

자미고구마의 유용생리활성을 활용한
가공식품 개발 및 산업화

Development and industrialization of functional food
using biological activity from purple sweet potato

연구 기관
진주국제대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “자미고구마의 유용생리활성을 활용한 가공식품 개발 및 산업화에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 진주국제대학교

총괄연구책임자 : 정 영 철

세부연구책임자 : 최 철 응

연 구 원 : 김 희 숙

연 구 원 : 강 신 권

연 구 원 : 전 은 우

연 구 원 : 서 중 권

연 구 원 : 최 준 민

연 구 원 : 황 용 필

연 구 원 : 한 은 희

연 구 원 : 최 재 호

연 구 원 : 최 영 구

협동연구기관명 : 조선대학교

협동연구책임자 : 정 혜 광

위탁연구기관명 : 지산식품

협동연구책임자 : 김 승 교

요 약 문

I. 제 목

자미고구마의 유용생리활성을 활용한 가공식품 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

농촌진흥청에서 전략육종품목으로 개발되어 전국 500여 농가에서 연간 14,000여 톤 생산되고 있는 자미고구마의 고부가가치화를 위하여 주요 생리활성물질인 안토시아닌 천연색소의 유용물질의 대량분리방법을 확립하여 산패억제용 천연항산화소재를 개발함과 아울러 항노화 활성, 미백개선활성 및 간장 질환 개선 활성을 규명한 결과를 기초로 다양한 가공식품을 개발 및 상품화함으로써 우량농작물의 건강기능식품화를 통한 농가소득증대, 기능성 대체 작물의 발굴 및 재배확대, 토종농산물의 국제 경쟁력제고, 국민건강 증진에 기여 하는 것이 최종 목표임

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 자미고구마를 이용한 기능성소재, 가공식품 개발 및 상품화

- 자미고구마로부터 천연 안토시아닌 색소의 대량생산 방법확립 및 표준화
- 자미고구마 안토시아닌 색소의 기능성 소재화
- 자미고구마 안토시아닌 색소를 이용한 각종 가공식품 개발 및 상품화
- 자미고구마 안토시아닌 색소를 주원료로 하는 다양한 기능성 식품 개발 및 상품화
- 자미고구마 안토시아닌 색소를 활용한 기능성소재, 일반가공식품 및 기능성식품의 상품화

2. 자미고구마의 안토시아닌 색소의 분리 및 식품산패 억제 활성 검증을 기초한 천연 항산화소재 개발

- 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 항산화 기전 규명
- 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 피부노화 방지효과 규명
- 자미고구마 유용생리활성 물질의 피부 미백 개선효과

3. 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 급성 간독성의 질환 개선 활성 및 기전 연구

- 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 급성 간 손상 질환 개선 활성 및 기전 연구
- 급성 간염 동물실험 모델을 이용한 간보호 효과를 병리학적 관점에서 확인
- 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 간 섬유화 억제 및 예방 작용/기전 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 자미고구마를 이용한 기능성 소재, 가공식품 개발 및 상품화

- 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 추출조건을 에탄올 용매의 농도, 시간, 온도, 진탕여부에 따라 조사한 결과 에탄올 농도 20%이상, 30~40℃에서 12~15시간 동안 교반하면서 추출 시에 수율이 가장 높게 나타났다.
- 자미고구마 유래 안토시아닌 색소는 pH 3.5이하의 산성부근에서 비교적 안정성이 높았으나, pH 4.0이상에서는 색소 분해가 잘 일어나는 것으로 나타났다.

색소의 pH 안전성을 높이기 위해 구연산을 농도별로 첨가하여 60℃에서 3일간 방치 후 안전성을 조사한 결과 0.7~1% 첨가 시에 색소의 추출수율 뿐만 아니라 pH 안전성을 동시에 얻을 수 있었다. 또한 자미고구마 안토시아닌 색소는 일광에 의해 쉽게 파괴되는 것으로 나타나 색소 추출 시와 가공식품 제조 시에 빛이 투과되지 않은 조건 및 용기의 선택이 중요한 것으로 나타났다.

- 자미고구마 안토시아닌 색소의 대량생산공정이 표준화되었고, 이 기술은 참여 기업인 지산식품에 기술이전이 완료됨에 따라 현재 2종의 기능성 안토시아닌 색소 소재가 상품화 되어 대기업 등 5개 업체에 납품 중에 있다.
- 자미고구마의 안토시아닌 농축물과 열풍건조분말을 활용하여 자미고구마 기능성음료 3종(농축음료, 즉석음료, 감식초칼라음료), 자미고구마 유가공품, 자미고구마 칼라두부, 면류, 떡류 및 환제품 등이 개발되었다. 이 중에 자미고구마 농축음료와 즉석음료 2종은 상품화가 완료되어 시판 중에 있다.
- 제2세부과제에서 얻어진 결과를 기초로 자미고구마의 안토시아닌 천연 농축물을 이용하여 간기능 개선 기능성식품과 미백화장품을 개발하였다.

2. 자미고구마의 안토시아닌 색소의 분리 및 식품산패 억제 활성 검증을 기초한 천연 항산화소재 개발

- 자미고구마에서 분리한 색소의 건강기능식품으로서의 가능성을 조사하기 위하여, 항산화를 동물세포 및 in vitro 상에서 측정한 결과 우수한 항산화 효과를 (Vit. C의 50%) 확인 할 수 있었으며, 산화적 자극에 의한 세포의 사멸도 방지하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 식품의 산패에 대한 방호 효과를 측정한 결과 7일동안 약 30% 정도의 산패를 저해 하는 것을 확인 할 수 있었다.
- 자미고구마의 유용생리활성물질에 대한 항산화 활성 기전 규명을 위해 산화 자극에 대한 피부 보호 효과 및 노화 방지에 대한 효과를 확인하기 위하여 피부 세포를 배양하여, MMP 효소에 대한 활성과 MMP효소의 RT-PCR, 피

부 세포에서의 ROS 소거능, 피부세포에서의 확인한 결과 MMP분해 효소 활성을 유의적으로 증가 시키는 것을 확인 하였으며, 이는 MMP 효소의 생산 mRNA의 생성을 증가시켜 효소의 생성이 증가하는 것이라는 것을 실험을 통해 확인 하였다. 또한 피부 주름개선에 대한 효과를 확인하기 위해 피부 세포주 NIH3T3에서의 collagen 생성효과를 측정 한 결과 자미고구마 추출물에 의해 유의적인 증가(20%)를 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 피부 세포독성에 대한 연구를 수행한 결과 세포 독성도 유의적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 자체 독성을 고농도에서(200ug/ml)에서도 확인 할 수 없었다. 연구 계획서 평가 중에 심사위원에게 요구된 타 지역 생산 자미고구마와의 차이 비교에서는 함양지역과 타 지역의 고구마의 유의성 있는 차이는 찾을 수 없었다.

- 자미고구마 유용생리활성 물질에 대한 항산화 활성을 피부 미백 개선효과를 확인 하는 방법인 Tyrosinase 활성을 버섯 Tyrosinase 효소를 이용한 방법과 B16F10의 흑색종 세포를 이용한 방법을 통해 측정하여, 멜라닌 세포에서의 멜라닌 합성과 Tyrosinase의 활성이 유의성 있게 저해 되는 것을 확인 하였다(알부틴의 110%). 하지만 멜라닌 세포에서 생성된 멜라노솜의 각질 세포로의 이동은 약 15% 정도의 감소를 보였으나, 그 결과의 유의성은 증명 할 수 없었다. 이러한 결과로 우수한 미백 소재로 활용 가능 할 것으로 판단하였다. 하지만 화장품제조를 위한하여 80℃정도의 열 처리 시 미백 관련 생리활성을 81%(알부틴의 30%) 정도 잃어버리는 것으로 나타났으며, 자미고구마 유용생리활성 물질의 대부분인 anthocyanin의 특성에 따라 화장품 제조 시 첨가량에 제한을 받아(피부 염색 등) 미백 개선용 기능성 식품으로의 개발이 더 적합한 것을 본 연구를 통해 알 수 있었다.

3. 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 급성 간독성의 질환 개선 활성 및 기전 연구

- 일차 간세포를 이용한 세포독성 효능 검색 : 일차 간세포를 이용한 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 독성 테스트를 통한 세포독성 유무를 확인하였다.

- 급성 간독성 동물 모델 확립 및 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 효능 검색 : 급성 간독성 유발물질을 이용한 급성 간독성 모델을 확립하고 APAP에 의한 급성 간독성으로 증가된 혈중 ALT 및 AST 효소 활성변화가 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌에 의해 감소함을 확인하였다.
- 간 조직을 이용한 지질과산화 및 Glutathione (GSH)의 함량 변화에 대한 연구 : 급성 간독성이 유발된 간 조직을 이용한 지질과산화에서 APAP에 의해 증가된 과산화지질이 안토시아닌 생리활성물질인 안토시아닌에 의해 감소함을 확인함. 또한, 간 조직을 이용한 Glutathione (GSH) 함량 변화에서도 APAP에 의해 소실된 GSH의 함량이 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌에 의해 증가함을 확인하였다.
- 조직학적인 소견 : Haematoxylin Eosin (HE) 염색을 통한 간 조직의 임상학적인 변화에서 APAP에 의해 괴사된 조직이 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌에 의해 보호되는 것을 확인하였다.
- 약물대사효소의 활성측정 : 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌만을 단독으로 투여한 경우 APAP와 같은 간 손상을 유발하는 화학물질의 대사에 관여된 간의 약물대사 효소인 Cytochrome(CYP) P450의 효소들 (P450 1A1, P450 2E1)의 활성을 억제하는 것을 확인하였다.
- 제조 항체를 이용한 Cytochrome(CYP) P450 2E1의 western blotting : 마우스를 이용하여 제조한 특이 CYP 2E1의 항체를 이용하여 western blotting을 수행한 결과, 자미고구마의 생리활성인 안토시아닌 투여 농도 별로 CYP 2E1의 발현이 감소하는 것을 실험동물의 간을 이용하여 확인하였다.
- 간 성상세포 (Hepatic Stellate Cell)의 간 성상세포 증식 억제에 대한 연구 : 간 성상세포의 배양조건을 확립하고, 간 성상세포를 이용한 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 독성 테스트를 통한 세포독성 유무를 확인하였다.

- 간 정상세포 (Hepatic Stellate Cell)를 이용한 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 효능검색 : 간 정상세포의 활성 지표인 alpha-smooth muscle actin (α-SMA) 생성에 대해 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 억제 효능을 확인하였다.
- 간 섬유화 동물모델 확립 및 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 효능 검색 : 간 섬유화 유발물질을 이용하여 간 섬유화 모델을 확립하고 DMN에 의한 간 손상으로 증가된 혈중 ALT 및 AST의 효소 활성변화가 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌에 의해 감소한 것을 확인하였다.
- 간 섬유화 동물모델을 이용한 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 효능 검색 : 간 섬유화에 의해 증가된 간 조직내 콜라겐의 형성이 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 간 조직 내 alpha-smooth muscle actin (α-SMA)의 발현 및 콜라겐 생성 양이 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌에 의해 감소하는 것을 확인하였다.
- 본 연구의 결과는 자미고구마 재배 농가에 이전되어 고부가가치 제품 생산으로 농가 소득 향상에 기여하게 될 것이다
- 자미고구마 추출물의 항산화 활성 및 산패 방지 효과는 식품에 첨가되어 노화 방지등및 식품 유통기한 개선용 천연 소재로 활용가능하여, 식품 첨가용 천연 소재 제품으로의 개발에 활용 하고자 한다
- 자미고구마 추출물의 미백 개선용 효과는 및 주름 개선효과는 추후 병원과 연계한 인체실험을 통해 미백 개선용 식품소재로의 개발을 통한 건강기능식품 등록에 기초 자료로 활용 하고자 한다
- 향후 본 연구에서 구명되지 않은 기능성 성분과 보다 다양한 기능성 제품 개발, 생체 내에서의 항산화 미백 간기능 개선활성 메카니즘적인 연구가 필요하다.
- APAP에 의한 급성 간 손상 model과 DMN 등에 의해 유도되는 간 섬유화 모델을 확립하였으며, 이를 이용한 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌의 급성 간

손상 및 간 섬유화 등의 예방 효능과 그 작용기전 규명을 통해 관련 질환에 대한 기능성 건강식품 (Nutraceutical Food) 개발의 모델구축으로 인한 국제적 기술우위를 확보하였으며, 이를 이용하여 새로운 간질환 관련 기능성 소재 탐색에 응용하고자 한다.

- 급성 간 손상 억제효력 시험 및 간 섬유화 억제 효력 시험을 통한 급성 간 손상 및 간 섬유화를 예방하거나 억제할 수 있는 기능성 소재개발에 관련 기술을 응용하여 기능성 식품 소재 및 치료제 개발에 근거자료 활용하고자 한다.
- 본 연구를 통해 얻어진 급성 간 손상 억제, 간 섬유화 억제, 간암 예방제 탐색 및 기전연구로 우수한 약효를 갖는 천연물질을 발굴하여 농가소득 증대 및 산업화에 기여하고자 한다.
- 본 연구 결과 중 일부는 국내외 학술 잡지에 게재되어 관련 학문과 기술의 개발에 이바지될 것이다.

SUMMARY

I. The subjective of the project

Development and industrialization of functional food using biological activity from purple sweet potato

II. The objective and importance of the project

A new purple color sweet potato cultivar "Zami" which was: Mokpo 29" was developed by sweet potato breeding team at the Mokpo experiment station, National Honam Agricultural experiment station from 1993 to 1998. This cultivar was selected from the cross between the food processing type cultivar 'gummi' and purple color cultivar 'yamakawamurasaki' introduced from Japan. Purple color sweet potato are now processed and marketed at the farm level. Therefore through the scientific study of pharmacological effects on the several diseases, health-benefit functional foods using purple sweet potato should be developed for the high income of the farmers as well as the decrease of the social medical expenses.

III. The scope and contents of the project

1. The development and industrialization of functional materials and foods using purple sweet potato extracts.

- The mass production and it standardization of anthocyanin pigment from purple sweet potato extracts.

- The development as functional materials of anthocyanin pigments isolated from purple sweet potato extracts.
- The development of various foods using powder or anthocyanin concentrate produced from purple sweet potato extracts.
- The development of functional foods and cosmeceuticals using the concentrated anthocyanin pigments from purple sweet potato extracts.
- The industrialization of functional materials and foods using the biological activity of anthocyanin pigments from purple sweet potato extracts.

2. Determination of oxidative stability and antioxidant effect with purple sweet potato extracts.

- The characterization of antioxidative activities of purple sweet potato extracts.
- The effects of anthocyanin on mushroom tyrosinase, tyrosinase inhibitory activity, and melanin content were assessed in B16 melanoma cells (B16 cells).
- The effect of anthocyanin on anthocyanin inhibition of melanogenesis and antioxidant activity were determined in B16 cells. And also the effect of anthocyanin on reactive species (ROS) generation was determined in B16 cells.

3. Hepatoprotective effect of anthocyanin pigments from purple sweet potato extracts on oxidative stress–induced liver damage in mice.

- The fractionation of anthocyanin pigments from purple sweet potato and

the hepatoprotective effect of its on acetaminophen (APAP)–induced hepatotoxicity and the possible protective mechanisms were investigated in mice.

- The protective effect of anthocyanin pigments from purple sweet potato on hepatic fibrosis in *in vitro* and *in vivo*.

IV. The research results and the recommendation

1. The development and industrialization of functional materials and foods using purple sweet potato

- The goal of project was development and industrialization of functional materials and foods using purple sweet potato.
- To investigate the optimal conditions for the production of anthocyanin pigment from purple sweet potato, the optimal ethanol solvent and citrate concentration, and the optimal extraction temperature and time were determined.
- Twenty percent ethanol solution acidified with 0.7~1% citrate was found to be a maximum yield of anthocyanin pigment by agitating purple sweet potato for 12~15 hrs at 30~40 temperature. Under the above optimal condition, pilot plant scale extraction(500kg) and concentration of purple sweet potato anthocyanin pigment were also performed and showed to a similar extraction yield.
- The stability of anthocyanin pigment from purple sweet potato was determined. The color of purple sweet potato anthocyanin pigment was more intense and stable at low pH level, the addition of citrate increased the stability and extraction yield. he purple sweet potato anthocyanin

pigment was unstable under sunlight, and can be decreased its degradation by shielding the light from the pigment.

- The mass production system of purple sweet potato anthocyanin pigment was standardized and transferred to the participated company.
- Two types of the anthocyanin concentrate and a powder from purple sweet potato are on the market.
- Various functional foods, and cosmeceutical using biological activities of anthocyanin pigment from purple sweet potato were developed, and three types of functional food were merchandised.

2. Determination of oxidative stability and antioxidant effect with purple sweet potato extracts.

- To find antioxidative agents and skin-whitening agents, the melanogenesis inhibitory action of EtOH extracts of Zami (anthocyanin) was investigated.
- In this current study, the effects of anthocyanin on mushroom tyrosinase, tyrosinase inhibitory activity, and melanin content were assessed in B16 melanoma cells (B16 cells). Results indicated that anthocyanin has a strong antityrosinase activity ($IC_{50}=3.59 \times 10^{-6}$ M).
- Furthermore, data on murine tyrosinase activity and melanin biosynthesis revealed that anthocyanin effectively suppressed murine tyrosinase action and the amount of melanin. To investigate the relation between anthocyanin inhibition of melanogenesis and antioxidant activity, the effect of anthocyanin on reactive species (ROS) generation were determined in B16 cells. As the results, the ROS generation was effectively down-regulated by anthocyanin. These results suggested that anthocyanin

has anti-melanogenic activity and antioxidant properties by suppressing ROS generation.

3. Hepatoprotective effect of anthocyanin extracts from purple sweet potato on oxidative stress-induced liver damage in mice.

- The first study was examined the protective effects of an anthocyanin fraction from purple sweet potato on acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicities and the possible protective mechanisms were investigated in mice. In mice, pretreatment with anthocyanin prior to the administration of APAP significantly prevented the increase in serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity and hepatic malondialdehyde formation. In addition, pretreatment with anthocyanin rescued the APAP-induced depletion of hepatic glutathione (GSH) levels. APAP-induced hepatotoxicity was also prevented by pretreatment with anthocyanin, as indicated by liver histopathology. The effects of anthocyanin on cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 2E1, the major isozyme involved in APAP bioactivation, were investigated. Treatment of the mice with anthocyanin resulted in a significant decrease in the CYP1A1-dependant ethoxyresorufin O-deethylase activity, the CYP2E1-dependent aniline hydroxylase activity and CYP2E1 protein levels in dose dependent manner.
- The second study was examined the in vitro and in vivo effects of an anthocyanin fraction from purple sweet potato on hepatic fibrosis. The viability of hepatic stellate cells was examined after exposure to anthocyanin. The cell viability was measured using a WST-1 assay. Also, the protein expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) induced-acetaldehyde was reduced by anthocyanin in hepatic stellate cell. In rat, pretreatment with anthocyanin prior to the administration of DMN significantly decreased the increase in serum alanine aminotransferase

(ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity. Anthocyanin reduced the protein expression of α -SMA and collagen type III in the liver tissue induced DMN from rats. Fibrosis scores of livers from DMN rats with anthocyanin were reduced in comparison with DMN rats, as indicated by liver histopathology. Hepatic collagen content of DMN rats was reduced by anthocyanin treatment.

- In conclusion, the present results show that anthocyanin treatment exerts anti-hepatotoxicity and anti-fibrotic effects in APAP- and DMN-induced animal models.

CONTENTS

Charpter 1. Outline of the project	1
Charpter 2. The dosmetic and international states of the technology	6
Charpter 3. The research contents and results	8
1. The development and industrialization of functional materials and foods using purple sweet potato.	8
1. Introduction	8
2. Material and Methods	10
3. The research contents and results	12
1). The mass production and its standardization of anthocyanin pigment from purple sweet potato	12
2) The development as functional material of anthocyanin pigment isolated from purple sweet potato	23
3) The development of various foods using powder or anthocyanin concentrate produced from purple sweet potato.	33
4) The development of functional food and cosmeceuticals using the concentrated anthocyanin pigment from purple sweet potato.	6
5) The industrialization of functional materials and foods using the biological activity of anthocyanin pigment from purple sweet potato.	8
4. Summary	85

5. Reference	8
2. Determination of oxidative stability and antioxidant effect with purple sweet potato extract	91
1. Introduction	9
2. Material and Methods	3
3. The research contents and results	9
1) The Characterization of antioxidative activites from purple sweet potato	89
2) Anti-oxidation and inhibition of matrix metalloproteinase in oxidative stress induced fibroblast by purple sweet potato	13
3) The effect of purple sweet potato extract on melanin formation melanogenesis in B16 cells mouse melanoma cell line	18
4. Summary	119
5. Reference	120
3. Hepatoprotective effect of anthocyanin extracted from purple-fleshed sweet potato on oxidative stress induced liver damage in mice	125
1. Introduction	125
2. Material and Methods	128
3. The research contents and results	13
1) Hepatoprotective mechanism of anthocyanin pigment from purple sweet potato extracts on several hepatocyte	13
2) The fractionation of anthocyanin pigments from purple sweet potato and the hepatoprotective effect of its on acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity and the possible protective mechanisms in mice	144

3) The protective effect of anthocyanin pigments from purple sweet potato on hepatic fibrosis in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	146
4. Summary	150
5. Reference	151
Chapter 4. The attainment and contribution	551
Chapter 5. The utilization and extension	751
별첨	160

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	6
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	8
제 1 절	자미고구마의 유용생리활성을 활용한 가공식품 개발 및 산업화 ...	8
1. 서론	8
2. 재료 및 방법	10
3. 결과 및 고찰	12
가. 자미고구마로부터 천연 안토시아닌 색소의 대량생산 방법 표준화	12
나. 자미고구마 안토시아닌 색소의 기능성 소재화	28
다. 자미고구마 안토시아닌 색소를 이용한 각종 가공식품 개발	30
라. 자미고구마 안토시아닌 색소를 주원료로 하는 다양한 기능성식품 개발	66
마. 자미고구마 안토시아닌 색소를 활용한 기능성 소재, 일반가공식품 및 기능성 식품의 상품화	82
4. 요약	85
5. 참고문헌	86
제 2 절	자미고구마의 안토시아닌 색소의 분리 및 식품산패 억제 활성 검증을 기초한 천연 향산화 소재 개발	91
1. 서론	91

2. 재료 및 방법	98
3. 결과 및 고찰	98
가. 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 항산화 기전 규명	98
나. 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 피부노화방지효과 규명	103
다. 자미고구마 유용 생리활성물질의 피부 미백 개선효과	113
4. 요약	119
5. 참고문헌	120
제 3 절 간장 질환 예방·개선용 식품개발을 위한 자미고구마의 간 기능 개선 및 작용기전 검색	125
1. 서론	125
2. 재료 및 방법	128
3. 결과 및 고찰	133
가. 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 급성 간손상 질환 개선 활성 및 기전 연구	133
나. 급성 간염 동물실험 모델을 이용한 간보호 효과를 병리학적 관점에서 확인	144
다. 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 간 섬유화 억제 및 예방 작용 및 기전 연구	146
4. 요약	150
5. 참고문헌	151
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	155
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	157
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	159

별첨	160
----------	-----

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 농촌진흥청에서 전략육종품목으로 개발되어 전국 500여 농가에서 연간 14,000여 톤 생산되고 있는 자미고구마의 고부가가치화를 위하여 주요 생리활성물질인 안토시아닌 천연색소의 유용물질의 대량분리방법을 확립하여 산패억제용 천연항산화소재를 개발함과 아울러 항노화활성, 미백개선활성 및 간장 질환개선 활성을 규명한 결과를 기초로 다양한 가공식품을 개발 및 상품화함으로써 우량농작물의 건강기능식품화를 통한 농가소득증대, 기능성 대체 작물의 발굴 및 재배 확대, 토종농산물의 국제 경쟁력제고, 국민건강 증진에 기여 하는 것이 최종 목표로 하고 있다.
- 최근 WTO 체제의 출범과 FTA 발효에 따라 세계 농산물이 무한 경쟁시대에 돌입함으로써 농산물의 개방화와 국제 경쟁상황에서 생존할 수 있는 가장 능동적인 대처방안의 하나가 고부가가치의 농산물을 지역특화 품목으로 육성함과 더불어 이들 농산물의 기능을 이용한 건강 지향적 가공식품의 개발 및 상품화를 과학적으로 검증하여 국내·외 시장에 많이 보급·확산시켜 우리 농산물의 안정적 수급 체계의 구축과 농산물의 고부가가치화를 실현하는 것이 최적의 대안으로 지적되고 있다.
- 이런 측면에서 한국농촌진흥청 산하 목포시험장은 1993년부터 가공용 다수성 고구마 품종인 건미와 안토시아닌색소를 많이 함유하고 있는 일본종 야마게와 무라시게를 인공 교배하여 자미 고구마 3종(자미 목포 29호, 보라미 목포 35호, 신자미 목포 38호)을 개발하여 1996년부터 2001년 까지 전남과 경남에서 지역적응시험을 완료한 후 목포 29호는 기능성 식품가공용소재로, 목포 35호는 생식 및 가공용 소재로, 목포 38호는 천연 색소가공용 소재로 농가에 보급하고 있다.
- 현재 자미고구마의 생산지역은 전남 무안과 해남, 전북 익산, 경남 함양에 집중되어 있으며, 재배 면적은 약 95ha이고, 약 500여 농가에서 연간 1,400톤이 생산되고 있으나, 생체로만 판매되고, 가공식품 소재로는 사용이 거의 없는

실정 이어서 생산농가가 판로에 큰 애로를 겪고 있다.

- 특히 함양군은 지자체의 추천으로 338농가가 자미고구마 작목반을 구성하여 128.822평 (42.9ha)에서 연간 750톤을 생산하고 있으나, 생체판매가 부진하여 현재 저온창고에 저장 중에 있어 가공식품의 개발 및 상품화가 절실히 요구되고 있는 상황이다.
- 자미고구마는 상기와 같이 농촌진흥청이 농산물의 부가가치를 높이기 위해 전략적으로 육종한 우량품종으로서, 자미고구마에는 고구마 고유의 당질과 섬유소뿐만 아니라 최근 항산화, 항암, 간보호 활성 등이 보고된 안토시아닌 색소가 다량 함유되어 있어, 기능성 식품소재로서의 활용가치가 매우 높은 농산물로 평가되고 있다.
- 자미고구마는 아래 그림과 같이 안토시아닌색소를 생체 중량대비 약 3.8%함유하고 있어 표피층뿐만 아니라 육질 전체가 진한 자색을 띠고 있는데, 이 기능성 색소함량이 cranberry보다는 10-60배, 포도보다는 5-7배 높아 천연 기능성 색소 원뿐만 아니라 기능성 식품소재로서 가치가 우수하다.
- 자미고구마에 대한 연구는 일본에서 일부 수행되어 안토시아닌색소의 분리정제 및 구조분석, 그리고 사염화탄소 유발 흰쥐에 대한 간 손상 보호 활성이 주류를 이루고 있으며, 국내에서는 호남농업시험장 산하 목포시험장이 주축이 되어 안토시아닌 색소의 추출, 분리 및 특성 등을 수행한 과제는 있으나 기능성 또는 일반가공식품소재 개발 및 상품화를 위한 과학적·체계적 연구는 극히 미흡한 실정이다.
- 최근 산소를 소비하는 모든 생물체와 식품들은 반응성이 매우 큰 유독성 활성산소와 반응 시 지질·단백질·DNA등에 대하여 비선택적, 비가역적 산화반응을 촉진하여 암, 노화, 간장 질환뿐만 아니라 식품의 산패를 유발시키는데, 이를 제어할 수 있는 방법으로는 인체 내 항산화계 효소 생성을 활성화시키거나 인위적으로 항산화제를 섭취 또는 첨가하면 되나, 상업적으로 사용할 수 있는 무독성 고효율성 이면서 저가 천연항산화제는 상용화되지 못하고 있는

실정이다.

- 따라서 본 연구에서는 상기에서 언급한 선행연구의 결과와 항산화활성이 우수하면서 저가로 분리 가능한 자미고구마의 안토시아닌색소 (3.8%)를 이용한 각종 항산화(천연 항산화 식품소재, 항노화 기능성소재, 미백소재, 간보호 소재) 활성을 검증한 후 이들 소재를 활용한 다양한 기능성 식품을 개발 및 상품화하면 재배농가의 소득증대 뿐만 아니라 가공식품의 국내외 시장 진입을 위한 기술경쟁력 확보가 가능할 것으로 판단된다.
- 정부가 주도하여 육종·보급한 자미고구마가 고부가가치의 농산물로 성공하기 위해서는 재배·보급에서 개발·가공·상품화 및 유통에 까지 통합적 지원을 통한 one-stop 지원 체계 구축이 요구되고 있다.
- 현재 약 500여 농가에서 연간 1,400톤 규모로 생산되고 있는 전남 무안과 해남 및 경남 함양의 지역특화작물인 자미고구마의 수익성 제고를 위해서는 산업화를 위한 기술개발이 선행되어야 한다.
- 과학의 발달과 소득 향상에 따라 건강지향적 기능성 식품소재 및 식품에 대한 관심이 고조되면서 현대인의 각종 생활습관병(암, 당뇨, 혈액순환기계질환 등) 과 노화가 체내 활성산소와 식품중의 과산화물에 의해 유발 또는 촉진된다는 것이 밝혀져, 부작용을 초래하는 의약품 보다는 무독성이면서 장기 복용이 가능한 천연식품소재로부터 이들 질병을 관리, 예방하는 건강기능성 식품 시장이 선진국을 중심으로 급속도로 성장하고 있다.
- 또한 농산물을 이용한 기능성 소재에 대한 세계시장은 시장은 1997년 650억 달러에서 2000년 1,380억 달러로 높은 성장을 보이고 있으며, 2005년도에는 현재 시장의 10배 이상의 규모로 증가되어 2010에는 자동차 시장규모로 성장할 것으로 예상되고 있으며, 특히 농산물에서의 항산화물질은 독성이 적어, 장기적 사용이 가능함으로 식품산업, 의약산업, 화장품산업 등 다양한 분야에서 이용될 수 있기 때문에 국가의 경제적·산업적 측면에서 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있다.

- 향산화물질의 시장규모를 보면 식품분야에서만도 연간 10억불 이상의 세계시장을 확보하고 있는데, 현재 많이 사용되고 있는 합성향산화제보다 천연 향산화제의 이용이 대폭 증가 하고 있는 추세이다.
- 다량의 기능성 소재들이 향산화 소재로 검토되었으나 산업화에 실패한 주요 원인은 생산비용이 고가이고 활성이 낮은데 기인하는데, 자미고구마의 주요 향산화물질인 안토시아닌 색소는 생체 중량당 3.7g%로서 함량이 높고, 예비 실험결과 활성이 높기 때문에 상품화 성공 가능성이 매우 높다.
- 천연물 시장에서 가장 큰 고부가가치를 창출한 적송껍질로부터 분리된 Pyconogenol은 수년간 3억불의 매우 큰 시장을 형성하고 있으며, 최근 일본에서도 판매를 시작했는데 음료와 화장품원료로 kg당 40만 엔을 호가하고 있는 등 커다란 시장을 형성하고 있음. 펄프 제지 산업의 부산물인 적송의 껍질로부터 Pyconogenol이라는 향산화제를 개발함으로써 고부가가치 상품을 창출한 성공적인 예가 되고 있다.
- 농업신소재개발 등의 기술은 최근 세계 각국의 기술보호정책에 따라 그 도입이나 이용이 매우 어려우므로 우리나라에서 개발한 신규 농산물인 자미 고구마를 이용한 기능성 신소재의 개발과 이를 이용한 산업화는 기능성식품시대에 국제 경쟁력확보에 크게 기여 할 것으로 예상된다.
- 본 연구는 자미고구마를 이용하여 향산화, 항노화, 미백, 간보호 등의 기능성 소재를 개발하고, 그 추출방법을 정립화 시켜, 기업에 기술이전을 통해 농가 소득의 증진에 기여하고자 하며. 국내 육종기술에 의해 만들어진 자미고구마를 이용한 기능성 식품은 수출시장개척 및 진입도 용이할 것으로 전망된다.
- 식품산업의 발전단계를 사회·문화적 측면에서 고려해 보면 1990년 이전에는 식품의 1차 기능인 영양과 제 2차 기능인 감각(기호)기능을 근거로 식품이 제조·가공·판매되어 왔으나, 1995년부터는 고령화시대 진입, 과학기술의 발전과 식생활습관의 급격한 변화에 따라 각종 퇴행성 난치성 질환의 급증으로

영양분손실을 현저히 줄인 최소가공품, 특히 각종 질환에 생리적 활성을 발휘하는 식품의 3차 기능인 기능성물질을 재조합하여 제조되는 건강기능식품이 2010년까지 식품산업을 주도할 것으로 예견되며, 2010년부터는 인간 genome의 유전적 해석 및 규명에 따라 개인별 유전적 특성에 맞는 맞춤형 식품(nutrigenomics)이 출현하여 의약품과 기능성식품의 한계가 불명확한 시대가 도래 할 것으로 예측하고 있다.

- 이와 같은 상황에서 자미고구마의 기능성 소재는 간편화, 최소화, 기능성, 맞춤형 식품시대에 매우 부합되는 항산화(천연항산화식품소재), 항노화 소재, 미백소재, 간보호 개선소재로서 각광을 받을 것으로 기대되며, 이들 소재를 활용한 다양한 가공식품 (고추대용 김치 및 고추장제조, 항산화용 기능성 면류 및 제과제조, 적색 술 제조등 다수)과 기능성 식품, 그리고 화장품 및 의약품 제조에까지 활용범위가 대폭 확대될 것으로 전망된다.
- 대표적인 구황식물인 고구마는 전통적인 부식 또는 간식으로 애용되어 왔으나, 본 과제를 통해 최근 기능성 농산물로 육종·보급되고 있는 자미고구마에 대한 항산화 및 간기능 개선 활성을 과학적으로 검증한 결과를 기초로 웰빙 건강식품으로 상품화함으로써 시대요청에 부합되는 식품의 산업화와 농가소득 증대를 병행하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외 현황

- 자미고구마(자색고구마, Purple colored sweet potato) 품종은 일본에서 최초로 육종에 성공하여 antocyanin 함량이 대량 함유된 "Ayamurasaki"를 규슈지방을 중심으로 일본 농가에 보급하여 재배되고 있으나, 그 외의 나라에서는 거의 재배되지 않고 있다.
- 일본에서 수행한 자미고구마에 대한 주요 연구는 안토시아닌 색소의 분리 정제 및 구조분석 등에 주류를 이루고 있는데, Odake 등은 자미고구마의 안토시아닌의 주 색소는 cyanidin과 peonidin의 3-caffeoylferuloylsophoroside-5-glucoside라고 보고 하였고, Tsukui 등은 cyanidin-(3,6)- α -D-glucopyranosyl-(1,2)- β -D-fructo-furanoside 와 cyanidin-(3,6)- α -D-glucopyranosyl-(5,1)- α -D-xyloside로서 caffeic acid나 ferulic acid가 acylation의 형태라고 보고하여, 자색고구마의 품종에 따라 주색소의 구조적 차이가 있는 것으로 밝혀졌다.
- 일본에서는 자미고구마의 안토시아닌 색소를 이용하여 사염화탄소 유발 흰쥐에 대한 간보호 효과를 GOT, GPT, LDH, TBA-RS 등으로 조사한 결과 간보호 활성이 극히 일부 규명된 바 있으며, 최근에는 이들 색소를 이용한 음료개발에 대한 연구가 보고되고 있다.

2. 국내 현황 및 문제점

- 농촌진흥청 호남농업시험장 목포시험장에서 1993년 자미고구마를 토종고구마인 건미와 일본종인 야마카와무라사끼를 교배하여 자미(목포 29호)를 육종에 성공하여 생산력 검정시험을 한 결과 자색색소는 많이 함유되어 있으나 단위면적당 생산량이 보통의 고구마에 비해 60-70% 정도로 낮은 단점이 지적되어, 1994년부터 신미와 교배하여 다수성이면서 식미가 향상되고 자색 색소가 다량 함유된 보라미(목포 35호)와 신자미(목포 38호) 개발에 성공함에 따라

현재 전남, 전북, 경남 500여 농가에 보급하여 재배 중에 있다.

- 육종에 성공한 기능성 우량 구황식물인 자미고구마에 대한 국내 연구는 목포 시험장을 중심으로 색소의 추출, 분석, 안정성, 광안정성, 가열에 대한 속도론적 연구 및 동정등 안토시아닌 색소에 대한 분리, 추출 및 특징에 한정되어 수행되어 왔고 가공, 상품화연구 및 산업화를 위한 필수 요건인 항산화 활성 등에 대한 연구는 전무한 실정이다.
- 본 연구에서 추진할 식품의 산패억제용으로 활용할 항산화 활성과 항노화 활성, 미백개선 활성 및 간염, 간 섬유화 개선 활성 등에 대한 체계적·과학적 연구 수행실적은 극히 부진한 것으로 나타났다.
- 본 연구팀이 예비 실험에서 국산 자미 고구마에 대한 항산화, 항염증, 미백개선 및 간개선 활성을 극히 일부분 밝혔기 때문에 이들 선행연구 실적을 기초로 세부·협동·위탁 연구팀끼리 상호 체계적으로 과제가 수행되면 기능성 규명을 통한 다양한 가공식품의 상품화가 가능할 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 자미고구마의 유용생리활성을 활용한 가공식품 개발 및 산업화

1. 서론

- 자미고구마는 농촌진흥청이 1993년부터 가공용 다수성 토종 고구마 품종인 건미와 안토시아닌 색소를 많이 함유하고 있는 일본종 야마게와무라시게를 인공 교배하여 자미고구마 3종(자미 목포 29호, 보라미 목포 35호, 신자미 목포 38호)을 개발하여 1996년부터 2001년 까지 전남과 경남에서 지역 적응시험을 완료한 후 목포 29호는 기능성식품 가공용 소재로, 목포 35호는 생식 및 가공용소재로, 목포 38호는 천연색소 가공용 소재로 농가에 보급하고 있는 우량 품종이다.
- 현재 자미고구마의 생산지역은 전남 무안과 해남, 전북 익산, 경남 함양에 집중되어 있으며, 재배면적은 약 95ha이고, 약 500농가에서 연간 1,400톤이 생산되고 있으나 생체로만 판매되고 가공식품 소재로는 사용이 거의 없는 실정이다.
- 자미고구마는 상기와 같이 농촌진흥청이 농산물의 부가가치를 높이기 위해 전략적으로 육종한 우량품종으로서, 자미고구마에는 고구마 고유의 당질과 섬유소뿐만 아니라 최근 항산화, 항암, 간보호 활성 등이 보고된 안토시아닌 색소가 다량 함유되어 있어 기능성식품 소재로서의 활용가치가 매우 높은 농산물로 평가되고 있다.
- 자미고구마는 안토시아닌 색소를 생체 중량대비 약 3.8 % 함유하고 있어 표피층뿐만 아니라 육질 전체가 진한 자미를 띠고 있는데, 이 기능성색소 함량이 cranberry 보다는 10~60배, 포도보다는 5~7배 높아 천연 기능성 색소원 뿐만 아니라 기능성 식품소재로서 가치가 우수함이 밝혀지고 있다.

- 전분함량은 59.4 %로서 일반고구마와 비슷한 수준을 보이고 있어 색감 증진 및 기능성 향상을 목적으로 하는 전분가공용 식품제조에도 활용가능성이 매우 높다.
- 일반고구마에 비해 유리당 함량이 $\frac{1}{3}$ 정도 함유되어 있어 감미는 낮으나, 섬유질, 단백질, 비타민, 무기질이 풍부하고, 특히 안토시아닌색소를 다량 함유하고 있기 때문에 야구르트, 된장, 김치, 고추장 등의 제조 시에 발효미생물의 생육에 좋은 영양분으로 사용될 뿐만 아니라 발효가 진행되는 동안 생성되는 산에 의해 안토시아닌색소가 안정화됨에 따라 색감증진 뿐만 아니라 기능성 증진에도 매우 유용한 소재로 각광을 받고 있다.
- 식품이 본래 가지고 있는 색의 변색이나 퇴색을 방지하고 식품의 가치를 높여 주기 위해 사용되는 식품첨가물 중의 하나인 착색료(색소)는 주로 타르색소를 대표하는 합성착색료를 사용하여 왔으나 최근에 이들 합성착색료가 장기간 섭취 시에 발암성과 독성물질로 변화될 가능성이 있기 때문에 천연물 유래의 무독성이면서 고 기능성의 착색료를 개발하려는 욕구가 강하게 대두되어 식품 유래의 천연착색료에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 이러한 배경 하에서 천연 색소로 상품화에 성공하기 위해서는 목적하는 색소를 다량 함유하면서 다양한 기능성을 발휘하는 저가의 식물체가 필요한데, 이러한 요구에 가장 적합한 것이 자미고구마의 안토시아닌 색소라 할 수 있다. 자미고구마 유래의 안토시아닌 색소의 주요성분은 cyanidin과 peonidin의 3-cafferylferuly-sophoroside-5-glucoside 로서 주색소의 구조는 peonidin-3-diglucoside-5-glucoside acylated with caffeic acid or ferulic acid 로 요약된다.
- 이와 같이 자미고구마의 안토시아닌 색소는 caffeic acid와 ferulic acid등과 아실화된 상태로 존재하기 때문에 다른 식물체에서 분리된 안토시아닌 색소에 비하여 중성 및 약산성, 그리고 빛에 대해서 안전성이 높고, 특히 항산화 활성이 높은 장점을 가지고 있기 때문에 천연색소로서 활용가치가 높다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

함양군에서 계약재배로 생산되고 있는 자미고구마를 본 연구의 참여업체인 지산식품이 일괄 구매한 재료를 본 실험에 사용하였다.

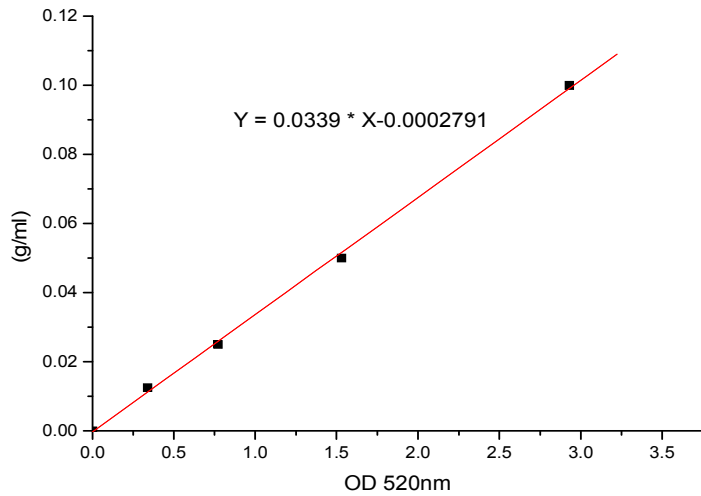
나. 자미고구마의 실험재료 제조

실험에 사용된 자미고구마의 안토시아닌색소 추출은 0.7%~1% 구연산으로 산성화시킨 20% 에탄올 용액을 자미고구마 대비 10배가량 가한 후 상온에서 8~12시간, 진탕하면서 추출한 후 감압 농축하여 사용하였다.

각종 일반 및 기능성식품류의 제조에 사용된 자미고구마 추출물은 참여업체인 지산식품에서 대량생산된 농축액과 열풍건조분말을 제공받았다.

다. 자미고구마 유래 실험용 안토시아닌 색소의 추출 및 정량

자미고구마로부터 안토시아닌 색소의 추출조건 확립, 색소안전성 및 항산화 활성 검증 및 간기능 개선 실험에 사용된 색소의 분리는 2~3mm 두께로 세절한 생자미고구마 시료 대비 약 10배 부피의 20% ethanol 용액을 가한 다음 실온에서 정치하여 8시간 동안 추출하였다. 이 추출액을 membrane filter로 여과한 다음 vacuum evaporator로 40℃에서 ethanol을 완전히 제거한 후 HP-20resin을 충전시킨 column에 안토시아닌 색소를 흡착시켰다. HP-20 resin에 흡착된 색소는 100% ethanol로 용출시킨 다음, 이 용액을 vacuum evaporator로 감압 농축하여 건조한 다음 증류수에 용해시켜 520nm에서 흡광도를 측정하였다.(Total Optimal Density, TOD) 안토시아닌 색소의 정량은 아래 그래프의 검량선을 이용하였고, 본 연구에 사용된 방법으로 추출정량시에 순도 98%이상의 안토시아닌 색소를 얻을 수 있었다. 특히 이 방법은 기존의 안토시아닌 색소 정량법에 비하여 자미고구마로부터 순수색소 함량이 0.5%~0.7% 더 높게 검출되었다.



라. 안토시아닌 색소 최적 추출조건 확립

자미고구마로부터 안토시아닌 색소의 최적 추출조건을 확립하기 위해, 먼저 식용으로 사용하는데 많은 잇점이 있는 에탄올(주정)을 선정하여 10%, 15%, 20%, 30%, 40%에서 최적추출농도를 구한 다음, 추출온도(20, 30, 40, 50, 60, 70°C)와 추출시간(3, 6, 9, 12, 15시간), 그리고 교반여부에 따른 추출수율을 TOD로 산출하였다.

마. 광안정성

자미고구마 안토시아닌 색소의 안정성에 대한 광의 영향을 조사하기 위하여 pH 3.0의 완충용액을 사용하여 20배로 희석하여 제조한 색소액을 20ml씩 취하여 cap test tube에 넣고 밀봉한 후 일부는 일광에 노출시켜 상온에 보관하였고, 나머지는 빛을 차단하기 위하여 cap test tube를 aluminum foil로 싸 후 암소에 보관하면서 색소액의 경시적인 흡광도의 변화를 520nm에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 자미고구마로부터 천연 안토시아닌 색소의 대량생산 방법 표준화

1) 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 추출조건 확립

가) 추출용매 및 농도

지금까지 안토시아닌 색소의 추출용매로서 많이 연구된 것은 methanol 과 ethanol등이 주류를 이루고 있는데, 본 연구의 최종 목표는 자미고구마로부터 식용이 가능한 천연색소를 추출하여 각종 기능성 소재로 활용하는 것에 있으므로 식용 가능한 용매인 물과 주정을 이용하여 안토시아닌 색소의 추출 수율을 조사하였다. 세절한 자미고구마에 증류수, 10% 주정, 15%주정, 20%주정, 30%주정, 40%주정을 10배 첨가한 다음 30℃에서 정치하여 24시간 동안 추출하였다.

식용으로 사용할 경우와 추출설비의 경비 및 추출비용 측면에서 고려해 볼 때 물로 추출하는 것이 주정보다 많은 잇점을 가지고 있으나 자미고구마의 안토시아닌 색소는 증류수 보다는 주정에서 추출수율이 현저히 높았고 또한 주정 농도가 20%이상에서 추출수율이 최고 수준에 도달하였다(Table 1.).

Table 1. Extraction yields of anthocyanins from purple sweet potato with various solvents

Solvent	Extraction yield (%)
Water	35
10% Ethanol	58
15% Ethanol	73
20% Ethanol	98
30% Ethanol	100
40% Ethanol	100

나) 추출온도 및 시간

대량생산을 위한 자미고구마 안토시아닌 색소의 최적 추출용매는 20%주정으로 결정되었기 때문에 추출온도에 따른 안토시아닌 색소의 수율을 20% 주정추출용매를 사용하여 20, 30, 40, 50, 60, 70℃에서 정치하여 3, 6, 9, 12, 15시간별로 조사하였다(Table 2.).

일반적으로 추출온도가 높을수록 추출수율은 증가하는 경향이 있고 모든 실험구에서 추출 9시간 까지는 추출수율이 급격히 증가하다가 12시간 이후에는 20℃를 제외한 모든 온도에서 비슷한 추출수율을 보였다. 공장에서 대량생산 시에는 추출용매가 20% 주정을 사용하기 때문에 고온에서 추출 시에는 설비에 많은 비용이 소요되고 특히 안토시아닌 색소는 열안전성이 비교적 낮으므로 30~40℃가 적당한 온도로 판단된다.

Table 2. Effect of temperature on anthocyanin extraction from purple sweet potato

Temp(℃)	Extraction yield (%)				
	3hr	6hr	9hr	12hr	15hr
20	18	40	58	72	92
30	23	52	75	91	100
40	31	58	88	96	100
50	35	67	91	99	100
60	41	79	98	100	100
70	47	84	98	100	100

다) 정치 및 교반에 따른 추출수율

앞의 추출온도에 따른 색소 추출수율 실험에서 보는 바와 같이 약 12시간 동안 추출해야만 거의 100% 추출되어 공장 규모에서 대량생산 시에는 장시간 추출에 따른 여러 가지 단점이 발생하기 때문에 대량 추출설비 제작 시에 매우 중요한 요소인 교반장치의 장착 유무를 결정하기 위하여 20% 주정 추출용매를 이용하여 30℃에서 시간 별로 정치 또는 교반(150rpm)하면서 추출 정도를 조사하였다.

Table 3.에서 보는 바와 같이 자미고구마 대비 용매를 10배 첨가하여 정치 혹은 교반 시에 추출수율은 교반할 때가 훨씬 우수하였고, 특히 교반 시에는 추출시간을 6시간 이상 단축할 수 있기 때문에 공장 추출설비 시에는 추출탱크에 교반 또는 통기장치가 반드시 필요한 것으로 나타났다.

Table 3. Effect of stationary or shaking conditions on anthocyanin extraction from purple sweet potato

Temp(℃)	Extraction yield (%)				
	3hr	6hr	9hr	12hr	15hr
Stationary	23	52	75	91	100
Shaking	87	100	100	100	100

2) 자미고구마 안토시아닌 색소의 안전성

식품이 본래 가지고 있는 색의 변색이나 퇴색을 방지하고 식품의 가치를 높여 주기 위해 사용되는 식품첨가물 중의 하나인 착색료(색소)는 주로 타르색소를 대표하는 합성착색료를 사용하여 왔으나 최근에 이들 합성착색료가 장기간 섭취 시에 발암성과 독성물질로 변화될 가능성이 있기 때문에 천연물 유래의 무독성이면서 고 기능성의 착색료를 개발하려는 욕구가 강하게 대두되어 식품 유래의 천연착색료에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

이러한 배경 하에서 천연 색소로 상품화에 성공하기 위해서는 목적하는 색소를 다량 함유하면서 다양한 기능을 발휘하는 저가의 식물체가 필요한데, 이러한 요구에 가장 적합한 것이 자미고구마의 안토시아닌 색소라 할 수 있다.

자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 주요성분은 cyanidin 과 peonidin의 3-cafferylferulysoph oroside-5-glucoside 로서 caffeic acid와 ferulic acid등과 아실화된 상태로 존재하기 때문에 다른 식물체에서 분리된 안토시아닌 색소에 비하여 중성 및 약산성, 그리고 빛에 대해서 안전성이 높고, 특히 항산화 활성이 높은 장점을 가지고 있기 때문에 천연색소로서 활용가치가 높다.

본 연구에서는 천연색소 뿐만 아니라 기능성 소재로 상용화 하는데 반드시 요구되는 안전성을 향상시키는 실험을 pH와 유기산 등을 이용하여 조사하였다.

가) pH의 영향

자미고구마 색소의 안전성에 대한 pH 영향을 조사하기 위하여 완충용액을 이용하여 pH를 2, 3, 4, 5, 6, 7로 조절한 색소용액에 대해 최대 흡수파장대를 측정하였다. pH가 산성일수록 최대흡수 파장대는 520nm부근을 나타내었고, pH가 중성 부근에 접근하면서 장파장대인 560nm부근으로 이동하는 전형적인 bathochromic shift현상이 관찰되었다.

각 pH별 시간에 따른 색소 안전성을 65°C에서 조사한 결과는 Table 4.와 같이 pH 2 에서는 시간의 경과에 따라 색소 파괴는 비교적 빠르게 일어나나, 15일 이후의 색소량은 가장 많이 잔존하는 것으로 보아 산성 부근에서 안전성이 높은 것으로 확인되었다. 특히 pH 4.0이상에서는 잔존 색소량이 극히 낮은 결과를 보였기 때문에 공장에서 대량 생산 시에 최종제품의 pH를 적어도 3.5이하로 조절하여 보관, 유통시켜야 안전성에 문제가 없는 것으로 나타났다.

Table 4. Effect of pH on the color intensity of anthocyanin pigment from purple sweet potato

pH	Absorbance at max.wavelength					
	0	3	6	9	12	15days
2.0	1.35	0.97	0.98	0.95	0.74	0.70
3.0	1.04	0.96	0.85	0.72	0.65	0.60
3.5	0.95	0.91	0.74	0.67	0.52	0.45
4.0	0.48	0.35	0.30	0.27	0.25	0.21
5.0	0.42	0.33	0.28	0.21	0.20	0.18
6.0	0.37	0.28	0.22	0.20	0.17	0.17
7.0	0.35	0.28	0.21	0.20	0.17	0.17

나) 구연산의 영향

안토시아닌 색소의 안전성은 pH 의존적 특성을 강하게 띠고 있으므로 공장규모에서 색소의 대량 추출시의 수율향상과 색깔 안전성을 향상시킬 목적으로 지금까지 연구된 결과를 기초로 색소 추출액의 기호성과 색소 안전성 측면에서 구연산을 최종 선정하였다.

구연산을 pH 3.5로 조절된 안토시아닌 색소용액에 0.1%에서 1.5%까지 첨가하여 60℃에서 3일간 방치한 후 520nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Table 5.와 같다. 구연산 농도에 따른 색소의 안전성은 0.9% 까지는 첨가량에 비례하여 증가하는 경향을 보였는데 0.9% 이상에서는 더 이상 증가하지 않았다. 따라서 대량생산을 위해서는 약 0.7~1%의 구연산을 첨가하면 추출수율 향상 및 색소안전성을 동시에 얻을수 있고, 특히 pH가 3.5이하로 유지되어 저장안전성이 크게 향상되는 것으로 나타났다.

Table 5. Effect of citrate concentration on the color intensity of anthocyanin pigment from purple sweet potato

Citrate conc.(%)	Absorbance at 520nm
0	0.38
0.1	0.52
0.3	0.63
0.6	0.95
0.9	1.22
1.2	1.24
1.5	1.23

다) 빛 처리에 따른 저장 안전성

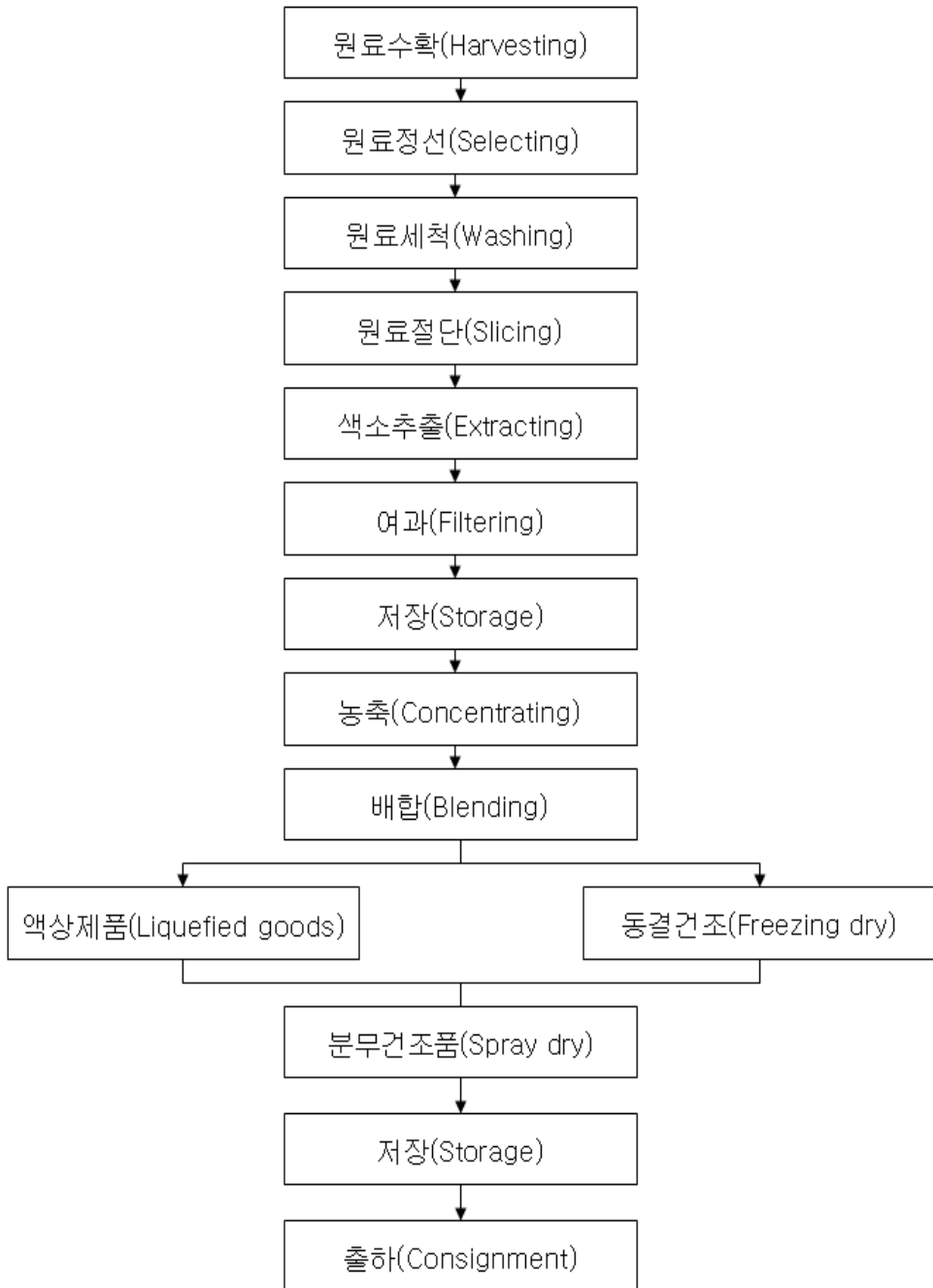
자미고구마 안토시아닌 색소의 저장 안전성에 대한 빛의 영향을 조사하기 위하여 구연산으로 조절한 pH 3.0의 색소 표준액을 시험관에 넣고 밀봉 후 일광에 노출 또는 암소에 보관하면서 5, 10일간 30℃에 보관하면서 색소 함량을 조사한 결과는 Table 6.과 같다.

자미고구마 색소는 일광에 의해 쉽게 파괴되어 광에 대한 안전성이 매우 낮기 때문에 추출·농축공정 뿐만 아니라 색소의 저장시와 가공식품의 용기는 빛이 투과되지 않는 것을 선택하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

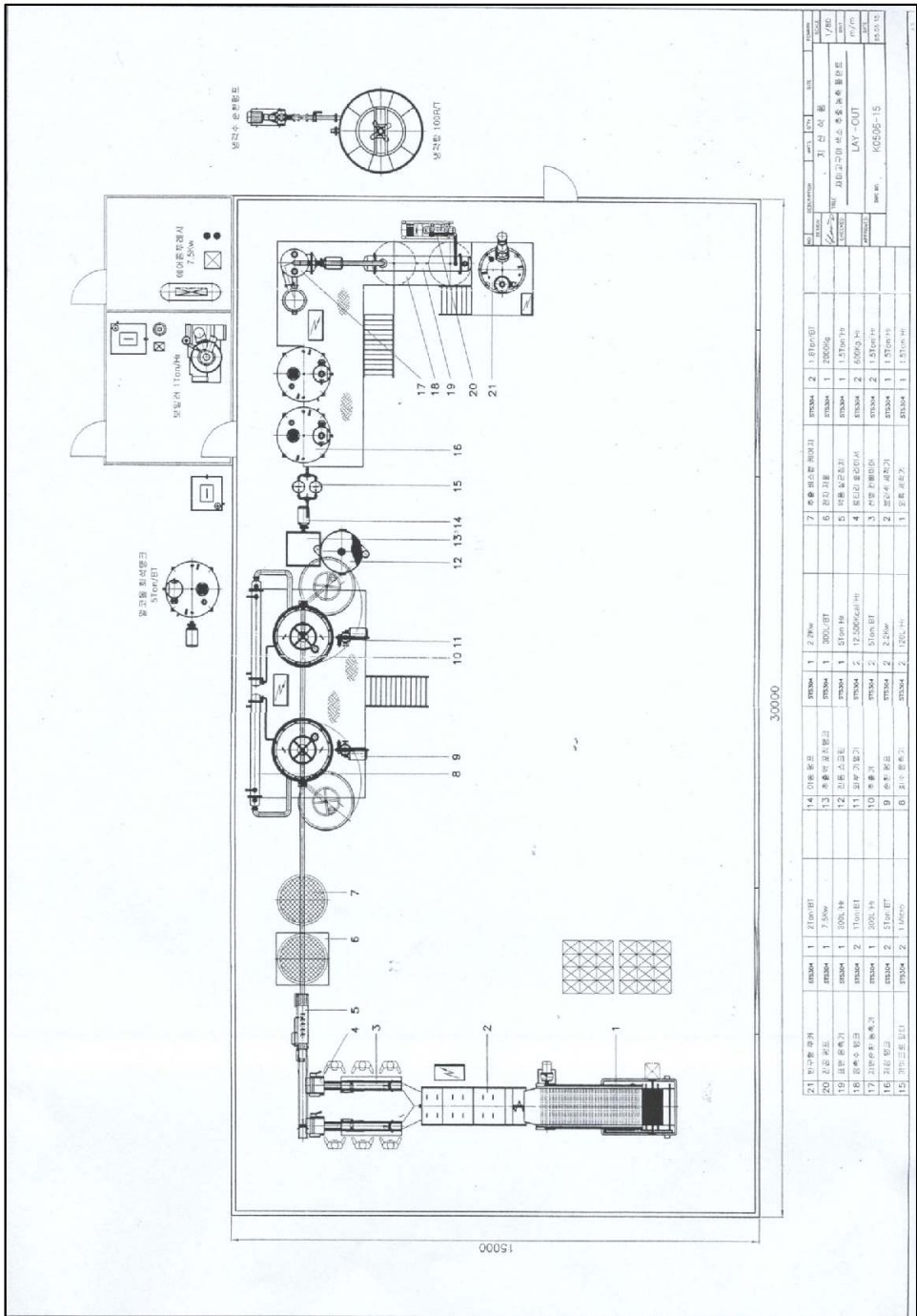
Table 6. Effect of lights on the stability of anthocyanin extracted from purple sweet potato

Conditions	Absorbance at 520nm		
	0	5	10days
Sunlight	1.04	0.84	0.63
Dark	1.04	1.02	0.95

3) 자미고구마 안토시아닌 색소의 대량생산 공정



나) 자미고구마 색소 가공공장의 LAY-OUT



다) 대량생산공정의 재확립

1차년도 연구에서 도출된 자미고구마의 대량제조공정, 즉 자미고구마 수확, 정선, 세척, 절단, 추출, 여과, 저장, 농축, 배합 공정 중에서 산업화에 가장 문제시 되는 것이 자미고구마 원료의 색도함량과 추출용매의 단가 등인데, 이에 대한 추가 실험을 행하여 재정립하였다. 먼저 함양군에서 위탁 재배되고 있는 자미고구마는 재배농가에 따라 크기와 안토시아닌색소 함량이 일정하지 않아 2006년 가을에 수확된 자미고구마 10g을 크기별로 5개군으로 나누어 최적추출용매(20%에탄올, 1%구연산) 100g을 가한 다음 30℃에서 15시간 진탕추출하였다. 이 용액을 여과하여 농축(55Brix) 한 다음 식품첨가물공전에 색가 측정법으로 색가를 측정한 결과는 Table 7.과 같다.

Table. 7. Extraction yields of anthocyanin pigment according to size of purple sweet potato

Group	Size(cm, L×D)	Extraction yields
A	3 × 1.5cm	83%
B	5 × 2.0cm	85%
C	7 × 3.0cm	86%
D	10 × 5.0cm	98%
E	15 × 7.0cm	100%

Table 7.에서 보는 바와 같이 15 × 7.0cm를 100% 대조군으로 하여 추출수율을 산출한 결과 자미고구마의 크기가 작을수록 (3 × 1.5cm) 수율이 83% 수준에 불과하였고, 대체로 7 × 3.0cm 이하의 크기에서 90% 이하의 색가를 보였다. 따라서 자미고구마로부터 안토시아닌 색소를 추출 시에는 크기가 작은 자미고구마는 선별하여 분말 제조용으로 사용하는 것이 적합한 것으로 나타났다.

또한 함양군에서 2006년 가을에 생산된 자미고구마 원료 중에는 육안 상 자미색소 함량이 현저히 낮은 자미고구마가 많이 발견되어 정상 색가를 가진 자미고구마와 최적 조건에서 색가를 측정한 결과 저품질 자미고구마의 색가는 정상자미고구마에 비하여 약 25%수준으로서 천연색소 추출원료로는 부적합한 것으로 나타났다.

그리고 자미고구마로부터 안토시아닌 추출 시에 사용되는 주정은 비교적 고가로서 최종제품의 단가에 미치는 영향이 가장 높은 추출 용매이다. 따라서 참여 업체의 요구와 자미고구마유래 천연안토시아닌 기능성 소재의 산업화에 가장 중요한 요소인 주정 추출용매의 사용량을 줄이는 실험을 크게 3가지 측면, 즉 주정 사용량을 줄이는 대신 구연산함량을 증가시키면서 추출시간을 연장시키는 방법으로 수행하였다.

생자미고구마 10g을 2~3cm × 3~5mm로 절단한 후 구연산과 주정을 농도별로 100g 가한 다음 37℃에서 10시간 동안 진탕한 것을 여과하여 일정 농도로 농축하였다. 이 농축액을 식품첨가물공전 상의 색가 측정법으로 색소 함량을 산출한 결과는 Table 8.와 같다. 주정함량을 줄이기 위해 구연산 첨가량을 1%로 고정시키고, 주정첨가량을 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20%로 증가시킬 경우 주정농도의 준적으로 색가는 증가하는 경향을 보였으나, 15%이상 첨가 구에서는 20%첨가구와 비슷한 색가를 보였다.

또한 구연산농도를 2%로 증가시키면 주정 사용량을 7.5%로 줄여도 구연산 1%와 주정 20%첨가구와 비슷한 색가를 보여 주정 사용량을 현저히 줄여 색소추출 원가 절감에 유용한 것으로 나타났다. 특히 공장현장 시험에 적용한 결과 실험실 결과와 유사하였고, 추출시간을 8시간에서 10시간 연장시키면 추출수율을 20%이상 향상시킬 수 있는 결과를 얻었다.

Table 8. Pigment values of purple sweet potato anthocyanin extracts with various solvents

Solvents	Soluble solid contents(Brix)	Pigment values
control(water 100%)	0.2	—
1% citrate + 0% ethanol	0.2	—
1% citrate + 5% ethanol	2.0	0.09
1% citrate + 7.5% ethanol	2.3	0.11
1% citrate + 10% ethanol	3.5	0.11
1% citrate + 12.5% ethanol	4.3	0.12
1% citrate + 15% ethanol	5.2	0.14
1% citrate + 17.5% ethanol	6.2	0.14
1% citrate + 20% ethanol	7.2	0.15
2% citrate + 5% ethanol	3.8	0.13
2% citrate + 7.5% ethanol	4.5	0.14
2% citrate + 10% ethanol	7.1	0.15
2% citrate + 15% ethanol	7.2	0.17

4) 안토시아닌 색소 대량생산공정 표준화

가 원료수확 · 정선 · 세척 · 절단공정

세부공정	주요내용	기준 및 규격	판정 (적/부)
원료수확 (Harvesting)	<ul style="list-style-type: none"> •자미고구마는 서리가 내리기 전에 수확 (10월말 이전) •수확된 원료는 5℃ 부근에 저장 	<ul style="list-style-type: none"> •원료의 동결여부 	
원료정선 (Selecting)	<ul style="list-style-type: none"> •원료표면의 흙, 이물질을 1차로 제거(세척 용이) •미생물·곤충 등에 의해 부식·부패된 원료는 선별하여 제거 	<ul style="list-style-type: none"> •원료표면의 청결도 •부식·부패 원료의 유무 	
원료세척 (Washing)	<ul style="list-style-type: none"> •1차 와류세척기 : Ring Blower를 이용하여 세척수 내부에 강력한 공기를 혼입, 와류를 발생시켜 굴곡이 심한 원료표면의 이물질을 제거 •2차 브러쉬 세척기: PE세척기를 이용하여 굴곡이 심한 부분과 손상된 부분의 이물질을 제거 	<ul style="list-style-type: none"> •굴곡이 심한 구석에 있는 이물질 제거정도 •원료표면의 청결도 	
원료절단 (Slicing)	<ul style="list-style-type: none"> •Rotary slicer로 3~5mm 두께로 슬라이스함 •절단전에 원료표면에 있는 미생물을 제거하기 위해 미생물 살균제 또는 0.1% 구연산 용액으로 spray하면 효과적임 	<ul style="list-style-type: none"> • 크기: 2×3cm • 두께: 3~5mm 	

**추출 (Extracting) 및 여과 (Filtering)**

세부공정	주요내용	기준 및 규격	판정 (적/부)
추출 (Extracting)	<ul style="list-style-type: none"> ● 추출방법 절단원료의 계량 ↓ 20% ethanol (0.7%구연산 포함) 첨가 / 원료대비10배 ↓ 30℃, 4시간 이상 추출 (용매순환) 	<ul style="list-style-type: none"> ●고형물함량 : 7.0~7.2Brix ●pH : 3.2~3.3이하 ●색깔 : 적자미 ●지산식품에서 설치한 추출장치는 강력한 용매순환 시스템이어서 시 운전 시 3~4시간 이상 추출 시에 실험실 규모에서 8시간 추출수율과 비슷한 수준이었음. 	
여과 (Filtering)	<ul style="list-style-type: none"> ●진동스크린에 의한 1차 여과 ●Microfilter에 의한 2차 여과 	<ul style="list-style-type: none"> ●침전물이 없이 투명할 것 	

**농축 · 배합 · 저장**

세부 공정	주 요 내 용	기 준 및 규 격	판 정 (적/부)
농축	<ul style="list-style-type: none"> ●진공증발농축기에 의한 자연순환 농축 (Natural Circulation Evaporating) ●농축조건 : 50℃ 미만에서 4시간, 30~35 Brix까지 농축 (저온일수록 색소과피 적음) ●증발된 알콜은 회수하여 재사용 (알콜 농도 측정) 	<ul style="list-style-type: none"> ●고형물함량 : 35~50Brix ●pH : 3.0~3.3 ●색상 : 강한 적자미 ●맛 : 고구마 고유의맛 ●향미 : 고구마향 	
배합	<ul style="list-style-type: none"> ●액상제품 : 상기 농축액과 dextrin(DE5)을 혼합하여 고형분 60Brix 이상되게 조정 (이때 cystein 0.1% 첨가시 색소안정화 향상) ● 고형제품 (S·D) ⇒ 추출물 농도 20~25% 	<ul style="list-style-type: none"> ●고형물 : 60Brix이상 ●pH : 3.0~3.3이하 	
저장	<ul style="list-style-type: none"> ●액상제품 : 10℃이하 ●고형제품 : 실온 	<ul style="list-style-type: none"> ●암소 보관 	

[참여기업에서 상품화 된 3종 제품의 현황]

제품명	제품형태	특징	응용 가능 식품
자미고구마 농축액 A	액상 (50Brix)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자 미 고 구 마 추출물을 농 축한 액 ○ 안토시아닌색 소 함량 50 % 이상 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연색소 및 천연항산화제로 활용 ○ 간기능개선 기능성소재로 활용 ○ 기능성 칼라 식초 제조 ○ 주류 : 숙취해소 및 칼라 술 ○ 요구르트 : 항산화 기능성 칼라요구르트 ○ 음료 : 숙취해소 및 항산화 기능성 칼라 음료 ○ 김치, 고추장, 된장 : 색감 증진 및 기능성 향상 ○ 칼라 생면, 기능성 한과 및 떡류 등
자미고구마 농축액 B	액상 (60Brix)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자 미 고 구 마 농 축 액 과 dextrin을 혼 합한 액 ○ 안토시아닌색 소 함량 25 % 이상 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 호상요구르트 제조 ○ 된장, 청국장, 고추장 제조 시 색감 및 기능성 증진에 응용 ○ 제빵, 면류 제조 원료 ○ 기능성 주류 제조시 원료 ○ 각종 발효식품에 전분 대용으로 활용
자미고구마 건조분말	열풍 건조분말	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자 미 고 구 마 100 % ○ 수분 10% 이하 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 호상요구르트 제조 ○ 된장, 청국장, 고추장 제조 시 색감 및 기능성 증진에 응용 ○ 제빵, 면류 제조 원료 ○ 기능성 주류 제조시 원료 ○ 각종 발효식품에 전분 대용으로 활용

나. 자미고구마 안토시아닌 색소의 기능성 소재화

1) 자미고구마 유래 안토시아닌 색소추출물의 자가기준 및 규격설정

참여기업이 상품화에 성공한 자미고구마 추출물(추출물 100%)과 혼합추출물(추출물 60%, polydextrin 40% 혼합물)에 대한 고형물, pH, 비중, 색가를 아래와 같은 방법으로 측정하여 자가 기준 및 규격을 설정한 결과는 다음과 같으며, 현재 시판되고 있는 제품에 대한 품질관리 기준으로 이용되고 있다.

- 고형물함량 : 당도계로 Brix 측정
- 비 중 : 비중계로 자미고구마 추출물은 원액, 혼합추출물은 2배 희석하여 측정
- 색 가 : 식품첨가물 공정에 따라 자미고구마 농축액 1g을 구연산·인산이나트륨 완충용액(pH7)에 혼합하여 100ml로 정용한다. 상기액 10ml를 취하여 원심분리(5000rpm, 10분간)한 다음 상등액을 구연산·인산이나트륨 완충용액(pH7)을 대조액으로 하여 500nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 색가를 계산한다.

$$\text{색가(E)} = \frac{\text{흡광도} \times 10}{\text{검체의 채취량(1g)}}$$

< 자미고구마 천연색소의 자가 기준 및 규격 설정 >

품 명	Brix	pH	비중	색가
자미고구마 혼합 농축액 (60Brix)	60±1	3.9~4.2	1.124 (2배희석)	1.80±0.20
자미고구마 농축액 (50Brix)	50~54	3.8~4.2	1.238 (원액)	5.00±0.20

2) 자미고구마 안토시아닌 색소 추출물을 이용한 개발 가능식품 현황

본 연구에서 개발되어 상품화가 완료되어 시판 중인 색소 추출물과 전분을 활용한 다양한 개발 가능식품 현황은 아래표와 같다.

[개발 가능식품군 현황]

구분	식품군	개발 현황
자미고구마 유래 안토시아닌 색소추출물	발효식품	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자미고구마를 첨가한 액상요구르트 ○ 자미고구마를 이용한 유산발효식품 ○ 자미고구마를 이용한 생리기능성 발효주 ○ 자미고구마 양조식초 제조방법 ○ 자미고구마를 이용한 홍주 제조
	일반 가공식품	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자미고구마 추출물을 이용한 기능성 음료 ○ 자미고구마 추출물을 이용한 면류 ○ 기능성 칼라 두부
자미고구마 전분	제빵	자미고구마 가루를 이용한 제빵 제조
	술	자미고구마 와인, 홍주, 민속주
	잼	자미고구마 분말을 첨가한 잼류
	호상요구르트	자미고구마 분말을 첨가한 호상요구르트 제조

다. 자미고구마 안토시아닌 색소를 이용한 각종 가공식품 개발

1) 자미고구마 기능성음료 개발 및 시제품 제작

자미고구마 추출물의 안토시아닌천연색소를 이용한 기능성음료 3종, 즉 자미고구마 농축음료, 자미고구마 즉석음료, 자미고구마 감식초음료가 개발 되었고, 이 중에서 자미고구마 농축음료는 “자미인”이란 제품명으로 시판 중에 있다.

가) 자미고구마 농축음료(상품명 : 자미인)

(가) 개요

구 분	내용 및 특징
목 적	◦자미고구마 농축액 중의 안토시아닌색소를 항산화 및 간기능 개선 활성이 잘 발휘되면서 색감 및 기호성이 우수한 5배 농축 희석음료의 개발 및 상품화
주요성분 및 첨가량	◦자미고구마 농축액(25Brix) 40% 이상 → 각종 생리활성 및 칼라음료 ◦사과농축액(65Brix) 2~5% ◦오미자당침추출액(25Brix) 4~5% ◦올리고당 30~33% ◦정백당 10~11% ◦구연산 0.4~0.6% ◦flavor 0.2~0.4%
제조공정	◦자미고구마농축액 및 오미자 당침액 제조→ 상기 성분 배합 → 여과 → 병입→ 살균(80℃, 20~30분) → 냉각 → 포장 → 출하
기준 및 규격	◦pH : 3.0~3.3 ◦고형물 : 50±5Brix ◦세균 및 대장균 : 불검출 ◦인공색소 : 불검출 ◦안토시아닌색소 : 5,000mg% 이상

(나) 상품화 현황

자미고구마 천연안토시아닌 개강음료
농림부, 함양군, 지에스, 진주국제대 식품사업단 공동연구로 개발성공

보라색 고구마가 주는
천연의 맛

자미고구마라?
육질 전체가 진한 자색을 띠고 있는 자미고구마에는 일반 고구마에 비해 유리당 함량이 13정도 함유되어 있어 감미는 낮으나 섬유질, 단백질, 비타민, 무기질이 풍부하고 특히 안토시아닌 물질을 다량 함유하고 있다.

자미고구마 안토시아닌 물질이란?

- 자미고구마 안토시아닌 물질은 항산화활성이 비타민E 보다 높은 기능성식품 신소재로서 일본 KUO SUDA 등의 연구에 의하면 자미고구마추출액을 투여하면 혈중 GDT, GPT 활성이 개선되는 것으로 보고되어 있습니다.
- 특히 농림부와 함양군의 지원으로 진주국제대학교 식품사업단과 지산식품이 공동으로 수행한 연구에서 자미고구마의 안토시아닌 물질은 간 손상을 예방 개선시키는 활성이 규명되어 특허를 출원중에 있습니다. (자미고구마 추출물을 포함하는 강질함 예방 및 치료용 조성물 : 10-2006-0010402호)
- 자미고구마의 안토시아닌 물질은 피부노화를 억제하는 활성과 미백활성이 진주국제대학교 식품사업단에 의해 확인되어 피부에 활력을 줍니다.

자미인

언제나 날씬한 그녀는







(주)지.에스
www.jisanfoods.com
경남 함양군 수동면 화산리 1250-32번지
TEL : 055-964-0011-2

자매품 **오미인 지구자다독스**
썩향

< 자미고구마 디자인 1 >



< 자미인 제품 사진 >

나) 자미고구마 즉석음료(오미자 자미고구마)

(가) 개요

구 분	내 용 및 특 징
목 적	<ul style="list-style-type: none"> ◦자미고구마로부터 대량생산에 성공한 안토시아닌 색소의 간기능 개선 활성이 충분히 발휘 되도록 최적배합 비율을 도출한 후 기호성 및 색감이 현저히 증진된 간기능 개선 용 기능성 음료의 개발
주요성분 및 첨가량 (50종 중에 3종 최종 선정)	<ul style="list-style-type: none"> ◦자미고구마 안토시아닌 색소(20~25%, 6.25brix) → 간기능 개선 활성 및 색감증진 ◦오미자 당침 저온 추출물 (50~65%, 3.0brix) → 오미자당침액에 물을 10배가하여 45℃에서 60분간 추출한 액으로서 뽀은 맛이 순화된 오미자 추출물 (간기능 개선 및 기호성 증진) ◦감미 증진 물질로서 고과당, 정백당 및 올리고당(14~15%) ◦기호성 증진 → 사과농축액(2%~5%) 첨가 ◦색소 안정화 및 청량감 부여 목적으로 구연산 첨가(0.25%) ◦최종제품의 고온에서 살균시에 색소 파괴를 방지하기 위해 천연 향균물질이면서 항산화활성이 강한 자몽씨 추출액 첨가(0.05%)
제조공정	<ul style="list-style-type: none"> ◦추출액 조제 → 배합 → 여과 → 병입 → 살균 → 냉각 → 포장 → 출하
기준 및 규격	<ul style="list-style-type: none"> ◦pH : 3.0 ~ 3.1 ◦고형물 : 15~17 brix ◦세균 및 대장균 : 불검출 ◦안토시아닌 색소 : 1,200mg% 이상 함유

(나) 상품화 현황



<자미인 제품사진>

다) 자미고구마 감식초 음료 : Type I

(가) 개요

구 분	주요내용 및 특징
주성분	감식초 회석액(5%) 92~95%, 올리고당 2%, 고과당 2%, 안토시아닌색소 2%, 사과농축액 2~3%
특징	<ul style="list-style-type: none"> ◦저열량/고기능성 음료 ◦감식초와 천연안토시아닌 색소 다량 함유 ◦사과농축액 3~5% 첨가 시 기호성 향상
최종 개발품	<ul style="list-style-type: none"> ◦사과농축액 무 첨가 1종 : 저열량 고기능성 음료 ◦사과농축액 첨가 1종 : 고기능·고기호성 음료

(나) 안토시아닌색소 첨가에 따른 감식초 칼라

안토시아닌감식초음료 개발 시에 가장 중요한 요소는 감식초원액의 희석비율 결정과 최적 희석비율에 대한 안토시아닌색소의 첨가량을 결정하는 것인데, 본 연구에서 결정된 최적 희석비율은 5%로 나타났고, 이 농도에서 기호성 및 물성특성(특히 pH)이 가장 우수하였다.

감식초 5% 희석액에 안토시아닌농축액(50Brix)을 0.1%에서 5%까지 첨가하여 색감을 조사한 결과 1.5%이상에서 투명한 자미를 띠는 것으로 나타났다.



< 안토시아닌색소 농도 별 감식초 칼라 >

(다) 시제품 사진



< 사과농축액 무첨가 >



< 사과농축액 첨가 >

라) 자미고구마 겨우살이 감식초 음료 : Type II

(가) 겨우살이 추출액의 제조 및 특성

겨우살이 유용물질이 함유된 음료를 제조하기 위하여 겨우살이 유용물질을 추출하는 용매로 감식초를 선정하여 건조·세절한 겨우살이 100g에 감식초 원액(산도 9.21%) 1000ml을 가하여 실온에서 방치 하면서 추출 정도를 50일간 조사하였다(Table. 9).

추출시간이 갈수록 추출수율은 증가하나, pH는 낮아지는 특징을 보였고 기호성은 약간 감소하였다.

Table. 9 Changes in mistletoe extract with extraction day.

Extraction day	solid content(Brix)	pH
5	5.0	3.40
10	5.3	3.52
15	5.5	3.53
20	6.8	3.54
30	6.9	3.61
40	7.0	3.61
50	7.0	3.61

(나) 겨우살이 감식초 칼라 음료의 특성

겨우살이 감식초 추출액을 희석(3%)한 후 고과당, 올리고당, 말티톨 등의 당류, 사과과즙농축액, polydextrose 등과 자미고구마 유래의 안토시아닌 천연색소 등을 이용하여 3종의 음료를 개발한 것을 요약하면 다음과 같다.

[최종 선정된 겨우살이 감식초 칼라음료의 최적 배합비 비율 및 특성]

구 분	음료 I	음료 II	음료 III
<ul style="list-style-type: none"> 성 분 			
겨우살이 감식초 추출액 (3% 희석액)	81	85	86
고과당	—	2	8
올리고당	—	6	—
말티톨	10	—	—
polydextrose	—	—	1
안토시아닌 천연색소 (50Brix)	2	2	2
사과과즙 (60Brix)	7	7	3
<ul style="list-style-type: none"> 특 성 			
고형물(Brix)	13.6	11.3	10.2
pH	3.14	3.19	3.51
기호성 및 성상	신맛과 단맛이 조화로운 자미 액상	신맛이 강한 자미 액상	겨우살이의 뽕은맛이 감소된 자미 액상
세균·대장균	음성	음성	음성

(다) 최종 선정된 겨우살이 음료의 관능검사

최종 선정된 3종 음료의 색상, 향기·맛의 조화, 전체적인 기호도 등에 대하여 12명 학생을 Panel로 관능검사를 실시하였다(Table. 10).

상기 3종 음료에 대한 관능검사 결과를 Table. 10과 같이 색상, 향기·맛의 조화, 전체적인 기호도에서 음료 I 이 가장 높았으며, 음료Ⅲ, 음료Ⅱ 순으로 선호도가 높았다.

Table. 10 Sensory evaluation of mistletoe beverage

Sensory properties	Samples		
	Beverage I	Beverage II	Beverage III
Color	6.8±0.3	6.2±0.4	6.1±0.5
Flavor	6.7±0.5	6.4±0.6	6.3±0.3
Taste	6.7±0.5	6.5±0.5	6.3±0.2
Overall acceptability	6.5±0.2	6.2±0.1	6.1±0.4

1~7 scale : 7, very acceptable ; 1, very unacceptable

(라) 겨우살이 감식초 칼라 음료의 시제품



< 겨우살이 감식초 칼라 음료 시제품 >

2) 자미고구마 유가공품 개발 및 시제품 제작

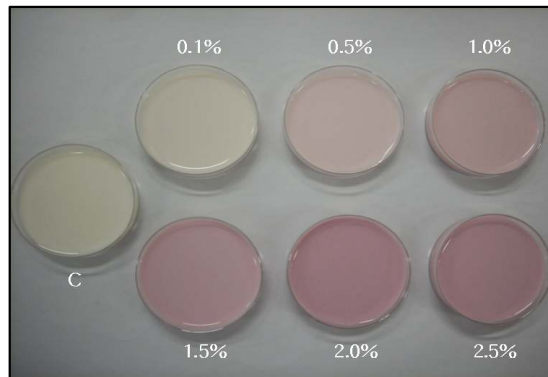
가) 자미고구마 yogurt 제조기술 개발

(가)

개요

세부내용	주요내용
최종 목표	◦자미고구마 유래 안토시아닌 천연색소가 함유된 yoghurt 제조법 확립 및 상품화
제품 유형	◦호상 요구르트
자미고구마 첨가 방법	◦젖산 발효 전 농축액(50Brix) 첨가에 따른 발효능 ◦젖산 발효 후 농축액(50Brix) 첨가에 따른 특성 ◦젖산 발효 후 건조분말 첨가에 따른 제품 특성
주요실험 결과	◦젖산 발효 전 농축액을 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% 첨가시, 고농도에서 curd 생성능은 감소하나 젖산 발효능은 약간 증가 ◦젖산 발효 후 농축액 첨가 시 색감 향상 ◦젖산 발효 후 건조분말을 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7.5% 10% 첨가시에 3% 이상시에 농축액보다 색감이 저하, curd 생성능은 우수
상품화 추진 현황	◦자미고구마 농축액을 유가공업체에 납품 중

(나) 자미고구마 yoghurt 시제품



< 농축액 : 발효전 첨가 >



< 농축액 : 1차발효 후 첨가 >



< 건조분말 : 발효후 첨가 >

나) 자미고구마 발효유 및 우유

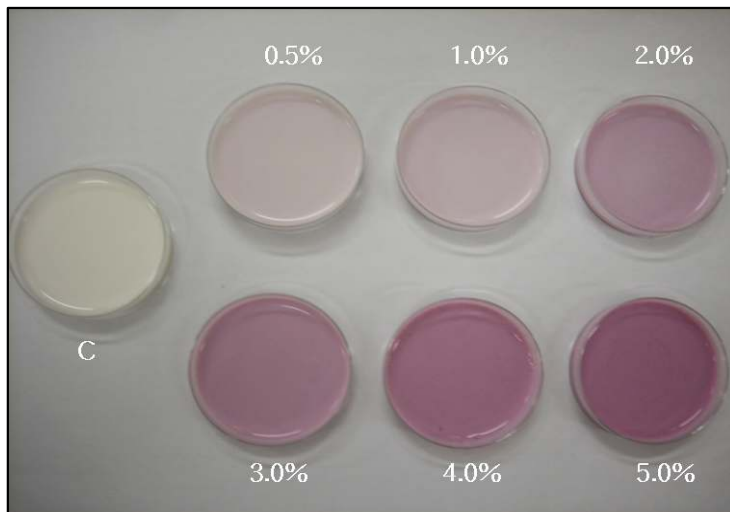
(가) 개요

세부 내용	주요 내용
목적 및 목표	<ul style="list-style-type: none"> ◦자미고구마 유래 천연 안토시아닌 색소가 함유된 기능성 칼라 발효유와 우유의 제조기술 개발 및 상품화 ◦개발기술은 유가공회사에 기술 이전을 통한 천연색소 판로 개척 및 촉진
주요 결과	<ul style="list-style-type: none"> ◦발효유(pH 4.20 , 산도 1.13%)에 안토시아닌 농축색소 (50Brix)를 발효 종료 후 농도별로 첨가시에 3%가 기호성 및 색감이 가장 우수 ◦시판우유에 안토시아닌 농축색소를 3% 이상 첨가시 색감은 양호하나 점성이 높아 기호성은 저하
상품화 추진현황	<ul style="list-style-type: none"> ◦자미고구마 농축액을 유가공업체에 납품 중

(나) 자미고구마 발효유 및 우유 시제품



< 자미고구마 발효유 >



< 자미고구마 우유 >

3) 자미고구마 칼라두부 개발 및 시제품 제작

가) 자미고구마 칼라두부 제조방법

안토시아닌두부의 제조공정은 예비실험을 통해 가장 높은 관능평가를 얻은 최적 조건 선정으로 결정된 농도를 기준으로 안토시아닌을 첨가하지 않은 군, 안토시아닌색소 액상 10Brix 첨가군, 안토시아닌 색소 액상 20Brix 첨가군, 안토시아닌 색소 액상 30Brix 첨가군으로 분류하였다. 또한 안토시아닌 액상의 양은 전체양의 0.7%를 첨가하였다(Fig. 1).

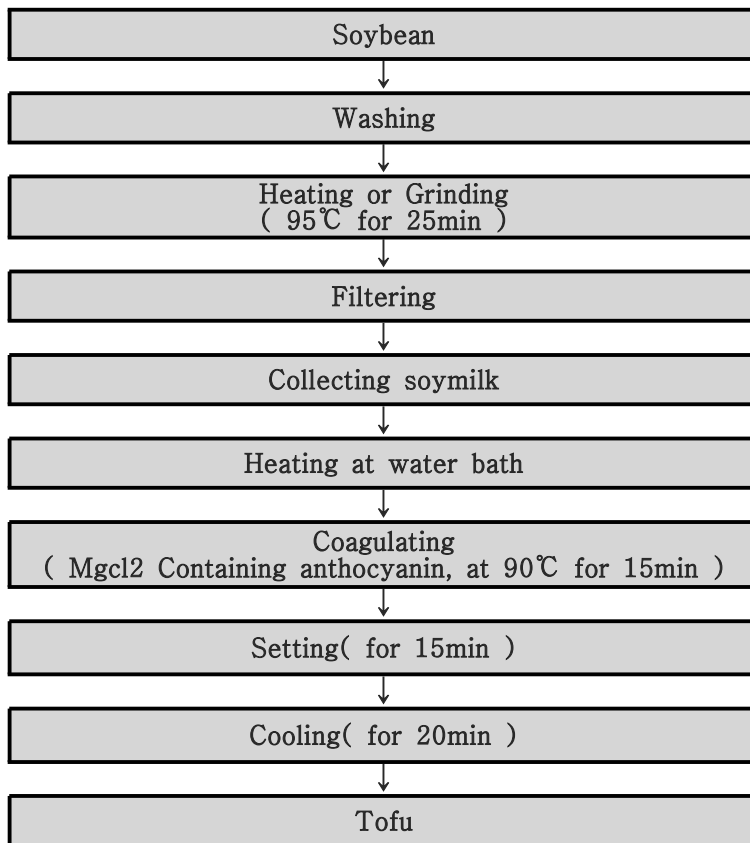


Fig. 1. Procedures for preparation of Tofu added with anthocyanin

나) 관능검사

두부에 대한 관능적 품질평가는 진주국제대학교 식품과학부 공동 실험실 연구원 14명을 관능검사 요원으로 선정하여 맛, 색, 향, 질감, 씹는 느낌, 뽕은맛의 6가지 항목으로 나누어 Control 3점을 기준으로 기호도가 높으면 4점, 5점 기호도가 낮으면 2점, 1점으로 평점 하였다. 두부를 제조한 다음 1시간 냉각 후에 일정한 크기로 잘라, 흰 접시에 물과 함께 제공하였으며 2회 반복 측정된 값을 평균 내었다.

안토시아닌두부의 관능검사의 결과는 Table. 11와 같다. 맛은 안토시아닌 10Brix를 첨가한 군에서 가장 기호도가 높았으며 첨가량이 높아질수록 기호도가 낮아졌다. 색상은 안토시아닌 첨가량이 높을수록 기호도가 높았다. 향은 안토시아닌 20Brix를 첨가한 군에서 기호도가 높게 나왔으며 질감은 안토시아닌 10Brix 첨가한 군이 높게 나왔다. 씹는 느낌은 안토시아닌 20Brix를 첨가한 군에서 기호도가 높게 나타났으며 뽕은맛은 첨가량이 낮을수록 증가하였다.

이상의 관능검사 결과를 종합하여 보았을 때 안토시아닌 첨가량이 10Brix 첨가한 군에서 가장 맛이 좋고 질감과 뽕은맛의 기호도가 높게 평가되어 전체적인 기호도가 가장 높았다. 그리고 안토시아닌 첨가량이 30Brix 첨가한 군은 뽕은맛이 강할 뿐 아니라 전체적인 기호도가 낮았다.

Table. 11 Sensory quality of Tofu added with anthocyanin

Group	Taste	Color	Flavor	Texture	Swallowing feel	Astringent taste
Brix10	2.333 ±0.19	2.416 ±0.22	2.916 ±0.25	3.000 ±0.25	2.083 ±0.18	2.833 ±0.16
Brix20	2.000 ±0.15	2.916 ±0.24	3.333 ±0.30	2.416 ±0.22	2.333 ±0.17	1.750 ±0.14
Brix30	1.583 ±0.13	3.333 ±0.30	2.750 ±0.22	2.583 ±0.23	1.916 ±0.12	2.500 ±0.22

다) 시제품 제작



< 자미고구마 추출물이 첨가된 칼라두부 >

4) 자미고구마 면류

가) 개요

세부내용	주요내용 및 결과
<p>목 적</p>	<p>◦자미고구마 분말이 혼입된 기능성 칼라면류 및 상품화</p>
<p>주요 실험</p>	<p>◦최적배합비율 : 자미고구마 열풍건조분말 4~10% 첨가 가능, 이때 점탄성 향상을 위해 등글레분말을 1~3% 첨가하면 물성특성 우수</p> <p>◦제조공정 표준화 : 혼합반죽 → 숙성 (35℃, 15분) → 압연 및 면대숙성 (27℃, 30분) → 연면 및 선절 → 건조 및 숙성 (50℃, 12~24시간) → 절단 · 포장</p>
<p>상품화 추진</p>	<p>◦지리산 식품 및 금강종합식품에서 생산 · 시판 중 (3종)</p>

나) 시제품 제작



< 증숙면 >



< 건조면 >



< 면류 3종 >

다) 자미고구마 국수 제조 기술 [특허 출원]

- 밀가루, 청국장 분말, 등글레 분말, 자미고구마 분말, 소금을 혼합하는데, 청국장 분말은 전체 국수가루 중량비 2% 내지 6%이고, 등글레 분말은 1 내지 3%이며, 자미고구마 분말은 2% 내지 5%이며, 소금은 2%인 경우가 바람직하다. 소금 함량은 소비자의 기호에 맞추어 조절될 수 있다. 더욱 바람직하게는 청국장 분말과 등글레 분말의 비가 2 : 1인 경우가 바람직하다.
- 등글레 분말을 혼합함으로써 등글레 향이 청국장 특유의 냄새를 감싸게 되어 청국장 특유의 냄새가 나지 않는 청국장 분말을 함유한 국수가 만들어진다. 청국장 분말과 등글레 분말의 비가 2 : 1인 경우가 청국장 특유의 냄새가 나지 않도록 하는데 효과적이다. 등글레 분말은 또한 비타민 A, 배당체 등이 들어있는 것으로 알려져 있다.
- 한편 자미고구마는 천연안토시아닌색소를 다량으로 가지는바, 이 분말을 혼합하여 인공색소가 아닌 안전한 천연색소를 포함하면서 색감이 뛰어나고, 시각적으로 식욕을 일으키게 된다.
- 밀가루 외의 청국장 분말, 등글레 분말, 자미고구마 분말의 비율이 높아지면 국수 본연의 쫄깃함을 감소시키고, 청국장 분말의 비율이 상기 제시된 것보다 낮은 경우 영양성분이 우수한 청국장 분말을 섭취하고자 하는 본연의 목적에서 벗어나며, 자미고구마 분말의 비율이 상기 제시된 것보다 낮은 경우에는 국수의 자미가 희미하여 색감이 뛰어나지 않게 된다. 등글레 분말의 경우 비율이 상기 제시된 것보다 낮은 경우에는 청국장 특유의 냄새를 제거하지 못하게 된다.

라) 제조 공정

① 제 1 공정 : 혼합 및 반죽

본 공정은 상기에 청국장 분말, 등글레 분말, 자미고구마 분말과 밀가루를 포함하는 국수가루를 혼합하고, 여기에 소금 및 물을 첨가하여 반죽하는 단계이다. 소금함량은 소비자의 기호에 맞게 조절할 수 있다.

② 제 2 공정 : 반죽의 숙성(1차 숙성)

국수재료를 혼합하면서 15분 정도 반죽하여 자미고구마 분말의 자미가 잘 배이도록 함과 동시에 청국장 분말과 등글레 분말이 고루 섞이도록 한다. 고르지 못한 부분을 고르게 하기 위하여 서서히 교반하면서 숙성의 효과를 동시에 꾀한다. 온도는 35℃ 정도가 적당하다. 바람직하게는 진공반죽을 실시한다.

③ 제 3 공정 : 압연 및 면대의 숙성(2차 숙성)

상기 숙성된 반죽을 압연 롤러로 밀어 최초의 면대를 형성시키는데, 쌍롤에서 두 장의 면대를 형성하여 다시 한 장의 면대로 복합하며 면대를 만든다. 형성되면 대는 26~27℃에서 30분간 숙성시킨다.

④ 제 4 공정 : 연연 및 선절

연연기는 물을 점차 눌러주면서 상기 숙성된 면대를 목적하는 두께로 만들어낸다. 국수의 두께는 규격으로 결정하며, 이에 30cm 폭에 국수 가락수가 25~30 가락인 경우가 소면, 18~23 가락인 경우가 중면에 해당한다. 원하는 면의 종류에 맞추어 선절한다.

⑤ 제 5 공정 : 건조 및 절단포장

국수제조에 가장 중요한 공정으로 50~55℃에서 12~24시간 간 3차 숙성을 병행하면서 상기 선절한 면대를 건조한다. 이후 상기 건조된 국수를 절단하여 방향성의 폴리프로필렌(OPP, oriented Poly Propylene) 필름이나 종이 포장 등을 행한다.

⑥ 실시 예

먼저 청국장 분말 250g(5%), 등글레 분말 125g(2.5%), 자미고구마 분말 100g(2%), 밀가루 4425g(88.5%), 및 정제염 100g(2%)을 혼합하고, 여기에 물을 첨가해 믹서기에 넣고 원료를 균일하게 혼합 반죽하였다. 15분간 진공반죽을 실시하면서 35℃에서 숙성시켰다.

상기 숙성된 반죽을 압연한 후 만들어진 면대를 26℃에서 30분간 2차 숙성시

키고, 숙성된 면대는 다시 연연하고 소면으로 선절하였다. 제조된 소면은 다시 건조시키며 52℃에서 12시간 숙성시켜 국수를 제조하였다.

⑦ 관능검사

제조된 본 발명의 국수가 청국장 특유의 냄새가 있지 않은지, 맛과 색에서 우수한지를 10명의 패널을 선정하여 관능검사를 행하였다.

각 평가는 맛, 색, 향, 면발의 감촉, 전체적인 기호도에 대한 이루어졌으며, 그 결과는 Table. 12에서 볼 수 있다.

Table. 12 10점 기호 척도법에 의한 관능평가

관능적 특성	평균(10점 만점 기준)
전체적인 맛에 대한 기호도	9.8
색에 대한 기호도	9.6
청국장 냄새의 강도	0.3
쫄깃한 정도	9.3
전체적인 기호도	9.68

전체적인 맛에 대한 기호도는 평균 9.8점으로서 높은 선호도를 나타냈으며, 천연 자미소로 인한 국수의 색에 대한 기호도에서도 평균 9.6점으로 높게 나타났다.

특히 청국장 냄새의 강도에 대한 평가는 있어서는, 10명의 패널 중 4명이 0점을 기록하였음, 평균 0.3점의 매우 낮은 점수로 나타난바, 본 발명의 목적대로 본 발명에 의하여 제조된 청국장 분말 및 천연 자미소를 포함한 국수는 청국장 특유의 냄새가 거의 나타나지 않음을 볼 수 있다.

국수 면발에 있어서는도 평균 9.3점으로서 매우 쫄깃하다는 평가가 있었고, 전체적인 기호도 면에서도 평균 9.68점으로 높은 선호도를 보였다.

5) 자미고구마 떡류의 개발 및 시제품 제작

가) 개요

구 분	주요 내용
목적	◦자미고구마 분말과 안토시아닌색소가 다량 함유된 고기능성 칼라 떡류의 개발 및 상품화
주요실험 및 결과	◦색소 및 분말 첨가량 ◦최적 배합비 도출 ◦생산공정 확립 ◦특성 조사
개발 제품	◦3종 (백설기, 찹쌀떡, 가래떡)
상품화 계획	◦남강휴게소 납품예정(가래떡)

나) 자미고구마 안토시아닌색소의 농도별 색가

본 과제에서 상품화가 완료된 자미고구마 추출물(50Brix)과 혼합추출물(60Brix)의 첨가 농도에 따른 색가를 측정함으로써 떡류제조에 첨가되는 추출물의 적정 농도를 결정하는 시험을 행한 후 색가를 측정한 결과는 아래와 같다(Fig. 2). 혼합추출물(60Brix)는 11%첨가 시에도 색가가 0.26%로 낮아 떡류 제조에는 부적합한 것으로 판명되었고, 50Brix추출물은 9%이상에서 약 0.5%이상의 색가가 나와 떡류 제조에 사용이 가능한 것으로 나타났다. 또한 쌀가루의 추출물을 농도별로 반죽시에도 9%이상 첨가 시에 외관상 자미칼라가 선명하였다(Fig. 3).

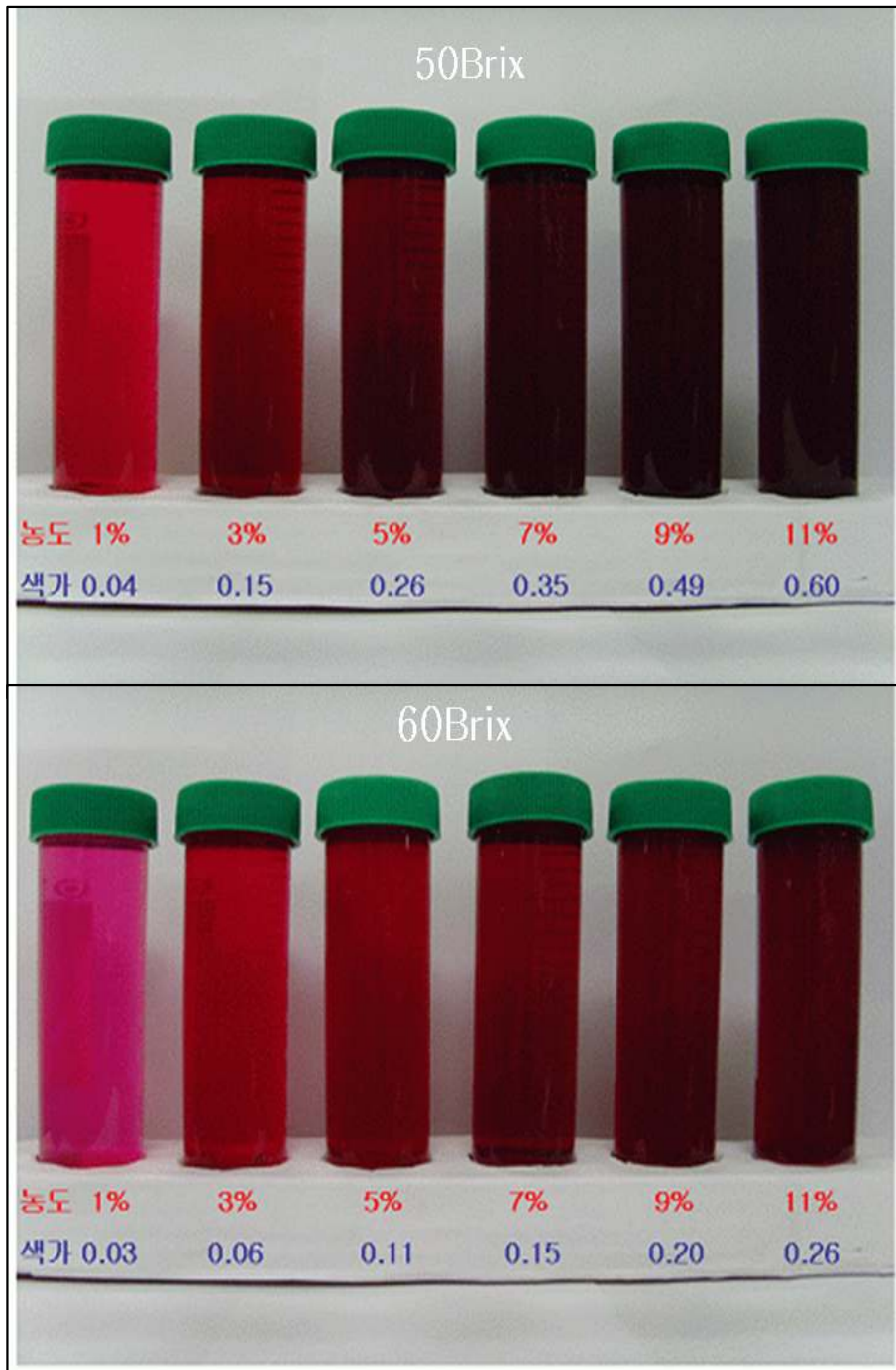


Fig. 2 안토시아닌 색소의 농도별 색가

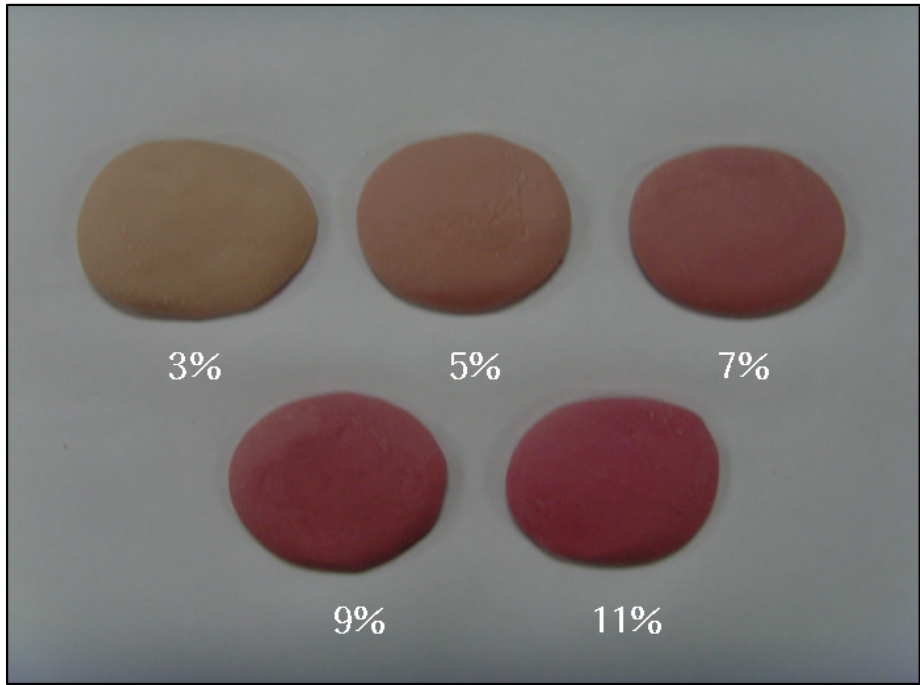


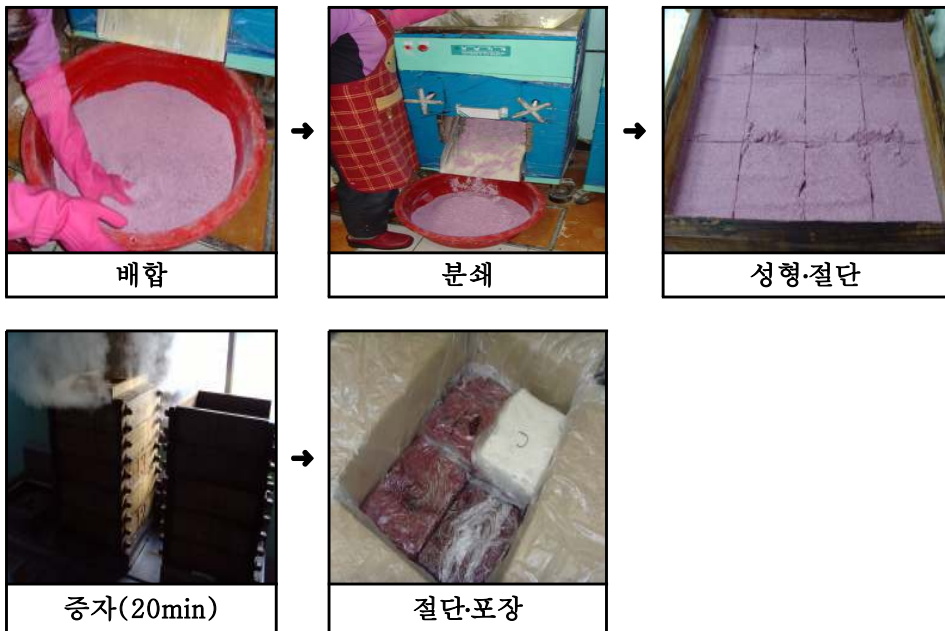
Fig. 3 안토시아닌 색소의 농도 별 반죽 후 색가

다) 자미고구마 백설기

(가) 배합비

	쌀가루	자미고구마 분말	안토시아닌 색소 10% 회석액	소금	설탕
Control	1600g	-	물 200ml	20g	300g
배합비1	1600g	200g	색소 300ml	20g	300g
배합비2	1600g	400g	색소 400ml	20g	300g
배합비3	1600g	600g	색소 500ml	20g	300g
배합비4	1600g	800g	색소 600ml	20g	300g

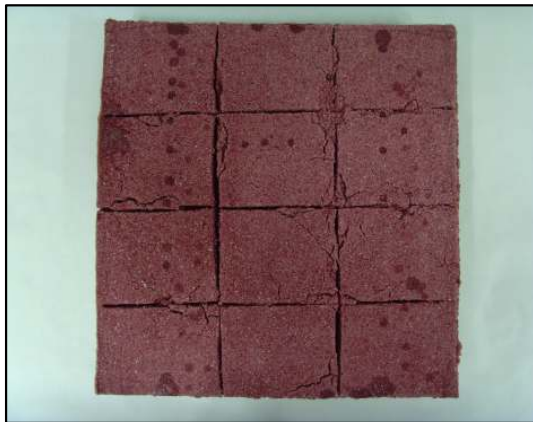
(2) 제조법



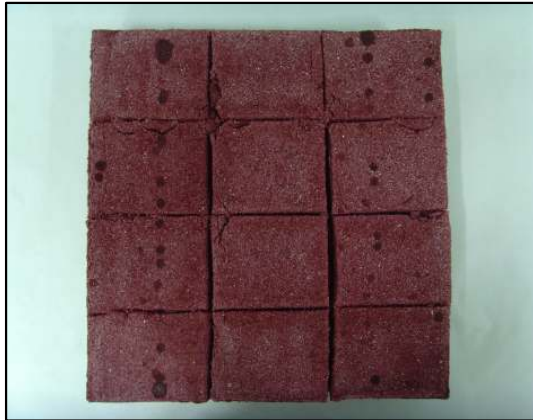
(다) 시제품



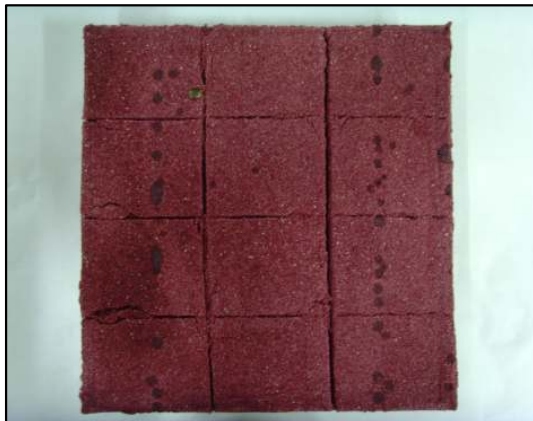
< Control >



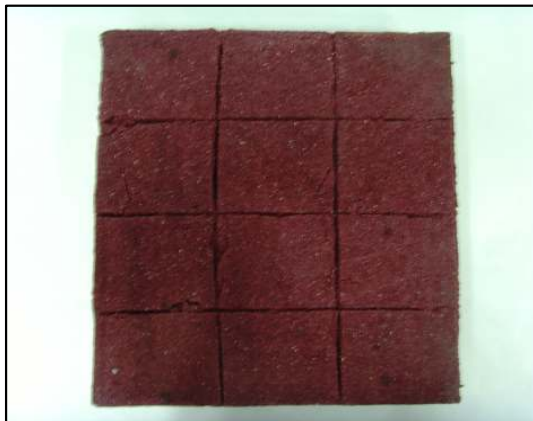
< 배합비 1 >



< 배합비 2 >



< 배합비 3 >



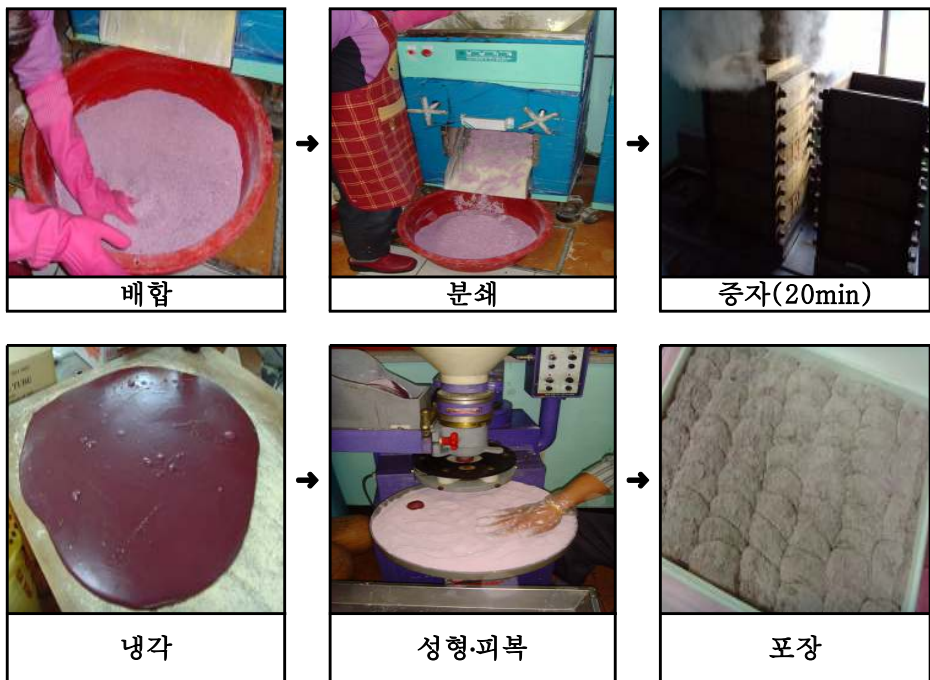
< 배합비 4 >

라) 자미고구마 찹쌀떡

(가) 배합비

찰쌀가루	물	자미고구마 분말	안토시아닌 색소 10% 희석액
1600g	125ml	100g	300ml

(나) 제조법



(다) 시제품



< 자미고구마 찹쌀떡 시제품 >



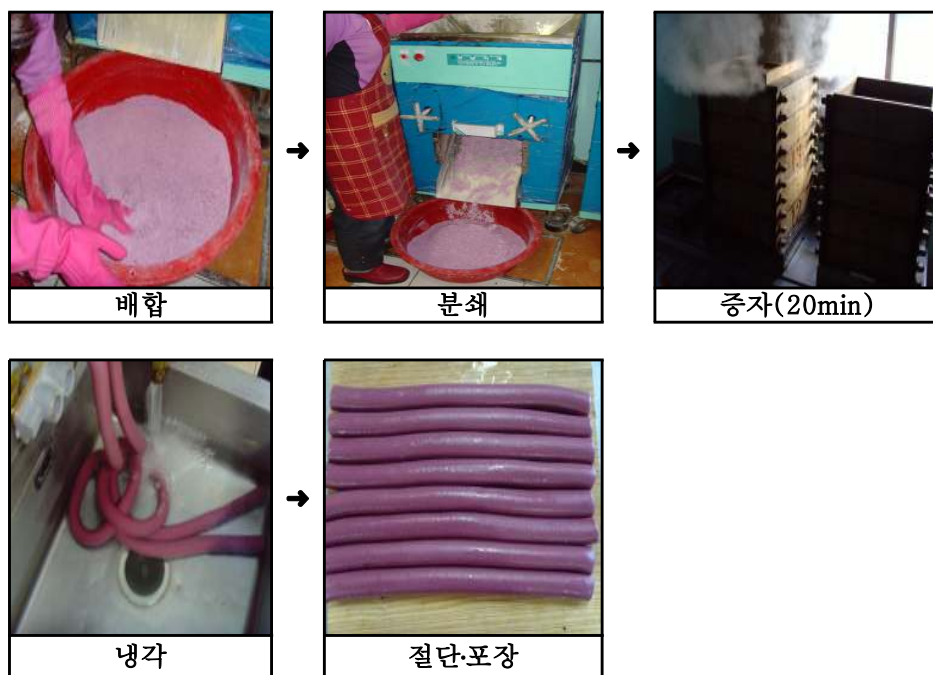
< 자미고구마 찹쌀떡 시제품 포장 >

마) 자미고구마 가래떡

(가) 배합비

쌀가루	자미고구마 분말	안토시아닌 색소 10% 희석액
1600g	300g	400ml

(나) 제조법



(다) 시제품



< 자미고구마 가래떡 시제품 >

바) 자미고구마 떡류의 색도

자미고구마 추출물(50Brix)이 농도별로 첨가된 떡류의 색도측정 Chromameter (Minolta, CM-3500d)를 사용하여 측정하였으며, 표준광원으로는 D65으로 하였고, 측정된 값은 Hunters wlor value으로 나타내었다. 자미고구마 색소추출물의 첨가에 따른 떡류의 명도를 나타내는 L값, 녹색에서 적색을 나타내는 a값, 황색에서 적색을 나타내는 b값을 측정한 결과는 Table. 13과 같다.

백설기에 색소추출물과 분말 첨가량이 증가 할수록 대조군(79.23)에 비하여 명도가 농도의 굴절으로 감소함을 볼 수 있고, 찹쌀떡과 가래떡에서도 비슷한 경향을 보였다. 또한 녹색에서 적색을 나타내는 a값은 대조군 -1.25에서 색소 농도가 높을수록 적색으로 수치가 현저히 높게 나타났다. 그리고 청색에서 황색을 나타내는 b값은 대조군에 비해 비교적 낮게 검출되는 특성을 보였다.

Table. 13 자미고구마 떡류의 색도 변화

	L*	a*	b*
백설기 C	79.23	-1.25	8.69
백설기 1	36.28	14.99	4.75
백설기 2	33.68	14.69	3.77
백설기 3	26.86	13.67	4.39
백설기 4	23.75	13.82	3.98
찹쌀떡	31.94	10.27	3.07
가래떡	26.60	11.44	1.40

라. 자미고구마 안토시아닌 색소를 주원료로 하는 다양한 기능성식품 개발

1) 자미고구마 환제품

가) 개요

구 분	내용 및 결과
특 징	자미고구마 열풍건조분말 및 색소추출물이 첨가된 환형 제품
주 요 성 분	<ul style="list-style-type: none"> ◦자미고구마 분말 ◦자미고구마 추출액 ◦청국장 분말 ◦매실액
제 조 공 정	원료의 선정 → 자미고구마색소 추출·여과·농축 → 혼합 및 반죽 → 제환 및 절환 → 성형 → 건조 (65℃, 8시간, 수분함량 10%이하) → 포장 및 제품검사 (성장, 수분함량, 봉해도, 생균수, 대장균군)
상 품 화	◦상품화 완료되어 시판 중(1종)

나) 제품의 품질특성

구 분	내 용
외관 및 성상	갈색의 고형제품
수분	7.5%
분해도	80분 이하
일반세균	300CF/g 이하
대장균	불검출
환제규격	780mg/10환, 4.25±0.5mm

다) 시제품



< 자미고구마 환제품 시제품 >

2) 자미고구마 캡슐제품

가) 제품의 개요 및 특징

구 분	주 요 내 용
특 징	<ul style="list-style-type: none"> • 식약청이 인정한 건강기능식품 원료 중에서 항산화 활성이 우수한 2가지 이상의 원료에 자미고구마 안토시아닌 색소가 최적으로 배합된 복합제품 • 고시형 원료(녹차추출물)+자미고구마 추출물
성분 및 비율	<ul style="list-style-type: none"> • 자미고구마 안토시아닌 동결건조 분말 :10% • 자미고구마 열풍건조 분말 : 30% • 녹차 건조분말 : 30% • 레시틴 분말 : 30%
유 형	건강기능식품 복합제품
형 태	Capsule (300~950mg/개)
기 능 성	<ul style="list-style-type: none"> • 두뇌영양보급 • 혈행개선 • 항산화작용 • 콜레스테롤 개선
용도·용법	<ul style="list-style-type: none"> • 수험생 두뇌활동 촉진 • 항산화 효과 • 1일 3회, 식후 1회 2~3 capsule 섭취

나) 기능성 제품의 제조과정



다) 기능성 제품의 기준·규격

구 분	내 용
외관 및 성상	갈색의 과립분말로서 고유의 향미가 있음
내용량	300~1000mg/개
수분	6% 이하
분해도	10분 이하
이물	없음
대장균	불검출
일반세균	300CPU/g 이하
기밀성	기밀일 것

라) 기능성 제품의 시제품 제작 : capsule형



< 기능성 캡슐 >

3) 기능성 화장품

가) 자미고구마 추출물의 1차 피부 안전성 평가

자미고구마 안토시아닌 농축물을 Tween 80/ saline(1:99,u/v)에 녹여서 patch에 적신 후 1×1인치 크기로 면도시킨 실험동물의 피부에 부착시키고 24h, 48h, 72h 동안 접촉시킨 후 육안 관찰한 결과 뚜렷한 홍반 반응이 나타나지 않아서 화장품 원료로 사용이 가능한 것으로 확인되었다(Table. 14).

Table. 14 자미고구마 안토시아닌 농축물의 1차 자극성 index(P.I.I)

홍반	관정시간	평 점
자미고구마 안토시아닌 농축물	24	0
	48	0
	72	1

$$P. I. I. = 4/4 = 1$$

P.I.I.는 최저 0, 최고 8점이 되어 그것을 다음 Table. 15와 같이 3구분한다.

Table. 15 안전성 구분에 의한 1차 자극성 index

안전성 구분	1차 자극성 index
약한 자극물	0 ~ 2
중등도 자극물	3 ~ 5
강한 자극물	6 ~

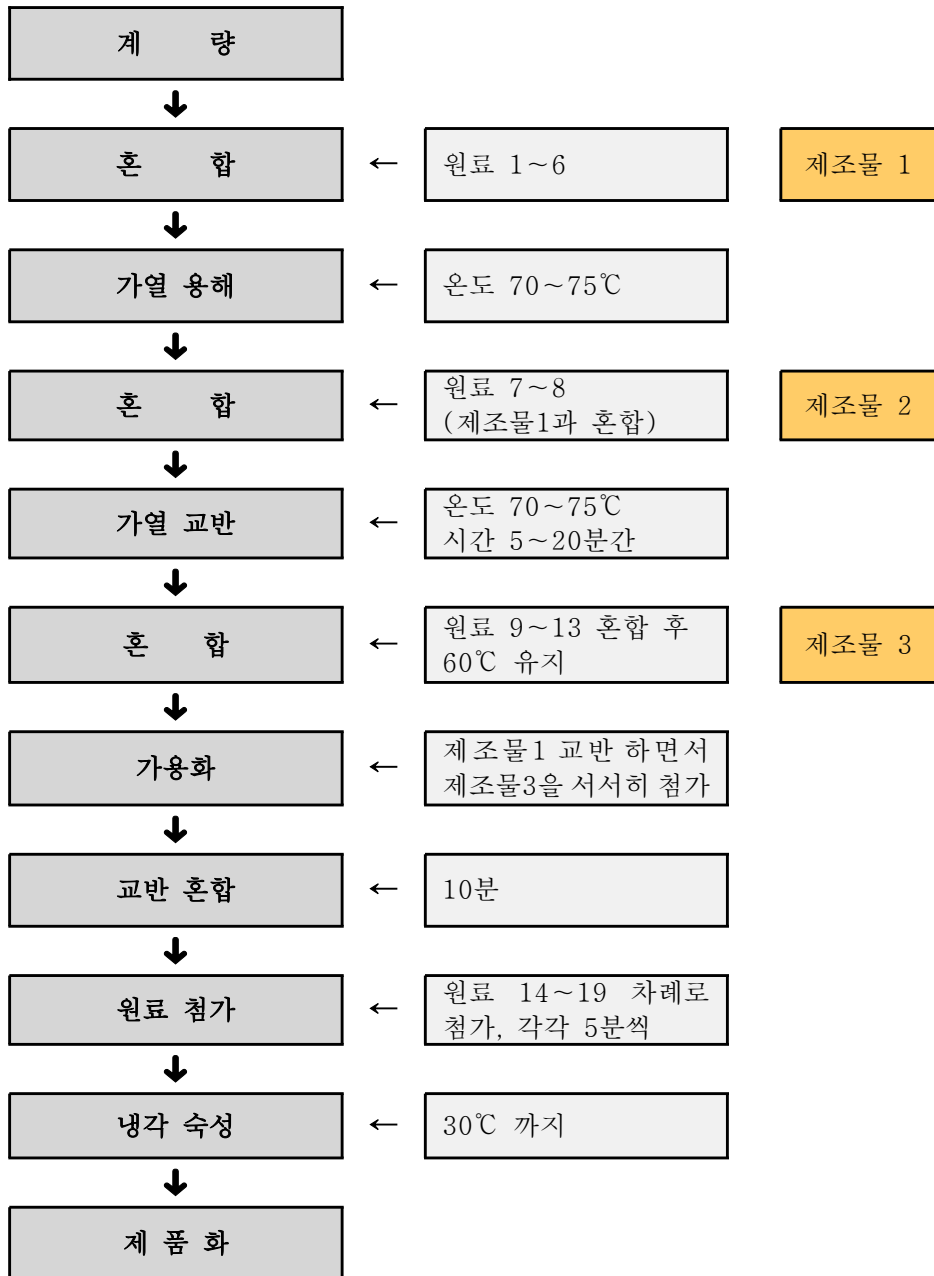
이러한 결과로 미루어 자미고구마 안토시아닌 농축물은 피부노화 억제(주름개선) 기능성 화장품 소재로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

나) 기능성 영양크림의 개발

(가) 최적 배합비

구분	원	료	함 량(%)					
			A	B	C	D	E	F
1	보 습 제	Glycerin/ Propylene glycol	5.0/5.0	5.0/5.0	5.0/5.0	5.0/5.0	5.0/5.0	5.0/5.0
2	금속이온 붕쇄제	EDTA-2Na	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
3	방 부 제	Methyl paraben	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
4	정 제 수	Water	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s
5	고 분 자	Xanthan gum (2% soln)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
6		Carbopol 934 (2% soln)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
7	지 방 산	Stearic acid	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
8	왁 스 류	Bees wax	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
9	계면 활성제	Glycerin monostearate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
10		DEA-Cetyl phosphate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
11		Arlacel-165	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
12		Arlacel-60/ Tween-60	1.0/0.5	1.0/0.5	1.0/0.5	1.0/0.5	1.0/0.5	1.0/0.5
13	오 일 류	Sunflower oil	3.0	5.0	7.0	9.0	5.0	7.0
14		LP-70/Silicon 345	2.0/5.0	2.0/5.0	2.0/5.0	2.0/5.0	2.0/5.0	2.0/5.0
15	방 부 제	Buthyl paraben	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
16		Propyl paraben	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
17	pH조절제	TEA	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
18	방 부 제	Imidazolidinyl urea	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
19	정 제 수	Water	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
20	향 료	Fragrance	0.05	0.1	0.15	0.2	0.2	0.2
21	자미고구마 안토시아닌 농축액	60 Brix	0.5	0.7	0.9	1.0	1.0	1.0
Total			100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

(나) 제조방법

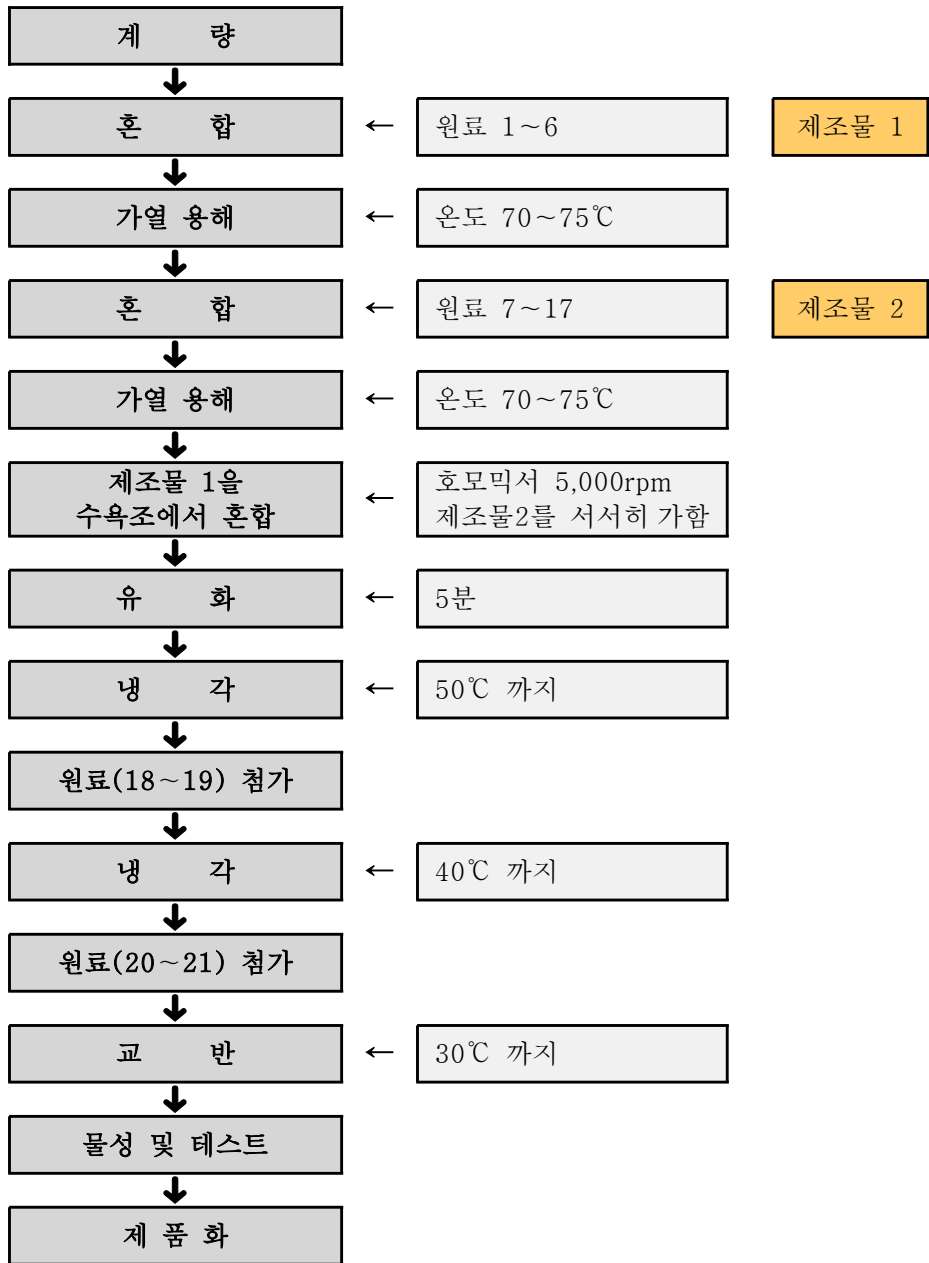


다) 기능성 에센스 개발

(가) 최적 배합비

구분	원 료		합 량(%)				
			A	B	C	D	E
1	보 습 제	Propylene glycol	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
		Glycerin	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
2	변색방지제	Benzophenone-9	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
3	소 염 제	Allantoin	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
4	금속이온 봉쇄제	EDTA-2Na	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
5	정 제 수	Hot water	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
6	방 부 제	Methyl paraben	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
7	정 제 수	Water	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s
8	고 분 자	Polymer (1% soln)	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
9	알 코 올	SD alcohol 40	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
10	방 부 제	Methyl paraben	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
11	가용화제	PPG-26-Buteth-26/ PEG-40	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		Hydrogenated castor oil (Solubilisant LRI)					
12	산화방지제	Vitamin-E acetate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
13	향 료	Fragrance	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
14	방 부 제	Imidazolidinyl urea	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
15	정 제 수	Water	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
16	유 용 성 분	안토시아닌 추출물 A	5.0	4.0	3.5	3.0	2.5
17		안토시아닌 추출물 B	5.0	4.0	3.5	3.0	2.5
18	pH조절제	TEA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
19	정 제 수	Water	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Total			100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

(나) 제조방법

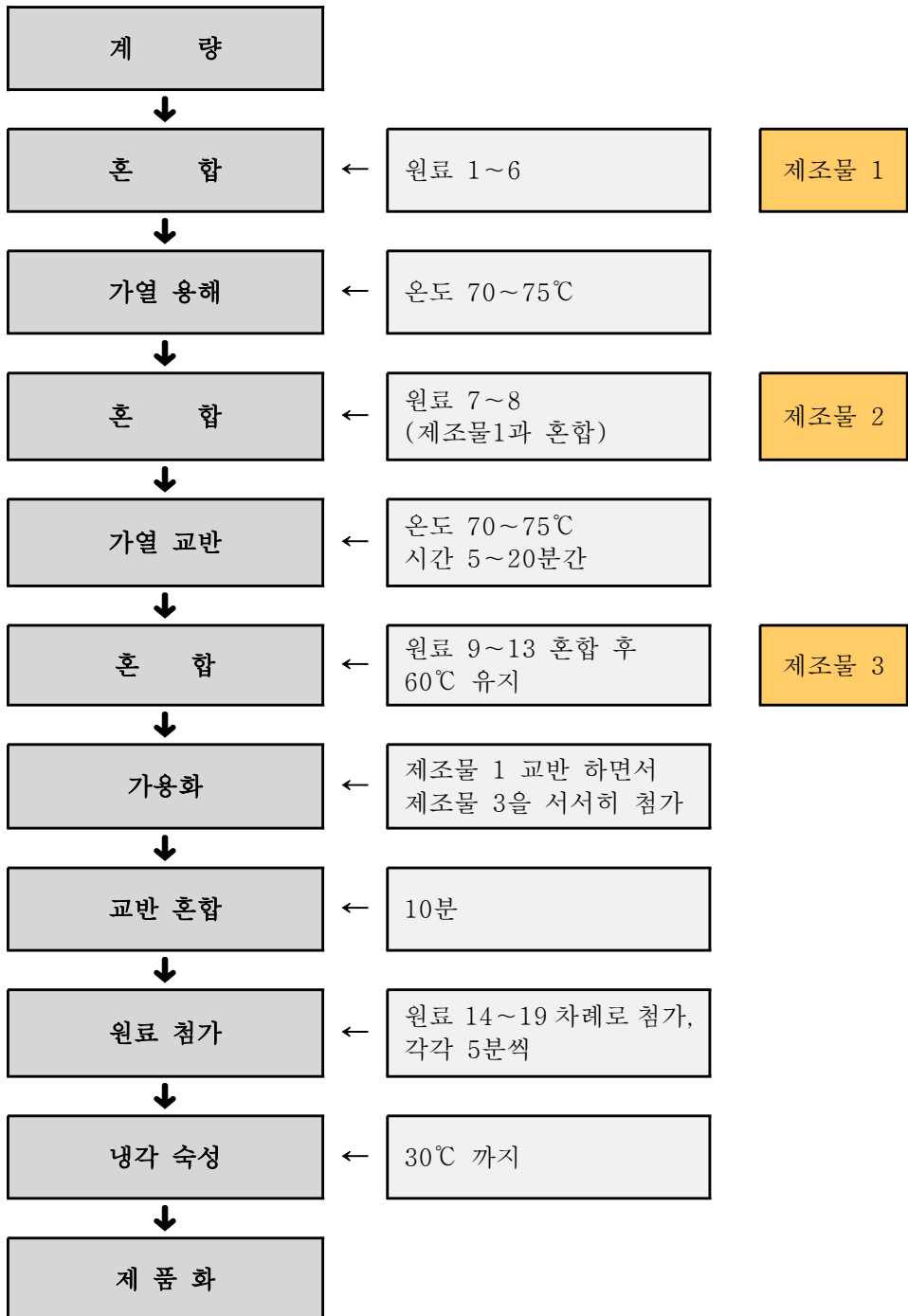


라) 기능성 로션 개발

(가) 최적 배합비

구 분	원 료		합 량(%)
1	보 습 제	Propylene glycol	6.0
		Glycerin	3.0
2	변색방지제	Benzophenone-9	0.05
3	소 염 제	Allantoin	0.05
4	금속이온봉쇄제	EDTA-2Na	0.05
5	정 제 수	Hot water	10.0
6	방 부 제	Methyl paraben	0.2
7	정 제 수	Water	q.s
8	고 분 자	Polymer (1% soln)	30.0
9	알 코 올	SD alcohol 40	1.00
10	방 부 제	Methyl paraben	0.2
11	가 용 화 제	PPG-26-Buteth-26/ PEG-40 Hydrogenated castor oil(Solubilisant LRI)	1.0
12	산화방지제	Vitamin-E acetate	0.1
13	향 료	Fragrance	0.1
14	방 부 제	Imidazolidinyl urea	0.2
15	정 제 수	Water	2.0
16	유 용 성 분	안토시아닌 추출물 A	5.0
17		안토시아닌 추출물 B	1.0
18	pH 조절제	TEA	0.1
19	정 제 수	Water	2.0
Total			100.00

(나) 최적 생산공정



마) 기능성 화장품의 시제품 제작



< 기능성 영양크림 >



< 기능성 에센스 >



< 기능성 로션 >



< 기능성 스킨 >

마. 자미고구마 안토시아닌 색소를 활용한 기능성 소재, 일반가공식품 및 기능성식품의 상품화

○ 본 과제의 수행으로 개발된 자미고구마 유래의 안토시아닌 색소 농축액 2종 (A, B형)과 열풍건조 분말의 특징과 응용가능식품의 현황은 아래와 같이 요약된다.

제품명	제품형태	특징	응용가능식품
자미고구마 농축액 A	액상 (50Brix)	<ul style="list-style-type: none"> •자미고구마 추출물을 농축한 액 •안토시아닌 색소 함량 50% 이상 	<ul style="list-style-type: none"> •천연색소 및 천연 항산화제로 활용 •간기능 개선 기능성 소재로 활용 •기능성 칼라식초 제조 •주류 : 숙취해소 및 칼라 술 •요구르트 : 항산화 기능성칼라 요구르트 •음료 : 숙취해소 및 항산화 기능성 칼라음료 •김치, 고추장, 된장 : 색감 증진 및 기능성 향상 •칼라 생면, 기능성 한과 및 떡류
자미고구마 농축액 B	액상 (60Brix)	<ul style="list-style-type: none"> •자미고구마 농축액과 dextrin을 혼합한 액 •안토시아닌색소 함량 25% 이상 	
자미고구마 건조분말	열풍건조 분말	<ul style="list-style-type: none"> •자미고구마 100% •수분 100% 이하 	<ul style="list-style-type: none"> •호상요구르트 제조 •된장, 청국장, 고추장 제조 시 색감 및 기능성 증진에 응용 •제빵, 면류 제조 원료 •기능성 주류 제조 시 원료 •각종 발효식품에 전분 대용으로 활용

○ 그리고 상기 제품의 상품화 현황은 아래와 같다.

구 분	내 용		
제품명	자미고구마 추출물	자미고구마 혼합추출물	자미고구마 건조분말
식품유형	서류가공식품 (추출물 100%)	서류가공식품 (추출물60% + 텍스트린40%)	서류가공식품 (열풍건조분말 100%)
식품위생법상 기준·규격	합성보존료, 산화방지제, 타르색소, 이물, 성상	합성보존료, 산화방지제, 타르색소, 이물, 성상	합성보존료, 산화방지제, 타르색소, 이물, 성상
용도·용법 /포장단위	<ul style="list-style-type: none"> ◦천연색소(색감증진, 천연항산화제) ◦10kg, 15kg, 20kg PE 	<ul style="list-style-type: none"> ◦천연색소 (색감증진, 천연항산 화제) ◦10kg, 15kg, 20kg PE 	<ul style="list-style-type: none"> ◦천연색소와 전분 (면류, 호상요 구르트, 떡류 등) ◦1kg, 5kg, 10kg, 15kg, 20kg (PET+PE)
자가품질 규격 설정	고형물, pH, 비중, 색가	고형물, pH, 비중, 색가	수분, 색가

- 본 과제의 연구수행으로 개발된 가공 및 기능성 식품의 상품화 현황 및 계획은 아래와 같다.

구 분	내 용
상품화 현황	<ul style="list-style-type: none"> ●자미고구마 열풍건조분말 1종 상품화 완료(시판 중) ●자미고구마 안토시아닌 색소 농축물 2종 상품화 완료(시판 중) ●자미고구마 안토시아닌 색소 활용 음료 4종 개발 및 2종 상품화 완료(자미인으로 시판 중) ●자미고구마 국수 1종 상품화 완료(시판 중) ●자미고구마 기능성 환 1종 상품화 완료(시판 중) ●자미고구마 기능성식품 1종 및 화장품 4종 개발완료 (상품화 계획 중)
자미고구마 산업화 현황 및 계획	<ul style="list-style-type: none"> ●참여 업체인 지산식품이 자미고구마 안토시아닌 색소 추출·농축 및 열풍건조 설비를 완비하여 현재 3종 제품 산업화 완료 (연 매출 15억) ●자미고구마 농축액을 활용한 음료 2종 산업화 완료 ●자미고구마 농축액의 대형 식품업체(6개 업체) 납품 중 ●자미고구마 농축액 및 분말의 판로 개척 지속적 추진 중

4. 요약

- 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 추출조건을 에탄올 용매의 농도, 시간, 온도, 진탕여부에 따라 조사한 결과 에탄올 농도 20%이상, 30~40℃에서 12~15시간 동안 교반하면서 추출 시에 수율이 가장 높게 나타났다.
- 자미고구마 유래 안토시아닌 색소는 pH 3.5이하의 산성부근에서 비교적 안전성이 높았으나, pH 4.0이상에서는 색소 분해가 잘 일어나는 것으로 나타났다. 색소의 pH 안전성을 높이기 위해 구연산을 농도별로 첨가하여 60℃에서 3일간 방치 후 안전성을 조사한 결과 0.7~1% 첨가 시에 색소의 추출수율 뿐만 아니라 pH 안전성을 동시에 얻을 수 있었다. 또한 자미고구마 안토시아닌 색소는 일광에 의해 쉽게 파괴되는 것으로 나타나 색소 추출시와 가공식품 제조 시에 빛이 투과되지 않은 조건 및 용기의 선택이 중요한 것으로 나타났다.
- 자미고구마 안토시아닌 색소의 대량생산공정이 표준화되었고, 이 기술은 참여 기업인 지산식품에 기술이전이 완료됨에 따라 현재 2종의 기능성 안토시아닌 색소 소재가 상품화 되어 대기업 등 5개 업체에 납품 중에 있다.
- 자미고구마의 안토시아닌 농축물과 열풍건조분말을 활용하여 자미고구마 기능성음료 3종(농축음료, 즉석음료, 감식초칼라음료), 자미고구마 유가공품, 자미고구마 칼라두부, 면류, 떡류 및 환제품 등이 개발되었다. 이 중에 자미고구마 농축음료와 즉석음료 2종은 상품화가 완료되어 시판 중에 있다.
- 제2세부과제에서 얻어진 결과를 기초로 자미고구마의 안토시아닌 천연 농축물을 이용하여 간기능 개선 기능성식품과 미백화장품을 개발하였다.

5. 참고문헌

1. Francis, F.J. Food Colorants: Anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* 28: 273-314 (1989)
2. Jackman R.L. and Smith, J.L. Anthocyanins and Betalains. pp.183-241. In: Natural Food Colorants, 2nd ed. Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D.(eds.). Houghton Blackie A&P, *Great Britain* (1996)
3. Mazza, G. and Miniati, E. Introduction pp. 1-28 In: Anthocyanins in fruits, vegetables and grains., G. Mazza and E. Miniati (eds.) *CRE Press, Boca Raton, FL.* (1993)
4. Henry, B.S. Natural food colours. pp. 39-78. In: Natural Food Colorants, 2nd ed., Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D. (eds.). Houghton Blackie A&P, *Great Britain* (1996)
5. Fuleki, T and Francis, F.J. Quantitative methods for anthocyanins. 1.Extraction and determination of total anthocyanin in crabberries. *J. Food Sci.* 33. 72-77 (1968)
6. Cemeroglu, B., Velioglu, S. and Isik S. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J. Food Sci.* 58:1216-1218 (1994)
7. Shi. Z., Bassa, I.A., Gabriel, S.L. and Francis, F.J. Anthocyanin pigments of sweet potatoes-*Ipomoea batatas*. *J. Food Sci.* 57: 755-757 (1992)
8. Odake, K., Terahara, N., Sito, N and Honda, T. Chemical structures of two anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Phytochem.* 31:2127-2130 (1992)

9. Rodriguez-Saona, L.E., Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E. Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. *J. Food Sci.* 66: 458-465 (1998)
10. Rhim, J.W. and Kim, S.J. Characteristics and stability of anthocyanin pigment extracted from purple-fleshed potato. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 348-388 (1999)
11. Kim, S.J., Rhim, J.W., Lee, L.S. and Lee, J.S. Extraction and characteristics of purple sweet potato pigment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 345-351 (1996)
12. Lee, L.S., Rhim, J.W., Kim, S.J. and Chung, B.C. Study on the stability of anthocyanin pigment extracted from purple sweet potato. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 352-359 (1996)
13. Lee, L.S., Kim, S.J. and Rhim, J.W. Analysis of anthocyanin pigments from purple-fleshed sweet potato (Jami). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutri.* 29:555-560 (2000)
14. Lee, L.S., Chang, E.J., Rhim, J.W., Ko, B.S. and Choi, S.W. Isolation and identification of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Korean J. Food Sci. Nutr.* 2: 83-88 (1997)
15. Choi, C.R., Rhim, J.W. and Park, Y.K. Physicochemical properties of purple-fleshed sweet potato starch. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 1-5 (2000)
16. Lee, J.C., Lee, K.S., Lee, J.D., Han, K.H. and Oh, M.J. Preparation and characteristics of curd yogurt from milk added with purple sweet potato. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 6: 442-447 (1999)

17. Kalt, W. McDonald, J.E. and Donner, H. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. *J. Food Sci.* 65: 390–393 (2000)
18. Yoshimato, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamagawa, O., Yamaguchi, M. and Yamada, J. Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 63: 537–541 (1999)
19. Jackman, R.L., Yada, R.Y. and Tung, M.A. A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. *J. Food Biochem.* 11, 279–308 (1987)
20. Lee, J.W., Lee, H.H., Rhim, J.W. and Jo, J.S. Determination of the conditions for anthocyanin extraction from purple-fleshed sweet potato. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 790–795 (2000)
21. Lee, L.S. and Rhim, J.W. Thermal kinetics of color changes of purple sweet potato anthocyanin pigment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 497–501 (1997)
22. Lee, H.H., Lee, J.W. and Rhim, J.W. Characteristics of anthocyanins from various fruits & vegetables. *Korean J. Post harvest Sci. Technol.* 7. (2000)
23. Jackman, R.L. and Yada, R.Y. Anthocyanin as food colorants—a review. *J. Food Biochem.* 11: 201–247 (1987)
24. Ochoa, M.R., Kessler, A.G., Vullioud, M.V. and Lozano, J.E. Physical and chemical characteristics of raspberry pulp: storage effect on composition and color. *Lebensm-Wiss. u-Technol.* 32: 149–153 (1999)
25. Shin, J.K., Sin, H.H. Effects of high voltage pulsed electric fields on

- extraction of purple sweet potato pigment. *Korean J. Food Preserv.* Vol.14, No.2. pp. 165–169 (2007)
26. Rhim, J.W. and Lee, J.W. Photostability of anthocyanin extracted from purple-fleshed sweet potato. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34, 346–349 (2002)
 27. Rhim J.W. and Lee, J.W. Degradation kinetics of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato pigment concentrates and a japanese plum juice based beverage, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34, 238–243 (2002)
 28. Jin, S., Chung, M.N., Kim, J.T., Chi, H.Y., Son, J.R. Quality characteristics and antioxidative activities in various cultivars of sweet potato, *Korean J. Crop Sci*, 50(S): 141–146 (2005)
 29. Huang, Y.C., Chang, Y.H., Yuan, S.Y. Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry* (2005)
 30. Lee, J.W., Lee, H.H. Rhim, J.W., Jo, J.S. Determination of the conditions for anthocyanin extraction from purple-fleshed sweet potato, *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.*29(5), 790–795 (2000)
 31. Jeong, B.C., Ahn, Y.S., Chung, M.N., Lee, J.S., Jeong, K.B., Oh, Y.B., Jeong, K.H., Cho, S.Y., Min, K.S., Lee, J.S., Kim, E.S., Kim, T.G., Park, S.J. A new purple colored sweet potato(*Ipomoea batatas(L.)Lam.*) cultivar, "Zami" for processing, *Korean J. Breed*, 32(1): 91–92 (2000)
 32. Lee, J.S., Jeong, B.C., Ahn, Y.S., Chung, M.N., Kim, H.S. Color stability according to storage period of purple sweet potato products, *Korean J. Crop Sci*, 51(S): 204–208 (2006)
 33. Lee, H.H., Lee, J.W., Rhim, J.W. Characteristics of anthocyanins from various fruits and vegetables, *Korean J. Postharvest Sci. Technol*, Vol.7. No. 3, pp. 285–290 (2000)

34. Kato–Noguchi H. Allelopathic substances in *Pueraria thunbergiana*. *Phytochemistry* 63:577–580 (2003)
35. Konczak–Islam, I., Yoshinaga, M., Nakatani, M., Terahara, N., Yamakawa, O., Establishment and characteristic of anthocyanin producing embryogenic cell line from sweet potato storage root. *Plant Cell Reports* 19(5), 472–477 (2000)
36. McCoy, D.L., Jones, J.M., Anderson, J.W., et al., Distribution of cytochrome P4501A1–inducing chemicals in sediments of the Delaware River–Bay system *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 1618–1627 (2002)
37. Murata, M., Watanabe, M., Yamanaka, M., Kubota, Y., Ito H. et al., Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP2E1, glutathione S–transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *Cancer Lett.* 165: 171–177 (2001)
38. Giusti, M.M., and Wrolstad, R.E. Characterization of red radish anthocyanins. *J. Food Sci.* 61: 322–326 (1996)
39. Yoon, J.M., Cho, M.H., Hahn, T.R., Paik, Y.S., and Yoon, H.H. Physicochemical stability of anthocyanins from a Korean pigmented rice variety as natural food colorants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 211–217 (1997)
40. Cho, M.H., Paik, Y.S., Yoon, H.H., Hahn, T.R. Chemical structure of the major color component from a Korean pigmented rice variety. *Agric. Chem. Biotechnol.* 39: 304–308 (1996)
41. Lee, H.H., Kang, S.K., Rhim, J.W. Characteristics of antioxidative and antimicrobial activities of various cultivars of sweet potato. *Korean J. Food Sci, Technol.* 31: 1090–1095 (1999)

제 2 절 자미고구마의 안토시아닌 색소의 분리 및 식품산패 억제 활성 검증을 기초한 천연 항산화 소재 개발

1. 서론

- 자미고구마의 가공 상품화를 위한 예비 선행연구를 수행한 결과 아래 그림과 같은 항산화 활성(천연 기능성 식품색소) 항노화활성 및 미백활성을 나타내는 안토시아닌 조성분을 분리 하였으며, 향후 이 물질들을 이용하여 제품개발에 필요한 제반 실험을 수행하고자 본 연구를 진행 하게 되었다.
- 피부 노화는 크게 두 종류로 나눌 수 있음. 하나는 내인성 노화(intrinsic aging)로써 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화현상이고 다른 하나는 광노화(photoaging)로써 오랫동안 햇빛에 노출된 얼굴, 손등, 목 뒤 등의 피부에서 관찰되는 탄력조직이 파괴되는 노화현상을 말하며 내인성 노화와 자외선에 의한 영향이 합쳐진 결과로 발생한다. 이러한 광노화 현상은 자외선의 노출을 피하면 예방할 수 있는 피부 노화현상이다. 피부노화의 주원인으로 진피 내 세포 외 기질단백질 (extracellular matrix)의 감소를 들 수 있음. 피부에서의 교원질 양이 성인 이후에 매년 1%씩 감소되며 자외선에 노출된 피부에서는 그 양이 더욱 감소된다.
- 피부 두께의 약 85%를 구성하는 진피층은 주로 교원섬유(collagenous fiber)와 탄력섬유(elastic fiber)로 이루어져 있다. 진피의 약 70%를 차지하는 교원섬유는 흔히 다발을 이루며 굵은 섬유와 가는 섬유로 되어있고 콜라겐(collagen) 단백질로 이루어져 있으며 진피에 장력을 제공하여 외부의 자극이나 생리적 및 화학적 자극에 대해 강한 저항력을 가지고 있으며 외부로부터 신체 내부를 보호하는 역할을 한다.
- 한편, 진피의 약 5%를 차지하는 탄력섬유는 고무와 같은 탄성이 있으며, 교원섬유에 비해 짧고 가늘며 탄력성이 있고 콜라겐을 이어주는 스프링 형 고리

와 같은 역할을 하여 피부에 탄력성을 주는 역할을 한다.

- 일반적으로 피부노화란 주름의 증가, 피부의 처짐과 피부이완 등을 일컬으며, 시간의 흐름에 따라 나타나는 자연적인 노화와 장시간 일광에 노출되어 일어나는 인위적인 노화 등의 외부 환경에 의해서 피부노화가 진행되며 자외선 A (UVA)와 자외선 B (UVB)의 노출에 의해 발생하는 피부노화는 자연적인 피부노화와는 달리 피부의 손상으로 간주되고 있다. 콜라겐 생합성은 나이가 들거나, UVA와 UVB에 노출되었을 때 생합성 효율이 낮아져 피부노화 및 피부손상이 촉진된다.
- Matrix metalloproteinases (MMPs)는 다형핵성 호중구, 대식세포, 치은섬유아 세포, 골세포 등과 같은 세포로부터 분비되는 칼슘 및 아연 의존성 엔도펩티다제 (Endopeptidase)로 중성 pH에서 작용하는 효소이다. 세포는 교원질을 분해시키는 효소인 MMP-1 (type I collagen) 과 교원질을 조성하는 다른 효소를 적절히 조절하면서 균형을 취하지만 피부가 태양의 자외선에 노출되면 세포가 자극을 받아 상대적으로 MMP-1이 많아지면서 피부주름이 형성된다.
- 이러한 MMPs는 조직의 형성, 암전이, 염증, 당뇨병, 피부노화 및 주름, 화상 및 상처 치료와 같은 병리학적 과정과 각종 질환에 관여하는 것으로 알려져 있으며 구조적 유사성과 기질 특이성을 근거로 하여 MMPs는 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane type-MMPs 그리고 알려지지 않은 MMPs 등으로 분류된다. MMPs는 growth factors, cytokines, tumor promoters 및 ultraviolet (UV) 등과 같은 다양한 외부 자극인자에 의해서 과발현된다.
- 피부 섬유아세포에서 UV에 의해 유도된 MMPs의 다양한 발현은 collagen이나 젤라틴등 다른 세포외기질 (extracellular matrix: ECM)의 파괴를 유도하기 때문에 MMPs의 활성은 피부 노화와 밀접한 관계를 가지고 있다. 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 발생은 UV에 의해 유도되는 MAP kinase-mediated signal transduction에 결정적 역할을 하며, ROS가 발생되면 MMP-12의 발현이 증가되고, 이러한 ROS의 활성을 억제하는 물질들은 UV

에 의해 유도되는 AP-1 활성화와 MMP-12의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다.

- 또한 최근 산소를 소비하는 모든 생물체와 식품들은 반응성이 매우 큰 유독성 활성산소와 반응 시 지질·단백질·DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적 산화반응을 촉진하여 암, 노화, 간장질환 뿐만 아니라 식품의 산패를 유발시키는 데, 이를 제어할 수 있는 방법으로는 인체 내 항산화계 효소 생성을 활성화시키거나 인위적으로 항산화제를 섭취 또는 첨가하면 되나, 상업적으로 사용할 수 있는 무독성 고효율성 이면서 저가 천연항산화제는 상용화되지 못하고 있는 실정이며, 본 연구에서는 상기에서 언급한 선행연구의 결과와 항산화활성이 우수하면서 저가로 분리 가능한 자미고구마의 안토시아닌색소(3.8%)를 이용한 각종 항산화(천연 항산화 식품소재, 항노화 기능성소재, 미백소재, 간보호소재) 활성을 검증한 후 이들 소재를 활용한 다양한 기능성 식품을 개발 및 상품화하면 재배농가의 소득증대 뿐만 아니라 가공식품의 국내외 시장 진입을 위한 기술경쟁력 확보가 가능할 것으로 판단되어진다.

2. 재료 및 방법

가. Free radical 소거 작용

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazil)는 분자내 radical을 함유하고 있는데 이것이 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만듦. 이러한 DPPH의 작용은 hydroxyl radical과 유사하여 free radical 소거 실험에 활용된다. 본 실험은 60 μM 의 DPPH 2 ml에 다년생 길경을 농도별로 처리한 다음 1분간 잘 섞고, 10분 후에 520 nm에서 측정하였다

나. Superoxide 소거 작용

Xanthine (100 μM)과 xanthine oxidase (0.02 U)를 처리해 생성된 superoxide에 대한 안토시아닌의 소거능을 알아보기 위하여 0.1 M potassium-phosphate buffer (pH 7.4)에 다양한 농도의 안토시아닌을 처리함. 처리 후 nitroblue

tetrazolium (100 μ M)을 기질로 사용하여 안토시아닌의 superoxide 활성도를 측정하였다.

다. MTT Assay를 이용한 세포독성 측정

취장세포를 96-well microtiter plate에 세포농도 5×10^6 cells/ml로 조절하여 100 μ l씩 well에 넣은 다음 안토시아닌 및 t-BHP를 농도별로 처리 한 다음 1시간 배양함. 배양액을 교환한 후 MTT labeling reagent에 electron coupling reagent를 첨가하여 준비한 MTT labeling mixture를 각 well당 10 μ l씩 (최종농도 0.5mg/ml) 4시간 처리한 후 550 nm 파장에서 흡광도를 이용하여 안토시아닌 자체의 세포독성을 조사하였다.

라. 배양액 내 Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

실험에 이용한 안토시아닌의 취장세포 손상에 대한 영향을 조사하기 위하여 배지내의 LDH 활성을 측정함. LDH 활성은 기질 pyruvate가 lactate로 감소되는 정도를 조사하여 측정함. 이 감소는 reduced NADH가 산화되고, 340 nm에서 최대 흡광도를 나타냄. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 2.7 ml을 cuvette에 넣고 0.1ml culture media를 첨가하고, 0.02 M sodium pyruvate 0.1 ml을 넣은 후, NADH (0.2 mg) 0.1 ml을 첨가하여 잘 섞어준 후 340 nm 흡광도에서 2분 동안 흡광도를 측정하였다.

마. 지질과산화 수준 측정

안토시아닌을 1시간 전 처리한 후 t-BHP을 0.25 mM 농도로 1시간 동안 처리함. 배양액을 버리고, ice-cold PBS로 두차례 세척한 후 rubber policeman으로 긁어모아서 Homogenizer로 균질화 함. 지질과산화 (Lipid Peroxidation)의 지표로써 MDA의 양을 측정함. 수합한 세포를 0.5 ml 취해 0.37% (w/v) TBA (2-Thiobarbituric acid), 15%(w/v) TCA (Trichloroacetic acid)이 포함된 0.25M HCl 용액을 첨가하여 80 $^{\circ}$ C로 15분간 가열하고, 동량의 부탄올을 첨가한 후 4000 g로 5분간 원심분리함. 상층액을 취해 530 nm의 파장에서 흡광도를 측정하

였다.

바. 대식세포 내 ROS 측정

대식 세포 내 ROS의 양은 형광 probe인 DCF-DA을 사용하여 측정함. 배양액에 DCF-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)를 well당 25 μ M로 처리하여 15분 간 배양한 후 안토시아닌과 세포 내 ROS를 유발시키는 t-BHP (0.25 mM)를 처리함. 반응 후 형성된 세포내 과산화물은 excitation 파장 485 nm, emission 파장 530 nm에서 fluorescence를 측정하였다

사. 피부세포의 재생 능력 및 콜라겐 분해 효과 측정

피부세포(NIH 3T3)에 시료를 처리한 후 콜라겐 생성과 분해에 관여하는 효소의 활성을 zymography를 이용하여 측정 하였다.

아. 복강거식세포 분리와 배양

실험동물을 절식사 시킨 후 HBSS를 복강주사. 복부 부분을 마사지한 후 거식 세포 분리. 세포를 씻어준 후 세포수를 측정하여 phenol red-free RPMI1640 배지로 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양한 다음 부착되지 않은 세포는 PBS로 세척하고 부착된 세포 (거식세포)에 시료를 가하여 배양하였다

자. Nitric Oxide 측정

거식세포 또는 RAW 264.7 cells을 phenol red-free RPMI 1640 배지로 5 x 10⁵ / ml 의 농도로 희석하고 시료를 가하여 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양액내의 NO를 측정하기 위하여 배양 상층액을 Griess시약과 혼합한 후 상온에서 10분 방치 후 550nm에서 흡광도를 측정. NO₂⁻의 농도는 NaNO₃를 이용하여 표준곡선을 만들고, 이와 비교하여 NO의 생성량을 정량함.

차. RT-PCR을 이용한 MMP 유전자의 발현 측정

시료를 4M guanidium thiocyanate에 용해시키거나 RNazol 용액을 이용하여 전체 세포내 RNA를 분리한 다음, oligo d(T) cellulose spin column을 이용하여 mRNA를 분리. 분리한 mRNA 0.1 μ g를 0.5 μ g oligo d(T) 18 primer와 Super-script reverse transcriptase을 이용하여 cDNA를 합성. 합성한 cDNA를 이용하여 MMPs 의 발현을 이들에 대한 특이적 primer를 이용한 PCR로 증폭함. 증폭된 PCR산물을 2% agarose gel 상에서 Ethidium Bromide을 사용하여 확인하며 전기영동 후 Image Analyzer System (KODAK)과 PC Image Analyser (NIH Imager)를 사용하여 정량함.

카. 시료의 제조

차년도 연구를 통해 구축된 시료 채취방법을 이용하여, 자색 고구마로부터 안토시아닌 색소를 분리 정제하여, 연구에 이용하였으며, 사용된 자색고구마는 협력 업체인 지산식품으로부터 공급 받아 연구에 이용하였다. 사용된 시료는 모두 2%의 에탄올을 첨가하여 분리 시료의 용해 농도를 높였으며, 세포 등에서의 흡수율을 높였다.

타. in vitro에서 mushroom tyrosinase 활성억제 실험

피부에 있어서 색소침착의 주원인으로 알려진 melanin은 피부 기저층에 존재하는 melanocyte라고 불리는 색소세포내의 melanosome에서 생성되어 진다. 세포가 자외선 등의 자극을 받을 경우 생성된 tyrosinase에 의해 tyrosine이 dopa, dopaquinone 으로 변환되어 각종 melanin 중간대사산물을 경유하여 이들의 산화, 중합에 의하여 생성된다. 이 반응의 유일한 조절단계는 tyrosinase가 촉매하는 step으로, tyrosinase 활성 물질의 탐색은 melanin 생성억제물질을 효과적으로 screening 하는 수단으로 사용되어 진다. 본 연구에서는 자색고구마의 추출물을 이용하여 mushroom tyrosinase 활성을 측정하는 방법으로 추출물의 미백활성에 대한 연구 기초 자료로 사용 하였다.

파. 미백 효과 측정

B16F10 세포는 CO₂ 세포배양기에서 10% FBS(gibco. co. USA)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin(sigma)를 첨가하였으며, 24시간 주기로 DMEM 배양액을 교체 하였다. Sulforhodamine(SRB) assay 는 Skehan의 방법을 변형하여 측정하였다. 배양중인 96 well 배양용기에 TCA 용액을 첨가하여 저온에서 1시간동안 보관하여 배양용기에 결합된 세포를 고정 하였다. 세포를 5회 물로 씻어준 후 실온에서 건조하여 여기에 0.4% SRB를 넣고 30분 동안 방치한 후 SRB를 제거하고 1% 초산으로 4회 씻고 이를 실온에서 건조시킨 후 Tris base를 첨가하여 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 Hosoi 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2회 세척한 후 원심분리 하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO를 첨가한 1N NaOH 용액을 첨가하여 80℃에서 1시간동안 용해하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다. Tyrosinase 활성도 측정은 Matienz-Esparza의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고 100ul의 lysis buffer(1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, 0.1mM phenyl methyl sulfonylfluoride)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100mM sodium phosphate 용액 100ul에 시료 효소용액 50ul를 가하고 37℃, 305nm의 조건에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

하. 통계 방법

실험결과는 평균 \pm 표준편차포 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 student' t-test를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 항산화 기전 규명

1) 식품산패 억제용 소재 개발을 위한 항산화 활성 검증

산화 스트레스 (Oxidative stress)에 의한 의해 유발되는 식품의 산패 작용과, 인간의 노화 및 각종 질병을 유발하는 것으로 알려져 있는 산화 작용에 대한 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 항산화 효능을 알아보기 위해, 각각 콩에서 분리한 식용지질과 쥐의 뇌 추출 지질을 이용하여, 지질과산화물을 측정 하였다. DMSO에 녹인 안토시아닌 색소를 첨가하여 7일 동안 상온에서 방치한 식용지질의 경우 일반 지질에 비해 산패 정도가 30%이상 감소하였으며(Fig.4), 쥐의 뇌 추출 지질을 이용한 항산화 능을 지질 과산화 (lipid peroxidation ; LPO) 수준을 이용하여 측정한 결과 안토시아닌 색소의 농도에 비례하여 산화반응이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig 5).

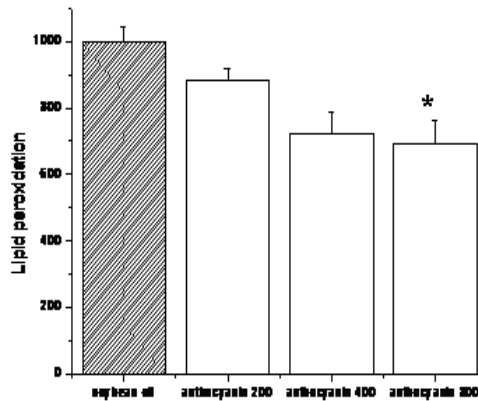


Fig. 4 The inhibitory effect of anthocyanin from purple-fleshed sweet potato on the rancidity of soybean oil. Anthocyanine(200, 400, 800 ug/ml) was mixed with soybean oil (10ml) in ethanol and DMSO mixture. Each value represents the mean S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. * $P < 0.05$, significantly.

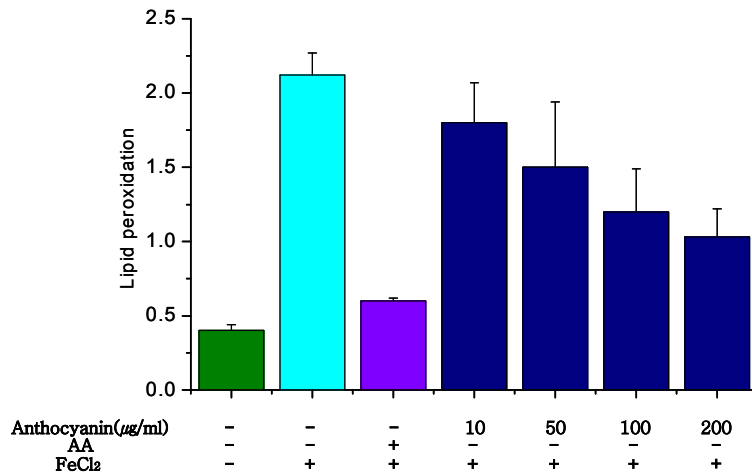


Fig. 5 The inhibitory effect of anthocyanin from purple-fleshed sweet potato on oxidative stress effect induced FeCl₂. Anthocyanin(10, 50, 100, 200 ug/ml) was mixed with brain extract (100mg) in PBS 1ml with FeCl₂. Each value represents the mean S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. **P* < 0.05, significantly. AA : vit.C.

2) 자미고구마 유래 안토시아닌의 항산화 활성 검증

지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical을 소거함으로써 항산화제로 작용하는 물질은 free radical인 BHA와 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 hydrazine 형태로 환원시키는 능력을 조사함으로써 검색할 수 있다. BHA 방법과 DPPH 방법을 이용하여 자미고구마 유래 안토시아닌 free radical 소거능을 확인한 결과 DPPH의 경우 vitamin C의 1/2정도의 항산화 능을 보였으며, BHA를 이용한 항산화 작용은 vitamin C와 거의 동일한 정도의 높은 항산화 효능을 볼 수 있었다 (Table 16). 최근에 차세대 질병예방과 건강지원 차원의 관리형 진단 마커로 큰 관심을 모으고 있는 것이 free radical에 의한 산화적 스트레스와 이를 방어하는 항산화 작용이다. 산소는 여러 요인들에 의하여 반응성이 매우 큰 활성 산소종 (reactive oxygen species; ROS)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다. 또한 이들 활성산소에

의한 지질과산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 체내에서 생성되는 과산화물도 세포에 대한 산화적 스트레스를 유발하여 각종 기능장애를 야기함으로써 노화와 질병의 원인이 되기도 한다. 위의 안토시아닌 색소의 항산화 효과가 동물세포를 이용한 항산화 실험에서 동일하게 효과를 나타내는지 알아보기 위하여, 대식세포를 이용하여 ROS를 측정 하였다. 측정결과, 과산화수소(H₂O₂)에 의해 증가한 ROS의 값이 안토시아닌 색소의 농도에 의존해 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 6).

Table 16. Radical scavenging activity of aerial parts of purple-fleshed sweet potato (against DPPH and superoxide radical)

Compounds	SC ₅₀ ^a values (mM)	
	DPPH ^b	Superoxide radical ^c
<i>Purple-fleshed sweet potato</i>	0.18	0.18
BHA ^d	0.12	0.25
Vitamin C	0.10	0.21

a : SC₅₀ values, sample concentration to scavenge reactive oxygen species by 50%.

b : DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. c : superoxide radical was produced from xanthin with xanthine oxydease oxidation reaction. d : BHA, 3-t-butyl-4-hydro xyanisole. AA : Vit.C.

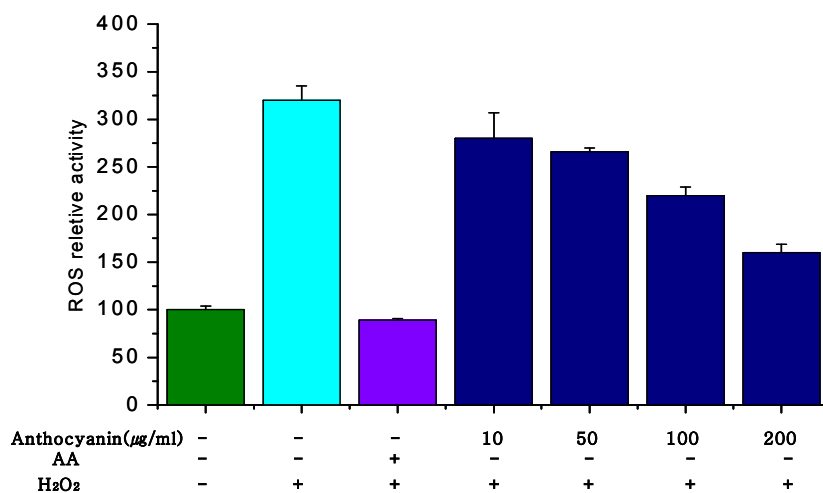


Fig. 6 Effects of purple-fleshed sweet potato(jami) on H₂O₂-induced cellular ROS production. Hepatocytes were treated with different concentrations of tongo, algo and pakak with H₂O₂. The bars represent the increase in fluorescence relative to unstimulated control cells at 20 min after addition of the stimulants. Each value represents mean±S.E. of three independent experiments carried out in triplicate.

3) 자미고구마 유래 안토시아닌의 면역세포 보호 작용

산화적 자극에 의해 발생하는 동물세포 독성에 대한 실험을 수행 한 결과 과산화수소에 의해 유발된 산화적 자극에 의해 사멸해 가는 세포의 양이 안토시아닌 색소를 동시 처리 하였을 경우 현저하게 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로, 자미고구마 유래 안토시아닌 색소는 산화적 자극을 줄여 동물세포에 보호 작용을 하는 것을 알 수 있었다(Fig 7).

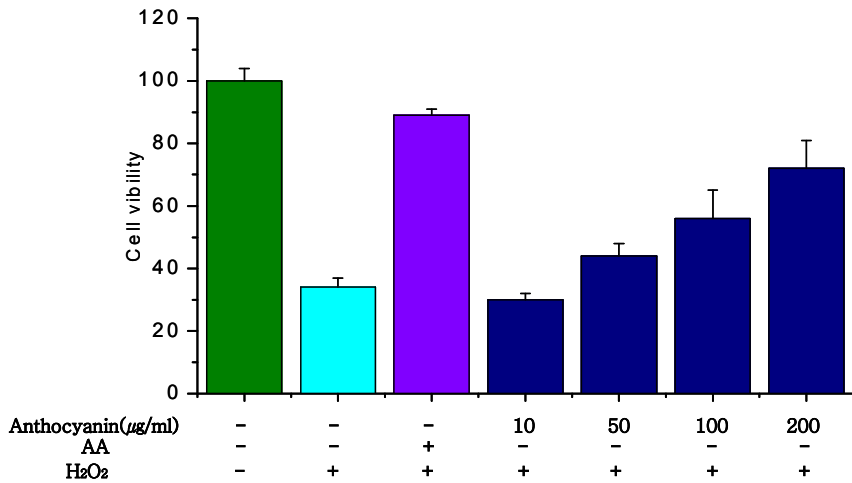


Fig. 7 Effect of anthocyanin on H₂O₂-mediated cytotoxicity in peritoneal macrophages. The cells (1×10⁵ cells/ml) were treated with various concentrations of anthocyanin and the cells were tested for viability by MTT assay 24h after the treatment of purple sweet potato. The value represented the mean±S.E.M. from four independent experiments.

4) 자미고구마 유래 안토시아닌의 항염증 활성 검증

분리한 안토시아닌 조성분을 이용하여 항염에 대한 효과를 측정 한 결과 시료의 농도에 의존하여 항염증 효과가 저해 되는 것을 확인 하였다(Fig 8.). 이러한 결과로 미루어 자미고구마 유래 안토시아닌 색소는 항산화, 항염증용 식품첨가소재로 활용이 매우 용의 할 것으로 사료된다.

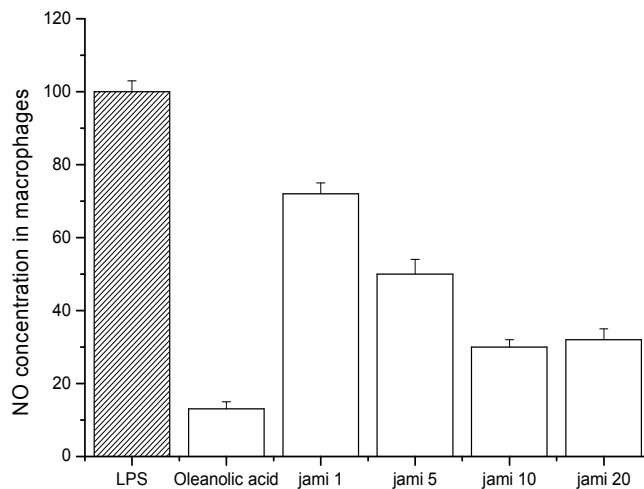


Fig. 8 Effects of purple-fleshed sweet potato(jami) on NO production. Peritoneal macrophages were cultured with the indicated concentrations of jami for 24 h. NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the medium. Each bar shows the mean \pm S.D. of four independent experiments, performed in triplicate.

나. 자미고구마 유래 안토시아닌 색소의 피부노화 방지효과 규명

1) 피부 노화 방지 효과

피부 노화는 크게 두 종류로 나눌 수 있음. 하나는 내인성 노화(intrinsic aging)로써 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화현상이고 다른 하나는 광노화

(photoaging)로써 오랫동안 햇빛에 노출된 얼굴, 손등, 목 뒤 등의 피부에서 관찰되는 탄력조직이 파괴되는 노화현상을 말하며 내인성 노화와 자외선에 의한 영향이 합쳐진 결과로 발생함. 이러한 광노화 현상은 자외선의 노출을 피하면 예방할 수 있는 피부 노화현상이다. 피부노화의 주원인으로 진피 내 세포 외 기질단백질 (extracellular matrix)의 감소를 들 수 있음. 피부에서의 교원질 양이 성인 이후에 매년 1%씩 감소되며 자외선에 노출된 피부에서는 그 양이 더욱 감소된다. 피부 두께의 약 85%를 구성하는 진피층은 주로 교원섬유(collagenous fiber)와 탄력섬유(elastic fiber)로 이루어져 있다. 진피의 약 70%를 차지하는 교원섬유는 흔히 다발을 이루며 굵은 섬유와 가는 섬유로 되어있고 콜라겐(collagen) 단백질로 이루어져 있으며 진피에 장력을 제공하여 외부의 자극이나 생리적 및 화학적 자극에 대해 강한 저항력을 가지고 있으며 외부로부터 신체 내부를 보호하는 역할을 한다. 한편, 진피의 약 5%를 차지하는 탄력섬유는 고무와 같은 탄성이 있으며, 교원섬유에 비해 짧고 가늘며 탄력성이 있고 콜라겐을 이어주는 스프링형 고리와 같은 역할을 하여 피부에 탄력성을 주는 역할을 한다. 일반적으로 피부노화란 주름의 증가, 피부의 처짐과 피부이완 등을 일컬으며, 시간의 흐름에 따라 나타나는 자연적인 노화와 장시간 일광에 노출되어 일어나는 인위적인 노화 등의 외부 환경에 의해서 피부노화가 진행되며 자외선 A (UVA)와 자외선 B (UVB)의 노출에 의해 발생하는 피부노화는 자연적인 피부노화와는 달리 피부의 손상으로 간주되고 있다. 콜라겐 생합성은 나이가 들거나, UVA와 UVB에 노출되었을 때 생합성 효율이 낮아져 피부노화 및 피부손상이 촉진된다. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 다형핵성 호중구, 대식세포, 치은섬유아세포, 골세포 등과 같은 세포로부터 분비되는 칼슘 및 아연 의존성 엔도펩티다제 (Endopeptidase)로 중성 pH에서 작용하는 효소이다. 세포는 교원질을 분해시키는 효소인 MMP-1 (type I collagen) 과 교원질을 조성하는 다른 효소를 적절히 조절하면서 균형을 취하지만 피부가 태양의 자외선에 노출되면 세포가 자극을 받아 상대적으로 MMP-1이 많아지면서 피부주름이 형성된다. 이러한 MMPs는 조직의 형성, 암전이, 염증, 당뇨병, 피부노화 및 주름, 화상 및 상처 치료와 같은 병리학적 과정과 각종 질환에 관여하는 것으로 알려져 있으며 구조적 유사성과 기질 특이성을 근거로 하여 MMPs는 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane type-MMPs 그리고 알려지지 않은 MMPs 등으로 분류된다. MMPs는 growth factors, cytokines, tumor promoters 및 ultraviolet (UV)

등과 같은 다양한 외부 자극인자에 의해서 과 발현된다. 피부 섬유아세포에서 UV에 의해 유도된 MMPs의 다양한 발현은 collagen이나 젤라틴등 다른 세포외 기질 (extracellular matrix: ECM)의 파괴를 유도하기 때문에 MMPs의 활성화는 피부 노화와 밀접한 관계를 가지고 있다. 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 발생은 UV에 의해 유도되는 MAP kinase-mediated signal transduction에 결정적 역할을 하며, ROS가 발생되면 MMP-12의 발현이 증가되고, 이러한 ROS의 활성을 억제하는 물질들은 UV에 의해 유도되는 AP-1 활성화와 MMP-12의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, 전년도 연구 결과의 자미고구마 추출 안토시아닌 색소의 항산화효과에 대한 영향을 나타낸 결과를 토대로 당해연도에는 MMP 활성화에 대한 연구를 수행하였다.

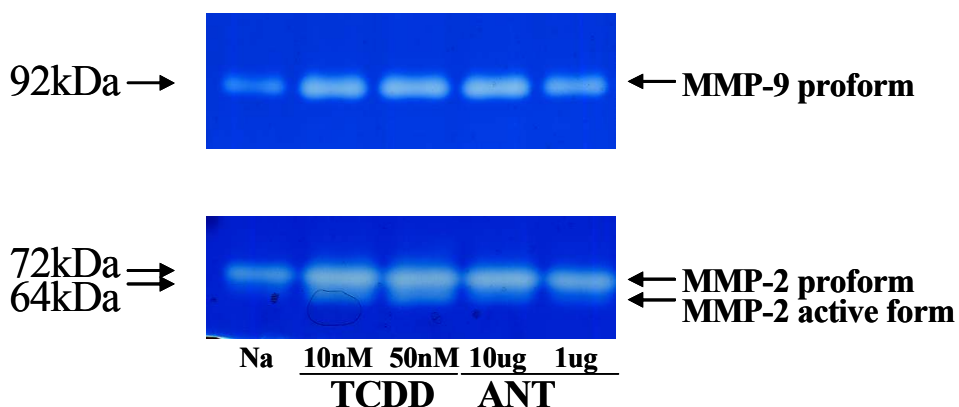


Fig 9. Typical samples of gelatin zymography for MMP-2 and MMP-9. MMP-2 activity was observed as a transparent band at 62 kDa in the stained gel.

2) 자미고구마에서 분리한 색소의 건강기능식품으로서의 가능성 조사

자미고구마는 아래 그림과 같이 안토시아닌 색소를 생체 중량대비 약 3.8% 함유하고 있어 표피층뿐만 아니라 육질 전체가 진한 자색을 띠고 있는데, 이 기능성 색소함량이 cranberry보다는 10~60배, 포도보다는 5~7배 높아 천연 기능성 색소 원뿐만 아니라 기능성 식품소재로서 가치가 우수하다.



<일반 고구마>

<자미 고구마>

3) MMPs의 효소 활성

MMPs 에 대한 Zymography를 실시한 결과 Fig 10.에서 보는 바와 같이 자미오 구마 안토시아닌색소의 농도에 의존하여, 피부세포에(NIH 3T3)세포에 처리한 MMP2의 활성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

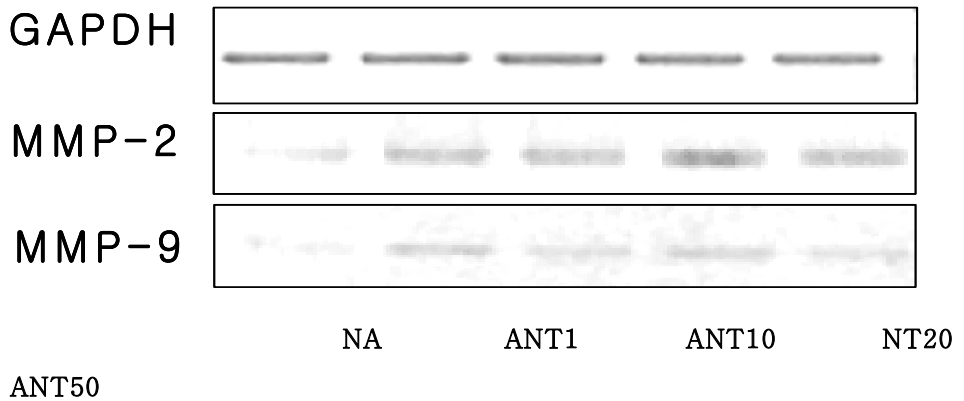


Fig 10. Effect of anthocyanin on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in NIH3T3 cells by RT-PCR: cellular RNA of NIH3T3 cells were harvested 24 h after depsipeptide treatment and analyzed for MMP-2 and MMP-9. GAPDH served as an internal control.

또한 이러한 효소의 활성의 변화가 유전자 발현에 의존하는 것이지 확인하기 위하여 MMP-2,9에 대한 RT-PCR을 수행 하였다, 수행 결과 효소의 활성 변화와 동일한 결과를 얻을 수 있었으며, 효소의 활성이 효소의 발현 변화에 의한 것임을 알 수 있었다.

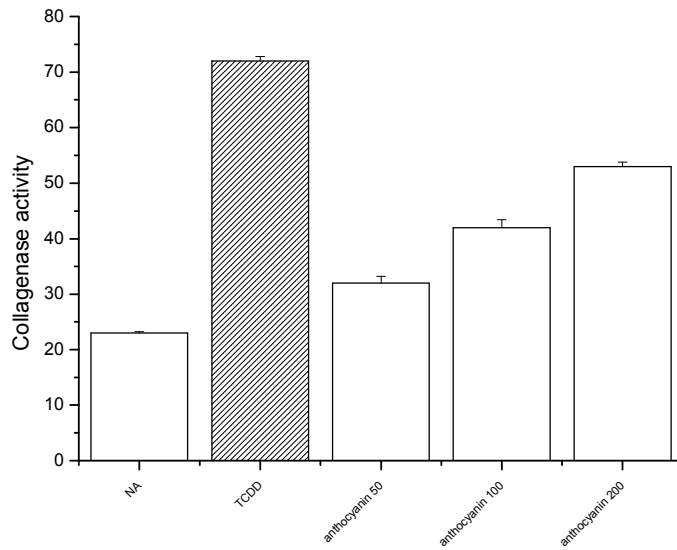


Fig. 11. Effect of anthocyanin on collagenase activity in NIH3T3 cells by pro-collagen of NIH3T3 cells were harvested 24hr after depsipeptide treatment and analyzed for collagenase activity.

4) 콜라겐 분해능 측정

콜라겐 분해에 대한 효과를 procollagen의 분해능을 측정하는 방법으로 측정하였으며, 그 결과 콜라겐 분해 효소의 활성이 농도에 의존하여 증가 하는 것을 확인할 수 있었다

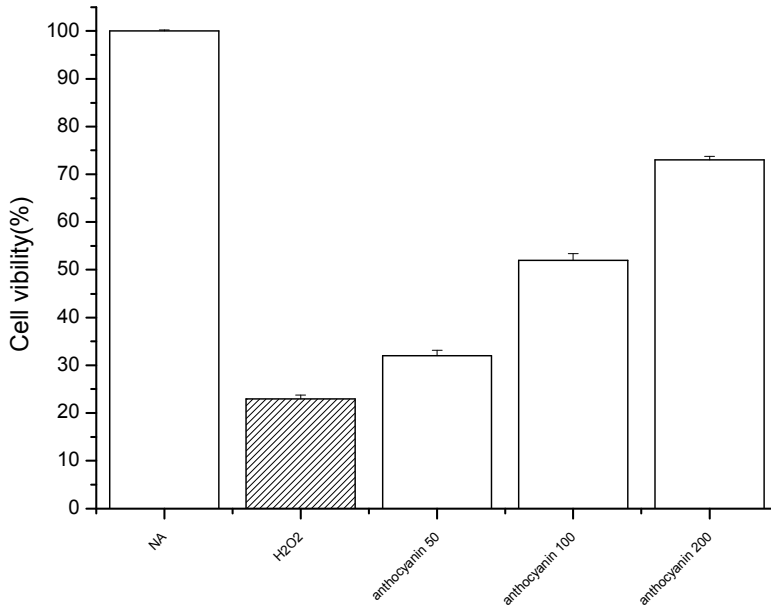


Fig 12. Effects of anthocyanin on cell viability of NTH3T3 cells in 24hr, and 48hr by WST-1 assay. Values represents % of control. Experiments were performed in triplicate and each value is mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

피부 세포에서의 라디칼에 대한 소거능을 확인하기 위하여 피부세포에 과산화수소를 처리하여 산화적 자극을 준 후에 안토시아닌 색소의 라디칼 소거능을 확인하였다. 확인 결과 농도에 의존하여 라디칼 소거능이 증가 하는 것을 확인하였다.

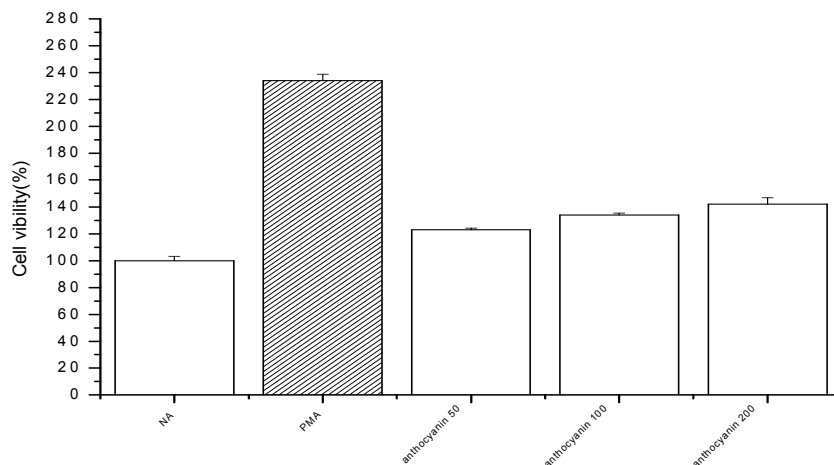


Fig 13. Effects of anthocyanin on cell viability of NTH3T3 cells in 24hr, and 48hr by WST-1 assay. Values represents % of control. Experiments were performed in triplicate and each value is mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

또한 피부 세포에 세포 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과, 안토시아닌 색소의 처리 농도에 의존하여 약 최고 21% 정도의 세포의 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Table 17. Radical scavenging activity of aerial parts of purple-fleshed sweet potato (against DPPH and superoxide radical)

Compounds	SC50 ^a values (mM)	
	DPPH ^b	Superoxide radical ^c
<i>Purple-fleshed sweet potato</i> (무안)	0.18	0.21
<i>Purple-fleshed sweet potato</i> (함양)	0.19	0.13
Vitamin C	0.11	0.23

a : SC50 values, sample concentration to scavenge reactive oxygen species by 50%.

b : DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.

c : superoxide radical was produced from xanthin with xanthine oxydease oxidation reaction.

5) 지역별 자미고구마의 특성 비교 분석

1차년도 평가 요청에 의해 기능성 식품으로 등록의 기초 자료로 사용하기 위하여 지역별 생산 자미고구마의 색소에 대한 항산화 능력을 비교하였음. 전라남도 무안 과 경상남도 함양의 생산 자미 고구마를 원료로 하여 동일한 조건하에서 항산화 능력을 테스트한 결과 유의성 있는 차이를 발견할 수 없었다.

6) 세포증식에 미치는 영향

자미고구마 추출물이 B16 mouse melanoma 세포의 증식에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 자미고구마 추출물을 1ug/ml에서 500ug/ml까지의 다양한 농도로 B16 mouse melanoma세포에 처리하고 24시간 후에 MTT와 SRB방법으로 세포의 증식을 관찰하였다. Fig 12.와 13.에서 보는 바와 같이 자미고구마 추출물에 의한 세포의 증식은 낮은 농도에서나 높은 농도에서 모두 유의성 있는 결과를 보이지 않았으나, 300이상의 농도에서 배지에 녹는 양이 한정되어 최고 농도를 200ug/ml의 농도로 제한하여 사용 하였다.

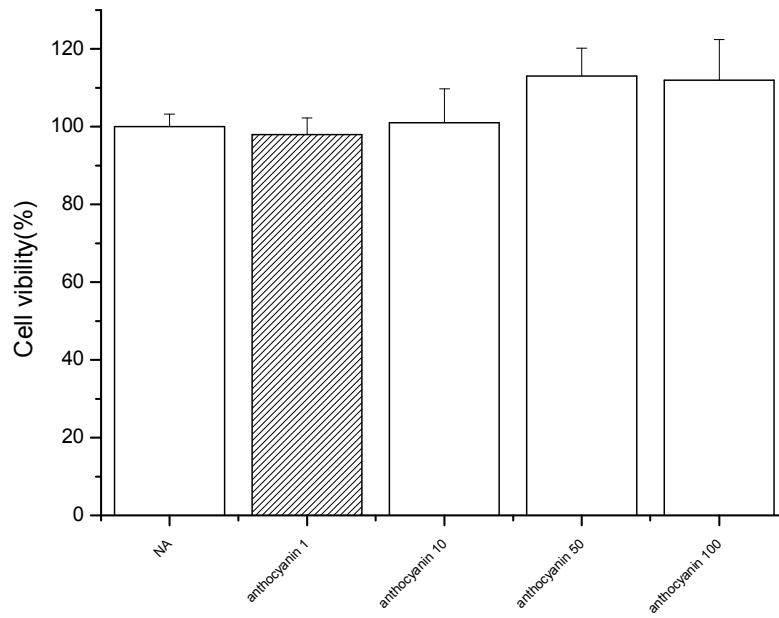


Fig 12. Effects of anthocyanin on cell viability of b16F10 cells in 24 h by WST-1 assay. Values represents % of control. Experiments were performed in triplicate and each value is mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

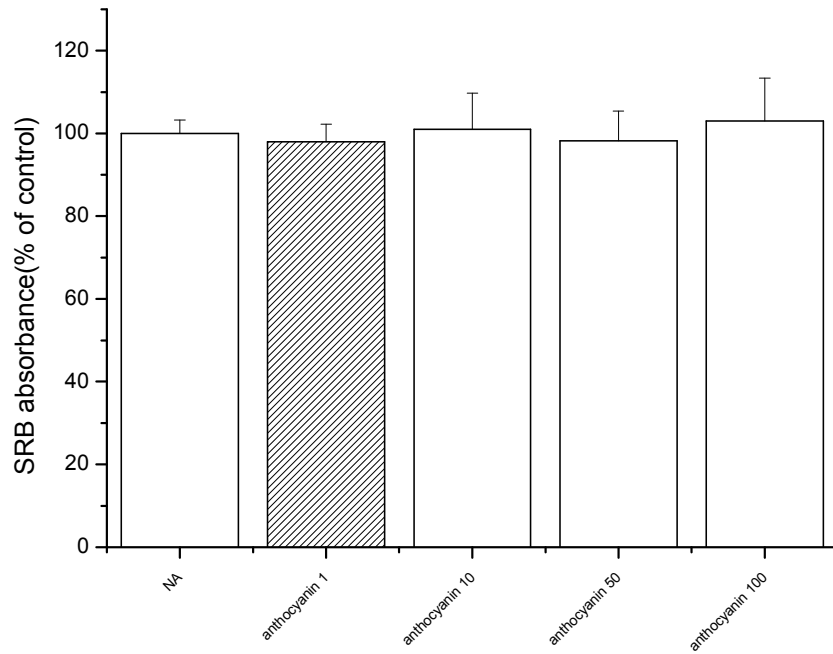


Fig 13. Effects of anthocyanin on on the proliferation of B16F10 mouse melanoma cells. Values represents % of control. Experiments were performed in triplicate and each value is mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

다. 자미고구마 유용 생리활성물질의 피부 미백 개선효과

1) B16 mouse melanoma 세포의 수적변화

자미고구마 추출물이 B16 mouse melanoma 세포의 수에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 자미고구마 추출물을 처리하고 72시간 배양한 후에 세포 수를 조사해본 결과 대조군에 비하여 자미고구마 추출물 처리군은 세포수가 약간 증가되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의성은 없었다. (Table 18.)

Table 18. Comparison to the number of melanoma between control group and experiment group at 24hr culture

Compounds	number of melanoma cell line
control	100 ± 0
anthocyanin 1	100.4 ± 7.2
anthocyanin 10	101.2 ± 4
anthocyanin 50	107 ± 6
anthocyanin 100	109 ± 7.4
anthocyanin 200	108 ± 4.2

a : SC50 values, sample concentration to scavenge reactive oxygen species by 50%.

b : DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.

c : superoxide radical was produced from xanthin with xanthine oxydease oxidation

2) 멜라닌양의 측정

a-MSH나 UV같은 외부적인 요인이 melanoma 세포를 자극하면 여러 단계를 거쳐 멜라닌화가 촉진되어 멜라닌을 합성하게 된다. 자미고구마 추출물이 멜라닌화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 melanoma 세포를 well당 1*10⁵개씩 넣고 24시간 후 새로운 배양액으로 교체하고 자미고구마 추출물을 배양액에 투여하였다. 72시간 배양한 후 관찰해본 결과 세포 내에서뿐만 아니라 상층액인 배양액에서도 육안적으로 멜라닌 생성을 관찰할 수 있었다. 그래서 melanoma 세포뿐만 아니라 상층 배양액 모두에서 멜라닌양을 조사하였다. Table 18.에서 보는 바와 같이 세포내에서만 아니라 상층 배양액에서도 melanoma 세포의 11%에 해당하는 멜라닌양을 측정할 수 있었다. 이것은 melanoma 세포에서 생성된 멜라닌의 일부가 배양액으로 추출되어 나오는 것으로 사료된다. 따라서 이후로 멜라닌양은 세

포와 배양액 모두를 시료로 취하여 측정하였다.

3) α -MSH가 멜라닌 합성에 미치는 영향

멜라닌세포자극 호르몬(MSH, melanocyte stimulating hormone)은 뇌하수체에서 ACTH(adrenocorticotrophic hormone), Lipotropic 호르몬과 Endorphin의 전구체인 POMC(proopiomelanocortin)의 형태로 분비되며, 흑색종 세포와 실험동물의 멜라닌세포(murine melanocyte)의 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려져 왔다. 19) 1961년에는 Lerner와 McGuire 20)가 인체에 멜라닌 세포 자극 호르몬을 주입한 후 피부색의 색소침착을 관찰하고 인체 피부의 멜라닌화와 이 호르몬과의 연관성을 제시하였다. 자미고구마 추출물이 B16 mouse melanoma 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 측정하기 전에 먼저 멜라닌 합성에 가장 효능이 있는 활성제로 알려진 α -MSH에 의한 멜라닌 합량을 측정하였다. B16 mouse melanoma 세포를 24시간 배양한 후 α -MSH를 0.01nM에서 10nM까지 다양한 농도로 처리하고 72시간 배양한 다음 멜라닌 양을 측정하였다. Fig 14.에서 보는 바와 같이 α -MSH처리군이 대조군에 비하여 모두 의미 있게 증가하였으며($p < 0.05$), 특히 5nM에서는 대조군에 비하여 약2.5배의 멜라닌 생성 증가를 보였다. 결과는 박 등21)이 0.5nM α -MSH를 처리하여 멜라닌 양이 2배 증가되었다는 연구결과와 일치하였다.

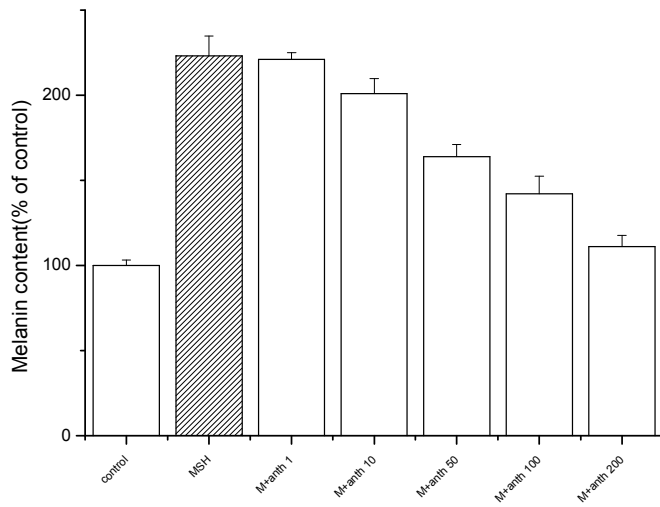


Fig. 14 Effect of anthocyanin concentration on melanin content of B16 mouse melanoma cells. Data were means \pm . This experiment was repeated five times.

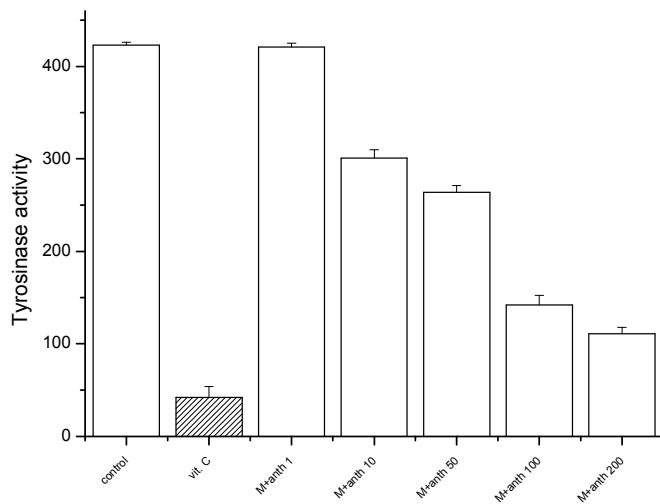


Fig. 15 Effect of anthocyanin concentration on tyrosinase activity of B 16 mouse melanoma cells. Data were means \pm . This experiment was repeated five times.

4) α -MSH가 tyrosinase 활성화에 미치는 영향

α -MSH가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 밝히기 위하여 α -MSH 처리 후에 tyrosinase의 활성도를 in vitro에서 측정하였다. Fig 15.에서 보는 바와 같이 α -MSH처리군이 대조군에 비하여 모두 의미있게 증가되었으며, 특히 5nM에서는 대조군에 비하여 약 3.6배의 tyrosinase 활성을 보였다.($p < 0.05$) 이것은 멜라닌 양이 2.5배 증가한 것과 비교하면 더 많은 증가를 보인 것이며, 전체적으로 tyrosinase 활성이 대조군에 비하여 더 많은 증가를 보인 반면, 멜라닌의 생성 양은 그에 미치지 못하였다. 이것은 tyrosinase 작용이 멜라닌 합성의 초기단계로서 활성이 크게 증가하지만, 멜라닌은 최종산물이므로 초기단계에 증가하는 tyrosinase 활성화에 비하여 멜라닌은 다른 경로들도 많고 여러 단계를 거치므로 적게 만들어지기 때문인 것을 사료된다. 이것은 배양된 인체 멜라닌 세포에 α -MSH를 투여하여 α -MSH의 세포내 신호 전달물질인 cAMP의 증가와 tyrosinase 활성도가 증가된 것(22)과 멜라닌 세포의 멜라닌화뿐만 아니라 세포의 증식도 일어난다고 보고된 내용(23)과 같은 결과이다. α -MSH가 세포막에 존재하는 수용체와 결합하면 adenylate cyclase가 활성화되어 세포내 cAMP를 증가시키고, 증가된 cAMP에 의하여 cAMP-dependent protein kinase(PKA)가 활성화된다. 그 후 일련의 과정을 거쳐 tyrosinase가 활성화되어 멜라닌화가 진행되는 것으로 설명할 수 있다.

5) 자미고구마 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향

자미고구마 추출물이 in vitro에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌양을 측정하였다. B16 mouse melanoma 세포를 24시간 배양한 후 배양액을 교체하고 자미고구마 추출물을 1ug/ml에서부터 200ug/ml까지 다양하게 처리하였다. 24시간 배양한 다음 B16 mouse melanoma 세포의 전체 멜라닌양을 측정할 결과 자미고구마 추출물군 모두가 대조군에 비해 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.($p < 0.01$) 특히 100ug/ml 자미고구마 추출물에서는 대조군에 비하여 약 30%의 멜라닌 생성 저해효과를 보였다. (Fig 14.)

6) 자미고구마 추출물이 tyrosinase activity에 미치는 영향

tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에서 속도제한(rate-limiting)효소이며 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다. 자미고구마 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자미고구마 추출물 처리 후에 tyrosinase의 활성도를 in vitro에서 측정하였다. B16 mouse melanoma 세포를 24시간 배양한 후 배양액을 교체하고 MSH와 함께 자미고구마 추출물을 1ug/ml에서 부터 200ug/ml까지 다양하게 처리하고 배양시간에 따라 tyrosinase의 활성도를 측정하였다. Fig 15.에서 보는 바와 같이 자미고구마 추출물 처리량이 증가함에 따라 tyrosinase 측정값은 대조군에 비하여 모두 의미있는 감소율을 보였다. 특히 100ug/ml 투여군에서는 대조군에 비해 약 대조군의 30% 정도의 활성만을 나타내었다. ($p < 0.05$) 자미고구마 추출물을 B16 mouse melanoma 세포에 처리시 대조군에 비하여 멜라닌 양과 tyrosinase 활성이 감소 하는 경향을 보였다. 자미고구마 추출물을 이용한 멜라노마 세포에서 생성된 멜라노솨이 각질 세포로의 이동에 미치는 영향을 측정하기 위해 B16F10 세포와 NIH 3T3 세포를 공동배양하여 NIH세포의 멜라노솨의 이동을 현미경으로 관찰 하였으나, control에 비해 유의성 있게 감소하는 것을 관찰 할 수 없었다. 이러한 결과로 자미고구마 추출물은 멜라닌 생성에 관여하는 Tyrosinase 의 활성을 저해하여, 멜라노솨의 생성은 효과적으로 저해 하나 멜라노솨의 이동에는 큰 영향을 미치지 못하는 것을 관찰 할 수 있어, 피부 미백 개선 소재로서의 가능성은 확인 할 수 있었으며, 본 결과를 미백 소재 개발에 활용 하였다.

4. 요약

- BHA 방법과 DPPH 방법을 이용하여 자미고구마 유래 안토시아닌 free radical 소거능을 확인한 결과 DPPH의 경우 vitamin C의 1/2정도의 항산화 능을 보였으며, BHA를 이용한 항산화 작용은 vitamin C와 거의 동일한 정도의 높은 항산화 효능을 있었으며, 대식세포를 이용하여 ROS를 측정 하였다. 측정결과, 과산화수소(H₂O₂)에 의해 증가한 ROS의 값이 안토시아닌 색소의 농도에 의존해 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.
- 자미고구마 추출물이 B16 mouse melanoma 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 측정하여 MSH에 의해 증가한 멜라닌 색소의 함량을 효과적으로 감소시키는 것을 확인 하였다. 또한 멜라닌 생성에 관여하는 Tyrosinase의 활성을 효소에 직접적으로 작용하여 감소시키는 결과와 세포차원에서 감소시키는 것을 확인 하였다.
- 자미 고구마 추출물을 이용한 멜라노마 세포에서 생성된 멜라노솜이 각질 세포로의 이동에 미치는 영향을 측정하기 위해 B16F10 세포와 NIH 3T3 세포를 공동 배양하여 NIH세포의 멜라노솜의 이동을 현미경으로 관찰 하였으나, control에 비해 유의성 있게 감소하는 것을 관찰 할 수 없었다. 이러한 결과로 자미고구마 추출물은 멜라닌 생성에 관여하는 Tyrosinase 의 활성을 저해하여, 멜라노솜의 생성은 효과적으로 저해 하나 멜라노솜의 이동에는 큰 영향을 미치지 못하는 것을 관찰 할 수 있어, 피부 미백 개선 소재로써의 가능성은 확인 할 수 있었으며, 본 결과를 미백 소재 개발에 활용 하였다.

5. 참고문헌

1. Ali, B. H., Mousa, H. M., and El-Mougy, S. The effect of a water extract and anthocyanins of hibiscus sabdariffa L on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 17, 56–59. (2003)
2. Amimoto, T., Matura, T., Koyama, S. Y., Nakanishi, T., Yamada, K., and Kajiyama, G. Acetaminophen-induced hepatic injury in mice: the role of lipid 15 peroxidation and effects of pretreatment with coenzyme Q10 and alphatocopherol. *Free radical biology & medicine* 19, 169–176. (1995)
3. Ancans, J. and Thody, A.J., Activation of melanogenesis by vacuolar type H+ATPase inhibitors in amelanotic, tyrosinase positive human and mouse melanoma cells. *FEBS Lett.* 478, pp. 57-60. (2000)
4. Aroca, P., Urabe, K., Kobayashi, T., Tsukamoto, K. and Hearing, V.J., Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* 268, pp. 25650-25655. (1993)
5. Baroni, A., Paoletti, I., Silvestri, I., Buommino, E. and Carriero, M.V., Early vitronectin receptor downregulation in a melanoma cell line during all-trans retinoic acid-induced apoptosis. *Br. J. Dermatol.* 148, pp. 424-433. (2003)
6. Beitner, H. and Wennersten, G., A qualitative and quantitative transmission electron microscopic study of the immediate pigment darkening reaction. *Photodermatology* 2, pp. 273-278. (1985)
7. Bessems, J. G., and Vermeulen, N. P. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Critical reviews in toxicology* 31, 55–138. (2001)

8. Bicomumpaka, C. and Page, M., Paclitaxel stimulates melanogenesis in B16-F1 melanoma cells. *Anticancer Res.* 18, pp. 4101-4104. (1998)
9. Bozzola, J.J., Russel, L.D., Electron microscopy principles and techniques for biologists. In: Quantitative electron microscopy. *Jones and Bartlett Publishers, Boston, USA*, pp. 288-304. (1991)
10. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254. (1976)
11. Chandraratna, R.A.S., Future trends: a new generation of retinoids. *J. Am. Acad. Dermatol.* 39, pp. 49-52. (1998)
12. Cohen, S. D., and Khairallah, E. A. Selective protein arylation and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews* 29, 59-77. (1997)
13. Dahlin, D. C., Miwa, G. T., Lu, A. Y., and Nelson, S. D. N-acetyl-pbenzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 1327-1331. (1984)
14. Davis, D. C., Potter, W. Z., Jollow, D. J., and Mitchell, J. R. Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life sciences* 14, 2099-2109. (1974)
15. De Brabander, M. and Borges, M., The formation of annulated lamellae induced by the disintegration of microtubules. *J. Cell. Sci.* 19, pp. 331-340. (1975)

16. Dicker, E., McHugh, T., and Cederbaum, A. I. Increased oxidation of p-nitrophenol and aniline by intact hepatocytes isolated from pyrazole-treated rats. *Biochimica et biophysica acta* 1035, 249–256. (1990)
17. Edward, M., Gold, J.A. and Mackie, R.M., Different susceptibilities of melanoma cell to retinoic acid-induced changes in melanotic expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, pp. 773–778. (1988)
18. Frank A. Anania, Lawrence Womack, Mingde Jiang, and Neeraj K. Saxena. Aldehydes potentiate 2(I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med.* 30(8):846–857. (2001)
19. Gianluca Svegliati-Baroni, Francesco Ridolfi, Antonio Di Sario, Stefania Saccomanno, Emanuele Bendia, Antonio Benedetti, and Patricia Greenwel. *Hepatology.* 33(5):1130–1140. (2001)
20. Giusti, M. M., Rodriguez-Saona, L. E., Griffin, D., and Wrolstad, R. E. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J Agric Food Chem* 47, 4657–4664. (1999)
21. Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 175, 710–716. (1976)
22. Hagiwara, A., Yoshino, H., Ichihara, T., Kawabe, M., Tamano, S., Aoki, H., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., and Shirai, T. Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal 16 carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *The Journal of toxicological sciences* 27, 57–68. (2002)

23. Heinonen, I. M., Lehtonen, P. J., and Hopia, A. I. Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors. *J Agric Food Chem* 46, 25–31. (1998)
24. Helige, C., Smolle, J., Zellnig, G., Hartmann, E., Fink–Puches, R., Kerl, H. and Tritthart, A., Inhibition of K1735–M2 melanoma cell invasion in vitro by retinoic acid. *Clin. Exp. Metastasis* 11, pp. 409–418. (1993)
25. Hendrix, M.J.S., Wood, R., Seftor, E.A., Lotan, D., Nakajima, M., Misiorowski, R.L., Seftor, R.E.B., Stetler–Stevenson, W.G., Bevacqua, S.J., Liotta, L.A., Sobel, M.E., Raz, A. and Lotan, R., Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor. *Cancer Res.* 50, pp. 4121–4130. (1990)
26. Hinson, J. A., Reid, A. B., McCullough, S. S., and James, L. P. Acetaminophen induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug metabolism reviews* 36, 805–822. (2004)
27. Hu, D.N., Stjernschantz, J. and McCormick, S.A., Effect of prostaglandins A (2), E (1), F (2 alpha) and latanoprost on cultured human iridal melanocytes. *Exp. Eye Res.* 70, pp. 113–120. (2000)
28. Igarashi, K., Kimura, Y., and Takenaka, A. Preventive effects of dietary cabbage acylated anthocyanins on paraquat–induced oxidative stress in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 64, 1600–1607. (2000).
29. Ito, S., Wakamatsu, K. and Ozeki, H., Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment.*

Cell. Res. 13, pp. 103-109. View Record in Scopus / Cited By in Scopus (41) (2000)

30. James, L. P., Mayeux, P. R., and Hinson, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31, 1499-1506. (2003a).

제 3 절 간장 질환 예방 · 개선용 식품개발을 위한 자미 고구마의 간 기능 개선 및 작용기전 검색

1. 서론

- 간은 체외에서 들어온 물질 및 체내 물질의 대사에서 중추적인 역할을 담당하며 지속적으로 효소반응 및 에너지대사가 일어나는 생체기관이다.
- 특히 선진국에 비하여 음주인구가 상대적으로 높고 폭음에 의한 간 손상 발생 원인이 높은 만큼 이에 대한 관심도 지대하다.
- 간질환은 한국인 40대 남성의 사망원인 중 1위를 차지하고 있으며, 현재 한국인의 간과 연관된 사망율은 인구 10만 명당 약 54명이며, 간암으로 인한 사망률은 인구 10만 명당 약 35.1명으로 매우 높은 편으로 주로 간 섬유화로 인한 간경변과 간암으로 사망하였다.
- 만성 간질환의 변이는 화학물질이나 바이러스 등과 같은 생물학적 요인에 의한 급성간염 (Acute hepatitis) ⇒ 만성간염 (Chronic hepatitis) ⇒ 간 섬유화 (Liver fibrosis) ⇒ 간경변 (Liver cirrhosis) ⇒ 간암 (Hepatocarcinoma) 으로 진행된다.
- 간 질환의 치료제로 B형 간염을 미연에 방지할 수 있는 백신만이 개발되어 있을 뿐 현재까지 뚜렷한 간 섬유화를 비롯한 만성 간질환에 대한 궁극적인 치료제가 없는 상태이며 대증치료가 주로 이루어지고 있는 상태이다.
- 지금까지 간 섬유화 및 간경변은 불치병으로 인식되어 왔으나 최근 과도한 섬유생성이 특징인 간 섬유화의 연구가 분자수준에서 밝혀짐에 따라 간 섬유화 및 간경변증은 불가역적인 질환이 아닌, 간 섬유생성의 억제 또는 용해촉진 등에 의해 가역적인 질환으로 개념이 변화되고 있다.

- 간 섬유화는 음주, 화학물질이나 바이러스 등과 같은 생물학적 요인으로 인한 자극 ⇒ 지속적인 간세포 손상 및 염증 유발 ⇒ 간세포 주변의 간 정상세포 (Hepatic Stellate Cells)의 과다 증식 및 활성화 ⇒ 간 섬유화 과정을 거치게 된다.
- 적절히 치료되지 않은 만성 간질환의 대부분은 간암으로 발전하게 되므로 이들 간 섬유화 억제 소재가 간암 예방효과를 갖고 있으면 만성 간질환 같은 질병 진행억제에 매우 효과적이다.
- 간 섬유화는 선진국에서는 발병율이 현저히 낮은 반면 한국인에게는 대단히 심각한 만성질환으로 간 섬유화 억제 및 예방 기능을 갖는 소재 개발은 시급히 해결해야할 중대한 과제라고 사료된다.
- 본 연구를 수행함으로써 농촌진흥청에서 전략 육종품목으로 개발되어 생산되고 있는 자미고구마의 주요 생리활성물질인 안토시아닌 천연색소의 유용물질을 이용하여 급성 간 손상, 간 섬유화 억제 및 예방과 같은 생리활성작용을 갖는 유효성분의 기능성 소재개발과 이와 관련된 소재의 작용기전을 탐색하는 소재 개발 및 응용기술의 구축이 가능하다
- 간 섬유화 억제 및 예방기능을 갖는 간 보호 활성 성분의 세포 보호, 간 섬유화, 간경변증 치료효과를 입증하고 작용기전을 규명함으로써 간 보호 기능을 갖는 기능성 식품을 일차적으로 개발하고, 궁극적으로 간 섬유화, 간 경변 같은 만성 간질환을 치료하는 약제의 상품화가 가능할 것으로 전망하였다.
- 천연물과 식용 식물은 인간이 항상 대량으로 섭취하고 있는 식품 등에 대량 함유되어 있을 뿐만 아니라 모든 사람들이 항상 접촉하고 있기 때문에 이들로부터 새로운 생리활성을 가지는 신기능성 물질을 검색하거나 밝혀지지 않는 생리활성을 조사할 수 있는 많은 가능성을 내포한다.
- 최근의 여러 국제협약들의 타결로 국내시장을 선진국들에게 완전히 개방하여야 할 입장이기 때문에 국내산업 보호차원 및 국제 경쟁력 확보를 위하여 국

내 자생 식용식물 등의 천연물로부터 신기능성 물질의 개발은 매우 시급한 과제이다.

- 상기 연구에서 도출한 자미고구마의 약리적 및 생리적 활성은 일반 고구마와는 확연히 구별되는 특성을 가지고 있어 기능성 소재 또는 약용 소재로 활용 가치가 높을 뿐만 아니라 고부가가치 제품 개발에 의한 세계적 독점체제 확보가 가능할 것으로 판단된다.
- 본 연구에서는 농촌진흥청에서 전략 육종품목으로 개발되어 생산되고 있는 자미고구마의 주요 생리활성물질인 안토시아닌 천연색소의 유용물질을 이용하여 급성 간 손상, 간 섬유화 억제 및 예방과 같은 생리활성작용을 갖는 유효성분을 도출하고 대량분리 방법을 확립하여 단기적으로는 간 보호 기능을 갖는 기능성 식품을 일차적으로 개발하고, 궁극적으로 간 섬유화, 간 경변 같은 만성 간질환을 치료하는 약제를 개발하고자 한다.
- 농촌진흥청에서 전략 육종품목으로 개발되어 생산되고 있는 자미고구마의 주요 생리활성물질인 안토시아닌 천연색소로부터 간 섬유화 과정에 관련된 면역조절 또는 대사과정의 효소 활성이나 유전자 발현을 조절할 수 있는 특이적인 target에 작용하여 간 보호 작용에 탁월한 효능을 지닌 물질을 탐색하여 그 물질을 규명하고 그 기전을 밝혀냄으로서, 기능성 식품, 치료제에 이르기까지의 일련의 과정을 체계적으로 확립하기 위해서는 본 연구의 수행이 필요하다.
- 최근 선진국들의 시장 개방 압력과 물질 특허 독점에 따라 국내 산업을 보호하고 국제경쟁력을 확보를 위해서는 우리가 사용해 온 식용식물 등의 천연물로부터 약리 효능을 가진 기능성 물질의 개발과 이들 물질들의 생체영향 및 독성 평가는 매우 시급하면서도 중요한 과제로 현대 과학적 기술을 활용하여 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌으로부터 급성 간 손상 억제, 간 섬유화 억제 및 예방 효능을 가진 물질들을 탐색하여 간 치료와 관련된 신기능성 소재를 개발하면 천문학적 규모의 건강보조, 의약품시장에서 고부가가치를 생산하여 국가발전에 크게 기여하리라 사료된다.

2. 재료 및 방법

가. 일차 간세포에서 화학물질을 이용한 세포 독성 능력 검사

96 well plate에 일차 간세포를 seeding 하고, 다음 날 FBS가 없는 배지로 교체한 후 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌을 24시간 처리하였다. 안토시아닌을 처리한 배지에 HBSS에 희석한 MTT 시약을 100 μ l 씩 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C CO₂ Incubator에서 반응 후 30분 후에 cell을 lysis 시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 급성 간독성 동물모델 확립

실험동물은 약 25~30 g의 Specific Pathogenic Free (SPF) male ICR mice를 주식회사 대한바이오텍로부터 구입하여 실험동물로 사용하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하며, 사육실의 온도는 21~24 $^{\circ}$ C, 상대 습도는 40~60%로 유지하였다. 또한 사육실의 낮과 밤이 12시간마다 반복되도록 조절하고, 동물 사육 장치내로 외부 오염물질이 침입하지 않도록 Hepa-filter를 이용하였다.

다. 시료의 투여

자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌 천연색소를 생리식염수에 녹인 후 농도별 (200, 400, 800 mg/kg)로 7일 동안 연속해서 경구 투여함. 대조군은 생리식염수만을 경구 투여하여 안토시아닌에 대한 효능을 실시하였다.

라. 화학물질에 의한 간독성 유발

실험동물에 간독성의 유발은 Acetaminophen (APAP, 400 mg/kg)을 생리식염수에 녹인 후 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌을 마지막으로 투여한 후 3시간 후에 APAP를 복강 투여하여 인위적인 간독성을 유발시킨 다음 18시간 후에 실험동물을 에탄올로 마취하여 혈액과 간을 채취하였다. 적출한 간의 일부는 조직학적 검사를 위하여 10 % 포르말린 용액에 담가두고, 나머지 조직은 즉시 -70 $^{\circ}$ C

에서 냉동 보관하였다.

마. 혈청의 이화학적인 검사

간독성 유발물질에 따른 간 손상시 혈액으로 유리되어 나오는 alanine amino transferase (ALT) 및 aspartate amino transferase (AST)의 양을 측정함으로써 간 손상 여부를 확인할 수 있다. ALT 및 AST 양은 Reitman-Frankel 방법에 준하여 측정하였다. 시료를 농도별로 처리한 후에 배양액을 ALT 및 AST 기질액과 37°C에서 30분 동안 반응시켜 pyruvate를 생성시킨 후, 발색액을 넣고, 20분 후 0.4 N-NaOH 를 섞어서 동정색의 발색이 되면 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. 간 조직을 이용한 지질과산화 연구

간 100mg을 완충액 (Tris-HCl) 10ml로 Homogenizer로 균질화 시켰다. 과산화지질의 분해 생성물인 말론디알데하이드 (Malondialdehyde, MDA)의 양을 티오바비투릭산 (2-Thiobarbituric acid, TBA)과 100°C에서 20분간 가열 반응시켜 생긴 티오바비투릭산 색소를 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 간 조직에서의 Glutathione (GSH) 함량 변화 연구

간 100mg을 0.02 M EDTA에 넣은 후 Homogenizer로 균질화 시켰다. 4°C, 12000rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층액 100 μ l만 취하였다. 이 상층액에 1.8 ml Phosphate-EDTA 완충액과 O-Phthaldialdehyde 100 μ l를 넣은 후, 15분간 반응한 후에 412nm에서 흡광도를 측정하였다.

아. Hematoxylin Eosin (HE) 염색을 이용한 간 조직의 임상학적 변화

HE 염색을 통해 급성 간독성으로 인한 간 조직의 임상학적 변화를 확인할 수 있다. 간을 10% 포르말린 용액으로 24시간 고정 후, 고정이 끝난 조직에서 고정액을 제거하기 위하여 1시간 동안 흐르는 물에 세척한 후 저농도에서 고농도 (7

0~100%) ethanol 과정을 거쳐 탈수함. Xylene으로 alcohol을 제거한 후 조직을 투명화 하여 paraffin을 침투시켜 포함하였다.. 조직의 이탈을 방지하기 위하여 poly-L-lysine (Sigma Chem., Chembio., Co., Seoul)을 슬라이드에 도말 건조시켰다. 파라핀으로 포매된 조직블록을 박편절단기 (Microtome, Leica)로 4 μ m 두께의 연속 절편을 취하여 xylene을 이용하여 탈파라핀화 시키고, 알코올을 이용하여 함수과정을 수행하였다. Hematoxyline 용액으로 핵을 염색하고, Eosin 용액으로 세포질을 염색시키고 나서, mounting하여 관찰하였다.

자. 간의 약물대사 효소인 Cytochrome(CYP) P450의 효소들의 활성 측정

자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌만을 단독으로 7일간 경구 투여한 후 간 100mg을 10ml의 homogenizer buffer에 넣은 후 조직을 균질화 시키고, 9,000 xg에서 4°C 30 분간 원심분리한 후, 상층액 만을 다시 초 원심분리 튜브 (ultracentrifuge tube)에 옮긴 후 100,000 xg에서 4°C 한 시간 초 원심분리를 하였다. 초 원심분리 한 후 상층액인 cytosol을 microcentrifuge tube에 옮기고, 침전된 microsome을 저장용액 (storage buffer ; 호모게나이저 용액 에 10% 글리세롤을 혼합한 용액) 1 ml을 넣고 피펫을 이용해서 잘 부유시킨 후 microcentrifuge tube에 옮겼다. 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌만 투여한 경우 APAP와 같은 간 손상을 유발하는 화학물질의 대사에 관여된 간의 약물대사 효소인 Cytochrome(CYP) P450의 효소들 (P450 1A1, P450 2E1)의 활성을 억제하는 것을 확인하였다.

차. 제조 항체를 이용한 Cytochrome(CYP) P450 2E1의 western blotting

마우스를 이용하여 제조한 특이 CYP 2E1의 항체를 이용하여 western blotting을 수행한 결과, 자미고구마의 생리활성인 안토시아닌 투여 농도 별로 CYP 2E1의 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

카. 간 정상세포에서 화학물질을 이용한 세포 독성 및 증식 능력 검사

96 well plate에 간 정상세포를 seeding 하고, 다음 날 FBS가 없는 배지로 교체

한 후 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌을 24시간 처리하였다. 안토시아닌을 처리한 배지에 HBSS에 희석한 WST-1 시약을 10 μ l 씩 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C CO₂ Incubator에서 반응 후 30분마다 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

타. Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA) western Blotting

간 정상세포를 100mm Dish에서 배양하여 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌을 농도별로 24시간 전처리하고 에탄올에 의한 간 손상의 유발 및 세포 독성을 유발하는 Acetaldehyde (Sigma-Aldrich)를 24시간 처리하여 PBS 1ml를 이용하여 끊어 모았다. 4 $^{\circ}$ C의 3000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층액을 제거하고 lysis buffer (RIPA Buffer, Biosesang, Protease inhibitor, Calbiochem)로 pellet을 lysis 시키고 13000 rpm에서 10분간 재차 원심분리 하였다. 수거한 상층액을 bradford assay를 통해 단백질 정량하고, 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 30 μ g을 전기영동 하였음. SDS-PAGE gel 위에서 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고, 5% Skim milk로 비특이적 항원항체반응을 미리 차단시켰다. Membrane은 Tris-buffered saline tween 20 (TBST)으로 3번 씻어내고 monoclonal mouse anti-human smooth muscle actin antibody (1:1000 in TBST, Dako, Clone 1A4)를 붙여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시키고 TBST로 3번 씻어내었다. 실온에서 1시간 동안 Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (1:1000 in TBST, Cell Signaling)를 붙여 두었다. TBST로 씻어 낸 뒤 WEST-ZOL[®]Plus solution (iNtRON)에 3분간 노출시킨 후 LAS 3000 mini(FUJIFILM)를 이용하여 확인하였다.

파. 화학물질에 의한 간 섬유화 유발

실험동물에 간 섬유화의 유발은 Dimethylnitrosamine (DMN, 10 mg/kg)을 생리식염수에 녹인 후 1주에 3회씩 3주, 마지막 4주째에는 5회 연속 복강 투여하여 인위적인 간 섬유화를 유발시킨 다음 18시간 후에 실험동물을 에탄올로 마취하여 혈액과 간을 채취하였다. 적출한 간의 일부는 조직학적 검사를 위하여 10 % 포르말린 용액에 담가두고, 나머지 조직은 즉시 -70 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하였다.

하. Collagen III western Blotting

동일 부위 간 조직 100mg을 PBS 1ml로 Homogenizer를 이용하여 균질화 시켰다. 4°C의 3000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층액을 13000 rpm에서 10분간 재차 원심분리 하였음. 수거한 상층액을 bradford assay를 통해 단백질 정량하고, 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 30 μ g을 전기영동 하였다. SDS-PAGE gel 위에서 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고, 5% Skim milk로 비특이적 항원항체반응을 미리 차단시켰다. Membrane은 Tris-buffered saline tween 20 (TBST)으로 3회 씻어내고 Collagen Type III antibody (1:1000 in TBST, SantaCruz, S-17)를 붙여 상온에서 2시간 반응시키고 TBST로 3번 씻어 내었다. 실온에서 1시간 동안 Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (1:1000 in TBST, Cell Signaling)를 반응시키고, TBST로 3회 씻어 낸 뒤 WEST-ZOL[®] Plus solution (iNtRON)에 3분간 노출시킨 후 LAS 3000 mini(FUJIFILM)를 이용하여 확인하였다.

가. 총 콜라겐 양 측정

4-하이드록시프로린 (4-Hydroxyproline)의 함량의 측정을 통해 간 섬유화에 따른 간 조직 내에 존재하는 총 콜라겐 (Collagen)의 양을 정량적인 파악을 확인할 수 있다. 간 조직 200mg씩 2ml의 6N-HCl 용액에 넣고 110°C에서 24시간 가수분해 시킨 다음 각 시료를 여과하였다. 여과한 시료를 건조한 다음 200 μ l의 클로라민-T (Chloramine-T) 용액과 섞어 10분간 방치하였다. 1.2ml의 Ehrlich 반응시약을 넣어 섞은 후 50°C에서 90분간 보관 후 상온에서 식혀서 558nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 급성 간손상 질환 개선 활성 및 기전 연구

1) 일차 간세포에서 화학물질을 이용한 세포 독성 능력 검사

자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌에 대한 일차 간세포의 세포 독성을 조사한 결과, 2 μ g/ml 까지 세포 독성이 나타나지 않은 것을 MTT를 통하여 확인하였다.

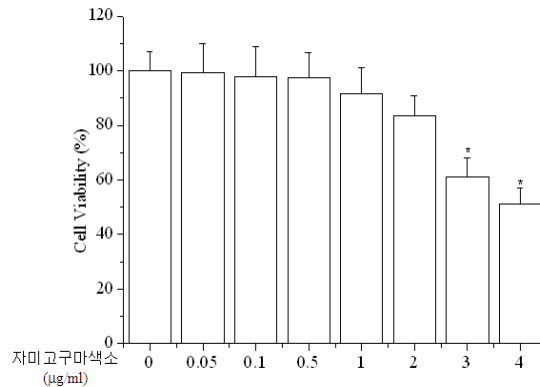


Fig 16. The cultured mouse hepatoma cells were pre-treated with different concentrations of JAMI (μ g/ml) for 24 h. The cell viabilities were evaluated using the MTT assays. Each bar represents the mean \pm SD of at least three independent experiments made in triplicate. *Significantly different from the control at $P < 0.05$.

Table 19. Dose-dependent effects of anthocyanine on t-BHP-mediated cytotoxicity in hepatotoxicity.

concentration ($\mu\text{g/ml}$)	LDH release (% of t-BHP)	MTT (% of control)
control	32 \pm 6.7	100 \pm 7.3
anthocyanin 800	39 \pm 4.3	96 \pm 12
t-BHP	100 \pm 8.8	34 \pm 3.8
anthocyanin 200 + t-BHP	87 \pm 6.4	65 \pm 8.4
anthocyanin 400 + t-BHP	55 \pm 7.2	83 \pm 10
anthocyanin 800 + t-BHP	42 \pm 5.3	92 \pm 11

The cultured hepatocytes were treated with t-BHP (250 μM) and anthocyanin (200, 400 or 800 $\mu\text{g/ml}$) for 6 h (LDH and MTT assay) oxidative hepatotoxicities were evaluated using the LDH and MTT assay. Each value represents the mean \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate.

2) 급성 간독성 유발 물질인 Acetaminophen (APAP)을 이용하여 급성 간독성 모델 확립.

약 25~30g의 Specific Pathogenic Free (SPF) male ICR mice를 구입한 후, 급성 간독성 유발물질인 Acetaminophen (APAP)을 300, 400, 500 mg/kg을 생리식염수에 녹인 후 복강 투여하여 인위적인 간독성을 유발시켰다. 유의성이 있는 인위적인 간독성은 400 mg/kg이상에서 나타났으며, 400과 500 mg/kg에서 큰 간독성의 차이가 보이지 않았으므로 본 연구에서 이용한 급성 간독성 유발물질로 사용한 APAP의 농도는 400 mg/kg을 이용하였다.

3) ALT 및 AST 결과

APAP에 의해 유발된 급성 간독성에 따른 간 손상으로 증가된 혈액 내 간 손상 지표 기준인 ALT 및 AST 효소 활성이 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 감소하는 것을 ALT 및 AST 효소활성을 통해 확인하였다.

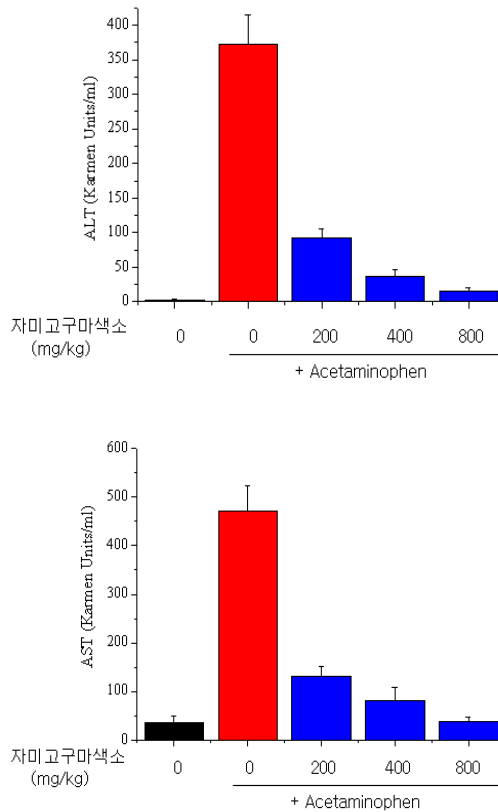


Fig. 17 The mice were pre-treated with JAMI (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days. The control mice were given saline. Three h after the final treatment, the mice were treated with APAP (400 mg/kg, ip). Hepatotoxicity was determined 18 hr later by quantifying the serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Each value represents the mean \pm SD of five mice.

4) 지질과산화 결과

APAP에 의해 유발된 급성 간독성에 따른 간 손상으로 증가된 조직 내 과산화지질이 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 과산화지질이 감소하는 것을 지질과산화 실험을 통하여 확인하였다.

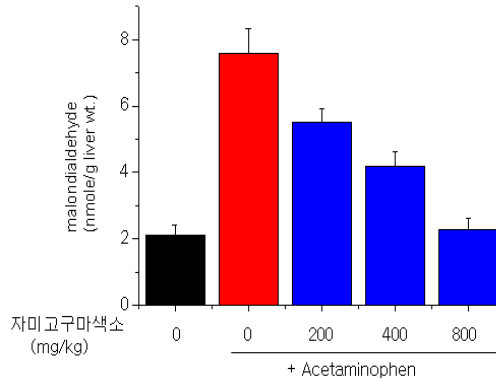


Fig 18. The mice were pre-treated with JAMI (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days. The control mice were given saline. Three h after the final treatment, the mice were treated with APAP (400 mg/kg, ip). Hepatotoxicity was determined 18 hr later by quantifying the hepatic lipid peroxidation. Each value represents the mean \pm SD of five mice.

5) Glutathione (GSH) 결과

APAP에 의해 유발된 급성 간독성에 따른 간 손상으로 소실된 조직 내 GSH 결손 양이 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 GSH 함량이 증가하는 것을 GSH을 통하여 확인하였다.

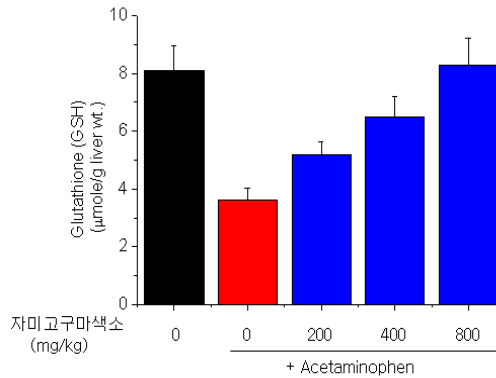


Fig. 19 The mice were pre-treated with JAMI (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days. The control mice were given saline. Three h after the final treatment, the mice were treated with APAP (400 mg/kg, ip). Mice were sacrificed 18 h after the APAP administration. Hepatic cellular glutathione (GSH) contents were measured. Each bar represents the mean \pm SD for five mice.

6) Hematoxylin Eosin (HE) 염색 결과

APAP에 의해 유발된 급성 간독성에 따른 간 손상으로 간세포에 심각한 괴사를 나타내는 대조군에 비해 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 의존적으로 APAP에 의한 간세포의 괴사 및 변성이 감소함을 HE 염색을 통하여 확인하였다.

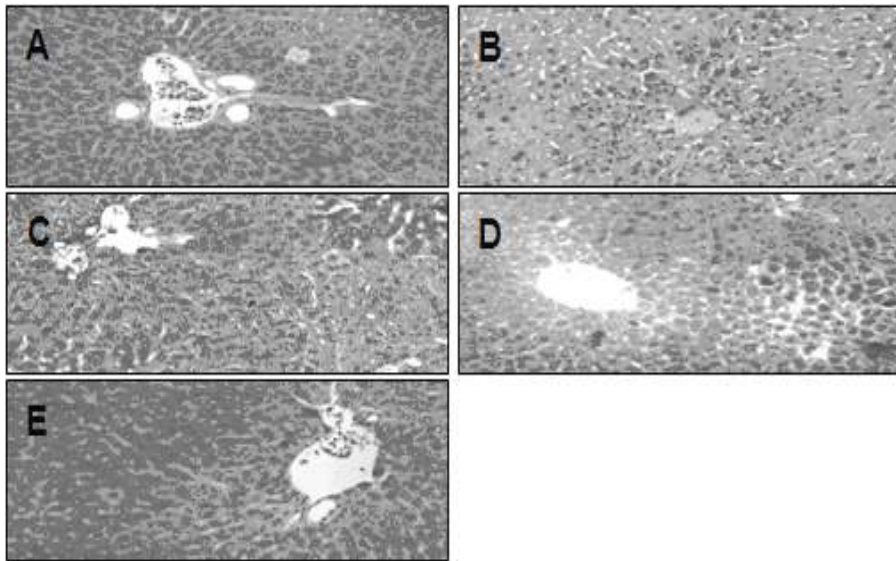


Fig 20. The mice were pre-treated with JAMI (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days. The control mice were given saline. Three h after the final treatment, the mice were treated with APAP (400 mg/kg, ip). Mice were sacrificed 18 h after the APAP administration. At the end of the total treatment period, the liver was removed, fixed in formalin solution, and stained with Haematoxylin Eosin (100x) for histological examination under a light microscope. A) Control mice receiving saline, (B) APAP mice receiving saline, (C) APAP mice receiving JAMI (200 mg/kg), (D) APAP mice receiving JAMI (400 mg/kg), and (E) APAP mice receiving JAMI (800 mg/kg).

7) 간의 약물대사 효소인 Cytochrome(CYP) P450의 효소들의 활성 측정 결과

간으로 유입된 Acetaminophen(APAP)을 비롯한 간 손상 화학물질들의 간 손상을 유발시키는 대사체들의 생성에 관여하는 간 내의 대사효소 CYP 1A1 및 CYP 2E1에 대한 영향을 조사한 것으로, 아세트아미노펜의 대사체인 아세틸벤조퀴논 이민 (N-acetyl-p-benzoquinone imine)으로 전환시키는 효소 CYP 1A1의 활성을 측정하기 위하여 CYP 1A1에 특이적인 효소반응인 EROD (ethoxyresorufin O-deethylase) 및 CYP 2E1에 특이적인 효소반응인 AH (aniline 4-hydroxyaniline) 활성도를 측정한 결과 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌 색소를 처리한 군들은 처리 농도에 의존적으로 간 내의 EROD 및 AH의 활성이 감소하였다.

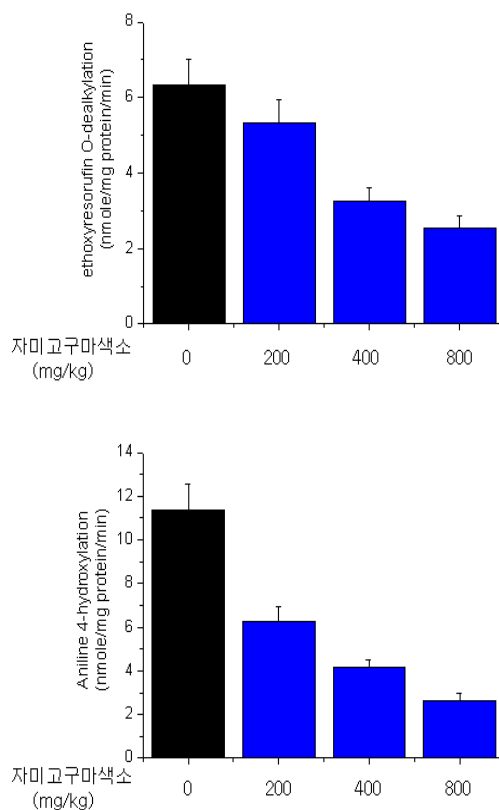


Fig 21. The mice were pre-treated with JAMI (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days. The control mice were given saline. 24 hr after the final treatment, mice were killed and cytochrome P450 1A1-dependent hepatic ethoxyresorufin-O-dealkylase activities and cytochrome P450 2E1-dependent hepatic aniline 4-hydroxyaniline activities were measured. Each bar represents the mean \pm SD for five mice.

8) 제조 항체를 이용한 Cytochrome(CYP) P450 2E1의 western blotting 결과

아세트아미노펜의 대사체인 아세틸벤조퀴논 이민 (N-acetyl-p-benzoquinone imine)으로 전환시키는 효소 CYP 2E1 항체를 마우스를 이용하여 제조한 특이 CYP 2E1의 항체를 이용하여 western blotting을 수행한 결과, 자미고구마의 생리활성인 안토시아닌 투여 농도 별로 CYP 2E1의 발현이 감소하는 것을 western blotting을 통하여 확인하였다.

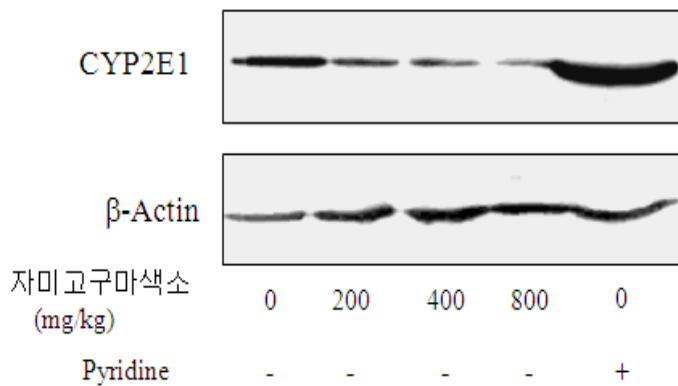


Fig 22. The mice were pre-treated with JAMI (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days. The control mice were given saline. 24 hr after the final treatment, mice were killed and hepatic Cytochrome P450 2E1 expression were detected by western blotting.

9) 세포 독성 (Cell cytotoxicity) 및 증식 (Cell viability) 능력

자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌에 대한 간 정상세포의 세포 독성 및 증식능력을 조사한 결과, 2 μ g/ml 까지 세포 독성이 나타나지 않은 것을 WST-1을 통하여 확인하였다.

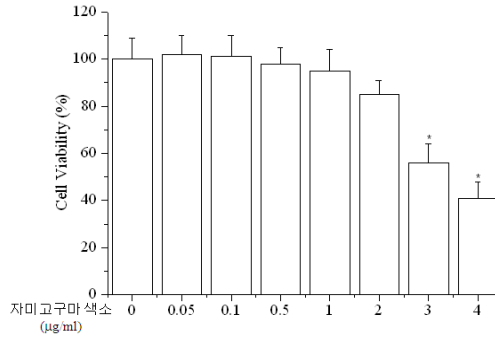


Fig 23. The cultured hepatic stellate cells were pre-treated with different concentrations of JAMI (μ g/ml) for 24 h. The cell viabilities were evaluated using the WST-1 assays. Each bar represents the mean \pm SD of at least three independent experiments made in triplicate. *Significantly different from the control at $P < 0.05$.

10) Alpha Smooth Muscle Actin(α -SMA)의 western Blotting 결과

Acetaldehyde에 의한 손상으로 증가된 간 정상세포의 alpha smooth muscle actin (α -SMA)의 발현이 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도 의존적으로 α -SMA의 발현이 감소하는 것을 western Blotting을 통하여 확인하였다.

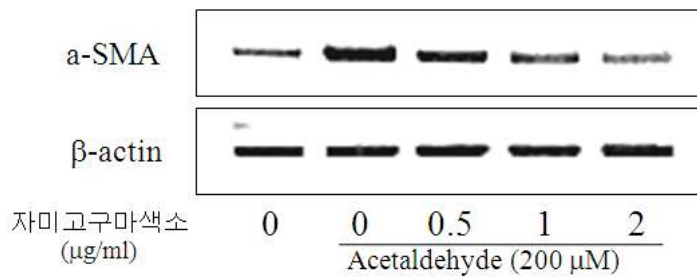


Fig. 24 The cultured hepatic stellate cells were pretreated with different concentrations of JAMI ($\mu\text{g/ml}$) for 24 h and were treated with acetaldehyde (200 μM) for 24h. The alpha-smooth muscle actin (α -SMA) in cellular extracts were detected by western blotting.

나. 급성 간염 동물실험 모델을 이용한 간보호 효과를 병리학적 관점에서 확인

1) 간 섬유화 유발 물질인 dimethylnitrosamine (DMN)을 이용하여 간 섬유화 모델 확립

약 180~200의 Specific Pathogenic Free (SPF) male Sprague Dawley (SD) rat 을 구입한 후, 간 섬유화 유발물질인 Dimethylnitrosamine (DMN)을 5, 10, 20 mg/kg을 생리식염수에 녹인 후 1주일에 3번 씩 3주, 마지막 4주에는 5일 연속하여 복강 투여하여 인위적인 간 섬유화를 유발시켰다. 유의성이 있는 인위적인 간 섬유화는 10 mg/kg 이상에서 나타났지만, 20 mg/kg 이상에서는 DMN을 투여 중 일부 실험동물이 사망하는 등 실험에 문제가 발생하였으므로 본 연구에서는 간 섬유화 유발물질로 사용한 DMN의 농도는 10 mg/kg을 이용하였다.

2) ALT 및 AST 결과

DMN에 의해 유발된 간 섬유화에 따른 간 손상으로 증가된 혈액 내 간 손상 지표 기준인 ALT 및 AST 효소 활성이 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 감소하는 것을 ALT 및 AST 효소 활성을 통해 확인하였다.

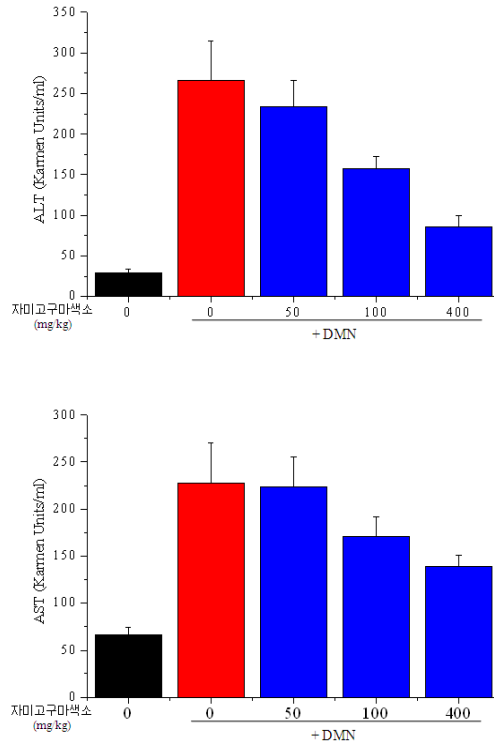


Fig. 25 Rats were pre-treated with JAMI (50, 100 or 400 mg/kg, ig) once daily for 6 times per weeks for 4 weeks. Control mice were given saline. Dimethylnitrosamine (DMN 10mg/kg) was intraperitoneally injected to rats 3 times per weeks for 3 weeks, and then on the 4th week the rats were subjected to five consecutive daily DMN injection. Hepatotoxicity was determined 24 hr later by quantifying the serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Each value represents the mean \pm SD of five rats.

다. 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 간 섬유화 억제 및 예방 작용 및 기전 연구

1) Alpha Smooth Muscle Actin(α -SMA)의 western Blotting 결과

DMN에 의해 유발된 간 섬유화에 따른 간 손상으로 증가된 조직 내 α -SMA의 발현이 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 α -SMA의 발현이 감소하는 것을 western Blotting을 통하여 확인하였다.

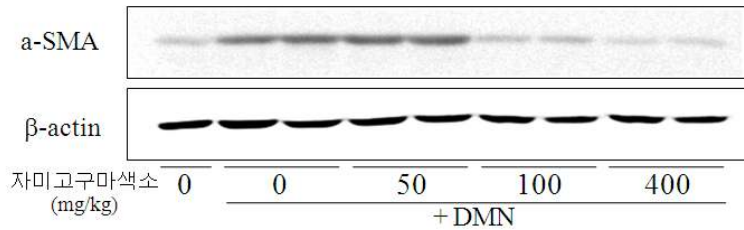


Fig 26. Rats were pretreated with JAMI (50, 100 or 400 mg/kg, ig) once daily for 6 times per weeks for 4 weeks. Control mice were given saline. Dimethylnitrosamine (DMN 10mg/kg) was intraperitoneally injected to rats 3 times per weeks for 3 weeks, and then on the 4th week the rats were subjected to five consecutive daily DMN injection. The alpha-smooth muscle actin (α -SMA) expression were detected by western blotting.

2) Collagen Type III의 western Blotting 결과

DMN에 의해 유발된 간 섬유화에 따른 간 손상으로 증가된 조직 내 Collagen의 발현이 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 Collagen Type III의 발현이 감소하는 것을 western Blotting을 통하여 확인하였다.

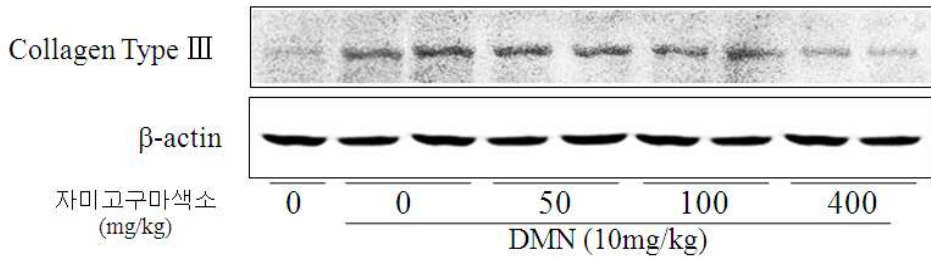


Fig 27. Rats were pretreated with JAMI (50, 100 or 400 mg/kg, ig) once daily for 6 times per weeks for 4 weeks. Control mice were given saline. Dimethylnitrosamine (DMN 10mg/kg) was intraperitoneally injected to rats 3 times per weeks for 3 weeks, and then on the 4th week the rats were subjected to five consecutive daily DMN injection. The collagen type III expression were detected by western blotting.

3) Masson Trichrome 염색 결과

DMN에 의해 유발된 간 섬유화에 따른 콜라겐 형성이 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 콜라겐 형성이 감소함을 Masson Trichrome 염색을 통하여 확인하였다.

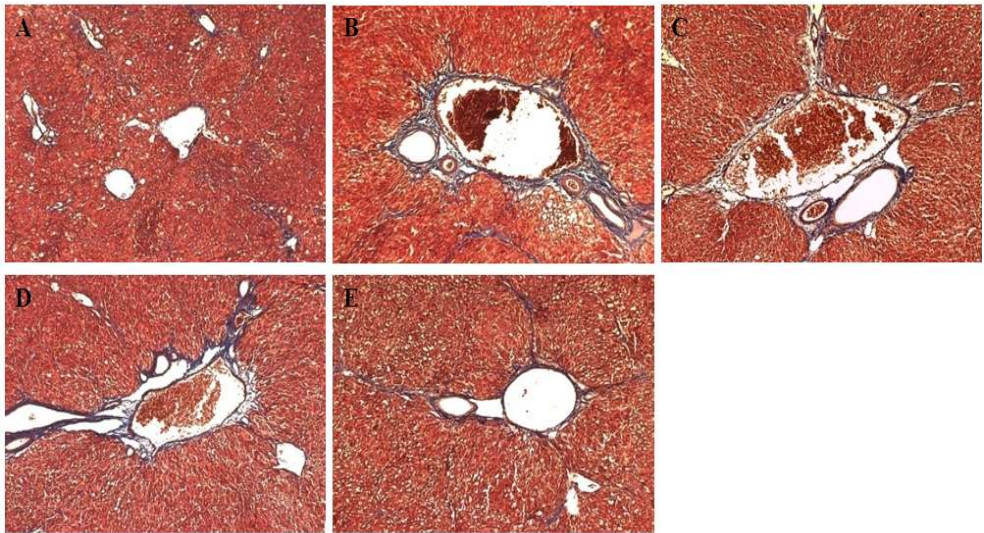


Fig 28. Rats were pretreated with JAMI (50, 100 or 400 mg/kg, ig) once daily for 6 times per weeks for 4 weeks. Control mice were given saline. Dimethylnitrosamine (DMN 10mg/kg) was intraperitoneally injected to rats 3 times per weeks for 3 weeks, and then on the 4th week the rats were subjected to five consecutive daily DMN injection. At the end of the total treatment period, the liver was removed, fixed in Bouin's solution, and stained with Masson's Trichrome (100x) for histological examination under a light microscope. (A) Control rat receiving saline, (B) DMN rat receiving saline, (C) DMN rat receiving JAMI (50 mg/kg), (D) DMN rat receiving JAMI (100 mg/kg), and (E) DMN rat receiving JAMI (400 mg/kg).

4) 총 콜라겐 양 측정 결과

DMN에 의해 유발된 간 섬유화에 따른 총 콜라겐 함량이 자미고구마 생리활성 물질인 안토시아닌 투여농도에 비례하여 감소함을 4-하이드록시프로린을 통하여 확인하였다.

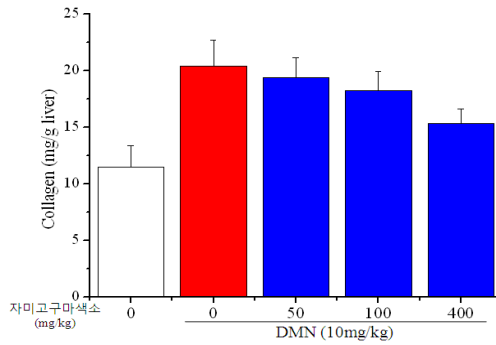


Fig 29. Rats were pre-treated with JAMI (50, 100 or 400 mg/kg, ig) once daily for 6 times per weeks for 4 weeks. Control mice were given saline. Dimethylnitrosamine (DMN 10mg/kg) was intraperitoneally injected to rats 3 times per weeks for 3 weeks, and then on the 4th week the rats were subjected to five consecutive daily DMN injection. The hepatic collagen content detected by 4-hydroxyproline.

4. 요약

- 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌을 처리한 간 정상세포를 이용하여 배양조건을 확립하였으며, 세포독성 테스트를 기초로 독성이 없는 범위를 찾았다. 간 섬유화 동물 모델을 이용한 실험에서 혈액 내 간 손상의 지표인 ALT 및 AST의 효소 활성이 DMN만을 처리한 그룹에 비해 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 간 섬유화에 의해 증가된 간 조직내 콜라겐 형성이 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌 투여 농도에 비례하여 간 조직내 alpha-smooth muscle actin (α -SMA)의 발현 및 콜라겐 생성 양이 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌에 의해 감소하는 것을 확인하였다. Masson Trichrome 염색을 통한 임상학적인 변화에서도 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌의 투여 농도에 의존적으로 회복됨을 확인할 수 있었다.
- 이상의 결과들로부터 유추해 볼 때, 자미고구마의 생리활성물질인 안토시아닌은 간 섬유화에 대해 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료되며, 이러한 작용을 나타내는 생리활성물질에 대해 추후에 좀 더 심도 있는 실험이 필요하다.

5. 참고문헌

1. James, L. P., McCullough, S. S., Knight, T. R., Jaeschke, H., and Hinson, J. A.. Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. *Free radical research* 37, 1289–1297. (2003b)
2. Jeong, H. G., and Yun, C. H. Induction of rat hepatic cytochrome P450 enzymes by myristicin. *Biochemical and biophysical research communications* 217, 966–971. (1995)
3. Kikuchi, A., Shimizu, H. and Nishikawa, T., Expression and ultrastructural localization of HMB-45 antigen. *Br. J. Dermatol.* 135, pp. 400-405. (1996)
4. Kwan Sik Lee. Hepatic fibrogenesis, *Korean J Gastroenterol.* 48:297–305. (2006)
5. Lee, K. J., Choi, J. H., and Jeong, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* (2007)
6. Lee, K. J., You, H. J., Park, S. J., Kim, Y. S., Chung, Y. C., Jeong, T. C., and Jeong, H. G. Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Cancer letters* 174, 73–81. (2001)
7. Li, H. and Zhu, W., Effects of acidum vitamin A on tyrosinase activity. *Chin. Med. J.* 114, pp. 415-417. (2001)
8. Liu, Z. X., and Kaplowitz, N. . Role of innate immunity in acetaminophen

- induced hepatotoxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2, 493–503. (2006)
9. Lotan, R. and Lotan, D., Stimulation of melanogenesis in a human melanoma cell line by retinoids. *Cancer Res.* 40, pp. 3345–3350. (1980)
 10. Lotan, R. and Lotan, D., Enhancement of melanotic expression in cultured mouse melanoma cells by retinoids. *J. Cell. Physiol.* 106, pp. 179–189. (1981)
 11. Manyike, P. T., Kharasch, E. D., Kalhorn, T. F., and Slattery, J. T. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *17 Clinical pharmacology and therapeutics* 67, 275–282. (2000)
 12. Marks, M.S. and Seabra, M.C.,. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat. Ver. Mol. Cell. Biol.* 2, pp. 738–748. (2001)
 13. Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., and Holub, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 50, 7731–7737. (2002)
 14. Miller, W.H., The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 15, pp. 1471–1478. (1998)
 15. Mitchell, J. R., Hughes, H., Lauterburg, B. H., and Smith, C. V. . Chemical nature of reactive intermediates as determinant of toxicologic responses. *Drug metabolism reviews* 13, 539–553. (1982)
 16. Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillette, J. R., and Brodie, B. B. Acetaminophen–induced hepatic necrosis. IV. Protective role of

- glutathione. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 187, 211–217. (1973)
17. Nascimento, A.A.C., Amaral, R.G., Bizario, J.C.S., Larson, R.E. and Espreafico, E.M., Subcellular localization of Myosin-V in the B16 melanoma cells, a wild-type cell line for the dilute gene. *Mol. Biol. Cell.* 8, pp. 1971–1988. (1997)
 18. Nedorost, S.T., Bergfeld, W.F., Guitart, J. and Fleming, M.G., Cell cycle analysis by flow cytometry of non-exposed, sun-exposed, and tretinoin-treated skin. *J. Cutan. Pathol.* 19, pp. 371–375. (1992)
 19. Nerland, D. E., Cai, J., Pierce, W. M., Jr., and Benz, F. W. Covalent binding of acrylonitrile to specific rat liver glutathione S-transferases in vivo. *Chemical research in toxicology* 14, 799–806. (2001)
 20. Nicolson, G.L., Experimental tumor metastasis: characteristics and organ specificity. *BioScience* 28, pp. 441–447. (1978).
 21. Niles, R.M. and Combs, R., The relationship between susceptibility to retinoic acid treatment and protein Kinase C expression in murine melanoma cell lines. *Exp. Cell. Res.* 223, pp. 20–28. (1996).
 22. Stein, J. H., Keevil, J. G., Wiebe, D. A., Aeschlimann, S., and Folts, J. D. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100, 1050–1055. (1999)
 23. Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G. L., Carraturo,

- A., Faruolo, C., Moio, L., and Palumbo, R. . Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 11, 114–119. (2000)
24. Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., and Osawa, T. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical pharmacology* 52, 1033–1039. (1996)
25. Vermeulen, N. P., Bessems, J. G., and Van de Straat, R. Molecular aspects of 18 paracetamol–induced hepatotoxicity and its mechanism–based prevention. *Drug metabolism reviews* 24, 367–407.(1992)
26. Xiao, Y., Desai, D., Quick, T. and Niles, R.M., . Control of retinoic acid receptor expression and function in mouse melanoma by cyclic AMP. *J. Cell. Physiol.* 167, pp. 413–421 (1996)
27. Yi–Chao Hsu, Yung–Tsun Chiu, Ching–Chang Cheng, Ching–Fen Wu, Yun–Lian Lin, and Yi–Tsau Huang. Antifibrotic effects of tetrandrine on hepatic stellate cells and rats with liver fibrosis, *J Gastroenterol Hepatol.* (1):99–111 (2007)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연차	연차별 목표	목표 달성도	기여도
1 년차	<ul style="list-style-type: none"> 자미고구마의 생리활성물질 분리 및 확보 하여 연구에 활용하였으며, 분리 색소인 안토시아닌 색소의 안정성과 대량 생산 공정 확립 	100% 달성	
	<ul style="list-style-type: none"> 자미고구마에서 분리한 안토시아닌 색소의 항산화 효능을 검증 하였으며, 구축한 검증 방법을 통해 안정적인 색소 확보 및 보관 방법을 구축하였으며, 건강기능식품으로서의 가능성을 항산화, 항노화, 항염등의 검증 	100% 달성	
	<ul style="list-style-type: none"> 간세포의 분리 및 1차 배양을 통해 간세포에서의 간기능관련 효소 및 유전자의 활성을 측정하였으며, 간기능 개선 매커니즘을 규명하여, 항산화 효과와 함께 특허 출원 	100% 달성	
2 년차	<ul style="list-style-type: none"> 항노화 기능성 음료 및 시제품 개발 	100% 달성	
	<ul style="list-style-type: none"> 자미고구 추출 안토시아닌 색소에서 항노화 기전인 항산화와 피부 노화 기전인 MMP의 활성과 발현을 측정하여 피부에서의 항노화 작용에 대해 분석하였다. 본 연구 결과를 기능성 식품 및 피부 개선 소재 개발 	100% 달성	
	<ul style="list-style-type: none"> 급성 간독성 유발 물질 중에 하나인 Acetaminophen을 이용하여 급성 간 손상 모델에 의한 보호 및 개선에 의한 동물 모델을 확립하였으며, 이를 이용한 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌의 급성 간 손상 등의 예방 효과와 그 작용기전 규명을 통해 관련 질환에 대한 기능성 건강식품 (Nutraceutical Food) 개발의 모델 구축으로 인한 국제적 기술 우위를 확보 	100% 달성	
3 년차	<ul style="list-style-type: none"> 자미고구 추출 안토시아닌 색소에서 항노화 기전인 항산화와 피부 노화 기전인 MMP의 활성과 발현을 측정하여 피부에서의 항노화 작용에 대해 분석하였다. 본 연구 결과를 기능성 식품 및 피부 개선 소재 개발 	100% 달성	
	<ul style="list-style-type: none"> Dimethylnitrosamine (DMN)을 이용하여 간 섬유화 모델에 의한 보호 및 개선에 의한 동물 모델을 확립하였으며, 이를 이용한 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌의 간 섬유화의 예방 효과 규명 	100% 달성	
	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 화장품 공정모델 개발 및 미백 개선용 뷰티식품 개발 	100% 달성	

	정량적 성과	정성적 성과
최종 성과	<ul style="list-style-type: none"> ●국제 논문 1편 ●국내 등록 특허 3편 ●저명 학회지 3편 ●자미고구마 열풍건조분말 1종 상품화 완료(시판 중) ●자미고구마 안토시아닌 색소 농축물 2종 상품화 완료(시판 중) ●자미고구마 안토시아닌 색소 활용 음료 4종 개발 및 2종 상품화 완료 (자미인으로 시판 중) ●자미고구마 국수 1종 상품화 완료 (시판 중) ●자미고구마 기능성 환 1종 상품화 완료 (시판 중) ●자미고구마 기능성식품 1종 및 화장품 4종 개발완료(상품화 계획 중) ●참여 업체인 지산식품이 자미고구마 안토시아닌 색소 추출·농축 및 열풍건조 설비를 완비하여 현재 3종 제품 산업화 완료(연 매출 15억) ●자미고구마 농축액을 활용한 음료 2종 산업화 완료 ●자미고구마 농축액의 대형 식품업체(6개 업체) 납품 중 ●자미고구마 농축액 및 분말의 판로 개척 지속적 추진 중 	<ul style="list-style-type: none"> ●참여 업체인 지산식품이 자미고구마 안토시아닌 색소 추출·농축 및 열풍건조 설비를 완비하여 현재 3종 제품 산업화 완료(연 매출 15억) ●자미고구마 농축액을 활용한 음료 2종 산업화 완료 ●자미고구마 농축액의 대형 식품업체(6개 업체) 납품 중 ●자미고구마 농축액 및 분말의 판로 개척 지속적 추진 중

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

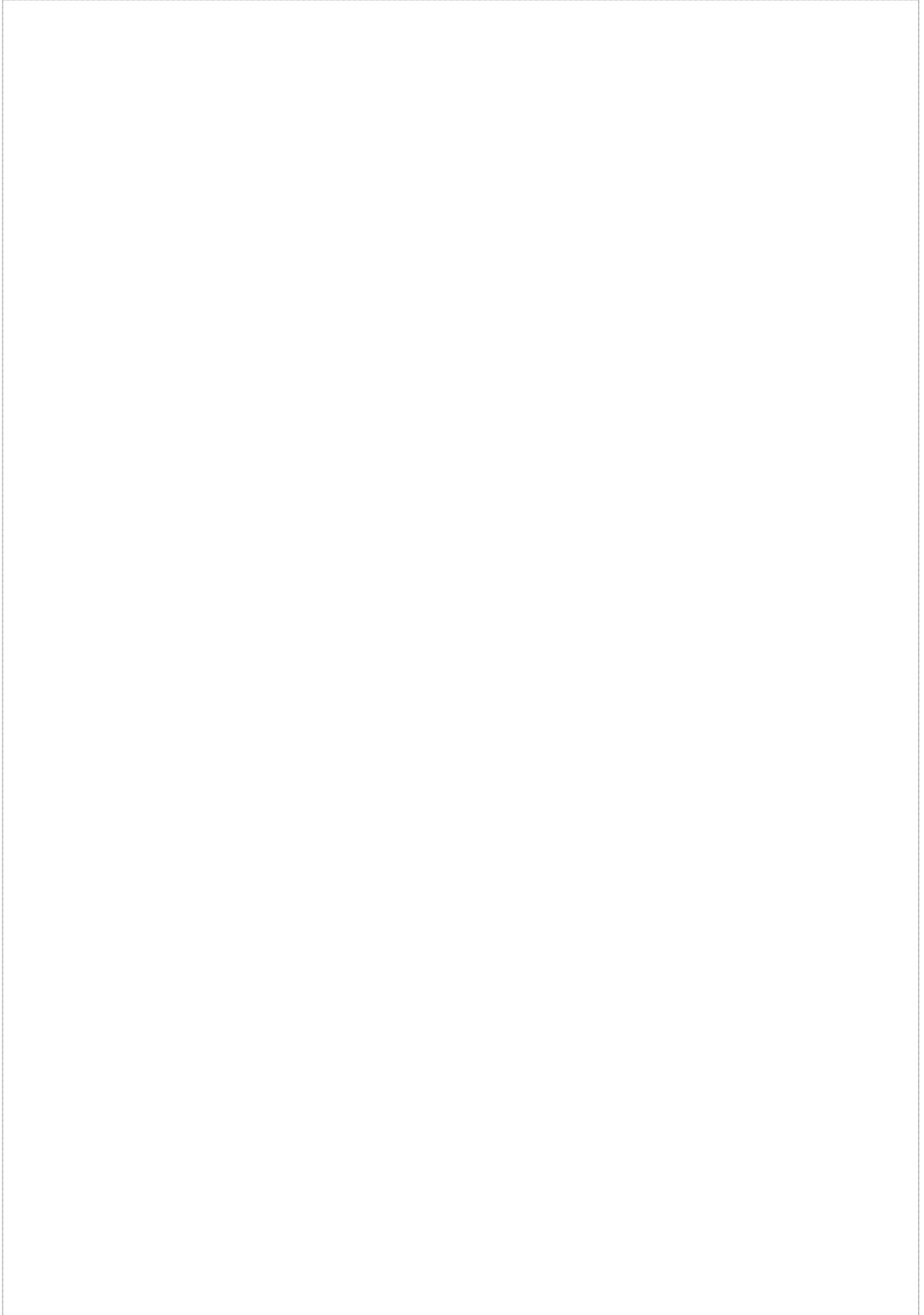
- 본 과제에서 도출된 자미고구마 안토시아닌 농축물 2종과 분말 1종, 그리고 자미고구마 국수, 환 및 음료2종은 참여기업에서 상품화가 완료되었고, 그 외 기능성식품과 화장품은 기술이전하여 상품화를 추진할 계획이다.
- 자미고구마 추출물의 항산화 활성 및 산패 방지 효과는 식품에 첨가되어 노화 방지 및 식품 유통기한 개선용 천연 소재로 활용이 가능하여 식품 첨가용 천연 소재로 활용범위를 확대하고자 한다.
- 자미고구마 추출물의 미백 개선용 효과는 및 주름 개선효과는 추후 병원과 연계한 인체실험을 통해 미백 개선용 식품소재로의 개발을 통한 건강기능식품 등록에 기초 자료로 이용한다.
- 본 연구 결과 중 일부는 국내외 학술 잡지에 게재되어 관련 학문과 기술개발의 기초자료를 제공할 것으로 예상된다.
- 향후 본 연구에서 구명되지 않은 생체 내에서의 항산화, 미백, 간기능 개선 활성에 대한 구체적인 연구가 필요하다.
- APAP에 의한 급성 간 손상 model과 DMN 등에 의해 유도되는 간 섬유화 모델을 확립하였으며, 이를 이용한 자미고구마 생리활성물질인 안토시아닌의 급성 간 손상 및 간 섬유화 등의 예방 효능과 그 작용기전 규명을 통해 관련 질환에 대한 기능성 건강식품 (Nutraceutical Food) 개발의 모델 구축으로 인한 국제적 기술우위를 확보하였으며, 이를 이용하여 새로운 간질환 관련 기능성 소재 탐색에 응용하고자 한다.
- 급성 간 손상 억제효력 시험 및 간 섬유화 억제 효력 시험을 통한 급성 간 손상 및 간 섬유화를 예방하거나 억제할 수 있는 기능성 소재개발에 관련 기술을 응용하여 기능성 식품 소재 및 치료제 개발에 근거자료 활용하고자 한다.

- 본 연구를 통해 얻어진 급성 간 손상 억제, 간 섬유화 억제, 간암 예방제 탐색 및 기전연구로 우수한 약효를 갖는 천연물질을 발굴하여 농가소득 증대 및 산업화에 기여하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

- 해당사항 없음

별첨



Journal of
MEDICINAL FOOD

Journal of Medicinal Food: <http://mc.manuscriptcentral.com/medicinalfood>

Hepatoprotective effects of anthocyanins fraction from Purple-Fleshed sweet potato against acetaminophen-induced liver damage in mice

Journal:	<i>Journal of Medicinal Food</i>
Manuscript ID:	JMF-2007-0691.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	31-Mar-2008
Complete List of Authors:	Choi, Jae Ho; Chosun University, Pharmacy Choi, Chul Yung; Jinju International University, Division of Food Science Lee, KyungJin; Chosun University, Pharmacy; Chonnam National University, Biology Hwang, Yong Pil; Chosun University, Pharmacy Chung, Young Chul; Jinju International University, Division of Food Science Jeong, Hye Gwang; Chosun University, Pharmacy
Keyword:	acetaminophen, hepatoprotection



Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Hepatoprotective effects of anthocyanins fraction from *Purple-Fleshed sweet potato* against acetaminophen-induced liver damage in mice

Jae Ho Choi^{1,†}, Chul Yung Choi^{2,†}, Kyung Jin Lee^{1,†}, Yong Pil Hwang¹, Young Chul Chung²,
Hye Gwang Jeong^{1,*}

¹BK21 Project Team, Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Research Center for Proteinous Materials, Chosun University, Kwangju, South Korea

²Division of Food Science, Jinju International University, Jinju, South Korea

[†]The first three authors contributed equally to this work.

*To whom correspondence should be addressed: Hye Gwang Jeong; Department of Pharmacy, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Kwangju 501-759, South Korea. Tel: +82-62-230-6639; Fax: +82-62-230-6639; E-mail: hgjeong@chosun.ac.kr

Running Title: Hepatoprotective effects of anthocyanins against acetaminophen

Keywords: Anthocyanins, Purple-Fleshed Sweet Potato, Acetaminophen, Hepatotoxicity, CYP2E1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

The present study was undertaken to examine the protective effects of anthocyanins fraction (AF) obtained from *Purple-Fleshed sweet potato* on acetaminophen (APAP, paracetamol)-induced hepatotoxicity, and to determine the mechanism involved in mice. Animals pretreated with AF prior to APAP administration showed significantly lower increases in the activities of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase and hepatic malondialdehyde formation than APAP treated animals. In addition, AF prevented hepatic glutathione (GSH) depletion by APAP, and hepatic GSH levels and glutathione-S-transferase (GST) activities were upregulated by AF. APAP-induced hepatotoxicity was also prevented by AF, as indicated by liver histopathology findings. In addition, the authors examined the effect of AF on cytochrome P450 (CYP) 2E1, the major isozyme involved in APAP bioactivation. Treatment of mice with AF significantly and dose-dependently reduced CYP2E1-dependent aniline hydroxylation and CYP2E1 protein levels. Furthermore, AF had an antioxidant effect on FeCl₂-ascorbate-induced lipid peroxidation in mouse liver homogenates, and had superoxide radical scavenging activity. These results suggest that AF protects against APAP-induced hepatotoxicity by blocking CYP2E1-mediated APAP bioactivation, by upregulating hepatic GSH levels, and by acting as a free radical scavenger.

INTRODUCTION

Acetaminophen (APAP) is widely used as analgesic and antipyretic drug throughout the world. Nevertheless, overdoses of APAP may lead to severe and sometimes fatal hepatic damage^{1,2}. ~~Under normal conditions~~ At normal dosage levels, APAP is detoxified in the liver by glucuronidation and sulfation, and a small amount of APAP is metabolized by cytochrome

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

P450 (CYP) to form highly reactive species, such as, *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), which under normal conditions are readily detoxified by conjugation with glutathione. However, the high doses of APAP result in the saturation of detoxification pathways, to hepatic glutathione depletion, and the excessive production of NAPQI, which freely binds to topically-expressed cellular molecules in humans and mice³. The toxicity of APAP is initiated by formation of a reactive metabolite, which depletes glutathione and then covalently binds to cellular proteins^{4,6}. Subsequently, covalent binding of NAPQI to cellular macromolecules, membrane lipid peroxidation, and the disturbance of intracellular calcium balance causes cell damage or death^{6,7}. Previous studies have that demonstrated that APAP-induced hepatotoxicity can be modulated by substances that influence cytochrome P450 CYP activity^{8,9}. Moreover, at high doses, APAP is metabolized to NAPQI predominantly by CYP2E1 and to a lesser extent by CYP1A2 or CYP3A4^{10,11}.

Anthocyanins are polyphenols and are found in many red-skinned fruits, vegetables, and cereals^{12,13}, and in red wine^{14,15}, but are not recognized as physiologically functional food factors. Phyto-anthocyanins have recently received attention because of their varied physiological functions, e.g., they have been reported to act as antioxidants^{16,17}, to prevent carcinogenesis¹⁸, and to have a protective effect on liver injuries induced by carbon tetrachloride^{13,19} and *tert*-butyl hydroperoxide²⁰ in rats. However, the physiological effects of anthocyanins and the mechanisms underlying their hepatoprotective effects with respect to chemically-induced liver injury have not been determined.

The present study was undertaken to evaluate the protective effects of an anthocyanin fraction (AF) obtained from the *Purple-Fleshed Sweet Potato* on APAP-induced hepatotoxicity, and to elucidate the mechanisms underlying these protective effects in mice. In addition, we explored the possibilities that AF inhibits the phase I enzymes involved in the metabolic activation of APAP, and that it induces phase II conjugation enzymes that detoxify the reactive product formed. To investigate this hypothesis, we examined the effects of AF on CYP2E1 activity and on hepatic GSH levels.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Acetaminophen (APAP), corn oil, diagnostic kits to measure serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, thiobarbituric acid, dithionitrobenzoic acid, L-(-)-ascorbic acid, xanthine, xanthine oxidase, phenylmethoxysulfonyl fluoride, reduced GSH, ferrous sulfate, 1,1,3,3-tetraethoxypropan, superoxide dismutase, and hydrogen peroxide were obtained from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Antibodies against CYP2E1 and β -actin were purchased from Chemicon (Temecula, USA). All other chemicals and solvents were of the highest grades commercially available.

Plant material

The anthocyanins fraction (AF) referred to was purified from the aqueous extract of the whole bodies of purple-fleshed sweet potato, which was supplied by the Ji San Food Co. (Hamyang, South Korea). AF was prepared using methods described elsewhere and their compositions were previously published^{21,22}. Briefly, uniformly sized tubers without defects were washed, peeled, diced into 0.5cm cubes, and freeze-dried. Freeze-dried tuber samples (0.5g) were homogenized in 15 ml of 85:15 ethanol:water using an Ultra Turrax Tissumizer (Cincinnati, OH) (30,000 rpm) and stored for 12 h at -20°C . Supernatants obtained by centrifugation were concentrated and then diluted to 5 ml using 0.01% aqueous HCl (whole extract), and passed through C-18 Sep-Pak cartridges (Waters, MA) preconditioned with 0.01% acidified methanol to absorb anthocyanins²³. Anthocyanins were obtained by eluting

1
2
3
4 columns with 0.01% methanolic HCl, concentrating eluates (under a nitrogen flow), and
5 reconstituted with either alcohol or DMSO. The yield of dried residue corresponded to 2.5%
6 of original dry hole body weight. This was powdered in a grinder to pass through a 40-mesh
7 sieve and kept at -20°C until used.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

18 *Animals and treatment*

19
20 Male ICR mice (25–30 g) were obtained from Daehan Biolink (Chungbuk, Korea). The
21 experimental procedures were performed in accordance with the animal care guidelines
22 issued by the Korean National Institute of Health and the Korean Academy of Medical
23 Sciences. Animals were allowed free access to Purina Rodent Chow and tap water, and were
24 maintained in a controlled environment at 22±2°C and 50±5% relative humidity under a 12
25 h dark/light cycle and acclimatized for at least 1 week before use. AF in saline was oral
26 administered at 0, 200, 400, 800 mg/kg once daily for 7 consecutive days. Three h after the
27 final treatment, mice were treated with APAP (400 mg/kg, per oral (p.o.), dissolved in saline
28 (2%, v/v)). Food was removed 18 h prior to APAP injection. Control group animals were
29 given appropriate vehicles. Eighteen hours after administrating APAP, the mice were
30 anesthetized with CO₂. Blood was then removed by cardiac puncture to determine serum the
31 activities of ALT and AST, and the animals were killed by cervical dislocation. After
32 bleeding, livers were weighed, frozen quickly in dry ice, and stored at -70°C until required
33 for GSH content and lipid peroxidation analyses.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Hepatotoxicity studies

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The serum activities of ALT and AST, and hepatic lipid peroxidation levels were measured to assess hepatotoxicity. The serum ALT and AST activities were measured using spectrophotometric diagnostic kits obtained from the Sigma Chemical Co. Levels of hepatic lipid peroxidation were measured by determining malondialdehyde (MDA) levels in serum, as described previously²⁴.

Histological examinations

Fresh liver tissues, which had been trimmed to a thickness of *ca.* 7 mm, were placed in plastic cassettes and immersed in neutral buffered formalin for 24 h. These fixed tissues were then embedded in paraffin, sectioned, deparaffinized, and rehydrated using standard techniques. The extent of APAP-induced necrosis was evaluated by assessing morphological changes in liver sections stained with hematoxylin and eosin (H&E), again using standard techniques.

Hepatic GSH determinations and GST activity assays

Livers were quickly removed, weighed and perfused with ice-cold 0.15 M KCl, and then homogenized in 4 vols. (w/v) of 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.15 M KCl, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM dithiothreitol and 0.01 mM phenylmethoxysulfonyl fluoride in a Potter-Elvehjem homogenizer. Hepatic microsomal and cytosolic fractions were prepared by differential centrifugation, as described previously²⁴. Hepatic GSH levels were estimated using a colorimetric method using Ellman's reagent, as described previously²⁶. Cytosolic fractions were used to assay GST activity, and cytosolic GST activities were determined using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as a substrate²⁵.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CYP2E1 activity assays

Microsomal fractions were used to determine CYP2E1-specific oxidative activities, such as, that of aniline hydroxylase, which was determined by measuring *p*-aminophenol formation²⁶. Microsomal protein levels were determined using Bradford method using bovine serum albumin as a standard²⁹. For inhibition studies, anthocyanins were dissolved in saline and added to incubation mixture as a previous described²⁴. All assays were run in triplicate. For the inhibition study, AF was dissolved in saline and added to the incubation mixture.

Immunoblot analysis

CYP2E1 was detected immunochemically, as described previously³⁰. Briefly, microsomal proteins were separated electrophoretically in 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE), electrotransferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with anti mouse-CYP2E1 (1000:1) or anti- β -actin antibodies (2000:1); horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-rat IgG was used as the secondary antibody. Blots were probed with an ECL western blot detection system, according to the manufacturer's instructions. CYP2E1 levels were normalized versus anti- β -actin after quantitation using NIH Image software (Bethesda, MD). Relative CYP2E1 levels were arbitrarily set at 1.0 in the control group.

FeCl₂-ascorbic acid stimulated lipid peroxidation assays in liver homogenates and superoxide scavenging activities

Liver homogenates weighing 20-25 g from male ICR mice were used. The R reaction

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

mixture~~s~~ ~~were~~ was composed of 0.25 ml of liver homogenate, 0.1 ml Tris-HCl buffer (pH 7.2), 0.05 ml of 0.1 mM ascorbic acid, 0.05 ml of 4 mM FeCl₂, and 0.05 ml of solution with various concentrations of AF. Lipid peroxidation products were quantified by the formation of MDA (a thiobarbituric acid-reactive material), as described previously (Lee *et al.*, 2007). Superoxide was generated using xanthine (100 μM) and xanthine oxidase (0.02 U/μl) with or without AF at various concentrations in 1 ml of a 10 mM KH₂PO₄-KOH buffer (pH 7.4), and was detected using nitroblue tetrazolium (100 μM) and quantified spectrophotometrically at 550 nm, as described previously²¹. Superoxide dismutase (100 U/ml) was used as the reference inhibitor.

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. Means ± SD were calculated for each group and Dunnett's t test was used to calculate statistical significance. Differences were considered statistically significant at the $P < 0.01$ level.

RESULTS

Effect of AF on APAP-induced hepatotoxicity

The effects of AF pretreatment on the APAP-induced elevations of the activities of serum ALT and AST are shown in Table 1. AF (800 mg/kg) treatment alone resulted in no change in serum ALT and AST activities versus untreated controls (data not shown). A single dose of APAP (400 mg/kg) had a hepatotoxic effect in mice, as was indicated by increases in ALT

1
2
3
4 and AST serum activities after APAP administration (Table 1). AF pretreatment prevented the
5
6 APAP-induced elevations of ALT and AST serum activities in a dose-dependent manner.
7
8 Consistent with the serum activities ALT and AST, pretreatment with anthocyanins
9
10 significantly decreased APAP-induced hepatic lipid peroxidation in a dose-dependent manner
11
12 (Table 1). In addition, histopathological analysis showed that APAP induced hepatocyte and
13
14 hepatic cord degeneration and focal necrosis in mouse livers (Fig. 1). Microscopic
15
16 examinations showed that the severe hepatic lesions induced by APAP were remarkably
17
18 prevented by AF pretreatment, which agreed well with serum aminotransferase activities.
19
20 Necrosis, a more severe form of injury, was markedly reduced by AF pretreatment (Fig. 1F),
21
22 whereas AF (800 mg/kg) alone caused no change in liver histology (data not shown).
23
24
25
26
27
28
29
30

31 *Effects of AF on APAP related CYP2E1 activities and protein expressions*

32
33 In mice, AF pretreatment was found to have a dose-dependent protective effect on APAP-
34
35 induced hepatotoxicity. It is known that APAP requires CYP2E1-associated bioactivation to
36
37 produce liver injury. Therefore, the effects of AF on hepatic microsomal CYP2E1-specific
38
39 monooxygenase activities were examined. As shown in Fig. 2A, hepatic microsomal fractions
40
41 from mice treated with AF showed significant dose-dependent decreases in the
42
43 hydroxylations of CYP2E1-specific substrates, e.g., aniline. The inhibitory activities of
44
45 anthocyanins on hepatic microsomal CYP2E1-specific monooxygenase activities were
46
47 confirmed in pyridine-induced hepatic microsomal incubations. Immunoblotting analysis was
48
49 performed to examine the effect of anthocyanins on CYP2E1 protein expression. Hepatic
50
51 microsomes from AF pretreated mice were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with
52
53 anti-CYP2E1, and CYP2E1 protein levels were found to be dose-dependently suppressed by
54
55 AF treatment (Fig. 2B).
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Effects of AF on hepatic GSH levels and GST activities

To determine whether AF can induce Phase II conjugation enzymes, we measured hepatic GSH levels and GST activities in AF-pretreated mice for 7 days. Interestingly, hepatic GSH levels (Fig. 3A) and GST activities (Fig. 3B) were increased by AF alone. In addition, APAP administration alone significantly depleted the GSH levels, whereas pretreatment with AF significantly and dose-dependently reduced this GSH depletion by APAP (Fig. 3C).

3.4. Effects of AF on FeCl₂-ascorbic acid stimulated lipid peroxidation and superoxide scavenging activity

The effects of AF on lipid peroxidation in liver homogenates and its superoxide scavenging activity were investigated in order to determine its antioxidant effects. Consistent with its observed effect on APAP-induced hepatic lipid peroxidation, AF ~~was found to~~ showed a dose-dependently inhibition of FeCl₂-ascorbic acid stimulated lipid peroxidation in liver homogenates (Fig. 4A), and also to exhibit dose-dependent superoxide-scavenging activity (Fig. 4B).

DISCUSSION

The liver injuries induced by APAP are commonly used to screen potential hepatoprotective activity of drugs³¹. APAP increases the serum levels of ALT and AST, and is believed to cause damage to the structural integrity of the liver, because ALT and AST are normally located in the cytoplasm and are released into the circulation after cellular damage³². The present study demonstrates that oral AF pretreatment dramatically suppresses APAP-induced

1
2
3
4 hepatic injury. In particular, AF (800 mg/kg) was observed to have a hepatoprotective effect
5 as demonstrated by significant decreases in the activities of ALT and AST and by reducing
6 histopathological changes in the livers of mice treated with APAP.
7

8
9 Based on the metabolism of APAP, this preventative effect of AF on APAP-induced
10 hepatotoxicity could be least, accomplished in the following ways; (1) by **inhibiting of**
11 **CYP2E1 inhibition**, (2) by stimulating GSH synthesis, or (3) by inhibiting oxidative stress.
12
13

14
15 APAP at high doses is metabolized to NAPQI predominantly by CYP2E1, and to lesser
16 extents by CYP1A2 and CYP3A4^{10,11}. NAPQI is formed by CYP in the liver and induces
17 liver damage through a chain of cellular events^{4,5,32}. Therefore, the suppression of CYP
18 could reduce the formation of reactive metabolites, and thus, reduce tissue injury. In a
19 previous study, CYP2E1 inhibitors, like diallyl sulfide, which occurs naturally in garlic, was
20 found to effectively inhibit APAP-induced hepatotoxicity³³. Therefore, this hypothesis
21 suggests that there is a good correlation between a reduction in the enzymic activity and
22 protein expression of CYP2E1 and the protection afforded against APAP-induced
23 hepatotoxicity in mice. This idea is consistent with our results, and suggests that CYP2E1
24 suppression by AF in mice plays an important role in AF-induced hepatoprotection against
25 APAP.
26
27

28
29 In contrast to the toxic effect of APAP via the CYP2E1 pathway, the detoxification pathway
30 involves GSH conjugation of the NAPQI radical (a CYP2E1-mediated APAP metabolite).
31 Previous studies on the mechanism of APAP-induced hepatotoxicity have shown that GSH
32 plays a key role in detoxifying the reactive toxic metabolites of APAP, and that liver necrosis
33 begins when GSH stores are depleted^{4,5,32}. Therefore, GSH conjugation is an important in
34 the mitigation of the hepatotoxic effect of APAP, and to be mediated by GST, which is
35 known to be important for APAP detoxification. Our results show that AF pretreatment
36 significantly inhibited the ~~prevents~~ APAP-induced ~~depletion of~~ hepatic GSH ~~depletion~~.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Moreover, treatment with AF only significantly induced hepatic GSH levels and GST activities. These results suggested that the mechanism underlying the protective effect of AF against APAP-induced hepatotoxicity is related to increases in hepatic GSH levels and GST activities.

GSH contributes to the detoxification of APAP, and it has been suggested that lipid peroxidation caused by the free radical derivatives of APAP is a principal cause of APAP-induced liver injury^{34, 35}. Therefore, the antioxidant activity and/or the inhibition of free radical generation present important targets in terms of protecting the liver from APAP-induced damage³. In addition, Fe²⁺ and ascorbic acid stimulated lipid peroxidation in rat liver microsomes and mitochondria have been reported²⁴ and that AF is an oxygen radical scavenger^{16, 17}. Therefore, in the present study, in vitro lipid peroxidation experiments were carried out to determine the mechanism of AF protection with respect to APAP-induced liver injury. The results obtained are consistent with the findings of previous reports, which showed that AF inhibits FeCl₂-ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in liver homogenates and that it effectively scavenges superoxide radicals generated by the xanthine-xanthine oxidase system. Therefore, we suggest that AF acts by scavenging free radicals and ROS formed during the metabolism of APAP.

In conclusion, this study demonstrates that AF has a potent hepatoprotective effect in our APAP-induced hepatic damage ~~mouse~~ mouse model. Our results show that this hepatoprotective effect of AF may be due to ~~the~~ their ability ~~of AF~~ to block the bioactivation of APAP by inhibiting CYP2E1 activity and by upregulating GSH levels and GST activities, which would reduce NAPQI radical formation and increase the antioxidant activity such as GSH, and its abilities to scavenge free radicals and inhibit lipid peroxidation, all of which are capable of producing hepatocellular injury.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry (105016-3), Republic of Korea.

REFERENCES

1. Bessems JG, Vermeulen NP: Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Critical reviews in toxicology* 2001;31:55-138.
2. James LP, Mayeux PR, Hinson JA: Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2003;31:1499-1506.
3. Hinson JA, Reid AB, McCullough SS, James LP: Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug metabolism reviews* 2004;36:805-822.
4. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD: N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81:1327-1331.
5. Cohen SD, Khairallah EA: Selective protein arylation and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews* 1997;29:59-77.
6. Nerland DE, Cai J, Pierce WM, Jr., Benz FW: Covalent binding of acrylonitrile to specific rat liver glutathione S-transferases in vivo. *Chemical research in toxicology* 2001;14:799-806.

- 1
2
3
4 7. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, *et al.*: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I.
5 Role of drug metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*
6 1973;187:185-194.
7
8
- 9
10
11 8. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB: Acetaminophen-induced
12 hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *The Journal of pharmacology and*
13 *experimental therapeutics* 1973;187:211-217.
14
15
- 16
17
18 9. Mitchell JR, Hughes H, Lauterburg BH, Smith CV: Chemical nature of reactive
19 intermediates as determinant of toxicologic responses. *Drug metabolism reviews*
20 1982;13:539-553.
21
22
- 23
24
25 10. Sarich T, Kalhorn T, Magee S, *et al.*: The effect of omeprazole pretreatment on
26 acetaminophen metabolism in rapid and slow metabolizers of S-mephenytoin. *Clinical*
27 *pharmacology and therapeutics* 1997;62:21-28.
28
29
- 30
31
32 11. Manyike PT, Kharasch ED, Kalhorn TF, Slattery JT: Contribution of CYP2E1 and
33 CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clinical pharmacology and*
34 *therapeutics* 2000;67:275-282.
35
36
- 37
38
39 12. Heinonen IM, Lehtonen PJ, Hopia AI: Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines
40 and Liquors. *J Agric Food Chem* 1998;46:25-31.
41
42
- 43
44
45 13. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD: Purple grape juice improves
46 endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in
47 patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:1050-1055.
48
49
- 50
51
52 14. Tedesco I, Russo M, Russo P, *et al.*: Antioxidant effect of red wine polyphenols on red
53 blood cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 2000;11:114-119.
54
55
- 56
57
58 15. Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ: Absorption of anthocyanins from blueberries
59 and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 2002;50:7731-7737.
60
16. Tsuda T, Shiga K, Ohshima K, Kawakishi S, Osawa T: Inhibition of lipid peroxidation

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical pharmacology* 1996;52:1033-1039.
17. Igarashi K, Kimura Y, Takenaka A: Preventive effects of dietary cabbage acylated anthocyanins on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2000;64:1600-1607.
18. Hagiwara A, Yoshino H, Ichihara T, *et al.*: Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *The Journal of toxicological sciences* 2002;27:57-68.
19. Ali BH, Mousa HM, El-Mougy S: The effect of a water extract and anthocyanins of hibiscus sabdariffa L on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 2003;17:56-59.
20. Wang CJ, Wang JM, Lin WL, *et al.*: Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2000;38:411-416.
21. Lee LS, Kim SJ, Rhim JW: Analysis of anthocyanin pigments from Purple-Flashed Sweet Potato (Jami). *J Korea Soc Food sci Nutr* 2001;29:555-560.
22. Lee LS, Chang EJ, Rhim JW, Ko BS, Choi SW: Isolation and identification of anthocyanins from purple sweet potatoes. *J Food Sci Nutr* 2007;2:83-88.
23. Lee KJ, Choi JH, Jeong HG: Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol* 2007.
24. Lee KJ, You HJ, Park SJ, *et al.*: Hepatoprotective effects of Platycodon grandiflorum on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Cancer letters* 2001;174:73-81.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
25. Giusti MM, Rodriguez-Saona LE, Griffin D, Wrolstad RE: Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J Agric Food Chem* 1999;47:4657-4664.
26. Sedlak J, Lindsay RH: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry* 1968;25:192-205.
27. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB: Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 1976;175:710-716.
28. Dicker E, McHugh T, Cederbaum AI: Increased oxidation of p-nitrophenol and aniline by intact hepatocytes isolated from pyrazole-treated rats. *Biochimica et biophysica acta* 1990;1035:249-256.
29. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976;72:248-254.
30. Jeong HG, Yun CH: Induction of rat hepatic cytochrome P450 enzymes by myristicin. *Biochemical and biophysical research communications* 1995;217:966-971.
31. Davis DC, Potter WZ, Jollow DJ, Mitchell JR: Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life sciences* 1974;14:2099-2109.
32. Vermeulen NP, Bessems JG, Van de Straat R: Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug metabolism reviews* 1992;24:367-407.
33. Brady JF, Li DC, Ishizaki H, Yang CS: Effect of diallyl sulfide on rat liver microsomal nitrosamine metabolism and other monooxygenase activities. *Cancer research* 1988;48:5937-5940.
34. Amimoto T, Matsura T, Koyama SY, *et al.*: Acetaminophen-induced hepatic injury in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

mice: the role of lipid peroxidation and effects of pretreatment with coenzyme Q10 and alpha-tocopherol. *Free radical biology & medicine* 1995;19:169-176.

35. James LP, McCullough SS, Knight TR, Jaeschke H, Hinson JA: Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. *Free radical research* 2003;37:1289-1297.

For Peer Review

Table 1. Dose-dependent Effects of AF on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice

Treatment	Serum ALT (Karmen Units/ml)	Serum AST (Karmen Units/ml)	Hepatic Lipid peroxidation (MDA, nmole/g liver wt.)
Control	3 ± 1*	36 ± 14*	2.1 ± 0.32*
APAP	372 ± 44	470 ± 52	7.6 ± 0.72
AF 200 + APAP	253 ± 12	331 ± 21	6.5 ± 0.42
AF 400 + APAP	167 ± 10*	182 ± 27*	3.9 ± 0.42*
AF 800 + APAP	15 ± 5*	37 ± 8*	2.3 ± 0.33*

Mice were pretreated with AF (200, 400 or 800 mg/kg, *i.g.* p.o.) once daily for 7 consecutive days. Control mice were given saline. Three hours after final treatment, mice were treated with acetaminophen (APAP, 400 mg/kg, *i.p.*). Hepatotoxicity was determined 18 h later by quantifying the serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), and by determining hepatic lipid peroxidation. Each value represents the mean ± SD of six mice. *Significantly different from APAP at $p < 0.01$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Legends

Fig. 1. Effects of AF on APAP-induced liver damage in mice. Mice were pretreated with AF (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days; control mice were given saline. Three h after final treatment, mice were treated with APAP (400 mg/kg, ip). Mice were sacrificed 18 h after APAP administration. (A) Liver from a mouse treated with saline; (B) liver from a mouse treated with APAP; (C) liver from a mouse treated with AF (200 mg/kg) plus APAP; (D) liver from a mouse treated with AF (400 mg/kg) plus APAP; (E) liver from a mouse treated with AF (800 mg/kg) plus APAP. N; necrosis. X100. (F) Quantitative examination of hepatic necrosis.

Fig. 2. Effects of AF on CYP2E1 activity and protein expression. Liver microsomes were obtained from 4 different mice treated with AF (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days. (A) CYP2E1 enzyme activities were measured as described in Materials and Methods. (B) Microsomal proteins were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels, and CYP2E1 and β -actin proteins were detected by immunoblotting using specific antibodies. β -Actin was used as an internal control. (C) Quantitative analysis of CYP2E1 protein.

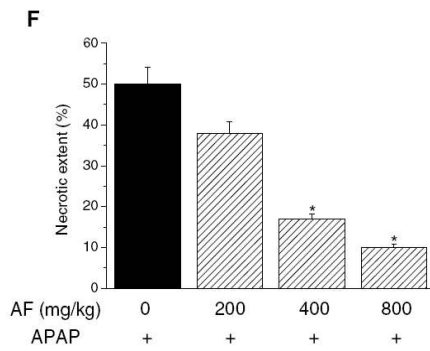
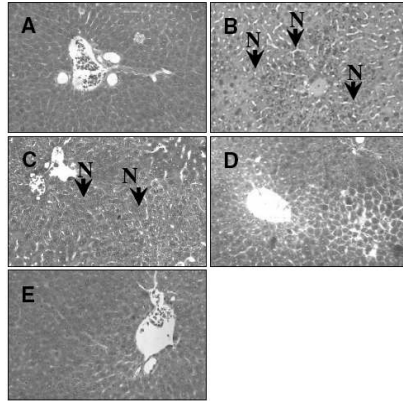
Fig. 3. Effects of AF on hepatic GSH levels and GST activities in mice. Animals were pretreated with AF (200, 400 or 800 mg/kg, i.g.) once daily for 7 consecutive days; control mice were given saline. Hepatic cellular GSH contents (A) and GST activities (B) were measured as described in Materials and Methods. (C) Three h after final treatment, mice were treated with APAP (400 mg/kg, i.p.). The mice were sacrificed 18 h after APAP treatment. Hepatic cellular GSH levels were measured as described in Materials and Methods. Bars

1
2
3
4 represent means \pm SD for five mice. *Significantly different from APAP at the $p < 0.01$ level.
5
6
7

8
9
10 **Fig. 4.** Inhibitory effects of AF on FeCl₂-ascorbic acid stimulated lipid peroxidation and on
11 superoxide scavenging activity. (A) Mouse liver homogenates were stimulated with FeCl₂-
12 ascorbic acid in the presence or absence of AF. Lipid peroxidation was measured as
13 described in Materials and Methods. (B) Superoxide was generated by the xanthine/xanthine
14 oxidase reaction in the presence or absence of AF, and scavenging activity was measured as
15 described in Materials and Methods. Values are presented as mean percentage inhibitions \pm
16 SD for three independent experiments performed in triplicate.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

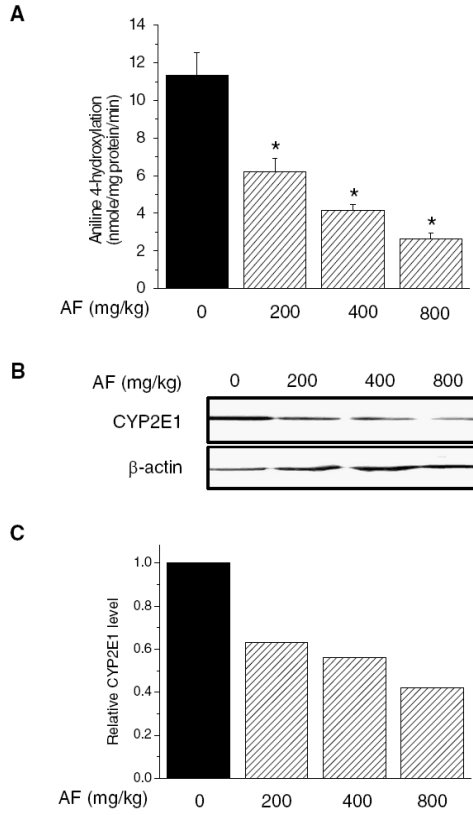
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. 1



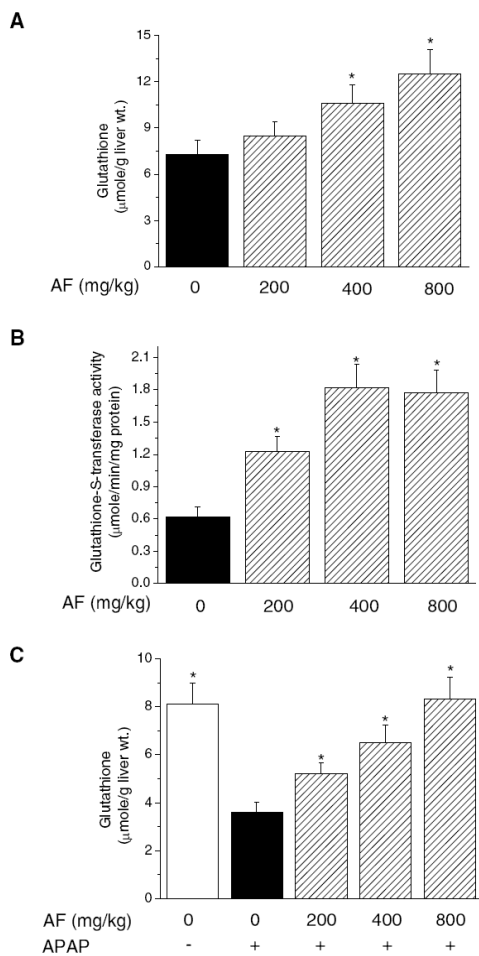
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

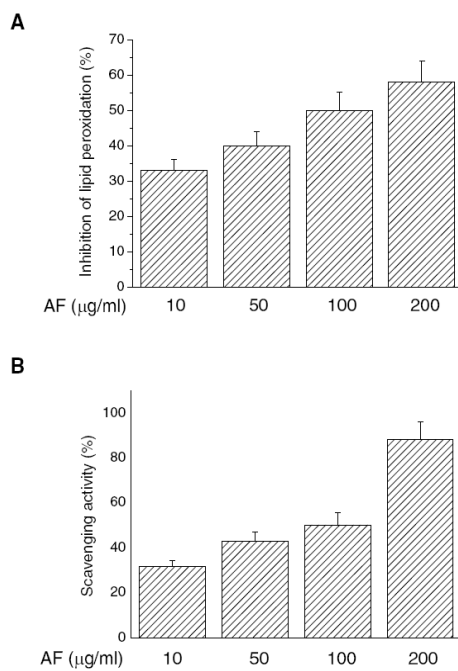
Fig. 2



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. 3



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60**Fig. 4**



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월04일
(11) 등록번호 10-0792029
(24) 등록일자 2007년12월28일

(51) Int. Cl.
A61K 36/39 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0010402
(22) 출원일자 2006년02월03일
심사청구일자 2006년02월03일
(65) 공개번호 10-2007-0079637
(43) 공개일자 2007년08월08일
(56) 선행기술조사문헌
Korean J. Food Culture 2003
KR 2002-0005169 A

(73) 특허권자
전주국세대학교 산학협력단
경남 진주시 문산읍 상문리 산 270

(72) 발명자
정예광
광주광역시 동구 산수동 두암타운아파트 102-803
최재호
광주 북구 양산동 금광아파트 101동 909호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 2 항

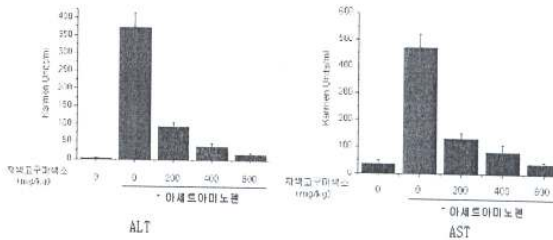
심사관 : 심선영

(54) 자색고구마 색소 추출물을 포함하는 간 질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 간질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 자색고구마 색소 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 아세트아미노펜과 같은 간 손상을 유발하는 화학물질의 대사에 관여된 간의 약물대사 효소인 시토크롬 P450의 효소들 (P450 1A1, P450 2E1)의 활성을 억제하고, 간 손상을 유발시키는 화학물질의 대사체의 포함반응을 통한 체외 방출을 촉진하는 해독효소를 증가시킴으로써, 간질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



등록특허 10-0792029

(72) 발명자

정영철

경남 진주시 하대2동 천대아파트 101동 2007호

최철웅

광주 북구 운암동 395-27번지

김지영

광주 동구 계림동 금호타운 109동 1904호

서종권

경남 진주시 평거동 191-1번지 들말홍안아파트 11
2동 304호

특허청구의 범위

청구항 1

차미 자색고구마(목포 29호)를 20% 에탄올로 추출하여 제조한 조추출물을 수지관 및 70% 에탄올 용매를 사용하여 정제한 색소 추출물을 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜에 의해 유도되는 급성간염 또는 만성간염의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2

차미 자색고구마(목포 29호)를 20% 에탄올로 추출하여 제조한 조추출물을 수지관 및 70% 에탄올 용매를 사용하여 정제한 색소 추출물을 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜에 의해 유도되는 급성간염 또는 만성간염의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<12> 본 발명은 간질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 자색고구마 색소 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

<13> 간 보호 활성에 관한 연구는 주로 두 가지 경로에 초점을 맞추어 이루어진다. 한 가지는 사염화탄소 (CCl₄), 아세트아미노펜 (acetaminophen), 티오아세트아마이드 (thioacetamide), 타크린 (tacrine), 그리고 루브라톡신 B (rubratoxin B)와 과산화수소 (H₂O₂)와 같은 독성 간독소의 해독반응 뿐만 아니라, 슈퍼옥사이드 디스뮤티아제 (superoxide dismutase), 카탈라아제 (catalase), 그리고 글루타치온 퍼옥시다제 (glutathione peroxidase)와 같은 신체 항산화 방어계를 함께 평가하는 것이고 다른 하나는 간 손상에 의해 방출된 혈청 글루타메이트 퍼루베이트 아미노기 전이효소 (serum glutamate pyruvate transaminase: GPT, alanine amino transferase: ALT)와 혈청 글루타메이트 옥살로아세테이트 아미노기전효소 (serum glutamate oxaloacetate transaminase: GOT, aspartate alanine amino transferase: AST)를 포함하는 혈청조절효소의 수준과 활성을 평가하는 것이다. 시토크롬 P450 (Cytochrome P450) 시스템과 관련된 사염화탄소 (CCl₄) 물질대사인 트리클로로 메틸 프리 라디칼 (trichloromethyl free radical, CCl₃·)과 트리클로로메틸퍼옥시 라디칼 (trichloromethyl peroxy radicals, CCl₃OO·)같은 자유 라디칼 (free radicals)에 대한 소거 그리고/또는 억제활성은 산화 방지에 대한 세포기관과 세포막에서의 간 보호 활성과 연관 지을 수 있을 것이다(Hsiao et al., J. Agric. Food

Chem., 51, pp 3302-3308, 2003; Song et al., *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp 1571-1577, 2003).

- <14> 아세트아미노펜(Actaminophen)은 현재 새로운 간보호제 또는 치료제의 효과를 검증하기 위한 표준적인 간독성 유발물질로 널리 이용되고 있다(D. J. Jollow et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, pp 195-202, 1973; J. R. Mitchell et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, pp 185-194, 1973). 아세트아미노펜은 치료적 용량으로 사용할 때 효과적인 해열, 진통제이지만, 과 용량으로 복용할 때에는 치명적인 간 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다(B. H. Rumack, *Hepatology* 40, pp 10-15, 2004; W. M. Lee, *Hepatology* 40, pp 6-9, 2004). 아세트아미노펜이 과량복용에 따른 치명상은 광범위한 간세포의 괴사(Necrosis)를 특징으로 하는 이차적인 간 손상으로 설명된다(D. Zakin et al., *Hepatology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, pp 759-762, 1990). 이러한 독성은 아세트아미노펜이 간에서 시토크롬(cytochrome) P450에 의해 활성화된 부산물인 NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine)로 대사되고, 이 대사체가 간조직의 손상 및 괴사를 유발하여 발생한다.
- <15> 아세트아미노펜이 치료적 용량으로 투여될 때 NAPQI는 GSH(glutathione)에 의해 효과적으로 해독화 되지만, 과량이 투여될 때에는 세포내 GSH가 고갈되어 NAPQI는 배설되지 못하고 인체 내 장기, 특히 간 조직에서 독성 작용을 나타낸다(J. D. Gibson et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 9, pp 580-585, 1996). 이에 따라 아세트아미노펜 유발성 간독성의 가장 특징적인 조직학적 지표인 간 중심 정맥주위 세포괴사(Hepatic Central Necrosis)를 나타내고, 간세포의 퇴화(Degeneration) 및 염증세포의 출현을 일으킨다(D. Zakin et al., *Hepatology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, pp 759-762, 1990). 또한 APAP을 과량 투여할 때 간 손상을 가장 특징적으로 나타내는 혈액학적 지표로서 ALT(Alanine aminotransferase)와 일반적 세포괴사를 지표하는 LDH (Lactate dehydrogenase)활성이 상승한다. 나아가, 인체 세포내 GSH가 고갈되어 있는 상황에서 아세트아미노펜을 과 복용하게 되면, 아세트아미노펜의 대사체인 NAPQI가 과량으로 생성되어 더욱 강력한 간 손상을 유발한다(J. D. Gibson et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 9, pp 580-585, 1996). 정상적인 상태에서 인체 GSH의 농도는 일정하게 유지되지만, 특별한 병적상황에서는 GSH 농도가 급격히 하락하여 독성물질에 대한 인체의 감수성을 증가시킨다(E. Y. Park et al., *Chem. Biol. Interact.*, 155, pp 82-96, 2005). 이와 유사하게, 생체 GSH 농도가 감소할 때에는 바이러스 감염에 의한 간 손상도 증폭된다. 이러한 사실은 만성 HBV 또는 HCV 감염 환자의 간 조직 괴사가 생체 GSH의 감소를 수반하는 발견에 의해 뒷받침 된다(T. Tanyalcin et al., *Hepato. Res.*, 18, pp 104-109, 2000).
- <16> 본 분야의 종래 기술에서는 일반적으로, 아세트아미노펜 독성의 치료를 위하여 NAC(N-acetylcysteine)이 거의 유일하게 사용되고 있는 약품이다. 따라서 NAC보다 더욱 효율적인 다른 대체약품의 개발이 시급한 실정이다.
- <17> 한편, 자색고구마 (자미고구마; Purple-Fleshed sweet potato)는 1993년 가공용 다수성 품종 건미를 모본으로하고 자색 색소를 함유한 야마까와무라사끼를 부분으로 인공 교배하여 그 후대인 실생 개체선발 및 계통선발시험에서 색소용으로 선발된 계통(MI9308-11, 색소원료용 자색고구마의 평가방법과 육종 (1994, Kinoshuke Odake 등 8인, 일본) 기술보고 41(4), 287-293)으로, 생산력검정시험과 지역적용시험(목포29호)에서 다수성이 확인되어 품종교배를 통해 지난 1998년 자미, 2000년 보라미, 2001년에 신자미 등 3가지 신품종으로 육성되었다. 이들 신품종은 야생 고구마의 고유 성분은 모두 간직하고 있으면서 크기는 일반 고구마와 비슷한 반면 수확량은 야생보다 2배 이상 많고, 고구마 고유의 당질과 섬유소를 가지고 있다는 장점을 지니고 있다.
- <18> 이러한 자색고구마의 주요 활성성분은 플라보노이드계의 색소인 안토시아닌으로 항산화작용(*J. Agric. Food Chem.*, 51, pp 628-633, 2003; *J. Nat. Prod.*, 62, p 802, 1999; *J. Med. Food.*, 4 pp 211-218, 2001), 항당뇨(*J. Agric. Food Chem.*, 49, pp 1948-1951, 2001), 항암작용(*Cancer Lett.*, in press pp 1-12, 2005) 효과 등이 있는 것으로 보고되어 있다. 자색고구마의 색소추출물은 생체 중량대비 약 3.8 %를 함유하고 있어 표피층뿐만 아니라 육질 전체가 진한 자색을 띠고 있는데, 이 기능성 색소함량이 크란베리 보다는 10-60배, 포도보다는 5-7배 높아 천연 기능성 색소 원료만 아니라 기능성 식품소재로서 가치가 우수하다.
- <19> 이에 본 발명은 안전하고 독성이 없는 천연물로부터 간 손상을 예방하고 만성 간 손상에 의한 간경화나 간질환을 치료하기 위한 소재를 찾던 중 자색고구마 색소 추출물이 간 내외부에서 유입되는 아세트아미노펜과 같은 간 손상을 유발시키는 화학물질의 대사에 관여하는 특정 시토크롬 P450 1A1 및 2E1 효소의 활성을 억제하면서 이들 화학물질의 대사에 의해 형성되는 유독성 화학물질 대사체의 체외 배출을 촉진하는 글루타티온-S-트랜스페라제의 효소활성을 증가시키는 효과로 간독성을 억제함을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<20> 본 발명의 목적은 간질환에 효과적인 자색고구마 색소 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<21> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자색고구마 색소 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

<22> 상기 자색고구마는 자미(목포 29호), 브라미(목포 35호), 신자미(목포 38호)의 품종인 것을 포함한다.

<23> 상기 추출물은 물, 메탄올, 에탄올 등과 같은 극성용매 및 이들의 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.

<24> 상기 간질환은 자가 면역성 간질환, 약물유인성 간질환, 알코올성 간질환, 감염성 간질환, 선천성대사성 간질환, 급성간염, 만성간염, 간경변증, 간경화, 지방간, 간암을 포함한다.

<25> 이하, 상기 자색고구마 색소 추출물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

<26> 본 발명의 자색고구마 추출물은, 생 자색고구마를 세절하여 무게(kg)의 약 1배 내지 20배, 바람직하게는 약 3배 내지 10배의 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 에탄올로, 20℃ 내지 100℃, 바람직하게는 50℃ 내지 100℃ 추출온도에서 약 1시간 내지 10일, 바람직하게는 약 2시간 내지 5시간동안 냉침, 열수추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출방법을 이용하여 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 수득할 수 있다.

<27> 상기 추출물을 100% 물에 20배(w/v) 희석한 후 HP-20 수지가 채워진 관을 통과시켜, 색소가 HP-20 수지에 결합할 수 있도록 하였으며, HP-20 수지에 결합한 자색의 색소를 다시 C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 에탄올을 이용하여 재 추출 한 후 감압, 농축 및 건조를 통해 순수 자색고구마 색소 추출물을 수득할 수 있다. 구입한 자색 색소분말을 정량적으로 취하여 흡광도 532 nm으로 측정하여 검광선을 작성하였고, 이 검광선을 이용하여 자색색소 추출물의 색소함량을 측정하여 순도 98% 이상의 것을 이용하는 것이 바람직하다.

<28> 또한 본 발명은 상기 제법으로 얻어진 자색고구마 색소 추출물을 유효성분으로 함유하고, 간질환의 예방 및 치료에 효과적인 약학 조성물을 제공한다.

<29> 본 발명의 조성물은 자색고구마 색소 추출물을 0.01 - 99.9% 함유하는 것이 바람직하고, 0.1 - 90% 함유하는 것이 더욱 바람직하다. 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

<30> 본 발명의 자색 고구마 색소 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<31> 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 알슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시셀룰로오스, 프로필히드록시셀룰로오스, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 체제화할 경우에는 보통 사용하는 증진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방항제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용액, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용액, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리

플, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텟솔(witepsol), 마크로플, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- <32> 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- <33> 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 10 내지 1,000 mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <34> 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌척수 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- <35> 본 발명은 간질환의 예방의 효과를 나타내는 자색고구마 색소 추출물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 본 자색고구마 색소 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 쥬스, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있고, 분말, 파우더, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- <36> 본 발명의 자색고구마 색소 추출물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- <37> 본 발명의 상기 추출물은 간질환의 예방을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- <38> 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 테바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르트 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100mg당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- <39> 상기 외에 본 발명의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 추출물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- <40> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <41> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- <42> 실시예 1. 자색 고구마 추출물의 제조
- <43> 1-1. 자색고구마 조추출물의 제조
- <44> 경남 함양군에서 제공한 목포 29호 자색고구마 육질전체 100g을 세척하여 20% 에틸 알콜에 침지시킨 후 실온에서 추출액을 수득하고, 다시 에틸 알콜을 가하여 2회 더 추출하였고, 상기 각 추출액을 여과한 후, 여과액을 혼합하였다. 상기 에탄올 추출물을 감압, 농축 및 건조하여 총 추출물 12.3g을 수득하였다.
- <45> 1-2. 자색고구마 색소 추출물의 제조
- <46> 상기 실시예 1-1의 조추출물을 100% 물에 20배(w/v) 희석한 후 HP-20 수지가 채워진 관을 통과시켜, 색

소가 HP-20 수지에 결합할 수 있도록 하였다. HP-20 수지에 결합한 자색의 색소를 다시 70% 에틸 알콜을 이용하여 제 추출 한 후 감압, 농축 및 건조를 통해 순수 자색고구마 색소 추출물 2.5 g 얻었다.

<47> **참고예 1. 실험동물 및 처리**

<48> 실험동물은 (주)대한바이오텍로부터 구입한 SPF(특정병원균미감염) ICR(Institute of Cancer Research) 생후 8주된 25-30g의 수컷 마우스(mouse)를 사용하였고, 사료 (purina korea)와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 사육장의 온도는 21-24℃, 상대습도는 40-80%로 유지하였다. 또한 12 시간마다 낮과 밤이 반복되도록 사육장내 빛을 조절하였다.

<49> 아세트아미노펜 (Acetaminophen, APAP), 알라닌 아미노 트랜스퍼라제 (alanine amino transferase, ALT)와 아스파레이트 아미노 트랜스퍼라제 (aspartate amino transferase, AST) 키트, 티오바비투릭산 (Thiobarbituric acid, TBA), 프탈디알데하이드 (O-Phthaldialdehyde), 페닐메톡실 설포닐 플로라이드 (phenylmethoxyl sulfonyl fluoride)와 글루타티온 (Glutathione, GSH)은 시그마사 (Sigma chemical Co)에서 구입하였다.

<50> **실험예 1. 간 독성을 일으키는 물질에 대한 자색고구마 색소 추출물의 간 보호 효과**

<51> **1-1. 자색고구마 색소 추출물 투여 및 화학물질들에 의한 간 손상 유발**

<52> 실험동물 (ICR Mouse)에 자색고구마 색소 추출물을 200, 400, 800 mg/kg으로 생리 식염수(0.85% NaCl)에 녹여 7일 동안 경구 투여하였다. 대조군은 생리 식염수(0.85% NaCl)만을 경구 투여하였다. 각각의 실험군은 6마리의 동물을 사용하였다. 자색고구마 색소 추출물을 전 처리 한 후 아세트아미노펜 (APAP, 400 mg/kg)를 복강 투여하여 인위적인 간 손상을 유발시킨 다음, 18시간 지난 후에 마우스를 에테르로 마취 후 혈액과 간을 채취하였다.

<53> **1-2. 혈액 내 알라닌 아미노 트랜스퍼라제 (ALT)와 아스파레이트 아미노 트랜스퍼라제(ALT)활성도 측정**

<54> 간 손상시 혈액으로 유리되어 나오는 알라닌 아미노 트랜스퍼라제(ALT)와 아스파레이트 아미노 트랜스퍼라제(ALT) 활성도 양을 라이언 플랭클린 (Reitman - Frankel)(*J Ethnopharmacol.* 66, pp 263-269, 1999; *J Ethnopharmacol.* 66, pp 355-361, 1999; *J Nutr. Biochem.* 11, pp 509-514, 2000) 방법에 준하여 측정하였다. 자색고구마 색소 추출물을 7일 동안 경구투여 후 아세트아미노펜을 복강투여로 처리하고 18시간 후에 심장으로 부터 채취한 혈청을 ALT 및 AST 각각의 기질액과 37℃에서 30분 동안 반응시켜 피루빅산 (pyruvate)을 생성시킨 후, 발색액을 넣고, 20분 후 0.4 N-수산화나트륨 (NaOH)을 섞어서 동경색의 발색이 되면 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 표 1과 같다.

표 1

구 분	대조군	아세트 아미노펜 (APAP)			
		0	200	400	800
자색고구마 색소 추출물 (mg/kg)					
혈청 ALT (Karmen Units/ml)	3±1	372±44	93±12	37±10	15±5
혈청 AST (Karmen Units/ml)	36±14	470±52	131±21	82±27	37±8

<56> 상기 표 1과 도 1은 아세트아미노펜에 의한 간 손상으로 간세포에서 혈청으로 유리된 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT)와 아스파레이트 아미노 트랜스퍼라제(ALT) 활성도를 측정된 결과 자색고구마 색소 추출물을 전 처리한 군들은 아세트아미노펜만을 단독 처리한 군에 비해 자색고구마 색소 추출물의 처리 농도에 의존적으로 간 손상 지표인 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT)와 아스파레이트 아미노 트랜스퍼라제(ALT)활성이 감소하였으며, 특히 자색고구마 색소 추출물의 800 mg/kg을 전 처리한 군에서는 대조군과 유사한 정도의 간 보호 활성 (ALT와 AST 활성 감소)을 나타내었다.

<57> **1-3. 간장의 지질과산화 측정**

<58> 아세트아미노펜에 의하여 생성된 지질과산화에 대한 자색고구마 색소 추출물의 간 손상 보호효과를 확인하기 위해 간 100 mg을 10 ml의 완충액 (Tris-HCl)에 넣은 후 분쇄기 (homogenizer)로 부순 다음 과산화 지

질의 분해 생성물인 말ondi알데하이드 (malon-dialdehyde, MDA)의 양을 티오바비투릭산 (2-Thiobarbituric acid, TBA)과 100°C에서 20분간 가열 반응시켜 생긴 티오바비투릭산 색소를 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 표 2와 같다.

표 2

구 분	대조군	아세트 아미노벤 (APAP)			
		0	200	400	800
자색고구마 색소 추출물 (mg/kg)					
간지질과산화 (MDA, nmol/g liver)	2.1±0.32	7.6±0.72	5.5±0.42	4.2±0.42	2.3±0.33

<60> 상기 표 2와 도 2는 아세트아미노벤에 의해 유발된 지질과산화 수준을 측정된 결과로 자색고구마 색소 추출물을 전 처리한 군들이 아세트아미노벤만을 단독 처리한 군에 비해 지질과산화 수준이 농도 의존적으로 감소하였으며, 자색고구마 색소 추출물을 800 mg/kg으로 전 처리한 경우 대조군과 유사한 정도의 간 보호 활성 (지질과산화 수준 억제)을 나타내었다.

<61> 실험예 2. 간 손상물질을 의해 감소된 글루타티온 (Glutathione, GSH) 양 회복

<62> 적출한 간을 중류수로 씻은 후에 잠시 건조 후 무게를 전 다음 간의 일부분을 사용하여 글루타티온 양을 측정한다. 그 방법으로는 적출한 간 100 mg을 0.02M EDTA에 넣은 후 분쇄기 (Homogenizer)를 이용하여 조직을 잘게 부순다. 이 수용액을 12000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액 100 μ l만 취한다. 이 상등액에 1.8 ml 포스페이트-이디티에이 (phosphate-EDTA) 완충액과 프탈디알데하이드 (O-Phthalaldialdehyde) 100 μ l를 넣은 후, 15분 후에 분광광도계 (spectrophotometer)로 412 nm에서 흡광도를 측정한다. 그 결과는 표 3과 같다.

표 3

구 분	대조군	아세트 아미노벤 (APAP)			
		0	200	400	800
자색고구마 색소 추출물 (mg/kg)					
GSH (μ mole/g liver wt.)	8.1±0.88	3.6±0.42	5.2±0.45	6.5±0.71	8.3±0.93

<64> 상기 표 3과 도 3은 자색고구마 색소 추출물이 간 조직 내에서 아세트아미노벤 해독작용으로 소실된 글루타티온 결손 양의 증가효과를 확인하기 위해 간 조직 내 글루타티온(GSH) 양을 측정된 결과, 자색고구마 색소 추출물을 전 처리한 군들이 아세트아미노벤만을 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 자색고구마 색소 추출물 800 mg/kg을 전 처리한 경우 대조군의 글루타티온 양과 유사하게 측정되었다.

<65> 실험예 3. 간독성 유발물질의 대사활성에 관련된 시토크롬 P450 (cytochrome P450) 약물대사 효소활성도 변화조사

<66> 3-1. 세포내 활성실험(in vivo)을 위한 실험동물 처리 후 마이크로솜 (microsome) 분리

<67> 자색 고구마 색소 추출물을 200, 400, 800 mg/kg으로 7일간 경구 투여한 간 100 mg을 10 ml의 호모제 나이저 용액 (homogenizer buffer)에 넣은 후 분쇄기 (homogenizer)를 이용하여 조직을 잘게 부순다. 이 수용액을 9,000 xg에서 4°C 30 분간 원심분리한 후, 상등액만을 다시 초 원심분리 튜브 (ultracentrifuge tube)에 옮긴 후 100,000 xg에서 4°C 한 시간 초 원심분리를 하였다. 초 원심분리 한 후 상등액인 시토크롬 (cytosol)을 새 마이크로센트리피유즈 튜브 (microcentrifuge tube)에 옮기고, 침전된 펠렛 (microsome)을 저장용액 (storage buffer ; 호모제나이저 용액 에 10% 글리세롤을 혼합한 용액) 1 ml를 넣고 피펫을 이용해서 잘 부유시킨 후 새 마이크로센트리피유즈 튜브 (microcentrifuge tube)에 옮겨서 사용시까지 -80°C에서 보관하였다.

<68> 3-2. 시토크롬 P450 (cytochrome P450) 1A1 약물대사 효소에 대한 특이적 효소반응인 EROD (7-ethoxyresorufin-O-dealkylase) 효소 활성도 측정

<69> 0.1 M 인산칼륨(Potassium Phosphate, pH 7.4)에 2 mg/ml의 소혈청 단백질(bovine serum albumin), 10 μ M 디쿠마롤 (Dicumarol), NADPH 재생계 (degeneration system) (5 mM 글루코스-6 포스페이트 (glucose-6-

phosphate), 5 unit/ml 글루코스-6-포스페이트 디하이드로제나제 (glucose-6-phosphate dehydrogenase), 10 μM NADPH, 2.5 μM 에톡실레졸루핀 (7-ethoxyresorufin)과 마이크로솜 (Microsome) 시료를 혼합한 후에 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 형성된 레졸루핀 (resorufin)은 발광 (excitation) 파장 550 nm, 방출 (emission) 파장 585 nm에서 형광분석측정기 (Fluorometer)로 측정했다. 마이크로솜 시료내의 단백질의 농도는 로리 등의 방법으로 결정했다(*J Ethnopharmacol.* 66, pp 263-269, 1999; *J Nutr. Biochem.* 14, pp 452-458, 2003; *Toxicol.* 42, pp 367-372, 2003). 그 결과는 표 4와 같다.

표 4

<70>

구분	대조군	자색고구마 색소 추출물 (mg/kg)		
		200	400	800
EROD 활성 (nmole/mg protein/min)	14.34±0.96	12.26	6.48	4.14

<71>

상기 표 4와 도 4는 간장내로 유입된 아세트아미노펜 (Acetaminophen)을 비롯한 간 손상 화학물질들의 간 손상을 유발시키는 대사체들의 생성에 관여하는 간장내의 대사효소 P450 1A1에 대한 영향을 조사한 것으로, 아세트아미노펜의 대사체인 아세틸벤조퀴논 이민 (N-acetyl-p-benzoquinone imine)으로 전환시키는 효소 P450 1A1의 활성을 측정하기 위하여 P450 1A1에 특이적인 효소반응인 EROD (ethoxyresorufin O-deethylase) 활성도를 측정할 결과 자색고구마 색소 추출물을 처리한 군들은 처리 농도에 의존적으로 간장내의 EROD 활성이 감소하였다.

<72>

3-3. 시토크롬 P450 (cytochrome P450) - 2E1 약물대사 효소에 대한 특이적 효소 반응인 AH(aniline hydroxylase) 효소 활성도 측정

<73>

아닐린 (aniline, 5-20 mM)과 10 μM NADPH, NADPH 재생산 시스템 (regenerating system) 및 마이크로솜 시료를 0.1 M 포타슘포스페이트 완충액 (potassium phosphate buffer, pH 7.4)에 혼합한 후 37°C 항온 수조 (shacking water incubator)에서 20 분동안 반응시킨 다음, 20% TCA를 가하여 반응을 종결시켰고 5% 페놀과 2.5 N 수산화나트륨 (NaOH)을 가하여 혼합한 다음, 2.5 N 탄산나트륨 (Na₂CO₃)을 가하여 30분 동안 실온에서 방치하면서 발색 시켰다. 630 nm에서 흡광도를 측정하고 4-하이드록시 아닐린 (4-hydroxyaniline) 검량선으로부터 활성도를 계산했다. 그 결과는 표 5와 같다.

표 5

<74>

구분	대조군	자색고구마 색소 추출물 (mg/kg)		
		200	400	800
AH 활성 (nmole/mg protein/min)	11.34±1.2	6.23±0.71	4.16±0.33	2.65±0.32

<75>

상기 표 5와 도 5는 간장내로 유입된 아세트아미노펜 (Acetaminophen)을 비롯한 간 손상 화학물질들의 간 손상을 유발시키는 대사체들의 생성에 관여하는 간장내의 대사효소 P450 2E1에 대한 영향을 조사한 것으로, 아세트아미노펜의 대사체인 아세틸벤조퀴논 이민 (N-acetyl-p-benzoquinone imine)으로 전환시키는 효소 P450 2E1의 활성을 측정하기 위하여 P450 2E1에 특이적인 효소반응인 AH (aniline hydroxylase) 활성도를 측정할 결과 자색고구마 색소 추출물을 처리한 군들은 처리 농도에 의존적으로 간장내의 AH 효소 활성이 감소하였다.

<76>

3-4. 시토크롬 P450 (cytochrome P450) 2E1 약물대사 효소 발현 변화 조사

<77>

자색고구마 색소 추출물의 간 내 약물 대사 효소 시토크롬 P450 2E1 발현에 대한 영향을 조사하기 위하여 자색고구마 색소 추출물을 처리한 간에서 분리한 마이크로솜 (microsome)을 이용하여 시토크롬 P450 2E1에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 (Western blot)을 수행하였다. 결과는 도 6과 같다. 도 6은 간장내로 유입된 아세트아미노펜 (Acetaminophen)을 비롯한 간 손상 화학물질들의 간 손상을 유발시키는 대사체들의 생성에 관여하는 간장내의 대사효소 P450 2E1 효소발현에 대한 영향을 조사한 것으로, 아세트아미노펜의 대사체인 아세틸벤조퀴논 이민 (N-acetyl-p-benzoquinone imine)으로 전환시키는 효소 P450 2E1의 발현이 자색고구마 색소 추출물의 처리 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 베타-액틴(β-actin)은 P450 2E1 단백질 발현에 대한 대조군

으로 사용하였다.

<78> 3-5. 세포의 활성실험(in vitro)을 위한 실험동물 처리

<79> 실험동물은 (주)대한바이오링크로부터 구입한 SPF(특정병원균미감염) (Sprague-Dawley ; SD) 생후 8주 된 250~280g의 수컷 랫트(rat)에 정상군은 무 처리 하였으며, 간장내의 P450 1A1 효소 유도는 베타-나프타플라본 (β -naphthoflavone)을 그리고 P450 2E1 유도는 피리딘 (pyridine)을 3일 복강 투여하였다. 4일째, 랫트를 에테르로 마취 후, 간을 적출하여 위에서의 방법과 동일하게 간장내의 마이크로솜을 분리하고 사용시까지 -80℃에서 보관하였다.

<80> 3-6. 세포의 활성실험에서의 시토크롬 P450 (cytochrome P450) 1A1 약물대사 효소에 대한 특이적 효소 반응인 EROD (7-ethoxyresorufin-O-dealkylase) 효소 활성도 측정

<81> 세포내 활성실험에서의 EROD 활성도를 측정한 방법과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다. 그 결과는 표 6, 도 7과 같다.

표 6

<82>

구 분	대조군	자색고구마 색소 추출물 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		200	400	800
EROD 활성 (nmole/mg protein/min)	6.34 \pm 0.67	5.33 \pm 0.61	3.26 \pm 0.36	2.55 \pm 0.32

<83> 상기 표 6과 도 7은 간장내로 유입된 아세트아미노펜 (Acetaminophen)을 비롯한 간 손상 화학물질들의 간 손상을 유발시키는 대사체들의 생성에 관여하는 간장내의 대사효소 시토크롬 P450 1A1 효소활성에 대한 영향을 조사한 것으로, 아세트아미노펜의 대사체인 아세틸벤조퀴논 이민 (N-acetyl-p-benzoquinone imine)으로 전환시키는 효소 P450 1A1의 활성을 측정하기 위하여 정상 간으로부터 분리된 마이크로솜에 자색고구마 색소 추출물을 처리한 후 P450 1A1에 특이적인 효소반응인 EROD (ethoxyresorufin O-deethylase) 활성도를 측정한 결과 자색고구마 색소 추출물을 처리한 군들은 처리 농도에 의존적으로 EROD 효소 활성이 감소하였다.

표 7

<84>

구 분	베타-나프타플라본 (β -naphthoflavone) 유도 간장 마이크로솜			
	0	200	400	800
자색고구마 색소 추출물 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
EROD 활성 (nmole/mg protein/min)	36.42 \pm 2.13	19.25 \pm 0.52	15.37 \pm 0.11	10.74 \pm 3.21

<85> 상기 표 7과 도 8은 시토크롬 P450 1A1 효소를 유도하는 베타-나프타플라본을 처리한 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜에 세포의 활성실험에서의 자색고구마 색소 추출물에 의한 간 대사효소 시토크롬 P450 1A1 효소활성에 대한 영향을 조사한 것으로, P450 1A1에 특이적인 효소반응인 EROD (ethoxyresorufin O-deethylase) 활성도를 측정한 결과 자색고구마 색소 추출물을 처리한 군들은 처리 농도에 의존적으로 EROD 효소 활성이 감소하였다.

<86> 3-7. 세포의 활성실험에서의 시토크롬 P450 (cytochrome P450) 2E1 약물대사 효소에 대한 특이적 효소 반응인 AH (aniline hydroxylase) 효소 활성도 측정

<87> 세포내 활성실험에서의 AH 활성도를 측정한 방법과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다. 그 결과는 표 8 및 도 9와 같다.

표 8

<88>

구 분	대조군	자색고구마 색소 추출물 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		200	400	800

AH 활성 (nmole/mg protein/min)	10.32±1.21	6.21±0.72	5.34±0.63	3.93±0.44
---------------------------------	------------	-----------	-----------	-----------

<89> 상기 표 8과 도 9는 간장내로 유입된 아세트아미노펜(Acetaminophen)을 비롯한 간 손상 화학물질들의 간 손상을 유발시키는 대사체들의 생성에 관여하는 간장내의 대사효소 시토크롬 P450 2E1 효소활성에 대한 영향을 조사한 것으로, 아세트아미노펜의 대사체인 아세틸벤조퀴논 이민(N-acetyl-p-benzoquinone imine)으로 전환시키는 효소 P450 2E1의 활성을 측정하기 위하여 정상 간으로부터 분리된 마이크로솜에 자색고구마 색소 추출물을 처리한 후 P450 2E1에 특이적인 효소반응인 AH(aniline hydroxylase) 활성도를 측정할 결과 자색고구마 색소 추출물을 처리한 군들은 처리 농도에 의존적으로 AH 효소 활성이 감소하였다.

표 9

자색고구마 색소 추출물 (µg /mg)	피리딘(pyridine) 유도 간장 마이크로솜			
	0	200	400	800
AH 활성 (nmole/mg protein/min)	28.37±3.92	13.72±2.12	10.28±1.75	7.31±0.84

<91> 상기 표 9와 도 10은 시토크롬 P450 2E1 효소를 유도하는 피리딘을 처리한 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜에 세포 외 활성실험에서의 자색고구마 색소 추출물에 의한 간 대사효소 시토크롬 P450 2E1 효소활성에 대한 영향을 조사한 것으로, P450 2E1에 특이적인 효소반응인 AH(aniline hydroxylase) 활성도를 측정할 결과 자색고구마 색소 추출물을 처리한 군들은 처리 농도에 의존적으로 AH 활성이 감소하였다.

<92> 실험예 4. 간독성 유발물질의 체외 배출과 관련된 글루타티온-S-트랜스페라제(Glutathione-S-Transferase; GST) 효소 활성도 변화 조사

<93> 초 원심 분리하여 -80℃에서 보관하였던 간장의 시토플(cytosol)을 4℃에서 녹인 후에 글루타티온-S-트랜스페라제(Glutathione-S-Transferase) 효소 활성도를 측정하였다. 시토플 10µl, 0.1M 인산칼륨(0.1M potassium phosphate) 90 µl, 10mM GSH 50 µl, 10mM 시디엔비(cDNB; 1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 50 µl를 혼합한 후에 37℃에서 반응시키면서, 5분 간격으로 15분 동안 분광광도계(spectrophotometer)로 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 15분 후에 4℃에서 5분간 방치하여 반응을 정지한 후, 로리 등의 방법으로 단백질을 정량하였다(J Ethnopharmacol. 66, pp 263-269, 1999; J Nutr. Biochem. 14, pp 452-458, 2003; Toxicol. 42, pp 367-372, 2003). 15분 정량 값에서 5분 정량 값을 빼준 후, 시토플(cytosol) 내의 글루타티온-S-트랜스페라제(Glutathione-S-Transferase)의 활성도를 계산하였다. 그 결과는 표 10과 같다.

표 10

GST 활성 (nmole/mg protein/min)	대조군	자색고구마 색소 추출물 (mg/kg)		
		200	400	800
	98±10.2	224±33.2	316±43.4	268±62.4

<95> 상기 표 10과 도 11은 간장 내로 유입된 아세트아미노펜(acetaminophen)을 비롯한 간 손상 화학물질들의 간 손상을 유발시키는 대사체들과 간장내의 글루타티온(glutathione)과의 포함(conjugation)반응을 통한 체외배설에 관여하는 간장내의 제2상(Phase II) 대사효소 글루타티온-S-트랜스페라제(Glutathione-S-Transferase)의 활성에 대한 자색고구마 색소 추출물의 영향을 조사한 것으로 자색고구마 색소 추출물을 처리한 군들은 처리 농도에 의존적으로 간장내의 글루타티온-S-트랜스페라제(Glutathione-S-Transferase) 효소 활성이 증가함을 확인하였다.

<96> 위의 결과들을 종합해 볼 때, 아세트아미노펜에 의한 간세포 손상이 자색고구마 색소 추출물에 의해 회복됨을 혈청 내 효소들(ALT, AST)과 간 세포내 지질과산화 수준을 통해 확인하였다. 또한 아세트아미노펜에 의해 생성된 간 독성 물질인 아세틸-para-벤조퀴논이민의 세포외의 배출속진과 관련된 간 손상을 방지하는 제2상

대사효소인 글루타티온-S-트랜스페라제의 효소활성이 자색고구마 색소 추출물에 의해 증가되는 것이 확인하였다.

<97> 이러한 대사경로를 기초로 하여 자색고구마 색소 추출물의 회복 기작을 시토크롬 P450의 효소들과 글루타티온 결손효과를 조사한 결과로 먼저 마이크로솜내 P450 1A1 과 P450 2E1의 효소활성이 자색고구마 색소 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 아세트아미노펜에 의한 아세틸벤조퀴논 이민이 생성이 감소하여 간 독성을 저해한다고 추정할 수 있다.

<98> 이와는 별도의 해독과정으로는 글루타티온이 아세틸벤조퀴논 이민과 결합하여 해독하는 과정이 있다. 자색고구마 색소 추출물의 경우는 글루타티온의 양이 농도 의존적으로 증가함을 관찰하였다. 다만, P450 1A1와 P450 2E1의 효소활성의 저해로 아세틸벤조퀴논 이민생성이 저해되고 글루타티온과 아세틸-피리-벤조퀴논 이민 결합이 줄어들어, 간에 존재하는 글루타티온의 양의 결손을 줄임도 관찰할 수 있었다.

<99> **제제에 1. 주사제제의 제조**

- <100> 실시예 1의 자색고구마 색소 추출물.....10 mg
- <101> 소디움 메타비설파이트.....3.0 mg
- <102> 메틸파라벤.....0.8 mg
- <103> 프로필파라벤.....0.1 mg
- <104> 주사용 멸균증류수.....적량
- <105> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 방법으로 2ml로 한 후, 2ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조한다.

<106> **제제에 2. 정제의 제조**

- <107> 실시예 1의 자색고구마 색소 추출.....200 mg
- <108> 유당.....100 mg
- <109> 전분.....100 mg
- <110> 스테아린산 마그네슘.....적량
- <111> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<112> **제제에 3. 캡슐제의 제조**

- <113> 실시예 1의 자색고구마 색소 추출물.....10 mg
- <114> 유당.....50 mg
- <115> 전분.....50 mg
- <116> 탈크.....2 mg
- <117> 스테아린산 마그네슘.....적량
- <118> 상기의 성분을 혼합하고 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<119> **제제에 4. 액제의 제조**

- <120> 실시예 1의 자색고구마 색소 추출물.....1000 mg
- <121> 설탕.....20 g
- <122> 이성화당.....20 g
- <123> 레몬향.....적량
- <124> 정제수를 가하여 전체 1000ml 로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

<125> 제제에 5. 건강 식품의 제조

<126>	실시에 1의 자색고구마 색소 추출물	1000 mg
<127>	비타민 혼합물	적량
<128>	비타민 A 아세테이트	70 μ g
<129>	비타민 E	1.0 mg
<130>	비타민 B1	0.13 mg
<131>	비타민 B2	0.15 mg
<132>	비타민 B6	0.5 mg
<133>	비타민 B12	0.2 mg
<134>	비타민 C	10 mg
<135>	비오틴	10 μ g
<136>	니코틴산아미드	1.7 mg
<137>	엽산	50 mg
<138>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<139>	무기질 혼합물	적량
<140>	황산제1철	1.75 mg
<141>	산화아연	0.82 mg
<142>	탄산마그네슘	25.3 mg
<143>	제1인산칼슘	15 mg
<144>	제2인산칼슘	55 mg
<145>	구연산칼슘	90 mg
<146>	탄산칼슘	100 mg
<147>	염화마그네슘	24.8 mg

<148> 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

<149> 제제에 6. 건강 음료의 제조

<150>	실시에 1의 자색고구마 색소 추출물	1000 mg
<151>	구연산	1000 mg
<152>	올리고당	100 g
<153>	매실농축액	2 g
<154>	타우린	1 g
<155>	정제수를 가하여 전체	900 ml

<156> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 밀균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 밀균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<157> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층이나,

수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비율 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과

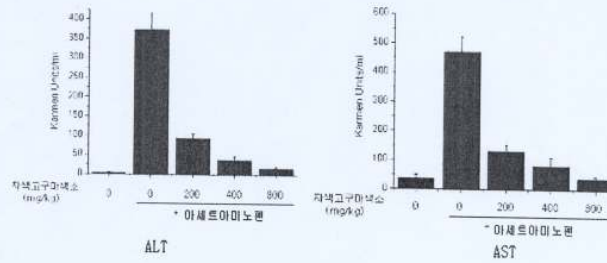
<158> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 자색고구마 색소 추출물은 아세트아미노펜과 같은 외부 물질에 의해 손상된 간세포를 회복시키는 작용을 나타내어, 간 질환의 예방 또는 치료용 조성물로, 독성이 없는 천연약제로 구성된 의약품 및 건강기능식품으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

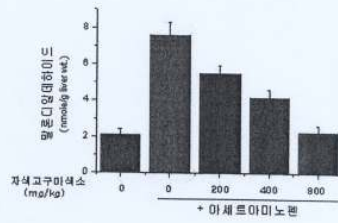
- <1> 도 1은 자색고구마 색소 추출물이 간 손상 유발물질(아세트아미노펜)에 의해 손상된 간의 보호효과를 ALT와 AST의 활성으로 나타낸 도이며,
- <2> 도 2는 자색고구마 색소 추출물을 처리한 실험동물의 간의 지질과산화 수준을 나타낸 도이고,
- <3> 도 3은 자색고구마 색소 추출물을 처리한 실험동물의 간 조직 내 글루타티온 양을 나타낸 도이며,
- <4> 도 4는 자색고구마 색소 추출물을 처리한 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜 내의 시토크롬 P450 1A1 효소의 활성을 나타낸 도이고,
- <5> 도 5는 자색고구마 색소 추출물을 처리한 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜 내의 시토크롬 P450 2E1 효소의 활성을 나타낸 도이며,
- <6> 도 6은 자색고구마 색소 추출물을 처리한 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜을 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 도이고,
- <7> 도 7은 정상 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜 내의 세포의 활성실험(in vitro)에서의 시토크롬 P450 1A1 효소의 활성에 대한 자색고구마 색소 추출물의 영향을 나타낸 도이며,
- <8> 도 8은 시토크롬 P450 1A1 효소를 유도하는 베타-나프타플라본을 처리한 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜에서 세포의 활성실험에서의 자색고구마 색소 추출물의 시토크롬 P450 1A1 효소의 활성 저해 효과를 나타낸 도이고,
- <9> 도 9는 정상 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜 내의 세포의 활성실험에서의 시토크롬 P450 2E1 효소의 활성에 대한 자색고구마 색소 추출물의 효소 활성 억제 효과를 나타낸 도이며,
- <10> 도 10은 시토크롬 P450 2E1 효소를 유도하는 페리딘을 처리한 실험동물의 간에서 분리한 마이크로솜에서 세포의 활성실험에서의 자색고구마 색소 추출물의 시토크롬 P450 2E1 효소의 활성 저해 효과를 나타낸 도이고,
- <11> 도 11은 자색고구마 색소 추출물을 처리한 간에서 분리한 마이크로솜 내의 글루타티온-S-트랜스페라제 효소활성을 나타낸 도이다.

도면

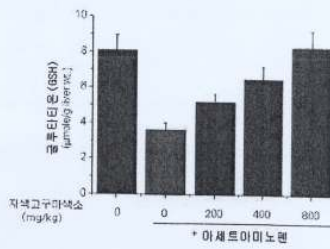
도면1



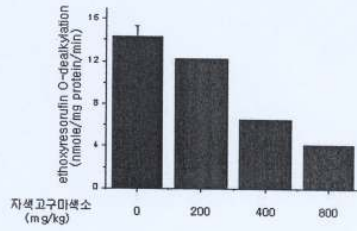
도면2



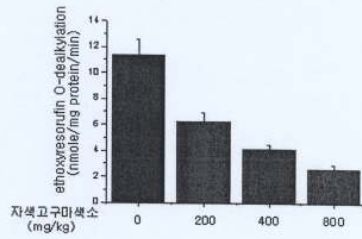
도면3



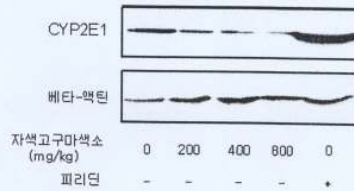
도면4



도면5



도면6





(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년09월19일
(11) 등록번호 10-0760263
(24) 등록일자 2007년09월13일

(51) Int. Cl.

A23L 2/02 (2006.01) A23L 2/04 (2006.01)
A23L 2/38 (2006.01) A23L 2/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0002977

(22) 출원일자 2007년01월10일

심사청구일자 2007년01월10일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020000072066 A

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

함양군

경남 함양군 함양읍 윤림리 31-2

진주국제대학교 산학협력단

경남 진주시 문산읍 상문리 산 270

(72) 발명자

정영철

경상남도 진주시 하대2동 하대현대아파트 101동

2007호

강신권

경상남도 진주시 상대2동 307-4 흥환아파트

101-805

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

고영희

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김계현

(54) 자미고구마를 주요성분으로 함유하는 음료조성물의제조방법

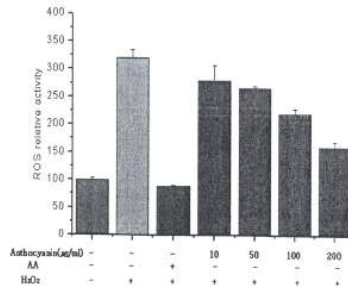
(57) 요약

본 발명은 자미고구마를 세절하는 세절단계; 추출용매로 에탄올을 첨가하여 추출하는 추출단계; 상기 추출액을 여과하고 자연순환 농축을 하는 여과 및 농축단계; 상기 농축액의 안토시아닌 색소의 안정화를 위하여 렉트린을 혼합하며 농도를 조절하는 색소 안정화 단계; 상기 색소 안정화 단계를 거친 농축액 40-50중량%에 오미자당 원출액 2-6중량%, 사과농축액 3-7 중량%, 울리고당 25-35중량%를 첨가하여 용해시키는 1차 혼합단계; 및, 상기 1차 혼합물에 정백당 8-12중량%, 구연산 0.2-0.6중량%, 향미료(flavor) 0.2-0.4중량%를 혼합하는 2차 혼합단계로 구성되는 자미고구마를 주요성분으로 함유한 음료 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명은 자색고구마의 교배종인 자미고구마의 안토시아닌의 항산화 활성 및 간기능 개선 효과를 확인하여 이를 음료조성물의 주요성분으로 사용함으로써 노화억제 및 간 기능 개선 효과 등 기능성을 유지하면서도 천연물을 사용하여 독성 등 부작용이 없으며, 농민산물의 부가가치 향상에 도움을 줄 수 있는 음료 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 각 조성물의 가장 바람직한 조성비를 제공함으로써 기호도, 색, 냄새, 맛에서 우수한 기능성 음료를 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

전성식

경상남도 진주시 금산면 장사리 금산홍환아파트
106-505

전은우

경남 진주시 금산면 장사리 905-1 복진주아이파크
105-305

황영정

경남 김해시 장유면 부곡리 월산마을 부영13차
103-901호

우정부

경남 하동군 화개면 용강리 445번지

강동민

경남 진주시 주악동 156 한주럭키아파트 7-1304호

진순우

경남 진주시 하대동 317-18번지

우정도

경남 하동군 화개면 용강리 445번지

김혜란

경남 진주시 상대동 246-6번지 201호

송원영

경남 진주시 상봉동 1030-27번지

(56) 선행기술조사문헌

KR1020010073395 A

KR10219980053132 A

논문(2006년)

특허청구의 범위

청구항 1

자미고구마를 세절하는 세절단계;

추출용매로 에탄올을 첨가하여 추출하는 추출단계;

상기 추출액을 여과하고 자연순환 농축을 하는 여과 및 농축단계;

상기 농축액의 안토시아닌 색소의 안정화를 위하여 텍스트린을 혼합하며 농도를 조절하는 색소 안정화 단계;

상기 색소 안정화 단계를 거친 농축액 40-50중량%에 오미자당 침출액 2-6중량%, 사과농축액 3-7 중량%, 울리고당 25-35중량%를 첨가하여 용해시키는 1차 혼합단계; 및

상기 1차 혼합물에 정백당 8-12중량%, 구연산 0.2-0.6중량%, 향미료(flavor) 0.2-0.4중량%를 혼합하는 2차 혼합단계;

로 구성되는 자미고구마를 주요성분으로 함유하는 음료 조성물의 제조방법.

청구항 2

제1항에서,

상기 추출단계는 20% 에탄올을 원료대비 5-10배로 첨가하여 냉각추출장치로 30-40℃에서 4-5시간 추출하는 것을 특징으로 하는 자미고구마를 주요성분으로 함유하는 음료 조성물의 제조방법.

청구항 3

제1항에서,

상기 여과 및 농축단계는 진동스크린에 의한 1차 여과 및 마이크로 필터에 의한 2차 여과단계를 거치는 것을 특징으로 하고,

40-50℃에서 자연순환 농축을 실시하여 자미고구마 추출액의 농도가 30-50Brix가 되도록 농축하는 것을 특징으로 하는 자미고구마를 주요성분으로 함유하는 음료 조성물의 제조방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에서,

상기 색소 안정화 단계는 텍스트린을 혼합하여 50-60 Brix로 농도를 조정하는 것을 특징으로 하는 자미고구마를 주요성분으로 함유하는 음료 조성물의 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> 본 발명은 자미고구마를 주요성분으로 한 음료 조성물의 제조방법에 관한 것으로, 자미고구마 추출액, 오미자당 침출액, 사과농축액, 울리고당 등을 포함하여 제조되는 것을 특징으로 한다.
- <3> 자미고구마란 자색고구마의 교배종으로서 농촌진흥청이 1993년부터 가공용 다수성 토종 고구마 품종인 건미와 안토시아닌 색소를 많이 함유하고 있는 일본종 야마게와무라시게를 인공 교배하여 개발한 것으로서, 자미 목포 29호, 보라미 목포 35호, 신자미 목포 38호의 3종이 있다. 이들은 1996년부터 2001년까지 전남과 경남에서 지역 적응시험을 완료한 후 자미 목포 29호는 기능성 식품 가공용 소재로, 보라미 목포 35호는 생식 및 가공용 소재로, 신자미 목포 38호는 천연색소 가공용 소재로 사용하는 것을 목표로 농가에 보급하고 있는 우량 품종이다.
- <4> 자색고구마는 고구마 고유의 당질과 섬유소뿐만 아니라 자색고구마가 다량 함유하고 있는 안토시아닌 색소는 항

산화, 항암, 간보호 활성 등의 효능이 있는 것으로 보고되고 있어 기능성 식품의 소재로서 활용가치가 높을 것으로 기대되고 있다. 자색고구마의 안토시아닌 색소는 caffeic acid와 ferulic acid 등과 아실화된 상태로 존재하기 때문에 다른 식물체에서 분리된 안토시아닌 색소에 비하여 중성 및 약산성, 그리고 빛에 대하여 안정성이 높고, 항산화 활성도 높은 것으로 나타나 그 활용가치가 높다고 할 수 있다.

- <5> 한편 오미자는 목련과의 낙엽성 덩굴식물로 한국, 사할린, 아무리지방, 중국, 일본 등지에 분포하고 있으며, 줄기는 가지에서 드문드문 나고 자루가 달린 잎이 어긋난다. 이의 열매를 말려 겹게 만든 것을 오미자라고 부르며, 한방에서는 진해, 강장, 흥분, 지사·지한제로서 천해, 도한, 음위, 파로, 신경계 질환의 치료에 사용하여 왔다.
- <6> 그리고, 사과는 수분이 약 86-87%를 차지하며, 주성분은 탄수화물로 단백질과 지방질 함량이 비교적 적고 비타민 A와 C, 칼슘, 칼륨, 나트륨 등 무기질의 함량은 다른 식품에 비하여 비교적 다량 함유하고 있는 알칼리성 식품에 속한다. 이의 주요 성분은 유기산과 펙틴, 당분이다. 당질은 품종에 따라 다소 차이가 있으나 약 10-15%이며, 대부분이 과당과 포도당으로 인체에 흡수가 잘된다. 유기산은 0.5% 가량 들어있으며 주로 사과산이 대부분을 차지하고 있으며 구연산, 주석산 등도 함유한다. 특히 이들 유기산은 인체에 쌓인 피로물질을 제거하는데 효과적이다.
- <7>
- <8> 한편, 자색고구마의 안토시아닌 색소의 항산화 효과 등에 대한 연구가 보고되고 있으나 이를 포함한 노화억제 및 간기능 개선을 위한 기능성 식품조성물에 대한 개발의 예는 드물다. 특히 자색고구마의 교배종인 자미고구마를 이용한 항산화 효과에 의한 노화억제 및 간 기능 개선을 위한 식품조성물의 개발 예가 없는 바 손쉽게 응용이 가능한 음료의 형태로 항산화 효과, 간기능 개선 등의 기능성을 지니면서도 수요자의 기호를 만족하는 음료의 개발이 요구되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <9> 본 발명은 상술한 것과 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 항산화 활성 및 간기능 개선 효과가 있는 자미고구마 추출물을 주요성분으로 함유하면서도 맛, 색, 향에서 우수한 기호성이 높은 음료 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <10> 상기와 같은 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 자미고구마를 세절하는 세절단계; 추출용매로 에탄올을 첨가하여 추출하는 추출단계; 상기 추출액을 여과하고 자연순환 농축을 하는 여과 및 농축단계; 상기 농축액의 안토시아닌 색소의 안정화를 위하여 텍스트린을 혼합하며 농도를 조절하는 색소 안정화 단계; 상기 색소 안정화 단계를 거친 농축액 40-50중량%에 오미자당 침출액 2-6중량%, 사과농축액 3-7 중량%, 울리고당 25-35중량%를 첨가하여 용해시키는 1차 혼합단계; 및, 상기 1차 혼합물에 정백당 8-12중량%, 구연산 0.2-0.6중량%, 향미료(flavor) 0.2-0.4중량%를 혼합하는 2차 혼합단계로 구성되는 자미고구마를 주요성분으로 함유한 음료 조성물의 제조방법을 제공한다.
- <11> 또한 본 발명은 바람직하게는 추출단계는 20% 에탄올을 원료대비 5-10배로 첨가하여 냉각추출장치로 30-40℃에서 4-5시간 추출하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 여과 및 농축단계는 진동스크린에 의한 1차 여과 및 마이크로 필터에 의한 2차 여과단계를 거치는 것을 특징으로 한다. 또한, 40-50℃에서 자연순환 농축을 실시하여 자미고구마 추출액의 농도가 30-50Brix가 되도록 농축하는 것을 특징으로 한다. 그리고, 상기 색소 안정화 단계는 텍스트린을 혼합하여 50-60 Brix로 농도를 조정함이 바람직하다.
- <12> 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기술함으로써, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <13> (1) 자미고구마 선별 및 전처리 공정 - 세절단계
- <14> 냉장 저장된 상태의 자미고구마의 이물질을 제거한 다음 물로 깨끗이 세정하고 추출이 용이하도록 직경2-3cm, 두께 3-5mm내외로 세절한다.
- <15> (2) 추출, 여과 및 농축 공정
- <16> - 자미고구마의 추출단계
- <17> 상기 공정에서 얻어진 재료를 추출장치에 넣고 추출용매로 추출한다. 이때 추출용매로 20% 에탄올을 원료대비

10배를 첨가하여 냉각추출 장치로 30℃에서 4 시간 이상 추출한다. 이때 바람직하게는 에탄올은 원료대비 5-10 배로 사용하고, 추출온도는 30-40℃, 추출시간은 4-5시간으로 하는 것이 바람직하다.

- <18> - 여과 및 농축단계
- <19> 상기 추출액을 진동스크린에 의해 1차 여과하고 마이크로필터에 의해 2차 여과한다. 이때 여과된 액은 고형물 함량 7.2Brix로 pH는 3.3, 적자색을 띤다. 여과된 추출액을 40-50℃에서 자연순환 농축을 실시하여 고형물 최적 농도가 30-50 Brix가 되도록 농축, 조절한다.
- <20> (3) 색소안정화 공정
- <21> 상기 농축액의 안토시아닌 색소를 안정화시키기 위하여 덱스트린(DE50)을 혼합하여 고형분이 50-60 Brix가 되도록 농도를 조정한다.
- <22> (4) 1차 및 2차 혼합공정
- <23> 상기 공정을 통해 얻어진 농축액 40-50중량% 오미자당침출액 2-6 중량%, 사과농축액 3-7 중량%, 울리고당 25-35 중량%를 첨가하여 완전 용해시킨다. 이때, 오미자당 침출액은 20-25 Brix의 것을 사용하고, 사과농축액은 60-65 Brix의 것을 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 음료의 기호성과 기능성을 증대시키기 위해 정백당 8-12중량%, 구연산 0.2-0.6중량%, 향미료(flavor) 0.2-0.4중량%를 첨가하여 용해시킨다. 상기 조성비는 제조된 음료 조성물의 기호성, 색깔, 향 등의 기호도를 고려한 최적의 조성비이다.
- <24> 이때 상기 자미고구마 추출물 농축액은 원액역상제품으로 제조시에는 상기 50-60 Brix의 것을 그대로 사용하나, 통상의 음료제품으로 제조시에는 상기 자미고구마 추출물 농축액에 정제수를 가하여 20-25 Brix로 희석하여 사용한다.
- <25> (5) 포장 및 살균공정
- <26> 상기 공정을 통해 얻어진 혼합액을 파우치형 포장기에 40g씩 자동포장하여 밀봉한다. 밀봉된 용기를 자동살균기를 통해 살균한 다음 진동에 냉각하여 내용물의 온도를 신속히 감소시키고 포장한다.
- <27> 실시예 1. 본 발명의 음료 조성물의 기호도 테스트
- <28> 본 발명의 음료 조성물에 대한 기호도를 테스트하기 위하여 먼저 다음과 같이 음료를 제조하였다.
- <29> 즉 상기와 같이 추출단계 및 여과, 색소 안정화 단계를 거친 자미고구마 추출액(60Brix)에 정제수를 가하여 25 Brix로 희석하였다. 그리고 희석된 자미고구마 농축액 45중량%에 오미자당 침출액 5중량%, 사과농축액 5중량%, 울리고당 33중량%, 정제당 11중량%, 구연산 0.6중량%, 향미료 0.4중량%를 혼합하였다. 이때, 자미고구마 농축액에 오미자당 침출액, 사과농축액, 울리고당을 먼저 첨가해 용해시킨 후, 다시 이에 정백당, 구연산, 향미료(flavor)를 첨가하여 용해시켰다. 오미자당 침출액 및 사과농축액은 각각 25Brix와 65Brix로 시중유통제품을 구입하여 사용하였다.
- <30> 상기의 음료에 대한 관능검사는 관능요원 20명(20-23세)을 대상으로 하여 기호도, 색깔, 냄새, 맛의 4항목을 기준으로 수행하였다. 제조된 음료에 대한 관능은 10점 스케일의 기호도 검사법으로 평가하였으며 그 평가 결과는 다음과 같다.

<31> <표 1>

관능항목	기호성	색깔	냄새	맛
제조된 음료	8.9	9.6	8.3	8.9

- <33> 아주나쁨: 0점, 보통: 5점, 아주좋음: 10점
- <34> 상기 표 1과 같이 평가 결과 각 항목에서 모두 8점 이상으로 평가되어 기호성, 색깔, 냄새, 맛에서 모두 우수한 것으로 나타났으며, 이에 제품화가 가능한 것으로 확인되었다.
- <35> 실시예 2. 자미고구마의 안토시아닌 색소의 항산화 활성 시험.
- <36> 본 발명의 자미고구마를 주요성분으로 함유한 음료 조성물의 항산화 효과를 조사하기 위하여 자미고구마의 안토시아닌 색소의 항산화 활성을 다음과 같이 시험하였다. 시험에 사용한 안토시아닌 색소는 실시예 1과 같이 20%로 에탄올을 원료대비 10배 첨가하여 냉각추출장치에서 30℃에서 4시간 이상 추출한 자미고구마 추출액에서 용

상의 방법으로 분리한 것이다.

- <37> 지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 자유 라디칼(free radical)을 소거함으로써 항산화제로 작용하는 물질은 자유 라디칼(free radical)인 BHA와 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 하이드라진(hydrazine) 형태로 환원시키는 능력을 조사함으로써 검색할 수 있다.
- <38> 이에 BHA 방법과 DPPH 방법을 이용하여 자미고구마 유래 안토시아닌 free radical 소거능을 확인하였으며, 그 결과는 표 2와 같다. 표 2와 같이 DPPH의 경우 vitamin C의 1/2정도의 항산화 능을 보였으며, BHA를 이용한 항산화 작용은 vitamin C와 거의 동일한 정도의 높은 항산화 효능을 볼 수 있었다.

<39> <표 2>

Compounds	SC50 ^a values(mM)	
	DPPH ^b	Superoxide radical ^c
자미고구마유래안토시아닌	0.18	0.18
BHA ^d	0.12	0.25
비타민 C	0.10	0.21

- <41> a: SC50 values, 활성산소종(reactive oxygen species)을 50%까지 배출하는 시료의 농도. b: DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. c: 크산틴 산화반응에 의해 크산틴으로부터 배출되는 초과산화물 라디칼(superoxide radical). d: BHA, 3-t-butyl-4-hydro xyanisole.
- <42> 한편, 최근에 차세대 질병예방과 건강지원 자원의 관리형 진단 마커로 큰 관심을 모으고 있는 것이 자유 라디칼(free radical)에 의한 산화적 스트레스와 이를 방어하는 항산화 작용으로 산소는 여러 요인들에 의하여 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다. 또한 이들 활성산소에 의한 지질과산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 체내에서 생성되는 과산화물도 세포에 대한 산화적 스트레스를 유발하여 각종 기능장애를 야기함으로써 노화와 질병의 원인이 되기도 한다.
- <43> 이에 상기 자미고구마의 안토시아닌 색소의 항산화 효과가 동물세포를 이용한 항산화 실험에서도 동일하게 효과를 나타내는지 알아보기 위하여, 대식세포를 이용하여 활성산소종(ROS)을 측정하였다. 측정결과, 도 1과 같이 과산화수소(H₂O₂)에 의해 증가한 ROS의 값이 자미고구마의 안토시아닌 색소의 농도에 의존해 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 도 1에서 AA는 비타민 C를 나타낸다.
- <44> 실시예 3. 자미고구마의 안토시아닌 색소의 간기능 개선 효과 시험
- <45> 본 발명의 자미고구마를 주요성분으로 함유한 음료 조성물의 간기능 개선 효과를 조사하기 위하여 자미고구마의 안토시아닌 색소의 항산화 활성을 다음과 같이 시험하였다. 사용한 안토시아닌 색소는 실시예 2와 같이 준비하였다.
- <46> 시험은 자미고구마에서 분리한 안토시아닌 색소를 이용하여 일차 간세포를 배양하여 t-BHP에 의한 간세포의 독성에 의한 LDH, MTT에 대한 영향 및 tBHP에 의해 유발된 간세포 손상에 대한 자미고구마의 안토시아닌 색소의 보호효과를 조사하는 것으로 이루어졌다. 즉 6시간 동안 t-BHP는 250 μM로, 안토시아닌 색소는 각각 200, 400, 또는 800 μg/ml의 농도로 처리하여 LDH 및 MTT assay로 산출하였다.
- <47> 시험 결과, 표 3과 같이 산화적 손상을 유발하는 화학물질에 의해 손상된 간세포로부터 유리되는 Lactate dehydrogenase(LDH) 효소 활성 측정에서 안토시아닌을 투여한 군들에서는 투여 농도에 의존적으로 LDH 효소 활성이 감소하였다. 또한 세포 증식(Cell proliferation)과 세포독성(cytotoxicity)을 in vitro 상에서 분석하는 매우 유용한 MTT 법에서는 측정된 결과 t-BHP에 의해 유도된 간세포 독성은 안토시아닌 색소의 처리 농도에 의존적으로 보호되었다.

<48> <표 >

<49>

농도 (<i>ug/ml</i>)	LDH release (% of t-BHP)	MTT (% of control)
대조군	32±6.7	100±7.3
안토시아닌 800	39±4.3	96±12
t-BHP(250 μ M)	100±8.8	34±3.8
안토시아닌 200 + t-BHP	87±6.4	65±8.4
안토시아닌 400 + t-BHP	55±7.2	83±10
안토시아닌 800 + t-BHP	42±5.3	92±11

<50> 상기에서 각 수치는 3중으로 수행된 3개의 독립적 실험의 평균 \pm S.D를 나타낸다.

발명의 효과

<51> 이상에서와 같이, 본 발명은 자색고구마의 교배종인 자미고구마의 안토시아닌의 항산화 활성 및 간기능 개선 효과를 확인하여 이를 음료조성물의 주요성분으로 사용함으로써 노화억제 및 간 기능 개선 효과 등 기능성을 유지하면서도 천연물을 사용하여 독성 등 부작용이 없으며, 농민산물의 부가가치 향상에 도움을 줄 수 있는 음료 조성물을 제공한다.

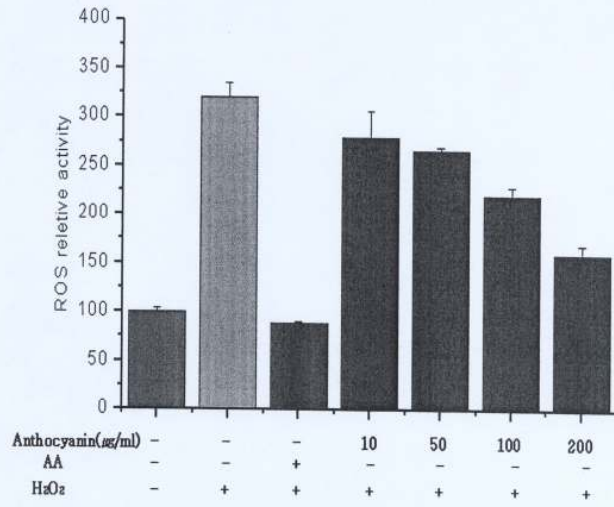
<52> 또한 본 발명은 각 조성물의 가장 바람직한 조성비를 제공함으로써 기호도, 색, 냄새, 맛에서 우수한 기능성 음료를 제공한다.


도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 자미고구마의 안토시아닌 색소의 대식세포를 이용한 항산화능을 시험한 결과를 나타내는 그래프이다.

도면

도면1



	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호 10-2008-0006328
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자 2008년01월16일
(51) Int. Cl. A23L 1/16 (2006.01) A23L 1/162 (2006.01)		(71) 출원인 진주국제대학교 산학협력단 경남 진주시 문산읍 상문리 산 270
(21) 출원번호 10-2006-0065388 (22) 출원일자 2006년07월12일 심사청구일자 2006년07월12일		(72) 발명자 표재호 경남 함양군 휴천면 송전리 770 성낙주 경남 진주시 주약동 156 한주럭키아파트 7동 403호 (뒷면에 계속)
		(74) 대리인 고영희

전체 청구항 수 : 총 4 항

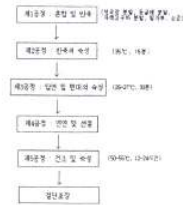
(54) 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (a)청국장 분말, 등굴레 분말과 밀가루를 포함하는 국수가루를 혼합하고, 염수를 첨가해 반죽하는 단계; (b)상기 반죽물을 진공포장하여 1차 숙성하는 단계; (c)상기 1차 숙성된 반죽물을 압연롤러로 면대를 형성하는 단계; (d)상기 면대를 2차 숙성하는 단계; (e)상기 2차 숙성된 면대를 연면하고 신질하는 단계; 및 (f)상기 신질된 면대를 건조하는 단계를 포함하는 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법을 제공한다. 상세하게는 본 발명은 상기 (b)단계는 35℃로 15분간 행하며; 상기 (d)단계는 26-27℃에서 30분간 행하며; 상기 (f)단계는 50-55℃에서 12-24시간 동안 건조와 동시에 3차 숙성하는 단계를 더 포함하며, 상기 청국장 분말은 중량비상 국수가루의 2 내지 6%를 특징으로 하고, 상기 등굴레 분말은 중량비상 국수가루의 1 내지 3%를 특징으로 하는 국수의 제조방법을 포함한다. 또한 더욱 상세하게는 중량비상 국수가루의 2 내지 5%의 비율로 자색고구마 분말을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법을 제공한다.

본 발명에 의해 제조된 국수는 영양성분이 우수한 청국장 분말을 함유하고 있으면서도 청국장 특유의 냄새가 거의 나타나지 않으며, 영양 면에서 우수한 등굴레 분말을 포함한다. 또한, 천연 자색소를 포함하여 시각적인 면에서 기호도가 높으며 맛, 감촉, 전체적인 기호도에서 선호도가 높다.

대표도 - 도1



공개특허 10-2008-0006328

(72) 발명자
정영철
경남 진주시 하대동 101 현대아파트 101-2007

황영정
경남 김해시 장유면 무곡리월산마을 부영13차 103
동 901호

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 청국장 분말, 등골래 분말, 밀가루를 포함하는 국수가루를 혼합하고, 염수를 첨가해 반죽하는 단계;
- (b) 상기 반죽물을 진공포장하여 1차 숙성하는 단계;
- (c) 상기 1차 숙성된 반죽물을 압연롤러로 면대를 형성하는 단계;
- (d) 상기 면대를 2차 숙성하는 단계;
- (e) 상기 2차 숙성된 면대를 연연하고 선질하는 단계; 및
- (f) 상기 선질된 면대를 건조하는 단계를 포함하는 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법.

청구항 2

제1항에서,

상기 (b)단계는 35℃에서 15분간 행하여지며;

상기 (d)단계는 26-27℃에서 30분간 행하여지며;

상기 (f)단계는 50-55℃에서 12-24시간 동안 건조와 동시에 3차 숙성하는 단계를 더 포함하며;

상기 청국장 분말은 중량비상 국수가루의 2 내지 6%를 특징으로 하고;

상기 등골래 분말은 중량비상 국수가루의 1 내지 3%를 특징으로 하는 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에서,

상기 청국장 분말과 상기 등골래 분말의 중량비는 바람직하게는 2 : 1인 것을 특징으로 하는 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에서,

상기 국수가루는 중량비상 국수가루의 2 내지 5%의 비율로 자색고구마분말을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <3> 본 발명은 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법에 대한 것이다.
- <4> 청국장은 우리나라 전통 장류의 하나로 그 기록은 역사적으로 고구려까지 거슬러 올라간다. 이는 간장, 된장, 고추장의 다른 전통 장류와 달리 콩을 삶아서 소금을 넣지 않고 고온에서 숙성으로 발효시킨 식품이다. 청국장은 볶김에 붙어있는 고초균이라고 부르는 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)를 이용하여 발효시킨 것으로 발효과정에서 특유의 맛과 강한 냄새가 발생한다.
- <5> 청국장은 표 1과 같이 우수한 영양성분을 함유하는 것으로 알려져 왔다.

<6> <표 1>

<7>

청국장(100g당)의 성분				
성분	미네랄		비타민	아미노산
수분	55g	칼슘 217mg	비타민 B ₁ 0.16mg	트립토판 0.22g
열량	212kcal	철 8.6mg	비타민 B ₂ 0.56mg	트레오닌 0.81g
단백질	17.7g	마그네슘 115mg	니아신 1.1mg	이소류신 0.93g
지질	11g	인 174mg	판토텐산 0.21mg	류신 1.5g
당질	14.3g	소듐 7mg	비타민 B ₆ 0.13mg	리신 1.14g
섬유질	5.4g	포타슘 790mg	엽산 8μg	에티오닌 0.2g
회분	1.9g	아연 3mg	비타민 B12 0.32μg	시스틴 0.22g
		구리 0.6mg	비타민 E 0.01mg	페닐알라닌 0.94g
		망간 1.5mg	비타민 K 870μg	티로신 0.55g
		셀레늄 8.8μg		발린 1.01g
				아르기닌 0.9g
				히스티딘 0.51g
				알라닌 0.79g
				아스파르트산 1.95g
				글루탐산 3.33g
				글리신 0.64g
				프로린 1.4g
				세린 1.12g
청국장의 지방산 조성비(%)				
			53.8%	
			21.2%	
			12.4%	
			9.0%	
			3.7%	

<8> 이에 종래에는 청국장을 주로 찌개의 재료로 사용하여 왔으나, 최근에는 청국장의 풍부한 영양성분이 주목을 받으며, 청국장완, 청국장 가루 등으로 제조되어 건강식품으로서 주목받고 있다.

<9> 그러나 청국장은 특유의 냄새로 인해 현대인의 기호에 맞지않는 문제점이 있는바, 발효 식품 특유의 냄새는 없으면서 청국장의 영양분을 간편히 한끼 식사로서 섭취할 수 있는 방안이 요구되었다.

<10> 한편, 사회생활의 구조가 산업화됨에 따라 식생활 양식도 변화하며 면류의 이용 비중이 커지게 되었다. 이 중국수는 비교적 제조방법이 간단하고 여러 요리에 사용될 수 있다. 이에 현대인의 기호를 만족할 수 있도록 영양이 우수하고, 색상, 맛에서 우수한 국수제품의 개발이 요구되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<11> 상술한 종래의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명의 목적은 영양이 우수한 청국장 가루를 포함하면서도 발효 식품 특유의 냄새는 없는 국수의 제조방법을 제공하는 것이다.

<12> 또한, 색상에서 현대인의 기호를 만족할 수 있도록 천연 자색소를 포함하는 국수의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<13> 본 발명은 (a)청국장 분말, 등글레 분말과 밀가루 중력분을 포함하는 국수가루를 혼합하고, 염수를 첨가해 반죽하는 단계; (b)상기 반죽물을 진공포장하여 1차 숙성하는 단계; (c)상기 1차 숙성된 반죽물을 압연롤러로 면대를 형성하는 단계; (d)상기 면대를 2차 숙성하는 단계; (e)상기 2차 숙성된 면대를 연연하고 선결하는 단계; 및 (f)상기 선결된 면대를 건조하는 단계를 포함하는 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법을 제공한다. 상세하게는 본 발명은 상기 (b)단계는 35℃로 15분간 행하며; 상기 (d)단계는 26-27℃에서 30분간 행하며; 상기 (f)단계는 50-55℃에서 12-24시간 동안 건조와 동시에 3차 숙성하는 단계를 더 포함하며, 상기 청국장 분말은 중량비상 국수가루의 2 내지 6%임을 특징으로 하고, 상기 등글레 분말은 중량비상 국수가루의 1 내지 3%임을 특징으로 하는 국수의 제조방법을 포함한다. 또한 더욱 상세하게는 중량비상 국수가루의 2 내지 5%의 비율로 자색고구마 분말을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 청국장 분말을 포함하는 국수의 제조방법을 제공한다.

<14> 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 기술함으로써, 본 발명을 상세히 설명한다.

<15> 도 1은 본 발명의 청국장 분말 및 자색고구마의 천연 자색소를 함유하는 국수의 제조공정도이다.

- <16> **재료배합**
- <17> 밀가루, 청국장 분말, 등글레 분말, 자색고구마 분말, 소금을 혼합하는데, 청국장 분말은 전체 국수가루 중량비의 2 내지 6%이고, 등글레 분말은 1 내지 3%이며, 자색고구마 분말은 2 내지 5%이며, 소금은 2%인 경우가 바람직하다. 소금 함량은 소비자의 기호에 맞추어 조절될 수 있다. 더욱 바람직하게는 청국장 분말과 등글레 분말의 비가 2 : 1인 경우가 바람직하다.
- <18> 등글레 분말을 혼합함으로써 등글레 향이 청국장 특유의 냄새를 감싸게 되어 청국장 특유의 냄새가 나지않는 청국장 분말을 함유한 국수가 만들어진다. 청국장 분말과 등글레 분말의 비가 2 : 1인 경우가 청국장 특유의 냄새가 나지않도록 하는데 효과적이다. 등글레 분말은 또한 비타민 A, 배당체 등이 들어있는 것으로 알려져 있다.
- <19> 한편 자색 고구마는 천연 안토시아닌 색소를 다량으로 가지는바, 이 분말을 혼합하여 인공색소가 아닌 안전한 천연색소를 포함하면서 색감이 뛰어나고, 시각적으로 식욕을 일으키게 된다.
- <20> 밀가루 외의 청국장 분말, 등글레 분말, 자색고구마 분말의 비율이 높아지면 국수 본연의 쫄깃함을 감소시키고, 청국장 분말의 비율이 상기 제시된 것보다 낮은 경우 영양성분이 우수한 청국장 분말을 섭취하고자 하는 본연의 목적에서 벗어나며, 자색고구마 분말의 비율이 상기 제시된 것보다 낮은 경우에는 국수의 자색이 희미하여 색깔이 뛰어나지 않게 된다. 등글레 분말의 경우 비율이 상기 제시된 것보다 낮은 경우에는 청국장 특유의 냄새를 제거하지 못하게 된다.
- <21> **제1공정 : 혼합 및 반죽**
- <22> 본 공정은 상기의 청국장 분말, 등글레 분말, 자색고구마 분말과 밀가루를 포함하는 국수가루를 혼합하고, 여기에 소금 및 물을 첨가하여 반죽하는 단계이다. 소금함량은 소비자의 기호에 맞게 조절할 수 있다.
- <23> **제 2공정 : 반죽의 숙성(1차 숙성)**
- <24> 국수재료를 혼합하면서 15분 정도 반죽하여 자색고구마 분말의 자색이 잘 배이도록 함과 동시에 청국장 분말과 등글레 분말이 고루 섞이도록 한다. 고르지 못한 부분을 고르게 하기 위하여 서서히 교반하면서 숙성의 효과를 동시에 꾀한다. 온도는 35℃ 정도가 적당하다. 바람직하게는 진공반죽을 실시한다.
- <25> **제 3공정 : 압연 및 면대의 숙성(2차 숙성)**
- <26> 상기 숙성된 반죽을 압연 롤러로 밀어 최초의 면대를 형성시키는데, 쌍물에서 두 장의 면대를 형성하여 다시 한 장의 면대로 복합하여 면대를 만든다. 형성된 면대는 26-27℃에서 30분간 숙성시킨다.
- <27> **제 4공정 : 연연 및 선결**
- <28> 연연기는 물을 점차 눌러주면서 상기 숙성된 면대를 목격하는 두께로 만들어 낸다. 국수의 두께는 규격으로 결정하며, 이에 30cm 폭에 국수가라수가 25-30 가락인 경우가 소면, 18-23 가락인 경우가 중면에 해당한다. 원하는 면의 종류에 맞추어 선결한다.
- <29> **제 5 공정 : 건조 및 절단포장**
- <30> 국수제조에 가장 중요한 공정으로 50-55℃에서 12-24시간간 3차 숙성을 병행하면서 상기 선결한 면대를 건조한다. 이후 상기 건조된 국수를 절단하여 방향성의 폴리프로필렌(OPP, oriented Poly Propylene) 필름이나 종이 포장 등을 행한다.
- <31> **실시예**
- <32> 먼저 청국장 분말 250g(5%), 등글레 분말 125g(2.5%), 자색고구마 분말 100g(2%), 밀가루 4425g(88.5%) 및 정제염 100g(2%)을 혼합하고, 여기에 물을 첨가해 믹서기에 넣고 원료를 균일하게 혼합 반죽하였다. 15분간 진공 반죽을 실시하면서 35℃에서 숙성시켰다.
- <33> 상기 숙성된 반죽을 압연한 후 만들어진 면대를 26℃에서 30분간 2차 숙성시키고, 숙성된 면대는 다시 연연하고 소면으로 선결하였다. 제조된 소면은 다시 건조시키며 52℃에서 12시간 숙성시켜 국수를 제조하였다.
- <34> **관능검사**
- <35> 제조된 본 발명의 국수가 청국장 특유의 냄새가 있지 않은지, 맛과 색에서 우수한지를 10명의 패널을 선정하여

관능검사를 행하였다.

- <36> 도 2는 본 발명의 국수에 대한 관능검사표이다.
- <37> 각 평가는 맛, 색, 향, 면발의 감촉, 전체적인 기호도에 대해 이루어졌으며, 그 결과는 표 2에서 볼 수 있다.
- <38> <표 > 10점 기호척도법에 의한 관능평가

관능적 특성	평균(10점 만점 기준)
전체적인 맛에 대한 기호도	9.8
색에 대한 기호도	9.6
청국장 냄새의 강도	0.3
쫄깃한 정도	9.3
전체적인 기호도	9.68

- <40> 전체적인 맛에 대한 기호도는 평균 9.8점으로서 높은 선호도를 나타냈으며, 천연 자색소로 인한 국수의 색에 대한 기호도에서도 평균 9.6점으로 높게 나타났다.
- <41> 특히 청국장 냄새의 강도에 대한 평가에 있어서는, 10명의 패널 중 4명이 0점을 기록하였으며, 평균 0.3점의 매우 낮은 점수로 나타난바, 본 발명의 목적대로 본 발명에 의하여 제조된 청국장 분말 및 천연 자색소를 포함한 국수는 청국장 특유의 냄새가 거의 나타나지 않음을 볼 수 있다.
- <42> 국수 면발에 있어서도 평균 9.3점으로서 매우 쫄깃하다는 평가가 있었으며, 전체적인 기호도 면에서도 평균 9.68점으로 높은 선호도를 보였다.

발명의 효과

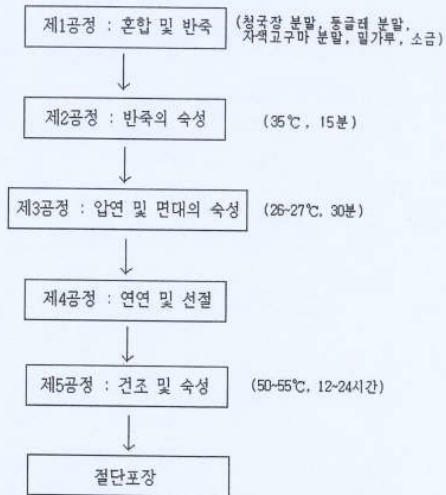
- <43> 상기와 같은 구성의 발명의 효과는 다음과 같다.
- <44> 첫째, 영양성분이 우수한 청국장 분말을 함유하고 있으면서도 청국장 특유의 냄새가 거의 나타나지 않는다.
- <45> 둘째, 영양 면에서 우수한 등글레 분말을 포함한다.
- <46> 셋째, 천연 자색소를 포함하여 시각적인 면에서 기호도가 높으며 맛, 감촉, 전체적인 기호도에서 선호도가 높다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 본 발명의 제조공정도이다.
- <2> 도 2는 본 발명에 대한 관능검사표 도면이다.

도면

도면1



도면2

청국장 자색국수에 대한 기호도

성명 :

일시 :

다음에 묘사된 청국장 자색국수의 특성별로 귀하가 느끼는 강도를 가장 잘 묘사하는 10단계 기호척도의 해당 위치를 표시해 주십시오.

1. 전체적인 맛에 대한 기호도 (점)

좋음	보통	나쁨
II-----II		II
10	5	0

2. 색에 대한 기호도 (점)

좋음	보통	나쁨
II-----II		II
10	5	0

3. 청국장 냄새의 강도 (점)

매우 강함	보통	매우 약함
II-----II		II
10	5	0

4. 풀것한 정도 (점)

좋음	보통	나쁨
II-----II		II
10	5	0

5. 전체적인 기호도 (점)

좋음	보통	나쁨
II-----II		II
10	5	0

주 의

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

자미구마의 유용생리활성을 활용한 가공식품 개발 및 산업화

농림부