

일반과제 과제번호 : 106041-03-3-CG000

검정콩 안토시아닌 특성 규명과 기능성식품 개발

Characterization of anthocyanin and development of
functional foods containing anthocyanin in black soybean

순천향대학교

농림수산식품자료실



0017076

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “검정콩 안토시아닌 특성 규명과 기능성식품 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 순천향대학교
총괄연구책임자 : 김 용 호
세부연구책임자 : 김 용 호
연 구 원 : 안 형 균
연 구 원 : 김 세 영
연 구 원 : 박 강 일
협동연구기관명 : 가천의과학대학교
협동연구책임자 : 이 혜 정
연 구 원 : 최 은 영
연 구 원 : 변 영 은
연 구 원 : 엄 지 은
협동연구기관명 : 경기도농업기술원
협동연구책임자 : 김 희 동
연 구 원 : 최 병 열
연 구 원 : 이 은 섭
연 구 원 : 지 정 현
연 구 원 : 이 재 홍
연 구 원 : 주 정 일

요 약 문

I. 제 목

검정콩 안토시아닌 특성 규명과 기능성식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국민소득이 증가됨에 따라 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며 최근에는 웰빙 바람과 함께 기능성 식품에 대한 요구도가 나날이 커지고 있다. 이런 추세에 따라 기능성 성분으로서 천연색소의 효과에 대한 연구도 늘어나고 있다. 천연색소 중 안토시아닌은 적색, 자색, 청색을 나타내는 수용성 flavonoid 계 색소이며 이들은 착색물질로서의 역할 뿐만 아니라 생체 내의 생리활성(항암, 항알러지, 항바이러스, 면역증강 등)에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 안토시아닌에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

우리나라에서 검정콩은 소위 '약콩'으로 불리며 혈액자양, 풍의 소통, 시력 증진, 두통치료 등에 효과가 있다고 하여 민간요법에 많이 활용되었으며, 최근에는 국내에서 검정콩을 주재료로 하는 건강기능성 식품들도 개발 보급되고 있다. 검정콩 종피에는 안토시아닌 색소가 함유되어 있는데 콩 품종간 항산화효과의 차이는 종피의 안토시아닌 함량과 높은 관련성이 있음을 보고된 바 있다.

따라서 본 연구는 검정콩 함유 고 기능성 안토시아닌(D3G, C3G)의 유전적·환경적 변이를 구명하는 한편 안토시아닌 색소를 이용한 건강식품을 개발함으로써 국내 검정콩 산업의 고부가가치화를 위한 기초 자료를 제공함을 최종 목표로 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 검정콩 천연색소의 유전적 변이 및 항산화 효과를 탐색하는 한편 검정콩의 천연색소를 추출 분리하여 기능성 식품을 개발함으로써 천연색소를 이용하는 신소재 개발 및 상품의 고부가가치화를 위한 기초 자료를 제공하고자 수행되었다. 따라서 제 1과제에서는 고부가가치 검정콩 유전자원 평가 및 육성에 관한 연구를 수행하였다. 먼저 검정콩 유전자원을 평가하여 D3G 및 C3G 고 함유 자원을 선발하는 한편, 이들을 교배하여 우수한 고부가가치 검정콩 품종 육성의 기초 자료를 제공하고자 하였다. 또한 재배 및 환경 조건에 따르는 안토시아닌 물질 함량 변화를 구명하기 위하여 재배 지역과 과종기에 따른 년차 변이를 분석하여 검정콩 함유 안토시아닌 함량의 환경 변이 특성을 구명하였다. 제2과제에서는 검정콩 안토시아닌 함량의 평가를 위하여 근적외선 분광광도계(NIRS)를 이용한 비파괴적, 신속 편이 기술을 개발함으로써 우수 품종 육성 및 품질 관리에 적용하고자 하였다. 또한 검정콩 안토시아닌의 기능성 효과를 *in vitro* 및 동물 식이실험을 통하여 검증하였다. 제3과제에서는 검정콩 안토시아닌을 이용한 건강기능성 식품을 개발함으로써 검정콩의 부가가치향상 및 농가의 수익 개선에 도움을 주고자 하였다.

IV. 연구개발 결과

1. 검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 및 환경변이 분석

안토시아닌 고함유 유전자원 선별을 위해 2006년부터 2008년까지 총 1,032점을 수집하여 개화기, 생리적 성숙기, 수확기, 백립중 및 총 안토시아닌 함량과 C3G, D3G, Pt3G 함량을 분석하였다. 수집된 유전자원의 총 안토시아닌 함량은 평균 11.67mg/g이었고 범위는 0.54~23.45mg/g으로 나타났다. 종류별로는 C3G가 평균 8.81mg/g로 비중이 가장 컸으며 그 다음이 D3G가 평균 1.78mg/g이었고 Pt3G가 평균 0.79mg/g으로 가장 적었다. 총 안토시아닌 함량별 수집종 분포는 10~15mg/g 범위가 371점으로 가장 많았고 20mg/g이

상인 유전자원은 30종이었다. 주요 농업형질에 따른 안토시아닌 함량은 개화기, 생리적 성숙기, 고숙기가 늦을수록 많았고 등숙일수가 길수록, 종실중이 무거울수록 많은 경향이였다. 따라서 백립중이 35g 이상이면서 안토시아닌 함량이 많은 유전자원을 육종소재로 F₂ 3249개체, F₁ 82립을 육성하여 세대진전 및 선발 후 안토시아닌 고함유 계통 및 품종육성 재료로 활용하였다.

환경조건에 따른 안토시아닌 함량은 지역, 품종 및 과중기 모두에 영향을 받는 것으로 나타났다. 종피의 색도와 안토시아닌 함량과의 상관관계를 분석한 결과 L(명도)과 b(적색도)값은 고 D3G, C3G 및 총 안토시아닌 함량과 고도의 부의 상관, a(적색도)값은 C3G와 총 안토시아닌 함량과 부의 상관관계를 보였다. 안토시아닌 함량과 기상요인의 관계를 분석한 결과, 일품검정콩과 청자콩이 평균기온 및 적산온도와 부의 상관, 평균일교차와는 정의 상관관계를 보였다. 따라서 안토시아닌 고함유 검정콩 생산을 위해서는 황색 자엽종은 일품검정콩, 녹색 자엽종은 청자콩처럼 유전적으로 안토시아닌 축적량이 많은 품종은 등숙기간 중 평균기온이 낮아 적산온도가 낮고 일교차가 큰 지역에서 생산하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

2. 검정콩 안토시아닌 함량의 신속 편이 기술 개발

검정콩 종피에 함유된 안토시아닌의 색소별 함량을 비파괴적으로 신속하게 분석하기 위하여 NIRS(근적외선 분광분석기)를 이용한 모델을 개발하였다. 재료는 검정콩 유전자원 800여 계통을 사용하였으며, HPLC에서 분석된 종피의 안토시아닌 함량치를 NIRS 스펙트럼에 적용시킨 후 검량식을 작성하였다. NIRS의 검량식을 몇 가지 방법에 의하여 비교 분석한 결과 1차미분된 스펙트럼을 MPLS(Modified Partial Least Squares)를 이용한 회귀식에 이용하는 것이 가장 적합하였다. HPLC를 이용한 유전자원들의 성분 함량과 NIRS에서 도출된 검량식과의 상관계수는 C3G, D3G 및 Pt3G가 각각 0.952, 0.936과 0.833을 나타내었다. 이들 검량식은 validation file에서도 C3G와 D3G는 0.897, 0.849의 높은 상관관계를 보였으며, 이는 NIRS를 이용하여 검정콩의 안

토시아닌 함량을 신속하게 분석할 수 있음을 나타내는 것으로 판단되었다.

종피가 아닌 검정콩 종실을 직접 NIRS에 적용시켰을 때는 검량식의 상관도가 떨어졌다. 그러나 C3G의 경우는 상관도가 0.80 이상을 나타내었으므로 종실을 직접 이용하는 것에도 무리가 없으리라 판단된다.

3. 검정콩 안토시아닌 효능의 in vitro 분석

Anthocyanin extracts는 0.01%에서 0.5% 범위에서 농도 의존적으로 SOD 활성을 증가시켰으며 0.5%에서 superoxide radical을 100% 소거시키는 결과를 관찰할 수 있었다. 또한 RAW 264.7 세포를 배양한 후, 세포 배양액에 LPS와 농도별 안토시아닌 추출물을 가한 결과, 안토시아닌 추출물을 0.001%, 0.01%, 0.02% 농도로 각각 처리했을 때 LPS에 의해 증가된 NO의 생산이 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였다. 그러나 안토시아닌 추출물은 *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*에 대해서는 10%의 농도에서도 항균력을 보이지 않았다.

한편, 인간 암세포인 Jurkat T 세포와 MCF-7 세포에 안토시아닌 개별색소(C3G, D3G 및 Pt3G)를 100~500 µg/mL 농도로 처리하고 암세포에 대한 독성을 관찰한 결과, 3가지 색소 모두 두 가지 암 세포에서 세포독성 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 검정콩 안토시아닌이 여러 가지 생리활성 효과를 가지고 있음을 나타내는 결과로 판단되었다.

4. 동물실험을 통한 안토시아닌 독성 평가

검정콩 천연색소인 안토시아닌에 대하여 동물에서의 식이실험을 통한 안전성 자료를 확보하고자 실험을 수행하였다. 안토시아닌에 대한 암·수 마우스를 이용한 단회 경구 투여 및 4주 경구 반복투여 독성시험을 실시한 결과, 단회 경구 투여에 의한 명확한 중독량 또는 개략의 치사량은 5,000 mg/kg 이상으로 나타났으며, OECD 가이드라인에 따른 한계 시험용량인 1,000

mg/kg을 4주간 반복 경구투여시 암·수 모든 투여군에서 시험물질에 의한 독성변화가 관찰되지 않았다. 시험 기간 동안 치사한 동물은 없었으며, 4주후의 체중 및 장기의 무게 변화에 이상이 없었다. 혈액학적 수치 및 혈청학적 수치도 모든 시료 투여군에서 정상치 범위를 나타내었으며, 부검 후의 육안적 소견과 여러 가지 조직들의 병리학적 검사에서도 이상 징후가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험에 사용된 안토시아닌은 자체 안전성 스크리닝 결과 경구 사용시 안전한 물질로 판단되었다.

5. 추출조건과 첨가물에 따른 안토시아닌 함량과 색소 안정성 평가

안토시아닌 색소를 counter current system으로 추출하고 가공 조건하의 안정성에 대한 효과를 조사하고자 온도 조건을 8°C, 60°C, 80°C에서 1시간 추출하였다. 추출 방법에 따른 안토시아닌 함량 분석 결과, 메탄올 추출은 검정콩의 안토시아닌 색소인 C3G가 2.23 ppm 분석되었으며, counter current system 추출에서는 C3G가 8°C에서 2.38 ppm, 60°C에서 1.73 ppm, 80°C에서 1.73 ppm 분석되어 식품 첨가제로서 안토시아닌의 효용성을 볼 때 물을 이용하는 counter current system의 추출이 유용한 것으로 판단되었다. 가열에 의한 변색의 정도를 delta E값으로 분석한 결과, 메탄올 추출물은 가열 시간이 경과함에 따라 감소하였고, counter current system의 8°C, 60°C, 80°C의 추출은 추출 온도가 낮을수록 가열 시간과 높은 상관관계를 나타내어 8°C 추출이 2 시간까지는 안정화 효과를 나타내었다. 안정제와 당류 첨가에 따른 안토시아닌의 안정화 효과에서 메탄올 추출은 β -cyclodextrin 1% 첨가가 2시간까지 변색 지연 효과를 보였으며, 당류는 sucrose 1% 첨가군이 안정 효과를 나타내었다. 한편, counter current system 추출에서는 β -cyclodextrin 1%가 세 종류 온도 추출물에서 모두 퇴색 지연 효과가 있었으며, maltodextrin은 1% 첨가가 가열 시간과 추출 온도 모두에서 1% 유의 수준의 안정 효과를 보였고, 5% 첨가군은 8°C 추출에서 2시간까지는 안정 효과가 있었다. Sucrose 1%와 maltose 1% 및 10% 첨가도 8°C 추출에서 안정화 효과를 나타내었다. 따라서 counter

current system에 의한 검정콩 안토시아닌 추출은 함량면에서 8℃ 추출이 효과적이며, 추출 색소 안정화 효과는 β -cyclodextrin 1%, maltodextrin 1%와 sucrose 1%, maltose 1%가 실제 활용면에서 유용할 것으로 판단되었다.

6. 안토시아닌 첨가 발효유 및 안토시아닌 활용 머핀 개발

안토시아닌 색소의 안정성과 기능성 성분을 얻고자 색소 안정성이 예측되는 요거트를 제조하여 품질 특성을 조사한 결과 균주는 호기성 균주로 *Streptococcus thermophilus*와 *Lactobacillus plantarum* 균주를 혼합한 것이 관능적 특성이 우수하였으며, 안토시아닌 농축물은 0.5% 첨가가 적합한 것으로 관능검사 결과 판단되었다. 안토시아닌을 첨가한 머핀들을 상품화 하기 위한 조건들로 품질 특성, 조직감, 색도, 관능검사 항목을 분석한 결과 바닐라 머핀은 20% 까지, 흑임자 머핀은 30%, 단호박은 30% 까지 첨가하여 제조 하는 방법은 상품화를 위한 기초 자료로 제시 될 수 있을 것이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제 수행 기간을 통하여 전문학술지에 7편의 논문을 게재하였으며, 국내외 학술발표회에서 7건의 논문을 발표하였다.

본 과제를 통하여 도출된 연구 결과들은 도 농업기술원 등 실질적 농민 대상 교육 및 기술 보급 기관과의 지속적인 공동연구를 통하여 기술을 이전할 계획이다. 따라서 품질이 우수한 검정콩 재배 단지의 확대 등이 예상된다. 그리고 현재 선발되어 육성 중인 안토시아닌 고 함유 검정콩 계통들은 육종 사업에도 큰 몫을 할 수 있으리라 판단된다.

이밖에 안토시아닌 추출방법, 안정성에 관련한 요인 등은 검정콩 안토시아닌 관련 기업체로의 기술 이전을 추진할 것이며, 기타 시제품으로 개발한 안토시아닌을 이용한 기능성 식품은 특허 등으로 지적재산권 확보를 위해 노력할 것이다.

SUMMARY

I. Title

Characterization of anthocyanin and development of functional foods
containing anthocyanin in black soybean

II. Objectives and Significance

Soybean seeds are one of the most important sources of protein and oil in the world, and it has been known a potential roles in the prevention and treatment of chronic diseases, most notably cancer, osteoporosis, and heart disease. Especially over the past few years, anthocyanin which is contained on seed coat of black soybean has been demonstrated to exert potentially anti-oxidative and bioavailability effects including anti-cardiovascular disease and cancer-preventive effects in humans. So, the soybean components has been emphasized to improve food-processing quality and biological activity for the processed soybean products such as soymilk and various edible ingredients as well as for the traditional soy-foods in now. The major objectives of this report are (1) understanding of genetic and environmental variations of anthocyanin contents in black soybean varieties, (2) development of anthocyanin-based functional foodstuff by establishing optimal extraction and purification conditions to concentrate anthocyanin pigments from black soybean, (3) verification of pharmaceutical effects such as antioxidative, anticarcinogenic and other various beneficial effects of the anthocyanin extracts as well as evaluation of oral toxicity, and (4) development of nondestructive and rapid analysis methods by using NIRS to quantify

anthocyanin contents in black soybean.

III. Major Results and Discussions

1. Genetic and environmental variations of anthocyanin contents in black soybean

Anthocyanin contents of black soybean were analyzed for development of superior breeding lines with high anthocyanin contents. Total 1,042 blacksoybean germplasm collected through the whole south Korea were analyzed with HPLC. It were detected C3G(Cyanidin-3-Glucoside), D3G(Delphinidin-3-glucoside), and Pt3G(Petunidin-3-Glucoside) as main anthocyanin pigments and each pigment contents were significantly different according to genotypes. C3G content showed the highest value in all materials and its variation was also wide, whereas D3G and Pt3G were not detected in 4 and 24 genotypes. Mean value of C3G, D3G, and Pt3G contents were 8.81, 1.78 and 0.79 mg/g, respectively. Consequently total anthocyanin content of collections were ranged 0.54~23.45mg/g and average of content was 11.67mg/g. Also total anthocyanin contents were higher in seed coat as maturation period were longer from flowering stage and seed weight were more heavy. Anthocyanin content in seed coat was different according to location, genotypes and seeding time, so it can be concluded that anthocyanin content was effected by environmetal and genetic variation.

The correlations between color index and anthocyanin content were analyzed. L(lightness) and b(yellowness) values were correlated negatively with D3G, C3G and total anthocyanin content while a(redness) value was correlated negatively with C3G content. The correlations between climatic factors and anthocyanin content were analyzed. Anthocyanin content was

correlated negatively with mean temperature and accumulated temperature whereas mean daily temperature range showed positive correlation. We could conclude that the area in which mean temperature was low and daily temperature range was high is good for production of high anthocyanin containing black soybean.

2. Nondestructive and rapid analysis methods by NIRS to quantify anthocyanin contents

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) is a rapid and accurate analytical method for determining the composition of agricultural products and feeds. This study was conducted to measure anthocyanin contents in black colored soybean by using NIRS system. Total 300 seed coat of black colored soybean samples previously analyzed by HPLC were scanned by NIRS and over 250 samples were selected for calibration and validation equation. A calibration equation calculated by MPLS(modified partial least squares) regression technique was developed in which the coefficient of determination for anthocyanin pigment C3G, D3G and Pt3G content was 0.952, 0.936, and 0.833, respectively. Each calibration equation was applied to validation set that was performed with the remaining samples not included in the calibration set, which showed high positive correlation both in C3G and D3G content file. In case Pt3G, the prediction model was needed more accuracy because of low R^2 value in validation set. This results demonstrate that the developed NIRS equation can be practically used as a rapid screening method for quantification of C3G and D3G contents in black colored soybean.

3. Pharmaceutical effects and oral toxicity of anthocyanin extracts

Anthocyanin pigments in soybean seed coat were D3G(Delphinidin-3-glucoside), C3G(Cyanidin-3-glucoside) and Pt3G (Petunidin-3-glucoside), which have been known potential roles in the prevention and treatment of chronic diseases. Effects of anthocyanin to human cancer cells was analyzed by MTT assay after anthocyanin pigments treated on leukemia (Jurkat-T) and adenocarcinoma (MCF-7) cells. It showed decrement of cell numbers as anthocyanin concentration is increasing. EC₅₀ range of anthocyanin concentrations were 100~250 ug/mL and 100~250 ug/mL in Jurkat-T and MCF-7 cell, respectively. D3G showed higher cytotoxicity than other pigments in Jurkat-T cell whereas activity of C3G was high in MCF-7 cell. And SOD activity and inhibition of nitrogen dioxide production by anthocyanin extracts treatment were also showed the biological activity. It is believed that supplementation of human diets with soybean anthocyanin markedly reduces human cancer mortality rates.

This study was also conducted to assess the toxicity of anthocyanin extracts from black soybean seed coats via oral administration in a mice feeding test. The final anthocyanin-containing products induced signs of toxicity on mortality in the 4-week feeding test. The incidence of clinical signs and changes in body and organ weight were also not observed in all anthocyanin-treated groups as compared with the control groups. In hematology analysis, RBC indices concluding MCV, MCH, and MCHC and WBC differential counting such a NEU, LYM, MONO, EOS, and BASO evidenced no significant differences between the anthocyanin treatment and control groups. The biochemical parameters in serum analysis – ALT, AST, BUN, Crea *etc.* – were also not significantly altered in those groups. Absolute and relative organ weights were not increased after 4 weeks of treatment with anthocyanin extracts in mice. In conclusion, anthocyanin extracts from the black soybean has biological activity without any toxic

effects, which also suggests that the consumption of soy containing anthocyanin products may be a good source for health and medical supplies.

4. Development of anthocyanin-based functional foodstuff

We analyzed the anthocyanin contents of black soybean crude extracts derived using a countercurrent system and to compare the effects of stabilizers(β -cyclodextrin, maltodextrin) and sugars(sucrose, maltose) on the color deterioration of the anthocyanin. When the extraction process was kept at 100°C for 120~180 min, only C3G (cyanidin-3-glucoside) was detected in the water extract. The C3G contents in the water extracts acquired at 8°C, 60°C, and 80°C were 2.38 ppm, 1.73 ppm, and 1.73 ppm, respectively. Sucrose and maltose retarded color deterioration of the crude pigment extract by the countercurrent method with methanol. Finally, the additions of maltodextrin or β -cyclodextrin did not retard thermal color deterioration of the black soybean crude pigment extract.

Quality of anthocyanin extract yogurt on during storage was analyzed. To strengthen the usage of anthocyanin extract, the yogurt containing skim milk powder and anthocyanin was fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus plantarum*. Control group was yogurt containing only skim milk 15.4 % and experimental groups were replaced the part of skim milk, 0.5 %, 1 % and 1.5 % with anthocyanin extract. The amount of lactic acid were increased according to the amount of anthocyanin extract during fermentation and the viscosity was also increased, too. The more the addition of anthocyanin extract to yogurt by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus plantarum* was increased the sensory properties, such as fragrance, texture and overall preference. This experiment suggest that it is desirable to add anthocyanin extract 0.5 %

or less than 1 % to the yogurt and further research for the selection of lactic acid bacteria and for adequate proportion of skim milk powder vs. anthocyanin extract is needed.

Also, quality characteristics of muffin added anthocyanin extract was analyzed. Anthocyanin extract was used in muffin production at different concentrations ranging from 0 to 50%. The lightness value of muffins decreased, however, the yellowness value increased with increasing amounts of anthocyanin extract. The bulk of the muffins was generally reduced by the addition of anthocyanin extract. At the 10% concentration, hardness and viscosity were similar to the control, and there were no changes in springiness or cohesiveness. For the sensory evaluation, parameters such as appearance, color, texture, taste, and overall acceptability increased significantly from the control at the 10% concentration of anthocyanin, but flavor increased with increasing amounts of anthocyanin extract. Based on these results and the sensory evaluation specifically, the optimal of anthocyanin added to the muffins was the 10% concentration.

CONTENTS

Chapter 1. General introduction	7
Section 1. Purpose of research	7
Section 2. Necessity and area of research	7
Chapter 2. The current status related with research topic	9
Chapter 3. The contents and results of research development achievement	22
Section 1. The method of research development	2
Section 2. The results and discussion of research development achievement	84
1. Genetic and environmental variations of anthocyanin contents in black soybean	48
2. Nondestructive and rapid analysis methods by NIRS to quantify anthocyanin contents	74
3. Pharmaceutical effects and oral toxicity of anthocyanin extracts	78
4. Evaluation of toxicity of anthocyanin from black soybean by feeding test in mice	97
5. Anthocyanin—contents and pigment stability of black soybean by different extract condition and stabilize	108
6. Development of functional foodstuff yogurt added anthocyanin	120
7. Development of functional foodstuff muffin added anthocyanin	133
Chapter 4. The achievement index of research proposal	16
Chapter 5. The application plan for research results	18
Section 1. Achievements of research development	18
Section 2. Plan for practical application	10
Chapter 6. Scientific informations from abroad	10
Chapter 7. References	15

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	17
제 1 절	연구개발의 목적	17
제 2 절	연구 개발의 필요성 및 범위	17
제 2 장	국내외 기술 개발 현황	19
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절	연구 수행 방법	22
1.	검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 및 환경변이 분석	22
2.	검정콩 안토시아닌 함량의 신속·비파괴분석 기술 개발	26
3.	검정콩 안토시아닌 효능의 <i>in vitro</i> 분석	26
4.	동물실험을 통한 안토시아닌 독성 평가	29
5.	추출조건과 첨가물에 따른 안토시아닌 함량과 색소 안정성 평가	35
6.	안토시아닌 첨가 발효유 개발	40
7.	안토시아닌 활용 머핀 개발	43
제 2 절	연구 수행 결과 및 고찰	48
1.	검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 및 환경변이 분석	48
가.	검정콩 유전자원 안토시아닌 함량 평가	48
나.	검정콩 안토시아닌 함량의 환경 변이 평가	61
2.	검정콩 안토시아닌 함량의 신속·비파괴분석 기술 개발	74
가.	검정콩 종피를 이용한 안토시아닌 함량의 NIRS 검량식 작성	74
나.	검정콩 종실을 이용한 총 안토시아닌 함량의 NIRS 검량식 작성	80
3.	검정콩 안토시아닌 효능의 <i>in vitro</i> 분석	87
가.	Superoxide dismutase(SOD) assay	87
나.	Nitric Oxide(NO) assay	87
다.	항균력 효과 분석	91
라.	항암성 평가	91
4.	동물실험을 통한 안토시아닌 독성 평가	97

5. 추출조건과 첨가물에 따른 안토시아닌 함량과 색소 안정성 평가	108
가. 검정콩 안토시아닌 추출	108
나. 안토시아닌 색소의 안정성	112
6. 안토시아닌 첨가 발효유 개발	120
7. 안토시아닌 활용 머핀 개발	133
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	146
제 1 절 목표 달성도	146
제 2 절 관련분야에의 기여도	147
제 5 장 연구 개발 성과 및 성과활용 계획	148
제 1 절 연구개발 성과	148
1. 계량적 성과	148
2. 성과 내용	148
제 2 절 연구개발의 활용 계획	150
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	150
제 7 장 참고문헌	151

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 검정콩 함유 고 기능성 안토시아닌(D3G, C3G)의 유전적·환경적 변이를 구명하는 한편 안토시아닌 색소를 이용한 건강식품을 개발함으로써 국내 검정콩 산업의 고부가가치화를 위한 기초 자료를 제공함을 최종 목표로 한다.

제 2 절 연구 개발의 필요성 및 범위

국민소득이 증가됨에 따라 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며 최근에는 웰빙 바람과 함께 기능성 식품에 대한 요구도가 나날이 커지고 있다. 이런 추세에 따라 기능성 성분으로서 천연색소의 효과에 대한 연구도 늘어나고 있다. 식품의 색은 종류에 따라 제각기 독특한 빛깔을 나타내고 있으며, 그 식품의 품질과 선호도를 결정하는 중요한 척도이다. 일반적으로 식품 제조 공정이나 저장 중에는 소실된 식품 고유의 색을 되살리기 위해 인위적으로 식용색소를 첨가하는 방법이 널리 사용되고 있다. 그러나 최근 소비자들의 식품에 대한 인식이 건강 및 위생적인 측면으로 많이 바뀐 까닭에 인공합성 색소들의 독성과 발암성 등 안정성에 대한 소비자들의 우려의 소리가 높아지고 있다. 따라서 이를 대체할 천연색소에 대한 요구가 한층 높아지고 있다. 한편, 천연색소는 생리적, 기능적 측면에서도 새롭게 평가받고 있는데 특히 안

토시아닌 색소에 대한 연구가 활발하다. 식물의 열매, 꽃, 과일, 줄기 잎, 뿌리 등에 폭넓게 함유되어 있는 안토시아닌은 적색, 자색, 청색을 나타내는 수용성 flavonoid계 색소이며 식물에 분포하는 종류는 20여종에 이르는 것으로 알려져 있다(Harborne, 1988). 이들은 착색물질로서의 역할 뿐만 아니라 생체 내의 생리활성(항암, 항알러지, 항바이러스, 면역증강 등)에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 안토시아닌에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며(Prior *et al.* 2005; Kong *et al.* 2003; Yang *et al.* 2001; Harborne & William, 2000), 특히 항산화력에 대한 연구가 많이 보고되었다(Plochmann *et al.* 2007; Kanatt *et al.* 2005; Wang & Lin, 2000).

검정콩은 우리나라, 일본, 중국 동북부 지방 정도에서만 재배되고 있으며, 우리나라에서는 전통적 음식인 밥밀콩, 콩자반, 콩강정, 떡소용 등에 이용하여 왔다. 특히 예로부터 검정콩은 소위 '약콩'으로 불리며 혈액자양, 풍의 소통, 시력증진, 두통치료 등에 효과가 있다고 하여 민간요법에 많이 활용되었으며, 최근에는 국내에서 검정콩을 주재료로 하는 건강기능성 식품들도 개발 보급되고 있다. 검정콩 종피에는 안토시아닌 색소가 함유되어 있는데(Aleksandrova & Aleksandrova, 1943; Yoshikura & Hamaguchi, 1969), Bae & Moon(1997), 그리고 Kim 등(2006)은 콩 품종간 항산화효과의 차이는 종피의 안토시아닌 함량과 높은 관련성이 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 검정콩 천연색소의 유전적 변이 및 항산화 효과를 탐색하는 한편 검정콩의 천연색소를 추출 분리하여 기능성 식품을 개발함으로써 천연색소를 이용하는 신소재 개발 및 상품의 고부가가치화를 위한 기초 자료를 제공하고자 수행되었다. 따라서 제 1과제에서는 고부가가치 검정콩 유전자원 평가 및 육성에 관한 연구를 수행하였다. 먼저 검정콩 유전자원을 평가하여 D3G 및 C3G 고 함유 자원을 선발하는 한편, 이들을 교배하여 우수한 고부가가치 검정콩 품종 육성의 기초 자료를 제공하고자 하였다. 또한 재배 및 환경 조건에 따르는 안토시아닌 물질 함량 변화를 구명하기 위하여 재배 지역과 파종기에 따른 년차 변이를 분석하여 검정콩 함유 안토시아닌 함량의 환경 변이 특성을 구명하였다. 제2과제에서는 검정콩 안토시아닌 함량의 평

가를 위하여 근적외선 분광광도계(NIRS)를 이용한 비파괴적, 신속 편이 기술을 개발함으로써 우수 품종 육성 및 품질 관리에 적용하고자 하였다. 또한 검정콩 안토시아닌의 기능성 효과를 *in vitro* 및 동물 식이실험을 통하여 검증하였다. 제3과제에서는 검정콩 안토시아닌을 이용한 건강기능성 식품을 개발함으로써 검정콩의 부가가치향상 및 농가의 수익 개선에 도움을 주고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

○ 천연색소 연구

안토시아닌은 적색, 적자색, 청색 등을 나타내는 색소로서 꽃이나 과실에 많이 들어있는데, 이들의 분포와 화학구조에 관한 연구는 일찍부터 광범위하게 이루어졌다. 식물 천연색소에 관한 연구는 국내에서도 포도, 딸기, 고구마, 유색미 등에 관하여 많이 수행되었으며 주로 천연색소의 안정성에 관한 연구가 주를 이루고 있는 형편이다. 최근에는 유색미를 중심으로 천연색소의 기능성에 관한 연구도 활기를 띠고 있으며, 국외에서는 포도에 함유된 안토시아닌을 포함한 플라보노이드류가 항암효과가 있음이 발표된 바 있다(2005). 이들은 착색물질로서의 역할 뿐만 아니라 생체 내의 생리활성(항암, 항알러지, 항바이러스, 면역증강 등)에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 안토시아닌에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며(Prior *et al.* 2005; Kong *et al.* 2003; Yang *et al.* 2001; Harborne & William, 2000), 특히 항산화력에 대한 연구가 많이 보고되었다(Plochmann *et al.* 2007; Kanatt *et al.* 2005; Wang & Lin, 2000). Niki 등(1999)은 자외선 상해 효과 연구에서 안토시아닌의 C3G, D3G, P3G가 UV에 의한 지질 과산화 억제 능력이 있고, 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase 활성 저해가 있다고 보고한 바 있다. 특히 안토시아닌의 aglycone이 *in vitro* 실험에서는 δ -tocopherol을 상회하는 항산화 효과를 나타내었고, hydroxy radical, superoxide 음이온 제거능이 있다고 보고하였다.

○ 검정콩의 안토시아닌 연구

검정콩의 색소에 관한 연구는 아직 미흡한데, 그 이유는 검정콩이 우리나라, 일본 및 만주 등 동북아시아 지역에서만 재배, 식용되고 있기 때문이다. 과거에는 검정콩 색소에 관한 연구는 일본학자들에 의해서만 이루어졌다고 하여도 과언이 아닌데, 국내에서는 정 등(2002)이 콩의 색소는 주성분이 cyanidin-3-glucoside을 포함한 3개의 anthocyanin pigment로 구성되어 있음을 보고한 바 있다.

검정콩 종피의 안토시아닌 축적은 우성유전자인 I 유전자에 의해 생성 축적이 조절되며 R locus와 모용색 대립유전자(T, t)에 영향을 받는데, 검정 종피는 I, R, T gene이 그리고 불완전한 검정 종피에는 I, R, t gene이 존재해야 안토시아닌이 축적된다(Joo *et al.*, 2003)고 하였다. 안토시아닌 함량은 일반적으로 종실비대기인 R₆에서 수확기인 R₈로 갈수록 개별색소 및 총 함량이 증가된다(Chu *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004). 그리고 안토시아닌의 축적은 품종(박, 2003), 생육일수(Jung *et al.*, 1996), 재배년도, 재배지역(Kim *et al.*, 2005), 과중시기(Jung *et al.*, 1996, 박, 2003) 등에 의해 영향을 받는다. 검정콩에 존재하는 안토시아닌 함량비율은 cyanidin, pelargonidin, petunidin 및 delphinidin 등이 각각 80%, 8.0%, 7.4%, 4.3% 이며, 돌콩에서의 비율은 85%, 0%, 3.4% 및 10.9% 이었다(Oh, 2001). 이와 같이 다양한 분야에서 연구가 이루어졌음에도 불구하고 검정콩에서 안토시아닌 고함유 신품종 육성에 필요한 교배 모부본을 선정할 만큼의 다양한 국내 유전자원에 대한 안토시아닌 함량과 재배환경에 따른 연구결과는 매우 미흡한 실정이다.

O 안토시아닌 이용 식품 개발

Anthocyanin 추출에 관한 연구로는 여러 용매를 사용하여 검정콩과 포도의 안토시아닌을 추출한 보고가 있으며, Cho 등(2003)과 Chung 등(2004)은 안토시아닌은 cyanidin계의 chrysanthemine으로 물에 녹아 식품에 응용하기 용이하다고 하였으며, 용출에 영향을 주는 인자로서 물의 침지 온도와 시간의 연구에서 온도와 색의 변화는 상관도가 높다고 하였다. 검정콩 안토시아닌 색소의 안정화는 flavylum ring의 수화를 억제하여야 하는데, 이에 영향을 주는 인자로는 유기산, 플라보노이드, 폴리페놀 등의 조색소, 당류, 온도, pH, 금속 이온 등(Yang *et al.*, 1982)이 보고되었으며, 그 중에서도 단당류는 변색을 촉진시키고 이당류는 억제 효과가 큰 것으로 보고한 바 있다. 유기산에 의한 색소 안정성은 malic acid가 가장 효과가 크고, 다음으로 tartaric acid, citric acid, succinic acid, malonic acid 그리고 ascorbic acid 등의 효과도 있음이 보고되었다(Lee *et al.*, 2000). Oh 등(2005)은 포도 과피에서 추출한 안토시아닌에 중성

아미노산인 glycine, isoleucine, methionine과 산성 아미노산인 aspartic acid, glutamic acid와 염기성 아미노산인 arginine, lysine을 pH 3.5에서 첨가하여 색소의 강도를 측정한 결과 aspartic acid 첨가구가 중성 아미노산 첨가구보다 높음을 보고하였다.

안토시아닌을 이용한 식품개발로는 다시마, 홍삼추출물, 스피루리나, 함초추출물, 유자 등을 이용한 발효유 개발이 이루어졌으며 검정콩 요구르트도 국내에서 시판되었다. 이밖에도 안토시아닌을 활용한 머핀 개발이 마 분말, 천일염 된장분말, 브로콜리 분말, 홍국분말, 단호박 가루, 클로렐라 등에서 이루어진 바 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 방법

1. 검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 및 환경변이 분석

가. 공시 재료

검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 평가는 2006년부터 2008년까지 3개년 동안 유전자원 1,044종을 공시하였는데, 이중 261점은 농촌진흥청 작물과학원, 489종은 농촌진흥청 생명공학연구소 유전자원과로부터 분양받았고, 2종은 중국에서 수집하였고 우리나라 육성품종 11종, 34종은 농촌진흥청 영남농업연구소에서 분양받았으며 나머지 247종은 경기도농업기술원에서 자체수집보관중인 종자를 사용하였다.

본 연구에 이용된 검정콩 유전자원 1,042종에 대한 지역별 수집내역은 Table 1과 같다. 지역별 유전자원은 경기도가 225종으로 가장 많았고, 강원 191, 전북 97, 전남 96, 경북 94, 경남 80, 충북 74, 충남 44종이었고, 인천 9, 대전 8, 대구, 서울, 제주가 각각 7, 부산이 5종 순이었고 중국도 2종이었으며 미상 53종 육성계통 34, 육성품종 11종이었다. 이들은 2006년과 2007년은 800종을 경기도 화성시 소재 경기도농업기술원 작물연구과 시험포장, 2008년에는 244종을 경기도 연천군 소재 제2농업연구소에서 재배하여 외관 품질 및 안토시아닌 함량을 조사하였다.

나. 안토시아닌의 함량 및 환경변이 분석

1) 공시재료 및 재배법

검정콩 안토시아닌 함량의 환경변이 평가는 2006년부터 2008년까지 일품검정콩,

Table 1. No. of black soybeans according to collection sites

Year	Gyeonggi	Gangwon	Chungbuk	Chungnam	Jeonbuk	Jeonnam	Kyeongbuk	Kyeongnam
2006	51	74	32	8	23	26	28	26
2007	73	87	36	28	67	66	64	50
2008	101	30	6	8	7	4	2	4
Total	225	191	74	44	97	96	94	80

Year	Jeju	Busan	Daegu	Incheon	Daejeon	Cultivar	Breeding line	China	Not observed	Total
2006	2	2	0	3	1	0	0	0	21	300
2007	5	3	3	5	5	0	0	0	4	500
2008	0	0	4	1	2	11	34	2	28	244
Total	7	5	7	9	8	11	34	2	53	1,044

청자콩, 흑청콩 등 3품종을 경기 연천(경기도농업기술원 제2농업연구소 포장), 충남 예산(충청남도농업기술원 작물연구과 포장), 경북 진주(경상남도 진주시 진성면 소재) 등 3개 지역에서 재배하여 얻어진 종실을 안토시아닌 함량 분석시험에 이용하였다.

파종은 경기 연천, 충남 예산과 경남 진주에서는 5월15일, 5월30일, 6월15일 등 3시기에 걸쳐 실시하였으며 기타 재배법은 지역별 표준재배법에 준하였다.

2) 농업적 특성 조사

성숙단계는 개화기, R6, 수확기를, 수량특성은 백립중, 종실수량 등을 조사하였다. 개화기는 40%이상 개화한 날로 하였으며 착색기는 헝 5개중 헝 3개 이상이 착색된 시기로 하였고, 수확기는 헝의 95%이상 고유의 성숙색을 띠는 시기를 수확기로 하였다. 착색소요일수는 종피에 착색이 시작되는 시기부터 수확기까지의 일수로 하였고, 성숙소요일수는 개화기부터~수확기까지의 소요일수로 하였다. 백립중은 수확된 종실을 무작위로 100립씩 3반복을 정량하였고, 수량은 수확기에 40주를 3반복 수확하여 환산하였다. 성숙기간 중의 기상환경은 기상청으로부터 시험대상지역의 일일기상자료를 받아 평균기온, 적산온도, 일교차, 일조시수 및 강수량 등을 분석하였다.

3) 색도 및 안토시아닌 함량 분석

색도는 색도색차계(CM 3500d, Minolta)를 이용하여 분석하였다. 안토시아닌 함량은 콩 종피 0.1g에 1%HCl-99%MeOH 용액 5ml를 넣어 4℃에서 24시간씩 3회 추출한 후 여과지(Advantec No. 2, Ø55mm)을 이용하여 여과한 후 추출용매로 25ml가 되도록 정용하였다. 여과한 추출용액은 syringe filter (whatman 0.2µm NYL)를 이용 여과 후 분석 시험용액으로 사용하였다. 표준물질은 Dephinidin 3-O-β-Glucopyranoside, Cyanidin 3-O-β-Glucopyranoside 및 Petunidin 3-O-β-Glucopyranoside 등을 Polyphenols (Norway)에서 구입하여 농도구배로 검량선을 구하였다. 분석조건은 Table 2와 3과 같이 하였으며 통계분석은 SAS 8.01로 분석하였다.

Table 2. Condition of anthocyanin analysis by HPLC

Parameter	Condition	
	Germplasm	Environmental variation
Instrument	Acquity TM UPLC	Agilent 1100
Wavelength UV detector	520nm	520nm
Mobile phase	D.W. : MeOH : TFA 75.8 : 24.0 : 0.2	D.W.: MeOH : formic acid 75 : 20 : 5
Flow rate	0.5ml/min	0.85ml/min
Sample injection volume	1 μ l	20 μ l
Oven temperature	35°C	35°C
Column	Acquity TM BEH SHIELD RP18 1.7 μ m \times 21 \times 100mm	Atlantis TM dc18 (4.6 \times 150 mm, 3 μ m)

Table 3. Estimated linear regression equations on anthocyanin analysis

	Anthocyanin pigment	Regression	Coefficient of determination
Germplasm	Dephinidin-3-Glucose	$y = 3,040X - 4,110$	$R^2 = 0.9994$
	Cyanidin-3-Glucose	$y = 1,960X + 1020$	$R^2 = 0.9999$
	Petionidin-3-Glucose	$y = 1,030X + 138$	$R^2 = 0.9996$
Environmental variation	Dephinidin-3-Glucose	$y = 35.2140X - 2.1565$	$R^2 = 0.9999$
	Cyanidin-3-Glucose	$y = 48.6323X + 7.9522$	$R^2 = 0.9999$
	Petionidin-3-Glucose	$y = 55.4087X + 13.0678$	$R^2 = 0.9999$

2. 검정콩 안토시아닌 함량의 신속·비파괴분석 기술 개발

NIRS를 이용한 정량분석 방법은 먼저 수집된 유전자원들의 NIR spectrum을 얻은 후, 검량식을 유도하여야 한다. NIR spectrum 은 가시광선 및 근적외선 대역(400 - 2,500 nm)에서 종피 및 종실 상태로 스캐닝하였으며, 분획 안토시아닌인 C3G, D3G 및 Pt3G의 HPLC 분석치와 비교 분석하여 검량식을 작성하였다. 분석에 이용된 기기는 NIRSystem model 6500 (Foss NIRSystems)이었다. 검량식은 우선 spectrum을 4가지 수처리 방법을 통하여 1차적으로 noise와 bias를 줄였다. 수처리(math treatment)는 1차미분법을 이용한 1, 4, 4, 1(1st derivative, 4 nm gap, 4 points smooth, and 1 pont second smooth) 조건, 1, 10, 10, 1 조건과 2차 미분을 이용한 2, 4, 4, 1 조건 및 2, 10, 10, 1 조건을 사용하였다. 수처리된 spectrum은 회귀분석을 통하여 검량식을 작성하였다. 회귀분석은 Step up, Step wise, 그리고 MPLS (Modified Partial Least Squares)법을 사용하여 검량식을 산출하였으며, 작성된 검량식을 상호 비교 분석한 후 적정의 검량식을 도출하였다.

3. 검정콩 안토시아닌 효능의 in vitro 분석

가. 공시재료

검정콩 1kg을 80% 메탄올 15L에 넣고 3일간 실온에서 방치한 후 100um 필터백으로 여과하였다. 다시 여과액을 감압농축한 후 동결건조한 결과 와인색의 바삭바삭한 추출시료를 획득할 수 있었다. 이후 시료는 갈색병에 담은 후 냉장 보관하면서 안토시아닌 효능 분석에 사용하였다. 추출 시료는 73.93g이었으며, 시료의 안토시아닌 함량을 HPLC로 분석한 결과 Cyanidin-3-glucoside 만 검출되었으며 그 함량은 2.2%이었다.

나. 시험방법

1) Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD 활성은 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법을 이용하였다. NBT는 산소 존재 시 푸른색으로 환원되어 560 nm에서 흡광을 띄며 SOD는 이 반응을 억제한다. 효소 반응 buffer (50 mM sodium phosphate (pH 7.8), 3 mM xanthine, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA)에 50 μ l의 세포추출물을 첨가하고 0.1 mg/ml의 xanthine oxidase를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨다. 6 mM CuCl_2 를 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 상층액을 560 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 항산화능은 superoxide anion 제거율로 판단하였다.

2) Nitric Oxide(NO) assay

한국세포주은행의 RAW 264.7 세포를 사용하였다. 세포(5×10^5 cells/ml)를 12 well plate에서 18시간 배양한 후 시료와 LPS(lipopolysaccharide, Sigma)를 처리하고, 48시간 후 NO의 안정한 대사물질인 nitrite를 Griess 방법으로 측정하였다. 그 후 5% phosphoric acid에 용해된 1% sulfanilic acid와 0.1% Naphthylethylene diamine dihydrochloride를 동량으로 혼합한 Griess 시약 100 μ l를 동량의 시료와 혼합하여 37°C에서 30분간 처리하였다. 흡광도는 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 측정하였고, NaNO_2 를 이용한 표준 곡선에서 농도를 계산하였다.

3) 항균력 효과 분석

Escherichia coli(KCTC 2571), *Staphylococcus aureus*(KCTC 1916), *Candida albicans*(KCTC 7965), *Aspergillus niger*(KCTC6906)의 4가지 균주를 사용하여 항염증 효과를 분석하였다. 먼저 시험균을 액체배지에서 1~2일 동안 전배양한 후, 한천 농도가 0.8 %되는 한천배지 7ml에 균수가 10^{5-6} 세포/ml이 되도록 전배양액을 첨가하였다. 다시 균을 포함한 한천배지를 시험할 한천배지 위에 분주한 후, 50 μ l의 시료, erythromycin, amphotericin B (positive control)를 각각의 원반(paper disk)에 적신 후 배지 위에 치상하고

균이 충분히 자랄 때까지 30~37°C에서 3~4일 동안 배양하였다. 항균활성은 배지 내에 형성된 투명대 크기(직경)를 millimeter단위로 측정하여 나타내었다.

4) 항암성 평가

JurKat T 세포(T cell leukaemia, KCLB 40152, 한국세포주은행, 급성 백혈병 세포주)와 MCF-7 세포(Adenocarcinoma, KCLB 3002, 한국세포주은행, 유방암 세포주) 배양을 이용하여 시험물질에 대한 세포 독성을 테스트하기 위해 시험물질을 처리하고 세포를 배양하여 세포의 viability를 분석하였으며, 생세포를 측정하기 위한 방법으로는 MTT assay를 이용하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 담황색의 기질로서 생세포의 미토콘드리아 내의 호흡효소에 의해 개열하고 암청색의 formazan을 생성한다. 죽은 세포에서는 반응이 일어나지 않으므로 이 formazan의 생성량은 생세포수 측정에 이용하였다.

세포배양은 JurKat-T 세포와 MCF-7 세포를 RPMI1640 배지에 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며 다음 순서로 처리하였다..

① 시험 시료를 100 mg/ml(10%, w/v) 농도로 DMSO에 녹였다. 시료농도는 세포에 처리할 농도의 200~1000배로 준비해 두었다.

* Jurkat T세포와 MCF-7세포에서 DMSO는 0.5% 농도까지 세포독성이 없는 것으로 알려져 있다(Plochemann K,2007). 따라서 각 세포마다 처리시료의 최고농도와 같은 양의 DMSO를 처리하여 세포독성효과를 관찰하였다.

② MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 시약은 PBS(pH 7.4)에 1mg/ml 농도로 녹인 후 0.2 um syringr filer로 filtration 한 후 분주해서 냉장 보관하였다.

한편, 세포생존력 측정은 다음 순서에 의하여 수행되었다.

① JurKatT 세포와 MCF-7 세포를 96 well plate에 1X10⁴개/well 농도로 접

종한 후 하루동안 배양한다.

② 각각의well에 시험물질을 농도별로 처리한 후, 72시간 동안 다시 배양한다.

③ 시험물질 처리기간이끝난 후 전체 배지의 1/10되는 양으로 MTT 용액 (1 mg/ml in PBS)을 넣어준다.

④ 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 반응시킨다.

⑤ MCF-7 세포의 경우 배양액을 모두 제거하고 각 well에 DMSO를 100 ul 씩 넣고 세포내 형성된 formazan을 용해시킨다. Jurkat T 세포의 경우 1.7ml tube에 담고 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 배양액을 제거한 후 남은 cell pellet에 DMSO를 가하여 녹인다.

⑥ 540nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정한다.

4. 동물실험을 통한 안토시아닌 독성 평가

가. 공시재료

검정콩 안토시아닌 효능의 in vitro 분석에 이용된 재료를 사용하였다.

나. 시험 및 방법

1) 시험계

마우스를 이용한 anthocyanin를 단회 및 4주 반복 경구시 독성변화를 관찰하기 위해 임상증상, 혈청생화학적 검사, 조직병리학적 검사 등을 통하여 무관찰부 작용량 (No observed adverse effect level, NOAEL)을 구함으로써 anthocyanin에 대한 안전성을 분석하였다.

시험계는 마우스 ICR 계통을 (주)코아텍에서 구입 후 사용하였는데 본 ICR 마우스는 설치류 실험동물로서 종 및 계통이 확립되어있고, 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있다. 성별 및 구입동물 수는 암수 마우스 각 25 마리였으며 구입시 주령 및 체중범위는 5주령으로 수컷 25~30 g, 암컷 20~

26 g이었다. 이들은 약 1주일간의 검역순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하고 동물의 건강상태를 확인하였다. 검역순화기간 종료 시 체중을 측정하고, 일반상태 및 체중증가에 이상이 없는 암수 각 25마리를 선발한 후, 체중을 기초로 하여 'Z'자 식으로 균분리 하였으며, 군 평균체중 및 표준편차를 계산하여 군간 균등성 여부를 확인하였다. 따라서 시험투여는 6주령으로 수행되었다.

2) 사육 환경조건

사육 환경조건은 온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 20\%$, 환기회수 및 방식은 10~15회/시간으로 전 배기방식을 택했으며, 조명시간 및 명암주기는 오전 7시~오후 7시 조명(12 hr 점등/12 hr 소등)으로 조도는 150 ~ 300 Lux로 조정하였다.

사료는 일반 마우스 사료를 (주)중앙실험동물에서 구입 후 사용하였으며, 급이방법은 급이기에 고품사료를 넣어 자유섭취 시켰다. 음수는 필터와 유수 살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수를 사용하였으며 폴리카보네이트제 음수병 (500 mL)에 정제수를 넣어 자유섭취 시켰다.

안토시아닌은 마우스에 경구 투여시켰는데 개체별 투여액량은 최근의 체중을 기준으로 산출하였다. 단회 독성 시험은 투여 전에 약 16시간 동안 음수를 자유섭취 시키면서 절식시킨 후 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (1mL)를 이용하여 위내에 단회 강제투여하고, 약 3 ~ 4시간 후에 사료를 급여하였다. 반복 경구 투여 독성 시험은 매일 오전 일정한 시간에 4주간 1일 1회 위내에 강제 투여하였다.

3) 시험군 및 용량설정

시험군 및 용량설정은 다음과 같이 하였다.

① 단회 경구투여 독성 시험군

군구성		투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물 수(개체번호)	
				수컷	암컷
G1	대조군	0	10	6(1M01~06)	6(1F01~06)
G2	고용량군	5,000	10	6(2M01~06)	6(2F01~06)

② 4주 반복 경구투여 독성 시험군

군구성		투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물 수(개체번호)	
				수컷	암컷
G1	대조군	0	10	6(1M01~06)	6(1F01~06)
G2	고용량군	1,000	10	6(2M01~06)	6(2F01~06)

③ 용량설정

단회 경구투여 독성 실험은 식약청 고시에 명시된 최고 농도인 5,000 mg/kg을 고용량군으로 설정하였으며, 대조군에는 부형제인 정제수를 투여하였다. 4주 반복투여 독성 실험에서는 anthocyanin은 독성관련 보고가 되지 않은 안전한 물질인 점을 감안하여 OECD 가이드라인에서 제시하는 한계시험용량인 1,000 mg/kg을 고용량으로 설정하였다. 대조군으로는 정제수를 투여하였으며 투여액량은 10 mL/kg으로 하였다.

다. 관찰 및 검사방법

관찰 및 검사방법은 다음과 같이 수행되었다.

1) 일반증상 관찰

관찰기간 중 모든 시험계에 대하여 1일 1회 일반상태, 운동성, 자율신경계의 기능 및 배설물 등의 일반증상을 관찰하고, 오후에 빈사나 사망동물의 유무를 확인하였다. 다만, 단회 급성독성 시험은 투여 2일부터 15일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

2) 빈사 및 사망동물의 처리

관찰기간 중 빈사동물은 더 많은 자료를 얻기 위하여 ether로 마취하여 복대동맥에서 가능한 범위 내로 혈액을 채취하고 부검을 실시하였으며, 사망 동물은 발견 시마다 부검하는 것을 원칙으로 하나, 즉시 부검이 불가능할 경우 냉장보관 후 24시간 이내에 부검하였다.

3) 체중측정

체중은 군분리시, 투여개시 일, 투여 개시 후 주 1회, 그리고 부검 전 절식체중을 측정하였다. 단회 급성 독성 시험에서는 체중은 투여 1, 4, 8일 및 15일(부검일)에 측정하였다.

4) 절식

모든 시험동물에 대하여 부검 전 18시간 이상 절식시켰다.

5) 혈액학적 검사

실험종료 시 모든 생존동물은 절식시킨 후 복대동맥으로부터 혈액을 채취한 후, 그 중 약 200 uL 은 EDTA가 함유된 CBC bottle에 취하여 전임상 GLP기관인 (주)바이오톡스에 의뢰하여 혈구자동측정기(ADVIA 120, Bayer, Germany)로 다음 항목들을 측정였다.

항목	단위	측정방법
총적혈구수 (total erythrocyte count : RB)	10 ⁶ cells/uL	Isovolumetric 2D, Flow cytometry method
혈색소량 (hemoglobin concentration : HG)	g/dL	Optical absorbance method
헤마토크리트치(hematocrit : HCT)	%	Calculated
평균 적혈구 용적 (mean cell volume : MC)	fL	Calculated
평균 적혈구 헤모글로빈량 (mean cell hemoglobin : MCH)	pg	Calculated
평균 적혈구 헤모글로빈농도 (mean cell hemoglobin concentration MCHC)	g/dL	Calculated
혈소판수(platelet : PLT)	10 ³ cells/uL	Isovolumetric 2D, Flow cytometry method
총백혈구수 (total leucocyte count WBC)	10 ³ cells/uL	Flow cytometry, Optical lobularity
백혈구백분율(WBC differential countin - 중성호성백혈구(neutrophils : NEU) - 림프구(lymphocytes : LYM) - 단핵구(monocytes : MONO) - 산호성 백혈구(eosinophils : EOS) - 염기호성 백혈구(basophils : BASO)	%	Flow cytometry, Peroxidase stain

6) 혈청생화학적 검사

전임상 GLP기관인 (주)바이오독스에 의뢰하여 혈청생화학적 검사를 혈액학적 검사에서 사용하고 남은 혈액을 사용하여 실시하였다. 즉, 혈액을 원심분리(3000 rpm, 10분)한 후, 혈청을 분리하여 혈액생화학분석기(7080, HITACHI, Japan)를 이용하여 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
알라닌 아미노기전이효소 (alanine aminotransferase : ALT)	U/L	JSCC method (UV Kinetic)
아스파테이트 아미노기전이효소 (aspartate aminotransferase : AST)	U/L	JSCC method
알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase : ALP)	U/L	p-Nitrophenylphosphate substrate method
혈액요소질소(blood urea nitrogen : BUN)	mg/dL	Urease-GLDH
크레아티닌(creatinine : Crea)	mg/dL	Jaffe
총빌리루빈(total bilirubin : T-Bili)	mg/dL	Vanadate oxidation method
총콜레스테롤(total cholesterol : T-Chol)	mg/dL	Cholesterol oxidase HDAOS method
트리글리세라이드(triglycerides : TG)	mg/dL	COD-HDAOS method (Glycerol blanking)

7) 부검

사망동물, 빈사 처분동물 및 관찰기간 종료 시 계획부검 동물에 대해서 외관검사를 실시한 후 체표, 두부, 경부, 흉부 및 복부를 포함한 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

8) 장기중량 측정

부검시 개체별로 다음의 장기들을 적출하여 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기 중량비를 산출하였다.

- 심장(heart), 간(liver), 신장(kidney - Lt./Rt.), 비장(spleen), 폐(lung) 고환(testis-Lt./Rt.), 난소(ovary - Lt./Rt.), 부고환(Epididymus-Lt./Rt.)

9) 기관·조직의 고정 및 검체의 제작

부검시 육안소견이 관찰된 장기·조직을 적출하여 10 % 중성완충 포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정한 후, 고정된 장기·조직은 탈수·파

라핀, 조직의 파라핀 포매 등의 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 이후 박절과정을 거쳐 슬라이드를 제작하여 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 실시하였다.

10) 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사는 아래의 기관·조직에 대하여 실시하였다.

- 대조군과 고용량군의 모든 개체
- 빈사 및 사망개체

라. 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량 등 자료들에 대해 Levene's test를 실시하여 분산의 동질성을 확인하고, 분산이 이질적인 경우 적절한 data transformation을 실시한 후 분산의 동질성을 재확인하였다. 그 다음 one way ANOVA test를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과 비교 시 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였다.

5. 추출조건과 첨가물에 따른 안토시아닌 함량과 색소 안정성 평가

가. 안토시아닌 추출

1) 재료

검정콩을 유기농 매장(생협, 인천)에서 구입하여 -20°C 에서 보관하면서 사용하였다.

2) 안토시아닌 색소 추출

(가) 메탄올 추출

검정콩 종피 1 g을 추출용매 30 ml(메탄올 60%)에 넣고 상온상태에서 24 시간 추출하였다. 추출한 용액을 syringe와 syringe filter(Nylon 66 syringe filter 13 mm, 0.45 μ m)를 이용하여 여과한 다음 보관하면서 시료로 사용하였다. Standard는 polyphenols사(Sandnes, Norway)에서 구입한 cyanidin-3-glucoside(C3G), delphinidin-3-glucoside(D3G), petunidin-3-glucoside(Pt3G)을 사용하였다. 추출한 시료는 모두 whatman No.4 로 여과하여 3.5 brix로 감압농축(Vacuum Evaporator, Eyela, Japan)한 후 분석에 사용하였다.

(나) Counter Current 추출

검정콩 종피를 Laboratory Blender(Waring Laboratory, Chicago, USA)에 분쇄하여 10 g 시료에 155 ml의 물을 넣고 1 시간마다 새로운 종피를 넣고 추출하여 세 번 모으는 counter current system으로 추출하였다. 온도 조건은 8 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C에서 추출하였으며, 추출물은 Whatman No. 4 로 여과한 후 3.5 brix로 감압 농축하여 암소에 보관하며 시료로 사용하였다.

3) 안토시아닌 함량 분석

안토시아닌 함량은 용매와 각각의 추출 방법에 의한 농도를 HPLC(Agilent LC 1200, Santa Clara, USA)로 측정하였으며, 분석 조건은 Table 4와 같다.

4) 색차 분석

색차 측정은 색소 추출물을 빛이 투과되지 않도록 제작된 백색 계량용기(dia. 32 mm i.n. \times H150 mm)에 10 ml을 넣어 8 $^{\circ}$ C의 표준 색판(백색판-L값은 0.44, a값 1.38, b값 -0.62), 80 $^{\circ}$ C의 표준 색판(L값은 0.63, a값 2.37, b값 0.47) 및 60 $^{\circ}$ C의 표준 색판(L값은 2.82, a값 4.06, b값 0.63)으로 기본 값을 설정한 spectrophotometer(d-3500d, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 Hunter's value 인 L(Lightness), a(Redness), b(Yellowness)값을 측정하였다.

나. 색소 안정성 분석

1) 가열에 의한 색도 변화

Anthocyanin 색소 추출액의 열 안정성을 조사하기 위하여 열수 추출방법에 의한 각 시료의 조추출물을 round flask에 50ml 씩 분주하고 환류냉각관을 연결한 다음 oil bath(471, Buchi, Switzerland)를 이용하여 가열하였다. 메탄올 추출액은 syringe와 syringe filter(Nylon 66 syringe filter 13mm, 0.45micrometer)를 이용하여 여과한 다음 20배 희석하여 cap test tube에 각각 10ml 씩 넣고 밀봉한 후 분석을 수행하였다. 가열 변색에 대한 안정화제의 효과를 명확히 하기 위해 비교적 가혹조건인 100℃에서 0-180분간 가열하는 조건을 설정하여 실험하였다. 반응물은 가열 후 즉시 ice bath에 방치하여 변색 반응을 종료시켰다. 가열 처리된 조추출물의 변색 지표로는 퇴색도(Degradation index, DI)와 Spectrophotometer의 Hunter's value에 의한 색도값을 사용하였다. DI는 Fuleki와 Francis의 방법에 따라 조추출물을 pH 1.0의 완충용액(0.2N KCl : 0.2N HCl) (25:67)과 pH 4.5 완충용액 (1N sodium acetate : 1N HCl : water)(100:60:90)을 이용하여 적절한 농도로 희석하고 525nm에서 흡광도를 측정 후 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$DI = A_{pH1.0} / (A_{pH 1.0} - A_{pH 4.5})$$

$A_{pH1.0}$ = Absorbance at 525nm at pH 1.0

$A_{pH 4.5}$ = Absorbance at 525nm at pH 4.5

색도값은 색차계(Minolta-3500d)를 이용하여 Hunter's L, a, b 값으로 나타내었다.

2) 당의 영향

색소 추출액의 열 안정성 변화는 sucrose(Junsei Chemical Co, Osaka, Japan)와 maltose(Junsei Chemical Co, Osaka, Japan)를 선정하여 검정콩 추출물에 최종 농도가 각각 1%, 10% 되도록 첨가하여 반응액을 제조하였다.

반응액의 pH를 3.0으로 조절하고 100℃에서 0~180분간 동안 가열한 후 DI를 측정하였다.

3) 색소 안정화제의 영향

색소 안정화에 이용되는 β -cyclodextrin(Junsei Chemical Co, Osaka, Japan), maltodextrin(Junsei Chemical Co, Osaka, Japan)을 1%와 5%의 농도로 각각 첨가하여 100℃에서 180분간 가열한 후 DI 변화를 측정하여 안토시아닌의 가열 안정성을 조사하였다.

다. 통계처리

실험결과는 SAS program(Version 6.0)을 이용하여 one way 분산분석(ANOVA)을 실시하여 Duncan의 다중 범위검정으로 시료간의 유의차를 검증하였으며, 추출조건과 첨가물간의 상관관계는 Pearson의 적률 상관 계수를 이용하여 상관도를 검증하였다.

Table 4. HPLC conditions for anthocyanin pigments analysis

Column	Tosoh Bioscience TSKgel TM ODS - 120T (5 μ m 150 \times 4.6 mm)
wavelength	UV - visible 530nm lange scanning: 200 ~ 900
Mobile phase	H2O : Methanol : Formic Acid (78 : 17 : 5 v/v/v)
Flow rate	1.0ml/min
Sample size	2.0 μ l

6. 안토시아닌 첨가 발효유 개발

가. 요구르트의 제조

1) 안토시아닌의 추출

Counter current에 의한 추출 방법으로 검정콩 종피에서 안토시아닌을 추출하였으며, 추출물은 L값이 80정도에 이를 때 까지 감압농축하였다.

2) 공시균주

발효유를 제조하기 위해 사용된 균주로는 호기성 균 2 종(*Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*)과 혐기성 균주 3 종(*Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*)의 균주를 주식회사 Cell Biotech에서 분양받아 사용 하였다.

3) 요구르트 재료

선발된 균주로 유산균 발효유를 제조하였으며 발효유 기질로는 서울우유 협동조합의 탈지분유와 우유를 사용하였다. 농축 안토시아닌과 선발된 균주를 배양없이 starter를 0.02% 접종한 후 38℃ 항온기에서 24시간 배양하여 유산균 발효유의 품질 특성을 측정하였다.

4) 요구르트의 제조

안토시아닌 요구르트 제조를 위한 최적의 균주를 선정하기 위해 탈지분유 10g, 물 50ml에 각 미생물을 0.0004% 비율로 92℃에서 10분간 가열 살균하고 냉각한 후 접종하였다. 호기성 균주 2종과 혐기성 균주 3 종을 가지고 안토시아닌 요구르트를 제조 개발 실험을 한 결과 호기성 균주에서는 안토시아닌 요구르트 제조가 가능하였으나 모든 혐기성 균주에서는 제조되지 않았으며, 호기성 균주와의 혼합에서도 안토시아닌 요구르트는 제조 불가능하였다. 따라서 *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*와 이 두 종류의

균주의 혼합균을 실험균주로 선정하여 제조하였다. 각 대조균과 실험균은 38°C에서 8 시간 배양하면서 24시간 간격으로 시료를 채취하여 pH, 젖산균수를 측정하였다.

나. 요구르트의 분석

1) pH 및 산도 측정

적정산도 및 pH, 발효 중 경시적인 산의 생성량을 조사하기 위해 발효액 5 g에 멸균 증류수 45 ml를 가한 후 잘 용해하였으며, 10 ml를 취하여 0.01N Phenolphthalein 용액으로 적정하였고, pH(Orion 3 Star, Thermo electron corporation)를 측정하였다.

2) 젖산균수 측정

젖산균수는 배양액 1 g에 멸균 식염수 9 ml을 혼합 분쇄하여 10진법으로 적절하게 희석하였다. 각각의 희석액 1ml를 plate에 접종하고 MRS agar(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)배지를 부어 혼합한 후 40°C 에서 24시간 배양하였다. 형성된 colony는 g당 colony forming units(CFU/g)로 나타내었다. 측정은 3 회 반복실험을 실시하여 평균값으로 나타내었다

3) 점도

발효가 완료된 요구르트를 실온에서 Brookfield viscometer(Model LV DV-E, Brookfield Co., USA)를 이용하여 상온에서 spindle No.5, 회전속도 15rpm에서 2 분이 경과 한 후의 점도를 측정하였다.

4) 유기산

유기산 변화를 측정하기 위해 시료를 적당량 취하여 탈이온수(deionized water)로 5 배 희석한 후 1분간 흔들여 주고 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 얻어진 상등액을 Sep-Pak C18 cartridge(Waters Co.)에 통과

시킨 후 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 표준 유기산으로는 초산, 젖산, 타르타르산, 옥살산을 사용하였으며, HPLC 분석 조건은 다음과 같다.

Instrument ; Vitamin Analyzer

Column : μ Bondapak C18(300mm x 3.9mm)

Detector :UV930 (210nm)

Mobile phase : 10mM KH₂PO₄(pH2.32 with H₃PO₄)

Flow rate : 0.6 μ l/min

Injection vol.: 10 μ l

Column temperature : 20 $^{\circ}$ C

Sample temperature : 20 $^{\circ}$ C

5) 색도

안토시아닌이 0.5%, 1.0%, 1.5% 첨가된 시료들을 색차계로 Hunter value를 측정하였다. 증류수를 표준으로 이용하여(L : 13.93, a : 0.57, b : 3.56) Spectrophotomer (CD-3500d, Minolta, Japan)로 분석하였다.

6) 관능검사

발효가 완료된 요구르트에 설탕을 10% 넣어 잘 균질화 시키고 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 보관한 후 가천의과학대학교 식품영양학과 학생 15명을 검사원으로 색(color), 향미(flavor), 맛(taste), 신맛(sour taste) 및 전체적인 기호도(overall preference)에 대하여 최저 1 점, 최고 5 점의 5 단계 평가법으로 평가하였다.

7) 통계 처리

통계 분석은 SAS Program 8.0을 사용하였으며 Duncan's multiple range test에 의해 시료간 유의 수준은 5% ($p < 0.05$)에서 검증하였다.

7. 안토시아닌 활용 머핀 개발

가. 실험재료

머핀제조에 혼합되는 분말들은 100 mesh의 체를 통과시켜 재료로 사용하였으며 박력분을 비롯한 재료들과 재료들의 구입처는 Table 5와 같다.

밀가루와 머핀 제조에 혼합되는 재료들의 입자 크기 분포는 시료 250 g을 10분간 sieve shaker(Rotary-29.W.S.Tyler)를 이용하여 측정하였으며, 시료의 일반성분 분석은 AOAC법에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 직접 회화법으로 분석하였다.

나. 안토시아닌 머핀의 제조

제조 개발된 분말들을 straight dough method에 의하여 계란 1 개(50g), 물엿(13g), 식용유(15g)에 premix 분말 216g 과 물 70g을 넣어 교반하여 머핀을 제조하였다. 기본적인 formula는 Table 6과 같다. 머핀의 제조는 상업적인 레시피에는 설탕과 버터가 밀가루 대비 70% 이상 함유되는 고칼로리 식품이므로 본 실험에서는 버터를 식용유로 대체하면서 첨가량을 감소시켰으며, 설탕도 밀가루 대비 70% 인 것을 함량을 높이고 당류와 결정 과당으로 대체하여 기본 레시피를 정하였다. 안토시아닌 색소 추출은 counter current system으로 추출하였고 감압농축한 상태의 brix는 3.5로 한 후 Hunter value를 측정하였다. 밀가루 용적비 당 10%부터 첨가하면서 예비실험 한 결과 제조는 80% 까지 가능하였으나 특유의 짹짹한 맛으로 기호도가 현저히 떨어져 10-50% 범위로 조정하였으며, 레시피 개발을 위해 반죽은 National Co(USA)의 mixer로 반죽하였다. 반죽은 알미늄 호일 컵에 2/3 되게 담아 예열된 전자렌지(MP-927MB, LG 전자)를 이용하여 180℃에서 20분간 baking 하였다.

Table 5. Materials of preparation of cup cake premix

Materials	Place of purchase or maker	Time of purchase
Wheat flour	대한제분	2007년 10월
Sugar(purity 99.0%)	제일제당	2007년 7월
Instant dry yeast 98.9%	제일제당	2007년 9월
Corn oil	제일제당	2007년 10월
Salt	삼양소금	2007년 10월
Liquified sugar	제일제당	2007년 12월
Egg	마트	수시 구입
Vanilla flavor	삼양사	2007년 10월
Cheese mixed power	Seo Kang Dairy & Food Co., Ltd.	2007년 12월
Baking powder	제일제당	2007년 12월
Skim milk	서울 우유	수시 구입
Glucose powder	삼양사	2007년 10월
Yogurt powder	Seo Kang Dairy & Food Co., Ltd.	2007년 12월
Rye powder	캐나다산, 한중식품	2008년 1월
Squash powder	계림산업(주)	2008년 2월
Black sesame powder	E-마트 부평점	2008년 3월

Table 6. Baking formula based on wheat flour weight

Ingredients	Preparation of Muffin											
	C	CV1	CV2	CV3	CB	CB1	CB ₂	CB3	CS	CS ₁	CS ₂	CS ₃
	quantity (g)											
Corn oil	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Salt	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Skimmed milk powder	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Powder of glucose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Powder of cheese	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Egg(개)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Low gluten flour	450	405	360	315	400	360	315	275	350	405	360	315
Baking powder	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Vanilla	10	10	10	10								
anthocyanin extract		45	90	135		40	135	275	40	45	90	135
Powder of black sesame seed					50	50	50	50				
Powder of squash									50	50	50	50
Sorbitol	40	40	40	40	40	40	40	40	40			
분당	40	40	40	40	40	40	40	40	40			
결정과당	10	10	10	10	10	10	10	10	10			
maltitol	2	2	2	2	2	2	2	2	2			

C : Muffin with powder of vanilla

CV1: Muffin with powder of vanilla and anthocyanin extract 10%

CV2: Muffin with powder of vanilla and anthocyanin extract 20%

CV3: Muffin with powder of vanilla and anthocyanin extract 30%

CB: Muffin with powder of black sesame seed

CB1: Muffin with powder of black sesame seed and anthocyanin extract 10%

CB2: Muffin with powder of black sesame seed and anthocyanin extract 30%

CB3: Muffin with powder of black sesame seed and anthocyanin extract 50%

CS; Muffin with powder of squash

CS1: Muffin with powder of sqash and anthocyanin extract 10%

CS2: Muffin with powder of sqash and anthocyanin extract 20%

CS3: Muffin with powder of sqash and anthocyanin extract 30%

다. 머핀의 품질 분석

1) 품질 특성

머핀의 부피와 무게는 baking한 다음 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 측정하였으며, 부피는 종자 치환법으로 측정하였고, 제조한 컵 케익으로부터 무게(g), 부피(cc)를 측정하여 이로부터 비체적(cc/g)을 산출하였다. Volume index 및 uniformity는 AACC 10-91 방법(AACC 1992)을 이용하여 측정하였다.

Volume index는 머핀의 부피 증대를 입체적으로 나타내기 위한 척도로 컵 케익을 세로로 절단 한 다음 양면과 밑면의 중심과 일직선인 선의 길이를 측정 후 합하여 3으로 나뉘 나타내었다. Uniformity는 세로로 자른 단면의 양면의 길이를 각각 측정하여 뺀 값으로 나타냈다.

2) 색도 측정

머핀의 색도는 내부를 취하여 Spectrophotometer(Minolta CR-3500d, Japan)를 사용하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값을 3 회 반복 측정하였으며, 이때 표준 백판의 L, a, b 값은 96.86, -0.07, 2.02 이었다.

3) 머핀의 조직감 측정

머핀의 조직감은 baking 1 시간 후 컵 케익의 내부를 동일한 크기 (5x5x3cm)로 잘라 Texture analyzer(TA-XT2, Stable Micro Systems Co., UK)를 사용하여 측정하였다. Force-time 곡선의 Texture profile analysis(TPA)를 parameter로부터 탄력성(springness), 응집성(cohesiveness), 점성(gumminess), 경도(hardness), 씹힘성(chewiness)등을 산출하였고, 이 모든 측정에 이용한 알루미늄 plunger는 지름 35 mm이었으며, pretest speed 5.0 mm/sec, test speed 0.5mm/sec, post test speed 10mm/sec, distance 10mm, trigger force 20g 0.5 mm/sec의 속도로 10 mm까지 압축하여 측정하였다.

4) 관능검사

관능검사원으로 가천의과학대학교 식품영양과 학생들에게 실험목적을 설명하고 각 특성치에 대하여 반복하여 훈련시킨 후 각각의 처리구별로 제조된 머핀의 외관, 색상, 향, 맛, 조직감, 전반적인 기호도에 대하여 1(대단히 나쁘다)에서 5(대단히 좋다)까지의 점수를 사용하여 평가하도록 하였다.

5) 통계 분석

통계 분석은 SAS(Statistical Analysis System, Version 6) 통계 package 로 분산분석 및 Duncan 다범위 검증법(Duncan's multiple test)을 사용하였다.

제 2 절 연구 수행 결과 및 고찰

1. 검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 및 환경변이 분석

가. 검정콩 유전자원 안토시아닌 함량 평가

본 연구에 사용한 유전자원의 재배현황은 표 7과 같다.

과종된 유전자원은 총 1,042종이 출현하였으나 14종이 생육도중에 고사, 5종은 분리되어 총 1,032점을 수확하여 분석할 수 있었다. 유전자원 1,032종에 대한 안토시아닌 함량 분포를 조사한 결과는 표 8과 같다.

총 안토시아닌 함량은 평균 11.67, 최대값은 23.65, 최소값은 0.54mg/g을 보였으며 등급별 분포종수는 10~15mg/g 범위가 371종으로 가장 많았고, 5~10mg/g 359종, 15~20mg/g 200종, 0~5mg 72종이었다. Cyanidin-3-Glucose chloride는 평균 8.81, 최대 21.35, 최소값은 0.54mg/g으로 나타났으며 계급별 분포종수는 5~10mg/g 범위가 378종으로 가장 높았고, 10~15mg/g 303종, 0~5mg/g 251종, 15~20mg/g 98종이었으며 20mg/g 이상은 2종으로 총 안토시아닌 함량과 유사한 경향으로 안토시아닌 종류 중에서 총 안토시아닌 함량에 미치는 영향이 가장 큰 것으로 나타났다. Joo 등(2004) 등이 총 안토시아닌 함량은 3.32~16.67mg/g이란 보고에 비하여 범위가 더 넓었는데, 이는 더 다양한 유전자원을 수집분석에 결과라 판단되며 특히 20.0mg/g이 넘는 유전자원은 육종소재로 유용하다고 판단된다.

Dephinidin-3-Glucose chloride는 평균 1.78, 최대 5.86mg/g으로 총 안토시아닌 함량에 미치는 기여비율이 미미한 것으로 나타났다. 또 함량별 수집종 분포종수는 0~5mg/g 범위가 조사된 1,032종중 941종이었고, 5~10mg/g 범위는 3종이었고, 검출되지 않은 유전자원도 88종이 있었다. Petionidin-3-Glucose chloride는 평균 0.79, 최대 4.33mg/g으로 총 안토시아닌 함량에 미치는 영향이 가장 적은 것으로 나타났다. 또 함량별 수집종 분포종수는 0~5mg/g 범위가 894종이었고, 검출되지 않은 유전자원도 138종이나 되었다.

표 7. 검정콩 유전자원의 재배현황

(단위 : 종)

연도	과종	출현	정상생육	고사	분리	수확
2006	300	300	294	6	5	299
2007	500	498	496	1	0	496
2008	244	244	237	7	0	237
계	1044	1042	1,027	14	5	1,032

표 8. 수집 유전자원의 안토시아닌 함량

	Total	안토시아닌 함량(mg/g)						Min.	Max.	Mean
		n.d ¹⁾	0~5	5~10	10~15	15~20	20<			
Total	1,032	0	72	359	371	200	30	0.54	23.65	11.37
C3G	1,032	0	251	378	303	98	2	0.54	21.35	8.81
D3G	1,032	88	941	3	0	0	0	nd	5.86	1.78
Pt3G	1,032	138	894	0	0	0	0	nd	4.33	0.79

C3G : Cyanidin-3-Glucose chloride; D3G : Dephinidin-3-Glucose chloride, Pt3G : Petionidin-3-Glucose chloride

1) not detected

검정콩 유전자원의 개화기 분포를 조사한 결과는 그림 1과 같다.

유전자원의 개화기는 7월 12일부터 8월 13일까지 분포하였다. 이중에서도 7월26일~7월 31일이 330점으로 가장 많았고, 그 다음은 7월 25일 이전 214 점, 8월1~5일 174점, 8월 6~10일 68점, 8월 11~13일 8점 순이었다. 한편, 개화기에 따른 유전자원의 안토시아닌 평균함량을 조사한 결과는 표 9와 같이 개화가 늦을수록 많은 경향을 나타내어 개화기별로 8월 11일~13일 > 8월 6~8월10일 > 8월1~6일 > 7월26~31 > 7월25일 이전 순으로 많았다. 한편 Cyanidin-3-Glucose chloride도 총 안토시아닌 함량과 같은 경향이었으나 Dephinidin-3-Glucose chloride와 Petionidin-3-Glucose chloride는 개화기간에 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다.

검정콩 유전자원의 생리적 성숙기(R₆) 분포는 그림 2와 같다.

유전자원의 생리적 성숙기(R₆)는 9월 9일부터 10월 28일까지 분포하였다. 이중에서도 10월 1~10일에 347점으로 가장 많았고, 그 다음은 9월 21~30일 301점, 10월11~20일 88점, 9월 09~20일 45점, 10월21~31일 9 순이었다.

생리적 성숙기에 따른 안토시아닌 함량 변이를 분석한 결과는 표 10과 같다. 개화기에 따른 유전자원들의 총 안토시아닌 평균함량은 10월 21~28일 개화 14.7 > 10월11~20일 개화 13.6 > 10월 1~10일 개화 11.6 > 9월21~30일 개화 9.8 > 9월9~20일 개화 9.2mg/g으로 10월 28일까지 수확이 늦어질수록 많은 경향을 나타내었다. 한편 Cyanidin-3-Glucose chloride도 같은 경향이었으나 Dephinidin-3-Glucose chloride과 Petionidin-3-Glucose chloride 함량은 생리적 성숙기간에 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다.

수집된 검정콩 유전자원의 수확기 분포는 그림 3과 같다.

유전자원의 수확기는 8월 29일부터 11월 4일까지 분포하였다. 수확기에 따른 유전자원의 분포는 10월 1~10일에 394점으로 가장 많았고, 그 다음은 10월 11~20일 220점, 10월21~30일 91점, 9월 30일 이전이 34점 순이었다.

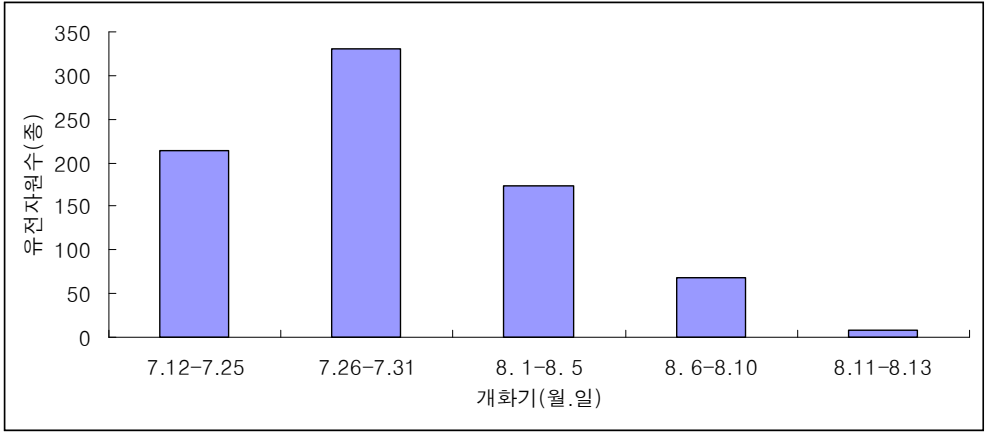


그림 1. 개화기별 수집종수 분포

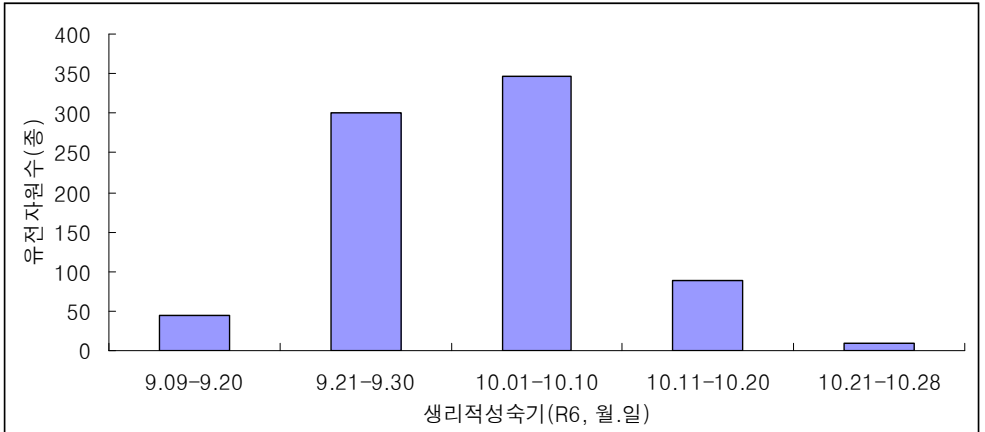


그림 2. 생리적 성숙기별 수집종수 분포

표 9. 개화기에 따른 안토시아닌 함량 변이 (단위 : mg/g)

	개 화 기(월.일)				
	7.12~7.25	7.26~7.31	8.1~8.5	8.6~8.10	8.11~13
Total	8.9±4.00	10.5±3.75	13.4±4.04	14.0±4.26	15.3±4.85
C3G	6.1±3.28	7.7±3.62	10.9±4.10	11.4±4.00	12.6±4.42
D3G	1.9±1.05	2.0±1.18	1.7±0.92	1.7±0.77	1.7±0.81
Pt3G	0.8±0.69	0.9±0.70	0.8±0.70	1.0±0.71	1.1±0.60

C3G : Cyanidin-3-Glucose chloride; D3G : Dephinidin-3-Glucose chloride, Pt3G : Petionidin-3-Glucose chloride

표 10. 생리적성숙기에 따른 안토시아닌 함량 변이 (단위 : mg/g)

	R 6 (월.일)				
	9.09~9.20	9.21~9.30	10.1~10.10	10.11~10.20	10.21~10.28
Total	9.2±4.04	9.8±3.79	11.6±4.59	13.6±3.67	14.7±3.04
C3G	6.8±3.58	6.9±3.39	8.9±4.30	11.6±3.77	13.3±2.54
D3G	1.5±0.08	1.9±1.03	1.9±1.12	1.5±0.85	1.0±0.95
Pt3G	0.9±0.70	1.0±0.77	0.8±0.63	0.5±0.51	0.4±0.27

C3G : Cyanidin-3-Glucose chloride; D3G : Dephinidin-3-Glucose chloride, Pt3G : Petionidin-3-Glucose chloride

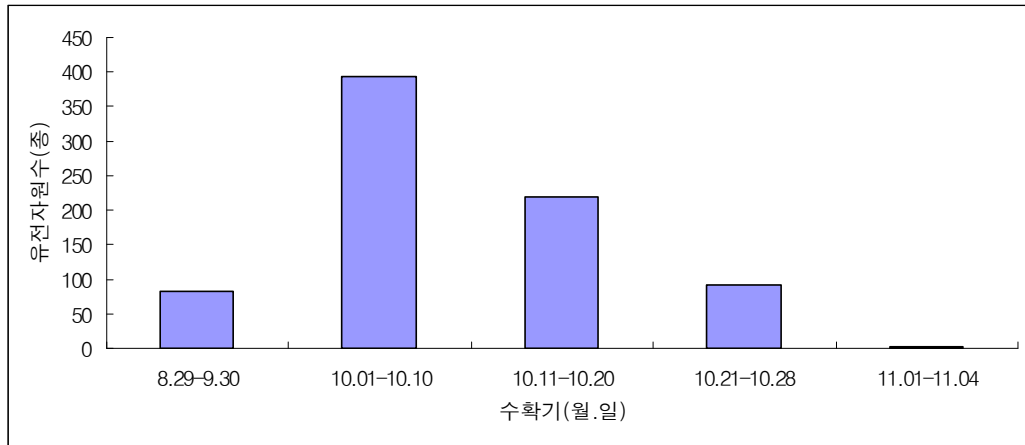


그림 3. 수확기 수집중수 분포

표 11. 수확기별 안토시아닌 함량 변이 (단위 : mg/g)

	R 7 (월.일)				
	8.29~9.30	10.1~10.10	10.11~10.20	10.21~10.31	11.1~11.4
Total	8.9±3.64	9.9±4.07	12.4±3.86	14.7±4.14	13.9±3.13
C3G	6.2±3.16	7.2±3.69	9.6±3.98	12.1±3.77	13.1±2.40
D3G	1.8±0.93	1.9±1.15	1.9±1.01	1.8±0.84	0.5±0.47
Pt3G	0.9±0.71	0.9±0.72	0.9±0.69	0.8±0.58	0.3±0.40

수확기에 따른 안토시아닌 함량 변이를 분석한 결과는 표 11과 같이 총 안토시아닌 평균함량은 수확이 늦어질수록 많아지다가 11월 1일 이후 다소 감소하는 경향을 나타내 10월 21~31일 이후 고숙기에 도달한 유전자원에서 $14.7 \pm 4.14 \text{mg/g}$ 으로 가장 많았고, 그 다음이 11월 1~4일 13.9, 1월 11~20일 12.4mg/g 순으로 많았다. 이 경향은 Cyanidin-3-Glucose chloride의 경우에도 유사하여 10월 21~31일이 12.1mg/g 으로 가장 많았다. 그러나 Dephinidin-3-Glucose chloride와 Petionidin-3-Glucose chloride는 일정한 경향을 보이지 않았다.

안토시아닌함량 축적이 이루어졌을 것으로 보이는 개화기부터 수확기까지의 등숙일수 분포는 그림 4와 같다. 수집된 유전자원의 등숙 소요일수는 51일부터 91일까지 분포하였다. 이중에서도 71~75일이 286점으로 가장 많았고, 그 다음은 66~70일 171점, 76~80일 146점, 61~65일 83점, 81~85일 63점 순이었으며 60일 이하 25점, 86일 이상이 15점이었다.

등숙일수에 따른 안토시아닌 함량 변이를 분석한 결과는 표 12와 같이 총 안토시아닌 평균함량은 등숙일수가 길어질수록 많은 경향을 나타내어, 86일 이상 유전자원이 14.5mg/g 로 가장 높았다. 그 다음은 81~85일인 유전자원들이 13.4mg/g 으로 많았으며 이는 Cyanidin-3-Glucose chloride의 경우에도 유사하였는데 이러한 경향은 Jung 등(1996)이 안토시아닌 함량은 생육일수에 의해 영향을 받는다는 보고와 같은 결과로 생각된다. 그러나 Dephinidin-3-Glucose chloride와 Petionidin-3-Glucose chloride는 뚜렷한 경향이 없었는데 이는 Joo 등(2004)이 D3G는 품종간에 큰 변이를 보이지 않았다는 보고와 유사한 결과로 판단된다.

유전자원의 종실크기에 따른 백립중 분포 조사 결과는 그림 5와 같다.

수집된 검정콩 유전자원의 100립중은 5.5~49.8g의 범위였으며 100립중에 따른 유전자원 분포는 25.1~30.0g이 231종으로 가장 많았고, 그 다음은 10.1~15.0g 180종, 20.1~25.0g 172종, 30.1~35.0g 122종, 5.5~10.0g 120종 순으로 많았으며 나머지는 35.1~40.0g 86종, 15.1~20.0g 64종, 40.1~45.0g 39종

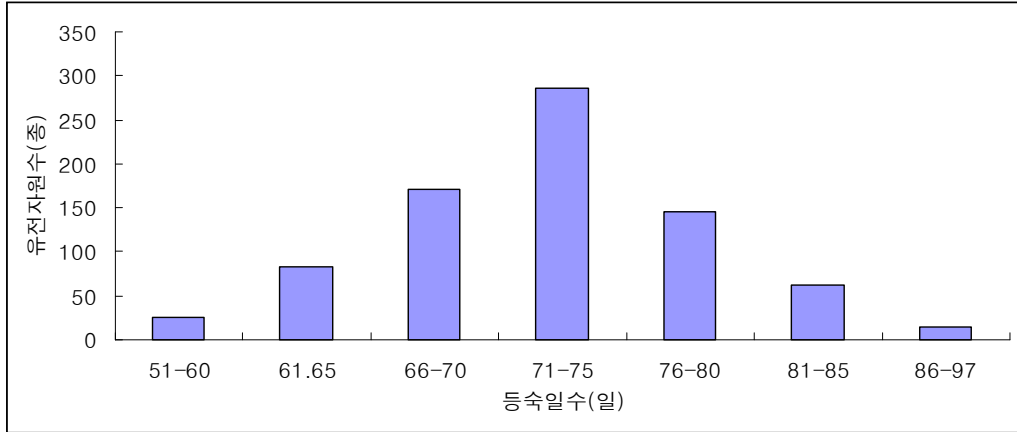


그림 4. 등숙일수별 수집종수 분포

표 12. 등숙일수에 따른 안토시아닌 함량 변이 (단위 : mg/g)

	등숙일수 (일수)						
	51~60	61~65	66~70	71~75	76~80	81~85	86이상
Total	9.9±3.00	10.3±3.95	9.8±3.99	10.6±4.41	12.6±4.16	13.4±4.15	14.5±4.66
C3G	7.2±3.30	7.6±3.78	7.2±3.78	7.9±4.13	9.7±4.16	10.6±4.21	11.9±4.20
D3G	1.8±1.00	1.7±0.98	1.7±1.08	1.9±1.13	2.0±0.98	1.9±1.03	1.8±0.85
Pt3G	0.8±0.80	1.0±0.71	0.9±0.77	0.8±0.71	0.9±0.58	0.8±0.63	0.9±0.63

순이었으며 45.1g이상도 42종이 있었다. 특히 우리나라 소비자들은 검정콩 중 대립이며 당 함량이 높은 서리태를 선호하는 것으로 알려져 있는데 35g 이상의 대립종 유전자원은 129종이었다.

수집된 유전자원의 안토시아닌 평균함량을 유전자원 종실크기로 나누어 분석한 결과는 표 13과 같다.

안토시아닌 함량은 종실중 5.5~35.0g까지는 큰 차이가 없었으나, 35g이상에서 15.7~17.8mg/g으로 많았으며, 이러한 양상은 Cyanidin-3-Glucose chloride도 같은 경향으로 35.1g 이상에서 12.5~15.7mg/g으로 많았다. 그러나 Dephinidin-3-Glucose chloride와 Petionidin-3-Glucose chloride 함량은 종실중에 따른 일정한 경향이 없었다.

이상을 종합하면 검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량분포는 개화기나 성숙기가 늦고 등숙일수가 길수록, 백립중이 대립인 경우가 총 안토시아닌 함량이 높은 편이었으며, C3G함량이 총 안토시아닌 함량에 기여하는 비율이 높아 안토시아닌 고함유 유전자원 선발은 C3G함량이 높고 대립이며 당 함량이 높은 자원을 중심으로 선발하는 것이 효율적이라 판단된다.

한편 백립중이 35g이상으로 대립이며 안토시아닌 함량이 많은 유전자원을 육종모재로 하여 고 안토시아닌 함유 계통을 육성하기 위해 인공교배 및 세대 진전을 실시하였다. 2006년 선발자원을 이용하여 2007년에는 표 14와 같이 인공교배 후 2008년에 43개 F₂집단을 육성하여 3,249립을 채종하였다(표 15). 이들은 향후 세대진전 및 선발로 안토시아닌 고함유 품종을 육성할 계획이다. 또 2007년 수집 선발된 유전자원을 이용하여 표 16과 같이 인공교배 17조합을 실시하여 82립의 F₁종자를 수확하고 동계에 F₂ 집단을 육성하였다. 이들은 안토시아닌 고함유 계통으로 육성될 것이며, 2008년 수집된 유전자원은 2009년 인공교배에 활용할 계획이다.

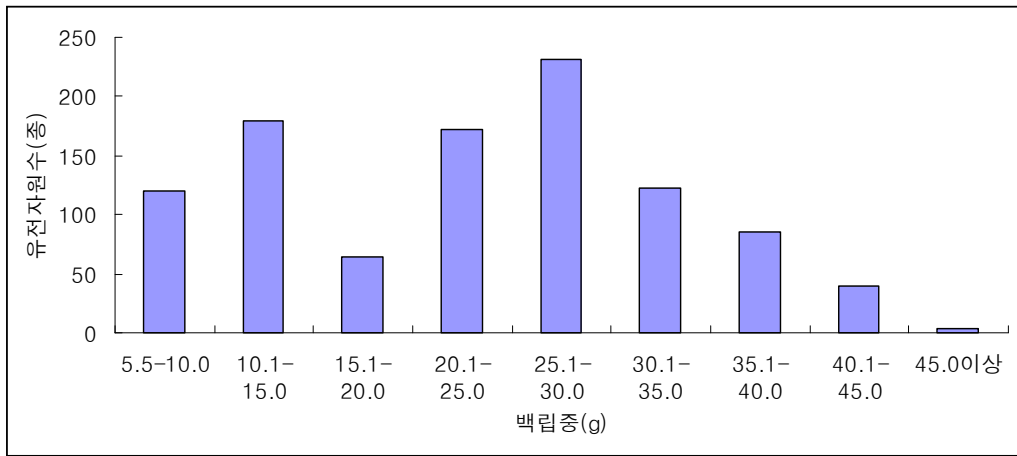


그림 5. 유전자원의 종실크기 분포

표 13. 종실중에 따른 안토시아닌 함량 변이 (단위 : mg/g)

	종실중(g/100립)								
	5.5~10.0	10.1~15.0	15.1~20.0	20.1~25.0	25.1~30.0	30.1~35.0	35.1~40.0	40.1~45.0	45.1이상
Total	10.0±3.18	10.7±4.06	10.3±3.28	10.9±4.05	10.8±4.60	11.9±4.66	15.7±4.01	14.6±3.05	17.8±4.12
C3G	7.6±3.55	8.5±4.15	7.5±3.16	7.9±3.89	8.1±4.38	9.3±4.17	13.1±3.86	12.5±3.14	15.7±4.30
D3G	1.4±0.98	1.3±1.14	1.9±11.2	2.1±0.96	2.0±1.01	2.0±1.02	1.9±0.71	1.6±0.91	1.7±0.84
Pt3G	1.0±0.83	0.8±0.80	0.9±0.78	0.9±0.60	0.7±0.52	0.7±0.54	0.7±0.46	0.5±0.40	0.5±0.24

표 14 . 2007년 인공교배 결과

과종번호	교배번호	교배조합	수확립수(립)
GBS001~005	GBS200701	IT177797/청자3호	5
GBS006~014	GBS200702	IT177797/보은재래	9
GBS015~016	GBS200703	IT177797/양양재래	2
GBS017~020	GBS200704	IT177797/정읍재래	4
GBS021~022	GBS200705	IT177797/화성재래	2
GBS023~030	GBS200706	보은재래/IT177797	8
GBS031~033	GBS200707	보은재래/정읍재래	3
GBS034~036	GBS200708	보은재래/화성재래	3
GBS037~038	GBS200709	정읍재래/IT177797	2
GBS039~040	GBS200710	정읍재래/화성재래	2
GBS041~041	GBS200711	정읍재래/보은재래	1
GBS042~043	GBS200712	화성재래/보은재래	2
계		12조합	43

표 15 . 2008년 F₂ 세대 양성 결과 (F₃ 종자 등숙 중)

세대	일련번호	교배번호	교배조합	립수
F2	1	GS0701-1	IT177797/청자3호	52
F2	2	GS0701-2	"	101
F2	3	GS0701-3	"	102
F2	4	GS0701-4	"	121
F2	5	GS0701-5	"	40
F2	6	GS0702-1	IT177797/보은재래	44
F2	7	GS0702-2	"	56
F2	8	GS0702-3	"	158
F2	9	GS0702-4	"	38
F2	10	GS0702-5	"	96
F2	11	GS0702-6	"	59
F2	12	GS0702-7	"	26
F2	13	GS0702-8	"	67
F2	14	GS0702-9	"	91
F2	15	GS0703-1	IT177797/양양재래	88
F2	16	GS0703-2	"	84
F2	17	GS0704-1	IT177797/정읍재래	75
F2	18	GS0704-2	"	86
F2	19	GS0704-3	"	75
F2	20	GS0704-4	"	73
F2	21	GS0705-1	IT177797/화성재래	69
F2	22	GS0705-2	"	25
F2	23	GS0706-1	보은재래/IT177797	79
F2	24	GS0706-2	"	32
F2	25	GS0706-3	"	39
F2	26	GS0706-4	"	61
F2	27	GS0706-5	"	42
F2	28	GS0706-6	"	124
F2	29	GS0706-7	"	82
F2	30	GS0706-8	"	43
F2	31	GS0707-1	보은재래/정읍재래	66
F2	32	GS0707-2	"	66
F2	33	GS0707-3	"	95
F2	34	GS0708-1	보은재래/화성재래	127
F2	35	GS0708-2	"	98
F2	36	GS0708-3	"	112
F2	37	GS0709-1	정읍재래/IT177797	100
F2	38	GS0709-2	"	91
F2	39	GS0710-1	정읍재래/화성재래	70
F2	40	GS0710-2	"	61
F2	41	GS0711-1	정읍재래/보은재래	68
F2	42	GS0712-1	화성재래/보은재래	75
F2	43	GS0712-2	"	92
합계				3249

표 16. 2008년 인공교배 결과 (2007년 수집 유전자원 활용)

세대	일련번호	교배번호	교배조합	채종립수
F1	1	GS0801	청자3호/354	25
F1	2	GS0802	청자3호/537	3
F1	3	GS0803	단과흑대두/청자3호	1
F1	4	GS0804	단과흑대두/354	3
F1	5	GS0805	단과흑대두/515	8
F1	6	GS0806	단과흑대두/537	3
F1	7	GS0807	보은재래/청자3호	8
F1	8	GS0808	보은재래/345	1
F1	9	GS0809	보은재래/354	4
F1	10	GS0810	보은재래/515	1
F1	11	GS0811	345/354	1
F1	12	GS0812	354/보은재래	2
F1	13	GS0813	354/청자3호	9
F1	14	GS0814	515/보은재래	2
F1	15	GS0815	515/354	1
F1	16	GS0816	537/보은재래	4
F1	17	GS0817	537/354	6
합계				82

나. 검정콩 안토시아닌 함량의 환경 변이 평가

일품검정콩 등 시험품종의 종피와 자엽의 특성은 사진 1과 같다.

일품검정콩은 종피에 광택이 있으나 분이 없으며 자엽은 황색이고, 청자콩은 종피에 광택이 없고 분이 있으며 자엽은 엷은 녹색이며, 흑청콩은 종피에 광택이 없고 분이 많으며 자엽은 짙은 녹색이다.

지역별 2006년부터 2008년의 등숙기간중 평균기온, 적산온도, 일교차, 일조시수 및 강수량의 평균은 표 17과 같다. 지역간 평균기온과 적산온도는 진주, 예산, 연천 순으로 높아 위도가 낮을수록 높은 경향이었으며 이에 반하여 평균일교차는 연천, 진주, 예산 순으로 위도가 높을수록 크게 나타났다. 또 품종간에는 흑청콩, 청자콩, 일품검정콩 순으로 수확기가 늦을수록 평균기온은 낮고 적산온도와 평균일교차는 큰 경향이였다. 또 파종기간에는 파종기가 늦을수록 평균기온과 적산온도는 낮고 평균일교차는 크게 나타났다. 다만 일조시수는 강수량이 많을수록 작은 경향이였다.

지역별로 보면 연천에서 평균기온은 품종 간에는 일품검정콩은 22.3~23.0℃, 청자콩 21.5~22.3℃, 흑청콩이 20.6~21.4℃로 나타나 수확기가 늦은 품종일수록 낮았다. 파종기간에는 파종이 늦어질수록 낮아졌는데, 그 차이는 청자콩과 흑청콩이 0.8℃로 가장 크고, 일품검정콩이 0.7℃였다. 평균일교차는 품종 간에는 등숙기간이 길고 수확기가 늦은 흑청콩이 가장 컸고 파종기간에는 파종이 늦을수록 컸는데, 일품검정콩은 10.0~10.9℃, 청자콩은 10.8~11.6℃, 흑청콩은 11.4~12.2℃이었다. 적산온도는 품종간에는 흑청콩 1,442~1,662, 청자콩 1,402~1,561, 일품검정콩 1,010~1,524℃로 수확기가 늦은 품종일수록 많은 경향이였다. 파종기간에는 파종이 늦어질수록 낮아졌으며 파종기간 차이는 청자콩이 160℃, 일품검정콩 514℃, 흑청콩 220℃로 품종에 따라 다소 다르게 나타났다.

예산에서 평균기온은 품종간에는 연천과 비슷한 경향으로 일품검정콩 23.5~24.3℃, 청자콩 22.8~23.5℃, 흑청콩이 22.2~22.9℃ 순으로 낮았으며 파종기간에는 파종이 늦을수록 낮아 파종기간 차이는 품종에 따라 0.7~0.8℃로 나타났다. 평균일교차는 품종 간에는 성숙기간이 길고 수확기가 늦은 흑청콩



사진 1. 품종별 콩 형태 및 자엽의 특성

표 17. 지역 및 파종기에 따른 품종별 개화기~수확기 기상

○ 연천

품종명	파종기 (월.일)	평균기온 (℃)	적산온도 (℃)	일교차 (℃)	일조시수 (시간)	강수량 (mm)
일품검정콩	5.15	23.0	1,524	10.0	355	1,239
	5.30	22.8	1,440	10.4	351	2440
	6.15	22.3	1010	10.9	353	968
청자콩	5.15	22.3	1561	10.8	395	1,127
	5.30	22.1	1512	11.1	395	1,016
	6.15	21.5	1,401	11.6	395	1,011
흑청콩	5.15	21.4	1,662	11.4	450	1,061
	5.30	21.2	1,541	11.9	452	983
	6.15	20.6	1,442	12.2	439	886

○ 예산

품종명	파종기 (월.일)	평균기온 (℃)	적산온도 (℃)	일교차 (℃)	일조시수 (시간)	강수량 (mm)
일품검정콩	5.15	24.3	1,723	9.4	340	638
	5.30	24.0	1,601	9.4	316	625
	6.15	23.5	1,424	9.7	305	505
청자콩	5.15	23.5	1,780	9.6	366	631
	5.30	23.3	1,675	9.7	353	616
	6.15	22.8	1,473	10.0	372	500
흑청콩	5.15	22.9	1,787	9.8	373	618
	5.30	22.7	1,711	10.0	388	569
	6.15	22.2	1,596	10.4	385	456

○ 진주

품종명	파종기 (월.일)	평균기온 (℃)	적산온도 (℃)	일교차 (℃)	일조시수 (시간)	강수량 (mm)
일품검정콩	5.15	25.4	1,807	8.5	511	735
	5.30	24.7	1,808	8.9	497	685
	6.15	24.2	1,606	9.1	431	641
청자콩	5.15	24.5	1,928	9.1	571	763
	5.30	24.1	1,888	9.6	563	740
	6.15	23.3	1,739	9.7	500	736
흑청콩	5.15	24.0	2,003	9.5	576	792
	5.30	23.6	1,951	9.8	571	782
	6.15	22.7	1,825	10.1	528	745

이 가장 컸으며, 파종기간에는 파종이 지연될수록 컸다. 적산온도는 품종간에는 흑청콩 1,596~1,787, 청자콩 1,473~1,780, 일품검정콩이 1,424~1,723°C로 수확기가 늦은 품종일수록 많은 경향이었고, 파종기간에는 파종이 늦어질수록 낮아졌는데 그 차이는 청자콩이 307°C, 일품검정콩 299°C, 흑청콩 191°C 순으로 크게 나타났다.

진주에서 평균기온은 품종간에는 일품검정콩은 24.2~25.4°C, 청자콩 23.3~24.5°C, 흑청콩 22.7~24.0°C 순이었으며, 파종기간에는 파종이 늦어질수록 수확기가 늦을수록 낮았다. 또 파종기에 따른 품종별 평균기온 차이는 1.2~1.3°C였다. 평균일교차는 품종 간에는 등숙기간이 길고 수확기가 늦은 흑청콩이 가장 컸고 청자콩, 일품검정콩 순으로 컸으며, 파종기간에는 파종이 지연될수록 컸다. 적산온도는 품종간에는 흑청콩 1,825~2,003, 청자콩 1,739~1,928, 일품검정콩이 1,606~1,807°C로 수확기가 늦은 품종일수록 많은 경향이 있었다. 파종기간에는 파종이 늦어질수록 낮아졌는데 그 차이는 일품검정콩 201°C, 청자콩 189°C, 흑청콩 178°C 순으로 크게 나타났다.

품종별 파종기에 따른 등숙일수와 백립중을 조사한 결과 표 18과 같다.

지역별 등숙일수는 진주, 예산, 연천 순으로 위도가 낮을수록 많은 경향이 있었으며, 품종간에는 흑청콩, 청자콩, 일품검정콩 순으로 수확기가 늦은 품종일수록 길어지는 경향이였다. 지역별 백립중은 등숙일수가 가장 길었던 진주가 가장 컸으며 파종기간에는 큰 차이가 없었는데, 이는 파종기 뿐만 아니라 기상요인의 연차변이 및 파종기에 따른 변이와 토양특성 등 다른 요인이 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

연천에서는 성숙소요일수는 일품검정콩 60~66일, 청자콩 65~70일, 흑청콩 70~77일로 나타나 수확기가 늦은 품종일수록 길었고, 파종기간에는 파종기가 지연될수록 5~7일 단축되었다. 백립중은 품종간에는 청자콩이 가장 무거워 평균 31.3g이었고 품종내 파종기간에는 3품종 모두 유의한 차를 보이지 않았다.

예산에서 성숙소요일수는 일품검정콩 59~68일, 청자콩 62~75일, 흑청콩 72~76일이였다. 품종내에서 파종기간에는 시험품종 모두 파종기가 늦어질수

표 18. 지역에 따른 품종별 파종기간 등숙일수와 백립중 변화
○ 연 천

품종명	파종기(월.일)	성숙소요일수(일)	백립중(g)
일품검정콩	5.15	66	28.1a
	5.30	63	28.9a
	6.15	60	28.6a
평균		63	28.5b
청자콩	5.15	70	32.0a
	5.30	67	32.2a
	6.15	65	29.7a
평균		67	31.3a
흑청콩	5.15	77	28.1a
	5.30	73	29.6a
	6.15	70	27.3a
평균		73	28.3b

○ 예 산

품종명	파종기(월.일)	성숙소요일수(일)	백립중(g)
일품검정콩	5.15	68	30.0a
	5.30	66	31.4a
	6.15	59	28.8a
평균		65	30.0a
청자콩	5.15	75	28.8a
	5.30	71	31.9a
	6.15	62	27.5a
평균		69	29.4a
흑청콩	5.15	76	29.9a
	5.30	75	27.8a
	6.15	72	27.6a
평균		74	28.4a

○ 진 주

품종명	파종기(월.일)	성숙소요일수(일)	백립중(g)
일품검정콩	5.15	71	31.8a
	5.30	73	32.1a
	6.15	66	30.2a
평균		70	31.4a
청자콩	5.15	84	32.6a
	5.30	81	31.5ab
	6.15	77	30.5b
평균		81	31.5a
흑청콩	5.15	83	32.2a
	5.30	83	31.5a
	6.15	80	29.9a
평균		82	31.2a

†Means followed by common letter are not significantly different 5% level by LSD.

록 청자콩, 일품검정콩, 흑청콩 순으로 4~13일 단축되었다. 백립중은 일품검정콩 28.8~31.4g > 청자콩 27.5~31.9g > 흑청콩은 27.6~29.9g 순이었으나 유의한 차를 보이지 않았다. 품종내에서 파종기간에는 전술한 바와 같이 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

진주에서 성숙소요일수는 일품검정콩 66~71일, 청자콩 77~84일, 흑청콩 80~83일로 품종별로는 흑청콩이 길었다. 파종기간에는 5월 15일 파종시 가장 길었는데 이는 파종이 조기 파종일수록 등숙일수가 길어졌다는 보고와 유사한 경향으로 파종기가 지연될수록 단축되었다. 백립중은 품종 간에는 유의한 차가 없었으며 파종기간에는 청자콩만 5월 15일 파종이 6월 15일 파종에 비하여 무거웠다.

지역별 시험품종별 파종기 차이에 따른 종피 색도를 측정한 결과는 표 19와 같다.

지역간의 L과 b값은 진주에서 가장 컸으며 a값은 일정한 경향이 없었다. 품종간에는 예산에서만 a값이 청자콩과 비슷한 것으로 제외하고는 L과 a값은 등숙일수가 짧고 수확기가 빨랐던 일품검정콩이 가장 컸다. 예산에서 청자콩이 약간 컸던 것을 제외하고 b값은 등숙일수가 길고 수확기가 늦었던 흑청콩이 가장 높았다. 파종기간에는 흑청콩의 b값이 파종기가 지연될수록 낮아진 것을 제외하고는 일정한 경향이 없었다. 지역별로는 연천에서는 L과 a값은 품종간에는 흑청콩 > 청자콩 > 일품검정콩 순으로 높았고, 파종기간에는 품종별로 다른 경향을 보였다. b값은 흑청콩에서 높았으나 차이는 크지 않았고, 파종기간에는 품종별로 다른 경향을 보였으나 대체로 파종기가 지연될수록 낮은 경향이였다.

예산에서 L값은 품종간에 흑청콩 > 청자콩 > 일품검정콩 순으로 높아 연천과 유사한 경향이였다. 파종기간에는 일품검정콩과 청자콩은 파종이 지연될수록 높았으나, 흑청콩은 파종기가 지연될수록 낮았다. a값은 품종간에 일품검정콩과 청자콩에 비하여 흑청콩에서 낮았으며 파종기간에는 뚜렷한 경향이 없었다. b값은 품종간에는 청자콩 > 흑청콩 > 일품검정콩 순으로 높았으며, 파종기간에는 대체로 파종이 지연될수록 낮은 경향이였다.

표 19. 지역에 따른 품종별 파종기간 종피 색도(Hunter's value)

○ 연 천

품 종 명	파종기(월.일)	L	a	b
일품검정콩	5.15	18.98	-0.21	-1.16
	5.30	18.27	-0.16	-1.18
	6.15	18.04	-0.26	-1.24
	평균	18.43	-0.21	-1.19
청 자 콩	5.15	21.15	-0.23	-0.83
	5.30	21.86	-0.43	-1.25
	6.15	21.14	-0.26	-1.03
	평균	21.38	-0.31	-1.04
흑 청 콩	5.15	21.13	-0.37	-0.79
	5.30	22.21	-0.41	-0.82
	6.15	22.00	-0.31	-1.01
	평균	21.78	-0.36	-0.87

○ 예 산

품 종 명	파종기(월.일)	L	a	b
일품검정콩	5.15	18.13	-0.15	-0.79
	5.30	18.64	-0.13	-0.89
	6.15	18.83	-0.12	-0.85
	평균	18.53	-0.13	-0.84
청 자 콩	5.15	20.06	-0.16	-0.02
	5.30	22.06	-0.03	-0.20
	6.15	21.96	-0.18	-0.67
	평균	21.36	-0.12	-0.30
흑 청 콩	5.15	23.00	-0.39	-0.11
	5.30	22.44	-0.29	-0.45
	6.15	22.41	-0.30	-0.70
	평균	22.62	-0.33	-0.42

○ 진 주

품 종 명	파종기(월.일)	L	a	b
일품검정콩	5.15	20.80	-0.16	-0.61
	5.30	20.25	-0.13	-0.84
	6.15	20.11	-0.07	-0.69
	평균	20.39	-0.12	-0.71
청 자 콩	5.15	24.39	0.06	0.87
	5.30	24.55	-0.22	0.03
	6.15	23.33	-0.38	-0.81
	평균	24.09	-0.18	0.03
흑 청 콩	5.15	28.09	-0.44	1.65
	5.30	27.17	-0.15	1.60
	6.15	25.62	-0.16	1.00
	평균	26.96	-0.25	1.42

진주에서 L값은 품종간에 흑청콩>청자콩>일품검정콩 순으로 높았고 파종기간에는 대체적으로 파종기가 늦어질수록 작아지는 경향이였다. a값은 품종간에는 서로 경향이 다르게 나타나 일품검정콩과 흑청콩은 파종기가 늦어질수록 크고 청자콩은 파종기가 지연될수록 작았다. b값은 품종간에는 흑청콩이 가장 컸으며, 파종기간에는 청자콩과 흑청콩은 파종이 빠를수록 컸으며, 일품검정콩은 5월30일 파종시 가장 작았다.

지역에 따른 품종별 파종기간 안토시아닌 함량을 분석한 결과는 표 20과 같았으며 Pt3G는 함량이 너무 미미하여 분석대상에서 제외하였다.

지역간에는 총 안토시아닌 함량은 연천이 가장 많았고 일품검정콩을 제외하고는 예산>진주 순이었다. 품종간에는 연천과 예산에서는 일품검정콩과 청자콩이 흑청콩에 비하여 많았으며 진주에서도 일품검정콩>청자콩>흑청콩 순으로 높아 전체적으로 일품검정콩, 청자콩, 흑청콩 순으로 많은 경향이였다. 파종기간에는 청자콩은 연천에서만 다른 파종기에 비하여 5월30일 파종시 낮았던 것을 제외하고는 일품검정콩과 청자콩은 파종기간에 유의한 차가 없었다. 흑청콩은 지역별로 파종기에 따라 서로 다른 경향을 보였는데 연천에서는 파종기가 늦어질수록 작고, 예산에서는 파종기가 지연될수록 증가된 것에 비하여 진주에서는 유의한 차가 없었다. C3G 함량은 총 안토시아닌 함량에 대한 기여 비중이 가장 큰 안토시아닌 종류로서 지역간에는 연천이 가장 많았고 일품검정콩을 제외하고는 예산>진주 순으로 총 안토시아닌 함량과 유사한 경향이였다. 품종간에는 3개 지역 모두 일품검정콩과 청자콩이 흑청콩에 비하여 많았다. 파종기간에는 5월30일 파종시 가장 적었던 연천지역 청자콩, 파종기가 늦어질수록 증대되었던 예산지역 흑청콩을 제외하고는 유의한 차가 없었다. D3G 함량은 지역간에는 연천이 가장 많았고 그 다음은 흑청콩을 제외하고는 진주>예산 순으로 많았다. 품종간에는 3개지역 모두 일품검정콩>청자콩>흑청콩 순으로 많았다. 파종기간에는 지역과 품종내에서 모두 유의한 차가 없었으나 다만 예산에서 흑청콩만 6월15일 파종이 다른 파종기에 비하여 적게 나타났다. 이상의 결과는 안토시아닌 함량은 박(2003)이 품종, Jung 등(1996)이 생육일수, Kim 등(2005)이 재배연도, 재배지역, Jung 등(1996)과 박

표 20. 지역에 따른 품종별 파종기간 안토시아닌 함량 (mg/g)

○ 연 천

품종명	파종기(월.일)	D3G(A)	C3G(B)	Total(A+B+Pt3G)
일품검정콩	5.15	2.78a	8.70a	12.86a
	5.30	3.00a	9.17a	13.16a
	6.15	2.86a	10.73a	14.77a
평균		2.88a	9.53a	13.60a
청자콩	5.15	2.67a	10.25a	13.89a
	5.30	2.16a	8.14b	10.72b
	6.15	2.33a	9.90a	12.86a
평균		2.39b	9.43a	12.49a
흑청콩	5.15	0.79a	2.70a	3.67a
	5.30	0.71a	2.46a	3.35b
	6.15	0.72a	2.44a	3.32b
평균		0.74c	2.53b	3.45b

○ 예 산

품종명	파종기(월.일)	D3G(A)	C3G(B)	Total(A+B+Pt3G)
일품검정콩	5.15	2.38a	6.31a	9.18a
	5.30	2.63a	7.30a	10.57a
	6.15	2.51a	7.49a	10.34a
평균		2.51a	7.03a	10.03a
청자콩	5.15	2.30a	7.13a	10.11a
	5.30	1.77a	6.78a	9.03a
	6.15	2.15a	8.23a	10.50a
평균		2.07b	7.38a	9.88a
흑청콩	5.15	0.68a	2.32b	3.18b
	5.30	0.99a	2.58ab	3.74ab
	6.15	1.35b	3.11a	4.68a
평균		1.01c	2.67b	3.87b

○ 진 주

품종명	파종기(월.일)	D3G(A)	C3G(B)	Total(A+B+Pt3G)
일품검정콩	5.15	2.70a	6.69a	9.82a
	5.30	2.73a	8.28a	11.98a
	6.15	2.57a	8.37a	11.55a
평균		2.67a	7.78a	11.12a
청자콩	5.15	2.10a	6.50a	8.64a
	5.30	2.06a	6.70a	9.47a
	6.15	2.11a	7.22a	9.61a
평균		2.09b	6.81a	9.24b
흑청콩	5.15	0.73a	2.07a	2.87a
	5.30	0.65a	2.29a	3.20a
	6.15	0.73a	2.36a	3.35a
평균		0.70c	2.24b	3.14c

†Means followed by common letter are not significantly different 5% level by LSD.

(2003)이 파종시기에 의해 영향을 받는다는 보고와 유사한 경향이었다.

지역별로 보면 연천에서는 총안토시아닌 함량은 품종별로는 일품검정콩 13.60mg/g과 청자콩 12.49mg/g으로 흑청콩 3.45mg/g보다 많았다. 파종기간에는 일품검정콩은 차이가 없었으며 청자콩은 5월30일 파종이 적고 흑청콩은 5월15일 파종이 다른 파종기에 비해 많이 나타났다. 안토시아닌 종류별로는 C3G가 2.44~10.73mg/g으로 가장 많아 총 안토시아닌 함량에 기여하는 비율이 높은 것으로 나타났다. 종류별로 보면 D3G는 품종간에는 평균함량이 일품검정콩 2.88mg/g>청자콩 2.39mg/g>흑청콩 0.74mg/g 순이었다. 파종기간에는 전 품종 모두 유의한 차이가 없었다. C3G 함량은 품종간에는 일품검정콩과 청자콩이 흑청콩에 비하여 많았고 파종기간에는 일품검정콩과 흑청콩은 유의한 차가 없었으며 청자콩은 5월 30일 파종시 다른 파종기에 비하여 적게 나타나 품종별로 다른 경향을 나타냈다.

예산에서는 총 안토시아닌 함량은 품종간에는 연천지역과 유사한 경향으로 일품검정콩과 청자콩이 흑청콩에 비하여 많았다. 파종기간에는 일품검정콩과 청자콩은 유의한 차이가 없었으며 흑청콩은 파종이 늦어질수록 많아지는 경향이었다. 안토시아닌 종류별로는 C3G가 2.32~8.23mg/g으로 가장 많아 총 안토시아닌 함량에 기여하는 비율이 높은 것으로 나타나 연천지역과 비슷한 경향이었다. D3G는 일품검정콩 2.51mg/g>청자콩 2.07mg/g>흑청콩 1.01mg/g으로 많아 품종간에 뚜렷한 차이를 나타내었다. 파종기간에는 일품검정콩과 청자콩은 차이가 인정되지 않았으며 흑청콩은 6월15일 파종이 다른 파종기에 비하여 적은 경향이었다. C3G는 일품검정콩 7.03, 청자콩 7.38mg/g에 비하여 흑청콩은 2.67mg/g으로 적었고, 파종기간에는 일품검정콩과 흑청콩은 뚜렷한 차이가 없었으나 흑청콩은 6월15일 파종이 5월15일 파종보다 많아 대체적으로 파종기가 늦을수록 많은 경향이었다.

진주에서는 총 안토시아닌 함량과 D3G함량은 품종간에는 일품검정콩>청자콩>흑청콩 순으로 많아 연천지역과 유사한 경향이었으며 C3G는 일품검정콩과 청자콩은 차이가 인정되지 않았으나 흑청콩은 다소 적었다. 파종기간에는 총 안토시아닌, D3G, C3G 함량 모두 파종기간에 차이가 인정되지 않았다.

안토시아닌 함량을 간접적으로 표시할 수 있는 종피 색도와 안토시아닌 함량과의 상관관계를 분석한 결과는 표 21과 같다.

L값과 b 값은 D3G, C3G 및 총 안토시아닌 함량과는 고도의 부의 상관을 보였고, a 값은 총 안토시아닌 함량과 C3G와는 고도의 부의 상관을 보였으며 D3G값과는 상관이 나타나지 않았다. 따라서 고 안토시아닌 함유 품종 육성 시 안토시아닌 함량 분석에 소요되는 인력과 경비를 줄이기 위해 L값을 구하여 선발하면 경제성을 높일 수 있을 것으로 생각되며 보다 정밀한 관계를 구명하기 위해서 면밀한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

총 안토시아닌 함량과 등숙기간중 기상요소와의 관계식 및 상관분석을 실시한 결과는 표 22와 같았다.

안토시아닌 함량은 전술한 바와 같이 유전적 변이가 크므로 기상환경과의 반응을 품종별로 분석한 결과 품종에 따라 다소 다른 경향을 나타냈다. 일품검정콩과 청자콩은 평균기온, 적산온도와 부의상관을, 평균일교차와는 정의상관을 보였으며, 기상요소에 따른 결정계수는 일품검정콩이 0.5313~0.5876, 청자콩이 0.4986~0.6755로 나타났으며 일조시수와는 상관관계가 인정되지 않았다. 한편 흑청콩은 평균기온, 적산온도, 평균일교차, 일조시수 등 기상요소 전부가 상관관계가 인정되지 않았다. 이상을 종합해본다면 품종에 따라 약간의 반응은 차이가 있으나 검정콩의 안토시아닌 함량 증대를 위해서는 평균기온이 낮아 적산온도가 낮으며, 일교차가 큰 지역에서 재배하는 것이 유리할 것으로 생각된다.

결 론

안토시아닌 고함유 유전자원 선발을 위해 2006년부터 2008년까지 총 1,032점을 수집하여 개화기, 생리적 성숙기, 수확기, 백립중 및 총 안토시아닌 함량과 C3G, D3G, Pt3G 함량을 분석하였다. 수집된 유전자원의 총 안토시아닌 함량은 평균 11.67mg/g이었고 범위는 0.54~23.45mg/g으로 나타났다. 종류별로는 C3G가 평균 8.81mg/g로 비중이 가장 컸으며 그 다음이 D3G가 평

표 21. 종피 Hunter 값과 안토시아닌 함량과의 상관관계

	D3G	C3G	Total
L	-0.7071**	-0.6262**	-0.6618**†
a	0.1507 ^{ns}	-0.4685*	-0.3881*
b	-0.5341**	-0.5413**	-0.5500**

†*, ** : Significantly different at 0.05, 0.01 provability level, respectively

표 22. 품종간 총안토시아닌 함량과 기상환경과의 관계식

품 종 명	기상요소	회 귀 식	결정계수	상관계수
일품검정콩	평균기온	$y = -1.397x + 44.823$	0.5876*	-0.76*
	적산온도	$y = -0.005x + 19.803$	0.5313*	-0.73*
	일 교 차	$y = 1.773x - 5.403$	0.5625*	0.75*
	일조시수	$y = -0.002x + 12.374$	0.0077 ^{ns}	-0.09 ^{ns}
청 자 콩	평균기온	$y = -1.468x + 44.357$	0.6501**	-0.81**
	적산온도	$y = -0.007x + 21.595$	0.4986*	-0.71*
	일 교 차	$y = 1.733x - 7.025$	0.6755**	0.82**
	일조시수	$y = -0.009x + 14.443$	0.1942 ^{ns}	-0.44 ^{ns}
흑 청 콩	평균기온	$y = -0.139x + 6.589$	0.0911 ^{ns}	-0.30 ^{ns}
	적산온도	$y = -0.001x + 5.761$	0.2252 ^{ns}	-0.47 ^{ns}
	일 교 차	$y = 0.066x + 2.783$	0.0165 ^{ns}	0.13 ^{ns}
	일조시수	$y = -0.004x + 5.274$	0.3447 ^{ns}	-0.59 ^{ns}

‡*, ** : Significantly different at 0.05, 0.01 provability level, ns : not significant

균 1.78mg/g이었고 Pt3G가 평균 0.79mg/g으로 가장 적었다. 총 안토시아닌 함량별 수집종 분포는 10~15mg/g 범위가 371점으로 가장 많았고 20mg/g 이상인 유전자원은 30종이었다. 주요 농업형질에 따른 안토시아닌 함량은 개화기, 생리적 성숙기, 고숙기가 늦을수록 많았고 등숙일수가 길수록, 종실중이 무거울수록 많은 경향이였다. 따라서 백립중이 35g 이상이면서 안토시아닌 함량이 많은 유전자원을 육종소재로 F₂ 3249개체, F₁ 82립을 육성하여 세대진전 및 선발 후 안토시아닌 고함유 계통 및 품종육성 재료로 활용하였다.

환경조건에 따른 안토시아닌 함량은 지역, 품종 및 과중기 모두에 영향을 받는 것으로 나타났다. 종피의 색도와 안토시아닌 함량과의 상관성을 분석한 결과 L(명도)과 b(적색도)값은 고 D3G, C3G 및 총 안토시아닌 함량과 고도의 부의 상관, a(적색도)값은 C3G와 총 안토시아닌 함량과 부의 상관성을 보였다. 안토시아닌 함량과 기상요인의 관계를 분석한 결과, 일품검정콩과 청자콩이 평균기온 및 적산온도와 부의 상관, 평균일교차와는 정의 상관성을 보였다.

따라서 안토시아닌 고함유 검정콩 생산을 위해서는 황색 자엽종은 일품검정콩, 녹색 자엽종은 청자콩처럼 유전적으로 안토시아닌 축적량이 많은 품종은 등숙기간 중 평균기온이 낮아 적산온도가 낮고 일교차가 큰 지역에서 생산하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

2. 검정콩 안토시아닌 함량의 신속 편이 기술 개발

가. 검정콩 종피를 이용한 안토시아닌 함량의 NIRS 검량식 작성

검정콩 유전자원 300점을 대상으로 안토시아닌 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과(1차년도, 2006) 성분함량들의 변이가 크게 나타났으며 이런 점은 NIRS를 이용하여 안토시아닌 함량 분석을 함에 있어 유리하게 작용할 수 있었다. C3G는 유전자원간에 3.25~ 57.01mg/g의 변이 폭을 나타내었으며 D3G와 Pt3G는 각각 0 ~ 11.98mg/g, 0 ~ 10.41mg/g의 변이를 보였다. 즉 검정콩에는 C3G가 다량 함유되어 있었으며, 유전자원 간에는 D3G 또는 Pt3G가 결핍된 것도 있었다.

검정콩 종피를 NIRS를 이용하여 NIR 대역(1,100~2,500 nm)에서 스펙트럼을 구하였다. Fig. 6은 NIRS에 나타난 검정콩 종피의 스펙트럼 중에서 최저, 최고 및 평균치를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 변이 폭이 넓게 나타났는데 이것은 각 스펙트럼의 바탕선이 일치하지 않는 것도 한 요인이 될 수 있다. 따라서 바탕선의 일치를 위하여 NIRS 분석에는 수처리를 하게 되며 본 실험에서도 1차 및 2차 미분 등을 통한 수처리를 수행한 후 검량식을 작성하였다.

한편 정확한 NIRS 분석을 위하여 검정콩 종피를 마쇄하여 100 mesh의 분말로 사용한 것과 마쇄하지 않은 상태의 종피를 사용한 것과의 성적을 비교 분석하였다. Table 23은 마쇄하지 않은 종피를 사용하여 안토시아닌 함량의 NIRS 검량식을 도출한 결과이다. 수처리는 모두 1차 미분을 사용하였으며 과장간 gap 처리를 4, 6 및 10nm로 나누어 비교하였다. 회귀분석법은 예비실험에서 step-wise, step-up 및 MPLS 방법을 이용하였으나 MPLS 방법이 정확하였으므로 본 실험에서는 MPLS법을 적용하였다.

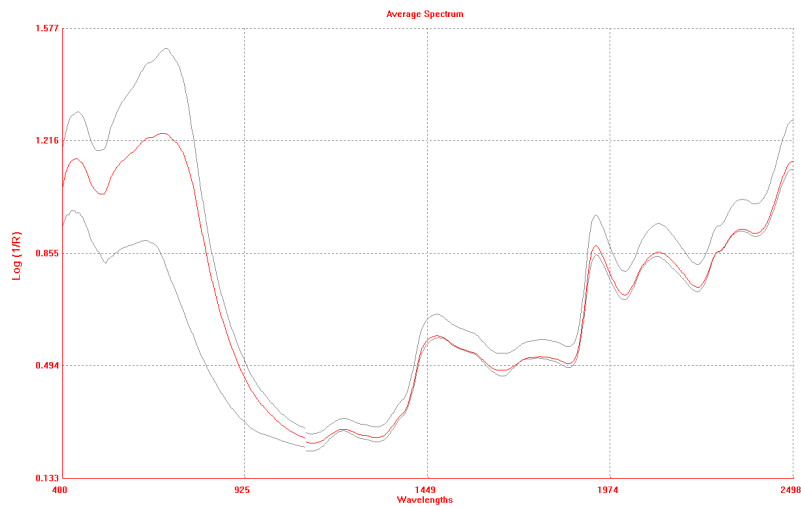


Fig. 6. Spectra(log 1/R) of black soybean seed coats scanned by NIRS

Table 23. Calibration parameters according to wavelength gap for anthocyanin content analysis by NIRS in black soybean

Math treatment	Calibration set								
	C3G(mg/g)			D3G(mg/g)			Pt3G(mg/g)		
	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC
1, 4, 4, 1	0.952	23.7	2.51	0.895	5.45	0.70	0.778	3.19	0.56
1, 6, 6, 1	0.943	23.9	2.60	0.923	5.47	0.64	0.814	3.34	0.57
1, 10, 10, 1	0.946	23.9	2.69	0.936	5.47	0.56	0.833	3.41	0.60

* Math treatment a, b, c, d: a = derivative function; b = gap; c = smooth; d = second smooth

** R² = squared coefficient of multiple determination in calibration;
SEC = standard error of calibration

표에서 보는 바와 같이 R^2 및 SEC 값으로 판단할 때 수치리 방법은 3가지 안토시아닌 pigments 모두 1,4,4,1 방법이 기타 방법보다 우수한 것으로 나타났다. 따라서 이후 NIRS 분석은 수치리시 파장간 간격을 4nm로 정한 후 수행되어졌다. 그러나 calibration set의 parameter 값은 그 정확도가 크게 높지 않은 것으로 판단되어 좀 더 정밀한 안토시아닌 함량 분석을 위하여 미분방법을 달리하여 다시 수행하였다.

Table 24는 미분법을 달리하여 다시 검량식을 작성한 결과이다.

표에서 보는 바와 1, 2차 미분간에는 큰 차이가 없었으나 3차 미분시에는 오히려 분석치의 정확도가 떨어지는 경향이였다. 1, 2차 미분간에도 C3G와 Pt3G는 1차 미분시 수치가 2차 미분보다 우수하였으며, D3G의 경우도 큰 차이는 없었으나 1차 미분시의 값이 우수하였다. 한편 NIRS 이용시 유용한 검량식을 얻기 위해서는 validation file을 작성한 후 calibration file에서 얻어진 검량식을 적용하여 봄으로써 그 유효성을 판단하여야 하므로 이를 다시 수행하였다.

Table 25에서 보는 바와 같이 calibration 과 validation의 parameter를 비교하여 볼 때 C3G, D3G, Pt3G 모두 1,4,4,1의 수치리가 우수하였다. 그런데 C3G와 D3G의 경우에는 대체로 상관계수 값이 0.9에 도달하므로 NIRS에서의 안토시아닌 함량분석이 가능함을 알 수 있었으나 Pt3G의 경우는 상관계수의 값이 1, 2차 미분 모두에서 정확도가 상당히 떨어져 NIRS 분석에는 부적당하다고 판단되었다. 따라서 추후 좀 더 정밀한 수치리 방법 등이 적용되어야 할 것이다.

Table 26은 종피를 마쇄하여 100 mesh의 분말을 만든 후 NIRS에서 안토시아닌 함량을 분석한 결과이다. 종피를 사용하였을 때 보다 calibration의 parameter 수치가 우수하여 NIRS의 정확도가 높아졌다. C3G와 D3G는 1차 미분이 2차 미분 보다 우수하였으며, Pt3G의 경우는 2차 미분의 수치가 정확성을 더 높인 것으로 판단되었다.

Table 24. Calibration parameters according to derivative function for anthocyanin content analysis by NIRS in black soybean

Math treatment	Calibration set								
	C3G(mg/g)			D3G(mg/g)			Pt3G(mg/g)		
	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC
1, 10, 10, 1	0.946	23.9	2.69	0.936	5.47	0.56	0.833	3.41	0.60
2, 10, 10, 1	0.942	24.0	2.77	0.894	5.45	0.70	0.815	3.23	0.53
3, 10, 10, 1	0.883	24.2	3.21	0.818	5.50	0.66	0.782	3.31	0.67

Table 25. Calibration and cross validation parameters by MPLS regression for anthocyanin contents in black soybean

Math treatment	C3G				D3G				Pt3G			
	Calibration		Validation		Calibration		Validation		Calibration		Validation	
	R ²	SEC	r ²	SEP	R ²	SEC	r ²	SEP	R ²	SEC	r ²	SEP
1, 4, 4, 1	0.952	2.51	0.897	3.86	0.895	0.70	0.817	0.99	0.778	0.56	0.503	1.30
1, 10, 10, 1	0.946	2.69	0.905	3.70	0.936	0.56	0.849	0.91	0.833	0.60	0.658	1.06

*SEP : Standard error of prediction in validation

Table 26. Calibration parameters for anthocyanin content analysis by NIRS using black soybean seed-coat powder

Math treatment	Calibration set								
	C3G(mg/g)			D3G(mg/g)			Pt3G(mg/g)		
	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC
1, 4, 4, 1	0.963	24.6	2.36	0.926	5.41	0.59	0.624	3.29	0.80
2, 4, 4, 1	0.950	24.5	2.69	0.911	5.41	0.66	0.723	3.56	0.89

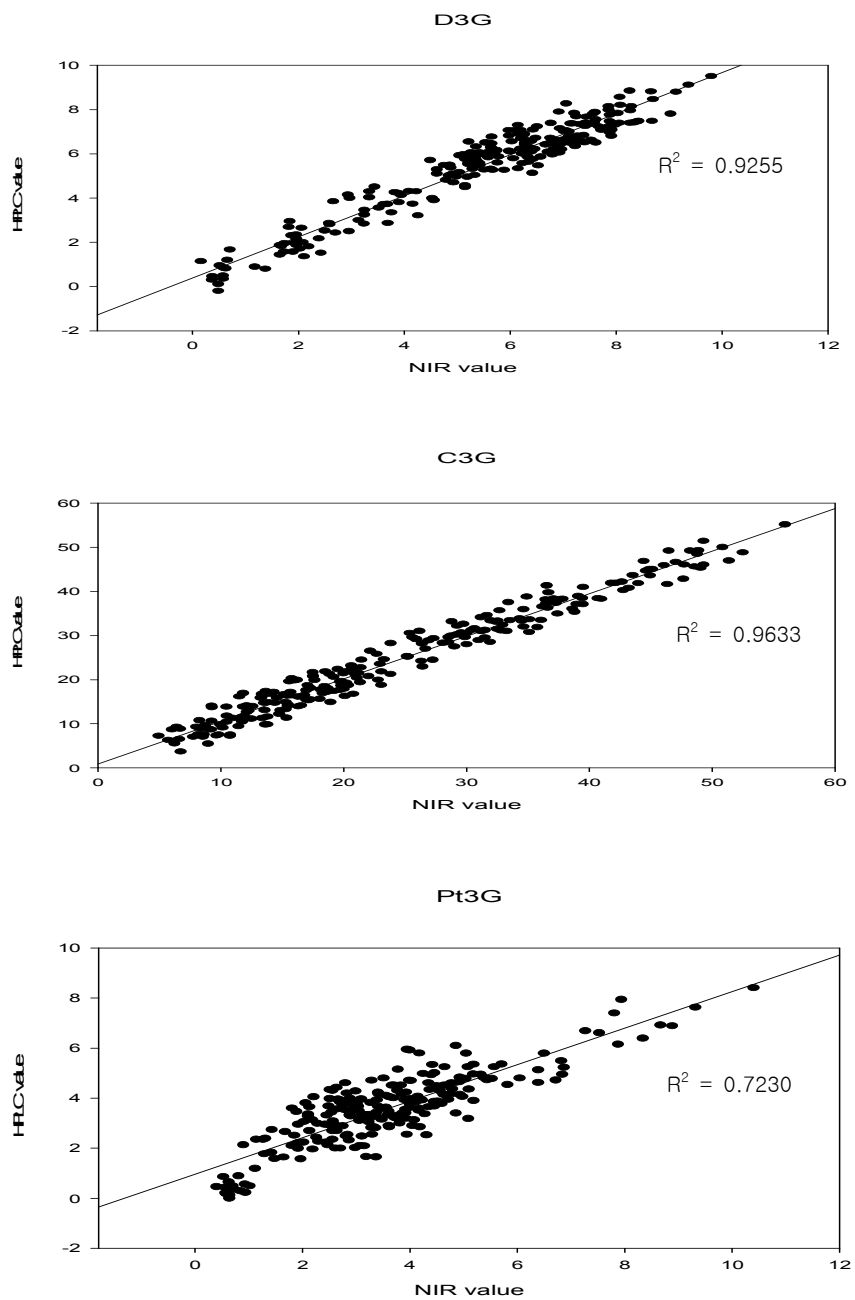


Fig. 7. Correlation plot for anthocyanin pigments contents, NIRS data vs. laboratory data of the calibration set in black soybean. (Unit : mg/g)

따라서 검정콩 안토시아닌 함량 분석을 위한 NIRS 이용은 종피 분말을 사용하되 C3G와 D3G는 1차 미분의 수처리를 Pt3G는 2차 미분을 하는 것이 정확도를 높이는 것으로 판단되었다. 그러나 이상에서 도출된 결과들, 특히 Pt3G의 경우는 그 정확도가 떨어지므로 좀 더 많은 유전자원들의 함량치가 보완된 NIRS 검량식을 작성하여야 할 것으로 판단된다.

Fig. 7은 현재 도출된 검량식에서 가장 우수한 검정콩 안토시아닌 함량의 NIRS 와 HPLC value 간의 상관관계를 나타낸 것이다.

나. 검정콩 종실을 이용한 총 안토시아닌 함량의 NIRS 검량식 작성

검정콩 유전자원 496점의 안토시아닌 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다(2차년도, 2007). 총 안토시아닌 함량은 Table 27에서와 같이 분석된 유전자원간에 0.54 ~ 22.85 mg/g의 변이 폭을 나타내었으며, HPLC value를 바탕으로 NIRS로 분석된 함량치는 0.01 ~ 22.63 mg/g로 나타나 HPLC 와 NIRS 분석치간에 높은 상관을 보였다.

NIRS 분석을 위하여 400~2,500 nm에서 스펙트럼을 구하였는데 1차년도의 data인 Fig. 6과 같은 경향이였다. 가시광선 대역(400~900 nm)에서는 변이 폭이 너무 크게 나타나 서로의 차이를 분석할 수가 없었으며, 따라서 NIRS 분석의 기본 파장대역인 1,100~2,500 nm의 스펙트럼을 이용하여 분석에 임하였다. 한편, NIRS 대역에서도 스펙트럼간 변이 폭이 크게 나타났는데 이것은 각 스펙트럼의 바탕선이 일치하지 않는 것도 한 요인이 될 수 있다. 따라서 바탕선의 일치를 위하여 1차 및 2차 미분 등을 통한 수처리를 수행한 후 검량식을 작성하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 수처리를 통하여 바탕선을 균일하게 조정할 수 있었으며 파장별의 스펙트럼 차이를 분명하게 알 수 있었다.

Table 27. Anthocyanin contents of black soybean germplasm

	No. of sample	Anthocyanin content(mg/g)		
		Min.	Mean	Max.
HPLC	496	0.54	10.97	22.85
NIRS	496	0.01	10.49	22.63

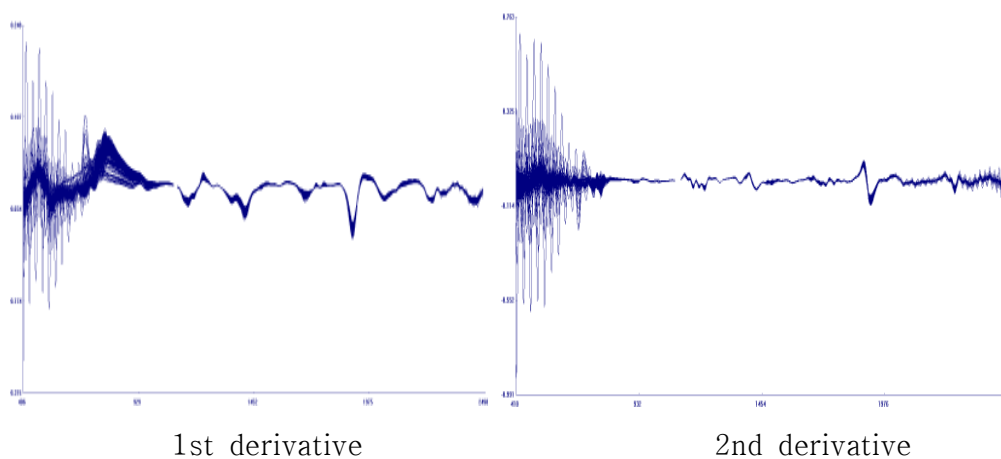


Fig. 8. Spectra of black soybean seed coats scanned by NIRS through math treatment

Table 28은 수처리된 스펙트럼을 이용하여 검량식을 작성한 결과이다.

검량식 도출을 위한 회귀식은 PLS 및 MPLS를 사용하였다. 수처리는 1차 및 2차 미분을 사용하였으며 파장간 gap 처리를 4, 6 및 10nm로 나누어 비교하였다. 표에서 보는 바와 같이 R^2 및 SEC 값으로 판단할 때 MPLS 회귀식이 PLS 회귀식보다 우수하였다. 그리고 수처리 방법은 1차미분에서는 4nm의 gap 상태가 우수하였으며 2차 미분에서는 10 nm의 gap 처리가 우수하였다. 한편, calibration set의 parameter 값이 모두 R^2 value가 0.8정도에 불과하여 그 정확도가 크게 높지 않은 것으로 판단되므로 추후 좀 더 정밀한 분석이 요구되었다. 그러나 많은 NIRS 관련 보고서에서는 R^2 value가 0.8을 넘으면 우수한 검량식으로 판단하고 있으며, 본 검량식도 Table 28에서와 같이 HPLC 분석치와 큰 차이가 없으므로 실제 응용면에서는 무리가 없을 것으로 판단되었다.

NIRS 분석에서 유용한 검량식을 얻기 위해서는 validation file을 작성한 후 calibration file에서 얻어진 검량식을 적용하여 봄으로써 그 유효성을 판단하여야 한다. Table 29는 이에 관한 결과이다.

Calibration 과 validation의 parameter를 비교하여 볼 때 대체로 1,4,4,1의 수처리가 다른 처리보다 우수하였다. 그러나 validation 에서는 SEP가 높게 분석되었으며 따라서 상관값이 0.8을 넘지 못하였다. 추후 좀 더 정밀한 수처리 방법 등이 적용되어야 할 것으로 판단되었다.

Fig. 9는 현재 도출된 검량식에서 가장 우수한 검정콩 안토시아닌 함량의 NIRS 와 HPLC value 간의 상관관계를 나타낸 것이다.

Table 30은 검정콩 종실을 직접 NIRS에 적용시켰을 때 안토시아닌 색소별 함량 분석 결과이다.

Table 29에 나타난 것처럼 종실을 직접 이용했을 때의 NIRS 수치는 HPLC의 분석값과의 상관성이 크게 높지 않았다. 회귀식간에는 MPLS가 PLS 보다는 우수한 것으로 판단되었다. MPLS 회귀식을 사용했을 때, 수처리간 비교에서는 1차 미분과 2차 미분사이에는 큰 차이가 없었다. 색소별 함량은 C3G의 경우 calibration의 상관성이 0.82 이상을 나타내었으며 validation에서도

Table 28. Calibration parameters according to regression analysis and math treatment for anthocyanin content by NIRS using whole black soybean seed

Regre.	Math treatment	Mean	SEC	R ²
MPLS	1.4.4.1	10.55	1.91	0.808
	1.10.10.1	10.62	2.05	0.781
	2.4.4.1	10.57	2.32	0.720
	2.10.10.1	10.54	1.97	0.793
PLS	1.4.4.1	10.54	2.12	0.768
	1.10.10.1	10.60	2.19	0.751
	2.4.4.1	10.62	2.39	0.678
	2.10.10.1	10.57	2.12	0.759

– Math treatment a, b, c, d: a = derivative function; b = gap; c =s mooth; d = second smooth; SEC = standard error of calibration; R² = squared coefficient of multiple determination in calibration;

Table 29. Calibration and cross validation parameters by MPLS regression for anthocyanin contents using whole black soybean seed

Math treatment	Calibration		Validation	
	SEC	R ²	SEP	r ²
1.4.4.1	1.9075	0.8078	2.1776	0.7521
1.10.10.1	2.0504	0.7809	2.2545	0.7375
2.10.10.1	1.9711	0.7931	2.2496	0.7327

*SEP : Standard error of prediction in validation

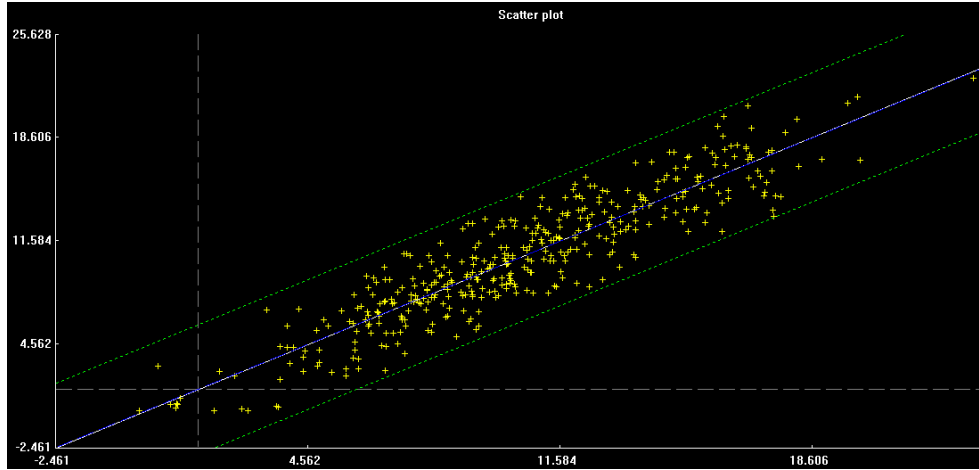


Fig. 9. Correlation plot for anthocyanin pigments contents, NIRS data vs. laboratory data of the calibration set by black soybean whole seed

0.80에 근접하였으므로 본 연구에서 도출된 검량식은 추후 일상 분석에서 무리없이 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 D3G 및 Pt3G의 경우는 상관관계가 떨어져 직접적인 적용은 어려울 것으로 사료된다. 특히 Pt3G는 HPLC 값과의 상관관계를 거의 찾아볼 수 없었는데, 이것은 콩 종실에 함유되어 있는 Pt3G의 양이 소량이어서 NIRS에서 반응하기에는 문제가 있기 때문일 것이다. 그러나 Table 25 등에서 보는 바와 같이 종실을 직접 이용하지 않고 종피만을 사용하면 NIRS의 분석이 가능할 것으로 판단된다.

결 론

검정콩 종피에 함유된 안토시아닌의 색소별 함량을 비파괴적으로 신속하게 분석하기 위하여 NIRS(근적외선 분광분석기)를 이용한 모델을 개발하였다. 재료는 검정콩 유전자원 800여 계통을 사용하였으며, HPLC에서 분석된 종피의 안토시아닌 함량치를 NIRS 스펙트럼에 적용시킨 후 검량식을 작성하였다. NIRS의 검량식을 몇 가지 방법에 의하여 비교 분석한 결과 1차미분된 스펙트럼을 MPLS(Modified Partial Least Squares)를 이용한 회귀식에 이용하는 것이 가장 적합하였다. HPLC를 이용한 유전자원들의 성분 함량과 NIRS에서 도출된 검량식과의 상관관계수는 C3G, D3G 및 Pt3G가 각각 0.952, 0.936과 0.833을 나타내었다. 이들 검량식은 validation file에서도 C3G와 D3G는 0.897, 0.849의 높은 상관관계를 보였으며, 이는 NIRS를 이용하여 검정콩의 안토시아닌 함량을 신속하게 분석할 수 있음을 나타내는 것으로 판단되었다.

종피가 아닌 검정콩 종실을 직접 NIRS에 적용시켰을 때는 검량식의 상관도가 떨어졌다. 그러나 C3G의 경우는 상관관계가 0.80 이상을 나타내었으므로 종실을 직접 이용하는 것에도 무리가 없으리라 판단된다.

Table 30. Calibration and cross validation parameters according to regression and math treatment for anthocyanin contents using whole black soybean seed

Regre.	Math. treatment	Pigment	Mean	SEC	RSQ	SECV	1-VR
MPLS	1.4.4.1	D3G	1.9796	0.7204	0.5065	0.7678	0.4402
		C3G	7.973	1.7575	0.8287	1.9913	0.7823
		Pt3G	0.6685	0.3589	0.0369	0.3607	0.0273
	1.10.10.1	D3G	1.9684	0.7618	0.4474	0.8055	0.3824
		C3G	7.9959	1.7782	0.8249	1.9421	0.7932
		Pt3G	0.7004	0.3755	0.1884	0.3965	0.0938
	2.4.4.1	D3G	2.006	0.7602	0.4861	0.8936	0.2892
		C3G	8.0924	2.2786	0.7159	2.5833	0.6383
		Pt3G	0.6679	0.357	0.0369	0.3605	0.0209
	2.10.10.1	D3G	1.9905	0.6768	0.5789	0.7678	0.4582
		C3G	8.0021	1.7811	0.8242	2.049	0.7697
		Pt3G	0.6952	0.3567	0.2309	0.3864	0.0963
PLS	1.4.4.1	D3G	1.9719	0.7175	0.5078	0.7571	0.4531
		C3G	8.0644	1.871	0.8062	2.1169	0.7547
		Pt3G	0.6679	0.3553	0.0464	0.357	0.0399
	1.10.10.1	D3G	1.9898	0.768	0.4405	0.8108	0.3772
		C3G	8.0198	1.9212	0.792	2.0697	0.7611
		Pt3G	0.693	0.3786	0.1323	0.3889	0.0828
	2.4.4.1	D3G	2.0082	0.7503	0.4971	0.8963	0.282
		C3G	8.0912	2.2447	0.7256	2.5399	0.6519
		Pt3G	0.6679	0.3593	0.0249	0.3607	0.0198
	2.10.10.1	D3G	1.99	0.6923	0.5419	0.7704	0.4336
		C3G	8.0093	1.8899	0.8017	2.1234	0.7522
		Pt3G	0.6961	0.3639	0.2115	0.3876	0.1047

3. 검정콩 안토시아닌 효능의 in vitro 분석

가. Superoxide dismutase (SOD) assay

Superoxide dismutase(SOD)는 superoxide anion을 H_2O_2 와 O_2 로 전환시키는 항산화효소로 알려져 있다. 본 연구는 Xanthine oxidase에 의해 발생한 superoxide anion이 안토시아닌 추출물에 의해 제거된 비율을 관찰함으로써 시료의 항산화능을 평가하였다.

Table 31과 Fig. 10에서 보는 바와 같이 anthocyanin extracts는 0.01%에서 0.5% 범위에서 농도 의존적으로 SOD 활성을 증가시켜 0.5%에서 superoxide radical을 100% 소거시키는 결과를 관찰할 수 있었다.

나. Nitric Oxide(NO) assay

한국세포주은행의 RAW 264.7 세포를 사용하여 안토시아닌 추출물이 NO 억제에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 12, 13, Table 32).

RAW 264.7 세포를 배양한 후, 세포 배양액에 LPS와 농도별 안토시아닌 추출물을 가하여 48시간 배양하였다. 그 후 일정량의 cell supernatant를 취하여 Griess assay를 수행하였다. 표와 그림에서 보는 바와 같이 안토시아닌 추출물을 0.001%, 0.01%, 0.02% 농도로 각각 처리했을 때, LPS에 의해 증가된 NO의 생산이 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였다.

따라서 검정콩 안토시아닌은 항산화력을 가지는 것으로 판단되었다.

Table 31. SOD activity by anthocyanin (unit : % inhibition)

		1	2	Mean	S.D
Vit. C	0.01%	91	94	92	0.7
Anthocyanin -extract	0.01%	43	41	42	1.5
	0.05%	67	66	66	0.3
	0.1%	89	94	91	3.8
	0.5%	100	100	100	0.2

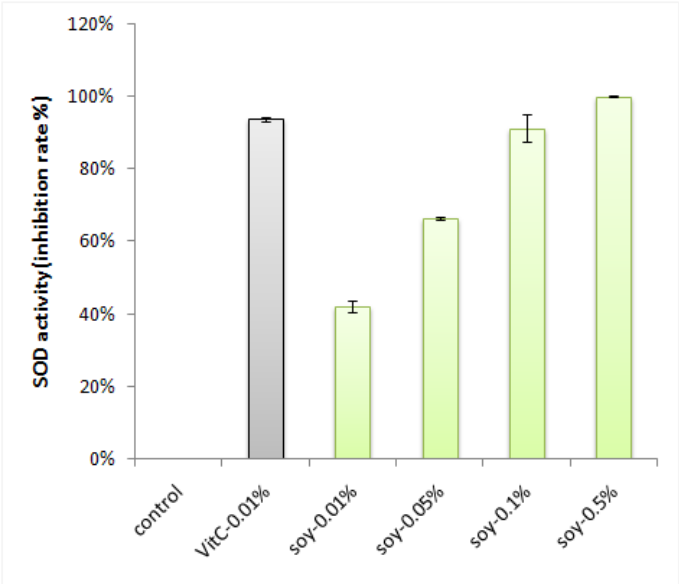


Fig 10. SOD activity by anthocyanin extracts

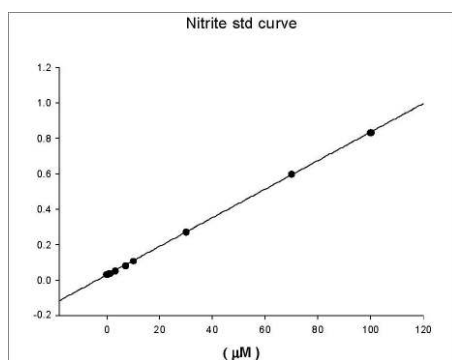


Fig. 11. Nitrite standard curve ($y=0.081X + 0.0282$)

Table 32. Effect of NO production inhibition by anthocyanin (ug/ml)

	1	2	Mean	S.D
Control	3.93	3.80	3.86	0.09
LPS + DMSO	8.12	8.31	8.22	0.13
LPS + extract 0.001%	7.81	7.07	7.44	0.52
LPS + extract 0.01%	7.44	6.77	7.10	0.48
LPS + extract 0.02%	6.33	6.27	6.30	0.04
LPS + EGCG 0.001%	7.44	7.20	7.32	0.17
LPS + EGCG 0.002%	6.52	6.33	6.43	0.13

* EGCG : epigallocatechin-3-gallate

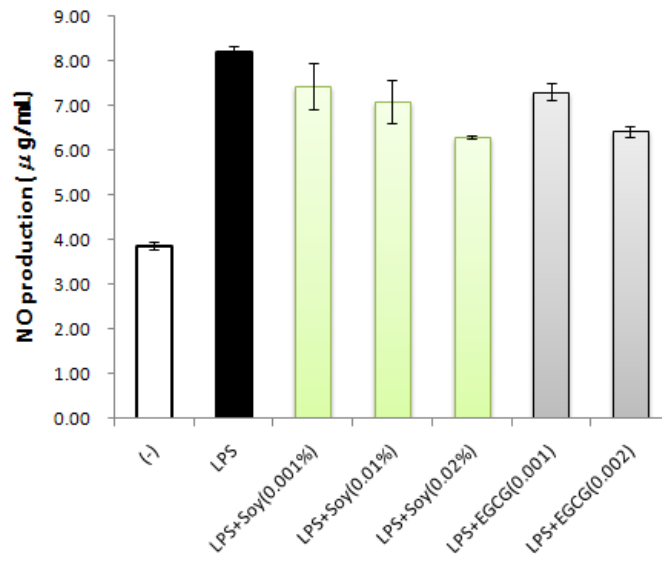


Fig. 12. Effect of NO production inhibition by anthocyanin

다. 항균력 효과 분석

4개의 시험균을 배양한 후 erythromycin, amphotericin B(positive control) 등을 처리하여 항염증 효과를 분석하였다. 항균활성은 배지 내에 형성된 투명대 크기 (직경)를 millimeter단위로 측정하여 나타내었다.

Table 33은 *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*에 대하여 soy powder를 각각 0.1%, 1.0%, 5.0%, 10% 처리하였을 때의 항균력을 DDT에 의해 수치로 나타낸 것이며 이를 각각 균주에 대하여 사진으로 정리하였다 (Fig. 13). 표와 그림에서 보는 바와 같이, 시험물질 안토시아닌 추출물은 *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*에 대해서 10%의 농도에서도 항균력을 보이지 않았다. 항산화성을 나타내는 data를 안토시아닌이 나타낸 까닭에 항염증 효과도 있으리라 사료되었으나 본 결과에서는 그 효과를 볼 수 없었다. 이것이 안토시아닌 추출물이 깨끗이 정제되지 않은 탓인지, 아니면 안토시아닌이 원래 항균력은 떨어지는 것인지에 대해서는 추후 좀 더 깊은 연구가 있어야 할 것이다.

라. 항암성 평가

Jurkat T 세포를 96 well plate에 10^4 개/well 농도로 분주하고 24시간 후, 세포 배양액에 샘플을 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. MTT assay를 이용해 세포생존력을 측정하였으며 그 결과는 Table 34 및 Fig. 15와 같다.

Jurkat T 세포와 MCF-7 세포를 3일간 배양 후 MTT assay를 통해 세포 독성 효과를 관찰한 결과, Jurkat T 세포에서 음성대조군과 비교하여 안토시아닌 색소 모두 농도 의존적으로 세포수를 감소시켰다. EC50 농도는 Pt3G와 C3G의 경우 125 ug/mL 농도와 250 ug/mL 농도 사이였고, D3G의 경우 100 ug/mL 농도와 125 ug/mL 농도 사이 값으로 관찰되었다.

Table 33. Antimicrobial activity by DDT (Disk Diffusion Test)
(Unit : mm)

		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
P.C. ^a	10.0%	32	12	29	15
	10.0%	NE ^b	NE	NE	NE
SP	5.0%	NE	NE	NE	NE
	1%	NE	NE	NE	NE
	0.1%	NE	NE	NE	NE

^aP.C: Positive control(*E. coli*, *S. aureus*: Erythromycin, *C. albicans*, *A. niger*: Amphotericin B)

^bNE: No effect

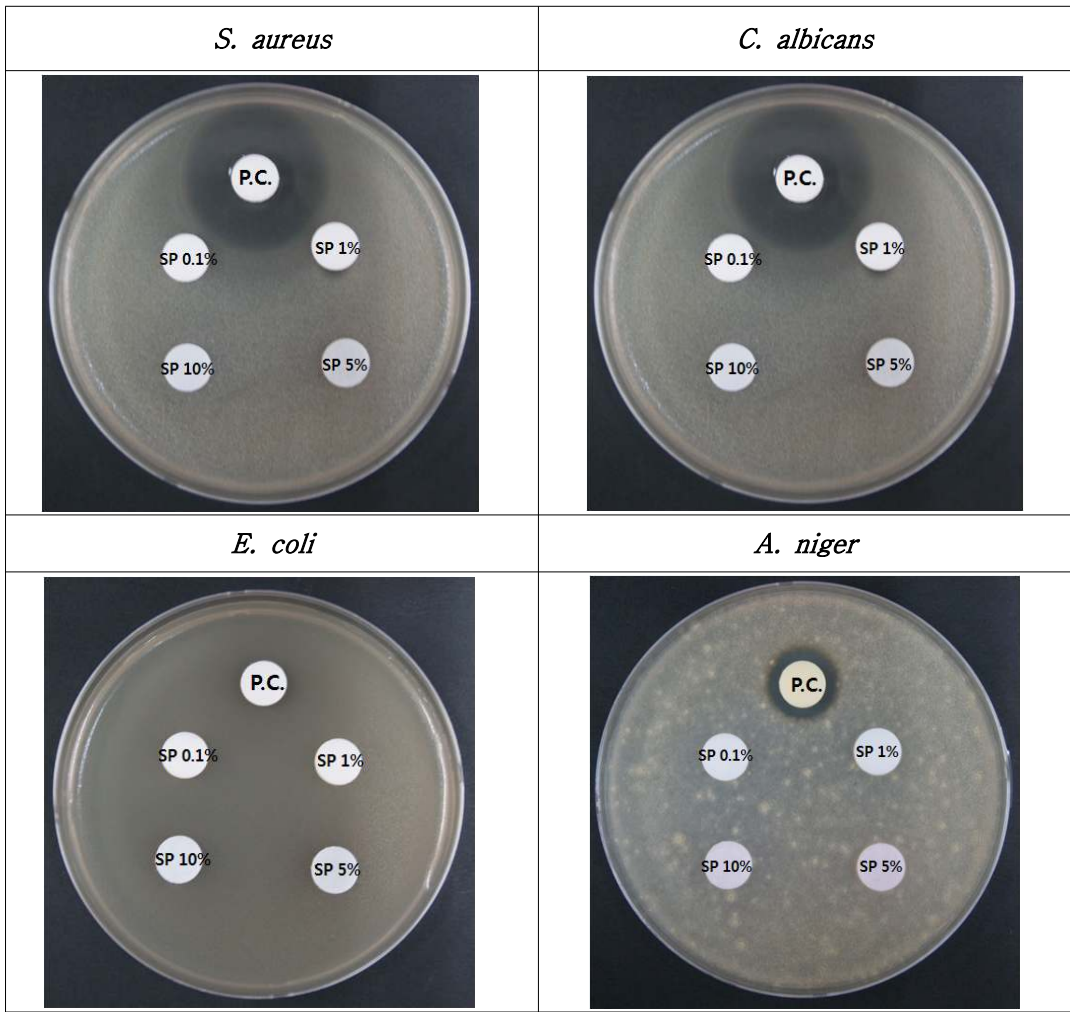


Fig. 13. Appearance of antimicrobial activity by DDT

MCF-7 세포에 관한 결과는 표 35와 그림 16과 같다.

MCF-7 세포에서도 음성대조군과 비교하여 시험물질 모두 농도 의존적으로 세포수를 감소시켰다. EC50 농도는 Pt3G와 D3G의 경우 250 ug/mL 농도와 500 ug/mL 농도 사이였고 C3G의 경우 100 ug/mL 농도와 250 ug/mL 농도 사이값으로 관찰되었다.

따라서 Jurkat T 세포와 MCF-7 세포에 안토시아닌을 색소별(Pt3G, D3G, C3G)로 100~500 ug/mL 농도로 처리하고 세포독성을 관찰한 결과, 3가지 시험물질 모두 두 세포에서 세포독성 효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

결 론

Anthocyanin extracts는 0.01%에서 0.5% 범위에서 농도 의존적으로 SOD 활성을 증가시켰으며 0.5%에서 superoxide radical을 100% 소거시키는 결과를 관찰할 수 있었다. 또한 RAW 264.7 세포를 배양한 후, 세포 배양액에 LPS와 농도별 안토시아닌 추출물을 가한 결과, 안토시아닌 추출물을 0.001%, 0.01%, 0.02% 농도로 각각 처리했을 때 LPS에 의해 증가된 NO의 생산이 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였다. 그러나 안토시아닌 추출물은 *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*에 대해서는 10%의 농도에서도 항균력을 보이지 않았다.

한편, 인간 암세포인 Jurkat T 세포와 MCF-7 세포에 안토시아닌 개별색소(C3G, D3G 및 Pt3G)를 100~500 ug/mL 농도로 처리하고 암세포에 대한 독성을 관찰한 결과, 3가지 색소 모두 두 가지 암 세포에서 세포독성 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 검정콩 안토시아닌이 여러 가지 생리활성 효과를 가지고 있음을 나타내는 결과로 판단되었다.

Table 34. Anthocyanin-induced cytotoxicity on Jurkat T cell

Sample	Control	1	2	Average	SD	%AV
DMSO	0.1%	0.724	0.756	0.740	0.023	100
Pt3G	100ug/ml	0.619	0.672	0.646	0.037	87
	125ug/ml	0.401	0.410	0.406	0.006	55
	250ug/ml	0.254	0.260	0.257	0.004	35
C3G	100ug/ml	0.489	0.500	0.495	0.008	67
	125ug/ml	0.424	0.441	0.433	0.012	58
	250ug/ml	0.297	0.297	0.297	0.007	40
D3G	100ug/ml	0.474	0.484	0.479	0.007	65
	125ug/ml	0.304	0.347	0.326	0.030	44
	250ug/ml	0.154	0.208	0.181	0.038	24

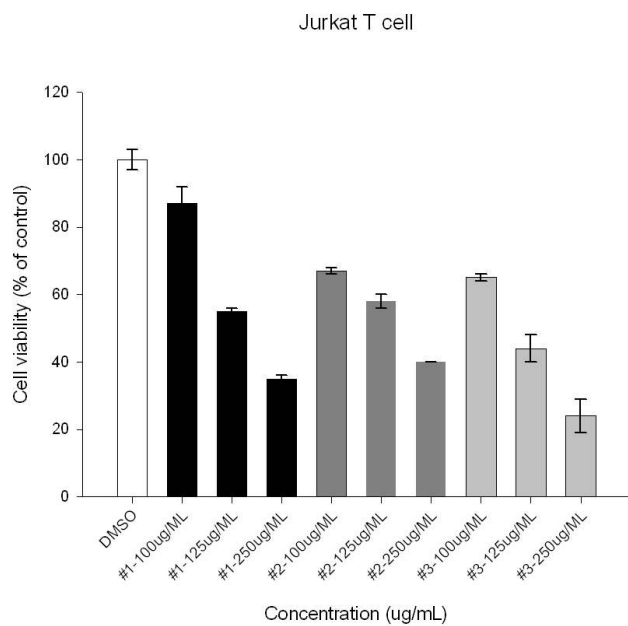


Fig. 14. Anthocyanin-induced cytotoxicity on human leukemia cells
 #1:Petunidin-3-glucoside; #2:Cyanidin-3-glucoside; #3:Delphinidin-3-glucoside

Table 35. Anthocyanin-induced cytotoxicity on MCF-7

Sample	Conc.	1	2	Average	SD	%AV
DMSO	0.1%	0.426	0.407	0.417	0.013	100
	0.5%	0.417	0.398	0.408	0.013	100
Pt3G	100ug/ml	0.355	0.316	0.336	0.028	81
	250ug/ml	0.281	0.261	0.271	0.014	65
	500ug/ml	0.192	0.215	0.204	0.016	50
C3G	100ug/ml	0.388	0.350	0.369	0.027	89
	250ug/ml	0.177	0.144	0.161	0.023	39
	500ug/ml	0.168	0.127	0.148	0.029	36
D3G	100ug/ml	0.407	0.361	0.384	0.033	92
	250ug/ml	0.264	0.240	0.252	0.017	61
	500ug/ml	0.115	0.123	0.119	0.006	29

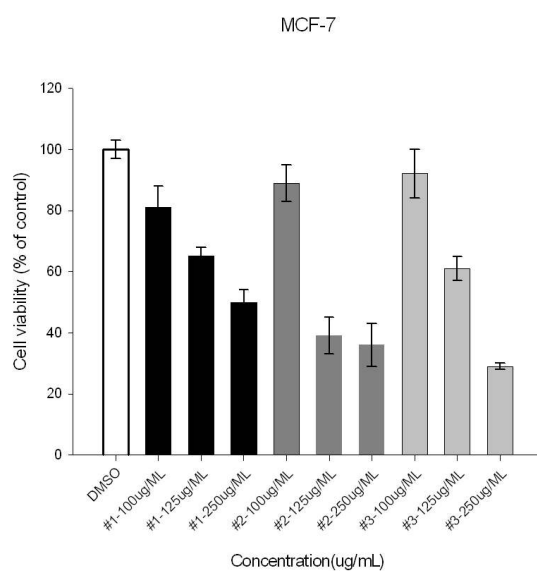


Fig. 15. Anthocyanin-induced cytotoxicity on human adenocarcinoma cells.
 #1:Petunidin-3-glucoside; #2:Cyanidin-3-glucoside; #3:Delphinidin-3-glucoside

4. 동물실험을 통한 안토시아닌 독성 평가

가. 일반증상 및 사망률

실험 기간 동안 단회 독성시험에서 흑색변이 암수 5,000mg/kg 투여군에서 투여 1일차에 관찰되었으나, 이후로는 관찰되지 않아 고용량 투여에 의한 일시적 현상으로 약물투여에 의한 증상으로 인정되지 않았다. 이외의 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

나. 체중

단회 투여 시작 일 체중에서 14일 관찰기간 동안의 체중 증감에 있어 암수 모두 군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며, 투여 전날 절식으로 인한 체중감소를 제외하면 시험물질 투여에 의한 특이적인 체중변화는 관찰되지 않았으며 사망한 개체도 관찰되지 않아 명확한 중독량 또는 개략의 치사량은 5,000mg/kg 이상인 것을 판단되었다(Table 36, 37).

4주 반복 독성시험에서도 시험 전 기간에 걸쳐 군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며, 시험물질 투여에 의한 특이적인 체중변화도 관찰되지 않았다 (Table 38, 39)

Table 36. Change in body weights of male mice after single treatment with anthocyanin (5,000 mg/kg, p.o).

Group	ID	0 day	1 day	3 days	8 days	14 days
Male	1M01	33.79	31.66	37.39	39.55	39.68
Control	1M02	32.63	30.37	34.49	35.31	36.22
	1M03	32.21	30.79	34.51	36.6	38.9
	1M04	32.04	30.84	35.36	36.75	37.27
	1M05	31.41	30.26	32.6	34.3	36.26
	1M06	30.91	29.31	33.22	33.76	36.04
		Mean	32.17	30.54	34.60	36.05
	SD	1.00	0.78	1.69	2.09	1.55
Male	2M01	33.07	31.45	35.12	36.94	40.46
Anthocyanin 5,000 mg/kg per oral	2M02	32.98	31.41	35.83	37.39	40.07
	2M03	32.31	30.72	33.93	35.28	36.19
	2M04	32.01	30.36	34.19	37.37	39.2
	2M05	31.41	29.56	33.33	37.04	38.29
	2M06	31.27	28.79	29.07	30.06	33.45
		Mean	32.18	30.38	33.58	35.68
	SD	0.76	1.05	2.38	2.86	2.68
	n	6	6	6	6	6
	p value	0.9850	0.7750	0.4140	0.8060	0.6730

Table 37. Change in body weights of male mice after single treatment with anthocyanin (5,000 mg/kg, p.o).

	ID	0 day	1 day	3 days	8 days	14 days
Female	1F01	27.78	25.7	30.25	31.71	32.29
Control	1F02	26.93	25.07	28.7	29.89	31.77
	1F03	26.79	23.96	26.55	27.65	30.23
	1F04	25.81	23.81	26.05	27.12	29.89
	1F05	25.76	24.13	26.99	28.12	28.59
	1F06	25	23.18	27.14	27.1	28.57
		Mean	26.35	24.31	27.61	28.60
	SD	1.00	0.92	1.57	1.84	1.56
Female	2F01	27.67	25.05	28.66	30.07	31.53
Anthocyanin 5,000 mg/kg per oral	2F02	27.16	24.24	27.23	28.79	30.6
	2F03	26.68	25.36	28.5	32.77	32.57
	2F04	25.98	22.41	26.62	26.63	27.73
	2F05	25.74	24.67	27.55	28.43	28.66
	2F06	24.81	21.36	25.35	26.42	26.92
		Mean	26.34	23.85	27.32	28.85
	SD	1.04	1.60	1.23	2.36	2.24
	n	6	6	6	6	6
	p value	0.9930	0.5550	0.7250	0.8400	0.6290

Table 38. Change in body weights of male mice during 4 weeks treatment with anthocyanin (1,000 mg/kg, p.o).

Group	ID	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Male	1M01	33.47	35.74	35.58	35.62	36.83
Control	1M02	32.69	35.86	37.66	38.01	38.7
	1M03	32.57	35.2	34.32	35.59	35.4
	1M04	32.17	31.62	35.73	36.51	36.48
	1M05	31.8	34.16	35.85	38.48	38.76
	1M06	30.38	31.78	34.06	35.16	36.7
		Mean	32.18	34.06	35.53	36.56
	SD	1.05	1.92	1.29	1.38	1.33
Male	2M01	33.75	35	36.88	37.48	38.35
Anthocyanin 1,000 mg/kg per oral	2M02	32.66	35.78	35.56	35.05	37.77
	2M03	32.52	37.52	32.34	35.34	35.24
	2M04	31.97	34.40	36.44	35.71	35.64
	2M05	31.53	33.97	34.82	35.9	37.63
	2M06	30.65	32.90	33.56	35.63	37.54
		Mean	32.18	34.93	34.93	35.85
	SD	1.06	1.60	1.74	0.85	1.27
	n	6	6	6	6	6
	p value	1.0000	0.4150	0.5120	0.3100	0.8790

Table 39. Change in body weights of male mice during 4 weeks treatment with anthocyanin (1,000 mg/kg, p.o).

	ID	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Female	1F01	27.51	29.24	30.59	30.23	32.01
Control	1F02	27.41	27.65	28.42	30.99	31.65
	1F03	26.12	26.93	27.62	27.09	28.17
	1F04	26.11	29.58	27.85	28.95	30.41
	1F05	25.64	25.03	26.65	26.98	28.38
	1F06	25.32	24.45	24.31	24.68	25.65
		Mean	26.35	27.15	27.57	28.15
	SD	0.91	2.11	2.07	2.35	2.43
Female	2F01	27.56	29	29.34	29.63	29.79
Anthocyanin 1,000 mg/kg per oral	2F02	27.27	28.09	30.72	29.89	31.32
	2F03	26.51	25.98	26.78	27.77	28.75
	2F04	26.04	26.14	25.83	25.58	26.73
	2F05	25.47	25.38	26.89	27.97	27.76
	2F06	25.28	24.90	23.87	27.88	29.66
		Mean	26.36	26.58	27.24	28.12
	SD	0.93	1.61	2.46	1.55	1.62
	n	6	6	6	6	6
	p value	0.9950	0.6140	0.8040	0.9770	0.7590

다. 혈액학적 검사

수컷의 경우 대조군에 비해 투여군에서 HCT($p < 0.05$)는 증가하였으며, 암컷에서는 Differential Counting에서의 Neutrophil의 %가 대조군에 비해 증가($p < 0.05$)하였다. 그러나, 이러한 변화는 모두 생리적 변동 범위에 속하여 있고 연관된 마커의 변화를 보이지 않아 시험물질에 의한 독성학적 의미는 없는 것으로 판단되었다(Table 40, 41).

라. 혈청학적 검사

수컷 및 암컷 모든 개체에서 혈청학적 검사 상의 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table 42, 43).

마. 장기중량

수컷 및 암컷 모든 개체에서 절대 장기 중량 및 상대장기 중량의 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table 44, 45).

바. 부검 육안소견

모든 생존동물의 도살 부검시 육안적 소견에 있어서 시험물질에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

사. 병리학적 검사

모든 생존동물의 도살 부검 후 심장, 간, 신장, 비장, 췌장, 폐에 대한 조직병리학적 검사를 실시한 결과 시험물질과 관련된 이상 소견이 관찰되지 않았다(Table 46).

Table 40. Hematology in male mice after 4 weeks treatment with anthoc yanin.

Animal ID	RBC ($\times 10^4$ cells/ μ)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)
				MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	
1M01	8.71	14.2	42.0	47.5	18.1	36.6	1194
1M02	8.27	15.2	40.0	48.4	18.4	38.0	1246
1M03	8.41	15.2	43.3	51.5	18.1	35.1	1162
1M04	7.90	14.0	39.9	50.5	17.7	35.1	578
1M05	-	-	-	-	-	-	-
1M06	8.06	14.4	40.1	49.8	17.9	36.0	751
Mean	8.27	14.6	41.1	49.5	18.0	36.2	986
S.D.	0.31	0.6	1.5	1.6	0.3	1.2	302
N	5	5	5	5	5	5	5
2M01	8.85	16.2	46.5	52.5	18.3	34.9	654
2M02	9.21	15.2	45.0	48.8	16.5	33.8	974
2M03	7.69	14.7	42.1	54.8	19.1	34.8	652
2M04	8.70	15.2	45.0	51.7	17.5	33.8	1166
2M05	-	-	-	-	-	-	-
2M06	8.98	16.0	43.0	47.8	17.8	37.2	1447
Mean	8.69	15.5	44.3 *	51.1	17.8	34.9	979
S.D.	0.59	0.6	1.8	2.8	1.0	1.4	342
N	5	5	5	5	5	5	5
p value	0.2000	0.0520	0.0140	0.3100	0.6660	0.1650	0.9710

Animal ID	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ)	WBC Differential Counting (%)				
		NEU	LYM	MONO	EOS	BASO
1M01	2.54	7.5	73.5	3.6	5.8	0.1
1M02	2.88	14.6	72.5	4.6	7.3	0.3
1M03	3.22	8.7	81.6	3.8	5.3	0.1
1M04	2.44	16.3	69.0	4.7	8.3	0.4
1M05	-	-	-	-	-	-
1M06	3.29	11.8	74.5	4.0	8.2	0.3
Mean	2.87	11.8	74.2	4.1	7.0	0.2
S.D.	0.38	3.7	4.6	0.5	1.4	0.1
N	5	5	5	5	5	5
2M01	4.67	10.7	81.8	4.3	2.3	0.1
2M02	3.41	9.7	82.8	4.1	3.1	0.0
2M03	4.50	14.3	71.8	4.4	8.1	0.2
2M04	2.51	11.1	78.7	4.8	4.6	0.1
2M05	-	-	-	-	-	-
2M06	2.70	32.1	55.8	6.4	5.1	0.1
Mean	3.56	15.6	74.2	4.8	4.6	0.1
S.D.	1.00	9.4	11.1	0.9	2.2	0.1
N	5	5	5	5	5	5
p value	0.1900	0.4250	0.9940	0.1980	0.0810	0.0730

-, not detected due to hemolysis.

Significant differences as compared with control (*:p<0.05, **:p<0.01)

Table 41. Hematology in female mice after 4 weeks treatment with anthocyanin.

Animal ID	RBC ($\times 10^4$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)
				MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	
1F01	7.98	14.6	38.0	47.6	18.3	38.4	492
1F02	9.16	16.6	47.8	52.2	18.1	34.7	683
1F03	-	-	-	-	-	-	-
1F04	7.81	14.2	41.9	48.5	17.8	36.1	1158
1F05	8.81	16.2	42.0	47.7	18.4	38.6	1284
1F06	8.08	14.9	40.4	50.0	18.5	36.9	1028
Mean	8.37	15.3	42.0	49.2	18.2	36.9	929
S.D.	0.58	1.0	3.6	1.9	0.3	1.6	332
N	5	5	5	5	5	5	5
2F01	8.67	15.6	45.3	52.2	18.0	34.5	688
2F02	9.26	15.9	46.6	50.4	17.2	34.2	569
2F03	7.64	15.7	42.3	50.8	18.2	33.7	652
2F04	-	-	-	-	-	-	-
2F05	8.74	17.0	45.8	52.4	19.5	37.2	983
2F06	-	-	-	-	-	-	-
Mean	8.58	16.1	45.0	51.5	18.2	34.9	723
S.D.	0.68	0.6	1.9	1.0	1.0	1.6	180
N	4	4	4	4	4	4	4
<i>p</i> value	0.6330	0.2520	0.1820	0.0740	0.9910	0.1000	0.3040

Animal ID	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting (%)				
		NEU	LYM	MONO	EOS	BASO
1F01	2.49	6.5	83.5	3.6	5.9	0.1
1F02	2.02	6.5	85.9	2.1	5.2	0.1
1F03	-	-	-	-	-	-
1F04	2.40	13.3	74.4	4.7	6.3	0.3
1F05	1.74	9.3	73.3	6.1	10.2	0.1
1F06	0.96	10.1	72.3	3.1	13.9	0.1
Mean	1.92	9.1	77.9	3.9	8.3	0.1
S.D.	0.62	2.8	6.3	1.5	3.7	0.1
N	5	5	5	5	5	5
2F01	4.11	16.9	68.2	4.2	8.9	0.5
2F02	6.90	11.0	83.9	3.0	1.0	0.1
2F03	4.44	13.3	71.7	5.3	7.8	0.2
2F04	-	-	-	-	-	-
2F05	1.60	18.5	65.8	5.5	7.9	0.7
2F06	-	-	-	-	-	-
Mean	4.26	14.9 *	72.4	4.5	6.4	0.4
S.D.	2.17	3.4	8.0	1.2	3.6	0.3
N	4	4	4	4	4	4
<i>p</i> value	0.0520	0.0270	0.2880	0.5520	0.4650	0.1120

-, not detected due to hemolysis.

Significant differences as compared with control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

Table 42. Biochemistry in male mice after 4 weeks treatment with anthocyanin.

Group	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
Male Control	1M01	52.1	80.4	127.9	31.0	0.67	0.15	156	139
	1M02	33.7	54.6	146.5	28.3	0.34	0.14	133	79
	1M03	33.7	50.2	163.3	35.0	0.52	0.10	134	127
	1M04	34.1	82.8	186.1	43.7	0.61	0.12	123	40
	1M05	63.9	76.4	158.4	36.8	0.47	0.16	181	151
	1M06	104.2	76.9	196.0	30.8	0.48	0.18	134	126
	Mean	53.6	70.2	163.0	34.3	0.52	0.14	144	110
	S.D.	27.7	14.1	25.1	5.6	0.12	0.03	21	42
Male Anthocyanin 1,000 mg/kg per oral	2M01	50.4	59.1	87.1	22.6	0.48	0.16	235	161
	2M02	46.7	40.7	189.3	26.8	0.60	0.19	172	124
	2M03	63.6	46.1	145.6	29.7	0.55	0.23	156	101
	2M04	95.2	96.2	178.0	43.1	0.49	0.20	146	120
	2M05	47.7	42.7	88.3	36.7	0.60	0.15	152	126
	2M06	32.7	35.3	84.6	26.3	0.33	0.09	123	143
	Mean	56.050	53.350	128.822	30.867	0.508	0.170	164.000	129.167
	SD	21.559	22.454	48.360	7.626	0.101	0.049	38.257	20.586
	n	6	6	6	6	6	6	6	6
	p value	0.8690	0.1500	0.1550	0.3980	0.9180	0.2460	0.2780	0.3500

Table 43. Biochemistry in female mice after 4 weeks treatment with anthocyanin

Group	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
Female Control	1F01	31.2	71.5	32.6	26.7	0.64	0.06	110	59
	1F02	23.4	59.5	125.0	18.8	0.44	0.05	94	75
	1F03	58.2	59.9	129.8	33.0	0.47	0.03	81	85
	1F04	26.5	57.4	100.9	27.1	0.50	0.07	96	137
	1F05	28.6	89.1	247.2	25.2	0.37	0.11	106	147
	1F06	28.9	71.5	270.8	35.5	0.38	0.06	82	25
	Mean	32.8	68.2	151.1	28.0	0.50	0.06	95	88
	S.D.	12.7	12.0	90.8	6.0	0.10	0.03	12	47
Female Anthocyanin 1,000 mg/kg per oral	2F01	26.5	56.4	172.6	32.6	0.5	0.07	102	187
	2F02	36.0	49.2	128.5	15.0	0.52	0.06	140	65
	2F03	75.7	54.1	183.6	47.1	0.33	0.04	110	12
	2F04	46.0	89.2	122.5	15.0	0.52	0.06	120	75
	2F05	52.2	54.9	121.8	32.5	0.47	0.03	91	85
	2F06	36.5	52.3	110.9	27.1	0.50	0.07	86	87
	Mean	45.483	59.350	139.983	28.217	0.473	0.055	108.167	85.167
	SD	17.259	14.831	30.266	12.204	0.073	0.016	19.904	56.986
	n	6	6	6	6	6	6	6	6
	p value	0.1780	0.2850	0.7830	0.9300	0.8970	0.5280	0.1900	0.9270

Table 44. Absolute organ weight in male mice after 4 weeks treatment with anthocyanin

Group	ID	비장	간	신장(좌)	신장(우)	고환(좌)	고환(우)	부고환(좌)	부고환(우)	홀선	심장	폐
Male Control	1M01	0.072	1.381	0.226	0.227	0.111	0.119	0.037	0.035	0.050	0.154	0.178
	1M02	0.091	1.560	0.265	0.298	0.129	0.135	0.039	0.036	0.051	0.179	0.220
	1M03	0.116	1.404	0.243	0.254	0.118	0.123	0.041	0.042	0.038	0.155	0.198
	1M04	0.085	1.382	0.269	0.262	0.131	0.134	0.036	0.044	0.034	0.156	0.220
	1M05	0.117	1.608	0.300	0.303	0.121	0.131	0.035	0.034	0.053	0.168	0.225
	1M06	0.081	1.442	0.228	0.234	0.116	0.126	0.035	0.040	0.063	0.143	0.165
	Mean	0.094	1.463	0.255	0.263	0.121	0.128	0.037	0.039	0.048	0.159	0.201
SD	0.019	0.098	0.028	0.032	0.008	0.006	0.002	0.004	0.011	0.013	0.025	
Male Anthocyanin 1,000 mg/kg per oral	2M01	0.079	1.440	0.219	0.211	0.098	0.093	0.041	0.033	0.016	0.144	0.218
	2M02	0.086	1.360	0.227	0.244	0.115	0.120	0.036	0.033	0.034	0.157	0.195
	2M03	0.107	1.321	0.224	0.217	0.110	0.114	0.041	0.039	0.067	0.123	0.191
	2M04	0.072	1.564	0.216	0.220	0.123	0.127	0.042	0.044	0.028	0.166	0.196
	2M05	0.088	1.582	0.234	0.259	0.126	0.127	0.040	0.045	0.047	0.144	0.185
	2M06	0.075	1.444	0.270	0.276	0.121	0.125	0.035	0.030	0.012	0.153	0.412
	Mean	0.085	1.452	0.232	0.238	0.116	0.118	0.039	0.037	0.034	0.148	0.233
SD	0.013	0.105	0.020	0.026	0.010	0.013	0.003	0.006	0.021	0.015	0.088	
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
p value	0.3440	0.8550	0.1270	0.1650	0.3210	0.1130	0.2250	0.7110	0.1630	0.1820	0.4160	

Group	ID	비장	간	신장(좌)	신장(우)	고환(좌)	고환(우)	부고환(좌)	부고환(우)	홀선	심장	폐
Male Control	1M01	0.205	3.932	0.644	0.646	0.316	0.339	0.105	0.100	0.142	0.438	0.507
	1M02	0.251	4.296	0.730	0.821	0.355	0.372	0.107	0.099	0.140	0.493	0.606
	1M03	0.348	4.217	0.730	0.763	0.354	0.369	0.123	0.126	0.114	0.466	0.595
	1M04	0.254	4.124	0.803	0.782	0.391	0.400	0.107	0.131	0.101	0.466	0.657
	1M05	0.320	4.393	0.820	0.828	0.331	0.358	0.096	0.093	0.145	0.459	0.615
	1M06	0.229	4.082	0.645	0.662	0.328	0.357	0.099	0.113	0.178	0.405	0.467
	Mean	0.268	4.174	0.729	0.750	0.346	0.366	0.106	0.110	0.137	0.454	0.574
SD	0.055	0.164	0.075	0.078	0.027	0.020	0.010	0.016	0.027	0.030	0.072	
Male Anthocyanin 1,000 mg/kg per oral	2M01	0.217	3.953	0.601	0.579	0.269	0.255	0.113	0.091	0.044	0.395	0.598
	2M02	0.242	3.828	0.639	0.687	0.324	0.338	0.101	0.093	0.096	0.442	0.549
	2M03	0.334	4.118	0.698	0.676	0.343	0.355	0.128	0.122	0.209	0.383	0.595
	2M04	0.210	4.557	0.629	0.641	0.358	0.370	0.122	0.128	0.082	0.484	0.571
	2M05	0.239	4.305	0.637	0.705	0.343	0.346	0.109	0.122	0.128	0.392	0.503
	2M06	0.213	4.110	0.769	0.786	0.344	0.356	0.100	0.085	0.034	0.436	1.173
	Mean	0.243	4.145	0.662	0.679	0.330	0.337	0.112	0.107	0.099	0.422	0.665
SD	0.047	0.259	0.061	0.069	0.032	0.041	0.011	0.019	0.064	0.039	0.251	
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
p value	0.4100	0.8220	0.1230	0.1250	0.3790	0.1530	0.3390	0.7350	0.2110	0.1360	0.4170	

Table 45. Absolute organ weight in female mice after 4 weeks treatment with anthocyanin.

Group	ID	비장	간	신장(좌)	신장(우)	난소(좌)	난소(우)	흉선	심장	폐
Female	1F01	0.120	1.345	0.175	0.192	0.008	0.007	0.063	0.138	0.182
Control	1F02	0.110	1.368	0.181	0.195	0.008	0.008	0.071	0.134	0.167
	1F03	0.097	1.118	0.155	0.163	0.005	0.005	0.056	0.132	0.153
	1F04	0.143	1.311	0.155	0.156	0.009	0.011	0.071	0.123	0.191
	1F05	0.126	1.23	0.162	0.167	0.008	0.012	0.057	0.134	0.178
	1F06	0.087	0.861	0.151	0.156	0.008	0.008	0.056	0.106	0.155
	Mean	0.114	1.206	0.163	0.172	0.008	0.009	0.062	0.128	0.171
SD	0.020	0.192	0.012	0.018	0.001	0.003	0.007	0.012	0.015	
Female	2F01	0.102	1.246	0.163	0.168	0.005	0.005	0.034	0.127	0.189
Anthocyanin 1,000 mg/kg per oral	2F02	0.089	1.231	0.154	0.157	0.007	0.008	0.064	0.111	0.186
	2F03	0.083	0.923	0.163	0.172	0.008	0.01	0.075	0.112	0.159
	2F04	0.123	0.883	0.158	0.18	0.007	0.01	0.054	0.102	0.160
	2F05	0.088	1.04	0.174	0.177	0.006	0.007	0.044	0.108	0.204
	2F06	0.102	1.235	0.143	0.167	0.005	0.005	0.055	0.137	0.177
	Mean	0.098	1.093	0.159	0.170	0.006	0.008	0.054	0.116	0.179
SD	0.015	0.166	0.010	0.008	0.001	0.002	0.014	0.013	0.018	
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
p value	0.1480	0.3030	0.5540	0.8700	0.1040	0.4920	0.2520	0.1370	0.4100	

Group	ID	비장	간	신장(좌)	신장(우)	난소(좌)	난소(우)	흉선	심장	폐
Female	1F01	0.385	4.788	0.634	0.683	0.028	0.028	0.249	0.469	0.585
Control	1F02	0.375	4.322	0.599	0.630	0.019	0.019	0.216	0.510	0.591
	1F03	0.492	4.508	0.533	0.536	0.031	0.038	0.244	0.423	0.657
	1F04	0.471	4.593	0.605	0.624	0.030	0.045	0.213	0.500	0.665
	1F05	0.356	3.523	0.618	0.638	0.033	0.033	0.229	0.434	0.634
	1F06	0.415	4.392	0.594	0.625	0.028	0.031	0.227	0.466	0.623
	Mean	0.415	4.354	0.597	0.623	0.028	0.032	0.230	0.467	0.626
SD	0.055	0.439	0.034	0.048	0.005	0.009	0.014	0.035	0.033	
Female	2F01	0.340	4.698	0.588	0.599	0.027	0.031	0.244	0.424	0.710
Anthocyanin 1,000 mg/kg per oral	2F02	0.338	3.757	0.663	0.700	0.033	0.041	0.305	0.456	0.647
	2F03	0.481	3.456	0.618	0.705	0.027	0.039	0.211	0.399	0.626
	2F04	0.382	4.514	0.755	0.768	0.026	0.030	0.191	0.468	0.885
	2F05	0.357	4.317	0.500	0.584	0.017	0.017	0.192	0.479	0.619
	2F06	0.374	4.175	0.608	0.650	0.024	0.029	0.208	0.444	0.684
	Mean	0.378	4.153	0.622	0.667	0.026	0.031	0.225	0.445	0.695
SD	0.053	0.469	0.084	0.070	0.005	0.008	0.044	0.030	0.099	
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
p value	0.2630	0.4600	0.5200	0.2230	0.4110	0.8210	0.8150	0.2630	0.1360	

Anthocyanin 투여 소수의 개체에서 간세포의 국소적 변성 소견과 국소적인 염증세포 침윤이 관찰되었으나, 염증세포 침윤은 암컷 음성 대조군 개체에서도 관찰된 결과로 anthocyanin 투여에 의한 변화로 보기 어려웠다. 국소적 간세포 변성 소견 또한 소수의 간세포에서 관찰되는 점과 혈액생화학적 변화에서 ALT, AST의 유의한 변화가 관찰되지 않은 점으로 미루어 anthocyanin 투여에 의한 변화가 아닌 것으로 판단된다. 폐장의 소견 또한 anthocyanin 투여 수컷 두 개체에서 가벼운 간질성 폐렴 소견이 관찰되었으나 음성대조 개체에서도 동일 소견이 관찰되는 점으로 미루어 anthocyanin 투여에 의한 변화가 아닌 것으로 판단되었다. 이외에 다른 장기에서 특이한 병리조직학적 변화는 관찰되지 않았다.

따라서 암·수 마우스를 이용한 이상과 같은 연구결과를 볼 때 검정콩 추출 안토시아닌 조추출물은 경구 사용시 안전한 물질인 것으로 판단되었다.

결 론

검정콩 천연색소인 안토시아닌에 대하여 동물에서의 식이실험을 통한 안전성 자료를 확보하고자 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

안토시아닌에 대한 암·수 마우스를 이용한 단회 경구 투여 및 4주 경구 반복투여 독성시험을 실시한 결과, 단회 경구 투여에 의한 명확한 중독량 또는 개략의 치사량은 5,000 mg/kg 이상으로 나타났으며, OECD 가이드라인에 따른 한계 시험용량인 1,000 mg/kg을 4주간 반복 경구투여시 암·수 모든 투여군에서 시험물질에 의한 독성변화가 관찰되지 않았다. 시험 기간 동안 치사한 동물은 없었으며, 4주후의 체중 및 장기의 무게 변화에 이상이 없었다. 혈액학적 수치 및 혈청학적 수치도 모든 시료 투여군에서 정상치 범위를 나타내었으며, 부검 후의 육안적 소견과 여러 가지 조직들의 병리학적 검사에서도 이상 징후가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험에 사용된 안토시아닌은 자체 안전성 스크리닝 결과 경구 사용시 안전한 물질로 판단되었다.

Table 46. Histological findings in mice after 4-weeks treatment with anthocyanin

Dose		Male		Female	
		0 mg/kg	1,000 mg/kg	0 mg/kg	1,000 mg/kg
Liver	Focal hepatocyte degeneration	0/6	1/6 ¹⁾	0/6	0/6
	Focal cellular infiltration	0/6	0/6	1/6	1/6
Lung	Mild interstitial pneumonia	1/6	2/6	0/6	0/6

¹⁾ Values: number of clinical signed animals/number of tested animals .

5. 추출조건과 첨가물에 따른 안토시아닌 함량과 색소 안정성 평가

가. 검정콩 안토시아닌 추출

1) 메탄올 추출에 의한 안토시아닌 함량

정량 분석에 사용된 안토시아닌 표준물질의 검량 회귀식은 RP-HPLC에서 delphinidin-3-glucoside(D3G), cyanidin-3-glucoside(C3G) 및 petunidin-3-glucoside(Pt3G) 순으로 chromatogram이 나타났으며, anthocyanin standard의 peak area와 각각의 표준물질을 농도구배로 회석하여 회귀식을 구하였다. 계산된 D3G, C3G 및 Pt3G의 회귀식과 결정 계수는 D3G가 $Y = -1948.x + 6583 (r^2 = 0.974)$, C3G가 $Y = -5741.x + 19525 (r^2 = 0.983)$, Pt3G가 $Y = -3488.x + 11783 (r^2 = 0.990)$ 이었으며, 이를 시료의 검량식으로 사용하였다. 메탄올 추출에 의한 검정콩 안토시아닌을 분석한 결과, C3G와 D3G가 검출되었으며(Fig. 16), 함량은 D3G가 0.57 ppm, C3G가 2.23 ppm이었다(Table 47). 이 값은 Kim 등(2006)이 분석한 수치에 비해 상당히 낮은 함량이었는데, 이것은 용매 사용시 HCl 등의 산이 첨가되지 않은 까닭으로 사료된다.

2) Counter Current System에서 추출한 검정콩의 안토시아닌 함량 및 과장 분석

Count current system을 이용하여 8°C에서 추출한 검정콩 안토시아닌은 1개의 chromatogram이 검출되었다(Fig. 17). 검출된 peak를 standard와 비교하여 과장 분석을 한 결과(Fig. 18) 나타난 chromatogram은 C3G임을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 60°C와 80°C에서도 같은 경향이였다. 다만 안토시아닌 함량이 추출 온도에 따라 다르게 나타났는데, 8°C에서의 안토시아닌 함량이 2.38 ppm이었던 반면, 60°C와 80°C에서는 1.73 ppm을 나타내어 추출 온도가 높아짐에 따라 안토시아닌의 안정성이 떨어짐을 알 수 있었다(Table 48).

이와 같은 결과를 종합할 때 메탄올 추출에서는 C3G와 D3G가 검출된 반면 counter current system에서는 C3G만 분석되었는데, 이것은 안토시아닌 용출 과정에서의 색소 안정성과 관련이 있을 것으로 사료되나 추후 정밀한 검토가 필요하겠다. 본 연구의 결과로는 C3G가 D3G가 안정성이 높으리라 판단되었

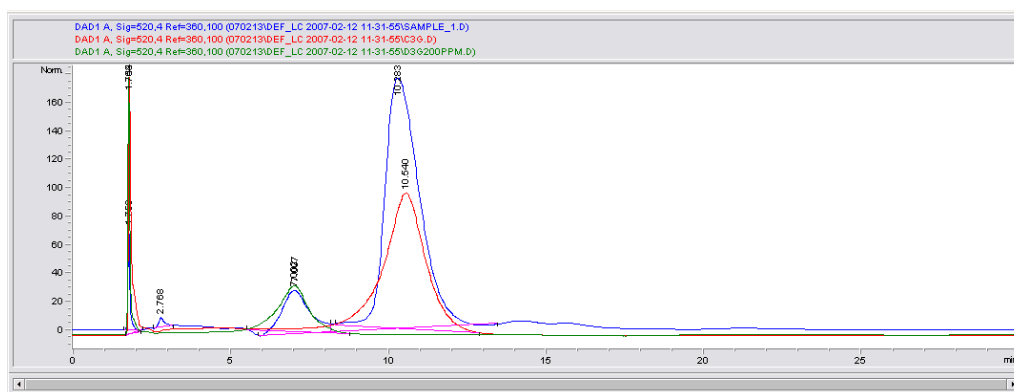


Fig. 16. Comparison of HPLC chromatogram between standard(red) and anthocyanin of black soybean(blue) extracted by metanol.

Table 47. Anthocyanin content by methanol extraction in black soybean

Anthocyanin	RT	Content
D3G ¹⁾	7.002	0.57 ppm
C3G ²⁾	10.233	2.23 ppm
Pt3G ³⁾	n.d. ⁴⁾	n.d. ⁴⁾

¹⁾ D3G; delphinidin-3-glucoside, ²⁾ C3G; cyanidin-3-glucoside,

³⁾ Pt3G; petunidin-3-glucoside, ⁴⁾ n.d.; not detected.

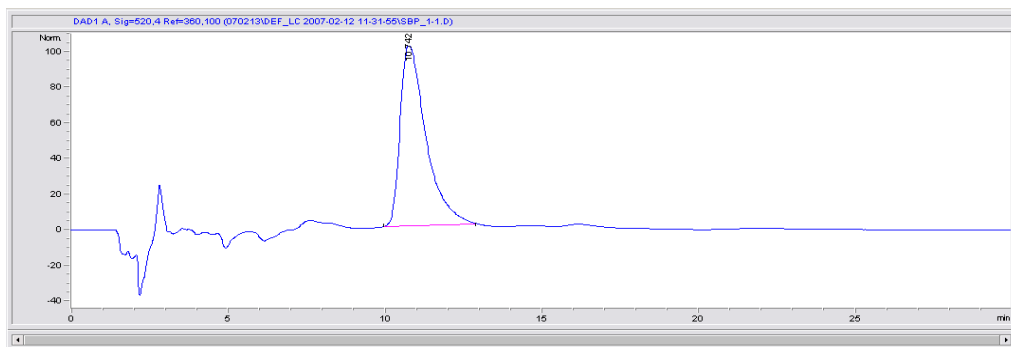


Fig. 17. HPLC chromatogram of anthocyanin extracts by counter current system at 8°C from black soybean.

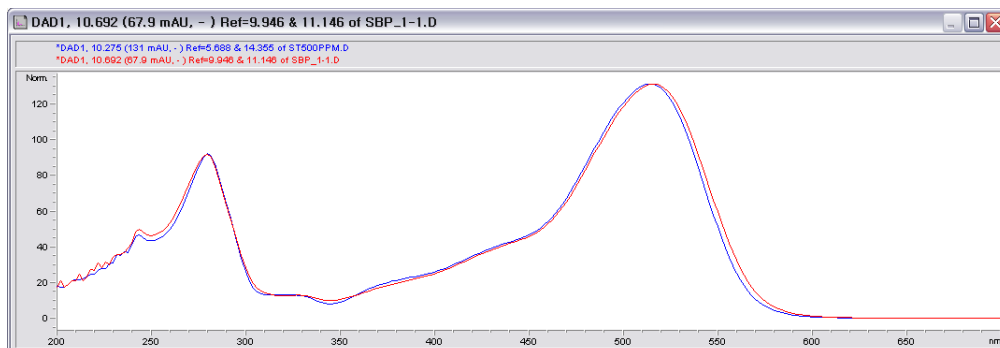


Fig. 18. Comparison of Wave length between standard(red) and anthocyanin extracts(blue) by counter current system at 8°C from black soybean.

Table 48. Anthocyanin content by counter current system from black soybean at different temperature

Extraction temp.	Anthocyanin content		
	D3G ¹⁾	C3G ²⁾	Pt3G ³⁾
8°C	n.d. ⁴⁾	2.38 ppm	n.d. ⁴⁾
60°C	n.d. ⁴⁾	1.73 ppm	n.d. ⁴⁾
80°C	n.d. ⁴⁾	1.73 ppm	n.d. ⁴⁾

¹⁾ D3G; delphinidin-3-glucoside, ²⁾ C3G; cyanidin-3-glucoside,

³⁾ Pt3G; petunidin-3-glucoside, ⁴⁾ n.d.; not detected.

는데, 원래 검정콩 안토시아닌 색소 중 D3G의 함량이 C3G보다 낮은 것도 counter current system에서 D3G가 검출되지 않은 한 요인으로 생각된다. 한편, 메탄올 추출은 준비과정이 매우 간편한 반면 counter current system 추출은 농축 등의 시간이 더 많이 걸린다는 단점이 있으나, 메탄올 추출로는 식품에 직접 이용할 수 없으므로 식품 첨가제로서의 안토시아닌 활용도를 고려하면 counter current system 추출이 메탄올 추출보다 유용하다고 하겠다. 특히 8°C의 counter current system 추출은 메탄올 추출과 비교했을 때 안토시아닌 함량이 비슷하므로 안토시아닌 색소 추출의 효과적인 방법으로 제시해 볼 수 있겠다. 그러나 Kim(2006)등은 메탄올 추출시 HCl 등의 산이 첨가되면 안토시아닌의 추출 효율을 훨씬 높일 수 있다고 한 바 있다.

나. 안토시아닌 색소의 안정성

1) 가열에 의한 변색

추출된 색소의 안정성은 Chung(2004)과 Kim(2003)의 연구에서 색소와 색차 형질을 Hunter value로 측정한 결과, 흡광도와 Hunter value의 data가 높은 상관도를 보였다는 보고(Jung, 1996) 등을 참조하여 가열 처리 시 첨가물에 따른 색소 안정성을 분석하였다.

가열 온도와 시간에 따른 조추출물의 변색 지표로 사용한 DI는 pH에 따라 안토시아닌의 색이 변하는 특성을 이용한 것이다. 즉, 산성에서 강한 적색을 나타내며, pH가 증가함에 따라 무색을 거쳐 청색으로 변화하는 특성을 이용한 것으로 안토시아닌 색소가 파괴되어 갈색 화합물이 증가하게 되면 pH 4.5에서의 흡광도 값이 증가하게 된다. 따라서 DI는 가열 시간이 길어지면 증가하여 100°C에서 180분간 가열하였을 때의 DI 값이 증가한다. 종합적인 색의 변화를 나타내는 delta E값은 가열 시간과 가열 온도에 비례하여 가열 시간이 증가함에 따라 L값은 약간 감소하고, b값은 거의 변화가 없고, a값은 급격하게 감소한다고 Jung(1996) 등은 보고하였다.

그러나 본 실험의 결과에서는 메탄올에서 추출한 시료들의 L값은 증가하고 a와 b값은 감소하였으며, delta E값은 가열 시간이 증가함에 따라 감소하

여 Kim 등(2006)의 보고와는 상반되는 경향을 나타내었다. 즉, 메탄올 추출에서의 delta E값과 가열 시간과의 상관관계는 -0.993로 역의 높은 상관관계를 보였다(Table 49). 물 추출 안토시아닌 중 60℃와 80℃에서 추출한 안토시아닌의 Hunter value도 L값은 증가하고 a값은 약간 감소하고, b값은 증가하거나 변화가 없었으며, Delta E값이 80℃에서는 -0.82, 60℃에서는 0.72로 나타났다. 8℃에서 추출한 시료의 Delta E값은 0.89로 추출 온도가 낮을수록 가열 시간과의 높은 상관관계를 보였다(Table 50).

2) 추출용매에 의한 색도 변이

(1) 메탄올 추출 안토시아닌의 색차 변이

메탄올 추출 안토시아닌 색소의 색차 변이는 Table 51에서와 같이 대조군은 가열 시간에 따라 26% 증가하였고, 퇴색지표들은 $p < 0.05$ 로 유의성을 보였다. 가열에 의한 색차 변이도는 β -cyclodextrin 및 maltodextrin을 1%와 5% 농도로 조추출물에 첨가하고 100℃에서 180분간 가열하였을 때의 DI 값은 가열 시간에 따라 유의성을 보였으나 대조군과는 유의적인 차이가 없었다. 1%와 5% 첨가 간에도 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 1% 첨가는 2시간까지 가열의 다른 군과 비교할 때 퇴색 정도가 약했다. Maltodextrin은 대조군과 1%, 5% 첨가군 간의 농도에 따른 차이는 없었으나 가열 시간에 따른 차이는 있었으며, 색차 변이도는 약했으나 지연 효과는 유의성을 보이지 않았다.

안토시아닌의 가열에 의한 색차 변이 정도를 sucrose와 maltose로 DI를 측정하여 본 결과 Table 52와 같이 sucrose 첨가군은 농도가 높을수록 색차 변이도가 높아져 1% sucrose 첨가군이 대조군에 비해 29% 증가하였으며, 10% 첨가 시에는 37.5% 증가하여 sucrose 1% 첨가군이 색소 안정 효과가 있는 것으로 나타났다. Maltose 첨가는 가열 시간에 따른 퇴색의 정도가 대조군과 유사한 수준이었고, 농도에 따른 퇴색의 차가 거의 없었다.

Table 49. Comparison of Hunter's value of anthocyanin by methanol extraction in black soybean

Heating time (Hour)	Hunter's value			
	L*	a*	b*	dE*a
0	65.04	61.86	37.04	
1	69.13	54.61	29.28	-0.993
2	72.31	47.42	27.24	
3	74.71	40.02	27.35	

Table 50. Hunter's value of anthocyanin from black soybean by counter current system extraction at 8°C, 60°C and 80°C

Heating time (hour)	8°C				60°C				80°C			
	L	a	b	dE*a	L	a	b	dE*a	L	a	b	dE*a
0	0.44	1.38	-0.62		2.82	4.06	-0.63		0.63	2.37	0.47	
1	0.33	1.66	0.56	0.89	5.53	4.07	0.38	0.72	0.36	1.90	0.61	-0.82
2	0.57	2.47	0.98		4.88	5.96	3.71		0.27	1.67	0.47	
3	1.05	2.29	1.77		4.67	4.45	3.44		0.31	1.79	0.54	

Table 51. Effect of heating time and stabilizers on degradation index of anthocyanin with methanol extract

Heating time		0	1 hr	2 hr	3 hr
Control		1.23±0.00 ^d	1.34±0.00 ^c	1.48±0.01 ^b	1.68±0.04 ^a
β-Cyclodextrin	1%	1.21±0.00 ^d	1.32±0.00 ^c	1.52±0.03 ^b	1.69±0.01 ^a
	5%	1.27±0.01 ^c	1.36±0.00 ^b	1.54±0.02 ^a	1.58±0.02 ^a
Maltodextrin	1%	1.23±0.00 ^d	1.35±0.01 ^c	1.62±0.01 ^b	1.69±0.02 ^a
	5%	1.23±0.00 ^d	1.34±0.00 ^c	1.55±0.00 ^b	1.65±0.01 ^a

Superscript with the same letter in vertical of each sample is not significantly different($p<0.05$).

Table 52. Effect of heating time and sugars on degradation index of anthocyanin with methanol extract

Heating time		0	1 hr	2 hr	3 hr
Control		1.23±0.00 ^d	1.34±0.00 ^c	1.48±0.01 ^b	1.68±0.04 ^a
Sucrose	1%	1.23±0.00 ^d	1.36±0.01 ^c	1.60±0.03 ^b	1.74±0.04 ^a
	10%	1.25±0.00 ^d	1.43±0.01 ^c	1.74±0.03 ^b	2.00±0.05 ^a
Maltose	1%	1.23±0.00 ^d	1.36±0.00 ^c	1.56±0.02 ^b	1.72±0.02 ^a
	10%	1.24±0.00 ^d	1.36±0.01 ^c	1.56±0.01 ^b	1.74±0.03 ^a

Superscript with the same letter in vertical of each sample is not significantly different($p<0.05$).

(2) Counter Current System 추출 안토시아닌의 변색

Table 53과 같이 대조군은 각각 3시간 가열시 8°C에서 25% 증가하였고, 60°C에서의 추출물은 26%, 80°C에서의 추출물들은 27%의 DI 값의 증가를 보여 가열 시간과 추출 온도의 교호작용 효과가 있었다. 즉, 8°C 추출물은 2시간 가열 시 색차 변이가 가장 적었고, 3시간 가열 시에는 색차 변이가 컸으며, 60°C 추출물은 가열 전보다 1시간 경에는 색차 변이가 적었으나, 3시간 이후에는 색차 변이가 컸다. 80°C 추출물은 60°C 추출물과 같은 경향을 나타내었다. 이런 결과는 Kim(2003)이 오미자를 100°C에서 180분 가열하였을 때 60% 증가한 것과 비교하면 색 변화의 정도가 낮아 안정적인 것으로 유추할 수 있겠다.

안정제 처리에 따른 색소의 안정성을 검토한 결과는 다음과 같다. β -cyclodextrin 첨가군은 대조군과 비교하여 가열 시간에 따라 DI 값이 거의 증가하지 않아 퇴색 지연 효과가 있는 것으로 판단되었다. 1% 첨가군과 5% 첨가군은 가열 시간에 따라 다르게 나타났으며, 1% 첨가군에서는 가열 시간과 추출 온도가 교호작용이 있어 변색에 영향을 주는 것으로 추정되었으며, 5% 첨가군에서는 가열 시간의 영향만 있으며 추출 온도의 영향은 없어 가열 시간과 추출 온도간의 교호작용 효과가 있었다. Maltodextrin 1%와 5% 첨가가 변색에 미치는 영향은 추출 온도와 가열 시간과의 교호작용이 있었으며, 1% 첨가군은 $p < 0.01$ 유의 수준에서, 5%는 $p < 0.05$ 에서 영향을 미쳤다. 1% 첨가군은 가열 시간에는 영향이 없었으나 80°C 추출에서는 색차 변이 정도가 약했으며, 5% 첨가군은 $p < 0.05$ 유의수준에서 8°C 추출은 2시간 가열시, 80°C 추출에서의 1시간 가열은 색차 변이 정도가 낮았다. 즉, 5% 첨가군은 추출 온도에 상관없이 색차 변이가 지연되었고, 이런 결과는 Kim(2003) 등의 연구와 유사한 경향이였다.

Sucrose 첨가군은 Table 54와 같이 10% 첨가군에서 변색이 약했고, 1% 첨가군은 가열 시간에 따라 변색은 하였으나 추출 온도에 대한 영향은 없는 것으로 나타났다. 1% 첨가군에서 8°C 추출은 가열 시간에 따라 색차 변이의 정도가 감소하였으며, 1% 첨가군 60°C 및 80°C 추출물과 10% 첨가군의 8°C, 60°C 그리고 80°C에서는 색차 변이가 증가하였다. 다른 당류인 maltose 처리

Table 53. Effect of heating time and stabilizers on degradation index of anthocyanin by counter current system extraction in black soybean at different temperatures

	8°C				60°C				80°C				F value		a*b
	0	1 hr	2 hr	3 hr	0	1 hr	2 hr	3 hr	0	1 hr	2 hr	3 hr	Heating time(a)	Extraction temp.(b)	
Control	1.32 ±0.01 ^c	1.41 ±0.00 ^b	1.61 ±0.03 ^a	1.46 ±0.04 ^b	1.24 ±0.03 ^a	1.24 ±0.02 ^a	1.26 ±0.01 ^a	1.27 ±0.02 ^a	1.79 ±0.17 ^b	1.76 ±0.05 ^b	1.91 ±0.13 ^{ba}	2.21 ±0.28 ^a	73.72 <.0001**	17.49 <.0001**	7.47 0.0002**
β-cyclo dextrin	1.57 ±0.05 ^b	1.95 ±0.16 ^a	1.96 ±0.09 ^a	1.83 ±0.06 ^a	1.62 ±0.06 ^b	1.68 ±0.02 ^b	2.07 ±0.08 ^a	1.71 ±0.01 ^b	1.63 ±0.04 ^a	1.58 ±0.04 ^a	1.41 ±0.02 ^b	1.45 ±0.03 ^b	49.13 <.0001**	8.53 0.0019**	18.16 <.0001**
	5%	1.44 ±0.02 ^c	1.95 ±0.10 ^a	1.87 ±0.11 ^a	1.65 ±0.05 ^b	1.57 ±0.03 ^c	1.76 ±0.04 ^b	2.08 ±0.06 ^a	1.72 ±0.06 ^b	1.44 ±0.02 ^b	1.47 ±0.02 ^b	1.57 ±0.05 ^a	1.50 ±0.06 ^{ba}	33.41 <.0001**	1.57 0.2309
Malto dextrin	2.27 ±2.46 ^a	1.48 ±1.54 ^b	1.48 ±1.54 ^b	1.69 ±1.79 ^b	1.47 ±0.02 ^c	1.50 ±0.03 ^{cb}	1.78 ±0.04 ^a	1.53 ±0.01 ^b	1.60 ±0.02 ^a	1.84 ±0.33 ^a	1.86 ±0.04 ^a	1.54 ±0.06 ^a	3.06 0.0505	24.18 <.0001**	8.33 0.0001**
	5%	1.71 ±0.28 ^a	1.35 ±0.06 ^b	1.51 ±0.05 ^{ba}	1.78 ±0.05 ^a	1.45 ±0.01 ^b	1.47 ±0.01 ^b	1.53 ±0.02 ^a	1.55 ±0.05 ^a	1.56 ±0.02 ^b	1.47 ±0.01 ^b	1.66 ±0.06 ^a	1.69 ±0.06 ^a	4.73 0.0113*	3.61 0.0450*

*,** Significant at the $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively, Superscript with the same letter in vertical of each sample is not significantly different($p<0.05$).

Table 54. Effect of heating time and sugars on degradation index of anthocyanin by counter current system extraction in black soybean at different temperatures

	8°C				60°C				80°C				F value		a*b	
	0	1 hr	2 hr	3 hr	0	1 hr	2 hr	3 hr	0	1 hr	2 hr	3 hr	Heating time(a)	Extraction temp.(b)		Pr>F
Sucrose	1%	1.97 ±0.15 ^a	1.55 ±0.06 ^b	1.55 ±0.03 ^b	1.65 ±0.01 ^b	1.57 ±0.06 ^a	1.52 ±0.02 ^a	1.53 ±0.01 ^a	1.59 ±0.04 ^c	1.67 ±0.03 ^c	1.96 ±0.07 ^a	1.83 ±0.04 ^b	1.83 ±0.04	27.8 <.0001**	1.81 0.1876	13.94 <.0001**
	10%	1.40 ±0.05 ^a	0.82 ±1.14 ^a	1.53 ±0.00 ^a	1.47 ±0.05 ^a	1.46 ±0.04 ^b	1.48 ±0.04 ^b	1.44 ±0.08 ^b	1.50 ±0.02 ^b	1.53 ±0.02 ^b	1.71 ±0.07 ^a	1.70 ±0.14 ^a	1.70 ±0.14	1.92 0.1577	0.56 0.5783	1.07 0.4132
Maltose	1%	2.25 ±0.52 ^a	1.59 ±0.05 ^b	1.59 ±0.05 ^b	1.73 ±0.04 ^b	1.38 ±0.05 ^a	1.39 ±0.01 ^a	1.47 ±0.07 ^a	1.49 ±0.02 ^d	1.55 ±0.04 ^c	1.77 ±0.02 ^b	1.87 ±0.03 ^a	1.87 ±0.03	104.13 <.0001**	55.81 <.0001**	108.88 <.0001**
	10%	1.35 ±0.04 ^b	1.43 ±0.01 ^a	1.49 ±0.01 ^a	1.47 ±0.04 ^a	1.85 ±0.04 ^{ba}	1.97 ±0.17 ^a	1.96 ±0.04 ^a	1.49 ±0.01 ^b	1.53 ±0.02 ^b	1.60 ±0.06 ^b	1.74 ±0.11 ^a	1.74 ±0.11	29.95 <.0001**	3.82 0.0385*	19.64 <.0001**

*,** significant at the $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively, Superscript with the same letter in vertical of each sample is not significantly different($p<0.05$).

에서는 10% 첨가군은 색차 변이가 적었으며, 8°C 추출물은 가열 시간에 따라 색차 변이가 감소하였으나, 60°C, 80°C 추출물은 색차 변이도가 증가하였다. 즉, 색소 안정화에서 maltose는 가열 시간과 추출 온도 사이에 $p < 0.01$ 에서 교호작용 효과가 있었으며, 10% 첨가군이 1% 첨가군보다 색소 안정화에 기여하는 것으로 판단되었다. 이와 같은 경향은 8°C, 60°C, 80°C의 추출물에서 동일했다.

결론

안토시아닌 색소를 counter current system으로 추출하고 가공 조건하의 안정성에 대한 효과를 조사하고자 온도 조건을 8°C, 60°C, 80°C에서 1시간 추출하였다. 추출 방법에 따른 안토시아닌 함량 분석 결과, 메탄올 추출은 검정콩의 안토시아닌 색소인 C3G가 2.23 ppm 분석되었으며, counter current system 추출에서는 C3G가 8°C에서 2.38 ppm, 60°C에서 1.73 ppm, 80°C에서 1.73 ppm 분석되어 식품 첨가제로서 안토시아닌의 효용성을 볼 때 물을 이용하는 counter current system의 추출이 유용한 것으로 판단되었다. 가열에 의한 변색의 정도를 ΔE 값으로 분석한 결과, 메탄올 추출물은 가열 시간이 경과함에 따라 감소하였고, counter current system의 8°C, 60°C, 80°C의 추출은 추출 온도가 낮을수록 가열 시간과 높은 상관관계를 나타내어 8°C 추출이 2 시간까지는 안정화 효과를 나타내었다. 안정제와 당류 첨가에 따른 안토시아닌의 안정화 효과에서 메탄올 추출은 β -cyclodextrin 1% 첨가가 2시간까지 변색 지연 효과를 보였으며, 당류는 sucrose 1% 첨가군이 안정 효과를 나타내었다. 한편, counter current system 추출에서는 β -cyclodextrin 1%가 세 종류 온도 추출물에서 모두 퇴색 지연 효과가 있었으며, maltodextrin은 1% 첨가가 가열 시간과 추출 온도 모두에서 1% 유의 수준의 안정 효과를 보였고, 5% 첨가군은 8°C 추출에서 2시간까지는 안정 효과가 있었다. Sucrose 1%와 maltose 1% 및 10% 첨가도 8°C 추출에서 안정화 효과를 나타내었다. 따라서 counter current system에 의한 검정콩 안토시아닌 추출은 함량면에서 8°C 추출이 효과적이며, 추출 색소 안정화 효과는 β -cyclodextrin 1%, maltodextrin 1%와 sucrose 1%, maltose 1%가 실제 활용면에서 유용할 것으로 판단되었다.

6. 안토시아닌 첨가 발효유 개발

가. 안토시아닌 농축물 첨가에 따른 발효 중 pH 및 산도의 변화

안토시아닌 요구르트의 산 생성 정도를 알아보기 위해 농축 안토시아닌을 우유 배지에 각각 0.5%, 1.0%, 1.5%(w/v)농도로 첨가하여 37°C에서 30시간 동안 배양하면서 pH와 적정 산도를 측정하였다. Table 54와 같이 발효 중 pH의 변화는 2일, 4일, 6일로 저장함에 따라 pH는 감소하는 경향을 보였다. Streptococcus 균주를 비롯한 Lactobacillus 균주와 혼합 균주도 pH 변화의 양상은 거의 유사하였다.

그러나 대조군에 비하면 anthocyanin을 첨가한 시료들은 모두 낮은 값을 보였고, Streptococcus 균주와 Streptococcus와 Lactobacillus을 혼합한 균주에서 anthocyanin 첨가량에 따라 pH가 낮아지는 경향이 확실하였다. 한편, 미국 펜실베이니아 주에서 판매되는 요구르트의 pH는 12시간 이후부터 30시간 배양시 4.19 ~ 4.44로 시중 요구르트 제품의 일반적인 pH값이 4.5 ~ 5.0보다 다소 낮았다.

적정 산도는 Table 55와 같이 pH의 변화와는 달리 꾸준히 증가하였고, 안토시아닌 첨가 요구르트가 대조군에 비해서는 높은 산도 값을 나타내었다. 발효 24 시간 후 대조군 및 안토시아닌 첨가군 모두에서 적정 산도는 1.31보다 높은 값을 나타내었다. 호상 요구르트의 적정 산도는 1.0 ~ 1.1일 때 가장 좋은 품질을 나타낸다고 하였는데 본 실험의 요구르트 중에서는 Lactobacillus와 Streptococcus thermophilus 혼합균주가 가장 낮은 값을 보였고, Streptococcus thermophilus 균주는 산도가 높은 것으로 나타났다.

Table 54. Effects of additive anthocyanin on the yogurt pH during lactic fermentation

Samples	Storage days			
	0	2	4	6
st-control	4.36	4.34	4.28	4.23
st-B	4.27	4.39	4.21	4.22
st-C	4.29	4.22	4.19	4.19
st-D	4.20	4.30	4.19	4.25
lp-control	4.44	4.38	4.35	4.35
lp-B	4.37	4.31	4.26	4.32
lp-C	4.44	4.28	4.25	4.29
lp-D	4.38	4.24	4.23	4.27
stlp-control	4.29	4.27	4.36	4.31
stlp-B	4.32	4.25	4.30	4.28
stlp-C	4.25	4.24	4.23	4.37
stlp-D	4.24	4.25	4.29	4.25

st-control : whole milk + skim milk + Streptococcus thermophilus

st-B : whole milk + skim milk + anthocyanin 9ml + Streptococcus thermophilus

st-C : whole milk + skim milk + anthocyanin 12ml + Streptococcus thermophilus

st-D : whole milk + skim milk + anthocyanin 15ml + Streptococcus thermophilus

lp-control : whole milk + skim milk + Lactobacillus plantarum

lp-B : whole milk + skim milk + anthocyanin 9ml + Lactobacillus plantarum

lp-C : whole milk + skim milk + anthocyanin 12ml + Lactobacillus plantarum

lp-D : whole milk + skim milk + anthocyanin 15ml + Lactobacillus plantarum

stlp-control : whole milk + skim milk + Streptococcus thermophilus + Lactobacillus plantarum

stlp-B : whole milk + skim milk + anthocyanin 9ml + Streptococcus thermophilus + Lactobacillus plantarum

stlp-C : whole milk + skim milk + anthocyanin 12ml + Streptococcus thermophilus + Lactobacillus plantarum

stlp-D : whole milk + skim milk + anthocyanin 15ml + Streptococcus thermophilus + Lactobacillus plantarum

Table 55. Effects of additive anthocyanin on the yogurt titratable acidity(TA) during lactic fermentation

Samples	Storage days			
	0	2	4	6
st-Control	1.259±0.030	1.352±0.811	1.421±0.066	1.586±0.052
st-B	1.431±0.001	1.342±0.033	1.455±0.018	1.617±0.008
st-C	1.341±0.077	1.528±0.055	1.619±0.013	1.719±0.012
st-D	1.405±0.065	1.522±0.006	1.833±0.135	1.912±0.008
lp-Control	1.368±0.152	1.422±0.086	1.633±0.054	1.753±0.034
lp-B	1.297±0.086	1.323±0.005	1.631±0.008	1.667±0.005
lp-C	1.366±0.056	1.422±0.087	1.569±0.005	1.701±0.008
lp-D	1.422±0.064	1.423±0.035	1.686±0.002	1.733±0.025
stlp-Control	1.297±0.039	1.421±0.025	1.67±0.003	1.822±0.003
stlp-B	1.444±0.057	1.521±0.033	1.761±0.023	1.866±0.002
stlp-C	1.555±0.002	1.620±0.034	1.820±0.021	1.822±0.025
stlp-D	1.501±0.1.8	1.621±0.004	1.630±0.052	1.960±0.017

* Samples are the same as Table 54.

나. 안토시아닌 농축물 첨가에 따른 발효 중 색도의 변화

밝기의 정도를 나타내며 안토시아닌 색소의 지표가 될 수 있는 Lightness는 대조구는 매우 밝은 93.02 이었으나 안토시아닌 첨가량이 많을수록 L 값은 감소하는 경향을 보였다. 균주에 따라서는 *Streptococcus thermophilus* 균주의 요구르트가 L 값이 가장 적어 안토시아닌의 변화가 적은 것으로 추측할 수 있었다. Redness를 나타내는 a 값은 대조구에 비해 첨가량에 따라 점점 값이 커졌고, yellowness를 나타내는 b 값은 대조구에 비해 안토시아닌 첨가량이 많을수록 낮아지는 경향을 뚜렷이 보였다. 저장 기간에 따른 안정성을 보기 위해서 저장 6일 째 되는 날에 측정된 Hunter 값의 변화는 Table 56과 같이 대조구는 약간 낮아지거나 변화가 없었으며, 시간이 지남에 따라 안토시아닌 첨가 요구르트의 색이 약간 변질되어 L 값이 약간 씩 증가하였다. 이런 현상은 세 가지 균주에서 거의 유사한 경향을 보였으나 *Streptococcus thermophilus*와 *Lactobacillus* 혼합균주는 값의 변화가 거의 미미한 정도였다. a 값은 대조구에 비해서 증가하는 경향은 첫째 날과 같았으며, 시간이 지남에 따라서는 약간 감소하는 경향을 나타내었다. Yellowness의 b 값은 저장 기간에 따라 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

다. 안토시아닌 농축물 첨가에 따른 발효 중 생균수의 변화

안토시아닌 농축물을 첨가한 요구르트를 항온기에서 꺼내서 잘 저은 후 냉장고에 넣고 실험 항온기의 발효 과정 중 젖산균수의 변화를 살펴본 결과는 Table 57과 같았다. 대조군을 포함한 전 실험군의 젖산균의 수는 증가하기도 하고 감소했다가 증가하기도 하였으며 또는 계속 감소하기도 하는 등 일정한 경향을 보이지 않았으나 젖산균 수가 $10^7 \sim 10^{10}$ CFU/ml 사이로 존재하였다. 전반적으로 모든 실험군들에 있어서 젖산균수의 변화는 크지 않았으나 산 생성이 증가하는 것으로 보아 젖산균이 지속적으로 존재하므로 산 생성이 계속되어 축적되기 때문으로 생각된다. 다른 연구들에 의하면 쌀가루와 탈지분유를 첨가한 시료에서 쌀가루 6%와 탈지 분유 1 ~ 2% 첨가한 경우 8 시간 배양 후 젖산균의 수가 가장 많이

Table 56. Effects of additive anthocyanin on the yogurt hunter value during the storage

Samples	Storage days					
	0			6		
	L	a	b	L	a	b
st-control	93.02	-2.07	8.80	92.69	-2.9	7.60
st-B	79.87	5.58	6.91	80.51	5.39	6.52
st-C	77.61	6.64	7.04	78.23	6.46	6.67
st-D	75.82	7.28	6.96	76.51	7.01	6.56
lp-control	92.31	-2.13	7.10	92.97	-2.25	8.42
lp-B	89.97	0.72	7.45	80.99	0.42	7.24
lp-C	88.81	1.41	7.11	89.01	1.20	6.89
lp-D	87.85	2.27	7.01	88.07	1.81	6.59
stlp-control	93.60	-1.57	10.15	93.52	-1.86	9.68
stlp-B	89.41	1.48	7.51	89.61	0.77	7.48
stlp-C	88.57	1.91	7.37	88.88	1.71	7.16
stlp-D	87.56	2.56	6.79	87.84	2.21	6.38

* Samples are the same as Table 54.

Table 57. Changes of viable cell count of yogurt prepared with skim milk powder and anthocyanin on the yogurt hunter value during the storage

Samples	Viable cell counts (CFU/g)			
	0	2	4	6
st-Control	33×10^8	30×10^9	27×10^9	37×10^9
st-B	41×10^8	61×10^8	49×10^9	57×10^9
st-C	40×10^8	91×10^8	17×10^9	92×10^{10}
st-D	10×10^8	67×10^8	35×10^9	74×10^{10}
lp-Control	46×10^8	14×10^8	19×10^9	20×10^9
lp-B	88×10^8	7.7×10^8	18×10^9	27×10^{10}
lp-C	37×10^7	69×10^8	89×10^9	96×10^{10}
lp-D	75×10^8	14×10^8	16×10^9	17×10^{10}
stlp-Control	17×10^7	42×10^8	17×10^9	18×10^{10}
stlp-B	14×10^8	52×10^8	76×10^{10}	86×10^{10}
stlp-C	15×10^7	62×10^8	82×10^{10}	82×10^{10}
stlp-D	15×10^8	16×10^8	63×10^{10}	19×10^{10}

* Samples are the same as Table 54.

증가하였다고 하고, 인삼 요구르트의 경우에도 젖산균 수가 12시간 후 급격한 증가를 보이다가 30시간에서는 큰 변화가 없었다고 한다. 이런 결과들과 본 실험의 결과는 양상이 다르나 호상 요구르트의 젖산균수는 10^8 CFU/ml 이상으로 규정하고 있는 한국식품공업협회(1994)의 규정에 본 실험의 모든 실험균들의 젖산균수는 모두 부합하였다.

라. 안토시아닌 농축물 첨가에 따른 발효 중 점도의 변화

안토시아닌을 첨가한 요구르트를 산도 1.0%에 도달하였을 때 냉각한 후 냉장 온도에서 6일간 저장하면서 점도를 측정한 결과는 Table 58과 같았다. 제조 당일에는 대조군이 12.5% 정도로 가장 낮았으며, Streptococcus 균 접종균은 첨가량이 많은 15 ml 첨가균에서 점도가 높았다. 그리고 두 종류의 균을 공동접종한 것은 대조군과 실험균의 점도가 거의 유사한 경향을 나타내었다. 저장 기간이 길어짐에 따라서 Streptococcus 접종균은 점도가 높아지는 경향을 보였으나 두 종류의 균을 접종한 시료들은 저장 기간이 길어짐에 따라서 점도의 변화가 나타나지 않았다. 그러나 요구르트에 쌀, 전분, 감자, 옥수수, 팽화미 등을 첨가한 실험에서는 저장기간이 경과함에 따라 점도가 증가하는 것으로 보고된 바 있어 본 실험의 결과와 유사하였다.

마. 안토시아닌 농축물 첨가에 따른 발효 중 유기산 함량

유제품에서 유기산은 그 속에 존재하는 유지방의 가수 분해 및 유산균의 대사산물 등에 의해 생성되고, 요구르트에 있어서 유기산은 향기와 영양적 측면 이외에도 젖산균 생육 활성의 지표로서 아주 중요하다. 안토시아닌 농축물의 첨가가 요구르트 내의 유기산 함량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 59와 같다. 표준물질로 사용한 유기산들 중 아세트산을 제외하고는 안토시아닌 농축물 첨가 요구르트내에서 이들 존재가 확인되었다. 유기산 함량은 대조군에 비해 안토시아닌 농축물 첨가균의 경우 옥살산의 농도가 높은 반면 타타르산은 경향이 일정하지 않았다. 젖산은 증가였으나 안토시아닌 첨가량에 따라서는 1.5% 첨가구는 젖산 생성이 적으며, 특히 Streptococcus

Table 58. Viscosity of yogurt with skim milk powder and anthocyanin during fermentation (unit : cP)

Samples	Storage days			
	0	2	4	6
st-Control	12.57±0.03	25.23±3.81	12.37±0.56	14.67±5.62
st-B	17.03±4.92	19.30±4.11	22.67±7.69	32.30±4.95
st-C	18.67±0.29	22.50±0.46	23.27±1.33	28.97±4.34
st-D	22.10±4.43	22.33±0.70	24.40±0.35	25.48±3.97
lp-Control	24.87±1.42	24.67±0.21	25.00±2.80	25.53±0.88
lp-B	25.90±2.21	26.80±2.37	28.93±4.35	30.20±2.88
lp-C	25.27±0.12	21.22±1.08	25.65±0.05	21.27±0.08
lp-D	21.24±0.06	21.42±0.03	21.86±0.02	21.73±0.02
stlp-Control	21.92±0.03	21.24±0.02	23.27±0.03	25.52±2.03
stlp-B	21.41±0.07	22.52±1.03	23.67±0.02	24.67±2.01
stlp-C	21.55±2.02	23.26±0.03	24.28±0.02	26.82±0.02
stlp-D	21.50±0.18	23.62±1.40	25.63±1.52	28.96±1.17

* Samples are the same as Table 54.

Table 59. Composition of some organic acids in yogurt added with anthocyanin during lactic acid fermentation

Samples	Organic acid(Unit: mg/100mL)		
	Oxalic acid	Tartaric acid	Lactic acid
st-control	133.49	288.18	1163.28
st-B	93.81	327.08	1330.64
st-C	87.40	242.39	1056.60
st-D	105.94	290.85	1238.67
lp-control	87.52	348.69	892.84
lp-B	177.27	276.73	1070.75
lp-C	98.72	271.13	1067.68
lp-D	133.67	273.55	1119.00
stlp-control	89.89	262.01	1001.53
stlp-B	102.84	256.66	1028.94
stlp-C	115.59	302.06	1207.70
stlp-D	102.43	237.62	991.44

* Samples are the same as Table 54.

thermophilus균과 Lactobacillus 균주 혼합에서 안토시아닌 1.5% 첨가구는 젖산 생성이 아주 적은 것으로 나타났다.

바. 안토시아닌 농축물 첨가에 따른 발효 요구르트의 관능검사

안토시아닌을 첨가하여 제조한 요구르트의 기호도를 알아보기 위해 24시간 발효된 요구르트에 설탕을 8% 넣어 잘 혼합한 후 냉장고에서 하루 방치하고 각 균주의 대조구들과 색(color), 향미(flavor), 맛(taste), 조직감(mouth feel), 그리고 종합적인 기호도(overall preference) 등의 항목으로 관능검사를 한 결과는 Table 60과 같다. 색에서는 Streptococcus thermophilus와 Lactobacillus 혼합균주에서 안토시아닌을 0.5% 첨가구가 가장 높은 점수를 받았다. 이는 0.5%부터 안토시아닌의 고유색과 젖산에 의한 색소 안정화가 이루어져 예쁜 보라색이 되는 현상이 뚜렷하였다. 향과 맛은 Streptococcus thermophilus와 Lactobacillus 혼합균주의 발효 요구르트의 향이 높은 값을 얻었고, 전체적으로 mouth feel 항목은 비교적 보통 이상의 점수를 얻었으나 이 항목도 Streptococcus thermophilus와 Lactobacillus 혼합 균주의 제품이 좋은 것으로 응답되었고, overall preference도 혼합 균주의 제품이 좋은 것으로 응답하였다.

결론

안토시아닌 색소의 안정성과 기능성 성분을 얻고자 색소 안정성이 예측되는 요구르트를 제조하여 품질 특성을 조사한 결과 균주는 호기성 균주로 Streptococcus thermophilus와 Lactobacillus plantarum 균주를 혼합한 것이 관능적 특성이 우수하였으며, 안토시아닌 농축물은 0.5% 첨가가 적합한 것으로 관능검사 결과 판단되었다.

Table 60. Sensory scores of the yogurt added anthocyanin after lactic fermentation

Samples	Color	Flavor	Taste	Texture	Overall Preference
st-control	4.5±0.83 ^a	3.33±1.21 ^{ba}	2.83±0.98 ^b	3.91±0.80 ^{ba}	3.58±1.28 ^{ba}
st-B	3±1.26 ^a	2.83±0.75 ^a	1.75±0.75 ^a	3±1.26 ^a	2.66±1.2 ^a
st-C	2.08±0.66 ^a	2.33±0.81 ^a	2±0.89 ^a	3.25±1.25 ^a	2.66±1.03 ^a
st-D	1.41±0.49 ^b	2.25±1.08 ^{ba}	1.91±1.56 ^{ba}	2.83±1.16 ^a	2.33±0.51 ^{ba}
lp-control	4.5±0.83 ^a	3.5±1.04 ^{ba}	3±0.89 ^b	3.83±0.75 ^{ba}	3.83±0.75 ^{ba}
lp-B	3.66±1.03 ^a	2.83±0.75 ^a	2.33±1.03 ^a	3.5±1.37 ^a	3.16±0.98 ^a
lp-C	2.83±0.98 ^{ba}	2.83±1.16 ^{ba}	1.83±0.75 ^b	3.16±0.98 ^a	2.5±1.04 ^{ba}
lp-D	2.66±1.03 ^a	3±0.89 ^a	3±1.09 ^a	2.83±1.47 ^a	3.16±0.75 ^a
stlp-control	4.16±0.98 ^a	2.91±0.66 ^b	3.25±0.61 ^{ba}	3.08±1.11 ^{ba}	3.66±0.81 ^{ba}
stlp-B	4.08±0.66 ^a	3±0.89 ^b	3±0.63 ^b	3.5±0.54 ^{ba}	3.5±0.54 ^{ba}
pstlp-C	2.91±0.66 ^a	3±1.09 ^a	2.58±1.35 ^a	3.33±0.81 ^a	3±0.63 ^a
stlp-D	2.75±0.75 ^a	3±1.09 ^a	2.75±0.98 ^a	3.66±0.81 ^a	3±0.89 ^a

Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

* Samples are the same as Table 54.

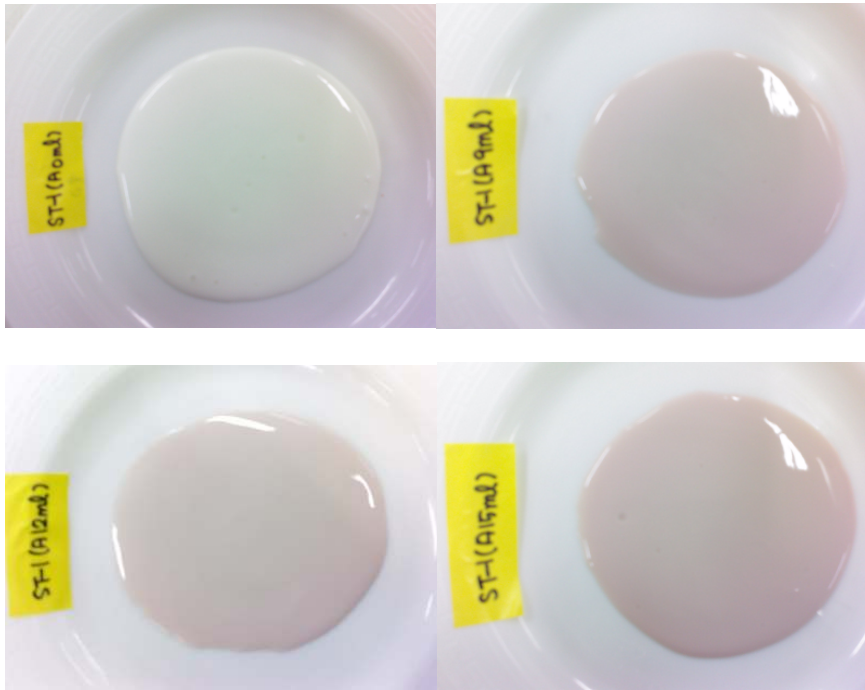


Fig. 190. Appearance of yogurt added anthocyanin after lactic fermentation

7. 안토시아닌 활용 머핀 개발

가. 재료의 특성 분석

1) 입자 분석

머핀 제조에 사용된 밀가루는 150 μm 미만의 입자로 99% 이상이 75~106 μm 범위의 입자 분포를 보였다. 그러나 흑임자 및 단호박의 입자 크기는 100 μm 에서 200 μm 까지 비교적 큰 입자의 분포를 보였다.

2) 일반성분 분석

본 실험에 사용된 재료의 일반성분 분석 결과는 Table 61과 같다. 밀가루는 단백질 12.6%, 회분 0.4%의 1등급 밀가루였고, 흑임자 분말은 조단백질 7.8%, 조지방 10.4%, 단호박 분말은 조단백질 8.2%, 조지방 6.8% 이었다.

3) 재료들의 색도

머핀에 혼합된 재료들의 색도 결과는 Table 62와 같다. 밀가루의 명도가 90을 넘는 정도로 밝은 색을 나타낸 반면, 바닐라 분말은 명도가 80 정도이고, 단호박은 75 정도이며, 흑임자는 58 수준이었다. 본 시료에 사용된 안토시아닌 추출물은 3 정도의 어두운 색상을 나타냈으며, 적색의 정도를 나타내는 a 값은 단 호박이 7 정도로 머핀에 사용된 재료 중에서는 가장 높은 값을 보였으며, 황색의 정도를 나타내는 b 값은 단호박, 바닐라 그리고 흑임자의 순으로 높았다. 이런 이유는 단호박이 carotenoid와 xanthophyll를 함유하기 때문으로 사료된다. 본 실험에서는 명도가 가장 높은 바닐라, 중간 단계인 단호박, 아주 낮은 흑임자를 시료로 안토시아닌을 첨가한 머핀을 제조하여 상업화를 위한 품질 특성을 고찰하고자 하였다.

Table 61. Chemical composition of wheat flour and rice powder

	Contents(%)		
	Wheat flour	Black sesame powder	Squash powder
Moisture	3.5	11.8	12.2
Lipid	0.9	9.4	6.8
Protein	12.6	7.8	8.2
Ash	0.4	0.2	0.29

Table 62. Hunter's color value of powder of raw material of muffin

Samples	Hunter's value			
	L value	a value	b value	delta E
white flour	94.98	0.29	8.39	4.00
vanilla	81.93	2.88	30.13	5.97
black sesame seed	54.97	0.75	11.16	36.23
squash	75.88	7.05	48.78	14.93
anthocyanin extract	3.68	1.94	0.56	0.84

1) L=white; a=red; b=yellow

2) All data are mean value

나. 머핀의 물리적 품질 특성

머핀들의 무게, 부피, 용적 밀도 등의 품질 특성은 Table 63과 같다.

대조구인 바닐라 머핀의 부피가 130 mL에 비해 안토시아닌을 10% 첨가한 머핀은 대조구와 같은 부피를 보였고, 안토시아닌 첨가율이 30%인 머핀은 135 mL로 부피가 대조구와 유사한 정도를 나타냈다. 흑임자 머핀의 부피는 185 mL로 바닐라 머핀에 비해 부피가 컸으며, 안토시아닌을 10% 첨가한 시료는 175 mL, 30% 및 50% 첨가한 시료는 180 mL로 대조구보다 작은 값을 나타내었다. 단호박 가루를 첨가한 머핀의 대조구는 175 mL이고, 10% 첨가한 시료는 180 mL, 20% 첨가한 시료도 180 mL, 30% 첨가한 시료는 175 mL 이었다. 바닐라 머핀은 3 종류의 머핀 중 가장 적었고, 흑임자를 혼합하여 만든 것과 단호박 가루를 첨가한 시료는 부피가 많았다.

머핀의 무게는 바닐라 머핀의 대조구가 98 g에 비해 안토시아닌을 20%, 30% 첨가한 시료들은 무게가 더 무거워졌으며, 흑임자에 첨가한 시료들에서는 대조구가 96 g이었고, 안토시아닌을 첨가한 시료들 모두가 대조구에 비해서 무게가 가벼웠다. 단호박 머핀의 대조구도 102 g으로 안토시아닌을 첨가한 시료들 모두가 무게가 가벼웠으며, 특히 안토시아닌을 20%, 30% 첨가한 시료들의 무게가 가벼웠다.

일반적으로 컵 케익은 밀도(g/cc)가 낮을수록 품질이 좋은 것으로 평가되는데, 바닐라 대조구는 0.75였고, 안토시아닌 첨가율이 30% 인 제품은 0.70으로 대조구에 비해 품질이 좋은 것으로 평가할 수 있었다. 흑임자 머핀은 대조구가 0.52이고, 안토시아닌 30% 첨가구가 0.45로 대조구에 비해 좋은 것으로 평가되었으며, 단호박의 경우 대조구가 0.59이고 10%, 20%, 30% 안토시아닌의 첨가가 머핀의 품질에 좋은 영향을 미치는 것으로 나타나 전 제품에서 대조구에 비해 좋게 평가되었다

머핀의 무게에 대한 부피의 값을 나타내는 용적 밀도는 바닐라 대조구가 1.33이고, 10% 안토시아닌 첨가구는 1.36, 20% 첨가구는 2.96, 30% 첨가는 1.25로 10%, 20% 안토시아닌 첨가는 바닐라 머핀에서 완성도가 좋은 것으로

Table 63. Effect of Premix on physical characteristics of cupcake added with different powder

Samples ¹⁾	Physical characteristics							
	Volume (mL)	Density ⁴⁾	Weight (g)	Height (cm)	Width (cm)	Specific volume ²⁾	Height (cm)	
							Max.	Min.
C	130	0.75	98	8.0	6.5	1.33	7.0	5.0
CV1	130	0.74	96	7.7	6.1	1.36	7.1	5.5
CV2	125	0.80	100	7.8	6.1	2.96	7.0	4.8
CV3	135	0.77	104	7.4	6.2	1.25	7.5	6.0
CB	185	0.52	96	7.4	7.0	1.93	5.0	6.5
CB1	175	0.51	88	6.8	6.2	1.99	7.0	5.0
CB2	180	0.53	94	7.0	6.0	2.00	6.5	6.5
CB3	180	0.45	80	7.0	6.3	1.92	5.0	6.5
CS	175	0.59	102	7.2	6.4	1.72	5.8	6.0
CS1	180	0.55	98	7.1	6.2	1.84	6.0	5.0
CS2	180	0.50	90	7.0	6.4	2.00	6.6	5.0
CS3	175	0.52	90	6.8	6.3	1.92	6.2	4.8

1) Refer to the legend in Table 6

2) Specific volume = Volume (mL)/Weight (g)

3) All volume are mean

4) Density is g/mL

평가 되었다. 흑임자도 대조구는 1.93이었으나 10% 첨가구는 1.99, 20% 첨가구는 2.00, 50% 첨가는 1.92로 이 제품 역시 흑임자 머핀은 안토시아닌 첨가구가 완성도가 높은 것으로 평가 되었다. 단호박 머핀의 대조구는 1.72로 10% 첨가구가 1.84, 20% 첨가구가 2.00, 30% 첨가구가 1.92로 완성도가 좋은 것으로 평가되었다

머핀의 높이는 단면의 크기를 측정하기 위해 머핀을 위에서 아래로 정확히 반을 자른 다음 높이를 측정하였다. 실험 결과 바닐라 머핀은 대조구가 8cm 이고 10%, 20%, 30% 안토시아닌 첨가구는 각각 7.7cm, 7.8cm, 7.4cm로 작은 수치를 보였다. 흑임자도 대조구가 7.4cm이고 안토시아닌을 첨가한 시료들은 낮은 수치를 나타내었으며 단호박 머핀도 같은 경향이였다. 머핀의 자른 단면의 최고 높이는 바닐라 대조구가 7cm이었으며, 10%, 20%, 30% 안토시아닌을 첨가한 시료들도 유사한 값을 보였으나, 흑임자와 단호박의 머핀은 대조구에 비해 안토시아닌 첨가 시료들은 유사하거나 더 큰 값을 보였다.

머핀의 폭을 볼 수 있는 지름의 길이는 바닐라 대조구가 6.5cm이고 안토시아닌을 첨가한 시료들은 6.1cm ~ 6.2cm 이었고, 흑임자 대조구도 7.0cm이었으나 안토시아닌 첨가시료들은 6.2 ~ 6.3cm로 대조구에 비해 낮은 값을 보였다. 이런 결과는 단호박 머핀도 같은 결과를 나타내어 안토시아닌 첨가가 기공의 발달을 촉진하여 부피를 증가시키는 팽창력을 좋게 하지는 않는 것으로 판단되었다.

다. 머핀의 색도

1) 머핀 내부의 색도

제조한 머핀의 내부 색도는 Table 64와 같다. 머핀 내부의 색도 결과는 명도 (L)는 바닐라 대조구가 77 정도로 색상이 밝으나 안토시아닌의 첨가량에 따라 점점 어두운 색을 띄게 되어 L 값이 낮아져 30% 첨가는 흑임자 머핀과 같은 정도의 명도를 보였다. 흑임자 머핀은 대조구와 안토시아닌을 첨가한 시료들의 L 값은 특별한 차이를 나타내지 않았으며, 단호박 대조구는 바닐라

Table 64. Hunter's color value of cup cake added with different powder

Sample ¹⁾	Color values of crumb			
	L value	a value	b value	delta E
C	77.61	3.34	41.11	5.97
CV1	69.46	5.17	34.46	4.00
CV2	61.44	8.28	29.18	9.04
CV3	59.29	6.11	25.65	9.54
CB	53.18	0.91	11.54	3.40
CB1	54.06	2.67	12.57	4.35
CB2	55.75	3.88	16.41	5.79
CB3	53.18	4.68	13.64	8.79
CS	76.83	5.22	50.00	6.04
CS1	73.29	7.01	45.53	8.41
CS2	68.42	9.26	44.74	8.70
CS3	67.78	7.93	40.25	8.47

L=white; black; a=red; b=yellow

¹⁾Refer to the legend in Table 6

²⁾All data are mean value

머핀과 유사한 정도의 L 값을 보였으나, 안토시아닌을 첨가한 시료들의 L 값이 안토시아닌 바닐라 머핀 보다 밝은 색상을 나타내는 특징을 보였다. 적색의 정도를 나타내는 a 값은 바닐라 대조구는 3.34로 안토시아닌을 첨가한 시료들에서도 차이를 나타내지 않았으며, 흑임자도 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 단호박 머핀은 대조구가 5.23인 반면 안토시아닌을 첨가한 시료들의 a 값이 높은 경향을 보였다. 황색의 정도를 나타내는 b 값은 바닐라 머핀의 대조구가 41.11로 진한 황색을 나타내었으나, 안토시아닌을 첨가한 시료들의 b 값은 첨가량이 높아질수록 낮아지는 경향을 보였다. 흑임자 머핀은 대조구의 b 값은 11.54이고, 안토시아닌 첨가량에 따른 b 값의 결과는 바닐라와 유사한 경향을 보였으며, 단호박 머핀은 안토시아닌의 첨가량이 많아질수록 b 값이 낮아지는 결과를 나타내었다. 따라서 바닐라 머핀과 단호박 머핀의 b 값이 큰 것은 원료의 색에 원인이 있는 것으로 유추할 수 있었다.

따라서 보리로 만든 머핀의 b 값이 22.10로 보고된 것을 볼 때, 바닐라와 단호박 머핀은 이보다 약간 진한 황색을 나타내는 것으로 판단할 수 있었다. 또한 종합적인 색의 변화를 나타내는 delta E(total color difference)는 바닐라 머핀의 내부에서는 대조구에 비해서 안토시아닌의 첨가량이 많아 색상이 진한 머핀들이 아주 높은 결과를 보였으며, 이런 결과는 흑임자와 단호박에서도 유사한 결과를 나타내었다.

2) 머핀 외부의 색도

안토시아닌을 첨가하여 제조한 머핀의 내부의 색도는 Table 65와 같다.

머핀의 외부의 색도 결과에서 명도에서(L) 전체적으로는 가장 밝은 색을 나타내는 것은 대조구이고 다음으로 단호박과 흑임자이었다. 바닐라의 대조구는 65 이나 안토시아닌을 첨가한 시료들의 값은 다소 낮은 53 ~ 55를 나타내었다. 흑임자는 바닐라에 비해 훨씬 낮은 값으로 대조구가 32 임에 비해 안토시아닌을 첨가한 머핀 등에서는 유사한 값을 나타내었고, 단호박 분말 첨가 머핀에서도 대조구와 실험군들의 값이 비슷한 결과를 나타내었다. 적색의 정도를 나타내는 a 값은 바닐라 대조구는 15이나 안토시아닌을 첨가한 머핀들

Table 65. Hunter's color value of cup cake added with different cup cake premix

Sample ¹⁾	Color values of crust			
	L value	a value	b value	delta E
C	65.38	15.43	47.21	51.19
CV1	55.61	18.92	45.31	36.25
CV2	53.22	17.23	39.83	48.40
CV3	60.87	11.11	33.96	38.54
CB	32.59	19.25	45.21	33.83
CB1	30.56	18.98	43.15	47.79
CB2	32.47	20.26	49.77	29.60
CB3	25.57	21.01	42.62	18.69
CS	34.41	23.42	49.69	33.06
CS1	35.59	22.3	47.39	28.62
CS2	34.24	23.57	49.94	43.22
CS3	40.19	23.72	48.99	38.50

L=white, 0-black: +a=red, +b= yellow

¹⁾Refer to the legend in Table 6

²⁾All value are mean

의 값은 높게 나타났고, 흑임자의 대조구는 19로 안토시아닌을 첨가한 시료들의 값이 높았다. 단호박 머핀은 안토시아닌을 첨가한 시료들에서 a 값의 차이가 없었다. 황색의 정도를 나타내는 b 값은 바닐라 머핀은 흑임자와 단호박 머핀에 비해 낮은 값을 보였으며, 단호박과 흑임자의 b 값이 높아 황색이 분명한 편이었다. 이는 보리로 만든 컵케익의 b 값이 35.10인 것과 유사한 정도를 나타내는 것이다. 또한 delta E(total color difference)는 대조구에 비해서는 안토시아닌을 첨가하여 제조한 컵케익이 낮은 결과를 나타내었다.

라. 머핀의 조직감 측정

머핀의 조직감 측정 결과는 Table 66과 같다.

경도(hardness)는 바닐라 머핀 대조구가 527 g/s이며 안토시아닌을 첨가한 바닐라 머핀들의 hardness도 유사한 값을 나타내었다. 흑임자 머핀과 단호박 머핀도 안토시아닌을 첨가한 시료들의 값이 대조구와 유사한 정도를 나타내었다. 응집성은 바닐라, 흑임자 그리고 단호박 머핀은 대조구와 안토시아닌을 혼합한 시료들에서 유사한 값을 나타내었다. 점착성은 바닐라 머핀은 대조구에 비해서는 안토시아닌 첨가 시료들이 값이 유사했으며, 흑임자 머핀은 대조구가 942 g/s였으나 안토시아닌을 첨가한 시료들의 값은 낮았다. 단호박은 대조구와 안토시아닌을 첨가한 시료들의 값이 유사한 정도를 나타내었다. 씹힘성에서는 바닐라 머핀 대조구는 562 g/s 이었고 안토시아닌을 첨가한 시료들의 값은 낮았으며, 흑임자 머핀은 대조구가 594 g/s로 안토시아닌을 첨가한 시료들과 유사한 값을 나타내었다.

마. 머핀의 일반성분 및 열량

각각의 머핀들의 일반성분은 Table 67과 같다.

바닐라 머핀의 조지방은 대조구가 18.71%이었고, 안토시아닌을 첨가한 시료들은 대조구 보다 낮은 15.06 ~ 16.24%로 높게 나타났다. 흑임자 머핀은

Table 66. Textural characteristics of cup cake added with different cup cake premix

Sample ¹⁾	Hardness (g/s)	Springiness	Cohesiveness	Gumminess (g/s)	Chewiness (g/s)
Control	527.1	1.45	0.74	390.32	565.19
CV1	559.8	0.93	0.69	388.49	362.85
CV2	508.6	0.94	0.72	365.5	344.3
CV3	539.7	0.91	0.74	397.07	359.74
CB	1079.2	0.84	0.55	942.37	593.87
CB1	984.8	0.85	0.54	527.54	450.52
CB2	848.1	1.03	0.61	520.71	537.37
CB3	830.1	0.93	0.58	478.49	445.95
CS	424.9	1.27	0.81	342.87	436.99
CS1	478.5	5.42	0.61	398.52	2,160.6
CS2	480.5	1.00	0.78	372.8	576.23
CS3	638.7	5.69	0.74	475.18	2,702.01

¹⁾ Refer to the legend in Table 6

²⁾ All value are mean

Table 67. Proximate composition of cup cake added with different cup cake premix

Samples ¹⁾	Proximate composition (%)					Energy (kcal)
	Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash	Carbohy- -drate	
C	21.55	6.98	18.71	1.32	51.44	402.07
CV1	16.41	6.72	16.19	1.21	59.46	410.43
CV2	17.52	6.86	15.06	1.20	59.36	400.32
CV3	15.40	6.76	16.24	1.29	60.30	413.20
CB	18.17	7.46	16.26	1.30	56.79	403.34
CB1	17.25	6.26	17.17	1.27	58.05	411.77
CB2	14.83	7.54	18.56	1.46	57.60	427.66
CB3	17.99	6.51	13.67	1.14	60.68	389.31
CS	18.02	6.30	14.75	1.07	59.86	397.39
CS1	15.98	7.19	15.15	1.17	60.51	407.15
CS2	20.28	7.13	17.40	1.26	53.93	395.40
CS3	18.99	6.64	15.51	1.26	57.69	392.78

¹⁾ Refer to the legend in Table 6

²⁾ All value are mean

대조구가 26%이었고, 안토시아닌 첨가 시료들의 값은 대조구에 비해 약간 높은 경향이였다. 단호박도 안토시아닌 첨가 시료가 대조구에 비해 약간 높은 경향을 나타내었다.

조단백 함량은 바닐라 머핀의 대조구가 6.98% 이었고, 안토시아닌을 첨가한 시료들의 값은 유사한 정도를 나타내었다. 흑임자 머핀은 대조구가 7.46%이었으나 안토시아닌을 첨가한 머핀들은 약간 낮은 수준을 나타내었고, 단호박 머핀은 대조구가 6.30%로 안토시아닌을 첨가한 시료들이 약간 높은 경향을 나타내었다

총열량은 바닐라 머핀은 400.32 ~ 413.20 kcal로 대조구와 안토시아닌을 첨가한 시료가 유사한 수준을 나타내었다. 흑임자 머핀은 대조구가 403 kcal로 10%, 30% 첨가한 시료들과는 유사하였으나, 안토시아닌을 50% 첨가한 시료는 389 kcal로 낮은 열량을 나타내었다. 단호박 머핀은 바닐라 머핀과 흑임자 머핀에 비해 열량이 낮은 결과를 보였으며, 안토시아닌 10%와 30% 첨가한 시료들의 열량이 낮은 것으로 나타났다.

바. 관능검사

각각의 머핀들의 관능검사 결과는 Table 68과 같다.

맛 항목에서 바닐라 머핀은 대조구와 비교한 검사에서 안토시아닌을 첨가한 머핀들의 맛에 대한 기호도는 높은 수준으로 평가되었다. 흑임자 머핀도 대조구에 비해 안토시아닌을 첨가한 머핀들의 맛에 대한 기호도가 높게 평가되었으며, 단호박 머핀은 대조구와 유사한 정도의 맛의 기호도에 대한 평가를 보였다. 외관은 팽창의 대칭의 정도를 평가하게 한 것으로 서로간에 거의 유사한 수준이었다. 바닐라 머핀은 대조구와 유사한 수준으로 평가되었으며, 흑임자는 대조구에 비해 안토시아닌이 50% 첨가한 시료의 외관이 낮게 평가되었다. 단호박 머핀은 대조구와 안토시아닌 첨가 시료들 간에 유사한 정도로 평가 되었으나 안토시아닌이 30% 첨가한 시료들은 높게 평가 되었다. 조직감 항목은 바닐라 머핀의 대조구 보다는 안토시아닌을 첨가한 시료들의 평

가가 높았으나 안토시아닌이 30% 첨가한 시료들은 낮게 평가 되었다. 흑임자 머핀은 대조구에 비해 안토시아닌 50% 첨가 머핀의 조직감이 낮게 평가 되었으며, 단호박 머핀은 대조구에 비해 안토시아닌 첨가 시료들이 조직감 항목에서 높게 평가 되었다. 따라서 전체적인 기호도에서는 바닐라 머핀의 경우, 대조구에 비해 안토시아닌 첨가 시료들에서 높게 평가 되었으며, 단호박 머핀도 같은 경향이였다.

결론

안토시아닌을 첨가한 머핀들을 상품화 하기 위한 조건들로 품질 특성, 조직감, 색도, 관능검사 항목을 분석한 결과 바닐라 머핀은 20% 까지, 흑임자 머핀은 30%, 단호박은 30% 까지 첨가하여 제조 하는 방법은 상품화를 위한 기초 자료로 제시 될 수 있을 것이다.

Table 68. Sensory characteristics of cup cake added with different cup cake premix

Samples ¹⁾	Sensory characteristics				
	Taste	Flavor	Appearance	Texture	Overall acceptability
C	2.9±0.73 ^c	3.6±0.69 ^{ba}	4±0.66 ^a	3±0.66 ^{ba}	2.7±0.48 ^c
CV1	4.2±0.42 ^a	3.4±1.17 ^a	3.9±1.28 ^a	3.6±0.51 ^a	3.98±0.73 ^a
CV2	4.0±0.66 ^a	3.7±0.67 ^a	3.9±0.99 ^a	4±0.66 ^a	3.7±0.82 ^a
CV3	3.9±0.16 ^a	3.72±0.27 ^a	3.9±0.11 ^a	3.3±0.12 ^{ba}	3.7±0.27 ^c
CB	3.6±0.96 ^a	3.5±0.10 ^a	3.6±0.84 ^a	3.6±0.96 ^a	3.3±0.82 ^a
CB1	4.1±0.36 ^a	3.11±0.21 ^b	3.61±0.34 ^{ba}	3.61±0.31 ^{ba}	3.92±0.33 ^a
CB2	4.0±0.66 ^a	3±0.81 ^b	3.6±1.34 ^{ba}	3.6±0.51 ^{ba}	3.9±0.73 ^a
CB3	3.5±1.35 ^{bc}	3.1±0.73 ^{bc}	2.9±0.73 ^b	2.9±0.56 ^b	3.1±0.87 ^{ba}
CS	3.5±0.52 ^{ba}	3.3±0.82 ^{ba}	3.2±1.03 ^{ba}	2.7±0.82 ^b	3.3±0.57 ^{ba}
CS1	4.0±0.81 ^b	3.7±0.94 ^a	3.5±0.52 ^a	3.7±0.82 ^a	3.6±0.84 ^a
CS2	3.5±0.70 ^a	3.0±0.66 ^c	3.2±0.78 ^{cb}	3.5±0.70 ^{cb}	3.7±0.48 ^b
CS3	3.7±0.94 ^{ab}	3.8±1.03 ^a	4.4±0.87 ^a	4.1±0.87 ^a	3.8±1.22 ^a

The same rows with same superscript are not significantly different ($p < 0.05$).

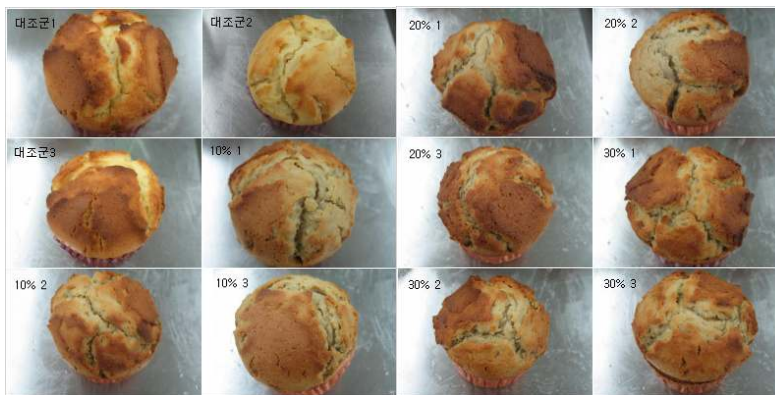
¹⁾Refer to the legend in Table 6

²⁾values are mean± standard deviation

A



B



C

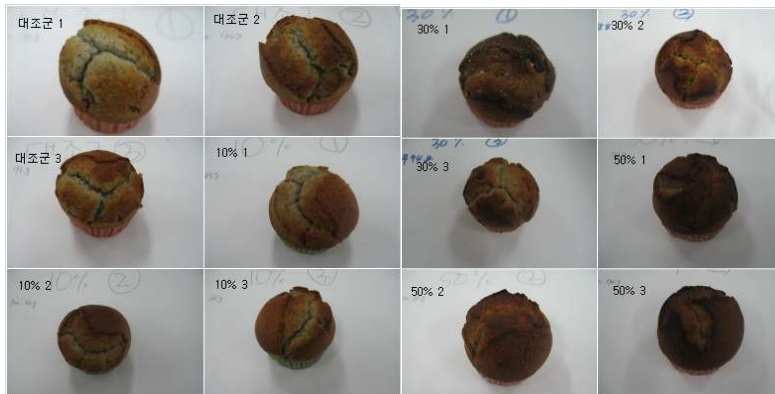


Fig. 20. Appearance of cup cake added with different cup cake premix
A : squash; B : vanilla; C : black sesame seed

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

구분	연도	세부연구개발 목표	연구내용	목표 달성도
1차 년도	2006	검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 분석 및 안토시아닌의 환경변이 평가	- 유전자원(300점) 평가 - 3 지역 안토시아닌 환경 변이 평가	100%
		검정콩 안토시아닌 색소의 추출, 정제 및 안정성 기술 개발	- 안토시아닌의 대량 추출법 개발 - 안토시아닌 색소 안정화에 미치는 요인 규명	100
		검정콩 종피 이용 안토시아닌 함량의 NIRS 분석기술 개발	- 검정콩 종피 이용 안토시아닌 함량 분석의 NIRS 기술 개발	100
		분리 안토시아닌 색소별 항산화 및 항암 효과 검증	- 안토시아닌 색소별 in vitro 항산화 효과 평가	100
2차 년도	2007	검정콩 유전자원의 평가, 선발 및 년차 변이 평가	- 유전자원 400점 평가 - 유전자원의 선발 및 인공교배 - 안토시아닌 함량 년차변이 평가	100
		안토시아닌 기능성 식품 개발	- 검정콩 이용 요구르트 개발	100
		안토시아닌 독성 및 항암 효과 검증	- 안토시아닌의 독성 및 항암 효과 평가	100
		검정콩 종실 이용 안토시아닌 함량의 NIRS 분석기술 개발	- 검정콩 종실 이용 안토시아닌 함량의 NIRS 분석 기술 개발	100
3차 년도	2008	검정콩 유전자원의 평가 및 우량계통 육성	- 유전자원 400점 평가는 - 교잡 후대의 평가 및 선발 - 안토시아닌 함량 년차변이 평가	100
		안토시아닌 함유 건강식품 개발	- 검정콩 이용 머핀 개발	100
		검정콩 안토시아닌의 동물식이 실험을 통한 생리활성 효과 검증	- 검정콩 안토시아닌 추출물을 이용한 동물식이 실험 평가	100
		종실 이용 안토시아닌 색소별 함량의 NIRS 분석기술 개발	- NIRS를 이용한 검정콩 종실 안토시아닌 색소별 함량 분석	100
최종 평가		유전자원의 안토시아닌 함량 평가 및 환경변이 규명	- 유전자원의 1,000여점 평가 - 안토시아닌 유전, 환경 변이 규명	100
		검정콩 안토시아닌 이용 건강식품 개발	- 안토시아닌이 함유된 요구르트, 머핀 시제품 개발	100
		검정콩 안토시아닌의 항산화/항암평가 및 동물식이 실험	- 안토시아닌의 항산화/항암 평가 및 동물식이 실험	100
		NIRS를 이용한 검정콩 안토시아닌 함량의 비파괴적 신속편이기술 개발	- NIRS를 이용한 안토시아닌 함량의 비파괴적 신속편이 분석기술 개발	100

제 2 절 관련분야에의 기여도

가. 기술적 측면

- 검정콩 안토시아닌의 색소추출 및 안정성 기술을 개발하였으므로 기타 식물체 이용 천연색소 추출법의 기초자료로 활용할 수 있음.
- 추출 색소의 안정성을 바탕으로 한 추출효율이 높은 분리 정제 기술 체계의 다양화에 응용될 수 있음.
- 검정콩 안토시아닌을 이용한 건강보조 및 특수 영양제품의 생산기술이 축적될 수 있을 것임.

나. 경제적·산업적 측면

- 추출되는 색소는 식품, 고급 화장품 및 의약품 코팅 재료 등에 활용할 수 있어 신소재 개발 산업으로 유도할 수 있으며 또한 색소가 가지는 생리활성을 부각시킴으로써 상품의 고부가가치화를 기할 수 있음.
- 천연색소 추출용 원료 생산을 산업체와 연계하여 검정콩 계약재배를 유도함으로써 농민 수익 증대에 기여할 수 있음.
- 안토시아닌 고 함유 검정콩 우량 품종 육성으로 콩의 품질 제고 및 재배 농가의 소득 향상에 일익을 담당할 수 있을 것임

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 계량적 성과

(2009. 4월 현재)

전문학술지		학회발표		인력양성 (명)				특허	
국외	국내	국외	국내	박사		석사		국외	국내
				졸업	재학	졸업	재학		
-	7	3	4	-	1		2	-	-

2. 성과내용

가. 학술논문

1) 국내

- 김용호, 안형균, 이은섭, 김희동. 2008. 근적외분광분석기를 이용한 검정콩 안토시아닌의 함량분석. 한국작물학회지 53(1): 15~20.
- 이혜정, 장재선, 최은영, 김용호. 2008. 흑미의 추출조건에 따른 안토시아닌 함량과 첨가물에 따른 색소 안정성. 한국식품영양학회지. 21(2): 127~134.
- 김용호, 김동선, 우성식, 김현희, 이영상, 김희선, 고광오, 이석기. 2008. 검정콩 안토시아닌의 항산화 및 암세포독성. 한국작물학회지 53(4): 407~412.
- 김선영, 고광오, 이영상, 김희선, 김용호. 2008. 검정콩 종피 안토시아닌의 적정 추출 효율 및 안정성. 한국작물학회지 53(S): 84~88.
- 김용호, 도선길, 김동선, 우성식, 김옥진, 이혜정. 2008. 검정콩 안토시아닌의 마우스를 이용한 안전성 연구. 한국식품영양학회지. 21(4): 397~402.
- 이은섭, 이용선, 김희동, 김용호. 2008. 12. 검정콩 수집지역과 성숙기에 따른 안토시아닌 함량변이. 한국작물학회지 53(4): 376~381.

- 이해정, 최은영, 심영자, 김옥선, 유호정, 도완녀, 김용호. 2009. 추출 조건과 첨가물에 따른 검정콩의 안토시아닌 함량과 색소 안정성. 한국식품영양학회지. 22(1) : 150~157.

나. 학회 발표

1) 국내

- Ahn, H.K., E.S. Lee, D.H. Nam, and Y.H. Kim. 2007. Development of prediction model of anthocyanin contents by NIRS in black colored soybean. 2007 한국작물학회지. 53(S1) : 77
- 이해정, 박희옥, 장재선, 최은영, 김용호. 2008. 흑미의 추출조건에 따른 안토시아닌 함량과 첨가물에 따른 색소 안정성. 2008 한국식품영양학회 하계학술심포지엄. p 90.
- 최병열, 이은섭, 지정현, 이재홍, 김희동, 김용호, 이석하. 2009. 검정콩 수집종 안토시아닌 함량의 유전 및 호환경변이. 2009 한국작물학회지 54(S1): 166
- 안형균, 김세영, 김용호. 2009. 검정콩 안토시아닌의 항산화력 및 항염증 반응 한국작물학회지 54(S1): 140.

2) 국제학술회의

- 이은섭, 이용선, 김희동, 김용호. 2007. 수집 검정콩에 대한 안토시아닌 함량 평가. 제6회 오송 국제 바이오 심포지엄. p. 218
- 이은섭, 김용호. 2007. 검정콩에서의 안토시아닌 생성시기 및 량의 변화. 제6회 오송 국제 바이오 심포지엄. p. 238
- Kim YH, Kim DS and Woo SS. 2008. Anthocyanin-induced cytotoxicity on human leukemia and adenocarcinoma cells. 5th International Crop Science Congress & Exhibition Abstracts. p. 167.

제 2 절 연구개발의 활용 계획

- 도 농업기술원 등 실질적 농민 대상 교육 및 기술 보급 기관과의 지속적인 공동연구
 - 검정콩 재배 단지 확대 등
 - 안토시아닌 고 함유 검정콩 품종 육성
 - ⇒ 본 연구에서 선발된 우량계통이 현재 세대진전 중임
- 검정콩 안토시아닌 관련 기업체에의 기술 이전
 - 안토시아닌의 대량 추출
 - 안토시아닌을 이용한 기능성 식품 개발

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

- 본 과제와 관련된 특이한 동향은 없음
- 제2장 국내외 기술 개발 현황과 참고문헌에 언급되었음

제 7 장 참 고 문 헌

1. Bae, E.A. and G.S. Moon. 1997. A study of the antioxidative activities of Korean soybeans. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 203~208.
2. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. Nature 181 : 1199 ~ 1200.
3. Cho, S.B., H.J. Kim, J.I. Yoon, and H.S. Chun. 2003. Kinetic study on the color deterioration of crude anthocyanin extract from Schizandra fruit. Korean J. Food Sci. Technol. 35 : 23 ~ 27.
4. Choi, H.C. *et al.* 1996. Development and industrial utilization of natural pigments from colored rices. G7 final report. NCES, RDA.
5. Choung, M.G., W.Y. Han, I.Y. Baek, D.C. Shin, S.D. Km, H.P. Moon, and K.H. Kang. 2002. Structural analysis of anthocyanin in black soybeans. Kor. Soybean Digest. 19 : 68 ~ 77.
6. Choung, M.G., I.Y. Baek, and S.T. Kang. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean. J. Agr. Food Chem. 49 : 5848 ~ 5851.
7. Chung, K.W., Y.H. Joo, and D.J. Lee. 2004. Content and color difference of anthocyanin by different storage periods in seed coats of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Kor. J. Int. Agri. 16 :196 ~199.
8. Clark, A., F. El-Ferally, and W. Li. 1981. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. J. Pharm. Sci., 70 : 951 ~ 952.
9. Daun, J.K., K.M. Clear, and P. Williams. 1994. Comparison of three whole seed near-infrared analyzers for measuring quality components of canola seed. JAOCS. 71(10): 1063~1068.
10. Deguchi, T, Ohba, R and Ueda, S. 2000. Radical scavenging activity of

- a purple pigment, hordeumin, from uncooked barley bran-fermented broth. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 3198 ~ 3201.
11. Dikshith, T.S., K.K. Datta, R.B. Raizada, and H.S. Kushwah. 1979. Effects of paraquat dichloride in male rabbits. *Ind. J. Experimental Biol.* 17 : 926 ~ 928.
 12. Espin, J.C., C. Soler-Rivas, H.J. Wichers, and C. Garcia-Viguera. 2000. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 1588 ~ 1592.
 13. Fuleki, T. and F.J. Francis. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. I. Extraction and determination of total antocyanin in cranberries. *J. Food Sci.* 33 : 254 ~ 259.
 14. Harborne, J.B. and C.A. Wiliam. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 55 : 481 ~ 504.
 15. Harborne, J.B., 1988. Introduction to ecological biochemistry. 3rd ed. Academic press. London
 16. Havsteen. B. 1983. Flavonoids : a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32 : 1141~1145
 17. Francis, F.J. 1989. Food Colorants: Anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28 : 273~314
 18. Hong, J.H., H.S. Chung, and K.S. Youn. 2002. Storage stability of anthocyanin pigment isolated from a wasted grape peels. *Korean J. Post-Harvest Sci. Technol. Agri. Products.* 9 : 327~ 331.
 19. Huygen, I.C. 1970. Reaction of nitrogen dioxide with Griess type reagents. *Anal Chem.* 42(3): 407~409.
 20. Imal, Y., H. Kolb, and V. Burkart. 1993. Nitric oxide production from macrophages is regulated by arachidonic acid metabolites. *Biophys Res Commun.* 197(1): 105~109.
 21. Jung, C.S., Y.J. Park, Y.C. Kwon, and H.S. Suh. 1996. Variation of

- anthocyanin content in color-soybean collections. Korean J. Crop Sci. 41 : 302 ~ 307.
22. Jung, C.S., B.J. Kim, Y.C. Kwon, W.Y. Han, and Y.H. Kwack. 1998. Analysis of protein and moisture contents in pea using near-infrared reflectance spectroscopy. Korean J. Crop Sci. 43(2) : 101~104.
23. Kanatt, S.R., R. Chander, P. Radhakrishna, and A. Sharma. 2005. Potato peel extract a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. J. Agric. Food Chem. 53 : 1499~1504.
24. Kim, DH, H.C. Yang, Y.C. Lee, and S.G. Kim. 1994. Agriculture Products Processing. Youngji Publishers. Seoul. pp.149 ~ 153.
25. Kim, H.J., S.B. Jo, and H.S. Jeon. 2003. Effects of selected stabilizers on the color deterioration of crude pigment extract from schizandra fruit(*Schizandra fructus*). Korean J. Dietary Culture. 18 : 475~ 482.
26. Kim, K.S., S.H. Park, M.G. Chung, and Y.S. Jung. 2007. Use of near infrared spectroscopy for estimating fatty acid composition in intact seeds of rapeseed. J. Crop Sci. Biot. 10(1) : 15 ~ 20.
27. Kim, S.L., J.J. Hwang, J. Song, and K.H. Jung. 2000. Extraction, purification and quantification of anthocyanins in colored rice, black soybean, and black waxy corn. Korean J. Breed. 32(2) : 146 ~ 152.
28. Kim, Y.H., J.H. Lee, Y.S. Lee, and H.T. Yun. 2006. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. K. Soybean Digest 23(1) : 1 ~ 9.
29. Kim, Y.H., B.R. Choi, H.Y. Baek, and Y.S. Lee. 2002. Quantification of icariin contents in *Epimedium Koreanum* N. by using a near infrared reflectance spectroscopy. K. J. Medicinal Crop Sci. 10(5) : 340 ~ 343.
30. Kim Y.H., H.T. Yun, K.Y. Park, and S.D. Kim. 1997. Extraction and separation of anthocyanins in black soybean. RDA J. Crop. Sci. 39 : 3

31. Kim, YH, J.H. Lee, Y.S. Lee, and H.T. Yun. 2006. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. *Kor. Soybean Digest*. 23 : 1 ~ 9.
32. Kim, YH, H.T. Yun, and K.Y. Park. 2004. Biological Effects of Black Colored Soybean. *Plant Resources*. 7 : 195 ~ 199.
33. Koide, T., H. Kamei, Y. Hashimoto, T. Kojima, and M. Hasegawa. 1997. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer Biotherapy and Radio pharmacology*. 12 : 277 ~ 280.
34. Kong, J.M., L.S. Chia, N.K. Goh, T.F. Chia, and R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64 : 923 ~ 933.
35. Kwon, Y.R., M.H. Baek, D.C. Choi, J.S. Choi, and Y.G. Choi. 2005. Determination of calibration curve for total nitrogen contents analysis in fresh rice leaves using visible and near infrared spectroscopy. *Korean J. Crop Sci*. 50(6) : 394~399.
36. Lee, H.B., B.R. Choi, C.S. Kang, Y.H. Kim, and Y.J. Choi. 2001. Determination of seed protein and oil concentration in kidney bean by near infrared spectroscopic analysis. *Korean J. Crop Sci*. 46(3): 248~252.
37. Lee, H.H., J.W. Lee, and J.W. Rhim. 2000. Characteristics of anthocyanins from various fruits and vegetables. *Korean J. Post-Harvest Sci. Technol. Agri. Products*. 7 : 285 ~ 290.
38. Martin, W. and G. Harzdina. 1978. High-pressure liquid chromatographic separation of 3-glucoside, 3,5-diglucosides, 3-(6-O-p-coumaryl)glucosides and 3-(6-O-p-coumarylglucoside)-5-glucosides of anthocyanidins. *J. Chromatography* 155 : 389 ~ 398.
39. McCord, J.M. and I. Fridovich. 1969. The utility of superoxide

- dismutase in studying free radical reactions. 1. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* 244(22) : 6056 ~ 6063.
40. Meiers, S., M. Kemeny, U. Weyand, R. Gastpar, E. von Angerer, and D. Marko. 2001. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J. Agric. Food Chem.* 49 : 958 ~ 962.
41. Miller, N.J., C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sci.* 84 : 407 ~ 412.
42. Mitscher, L., *et al.*, 1980. Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial isoflavanoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. *typica*. *J. Nat. Prod.*, 43(2) : 259 ~ 269.
43. Niki, E., T. Yoshikawa, and T. Osawa. 1999. Recent development of food factors for the disease prevention. *CMC.*: 246 ~ 252.
44. OECD. 2006. Draft final report of the validation of the updated test guideline 407 : Repeated dose 28-day oral toxicity study in laboratory rats.
45. Oh, J.K. and J.Y. Imm. 2005. Effect of amino acids addition on stability and antioxidative property of anthocyanins. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37 : 562 ~ 566.
46. Park, Y.E., J.C. Jeong, H.M. Cho, H.J. Lee, Y.S. Hwang, S.S. Choi, S.J. Lee, E.S. Park, J.D. Lim, and M.G. Choung. 2008. Antimutagenic effect and cytotoxicity to human cancer cell lines of colored potato extracts. *Kor. J. Crop. Sci.* 53 : 75 ~ 84.
47. Park, J., J. Lee, E. Jung, Y. Park, K. Kim, B. Park, K. Jung, E. Park, J. Kim, and D. Park. 2004. In vitro antibacterial and anti-inflammatory

- effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp.. Eur. J. Pharmacol. 496 : 189 ~ 95
48. Plochmann, K., G. Korte, E. Koutsilieris, E. Richling, P. Riederer, A. Rethwilm, P. Schreier, and C. Scheller. 2007. Structure–activity relationships of flavonoid–induced cytotoxicity on human leukemia cells. Arch Biochem Biophys. 460(1) : 1 ~ 9.
49. Prior R.L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. Standardized method for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and biological and food samples. J. Agric. Food Chem. 53 : 4290 ~ 4302.
50. Rhim, J.W. and S.J. Kim. 1999. Characteristics and stability of anthocyanin pigment extracted from purple–fleshed potato. Kor. J. Food Sci. 31 : 348 ~ 355.
51. Sutherland, M.W. and B.A. Learmonth. 1997. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. Free Radic. Res. 27(3) : 283 ~ 289.
52. Tsuda, T., F. Horio, J. Kitoh, and T. Osawa. 1999. Protective effects of dietary cyanidin–3–O–beta–glucoside on liver Ischemia–reperfusion injury in rats. Archives. Biochem. Biophys. 368(2) : 361 ~ 366
53. Tsukada, Y.I., K. Miyazawa, and N. Kitamura. 2001. High Intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor–induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. J. Biol. Chem. 276 : 40968 ~ 40976.
54. US environmental protection agency. 1998. Health effects test guidelines OPPTS 870. 1100 acute oral toxicity, US government printing Office. Washington. DC. USA.
55. Velasco, L., J. Fernandez–Martinez, and A.D. Haro. 1996. Screening ethiopian mustard for erucic acid by near infrared reflectance spectroscopy. Crop Sci. 36 : 1068 ~ 1071.

56. Wang, S.Y. and H.S. Lin. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 140 ~ 146.
57. Williams, P.C., H.M. Cordeiro, and M.F.T. Harnden. 1991. Analysis of oat bran products by near infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Foods World.* 36(7) : 571 ~ 574.
58. Yang, H.C., J.M. Lee, and K.B. Song. 1982. Anthocyanins in cultured Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) and its stability. *Agricultural Chem. and Biotech.* 25 : 35 ~ 43.
59. Yang, C.S., J.M. Landau, M.T. Huang, and H.L. Newmark. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21 : 381 ~ 406.
60. Yoon, T.H. and S.W. Lee. 1979. Stability of anthocyanin in foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 11 : 63 ~ 73.
61. Yoshikura, K. and Y. Hamaguchi. 1969. Anthocyanins of the black soybean. *Eiyo To Shokuryo*, 22, 367(CA 72, 63600).