

식품성분의 초급속산화를 억제하는
고효율 일중항산소 소거제의 분리,
안정성 평가 및 식품가공공정에의 이용

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

농림수산식품자료실



0016164

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식품성분의 초급속산화를 억제하는 고효율 일중항산소 소거제의 분리, 안정성 평가 및 식품가공공정에의 이용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 윤 석 후

세부연구책임자 : 윤 석 후

연 구 원 : 김 진 희

연 구 원 : 노 시 원

협동연구기관명 : 우석대학교

협동연구책임자 : 정 문 응

협동연구기관명 : 인하대학교

협동연구책임자 : 최 은 옥

요 약 문

I. 제 목

식품성분의 초급속산화를 억제하는 고효율 일중항산소 소거제의 분리, 안정성 평가 및 식품가공공정에의 이용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

식품의 가공, 저장 중 산소는 식품성분을 산화시켜 바람직하지 못한 volatile compound들을 생성하고 필수지방산, 아미노산 및 비타민 등 영양성분이 제공하는 식품의 1차 기능 뿐 아니라 2, 3차 기능을 변화시키며 심한 경우 발암물질을 생성한다. 이러한 식품성분의 산화반응은 여러 형태의 산소 중 일중항산소 (1O_2)의 반응성이 삼중항산소 (3O_2)에 비해 $10^3\sim 10^4$ 배 정도로 월등히 높아, 가공이나 저장 중 식품 system에서 생성되는 1O_2 을 소거함으로써, 유지함유 식품의 초급속산화를 억제하여 식품의 영양가와 기능성을 개선하려는 노력이 계속되어져 왔다. 본 연구에서는 이미 알려진 1O_2 quencher와 비슷한 구조적 특성을 가진 anthocyanin을 포함한 flavonoids에 주목하고 이들 화합물의 1O_2 quenching activity를 탐색하고, 식품들에 존재하는 anthocyanin등의 1O_2 quenching activity를 비교하고 이를 토대로 1O_2 quenching에 의한 antioxidant로서의 가능성을 모색하며, 효율적인 1O_2 quenching을 위하여 anthocyanin등의 식품 가공, 저장에 따른 광산화조건에서의 안정성을 고찰함으로써 궁극적으로 식품성분의 초급속산화를 효과적으로 억제할 수 있는 일중항산소 소거제를 개발하여, 1O_2 quencher로서의 anthocyanin등 flavonoids를 식품과 가공공정에 응용하여 영양성분의 보존과 색을 포함한 식품의 texture가 우수한 고영양, 고품질의 식품 및 공정모델을 제시하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 riboflavin 등 sensitizer를 포함한 식품에서 빈번히 접하게 되는 조건, 즉 산소와 빛 존재 하에서 생성되는 $^1\text{O}_2$ 에 의한 식품성분의 초급속 산화를 억제하기 위하여 구조특성상 $^1\text{O}_2$ quencher 가능성이 있는 anthocyanin 등 flavonoids를 탐색하고 식품의 자체 system 또는 가공 및 저장 조건에서의 이들 물질의 안정성을 탐색한 후 궁극적으로 식품성분의 안정성 및 기능성이 향상된 가공 식품의 모델을 제시하고자 하였다. 1차년도에는 ‘(1) Anthocyanin 등 flavonoids를 함유한 식품재료의 광산화억제작용 탐색과 anthocyanin 등의 안정성 평가 및 광산화 식품모델의 탐색’이, 2차년도에는 ‘(2) $^1\text{O}_2$ 소거능력을 가진 선별 분리된 책임물질의 분리 및 $^1\text{O}_2$ 소거능력 평가와 분리된 anthocyanin 등의 $^1\text{O}_2$ 존재하에서 안정성 및 식품에의 응용’이 연구되었다. (1)의 세부내용으로 ① 영양성분의 광산화에 대한 anthocyanin등을 함유한 식품재료의 억제효과탐색 및 기작규명 ② 광산화억제 활성물질의 분리 ③ 식품의 자체 system 하에서 자연으로 함유된 anthocyanin등의 $^1\text{O}_2$ 존재시 안정성 ④ anthocyanin등을 적용하여 품질을 개선시킬 수 있는 식품재료 및 공정의 탐색을 포함하며 (2)의 세부내용으로 ① 식품재료로부터 분리한 $^1\text{O}_2$ 소거 활성물질의 $^1\text{O}_2$ 소거능력 측정 및 작용기작 ② 영양성분의 초급속 산화에 대한 활성물질의 산화억제효과 ③ 가공식품에의 응용을 위하여 식품재료로부터 분리한 anthocyanin등의 $^1\text{O}_2$ 존재하에서 가공공정과 식품형태에 따른 안정성 ④ anthocyanin등을 첨가하여 $^1\text{O}_2$ 소거활성이 강한 식품과 공정 모델 개발 및 제품의 저장안정성을 포함하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 머루로부터 추출한 안토시아닌의 항산화 활성을 검토하고 광산화에 의한 $^1\text{O}_2$ 생성가능성이 높은 식품으로 두유와 우유를 선정하여 $^1\text{O}_2$ 가 소거되는 정도를 실험으로 확인하고 두유를 직접 제조하여 안토시아닌을 첨가한 시작품을 제시하였다. 머루에서 추출한 안토시아닌은 ORAC 분석방법을 통해 비교한 결과 α -tocopherol, δ -tocopherol, β -carotene 등의 항산화제 보다 항산화능이 높게 나타났으며 두유와 우유에 안토시아닌을 첨가한 후 4°C와 30°C에서 광산화 실험을 진행한 결

과 우유와 두유의 광산화를 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 대조구 실험과 비교하였을 때 광산화가 8 hr가 지난 후 대조구의 headspace oxygen content는 두유의 경우 4℃에서 22.74에서 17.12로 줄어들고 30℃에서 22.74에서 17.27로 줄어든 반면 안토시아닌을 1000 ppm을 첨가하면 4℃에서 19.28, 30℃에서 19.27로 광산화를 감소시키는 결과를 볼 수 있었다. 또한 우유는 4℃에서 대조구의 headspace oxygen content가 22.74에서 17.95, 30℃에서는 22.74에서 18.48로 줄어들지만 안토시아닌 1000 ppm을 첨가하면 4℃에서 19.29, 30℃에서 19.30으로 두유와 마찬가지로 광산화를 감소시키는 결과를 볼 수 있었다. 그러므로 추출의 어려움을 고려하였을 때 1000 ppm 정도의 첨가량이 적당하다고 판단하였고 두유와 우유에 안토시아닌을 첨가 전과 후의 lightness, redness, yellowness를 분석한 결과 수치적으로 큰 차이를 보이지 않았으며 육안으로도 차이를 보이지 않았다. 두유의 광산화에 라이보플라빈과 아스코르브산의 영향을 실험하기 위해 라이보플라빈을 5 ppm을 첨가하고 아스코르브산을 0, 200, 500, 1000 ppm 첨가한 결과 두유에서는 아스코르브산이 항산화 효과를 나타내지 않았으며 광산화로 인한 두유의 이취의 생성에 안토시아닌이 주는 영향을 확인하기 위해 안토시아닌 1000 ppm을 첨가하고 실험한 결과 안토시아닌은 두유의 광산화에 의한 diacetyl 생성을 낮추는 것을 gas chromatography의 area value로 확인하였으며 결과적으로 두유에 안토시아닌을 첨가 시에 두유의 광산화에 의한 이취를 경감시킬 수 있음을 알 수 있었다.

마이크로에멀전상태에서 화학적으로 유도되는 일중항 산소에 의하여 일어나는 rubrene 산화시스템을 이용하여 17종의 과일 및 채소류로부터 얻은 주스의 일중항 산소 소광활성을 측정하였다. 측정결과 주스의 종류마다 서로다른 일중항 산소 활성을 나타내었다. 그중 늦머루 주스가 가장 그 활성이 강하게 나타났고, 특이하게도 모든 포도류로부터 얻은 주스들은 모두 비교적 강한 활성을 나타내었다. 주스들의 일중항 산소 소광활성은 ABTS 라디칼 소거활성과 상관관계가 낮게 나왔다. 이결과는 비라디칼성 활성산소종인 일중항 산소소광활성과 라디칼소거활성과는 그 근본 기작이 서로 다르다는 것을 다시 한번 확인한 것이었다. 그러나 주스들의 일중항 산소 소광활성은 그 주스들에 포함되어 있는 안토시아닌함량과는 비교적 높은 상관관계를 나타내었다. 이는 안토시아닌이 일중항 산소소거활성을 가지고 있을 가능성을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 추후 6종을 포도를 다시 구입하여 이들의 일중항 산소 소광능력과 일중항 산소가 유도되는 광조사에 의한 우유의 초급성 산화를 억제하는 능

력을 측정하였다. 이 연구결과에 따르면, 닛머루 주스가 이들 우유의 초급성 산화에 의하여 생성되는 과산화지질 및 hexanal 생성 및 토코페롤 파괴에 대한 억제활성이 가장 강하게 나타났다. 또한 닛머루 주스는 비타민 B2 (라이보플라빈)의 광선에 의한 자가광분해도 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 이렇게 활성이 강한 닛머루 주스를 XAD-7 column chromatography를 이용하여 물질을 분리하여 3개의 분획(FI, FII, FIII)을 얻었다. 이들중 FII가 가장 강력한 일중항 산소 소거 활성을 나타내었고, FIII도 비교적 강한 활성을 나타내었다. 그러나 FI 분획물은 그 활성이 미미하였다. 이들 활성분획을 동일한 양의 아스코르브산과 함께, 이들이 우유의 초급성 산화를 억제하는 활성을 비교하였다. 이때 비교 대상으로 이용한 아스코르브산은 식용이 가능한 수용성물질중 가장 일중항 산소 소거능력이 강한 것으로 알려진 물질이다. 놀랍게도 이번 실험에서 머루에서 얻은 활성분획이 우유의 초급성 산화를 억제하는 효과(과산화지질 및 hexanal 생성 억제효과 및 토코페롤파괴 억제효과)에서 동일한 양의 아스코르브산에 비하여 훨씬 더 강한 활성을 나타내었다. 이와 같은 사실을 이전에 보고된 바가 없었다. 이들 활성분획물에 함유된 안토시아닌을 C-18 HPLC로 분리하고, 이들을 각각 C-18 HPLC/diode array detector (DAD), HPLC/MS, 및 HPLC/MS/MS 방법을 이용하여 구조를 확인하였다. 닛머루활성 분획에는 다양한 안토시아닌이 함유되어 있었고, 그중 delphinidin 3-glucoside, malvidin 3,5-diglucoside, pheonidin 3,5-diglucoside등이 주 안토시아닌이었다. ESR 및 rubrene 산화시스템을 이용하여, 일반적으로 가장 얻기 쉬운 안토시아닌인 cyanidin 3-glucoside 와 아스코르브산과 일중항 산소 소거활성을 비교한 결과, 놀랍게도 ESR 결과에서는 cyanidin 3-glucoside가 아스코르브산에 비하여 동일한 농도에서 2배 가량, rubrene 산화시스템에서는 2.5배 더 강한 활성을 나타내었다. 따라서, 이번 연구에 의하여 다양한 식품 및 식품소재의 초급성 산화를 억제하는데 사용할 수 유력한 후보물질로서 안토시아닌함량이 높은 머루주스 활성분획을 확보하게 되었다.

식품재료로부터 추출한 안토시아닌의 광화학적으로 생성된 일중항산소에 대한 안정성과 안토시아닌 함유 식품의 가공 중 일중항산소에 의한 안토시아닌의 안정성을 평가하였다. Riboflavin 존재하에서 일중항산소의 광화학적 생성은 riboflavin의 분해와 일중항산소 소거제인 sodium azide의 분해로 확인하였다. 오디에서 추출한 안토시아닌은 물-acetonitrile system에서 일중항산소에 의해 12시간동안 약 40%가 분해되었다. 머루에서 추출한 안토시아닌은 물 system에서 4℃에서 8시간동안 일중항산소와 반응한 후 약 20%가 분해되었다.

딸기잼 가공공정 중 riboflavin과 함께 잼에 첨가되는 sucrose, glucose, fructose 등의 당 종류, 가열온도 (25℃, 60℃), 가열시간 (0, 1, 2 시간)은 딸기 안토시아닌의 안정성에 영향을 주었다. 딸기 안토시아닌은 가열온도가 높아질수록, 또한 가열시간이 길어질수록 많이 분해되었으며 당의 종류도 일중항산소에 의한 안토시아닌의 안정성에 영향을 주어 설탕을 첨가한 딸기잼에서 일중항산소에 대한 안정성이 가장 낮았다. 저당 머루잼 가공공정 중 riboflavin과 함께 첨가되는 당 종류 (sucrose, glucose, fructose)와 가공시간 (0, 0.5, 1, 2, 3 시간)도 머루 안토시아닌의 안정성에 영향을 주었다. 머루 안토시아닌은 가열시간이 길어질수록 많이 분해되었으며 안토시아닌 diglucoside보다 안토시아닌 monoglucoside가 일중항산소에 의한 분해속도가 컸다. 또한 과당을 첨가한 머루잼의 안토시아닌은 설탕이나 포도당 머루잼의 안토시아닌보다 일중항산소에 의한 분해속도가 더 컸다. 이상의 결과에서 일중항산소는 안토시아닌을 분해시키며 안토시아닌을 함유한 식품가공 중 가열온도, 가열시간, 첨가된 당의 종류, 그리고 안토시아닌에 결합된 당의 개수가 일중항산소에 의한 안토시아닌의 안정성에 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

본 연구 결과를 이용하여 1O_2 소거기능이 강한 식품재료, 1O_2 생성으로 인한 영양성분, texture, 저장성이 급속히 감소하는 식품 및 공정, 1O_2 에 의한 anthocyanin 등의 산화안정성에 대한 자료 및 데이터를 확보하여, 이들 물질을 이용한 식품성분의 초급속 산화 억제 기술을 다른 식품의 가공 및 저장 분야로 파급 확대할 수 있다. 또한 anthocyanin등의 1O_2 소거기능 기작을 규명함으로써 학문 발전에 기여함은 물론, 식품성분의 초급속산화 억제로 인한 고품질 고영양 식품 제조 공정의 기반을 제공할 수 있다. 이들을 통하여 국민 건강 증진에 기여하고 식품의 저장성 개선으로 인한 식량자원의 수명을 연장시키고, 초급속산화로 인한 식품의 품질변화에 따른 부가적인 유통, 저장, 가공비용 등을 줄임으로써 식품산업의 경쟁력을 제고시키고, 고품질 고영양 정보에 의한 소비자들의 구매 촉진 효과로 가공 식품의 매출 증대효과를 유발시킬 수 있을 것이다. 또한 연구 활동에 참여하는 인력에 대해서는 GC, HPLC, MS, chromatography 등의 분리, 분석 기술의 습득과 식품성분의 산화 및 산화방지에 대한 전문 지식 및 기술 습득으로 졸업 후 산업체에서 즉시 적용 가능하여 식품산업계의 발전에 기여할 수 있을 것이다.

SUMMARY

It is well known that milk easily deteriorates under the light due to lipid oxidation initiated by photooxidation of milk lipids. To avoid photooxidation of milk, singlet oxygen should be removed or quenched. Anthocyanins has been known to have singlet oxygen quenching effects due to their molecular structures. Comparative antioxidant effects of anthocyanin, α - and δ -tocopherol, and β -carotene were determined in photooxidation of cow milk under the light during storage. Anthocyanin was prepared from wild grape, and methylene blue (MB, 100ppm) was used as photosensitizer. Degree of lipid oxidation was determined by headspace oxygen content (HOC). Samples were stored at 4 and 30° under light (18,000lux) for 8hrs. Oxidative stability of cow milks containing methylene blue significantly reduced under light at both temperatures. At 4°, addition of MB to milk significantly reduced HOC from 22.74% to 17.95 within 8hrs. HOC was, however, maintained at 19.55% when 1,000ppm anthocyanin was added to milk and MB mixture. This result clearly showed the strong antioxidant effect of anthocyanin. With the increase of anthocyanin concentration up to 1,000ppm, the antioxidation effect also increased. No significant effects, however, were shown higher than 1,000ppm of MB. HOC of milk treated with δ -tocopherol, α -tocopherol, and β -carotene were 19.51, 19.12, and 19.12, respectively. At 30°, HOC of control sample was 18.48 after 8hrs storage. HOC of milk treated with anthocyanin, δ -tocopherol, α -tocopherol, and β -carotene were 19.30, 18.64, 18.56, and 17.86, individually. In conclusion, anthocyanin showed the highest antioxidant effect at low and room temperatures, while β -carotene revealed the lowest antioxidant effect in photooxidation of milk.

Singlet oxygen quenching activity of seventeen different juices obtained from fruit and vegetable were monitored by a system of rubrene oxidation induced by a chemical source of singlet oxygen in a microemulsion system. The grape juices exhibited the strong singlet oxygen quenching activity. *Neut-Meoru* grape juice

showed the highest singlet oxygen quenching activity as determined by the rubrene oxidation. Singlet oxygen quenching activities of juices had low correlation with both ABTS radical scavenging activity and total phenolic contents. However, a high correlation was found between the singlet oxygen quenching activities and total anthocyanin contents of juices. The antioxidative activities of six different grape juices on the milk oxidation under light illumination condition were determined by measuring the lipid hydroperoxides, volatile compound formation, and tocopherol loss. *Meoru* juice also showed strong protective activity on the self-sensitized photodecomposition. Our results showed that *Neut-Meoru* juice had the highest protective activity on the milk oxidation. The *Neut-Meoru* juice also showed strong protective activity on the self-sensitized photodecomposition of Vitamin B2. The *Neut Meoru* juice was fractionated into 3 fractions (FI, FII, FIII) by XAD-7 column chromatography. Among these fractions, FII showed the highest activity on the photooxidation of milk, followed by FIII fraction. FI showed low activity. The active fraction of *Meoru* juice showed significantly higher protective activity than ascorbic acid at the same concentration on the lipid hydroperoxide, hexanal formation, and tocopherol loss in milks stored under light illumination conditions. The anthocyanin profiles of active fractions obtained from *Neut-Meoru* juice through XAD-7 column chromatography was characterized by C-18 HPLC/diode array detector (DAD), HPLC/MS, and HPLC/MS/MS analyses. It was found that the column oven temperature during the reverse phase C-18 HPLC greatly affected the separation of individual anthocyanins with optimum separation temperature of 35°C. Sixteen different anthocyanins (11 nonacylated and 5 acylated anthocyanins) were identified in the grape juices. It was found that delphinidin 3-glucoside, malvidin 3,5-diglucoside, and pheonidin 3,5-diglucosidewere the major anthocyanins in the active fraction. We further studied both an electron resonance spectroscopy and rubrene oxidation anysis to determine the singlet oxygen quenching activity of cyanidin 3-G (a component of active fraction) and compred with that of ascorbic acid, which is known the most strongest water soluble

singlet oxygen quencher. The ESR study showed that cyanidin 3-glucoside had about twice strong singlet oxygen quenching activity. Furthermore, Rubrene oxidation analysis results showed that cyanidin 3-glucoside had 2.5 times stronger singlet oxygen quenching activity than that of ascorbic acid. The result indicated that anthocyanins in active fraction of meoru juice has greatly strong singlet oxygen quenching activity. This represents the first report on the strong singlet oxygen quenching activity of anthocyanins.

Stability of anthocyanins isolated and food anthocyanins during processing in the presence of photochemically produced singlet oxygen were determined. Photochemical production of singlet oxygen was confirmed by degradation of riboflavin and sodium azide. Forty percent of mulberry anthocyanins in water-acetonitrile was degraded by singlet oxygen after 12 hours. Wild vine anthocyanins in water were degraded to 80% level by singlet oxygen at 4°C after 12 hours. Kinds of sugars (sucrose, glucose, fructose), heating temperature (25°C, 60°C), and heating time (0, 1, 2 hour) affected the stability of strawberry anthocyanins during strawberry jam manufacturing under light. Higher heating temperature and longer heating time accelerated the degradation of strawberry anthocyanins under light. Anthocyanins in strawberry jam with sucrose showed the lowest stability in the presence of singlet oxygen during jam manufacturing. Kinds of sugars (sucrose, glucose, fructose) and heating time (0, 0.5, 1, 2, 3 hour) affected stability of wild vine anthocyanins by singlet oxygen. Longer heating time accelerated the degradation of wild vine anthocyanins by singlet oxygen and the degradation rate of monoglucoside anthocyanins was faster than that of diglucoside anthocyanins. Anthocyanins in wild vine jam with reduced fructose showed the lowest stability in the presence of singlet oxygen.

The results clearly showed that anthocyanins were decomposed by photochemically produced singlet oxygen and manufacturing conditions such as heating temperature, heating time, kind of added sugars, and number of sugar bound to anthocyanin affected the stability of anthocyanins in the presence of singlet oxygen.

CONTENTS

Summary	7
Contents	10
I. Introduction	12
1. Background	12
2. Objectives and Scope	15
II. Literature Review	17
III. Results and Discussion	18
Chapter 1 – Application of singlet oxygen quencher in food processing ...	18
1. Materials	18
2. Experimentals	18
3. Results and discussion	25
Chapter 2 – Singlet oxygen quenching and antioxidation of foods containing anthocyanin	75
1. Materials	75
2. Experimentals	75
3. Results and discussion	79
Chapter 3 – Stability of anthocyanin against singlet oxygen	109
1. Materials	109
2. Experimentals	109
3. Results and discussion	114
IV. Accomplishments and Significances	134
V. Achievements and Application of the Results	136
1. Achievements	136
2. Application of the Results	137
VI. References	139

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
Summary	7
Contents	10
목 차	11
제 1 장 연구과제의 개요	12
제 1 절 연구의 필요성	12
제 2 절 연구의 목적과 범위	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	18
제 1 세부과제 - 일중항산소 소거제의 식품가공공정에의 적용	18
제 1 절 연구재료	18
제 2 절 연구방법	18
제 3 절 연구결과 및 고찰	25
제 2 세부과제 : 안토시아닌 등 플라보노이드 함유식품의 일중항산소 소거및 산화억제 기능	75
제 1 절 연구재료	75
제 2 절 연구방법	75
제 3 절 연구결과 및 고찰	79
제 3 세부과제 - 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성	109
제 1 절 연구재료	109
제 2 절 연구방법	109
제 3 절 연구결과 및 고찰	114
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	134
제 5 장 연구 성과 및 활용계획	136
제 1 절 연구 성과	136
제 2 절 활용계획	137
제 6 장 참 고 문 헌	139

제 1 장 연구과제의 개요

제 1 절 연구의 필요성

1. 연구의 경제적·산업적 중요성

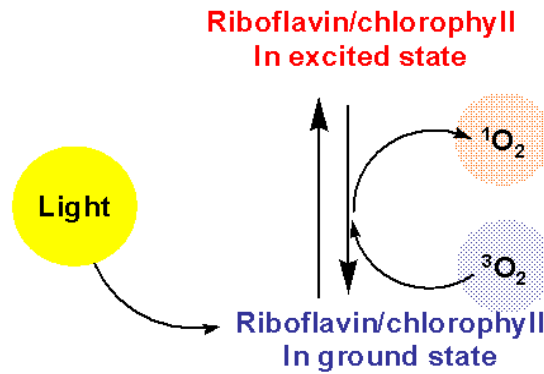
식품을 구성하고 있는 탄수화물, 단백질, 지방, 비타민 등 영양성분은 조리, 가공, 저장 중 공기 중의 산소에 의해 산화되고, 산화 생성물은 식품에 바람직하지 못한 volatile compound들을 생성하고 필수 지방산, 아미노산 및 비타민을 파괴시키며 심지어 발암물질을 생성하기도 한다. 탄수화물, 단백질, 지방 등 영양성분의 산화결과 생성된 dimer나 polymer등은 이들의 기능성 (functionality)을 변화시킬 수도 있다.

산화를 유발하는 공기 중의 산소는 대부분이 삼중항산소 (3O_2) 나 반응성이 매우 강한 일중항산소 (1O_2)도 소량 존재하는데 일중항산소에 의한 산화는 대두유에서의 reversion flavor, 우유의 sunlight flavor, 두유의 불쾌취, 맥주의 역취를 야기시키는 것으로 보고되고 있는데, 특히 우유는 직사광선하에서 초급속산화에 의하여 불과 5분 내에 아주 불쾌한 sunlight struck off-flavor를 발생하여 제품의 품질을 저하시키는데 이 원인물질이 바로 일중항산소이다. 초급속산화는 자체의 발생도 문제가 되며, 삼중항산소에 의한 라디칼 산화반응을 촉발하는 역할을 하므로 식품가공공정이나 유통, 저장 중 식품 system에서 생성되는 1O_2 을 소거함으로써 식품의 영양가와 기능성을 개선하려는 노력이 계속되어져 왔다.

1O_2 과 $\cdot OH$ 의 반응성이 다른 ROS나 3O_2 에 비해 월등히 높는데 특히 반응물이 radical이 되어야 하는 $\cdot OH$ 에 비해 1O_2 은 이중결합을 가지거나 비공유 전자쌍을 가진 원소를 함유한 화합물과 직접 반응할 수 있어 식품성분의 산화는 초급속으로 진행된다. 영양성분의 산화반응은 공기 중에 존재하는 주요한 산소형태인 triplet oxygen (3O_2) 뿐 아니라 singlet oxygen (1O_2), superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), hydroxy radical ($\cdot OH$), peroxy radical ($ROO\cdot$), alkoxy radical ($RO\cdot$), hydroperoxy radical ($HOO\cdot$) 등을 포함하는 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)에 의해 진행된다. 3O_2 은 2개의 $2\pi^*$ orbital이 전자를 1개씩 가지고 있어 radical character를 나타내고 이 두개의 unpaired electron이 자기장하에서 3개의 서로 다른 에너지를 나타내기

때문에 삼중항산소라 일컬어진다. 이에 반해, $^1\text{O}_2$ 은 2개의 $2\pi^*$ 전자가 짝을 이루어 (paired) 한 orbital에 위치하고, 따라서 0의 magnetic moment를 가지고 1개의 에너지 상태를 보여 일중항산소라 하며, $^3\text{O}_2$ 보다 에너지 준위가 93.6 kJ 정도 높은 친전자 화학종 (electrophilic species)이다. 따라서 $^3\text{O}_2$ 과 반응할 수 있는 화합물이나 화학종은 radical이어야 하지만, $^1\text{O}_2$ 은 분자 구조 내에 이중결합을 가진 화합물과 직접적으로 반응할 수 있어 산화반응은 $^3\text{O}_2$ 에 비해 매우 빠름. 예를 들어 linoleic acid에 대한 $^3\text{O}_2$ 과 $^1\text{O}_2$ 의 반응속도 상수는 각각 $8.9 \times 10^3/\text{M/s}$, $1.3 \times 10^5/\text{M/s}$ 이다.

$^1\text{O}_2$ 은 curcumin, methylene blue 등의 dye, chlorophyll, riboflavin이나 hematoporphyrin 등의 색소, anthracene 등의 aromatic hydrocarbon 등의 감광제와 빛이 존재하는 system에서 에너지 전달 등의 과정을 통해 $^3\text{O}_2$ 으로부터 생성됨. Kochevar 와 Redmond (2000)는 감광제 1분자가 10^3 - 10^5 분자 정도의 $^1\text{O}_2$ 을 생성하는 것으로 보고되고 있다.

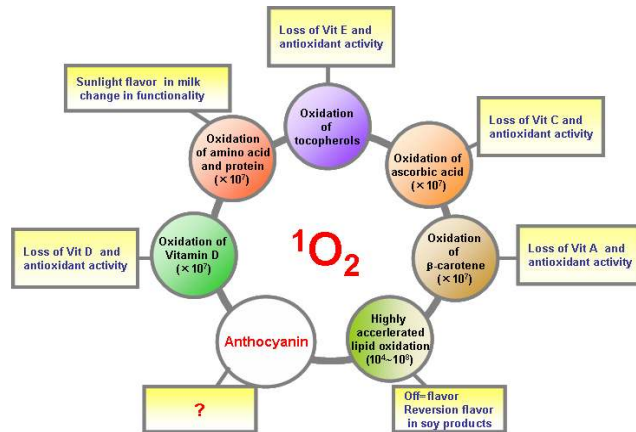


$^1\text{O}_2$ 은 식품내에서 주로 photosensitization mechanism에 의해 생성되지만 철이나 구리 같은 전이금속의 존재 하에 hydrogen peroxide 와 superoxide anion radical에 의해 생성되기도 하며 (Halliwell and Gutterodge 2000), phosphatidylcholine hydroperoxide가 Cu^{2+} 의 존재하에 분해되어 생성될 수도 있다. $^1\text{O}_2$ 과 식품 성분들과의 반응성은 system에 따라 다소 차이는 있으나, 비타민과 아미노산과는 $10^7 \sim 10^9$ order, 당류, 콜레스테롤 및 지방산과 유지와는 $10^4 \sim 10^9$, 단백질과는 $10^4 \sim 10^5$ 정도의 반응속도를 보인다.

2. 연구의 필요성

$^1\text{O}_2$ 소거제로 알려진 물질로는 tocopherol, carotenoid 등이 있는데 이들은 각각 vitamin E, 또는 vitamin A 활성을 가지고 있으나 $^1\text{O}_2$ 에 의한 tocopheryl hydroperoxydienone, tocopheryl quinone, 5, 8-endoperoxide, quinone epoxide 등의 산화생성물들은 vitamin 활성을 잃거나 또는 감소하여 결과적으로 식품의 영양가 뿐만 아니라 이들이 가진 생리활성기능 감소를 초래한다. 따라서 tocopherol, β -carotene 과 같은 영양성분을 대체할 수 있는 $^1\text{O}_2$ quencher 탐색이 필수적임. 현재까지 알려진 $^1\text{O}_2$ quencher 화합물들은 이중결합을 갖고 있고 전기음성도가 비교적 높은 산소, 질소, 황 등의 원소를 함유하며 특히 benzene ring 구조를 가진 경우가 많다. 유색 채소 및 과일의 주요한 색소 중 하나인 anthocyanin을 포함한 flavonoids는 이들 구조와 유사한 구조를 갖는다. 특히 anthocyanin 은 anthocyanidin에 당이 결합한 배당체로서 과일의 종류에 따라 그 구조와 함량이 다르다. Anthocyanin이 많이 함유된 식품으로는 포도, raspberry, blue berry, black berry 등의 berry 종류가 있으나 포도를 제외하고는 우리나라에서 많이 재배하고 있지 않으며 또한 유색미, 검정콩도 anthocyanin이 비교적 많은 것으로 알려져 있으나 대부분 과피에 존재하고 몇몇 과일, 채소의 경우 껍질을 폐기하는 경우가 많아 식품전체에 대한 이용도가 떨어질 뿐만 아니라 경제적, 산업적 손실도 많은 편이다.

또한 과일의 과육과 과피 뿐 아니라 씨에 함유된 유용한 polyphenol 화합물들이 계속적으로 보고되고는 있으나 가공과정에서 씨가 제거되는 경우가 많아 과피 및 씨에 함유된 유용성분을 이용하지 못하고 폐기하는 경우가 대부분이므로 이에 따른 경제적, 산업적 손실도 많은 편이다. Anthocyanin은 식품에 색을 제공하는 외에도 노화억제, 항당뇨, 당뇨병성 망막장애의 치료 및 시력개선효과, 항암, 항산화 작용 등 다양한 생리활성 기능이 있는 것으로 알려져 있는데, 특히 anthocyanin의 산화방지 작용은 hydroxy radical, superoxide quenching, 또는 단순히 free radical scavenging activity를 중심으로 연구되어져 왔으나 $^1\text{O}_2$ quenching에 대한 연구는 거의 이루어지지 않는 실정이다.



그러나 그 구조가 기존에 알려진 $^1\text{O}_2$ quencher의 구조와 비슷한 부분이 있어 anthocyanin을 포함한 flavonoids의 $^1\text{O}_2$ quenching activity를 탐색할 필요가 있으며, 또한 채소, 과일의 종류에 따라 anthocyanidin의 종류가 다르므로 식품원료에 따른 $^1\text{O}_2$ quenching activity에 차이가 있을 가능성이 있다. 따라서 몇몇 채소, 과일에 존재하는 anthocyanin등의 $^1\text{O}_2$ quenching activity를 비교하고 이를 토대로 $^1\text{O}_2$ quenching에 의한 antioxidant로서의 가능성을 모색할 필요가 있다.

또한 효율적인 $^1\text{O}_2$ quenching을 위하여 anthocyanin등 flavonoids의 식품 가공, 저장에 따른 안정성을 고찰함으로써 산화방지제로서의 효율을 상승시킬 필요 있으며, 궁극적으로 $^1\text{O}_2$ quencher로서의 anthocyanin등 flavonoids를 식품에 응용함으로써 영양성분의 보존과 색을 포함한 식품의 texture 개선 등에 기여하고자 한다.

제 2 절 연구의 목적과 범위

본 연구는 식품성분의 초급속산화를 효과적으로 억제할 수 있는 일중항산소 ($^1\text{O}_2$) 소거제로써의 anthocyanin등 flavonoids를 천연자원으로부터 탐색, 분리하고 이들의 광산화조건에서의 안정성을 규명한 후, $^1\text{O}_2$ 에 의한 초급속산화를 억제함으로써 고영양, 고품질의 식품 및 공정 모델 개발을 제시하는데 그 목적이 있다. 즉 riboflavin 등 sensitizer를 포함한 식품에서 빈번히 접하게 되는 조건, 즉 산소와 빛 존재 하에서 생성되는 $^1\text{O}_2$ 에 의한 식품성분의 초급속산화를 억제하기 위하여 구조특성상 $^1\text{O}_2$

quencher 가능성이 있는 anthocyanin 등 flavonoids를 탐색하고 식품의 자체 system 또는 가공 및 저장 조건에서의 이들 물질의 안정성을 탐색한 후 식품성분의 안정성 및 기능이 향상된 가공 식품의 모델 제시를 위한 시작품을 개발하는데 그 목적이 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

세계적으로 보아도 $^1\text{O}_2$ 에 의한 식품성분의 산화기작에 대한 연구 및 식품의 초급속산화 안정성을 확보하기 위한 $^1\text{O}_2$ 소거제의 이용기술은 개념정립단계의 말기에서 기술의 기업화 준비단계에 속하는 기술로써 국제적으로도 아직 완성도가 낮은 분야이다.

국내에서는 한국식품연구원, 우석대학교, 인하대학교를 중심으로 일중항산소 소거제에 대한 연구가 진행되어 왔고, 현재 국제적인 수준에 거의 근접해 있다. 특히 본 연구팀은 미국의 Ohio State University와 공동으로 식품성분 특히 유지성분의 $^1\text{O}_2$ 산화를 계속적으로 연구하고 있으며 이에 따른 결과를 국제 저명학술지에 발표함으로써 세계의 학자들과 선진 기술을 공유하고 있다.

국내외에서 수행되고 있는 일중항산소에 대한 연구 현황을 아래 표 1에 나타내었다.

표 1. 일중항산소에 의한 산화에 관한 연구 현황

연구수행기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
University of California, Davis	<ul style="list-style-type: none"> 지질의 초급속 산화기작 	<ul style="list-style-type: none"> $^1\text{O}_2$에 의한 지질의 불쾌취 추적 및 산화생성물 확인
Ohio State University 한국식품연구원	<ul style="list-style-type: none"> 올리브유, 대두유의 $^1\text{O}_2$ 과 관련된 산화개시기작규명 우유의 sun struck off-flavor 생성 기작 연구 콩기름의 reversion flavor 원인물질 생성 메카니즘 	<ul style="list-style-type: none"> 대두유 가공공정의 개선 우유 및 유제품의 유통기간 중 초급속 산화취 억제 기술 개발 콩기름의 변향 억제 기술 개발
우석대학교	<ul style="list-style-type: none"> 광선에 의한 탈지우유 및 전지우유 중의 아스코브산 및 레티놀 안정화 기술 광선 조사에 의한 지질의 초급속산화에 대한 세사물의 억제효과 	<ul style="list-style-type: none"> 우유에 함유된 비타민의 광안정성 증가 세사물의 광감성 초급속 지질 산화 억제 가능성 제시
Ohio State University 인하대학교	<ul style="list-style-type: none"> $^1\text{O}_2$과 riboflavin의 반응성 연구 $^1\text{O}_2$에 의한 두유의 flavor 안정성 연구 Full fat soy flour의 $^1\text{O}_2$ 산화 안정성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> Riboflavin 안정성 증대 방법 제시 두유 flavor의 개선 조건 제시 저장성이 개선된 full fat soy flour의 저장 조건 개선

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 세부과제 - 일중항산소 소거제의 식품가공공정에의 적용

제 1 절 연구재료

오디는 62친환경 유기마켓(www.62market.com)에서 머루는 성남 모란 재래시장에서 각각 구입하여 동결건조 후 본 실험에 사용하였다. 대두는 성남 모란 재래시장에서 구입하였고 α -Tocopherol, δ -Tocopherol, β -Carotene과 hexanal, diacetyl, dimethyl disulfide과 안토시아닌 정제를 위해 사용한 수지 Amberlite XAD-7 (particle size 20-60 mesh)은 Sigma Chmical Co.에서 각각 구입하였다. 안토시아닌 표준물질은 Genay france사에서 각각 구입하여 실험에 사용하였다.

제 2 절 연구방법

1. 시료의 전처리

(1) 시료의 동결건조

시료의 씨와 과육을 제거하기 위해 핸드믹서 (필립스전자, HR 1385/A)로 갈아서 치즈 천을 이용하여 과즙을 내어 동결건조(Ilshin, MCFD8508, Seoul, Korea) 하였다. 단, 오디는 씨를 제거할 필요가 없기 때문에 오디자체를 동결 건조 후 본 실험에 사용하였다.

(2) 안토시아닌 추출과 정제

머루와 오디는 다음의 Fig. 1-1과 같이 crude anthocyanin을 추출하여 농축한 다음 Glass Open Column(2.5 cm id * 25 cm)을 통과시켜 정제된 안토시아닌을 얻었다. Glass Open Column으로 정제하는 방법은 윤 등 (1998)의 방법을 변형시켜 본

실험에 사용하였다 (Fig. 1-2). Glass Open Column을 Amberlite XAD-7로 충전하고 seasand를 위아래로 충분히 넣어 수지를 손상시키지 않도록 하였다. 그리고 3차 증류수 1000 mL을 용출시켜 수지의 불순물을 제거한 다음 시료를 loading (0.5 g/2 mL) 하였다. 시료에 당류와 유기산, 비흡착 색소, 아미노산등의 제거를 위해 3차 증류수 1000 mL을 흘려준 뒤 1% HCl-MeOH을 250 mL을 용출시켜 40°C에서 회전압 농축을 하였다.

머루와 오디를 위와 같은 방법으로 추출·정제하고 이때 적절한 용매 용출량을 설정하기 위해 총 1000 mL의 1% HCl-MeOH을 각각 50 mL씩 fraction 받아 5 mL로 회전압 농축하여 UV-spectrophotometer (Jasco, V-530, Tokyo, Japan)와 HPLC로 anthocyanin의 정제 정도를 측정하여 용출량을 설정 하였다.

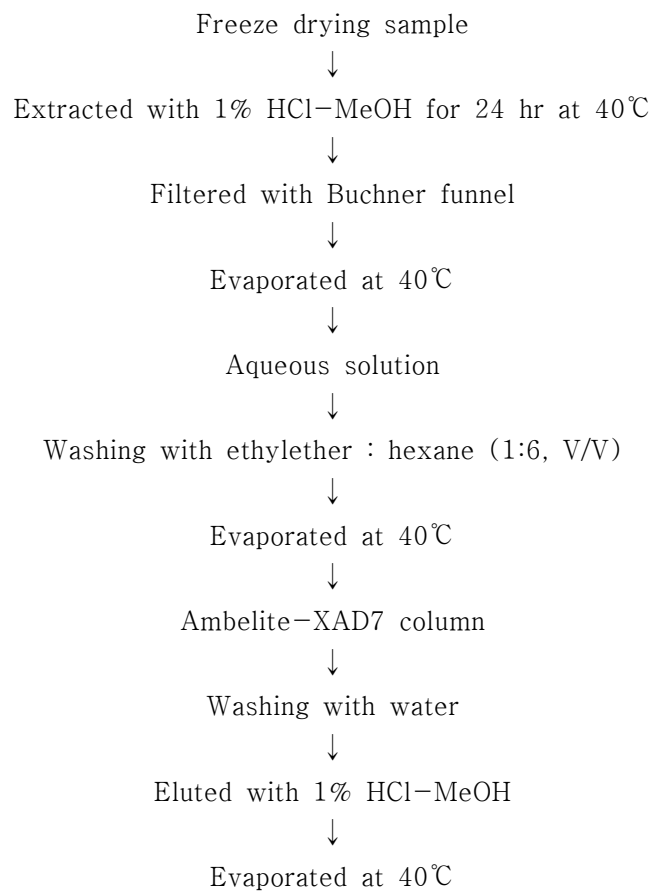


Fig. 1-1. Extraction and purification of anthocyanins from mulberry and wild grape.

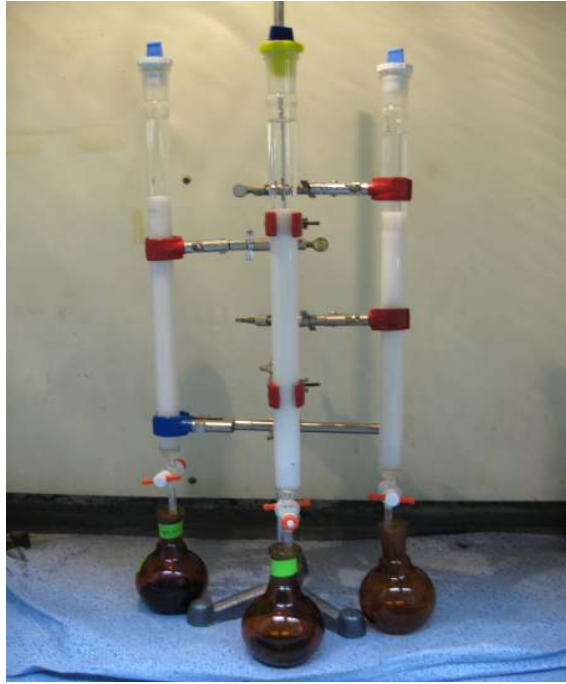


Fig. 1-2. Purification of anthocyanin from wild grape and mulberry

(3) pH별 안정성

pH용액 (pH1-14) 1 mL에 동결건조 시킨 머루와 오디를 각각 0.006 ± 0.0001 g 씩 ependorf tube에 넣고 UV-spectrophotometer의 spectrum measurement로 측정하였다.

(4) HPLC 분석

오디와 머루를 HPLC (JASCO, UV-975, Tokyo, Japan)에 0.5 g/mL의 농도로 20 μ L을 주입하여 anthocyanin 색소물질의 조성을 분석하였고 이때 분석조건은 Table 1-1.에 나타내었다. A용매를 31분까지 0%에서 20%까지 올리고 이후 45분에 30%까지 올렸으며 60분에 다시 0%가 되도록 하였다. 표준물질은 Delphinidin-3-O-glucoside chloride, Cyanidin-3-O-glucoside chloride, Cyanidin-3,5-di-glucoside, Malvidin -3,5 -di- glucoside chloride, Pelagonidin-3-O-glucoside 총 5가지의 표준 물질을 측정하여 사용하였다.

Table 1-1. Instrument and analysis conditions for anthocyanins in mulberry fruits and wild grapes.

Classification	Anthocyanin
Instruments	Jasco LC system
Wave length	538 nm
Column	Symetry C ₁₈ 5 μm (4.6 * 250 mm)
Column Temp	35°C
Mobile phase	A : Acetonitrille, B : 10% Formic acid
Flow rate	1 mL/min

(5) Anthocyanin의 항산화능 확인

Anthocyanin의 항산화능력의 Fig. 1-3의 방법과 같이 ORAC 분석방법을 통해 ELISA(Spectra Max M2^e)으로 분석하였다. 본 실험에 사용한 ORAC buffer는 K₂HPO₄와 NaH₂PO₄와 증류수를 혼합하여 pH 7.0이 되도록 하였고 Flourescein stock solution은 ORAC buffer와 혼합하여 200 nM이 되도록 하였으며 AAPH [2,2'-Azobis (2-metylpropionamide) Dihydrochloride] 용액은 ORAC buffer와 혼합하여 0.32 M을 만들어서 사용하였다. Trolox standard stock solution은 20, 40, 60, 80 μM의 농도로 standard curve를 측정하고 안토시아닌의 항산화능을 Standard curve를 이용하여 값으로 나타내었다.

3. ¹O₂ 가 생성되는 식품 및 가공조건의 탐색

(1) ¹O₂ 가 생성되는 식품 탐색

Riboflavin등 Sensitizer가 함유된 식품으로 두유와 우유를 선정하였다. 두유와 우유 속에는 비타민 B₂(6%, 9%)와 C(13%, 4.5%) 함량이 높고 ¹O₂ 생성가능성이 높은 식품으로 Anthocyanin을 함께 사용할 수 있고 부가적으로 color를 제공받을 수 있는 이유로 선정하였다.

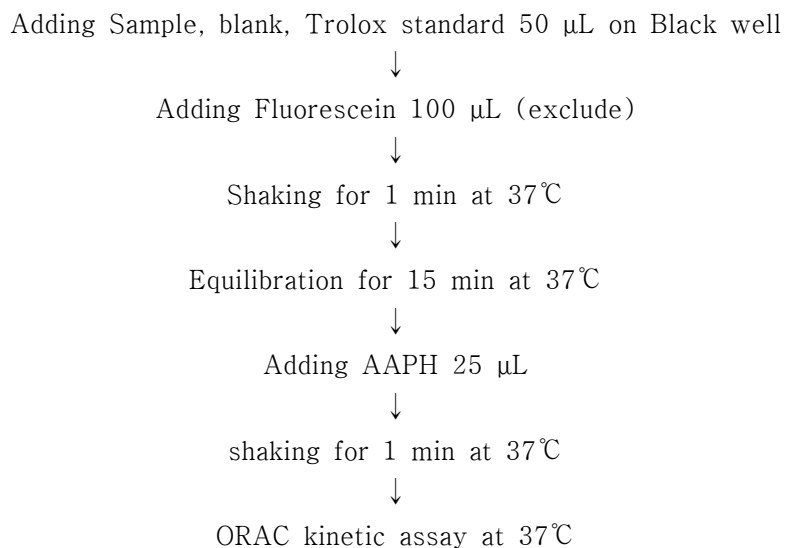


Fig. 1-3. ORAC kinetic assay methods

(2) $^1\text{O}_2$ 이 생성되는 가공조건의 탐색

두유와 우유의 광산화 반응을 일으키는데 사용되는 Light box는 나무상자를 이용하여 제작하였고 시료는 나무상자의 하단에 위치한 유리 위에 놓았다. 각각의 시료가 될 수 있는 한 균일한 조도를 받도록 실험을 진행하였으며 조도는 18,000 lux였다.

두유와 우유의 광산화를 효과적으로 연구하기 위해 Methylene blue를 sensitizer로 첨가하였고 시료를 30 mL serum bottle에 넣고 시료를 제작하였으며 Teflon septa와 aluminum cap으로 밀봉하였다. Light box에서 4°C, 30°C에서 각각 8 hr 동안 저장하고 Static Headspace 방법으로 세 번 반복 실험하였다. 두유의 광산화는 Mol sieve 5A PLOT(30 m*0.32 mm)를 장착한 HP5890 thermal conductivity detector로 측정하였다. Injector 200°C, Oven 60°C, Detector 250°C에서 Serum bottle의 Headspace oxygen 1 mL을 syringe로 취하여 측정하였다.

(3) 실제 식품시스템의 광산화 안정성

실제 식품 시스템으로는 두유와 우유가 실험에 사용되었고 안토시아닌은 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 ppm 을 첨가하여 시료를 만들었다. 시료는 30 mL

시료병에 넣은 후 시료병을 Teflon septa 와 Aluminun cap으로 밀봉하고 4℃, 30℃에서 0, 2, 4, 6, 8 시간동안 저장하였으며 α -Tocopherol, δ -Tocopherol, β -Carotene 와 비교하여 세 번씩 반복하여 측정하였다.

(4) 안토시아닌 첨가 후의 색 변화

두유와 우유에 안토시아닌의 첨가 후 색의 변화를 알기 위해 UV-spectrophotometer (Jasco, V-530, Tokyo, Japan)로 L, a, b 값을 측정하였다.

4. $^1\text{O}_2$ 소거활성을 가진 고영양, 고품질 제품모델 개발

(1) $^1\text{O}_2$ 소거활성을 가진 고영양, 고품질 제품모델 개발

표준모델은 위에서 명시한 바와 같이 두유로 선정되었고 Lee(1996)방법에 의해 직접 조제하였으며 두유제조 방법과 모델의 사진은 Fig. 1-4 에 묘사하였다. 또한 $^1\text{O}_2$ 소거활성을 가진 성분으로는 머루에서 추출한 안토시아닌이 사용되었고 두유의 pH는 시판 두유와 맞게 7.12로 맞추어서 실험에 사용하였다.

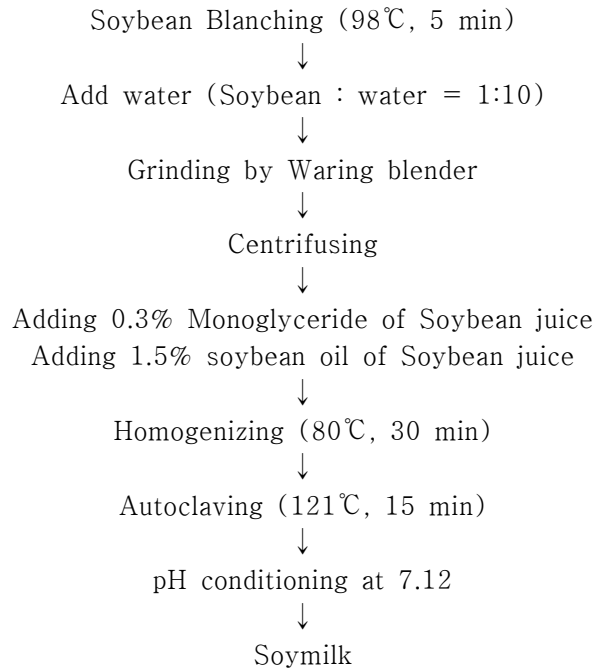


Fig. 1-4 Outlined process for the preparation of soymilk

(2) 제품 모델의 광산화 안정성 및 물리적 변화

안토시아닌이 제조두유의 광산화 안정성에 소거제로서 얼마나 효과적인가를 연구하기 위해 1000, 2000 ppm의 안토시아닌을 제조두유에 첨가하여 시료를 만들었다. 시료는 30 mL 시료병에 넣은 후 시료병을 Teflon septa 와 Aluminun cap으로 밀봉하고 4°C, 30°C,에서 0, 2, 4, 6, 8 hr동안 저장하여 측정하였다. 또한 안토시아닌의 소거제로서의 역할을 비교하기 위해 α -Tocopherol, δ -Tocopherol, β -Carotene을 사용하였고 모든 실험은 세 번씩 반복실험을 하였다.

(3) 안토시아닌 첨가 후의 색 변화

제조두유에 안토시아닌의 첨가 후 색의 변화를 알기 위해 UV-spectrophotometer (Jasco, V-530, Tokyo, Japan)로 L, a, b 값을 측정하였다.

(4) 두유의 광산화에 주는 라이보플라빈과 아스코르브산의 영향

라이보플라빈이 두유의 광산화 반응에 감광체로서 얼마나 효과적인가를 연구하기 위하여 5 ppm의 라이보플라빈을 두유에 첨가하여 시료를 만들었다. 아스코르브산이 라이보플라빈의 감광에 의한 두유의 광산화 반응에 주는 항산화 효과를 연구하기 위해 0, 200, 500, 1000 ppm의 아스코르브산을 첨가하여 시료를 만들었다. 시료를 30 mL 시료병에 넣은 후 4도 Light box에서 0, 2, 4, 6, 8 hr 동안 저장하였고 세 번 반복으로 측정하였다.

5. 실제 식품 시스템에서의 휘발성분 생성에 주는 영향

(1) 두유의 광산화에 따른 이취 생성정도

두유의 광산화에 따른 이취 생성정도를 알아보기 위해서 시료를 30 mL 시료병에 넣은 후 4°C, Light box에서 0, 1, 2일 동안 저장하여 휘발성분 생성정도를 비교하였고 Solid phase microextraction(SPME)법을 이용하여 추출하였다. Lee(2003), Steenson(2002), Yang(2005)등의 방법을 변형하여 시료병을 45분 동안 60°C 항온수조에 방치시켜 Headspace내의 휘발성 물질의 평형을 이루도록 하였고 SPME needle을 삽입 후 Fiber를 돌출 시켜 45분간 Stirring 하면서 방치시켰다. Flame ionization detector(FID)가 설치된 Gas Chromatograph(HP7890)를 이용하여 SPME Fiber로부

터 휘발성 물질을 분리하였다.

(2) 휘발성 물질 분리 조건

SPME fiber는 R.HUANG(2004)등의 방법에 의해 두유의 휘발성 물질을 높은 민감도로 추출할 수 있는 70 μm carboxen/polydimethylsiloxane(CAR/PDMS)로 선정하였다. Gas chromatography 조건으로 0.75 mm 내경 injector liner, FID, DB-WAX(30 m*0.32 m ID, 0.25 mm film thickness) Column을 사용하였다. Gas chromatography 오븐의 온도 조건은 JUNG(1998)등의 방법에 의해 초기 40°C에서 5°C/분의 속도로 225°C까지 증가시키고 10분간 머무르게 하였다. Injector와 Detector의 온도는 각각 250°C와 280°C였고 Carrier gas는 질소로서 flow rate는 1.0 mL/min이었다. Splitless mode를 이용하였고 SPME fiber는 injector내에서 5분간 방치하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 안토시아닌 추출과 정제

(1) 안토시아닌 수율

머루와 오디의 총 수율은 Table 1-2 에 제시하였다. 머루는 씨를 제거하는 과정에서 40% 정도가 제거되고 동결건조 후 수분이 19%정도 제거되는 것으로 보였다. 이후 지질제거로 7.65% 정도가 제거되지만 이는 소량으로 진행되는 실험과정에서 손실되는 양이 있는 큰 것으로 보이며 추후 대량으로 실제 공정 시에는 손실되는 양을 줄일 수 있을 것이라고 판단된다. 컬럼 정제까지의 과정을 거치고 나면 100 g당 1.05 g정도의 양을 정제된 안토시아닌을 얻을 수 있었다. 오디는 동결건조로 15.63%의 수율을 얻었고 추출과 정제과정을 거쳐 100 g기준으로 0.94 g을 얻을 수 있었다. 결론적으로 머루와 오디는 100 g당 대략 1 g의 정제물질을 얻을 수 있었으며 머루가 오디에 비해 안토시아닌이 소량 많은 것으로 나타났다. 정제과정의 용매 용출량은 UV-spectrophotometer로 확인한 결과 536~540 nm에서 최대 흡광도를 가졌으며 100 mL이 넘어가면서 값이 현저하게 줄어들고 350 mL 이후부터는 peak라고 판단되

지 않았다 (Fig. 1-5). HPLC로 확인한 결과 200 mL 이후부터는 안토시아닌이라고 보기는 어렵다고 판단되었다. 또한 회전감압 농축 시 용매 량의 양이 많아질수록 시간이 오래 걸리는 단점을 보완하기 위해서는 용매의 양을 최소로 하는 것이 좋다고 판단되었다. 따라서 용매 용출량은 안토시아닌의 수율정도와 시간을 고려하였을 때 약 250 mL이 좋은 것으로 나타났다.

Table 1-2. Total yield of anthocyanin

	wild grape	mulberry
A	100%	100%
B	62.71%	-
C	11.92%	15.63%
D	11.51%	11.30%
E	10.60%	8.51%
F	1.06%	0.94%

A: raw sample, B: extracted sample, C: freeze drying sample, D: 1% HCl-MeOH extracted sample, E: lipid removal(exclude) sample, F: purified sample

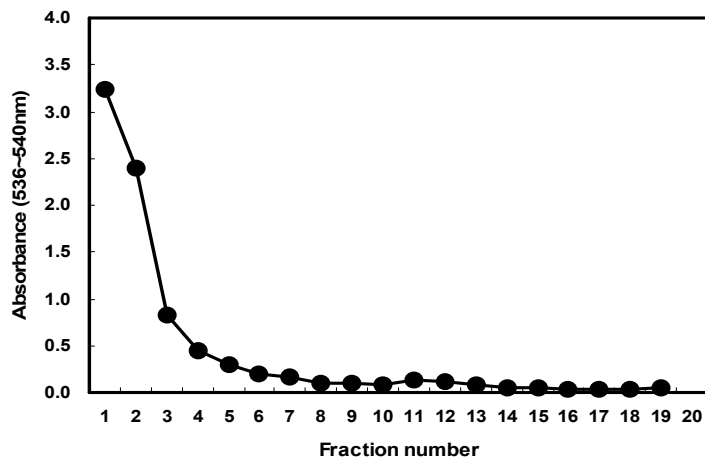


Fig. 1-5. Absorption spectra of fraction in the purified anthocyanin of wild grape

(2) 안토시아닌의 pH안정성

안토시아닌은 pH에 안정하지 못하고 낮은 pH에서 안정한 형태를 가진다고 윤 등 (1979)이 보고하고 있다. 본 실험의 결과 역시 육안으로 보이는 안토시아닌의 색은 낮은 pH 즉 pH 1-2에서 선명한 빨강 색을 가지는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1-6, 7). 이는 강등 (2003)의 결과와 매우 유사한 경향을 나타내었다. UV-spectrophotometer로 측정된 결과 pH 3 이후로는 안토시아닌 함량이 반으로 줄어드는 것으로 나타났다. 또한 pH 3 이하에서만 확실한 peak를 가지는 것으로 보이고 pH 4~11까지는 매우 broad한 피크를 보였으며 pH 12이후에는 전혀 다른 형태를 보이는 것으로 나타났다.

머루와 오디는 높은 pH에서만 육안으로 보이는 색의 차이는 약간 있었으나 전체적인 pH에서의 안토시아닌 농도는 UV-spectrophotometer로 측정된 결과 거의 비슷한 경향으로 나타났다.

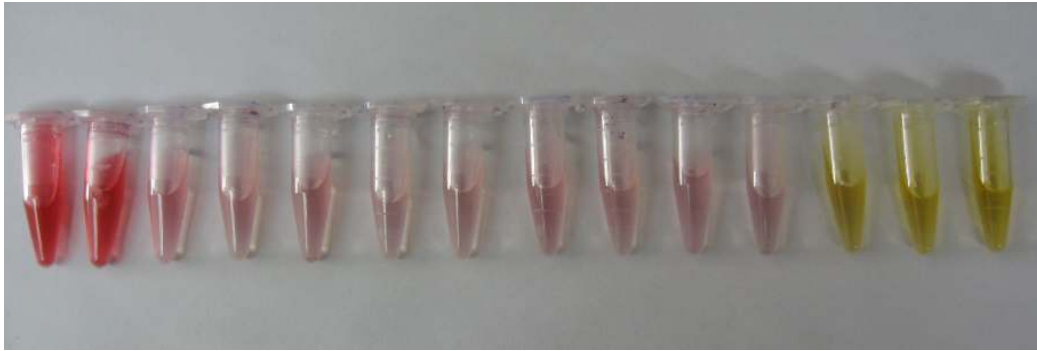


Fig. 1-6 Color change of wild grape at pHs



Fig. 1-7 Color change of mulberry at pHs

(3) HPLC 분석

안토시아닌의 표준물질을 HPLC로 분석한 결과 flow rate 1 mL/min 일 때 Delphinidin-3-O-glucoside, Cyanidin-3-O-glucoside, Cyanidin-3,5-di-rutinoside, Malvidin-3,5-di-glucoside 그리고 Pelagonidin-3-O-glucoside의 순서로 나오는 것을 확인 하였다 (Fig. 1-8). 머루를 분석한 결과 다양한 물질 즉, 다양한 안토시아닌이 있는 것으로 나타났는데 이는 Fig. 1-9 에 나타내었다. 이 중 표준물질과 비교해 보았을 때 다섯 개의 안토시아닌이 확인되었다. 오디 (Fig. 1-10)는 거의 대부분이 Cyanidin-3-O-glucoside의 peak로 나타났고 이는 김 등(2003)의 결과와 유사하였다.

(4) 안토시아닌의 항산화능력 측정

안토시아닌의 항산화능력 측정을 위해 ORAC 방법으로 농도에 따른 항산화 능력을 측정한 결과 (Fig. 1-11, Table 1-3) 500 ppm에서 1000 ppm으로 농도가 높아지면서 ORAC value가 72.2에서 121.5로 크게 증가하였다. 그러나 1500 ppm과 2000 ppm으로 농도를 더 높였을 때 SAS (Duncan's multiple range test, 1999)에 의해서는 유의적인 차이를 보이지만 수치적으로는 1000 ppm과 큰 차이를 보이지 않았다. ($p < 0.05$) 안토시아닌의 항산화능력을 비교하기 위해 α -Tocopherol, δ -Tocopherol, β -Carotene을 같은 농도로 첨가한 결과 세 개의 항산화제가 모두 500 ppm에서 1000, 1500, 2000 ppm으로 갈수록 ORAC value가 커졌으며 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$).

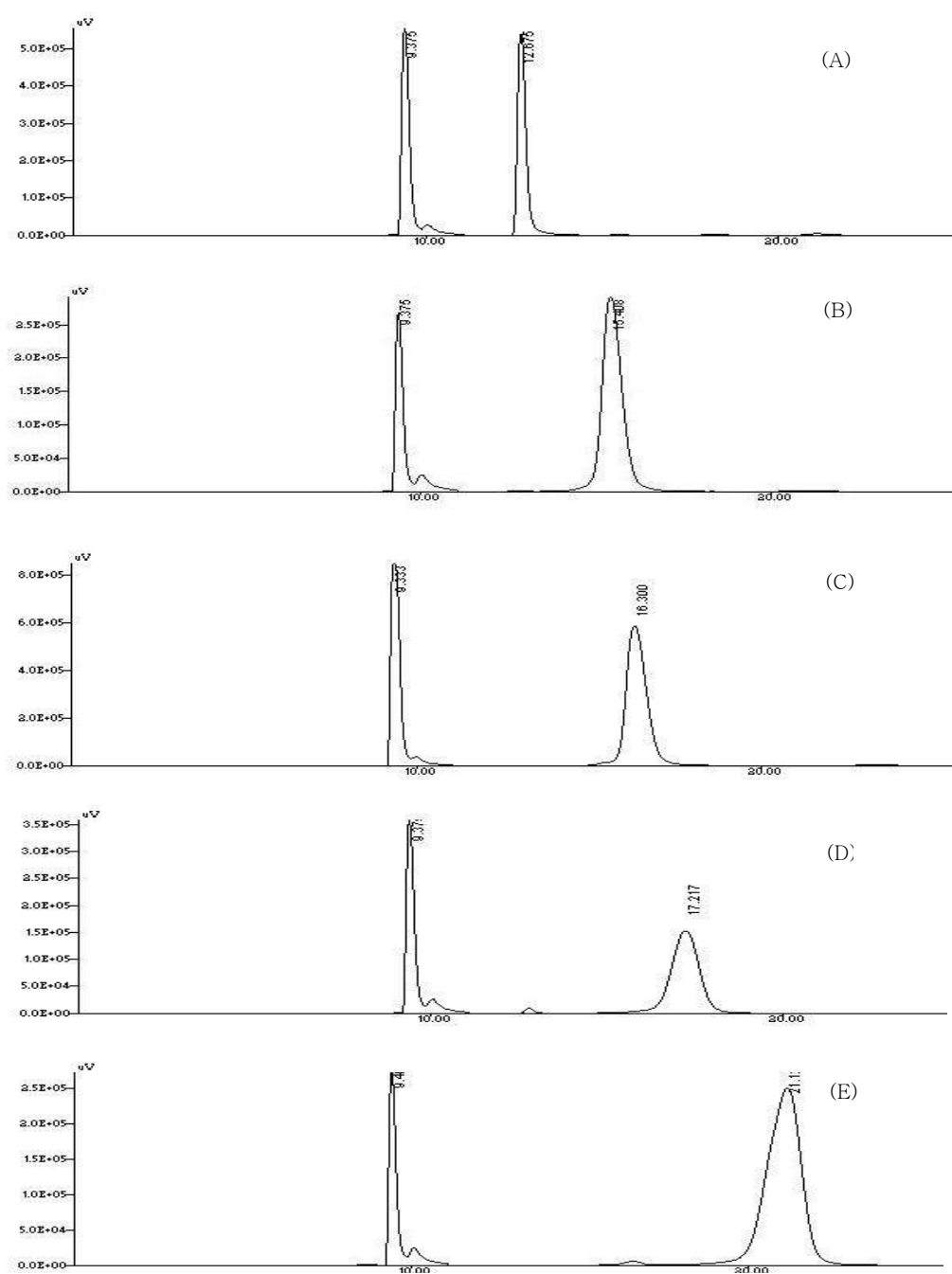


Fig. 1-8 HPLC chromatogram of anthocyanin standards

(A: Delphinidin-3-O-glucoside, B: Cyanidin-3-O-glucoside,
 C: Cyanidin-3,5-di-glucoside, D: Malvidin-3,5-di-glucoside,
 E: Pelargonidin-3-O-glucoside)

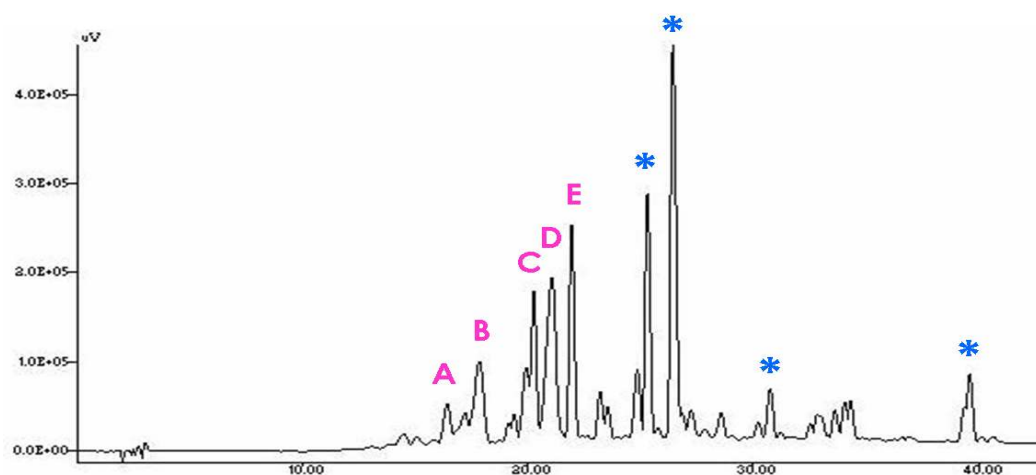


Fig. 1-9. HPLC chromatogram of wild grape obtain of column chromatography
 A : Delphinidin-3-O-glucoside, B : Cyanidin-3-O-glucoside,
 C : Cyanidin-3,5-di-glucoside, D : Malvidin-3,5-di-glucoside,
 E : Pelargonidin-3-O-glucoside, * : Unknown

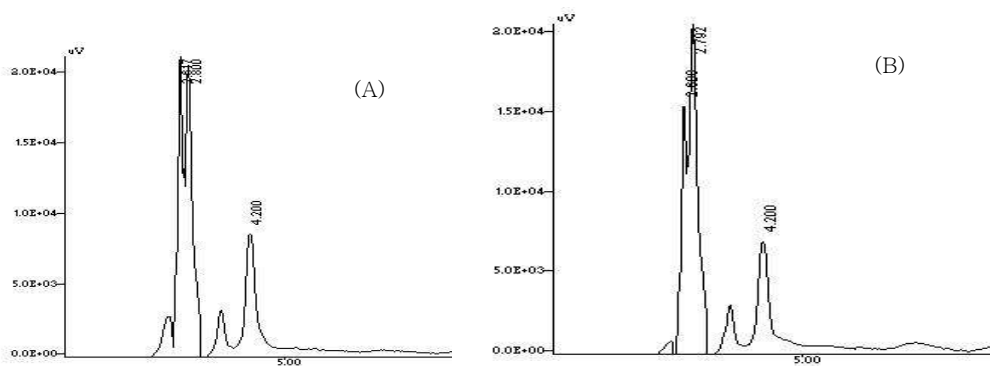


Fig. 1-10. HPLC chromatogram of mulberry
 (A : crude mulberry, B : purified mulberry)

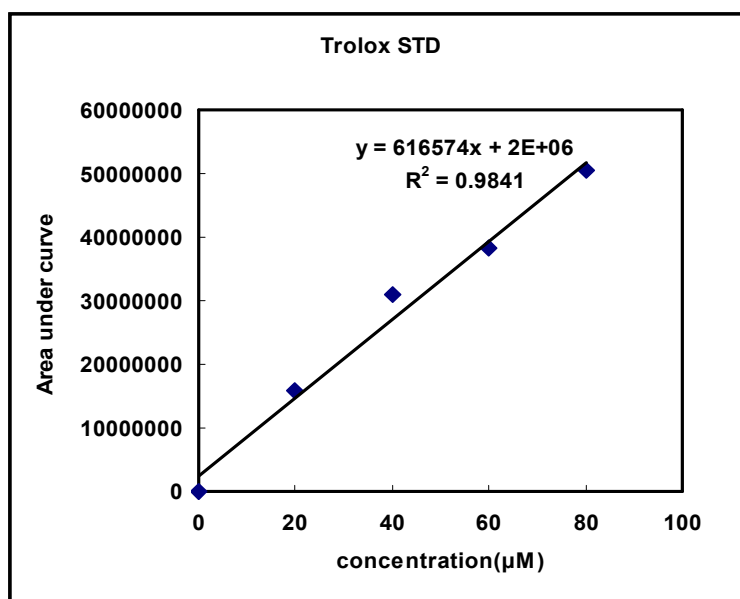


Fig. 1-11. Trolox standards curve

Table 1-3. Antioxidant effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin and β -carotene by ORAC methods

Concentration	Antioxidant			
	α -Tocopherol	δ -Tocopherol	Anthocyanin	β -Carotene
500	45.5 ^c	55.0 ^d	72.2 ^c	37.5 ^c
1000	47.7 ^b	65.0 ^b	121.5 ^a	51.6 ^b
1500	68.4 ^a	86.6 ^a	137.1 ^d	76.1 ^a
2000	72.2 ^d	91.2 ^c	141.3 ^b	71.4 ^d

* Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

2. 실제 식품시스템의 광산화 안정성 및 물리적 변화

(1) 두유의 광산화 안정성

① 두유의 용량비교 실험

두유의 광산화 안정성 연구에 Static headspace 방법이 적용되었고 시료의 부피에 따른 실험을 하였다. 10, 20, 30 mL의 시료로 4°C와 30°C에서 광산화 실험을 진행한 결과, 시료의 부피가 두유의 Headspace oxygen content에 주는 영향을 Gas chromatography로 분석하였다. SAS에 의해 통계 분석한 결과를 Table 1-4, 5, Fig. 1-12, 13에 나타내었다. 시료의 용량이 10, 20, 30 mL로 커질수록 저장시간이 8 hr가 지났을 때 4°C에서는 20.11, 19.50, 18.19, 30°C에서는 20.66, 20.14, 18.39로 광산화에 민감도가 더욱 높아지면서 Headspace oxygen content가 더욱 빠르게 낮아지는 것을 수치로 확인했으며 시료의 부피에 따라 유의적인 차이를 보였다. ($p < 0.05$) 그러므로 Headspace의 용적을 최소화 하고 재현성을 높이면서 대조구 실험으로 비교를 쉽게 하기 위해 30 mL이 적당함을 판단되었고 이후 사용될 두유의 양을 30 mL로 고정하기로 하였다.

Table 1-4. Effect of soymilk volume on the headspace oxygen of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Soymilk volume (mL)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
10	22.74 ^a	21.75 ^a	21.21 ^a	20.71 ^a	20.11 ^a
20	22.74 ^a	21.32 ^b	20.57 ^b	19.51 ^b	19.50 ^b
30	22.74 ^a	20.69 ^c	19.91 ^c	18.88 ^c	18.19 ^c

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

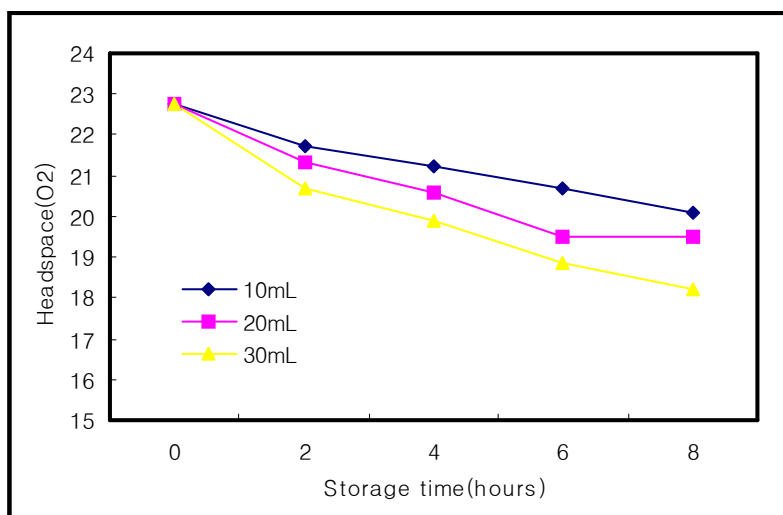


Fig. 1–12. Effect of soymilk volume on the headspace oxygen of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1–5. Effect of soymilk volume on the headspace oxygen of soymilk under light storage at 30°C for 8 hrs

Soymilk volume (mL)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
10	22.74 ^a	21.09 ^a	21.79 ^a	20.74 ^a	20.66 ^a
20	22.74 ^a	20.92 ^a	20.72 ^a	20.29 ^a	20.14 ^a
30	22.74 ^a	20.22 ^a	19.76 ^b	18.85 ^b	18.39 ^b

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

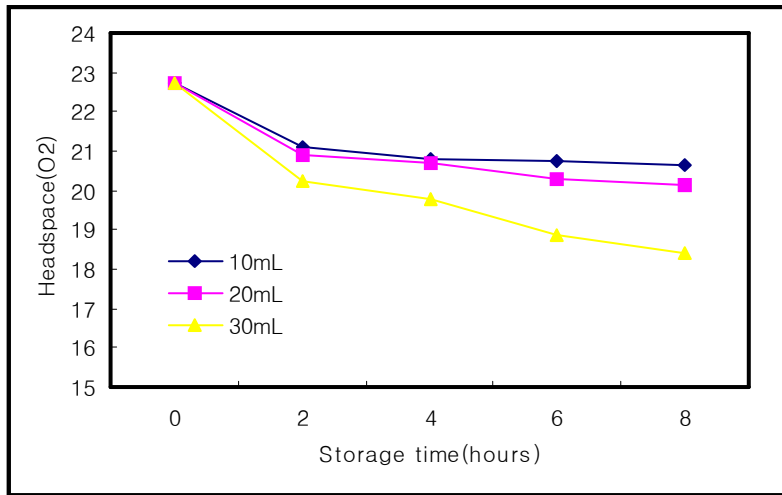


Fig. 1-13. Effect of soymilk volume on the headspace oxygen of soymilk under light storage at 30°C for 8 hrs

② Methylene Blue의 감광성 실험

Methylene Blue가 두유의 광산화 반응에 감광체로서 얼마나 효과적인가를 연구하기 위하여 0, 100, 200, 300, 400 ppm의 Methylene Blue를 두유에 첨가하여 4°C와 30°C에서 실험하고 두유의 Headspace oxygen content에 주는 영향을 SAS에 의해 통계 분석한 결과는 Table 1-6, 8과 Fig. 1-14, 16과 같고 pH에 주는 영향은 Table 1-7, 9와 Fig. 1-15, 17에 나타내었다. Methylene Blue를 함유하는 두유의 Headspace oxygen content가 Methylene Blue가 들어있지 않은 두유의 Headspace oxygen content와 비교하여 4°C에서는 18.19와 다르게 17.12, 17.11, 17.11, 17.19로, 30°C에서는 19.81과 다르게 17.27, 16.71, 16.70, 16.57로 감소되었고 유의성의 차이를 보였다. ($p < 0.05$) 또한 pH 수치도 4°C에서는 7.08과 비교하여 7.03, 7.01, 7.00, 7.00이고 30°C에서는 7.07과 비교하여 6.95, 6.94, 6.93, 6.91로 눈에 띄게 감소된 것을 보아 Methylene Blue가 감광체로서 작용했음을 알 수 있다. 그러나 두유의 Methylene Blue 함량이 0 ppm에서 100, 200, 300, 400 ppm으로 증가하여도 Headspace oxygen content는 통계적으로 유의성의 차이를 보이지 않는 것으로 보고 이후 진행될 실험에 감광체로서 첨가되는 Methylene Blue의 양을 100 ppm으로 고정하기로 하였다.

Table 1-6. Effect of methylene blue on the headspace oxygen of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Methylene blue (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74 ^a	20.69 ^a	19.91 ^a	18.88 ^a	18.19 ^a
100	22.74 ^a	19.81 ^b	18.65 ^b	18.22 ^c	17.12 ^b
200	22.74 ^a	19.36 ^d	17.82 ^e	17.80 ^d	17.11 ^b
300	22.74 ^a	19.07 ^e	18.12 ^d	17.78 ^e	17.11 ^b
400	22.74 ^a	19.43 ^c	18.47 ^c	18.35 ^b	17.09 ^b

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

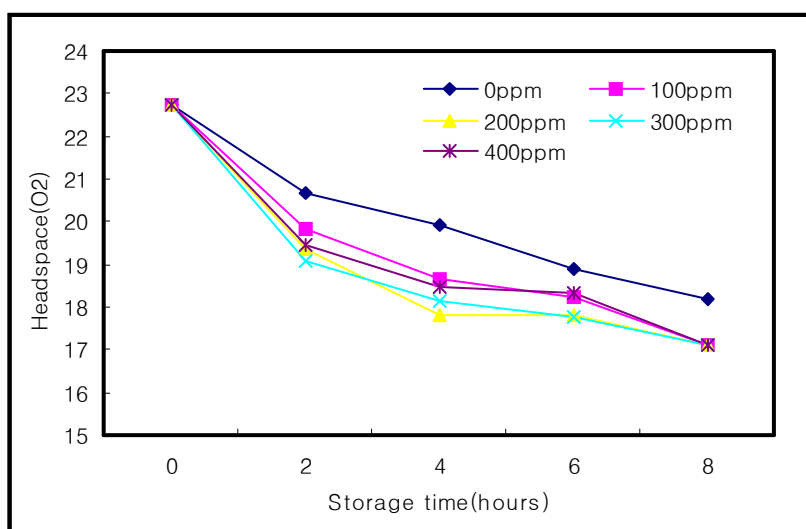


Fig. 1-14. Effect of methylene blue on the headspace oxygen of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-7. Effect of methylene blue on the pH of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Methylene blue (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	7.12	7.12	7.11	7.10	7.08
100	7.12	7.12	7.11	7.06	7.03
200	7.12	7.11	7.10	7.04	7.01
300	7.12	7.10	7.09	7.04	7.00
400	7.12	7.09	7.07	7.03	7.00

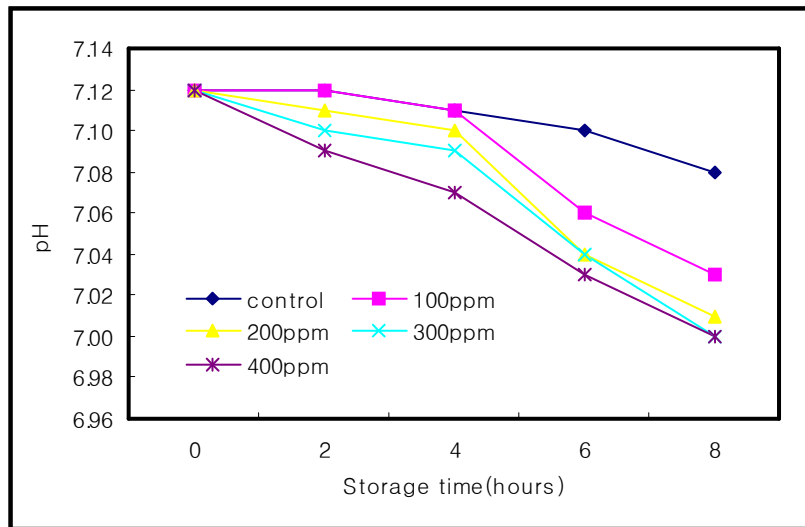


Fig. 1-15. Effect of methylene blue on the pH of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1–8. Effect of methylene blue on the headspace oxygen of soymilk under light storage at 30°C for 8 hrs

Methylene blue (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74 ^a	20.92 ^a	20.72 ^a	19.71 ^{ab}	19.81 ^a
100	22.74 ^a	21.20 ^a	19.78 ^a	19.30 ^{bc}	17.27 ^b
200	22.74 ^a	21.15 ^a	19.89 ^a	18.70 ^d	16.71 ^b
300	22.74 ^a	20.95 ^a	20.06 ^a	18.97 ^{cd}	16.70 ^b
400	22.74 ^a	21.12 ^a	20.05 ^a	19.84 ^a	16.57 ^b

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

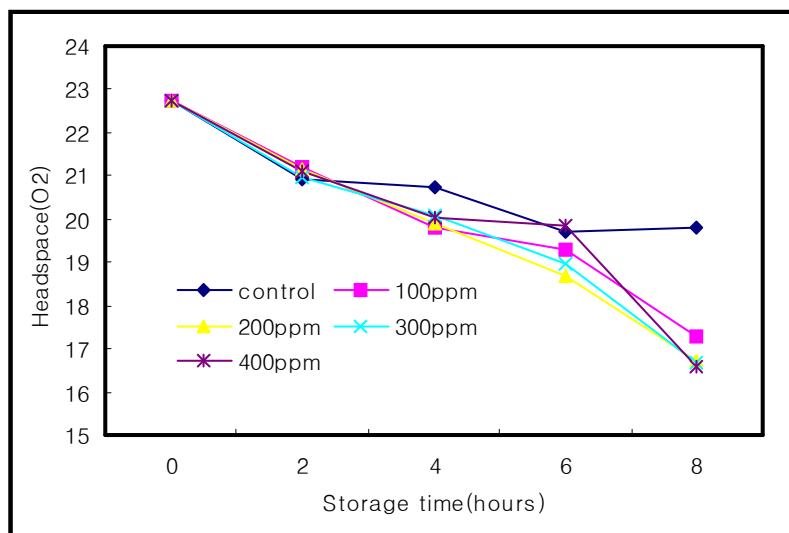


Fig. 1–16. Effect of methylene blue on the headspace oxygen of soymilk under light storage at 30°C for 8 hrs

Table 1-9. Effect of methylene blue on the pH of soymilk under light storage at 30°C for 8 hrs

Methylene blue (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	7.12	7.12	7.11	7.09	7.07
100	7.12	7.12	7.08	6.97	6.95
200	7.12	7.12	7.04	6.97	6.94
300	7.12	7.11	7.01	6.95	6.93
400	7.12	7.11	7.00	6.94	6.91

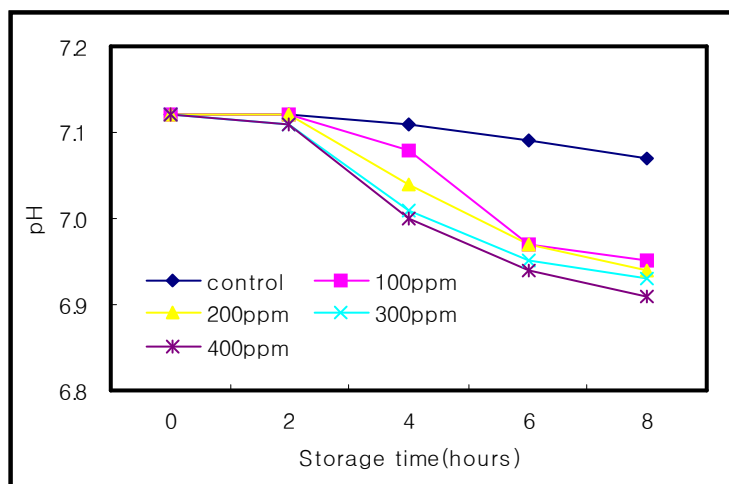


Fig. 1-17. Effect of methylene blue on the pH of soymilk under light storage at 30°C for 8 hrs

③ 두유 속 안토시아닌의 항산화력 측정

Methylene Blue를 100 ppm 함유하는 두유를 4°C와 30°C에서 18000 lux로 0, 2, 4, 6, 8 hr 동안 저장했을 때 Anthocyanin이 두유의 Headspace oxygen content에 주는 영향을 분석한 결과를 Table 1-10, 11과 Fig. 1-18, 19에 나타내었다. Anthocyanin의 함량이 0 ppm에서 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 ppm으로 증가함에 따라 두유의 Headspace oxygen content는 높은 값을 나타내었고 SAS에 의해 통계 분석한 결과 유의성의 차이를 보였다. ($p < 0.05$) 그러나 Anthocyanin의 추출이 어렵고 저장 시간이 8 hr가 지났을 때 1000 ppm은 4°C-19.28, 30°C-19.27의 값이 Control 4°C-17.12, 30°C-17.27와는 높은 차이를 보이면서 1500 ppm 4°C-18.88, 30°C-19.12, 2000 ppm 4°C-20.73, 30°C-20.15와 수치적으로 큰 차이를 보이지 않기 때문에 1000 ppm으로 결정하였다. α -Tocopherol, δ -Tocopherol, Anthocyanin, and β -Carotene이 두유의 Headspace oxygen content의 감소량에 주는 영향을 Table 1-12, 13과 Fig. 1-20, 21에 나타내었다. α -Tocopherol, δ -Tocopherol, Anthocyanin, and β -Carotene이 항산화제로서 두유의 Methylene Blue의 감광에 의한 광산화를 감소시켰다는 것을 알 수 있다. 또한 비교적 작은 차이이지만 Anthocyanin > δ -Tocopherol > α -Tocopherol > β -Carotene 순으로 두유의 광산화를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

Table 1-10. Effect of anthocyanin on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74 ^a	19.81 ^h	18.65 ^h	18.22 ^h	17.12 ^g
200	22.74 ^a	22.36 ^a	22.19 ^a	21.75 ^a	18.36 ^f
400	22.74 ^a	21.38 ^c	20.91 ^c	19.29 ^f	18.62 ^e
600	22.74 ^a	20.42 ^g	20.29 ^f	18.63 ^g	18.35 ^f
800	22.74 ^a	20.48 ^f	20.32 ^e	19.31 ^e	19.03 ^c
1000	22.74 ^a	21.70 ^b	20.63 ^d	20.57 ^c	19.28 ^b
1500	22.74 ^a	21.35 ^d	19.85 ^g	19.73 ^d	18.88 ^d
2000	22.74 ^a	21.15 ^e	21.10 ^b	20.90 ^b	20.73 ^a

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

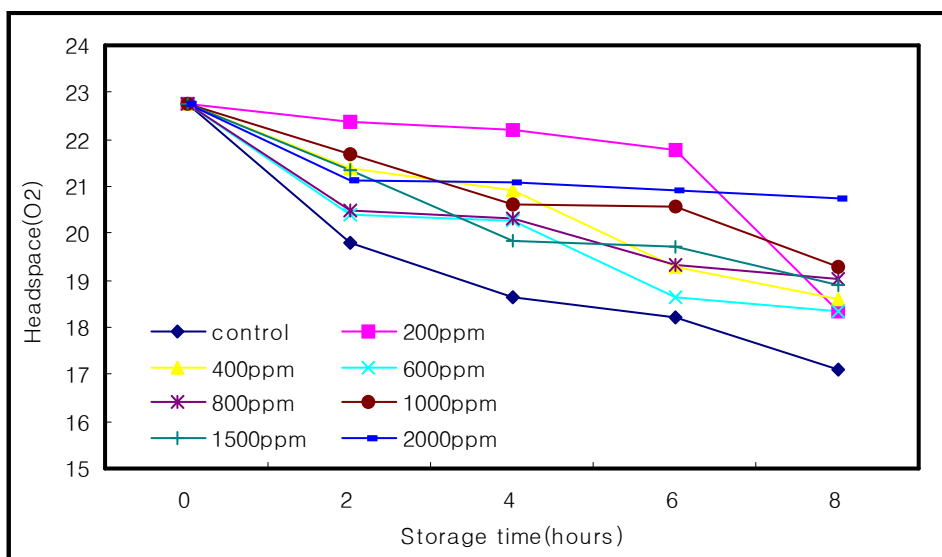


Fig. 1-18. Effect of anthocyanin on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-11. Effect of anthocyanin on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 30°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74 ^a	21.20 ^h	19.78 ^g	19.30 ^h	17.27 ^h
200	22.74 ^a	21.36 ^g	21.12 ^e	20.75 ^b	18.45 ^g
400	22.74 ^a	21.37 ^f	21.34 ^d	20.29 ^g	18.61 ^f
600	22.74 ^a	21.64 ^e	21.45 ^b	20.62 ^d	18.64 ^e
800	22.74 ^a	21.97 ^b	21.37 ^c	20.37 ^f	19.09 ^d
1000	22.74 ^a	21.79 ^c	21.61 ^a	20.58 ^e	19.27 ^b
1500	22.74 ^a	21.67 ^d	21.61 ^a	20.71 ^c	19.12 ^c
2000	22.74 ^a	21.99 ^a	21.11 ^f	20.90 ^a	20.15 ^a

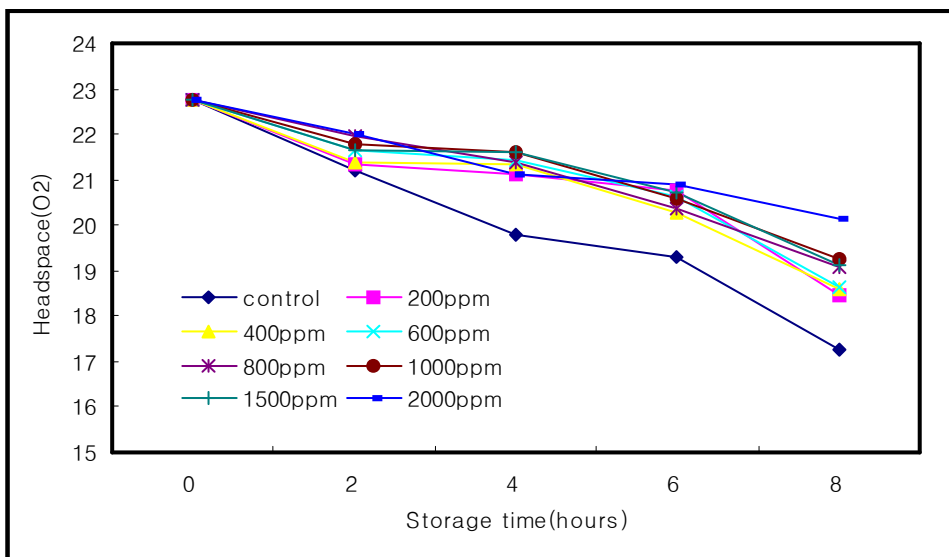


Fig. 1-19. Effect of anthocyanin on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 30°C for 8 hrs

Table 1-12. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Antioxidant (1000 ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
α -Tocopherol	22.74	19.84	19.76	19.23	18.80
δ -Tocopherol	22.74	20.82	20.45	19.79	18.90
Anthocyanin	22.74	21.70	20.62	20.57	19.29
β -Carotene	22.74	20.59	20.58	18.64	17.59

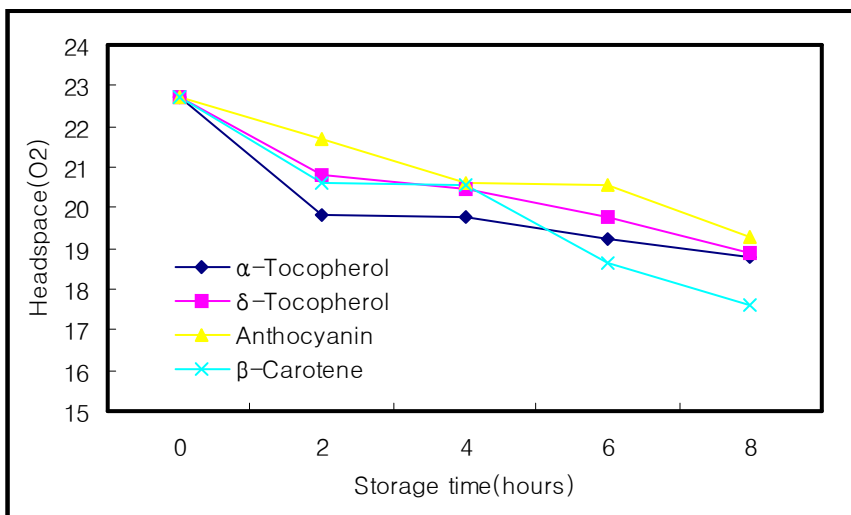


Fig. 1-20. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-13. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 30°C for 8 hrs

Antioxidant (1000 ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
α -Tocopherol	22.74	20.01	20.00	20.01	18.81
δ -Tocopherol	22.74	20.81	20.67	20.13	18.89
Anthocyanin	22.74	21.79	21.61	20.58	19.27
β -Carotene	22.74	20.24	20.12	18.99	18.11

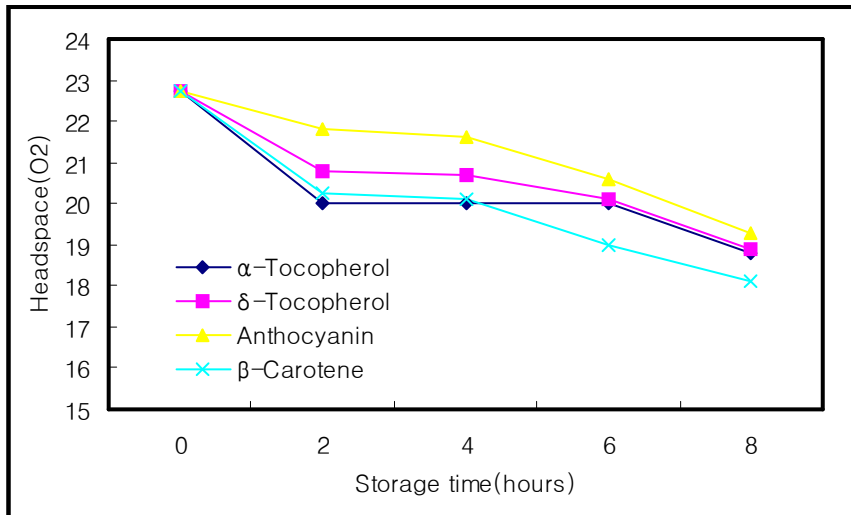


Fig. 1-21. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 30°C for 8 hrs

④ Anthocyanin을 첨가한 두유의 색 변화

Anthocyanin을 함유하는 두유를 4°C에서 0, 2, 4, 6, 8 hr동안 18000 lux로 저장했을 때 Anthocyanin이 두유의 색 변화에 주는 영향을 UV-spectrophotometer로 Spectrum measurement의 Lightness, Redness, Yellowness로 분석하였고 SAS에 의해 통계 분석한 결과는 Table 1-14, 15, 16, Fig. 1-22, 23, 24와 같다. Anthocyanin을 함유하는 두유는 Control과 비교할 때 통계분석에 의해서는 시간이 0에서 2, 4, 6, 8 hr로 증가함에 따라 Lightness, Redness, Yellowness 모두 유의적인 차이를 나타내지만 수치적으로는 Lightness는 조금 증가하는 경향을 나타내고 Redness, Yellowness에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. ($p < 0.05$) 또한 두유와 Anthocyanin을 1000 ppm 함유하는 두유를 Fig.1-25에 나타내었으며 육안으로도 크게 차이를 보이지 않는다. 그러므로 항산화 효과를 위해 선택된 1000 ppm의 Anthocyanin을 두유에 첨가하여도 색에는 큰 영향을 주지 않을 것으로 사료된다.

Table 1–14. Effects of anthocyanin on the lightness value of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	32.74 ^e	32.75 ^e	32.75 ^e	32.76 ^e	32.80 ^e
500	32.76 ^d	32.82 ^b	32.81 ^c	32.88 ^b	32.91 ^c
1000	32.80 ^a	32.81 ^c	32.83 ^b	32.83 ^c	32.98 ^b
1500	32.77 ^c	32.79 ^d	32.77 ^d	32.81 ^d	32.88 ^d
2000	32.79 ^b	32.89 ^a	32.91 ^a	32.97 ^a	32.99 ^a

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

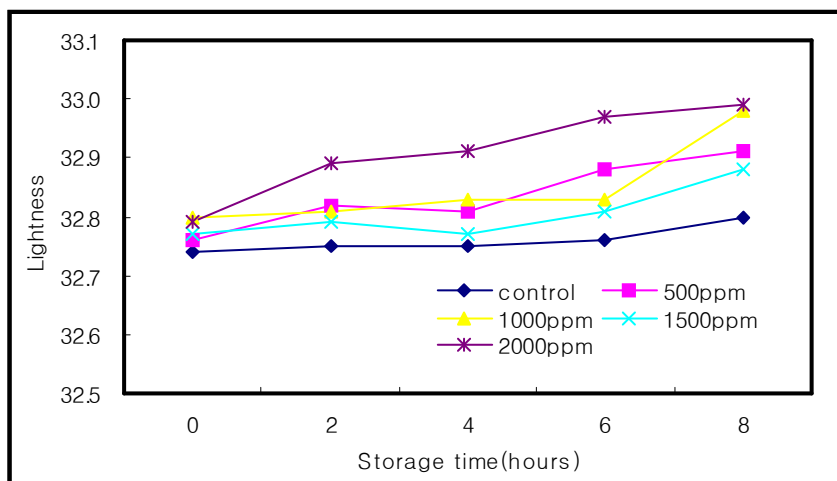


Fig. 1–22. Effects of anthocyanin on the lightness value of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1–15. Effects of anthocyanin on the redness value of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	-1.63 ^a	-1.64 ^a	-1.64 ^a	-1.66 ^a	-1.68 ^a
500	-1.69 ^c	-1.68 ^b	-1.70 ^c	-1.71 ^c	-1.71 ^b
1000	-1.68 ^b	-1.71 ^d	-1.70 ^c	-1.70 ^b	-1.71 ^b
1500	-1.69 ^c	-1.69 ^c	-1.67 ^b	-1.70 ^b	-1.73 ^d
2000	-1.71 ^d	-1.71 ^d	-1.71 ^d	-1.71 ^c	-1.72 ^c

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

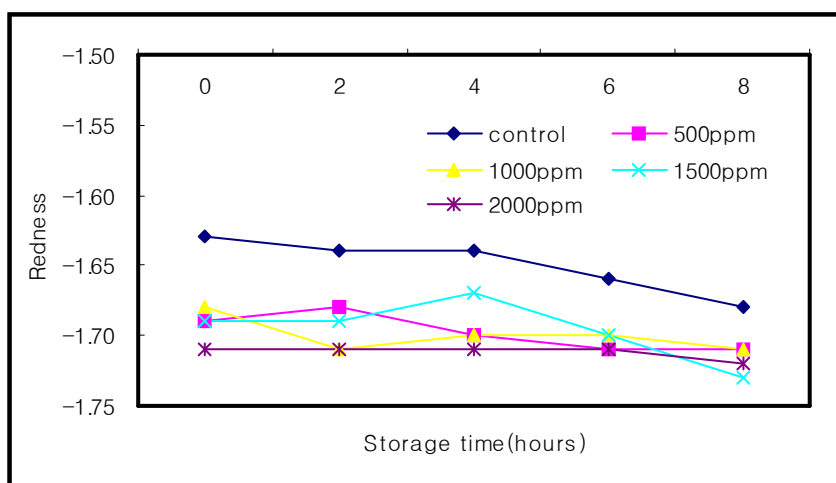


Fig. 1–23. Effects of anthocyanin on the redness value of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-16. Effects of anthocyanin on the yellowness value of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	1.75 ^a	1.76 ^a	1.77 ^a	1.77 ^a	1.76 ^a
500	1.68 ^c	1.67 ^c	1.67 ^b	1.67 ^c	1.70 ^d
1000	1.67 ^d	1.66 ^d	1.67 ^b	1.67 ^c	1.68 ^e
1500	1.68 ^c	1.65 ^e	1.66 ^c	1.68 ^b	1.72 ^b
2000	1.70 ^b	1.68 ^b	1.67 ^b	1.67 ^c	1.71 ^c

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

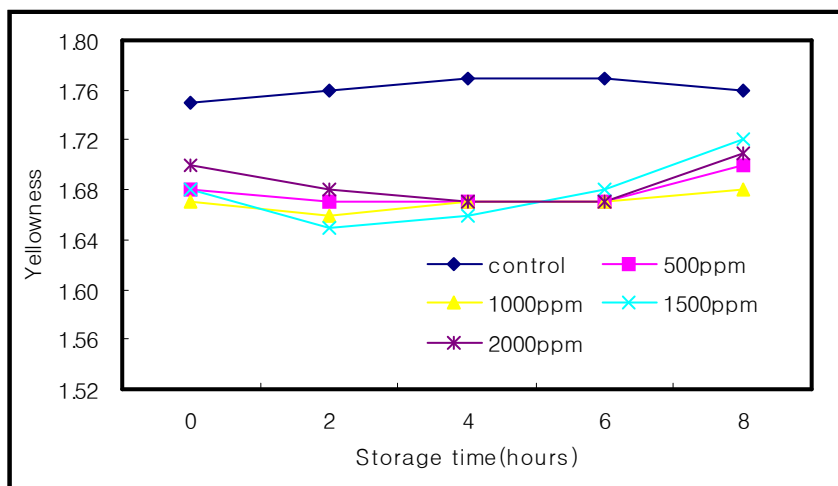


Fig. 1-24. Effects of anthocyanin on the yellowness value of soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs



Fig. 1-25. Difference of existence and nonexistence anthocyanin in soy milk
(Left : soy milk, Right : soy milk containing 1000 ppm anthocyanin)

(2) 우유의 광산화 안정성

① 우유의 용량비교 실험

우유의 광산화 안정성 연구에 Static headspace 방법이 적용되었고 시료의 부피에 따른 실험을 하였다. 10, 20, 30 mL의 시료로 4°C와 30°C에서 광산화 실험을 진행한 결과, 시료의 부피가 우유의 Headspace oxygen content에 주는 영향을 SAS에 의해 통계 분석하여 Table 1-17, 18과 Fig. 1-26, 27에 나타내었다. 두유와 같이 시료의 용량이 10, 20, 30 mL로 커질수록 저장시간이 8 hr가 지났을 때 4°C에서는 20.91, 20.21, 18.67, 30°C에서는 21.08, 20.71, 19.63 으로 광산화에 민감도가 더욱 높아지면 서 Headspace oxygen content가 더욱 빠르게 낮아지는 것을 수치로 확인했으며 시료의 부피에 따라 유의적인 차이를 보였다. ($p < 0.05$) 그러므로 Headspace의 용적을 최소화 하고 재현성을 높이면서 대조구 실험으로 비교를 쉽게 하기 위해 30 mL이 적당함을 판단되었고 이후 사용될 우유의 양을 30 mL로 고정하기로 하였다.

Table 1-17. Effect of cowmilk volume on the headspace oxygen of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Cowmilk volume (mL)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
10	22.74 ^a	21.92 ^a	21.85 ^a	21.61 ^a	20.91 ^a
20	22.74 ^a	20.67 ^c	20.61 ^b	20.59 ^b	20.21 ^b
30	22.74 ^a	20.72 ^b	19.94 ^c	19.81 ^c	18.67 ^c

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

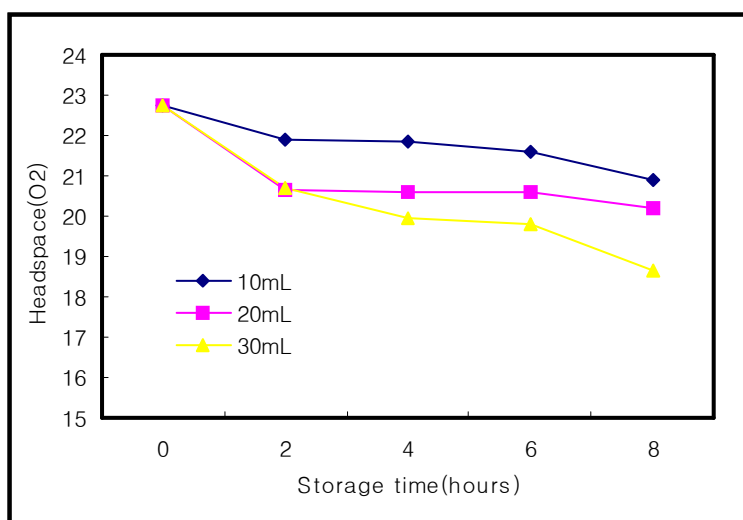


Fig. 1-26. Effect of cowmilk volume on the headspace oxygen of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-18. Effect of cowmilk volume on the headspace oxygen of cowmilk under light storage at 30°C for 8 hrs

Cowmilk volume(mL)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
10	22.74 ^a	21.11 ^a	21.11 ^a	21.09 ^a	21.08 ^a
20	22.74 ^a	21.12 ^a	20.99 ^b	20.89 ^{ab}	20.71 ^b
30	22.74 ^a	21.55 ^a	20.66 ^c	20.33 ^b	19.63 ^c

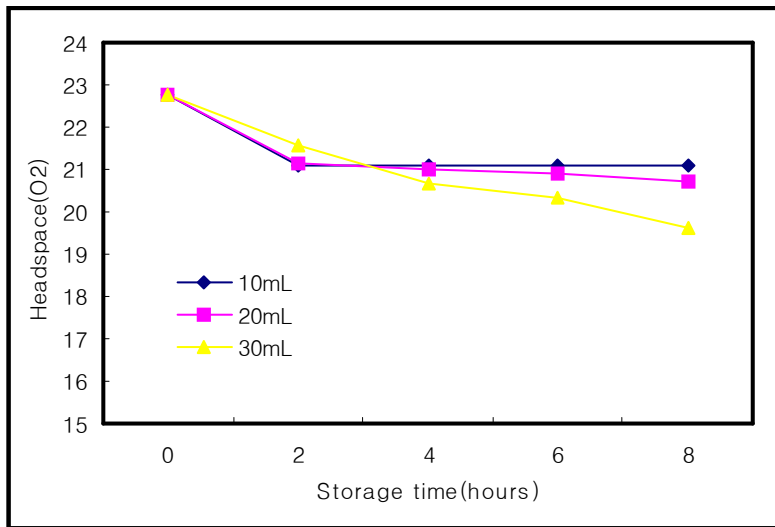


Fig. 1-27. Effect of cowmilk volume on the headspace oxygen of cowmilk under light storage at 30°C for 8 hrs

② Methylene Blue의 감광성 실험

Methylene Blue가 우유의 광산화 반응에 감광체로서 얼마나 효과적인가를 연구하기 위하여 0, 100, 200, 300, 400 ppm의 Methylene Blue를 두유에 첨가하여 4°C와 30°C에서 실험하고 우유의 Headspace oxygen content에 주는 영향을 SAS에 의해 통계 분석한 결과는 Table 1-19, 21 Fig. 1-28, 30과 같고 pH에 주는 영향은 Table

1-20, 22과 Fig.1-29, 31에 나타내었다. Methylene Blue를 함유하는 우유의 Headspace oxygen content가 Methylene Blue가 들어있지 않은 우유의 Headspace oxygen content와 비교하여 4°C에서는 18.67과 다르게 17.95, 17.90, 17.93, 17.88로, 30°C에서는 20.27과 다르게 18.91, 18.48, 18.19, 18.20으로 감소되었고 유의적인 차이를 보였다. ($p < 0.05$) 또한 pH 수치도 4°C에서는 6.56과 비교하여 6.55, 6.54, 6.52, 6.51 이고 30°C에서는 6.56과 비교하여 6.54, 6.53, 6.52, 6.51로 눈에 띄게 감소된 것을 보아 Methylene Blue가 감광체로서 작용했음을 알 수 있다. 그러나 우유의 Methylene Blue 함량이 0 ppm에서 100, 200, 300, 400 ppm으로 증가하여도 Headspace oxygen content는 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 보고 이후 진행될 실험에 감광체로서 첨가되는 Methylene Blue의 양을 100 ppm으로 고정하기로 하였다.

Table 1-19. Effect of methylene blue on the headspace oxygen of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Methylene blue (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74 ^a	20.72 ^a	19.94 ^a	19.81 ^a	18.67 ^a
100	22.74 ^a	20.45 ^c	19.47 ^e	19.84 ^c	17.95 ^b
200	22.74 ^a	20.40 ^e	19.49 ^d	19.40 ^e	17.90 ^d
300	22.74 ^a	20.43 ^d	19.53 ^b	19.41 ^d	17.93 ^c
400	22.74 ^a	20.47 ^b	19.51 ^c	19.49 ^b	17.88 ^e

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

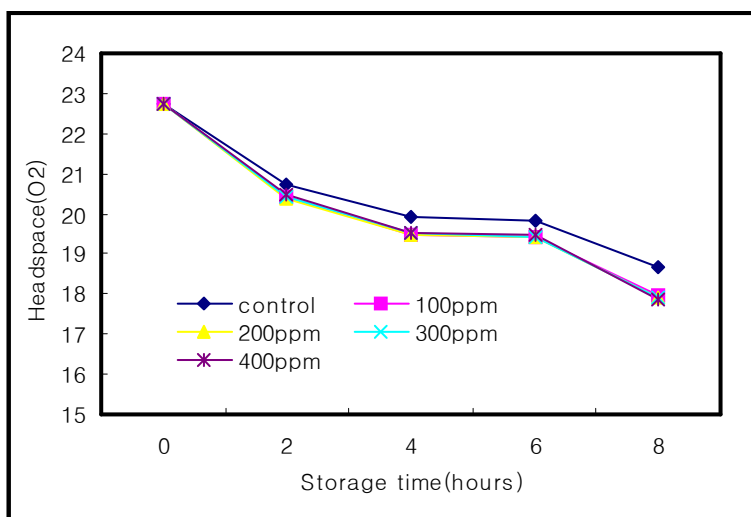


Fig. 1-28. Effect of methylene blue on the headspace oxygen of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-20. Effect of methylene blue on the pH of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Methylene blue (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	6.70	6.63	6.57	6.57	6.56
100	6.70	6.60	6.57	6.56	6.55
200	6.70	6.61	6.57	6.56	6.54
300	6.70	6.60	6.56	6.54	6.52
400	6.70	6.59	6.55	6.52	6.51

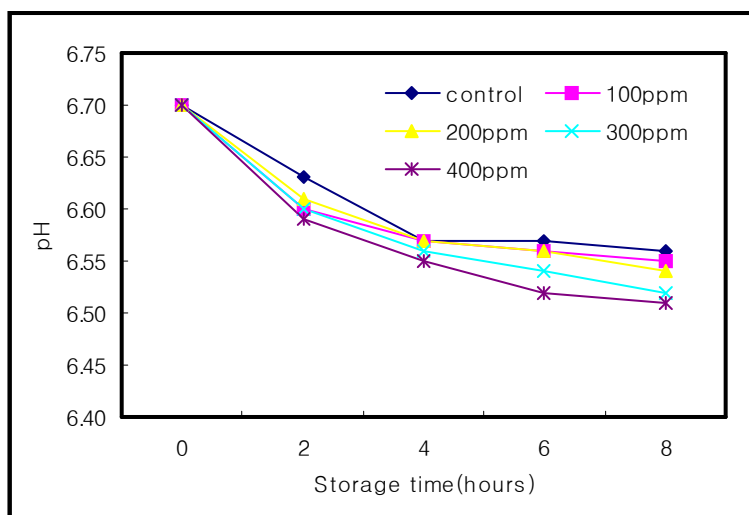


Fig. 1–29. Effect of methylene blue on the pH of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1–21. Effect of methylene blue on the headspace oxygen of cowmilk under light storage at 30°C for 8 hrs

Methylene blue (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74 ^a	20.88 ^a	20.66 ^a	20.65 ^a	20.27 ^a
100	22.74 ^a	20.85 ^a	20.64 ^a	20.25 ^a	18.91 ^b
200	22.74 ^a	20.84 ^a	20.34 ^a	20.22 ^a	18.48 ^{bc}
300	22.74 ^a	20.67 ^b	20.34 ^a	20.19 ^a	18.19 ^c
400	22.74 ^a	20.80 ^{ab}	20.56 ^a	20.23 ^a	18.20 ^c

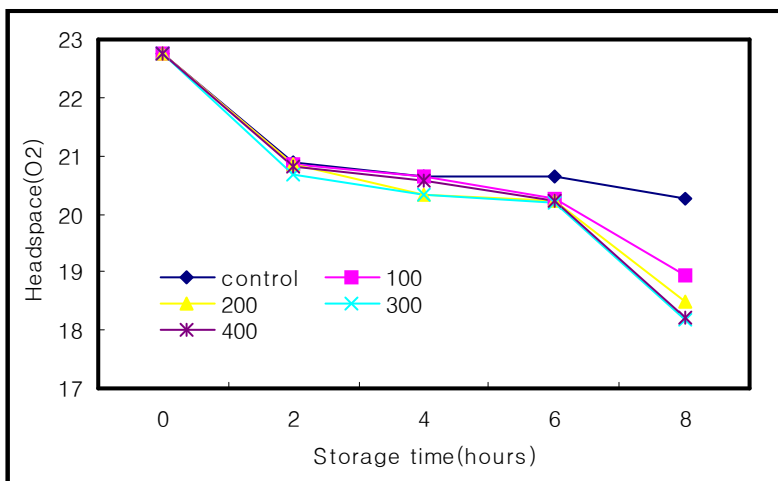


Fig. 1-30. Effect of methylene blue on the headspace oxygen of cowmilk under light storage at 30°C for 8 hrs

Table 1-22. Effect of methylene blue on the pH of cowmilk under light storage at 30°C for 8 hrs

Methylene blue (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	6.70	6.63	6.56	6.56	6.56
100	6.70	6.60	6.57	6.55	6.54
200	6.70	6.61	6.56	6.55	6.53
300	6.70	6.62	6.56	6.55	6.52
400	6.70	6.59	6.53	6.51	6.51

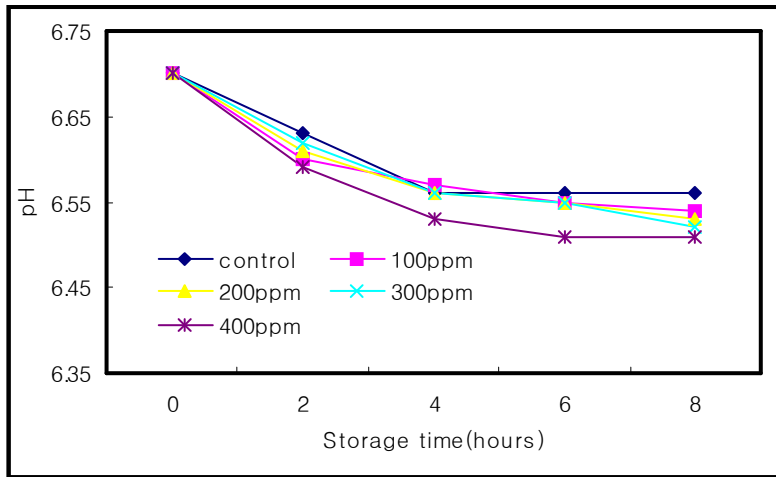


Fig. 1-31. Effect of methylene blue on the pH of cowmilk under light storage at 30°C for 8 hrs

③ 우유 속 안토시아닌의 항산화력 측정

Methylene Blue를 100 ppm 함유하는 우유를 4°C와 30°C에서 18000 lux로 0, 2, 4, 6, 8 hr 저장했을 때 Anthocyanin이 우유의 Headspace oxygen content에 주는 영향은 Table 1-23, 24과 Fig. 1-32, 33에 나타내었다. Anthocyanin의 함량이 0 ppm에서 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 ppm으로 증가함에 따라 우유의 Headspace oxygen content는 높은 값을 나타내었고 SAS에 의해 통계 분석한 결과 유의성의 차이를 보였다. ($p < 0.05$) 그러나 Anthocyanin의 추출이 어렵고 저장시간이 8 hr가 지났을 때 1000 ppm은 4°C-19.29, 30°C-19.30의 값이 Control 4°C-17.95, 30°C-18.48와는 높은 차이를 보이면서 1500 ppm 4°C-18.87, 30°C-19.35, 2000 ppm 4°C-20.74, 30°C-19.41과 수치적으로 큰 차이를 보이지 않기 때문에 1000 ppm으로 결정하였다. α -Tocopherol, δ -Tocopherol, Anthocyanin, and β -Carotene이 우유의 Headspace oxygen content의 감소량에 주는 영향을 Table 1-25, 26과 Fig.1-34, 35에 나타내었다. α -Tocopherol, δ -Tocopherol, Anthocyanin, and β -Carotene이 항산화제로서 우유의 Methylene Blue의 감광에 의한 광산화를 감소시켰다는 것을 알 수 있다. 또한 비교적 작은 차이이지만 Anthocyanin > δ -Tocopherol > α -Tocopherol > β -Carotene 순으로 우유의 광산화를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

Table 1–23. Effect of Anthocyanin on the headspace oxygen of cowmilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74 ^a	20.45 ^g	19.47 ^h	19.44 ^e	17.95 ^h
200	22.74 ^a	21.77 ^a	21.70 ^a	19.28 ^b	18.36 ^b
400	22.74 ^a	21.39 ^c	20.91 ^c	19.28 ^g	18.63 ^f
600	22.74 ^a	20.43 ^h	20.30 ^f	18.62 ^h	18.36 ^g
800	22.74 ^a	20.49 ^f	20.34 ^e	19.32 ^f	19.06 ^d
1000	22.74 ^a	21.70 ^b	20.62 ^d	20.57 ^c	19.29 ^c
1500	22.74 ^a	21.35 ^d	19.86 ^g	19.71 ^d	18.87 ^e
2000	22.74 ^a	21.15 ^e	21.11 ^b	20.91 ^a	20.74 ^a

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

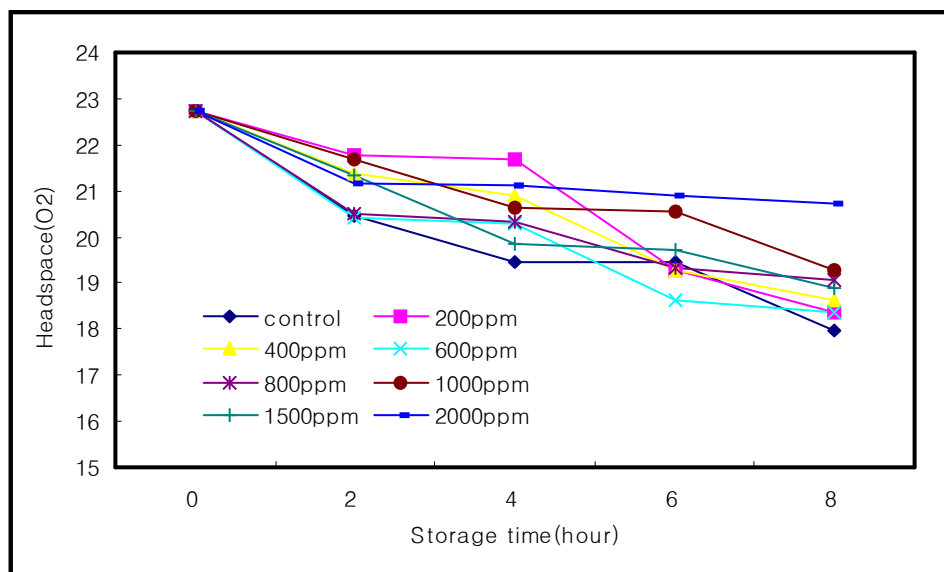


Fig. 1–32. Effect of anthocyanin on the headspace oxygen of cowmilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1–24. Effect of anthocyanin on the headspace oxygen of cowmilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 30°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74 ^a	20.85 ^b	20.64 ^b	20.25 ^a	18.48 ^e
200	22.74 ^a	20.35 ^h	19.97 ^g	18.18 ^h	18.07 ^h
400	22.74 ^a	20.42 ^g	20.18 ^e	18.61 ^g	18.12 ^g
600	22.74 ^a	20.43 ^f	20.30 ^d	18.62 ^f	18.36 ^f
800	22.74 ^a	20.49 ^e	20.34 ^c	19.32 ^e	19.06 ^d
1000	22.74 ^a	21.02 ^a	20.77 ^a	19.50 ^d	19.30 ^c
1500	22.74 ^a	20.71 ^c	20.12 ^f	19.61 ^c	19.35 ^b
2000	22.74 ^a	20.53 ^d	19.87 ^h	19.67 ^b	19.41 ^a

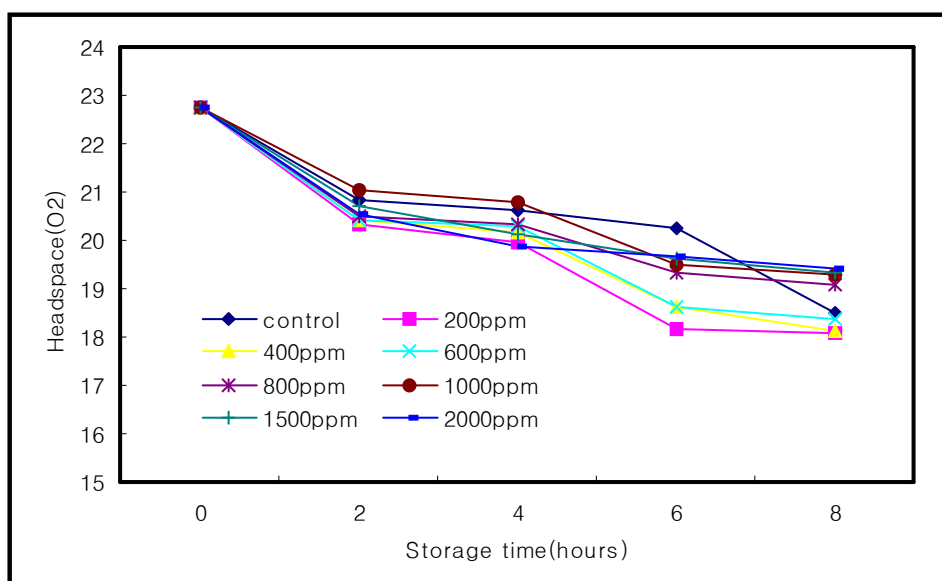


Fig. 1–33. Effect of anthocyanin on the headspace oxygen of cowmilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 30°C for 8 hrs

Table 1–25. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Antioxidant	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
α -Tocopherol	22.74	19.84	19.76	19.23	18.80
δ -Tocopherol	22.74	20.82	20.45	19.79	18.90
Anthocyanin	22.74	21.70	20.62	20.57	19.29
β -Carotene	22.74	20.59	20.58	18.64	17.59

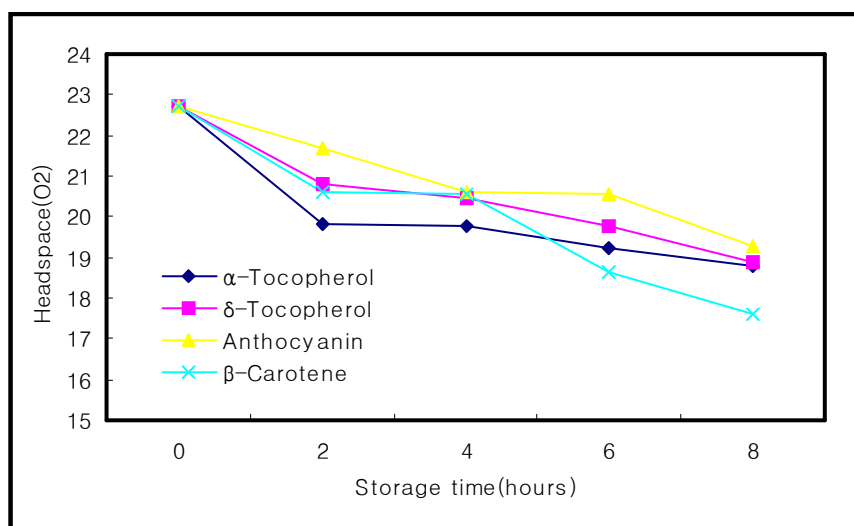


Fig. 1–34. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-26. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 30°C for 8 hrs

Antioxidant	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
α -Tocopherol	22.74	20.41	19.26	18.81	18.56
δ -Tocopherol	22.74	19.72	19.42	18.85	18.64
Anthocyanin	22.74	21.02	20.77	19.50	19.30
β -Carotene	22.74	19.66	18.88	18.48	17.86

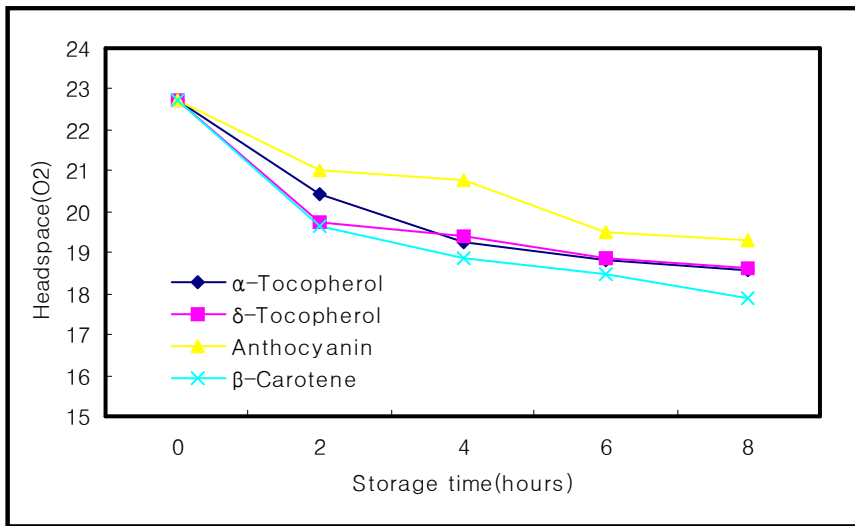


Fig. 1-35. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 30°C for 8 hrs

④ 안토시아닌을 첨가한 우유의 색 변화

Anthocyanin을 함유하는 우유를 4°C에서 0, 2, 4, 6, 8 hr동안 18000 lux로 저장했을 때 Anthocyanin이 우유의 색 변화에 주는 영향을 UV-spectrophotometer로

Spectrum measurement의 Lightness, Redness, Yellowness로 분석하였고 SAS에 의해 통계 분석한 결과는 Table 1-27, 28, 29, Fig. 1-36, 37, 38과 같다. ($p < 0.05$) Anthocyanin을 함유하는 우유는 Control과 비교할 때 통계분석으로는 시간이 0에서 2, 4, 6, 8 hr로 증가함에 따라 Lightness, Redness, Yellowness 모두 유의적인 차이를 나타내지만 수치적으로는 Lightness는 조금 증가하는 경향을 나타내고 Redness, Yellowness에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. 또한 우유와 Anthocyanin을 1000 ppm 함유하는 우유를 Fig.1-39 에 나타내었으며 육안으로도 크게 차이를 보이지 않는다. 그러므로 항산화 효과를 위해 선택된 1000 ppm의 Anthocyanin을 우유에 첨가하여도 색에는 큰 영향을 주지 않을 것으로 사료된다.

Table 1-27. Effects of anthocyanin on the lightness value of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	32.57 ^d	32.59 ^d	32.60 ^d	32.66 ^e	32.69 ^d
500	32.63 ^c	32.73 ^a	32.73 ^b	32.70 ^d	32.94 ^b
1000	32.63 ^c	32.71 ^b	32.73 ^b	32.78 ^c	32.94 ^b
1500	32.68 ^b	32.63 ^c	32.70 ^c	32.81 ^b	32.92 ^c
2000	32.70 ^a	32.65 ^c	32.76 ^a	32.84 ^a	32.97 ^a

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

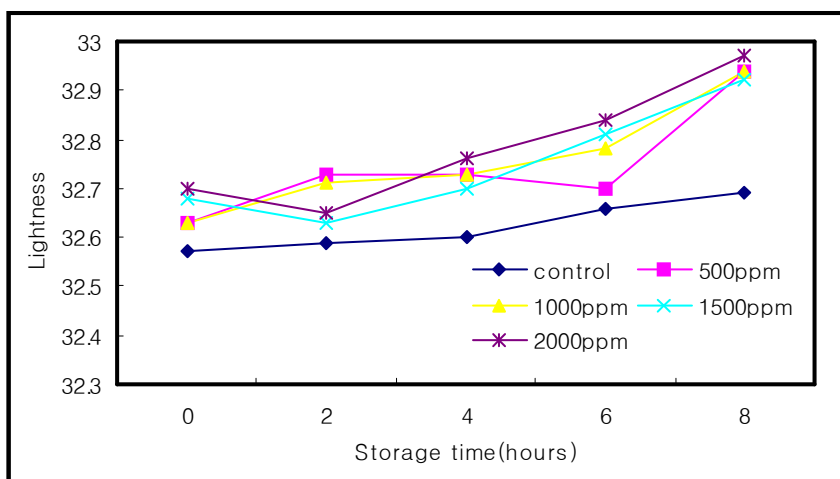


Fig.1-36. Effects of anthocyanin on the lightness value of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-28. Effects of anthocyanin on the redness value of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	-1.65 ^a	-1.65 ^a	-1.66 ^a	-1.65 ^a	-1.66 ^a
500	-1.70 ^d	-1.69 ^c	-1.69 ^c	-1.68 ^c	-1.67 ^b
1000	-1.68 ^b	-1.67 ^b	-1.66 ^a	-1.67	-1.66 ^a
1500	-1.68 ^b	-1.67 ^b	-1.67 ^b	-1.67 ^b	-1.67 ^b
2000	-1.69 ^c	-1.69 ^c	-1.69 ^c	-1.68 ^c	-1.68 ^c

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

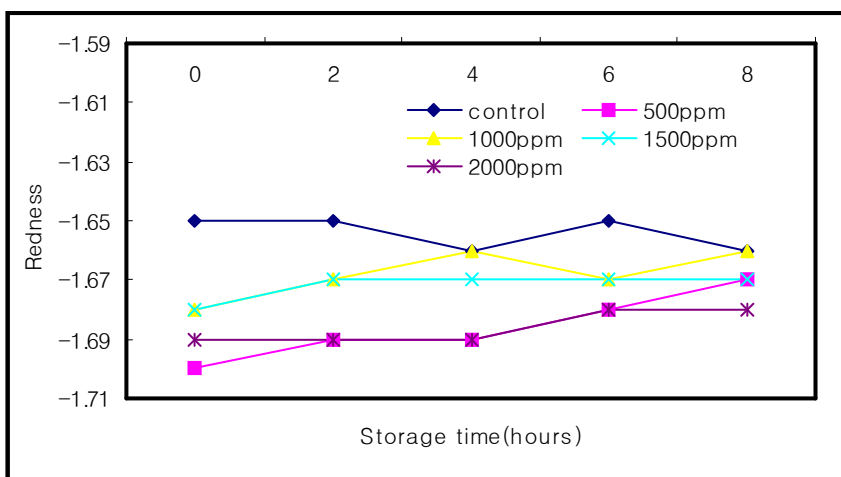


Fig. 1-37. Effects of anthocyanin on the redness value of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-29. Effects of anthocyanin on the yellowness value of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	1.67 ^b	1.67 ^c	1.68 ^c	1.69 ^c	1.70 ^b
500	1.66 ^c	1.68 ^b	1.69 ^b	1.92 ^c	1.71 ^a
1000	1.64 ^e	1.67 ^c	1.68 ^c	1.70 ^b	1.71 ^a
1500	1.65 ^d	1.70 ^a	1.65 ^d	1.70 ^b	1.67 ^c
2000	1.69 ^a	1.70 ^a	1.57 ^a	1.79 ^a	1.70 ^b

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

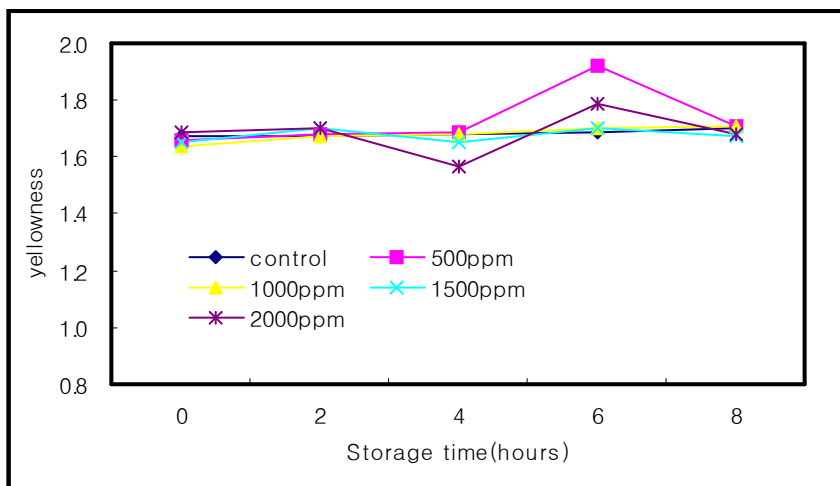


Fig. 1-38. Effects of anthocyanin on the yellowness value of cowmilk under light storage at 4°C for 8 hrs



Fig. 1-39. Difference of existence and nonexistence anthocyanin in cowmilk
(Left : cowmilk, Right : cowmilk containing 1000 ppm anthocyanin)

3. 제품모델에서의 광산화 안정성 및 물리적 변화

(1) 제조두유의 광산화 안정성

먼저 진행한 두유와 우유에서 선택한 조건으로 제조두유에 30 mL에 Methylene blue 100 ppm을 첨가하고 Antioxidant를 1000, 2000 ppm을 첨가한 후 제조두유를 4°C에서 8시간 동안 저장했을 때 제조두유의 Headspace oxygen content 에 주는 영향을 측정한 결과는 Table 1-30, 31와 Fig. 1-40, 41에 나와 있다. α -Tocopherol, δ -Tocopherol, Anthocyanin, and β -Carotene의 항산화효과를 Headspace oxygen content 을 비교해 본 결과 Anthocyanin> δ -Tocopherol> β -Carotene> α -Tocopherol, 2000 ppm 첨가 시에는 Anthocyanin> β -Carotene> δ -Tocopherol> α -Tocopherol 의 순서로 우유의 광산화를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있다. 제조두유에서도 마찬가지로 Anthocyanin함량이 1000 ppm에서 2000 ppm으로 증가함에 따라 수치가 증가했지만 크게 차이를 보이지 않아 Anthocyanin 첨가량은 1000 ppm이 적당할 것으로 판단되었다.

Table 1-30. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Antioxidant (1000 ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74	20.12	19.09	18.90	17.40
α -Tocopherol	22.74	19.01	18.28	18.04	17.46
δ -Tocopherol	22.74	20.18	19.97	19.57	19.03
Anthocyanin	22.74	20.15	19.97	19.60	19.38
β -Carotene	22.74	19.96	19.42	19.37	19.32

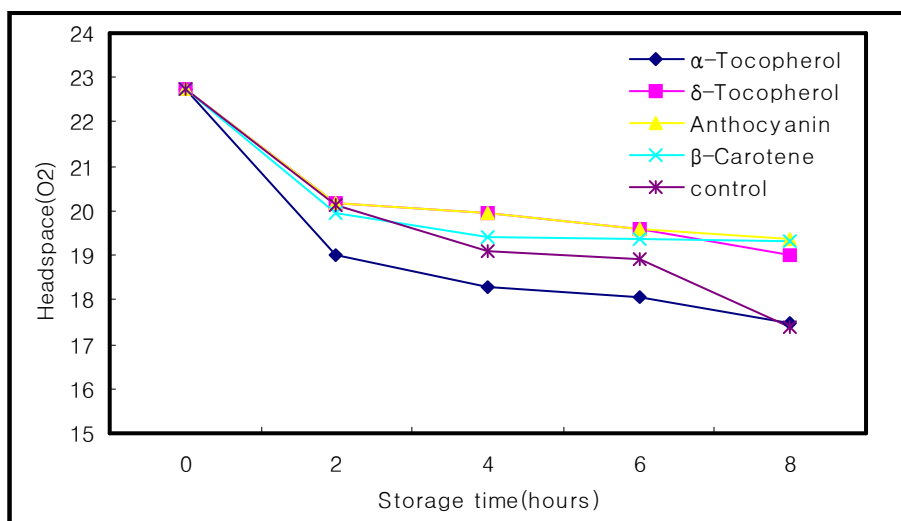


Fig. 1-40. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-31. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 2000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

Antioxidant (1000 ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	22.74	20.12	19.09	18.90	17.40
α -Tocopherol	22.74	20.18	19.93	19.06	18.82
δ -Tocopherol	22.74	21.18	20.39	19.94	19.06
Anthocyanin	22.74	21.07	20.36	19.98	19.54
β -Carotene	22.74	20.94	20.72	19.40	18.10

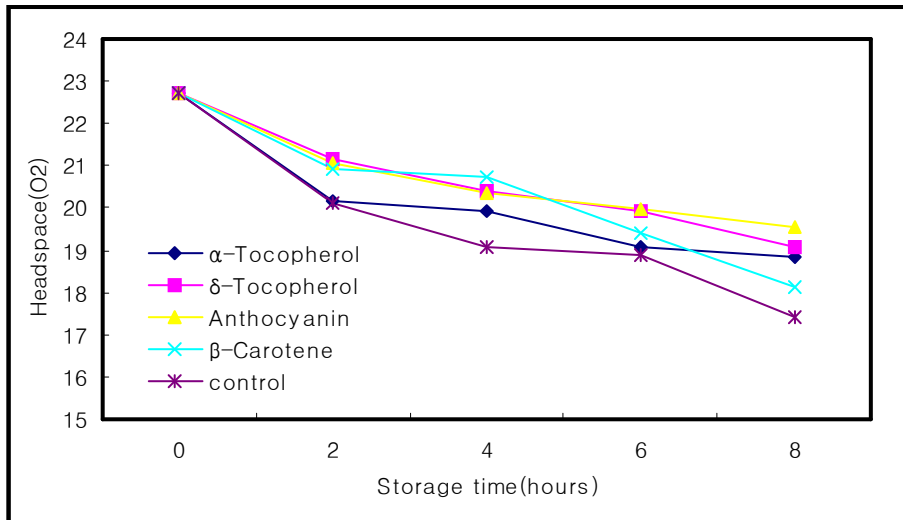


Fig. 1-41. Effect of α -tocopherol, δ -tocopherol, anthocyanin, and β -carotene 2000 ppm on the headspace oxygen of soymilk containing 100 ppm methylene blue under light storage at 4°C for 8 hrs

(2) 안토시아닌을 첨가한 제조두유의 색 변화

Anthocyanin을 함유하는 제조두유를 4°C에서 0, 2, 4, 6, 8 hr동안 18000 lux로 저장했을 때 Anthocyanin이 제조두유의 색 변화에 주는 영향을 UV-spectrophotometer로 Spectrum measurement의 Lightness, Redness, Yellowness로 분석하였고 SAS에 의해 통계 분석한 결과는 Table 1-32, 33, 34, Fig. 1-42, 43, 44과 같다. Anthocyanin을 함유하는 제조두유는 Control과 비교할 때 통계분석에 의해서 는 시간이 0에서 2, 4, 6, 8 hr로 증가함에 따라 Lightness, Redness, Yellowness 모두 유의적인 차이를 나타내지만 수치적으로는 Lightness는 조금 증가하는 경향을 나타내고 Redness, Yellowness에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. ($p < 0.05$) 또한 제조두유와 Anthocyanin을 1000 ppm 함유하는 제조두유를 Fig. 1-45 에 나타내었으며 육안으로도 크게 차이를 보이지 않는다. 그러므로 두유와 우유의 결과와 같게 항산화 효과를 위해 선택된 1000 ppm의 Anthocyanin을 제조두유에 첨가하여도 색에는 큰 영향을 주지 않을 것으로 사료된다.

Table 1–32. Effects of anthocyanin on the lightness value of manufactured soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	32.35 ^b	32.35 ^b	32.36 ^c	32.36 ^e	32.41 ^d
500	32.33 ^c	32.35 ^b	32.36 ^c	32.37 ^d	32.41 ^d
1000	32.35 ^b	32.35 ^b	32.35 ^d	32.39 ^b	32.43 ^b
1500	32.33 ^c	32.35 ^b	32.37 ^b	32.38 ^c	32.42 ^c
2000	32.37 ^a	32.38 ^a	32.41 ^a	32.41 ^a	32.47 ^a

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

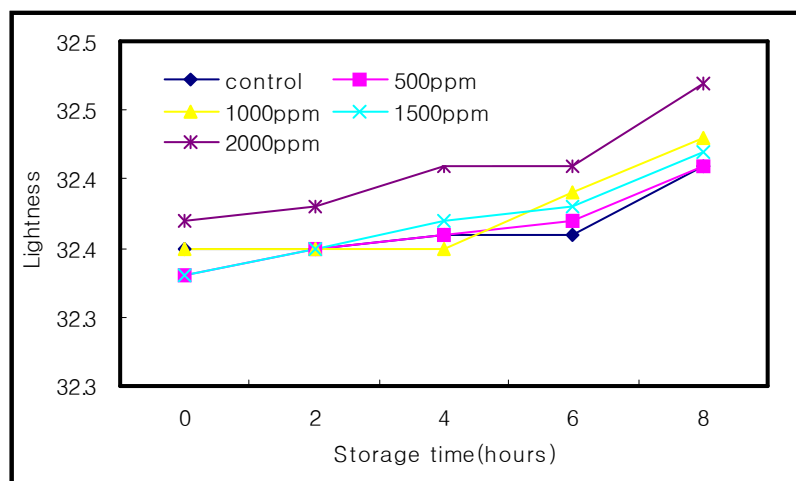


Fig. 1–42. Effects of anthocyanin on the lightness value of manufactured soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1–33. Effects of anthocyanin on the redness value of manufactured soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	-1.66 ^a	-1.66 ^a	-1.66 ^a	-1.67 ^a	-1.67 ^a
500	-1.66 ^a	-1.67 ^b	-1.67 ^b	-1.68 ^b	-1.68 ^b
1000	-1.66 ^a	-1.67 ^b	-1.66 ^a	-1.68 ^b	-1.68 ^b
1500	-1.67	-1.67 ^b	-1.68 ^c	-1.68 ^b	-1.68 ^b
2000	-1.67	-1.68 ^c	-1.68 ^c	-1.68 ^b	-1.68 ^b

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

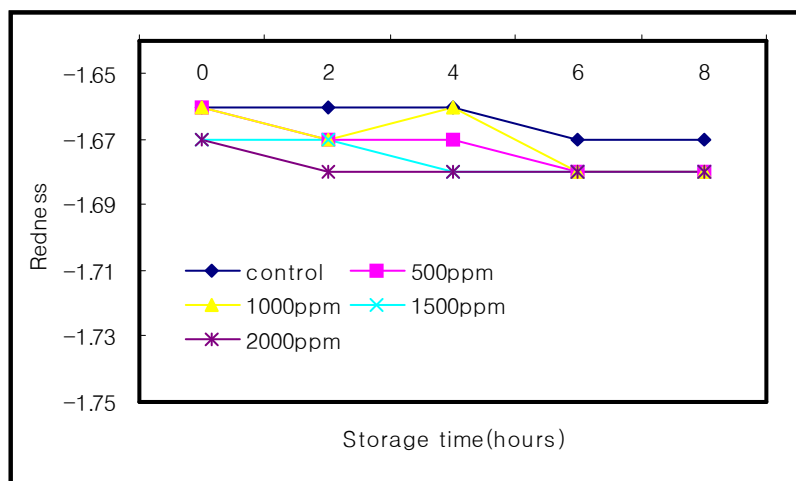


Fig. 1–43. Effects of anthocyanin on the redness value of manufactured soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Table 1-34. Effects of anthocyanin on the yellowness value of manufactured soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs

Anthocyanin (ppm)	Storage time (hours)				
	0	2	4	6	8
Control	1.66 ^b	1.68 ^b	1.68 ^b	1.68 ^b	1.69 ^b
500	1.68 ^a	1.69 ^a	1.69 ^a	1.69 ^a	1.7 ^a
1000	1.66 ^b	1.65 ^e	1.66 ^d	1.68 ^b	1.69 ^b
1500	1.65 ^c	1.66 ^d	1.67 ^c	1.66 ^c	1.67 ^c
2000	1.66 ^b	1.67 ^c	1.67 ^c	1.68 ^b	1.67 ^c

Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$)

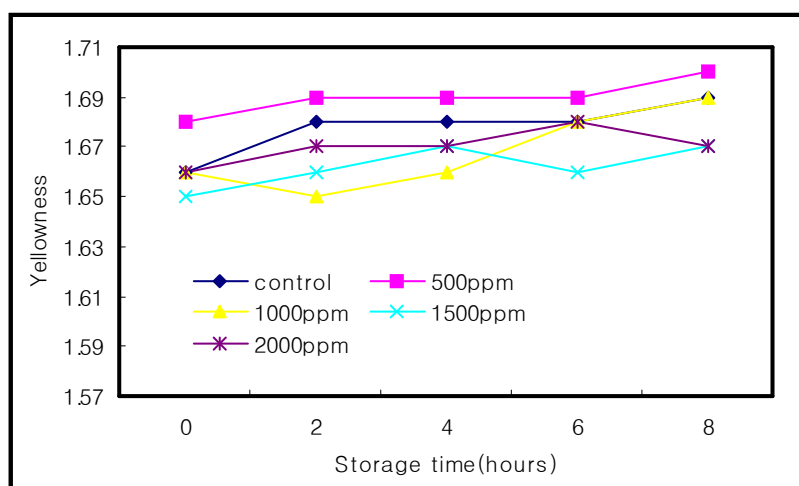


Fig. 1-44. Effects of anthocyanin on the yellowness value of manufactured soymilk under light storage at 4°C for 8 hrs



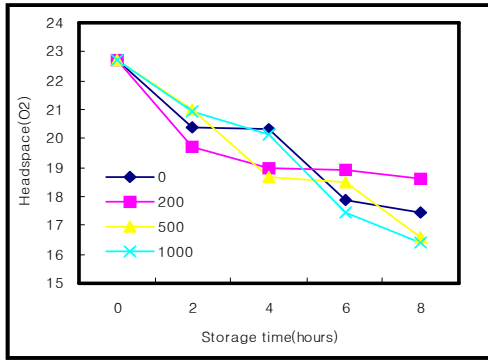
Fig. 1-45. Difference of existence and nonexistence anthocyanin in manufactured soymilk. Left : manufactured soymilk, Right : manufactured soymilk containing 1000 ppm Anthocyanin

4. 두유의 광산화에 주는 라이보플라빈과 아스코르브산의 영향

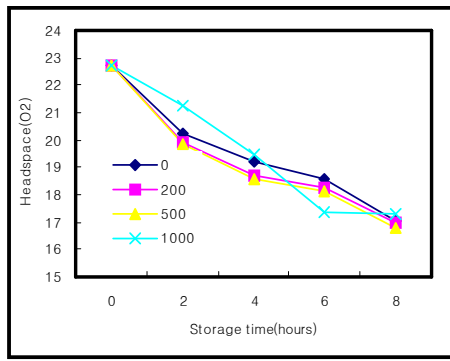
라이보플라빈을 함유하는 두유를 JUNG(3)방법을 변형하여 4°C에서 0, 2, 4, 6, 8 hr동안 18000 lux로 저장했을 때 아스코르브산이 두유의 Headspace oxygen content에 주는 영향을 Gas chromatography을 사용하여 우유, 탈지우유, 제조두유와 비교한 결과는 Table 1-35와 Fig. 1-46 과 같다. 또한 두유, 우유, 탈지우유, 제조두유에 라이보플라빈 5 ppm과 아스코르브산 1000 ppm을 넣고 0, 2, 4, 6, 8 hr 동안 18000 lux로 저장하여 실험한 결과를 Fig. 1-47에 나타내었다. 제조두유와 탈지우유에서는 아스코르브산의 항산화효과가 나타나지만 우유와 두유에서는 항산화 효과를 보이지 않았다.

Table 1–35. Effect of ascorbic acid on the headspace oxygen of soymilk, cowmilk, skim milk, manufactured soymilk containing 5 ppm riboflavin under light storage at 4°C for 8 hrs

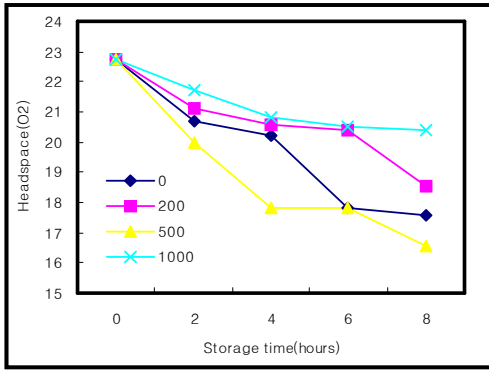
Sample	Concentration (ppm)	Storage time (hours)				
		0	2	4	6	8
Soymilk	0	22.74	20.39	20.31	17.86	17.42
	200	22.74	19.71	19.01	18.89	18.59
	500	22.74	20.97	18.67	18.48	16.58
	1000	22.74	20.93	20.17	17.42	16.43
Cowmilk	0	22.74	20.21	19.24	18.56	17.04
	200	22.74	19.94	18.69	18.25	17.01
	500	22.74	19.86	18.59	18.12	16.76
	1000	22.74	21.24	19.47	17.39	17.32
Skim milk	0	22.74	20.67	20.21	17.82	17.55
	200	22.74	21.10	20.61	20.40	18.51
	500	22.74	19.97	17.82	17.80	16.56
	1000	22.74	21.71	20.81	20.51	20.43
Manufactured Soymilk	0	22.74	20.25	19.94	18.96	18.55
	200	22.74	19.93	19.86	19.81	19.11
	500	22.74	20.68	19.48	19.47	18.49
	1000	22.74	20.68	20.81	20.72	20.12



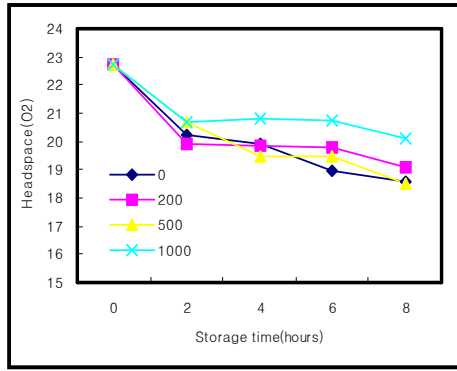
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 1-46. Effect of ascorbic acid on the headspace oxygen of (A) soymilk, (B) cowmilk, (C) skim milk, (D) manufactured soymilk containing 5 ppm riboflavin under light storage at 4°C for 8 hrs

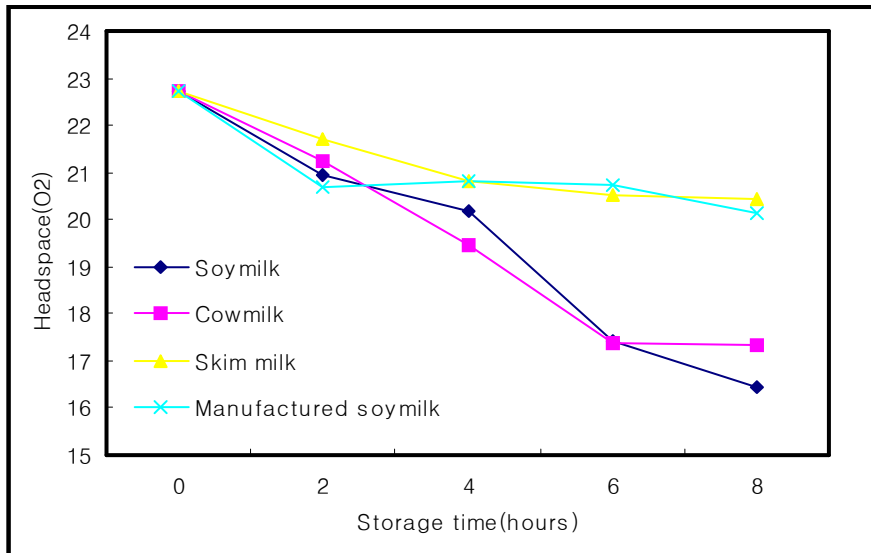


Fig. 1-47. Effect of ascorbic acid 1000 ppm on the headspace oxygen of soymilk, cowmilk, skim milk, manufactured soymilk containing 5 ppm riboflavin under light storage at 4°C for 8 hrs

5. 실제 식품 시스템에서의 휘발성분 생성에 주는 영향

두유는 광산화에 의해 특이한 냄새를 내는데 대표적인 것으로 유제품 특유의 향인 Diacetyl과 콩 비린내 특유의 향인 Hexanal과 Methionine의 일중항산화 산화에 의한 Dimethyl disulfide가 있다. 본 실험에서는 두유를 24, 48 hr동안 광산화 시킨 후 Diacetyl, Hexanal, Dimethyl disulfide의 생성 정도를 SPME를 통한 Gas chromatography로 분석한 결과의 Area value로 비교하였고 특히 Anthocyanin을 1000 ppm 첨가하였을 때 다른 항산화제 α -Tocopherol, δ -Tocopherol, β -Carotene 들과 비교하여서 광산화로 인한 두유의 이취에 기인하는 이들 성분의 생성정도를 비교하였으며 Table 1-36 에 나타내었다. 본 실험의 대조구가 되는 두유의 본래 향의 chromatogram을 Fig. 1-48에 나타내었으며 표준물질들의 chromatogram을 Fig. 1-49에 나타내었다. Diacetyl은 control이 0 hr에서 24, 48 hr로 지남에 따라 69.9에서 627.3, 705.4로 상승한 것에 비해 Anthocyanin의 첨가 시 66.4에서 380.2, 482.4로 적게 상승된 것으로 보아 Anthocyanin이 두유의 광산화에서 유제품 특유향인 Diacetyl의 생성을 적게 하는데 기인한 것으로 볼 수 있다. 또한 α -Tocopherol, δ

-Tocopherol도 Diacetyl의 생성을 적게 하였지만 β -Carotene은 크게 효과를 보이지 않았다. 두유의 콩 비린내를 나타내는 Hexanal은 control이 크게 생성되지 않았고 오히려 Anthocyanin을 첨가하였을 때 향 생성이 증가하였다. 그러나 α -Tocopherol, δ -Tocopherol, β -Carotene을 첨가하면 control보다 Hexanal의 생성을 줄일 수 있는 것을 수치로 확인하였다. Methionine의 일중항산화 산화에 의한 Dimethyl disulfide은 control은 0 hr에서 24, 48 hr로 지남에 따라 12.8에서 17.1, 174.3으로 증가하고 Anthocyanin을 첨가하였을 때 74.9에서 176.3, 169.3으로 비슷하게 증가하였음을 보였다. 또한 다른 항산화제 α -Tocopherol, δ -Tocopherol, β -Carotene의 첨가 시에는 Dimethyl disulfide의 Area value가 눈에 띄게 줄었음을 알 수 있었다. 결과적으로 두유는 광산화에 의해 특이적인 향을 생성하는데 항산화제를 첨가 시 두유의 광산화에 의한 이취를 경감시킬 수 있고 특히 Anthocyanin의 첨가 시 Diacetyl의 향을 많이 줄일 수 있는 것을 알 수 있었다.

Table 1-36. Area value of soymilk containing 1000 ppm antioxidant by Gas chromatography

Flavor	Storage time (hr)	Antioxidant				
		Control	Anthocyanin	α -Tocopherol	δ -Tocopherol	β -Carotene
Diacetyl	0	69.9	66.4	64.2	375.5	521.2
	24	627.3	380.2	446.3	568.27	554.3
	48	705.4	482.4	493.3	589.8	726.1
Hexanal	0	100.1	15.3	189.5	824.4	17.8
	24	23	213.2	40.2	57.6	162.2
	48	91	256.8	23	60.51	65.2
Dimethyl disulfide	0	12.8	74.9	X	X	5.9
	24	17.1	176.6	13.8	18.0	510.2
	48	174.3	169.3	X	13.4	16.3

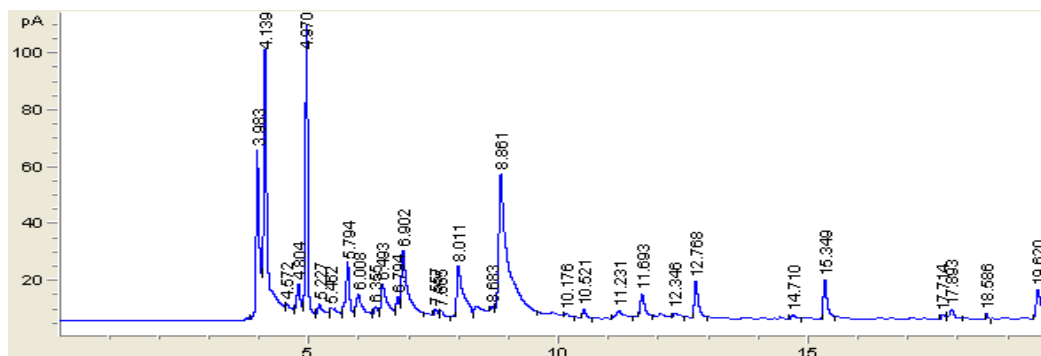


Fig. 1-48. Gas chromatography chromatogram of soymilk flavor

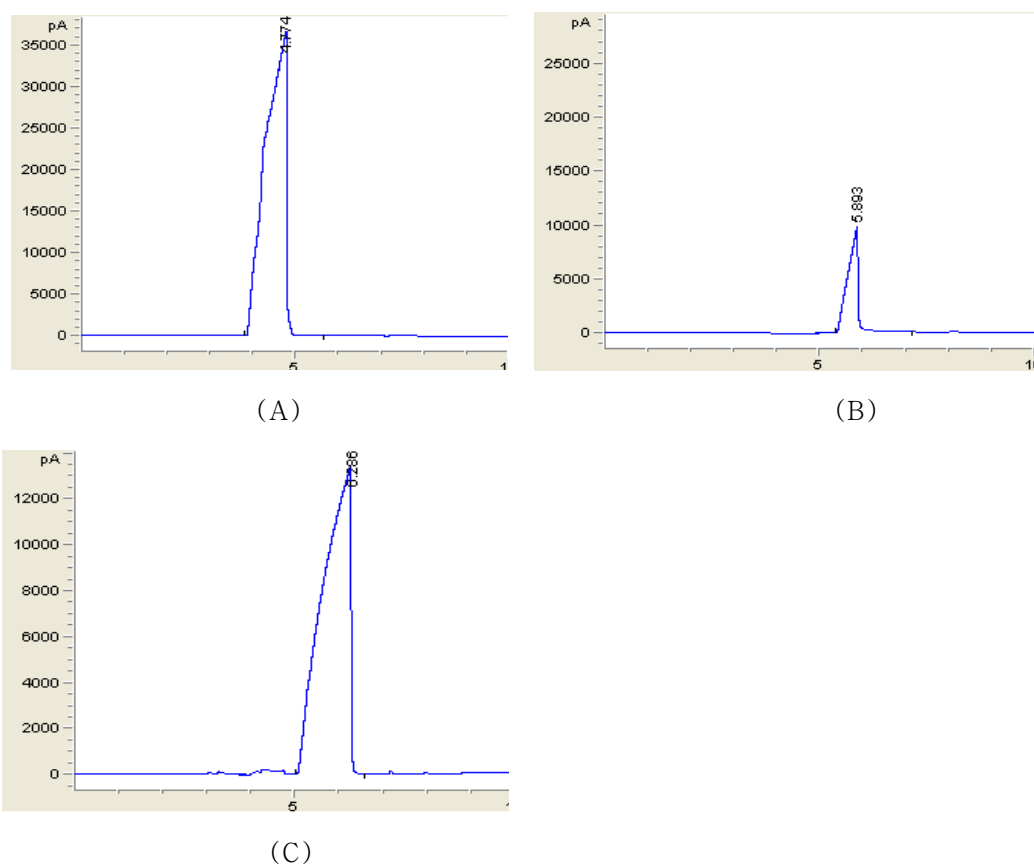


Fig. 1-49. Gas chromatography chromatogram of flavor standards
(A: Diacetyl, B: Hexanal, C: Dimethyl disulfide)

제 2 세부과제 : 안토시아닌 등 플라보노이드 함유식품의 일중항산소 소거 및 산화억제 기능

제 1 절 연구재료

딸기, 오디, 머루는 각각 세미원푸드, 마이산 오디 영농 법인, 봉화산머루 농장에서 구입하였다. Riboflavin과 sodium azide (NaN_3)는 Sigma Co. 와 Shinyo Co. 에서 각각 구입하여 실험에 이용하였으며, 유리컬럼 크로마토그래피를 위한 Amberlite XAD-7 (particle size 20-60 mesh)은 Sigma Co. 에서 구입하였다. Acetonitrile, water, phosphoric acid, acetic acid는 HPLC용(J.T. Bakers)으로 구입하여 실험에 이용하였고 그 외 시약은 모두 일급이었다.

제 2 절 연구방법

1. 일중항 산소 소광활성이 강한 식품소재 탐색

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Buffer 용액, SDS, 1-butanol, 및 methylene chloride 로 구성된 W/O microemulsion 에 37.5 micromol rubrene을 위에 제조한 용액 10 mL에 첨가하여 제조한 후 이곳에 50 micro mole의 H_2O_2 를 점적하여 $^1\text{O}_2$ 를 발생시키면서, rubrene을 선택적으로 산화시켜 생성되는 rubrene endoperoxide를 522 nm에서 흡광도를 측정하여 그 생성량을 계산하였다.

2. Total anthocyanin, total phenolics, 및 ABTS radical scavenging activity 측정

총 안토시아닌 함량은 비색법에 의하여 측정하였고, ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) radical scavenging activities 는 이전에 발표된 방법에 따라서 측정하였다 (Kim et al., 2002). Total phenolic함량은 Folin-Ciocalteu법에 따라서 측정하였다 (Singleton et al., 1999).

3. Eletron Spin Resonance Spectroscopy를 이용한 $^1\text{O}_2$ 소강능력 측정

메틸렌블루-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (TMPD) 시스템을 이용하여, tungsten halogen lamp로부터 광선 (>325 nm)을 집광기 (condenser)를 통하여 샘플에 일정량 조사한 후 생성되는 수용성 TMPD-N-oxyl radical을 ESR Spectroscopy로 측정하여 1O_2 의 생성 여부를 확인하였다. 이때 이 시스템에 시료를 첨가하여 TMPD-N-oxyl radical 피크의 크기를 비교하여 시료의 일중항 산소 소거능력을 측정하였다.

4. XAD-7 column chromatography를 이용한 머루로부터 광산화억제 책임성분의 분리

XAD-7 column에 머루주스를 통과시키고, 증류수 100 mL를 흘려보내 수용성이 강한 성분을 Fraction I으로 분획하고, 이어서 메탄올-증류수 (1:1, v/v)를 100 mL로 컬럼에 흘려보내서 Fraction II를 얻었다. 그리고 메탄올-1% HcL을 용매를 흘려보내서 Fraction III를 얻었다.

5. C-18 Column HPLC를 이용한 안토시아닌 분리

머루 주스에서 얻은 Fraction II 및 III에 함유된 안토시아닌을 분리하기 위하여 C18 column (Zorbax 300SB-C18, Agilent Technologies, Rising Sun, MD, USA)을 사용하여 522 nm에서 HPLC/DAD (SPD-M10A, Shimadzu, Japan) 분석을 실시하였다. Solvent A (formic acid/water, 5:95) 와 Solvent B (formic acid/acetonitrile, 5:95)를 사용하였으며 분석에 이용된 용매구배조건은 다음과 같다: 0-5 min, 5% B; 5-15 min, 5-8% B; 15-32 min, 15% B; and 32-55 min, 15% B and 55-60 min, 5%. 컬럼의 온도는 temperature programmable column oven (Younglin Instrument, Seoul, Korea)을 이용하였다.

6. 머루주스의 리보플라빈 광산화억제 효과 측정

머루주스의 광산화억제 효과를 측정하기 위하여, riboflavin을 sodium phosphate buffers (20 mM, pH 6.5)에 용해하고, 머루주스 일정량을 첨가하여 20 μ M riboflavin 용액을 제조하였다. 이들 riboflavin 용액을 100 mL-capacity Erlenmeyer flask에 넣은 후 parafilm으로 밀봉하였다. 이렇게 준비된 시료들은 광저장박스내의 형광광선아래에서 보관하였다 (광도: 3000 lux). 시료는 매 30분마다 120분간 저장하면서 취하

여, 시료중의 riboflavin 함량변화를 HPLC법으로 관찰하였다.

7. HPLC Analysis법에 의한 riboflavin 분석

시료중의 riboflavin 함량은 HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였으며, 이때 사용된 분석칼럼은 Platinum C18 column (3 μ , 4.6 x 150mm, Alltech, USA)이었다. 분리에 이용한 이동상 용매로는 acetonitrile과 purified water였고 이들 용매들을 다음과 같은 용매구배조건에서 분석하였다. 초기 18 분동안에는, acetonitrile/water비율을 10/90로 유지하다가, 18분에서 20분 까지 그 비율을 10/90에서 30/70로 변화시켰다. 이동상의 속도는 1.0mL/min이었고, 검출기는 A Diode Array Detector at 440 nm 이었다.

8. 우유의 초급성 영양성분 산화실험

우유의 초급성 산화실험을 위하여, 우유를 미리 살균한 Erlenmeyer flask에 넣은 후 광저장박스내에서 형광광선에 조사되는 조건으로 60시간 동안 5oC working cooler내에서 저장하였다. 저장중에 일정시간마다 시료를 채취하여 지질과산화물, 휘발성화합물의 생성량 및 토코페롤 산화정도를 측정하였다.

9. 우유의 과산화지질 분석

우유의 과산화지질 분석을 위하여, 우유로부터 methanol 및 chloroform을 첨가한 후 잘 혼합하고 정치하여, 우유 지질성분을 chloroform으로 용해하고, bench top centrifuge로 13000 rpm으로 원심분리하여 얻은 지질성분을 함유한 chroloform층을 비색법으로 정량하였다. 이때 검출된 우유에 함유된 과산화지질함량은 cumin hydroperoxide를 이용하여 얻은 standard curve를 이용하여 nmol로 계산하였다.

10. HPLC법을 이용한 우유시료의 토코페롤 분석

우유시료 (2..5g)에 아스코르브산 (0.05g)을 첨가한후 absolute ethanol 5 mL, KOH(60%)용액 1mL를 첨가하고 70oC에서 30분간 가열하여 지질을 검화하였다. 검화물을 BHA를 첨가한 hexane으로 3회반복하여 토코페롤을 추출한 다음, hexane은 질소로 휘발하고, 이 시료를 95% 에탄올로 용해하여 마이크로 필터를 통과시킨후 HPLC에 주입하여 토코페롤함량을 분석하였다. 이때 사용된 분석칼럼은 Platinum

C18 column (3 μ , 4.6 x 150mm, Alltech, USA)이었다. 분리에 이용한 이동상 용매로는 acetonitrile과 purified water였고 이들 용매들을 다음과 같은 용매구배조건에서 분석하였다. 초기 18 분동안에는, acetonitrile/water비율을 10/90로 유지하다가, 18분에서 20분 까지 그 비율을 10/90에서 30/70로 변화시켰다. 이동상의 속도는 1.0mL/min이었고, 검출기는 형광검출기 (RF 10-A, Ex 294 Em 330 nm)를 사용하였다.

11. SPME-GC분석법을 이용한 우유시료의 휘발성 화합물 측정

시료우유 2.5 mL를 micro-scale magnetic bar (15 mm \times 1.5 mm)와 함께 15 mL serum bottle에 넣고, Teflon-coated rubber septum와 aluminum cap으로 기밀 밀봉한다. Serum bottle headspace volatile compounds는 75 μ m Carboxen/PDMS fiber (Supleco Inc., Bellefonte, PA)를 이용하여 SPME방법으로 분석하였다. 시료가 담긴 serum bottle은 magnetic bar로 시료를 교반하면서 핫플레이트에서 10분간 기다렸다가 그 후에 Carboxen/PDMS fiber를 시료병에 주입하고 20분간 휘발성 물질을 fiber에 흡착시켰다. SPME fiber에 흡착된 휘발성 화합물들은 gas chromatograph (Shimadzu GC-14B, Shimadzu, Japan)의 250 $^{\circ}$ C로 맞추어진 injection port (fitted with a 0.75 mm internal diameter splitless glass liner)에 주입하여 5 minutes 탈착하였다. 이때 사용된 column은 DB-5 MS (30 m \times 0.22 mm, 0.25 μ m film thickness Supelco Inc., Bellefonte, PA)이었고, 검출기는 a flame ionization detector이었다. Carrier gas로는 helium을 사용하였고, GC oven temperature는 40 $^{\circ}$ C에서 2분 정체를, 7 $^{\circ}$ C/minute의 속도로 150 $^{\circ}$ C까지 승온시키고, 150 $^{\circ}$ C로 20분간 유지하였다.

12. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS)를 이용한 우유의 휘발성 화합물 측정

우유시료의 휘발성 화합물에 대한 동정 실험은 a Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (Perkin-Elmer)를 이용하여 행하였다. 이때 사용되었던 electron ionization of mass spectra은 70 eV. GC/MS의 분석 조건은 상기한 SPME-GC분석에서 사용된 것과 동일하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. Anthocyanin 등 flavonoids 함유소재의 1O_2 quencher activity활성 탐색

이전에 발표된 방법 (Nardello, Matini, Perlot, and Aubry 1999, Kim, Choi, and Jung 2003)을 약간 변형하여, 0.2M $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ (290.4 mg in 6 mL of 0.15M phosphate buffer solution containing 1.0 mM EDTA, pH 7.4) 한방울씩 SDS (4.7g), 1-butanol (9.4g), methylene chloride (60 mL) 슬러리에 첨가하고, 잘 혼합하여 완전히 투명한 상태가 되었을 때, 0.02 gram (37.5 micromol) of rubrene을 위에 제조한 용액 10 mL에 첨가하여 W/O 마이크로 에멀전을 제조하고, 이 에멀전 시스템에 50 micro mole의 H_2O_2 를 점적하여 1O_2 를 발생시키면서, rubrene을 선택적으로 산화시켜 생성되는 rubrene endoperoxide를 522 nm에서 흡광도를 측정하여 그 산화물의 생성량을 측정하였다.

안토시아닌이 풍부한 과일 및 채소류 17종을 선발하여, 스쿠르식 압착법에 의하여 주스를 얻었다. 이렇게 얻은 주스를 50 μ L를 일중항 산소 측정 시스템에 첨가하여 주스별 rubrene endoperoxide생성억제력을 비교하여 측정하였다 (Fig 2-1).

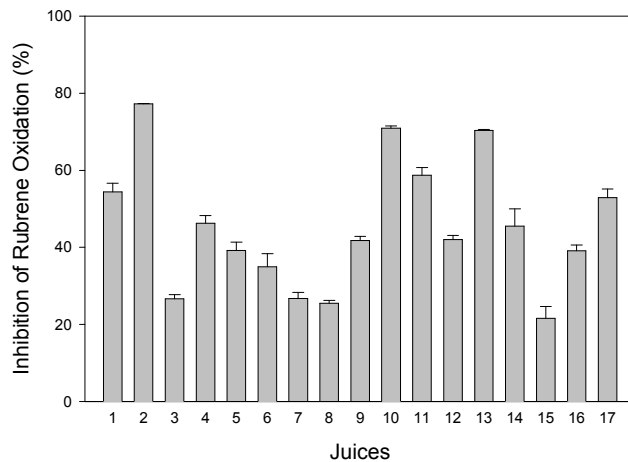


Fig 2-1. Effects of various vegetable and fruit juices on the singlet oxygen rubrene peroxidation induced by hydrogen peroxide-sodium molybdate in a w/o microemulsion. (1=거봉포도, 2=늦머루, 3=딸기(매향), 4=딸기(설향), 5=딸기(육보), 6=딸기(장이), 7=복분자(수피왕), 8=복분자(황금), 9=복분자(V3), 10=벗찌, 11=석류, 12=오디, 13=올머루, 14=앵두, 15=자두, 16=적채, 17=포도)

이번 연구결과를 이전에 발표된 연구결과와 비교할 때, 안토시아닌함유 과일에는 모두 강력한 일중항 산소에 의한 산화를 억제하는 능력이 매우 강하다는 것을 확인하였다. 이들 주스의 일중항 산소에 의한 rubrene endoperoxide 생성 억제력은 가장 적게는 자두의 21.6%에서 가장 크게는 늦머루의 77.3%에 이르렀다. 특이하게도 거봉포도, 늦머루, 일반포도, 올머루등의 이번 연구에 포함되었던 포도종류들이 모두 좋은 rubrene endoperoxide 생성억제능력을 갖고 있었다.

2. ABTS radical 소거 활성 및 총안토시아닌, 페놀함량 측정

이들 주스시료들의 라디칼에 의한 산화를 억제하는 항산화능력을 측정하기 위하여 ABTS radical scavenging activity를 측정하였다 (Fig 2-2). 이번 ABTS 라디칼 생성 억제 활성연구 결과에 의하면, 벚찌가 가장 강력한 ABTS radical 소거활성을 나타내었고. 그 뒤를 이어 오디, 늦머루, 올머루, 적채등의 순서였다. 벚찌는 일중항산소에 의한 산화방지능력은 늦머루에 비하여 떨어졌지만, 라디칼소거기능은 늦머루에 비하여 강하였다. 이는 일중항 산소에 의한 산화와 라디칼에 의한 산화의 기작이 완전히 서로 다르다는 것을 확인하는 것이다.

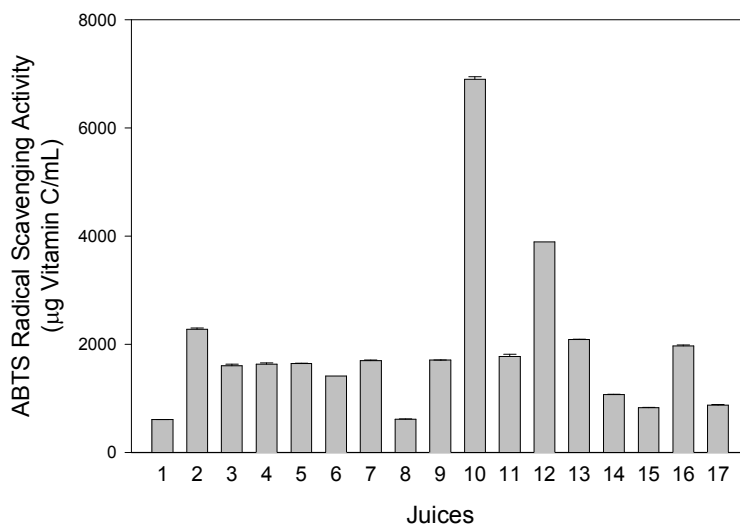


Fig 2-2. ASTS radical scavenging activity (ug vitamin C/mL) of various vegetable and fruit juices. (refer to Fig 2-1 for the identities of juice samples)

주스시료들 사이에 일중항산소에 의한 산화억제력 (rubrene endoperoxide 생성억제력)과 total anthocyanin함량 및 total phenolics 함량과의 관계를 확인하기 위하여 이들 함량을 측정하여 비교하였다 (Fig 2-3, Fig 2-4). 이 연구 결과에 의하면, rubrene endoperoxide 생성억제력으로 나타나는 일중항 산소 소거활성은 total phenolics함량보다는 total anthocyanin함량과 좀 더 관련성이 있음을 확인하였다 (Fig 2-5).

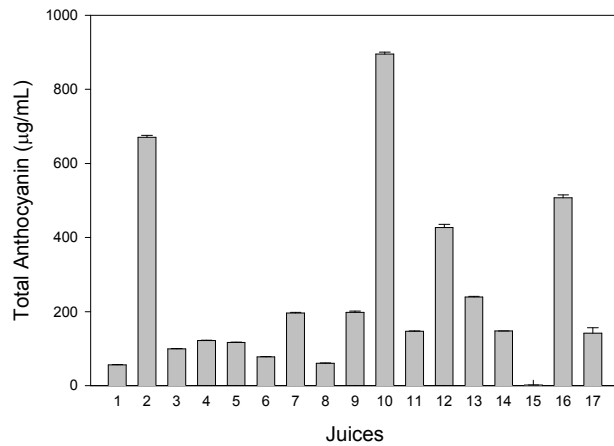


Fig 2-3. Total anthocyanin contents in various vegetable and fruit juices (refer to Fig 2-1 for the identities of juice samples)

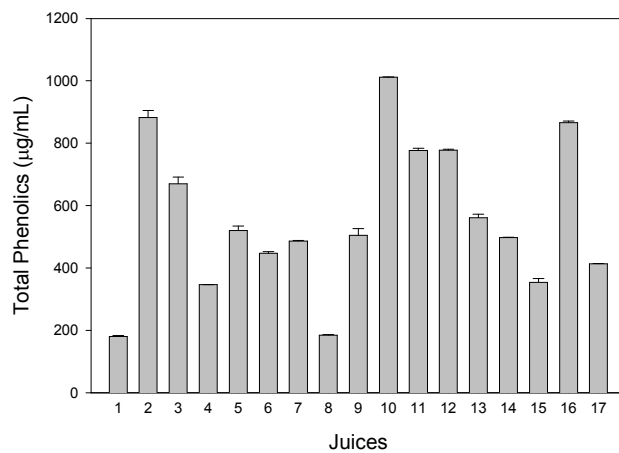


Fig 2-4. Total phenolic contents in various vegetable and fruit juices (refer to Fig 2-1 for the identities of juice samples)

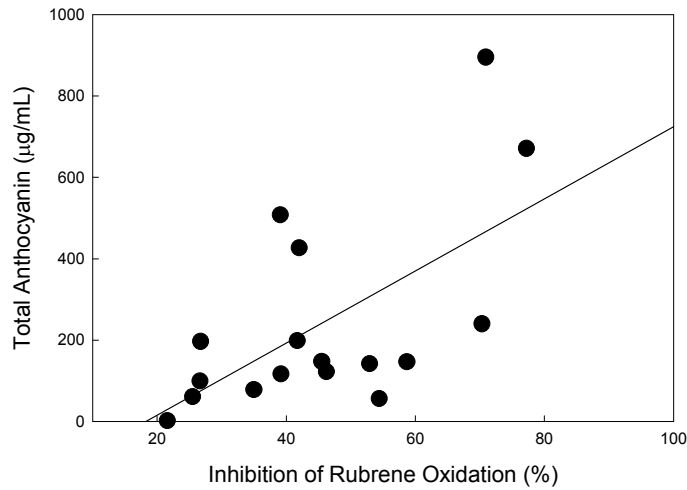


Fig 2-5. Correlation between total anthocyanin versus inhibition of rubrene oxidation of juices.

3. 포도 주스류의 우유의 광선조사에 의한 초급속 산화억제력 비교

위 실험에서 얻어진 결과에 의하면, 포도류로부터 얻어진 주스시료들이 모두 비교적 강력한 일중항 산소소거활성을 갖는 것으로 밝혀졌기 때문에, 이번 실험에서는 이들 포도주스류들이 우유의 광선조사조건에서 초급속으로 산화되어 영양성분이 파괴되는 속도를 어느정도 억제할 수 있는지 그리고 이들 포도류중에 이러한 초급속 산화억제력이 가장 탁월한 시료는 어떤 것인지 탐색하기 위하여 다양한 종류의 포도로부터 주스를 얻은 후 우유에 첨가하여 이들 주스가 우유시료의 지질과산화물 생성, 휘발성화합물생성 및 토코페롤 산화에 미치는 영향을 분석하였다.

Fig. 2-6은 다양한 종류의 포도주스류 (1% 첨가)가 우유의 36시간 광산화로 인하여 생성되는 과산화지질생성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 이 연구결과에 의하면, 대조구 (무처리우유)의 과산화지질은 광조사 이전에는 0 nmol/mL에서 36시간 광조사후에는 157.57 nmol/mL로 급격히 증가하였다. 이는 광선이 조사되는 조건에서는 지질산화반응이 급격히 일어나는 것을 의미한다. 늦머루주스 첨가구가 과산화지질의 생성을 억제하는 활성이 가장 뛰어났고, 뒤이어 올머루, 캠벨얼리, 머루포도(MBA), 거봉(Kyoho), 텔라웨어 순이었다. 늦머루 주스첨가구는 과산화지질생성량이 대조구의 1/3수준인 51.30 nmol/mL이었다 (Fig 2-6).

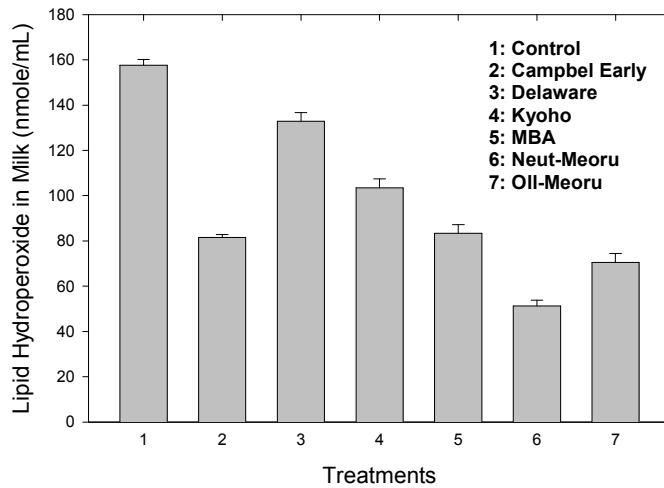


Fig 2-6. Effects of grape juice (1%) on the lipid hydroperoxide formation in milk after 36 hr light illumination at 5°C.

Fig 2-7은 우유시료를 36시간 광조사시킨 후 생성되는 휘발성화합물을 SPME-GC분석법으로 얻는 gas chromatogram이다. 이때 생성된 여러 종류의 휘발성화합물은 GC/MS를 이용하여 동정하였다. 빨간색 숫자로 표시한 피크들이 우유시료의 조사과정중에 주로 많이 생성되는 휘발성 화합물들이다.

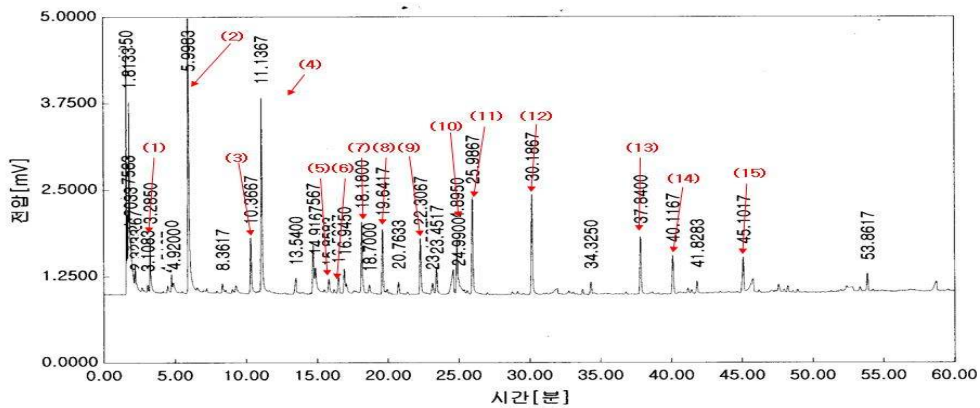


Fig 2-7. The GC chromatogram of volatile compounds formed in milk after 60 hr light illumination (peak 1: pentanal, peak 2: heptanal, peak 3: unknown, peak 4: hetanal, peak 5: 1-heptanol, peak 6: 2-hexen-1-ol, peak 7: octanol, peak 8: 1-decyne, peak 9: 2-hexanal, peak 10: 2-nonenone, peak 11: decanal, peak 12: 2-nonenal, peak 13: 2-decenal, peak 14L 2-undecanone)

Fig 2-8은 다양한 포도주스를 처리한 우유시료의 광조사에 의하여 생성되는 휘발성 화합물 중 대표적인 hexanal의 생성정도를 나타낸 것이다. 이번 연구결과에 의하면 포도주스류의 우유중의 hexanal의 생성억제효과는 과산화지질억제효과와 완벽히 일치하지는 않았다. 그러나 늦머루가 가장 강력한 hexanal 생성 억제효과를 나타내어, 과산화지질억제력과 일치하였다. hexanal 생성억제활성은 늦머루, 올머루, MBA, Kyoho, 캠벨얼리, 델라웨어의 순서이었다. 대조구의 hexanal함량은 광선조사전 0 (peak area, mv x sec)에서 36시간 광조사후 11.96 (peak area, mv x sec)로 급격히 상승하였는데, 늦머루 첨가구의 경우는 광선조사전에 hexanal 함량이 0에서 36시간 조사 후 2.57 (peak area, mv x sec)로 증가하는 데 그쳤다. 이결과는 머루주스가 매우 효율적으로 우유의 초급성 산화를 억제한다는 것을 나타낸 것이었다. 따라서 강력한 일중향 산소관련 초급속산화억제활성을 갖는 늦머루 주스를 계속연구 대상으로 선발하였다.

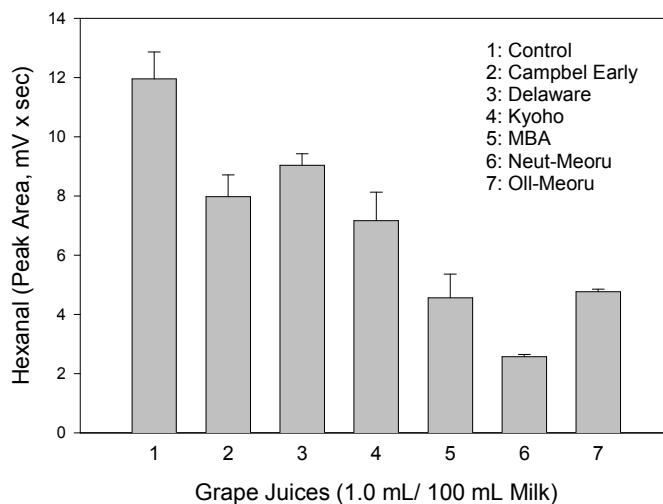


Fig. 2-8. Effects of grape juice (1%) on the hexanal formation in milk after 36 hr light illumination at 5°C.

4. 머루주스의 riboflavin 광분해 억제효과

늦머루 주스가 riboflavin 광분해에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 20 μ M riboflavin solutions in sodium phosphate buffers (20 mM, pH 6.5) 제조하여 광선을 조사면서, 매 30분 마다 riboflavin 함량을 측정하였다. Fig 2-9는 머루주스첨가구와 대조구에서 riboflavin 광분해속도를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 meoru

juice는 적은양에서도 riboflavin의 광분해를 효율적으로 억제하였고, 그 첨가량을 0.5%에서 1.0%로 증가하였을 경우 riboflavin 광분해억제 효율도 증가하는 것으로 나타났다.

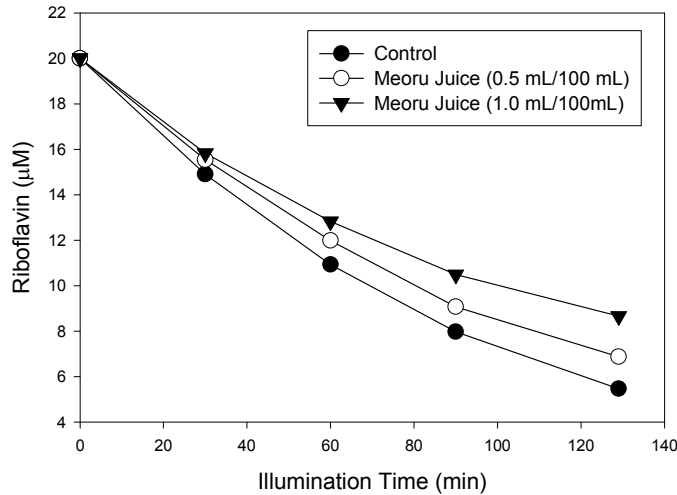


Fig 2-9. Effects of meoru juice on the self-sensitized photodecomposition during light illumination

5. 머루주스첨가량에 따른 우유 초급속산화에 의한 지질과산화물 및 hexanal 생성, 토코페롤 산화 억제효과

Figs 2-10, 2-11, 및 2-12는 각각 머루 주스 첨가량을 달리했을 때 우유의 광조사에 의한 지질과산화물생성, hexanal 생성, 및 토코페롤산화억제력을 나타낸 것이다. 표 2-10의 결과에 의하면, 대조구 (무첨가구)의 우유는 광조사전에 과산화지질함량 0 nmol/mL 에서 60시간 후에 162.16 nmol/mL로 급격히 증가하는 모습을 보였다. 그러나 머루주스 첨가구들은 대조구에 비하여 우유의 과산화지질생성량이 현격히 적었다. 머루주스 0.5, 1.0 및 1.5% 첨가구들의 60 시간후 과산화지질함량은 각각 107.19, 71.46 및 41.23 nmol/mL으로 나타나서, 머루주스 함량이 증가할수록 그 과산화지질 억제활성이 증가하는 것을 보여주었다. 특히 머루주스 1.5% 첨가구의 과산화지질 함량은 대조구의 약 1/4에 불과하였다. Fig 2-11에서 보는 바와 같이 머루 주스 첨가량을 달리한 실험구들에서는 현저히 hexanal 생성이 감소하였고, 그 첨가량이 증가할수록 hexanal 생성억제능력이 역시 증가함을 나타내어 이전의 과산화지질분석 결과와 일치

하는 결과를 나타내었다.

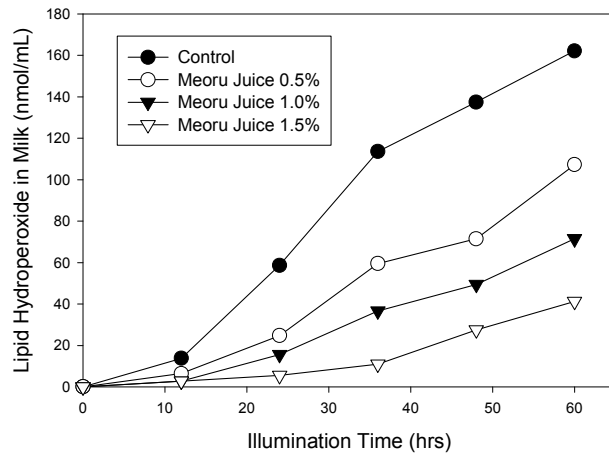


Fig. 2-10. Effects of different amount of meoru juice on the lipid hydrogen peroxide formation in milks during light illumination

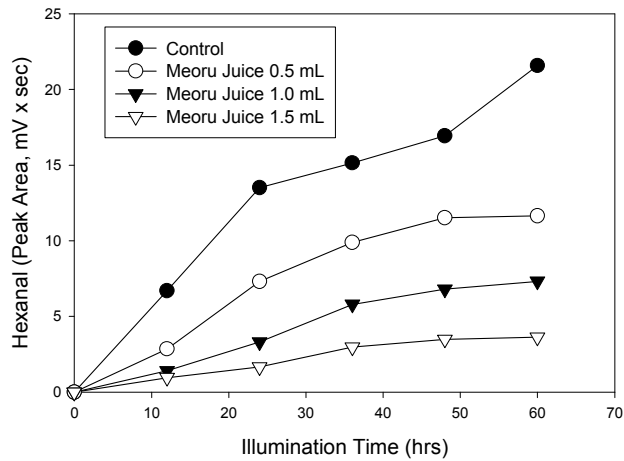


Fig. 2-11. Effects of different amount of meoru juice on the hexanal formation in milks during light illumination

Fig. 2-12에서 나타낸 바와 같이, 대조구 우유시료는 12시간만에 대부분의 토코페롤이 산화되었고 20시간이후에는 그 함량의 변화가 거의 나타나지 않았다. 대조구 우유시료는 초기 토코페롤함량이 120.76 ug/100mL에서 12시간후 21.79 ug/100mL로 감소하였으나, 머루주스 1.5%첨가군에서는 12시간후 120.76에서 70.27 ug/100mL로 감소하여 토코페롤 산화를 매우 효율적으로 억제하였다.

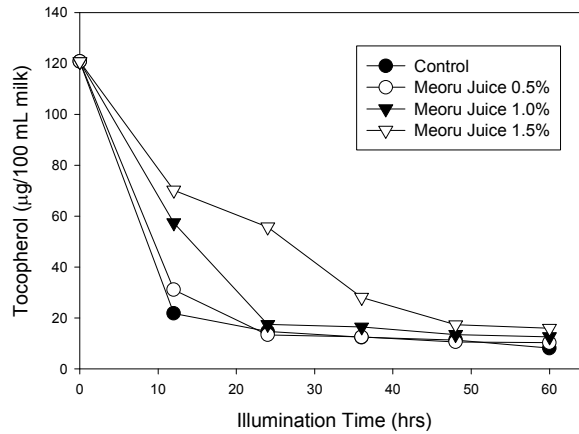


Fig. 2-12. Effects of different amount of meoru juice on the tocopherol decomposition in milks during light illumination

Fig 2-13, 2-14 및 2-15는 각각 우유시료를 36시간 광조사시키는 과정에서 meoru juice 1.5%처리구와 ascorbic acid 처리구 (0.005, 0.015 및 0.025%)처리구들의 과산화지질생성, hexanal 생성 및 토코페롤 산화억제효과를 비교한 것이다. 이 결과에서 보는 바와 같이 meoru juice 1.5%처리구는 과산화지질 생성을 억제하는 효과에서는 ascorbic acid 0.025%처리구보다 약간 약한 활성을 나타내었으나, hexanal 생성억제 및 토코페롤산화억제활성에 있어서는 meoru juice 1.5%처리구는 ascorbic acid 0.025%처리구와 동등한 활성을 나타내었다.

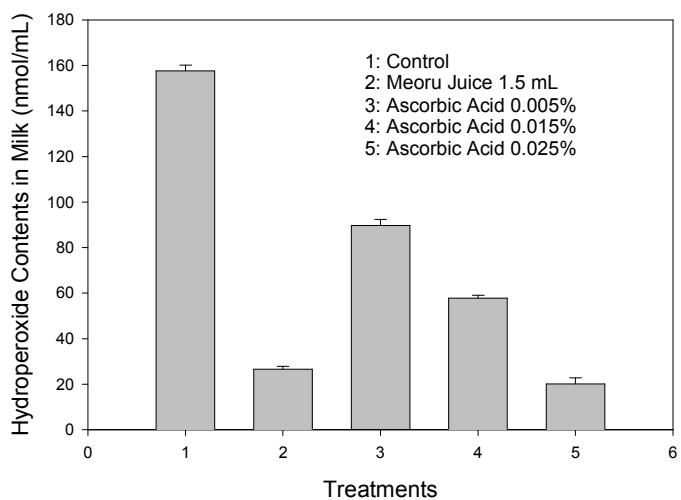


Fig 2-13. Comparison of meoru juice and ascorbic acid activities on the lipid hydroperoxide formation in milks after 36 hr light illumination

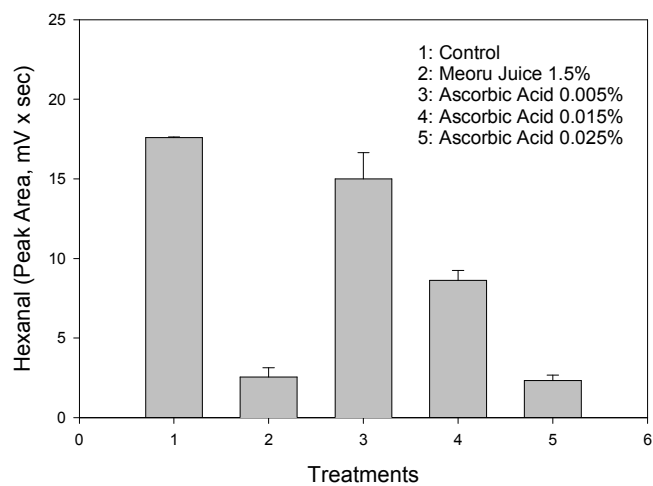


Fig 2-14. Comparison of meoru juice and ascorbic acid activities on the hexanal formation in milks after 36 hr light illumination

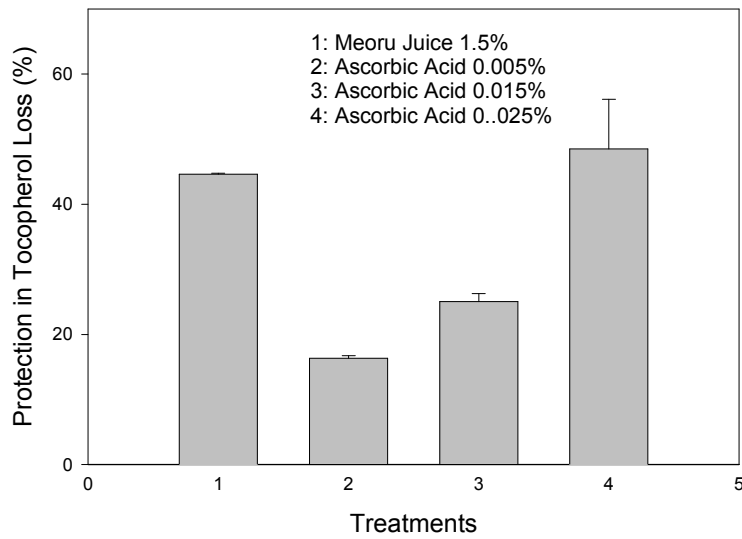


Fig 2-15. Comparison of meoru juice and ascorbic acid activities on the tocopherol loss in milks after 36 hr light illumination

6. 머루의 광산화억제 메카니즘 확인

머루의 강력한 광산화억제 활성을 확인하기 위하여, 감광체인 methylene blue-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (TMPD) 시스템을 이용하여, 머루 추출물을 시스템에 첨가하고, 광원인 tungsten halogen lamp (40W)로부터 광선 (>325 nm)을 집광기 (condenser)를 통하여 샘플에 30분간 조사한 후 생성되는 수용성 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-N-oxyl radical을 Electron Spin Resonance Spectroscopy로 측정하여 1O_2 의 생성 여부를 확인하고, 머루주스의 1O_2 소거능력을 확인하여 그 산화억제 메카니즘을 증명하였다 (Lion, et al. 1976, Su et al. 2003). Fig 2-15에서 확인하는 바와 같이 머루주스 1.25 uL의 적은양의 첨가에 의하여 생성되는 ESR spectrum의 피크 크기가 현저히 감소하였으며, 그 머루주스 첨가량이 증가할수록 피크크기는 더욱더 감소하는 효과를 나타내었다. 이는 머루주스가 일중항 산소를 효율적으로 소거하는 기작을 가지고 있음을 의미한다. Fig 2-16에서는 머루주스의 일중항산소 소거활성을 ascorbic acid와 비교하여 나타내었다.

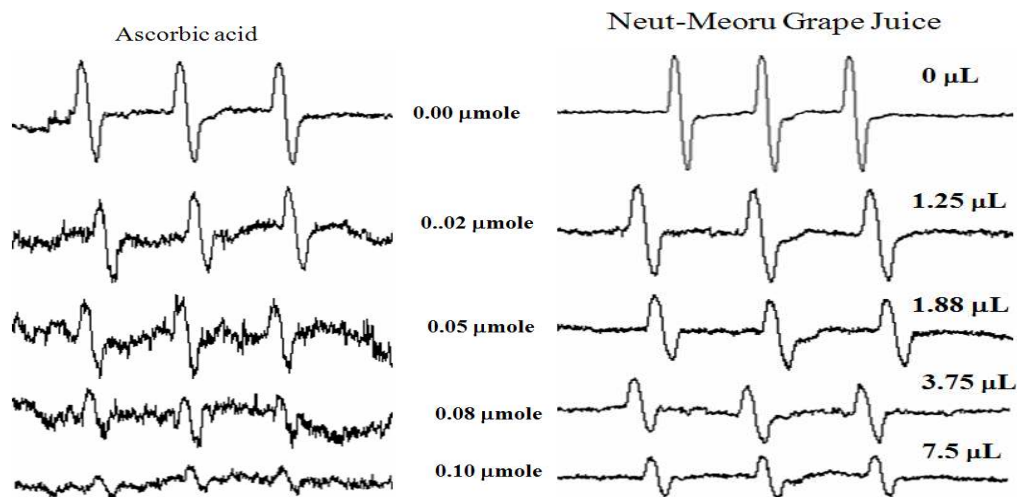


Fig 2-16. Effects of different amount of meoru juice and ascorbic acid on the ESR spectra in methylene blue-TMPD system after light illumination.

7. 머루의 분획물 획득 및 일중항 산소에 의한 methylene blue 산화억제활성 측정

XAD-7 column에 머루주스를 통과시키고, 증류수 100 mL를 흘려보내 수용성이 강한 성분을 Fraction I으로 분획하고, 이어서 메탄올-증류수 (1:1, v/v)를 100 mL로 컬럼에 흘려보내서 Fraction II를 얻었다. 그리고 메탄올-1% HcL을 용매를 흘려보내서 Fraction III를 얻었다. 이렇게 얻은 세 개의 fraction중에 안토시안함량이 제일 높은 Fraction II에서 그 활성이 가장 강하였다. Fraction II의 주요성분은 TLC 및 HPLC등으로 측정하여 본 결과 안토시안으로서 확인되었다 (Table 2-1).

Table 2-1. Effects of different meoru juice fractions on on the rubrene oxidation induced by singlet oxygen in a micro-emulsion system of H_2O_2/MoO_4^{2-}

Meoru Juice Fraction	% Inhibition
Fraction I (100 μL)	8.17
Fraction II (100 μL)	35.22
Fraction III (100 μL)	30.69

8. 머루주스의 활성분획 (Anthocyanin-rich fraction)의 항산화효과

이전 실험결과 머루주스의 분획물 FII 와 FIII가 모두 강력한 활성을 가지고 있으므로, FI을 제외한 FII 와 FIII을 합쳐서 활성분획으로 규정하였다. 이들 활성분획은 안토시아닌함량이 다량 농축된 분획이다. Fig 2-17은 머루주스에서 얻은 활성분획과 동일한 양의 아스코르브산첨가에 의한 우유의 광선조사 중에 일어나는 지질과산화물 생성억제효과를 나타낸 것이다. 대조구 우유는 60시간 광조사후 과산화지질이 0에서 295.00 nmol/mL로 급격히 증가하였다. 활성분획 0.01%첨가와 ascorbic acid 0.01%첨가의 경우 모두 우유의 과산화지질생성을 억제하였으나, 활성분획 0.01%처리구에서는 거의 과산화지질의 생성이 일어나지 않는 것을 알수 있었다. 활성분획 0.01%첨가와 ascorbic acid 0.01%첨가구에서의 60시간 광조사후 생성된 과산화지질 함량은 각각 31.14 및 153.91 nmol로서, 각각 약 90 및 50% 과산화지질 억제활성을 보였다.

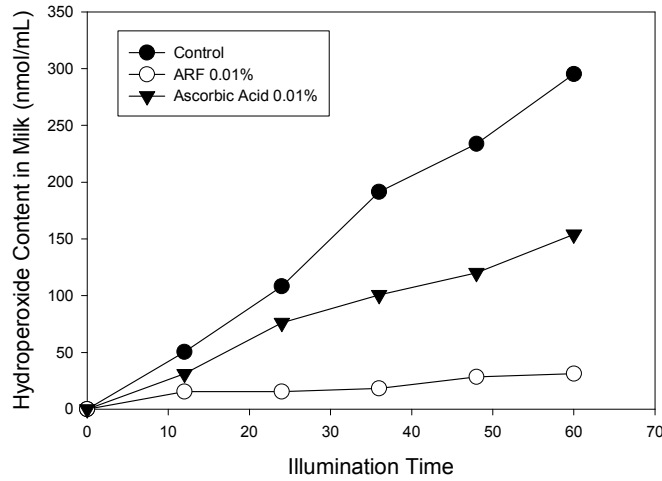


Fig 2-17. Effects of active Fraction (ARF) of Meoru juice on the lipid hydroperoxide formation in milk during light illumination

Fig 2-18은 머루주스에서 얻은 활성분획과 동일한 양의 아스코르브산첨가에 의한 우유의 광선조사 중에 생성된 휘발성 화합물을 GC/SPME법으로 분석하여 얻은 GC chromatogram이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 머루주스는 아스코르브산에 비하여 휘발성화합물의 생성을 억제하는 능력이 월등함을 보여준다. F2-19은 머루주스에서 얻은 활성분획과 동일한 양의 아스코르브산첨가에 의한 우유의 광선조사 중에 생성되는 hexanal함량변화를 나타낸 것이다. 이

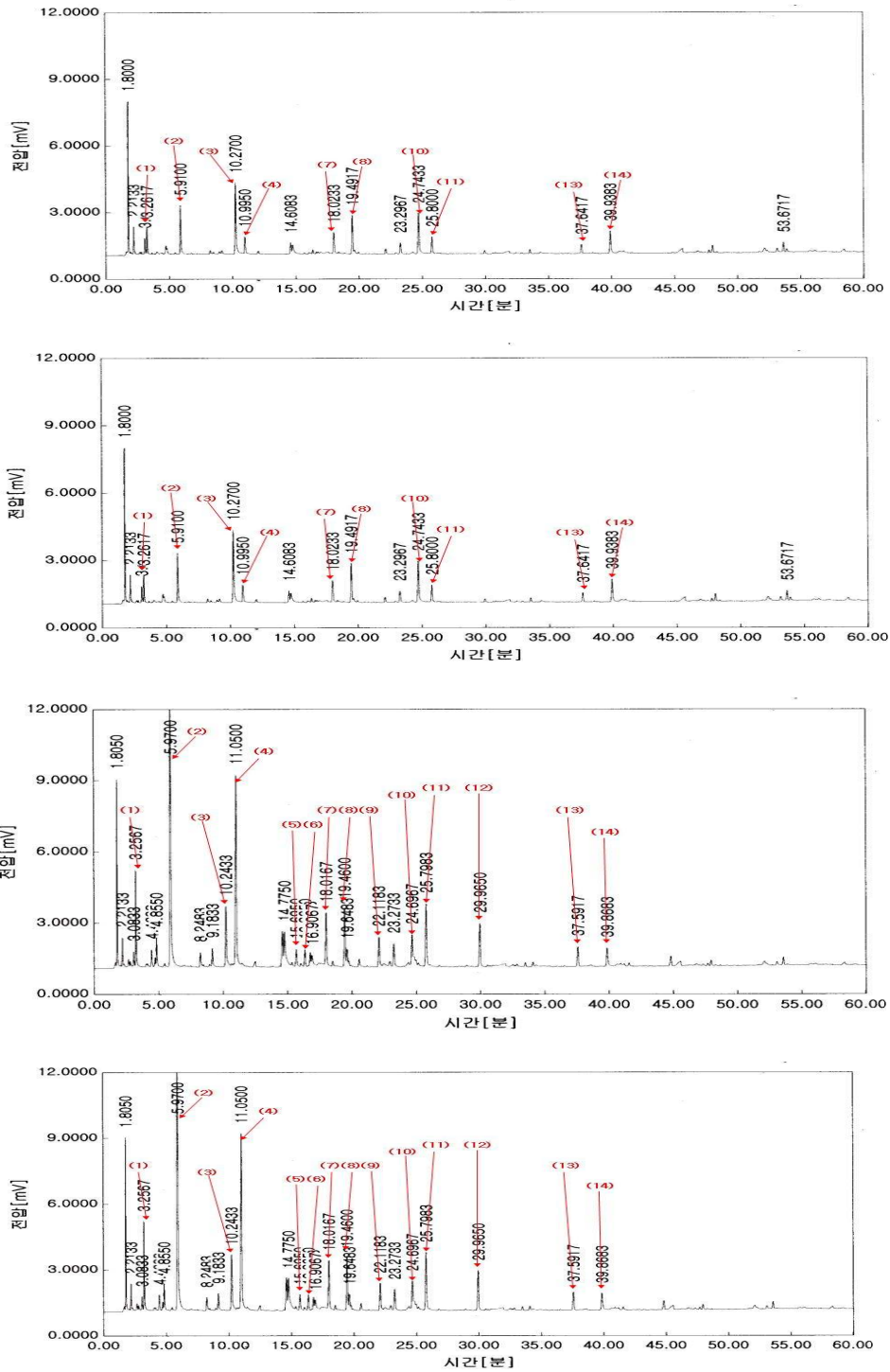


Fig 2-18. The GC chromatograms for volatile compounds in the non-treated milk (top) and milks treated with 0.01% meoru juice active fraction (middle) and with 0.01% ascorbic acid (bottom) after 60hr light illumination at 50C. (For the identification of the peaks, please refer to Fig 2-7.)

결과에서 보는 바와 같이 활성분획물은 동일한 양을 첨가할 경우 hexanal 생성이 거의 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 동일한 양의 ascorbic acid를 첨가한 실험군에 비하면 비교할 수 없을 정도의 강력한 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

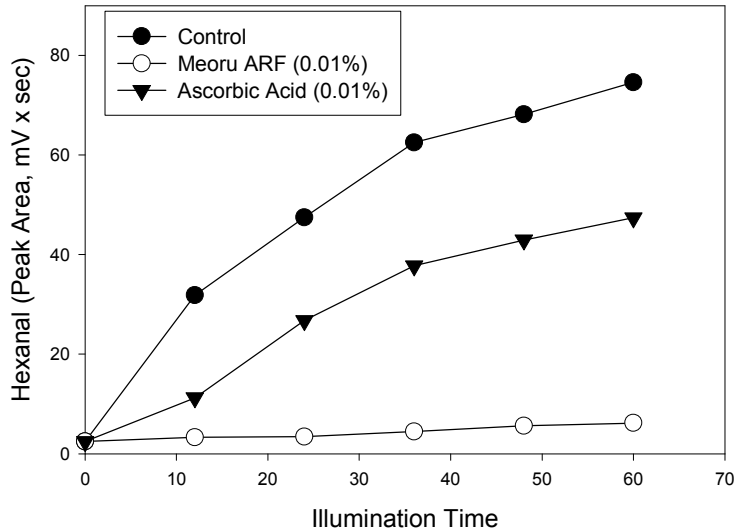


Fig 2-19. Effects of active Fraction (ARF) of Meoru juice on the hexanal formation in milk during light illumination

이러한 활성분획의 광산화억제 활성은 특히 우유의 토크페롤산화억제실험에서 더욱더 두드러지게 나타났다. Fig 2-20는 동일한 양의 머루주스의 활성분획과 아스코르브산의 첨가에 의한 우유중의 토크페롤 산화억제를 나타낸 것이다. 우유중의 토크페롤은 24시간 광조사후부터 거의 대부분 산화되었는데, 아스코르브산 첨가의 경우에는 12시간 광조사의 경우에만 약간 토크페롤산화를 억제할 뿐 그 이후 부터는 대조구와 유의적 차이를 나타내지 못하였다. 그러나 머루주스 활성분획물은 동일한 양을 처리할 경우 60시간 내내 토크페롤의 산화를 현격히 억제함을 보여주었다. 이것은 본 연구에서 얻어낸 활성분획물이 수용성항산화제중에 가장 강력한 일종한 산소소거제로 알려진 아스코르브산보다 월등히 뛰어난 활성을 갖는 물질을 확보하였음을 의미한다.

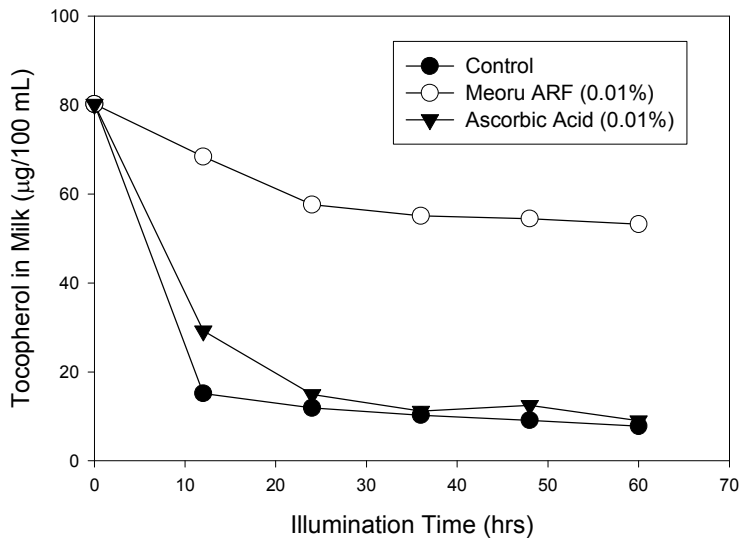


Fig 2-20. Effects of active Fraction (ARF) of Meoru juice on the tocopherol loss in milk during light illumination

9. 머루활성분획에서의 HPLC에 의한 안토시아닌 분리

1) HPLC 분리 최적 조건 확립

머루 주스에서 얻은 Fraction II 및 III에 함유된 안토시아닌을 분리하기 위하여 C18 column (Zorbax 300SB-C18, Agilent Technologies, Rising Sun, MD, USA)을 사용하여 522 nm에서 HPLC/DAD (SPD-M10A, Shimadzu, Japan) 분석을 실시하였다. Fig 2-21은 상온에서 분석한 HPLC chromatogram을 나타낸 것이다. 이러한 조건에서는 다양한 조건으로 용출 용매를 바꾸어 실험하여도 peak 3 과 4, 및 peak 5 와 6의 분리가 더 이상 잘 이루어질 수 없었다.

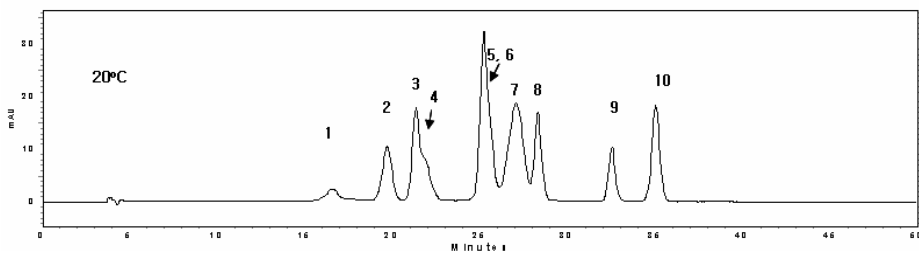


Figure 2-21. HPLC chromatogram of anthocyanins in Oll-Meoru grape juice performed at 20°C column oven temperature.

Fig. 2-22은 온도를 달리하여 분석한 머루주스의 안토시아닌 HPLC chromatogram을 나타낸 것이다. 그림 2-7에서 보는 바와 같이, 칼람의 온도를 달리하여 HPLC를 행한결과 온도가 증가할수록 피크 3과 4 및 피크 5와6이 분리가 점점 잘 이루어 지는 것을 확인하였다. 특히 40°C이상의 온도에서는 이들 피크가 완전히 분리하였다. 그러나 온도가 증가 할 수록 저온에서는 잘 분리되던 피크 7과 8이 40°C 이상에서는 분리가 되지 않았다. 따라서 최적분리조건이 35°C임을 확인하여, 추후 안토시아닌분리는 모두 35°C에서 행하였다.

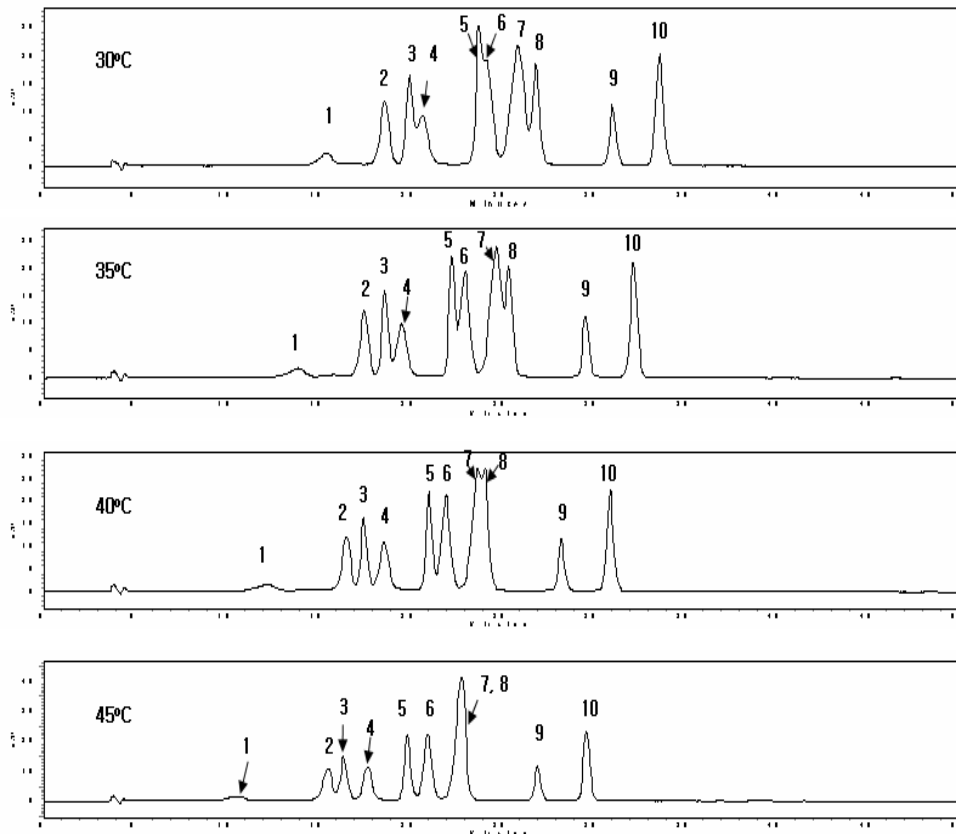


Fig. 2-22. HPLC chromatograms of anthocyanins in Oll-Meoru grape juice performed at different column oven temperature.

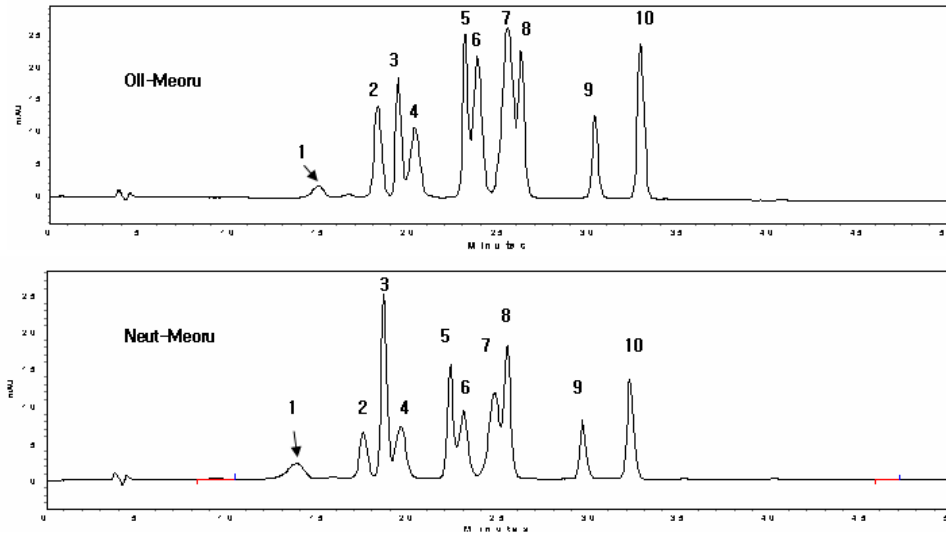


Fig. 2-23. HPLC chromatograms of anthocyanins in Oll-Meoru and Neut-Meoru grape juices performed at 35 °C column oven temperature.

2) 머루활성 분획의 안토시아닌 동정

Figure 2-23 은 올머루와 늦머루로부터 얻은 안토시아닌의 HPLC chromatograms 을 나타낸 것이다. Figure 2-24는 머루주스 안토시아닌 HPLC chromatogram상의 피크 1번에 대한 MS, MS/MS, and UV-Visible scanning spectrum을 나타낸 것이다. 피크 1의 MS spectrum의 결과에 의하면 분자 피크 m/z 627을 갖고 있으며, MS/MS spectrum결과 이 분자피크 m/z 627은 2개의 product ions인 465.2 ($[M - C_6H_{10}O_5]^+$) 와 303.1 ($[M - C_6H_{10}O_5 - C_6H_{10}O_5]^+$)로 쪼개지는 결과를 나타내었다. 이는 각각 delphinidin glucoside 와 delphinidine, 을 나타내는 피크들이다. The UV-visible of peak 1 결과는 a visible maximum at 521 nm을 가지며, $A_{440}/A_{vis-max}$ 의 값이 15.6% 이고 $A_{330}/A_{vis-max}$ 값은 15.7%를 나타내었다. 521 nm에서의 최대 흡광도는 B-ring이 3개의 hydroxyl group을 함유하는 것을 나타낸 값으로서, 피크 1의 안토시아닌은 delphinidin류의 분자구조를 갖는다는 것을 확인한 것이다 (Wang et al, 2003). $A_{440}/A_{vis-max}$ 및 $A_{330}/A_{vis-max}$ 값들은 각각 피크1 은 3,5-diglucoside 및 nonacylated anthocyanin구조를 갖는 다는 사실을 나타낸 것이다 (Rodriguez-Saona et al., 1998). 따라서, Peak 1은 dephinidin 3,5-diglucoside로

확인할 수 있었다 (Fig 2-25). Peak 2는 MS 분석상에서 m/z 611의 분자 이온을 갖 으며, MS/MS분석에서 이 분자이온이 두개의 product ions (m/z 449 and 287)으로 분리되었다 (Table 2). Peak 2에 대한 UV-visible spectrum은 513 nm에서 visible maxima를 보여서, B-ring의 분자구조가 cyanidin-like 구조를 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 A440/Avis-max 와 A330/Avis-max 값이 각각 18.3% and 10.9% 이어서, peak 2는 3,5 diglycoside이며 동시에 nonacylated anthocyanin임을 확인하였 다 (Table 2). 따라서 peak 2 는 cyanidin 3,5-diglucoside로 그 구조를 확인하였다. 피크 2의 분자구조는 추후 authentic sample을 이용하여 그 구조가 cyanidin 3,5-diglucoside임을 재차 확인하였다. Peak 3의 경우 분자 피크가 m/z 465이었으며, 그 MS/MS spectrum 은 한개의 product ion인 303 ($[M - C_6H_{10}O_5]^+$)을 나타내어, delphinidin 기본 구조를 갖고 있음을 확인하였다 (Fig 2-26). The UV-visible of peak 3은 521 nm에서 최대 흡광과장을 갖고 있었으며, 이 결과 또한 그 분자구조가 B-ring에 delphinidin의 기본구조를 갖고 있음을 재차확인 할 수 있었다 (Wang and others, 2003). The A440/Avis-max 와 A330/Avis-max값이 각각 29.7% 와 10.6%로 나타내어, 이는 3-glycoside 를 구조를 가지며 nonacylation형태를 갖는 다는 것을 의미하였다(Rodriguez-Saona et al., 1998). 따라서 Peak 3 는 delphinidin 3-gucoside 로 확인할 수 있었다 (Fig 2-27). 이 delphinidin 3-glucoside도 역시 추후 authentic sample과 HPLC상에서 retention time을 비교하여 재차 그 구조를 확인하였다. 이와 유사한 방법으로 HPLC,상의 모든 안토시아닌에 대한 분자구조를 확인하여 Table 2 에 나타내었다. Cyanidin 3-glucoside, petunidin 3-glucoside, pelagonidin 3-glucoside, 및 malvidin 3-glucoside은 추후에 commercially available anthocyanin standards를 이용하여 HPLC retention time을 비교함으로써 그 구조를 재차 확인하 였다. 한국에서 재배되는 울머루와 늦머루에대한 안토시아닌의 구조동정은 이루어 진 바가 없다.

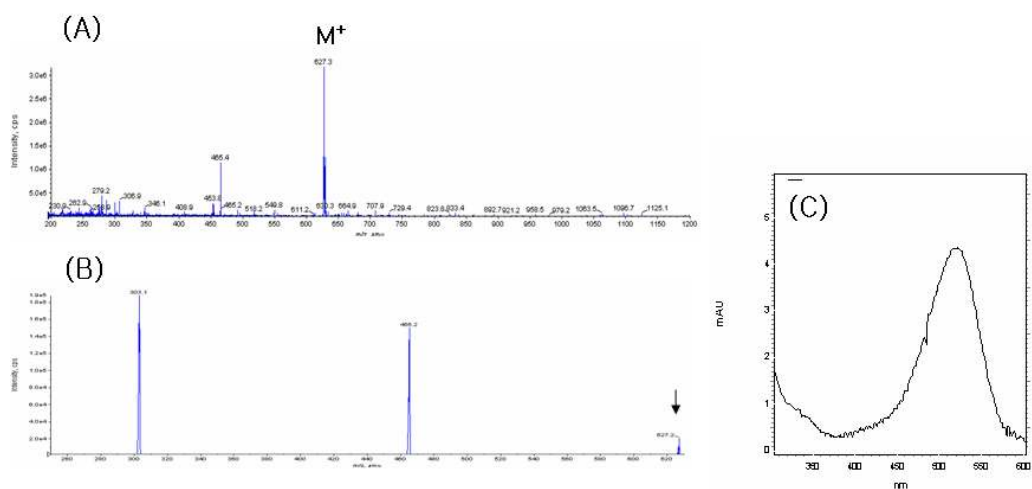
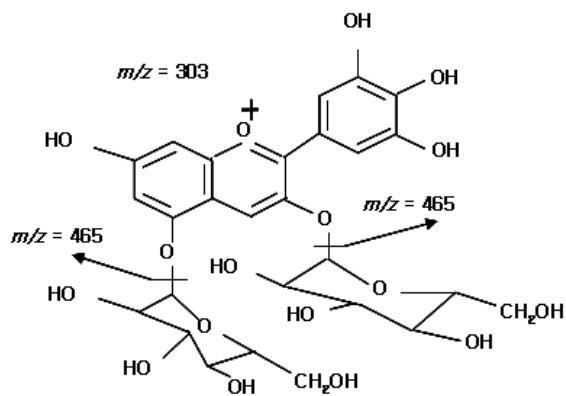


Figure 2–24. Spectra of MS (A), MS/MS (B), and UV–Visible scanning (C) of peak 1 in HPLC chromatogram of Meoru grape juices.



Delphinidin 3,5-diglucoside (MW = 627)

Fig. 2–25. Chemical structure of peak 1 in HPLC chromatogram of Meoru grape juices

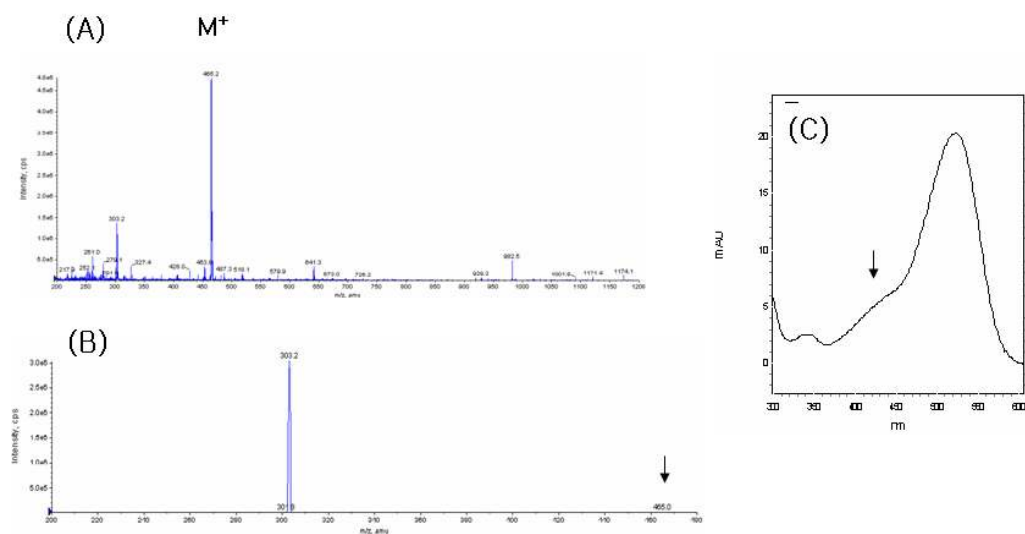
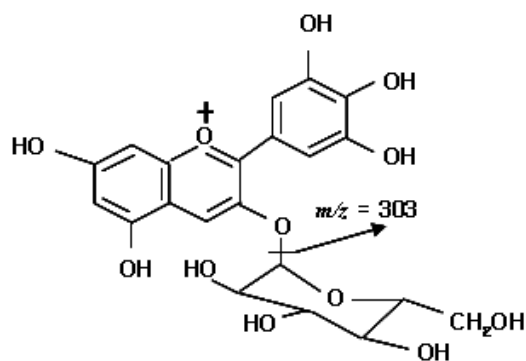


Figure 2-26. Spectra of MS (A), MS/MS (B), and UV-Visible scanning (C) of peak 3 in HPLC chromatograms of Meoru grape juice.



Delphinidin 3-glucoside (MW = 465)

Figure 2-27. Chemical structure of peak 3 in HPLC chromatogram of Meoru grape juices

Table 2. Identification of anthocyanins in Oll-Meoru and Neut-Meoru grape juices

Peak	RT	MS	MS/MS	UV/Visible Data			Identification
				λ max	A440/Avis-max	A330/Avis-max	
1	14.97	627	465/303	521	15.6	15.7	Dep 3,5-diglucoside
2	18.27	611	449/287	513	18.3	10.9	Cyd 3,5-diglucoside
3	19.41	465	303	521	29.7	10.6	Dep 3-glucoside
4	20.34	641	479/317	521	16.6	13.6	Ptd 3,5-diglucoside
5	23.14	449	287	514	33.0	11.9	Cyd 3-glucoside
6	23.84	625	463/301	513	19.2	19.4	Pdn 3,5-diglucoside
7	25.53	655	493/331	525	15.4	10.6	Mal 3,5-diglucoside
8	26.26	479	317	524	28.0	9.1	Ptd 3-glucoside
9	30.37	463	301	517	34.0	12.9	Pdn 3-glucoside
10	32.92	493	331	526	28.6	9.5	Mal 3-glucoside

Abbreviation: Cyd, cyanidin; Dep, delphinidin; Mvd, malvidin; Pdn, peonidin; Ptd, petunidin

Figure 2-28은 MBA(머루포도)주스에서 얻어진 안토시안 추출물의 HPLC chromatogram 을 나타낸 것이다. Table 2 는 머루포도 안토시안 추출물에서 얻어진 HPLC peak 동정에 대한 요약을 나타낸 것이다. 표 2에서 보는바와 같이, MBA 안토시안 피크 3, 5-10은 머루즈스의 그것들과 동일하였다. Figure 2-29은 MBA주스 피크 10에 대한 MS, MS/MS, UV-Visible Spectrum을 보여준 것이다. MS spectrum상에서 이온 피크 m/z 493을 나타내었고, MS/MS spectrum에서는 분자이온 493이 malvidin 분자구조를 갖는 한개의 product ion 331($[M - C_6H_{10}O_5]^+$)으로 분해되었다. UV-visible spectrum에서, peak 10 은 526 nm에서 최대 흡광을 갖고 있으며, A440/Avis-max 값은 28.2%이었고, A330/Avis-max 은 9.1%로 나타내어 아실화되지 않는 3-glycoside임을 확인할 수 있었다(Fig 2-29). 따라서, 피크 10은 malvidin

3-glucoside로 그 분자구조를 동정하였다. 유사한 방법으로 peaks 3, 5-9들은 각각 dephinidin 3-glucoside, cyaniding 3-glucoside, peonidin 3,5-diglucoside, malvidin 3,5-diglucoside, petunidin 3-glucoside, and peonidin 3-glucoside으로 확인하였다 (Table 3). MBA주스에 함유된 안토시아닌 피크 3, 5, 8-10은 추후 authentic anthocyanins을 이용하여 HPLC상에서 retention times를 비교하여 그 구조를 다시 한번 확인하였다.

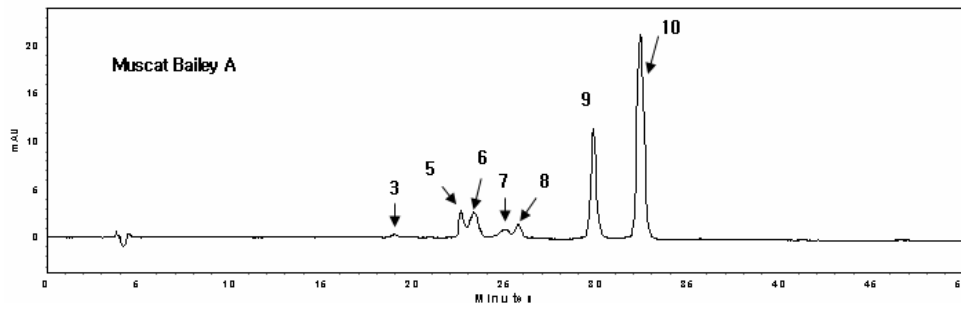


Figure 2-28. HPLC chromatogram of anthocyanins in Muscat Bailey A grape juice performed at 35 °C column oven temperature.

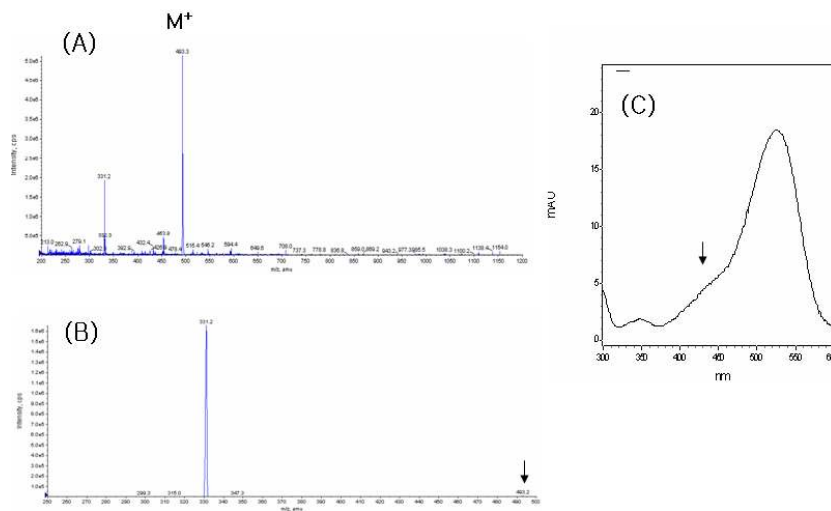


Figure 2-29. Spectra of MS (A), MS/MS (B), and UV-Visible scanning (C) of peak 10 in HPLC chromatograms of Muscat Bailey A grape juice.

Table 3. Identification of anthocyanins in Muscat Bailey A grape juice

Peaks	RT	MS	MS/MS	UV/Visible Data			Identification
				λ max	A440/Avis-max	A330/Av is-max	
3	18.94	465	303	521	–	–	Dep 3-glucoside
5	22.60	449	287	518	–	–	Cyd 3-glucoside
6	23.30	625	463/301	515	–	–	Pdn 3,5-diglucoside
7	24.94	655	493/331	521	–	–	Mal 3,5-diglucoside
8	25.70	479	317	525	–	–	Ptd 3-glucoside
9	29.80	463	301	515	33.9	11.8	Pdn 3-glucoside
10	32.38	493	331	526	28.2	9.1	Mal 3-glucoside

Abbreviation: Cyd, cyanidin Dep, delphinidin; Pdn, peonidin; Mvd, malvidin; Ptd, petunidin

Figure 2-30은 Campbell Early 포도 주스의 안토시아닌에 대한 HPLC chromatogram을 나타낸 것이다. Table 4는 이들 각각의 피크에 대한 안토시아닌분자 동정에 대한 요약을 표기한 것이다. Campbell Early 포도 주스의 HPLC 피크 2-7 및 9의 MS 와 MS/MS data들은 각각 머루포도주의 그것들과 동일하였다 (Table 4). 그러나 Campbell Early grape juice 안토시아닌 피크 11-16 머루주스 및 머루포도 주스에서는 발견되지 않은 것들이었다. Figure 2-31 는 피크 13에 대한 MS, MS/MS, UV-Visible scanning spectra를 보여주는 것이다. 피크 13에 대한 MS spectrum에서는 분자피크 m/z 757을 확인하였고, MS/MS spectrum 에서는 분자피크 m/z 757 이 3개의 product ions인 m/z 595 ($[M - C_6H_{10}O_5]^+$), 449 ($[M - C_{15}H_{16}O_7]^+$), and 287 ($[M - C_{15}H_{16}O_7 - C_6H_{10}O_5]^+$)로 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 이들 product ions 들은 각각 cyanidin 3-coumaroylglucoside, cyanidin 5-glucoside, and cyanidin을 나타내는 것이다. 피크 13에 대한 UV-visible spectrum 에서는 519 nm에서 visible maximum을 가지며, A440/Avis-max 값이 17.9%이고 A330/Av is-max 값이 51.6%. A440/Avis-max 및 A330/Av is-max 값들은 각각 3,5-diglycoside와 아실화그룹을 분자내 함유하고 있다는 것을 의미한다 (Fig 2-31). 따라서 Peak 13 은 cyanidin 3-(*p*-coumaroyl)glucoside 5-glucoside로 확인 할 수 있었다 (Figure 2-31). 유사한 방법으로, 피크 11, 12, 14-16들을 Table 4에 보는 바

와 같이 동정하였다.

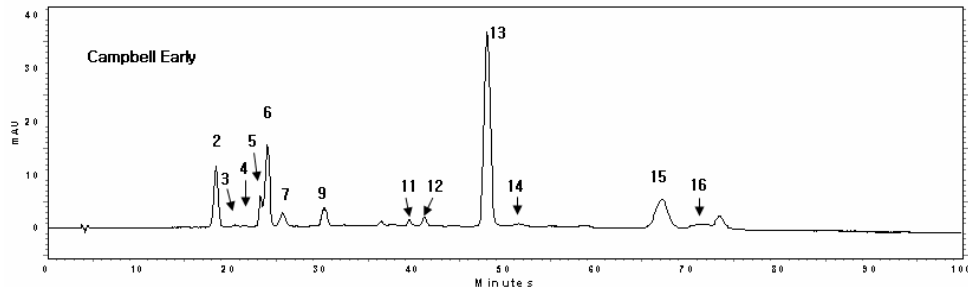


Figure 2-30. HPLC chromatogram of anthocyanins in Campbell Early grape juice performed at 35 °C column oven temperature.

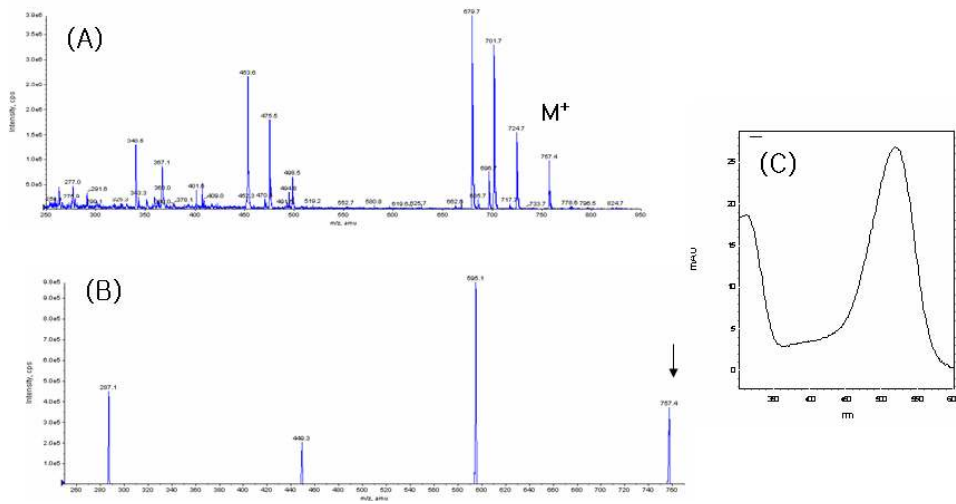


Figure 2-31. Spectra of MS (A), MS/MS (B), and UV-Visible scanning (C) of peak 13 in HPLC chromatograms of Campbell Early grape juice.

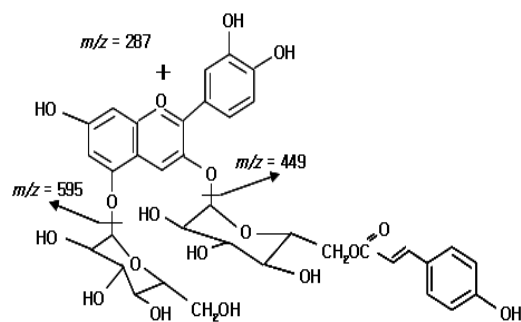


Figure 2–32. The chemical structure of cyanidin 3-(*p*-coumaroyl) glucoside 5-glucoside with its MS and MS/MS spectra pattern

Table 4. Identification of anthocyanins in Campbell Early grape juice

Peak	RT	MS	MS/MS	UV/Visible Data			Identification
				λ max	A440/Avis-max	A330/Avis-max	
2	18.41	611	449/287	513	18.9	21.9	Cyd 3,5-diglucoside
3	20.53	465	303	521	–	–	Dep 3-glucoside
4	21.44	641	449/287	521	–	–	Ptd 3,5-diglucoside
5	23.30	449	287	515	–	–	Cyd 3-glucoside
6	24.00	625	463/301	512	17.9	15.5	Pdn 3,5-diglucoside
7	25.71	655	493/331	525	–	–	Mvd 3,5-diglucoside
9	30.26	463	301	515	–	–	Pdn 3-glucoside
11	39.60	773	611/449/287	525	–	–	Cyd 3-diglucose 5-glucoside
12	41.22	773	611/465/303	525	–	–	Dep-3-(<i>p</i> -coumaroyl) glucoside 5-glucoside
13	48.03	757	595/449/287	519	17.9	51.6	Cyd 3-(<i>p</i> -coumaroyl) glucoside 5-glucoside
14	51.55	787	625/479/317	–	–	–	Ptd 3-(<i>p</i> -coumaroyl) glucoside 5-glucoside
15	67.18	771	611/465/303	522	15.7	65.4	Pdn-3-(<i>p</i> -coumaroyl) glucoside 5-glucoside
16	71.64	801	639/493/331	525	20.4	68.5	Mvd 3-(<i>p</i> -coumaroyl) glucoside 5-glucoside

Abbreviation: Cyd, cyanidin; Dep, delphinidin; Pdn, peonidin; Mvd, malvidin; Ptd, petunidin

3) HPLC법에 의한 포도주스의 안토시아닌 함량 측정

Table 5는 포도주스에 함유된 개별 및 총 안토시아닌 함량을 나타내었다. 총 안토시아닌 함량은 포도종류에 따라서 상당한 차이를 나타내었다. 늦머루 주스 (1043.5 mg/mL juices)는 가장 많은 total anthocyanins 함량을 보였고, 이어서 올머루주스 (997.7 mg/mL juices), MBA주스 (390.2 mg/mL juices), 및 Campbell Early주스 (183.9 mg/mL juices)순서였다. 올머루 와 늦머루는 동일한 종류의 안토시아닌으로 구성되어있으나, 그 각각의 함량구성은 판이하게 달랐다. 올머루 주스에서는, malvidin 3,5-diglucoside (236.7 mg/mL)가장 많이 함유된 안토시아닌이었고, 이어서 peonidin 3,5-diglucoside (227.7 mg/mL), delphinidin 3-glucoside (113.5 mg/mL), 그리고 malvidin 3-glucoside (99.9 mg/mL)순서이었다. 그러나 늦머루 포도 주스에서는, delphinidine 3-glycoside함량이 가장 높아서, 전체 안토시아닌 함량의 23.9%를 차지하였다. 올머루와 늦머루는 Korean native wild grape (*Vitis coignetiae*) 와 a native American grape Concord (*Vitis labrusca*)의 교배종이다. 일본의 wild grape species of *Vitis coignetiae* 에서는 malvidin 3,5-diglucoside의 함량이 가장 높다는 사실은 보고 된바 있고(Okamoto et al, 2002; Igarachi and Inagaki, 1991), 또 다른 한국 야생머루인 *Vitis amurensis Ruprecht* 에 함유되어 있는 안토시아닌에 대한 연구결과는 보고된 바 있으나 (Hwang and Ahn, 1975a,b), 한국야생종의 교배종인 머루에 대한 연구결과는 이전에 보고된 바 없다.

MBA 포도주스에서는 Malvidin 3-glucoside가 가장 많이 함유되어 있어서 총 안토시아닌 함량에 43.1%에 이르렀다. 두 번째 많이 들어 있는 Peonidin-3-glucoside 은 총 안토시아닌의 28.8%이었다. *Vitis labrusca* 와 *V. vinifera*의 교배종인 Campbell Early 주스에는 안토시아닌이 nonacylated- (37.25%)과 acylated-anthocyanins (62.75%)로 구성되어 있었다 (Table 4). Campbell Early 포도 주스에서는, cyanidin 3-(*p*-coumaroyl)glucoside 5-glucoside이 가장 많이 함유되어 있는 안토시아닌이었고, 이어서 peonidine 3-(*p*-coumaroyl)glucoside 5-glucoside, peonidin 3,5-diglucoside의 순이었다. 이 세종류의 anthocyanin류가 전체 안토시아닌 함량에 76.0를 차지하였다.

Table 5. Contents of anthocyanins in different grape juices

Peak	Anthocyanins	Anthocyanin Contents (mg/mL Juice)			
		Oll Meoru	Neut Meoru	M.B.A.	Campbell Early
1	Dep 3,5-diG	40.0 ± 6.6	76.7 ± 1.4		
2	Cyd 3,5-diG	50.9 ± 0.7	39.5 ± 1.3		9.7 ± 1.0
3	Dep 3-G	113.5 ± 2.6	250.2 ± 2.7	7.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1
4	Ptn 3,5-diG	54.6 ± 1.8	57.5 ± 1.2		0.5 ± 0.1
5	Cyd 3-G	49.4 ± 1.3	51.7 ± 1.5	11.6 ± 0.3	2.7 ± 0.1
6	Pdn 3,5-diG	227.7 ± 10.2	161.1 ± 2.1	64.0 ± 1.2	40.9 ± 4.8
7	Mal 3,5-diG	236.7 ± 8.4	167.4 ± 1.7	17.6 ± 1.1	6.4 ± 0.6
8	Ptd 3-G	57.3 ± 2.6	74.1 ± 1.5	8.9 ± 0.4	
9	Pdn 3-G	67.7 ± 1.9	70.4 ± 1.6	112.4 ± 1.4	6.9 ± 0.5
10	Mal 3-G	99.9 ± 2.9	94.9 ± 1.5	168.3 ± 2.8	
11	Cyd 3-diG 5-G				1.4 ± 0.1
12	Dep 3-CG-5-G				6.8 ± 1.7
13	Cyd 3-CG-5-G				55.2 ± 5.3
14	Ptd 3-CG-5-G				1.7 ± 0.0
15	Pdn 3-CG-5-G				43.6 ± 5.6
16	Mal 3-CG-5-G				6.7 ± 0.9
	Total Anthocyanin	997.7	1043.5	390.2	183.9

10. 안토시아닌의 일중항 산소 소거능력 측정

머루주스의 활성분획에서는 안토시아닌이 다량 함유되어 있었고, 그림 2-9의 연구 결과에서 보는 바와 같이 식품성분의 안토시아닌함량과 일중항 산소소거능력과는 상관관계가 높은 것으로 보아 안토시아닌이 머루주스의 활성성분중 활성물질로 판단된다. 따라서 이와 같은 사실을 확인하기 위하여 안토시아닌의 대표적인 물질인 cyanidin 3-glucoside 0.05 μmol 을 이용하여 TMPD-methylene blue 시스템에서 ESR분석을 통하여 cyanidin 3-glucoside의 일중항산소소거능력을 측정하였고 동일한 조건하에서 여러농도의 ascorbic acid와 그 활성을 비교하였다(Fig 2-33). ESR 결과에 따르면, 0.05 μmol C3G는 일중항산소 소거활성이 ascorbic acid 1.0 μmol 과 거의 동등하였다. 이 결과는 C3G의 일중항 산소 소거능력이 ascorbic acid에 비하여 약 2배 정도 강하다는 것을 나타낸 것이었다.

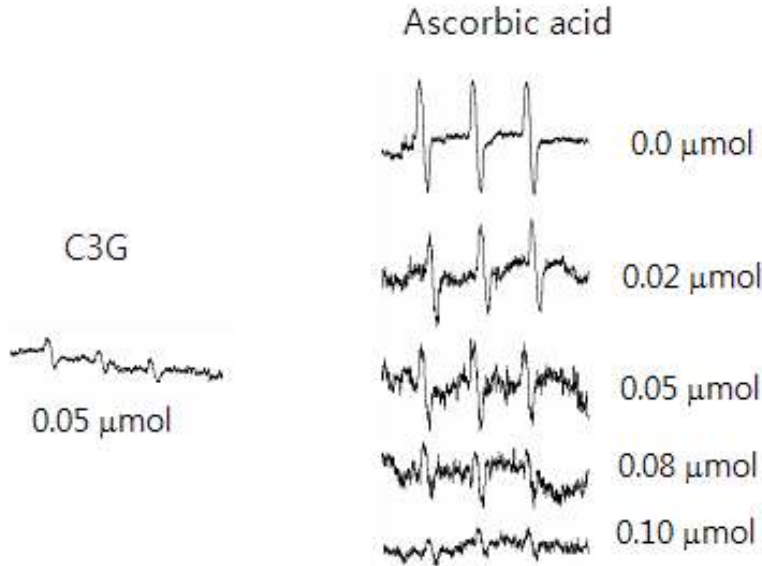


Figure 2-33. ESR spectra of TAN radical after light illumination of a TMPO-methylene blue solution as affected by cyanidin 3-glucoside and ascorbic acid

Table 5. Effects of cyanidin 3-glucoside and ascorbic acid on the rubrene oxidation induced by singlet oxygen in a micro-emulsion system of H_2O_2/MoO_4^{2-}

	0 min	40 min	% Inhibition
Control	0.631	0.042	
1.0 mmol C3G	0.642	0.260	35.15%
2.5 mmol Ascorbic Acid	0.625	0.253	37.35%

이러한 cyanidin 3-glucoside의 일중항 산소 소거활성을 화학적으로 유도된 일중항 산소에 의한 rubrene 산화시스템에서 확인한 결과 1.0 mmol cyanidin 3-glucoside가 2.5 mmol ascorbic acid와 동일한 일중항 산소 소거능력이 있음을 확인하였다. 이결과에 의하면 C3G의 활성이 ascorbic acid에 비하여 2.5배 강한 것을 의미하여, 위의 ESR 결과와 일치하였다. 안토시아닌이 일중항 산소를 소거하는 능력이 있다는 사실은 이미 밝혀진 바 있으나, 안토시아닌의 일중항 산소 소거활성이 아스코르브산보다 월등하다는 사실은 이전에 알려진 바 없었다.

제 3 세부과제 - 안토시아닌의 일증항산소에 대한 안정성

제 1 절 연구재료

딸기, 오디, 머루는 각각 세미원푸드, 마이산 오디 영농 법인, 봉화산머루 농장에서 구입하였다. Riboflavin과 sodium azide (NaN_3)는 Sigma Co. 와 Shinyo Co. 에서 각각 구입하여 실험에 이용하였으며, 유리컬럼 크로마토그래피를 위한 Amberlite XAD-7 (particle size 20-60 mesh)은 Sigma Co. 에서 구입하였다. Acetonitrile, water, phosphoric acid, acetic acid는 HPLC용(J.T. Bakers)으로 구입하여 실험에 이용하였고 그 외 시약은 모두 일급이었다.

제 2 절 연구방법

1. 식품재료에 존재하는 안토시아닌의 추출 및 정제

오디와 머루의 안토시아닌은 Kim HB (2003)과 Yoon JM 등 (1998)의 방법을 변형하여 다음과 같이 추출, 정제하였다.

동결건조 오디 또는 머루 40 g은 1% HCl-methanol 400 mL과 혼합하고 4°C 암소에서 24시간 교반한 뒤 Whatman 여과지 (No. 1)로 여과하였다. 잔사는 동일한 방법으로 다시 추출하였고 여과액은 혼합하여 38-40°C에서 감압농축하였다. 지질성분을 제거하기 위해 감압농축한 추출액은 에틸에테르와 헥산의 혼합용매 (1 : 6, v/v)로 2회 세척하였으며, 이를 다시 감압농축하여 남아있는 용매를 모두 제거하여 당, 유기산 및 색소 추출물을 얻었다. 오디 또는 머루의 당, 유기산 및 색소 추출물은 유리컬럼 크로마토그래피를 이용한 Yoon JM 등 (1998)의 방법을 변형하여 정제된 안토시아닌을 얻었다. 유리컬럼 (2.5 cm x 30 cm)을 Amberlite XAD-7 으로 충전하고 3차 증류수 1000 mL로 불순물을 제거한뒤, 1% HCl-methanol에 녹인 오디 또는 머루의 당 및 색소 추출물 2 g을 컬럼에 주입하였다. 3차 증류수 1000 mL를 사용하여 당류, 유기산, 비흡착 색소 등을 컬럼으로부터 제거한 뒤, 1% HCl-methanol을 흘려주면서 컬럼에 흡착된 색소를 모두 용출시켰다. 1% HCl-methanol로 용출된 안토시아닌 용

출액은 38-40°C에서 감압농축하여 용매를 모두 제거하여 당류, 유기산 및 다른 색소가 제거된 정제 안토시아닌을 얻었다.

2. 일중항산소의 광화학적 발생

실험 시스템에서의 일중항산소의 발생은 빛 존재 하에서의 대표적 수용성 감광체인 riboflavin의 분해 및 일중항산소 소거제인 sodium azide의 분해에 의한 두가지 방법으로 평가하였다 (EdTech 2007, Kristensen 등 2001, Huang 등 2004).

물과 acetonitrile의 혼합용매 (1 : 9, v/v)에 riboflavin을 10 ppm 농도가 되도록 용해시키고 5 mL씩 50 mL vial에 넣고 산소를 불어넣었다. Vial을 8시간동안 Fluorescent waterproof light가 설치된 4°C light box (Figure 3-1)에 넣어 일중항산소를 발생시켰다. riboflavin의 함량은 UV/Visible spectrophotometer를 사용하여 440 nm의 흡광도로 측정하였다 (Huang 등 2006).

실험시스템에서의 일중항산소의 발생은 빛과 riboflavin 존재하에서 대표적인 일중항산소 소거제인 sodium azide의 분해에 의해 평가하였다 (EdTech 2007, Huang 등 2004). 물에 riboflavin (0, 0.2 mM)을 용해시키고 2 mL씩 50 mL vial에 넣고 테프론으로 코팅된 septa와 알루미늄 캡으로 마개를 막았다. Vial을 0, 30, 60분동안 위와 동일한 4°C light box에 넣어 일중항산소를 발생시켰다. 일중항산소 소거제인 sodium azide (20 mM) 2mL을 주사기로 넣고 1분뒤 0.1 N HCl 0.2 mL과 3 mM FeCl₃ 0.2 mL을 차례로 넣어 발색시켰다. Sodium azide의 함량은 UV/Visible spectrophotometer를 사용하여 325 nm의 흡광도로 측정하였다.

3. 광화학적으로 생성된 일중항산소에 의한 안토시아닌의 분해

빛과 riboflavin의 존재하에서 만들어진 일중항산소에 의한 안토시아닌의 안정성을 검토하였다. 물과 acetonitrile 혼합용매 (1:9, v/v)에 riboflavin과 안토시아닌을 각각 10 ppm과 200 ppm 농도로 녹여 50 mL vial에 5 mL씩 넣고 산소를 불어넣은 뒤 4°C light box에서 12시간 동안 두면서 안토시아닌의 분해 정도를 분석하였다. 안토시아닌의 함량은 UV/Visible spectrophotometer로 520 nm에서의 흡광도로 확인하였으며 이때 안토시아닌의 발색을 위해 0.2 mL의 1% HCl-methanol을 첨가하였다.



Figure 3-1. Light box for singlet oxygen generation

4. 딸기잼 제조과정 중 안토시아닌의 안정성

안토시아닌을 많이 함유한 식품 중 딸기로 잼을 만드는 과정 중 일중항산소가 안토시아닌의 안정성에 미치는 영향을 다음과 같은 방법으로 평가하였다.

(1) 딸기잼의 제조

냉동딸기를 grinder로 마쇄한 후 딸기 중량의 65%에 해당하는 sucrose (0.047 mole)와 riboflavin (10 ppm)을 넣고 유리tube (2.8 cm x 15.5 cm)에 2.5 g 씩 담았다. 주입구를 막은 유리관은 각각 25°C, 60°C water bath에 0, 1, 2 시간동안 넣어 자연광은 차단한 채 딸기잼을 만들었다. 이때 반응 system에 가해지는 빛의 조절은 자연광을 차단하고 방수가 되는 형광등을 부착한 cover (Figure 3-2)를 사용하였다. 또한 sucrose 대신 glucose와 fructose를 각각 0.047 mole씩 딸기에 첨가하여 동일한 방법으로 잼을 만들어 시료로 이용하였다.

(2) 딸기잼에서의 안토시아닌 추출 및 분석

딸기잼에서의 안토시아닌 추출은 Ahmed 등 (2004)의 방법을 수정하여 수행하였다. (1)에서 제조한 딸기잼을 4°C 냉장고에서 20분간 식힌 후, 0.1 N HCl (5 mL), acidified ethanol (25 mL, 95% ethanol : 1.5 N HCl = 85 : 15, v/v), ethanol (20 mL)을 순서대로 넣고 유리병으로 섞은 뒤 Whatman 여과지 (No. 1)로 여과하였다. 여액은 38~40°C 진공증발기로 20분간 용매를 제거하고 5 mL volumetric flask로 옮

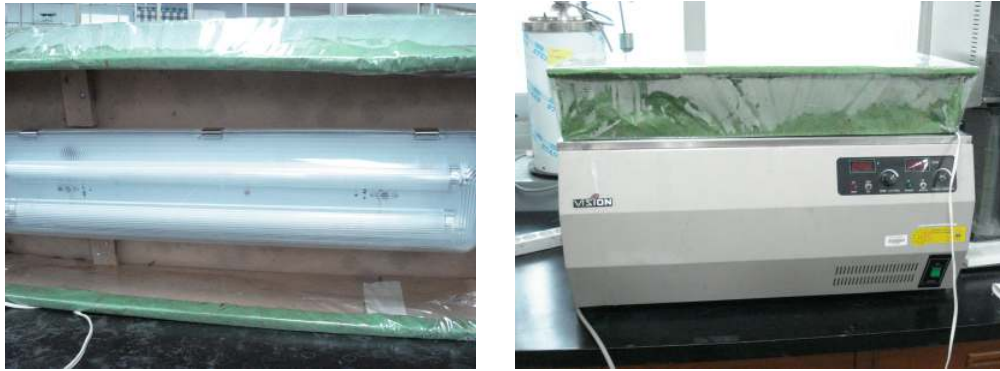


Figure 3-2. Apparatus for strawberry jam manufacturing with singlet oxygen generation

겨 ethanol로 정용한 뒤 syringe (micro syringe; Hamilton Co.)로 여과하여 HPLC에 주입하여 분석하였다 (Kim HB 2003). Symmetry C₁₈ 컬럼 (4.6 mm x 240 mm, Waters)이 장착된 영린 HPLC를 사용하였으며 용매는 water : acetonitrile : acetic acid : phosphoric acid (81.7:8.4:8.4:1.5, v/v/v/v)을 사용하여 0.5 mL/ min의 속도로 흘려 주었으며 538 nm에서의 흡광도로 안토시아닌을 정량하였다. 딸기잼 안토시아닌의 정량은 표준품으로 작성한 standard curve (pelargonidin-3-glucose, mg/g = $0.2 \times 10^6 X + 4.7786$, $R^2=0.9990$; cyanidin-3-glucose, mg/g = $0.6 \times 10^6 X - 37.799$, $R^2=0.9995$)를 이용하였다.

5. 머루 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성 측정

빛과 riboflavin의 존재하에서 만들어진 일중항산소에 의한 머루 안토시아닌의 안정성을 평가하였다. 머루에서 추출한 안토시아닌 (1000 ppm)을 물에 녹인 뒤 riboflavin (0, 10 ppm) 또는 sodium azide (0, 1000 ppm)를 녹여 50 mL vial에 5 mL씩 넣고 산소를 불어넣은 뒤 4°C light box (1700 lux)에서 8시간 동안 두면서 안토시아닌의 분해 정도를 분석하였다. 대조군 시료는 호일로 감싸 빛을 차단해주었으며 모든 시료는 2회 반복하도록 준비하였다. 안토시아닌의 함량은 UV/Visible spectrophotometer로 520 nm에서의 흡광도로 확인하였으며 이때 안토시아닌의 발색을 위해 0.5 mL의 1% HCl-methanol을 첨가하였다.

6. 저당 머루잼 제조과정 중 안토시아닌의 안정성

(1) 머루잼의 제조 및 물리적 특성 평가

머루잼은 Kim MY와 Chun SS의 방법 (2000)을 참고하여 제조하였다. 믹서(model No. 31BL92; Waring, Japan)로 머루를 3분간 갈아 조리용 체에 걸러 껍질과 씨를 제거한 후 설탕, 포도당, 및 과당을 각각 머루즙 중량의 65%, 80%, 90%, 또는 100%에 해당하는 1.89 M, 2.34 M, 2.63 M, 또는 2.92 M의 농도로 넣고 25°C, 60°C, 또는 90°C에서 3-4시간 가열하면서 머루잼을 제조하였다. 앞에서 얻어진 결과를 바탕으로 머루잼 제조에 필요한 당 농도의 50%에 해당하는 농도로 설탕, 포도당, 및 과당을 첨가하여 저당 머루잼을 만들었다. 이때 당의 함량감소로 인한 머루잼의 점도 저하는 펙틴을 첨가함으로써 보충하였다. 즉, 머루 과육에 1.46 M의 설탕을 넣고 펙틴을 0%, 0.3%, 0.5%, 0.8%, 또는 1%로 각각 첨가한 뒤 90°C에서 4시간 동안 가열하여 저당 머루잼을 제조하였다. 포도당 및 과당을 첨가한 머루잼도 설탕을 첨가했을 때와 동일한 방법으로 제조하였다. 모든 시료는 두 번 반복실험을 할 수 있도록 준비하였다.

머루잼의 점도는 실온에서 Viscotester (VT-04; Rion Co., LTD., Tokyo, Japan)로 Rotor No. 3을 이용하여 측정하였고, 수분함량과 pH는 각각 적외선 수분 측정계 (HA-300; Precisa Instruments AG, CH-Dietikon, Switzerland)와 pH meter (P25; iSTEK Inc., Korea)로 측정하였다.

(2) 일중항산소에 대한 저당 머루잼 안토시아닌의 안정성 측정

추출 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성이 평가된 머루로 저당잼을 만드는 과정 중 일중항산소가 안토시아닌의 안정성에 미치는 영향을 다음과 같은 방법으로 평가하였다.

머루즙에 sucrose (1.46 M), 펙틴 (0.5%), 그리고 riboflavin (0.2 mM)을 넣고 유리 tube (2.8 cm x 15.5 cm)에 2 g 씩 담았다. 주입구를 막은 유리관은 90°C water bath에 0, 0.5, 1, 2, 3 시간동안 넣어 자연광은 차단한 채 머루잼을 만들었다. 이때 반응 system에 가해지는 빛의 조절은 자연광을 차단하고 방수가 되는 형광등을 부착한 cover를 사용하였다. 또한 sucrose 대신 glucose와 fructose 역시 펙틴 (0.8%)과 riboflavin을 넣고 동일한 방법으로 잼을 만들어 시료로 이용하였다.

머루잼에서의 안토시아닌 추출은 Ahmed 등 (2004)의 방법을 수정하여 수행하였

다. 위에서 제조한 머루잼을 4°C 냉장고에서 20분간 식힌 후, 0.1 N HCl (5 mL), acidified ethanol (25 mL, 95% ethanol : 1.5 N HCl = 85 : 15, v/v), ethanol (20 mL)을 순서대로 넣고 유리병으로 섞은 뒤 Whatman 여과지 (No. 1)로 여과하였다. 여액은 38~40°C 진공증발기로 20분간 용매를 제거하고 5 mL volumetric flask로 옮겨 ethanol로 정용한 뒤 syringe (micro syringe; Hamilton Co.)로 여과하여 HPLC에 주입하여 안토시아닌을 분석하였다 (Manhita 등 2006). Atlantis dC₁₈ 컬럼 (4.6 mm x 250 mm, Waters)이 장착된 영린 HPLC를 사용하였으며 기울기 용매 시스템을 사용하였다. 용매 A는 acetonitrile (100)이고 용매 B는 acetonitrile (2.5) : formic acid (5) : 물 (92.5)의 혼합용매로 Table 3-1과 같이 흘러 주었으며 538 nm에서의 흡광도로 안토시아닌을 정량하였다. 머루잼 안토시아닌의 정량은 표준품으로 작성한 standard curve (cyanidin-3,5-diglucose, peak area = 22.16 x ppm - 25.93, R²=0.9970; delphinidin-3-glucose, peak area = 83.75 x ppm + 323.4, R²=0.9690; malvidin-3,5-diglucose, peak area = 76.70 x ppm - 25.17, R²=0.9960; cyanidin-3-glucose, peak area = 153.3 x ppm + 17.37, R²=0.9990; malvidin-3-glucose, peak area = 86.72 x ppm - 15.76, R²=0.9910)를 이용하였다.

Table 3-1. Gradient program for anthocyanin determination

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Solvent A	Solvent B
0	0.8	0	100
10	0.5	20	80
40	0.5	100	0

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 식품속 안토시아닌의 추출 및 정제

동결건조 오디 40 g에서 추출한 당, 유기산 및 색소 추출물은 31.23 ± 0.15 g이었다. 이 추출물 0.5 g에서 당 및 유기산을 제거하고 얻은 정제된 안토시아닌은 0.18 ±

0.04 g이었고 이는 동결건조 오디의 0.28%이었다. Kim HB (2003)은 오디는 품종에 따라 다르지만 0.3% - 0.9%의 안토시아닌을 함유한다고 보고하였다.

동결건조 머루 40 g에서 추출한 당, 유기산 및 색소 추출물은 28.80 ± 0.2 g으로 동결건조 머루의 72%였다. 이 추출물 0.5 g에서 당 및 유기산을 제거하고 얻은 정제된 안토시아닌은 475.0 mg/kg 이었다. Hwang IK and Ahn SY (1975)은 머루의 안토시아닌 함량은 359 mg/kg 이라고 보고하였다.

2. 일중항산소의 광화학적 발생

(1) Riboflavin의 분해를 통한 일중항산소의 확인

물과 acetonitrile의 혼합용매 (1 : 9, v/v)에서 빛 존재하에 8시간동안 저장한 riboflavin (10 ppm)의 분해는 Figure 3-3과 같다. 10 ppm의 riboflavin은 440 nm에서 0.34의 흡광도를 보였으나 8시간동안 빛을 쬐어준 후 0.14로 감소하였다. 이것은 빛의 존재하에서 riboflavin이 분해되었음을 의미한다. riboflavin의 분해는 Furuya 등(1984)이 보고한 분해속도가 빠른 초기단계와 느린 후기단계의 two-phase mechanism을 따랐다. 그러나 singlet oxygen quencher인 sodium azide가 함께 존재하였을때 8시간 조사후 반응물에서의 riboflavin의 흡광도는 0.16이었으며 8시간의 조사시간동안 sodium azide가 함께 있는 시료의 흡광도에 비해 낮은 값을 보였다. 이는 빛의 존재하에서 riboflavin의 분해에 일중항산소가 개입하고 있음을 분명히 보여준다.

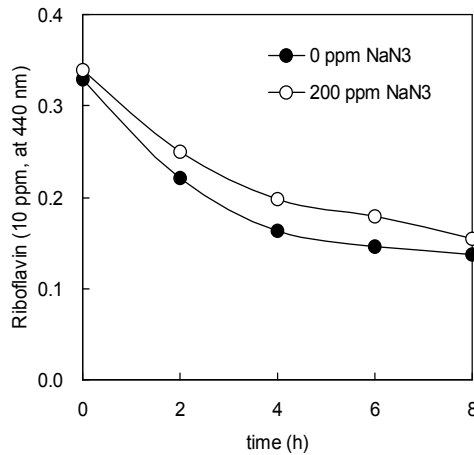


Figure 3-3. Riboflavin changes during storage under light at 4°C

(2) Sodium azide의 분해를 통한 일중항산소의 확인

빛과 riboflavin 존재하에서 일중항산소의 발생 확인은 일중항산소 소거제인 sodium azide의 분해로 평가하였다 (Figure 3-4). Riboflavin 수용액을 빛을 쬐여준 후 sodium azide를 넣었을 때 sodium azide는 A325nm에서 0.59의 흡광도를 보였으나 1시간 빛을 쬐인 후에는 0.54 흡광도로 감소하였다. 그러나 riboflavin을 넣지 않은 용액의 sodium azide의 흡광도는 빛을 쬐여주는 동안 아무런 변화가 없었다. 이는 riboflavin이 빛 존재하에서 일중항산소를 발생하였고, sodium azide가 일중항산소를 소거하여 분해되었음을 분명히 보여준다. 따라서 본 과제에서 riboflavin과 light가 존재하는 반응 system은 일중항산소의 광화학적인 발생 시스템의 적절한 모델로 판단되었으며, 안토시아닌의 안정성을 평가하기 위한 일중항산소 발생 시스템은 빛 존재하에서 riboflavin을 첨가한 시스템으로 결정하였다.

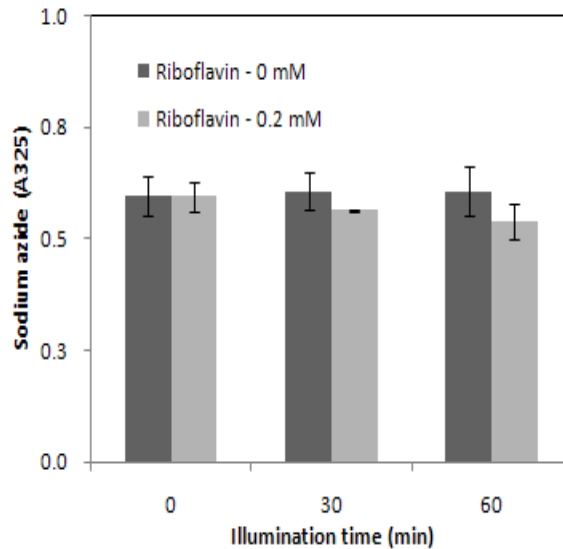


Figure 3-4. Sodium azide degradation

3. 광화학적으로 생성된 일중항산소 존재하에서 안토시아닌의 분해

빛의 존재하에서 riboflavin에 의해 생성된 일중항산소가 오디에서 추출 정제한 안토시아닌의 분해에 미치는 영향은 Figure 3-5와 같다. 오디의 안토시아닌 200 ppm을 함유한 시료의 520 nm에서의 흡광도는 0.48이었으며 저장 12시간 후에는 0.30으로 감소하였다. 이는 오디에서 추출한 안토시아닌이 일중항산소에 의해 분해되어 감

소되었음을 의미한다. Inami 등(1996)은 elderberry에서 추출한 안토시아닌을 자연광에서 저장했을 경우 20-50% 감소하였다고 보고하였다. 식품 속 안토시아닌은 광화학적으로 발생한 일중항산소에 의해 분해되며 그 결과 식품의 변색, 변향, 영양소 파괴등을 유발할 수 있으므로 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성을 여러 가지 조건에서 평가하는 것이 고품질 고영양 식품을 위한 저장 및 가공공정의 긍정적 기반을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

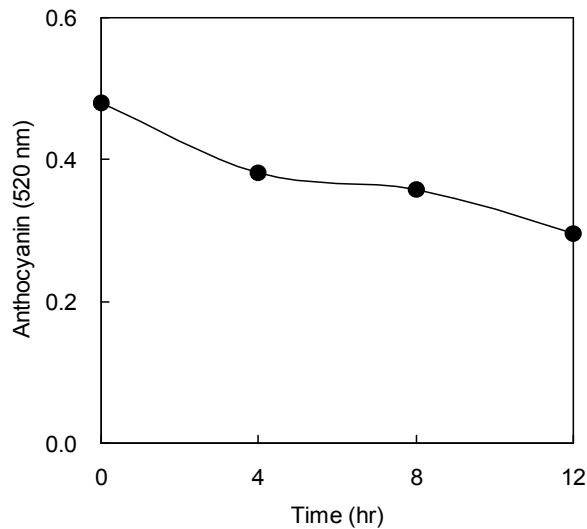


Figure 3-5. Anthocyanin degradation upon storage under light at 4°C

4. 딸기잼 제조 시 안토시아닌의 안정성

(1) 딸기의 안토시아닌 조성

딸기잼 원료인 딸기에 함유된 안토시아닌의 함량은 0.017%이었으며, HPLC로 분석한 안토시아닌의 조성은 Figure 3-6과 같다. 딸기의 안토시아닌은 pelargonidin-3-glucose (168.01 ± 0.268 ppm, 98.68%)와 cyanidin-3-glucose (2.24 ± 0.007 ppm, 1.31%)이었으며 이는 다른 연구결과 (Ebeling and Montgomery 1990, Silva 등 2002, Manhita 등 2006)와 유사하였다. 딸기의 안토시아닌은 주로 C3 위치에 glucose가 결합된 구조인 것으로 널리 알려져 있다 (Andersen 등 2004).

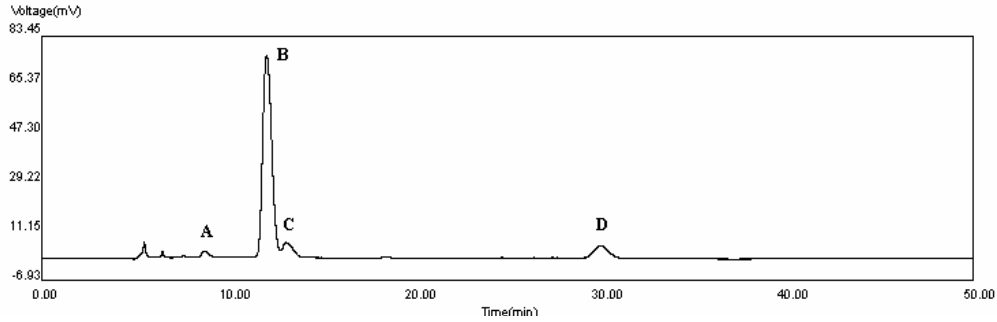


Figure 3-6. HPLC chromatogram of strawberry anthocyanins

(A: cyanidin-3-glucose, B: pelargonidin-3-glucose,
C: pelargonidin-3-rutinoside, D: pelargonidin-3-acetylglucose)

(2) 딸기잼 제조 온도가 일중항산소에 의한 딸기 안토시아닌의 분해에 미치는 영향

딸기에 sucrose를 첨가하고 25°C와 60°C에서 딸기잼을 만드는 과정 중 일중항산소에 대한 안토시아닌의 안정성은 Figure 3-7과 같다. 딸기에 가장 많이 함유된 pelargonidin-3-glucose 함량은 25°C에서 딸기잼을 만드는 2시간의 과정 동안 유의적인 차이 없이 일정하였다. 그러나 60°C에서 잼을 만드는 2시간 동안 pelargonidin-3-glucose의 함량은 195.27 ppm에서 132.32 ppm으로 감소하여 pelargonidin-3-glucose의 32.3%가 분해되었다. Cyanidin-3-glucose 역시 25°C에서 2시간 동안 잼을 만들 경우 함량의 변화는 거의 일정하였으나, 딸기잼 제조 온도가 60°C인 경우 2.69 ppm에서 2.25 ppm으로 16.4% 감소하였다.

이것은 일중항산소에 의한 안토시아닌의 안정성은 딸기잼 제조 온도에 따라 차이가 있을 수 있음을 보여주는 결과이다. 실온에서는 큰 변화가 없으나 온도가 증가하면 안토시아닌 분해에 대하여 약간의 촉진 효과가 있음을 시사한다. 그러나 변화는 크지 않은 것으로 생각된다. Kristensen 등(2001)과 Long and Kearns (1975)는 riboflavin의 분해 및 일중항산소의 생성은 온도와는 크게 관련이 없음을 보고하였다. Cemeroglu 등 (1994)은 체리 주스 제조 시 가열온도가 높아질수록 체리의 안토시아닌이 감소한다고 보고하였다. 딸기를 이용하여 가공식품을 만들 경우 pelargonidin-3-glucose의 낮은 안정성으로 인해 식품의 품질이 저하되는 현상은 잘 알려져 있다 (Adams and Ongley 1973).

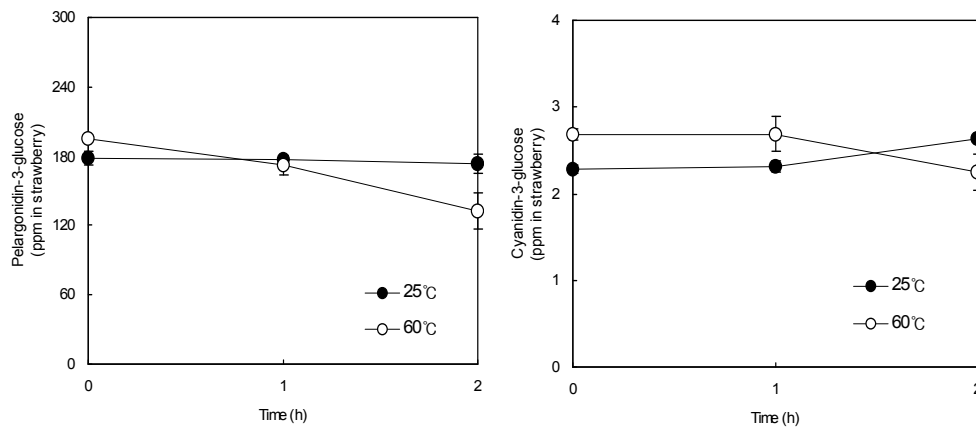


Figure 3-7. Effects of processing temperature on the stability of anthocyanin in strawberry jam made with sucrose under light

Figure 3-8은 딸기에 glucose를 첨가하여 일중항산소 존재하에 25°C와 60°C에서 딸기잼을 만들때 안토시아닌의 농도 변화를 보여준다. 25°C에서 딸기잼을 제조할 때 가열시간이 증가함에 따라 pelargonidin-3-glucose와 cyanidin-3-glucose는 약간 증가하였다. 그러나, 60°C의 제조온도에서는 제조시간이 증가함에 따라 pelargonidin-3-glucose와 cyanidin-3-glucose는 감소하여 가열 2시간 후 각각 처음 수준의 87.5%, 92.7%이었다.

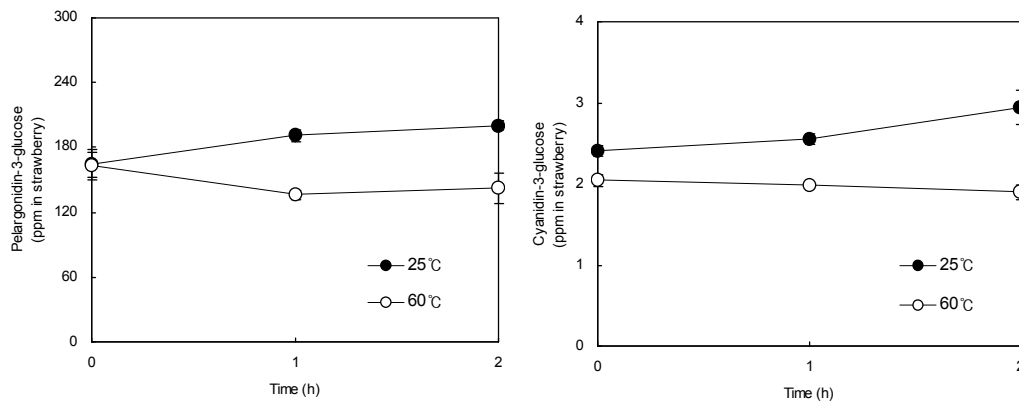


Figure 3- 8. Effects of processing temperature on the stability of anthocyanin in strawberry jam made with glucose under light

일중항산소 존재하에 fructose를 첨가하여 25℃와 60℃에서 딸기잼을 만들 때 가열시간에 따른 안토시아닌의 안정성은 Figure 3-9와 같이 sucrose를 첨가했을 때와 유사한 경향을 보였다.

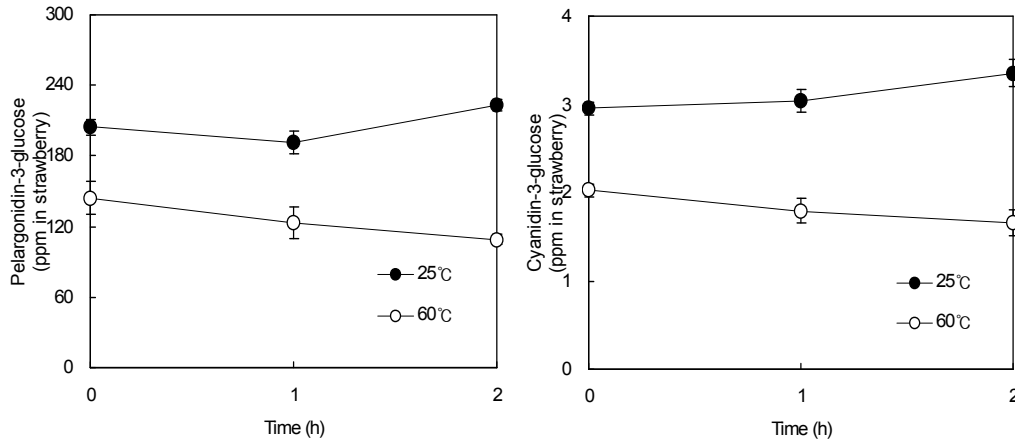


Figure 3-9. Effects of processing temperature on the stability of anthocyanin in strawberry jam made with fructose under light

Pelargonidin-3-glucose와 cyanidin-3-glucose는 딸기에 fructose를 넣고 25℃에서 잼을 만들 경우 가열시간이 증가함에 따라 일중항산소에 대해 비교적 안정하였으나 60℃에서는 그 양이 감소하여 pelargonidin-3-glucose는 24.3%, cyanidin-3-glucose는 18.3%가 감소하였다.

이들 결과는 딸기잼을 제조할 때 딸기 안토시아닌은 실온에서는 일중항산소에 대해 비교적 안정하나 온도가 높아지면 안정성이 감소하는 것을 의미한다. 안토시아닌의 여러 생리활성 기능이 중요하게 강조되고 있는 사회환경 속에서 안토시아닌을 많이 함유한 딸기와 같은 식품을 가공하는 과정에서는 그 효과가 크진 않다하더라도 제품의 가공 온도 결정에 일중항산소에 의한 안토시아닌의 안정성을 고려할 필요가 있다.

(3) 일중항산소 존재시 딸기에 첨가된 당의 종류에 따른 딸기 안토시아닌의 안정성
일중항산소 존재 하에 딸기에 sucrose, glucose, fructose를 각각 첨가하여 60℃에

서 딸기잼을 만들 경우 안토시아닌의 안정성은 Figure 3-10과 같다.

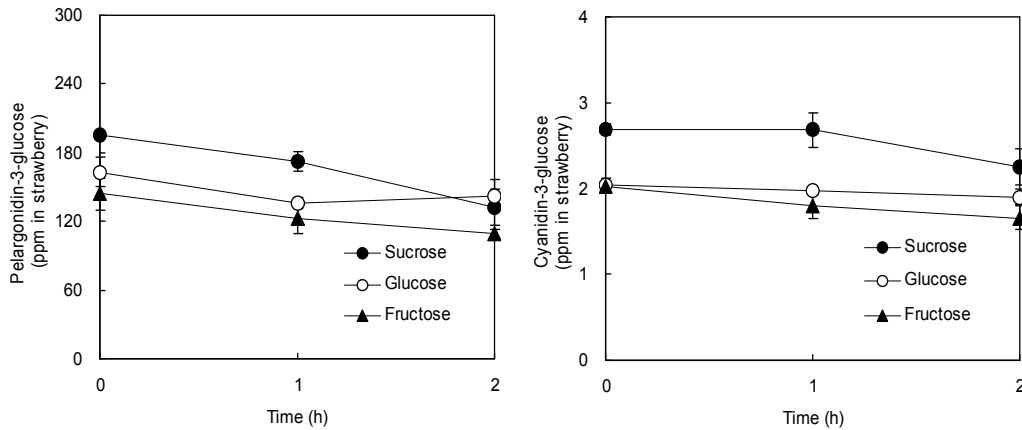


Figure 3-10. Effects of sugars on the anthocyanin contents during manufacturing strawberry jam at 60 °C

일중항산소에 의한 딸기 안토시아닌의 분해는 사용한 당의 종류와 관계없이 관찰되었으나 riboflavin과 빛에 의해 일중항산소가 만들어진 직후 (가열시간 0시간)의 안토시아닌 함량은 당의 종류에 따라 큰 차이를 보였다. 즉 sucrose, glucose, fructose를 넣고 일중항산소를 만든 직후의 pelargonidin-3-glucose의 함량은 각각 195.27, 162.99, 144.22 ppm, cyanidin-3-glucose의 함량은 각각 2.69, 2.05, 2.03 ppm이었다. 이것은 딸기잼 제조시 사용한 당의 종류가 일중항산소에 의한 안토시아닌의 분해에 결정적인 영향을 끼쳤음을 보여준다고 할 수 있다. 즉, fructose보다는 glucose가, glucose보다는 sucrose가 초기 일중항산소에 의한 안토시아닌의 분해를 억제하였다. 이것은 일중항산소와 당과의 반응에 의하여 일중항산소에 의한 안토시아닌의 분해를 간접적으로 억제하는데 부분적으로 기인한 것으로 생각된다. Glucose와 sucrose의 일중항산소와의 반응속도는 각각 $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Egorov and Krasnovsky 1986)으로 보고된 바 있다.

Table 3-2는 60°C에서의 딸기잼 가공시간과 안토시아닌의 잔존량 사이의 상관관계를 보여준다.

Table 3-2. Regression analysis between anthocyanin content and heating time of strawberry jam with different sugars under light

Anthocyanin	Sugar	Regression parameters ¹⁾		
		a	b	R ²
Pelargonidin-3-glucose	Sucrose	-31.48	198.28	0.97
	Glucose	-10.20	157.47	0.53
	Fructose	-17.54	143.04	0.99
Cyanidin-3-glucose	Sucrose	-0.22	2.76	0.75
	Glucose	-0.07	2.05	0.99
	Fructose	-0.18	2.01	0.98

¹⁾Anthocyanin content (ppm) = a x heating time (h) +b, R², correlation coefficient

앞서 언급한 바와 같이 딸기 안토시아닌은 일중항산소 존재시 잼가공 시간이 증가할수록 감소하였으며 가공시간에 따른 pelargonidin-3-glucose과 cyanidin-3-glucose의 감소속도 (회귀직선의 기울기, a)는 sucrose가 첨가된 딸기잼에서 각각 31.48% / h와 0.22% / h로 가장 높았다. 이에 비해 glucose를 사용하여 딸기잼을 제조할때 일중항산소에 의한 안토시아닌의 분해는 가장 느렸다. Park SJ 등 (1994)은 딸기잼 제조 시 첨가한 당 종류에 따라 안토시아닌의 잔존량은 다르다고 하였으며 sucrose가 glucose에 비해 안토시아닌의 파괴속도가 크다고 보고하여 본 연구와 일치하였다. 또한 여러 연구에서 첨가된 당의 종류가 안토시아닌의 가공 혹은 저장 중 안정성에 영향을 미친다고 보고 (Meschter 1953, Cemeroglu 등 1994)된 바 있으며 그 이유는 당 구조에서 ring의 안정성과 carbonyl activity가 다르기 때문 (Meschter 1953)이며 또한 가공 혹은 저장 중 당의 분해산물이 안토시아닌의 분해를 촉진하였기 때문 (Meschter 1953, Cemeroglu 등 1994, Viguera 등 1998)인 것으로 보고하였다.

5. 머루 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성

(1) 머루 안토시아닌의 조성

머루에 함유된 안토시아닌의 조성은 Figure 3-11과 같다. 머루의 안토시아닌은 cyanidin-3,5-diglucose (103.51± 33.9 ppm, 21.8%), delphinidin-3-glucose (123.2 ± 1.4 ppm, 25.9%), malvidin 3,5-diglucose (116.5 ± 0.2 ppm, 24.5%), cyanidin-3-glucose (16.13 ± 0.4 ppm, 3.4%), malvidin-3-glucose (46.5 ppm ± 2.5,

9.9%), unknowns (68.8 ± 2.5 ppm, 14.5%)이었으며 이는 Hwang IK and Ahn SY (1975)의 연구와 유사한 조성이었으나 함량은 다소 달랐다.

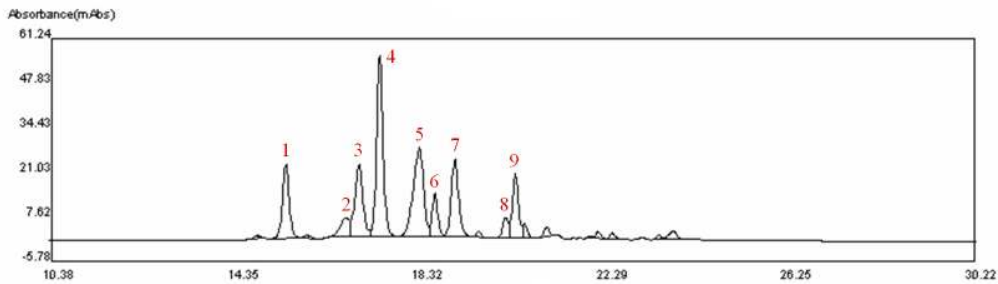


Figure 3-11. HPLC chromatogram of wild vine anthocyanins (1; unknown, 2; cyanidin-3,5-diglucose, 3; unknown, 4; delphinidin-3-glucose, 5; malvidin-3,5-diglucose, 6; cyanidin-3-glucose, 7; unknown, 8; unknown, 9; malvidin-3-glucose)

(2) 머루 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성

빛의 존재하에서 riboflavin에 의해 생성된 일중항산소가 머루에서 추출한 안토시아닌의 분해에 미치는 영향은 Figure 3-12와 같다. 머루의 안토시아닌 1000 ppm을 함유한 시료의 수용액을 빛과 riboflavin이 함께 존재하는 경우, 빛만 존재하는 경우, riboflavin만 존재하는 경우, 빛과 riboflavin 모두 없는 경우로 나누어 8시간동안 평가하였다. 빛의 존재 여부와 관계없이 riboflavin이 함께 있지 않을 경우 8시간 후 안토시아닌의 2-3%만 분해되었으나 빛과 riboflavin이 함께 존재할 경우 안토시아닌은 8시간 후 약 20%가 분해되었다. 또한 이와 동일한 조건일 경우 sodium azide가 존재했을 때 안토시아닌의 분해가 지연되어 전체 안토시아닌의 10%만 분해되었다. 이는 일중항산소가 머루 안토시아닌의 분해를 촉진했음을 의미한다. Elderberry의 안토시아닌 추출물을 광선에 조사시켰을 때 안토시아닌이 20-50% 분해되었으며 광선조사량이 많을수록 안토시아닌의 분해량도 증가하였다 (Inami 1996).

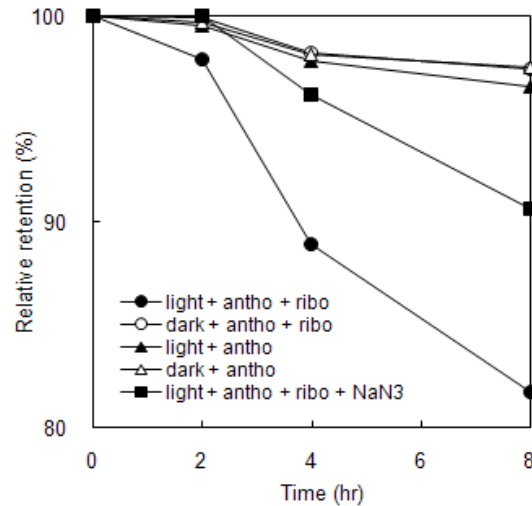


Figure 3-12. Anthocyanin degradation upon storage under light at 4°C

6. 머루잼 제조과정에서의 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성

(1) 머루잼 제조 조건의 탐색

머루잼 제조를 위한 잼 제조조건은 당종류, 당농도, 잼제조온도를 달리하여 정하였고, 잼의 점도와 pH로 평가하였다.

① 당 종류가 머루잼의 물리적 특성에 미치는 영향

믹서에 갈아 곱질과 씨를 체에 거른 머루즙의 점도와 pH는 0.45 ± 0.07 dPa·s, 3.78 ± 0.01 이었으며, 설탕, 포도당, 과당을 각각 1.89 M씩 머루즙에 첨가하여 90°C에서 3시간동안 가열하면서 머루잼을 제조했을 때의 점도는 Figure 3-13과 같다. 가열 2시간까지 설탕, 포도당, 과당을 첨가한 머루잼의 점도는 모두 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.05$), 이후 점도의 유의한 변화는 없었다. 머루잼에서의 점도 증가는 머루에 있는 유기산, 펙틴과 당 및 첨가된 당에 의해 젤이 형성되었기 때문이다. 머루는 100 g 당 892 mg의 유기산, 0.3-1.0% 펙틴, 9.0 mg의 당을 함유하고 있다 (Kim IJ 2003). 포도당 또는 과당을 첨가한 후 가열하여 만든 머루잼의 점도는 설탕을 첨가하여 만든 머루잼에 비해 유의하게 ($p < 0.05$) 낮아 가열 2시간 후 각각 1.00과 1.25 dPa·s였다. Hyvonen L과 Torma R (1983a)는 설탕을 첨가하여 만든 딸기잼의 점도가 과당을 첨가하여 만든 딸기잼의 점도보다 높았다고 보고하였다.

머루잼의 pH는 첨가한 당종류와 가열시간에 관계없이 모두 pH 3.6-3.8 범위로 유의하게 다르지 않았으며 ($p>0.05$), 이는 당알콜이나 올리고당을 첨가하여 딸기잼을 제조했을 때 잼의 pH가 다르지 않았던 것 (Kim MY과 Chun SS 2000, Park MK 2007)과 동일한 양상이었다.

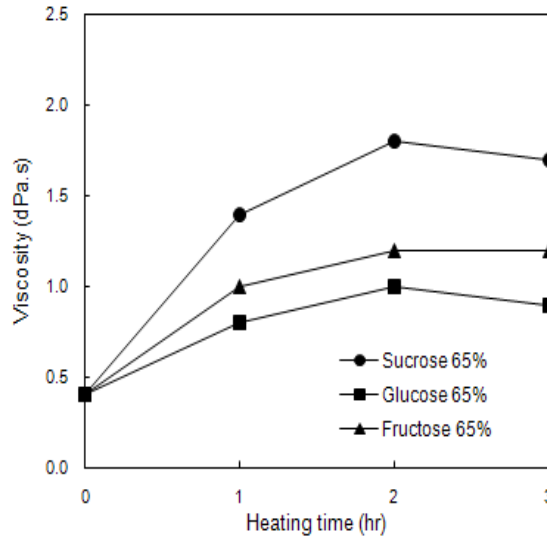


Figure 3-13. Effects of 1.89 M of sugars on the viscosity (dPa·s) of wild vine jam manufactured at 90°C

② 설탕 농도가 머루잼의 물리적 특성에 미치는 영향

머루잼에 설탕을 1.89 M, 2.34 M, 2.63 M, 2.92 M 농도로 첨가하여 90°C에서 4시간동안 가열하면서 잼을 만들었을 때의 점도는 Figure 3-14와 같다. 머루잼의 점도는 가열시간이 증가할수록 유의하게 증가하였고 ($p<0.05$), 설탕 농도가 높을수록 유의하게 높아 ($p<0.05$) Chen TS와 Joslyn MA (1967a, 1967b)의 연구와 같은 경향이 있었다. 이것은 설탕이 머루잼의 유전상수를 낮추어주고 수소결합을 증가시키므로 (Chen TS와 Joslyn MA 1967a) 설탕농도가 높아질수록 젤형성이 많아지기 때문이다. 2.92 M 농도로 설탕을 첨가하여 90°C에서 3시간동안 가열한 머루잼의 점도는 2.9 dPa·s로 가장 높았고 당함량이 50%인 저당딸기잼의 점도(3.7 dPa·s, Byun MW 등 2000)와 매우 유사하여 머루잼의 점도 기준도 이에 맞추어 2.92 M을 머루잼의 당 농도로 삼았다. 한편, 설탕농도를 달리하여 만든 머루잼의 pH는 시료별 유의한 차이

가 없이 3.6–3.8의 범위였다 ($p>0.05$).

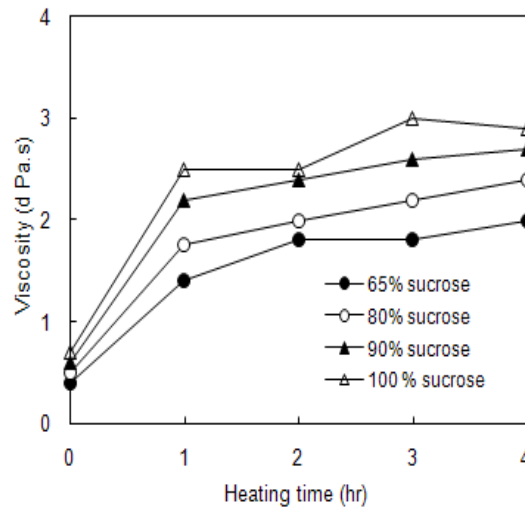


Figure 3-14. Effects of sucrose concentration on the viscosity (dPa·s) of wild vine jam manufactured at 90°C

③ 가열온도가 머루잼의 물리적 특성에 미치는 영향

Figure 3-15는 설탕을 2.92 M 농도로 머루즙에 첨가하여 25°C, 60°C, 90°C에서 각각 4시간동안 가열하여 머루잼을 제조했을 때의 점도를 보여준다. 머루잼의 점도는 가열온도에 관계없이 가열시간이 증가할수록 유의하게 증가했다 ($p<0.05$). 90°C에서 가열하여 만든 머루잼은 25°C와 60°C에서 가열하여 만든 머루잼에 비해 유의하게 높은 점도를 보였으며 ($p<0.05$), 이는 잼제조 온도가 높을수록 수분증발이 많이 이루어져 펙틴이 물분자보다는 설탕과 수소결합을 이루어 젤 형성이 잘 이루어졌기 때문 (Chen TS와 Joslyn MA 1967a)으로 사료된다. Rao 등 (1993)은 가열온도가 높아질수록 소수성 상호작용이 더욱 증가하여 젤 형성능력이 향상된다고 하였다. 25°C와 60°C에서 가열하여 만든 잼의 점도는 차이를 보이지 않았다. 2.92 M의 설탕을 넣고 가열하여 제조한 머루잼의 pH는 가열온도와 가열시간에 관계없이 모두 pH 3.6–3.8 범위로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p>0.05$). 위 결과를 고려하여 저당 머루잼에 대한 대조군 머루잼은 2.92 M의 설탕을 첨가하여 90°C에서 가열하여 만들었다.

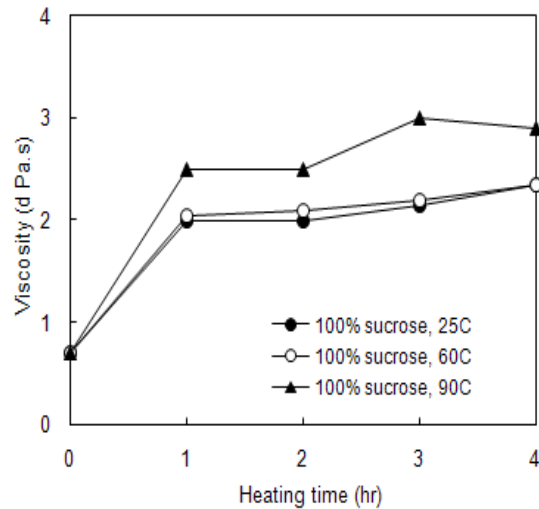


Figure 3-15. Effects of heating temperature on the viscosity (dPa·s) of wild vine jam manufactured with 2.92 M sucrose

④ 당과 펙틴이 저당 머루잼의 점도에 미치는 영향

당의 첨가량을 대조군 머루잼의 50%로 줄인 저당 머루잼의 가열시간에 따른 점도는 Figure 3-16과 같다. 저설탕 (Figure 3-16-A) 머루잼의 제조에서 0, 1, 2, 3 시간 동안의 가열에 따른 점도는 각각 0.70, 1.35, 1.40, 1.50 dPa·s로 대조군 머루잼 (0.70, 2.50, 2.55, 3.00 dPa·s)에 비해 매우 낮았으며 저포도당 (Figure 3-16-B), 저과당 (Figure 3-16-C) 머루잼에서도 비슷한 양상을 보였다. 따라서 저당 머루잼의 낮은 점도를 보충하기 위해 펙틴을 첨가하여 저설탕, 저포도당, 저과당 머루잼을 제조하였다. 저당 머루잼의 점도는 가열 1시간에 빨리 증가하였으며 이후 그 속도는 줄었으나 가열시간이 증가할수록 점도가 증가하였으며 이는 펙틴의 첨가량 및 사용한 당의 종류와 관계없이 동일한 양상이었다. 펙틴 첨가량이 0%에서 0.3%, 0.5%, 0.8%, 1.0%로 증가할수록 저당 머루잼의 점도는 유의하게 증가하여 ($p < 0.05$), 3시간 가열 후 펙틴이 0%인 저설탕 머루잼의 점도는 1.50 dPa·s이었으나 펙틴 첨가량이 1%인 저설탕 머루잼은 5.55 dPa·s의 점도를 보였다. 이는 펙틴에 의해 젤 형성이 많아져 저설탕 머루잼의 점도가 증가했음을 의미한다. Raphaelides SN 등 (1996)은 펙틴에 의해 젤 형성이 많아진다고 하였으며 Kar F and Arslan N (1999)은 펙틴의 농도가 높아

질수록 점도도 증가한다고 보고한 바 있다. 가열시간에 따른 저설탕 머루잼의 점도는 펙틴 첨가량이 0.5%일 때 설탕 첨가량이 2.92 M인 대조군 머루잼과 가장 유사하여 둘 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다 ($p>0.05$). 이는 1.46 M의 설탕과 0.5% 펙틴을 첨가한 후 가열하여 만든 저설탕 머루잼에서의 젤 형성정도는 설탕 2.92 M만을 넣고 만든 대조군 머루잼의 젤 형성 정도와 유의하게 같다는 것을 의미한다.

설탕대신 포도당 또는 과당을 첨가하여 저당 머루잼을 만들었을 때의 점도는 저설탕 머루잼의 점도와 유사한 경향을 나타내었다 (Figure 3-16-B, C). 포도당 또는 과당과 함께 첨가된 펙틴의 양이 증가할수록 저포도당 또는 저과당 머루잼의 점도는 증가하였으나 저설탕 머루잼보다는 낮았다. 3시간 가열 후 펙틴이 전혀 첨가되지 않은 저설탕 머루잼의 점도는 1.50 dPa·s이었으나 저포도당, 저과당 머루잼의 점도는 각각 1.15, 1.10 dPa·s이었으며 펙틴이 1.0% 첨가된 저포도당, 저과당 머루잼의 점도는 모두 3.25 dPa·s로 1.0% 펙틴을 첨가하고 3시간동안 가열한 저설탕 머루잼의 점도인 5.55 dPa·s보다 현저히 낮았다. 이것은 동일한 물농도의 설탕, 포도당, 과당을 첨가하여 머루잼을 만들 때 설탕의 젤 형성 능력이 포도당 또는 과당보다 우수하였음을 의미한다. 저포도당 또는 저과당 머루잼의 점도는 펙틴 첨가량이 0.8%일 때 설탕 첨가량이 2.92 M인 대조군 머루잼과 유사한 점도 특성을 보여주었다. 이는 설탕 2.92 M만을 넣고 만든 대조군 머루잼과 같은 정도의 젤을 가진 저포도당 또는 저과당 머루잼을 만들기 위해서는 1.46 M의 포도당 또는 과당과 함께 0.8% 펙틴을 첨가해야함을 의미한다.

위의 결과들은 저당 머루잼의 점도는 당종류와 펙틴의 첨가량에 따라 달랐으며 당 농도가 1.46 M인 저설탕 머루잼은 0.5% 펙틴, 저포도당과 저과당 머루잼은 0.8% 펙틴을 첨가한 후 가열하여 제조했을 때 2.92 M 설탕만을 넣고 제조한 머루잼과 젤 형성정도가 같음을 보여주었다.

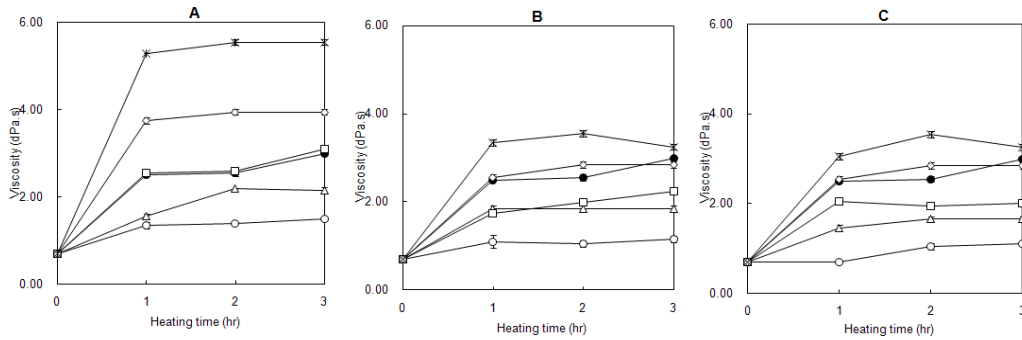


Figure 3-16. Effects of pectin on the viscosity of low sugars wild vine jam by 50% of the control when manufactured at 90°C for 3 hr, A: sucrose-added jam, B: glucose-added jam, C: fructose-added jam (●; control with 100% sugar and no pectin, ○; 0% pectin, △; 0.3% pectin, □; 0.5% pectin, ◇; 0.8% pectin, ×; 1.0% pectin)

(2) 저당 머루잼 제조시 머루 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성

설탕, 포도당, 과당을 보통 머루잼의 50% 수준으로 사용한 저설탕, 저포도당, 저과당 머루잼에 존재하는 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성에 대한 결과는 다음과 같다.

① 저설탕 머루잼

Figure 3-17은 저설탕 머루잼 제조시 빛과 riboflavin이 함께 존재할 경우 머루 안토시아닌의 함량변화(Figure 3-17-A)와 상대함량 변화 (Figure 3-17-B)이다. 안토시아닌은 가공시간동안 감소했으며 처음 1시간동안 가장 빠르게 감소했다. 이는 안토시아닌이 일중항산소에 의해 분해되었으며 처음 1시간동안이 일중항산소에 의한 영향이 큰 것임을 의미한다.

저설탕 머루잼 제조시 일중항산소에 의한 안토시아닌의 분해속도는 Table 3-3과 같다. Cyanidin-3-glucose, delphinidin-3-glucose, malvidine-3-glucose의 분해속도(회귀직선의 기울기, a)는 20.64-20.94%/h이었고 malvidin-3,5-diglucose와 cyanidin-3,5-diglucose의 분해속도는 각각 13.00%/h 와 9.57%/h로 monoglucoside 안토시아닌과 diglucoside 안토시아닌의 분해속도는 큰 차이를 보였다. 즉 diglucoside 안토시아닌보다 monoglucoside 안토시아닌이 일중항산소에 대한 분해속도가 컸으며 이는 안토시아닌에 결합된 당의 개수에 의해 안토시아닌 안정성이 달라짐을 의미한다(Daravingas and Cain 1968). Inami 등 (1996)은 광선조사 혹은 가열시 안토시아닌

의 안정성이 다른 것은 각 안토시아닌의 구조가 다르기 때문이라고 하였고, Elbe와 Schwartz (1996)는 안토시아닌에 당이 많이 결합될수록 안정성이 증가한다고 하였다.

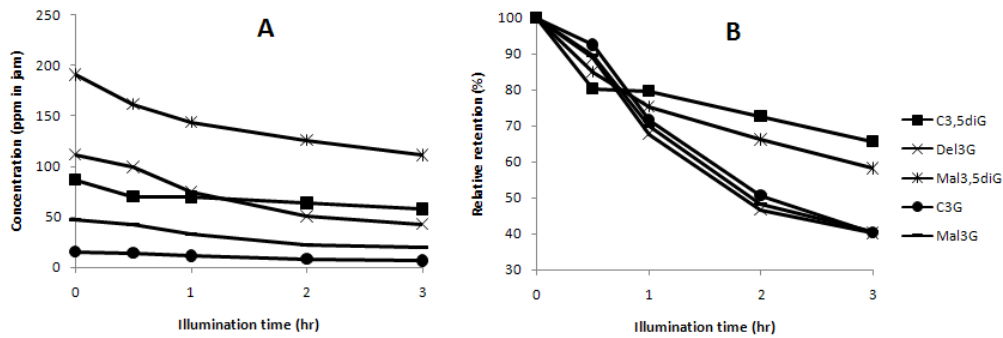


Figure 3-17. Content changes (A) and retention changes (B) of anthocyanins in low sucrose-added wild vine jam during manufacturing under light

Table 3-3. Regression analysis between anthocyanin retention and illumination time of low sucrose wild vine jam during manufacturing

Sugar	Anthocyanin	Regression parameters ¹⁾		
		a	b	R ²
Sucrose	Cyanidin-3,5-diglucose	-9.57	92.06	0.806
	Delphinidin-3-glucose	-20.77	95.62	0.931
	Malvidin-3,5-diglucose	-13.00	93.79	0.917
	Cyanidin-3-glucose	-20.94	98.25	0.956
	Malvidin-3-glucose	-20.68	96.47	0.943

¹⁾Anthocyanin retention (%) = a x illumination time (hr) + b, R² = correlation coefficient

② 저포도당 머루잼

Figure 3-18은 저포도당 머루잼 제조시 빛과 riboflavin이 함께 존재할 경우 머루

안토시아닌의 함량변화(Figure 3-18-A)와 상대함량 변화 (Figure 3-18-B)이다. 저포도당 머루잼의 안토시아닌은 저설탕 머루잼 안토시아닌과 유사한 경향을 보였다.

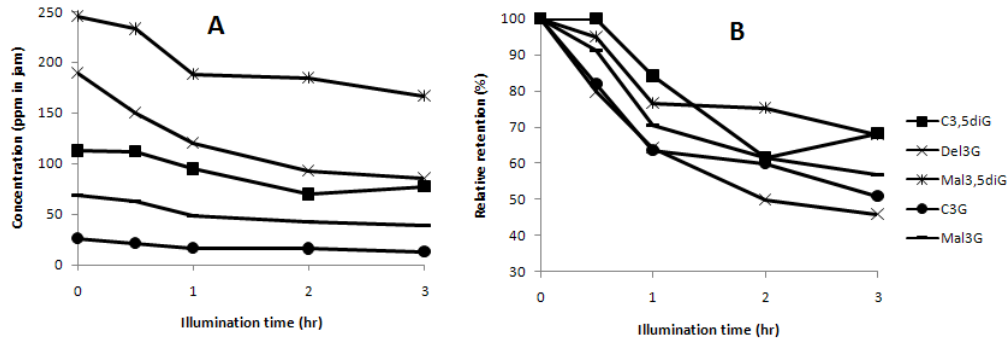


Figure 3-18. Content changes (A) and retention changes (B) of anthocyanins in low glucose-added wild vine jam during manufacturing under light

저포도당 머루잼 제조시 일중항산소에 의한 안토시아닌의 분해속도는 Table 3-4와 같다. Cyanidin-3-glucose, delphinidin-3-glucose, malvidine-3-glucose의 분해속도 (회귀직선의 기울기, a)는 각각14.85%/h, 17.24%/h, 14.59%/h이었고 malvidin-3,5-diglucose와 cyanidin-3,5-diglucose의 분해속도는 각각 10.50%/h 와 13.08%/h였다. 저설탕 머루잼의 안토시아닌과 마찬가지로 저포도당의 monoglucoside 안토시아닌과 diglucoside 안토시아닌의 분해속도는 차이를 보였지만 그 차이는 설탕을 첨가했을 때보다 적었다. 즉 포도당이 첨가된 머루잼의 monoglucoside 안토시아닌은 설탕을 첨가하여 제조한 잼에서보다 일중항산소에 대한 분해속도가 낮았다. 이는 첨가한 당의 종류가 일중항산소와 반응하여 안토시아닌의 안정성에 영향을 키치는 것으로 사료된다.

③ 저과당 머루잼

Figure 3-19는 저과당 머루잼 제조시 빛과 riboflavin이 함께 존재할 경우 머루 안토시아닌의 함량변화(Figure 3-19-A)와 상대함량 변화 (Figure 3-19-B)이다. 저과당 머루잼의 안토시아닌은 저설탕 또는 저포도당 머루잼 안토시아닌과 유사한 경향을 보여 첨가한 당의 종류에 관계없이 일중항산소에 대한 안토시아닌의 분해경향은 유사한 것으로 나타났다.

Table 3-4. Regression analysis between anthocyanin retention and illumination time of low glucose wild vine jam during manufacturing

Sugar	Anthocyanin	Regression parameters ¹⁾		
		a	b	R ²
Glucose	Cyanidin-3,5-diglucose	-13.08	99.80	0.795
	Delphinidin-3-glucose	-17.24	90.37	0.866
	Malvidin-3,5-diglucose	-10.50	96.55	0.837
	Cyanidin-3-glucose	-14.85	90.60	0.829
	Malvidin-3-glucose	-14.59	94.94	0.869

¹⁾ Anthocyanin retention (%) = a x illumination time (hr) + b, R² = correlation coefficient

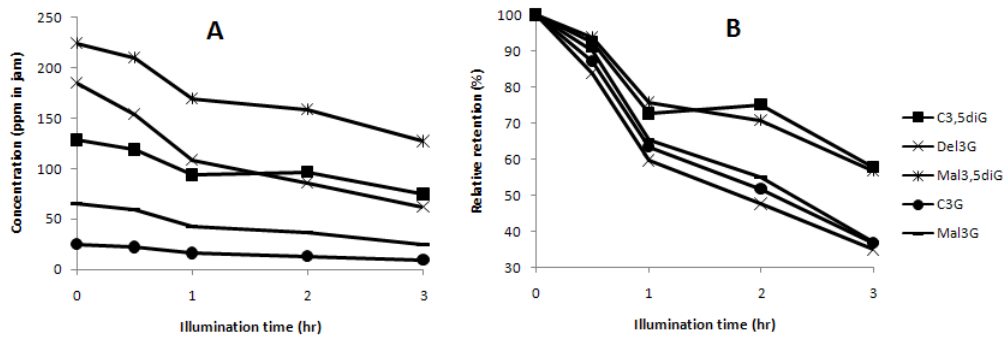


Figure 3-19. Content changes (A) and retention changes (B) of anthocyanins in low fructose-added wild vine jam during manufacturing under light

저과당 머루잼 제조시 일중항산소에 의한 안토시아닌의 분해속도는 Table 3-5와 같다. Cyanidin-3-glucose, delphinidin-3-glucose, malvidine-3-glucose의 분해속도(회귀직선의 기울기, a)는 20.69%/h, 21.07%/h, 20.79%/h이었고 malvidin-3,5-diglucose와 cyanidin-3,5-diglucose의 분해속도는 각각 14.09%/h 와 12.91%/h로 다

른 당종류를 첨가한 머루잼에서와 마찬가지로 monoglucoside 안토시아닌과 diglucoside 안토시아닌의 분해속도는 차이를 보였다. 과당을 첨가한 머루잼의 안토시아닌은 설탕이나 포도당 안토시아닌보다 일중항산소에 대한 분해속도가 더 컸으며 diglucoside 안토시아닌의 분해속도는 차이를 보이지 않았다. Tinsley 등 (1960)은 포도당보다 과당이 존재할 경우 안토시아닌의 분해속도가 컸다고 보고하였으며 Elbe와 Schwartz (1996)도 과당 존재시 안토시아닌의 안정성은 포도당이나 설탕이 존재할 때보다 낮다고 하였다. 이는 첨가된 당의 종류가 머루 안토시아닌의 일중항산소에 대한 안정성에 영향을 미쳤음을 분명히 보여준다.

Table 3-5. Regression analysis between anthocyanin retention and illumination time of low fructose wild vine jam during manufacturing

Sugar	Anthocyanin	Regression parameters ¹⁾		
		a	b	R ²
Fructose	Cyanidin-3,5-diglucose	-12.91	96.35	0.860
	Delphinidin-3-glucose	-21.07	92.58	0.915
	Malvidin-3,5-diglucose	-14.09	97.66	0.934
	Cyanidin-3-glucose	-20.69	94.71	0.936
	Malvidin-3-glucose	-20.69	96.40	0.946

¹⁾ Anthocyanin retention (%) = a x illumination time (hr) + b, R² = correlation coefficient

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
안토시아닌등을 적용하여 품질을 개선 시킬수 있는 식품재료 및 공정의 탐색	100%
일중항 산소 소거능력이 탁월한 식품소재 탐색, 안토시아닌의 분리 및 일중항산소 소거능 측정	100%
안토시아닌의 식품에의 응용연구	100%

2. 관련분야에의 기여도

연구 결과를 국내외에 발표하여 일중항산소에 대한 안토시아닌의 안정성 증진에 대한 과학적, 실험적 정보 제공 본 연구 결과를 이용하여 $^1\text{O}_2$ 소거기능이 강한 식품 재료, $^1\text{O}_2$ 생성으로 인한 영양성분, texture, 저장성이 급속히 감소하는 식품 및 공정, $^1\text{O}_2$ 에 의한 anthocyanin 등의 산화안정성에 대한 자료 및 데이터를 확보하였고, 이들 물질을 이용한 식품성분의 초급속 산화 억제 기술을 다른 식품의 가공 및 저장 분야로 파급을 꾀할 수 있게 하였다. 즉 anthocyanin등의 $^1\text{O}_2$ 소거기능 기작을 규명함으로써 학문 발전에 기여함은 물론, 식품성분의 초급속산화 억제로 인한 고품질 고영양 식품 제조 공정의 기반을 제공하였다고 할 수 있다. 이들을 통하여 국민 건강 증진에 기여하고 식품의 저장성 개선으로 인한 식량자원의 수명을 연장시키고, 초급속산화로 인한 식품의 품질변화에 따른 부가적인 유통, 저장, 가공비용 등을 줄임으로써 식품산업의 경쟁력을 제고시키고, 고품질 고영양 정보에 의한 소비자들의 구매 촉진 효과로 가공 식품의 매출 증대효과를 유발시킬 수 있을 것이다. 또한 연구 활

동에 참여하는 인력에 대해서는 GC, HPLC, MS, chromatography 등의 분리, 분석 기술의 습득과 식품성분의 산화 및 산화방지에 대한 전문 지식 및 기술 습득으로 졸업 후 산업체에서 즉시 적용 가능하여 식품산업계의 발전에 기여할 수 있도록 하였다.

제 5 장 연구 성과 및 활용계획

제 1 절 연구 성과

1. 학술지 게재

- (1) Oh YS, Lee JH, Yoon SH, Oh CH, Choi DS, Choe E, and Jung MY. Characterization of anthocyanins in grape juices obtained from the grapes cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. Journal of Food Science. 2008 (U.S.A., In Press)
- (2) Kim M, Yoon SH, Jung M, and Choe E. 2008. Effects of sugars and pectin on the quality of low-sugar wild vine (*Vitis coignetiea*) jam. Korean J. Cookery Sci., Accepted for Publication, 2008.

2. 학술 발표

- (1) Kim M, Yoon SH, Jung M, and Choe E. 2007. Stability of anthocyanin in wild vines (*Vitis coignetiea*) in the presence of light and riboflavin. Presented at the 74th meeting of the Korean Soc of Food Sci and Technol. Busan, Korea, p. 275, 2007.
- (2) Oh, YS and Jung, MY. Characterization and quantification of anthocyanins in juices obtained from five different grapes cultivated in Korea. 논문발표번호 OP-13, 2007, International Symposium and Annual Meeting, The Korean Society of Food Science and Nutrition. Muju Resort, Korea. October 17-19, 2007. (대학원생논문 구두발표 최우수상 수상)
- (3) Oh, YS, Choe EO, Yoon SH, Jung MY. Singlet oxygen quenching activities of various fruit and vegetable juices containing high quantity anthocyanins. 논문발표번호 P1-18, 2007 International Symposium and Annual Meeting, The Korean Society of Food Science and Nutrition. Muju Resort, Korea. October

17-19, 2007.

- (4) 노시원, 윤석후 : "Extraction of anthocyanin from mulberry and its color stability at various range of pH", P15-002, 제74차 한국식품과학회 학술대회, 부산 BEXCO, 2007. 6. 20 - 22.
- (5) 김문정, 윤석후, 최은옥 : "Stability of anthocyanin in wild vines (*Vitis coignetiea*) in the presence of light and riboflavin", P15-008, 제74차 한국식품과학회 학술대회, 부산 BEXCO, 2007. 6. 20 - 22.
- (6) 노시원, 윤석후 : "Extraction of Anthocyanin from Wild Grapes and Its Color Stability at Various Range of pH", Paper No. 95-12, Annual Meeting of Institute of Food Technologists, 2007. 7. 28 - 8. 1, Chicago, IL, U.S.A.

제 2 절 활용계획

1. 학술적 활용

관련 결과를 국내외 학술지에 게재하여 일중항산소에 대한 안토시아닌의 안정성 증진에 대한 과학적, 실험적 정보 제공한다. 또한 주관기관과 기술전수 업체의 협동에 의한 일중항산소 소거제로서의 안토시아닌을 상업적으로 활용하는 기반기술을 제공한다.

한국식품과학회지, Food Science and Biotechnology, J. Food Science, J Agricultural and Food Chemistry, Food Chemistry 등 국내외 저명 학술지에 결과를 발표하여 연구 결과를 홍보하고 공유할 것이다.

$^1\text{O}_2$ 소거기능이 강한 식품재료에 대한 자료를 확보하며, Anthocyanin등의 $^1\text{O}_2$ 소거기능을 평가하고 그 기작을 규명하여 $^1\text{O}_2$ 생성으로 인한 영양성분, texture, 저장성이 급속히 감소하는 식품에 대한 data를 확보한다.

식품성분의 초급속산화 억제로 인한 고품질 고영양 식품 제조 공정의 기초 데이터로 활용되며, 식품자체 system에서의 anthocyanin등의 1O_2 에 대한 안정성 데이터를 확보한다. pH, 온도, 조성 등 외부 system 변화에 의한 분리 및 anthocyanin의 1O_2 에 대한 안정성 data 등이 확보되어 기초자료로 활용한다.

2. 경제 산업적 측면

형광등이나 백열등 조사가 있는 환경에서 가공되거나 같은 조건에서 판매되는 식품의 초급속산화에 의한 영양물질의 감소를 억제함으로써 고영양식품을 제공하여 국민 건강에 도움을 줄 수 있다.

초급속산화로 인한 식품의 품질 변화를 막기위한 유통, 저장, 가공 비용 등을 줄임으로써 식품산업의 경쟁력을 제고시키고, 고품질, 고영양 정보에 의한 소비자들의 구매 촉진 효과는 가공 식품의 매출 증대효과를 유발시킬 수 있다. 초급속산화를 억제함으로써 식품의 저장성 개선으로 인한 식량자원의 수명을 연장할 수 있으며, 따라서 식품성분의 초급속산화 억제 기반 기술로 확대 보급될 수 있다.

Anthocyanin등을 이용하여 식품 성분의 초급속 산화를 억제하는 기술을 다른 식품의 가공 및 저장 분야로 파급 확대할 수 있으며, 본 연구에서 개발된 기술에 대하여 산업재산권을 획득하여 보호할 것이다. 식품성분의 초급속산화는 모든 식품에 관련된 연구 분야로서 본 연구를 통해 배출된 연구 인력은 학계 뿐 아니라 식품산업계의 발전에 기여할 것이며, 연구과제에 참여한 학생들에게 GC, HPLC, MS, chromatography 등의 분리, 분석 기술을 습득시켜 졸업 후 산업체에서 즉시 적용 가능한 인재로 육성시켜 산업 현장에서 즉시 적용이 가능하였다.

제 6 장 참고 문헌

- Abers JE, Wrolstad RE. 1979 Causative factors of color deterioration in strawberry preserves during processing and storage. J. Food Sci. 44: 75-81
- Abers JE, Wrolstad RE. Causative factors of color deterioration in strawberry preserves during processing and storage. J. Food Sci. 44: 75-81 (1979)
- Adams JN, Ongley MH. 1973. The degradation of anthocyanins in canned strawberries. I. The effect of various processing parameters on the retention of pelargonidin-3-glucoside. J Food Technol. 8: 139-145
- Ahmed J, Shivhare US, Raghavan GSV. 2004. Thermal degradation kinetics of anthocyanin and visual colour of plum puree. Eur. Food Res. Technol. 218:525-528
- Anderson OM, Fossen T, Torskangerpoll K, Fossen A, Hauge U. 2004. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. Phytochem. 65: 405-410
- Byun MW, Yook HS, Ahn HJ, Lee KH, Lee HJ. 2000. Quality evaluation of strawberry jams prepared with refined dietary fiber from ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic. Korean J Food Sci Technol 32(5):1068-1072
- Cemeroglu B, Velioglu S, Isik S. 1994. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. J. Food Sci. 59: 1216-1218
- Chen TS, Joslyn MA. 1967a. The effect of sugars on viscosity of pectin solutions. I. Comparison of corn syrup with sucrose solutions. J Collid Interface Sci 23(3):399-406
- Chen TS, Joslyn MA. 1967b. The effect of sugars on viscosity of pectin solutions. II. Comparison of dextrose, maltose, and dextrans. J Collid Interface Sci 25(3):346-352
- Choe, Eunok. Effects of Heating Time and Storage Temperature on the Oxidative Stability of Heated Palm oil. J. Food Sci 29(3) 407-411(1997)
- Choi SY, Cho HS, Kim HJ, Ryu JH, Lee JO, Sung NJ. 2006. Physicochemical analysis and antioxidative effects of wild grape (*Vitis coignetiea*) juice and its wine. Korean J Food Nutr.
- Daravingas G, Cain RF. 1968. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. J Food Sci. 33:138-142
- Ebeling VE, Montgomery MW. 1990. Strawberry polyphenol oxidase: Its role in anthocyanin degradation. J. Food Sci. 55: 731-734
- Egorov S Yu, Krasnovsky AA. 1986. Quenching of singlet molecular oxygen by components of media

used for isolating chloroplasts and studying photosynthetic activity. *Fiziologiya Rastenii (Moscow)*. 33(1):10–4.

Egorov S Yu, Krasnovsky AA. 1986. Quenching of singlet molecular oxygen by components of media used for isolating chloroplasts and studying photosynthetic activity. *Fiziologiya Rastenii (Moscow)*. 33(1):10–4.

Elbe JH, Schwartz SJ. 1996. Chapter 10. Colorants, in Food Chemistry, 3 rd. ed. by Fennema OR. Marcel Dekker. Inc., NY, USA. p 651–722

Francis, F.J. Food colorants : Anthocyanins. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 28 : 273–314 (1989)

Furuya EM, Warthesen JJ, Labuza TP. 1984. Effects of water activity, light intensity and physical structure of food on the kinetics of riboflavin photodegradation. *J Food Sci* 49(2):525–528.

Gracia S, Heinoneon M, Frankel EN. Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J Agric Food Chem* 45 : 3362–225 (1997)

Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. Antioxidative activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome oxidation. *J Agric Food Chem* 46 : 4107–4112 (1998)

Huang R, Choe E, Min DB. 2004. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *J Food Sci* (in press).

Huang, R., E.Choe, AND DB.Min. Effects of Riboflavin Photosensitized Oxidation on the Volatile Compounds of Soymilk. *J. Food Sci.* 69(9), 733–738 (2004)

Hwang I, Ahn S. 1975a. Studies on the anthocyanins in wild vines (*Vitis amurensis Ruprecht*). (Part 1) Identification of anthocyanins in wild vines. *J Korean Agric Chem Soc* 18: 183–187.

Hwang I, Ahn S. 1975b. Studies on the anthocyanins in wild vines (*Vitis amurensis Ruprecht*). (Part 2) Separation and determination of anthocyanins in wild vines. *J Korean Agric Chem Soc* 18: 188–193.

Hwang IK, Ahn SY. 1975. Studies on the anthocyanin in wild vines (*Vitis amurensis Ruprecht*) (Part 1). *J Korean Agric Chem Soc* 18(4):183–187

Hyvonen L, Torma R. 1983a. Examination of sugars, sugar alcohols, and artificial sweeteners as substitutes for sucrose in strawberry jam. Product development. *J Food Sci* 48(1):183–185

Hyvonen L, Torma R. 1983b. Examination of sugars, sugar alcohols, and artificial sweeteners as substitutes for sucrose in strawberry jam. Keeping quality tests. *J Food Sci* 48(1):186–192

Igarachi K, Inagaki K. 1991. Effects of the major anthocyanin of wild grape (*Vitis coignetiae*) on serum lipid levels in rats. *Agric Biol Chem* 55:285–287.

- Inami O, Tamura I, Kikuzaki H, Nakatani N. 1996. Stability of anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. J. Agric. Food Chem. 44: 3090–3096
- Jung, M.Y., S.H.Yoon, H.O.Lee and D.B.Min. Singlet oxygen and Ascorbic Acid Effects on Dimethyl Disulfide and Off-Flavor in Skim Milk Exposed to Light. J. Food Sci. 63(3), 408–412 (1998)
- Jung, MY., E. Choe, DB Min, α -, γ - and δ -Tocopherol Effects on Chlorophyll Photosensitized Oxidation of Soybean Oil. J. Food Sci. 56 : 807–810 (1991)
- Kang, Chang-soo, Sang-jo Ma, Won-Dai Cho and Jin-Man Kim. Stability of Anthocyanin Pigment Extracted from Mulberry Fruit. J. Korean Soc. Food Sci Nutr. 32(7) : 960–964 (2003)
- Kar F, Arslan N. 1999. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. Carbohydr Polym 40(4):277–284
- Kikoku, Y., Fukuhara, K., Saito, I. and Oota, H. Identification and high performance chromatographic determination of strawberry anthocyanin pigments. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 42(2) : 118–123.(1995)
- Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant activity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J Agric Food Chem. 50: 3713–3717.
- Kim HB. 2003. Quantification of cyanidin-e-glucoside (C3G) in mulberry fruits and grapes. Korean J. Seric. Sci. 45: 1–5
- Kim HB. Quantification of cyanidin-e-glucoside (C3G) in mulberry fruits and grapes. Korean J. Seric. Sci. 45: 1–5 (2003)
- Kim JI, Choi JS, Kim WS, Cheigh HS. Studies on identification and composition of nucleotides from mustard leaf and mustard leaf kimchi. J Korean Soc Food Sci
- Kim MY, Chun SS. 2000. The effects of fructo-oligosaccharide on the quality characteristics of strawberry jam. Korean J Soc Food Sci 16(6):530–537
- Kristensen D, Hansen E, Arndal A, Trinderup RA, Skibsted LH. 2001. Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. Int Dairy J 11:837–43.
- Lee JH, Diono R, Kim GY, Min DB. Optimization of solid phase microextraction on the headspace volatile compounds in parmesan cheese. J. Agric. Food Chem. 51 : 1136–1140 (2003)
- Lee, Sang Hwa. Factors Affecting the photooxidative Stability of Soymilk. J. Korean Soc. Food Nutr. 25(3), 441–452 (1996)
- Li, Tsung-lin and David MIN. Stability and Photochemistry of Vitamin D₂ in Model System. J. Food Sci 63(3), 413–417 (1998)
- Long CA, Kearns DR. 1975. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. II.

Temperature dependence and solvent effects. J Amer Chem Soc 97: 2018–20

Manhita AC, Teixeira DM, Costa CT. 2006. Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetables. Jorunal of chromatography A 1129: 14–20

Meschter EE. 1953. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. J. Agric. Food Chem. 1: 574–579

Min BS, S. Mistry Lee HO. 2003. Improvement of oxidative and emulsion stability of model salad dressing by glucose oxidase–catalase. J. Food Sci. 68:1272–1275

Mounchili, A., J.J.Wichtel, J.O.Bosset, I.R.Dohoo, M.Imhof, D.Altieri, S. Mallia, H.Stryhn. HS–SPME gas chromatographic characterization of volatile compounds in milk tainted with off-flavour. International Dairy Journal 15, 1203–1215, (2005)

Mun, Sung–Ae, Young–Bae Kim and Young–Tae Ko. Growth of Lactic Acid Bacteria in Soy Milk and Flavor of Soy Yogurt. J. Food Sci 18(2), 118–123 (1986)

Oh YS, Jang ES, Bock JY, Yoon SH, Jung MY. 2006. Singlet oxygen quenching activities of various fruit and vegetable juices and protective effects of apple and pear juices against hemolysis and protein oxidation induced by methylene blue photosensitization. J Food Sci 71: C260–C268

Okamoto G, Ueki K, Ichi T, Aoki H, Fujiwara M, Hirano K. 2002. Juice constituents and skin pigments in *Vitis coignetiae* Pulliat grapevines. Vitis 41:161–162.

Park MK. 2007. Quality characteristics of strawberry jam containing sugar alcohols. Korean J Food Sci Technol 39(1): 44–49

Park SJ, Lee JH, Rhim JH, Kwon KS, Jang HG, Yu MY. 1994. The change of anthocyanin and spreadmeter value of strawberry jam by heating and preservation. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 365–369

Pool–Aobel BL, Bub A, Schroder N, Rechkemmer G. 1999. anthocyanin are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. Eur J Nutr 38 :227–234 (1999)

Rao MA, Buren JP, Cooley HJ. 1993. Rheological changes during gelation of high–methoxyl pectin/fructose dispersions: Effect of temperature and aging. J Food Sci 58(1):173–176

Raphaelides SN, Ambatzidou A, Petridis D. 1996. Sugar composition effects on textural parameters of peach jam. J Food Sci 61(5):942–946

Rodriguez–Saona LE, Giusti MM, WrolstadRE. 1998. Anthocyanin pigment composition of red–fleshed potatoes. J Food Sci 63:458–465.

Saint–Cricq G, Glories Y, Vivas N. Free radical scavenging effect of anthocyanin in red wine. Food

Research International 32 : 327–333(1999)

Silva FL, Teresa S, Gonzalo JR, Buelga CS. 2002. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC Using DAD and ESI–MS detection. *Eur. Food Res. Technol.* 214: 248–253

Silva FL, Teresa S, Gonzalo JR, Buelga CS. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC Using DAD and ESI–MS detection. *Eur. Food Res. Technol.* 214: 248–253 (2002)

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela–Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substates and antioxidants by means of Folin–Ciocalius reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152–178.

Steenson DF, Lee JH, Min DB. Solid phase microextraction analyses of volatile compounds of soybean and corn oils. *J. Food Sci.* 67: 71–76 (1998)

Stephanie A. Smith Robert E. King, David B. Min. Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. *Food Chemistry* 102. 1208–1213(2007)

Tamura H, Yamagami A. Antioxidative Activity Monoacylated Anthocyanins Isolated from Muscat Bailey A Grape. *J Agric Food Chem* 42: 1612–1617 (1994)

Tinsley IJ, Bockian AH. 1960. Some effects of sugar on the breakdown on pelagonidin–3–glucoside in model system at 90°C. *Food Resezrch.* 25. 161

Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Choi SW, Kawakishi S, Osawa T. Antioxidant activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3–O– β –D–glucoside and cyanidin. *J Agric Food Chem* 42 : 2407–2410 (2000)

Viguera CG, Zafrilla P, Artes F, Romero F, Abellan P, Barberan F. 1998. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *J Sci. Food Agric.* 78: 565–573

Viguera CG, Zafrilla P, Artes F, Romero F, Abellan P, Barberan F. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *J Sci. Food Agric.* 78: 565–573 (1998)

Wang H, Race EJ, Shrikhande AJ.2003. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography–mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51–1839–1844.

Warner, K. and E.N.Frankel. Effects of β –Carotene on Light Stability of Soybean Oil. *JAOCS* 64(2), 213–218(1987)

Yang, Seung–OK, Pahn–shick Chang, and Jae–Hwan Lee. Effects of Riboflavin– photosensitized Oxidation on the Formation of Volatile Compounds in Oleic Acid Model Systems. *J. Food Sci. Technol* 37(5), 717–722 (2005)

Yoon JM, Hahn TR, Yoon HH. 1998. Effect of copigmentation on the stability of anthocyanins from a Korean pigmented rice variety. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 733–738

Yoon JM, Hahn TR, Yoon HH. Effect of copigmentation on the stability of anthocyanins from a Korean pigmented rice variety. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 733-738 (1998)

Yoon JM, Hahn TR, Yoon HH. Effect of copigmentation on the stability of anthocyanins from a Korean pigmented rice variety. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 733-738 (1998)

Yoon, Tai-Heon and Sung-Woo Lee, Stability of Anthocyanins in Foods.. Korean J. Food Sci. Technol 11(1) : 63-73 (1979)