2-Methylpropyl)nonane	1.16	MS
49	30.09	5-Methyl-5-propylnonane	1.93	MS
50	30.36	2,2,5-Trimethyldecane	2.16	MS, RI
51	30.99	1-Pentanol	1.19	MS, RI
52	32.67	3,9-Dimethylundecane	0.98	MS
53	34.21	3-Methyldodecane	0.62	MS, RI
54	37.36	Methyl lactate	1.99	MS, RI
55	39.25	Ethyl lactane	1.65	MS
56	40.14	1-Hexanol	2.43	MS, RI
57	43.07	3-Octanol	332.48	MS
58	46.28	Acetic acid	1.72	MS, RI
59	47.44	Furfural	2.13	MS, RI
60	49.56	3-Pentyl hydroperoxide	8.51	MS
61	50.15	2-Hydroperoxy-pentane	2.61	MS
62	52.47	2-Ethoxy-3-chlorobutane	0.54	MS
63	52.79	Propanoic acid	0.48	MS, RI
64	53.05	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	11.94	MS
65	54.78	Isobutanoic acid	2.40	MS, RI
66	55.20	2,3-butanediol	0.64	MS, RI
67	56.31	Hexadecane	0.39	MS, RI
68	60.55	2-Furanmethanol	13.20	MS, RI
69	61.23	3-Methylbutanoic acid	1.97	MS, RI
70	71.51	Hexanoic acid	1.03	MS, RI
71	74.74	Butylated Hydroxytoluene	10.21	MS
72	75.01	Benzenemethanol	9.08	MS, RI
73	77.60	Benzothiazole	1.18	MS, RI
74	88.12	Ethyl 4-ethoxybenzoate	2.59	MS
75	91.33	4-Methyloctanoic acid	0.57	MS, RI
76	91.97	Ethyl hexadecanoate	4.27	MS, RI
77	93.47	Ethyl	5.63	MS

		2-hydroxy-3-phenylpropanoate		
78	94.58	2,4-Di-tert-butylphenol	0.92	MS
79	97.69	n-Pentadecanol	0.99	MS, RI
80	98.19	Ethyl hydrogen succinate	2.88	MS
81	105.33	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	6.29	MS
82	108.67	1-Octadecanol	1.85	MS, RI
83	116.40	Hexadecanamide	3.06	MS
84	117.06	Dibutyl phthalate	24.47	MS
85	117.58	Tetradecanoic acid	20.13	MS, RI
86	140.78	Hexadecanoic acid	113.32	MS, RI

라. 기초담금의 방향성분 비교

Acetic acid : 신맛, Acetaldehyde : 사과향, Benzothiazole : 함황성분, 녹차향, 2,3-butandiol : 과일향, Butyl acetate : 달콤한 과일향(주요), Ethyl acetate : 과인에플 향, Furfural : 딸기꽃 향, 3-methylbutanoic acid : 달콤한 향, Pentanone: butter향 등의 특징 있는 성분들이 함유되어 있었다(Fig. 74).

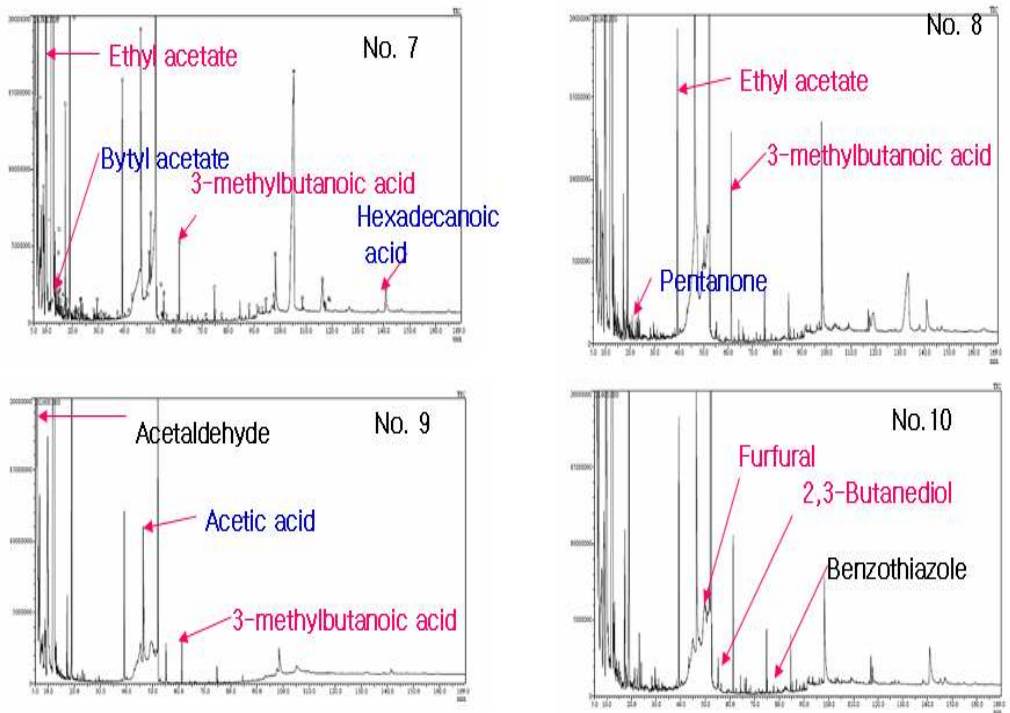


Fig. 74. Comparison of aromatic compounds with basic fermentation.

마. 개선한 담금의 방향성분

Acetic acid : 신맛, Acetaldehyde : 사과향, Benzothiazole : 함황성분, 녹차향, Butyl acetate : 달콤한 과일향(주요), 2,3-butandiol : 과일향, Ethyl acetate : 파인애플향, Ethyl formate : rum주의 주성분, Ethyl lactate : 술의 주된성분, Furfural : 딸기꽃향, 3-methyl-1-butanol : 술의 주성분, Pentanone: butter향 등이 함유 되어 있어 담그는 방법에 따라 방향성분의 특성이 달라지는 것을 알 수 있었다(Fig. 75).

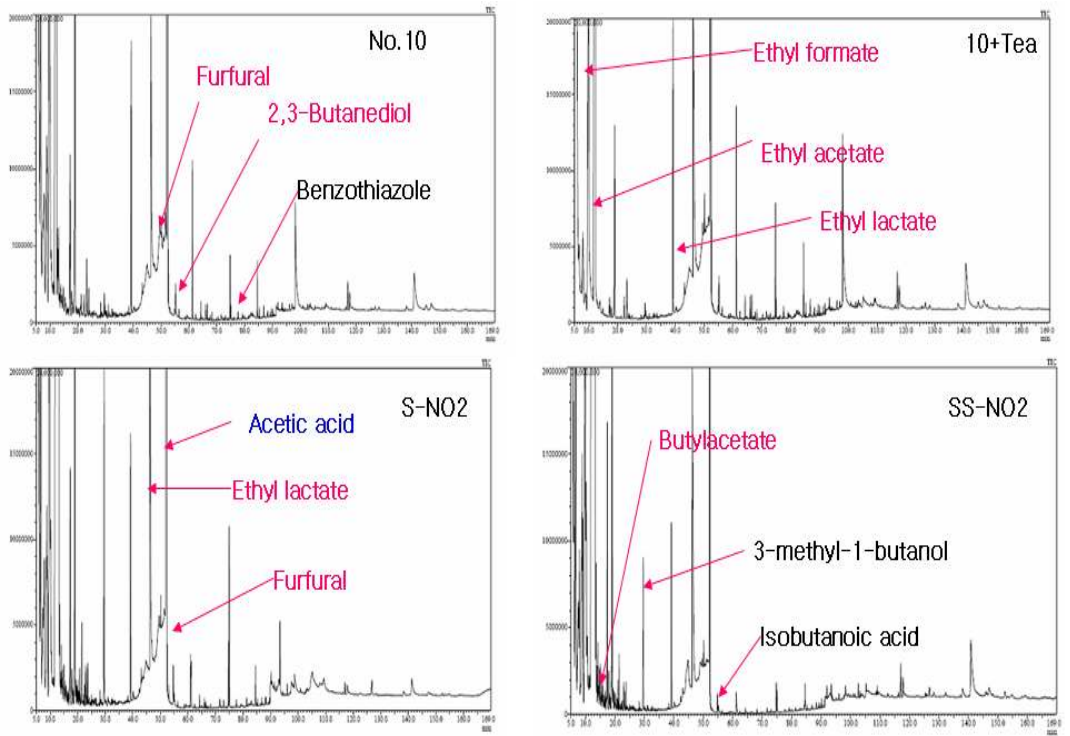


Fig. 75. Comparison of aromatic compounds with developed fermentation.

7. 4차 담금(2007.07.25)

가. 3차담금을 기본으로 맛의 증후함을 더하기 위하여 천연산물의 량을 증가시켜 발효를 행하였다.

No	참쌀	의이인	누룩	효모	물	증류주	DCHC	DAD	WGS	HWG	DOL	KAP	비고
1	2.0kg	1.0Kg	200g	30g	13.0L	최종 30%로 맞춤	300g	100g	30g	100g	10g	50g	
2	2.0kg	1.0Kg	200g	30g	13.0L	최종 30%로 맞춤	500g	150g	40g	100g	20g	70g	
3	2.0kg	1.0kg	200g	30g	13.0L	최종 30%로 맞춤	800g	200g	50g	200g	30g	100g	

나. 여과하여 4℃에 보관하여 후숙시켰다(8/16).

다. 기능의 향상을 위하여 0.25%의 녹차와 1%의 아가리쿠스버섯을 넣고 숙성시켰다.

제조술 명(O : Original)	0.25% 녹차(G)	1% 아가리쿠스(A)	비고
Alc-O-1	AO-1(1-1)		녹차 및 아가리쿠스를 첨가하지 않음
Alc-O-2	AO-2(2-1)		“
Alc-O-3	AO-3(3-1)		“
Alc-1	AO-1-0.25G(1-2)	AO-1-1A(1-4)	
Alc-2	AO-2-0.25G(2-2)	AO-2-1A(2-4)	
Alc-3	AO-3-0.25G(3-2)	AO-3-1A(3-4)	
ALc1-D2(2배 희석주)	AOD2-1-0.25G(1-3)	AOD2-1-1A(1-5)	
ALc2-D2(2배 희석주)	AOD2-2-0.25G(2-3)	AOD2-2-1A(2-5)	
ALc3-D2(2배 희석주)	AOD2-3-0.25G(3-3)	AOD2-3-1A(3-5)	

시료 기호	시료상태 (D2: Dilution x 2)	시료 기호	시료상태	시료 기호	시료상태
1-1	Alc-O-1	2-1	Alc-O-2	3-1	Alc-O-3
1-2	AO-1-0.25G(1-2)	2-2	AO-1-0.25G(2-2)	3-2	AO-1-0.25G(3-2)
1-3	AOD2-1-0.25G(1-3)	2-3	AOD2-1-0.25G(2-3)	3-3	AOD2-1-0.25G(3-3)
1-4	AO-1-1A(1-4)	2-4	AO-1-1A(2-4)	3-4	AO-1-1A(3-4)
1-5	AOD2-1-1A(1-5)	2-5	AOD2-1-1A(2-5)	3-5	AOD2-1-1A(3-5)

1) 휘발성 물질 추출

시료 100mL을 분액깔때기에 넣고 10% NaCl 50mL과 혼합한 다음 혼합 추출용매 (pentane: diethyl ether=1:1, v/v) 50mL을 가하여 격렬하게 흔든 다음 10분 정치후 pasture pipette을 이용하여 3회 반복 추출하였다. 추출물은 혼합하고 질소 가스를 이용하여 5mL로 농축한 다음 무수 Na_2SO_4 를 이용하여 물을 제거하였다. 다시 질소 가스를 이용하여 0.1mL로 농축하여 GC/MS의 시료로 사용하였다.

2) GC/MS분석 조건

술의 휘발성 추출물의 성분 확인을 위한 GC/MS조건은 Supelcowax-10 capillary column(30m x 0.25mm x 0.25 μm)을 이용하여 column 유속을 0.8ml/min, linear velocity는 21.6, column pressure를 46.9 kPa로 설정하고 oven 온도는 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 머무른 후, 220 $^{\circ}\text{C}$ 까지 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 승온하고 60분간 유지시켰다. MS 분석조건은 capillary direct interface 온도는 230 $^{\circ}\text{C}$; ion source 온도는 230 $^{\circ}\text{C}$; mass range는 35~350 a.m.u.; electron multiplier voltage는 1.00V 그리고 scan rate는 1/sec로 하였다.

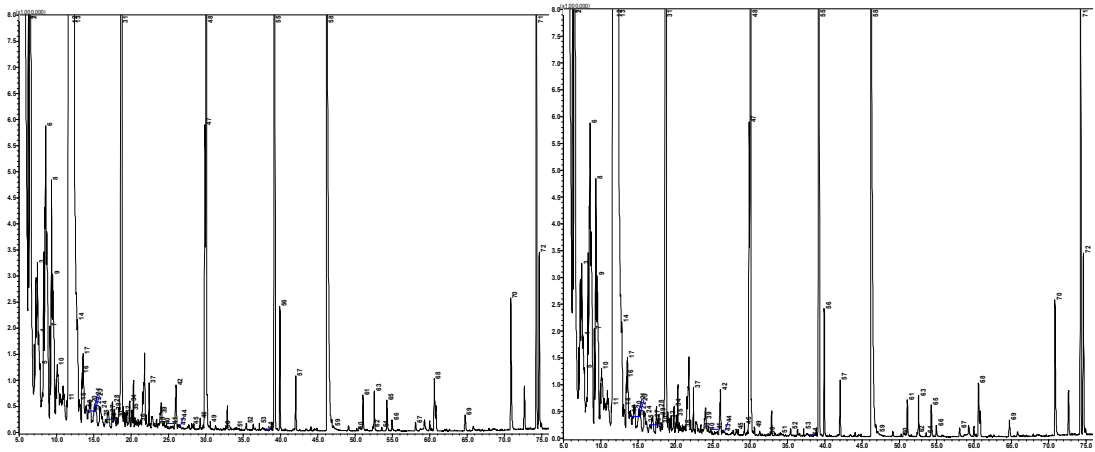


Fig. 76. Total ion chromatogram of 1-1

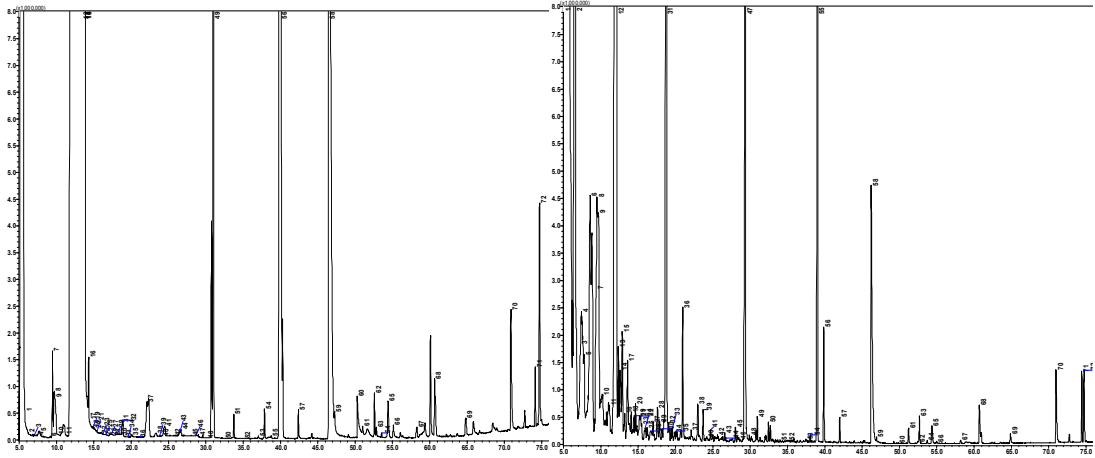


Fig. 77. Total ion chromatogram of 1-2 Fig. 79. Total ion chromatogram of 1-4

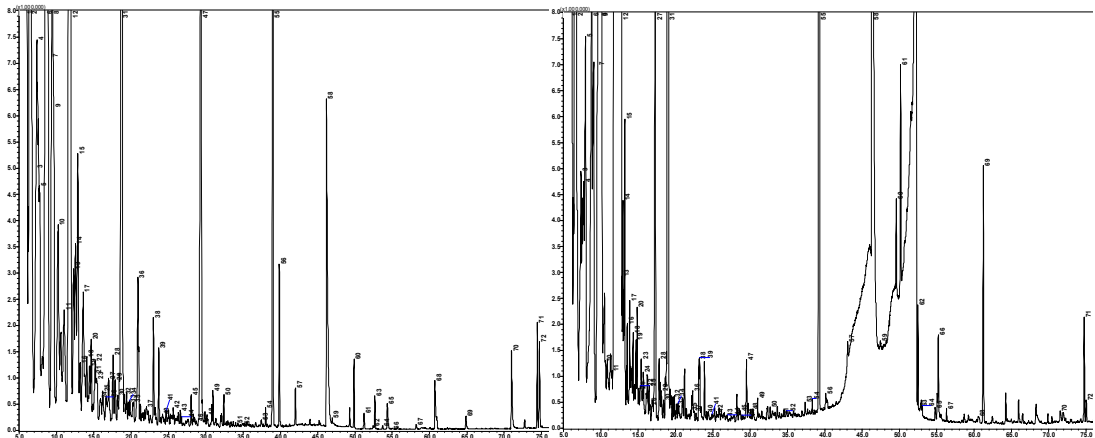


Fig. 78. Total ion chromatogram of 1-3 Fig. 80. Total ion chromatogram of 1-5

Table VIII. Major volatile compounds of sample No-1 group fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area(1.0×10^6)					Identification method
			1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	
1	6.07	Acetaldehyde	132.42	0.73	188.62	816.60	4.35	MS, RI
2	6.61	2,2,5-Trimethylpentane	375.38	0.14	475.67	150.26	0.77	MS, RI
3	7.49	Ethoxybutane	34.05	0.14	28.38	9.35	1.39	MS, RI
4	7.52	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	13.03	0.12	106.84	31.19	0.00	MS, RI
5	7.82	Ethyl formate	35.62	1.44	46.23	13.64	0.09	MS, RI
6	8.63	2,2,4-Trimethylhexane	108.93	0.13	209.02	111.27	0.21	MS, RI
7	9.44	1,3,5-Trimethylcyclohexane	22.90	8.28	28.45	17.54	0.17	MS, RI
8	9.51	Ethyl acetate	7.14	14.50	36.96	43.12	3.62	MS, RI
9	9.70	1,1-Diethoxyethane	45.78	4.98	21.99	51.28	3.67	MS
10	10.28	3-Methyloctane	43.45	0.21	55.34	12.61	1.47	MS, RI
11	11.39	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	3.05	0.16	34.82	2.76	16.49	MS
12	12.08	Ethanol	395.09	2854.76	443.40	484.67	2047.19	MS, RI
13	12.36	2,3-Dimethyloctane	21.51	572.48	32.02	10.85	105.60	MS, RI
14	12.62	2,5-Dimethyloctane	30.11	62.83	38.80	15.53	39.26	MS, RI
15	12.92	2,2,3,-Trimethylheptane	36.20	133.78	55.35	17.15	39.07	MS, RI
16	13.25	1,2-Diethylcyclohexane	8.93	9.76	10.40	4.46	628.47	MS, RI
17	13.63	3-Pentanone	28.41	0.46	35.99	14.06	252.89	MS, RI
18	14.12	2,6-Dimethyloctane	7.70	1.03	9.82	3.73	10.53	MS, RI
19	14.49	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	9.27	0.67	9.90	3.11	0.73	MS
20	14.70	5-Methyldecane	8.20	0.55	10.85	4.82	0.06	MS, RI
21	15.21	4-Methyldecane	5.45	0.14	1.76	4.79	0.09	MS, RI
22	15.38	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	3.12	0.20	8.68	5.13	0.12	MS
23	15.50	3-Methyldecane	2.28	0.02	8.87	1.62	0.02	MS, RI
24	16.00	4,6-Dimethylnonane	5.52	0.02	5.89	2.92	0.00	MS, RI
25	16.23	n-Butyl acetate	3.11	0.02	6.24	2.25	0.02	MS, RI
26	16.72	3,8-Dimethylnonane	5.19	0.12	5.93	2.89	0.00	MS, RI
27	17.04	Toluene	6.79	0.15	10.22	3.45	0.02	MS, RI
28	17.62	2-Methyldecane	7.78	0.02	9.64	4.52	0.17	MS, RI
29	17.89	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	5.04	0.15	6.87	2.93	0.00	MS
30	18.23	5-Ethyl-2-methyloctane	3.03	0.02	3.90	1.70	0.02	MS, RI
31	18.77	1,2-Dichloroethane	330.09	1.28	516.96	267.92	15.32	MS, RI
32	19.13	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	4.60	1.48	4.81	0.91	0.02	MS
33	19.66	Hexanal	2.03	0.01	2.55	1.45	0.02	MS, RI
34	19.91	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	2.68	0.00	3.37	1.30	0.14	MS
35	20.13	3,7-Dimethylnonane	3.29	0.44	5.75	1.09	0.03	MS, RI
36	20.98	3-Pentanol	29.13	0.01	31.40	14.46	0.04	MS, RI
37	22.10	2,8-Dimethyldecane	2.76	7.48	2.92	1.23	0.98	MS, RI
38	23.01	5-propylnonane	11.86	0.80	14.67	6.45	0.05	MS, RI
39	23.72	2-Pentanol	5.77	0.02	8.99	3.42	0.01	MS, RI
40	24.13	o-Xylene	2.84	0.04	2.64	0.69	0.05	MS, RI

41	24.69	1-Butanol	2.40	2.63	2.24	1.42	0.02	MS, RI
42	25.64	3,8-Dimethyldecane	5.59	0.02	3.64	0.62	0.00	MS, RI
43	26.37	1-Penten-3-ol	2.70	0.35	1.47	0.67	0.08	MS, RI
44	26.59	3-Methylundecane	1.80	1.01	0.77	0.30	0.06	MS, RI
45	28.16	2,2,6-Trimethyldecane	59.69	0.04	3.75	1.67	0.00	MS
46	28.75	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	0.32	0.12	0.65	0.45	0.03	MS
47	29.42	3-Methyl-1-butanol	236.85	0.31	215.71	128.44	0.00	MS, RI
48	30.19	5-(2-Methylpropyl)nonane	1.39	0.02	1.42	0.83	0.01	MS
49	30.99	5-Methyl-5-propylnonane	5.70	108.87	3.60	2.39	10.43	MS
50	32.46	2,2,5-Trimethyldecane	3.51	0.02	3.32	2.00	0.00	MS, RI
51	34.01	1-Pentanol	0.36	2.41	0.51	0.26	0.01	MS, RI
52	34.93	3,9-Dimethylundecane	0.31	0.00	0.24	0.14	0.05	MS
53	37.45	3-Methyldodecane	0.77	0.23	1.01	0.53	0.69	MS, RI
54	38.03	Methyl lactate	1.22	3.27	1.95	0.73	8.12	MS, RI
55	39.05	Ethyl lactane	133.23	0.41	113.52	84.05	0.05	MS
56	39.89	1-Hexanol	18.11	246.62	17.55	11.67	140.54	MS, RI
57	42.03	3-Octanol	4.24	3.05	4.05	2.67	0.32	MS
58	46.10	Acetic acid	127.27	370.20	76.79	53.86	296.88	MS, RI
59	46.96	Furfural	0.49	1.14	0.52	0.38	2.12	MS, RI
60	49.87	3-Pentyl hydroperoxide	2.71	10.65	7.21	0.02	31.01	MS
61	51.23	2-Hydroperoxypentane	2.29	1.26	2.01	1.87	0.32	MS
62	52.41	2-Ethoxy-3-chlorobutane	0.54	4.93	0.50	0.20	0.86	MS
63	52.68	Propanoic acid	3.31	1.19	3.51	2.65	3.89	MS, RI
64	53.71	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	0.39	0.42	0.41	0.35	3.03	MS
65	54.32	Isobutanoic acid	4.73	6.35	4.21	2.74	11.22	MS, RI
66	54.98	2,3-butanediol	0.42	1.95	0.18	0.29	1.47	MS, RI
67	58.18	Hexadecane	0.77	2.27	0.67	0.52	2.56	MS, RI
68	60.70	2-Furanmethanol	9.40	11.23	8.40	6.15	41.93	MS, RI
69	64.85	3-Methylbutanoic acid	2.03	3.72	1.98	1.45	1.37	MS, RI
70	70.97	Hexanoic acid	12.99	20.65	12.77	11.27	2.25	MS, RI
71	74.45	Benzenemethanol	6.90	6.30	11.38	7.31	2.27	MS
72	74.75	Butylated Hydroxytoluene	10.24	32.35	11.82	9.63	5.77	MS, RI
73	76.98	Benzothiazole	0.64	1.28	0.66	0.54	0.28	MS, RI
74	81.03	4-Hydroxynonanoic acid lactone	1.63	7.70	1.66	1.30	1.10	MS
75	82.51	Octanoic acid	0.58	0.98	0.46	0.43	1.13	MS, RI
76	88.06	Ethyl 4-ethoxybenzoate	0.54	19.99	0.55	0.29	0.06	MS, RI
77	93.18	Ethyl 2-hydroxy-3-phenylpropanoate	4.73	43.57	4.93	3.35	6.85	MS
78	97.38	n-Pentadecanol	0.92	27.25	0.61	0.66	0.72	MS

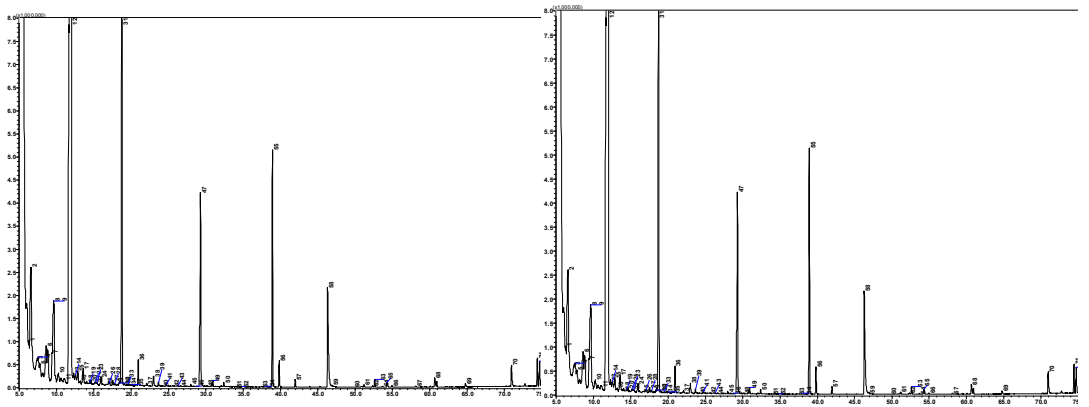


Fig. 81. Total ion chromatogram of 2-1

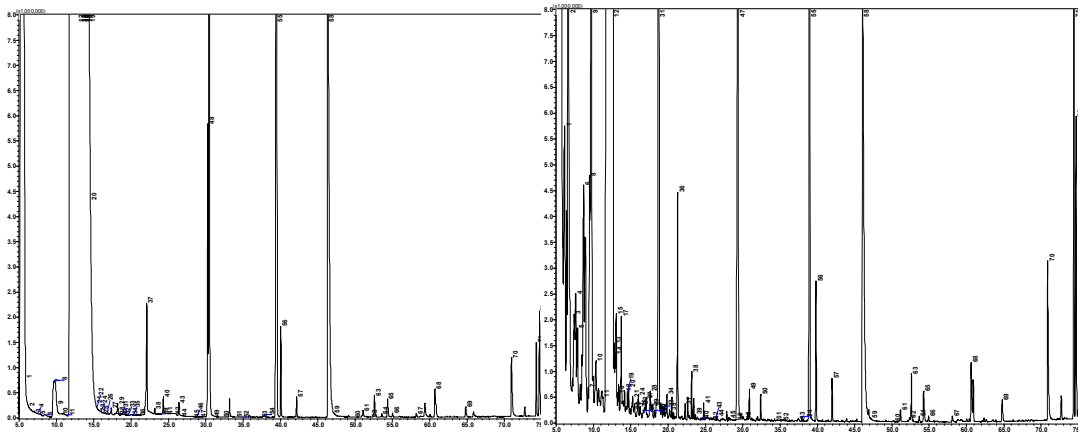


Fig. 82. Total ion chromatogram of 2-2 Fig. 84. Total ion chromatogram of 2-4

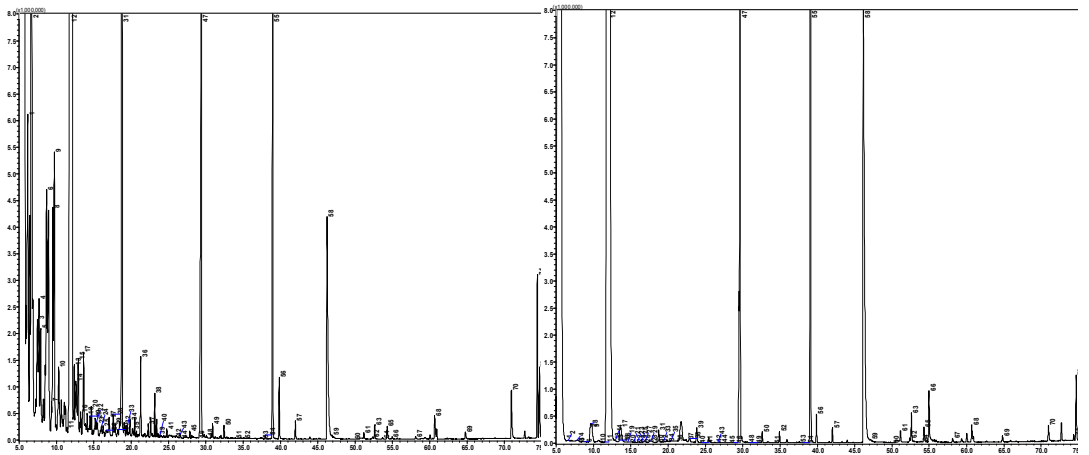


Fig. 83. Total ion chromatogram of 2-3 Fig. 85. Total ion chromatogram of 2-5

Table IX. Major volatile compounds of sample No-2 group fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area(1.0×10^6)					Identification method
			2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	
1	6.07	Acetaldehyde	0.39	2.04	44.62	40.60	0.26	MS, RI
2	6.61	2,2,5-Trimethylpentane	25.94	0.10	119.93	148.42	0.13	MS, RI
3	7.49	Ethoxybutane	3.08	0.17	16.34	16.51	0.09	MS, RI
4	7.52	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	3.35	0.00	20.19	20.42	0.12	MS, RI
5	7.82	Ethyl formate	2.47	0.02	13.77	14.22	0.22	MS, RI
6	8.63	2,2,4-Trimethylhexane	8.88	0.27	47.39	47.14	0.16	MS, RI
7	9.44	1,3,5-Trimethylcyclohexane	2.92	7.60	2.86	2.54	1.13	MS, RI
8	9.51	Ethyl acetate	8.36	12.64	28.62	30.73	7.56	MS, RI
9	9.70	1,1-Diethoxyethane	8.64	0.67	47.29	114.68	1.61	MS
10	10.28	3-Methyloctane	2.04	0.00	14.12	13.05	0.15	MS, RI
11	11.39	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	0.21	0.07	0.48	2.08	0.03	MS
12	12.08	Ethanol	355.83	1765.04	196.87	1554.08	551.17	MS, RI
13	12.36	2,3-Dimethyloctane	2.03	590.30	8.36	10.08	0.02	MS, RI
14	12.62	2,5-Dimethyloctane	2.19	50.14	11.83	1.31	0.02	MS, RI
15	12.92	2,2,3-Trimethylheptane	2.37	732.33	12.40	13.87	0.03	MS, RI
16	13.25	1,2-Diethylcyclohexane	0.70	1078.32	2.06	1.93	0.00	MS, RI
17	13.63	3-Pentanone	3.20	2.54	10.99	13.04	4.69	MS, RI
18	14.12	2,6-Dimethyloctane	0.35	2.03	1.67	2.86	0.14	MS, RI
19	14.49	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	0.25	7.59	1.83	2.38	0.00	MS
20	14.70	5-Methyldecane	0.50	17.35	2.63	2.60	0.05	MS, RI
21	15.21	4-Methyldecane	0.34	0.29	2.97	3.70	0.03	MS, RI
22	15.38	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	0.45	0.35	1.35	0.67	0.01	MS
23	15.50	3-Methyldecane	0.15	0.01	1.06	1.17	0.01	MS, RI
24	16.00	4,6-Dimethylnonane	1.29	0.02	1.26	4.11	0.01	MS, RI
25	16.23	n-Butyl acetate	0.40	0.02	1.42	1.59	0.00	MS, RI
26	16.72	3,8-Dimethylnonane	0.67	0.06	1.73	1.35	0.06	MS, RI
27	17.04	Toluene	0.67	0.65	2.41	3.09	0.11	MS, RI
28	17.62	2-Methyldecane	0.25	0.10	2.90	5.42	0.16	MS, RI
29	17.89	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	0.17	1.36	1.74	2.09	0.22	MS
30	18.23	5-Ethyl-2-methyloctane	0.43	0.00	0.90	1.20	0.03	MS, RI
31	18.77	1,2-Dichloroethane	67.80	0.03	232.58	248.82	1.85	MS, RI
32	19.13	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	0.13	0.00	0.74	0.07	0.01	MS
33	19.66	Hexanal	0.18	0.03	0.78	1.08	0.02	MS, RI
34	19.91	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	0.17	0.27	1.65	3.33	0.22	MS
35	20.13	3,7-Dimethylnonane	0.25	0.02	1.33	1.70	0.05	MS, RI
36	20.98	3-Pentanol	3.22	0.00	8.99	23.93	0.02	MS, RI
37	22.10	2,8-Dimethyldecane	0.29	17.93	1.25	1.45	0.29	MS, RI
38	23.01	5-propylnonane	1.60	0.60	4.08	4.48	0.81	MS, RI
39	23.72	2-Pentanol	0.58	0.03	0.36	0.62	2.72	MS, RI
40	24.13	o-Xylene	0.09	1.95	0.24	0.26	0.00	MS, RI
41	24.69	1-Butanol	0.20	0.03	0.93	1.67	0.00	MS, RI
42	25.64	3,8-Dimethyldecane	0.15	0.02	0.04	0.19	0.03	MS, RI
43	26.37	1-Penten-3-ol	0.06	1.50	0.42	0.06	0.00	MS, RI
44	26.59	3-Methylundecane	0.19	0.02	0.04	0.41	0.02	MS, RI
45	28.16	2,2,6-Trimethyldecane	0.29	0.00	0.81	0.37	0.01	MS
46	28.75	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	0.01	0.01	0.05	0.14	0.00	MS

47	29.42	3-Methyl-1-butanol	30.93	0.00	83.66	181.65	68.03	MS, RI
48	30.19	5-(2-Methylpropyl)nonane	0.09	30.95	0.18	0.15	0.08	MS
49	30.99	5-Methyl-5-propylnonane	0.68	0.22	1.41	3.25	0.01	MS
50	32.46	2,2,5-Trimethyldecane	0.51	0.03	1.34	2.73	1.05	MS, RI
51	34.01	1-Pentanol	0.03	0.01	0.13	0.27	0.00	MS, RI
52	34.93	3,9-Dimethylundecane	0.02	0.02	0.08	0.18	1.27	MS
53	37.45	3-Methyldecane	0.09	0.00	0.10	0.28	0.11	MS, RI
54	38.03	Methyl lactate	0.09	0.36	0.40	0.51	0.00	MS, RI
55	39.05	Ethyl lactane	29.18	144.35	53.99	115.11	98.31	MS
56	39.89	1-Hexanol	3.16	9.82	6.35	15.27	2.84	MS, RI
57	42.03	3-Octanol	0.89	2.34	1.95	4.75	1.55	MS
58	46.10	Acetic acid	19.79	148.18	44.04	140.75	106.19	MS, RI
59	46.96	Furfural	0.25	0.33	0.16	0.10	0.27	MS, RI
60	49.87	3-Pentyl hydroperoxide	0.00	0.00	0.00	0.09	0.01	MS
61	51.23	2-Hydroperoxypentane	0.32	0.82	0.73	1.49	1.41	MS
62	52.41	2-Ethoxy-3-chlorobutane	0.18	0.02	0.26	0.64	0.56	MS
63	52.68	Propanoic acid	0.89	3.26	1.52	5.32	3.41	MS, RI
64	53.71	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	0.10	0.37	0.18	0.63	0.08	MS
65	54.32	Isobutanoic acid	0.80	2.87	1.86	5.26	2.15	MS, RI
66	54.98	2,3-butanediol	0.19	0.49	0.30	0.67	6.98	MS, RI
67	58.18	Hexadecane	0.16	0.56	0.41	0.93	0.58	MS, RI
68	60.70	2-Furanmethanol	1.67	4.70	3.84	10.35	2.75	MS, RI
69	64.85	3-Methylbutanoic acid	0.46	1.58	1.03	3.53	0.87	MS, RI
70	70.97	Hexanoic acid	3.38	10.31	7.09	25.17	2.37	MS, RI
71	74.45	Benzenemethanol	3.45	8.76	17.68	56.67	0.58	MS
72	74.75	Butylated Hydroxytoluene	3.92	15.07	9.59	41.44	8.62	MS, RI
73	76.98	Benzothiazole	0.25	0.59	0.53	1.95	0.09	MS, RI
74	81.03	4-Hydroxynonanoic acid lactone	1.08	2.33	1.60	10.44	0.66	MS
75	82.51	Octanoic acid	0.22	0.55	0.41	1.98	0.16	MS, RI
76	88.06	Ethyl 4-ethoxybenzoate	0.53	0.53	0.17	2.70	0.40	MS, RI
77	93.18	Ethyl 2-hydroxy-3-phenylpropanoate	4.32	8.62	5.98	44.71	5.94	MS
78	97.38	n-Pentadecanol	0.61	1.48	0.55	0.69	1.17	MS

MS, RI was identified with mass spectral data and retention indices (RI) of an authentic compound; MS, LRI was identified with mass spectral data and retention indices of published literatures; MS was identified with only mass spectral data of published literatures.

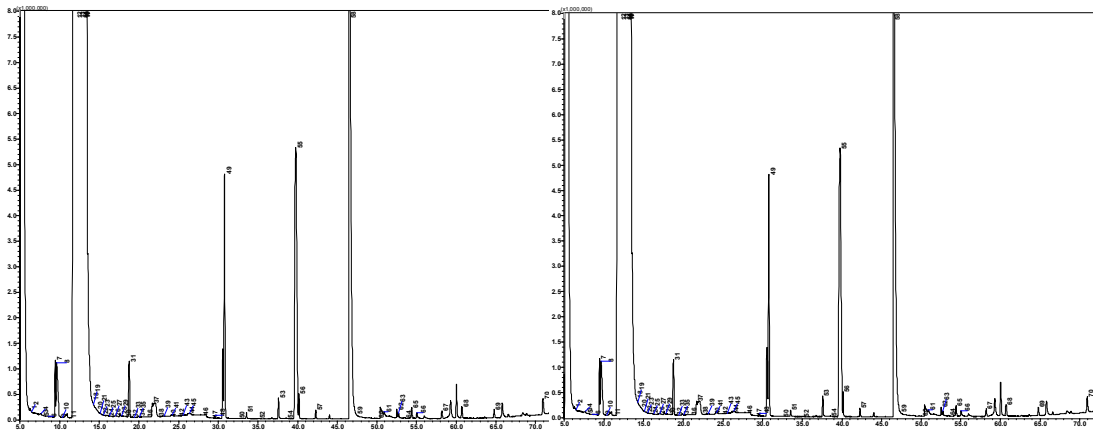


Fig. 86. Total ion chromatogram of 3-1

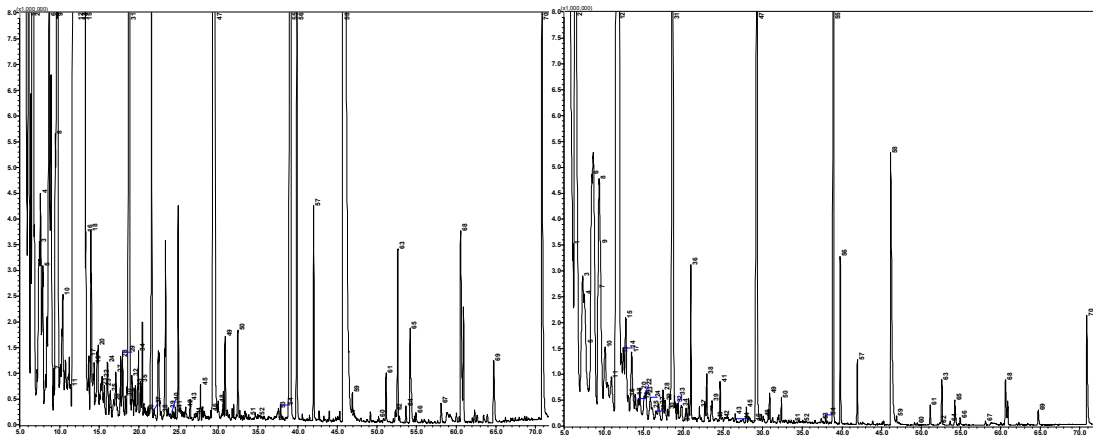


Fig. 87. Total ion chromatogram of 3-2 Fig. 89. Total ion chromatogram of 3-4

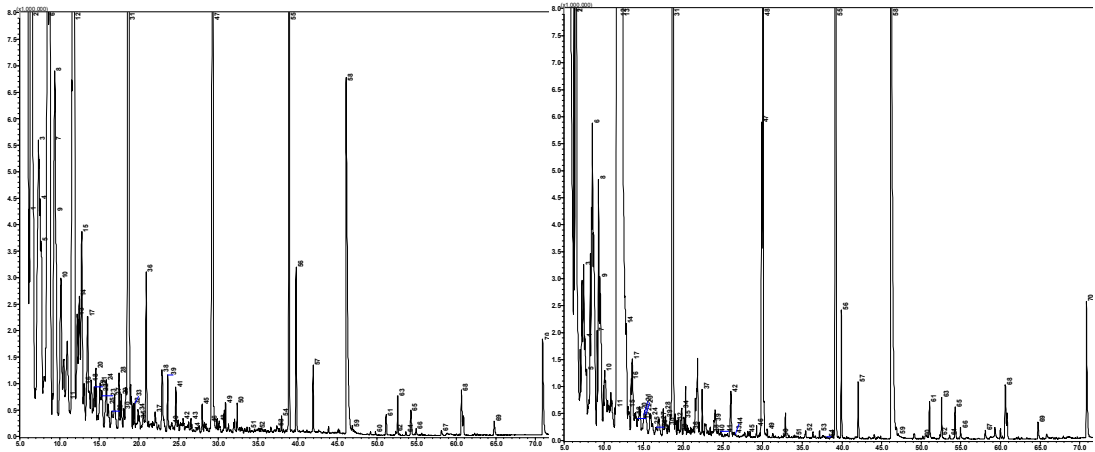


Fig. 88. Total ion chromatogram of 3-3 Fig. 90. Total ion chromatogram of 3-5

Table X. Major volatile compounds of sample No-3 group fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area(1.0×10^6)					Identification method
			3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	
1	6.07	Acetaldehyde	0.35	74.23	3.62	1.36	54.09	MS, RI
2	6.61	2,2,5-Trimethylpentane	0.09	269.76	387.44	237.04	155.58	MS, RI
3	7.49	Ethoxybutane	0.43	28.55	10.73	39.78	24.52	MS, RI
4	7.52	2,3,4-Trimethyl-2-pentene	0.51	75.96	1.18	34.13	13.10	MS, RI
5	7.82	Ethyl formate	0.07	27.78	35.25	2.98	3.49	MS, RI
6	8.63	2,2,4-Trimethylhexane	0.02	100.40	159.83	55.50	38.64	MS, RI
7	9.44	1,3,5-Trimethylcyclohexane	5.38	4.32	26.08	9.19	8.04	MS, RI
8	9.51	Ethyl acetate	14.71	40.22	119.04	99.22	33.29	MS, RI
9	9.70	1,1-Diethoxyethane	0.11	148.07	32.62	11.22	38.54	MS
10	10.28	3-Methyloctane	0.06	27.77	40.23	19.42	6.97	MS, RI
11	11.39	cis-1,1,3,5-Tetramethylcyclohexane	0.00	3.18	0.27	11.23	1.69	MS
12	12.08	Ethanol	284.99	734.96	315.22	493.21	477.37	MS, RI
13	12.36	2,3-Dimethyloctane	235.12	14.20	24.14	1.85	785.37	MS, RI
14	12.62	2,5-Dimethyloctane	200.40	11.62	29.29	6.29	3.60	MS, RI
15	12.92	2,2,3,-Trimethylheptane	32.22	2244.98	40.81	15.88	1.15	MS, RI
16	13.25	1,2-Diethylcyclohexane	23.85	14.21	7.31	1.36	4.98	MS, RI
17	13.63	3-Pentanone	21.50	9.74	30.28	17.54	14.44	MS, RI
18	14.12	2,6-Dimethyloctane	0.15	34.29	7.68	3.25	1.64	MS, RI
19	14.49	1-Ethyl-2,3-dimethylcyclohexane	0.44	9.24	8.52	2.17	1.53	MS
20	14.70	5-Methyldecane	0.51	18.22	8.66	4.60	2.77	MS, RI
21	15.21	4-Methyldecane	0.06	5.38	10.42	3.46	1.13	MS, RI
22	15.38	1-Ethyl-1,3-dimethylcyclohexane	0.07	7.74	8.39	2.98	4.73	MS
23	15.50	3-Methyldecane	0.05	5.22	2.55	4.49	3.69	MS, RI
24	16.00	4,6-Dimethylnonane	0.07	9.45	11.68	5.98	3.43	MS, RI
25	16.23	n-Butyl acetate	0.02	4.56	4.83	2.85	1.87	MS, RI
26	16.72	3,8-Dimethylnonane	0.08	4.36	4.01	2.11	1.99	MS, RI
27	17.04	Toluene	0.03	9.00	8.26	4.59	2.58	MS, RI
28	17.62	2-Methyldecane	0.23	8.75	8.14	5.17	4.03	MS, RI
29	17.89	1-Ethyl-1,4-dimethylcyclohexane	0.00	11.87	5.91	3.98	4.30	MS
30	18.23	5-Ethyl-2-methyloctane	0.07	3.33	3.24	2.06	1.78	MS, RI
31	18.77	1,2-Dichloroethane	8.76	403.24	442.66	340.69	310.25	MS, RI
32	19.13	1-Ethyl-2-propylcyclohexane	0.06	5.04	2.54	1.01	1.10	MS
33	19.66	Hexanal	0.01	3.11	2.67	1.77	0.27	MS, RI
34	19.91	(1,2-Dimethylpropyl)cyclohexane	0.18	9.47	4.24	2.65	3.34	MS
35	20.13	3,7-Dimethylnonane	0.00	5.21	1.41	0.08	1.16	MS, RI
36	20.98	3-Pentanol	0.00	0.26	22.07	16.48	0.56	MS, RI
37	22.10	2,8-Dimethyldecane	0.79	0.87	2.90	1.91	4.08	MS, RI
38	23.01	5-propylnonane	0.09	1.08	15.12	7.58	0.50	MS, RI
39	23.72	2-Pentanol	0.13	1.40	7.37	2.69	1.85	MS, RI
40	24.13	o-Xylene	0.00	1.06	2.63	0.68	0.32	MS, RI
41	24.69	1-Butanol	0.16	1.12	6.72	5.20	0.56	MS, RI
42	25.64	3,8-Dimethyldecane	0.00	1.71	4.07	0.75	8.20	MS, RI
43	26.37	1-Penten-3-ol	0.06	1.90	1.70	0.89	0.38	MS, RI
44	26.59	3-Methylundecane	0.18	0.77	0.30	0.31	0.12	MS, RI
45	28.16	2,2,6-Trimethydecane	0.13	3.95	3.65	2.17	0.51	MS

46	28.75	2,2,3,4,6,6-Hexamethylheptane	0.00	0.79	0.61	0.23	1.15	MS
47	29.42	3-Methyl-1-butanol	0.02	584.02	197.07	181.12	38.25	MS, RI
48	30.19	5-(2-Methylpropyl)nonane	0.26	2.79	1.94	0.69	120.11	MS
49	30.99	5-Methyl-5-propylnonane	36.62	7.64	3.16	3.55	0.91	MS
50	32.46	2,2,5-Trimethyldecane	0.02	9.45	3.00	3.11	0.21	MS, RI
51	34.01	1-Pentanol	0.68	0.43	0.52	0.38	0.20	MS, RI
52	34.93	3,9-Dimethylundecane	0.03	0.44	0.15	0.23	0.94	MS
53	37.45	3-Methyldecane	2.25	1.46	0.91	0.70	0.66	MS, RI
54	38.03	Methyl lactate	0.05	1.55	1.70	0.95	0.21	MS, RI
55	39.05	Ethyl lactane	94.36	273.03	100.05	99.20	119.29	MS
56	39.89	1-Hexanol	2.06	56.35	17.79	17.90	13.39	MS, RI
57	42.03	3-Octanol	0.95	23.96	7.23	7.10	5.76	MS
58	46.10	Acetic acid	157.38	537.16	80.77	58.96	143.33	MS, RI
59	46.96	Furfural	0.18	2.13	0.75	0.64	0.14	MS, RI
60	49.87	3-Pentyl hydroperoxide	0.07	0.46	0.25	0.16	0.16	MS
61	51.23	2-Hydroperoxypentane	0.84	6.32	2.58	2.62	4.40	MS
62	52.41	2-Ethoxy-3-chlorobutane	1.08	1.85	0.64	0.43	0.47	MS
63	52.68	Propanoic acid	0.58	20.00	4.12	5.21	4.45	MS, RI
64	53.71	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpropanoate	0.09	1.85	0.37	0.45	0.41	MS
65	54.32	Isobutanoic acid	1.47	18.06	4.27	4.27	4.32	MS, RI
66	54.98	2,3-butanediol	0.86	1.24	0.94	0.86	1.40	MS, RI
67	58.18	Hexadecane	1.21	3.14	0.69	0.63	1.19	MS, RI
68	60.70	2-Furanmethanol	2.12	33.55	8.02	7.97	8.49	MS, RI
69	64.85	3-Methylbutanoic acid	1.20	12.19	2.25	2.32	2.57	MS, RI
70	70.97	Hexanoic acid	2.67	88.15	15.40	17.42	19.87	MS, RI
71	74.45	Benzenemethanol	1.11	166.50	19.67	12.04	75.51	MS
72	74.75	Butylated Hydroxytoluene	6.55	120.81	14.16	15.65	24.90	MS, RI
73	76.98	Benzothiazole	0.18	5.89	0.81	0.93	0.65	MS, RI
74	81.03	4-Hydroxynonanoic acid lactone	0.97	34.94	1.82	3.15	7.58	MS
75	82.51	Octanoic acid	0.16	5.76	0.49	0.69	1.47	MS, RI
76	88.06	Ethyl 4-ethoxybenzoate	0.74	10.27	1.22	1.71	1.02	MS, RI
77	93.18	Ethyl 2-hydroxy-3-phenylpropanoate	7.07	132.10	4.88	8.94	25.01	MS
78	97.38	n-Pentadecanol	1.90	46.08	0.84	0.44	3.31	MS

MS, RI was identified with mass spectral data and retention indices (RI) of an authentic compound; MS, LRI was identified with mass spectral data and retention indices of published literatures; MS was identified with only mass spectral data of published literatures.

3) 개발한 발효주의 향미성분의 분석

가) 1번 발효주의 향미성분

Table XI. Major flavor compounds of sample No-1 group fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area(1.0×10^6)					Identification method
			1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	
1	6.07	Acetaldehyde	132.42	0.73	188.62	816.60	4.35	MS, RI
8	9.51	Ethyl acetate	7.14	14.50	36.96	43.12	3.62	MS, RI
12	12.08	Ethanol	395.09	2854.76	443.40	484.67	2047.19	MS, RI
55	39.05	Ethyl lactate	133.23	0.41	113.52	84.05	0.05	MS
58	46.10	Acetic acid	127.27	370.20	76.79	53.86	296.88	MS, RI
66	54.98	2,3-butenediol	0.42	1.95	0.18	0.29	1.47	MS, RI
27	17.04	Toluene	6.79	0.15	10.22	3.45	0.02	MS, RI
71	74.45	Benzenemethanol	6.90	6.30	11.38	7.31	2.27	MS
73	76.98	Benzothiazole	0.64	1.28	0.66	0.54	0.28	MS, RI
41	24.69	1-Butanol	2.40	2.63	2.24	1.42	0.02	MS, RI
25	16.23	n-Butyl acetate	3.11	0.02	6.24	2.25	0.02	MS, RI
5	7.82	Ethyl formate	35.62	1.44	46.23	13.64	0.09	MS, RI
59	46.96	Furfural	0.49	1.14	0.52	0.38	2.12	MS, RI
68	60.70	2-Furanmethanol	9.40	11.23	8.40	6.15	41.93	MS, RI
33	19.66	Hexanal	2.03	0.01	2.55	1.45	0.02	MS, RI
56	39.89	1-Hexanol	18.11	246.62	17.55	11.67	140.54	MS, RI
70	70.97	Hexanoic acid	12.99	20.65	12.77	11.27	2.25	MS, RI
65	54.32	Isobutanoic acid	4.73	6.35	4.21	2.74	11.22	MS, RI
69	64.85	3-Methylbutanoic acid	2.03	3.72	1.98	1.45	1.37	MS, RI
57	42.03	3-Octanol	4.24	3.05	4.05	2.67	0.32	MS
36	20.98	3-Pentanol	29.13	0.01	31.40	14.46	0.04	MS, RI
17	13.6	3-Pentanone	28.41	0.46	35.99	14.06	252.89	MS, RI
63	52.68	Propanoic acid	3.31	1.19	3.51	2.65	3.89	MS, RI

나) 2번 발효주의 향미성분

Table XII. Major flavor compounds of sample No-2 group fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area(1.0×10^6)					Identification method
			2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	
1	6.07	Acetaldehyde	0.39	2.04	44.62	40.60	0.26	MS, RI
8	9.51	Ethyl acetate	8.36	12.64	28.62	30.73	7.56	MS, RI
12	12.08	Ethanol	355.83	1765.04	196.87	1554.08	551.17	MS, RI
55	39.05	Ethyl lactane	29.18	144.35	53.99	115.11	98.31	MS
58	46.10	Acetic acid	19.79	148.18	44.04	140.75	106.19	MS, RI
66	54.98	2,3-butanediol	0.19	0.49	0.30	0.67	6.98	MS, RI
27	17.04	Toluene	0.67	0.65	2.41	3.09	0.11	MS, RI
71	74.45	Benzenemethanol	3.45	8.76	17.68	56.67	0.58	MS
73	76.98	Benzothiazole	0.25	0.59	0.53	1.95	0.09	MS, RI
41	24.69	1-Butanol	0.20	0.03	0.93	1.67	0.00	MS, RI
25	16.23	n-Butyl acetate	0.40	0.02	1.42	1.59	0.00	MS, RI
5	7.82	Ethyl formate	2.47	0.02	13.77	14.22	0.22	MS, RI
59	46.96	Furfural	0.25	0.33	0.16	0.10	0.27	MS, RI
68	60.70	2-Furanmethanol	1.67	4.70	3.84	10.35	2.75	MS, RI
33	19.66	Hexanal	0.18	0.03	0.78	1.08	0.02	MS, RI
56	39.89	1-Hexanol	3.16	9.82	6.35	15.27	2.84	MS, RI
70	70.97	Hexanoic acid	3.38	10.31	7.09	25.17	2.37	MS, RI
65	54.32	Isobutanoic acid	0.80	2.87	1.86	5.26	2.15	MS, RI
69	64.85	3-Methylbutanoic acid	0.46	1.58	1.03	3.53	0.87	MS, RI
57	42.03	3-Octanol	0.89	2.34	1.95	4.75	1.55	MS
36	20.98	3-Pentanol	3.22	0.00	8.99	23.93	0.02	MS, RI
17	13.63	3-Pentanone	3.20	2.54	10.99	13.04	4.69	MS, RI
63	52.68	Propanoic acid	0.89	3.26	1.52	5.32	3.41	MS, RI

다) 3번 발효주의 향미성분

Table XIII. Major flavor compounds of sample No-3 group fermentative alcohol.

Peak NO	Retention Time	Compounds	Peak area(1.0×10^6)					Identification method
			3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	
1	6.07	Acetaldehyde	0.35	74.23	3.62	1.36	54.09	MS, RI
8	9.51	Ethyl acetate	14.71	40.22	119.04	99.22	33.29	MS, RI
12	12.08	Ethanol	284.99	734.96	315.22	493.21	477.37	MS, RI
55	39.05	Ethyl lactane	94.36	273.03	100.05	99.20	119.29	MS
58	46.10	Acetic acid	157.38	537.16	80.77	58.96	143.33	MS, RI
66	54.98	2,3-butanediol	0.86	1.24	0.94	0.86	1.40	MS, RI
27	17.04	Toluene	0.03	9.00	8.26	4.59	2.58	MS, RI
71	74.45	Benzenemethanol	1.11	166.50	19.67	12.04	75.51	MS
73	76.98	Benzothiazole	0.18	5.89	0.81	0.93	0.65	MS, RI
41	24.69	1-Butanol	0.16	1.12	6.72	5.20	0.56	MS, RI
25	16.23	n-Butyl acetate	0.02	4.56	4.83	2.85	1.87	MS, RI
5	7.82	Ethyl formate	0.07	27.78	35.25	2.98	3.49	MS, RI
59	46.96	Furfural	0.18	2.13	0.75	0.64	0.14	MS, RI
68	60.70	2-Furanmethanol	2.12	33.55	8.02	7.97	8.49	MS, RI
33	19.66	Hexanal	0.01	3.11	2.67	1.77	0.27	MS, RI
56	39.89	1-Hexanol	2.06	56.35	17.79	17.90	13.39	MS, RI
70	70.97	Hexanoic acid	2.67	88.15	15.40	17.42	19.87	MS, RI
65	54.32	Isobutanoic acid	1.47	18.06	4.27	4.27	4.32	MS, RI
69	64.85	3-Methylbutanoic acid	1.20	12.19	2.25	2.32	2.57	MS, RI
57	42.03	3-Octanol	0.95	23.96	7.23	7.10	5.76	MS
36	20.98	3-Pentanol	0.00	0.26	22.07	16.48	0.56	MS, RI
17	13.63	3-Pentanone	21.50	9.74	30.28	17.54	14.44	MS, RI
63	52.68	Propanoic acid	0.58	20.00	4.12	5.21	4.45	MS, RI

라) 최적 발효주의 선별

Table XIV. Characteristics of major flavor compounds in fermentative alcohol.

성분	특징	대상
Ethyl acetate	과실향, 파인에폴 향	우리나라 전통 민속주, 맵쌀탁주, 맥주, 청주 농도가 높으면 고미의 원인이 됨.
Ethyl lactane	buttery, scotch 향,	술의주요한 향미 성분으로 작용함
2,3-butanediol	발효식품의 풍미 부여, 과일향을 냄	맥주, 포도주, 탁주, 일반적으로 술에 많이 함유된 성분
Benzenemethanol	장미꽃향, 오렌지꽃의 정유	맥주의 주요 향기 성분
Benzothiazole	차잎(tea leaves)에서 추출된 향기	향을 함유하는 성분,
n-Butyl acetate	달콤한 과일 향	술의 중요한 향미성분
Ethyl formate	rum의 술에서 향미 성분	
Furfural	딸기나 꽃의 향을 주는 성분	일반적으로 술에 많이 함유함
2-Furanmethanol	caramel, woody, sweet 등 다양한 향	술에 좋은 영향을 줌
1-Hexanol	허브향	대부분의 술에서 주요한 향미성분
3-Methylbutanoic acid	달콤한 향	많은 술에서 발견
3-Octanol	사과향	다른 술에서는 잘 발견되지 않는 성분
3-Pentanol	wine 향기	
Acetaldehyde	녹색풀 향, 특쓰는 향	
Acetic acid	휘발성 산미 성분	산화 생성물로서 자극취
1-Butanol	약(medicinal)냄새	대부분의 술에 함유함(좋지 않음)
Hexanal	풀(green)향을 내는 성분	일반적으로 나쁜영향
Hexanoic acid	땀 냄새의 불쾌한 성분	
Isobutanoic acid	산패 버터향	술의 향에 나쁜영향
3-Pentanone	지방산, butter 향(좋지 않은 향)	

술의 향기성분을 좋은 영향을 미치는 flavor 류와 그다지 좋은 영향을 미치지 않는 성분으로 나누어 식별하여, 각각의 제조된 술에 대하여 각 향기성분의 HPLC peak 면적으로 그 성분의 강도를 나타내었으며, 15종류의 술에 대하여 해당성분의 Peak 면적이 가장 큰 술을 15점으로 하고 차 순위의 peak 면적에 순차적으로 순위를 매겨 15점부터 1점까지 주어 그 점수를 합산함으로써 좋은 영향을 미치는 성분이 어는 술의 시료에서 많은가를 분석하였으며, 여기에 해당되는 향기성분은 Ethyl acetate, Ethanol, Ethyl lactane, 2,3-butanediol, Benzenemethanol, Benzothiazole, n-Butyl acetate, Ethyl formate, Furfural, 2-Furanmethanol, 1-Hexanol, 3-Methylbutanoic acid, 3-Octanol, 3-Pentanol등으로 하였고, 좋은 영향을 미치지 않는 성분들, 즉 Acetaldehyde, Acetic acid, 1-Butanol, Hexanal, Hexanoic acid, Isobutanoic acid, 3-Pentanone들은 역으로 그 성분의 peak 면적이 가장 작은 것을 15점으로 하고 면적의 크기에 따라 1점까지 점수를 부여하여 점수가 높을수록 유해도가 적도록 하였다. 그리고 좋은 영향을 미치는 성분의 합과 좋은 영향을 미치지 않는 성분의 점수를 합하여 객관적으로 보았을 때 가장 점수가 높은 술을 좋은 술로 판단하였다.

Table XV. Raking of the peak area of major good flavor compounds of each sample in fermentative alcohol.

성분 (flavor)	peak area																	
	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	소계	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	소계	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	소계
Ethyl acetate	2	6	11	13	1	33	4	5	8	9	3	29	7	13	15	14	10	59
Ethanol																		
Ethyl lactane	13	2	10	5	1	31	3	14	4	11	7	39	6	15	9	8	12	50
2,3-butanediol	5	14	1	3	13	36	2	6	4	7	15	34	8	11	10	9	12	50
Benzenemethanol	6	5	9	7	3	30	4	8	11	13	1	37	2	15	12	10	14	53
Benzothiazole	8	13	10	6	4	41	3	7	5	14	1	30	2	15	11	12	9	49
n-Butyl acetate	12	5	15	10	2	44	6	3	7	8	1	25	4	13	14	11	9	51
Ethyl	14	5	15	9	3	46	6	1	10	11	4	32	2	12	13	7	8	42

formate																			
Furfural	9	13	10	8	14	54	5	7	3	1	6	22	4	15	12	11	2	44	
2-Furanmethanol	11	13	9	6	15	54	1	5	4	12	3	25	2	14	8	7	10	41	
1-Hexanol	12	15	9	6	14	56	3	5	4	8	2	22	1	13	10	11	7	42	
3-Methylbutanoic acid	9	14	8	6	5	42	1	7	3	13	2	26	4	15	10	11	12	52	
3-Octanol	10	8	9	7	1	35	2	6	5	11	4	28	3	15	14	13	12	57	
3-Pentanol	14	3	15	10	5	47	8	2	9	13	4	36	1	6	12	11	7	37	
순위 (flavor)	6	8	5	9	10		14	12	11	5	13		15	1	2	3	7		

Table XVI. Raking of the peak area of major bad flavor compounds of each sample in fermentative alcohol.

성분 (bad flavor)	peak area																	
	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	소계	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	소계	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	소계
Acetaldehyde	3	12	2	1	8	26	13	10	6	7	15	51	14	4	9	11	5	43
Acetic acid	8	2	11	13	3	37	15	5	14	7	9	50	4	1	10	12	6	33
1-Butanol	4	3	5	7	14	33	11	13	9	6	15	54	12	8	1	2	10	33
Hexanal	4	14	3	6	12	39	10	11	8	7	13	49	15	1	2	5	9	32
Hexanoic acid	7	3	8	9	15	42	12	10	11	2	14	49	13	1	6	5	4	29
Isobutanoic acid	5	3	9	11	2	30	15	10	13	4	12	54	14	1	8	7	6	36
3-Pentanone	4	15	2	8	1	30	13	14	10	9	12	58	5	11	3	6	7	32
Sum	35	52	40	55	55	237	89	73	71	42	90	365	77	27	39	48	47	238
Raking	14	8	12	7	7		2	4	5	11	1		3	15	13	9	10	

Ethyl acetate(과실향), Ethyl lactane(scotch 향), 2,3-butanediol(과일향), Benzenemethano(장미꽃향), Benzothiazole(차잎향), n-Butyl acetate(과일향), 3-Methylbutanoic acid(달콤한 향), 3-Octanol(다른 술에서는 잘 보이지 않는 성분)을 나타내는 향기성분들은 No3 술이 No1 이나 No2 술보다도 많은 것으로 나타났으며, Furfural(딸기향), 2-Furanmethanol(caramel, woody 향), 1-Hexanol(허브향) 등은 No1 술에서 많이 생성하였다. 따라서 발효주의 구성성분을 조절함으로써 향이 다른 발효주

의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

특히 3-2번술은 3-1술에 녹차 및 아가리쿠스를 첨가한 것으로 No1 술은 그 성분 분석에서 좋은 성분을 별로 갖지 못하였으나 녹차를 첨가하여 후숙시킨 후의 향기 성분이 많이 형성되는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 녹차는 향기성분의 탈취역할을 하여 사용할 수 있는 범위가 제한되었으나 본 실험에서는 녹차의 이용이 향을 조절 할 수 있으며, 다른 향기성분도 형성하는 것으로 나타났다. 같은 경향은 아가리쿠스의 첨가에서도 보이며 향기성분이 좋지 않은 No1술에 아가리쿠스를 첨가하였을 때 향기성분이 많이 증가되는 것으로 나타났다.

그리고 No1술을 2배희석하여 도수를 배로 낮춘 술에서도 향미성분의 효과를 그대로 가지고 있으므로 낮은 도수의 술의 제조에도 좋은 영향을 미칠것으로 판단된다.

Table XVII. Total ranking of the peak area from total sum of good and bad major bad flavor compounds of each sample in fermentative alcohol.

성분 (flavor)	peak area																	
	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	sum	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	sum	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	sum
good flavor	125	116	131	96	81	549	48	76	77	131	53	385	46	172	150	135	124	627
bad flavor	35	52	40	55	55	237	89	73	71	42	90	365	77	27	39	48	47	238
Total sum	160	168	171	151	96	786	137	149	148	173	143	740	123	199	186	183	171	865
Total ranking	8	7	6	9	15		13	10	11	4	12		14	1	2	3	6	

Acetic acid(산미), 1-Butanol(약냄새), Hexana(생취), Hexanoic acid(산패 지방 냄새), Isobutanoic acid(산패 버터향), 3-Pentanone(지방산, 버터향)등 발효주에 좋지 않은 영향을 미치는 성분은 No2술에서 적게 나타났으며 No3 및 No1술은 그 경향이 비슷하게 나타났다. 따라서, 좋은 영향을 미치는 성분과 좋지 않은 영향을 미치는 성분들의 량을 합산하여 이론적인 좋은 술을 선별하였으며, 다음의 결과에서 3-2 발효주가 그 향미가 좋은 것으로 나타났다.

4) Ethanol 분석

시료 10 mL을 취한 다음, Filter paper(0.45 μ m)로 여과하고 이 용액을 HPLC로 분석하였다. HPLC(JASCO, Japan)에 Aminex HPX-87H과 Reflective index(Shimadzu Kyoto, Japan) 검출기 연결하고 oven 온도는 50 $^{\circ}$ C, 이동상으로는 5mM sulfuric acid (0.6mL/min)을 사용하여 당, 젖산, ethanol을 분하였다. 시료의 정량은 표준물질을 이용하여 standard 검량선을 작성하여 분석하였다.

5) 유기산 분석

시료를 filter paper(0.45 μ m)로 여과하고 이 용액을 Shimadzu 유기산 분석기를 사용하여 분석하였다. HPLC의 구성은 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, Sil-20AC auto-sampler, CDD-10A detector, CBM-20A system controller, LC Workstation software를 이용한다. column은 ion exchange Shim-pack SPR-102H(7.8 \times 250 mm)를 2개 직렬로 연결하고, Shim-pack SPR-H guard column (7.8 \times 50.0mm)을 사용하였다. 이동상은 4mM p-toluenesulfonic acid를 사용하였으며 유속은 0.8 mL/min로 조절하고 injection volumn은 10 μ L주입하며 post-column 방법을 이용하여 유기산을 유도체화 한 후 CDD 검출기를 사용하였다. 반응시약으로 4mM p-toluenesulfonic acid와 100 μ M EDTA를 포함하는 16mM Bis-Tris 용액을 반응시약으로 사용하였다. 총 분석시간은 30분 이었으며 유기산 표준물질을 탈 이온화 증류수에 용해시켜 0.1~30 μ L/mL 범위의 표준용액을 조제하여 HPLC 분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하여 정량한다.

가) No-1 발효주의 유기산 및 알콜함량

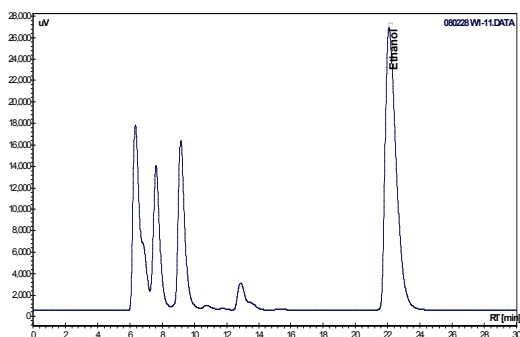


Fig. 91. Alcohol chromatogram 1-1

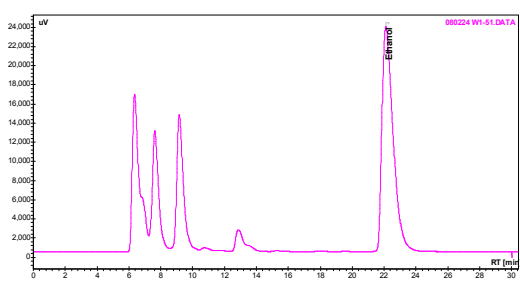
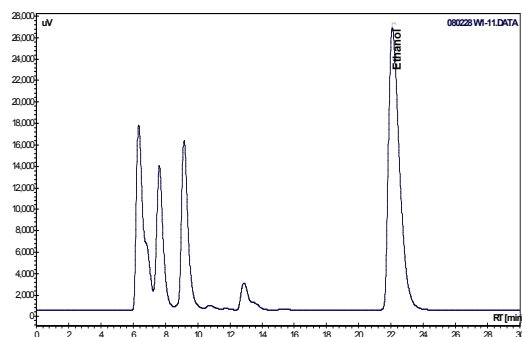


Fig. 92. Alcohol chromatogram 1-2

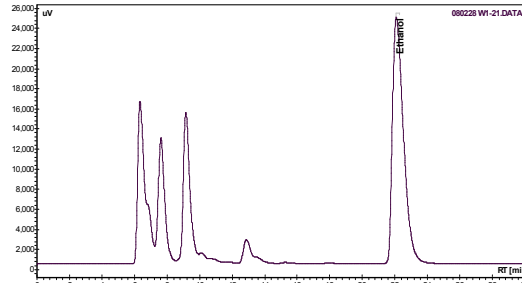


Fig. 94. Alcohol chromatogram 1-4

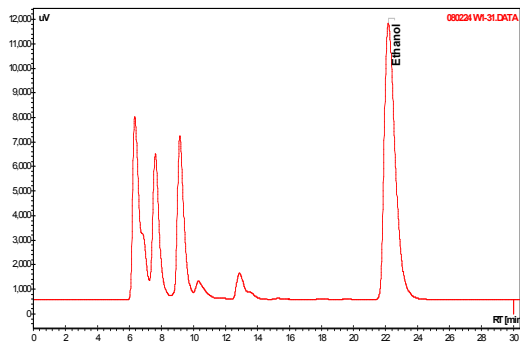


Fig. 93. Alcohol chromatogram 1-3

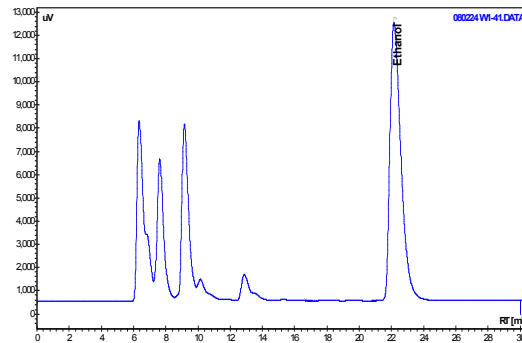


Fig. 95. Alcohol chromatogram 1-5

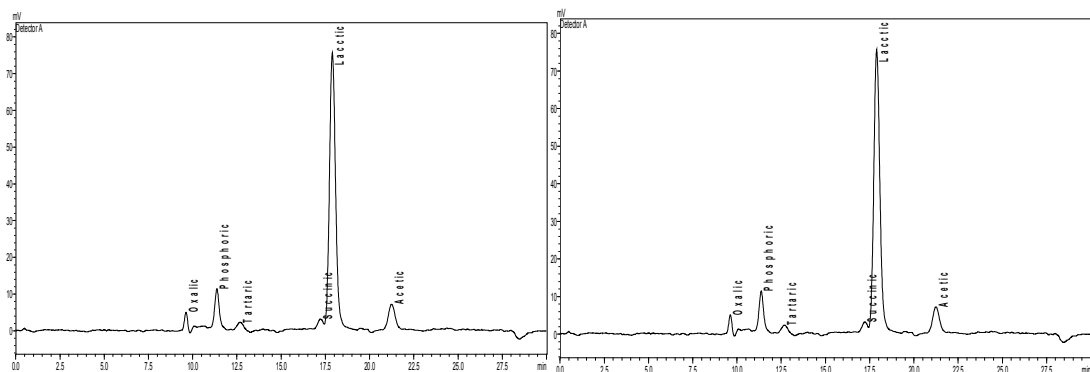


Fig. 96. Organic acid chromatogram 1-1

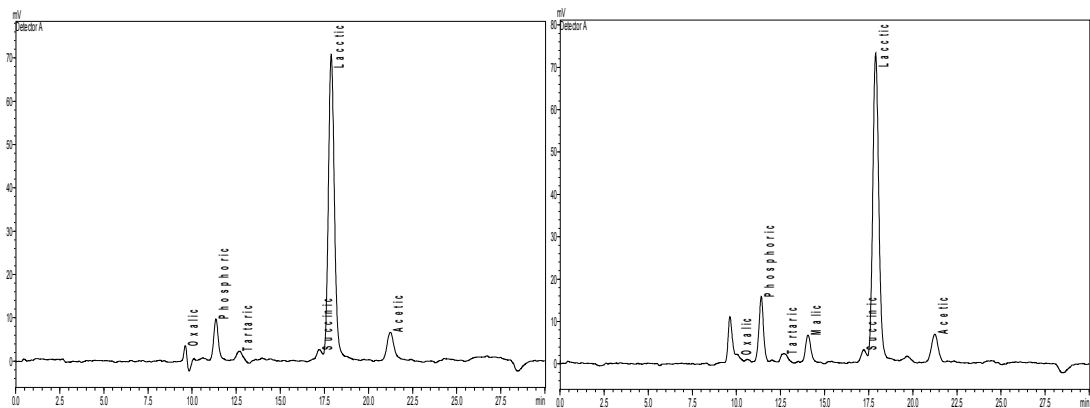


Fig. 97. Organic acid chromatogram 1-2

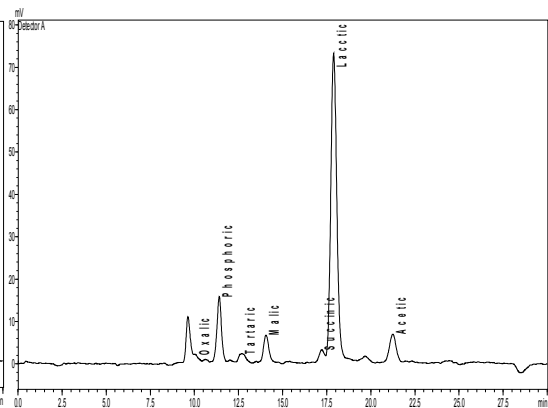


Fig. 99. Organic acid chromatogram 1-4

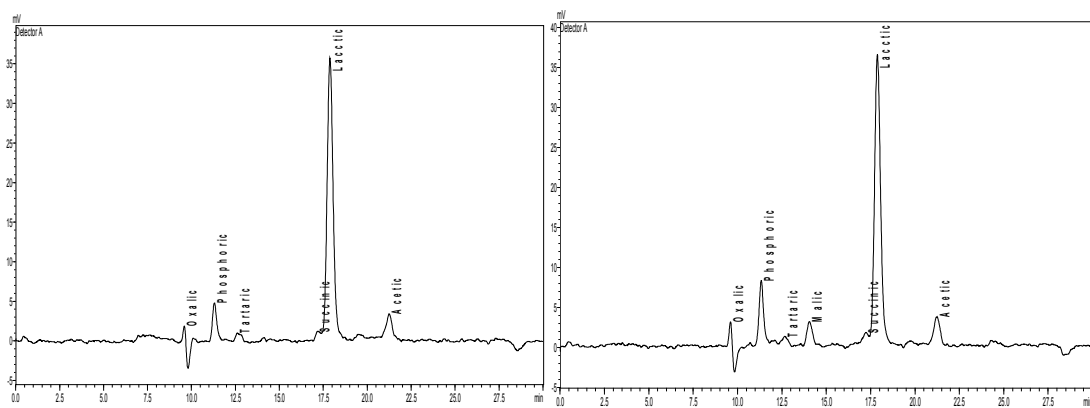


Fig. 98. Organic acid chromatogram 1-3

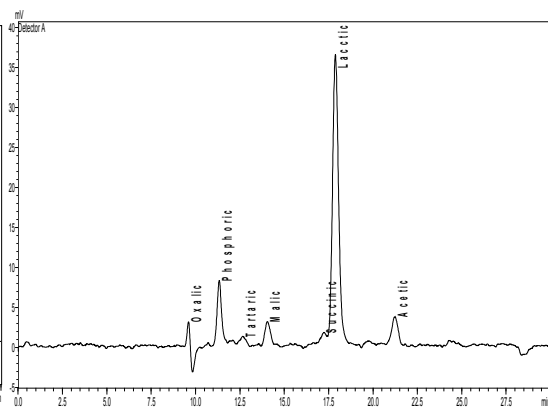


Fig. 100. Organic acid chromatogram 1-5

Table XVIII. Total amounts of organic acids from No-1 group sample in fermentative alcohol.

	(mg/100g)				
	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5
Oxalic acid	14.93	13.01	10.25	5.69	12.63
Phosphoric acid	253.01	225.6	105.67	349.91	181.73
Citric acid	0	0	0	0	0
Tartaric acid	66.52	61.76	25.65	59.15	25.67
Malic acid	0	0	0	33.18	16.71
Succinic acid	46.49	34.99	24.1	48.5	12.51
Lactic acid	658.25	610.81	310.97	630.17	310.48
Formic acid	0	0	0	0	0
Acetic acid	44.59	40.78	17.29	40.13	18.78
Sum	1083.79	986.95	493.93	1166.73	578.51
Ethanol(g/100g)	19.2	18.6	8.8	19.0	9.4

1-1의 발효주를 기준으로 녹차를 추가한 1-2와 아가리쿠스를 추가한 1-4의 발효주를 비교해볼때 1-4의 발효주에서 유기산의 농도가 높은 것으로 나타났다. 특히 phosphoric acid는 1-2의 발효주에서 많은 감소가 일어났으나, 1-4의 발효주에서는 많이 증가된 것을 볼 수 있고, 또한 latic acid는 공통으로 줄어든 것으로 나타났다. Succinic acid는 1-2의 발효주에서 감소되는 것으로 나타났으나, 1-4의 발효주에서는 증가되는 것으로 나타났고 특히 oxalic acid는 1-4의 발효주에서 현저히 줄어든 것으로 나타났다.

녹차를 첨가한 그룹의 발효주가 유기산 생성을 억제하는 반면 아가리쿠스는 유기산을 증가시키는 효과가 있어 발효주의 맛의 형성에 특징적으로 이용할 수 있을 것으로 보인다.

나) No-2 발효주의 유기산 및 알콜함량

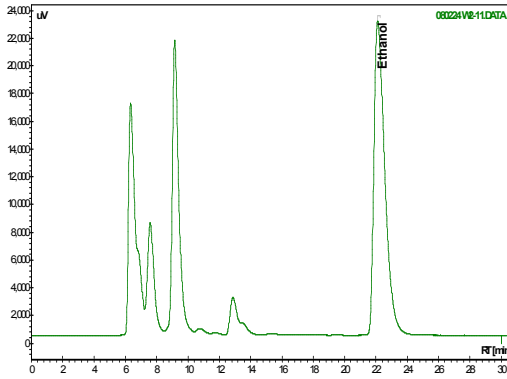


Fig. 101. Alcohol chromatogram 2-1

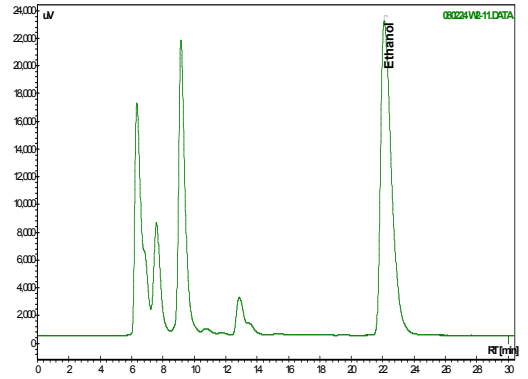


Fig. 102. Alcohol chromatogram 2-2

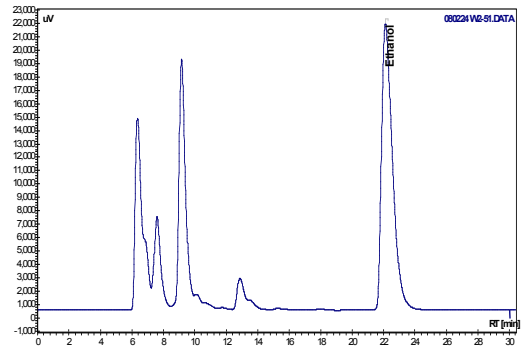


Fig. 104. Alcohol chromatogram 2-4

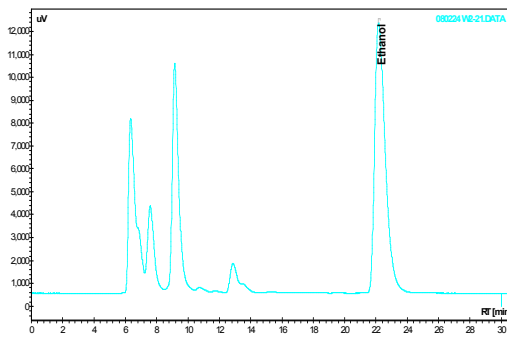


Fig. 103. Alcohol chromatogram 2-3

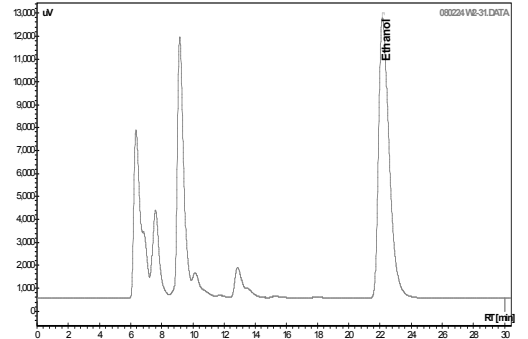


Fig. 105. Alcohol chromatogram 2-5

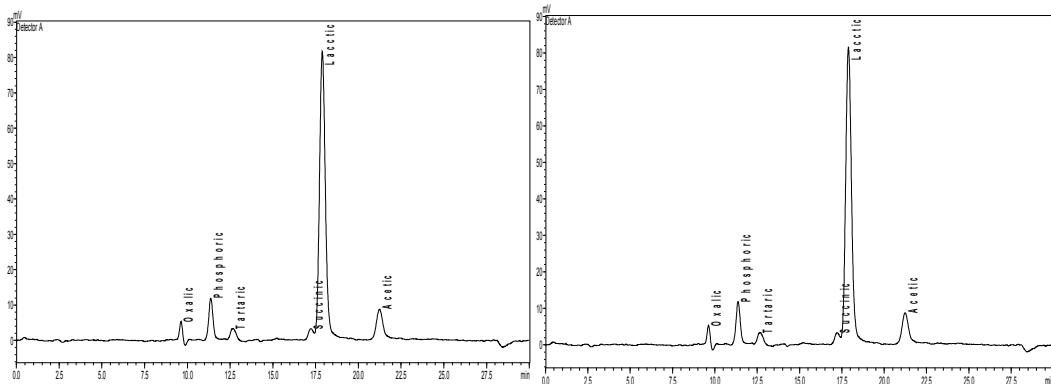


Fig. 106. Organic acid chromatogram 2-1

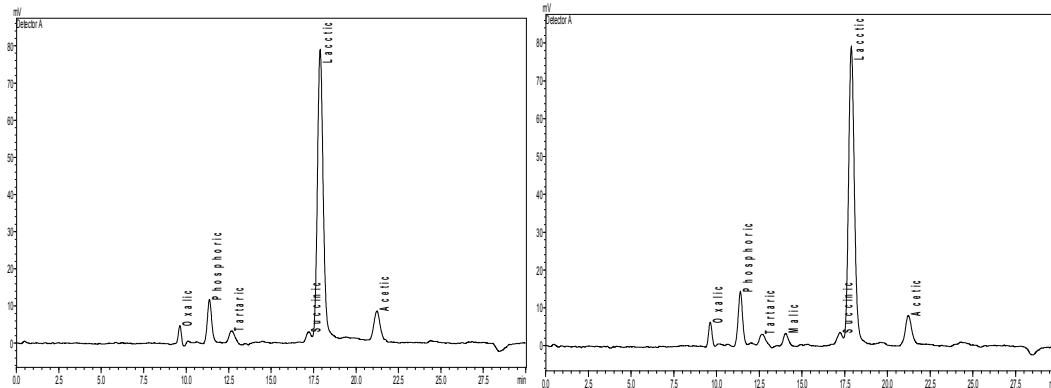


Fig. 107. Organic acid chromatogram 2-2

Fig. 109. Organic acid chromatogram 2-4

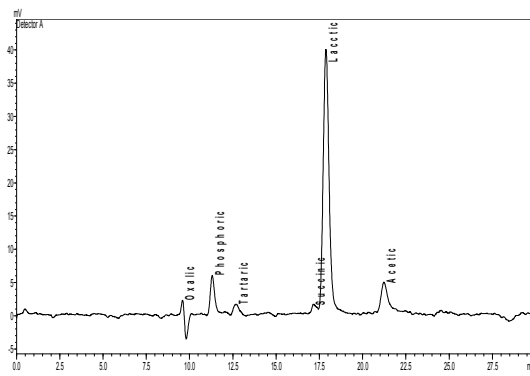


Fig. 108. Organic acid chromatogram 2-3

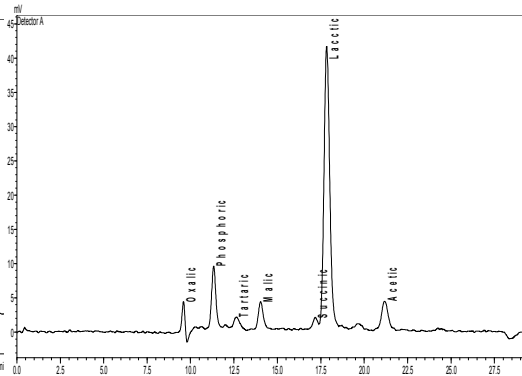


Fig. 110. Organic acid chromatogram 2-5

Table XIX. Total amounts of organic acids from No-2 group sample in fermentative alcohol.

	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
Oxalic acid	17.11	14.29	10.92	20.22	14.72
Phosphoric acid	267.75	268.81	124.28	325.3	193.71
Citric acid	0	0	0	0	0
Tartaric acid	83.24	87.23	42.6	87.82	39.52
Malic acid	0	0	0	17.65	19.64
Succinic acid	56.04	45.94	20.16	56.03	22.59
Lactic acid	721.26	684.63	338.74	693.35	345.46
Formic acid	0	0	0	0	0
Acetic acid	50.91	49.13	25.45	48.65	22.7
SUM	1196.31	1150.03	562.15	1249.02	658.34
Ethanol(g/100g)	18	16.6	9.2	17	9.5

2-1의 발효주를 기준으로 녹차를 추가한 2-2와 아가리쿠스를 추가한 2-4의 발효주를 비교해볼때 2-4의 발효주에서 유기산의 농도가 높은 것으로 나타났다. 특히 phosphoric acid는 2-2의 발효주에서 많은 감소가 일어났으나, 2-4의 발효주에서는 많이 증가된 것을 볼 수 있고, 또한 lactic acid는 공통으로 줄어든 것으로 나타났다. Succinic acid는 2-2의 발효주에서 감소되는 것으로 나타났으나, 2-4의 발효주에서는 변화가 없는 것으로 나타났고 특히 oxalic acid는 모두 변화가 없는 것으로 보였다. 녹차를 첨가한 그룹의 발효주가 유기산 생성을 억제하는 반면 아가리쿠스는 유기산을 증가시키는 효과가 있어 발효주의 맛의 형성에 특징적으로 이용할 수 있을 것으로 보인다. 인산은 막좌 향을 향상시키는 역할을 하므로 발효주의 맛을 도와줄 수 있을 것으로 판단된다.

다) No-3 발효주의 유기산 및 알콜함량

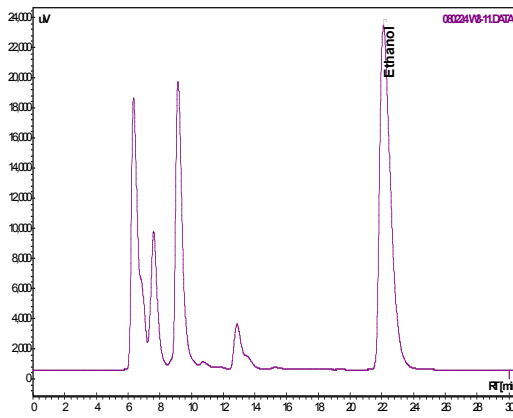


Fig. 111. Alcohol chromatogram 3-1

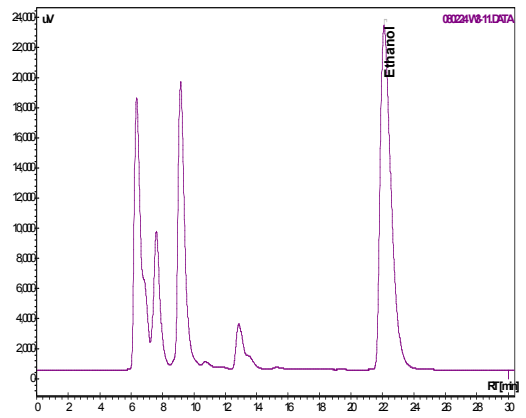


Fig. 112. Alcohol chromatogram 3-2

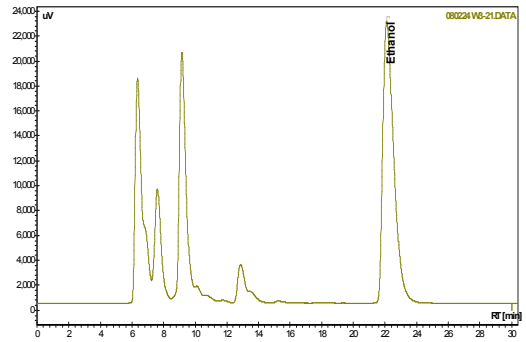


Fig. 114. Alcohol chromatogram 3-4

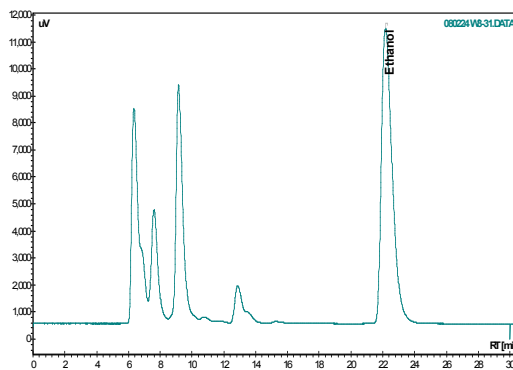


Fig. 113. Alcohol chromatogram 3-3

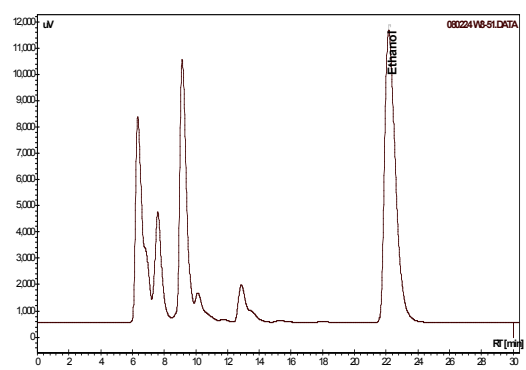


Fig. 115. Alcohol chromatogram 3-5

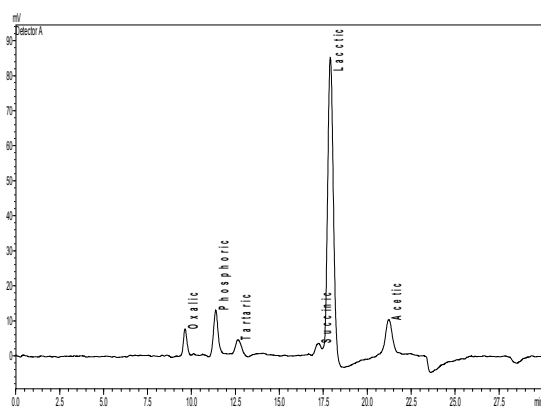


Fig. 116. Organic acid chromatogram 3-1

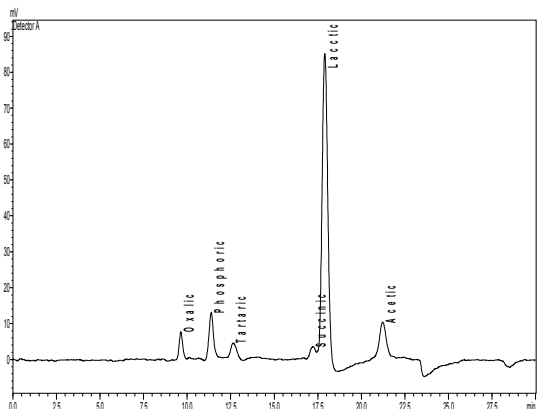


Fig. 117. Organic acid chromatogram 3-2

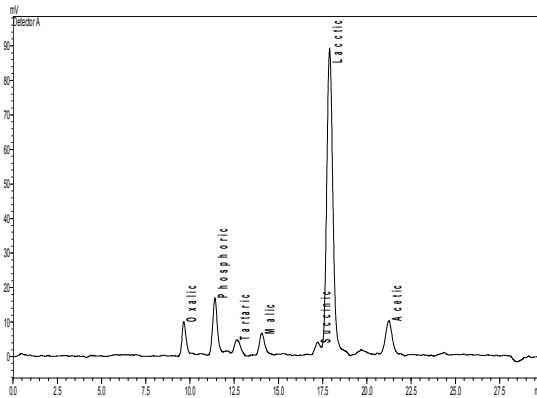


Fig. 119. Organic acid chromatogram 3-4

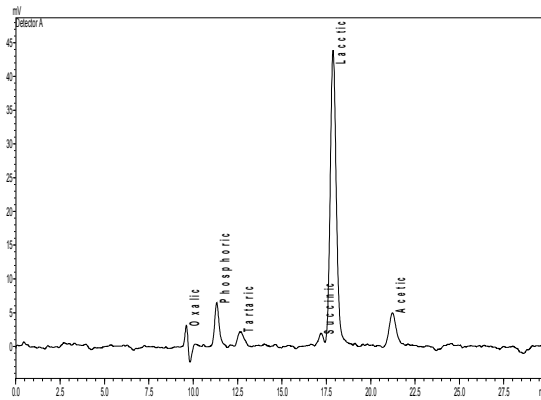


Fig. 118. Organic acid chromatogram 3-3

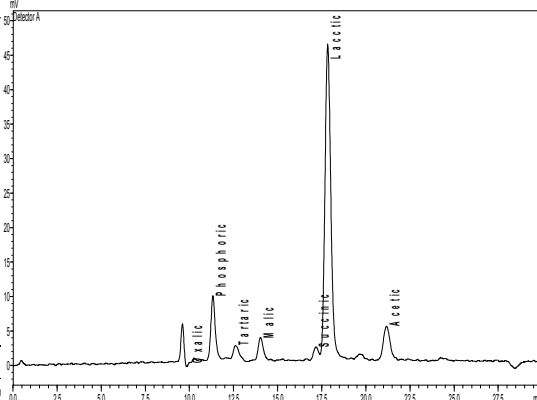


Fig. 120. Organic acid chromatogram 3-5

Table XX. Total amounts of organic acids from No-3 group sample in fermentative alcohol.

	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5
Oxalic acid	25.14	23.88	11.63	33.99	0.48
Phosphoric acid	300.09	291.05	153.52	368.84	204.92
Citric acid	0	0	0	0	0
Tartaric acid	109.43	112.48	55.33	105.69	48.65
Malic acid	0	0	0	34.24	16.63
Succinic acid	62.63	58.64	18.69	67.11	30.23
Lactic acid	801.21	792.73	374.35	805.09	383.47
Formic acid	0	0	0	0	0
Acetic acid	61.46	62.64	30.58	60.1	27.78
SUM	1359.96	1341.42	644.10	1475.06	712.16
Ethanol(g/100g)	18.1	16.8	8.5	17.9	8.7

3-1의 발효주를 기준으로 녹차를 추가한 3-2와 아가리쿠스를 추가한 3-4의 발효주를 비교해볼때 3-4의 발효주에서 유기산의 농도가 높은 것으로 나타났다. 특히 phosphoric acid는 3-2의 발효주에서 많은 감소가 일어났으나, 3-4의 발효주에서는 많이 증가된 것을 볼 수 있고, 또한 Tartaric acid와 succinic acid 및 Lactic acid는 공통적으로 변화가 없는 것으로 나타났다. 3번 발효주는 공통적으로 유기산의 변화가 phosphoric acid를 제외하면 적은 것으로 나타나 맛의 변화를 일으키지 않고 완충역할을 하는 것으로 보인다.

또한 phosphoric acid의 증가는 특쓰는 맛과 좋은 맛을 내는 성분이라 3번 발효주의 맛에 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 생각된다.

그리고, 3가지 종류의 술계열의 유기산은 No3 계열의 술에서 No1 및 No2계열의 술보다도 많은 유기산을 가지고 있어 발효주의 변패 및 오염균의 억제에 좋은 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

6) 환원당 분석

시료를 filter paper(0.45 μ m)로 여과하고 이 용액을 Shimadzu 유기산 분석기를 사용하여 분석하였다. HPLC의 구성은 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, SIL-20AC auto-sampler, RF-10Ax1 fluorescence detector, CBM-20A system controller, LC Workstation software를 이용한다. 환원당 분리는 ion exchange Shim-pack ISA-07 (4.0 \times 250 mm) 분석 column과 Shim-pack ISA guard column (4.0 \times 50.0mm)을 사용하였다. 이동상은 A용액으로 potassium borate (pH 8)과 B용액으로 potassium borate (pH 9)를 사용하였는데 B용매를 0분에서 0%으로 시작하여 30분에 50%으로 증가시키고 50분에 100%으로 증가하여 15분간 100%으로 유지하다가 65분 이후에 0%으로 감소하여 총 90분의 분석 시간으로 하였다. injection volume는 10 μ L주입하며 post-column 방법을 이용하여 환원당을 유도체화 한 후 형광 검출기를 사용하여 분석하였다. 반응시약으로 1% arginine과 3% boric acid를 함유하는 용액을 사용하였다. 환원당 표준물질을 탈이온화 증류수에 용해시켜 0.5~20 μ L/mL 범위의 표준용액을 조제하여 HPLC 분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하여 정량하였다.

가) No-1 발효주의 환원당 분석

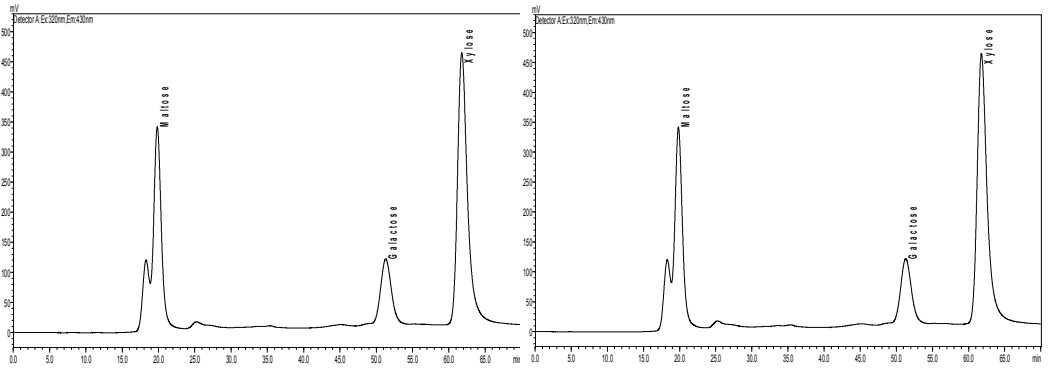


Fig. 121. Sugar chromatogram 1-1

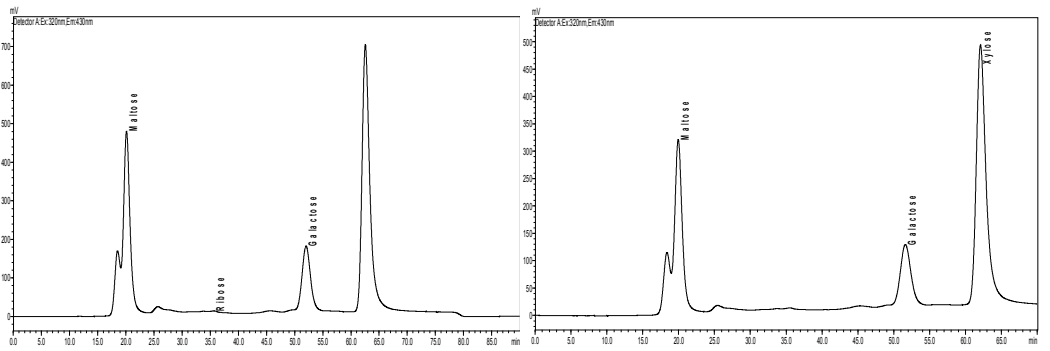


Fig. 122. Sugar chromatogram 1-2

Fig. 124. Sugar chromatogram 1-4

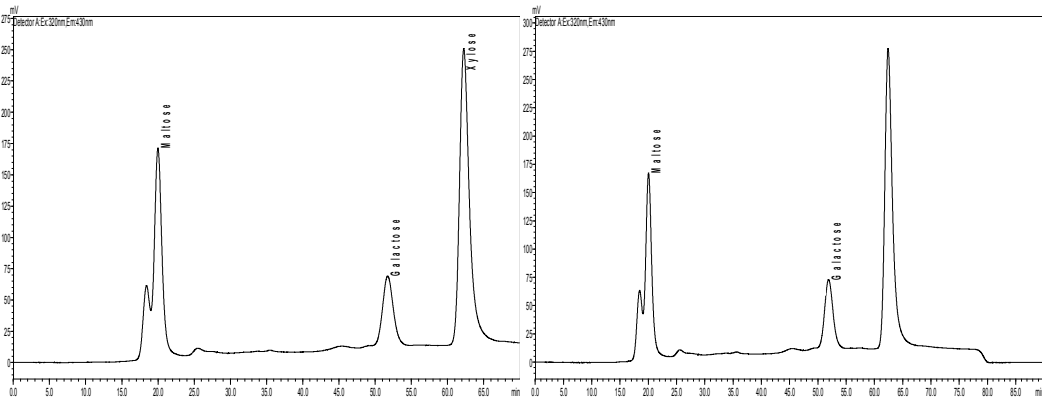


Fig. 123. Sugar chromatogram 1-3

Fig. 125. Sugar chromatogram 1-5

Table XXI. Total amounts of sugar from No-1 group sample in fermentative alcohol.

	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5
Sucrose	0	0	0	0	0
Maltose	192.4	294.86	94.43	180.91	93.74
Lactose	0	0	0	0	0
Ribose	0	0.32	0	0	0
Mannose	0	0	0	0	0
Galactose	142.3	222.99	70.94	148.6	77.82
Xylose	99.4	0	50.64	104.16	0
Glucose	0	0	0	0	0
SUM	434.1	518.17	216.01	433.67	171.56

1-1의 발효주를 기준으로 녹차를 추가한 1-2와 아가리쿠스를 추가한 1-4의 발효주를 비교해 볼때 1-2의 발효주에서 maltose 및 Gal의 양이 현저히 증가되는 것으로 나타났고, 1-4 발효주에서는 이 두가지의 당이 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 1-2의 발효주에서는 xylose 가 나타나지 않았으나 1-4의 발효주에서는 현저한 양이 증가된 것으로 나타났다. 이것은 녹차의 첨가가 알코올의 형성을 억제하는 것은 아닌가하는 생각이 들게하며, 또한 아가리쿠스는 xylose를 많이 함유하고 있거나 기존의 당을 xylose로 전환시키는 효소를 가지고 있는 것으로 판단되며 술의 맛에도 많은 영향을 미칠 것으로 판단된다. 모두 Glc를 가지고 있지 않은 것으로 보아 발효는 잘 일어 난 것으로 판단되고, 전반적으로 녹차의 첨가는 알코올의 형성을 억제하는 것 보이고, 아가리쿠스는 xylose의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

나) No-2 발효주의 환원당 분석

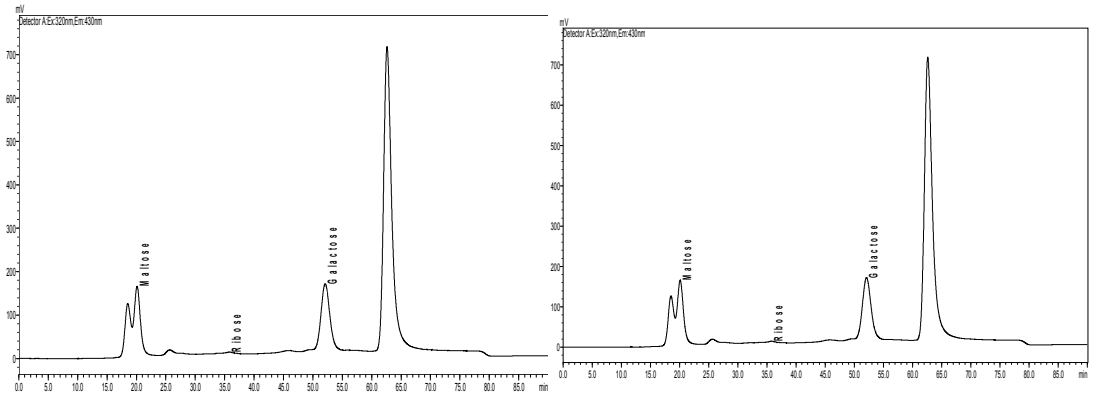


Fig. 126. Sugar chromatogram 2-1

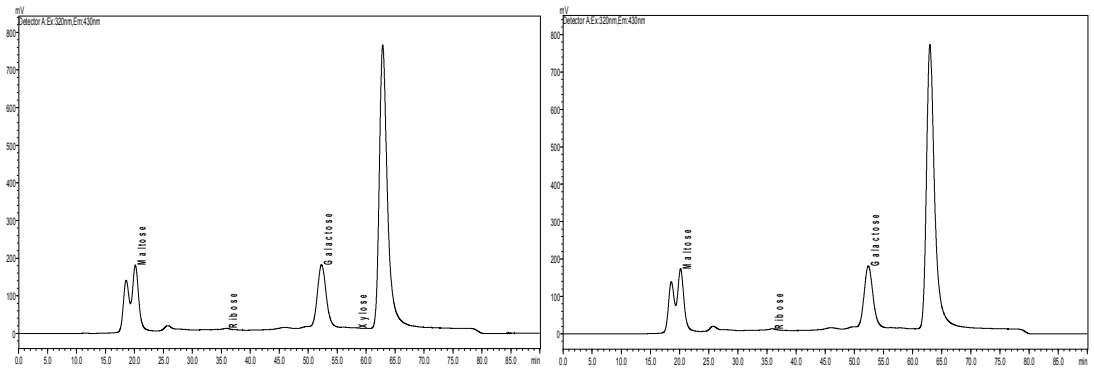


Fig. 127. Sugar chromatogram 2-2

Fig. 129. Sugar chromatogram 2-4

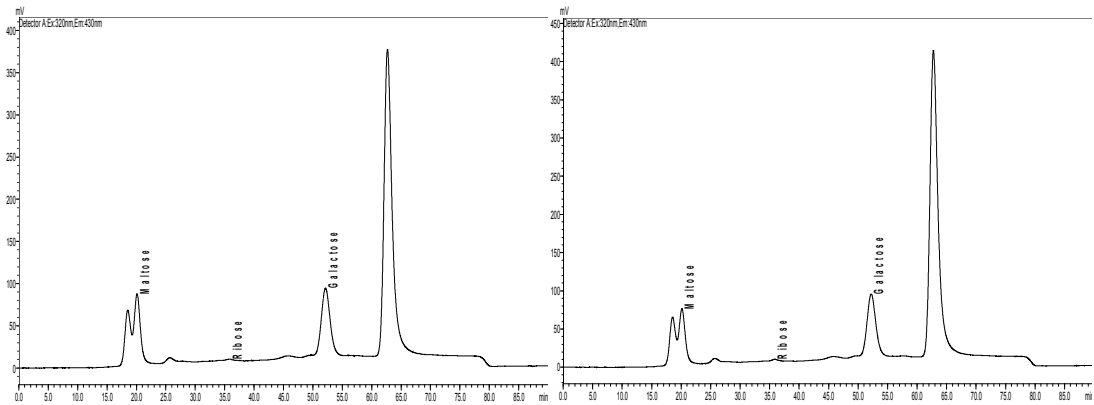


Fig. 128. Sugar chromatogram 2-3

Fig. 130. Sugar chromatogram 2-5

Table XXII. Total amounts of sugar from No-2 group sample in fermentative alcohol.

	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
Sucrose	0	0	0	0	0
Maltose	93.54	101.65	48.31	98.22	41.2
Lactose	0	0	0	0	0
Ribose	0.41	0.55	0.20	0.71	0.29
Mannose	0	0	0	0	0
Galactose	202.98	234.96	102.02	221.43	107.61
Xylose	0	0.12	0	0	0
Glucose	0	0	0	0	0
SUM	296.93	337.28	150.53	320.36	149.10

2-1의 발효주를 기준으로 녹차를 추가한 2-2와 아가리쿠스를 추가한 2-4의 발효주를 비교해 볼때 Mal의 변화는 없는 것으로 간주되며, Gal의 증가가 눈에 띈다. No-2 발효주의 천연산물의 배합은 Gal의 대사에 영향을 미치는 것으로 보인다.

다) No-3 발효주의 환원당 분석

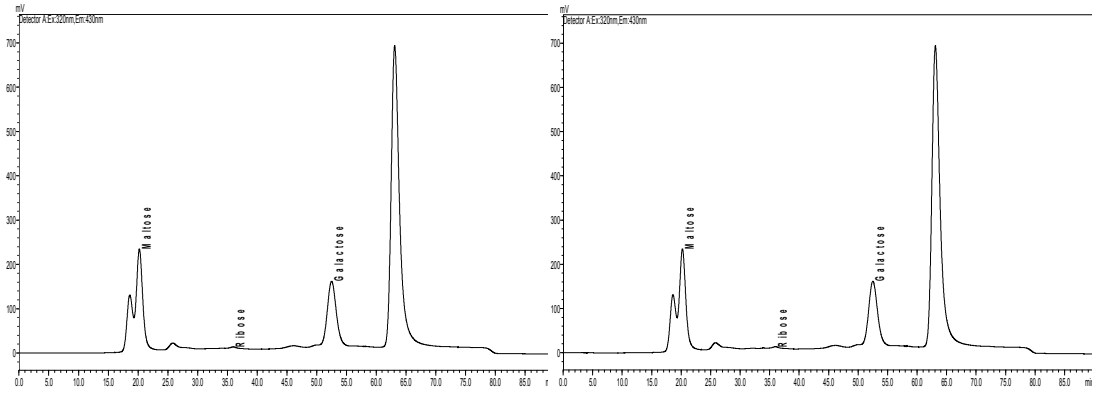


Fig. 131. Sugar chromatogram 3-1

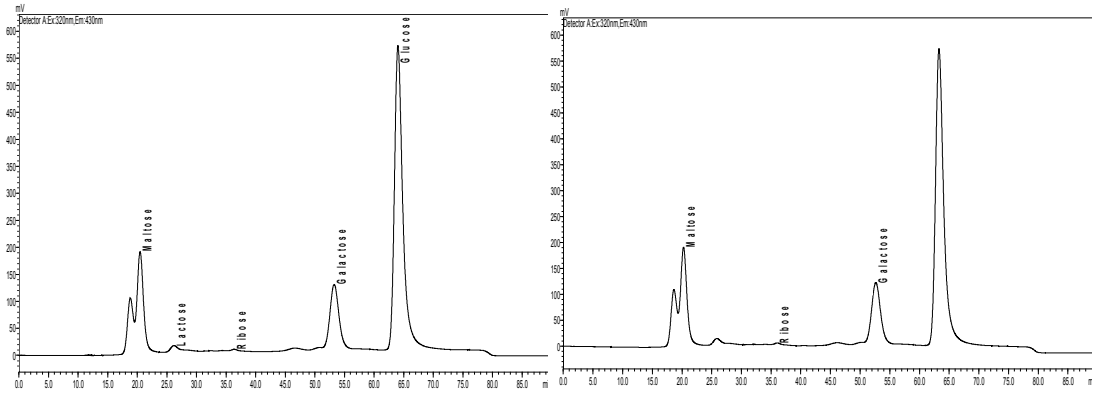


Fig. 132. Sugar chromatogram 3-2

Fig. 134. Sugar chromatogram 3-4

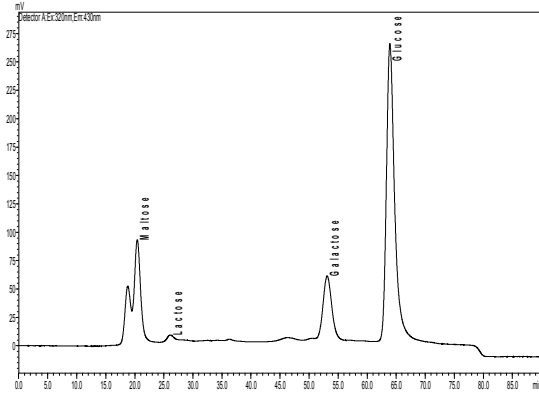


Fig. 133. Sugar chromatogram 3-3

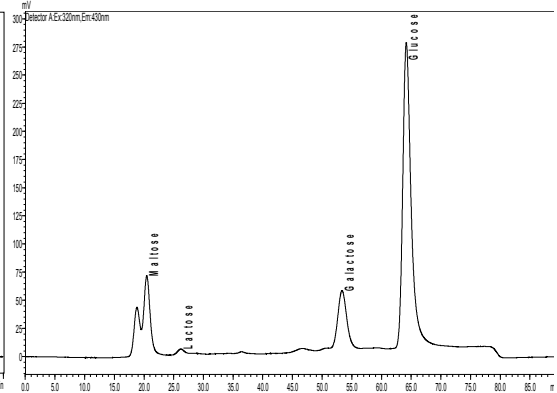


Fig. 135. Sugar chromatogram 3-5

Table XXII. Total amounts of sugar from No-3 group sample in fermentative alcohol.

	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5
Sucrose	0	0	0	0	0
Maltose	134.12	108.94	52.76	110.12	40.92
Lactose	0	6.48	2.96	0	2.62
Ribose	0.6	0.4	0	0.59	0
Mannose	0	0	0	0	0
Galactose	195.86	158.76	71.66	157.16	66.09
Xylose	0	0	0	0	0
Glucose	0	1223.92	563.27	0	576.91
SUM	330.58	1498.50	690.65	267.87	686.54

3-1의 발효주를 기준으로 녹차를 추가한 3-2와 아가리쿠스를 추가한 3-4의 발효주를 비교해 볼때 3-2 및 3-4의 발효주에서 Mal 및 Gal의 감소가 특징적이며, Xylose의 생성은 없었으나 기대하지 않았던 Glc의 양이 엄청나게 증가된 경향을 보이고 있으며, 이를 rwmdaudgkemt 3-1의 2배 희석한 3-3의 발효주에서도 3-2의 절반 정도의 Glc가 생성된 것을 볼 수 있다. 아가리쿠스 첨가군에서는 Mal 및 Gal의 감소가 일어나 2번 발효주와는 반대적인 양상을 보였다. 특히 Glc가 3-1의 원래의 발효주에서는 없던 것이 많은 양이 생성되었다는 것은 알콜을 기질로하여 Glc를 형성하는 효소가 있는 것이 아닌가하는 생각을 갖게 하며, 이 경우 숙취를 빨리 해소 할 수 있는 기능을 가질 수 있을 것으로 판단된다.

천연산물의 조성에 따라 알콜의 형성 및 대사에 다른 역할을 하는 것을 볼 수 있었고, 천연산물의 선택에 따라 보다 나은 발효주를 제조할 수 있을 것으로 판단된다.

제 5절 Wellbeing 제품의 디자인 개발

1. Wellbeing Tea

가. Tea Pack



나. Case Design



2. Skin Care

가. Cream



나. Facial Cleansing Lotion



3. Fermentative Alcohol



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 목표 달성도

1. 제 1차년도

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	2005	①항산화 실험,	2 %	FRAP이용한 항산화 능력
		②신생혈관 생성 억제 실험	10 %	신생혈관 형성 억제작용
		③보습효과	3 %	보습기능
		④tyrosinase 억제 시험	10 %	미백효과
		⑤균사체 분리 배양	5 %	동충하초 발효
		⑥면역 향상 실험	10 %	T-cell 증식 향상
		⑦세포독성 억제 효과	2 %	독성 시험
		⑧자외선 차단 효과	5 %	NIH3T3 생존율
		⑨중성지방 분해억제시험	10 %	항비만, 분화억제능
		⑩혼합제제의 독성 실험	3 %	세포독성
		⑪GOT 및 GPT 시험	10 %	간대사 향상물질
		⑫항혈전 효과	10 %	항혈전 물질
		⑬항 콜레스테롤 효과	10 %	콜레스테롤 저해
		⑭testosteron 유도 효과	10 %	testosteron 생산 향상
최종 평가		제1세부과제 수행을 위한 원료의 기능성시험(①②⑩ ⑫⑬)	35 %	
		제2세부과제 수행을 위한 원료의 기능성시험(③④⑦ ⑧⑨)	35 %	
		제3세부과제 수행을 위한 원료의 기능성시험(⑤⑥⑪ ⑭)	30 %	

2. 제 2차년도

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
2차 년도	2006- 2007	원료의 분쇄 방법의 연구 원료의 masking 기법의 연구	2 3	원료에 따른 masking 기법, 배합, 기능성 및 시제품등 35%

	散制 방법의 연구 추출 방법에 관한 연구 배합방법에 대한 연구 배합비에 관한 연구 추출물의 기능성 시험 제제형태의 연구 시제품의 제조	2 2 2 2 10 2 10	
	미백 효과 향상을 위한 배합구성 아토피 효과 향상을 위한 배합구성 보습효과 향상을 위한 배합구성 여드름억제 효과 향상을 위한 배합구성 UV-blocking 향상을 위한 배합구성 Triglyceride 억제기능 향상을 위한 배합구성 혼합을 위한 essential oil 배합 연구(기초제제) W/O, O/W 제제 배합의 구성 연구 기능성 시험 시제품의 제조	2 2 1 2 2 2 1 3 10 10	기능성 skin care 조성물, 배합구성, 기능성 및 시제품등 35%
	생체 기능향상을 위한 원료의 배합 연구 보당제제의 연구: 의의인, 참쌀 누룩의 제조 보리소주의 제조 1차 발효주의 제조 후숙성 및 여과 맛, 향, 색깔의 연구 원료 배합비의 결정 기능성 시험 시제품의 제조	2 1 1 1 1 1 1 2 10 10	원료배합, 기능성 및 시제품등 30%
최종 평가	원료에 따른 masking 기법, 배합, 기능성 및 시제품등	35 %	
	기능성 skin care 조성물, 배합구성, 기능성 및 시제품등	35 %	
	원료배합, 기능성 및 시제품등	30%	

3. 제 3차년도

구분	세부 과제	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
3차 년도 (07- 08)	제 1 세 부 과 제	① anti-angiogenesis	20 %	튜브 형성 대조군, positive control과 비교
		② anti-obesity, anti-weight 시험	20	체중감소, positive control과 비교
		③ 항atophy시험	10 %	가려움, positive control과 비교
		④ 면역 향상시험	10	TNFα, IL-6, Elisa
		⑤ GOT, ⑥GTP, ⑦LDH,⑧Glucose, ⑨Triglyceride	10 %	성분 판별, 대조군과 비교
		⑩Cholesterol, ⑪LDL-cholesterol	10	성분 판별, 대조군과 비교
		2) 시제품의 보완	20 %	미완 성분 보강
	제 2 세 부 과 제	① 미백 효과	15 %	대조군과 비교
		② 보습 효과	10	대조군과 비교
		③ 항atophy시험	10 %	가려움, positive control과 비교
		④ UV-blocking 시험	10	피부모양, 대조군 비교
		⑤ 피부자극성 시험	20 %	피부형태
		⑥감작성, 광독성 시험	20	피부형태
		2) 시제품의 보완	15 %	미완 성분 보강
	제 3 세 부 과 제	① anti-angiogenesis	10 %	튜브 형성 대조군, positive control과 비교
		② anti-obesity, anti-weight 시험	10	체중감소, positive control과 비교
		③ 항atophy시험	10 %	가려움, positive control과 비교
		④ 면역 향상시험	10	TNFα, IL-6, Elisa
		⑤ GOT, ⑥GTP, ⑦LDH,⑧Glucose, ⑨Triglyceride	20 %	성분 판별, 대조군과 비교
		⑩Cholesterol,	20	성분 판별, 대조군과 비교

		⑩LDL-cholesterol		
		2) 시제품의 보완	20 %	미완 성분 보강
최종 평가		anti-angiogenesis	20 %	Chorioallantoic membrane(CAM) 방법
		anti-obesity, anti-weight 시험	20 %	비만쥐 체중감소
		미백 효과	20 %	쥐 피부 미백효과, 대조군과 비교
		GOT, GTP, LDH, Glucose, Triglyceride	20 %	형액성분 비교
		Cholesterol, LDL-cholesterol	20 %	형액성분 비교

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. wellbeing tea의 제조

천연산물의 ① anti-angiogenesis, ② anti-obesity, anti-weight 시험, ③ 항atophy시험, ④ 면역 향상시험, ⑤ GOT, ⑥GTP, ⑦LDH, ⑧Glucose, ⑨Triglyceride, ⑩Cholesterol, ⑪ LDL-cholesterol등의 조절작용 및 저해작용을 측정하는 방법과 이들의 조합에 의하여 생체의 기능성을 도울 수 있는 차를 개발하였다. 이 같은 유용성분을 찾기 위하여 여러 가지의 천연산물에 대하여 생체의 free radical을 제거 할 수 있는 기본적인 항산화력의 측정으로부터 시작하여 항암 및 항비만에 관련이 되는 신생혈관 형성 억제기능을 갖는 천연산물을 선별하였다. 또한 실질적으로 rat을 이용하여 비만이 어느정도로 제어 될 수 있는가를 실험하였고, 더불어 쥐에게 compound 48/80을 투여하여 가려움증을 유발하고 이를 제어 할 수 있는 성분들도 선별하였다. 그리고 쥐의 혈액을 분석하여 간의 기능성 향상에 도움이 될 수 있도록 GOT, GPT를 저해 할 수 있는 기능성을 구비하도록 하였으며, 특히 중성지방의 저하에 따른 체중감소의 효과가 좋은 것으로 나타나 기능성 차로서의 역할을 할 수 있도록 하였다.

그리고 testosterone 유도효과를 가지게 하여 남성에게 희망을 줄수 있게하였으며, 항혈전 효과도 가지게하여 혈액 순환 및 고혈압에도 효과를 나타내도록 하였다. 더불어 신생혈관의 형성 억제작용을 계란의 수정란을 이용하여 CAM assay를 수행하여 실질적으로 증명하여 항비만 및 항암에 효과가 있음을 증명하였다.

또한 천연산물의 독특한 향의 유지와 특이한 맛을 masking 할수 있는 방법을 연구하였으며, 과립제제의 형태 및 capsule의 형태로 개발 하여 액제 및 과립제등의 제제로 개발 할 수 있게 하였다.

2. wellbeing skin care 제제의 제조

천연산물의 다양한 기능을 이용하여 미백효과, atopy 효과, UV-손상 회복효과, 보습효과 등을 이용하여 합성제제가 아닌 천연산물 제제로써 미백의 효과를 나타낼 수 있게 하였으며, 천연산물의 다양한 특징 및 조합을 이용하여 항아토피 효과를 가지게 하였으며, 특히 UV에 손상을 입은 피부를 효과적으로 회복 시킬 수 있는 조합을 개발하였고, 이를 실질적으로 nude mouse에 적용하여 그 효과를 제시하였다. 또한 이들의 시료가 피부에 자극을 미치는 정도를 파악하기 위하여 CAM assay를 실시하여 혈관의 자극에 의한 부종현상이나 출혈등의 자극정도를 파악하기 위하여 동물 시험을 행한 결과 자극성이 없이 좋은 효과를 나타내어 기능성 skin care 제제로서의 타당성을 보였다. 이러한 개발된 제제를 료선, 스킨, 에센셜 오일들의 형태로 제제를 개발하면 용도에 따라 다양하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

3. wellbeing 발효주의 개발

생체에 유용한 성분들을 다양하게 변화를 주어 발효주를 제조하고 여과한 후 후숙하고 녹차 및 아가리쿠스를 넣어 다시 후숙성한 후 HPLC로 발효주 속에 있는 성분을 조사하여 천연산물의 조성 변화에 따른 발효주의 성분 변화와 향기성분을 분석하여 발효주의 향미에 좋은 영향을 주는 성분과 좋지 않은 영향을 미치는 성분의 량을 파악한 후 가장 성적이 좋은 발효주를 비교, 선별 하였다.

처음 제조한 발효주로부터 성분의 변화에 대하여 자료를 수집하고, 이에 따라 다양한 발효주를 제조하여 자료를 더한 후 다시금 3종류의 발효주를 담근 후 5종류로 내용을 변화시켜 15종류에 대한 성분분석, 향기성분 분석, 알콜 분석, 유기산 분석등으로 그 효과를 비교하고 객관적인 HPLC의 peak 면적에 따라 그 성분의 용량과 영향을 분석하여 성적을 매겨 15종류의 개발 술에 대하여 성분에 따른 영향을 분석하였다.

천연물의 첨가가 발효에 미치는 영향이 각각 다른 것으로 나타나 이들의 응용이 발효주 및 향에 미치는 효과가 다양할 것으로 보인다. 또한 각성분의 peak 면적을 조사함으로써 발효의 진행 정도, 숙성정도 및 필요한 향의 함유등을 알 수 있을 것으로 판단 된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

본 연구는 부작용이 적은 천연산물을 이용하여 기능성 wellbeing tea, Skin care 및 발효주를 제조하는 것이다. wellbeing tea는 ① anti-angiogenesis, ② anti-obesity, anti-weight 시험, ③ 항atophy시험, ④ 면역 향상시험, ⑤ GOT, ⑥GTP, ⑦LDH, ⑧Glucose, ⑨Triglyceride, ⑩Cholesterol, ⑪LDL-cholesterol의 기능을 이용하여 생체에 도움을 주는 tea를 개발하였다. 이러한 기능을 갖고 있는 wellbeing tea가 고혈압이나 당뇨에도 효과가 있는지 등을 추가로 연구했으면 한다. 그리고 Skin care 제제도 다양한 기능과 효능을 가질 수 있게 제조하였으나 더욱 어떤 제제의 형태가 흡수 및 사용하기에 편리한지 등에 대하여 제제의 개발에 시간을 투자하고 싶으며, wellbeing 발효주에 대해서는 첨가하는 천연산물이 어떠한 기전으로 발효를 제어 하는 가에 대한 연구를 해보고 싶다. 같은 종류의 천연산물을 사용하여 발효주를 제조하였는데 녹차의 첨가에 따라 새롭게 당이 형성되는 이유를 밝혀 천연산물과 발효주 사이의 관계를 밝혀 보다 고급의 발효주를 개발하는데 도움이 되었으면 한다.

제 2 절 타 연구에의 응용

본 연구는 생체에 유용한 천연산물의 응용이라는 측면에서 다양하게 응용될 수 있다. 신생혈관의 형성억제작용을 응용하면 항암제 및 항비만제제의 개발의 연구에 직접적으로 사용이 가능하다. 암세포 및 비만세포에서 공통적으로 VEGF를 분비함으로써 신생혈관이 형성되어 암세포 및 비만세포를 증식시킴으로써 암세포의 증식, 암의 전이, 비만세포의 증식을 유도함으로써 신생혈관의 형성을 억제 함으로써 이들을 제어 할 수 있다. 또한 testosterone의 유도효과를 가짐으로써 비아그라와 같은 역할을 하는 제품의 개발에 사용할 수 있을 것이며, 항아토피 기능으로부터 아기들이 사용가능할 수 있게 저자극, 저 부작용의 제제를 개발 할 수 있고 섭취를 하더라도 부작용이 없어 유아의

기능성제제의 개발에도 사용이 가능하다. 그리고 UV로 인한 조직의 손상에도 그 회복 효과가 빨라 여름철 자외선에 의한 화상을 치료할 수 있을 것으로 생각된다. 또 합성물질이 아닌 천연산물로서의 미백효과를 갖는 기능도 화장품의 개발에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

그리고 기능성 발효주는 일반적으로 술의 섭취에 의하여 간의 기능에 손상을 입힐 수 있는 것을 간기능 향상에 도움이 될 수 있는 천연산물을 이용하여 발효주를 제조하면 생체에 손상이 적게하는 술의 제조도 가능하리라 판단된다.

또한 녹차는 발효주 내의 향을 탈취함으로써 녹차 발효주의 개발이 어려웠으나 본 연구에서 녹차의 발효 성질을 규명함으로써 녹차 발효주의 개발도 가능할 것으로 판단된다.

제 3 절 기업화 추진방안

본 연구 개발에 대한 제품화는 그렇게 어려울 것 같지는 않을 것으로 생각된다. 기능성 차는 참여기업에 의뢰하여 제품을 제조한 다음 기존의 녹차와 같이 전시하여 판매하면 될 것으로 생각한다. 기능성 차를 packing 하는 회사에서 본 기능성차의 향 때문에 자신들이 packing 할 때 녹차의 향에 영향을 미칠것으로 생각하고 있어 이를 해결하면 제품의 개발은 될 수 있을 것으로 생각한다.

그리고 Skin care 제제는 개발된 제제가 지적 재산권을 획득한 후 참여회사에서 상품화 할 수 있으며, 또한, 대기업에서 상품화 할 수 있을 것으로 생각한다. 화장품은 기 기능과 효능이 확실하면 어느 회사이든지 조율이 가능할 것으로 생각한다.

발효주는 지방의 특수 상품으로 개발하여 참여기업에서 지역 특산물로서의 개발이 가능할 것으로 판단된다. 대부분의 지방에 있는 발효주는 탁주 응용제품이 많으나 특질 있는 발효주가 없기 때문에 맛과 효능이 좋은 경우에 성사될 가능성은 높을 것으로 판단된다.

제 4 절 연구기획 사업

연구기획 사업은 그 원료가 어디에서 생산되는 가하는 것과 연관지을 수 있다. 특히, 녹차 및 천연산물은 전라남도에서 많이 생산되고 있고 특산물이 많기 때문에 지자체와의 연계하에서 지역의 특산물 개발로 이어 질 수 있다.

현재 전라남도에는 녹차 및 울금, 황금, 유자, 허브, 뽕나무 등 지리산을 중심으로 특징 있는 천연산물이 많이 생산되고 있어, 항비만체제의 개발의 테마로 시작할 수 있을 것으로 본다.

전남의 1차산업의 특징은 가공을 하지 않은 채로 시장으로 나가기 때문에 원료의 생산에 투입되는 인적, 물적 자원에 비교하여 부가가치가 너무 낮아 그 특성을 살리지 못하고 있어, 지역 특산물의 성격을 잘 이용하여 가공제품을 지역특산품화 함으로써 그에 상응하는 부가가치를 높일 수 있을 것으로 판단된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. YABEC 2007

- 1) Microorganism in the fermentation process of puer tea
- 2) Study of radical scavenging activity and inhibition of LDL oxidation of red wines extract of onion and related phenolic compounds
- 3) Anti-Cancer potential of *Glossogyne tenuifolia*

2. 2007 International Symposium on Fermented Foods

- 1) The Revolution of Wine Oxidation
- 2) Challenges for the application of Lactic Acid Bacteria for the benefit of Mankind
- 3) Ginsenoside as a Prodrug

3. Academic plaza(Tokyo) : 2007. 6.

- 1) Study on prolong Shelf-life of Tofu with Fermenting Soymilk by Lactobacillus
- 2) Natural Food Preservative- Antioxidant Properties of Seabuckthorn(*Hippophae rhamnoides*) Leaves Extracts
- 3) Attempts to prepare new foods by the use of biopreservative lactic acid bacteria
- 4) Application of Nano/Microencapsulation to High Functional Food Manufacture

4. Academic plaza(Tokyo) : 2006. 6.

- 1) Mushroom contain many functional ingredients for controlling life activities
-Taurin, GABA, and anti-oxidative and ACE inhibitory activity-
- 2) アガリクスの機能性食品としての 利用法
- 摂取の方法と効果 -
- 3) Effect of Yam and Dehulled A이모 Extracts on the Inhibition of Linoleic Acid Oxidation

5. Academic plaza(Tokyo) : 2005. 6.

- 1) On the Estimation of the Overall Flavor of Green Soybeans
- 2) Visualization of Food Quality
- 3) Research about the taste evaluation system of rice in China
The Productions of Useful Materials from Unused Resources in Food Industry
- 4) 高機能性 食品粉末の創製と特質
- 5) Physical Pulverizing and Enzymatic Processing on Seaweed for Extraction of Available Components.

6. 2005 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies

- 1) Modulation of Immune Responses by Probiotics and Prebiotics
- 2) Development of Anti-Angiogenic Material and Its Signal Transduction from Halophilic Enterobacteria
- 3) Production Optimization of an Anti-angiogenic Protein (Human Serum Albumin-TIMP-2 Fusion Protein)

제 7 장 참고문헌

1. Grieve, M(1994), A modern herbal. Dorset Press, p. 249–255.
2. Duke, J. A.(1992), Handbook of "phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants". CRC Press, p.587–589.
3. Racz–Kotilla, E., Racz, G., and Solomon, A.(1974), The action of *Taraxacum officinale* extracts on the body weight and diuresis of laboratory animal. *Planta medica*, 26, 212–217.
4. Williams, C.A., Goldstone, F., and Greenham, J.(1996), Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*, *Phytochemistry*, 42, 121–127.
5. Kang, M. J., Seo, Y. H., Kim, J. B., Shin, S. R. and Kim, K. S.(2000), The chemical composition of *Taraxacum officinale* consumed in Korea. *Korean J. Soc. Food. Sci.*, 16, 182–187.
6. 黄度淵原(1989), 證脈方藥合編, 南山堂
7. Shahidi, F., Janitha, P. K., and Wanasundara, P. D.(1992), Phenolic antioxidants. *Critical Review in Food science and Nutrition*, 32, 67–103.
8. Kang, M. J.(2001), Antioxidant activity and free radical scavenging effect of dandelion extract. Ph.D. Thesis, Yeungnam Univ. of Kyungsan, Korea.
9. Lee, B.W., and Shin, D. H.(1991), Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganism, *Korean J.Food Sci.Technol.*, 23, 200–204.
10. 생약학교재편찬위원회(2001), 생약학, 동명사, p503–505.
11. Kim, S.D., Kim, M.H., and Kim, D.H.(2000), Effect of dandelion extracts on the growth of lactic acid bacteria and gas formation from Kimchi. *Korean J.Phstharvest Sci.Technol.*,7, 321–325.
12. Baba, K., Abe, S., and Mizuno, D.(1981), Antitumor activity of hot water extract of dandelion, *Taraxacum officinale* corelation between antitumor activity and timing of administration. *Yakugaku Zasshi*, 101, 538–543.
13. Kim, D. H.(1995), Antitumor activity of fractions of Taraxaci Herba synergistic effect with anticancer drugs, M.S.thesis, Taejon Univ.

14. Cho, Y. S., Park, J. Y., Oh, Y. J., Jamg J. Y.(2000), Effect of dandelion leaf extracts on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet, J.Korean Soc. Food Sci.Nutri., 29, 676–682.
15. Kim, S.K.(1991), Effects of Herba Traxaci extract on the antialgesia and antiinflammatory. M.S.thesis, Wonkang Univ.
16. Park, J. M., Lee, S. H., Kim. J. O.(2004), *In vitro* and *in vivo* effects of extracts of *Lentinus edodes* on tumor growth in a human papillomavirus 16 oncogenes–transformed animal tumor model apoptosis–mediated tumor cell growth inhibition, Korean J. Food Sci. Technol, 36(1), 141–146.
17. Han. S. Y., Park. M. S., Seo. K.I(2002), Changes in the food components during storage of oyster mushroom *Kimchi*, Korean Journal of Food Preservation, 9(1), 51–55.
18. Koh. J. B., Choi. M. A(2004), Effect of liquid culture of coriolus versicolor on lipid metabolism, protein level and enzyme activities in rats, J. Korean Soc. Food Sci Nutr, 33(3), 512–517.
19. Hong. J. S., Kim. T. Y(1988), Contents of free–sugars & free–sugaralcohols in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edods* & *Agaricus bisporus*, Korean J. food Sci. Technol., 20(4), 459~462.
20. Hong, J. H., Youn, K. S., and Choi, Y. H.(2004), Characteristics of crude protein–bound polysaccharide from *Agaricus blazei* Murill by extraction and precipitation conditions and its antitumor effect, Korean J. food Sci. Technol., 36(4), 586–593.
21. Jong–Deog Kim, Min–Yong Kim, Jai–Yul Kong(2002),The growth promoting effect of enterobacteria *Bifidobacterium infantis* KCTC 3270 by combination of natural products bearing antioxidative capacity. J.Korean Soc.Food Sci.Nutr. 31(5), 931–938.
22. Choi, M. A, Park, N. Y., Woo, S. M., Jeong, Y. J., and Shin, S R.(2003), Characteristics of *Hericium erinaceus* and its extracts, Korean J.Food preservation,10(4), 560–564.

23. Kim, J. D., M. Y. Kim, H. J., Seo, B. J. Kim, D. H., Kim, E. O. Kim, H. Y. Chung, and J. Y. Kong (2002), Combination of natural products removing ROS for growth promoting effects of the useful enterobacteria *Lacobacillus* sp., Kor.J.Appl.Microbiol.Biotechnol. 30, 270–281.
24. Kim, J. D., M. Y. Kim, C. B. Ahn, H. J. Seo, B. J. Kim, J. K. Seo, J. S. Kim, and Jai–Yul Kong (2002), The growth promotion effect of useful enterobacteria *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216 by combination of natural products bearing antioxidative capacity, Korean J. Biotechnol. Bioeng.,17, 388–395.
25. Kim, J. D. (2002), The growth promoting effect of useful enterobacteria *Clostridium butyricum* KCTC 1785 by combination of natural products bearing antioxidative capacity, Korean Journal of Life Science, 12(5), 595–604.
26. Jong–Deog Kim(2002),The growth Inhibiting effect of *E. coli* KCTC 1039 by combination of natural products bearing Aantioxidative capacity, Korean J. Biotechnol. Bioeng.,17(5), 490–496.
27. Jong–Deog Kim(2002), The growth Inhibiting effect of *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471 by the natural products bearing antioxidative capacity, Korean Journal of Life Science, 12(6), 731–739.
28. Jong–Deog Kim(2002), The growth inhibiting effect of enterobacteria, *Clostridium perfringens* KCTC 5014, by the combination of natural products, J.Korean Soc.Food Sci.Nutr., 31(6), 1119–1125.
29. Kim, Jong–Deog and Tai–Sun Shin(2002), The growth promotion effect of *Bifidobacterium bifidum* by combination of natural products bearing antioxidative capacity. Kor.J.Appl.Microbiol.Biotechnol. 30(4), 388–394.
30. Chung, Y., Kim, S. B., Yang G. Y.(1998) Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine, 220(4), 213–217.
31. Weisbulger, J. H.(1999), Tea and Health :Society for Experimental Biology and Medicine, 220(4), 271–275.
32. Iris F. F. Benzie and F. F. Strain(1996) The ferric reducing a bility of plasma (FRAP) as a measure of "Antidant power": The FRAP assay articale NO.0292 *analytical biochemistry* 239, 70–76

33. Se-Yeong Lee, Eun-Ok Kim, Hyo-Jin Seo, Min-Yong Kim and Jong-Deog Kim(2004), Development of new method for antioxidant capacity with ORP-pH system., *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 10(5).
34. Chae, S. Y., Shin, S. H. and Yee S. T.(2004), Effect of arabinoxylane and PSP on activation of immune cell, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 33(2), 278-276.
35. Young, J. J., and Shin, Z. B. (1971) Effect of robinia pseudo acacia Linne on serum total cholesterol, β -lipoproteine content, serum glutamic transaminase activity of rabbits. *J. Korean Pharm. Sci.* 1(1), 12-21.
36. Lee, H. W., Seong, I. W., and Park, C. J. (1978) SGOT, SGPT and LDH levels of korean hemorrhagic fever patients, *Korean Journal of Virology*, 8(1).
37. Hahn, B. S., Wu, S. J., Kim, S. W. and Kim Y. S.(1999), Evaluation of anticoagulant and fibronolytic activities from crude extracts of insects, *Kor. J. Pharmacogn.*, 30(4), 409-412.
38. 김소림, 정수경, 김문종, 이진, 강영곤, 이영진, 배영철, *중년남성에서 테스토스테론과 골밀도와의 연관성, 가정의학회지*, 24, 365-374.
39. 고재숙, 하병조, *피부과학*, 73: 수문사.
40. G. Prota (1980). Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, *J. vest. Dermatol.*, 75: 122.
41. S. Pavel, F.A. Muskiet (1983). Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report, *Cancer detection and Prevention*, 6: 311.
42. Takagi, K., Shimomura, K., Koizumi, Y., Mitsunaga, T., Abe, I. (1999), Tyrosinase inhibitors from the pericarp of Jatoba (*Hymenaea courbaril* L.)(in japanese). *Nat Med.*, 53, 15-21.
43. Chen, J. S., Wei, S. C., and Marshall, M. R.(1991), Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem*, 39, 1897-1901.
44. Yang M. J., Kim, M. G., Ann, H. S., Ahn, R. M.(1999), Inhibitory effects of water-aceton extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji*, 43, 494-501.

45. Chun, H. J., Choi, E. Y., Uoon, S. C., Nam, H. W., Beak, S. H., Woo, W. H.(2001), Inhibitory effects of ethanol extract of *Atractylodis Rhizoma alba* on melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji*, 45, 269–275.
46. Kawfman, R. J.(1991). Vectors used for expression in mammalian cells. *Math In Enzymol.*, 87, 205–209.
47. Kaneyama, K., Takemura, T., Jamada, Y., Sakai, C., Kondon, S., Nishiyama, S.(1993), Rignent production in murine melanoma cells in regulated by tyrosinase, tyrosinase–related protein 1 (TRP 1), dopachrome tau7tomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest Dermal*, 100, 126–135.
48. V. J. Hearing, M. Jimenez(1987). Mammalian tyrosinase–the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, 19(12), 1141–1151.
49. Lanza, E. and Butrun, R. R.(1986), A critical review of food fiber analysis and data. *J. Am. Diet. Assoc.*, 86, 732–743.
50. Trowell, H. C.(1972), Ischemic heart disease and dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 926–932.
51. Mercurio, K. C. and Behm, P. A.(1981), Effect of fiber type and level on mineral excretion transit time and intestinal histology. *J. Food Sci.*, 46, 1462–1463.
52. Jacobs, L. R.(1986), Relationship between dietary fiber and cancer: Metabolic, physiologic, and cellular mechanism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 183, 299–310.

주 의

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