

발간등록번호

11-1543000-000190-01

맥문동의 가공기술개발을 통한 홍문동의 제조와 이를  
이용한 기능성 제품 개발

(Red Liriopsis tuber production by steam and drying  
process of Liriopsis tuber and development of its functional  
food products)

산동농협협동조합

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “맥문동의 가공기술개발을 통한 홍문동의 제조와 이를 이용한 기능성 제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 7월 31일

주관연구기관명 : 산동농협협동조합

주관연구책임자 : 이 종 섭

1세부연구책임자 : 이 종 섭

연 구 원 : 김 선 희

연 구 원 : 최 대 우

협동연구기관명 : 부산대학교 산학협력단

1협동연구책임자 : 이 희 섭

2협동연구책임자 : 손 홍 주

3협동연구책임자 : 황 대 연

# 요 약 문

I. 제 목 : 맥문동의 가공기술개발을 통한 홍문동의 제조와 이를 이용한 기능성 제품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 목적

맥문동(*Liriope platyphylla* Wang et Tang)은 예로부터 한방에서 맥문동은 점활성소염, 자양강장약으로서 진해, 거담, 강장 및 이뇨 등의 목적으로 맥문동탕, 죽엽석고탕, 자감초탕 또는 청심연자식 등에 사용되고 있으며, 맥문동의 효능으로는 혈당강하효과, 항당뇨, 항염증작용, 면역조절 효과, 간보호 효과, 항암효과 및 기억력 증진 효과 등이 보고되고 있다. 하지만, 맥문동 열수 추출물은 신맛과 떼은 맛을 함께 가지고 있어서 식품으로 개발하기에는 한계가 존재하므로 산업화에는 성공하지 못하였다. 따라서, 본 연구에서는 맥문동의 증숙 및 발효기법 등을 이용한 고부가가치 기능성 제품의 생산 및 생리활성 물질의 대량생산을 통하여 다양한 홍문동 관련 제품을 개발·생산함으로써 농가의 소득 향상 및 기업매출의 증진에 기여하고자 한다.

### 2. 필요성

국민소득이 증가함에 따라 우리 사회에는 웰빙 붐이 일어나고 있으며, 건강 기능성 제품에 대한 소비자의 관심이 높아지고 있으며, 특히 현대인은 동물성지방, 동물성단백질, 백설탕 등의 과잉 섭취와 비타민, 미네랄, 섬유질 등의 섭취가 부족함에 따라 심각한 영양불균형 상태에 놓여 있으며, 이로 인하여 뇌졸중, 동맥경화증, 고혈압, 암, 당뇨병 등의 성인병 및 만성퇴행성 질환의 발병률이 증가하고 있다. 인공합성 식품 및 미용제품에 대한 부정적 여론이 증대되면서 천연생물소재를 활용한 자연제품에 대한 소비자의 욕구가 날로 증대되고 있어, 이에 따라 식물자원을 활용한 다양한 제품이 개발·판매되고 있으나 소비자들의 다양한 욕구를 충족시키기에는 미흡한 실정이다. 또한, 인터넷 발전과 함께 나타난 정보화 사회는 정보공유를 통한 천연가공제품에 대한 욕구를 가속화시키며, 웰빙 열풍에 따른 품질표시제로 고급화의 필요성이 크게 대두되고 있다. 밀양의 맥문동은 saponin, isoflavon,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, steroidal glycosides, oligosaccharides 등의 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있는 우수한 기능성 작물이나 현재 화훼용도로만 사용이 되고 있으며, 맥문동을 이용한 제품개발에 대한 시도가 있었으나 산업화에는 성공하지 못하였다. Saponin을 함유하고 있는 인삼 및 홍삼제품에 대한 소비자의 요구도는 증가하고 있으나, 인삼의 재배기간이 최소 4년 이상 소요되고 가격이 비싸기 때문에 외국으로부터 수입량이 증가하고 있으나 국내산과의 구별할 수 있는 방법이 없어 문제가 되고 있다. 따라서 맥문동은 인삼에 비해 단기재배가 용이하며 saponin등의 기능성 성분을 다량 함유하고 있어 이의 가공공정을 개발함으로써 인삼 및 홍삼 대체 기능성 식품의 개발을 할

수 있는 가능성이 높으며, 맥문동의 다양한 처리 방법을 통한 기능성 제품의 제조를 통하여 인삼 및 홍삼제품을 대체할 수 있는 기능성 제품의 개발이 필요한 실정이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

- 홍문동의 기능성 제품 개발 및 산업화
  - 기능성 지표물질의 최적 추출공정 확립
  - 홍문동 음료 제품 및 가공제품의 배합 및 공정조건 확립
  - 홍문동 기능성 음료제품 및 가공제품 제조
  - 홍문동 기능성 제품의 기호도 및 시장조사
  - 홍문동 기능성 제품의 마케팅 및 홍보전략 수립
  
- 맥문동을 이용한 홍문동의 제조 및 기능성 물질 분석
  - 맥문동의 증숙 조건에 따른 홍문동 제조의 최적화 및 표준화
  - 맥문동의 증숙 단계별 이화학적인 성분 분석
  - 맥문동의 증숙 단계별 기능성 성분의 분석 및 분리
  - 기능성 성분의 대량 생산 방법 연구
  - 맥문동의 증숙에 따른 유해물질의 분석
  
- 맥문동 및 홍문동 발효를 통한 기능성 증진 연구
  - 맥문동 및 홍문동 발효 균주의 분리 및 선정
  - 선정균주의 동정 및 기능성 분석
  - 맥문동 및 홍문동 발효의 최적 조건 확립
  - 발효 맥문동 및 홍문동의 성분분석
  
- 홍문동의 생리활성 연구
  - 맥문동의 증숙 단계에 따른 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능 분석
  - 홍문동의 in vitro 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능 연구
  - 홍문동의 in vivo 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능 연구
  - 홍문동 생리활성 물질을 다른 추출물과 비교분석
  - 분리된 기능성 성분의 생리활성 검증

### IV. 연구개발결과

식품가공 방법의 하나인 증숙 및 건조의 공정을 통해 맥문동의 성분 변화를 일으켜 생리 활성 성분의 함량을 증가 시키고 맥문동에 존재하지 않는 새로운 생리 성분들을 생성하고자 맥문동 증숙 조건을 표준화 및 최적화를 연구하였다. 증숙 온도 및 증숙 횟수에 따른 일반성분

분석, 조사포닌, 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량을 분석하였으며, 또한 다양한 항산화능의 분석을 통하여 15시간 동안 증숙을 한 후 70℃에서 72시간 건조하는 것이 유효성분을 극대화시킬수 있는 최적의 조건임을 판단할 수 있었다. 현재 증숙에 따라 생성 가능한 유해물질인 벤조피렌 등에 대한 분석을 수행한 결과 증숙에 따른 유해물질은 생성되지 않았다.

증숙 맥문동(홍문동)의 생리활성 성분을 분석하기 위하여 메탄올 추출물과 부탄올 추출물을 제조하였다. 메탄올 추출물과 부탄올 추출물에 따른 phenolic compound, 사포닌 계열 물질, 아미노당, 당류 분석 등을 분석하였으며, 메탄올 추출물로부터 얻어진 분획으로부터 증숙에 따라 생성된 물질을 Prep HPLC와 recycling HPLC를 이용하여 순수 분리하였다. 또한, Prep HPLC를 이용하여 대량 분취한 분획물을 활용하여 항당뇨와 관련된 인슐린 분비능에 대한 효능검증을 수행하여 증숙에 따라 생성되는 갈변관련 물질이 인슐린의 분비능과 연관성이 있음을 확인하였다.

발효 맥문동 및 발효 홍문동의 생리활성 성분의 분석에 있어서 유산균 발효에 의한 발효맥문동과 발효홍문동은 추출과정에서 열수추출과 고온고압추출을 거치므로 증숙맥문동과 유사한 물질들이 증가하는 경향을 나타내었고, 특히 발효 홍문동 고온고압추출물에서 증숙 맥문동과 유사한 색도와 HMF 및 아미노당 함량을 나타내었다. 유산균 발효는 증숙과 유사한 효과를 가져오며 갈변반응에 의한 갈변물질이 공통적으로 증가하는 결과를 나타내었다. 주요 사포닌 중 하나인 spicatoside A의 함량은 열처리를 통하여 감소하지만 sapogenin 류인 diosgenin, ruscogenin 등의 물질이 새로이 생성되고, thermal processing 중 생성되는 환원당과 맥문동에 아미노산의 용출이 용이해지는 과정에서 생성되는 아미노당의 생성도 확인 할 수 있었다.

미생물을 이용한 발효에 의하여 식품을 제조할 경우, 식품자체가 가지는 생리활성을 보강할 수 있을 뿐만 아니라 기존의 존재하지 않았던 새로운 생리활성까지 부여할 수 있다. 따라서 이러한 목적을 위해 맥문동 및 홍문동 발효를 위한 안전성이 확보된 토착미생물(유산균 74 균주, Bacillus 50 균주)를 한국 전통식품 및 농작물의 근면, 엽면 등으로부터 분리한 후, 동정하였다. 또한 이들 분리균주가 가지는 생리활성을 확인하기 위하여 항산화 활성, 항고혈압 활성(ACE 저해능), 항균 활성, 내산성, 내담즙성 및 세포성분 분해효소의 활성을 조사하였으며, 그 결과에 의거하여 맥문동 등에 적용이 가능성이 높은 균주들을 확보하였다.

맥문동 및 홍문동 자체가 가지는 생리활성을 보강하기 위하여 확보된 균주 가운데 항산화능과 ACE 저해능이 우수한 균주를 각각 발효균주로 선정하였다. 우선 이들 균주 자체의 활용을 위하여 각 균주들의 항산화능 및 ACE 저해능을 위한 최적조건을 확립하였다. 또한 맥문동 추출조건(열수 및 고압 열수추출)을 조사한 후, 각 추출액의 성분 및 생리활성을 조사하였으며, 추출액의 젖산발효를 위한 선행연구로서 젖산균의 생육정도를 검토하였다. 그 결과 각 추출액은 젖산균의 생육을 부양함을 알 수 있었다. 이러한 결과에 의거하여 선정 젖산균에 의한 맥문동 추출액의 발효양상을 조사한 결과, 미생물 발효에 의하여 pH의 감소 및 적정산도의 생산이 일어남을 확인하였다.

확보된 분리균주 중 DPPH 라디칼 소거활성과 ACE 저해활성이 모두 우수한 Lactobacillus brevis DD1을 실험균주로 선정하여 맥문동 및 홍문동 추출물에 접종하여 젖산발효를 수행하였다. 실험균주에 의한 맥문동 추출물 발효시 배양온도, 초기 pH 및 접종량 등 기본조건을 최적화하였다. 또한 이들 실험을 수행하면서 각종 배양변수(적정산도, 균체생육도, 총당 및 환원당) 및 생리활성(DPPH 라디칼 소거능, ACE 저해능, 폴리페놀화합물 및 플라보노이드)의 경시적 변화를 조사하였다. 실험균주에 의한 홍문동 고체발효를 예비적으로 수행한 결과, 배양시간 경

과에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 오히려 감소하였고, 홍문동 외형적 특성의 저하, 이취 발생 등으로 인하여 고체발효는 의미가 없다고 판단, 맥문동 추출물 발효에서 최적화된 조건을 이용하여 홍문동 추출물의 액체발효를 수행하였다. 동시에 각종 배양변수(적정산도, 균체생육도, 총당 및 환원당) 및 생리활성(DPPH 라디칼 소거능, ACE 저해능, 폴리페놀화합물 및 플라보노이드)의 경시적 변화도 조사하였다. 상기 실험을 통하여 맥문동 발효를 통하여 각종 생리활성능이 증가된다는 사실을 확인할 수 있었으며, 특히 ACE 저해능은 두 배 이상 활성이 증가함을 알 수 있었다. ACE 저해활성 생성을 위한 열수 추출물의 최적 발효조건은 pH 4.5, 35°C 및 접종량 4% (v/v)이었으며, 고압열수 추출물의 최적 발효조건은 pH 5.0, 30°C 및 접종량 6% (v/v)이었다. 맥문동 증숙을 통하여 제조된 홍문동의 생리활성은 맥문동보다 높았으며, 특히 ACE 저해능은 크게 증가했음을 확인할 수 있었다. 또한 홍문동 역시 맥문동처럼 발효를 통하여 각종 생리활성능이 보다 증가된다는 사실을 알 수 있었다. 본 실험 결과에 의거하여 증숙 및 미생물 발효를 통하여 생리활성이 증강된 맥문동 및 홍문동 음료 개발을 위한 기초 자료를 확보할 수 있었다.

증숙조건에 따라 다양하게 제조된 맥문동이 세포의 생리활성에 미치는 영향을 항당뇨와 인지개선의 측면에서 분석하고자 하였다. 그 결과, 췌장세포주와 신경세포주의 배양조건을 확립하였으며, 췌장세포에서 맥문동의 독성과 인슐린 분비를 위한 최적농도를 결정하였다. 결정된 농도로 다양한 증숙조건에서 개발된 맥문동을 처리하여 인슐린분비량을 측정하여 3시간과 9회 증숙조건에서 우수함을 확인하였다. 또한 이들 증숙물질이 insulin receptor signaling pathway에 미치는 영향을 평가하였다. 인지개선 평가는 신경세포주로부터 NGF의 분비유도능을 분석함으로써 확인하였으며, 우수조건은 9시간, 7회반복임을 관찰하였다. 또한 증숙조건에 따라 생성된 맥문동이 두 종류의 NGF receptor signaling pathway에 미치는 영향을 평가하였으며, 비록 효과가 차이는 있지만 일반맥문동보다 증숙된 맥문동이 우수한 신호전달효과에 영향을 미침을 확인하였다.

홍문동에 대한 in vitro 실험결과를 바탕으로 인체와 유사한 증상을 나타내는 질환모델동물을 이용하여 제품화를 위한 최적조건에서 확립된 홍문동과 발효맥문동 등을 이용하여 항당뇨와 인지개선의 측면에서 분석하고자 하였다. 당뇨질환을 나타내는 OLETF 랫드모델동물을 확보하여 체중, 당뇨발병시기, 혈당 등의 기초생리 특성을 분석하였고, 3주 동안 물질을 처리하여 인슐린분비 증가, 지방농도 감소, adiponectin 증가 등을 나타내었다. 특히 간에서 지방의 대사를 크게 감소시키는 효능을 나타내었고, 이와 관련된 기전을 분석하였다. 또한, 1차년도 실험과 연계하여 췌장세포주에서 홍문동이 칼슘농도의 조절에 크게 기여함을 처음으로 규명하였다. 인지개선측면의 연구에서, 식약청에서 개발한 치매모델동물을 분양받아 교배를 통해 대량증식하여 모델동물을 확보하였고, 이들의 치매질환에 대한 기본적인 생리학적 특징을 분석하였다. 이들 12개월령 치매모델동물에 3주동안 홍문동을 처리하여 신경세포의 분화에 중요한 역할을 수행하는 NGF의 분비가 유의적으로 증가함을 측정하였고, NGF receptor 신호전달에 미치는 영향을 규명하였다. 특히, 이들 모델동물의 뇌조직에 치매의 원인단백질인 A $\beta$ -42의 생성이 홍문동에 의해 감소됨을 관찰하였으며, 원인단백질의 생성을 조절하는  $\gamma$ -secretase의 일부단백질의 발현 감소를 유도함을 확인하였다.

홍문동의 in vitro 및 in vivo 실험결과를 최종제품의 허가를 위한 독성시험, 효능실험 등을 수행하고, 식약청 허가자료를 확보하여 제품인증을 추진하고자 하였다. 홍문동이 체중, 간독성, 신장독성 등에 미치는 영향을 분석하기 위하여 홍문동의 GLP독성시험 프로토콜의 조사 및 확

립을 통한 단회독성시험 실시한 결과 홍문동은 체중, 간독성 및 신장독성 등과 관련하여 전체적으로 유의적인 독성을 미치지 못함을 확인하였다. 비임상시험 단계로서 약리효과 및 그 작용기전을 설명하는 것과 더불어, 표적기관외 다른 기관에서의 바람직하지 않은 효과를 평가하여 바람직하지 아니한 약리작용을 예측하고 약물의 체내동태를 알아보기 위하여 비임상에서의 약리작용에 관한시험(홍문동의 독성 유발 유무 및 질환개선 효과, 알리지 개선 효과 등)을 실험한 결과, 홍문동은 독성을 유발하지 않으며 알리지 개선효과를 나타내고 PA에 의해 유도된 면역증상을 완화시키는 효과를 나타내었다. 또한, 홍문동의 약리동력학관련 영향평가에 있어서 로퍼라마이드 투여에 따른 변비 유발 유무를 확인하고 홍문동의 투여에 따른 변비의 개선 효과를 확인하기 위하여 변의 무게를 시간별로 측정 한 결과, 홍문동에 의해 로퍼라마이드로 유발된 변비 증상이 시간에 따라 완화 되는 것을 확인할 수 있었다.

홍문동(중숙 맥문동) 기능성 물질의 최적 추출조건을 확립하기 위하여 열수, 주정 등을 이용하여 추출수율 및 항산화능을 측정한 결과 열수 추출물에서 가장 추출효율이 높았으며 항산화능도 높게 나타났다. 이 결과를 토대로 열수추출을 통한 차음료로의 개발이 가장 효율적으로 판단되어 차음료의 배합 및 제조 조건을 확립하였다. 또한 차음료 제품의 생산을 위한 제품의 명칭 및 제품 디자인을 제작하였으며, 생산을 위해 필요한 영양성분분석을 수행하였으며, 소비자 조사 및 기호도 조사를 통하여 제품생산에 반영하여 제품의 완성도를 높이고자 하였다.

발효 맥문동 및 홍문동을 활용한 다양한 기능성 제품의 생산을 위해서, 제2협동의 연구결과에서 선정된 젖산균을 이용하여 발효공정 조건을 확립하여 맥문동 및 홍문동 발효 음료의 제품 개발을 진행하였으며, 제품 디자인을 제작하였으며, 생산을 위해 필요한 영양성분분석을 수행하였으며, 소비자 조사 및 기호도 조사를 통하여 제품생산에 반영하여 제품의 완성도를 높이고자 하였다. 또한, 제품 출시 후 재설문을 통한 소비자 조사 및 기호도 조사를 통하여 제품생산에 피드백할 계획이다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 결과를 토대로 국내외 9건의 학술논문이 게재되었거나 게재승인 되었으며, 특허 2건을 출원하였다. 출원된 2건 중에서 현재 “생리활성물질의 함량이 증가된 중숙 맥문동의 제조방법”은 등록이 결정된 상태이다. 또한, 홍문동, 발효 맥문동, 및 발효 홍문동을 활용하여 다양한 시제품을 생산하였으며, 빠른 시일안에 제품을 생산할 계획을 가지고 있으며, 등록된 특허를 바탕으로 기술의 우수성을 홍보하고자 한다. 맥문동의 중숙 및 발효를 이용한 다양한 제품의 상업화가 이루어질 경우 천연소재에 대한 소비욕구와 기능성을 가진 제품의 홍보를 통해서 수익창출이 기대된다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

I. Title : Red *Liriopsis* tuber production by steam and drying process of *Liriopsis* tuber and development of its functional food products

II. The purpose and necessity of reasearch

#### 1. Purpose

Dried root of Maekmundong (*Liriope platyphylla* Wang et Tang; *Liriopsis* tuber; LP) has been used for traditional medicine in Korea for many years for the treatment of asthma and bronchial and lung inflammation. A number of previous studies have reported the preventative effects of *Liriopsis* tuber extracts on diabetes, cancer, inflammation, and neurodegenerative disease. Although hot water extracts of *Liriopsis* tuber have numerous pharmaceutical benefits and thus they have been used as a tonic in Korea to stamina and also as an expectorant, their sour and astringent tastes are acting as a disadvantage for their applications in functional beverage. Therefore, in this study of *Liriopsis* tuber using techniques such as steaming and fermentation production, we tried to develop a variety of *Liriopsis* tuber-related products of high value-added functionality and mass production of biologically active substances, thereby improving the income of farmers and businesses to contribute to the promotion of sales.

#### 2. Necessity

Although the increase of the national income, the wellness boom in our society, and the interest of consumers in functional products, various functional food products from botanical origin are insufficient to meet the needs of the consumers. In addition, with the development of the Internet through the sharing of information, the desire for minimally processed products and the high quality of the products has been accelerated. *Liriopsis* tuber cultivated in Miryang contains a variety of bioactive compounds such as saponin, isoflavon,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, steroidal glycosides, oligosaccharides, etc. but *Liriope platyphylla* is often used in landscaping for evergreen foliage as a groundcover in temperate latitude. The development of *Liriopsis* tuber products was attempted but was not a success. The needs of consumers about ginseng and red ginseng products which contain lots of saponin contents is increasing, but ginseng needs at least four years of cultivation period and the price of ginseng is high. *Liriopsis* tuber is easy to cultivate compared to ginseng, and has a variety of functional ingredients rich, especially in saponin contents. From these points of view, it is necessary to develop the functional food product using *Liriopsis* tuber.



### III. Content and scope of research and development

- Development of steamed and dried *Liriopsis* tuber (red *Liriopsis* tuber)
  - Establishing optimal extraction process of functional ingredients
  - Establishing optimal beverage products formulation and process
  - Consumer's acceptance and market research of the product
  - Establishing marketing and promotion strategies
  
- Steaming and drying process of *Liriopsis* tuber and its physicochemical analysis
  - Optimization of steaming and drying process of *Liriopsis* tuber
  - Analysis and purification of biologically active compounds in steamed and dried *Liriopsis* tuber (red *Liriopsis* tuber)
  - Structural analysis and purification of biologically active compounds
  - Analysis of biologically active compounds in fermented *Liriopsis* tuber
  
- Improvement of functional properties of *Liriopsis* tuber and red *Liriopsis* tuber by fermentation
  - Screening of strain for fermentation of *Liriopsis* tuber
  - Identification and functional analysis of selected strains
  - Optimization of fermentation conditions
  - Functional analysis of fermented *Liriopsis* tuber and red *Liriopsis* tuber
  
- Efficacy study of Red *Liriopsis* tuber on the biological activity
  - Analysis of biological activity according to steaming and drying process of *Liriopsis* tuber (anti-diabetic, and cognitive improvement)
  - Evaluation of the biological activity on red *Liriopsis* tuber in vitro (anti-diabetic, and cognitive improvement)
  - Evaluation of the biological activity on red *Liriopsis* tuber in vivo (anti-diabetic, and cognitive improvement)
  - Toxicity analysis and pharmacological effects of red *Liriopsis* tuber

### IV. Results of research and development

We tried to optimize the steaming and drying process of *Liriopsis* tuber which is one of the ways of food processing, thereby increasing the content of bioactive components in *Liriopsis* tuber. Changes of general components, crude saponin, total phenolic compounds, flavonoid compounds, and antioxidative activities were analyzed according to steaming times and and steaming frequencies. From the results, the condition for steaming during 15 hours and drying for 72 hours at 70 °C was the best condition to maximize the biologically active compounds. During the steaming and drying process, newly forming toxic substances

such as benzopyrene was not detected.

To analyze the bioactive components of steamed *Liriopsis* tuber (red *Liriopsis* tuber), the methanol extract and the butanol extract were prepared. From these extracts, phenolic compound, saponin, amino sugars, and sugar components were analyzed. Pure compound produced during steaming process was purified by Prep HPLC and recycling HPLC. In addition, large amounts of fractions was prepared by Prep HPLC and their anti-diabetic effect on insulin secretion was confirmed, showing browning reaction produced during the steaming process to be related with insulin secretion.

From the analysis of fermented *Liriopsis* tuber and fermented red *Liriopsis* tuber, similar bioactive compounds found in red *Liriopsis* tuber were observed, which is due to the high temperature and high pressure during the extraction process. Especially color of the extracts, contents of HMF and amino sugar were increased in both cases. Spicatoside A, one of the important saponin compounds in *Liriopsis* tuber was decreased, but diosgenin and ruscogenin were newly produced in fermented *Liriopsis* tuber and fermented red *Liriopsis* tuber.

Fermentation by microorganisms could enhance biological activity, as well as produce de novo biologically active compounds. For the fermentation of *Liriopsis* tuber, microorganisms (*Lactobacillus* 74 strains, *Bacillus* 50 strains) were screened from the Korea traditional food, and the surface of various plants. The biological activity of these strains was confirmed by antioxidant activity, anti-hypertensive activity (ACE inhibition activity), antimicrobial activity, acid and bile acid resistance, enzymes activity toward cellular components.

Two strains having antioxidative activity and ACE inhibitory activity were selected for further fermentation. With two strain, fermentation condition was optimized to maximize the antioxidative activity and ACE inhibitory activity. Also, effects of *Liriopsis* tuber extraction condition, growth rate of selected strains, and biological activities of culture broth were analyzed. Based on the fermentation pattern, two strain showed the reduction of pH and the production of titrable acid through the fermentation.

Among screened strains, *Lactobacillus brevis* DD1 was finally chosen according to DPPH radical scavenging activity and ACE inhibitory activity for the fermentation of *Liriopsis* tuber and red *Liriopsis* tuber. Fermentation by this strain was monitored and optimized based on incubation temperature, initial pH and amounts of initial inoculum. In addition, various cultures parameters (titratable acidity, cell growth, too, total sugar and reducing sugar) and physiological activity (DPPH radical scavenging activity, ACE inhibitory activity, polyphenolic compounds and flavonoids) were investigated during the fermentation. From these results, biological activities were increased during the fermentation and ACE inhibitory activity was doubled by the fermentation process.

Optimal fermentation condition of hot water extract for the best ACE inhibitory activity was pH 4.5, 35°C, and 4% (v/v) initial inoculum, and optimal fermentation condition of high temperature and high pressure water extract for the best ACE inhibitory activity was pH 5.0, 30°C, and 6% (v/v) initial inoculum, respectively.

Effects of steaming conditions on the physiological activity of the cells were investigated in terms of anti-diabetics and memorial improvement. As a result, culture conditions of the B35 neuronal cell line, PC12 pheochromocytoma cell line, and INS cell lines were established. Toxicity and optimal concentration for insulin secretion was measured using various red *Liriodopsis* tuber extracts. In INS cell, highest insulin secretion was observed in 3 hour and 9 times steamed and dried *Liriodopsis* tuber extracts. Also, insulin receptor signaling pathway was investigated. For memorial improvement by B35 neuronal cell, 9 hour and 7 times steamed and dried *Liriodopsis* tuber extracts showed highest NGF secretion activity. From these results, steaming and drying process of *Liriodopsis* tuber affects in insulin secretion and NGF secretion activity.

From in vitro results, the insulin secretion ability and glucose receptor signaling pathway was confirmed in an animal model of for type I diabetes. The following results were obtained: i) insulin secretion was induced in red *Liriodopsis* tuber extract-treated OLETF rats, although there were no significant differences in body weight, glucose tolerance test and glucose concentration; ii) the red *Liriodopsis* tuber extract-treated OLETF rats showed a significant increase in adiponectin concentration but the concentration of triglyceride and LDL decreased compared to the vehicle-treated rats; iii) although the abdominal fat mass and adipocyte size did not change with red *Liriodopsis* tuber extract treatment, expression of the adipocyte marker genes and  $\beta$ -oxidation genes in fat tissue was recovered to the level of the LETO rats; These results suggest that red *Liriodopsis* tuber extract may stimulate insulin secretion and a decrease in lipid in serum, and may also suppress fatty liver formation through the regulation of fatty acid oxidation. The data presented here highlight the possibility that red *Liriodopsis* tuber extract can be considered a candidate for the prevention or alleviation of obesity-related diseases. To examine the therapeutic effects of Red LP (RLP) manufactured by steaming process on neurodegenerative disorders, significant alteration of the key factors influencing Alzheimer's Disease (AD) was detected in NSE/hAPPsw transgenic (Tg) mice after red *Liriodopsis* tuber extract treatment. The concentration of nerve growth factor (NGF) in serum increased in red *Liriodopsis* tuber extract-treated NSE/hAPPsw Tg mice compared with vehicle-treated Tg mice. Further, analysis of  $\gamma$ -secretase components showed that A $\beta$ -42 peptide expression was downregulated. Overall, these results suggest that red *Liriodopsis* tuber extract can help relieve neurodegenerative diseases, especially AD, through upregulation of NGF secretion ability, activation of NGF signaling pathway, downregulation of A $\beta$ -42 peptide deposition, and alteration of  $\gamma$ -secretase components.

The toxicity tests and efficacy test were investigated for approval of the final product and the data to promote the product certification by KFDA approval. Investigation of GLP protocol and single dose toxicity test was conducted to analyze the effects of red *Liriodopsis* tuber extract on body weight, hepatotoxicity, nephrotoxicity with renal function test, which showed that red *Liriodopsis* tuber extract has no effects. As a non-clinical trial stage, the pharmacological effects and the mechanism of action as well as target organs to assess the

effects of the undesirable pharmacological action were evaluated and red *Liriopsis* tuber extract did not cause a toxic effect and showed relief of the immune response induced by PA. In addition, the pharmacokinetic study showed that red *Liriopsis* tuber extract improved the constipation induced by loperamide.

To establish optimum conditions of extraction process, the extraction yield and antioxidative activity were analyzed on the hot water extract and ethanol extract. Hot water extract showed highest extraction yield with the high antioxidative activity. From these results, development of beverage products is suitable item for the industrial production and beverage product formulation and manufacturing conditions has been established. In addition, product name and design were fabricated and nutrient value was analyzed for the manufacturing beverage product. Sensory evaluation and consumer's acceptance was investigated and these results would be adapted in final products.

For the development of various fermented *Liriopsis* tuber and fermented red *Liriopsis* tuber products, lactic acid bacteria selected from cooperative study was chosen, and its fermentation condition was established for the production of items. Product formulation and manufacturing conditions has been established and product design was selected. In addition, nutrient value was analyzed for the manufacturing the product. Sensory evaluation and consumer's acceptance were investigated and these results would be also adapted in final products.

## V. Results of the study and application plan

The results of this study have been published or approved for publication in nine scientific papers and two domestic patents is pending, of which the patent for development of steamed and dried *Liriopsis* tuber is approved for registration in Korean Intellectual property office. A lot of functional beverage products from red *Liriopsis* tuber and fermented *Liriopsis* tuber have been developed through the research, and they could be practically operated and come out in the market near future.

## CONTENTS

<b>Chapter 1. Outline of the research project</b> .....	16
Section 1. The purpose of research .....	16
Section 2. The necessity of research .....	17
Section 3. The range of research .....	20
<b>Chapter 2. Trend of foreign and domestic on researches</b> .....	22
<b>Chapter 3. The contents and results</b> .....	27
Section 1. Development of functional food products from Hongmundong(red <i>Liriopsis</i> tuber) .....	27
1. Development of red <i>Liriopsis</i> tuber products .....	27
2. Development of fermented <i>Liriopsis</i> tuber products .....	50
3. Development of fermented red <i>Liriopsis</i> tuber products .....	64
4. Plan for marketing and promotion of <i>Liriopsis</i> tuber products .....	76
Section 2. Steaming and drying process, and physicochemical analysis of <i>Liriopsis</i> tuber .....	77
1. Optimization of steaming and drying process of <i>Liriopsis</i> tuber .....	77
2. Analysis and purification of biologically active compounds in steamed and dried <i>Liriopsis</i> tuber(red <i>Liriopsis</i> tuber) .....	92
3. Structural analysis and purification of biologically active compounds .....	119
4. Analysis of biologically active compounds in fermented <i>Liriopsis</i> tuber .....	138
Section 3. Improvement of functional properties of Maegmundong( <i>Liriopsis</i> tuber) and Hongmundong(red <i>Liriopsis</i> tuber) by fermentation .....	141
1. Isolation, identification and functionality of fermentative bacteria .....	141
2. Production condition of functional metabolite by fermentative bacteria .....	157
3. Effect of Maegmundong on growth of fermentative bacteria and preparative fermentation .....	182

4. Fermentation of Maegmundong and Hongmundong .....	189
Section 4. Efficacy study of Red <i>Liriopsis</i> tuber on the biological activity .....	211
1. Establishment of pancreatic beta cell and neuroblastoma cell line .....	211
2. Evaluation of the biological activity In vitro .....	211
3. Establishment of animal model for human disease .....	228
4. Evaluation of the biological activity In vivo .....	232
5. Toxicity analysis of Red <i>Liriopsis</i> tuber .....	252
6. Pharmacological effects of Red <i>Liriopsis</i> tuber .....	261
<b>Chapter 4. Goal achievement and contribution to related industries ..</b>	<b>286</b>
Section 1. Achievements of Goals and Contributions .....	286
Section 2. Technological aspect .....	290
Section 3. Economical and industrial aspect .....	290
Section 4. Social and cultural aspect .....	290
<b>Chapter 5. Results of the study and application plan .....</b>	<b>291</b>
Section 1. A Patent Application .....	291
Section 2. Papers .....	291
Section 3. Academic Presentaion .....	293
Section 4. Other Application Plans .....	295
<b>Chapter 6. International science and technology information collected in the process of the study .....</b>	<b>296</b>
<b>Chapter 7. Research facilities and equipment status .....</b>	<b>299</b>
<b>Chapter 8. References .....</b>	<b>300</b>

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b>	16
제 1절	연구개발의 목적	16
제 2절	연구개발의 필요성	17
제 3절	연구개발의 범위	20
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b>	22
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b>	27
제 1절:	제 1세부 홍문동의 기능성 제품 개발 및 산업화	27
1.	홍문동의 기능성 제품 개발	27
2.	발효 맥문동 기능성 제품 개발	50
3.	발효 홍문동 기능성 제품 개발	64
4.	홍문동 및 발효제품의 마케팅 및 홍보전략	76
제 2절:	제 1협동 맥문동을 이용한 홍문동의 제조 및 기능성 물질 분석	77
1.	맥문동 증숙 조건의 확립 및 최적화	77
2.	홍문동의 기능성 성분 분석 및 정제	92
3.	홍문동의 기능성 성분 구조 분석 및 대량 분리	119
4.	발효 맥문동의 기능성 성분 분석	138
제 3절:	제 2협동 맥문동 및 홍문동 발효를 통한 기능성 증진 연구	141
1.	발효균주의 분리, 동정 및 기능성 조사	141
2.	발효균주의 기능성 물질 생산조건	157
3.	맥문동의 발효균주 증식효과 및 예비발효	182
4.	맥문동 및 홍문동 발효	189
제 4절:	제 3협동 홍문동의 생리활성 효능연구	211
1.	생리활성 검증을 위한 채장 세포주와 신경세포주의 확립	211
2.	In vitro 생리활성 효능평가	211

3. 효능분석을 위한 모델동물 확립 .....	228
4. In vivo 생리활성 효능평가 .....	232
5. 홍문동의 독성시험 .....	252
6. 홍문동의 약리효능 평가 .....	261
<b>제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>286</b>
제 1 절 연구개발의 달성도 및 기여도 .....	286
제 2 절 기술적 측면 .....	290
제 3 절 경제·산업적 측면 .....	290
제 4 절 사회·문화적 측면 .....	290
<b>제 5 장    연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....</b>	<b>291</b>
제 1 절 특허 출원 .....	291
제 2 절 논문 .....	291
제 3 절 학술발표 .....	293
제 4 절 그 외 활용계획 .....	295
<b>제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>296</b>
<b>제 7 장    연구시설·장비 현황 .....</b>	<b>299</b>
<b>제 8 장    참고문헌 .....</b>	<b>300</b>



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

맥문동(*Liriope platyphylla* Wang et Tang)은 백합과(Liriaceae)에 속하는 다년생 상록 초본식물로 해발 2,000 m이하의 산지의 나무그늘이나 초지 등에 자생하고, 근경은 굵고 짧으며 뿌리는 가늘지만 강하고 수염뿌리 끝에 짧은 방추형의 괴근이 생기며 우리나라에서는 남부지방에 널리 분포하고 있다. 한방에서 맥문동은 점활성소염, 자양강장약으로서 진해, 거담, 강장 및 이뇨 등의 목적으로 맥문동탕, 죽엽석고탕, 자감초탕 또는 청심연자식 등에 사용되고 있으며, 맥문동의 효능으로는 혈당강하효과, 항당뇨, 항염증작용, 면역조절 효과, 간보호 효과, 항암효과 및 기억력 증진 효과 등이 보고되고 있다. 맥문동은 다양한 saponin을 함유하고 있으며, 그 함량이 맥문동 건근의 8.4%(인삼의 경우 6.4%)를 차지할 정도로 많은 양을 함유하고 있는 우수한 기능성 작물이나, 현재 한약재와 화훼용으로만 사용이 되고 있다. 맥문동을 이용한 제품개발에 대한 시도가 있었으나, 맥문동 열수 추출물은 신맛과 떼은 맛을 함께 가지고 있어서 식품으로 개발하기에는 한계가 존재하므로 산업화에는 성공하지 못하였다. 또한, saponin을 함유하고 있는 인삼 및 홍삼제품에 대한 소비자의 요구도는 증가하고 있으나, 인삼의 재배기간이 최소 4년 이상 소요되고 가격이 비싸기 때문에 외국으로부터 수입량이 증가하고 있으나 국내산과의 구별할 수 있는 방법이 없어 문제가 되고 있는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 맥문동의 다양한 처리 방법을 통한 고부가가치 기능성 제품을 개발·판매함으로써 농가의 소득 향상 및 기업매출의 증진에 기여하고자 하며 최종 목표 및 주요 내용은 다음과 같다.

### ○ 최종목표 :

- 증숙 및 발효기법 등을 이용한 맥문동의 고부가가치 제품의 생산 및 생리활성 물질의 대량 생산
- 홍문동 및 발효 홍문동을 이용한 기능성 제품 개발 및 생산

### ○ 주요내용

- 맥문동의 증숙을 통한 홍문동의 제조 최적화 및 표준화와 기능성 물질의 분리 및 대량생산
- 맥문동 및 홍문동 발효를 통한 기능성 증진 연구
- 홍문동의 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능연구와 홍삼 등과의 비교 연구
- 홍문동의 기능성 제품 개발 및 산업화

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 건강기능성 제품에 대한 수요 증대

- 국민소득이 증가함에 따라 우리 사회에는 웰빙 붐이 일어나고 있으며, 건강 기능성 제품에 대한 소비자의 관심이 높아지고 있음.
- 특히 현대인은 동물성지방, 동물성단백질, 백설탕 등의 과잉 섭취와 비타민, 미네랄, 섬유질 등의 섭취가 부족함에 따라 심각한 영양불균형 상태에 놓여 있으며, 이로 인하여 뇌졸중, 동맥경화증, 고혈압, 암, 당뇨병 등의 성인병 및 만성퇴행성 질환의 발병률이 증가하고 있음.
- 한편, 세계 건강기능제품 시장은 연평균 10%(2007년 약 5,321억 달러) 성장하고 있으며 이러한 시장 확대는 생활수준 향상, 고령화로 인한 건강지향욕구 증대, 대체의학과 자가치료에 대한 관심증대 그리고 건강과 식품에 관한 지식 축적 등에 기인함.
- 건강기능성 제품 시장은 소득 수준이 높은 국가일수록 시장 점유율이 높으며, 우리나라의 시장 점유율은 0.5%로 미국시장의 15% 수준에 못 미치지만 향후 크게 성장할 것으로 전망됨.

#### ● 국내외 기능성 음료 및 미용제품 시장은 연간 2~6% 증가됨

- 소비자는 새로운 기능성 제품 요구
- 기존 제품은 다른 기능성 제품으로 대체되기에 새로운 제품 개발 필요

#### <국내>

	증가 현황			
	2007년(전년비)	2008년	2009년	
음료	1% 성장	3~4% 성장	4~5% 성장예상	매년 기능성음료 50여종 출시
미용제품	5.7% 성장	5.9% 성장	6.2% 성장예상	매년 기능성제품 200여종 출시

식품의약품안전청, 한국보건산업진흥원 2007~2008

#### <일본>

	증가 현황			
	2007년(전년비)	2008년	2009년	
음료	1.2% 성장	1.8% 성장	2.3% 성장예상	매년 기능성음료 30~40여종 출시
미용제품	1.9% 성장	1.8% 성장	1.8% 성장예상	매년 기능성제품 300여종 출시

후지경제 2008

### 2. 천연소재 가공제품에 대한 수요증대

- 인공합성 식품 및 미용제품에 대한 부정적 여론이 증대되면서 천연생물소재를 활용한 자연제품에 대한 소비자의 욕구가 날로 증대되고 있음.
- 이에 따라 슬로우푸드, 식물자원을 활용한 기능성 화장품 등이 소수 개발·판매되고 있으나 소비자들의 다양한 욕구를 충족시키기에는 미흡한 실정임.

3. 소득 증대로 인한 고품질제품 선호

- 인터넷 발전과 함께 나타난 정보화 사회는 정보공유를 통한 천연가공제품에 대한 욕구를 가속화시킴.
- 소비자들이 안심하고 먹을 수 있는 상품, 특화 및 차별화된 상품에 대한 수요가 급속히 증가하고 있음.
- 웰빙 열풍에 따른 품질표시제로 고급화의 필요성이 크게 대두되고 있음.

4. 밀양 맥문동의 부가가치 제고

- 밀양의 맥문동은 saponin, isoflavon,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, steroidal glycosides, oligosaccharides 등의 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있으며, 밀양의 영남농업연구소에서 육성하여 품종명과 계통명이 밀양 1호(맥문동 1호), 밀양 2호(맥문동 2호)임.

<표> 맥문동의 기능적 특성 및 생리활성 물질

대표작물	기능적 특성	생리활성물질
맥문동	혈당강하, 항염증, 항암, 간보호, 피부보습 및 미백, 갈증해소, 피로회복, 식욕증진, 면역기능 강화	사포닌, 이소플라본, 올리고당, 식물성 스테롤류, 세레토닌, 오피오포고닌

<표> 밀양 맥문동의 특징

대표품목	특징	비 고
맥문동	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 남부지방일수록 유리하기 때문에 청양, 부여에 비하여 saponin, isoflavon 등의 다양한 생리활성 물질을 함유</li> <li>• 영남농업연구소 품종육성: <b>밀양 1호, 2호</b></li> </ul>	한국약용작물학회 (2007. 6월)

<표> 밀양 맥문동의 재배현황

재배면적(ha)	생산량(t/m <sup>2</sup> )	전국점유율(%)	농가수(호)	소득
19.19	87.8	35	125	NA

(자료: 2006년 농촌진흥청, 밀양시)

5. 맥문동 가공제품의 개발 필요성

- 맥문동은 다양한 saponin을 함유하고 있으며, 그 함량이 맥문동 건근의 8.4%(인삼의 경우 6.4%)를 차지할 정도로 많은 양을 함유하고 있는 우수한 기능성 작물이나 현재 화훼용으로

# 밀양의 맥문동



- 학명 Liriope platyphylla
- 분류 백합목 백합과
- 분포지역 한국 · 일본 · 중국 · 타이완
- 식장소 그늘진 곳
- 효능
  - 1) 해열약, 폐열로 인한 기침. 폐허로 인한 마른 기침, 가래, 열병으로 인한 땀과 입안이 마를 때,
  - 2) 미열, 변이 굳을 때 등 일반적으로 몸이 허약할 때 사용.
  - 3) 강장, 강심, 이뇨 작용에 효과가 있고 협심증에 사용
  - 4) 민간요법으로 소갈(당뇨)의 치료에 사용
  - 5) 신경물질 분비에 따른 기억력 증진 작용에도 효과가 있음이 밝혀짐

■ 노인성 치매 환자수 추이 (단위: 명)



만 사용이 되고 있으며, 맥문동을 이용한 제품개발에 대한 시도가 있었으나 산업화에는 성공하지 못하였음

- Saponin을 함유하고 있는 인삼 및 홍삼제품에 대한 소비자의 요구도는 증가하고 있으나, 인삼의 재배기간이 최소 4년 이상 소요되고 가격이 비싸기 때문에 외국으로부터 수입량이 증가하고 있으나 국내산과의 구별할 수 있는 방법이 없어 문제가 되고 있음
- 따라서 맥문동은 인삼에 비해 단기재배가 용이하며 saponin등의 기능성 성분을 다량 함유하고 있어 이의 가공공정을 개발함으로써 인삼 및 홍삼 대체 기능성 식품의 개발을 할 수 있는 가능성이 높음
- 맥문동의 다양한 처리 방법을 통한 기능성 제품의 제조를 통하여 인삼 및 홍삼제품을 대체할 수 있는 기능성 제품의 개발이 필요한 실정임

### 제 3 절 연구개발의 범위

맥문동은 인삼에 비해 단기재배가 용이하고, 다양한 종류의 생리활성 물질을 함유하고 있으며 그 함량도 높기 때문에 인삼을 대체할 수 있는 기능성 재료중의 하나이지만, 현재 일부 한약재 혹은 화훼용으로만 사용되고 있는 실정이다. 맥문동을 이용한 제품개발에 대한 시도는 일부 있었으나 산업화에는 성공하지 못하였는데, 그 이유로는 맥문동이 지니고 있는 특유의 신맛과 짝은 맛에 의해서 기호도가 상당히 낮기 때문이며, 맥문동을 활용한 제품의 개발에 있어서 이러한 단점을 극복하는 것이 관건이 된다. 따라서 본 과제에서는 원재료의 기호도를 증진시키기 위한 방법으로 증숙 및 발효의 방법을 적용하고자 한다. 증숙에 따른 열처리·건조 조건 및 발효에 따른 조건에 따라 원료의 특성이 달라지게 되므로, 맥문동의 증숙 및 발효 조건을 최적화하여 최적의 품질을 나타내는 가공처리방법을 표준화하며, 이로부터 얻어지는 재료를 활용하여 고부가가치 제품으로 개발·효능평가·제품화함으로서 맥문동의 소비를 촉진하여 농가의 소득 향상 및 기업매출의 증진에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

구체적인 연구범위는 다음과 같다.

- 홍문동의 기능성 제품 개발 및 산업화
  - 기능성 지표물질의 최적 추출공정 확립
  - 홍문동 음료 제품 및 가공제품의 배합 및 공정조건 확립
  - 홍문동 기능성 음료제품 및 가공제품 제조
  - 홍문동 기능성 제품의 기호도 및 시장조사
  - 홍문동 기능성 제품의 마케팅 및 홍보전략 수립
- 맥문동을 이용한 홍문동의 제조 및 기능성 물질 분석
  - 맥문동의 증숙 조건에 따른 홍문동 제조의 최적화 및 표준화
  - 맥문동의 증숙 단계별 이화화학적 성분 분석
  - 맥문동의 증숙 단계별 기능성 성분의 분석 및 분리
  - 기능성 성분의 대량 생산 방법 연구
  - 맥문동의 증숙에 따른 유해물질의 분석
- 맥문동 및 홍문동 발효를 통한 기능성 증진 연구
  - 맥문동 및 홍문동 발효 균주의 분리 및 선정
  - 선정균주의 동정 및 기능성 분석
  - 맥문동 및 홍문동 발효의 최적 조건 확립
  - 발효 맥문동 및 홍문동의 성분분석
- 홍문동의 생리활성 연구
  - 맥문동의 증숙 단계에 따른 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능 분석
  - 홍문동의 *in vitro* 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능 연구

- 홍문동의 *in vivo* 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능 연구
- 홍문동 생리활성 물질을 다른 추출물과 비교분석
- 분리된 기능성 성분의 생리활성 검증

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 관련기술 현황

#### 1. 열처리 관련 기술

- 증숙이란 증기를 이용해 열처리를 하여 원재료의 구성성분들의 변화를 야기시키어 새로운 화합물을 만들어 내거나 재료의 조직을 파괴하여 유용성분 용출을 극대화하는 공정으로 인삼의 증숙이 많이 알려져 있다. 한방에서는 수치(修治)라 하여 한약재의 가열처리를 통한 독성을 낮추고 부작용을 최소화하여 치료효과를 높이며, 가공이나 절편에 편리하게 사용하고자 하는 방법의 하나로 사용해 왔다. 특히 수치법 중의 하나인 구증구포(九蒸九曝)의 방법은 9번 찌고 말리는 과정을 반복하여 제조하는 것으로 수삼에 적용하여, 홍삼 및 흑삼등의 제조에 많이 이용하는 가공 방법이다.
- 일반적으로 직접적인 열처리에 의한 추출공정은 조직성분을 연소시키며 활성성분의 파괴가 야기될 수 있으며, 그에 따른 활성성분의 수율 및 생리활성도 감소하게 되기 때문에, 이러한 단점을 극복하기 위한 공정으로 직접적 열처리가 아닌 습기를 통한 간접적인 열처리로 활성성분의 파괴를 막으며, 유용성분의 용출을 증진시킬 수 있는 증숙을 사용하고 있다.
- 증숙과정을 통하여 약용식물의 free polyphenolic compound 및 flavonoids 등의 성분 용출이 용이하고 활성산소 소거작용이 증가를 가져오는 것으로 보고되어 지고 있으며, 특히 홍삼의 경우에는 열처리에 의하여 ginsenoside의 C-20 위치에 결합한 당이 이탈 및 이성화에 의하여 Rh<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>4</sub> 등이 생성되며, 이들은 강한 항암작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 증숙 과정 중의 Maillard 반응에 의해 생성된 Arg-Fru-Glc 중합체는 혈류개선 효과가 뛰어나며, maltol 은 강한 활성산소 소거작용을 가지는 것으로 보고되고 있다.
- 증기를 이용한 열처리는 원재료의 물리적인 조직 변화뿐만 아니라 화학적인 변화를 일으키며, 폴리페놀 화합물, 갈변 물질 등에 의한 항산화 활성의 증가를 가져오는 것으로 여겨지고 있으며, 열처리 시 가열 온도, 시간 열처리 횟수에 따라 다양한 양상의 물리, 화학적 특성 변화를 가져온다.
- 증숙과 관련된 열처리 기술은 일반적으로 인삼에 가장 많이 적용이 되고 있으며, 이와 관련된 연구 또한 가장 많이 진행되어 왔다. 그러나 인삼을 제외한 재료에 있어서는 마늘, 차가버섯, 오미자 등에 일부가 진행되고 있으나, 맥문동에 증숙 공정을 이용한 연구는 진행된 바가 없다. 증숙처리 조건은 원재료에 따라 온도 및 시간, 그리고 건조과정이 매우 다르기 때문에 맥문동을 증숙하는 열처리 공정에 대한 연구는 전무한 상황이다.

#### 2. 발효관련 기술

- 최근 들어 젯산균, 효모, 곰팡이 등의 유익 미생물을 이용한 발효기술의 진보로 올리고당,

아미노산, 펩티드 등의 발효산물을 얻거나 또는 상호간의 시너지 작용에 의하여 생리활성 효과가 증가되는 것으로 알려져 있다.

- 이에 따라 가시오가피, 구지뽕, 뽕잎, 인삼, 콩, 현미 등 각종 농작물을 다양한 미생물을 이용하여 발효시킴으로써 항산화 활성, 항고혈압 활성 등을 증진시키고, 발효산물을 추출하여 요구르트 등의 식품에 첨가하는 연구가 실험실 수준에서 활발히 수행되고 있다. 또한 한약재를 유산균을 이용하여 발효시킴으로써 한약 성분의 체내 흡수율과 생체 이용률을 향상시키는 연구 또한 최근 보고되었다.
- 이에 반해 맥문동의 경우, 괴경을 추출하여 음료를 음용하기 위한 시도만 있었을 뿐 미생물을 이용하여 맥문동을 발효한 연구는 거의 수행되어 있지 않다. 따라서 맥문동 및 홍문동의 미생물 발효기술 수준은 초창기에 있다고 해도 과언이 아니다.



## 제 2 절 국내외 제품생산 및 시장현황

### 1. 국내 현황

- 맥문동의 증숙과정을 거쳐서 제조되는 홍문동, 발효홍문동 및 발효맥문동에 관한 연구가 거의 전무한 실정이므로 이를 이용한 제품은 현재 찾아볼 수 없는 실정이다. 또한 맥문동을 이용하는 경우에도 현재 시판되고 있는 제품의 경우 차형태의 티백, 생맥산 음료와 일부 화장품이 개발되어 있으나 대부분은 첨가하는 다양한 한약재중 한가지로 사용되기 때문에 그 사용량이나 제품에서 차지하는 비중이 거의 미비한 수준이다.
- 맥문동은 다양한 saponin을 함유하고 있으며 그 함량이 맥문동 건근의 8.4%(인삼의 경우 6.4%)를 차지할 정도로 많은 양을 함유하고 있는 우수한 기능성 작물로 인삼에 비견될수 있으며 맥문동을 증숙하여 제조되는 홍문동의 경우 홍삼에 비견된다고 볼 수 있다. 따라서 인삼과 홍삼의 제품생산 및 시장현황을 살펴봄으로서 맥문동 및 홍문동의 제품생산 및 시장현황을 전망해 볼 수 있을 것으로 사료된다.
- 전통적으로 인삼을 달여서 섭취하는 한의학적 방법은 조제에 시간과 불편이 따르므로 근래에 와서 가공기술의 발달로 소비자들이 섭취가 간편하고, 휴대가 편리한 2차 가공인삼제품들이 가공되고 있다. 이러한 가공제품들은 농축, 정분, 차류, 타블렛, 캡슐, 분말류, 음료, 환제, 절편삼, 봉밀삼, 과자류, 주류 등 소비자들 기호에 맞는 다양한 제조기법으로 제품이 개발되고 있다.
- 생활수준의 향상과 함께 건강에 관심이 높아지면서 웰빙추구로 인삼/홍삼에 관한 관심도 꾸준히 높아지고 있다. 2004년부터 시행된 건강기능식품법의 시행으로 많은 대기업에서 인삼제품 시장에 진출해 시장규모가 급격히 늘어나고 있는데, 인삼업계는 홍삼시장규모는 2004년 2,113억원, 2006년 6,000억원, 2010년도에는 1조원대의 거대시장을 형성할 것으로 전망하고 있다.
- 이러한 인삼시장의 급격한 성장은 인삼이 중장년층, 노년층이 섭취하는 보약개념에만 국한되었던 것이 어린이, 청소년층, 여성층 등 다양한 소비자층의 욕구에 부응하는 제품 출시와 질병예방, 건강유지 등 일반인들의 관심 증가로 소비자층이 확대되었기 때문인 것으로 사료된다. 한국의 인삼시장의 특징은 단일 시장 중에서는 매우 커다란 시장을 형성하고 있다는 것이다. 이는 오랫동안 인삼의 효능에 대한 인식과 활용경험에 의거한 한국인의 인삼선호도에 기인하리라 여겨진다. 1차 재배산물을 기준으로 총 인삼 생산량(2005년기준, 약 1만 5천톤) 약 14%만 수출하고 나머지는 국내에서 소비한다는 것 큰 내수시장을 가지고 있음을 의미한다.

**인삼, 약초, 버섯은 고 소득작물로 인식되어 생산액 꾸준히 증가**

- 인삼(억원) : ('02) 5,598 → ('07) 7,995 (43% 증)
- 약용작물(억원) : ('05) 5,237 → ('07) 8,219( 1.9배)
- 버섯(억원) : ('05) 6,942 → ('07) 7,600

**국민 소득향상에 따른 건강기능성 식품 선호로 소비량 증가 추세**

- 인삼(1인/년) : ('00) 330 → ('07) 450g('00년 대비 73% 증)
- 버섯(1인/년) : ('00) 2.6 → ('07) 3.7Kg (42% 증)

- 현재 국내에 유통되는 전체 인삼제품의 품목별 분포를 인삼과 홍삼으로 대별해 보면 인삼류 보다 홍삼류가 약 6배 정도 많은 출하량을 보이고 있고, 홍삼엑기스나 홍삼분말과 같은 그자체로서 보다 홍삼을 이용한 음료나 식품류가 더 많은 출하액을 보인다. 이는 점차 인삼에 대한 수요가 고유한 인삼보다 좀 더 부가가치가 높은 홍삼이나 홍삼을 응용한 새로운 형태의 제품이 개발되고 시장을 점유한다는 의미로 해석된다. 따라서 맥문동을 증속하여 제조하는 홍문동과 발효 홍문동의 기능성 제품이 맥문동을 이용하는 제품에 비해 보다 높은 선호도를 보일 것으로 전망된다.

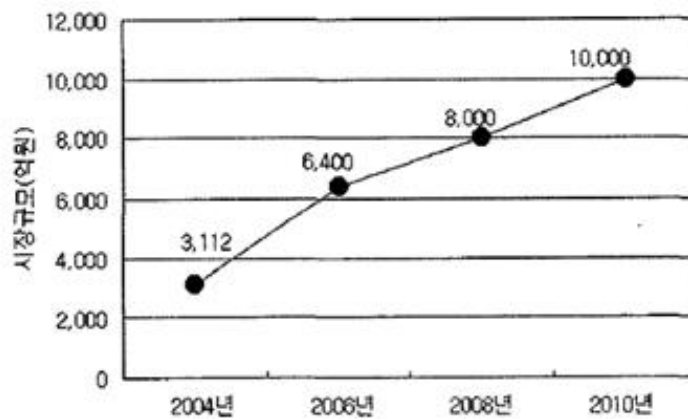


그림 2. 홍삼시장 예상 규모 (출처: 건강기능신문: 관련업계 추정).

**2. 국외 현황**

- 인삼의 다양하고 우수한 효용성에 근거하여 인삼류의 개발과 제품생산이 활발하게 이루어져 현재 국내 건강보조식품 생산량 중에서 인삼류가 30%를 차지한다.
- 한국에서의 인삼류 생산의 활성화에도 불구하고, 한국 인삼이 세계시장에서 차지하는 위상은 심각하게 축소되어가고 있는 실정이다. 약 200억불 정도에 달하는 세계 인삼제품 시장에서 한국인삼은 1990년 1억 6500만 달러를 정점으로 점차 줄어들고 있다.
- 세계적으로 인삼을 주로 소비하는 지역은 한국, 일본, 중국 등 동남아시아권의 나라들이나 건강기능성 식품이 각광받으면서 전 세계적으로 인삼시장에 대한 관심도가 점차 높아지고

있다. 주로 인삼이 소비되는 나라들의 그 추세를 살펴보면 일본은 한국과 달리 뿌리삼형태로의 유통은 거의 없고 제약회사나 건강기능식품의 완제품 형태로 판매되는 것이 특징이고, 미국의 천연물 제품 매출은 2004년 약 52억불에 달하여 전년대비 15%의 고성장을 보이고 있으며, 그 중 인삼제품은 가장 인기 있는 제품 중에 하나이다. 미국 시장 내 소비패턴은 뿌리삼의 형태는 거의 없고 캡슐이나 타정 형태이거나 스낵이나 드링크와 같은 형태의 상품을 선호하고 있으며, 객관적인 인삼효능의 데이터 등을 요구하는 경향이 강하므로 이에 대한 고려가 필요하다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 제1세부 홍문동의 기능성 제품 개발 및 산업화

#### 1. 홍문동의 기능성 제품 개발

##### 가. 기능성 지표 물질의 최적 추출 공정 확립

맥문동의 증숙처리에 따른 홍문동을 제조하고 제조된 홍문동을 활용한 제품의 개발을 위하여 생리활성물질의 추출을 가장 효율적으로 할 수 있는 공정을 확립하고자 하였다. 실험에 사용한 맥문동 괴경(*Liriodopsis tuber*)은 경남 밀양시에서 2010년도에 재배한 것을 4월에 수확하여 선별, 세척 및 60℃에서 열풍 건조시킨 건근을 사용하였으며, 제 1협동의 결과를 토대로 실험을 진행하였다. 맥문동 건근 200g을 150ml의 물을 가하여 증숙기에 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 시간 동안 증숙하여 70℃ 열풍건조기에서 72시간 건조 처리하여 홍문동을 제조하였다. 건조 처리된 홍문동 20g당 1.2L에 해당하는 열수, 80% 메탄올 및 70% 주정을 사용하여 추출을 하였으며, 이에 따른 추출효율은 Table 1과 같았다. 증숙 시간의 차이에 따라 각각 열수, 80% 메탄올 및 70% 주정의 경우에 있어서 차이는 없었으나, 용매의 종류에 따라서는 80% 메탄올이 추출수율이 가장 높았으며 그 다음으로는 70% 주정 및 열수의 순서였다. 그러나 용매 종류에 따른 추출수율은 큰 차이를 보이지 않아 제품 개발시에 주정 및 열수의 사용이 가능한 것으로 판단된다.

또한 열수, 80% 메탄올 및 70% 주정 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 항산화능 측정을 통하여 생리활성물질의 기능성에 대한 판단이 가능하므로 증숙시간 및 용매 종류에 따른 추출물의 항산화능을 측정하였다. 홍문동 추출물에 대한 DPPH radical 소거능은 Fig. 1에서와 같이 증숙시간이 증가함에 따라 증가하였다. 15시간 및 24시간 증숙한 경우에는 큰 차이를 보이지는 않았지만 15시간 증숙하여 제조한 홍문동이 80% 메탄올, 70% 주정, 및 열수에 따라서 각각 39.4%, 49.1% 및 66.5%의 저해율을 나타내 가장 좋게 나타났으며, 제1협동의 결과를 토대로 유추해 볼 때 조사포닌, 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량의 증가에 기인하는 것으로 판단된다. 특히 열수추출물이 다른 종류의 용매를 사용한 경우에 전반적으로 높은 수치를 나타내는 것으로 판단할 때 열수를 이용한 추출방법이 조사포닌, 총폴리페놀 및 총플라보노이드등과 같은 생리활성물질을 가장 효율적으로 이용하는 방법으로 판단된다.

이상의 결과를 종합할 경우 용매 종류에 따른 추출 수율에 대한 차이는 그리 크지 않음을 확인할 수 있었으나, 항산화능에 있어서는 열수를 이용한 홍문동 추출물이 다른 용매에 비해서 높은 항산화능을 나타내며, 또한 차음료 및 파우치 제품의 개발에 있어서는 열수추출이 훨씬 유리하므로 열수추출을 이용하는 것이 음료제품의 공정에 적합한 것으로 판단되었다.

Table 1. 증숙 맥문동(홍문동)의 추출 수율

시료	추출수율(%)		
	80% MeOH	70% 주정	열수추출
NSLT	88.64	87.14	83.26
SLT-3	92.88	88.58	82.00
SLT-6	93.41	93.04	85.08
SLT-9	87.38	91.74	87.08
SLT-12	98.97	91.59	86.41
SLT-15	95.11	90.03	87.05
SLT-18	96.46	89.25	84.86
SLT-21	93.30	85.14	83.98
SLT-24	90.37	88.48	86.18

NSLT, 맥문동; SLT-3, 3시간 증숙 맥문동; SLT-6, 6시간 증숙 맥문동; SLT-9, 9시간 증숙 맥문동; SLT-12, 12시간 증숙 맥문동; SLT-15, 15시간 증숙 맥문동; SLT-18, 18시간 증숙 맥문동; SLT-21, 21시간 증숙 맥문동; SLT-24, 24시간 증숙 맥문동.

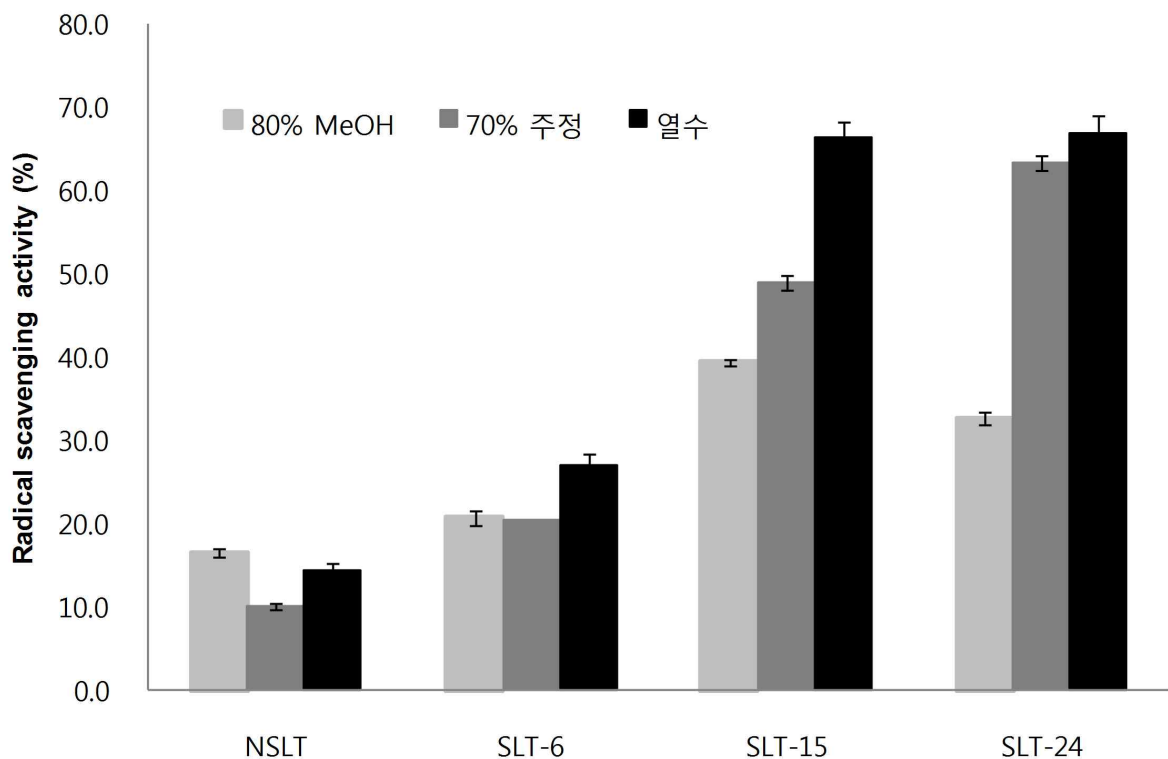


Fig. 1. 증숙 맥문동(홍문동)의 추출 조건에 따른 DPPH radical 소거능

나. 제품의 배합 및 공정 조건 확립

홍문동을 이용한 제품의 개발에 있어서는 용매별 추출 효율성 및 항산화능 결과를 종합하여 볼 때 차음료로의 개발이나 파우치 제품으로의 개발이 가장 적합한 것으로 판단된다. 따라서 차음료 및 파우치 제품으로 개발하기 위하여 열수추출액의 색도 및 고형분의 함량(brix)를 측정하였다. 상기의 조건으로 추출한 열수 추출물의 색도는 색차계를 이용하여 L값 (Lightness), a값 (redness), b값 (yellowness)으로 측정하였으며, 고형분의 함량은 당도계를 사용하여 그 값을 Table 2와 Table 3에 나타내었다. 홍문동을 제조하기 위한 증숙시간이 길어질수록 L값은 급격히 감소하고, a값과 b값은 증가하는 경향을 나타내어 진한 갈색을 나타내었으며, 증숙시간에 따른 고형분 함량의 차이는 거의 없는 것으로 판단되었다.

Table 2. 홍문동 열수 추출물(원액)의 색도 및 당도

시료	Color			Brix (%)
	L	a	b	
NSLT	98.44±0.036 <sup>d</sup>	-0.44±0.030 <sup>a</sup>	3.28±0.032 <sup>a</sup>	1.1
SLT-6	66.87±0.050 <sup>c</sup>	16.91±0.045 <sup>b</sup>	79.04±0.051 <sup>c</sup>	1.6
SLT-15	49.91±0.095 <sup>b</sup>	28.67±0.029 <sup>c</sup>	79.27±0.176 <sup>d</sup>	1.8
SLT-24	32.61±0.059 <sup>a</sup>	34.05±0.038 <sup>d</sup>	55.53±0.126 <sup>b</sup>	1.7

Table 3. 홍문동 열수 추출물(5배 희석)의 색도 및 당도

시료	Color			Brix (%)
	L	a	b	
NSLT	99.66±0.015 <sup>d</sup>	0.01±0.046 <sup>c</sup>	0.65±0.006 <sup>a</sup>	0.2
SLT-6	91.84±0.006 <sup>c</sup>	-2.12±0.056 <sup>a</sup>	30.73±0.025 <sup>b</sup>	0.3
SLT-15	86.25±0.026 <sup>b</sup>	-0.72±0.040 <sup>b</sup>	46.59±0.029 <sup>c</sup>	0.4
SLT-24	79.59±0.020 <sup>a</sup>	3.11±0.066 <sup>d</sup>	59.13±0.055 <sup>d</sup>	0.4

Values are mean ± S.D

<sup>a-d</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

NSLT, 맥문동; SLT-6, 6시간 증숙 맥문동; SLT-15, 15시간 증숙 맥문동; SLT-24, 24시간 증숙 맥문동.

홍문동 열수 추출물을 이용한 차음료를 개발하기 위하여 추출물의 농도에 따른 관능평가를 실시하였다. 일반적으로 차음료의 경우, 젊은층에서 가장 선호도가 높기 때문에 24명의 20대 여성을 대상으로 하여 농도에 따른 관능평가를 수행하였다. 농도에 따른 관능평가의 경우 색, 향, 종합적 기호도 및 구매의향에서 5배로 희석한 0.4 brix의 농도가 가장 높은 선호도를 나타내었으며, 맛에 있어서 단맛, 신맛 및 떫은맛은 원액이 가장 높게 나타났다(Table 4). 원액의 경우 단맛은 많지만 신맛 및 떫은맛과 같은 좋지 않은 맛의 값이 높게 나와 선호도가 낮게 나온 것으로 보인다. 따라서 차음료로 개발에 있어서는 5배정도로 희석한 0.4 brix의 고형분 함량이 가장 적합한 농도로 판단되었으며, 파우치 제품으로 개발하기 위한 원액의 경우에는 신맛 및 떫은맛을 제거하기 위해 다른 원료와의 배합과 같은 방법이 필요한 것으로 판단된다.

Table 4. 홍문동 열수추출물의 농도에 따른 관능평가

희석배수	1배	3배	5배	7배	9배
1. 색	2.67±1.37 <sup>a</sup>	4.33±1.51 <sup>b</sup>	6.67±0.52 <sup>c</sup>	5.17±1.60 <sup>b</sup>	5.00±0.89 <sup>b</sup>
2. 맛 <세부적인 맛 평가>					
① 단 맛	7.67±0.52 <sup>e</sup>	6.67±0.82 <sup>d</sup>	5.50±0.55 <sup>c</sup>	4.50±1.38 <sup>b</sup>	3.00±0.63 <sup>a</sup>
② 쓴 맛	1.83±0.75 <sup>a</sup>	2.33±1.86 <sup>a</sup>	1.83±1.17 <sup>a</sup>	1.67±0.82 <sup>a</sup>	1.67±0.82 <sup>a</sup>
③ 신 맛	4.50±2.59 <sup>b</sup>	4.00±2.10 <sup>ab</sup>	2.50±1.22 <sup>ab</sup>	2.50±1.22 <sup>ab</sup>	2.17±1.17 <sup>a</sup>
④ 떫은 맛	4.00±2.10 <sup>a</sup>	3.17±1.72 <sup>a</sup>	2.50±1.38 <sup>a</sup>	2.67±1.63 <sup>a</sup>	2.33±1.21 <sup>a</sup>
⑤ 감칠 맛	3.33±1.51 <sup>a</sup>	3.67±1.37 <sup>a</sup>	4.00±1.41 <sup>a</sup>	4.17±1.17 <sup>a</sup>	4.17±1.17 <sup>a</sup>
3. 향	3.50±1.38 <sup>a</sup>	4.00±1.26 <sup>a</sup>	5.67±0.82 <sup>b</sup>	4.67±1.03 <sup>ab</sup>	4.00±1.10 <sup>a</sup>
4. 종합적인 기호도	3.67±0.82 <sup>a</sup>	4.83±0.75 <sup>b</sup>	6.67±0.52 <sup>c</sup>	5.17±0.98 <sup>b</sup>	4.50±1.22 <sup>ab</sup>
5. 구매의향	3.17±1.17 <sup>a</sup>	4.33±1.51 <sup>a</sup>	6.83±0.41 <sup>b</sup>	4.50±1.22 <sup>a</sup>	4.00±0.89 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

또한, 증숙시간에 따른 홍문동 열수 추출물에 대한 관능평가를 실시하였다. 홍문동 열수 추출물의 농도에 따른 실험결과를 참고로 하여 증숙시간에 따른 홍문동 열수 추출물을 제조한 후 5배정도 희석하여 0.4 brix로 고형분 농도를 조정 한 후, 상기에서와 같은 방법으로 평가를 수행하였다. Table 5와 같이 증숙시간에 따른 홍문동 열수 추출물의 경우 증숙 시간에 따른 홍문동 음료의 경우 큰 차이를 보이지는 않았지만 전반적으로 15시간 증숙한 경우가 색, 단맛,

종합적 기호도 및 구매의향에서 가장 높은 점수를 얻어 차음료로 사용함에 있어서는 15시간 증숙한 홍문동의 경우가 가장 선호도가 높음을 알 수 있었다. 그리고 제1협동의 연구결과인 생리활성물질의 경향에서 볼 때 15시간 이상 증숙한 경우에는 생리활성물질의 함량이 높으며, 그 이상의 증숙에서는 거의 비슷한 경향을 나타내므로 15시간 증숙하여 제조한 홍문동을 이용한 차음료의 제조가 기호도 및 생리활성성분의 증대라는 두 가지 관점에서 볼 때 가장 최적의 음료 제조를 위한 조건으로 판단된다. 따라서 이러한 조건을 이용하여 차음료를 생산하고자 한다.

이상의 결과를 종합적으로 판단해 볼 때, 홍문동 열수 추출물을 이용한 차음료 및 파우치의 생산이 효과적인 것으로 사료된다. 그리고, 본 기관의 연구와 제1협동의 연구결과를 종합적으로 판단할 경우 조사포닌 등과 같은 생리활성물질에 기초를 둔 제품의 개발에 있어서는 15시간 증숙처리한 홍문동을 이용하여 열수 추출물을 제조하고 이의 농도를 0.4 brix로 조정하는 것이 최적인 것으로 판단된다. 또한 본 기관의 연구와 제3협동의 연구결과를 종합적으로 판단할 경우, 인지능력을 개선 및 항당뇨를 위한 제품의 개발에 있어서는 각각 7회 및 9회 증숙과 건조를 반복하여 제조한 홍문동을 활용하여 제품을 개발하는 것이 효과적인 것으로 보이며, 이를 활용한 파우치 제품을 생산하기 위해서는 다른 재료와의 조합을 통해서 맛의 개선이 조금은 필요한 것으로 판단된다.

Table 5. 증숙시간에 따른 홍문동 열수 추출물의 관능평가

	NSLT	SLT-6	SLT-15	SLT-24
1. 색	3.54±1.59 <sup>a</sup>	6.00±1.25 <sup>c</sup>	6.38±1.64 <sup>c</sup>	4.96±1.43 <sup>b</sup>
2. 맛 <세부적인 맛 평가>				
① 단 맛	3.63±1.74 <sup>a</sup>	4.54±1.89 <sup>ab</sup>	5.17±1.74 <sup>b</sup>	5.04±2.05 <sup>b</sup>
② 쓴 맛	2.29±1.55 <sup>NS</sup>	2.46±1.44	2.58±1.53	2.83±1.61
③ 신 맛	2.63±1.64 <sup>NS</sup>	2.25±1.22	2.42±1.79	3.25±2.21
④ 떫은 맛	2.88±1.57 <sup>NS</sup>	3.00±1.72	2.88±1.75	3.71±1.78
⑤ 감칠 맛	3.54±1.79 <sup>NS</sup>	4.00±1.74	4.38±1.91	4.58±1.89
3. 향	4.54±1.59 <sup>NS</sup>	4.58±1.28	4.92±1.28	4.63±1.35
4. 종합적인 기호도	4.17±1.69 <sup>a</sup>	4.88±1.60 <sup>ab</sup>	5.54±1.47 <sup>b</sup>	4.54±1.32 <sup>a</sup>
5. 구매의향	3.33±1.99 <sup>a</sup>	4.29±1.68 <sup>ab</sup>	5.00±1.79 <sup>b</sup>	4.25±1.51 <sup>ab</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-b</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

NSLT, 맥문동; SLT-6, 6시간 증숙 맥문동; SLT-15, 15시간 증숙 맥문동; SLT-24, 24시간 증숙 맥문동.



다. 홍문동 제품의 대량생산을 위한 공정 표준화 체계 구축

주관기관 및 세부협동과제의 연구 결과를 바탕으로 홍문동 활용한 기능성 가공제품을 개발하고자 하였으며, 개발 제품의 현황 및 조건은 Table 6과 같다. 홍문동 제품의 경우는 차음료, 액기스, 및 농축액의 3가지 제품을 개발하고자 하며, 차음료의 경우에 여러 가지 기능성 성분이 들어있기는 하지만, 일반적으로 사용하는 340mL의 용기를 기준으로 할 경우, 5kcal미만이므로 0 kcal로 무칼로리 음료에 해당하며, 액기스는 홍삼 및 인삼 파우치 대체 제품으로 개발이 가능하며, 농축액의 경우 주정을 이용한 추출을 통하여 사포닌 계열의 물질 및 당류 등을 포함하고 있어 피로회복 및 인지개선의 기능을 나타내는 것으로 판단된다.

Table 6. 홍문동 가공제품의 개발

구분	발효 및 추출조건	기능성물질 및 특징	효능
홍문동음료	재료 : 홍문동 건근 제조방법 : 열수추출 조건 : 최종 농도 0.4brix 내외	저칼로리	→ 다이어트
홍문동액기스	재료 : 홍문동 건근 제조방법 : 열수추출 조건 : 최종 농도 4.2brix 내외	Phenolic compound Flavonoid compound 소당류 및 올리고당 등	→ 항당뇨/ 인지개선
홍문동 농축액	재료 : 홍문동 건근 제조방법 : 주정 추출후 농축	saponin, 소당류 및 올리고당 등	피로회복/ 인지개선

### (1) 홍문동 차음료

홍문동을 활용한 제품생산은 차음료로의 생산이 가장 적합한 것으로 판단되므로 이를 수행하기 위해서는 제품의 유형, 제품명의 선정, 제품용기의 선택, 제품 디자인 및 제품의 영양성분 분석이 필요하다.

#### (가) 제품명 및 디자인

제품의 유형은 식품공전에 따라 액상차의 형태이며, 제품명의 선정을 위해서는 홍문동 차음료가 가지고 있는 특징을 토대로 네이밍을 한 결과 “달콤한 오후의 茶”로 정하였다.

차음료 제품의 경우는 젊은 층이 선호하며 일반적으로 340ml정도의 내열병을 선호하므로 아래의 예시와 같은 병을 선정하여 이 크기에 맞는 디자인의 도안을 수행하였으며 그 디자인은 Fig. 2와 같다.



<예시 : 340ml 내열성 PET병>



Fig. 2. 홍문동 차음료의 디자인 도안

(나) 시험성적서

다음으로 “달콤한 오후의 茶”에 표시되어야 하는 영양성분의 분석의 경우는 식품의약품안전청에서 지정한 검사기관에서만 분석이 가능하고 또한 이를 제품에 표기할 수 있기 때문에 식품의약품안전청에서 검사기관으로 허가받은 중부대학교 산학협력단의 생명과학연구센터에 현재 분석을 의뢰하였다. 시험분석의 내용은 열량, 탄수화물, 단백질, 지방, 나트륨, 포화지방, 트랜스지방, 당, 콜레스테롤 및 조사포닌의 함량을 분석 의뢰하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같다. 홍문동으로 제조할 경우 맥문동에 비하여 조사포닌의 함량이 제1협동의 결과에서와 같이 증가하므로 조사포닌의 함량을 홍보하기 위해서 조사포닌의 함량을 분석의뢰한 결과, 음료 100ml 당 조사포닌 함량이 25mg 으로 나타났으며, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤을 포함하지 않은 것으로 나타났다. 또한, 차음료의 성분 규격과 관련하여 중금속과 관련된 품질 검사를 수행한 성적서는 Fig. 4와 같으며 차음료의 규격에 부합하는 결과를 나타내었다.



## 시험 성적서

발급번호 : 생참1105- 104		2011년 5월 9일	
접수번호	12-1104-417	접수일자	2011년 4월 28일
시료명	달콤한오후의茶	검사구분	참 고 용

의뢰자 (제조업소 등 기관명)	산동농협가공공장		
소재지 (연락처)	경남 밀양시 단장면 단장리 781		055-351-0420

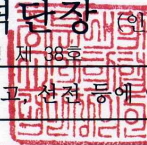
### 시험 결과

검사항목	결과	%영양소기준치
열량	1.27 kcal/100g	
탄수화물	0.25 g/100g	0.1%
단백질	0.00 g/100g	0.0%
지방	0.03 g/100g	0.1%
나트륨	10.08 mg/100g	0.5%
포화지방	0.00 g/100g	0.0%
트랜스지방	0.00 g/100g	-
당	0.23 g/100g	-
콜레스테롤	0.00 mg/100g	0.0%
조사포닌	0.25 mg/g	-

2011년 5월 9일

**중부대학교 산학협력단장**

식품의약품안전청 식품위생검사기관지정 제 38호



□ 이 성적은 제시된 검체에 한하며, 시험의뢰 목적 외의 광고, 선전 등에 이용 할 수 없음

Fig. 3. '달콤한 오후의 茶' 시험성적서

품질검사 성적서			
접수번호	2001-2011 05-24251	검사목적	기타검사
접수일자	2011년 5월 24일	검사완료일	2011년 5월 31일
의뢰처명	산동농협 대추가공공장	대표자	손문규
의뢰처주소	경남 밀양시 단장면 단장리781		
제품명	달콤한 오후의 차	식품유형	액상차
제조일자	2011년 5월 23일	유통기한	2012년 5월 22일
참고사항			

◎ 시험성적

시험항목	기준치	검사결과	항목판정
납(mg/kg)	0.30이하	불검출	적합
카드뮴(mg/kg)	0.1 이하	불검출	적합
비소(mg/kg)		불검출	무판정
수은(mg/kg)		0.00	무판정

<b>판 정</b>	<b>무판정</b>
※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함. 본 성적서는 기타검사로 의뢰된 검사항목에 한함.	
○ 비 고	납, 카드뮴, 비소, 수은
<p style="text-align: center;">의뢰하신 제품의 검사결과를 위와 같이 통지합니다.</p> <p style="text-align: center;">2011년 5월 31일</p> <p style="text-align: center;">시험원 : 김 진 영                                  기술책임자 : 김 준 성</p> <p style="text-align: center;"><b>농협중앙회 식품안전연구원장</b></p> <p style="text-align: center;">※식품안전연구원 전화번호 : 02-570-5000 , 팩스 : 02-2057-5645</p> <p style="text-align: center;">본 성적서는 의뢰된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 및 상업용에 사용할 수 없습니다.</p>	

Fig. 4. '달콤한 오후의 차' 품질검사 성적서

(다) 소비자 조사 및 기호도 조사

홍문동 차음료에 대한 제품 또는 시제품을 대상으로 소비자 및 기호도 조사를 수행하기 위하여 아래와 같이 설문지를 작성하였다. 본 설문지를 통해 홍문동 차음료 제품인 “달콤한 오후의 茶”에 대한 제품 분석을 수행하고 이에 대한 피드백을 다시 제품에 반영하여 완성도가 높은 제품을 만들고자 한다.

<< 차음료 신제품 개발을 위한 선호도 조사 >>

안녕하세요. 본 설문지는 밀양시 산동농협에서 개발한 ‘차음료 신제품 개발’이라는 주제로 대중의 차음료 선호도 조사를 위한 것입니다. 응답해 주신 설문 내용은 분석용 이외에는 절대 사용되지 않을 것을 약속드립니다. 바쁘시더라도 성심성의껏 답해주시면 감사하겠습니다.

◎ 다음은 설문 조사 분석에 필요한 간단한 인적 사항에 관한 질문입니다.

1) 성별은?

- ① 여 ② 남

2) 나이는?

- ① 10대 ② 20대 ③ 30대 ④ 40대 ⑤ 50대 이상

3) 차 음료를 구매한 경험이 있습니까?

- ① 예 ② 아니오

3)번의 ①을 선택하신 분은 아래의 설문에 대답해 주시기 바랍니다.

◎ 다음은 소비자들의 소비행태에 관한 질문입니다.

1) 다음 중 차 음료를 구매 시 제품 선택에 가장 큰 영향을 미치는 요인을 선택해 주시기 바랍니다.

- ① 경험상 가장 맛있다고 기억되는 제품  
② 제조 회사를 믿을 수 있다고 생각되는 제품  
③ 광고를 많이 하는 제품

- ④ 매장에 가장 많이 진열되어 있는 제품
- ⑤ 포장 디자인이 가장 마음에 드는 제품
- ⑥ 가장 최근에 나온 신제품
- ⑦ 가격이 싼 제품
- ⑧ 용량이 큰 제품
- ⑨ 기타( )

◎ 다음은 '달콤한 오후의 茶' 제품에 관한 평가입니다. 5점 척도(매우 그렇지 않음, 그렇지 않음, 보통, 그러함, 매우 그러함)로 평가해 주십시오.

1 '달콤한 오후의 茶' 제품이 새로운 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
 매우 그렇지 않음      보통                      매우 그러함

2) '달콤한 오후의 茶' 제품이 독특한 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
 매우 그렇지 않음      보통                      매우 그러함

3) '달콤한 오후의 茶' 제품이 관심과 흥미를 불러일으키는 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
 매우 그렇지 않음      보통                      매우 그러함

4) '달콤한 오후의 茶' 제품에 대한 전반적인 기호도가 우수하다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
 매우 그렇지 않음      보통                      매우 그러함

5) '달콤한 오후의 茶' 제품을 구매하고 싶다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
 매우 그렇지 않음      보통                      매우 그러함

◎ 다음은 '달콤한 오후의 茶' 제품 패키지 디자인에 관한 평가입니다. 5점 척도(매우 그렇지 않음, 그렇지 않음, 보통, 그러함, 매우 그러함)로 평가해 주십시오.

1) '달콤한 오후의 茶' 제품의 패키지 디자인이 세련된 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
 매우 그렇지 않음      보통                      매우 그러함

2) '달콤한 오후의 茶' 제품의 패키지 디자인이 고급스러운 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
매우 그렇지 않음            보통            매우 그러함

3) '달콤한 오후의 茶' 제품의 패키지 디자인이 독특한 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
매우 그렇지 않음            보통            매우 그러함

4) '달콤한 오후의 茶' 제품의 패키지 디자인이 눈에 잘 띄는 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
매우 그렇지 않음            보통            매우 그러함

5) '달콤한 오후의 茶' 제품의 패키지 디자인에 제품의 특성이 잘 나타나 있는 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
매우 그렇지 않음            보통            매우 그러함

6) '달콤한 오후의 茶' 제품의 패키지 디자인의 전체적 구성이 잘 되어있는 것 같다.

①            ②            ③            ④            ⑤            \_\_\_\_\_  
매우 그렇지 않음            보통            매우 그러함

◎ 다음은 '달콤한 오후의 茶' 제품에 대한 가격 민감도에 관한 설문입니다.

1) 다음 중 보통 구입하시는 음료의 가격을 선택해 주시기 바랍니다.

- ① 1000원 미만    ② 1000원 이상~1300원 미만    ③ 1300원 이상~1600원 미만  
④ 1600원 이상~2000원 미만    ⑤ 2000원 이상

2) '달콤한 오후의 茶' 제품의 적당한 가격대는 어느정도라고 생각하십니까?

- ① 1000원 미만    ② 1000원 이상~1300원 미만    ③ 1300원 이상~1600원 미만  
④ 1600원 이상~2000원 미만    ⑤ 2000원 이상

◆ 설문에 응해 주셔서 감사합니다 ◆

홍문동 음료인 '달콤한 오후의 茶'에 대한 제품 선호도 조사를 분석한 결과 조사 대상자의 100%가 음료를 구매한 경험이 있었다고 응답하였으며, 차음료 구매 시 제품 선택에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로는 경험과 광고였으며 (Fig. 5A) 이 중 응답자의 78.6%가 경험을 바탕으로 음료를 선택하며 소비자는 제품 구매 시 여러 가지 음료 중 자신이 가장 맛있다고 기억되어지는 제품을 지속적으로 선택하며 이는 제품을 개발하는데 있어 가장 대중적인 소비자의 기호도에 맞출 필요가 있음을 시사한다. Fig. 5B와 같이 '달콤한 오후의 茶'에 대한 평가 소비자 선호도 조사 결과는 제품에 대한 신선함과 독특함, 관심도가 다른 항목에 비하여 높은 평가를 받았으며 이는 시판되는 차음료의 재료와 증숙 맥문동을 이용한 음료의 재료의 신선함과 증숙을 이용한 방법의 차별성에 따른 관심도가 증가로 인한 결과로 보여진다. 그리고 실제로 '달콤한 오후의 茶'를 음용 후 기호도가 높게 나타나 이는 '달콤한 오후의 茶'가 대중적인 기호도를 충족시키며 기를 가지고 있음을 시사하며 구매의향에서도 매우그러함(7.1%), 그러함 (14.3%) 보통 (42.9%)로 제품의 신선함, 다른 제품과의 차별성, 관심도, 기호성과 높은 구매의향을 나타내어 증숙맥문동을 이용한 '달콤한 오후의 茶'에 대한 소비자의 평가는 높은 것으로 나타나 향후 제품 디자인 및 마케팅 부분에서도 이러한 소비자의 관심도를 반영할 필요성이 요구되어진다. 제품의 가격면에서는 소비자가 주로 차음료를 구매하는 가격은 1000원~1300원 미만인 57.1%로 가장 높았으며 92% 이상이 1000원 이상의 가격에서 차음료 제품을 구매하고 있는 것으로 나타났다. 소비자가 생각하는 '달콤한 오후의 茶'의 적당한 가격은 50%가 1000원~1300원 미만으로 기존의 차음료를 구매하는 가격과 비슷한 수준을 선택하였다.

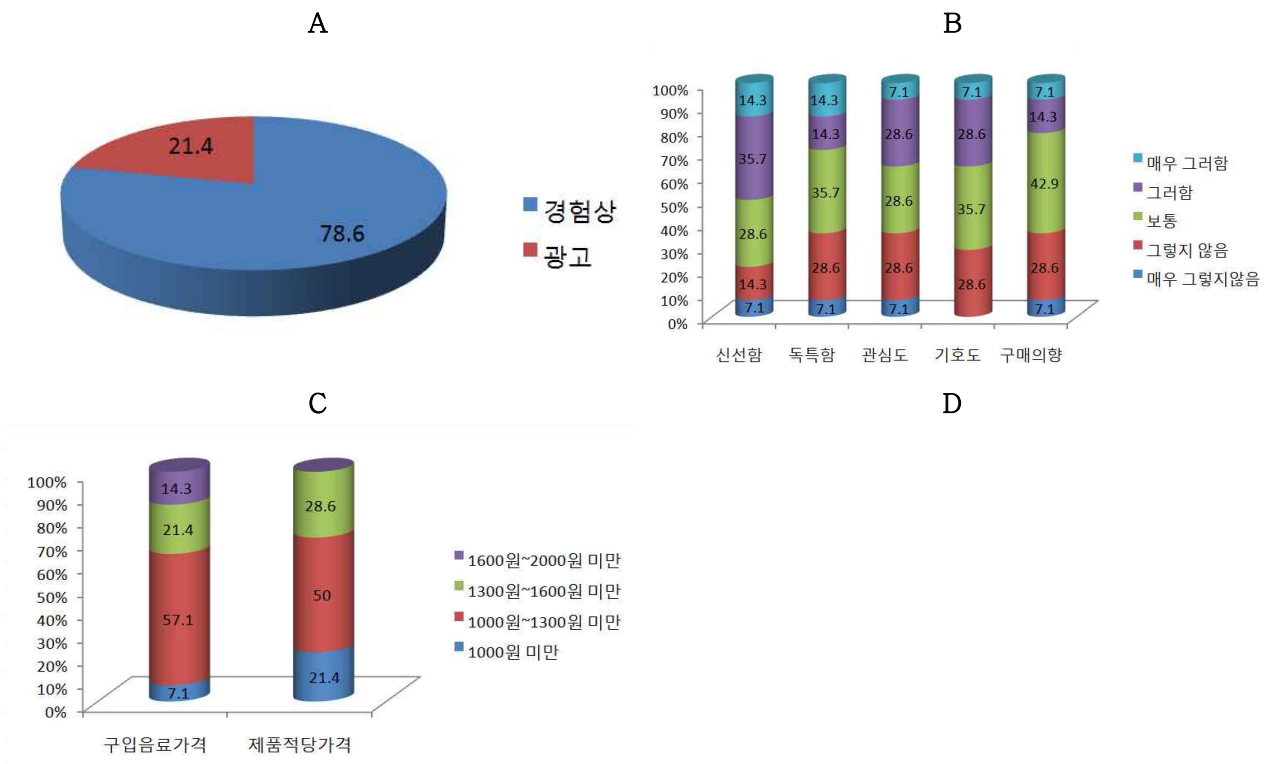


Fig. 5. 홍문동 차음료의 선호도 조사

A, 제품선택 요인; B, 제품평가; C, 가격민감도



홍문동 음료인 “달콤한 오후의 茶” 소비자 기호도를 알아보기 위하여 타사의 동일한 유형의 액상차를 무작위로 선정하여 차음료의 선호도가 높은 젊은층인 20대 여성을 대상으로 하여 관능평가를 수행하였다. 그 결과는 Table 7와 같으며, 일반적으로 “달콤한 오후의 茶”가 타사 제품에 비해 단 맛, 감칠 맛, 향, 종합적인 기호도 및 구매의향에서 높지 않은 것으로 나타났는데 이는 홍문동 원액의 경우 단맛은 많지만 감칠맛과 향이 뒷받침되지 못하는 것에 의한 것으로 생각되며 타사 제품과 경쟁력을 가지기 위해서는 다른 원료와의 배합을 통해 그에 따른 향과 감칠맛을 보완해야할 필요가 있다고 판단된다. 관능평가와 더해서 각 음료의 색도와 고형분 함량을 측정하였다. 색도는 색차계를 이용하여 L값 (Lightness), a값 (redness), b값 (yellowness)으로 측정하였으며, 고형분의 함량은 당도계를 사용하여 그 값을 Table 8에 나타내었다. “달콤한 오후의 茶”와 다른 제품군에서의 색도는 유의적 차이가 있었으며 b value가 유의적으로 높게 나타났고, 이는 음료의 원재료에 따른 차이로 판단되며 Table 7의 결과에서 관능적 색도 평가에서 높은 점수를 나타내었다. 제품에 따른 고형분 함량의 차이는 달콤한 오후의 차는 A제품과 동일한 고형분 함량을 나타냈으며 C제품의 고형분 함량보다 유의적으로 낮게 나타났다.



Fig. 6. 차음료 제품사진  
A, C : 타사 제품; B : 홍문동 음료

Table 7. 제품별 차음료의 관능평가

음료	A	B	C
1. 색	5.79±1.31 <sup>b</sup>	6.64±1.01 <sup>c</sup>	4.57±1.09 <sup>a</sup>
2. 맛 <세부적인 맛 평가>			
① 단 맛	5.50±1.16 <sup>b</sup>	4.64±1.60 <sup>ab</sup>	3.79±1.31 <sup>a</sup>
② 쓴 맛	2.43±1.34 <sup>a</sup>	2.71±1.73 <sup>a</sup>	3.36±1.98 <sup>a</sup>
③ 신 맛	2.50±2.03 <sup>a</sup>	2.07±1.27 <sup>a</sup>	2.36±1.65 <sup>a</sup>
④ 떫은 맛	2.93±1.73 <sup>a</sup>	3.00±1.71 <sup>a</sup>	3.93±2.02 <sup>a</sup>
⑤ 감칠 맛	5.29±1.44 <sup>b</sup>	3.71±1.77 <sup>a</sup>	3.93±1.21 <sup>a</sup>
<종합적인 맛 평가>	5.43±1.09 <sup>b</sup>	5.14±1.17 <sup>ab</sup>	4.43±1.34 <sup>a</sup>
3. 향	5.86±1.46 <sup>a</sup>	4.86±1.17 <sup>a</sup>	4.79±1.67 <sup>a</sup>
4. 종합적인 기호도	6.14±1.17 <sup>b</sup>	5.14±1.10 <sup>a</sup>	4.71±1.20 <sup>a</sup>
5. 구매의향	5.29±1.73 <sup>b</sup>	4.93±1.59 <sup>ab</sup>	3.79±1.31 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

Table 8. 차음료의 색도 및 당도

Sample	Color			Brix (%)
	L	a	b	
A	77.47±0.117 <sup>a</sup>	6.83±0.090 <sup>c</sup>	46.93±0.058 <sup>b</sup>	0.4 <sup>b</sup>
B	78.04±0.070 <sup>b</sup>	4.81±0.107 <sup>b</sup>	59.52±0.060 <sup>c</sup>	0.4 <sup>b</sup>
C	91.14±0.284 <sup>c</sup>	-2.87±0.049 <sup>a</sup>	33.21±0.108 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.01 level of significance.

타사 음료와 비교한 관능평가에서 나타난 감칠맛과 향의 부족한 부분을 보완하기 위해 증숙 맥문동 음료인 '달콤한 오후의 茶'에 170℃에서 로스팅한 맥문동을 열수 추출하여 혼합한 후 관능평가를 실시하였다(Fig. 7 및 Table 9). 그 결과 '달콤한 오후의 茶'에 로스팅된 맥문동이 25% 첨가되었을 때 단 맛 뿐 아니라 감칠맛, 종합적인 평가, 향, 종합적인 기호도, 구매의향이 유의적으로 높게 나타나 이는 로스팅된 맥문동이 구수한 맛과 향기를 증가시켜 그에 따른 증숙 맥문동의 감칠맛과 기호성을 상승시킨 결과라고 보여진다.

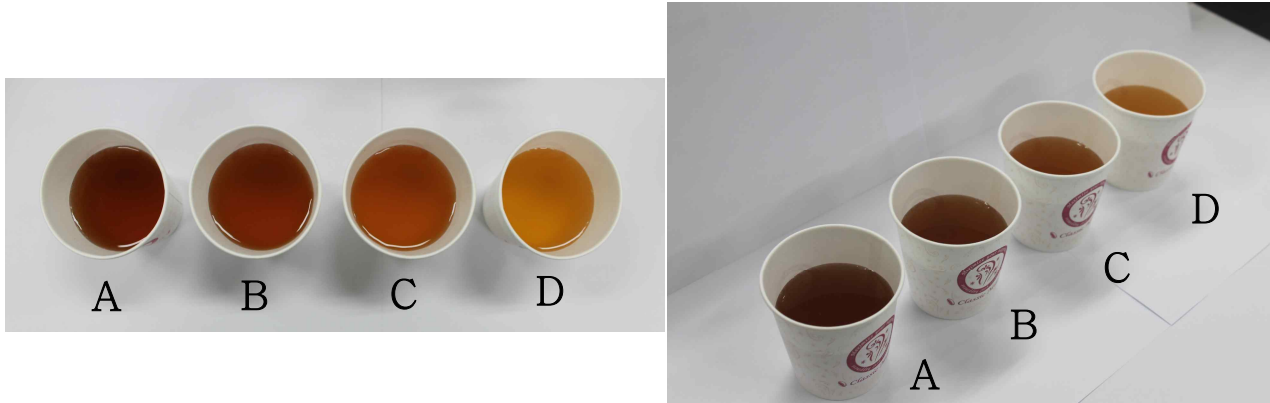


Fig. 7. 배합 조절에 따른 홍문동 액상차의 제품

- A : 홍문동 액상차 100%
- B : 홍문동 액상차 75% + 로스팅 맥문동 차 25%
- C : 홍문동 액상차 50% + 로스팅 맥문동 차 50%
- D : 홍문동 액상차 25% + 로스팅 맥문동 차 75%

Table 9. 홍문동 음료의 배합 조절에 따른 관능평가

음료	A	B	C	D
1. 색	4.50±0.84 <sup>a</sup>	6.00±1.10 <sup>b</sup>	6.33±1.21 <sup>b</sup>	4.17±1.33 <sup>a</sup>
2. 맛 <세부적인 맛 평가>				
① 단 맛	5.83±0.98 <sup>b</sup>	6.33±0.52 <sup>b</sup>	4.00±1.26 <sup>a</sup>	3.83±1.17 <sup>a</sup>
② 쓴 맛	2.83±1.83 <sup>a</sup>	2.50±1.76 <sup>a</sup>	2.33±1.21 <sup>a</sup>	2.00±0.89 <sup>a</sup>
③ 신 맛	3.33±1.75 <sup>a</sup>	2.83±1.94 <sup>a</sup>	2.83±1.83 <sup>a</sup>	2.67±1.37 <sup>a</sup>
④ 떫은 맛	3.67±1.63 <sup>b</sup>	2.83±0.98 <sup>ab</sup>	2.50±0.84 <sup>ab</sup>	2.00±0.89 <sup>a</sup>
⑤ 감칠 맛	5.00±1.10 <sup>a</sup>	6.00±1.67 <sup>a</sup>	4.17±2.04 <sup>a</sup>	4.83±2.14 <sup>a</sup>
<종합적인 맛 평가>	4.67±1.03 <sup>a</sup>	6.33±1.21 <sup>b</sup>	4.00±1.79 <sup>a</sup>	4.50±1.05 <sup>a</sup>
3. 향	4.50±0.84 <sup>a</sup>	6.00±0.89 <sup>b</sup>	3.83±1.17 <sup>a</sup>	5.00±1.41 <sup>ab</sup>
4. 종합적인 기호도	4.67±1.37 <sup>a</sup>	6.33±0.82 <sup>b</sup>	3.83±1.47 <sup>a</sup>	4.00±0.89 <sup>a</sup>
5. 구매의향	5.00±1.10 <sup>ab</sup>	6.33±1.03 <sup>b</sup>	3.83±1.72 <sup>a</sup>	4.00±0.89 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-b</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

(2) 홍문동 액기스 제품

차음료 이외에 활용가능성이 높은 제품으로는 액기스 형태의 파우치 제품으로, 일반적인 홍삼의 파우치 제품과 유사한 형태로 간편하게 음용할 수 있도록 개발하였다.

(가) 디자인

차음료 이외의 파우치 제품의 생산을 위한 디자인을 도안하였으며 Fig. 8과 9에 나타내었다.



Fig. 8. '홍문동 액기스'의 디자인 도안



Fig. 9. '홍문동 액기스'의 제품사진

(나) 기호도 조사

홍문동 농축음료인 '홍문동 액기스'의 소비자 기호도를 알아보기 위하여 타사의 동일한 유형의 농축음료를 무작위로 선정하여 관능평가를 수행하였다. 그 결과는 Table 10과 같으며, 일반적으로 '홍문동 액기스'가 타사 제품에 비해 색, 단 맛, 감칠 맛, 향, 종합적인 기호도 및 구매의향이 높은 것으로 나타났는데 이는 타사 제품은 맛이 쓰거나 달거나 또는 원재료의 맛과 향이 강하게 나는데 비해 "홍문동 액기스"는 그 본연의 맛이 강하지 않으며 다른 제품과는 다르게 첨가물에 의한 과도한 단맛을 억제하고 증숙에서 기인한 단맛이 적절하게 조화되어 다른 제품에 비하여 기호도와 종합적인 평가가 유의적으로 높게 나타났을 것이라 생각되어지며, 이에 따라 각 음료의 색도와 고형분 함량을 측정하였다. 색도는 색차계를 이용하여 L값 (Lightness), a값 (redness), b값 (yellowness)으로 측정하였으며, 고형분의 함량은 당도계를 사용하여 그 값을 Table 11에 나타내었다. '홍문동 액기스'는 전반적으로 진한 갈색을 띄며 색도 측정을 위해 2배 희석한 C음료와 그 값이 비슷함을 알 수 있었으며 나머지 B와 D음료와는 그 색의 유의적인 차이가 나타났다. 고형분 함량은 '홍문동 액기스'와 D음료가 비슷했으며 음료 B의 경우 유의적으로 낮게 나타났으며 음료 C의 경우 유의적으로 높게 나타났다.

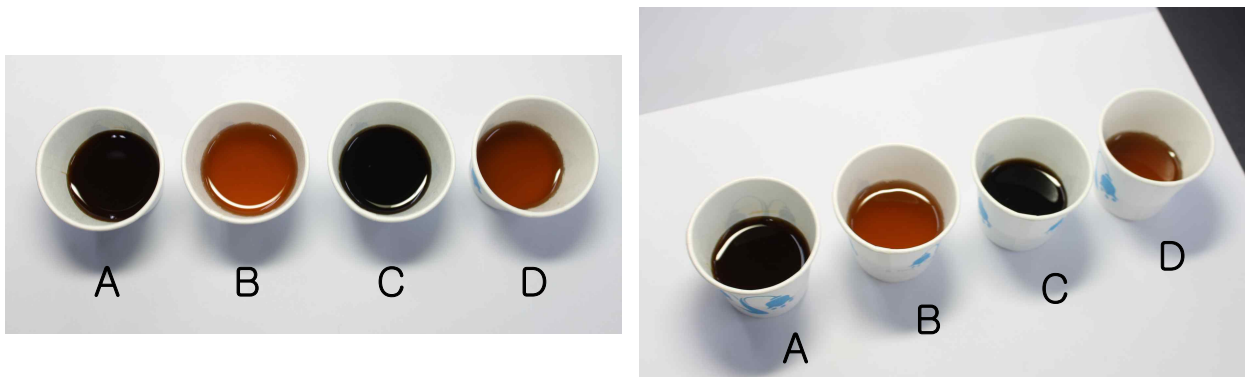


Fig. 10. 농축음료 제품사진

A: 홍문동 액기스; B~D : 타사 제품

Table 10. 홍문동 액기스 제품의 관능평가

음료	A	B	C	D
1. 색	4.85±1.91 <sup>ab</sup>	4.62±1.61 <sup>ab</sup>	3.38±2.06 <sup>a</sup>	5.08±1.50 <sup>b</sup>
2. 맛 <세부적인 맛 평가>				
① 단 맛	5.62±1.61 <sup>d</sup>	1.92±0.95 <sup>a</sup>	5.54±2.47 <sup>c</sup>	3.46±1.71 <sup>b</sup>
② 쓴 맛	3.69±1.44 <sup>a</sup>	7.85±1.86 <sup>c</sup>	5.62±2.36 <sup>b</sup>	4.85±2.27 <sup>ab</sup>
③ 신 맛	3.54±2.40 <sup>a</sup>	3.62±2.33 <sup>a</sup>	3.83±2.44 <sup>a</sup>	4.00±2.42 <sup>a</sup>
④ 떫은 맛	3.23±1.17 <sup>a</sup>	6.08±1.89 <sup>b</sup>	4.54±2.15 <sup>a</sup>	4.08±2.18 <sup>a</sup>
⑤ 감칠 맛	3.77±1.36 <sup>a</sup>	3.00±1.47 <sup>a</sup>	3.69±1.49 <sup>a</sup>	3.69±1.32 <sup>a</sup>
<종합적인 맛 평가>	5.08±1.55 <sup>b</sup>	3.00±1.63 <sup>a</sup>	4.00±2.00 <sup>ab</sup>	3.77±1.30 <sup>ab</sup>
3. 향	4.92±1.26 <sup>b</sup>	2.92±1.66 <sup>a</sup>	3.46±1.98 <sup>a</sup>	3.92±1.66 <sup>ab</sup>
4. 종합적인 기호도	5.08±1.55 <sup>b</sup>	2.54±0.97 <sup>a</sup>	3.31±1.80 <sup>a</sup>	3.62±1.26 <sup>a</sup>
5. 구매의향	4.23±1.69 <sup>c</sup>	1.46±0.88 <sup>a</sup>	2.69±2.10 <sup>ab</sup>	3.15±1.68 <sup>bc</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-d</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

Table 11. 홍문동 액기스 제품 및 타사제품의 갈변도 및 색도

Sample	Color			Brix (%)
	L	a	b	
A	0.34±0.040 <sup>a</sup>	4.52±0.208 <sup>a</sup>	0.54±0.023 <sup>a</sup>	4.2 <sup>b</sup>
B	38.72±0.010 <sup>d</sup>	18.62±0.076 <sup>c</sup>	57.31±0.116 <sup>d</sup>	2.23 <sup>a</sup>
C	1.38±0.235 <sup>b</sup>	8.51±1.260 <sup>b</sup>	2.35±0.391 <sup>b</sup>	27.13 <sup>c</sup>
D	27.04±0.532 <sup>c</sup>	20.67±0.049 <sup>d</sup>	43.56±0.756 <sup>c</sup>	4.2 <sup>b</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-d</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.01 level of significance.



(다) 소비자 조사

홍문동 액기스 제품의 선호도 조사는 Fig. 11과 같으며, 응답자 중 57.1%가 음료를 구매한 경험이 있었다. 농축음료 구매 시 제품 선택에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로는 경험과 제조 회사였는데, 이 중 경험이 가장 큰 비중을 차지했다. 소비자는 제품 구매 시 여러 가지 음료 중 자신에게 가장 적합하다고 기억되어지는 제품을 지속적으로 선택하며 이는 제품을 개발하는데 있어 가장 대중적인 소비자의 기호도에 맞출 필요가 있음을 시사한다.

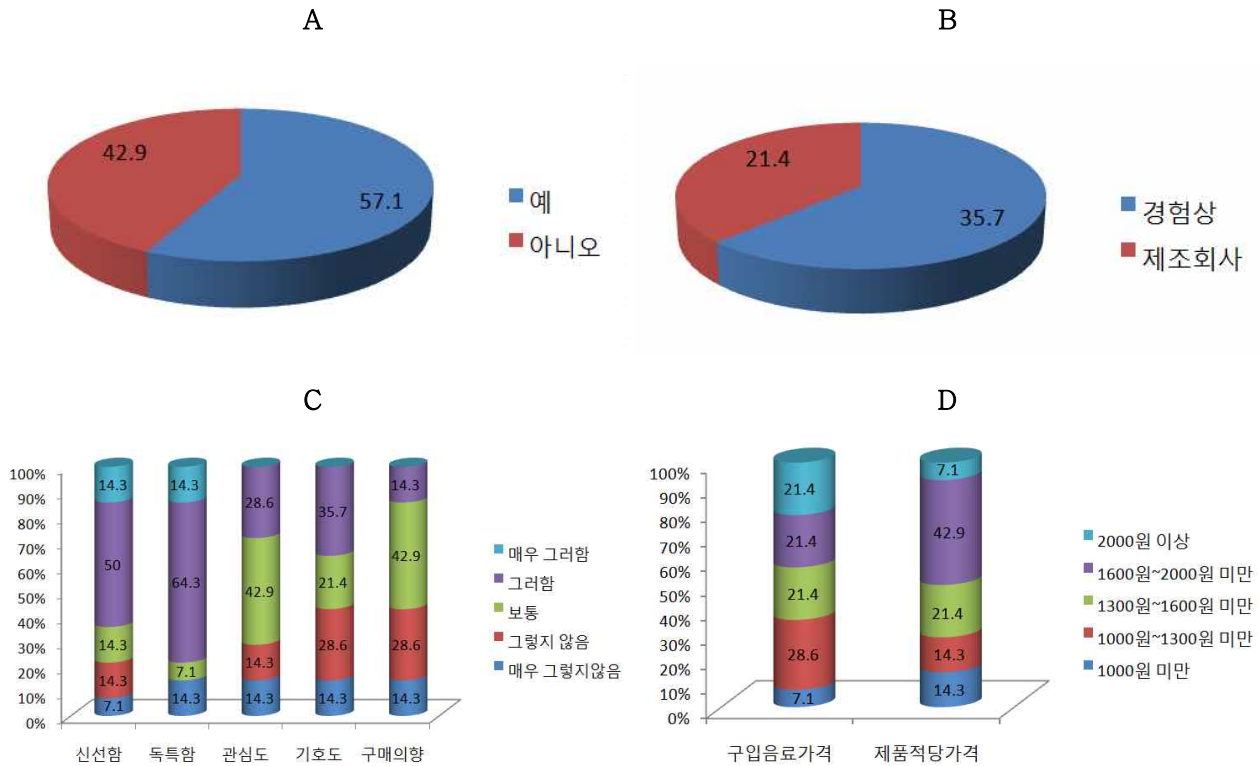


Fig. 11. 홍문동 액기스 제품의 선호도 조사

A, 제품구매 경험; B, 제품선택요인; C, 제품평가; D, 가격민감도

(3) 홍문동 농축액 제품

홍문동 농축액 제품은 주정으로 추출후 농축한 제품으로 사포닌, 소당류 및 올리고당을 함유하고 있어서 피로회복을 위한 제품으로 개발하고자 하였으며, 소량을 열수에 녹여서 차형태로 음료하도록 개발하였으며, 농축액의 시제품 및 디자인 도안은 Fig. 12와 13과 같다.



Fig. 12. 홍문동 농축액 시제품 사진



Fig. 13. 홍문동 농축액의 디자인 도안

## 2. 발효 맥문동 기능성 제품 개발

### 가. 기능성 지표 물질의 최적 추출 공정 확립

일반적으로 식물체에 존재하는 페놀성 화합물은 phenolic hydroxyl group으로 인하여 단백질과 결합하는 성질 및 항산화 효과 등을 가지는 이차대사산물로서, 식물체 발효에 있어 주요한 기능성 지표성분 중 하나이다. 따라서 맥문동 추출물(열수 및 고압열수추출물)을 젖산발효시키면서 총페놀성 화합물의 함량 변화를 조사하였다. 즉, 제 2 협동과제에서 선정된 젖산균 (*Lactobacillus plantarum* K31 및 *Lactobacillus brevis* DD1)들을 발효종균(5%, v/v 접종)으로 이용하여 각 발효방법(진탕 및 정치)에 따른 총페놀성 화합물의 함량 변화는 Fig. 14 및 Fig. 15에서 보는 바와 같다. 열수 및 고압 열수추출물 중 총당 15% 및 10%로 조정한 발효액의 경우, DD1 균주와 K31 균주는 진탕 및 정치배양에서 발효시간 경과에 따라 총페놀성 화합물의 함량이 감소하다가 증가하는 경향을 나타내었으나 발효 초기보다 총페놀성 화합물의 함량이 높지는 않았다. 그 외 다른 경우는 모두 발효시간 경과에 따라 총페놀성 화합물의 증가를 동반하였으며, 그 함량은 발효 초기보다 높았다. 특히 추출원액을 발효한 경우, 발효시간 경과에 따라 총페놀성 화합물의 함량이 크게 증가하였다. 따라서 본 실험에 사용한 발효균주는 맥문동 추출물에 함유된 총페놀성 화합물의 함량 감소에 크게 영향을 미치지 않을 뿐만 아니라 발효액의 종류에 따라 오히려 그 함량을 증가시킬 수 있었으며, 결과적으로 최종적으로 생산된 맥문동 발효액은 기능성 성분이 강화되었음을 확인하였다.

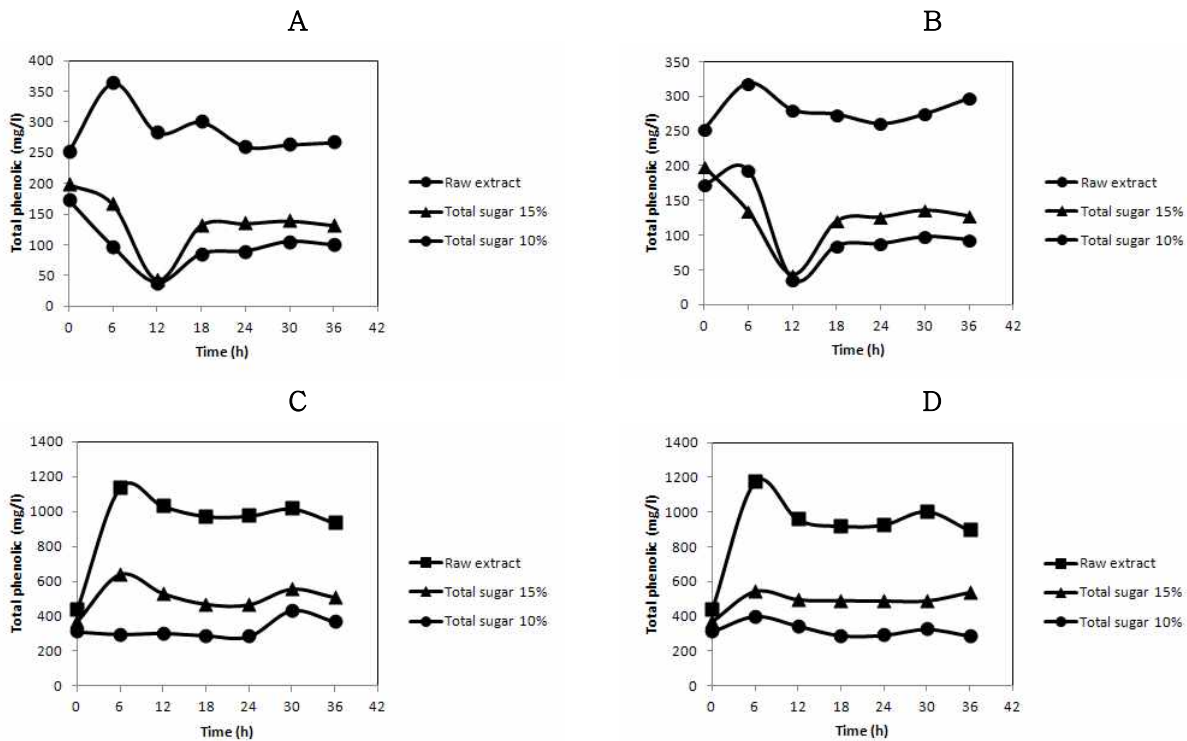


Fig. 14. 맥문동 발효에 따른 총페놀성분의 함량 변화(진탕발효). A, 열수추출물, strain DD1; B, 열수추출물, strain K31; C, 고온고압추출물, strain DD1; D, 고온고압추출물, strain K31.

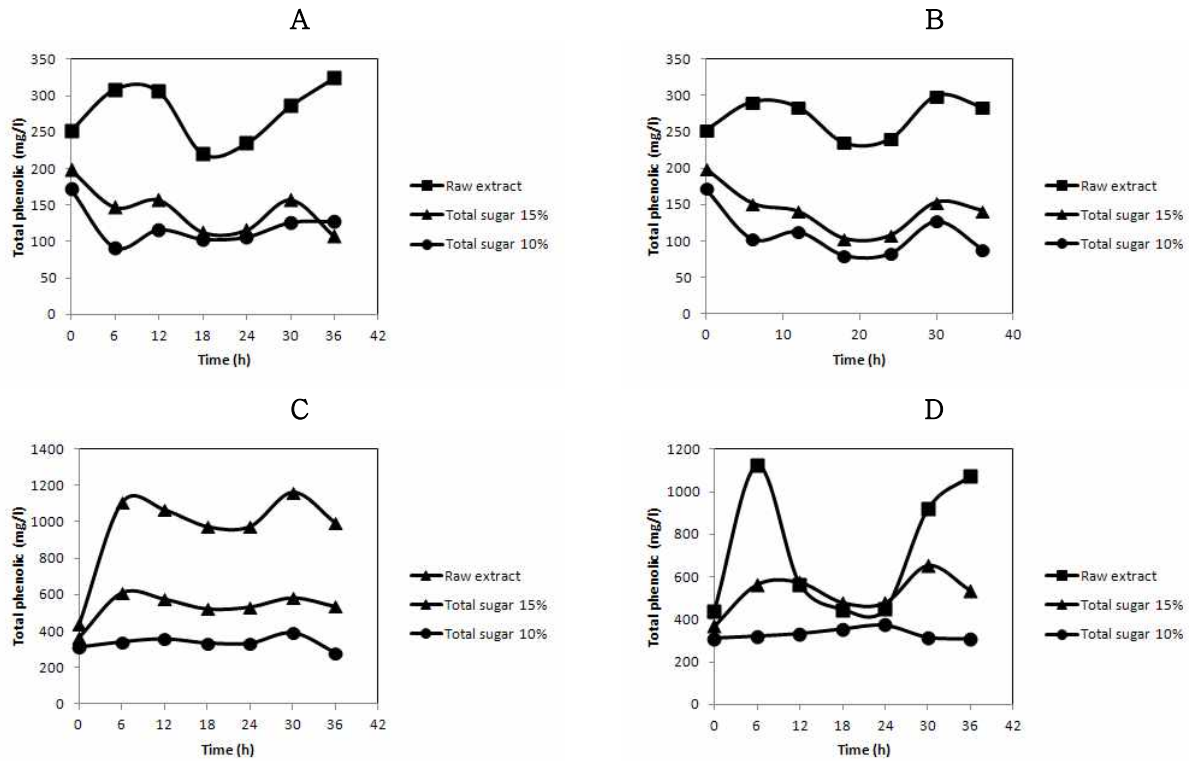


Fig. 15. 맥문동 발효에 따른 총페놀성분의 함량 변화(정치발효). A, 열수추출물, strain DD1; B, 열수추출물, strain K31; C, 고온고압추출물, strain DD1; D, 고온고압추출물, strain K31.

식물체에 함유되어 있는 플라보노이드는 항산화, 항균, 항염 작용 및 콜레스테롤 저하작용 등이 보고되어 있는 기능성 성분이다. 따라서 맥문동 추출물에 선정된 균주를 접종하여 진탕 및 정치발효시키면서 발효시간 경과에 따른 총플라보노이드의 함량 변화를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 16 및 Fig. 17에서 보는 바와 같다. 전반적으로 모든 실험구에서 총플라보노이드의 함량이 발효시간 경과에 따라 증가하였으며, 일부 경우에 있어 증가→감소→증가의 경향을 보여주었는데 총플라보노이드의 최고 함량은 발효초기보다 높았다. 또한 고압 열수추출물 발효액은 열수추출물 발효액보다 총플라보노이드 함량이 높았다. 따라서 총페놀성 화합물 함량 변화에서 살펴본 것과 마찬가지로 본 실험에 사용한 발효균주는 총플라보노이드 함량 증가에 긍정적인 영향을 미치고, 최종적으로 생산된 발효액의 총플라보노이드 성분은 강화되었음을 알 수 있었다.

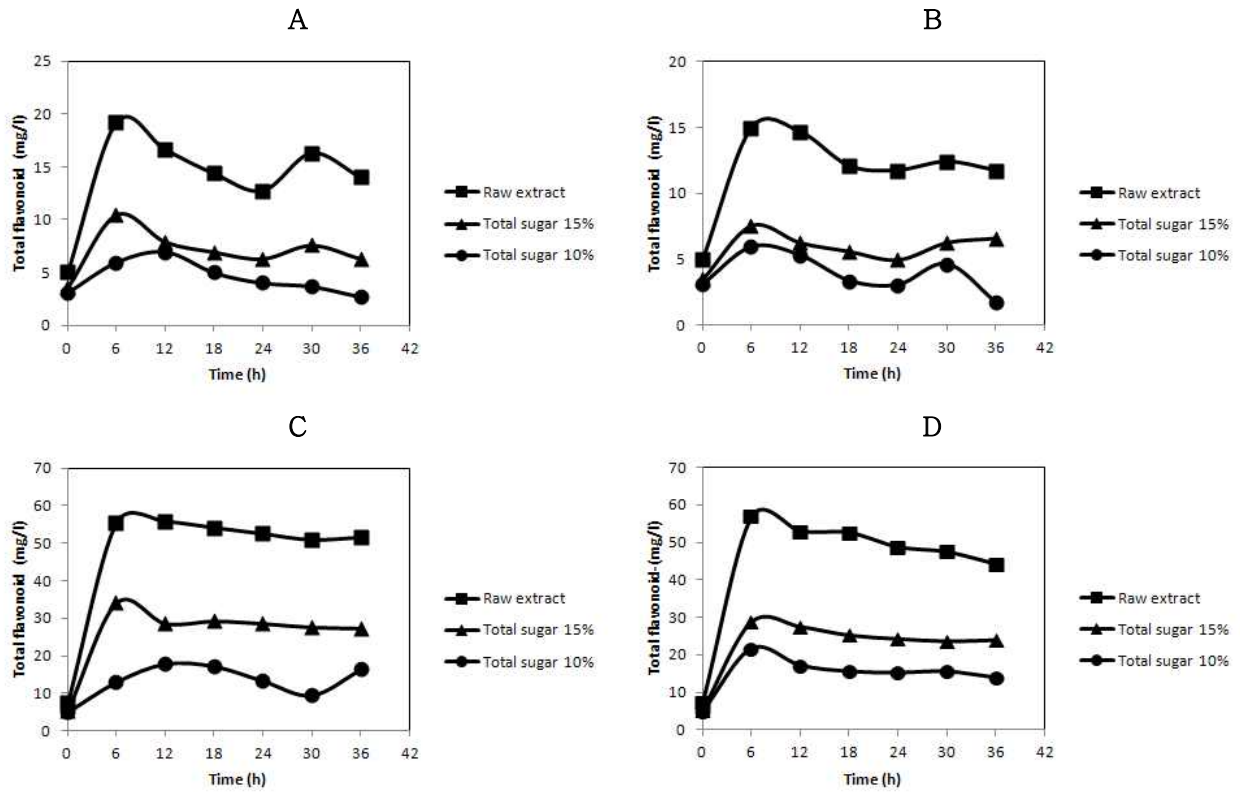


Fig. 16. 맥문동 발효에 따른 플라보노이드 성분의 함량 변화(진탕발효). A, 열수추출물, strain DD1; B, 열수추출물, strain K31; C, 고온고압추출물, strain DD1; D, 고온고압추출물, strain K31.

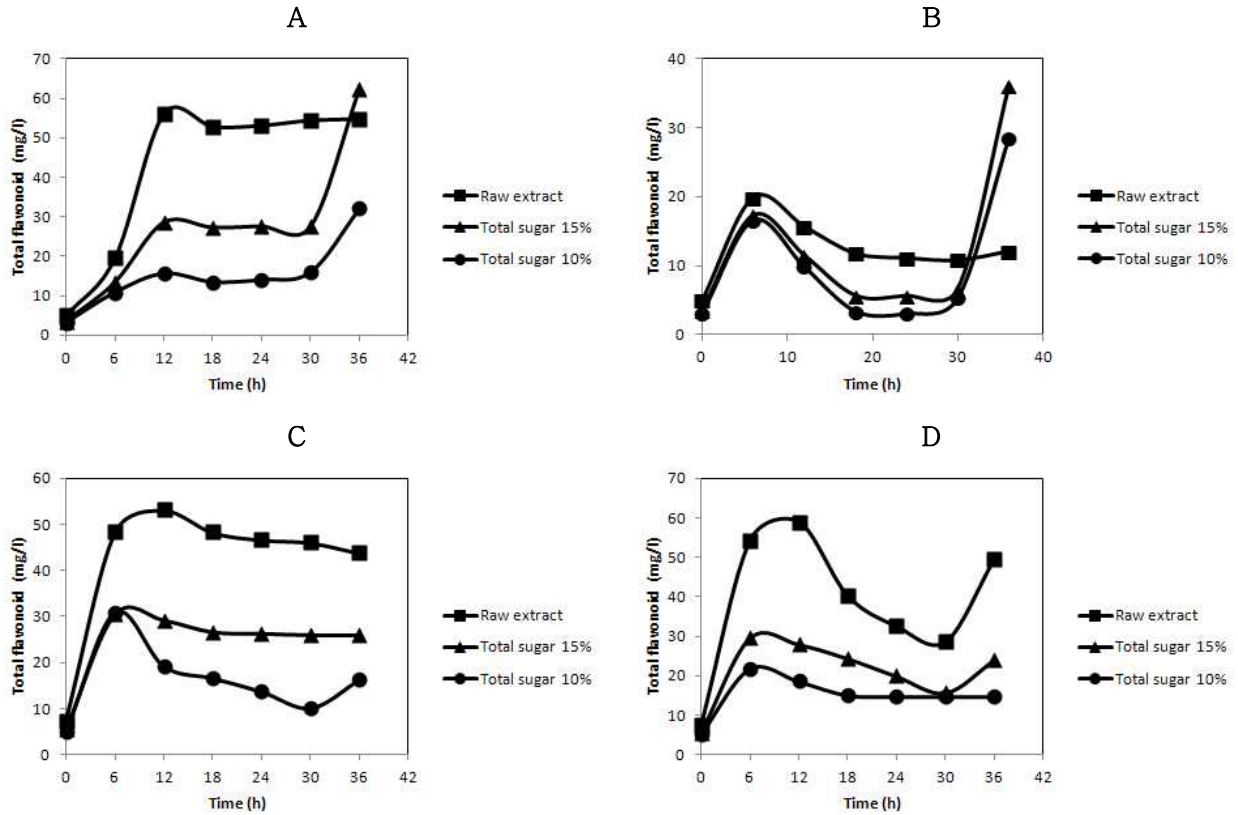


Fig. 17. 맥문동 발효에 따른 플라보노이드 성분의 함량 변화(정치발효). A, 열수추출물, strain DD1; B, 열수추출물, strain K31; C, 고온고압추출물, strain DD1; D, 고온고압추출물, strain K31.

DPPH는 분자 내에 라디칼을 가지고 있어 다른 자유 라디칼들과 결합하여 안정한 복합체를 만들고, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며, 이때 고유의 청색이 없어지는 특성을 가지고 있어 이것을 이용하여 전자공여능을 측정할 수 있다. 진탕 및 정치배양에서 배양시간 경과에 따른 DPPH 라디칼 소거활성의 변화는 Fig. 18 및 19에서 보는 바와 같다. 배양 6시간 경, 모든 실험구에서 DPPH 라디칼 소거활성이 크게 증가하였으며, 그 이후 일정하게 유지되거나 아주 완만하게 감소하는 경향을 나타내었다. 시료별 DPPH 라디칼 소거활성의 차이는 거의 없었으나 맥문동 추출원액의 소거활성이 약간 높았다. 일반적으로 페놀성 화합물의 함량 증가에 비례하여 DPPH 라디칼 소거활성이 증가한다는 보고가 있는 반면, 상관관계가 거의 없다는 보고도 있다. 본 연구에 있어서도 상기 총페놀성 화합물 실험결과에서 보았듯이 총페놀성 화합물과 DPPH 라디칼 소거활성간의 상관관계가 높은 실험구와 그렇지 않은 실험구가 있었다. 따라서 이에 대한 보다 세부적인 연구가 필요함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 기능성이 증진된 발효 맥문동 음료를 제조하기 위하여 맥문동 열수 추출물에 젖산균을 접종하고 진탕배양을 하여 30℃에서 24시간 배양하면, 생리활성이 증진된 맥문동 발효액을 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

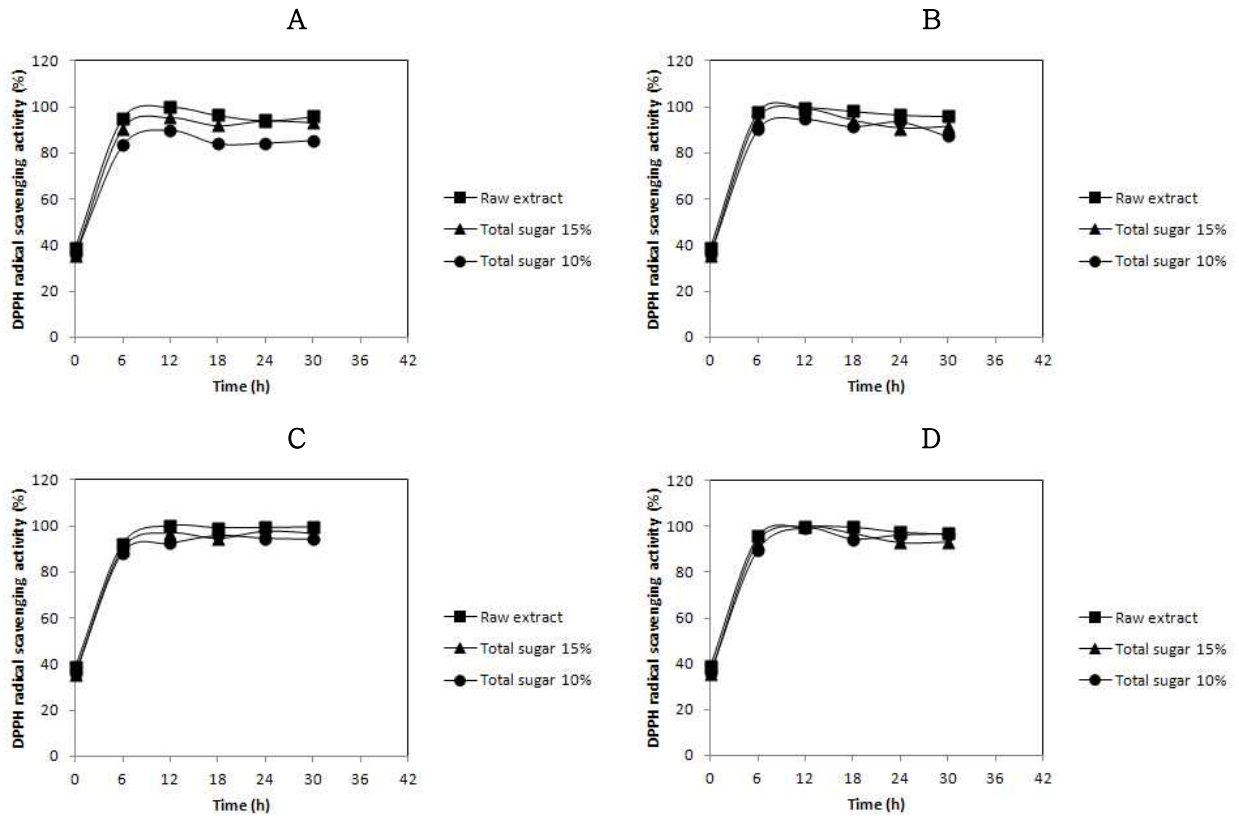


Fig. 18. 맥분동 발효에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 변화(진탕배양). A, 열수추출물, strain DD1; B, 열수추출물, strain K31; C, 고온고압추출물, strain DD1; D, 고온고압추출물, strain K31.

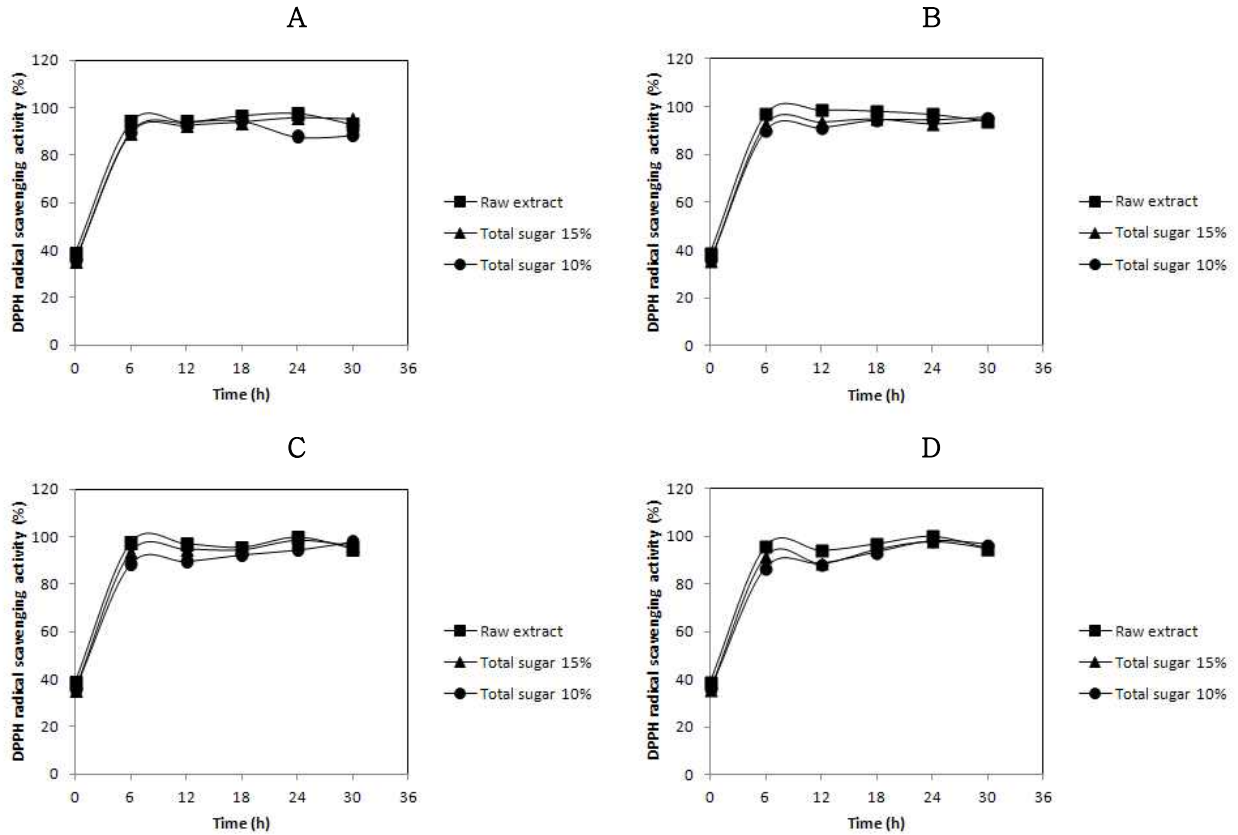


Fig. 19. 맥문동 발효에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 변화(정치배양). A, 열수추출물, strain DD1; B, 열수추출물, strain K31; C, 고온고압추출물, strain DD1; D, 고온고압추출물, strain K31.

#### 나. 발효 맥문동 기능성 제품의 개발

##### (1) 제품의 컨셉

주관기관 및 세부협동과제의 연구 결과를 바탕으로 발효 맥문동을 활용한 기능성 가공제품을 개발하고자 하였으며, 개발 제품의 현황 및 조건은 Table 12와 같다. 발효 맥문동 제품은 제2협동에서 개발된 균주 중에서 젖산균을 활용하여 생산하고자 하며, phenolic compound와 플라보노이드 성분을 함유하고 있어 항산화능을 가지고 있으며, 또한 ACE 저해능을 동시에 보유하고 있으므로 동맥경화 및 고혈압 예방의 효능을 나타내고 있는 것으로 판단되며, 발효 맥문동의 경우 340mL 크기의 용기에 발효 음료형태로 개발하고자 한다.



Table 12. 발효 맥문동 제품 개발

구 분	- 발효 맥문동 제품
추출조건	- 재료 : 맥문동 - 조건 열수추출액 (100℃, 3시간) 고압열수 추출액 (121℃, 3시간)
발효조건	- 균주 : <i>Lactobacillus brevis</i> DD1 - 조건 열수추출액 (35℃, pH 4.5, 3일 진탕배양) 고압열수 추출액 (30℃, pH 5.0, 3일 진탕배양)
기능성물질 및 특징	- Phenolic compound - Flavonoid compound - ACE 저해 효과 - 항산화
효 능	→ 동맥경화예방/고혈압예방

(2) 제품 디자인

발효 맥문동 제품은 ‘달콤한 오후의 茶’와 같이 음료 형태로 개발함으로써 소비자들이 쉽게 접근할 수 있도록 하였다. 디자인은 일반적인 차음료 용량인 340ml 정도의 내열병 크기에 맞는 디자인의 도안을 수행하였으며 그 디자인은 Fig. 20, 21과 같다.



Fig. 20. ‘발효 맥문동’의 디자인 도안



Fig. 21. '발효 맥문동 음료'의 제품사진

### (3) 기호도 조사 및 소비자 조사

발효 맥문동의 소비자 기호도를 알아보기 위하여 앞서 본 과제에서 개발된 “달콤한 오후의 茶”와 함께 차음료의 선호도가 높은 젊은층인 20대 여성을 대상으로 하여 관능가를 수행하였다. 그 결과는 Table 13과 같으며, 발효 맥문동 음료에서는 열수 추출 발효 음료와 고압열수 발효 음료 두 가지 모두 구매의향, 종합적인 기호도, 종합적인 맛 평가에서 낮은 평가가 나왔는데 이는 관능평가의 결과에서도 알 수 있듯이 음료의 단맛은 낮으며, 신 맛이 높은 것에 의한 것으로 판단된다. 그래서 신 맛을 개선시키기 위한 방법으로 발효 맥문동에 당을 첨가하여 관능검사를 실시하여 기호도적인 면을 보완하고자 하였다. 관능평가와 더해서 각 음료의 색도와 고형분 함량을 측정하였다. 색도는 색차계를 이용하여 L값 (Lightness), a값 (redness), b값 (yellowness)으로 측정하였으며, 고형분의 함량은 당도계를 사용하여 그 값을 Table 14에 나타내었다. “달콤한 오후의 茶”와 발효 맥문동 음료의 색도는 모든 값에서 유의적 차이가 있었으며 L value는 B제품이 유의적으로 높게 나타났고, a value와 b value는 A 제품에서 유의적으로 높았다. 제품에 따른 고형분 함량은 B 제품이 가장 높았다.

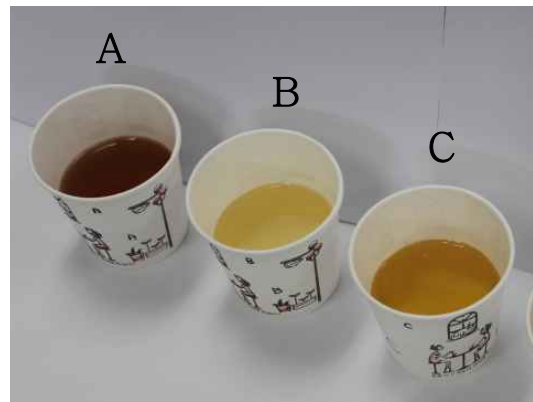
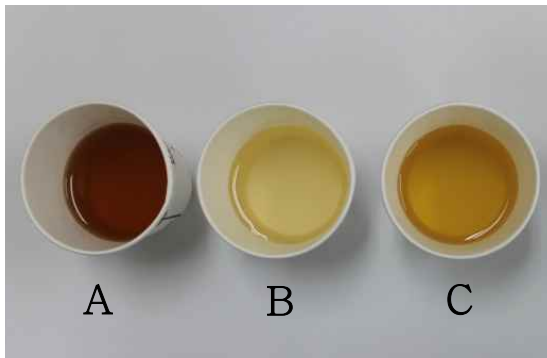


Fig. 22 발효음료 제품사진

A : 달콤한 오후의 茶; B : 맥문동 열수 발효액; C : 맥문동 고압열수처리 발효액;

Table 13. 차음료와 발효 맥문동 음료의 관능평가

음료	A	B	C
1. 색	5.83±1.59 <sup>b</sup>	4.22±1.73 <sup>a</sup>	5.43±1.72 <sup>b</sup>
2. 맛 <세부적인 맛 평가>			
① 단 맛	4.57±1.97 <sup>b</sup>	2.83±1.92 <sup>a</sup>	3.26±1.82 <sup>a</sup>
② 쓴 맛	3.00±1.91 <sup>NS</sup>	3.48±1.82 <sup>NS</sup>	3.13±1.71 <sup>NS</sup>
③ 신 맛	3.09±2.19 <sup>a</sup>	7.13±2.68 <sup>b</sup>	6.43±2.48 <sup>b</sup>
④ 떫은 맛	2.96±1.64 <sup>a</sup>	4.35±1.77 <sup>b</sup>	3.74±1.70 <sup>ab</sup>
⑤ 감칠 맛	4.17±2.19 <sup>b</sup>	2.61±1.94 <sup>a</sup>	3.09±1.75 <sup>b</sup>
<종합적인 맛 평가>	4.91±2.29 <sup>c</sup>	3.22±2.15 <sup>a</sup>	3.48±1.85 <sup>ab</sup>
3. 향	5.39±1.53 <sup>c</sup>	3.39±1.88 <sup>a</sup>	4.35±1.72 <sup>b</sup>
4. 종합적인 기호도	5.35±1.53 <sup>c</sup>	2.83±1.89 <sup>a</sup>	3.30±1.71 <sup>a</sup>
5. 구매의향	4.65±2.08 <sup>c</sup>	2.26±2.05 <sup>a</sup>	2.87±1.86 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

<sup>NS</sup> Non significance

Table 14. 차음료와 발효 맥문동 음료의 색도 및 당도

Sample	Color			Brix (%)
	L	a	b	
A	78.04±0.07 <sup>a</sup>	4.81±0.11 <sup>c</sup>	59.52±0.06 <sup>c</sup>	0.4 <sup>b</sup>
B	97.59±0.02 <sup>c</sup>	-1.23±0.04 <sup>b</sup>	9.12±0.03 <sup>a</sup>	0.5 <sup>c</sup>
C	94.01±0.02 <sup>b</sup>	-2.43±0.04 <sup>a</sup>	22.89±0.01 <sup>b</sup>	0.3 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.01 level of significance.

발효 음료에 대한 소비자의 기호도를 알아보고자 실시한 관능평가에서 맥문동 발효 음료는 높은 신 맛과 낮은 단 맛으로 인해 기호도가 떨어져 이를 보완하기 위해 당을 일정량 혼합하여 관능평가를 실시하였다. 그 결과는 Table 15와 같다. 종합적인 기호도와 구매의향 등에서 당을 첨가하지 않은 A제품보다 1%, 2%, 4%의 당을 첨가한 맥문동 발효 음료에서 더 높은 점수가 나왔다. 종합적인 기호도에서는 A제품과 B, C제품이 유의적인 차이가 있었으며, 구매의향에서는 A제품과 B제품 간에는 유의적인 차이가 없었지만 A와 C제품에서는 C제품이 유의적으로 구매의향이 높게 나왔다. 따라서 본 관능검사 결과를 바탕으로 맥문동 발효 음료는 2% 당을 첨가하여 개발한 후 소비자 조사를 실시하였다.

Table 15. 당첨가 비율에 따른 맥문동 발효 음료의 관능평가

음료	A	B	C	E
1. 색	6.40±0.55 <sup>c</sup>	6.20±0.84 <sup>c</sup>	5.20±0.45 <sup>b</sup>	4.20±0.45 <sup>a</sup>
2. 맛 <세부적인 맛 평가>				
① 단 맛	2.60±2.07 <sup>a</sup>	6.20±1.92 <sup>b</sup>	7.20±1.30 <sup>b</sup>	8.40±0.55 <sup>b</sup>
② 쓴 맛	3.00±1.41 <sup>NS</sup>	1.80±0.84 <sup>NS</sup>	2.00±1.00 <sup>NS</sup>	1.60±0.89 <sup>NS</sup>
③ 신 맛	6.60±0.55 <sup>b</sup>	4.20±0.84 <sup>a</sup>	2.80±1.48 <sup>a</sup>	3.00±2.00 <sup>a</sup>
④ 뽀은 맛	4.00±2.00 <sup>NS</sup>	2.80±1.64 <sup>NS</sup>	3.20±1.79 <sup>NS</sup>	2.40±1.14 <sup>NS</sup>
⑤ 감칠 맛	2.40±1.52 <sup>NS</sup>	3.60±1.67 <sup>NS</sup>	3.40±1.14 <sup>NS</sup>	3.80±2.39 <sup>NS</sup>
<종합적인 맛 평가>	3.00±1.22 <sup>NS</sup>	4.80±1.48 <sup>NS</sup>	4.80±0.84 <sup>NS</sup>	3.60±1.52 <sup>NS</sup>
3. 향	2.80±0.84 <sup>a</sup>	4.20±1.30 <sup>ab</sup>	4.20±1.30 <sup>ab</sup>	4.60±1.14 <sup>b</sup>
4. 종합적인 기호도	2.80±0.45 <sup>a</sup>	4.40±1.14 <sup>b</sup>	4.80±1.10 <sup>b</sup>	3.40±1.52 <sup>ab</sup>
5. 구매의향	2.20±0.84 <sup>a</sup>	3.80±1.48 <sup>ab</sup>	4.20±1.48 <sup>b</sup>	3.00±1.58 <sup>ab</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

<sup>NS</sup> Non significance

A : 0% 당 첨가; B : 1% 당 첨가; C : 2% 당 첨가; D : 4% 당 첨가

발효 맥문동 음료에 대한 제품 또는 시제품을 대상으로 소비자 및 기호도 조사를 수행하기 위하여 아래와 같이 설문지를 작성하였다. 본 설문지를 통해 제품 분석을 수행하고 이에 대한 피드백을 다시 제품에 반영하여 완성도가 높은 제품을 만들고자 한다.

### << 맥문동 발효 음료 신제품 개발을 위한 선호도 조사 >>

안녕하세요. 본 설문지는 밀양시 산동농협에서 개발한 '맥문동 발효음료'에 대한 선호도 조사를 위한 것입니다. 응답해 주신 설문 내용은 분석용 이외에는 절대 사용되지 않을 것을 약속드립니다. 바쁘시더라도 성심성의껏 답해주시면 감사하겠습니다.

◎ 다음은 설문 조사 분석에 필요한 간단한 인적 사항에 관한 질문입니다.

1) 성별은?  ① 여 ② 남
2) 나이는?  ① 10대 ② 20대 ③ 30대 ④ 40대 ⑤ 50대 이상
3) 발효 음료를 구매한 경험이 있습니까?  ① 예 ② 아니오
3)번의 ①을 선택하신 분은 아래의 질문에 대답해 주시기 바랍니다.

◎ 다음은 소비자들의 소비행태에 관한 질문입니다.

1) 다음 중 발효음료 구매 시 제품 선택에 가장 큰 영향을 미치는 요인을 선택해 주시기 바랍니다.  ① 경험상 가장 맛있다고 기억되는 제품 ② 제조 회사를 믿을 수 있다고 생각되는 제품 ③ 광고를 많이 하는 제품 ④ 매장에 가장 많이 진열되어 있는 제품 ⑤ 포장 디자인이 가장 마음에 드는 제품 ⑥ 가장 최근에 나온 신제품 ⑦ 가격이 싼 제품
--

⑧ 용량이 큰 제품

⑨ 기타( )

◎ 다음은 '맥문동 발효 음료' 제품에 관한 평가입니다. 5점 척도(매우 그렇지 않음, 그렇지 않음, 보통, 그러함, 매우 그러함)로 평가해 주십시오.

1) '맥문동 발효 음료' 제품이 새로운 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

2) '맥문동 발효 음료' 제품이 독특한 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

3) '맥문동 발효 음료' 제품이 관심과 흥미를 불러일으키는 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

4) '맥문동 발효 음료' 제품에 대한 전반적인 기호도가 우수하다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

5) '맥문동 발효 음료' 제품을 구매하고 싶다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

◎ 다음은 '맥문동 발효 음료' 제품 패키지 디자인에 관한 평가입니다. 5점 척도(매우 그렇지 않음, 그렇지 않음, 보통, 그러함, 매우 그러함)로 평가해 주십시오.

1) '맥문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인이 세련된 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

2) '맥문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인이 고급스러운 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

3) '맥문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인이 독특한 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

\_\_\_\_\_

4) '맥문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인이 눈에 잘 띄는 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

\_\_\_\_\_

5) '맥문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인에 제품의 특성이 잘 나타나 있는 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

\_\_\_\_\_

6) '맥문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인의 전체적 구성이 잘 되어있는 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

\_\_\_\_\_

◎ 다음은 '맥문동 발효 음료' 제품에 대한 가격 민감도에 관한 설문입니다.

1) 다음 중 보통 구입하시는 발효 음료의 가격을 선택해 주시기 바랍니다.

- ① 1000원 미만    ② 1000원 이상~1300원 미만    ③ 1300원 이상~1600원 미만  
④ 1600원 이상~2000원 미만    ⑤ 2000원 이상

2) '발효 맥 문동 음료' 제품의 적당한 가격대는 어느 정도라고 생각하십니까?

- ① 1000원 미만    ② 1000원 이상~1300원 미만    ③ 1300원 이상~1600원 미만  
④ 1600원 이상~2000원 미만    ⑤ 2000원 이상

◆ 설문에 응해 주셔서 감사합니다 ◆

맥문동 발효 음료의 소비자 조사에서 발효음료 구매 경험에 대한 질문에 조사대상자의 36%가 음료를 구매한 경험이 있다고 답하였고, 64%가 구매한 경험이 없다고 답하였다. 이는 발효 음료에 대한 소비자의 인지도가 낮다는 것을 의미하며, 발효 음료 인지도 상승을 위해서는 지속적인 개발과 홍보가 필요할 것으로 여겨진다. Fig. 26과 같이 '맥문동 발효 음료' 대한 소비자 선호도 조사 결과는 제품에 대한 신선함과 독특함이 다른 항목에 비하여 높은 평가를 받았는데 이는 시판되는 차음료 중 발효 음료가

소비자에 많이 알려지지 않았고, 맥문동이라는 기본재료에 대한 신선함과 발효라는 방법이 더해진 결과로 보여진다. 그 외에도 제품에 대한 관심도(매우 그러함; 16%, 그러함; 32%, 보통; 16%)와 기호도(매우 그러함; 12%, 그러함; 20%, 보통; 40%), 구매의향(매우 그러함; 8%, 그러함; 16%, 보통; 40%)로 각 항목에 대한 평가가 50%가 넘는 것을 보이며 맥문동 발효 음료에 대한 소비자 평가가 높은 것으로 나타났다. 제품의 가격면에서는 Fig. 27과 같이 소비자가 기존의 차 음료를 구입하는 가격은 1000원~1300원 미만이 64%로 가장 높았으며, 시중에서 구입하는 차 음료의 가격은 모두 1000원 이상인 것으로 조사되었다. 이에 대해 제품에 대한 적당 가격을 묻는 설문에서도 역시 64%가 1000~1300원 미만, 28%가 1300~1600원 미만으로 기존의 차 음료 구입가격과 비슷한 수준을 선택하였다. 이러한 결과는 앞으로 제품을 출시할 때 고려되어야 할 것으로 판단된다.

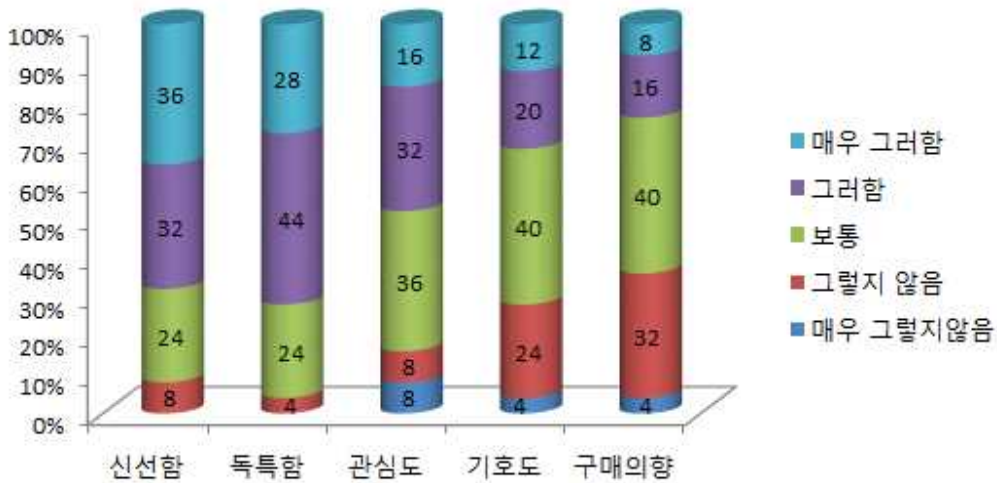


Fig. 26. 맥문동 발효 음료의 제품 평가

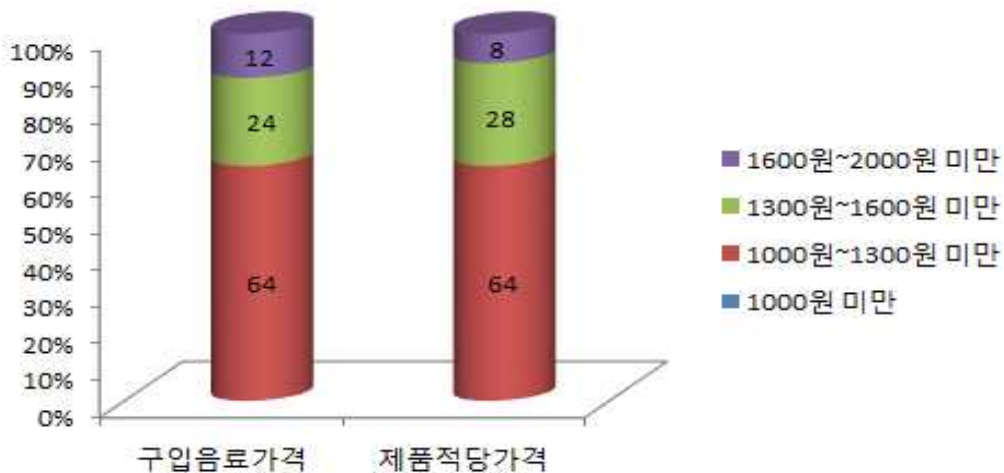


Fig. 27. 맥문동 발효 음료의 가격 민감도



### 3. 발효 홍문동 기능성 제품 개발

#### 가. 기능성 지표 물질의 최적 추출 공정 확립

맥문동 발효에서 최적화된 발효조건을 이용하여 홍문동 추출물 발효를 실시하였다. 즉, 홍문동 열수 추출물은 pH 4.5, 35°C 및 접종량 4% (v/v)의 조건에서, 홍문동 고압열수 추출물은 pH 5.0, 30°C 및 접종량 6% (v/v)의 조건에서 발효를 실시하였다. 공시 발효조건에서 배양시간 경과에 따른 플라보노이드 함량의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 28에서 보는 바와 같다. 홍문동 추출물의 초기 플라보노이드 함량은 맥문동 추출물보다 두 추출물 모두 두 배 이상 많았음을 알 수 있었고, 이것은 증숙과정에 의하여 플라보노이드 함량이 증가했음을 의미한다. 또한 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 플라보노이드 함량이 증가하였는데 고압열수 추출물의 함량 증가가 더 높았다. 열수 추출물의 플라보노이드 함량은 103.2  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 발효에 의하여 최고 163.4  $\mu\text{g/ml}$ , 고압열수 추출물은 110.4  $\mu\text{g/ml}$ 에서 최고 237.1  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하였다.

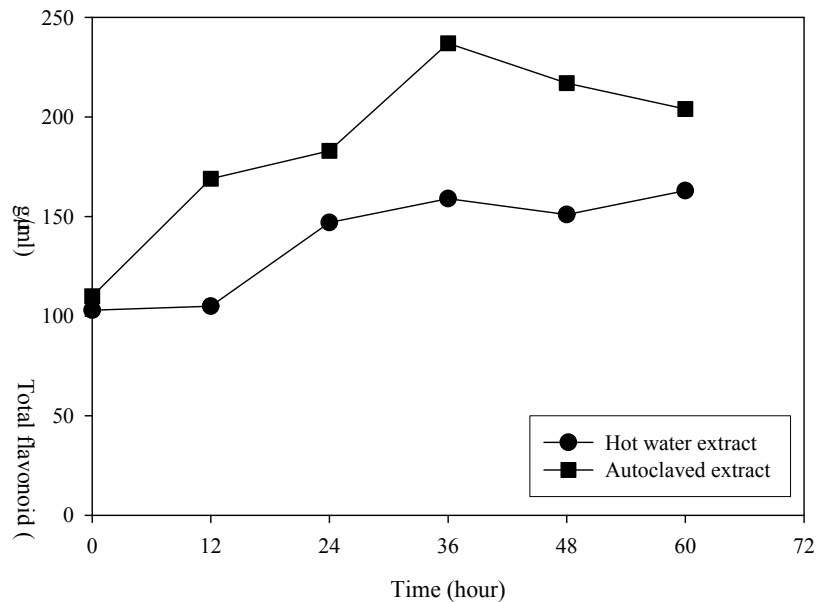


Fig. 28. 홍문동 발효에 따른 플라보노이드 성분의 함량 변화, *L. brevis* DD1.

발효조건에서 배양시간 경과에 따른 폴리페놀 화합물 함량의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 29에서 보는 바와 같다. 홍문동 추출물의 초기 폴리페놀 화합물 함량은 맥문동 추출물보다 훨씬 많았으며, 이것은 플라보노이드의 경우와 마찬가지로 증숙과정에 의하여 폴리페놀 화합물의 함량이 증가했음을 의미한다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 플라보노이드 함량이 약간 증가하였는데, 고압열수 추출물의 함량이 다소 많았다. 열수 추출물의 플라보노이드 함량은 1392  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 발효에 의하여 최고 1750  $\mu\text{g/ml}$ , 고압열수 추출물은 1473  $\mu\text{g/ml}$ 에서 최고 1784  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하였다.

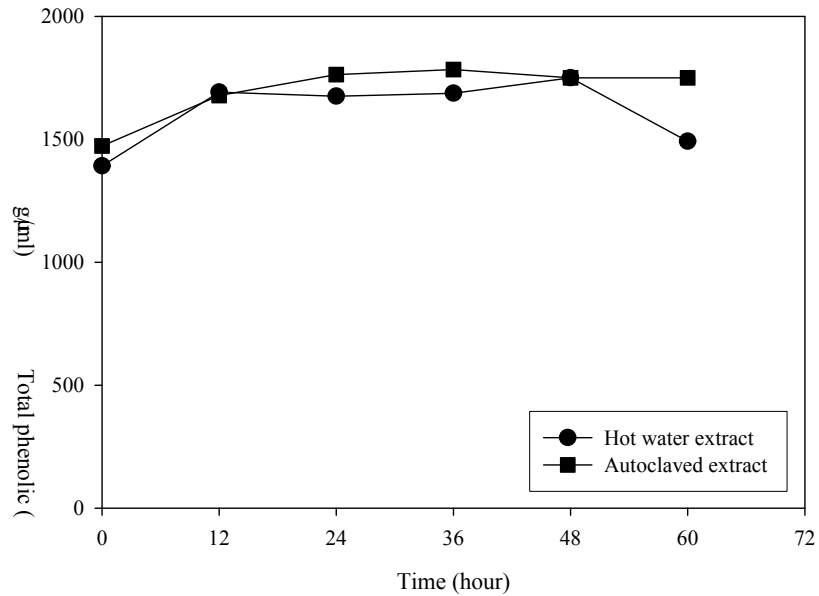


Fig. 29. 홍문동 발효에 따른 총페놀성분의 함량 변화, *L. brevis* DD1.

#### 나. 발효 홍문동 기능성 제품의 개발

##### (1) 제품의 컨셉

주관기관 및 세부협동과제의 연구 결과를 바탕으로 발효 홍문동을 활용한 기능성 가공제품을 개발하고자 하였으며, 개발 제품의 현황 및 조건은 Table 16와 같다. 발효 홍문동 제품은 발효 맥문동 제품과 마찬가지로 제2협동에서 개발된 균주 중에서 젖산균을 활용하여 생산하고자 하며, phenolic compound와 플라보노이드 성분을 함유하고 있어 항산화능을 가지고 있으며, 또한 ACE저해능을 동시에 보유하고 있으므로 동맥경화 및 고혈압 예방의 효능을 나타내고 있는 것으로 판단되며, 발효 홍문동 역시 340mL 크기의 용기에 발효 음료형태로 개발하고자 한다.

Table 16. 발효 맥문동 제품 개발

구 분	- 발효 홍문동 제품
추출조건	- 재료 : 홍문동 - 조건 열수추출액 (100℃, 3시간) 고압열수 추출액 (121℃, 3시간)
발효조건	- 균주 : <i>Lactobacillus brevis</i> DD1 - 조건 열수추출액 (35℃, pH 4.5, 3일 진탕배양) 고압열수 추출액 (30℃, pH 5.0, 3일 진탕배양)
기능성물질 및 특징	- Phenolic compound - Flavonoid compound - ACE 저해 효과 - 항산화
효 능	→ 동맥경화예방/고혈압예방

(2) 제품 디자인

발효 홍문동 제품은 발효 맥문동 제품과 마찬가지로 ‘달콤한 오후의 茶’와 같이 음료 형태로 개발함으로써 소비자들이 쉽게 접근할 수 있도록 하였다. 디자인은 일반적인 차음료 용량인 340ml 정도의 내열병 크기에 맞는 디자인의 도안을 수행하였으며 그 디자인은 Fig. 30, 31과 같다.



Fig. 30. '발효 홍문동'의 디자인 도안



Fig. 31. '발효 홍문동 음료'의 제품사진

### (3) 시험성적서

다음으로 “발효 홍문동”에 표시되어야 하는 영양성분의 분석의 경우는 식품의약품안전청에서 지정한 검사기관에서만 분석이 가능하고 또한 이를 제품에 표기할 수 있기 때문에 식품의약품안전청에서 검사기관으로 허가받은 중부대학교 산학협력단의 생명과학연구센터에 현재 분석을 의뢰하였다. 시험분석의 내용은 열량, 탄수화물, 단백질, 지방, 나트륨, 포화지방, 트랜스지방, 당, 콜레스테롤 및 조사포닌의 함량을 분석 의뢰하였으며 그 결과는 Fig. 32과 33와 같다. 발효 홍문동의 조사포닌의 함량을 분석의뢰한 결과, 음료 100ml 당 조사포닌 함량이 20mg 으로 나타났으며, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤을 포함하지 않은 것으로 나타났다.



## 시험성적서


발급번호 : 생참1307- 558		2013년 7월 29일	
접수번호	12-1307-302	접수일자	2013년 7월 16일
시료명	발효홍문동차	검사구분	참 고 용
의뢰자 (제조업소 등 기관명)	산동농협대추가공공장		
소재지 (연락처)	경남 밀양시 단장면 표충로 89-62 055-351-0420		
시험 결과			
검사항목	결과	%영양소기준치	
열량	2.5 kcal/100g		
탄수화물	0.6 g/100g	0.2%	
단백질	0.0 g/100g	0.0%	
지방	0.0 g/100g	0.0%	
나트륨	7.4 mg/100g	0.4%	
포화지방	0.0 g/100g	0.0%	
트랜스지방	0.0 g/100g	-	
당	0.5 g/100g	-	
콜레스테롤	0.0 mg/100g	0.0%	
2013년 7월 29일			
<b>중부대학교 산학협력단장</b> (인) 			
<input type="checkbox"/> 이 성적은 제시된 검체에 한하며, 시험의뢰 목적 외의 광고, 선전 등에 이용 할 수 없음			

Fig. 32. '발효 홍문동' 시험성적서



# 시험 성적서

생명과학연구센터

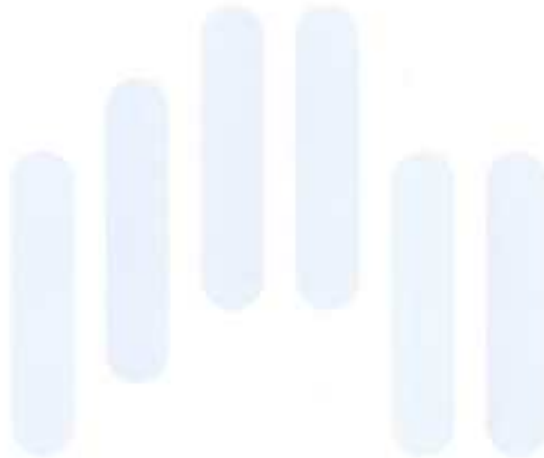
발급번호 생창 1307-559호

검수번호 12 - 1307 - 302

제품명	발효 홍문동차	제조일자나 유통기간 또는 제조번호	-
의뢰인	업소명	산동농협대추거공공장	성 명 김정인
	소재지	경남 밀양시 단장면 표충로 80-62	
접수년월일	2013년 7월 16일	검사완료일	2013년 7월 29일
제품유형(제품)	-		
검사목적	장교물		

### 시험 항목 및 결과

시험항목	결과	비고
조사포닌	0.2 mg/g	



본 검사성적서의 내용은 의뢰인이 제출한 시료에 대한 검사 결과로서 용도 이외의 목적으로 사용함에  
 미고: 미려 발생하는 모든 사항에 대해, 당사는 그 어떠한 법적책임도 지지 않습니다.

2013년 7월 29일

중부대학교 산학협력단



Fig. 33. '발효 홍문동' 시험성적서

#### (4) 기호도 조사 및 소비자 조사

발효 홍문동 음료의 소비자 기호도를 알아보기 위하여 앞서 본 과제에서 개발된 “달콤한 오후의 茶”와 함께 차음료의 선호도가 높은 젊은층인 20대 여성을 대상으로 하여 관능평가를 수행하였다. 그 결과는 Table 17과 같다. 발효 홍문동 음료와 달콤한 오후의 茶를 비교하였을 때 색, 단 맛, 쓴 맛, 떫은 맛, 감칠 맛, 종합적인 맛 평가에서 유의적인 차이가 없었으며, 일반적으로 C제품에서 단 맛, 감칠 맛, 종합적인 맛, 향, 종합적인 기호도 및 구매의향에서 “달콤한 오후의 茶”와 비교하였을 때 유의적으로 차이가 없었는데 이는 발효 홍문동 음료가 소비자의 기호도적인 면에서는 큰 차이가 나타나지 않는다는 것을 알 수 있으며, 기호도 면에서 유의적인 차이가 없으면서 기존의 홍문동 음료보다 기능성 성분이 더 높은 점을 소비자에게 부각하여 제품 홍보에 이용할 수 있으리라 생각된다. 관능평가와 더불어 각 음료의 색도와 고형분 함량을 측정하였다. 색도는 색차계를 이용하여 L값 (Lightness), a값 (redness), b값 (yellowness)으로 측정하였으며, 고형분의 함량은 당도계를 사용하여 그 값을 Table 18에 나타내었다. “달콤한 오후의 茶”와 발효 홍문동 음료의 색도는 모든 제품에서 유의적 차이가 있었으며 L value는 B제품이 유의적으로 높게 나타났고, a value와 b value는 A 제품에서 유의적으로 높았다. 제품에 따른 고형분 함량은 달콤한 오후의 茶와 C 제품이 동일하였다.

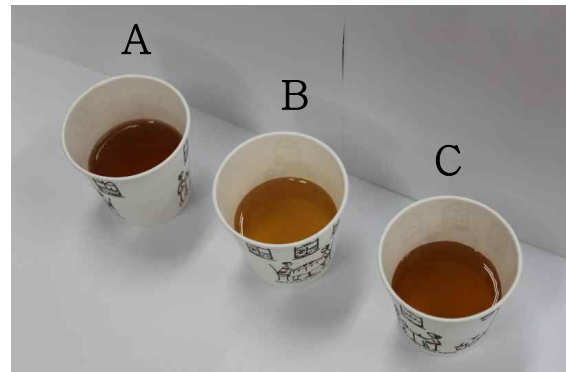
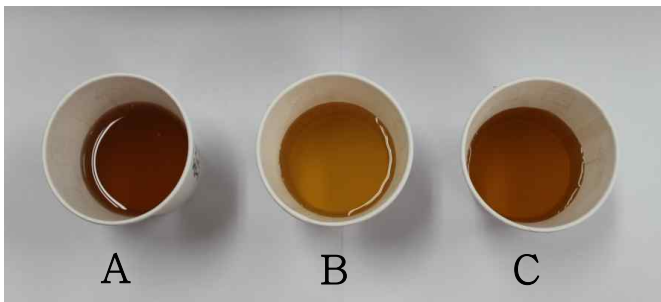


Fig. 34. 발효음료 제품사진

A : 달콤한 오후의 茶; B : 홍문동 열수 발효액; C : 홍문동 고압열수처리 발효액;

Table 17. 차음료와 발효 홍문동 음료의 관능평가

음료	A	B	C
1. 색	5.83±1.59 <sup>NS</sup>	6.17±1.71 <sup>NS</sup>	6.30±1.73 <sup>NS</sup>
2. 맛 <세부적인 맛 평가>			
① 단 맛	4.57±1.97 <sup>NS</sup>	3.65±1.82 <sup>NS</sup>	3.87±1.88 <sup>NS</sup>
② 쓴 맛	3.00±1.91 <sup>NS</sup>	3.43±1.76 <sup>NS</sup>	2.96±1.75 <sup>NS</sup>
③ 신 맛	3.09±2.19 <sup>a</sup>	6.04±2.31 <sup>b</sup>	5.17±2.26 <sup>b</sup>
④ 떫은 맛	2.96±1.64 <sup>NS</sup>	3.70±1.66 <sup>NS</sup>	3.70±1.67 <sup>NS</sup>
⑤ 감칠 맛	4.17±2.19 <sup>NS</sup>	3.30±1.69 <sup>NS</sup>	3.57±1.66 <sup>NS</sup>
<종합적인 맛 평가>	4.91±2.29 <sup>NS</sup>	4.26±1.76 <sup>NS</sup>	4.48±1.75 <sup>NS</sup>
3. 향	5.39±1.53 <sup>b</sup>	4.17±1.64 <sup>a</sup>	4.96±1.66 <sup>ab</sup>
4. 종합적인 기호도	5.35±1.53 <sup>b</sup>	3.74±1.67 <sup>a</sup>	4.52±1.76 <sup>ab</sup>
5. 구매의향	4.65±2.08 <sup>b</sup>	3.30±1.80 <sup>a</sup>	3.96±1.86 <sup>ab</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-b</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

<sup>NS</sup> Non significance

Table 18. 차음료와 발효 홍문동 음료의 색도 및 당도

Sample	Color			Brix (%)
	L	a	b	
A	78.04±0.07 <sup>a</sup>	4.81±0.11 <sup>c</sup>	59.52±0.06 <sup>c</sup>	0.4 <sup>b</sup>
B	88.40±0.07 <sup>c</sup>	-0.36±1.09 <sup>a</sup>	37.25±0.03 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>
C	82.94±0.04 <sup>b</sup>	1.49±0.04 <sup>b</sup>	54.03±0.02 <sup>b</sup>	0.4 <sup>b</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.01 level of significance.



발효 홍문동 음료에 대한 제품 또는 시제품을 대상으로 소비자 및 기호도 조사를 수행하기 위하여 아래와 같이 설문지를 작성하였다. 본 설문지를 통해 제품 분석을 수행하고 이에 대한 피드백을 다시 제품에 반영하여 완성도가 높은 제품을 만들고자 한다.

## << 홍문동 발효 음료 신제품 개발을 위한 선호도 조사 >>

안녕하세요. 본 설문지는 밀양시 산동농협에서 개발한 '발효 홍문동 음료'에 대한 선호도 조사를 위한 것입니다. 응답해 주신 설문 내용은 분석용 이외에는 절대 사용되지 않을 것을 약속드립니다. 바쁘시더라도 성심성의껏 답해주시면 감사하겠습니다.

◎ 다음은 설문 조사 분석에 필요한 간단한 인적 사항에 관한 질문입니다.

1) 성별은?

- ① 여 ② 남

2) 나이는?

- ① 10대 ② 20대 ③ 30대 ④ 40대 ⑤ 50대 이상

3) 발효 음료를 구매한 경험이 있습니까?

- ① 예 ② 아니오

3)번의 ①을 선택하신 분은 아래의 질문에 대답해 주시기 바랍니다.

◎ 다음은 소비자들의 소비행태에 관한 질문입니다.

1) 다음 중 발효음료 구매 시 제품 선택에 가장 큰 영향을 미치는 요인을 선택해 주시기 바랍니다.

- ① 경험상 가장 맛있다고 기억되는 제품
- ② 제조 회사를 믿을 수 있다고 생각되는 제품
- ③ 광고를 많이 하는 제품
- ④ 매장에 가장 많이 진열되어 있는 제품
- ⑤ 포장 디자인이 가장 마음에 드는 제품
- ⑥ 가장 최근에 나온 신제품
- ⑦ 가격이 싼 제품

⑧ 용량이 큰 제품

⑨ 기타( )

◎ 다음은 '홍문동 발효 음료' 제품에 관한 평가입니다. 5점 척도(매우 그렇지 않음, 그렇지 않음, 보통, 그러함, 매우 그러함)로 평가해 주십시오.

1) '홍문동 발효 음료' 제품이 새로운 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

2) '홍문동 발효 음료' 제품이 독특한 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

3) '홍문동 발효 음료' 제품이 관심과 흥미를 불러일으키는 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

4) '홍문동 발효 음료' 제품에 대한 전반적인 기호도가 우수하다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

5) '홍문동 발효 음료' 제품을 구매하고 싶다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

◎ 다음은 '홍문동 발효 음료' 제품 패키지 디자인에 관한 평가입니다. 5점 척도(매우 그렇지 않음, 그렇지 않음, 보통, 그러함, 매우 그러함)로 평가해 주십시오.

1) '홍문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인이 세련된 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

2) '홍문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인이 고급스러운 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

3) '홍문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인이 독특한 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

\_\_\_\_\_

4) '홍문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인이 눈에 잘 띄는 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

\_\_\_\_\_

5) '홍문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인에 제품의 특성이 잘 나타나 있는 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

\_\_\_\_\_

6) '홍문동 발효 음료' 제품의 패키지 디자인의 전체적 구성이 잘 되어있는 것 같다.

①      ②      ③      ④      ⑤  
매우 그렇지 않음      보통      매우 그러함

\_\_\_\_\_

◎ 다음은 '홍문동 발효 음료' 제품에 대한 가격 민감도에 관한 설문입니다.

1) 다음 중 보통 구입하시는 발효 음료의 가격을 선택해 주시기 바랍니다.

- ① 1000원 미만    ② 1000원 이상~1300원 미만    ③ 1300원 이상~1600원 미만  
④ 1600원 이상~2000원 미만    ⑤ 2000원 이상

2) '홍문동 발효 음료' 제품의 적당한 가격대는 어느 정도라고 생각하십니까?

- ① 1000원 미만    ② 1000원 이상~1300원 미만    ③ 1300원 이상~1600원 미만  
④ 1600원 이상~2000원 미만    ⑤ 2000원 이상

◆ 설문에 응해 주셔서 감사합니다 ◆

Fig. 35와 같이 '홍문동 발효 음료' 대한 소비자 선호도 조사 결과는 제품에 대한 신선함과 독특함이 다른 항목에 비하여 높은 평가를 받았는데 이 역시 '맥문동 발효 음료'와 마찬가지로 시판되는 차음료 중 발효 음료가 소비자에 많이 알려지지 않았고, 맥문동을 증숙시켜 만든 홍문동이라는 기본재료에 대한 신선함과 증숙과 발효라는 방법이 더해진 결과로 보여진다. 그 외에도 제품에 대한 관심도(매우 그러함; 24%, 그러함; 28%, 보통; 36%)와 기호도(매우 그러함; 16%, 그러함; 20%, 보통; 32%), 구매의향(매우

그러함; 8%, 그러함; 12%, 보통; 44%)로 각 항목에 대한 평가가 50%가 넘는 것을 보이며 홍문동 발효 음료에 대한 소비자 평가가 높은 것으로 나타났다. 제품의 가격면에서 소비자가 기존의 차 음료를 구입하는 가격은 1000원~1300미만이 64%로 가장 높았으며, 시중에서 구입하는 차 음료의 가격은 모두 1000원 이상인 것으로 조사되었다(Fig. 36). 이에 대해 제품에 대한 적당 가격을 묻는 설문에서도 역시 60%가 1000~1300원 미만, 24%가 1300~1600원 미만으로 기존의 차 음료 구입가격과 비슷한 수준을 선택하였다. 이러한 결과는 앞으로 제품을 출시할 때 고려되어야 할 것으로 판단된다.

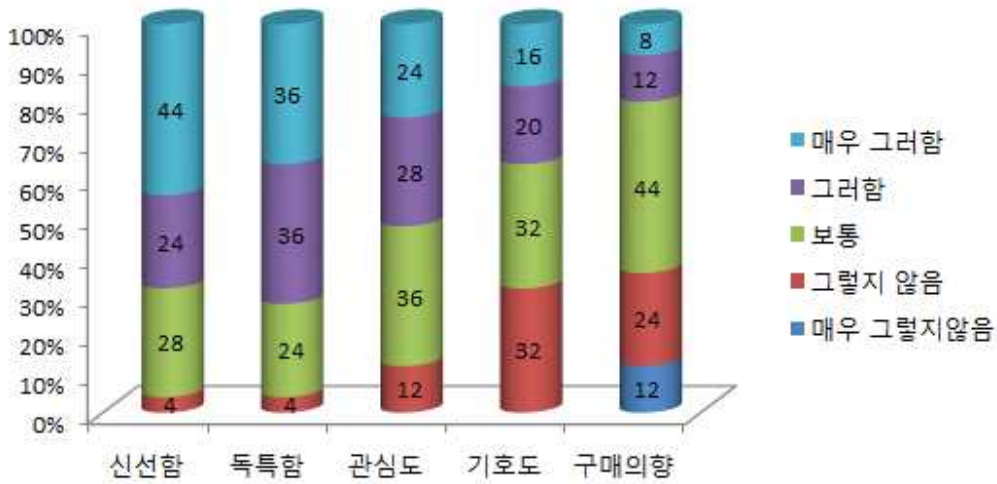


Fig. 35. 홍문동 발효 음료의 제품 평가

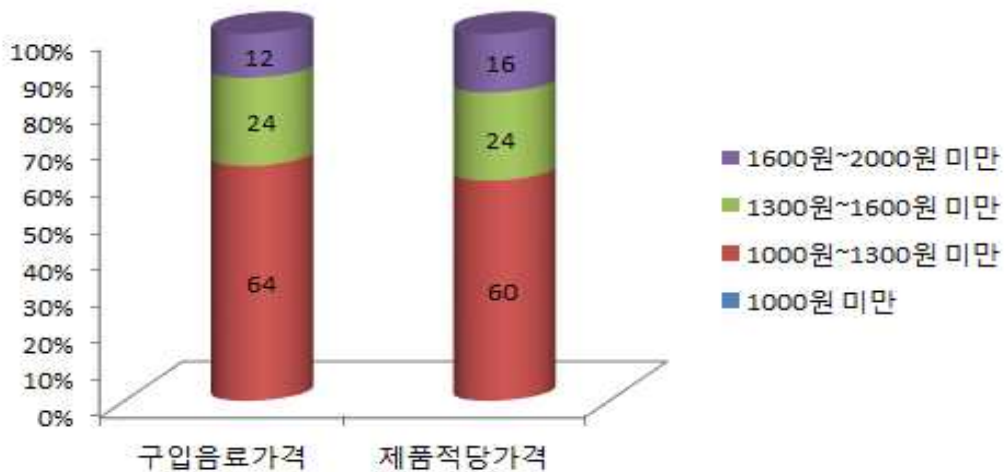


Fig. 36. 홍문동 발효 음료의 가격민감도

#### 4. 홍문동 및 발효제품의 마케팅 및 홍보전략 수립

홍문동 및 발효제품에 대한 마케팅 및 홍보를 위한 전략은 전문가의 도움 및 본 수행기관의 상위기관인 농협을 활용하여 마케팅 및 홍보를 수행하며, 협동기관인 부산대학교 장전캠퍼스 및 밀양캠퍼스와 연계하여 진행하고 있으며 제품의 출시와 함께 본격적으로 홍보를 하고자 한다.

기본적인 마케팅 및 홍보전략으로는 4P 전략을 바탕으로 수행하며 그 내용은 다음과 같다. 첫 번째로 Product 전략에 있어서는 현재 기획하고 있는 제품포장, 제품명칭, 제품용기 등을 상기에서 기술한 소비자 및 기호도 조사 분석의 결과 및 Fig. 37의 발효 음료 제품평가를 피드백하여 제품에 다시 반영하고자 하며, Price 전략은 소비자 및 기호도 조사 분석에서의 소비자의 구매행태 분석을 통한 판매우위를 선점할 수 있는 가격결정 및 시장진입 추진과 대상 소비계층 구매 유도 가격으로 책정하고자 한다. 또한, Place 전략은 본 연구의 수행기관인 산동농협가공공장과 연계된 독립적 유통 경로인 농협 하나로마트(전국 1200개 판매처) 및 본 연구의 협동기관인 부산대학교의 생활협동조합과의 연계를 통해 소비자에게 제품이 포지셔닝 할 수 있도록 유도하고자 한다. 마지막으로 Promotion 전략으로는 다양한 매체의 홍보물 제작하여 잡지, 온라인 등을 통해 전파하며, 특히 제품 개발 초기에는 농협 하나로마트 및 부산대학교 등 공공기관에서 홍보용 제품 무료 제공하는 등 적극적인 활동을 전개하고자 한다.



Fig. 37. 발효 음료 제품 평가

## 제 2 절 제1협동 맥문동을 이용한 홍문동의 제조 및 기능성 물질 분석

### 1. 맥문동 증숙 조건의 확립 및 최적화

#### 가. 맥문동 증숙 조건의 확립

식품의 가공방법중의 하나인 증숙 및 건조 공정은 인삼의 가공 제품인 홍삼의 제조에서 알 수 있듯이 가공공정을 통해 성분 변화를 일으켜 생리 활성 성분의 함량을 증가 시키고 새로운 생리 성분들을 생성한다. 증숙 및 건조의 최적화 공정을 이용하여 맥문동을 이용한 증숙 맥문동(홍문동)을 제조하고자 하였다.

본 실험에 사용한 맥문동 괴경(*Liriopsis tuber*)은 경남 밀양시에서 2010년도에 재배한 것을 4월에 수확하여 선별, 세척, 60°C에서 열풍 건조시킨 건근을 사용하였다. 증숙 방법으로는 시간별 증숙과정과 횡수별 증숙과정으로 나누어서 실시하였다. 시간별 증숙과정에 있어서의 증숙온도, 증숙시간, 건조온도, 건조시간 및 최종 건조조건은 Table 1과 같으며, 자세한 조건은 다음과 같다. 맥문동 건근 200g 을 150ml의 물을 가하여 증숙기에 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24시간 동안 증숙하여 70°C 열풍건조기(72시간), 동결건조기(48시간) 처리하였다. 건조 처리된 시료는 실험용 분쇄기를 이용하여 50 mesh 이하로 분쇄하여 맥문동 이화학적 분석과 기능성 성분 분석에 사용하였다. 횡수별 증숙과정에 있어서의 증숙온도, 증숙시간, 건조온도, 건조시간 및 최종 건조조건은 Table 2와 같으며, 자세한 조건은 다음과 같다. 증숙 횡수에 따른 시료 처리는 1회 증숙 시, 3시간 증숙 후 70°C 열풍건조기를 이용하여 21시간 건조하여 최종 건조는 70°C 열풍건조기(72시간), 동결건조기(48시간) 하여 1, 3, 5, 7, 9회의 반복적 증숙 공정을 거친 시료를 동일한 방법으로 분쇄하여 시료로 사용하였다. 전체적인 증숙 및 건조를 통한 증숙 맥문동(홍문동)의 제조 조건은 Fig. 1에 도식화하여 나타내었다.

증숙 시간별 제조된 홍문동(증숙 맥문동)은 Fig. 2(A)에서 보는 바와 같이 증숙 시간이 증가함에 따라 붉은 색이 진해지다가 24시간동안 증숙한 경우에 있어서는 검은 색으로 변하였다. 분쇄한 시료의 경우(Fig. 2B), 18시간 동안 증숙한 경우 붉은 색이 최고에 달한 후에 그 이상 증숙을 하였을 경우에는 붉은 색이 감소하는 경향을 나타내었으며, 이와 같은 경향은 증숙 횡수에 따른 홍문동의 경우에도 비슷한 경향을 보이며(Fig. 3), 증숙 횡수가 5회의 경우에 가장 붉은 색을 띠며 그 이상의 증숙횡수를 처리한 경우 검은 색으로 변하였다. 하지만 제조된 홍문동의 경우 색 이외에는 전반적인 형태에 있어서는 증숙처리하지 않은 맥문동 건근과 유사한 형태를 유지하는 것으로 판단된다.

Table 1. Conditions for steaming and drying of *Liriopsis* tuber with different times.

Sample	Steaming		Hot-air drying		Freeze drying	
	Temp (°C)	Time (hr)	Temp (°C)	Time (hr)	Temp (°C)	Time (hr)
NSLT	99	0	70	72	-80	48
SLT-3	99	3	70	72	-80	48
SLT-6	99	6	70	72	-80	48
SLT-9	99	9	70	72	-80	48
SLT-12	99	12	70	72	-80	48
SLT-15	99	15	70	72	-80	48
SLT-18	99	18	70	72	-80	48
SLT-21	99	21	70	72	-80	48
SLT-24	99	24	70	72	-80	48

NSLT, not-steamed *Liriopsis* tuber(LP); SLT-3, steamed LP for 3 hours; SLT-6, steamed LP for 6 hours; SLT-9, steamed LP for 9 hours; SLT-12, steamed LP for 12 hours; SLT-15, steamed LP for 15 hours; SLT-18, steamed LP for 18 hours; SLT-21, steamed LP for 21 hours; SLT-24, steamed LP for 24 hours.

Table 2. Conditions for steaming and drying of *Liriopsis* tuber with different steaming frequency.

Sample	Steaming			Hot-air drying		Freeze drying	
	Temp (°C)	Time (hr)	Times	Temp (°C)	Time (hr)	Temp (°C)	Time (hr)
NSLT	99	3	0	70	72	-80	48
RSLT-1	99	3	1	70	72	-80	48
RSLT-3	99	3	3	70	72	-80	48
RSLT-5	99	3	5	70	72	-80	48
RSLT-7	99	3	7	70	72	-80	48
RSLT-9	99	3	9	70	72	-80	48

NSLT, not-steamed *Liriopsis* tuber(LP); RSLT-1, steamed and dried LP; RSLT-3, 3 times steamed and dried LP repeatedly; RSLT-5, 5 times steamed and dried LP repeatedly; RSLT-7, 7 times steamed and dried LP repeatedly; RSLT-9, 9 times steamed and dried LP repeatedly.



Fig. 1. Schematic diagram of steaming and drying process of *Liriopsis tuber*

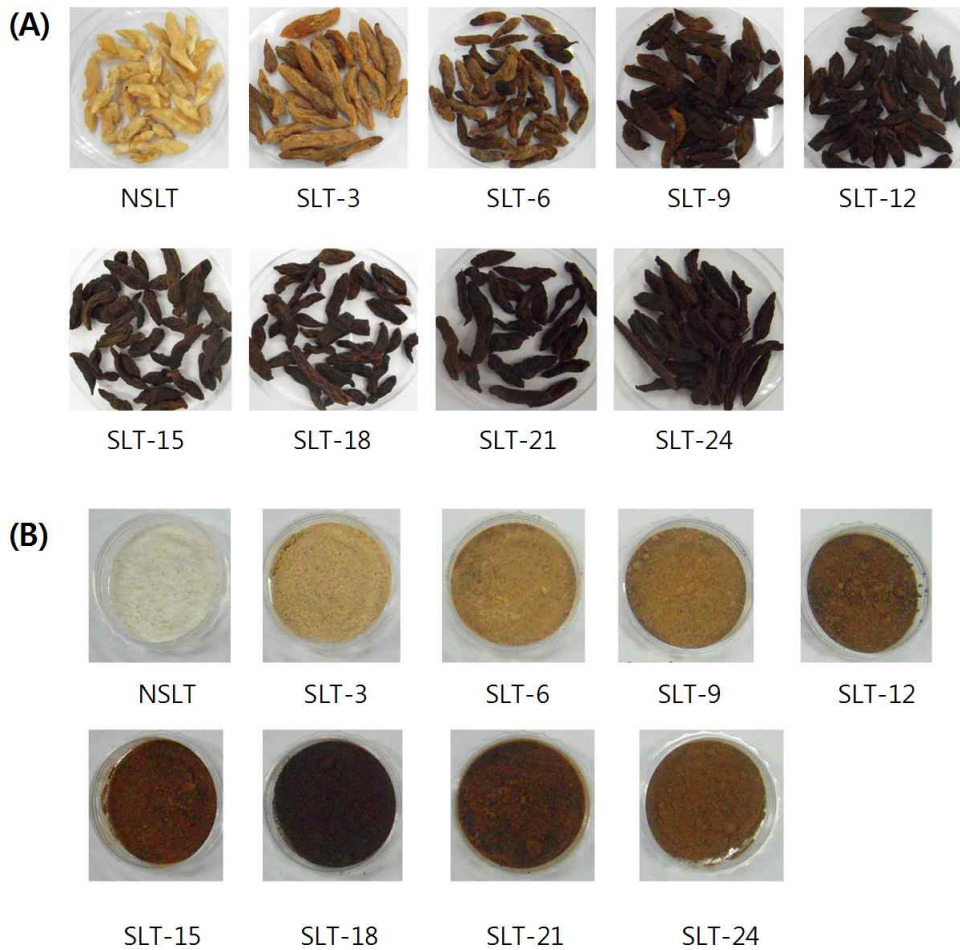


Fig. 2. Steamed and dried *Liriopsis tuber* (red *Liriopsis tuber*) produced with different steaming time.



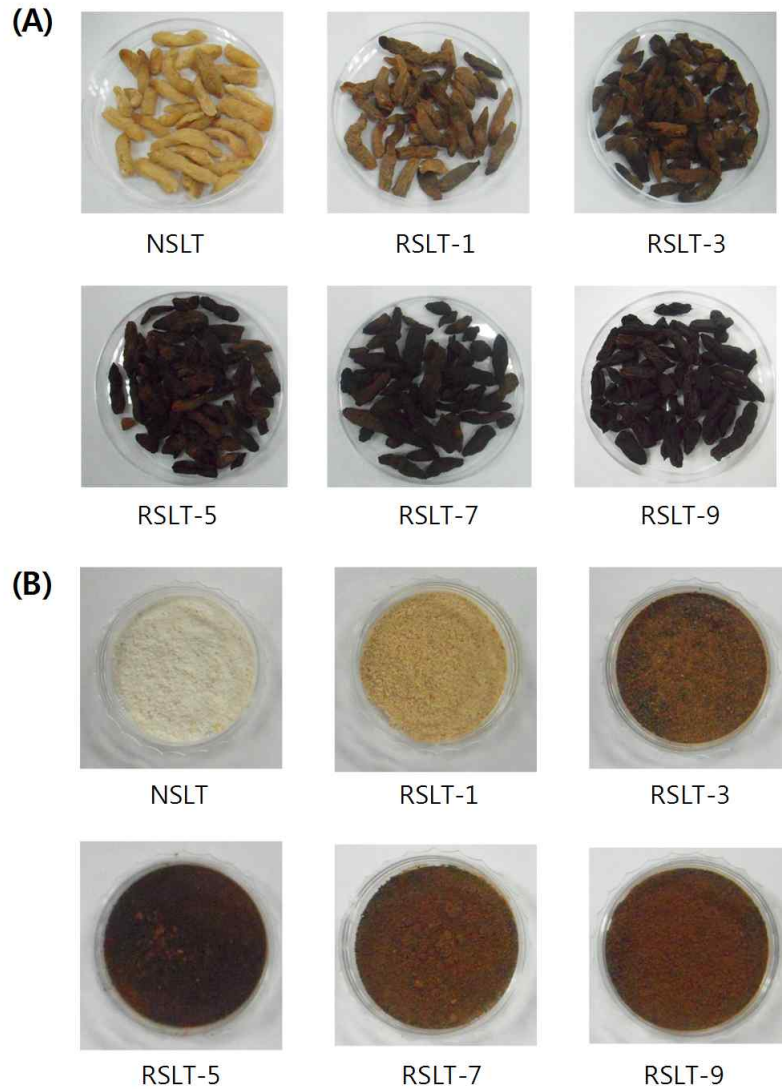


Fig. 3. Steamed and dried *Liriopsis tuber* (red *Liriopsis tuber*) produced with different steaming frequency.

나. 맥문동 증숙 조건(홍문동 제조) 표준화 및 최적화

증숙 조건에 따른 홍문동 제조방법의 표준화 및 최적화를 위하여 항산화능 측정중의 한 방법인 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거측정을 측정하였다. 50% 에탄올에 농도별로 용해시킨 추출물 100 $\mu$ l와 60 $\mu$ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 100 $\mu$ l를 96 well plate에 넣은 후 혼합하여 차광한 후 상온에서 30분간 방치시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 DPPH 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다.

증숙 시간에 따라 제조된 홍문동의 경우 Fig. 4(A)에서와 같이 증숙 시간이 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 증가함을 알 수 있었으며, 증숙 시간이 12시간 이상에서는 거의 일정

하게 유지되었다. 또한 증숙 횟수에 따라 제조된 홍문동의 경우, 증숙 시간에 따라 제조된 홍문동과 유사한 경향을 나타내어 증숙 횟수가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 증가하였으며, 증숙 횟수가 7번 이상에서는 일정하게 유지됨을 확인하였다(Fig. 4(B)). 이상의 결과에 따라, 증숙 시간과 횟수에 따라서는 비슷한 경향을 보이므로 증숙 및 건조 과정을 통한 홍문동의 제조에 있어서는 12시간 이상의 증숙이나 또는 7회 이상의 증숙횟수 처리가 적절한 것으로 판단된다. 일반적으로 시간별 증숙방법이 증숙횟수에 비하여 공정 단계가 훨씬 편리한 잇점을 가지고 있으므로 따라서 12시간 이상의 증숙처리하는 것이 홍문동 제조에 있어서는 가장 효율적인 방법으로 판단된다.

가장 최적화된 홍문동 제조의 방법은 이후에 기술할 홍문동의 일반성분 분석 및 기능성 성분 분석의 데이터를 종합하여 볼 때 증숙기에서 15시간 증숙한 후, 70°C 열풍건조기에서 72시간 건조하여 제조된 홍문동이 가장 효율적인 것으로 판단된다. 또한 증숙 조건 및 증숙횟수에 따른 효능평가의 연구를 위해 증숙 시간별 및 증숙횟수별 시료를 제3협동연구에 제공하였다.

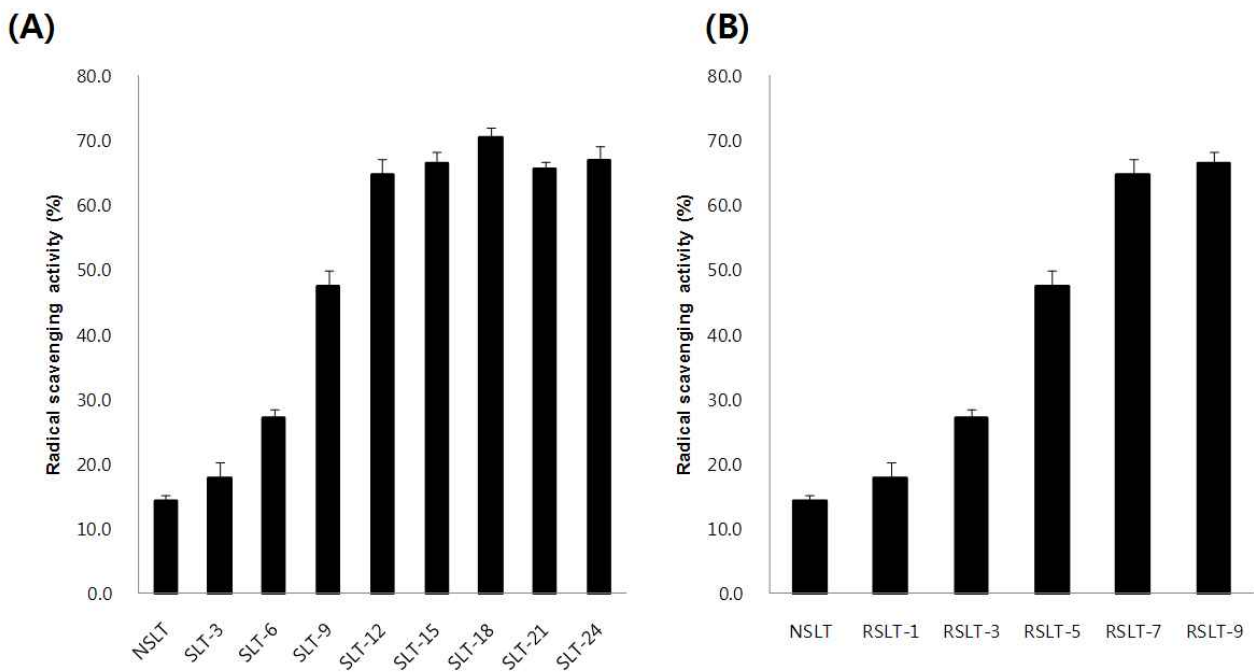


Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of red *Liriopsis tuber* produced with different steaming time (A) and frequency (B).

다. 홍문동(증숙 맥문동)의 기능성 성분 및 유해물질 분석

(1) 증숙에 따른 홍문동의 성분 분석

(가) 일반성분 분석

증숙 시간 및 증숙 횟수에 따른 일반성분 분석에는 수분, 탄수화물, 단백질, 지방 및 조회분의 분석이 있으며 AOAC방법에 따라 수분, 단백질, 지방 및 조회분의 함량을 측정하고 있으며, 탄수화물의 함량의 경우에는 100에서 수분, 단백질 및 지방의 함량을 뺀 값을 탄수화물 함량으로 하였다. 증숙 시간과 횟수에 따른 일반 성분의 변화는 Table 3 및 Table 4와 같이 크지 않음을 확인할 수 있었다.

Table 3. General composition of steamed and dried *Liriopsis* tuber with different times.

Component	Contents (%)								
	NSLT <sup>1)</sup>	SLT-3	SLT-6	SLT-9	SLT-12	SLT-15	SLT-18	SLT-21	SLT-24
Moisture	14.20 ± 0.08	8.42 ± 0.13	9.96 ± 0.53	9.21 ± 0.33	12.73 ± 0.54	12.15 ± 0.74	10.50 ± 0.82	9.07 ± 0.63	7.58 ± 0.13
Crude protein	4.51 ± 0.04	5.24 ± 0.21	4.94 ± 0.12	4.99 ± 0.05	5.03 ± 0.17	5.15 ± 0.11	5.01 ± 0.13	4.91 ± 0.10	5.23 ± 0.05
Carbohydrate	78.48 ± 0.09	83.37 ± 0.45	82.51 ± 0.28	79.74 ± 0.40	76.94 ± 3.77	81.07 ± 0.44	83.54 ± 0.76	84.45 ± 0.26	82.88 ± 0.19
Crude fat	0.51 ± 0.10	0.82 ± 0.13	0.69 ± 0.06	0.90 ± 0.04	0.26 ± 0.13	0.87 ± 0.10	0.77 ± 0.12	0.37 ± 0.08	0.39 ± 0.02
Crude ash	2.30 ± 0.08	2.48 ± 0.13	2.45 ± 0.05	2.39 ± 0.10	2.25 ± 0.10	2.16 ± 0.10	2.55 ± 0.31	2.11 ± 0.08	2.35 ± 0.24

<sup>1)</sup>Abbreviations are same as Table 1.

Values are mean ± S.D.

Table 4. General composition of steamed and dried *Liriopsis* tuber with different frequency.

Component	Contents (%)					
	NSLT <sup>1)</sup>	RSLT-1	RSLT-3	RSLT-5	RSLT-7	RSLT-9
Moisture	14.20 ± 0.08	8.42 ± 0.13	9.30 ± 0.16	11.48 ± 0.41	7.18 ± 0.15	8.24 ± 0.09
Crude protein	4.51 ± 0.04	5.24 ± 0.21	4.96 ± 0.05	5.04 ± 0.12	4.86 ± 0.06	4.94 ± 0.24
Carbohydrate	78.48 ± 0.09	83.37 ± 0.45	82.88 ± 0.19	80.74 ± 0.18	84.80 ± 0.05	83.22 ± 0.37
Crude fat	0.51 ± 0.10	0.82 ± 0.13	0.48 ± 0.03	0.28 ± 0.06	0.54 ± 0.10	0.94 ± 0.04
Crude ash	2.30 ± 0.08	2.48 ± 0.13	2.38 ± 0.09	2.46 ± 0.06	2.61 ± 0.06	2.66 ± 0.08

<sup>1)</sup>Abbreviations are same as Table 2.

Values are mean ± S.D.

(나) 색도 및 갈변도

증숙 시간 및 증숙 횟수에 따른 색의 변화는 증숙 후 건조된 시료를 분쇄하여 사용하였으며 색차계로 L값 (Lightness), a값 (redness), b값 (yellowness)으로 측정하였으며, 그 결과는 Table 5과 Table 6과 같다. 명도인 L값은 증숙시간 및 증숙횟수의 증가에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며, 붉은색을 나타내는 a값은 증숙시간 및 증숙횟수에 따라 점차 증가하다가 증숙시간 15시간 및 증숙횟수 5회 이후에 감소하는 경향을 나타내었으며 b값도 비슷한 경향을 나타내었다.

갈변도는 증숙 시간 및 증숙 횟수에 따라 제조된 홍문동을 열수를 이용하여 추출한 후 Spectrophotometer를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당과 질소화합물을 함유한 식품을 가열하게 되면 이들 성분들은 감소하게 되고 갈변도는 증가되는데, 증숙시간 및 증숙 횟수에 따라 급격하게 증가함을 확인할 수 있었으며, 증숙시간에 따라 제조된 홍문동의 경우에는 18시간 이상의 증숙시간에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

Table 5. Changes on colors of *Liriopsis tuber* according to different steaming time

Sample	Color		
	L	a	b
NSLT <sup>1)</sup>	90.47 ± 0.03 <sup>i</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.81 ± 0.01 <sup>a</sup>
SLT-3	74.08 ± 0.02 <sup>h</sup>	5.17 ± 0.14 <sup>b</sup>	21.93 ± 0.39 <sup>d</sup>
SLT-6	68.43 ± 0.05 <sup>g</sup>	6.27 ± 0.02 <sup>c</sup>	24.42 ± 0.03 <sup>e</sup>
SLT-9	54.17 ± 0.07 <sup>f</sup>	8.90 ± 0.04 <sup>d</sup>	29.47 ± 0.06 <sup>h</sup>
SLT-12	38.20 ± 0.00 <sup>d</sup>	12.10 ± 0.02 <sup>g</sup>	28.66 ± 0.03 <sup>g</sup>
SLT-15	32.78 ± 0.01 <sup>c</sup>	13.92 ± 0.06 <sup>h</sup>	27.43 ± 0.03 <sup>f</sup>
SLT-18	26.65 ± 0.02 <sup>b</sup>	12.04 ± 0.03 <sup>g</sup>	18.93 ± 0.04 <sup>c</sup>
SLT-21	25.36 ± 0.01 <sup>a</sup>	11.46 ± 0.04 <sup>e</sup>	16.78 ± 0.03 <sup>b</sup>
SLT-24	40.56 ± 0.02 <sup>e</sup>	11.87 ± 0.03 <sup>f</sup>	30.16 ± 0.03 <sup>i</sup>

<sup>1)</sup>Abbreviations are same as Table 1.

Values are mean ± S.D.

<sup>a-i</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

Table 6. Changes on colors of *Liriopsis tuber* according to different steaming frequency

Sample	Color		
	L	a	b
NSLT <sup>1)</sup>	90.47 ± 0.03 <sup>f</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.81 ± 0.01 <sup>a</sup>
RSLT-1	74.08 ± 0.02 <sup>e</sup>	5.17 ± 0.14 <sup>b</sup>	21.93 ± 0.39 <sup>e</sup>
RSLT-3	43.33 ± 0.03 <sup>d</sup>	8.52 ± 0.07 <sup>c</sup>	21.00 ± 0.02 <sup>cd</sup>
RSLT-5	32.92 ± 0.03 <sup>c</sup>	10.01 ± 0.05 <sup>f</sup>	21.28 ± 0.04 <sup>d</sup>
RSLT-7	25.79 ± 0.03 <sup>a</sup>	9.66 ± 0.07 <sup>e</sup>	15.33 ± 0.11 <sup>b</sup>
RSLT-9	32.73 ± 0.07 <sup>b</sup>	8.74 ± 0.08 <sup>d</sup>	20.82 ± 0.04 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Abbreviations are same as Table 2.

Values are mean ± S.D.

<sup>a-f</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

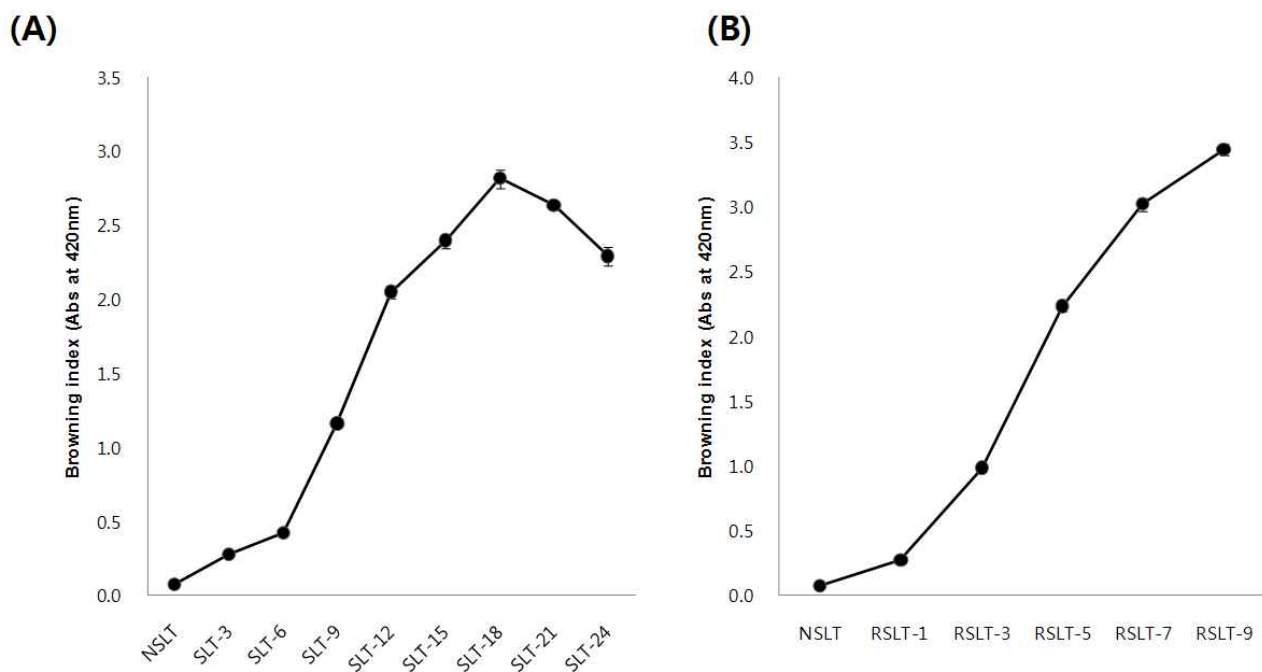


Fig. 5. Browning index of red *Liriopsis tuber* produced with different steaming time (A) and frequency (B).

(다) 사포닌, 총페놀물질 및 총플라보노이드 함량

홍문동의 사포닌 분석은 n-BuOH 추출법에 따라 수행하였으며, 홍문동 10g을 80% MeOH (v/v) 250ml에서 200rpm, 25°C에서 교반하면서 12시간 동안 추출을 3회 반복하여 감압농축하고 diethyl ether 250 ml를 혼합하여 지용성 성분을 제거하였다. 그 후 수포화 n-butanol을 3배 첨가하여 혼합한 후 약 3시간 정도 방치한 후 분리하여 60°C에서 감압 농축하여 중량을 측정하였다. 증속하지 않은 맥문동의 경우 조사포닌의 함량이 시료 100g중 6.0g의 값에서, 증속 시간이 증가함에 따라 급격히 증가하여 12시간 이상의 증속에서는 40g이상의 값을 나타내었으며, 특히 15시간 증속의 경우 최대의 값인 47.2g의 조사포닌 함량을 나타내었다(Fig. 6A). 증속 횟수에 따른 조사포닌의 함량도 유사한 경향을 보이며 7번 증속 및 건조를 반복할 경우 최대 값인 46.4g의 조사포닌 함량의 값을 나타내었다(Fig. 6B). 따라서 증속시간 및 증속횟수가 증가함에 따라 조사포닌 값이 급격히 증가하며 최대 8배 증가하였으며, 이는 홍문동의 제조를 통하여 기능성 성분을 효과적으로 증가시킬 수 있는 것으로 판단된다.

증속에 따른 총폴리페놀 함량은 분쇄한 시료 20g에 1.2L의 물을 가하여 추출기에서 2시간 30분간 추출하여 열수 추출물을 제조하여 여과하고, 45°C에 감압농축하여 1000 µg/ml로 희석하여 분석용 시료로 사용하였다. 시료 50µl와 증류수 500µl에 Folin 시약 100µl를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 100µl 가하여 혼합한 다음, 차광하여 실온에서 1시간 정치한 후 UV-spectrophotometer를 사용하여 725nm에서 흡광도를 조사하였다. 정량에 사용한 표준품은 caffeic acid로써, 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 총폴리페놀 함량을 측정하였다. Fig. 7에서와 같이 증속시간 및 증속횟수가 증가함에 따라 급격히 총폴리페놀 함량이 증가하였으며, 증속시간의 경우는 15시간이 가장 높은 함량인 시료 1g당 13.9mg의 함량을 나타내었으며, 증속횟수의 경우에는 9번 증속 및 건조를 반복했을 때 14.8mg으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이는 조사포닌의 경우와 동일한 경향임을 알 수 있었다.

총플라보노이드 함량의 측정은 시료 추출물 100µl에 90% diethylene glycol 1ml, 1N NaOH 100µl를 가하여 37°C에서 1시간 동안 정치한 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 사용한 naringin의 표준 검량선으로부터 총 플라보노이드 함량을 나타내었다. Fig. 8에서와 같이 증속시간 및 증속횟수가 증가함에 따라 급격하게 증가하는 경향을 보였으며, 증속시간의 경우는 21시간이 가장 높은 함량인 시료 1g당 5.3mg의 함량을 나타내었으며, 증속횟수의 경우에는 9번 증속 및 건조를 반복했을 때 5.8mg으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 맥문동을 증속하여 홍문동을 제조하였을 경우 최대 7배 이상의 총플라보노이드 성분이 증가됨을 확인할 수 있었다.

이상의 사포닌, 총페놀물질 및 총플라보노이드 함량의 측정을 통하여 증속시간 및 증속횟수에 따라 기능성 성분이 4~7배 정도 증가함을 알 수 있었으며, 맥문동의 증속과정을 이용하여 홍문동을 제조할 경우, 기존의 맥문동에 비해서 생리활성물질의 함량이 증진된 기능성 식품재료로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

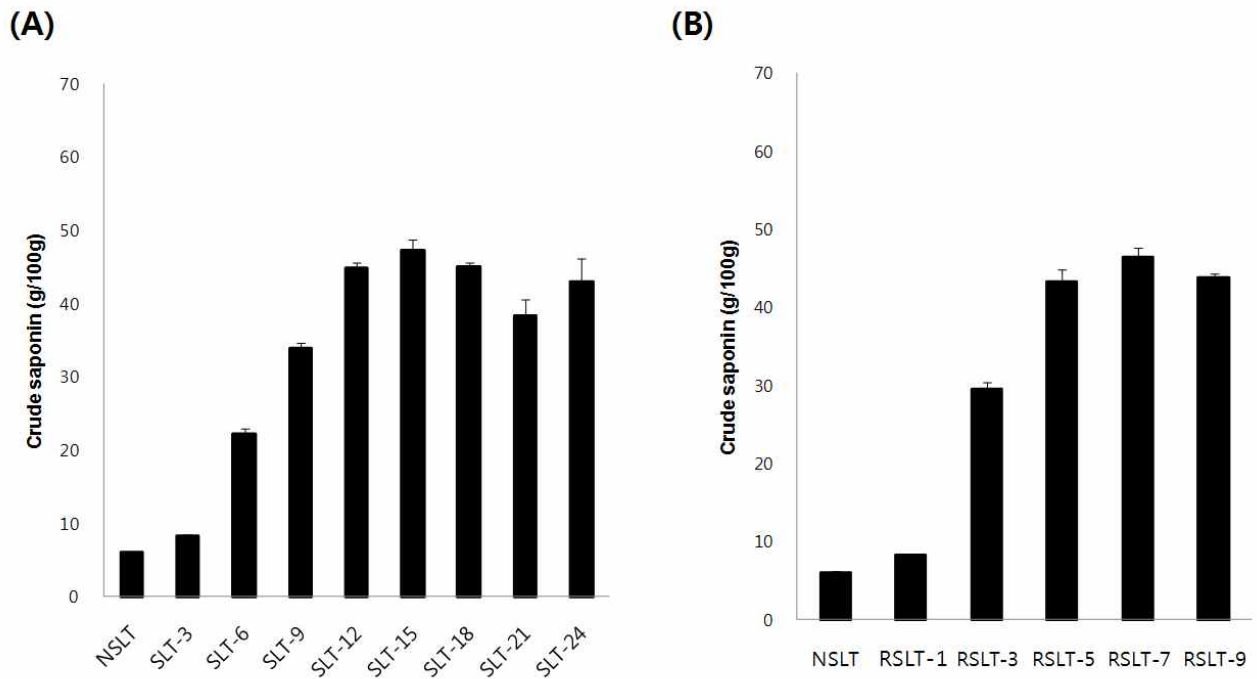


Fig. 6. Contents of crude saponin of red *Liriope tuber* produced with different steaming time (A) and frequency (B).

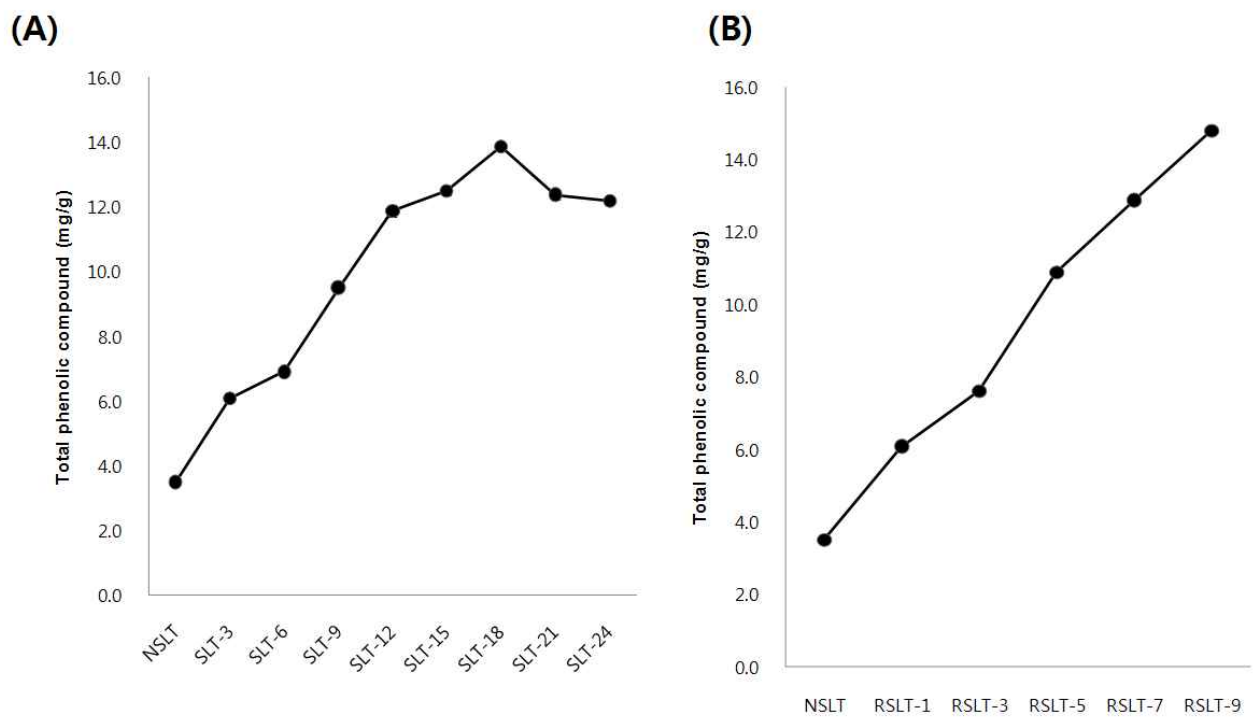


Fig. 7. Contents of total polyphenol of red *Liriope tuber* produced with different steaming time (A) and frequency (B).

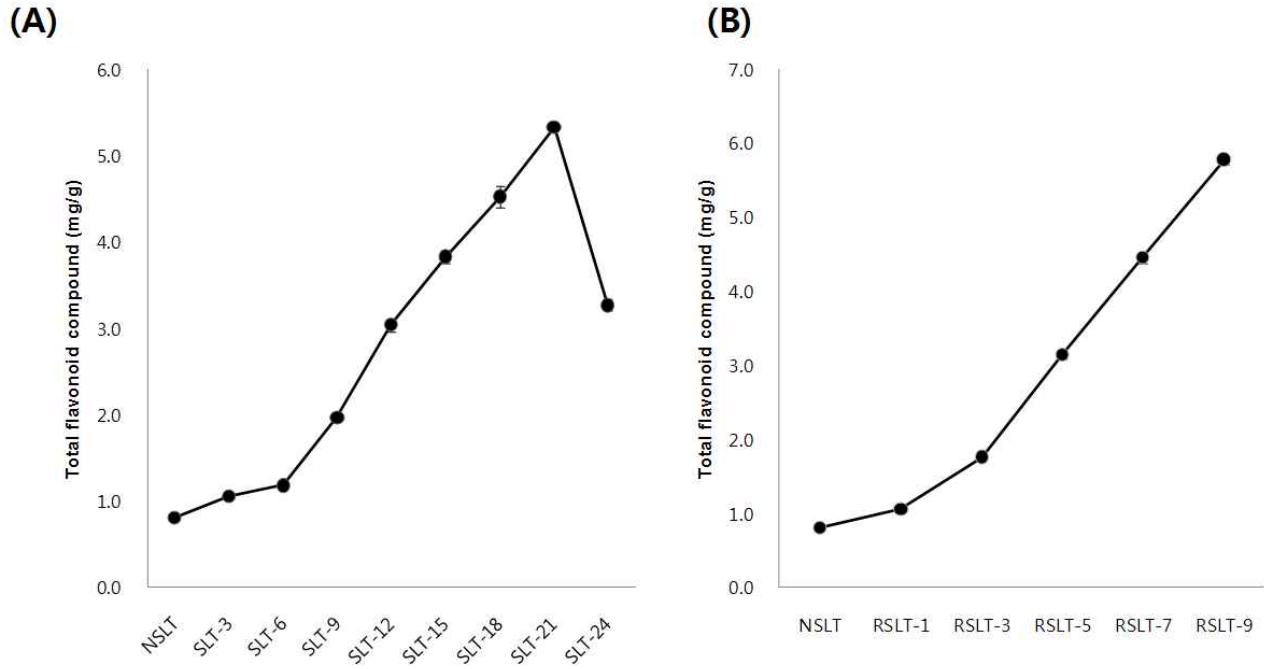


Fig. 8. Contents of total flavonoid of red *Liriopsis tuber* produced with different steaming time (A) and frequency (B).

(라) 항산화능

맥문동의 증숙에 따른 항산화능의 변화는 공정의 표준화 및 최적화의 방법에서 DPPH radical 소거능을 통하여 분석하였다. 생리활성 물질에 따라 DPPH radical 소거능 이외에 superoxide anion 소거능, hydroxyl radical 소거능, nitrite 소거능, 총항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)에 대한 효과가 차이가 나며, 이러한 차이는 산화를 막는 메카니즘의 차이에서 유래되며 이에 따라 다양한 생리활성 기능을 나타내게 된다. 따라서 증숙에 따른 맥문동의 superoxide anion 소거능, hydroxyl radical 소거능, nitrite 소거능 및 총항산화능 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)을 측정하였다.

Superoxide anion 소거능의 측정은 100mM phosphate buffer (pH 7.4)에 농도별로 용해시킨 추출물 100 $\mu$ l와 500 $\mu$ M xanthine 100 $\mu$ l, 3mM nitrobluetetrazolium (NBT) 100 $\mu$ l, 0.25U/ml xanthine oxidase 100 $\mu$ l, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 100 $\mu$ l을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. 이 혼합액을 96 well plate에 넣은 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 superoxide anion 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다. Table 7에서와 같이 증숙시간이 증가함에 따라 superoxide anion 소거능은 증가하는 경향을 나타냈으며, 21시간 동안 증숙한 홍문동에서 가장 높은 값인 47.18%의 저해율을 나타내었으며 15시간 이상에서는 40%이상의 저해율을 나타내어 증숙하지 않은 경우에 비하여 2배정도의 증가를 나타내었다. 또한 증숙횟수에 따른 소거능의 경우 증숙 및 건조의 횟수가 증가함에 따라 증가하



여 5번 반복한 경우 최대치인 45.95%의 저해율은 나타내었으며, 그 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(Table 8). Superoxide anion 소거능의 경우 적절한 증속이 필요하고 과도한 증속의 경우는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

Hydroxyl radical 소거능 측정은 PBS에 용해시킨 추출물 175 $\mu$ l와 10mM FeSO<sub>4</sub>-EDTA 25 $\mu$ l, 10mM Deoxyribose 25 $\mu$ l, 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 $\mu$ l을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응하였다. 2.8 % trichloroacetic acid 250 $\mu$ l, 1% tribarbituric acid 250 $\mu$ l를 가하여 100 $^{\circ}$ C에 끓여 반응정지시켰다. 이 혼합액을 96 well plate에 넣은 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 hydroxyl radical 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다. 증속시간이 증가함에 따라 hydroxyl radical 소거능은 증가하는 경향을 나타냈으며, 18시간 동안 증속한 홍문동에서 가장 높은 값인 52.47%의 저해율을 나타내어 증속하지 않은 경우에 비하여 4배정도의 증가를 나타내었다(Table 7). 그러나 21시간 증속부터는 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 증속횟수에 따른 소거능의 경우 증속 및 건조의 횟수가 증가함에 따라 증가하여 5번 반복한 경우 최대치인 46.82%의 저해율은 나타내었으며, 3회 이상의 증속 및 건조에서는 45%정도의 저해율을 나타내었다(Table 8).

발암성 물질인 nitrosoamine 생성의 전구체로 작용하는 아질산염(nitrite)의 소거능을 측정하였다. 100mM Nitroprusside용액 400 $\mu$ l에 시료 100 $\mu$ l을 혼합한 후 100mM phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 다음 상온에서 2시간 30분 동안 정치시키고 200 $\mu$ l씩 취한 다음 조제한 Griess(30% acetic acid로 조제한 1% Sulfanilic acid와 0.1% Naphtylethylene diamine dihydrochloride를 1:1비율로 혼합한 것) 시약 200 $\mu$ l를 가하여 잘 혼합한 후 30분간 방치하고 540nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산량을 구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신에 증류수 200 $\mu$ l를 가하여 동일한 방법으로 측정하였다. 증속시간에 따른 nitrite 소거능은 증속시간이 늘어남에 따라 증가하는 경향을 보였으며 12시간이상의 증속에서는 일정한 경향을 나타내었으며, 15시간 증속의 경우에 최대값인 14.46%를 나타내었고(Table 7), 증속횟수에 따른 소거능은 7회이상 높은 저해율을 나타내었다(Table 8). 하지만 다른 항산화능에 비해서는 상당히 낮은 값을 나타내었다.

총항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)의 측정은 7mM ABTS (2,2'-azono-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate))와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 ABTS radical cation (ABTS $\cdot^+$ )를 만들어 12시간 방치한 후 734nm에서 흡광도가 0.70 $\pm$ 0.02가 되도록 PBS (pH 7.4)로 조정된 후 사용하였다. 20 $\mu$ l의 증속 맥문동 열수추출물과 Trolox(표준물질)에 ABTS $\cdot^+$  용액 1ml를 첨가하여 734nm에서 6분간 흡광도를 측정하여 총항산화능은 Trolox 표준용액을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다. 증속시간이 늘어남에 따라 증가하여 12시간이후부터는 일정한 값으로 유지되었으며, 증속횟수가 증가함에 따라서도 유사한 경향을 나타내었다(Table 7, 8)

Table 7. Antioxdative activities of *Liriopsis tuber* according to different steaming time

Sample	Superoxide anion scavenging activity (%)	Hydroxyl radical scavenging avitivity (%)	Nitric oxide scavenging activity (%)	TEAC (mM Trolox equivalent)
NSLT	25.67 ± 1.23	13.24 ± 3.37	4.51 ± 1.89	0.291 ± 0.000
SLT-3	32.86 ± 1.77	18.65 ± 0.09	5.87 ± 0.96	0.313 ± 0.001
SLT-6	34.51 ± 2.44	19.25 ± 0.75	6.60 ± 1.97	0.328 ± 0.001
SLT-9	35.45 ± 2.15	30.13 ± 3.94	8.59 ± 1.84	0.375 ± 0.009
SLT-12	38.50 ± 1.47	31.05 ± 7.58	12.37 ± 1.73	0.404 ± 0.005
SLT-15	46.24 ± 3.61	50.79 ± 0.68	14.46 ± 3.82	0.413 ± 0.007
SLT-18	46.95 ± 1.47	52.47 ± 1.42	11.32 ± 0.63	0.421 ± 0.003
SLT-21	47.18 ± 0.00	31.54 ± 4.88	10.48 ± 1.84	0.418 ± 0.004
SLT-24	44.60 ± 0.81	32.47 ± 0.28	10.38 ± 1.13	0.412 ± 0.003

<sup>1)</sup>Abbreviations are same as Table 1.

Values are mean ± S.D.

Table 8. Antioxdative activities of *Liriopsis tuber* according to different steaming frequency

Sample	Superoxide anion scavenging activity (%)	Hydroxyl radical scavenging avitivity (%)	Nitric oxide scavenging activity (%)	TEAC (mM Trolox equivalent)
NSLT	25.67 ± 1.23	13.24 ± 3.37	4.51 ± 1.89	0.291 ± 0.000
RSLT-1	32.86 ± 1.77	18.65 ± 0.09	5.87 ± 0.96	0.313 ± 0.001
RSLT-3	36.94 ± 3.12	45.41 ± 1.72	7.55 ± 1.44	0.361 ± 0.006
RSLT-5	45.95 ± 2.71	46.82 ± 0.99	7.65 ± 1.31	0.409 ± 0.002
RSLT-7	18.92 ± 2.70	44.32 ± 2.37	12.37 ± 2.52	0.432 ± 0.005
RSLT-9	5.41 ± 0.00	43.12 ± 0.77	12.89 ± 0.55	0.450 ± 0.003

<sup>1)</sup>Abbreviations are same as Table 2.

Values are mean ± S.D.

## (2) 증숙에 따른 홍문동의 유해성분 분석

다환방향족탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 이하 PAHs)는 현재 내분비계장애 물질이면서 또한, 발암가능물질로 Codex 및 JECFA(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)의 위해평가를 위한 우선순위 목록에 포함되고 있다. 발암성에 근거하여 캐나다(8종) 및 미국 EPA(16종) 등에서는 PAHs 중 우선순위대상을 선정하여 식품 및 환경 중 PAHs를 모니터링하고 있으며 EU 등에서는 기준을 설정하여 관리하고 있다. 특히 내분비계장애물질로 알려진 대표적 PAHs 화합물 중 하나인 벤조피렌(Benzo(a)pyrene)은 최근 IARC에서 그룹 1(인체발암물질)로 분류하고 있으며, 식품 중 벤조피렌은 주로 음식을 조리, 가공할 때 식품의 주성분인 탄수화물, 단백질, 지방 등이 열분해 되어 생성되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서 사용한 방법도 지속적인 가열처리와 건조공정을 반복함으로써 벤조피렌의 생성의 위험성이 있기에 본 가공과정에서의 벤조피렌의 생성의 유무를 확인하는 것이 중요하다. 이에 각 증숙단계별 홍문동의 벤조피렌의 생성 유무와 그 함량을 측정하였다. 분쇄한 시료 약 5.0 g을 정밀하게 달아 물 100 mL를 넣어 90 분간 초음파 추출하였다. 여기에 헥산 약 100 mL 및 내부표준액 1 mL을 넣어 호모게나이저로 5 분간 균질하게 섞은 다음 30 분간 초음파 추출하였다. 헥산으로 진탕추출을 반복한 후 감압농축하였다. 활성화된 플로리실카트리지에 추출용액을 넣어 헥산·디클로로메탄혼합액(3 : 1) 20 mL를 초당 2 ~ 3방울의 속도로 용출시킨 후 35 °C이하의 수욕상에서 질소가스 하에 날려 보낸 후 잔류물을 아세토니트릴 1 mL에 녹인 다음 공경 0.45 µm이하의 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 하였다. 표준원액과 내부표준원액 적당량을 정확하게 취하여 아세토니트릴로 mL 당 3, 5, 10, 20 및 40 ng의 벤조피렌과 각각 50 ng의 내부표준물질이 함유되도록 희석하여 표준액으로 하였다. 이때 검액의 검출농도가 검량선의 범위를 벗어나면 표준액의 농도가 검량선의 범위에 들어오도록 농도를 조정하였다. 검액 및 표준액 10 µl씩을 가지고 Supelcosil LC-PAH(4.6 × 250 mm, 5 µm) 컬럼에 아세토니트릴·물 혼합액(8 : 2)을 이용하여 분리하였으며, 형광검출기(여기파장 : 294 nm, 형광파장 : 404 nm)를 이용하여 검출하였다. 각 표준액에서 얻은 내부표준물질 피크면적에 대한 벤조피렌의 피크면적비를 이용하여 분석하였다.

본 연구에서 사용된 증숙 맥문동의 안전성을 확인하기 위하여 벤조피렌 분석 결과 NSLT(맥문동), SLT-15(15시간 증숙 맥문동), SLT-24(24시간 증숙 맥문동)은 증숙 과정 중에서 검출되지 않았다는 결과를 나타내어 숙지황의 벤조피렌 함량 기준은 5ppb이하로 규정하는 기준과 관련하여 본 실험방법에 의해 제조된 증숙 맥문동은 벤조피렌 함량이 나타나지 않아 식품 소재로서의 안전한 제품으로 사료된다.

홍문동 제조에 있어서의 원재료인 맥문동의 잔류 농약에 관련된 기준은 총디디티, 디엘드린(Dieldrin), 총비에이치씨(총BHC : α,β,γ 및 δ-BHC의 합계), 알드린(Aldrin), 엔드린(Endrin), 펜디메탈린(Pendimethalin)이 있다. 분쇄한 시료 약 5 g을 달아 물 40 mL를 넣고 4시간 방치하고 여기에 아세톤 90 mL를 넣고 균질기(homogenizer)로 5분간 균질화한 후 진공펌프와 가지 달린 삼각플라스크 및 부크너갈때기로 감압여과 하였다. 이 여액을 500 mL 분액갈때기에 옮기

고 포화 식염수 50 mL와 증류수 100 mL를 가한다. 이에 디클로로메탄 70 mL를 넣고 심하게 흔들어서 섞은 다음 정치하여 층을 분리시켰다. 디클로로메탄층은 무수황산나트륨을 통과시켜 탈수하고 감압농축기에 넣어 농축한 다음 헥산 4 mL에 녹였다. 활성화된 플로리실 카트리지(6 mL, 1 g)를 이용하여 헥산·디클로로메탄·아세톤 (50:48.5:1.5) 5 mL로 유출하고 수욕상(40 °C 이하)에서 감압농축시켜 용매를 날려 보낸 다음 20 % 아세톤 함유 헥산 2 mL에 녹여 시험용액으로 사용하였으며, GC를 이용하여 각각의 잔류농약의 정성분석 및 정량분석을 수행하였다.

잔류농약 다성분 검사에서 280성분의 잔류농약을 검사한 결과 NSLT(맥문동), SLT-15(15시간 증숙 맥문동) kg당 잔류농약 성분이 검출되지 않아 식품의약품안전청 고시 '식품의 기준 및 규격' 총디디티 0.1mg/kg 이하, 디엘드린 0.01mg/kg이하, 총비에이치씨 0.2mg/kg이하, 알드린 0.01mg/kg이하, 엔드린 0.01mg/kg이하 펜디메탈린 0.02mg/kg이하의 기준에 모두 적합한 수준으로 본 실험방법에 의해 제조된 증숙 맥문동은 식품 소재로서의 안전한 제품으로 사료된다.

중금속 분석은 원자흡광광도법을 이용하여 중금속에 따른 특정파장에 있어서 흡광도를 측정하여, 납과 카드뮴에 대한 농도를 구하였다. 시험용액 및 공시험용액을 원자흡광광도계에 주입하여 흡광도를 구하고 따로 표준용액 및 이의 공시험용액에 대해서도 각각 시험용액의 경우와 같은 조작을 해서 검량선을 작성하여 시험용액의 농도를 구하였다. 중금속 분석 결과 모든 중금속 시험 항목에서 불검출되어 납(mg/kg) 0.3mg/kg 이하, 카드뮴(mg/kg) 0.1mg/kg, 비소(mg/kg), 수은(mg/kg) 의 기준에 모두 적합한 수준으로 본 실험방법에 의해 제조된 증숙 맥문동은 식품소재로서의 안전성이 검증되었다.

## 2. 홍문동의 기능성 성분 분석 및 정제

기능성 성분의 소재화 및 대량생산을 위한 기초 연구를 위하여 홍문동의 기능성 성분의 분석 및 분리에 관한 연구를 수행하였다. 앞에서 기술한 증숙 방법에 따라 맥문동에 증숙처리를 하였으며, 건조 후 메탄올과 부탄올을 이용한 추출물을 제조하여 생리활성 성분을 분리 및 정제하고 있으며, 성분분리 과정중에 도출된 분획물은 제3협동에게 시료를 제공하여 효능연구를 수행하고 있다. 또한, 유기용매를 이용한 추출물의 생리활성 효능에 따른 연구를 통하여 제1세부에서 수행하고 있는 홍문동 농축액의 제조에 기초자료를 제공하고 있다.

### 가. 홍문동의 Methanol 추출물의 제조

식품의 가공방법중의 하나인 증숙 및 건조 공정은 인삼의 가공 제품인 홍삼의 제조에서 알 수 있듯이 가공공정을 통해 성분 변화를 일으켜 생리 활성 성분의 함량을 증가 시키고 새로운 생리 성분들을 생성한다. 증숙 및 건조의 최적화 공정을 이용하여 맥문동을 이용한 증숙 맥문동(홍문동)을 제조하고자 하였다.

본 실험에 사용한 맥문동 괴경(*Liriopsis tuber*)은 경남 밀양시에서 2010년도에 재배한 것을 4월에 수확하여 선별, 세척, 60°C에서 열풍 건조시킨 건근을 사용하였다. 증숙 방법으로는 시간별 증숙과정과 횡수별 증숙과정으로 나누어서 실시하였다. 시간별 증숙과정에 있어서의 증숙온도, 증숙시간, 건조온도, 건조시간 및 최종 건조조건은 Table 1과 같으며, 자세한 조건은 다음과 같다. 맥문동 건근 200g 을 150ml의 물을 가하여 증숙기에 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24시간 동안 증숙하여 70°C 열풍건조기(72시간), 동결건조기(48시간) 처리하였다. 건조 처리된 시료는 실험용 분쇄기를 이용하여 50 mesh 이하로 분쇄하여 맥문동 이화학적 분석과 기능성 성분 분석에 사용하였다. 횡수별 증숙과정에 있어서의 증숙온도, 증숙시간, 건조온도, 건조시간 및 최종 건조조건은 Table 2-2와 같으며, 자세한 조건은 다음과 같다. 증숙 횡수에 따른 시료 처리는 1회 증숙 시, 3시간 증숙 후 70°C 열풍건조기를 이용하여 21시간 건조하여 최종 건조는 70°C 열풍건조기(72시간), 동결건조기(48시간) 하여 1, 3, 5, 7, 9회의 반복적 증숙 공정을 거친 시료를 동일한 방법으로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

시간과 횡수에 따른 증숙 맥문동을 50mesh 로 분쇄하여 시료 20g에 600ml 의 80% Methanol (v/v)을 가하여 shaking incubator에서 12시간 추출하였으며, 이를 3회 반복하여 메탄올 추출물을 제조하여 여과하고, 45°C에 감압 농축하여 생리활성 및 분석용 시료로 사용하였다.

### 나. 항산화능, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석

#### (1) 항산화능

증숙 조건에 따른 홍문동 Methanol 추출물의 생리활성을 측정하기 위하여 항산화능 측정중

의 한 방법인 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거측정을 측정하였다. 50% 에탄올에 농도별로 용해시킨 추출물 100 $\mu$ l와 60 $\mu$ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 100 $\mu$ l를 96 well plate에 넣은 후 혼합하여 차광한 후 상온에서 30분간 방치시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 DPPH 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다.

증숙 시간에 따라 제조된 홍문동의 경우 Fig. 9에서와 같이 증숙 시간이 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 증가함을 알 수 있었으며, 증숙 시간이 18시간에서 유의적으로 가장 높은 라디칼 소거능을 나타내었으며, 또한 증숙 횟수에 따라 제조된 홍문동의 경우, 증숙 시간에 따라 제조된 홍문동과 유사한 경향을 나타내어 증숙 횟수가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 증가하였으며 18시간 이상의 증숙에서는 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 증숙 횟수가 7번 이상에서는 66.49%를 나타내어 유의적으로 높은 DPPH radical 소거능을 확인할 수 있었으며 증숙 시간과 횟수에 대하여 추출물 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 10). 이상의 결과에 따라, 증숙 시간과 횟수에 따라서는 비슷한 경향을 보이므로 홍문동의 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거능은 18시간 증숙이나 또는 7회의 증숙횟수 처리가 적절한 것으로 판단된다. 일반적으로 시간별 증숙 방법이 증숙 횟수에 비하여 공정 단계가 훨씬 편리한 잇점을 가지고 있으므로 따라서 18시간의 증숙 처리하는 것이 홍문동 제조에 있어서는 가장 효율적인 방법으로 판단된다.

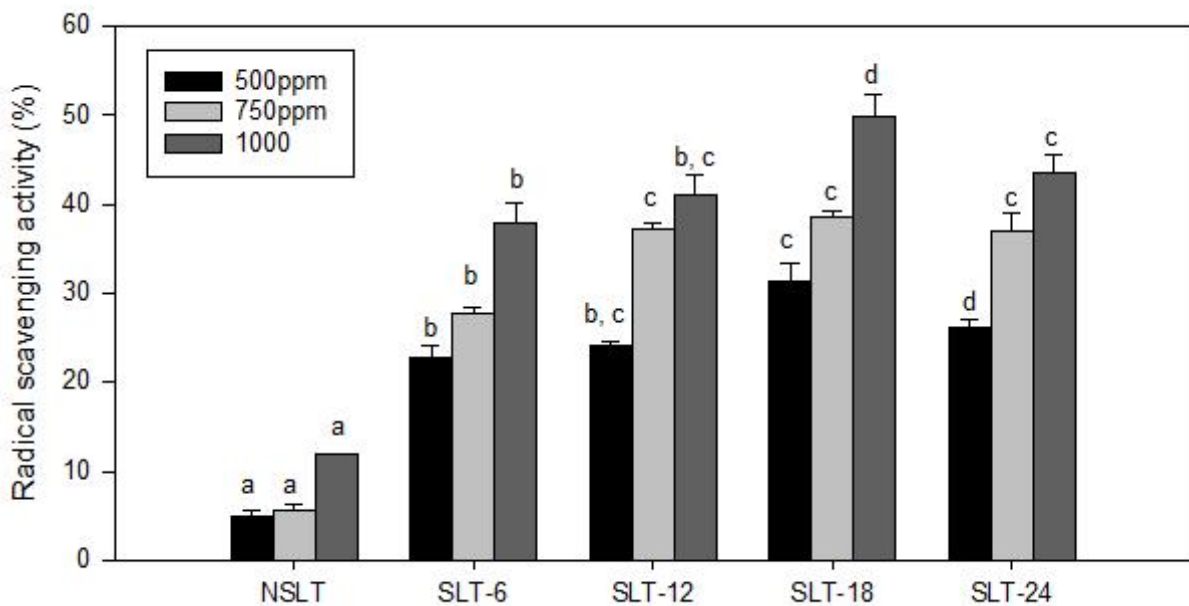


Fig. 9. DPPH radical scavenging activities of Red *Liriopsis tuber* MeOH extracts produced with different steaming time.

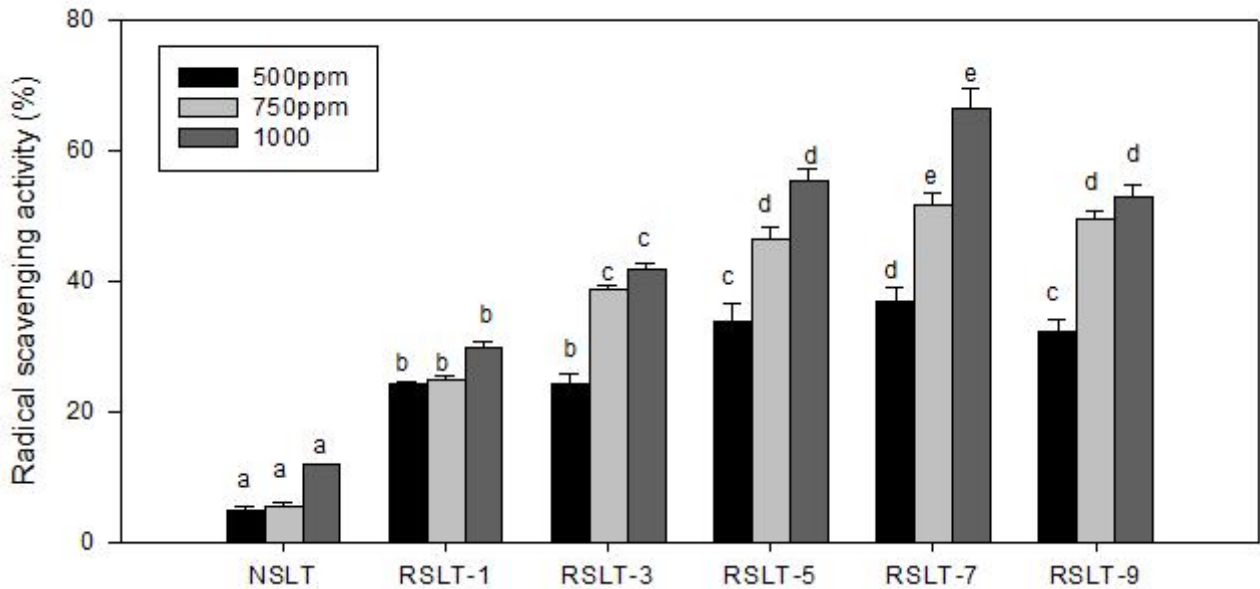


Fig 10. DPPH radical scavenging activities of Red *Liriois tuber* MeOH extracts produced with different steaming frequency.

증숙 맥문동 메탄올 추출물의 생리활성 물질에 따라 DPPH radical 소거능이외에 superoxide anion 소거능, hydroxyl radical 소거능, nitrite 소거능, 총항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)에 대한 효과가 차이가 나며, 이러한 차이는 산화를 막는 메카니즘의 차이에서 유래되며 이에 따라 다양한 생리활성 기능을 나타내게 된다. 따라서 증숙에 따른 맥문동의 superoxide anion 소거능, hydroxyl radical 소거능, nitrite 소거능 및 총항산화능 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)을 측정하였다.

Superoxide anion 소거능의 측정은 100mM phosphate buffer (pH 7.4)에 농도별로 용해시킨 추출물 100 $\mu$ l와 500 $\mu$ M xanthine 100 $\mu$ l, 3mM nitrobluetetrazolium (NBT) 100 $\mu$ l, 0.25U/ml xanthine oxidase 100 $\mu$ l, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 100 $\mu$ l을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. 이 혼합액을 96 well plate에 넣은 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 superoxide anion 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다. Table 9에서와 같이 증숙시간이 증가함에 따라 superoxide anion 소거능은 증가하는 경향을 나타냈으며, 18시간 동안 증숙한 홍문동에서 가장 높은 값인 77.14%의 저해율을 나타내었으며 증숙하지 않은 경우에 비하여 3배 정도의 증가를 나타내었다. 또한 증숙횟수에 따른 소거능의 경우 증숙 및 건조의 횟수가 증가함에 따라 증가하여 7번 반복한 경우 최대치인 56.87%의 저해율은 나타내었으며, 24시간 증숙 맥문동의 경우 감소하는 경향을 나타내었다. Superoxide anion 소거능의 경우 적절한 증숙이 필요하고 과도한 증숙의 경우는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 9. Antioxidative activities of Red Liriopsis tuber MeOH extracts according to different steaming time.

Sample	Superoxide anion scavenging activity (%)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	Nitric oxide scavenging activity (%)	TEAC (mM Trolox equivalent)
NSLT	22.23 ± 1.84	21.43 ± 1.50	15.56 ± 1.10	3.60 ± 0.01
SLT-6	40.72 ± 1.26	28.66 ± 0.61	23.49 ± 3.40	3.68 ± 0.05
SLT-12	50.29 ± 0.50	35.01 ± 1.50	27.42 ± 0.82	3.77 ± 0.02
SLT-18	77.14 ± 0.13	46.10 ± 1.51	26.94 ± 1.21	4.01 ± 0.11
SLT-24	72.65 ± 0.88	33.80 ± 0.90	24.94 ± 0.82	3.78 ± 0.01

<sup>1)</sup>Abbreviations are same as Table 1.

Values are mean ± S.D.

Table 10. Antioxidative activities of Red Liriopsis tuber MeOH extracts according to different steaming frequency.

Sample	Superoxide anion scavenging activity (%)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	Nitric oxide scavenging activity (%)	TEAC (mM Trolox equivalent)
NSLT	22.23 ± 1.84	21.43 ± 1.50	15.56 ± 1.10	3.60 ± 0.01
RSLT-1	32.98 ± 0.80	25.82 ± 0.79	18.22 ± 0.58	3.67 ± 0.04
RSLT-3	33.73 ± 0.14	29.71 ± 1.13	23.24 ± 0.98	3.67 ± 0.06
RSLT-5	42.05 ± 1.09	19.75 ± 0.63	23.70 ± 0.71	3.74 ± 0.12
RSLT-7	56.87 ± 1.12	13.53 ± 0.35	32.20 ± 0.71	3.88 ± 0.04
RSLT-9	48.62 ± 1.04	11.04 ± 0.98	19.39 ± 1.80	3.90 ± 0.01

<sup>1)</sup>Abbreviations are same as Table 2.

Values are mean ± S.D

Hydroxyl radical 소거능 측정에는 PBS에 용해시킨 추출물 175 $\mu$ l와 10mM FeSO<sub>4</sub>-EDTA 25 $\mu$ l, 10mM Deoxyribose 25 $\mu$ l, 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 $\mu$ l을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응하였다. 2.8 % trichloroacetic acid 250 $\mu$ l, 1% tribarbituric acid 250 $\mu$ l를 가하여 100 $^{\circ}$ C에 끓여 반응 정지 시켰다. 이 혼합액을 96 well plate에 넣은 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 hydroxyl radical 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다. 증숙 시간이 증



가함에 따라 hydroxyl radical 소거능은 증가하는 경향을 나타냈으며, 18시간 동안 증숙한 홍문동에서 가장 높은 값인 46.10%의 저해율을 나타내어 증숙 하지 않은 경우에 비하여 2배 정도의 증가를 나타내었다(Table 9). 그러나 24시간 증숙 부터는 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 증숙횟수에 따른 소거능의 경우 증숙 및 건조의 횟수가 증가함에 따라 증가하여 3번 반복한 경우 최대치인 29.71%의 저해율은 나타내었으며, 3회 이상의 증숙의 경우 유의적으로 감소하는 경향을 나타내어 18시간 증숙과 3회 증숙에서 유의적으로 가장 높은 Hydroxyl radical 소거능을 나타내었다(Table 10).

아질산염(nitrite) 소거능은 발암성 물질인 nitrosoamine 생성의 전구체로 작용하는 아질산염의 소거하는 능력을 측정하는 방법으로 100mM Nitroprusside용액 400 $\mu$ l에 시료 100 $\mu$ l을 혼합한 후 100mM phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 다음 상온에서 2시간 30분 동안 정치시키고 200 $\mu$ l씩 취한 다음 조제한 Griess(30% acetic acid로 조제한 1% Sulfanilic acid와 0.1% Naphtylethylene diamine dihydrochloride를 1:1비율로 혼합한 것) 시약 200 $\mu$ l를 가하여 잘 혼합한 후 30분간 방치하고 540nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산량을 산출하였다. 대조구는 Griess 시약 대신에 증류수 200 $\mu$ l를 가하여 동일한 방법으로 측정하였다. 증숙시간에 따른 nitrite 소거능은 증숙시간이 늘어남에 따라 증가하는 경향을 보였으며 12시간과 15시간 증숙에서는 일정한 경향을 나타내었으며, 12시간 증숙의 경우에 최대값인 27.42%를 나타내었고(Table 9), 증숙횟수에 따른 소거능은 7회 32.20%의 유의적으로 높은 저해율을 나타내었다(Table 10).

총항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)의 측정은 7mM ABTS (2,2'-azono-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate))와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 ABTS radical cation (ABTS $\cdot^+$ )를 만들어 12시간 방치한 후 734nm에서 흡광도가 0.70 $\pm$ 0.02가 되도록 PBS (pH 7.4)로 조정된 후 사용하였다. 20 $\mu$ l의 증숙 맥문동 열수추출물과 Trolox(표준 물질)에 ABTS $\cdot^+$  용액 1ml를 첨가하여 734nm에서 6분간 흡광도를 측정하여 총항산화능은 Trolox 표준 용액을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다. 증숙 시간이 늘어남에 따라 증가하여 18시간에서 유의적으로 가장 높은 총항산화능을 나타내었으며, 증숙 횟수가 증가함에 유의적으로 증가하는 유사한 경향을 나타내었다(Table 9, 10).

## (2) 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

홍문동 메탄올 추출물의 총폴리페놀 함량은 시료 50 $\mu$ l와 증류수 500 $\mu$ l에 Folin 시약 100 $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 100 $\mu$ l 가하여 혼합한 다음, 차광하여 실온에서 1시간 정치한 후 UV-spectrophotometer를 사용하여 725nm에서 흡광도를 조사하였다. 정량에 사용한 표준품은 Caffeic acid로써, 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 총폴리페놀 함량을 측정하였다. Fig. 11에서와 같이 증숙시간 및 증숙횟수가 증가함에 따라 급격히 총폴리페놀 함량이 증가하였으며, 증숙시간의 경우는 18시간이 가장 높은 함량인 시료 1g당 18.73mg의 함량을 나타내었으며, 증숙횟수의 경우에는 7번 증숙 및 건

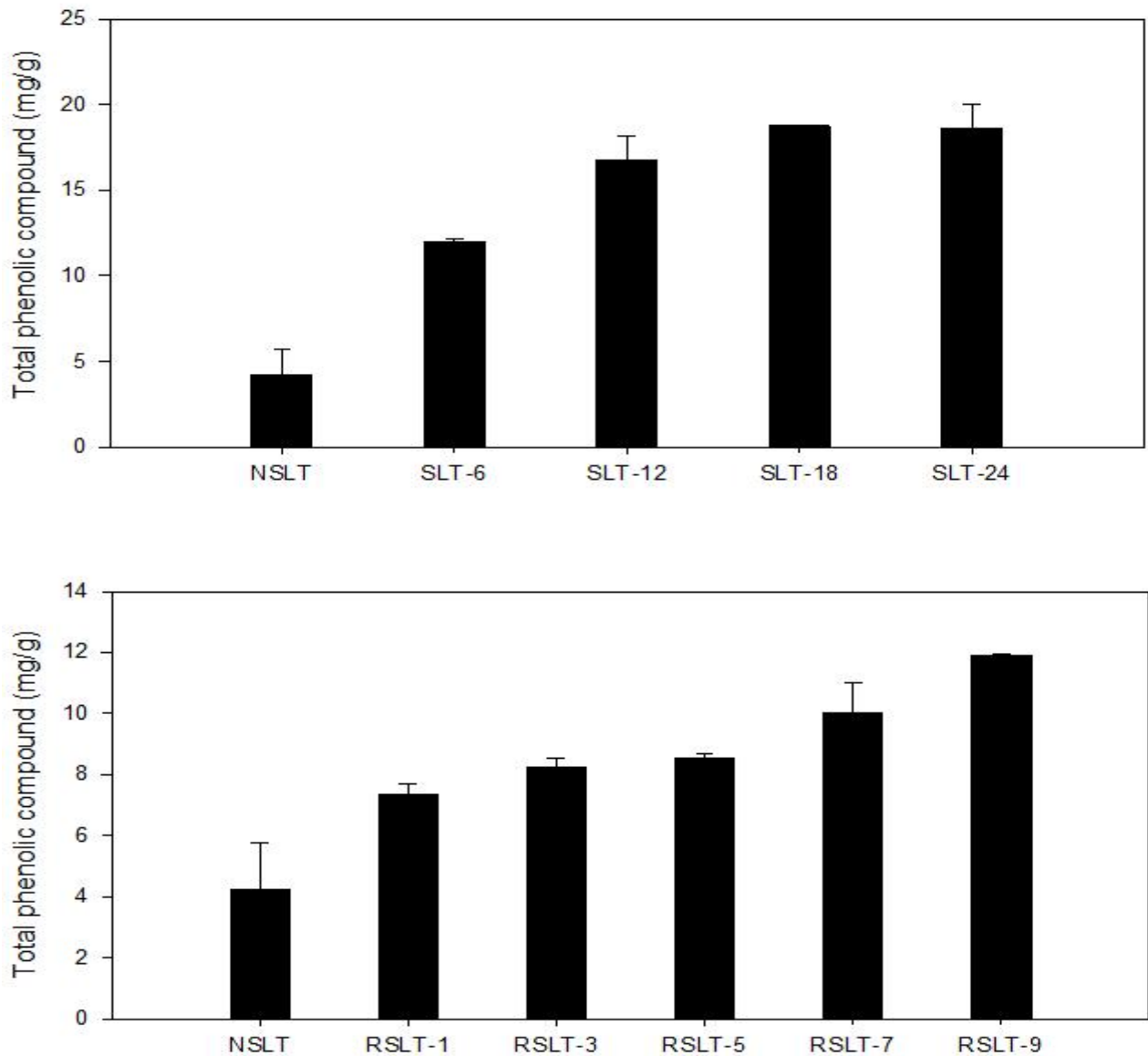


Fig. 11. Contents of total phenolic compound of Red *Liriodopsis tuber* MeOH extracts produced with different steaming time (a) and frequency (b).

조를 반복했을 때 11.91mg으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 7회 증숙 이상에서는 유사한 경향을 나타냈으며 증숙하지 않은 맥문동보다 3~4배 증가하여 메탄올 추출물의 폴리페놀 성분 분석을 실시하여 증가된 폴리페놀 화합물을 분리, 정제 하여 기능성 평가에 사용하고자 하였다. 총플라보노이드 함량의 측정은 메탄올 추출물 100 $\mu$ l에 90% diethylene glycol 1ml, 1N NaOH 100 $\mu$ l를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 정치한 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로 사용한 naringin의 표준 검량선으로부터 총 플라보노이드 함량을 나타내었다. Fig. 12에 서와 같이 증숙시간 및 증숙횟수가 증가함에 따라 급격하게 증가하는 경향을 보였으며, 증숙

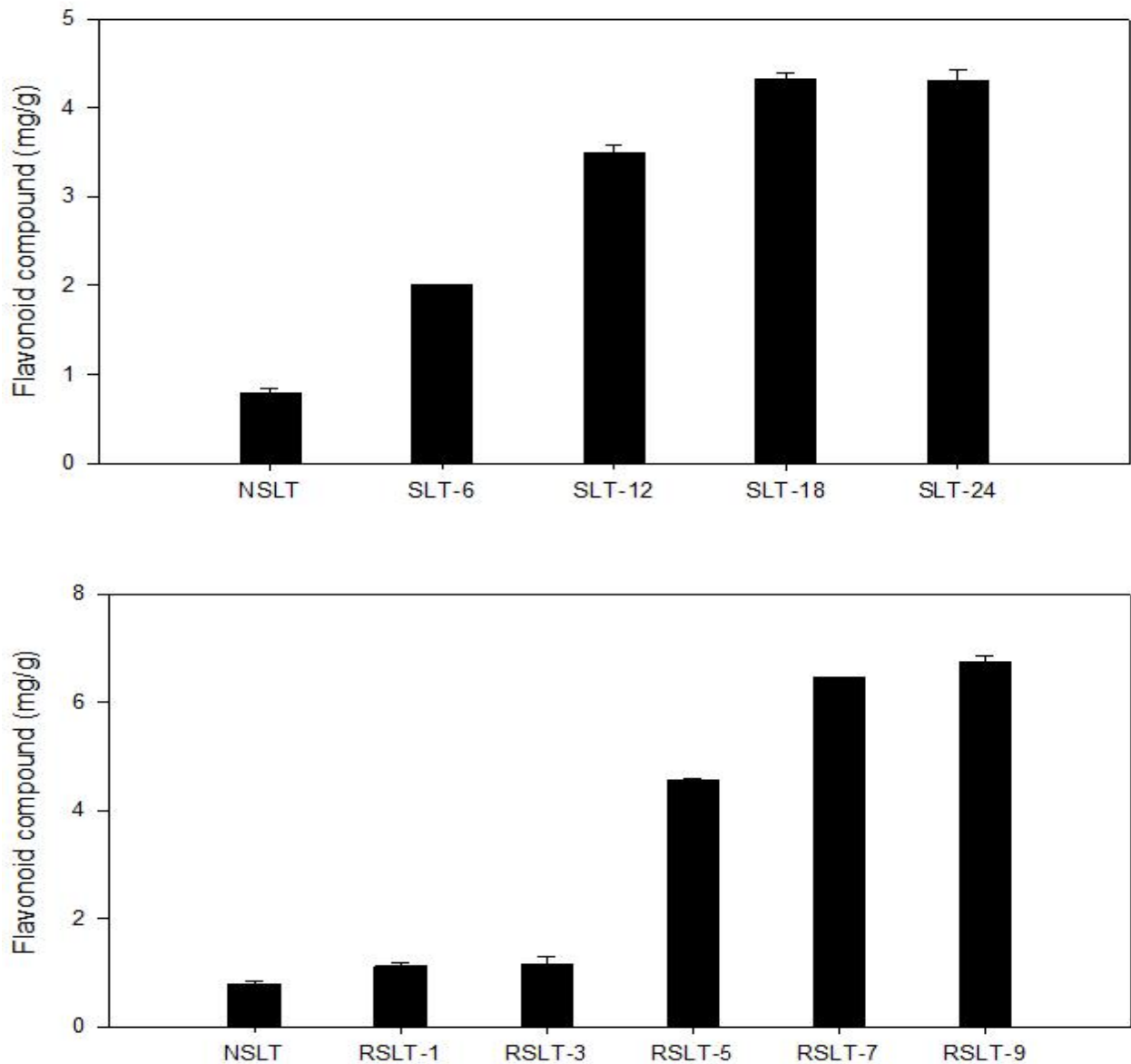


Fig. 12. Contents of flavonoid of Red *Liriodopsis tuber* MeOH extracts produced with different steaming time (a) and frequency (b).

시간의 경우는 18시간이 가장 높은 함량인 시료 1g당 4.32mg의 함량을 나타내었으며, 증숙 횟수의 경우에는 9번 증숙 및 건조를 반복했을 때 6.73mg으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 맥문동을 증숙하여 홍문동을 제조하였을 경우 최대 7배 이상의 총플라보노이드 성분이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이는 총폴리페놀 함량 경우와 동일한 경향임을 알 수 있었다.

이상의 총페놀물질 및 총플라보노이드 함량의 측정을 통하여 증숙시간 및 증숙 횟수에 따라 기능성 성분이 4~7배 정도 증가함을 알 수 있었으며, 맥문동의 증숙 과정을 이용하여 홍문동을 제조하여 메탄올 추출한 경우, 기존의 맥문동에 비해서 생리활성물질의 함량이 유의적으로 증가하였으며 18시간 증숙맥문동과 7회 증숙맥문동의 페놀 물질과 플라보노이드 성분에 대하

여 추후 성분 분석과 분리가 필요할 것이라 예상되어지며 증숙맥문동의 열수 추출물의 페놀물질과 플라보노이드 물질 보다 높은 함량을 나타내었다. 항산화 작용 및 식물체의 생리활성 성분인 폴리페놀과 플라보노이드 함량도 유의적으로 증가하여 이는 증숙 을 통한 열처리 과정과 건조 과정을 반복적을 수행하여 연화된 맥문동 조직이 페놀성 화합물의 추출 증가에 기인하였으며 생리활성물질의 용출이 용이해지면서 폴리페놀 및 기능성 화합물이 증가되었을 것으로 예상되어 기능성 물질의 분리 및 구조 분석을 하고자 하였다.

다. 홍문동의 기능성 성분 분석 및 정제

(1) MeOH 추출물의 HPLC 분석

MeOH 추출물을 80% 메탄올로 희석하여 syringe filter(0.45 $\mu$ m)로 필터링하여 4mg/ml의 시료를 Table 11와 같은 조건으로 HPLC 분석을 수행하였으며 HPLC장치는 Interface iLC 3000을 사용하였다. 증숙하지 않은 맥문동에 비교하여 증숙 후 맥문동은 280nm의 파장에서 흡광하는 물질을 포함하는 것으로 나타났으며, UV 흡광을 하지 않는 물질을 Charged aerosol detector 를 이용하여 검출하였다. UV Peak 1, 2, 3, 4 등의 물질 생성되어 시간별, 횟수별 증숙 정도에 따라서 이러한 물질의 생성 패턴을 알아보하고자 하였다. Fig. 13와 같이 생성된 물질의 특성을 확인하기 위하여 260~340nm의 다파장 검출기를 이용해 물질이 나타내는 spectrum을 측정하였다. UV Peak 1, 2, 3, 4 가 각각 고유한 파장을 나타내어 물질 확인을 위한 정보를 제공하여 각각의 standard 물질이 나타내는 고유한 파장과 비교하여 추후 연구에서 물질을 성분을 확인하기 위한 기초 자료로 사용하고자 하였다.

Table 11 . HPLC condition for methanol extract from Red *Liriopsis tuber*

Column	SHISEIDO CAPCELLPAC C18 MG
Detector	Photodiode array detection (PAD) at 280nm Charged aerosol detection (CAD)
Injection volume	20 $\mu$ l
Flow rate	0.8 ml/min
Mobile phase	0~30 min (B: 8→12%) 30~35 min (B: 12→100%)

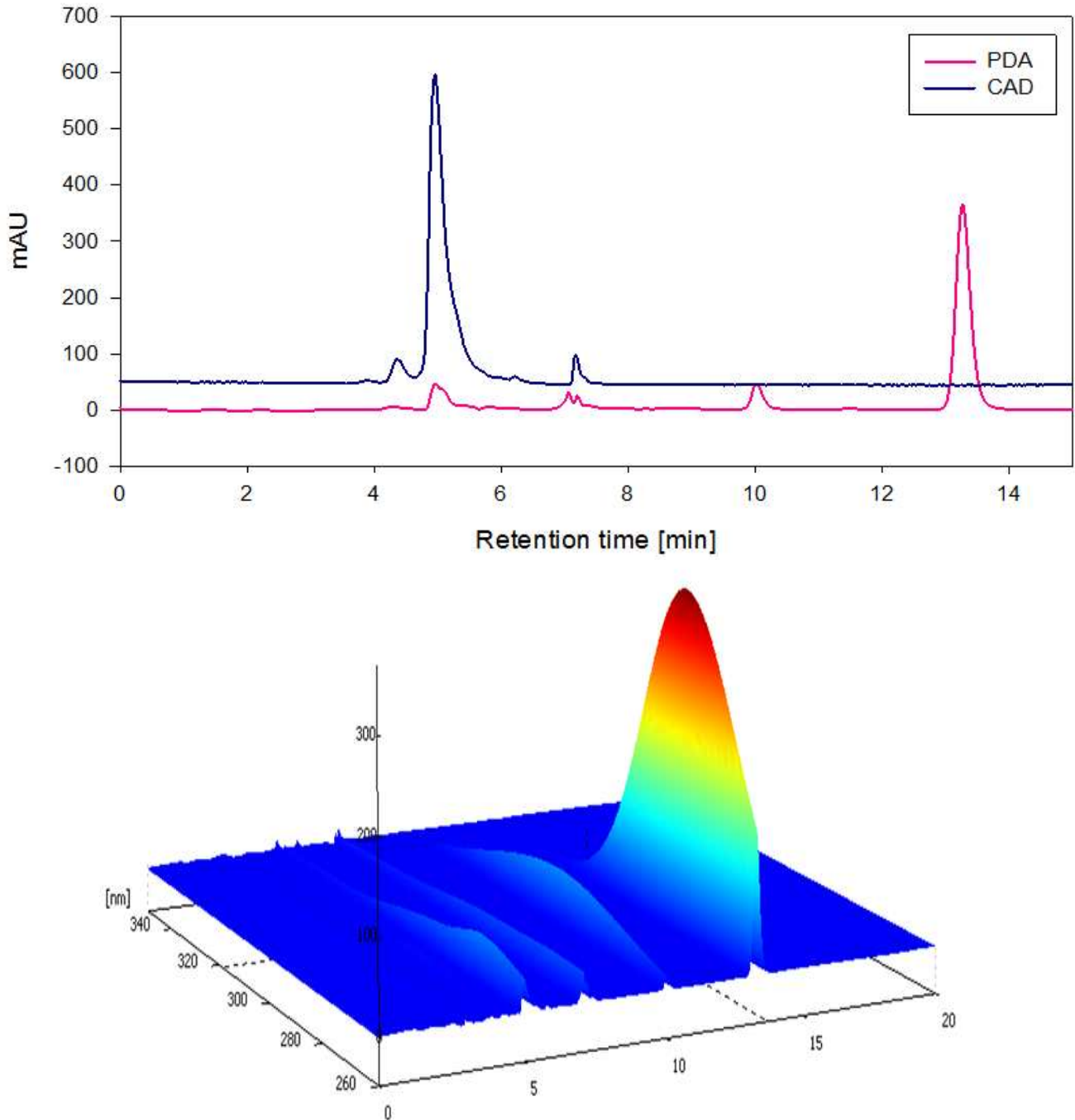


Fig 13. HPLC Chromatogram of red Liriopsis tuber methanol extract by HPLC with photodiode array detection (PAD) at 280nm (upper) and its 3D spectrum (lower).

## (2) Preparative HPLC를 이용한 성분 분리

증숙 맥문동의 기능성 성분의 분리를 위하여 증숙 맥문동을 메탄올 추출하여 Preparative HPLC(Agilent 1100, USA)를 사용하여 chromatogram을 여러 분획으로 나누어 각 분획을 분리, 정제하여 화합물의 구조 및 성분을 분석하고자 하였다. 분석조건은 Table 12과 같고 시료를

retention time 및 peak slope/time으로 각각을 Fraction A, B, C, D, E 분획으로 각각 획분하여 분리하였다 (Fig. 14). 분리된 시료는 농축하여 0.45 $\mu$ m membrane filter를 사용하여 필터링하여 정제 및 구조 분석에 사용하였다.

Fig. 15와 같이 증숙맥문동에서 Preparative HPLC를 통하여 분리된 Fraction B, C, D 를 각각 isocratic condition (0→25min : ACN 8%)으로 HPLC 및 TLC로 분석한 결과 물질의 정제 및 분리가 더 요구되어 Recycling HPLC를 이용하여 정제하였다. 재순환 시스템을 이용하여 target compound의 순도를 높이고, FT-IR 및 NMR등의 구조 분석과 기능성 물질의 생리활성을 분석하는 시료로 이용하고자 하였다.

Table 12. Preparative HPLC condition for methanol extract from Red *Liriope tuber*

Column	Phenomenex Gemini-NX 5 $\mu$ m, C18, 250*21.2mm
Detector	photodiode array detection (PAD) at 280nm
Injection volume	1800 $\mu$ l
Flow rate	20 ml/min
Mobile phase	0~30 min (B: 8→12%) 30~35 min (B: 12→100%)

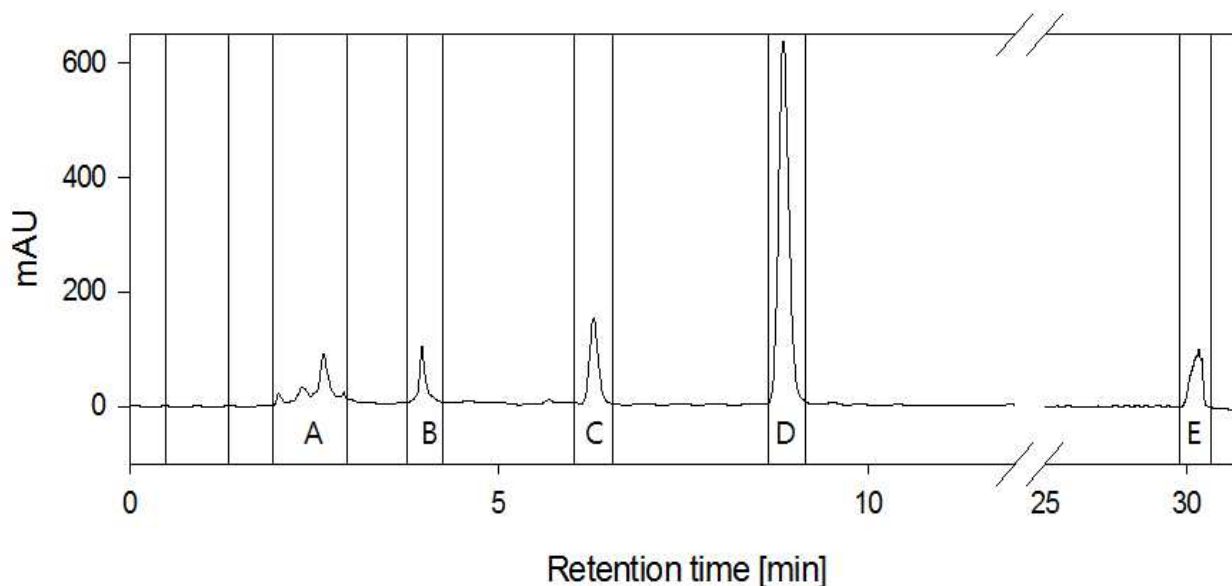


Fig 14. HPLC Chromatogram of compounds (A-E) isolated from red *Liriope tuber* methanol extract by Preparative HPLC with photodiode array detection (PAD) at 280nm

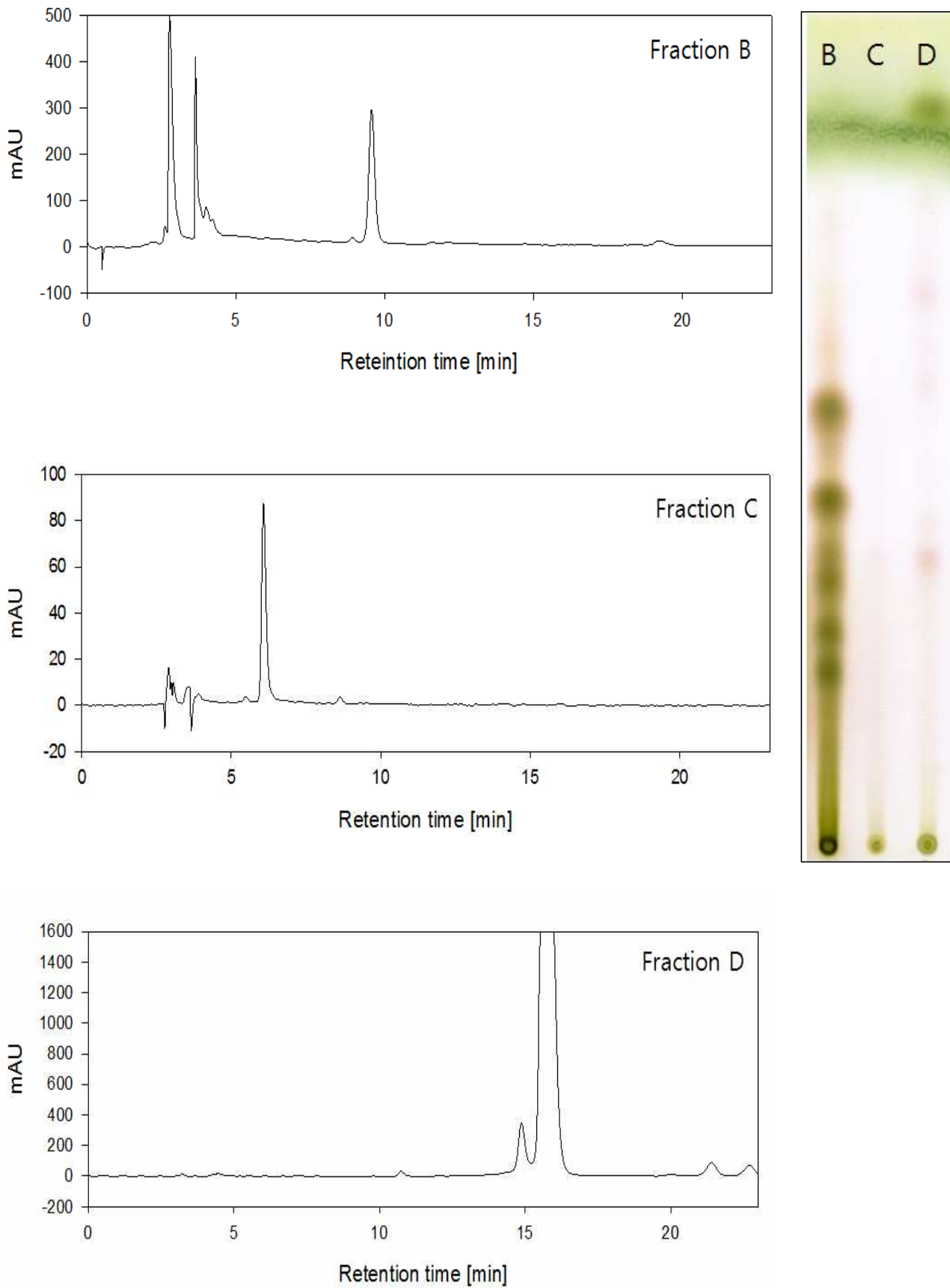


Fig. 15. HPLC chromatogram and TLC analysis of isolated fractions in Fig. 14.

### (3) Recycling HPLC를 이용한 순수정제

12시간 증숙 맥문동의 메탄올 추출물을 Preparative HPLC를 이용하여 소분획한 Fraction D를 농축하여 Recycling HPLC (JAI, Japan)에 의해 5회 재순환하여 물질을 분리하였다. 칼럼은 JAIGEL ODS-AP (20ΦX500mm), 온도는 30℃ 이동상의 속도는 3.5ml/min, UV 파장은 280nm, 이동상의 조성은 50% Methanol 용액을 사용하였다. Fig. 16과 같이 Recycling HPLC에 의해 분리한 compound를 TLC, analytical HPLC 및 HPLC/MS를 통하여 순도 및 Mass에 의하여 각각의 분자량을 확인하고자 하였다. 5번의 재순환에 의하여 분리 과정 중의 불순물을 제거하고 target compound만을 분리하여 증숙 맥문동의 메탄올 추출물에 함유된 기능성 물질을 순수 분리 및 정제하였다. 정제전과 정제후의 순도를 비교하기 위하여 HPLC를 이용해 분석한 결과는 Fig. 17에서 보는 바와 같이 순수하게 분리된 것으로 판단된다.

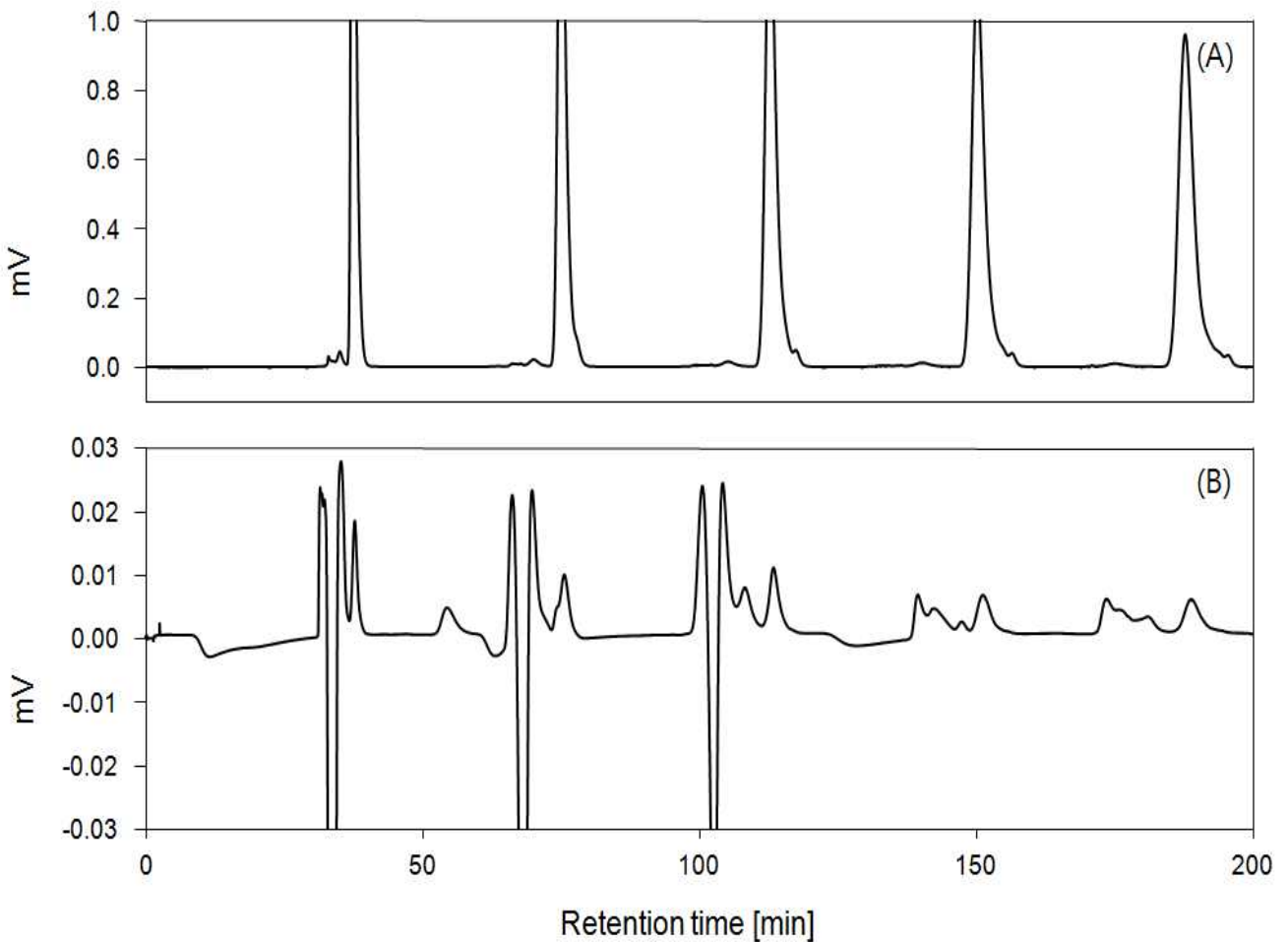


Fig. 16. Recycling HPLC chromatogram for isolation of Fraction D from SLT12 MeOH extract. : (A) with photodiode array detection (PAD) at 280nm (B) with RI detector



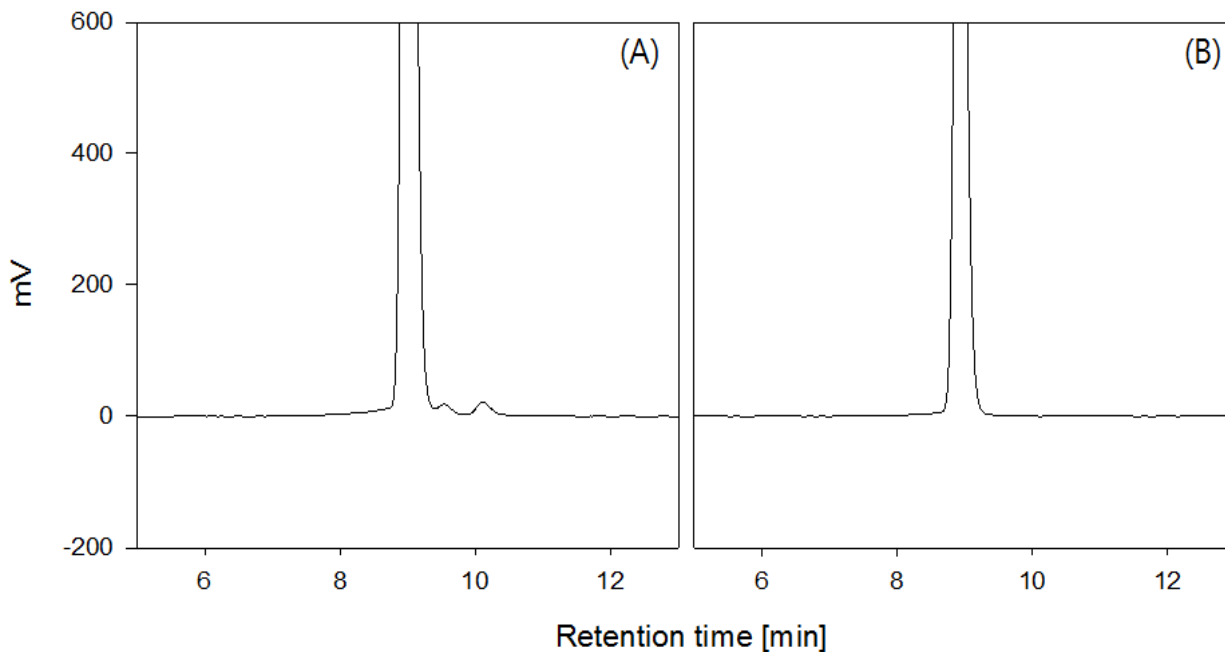


Fig. 17. HPLC chromatogram before(A) and after(B) recycling HPLC of Fraction D.

#### (4) 구조 분석

Recycling HPLC를 이용하여 분리, 정제된 물질(Fig. 17)의 구조분석을 위하여, LC-MS-APCI (Agilent 1100/G2708DA, Agilent tech., US), FT-IR,  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^1\text{H}$ -NMR을통하여 예상표준물질의 분자량과 그에 따른 구조를 분석하였다. LC/MS는 APCI 이온화방법을 이용하여 Table 13의 방법으로 분석하였으며, 분석 결과 Fig. 18과 같이  $m/z$  (mass-to-charge ratio: 분자량 대 전하비)가 표준물질(5-HMF)와 시료로부터 형성된 질량스펙트럼이 동일하게 났으며 또한 HPLC-DAD의 UV스펙트럼도 일치하여 두 물질은 같은 물질로 판단되었다. APCI 이온화 방법을 이용한 분자량 및 fragmentation pattern은 positive ion  $[m+H]^+$  127.1, 83.2 로 확인되었으며, 예상표준물질인 5-Hydroxymethyl-2-furfural [ $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ ]로 확인되었다(Table 14).

핵자기 공명분석인 NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, Bruker-AMX 400 (400MHz)을 실시 하여 spectra를 얻었다. 핵자기 공명 분석을 위한 용매로는  $\text{CD}_3\text{OD}$  를 이용하였으며, NMR 분석 결과는 Fig. 19와 같으며  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 9.53(1H, s, H-6), 7.38(1H, d,  $J = 3.4$  Hz, H-3), 6.58(1H, d,  $J = 3.4$  Hz, H-4), 4.60 (2H, s, H-7);  $^{13}\text{C}$ -NMR(400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 179.42(C-6), 163.21(C-5), 153.92(C-2), 124.87(C-3), 110.86(C-4), 57.64(C-7)로 나타났다.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) spectrum의 결과는 Fig. 20과 같으며 3400, 2850, 1670, 1450 ( $\text{CHCl}_3, \text{cm}^{-1}$ ) 스펙트럼이 나타나 Furan ring =CH, C=O, Furan ring C=C, Furan ring C-O-C의 구조가 확인되어 표준물질과 구조가 동일한 것으로 나타났다.

Table 13. LC/APCI-MS condition for compound D from Red *Liriopsis tuber*

Column	SHISEIDO CAPCELLPAC C18 MG
Detector	photodiode array detection (PAD) at 280nm
Injection volume	10 $\mu$ l
Flow rate	1 ml/min
Mobile phase	0~10 min (B: 10%)
Ionization mode	Negative APCI
Nebulizer pressure	60 psi
Drying gas flow	12L/min
Drying gas temperature	325 $^{\circ}$ C
Vaporizer temperature	425 $^{\circ}$ C
Capillary voltage	4 kV
Fragmentor voltage	5.5 kV

Table 14. Identification of compound isolated from SLT methanol extract elucidated by APCI<sup>+</sup>ion showing their molecular mass and molecular formula.

Identification	Molecular formula	Approximate molecular mass	Adduct with H <sup>+</sup>	Identity
5-Hydromethyl-2-furfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126.1 g/mol	127.1	[M+H] <sup>+</sup>

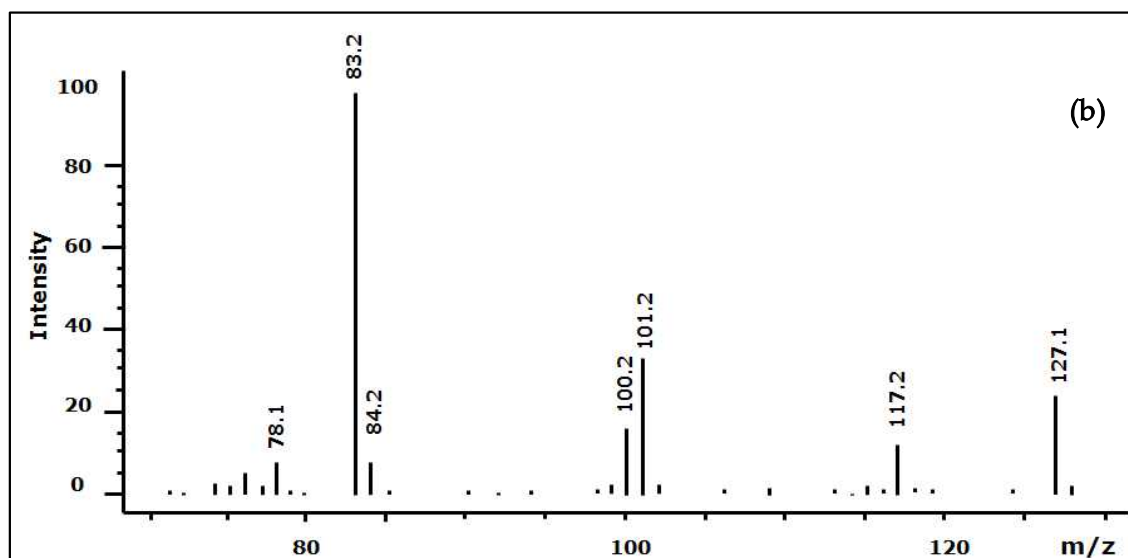
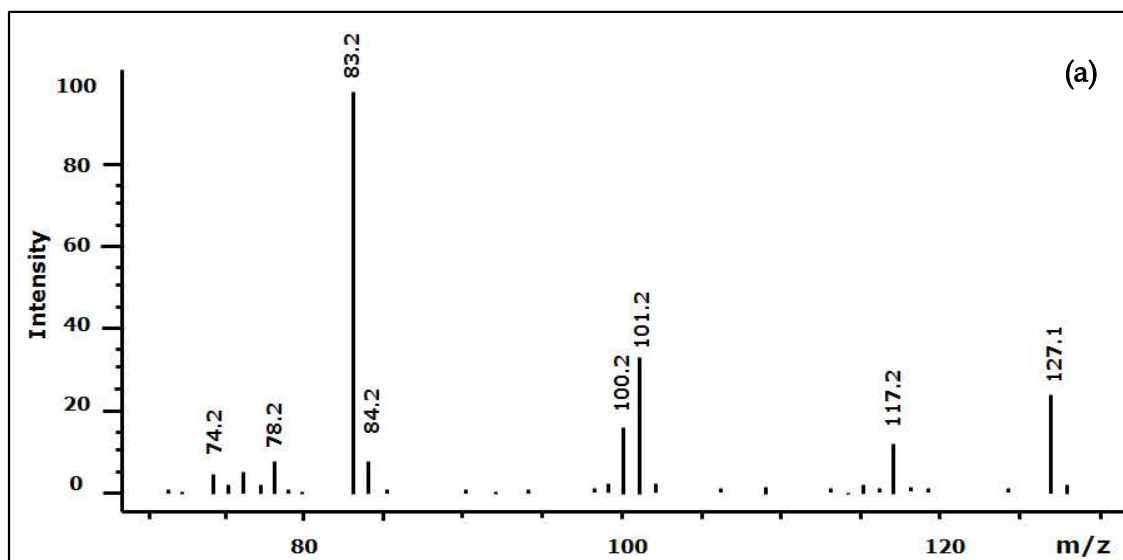


Fig. 18. Mass spectra of isolated compound D from red *Liriopsis* tuber MeOH extract(a) and 5-HMF(b)

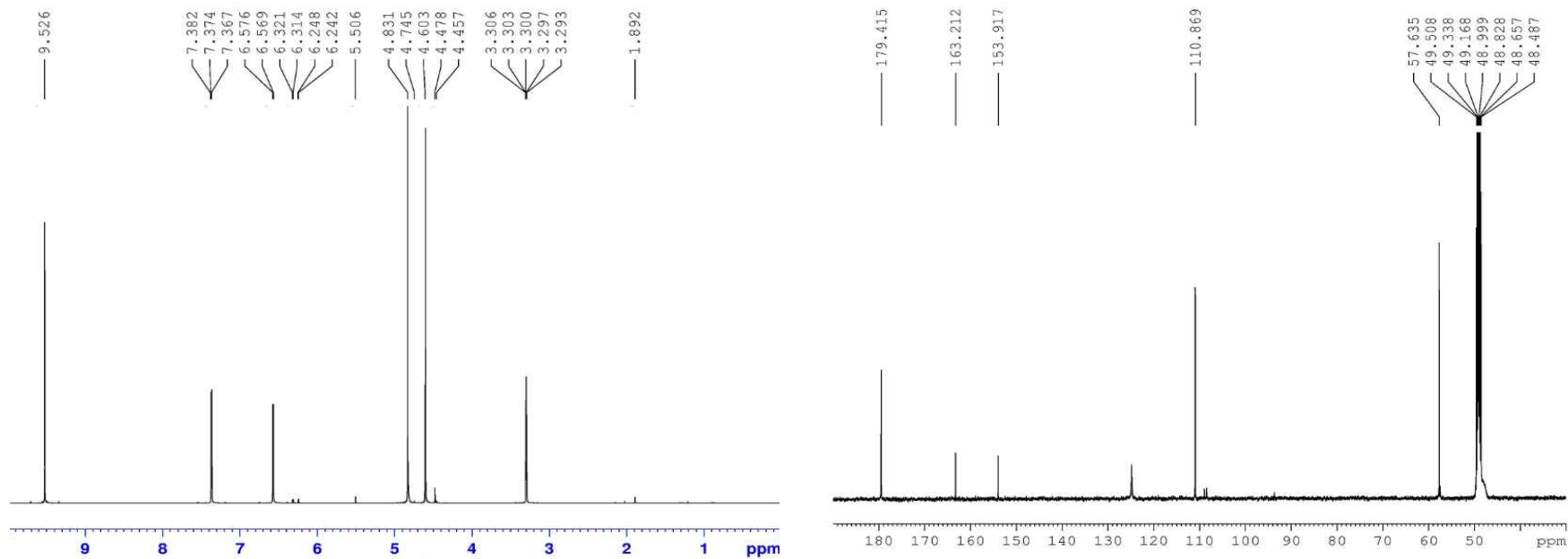


Figure 19.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound identified from SLT methanol extract

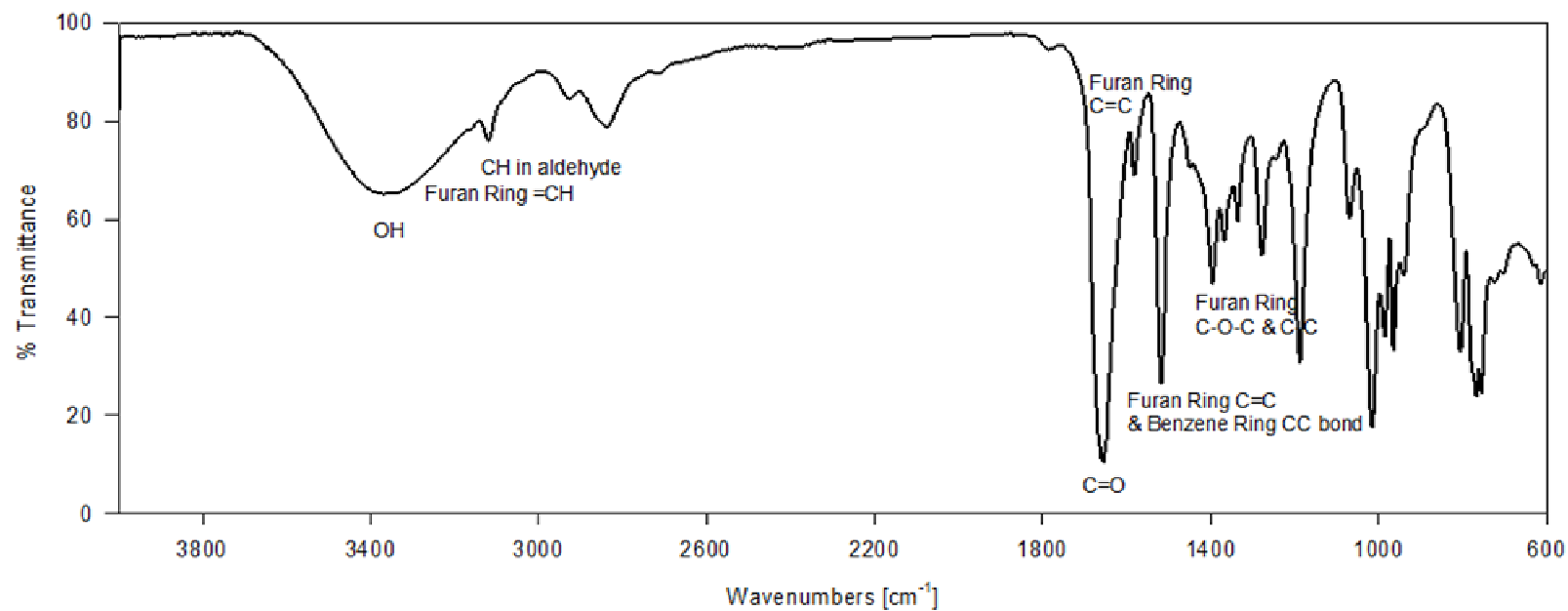


Figure 20. FT-IR spectra of compound isolated from SLT methanol extract

이 결과 홍문동에서 Prep-LC로 분리되어진 compound는 5-Hydroxymethyl-2-furfural [C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]로 구조 동정 되었다(Fig. 21).

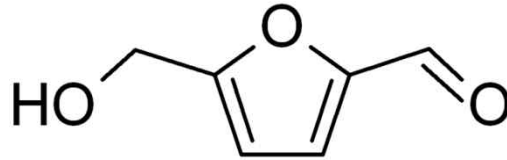


Figure 21. Chemical structure of 5-hydroxymethyl-2-furfural

#### (5) 증숙에 따른 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) 의 변화

5-HMF (5-hydroxymethyl-2-furaldehyde)는 증숙이나 열처리 과정에서 다당류가 분해되어 단당류의 농도가 증가하게 되고 분해산물 중 하나로 생성되는 물질로 식품 중의 비훈적 갈변반응으로 잘 알려져 있는 갈변물질로 대한약전에서 숙지황의 경우 5-HMF를 지표물질로 0.1% 이상 함유하도록 규정하고 있으며, 도라지, 더덕, 홍삼의 경우 증숙 과정에서 나타나는 지표 물질로 사용되고 있다. 맥문동의 경우 아직 정확한 규정이 없으며 5-HMF는 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성 등의 기능성 등이 알려져 있다.

증숙 시간에 따라 5-HMF의 함량이 증가하였으며 증숙 시간이 길어질수록 증가되는 경향을 나타내다가 24시간 증숙 맥문동의 경우 5-HMF의 함량이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 22). 증숙 횟수의 경우 메탄올 추출물에서 증숙하지 않은 맥문동에서는 5-HMF가 생성되지 않았으며 증숙 횟수가 증가할수록 열처리 시간의 증가로 인한 5-HMF의 함량이 증가되는 경향을 나타내어(Fig. 23), HPLC chromatogram을 5-HMF 표준물질의 곡선으로 환산하여 그 함량을 산출한 결과, Fig. 24와 같이 증숙하지 않은 맥문동에서는 메탄올 추출물 100g 당 0.0041mg 이 함유되어져 있어 극히 미량 건조 과정에서 생성되는 것이라 생각되어 지고, 증숙 시간이 증가할수록 열처리 온도에서 유리당이 분해되어 5-HMF를 생성하여 18시간 증숙의 경우 100g당 0.8522mg 포함하며 24시간 증숙의 경우 5-HMF가 점차 감소하는 경향을 나타내었고, 증숙횟수에 따른 함량은 증숙 횟수가 증가 할수록 5-HMF의 양이 점점 증가하는 것으로 나타나 이러한 결과는 5-HMF와 항산화 활성 결과와 유사한 경향이 나타났다.

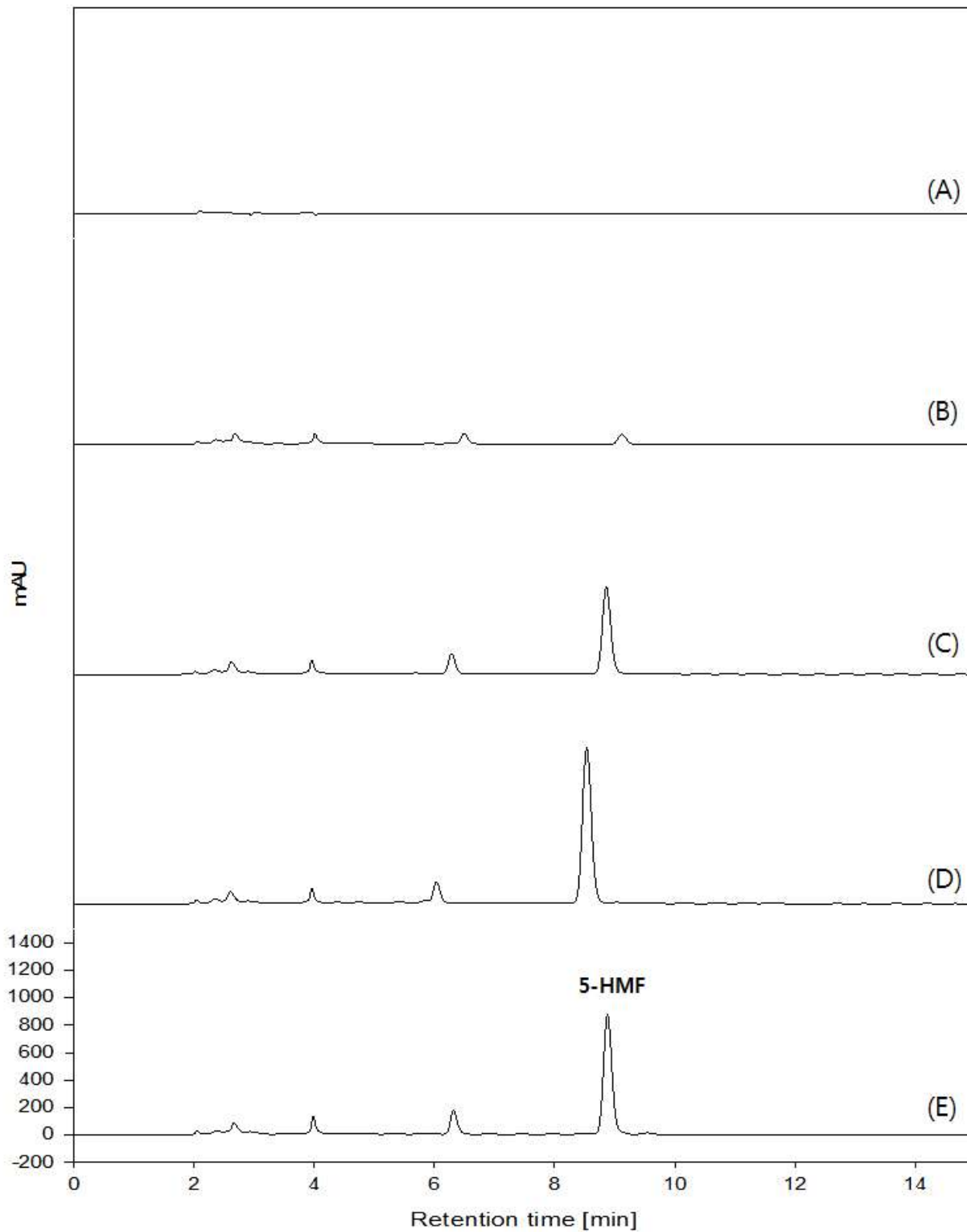


Fig. 22. HPLC chromatogram of MeOH extracts of Red Liriopsis tuber according to different steaming time with photodiode array detection (PAD) at 280nm

(A) NSLT MeOH extract (conc. 200 ppm, in 5% M); (B) SLT-6; (C) SLT-12; (D) SLT-18; (E) SLT-24.

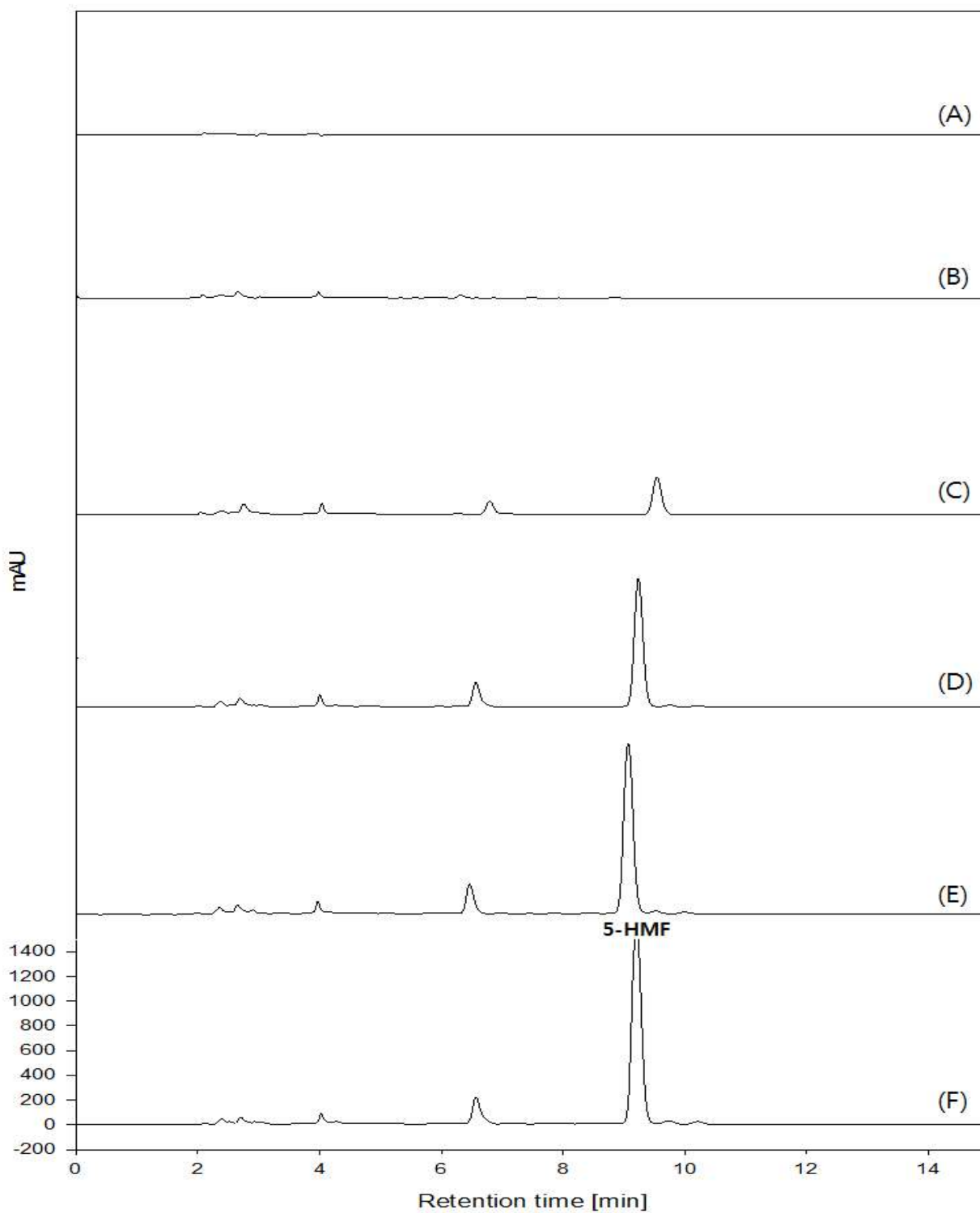


Fig. 23. HPLC chromatogram of MeOH extracts of Red Liriopsis tuber according to different steaming frequency with photodiode array detection (PAD) at 280nm

(A) NSLT BuOH extract (conc. 500 ppm, in 80% M); (B) RSLT-1; (C) RSLT-3; (D) RSLT-5; (E) RSLT-7; (F) RSLT-9.



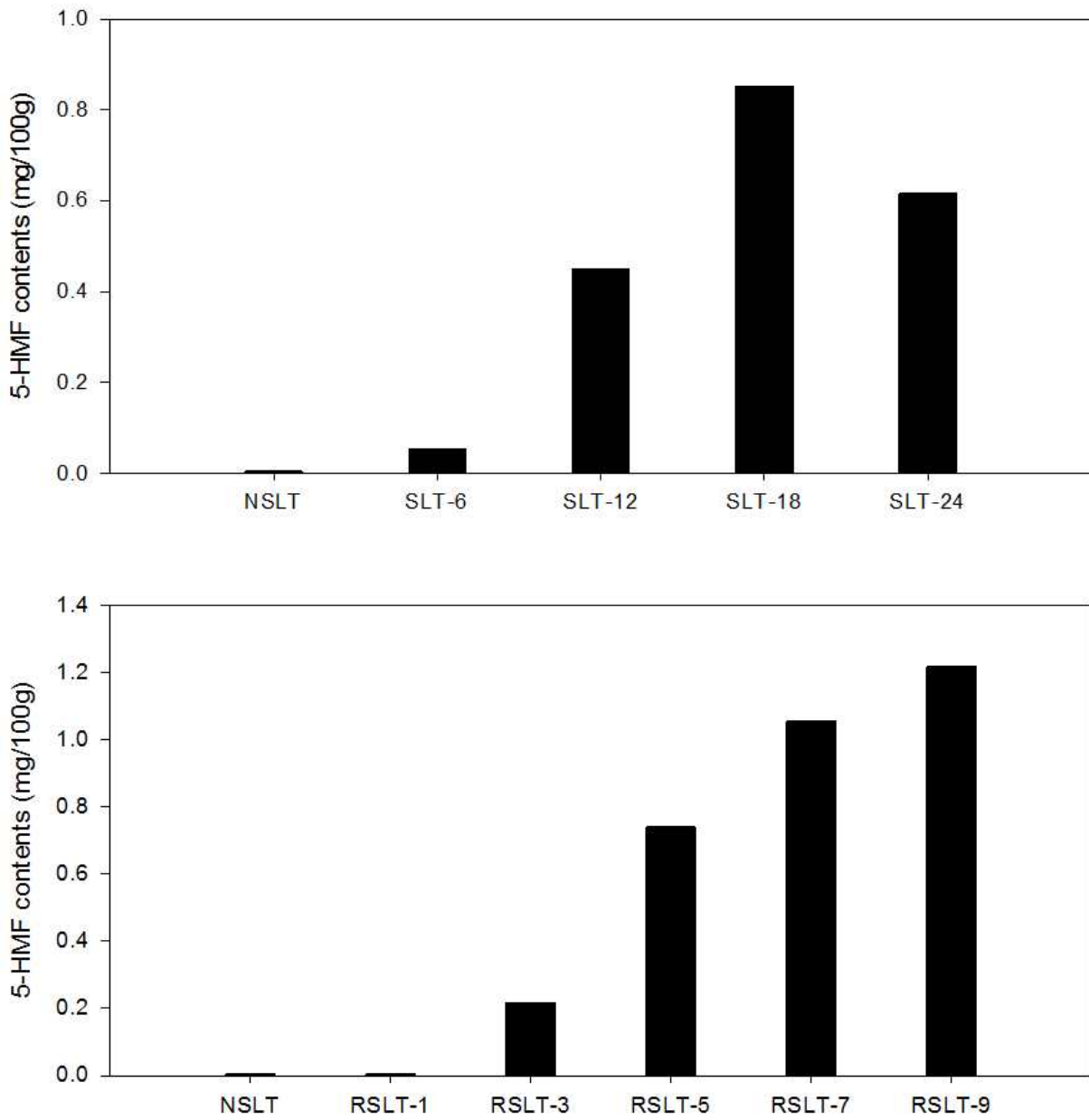


Fig. 24. Contents of 5-Hydroxymethylfurfural of Red *Liriope tuber* MeOH extracts produced with different steaming time (a) and frequency (b).

(6) BuOH 추출물의 기능성 성분의 분석 및 분리

맥문동의 중요한 성분중의 하나는 steroidal saponin계열인 spicatoside A로 보고되고 있으며, BuOH을 이용한 추출은 조사포닌계열의 물질들을 추출하기 위해 사용되는 일반적인 방법이다. 따라서, 증숙처리 조건에 따른 조사포닌의 변화를 살펴보기 위하여 BuOH 추출물을 제조하였으며, 감압농축후 건조된 시료를 이용하여 조사포닌을 분석하였다. 조사포닌의 분석 조건은 Table 15과 같으며, 증숙 시간에 따른 조사포닌의 변화는 Fig. 25, 증숙 횟수에 따른 조사포닌의 변화는 Fig. 26과 같다.

증숙 시간과 증숙 횟수에 따른 지표물질인 spicatoside A는 처리 조건이 증가함에 따라 급격히 감소하는 경향을 나타내었으며, 이는 증숙처리에 의해 spicatoside A가 분해되어 새로운 화합물로 전환되는 것으로 판단된다. HPLC 분석 조건에서 spicatoside A peak 뒤에 나오는 부분은 상대적으로 spicatoside A에 비해서 hydrophobicity가 강한 물질로 판단되며, 증숙 시간에 따른 분석에서 6시간 증숙에서는 피크의 크기가 감소한 반면 12시간 및 18시간에서는 새로운 피크가 증가하고 이후 24시간에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 증숙 횟수에 따른 분석에서는 증숙 1회와 3회에서 오히려 증가하는 경향을 나타내었으며, 5회부터 7회까지 감소하다가 다시 9회에서 증가하는 경향을 나타내었다. 이를 통해서 조사포닌 계열의 물질은 증숙 시간과 횟수에 따라 다른 물질들에 비해 변화 패턴이 상당히 다른 것으로 판단된다. 따라서 조사포닌 계열의 분석에 있어서는 증숙 시간보다는 증숙 횟수에 따라 제조된 홍문동을 활용하는 것이 보다 바람직한 것으로 판단된다.

Table 15. HPLC-CAD condition for butanol extract from Red *Liriodopsis tuber*

Column	SHISEIDO CAPCELLPAC C18 MG
Detector	Charged aerosol detection (CAD)
Injection volume	20 $\mu$ l
Drying gas flow	35psi
Flow rate	0.8 ml/min
Mobile phase	0~7 min (B: 8→12%, C: 10%), 7~23 min (B: 18→60% C: 10%), 23~35 min (B: 60%, C: 10%), 35~45 min (B: 60→90%, C: 10%) 45~60 min (B: 90%, C: 10%)

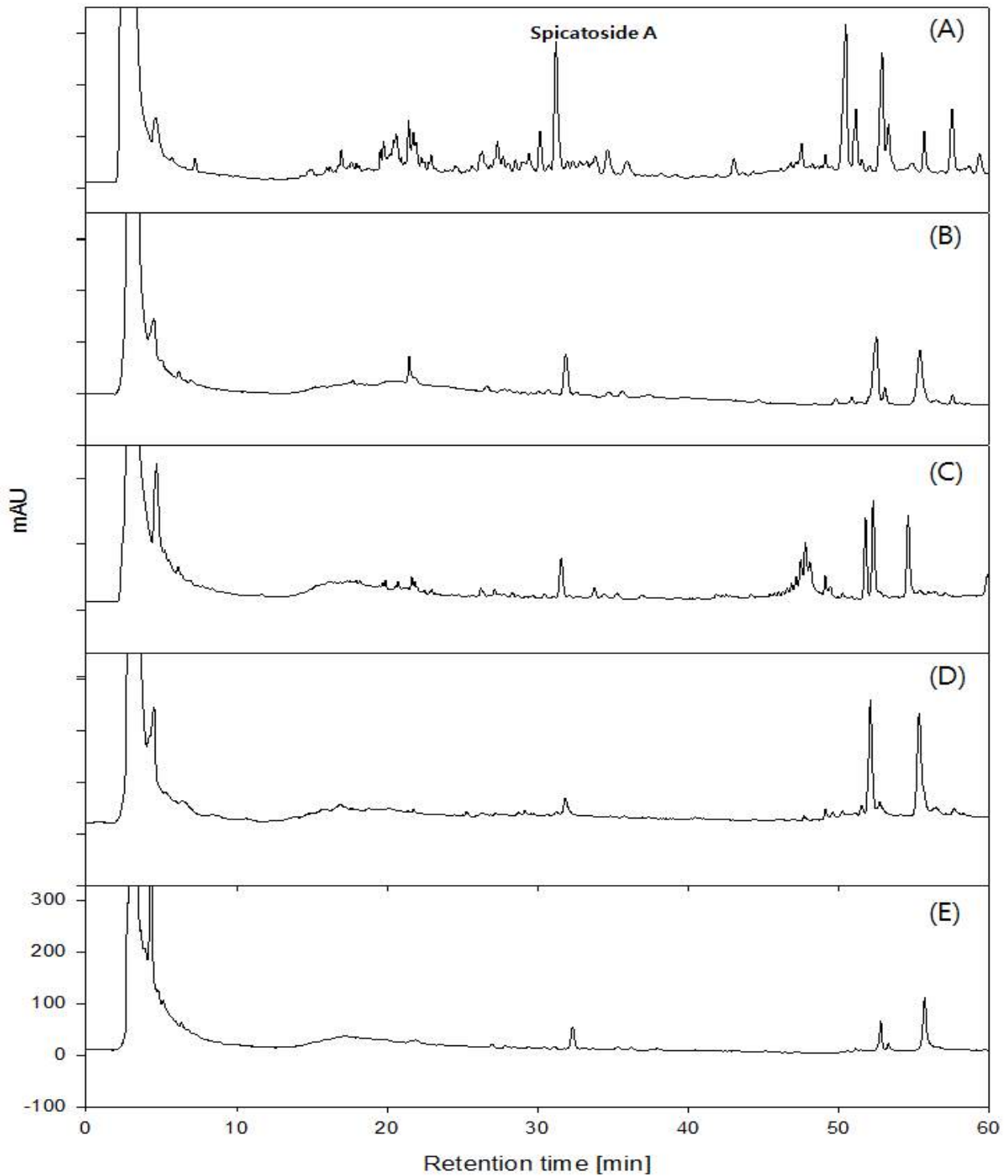


Fig. 25. HPLC chromatogram of BuOH extracts of Red Liriopsis tuber according to different steaming time with charged aerosol detector (CAD).

(A) NSLT BuOH extract (conc. 500 ppm, in 80% M); (B) SLT-6; (C) SLT-12; (D) SLT-18; (E) SLT-24.

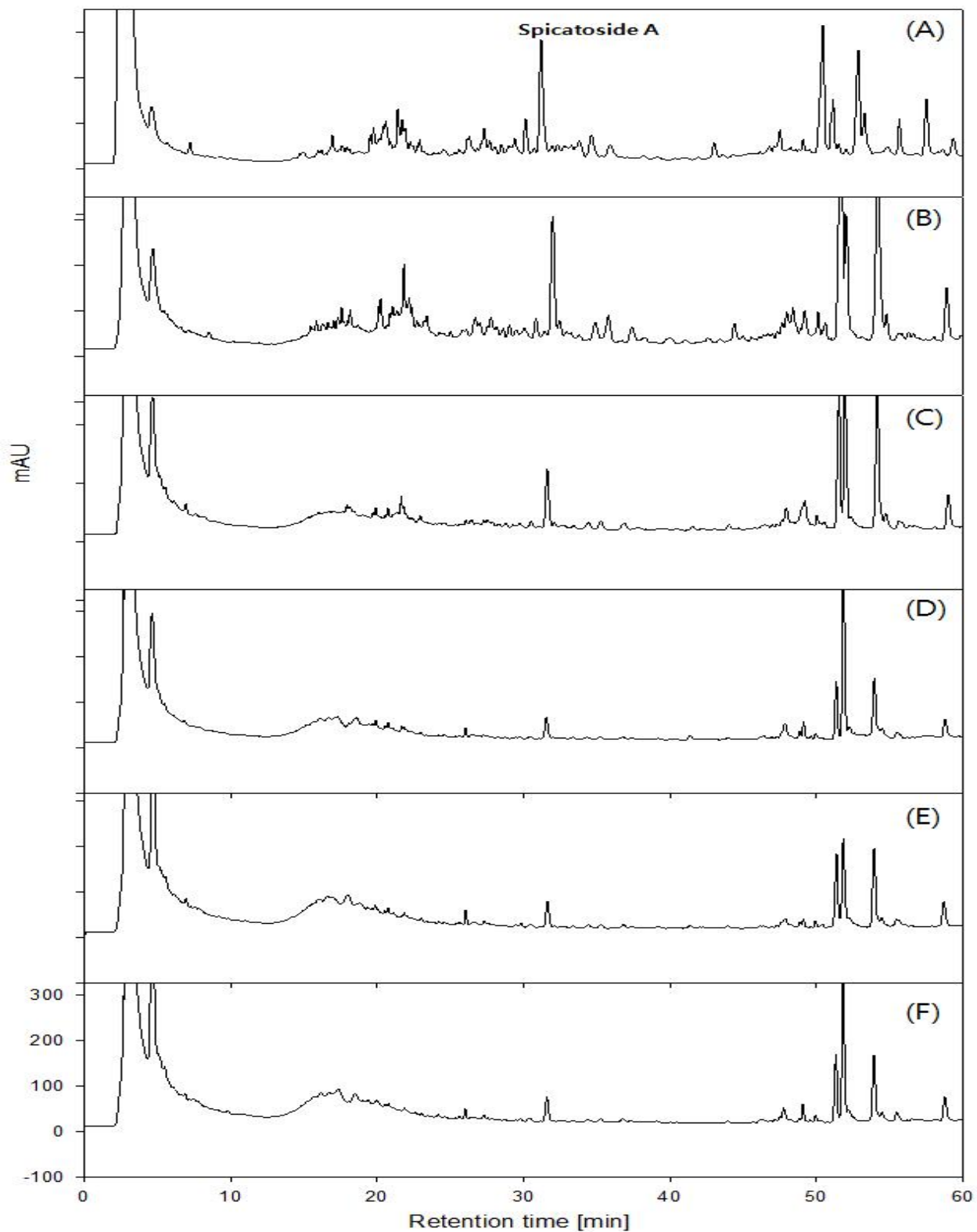


Fig. 26. HPLC chromatogram of BuOH extracts of Red Liriopsis tuber according to different steaming frequency.

(A) NSLT BuOH extract (conc. 500 ppm, in 80% M); (B) RSLT-1; (C) RSLT-3; (D) RSLT-5; (E) RSLT-7; (F) RSLT-9.

Spicatoside A의 뒤쪽에 나타나는 피크에 해당하는 물질의 분석을 위하여 diosgenin의 표준 물질을 사용하여 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 27과 같다. Spicatoside A가 열에 의해서 당이 떨어져 나갈 경우, 원래의 물질 보다는 hydrophobicity가 증가하게 되어 피크가 뒤로 이동될 수 있으므로, spicatoside A에서 당이 하나 없는 것과 구조적으로 상당히 유사한 물질인 diosgenin의 표준물질을 활용하여 분석하는 것은 증속에 따른 spicatoside A의 변화 패턴을 분석하는 데 유용하게 활용될 수 있다. Fig. 27(A)의 경우 diosgenin의 표준물질에 해당되며, Fig. 27(B)의 경우는 18시간 증속 처리한 맥문동에 해당한다. 두 개의 크로마토그램을 비교한 결과 HPLC에서 elution되는 시간이 유사하고, 12시간 증속과 18시간 증속에서 피크가 증가한 것으로 유추해 볼 때, 12시간과 18시간에서 증가된 것들은 맥문동에 존재하는 spicatoside A와 유사한 steroidal saponin 물질에 존재하는 당이 분해되어 보다 hydrophobic한 물질로 전환된 것으로 판단된다. 또한 이 부분에 해당하는 것들은 MeOH추출물의 분리과정에서 얻어진 분획물인 fraction E이 이 부분에 해당되는 물질과도 유사한 것으로 분석되고 있다. 따라서 fraction E 부분을 recycling HPLC를 통해 분리를 수행하고 있으며, 이부분에서 분리되어지는 물질은 증속에 의해 분자가 변화된 saponin계열의 물질일 것으로 판단된다.

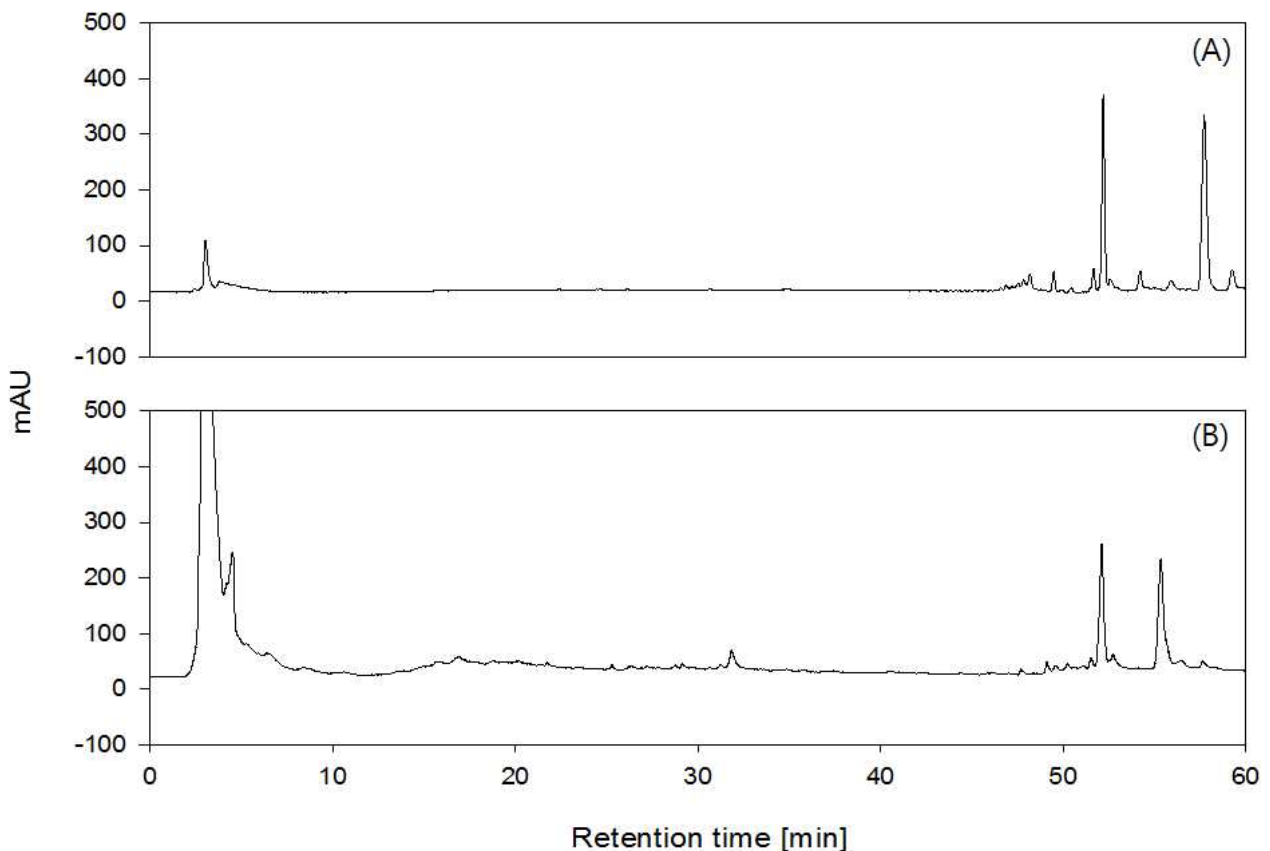


Fig. 27. HPLC chromatogram of diosgenin standard(A) and BuOH extracts of Red Liriodopsis tuber(B).

## (7) 맥문동 증숙에 따른 아미노당 및 소당류의 분석

식품 중의 아미노산과 당이 고온에서 반응하여 maillard reaction 물질을 생성하는 반응을 거쳐 아미노당이 생성되고, 고온에서 증숙하는 홍삼에서는 인삼에 함유량이 풍부한 아르기닌과 포도당이 고온에서 반응하여 Arginyl-furctosyl-glucose (AFG) 생성하며, 이 물질은 항당뇨 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되어지고 있다.

맥문동에 함유량이 많은 아르기닌, 프롤린, 글루탐산과 포도당, 맥아당이 풍부하고 100℃ 이상의 고온으로 증숙하여 생성되므로 여러 종류의 아미노당을 생성할 것으로 예상되어져 다음과 같은 모델 시스템을 이용하여 본 연구의 증숙 맥문동에 이러한 물질의 함유량과 기능성 활성을 평가하고자 하였다.

모델시스템은 Arginine 0.88g, Proline 0.88g, Glutamic acid 0.88g 과 glucose 1.8g를 혼합하여 acetic acid 10ml에 넣어 80℃에서 120분간 반응시켜 아미노당 반응산물을 분석하고자 하였다. Arginine 0.44g, Proline 0.44g, Glutamic acid 0.44g 과 maltose 1.8g를 혼합하여 acetic acid 10ml에 넣어 80℃에서 60분간 반응시키고 실온에서 냉각시켜 원심분리하여 상등액만 취하여 TLC, HPAEC 의 분석 장비를 이용하여 아미노당 반응산물을 분석하고자 하였다. HPAEC 분석에는 Carbo Pac PA1 컬럼을 이용하고 이동상은 360mM NaOH 용액을 사용하였으며 컬럼 온도는 30℃, 40분간 분석을 실시하였으며 Amperometric detector (Intergrated mode), working electrode : Au, Reference electrode : Ag/AgCl 을 이용하여 검출하였다. 모델시스템을 활용하여 반응시킨 생성물은 Fig. 28과 같으며, 아미노산의 종류와 당의 종류에 따라 다양한 아미노당 생성물이 생성되는 것을 확인 할 수 있었다. 현재 생성된 아미노당의 분리작업을 진행 중에 있으면 분리된 아미노당을 활용하여 증숙과정에서 생성되는 아미노당을 분석하는 데 활용되어 질 수 있을 것으로 판단된다.

맥문동의 구성 성분 중 당류는 가장 많은 비율을 차지하는 물질로 크게 가용성 유리당이나 다당체 성분 및 불용성 당류 성분으로 나누어 볼 수 있다. 맥문동의 증숙에 따른 당류의 변화를 HPAEC를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 29와 같다. 맥문동의 증숙에 따라 주로 fructose가 생성이 되며 그 외에도 glucose와 기타 소당류등이 소량 생성됨을 확인 할 수 있었으며, 이는 열처리에 따라 다당류 및 올리고당 등으로부터 분해되어 생성되는 것으로 판단된다. 이로 인해, 증숙 시간 및 횟수가 증가함에 따라 glucose와 fructose가 급격하게 증가하며 이는 맛에도 중요한 영향을 미치지만 아미노산의 갈변반응을 통해 제품의 색에도 중요한 영향을 미치는 것으로 판단된다.

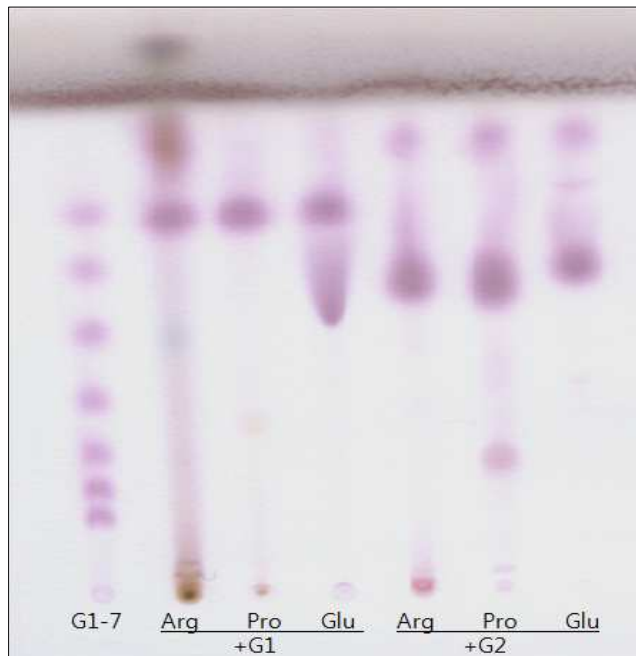


Fig. 28. TLC analysis of reaction products of various amino acid with reducing sugars.

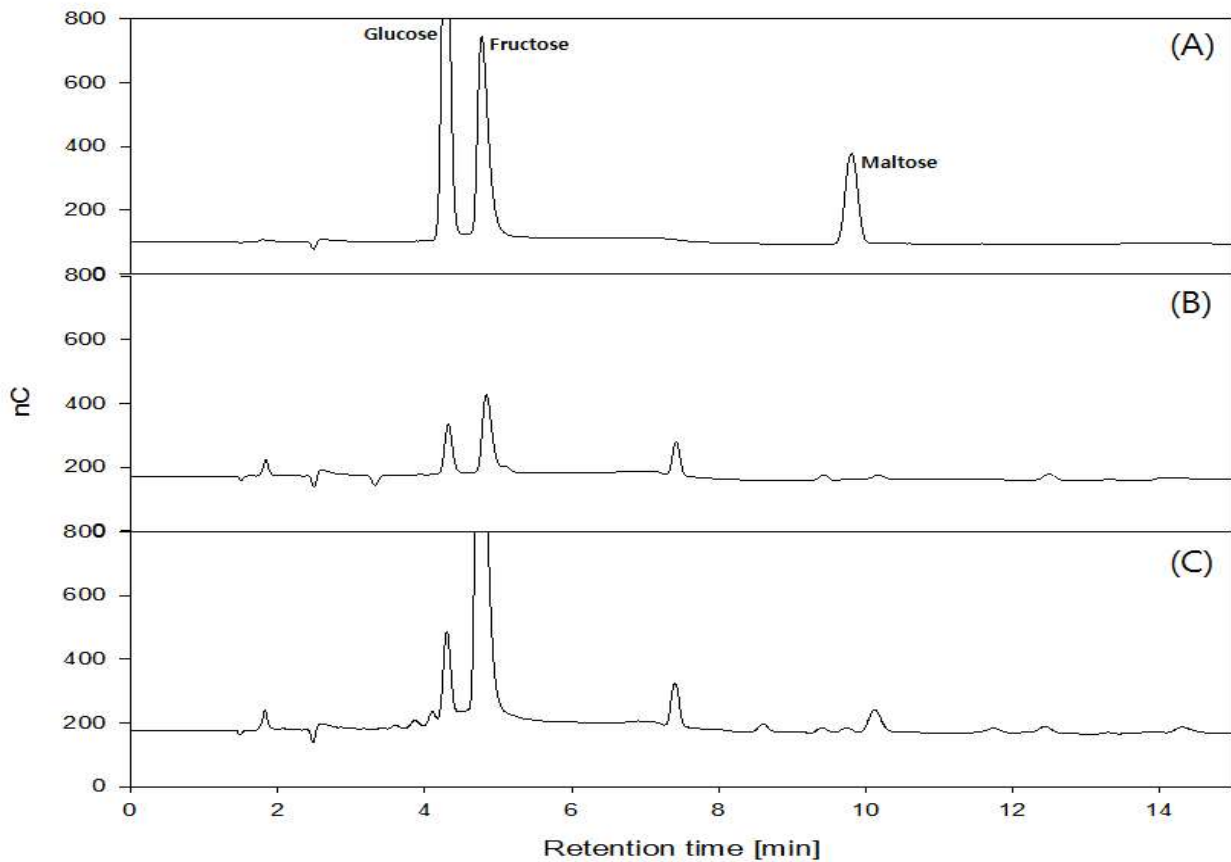


Fig. 29. HPAEC chromatogram of sugar standard (A), Liriopsis tuber (B), and red Liriopsis tuber (C).

### 3. 홍문동의 기능성 성분 구조 분석 및 대량 분리

#### 가. 기능성 성분의 Preparative HPLC를 이용한 대량 정제 및 분리

증숙 맥문동의 기능성 성분의 대량 분리를 위하여 증숙 맥문동 MeOH 추출물을 80% 메탄올로 희석하여 syringe filter로 정제 후 시료를 Multiple Preparative HPLC system(YMC-LC forte/R, YMC Co., Japan)으로 대량 분리 실시하여 기능성 효능 평가에 사용하였다. 기능성 물질의 분리도 및 분취량을 증가시키기 위하여 대용량 컬럼인 ECO plus glass column (25X250mm, silica packing)을 이용하여 대량 분리하였다. 그 결과 Fig. 30과 같이 Fraction A, B, C 로 나누어 분취하여 대용량 분리하였다. 분리되어진 분획물은 각각 INS-1 pancreatic beta cell에 처리하여 세포독성, 인슐린 분비능, 세포 및 Western blotting을 통하여 insulin 분비 관련 단백질 발현에 대하여 조사하였다.

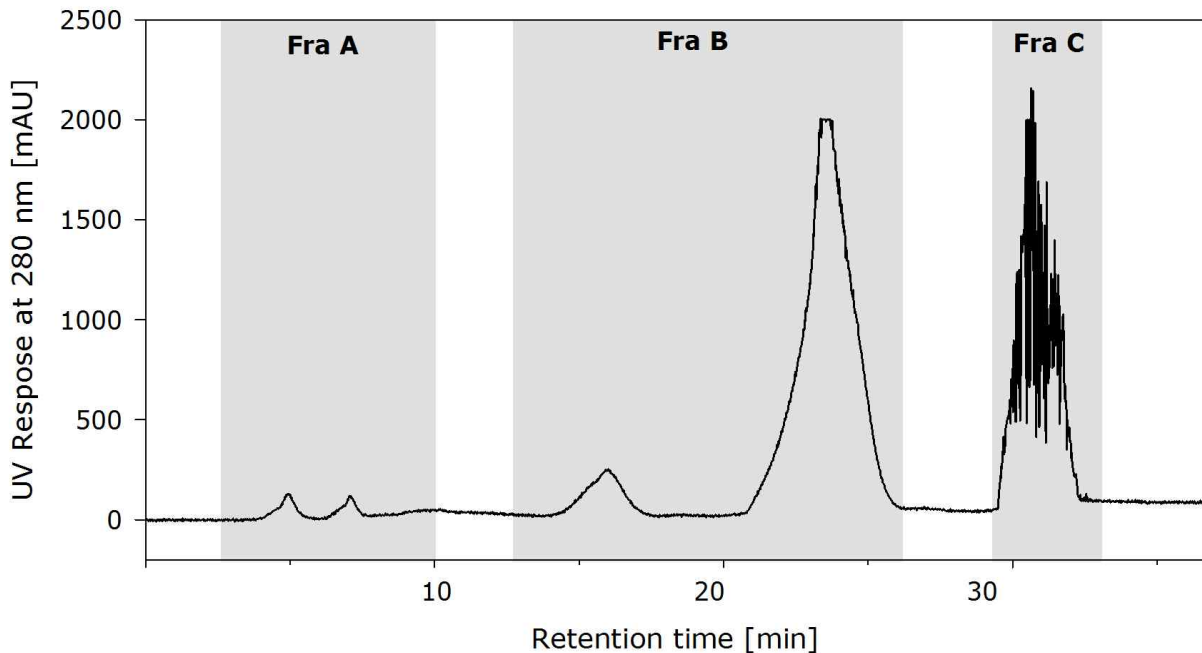


Figure 30. HPLC chromatogram of fractions A, B and C isolated from SLT methanol extract by preparative HPLC with PAD at 280nm

#### 나. 기능성 성분의 효능 평가

##### (1) 기능성 성분의 함량 변화

HPLC를 통하여 분리되어진 물질을 MS-APCI, FT-IR, NMR를 이용하여 구조를 동정하였다. 이렇게 동정된 물질인 5-Hydromethyl-2-furfural (HMF)의 함량 변화를 Fig. 31과 32에 나타내었다. HPLC 분석을 통하여 물질의 양을 측정한 결과 증숙 18시간까지는 HMF함량이 급격히



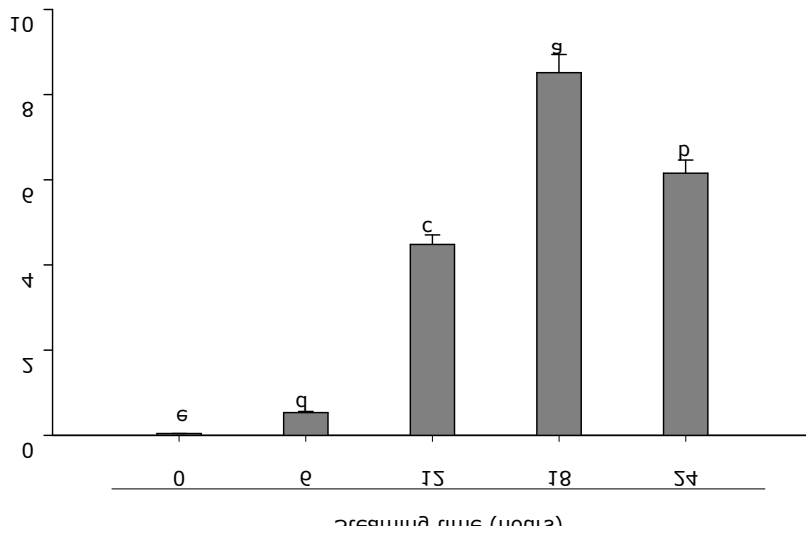


Fig. 31. Changes on 5-HMF contents of SLT methanol extract produced with different steaming time

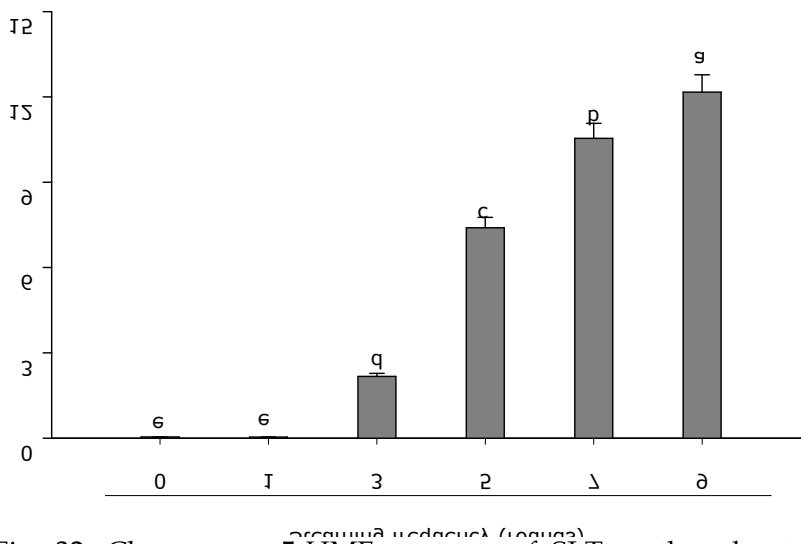


Fig. 32. Changes on 5-HMF contents of SLT methanol extract produced with different steaming frequency

증가한 반면 18시간 이후에는 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 횡수별 증숙 맥문동에서도 증숙 횡수가 증가할수록 HMF 함량은 증가하는 경향을 나타내었다.

HMF는 Maillard 반응의 중간물질로 비효소적 갈변물질로 알려져 있으며, 탄수화물과 단백질이 반응하여 생성된다. 이러한 결과는 홍삼과 같이 증숙 방법을 이용한 식품에서 유사한 경향을 나타내어 열처리 과정에서의 환원당이 유리되어 반응하면서 갈변이 급격히 증가한 것이라 생각되어지며, 증숙과정에서 pH가 감소하고 환원당의 함량이 증가한 결과와도 일치한다. 인삼,

마늘, 우유의 열처리 시에도 유사한 경향을 나타낸다. 증숙 과정에서 생성된 HMF는 항산화 활성을 증가시킨다는 연구결과를 바탕으로 본연구에서도 HMF 증가량과 항산화 활성의 증가가 유사한 경향을 나타내어 이러한 증숙에서 유도된 갈변물질이 항산화나 기능성에 영향을 줄 것이라 생각된다.

## (2) 홍문동 MeOH 분획물의 항당뇨활성

### (가) 췌장세포주 확립 (cell culture)

맥문동, 증숙맥문동 (홍문동), 증숙맥문동 분획물의 인슐린 세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 INS-1 pancreatic beta cell (INS-1 cell)을 사용하였다. 인간의 췌장 베타세포에서 분리되어진 INS-1 cell은 RPMI-1640 배지 (10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin, streptomycin)에서 incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

### (나) 항당뇨 효능 평가

#### ① 인슐린 분비량 측정 (Insulin secretion ability)

췌장 유래세포주인 INS 세포주에 맥문동, 증숙맥문동 (횃수별, 시간별) 및 분리정제된 물질을 24시간동안 처리하고, 세포배양액으로 분비되는 insulin의 분비량을 측정하기 위하여 “Insulin ELISA Kit” (MercoDIA, Sweden)를 이용하고, 구체적인 방법은 회사의 protocol에 따라 실시한다. Insulin antibody가 결합된 96 well plate의 각 well에 Enzyme conjugator (50 µl), Calibrator 0 (25 µl), 배양액 (25 µl)를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 흔들어주면서 insulin을 결합한다. Insulin 결합 후 96 well plate로부터 결합되지 않은 배양액을 제거하고, 1× Washing buffer (350 µl)를 이용하여 각 well을 6번 세척한다. 여기에 TMB substrate (200 µl)를 첨가하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 Stop solution (50 µl)를 첨가하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

증숙에 따른 맥문동의 INS-1 세포에서 세포 내의 인슐린 분비능을 측정하여 증숙 맥문동 및 증숙 맥문동 분획물의 항당뇨 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 33에서와 같이 증숙시간이 증가할수록 점차 인슐린 분비능이 증가하다가 18시간 이상 증숙 과정에서는 인슐린 분비능이 감소하는 결과가 보여 지고, 이는 기능성 물질 및 항산화 활성과 동일한 패턴을 나타낸다. 또한 횃수별 증숙 맥문동의 경우에서도 증숙 횃수가 증가함에 따라 인슐린 분비능도 급격히 증가함을 나타내었고 증숙하지 않은 맥문동과 비교하여 보면 7회 증숙에서 가장 높은 인슐린 분비능을 나타내고, 증숙에 의한 인슐린 분비능이 유의적인 차이를 보였다(Fig. 34). 이는 증숙 시 생성되는 갈변 및 기능성 물질이 열처리 과정에서 증가되고 이러한 물질들이 인슐린 분비능을 증가시키는 것으로 생각되어 지고 signal pathway 연구를 통하여 인슐린 분비능과 증숙 과정

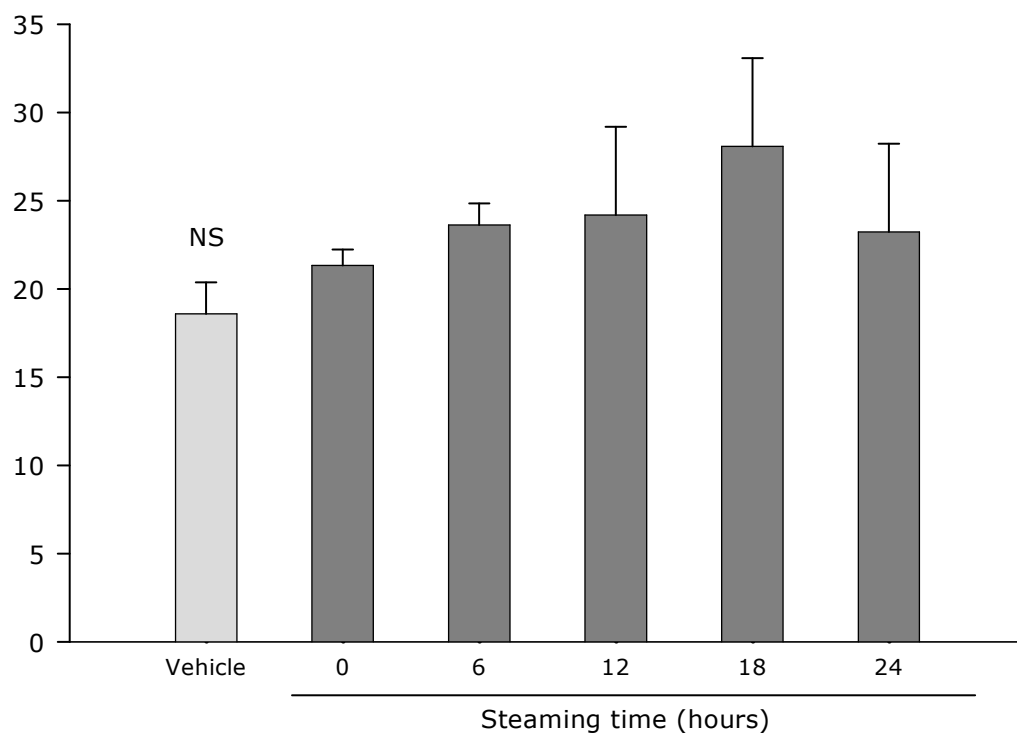


Fig. 33. Effects of SLT methanol extract according to steaming time of insulin secretion in INS-1 cells

Cells in well of 96-well plates ( $2 \times 10^4$  cells/well) were pre-incubated for 24 hours, and then incubated with different steaming time of SLT methanol extract for 24 hours. Insulin concentration in the supernatant was measured using an anti-insulin ELISA kit. The values of data represented the means  $\pm$  SD in triplicate experiments. \* $P < 0.05$  is the significance level relative to the vehicle-treated group.

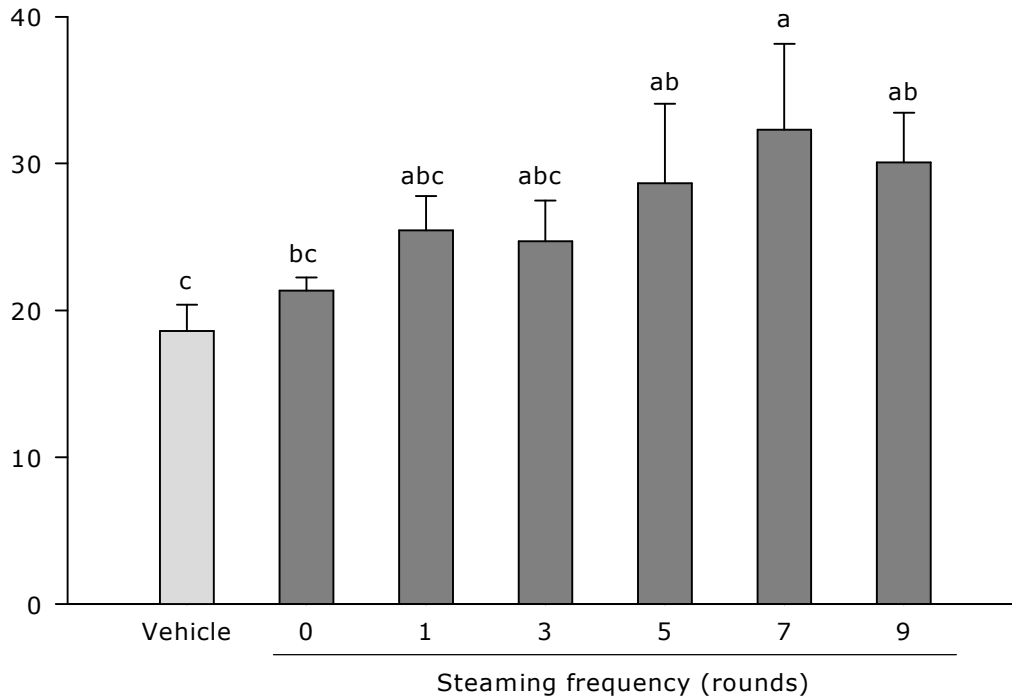


Fig. 34. Effects of SLT methanol extract according to steaming frequency of insulin secretion in INS-1 cells

Cells in well of 96-well plates (2x10<sup>4</sup> cells/well) were pre-incubated for 24 hours, and the incubated with different steaming frequency of RSLT methanol extract for 24 hours. Insulin concentration in the supernatant was measured using an anti-insulin ELISA kit. The values of data represented the means±SD in triplicate experiments. \*P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

에서 생성되는 물질과의 연관성을 알아보려고 하였다.

맥문동과 증숙 맥문동의 인슐린 분비능을 비교하면 9회 증숙 맥문동이 유의적으로 높은 인슐린 분비능을 나타내고, 증숙 맥문동에서 HPLC를 통하여 분획되어진 Fraction A,B,C의 결과를 살펴보면 갈변물질이 주를 이루는 Fraction B에서 인슐린 분비능이 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 35). 이러한 결과는 증숙 중 생성되는 갈변물질이 인슐린 분비능과의 연관성을 나타내고 있다고 생각되어지며, 기전연구를 통하여 인슐린 분비를 증가시키는 요인에 대하여 연구하였다.

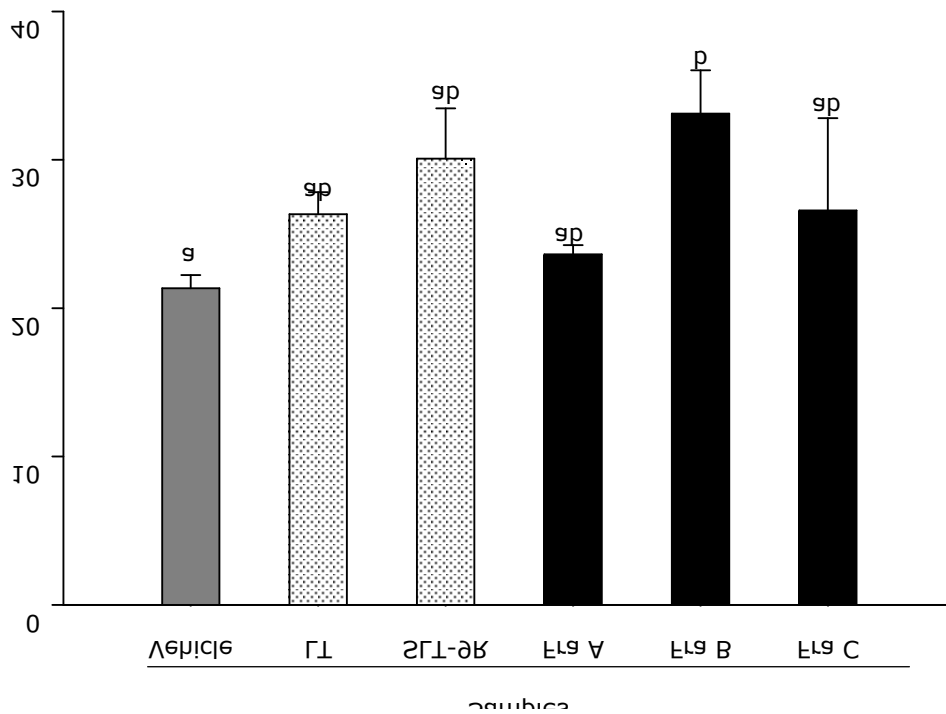


Fig. 35. Effects of the fractions isolated from SLT-9R methanol extract of insulin secretion in INS-1 cells

Cells in well of 96-well plates (2x10<sup>4</sup> cells/well) were pre-incubated for 24 hours, and the incubated with LT, SLT-9R, and three fractions (fra A-C isolated from SLT-9R methanol extract) for 24 hours. Insulin concentration in the supernatant was measured using an anti-insulin ELISA kit.

The values of data represented the means±SD in triplicate experiments. \*P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

## ② Insulin signaling pathway 변화 측정

분리된 물질의 insulin receptor signaling pathway 및 glucose transporter의 단백질 발현에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 western blotting을 통하여 단백질 발현 정도를 측정하였다. Vehicle (DMSO), 맥분동, 9회 증숙홍분동, 분획물 A (sugar riched fraction), 분획물 B (Maillard reaction products riched fraction), 분획물 C (color fraction)을 처리한 INS-1 cell을 pro-prep kit를 사용하여 단백질을 분리하였다. 각각 분리되어진 단백질 농도를 BCA kit를 이용하여 30 μg 농도로 희석하여 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동하였다. 전기영동한 단백질을 ECL membrane에 전이하고, 전이된 ECL membrane은 skim milk (5%, w/v) 로

blocking 하고 beta-actin antibody (Sigma-Aldrich), Insulin receptor beta antibody, GLUT-2, GLUT-3 antibody를 이용하여 1차 반응시키고, peroxidase conjugated anti-rat IgG rabbit (or mouse) 항체를 이용하여 2차 반응시킨다. 반응 후 membrane을 TNT solution (pH 8.0)을 이용하여 충분히 세척한 뒤, Enhanced chemiluminescence reagent (ECL) detection kit (Amersham)로 발현 정도를 확인하였다.

Vehicle (DMSO), 맥문동, 9회 증숙홍문동, 분획물 A (sugar fraction), 분획물 B (Maillard reaction products enriched fraction), 분획물 C (color fraction)을 처리한 INS-1 cell의 insulin receptor beta 는 A 분획물에서 가장 높은 발현을 나타내어 당성분이 insulin receptor beta 의 발현을 증가시켜 insulin 분비량을 증가시킨 것으로 생각된다(Fig. 36).

반면에 Akt 인산화 정도를 살펴보면 맥문동보다 증숙한 맥문동에서 높은 발현을 나타내었으며(Fig. 37), 분획물 A와 분획물 B에서 높은 발현량을 나타내었다. Glucose transporter의 발현량 변화는 Fig. 38과 같이 나타나 인슐린 분비를 유도하는 Glut2의 발현량은 분획물 A에서 Akt 인산화와 유사한 경향을 나타내었다.

이러한 결과는 증숙의 열처리 과정에서 유도되어진 환원당과 새롭게 생성된 Maillard reaction products가 인슐린 분비능을 증가시키고, insulin receptor와 insulin transporter의 발현에 영향을 미친다고 생각되어진다.

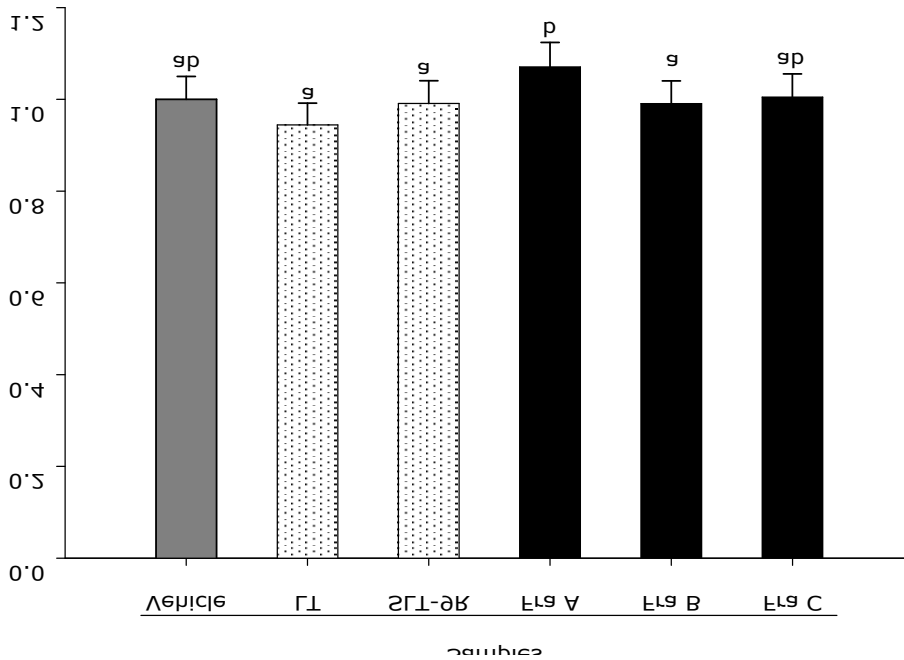
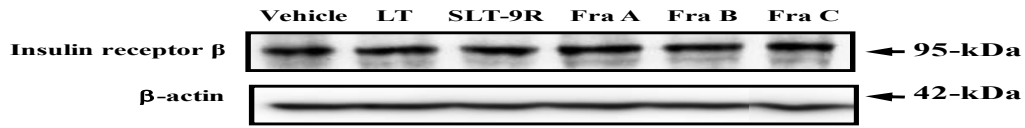


Fig. 36. Effects of the fractions isolated from SLT-9R methanol extract on the insulin receptor  $\beta$  expression of the insulin receptor signaling pathway via Western blotting. Total cell lysates were prepared from INS-1 cells treated with vehicle, LT, SLT-9R and three different fractions isolated from SLT-9R. Thirty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate via Western blotting. The values are expressed as means $\pm$ SD. <sup>a-b</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

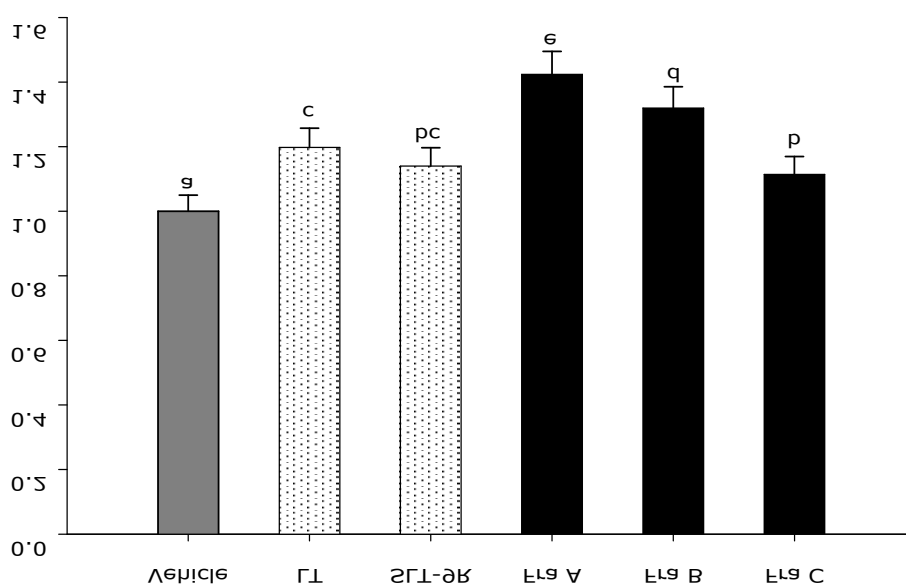
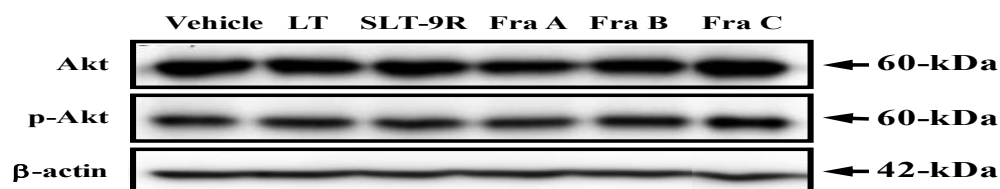


Fig. 37. Effects of the fractions isolated from SLT-9R methanol extract on the Akt phosphorylation of the insulin receptor signaling pathway via Western blotting.

Total cell lysates were prepared from INS-1 cells treated with vehicle, LT, SLT-9R and three different fractions isolated from SLT-9R. Thirty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate via Western blotting. The values are expressed as means $\pm$ SD. <sup>a-d</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.



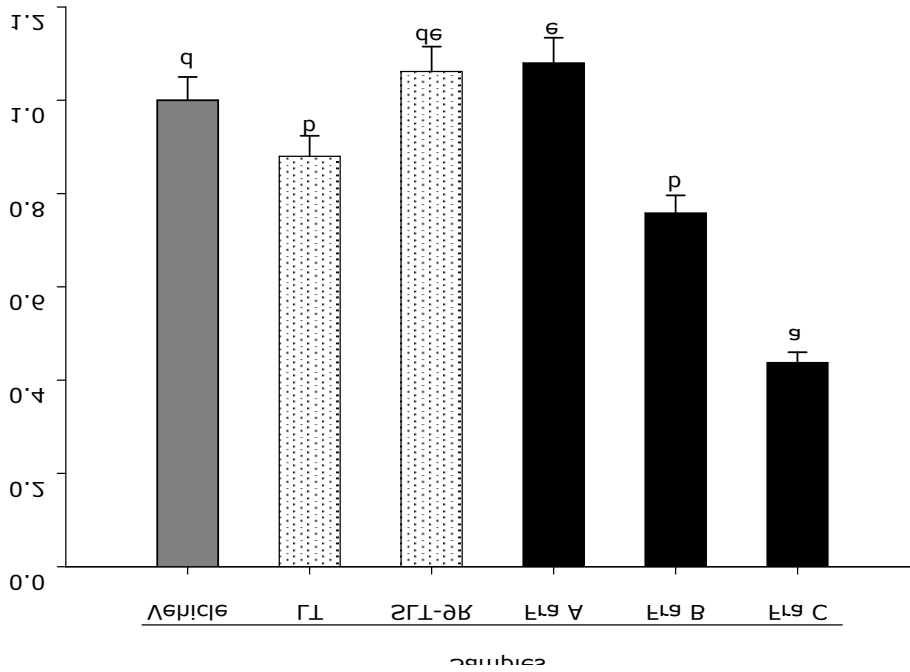
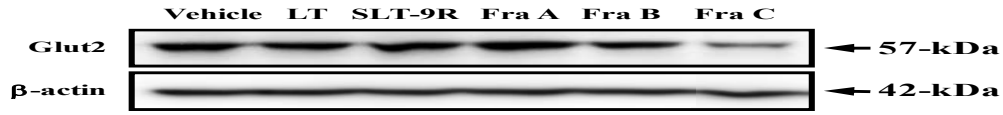


Fig. 38. Effects of the fractions isolated from SLT-9R methanol extract on the Glu2 expression of the insulin receptor signaling pathway via Western blotting. Total cell lysates were prepared from INS-1 cells treated with vehicle, LT, SLT-9R and three different fractions isolated from SLT-9R. Thirty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate via Western blotting. The values are expressed as means $\pm$ SD. <sup>a-d</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

다. 아미노당 model system을 이용한 물질 분리 및 효능 평가

증숙 과정에서 생성된 아미노당(aminosugar)의 종류 및 함량을 측정하기 위하여 아미노당 생성 model system를 설정하였다. 0.05mM 아미노산 (L-arginine, L-proline, L-glutamic acid)와 0.1M 당 (glucose, maltose, fructose)를 증류수에 용해하여 autoclave를 이용하여 열처리(120℃, 3hr, 10hr, 30min)한다. 실온에서 온도를 낮춘 뒤 10분간 centrifuge(1000g)하여 상등액을 speedVac concentrator (Savant)로 건조하여 아미노당 표준시료로 사용하였다.

맥문동 및 홍문동 열수추출물을 증류수로 희석하여 0.45µm filter로 여과하였다. 각각의 추출물의 아미노당 함량을 측정하기 위하여 High performance anion exchange chromatography (HPAEC)를 실시하였다. 360mM sodium hydroxide solution (v/v)을 용매로 사용하여 추출물의 아미노당을 분석하였다. 분석에는 Dionex ion chromatography system (ISC 3000), autosampler, electrochemical detector를 이용하였으며, CarboPac PA1 anion-exchange column (250mm x 4mm, Dionex)와 CarboPac PA1 guard column (50mm x 4mm, Dionex)를 통하여 분리하였다. 이동상은 360mM sodium hydroxide, flow rate 0.7ml/min, injection volume 20µL, gold working electrode, Ag/AgCl waveform으로 분석하였다(Fig. 39).

Sugar-amino browning reaction은 식품의 열처리 및 건조 과정에서 일어나는 화학반응이다. 맥문동은 arginine, glutamic acid, serine, proline과 같은 아미노산의 함량이 높고 이러한 아미노산은 증숙 처리 시 유리된 환원당과 반응하여 아미노당이 생성된다고 알려져 있다. model system을 수행한 결과, glutamic acid 및 proline은 환원당과 반응이 일어나지 않았으며, 반면 arginine과 환원당의 반응성이 높았으며, 이러한 반응에서 생성된 물질을 선행연구에서 연구되어진 분석과 비교하여 표준물질로 사용하였다.

맥문동의 구성 성분 중 당류는 가장 많은 비율을 차지하는 물질로 크게 가용성 유리당이나 다당체 성분 및 불용성 당류 성분으로 나누어 볼 수 있다. 맥문동과 증숙 맥문동의 아미노당의 함량을 측정한 결과는 Fig. 40과 41과 같이 나타났으며, 증숙 시간과 횟수가 증가할수록 Arginyl-fructose(AF), arginyl-fructosyl-glucose (AFG)의 생성량이 증가하는 경향을 나타냈다. 18시간 증숙 맥문동의 AF 함량이 급격히 증가하다가 증숙 시간이 증가할 경우 급격히 감소하는 경향을 보이고, AFG 함량은 증숙시간이 증가함에 따라 계속 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 선행연구에서와 유사한 결과로 열처리 과정 중 아미노당 중 AF의 생성량이 증가하다가 AF가 AFG로 변환됨에 따라 AFG 함량이 급격하게 증가한다고 생각되어진다. 증숙 횟수별 시료에서도 유사한 경향을 보이며 5회 증숙까지 AF가 먼저 증가하다가 감소하고 AFG가 계속적으로 증숙 횟수에 따라 증가하였다. 식품 중의 아미노산과 당이 고온에서 반응하여 maillard reaction 물질을 생성하는 반응을 거쳐 아미노당이 생성되고, 고온에서 증숙하는 홍삼에서는 인삼에 함유량이 풍부한 아르기닌과 포도당이 고온에서 반응하여 Arginyl-fructosyl-glucose (AFG) 생성하며, 이 물질은 항당뇨 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되어지고 있다.

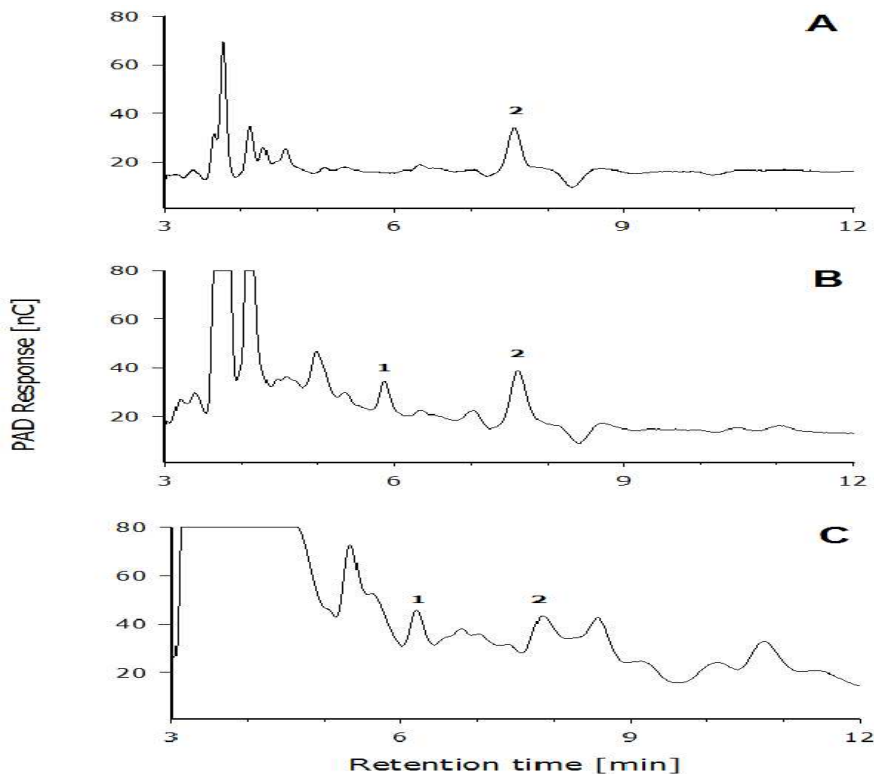


Fig. 39. HPAEC-PAD chromatograms of (1) Arg-Fru and (2) Arg-Fru-Glc from model system of amino sugar  
 (A)Arginine-Glucose; (B)Arginine-Maltose (C) SLT-5R methanol extract.

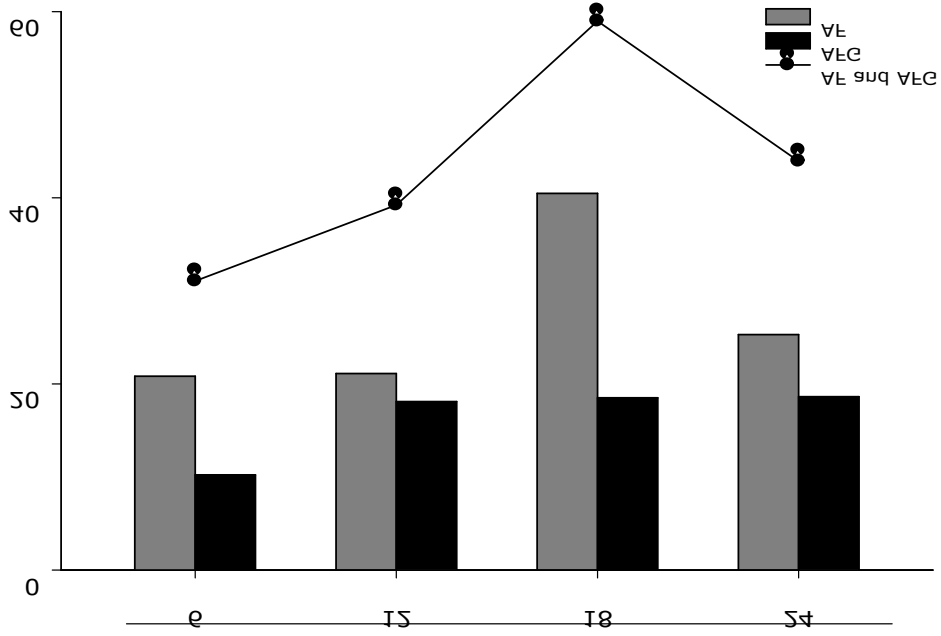


Fig. 40. Changes on arginyl-fructose(AF) and arginyl-fructosyl-glucose(AFG) level of SLT methanol extracts with different steaming time by HPAEC with PAD

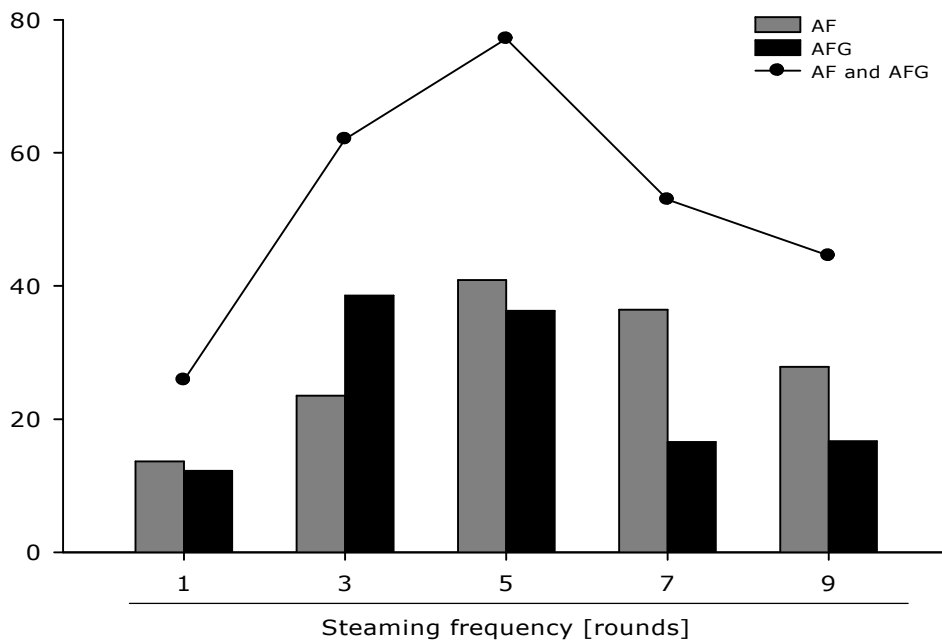


Fig. 41. Changes on arginyl-fructose(AF) and arginyl-fructosyl-glucose(AFG) level of SLT methanol extracts with different steaming frequency by HPAEC with PAD

마. 부탄올 추출물을 이용한 saponin 유도 물질 변화량 측정

맥문동의 중요한 성분중의 하나는 steroidal saponin계열인 spicatoside A로 보고되고 있으며, BuOH을 이용한 추출은 조사포닌계열의 물질들을 추출하기 위해 사용되는 일반적인 방법이다. 따라서, 증숙처리 조건에 따른 조사포닌의 변화를 살펴보기 위하여 BuOH 추출물을 제조하였으며, 감압농축후 건조된 시료를 이용하여 조사포닌을 분석하였다. 조사포닌의 분석 조건은 Table 16과 같으며, 증숙 시간에 따른 조사포닌의 변화는 Fig. 42, 증숙 횟수에 따른 조사포닌의 변화는 Fig. 43과 같다.

Table 16. HPLC-CAD condition for butanol extract from SLTs

---

Column	Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (3.0 mm X 150 mm, i.d 3.5 $\mu$ m)
Detector	Charged aerosol detection (CAD)
Injection volume	20 $\mu$ l
Drying gas flow	1.53 L/min, 35 psi
Flow rate	0.5 ml/min
Mobile phase	0-30 min : 8 $\rightarrow$ 12% B, 30~35min 12 $\rightarrow$ 100% B,

---

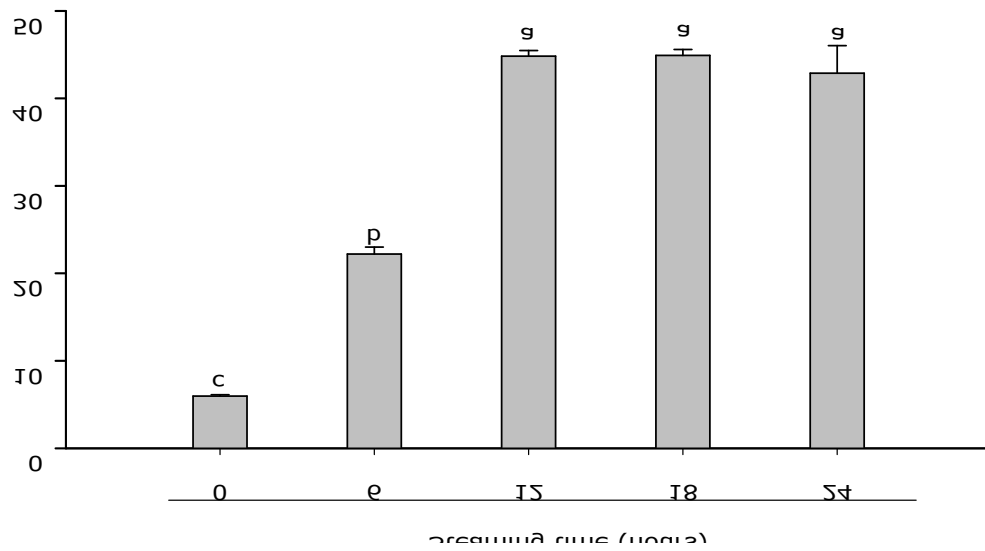


Fig. 42. Changes on crude saponin contents of SLT n-butanol extracts produced with different steaming time

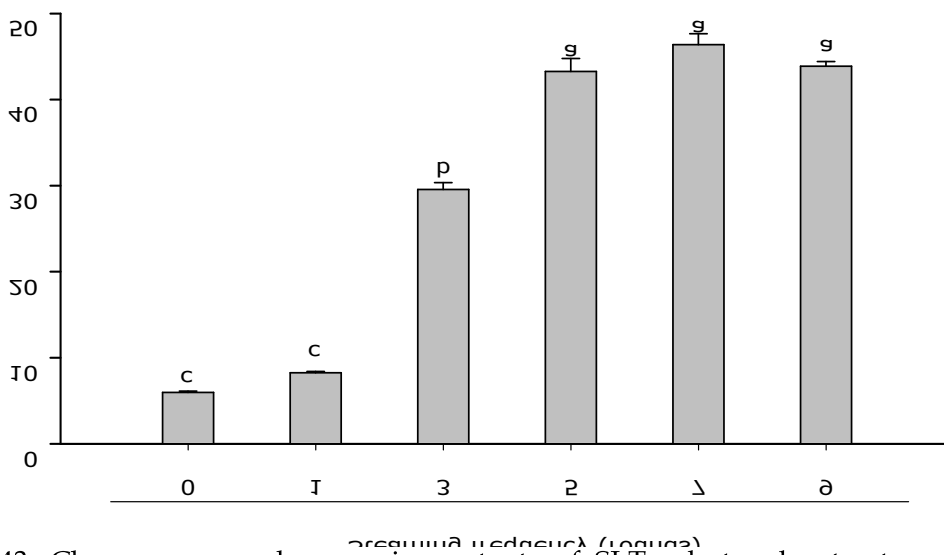


Fig. 43. Changes on crude saponin contents of SLT n-butanol extracts produced with different steaming frequency

증숙 시간과 증숙 횟수에 따른 지표물질인 spicatoside A는 처리 조건이 증가함에 따라 급격히 감소하는 경향을 나타내었으며, 이는 증숙 처리에 의해 spicatoside A가 분해되어 새로운

화합물로 전환되는 것으로 판단된다. HPLC 분석 조건에서 spicatoside A peak 뒤에 나오는 부분은 상대적으로 spicatoside A에 비해서 hydrophobicity가 강한 물질로 판단되며, 증숙 시간에 따른 분석에서 6시간 증숙에서는 피크의 크기가 감소한 반면 12시간 및 18시간에서는 새로운 피크가 증가하고 이후 24시간에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 증숙 횟수에 따른 분석에서는 증숙 1회와 3회에서 오히려 증가하는 경향을 나타내었으며, 5회부터 7회까지 감소하다가 다시 9회에서 증가하는 경향을 나타내었다. 이를 통해서 조사포닌 계열의 물질은 증숙 시간과 횟수에 따라 다른 물질들에 비해 변화 패턴이 상당히 다른 것으로 판단된다. 따라서 조사포닌 계열의 분석에 있어서는 증숙 시간보다는 증숙 횟수에 따라 제조된 홍문동을 활용하는 것이 보다 바람직한 것으로 판단된다.

Spicatoside A의 뒤쪽에 나타나는 피크에 해당하는 물질의 분석을 위하여 diosgenin의 표준 물질을 사용하여 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 45과 같다. Spicatoside A가 열에 의해서 당이 떨어져 나갈 경우, 원래의 물질 보다는 hydrophobicity가 증가하게 되어 피크가 뒤로 이동될 수 있으므로, spicatoside A에서 당이 하나 없는 것과 구조적으로 상당히 유사한 물질인 diosgenin의 표준물질을 활용하여 분석하는 것은 증숙에 따른 spicatoside A의 변화 패턴을 분석하는 데 유용하게 활용될 수 있다. Fig. 45(A)의 경우 diosgenin, ruscogenin 과 같은 표준물질에 해당되며, 증숙 처리한 맥문동에서 두물질의 해당한다. 두 개의 크로마토그램을 비교한 결과 HPLC에서 elution되는 시간이 유사하고, 12시간 증숙과 18시간 증숙에서 피크가 증가한 것으로 유추해 볼 때, 12시간과 18시간에서 증가된 것들은 맥문동에 존재하는 spicatoside A와 유사한 steroidal saponin 물질에 존재하는 당이 분해되어 보다 hydrophobic한 물질로 전환된 것으로 판단된다.

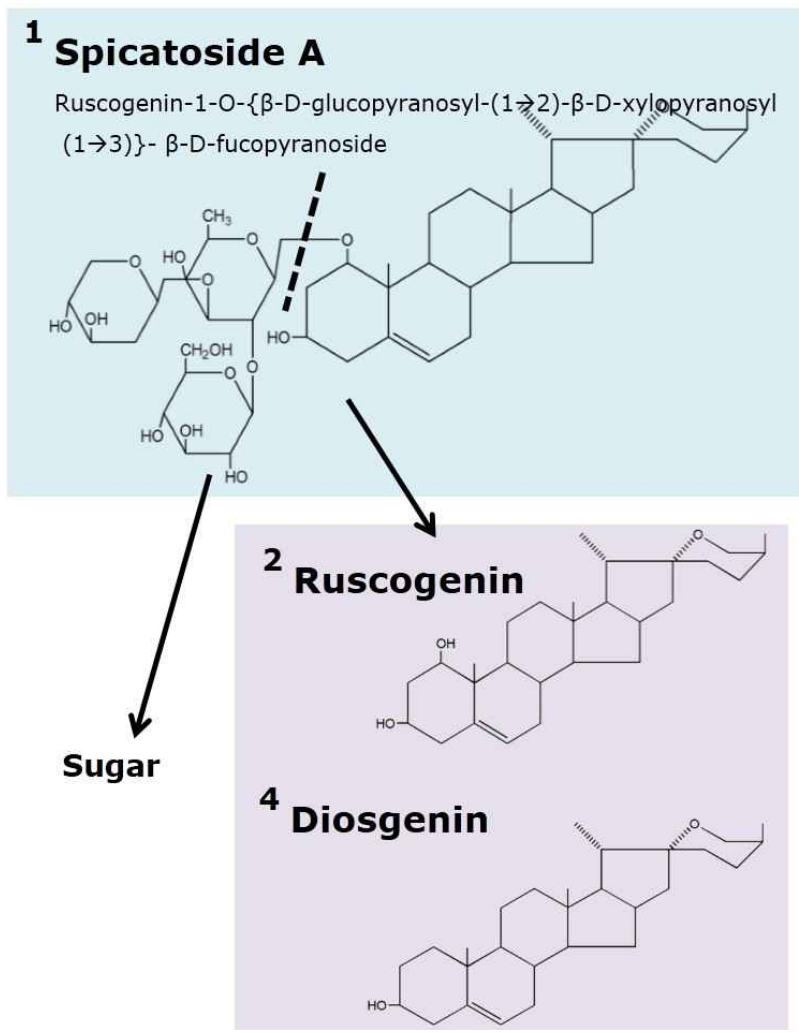


Fig. 44. Schematic diagram of decomposition products from spicatoside A



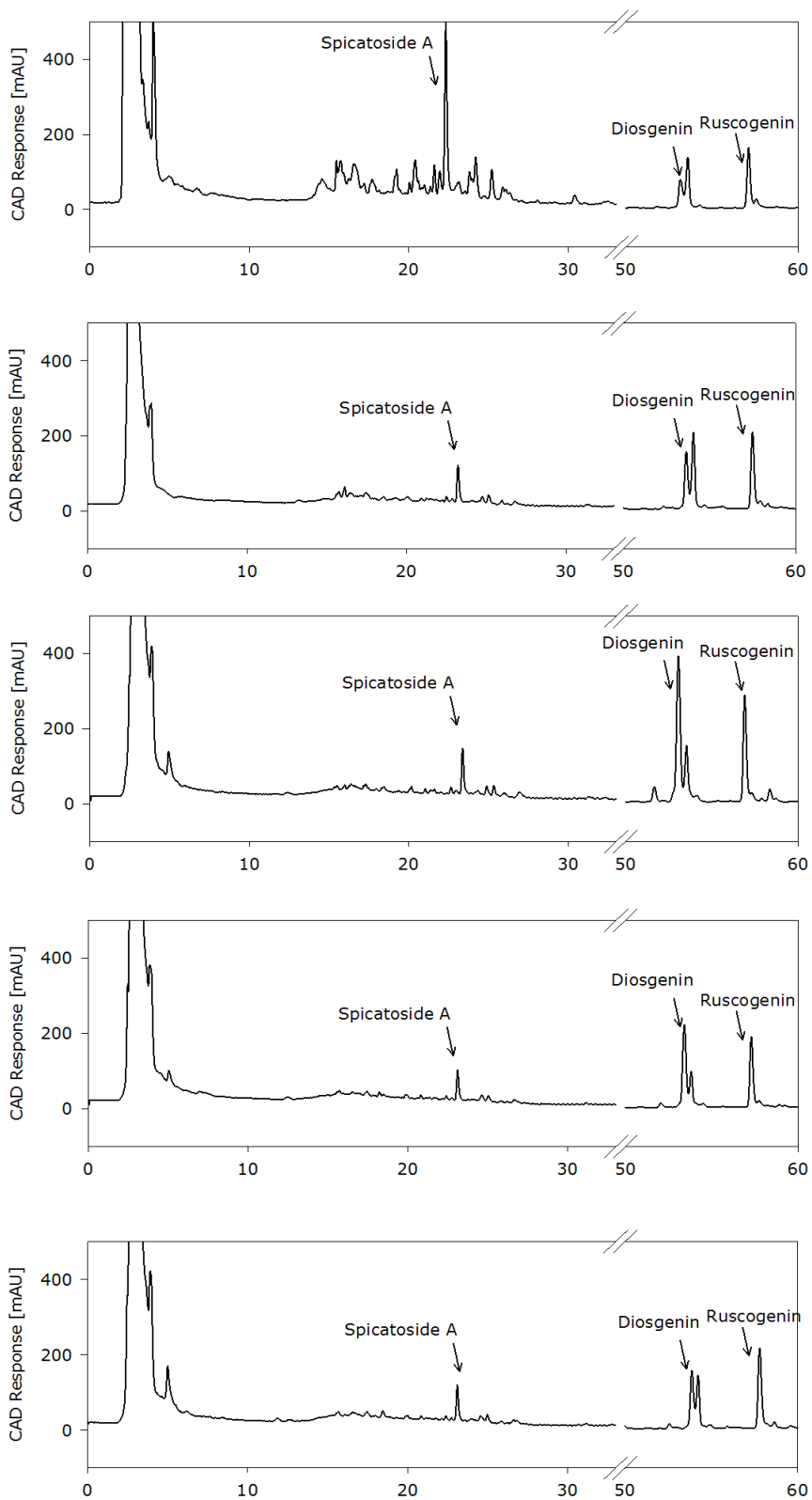


Fig. 45. HPLC Chromatograms of SLT butanol extracts according to steaming time with CAD ((A) LT extract; (B) SLT-6h extract; (C) SLT-12h extract; (D) SLT-18h extract; (E) SLT-24h extract)

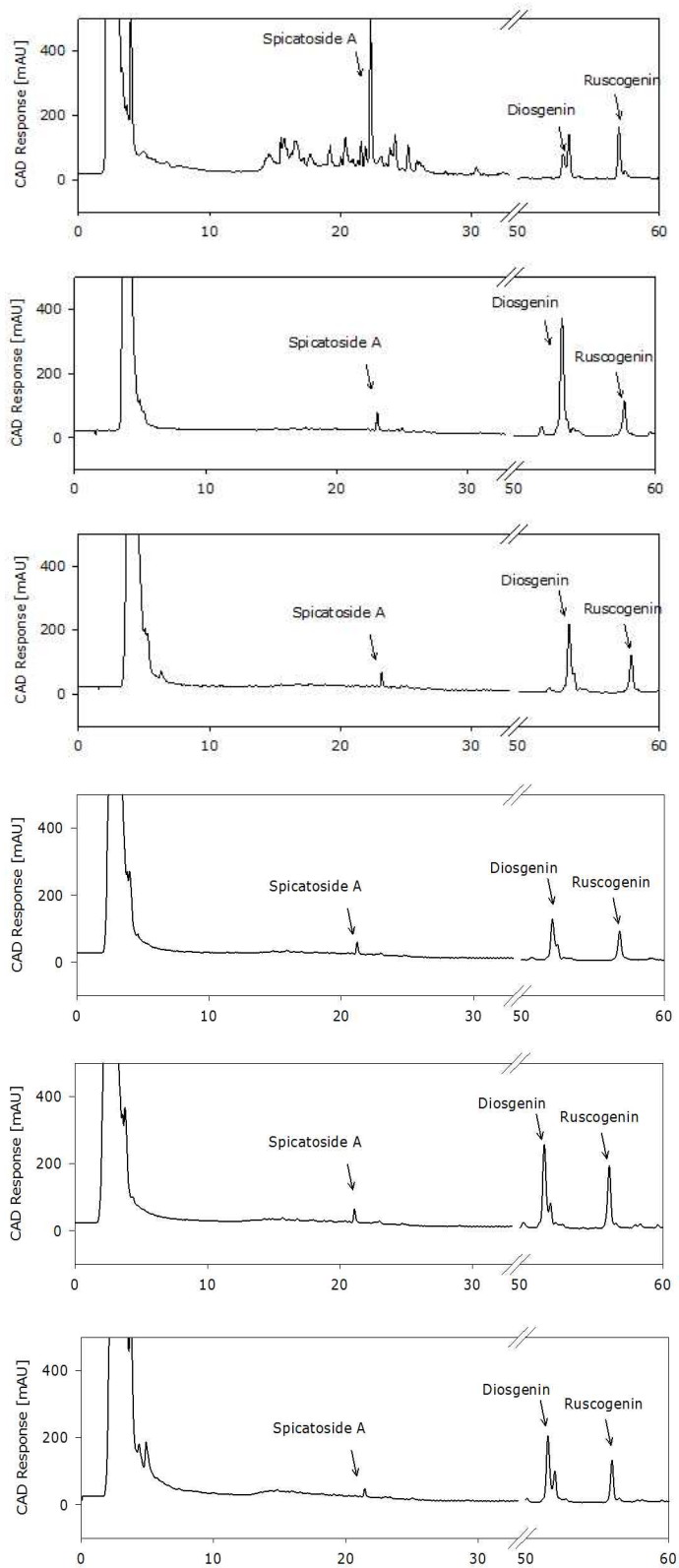


Fig. 46. HPLC Chromatograms of SLT butanol extracts according to steaming frequency with CAD ((A) LT extract; (B) SLT-1R extract; (C) SLT-3R extract; (D) SLT-5R extract; (E) SLT-7R extract; (F) SLT-9R extract))

#### 4. 발효 맥문동의 기능성 성분 분석

##### 가. 유기용매를 통한 추출 및 성분 확인

맥문동과 15시간 증숙 홍문동을 사용하여 열수추출과 고온, 고압 추출을 하여 각각 추출하였다. 열수추출액은 분말 10g에 증류수 100 ml를 첨가하여 100℃에서 3시간 추출하였으며, 고온고압추출액은 분말 10g에 증류수 100ml를 첨가하여 121℃, 3시간동안 autoclave하여 추출하였다. 각각의 추출물을 whatman paper (No.1)로 여과하여 발효액 제조에 사용하였다. 발효 조건은 *Lactobacillus brevis* DD1 균주를 이용하여 열수발효추출물은 균주액을 4% 접종하여 pH 4.5, 35℃, 72시간 진탕배양하며 발효하였으며, 고온고압발효추출물은 균주액을 6% 접종하여 pH 5.0, 30℃, 72시간 진탕배양하여 발효하였다. 위와 같은 조건은 제2협동 맥문동 및 홍문동의 발효조건 최적화하여 이용하였으며, (A) 맥문동\_열수발효추출물, (B) 맥문동\_고온고압발효추출물, (C) 홍문동\_열수발효추출물, (D) 홍문동\_고온고압발효추출물을 증류수로 2배 희석하여 기능성 성분 확인 및 함량을 측정하였다. 홍문동을 고온고압으로 추출하여 발효한 추출물의 경우 아래 Fig. 47과 같이 280nm에서 갈변화 물질이 다량 검출되었고, 맥문동 발효 추출물은 갈변화 물질 생성량이 극히 미량 생성됨을 나타내었다. 이 결과는 맥문동을 발효한 경우에도 기능성 유효 미생물 외에도 갈변물질 및 항산화 물질이 증가됨을 나타내었고, 맥문동보다 홍문동을 발효했을 때 이러한 물질의 양은 급격하게 증가됨을 나타낸다. 이는 홍문동을 고온고압에서 추출했을 때 극대화되며 온도가 높고 압력이 높을 때 기능성 성분의 추출이 용이하고, 양이 증가됨에 따라 발효 시에 이러한 물질 뿐 아니라 발효 시 생산되는 물질이 증가될 것이라 판단되어, 발효 물질의 기능성 물질 확인 및 분리 정제를 시행하고자 하였다.

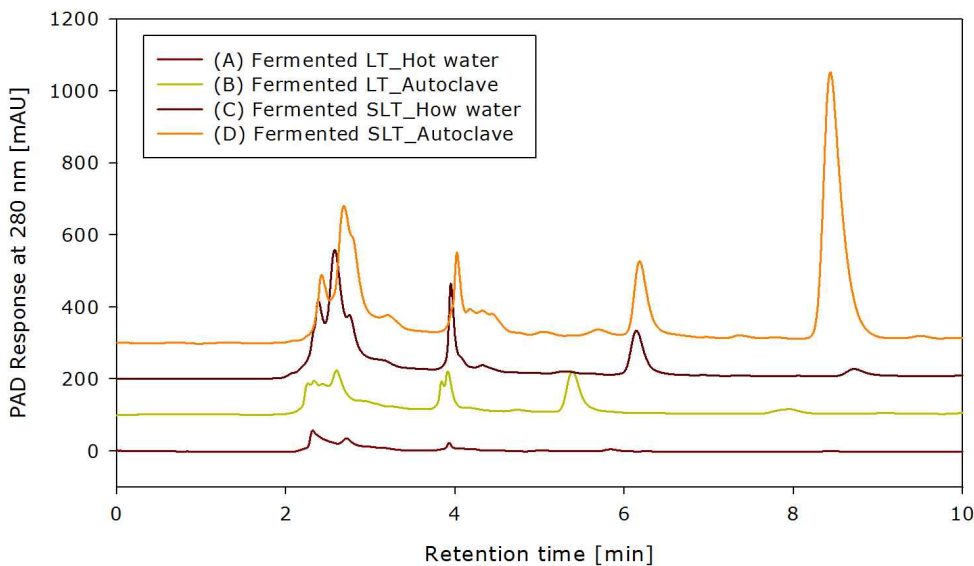


Fig. 47. HPLC chromatogram of fermented *Liriopsis tuber*

나. 발효 맥문동의 기능성 물질 확인 및 분리 정제

발효 과정에서 생성되는 아미노당(aminosugar)의 종류 및 함량을 측정하였다. A) 맥문동\_열수발효추출물, (B) 맥문동\_고온고압발효추출물, (C) 홍문동\_열수발효추출물, (D) 홍문동\_고온고압발효추출물을 증류수로 2배 희석하여 0.45 $\mu$ m filter로 여과하여 아미노당의 생성을 확인 및 함량을 측정하였다. 분석방법은 맥문동과 증숙맥문동의 아미노당 함량 측정 방법과 동일하다. 아미노당 생성량을 측정한 결과는 아래 Fig. 48과 같이 나타났다. AF (Arginyl-fructose)는 발효 맥문동 고온고압추출물에서 가장 높은 함량을 나타냈으며 이와 달리 AFG (Arginyl-fructosyl-glucose)는 증숙홍문동 그룹에서 함량이 높게 나타났다. 맥문동의 경우 발효 과정과 열수추출 및 고온고압 추출 시 고온의 조건에서 갈변이 일어나며 AF 및 AFG의 함량이 증가된 것이라 생각되어지며, AFG의 경우 지속적인 열처리를 가한 증숙맥문동 발효추출물에서 AF에 당이 반응하여 AFG의 함량이 맥문동 발효 시 보다 증가 된 것이라 생각되어지며, AF와 AFG의 전체적인 함량 변화를 살펴보면 발효맥문동 (A, B) 보다는 발효홍문동 (C, D)에서 항산화, 항당뇨 활성 및 다양한 기능성 활성을 가진 아미노당 (AFG 및 AF)의 함량이 증가하며, 추출 방법의 차이에서도 아미노당의 함량의 차이가 발생한다는 결과를 가져온다.

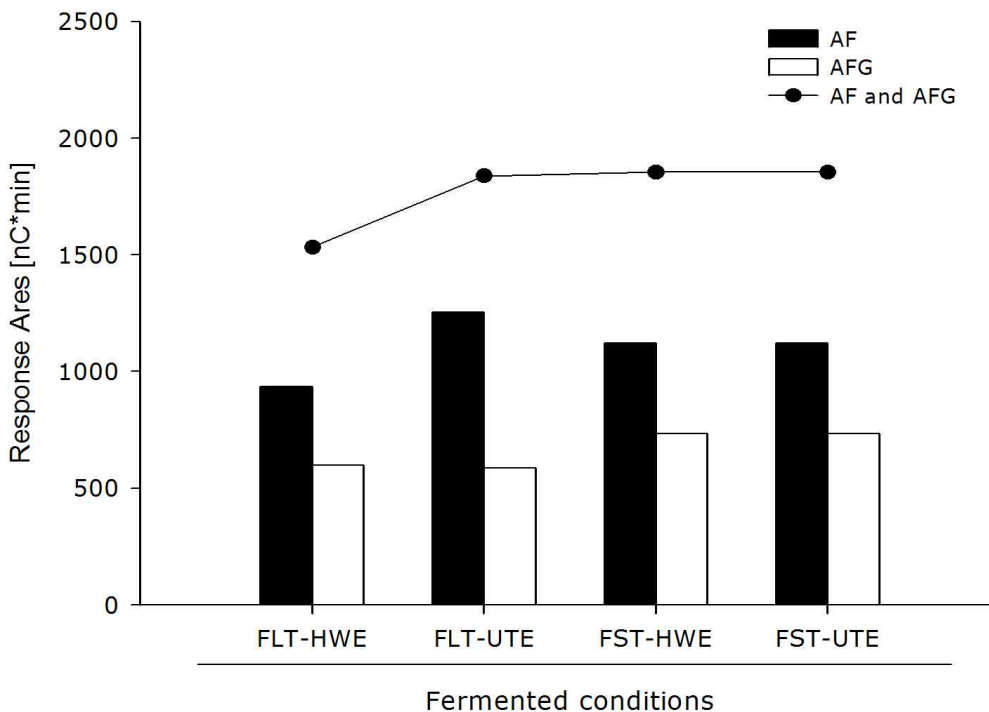


Fig. 48. Changes on arginyl-fructose(AF) and arginyl-fructosyl-glucose(AFG) level of fermented Liriopsis tuber by HPAEC with PAD

#### 다. 증숙맥문동과 발효맥문동의 기능성 물질 비교 평가

증숙맥문동은 증숙 시 고온으로 열처리하게되어 열에 의한 갈변 물질들이 생성되며 이는 이 화학적인 성분 변화 및 기능성 성분 분리를 통하여 Hydroxymethylfurfural (HMF) 및 당유도체 함량이 증가되며, 주요 사포닌 중 하나인 spicatoside A의 함량은 열처리를 통하여 감소하지만 sapogenin 류인 diosgenin, ruscogenin 등의 물질이 새로이 생성되고, thermal processing 중 생성되는 환원당과 맥문동에 아미노산의 용출이 용이해지는 과정에서 생성되는 아미노당의 생성도 확인 할 수 있었다. 특히 아미노당 중 홍삼에 풍부한 AF 및 AFG 함량이 증숙 과정에서 급격히 증가했다가 감소하는 경향을 보였고, 이는 인삼의 증숙과정과 일치하는 결과를 도출하였다. 이러한 결과를 종합해보면 증숙 맥문동의 경우 증숙하지 않은 맥문동과 일반성분, 이 화학적 성질의 변화, 항산화 활성 증가, 항당뇨 효과 및 기능성 성분의 함량 변화를 가져오고 이는 열처리 시간 및 횟수가 증가할수록 증숙을 통한 새로운 기능성 성분이 증가되는 경향을 나타내었다.

또한 유산균 발효에 의한 발효맥문동과 발효홍문동은 추출과정에서 열수추출과 고온고압추출을 거치므로 증숙맥문동과 유사한 물질들이 증가하는 경향을 나타내었고, 특히 발효 홍문동 고온고압추출물에서 증숙 맥문동과 유사한 색도와 HMF 및 Aminosugar (AF 및 AFG) 함량을 나타내었다. 유산균 발효는 증숙과 유사한 효과를 가져오며 갈변반응에 의한 갈변물질이 공통적으로 증가하는 결과를 나타내었다.

## 제 3 절 제2협동 맥문동 및 홍문동 발효를 통한 기능성 증진 연구

### 1. 발효균주의 분리, 동정 및 기능성 조사

맥문동은 isoflavon,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, steroidal glycosides, oligosaccharides 등의 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있다. 특히 맥문동은 다양한 saponin을 함유하고 있으며, 그 함량이 맥문동 건근의 8.4%(인삼의 경우 6.4%)를 차지할 정도로 많은 양을 함유하고 있는 우수한 기능성 작물이다. 그러나 현재 화훼용으로만 사용되고 있으며, 맥문동을 이용한 제품 개발에 대한 시도가 있었으나 산업화에는 성공하지 못하였다.

Saponin을 함유하고 있는 인삼 및 홍삼제품에 대한 소비자의 요구는 계속적으로 증가하고 있는데, 인삼의 재배기간이 최소 4년 이상 소요되고 가격이 비싸기 때문에 외국으로부터 수입량이 증가하고 있으나 국내산과 구별할 수 있는 정확한 방법이 없어 문제가 되고 있다.

결과적으로 맥문동은 인삼에 비해 단기재배가 용이하며, saponin 등의 기능성 성분을 다량 함유하고 있어 다양한 가공 공정을 개발함으로써 인삼 및 홍삼을 대체할 수 있는 기능성 맥문동 제품을 창출할 필요가 있다.

한편, 미생물을 이용하여 맥문동을 발효할 경우, 맥문동이 가지고 있는 고유의 생리활성을 더욱 보강할 수 있을 뿐만 아니라 존재하지 않았던 새로운 생리활성을 맥문동에 부여할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 다양한 시료로부터 경험적으로 안전성이 확보된 (generally recognized as safe; GRAS) 젖산균 및 *Bacillus* spp.를 순수분리한 후, 이들이 가지는 여러 가지 생리활성을 분석함으로써 향후 항산화능(antioxidant activity) 및 항고혈압 활성(angiotensin-converting enzyme inhibitory activity)을 가지는 맥문동 및 홍문동 발효 제품 제조를 위한 토착 발효균주를 확보하고자 하였다.

#### 가. 발효균주의 분리

맥문동 및 홍문동 발효의 main starter로 이용하기 위하여 젖산균과 *Bacillus*를 각각 분리하였다. 다양한 시료로부터 농화배양에 의하여 젖산균 895 균주, *Bacillus* 635 균주를 분리하였다. 분리된 균주 가운데 젖산균의 경우 젖산 생성능이 우수한 것을, *Bacillus*의 경우 proteolysis 속도 및 생육속도가 빠른 것을 최종 선정하였으며, 그 결과는 Table 1에서 보는바와 같다. 젖산균은 총 74 균주가 선정되었다. 즉 양파, 오디로부터 각각 3균주, 포도 및 호박잎으로부터 각각 4균주, 콩나물, 오이, 양배추, 고구마, 당근 및 부추로부터 각각 1균주, 배추 및 옥수수 잎으로부터 각각 2균주가 선정되었으며, 깻잎김치, 무생채, 묵은지, 부추김치 등 각종 김치로부터 33균주가 선정되었다. 또한 양파절임으로부터 3균주, 오징어젓갈로부터 2균주, 된장, 식혜 및 동동주로부터 각각 8균주, 4균주, 1균주가 선정되었다. *Bacillus*는 총 50 균주가 선정되었다. 즉 된장 및 청국장에서 각각 29균주, 21균주가 선정되었다. Fig. 1은 젖산을 생성하여 콜로니 주위에

투명환을 생성하는 젓산균의 사진이다.

Table 1. Number of strains isolated from various samples

<b>Lactic acid bacteria</b>			
Source	No. of isolates (tentative name)	Source	No. of isolates (tentative name)
Crop plant	23 (C1 ~ C23)	Kimchi	33 (K1 ~ K33)
Pickle	3 (P1 ~ P3)	Jeotgal	2 (J1, J2)
Doinjang	8 (D1 ~ D8)	Sikhye	4 (S1 ~ S4)
Dongdongju	1 (DD1)		
<b>Bacillus</b>			
Source	No. of isolates (tentative name)	Source	No. of isolates (tentative name)
Doinjang	29 (BD1 ~ BD29)	Cheongkukjang	21 (BC1 ~ BC21)



Fig. 1. Clear zones around colonies by lactic acid production.

## 나. 젖산균의 내산성 및 내담즙성

인체에 적용되는 젖산균의 경우, 사람의 위 환경에서 사멸하지 않고 생존율을 향상시키는 것이 관건이다. 따라서 분리된 젖산균의 내산성(인공위액)을 조사하였으며, 그 결과는 Table 2에서 보는바와 같이 매우 다양하게 나타났다. 펩신을 함유한 pH 2.5 MRS broth에서 생존율이 10% 이하인 균주는 총 21 균주였는데 특히, C 12 균주를 비롯한 12 균주는 인공위액에서 모두 사멸되었다. 90% 이상 생존율을 나타낸 균주는 C 1 균주를 비롯한 14 균주, 80-80%의 생존율을 나타낸 균주는 C 2 균주를 비롯한 8 균주, 70-79%의 생존율을 나타낸 균주는 C 16 균주를 비롯한 8 균주였다. 나머지 균주는 11-69%의 생존율을 나타내었다. 현재 microcapsulation을 포함한 몇몇 방법에 의하여 젖산균의 위 속 생존율을 향상시키고 있다. 따라서 상기에서 확인된 생존율이 높은 균주는 인간 위 환경에 적용될 수 있는 잠재적 가능성이 있음을 시사한다.

인체에 적용되는 젖산균은 장의 담즙 환경(0.3%)에서도 생존할 수 있어야 한다. 따라서 젖산균의 0.5% bile salt에서의 내담즙성을 조사하였다(Table 2). 분리된 젖산균의 0.5% bile salt에서 생존율 역시 내산성과 마찬가지로 매우 다양하게 나타났다. K 5 균주는 91.8%, K 31 균주는 80.9%의 생존율을 나타내었으며, 그 외 균주들은 79% 이하의 생존율을 나타내었다. 특히 C 15 및 DD 1 균주는 상기 조건에서 전혀 생존할 수 없었다.

Table 2. Survival rates of isolates in MRS broth containing artificial gastric fluid or 0.5% bile salt.

Isolate	Survival rate (%) in artificial gastric fluid	Survival rate (%) in 0.5% bile salt	Source
C-1	96.9	74.4	Crop plant
C-2	88.1	67.6	
C-3	90.2	30.9	
C-4	55.5	46.2	
C-5	21.2	37.2	
C-6	29.6	43.1	
C-7	99.0	32.6	
C-8	88.0	23.9	
C-9	84.6	21.5	
C-10	66.8	39.1	
C-11	91.5	54.3	
C-12	0	57.1	
C-13	53.9	63.3	
C-14	1.5	40.7	
C-15	0	0	
C-16	74.9	50.0	
C-17	59.0	63.5	
C-18	86.1	59.1	
C-19	6.8	23.4	
C-20	42.6	34.8	
C-21	79.4	34.0	



C-22	0	12.4	
C-23	26.8	18.1	
DD-1	22.6	0	Dongdongju
K-1	0	77.2	Kimchi
K-2	0	37.3	
K-3	50.7	22.5	
K-4	0	60.5	
K-5	0	91.8	
K-6	74.6	20.9	
K-7	54.3	34.7	
K-8	78.3	24.4	
K-9	90.8	14.6	
K-10	83.7	64.5	
K-11	42.2	48.4	
K-12	71.9	56.2	
K-13	0	11.1	
K-14	92.9	15.4	
K-15	10.2	22.2	
K-16	77.6	23.4	
K-17	0	36.2	
K-18	84.5	20.2	
K-19	75.6	26.6	
K-21	36.7	17.2	
K-21	0	25.6	
K-22	0	8.9	
K-23	1.1	16.0	
K-24	0	48.4	
K-25	1.2	10.7	
K-25	5.4	24.4	
K-27	96.3	10.2	
K-28	97.8	8.8	
K-29	11.4	39.2	
K-30	97.3	20.8	
K-31	78.6	80.9	
K-32	84.6	68.9	
K-33	84.0	67.7	
P1	97.2	56.8	Pickle
P2	69.3	35.1	
P3	91.6	46.1	
J1	94.0	44.3	Jeotgal
J2	67.2	60.8	
D-1	10.3	57.0	Doinjang
D-2	5.4	21.7	
D-3	4.7	17.7	
D-4	7.7	41.4	
D-5	68.3	54.1	
D-6	92.7	15.4	
D-7	8.8	16.4	
D-8	96.5	22.0	

S-1	55.1	18.3	Sikhye
S-2	67.2	25.6	
S-3	21.9	26.7	
S-4	52.3	65.4	

#### 다. 젖산균의 항균능 및 hydrolytic enzyme 활성

젖산균의 hydrolytic enzyme 활성을 조사한 결과는 Table 3에서 보는바와 같다. 순수분리된 모든 젖산균은 amylase 활성을 가지고 있지 않았으나 protease 활성은 모두 가지고 있었다. 한편, 김치로부터 분리된 K14, K15, K29 균주 및 된장으로부터 분리된 D8 균주는 cellulase 활성을 가지고 있었으나 다른 젖산균은 가지고 있지 않았다. Protease 활성을 가진 일부 젖산균들은 우유 단백질을 분해하여 ACE 저해 펩티드를 생성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 맥문동에 소량의 우유를 첨가하여 발효를 수행할 경우, ACE 저해능이 있는 맥문동 발효식품이 제조될 가능성이 높을 것으로 판단된다. 그리고 cellulase 활성을 가진 균주들을 이용하여 맥문동 발효시 맥문동 섬유소를 분해하여 발효를 원활하게 진행시키는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

젖산균의 병원성 미생물에 대한 항균능을 조사한 결과는 Table 3에서 보는바와 같다. *S. aureus*(식중독 및 화농 유발균)에 대한 항균능은 농작물에서 분리한 C1 균주, 김치에서 분리한 K17, K27, K30 균주, 된장에서 분리한 D1, D8 균주에서만 나타났다. *L. monocytogenes*(식중독 유발균)에 대한 항균능은 농작물에서 분리한 7 균주, 김치에서 분리한 15 균주에서 나타났다. *E. coli*(분변오염 지표세균)에 대한 항균능은 농작물에서 분리한 8 균주, 동동주에서 분리한 1 균주, 김치에서 분리한 30 균주, 절임식품에서 분리한 2 균주, 젓갈에서 분리한 2균주, 된장에서 분리한 3 균주에서 나타났으며, *P. aeruginosa*(기회성 감염균)에 대한 항균능은 총 79 균주 중 59 균주에서 나타났다. 이러한 결과는 상기 균주들을 이용하여 맥문동을 발효할 경우, 항균능이 부여된 맥문동의 제조 가능성을 시사한다. 일부 균주의 상기 병원성 미생물에 대한 항균능을 관찰한 사진은 Fig. 2에서 보는바와 같다.

Table 3. Extracellular hydrolytic enzyme and antibacterial activities of isolates

Isolate	Enzyme activity			Antibacterial activity (mm)				Source
	Amylase	Cellulase	Protease	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	
C-1	-	-	+	170	-	-	110	Crop plant
C-2	-	-	+	160	220	-	-	
C-3	-	-	+	170	210	-	-	
C-4	-	-	+	-	220	-	-	
C-5	-	-	+	-	160	-	-	
C-6	-	-	+	-	160	-	-	
C-7	-	-	+	-	170	-	-	

C-8	-	-	+	-	160	-	-		
C-9	-	-	+	150	160	-	-		
C-10	-	-	+	-	160	-	-		
C-11	-	-	+	-	-	160	-		
C-12	-	-	+	-	-	-	-		
C-13	-	-	+	-	140	120	-		
C-14	-	-	+	120	160	-	-		
C-15	-	-	+	-	180	-	-		
C-16	-	-	+	220	200	120	-		
C-17	-	-	+	220	210	170	-		
C-18	-	-	+	230	210	150	-		
C-19	-	-	+	-	120	-	-		
C-20	-	-	+	-	130	-	-		
C-21		-	+	-	130	-	-		
C-22	-	-	+	-	-	150	-		
C-23	-	-	+	-	-	150	-		
DD-1	-	-	+	120	160	-	-		Dongdongju
K-1	-	-	+	-	190	180	-		Kimchi
K-2	-	-	+	160	190	150	-		
K-3	-	-	+	160	200	200	-		
K-4	-	-	+	160	150	-	-		
K-5	-	-	+	-	150	-	-		
K-6	-	-	+	180	210	-	-		
K-7	-	-	+	170	170	-	-		
K-8	-	-	+	170	170	-	-		
K-9	-	-	+	160	190	-	-		
K-10	-	-	+	180	200	120	-		
K-11	-	-	+	170	220	-	-		
K-12	-	-	+	160	220	-	-		
K-13	-	-	+	180	200	120	-		
K-14	-	-	+	180	200	110	-		
K-15	-	+	+	180	-	-	-		
K-16	-	+	+	230	220	120	-		
K-17	-	-	+	-	130	-	120		
K-18	-	-	+	170	210	120	-		
K-19	-	-	+	180	190	120	-		
K-21	-	-	+	180	200	130	-		
K-21	-	-	+	190	200	110	-		
K-22	-	-	+	170	190	-	-		
K-23	-	-	+	180	180	-	-		
K-24	-	-	+	160	180	-	-		
K-25	-	-	+	150	160	-	-		
K-25	-	-	+	200	210	120	-		
K-27	-	-	+	190	210	130	100		
K-28	-	-	+	180	190	140	-		
K-29	-	+	+	170	200	130			
K-30	-	-	+	180	190	-	110		
K-31	-	-	+	150	-	-	-		
K-32	-	-	+	140	-	-	-		

K-33	-	-	+	170	-	-	-	
P-1	-	-	+	180	-	-	-	Pickle
P-2	-	-	+	190	-	-	-	
P-3	-	-	+	-	-	-	-	
J-1	-	-	+	170	-	-	-	Jeotgal
J-2	-	-	+	160	-	-	-	
D-1	-	-	+	180	-	-	110	Doinjang
D-2	-	-	+	-	150	-	-	
D-3	-	-	+	-	150	-	-	
D-4	-	-	+	-	130	-	-	
D-5	-	-	+	-	210	-	-	
D-6	-	-	+	180	190	-	-	
D-7	-	-	+	-	120	-	-	
D-8	-	+	+	180	190	-	110	
S-1	-	-	+	-	180	-	-	Sikhye
S-2	-	-	+	-	170	-	-	
S-3	-	-	+	-	170	-	-	
S-4	-	-	+	-	180	-	-	

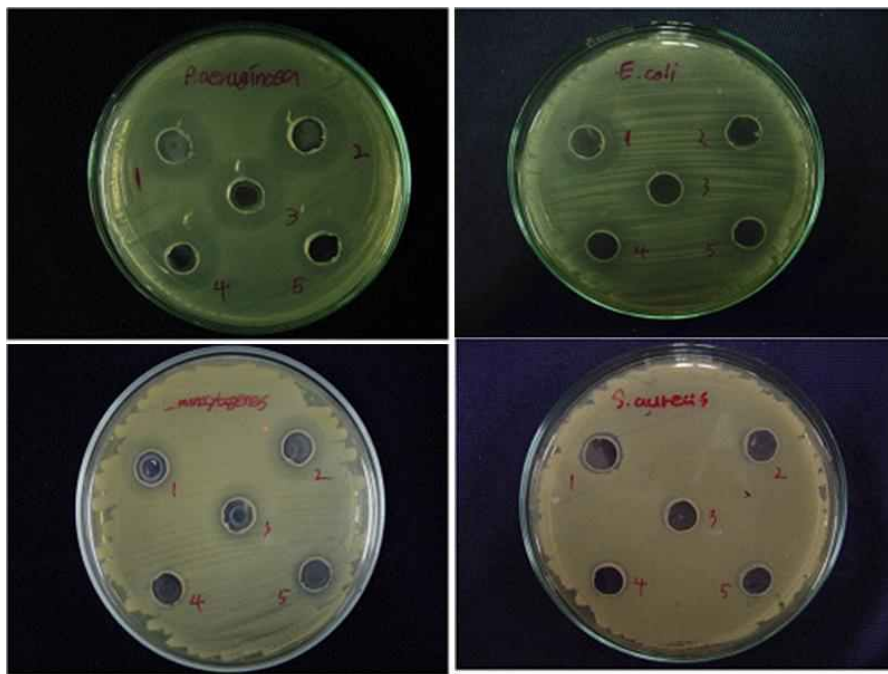


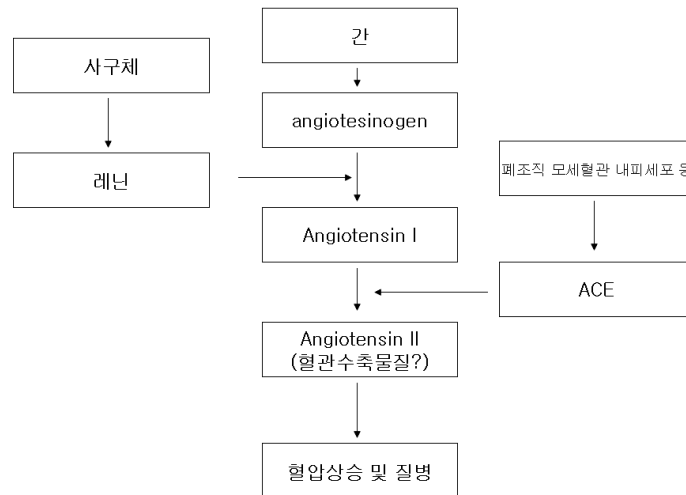
Fig. 2. Antibacterial activity of lactic acid bacteria selected against pathogenic bacteria.

#### 라. 젖산균의 항산화능 및 ACE 저해능

인간의 세포는 산화된 식품의 섭취와 산소 호흡으로 인한 생체 내 대사과정 중에 발생된 여러 종류의 유리 라디칼, 오염물질 및 광선조사 등과 같은 다양한 산화적 스트레스(oxidative stress)에 직면하고 있으며 이는 산화적 손상(oxidative damage)을 유발한다. 따라서 이러한 스트레스를 소거할 수 있는 항산화 물질의 개발은 매우 중요한 과제이다. 이에 본 실험에서 분리된 모든 젖산균의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거능으로 측정하였으며, 그 결과는 Table 4에서

보는바와 같다. 모든 젖산균은 항산화능을 나타내었으며, 전체적으로 26.6%(S4 균주)-85.9% (C5 균주)의 범위를 나타내어 균주마다 항산화능이 상이함을 알 수 있었다. 항산화능이 높은 젖산균을 이용하여 맥문동을 발효할 경우, 시너지 효과가 있을 것으로 판단된다.

사람의 고혈압은 다음 그림과 같이 angiotensin-converting enzyme(ACE)에 의하여 초래되기도 한다. 따라서 ACE의 활성을 저해할 수 있다면 고혈압을 예방할 수 있을 것이다. 따라서 분리된 모든 젖산균의 ACE 저해능을 조사하였으며, 그 결과는 Table 4에서 보는바와 같다.



MRS broth에서 배양한 모든 젖산균은 ACE 저해능을 나타내었으며, 전체적으로 19.5%(C9 균주)-97.2%(K10, K14, K27 균주)의 범위에 있었다. 지금까지 젖산균의 ACE 저해능에 관한 연구는 거의 보고되어 있지 않다. 그러나 본 연구를 통하여 많은 젖산균이 ACE 저해능을 보유하고 있음을 알 수 있었다. Skim milk가 함유된 MRS broth에서 배양된 젖산균은 MRS broth보다 ACE 저해능이 높을 것으로 예상하여 추가실험을 실시하였다. 그러나 모든 젖산균이 그러한 경향을 나타내는 것이 아니었으며, 매우 흥미로운 결과를 나타내었다. 즉 결과는 3개의 패턴으로 나타났는데, MRS broth보다 ACE 저해능이 낮은 경우(C6, C8, C9, C11, C13, C16, C20, C22, K10, K14, K15, K16, K21, K22, K25, K27, K28, K29, K31, K32, K33, P3, J1, D3, D6, D8, S2, S3 균주), ACE 저해능이 나타나지 않은 경우(C2, C5, C17, K1, K2, K3, K4, S4 균주) 및 ACE 저해능이 높은 경우(그 외 균주)이었다. 특히 ACE 저해능이 나타나지 않은 균주는 생리학적으로 연구해 볼만한 가치가 있는 것으로 판단되었다. 요약하면 젖산균을 잘 선정하면 ACE 저해능을 향상시킬 수 있으며, 이 균주를 맥문동 발효에 이용시 역시 ACE 저해능이 높은 맥문동 발효제품을 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. Antioxidant and ACE inhibitory activities of isolates

Isolate	Antioxidant activity(%)	ACE inhibitory activity(%)		Source
		MRS	Skim milk	
C-1	53.2	49.7	72.3	Crop plant
C-2	60.1	53.1	-	
C-3	56.8	60.6	98.2	
C-4	52.7	79.7	95.3	
C-5	85.9	60.1	-	
C-6	36.9	40.6	7.1	
C-7	28.4	31.6	62.0	
C-8	54.3	69.9	7.1	
C-9	51.8	19.5	61.1	
C-10	47.0	37.4	54.4	
C-11	58.6	52.8	51.6	
C-12	48.9	57.5	70.1	
C-13	39.6	82.2	82.7	
C-14	56.5	65.9	87.8	
C-15	45.1	24.1	51.6	
C-16	61.0	26.2	11.1	
C-17	39.7	44.5	-	
C-18	58.2	53.1	67.2	
C-19	42.5	44.3	59.8	
C-20	53.5	60.2	39.5	
C-21	55.0	61.7	80.2	
C-22	55.6	58.2	30.4	
C-23	54.3	55.9	62.9	
DD-1	82.7	62.5	98.6	Dongdongju
K-1	61.1	35.2	-	Kimchi
K-2	63.5	39.5	-	
K-3	49.6	48.1	-	
K-4	62.8	75.4	-	
K-5	53.6	23.8	44.7	
K-6	78.6	32.4	35.2	
K-7	57.3	36.8	62.7	
K-8	62.2	38.7	76.3	
K-9	61.2	40.8	53.5	
K-10	59.4	97.2	72.3	
K-11	47.9	61.5	91.5	
K-12	57.8	26.4	71.2	
K-13	50.1	84.4	95.0	
K-14	54.8	97.2	35.6	
K-15	66.7	71.9	70.5	
K-16	52.8	86.9	65.5	
K-17	59.8	42.0	57.3	
K-18	55.7	83.4	97.5	
K-19	38.4	71.9	77.7	
K-21	31.4	94.1	69.4	
K-21	56.8	43.1	48.4	

K-22	35.2	78.1	63.0	
K-23	50.3	38.5	48.1	
K-24	64.0	47.7	63.9	
K-25	48.1	74.4	97.5	
K-25	49.9	86.6	68.7	
K-27	57.2	97.2	73.4	
K-28	45.7	93.4	19.8	
K-29	49.1	46.9	44.2	
K-30	61.5	72.8	89.2	
K-31	79.4	32.8	1.2	
K-32	58.9	51.2	34.0	
K-33	77.1	48.3	20.2	
P-1	55.5	45.0	88.5	
P-2	71.8	65.9	91.3	
P-3	40.8	73.1	68.3	
J-1	54.1	69.0	65.2	Jeotgal
J-2	52.5	53.4	55.7	
D-1	53.5	40.8	41.1	Doinjang
D-2	56.5	68.4	74.8	
D-3	57.4	84.7	78.8	
D-4	53.6	65.6	76.6	
D-5	69.9	40.6	66.8	
D-6	72.5	79.3	39.5	
D-7	49.7	46.1	74.1	
D-8	63.4	81.9	56.1	
S-1	45.5	45.7	64.8	Sikhye
S-2	43.9	66.0	40.1	
S-3	29.0	61.5	60.1	
S-4	26.6	69.9	-	

#### 마. 배양시간 경과에 따른 *Bacillus*의 protease 생성능 변화

앞에서 언급하였듯이 protease 활성을 가진 젓산균과 함께 protease 활성을 가진 *Bacillus*를 혼합배양할 경우, ACE 저해 펩티드를 보다 많이 생성할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 맥문동 발효의 starter로 *Bacillus*를 이용하기 위하여 분리된 총 50 균주의 protease 생성능을 배양시간 경과에 따라 조사하였다. 각 균주의 protease 활성이 더 이상 증가하지 않는 시점까지 배양하면서 protease 활성을 조사하였다. Table 5에서 보는바와 같이 된장에서 분리된 BD 6, 13, 20, 27 균주 및 청국장에서 분리된 BC 2, 10, 19 균주의 protease 생성능이 전반적으로 우수하였다. 특히 BC 19 균주의 protease 생성능이 가장 우수하였는데 배양 48 시간 경 가장 높은 활성을 나타내었다. BC 18 및 21 균주는 배양초기 protease 생성능이 가장 낮았는데 전 배양시간에 걸쳐 다른 균주들보다 낮은 활성을 나타내었다. Fig. 3은 상기 균주의 skim milk agar plate에서의 protease 생성능을 관찰한 사진으로서, proteolysis zone인 투명환의 직경은 BC 2 균주에서 가장 높았다. 즉, 액체배지에서 protease 생성능을 정량한 결과(Table 5)와 고체배지에서 투명환의 직경을 정성 분석한 결과는 정확하게 일치하지 않았다. 고체배지의 경우, 배지의 조

성 및 고화제 농도가 세포 밖으로 분비된 protease의 확산 이동을 제한하는 하나의 요인으로 작용한 것에 기인한 것으로 판단된다.

Table 5. Time course of protease production and cell growth by isolates

Protease activity ( $A_{280}$ )						Cell growth ( $A_{660}$ )				
isolate time	BD1	BD2	BD3	BD4	BD5	BD1	BD2	BD3	BD4	BD5
24 h	0.467	0.444	0.431	0.442	0.446	0.330	0.292	0.352	0.214	0.347
36 h	0.500	0.510	0.482	0.500	0.501	0.524	0.493	0.491	0.424	0.493
48 h	0.481	0.475	0.501	0.586	0.504	0.247	0.475	0.275	0.238	0.309
60 h	0.554		0.510	0.286	0.536	0.214		0.266	0.210	0.378
72 h	0.479		0.503		0.489	0.158		0.222		0.271
isolate time	BD6	BD7	BD8	BD9	BD10	BD6	BD7	BD8	BD9	BD10
24 h	<b>0.473</b>	0.422	0.412	0.441	0.452	0.422	0.264	0.226	0.310	0.320
36 h	<b>0.417</b>	0.453	0.469	0.515	0.468	0.580	0.594	0.464	0.206	0.329
48 h	<b>0.530</b>	0.508	0.491	0.483	0.503	0.375	0.307	0.260	0.359	0.326
60 h	<b>0.612</b>	0.273	0.544	0.525	0.514	0.276	0.290	0.235	0.154	0.318
72 h	<b>0.549</b>		0.498	0.500		0.236		0.236	0.300	
isolate time	BD11	BD12	BD13	BD14	BD15	BD11	BD12	BD13	BD14	BD15
24 h	0.472	0.486	<b>0.463</b>	0.456	0.459	0.245	0.349	0.366	0.419	0.441
36 h	0.506	0.524	<b>0.575</b>	0.548	0.529	0.428	0.659	0.482	0.894	0.549
48 h	0.517	0.524	<b>0.623</b>	0.556	0.543	0.268	0.316	0.260	0.311	0.330
60 h	0.528	0.555	<b>0.545</b>	0.549	0.541	0.291	0.254	0.298	0.313	0.318
72 h		0.539					0.221			
isolate time	BD16	BD17	BD18	BD19	BD20	BD16	BD17	BD18	BD19	BD20
12 h	0.521	0.530	0.471	0.463	<b>0.507</b>	0.122	0.173	0.276	0.292	0.273
24 h	0.541	0.536	0.488	0.501	<b>0.527</b>	0.541	0.536	0.488	0.501	0.527
36 h	0.481	0.503	0.534	0.512	<b>0.597</b>	0.340	0.339	0.388	0.411	0.377
48 h		0.506	0.516	0.513	<b>0.535</b>	0.339	0.327	0.393	0.383	0.316
isolate time	BD21	BD22	BD23	BD24	BD25	BD21	BD22	BD23	BD24	BD25
12 h	0.480	0.507	0.417	0.517	0.480	0.353	0.224	0.235	0.296	0.248
24 h	0.438	0.501	0.467	0.511	0.482	0.438	0.501	0.467	0.511	0.482
36 h	0.409	0.549	0.524	0.554	0.504	0.318	0.416	0.567	0.418	0.464
48 h		0.468	0.516	0.527	0.516		0.449	0.516	0.337	0.463
isolate	BD26	BD27	BD28	BD29	BC1	BD26	BD27	BD28	BD29	BC1



time										
12 h	0.405	<b>0.509</b>	0.525	0.497	0.544	0.206	0.232	0.153	0.115	0.196
24 h	0.535	<b>0.617</b>	0.550	0.537	0.504	0.505	0.517	0.550	0.537	0.504
36 h	0.564	<b>0.652</b>	0.566	0.538	0.518	0.340	0.346	0.588	0.328	0.292
48 h	0.508	<b>0.620</b>	0.561	0.557	0.528	0.327	0.342	0.356	0.351	0.290
isolate time	<b>BC2</b>	BC3	BC4	BC5	BC6	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6
12 h	<b>0.588</b>	0.572	0.553	0.488	0.511	0.233	0.174	0.310	0.304	0.132
24 h	<b>0.445</b>	0.575	0.478	0.525	0.579	0.255	0.247	0.318	0.416	0.248
36 h	<b>0.603</b>	0.547	0.494	0.568	0.551	0.309	0.332	0.264	0.390	0.437
48 h	<b>0.601</b>		0.444	0.557	0.572	0.289	0.307			0.416
isolate time	BC7	BC8	BC9	<b>BC10</b>	BC11	BC7	BC8	BC9	BC10	BC11
12 h	0.497	0.461	0.477	<b>0.515</b>	0.494	0.250	0.294	0.345	0.326	0.362
24 h	0.527	0.550	0.542	<b>0.534</b>	0.113	0.309	0.256	0.514	0.428	0.293
36 h	0.547	0.502	0.566	<b>0.506</b>	0.521	0.420	0.429	0.390	0.353	0.279
48 h	0.553	0.447	0.573	<b>0.621</b>	0.548	0.496	0.445	0.378	0.250	0.279
60 h			0.512	<b>0.695</b>	0.514	0.467	0.449			0.260
isolate time	BC12	BC13	BC14	BC15	BC16	BC12	BC13	BC14	BC15	BC16
12 h	0.486	0.440	0.461	0.455	0.454	0.353	0.274	0.337	0.244	0.240
24 h	0.541	0.450	0.460	0.567	0.505	0.412	0.275	0.417	0.329	0.277
36 h	0.442	0.463	0.472	0.520	0.482	0.315	0.249	0.402	0.490	0.422
48 h	0.412	0.570	0.557	0.535	0.545	0.262	0.270	0.255	0.308	0.395
60 h		0.506	0.534		0.548		0.213	0.236		0.353
isolate time	BC17	BC18	<b>BC19</b>	BC20	BC21	BC17	BC18	BC19	BC20	BC21
12 h	0.477	0.541	<b>0.536</b>	0.462	0.541	0.306	0.007	0.223	0.313	0.079
24 h	0.534	0.507	<b>0.616</b>	0.426	0.481	0.440	0.109	0.305	0.510	0.240
36 h	0.500	0.448	<b>0.688</b>	0.397	0.499	0.392	0.278	0.284	0.405	0.226
48 h	0.298	0.421	<b>0.778</b>		0.500	0.341	0.232	0.329		0.256
60 h			<b>0.735</b>				0.225	0.255		0.209

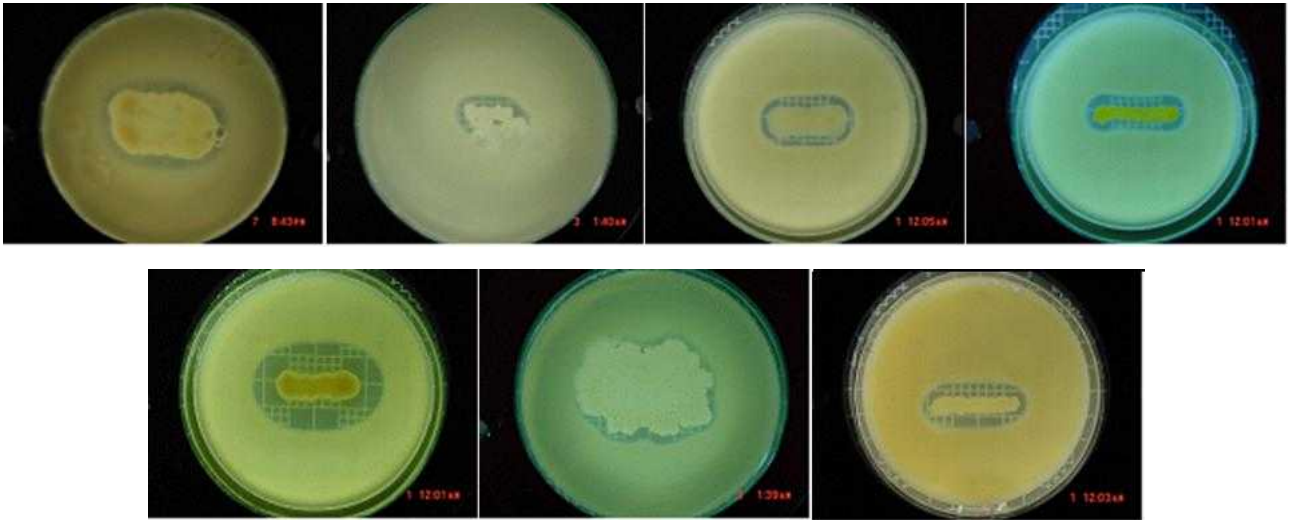


Fig. 3. Proteolytic activity of *Bacillus* spp. selected in skim milk agar plate(From upper left to right : BD 6, BD 13, BD 20, BD 27, BC 2, BC 10, BC 19).

#### 바. 분리균주의 동정

분리된 젖산균 및 *Bacillus* 가운데 다양한 생리활성을 가지고, proteolysis 활성이 우수한 것을 다시 선정하여 Biolog 및 16S rRNA gene 염기서열 분석에 의거하여 분류학적 위치를 조사하였다.

분리된 *Bacillus* 가운데 배양시간 경과에 따라 protease 생성능이 가장 우수하였던 BC 2, BC 19, BD 6, BD 10, BD 13, BD 20, BD 27 균주를 선정하여 Biolog 및 16S rRNA gene 염기서열에 의거하여 동정하였다. 먼저 Biolog metabolic finger print의 차이에 의하여 동정한 결과, BC 2 및 BC 27 균주는 *B. amyloliquefaciens*와 각각 0.79, 0.83의 유사도(similarity)를 나타내었으며, BC 19, BD 6, BD 10, BD 13, BD 20 균주는 *B. subtilis*와 각각 0.94, 0.87, 0.90, 0.78, 0.82의 유사도(similarity)를 나타내었다(Table 6). Biolog user guide에 의하면 MicroLog™ system을 이용하여 세균을 동정할 경우, 각각 4시간 및 24시간 배양시, 균주의 similarity가 0.75 및 0.5 이상이 되어야만 정확하게 동정되었음을 나타낸다.

선정균주의 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene의 염기서열 분석을 실시하였다. 선정균주의 genomic DNA를 추출하여 16S rRNA gene primer를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭된 gene의 부분 염기서열을 분석한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 이 염기서열을 NCBI GenBank에 등록된 유사 균주와 비교분석하여 유전자간 상관성을 알아본 결과, BC 2 및 BD 27 균주는 *B. amyloliquefaciens*와 각각 98%의 상동성(homology)를 나타내었으며, BC 19, BD 6, BD 10, BD 13, BD 20 균주는 *B. subtilis*와 각각 99%, 98%, 98%, 97%, 98%의 상동성을 나타내었다(Table 6). 한편, 16S rRNA gene 구조에 기초하여 선정균주와 기존의 알려진 *Bacillus* spp.(type strains)와의 분자계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 neighbor-joining method에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였고, 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 즉, 분자계통학적 분석에서도 선정균주들은 *Bacillus* 속을 포함하는 계통학적 그룹에 속하였으며, 각각 *B.*

*amyloliquefacians* 및 *B. subtilis*와 가장 높은 유연관계를 나타내었다.

BD20	BD13
<p>CATCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGTTCACGCACTGCGAGTTGCGAGCTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCGAGCATGAGGGGCGGAAACCCCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTTCGCGATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCGAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGCGGTGACTACCAAGGTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTAGTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCCTCAAGGTCGCGCCCTATTGAAACGGCACTGTTCTTCCCTAACANAGAGCTTTCAGATCCGAAACCTTCATCACTACGCGGNGTGTCTGTCAGACTTTCGTTNNGCGNNATCCCTACTGCTGCC</p>	<p>CTGTTCNCATCAGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGTTCACGCACTGCGAGTTGCGAGCTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCGAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGCGGTGACTACCAAGGTTTCACAGGATATCTAATCTGTTCCGCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTACAGTACAGACCGAGAGTGTGCTTCGCCACTGGTTCCTCCACATCTCAGCATTACCCGCTACACGTGGAATTCACCTTCTCAGCTTCTTTCGACTCAAGTTCGCCGTTTCCCAATGACCTCCCGGTTGAGCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTAGTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCCTCAAGGTCGCGCCCTATTGAAACGGCACTGTTCTTCCCTAACANAGAGCTTTCAGATCCGAAACCTTCATCACTACGCGGNGTGTCTGTCAGACTTTCGTTNNGCGNNATCCCTACTGCTGCC</p>
BD6	BC10
<p>TTGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGTTCACGCACTGCGAGTTGCGAGCTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTTCGCGATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCGAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGCGGTGACTACCAAGGTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTAGTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCCTCAAGGTCGCGCCCTATTGAAACGGCACTGTTCTTCCCTAACANAGAGCTTTCAGATCCGAAACCTTCATCACTACGCGGNGTGTCTGTCAGACTTTCGTCATGCGNNATCCNACTGCTGNTCCGTAGANTCTG</p>	<p>GTTTCNCATTCGGGCGGTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGTTCACGCACTGCGAGTTGCGAGCTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTTCGCGATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCGAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGCGGTGACTACCAAGGTTTCACAGGATATCTAATCTGTTCCGCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTACAGTACAGACCGAGAGTGTGCTTCGCCACTGGTTCCTCCACATCTCAGCATTACCCGCTACACGTGGAATTCACCTTCTCAGCTTCTTTCGACTCAAGTTCGCCGTTTCCCAATGACCTCCCGGTTGAGCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTAGTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCCTCAAGGTCGCGCCCTATTGAAACGGCACTGTTCTTCCCTAACANAGAGCTTTCAGATCCGAAACCTTCATCACTACGCGGNGTGTCTGTCAGACTTTCGTCATGCGNNATCCNACTGCTGNTCCGTAGANTCTG</p>
BC19	BC2
<p>TTGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGTTCACGCACTGCGAGTTGCGAGCTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTTCGCGATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCGAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGCGGTGACTACCAAGGTTTCATCTAATCTGTTCCGCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTACAGTACAGACAGAGTGTGCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTCAGCATTACCCGCTACACGTGGAATTCACCTTCTCAGCTTCTTTCGACTCAAGTTCGCCGTTTCCCAATGACCTCCCGGTTGAGCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCNATAANTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTAGTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCCTCAAGGTCGCGCCCTATTGAAACGGCACTGTTCTTCCCTAACANAGAGCTTTCAGATCCGAAANNNATCACTCANGCGNNNCTGTCNNAGCTTTCGTCATGCGANATNCTACTGCTGCCCTCGTAGNNCTGG</p>	<p>TCGGGCGGTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGTTCACGCACTGCGAGTTGCGAGCTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTTCGCGATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCGAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGCGGTGACTACCAAGGTTTCATCTGTTCCGCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTACAGTACAGACAGAGTGTGCTTCGCCACTGAGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTAGTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCCTCAAGGTCGCGCCCTATTGAAACGGCACTGTTCTTCCCTAACANAGAGCTTTCAGATCCGAAACCTTCATCACTACGCGGNGTGTCTGTCAGACTTTCGTCATGCGNNATCCNACTGCTGNTCCGTAGANTCTG</p>
BD27	
<p>CNCATNNGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGTTCACGCACTGCGAGTTGCGAGCTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTGACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTACCCGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCGAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCGAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGCGGTGACTACCAAGGTTTCAGGATCTAATCTGTTCCGCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTACAGTACAGACAGAGAGTGTGCTGCCCTTGCCACTGGTGTCTCCACATCTCAGCATTACCCGCTACAGTGGAAATTCCTACTCCTCTTCGACTCAAGTTCGCCGTTTCCCAATGACCTCCCGGTTGAGCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTAGTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCCTCAAGGTCGCGCCCTATTGAAACGGCACTGTTCTTCCCTAACANAGAGCTTTCAGATCCGAAACCTTCATCACTACGCGGNGTGTCTGTCAGACTTTCGTCATGCGNNATCCNACTGCTGNTCCGTAGANTCTG</p>	

Fig. 4. Partial nucleotide sequence of 16S rRNA gene from *Bacillus* selected.

Table 6. Identification results of *Bacillus* strains selected.

Strain	Identification by Biolog (similarity)	Identification by 16S rRNA gene (homology)
BC2	<i>B. amyloliquefacians</i> (0.79)	<i>B. amyloliquefacians</i> (98%)
BC19	<i>B. subtilis</i> (0.94)	<i>B. subtilis</i> (99%)
BD6	<i>B. subtilis</i> (0.87)	<i>B. subtilis</i> (98%)
BD10	<i>B. subtilis</i> (0.90)	<i>B. subtilis</i> (98%)
BD13	<i>B. subtilis</i> (0.78)	<i>B. subtilis</i> (97%)
BD20	<i>B. subtilis</i> (0.82)	<i>B. subtilis</i> (98%)
BD27	<i>B. amyloliquefacians</i> (0.83)	<i>B. amyloliquefacians</i> (98%)

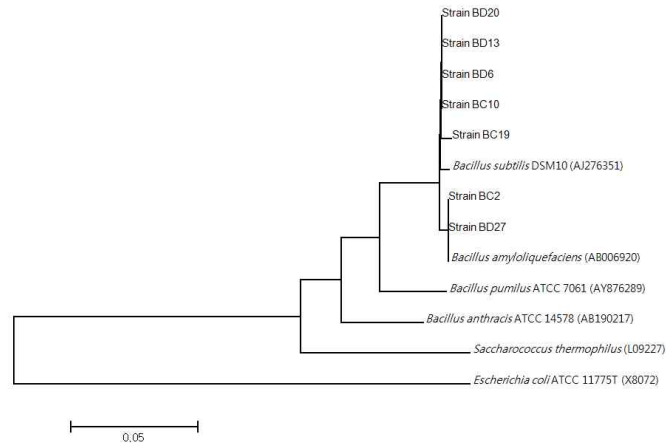


Fig. 5. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of strains selected and the type strains of some *Bacillus* species.

또한, 선정된 젓산균의 16S rRNA gene의 염기서열 분석을 실시하였다. 선정균주의 genomic DNA를 추출하여 16S rRNA gene primer를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭된 gene의 부분 염기서열을 결정한 후, 이 염기서열을 NCBI GenBank에 등록된 유사 균주와 비교분석하여 유전자간 상관성을 알아본 결과는 Table 7에서 보는바와 같다.

Table 7. Identification results of Lactic acid bacteria selected.

Strain	Identification by 16S rRNA gene (homology)
C-3	<i>Lactobacillus plantarum</i> (98%)
C-5	<i>L. brevis</i> (97%)
C-6	<i>Weissella cibaria</i> (97%)
C-7	<i>Enterococcus durans</i> (98%)
C-12	<i>L. brevis</i> (98%)
C-14	<i>L. plantarum</i> (97%)
C-17	<i>L. fermentum</i> (97%)
C-20	<i>W. cibaria</i> (98%)
C-21	<i>L. pentosus</i> (98%)
C-22	<i>W. cibaria</i> (97%)
C-23	<i>L. pentosus</i> (99%)
C-26	<i>W. cibaria</i> (97%)
D-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (98%)
D-5	<i>E. durans</i> (99%)
D-6	<i>W. cibaria</i> (99%)
DD-1	<i>L. brevis</i> (98%)
J-1	<i>L. plantarum</i> (99%)
J-2	<i>L. plantarum</i> (97%)
K-1	<i>E. durans</i> (99%)
K-2	<i>E. faecium</i> (98%)
K-3	<i>P. pentosaceus</i> (98%)
K-4	<i>P. pentosaceus</i> (97%)
K-6	<i>L. pentosus</i> (96%)
K-10	<i>L. pentosus</i> (98%)
K-15	<i>L. pentosus</i> (98%)
K-18	<i>L. brevis</i> (98%)
K-22	<i>L. sakei</i> (98%)
K-23	<i>E. durans</i> (98%)
K-31	<i>L. brevis</i> (98%)
P-2	<i>L. plantarum</i> (98%)
S-2	<i>L. brevis</i> (97%)

## 2. 발효균주의 기능성물질 생산조건

상기 연구를 통하여 확보된 젓산균과 *Bacillus* 중 DPPH 라디칼 소거활성과 ACE 저해활성이 뛰어난 균주를 각각 선정하여 각 균주의 DPPH 라디칼 소거활성 및 ACE 저해활성 생산 최적조건을 확립하였으며, 최적화된 조건에서 다양한 항산화 활성을 조사하였다. 또한 맥문동을 열수추출 및 고압 열수추출한 후, 화학조성을 비교하였으며, 각 추출물을 배지로 이용했을 때 젓산균의 생육 특성을 조사하였다. 선정된 젓산균을 종균으로 이용하여 각 맥문동 추출물을 진탕 및 정치배양하면서 배양시간 경과에 따른 각종 발효변수의 변화를 조사하였다.

### 가. 발효균주의 기능성물질 생산조건 확립

#### (1) 균주 선정

상기 연구에서 DPPH 라디칼 소거활성과 ACE 저해활성을 가진 다양한 젓산균 및 *Bacillus*를 분리하였다. 확보한 균주들을 젓산균과 *Bacillus*로 구분하여 각각 DPPH 라디칼 소거활성과 ACE 저해활성이 우수한 균주를 실험균주로 선정하였다. 즉, DPPH 라디칼 소거활성이 뛰어난 *Lactobacillus plantarum* K31 및 *Bacillus subtilis* BD6을 선정하여 DPPH 라디칼 소거활성 생산 최적조건을 조사하였으며, ACE 저해활성이 뛰어난 *Lactobacillus brevis* DD1 및 *Bacillus amyloliquefaciens* BC2를 실험균주로 선정하여 ACE 저해활성 생산 최적조건을 조사하였다.

#### (2) 기본배지 선정

실험균주에 적합한 기본배지를 선정하기 위하여 다양한 배지를 이용하여 배양시간에 따른 time curve를 작성하였다. ACE 저해활성 실험을 위한 배지의 경우, 예비실험을 통하여 DD1 균주는 MRS(배양시간 12시간), BC2 균주는 TSB(배양시간 24시간)가 선정되었다. DPPH 라디칼 소거활성을 위한 배지의 경우, K31 균주는 TYL(배양시간 12시간), BD6 균주는 TSB(배양시간 12시간)가 선정되었다.

MRS의 조성은 Proteose peptone No. 3 1%, beef extract 1%, yeast extract 0.5%, glucose 2%, Tween 80 0.1%, ammonium citrate 0.2%, sodium acetate 0.5%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.01%, MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 0.005%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%(pH 6.8)이었으며, TSB의 조성은 tryptone 1.7%, soytone 0.3%, NaCl 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25%, glucose 0.25%(pH 6.8)이었다. 또한 TYL의 조성은 tryptone 1%, yeast extract 0.5%, lactose 0.5%, Tween 80 0.1%, L-cysteine HCl 0.01%(pH 6.8)이었다.

#### (3) 젓산균으로부터 DPPH 라디칼 소거활성 및 ACE 저해활성 생산 최적조건

실험에 사용된 균주는 *Lactobacillus brevis* DD1(ACE 저해활성) 및 *Lactobacillus plantarum* K31(DPPH 라디칼 소거활성)이었다. ACE 저해활성과 DPPH 라디칼 소거활성은 각각 상대활성(%)으로 표현하였다. 모든 실험은 3반복 수행 후, 평균값으로 결과를 나타내었다.

(가) 각종 탄소원에 따른 영향

탄소원이 DD1 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지인 MRS에 각종 탄소원 2%를 첨가하여 30℃에서 12시간동안 배양하였으며, 그 결과는 Table 8에서 보는 바와 같다. Fructose, maltose, sucrose 및 lactose 등에서 우수한 ACE 저해활성이 나타났으며, 특히 sucrose에서 가장 높은 ACE 저해활성을 보였다. Sucrose를 최적 탄소원으로 선정하여 ACE 저해활성을 위한 최적 농도를 조사한 결과, 2.5%에서 가장 높은 저해활성을 보였다(Fig. 6).

Table 8. Effect of carbon source on ACE inhibition activity of strain DD1

Carbon source	Relative ACE inhibition activity (%)
None	63.1
Glucose	31.0
Galactose	31.0
Fructose	70.3
Sucrose	100.0
Maltose	69.1
Lactose	73.9

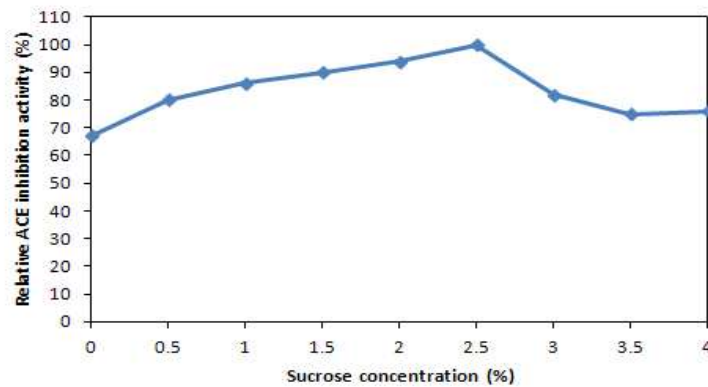


Fig. 6. Effect of sucrose concentration on ACE inhibition activity of strain DD1.

탄소원이 K31 균주의 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지인 TYL에 각종 탄소원 0.5%를 첨가하여 30℃에서 12시간동안 배양한 결과는 Table 9에서 보는 바와 같다. 탄소원을 첨가한 대부분의 실험구에서 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었으나, 탄소원을 첨가하지 않았을 때 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다.

Table 9. Effect of carbon source on DPPH radical scavenging activity of strain K31

Carbon source	Relative DPPH scavenging activity (%)
None	100.0
Galactose	90.4
Fructose	89.5
Sucrose	93.3
Maltose	92.4
Lactose	96.0
Glucose	97.1

**(나) 각종 질소원에 따른 영향**

질소원이 DD1 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2.5% sucrose가 함유된 배지에 각종 질소원 2.5%를 첨가하여 30℃에서 12시간동안 배양한 결과는 Table 10에서 보는 바와 같다. 질소원 무첨가 배지, bactopectone, casein, skim milk, beef extract, gelatin 및 무기질소원을 첨가한 배지에서는 ACE 저해활성이 나타나지 않았다. 그 외 질소원을 첨가한 배지에서는 ACE 저해활성을 나타내었으며, 특히, polypeptone과 proteose peptone No. 3에서 높은 저해활성을 보였다. 최적 질소원으로 polypeptone과 proteose peptone No. 3을 선정하여 각 질소원의 최적농도를 확인한 후(Fig. 7), 두 질소원의 첨가비율(최종농도 2.5%)에 따른 ACE 저해활성을 조사한 결과, 2% polypeptone 및 0.5% proteose peptone No. 3을 혼합 첨가시 가장 높은 저해활성을 나타내었다(Fig. 8).



Table 10. Effect of nitrogen source on ACE inhibition activity of strain DD1

Nitrogen source	Relative ACE inhibition activity (%)
Proteose peptone No. 3 1% + beef extract 1% + yeast extract 0.5%	84.6
Polypeptone	98.1
Bactopeptone	0.0
Proteose peptone No. 3	100.0
Soytone	87.5
Tryptone	37.5
Casein	0.0
Skim milk	0.0
Beef extract	0.0
Corn steep liquor	38.5
Casamino acid	17.3
Malt extract	0.0
Gelatin	0.0
Yeast extract	74.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.0
NH <sub>4</sub> Cl	0.0
None	0.0

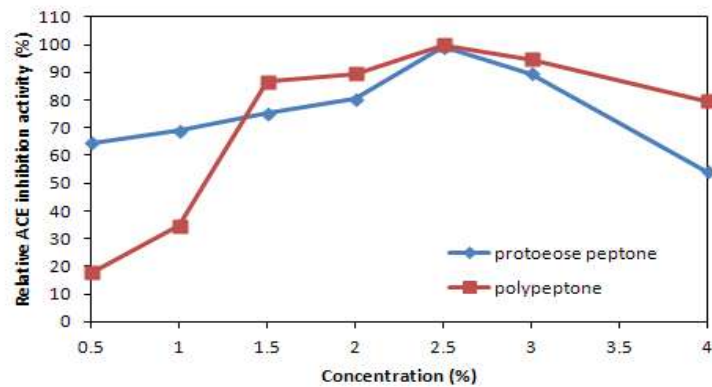


Fig. 7. Effect of proteose peptone No. 3 and polypeptone concentration on ACE inhibition activity of strain DD1.

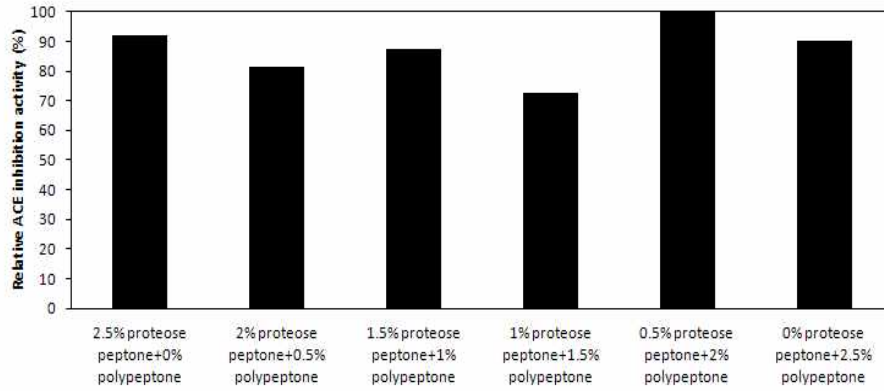


Fig. 8. Effect of proteose peptone No. 3 and polypeptide combination ratio on ACE inhibition activity of strain DD1.

질소원이 K31 균주의 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 질소원을 1.5% 첨가하여 30°C에서 12시간동안 배양한 결과는 Table 11에서 보는 바와 같다. Skim milk 및 gelatin를 제외한 나머지 질소원을 첨가한 배지에서 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었으며 특히, bacto-peptone, polypeptide, casamino acid, tryptone+yeast extract를 첨가한 배지에서 높은 소거활성을 나타내었다. 이들 질소원을 0-2% 농도별로 첨가하여 소거활성을 비교한 결과, 0.5% bacto-peptone에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다(Fig. 9).

Table 11. Effect of nitrogen source on DPPH radical scavenging activity of strain K31

Nitrogen source	Relative DPPH scavenging activity (%)
Tryptone 1%+yeast extract 0.5%	97.1
Polypeptone	98.5
Bactopeptone	100.0
Proteose peptone No. 3	78.2
Soytone	93.8
Tryptone	99.2
Casein	93.1
Skim milk	0.0
Beef extract	73.6
Corn steep liquor	91.5
Casamino acid	98.2
Malt extract	91.3
Gelatin	0.0
Yeast extract	56.9
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	62.7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	79.2
NH <sub>4</sub> Cl	82.4
None	84.7

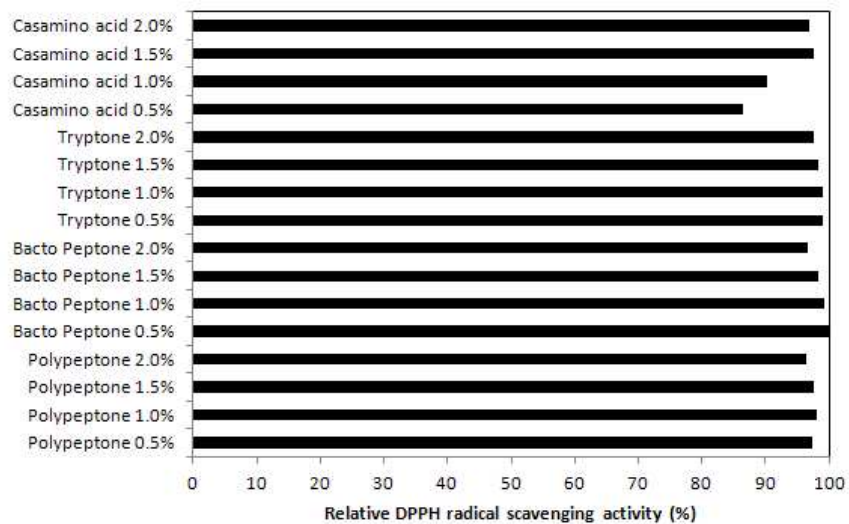


Fig. 9. Effect of nitrogen source concentration on DPPH radical scavenging activity of strain K31.

(다) 각종 무기염과 계면활성제에 따른 영향

각종 배지성분이 DD1 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 우선 single

omission technique을 이용하였다. 즉, ammonium citrate, Tween 80,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , sodium acetate 및  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 가 각각 제외된 배지를 이용하여 30°C에서 12시간동안 배양한 결과는 Fig. 10에서 보는 바와 같이 ammonium citrate, Tween 80을 제외한 모든 배지 성분이 ACE 저해활성 생산에 필요한 것으로 나타났다. 따라서  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , sodium acetate 및  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 의 농도에 따른 ACE 저해활성을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 11에서 보는 바와 같이 0.2%  $K_2HPO_4$ , 0.005%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1% sodium acetate 그리고 0.001%  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 에서 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내었다.

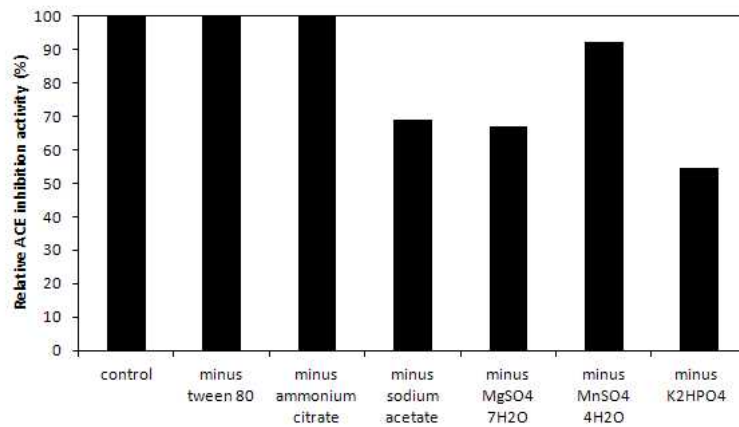


Fig. 10. Effect of medium component omission on ACE inhibition activity of strain DD1.

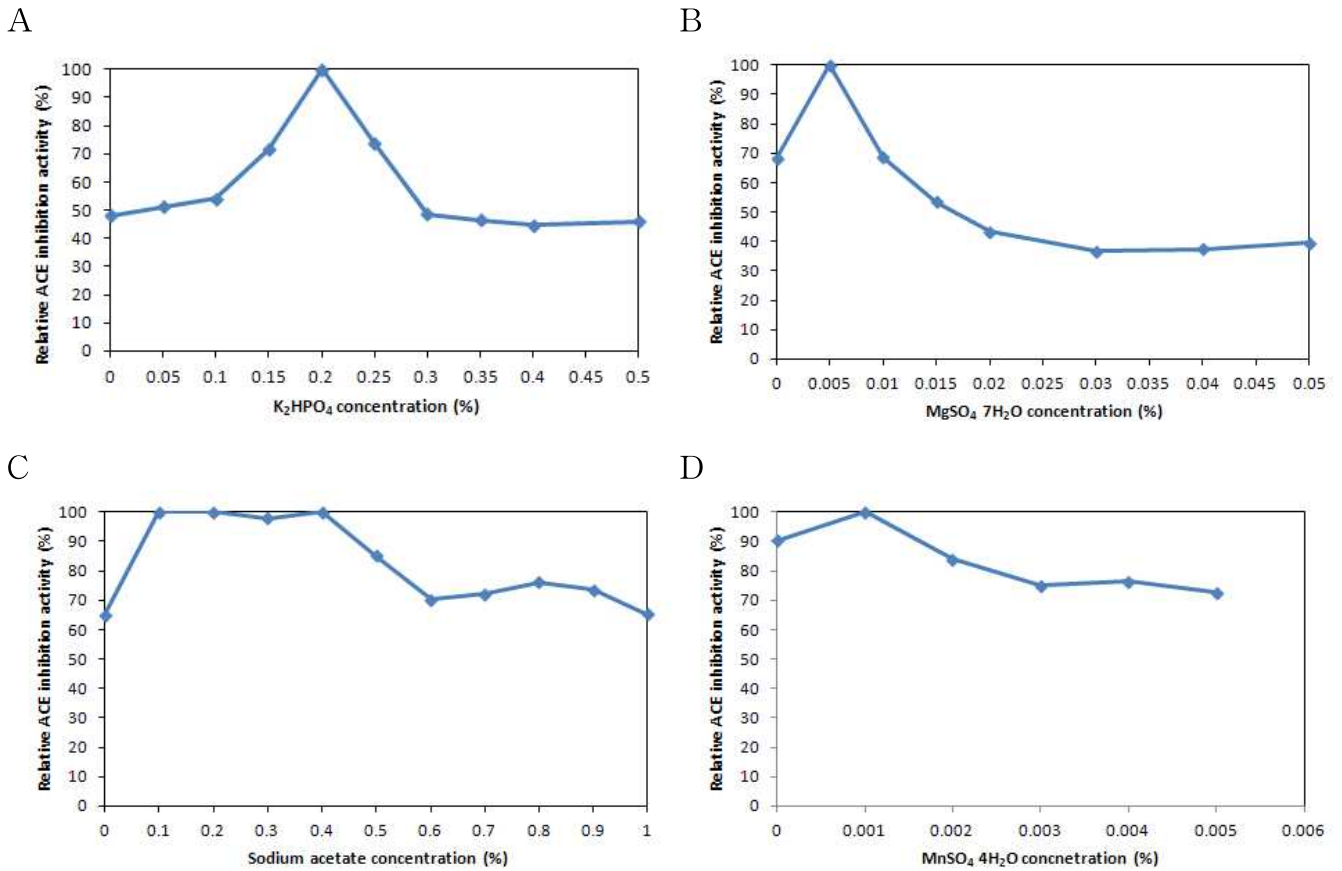


Fig. 11. Effect of inorganic salt and sodium acetate on ACE inhibition activity of strain DD1. A, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; B, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; C, sodium acetate; D, MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O.

L-cysteine HCl의 농도가 K31 균주의 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 12에서 보는 바와 같이 0.02%에서 가장 높은 소거활성을 나타내었다. 또한 Tween 80의 농도가 K31 균주의 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 0.05%에서 가장 높은 소거활성을 나타내었다(Fig. 13). 기본배지에 포함되어 있지 않은 기타 성분(ammonium citrate, sodium acetate, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 첨가 효과를 조사한 결과, 이들 성분을 첨가하지 않는 것이 DPPH 라디칼 소거활성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다(Fig. 14).

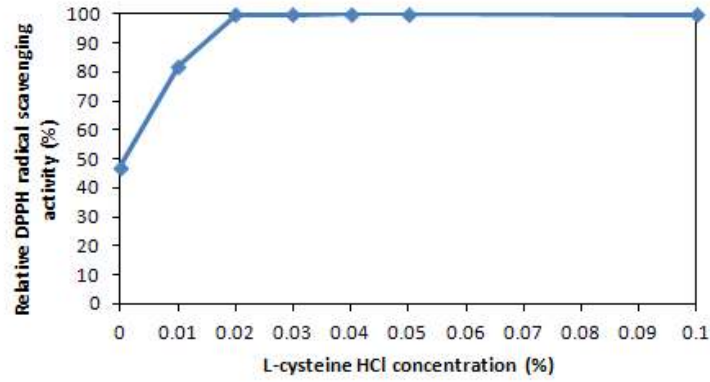


Fig. 12. Effect of L-cysteine HCl concentration on DPPH radical scavenging activity of strain K31.

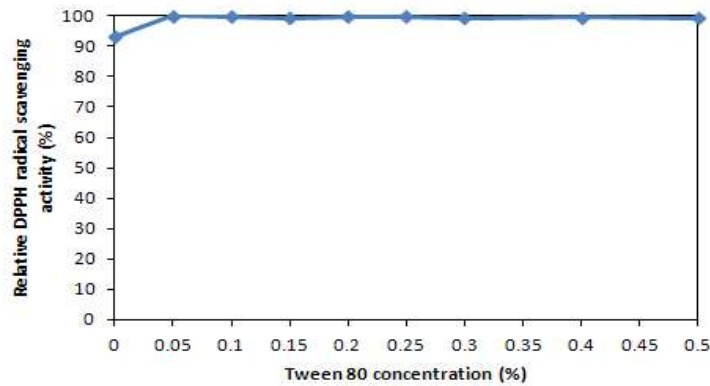


Fig. 13. Effect of tween 80 concentration on DPPH radical scavenging activity of strain K31.

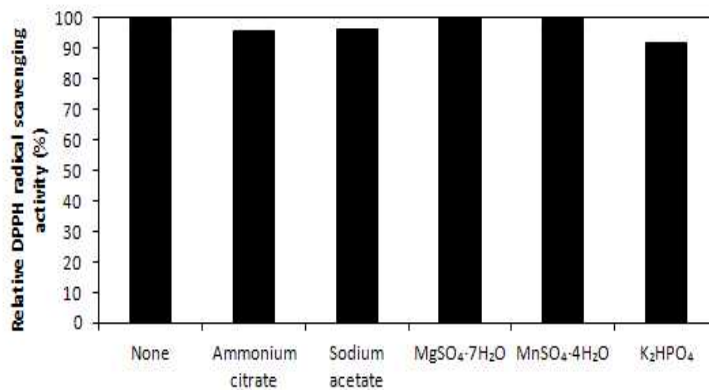


Fig. 14. Effect of additional inorganic compound on DPPH radical scavenging activity of strain K31.

(라) 배양온도 및 pH에 따른 영향

배양온도와 배지의 초기 pH가 DD1 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사한 결과는

Fig. 15 및 16에서 보는 바와 같이 35℃ 및 pH 6.5에서 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내었다.

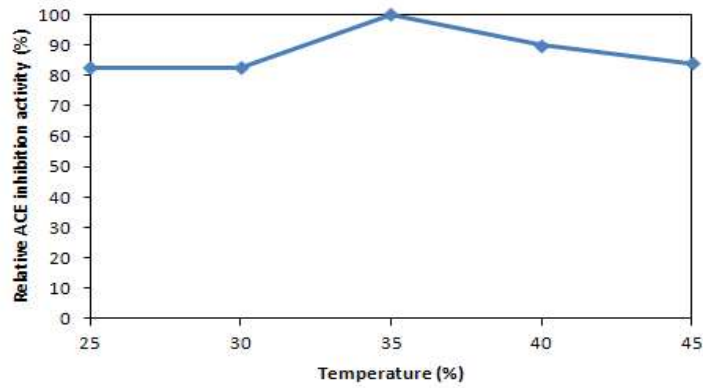


Fig. 15. Effect of temperature on ACE inhibition activity of strain DD1.

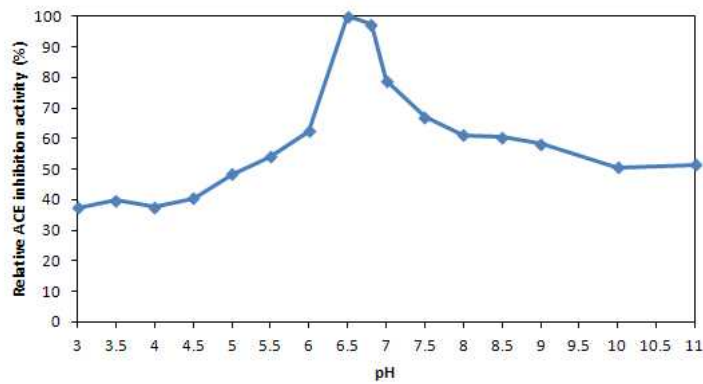


Fig. 16. Effect of initial pH on ACE inhibition activity of strain DD1.

한편, 배양온도와 배지의 초기 pH가 K31 균주의 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 25-30℃ 및 pH 3-7의 넓은 영역에서 DPPH 라디칼 소거활성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 17-18).

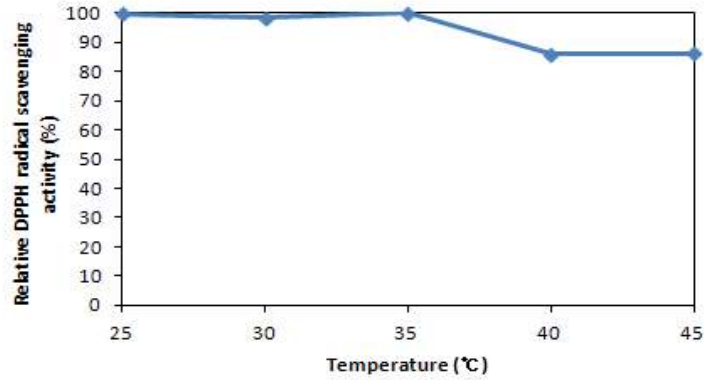


Fig. 17. Effect of temperature on DPPH radical scavenging activity of strain K31.

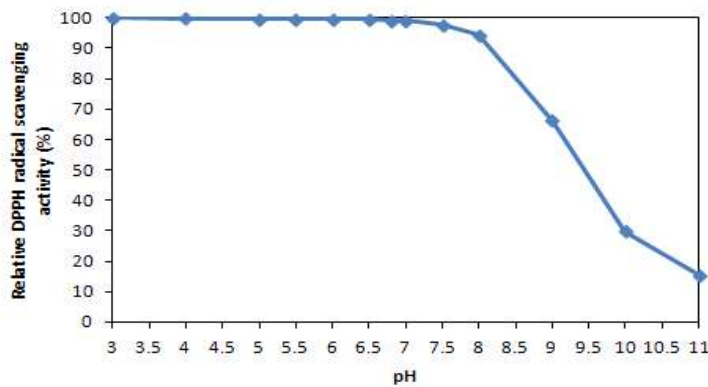


Fig. 18. Effect of initial pH on DPPH radical scavenging activity of strain K31.

#### (마) 진탕속도에 따른 영향

진탕속도가 DD1 균주 및 K31 균주의 ACE 저해활성과 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 19 및 20에서 보는 바와 같이 두 균주 모두 정치배양에서 가장 높은 ACE 저해활성 및 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. 특히 DD1 균주의 경우, 진탕속도가 증가함에 따라 ACE 저해활성은 크게 감소하였다.

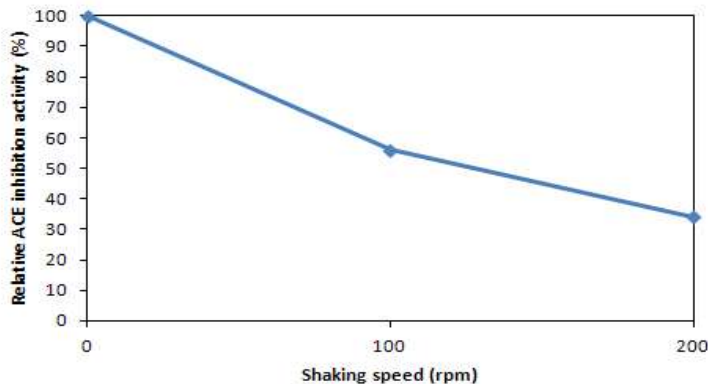




Fig. 19. Effect of shaking speed on ACE inhibition activity of strain DD1.

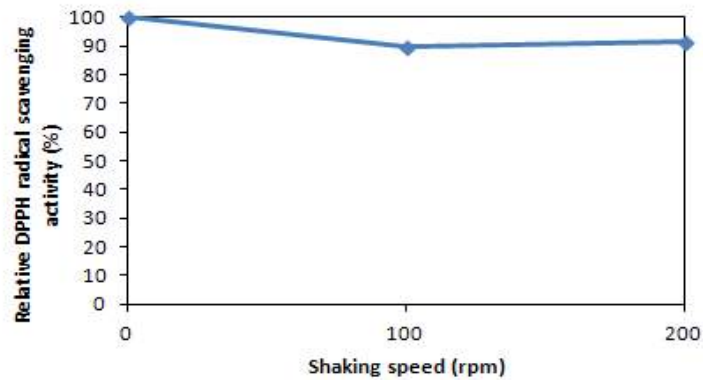


Fig. 20. Effect of shaking speed on DPPH radical scavenging activity of strain K31.

**(바) 접종량에 따른 영향**

종균 접종량이 DD1 균주 및 K31 균주의 ACE 저해활성과 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 21 및 22에서 보는 바와 같다. DD1 균주의 경우, 1-2%의 종균을 접종했을 때 높은 ACE 저해활성을 나타내었으며, 3% 이상의 접종량에서는 저해활성이 감소하였다. 그러나 K31 균주의 경우, DPPH 라디칼 소거활성은 접종량에 관계없었다.

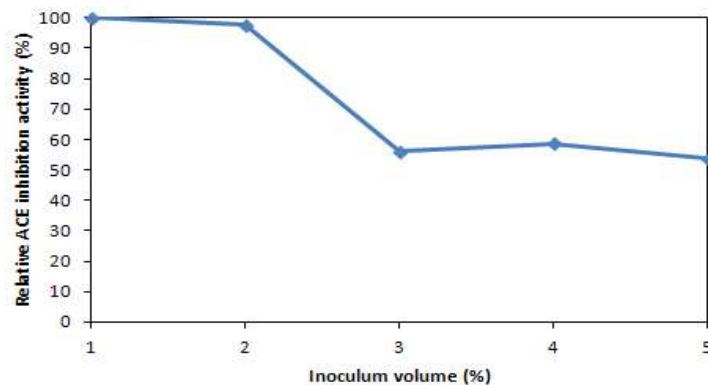


Fig. 21. Effect of inoculum volume on ACE inhibition activity of strain DD1.

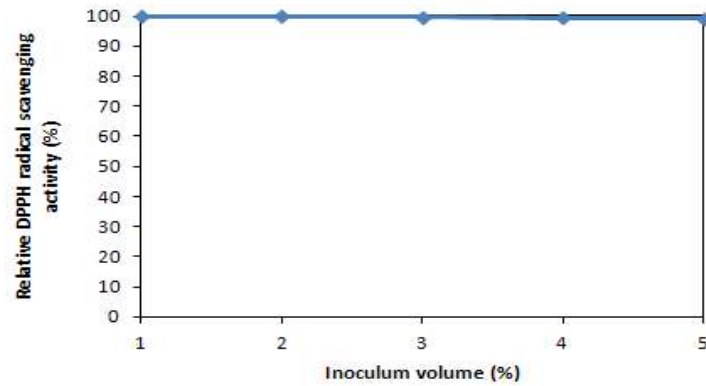


Fig. 22. Effect of inoculum volume on DPPH radical scavenging activity of strain K31.

(사) 최적조건에서 생육도 및 생리활성

DD1 균주의 ACE 저해활성을 위한 최적조건은 sucrose 2.5%, proteose peptone No. 3 0.5% polypeptone 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, sodium acetate 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.005%, MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 0.001%, pH 6.5, 35°C 및 종균 접종량 1%이었다. K31 균주의 DPPH 라디칼 소거활성을 위한 최적조건은 bactopectone 0.5%, tween 80 0.05%, L-cysteine HCl 0.02%, pH 6.8, 30°C, 종균 접종량 5%이었다.

최적조건에서 DD1 균주 및 K31 균주를 각각 배양하면서 조사한 최대 균체 생육도 및 최대 생리활성은 Table 12에서 보는 바와 같다. K31 균주의 경우, DPPH 라디칼 소거활성을 위한 최적조건에서 94.6%의 소거활성을 보였을 뿐만 아니라 환원력을 제외한 다른 생리활성도 28.1-48%의 범위에 있었다. DD1 균주의 경우, ACE 저해활성을 위한 최적조건에서 93.3%의 저해활성을 보였으며, OH 라디칼 소거활성과 환원력을 제외한 다른 생리활성도 25.4-99.9%의 범위에 있었다.

Table 12. Bioactive activities of selected strain under optimal condition

	<i>Lactobacillus brevis</i> DD1	<i>Lactobacillus plantarum</i> K31
Cell growth (A <sub>660</sub> )	0.385	0.168
DPPH radical scavenging activity (%)	94.1	94.6
ABTS radical scavenging activity (%)	99.9	42.9
Metal(Fe <sup>2+</sup> ) chelation activity (%)	65.4	48.0
SOD-like activity (%)	25.4	32.9
Reducing power (%)	10.1	3.4
NO scavenging activity (%)	50.7	44.6
OH scavenging activity (%)	7.6	28.1
ACE inhibition activity (%)	93.3	38.8

#### (4) *Bacillus*로부터 DPPH 라디칼 소거활성 및 ACE 저해활성 생산 최적조건

실험에 사용된 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens* BC2(ACE 저해활성) 및 *Bacillus subtilis* BD6(DPPH 라디칼 소거활성)이었다. ACE 저해활성 및 DPPH 라디칼 소거활성은 각각 상대활성(%)으로 표현하였다. 모든 실험은 3반복 수행 후, 평균값으로 결과를 나타내었다.

##### (가) 각종 탄소원에 따른 영향

탄소원이 BC2 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지인 TSB에 각종 탄소원 0.25%를 첨가하여 30℃에서 24시간동안 배양하였으며, 그 결과는 Table 13에서 보는 바와 같다. 탄소원을 첨가한 모든 배지에서 ACE 저해활성을 나타내었지만 탄소원을 첨가하지 않은 배지에서 가장 높은 저해활성을 나타내었다.

Table 13. Effect of carbon source on ACE inhibition activity of strain BC2

Carbon source	Relative ACE inhibition activity (%)
None	100.0
Glucose	83.4
Galactose	60.9
Fructose	88.5
Sucrose	78.9
Maltose	85.3
Lactose	93.7
Mannitol	86.6
Sorbitol	89.7
Glycerol	90.4
Soluble starch	70.5

탄소원이 BD6 균주의 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지인 TSB에 각종 탄소원 0.25%를 첨가하여 30℃에서 12시간동안 배양한 결과는 Table 14에서 보는 바와 같다. Galactose, maltose, glycerol 및 sucrose 등에서 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였는데 특히, sucrose에서 가장 높은 소거활성을 나타내었다. Sucrose를 최적 탄소원으로 선정하여 DPPH 라디칼 소거활성을 위한 최적 농도를 조사한 결과, 0.25%에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다(Fig. 23).

Table 14. Effect of carbon source on DPPH radical scavenging activity of strain BD6

Carbon source	Relative DPPH radical scavenging activity (%)
None	92.1
Galactose	91.5
Fructose	94.4
Sucrose	100.0
Maltose	99.2
Lactose	92.1
Mannitol	93.1
Sorbitol	98.0
Glycerol	98.2
Soluble Starch	55.3
Glucose	95.2

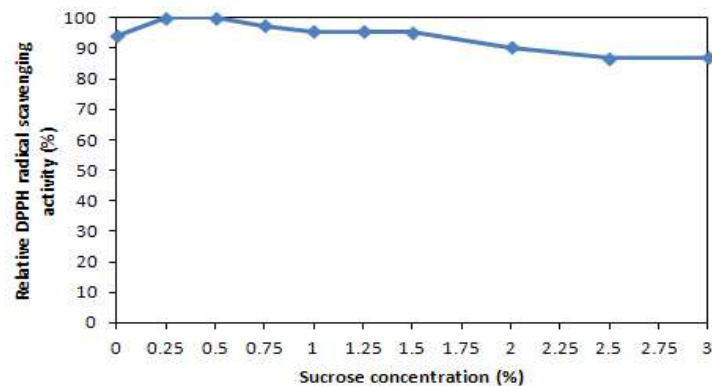


Fig. 23. Effect of sucrose concentration on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

**(나) 각종 질소원에 따른 영향**

질소원이 BC2 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 탄소원이 함유되지 않은 기본배지에 각종 질소원을 2%씩 첨가하여 30℃에서 24시간동안 배양한 결과는 Table 15에서 보는 바와 같다. 질소원은 ACE 저해활성 생산에 필수적임을 알 수 있었으며, gelatin과 무기질소원을 첨가한 배지에서 ACE 저해활성은 매우 낮았다. 그 외 질소원을 첨가한 배지에서는 비교적 높은 ACE 저해활성을 보였으며 특히, tryptone+soytone을 첨가한 배지와 casein을 첨가한 배지에서 높은 ACE 저해활성을 나타내었다. 따라서 최적 질소원으로 casein 및 soytone+tryptone을 선정된 후, casein의 농도 및 soytone과 tryptone의 첨가비율에 따른 ACE 저해활성을 조사한 결과, 2-2.5% casein을 첨가했을 때 가장 높은 저해활성을 나타내었다(Fig. 24).

Table 15. Effect of nitrogen source on ACE inhibition activity of strain BC2

Nitrogen source	Relative ACE inhibition activity (%)
None	0.0
Tryptone 1.7%+soytone 0.3%	96.3
Polypeptone	66.1
Bactopeptone	65.2
Soytone	91.1
Tryptone	80.4
Casein	100.0
Skim milk	80.4
Beef extract	81.3
Corn steep liquor	84.8
Casamino acid	70.5
Malt extract	74.1
Gelatin	31.3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	27.7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16.1
NH <sub>4</sub> Cl	47.3

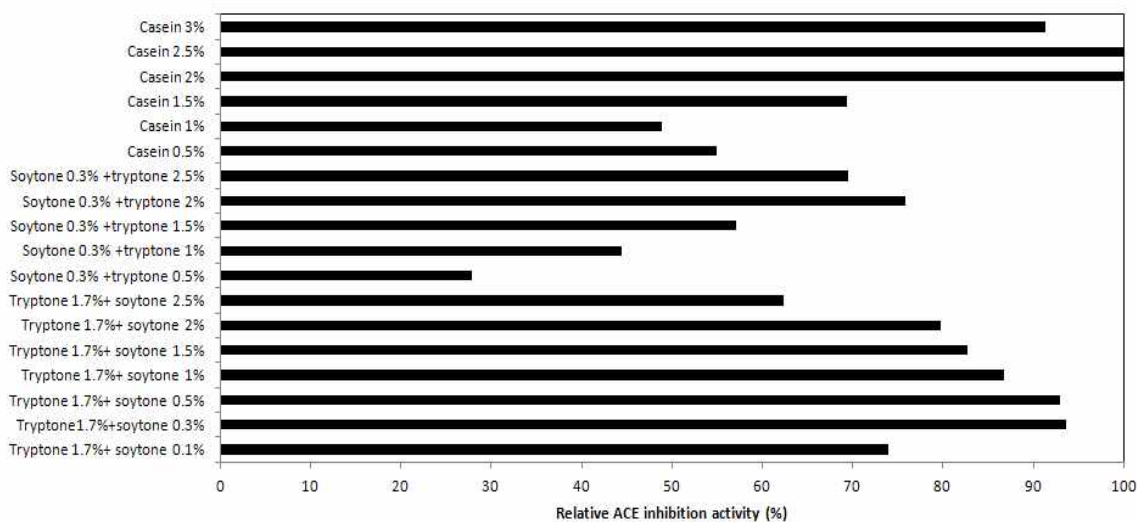


Fig. 24. Effect of nitrogen source concentration on ACE inhibition activity of strain BC2.

질소원이 BD6 균주의 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.25%의 sucrose가 첨가된 배지에 각종 질소원을 2%씩 첨가하여 30°C에서 12시간동안 배양한 결과는 Table 16에서 보는 바와 같다. 질소원을 첨가하지 않은 배지, 무기질소원을 첨가한 배지, casein 및 yeast extract를 첨가한 배지에서 DPPH 라디칼 소거활성은 낮았다. 그 외 질소원을 첨가한 배지에서는 DPPH 라디칼 소거활성이 비교적 높았으며, 특히 casamino acid, tryptone,

bactopeptone, tryptone+soytone에서 우수한 소거활성을 나타내었다. 따라서 이들의 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거활성을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 25에서 보는 바와 같이 1% bactopeptone에서 가장 높은 소거활성을 나타내었다.

Table 16. Effect of nitrogen source on DPPH radical scavenging activity of strain BD6

Nitrogen source	Relative DPPH radical scavenging activity (%)
None	47.1
Tryptone 1.7%+ soytone 0.3%	100.0
Polypeptone	95.9
Bactopeptone	100.0
Soytone	79.7
Tryptone	98.0
Casein	34.1
Skim milk	88.7
Beef extract	62.5
Corn steep liquor	66.4
Casamino acid	99.0
Malt extract	89.5
Gelatin	84.1
Yeast extract	40.5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	38.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	38.8
NH <sub>4</sub> Cl	31.0

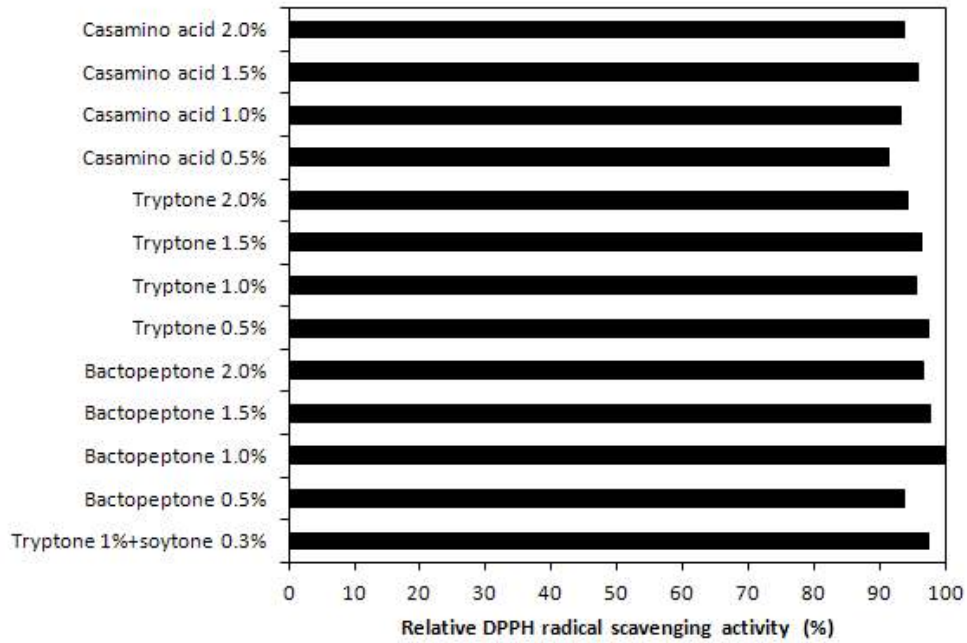


Fig. 25. Effect of nitrogen source concentration on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

**(다) NaCl 및 인산염에 따른 영향**

NaCl 및 인산염이 BC2 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NaCl,  $K_2HPO_4$  및  $Na_2HPO_4$ 를 농도별로 배지에 첨가하여 30°C에서 24시간동안 배양한 결과는 Fig. 26에서 보는 바와 같다. NaCl은 전 실험농도에서 높은 ACE 저해활성을 보였으며, 특히 0.5% NaCl에서 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 또한  $K_2HPO_4$ 를 첨가했을 때  $Na_2HPO_4$ 보다 높은 ACE 저해활성을 나타내었으나, 인산염을 무첨가시 가장 높은 저해활성을 나타내었다.

한편, BD6 균주의 경우, NaCl 및  $K_2HPO_4$ 의 첨가는 DPPH 라디칼 소거활성에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 27).

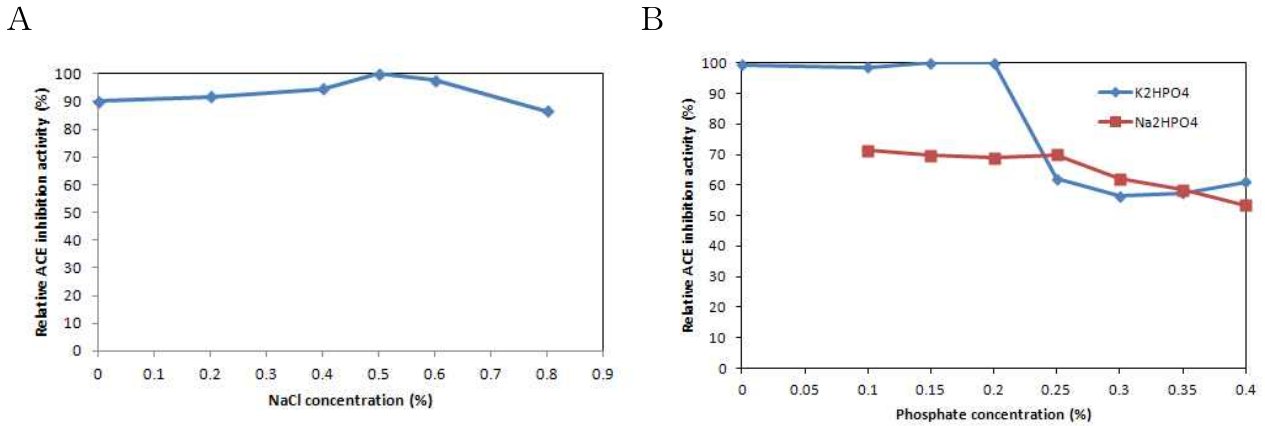


Fig. 26. Effect of NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> on ACE inhibition activity of strain BC2. A, NaCl; B, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

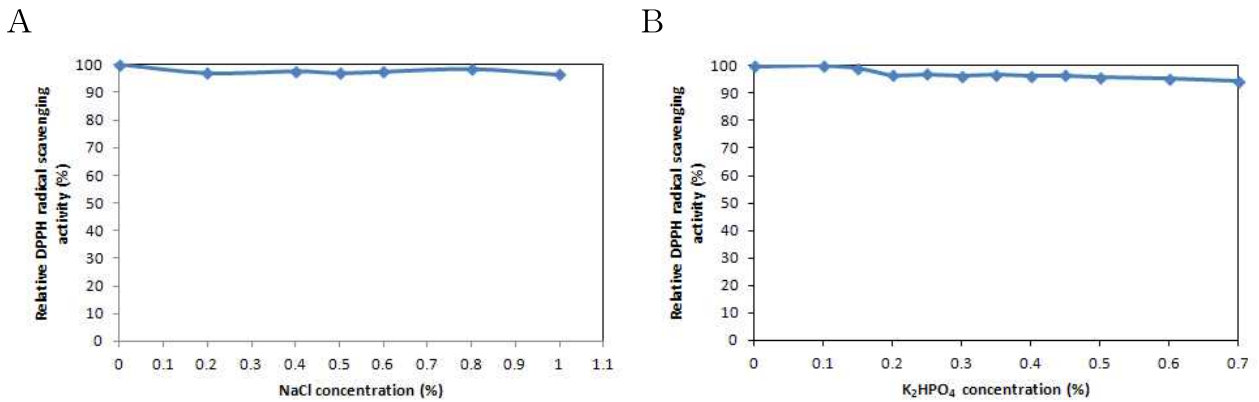


Fig. 27. Effect of NaCl and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> on DPPH radical scavenging activity of strain BD6. A, NaCl; B, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

**(라) 기타 무기염 첨가에 따른 영향**

기본배지에 포함되어 있지 않은 기타 무기염의 첨가가 BC2 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 물질을 0.05% 및 0.01%씩 첨가하여 30℃에서 24시간동안 배양한 결과는 Fig. 28에서 보는 바와 같이 조사한 모든 무기염의 첨가는 ACE 저해활성 증가에 아무런 영향을 미치지 않았다.

한편, BD6 균주의 경우, 무첨가 배지보다 CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O와 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O를 첨가한 배지에서 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 그중 0.01% MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O를 첨가했을 때 소거활성 가장 높았다(Fig. 29). CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O와 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O의 농도조합은 DPPH 라디칼 소거활성에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 30).



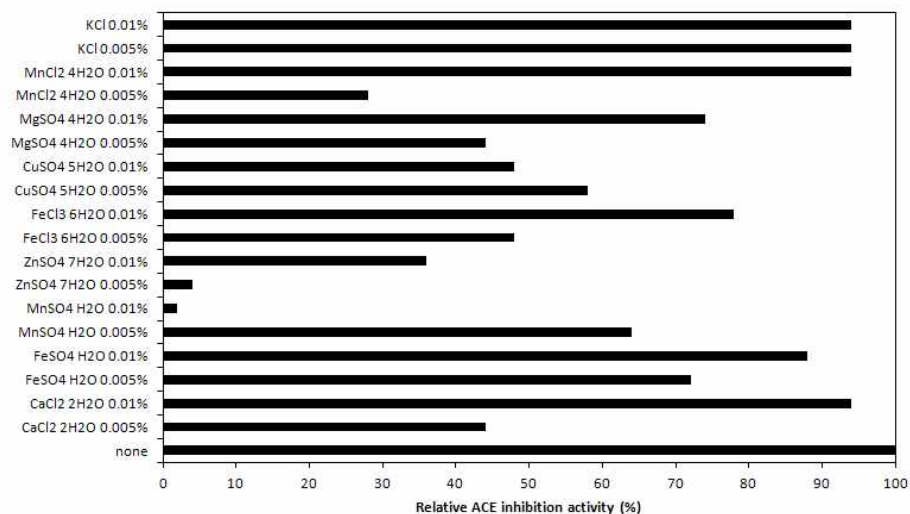


Fig. 28. Effect of additional inorganic compound on ACE inhibition activity of strain BC2.

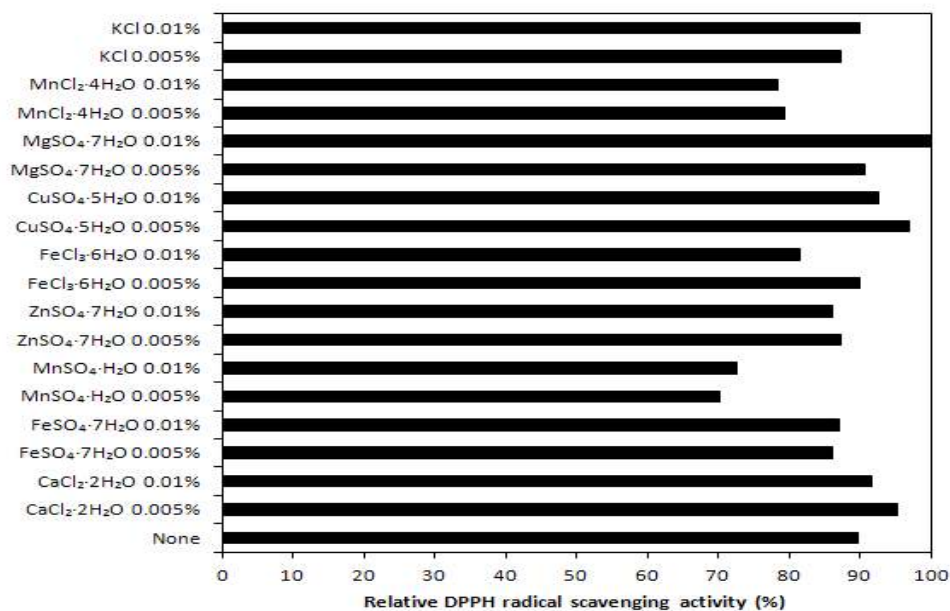


Fig. 29. Effect of additional inorganic compound on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

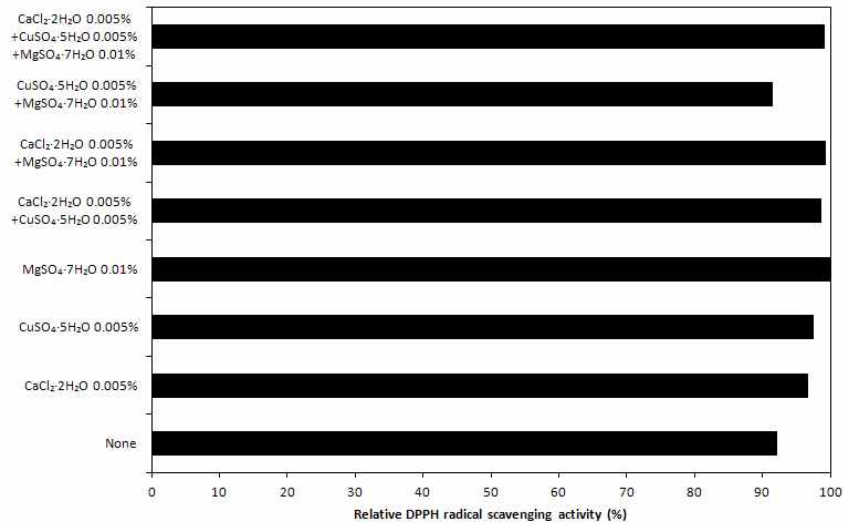


Fig. 30. Effect of inorganic compound combination ratio on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

**(마) 배양온도 및 pH에 따른 영향**

배양온도와 배지의 초기 pH가 BC2 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 31 및 32에서 보는 바와 같이 35°C 및 pH 7에서 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내었다.

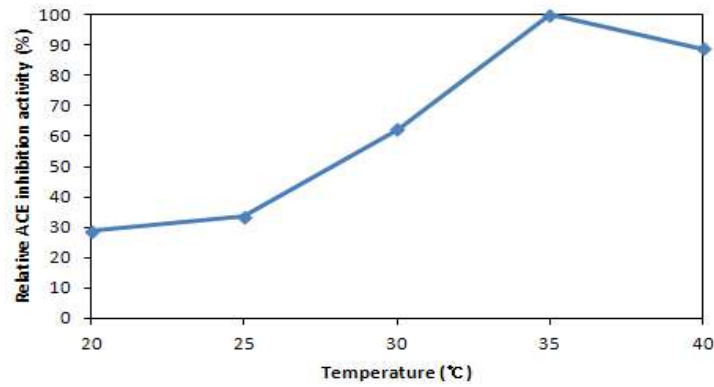


Fig. 31. Effect of temperature on ACE inhibition activity of strain BC2.

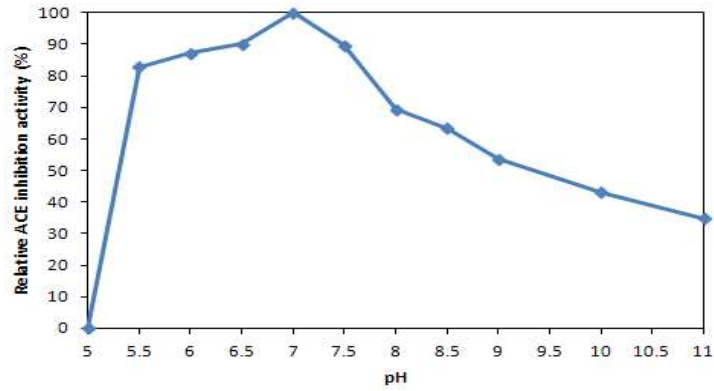


Fig. 32. Effect of initial pH on ACE inhibition activity of strain BC2.

한편, BD6 균주의 경우, 조사한 배양온도 범위인 25-40°C 및 pH 3-8에서 DPPH 라디칼 소거 활성이 높았으며(Fig. 33-34), 전체적으로 K31 균주와 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 30°C 및 pH 6.8을 최적 배양온도 및 pH로 선정하였다.

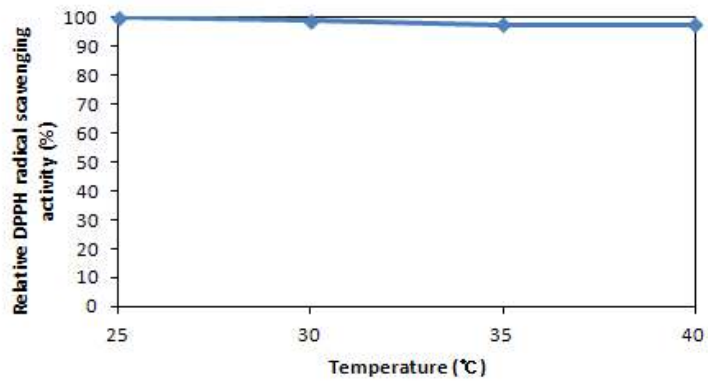


Fig. 33. Effect of temperature on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

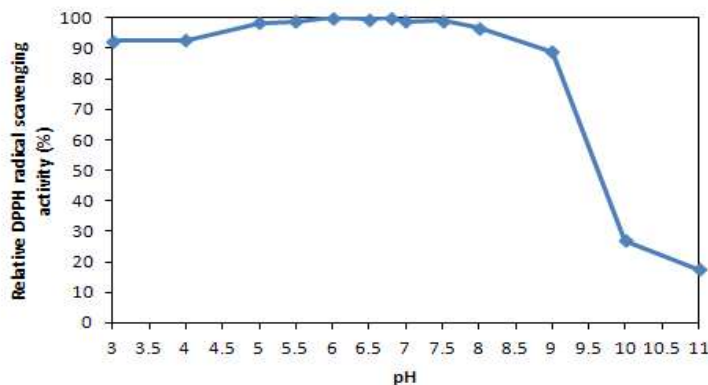


Fig. 34. Effect of initial pH on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

### (바) 통기량에 따른 영향

실험균주의 분류학적 특성에 따라 통기량이 BC2 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 35에서 보는 바와 같이 50ml/250ml flask에서 가장 높은 ACE저해활성을 나타내었다.

한편, BD 균주의 경우, 조사한 모든 통기량 범위에서 DPPH 라디칼 소거활성의 변화는 없었다(Fig. 36).

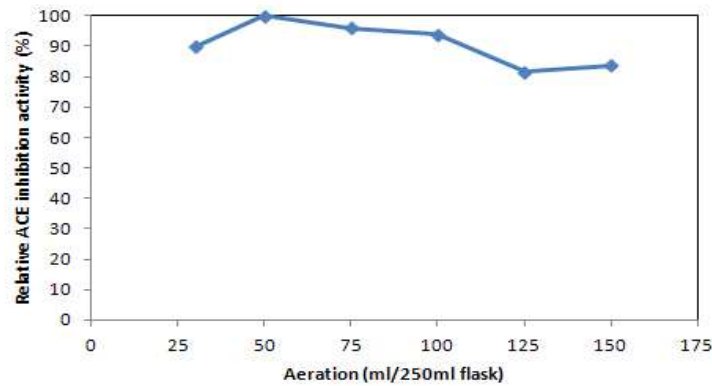


Fig. 35. Effect of aeration on ACE inhibition activity of strain BC2.

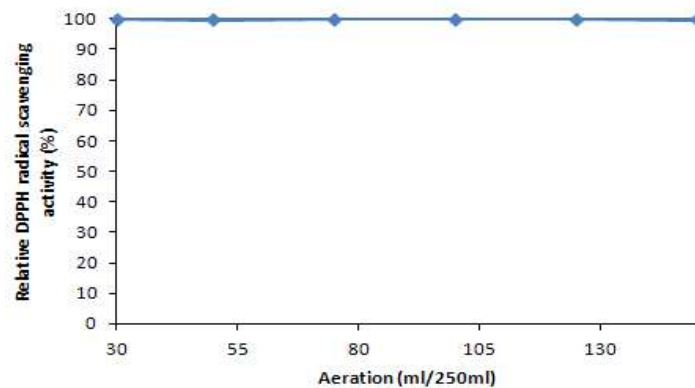


Fig. 36. Effect of aeration on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

### (사) 진탕속도에 따른 영향

진탕속도가 BC2 균주의 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 200 rpm에서 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내었다(Fig. 37).

한편, BD6 균주의 경우, 조사한 모든 진탕속도 범위에서 DPPH 라디칼 소거활성의 변화는 없었다(Fig. 38).

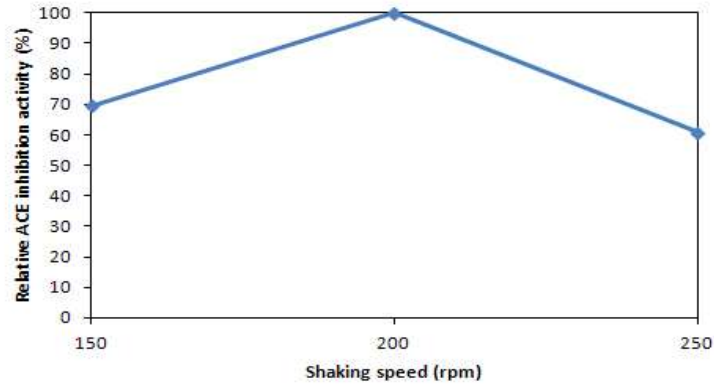


Fig. 37. Effect of shaking speed on ACE inhibition activity of strain BC2.

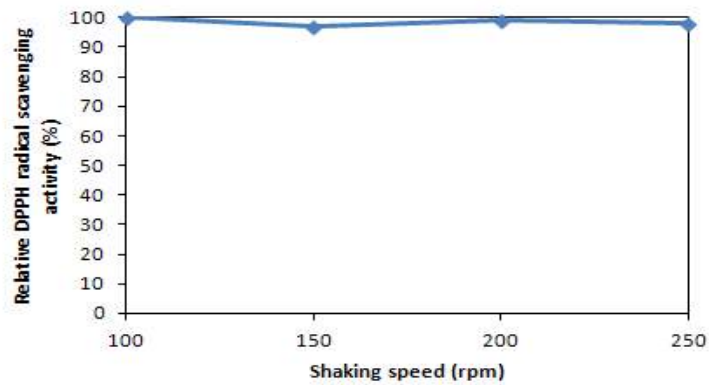


Fig. 38. Effect of shaking speed on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

**(아) 접종량에 따른 영향**

종균 접종량이 BC2 균주 및 BD6 균주의 ACE 저해활성과 DPPH 라디칼 소거활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 39에서 보는 바와 같다. BC2 균주의 경우, 2%의 종균을 접종했을 때 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내었으며, 그 이상의 접종량에서는 저해활성이 완만하게 감소하였다.

한편, K31 균주의 경우, 접종량이 DPPH 라디칼 소거활성에 큰 영향을 미치지 않았으나 4%의 종균을 접종했을 때 가장 높은 소거활성을 나타내었다(Fig. 40).

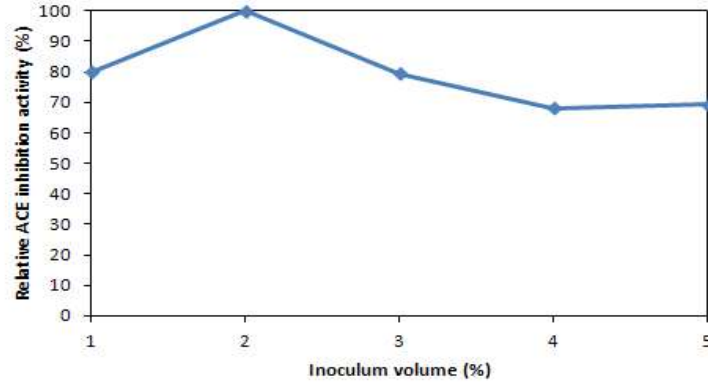


Fig. 39. Effect of inoculum volume on ACE inhibition activity of strain BC2.

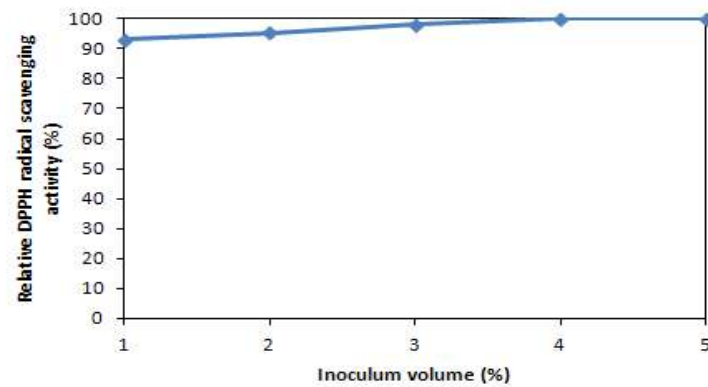


Fig. 40. Effect of inoculum volume on DPPH radical scavenging activity of strain BD6.

**(자) 최적조건에서 균체 생육도 및 생리활성**

BC2 균주의 ACE 저해활성을 위한 최적조건은 casein 2%, NaCl 0.5%, pH 7, 35°C, 50ml/250ml flask, 200 rpm, 종균 접종량 2%이었다. BD6 균주의 DPPH 라디칼 소거활성을 위한 최적조건은 sucrose 0.25%, bactopectone 1%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.01%, pH 6.5, 30°C, 50ml/250ml flask, 200 rpm, 종균 접종량 4%이었다.

최적조건에서 BC2 균주 및 BD6 균주를 각각 배양하면서 조사한 최대 균체 생육도 및 최대 생리활성은 Table 17에서 보는 바와 같다. BD6 균주의 경우, DPPH 라디칼 소거활성을 위한 최적조건에서 92.0%의 소거활성을 보였을 뿐만 아니라 OH 라디칼 소거활성과 환원력을 제외한 다른 생리활성도 19.3-99.8%의 범위에 있었다. BC2 균주의 경우, ACE 저해활성을 위한 최적조건에서 100%의 저해활성을 보였으며, NO 라디칼 소거활성과 환원력을 제외한 다른 생리활성도 29.1-100%의 범위에 있었다.

Table 17. Bioactive activities of selected strain under optimal condition

	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
	BC2	BD6
Cell growth ( $A_{660}$ )	2.941	4.777
DPPH radical scavenging activity (%)	100	92.0
ABTS radical scavenging activity (%)	99.9	99.8
Metal( $Fe^{2+}$ ) chelation activity (%)	84.0	65.8
SOD-like activity (%)	29.1	33.5
Reducing power (%)	7.1	3.7
NO scavenging activity (%)	15.0	19.3
OH scavenging activity (%)	65.1	7.2
ACE inhibition activity (%)	100	49.0

### 3. 맥문동의 발효균주 증식효과 및 예비발효

#### 가. 맥문동 추출 및 성분 분석

맥문동 괴근 2 kg을 60℃에서 48 시간동안 건조한 후, homogenizer를 이용하여 마쇄하였다. 이후 250  $\mu$ m의 공극을 가진 sieve를 이용하여 250  $\mu$ m 이하의 맥문동 분말을 회수하여 실험을 위한 원시료로 사용하였다. 맥문동 분말은 다음과 같이 열수 및 고압 열수추출하였다. 즉, 증류수 1 l당 맥문동 분말 100 g을 첨가하여 충분히 교반하고, 100℃의 끓는 물에서 3시간동안 중탕 또는 121℃에서 3시간동안 autoclave하여 추출하였다. 추출시료를 냉각한 후, whatman no.1 여과지로 여과하여 맥문동 잔사를 제거하였다. 추출액은 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

맥문동의 추출 용매에 대한 자세한 기록은 없으나 맥문동 가비방의 경우, 시료에 대한 물의 부피 비율이 10 내외인 것으로 알려져 있다. 따라서 물과 맥문동의 비율을 10:1로 조정하여 상기의 조건에서 가열 추출하였다. 각 추출액의 화학조성을 각 표준분석법에 준하여 조사한 결과는 Table 18에서 보는바와 같다. 열수추출물의 가용성 고형분은 19.43%였으며, 총당과 환원당의 함량은 각각 16.1% 및 0.31%였다. 단백질과 지질의 함량은 각각 0.006% 및 0.04%였으며, 총페놀성 화합물(gallic acid 기준)과 총플라보노이드(quercetin 기준)의 함량은 각각 252.3 mg/l 및 5.0 mg/l였다. 고압열수추출물의 가용성 고형분은 19.88%였으며, 총당과 환원당의 함량은 각각 17.4% 및 0.46%였다. 단백질과 지질의 함량은 0.007% 및 0.04%였으며, 총페놀성 화합물과 총플라보노이드의 함량은 각각 440.8 mg/l 및 7.3 mg/l였다. 또한 열수 및 고압 열수추출물의 pH는 각각 5.83 및 5.9였다.

Table 18. Concentration of general component in hot water and autoclaved extracts

	Hot water extract	Autoclaved extract
Total soluble solid(%)	19.43	19.88
Total sugar(%)	16.1	17.4
Reducing sugar(%)	0.31	0.46
Protein(%)	0.006	0.007
Lipid(%)	0.04	0.04
Total phenolic compound(mg/l)	252.3	440.8
Total flavonoid(mg/l)	5.0	7.3
pH	5.83	5.90

#### 나. 맥문동 추출액이 젖산균의 생육에 미치는 영향

맥문동 추출원액과 총당 10% 및 15%가 되도록 각각 희석한 추출액을 젖산균 생육을 위한 배지로 사용하였다. 전배양은 MRS 배지(pH 6.8) 100 ml에 각 실험균주 집락 2-3개를 접종한 후, 30°C에서 24시간동안 정치배양하였다. 본배양은 상기에서 조제된 각 시료의 pH를 6.8로 조정 한 후, 전배양액을 1% (v/v) 접종하고, 30°C에서 정치 및 진탕배양(200 rpm)하였다. 배양시 간 경과에 따라 경시적으로 배양액을 취한 후, 660 nm에서 균체 생육도를 측정하였다. 대조구 로는 젖산균 배양에 가장 널리 사용되는 MRS broth를 사용하였다.

모든 실험구에서 젖산균의 생육이 확인되었으며, 추출원액, 총당 15%로 조정 한 추출액, 총당 10%로 조정 한 추출액의 순서로 균체 생육도가 높았다(Fig. 41-42). 진탕배양의 경우, 고압 열수 추출액보다 열수추출액에서, DD1 균주보다 K31 균주에서 균체 생육도가 전반적으로 높게 나타났다. 정치배양은 진탕배양보다 모든 실험구에서 균체 생육도가 낮았으나 추출액의 종류 및 균주에 따른 균체 생육도는 진탕배양과 비슷한 경향을 나타내었다. 대조구인 MRS broth는 열수 및 고압 열수추출액보다 대체로 높은 균체 생육도를 보여주었는데, 특히 K31 균주를 진탕 배양했을 경우, 매우 높은 균체 생육도를 나타내었다(Fig. 43). 비록 맥문동 추출액이 MRS broth보다 젖산균의 생육 부양효과가 작았지만 젖산균을 이용하여 생성된 맥문동 발효액은 맥 문동과 젖산균의 생리활성물질을 모두 이용할 수 있다는 장점이 있다. 또한 젖산균에 의하여 각종 식물질을 발효할 경우, 식물질의 생리활성물질 농도가 증가한다는 보고가 일반적이므로, 맥문동 발효에서도 이런 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.



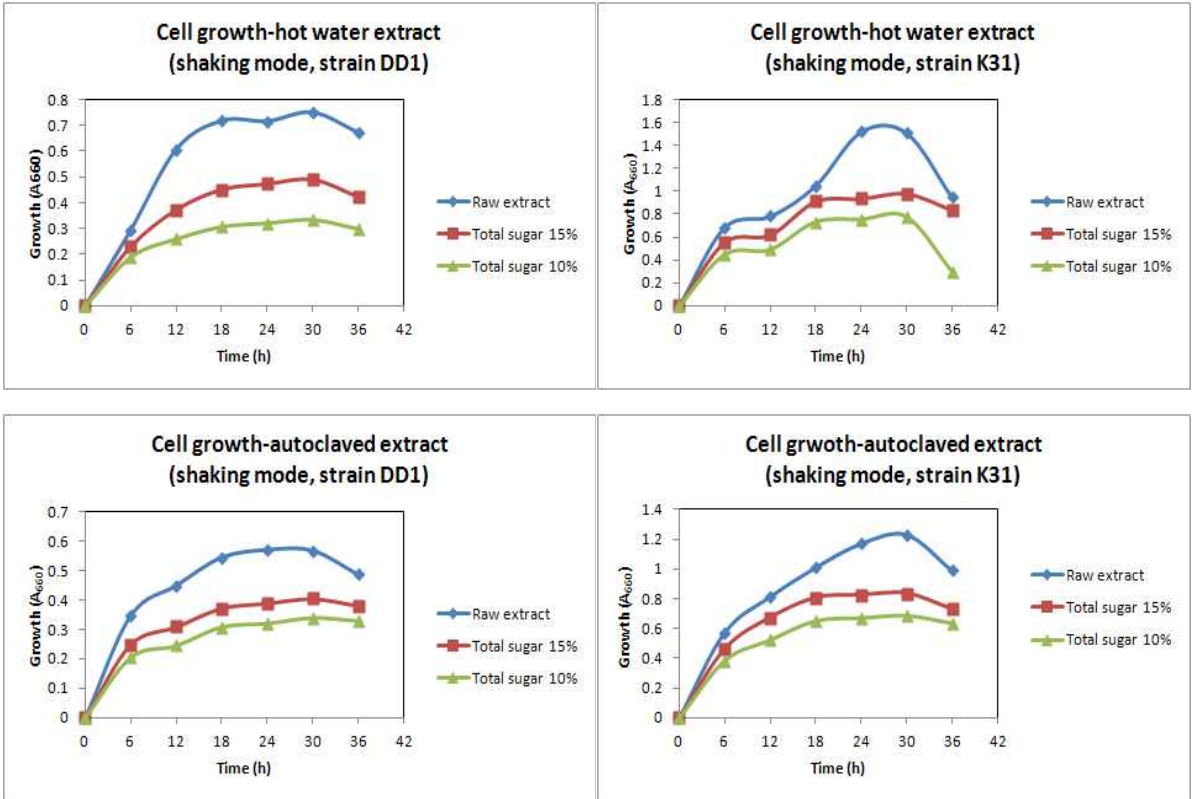


Fig. 41. Cell growth of selected strain using shaking mode in each extract.

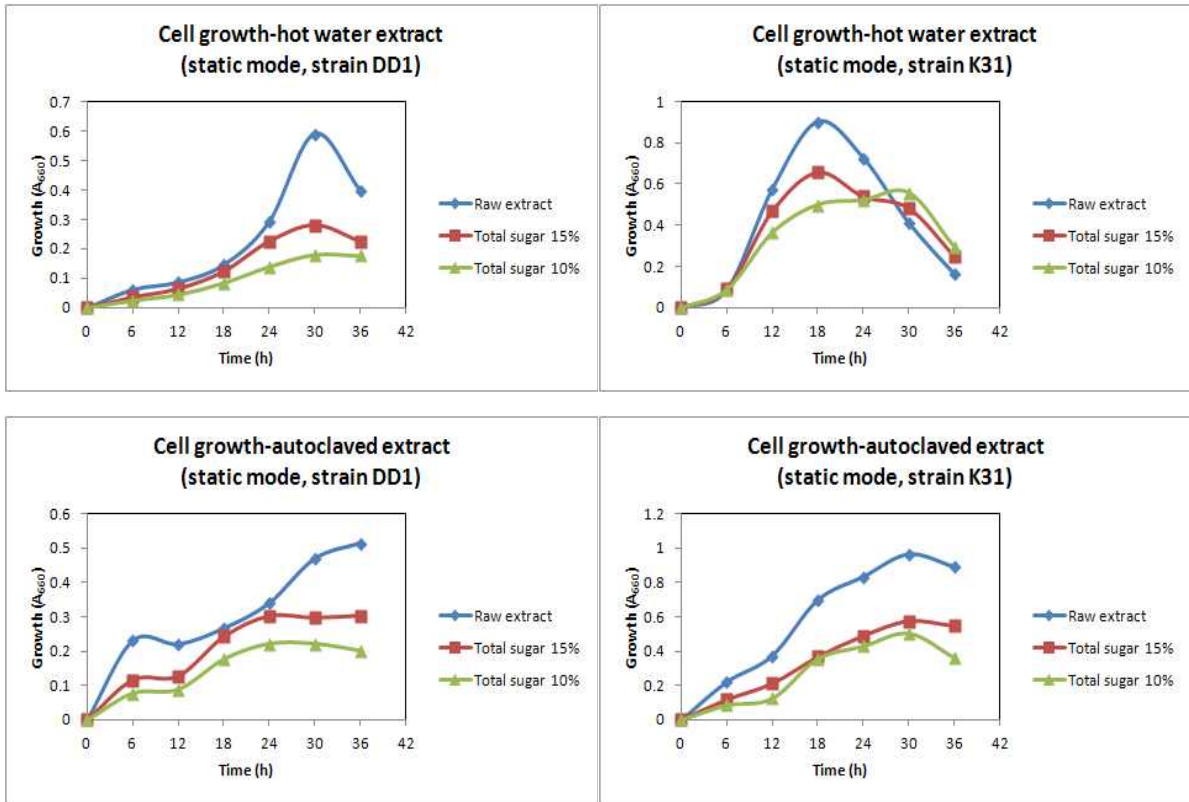


Fig. 42. Cell growth of selected strain using static mode in each extract.

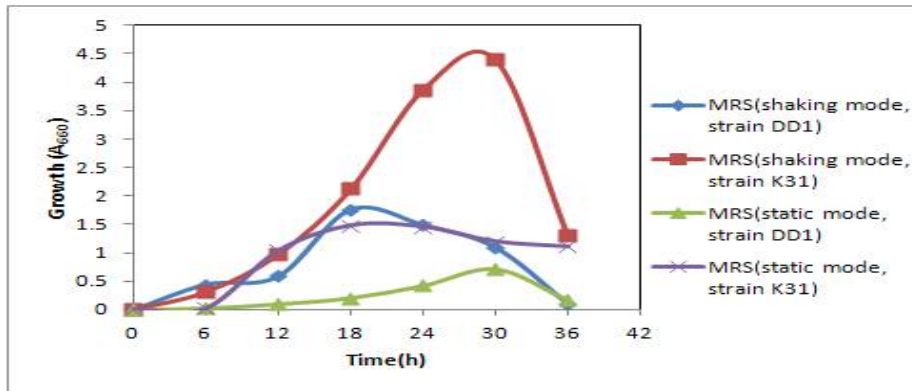


Fig. 43. Cell growth of selected strain using shaking and static modes in MRS.

#### 다. 맥문동 추출액의 예비 젖산발효

3의 나 항에서 제시한 동일한 재료 및 방법을 이용하여 맥문동 추출액을 발효시키면서 배양 시간 경과에 따라 경시적으로 배양액을 취한 후, pH, 적정산도 및 ACE 저해활성을 조사하였다.

발효액의 pH와 적정산도의 변화는 발효액의 성분 변화를 쉽게 알 수 있는 요인일 뿐 아니라 발효 진행상황을 알 수 있는 중요한 지표성분이 된다. 진탕 및 정치배양에서 배양시간 경과에 따른 pH 및 적정산도의 변화는 Fig. 44 및 45에서 보는 바와 같다. 발효 초기의 pH는 6.8

이었으나 발효 6시간 경 pH 3.8-5.4(진탕배양) 및 pH 4.9-5.8(정치배양)으로 급격히 감소하였으며, 그 이후에는 pH가 완만하게 조금씩 감소하였다. 일반적으로 젖산균에 의한 발효 중에는 젖산균의 대사산물로서 다양한 유기산 및 아미노산이 생성되고 이들은 적정산도에 영향을 미치는 직접적인 원인물질인 것으로 알려져 있다. 또한 적정산도는 발효액의 맛, 냄새와 직접적 관련이 있으며, 보존성에도 영향을 준다. 적정산도는 모든 실험구에 있어 pH 감소에 따라 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 배양방법에 따른 차이는 크지 않았으며, K31 균주를 접종한 경우가 DD1 균주를 접종했을 때보다 비교적 높은 적정산도를 나타내었다.

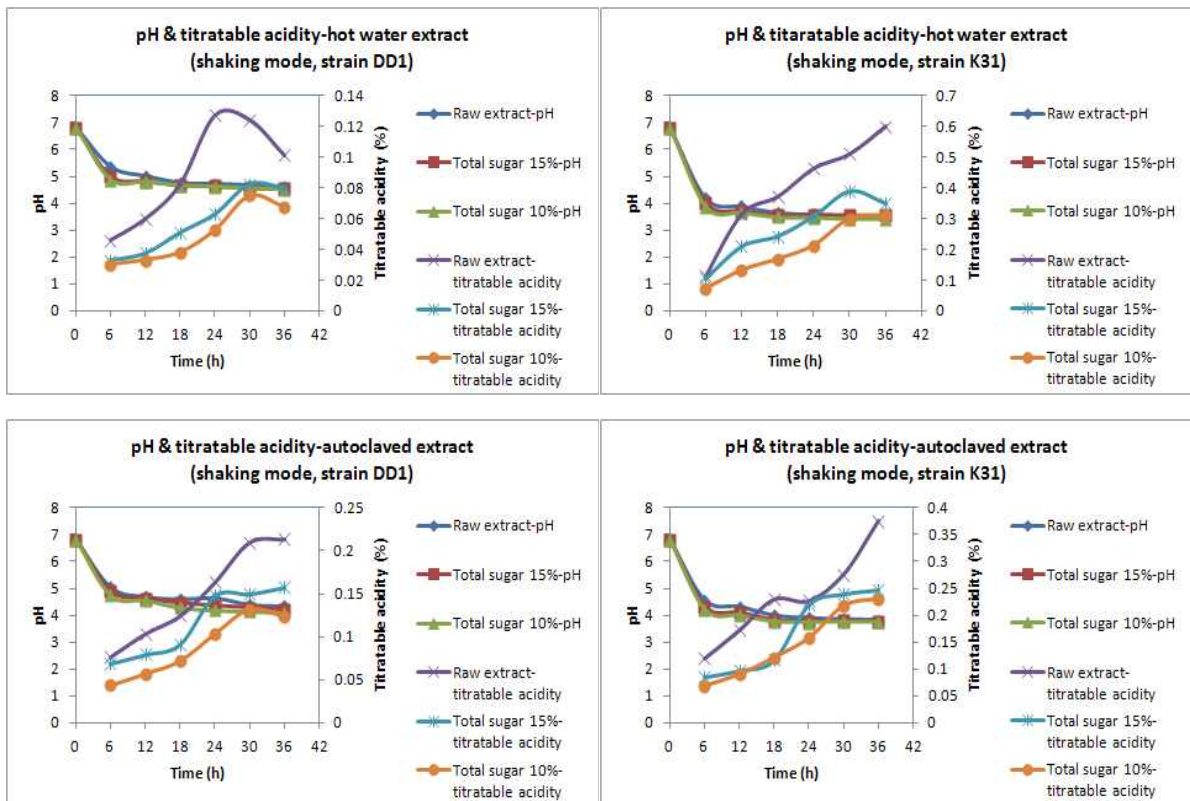
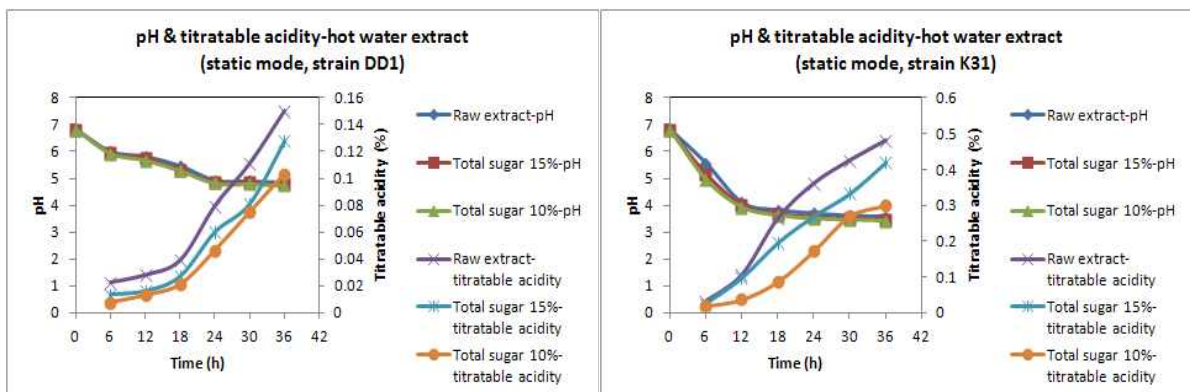


Fig. 44. Changes of pH and titratable acidity during shakin fermentation in each extract.



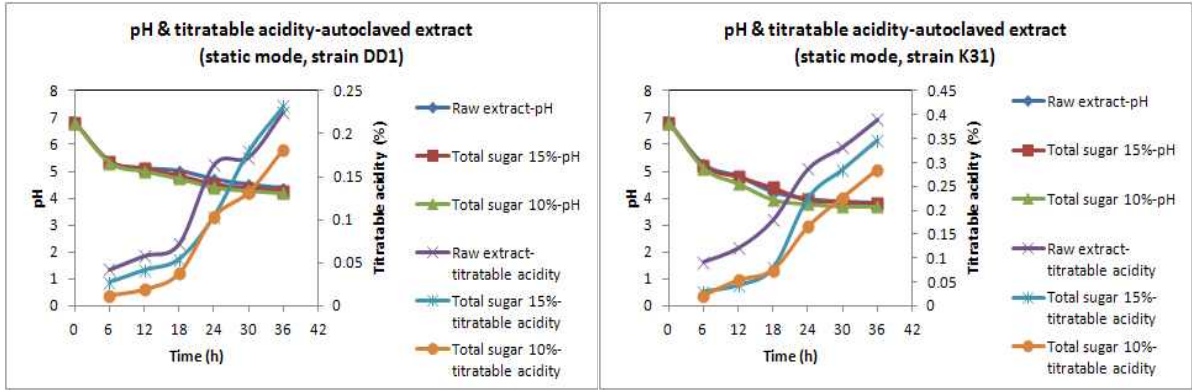


Fig. 45. Changes of pH and titratable acidity during static fermentation in each extract.

한편, 진탕 및 정치배양에서 배양시간 경과에 따른 ACE 저해활성의 변화는 Table 19 및 20에서 보는 바와 같다. 전체적으로 배양 12-18 시간 후, ACE 저해활성이 최고값을 나타내었다. 진탕배양의 경우, 고압추출액이 열수추출액보다 비교적 높은 ACE 저해활성을 보여 주었으며, 균주간의 큰 차이는 없었다. 정치배양 역시 진탕배양과 비슷한 경향을 나타내었다. 이로서 발효균주를 접종함에 따라 ACE 저해활성이 증가된다는 것을 확인할 수 있었다.

Table 19. ACE inhibition activity during shaking fermentation in each extract

<b>Autoclaved extract - shaking mode, strain DD1</b>						
	Time (h)	6	12	18	24	30
ACE inhibition activity (%)	Raw extract	74.9	91.7	42.8	30.6	22.6
	Total sugar 15%	53.7	67.8	64.8	56.9	22.6
	Total sugar 10%	50.2	72.2	74.9	68.1	35.7
<b>Autoclaved extract - shaking mode, strain 31</b>						
	Time (h)	6	12	18	24	30
ACE inhibition activity (%)	Raw extract	72.5	55.6	39.9	33.3	16.7
	Total sugar 15%	51.1	76.1	39.1	31.0	8.30
	Total sugar 10%	52.6	68.3	65.9	31.4	6.0
<b>Hot water extract - shaking mode, strain DD1</b>						
	Time (h)	6	12	18	24	30
ACE inhibition activity (%)	Raw extract	48.8	83.3	54.3	19.0	5.6
	Total sugar 15%	45.5	55.6	46.4	26.9	17.9
	Total sugar 10%	37.0	42.8	42.9	21.7	2.8
<b>Hot water extract - shaking mode, strain K31</b>						
	Time (h)	6	12	18	24	30
ACE inhibition activity (%)	Raw extract	54.0	70.0	42.0	9.2	10.7
	Total sugar 15%	47.8	65.4	31.7	25.7	0
	Total sugar 10%	35.1	41.7	48.6	48.6	81.1

Table 20. ACE inhibition activity during static fermentation in each extract

Autoclaved extract - static mode, strain DD1						
	Time (h)	6	12	18	24	30
ACE inhibition activity (%)	Raw extract	72.1	100.0	95.1	68.6	43.3
	Total sugar 15%	52.7	74.7	65.7	54.9	31.4
	Total sugar 10%	44.7	51.1	59.3	65.7	73.1
Autoclaved extract - static mode, strain K31						
	Time (h)	6	12	18	24	30
ACE inhibition activity (%)	Raw extract	76.0	80.0	100.0	88.1	51.4
	Total sugar 15%	45.3	64.7	93.9	62.7	37.1
	Total sugar 10%	34.7	37.3	50.7	25.7	22.4
Hot water extract - static mode, strain DD1						
	Time (h)	6	12	18	24	30
ACE inhibition activity (%)	Raw extract	64.7	66.7	67.4	62.9	74.6
	Total sugar 15%	44.0	47.2	47.8	34.1	20.0
	Total sugar 10%	31.3	37.5	29.3	22.9	17.9
Hot water extract - static mode, strain K31						
	Time (h)	6	12	18	24	30
ACE inhibition activity (%)	Raw extract	53.3	56.9	73.7	74.6	34.3
	Total sugar 15%	36.0	36.1	68.7	18.3	0
	Total sugar 10%	32.7	36.4	59.0	44.3	10.3

#### 4. 맥문동 및 홍문동 발효

상기 연구를 통하여 확보된 분리균주 중 DPPH 라디칼 소거활성과 ACE 저해활성이 모두 우수한 *Lactobacillus brevis* DD1을 실험균주로 선정하여 맥문동 및 홍문동 추출물에 접종하여 젖산발효를 수행하였다. 실험균주에 의한 맥문동 추출물 발효시 배양온도, 초기 pH 및 접종량 등 기본조건을 최적화하였다. 또한 이들 실험을 수행하면서 각종 배양변수(적정산도, 균체생육도, 총당 및 환원당) 및 생리활성(DPPH 라디칼 소거능, ACE 저해능, 폴리페놀화합물 및 플라보노이드)의 경시적 변화를 조사하였다. 실험균주에 의한 홍문동 고체발효를 예비적으로 수행한 결과, 배양시간 경과에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 오히려 감소하였고, 홍문동 외형적 특성의 저하, 이취 발생 등으로 인하여 고체발효는 의미가 없다고 판단, 맥문동 추출물 발효에서 최적화된 조건을 이용하여 홍문동 추출물의 액체발효를 수행하였다. 동시에 각종 배양변수(적정산도, 균체생육도, 총당 및 환원당) 및 생리활성(DPPH 라디칼 소거능, ACE 저해능, 폴리페놀화합물 및 플라보노이드)의 경시적 변화도 조사하였다.

##### 가. 맥문동 발효

맥문동 열수 및 고압열수 추출물을 발효를 위한 배지로 사용하였으며, 모든 실험은 3반복 수행 후, 평균값으로 결과를 나타내었다.

## (1) 초기 pH 조사

### (가) 균체 생육도에 대한 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH가 균체 생육도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물의 pH를 4-7로 조정하여 30°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 46에서 보는 바와 같다. 열수 및 고압열수 추출물 모두 산성 영역에서 균체 생육도가 우수하였다. 열수 추출물은 pH 4 및 4.5의 순서로, 고압열수 추출물은 pH 4.5, 4, 5의 순서로 생육도가 높았다. 두 추출물 모두 약 12시간의 유도기를 거친 후, 대수증식기에 들어갔으며, pH 6-7의 경우 24시간 경부터 정지기에 도달했으나 그 외의 경우에는 48시간 또는 68시간까지 대수증식을 계속하였다. 배양시간 경과에 따른 생육도의 증가는 두 추출물에서 큰 차이는 없었으나 열수 추출물에서 조금 더 양호한 생육도를 나타내었다.

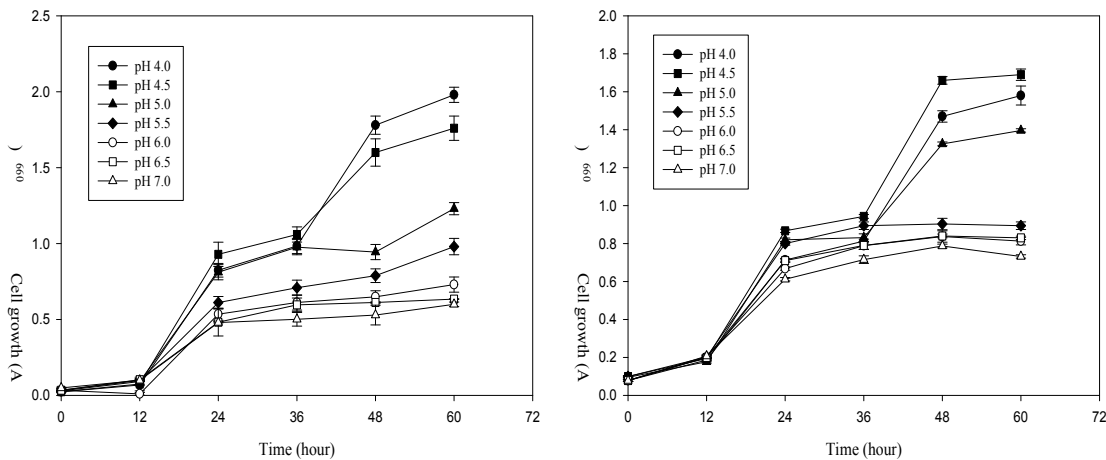


Fig. 46. Effect of pH on cell growth during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

### (나) 적정산도에 대한 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH가 적정산도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물의 pH를 4-7로 조정하여 30°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 47에서 보는 바와 같다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 비례하여 적정산도가 생성되었으며, 산성영역에서는 열수 추출물의 적정산도가 고압열수 추출물보다 높았으나, 중성영역으로 감에 따라 반대현상이 나타났다.

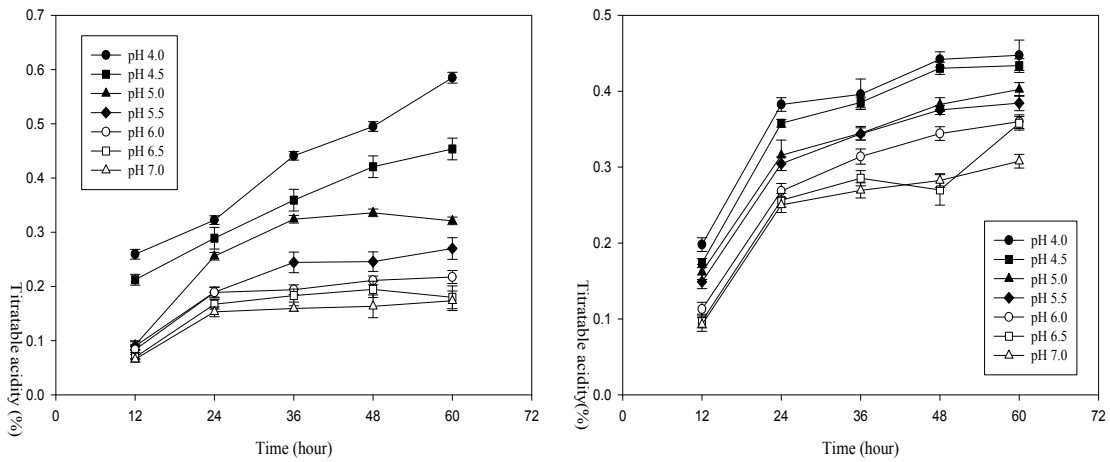


Fig. 47. Effect of pH on titratable acidity during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *Lactobacillus brevis* DD1.

**(다) 총당 함량에 대한 초기 pH의 영향**

배지의 초기 pH가 총당 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물의 pH를 4-7로 조정하여 30°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 48에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 경우, 배양 초기인 12시간까지 총당 함량이 증가하였으며, 그 이후 비교적 일정하게 유지되다가 배양 48시간 경부터 서서히 감소하기 시작하였다. 고압열수 추출물의 경우, 역시 배양 초기인 12시간까지 총당 함량이 증가하였으나 그 이후에는 pH 4와 4.5를 제외하고는 일정하게 유지되다가 배양 36-48시간 경부터 감소하기 시작하였다. 배양 초기 총당이 증가하는 현상은 실험균주가 생성하는 다당때문인 것을 판단되며, 이후 탄소원 이용속도가 증가함에 따라 총당의 함량이 감소하는 것으로 판단된다.

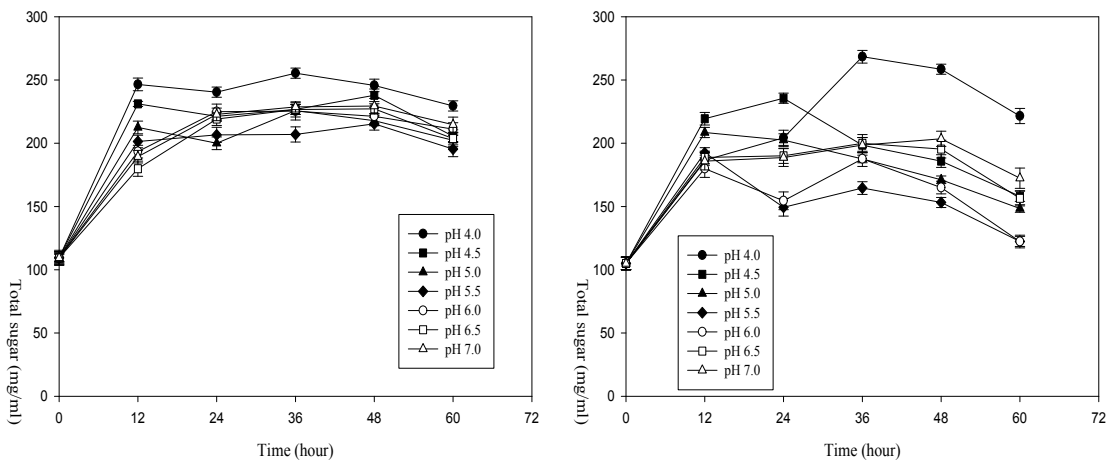


Fig. 48. Effect of pH on total sugar content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.



### (라) 환원당 함량에 대한 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH가 환원당 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물의 pH를 4-7로 조정하여 30°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 49에서 보는 바와 같이 두 추출물 모두 배양 시간 경과에 따라 환원당 함량이 비례적으로 감소함을 알 수 있었다. 특히 중성영역보다 산성 영역에서 환원당 함량 감소폭이 크므로 산성영역에서 탄소원 이용속도가 더 빠름을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 균체 생육도의 결과와 잘 일치하였다.

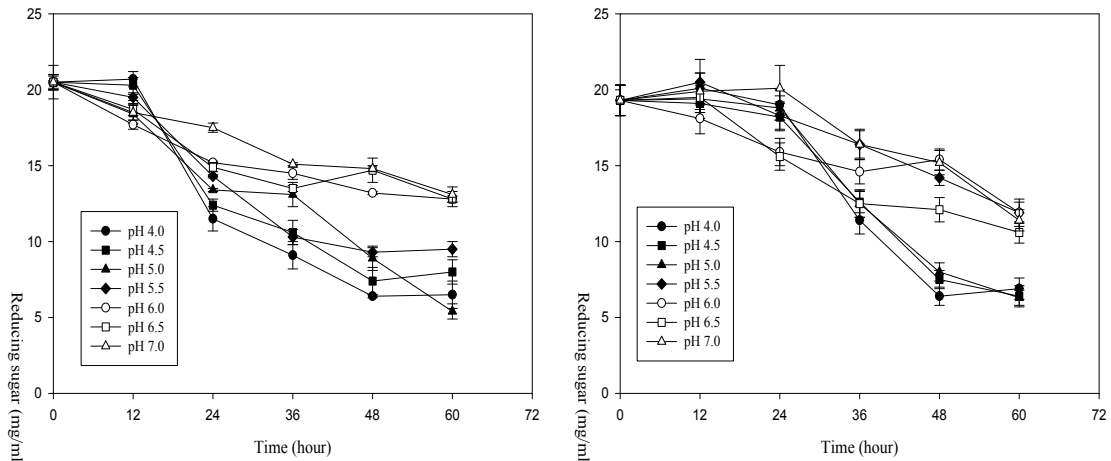


Fig. 49. Effect of pH on reducing sugar content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

### (마) 플라보노이드 함량에 대한 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH가 플라보노이드 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물의 pH를 4-7로 조정하여 30°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 50에서 보는 바와 같다. 발효가 진행됨에 따라 pH 7로 조정한 열수 추출물을 제외하고는 모든 실험구에서 플라보노이드 함량이 배양 38-48시간 경까지 증가하였으며, 그 이후 감소하기 시작하였다. 열수 추출물의 플라보노이드 함량은 68.2  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 발효에 의하여 최고 109  $\mu\text{g/ml}$  (pH 5.5), 고압열수 추출물은 64.4  $\mu\text{g/ml}$ 에서 최고 103.7  $\mu\text{g/ml}$ (pH 5.5)로 증가하였다.

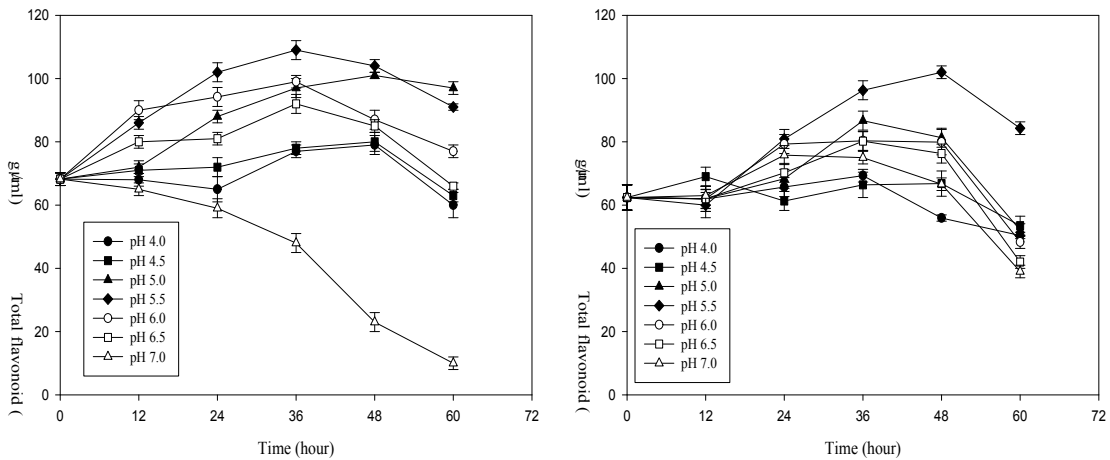


Fig. 50. Effect of pH on total flavonoid content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(바) 폴리페놀 화합물 함량에 대한 초기 pH의 영향**

배지의 초기 pH가 폴리페놀 화합물 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물의 pH를 4-7로 조정하여 30°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 51에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 경우, pH 7을 제외하고는 발효시간 경과에 따라 폴리페놀 화합물의 함량은 증가하였으며, 배양 48시간 이후부터 서서히 감소하였다. 고압열수 추출물은 pH 6-7을 제외하고 발효시간 경과에 따라 증가하다가 36-48시간 이후부터 서서히 감소하였다. 열수 추출물의 폴리페놀 화합물의 함량은 429  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 발효에 의하여 최고 604  $\mu\text{g/ml}$  (pH 4.5), 고압열수 추출물은 446  $\mu\text{g/ml}$ 에서 최고 673  $\mu\text{g/ml}$ (pH 5)로 증가하였다.

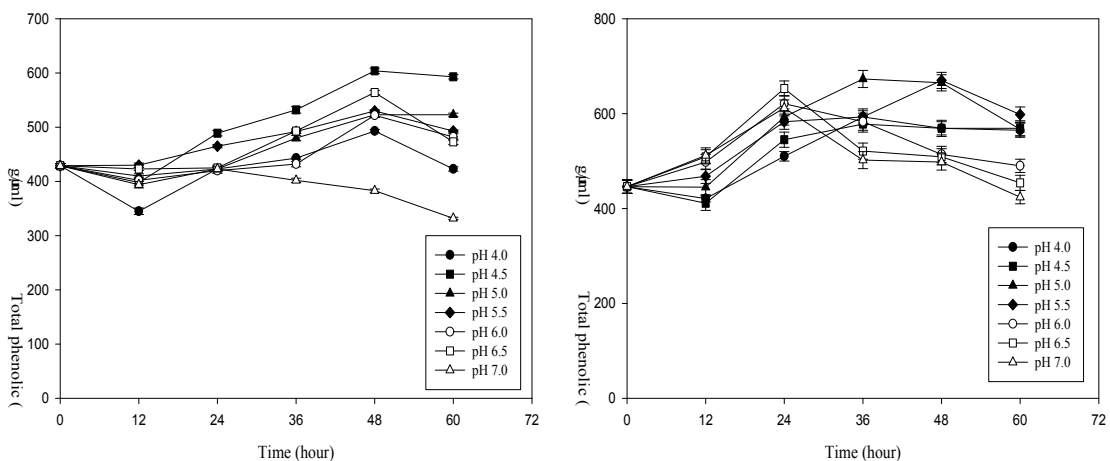


Fig. 51. Effect of pH on total phenolic content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

### (사) DPPH 라디칼 소거능에 대한 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH가 DPPH 라디칼 소거능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물의 pH를 4-7로 조정하여 30°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 52에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 83%였으며, 발효시간 경과에 따라 모든 실험구에서 라디칼 소거능은 증가하여 최고 98.7%(pH 5)를 나타내었다. 또한 고압열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 84.1%였으며, 24시간까지 모든 실험구에서 라디칼 소거능이 증가하여 최고 100%(pH 5)를 나타내었다. 그러나 pH 5.5와 pH 6.5-7을 제외한 실험구에서는 36시간 이후부터 라디칼 소거능이 완만하게 감소하였다.

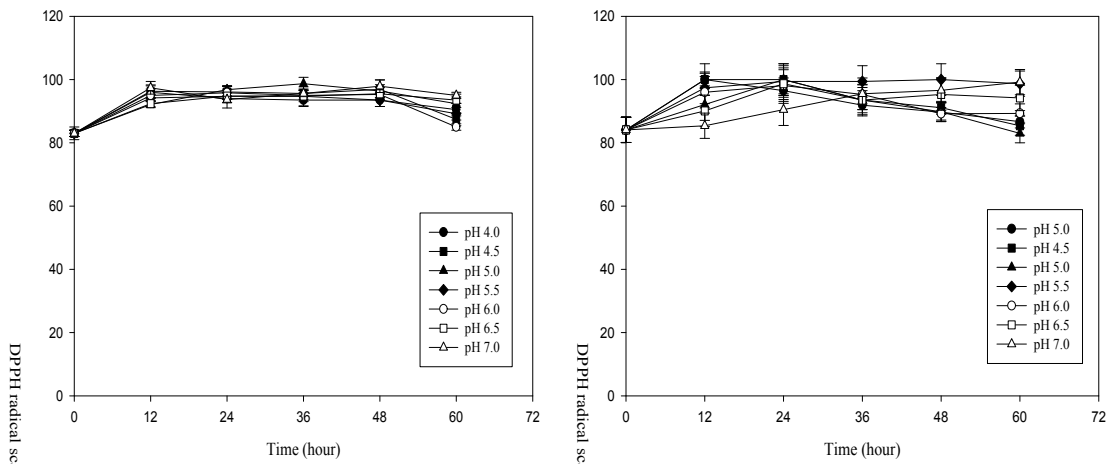


Fig. 52. Effect of pH on DPPH radical scavenging activity during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

### (아) ACE 저해능에 대한 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH가 ACE 저해능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물의 pH를 4-7로 조정하여 30°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 53에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 ACE 저해능은 39.5%였으며, 24시간까지 모든 실험구에서 ACE 저해능은 증가하였고, 최고 100%(pH 4.5)를 나타내었다. 또한 고압열수 추출물의 ACE 저해능은 36.4%였으며, 24시간까지 pH 5를 제외한 모든 실험구에서 ACE 저해능은 증가하여 최고 98%(pH 5)를 나타내었다. 열수 추출물의 경우, pH 7을 제외하고 배양시간이 경과해도 저해능이 일정하게 유지된 반면, 고압열수 추출물은 시간 경과에 따라 서서히 감소하는 실험구도 있었다.

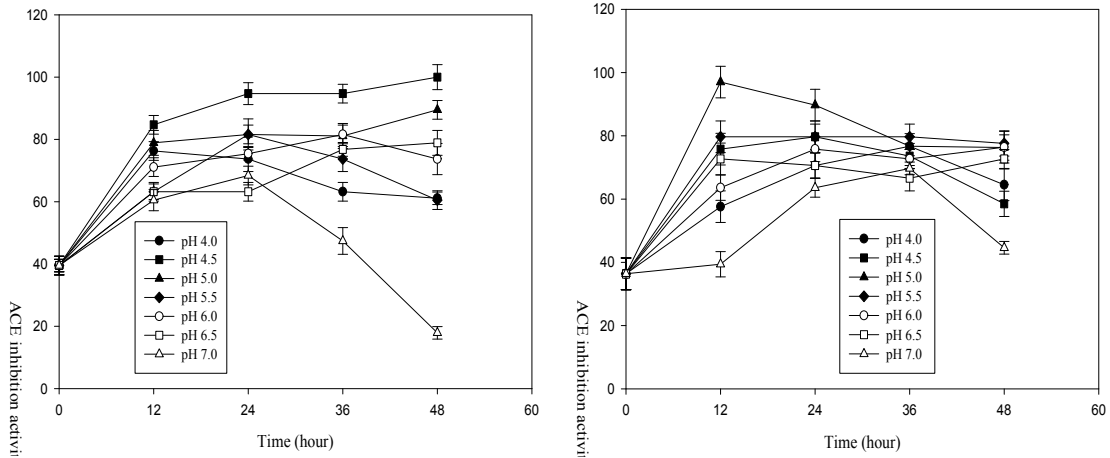


Fig. 53. Effect of pH on ACE inhibition activity during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

## (2) 배양온도의 영향

### (가) 균체 생육도에 대한 배양온도의 영향

배양온도가 균체 생육도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 접종한 후, 25-40°C의 범위에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 54에서 보는 바와 같다. 열수 및 고압열수 추출물 모두 30-35°C에서의 균체 생육도가 다른 온도보다 다소 우수하였다. 두 추출물 모두 30°C 및 35°C의 순서로 생육도가 높았다. 약 12시간의 유도기를 거친 후, 대수증식을 계속하여 48-60시간 경 정지기에 도달하였다. 전체적으로 배양시간 경과에 따른 생육도의 증가는 열수 추출물에서 양호하였다.

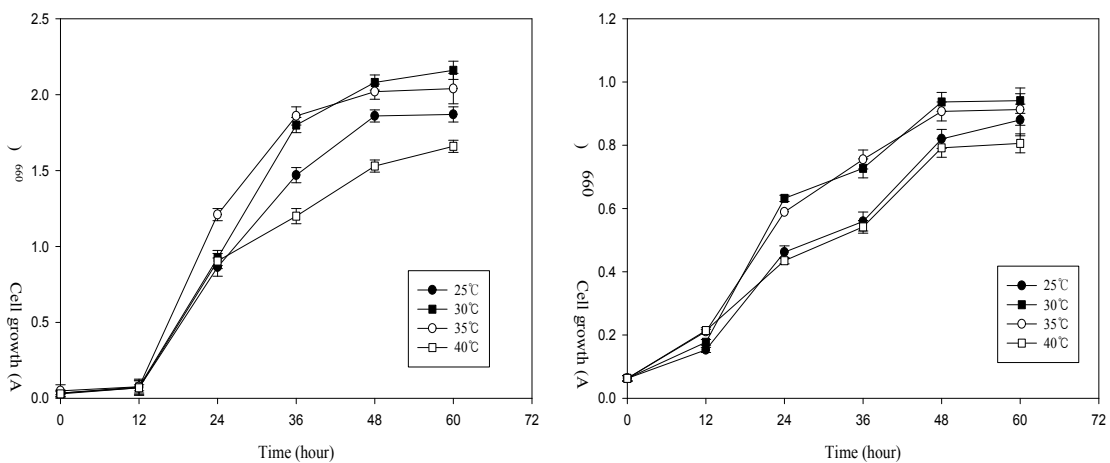


Fig. 54. Effect of temperature on cell growth during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(나) 적정산도에 대한 배양온도의 영향**

배양온도가 적정산도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 접종한 후, 25-40°C의 범위에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 55에서 보는 바와 같다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 비례하여 적정산도가 생성되었으며, 이 결과는 균체 생육도와 비슷하였다. 또한 두 추출물은 30°C, 35°C의 순서로 적정산도가 높았으며, 생성된 적정산도는 전체적으로 비슷한 범위에 있었다.

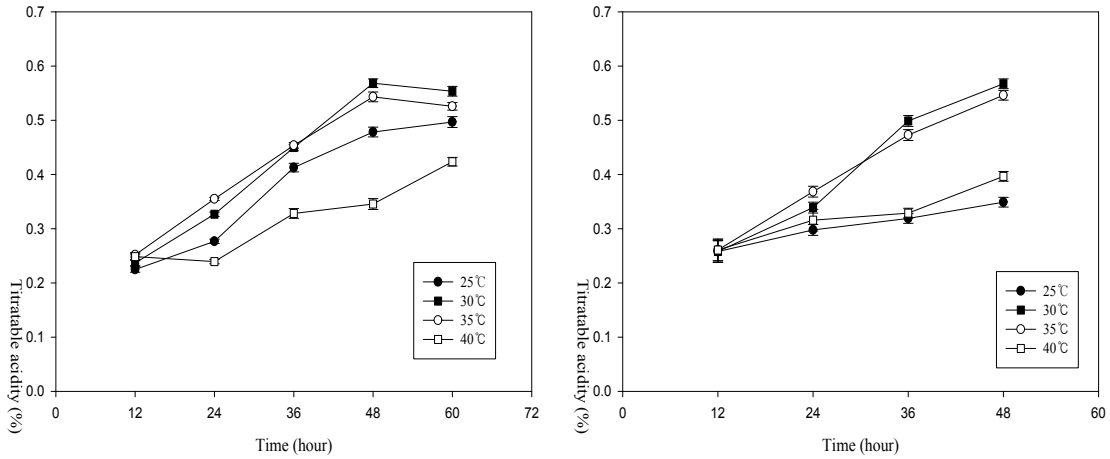


Fig. 55. Effect of temperature on titratable acidity during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(다) 총당 함량에 대한 배양온도의 영향**

배양온도가 적정산도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 접종한 후, 25-40°C의 범위에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 56에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 경우, 배양 초기인 12시간까지 총당 함량이 증가하였으며, 30°C를 제외한 실험구에서는 비교적 일정하게 유지되다가 배양 48시간 경부터 서서히 감소하기 시작하였으나 30°C에서는 24시간까지 증가하다가 그 이후 완만하게 감소하였다. 고압멸수 추출물의 경우, 역시 12시간까지 총당 함량이 증가하였으며, 그 이후 25°C에서는 완만하게 증가, 30°C에서는 완만하게 감소, 그 외 실험구에서는 비교적 일정하게 유지되었다. 배양 초기 총당이 증가하는 현상은 앞에서 언급한 바와 같이 실험균주가 생성하는 다당때문인 것으로 추정되며, 이후 탄소원 이용속도의 차이에 따라 다양한 총당 함량 패턴을 나타내는 것으로 판단된다.

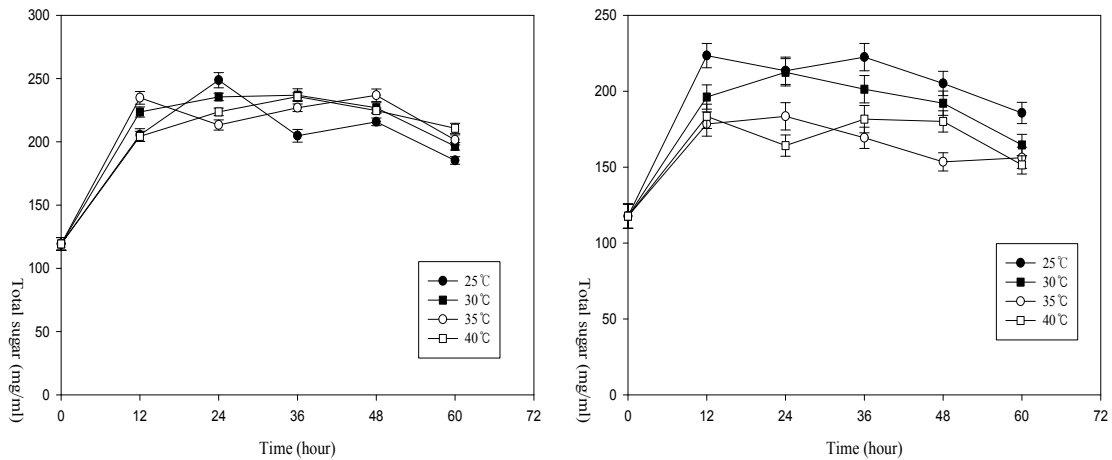


Fig. 56. Effect of temperature on total sugar content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(라) 환원당 함량에 대한 배양온도의 영향**

배양온도가 환원당 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 접종한 후, 25-40°C의 범위에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 57에서 보는 바와 같다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 환원당 함량이 비례적으로 감소하였으며, 특히 30 °C 및 35°C에서 환원당 함량 감소폭이 크므로 이 온도범위에서 탄소원 이용속도가 더 빠름을 알 수 있었다. 그러나 열수 추출물을 30°C에서 배양한 경우, 초기 환원당 함량 감소폭은 컸으나 36시간 이후 더 이상 환원당이 감소하지 않는 결과를 나타내어 이에 대한 세부적인 연구가 필요함을 알 수 있었다.

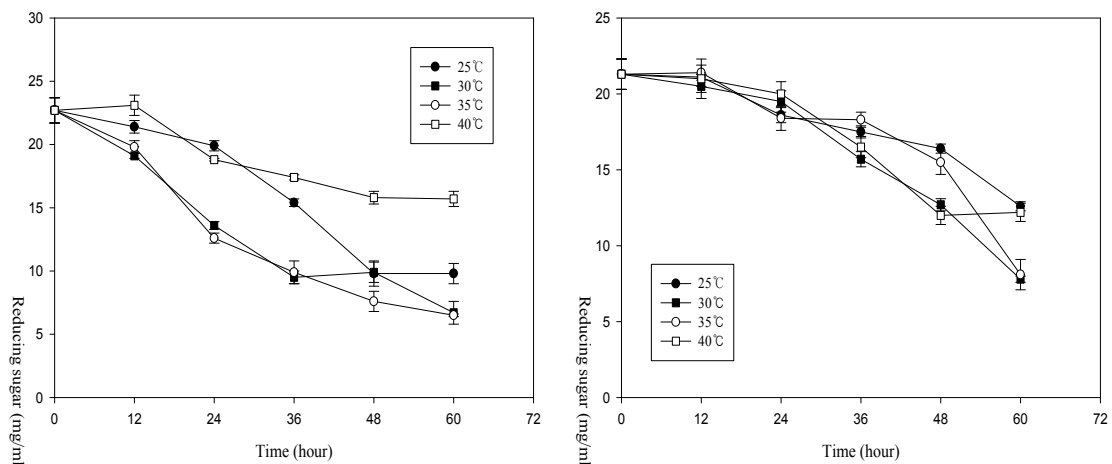


Fig. 57. Effect of temperature on reducing sugar content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(마) 플라보노이드 함량에 대한 배양온도의 영향**

배양온도가 플라보노이드 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 접종한 후, 25-40°C의 범위에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 58에서 보는 바와 같다. 전체적으로 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 플라보노이드 함량이 증가하였으며, 48시간 이후 완만하게 감소 또는 일정하게 유지되었다. 열수 추출물의 플라보노이드 함량은 66.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으나 발효에 의하여 최고 99.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (35°C), 고압열수 추출물은 60.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최고 81.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (30°C)로 증가하였다.

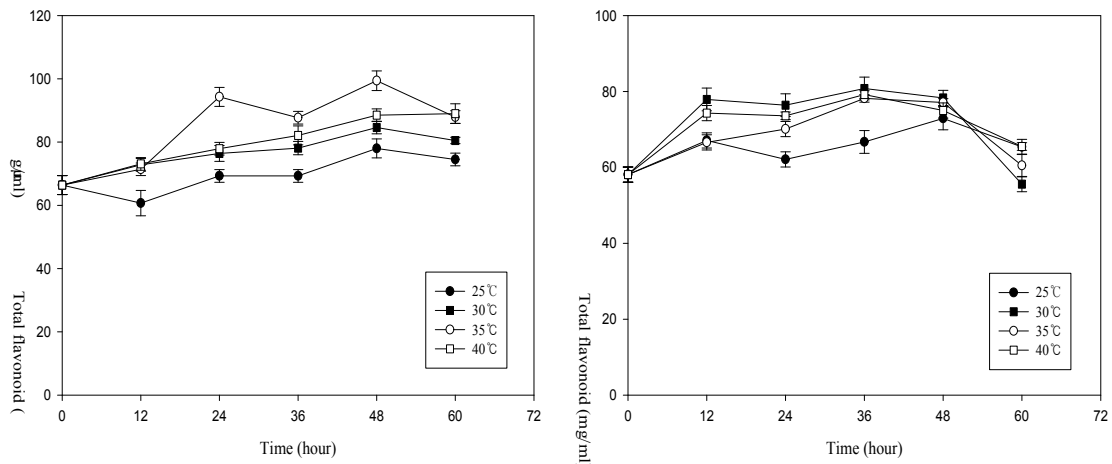


Fig. 58. Effect of temperature on total flavonoid content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(바) 폴리페놀 화합물 함량에 대한 배양온도의 영향**

배양온도가 폴리페놀 화합물 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 접종한 후, 25-40°C의 범위에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 59에서 보는 바와 같다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 폴리페놀 화합물의 함량은 증가하였는데, 열수 추출물의 경우, 25°C를 제외하고는 48시간 까지 지속적으로 증가하다가 그 이후 감소하였다. 고압열수 추출물의 경우, 36시간까지 폴리페놀 화합물의 함량이 증가하다가 그 이후 실험구에 따라 완만 증가, 완만 감소, 일정하게 유지되는 패턴을 나타내었다. 열수 추출물의 폴리페놀 화합물의 함량은 423  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 발효에 의하여 최고 592  $\mu\text{g/ml}$  (35°C), 고압열수 추출물은 435  $\mu\text{g/ml}$ 에서 최고 679  $\mu\text{g/ml}$ (35°C)로 증가하였다.

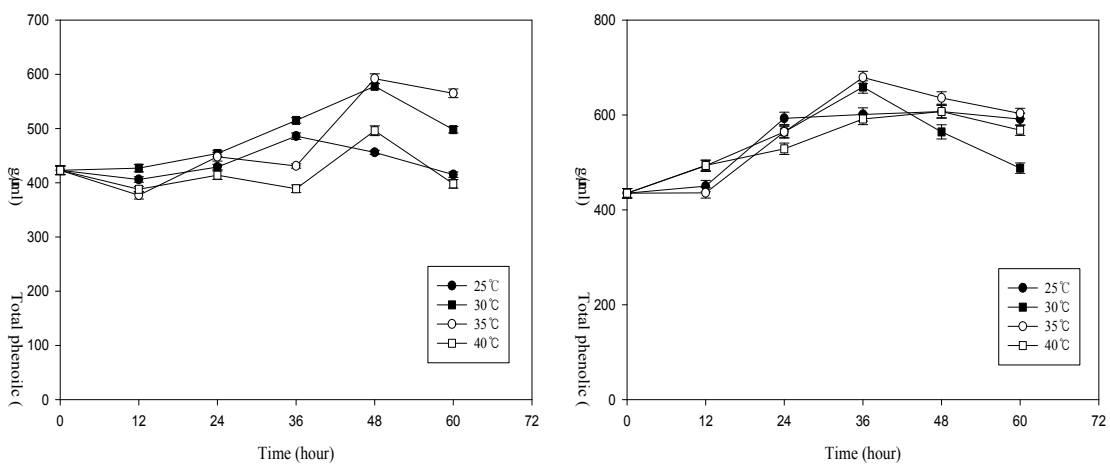


Fig. 59. Effect of temperature on total phenolic content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(사) DPPH 라디칼 소거능에 대한 배양온도의 영향**

배양온도가 DPPH 라디칼 소거능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 접종한 후, 25-40°C의 범위에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 60에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 84.8%였으며, 발효시간 경과에 따라 모든 실험구에서 라디칼 소거능은 증가하여 최고 98.1%(25°C, 30°C)를 나타내었으나 전체적으로 소거능은 비슷하였다. 또한 고압열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 82.5%였으며, 24시간까지 모든 실험구에서 라디칼 소거능이 증가하였고, 각 온도에서의 최고 라디칼 소거능은 각각 100%였다.



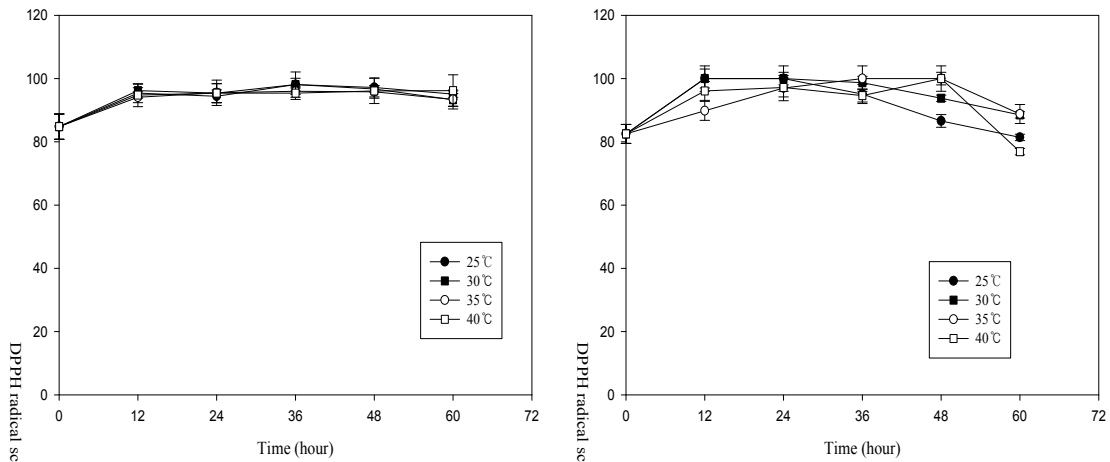


Fig. 60. Effect of temperature on DPPH radical scavenging activity during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

(아) ACE 저해능에 대한 배양온도의 영향

배양온도가 ACE 저해능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 접종한 후, 25-40°C의 범위에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 61에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 ACE 저해능은 41.2%였으며, 12-24시간까지 모든 실험구에서 ACE 저해능은 증가하였고, 최고 95.7%(35°C)를 나타내었다. 또한 고압열수 추출물의 ACE 저해능은 38.9%였으며, 12-24시간까지 모든 실험구에서 ACE 저해능은 증가하여 최고 100%(30°C)를 나타내었다.

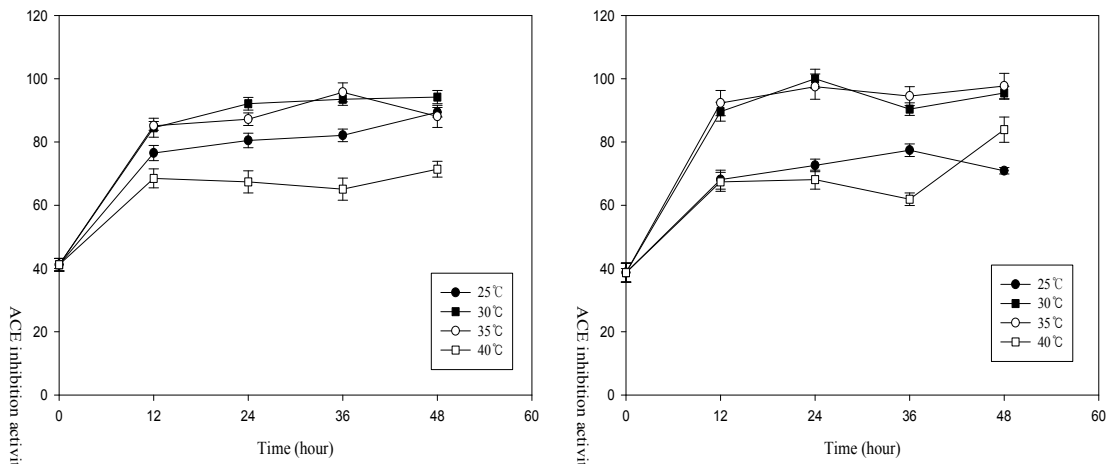


Fig. 61. Effect of temperature on ACE inhibition activity during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

(3) 접종량의 영향

(가) 균체 생육도에 대한 접종량의 영향

균체 접종량이 균체 생육도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 1-8% (v/v) 접종한 후, 35°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 62에서 보는 바와 같다. 열수 및 고압열수 추출물 모두 접종량이 많을수록 균체 생육도가 증가하였다. 1-4% (v/v)를 접종했을 경우, 유도기를 거쳤으나 6-8% (v/v)를 접종했을 때는 명확한 유도기없이 대수증식을 하는 것으로 나타났다. 전체적으로 배양시간 경과에 따른 생육도의 증가는 열수 추출물이 고압열수 추출물보다 우수하였다.

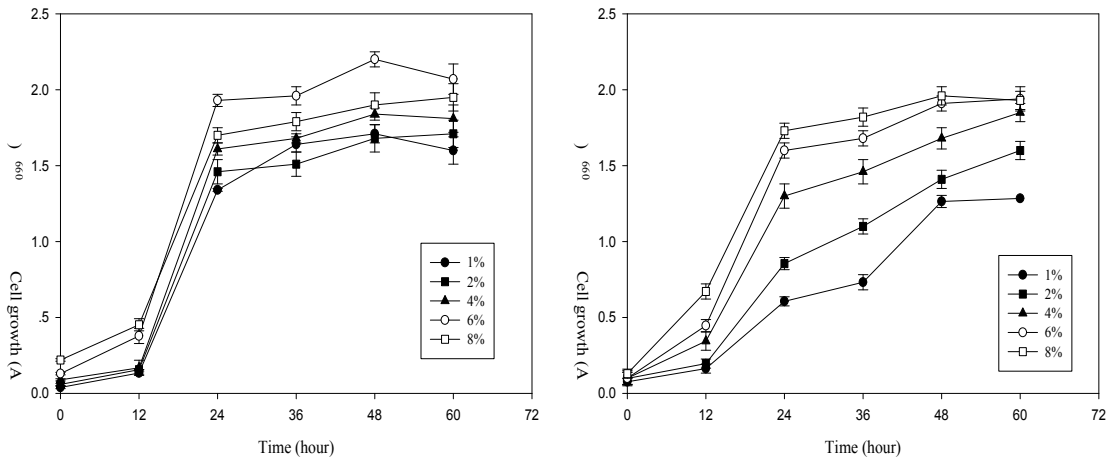


Fig. 62. Effect of inoculum size on cell growth during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

#### (나) 적정산도에 대한 접종량의 영향

균체 접종량이 적정산도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 1-8% (v/v) 접종한 후, 35°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 63에서 보는 바와 같다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 비례하여 적정산도가 생성되었으며, 접종량이 많을수록 생성된 적정산도도 많아 균체 생육도와 일치하는 결과를 나타내었다.

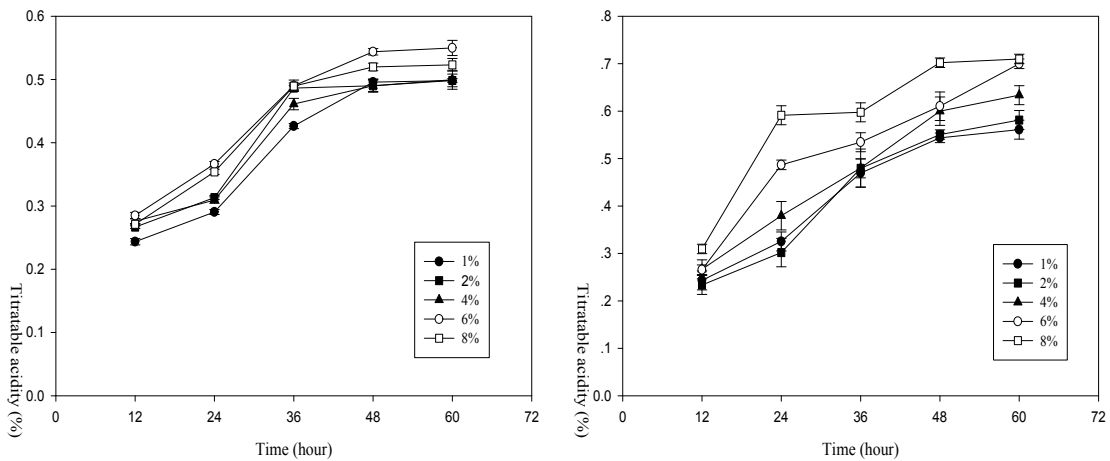


Fig. 63. Effect of inoculum size on titratable acidity during Maekmundong (hot water

extract, left; autoclaved extract, right)fermentation by *L. brevis* DD1.

#### (다) 총당 함량에 대한 접종량의 영향

균체 접종량이 총당 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 1-8% (v/v) 접종한 후, 35°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 64에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 경우, 배양 초기인 12시간까지 총당 함량이 급격히 증가하였으며, 그 이후 완만하게 증가하였으나 1% (v/v) 및 2% (v/v)를 접종했을 경우 각각 48시간 및 36시간 이후 감소하였다. 고압멸수 추출물의 경우, 24시간까지 총당 함량이 증가하였으며, 그 이후 6% (v/v), 8% (v/v)를 접종했을 때는 완만하게 증가, 그 외의 접종량은 완만하게 감소하였다. 배양 초기에 총당 함량이 증가하는 현상은 앞에서 언급한 바와 같이 실험균주가 생성하는 다당때문인 것으로 추정된다.

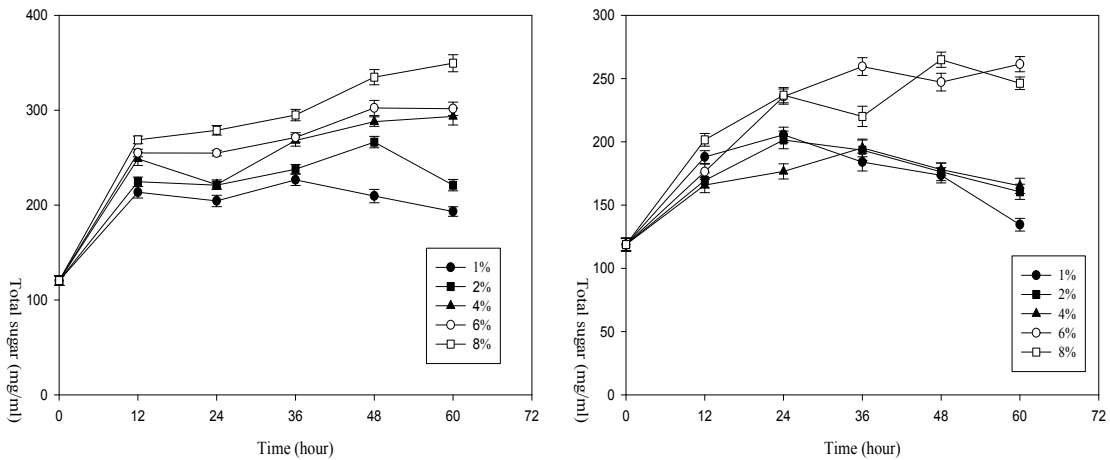


Fig. 64. Effect of inoculum size on total sugar content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(라) 환원당 함량에 대한 접종량의 영향**

균체 접종량이 환원당 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 1-8% (v/v) 접종한 후, 35°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 65에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 경우, 앞의 결과와 달리 6-8% (v/v)를 접종했을 때 12시간까지 환원당 함량이 증가한 후, 급격히 감소하는 현상을 나타내었고 그 외의 실험구에서는 배양 초기부터 환원당 함량이 감소하였다. 고압열수 추출물의 경우, 모두 배양시간 경과에 따라 환원당 함량이 비례적으로 감소하였다.

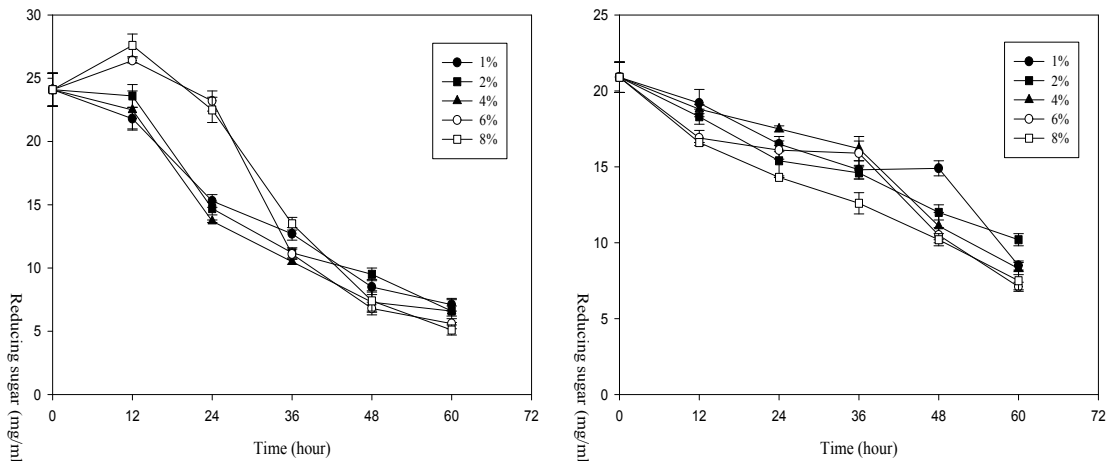


Fig. 65. Effect of inoculum size on reducing sugar content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

**(마) 플라보노이드 함량에 대한 접종량의 영향**

균체 접종량이 플라보노이드 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에

균주를 1-8% (v/v) 접종한 후, 35°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 66에서 보는 바와 같다. 전체적으로 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 플라보노이드 함량이 증가하였으며, 36시간 이후 완만하게 감소 또는 일정하게 유지된 후 감소하였다. 그러나 고압열수 추출물의 경우, 4-6% (v/v)를 접종했을 때 60시간까지 플라보노이드 함량이 증가하였다. 열수 추출물의 플라보노이드 함량은 67.1  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 발효에 의하여 최고 112  $\mu\text{g/ml}$  (8%, v/v), 고압열수 추출물은 55.9  $\mu\text{g/ml}$ 에서 최고 91  $\mu\text{g/ml}$ (2%, v/v)로 증가하였다.

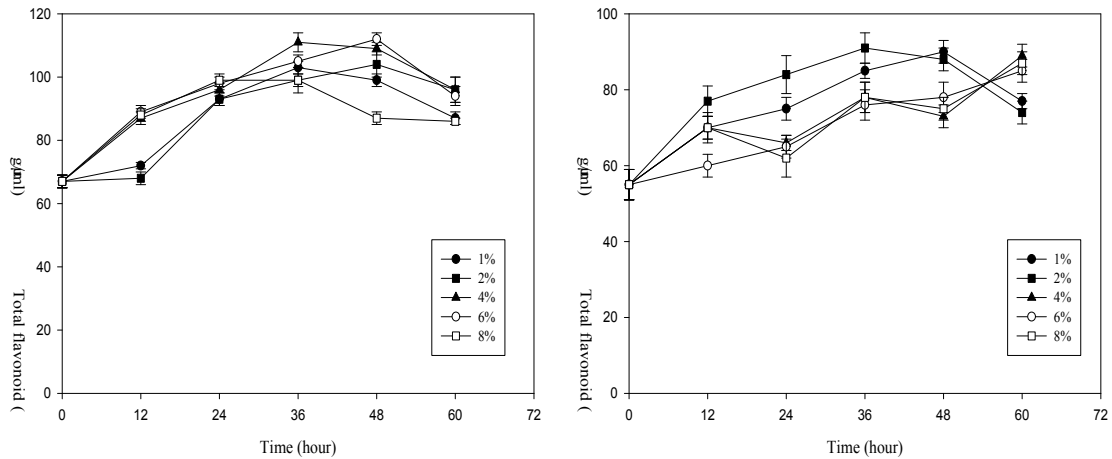


Fig. 66. Effect of inoculum size on total flavonoid content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

#### (바) 폴리페놀 화합물 함량에 대한 접종량의 영향

균체 접종량이 폴리페놀 화합물 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 1-8% (v/v) 접종한 후, 35°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 67에서 보는 바와 같다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 폴리페놀 화합물의 함량은 증가하였는데, 열수 추출물의 경우, 8% (v/v)를 제외하고는 36-48시간까지 완만하게 증가하다가 그 이후 감소하였다. 고압열수 추출물의 경우, 36시간까지 폴리페놀 화합물의 함량이 증가하다가 그 이후 실험구에 따라 완만 증가, 완만 감소, 일정하게 유지되는 패턴을 보여주었다. 열수 추출물의 폴리페놀 화합물의 함량은 433  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 발효에 의하여 최고 612  $\mu\text{g/ml}$  (4%, v/v), 고압열수 추출물은 464  $\mu\text{g/ml}$ 에서 최고 964  $\mu\text{g/ml}$ (2%, v/v)로 증가하였다. 전체적으로 고압열수 추출물의 폴리페놀 화합물의 함량이 열수 추출물보다 높았다.

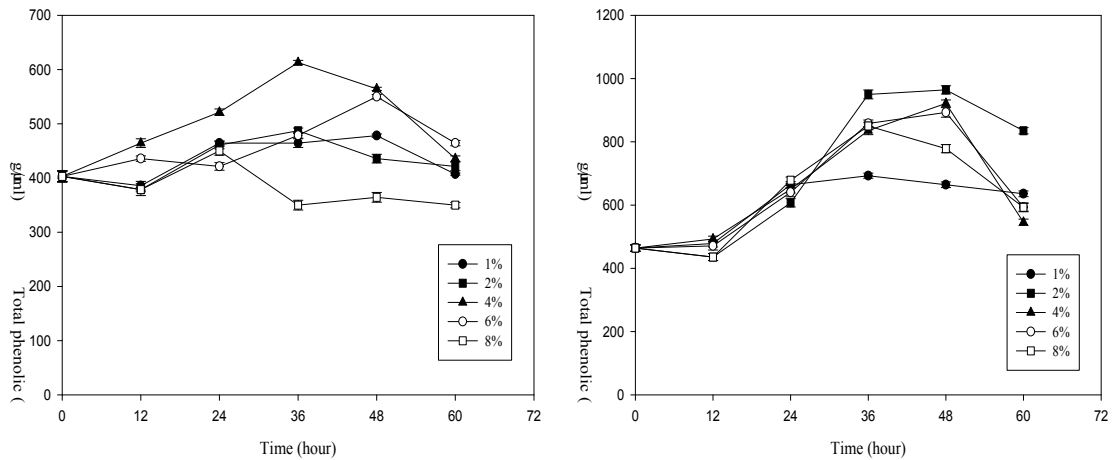


Fig. 67. Effect of inoculum size on total phenolic content during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

#### (사) DPPH 라디칼 소거능에 대한 접종량의 영향

균체 접종량이 DPPH 라디칼 소거능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를 1-8% (v/v) 접종한 후, 35°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 68에서 보는 바와 같다. 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 85.7%였으며, 발효시간 경과에 따라 모든 실험구에서 라디칼 소거능은 완만하게 증가하여 최고 94.6%(2%, v/v)를 나타내었으나 전체적으로 소거능은 비슷하였다. 또한 고압열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 81.3%였으며, 발효시간 경과에 따라 최고 100%(2%, v/v)를 나타내었다.

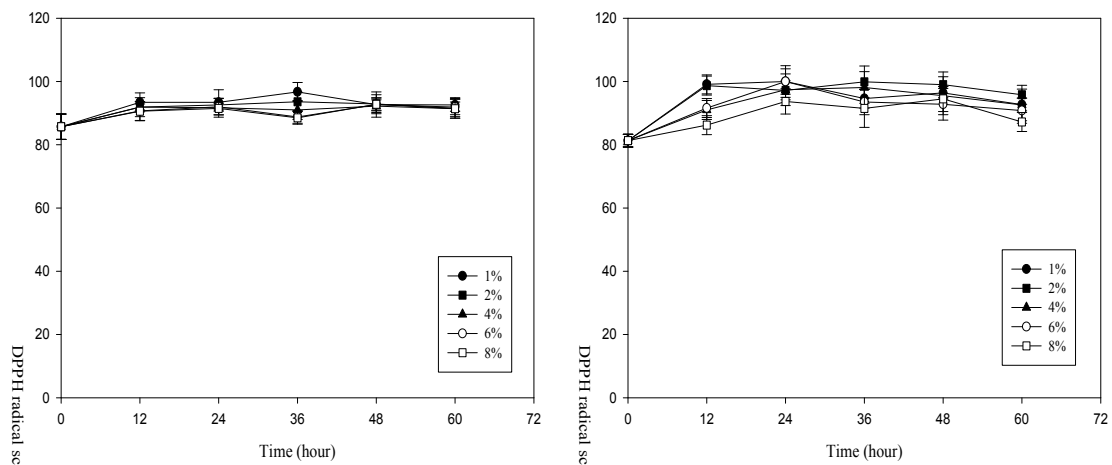


Fig. 68. Effect of inoculum size on DPPH radical scavenging activity during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

#### (아) ACE 저해능에 대한 접종량의 영향

균체 접종량이 ACE 저해능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물(pH 4.5)에 균주를

1-8% (v/v) 접종한 후, 35°C에서 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 69에서 보는 바와 같다. 두 추출물 모두 배양 12시간까지 ACE 저해능이 급격히 증가하였으며, 그 이후 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 열수 추출물의 ACE 저해능은 39.8%였으며, 최고 100%(4%, 6%, v/v)를 나타내었다. 또한 고압열수 추출물의 ACE 저해능은 43.9%였으며, 최고 100%(6%, v/v)를 나타내었다.

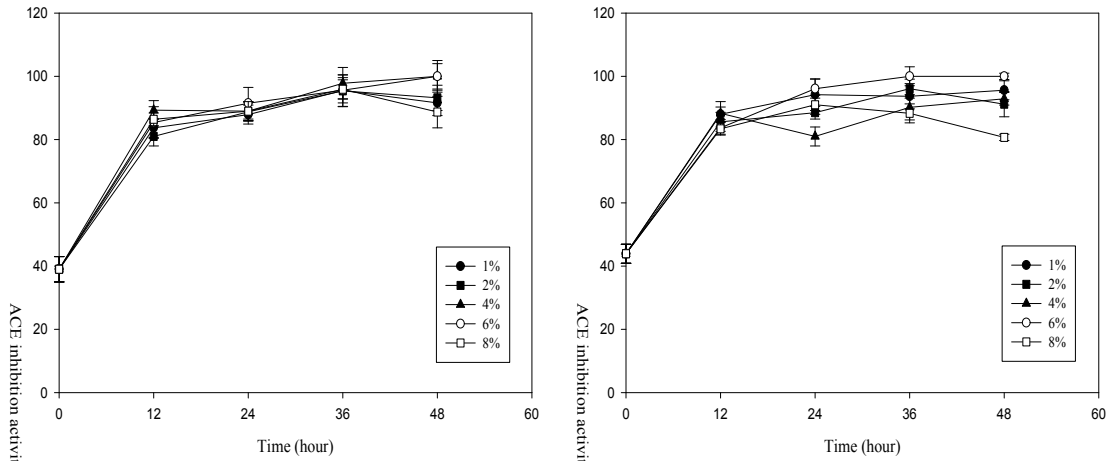


Fig. 69. Effect of inoculum size on ACE inhibition activity during Maekmundong (hot water extract, left; autoclaved extract, right) fermentation by *L. brevis* DD1.

상기 실험을 통하여 맥문동 발효를 통하여 각종 생리활성능이 증가된다는 사실을 확인할 수 있었으며, 특히 ACE 저해능은 두 배 이상 활성이 증가함을 알 수 있었다. ACE 저해활성 생성을 위한 열수 추출물의 최적 발효조건은 pH 4.5, 35°C 및 접종량 4% (v/v)이었으며, 고압열수 추출물의 최적 발효조건은 pH 5.0, 30°C 및 접종량 6% (v/v)이었다.

## 나. 홍문동 발효

홍문동 열수 및 고압열수 추출물을 발효를 위한 배지로 사용하였으며, 상기에서 최적화된 맥문동 추출물 발효조건을 이용하여 홍문동 추출물 발효를 실시하였다. 즉, 홍문동 열수 추출물은 pH 4.5, 35°C 및 접종량 4% (v/v)의 조건에서, 홍문동 고압열수 추출물은 pH 5.0, 30°C 및 접종량 6% (v/v)의 조건에서 발효를 실시하였다. 모든 실험은 3반복 수행 후, 평균값으로 결과를 나타내었다.

### (1) 발효에 따른 균체 생육도의 변화

공시 발효조건에서 배양시간 경과에 따른 균체 생육도의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 70에서 보는 바와 같다. 맥문동 추출물 발효와 달리 두 추출물 모두 유도기없이 대수증식기에 들어갔으며, 36시간 경 정지기에 도달하였다. 열수 추출물보다 고압열수 추출물에서 균체 생육도가 우수하였으며, 이 또한 맥문동 추출물 발효와 비슷한 양상이었으나 생육도 차이는 더 컸다.

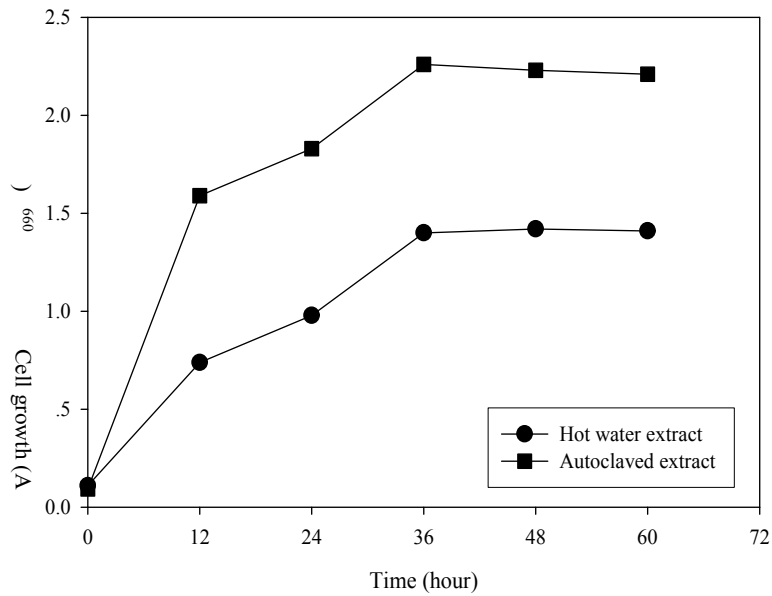


Fig. 70. Change of cell growth during Hongmundong fermentation by *L. brevis* DD1.

## (2) 발효에 따른 적정산도의 변화

공시 발효조건에서 배양시간 경과에 따른 적정산도의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 71에서 보는 바와 같다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 비례적으로 적정산도를 나타내었으며, 24시간까지 고압열수 추출물의 적정산도가 높았으나 36시간부터는 열수 추출물의 적정산도가 높았다. 두 추출물 모두 맥문동 추출물보다 약간 높은 적정산도를 나타내었다.

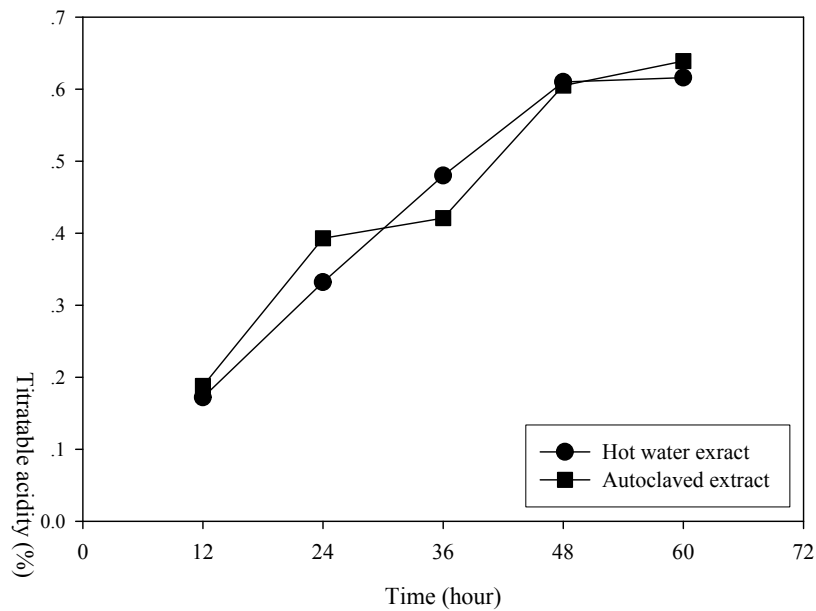


Fig. 71. Change of titratable acidity during Hongmundong fermentation by *L. brevis* DD1.



### (3) 발효에 따른 총당 함량의 변화

공시 발효조건에서 배양시간 경과에 따른 총당 함량의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 72에서 보는 바와 같다. 홍문동 추출물의 초기 총당 함량은 맥문동 추출물보다 많았다. 두 추출물 모두 배양 초기인 12시간까지 총당 함량이 급격히 증가하였으며, 그 이후부터 감소하기 시작하였다. 이러한 현상은 맥문동 추출물 발효와는 다른 양상이었다. 즉, 균체 생육도는 맥문동 추출물보다 홍문동 추출물에서 높았고, 이것으로 보아 공시균주의 기질 이용속도는 홍문동 추출물에서 보다 빠른 것으로 판단된다.

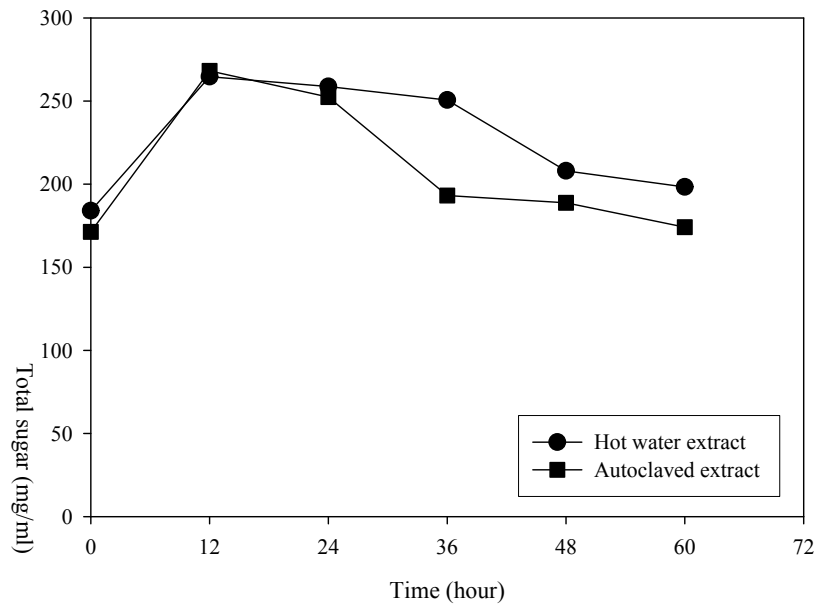


Fig. 72. Change of total sugar content during Hongmundong fermentation by *L. brevis* DD1.

### (4) 발효에 따른 환원당 함량의 변화

공시 발효조건에서 배양시간 경과에 따른 환원당 함량의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 73에서 보는 바와 같다. 홍문동 추출물의 초기 환원당 함량은 맥문동 추출물보다 약간 많았다. 두 추출물 모두 배양시간 경과에 따라 환원당 함량은 급격하게 감소하였으며, 이러한 결과는 배양시간 경과에 따라 공시균주의 기질로 이용되었음을 의미한다.

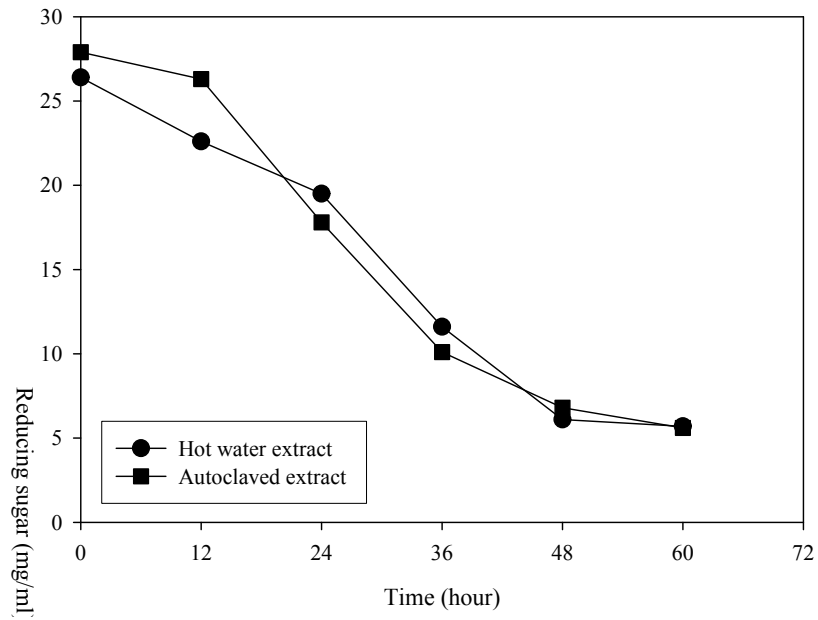


Fig. 73. Change of reducing sugar content during Hongmundong fermentation by *L. brevis* DD1.

#### (5) 발효에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 변화

공시 발효조건에서 배양시간 경과에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 76에서 보는 바와 같다. 홍문동 추출물의 초기 DPPH 라디칼 소거능은 맥문동 추출물보다 약간 높았다. 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 91.2%였으며, 12-36시간의 라디칼 소거능은 97-100%였으나 48시간 경 93.9%로 약간 감소하였다. 고압열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 88.2%였으며, 12-36시간의 라디칼 소거능은 100%였고, 48시간 경 95.6%로 감소하였다.

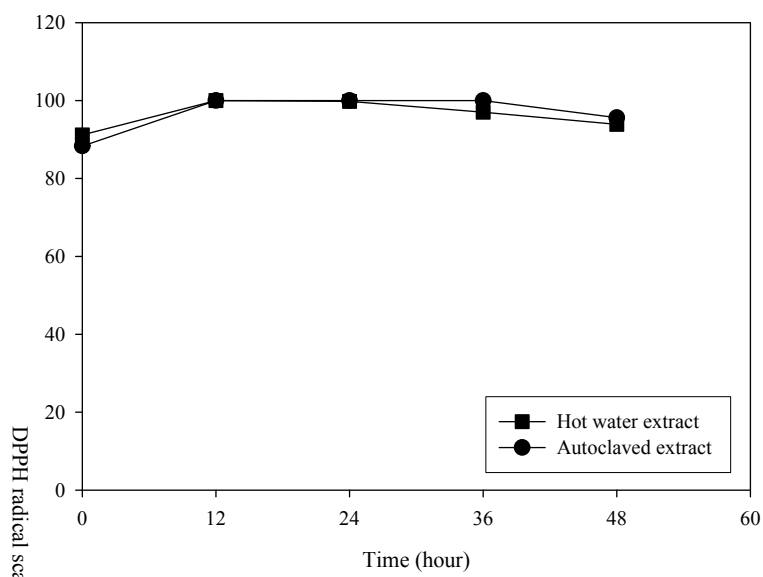


Fig. 76. Change of DPPH radical scavenging activity during Hongmundong fermentation by *L. brevis* DD1.

**(6) 발효에 따른 ACE 저해능의 변화**

공시 발효조건에서 배양시간 경과에 따른 ACE 저해능의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 77에서 보는 바와 같다. 홍문동 추출물의 초기 ACE 저해능은 맥문동 추출물보다 높았다. 두 추출물 모두 배양 12시간까지 ACE 저해능이 급격히 증가하였다. 열수 추출물의 ACE 저해능은 59.7%였으며, 최고 95.6%의 ACE 저해능을 나타내었다. 반면 고압열수 추출물의 저해능은 74.5%로 열수 추출물보다 높았으며, 최고 100%의 저해능을 나타내었다. 두 추출물 모두 36시간 이후 ACE 저해능이 완만하게 감소되었으나 여전히 85.6(열수 추출물), 82.4%(고압열수 추출물)의 높은 활성을 나타내었다.

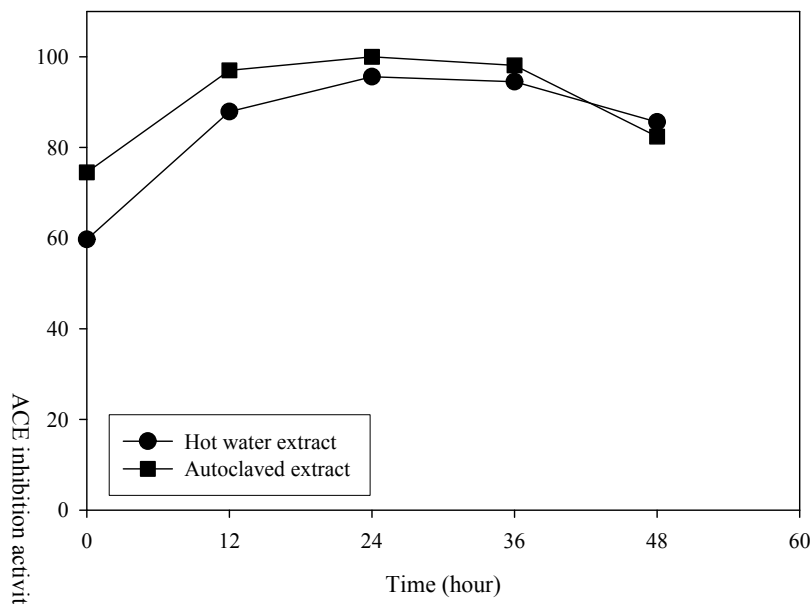


Fig. 77. Change of ACE inhibition activity during Hongmundong fermentation by *L. brevis* DD1.

상기 실험을 통하여 맥문동 증숙을 통하여 제조된 홍문동의 생리활성은 맥문동보다 높았으며, 특히 ACE 저해능은 크게 증가했음을 확인할 수 있었다. 또한 홍문동 역시 맥문동처럼 발효를 통하여 각종 생리활성능이 보다 증가된다는 사실을 알 수 있었다. 본 실험 결과에 의거하여 증숙 및 미생물 발효를 통하여 생리활성이 증강된 맥문동 및 홍문동 음료 개발을 위한 기초 자료를 확보할 수 있었다.

## 제 4 절 제3협동 홍문동의 생리활성 효능연구

### 1. 생리활성 검증을 위한 췌장 세포주와 신경세포주의 확립

#### 가. 췌장세포주의 확립

맥문동과 증숙맥문동(홍문동)의 추출물이 인슐린 세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 INS cell을 사용하였다(Fig. 1). Humman의 beta cell에서 기원된 INS 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin을 함유한 RPMI-1640 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 격일로 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대시켰다.

#### 나. 신경세포주의 확립

맥문동이 신경 세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 B35 cell과 PC12 cell을 사용하였다(Fig. 1). Neuroblastoma인 B35 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다. Pheochromocytoma인 PC12 cell은 0% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin을 함유한 RPMI-1640 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 격일로 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대하였다.

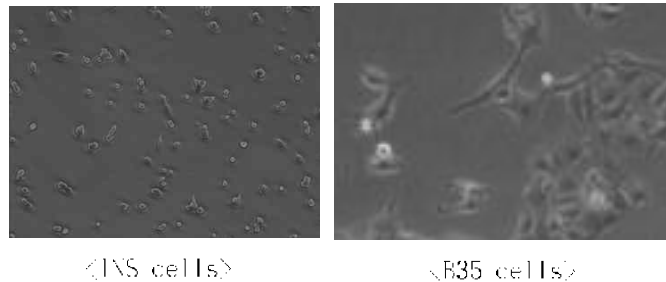


Figure 1. 확립된 췌장세포주와 신경세포주의 현미경 사진

### 2. In vitro 생리활성 효능평가

#### 가. 항당뇨 효능평가

##### (1) 효능 평가를 위한 최적 농도 결정

INS cell에 처리할 물질(인삼, 홍삼, 홍문동)의 농도를 결정하기 위하여, 먼저 맥문동을 다양한 농도(500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9  $\mu\text{l/ml}$ ) 로 처리하여 MTT assay 방법과 Insulin ELISA를 통해 최적농도를 결정하였다. 먼저 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였으며, MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma

chemical Co. USA)는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하게 되는데, 용해액 내 보라색 formazan의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존률을 예측하는 실험방법으로 이용되고 있다 (Gerlier and Thomasset, 1986). 이를 위해 INS cell을 96 well ( $5 \times 10^4$  cell/well)에 분주하여 24시간 배양한 뒤, Vehicle (dH<sub>2</sub>O)과 맥문동 추출물을 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 배양용 배지를 제거하고, MTT 용액을 50  $\mu\text{l}$  첨가한 뒤, 4시간 동안 배양하였다. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 Dimethyl sulphoxide(DMSO, Sigma Co.) 용액을 150  $\mu\text{l}$ 씩 넣고, formazan을 녹였다. 각 well에 나타난 색의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

맥문동에 의한 인슐린 분비량은 Mercodia사의 human Insulin ELISA kit (Cat. 10-1113-01)를 이용하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저 인슐린 분비세포인 INS cell을 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well이 되도록 분주한 후 80-90%로 자랄 때 까지 37 °C, CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 그리고 각 well에 맥문동 추출물을 농도별(500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9  $\mu\text{l}/\text{ml}$ )로 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 배양액을 채취하여 15,000 rpm에서 3분 동안 세포를 침전시켜 상층액을 준비하였다. ELISA kit의 각 well에 25  $\mu\text{l}$ 의 배양액을 넣고, 100  $\mu\text{l}$ 의 enzyme conjugate solution을 첨가하여 plate shaker에 1시간 동안 방치하여 항원-항체 반응을 유도하였다. 1시간 후 상층액을 제거하고, wash buffer (350  $\mu\text{l}$ )를 이용하여 비특이적으로 결합된 단백질이나 결합되지 않은 단백질을 세척하였다. 여기에 200  $\mu\text{l}$ 의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤 50  $\mu\text{l}$ 의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

그 결과 500~3.9  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 INS cell의 세포생존율에는 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2A). 그러나 인슐린 분비량에는 62.5  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 와 31.3  $\mu\text{l}/\text{ml}$  농도의 맥문동을 처리한 그룹에서 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 2B). 따라서 맥문동을 증숙한 홍문동을 INS cell에게 처리하는 농도를 50  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 로 결정하였다.

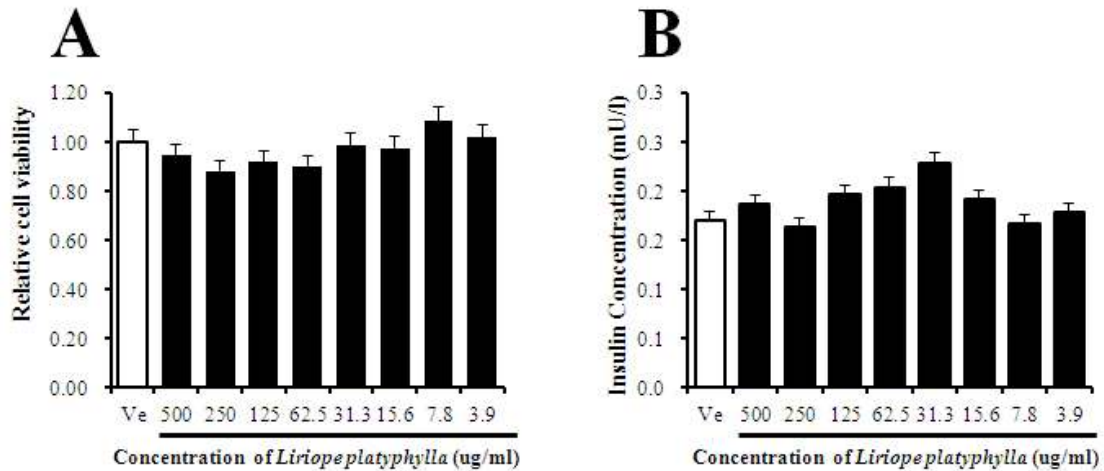


Figure 2. Toxicity of the different concentration of *Liriope platyphylla* on the INS cell (A) and effect of the different concentration of *Liriope platyphylla* on insulin secretion of INS cell (B) to determine of optimum concentration.

(2) 증숙단계별 세포 독성과 인슐린 분비량

증숙단계에 따른 INS cell의 세포 생존과 인슐린 분비에 대한 효과를 분석하기 위하여 INS cell에 증숙 시간(3h, 9h, 15h, 24h)을 다르게 하여 제조한 홍문동을 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존과 Mercodia사의 human Insulin ELISA kit를 이용하여 인슐린 분비량을 측정하였다. 그 결과 인삼의 경우에는 인삼을 처리한 그룹보다 인삼을 증숙하여 제조한 홍삼을 처리했을 때, 더 높은 세포 생존율을 나타내었으며, 맥문동을 처리한 그룹은 인삼을 처리한 그룹의 세포 생존율과 비슷한 결과를 보였다. 그러나 맥문동을 3시간, 9시간, 15시간, 24시간 증숙한 홍문동을 처리한 그룹에서의 세포생존율은 맥문동을 처리한 그룹보다 높았다(Fig. 3A). Insulin ELISA를 통한 분석에서는 인삼을 처리한 INS cell 그룹에서 Vehicle 그룹보다 많은 양의 인슐린을 분비하였다. 이러한 인슐린 농도의 증가율은 인삼을 처리한 그룹보다 홍삼을 처리한 그룹에서 더욱 높았다. 또한 맥문동을 처리한 그룹과 3시간 증숙시킨 홍문동을 처리한 그룹에서 높은 인슐린 분비를 나타내었다. 그러나 9시간과 15시간 증숙시킨 맥문동에서는 낮은 인슐린 분비를 나타내었으며 24시간 증숙시킨 맥문동에서는 홍삼을 처리한 그룹과 같은 수준의 인슐린을 분비하였다(Fig. 3B). 따라서 이러한 결과를 통해 3시간 증숙시킨 맥문동이 인슐린 분비세포인 INS cell의 인슐린 분비능을 증가시키는데 적정 상태로 판단된다.

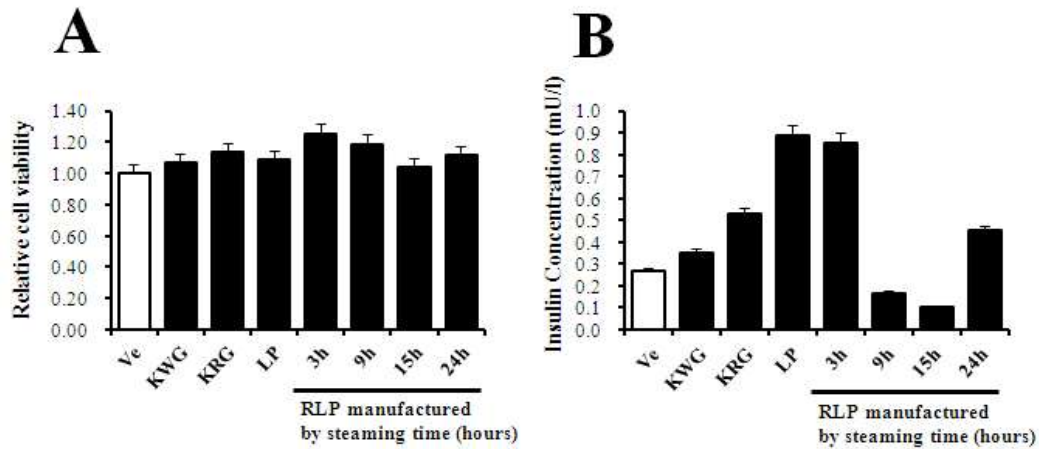


Figure 3. Toxicity(A) and effect of Insulin secretion(B) of *Korean White Ginseng* (KWG), *Korean Red Ginseng* (KRG), *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RLP) manufactured by different steaming times (3h, 9h, 15h, 24h) on the INS cell.

(3) 증숙 횟수에 따른 세포독성과 인슐린 분비량

증숙 횟수에 따른 INS cell의 세포 생존과 인슐린 분비에 대한 효과를 분석하기 위하여 INS cell에 증숙 횟수(1회, 3회, 5회, 7회, 9회)를 다르게 하여 제조한 홍문동을 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존과 Mercodia사의 human Insulin ELISA kit를 이용하여 인슐린 분비량을 측정하였다.

먼저, 세포 생존율을 분석한 결과 인삼과 홍삼, 맥문동과 홍문동을 처리한 그룹에서 Vehicle 처리 그룹보다 약간의 증가가 나타났다. 1회 증숙시킨 홍문동을 처리한 그룹에서 가장 높은 생존율을 나타내었으며, 3회와 7회 증숙시킨 홍문동을 처리한 그룹에서는 맥문동과 비슷한 수준의 세포 생존율을 나타내었으나, 9회 증숙시킨 홍문동을 처리한 그룹에서는 Vehicle 처리 그룹보다 약간의 감소가 나타났다(Fig. 4A). Insulin ELISA를 통한 Insulin 농도 분석에서는 인삼을 처리한 그룹에서보다 홍삼을 처리한 그룹에서 더 높은 수준의 인슐린이 분비되는 것을 확인할 수 있었으며, 맥문동을 처리한 그룹에서는 인삼과 홍삼보다 1.6, 2.5배 정도 더 많은 인슐린이 검출되었다. 또한 1회, 7회 증숙시킨 홍문동을 처리한 그룹에서는 맥문동을 처리한 그룹과 비슷한 수준의 인슐린 농도를 나타내었다. 그러나 3회와 5회 증숙시킨 홍문동을 처리한 그룹에서는 인슐린의 양이 감소되었다. 9회 증숙시킨 홍문동을 처리한 그룹에서 가장 높은 인슐린이 나타났다(Fig. 4B). 따라서 위의 결과를 통해 볼 때, 9회 증숙시킨 홍문동이 INS cell에서 인슐린 분비능을 촉진시킴을 제시하고 있다.

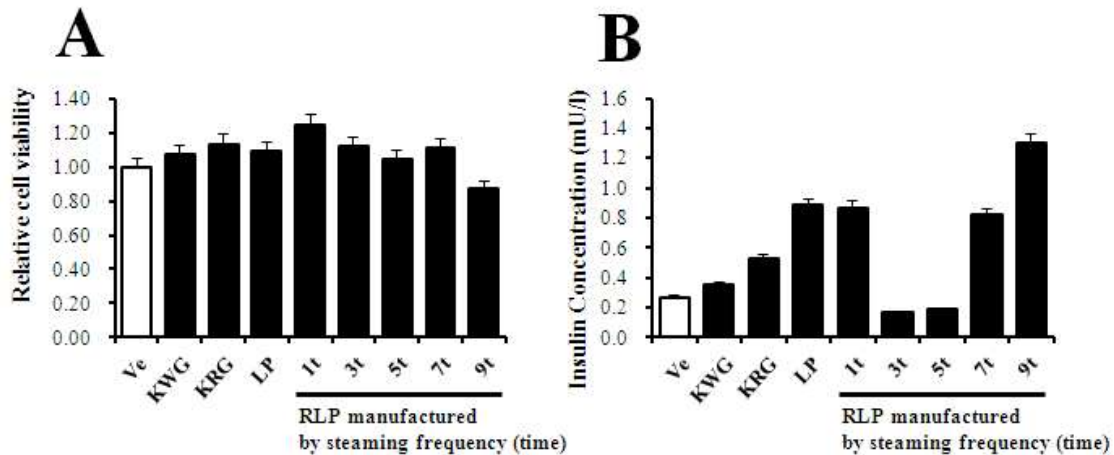


Figure 4. Toxicity(A) and effect of Insulin secretion(B) of *Korean White Ginseng* (KWG), *Korean Red Ginseng* (KRG), *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RPL) manufactured by different steaming frequency (1, 3, 5, 7, 9 times) on the INS cell.

(4) 맥문동 증숙시간이 Insulin signaling pathway에 미치는 영향

증숙 시간에 따라 제조된 홍문동이 Insulin receptor signaling pathway, 그리고 glucose transporter의 발현에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 Vehicle(dH<sub>2</sub>O)과 인삼, 홍삼, 맥문동, 그리고 증숙 시간(3h, 9h, 15h, 24h)에 따른 홍문동을 처리한 세포를 거두어 pro-prep(iNtRON)을 사용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질 농도는 BCA kit로 분석하여 30 μg의 단백질을 10% SDS-PAGE gel로 전기영동한 후 ECL membrane에 전이하였다. 단백질이 전이된 ECL membrane은 5% skim milk로 blocking한 후 beta-actin 항체(Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA), Insulin receptor β 항체(#3025, Cell Signaling Technology), IRS-1 항체(#3407, Cell Signaling Technology), GLUT2 항체(ab54460, abcam, USA), GLUT3 항체(ab15311, abcam, USA)로 각각 1차 반응시킨 다음 peroxidase conjugated anti-rat IgG rabbit 또는 mouse 항체를 이용하여 2차 반응을 시켰다. 반응이 끝난 membrane을 TNT solution (pH 8.0)을 이용하여 충분히 세척한 뒤, Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL) detection kit (Amersham)로 발현을 확인하였다.

먼저, insulin receptor β은 인삼과 맥문동 처리그룹에서는 거의 유사하거나 약간 증가하는 경향을 나타내었으나 홍삼이나 증숙을 시킨 맥문동에서는 크게 증가하였다. 특히 맥문동 증숙시키는 시간이 경과함에 따라 점진적으로 insulin receptor β의 발현이 증가하였다(Figure 5). 한편 insulin receptor β의 downstream에서 신호를 전달하는 Akt의 인산화는 다른 양상을 나타내었다. 홍삼을 처리한 세포는 인삼을 처리한 세포와 비교하여 크게 Akt 인산화가 감소하였으며, 증숙을 하지 않은 맥문동에서는 인산화는 낮았다. 그러나 3시간 증숙한 맥문동을 처리한 세포에서 Akt 인산화가 크게 증가하였으며 15시간 증숙한 맥문동에서도 유의적으로 증가하였다. 다른 단계의 증숙시간을 거친 맥문동은 모두 인산화를 억제하는 것으로 관찰되었다. 또한,



세포 내 글루코스 농도를 조절하는 기작에 중요하게 관여하는 Glut-2와 Glut-3의 발현을 관찰하였다. 일반적으로 Glut-3는 모든 세포에서 발현되는 단백질인 반면, Glut-2는 INS cell에서만 발현되는 단백질이다. Glut-2는 인삼과 홍삼을 처리했을 때 특별한 변화를 나타내지 않았으나, 증숙되지 않은 맥문동을 처리했을 때는 발현량이 감소하였다. 그러나 3시간과 9시간 증숙시킨 맥문동을 처리한 세포에서는 발현량이 유의적으로 증가하였다가 15시간과 24시간 처리한 세포에서는 다시 원래수준으로 감소되었다(Fig. 5). 이러한 결과를 통해 맥문동의 증숙시간은 insulin receptor signaling pathway에 다양한 방법으로 영향을 있음을 알 수 있으며, 그 중에서도 3시간 증숙처리가 매우 큰 영향을 있음을 확인할 수 있다.

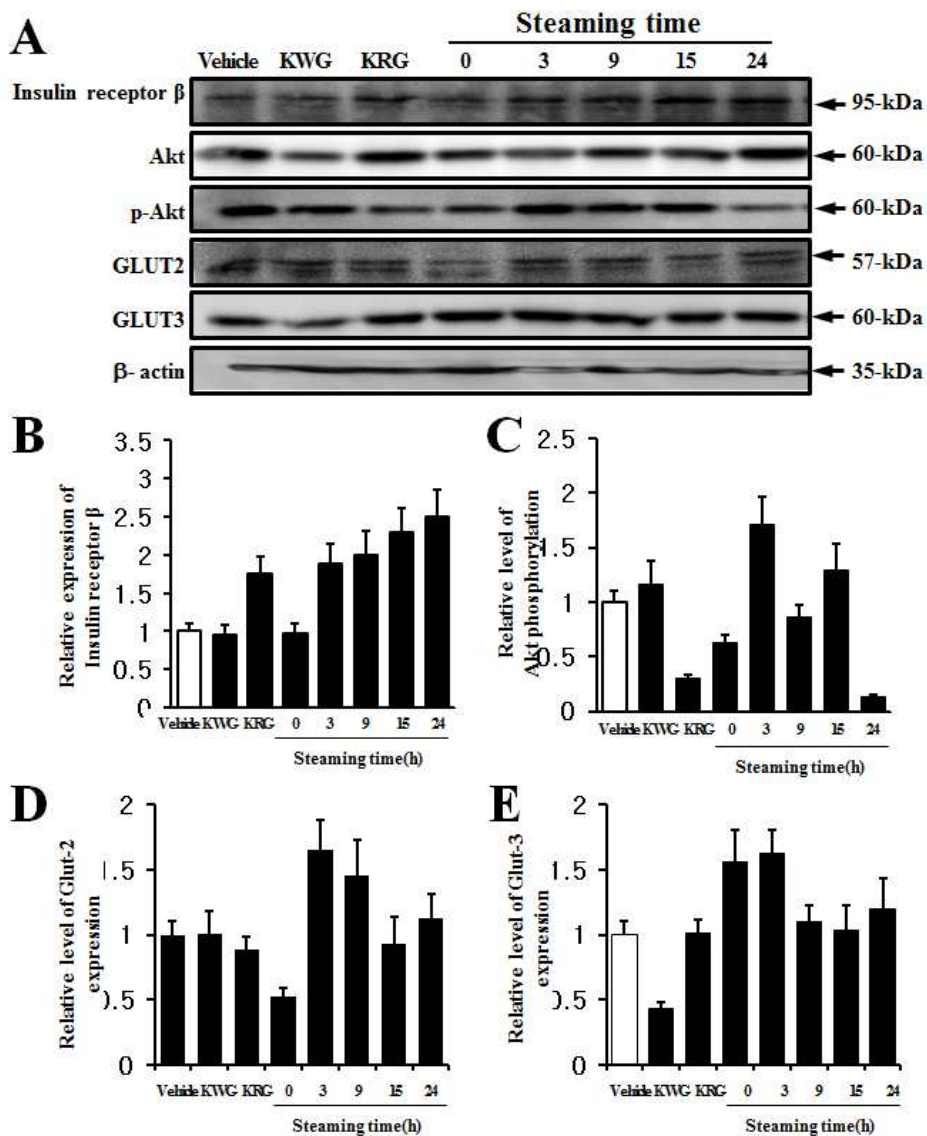
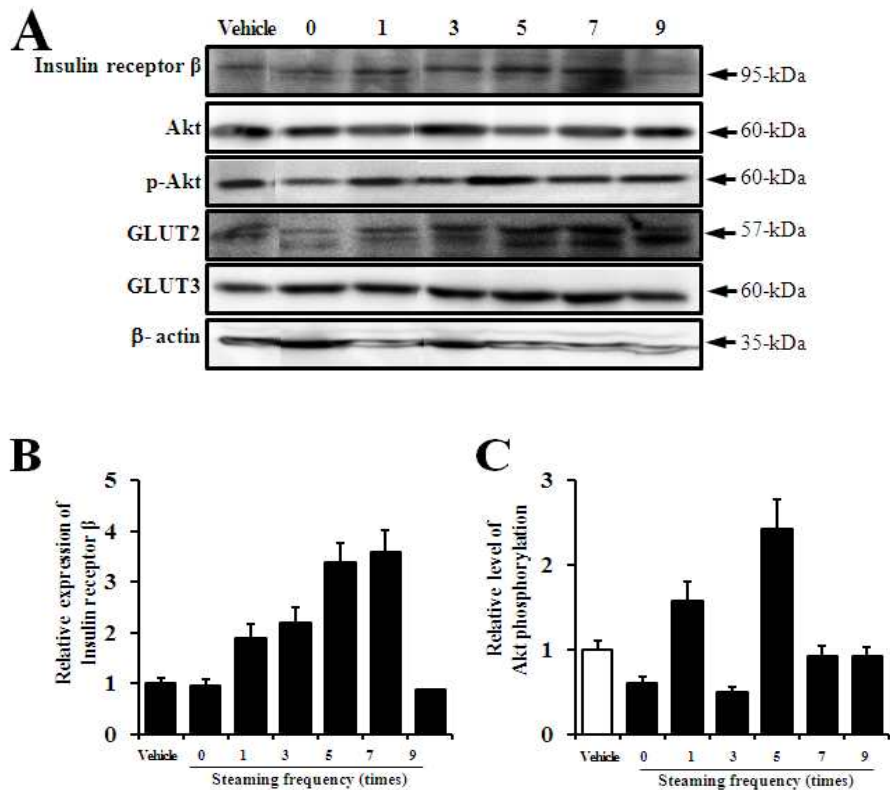


Figure 5. Effect of the *Korean White Ginseng* (KWG), *Korean Red Ginseng* (KRG), *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RPL) manufactured by different steaming frequency (1, 3, 5, 7, 9 times) about expression of Insulin receptor  $\beta$ , insulin signaling pathway (IRS-1, p-Akt, Akt), glucose transporter (Glut) 2 and 3 on the INS cell.

(5) 맥문동 증숙횟수가 Insulin signaling pathway에 미치는 영향

증숙 횟수에 따라 제조된 홍문동이 Insulin receptor와 Insulin signaling pathway와 glucose transporter의 발현에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 Vehicle (dH<sub>2</sub>O)과 맥문동, 그리고 증숙 횟수(1회, 3회, 5회, 7회, 9회)를 달리하여 제조한 홍문동을 처리한 세포의 단백질을 분리하여, western blot을 통해 분석하였다. 그 결과 비록, 9회 증숙에서는 발현량이 감소하였지만, 맥문동 증숙횟수가 증가함에 따라 insulin receptor의 발현량은 유의적으로 증가하였다. 그리고 Akt 인산화는 5회 증숙반복한 맥문동을 처리한 군에서 가장 증가하였으며, 다음으로는 1회 증숙반복한 맥문동을 처리한 군에서 나타났다. 그러나 나머지 처리군에서는 발현양의 감소를 나타내었다. 한편, Glut-2 발현량은 증숙단계의 진행에 따라 유의적으로 증가하여 7회 증숙과 9회 증숙 맥문동을 처리한 군에서 가장 높은 발현량을 나타내었으며, Glut-3의 발현양은 vehicle보다는 증가하였으나 증숙횟수에 따른 차이를 나타내지는 않았다(Fig. 6).



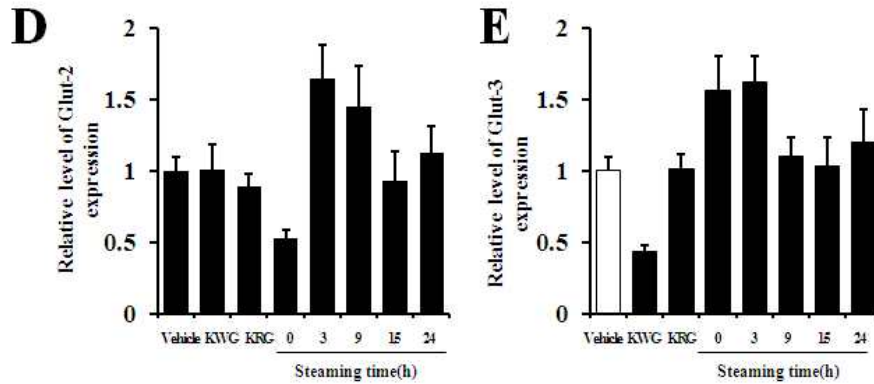


Figure 6. Effect of the *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RLP) manufactured by different steaming frequency about expression of Insulin receptor  $\beta$ , insulin signaling pathway (IRS-1, p-Akt, Akt), glucose transporter (Glut) 2 and 3 on the INS cell.

#### 나. 인지개선 효능평가

##### (1) 증숙 시간에 따른 맥문동의 세포독성과 NGF 분비량에 미치는 영향

증숙 시간에 따른 신경 세포의 세포 생존과 Nerve growth factor (NGF) 분비에 대한 효과를 분석하기 위하여 B35 cell에 Vehicle (dH<sub>2</sub>O), 인삼과 홍삼, 맥문동과 증숙 시간(3h, 9h, 15h, 24h)을 다르게 하여 제조한 홍문동을 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존과 Millipore사의 NGF ELISA kit를 이용하여 NGF 분비량을 측정하였다. 먼저 B35 cell을 96 well (5 × 10<sup>4</sup> cell/well)에 분주하여 24시간 배양한 뒤, Vehicle (dH<sub>2</sub>O)과 맥문동을 증숙시간 별로 50  $\mu$ l/ml의 농도로 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 배양용 배지를 제거하고, MTT용액을 50  $\mu$ l 첨가한 뒤, 4시간 동안 배양하였다. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 Dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Co.) 용액을 150  $\mu$ l씩 넣고, formazan을 녹였다. 각 well에 나타난 색깔의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

NGF는 cholinergic 뉴런의 가장 강력한 성장요인이며, 증식, 분화, 생존과 신경세포의 사멸에 영향을 미친다. NGF는 일부 cytokines 혹은 맥문동 추출물에 반응하는 다양한 세포형태에 의해서 생산되는데, NGF를 생산하는 세포는 neuron, inflammatory cell (lymphocytes 혹은 mast cell), structural cell (fibroblast, epithelial cell, smooth muscle cells) 등이 포함되지만 (Freund-Michel and Frossard, 2008), 맥문동의 butanol과 ethanol fraction은 primary astrocyte cell과 마우스에서도 발현을 유도한다(Hur *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). NGF 분비량은 Millipore의 NGF ELISA kit를 구입하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저 neuronal cell인 B35 cell을 96well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cell/well이 되도록 분주한 후 80-90%로 자랄 때 까지 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 그리고 각 well에 Vehicle (dH<sub>2</sub>O), 인삼과 홍삼, 맥문동과 증숙 시

간(3h, 9h, 15h, 24h)을 다르게 하여 제조한 홍문동을 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 배양액을 채취하여 15,000 rpm에서 3분 동안 세포를 침전시켜 상층액을 준비하였다. ELISA kit의 각 well에 100  $\mu$ l의 배양액을 넣고, plate sealer로 plate를 덮고 밤새동안 배양하였다. Plate를 wash buffer 250  $\mu$ l로 4번 세척하고, anti-mouse NGF monoclonal antibody 100  $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 2시간 후 wash buffer로 4번 세척해주고, peroxidase conjugated donkey anti-mouse IgG polyclonal antibody 100  $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 여기에 100  $\mu$ l의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤, 100  $\mu$ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro- reader, MDS Co., USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

그 결과, 인삼과 홍삼은 Vehicle 처리 그룹보다 세포 생존율이 20%정도 감소하였으며, 맥문동은 40% 감소하였다. 그러나 3시간과 9시간 증숙한 홍문동을 처리한 그룹은 Vehicle 처리 그룹과 비슷한 세포 생존율을 나타내었으며, 24시간 증숙한 홍문동을 처리한 그룹에서는 20% 증가하였다. 따라서 맥문동보다 증숙을 통해 제조된 홍문동이 세포 독성이 없음을 확인 할 수 있다(Fig. 7A). 또한 인삼과 홍삼을 처리한 그룹에서는 Vehicle을 처리한 그룹과 비슷한 수준의 NGF를 분비하지만, 맥문동을 처리한 그룹에서는 25% 증가한 수준의 NGF를 분비하였다. 증숙한 홍문동을 처리한 그룹에서는 모두 맥문동 처리 그룹보다 높은 수준의 NGF를 분비하였으며, 9h 증숙시킨 홍문동을 처리한 그룹에서 가장 높은 NGF 분비량을 나타내었다(Fig. 7B). 따라서 맥문동을 증숙시킨 홍문동은 NGF 분비에 영향을 미치는 것을 제시하고 있다.

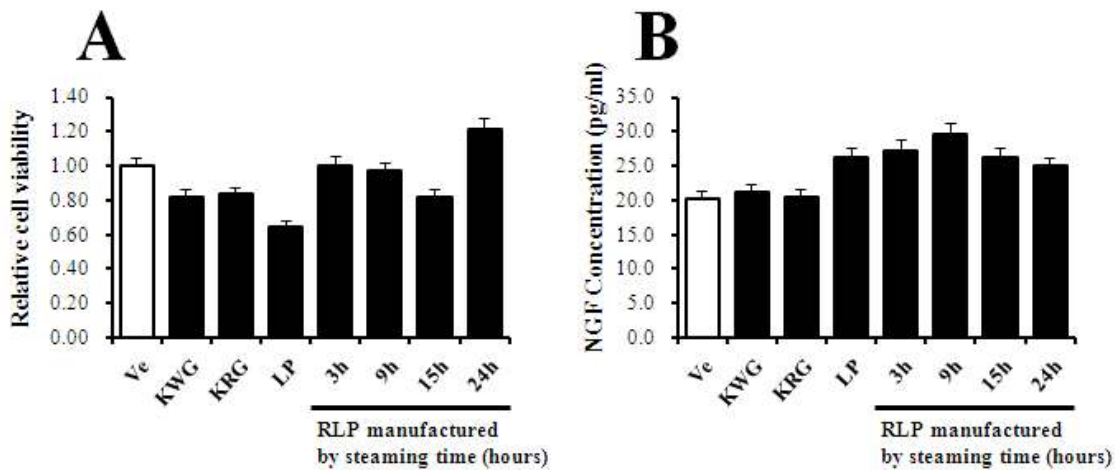


Figure 7. Toxicity(A) and effect of NGF secretion(B) of *Korean White Ginseng* (KWG), *Korean Red Ginseng* (KRG), *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RLP) manufactured by different steaming times (3h, 9h, 15h, 24h) on the B35 cell.

(2) 증숙횟수에 따른 세포독성과 NGF 분비량

증숙 횟수에 따른 신경 세포의 세포 생존과 NGF 분비에 대한 효과를 분석하기 위하여 B35 cell에 맥문동과 증숙 횟수(1회, 3회, 5회, 7회, 9회)를 다르게 하여 제조한 홍문동을 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존과 Millipore사의 NGF ELISA kit를 이용하여 NGF 분비량을 측정하였다. 그 결과 맥문동을 증숙한 홍문동을 처리한 그룹에서 모두 맥문동을 처리한 그룹보다 세포생존율이 높았으며, 특히 3회와 9회 증숙한 홍문동을 처리한 그룹에서 Vehicle 처리 그룹보다 세포 생존율이 20%정도 증가하였다. 따라서 맥문동을 증숙하였을 때 세포독성이 없음을 제시하고 있다(Fig. 8A). NGF의 분비량은 인삼과 홍삼을 처리한 세포에서는 특별한 차이가 없었으나 5회 증숙한 맥문동을 처리한 세포에서부터 증가하기 시작하여 7회 증숙한 맥문동 처리 세포에서 가장 많은 분비량이 유도되었고 9회 증숙된 맥문동 처리군에서 약간 감소하였다(Fig. 8B). 이러한 결과는 맥문동의 증숙이 NGF 분비에 효과적으로 작용함을 나타내고 있다.

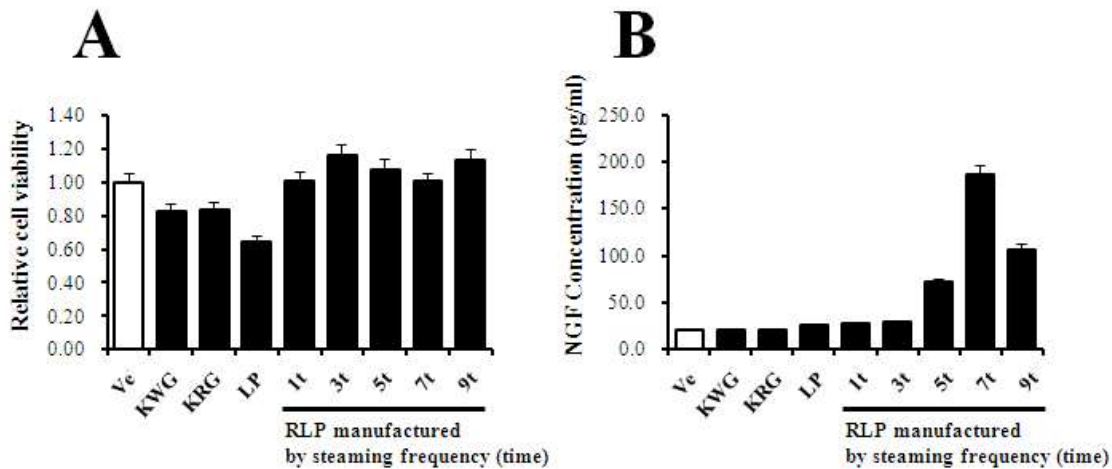


Figure 8. Toxicity(A) and effect of NGF secretion(B) of *Korean White Ginseng* (KWG), *Korean Red Ginseng* (KRG), *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RPL) manufactured by different steaming frequency (1, 3, 5, 7, 9 times) on the B35 cell.

(3) 증숙시간에 따라 제조된 맥문동에 의해 분비된 NGF가 PC12 cell의 증식에 미치는 영향

B35 세포주에서 분비된 NGF가 신경세포의 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 PC12 cell을 이용한 배양액 유도반응을 실시하였다. 먼저 신경세포인 B35 cell에 Vehicle과 인삼, 홍삼, 맥문동 그리고 증숙시간이 다른 홍문동을 첨가하여 24시간 배양하여, NGF가 분비된 배양액을 채취하여 세포 배양액을 확보하였다. 분비된 배양액을 PC12 cell에 처리하여 시간의 경과에 따른 cell의 변화를 위상차 도립현미경(Leica)을 이용하여 세포 상태를 관찰하였다. 그 결과, 인삼과 홍삼을 처리한 B35 cell 배양액은 vehicle 처리군과 매우 유사한 분화정도를 나타내었으나, 맥문동과 증숙 맥문동에서는 분화가 증가됨을 확인하였다. NGF 분비량과 분화정도가 정확

히 일치하는 지를 확인하기는 어려웠으나 증숙 맥문동의 처리에 의해 분비된 NGF는 PC12 cell의 분화를 유도할 수 있음을 보여주고 있다(Fig. 9).

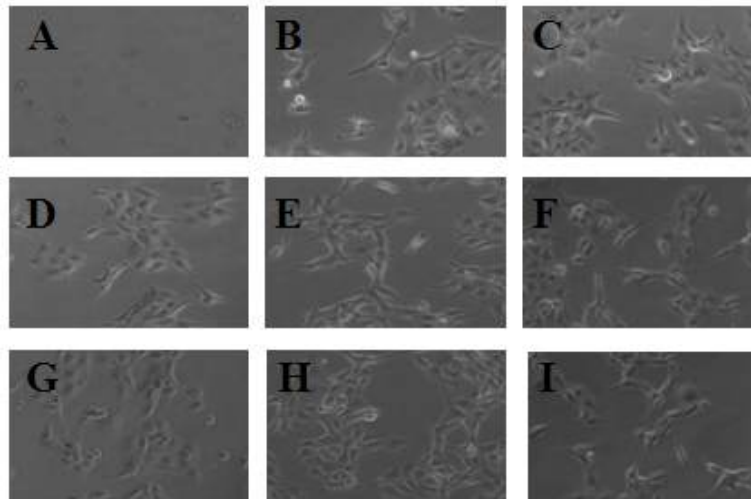


Figure 9. Microscope images of PC12 cell incubated with sup after 24hrs of treatment with *Korean White Ginseng* (KWG), *Korean Red Ginseng* (KRG), *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RLP) manufactured by different steaming times (3h, 9h, 15h, 24h) on the B35 cell. A, PC12 cells; B, Vehicle; C, KWG; D, KRG; E, LP; F, 3h steamed LP; G, 9h steamed LP; H, 15h steamed LP; I, 24h steamed LP.

(4) 증숙횟수에 따라 제조된 맥문동에 의해 분비된 NGF가 PC12 cell의 증식에 미치는 영향

홍문동의 제조를 위해 사용된 증숙 횟수 처리에 의해 분비된 NGF가 실제로 세포의 분화를 촉진시키는지 확인하고자 PC12 cell을 이용한 배양액 유도 반응을 실시하였다. 먼저 신경세포인 B35 cell에 Vehicle과 맥문동 그리고 증숙횟수가 다른 홍문동을 첨가하여 24시간 배양하여, NGF가 분비된 배양액을 채취하여 세포 배양액을 확보하였다. 분비된 배양액을 PC12 cell에 처리하여 시간의 경과에 따른 세포주의 변화를 위상차 도립현미경(Leica)을 이용하여 세포 상태를 관찰하였다. 다양한 횟수로 증숙된 맥문동을 처리하여 얻어진 배양액에 존재하는 NGF는 vehicle 처리한 세포보다 분화가 촉진되었으나 증숙횟수에 의한 정확한 차이는 확인하기 어려웠다 (Fig. 10).

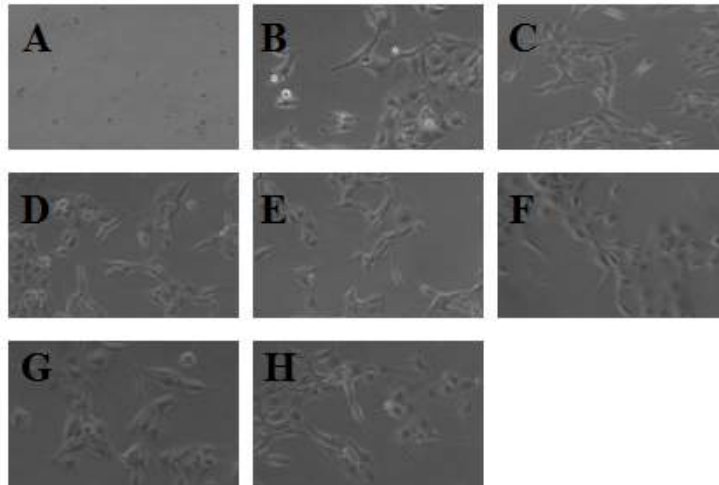


Figure 10. Microscope images of PC12 cell incubated with sup after 24hrs of treatment with *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RLP) manufactured by different steaming frequency (1, 3, 5, 7, 9 times) on the B35 cell. A, PC12 cells; B, Vehicle; C, LP; D, 1 steaming repeats LP; E, 3 steaming repeats LP; F, 5 steaming repeats LP; I, 7 steaming repeats LP; 9 steaming repeat LP.

(5) 다양한 증숙시간에서 제조된 홍문동이 NGF receptor TrkA signaling pathway에 미치는 영향

NGF receptor 중에서 TrkA receptor는 high affinity를 갖는다. NGF가 target cell의 원형질막에서 발견되는 high-affinity tyrosine kinase receptor인 TrkA에 결합하면, 각 수용체의 내재성 tyrosine kinase activity가 각 상대 수용체를 인산화하도록 한다. 인산화된 TrkA 수용체는 Ras 단백질과 ERK/p-ERK 등의 단계적인 반응을 유발하고, 다양한 단백질 kinase 활성의 결과를 가져온다. 이들 kinase의 일부는 CREB과 같은 전사 활성인자를 활성화시키기 위해 핵으로 이동시킨다. NGF 경로의 Ras-based component는 기본적으로 NGF-sensitive neuron의 분화를 유도하고 유지하는 역할을 한다. 또한 TrkA의 인산화는 세포 사멸을 억제하는 단백질 kinase(Akt kinase)의 활성을 유도하며, 교감신경과 감각 뉴런의 NGF-dependent 생존을 매개한다. 홍문동의 증숙시간이 TrkA와 TrkA downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다.

Vehicle(dH<sub>2</sub>O)과 인삼, 홍삼, 맥문동, 그리고 증숙 시간(3h, 9h, 15h, 24h)에 따른 홍문동을 처리한 세포에 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 50-100 mg의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 4-20% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life

Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-TrkA 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-TrkA 항체(Cell Signaling Technology), anti-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-ERK 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-p-ERK 항체(Santa Cruz Biotechnology), anti- $\beta$ -actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다.

그 결과, TrkA의 발현은 인삼보다 홍삼에서 증가하였지만, 맥문동에서는 3, 9, 24시간 증속된 맥문동에서는 발현이 오히려 감소하였고 15시간 증속된 맥문동에서 가장 많은 발현을 나타내었다. Akt의 인산화는 인삼에서 처리한 세포에서 크게 감소하였고, 홍삼을 처리한 세포에서는 정상으로 회복되었다. 그리고 맥문동과 홍문동 처리세포에서는 대부분 약간 감소하였으며, 24시간 증속 맥문동을 처리한 세포에서 가장 크게 감소하였다. 한편, ERK의 인산화는 인삼, 홍삼, 맥문동에서 큰차이를 나타내지 않았으나 3시간 증속 맥문동과 24시간 증속 맥문동에서 가장 크게 증가하였다 (Fig. 11).

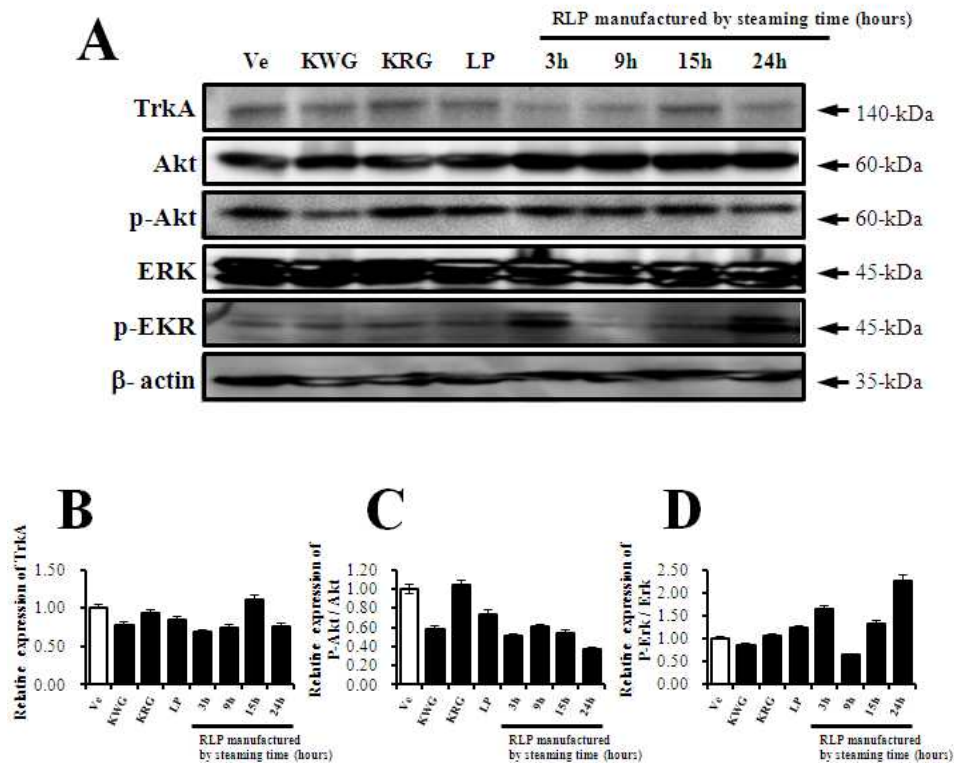


Figure 11. Effect of the *Liriopae platyphylla* (LP) and *Red Liriopae platyphylla* (RPL) manufactured by different steaming time on the NGF receptor Trk signaling pathway of B35 cells.



(6) 다양한 증숙횟수에서 제조된 홍문동이 NGF receptor TrkA signaling pathway에 미치는 영향

홍문동의 증숙횟수가 NGF와 high affinity를 갖는 NGF receptor인 TrkA와 TrkA downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 신경세포주에 다양한 맥문동을 처리한 후, 세포추출물을 이용하여 western blot을 통해 분석하였다. 그 결과, TrkA의 발현은 증숙횟수가 증가함에 따라 유의적으로 증가하여 7회와 9회 증숙한 맥문동에서 가장 높게 발현이 유도되었다. Akt의 인산화는 증숙 횟수에 큰 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었으며, ERK 인산화는 1회와 3회 증숙한 맥문동을 처리한 세포에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 12).

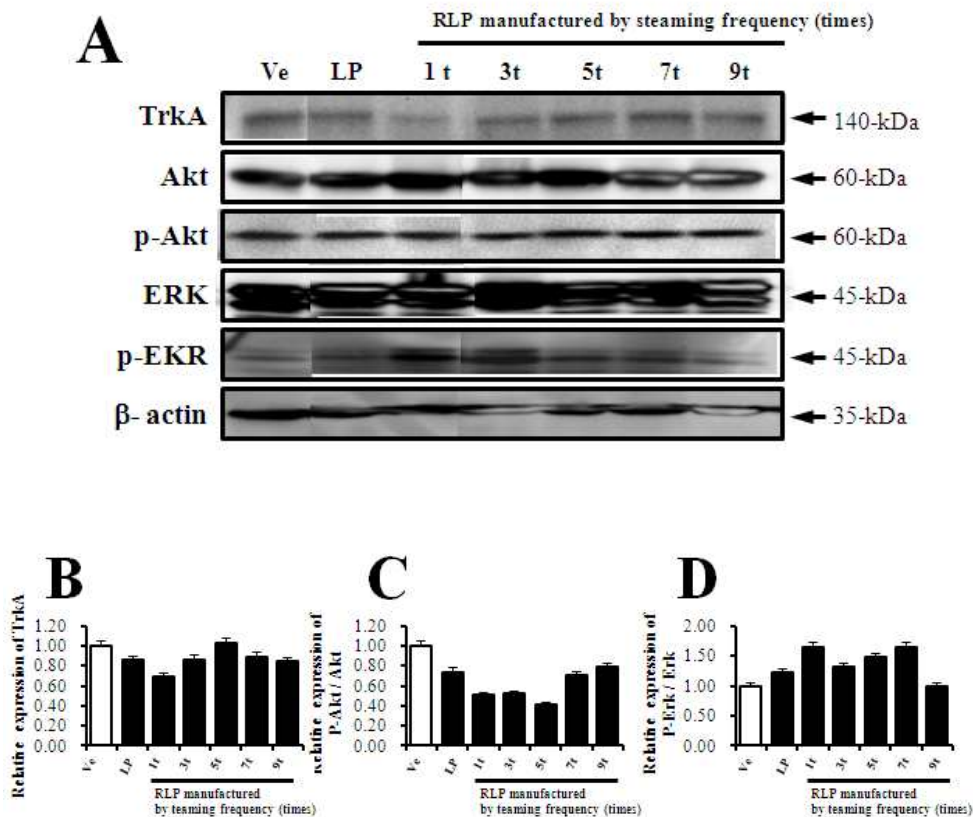


Figure 12. Effect of the *Liriopae platyphylla* (LP) and *Red Liriopae platyphylla* (RLP) manufactured by different steaming frequency on the NGF receptor Trk signaling pathway of B35 cells.

(7) 맥문동의 증숙시간이 NGF receptor p75<sup>NTR</sup> signaling pathway에 미치는 영향

NGF receptor 중에서 p75<sup>NTR</sup> receptor는 low affinity를 갖는다. Low affinity receptor인 p75<sup>NTR</sup>는 G-protein receptor family에 속하며, 세포질 부위에 chopper domain과 death domain을 갖고 있어 신호전달을 수행한다(di Mola *et al.*, 2000; Freund-Michel and Frossard, 2008). 홍문동의 증숙시간이 p75<sup>NTR</sup>와 p75<sup>NTR</sup> downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다.

Vehicle(dH<sub>2</sub>O)과 인삼, 홍삼, 맥문동, 그리고 증숙 시간(3h, 9h, 15h, 24h)에 따른 홍문동을 처리한 세포에 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 50-100 mg의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 4-20% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-p75<sup>NTR</sup> 항체(Cell Signaling Technology, Beverley, MA), anti-RhoA 항체(Cell Signaling Technology), anti-β-actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4℃에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, p75<sup>NTR</sup>의 발현은 인삼과 홍삼을 처리한 세포에서 유의적으로 증가하였으며, 홍삼이 인삼보다 약간 발현을 증가시키는 효과가 있었다. 맥문동을 처리한 cell은 vehicle을 처리한 cell보다 발현양이 증가하였으며, 증숙시간의 증가에 따라 더욱더 발현양이 증가하였다. 한편, RhoA의 발현은 인삼과 홍삼에서 증가하였고, 9시간, 15시간, 24시간 증숙시킨 맥문동에서 가장 높은 발현을 나타내었다. Bcl2와 Bax의 발현양상은 매우 유사하였다. 인삼, 홍삼 그리고 맥문동처리 세포는 낮은 발현양을 나타내었지만 3시간부터 24시간 증숙한 맥문동은 거의 유사하게 높은 발현양을 나타내었다(Fig. 13).

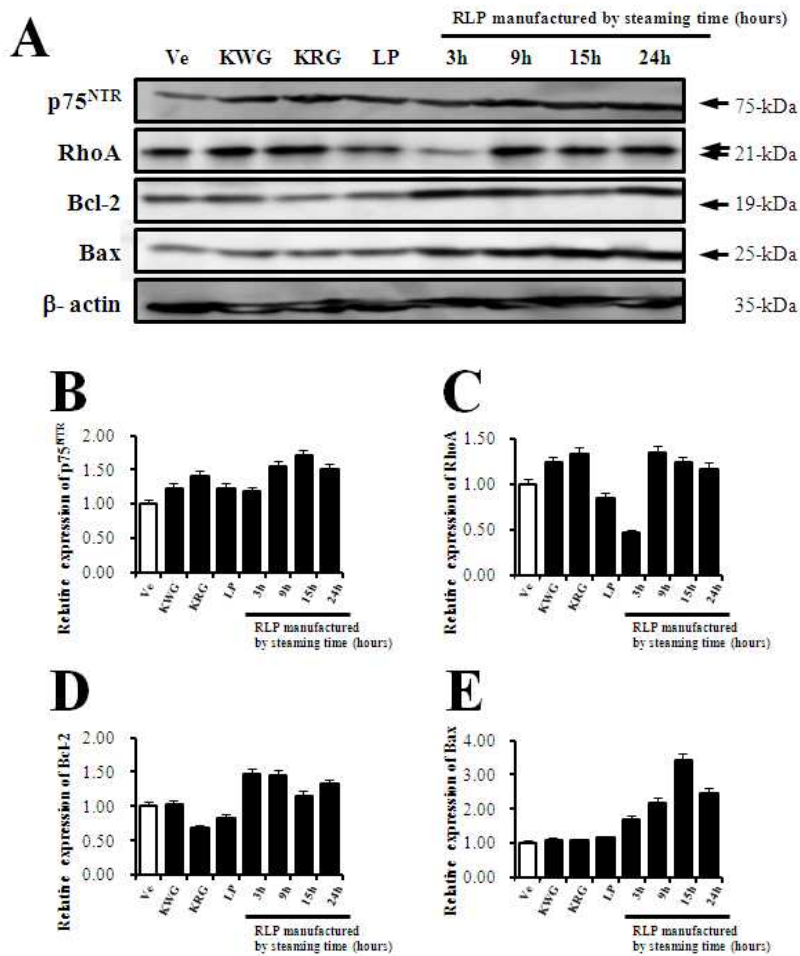


Figure 13. Effect of the *Liriopae platyphylla* (LP) and *Red Liriopae platyphylla* (RLP) manufactured by different steaming time on the NGF receptor p75<sup>NTR</sup> signaling pathway of B35 cells.

(8) 맥문동 증숙횟수가 NGF receptor p75<sup>NTR</sup> signaling pathway에 미치는 영향

홍문동의 증숙횟수가 NGF와 low affinity를 갖는 NGF receptor인 p75<sup>NTR</sup>와 p75<sup>NTR</sup> downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다. 그 결과, p75<sup>NTR</sup>의 발현은 맥문동 처리한 그룹과 증숙 맥문동 처리한 그룹에서 매우 유사하게 발현되었으며, vehicle 처리 cell보다는 높았다. RhoA의 발현양은 1회 증숙 맥문동에서는 매우 적었으나 3회부터 9회까지 증숙된 맥문동은 매우 높은 발현을 유도하였다. Bcl-2 발현은 1회와 2회 증숙된 맥문동을 처리한 세포에서 매우 높았으며, 다른 횟수로 증숙된 맥문동을 처리한 cell에서는 발현양이 낮았다. Bax의 발현양은 1회와 3회 증숙된 맥문동을 처리한 세포에서 가장 높은 발현을 나타내었고 9회 증숙된 맥문동도 상대적으로 높은 발현을 나타내었으나 다른 처리군에서는 낮았다(Fig. 14).

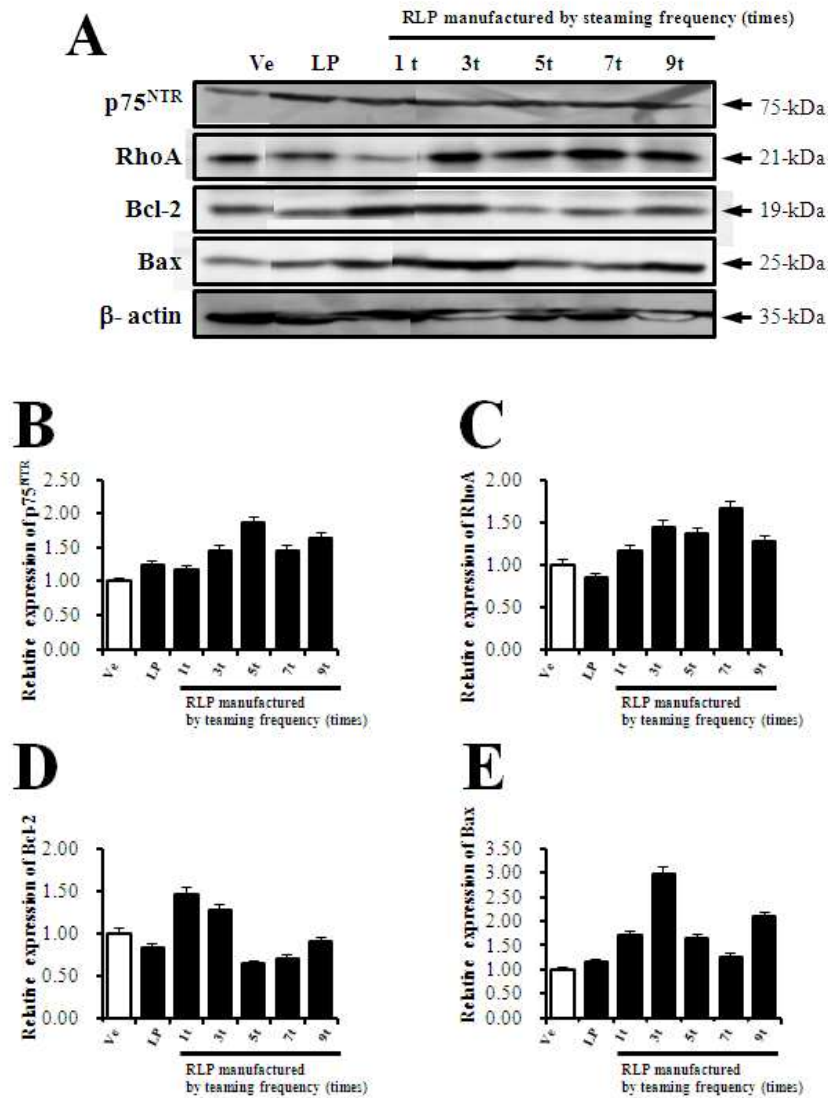


Figure 14. Effect of the *Liriope platyphylla* (LP) and *Red Liriope platyphylla* (RLP) manufactured by different steaming frequency on the NGF receptor p75<sup>NTR</sup> signaling pathway of B35 cells.

### 3. 효능분석을 위한 모델동물 확립

#### 가. 치매 증상을 나타내는 모델동물의 확보 (NSE/hAPPsw Tg mouse)

홍문동 추출물이 치매에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 치매질환동물모델인 NSE/hAPPsw 형질전환(transgenic: Tg) 마우스를 사용하였다(Fig. 15A). 사용된 형질전환 마우스는 치매의 원인유전자로 알려진 APPsw 유전자를 신경세포 특이적으로 과발현함으로써 신경세포에 Aβ-4 2펩타이드가 축적되는 모델동물이다.

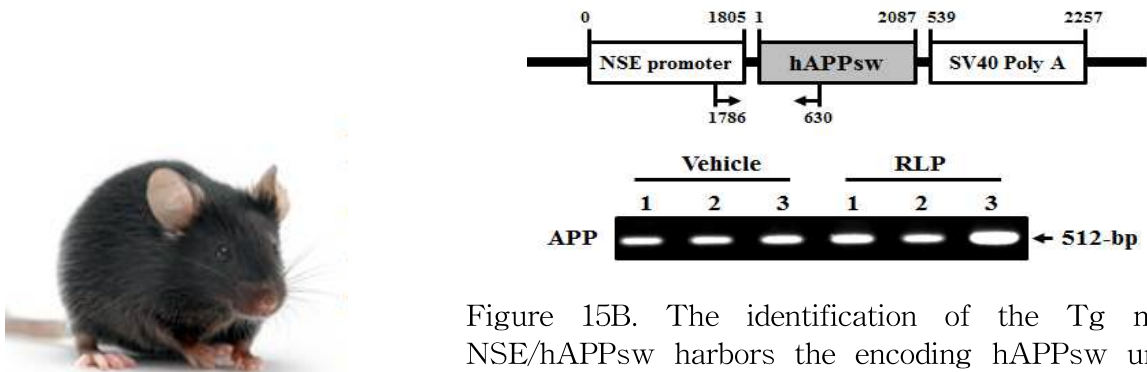


Figure 15A. NSE/hAPPsw mouse.

Figure 15B. The identification of the Tg mice. NSE/hAPPsw harbors the encoding hAPPsw under the control of the NSE gene promoter. In analysis for Tg mice identification, PCR was performed on the genomic DNA isolated from the tail of founder mice, and the resulting products (512-bp) are shown.

#### 나. 치매모델동물의 교배를 통한 대량생산

본 연구에 사용된 Tg 마우스를 대량으로 확보하기 위하여 치매모델동물 마우스를 C57BL/6 마우스와 교배하여 대량생산하였다. 생산된 Tg 마우스는 유전자형을 분석하기 위하여, 마우스 꼬리에서 추출한 genomic DNA를 polymerase chain reaction (PCR) 분석을 통하여 수행하였다. 사용한 프라이머는 다음과 같다 ; NSE-specific primers, sense : 5'-CTG AGT CTG CAG TCC TCG A-3' and APP-specific primers, antisense : 5'-CTC TTC TCA CTG CAT GTC TC-3'. NSE- 와 hAPPsw- 에 특이적인 PCR 산물을 1.0 % agarose 겔에 전기영동하여 512-bp의 유전자형을 확인하였다(Fig. 15B). 그 결과 모든 마우스는 형질전환 동물임을 확인하였으며, 두 개의 그룹(n=3): vehicle 처리군과 홍문동 처리군으로 나누어 실험에 사용하였다.

#### 다. 치매질환모델동물의 질병의 기초 생리자료 확보

NSE/hAPP<sup>sw</sup> 마우스는 식품의약품안전청에서 microinjection하여 생산한 형질전환 마우스이다(Fig. 16). 사용된 NSE/APP<sup>sw</sup> 마우스는 행동장애를 12개월 내에 관찰할 수 있고, APP와 A $\beta$ -42 band의 염색에 있어 Tg 마우스의 뇌에서 강한 반응을 나타내므로, 눈으로 확인 할 수 있을 정도로 뚜렷한 결과를 보이는 것으로 알려져있다. 이 형질전환 마우스 모델은 APP<sup>sw</sup>를 발현시키기 위해 NSE promoter를 사용하였으며, 대표적인 행동장애로는 swimming trial에서 그 속도나 거리, 패턴에서 일반 마우스와는 다른 양상을 보이는 것으로 알려져 있다(Fig. 17).

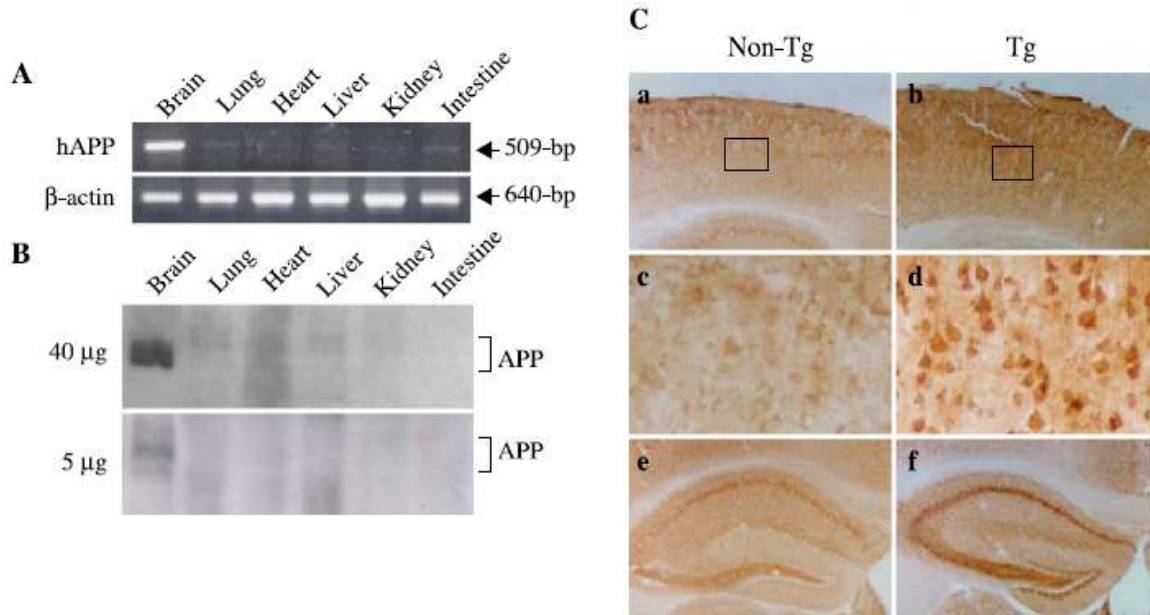


Figure 16. Tissue-specific expression of the transgene in transgenic mice. Expression of the NSE-APP<sup>sw</sup> fusion gene was regulated in a brainspecific manner. The h-actin signal served as a control, and their transcripts (640 bp) are shown to indicate RNA loading. Transcript (A) and protein levels (B) in the various tissues were determined. Since the thick band was visible in the brains of transgenic mice, 5 Ag of protein was used to test whether this thick band appeared with two bands. Amounts of protein were indicated. (C) Immunoreactivities for APP in the cortex layer (b, d) and throughout the hippocampus (f) are unique to the Tg mouse when compared to those in a non-Tg mouse (a, c, e). The resulting tissues were viewed with a microscope; 40magnification (a, b, e, f) and 400magnification (c, d).

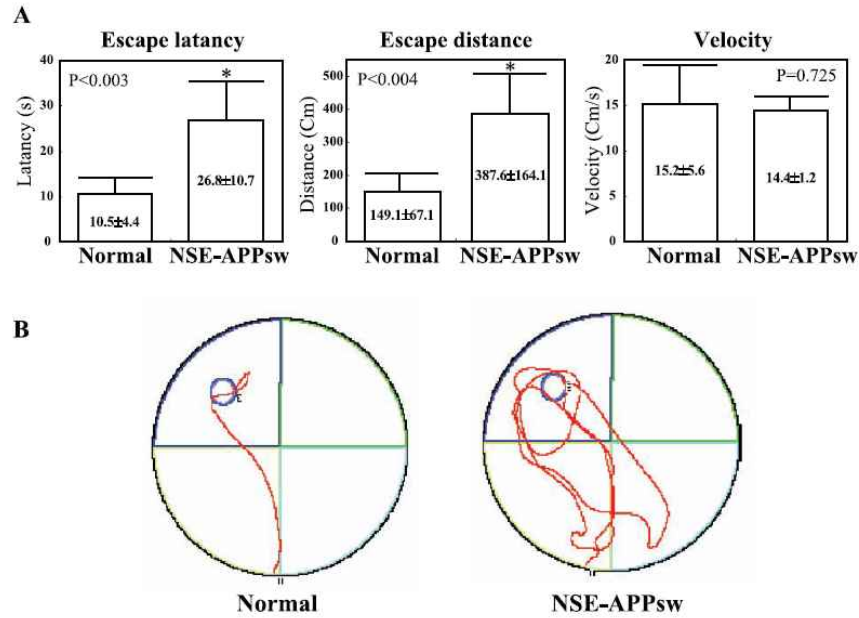


Figure 17. Water maze. (A) Patterns of the escape latency, escape distance, and swimming velocity in crossing to the former platform location in the water maze. Transgenic mice, at 12 months, showed a consistent trend toward longer escape latencies and distances than the control mice. However, the swimming velocity shows only a small difference between the transgenic and age-matched control mice. (B) Patterns of swimming shown in the transgenic and age-matched control mice. The patterns show a significant difference between the transgenic and controls in the crossing to the former platform location. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three to five mice. (Hwang et al., 2004)

라. 당뇨 증상을 나타내는 모델 동물의 확보(OLETF rat)

홍문동의 추출물이 당뇨에 미치는 영향을 평가하기 위하여 제2형 당뇨병 모델인 OLETF rat를 사용하였다. 실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen-free(SPF) 상태의 OLETF rat 마우스(4주령)로서 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 모든 랫드는 방사선 조사된 사료(Purina Com., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12시간의 조명 주기(06:00~18:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 5\%$ )에서 사육하였다(Fig. 18).

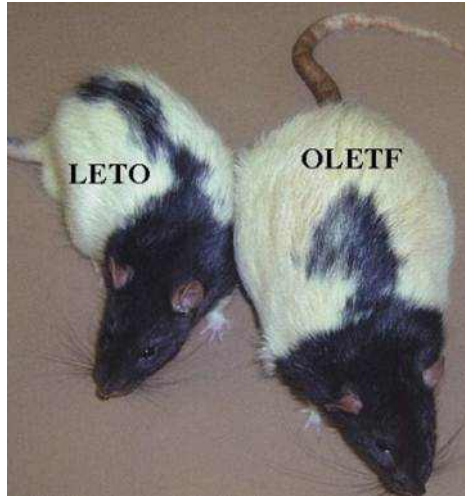


Figure 18. 제2형 당뇨 모델인 OLETF rat

마. 당뇨모델동물의 질병 기초생리자료 확보

OLETF rat은 일본 Otsuka 제약에서 개발한 당뇨병 동물 모델로 급격한 체중 증가가 일어나며, 비만과 함께 나타나는 인슐린 저항성, 고혈당 등의 징후는 제2형 당뇨병 환자에게 나타나는 증상과 유사하며, 비만형 제2형 당뇨병 동물 모델로 널리 이용되고 있다. 12-20주에 인슐린 저항성이 발생하고 18-30주에 걸쳐 고인슐린혈증이 발생하며, 40주 이후에는 췌장 소도세포의 수적 감소에 따른 제1형 당뇨병의 소견을 나타낸다. OLETF rat은 8주령부터 LETO rat보다 체중의 증가가 급격히 증가하며, Triglyceride의 농도가 증가한다. 또한 12주 췌에는 혈당과 인슐린의 농도가 LETO rat보다 증가함을 보인다(Fig. 19)

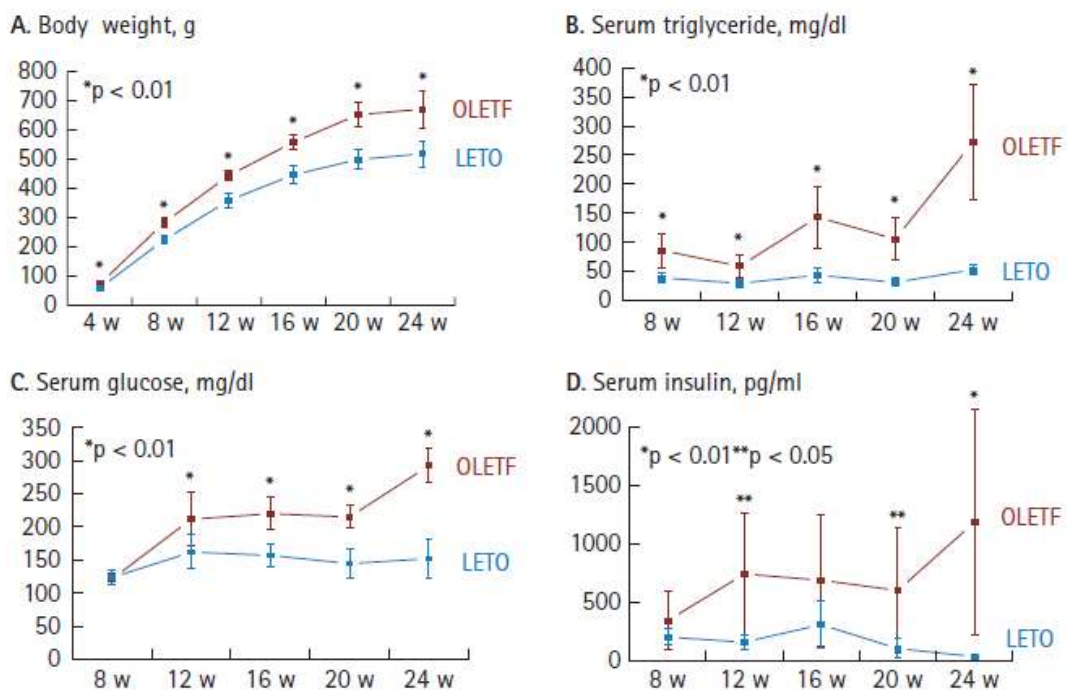




Figure 19. Time courses of body weight (A) and fasting serum levels of triglyceride (B), glucose (C) and insulin (D) in OLETF (red line) and LETO (blue line) rats (10 each). Values are the mean (SD). \*P<0.01, \*\*P<0.05.

#### 4. *In vivo* 생리활성 효능평가

##### 가. 모델동물을 활용한 맥문동의 항당뇨 효능 분석

###### (1) 세포주에서 홍문동이 칼슘농도조절에 미치는 영향

INS cell의 세포내의 칼슘에 대한 홍문동의 농도를 결정하기 위하여, 먼저 홍문동을 다양한 농도(25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 처리하여 Fura-2 assay 방법을 통해 최적농도를 결정하였다. Fura-2는 특정 신호를 주었을 때 변화되는 calcium의 양을 측정하는 방법으로, calcium과의 binding affinity가 매우 높아 미세한 칼슘 농도 변화를 확인할 수 있으며, calcium과 결합하지 않을 때는 380 nM, 결합했을 때는 340 nM로 두 파장의 변화비율에 따라 칼슘의 농도를 측정할 수 있다. 이를 위해 INS cell을 100mm dish에 RPMI 1640 media로 배양한 후, dish에 있는 기존 media는 suction하고, 1xPBS 10 ml로 세척하였다. 거기에 1xTry를 이용하여 cell을 dish로부터 분리하고 media 10 ml resuspend한 후에 원심분리하여 상층액을 제거함으로써 cell을 얻어냈다. 얻어진 cell은 다시 1xPBS 20 ml씩 2번의 washing 과정을 거치고, HKR buffer 10 ml로 더 세척한다. 그리고 나서 HKR buffer 10ml로 resuspend하고 Fura-2-AM 5  $\mu\text{M}$ 로 37°C에서 40분 배양하였다. 배양후에 원심분리하여 상층액을 버리고 새 HKR buffer로 세척한 후 1개의 cuvette에 1.5 ml씩 cell을 나누어 0.2초 간격으로 F4500 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Japna)으로 측정하였다. 물질처리는 측정 시 50초 때에 홍문동을 처리하고, 175초 때에 세포막 투과성물질인 Digitonin, 250초 때에 칼슘과 결합하는 EDTA를 처리하였으며, 300초 일 때 실험을 종료하였다.

그 결과 홍문동 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 처리했을 때 세포내의 칼슘농도는 홍문동의 농도 의존적으로 증가함을 보였다(Fig. 20A-C). 그 중 홍문동 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리했을 때 세포내의 칼슘 농도는 최대로 측정되었다. 그러나 홍문동 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때는 세포내의 칼슘이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 20D). 따라서, INS cell에 세포내 칼슘의 농도를 증가시키는 홍문동의 최적 농도는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때이다.

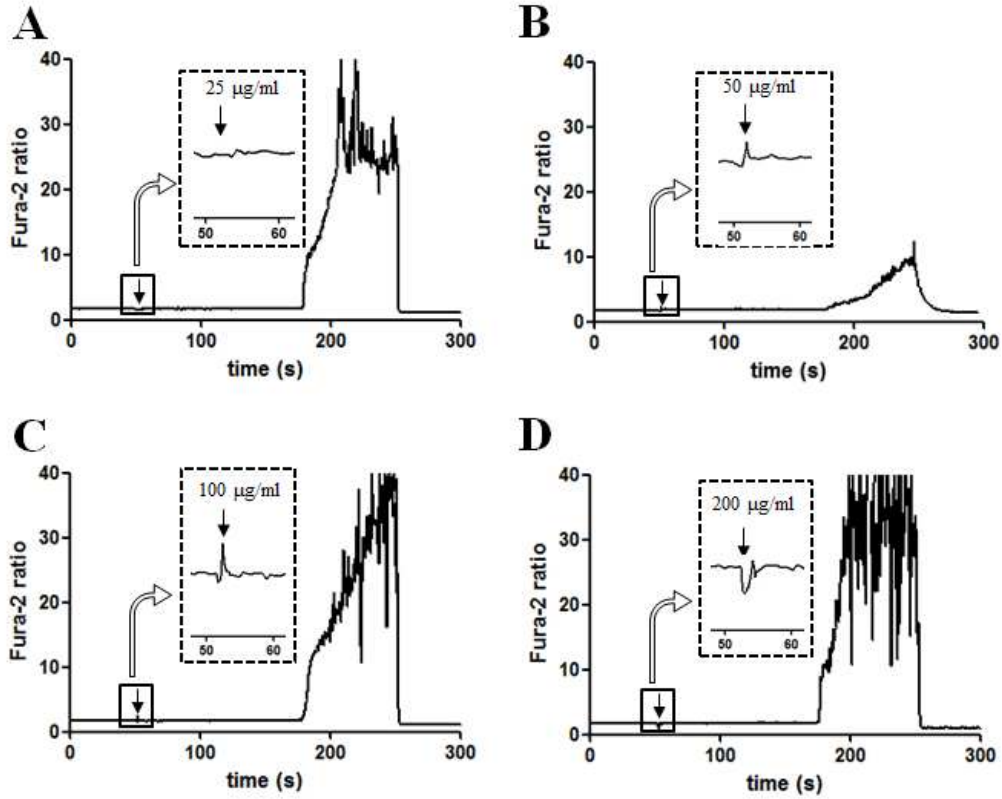


Figure 20. Dose effects of Red L. *Platyphylla* (RLP) on intracellular calcium in INS cells. Fura-2-loaded INS cells were challenged with four different concentration of RLP (25, 50, 100, 200 mg/ml) or vehicle at the time indicated by the arrow. Relative level of intracellular calcium concentration was expressed as fluorescence ratio (340:380 nm). Data are representative of three independent experiments.

INS cell 세포내의 칼슘에 대한 홍문동에 미치는 영향을 알아보기 위하여 물질별(인삼, 홍삼, 맥문동, 홍문동)로 100  $\mu\text{g/ml}$  의 농도로 처리하여 Fura-2 assay 방법을 통해 실시하였다. 그 결과 자연 상태의 인삼, 맥문동 보다 증숙 단계를 거친 홍삼, 홍문동이 INS cell 세포 내의 칼슘에 대한 영향이 더 높은 것으로 측정되었다(Fig. 21). 그 중에서도 홍삼보다는 홍문동을 처리하였을 때 세포내의 칼슘농도를 가장 높게 유도할 수 있다고 확인하였다. 따라서 홍문동은 다른 물질보다 INS cell 세포내의 칼슘 농도의 증가를 자극할 수 있다.

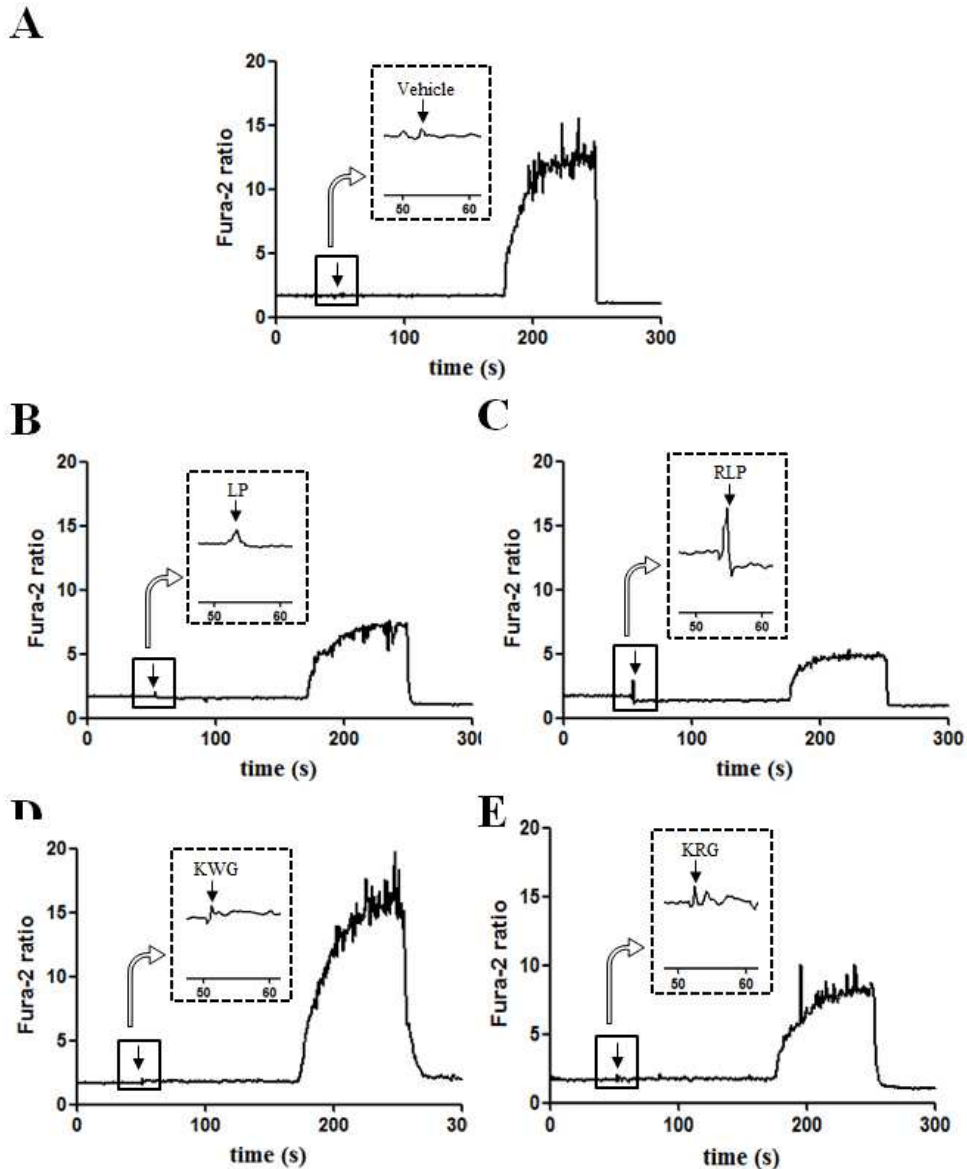


Figure 21. Comparison of Red L. Platyphylla (RLP) on the increase ability of intracellular calcium in INS cells. Fura-2-loaded INS cells were challenged with 100 mg/ml four different samples (LP, RLP, KWG and KRG) or vehicle at the time indicated by the arrow. Relative level of intracellular calcium concentration was expressed as fluorescence ratio (340:380 nm). Data are representative of three independent experiments.

## (2) 동물실험 설계

실험동물은 중앙실험동물에서 4주령을 수령해, 15주령이 될 때에 시작하였다. 랫드를 LETO 군(3마리), OLETF-Vehicle 군(2마리), OLETF-홍문동 처리군(4마리)로 배정하였다. LETO 군과 OLETF-Vehicle 군은 dH<sub>2</sub>O만을, OLETF-홍문동 처리군은 홍문동 추출물 50 mg/kg의 농도로 3

주 동안 경구투여 하였다. 3주 후, 랫드는 CO<sub>2</sub> gas로 마취하고, 조직을 적출하였다. 발효맥문동을 이용한 동물실험은 동일한 방법으로 현재 진행 중이며 6월까지 결과가 도출될 것으로 사료된다.

### (3) 홍문동에 대한 OLETF 랫드의 체중과 혈당에 대한 미치는 영향

홍문동에 대한 OLETF rat의 체중과 혈당의 변화에 대한 효과를 분석하기 위하여 OLETF rat에 홍문동을 50mg/kg의 농도로 3주간 처리하였으며, 홍문동 처리할 때에 Body weight, 포도당 내성 시험(Glucose tolerance test), Mercodia사의 Rat insulin ELISA kit(10-1250-01)를 이용하여 인슐린 분비량을 측정하였다.

포도당 내성 시험을 통한 분석에서는 8시간 이상의 공복을 유지한 상태에서 glucose를 4 mg/kg의 농도로 경구투여한 후, 0, 15, 30, 60, 120분에 꼬리정맥에서 채혈하여 포도당 내성을 분석하였으며, 홍문동에 의한 인슐린 분비량은 Mercodia사의 Rat Insulin ELISA Kit (Cat. 10-1250-01)을 이용하여 권장법에 따라 측정하였다. 홍문동을 최종 처리한 후 24시간 금식한 쥐의 혈액을 채취해, 상온에서 30분 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하였다. ELISA Kit의 각 well에 10  $\mu$ l의 배양액을 넣고, 100  $\mu$ l의 enzyme conjugate solution을 첨가하여 plate shaker에 2시간 방치하여 항원-항체 반응을 유도하였다. 2시간 후 상층액을 제거하고, wash buffer (350  $\mu$ l)를 이용하여 비특이적으로 결합된 단백질이나 결합되지 않은 단백질을 세척하였다. 여기에 200  $\mu$ l의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤 50  $\mu$ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

그 결과 LETO 쥐보다 Vehicle-OLETF 쥐의 체중이 더 높지만, 홍문동을 처리한 그룹과 비교했을 때는 관계가 없었다(Fig. 22A). LETO 랫드와 비교했을 때 OLETF 랫드는 포도당 내성이 높았지만, 홍문동을 처리한 그룹과 비교하였을 때 별 차이를 보이지 않았다. 그러나 초기 포도당 내성은 OLETF의 Vehicle 그룹보다 홍문동을 처리한 그룹에서 더 낮게 측정되었으며(Fig. 22B), 홍문동에 의한 혈당은 그룹별로 변화를 보이지 않았다(Fig. 22C).

Insulin ELISA를 통한 분석에서는 LETO 그룹과 OLETF의 Vehicle보다 홍문동을 처리한 그룹에서 6.4  $\mu$ g/l 로 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 22D). 또한, 유사한 패턴을 Immunostaining 분석을 이용해 췌장의 Islet에서 발견하였다(Fig. 22E). 따라서, 홍문동은 OLETF의 혈청에서 인슐린 분비능을 증가시키는 효과를 보였다.

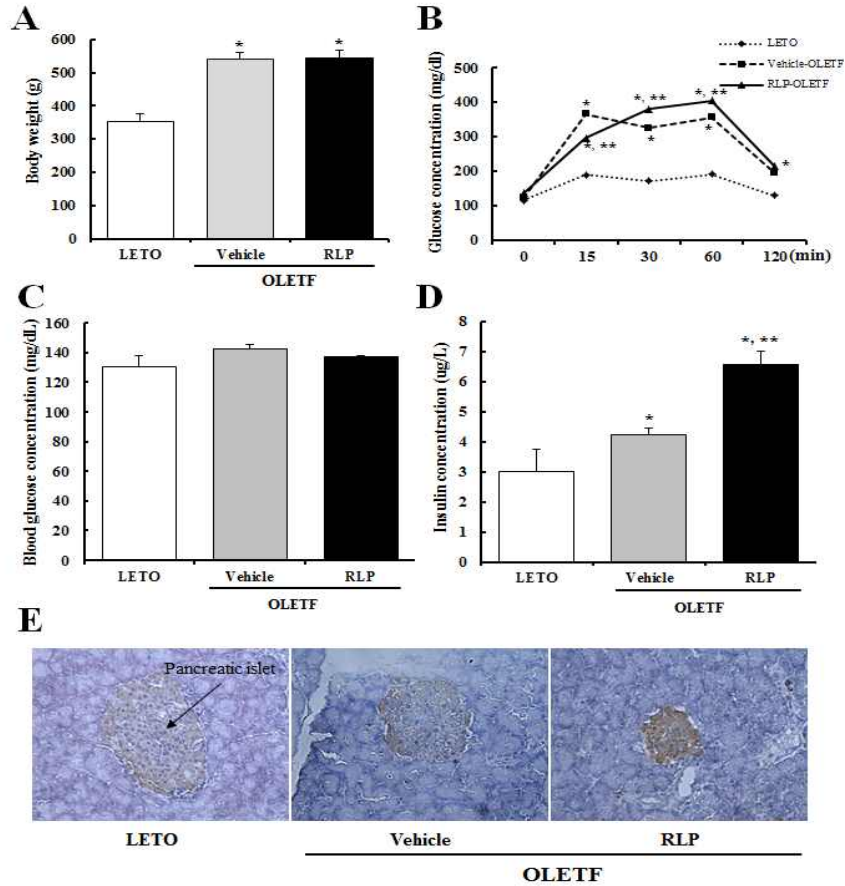


Figure 22. Change in body weight, glucose tolerance response, glucose concentration and insulin concentration after the RLP treatment. (A) Body weight of the rats in the three groups was measured using a chemical balance after the final RLP treatment. (B) The serum glucose level in the OGTT test was monitored over time after an I.P. injection of glucose (2 g/kg BW). A difference in the glucose level was observed between the two groups 15 min after the injection. Five rats per group were assayed in the OGTT test. (C) The rats were treated orally with RLP (50 mg/kg body weight/day) for 3 weeks. The control group received the vehicle only. On the final day, the glucose concentration was measured in the blood collected from the abdominal vein of rats. In addition, the insulin concentration (D) was detected in the serum using ELISA kit. This kit has 0.1 ng/ml of sensitivity and inter-assay coefficient of variation was in the 2.86-5.17 range. (E) Immunostaining analysis for insulin expression. The expression level of insulin was detected in the pancreatic islets of vehicle-treated and AEtLP-treated mice by immunostaining analysis. A high intensity was observed in the pancreatic islets of the RLP-treated rats as compared with the vehicle-treated rats at 200x magnification. The data is reported as the mean  $\pm$  SD from three replicates. \*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the LETO rat. \*\*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the

vehicle-treated OLETF rat.

(4) 홍문동에 대한 OLETF 랫드의 Adiponectin과 Lipid concentration에 대한 미치는 영향

홍문동에 대한 OLETF 랫드의 Adiponectin의 변화에 대한 효과를 보기 위하여 Adiponectin Kit(Cat. AG-45A-0005TP-KI01)를 이용하여 권장법에 따라 측정하였다. 혈청은 홍문동을 최종 처리한 후 24시간 금식한 쥐의 혈액을 채취해, 상온에서 30분 원심분리하여 얻은 Serum을 이용하였다. Adiponectin Kit의 각 well에 Serum 100  $\mu$ l씩 넣고, 1시간 가량 배양하였다. 1시간 후에 상층액을 제거하고, wash buffer(250  $\mu$ l)로 세척하였고, 여기에 secondary antibody 100  $\mu$ l씩 넣고 1시간 배양한다. 1시간 후에 상층액을 제거하고, wash buffer(250  $\mu$ l)로 세척하였고, detector 100  $\mu$ l씩 넣고 1시간 배양하여 검출하게 하였다. 마지막으로 wash buffer(250  $\mu$ l)로 세척하고, substrate (TMB)을 첨가하여 20분 동안 효소반응을 유도한 뒤, 100  $\mu$ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

지질 농도는 OLETF 랫드의 혈청을 이용하였으며, 홍문동을 처리하고 24시간 금식한 후 OLETF 랫드의 복부 정맥에서 채취하여 상온에서 30분 원심분리하여 상층액만을 분리하여 얻은 것이다. 이 혈청은 Automatic Serum Analyzer (HITACHI 74, Japan)을 사용하여 Triglyceride (TG), Cholesterol, Low density lipoprotein (LDL)을 측정하였다.

먼저, OLETF 랫드의 Adiponectin을 분석한 결과 LETO 그룹과 비교하였을 때, OLETF의 Vehicle 그룹에서 증가를 보였다. 게다가 OLETF의 홍문동을 처리한 그룹에서는 Vehicle 그룹보다 Adiponectin의 높은 증가를 보였다(Fig. 23A). 따라서, 홍문동은 OLETF 랫드의 Adiponectin의 농도를 증가시켜준다.

TG, Cholesterol, Low density lipoprotein (LDL)을 포함한 지질 농도의 변화는 다음과 같다. Triglyceride(TG)의 농도는 LETO 그룹보다 OLETF-Vehicle 그룹에서 높은 양상을 보였다. 그러나 OLETF-홍문동 그룹에서 Vehicle 그룹보다 농도가 낮아졌다. 그러나 그 수준이 LETO 그룹만큼은 낮아지지 않았다(Fig. 23B). LDL의 농도는 OLETF-홍문동 그룹이 LETO 그룹과 OLETF-vehicle 그룹보다 낮게 보였으나, Cholesterol 농도는 OLETF-홍문동 그룹에서 높게 나왔다(Fig. 23D). 따라서, 홍문동은 OLETF 랫드의 혈청에서 일부 지질의 농도를 줄이는 데 어느 정도의 영향력이 있다고 본다.

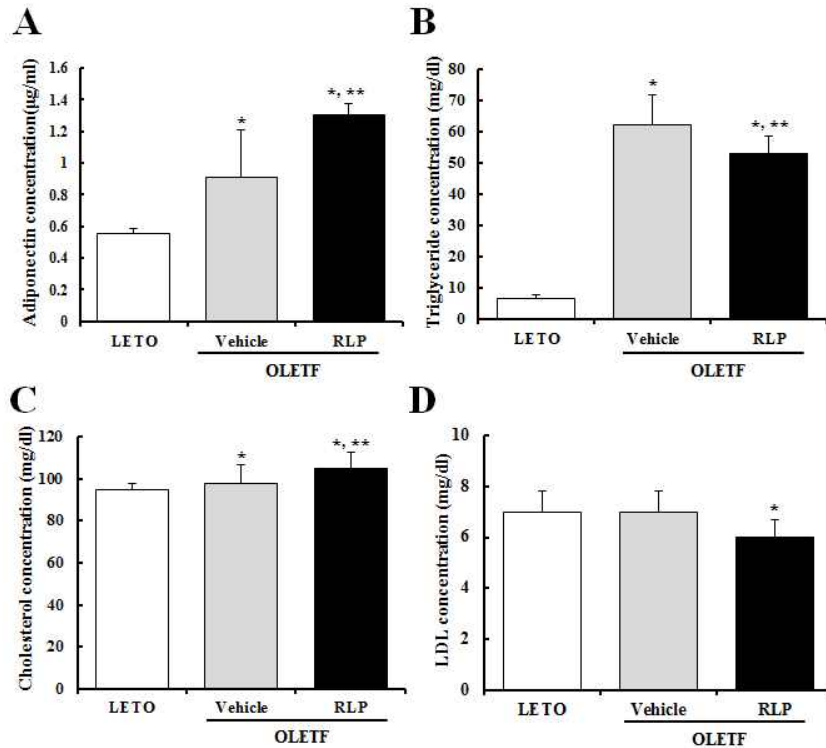


Figure 23. Concentration of adiponectin (A), triglyceride (B), cholesterol (C) and LDL cholesterol (D) in the serum. Blood was collected from the abdominal vein of rats, and triglyceride, cholesterol and LDL were analyzed in triplicate using serum biochemical analyzer. The values are reported as the mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the LETO rat. \*\*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle-treated OLETF rat.

(5) 홍문동에 대한 OLETF 랫드의 지방대사에 대한 미치는 영향

홍문동에 대한 OLETF 랫드의 복부지방의 무게측정 및 지방세포에 관여하는 유전자 발현을 확인하였다. 홍문동 추출물이 지방세포의 마커 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 랫드의 지방조직으로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. 랫드의 지방조직 500 mg을 적출하여 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNA를 추출하였다. RNAzol 추출물에 포함된 단백질을 chloroform을 이용하여 추출한 후 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 수확하였다. 분리된 전체 RNA는 260 nm 흡광도에서 양을 측정하고, 5  $\mu$ g을 RT반응에 사용하였다. RT반응은 RNA에 Oligo dT (Invitrogen, 18418-012)을 처리하고, 70°C에서 10분 동안 반응하여 Oligo dT를 RNA에 결합시켰다. 여기에 5x 완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II(Invitrogen, 18064-014, 200 U/ $\mu$ l)를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치한 후 42°C에서 50분 동안 RT 반응을 수행하였다. RT반응이 끝나면 RNaseH (Invitrogen, 18021-071)를 처리하여 37°C에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 94°C(45 sec), 62°C

(30 sec), 72°C(45 sec) 30 cycle로 유전자 특이적인 서열과 actin의 특이적 서열(5'-TGGAA TCCTG TGGCA TCCAT GAAAC-3'and 5'-TAAAA CGCAG CTCAG TAACA GTCCG-3')을 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 유전자는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 UV에서 관찰하였다.

그 결과, 복부지방의 무게는 OLETF-Vehicle 그룹에서 LETO 그룹과 비교하여 675% 증가되었다. 그러나 OLETF-홍문동 그룹에서는 OLETF-Vehicle과 비교하여 큰 차이가 없었다(Fig. 4-11A). 게다가, 지방세포의 평균 크기는 LETO 그룹보다 OLETF-Vehicle 그룹에서 161% 정도 크기의 차이를 보였지만, OLETF-홍문동 그룹과는 별 차이를 보이지 않았다(Fig. 24A). 따라서, 홍문동은 OLETF 랫드의 지방 질량과 지방세포의 크기에는 영향을 미치지 않는다.

홍문동이 OLETF 랫드의 지방세포의 마커 유전자에 영향을 알아보기 위해 PPAR $\gamma$ , aP2, Leptin, VLCAD, MCAD의 발현을 확인한 결과, 홍문동을 처리하기 전에 PPAR $\gamma$ , aP2, Leptin의 발현은 LETO 그룹보다 OLETF-Vehicle에서 높았다. 반면에 OLETF-홍문동 그룹은 PPAR $\gamma$ 와 Leptin은 OLETF-Vehicle보다 49%, 39% 감소하였으며, aP2의 발현은 OLETF-홍문동 그룹에서 제일 높았다(Fig. 24B). 따라서, 홍문동은 비만대사를 조절하는 leptin과 PPAR $\gamma$ 의 발현 억제를 조절할 수 있다.

복부지방에서의 지방산 산화에 대한 유전자의 발현을 알아보기 위해 VLCAD, MCAD의 발현을 확인한 결과, OLETF-Vehicle 그룹은 LETO 그룹보다 발현이 낮았지만, OLETF-홍문동 그룹은 OLETF-Vehicle 그룹보다 VLCAD, MCAD의 발현이 증가하였다. 따라서, 홍문동은 VLCAD와 MCAD의 높은 발현을 나타내었다(Fig. 24C).



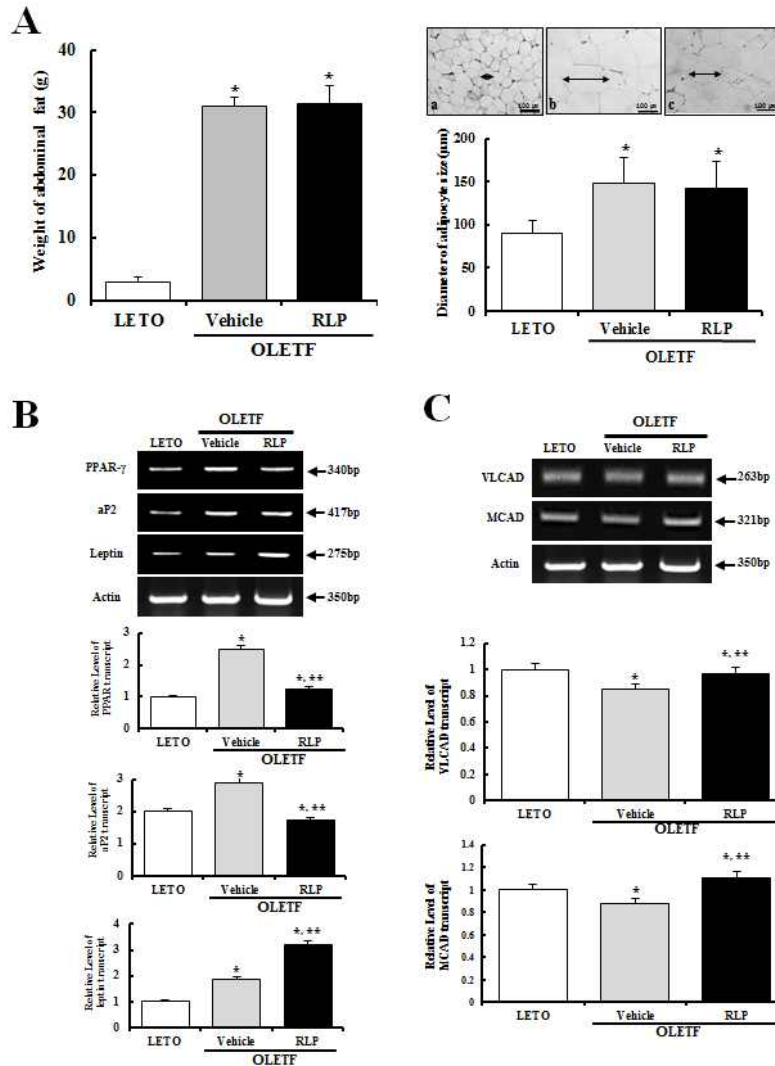


Figure 24. Changes in the fat metabolism in abdominal fat after RLP treatment for 3 weeks. (A) After the final administration, they were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber and the abdominal fat was collected from the abdominal cavity. Their weight was measured in triplicate on a chemical balance. The abdominal fat collected from the rats was fixed in 4% formalin and stained with H&E solution. The longest diameter of the adipocytes was measured in triplicate using a Leica Application Suite (Leica Microsystems, Switzerland) and is regarded as the cell size. (B) Expression of adipocyte marker gene in abdominal fat. The level of PPAR $\gamma$  (340-bp), aP2 (417-bp) and leptin (275-bp) mRNA was determined by RT-PCR. (C) Expression of the VLCAD and MCAD genes in abdominal fat. The levels of VLCAD (263-bp) and MCAD (321-bp) mRNA were determined by RT-PCR. The  $\beta$ -actin signal was used as the control, and the transcript (350-bp) indicates the RNA loading. The density of transcript was quantified using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120. The values is reported as the mean $\pm$ SD. \*

p<0.05 is the significance level compared to the LETO rat. \*\* p<0.05 is the significance level compared to the vehicle-treated OLETF rat.

(6) 홍문동에 대한 OLETF 랫드의 간에서의 지방대사에 대한 미치는 영향

홍문동에 대한 OLETF 랫드의 간 지방대사에 대한 미치는 영향을 알아보기 위하여 간조직에서 지방산 산화의 지방 축적과 RT-PCR을 실시하여 유전자 발현을 확인하였다. 랫드의 간조직으로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. 랫드의 간조직 100 mg을 적출하여 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNA를 추출하였다. RNAzol 추출물에 포함된 단백질은 chloroform을 이용하여 추출한 후 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 수확하였다. 분리된 전체 RNA는 260 nm 흡광도에서 양을 측정하고, 5  $\mu$ g을 RT반응에 사용하였다. RT반응은 RNA에 Oligo dT (Invitrogen, 18418-012)을 처리하고, 70°C에서 10분 동안 반응하여 Oligo dT를 RNA에 결합시켰다. 여기에 5x 완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II (Invitrogen, 18064-014, 200 U/ $\mu$ l)를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치한 후 42°C에서 50분 동안 RT 반응을 수행하였다. RT반응이 끝나면 RNaseH (Invitrogen, 18021-071)를 처리하여 37°C에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 94°C(45 sec), 62°C(30 sec), 72°C(45 sec) 30 cycle로 Shin *et al.*, 2010에 사용된 Primer의 특이적인 서열과 actin의 특이적 서열(5'-TGGAA TCCTG TGGCA TCCAT GAAAC-3' and 5'-TAAAA CGCAG CTCAG TAACA GTCCG-3')을 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 유전자는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 UV에서 관찰하였다.

그 결과, H&E staining으로 확인된 지방간의 형성은 LETO 그룹보다 OLETF-Vehicle 그룹에서 높았다. 그러나 OLETF-홍문동 그룹은 지방간의 형성이 LETO 그룹의 수준까지 현저히 감소하였다(Fig. 25A). 지방세포의 마커 유전자인 aP2와 leptin의 발현은 LETO 그룹과 비교하였을 때, OLETF-Vehicle, 홍문동 그룹에서는 증가하였으나, PPAR $\gamma$ 는 감소하였다(Fig.25B). 그러나 OLETF-홍문동 그룹에서 PPAR $\gamma$ 와 aP2의 발현 수준은 LETO 그룹의 수준과 비슷하나, leptin의 발현은 LETO 그룹의 수준보다 높음을 나타내었다. 따라서, 홍문동은 비만신진대사를 제어하는 PPAR $\gamma$ , aP2, leptin의 발현을 조절하는데 영향을 미친다.

간에서의 지방산 산화의 유전자 발현을 알아보기 위해 VLCAD와 MCAD의 발현량을 측정한 결과, LETO 그룹보다 OLETF-Vehicle 그룹에서 약간 감소하였다. 그러나 OLETF-홍문동 그룹에서는 OLETF-Vehicle 그룹과 비교할 때 증가하였다(Fig. 25C). 따라서, 홍문동은 OLETF 랫드의 지방산 산화에 대한 유전자 발현에 영향을 미친다.

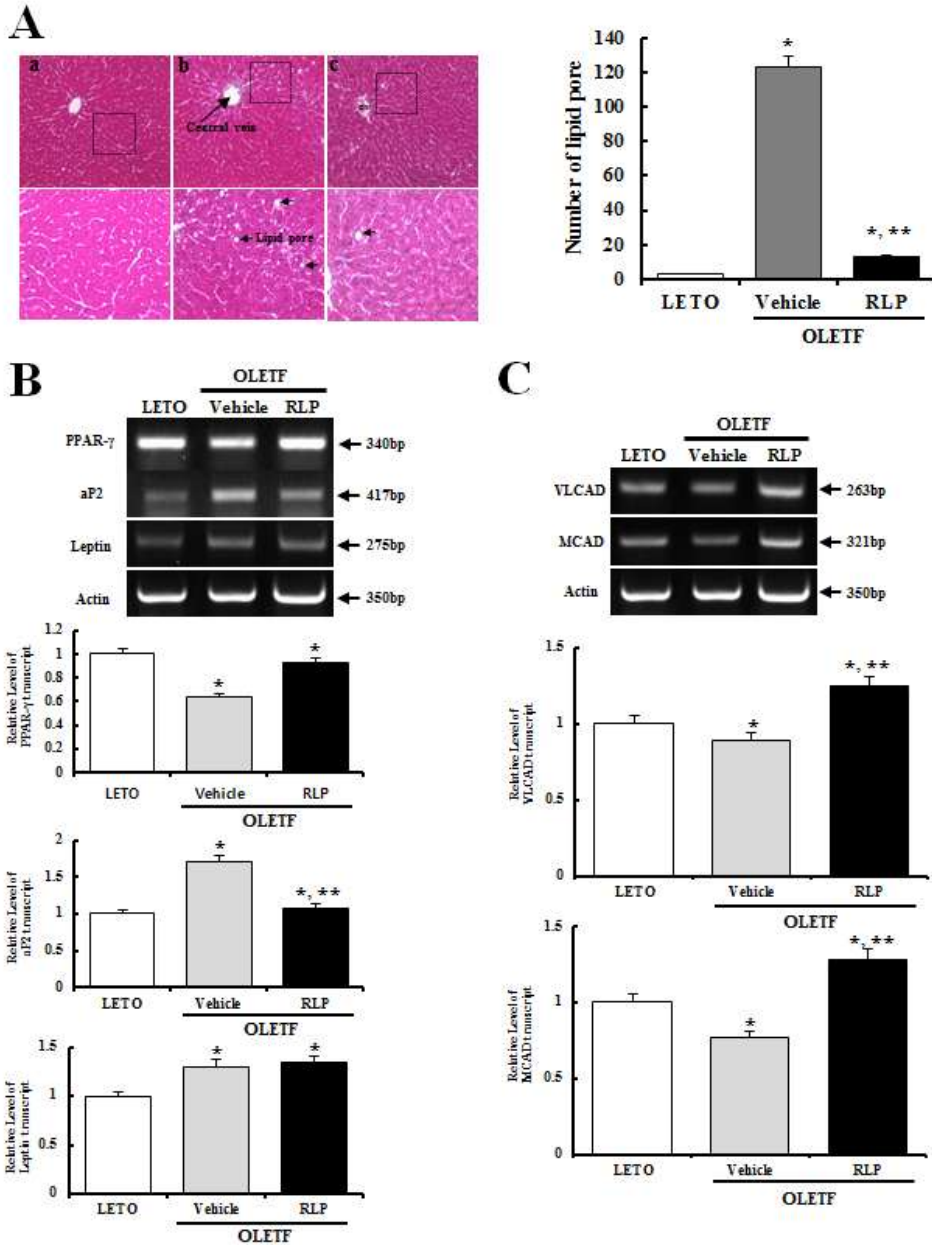


Figure 25. Changes in the fat metabolism in the liver after a RLP treatment for 3 weeks. (A) After final administration, the rats are euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber and the liver was collected from the abdominal cavity. Their weight was measured in triplicate on a chemical balance. The liver collected from the rats was fixed in 4% formalin and stained with H&E solution. The number of lipid pore was counted in triplicate using a Leica Application Suite (Leica Microsystems, Switzerland). (B) Expression of the adipocyte marker gene in liver tissue. The level of PPAR $\gamma$  (340-bp), aP2 (417-bp) and leptin (275-bp) mRNA was measured by RT-PCR. (C) Expression of the VLCAD and MCAD genes in liver tissue. The levels of VLCAD (263-bp) and MCAD (321-bp) mRNA were detected by RT-PCR. The  $\beta$ -actin signal was used as the control, and the transcript (350-bp) indicates the RNA loading. The

density of the transcript was quantified using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120. The values are reported as the mean $\pm$ SD. \*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the LETO rat. \*\*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle-treated OLETF rat.

가. 모델동물을 활용한 맥문동의 항치매 효능 분석

(1) 동물실험의 설계

또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호:PNU-2011-000220)을 받아 수행되었다. 실험에 사용된 NSE/hAPP<sup>sw</sup> 마우스는 치매 유발물질인 A $\beta$ -42 plaque가 대뇌에서 발견되는 형질전환 마우스로서, 치매 연구를 위해 사용되는 모델이다. 12개월령의 Tg 마우스를 식약청에서 구입하였으며, 실험동물을 3마리씩 2군(Vehicle 처리군, 홍문동 처리군)으로 무작위로 배정하였다. Vehicle 처리군은 멸균된 물을 3주 동안 9회에 걸쳐 경구투여 하였고, 홍문동 처리군은 격일로 3주 동안 홍문동 50 mg/ml의 농도로 경구투여하였다. 3주 후, 마우스는 Zoletil 1 ml/kg을 투여하여 마취하고, 혈액과 조직들을 적출하였다. 발효맥문동을 이용한 동물실험은 동일한 방법으로 현재 진행 중이며 6월까지 결과가 도출될 것으로 사료된다.

(2) NGF 분비량에 미치는 영향

이전 연구를 통해, *in vitro* 분석에서 맥문동을 3시간 증숙과 24시간 건조과정을 7회 반복하여 제조한 홍문동을 50 ug/ml 농도로 처리한 신경세포, B35 cell에서 가장 높은 NGF를 분비함을 확인하였다. 이번 연구에서는 *in vivo*에서 홍문동이 Nerve growth factor (NGF) 분비에 대한 효과를 분석하기 위하여, 부검시 얻은 혈청으로 Millipore사의 NGF ELISA kit를 이용하여 NGF 분비량을 측정하였다. NGF는 cholinergic 뉴런의 가장 강력한 성장요인이며, 증식, 분화, 생존과 신경세포의 사멸에 영향을 미친다. NGF는 일부 cytokines 혹은 맥문동 추출물에 반응하는 다양한 세포형태에 의해서 생산되는데, NGF를 생산하는 세포는 neuron, inflammatory cell (lymphocytes 혹은 mast cell), structural cell (fibroblast, epithelial cell, smooth muscle cells) 등이 포함되지만, 맥문동의 butanol과 ethanol fraction은 primary astrocyte cell과 마우스에서도 발현을 유도한다. NGF 분비량은 Millipore의 NGF ELISA kit를 구입하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저 마우스의 혈청을 ELISA kit의 각 well에 100  $\mu$ l의 배양액을 넣고, plate sealer로 plate를 덮고 밤새동안 배양하였다. Plate를 wash buffer 250  $\mu$ l로 4번 세척하고, anti-mouse NGF monoclonal antibody 100  $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 2시간 후 wash buffer로 4번 세척해주고, peroxidase conjugated donkey anti-mouse IgG polyclonal antibody 100  $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 여기에 100  $\mu$ l의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤, 100  $\mu$ l의 stop

solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro- reader, MDS Co., USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 그 결과, 홍문동을 처리한 Tg 마우스의 혈청에서 NGF의 농도가 150% 더 높게 나타났다(Fig. 26). 이러한 결과를 통해 홍문동 처리가 NSE/hAPP<sup>sw</sup> Tg 마우스에서 NGF의 분비를 촉진시킴을 알 수 있다.

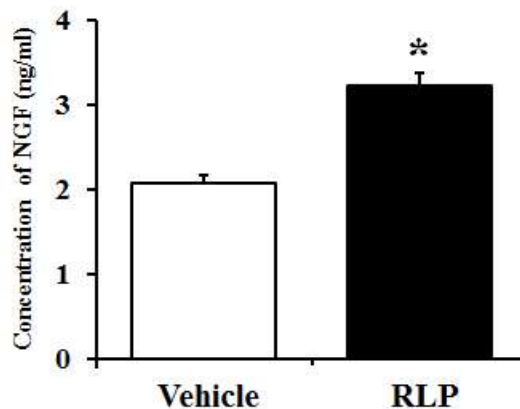


Figure 26. The NGF concentration in the blood serum of NSE/hAPP<sup>sw</sup> Tg mice was measured using an anti-NGF ELISA kit. The data is reported as the mean  $\pm$  SD of three experiments. \*P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

### (3) 홍문동이 NGF receptor TrkA signaling pathway에 미치는 영향

NGF receptor 중에서 TrkA receptor는 high affinity를 갖는다. NGF가 target cell의 원형질막에서 발견되는 high-affinity tyrosine kinase receptor인 TrkA에 결합하면, 각 수용체의 내재성 tyrosine kinase activity가 각 상대 수용체를 인산화하도록 한다. 인산화된 TrkA 수용체는 Ras 단백질과 ERK/p-ERK 등의 단계적인 반응을 유발하고, 다양한 단백질 kinase 활성의 결과를 가져온다. 이들 kinase의 일부는 CREB과 같은 전사 활성인자를 활성화시키기 위해 핵으로 이동시킨다. NGF 경로의 Ras-based component는 기본적으로 NGF-sensitive neuron의 분화를 유도하고 유지하는 역할을 한다. 또한 TrkA의 인산화는 세포 사멸을 억제하는 단백질 kinase (Akt kinase)의 활성을 유도하며, 교감신경과 감각 뉴런의 NGF-dependent 생존을 매개한다. 홍문동의 증속시간이 TrkA와 TrkA downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다.

Vehicle 처리군과 홍문동 처리군 마우스 뇌조직 100 mg을 정량하여, PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30-50 ug의 단백질을 western

blot에 사용하였다. 먼저, 4-20% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-TrkA 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-TrkA 항체(Cell Signaling Technology), anti-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-ERK 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-p-ERK 항체(Santa Cruz Biotechnology), anti-β-actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, TrkA의 발현은 Vehicle 처리군보다 흥분동 처리군에서 감소하였고, down signaling pathway에 있는 Akt의 인산화는 유의적인 변화를 나타내지 않았지만, ERK의 인산화는 흥분동 처리군에서 약간 증가하였다 (Fig. 27). 이러한 결과를 통해, 흥분동이 NGF receptor TrkA signaling pathway에서 유의적인 변화를 유도함을 알 수 있다.

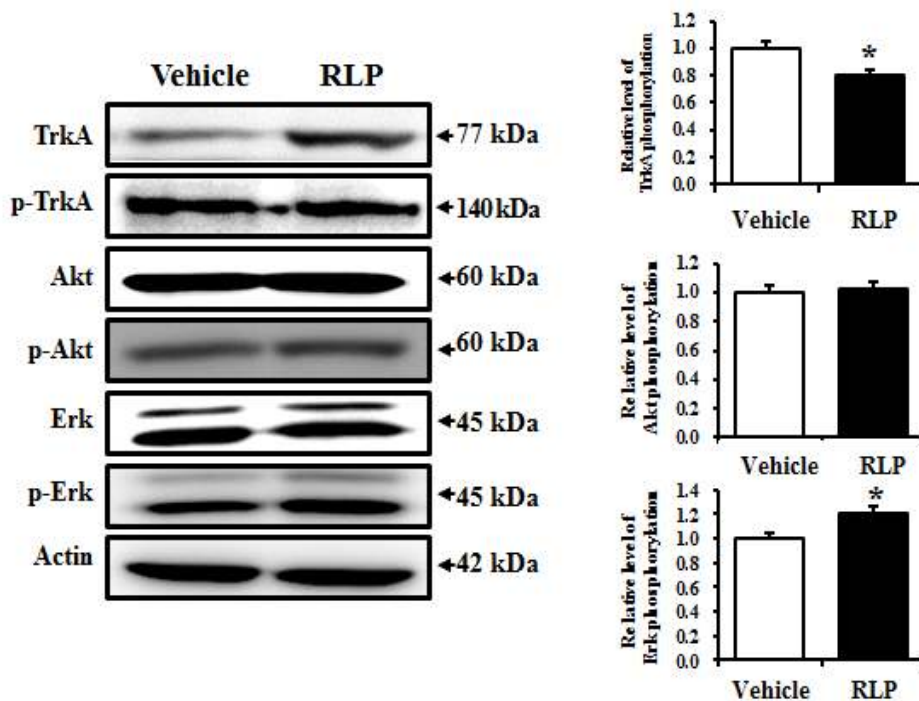


Figure 27. Effects of RLP on the down-stream signaling pathway of the high affinity NGF receptor, TrkA signaling pathway. The total cell lysates were prepared from brain cortex of NSE/hAPPsw Tg mice treated with the vehicle and RLP as described in the Materials and Methods sections. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with the antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate by Western blotting. The data is reported as the mean  $\pm$  SD of three experiments. \*P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

(4) 흥분동이 NGF receptor p75<sup>NTR</sup> signaling pathway에 미치는 영향

NGF receptor 중에서 p75<sup>NTR</sup> receptor는 low affinity를 갖는다. Low affinity receptor인 p75<sup>NTR</sup>는 G-protein receptor family에 속하며, 세포질 부위에 chopper domain과 death domain을 갖고 있어 신호전달을 수행한다. 흥분동의 증속시간이 p75<sup>NTR</sup>와 p75<sup>NTR</sup> downstream signaling pathway에 미치는 영향을 알아보기 위하여, western blot을 통해 분석하였다. Vehicle 처리군과 흥분동 처리군 마우스 뇌조직 100 mg을 정량하여, PRO-PREP Protein Extraction Solution을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit을 이용하여 정량하였으며, 30-50 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 4-20% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 ECL membrane에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-p75<sup>NTR</sup> 항체(Cell Signaling Technology), anti-RhoA 항체(Cell Signaling Technology), Bax 항체 (Abcam, Cambridge, UK), Bcl-2 항체 (Abcam), Caspase-3 항체 (Abcam), anti-β-actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, p75<sup>NTR</sup>의 발현과 down stream signaling pathway에 있는 RhoA의 발현은 흥분동 처리 그룹에서 감소하였다(Fig.28 Left). 또한 apoptosis 관련 단백질인, Bcl-2, Bax, casepase-3의 발현을 살펴보았다(Fig.28 Right). Bcl-2/Bax의 발현 비율은 흥분동 처리군에서 더 낮게 나타났으나, Caspase-3의 발현 흥분동 처리군에서 회복되었다. 이러한 결과를 통해, 흥분동이 NGF 수용체 p75<sup>NTR</sup> signaling pathway에서 유의적인 변화를 유도함을 알 수 있다.

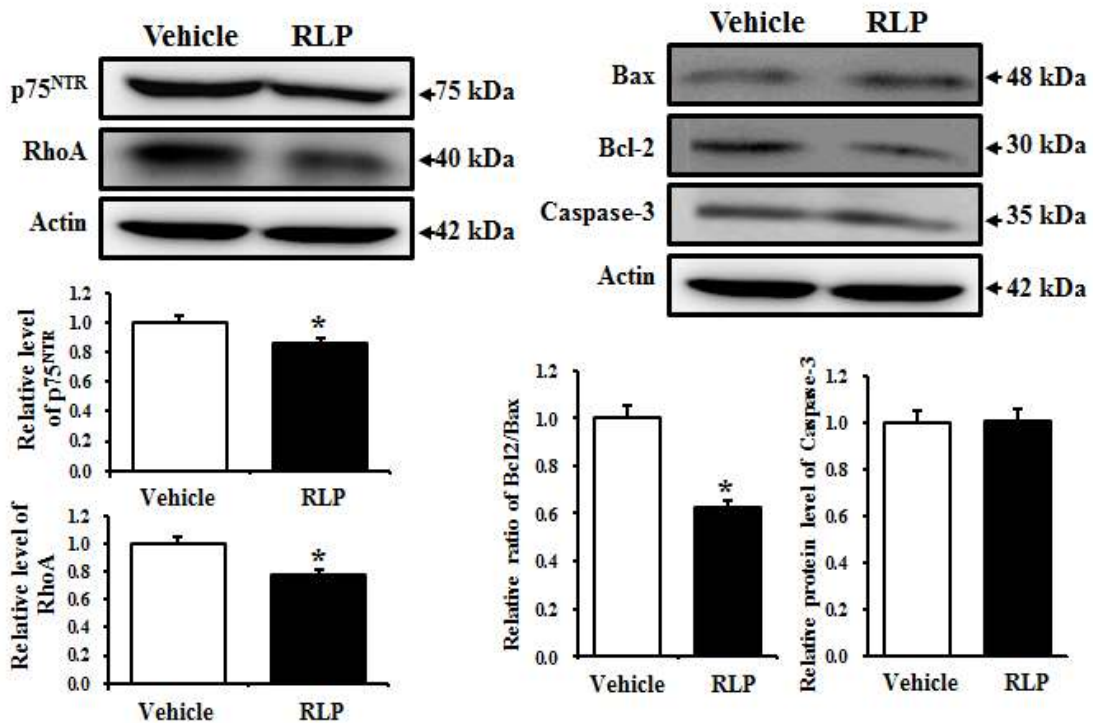


Figure 28. Effects of RLP on the down-stream signaling pathway of the low affinity

NGF receptor, p75<sup>NTR</sup> signaling pathway. The total cell lysates were prepared from brain cortex of NSE/hAPPsw Tg mice treated with the vehicle and RLP as described in the Materials and Methods sections. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with the antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate by Western blotting. The data is reported as the mean  $\pm$  SD of three experiments. \*P<0.05 is the significance level relative to the vehicle-treated group.

##### (5) 홍문동이 A $\beta$ -42 발현에 미치는 영향

치매는 뇌조직에 A $\beta$ -42 펩타이드의 과량축적으로 신경세포의 병적인 상태를 나타내는 신경퇴행성 질환이다. 따라서 홍문동이 A $\beta$ -42의 발현에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여, 면역염색과 Dot-blot, Human A $\beta$ -42 ELISA 분석을 실시하였다. 먼저, perfusion을 수행하여, 실험동물에서 적출한 조직을 10% formalin용액에서 48시간 고정하였다. 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 10  $\mu$ m의 크기로 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기 (Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisherr Scientific, Bakewell, England)를 이용하여 alcoco 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 embedding 한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤, Rotary Microtome (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 블록(block)을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후, 광학현미경(Olympus, PA, USA)으로 관찰하였다(Data is not shown). 또한 면역염색은 조직절편을 0.02 M 인산염완충액(pH 7.4; PBS)에서 약 10분 동안 2회 수세한 후 내재성 과산화효소의 활성을 제거하기 위해 0.3% 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 포함된 메틸알코올을 첨가시킨 용액에서 20분간 처리하고, PBS로 10분간 3회 세척한 다음 5% 정상 말 혈청(normal horse serum)에 30분간 두었다. 그 후 조직절편들을 세척하지 않고 가볍게 털어 낸 다음 일차항체인 anti-A $\beta$ -42 antibody (희석비율 1 : 100, Invitrogen Corporation, CA, USA)를 4 °C에서 overnight 배양시킨다. 그 다음, PBS로 10분씩 3회 세척하였고, 이어서 이차항체인 (goat anti-rabbit)-conjugated HRP streptavidin (Histostain-Plus Kit; Zymed, South San Francisco, CA, USA)를 1:1,500 비율로 희석하여 실온에서 1시간 동안 배양시켰다. 그 다음 이들 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6; Tris buffer)에 0.05% DAB (3, 3' -diaminobenzine tetrahydrochloride, Invitrogen)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 처리하여 약 10분간 실온에서 발색시켰다. 조직절편의 정색상태를 현미경 하에서 확인한 후 Tris buffer, PBS 및 증류수에서 각각 10분간씩 차례로 세척한 다음, Harris' hematoxylin 으로 대조염색을 하고, 통상적인 과정을 거쳐 Permount (Polysciences, USA)로 봉입하여 BX50F-3 optical microscope (Olympus, Tokyo, Japan)을 통해 확인하였다. 그 결과 Vehicle 처리군보다 홍문동 처리군에서 해마부(hippocampus)의 CA1, CA2, CA3 부위와 DG 부위에서 열



게 염색되었다(Fig. 29). 이러한 결과는 홍문동의 처리가 A $\beta$ -42 펩타이드의 농도를 감소시킴을 시사한다.

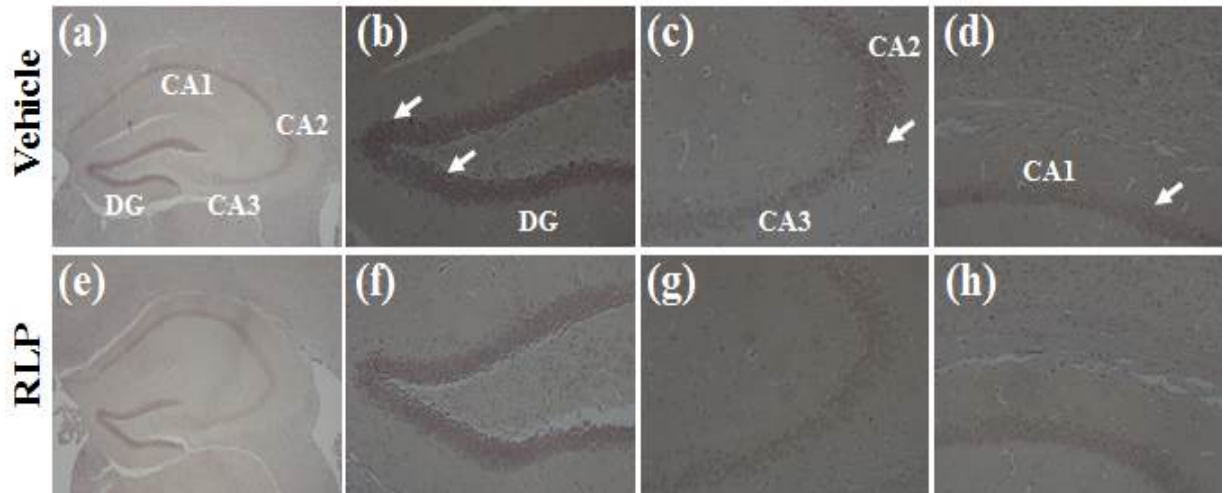


Figure 29. Effects of RLP on the production of A $\beta$ -42 peptides. Immunostaining analysis of A $\beta$ -42 peptides accumulation. The production of A $\beta$ -42 peptides in the brain at 10-months of age NSE/hAPPsw Tg mice was detected by immunostaining. A low intensity was observed in the hippocampus (CA1-3) and DG of the RLP-treated NSE/hAPPsw Tg mice (e) as compared with the vehicle-treated mice (a) at 200x magnification. Also, the detail histological features of several regions in hippocampus were showed in beside three rectangles at 400x magnification (b-d and f-h).

또한, 홍문동이 뇌에서 A $\beta$ -42 생성에 미치는 영향을 단백질 수준으로 확인하기 위해, 적출된 Tg 마우스의 뇌로부터 추출한 단백질을 Dot Blot analysis를 수행하였다. 단백질을 Slot Blot (Pharmacia Biotech, CA, USA)을 이용하여 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. Membrane은 한시간동안 실온에서 블로킹 한 후, 일차 항체인 rabbit polyclonal anti-A $\beta$ -42 antibody로 배양하였다. 그 후, wash buffer로 세척하고, 이차항체인 horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (GenTest, MA)를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 배양하였으며, ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과 Vehicle 처리군보다 홍문동 처리군에서 A $\beta$ -42의 농도가 감소하였다(Fig. 30).

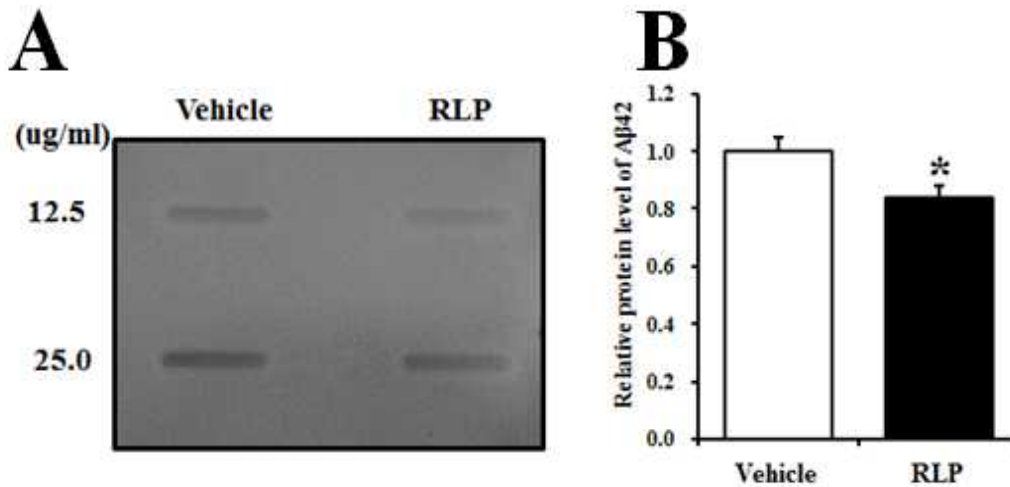


Figure 30. Effects of RLP on the production of A $\beta$ -42 peptides. The production of A $\beta$ -42 peptides in the brain at 12-months of age NSE/hAPPsw Tg mice was detected by dot blot analysis. The data is reported as the mean  $\pm$  SD. \*P<0.05 is the significance level compared to the mice treated with the vehicle-treated.

더 나아가, 홍문동이 뇌조직에서 soluble한 A $\beta$ -42의 발현에 미치는 영향에 대해 분석하고자, 부검시 얻은 혈청으로 Invitrogen사의 Human A $\beta$ -42 ELISA kit를 이용하여, 권장법에 따라 A $\beta$ -42 분비량을 측정하였다. 먼저 Tg 마우스의 뇌조직을 100 mg 정량하여, guanidine-tris buffer (5.0 M guanidine HCl/ 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 사용하여 조직을 균질화하였다. 균질화된 sample 또는 standard를 ELISA kit의 각 well에 넣고, Human A $\beta$ -42 detection antibody solution을 첨가하여, plate sealer로 plate를 덮고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새동안 배양하였다. Plate를 wash buffer 200  $\mu$ l로 3번 세척하고, HRP conjugated antibody 100  $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 shaking 배양하였다. 30분 후 wash buffer로 3번 세척해주고, 여기에 100  $\mu$ l의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 30분 동안 효소반응을 유도한 뒤, 100  $\mu$ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS Co., USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 그 결과, 홍문동 처리군에서 낮은 soluble A $\beta$ -42의 농도를 나타내었다(Fig. 31).

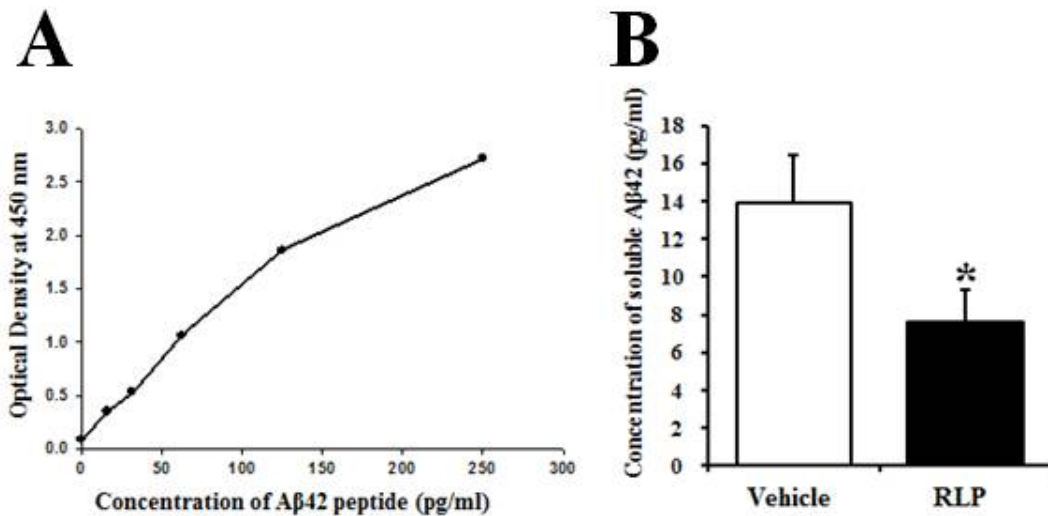


Figure 31. Effects of RLP on the production of Aβ-42 peptides. The production of Aβ-42 peptides in the brain at 12-months of age NSE/hAPPsw Tg mice was detected by Aβ-42 ELISA analysis. The data is reported as the mean ± SD. \*P<0.05 is the significance level compared to the mice treated with the vehicle-treated.

(6) 홍문동이 γ-secretase components 발현에 미치는 영향

이러한 치매 질병의 원인이 되는 Aβ-42 펩타이드는 β-secretase와 γ-secretase의 연속적인 단백질 절단에 의해 APP (Amyloid precursor protein) 단백질로부터 생성된다. γ-secretase는 Presenilin-1 (PS-1), PS-2, Nicastrin (NCT), APH-1, 그리고 Pen-2로 구성된 multimeric transmembrane 단백질 복합체이며, 세포 내 Notch, E-cadherin, CD44등 다양한 기질을 절단하여 대사반응을 조절한다. γ-secretase를 구성하는 복합체 단백질들의 상호간 결합은 특이적 차이가 존재하지만 복합체를 구성하는 개별 단백질들의 과발현은 γ-secretase 활성의 증가를 통해 Aβ-42 펩타이드의 증가를 유도한다. 그래서 홍문동이 γ-secretase components의 발현에 미치는 영향에 대해 알아보고자, western blot을 통해 분석하였다.

Vehicle 처리군과 홍문동 처리군 마우스 뇌조직 100 mg을 정량하여, PRO-PREP Protein Extraction Solution을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit을 이용하여 정량하였으며, 30-50 ug의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 4-20% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후, ECL membrane 에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-PS-2 항체(Cell Signaling Technology), anti-APH-1 항체(Sigma-Aldrich), anti-NCT 항체(Cell Signaling Technology), anti-Pen-2 항체(Santacruz Biotechnology), anti-β-actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4℃에서 밤새 배양한 후, HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여

발현을 확인하였다.

그 결과, PS-2의 full length와 C-terminal는 변화가 없었으나, APH-1과 NCT의 발현은 흥분동 처리군에서 Vehicle 처리군보다 상당히 감소하였다(Fig. 32). 반면, Pen-2의 발현은 흥분동 처리군에서 Vehicle 처리군보다 증가하였다. 따라서 이러한 결과는 흥분동 처리가 NSE/hAPP<sup>sw</sup> Tg 마우스의 뇌조직에서  $\gamma$ -secretase components의 발현을 조절함을 시사한다.

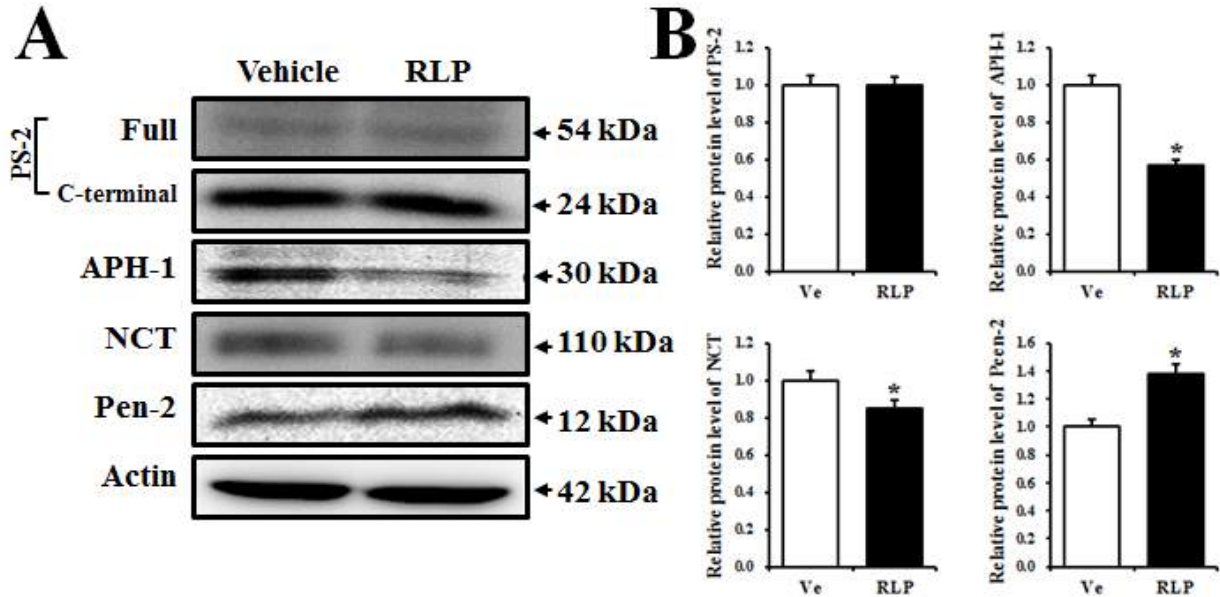


Figure 32. Expression of  $\gamma$ -secretase components in brain cortex of NSE/hAPP<sup>sw</sup> Tg mice. The cortex region was prepared from brain tissue of vehicle- and RLP-treated Tg mice. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibody for each protein. The expression of four  $\gamma$ -secretase components was detected with specific antibody as described in Materials and Methods, and horseradise peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG. The intensity of each protein was calculated using an imaging densitometer. The data represents the mean  $\pm$  SD from three replicates. \*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle-treated group.

## 5. 홍문동의 독성시험

### 가. GLP 시험 프로토콜 확립

산업활동의 급격한 증가와 더불어 화학물질이 환경 및 인간건강에 미치는 악영향은 날로 심각해지고 있으며 이에 따라 화학물질 위해성 평가는 각 나라의 환경정책에서 매우 중요한 부분을 차지하게 되었다. 화학물질 위해성 평가에서 독성시험 자료의 신뢰성 확보는 그 결과에 따른 화학물질 적정관리 방안도출에 있어서 가장 핵심적 사항이며 전체 관리과정의 요체이자 첫 출발점이라고도 할 수 있다. 이러한 맥락에서 국제적으로는 경제협력개발기구(OECD)를 중심으로 독성시험 성적서의 상호인정을 위해 GLP운영기준(GLP)과 시험지침(test guideline)을 제정하고 각 회원국이 이를 준수할 것을 규정하고 있다. 우리나라 부처별 GLP 운영은 대상물질에 따라 분류가 되며 의약품 및 화장품의 경우 식품의약품안전청에서 운영이 된다. 시험 항목으로는 단회투여독성시험, 반복투여독성시험, 생식·발생독성시험, 유전독성시험, 면역독성시험, 발암성시험, 국소독성시험, 기타독성시험으로 구성된다. GLP(good laboratory practice)는 의약품의 비임상적 안전성 평가를 위해 수행하는 비임상 시험의 신뢰성을 보증하기 위하여 시험기관의 지정, 관리기준, 운영 및 사후관리 등에 대한 준수사항을 규정하여 시험의 전 과정을 조직적, 체계적으로 관리하는 규정이다. 일반적인 GLP 약리효능시험 프로토콜의 내용은 기능성 제품이 일반 행동에 미치는 영향과 중추신경계에 미치는 영향, 자율신경계에 미치는 영향, 호흡기계에 미치는 영향, 순환기계에 미치는 영향, 소화기계에 미치는 영향으로 크게 나뉜다. 의약품등의 일반약리시험기준은 2012년 개정 된 이후 아래와 같다.

제1조(목적) 이 규정은 약사법 제31조, 제42조 및 같은법 시행규칙 제29조제1항제5호의 규정에 따라 제출되는 의약품 등의 일반약리시험의 항목과 시험방법을 정함을 목적으로 한다.

제2조(정의) 일반약리시험이란 독성시험 및 효력시험, 흡수·분포·대사·배설에 관한 시험을 제외한 전임상시험으로 의약품 등이 신체 각 부위(계) 및 기능 등에 미치는 영향에 관한 시험을 말한다.

제3조(시험항목) 일반약리시험에는 일반행동, 중추신경계, 자율신경계, 호흡기계, 순환기계 및 소화기계에 미치는 영향 등에 대한 시험이 있으며 필요에 따라 시험 항목을 추가 또는 면제할 수 있다.

제4조(시험동물) ① 시험동물은 계통, 성별 및 연령 등을 고려하여 마우스, 래트, 기니픽, 토끼, 고양이 및 개 등을 사용한다. ② 시험계로는 whole animal, 적출기관, 조직, 혈액 및 세포 등을 사용한다.

제5조(투여법) ① 투여경로는 임상투여경로를 원칙으로 한다. 다만, 시험의 종류 및 체내 흡수율 등에 따라 적절히 다른 투여경로를 이용할 수 있다. ② 투여횟수는 1회 투여를 원칙으로 한다. 다만, 반복투여에 의한 영향이 예상되는 경우에는 적당한 투여횟수를 정할 수 있다.

③ 투여용량은 효력용량 또는 임상투여용량이나 그 수 배에 해당하는 용량 및 LD<sub>50</sub>에서 산출한

용량(예: LD<sub>50</sub>의 1/5, LD<sub>50</sub> 1/10 등) 등에 따라 정한다. ④ 시험항목에 따라 필요한 경우 음성 및 양성대조군을 두어야 한다.

제6조(시험방법) 일반약리시험방법은 다음 각 호와 같다.

가. 일반행동에 미치는 영향

일반행동에 미치는 영향은 다차원관찰법을 통하여 검색한다.

나. 중추신경계에 미치는 영향

- (1) 자발운동량에 미치는 영향은 자발운동량시험을 통하여 검색한다.
- (2) 수면에 미치는 영향은 수면제 및 마취제 등으로 유도된 수면에 대한 수면연장작용시험을 통하여 검색한다.
- (3) 운동협조성에 미치는 영향은 회전봉법 등에 의한 근이완작용시험을 통하여 검색한다.
- (4) 경련에 미치는 영향은 전기저극이나 경련유발제로 유발시킨 경련에 대한 항경련작용시험을 통하여 검색한다.
- (5) 통증에 미치는 영향은 초산 writhing법 등을 이용한 진통작용시험을 통하여 검색한다.
- (6) 체온에 미치는 영향은 체온측정을 통하여 검색한다.

다. 자율신경계에 미치는 영향

자율신경계에 미치는 영향은 적출장관·순막 수축시험 등을 통하여 검색한다.

라. 호흡기계에 미치는 영향

호흡기계에 미치는 영향은 호흡수 및 호흡량 측정 등을 통하여 검색한다.

마. 순환기계에 미치는 영향

순환기계에 미치는 영향은 혈압·심박동수측정·적출심장시험 등을 통하여 검색한다.

바. 소화기계에 미치는 영향

소화기계에 미치는 영향은 장관수송능시험·위액분비량억제시험 등을 통하여 검색한다.

제7조(보칙) 시험물질의 특성에 따라 유사시험이나 세부확인시험을 실시하는 경우는 이 지침의 시험법을 적용하지 않을 수 있다. 또한 시험결과 안전성에 문제가 있다고 판단되는 경우에는 세부 보충시험자료를 요구할 수도 있다.

제8조(재검토기한) 「훈령·예규 등의 발령 및 관리에 관한 규정」(대통령훈령 제248호)에 따라 이 고시 발령 후의 법령이나 현실여건의 변화 등을 검토하여 이 고시를 폐지하거나 개정 등의 조치를 하여야 하는 기한은 2015년 8월 24일까지로 한다.

본 과제에서는 단회독성시험 등 독성시험을 실시함으로써 홍문동의 독성여부를 확인하고자 하였으며 그 결과는 아래와 같다.

나. 단회독성시험 등 독성시험실시

(1) 홍문동 성분분석

맥문동과 7회 증숙하여 제조된 홍문동의 성분을 비교하기 위하여 Corona® CAD®

Detector (ESA Bioscience, Inc., Chelmsford, MA, USA) 장비를 장착시킨 iLC 3000 HPLC 시스템 (Interface Engineering, Seoul, Korea)으로 분석하였다. 크로마토그래피 분리는 CAPCELL PAK MG C18 (4.6 mm × 250 mm, particle size 5 μm, Shiseido Co. Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 수행하였다. 운동상은 gradient elution 프로그램을 참고하여 0-25 분간은 30-90% solvent A (deionized water)를, 25-40 분간은 90% solvent B (acetonitrile)를 사용하도록 구성하였다. 샘플 분석은 1.0 mL/min 유속에서 실시하였고, 분무용 가스로는 압축 질소가 사용되었다. 기체의 유속과 압력은 각각 1.53 L/min와 35±2 psi를 유지하였다. 측정 신호는 Clarity™ chromatography software (DataApex, Prague, The Czech Republic)를 이용하여 기록하였다. 그 결과, 홍문동은 수분이 감소하였지만 총 단백질, 탄수화물, 총지방, 총회분의 함량은 맥문동에 비하여 증가하였다. 이들 중에서도 특히 탄수화물의 함량이 가장 증가하였다 (Fig. 33A). 또한 맥문동과 홍문동에서 polyphenolic compounds의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 그 결과 맥문동에 비하여 홍문동에서 polyphenolic compounds가 크게 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 33B). 이러한 결과는 맥문동은 증숙과정을 통해 일반성분의 함량도 증가하지만 특히 polyphenolic compounds가 크게 증가함을 제시하고 있다.

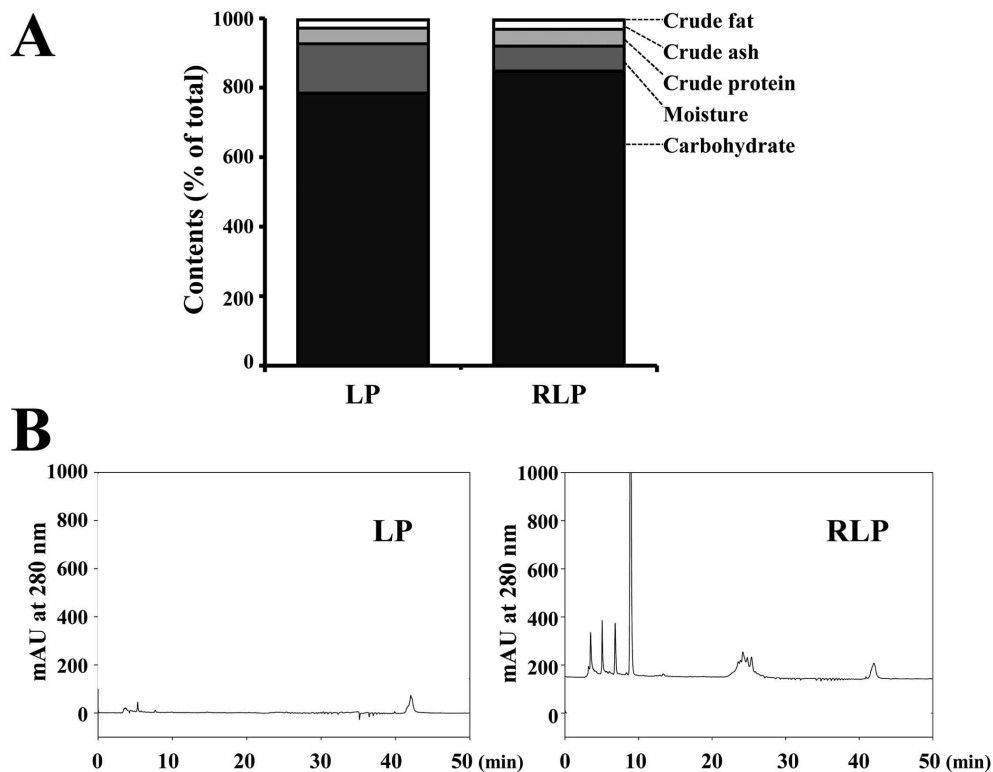


Figure 33. Composition of main components (A) and total phenolic compounds in LP and RLP (B).

## (2) *In vivo* 독성평가

### (가) 동물실험의 설계

실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen free (SPF) 상태의 암컷 ICR 마우스(8주

령, 20±5 g)로서 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina, Seoungnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22±1℃, 상대습도 50±5%)에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2011-0220)을 받아 수행되었다.

실험동물을 5마리씩 4개군(vehicle 처리군, 저농도 처리군, 중농도 처리군, 고농도 처리군)으로 무작위로 배정하였다. Vehicle 처리군은 증류수 0.2 ml만을, 저농도 처리군은 홍문동 12.5 mg/kg을, 중농도 처리군은 홍문동 25 mg/kg을, 고농도 처리군은 홍문동 50 mg/kg을 ICR마우스에 3주 동안 9회 경구투여하였다. 투여가 완료된 후 마우스는 Zoletil(VirBac, Corros cedex, France)를 이용해서 마취하여 혈액과 조직들을 적출하여 분석에 사용하였다.

#### (나) 홍문동이 임상증상에 미치는 영향

증숙된 홍문동이 ICR마우스에 미치는 독성을 평가하기 위하여, 3가지 농도로 3주 동안 처리하여 임상증상 및 사망률을 관찰하였다. 모든 실험동물에 대한 임상증상관찰 및 사망동물 수는 매일 2회 이상 관찰하였으며, 실험동물의 체중은 격일로 경구 투여전과 부검전에 화학저울(Mettler toledo, Greifensee, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 3가지 농도를 투여한 모든 집단에서 일반적인 중독증상인 침울, 운동감소, 경련, 보행 이상, 진전 등의 어떠한 증상도 관찰되지 않았다. 또한, 최고농도인 50 mg/ml의 농도를 경구 투여한 집단에서도 마우스의 사망은 관찰되지 않았다. 따라서 이러한 결과는 증숙된 홍문동은 ICR마우스의 임상적 독성이나 사망을 유발하지 못함을 나타내며, 홍문동의 최소치사량(minimum lethal dose, MLD)은 50 mg/kg 이상임을 제시하고 있다.

#### (다) 홍문동이 체중에 미치는 영향

증숙된 홍문동이 마우스의 체중에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 3주 동안 마우스의 사료 및 음수 섭취량, 체중을 측정하였다. 사료와 음수 섭취량은 홍문동을 처리한 3개 집단과 대조군에서 유의적인 차이가 없었다(Data not shown). 또한, 체중은 3주 동안 30 g 내외에서 일정하게 유지되었으며, 실험에 사용된 모든 집단에서 유의적인 차이가 관찰되지는 않았다(Fig. 34A). 따라서 이러한 결과는 홍문동은 체중, 사료 및 음수섭취량의 변화에 유의적인 영향을 미치지 못함을 제시하고 있다.

#### (라) 홍문동이 내장 장기에 미치는 영향

독성평가과정에서 체중 및 장기무게는 시험물질의 독성을 나타내는 가장 기본적인 일차지표이다. 특히 간과 신장은 외인성 화학 물질의 주요 배설경로이기 때문에 일반 독성시험에서 표적장기로 평가된다. 간의 무게증가는 지방이 간에 비정상적으로 축적되어 간이 비대해지고, 나아가서 괴사를 일으키기 때문이다. 따라서 홍문동이 실험동물의 장기에 미치는 영향을



평가하기 위해, 홍문동을 3주 동안 투여 후 실험동물을 부검하여 각 장기의 유관소견 상태와 장기무게를 측정하였다. 각 장기의 무게는 3회 측정하여 평균값을 산출하였으며, 모든 장기의 적출기준은 식약청의 독성시험 SOP에서 제시하는 기준을 준수하였다. 그 결과, ICR마우스의 모든 장기에서 유관적으로 특별한 이상을 관찰할 수는 없었다. 또한, 무게를 측정한 7개의 장기 중에서 오직 심장, 간장, 지라의 3개 장기에서만 무게 변화가 관찰되었고 다른 장기는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다. 심장은 대조군과 비교하여 중농도 처리군에서만 유의적으로 감소하였고, 저농도 처리군과 고농도 처리군에서는 유의적인 변화가 없었다(Fig. 34B). 또한, 간장의 무게는 대조군에 비하여 저농도 처리군에서 유의적으로 증가하였지만, 중농도 처리군과 고농도 처리군에서는 유의적인 변화가 없었다(Fig. 34D). 비장의 무게는 중농도 처리군에서만 유의적으로 감소하였고, 저농도 처리군과 고농도 처리군에서는 변화가 없었다(Fig. 34G). 이러한 결과는 저농도의 홍문동은 ICR마우스의 장기 중에 간의 무게에 약간의 변화를 유발함을 제시하고 있다.

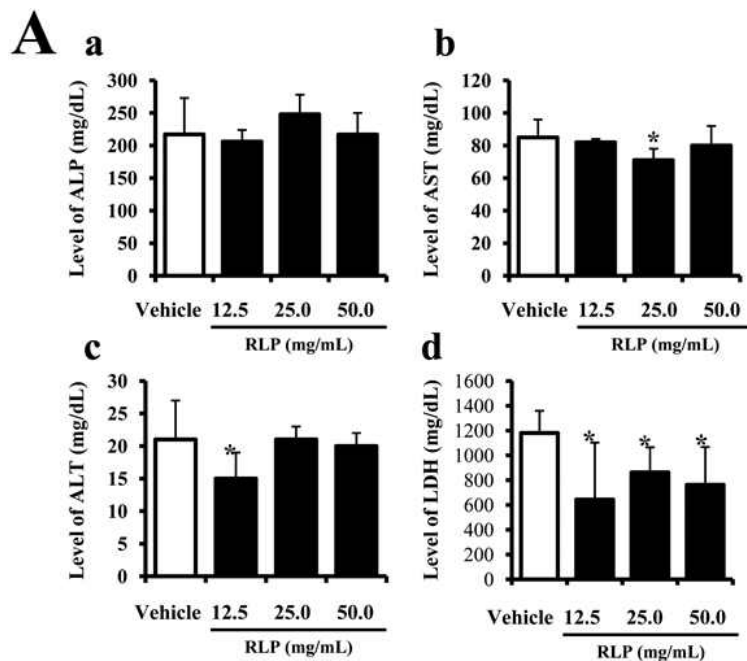
#### (마) 홍문동이 간독성에 미치는 영향

홍문동이 간에 미치는 독성 영향을 평가하기 위해, 혈청의 생화학적 분석 및 조직의 병리학적 검사를 수행하였다. 혈액은 ICR 마우스를 Zoletil을 이용하여 마취시킨 뒤 후대정맥을 통해 채취하였다. 채취한 혈액을 실온에서 30분 배양한 뒤, 4°C, 15000 rpm, 15분 원심분리시켜 혈청을 확보하였다. 혈청생화학적 검사는 자동생화학분석기(Hitachi 747 model, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 홍문동을 투여 한 ICR 마우스에서 적출한 간 조직은 10% formalin용액에서 48시간 고정한 뒤, 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기(Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisher Scientific, Bakewell, England)를 이용해서 alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 embedding 한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤 Rotary Microtome (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 블록(block)을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후 광학현미경(Olympus, PA, USA)으로 조직의 변화를 관찰하였다.

일반적으로 간독성은 혈청 내 간대사와 관련된 4가지 효소(ALT, AST, ALP, LDH)의 농도변화로 평가된다. ALT는 GPT (Glutamic pyruvic transaminase)라고도 사용되며 간 및 장기에 존재하는 아미노산 합성에 관여하는 효소로서 세포파괴시 혈액으로 유출된다. AST는 GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase)라고도 사용되며 아미노산 합성에 관여하는 효소로서 간, 심근, 골격근, 적혈구에 주로 존재한다. 일반적으로 간염과 같은 간 장애 발생시 세포막 투과성의 변화와 효소 제거 비율의 차이에 의해 AST와 ALP의 활성비율이 낮아지며, 간괴사가 진행될 경우 그에 비해 비율이 증가한다. 또한 ALP활성은 Intra-, extra hepatic cholestasis에

의존하여 primary biliary cirrhosis에서 아주 높이 상승하므로 담도 폐쇄 등의 담즙분비 질환 지표로 사용된다. LDH는 조직에 분포되어있는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid가 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 한다. LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승하며 간질환 중추신경에 영향을 준다. 본 실험에서 홍문동의 간독성을 평가하기위해 이들 3가지 혈청내 효소를 지표로 사용하였으며, 그 결과 ALP의 농도는 중농도 처리군에서만 약간 증가하지만 다른 처리군에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 35Aa). AST의 농도는 중농도 처리군에서만 감소하였으며, 저농도 처리군과 고농도 처리군에서는 변화가 없었다(Fig. 35Ab). 또한, ALT의 농도는 저농도 처리군에서만 감소하였고 중농도 처리군과 고농도 처리군에서는 유의적인 차이가 없었다(Fig. 35Ac). LDH 농도는 홍문동을 처리한 모든 집단에서 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 35Ad).

또한 더불어 간독성은 간조직의 다양한 조직학적 변화를 유발한다. 간독성 유발물질로 잘 알려진 CCl<sub>4</sub>는 간문맥을 제외한 중심정맥 주위에 간조직의 심한 응고성괴사를 유발하고, 괴사조직 가장자리부위로 지방변성(fatty change)을 동반한 퇴행성변화를 유발한다. 그러나 홍문동을 투여한 마우스에서 적출한 간 조직에서는 모든 처리군에서 염증, 괴사, bilitubin 침착, iron 침착 등의 병적인 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 35B). 이러한 결과는 증숙된 홍문동은 전체적으로 간조직에 유의적인 독성을 미치지 못함을 제시하고 있다.



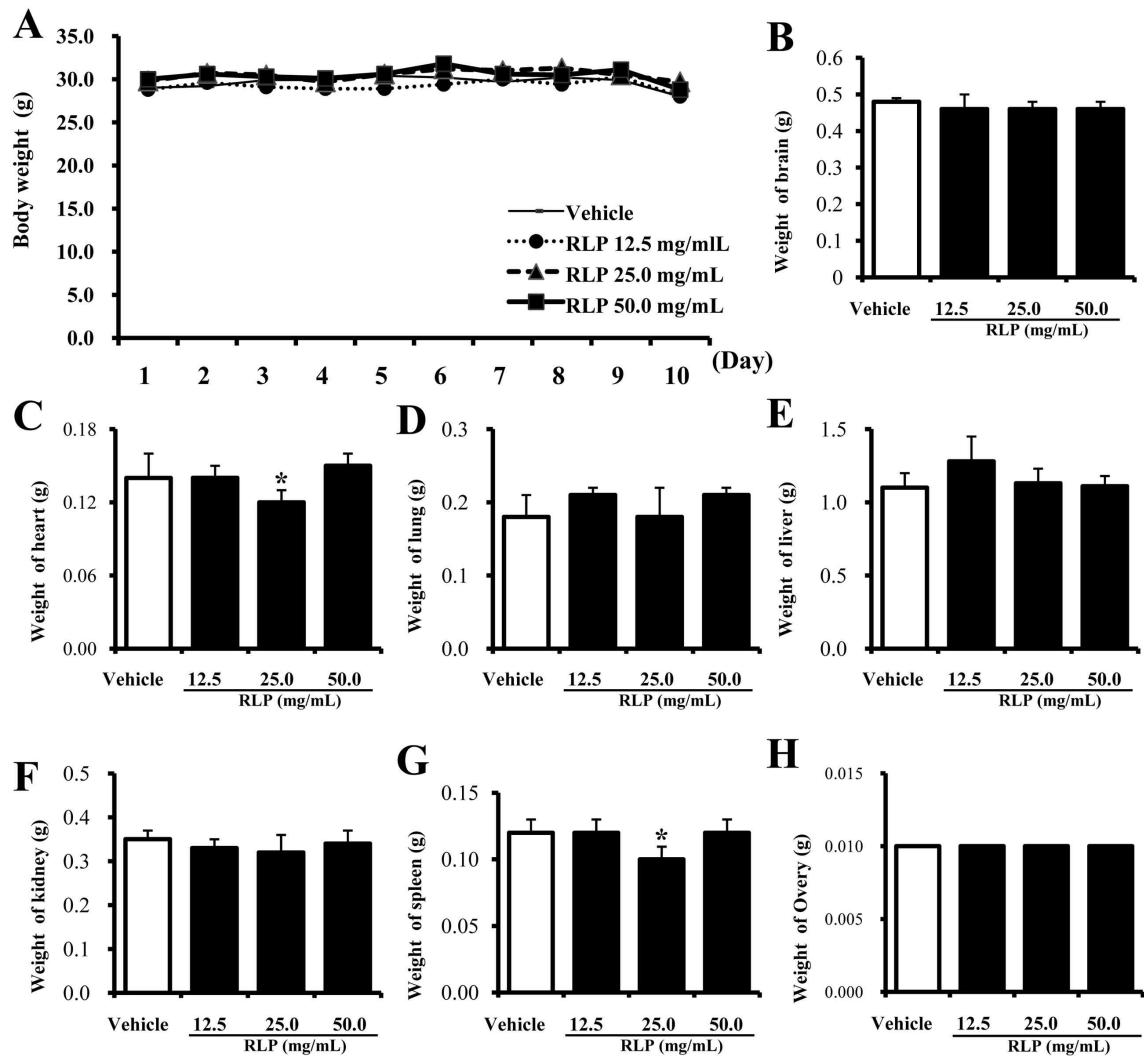


Figure 34. Effects of RLP on body and organ weights of ICR mice. At 24 hr after final RLP treatment, final body weight (A) and each organ weights (B-H) of ICR mice were measured daily using an electronic balance. Data represent the mean±SD from three replicates. \*P<0.05 is the significance level compared to vehicle-treated group.

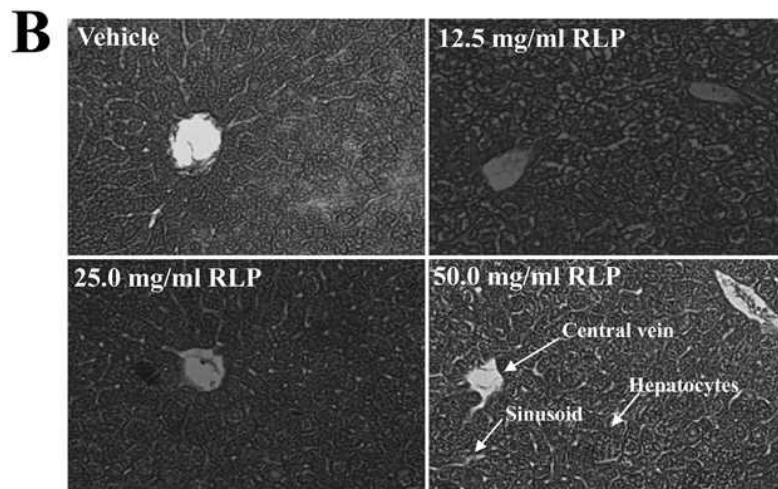


Figure 35. Effects of RLP on liver toxicity in ICR mice. Blood was collected from

abdominal veins of vehicle- and RLP-treated mice. Serum concentrations of ALP (Aa), AST (Ab), ALT (Ac), and LDH (Ad) were analyzed in duplicate using a serum biochemical analyzer as described in Materials and Methods. (B) Liver tissue of ICR mice was prepared on a histological slide, and cellular morphology was viewed at 200x magnification. Data represent the mean±SD from three replicates. \*P<0.05 is the significance level compared to vehicle-treated group.

#### (바) 홍문동이 신장독성에 미치는 영향

홍문동이 신장에 미치는 독성영향을 평가하기 위해, 혈청의 생화학적 분석 및 신장 조직의 병리학적 검사를 수행하였다. 혈액은 ICR 마우스를 Zoletil을 이용하여 마취시킨 뒤 후대 정맥을 통해 채취하였다. 채취한 혈액을 실온에서 30분 배양한 뒤, 4°C, 15000 rpm, 15분 원심 분리시켜 혈청을 확보하였다. 혈청생화학적 검사는 자동생화학분석기를 이용하여 측정하였다. 또한 홍문동을 투여 한 ICR 마우스에서 적출한 신장 조직은 10% formalin용액에서 48시간 고정된 뒤, 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기를 이용해서 alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station을 사용하여 embedding 한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤 Rotary Microtome을 사용하여 블록을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후 광학 현미경으로 조직의 변화를 관찰하였다.

신장독성은 혈청내 2가지 효소(BUN, CA)의 농도변화를 지표로하여 평가된다. BUN은 사구체로부터 여과되어 세뇨관에서 약 40%가 재흡수되고, 나머지는 배설되며, 신장의 기능장애로 인해 농도가 증가한다. 또한 CA는 근육에서 단백질이 에너지원으로 사용되고 난 후 생성된 크레아틴의 노폐물로서 항상 일정량 유지되며 신장기능에 의해서만 변화한다. 일반적으로 BUN과 CA은 각각 수치보다는 BUN/CA ratio를 이용하여 신장독성을 평가되며, 이는 생체 내에서 위장관 출혈, 혈구과과, 감염, 합성억제 약물복용, 고열 등이 발생할 경우 증가하고, 혈액량 감소, 울혈성 심부전, 간경화나 복수, 신증후군 등이 발생할 경우에는 감소한다. 본 실험에서는 신장독성을 평가하기 위하여 BUN과 CA 지표를 사용하였으며, 혈청의 생화학적 검사 결과, 신장독성을 나타내는 BUN의 농도는 고농도 처리군에서 유의적인 증가가 관찰되었으나 저농도 처리군과 중농도 처리군에서는 변화가 없었다(Fig. 36Aa). 그러나 CA의 농도는 모든 처리군에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 36Ab).

또한 더불어 신장독성을 평가하기 위해 신장조직의 변화를 관찰한다. 신장은 혈청 내 이온구성, 삼투압 농도(osmolality), 혈청양, 수소이온 농도를 조절하고, 대사폐기물과 외부물질의 제거하며, 호르몬을 분비하는 기능을 수행하는 기관으로서 피질과 수질로 구분되면, 독성이 발생할 경우, 피질과 수질 전반에 걸친 근위세뇨관 상피세포의 괴사, 괴양, 수복, 과형성 등이 관찰된다. 특히, 신장독성을 유발하는 물질인 Paraquat (1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridyliumion)(PQ)는 비선택적 접촉 및 속효성 제초제 중의 하나로 인간을 포함한 포유동물에 심각한 독성을 나타내는데, PQ 독성이 유도된 마우스에서는 근위 세뇨관의 괴사가 발생한다.

홍문동을 투여한 ICR 마우스의 신장에서는 염증, 괴사 등의 병적인 변화를 보이지 않았고 신장세포도 정상적인 구조를 유지하고 있었다. 면역학적 요인이나 독성물질에 기인하여 발생하는 사구체 및 세뇨관의 변성 및 괴사도 관찰되지 않았고 세관세포들이 잘 밀집되어있어 부족도 없음이 확인되었다(Fig. 36B). 이러한 결과는 홍문동에 의한 유의적인 신장독성은 유발되지 않음을 제시하고 있다.

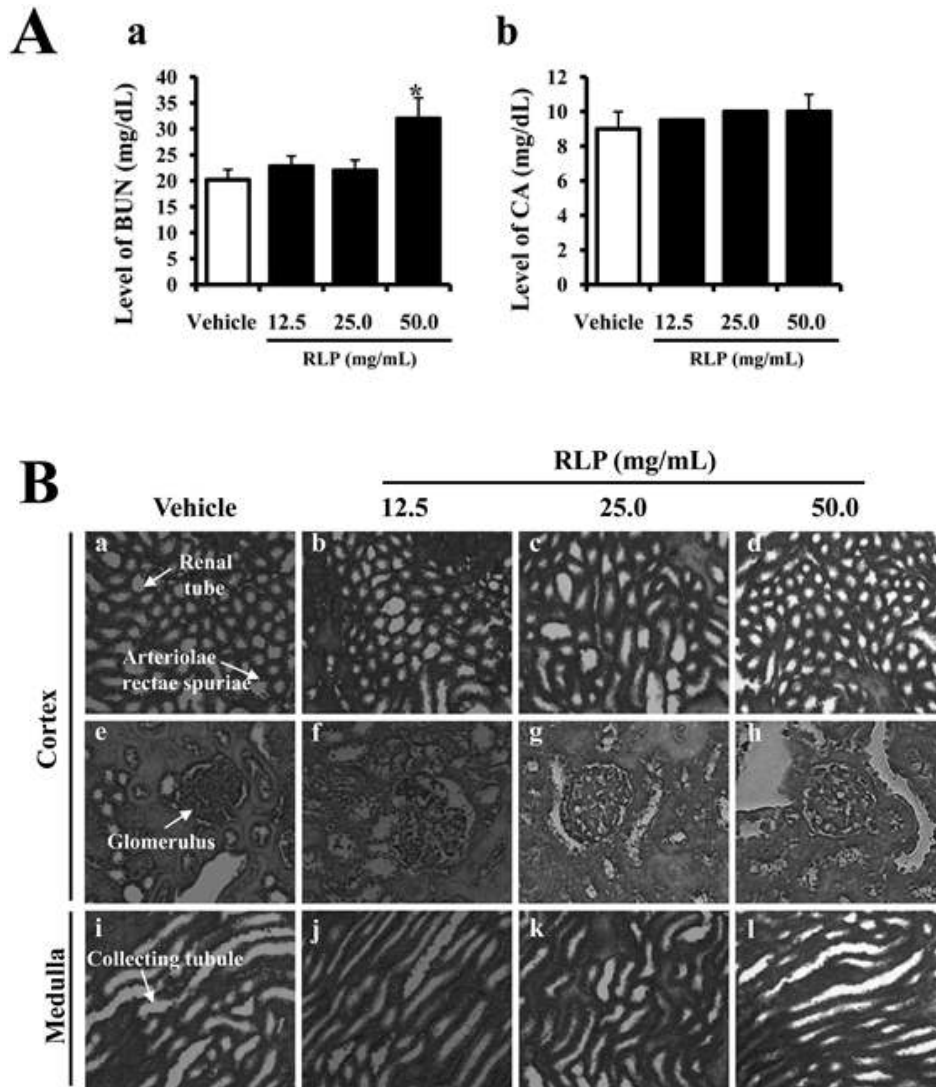


Figure 36. Effects of RLP on kidney toxicity in ICR mice. Blood was collected from abdominal veins of vehicle- and RLP-treated mice. Serum concentrations of BUN (Aa) and CA (Ab) were analyzed in duplicate using a serum biochemical analyzer as described in Materials and Methods. (B) Cortex (Ba-h) and medulla regions (Bi-l) of kidney tissue of ICR mice was prepared on a histological section, and the cellular morphology was viewed at 200x magnification. Data represent the mean±SD from three replicates. \*P<0.05 is the significance level compared to vehicle-treated group.

## 6. 홍문동의 약리효능 평가

### 가. 기능성 제품의 GLP 약리효능시험 프로토콜 확립

비임상시험은 사람을 대상으로 하는 시험 이전에 당해 의약품의 안전성과 유효성에 대한 최소한의 정보를 마련하기 위해 요구되는 시험이다. 그 중에서도 질병의 진단, 치료 및 예방의 목적에 사용하는 “약물”의 생체에 대한 작용기전, 흡수, 분포, 대사, 배설, 용법, 용량 등에 관하여 연구하는 것을 약리학(pharmacology)이라고 하며 약물을 개발할 때 임상에 적용하기 이전에 이들 약리에 관한 자료를 마련하여 제출할 것이 요구된다. 비임상시험 단계로서 약리효과 및 그 작용기전을 설명하는 것과 더불어, 표적기관외 다른 기관에서의 바람직하지 않은 효과를 평가하여 바람직하지 아니한 약리작용을 예측하고 약물의 체내동태를 알아보기 위하여 비임상에서의 약리작용에 관한시험을 실시한다. 비임상 약리에 관한 자료로써 효력시험 자료가 마련되어야 하며 그 지침은 아래와 같다.

Table 1 *In vitro, ex vivo, in vivo* 효력시험

효력시험의 목적 및 고려 사항	
<i>In vitro</i> 시험	목적 : 세포주 등을 이용하여 시험관 내에서 약물에 대한 반응을 확인 - 적절한 세포주 모델 설정 및 목표 질병에 대한 유효성 확인방법 설정 - 유효농도/용량의 결정
<i>Ex vivo</i> 시험	목적 : 동물의 장기등을 적출하여 시험관 내에서 약물에 대한 반응을 확인 - 적출한 장기의 동물 종, 적출기관, 적출 조직 및 보존상태의 적절성 - 시험물질의 적용 농도와 vehicle 설정
<i>In vivo</i> 시험	목적 : 질환모델 동물을 이용하여 약물에 대한 반응을 확인 - 동물 종, 투여방법(투여량, 투여기간, 투여시기) - 중간 차 유무, 동물 종별 유효용량 - 약리 작용이 가역적인지 비가역적인지 여부 - 병리모델에서 선택적으로 작용하는지(정상동물과 병리모델 동물에서의 비교) - 특정 동물 종에서 약물 투여방법 및 기타 조건을 달리하였을 경우 그 효력의 차이 - 기 실시된 임상시험에서의 목표 질병에 대한 약리 작용과 동물에서의 약리작용의 일관성 여부 및 동물종 간 유효용량의 차이 - 각종 병리모델 동물에서의 효력시험을 실시한 경우, 유효성 파라미터의 수치변화 - 모약물 및 대사체의 작용을 설명. 모약물의 대사기전과 대사 중 생성되는 대사물의 종류 및 모약물과 가 대사물의 약리작용 유무

\* 출처 : ‘Map of new drug application’, 식품의약품안전청, 식품의약품안전평가원

위의 표 내용과 더불어 본 과제에서는 1차년도와 2차년도에서 확립한 세포주 및 질환 모델 동물을 이용하고 홍문동의 최적 농도 및 투여 기간에 따른 in vivo, in vitro 실험을 통해 홍문동의 독성 유발 유무 및 질환개선 효과, 알러지 개선 효과 등을 관찰하였다.

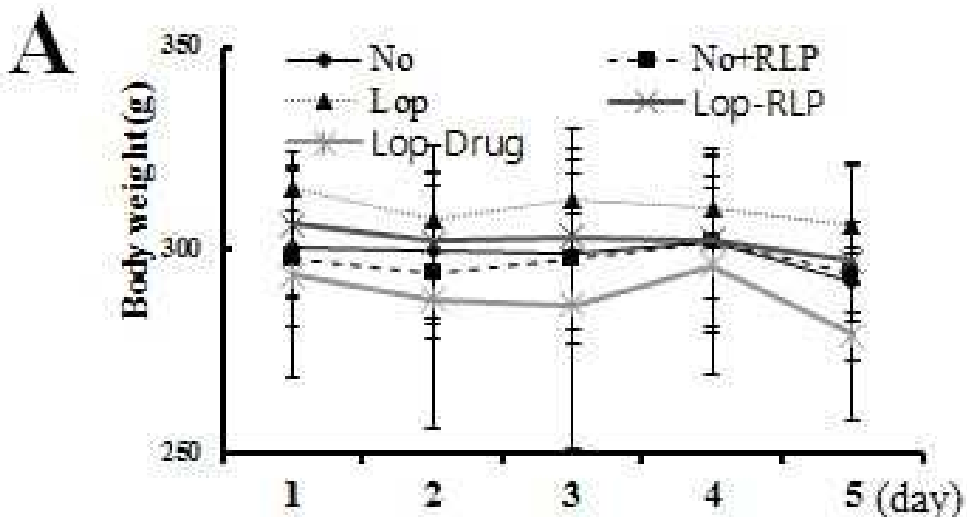
나. 기능성 제품의 질환개선 효능 평가

(1) 변비 유발 실험동물의 확보

홍문동 추출물이 변비에 미치는 영향을 평가하기 위하여 SD rat에 변비 증상을 일으키는 물질인 Loperamide (1.5 mg/kg) 를 하루에 두 번(9시, 18시)씩 3 일 동안 피하 투여하여 변비를 유도하였다. 실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen-free(SPF) 상태의 SD rat (6주령)로서 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 모든 랫드는 방사선 조사된 사료 (Purina Com., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12시간의 조명주기(06:00~18:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22±1℃, 상대습도 50±5%)에서 사육하였다.

(2) 체중 및 변에 미치는 영향

홍문동 추출물이 변비가 유발된 랫드에 체중과 변에 미치는 영향을 평가하기 위하여 랫드의 체중과 변의 개수, 무게, 수분량, 소변량을 측정하였다. 3일간 Loperamide를 피하투여하여 변비를 유발한 후, 1000mg/kg의 맥문동 추출물을 경구투여하여 24시간 후에 측정하였다. 그 결과, 각 그룹 간의 체중 변화에서는 큰 차이가 관찰되지 않았다(Fig.37A). 변의 개수와 무게, 수분량에서는 변비를 유발하지 않은 No군과 No+RLP군에 비해 변비를 유발한 Lop군과 Lop-RLP군, Lop-Drug군에서 유의적인 감소를 보였고, 홍문동 추출물과 변비약을 먹인 후에는



각각 Lop-RLP군과 Lop-Drug군에서 유의적인 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 37B-D). 따라서 이러한 실험결과는 홍문동 추출물이 변의 배출을 유도하면서 변의 수분량도 증가시킴을 제시하고 있다.

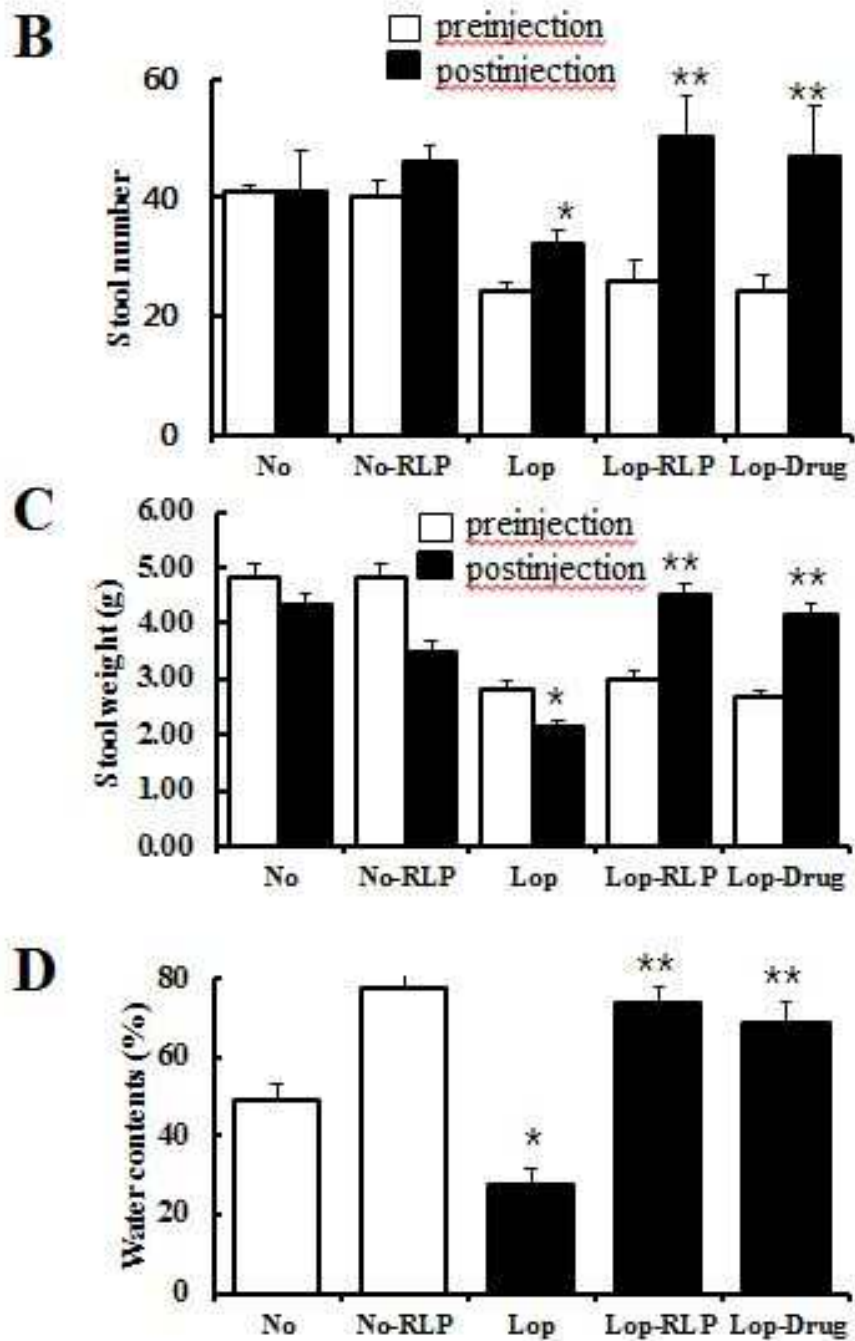


Figure 37. Change of body weight, stool number, stool weight and water contents before and after administration of loperamide and RLP. \*,  $p < 0.05$  is the significance level compared to No group. \*\*,  $p < 0.05$  is the significance level compared to Lop group.



(3) 홍문동 추출물이 변비가 유발된 랫드의 먹이와 물의 섭취량에 미치는 영향

홍문동 추출물이 변비가 유발된 랫드에 먹이와 물의 섭취량에 미치는 영향을 평가하기 위하여 매일 하루에 두 번(9시, 18시)씩 랫드의 먹이와 물 섭취량과 소변량을 측정하였다. 그 결과, 그룹간에 먹이 섭취량은 유의적인 변화를 관찰 할 수 없었고, 물 섭취량은 변비를 유발하고 아무것도 처리하지 않은 Lop군에서만 유의적인 증가를 관찰 할 수 있었다(Fig. 38A, B). 그러나 소변량은 아무것도 처리하지 않은 No군과 No-RLP군에 비해서 변비를 유발하고 아무것도 처리하지 않은 Lop군에서만 유의적인 증가를 관찰 할 수 있었고, 변비를 유발하고 각각 홍문동 추출물과 변비약을 투여한 Lop-RLP군과 Lop-Drug군에서는 아무것도 처리하지 않은 No군과 No-RLP군과 같은 수치인 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 38C). 따라서 홍문동 추출물이 소변량이 증가된 변비가 유발된 랫드에서 다시 정상적인 소변량으로 돌아온 것으로 보아 체내 수분 흡수율을 정상으로 회복시킴을 제시하고 있다.

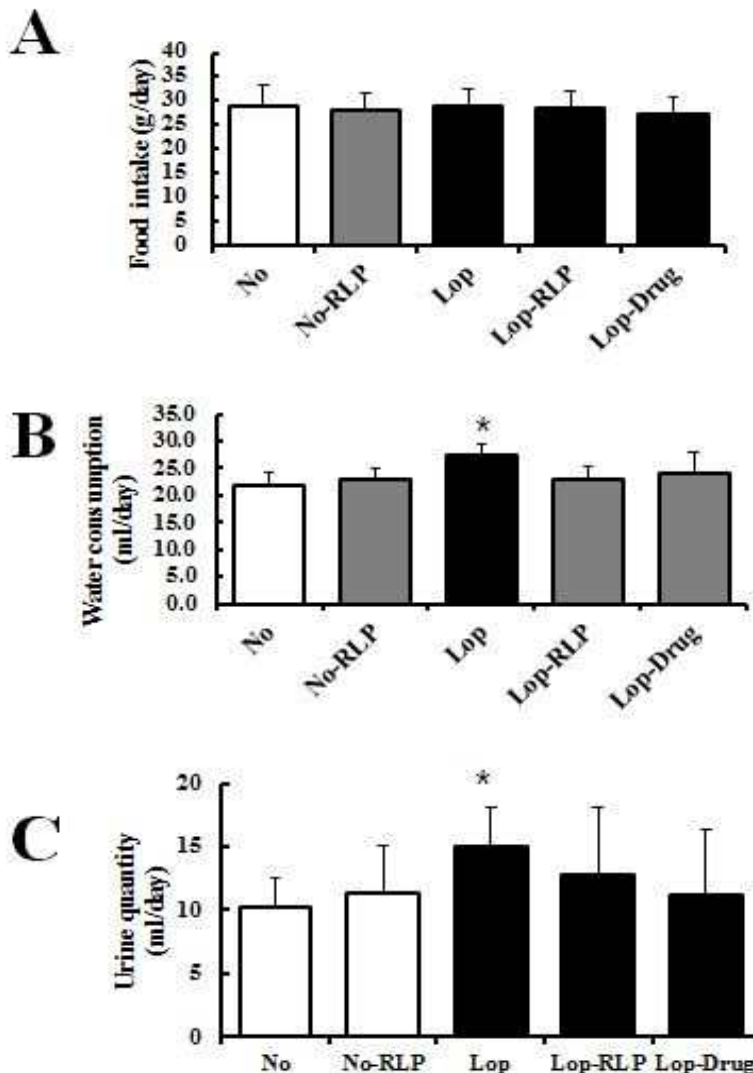


Figure 38. Change of water and food intake behavior and urine quantity. \*,  $p < 0.05$  is the significance level compared to No group.

#### (4) 홍문동 추출물이 변비에 유발된 랫드의 소장 미치는 영향

변비에 유발된 랫드의 홍문동 추출물이 소장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 소장의 조직을 H&E staining 분석을 실시하였다. 실험동물에서 적출한 조직을 10% formalin용액에서 48시간 고정하였다. 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 3  $\mu\text{m}$ 의 크기로 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기(Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisherr Scientific, Bakewell, England)를 이용하여 alcoco 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 embedding 한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤, Rotary Microtome (Leica, Heidelberg, ermany)을 사용하여 블록(block)을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후, 광학현미경(Olympus, PA, USA)으로 관찰하였다. 그 결과, 아무것도 처리하지 않은 No군과 No-RLP군에 비해서 변비를 유발하고 아무것도 처리하지 않은 Lop군에서 소장의 Villus의 길이와 Intestinal gland의 두께, 소장 근육의 두께가 현저히 감소함을 관찰하였고, 변비를 유발한 후에 홍문동 추출물과 변비약을 먹인 Lop-RLP군과 Lop-Drug군에서는 아무것도 처리하지 않은 Lop군보다 Villus의 길이와 Intestinal gland의 두께, 소장 근육의 두께가 현저히 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 39). 따라서 홍문동 추출물이 변비의 유발로 감소한 소장의 Villus의 길이와 Intestinal gland의 두께, 소장 근육의 두께를 증가시키고 변비로 인해 감소한 crypt cell의 증가와 손상된 goblet cell의 회복에 상당히 유의적인 효과가 있음을 제시하고 있다.

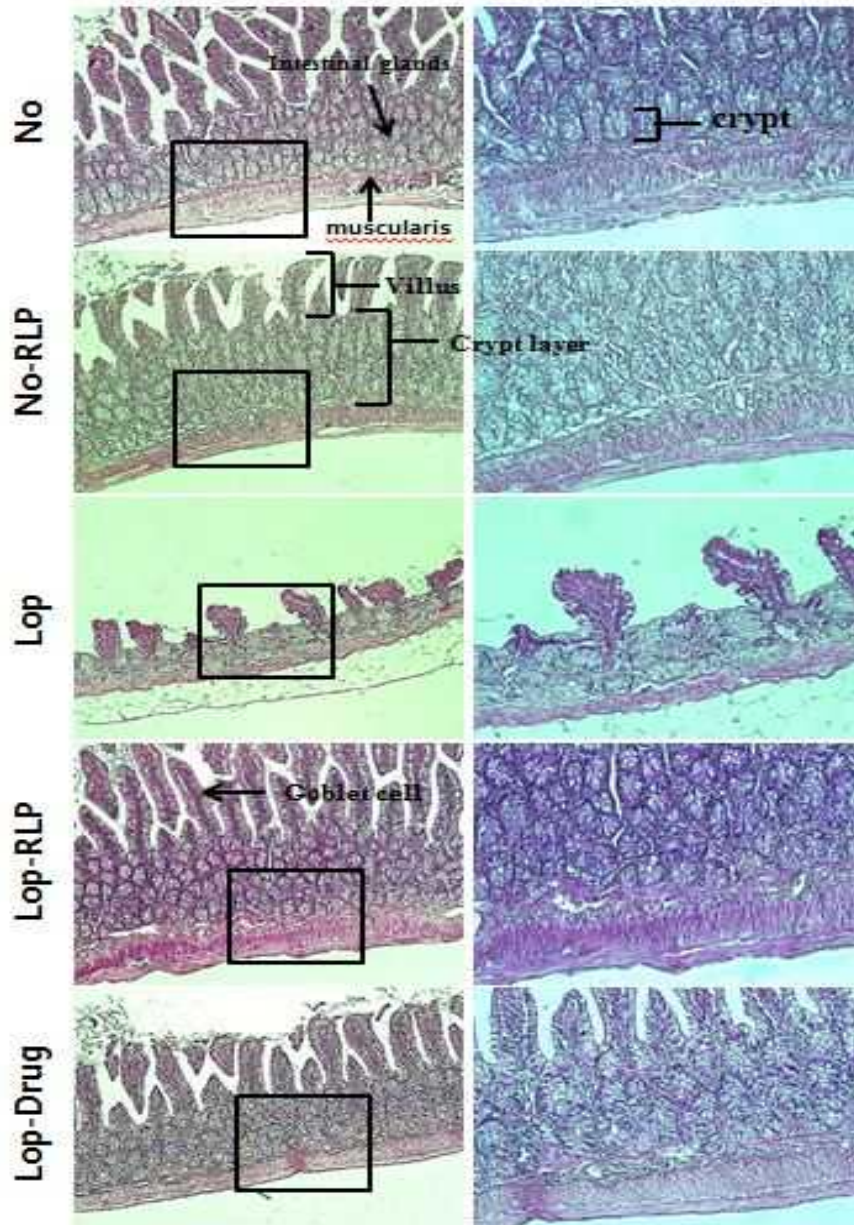


Figure 39. Histopathology analysis of intestine tissue. Slide sections of intestine tissue were stained with hematoxylin and eosin and observed at magnifications 200. The length of villus and thickness of intestinal gland were measured by microscope. Compare to Lop group, the length of villus was increased and intestinal gland was thickened in Lop-RLP group.

## 다. 기능성 제품의 약리효능 평가

### (1) 동물실험설계

실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen free (SPF) 상태의 수컷 IL-4마우스(8주령,  $20\pm 5$  g)로서 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina, Seoungnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도  $22\pm 1$  °C, 상대습도  $50\pm 5$ %)에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2012-0122)을 받아 수행되었다.

홍문동의 알러지 예방효과를 알아보기 위하여 실험동물의 귓등 부분에 Phthalic Anhydride(PA)를 도포하여 알러지를 유발 시킨 후 홍문동을 경구 투여하여 그 예방효과를 관찰하였다. 실험은 Non Tg 그룹과 Tg 그룹으로 나뉘며 Tg 그룹은 다시 Acetic Olive Oil(AOO)만 도포한 그룹 (Vehicle group), PA만 도포한 그룹 (PA group), PA를 도포한 후 25% 홍문동을 경구투여한 그룹 (PA+RLP25 group), PA를 도포한 후 50% 홍문동을 경구투여한 그룹 (PA+RLP50 group)으로 진행되었으며 홍문동을 농도별로 4주간 20회 투여를 실시하였다. 투여가 완료된 후 마우스는 Zoletil(VirBac, Corros cedex, France)를 이용해서 마취하여 혈액과 조직들을 적출하여 분석에 사용하였다.

### (2) 홍문동이 체중에 미치는 영향

홍문동이 마우스의 체중에 미치는 영향을 알아보기 위하여 4주간 마우스의 체중을 측정하였다. 그 결과, 홍문동을 처리한 3개의 집단과 control 그룹 간 유의적인 차이를 발견 할 수 없었으며 4주 동안 30g 내외에서 일정하게 유지되었다.(Figure 40a) 따라서 홍문동은 체중 변화에 영향을 미치지 않으며 이는 홍문동이 신체 독성을 유발하지 않음을 시사한다.

### (3) 홍문동이 귀 두께에 미치는 영향

홍문동이 귀 두께에 미치는 영향을 알아보기 위하여 4주간 PA를 마우스의 귓등에 발라 준 뒤 디지털외경마이크로미터(NA293-025S ,Bluebird)를 이용하여 귀 두께를 측정하였다. 그 결과, 실험 1주 후에는 모든 그룹에서 다소 두께가 증가하였으나 실험 2주 후에는 control 그룹에서는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으며 Vehicle 그룹과 PA+RLP50 그룹보다 PA그룹과 PA+RLP25 그룹에서 급격하게 증가하였다. 최종적인 귀 두께는 PA 그룹에서 가장 높았으며 홍문동 그룹에서는 PA+RLP50 그룹에서 그 변화가 가장 적었다.(Figure 40b) 알러지가 유발되면 비만세포의 증가로 귀 두께가 두꺼워 지며 마크로파지와 호중구의 이동으로 인해 혈관 두께가 두꺼워 지고 신생 혈관이 생성된다. 알러지를 유발 시킨 마우스 귓등의 혈관을 사진으로 촬영하여 관찰한 결과 PA 그룹에서 혈관이 매우 두꺼워 졌음을 확인하였고 홍문동 그룹에서 그 두께가 점차 감소하였다. (Figure 40c) 따라서 PA에 의해 유발된 알러지 반응이 홍문동에 의해 저해되었으며 이는 홍문동이 알러지 치유효과가 있음을 제시한다.

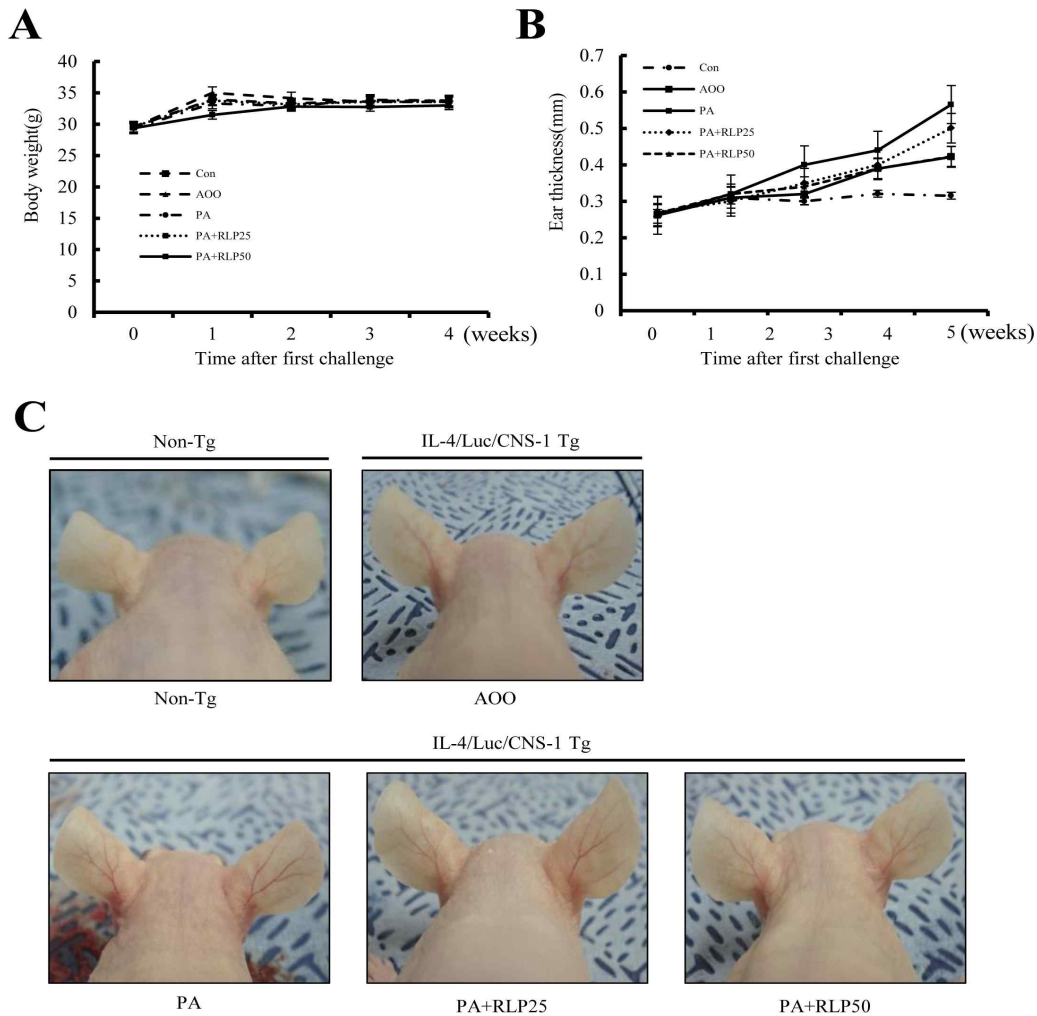


Figure 40. Differences in body weight, ear thickness, and ear phenotypes. (A) Body weights of mice in the five groups were measured with a chemical balance. PA solution was repeatedly applied to the dorsum of ears of IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice during oral gavage of RLP. After 4 weeks, ear thickness (B) and phenotypes (C) were observed by following the procedure described. Arrowhead indicated the ear vein. Data shown are the mean  $\pm$  SD (N=5). a,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the AOO-treated group. b,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the PA+Vehicle-treated group.

#### (4) 홍문동이 Luciferase 발현에 미치는 영향

본 실험에서 사용한 IL-4 형질전환 마우스는 Luciferase 벡터에 Human IL-4 promoter를 삽입시킨 것으로 이는 알러지 반응이 진행됨에 따라 분비되는 여러 cytokine 중 IL-4 발현으로 인한 promoter 촉진으로 형질전환 마우스 내의 Luciferase 발현량이 높아지게 된다. 이러한 원리를 이용하여 체내에 Luciferase의 기질 중 하나인 D-luciferin (Sigma-Aldrich, MO, USA)을 복강투여하여 D-luciferin의 분해에 따른 형광량을 In Vivo Imaging System (IVIS, Xenogen,

CA, USA)을 통해 측정하였다. Whole body image 결과는 Control(Non-Tg) 그룹과 Vehicle 그룹에서는 어느 인광도 관찰되지 않았으나 PA 그룹에서는 가장 높은 수치로 인광이 측정되었고 PA+RLP25 그룹, 그리고 PA+RLP50에서는 그 수치가 현저히 줄어드는 것을 확인하였다. 또한 tissue shot 에서는 whole body image와 마찬가지로 Control그룹과 AOO 그룹에서는 어느 인광도 발견되지 않았으나 PA 그룹에서는 턱밑 림프절, 이자, 흉선, 장간막 림프절 순서로 높은 인광이 측정되었으며 PA+RLP25 그룹과 PA+RLP50 그룹에서는 그 수치가 줄어들었다(Fig. 41).따라서 이러한 결과는 홍문동이 PA 에 유도된 알러지 반응에 대한 치유효과가 있음을 제시한다.

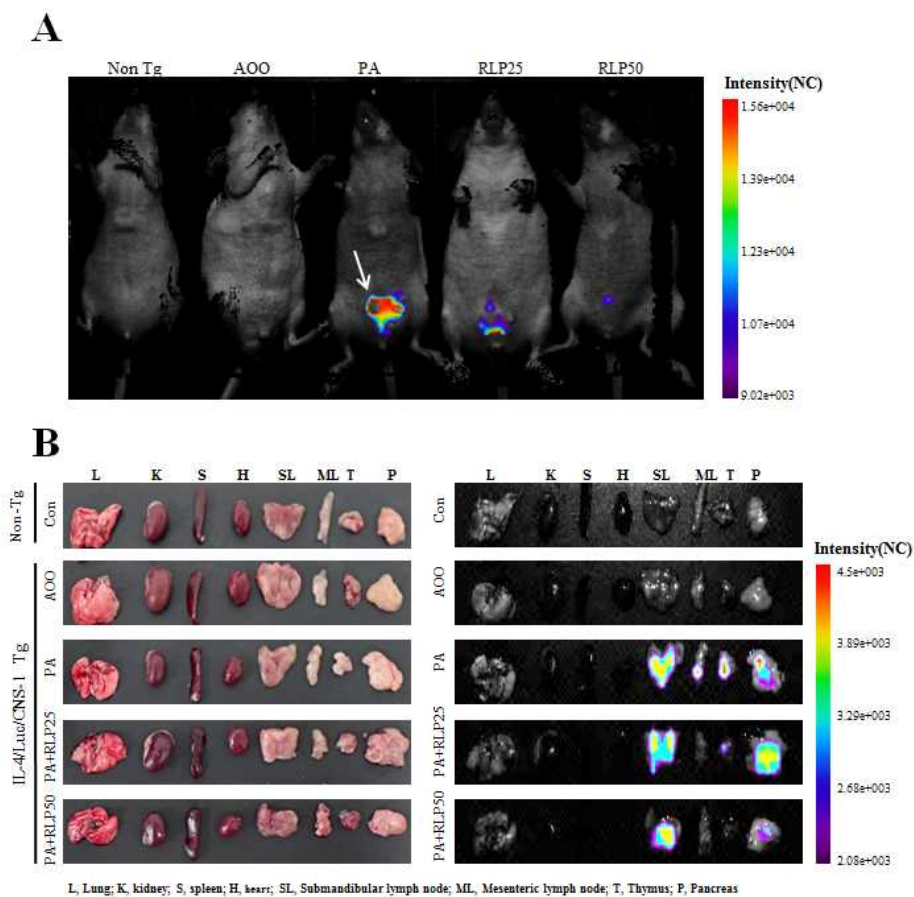


Figure 41. Detection of luciferase signal in the whole body(A) and each organ(B) of IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice. Mice were treated with AOO, PA+Vehicle, PA+RLP25, and PA+RLP50 for 4 weeks and imaged at 24h after final treatment using Living Image Software. Color overlay on the image represents the photons per second emitted from the organs, in accordance with the pseudo color scale shown next to the image. In this image, red indicates the highest number of photons per second while blue indicates the lowest number of photons per second. L,Lung; K,Kidney; S,Spleen; H,Heart; SL,Submandibular lymphnode; ML,Mesenteric lymphnode; T,Thymus; P,Pancreas.

#### (5) 홍문동이 면역학적 변화에 미치는 영향

홍문동이 면역학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 부검 이후 림프절의 무게와 형상을 관찰하였으며 혈청 내 면역글로불린 E의 농도를 측정하였다. 먼저 PA가 림프절 무게 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전자저울((Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)을 이용하여 림프절 무게를 측정한 결과, Control 그룹과 AOO 그룹보다 PA 그룹에서 림프절의 무게가 급격히 증가하였으며 이는 PA+RLP25, PA+RLP50 그룹에서 Control 그룹과 비슷한 수치로 회복되어 있음을 확인하였다. 다음으로 혈청내의 면역글로불린 E의 농도를 알아보기 위하여 Mouse IgE ELISA kit (Shibayagi, Inc., Gunma, Japan)를 이용하여 측정하였다. 실온에서 antibody-coated plate의 커버를 제거하고 안에 든 내용물을 버린 후 washing buffer(50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 채워서 plate를 3회 씻어낸다. 혈청 샘플을 buffer solution를 이용하여 희석한 후 standard solution을 농도별로 50ul 씩 만든다. 각 well 에 희석한 혈청 샘플을 50ul 씩 넣고 standard solution을 50ul 씩 넣는다. 330rpm에서 1분 동안 shaking 한 후 상온에서 2시간 배양한다. 배양이 끝난 well 의 내용물을 버린 후 washing buffer로 3번 씻어내고 HRP-conjugated avidin을 50ul 씩 모든 well 에 넣어준 후 330rpm에서 1분간 shaking하여 1시간 배양한다. 내용물을 버린 후 washing buffer로 3번 헹구 준 후 chromogenic substrate reagent-TMB를 각 well 에 50ul 씩 넣고 330rpm에서 1분간 shaking한다. 상온에서 20분 배양한 후 reaction stopper를 50ul 씩 넣고 330rpm에서 1분간 shaking 해 준다. 마지막으로 450nm에서 30분 이내에 흡광도를 측정한다. 그 결과, Control 그룹과 AOO 그룹보다 PA 그룹에서 면역글로불린 E의 농도가 급격히 증가하였으며 이는 PA+RLP25 그룹과 PA+RLP50 그룹에서 정상치 수치로 줄어드는 것을 확인하였다.(fig. 42) 따라서 이러한 결과는 홍문동이 PA에 의해 유발된 면역증상을 완화시켜준다는 것을 시사한다.

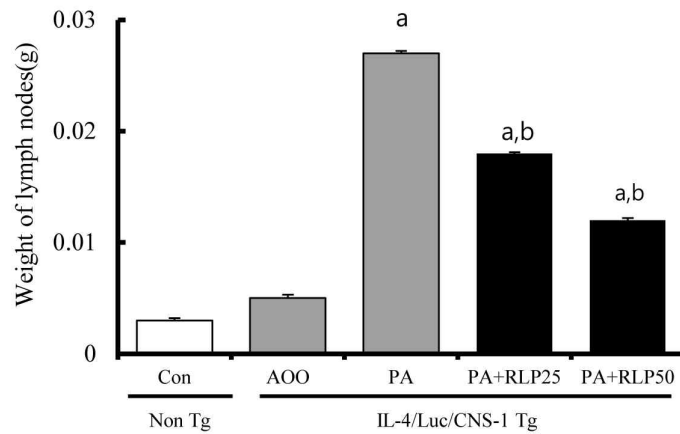
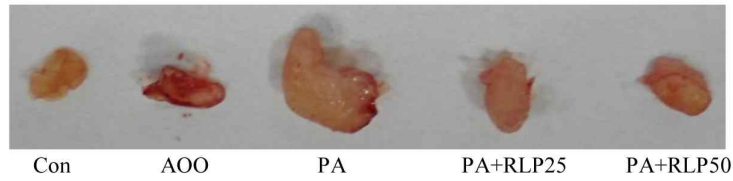
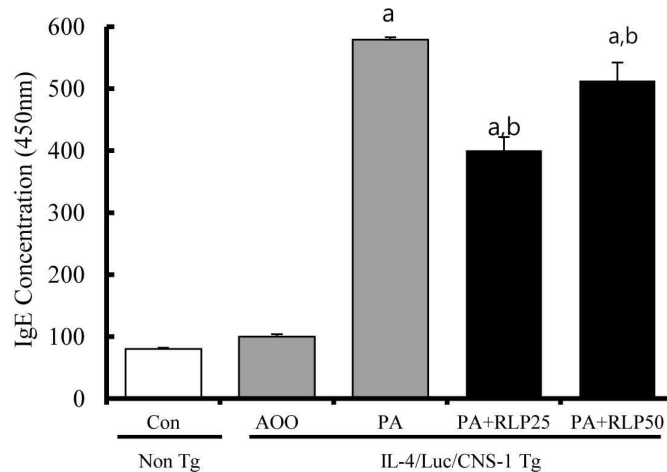
**A****B**

Figure 42. Changes in auricular lymphnode weight(A) and serum IgE concentration(B) in IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice. After final treatment, mice from each group were sacrificed under anesthesia. The auricular lymphnodes were then harvested from the neck region of the mice using a microscissor, after which they were weighted using a chemical balance. Serum used to measure the IgE concentration was quantified by ELISA. Data shown are the mean  $7SK(N=5)$ . a,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the AOO-treated group. b,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the PA+Vehicle-treated group.



#### (6) 홍문동이 조직학적 변화에 미치는 영향

각각의 실험그룹에서 적출한 창상조직은 부검 직후 10% 포르말린용액에 48시간 고정 한 후, 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣은 후 조직처리기(Shandon Citadel 1000, Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK)를 이용하여 고정시켰다. 고정된 조직은 Paraffin Embedding Station (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany)을 사용하여 함침시킨 후 Rotary Microtome (Leica Microsystems Nussloch GmbH)을 사용하여 박절하였다. 조직 내 표피, 진피 등의 변화를 알아보기 위하여 H&E 염색을 실시하였고, 이는 박절된 조직을 xylene에 3분씩 3번, 100% alcohol에 각각 2분, 1분 담근 후 95, 80, 70% alcohol에 각각 1분 30초씩 담근 후에 물로 1분 세척한 뒤 hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA)에 3분, 1% acid-alcohol에 30초, 10% scott's tap water (Sigma-Aldrich)에 1분, eosin (Sigma-Aldrich)에 3분동안 처리하여 조직 염색을 실시하였다. 염색된 조직은 다시 70, 80, 95, 100% alcohol의 순서로 탈수과정을 거치고 마지막으로 xylene에 3분씩 3번 처리하였다. 마지막으로 kanadabalsam과 xylene을 섞은 고정제를 이용하여 조직을 슬라이드에 고정시킨 후 건조하였다. 창상조직의 변화에 미치는 HCM-SCT의 영향은 BX50F-3 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, Leica Application Suite (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 이용하여 분석하였다. 또한, 비만세포의 침투를 분석하기 위하여 Toluidine blue 염색을 실시하였으며, 염색방법은 0.25% Toluidine blue 염색용액에 10초간 담근 후에 탈수과정을 거친다는 것을 제외하고는 Hematoxylin과 Eosin 염색법과 동일하게 실시하였다. 그 결과, 표피와 진피의 두께는 PA 그룹에서 가장 두꺼웠으며 두께 뿐 아니라 조직 내 pore(adipocyte)의 수도 PA 그룹에서 가장 많았으며 RLP를 처리한 PA+RLP25, PA+RLP50 그룹에서는 줄어들었다(Fig.43) Toluidine blue 염색 결과, PA 그룹에서 mast cell 의 수가 급증하였으며 이는 PA+RLP25, PA+RLP50 그룹에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 44) 이는 홍문동이 PA에 의해 유발된 귀 두께의 증가 및 알리지 유발 면역 세포인 mast cell 의 증가를 저해하여 염증반응을 억제시킴을 시사한다.

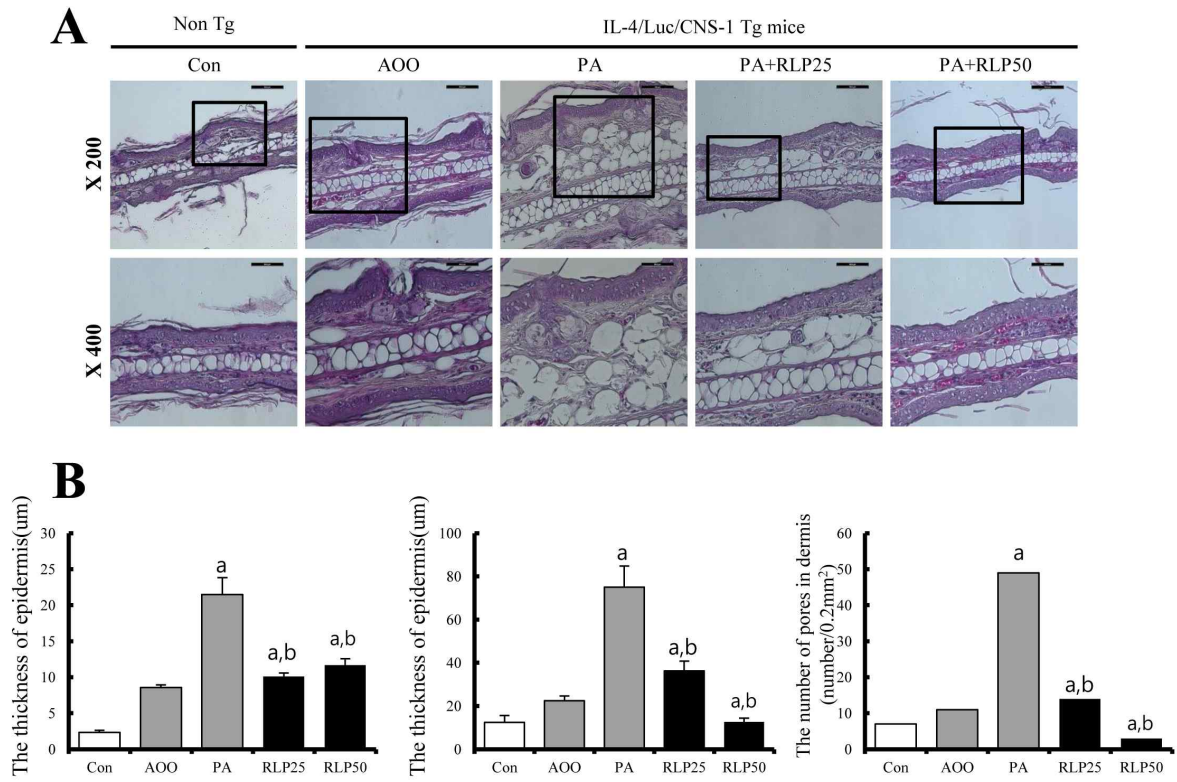


Figure 43. Histopathology of ear skin in non-Tg or IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice treated with AOO, PA, PA+RLP25, PA+RLP50. PA solution was repeatedly applied to the dorsum of ears of IL-4/Luc/CNS-1 tg mice during oral gavage of RLP. After 4 weeks, histological changes were observed as described. Slide sections of ear tissue were stained with hematoxylin and eosin and observed at magnifications of 100 or 200(A). Numbers of adipocytes as well as thickness of the epidermis and dermis(B). Data shown are the mean  $\pm$  7SD(N=5). a,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the AOO-treated group. b,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the PA group.

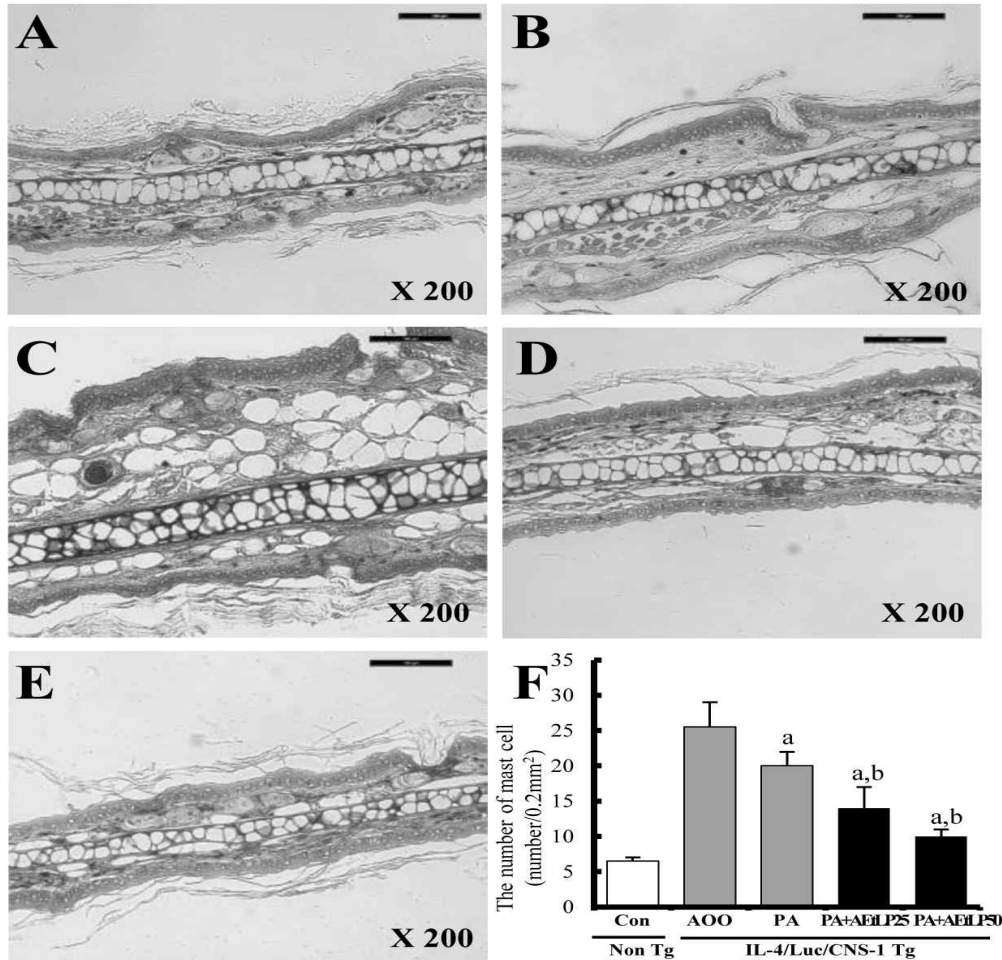


Figure 44. Infiltration of mast cells in non-Tg(A) or IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice treated with AOO(B), PA(C), PA+RLP25(D), PA+RLP50(E). Slide sections of ear tissue were stained with 0.25% toluidine blue and observed at magnifications of 200. Arrow head indicates infiltrated mast cells in the dermis of ears. (F) Numbers of infiltrated mast cells. Data shown are the mean  $\pm$  7SD (n=5). a,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the ALL-treated group. b,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the PA treated group.

#### 라. 기능성 제품의 pharmacokinetics 측정

Pharmacokinetics 는 약물을 흡수, 분포, 작용기작, 배출시키는 과정을 시간의 함수로 연구하는 학문이라 할 수 있다. 즉, 약물을 인체에 투여했을 때 인체가 약물을 어느 부위에서 혈관으로 얼마나 빨리 또는 느리게, 그리고 얼마나 많이 또는 적게 흡수시키는가, 어느 부위로 분포시키는가, 얼마나 배설 시키는가, 얼마나 대사 시키는가 하는 과정을 시간의 함수로 연구

하는 것이다. 대부분의 연구에서는 이를 측정하기 위해 투여 물질에 방사능을 태그를 하거나 혈장 내의 투여물질의 단일 성분을 추적하여 그 값을 함수화 시키는 방법을 사용한다. 하지만 홍문동의 경우에는 단일 성분이 아니라 복합성분으로 구성이 되어있어 투여 후 혈액 내에서의 성분 추적이 힘들다. 따라서 본 과제에서는 로퍼라마이드 투여에 따른 변비 유발 유무를 확인하고 홍문동의 투여에 따른 변비의 개선 효과를 확인하기 위하여 변의 무게를 시간별로 측정하였다. 그룹은 총 5가지로 아무 처리도 하지 않은 control 그룹 (No group), 홍문동만 투여한 그룹 (No-RLP group), 로퍼라마이드만 투여한 그룹 (Lop group), 로퍼라마이드를 투여하고 홍문동을 투여한 그룹 (Lop-RLP group), 마지막으로 로퍼라마이드를 투여한 후 기존에 출시된 변비제품을 투여한 그룹 (Lop-Drug group) 으로 구성하였다. 그 결과, 변의 개수는 RLP 그룹에서 가장 높았으며 그 다음으로는 control 그룹이 높았고, Lop 그룹이 가장 낮았다. Lop-RLP 그룹이 Lop-Drug 그룹 보다 높았으나 control 그룹 보다는 낮은 수치를 나타냈다. 따라서 홍문동에 의해 로퍼라마이드로 유발된 변비 증상이 완화 되는 것을 확인할 수 있다.

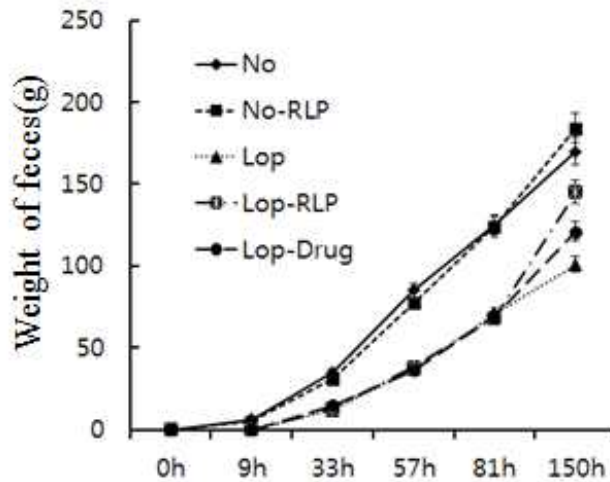


Figure 45. Weight of feces through the time dependent. No-RLP group was treated only RLP, Lop group was treated only loperamide, Lop-RLP group was treated loperamide and cotreated with RLP on oral administration. According to time passes, the weight of feces was increased steadily.

마. 기능성 제품의 생리활성 검증

(1) 효능분석을 위한 모델동물 확립

(가) 고혈압 증상을 나타내는 모델 동물의 확보 (SHR rat)

홍문동의 추출물이 고혈압에 미치는 영향을 평가하기 위하여 고혈압 질환동물모델인 spontaneous hypertensive rat (SHR rat)를 사용하였다. 실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen-free (SPF) 상태의 랫드(16주령)로서 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 모든 랫드는 방사선 조사된 사료(Purina Co., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였

고, 12시간의 조명주기(06:00~18:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 22±1℃, 상대습도 50±5%)에서 사육하였다.

(나) 고혈압모델동물의 질병 기초생리자료 확보

SHR 랫드는 본태성 고혈압 질환동물모델로서 고혈압을 비롯하여 심혈관계 질환의 연구에 주로 사용되는 동물이다(Fig. 46). 이 동물은 1960년대에 Okamoto에 의해 Wistar-Kyoto (WKY) rat를 outbred하여 생산된 알비노 rat이다. 정상쥐인 WHY rat의 혈압이 135-145 mmHg인데 비해 SHR rat는 5-6주령에 수축기 혈압이 180-200 mmHg에 도달하여 고혈압을 나타낸다. 또한 SHR 랫드의 성별에 따른 혈압 수치는 암컷에 비해 수컷이 높은 것으로 알려져 있다.



Figure 46. Phenotype of SHR rat

(2) 모델동물을 활용한 홍문동의 혈압강화 효능 분석

(가) 동물실험 설계

실험동물은 중앙실험동물에서 6주령을 수령하여, 16주령이 될 때에 시작하였다. 랫드는 정상혈압을 나타내는 WKY-control군(3마리), 고혈압을 나타내는 SHR-Vehicle군(3마리), SHR-홍문동 저농도 처리군(3마리), SHR-홍문동 고농도 처리군(4마리)로 배정하였다. WHY군과 SHR-vehicle군은 1x PBS만을, SHR-홍문동 저농도 처리군(RLP100)은 홍문동 추출물 100 mg/kg의 농도를, SHR-홍문동 고농도 처리군(RLP500)은 홍문동 추출물 500 mg/kg의 농도를 2주 동안 경구투여 하였다. 2주 후, 랫드는 CO<sub>2</sub> gas로 마취하고, 조직을 적출하였다.

(나) 홍문동 에탄올추출물이 SHR 랫드의 체중과 혈압에 대해 미치는 영향

홍문동 에탄올추출물이 SHR 랫드의 체중과 혈압의 변화에 대한 효과를 분석하기 위하여 SHR 랫드에 홍문동을 100 mg/kg, 500 mg/kg의 농도로 2주간 처리하였으며, 홍문동 에탄올추출물 투여기간 동안 체중과 혈압의 변화를 측정하였다. 그 결과, 2주간의 투여기간 동안 체중의 변화는 각 그룹간의 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었으며(Fig. 47). 이러한 결과는 홍문동 에탄올추출물은 체중의 변화가 없는 것으로 보아 독성이 없음을 나타낸다. 또한 실

험동물의 혈압측정은 tail-cuff method를 이용하였으며, 주 1회 측정하였다. 측정에 앞서 실험 동물은 37°C가 유지되는 환경에서 혈압분석기(Non Invasive Blood Pressure Analyzer;NIBP, (주) 싸이텍코리아)에 적응시킨 후, 3회 이상 반복되는 측정값의 평균값을 사용하였다. 그 결과, 홍문동 에탄올추출물의 투여 전의 혈압은 vehicle군을 비롯하여 SHR 랫드를 사용한 모든 군에서 정상혈압을 나타내는 WKY-control군에 비해 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 반면, 각 군의 투여 후의 혈압은 홍문동 에탄올추출물 투여 전에 비해 유의적인 변화가 없음을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과는 투여 전의 혈압은 SHR 랫드가 대조군인 WKY에 비해 수치가 높은 것을 통해 SHR 랫드는 고혈압질환이 잘 유발되었음을 확인할 수 있었으나, 모든 군에서 투여 전후의 혈압의 변화가 없는 것을 통해 홍문동 에탄올추출물은 SHR 랫드에서 직접적으로 혈압강하효능을 나타내지 못함을 제시하고 있다(Fig. 48).

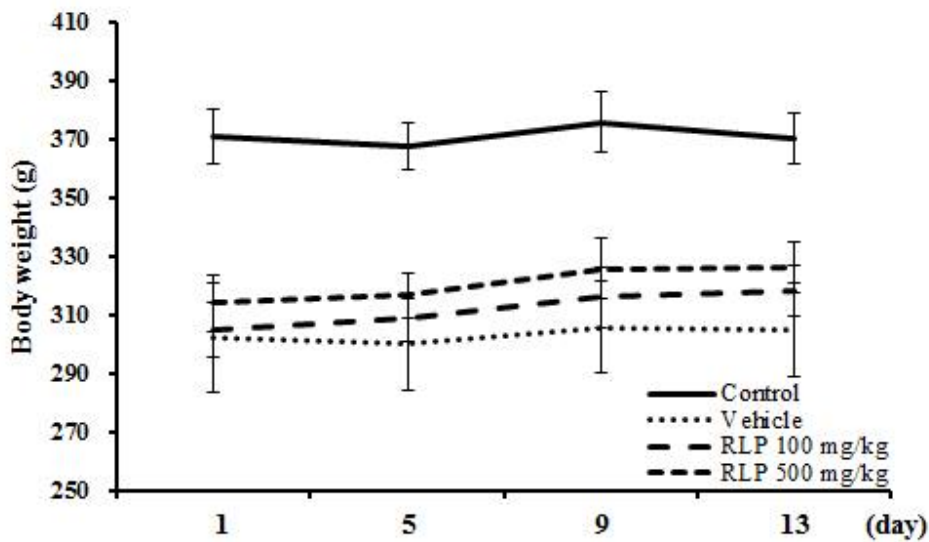


Figure 47. Effects of RLP on body weight of WKY and SHR rats. (A) After administration of three concentrations of RLP to SHR rats, body weight was measured using an electronic balance everyday. Data are reported as the mean  $\pm$  SD of three replicates.

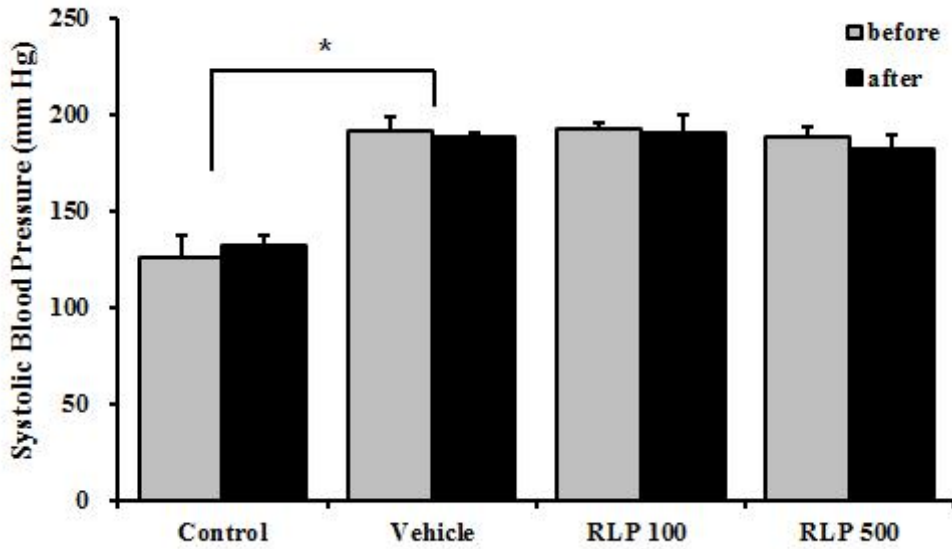


Figure 48. Changes of systolic blood pressure after RLP administration. Data are reported as the mean  $\pm$  SD of three replicates. \*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the control-treated group.

(다) 홍문동 에탄올추출물이 대동맥의 두께에 대해 미치는 영향

홍문동 에탄올추출물의 SHR 랫드 대동맥의 두께에 대한 효과를 보기 위하여, 변화에 대한 효과를 보기 위하여 실험동물에서 적출한 대동맥 혈관을 10% formalin용액에서 48시간 고정하였다. 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 4  $\mu$ m의 크기로 절단하여 카세트에 넣고, 카세트에 담긴 조직은 조직처리기(Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisherr Scientific, Bakewell, England)를 이용하여 ethyl alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 embedding 한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤, Rotary Microtome (Leica, Heidelberg, germany)을 사용하여 블록(block)을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후, 광학현미경(Olympus, PA, USA)으로 관찰하였다(Fig. 49A). 대동맥의 두께는 Leica Application Suite (Leica Microsystems, Switzerland)을 이용하여 측정된 평균값을 사용하였다(Fig. 49B). 그 결과, control군에 비해 vehicle군에서 혈관벽의 두께가 다소 증가하였으나 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 하지만 홍문동 에탄올추출물을 처리한 RLP100, RLP500군의 혈관벽의 두께는 control과 vehicle군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있다. 이러한 결과는 홍문동 에탄올추출물이 SHR 랫드의 혈압에는 직접적으로 영향을 미치지 못하지만 대동맥 두께의 감소를 유도하는 것을 제시하고 있다.

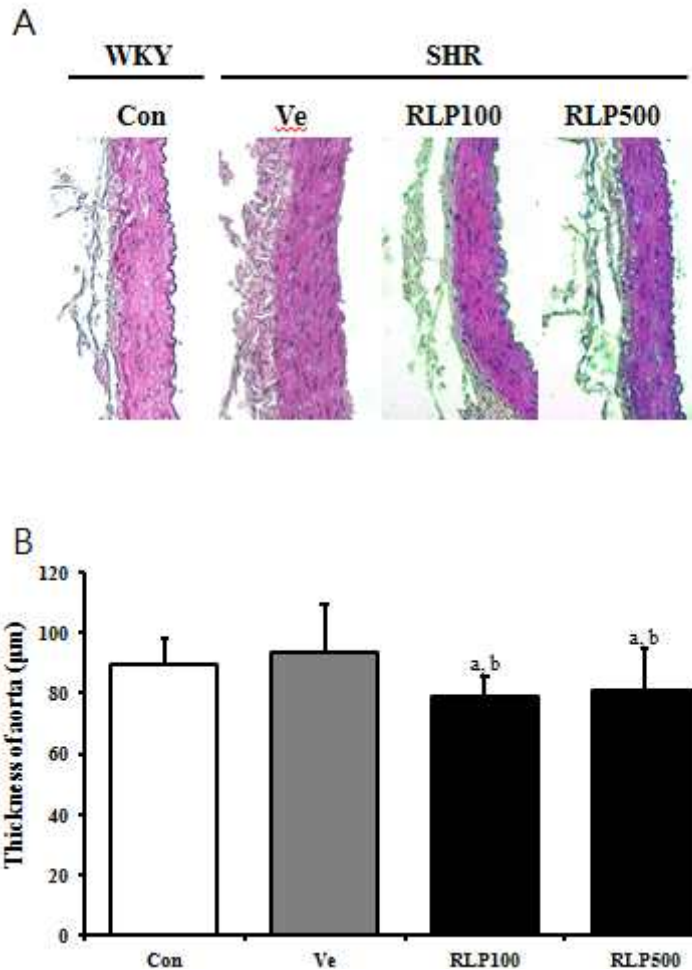


Figure 49. Thoracic aorta from WKY and SHR rats treated for 2 weeks with vehicle and RLP extracts. Data are reported as the mean  $\pm$  SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the control-treated group. b,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle-treated group.

(라) 홍문동 에탄올추출물이 대동맥 두께에 영향을 미치는 인자에 대한 영향

혈압은 주로 레닌-안지오텐신 system과 nitric oxide system, aldosterone system에 의해 조절된다. 대동맥 혈관벽의 두께에 영향을 미치는 요인을 알아보기 위하여 대동맥의 두께에 영향을 미치는 인자를 알아보기 위해서 western blot을 수행하였다. 먼저, Vehicle 처리군과 홍문동 처리군 랫드 대동맥 조직 100 mg을 정량하여, PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30  $\mu$ g의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 6-10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-ACE/CD143 항체(R&D Systems), anti-ACE2 항체(R&D



Systems), anti-eNOS 항체(Abcam), anti-p-eNOS 항체(Abcam), anti-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti-p-Akt 항체(Cell Signaling Technology), anti- $\beta$ -actin 항체 (Sigma-Aldrich)등의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, 레닌-안지오텐신 system에 관여하는 ACE와 ACE2는 control군에 비해 vehicle군의 발현이 감소하지 않았으며, 홍문동 에탄올추출물의 농도가 증가함에 따라 이들 단백질의 발현양이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 eNOS의 인산화는 vehicle군과 RLP100군에서 유의적으로 증가하였다. 반면 RLP500군은 vehicle에 비해 eNOS의 인산화가 감소하는 것을 보여준다. 또한 Akt의 인산화는 WKY 랫드에 비해 SHR 랫드에서 발현이 유의적으로 감소하였으며, 홍문동추출물의 농도증가에 따라 감소하는 양상을 나타냈다(Fig. 50). 이러한 결과를 통해, 홍문동추출물은 ACE 단백질의 발현의 증가에 의해 혈압강하가 이루어지지 않으며, Akt에 의해 매개되는 eNOS의 발현이 혈관벽의 두께와 연관 있음을 제시하고 있다.

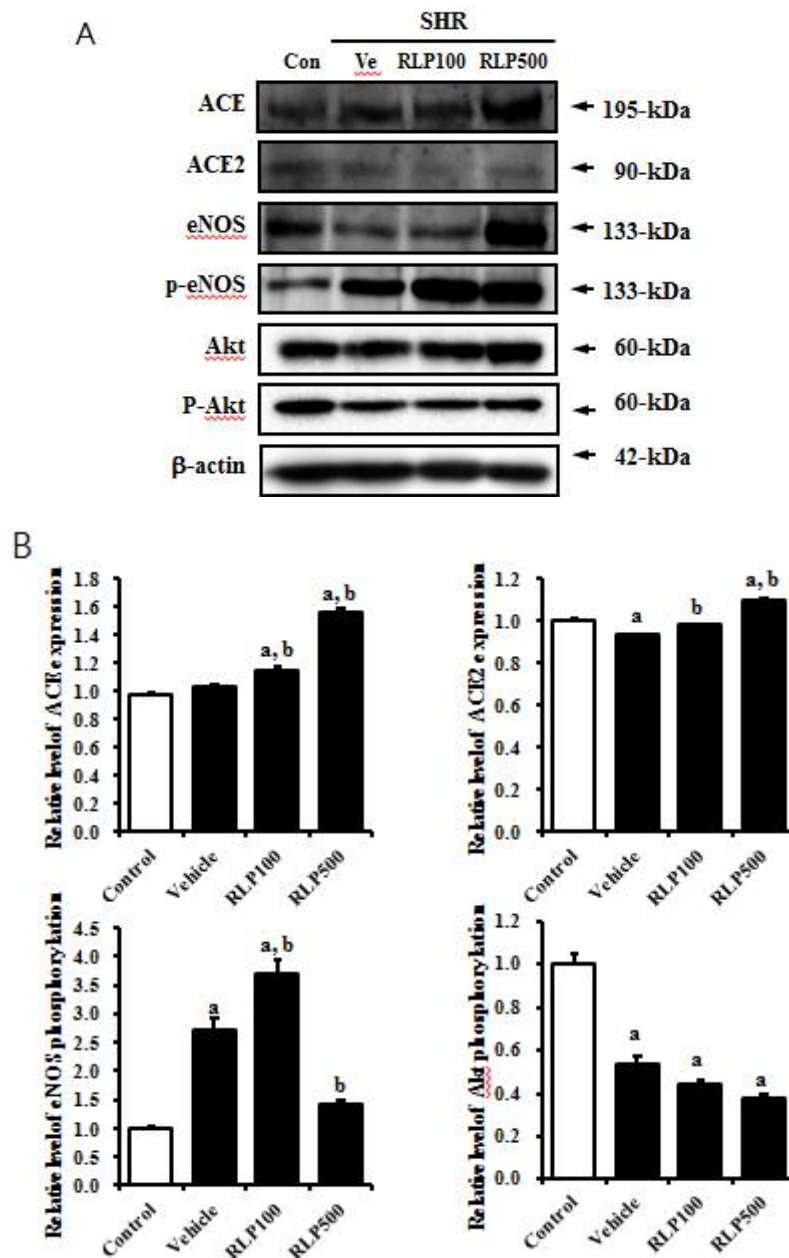


Figure 50. Effects of RLP treatment on protein expression associated with hypertension in WKY and SHR rats via Western blotting. Total homogenates were prepared from aorta tissue of WKY and SHR rats treated with RLP for 2 weeks. Thirty micrograms of protein per sample was immunoblotted with antibody for each protein (A). The intensity of each band was determined using an imaging densitometer, and their relative level of each protein was calculated based on the intensity of actin (B). Three samples were assayed in triplicate via Western blotting. Values of the data represent the means±SD. a,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the control-treated group. b,  $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle-treated group.

(마) 홍문동 에탄올추출물이 대동맥의 p-eNOS 발현에 미치는 영향

다음으로 대동맥 조직에서 p-eNOS 발현을 알아보기 위해서 실험동물에서 적출한 혈관 조직을 10% formalin용액에서 48시간 고정하였다. 병변조직 부위가 관찰될 수 있도록 4  $\mu$ m의 크기로 절단하여 카세트에 넣고, 카세트에 담긴 조직은 조직처리기(Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisherr Scientific, Bakewell, England)를 이용하여 ethyl alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Paraffin Embedding Station (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 embedding 한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤, Rotary Microtome (Leica, Heidelberg, germany)을 사용하여 블록(block)을 박절하였다. 조직 슬라이드는 0.02 M 인산염완충액(pH 7.4; PBS)에서 약 10분 동안 2회 수세한 후 내재성 과산화효소의 활성을 제거하기 위해 0.3% 과산화수소( $H_2O_2$ )가 포함된 메틸알코올을 첨가시킨 용액에서 20분간 처리하고, PBS로 10분간 3회 세척한 다음 5% 정상 말 혈청(normal horse serum)에 30분간 두었다. 그 후 조직절편들을 세척하지 않고 가볍게 털어 낸 다음 일차항체인 anti-eNOS antibody (희석비율 1 : 100, Abcam)를 4  $^{\circ}$ C에서 overnight 배양시킨다. 그 다음, PBS로 10분씩 3회 세척하였고, 이어서 이차항체인 (goat anti-rabbit)-conjugated HRP streptavidin (Histostain-Plus Kit; Zymed, South San Francisco, CA, USA)를 1:1,500 비율로 희석하여 실온에서 1시간 동안 배양시켰다. 그 다음 이들 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6; Tris buffer)에 0.05% DAB (3, 3'-diaminobenzine tetrahydrochloride, Invitrogen)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 처리하여 약 10분간 실온에서 발색시켰다. 조직절편의 정색상태를 현미경 하에서 확인한 후 Tris buffer, PBS 및 증류수에서 각각 10분간씩 차례로 세척한 다음, Harris' hematoxylin으로 대조염색을 하고, 통상적인 과정을 거쳐 Permount (Polysciences, USA)로 봉입하여 BX50F-3 optical microscope (Olympus, Tokyo, Japan)을 통해 확인하였다. 그 결과, control군에 비해 RLP100군에서 p-eNOS의 발현양이 증가하였으며 이전의 eNOS 인산화 정도와 유사한 결과임을 알 수 있었다 (Fig. 51). 이러한 결과는 홍문동 에탄올추출물이 p-eNOS의 발현을 증가시킴을 제시하고 있다.



Figure 51. Effects of RLP treatment on p-eNOS expression in WKY and SHR rats. Tissues from p-eNOS immunostaining were viewed using a microscope at 400x magnification in the aorta tissue. Values of the data represent the means $\pm$ SD of three experiments.

(바) 홍문동 에탄올추출물이 혈액 내 nitric oxide에 미치는 영향

홍문동 에탄올추출물이 nitric oxide의 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈청 내의 nitric oxide 분비량은 R&D Systems사의 Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite kit를 이용하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저 원심분리한 혈청을 1x reaction diluent로 2배 희석하고, 희석한 sample 또는 standard는 microplate strip에 50 $\mu$ l를 첨가하였다. Nitrite assay의 경우, 여기에 1x reaction diluent, Griess reagent I, Griess reagent II를 각각 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 상온에서 10분간 배양하였고 반응물의 endogenous nitrite 농도는 spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrate assay는 각 sample을 첨가한 microplate에 NADH, 1x nitrate standard diluent를 각각 25 $\mu$ l 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 그리고 나서 Griess reagent I, Griess reagent II를 각각 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 상온에서 10분간 배양하였다. 반응물의 total nitrite 농도는 spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, endogenous nitrite의 농도는 control군에 비해 vehicle군에서 높게 측정되었으며, 홍문동 추출물을 처리한 군에서는 vehicle군에 비해 다소 낮게 측정되었다. 하지만 이러한 변화는 유의적인 차이를 나타내지 못하고 있다. 또한, Nitrate가 nitrite로 변화한 후 total nitrite의 농도를 측정된 결과, vehicle군은 control군에 비해 높은 농도를 보였으나 고농도를 처리한 군에서는 vehicle군에 비해 낮은 수준의 농도를 나타내었으나 유의적이지 않았다(Fig. 52). 이러한 결과는 비록 nitric oxide의 농도의 변화가 있음에도 불구하고 유의적인 증감을 나타내지 않으므로, SHR 랫드의 혈압의 변화가 없음을 제시하고 있다.

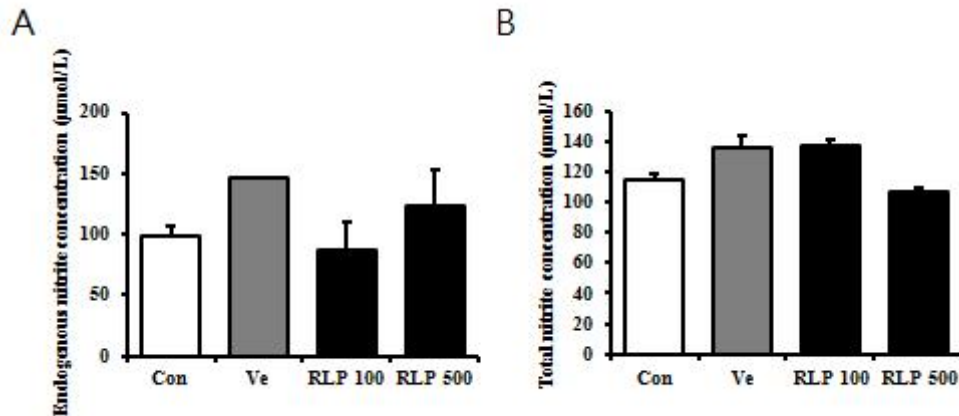


Figure 52. Alterations of nitric oxide expression. After final RLP administration, blood sera were collected from each group of WKY and SHR rats. Endogenous nitrite concentration (A) and total nitrite concentration (B) were detected using a total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite ELISA kit. Data are reported as the mean  $\pm$  SD of three replicates.\*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle-treated group.

(사) 홍문동 에탄올추출물이 이노작용 관련인자에 대해 미치는 영향

생체 내에서 이온의 조절은 요량을 증대시켜 체내의 불필요한 수분의 배출을 촉진시켜 혈압을 낮춘다. 알도스테론은 신장의 원위세뇨관에 직접적으로 작용하여 나트륨 이온의 재흡수와 칼륨 이온의 배출을 증가시킴으로써 혈류량을 늘리고, 혈압을 증가시키는 작용을 한다. 홍문동 에탄올추출물이 이노작용과 관련된 인자들의 농도변화를 알아보기 위하여 혈청분석을 수행하였다. 홍문동을 최종 처리한 후 랫드의 혈액을 채취해, 상온에서 30분 원심분리하여 얻은 serum을 이용하였다. 이 혈청은 홍문동을 2주 동안 처리하고 각 군의 랫드의 복부 정맥에서 채취하여 상온에서 30분 원심분리하여 상층액만을 분리하여 얻은 것이며, Automatic Serum Analyzer (HITACHI 74, Japan)을 사용하여 BUN, CRE, Na, K, Cl을 측정하였다. Aldosterone은 Radioimmunoassay (RIA) 검사방법으로 Coated A count Aldosterone (SIEMENS, USA) 시약을 이용하여  $\gamma$ -counter Quantum, USA (PACKARD, USA) 장비로 측정하였다. 그 결과, 혈청 내 BUN의 농도는 WKY 랫드에 비해 SHR 랫드 group에서 전체적으로 높은 것으로 관찰되었다. 특히 RLP100군의 BUN 농도는 control군에 비해 가장 높았으며, 반면 RLP500군에서는 control군에 비해 증가하였으나, 유의적인 증가를 보이지 않았다. Creatinine의 경우 RLP500군의 농도가 control군과 vehicle 군에 비해 유의적으로 감소한 것을 알 수 있었다. 혈중 Na, Cl의 농도는 각 군 간의 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며, potassium의 농도는 control군에 비해 vehicle군에서 증가하였다가 홍문동을 투여한 군에서 다시 감소되는 양상을 보였다. Aldosterone의 경우 홍문동 에탄올추출물을 투여한 그룹에서 control군과 vehicle군에 비해 감소하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 SHR 랫드는 WKY에 비해 신장기능이 저하되지만 혈압의 차이가 없는 것을 통해, 홍문동의 에탄올추출물은 신기능저하에 따른 혈압상승이 연관

성이 있음을 제시한다. 또한, 혈액 내의 Na, K, Cl과 같은 이온의 뚜렷한 변화를 나타내지는 못하지만, aldosterone의 농도는 유의적인 감소는 칼륨이온의 혈중 농도 감소에 의한 변화임을 제시한다.

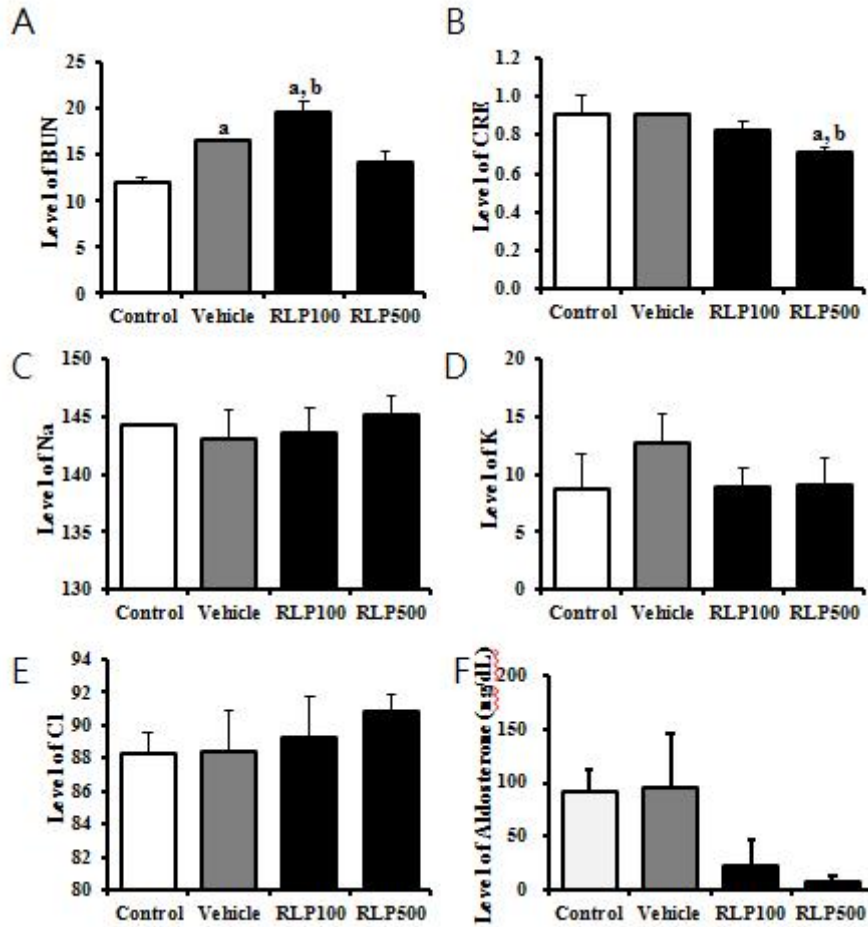


Figure 53. Effects of RLP on urea, creatinine, electrolyte and aldosterone levels in plasma. After final RLP administration, blood sera were collected from each group of WKY and SHR rats. (A) BUN, (B) creatinine, (C) Na, (D) K, (E) Cl, and (F) aldosterone level in WKY and SHR rats. Data are reported as the mean  $\pm$  SD of three replicates. \*  $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle-treated group.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발의 달성도 및 기여도

연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 1 세 부	1 차 년 도 홍문동의 기능성 제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 열수 및 주정을 이용하여 홍문동의 기능성 지표물질의 추출공정을 확립하였으며, 이를 토대로 차음료, 액기스 및 농축제품의 시제품을 생산함</li> <li>- 소비자 조사와 기호도 조사를 통해서 제품의 관능평가를 수행하였으며, 디자인 시안 작성 및 제품 시험성적, 품질검사를 통해서 제품 개발에 필요한 사항을 도출함</li> </ul>
	2 차 년 도 발효 맥문동 기능성 제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효 맥문동 제품을 개발하기 위하여 발효에 따른 총페놀성 화합물, 플라보노이드 및 항산화능에 대한 연구를 통해 맥문동 발효액의 생리활성을 검증하였고, 디자인 시안의 작성과 관능평가를 통해서 소비자의 기호에 맞는 배합 및 공정 조건을 확립함</li> </ul>
	3 차 년 도 발효 홍문동 기능성 제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효 홍문동 제품의 개발을 위하여 발효에 따른 생리활성 성분의 분석을 통해서 홍문동 발효액의 생리활성을 검증</li> <li>- 소비자 조사와 기호도 조사를 통해서 제품의 관능평가를 수행하였으며, 디자인 시안 작성 및 제품 시험성적서를 통해서 제품 개발에 필요한 사항을 도출함</li> </ul>

연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 1 협 동	1 차 년 도  홍문동 제조 최적화 및 특성 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 맥문동의 증숙을 시간 및 증숙 횟수에 따라서 홍문동을 제조함</li> <li>- 증숙 온도 및 증숙 횟수에 따른 일반성분 분석, 사포닌, 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량을 분석하였으며, 또한 다양한 항산화능의 분석을 통하여 15시간 동안 증숙을 한 후 70℃에서 72시간 건조하는 것이 유효성분을 극대화시킬수 있는 최적의 조건임을 제시함</li> <li>- 홍문동 제조시 문제가 될 수 있는 유해성분은 검출되지 않음</li> </ul>
	2 차 년 도  홍문동의 기능성 성분 분석 및 정제	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 메탄올 추출물과 부탄올 추출물에 따른 phenolic compound, 사포닌 계열 물질, 아미노당, 당류 분석 등을 수행하였으며, 메탄올 추출물로부터 얻어진 분획으로부터 증숙에 따라 생성된 물질을 순수 분리함</li> <li>- 맥문동의 증숙에 따른 당과 아미노산의 갈변반응에 의해 중요한 생리활성 물질이 생성됨을 제시함</li> </ul>
	3 차 년 도  - 홍문동의 기능성 성분 분석 및 대량분리 - 발효 맥문동의 기능성 성분 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prep HPLC를 이용하여 기능성 성분이 함유된 분획을 대량 분리하여 효능을 평가하였고, 증숙에 따른 사포닌 유도물질의 변화를 분석함으로써 증숙에 따른 맥문동의 생리활성 물질의 우수성을 과학적으로 증명함</li> <li>- 발효 맥문동의 기능성 물질을 분석하고 증숙맥문동과 비교 평가함</li> </ul>



연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 2 협 동	1 차 년 도 맥문동 및 홍문동 발효균주 분리 및 동정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 맥문동 및 홍문동을 발효할 수 있는 안전성이 확보된(GRAS) 다수의 토착 미생물을 확보함으로써 유용생물자원 수집에 기여하였음.</li> <li>- 분리균주들의 기능성을 평가한 후, 학술지에 논문을 게재하여 토착 미생물의 우수성 및 응용 가능성을 홍보하였음.</li> <li>- 분리균주들은 식품 전반에 이용가능하므로 제품의 다양화를 유도하는데 적용될 수 있음.</li> </ul>
	2 차 년 도 발효균주의 기능성 발현 최적조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 분리균주의 항산화 활성, 항고혈압 활성 생산 조건을 최적화함으로써 이들 배양액 이용을 위한 기초자료를 확보하는데 기여하였음.</li> <li>- 배양액 추출물은 다양한 식품에 응용가능하므로 유용미생물과 식품의 접목을 위한 기초자료를 제공하였음.</li> </ul>
	3 차 년 도 맥문동 및 홍문동 발효 최적조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지금까지 연구가 거의 수행되지 않았던 맥문동 및 홍문동의 발효과정을 확인함으로써 맥문동의 부가가치를 향상시키는데 기여하였음.</li> <li>- 발효를 통하여 맥문동 및 홍문동의 기능성을 발굴하고 평가함으로써 발효 맥문동 및 홍문동의 주요 활성성분들의 활용도를 증진시키는데 기여하였음.</li> </ul>

연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 3 협 동	1 차 년 도	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 홍문동의 항당뇨 및 인지개선 효능 분석을 위한 췌장세포주 (INS cells), 신경세포주(B35 cells)세포주 확립</li> <li>- 2종류의 세포주에 미치는 독성평가 및 최적처리농도의 결정</li> <li>- 증숙단계별 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능평가 수행 (인슐린 분비능 분석, 신호전달영향 분석)(NGF분비능 분석, 신호전달영향 분석)</li> <li>- 홍문동의 생리활성(항당뇨, 인지개선) 효능평가수행</li> <li>- 인삼 및 홍삼과 생리활성 효능의 비교분석</li> </ul>
	2 차 년 도	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 당뇨, 치매 등의 증상을 나타내는 모델동물 확보 및 교배를 통한 대량생산</li> <li>- 각 모델동물들의 질병에 대한 기초생리자료 확보</li> <li>- 홍문동의 항당뇨효능에 대한 분석 수행 (당뇨모델동물(OLETF 랫드)에서 인슐린분비량, 세포사, 신호전달에 미치는 영향 등을 분자생물학적, 조직학적, 생리학적 기술을 이용하여 분석)</li> <li>- 홍문동의 치매효능에 대한 분석 수행 (치매질환 모델동물(NSE/hAPPsw) 마우스에서 NGF의 분비, Aβ-42펩타이드의 생성, γ-secretase의 발현 등에 미치는 영향 분석)</li> </ul>
	3 차 년 도	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 홍문동의 GLP독성시험 프로토콜의 조사 및 확립을 통한 단회독성시험 실시 (홍문동이 체중, 간독성, 신장독성 등에 미치는 영향분석)</li> <li>- 홍문동이 질환개선 효능에 대한 평가 (홍문동의 변비기능개선에 미치는 영향 평가)</li> <li>- 홍문동의 약리효능 평가 (홍문동이 알러지에 미치는 영향 평가)</li> <li>- 홍문동의 약리동력학관련 영향평가</li> <li>- 홍문동의 생리활성 검증 (홍문동이 고혈압모델동물에서 질환개선에 미치는 영향 평가)</li> </ul>

## 제 2 절 기술적 측면

- 맥문동 증숙 및 발효 공정의 최적화를 통하여 농산물의 기능성 증진 기술의 선진화
- 맥문동에 특화된 가공방법의 개발과 제품개발전략에 맞춘 가공기술의 보유
- 고부가가치 및 기능성 식품소재의 개발로 관련산업의 국제 경쟁력 향상에 기여
- 기능성 소재 개발에 따른 특허등록으로 기술 선점 및 특허 출원을 통한 지적 재산권 확보
- 사업수행 과정에서 얻어진 자료들을 논문화하여 국내외 학술지에 게재

## 제 3 절 경제·산업적 측면

- 홍삼대체 식품 개발에 따른 저가·고기능성 사포닌 함유 제품 개발
- 맥문동 품질 향상으로 국내 농가 수익 창출
- 홍삼 수입 대체에 따른 국내산 맥문동 수요 창출
- 식음료분야 이외의 미용·두피 등 다양한 적용 가능성 창출
- 증숙 및 가공기술 노하우를 응용하여 다른 유용식물유래 기능성식품 및 제품 생산
- 기능성 소재 및 다양한 기능성 제품의 생산을 통하여 고부가가치 창출
- 기업의 신제품 개발로 경쟁력 제고

## 제 4 절 사회·문화적 측면

- 맥문동을 이용한 고부가가치 웰빙 기능성 식·의약 소재 개발로 농업분야에서 주변 국가와의 경쟁에서 차별성과 우월성을 확보하여 농가 발전 도모
- 맥문동의 우수한 생리적 안전성, 기능성이 검증 및 이용으로 국민보건 향상과 국가 위상제고

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 특허출원

1. 발명의 명칭: 생리활성물질의 함량이 증가된 증숙 맥문동의 제조방법

출원(등록)일자: 2011. 06. 30. (2013. 07. 30)

출원번호: 10-2011-0064739

등록번호: 10-1293250

출원인 명칭: 부산대학교 산학협력단

발명자 성명: 이희섭, 황대연, 손홍주, 박소해, 김민정, 박정은, 김원백

2. 발명의 명칭: 생리활성물질의 함량이 증가된 증숙 맥문동의 열수 추출물을 포함하는 음료 및 이의 제조방법

출원일자: 2011. 08. 18.

출원번호: 10-2011-0082164

출원인 명칭: 부산대학교 산학협력단

발명자 성명: 이희섭, 황대연, 손홍주, 이종섭, 박소해, 김민정, 박정은, 김원백

3. 맥문동 및 증숙 맥문동의 발효방법에 대해 특허 출원준비 중.

### 제 2 절 논문

1. 저널 : 미생물생명과학회지

저자 : 김정도, 박성보, 이나리, 정진하, 이희섭, 황대연, 이종섭, 정성윤, 손홍주

제목 : 잠재적 생균제로서 식물 젖산균의 분리 및 특성

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2011, 39(3), p.308-312

2. 저널 : Korean Journal of Life Science

저자 : Sung-Bo Park, Jeong-Do Kim, Na-Ri Lee, Jin-Ha Jeong, Seong-Yun jeong, Hee-Seob Lee, Dae-Youn Hwang, Jong-Sup Lee, Hong-Joo Son

제목 : Isolation and characterization of lactic acid bacteri with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2011, 21(10), p.1428-1433

3. 저널: Laboratory Animal Research

저자: Choi SI, Lee HR, Goo JS, Kim JE, Nam SH, Hwang IS, Lee YJ, Prak SH, Lee HS, Lee JS, Jang IS, Son HJ, Hwang DY.

제목: Effects of Steaming Time and Frequency for Manufactured Red *Liriope platyphylla* on the Insulin Secretion Ability and Insulin Receptor Signaling Pathway

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2011, 27(2), p.117-126

4. 저널: International Journal of Molecular Medicine

저자: Hye Ryun Lee, Ji Eun Kim, Jun Seo Goo, Sun Il Choi, In Sik Hwang, Young Ju Lee, Hong Joo Son, Hee Seob Lee, Jong Sup Lee, Dae Youn Hwang

제목: Red *Liriope platyphylla* contains a large amount of polyphenolic compounds which stimulate insulin secretion and suppress fatty liver formation through the regulation of fatty acid oxidation in OLETF rats

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2012, 30, p.905-913

5. 저널: Molecular Medicine Report

저자: Choi SI, Goo JS, Kim JE, Nam SH, Hwang IS, Lee HR, Lee YJ, Son HJ, Lee HS, Lee JS, Kim HJ, Hwang DY.

제목: Differential Effects of the Steaming Time and Frequency for Manufactured Red *Liriope platyphylla* on the NGF Secretion Ability, NGF Receptor Signaling Pathway, and Regulation of the Calcium Concentration

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2012, 6(5), p.1160-1170

6. 저널 : Laboratory Animal Research

저자 : Sun-Il Choi, Ji-Eun Kim, In-Sik Hwang, Hye-Ryun Lee, Young-Ju Lee, Moon-Hwa Kwak, Hong-Joo Son, Hee-Seob Lee, Jong-Sub Lee, Byeong-Cheol Kang, Dae-Youn Hwang

제목 : Toxicity of red *Liriope platyphylla* manufactured by steaming process on liver and kidney organs of ICR mice.

게재 년도, 볼륨, 페이지 : 2012, 28(4), p.229-238

7. 저널 : Laboratory Animal Research

저자 : Sun-Il Choi, Jun-Seo Goo, Ji-Eun Kim, In-Sik Hwang, Hye-Ryun Lee, Young-Ju Lee, Hong-Joo Son, Hee-Seob Lee, Jong-Sup Lee, Dae-Youn Hwang

제목 : Effects of Red *Liriope platyphylla* on NGF secretion ability, NGF receptor signaling

pathway and  $\gamma$ -secretase components in NSE/hAPPsw transgenic mice expressing Alzheimer's Disease.

게재 년도, 볼륨, 페이지: 2012, 28(3), p.155-163

8. 저널 : Laboratory Animal Research

저자 : Hye-Ryun Lee, Ji-Eun Kim, Young-Ju Lee, Moon-Hwa Kwak, Dong-Soon Im, Dae-Youn Hwang

제목 : Red Liriope platyphylla stimulated the insulin secretion through the regulation of calcium concentration in rat insulinoma cells and animal models.

게재 년도, 볼륨, 페이지 : 2013, 29(2), p.84-95

9. 저널 : 환경과학회지

저자 : 이나리, 우가영, 장준혁, 이상미, 고태훈, 이희섭, 황대연, 손홍주

제목 : 한국 전통발효식품인 청국장에서 분리한 *Bacillus methylotrophicus*에 의한 항산화물질의 생산

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2013. 22(7), p.855-862

### 제 3 절 학술발표

1. 국제학술대회

가. 학회 : 2011 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology

발표자 : So-Hae Park, Min-Jeong Kim, Jeong-Eun Park, Won-Baek Kim, Dae-Yeon Hwang, Hong-Ju Son, Heeseob Lee

제목 : Effects of steaming process on the phenolic content and antioxidant capacities of Liriopsis tuber

발표일시 : 2011. 6. 8.~ 6. 10.

나. 학회 : The 53rd Annual Meeting and International Symposium of Korean Society of Life Science

발표자 : Sung-Bo Park, Sang-Mee Lee, Na-Ri Lee, Hee-Seob Lee, Dae-Youn Hwang, Hong-Joo Son

제목 : Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria with ACE Inhibition Activity and Antioxidant Activity

발표일시 : 2012. 10. 25 (p239)

다. 학회 : The 53rd Annual Meeting and International Symposium of Korean Society of Life Science

발표자 : Sang-Mee Lee, Sung-Bo Park, Na-Ri Lee, Hee-Seob Lee, Dae-Youn Hwang, Hong-Joo Son

제목 : Physiological Characteristics and Fermentation of Hot-Water Extract and Autoclaved Extract from Maegmundong (*Liriope platyphylla*)

발표일시 : 2012. 10. 25 (p240)

## 2. 국내학술대회

가. 학회: 한국실험동물학회 동계학술대회

발표자: 최선일

제목: Red *Liriope Platyphylla* were signaifcantly increased the secretion of insulin and nerve growth factor

발표일시: 2011.02.18.

나. 학회 : 2011 한국응용생명화학학회 춘계학술대회

발표자 : Jeong-Do Kim, Sung-Bo Park, Na-Ri Lee, Young-Dong Jeon, Jin-Ha Jeong, Hee-Seob Lee, Dae-Youn Hwang, Hong-Joo Son

제목 : Isolation and characterization of lactic acid bacteria for development of fermented product of *Liriope platyphylla*

발표일시 : 2011. 4. 15 (p108)

다. 학회: 한국실험동물학회 국제학술대회

발표자: 이해련

제목: Effects of steaming time and frequency for manufactured Red *Liriope Platyphylla* on NGF secretion ability and NGF receptor signal pathway

발표일시: 2011.08.27

라. 학회: 한국실험동물학회 동계학술대회

발표자: 이해련

제목: Effect of RLP on the mechanism of insulin secretion

발표일시: 2012.02.16

## 제 4 절 그 외 활용계획

### ○ 활용방안

- 맥문동의 증숙, 발효 및 가공기술 개발을 통하여 사포닌 함량, 기능성 성분 등이 증가된 새로운 맥문동 제품(홍문동)을 생산하고, 이 과정에서 획득된 기술 노하우는 특수 기능성 제품 개발에 응용 가능할 것으로 예측되며, 결과적으로 다양한 기능성 식품 및 제품의 창출 및 국민 건강 증진에 활용할 수 있을 것임.
- 고가의 홍삼 대체식품 개발, 고기능성 사포닌 함유 제품 개발을 통하여 국내 맥문동 재배 농가의 확대 및 농가 수익 증가를 유도하고, 중장기적으로 저품질의 수입산 인삼 및 홍삼을 대체할 수 있는 학문적 기초자료로 활용할 수 있음.
- 맥문동 성분 표준화, 가공기술 표준화 등을 통하여 기존 맥문동 제품과 차별화될 수 있는 맥문동의 품질 향상을 꾀할 수 있으며, 나아가 식음료 외의 미용, 두피제품 등 다양한 고부가가치 맥문동 응용분야 창출 및 활성화에 활용할 수 있음.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 맥문동 유래 신규 물질 정보

중국에 자생하는 맥문동인 *Liriope muscari*로부터 신규 물질인 norcurlignan (2S,3R-methyl 7-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxylate)과 limlactone(4R,5S-5-(3-hydroxy-2,6-dimethylphenyl)-4-isopropylidihydrofuran-2-one)을 분리하여 보고하였으며, DPPH radical과 ATBS radical 소거능을 보유하고 있어 맥문동에 존재하는 항산화 물질로 판단된다. *L. muscari*는 본 연구과제에서 사용하는 국내 자생 맥문동인 *L. platyphylla*와는 일부 효능 및 생리활성 물질이 차이나는 것으로 알려져 있기는 하지만, *L. platyphylla*에 존재할 가능성이 있는 norcurlignan 및 limlactone 유사물질의 분리 및 구조 분석에 유익한 정보를 제공하고 있는 것으로 판단된다.

### 제 2 절 증숙 공정관련 해외 기술정보

일반적인 증숙의 방법은 인삼을 이용하여 홍삼을 제조하는 방법에 많이 사용되고 있으며, 물이 끓는 온도인 100℃의 증기를 이용하거나 121.1℃ (약 1atm)의 조건을 활용하고 있다. 최근의 연구 논문에서 183~258℃의 온도에서 10~45atm의 고압 증기를 이용하여 마늘을 처리한 후 항산화 활성을 측정된 연구가 보고 되었다. 항산화능은 45atm에서 5분간 처리하였을 때 가장 높은 항산화력을 보였으며, 이는 흑마늘보다 항산화능이 높은 것으로 나타났다. 또한 생리활성을 가지는 phenolic compound의 경우 30atm에서 5분간 처리하였을 때 가장 많이 생성되는 것으로 나타났다. 이와 같은 정보로부터 초고압의 증기(30~40atm)를 처리하였을 때, 기존의 증숙방법에 비해 처리하는 시간을 상당히 단축되며 우수한 증숙효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 하지만, 아직은 2L정도의 실험실 연구수준의 규모로 진행되는 형태이므로 산업적으로 이용되기에는 많은 연구 및 장비에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

### 제 2 절 효능평가를 위한 해외 질환모델 정보

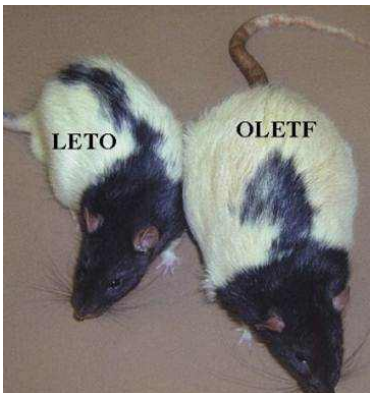
본 과제에서는 각 질환에 해당하는 모델 동물을 사용함으로써 홍문동의 치매 저해능 및 당뇨와 고혈압 저해능을 확인하고자 하였으며 사용된 질환모델동물의 정보는 아래와 같다.

### 1. NSE/hAPPsw mouse model



알츠하이머 질환 모델 동물로 그 증상은 첫째, 약간의 기억 및 학습능력의 손상. 둘째, 18개월령에서의 Tau 유전자의 현저한 발현 그리고 Tau 단백질의 활성화 및 paired helical filament (PHFs) 증가. 셋째, 연령과 비례하여 GSK3b 인산화 증가는 Tau와 b-catenin의 인산화 및 PS1의 활성화를 증가시킨다. 넷째, 정상마우스와 달리 형질전환된 Tau 마우스에서 Tau 결합단백질에 대한 lithium (LiCl)의 저해작용을 볼 수 있다. 그러므로, 형질전환동물에서의 hTau24 과발현은 Tau 결합단백질의 인산화를 유도하고 행동적인 결함을 유발시켜 결국은 알츠하이머 질환을 유도한다. 따라서, 이들 형질전환동물은 알츠하이머 질환을 치료하기 위한 새로운 치료제 개발에 유용할 것으로 기대할 수 있다. 본 과제에서는 이러한 알츠하이머 질환 모델 동물을 이용하여 홍문동의 알츠하이머 저해효과를 보고자 하였다.

### 2. OLETF rat 모델



당뇨병성 신증은 제2형 당뇨병에서 중요한 합병증이며 말기신 질환에 이르는 가장 중요한 원인이다. 당뇨병성 신증은 사구체간질과 세뇨관간질에 점진적인 세포외기질의 축적이 특징적이며 결국 단백뇨와 신부전에 이르는 특징이 있다.

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 랫드는 자발적으로 제2형 당뇨병이 발생하고 점차 당뇨병성 사구체경화증으로 진행되는 동물모델로 경도의 비만과 18주령 이후에 발생하는 고혈당 및 당뇨병의 만성합병증 등 사람의 제 2 형 당뇨병과 비슷한 경과를 취하는 동물로 알려져 있다. 적극적인 혈당조절과 고혈압치료에도 불구하고 당뇨병성 신증은 임상에서 중요한 문제이며 안지오텐신전환효소억제제와 안지오텐신수용체길항제가 널리 쓰이고 있지만 당뇨병에 의한 말기신부전환자는 증가추세이다. 따라서 새로운 당뇨병성 신증의 예방 및 치료제의 개발이 절실하다고 할 수 있다. 따라서 본 과제에서는 이러한 당뇨 질환 모델 동물을 사용하여 홍문동의 당뇨 치료 효과를 확인하고자 하였다.

### 3. SHR (Spontaneous Hypertensive Rat) 모델

일본 Okamoto에 의해 Wistar Kyoto 랫드에서 확립된 계통으로 알비노 중형이다. 선천적으로 생후 8-12주가 지나면 고혈압이 나타나고 사람의 일차성 고혈압의 질환모델로 쓰인다.



고혈압과 고지혈증은 심혈관 질환의 주요한 위험인자 중 하나이며, 이들 질환과 연관된 표적 장기의 손상은 심혈관 질환의 발생과 진행에 있어 중요한 역할을 한다. 표적장기 손상을 일으키는 주된 원인으로서는 고혈압, 고지혈증, 당뇨 등이 알려져 있으며, 최근에는 산화스트레스(oxidative stress)의 불균형이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 과제에서는 이러한 SHR 질환모델

동물을 사용하여 홍문동의 고혈압 예방효과를 알아보려고 하였다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

## 제 8 장 참고문헌

1. Academic society for pharmacognosy. 1992. Pharmacognosy. Hakchangsa, Seoul. p 467-469.
2. Back NI, Cho SJ, Bang MH, Lee IZ, Park CG, Kim MS, Kim KS, Sung JD. 1998. Cytotoxicity of steroid saponins from the tuber of *Liriope platyphylla* W.T. Agric Chem Biotechnol 41: 390-394.
3. Baek NI, Kim DS, Lee YH, Park JD, Lee CB, Kim SI. 1996. Ginsenoside Rh4, a genuine dammarane glycoside from Korean red ginseng. Planta Med 62(1): 86-87.
4. Chang WT, Choi YH, Van der Heijden R, Lee MS, Lin MK, Kong H, Kim HK, Verpoorte R, Hankemeier T, Van der Greef J, Wang M. 2011. Traditional processing strongly affects metabolite composition by hydrolysis in *Rehmannia glutinosa* roots. Chem Pharm Bull (Tokyo) 59(5):546-552.
5. Chao MV. 1994. The p75 neurotrophin receptor. J Neurobiol 25(11): 1373 - 1385.
6. Choi SI, Lee HR, Goo JS, Kim JE, Nam SH, Hwang IS, Lee YJ, Park SH, Lee HS, Lee JS, Jang IS, Son HJ, Hwang DY. 2011. Effects of Steaming Time and Frequency for Manufactured Red *Liriope platyphylla* on the Insulin Secretion Ability and Insulin Receptor Signaling Pathway. Lab Anim Res 27(2): 117-126.
7. Choi SI, Park JH, Her YK, Lee YK, Kim JE, Nam SH, Goo JS, Jang MJ, Lee HS, Son HJ, Lee CY, Hwang DY. 2010. Effects of Water Extract of *Liriope platyphylla* on the mRNA Expression and Protein Secretion of Nerve Growth Factors. Korean J Medicinal Crop Sci 18: 291-297.
8. Choi SB, Wha JD, Park S. 2004. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. Life Sci 75(22): 2653-2664.
9. Council for College of Pharmacy. 2003. Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia. 8th ed., Shinil Co., Seoul. p 1104-1105.

10. Hur J, Lee P, Kim J, Kim AJ, Kim H, Kim SY. 2004. Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biol Pharm Bull* 27(8): 1257-1260.
11. Hur J, Lee P, Moon E, Kang I, Kim SH, Oh MS, Kim SY. 2009. Neurite outgrowth induced by spicatoside A, a steroidal saponin, via the tyrosine kinase A receptor pathway. *Eur J Pharmacol* 620(1-3): 9-15.
12. Hwang DY, Chae KR, Kang TS, Hwang JH, Lim CH, Kang HK, Goo JS, Lee MR, Lim HJ, Min SH, Cho JY, Hong JT, Song CW, Paik SG, Cho JS, Kim YK. 2002. Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 16(8): 805-813.
13. Hyun KJ, Chung HW, Hong SS, Park JH, Lee J and Kwon SW. 2010. Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *J Food Chem* 119: 619-625.
14. Im JG, Kang MS, Park IK, Kim SD. 2005. Dietary effects of *Liriope* tuber water extracts on the level of blood glucose and serum cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rat. *J East Asian Dietary Life* 15: 20-28.
15. Jeong S, Chae K, Jung YS, Rho YH, Lee J, Ha J, Yoon KH, Kim GC, Oh KS, Shin SS, Yoon M. 2008. The Korean traditional medicine Gyeongshingangjeehwan inhibits obesity through the regulation of leptin and PPARalpha action in OLETF rats. *J Ethnopharmacol* 119(2): 245-251.
16. Kiefer D, Pantuso T. 2003. *Panax ginseng*. *Am Fam Physician* 68(8): 1539-1542.
17. Kim H, Jung HS, Kwon J, Lee KG. 2003. Effect of Maekmoondong-tang on the immunomodulatory action. *Korean J orient med pathol* 6: 946-951.
18. Kim K, Kim HY. 2008. Korean red ginseng stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *J Ethnopharmacol* 120(2): 190-195.

19. Kim SD, Ku YS, Lee IZ, Kim ID, Youn KS. 2001. General components and sensory evaluation of hot water extract from *Liriodopsis tuberosa*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 20-24.
20. Kim SJ. 2006. Brain cell protection and increase of memorial ability from *Liriodopsis tuberosa* extract component. Patent 10-0635440.
21. Kim SM, Lee CY, Kim YC, Choi IS, Min KK, Seong JD. 2007. Effects of organic fertilizers on growth and yield in *Liriodopsis platyphylla* Wang et Tang. *Korean J Med Crop Sci* 15: 148-151.
22. Kim SW, Chang IM, Oh KB. 2002. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by medicinal plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(12): 2751-2754.
23. Kim YC, Hong HD, Rho JH, Cho CW, Rhee YK and Yim JH. 2007. Changes of phenolic acid contents and radical scavenging activities of ginseng according to steaming times. *J. Ginseng Res.* 31(4): 230-236.
24. Lee WC. 1996. Korean plant encyclopedia. Academybook Co., Seoul. p 397.
25. Lee YC, Lee JC, Seo YB, Kook YB. 2005. *Liriodopsis tuberosa* inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. Inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *J Ethnopharmacol* 101(1-3): 144-152.
26. Lee YK, Kim JE, Nam SH, Goo JS, Choi SI, Choi YH, Bae CJ, Woo JM, Cho JS, Hwang DY. 2011. Differential regulation of the biosynthesis of glucose transporters by the PI3-K and MAPK pathways of insulin signaling by treatment with novel compounds from *Liriodopsis platyphylla*. *Int J Mol Med* 27(3): 319-327.
27. Li WJ, Zhang ZH, Cheng XL, Liu J, He Y, Zhou C, Guo Y, Lin RC, and Wang GL. 2012. Two new compounds isolated from *Liriodopsis muscari*. *Molecules* 17(8):8773-8781.
28. Lu JM, Yao Q, Chen C. 2009. Ginseng compounds: an update on their molecular mechanisms and medical applications. *Curr Vasc Pharmacol* 7(3): 293-302.

29. Miller FD, Kaplan DR. 2001. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 58(8): 1045 - 1053.
30. Ng TB. 2006. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panaxnotoginseng*). *J Pharm Pharmacol* 58(8): 1007-1019.
31. Noda Y, Asada C, Sasaki C, Hashimoto S, and Nakamura Y. 2013. Extraction method for increasing antioxidant activity of raw garlic using steam explosion. *Biochem Eng J* 73:1-4.
32. Okuda, H . 1995. Medicinal Korean ginseng 95. Kyoritsu Pub. Co., Tokyo, Japan. P 233
33. Prajapati KD, Sharma SS, Roy N. 2010. Upregulation of albumin expression in focal ischemic rat brain. *Brain Res* 1327: 118-124.
34. Ray B, Chauhan NB, Lahiri DK. 2011. Oxidative insults to neurons and synapse are prevented by aged garlic extract and S-allyl-Lcysteine treatment in the neuronal culture and APP-Tg mouse model. *J Neurochem* 117(3): 388-402.
- 35.. Rhee IJ, An JY. 2003. Hepatoprotective effects of water extract of *Liriopsis tuber* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Korean J Pharmacogn* 34: 166-171.
36. Shibata M, Noguchi R, Suzuki M, Iwase H, Soeda K, Niwayama K, Kataoke E, Hamano M. 1971. Pharmacological studies on medicinal plant components I. On the extracts of *Ophiopogon* and some folk medicine. *Proc Hoshi Pharm* 13: 66-76.
37. Shin JG, Park JW, Pyo JK, Kim MS. and Chung MH. 1990. Protective effects of a ginseng component, maltol (2-methyl -3-hydroxy-4-pyron) against tissue damages induced by oxygen radicals. *Korean J. Ginseng Sci.* 14: 197-190.
38. Tabuchi M, Yamaguchi T, Iizuka S, Imamura S, Ikarashi Y, Kase Y. 2009. Ameliorative effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol* 122(1): 157-162.



39. Tomoda M, Gonda R, Shimizu A, Kanari M. 1990. A reticuloendothelial system activating glycan from the barks of *Eucommis ulmosdes*. *Phytochemistry* 29: 3091-3094.
40. Torres KC, Dutra WO, Gollob KJ. 2004. Endogenous IL-4 and IFN gamma are essential for expression of Th2, but not Th1 cytokine message during the early differentiation of human CD4+ T helper cells. *Hum Immunol* 65(11): 1328-1335.
41. Wang YJ, Pollard A, Zhong JH, Dong XY, Wu XB, Zhou HD, Zhou XF. 2009. Intramuscular delivery of a single chain antibody gene reduces brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 30(3): 364-376.
42. Yun TK, Lee YS, Kwon HY, Choi KJ. 1996. Saponin contents and anticarcinogenic effects of ginseng depending on types and ages in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 17(4): 293-298.
43. Yun TK, Lee YS, Lee YH, Kim SI and Yun HY. 2001. Anticacinogenic effect of Panax ginseng C.A Meyer and identification of active compounds. *J Korean Med Sci* 16:S16-18.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.