

발간등록번호

11-1541000-001247-01

자색고구마 발효공정 최적화에 의한  
천연 기능성 색소 개발

(Development of natural and functional colorant  
through the fermentation process optimization for  
purple sweet potato)

전남식품산업연구센터

농림축산식품자료실



0022837

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “자색고구마의 발효공정 최적화에 의한 천연 기능성 색소개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 30일

주관연구기관명 : 전남식품산업연구센터

주관연구책임자 : 정 경 희

연 구 원 : 김 기 명

연 구 원 : 위 지 향

연 구 원 : 윤 수 경

연 구 원 : 성 혜 미

연 구 원 : 정 경 옥

협동연구기관명 : 한아름영농조합법인

협동연구책임자 : 이 덕 한

## 요 약 문

### I. 제목: 자색고구마의 발효공정 최적화에 의한 천연 기능성 색소 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 현대인은 생활습관 변화로 과도한 영양섭취와 운동 부족으로 인해 체내의 지방이 과잉축적되면서 비만이 유발 될 수 있음. 비만은 대사성 질환을 일으키는 위험 인자로서 만성적인 질환인 제2형 당뇨병, 고혈압, 동맥경화, 지방간, 심장질환의 원인이 됨.
- 공중 보건에 대한 관심이 높아지고 삶의 질을 향상시키고자 하는 욕구가 증가함에 따라 더욱더 많은 사람들이 비만의 위해성에 대해 깊이 인식하고 있으며 과도한 지방 섭취는 당뇨와 같은 다른 합병증을 유발할 확률이 현저하게 증가된다는 사실이 알려진 이후로 과도한 체지방이 단순한 미용의 관점에서 질병의 관점으로 인식의 전환이 이루어지고 있음.
- 비만과 당뇨는 세계 대부분의 나라의 인구 건강을 위협하는 대표적 질병으로 WHO는 2005년 당뇨병으로 사망한 사람을 110만명으로 추정하였으나 실제적으로는 이보다 훨씬 높을 것으로 예상되고 있음. 더욱이 이 수치는 과거 10년 전에 비해 50%나 증가한 수치임.
- 이러한 급격한 증가는 소아 비만율의 증가로 인한 것으로 과거 성인에게만 발병하는 것으로 인식되던 당뇨가 비만 소아에게도 나타나게 되었기 때문이며 비만과 관련된 복합적 질환인 대사성 질환의 발병 증가도 관련이 있음. 특히 대사성질환의 경우 당뇨병의 주요사인인 심혈관계 질환의 이환 가능성을 증가시킴. 그러므로 비만과 제2형 당뇨 및 관련 질환을 해결하기 위한 새로운 전략의 개발에 대한 필요가 절실함. 특히 대사성 질환과 관련 질환 발병 기전에 대한 정확한 이해는 이러한 새로운 치료 전략의 개발에 매우 필수적으로 사료됨.
- 비만은 인슐린 저항성 증가 및 제 2형 당뇨의 위험성을 증가시키는 것으로 알려져 왔음. 비만인의 지방조직은 비에스테르성 지방산(non-esterified fatty acid, NEFA), 글리세롤, 호르몬, 염증관련 cytokines 등을 분비하고 이는 인슐린 저항성을 유도하게 됨.
- 당뇨병은 고혈당 상태를 나타내는 여러 질환을 말하는 것으로 당뇨병의 병태생리는 매우 다양함. 일반적으로 인슐린 분비의 절대적 또는 상대적 부족이나, 인슐린 표적세포에서 인슐린의 생물학적 효과 감소로 인하여 발생하는 고혈당 및 이에 수반되는 대사장애가 장기간 지속되는 질환임. 당뇨가 유발되면 당질대사 및 지질대사 등의 생체 내 대사조절기능 이상으로 고혈당증, 고지혈증 및 심혈관계 질환 등의 합병증이 생기게 됨.

- 고지혈증에 노출되면 혈액 중 지질성분이 증가하는 상태로 고콜레스테롤 혈증과 고중성지방 혈증을 유발하며 그 원인으로는 식사조절, 운동부족, 노화 및 환경인자 등의 요인에 의하여 유발됨.
- 이러한 대사성 질환은 치료보다는 예방적인 대응이 바람직하여 음식을 통해서 섭취되는 phyrochemical, pigment 등의 식물 유래의 이차 대사산물이 중요한 역할을 하게 된다.
- 인공색소는 색소의 안정성은 우수하나, 안전성이 떨어지기 때문에, 안전한 먹거리를 찾는 시대적인 요구와 소비자의 요구가 많아지고 있는 실정이며, 천연색소의 경우에는 기능성과 안전성은 뛰어나지만 구조적으로 안정성이 떨어지므로, 이를 해결할 수 있는 안정성 증대 기술이 필요함.
- 천연색소의 세계시장은 2007년 4,800억원으로 시장이 확대되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우에는 천연색소의 시장이 미비하고, 거의 개발이 되지 않은 상황임. 안정성에 떨어지는 인공색소를 대신하여 기능성, 안전성을 갖춘 천연색소로의 시장이 전환 될 것임.
- 천연색소의 세계시장은 2007년 4,800억원으로 시장이 확대되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우에는 천연색소의 시장이 미비하고, 거의 개발이 되지 않은 상황임. 안정성에 떨어지는 인공색소를 대신하여 기능성, 안전성을 갖춘 천연색소로의 시장이 전환 될 것임.
- 이차 대사산물중 천연색소는 주요한 물질로서 향후 화학색소의 대체 소재로서 뿐만 아니라 건강기능성소재로서도 무한한 잠재력을 가지고 있어 색소에 대한 다양한 연구가 필요한 시점이다.
- 자색고구마의 생산지역은 전남 무안과 해남, 전북 익산, 경남 함양에 집중되어 있으며, 재배 면적은 약 95 ha이고, 약 500여 농가에서 연간 1,400톤이 생산되고 있으나, 생물로만 판매되고, 가공식품 소재로는 사용이 거의 없는 실정 이어서 생산농가가 판로에 큰 애로를 겪고 있음
- 색소자체의 물리화학적인 연구와 더불어 생리활성과의 연관성을 규명하는 연구는 매우 중요한 분야이며 안토시아닌의 다양한 생리기능성을 규명함으로써 천연색소의 응용분야가 확대되어질 것으로 예상된다.
- 안토시아닌으로서의 전체 색소의 기능에서 더 나아가 단일 물질로 분리된 색소 성분의 구조분석과 더불어 연관된 활성을 검증해나가는 것이 더욱 요구되고 있다.
- 색소 등의 생산에 있어서 안정성은 매우 중요한 요소이며 이와 관련하여 용매추출과 발효공정을 이용한 추출시 색소의 변화에 관한 연구도 점차적으로 증가하는 추세이다.
- 천연색소를 이용한 비만, 당뇨, 고혈압, 고혈압, 시력 관련 기능성들이 계속 밝혀지고 있으며 이는 미래의 식품에서 중요한 소재로서의 영역이 확대될 것으로 예상된다.

### III. 연구개발 내용 및 결과

국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 1994년에 일본 큐슈의 가고시마현에서 재배되어진 일본재래종 품종인 “Yamakawamurasaki (산천자)”와 국내품종 “신미”를 교배하여 얻어진 실생으로부터 2001년까지 8개년에 걸쳐 일련의 시험 및 선발과정을 거쳐 자색을 띠는 “신자미”라는 품종의 자색고구마가 국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 개발되었다.

본 실험에서는 신자미의 부분인 산천자와 모본인 신미 그리고 그로부터 얻어진 신자미 각각에 함유된 안토시아닌 조성을 비교하고자 하였다. 먼저 각각의 고구마를 일정량씩 취하여 일정한 크기로 slicing 한 후 이들 각각을 0.1% Trifluoroacetic acid가 함유된 70% EtOH로 추출한 후 여과하여 농축하고 이를 동결건조를 실시하여 분말형태의 추출물을 얻었다.

얻어진 각각의 추출물을 소량씩 취하여 MeOH에 녹여 520 nm에서 HPLC 분석을 실시하여 얻어진 크로마토그램을 비교하여 각각의 고구마에 함유된 안토시아닌 조성을 비교하였다.

HPLC 분석 결과, 자색을 전혀 보이지 않는 신미의 경우에는 역시나 520 nm에서 전혀 peak를 보이지 않았으나, 산천자와 신자미는 520 nm에서 흡광도를 나타내는 peak가 수중 확인되었다. 산천자의 경우에는 국내품종이 아닌 일본 큐슈지방에서 자생하는 고구마로서 일본에서는 이에 대한 연구가 상당히 많이 이루어져서 산천자에 함유된 안토시아닌 화합물에 대한 구조 동정이 많이 이루어진 상태로 산천자에 함유된 안토시아니딘은 peonidin이 대부분이며 그 외에 cyanidin이 소량 존재한다고 알려져 있으며, 이들 anthocyanidin 골격의 3번 또는 5번 위치에 당과 다른 phenolic 화합물이 결합되어 있다는 많은 보고들이 있다. 이에 이 산천자를 부분으로 하여 개발된 신자미도 산천자와 유사한 화합물들이 함유되어 있을 것이라 생각되어지며, 이를 산천자와 동일한 방법으로 추출하여 같은 조건에서 HPLC 분석을 실시해 본 결과 이들의 chromatogram이 거의 유사함을 확인할 수 있었다.

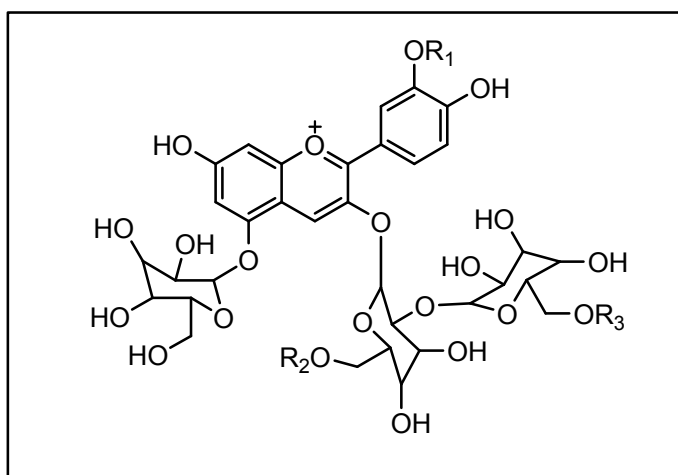
신자미(생물 약 1 kg)를 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 70% EtOH 4 L로 추출하여 안토시아닌 색소 추출물을 얻었다. Amberlite XAD-7 (20~60 mesh, sigma사)을 100% 증류수로 slurry를 만들어 column(3×19 cm)에 충전 시킨 후 자색고구마 추출물을 물에 녹여 Amberlite XAD-7 column에 charge 하여 물, EtOH 획분으로 분획하여 정제하였다. 얻어진 각각의 분획물을 대상으로 HPLC 분석을 실시하여 안토시아닌의 조성을 확인한 결과, EtOH 획분에 안토시아닌 화합물이 함유되어 있음이 확인되었다. 이 EtOH 획분에 함유된 안토시아닌을 더 정제하기 위하여 이 등의 방법에 따라 에탄올과 에테르를 이용한 침전법을 사용하여 색소를 정제하였다. 즉, Amberlite XAD-7에서 얻어진 EtOH 획분을 1% HCl이 함유된 MeOH 용액(250 ml)에 용해 시킨 후 이 용액에 3배수의 ethylether (750 mL)을 첨가하면 안토시아닌 색소가 침전되어진다. 침전된 안토시아닌 색소를 원심분리를 실시하여 침전물을 분리하였다.

분리된 침전물을 대상으로 520 nm에서 HPLC 분석을 실시한 결과, 총 12종의 안토시아닌

색소가 함유되어 있음을 알 수 있었다.

분리한 안토시아닌 침전물에 함유된 각각의 안토시아닌 색소를 분리하기 위하여 prep-HPLC를 이용하여 화합물을 분취한 후 자색고구마 안토시아닌 색소 각각의 구조를 확인하기 위하여 단리한 각각의 화합물을 대상으로 HPLC-MS/MS 및 NMR 분석을 실시하여 화합물 구조를 확인하였다.

논문의 raw data와 그 결과를 서로 비교하여 최종 구조를 확인하고 동정하였다. 그 결과 신자미에서 단리된 안토시아닌 화합물은 아래 표에 나타난 것과 같이 일본에서 단리한 안토시아닌과 그 구조가 거의 유사함을 확인할 수 있었다.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Total M.W.
S <sub>3</sub>	H	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	H	893
S <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	H	907
S <sub>9b</sub>	H	Caffeic acid	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	1055
S <sub>11</sub>	CH <sub>3</sub>	Caffeic acid	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	1069
S <sub>12</sub>	CH <sub>3</sub>	Caffeic acid	Ferulic acid	1125

자색고구마에 함유된 총 12종의 안토시아닌 중에서 main peak라 할 수 있는 5종의 화합물에 대한 구조는 확인이 되었으나 아직 그 구조가 확인되지 않은 나머지 화합물에 대해서는 현재 그 구조를 확인하는 작업을 진행하고 있다.

한아름영농조합에서 발효 음료제품의 생산 시 종균으로 사용하고 있는 혼합균을 이용하여 발효의 주 원인균을 단리·동정 결과, *Issatchenkia orientalis*와 *Lactobacillus fermentum* 균을 동정하였다. 자색고구마를 100℃에서 60분간 가열 처리한 후 단리한 균을 접종시킨 것과 동시에 한아름영농조합에서 자색고구마의 발효에 사용되는 혼합균주(종균)를 접종하여 발효

시켜보면서 발효 시간별로 발효액의 pH, Abs의 변화와 안토시아닌 색소의 정성/정량 분석 및 HPLC 분석을 통하여 발효 양상을 비교한 결과 *Issatchenkia orientalis* (Issa)를 접종하여 발효한 발효액과 혼합균주 (종균)를 접종하여 발효시킨 발효액의 이화학적, 물리적인 변화 양상이 거의 유사함이 확인되어 Issa 균주가 발효에 영향을 미치는 주 원인균으로 판단되었다. 발효 조건을 확립하고자 접종 농도, 발효시간 등을 비교한 결과, 자색고구마를 95℃에서 60분간 가열처리 한 후 Issa 균주를 0.5% 농도로 접종하여 30℃에서 3일간 발효시키는것이 적합하다는것을 확인하여 이 조건으로 pilot 발효를 실시하여 최종 발효 추출물을 얻었다.

자색고구마 pilot 발효 추출물의 저장기간에 따른 변화를 확인하기 위하여 추출물을 제조 하였을 때 520 nm에서의 chromatogram과 실온에서 약 1년 정도 보관된 추출물의 chromatogram을 비교함으로써 발효 추출물 안토시아닌의 변화를 확인한 결과, 자색고구마 발효추출물은 시간이 경과함에 따라 안토시아닌 함량의 감소를 확인하였다. 이에 자색고구마 추출물 분말의 온도, 빛, pH에 의한 안토시아닌의 안정성시험이 필요하다고 생각되어 이에 대한 실험을 실시한 결과, 고온에 장시간 노출 될 경우에는 발효 추출물 색소가 변화되어지며, 빛에 장기간 노출 되더라도 색소의 변화는 거의 일어나지 않았으며, pH에 의한 색소변화는 pH 10의 용액에서 보관할 경우 가장 많은 색소의 변화가 일어남을 확인 할 수 있었다.

발효 추출물에 대한 안전성 시험은 단회독성 test는 한국화학융합시험연구원(KTR) 헬스케어연구소에서 GLP 규정에 따라 수행하였으며, 반복독성은 자체적으로 실험하였는데, 두 실험모두 2 g/kg b.w./day 균 까지 각 군별 통계적 유의차를 보이지 않으며 이 용량까지 안전한 용량범위임이 확인되었다.

자색고구마 발효 추출물의 기능성 효능을 확인하기 위해 *in vitro*에서 Oil red O 염색법을 통한 지방 축적 저해능을 평가 한 결과, 자색고구마를 첨가한 군이 아무것도 첨가한 군에 비해 지방 축적 억제능을 현저히 증가 시켰다. 이에 이를 좀 더 비교 확인해 보고자 TG 함량 및 free glycerol 량을 측정 한 결과 역시 자색고구마 처리군은 배지 내에 free glycerol의 함량이 낮으며, 중성지방의 생성이 억제됨을 확인 할 수 있었다. 지방 대사과정 시 관여되는 PPAR $\gamma$  전사 인자 발현 감소를 확인한 결과 자색고구마 발효 추출물이 발현 감소 효능을 보여, 자색고구마 발효 추출물은 지방 저해 억제능이 있음을 확인하였다.

자색고구마 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 활성억제 관여하는 신호전달체계를 조사한 결과 발효자색고구마 추출물에 의해서 지방합성효소의 활성을 억제하는 AMPK 및 ACC의 인산화가 증가하였으며, 발효자색고구마 추출물의 지방합성 효소 발현에 대한 영향은 측정 한 결과 발효자색고구마 추출물에 의해서 FAS의 발현이 감소하였다

항비만 관련 효능 이외의 대사체 질환과 관련된 기능성 효능도 확인해 보기 위해 항당뇨,

항산화, 항고혈압 등의 기능성을 *in vitro*에서 확인 한 결과, 자색고구마 발효 및 비발효 추출물은 효능을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 자색고구마에 함유된 안토시아닌 색소가 시력보호 효능을 보이는지도 확인해 보기 위해 *in vitro*에서 시력보호 관련 효능을 조사한 결과 자색고구마 추출물은 시력보호 관련 효과도 나타남을 확인하였다.

이에 자색고구마가 가지는 다양한 기능성 효능들 중에서 대사체 질환의 가장 큰 원인이 라 할 수 있는 항비만 효능에 관한 동물실험을 2회 반복 실시하여, 마우스의 체중변화 및 관련 바이오 마커 등을 확인한 결과, 자색고구마 발효 추출물은 체중조절에 효능을 보였다. 하지만, 동물실험을 실시할 때 자색고구마 발효 추출물과 비발효 추출물을 동시에 실험하여 발효에 의한 기능성의 향상 등의 효능을 함께 비교해 보았으나, 발효추출물에 비해 비발효 추출물에서 더 높은 효능을 보이는 결과를 얻었다. 이에 본 연구자들은 단순 제조공정 과정을 선택하는 것이 시간적/비용적으로 경제적이라고 판단됨에 따라 비발효 추출물을 기능성 관련 효능 평가의 후보소재로 선택하여, 비발효 추출물을 농도 의존적으로 섭취하는 동물실험을 1건 더 수행하여 최종적으로 인체에서의 용량설정 근거 자료를 확보하였습니다.

지금까지 시험관 실험 및 동물실험에서의 대사성 관련 질환에의 효능 등에 관한 자색고구마 추출물의 기능성 연구를 토대로 현재 인체적용시험을 진행하고 있습니다.

#### IV. 연구성과 및 성과활용 계획

- 자색고구마 유용물질을 활용한 항비만 및 항 당뇨 기능 평가를 위한 *in vitro*, *in vivo* 시험법, 인체 적용시험 및 전임상 실험 model이 정립되고, 또한 안전성 평가 시스템이 확립됨에 따라 자색고구마의 유용성분을 이용한 건강기능성 식품의 인증 및 산업화를 위한 핵심기술이 확립될 수 있음.
- 지역특화품목의 고부가가치화로 지역경제 활성화 및 신기능성 소재 발굴에 따른 건강기능성 식품산업의 활성화에 기여할 것임.
- 전량 수입되는 시력개선 용 블루베리 추출 색소에 대하여, 발효자색고구마 추출 천연색소의 수입 대체 효과.
- 발효자색고구마 추출 천연색소를 이용한 기능성 발효 음료 개발.
- 자색고구마 생산 농가의 소득 창출 및 안정적인 지속적 소모 예상.
- 전남 무안에서 생산중인 마늘과 양파를 통한, 지방특화작물 의존성에서 자색고구마로의 주요작물 전환 가능.



## SUMMARY

### (영문 요약문)

Purple sweet potatoes(PSP) have received much attention because of its unique color, nutritional value, and its role in health. They have been regarded as a good source of stable anthocyanins as a food colorant and the purple sweet potato color may be recognized as a physiologically functional food factor. Also, It is associated with a low risk of cardiovascular disease, neurological disorders and carcinogenesis. Several investigations have determined the efficacy of anthocyanins as anti-atherosclerotic, anti-diabetic, anti-mutagenic, anti-oxidant and anti-cancer agents.

In the present study, The biological activities of fermented purple sweet potatoes (FPSP) extract were investigated. Also, its mode of action was examined in relation to biological activities and its active compound was purified.

Extraction of FPSP was water at 95°C for 1 hr and fermented by 0.5% *Issatchenkia orientalis*. Extract was filtered with Whatman paper No. 6 and concentrated in rotary evaporator under reduced pressure.

FPSP showed the high angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antidiabetic activity. Also, FPSP exhibited higher free radical scavenging activities and lipid accumulation inhibitory potential. Thus, the antiobesity effect of FPSP was investigated *in vitro* and *in vivo*. When cytotoxicities of the extracts were determined. FPSP showed no cytotoxicities up to 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 3T3-L1 cells, In maturing preadipocytes FPSP 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  suppressed intracellular lipid accumulation by 40%. In addition, FPSP 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  significantly decreased the expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), which act as key transcription factors. *In vivo*, Thirty mice were divided into three groups; normal diet control group (NC), high fat diet control group (PC) and high fat diet plus FPSP supplemented group (PC+PSP). Results, The body weight and total fat weight in the PC group were significantly higher than those in the NC group. The effects of the high fat diet were reduced by FPSP treatments, and the body weight and total fat deposition in the PC+FPSP group were significantly decreased compared to the PC group. Also, When compared to the PC group, the mice receiving plus FPSP exhibited significant decreases in plasma cholesterol and triglyceride. Taken together, our data indicate that combinations of FPSP can exert potential anti-obesity effects.

## CONTENTS

### (영 문 목 차)

Chapter 1. A summary of the subject of research and development .....	1
Chapter 2. Present situation of technical development on domestic and foreign ...	4
Chapter 3. Results and contents of the R&D's accomplishment .....	14
Section 1. Structure identify of anthocyanin in purple sweet potato and materials standardization .....	14
1. Comparison of anthocyanin construct in Sinjami system .....	15
2. Comparison of anthocyanin construct in purple sweet potato classes .....	18
가. Comparison of anthocyanin construct in domestic purple sweet potato classes ...	18
나. Comparison of anthocyanin construct in domestic and foreign purple sweet potato classes .....	20
3. Anthocyanin construct change by stages of purple sweet potato growth ...	23
4. Structure identify of anthocyanin in purple sweet potato .....	28
가. Isolation and purification of anthocyanin from Sinjami .....	28
나. Structure identify of isolated anthocyanin .....	30
5. Change by storage period of purple sweet potato material .....	34
6. Extract yield identify of anthocyanin by temperature, time and solvent in purple sweet potato .....	36
가. Anthocyanin construct change by solvent and temperature condition ...	36
나. Examination of influence by extract temperature, grindability and solvent ...	39

다.	Examination of influence on the addition time of extract temperature and solvent .....	42
라.	Influence of extract solvent .....	44
7.	Quantitative analysis of anthocyanin in purple sweet potato .....	47
가.	Purification of anthocyanin(standard pigment) in purple sweet potato ..	47
Section 2.	standardization of fermentation process .....	54
1.	HPLC and ingredient analysis of Water extract(Jamihyang), fermented extract (Jamiwon) and mixed strain culture .....	55
가.	General component change of Water extract(Jamihyang), fermented extract(Jamiwon) .....	55
나.	HPLC analysis and pH check of Water extract(Jamihyang), fermented extract(Jamiwon) and mixed strain culture .....	56
2.	Experimental comparison on fermentation appearance in Hanarmfu .....	58
3.	Isolation and identification of fermentation microorganism by mixed strain culture ..	61
가.	Morphology of microbial .....	61
나.	Isolation and identification of YL microbial from YPD Agar .....	62
다.	Isolation and identification of N1 microbial from Nutrient Agar .....	64
라.	Isolation and identification of M1 microbial from MRS Agar .....	64
마.	Isolation of microbial from potato dextose argar Agar .....	65
4.	Fermentation appearance on purple sweet potato of isolated microbial ..	66
가.	After sterilization, change of microbial according to the culture time ..	66
나.	Change according to the culture time and 100℃ temperature .....	68
다.	Comparison of fermentation patterns .....	69
라.	Comparison of fermentation patterns .....	79
5.	Change of the dissolved oxygen concentration on the chromacity .....	90
6.	Development of fermentation condition of purple sweet potato .....	91
가.	Development of fermentation condition of purple sweet potato - Lab. fermentation ..	91
나.	Development of fermentation condition of purple sweet potato - pilot fermentation ..	94
Section 3.	Stability experiment of fermented purple sweet potato .....	105

1. Anthocyanin change by temperature .....	105
가. Sample preparation .....	106
나. Change in anthocyanin over time - UV spectrum .....	106
다. Change in chromacity over time .....	107
라. Change in anthocyanin construct over time - HPLC .....	109
2. Anthocyanin change by light .....	117
가. Sample preparation .....	118
나. Change in anthocyanin by light - UV spectrum .....	118
다. Change in chromacity by light .....	119
라. Change in anthocyanin construct by light - HPLC .....	121
3. Anthocyanin change by pH .....	129
가. Sample preparation .....	129
나. pH Change by storage period .....	129
다. Change in anthocyanin by pH - UV spectrum .....	129
라. Change in chromacity by pH .....	132
마. Change in anthocyanin construct by pH - HPLC .....	133
Section 4. Formulation study of fermented purple sweet potato .....	138
1. Formulation study of kapsel type .....	138
2. Formulation study of tablet type .....	139
Section 5. Safety experiment of fermented purple sweet potato extract .....	141
1. Single dose toxicity study .....	141
가. Care of experiment animal .....	142
나. Weight change of experiment animal .....	142
다. General condition and survival rate .....	144
라. Administration volume and administration method .....	144
마. Necropsy and necropsy findings .....	144
2. Repeated dose toxicity study .....	146
가. Care of experiment animal .....	146
나. Weight change of experiment animal .....	146

다. General condition and survival rate .....	146
라. Administration volume and administration method .....	147
마. Tissue weight of experiment animal .....	147
바. Serum analysis .....	149
Section 6. Functional effect of purple sweet potato .....	153
1. Functional effect of purple sweet potato <i>in vitro</i> .....	153
가. Antiobesity .....	153
나. Antidiabet .....	166
다. Antioxidant .....	172
라. Antihypertensive .....	177
마. Protection against eyestrain .....	179
2. Functional effect of purple sweet potato <i>in vivo</i> .....	183
가. Antiobesity from fermentation purple sweet potato in ICR mice .....	183
나. Antiobesity from fermentation purple sweet potato in C57BL/6 .....	190
다. Antiobesity from non-fermentation purple sweet potato .....	198
3. Clinical trial of purple sweet potato .....	204
가. Protection against eyestrain of fermentation purple sweet potato .....	204
 Chapter 4. Level of Achievement of Goal and Contribution to concerned matters ·	208
 Chapter 5. R&D results and Practical application planning of results .....	211
 Chapter 6. Collective foreign science informations through process of driving R&D .....	213
 Chapter 7. Reference .....	214

## 목 차

제 1장. 연구개발과제의 개요 .....	1
제 1절. 연구개발의 필요성 .....	1
제 2절. 연구개발의 목적 .....	2
제 2장. 국내외 기술개발 현황 .....	4
제 1절. 국내외 건강기능식품 개발 및 시장현황 .....	4
1. 기능성 원료 개별인정형 개발현황 .....	4
2. 국내외 기능성 식품 시장현황 .....	7
가. 세계 시장 규모 .....	9
나. 국내 수요, 공급 규모 .....	10
제 2절. 국내외 색소 관련 기술개발 현황 .....	12
제 3장. 연구개발수행 내용 및 결과 .....	14
제 1절. 자색고구마에 함유된 안토시아닌 구조 확인 및 원재료 표준화 .....	14
1. 신자미 계통별 안토시아닌 조성 비교 .....	15
2. 자색고구마 품종별 안토시아닌 조성 비교 .....	18
가. 국내 자색고구마 품종별 안토시아닌 조성 비교 .....	18
나. 국내외 자색고구마 품종별 안토시아닌 조성 비교 .....	20
3. 자색고구마 성장 단계에 따른 안토시아닌 조성 변화 .....	23
4. 자색고구마에 함유된 안토시아닌 구조 확인 .....	28
가. 신자미로부터 안토시아닌 분리 정제 .....	28
나. 분리된 안토시아닌의 구조 확인 .....	30
5. 자색고구마 원재료의 저장기간에 따른 변화 .....	34

6. 자색고구마 추출온도, 시간, 용매에 의한 안토시아닌 추출 수율확인 .....	36
가. 추출용매 및 온도조건에 따른 안토시아닌 조성 변화 .....	36
나. 추출온도, 분쇄 정도 및 용매에 의한 영향 검토 .....	39
다. 추출온도 및 추출용매 첨가시기에 의한 영향검토 .....	42
라. 추출용매 영향 .....	44
7. 자색고구마에 함유된 안토시아닌 정량분석 .....	47
가. 자색고구마로부터 안토시아닌 추출용매 조건 확립 .....	47
제 2절 발효공정 표준화 .....	54
1. 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원), 혼합균주의 성분 및 HPLC 분석 .....	55
가. 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원) 일반성분 변화 .....	55
나. 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원), 혼합균주의 HPLC 분석 및 pH 확인 .....	56
2. 한아름영농조합에서 혼합균주 접종 후 발효 양상 비교 실험 .....	58
3. 혼합균주로부터 발효에 관여하는 미생물의 분리 동정 .....	61
가. 혼합균주의 현미경 관찰 .....	61
나. YPD Agar로부터 YL균의 분리 동정 .....	62
다. Nutrient Agar로부터 N1균의 분리 동정 .....	64
라. MRS Agar로부터 M1균의 분리 동정 .....	64
마. Potato dextose agar Agar로부터 균의 분리 .....	65
4. 분리된 각각의 균주를 자색고구마에 접종 후 실험실 발효 양상 비교실험 ..	66
가. 121℃, 15분 멸균 후 균주 및 배양시간에 따른 변화 .....	66
나. 100℃에서 열처리 및 배양시간에 따른 변화 .....	68
다. 단리된 균주와 혼합균주(종균)에 의한 발효양상 비교 .....	69
라. 분리된 균주와 유사한 균주를 구입하여 각 균에 의한 발효양상비교 .....	79
5. 용존산소(산소전달) 농도에 따른 색소의 변화 .....	90
6. 자색고구마 발효조건 확립 .....	91
가. 자색고구마 추출물의 발효조건 확립 - Lab. 발효 .....	91
나. 자색고구마 추출물의 발효조건 확립 - pilot 발효 .....	94
제 3절 자색고구마 발효추출물의 안정성 실험 .....	105
1. 온도에 의한 안토시아닌 변화 .....	105

가. 시료의 조제 .....	106
나. 시간경과에 따른 안토시아닌의 변화 - UV spectrum .....	106
다. 시간경과에 따른 색도 변화 .....	107
라. 시간경과에 따른 안토시아닌의 조성 변화 - HPLC .....	109
2. 빛에 의한 안토시아닌 변화 .....	117
가. 시료의 조제 .....	118
나. 빛에 의한 안토시아닌의 변화 - UV spectrum .....	118
다. 빛에 의한 색도 변화 .....	119
라. 빛에 의한 안토시아닌의 조성 변화 - HPLC .....	121
3. pH에 의한 안토시아닌 변화 .....	129
가. 시료의 조제 .....	129
나. 저장기간에 따른 pH 변화 .....	129
다. pH에 따른 안토시아닌의 변화 - UV spectrum .....	129
라. pH에 따른 색도 변화 .....	132
마. pH에 따른 안토시아닌의 조성 변화 - HPLC .....	133
제 4절 자색고구마 발효추출물에 대한 제형연구 .....	138
1. 캡셀 타입의 제형연구 .....	138
2. tablet 타입의 제형연구 .....	139
제 5절 자색고구마 발효추출물의 안전성 실험 .....	141
1. 단회독성 .....	141
가. 실험동물 사육 .....	142
나. 실험동물 몸무게 변화 .....	142
다. 일반증상 관찰 및 생존율 .....	144
라. 투여용량 및 투여방법 .....	144
마. 보검 및 부검 소견 .....	144
2. 반복독성 .....	146
가. 실험동물 사육 .....	146
나. 실험동물 몸무게 변화 .....	146
다. 일반증상 관찰 및 생존율 .....	146



라. 투여용량 및 투여방법 .....	147
마. 실험동물의 조직무게 .....	147
바. 혈중 화학적 표지물질의 측정 .....	149
제 6절 자색고구마 추출 분말의 기능성 효능평가 .....	153
1. 자색고구마의 <i>in vitro</i> 기능성 .....	153
가. 항비만 .....	153
나. 항당뇨 .....	166
다. 항산화 .....	172
라. 항고혈압 .....	177
마. 시력보호 .....	179
2. 자색고구마의 <i>in vivo</i> 기능성 .....	183
가. ICR에서 항비만 평가 .....	183
나. C57BL/6에서 항비만 평가 .....	190
다. 자색고구마 비발효추출물의 항비만 실험 .....	198
3. 자색고구마의 인체적용시험 .....	204
가. 발효 자색고구마의 안토시아닌을 이용한 시력보호 효과 .....	204
제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	208
제 5장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	211
제 6장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	213
제 7장. 참고문헌 .....	214

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 필요성

### ○ 기술적 측면

- 인공색소는 색소의 안정성은 우수하나, 안전성이 떨어지기 때문에, 안전한 먹거리를 찾는 시대적인 요구와 소비자의 요구가 많아지고 있는 실정이며, 천연색소의 경우에는 기능성과 안전성은 뛰어나지만 구조적으로 안정성이 떨어지므로, 이를 해결할 수 있는 안정성 증대 기술이 필요함.
- 고열량 지방산으로 인한 영양과잉 및 영양 불균형, 스트레스, 환경오염, 운동부족 등 현대인의 life-style과 식생활 변화는 심혈관 질환, 암, 당뇨, 치매 등의 생활 습관병의 발병율을 현저히 증가시켜, 이들 질환치료에 막대한 비용이 소요되어 국가 경제 발전에 큰 장애요인으로 작용하고 있으며, 특히 이들 질환의 가장 큰 원인중의 하나가 비만에 기인하는 것으로 밝혀져 비만을 효과적으로 예방, 개선시키는 저가이면서 무독성, 고효성의 기능성 식품소재의 개발 및 상품화가 절실히 요청되고 있음.
- 신개념의 항비만 기능성 소재에는 지방대사 촉진소재(합성억제 및 분해촉진) 열량소 흡수 억제 소재, 배변 촉진소재 및 면역증진 소재가 복합적으로 혼합된 조성물이 되어야 하는데, 본 연구에서는 자색고구마 유용 생리활성 물질의 항비만 효과를 고지방 식이 동물 실험을 이용하여 검증하고자 함
- 현재, 식품소재 중에 존재하는 활성성분을 이용, 인간에 내재하는 생체방어기구를 강화함으로써 각종 질환에 대응하고자 하는 연구에 많은 관심이 집중되고 있는 추세임.
- 따라서 본 연구에서는 발효자색고구마 추출 천연색소의 비만억제 효능 및 당뇨 개선 활성을 갖는 기능성 소재를 개발하고, 이를 주원료로 하여 여기에 지방 합성 억제 소재와 식이섬유가 첨가된 다양한 형태의 신개념의 항비만, 항당뇨, 시력보호용 건강 기능성 식품을 제품화하고자 함.

### ○ 경제·산업적 측면

- 천연색소의 세계시장은 2007년 4,800억원으로 시장이 확대되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우에는 천연색소의 시장이 미비하고, 거의 개발이 되지 않은 상황임. 안정성에 떨어지는 인공색소를 대신하여 기능성, 안전성을 갖춘 천연색소로의 시장이 전환 될 것임.
- 비만과 당뇨는 세계 대부분의 나라의 인구 건강을 위협하는 대표적 질병으로 WHO는 2005년 당뇨병으로 사망한 사람을 110만명으로 추정하였으나 실제적으로는 이보다 훨씬 높을 것으로 예상되고 있음. 더욱이 이 수치는 과거 10년 전에 비해 50%나 증가한 수치임.
- 이러한 급격한 증가는 소아 비만율의 증가로 인한 것으로 과거 성인에게만 발병하는 것으로 인식되던 당뇨가 비만 소아에게도 나타나게 되었기 때문이며 비만과 관련된 복합적 질환인 대사성 질환의 발병 증가도 관련이 있음. 특히 대사성질환의 경우 당뇨병의

주요 사인인 심혈관계 질환의 이환 가능성을 증가시킴. 그러므로 비만과 제2형 당뇨 및 관련 질환을 해결하기 위한 새로운 전략의 개발에 대한 필요가 절실함. 특히 대사성 질환과 관련 질환 발병 기전에 대한 정확한 이해는 이러한 새로운 치료 전략의 개발에 매우 필수적으로 사료됨.

- 현대인들의 식습관이 점차 서구화됨에 따라 육류 소비의 증가, 고칼로리 식단, 기타 환경적 요인에 의해 비만인구가 증가하고 있는 추세임.
- 공중 보건에 대한 관심이 높아지고 삶의 질을 향상시키고자 하는 욕구가 증가함에 따라 더욱더 많은 사람들이 비만의 위해성에 대해 깊이 인식하고 있으며 과도한 지방 섭취는 당뇨와 같은 다른 합병증을 유발할 확률이 현저하게 증가된다는 사실이 알려진 이후로 과도한 체지방이 단순한 미용의 관점에서 질병의 관점으로 인식의 전환이 이루어지고 있음.
- 천연물로부터 건강기능성 식품 소재 및 의약품 소재 개발을 위해서는 소재의 기능성에 대한 과학적 근거를 명확히 규정하여야 할 것이며, 과학적 근거에 의해 올바른 생리조절 기능을 표현하게 하여 구체적인 유용성을 표시하도록 하는 필요성이 대두되고 있음.
- 따라서 본 연구에서는 자색고구마의 비만 억제 및 당뇨 개선 효능을 지닌 기능성 소재를 개발하고, 이를 이용하여 다양한 형태의 항비만 및 기능성 소재의 상품화를 통한 내수축진은 물론 수출 경쟁력 제고에도 기여할 것으로 전망됨.

## 제 2절 연구개발의 목적

- 최근 식생활의 서구화에 따라 영양과다 등의 원인으로 비만이 증가하고 있음. 비만은 동맥경화증의 위험인자의 하나이고, 또한 당뇨병이나 고혈압 등과도 관련이 있어, 심각한 문제가 되고 있음. 비만은 신체에 지방이 과잉되게 축적된 상태이며, 지방이 체내에 축적되는 원인은 당질(탄수화물)의 과잉섭취 또는 지방을 과잉섭취 하는데 있음.
- 당질을 과잉하게 섭취함으로써 비만에 달하는 메카니즘은, 음식물 중에 함유되는 당질이 소화되어 단당이 되고 소장을 통해 체내로 흡수되며, 혈당이 상승하여 그 자극으로 분비되는 인슐린이 지방세포에 작용해서 혈액 중의 단당을 지방세포에 받아들이게 해서 지방으로 바꾸는 것임.
- 또한, 식품성분 중에서 가장 고칼로리인 지방(트리글리세리드)은 췌(膵) 리파아제에 의해 분해되어 소장을 통해 흡수되는 것이며, 섭취 칼로리의 과잉은 저장 칼로리를 증가하도록 작용하여, 저장 칼로리가 증가되는 결과가 됨. 즉, 과잉 지방섭취에 의해 비만에 달하는 것임.
- 그래서, 비만에 달하는 이들의 어떤 경로의 일부분을 저해함으로써, 항비만 작용을 발생시키려는 생각을 바탕으로 현재 각종 항비만제에 관한 연구가 진행되고 있음. 즉, 당질 과잉섭취로 비만에 달하는 경로를 저해하는, 당질분해 소화요소 저해작용, 혈당상승 억제작용, 또는 단당흡수 억제작용에 의해, 혹은 지방 과잉 섭취에 의해 비만에 달하는 경로를 저해하는, 콜산 흡착 배설작용, 콜레스테롤 지하작용, 혈중 트리글리세리드 저하작

용, 또는 리파아제 저해작용에 의해 비만을 예방, 개선할 수 있다고 생각되어, 이들 작용을 가지는 의약성분의 연구가 수없이 행해지고 있음.

- 또한, 탄수화물(당질)의 과잉섭취로 인한 급격한 식후 혈당상승과 과다한 인슐린 분비는, 비만 외에도 당뇨병 혹은 고지혈증을 조장한다고 생각되고 있고, 당질분해 소화효소를 저해함으로써, 당뇨병 혹은 고지혈증도 예방, 개선할 수 있다고 생각되고 있음. 더욱이, 고지혈증을 예방하는 것은 동맥경화증 예방의 효과적인 방법의 하나임.
- 따라서, 당질분해 소화효소 저해제, 단당흡수 억제제 또는 혈당상승 억제제는 항당뇨병제, 항고지혈증제 또는 항동맥경화증제로서 유용하다고 생각되고 있음.
- 비만은 인슐린 저항성 증가 및 제 2형 당뇨의 위험성을 증가시키는 것으로 알려져 왔음. 비만인의 지방조직은 비에스테르성 지방산(non-esterified fatty acid, NEFA), 글리세롤, 호르몬, 염증관련 cytokines 등을 분비하고 이는 인슐린 저항성을 유도하게 됨.
- 당뇨병은 고혈당 상태를 나타내는 여러 질환을 말하는 것으로 당뇨병의 병태생리는 매우 다양함. 일반적으로 인슐린 분비의 절대적 또는 상대적 부족이나, 인슐린 표적세포에서 인슐린의 생물학적 효과 감소로 인하여 발생하는 고혈당 및 이에 수반되는 대사장애가 장기간 지속되는 질환임. 당뇨가 유발되면 당질대사 및 지질대사 등의 생체내 대사조절기능 이상으로 고혈당증, 고지혈증 및 심혈관계질환 등의 합병증이 생기게 됨.
- 고지혈증에 노출되면 혈액 중 지질성분이 증가하는 상태로 고콜레스테롤혈증과 고중성지방혈증을 유발하며 그 원인으로는 식사조절, 운동부족, 노화 및 환경인자 등의 요인에 의하여 유발됨.
- 이러한 대사성 질환은 치료보다는 예방적인 대응이 바람직하여 음식을 통해서 섭취되는 phyrochemical, pigment 등의 식물 유래의 이차대사산물이 중요한 역할을 하게 된다.
- 이차 대사산물중 천연색소는 주요한 물질로서 향후 화학색소의 대체 소재로서 뿐만 아니라 건강기능성소재로서도 무한한 잠재력을 가지고 있어 색소에 대한 다양한 연구가 필요한 시점이다.
- 자색고구마의 생산지역은 전남 무안과 해남, 전북 익산, 경남 함양에 집중되어 있으며, 재배 면적은 약 95 ha이고, 약 500여 농가에서 연간 1,400톤이 생산되고 있으나, 생물로만 판매되고, 가공식품 소재로는 사용이 거의 없는 실정 이어서 생산농가가 판로에 큰 애로를 겪고 있음
- 색소자체의 물리화학적인 연구와 더불어 생리활성과의 연관성을 규명하는 연구는 매우 중요한 분야이며 안토시아닌의 다양한 생리기능성을 규명함으로써 천연색소의 응용분야가 확대되어질 것으로 예상된다.
- 안토시아닌으로서의 전체 색소의 기능에서 더 나아가 단일 물질로 분리된 색소 성분의 구조분석과 더불어 연관된 활성을 검증해나가는 것이 더욱 요구되고 있다.
- 색소 등의 생산에 있어서 안정성은 매우 중요한 요소이며 이와 관련하여 용매추출과 발효공정을 이용한 추출시 색소의 변화에 관한 연구도 점차적으로 증가하는 추세이다.
- 천연색소를 이용한 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈, 시력 관련 기능성들이 계속 밝혀지고 있으며 이는 미래의 식품에서 중요한 소재로서의 영역이 확대될 것으로 예상된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국내외 건강기능식품 개발 및 시장 현황

최근BT 분야의 천연물 이용은 생리활성물질인 3차 기능성분 물질이 건강관리, 다이어트나 미용 혹은 각종질병 예방효과를 기대하여 많이 이용되고 있다. 이와 같은 천연물들은 오랜기간 생약(生藥)을 비롯한 기능성 식품과 기능성 화장품 및 각종 민약(民藥) 분야에 많이 활용되어 왔다. 최근에는 기능성 식품과 기능성 화장품 분야에서, 첨단 BT 기술의 발전과 함께 크게 부상되어, 거대한 산업분야로 성장하고 있다. 그러나 아직 이들 분야에 대한, 활용상의 명확한 구분이 되어 있지 않고 있다.

특히 식품분야에서 기능성 식품산업은 고부가 가치 미래 핵심 산업의 하나로 2004년 건강기능식품법의 본격적인 시행 이후 국내 건강기능식품시장은 크게 확대되어 2008년 현재 식품의약품안전청에서 인정하고 있는 기능성 원료는 총 62종이며 건강기능식품으로 인정되고 있는 품목은 152종으로 식품산업의 발전에 따라 그 품목수가 점차 급증할 것으로 예상된다. 한 연구기관의 조사에 의하면 국내기업의 80%이상이 기능성식품 개발 연구를 진행하고 있는 것으로 나타나 향후 건강기능식품 시장은 지속적으로 증가할 것으로 기대된다.

#### 1. 기능성 원료 개별인정형 개발 현황

각 연도별 인정신청 실적에 대한 품목명과 기능정보를 보면, 이들 제품에 대한 기능성은 질병위험감소기능성 표시가 1종이 되었고 기타기능이 80종이었는데 이중 과학적 근거자료 확보 및 기능성 등에 대한 자료 등을 종합적으로 판단하여 볼 때 기타기능 1등급에 속하는 것이 5종, 기타기능 2등급인 59종, 기타기능 3등급이 16건을 차지하였다.

새로운 기능성 원료로 인정된 것의 기능성 내용을 살펴보면 체지방조절이 14종으로 가장 많았고 그 다음으로 혈당조절 및 항산화 기능성이 인정되었다. 이외에도 콜레스테롤 조절, 관절건강, 배변활동 등 순서로 이어지고 있다.

건강기능식품 개발을 위하여 가장 먼저 데이터베이스가 구축되어야 하는 기능성에 대하여 총 27개의 계약연구기관, 임상 시험기관, 전임상 시험기관, 식품위생검사대학내부설 연구소, 사단법인 연구기관을 대상으로 조사한 결과 면역기능 조절(55.6%), 혈당조절(55.6%)이 가장 높은 응답률을 보였으며, 다음으로 콜레스테롤 저하(40.7%), 항산화(40.7%), 간기능 조절(37.0%), 숙취해소(25.9%), 알레르기 조절(25.9%), 영양보충(25.9%), 혈압조절(25.9%), 체중 조절(22.2%), 피부주름 개선(22.2%), 기억력 증진(18.5%) 등의 순으로 조사되었다.

<DB 우선 구축 필요 기능성 종류>

	전체	계약연구 기관	임상시험 기관	전임상 시험기관	식품위생 검사	대학내 부설연구소	사단 법인
BASE FOR %	27	5	1	4	3	13	1
면역기능 조절	55.6	80.0	100.0	25.0	66.7	46.2	100.0
<b>혈당조절</b>	<b>55.6</b>	<b>20.0</b>	<b>100.0</b>	<b>25.0</b>	<b>66.7</b>	<b>69.2</b>	<b>100.0</b>
콜레스테롤 저하	40.7	20.0		25.0	33.3	61.5	
항산화	40.7	40.0		25.0		61.5	
간기능 조절	37.0	20.0		75.0	33.3	30.8	100.0
숙취 해소	25.9	20.0		25.0	33.3	23.1	100.0
알레르기 조절	25.9	20.0			66.7	30.8	
영양 보충	25.9	60.0		25.0	33.3	15.4	
혈압조절	25.9			25.0		46.2	
<b>체중조절</b>	<b>22.2</b>	<b>40.0</b>			<b>66.7</b>	<b>15.4</b>	
피부주름 개선	22.2	40.0		25.0		23.1	
기억력 증진	18.5		100.0	50.0		7.7	100.0
관절건강에 도움	14.8			25.0	66.7	7.7	
소화관 생리와 기능조절	14.8			25.0		23.1	
성기능 개선	11.1	40.0		25.0			
스트레스 완화	11.1	20.0			33.3	7.7	
종양치료에 도움	11.1		100.0	25.0		7.7	
성장 발달 및 분화조절	7.4	20.0				7.7	
치아 부식방지	7.4	20.0	100.0				
피로회복	3.7	20.0					
피부미백 효과	3.7			25.0			
혈행 개선	3.7			25.0			

\* 바이오푸드 네트워크 사업단 국내 기능성 식품 기업 및 연구기관 실태 조사 2006  
(base : n=27, 조사 대상 기관)

국내에서 향후 가장 먼저 연구/개발해야 할 기능성에 대하여 국내 건강기능식품 관련 기업체 68개社와 연구기관 35개를 대상으로 설문조사를 실시한 결과, 기업체의 경우 당뇨조절(36.8%)을 최우선으로 개발되어야 한다고 대답했고, 연구단체의 경우 비만조절(54.3%), 면역기능증진(34.3%)에 이어 당뇨조절(31.4%)을 세 번째 우선 연구가 필요한 기능성으로 답하였다.

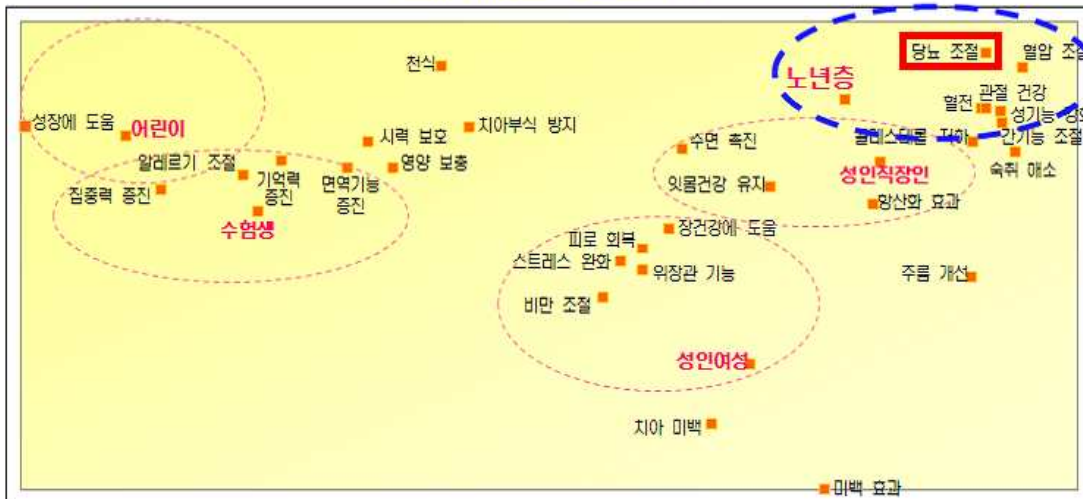
<DB 우선 구축 필요 기능성 종류>



\* 바이오푸드 네트워크 사업단 국내 바이오식품의 기업체 수요도 조사 2005

소비자의 연령 및 주요활동(수험생/직장인)에 따라 필요한 기능성을 분석하기 위하여 500명을 대상으로 설문 조사를 실시한 결과, 당뇨 조절에 대한 기능성은 노년층에서 가장 필요로 하는 것으로 조사되었고, 이외에 어린이는 성장, 알레르기 조절, 수험생은 집중력/기억력 증진, 성인 여성은 항산화 효과, 콜레스테롤 저하, 수면 촉진 기능성을 필요로 한다고 조사되었다.

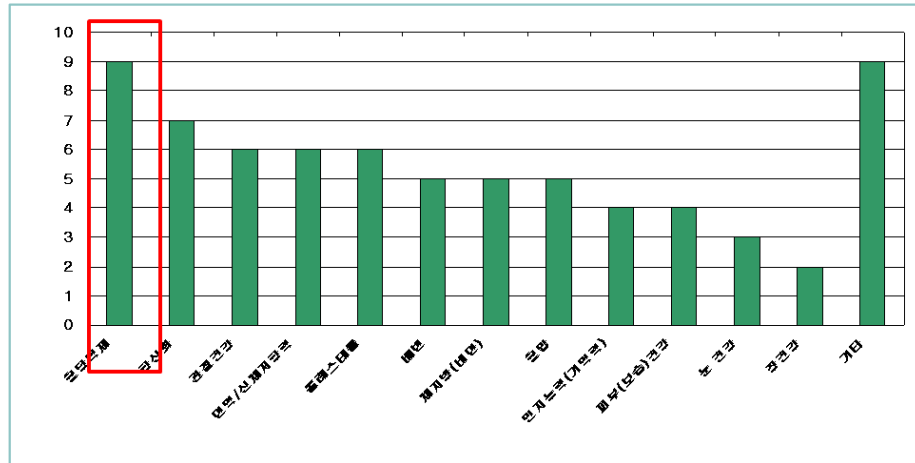
Correspondence Analysis



2008년 10월 현재 건강기능식품 개별인정 허가 신청 원료는 총 189개이며, 이 중 인정된 원료는 73개이다. 개별인정형으로 등록된 원료 73종을 기능성에 따라 분류하여 보면 “혈당 억제” 원료가 9종이 등록되어 가장 많은 수의 식약청 인정을 받은 것으로 나타났다.

다. 혈당 억제에 이어 항산화 (7종) > 관절건강=면역=콜레스테롤 (6종) > 배변=비만=기억력 (5종) > 기억력=피부건강 (4종) > 눈건강 (3종) > 장건강 (2종)의 순으로 나타났고, 나머지 9종은 기타로 분류하였다.

<개별인정형으로 등록된 원료의 기능성별 분류>



## 2. 국내의 기능성 식품 시장 현황

기능성 식품의 세계 시장규모는 보고서마다 다소 차이가 있지만 97년 이후 높은 성장률을 나타내고 있다. 미국 시장조사 전문업체인 Global Industry사의 조사 보고서에 따르면, 세계 기능성 식품시장은 지난해 약 723억 달러를 기록했으며, 오는 2010년까지 약 1,090억 달러 규모로 성장할 것으로 전망했다. 해외시장 중 미국 46%, 일본 24%, 유럽 13%로 산업화된 선진국 중심으로 발달되어 있으며 미국과 일본이 대략 70%정도를 차지하고 있다.

미국은 1994년에는 건강보조식품, 기능성식품에 대한 법안인 영양보조식품 건강교육법 (Dietary Supplements and Human Education Act, DSHEA)가 제정된 이후 미국의 건강기능식품 시장은 매년 급작한 성장을 하여 전 세계 건강기능식품 시장을 주도하고 있다. 미국정부에서는 사회적 대중의 요구에 따라 특히 1998년부터 보완·대체의학 연구부에서 전통천연약물의 객관화 연구 및 천연물 유래의 기능성 소재 개발에 집중적으로 투자하고 있다. 미국의 건강기능식품 시장 확대요인으로는 노령화 인구의 증가와 건강증진에 대한 관심 고조와 함께 예방의학과 대체의학에 대한 이해도와 관심도의 급증으로 분석되어진다. 미국의 건강기능식품시장은 매년 6%이상의 성장률을 보이고 있으며 향후 10년간 5%이상의 성장이 예상된다.

미국시장의 규모는 2002년 약 560억 달러에서 2006년 총 849억 달러를 기록하였으며 이것은 세계시장 2,261억 중 총 38%를 차지하고 있다. 품목별 점유율에서는 비타민이 약 35%를 차지했는데 특히 특별용도식품이 2003년 이후 지속적으로 10-15%의 성장을 보이고 있는 반면에 식사대용 허브, 비타민 제품군은 일부 마이너스 성장을 보이고 있는 실



정으로 nutrition business journal (NBJ)의 2006년 자료에 의하면 매년 성장하는 건강기능식품 산업 시장 중 향후 'Natural Personal Care'와 자연 유기식품 군이 10%정도 성장할 것으로 추정되며 비타민 및 식이보충용 제품 등의 성장은 비교적 저조할 것으로 예상된다. 특별식 및 기타의 항목을 세분화하였을 때 관절건강에 도움을 주는 글루코사민 및 콘드로이친이 미국에서도 인기가 있었으며 그 외 코엔자임 Q10이나 프로바이오틱이 차지하는 비중도 크게 나타났다. 미국 연구 개발자의 주요관심은 영양소 강화식품, 기능성 식용식물 및 식물성분의 소재화, 허브의 생리활성, 의약품 대체 기능성 식품개발, 소비자 맞춤형 제품 및 스트레스 완화 등 생활 활력 증진소재 등으로 분석되었다.

유럽은 주요 관심 건강요인인 특정질환을 타겟으로 하는 제품이 주류를 이루는 것이 특징이고 국가별 관심 요인에 대한 조사에서 영국은 에너지 충전, 튼튼한 뼈, 에너지 충전 등으로 관심을 보였으며, 독일의 경우에는 1998년 독일 의약품집에 게재된 의약품의 13.4%인 1,266가지 처방이 약용허브의 조제에 관한 것으로 허브류가 식품, 의약품 소재로 널리 사용되고 있다.

일본의 경우 1980년대 후반 기능성식품이 등장하여 1991년 특정보건용 식품제도를 제도화한 최초의 국가로서 2001년에 보건기능식품제도를 시행하여 제형을 확대하였으며 2005년 94품목이 추가되어 현재 569품목까지 확대되어 시판하면서, 기능성식품과 dietary supplement 제품의 국가경쟁력을 더욱 강화하였다. 일본의 건강기능식품 시장은 건강을 지향하는 분위기와 고령화로 인해 최근 몇 년간 지속적인 성장을 보이면서 주목받고 있다. 2005년 건강식품의 시장규모는 전년도에 비해 2.8% 증가한 1조 2,850억엔 규모이나 최근 몇 년간의 성장률에 비해 둔화됐으며 2006년에는 1조 2,100억엔으로 처음으로 마이너스 성장을 보였으나 특정보건용 식품시장은 매년 급성장하는 추세이다.

일본 건강식품시장의 성장이 지속된 요인으로는 2005년도 중반까지는 코엔자임 Q10이나 알파리포산의 히트가 있었으나 2006년도에는 히트소재가 없었으며 면역부활 소재로서 인기가 높았던 아카리쿠스 버섯 시장이 크게 축소됐고, 인기소재였던 대두 이소플라본이나 코엔자임 Q10의 상한 섭취량 문제로 소비자 심리가 냉각되었으며, 또한 건강식품에 대한 법 규제 및 행정감시의 강화, 부정상법 적발 등에 의한 소비자 심리약화 등이 성장률 둔화 요인으로 건강식품 시장 전체에 영향을 미친 것으로 생각된다.

우리나라 기능성식품 시장은 식품의약품안전청에서 제공하는 식품 및 식품첨가물 생산 실적 통계자료를 기준으로 분석한 결과, 2004년도 소비자 가격기준 시장 규모는 1조 8,000억원으로 추산되며, 생산실적은 5,675억원 규모로 산출되었다. 2005년도 시장규모는 2조 1,000억원 규모로 국내 건강기능식품 생산실적은 전년대비 약 19% 증가한 것으로 나타났다. 2006년도 시장규모는 2조 1,500억원 규모이며, 생산실적은 7,008억원 규모로 전년대비 약 2.3% 증가한 것으로 나타났다. 이는 장기적인 경기침체임에도 불구하고 건강을 지향하려는 소비자들의 요구가 일부 반영된 것으로 판단된다.

국내 1위 건강기능식품기업인 한국인삼공사의 6년산 홍삼브랜드 정관정의 아성을 위협

하듯 대상웰라이프와 롯데제과가 홍삼제품을 선보이며 홍삼시장에 출사표를 던졌다. 특히 건강기능식품 업체들은 기존 대형마트나 병원 약국 등에 스텝인숍으로 입점해 자사 브랜드 인지도를 어느 정도 높였다고 확신하고 건강기능식품점 런칭에 심혈을 기울였다.

국내 미국계 건강기능식품매장인 GNC는 고정고객 확보를 위해 멤버십 카드를 발급, 골드 회원에게 제품 구매시 할인혜택을 제공 하는 등 재구매율 높이기에 박차를 가하고 있다. GNC 이외에도 수입이 급증하는 가운데 국내 건강기능식품업체들의 건강기능식품점 오픈이 이어졌다. 대상웰라이프는 주력 품목이었던 클로렐라와 함께 홍의보감의 마케팅을 강화해 차세대 제품군으로 키우고 있으며, 건강식품점 더웰라이프를 런칭해 로드숍 운영에도 나섰다.

삼양사의 계열사 삼양제넥스는 고객맞춤 서비스 강화를 비전으로 내세우며 굿씽을 런칭하여 매장에 건강식품 30여종 유기농식품 70여종을 포함한 100여종 품목을 구비했다. 이외에도 KT&G 휴림, 비트로시스 등이 건강기능식품전문점 프랜차이즈화를 선언하면서 건강기능식품 전문점 오픈을 가속화했다. 또한 기존 건강기능식품시장에 진출해 있던 CJ, 대상, 동원F&B, 롯데제과에 이어 라면업계 1위인 농심, 음료시장을 이끌고 있는 웅진식품 등 대기업이 잇따라 건강기능식품 시장에 진입하고 있어 건강기능식품 시장은 앞으로 그 시장의 규모가 더욱 확대될 것으로 전망된다. 이처럼 시장에 뛰어드는 대기업의 수가 늘어나고 있는 것은 소비자들의 건강중시 풍조가 이어지고 있고 선진국처럼 소비자의 인지도가 높아지고 있어 건강기능식품사업은 전망성이 있는 사업이라는 평가를 받고 있기 때문인 것으로 생각된다.

## 가. 세계시장 규모

### (1) 세계시장규모

(단위: 억원)

구분	04년	05년	06년	07년	08년	연평균 증가율
vitamin	6,890	7,010	7,136	7,265	7,395	1.8
Herbs/Botanicals	4,300	4,390	4,490	4,576	4,672	2.1
Sports Nutrition	2,100	2,220	2,349	2,485	2,629	5.8
Minerals	1,740	1,750	1,757	1,764	1,771	0.4
Meal Supplements	2,320	2,250	2,182	2,117	2,053	-2.9
Specialty/Other	2,980	3,220	3,484	3,769	4,078	8.2
Natural & organic food	18,380	20,700	23,391	26,431	29,867	13.0
Functional foods	24,460	26,660	29,059	31,674	34,525	9.0
Natural personal care	5,470	5,940	6,415	6,928	7,482	8.0
전체	68,640	74,140	80,265	87,012	94,476	8.0

(2) 세계시장을 선도하는 주요생산 업체

업체명(국적)	생산품목과 주요 특징	비 고
Abbot (미국)	Ensure, Pediasure, Pedialyte, Glucerna, Osmolite, Promote, Similac, Isomil, ZonePerfect, 소아/성인 영양보충제	미국내 가장 시장 점유율이 큰기업 (전체의 5.2%차지)
Bristol-Myers Squibb Co	Enfamil 비타민제, 영양보충제 및 신생아 분유제품	
Wyeth	영양보충제, 글루코사민제품, Vt E, Vt C	
General Nutrition Company (GNC)	영양보충제	
Herbalife International Inc	체중조절 프로그램	
Amway	세계 최대의 영양보조식품 회사	
베리후르츠그룹 (뉴질랜드)	블랙커런트 관련제품	
AVON (일본)	락트알부민분말 블루베리 캡슐, 녹차캡슐, 키토산캡슐, 효모, 비타민 B	
Unilever	건강음료제품	

나. 국내 수요, 공급 규모

(1) 국내 시장규모

2006년도 식품의약품안전청의 건강기능식품 생산실적 통계자료에 의하면, 100억원 이상 판매된 제품은 홍삼을 비롯해 알로에, 영양보충제, 글루코사민, 인삼, 클로렐라, 감마리놀렌산, 효모, 유산균 DHA/EPA 함유제품 등이다.

다양한 건강기능식품 제품이 출시되고 있는 가운데 국내 건강기능식품시장은 홍삼·인삼과 알로에제품 등이 주도하고 있는 것으로, 식약청이 3년간 품목별 매출실적을 집계한 결과 드러났다. 이번 조사결과 2007도 총생산액은 7,234억원이었으며, 품목별로는 홍삼 제품 3,270억원, 알로에 제품 797억원, 영양보충용 제품 785억원, 인삼 제품 350억원, 글루코사민 제품 270억원이며, 이들 5개 품목이 전체 생산액의 75.6%를 차지했다. 또 EPA·DHA 함유 제품 167억원, 효모 제품 148억원, 화분 제품 37억원, 스쿠알렌 함유 제품 84억원, 효소 함유 제품 53억원, 유산균 함유 제품 175억원, 클로렐라 제품 187억원, 스피루리나 제품 44억원, 감마리놀렌산 함유 제품 165억원, 레시틴 제품 25억원, 옥타코사놀 함유 제품 11억원 등으로 파악됐다. 키토올리고당 함유 제품은 100억원을 넘었고 엽록소 함유 제품 17억원, 버섯 제품 19억원, 매실추출물 제품 18억원, 자라 제품 62억원, 베타카로틴 함유 제품 16억원, 녹차추출물 제품 22억원 등으로 그 뒤를 이었다. 개별인정형 제품으로는 CLA (126억원)과 코엔자임큐텐 (73억원)만이 성장세를 보였고 MSM과 N-아세틸그루코사민, 루테인, 쏘팔메트 등은 10억원에도 미달됐다.

국내 건강기능식품 제조업소의 품목제조 신고 현황을 보면, 현재 1만265개 품목이 신고 되었으며, 영양보충용제품 (32.3%), 홍삼제품 (9.6%), 유산균제품 (8.3%), 글루코사민제품 (7.1%), EPA/DHA제품 (4.2%) 순으로 품목신고가 많았다.

개별인정형 건강기능식품의 경우도, 2004년 이래 현재까지, 522개 제품 (5.1%)이 품목제조 신고 되었으며, 코엔자임큐텐제품, 공액리놀렌산제품, 루테인제품, 엠에스엠제품 순으로 많았다.

(2) 국내 생산규모

국내 건강기능식품제조업소가 식품의약품안전청에 2006년도에 보고한 “2005년도 건강기능식품 생산실적”을 보면 310개소에서 4,414개 품목을 신고하고, 그 매출액은 6,856억원(국내 판매액 : 4,433억, 수출액 : 423억) 되는 것으로 집계되었다. 이는 2004년도의 매출액 5,781억원 대비 1,075억원 (19%)이 증가한 것으로 국민들의 건강기능식품에 대한 관심이 증가하고 있음을 의미한다.

▶ 국내 출하액, 수출액 기준 상위 10개사 현황

(단위: 억원, 달러)

순위	업 체 명	출하액	순위	업 체 명	수출액
1	(주)한국인삼공사	1,821	1	(주)일화	10,827,836
2	(주)마임	874	2	(주)한국인삼공사	5,344,798
3	(주)남양	385	3	주식회사 쉐 바이오텍	3,457,839
4	대상(주)	236	4	대상(주)	2,402,349
5	풀무원건강생활(주)	229	5	(주)고려홍삼공사	2,301,610
6	(주)태평양제약	183	6	구안산업(주)	1,926,717
7	(주)세모	174	7	고려인삼제조주식회사	1,302,274
8	(주)렉스진바이오텍	173	8	한일인삼산업주식회사	1,295,663
9	종근당건강(주)	159	9	(주)렉스진바이오텍	1,258,864
10	일진제약주식회사	132	10	(주)진생사이언스	1,198,379

출처: 2007 보건산업백서

◎ 2005년 건강기능식품 매출현황 - 품목유형별

(단위 : 천원, 달러)

품 목 명	국내판매액	수 출 액		합 계
		달 러	천 원	
인삼	17,220,615	18,717,740	19,166,966	36,387,581
홍삼	179,861,285	11,759,184	12,041,404	191,902,689
스피루리나	3,074,600	2,764	2,830	3,077,430
감마리놀렌산	15,332,607	1,042	1,067	15,333,674
알로에	96,930,138	118,320	121,160	97,051,298
키토올리고당	8,605,589	149,411	152,997	8,758,586
프락토올리고당	116,838	-	-	216,872
개별인정형	8,254,286	-	-	8,254,286
기타	313,909,230	10,578,307	10,832,186	324,641,382
합계	643,305,188	41,326,768	42,318,610	685,623,798

자료: 2007-2008 한국식품연감(농수축산신문)

## 제 2절 국내외 색소 관련 기술개발 현황

식품첨가물 중 외형적으로 소비자의 구매 효과를 가장 높이는 요소로 사용되는 색소는 원래 천연물에서 유래하는 것이지만 상업적으로 취급의 용이성이나 저렴한 가격 등의 이유로 우리나라에서는 합성색소가 많이 사용되고 있다.

하지만 합성색소가 가지고 있는 유해성이 사회적으로 계속 논란이 되면서 일반 소비자들이 합성색소에 대한 거부감을 가지고 있으며 또한 웰빙을 추구하는 현대인의 생활형태의 변화 추세에 따라 천연색소의 사용도 계속적으로 증가할 것으로 보인다. 또한 가까운 일본의 경우 어린이가 먹는 식품에는 대부분 천연색소를 사용하고 있으며, Nestle는 2005년도에 자사의 제과류에 모든 인공색소를 사용하지 않기로 하고 합성색소에 대한 대체소재를 찾고 있다. Brilliant Blue (E133)의 대체물질을 찾기 위해서 당분간 인공색소를 제거한 채로 백색의 제품을 생산해 왔으며 최근 이에 대한 해답을 Spirulina [cyanobacteria (blue-green lake algae)로부터 생산]에서 찾았다. 천연 hibiscus 추출물로부터 음료수에 사용할 수 있는 bright red colour를 띠는 표준화된 anthocyanin을 개발하였으며, 최근에는 자색고구마로부터 붉은 색의 anthocyanin을 이용한 색소가 추가적으로 상품 군에 들어가고 있다. 이 색소는 산성

상태에서 붉은 색을 띠며 음료, 사베트, 샐러드, 드레싱, 소스 등에 사용될 수 있다. 새로운 대체 색소를 찾는 것뿐만 아니라 현존하는 천연색소의 효과를 개선하는 제품들도 소개 되고 있다. Slovenia의 Vitiva사는 rosemary extract를 이용하여 합성보존료를 사용하지 않고도 carotenoids와 천연색소를 안정화시키고 이취와 변색을 방지하여 보존기간을 연장할 수 있다고 주장하고 있다.

천연색소의 경우 인체에 대한 안전성이 합성색소인 타르계 색소에 비해 높으며, 최근 “색을 먹자” 라는 책이 화제를 끌 정도로 소비자들도 검은콩, 검은깨, 흑미, 녹황색채소, 토마토, 포도 등 색을 지니고 있는 식재료에 관심이 많아지고 있어 이들은 천연색소라기 보다 생리활성 기능으로 소비자들에게 더 크게 어필되어지고 있는 실정이다. 또한 천연색소는 노화억제, 시력개선, 항산화, 항암, 심장병예방, 면역시스템 향상, 비만 방지 등의 기능성을 가지고 있다는 점에서 식품에의 사용이 이상적이라 할 수 있으며 천연색소에 의한 착색된 색조가 소비자들에게 더 친근하게 다가갈 수 있는 것도 특징이라 할 수 있다.

천연색소의 경우 색의 선명도가 낮고 내광성, 내열성, 내산성 등의 안정성과 염착성이 떨어지는 단점, 원료확보와 가격의 문제를 안고 있다. 일본의 경우에는 그 문제점을 보완하기 위한 연구개발이 진행되어 유화, 물분산성, 이중유화 등의 제제 개발로 발색이 좋고 안전성이 높은 색상표현이 가능해졌다. 국내의 경우에도 국내의 천연색소 기업인 엠에스씨는 치자를 국내 수매하여 3가지(노랑, 빨강, 파랑) 색을 만드는데 세계에서 2번째로 성공하였으며 자색고구마의 경우도 국내에서 수매하여 정제도 높은 자색색소를 제조하는데 성공하였으며, 색소 대부분을 수입에 의존하고 있는 현실에서 코치닐 추출색소나 치자색소, 락색소 등의 경우 원료부터 처리, 생산까지 국내에서 이루어지고 있으며, 특히 코치닐 원료에서 코치닐색소와 카르민을 제조하며 해외로 연간 10억원 내외로 색소를 수출하고 있으며 미량이긴 하지만 치자색소, 홍국색소, 고량색소, 카라멜 색소 등의 경우 수출도 하고 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절. 자색고구마에 함유된 안토시아닌 구조 확인 및 원재료 표준화

현재 식품가공용으로 이용되고 있는 anthocyan 색소는 주로 포도주 생산에서 얻어지는 포도 껍질이나 블루베리, 적양배추 등으로부터 얻어지고 있는데 최근에는 새로운 색소원으로서 자색고구마의 이용 가능성에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

신선한 식품 중에서 안토시아닌은 모두 당과 결합한 배당체나 그 배당체부에 유기산이 에스테르 결합한 아실화 배당체로 존재하고 있다고 알려져 있다. 안토시아닌의 기본적인 색조는 안토시아니딘 (aglycone)의 구조로 결정되고, 안토시아니딘의 B환의 수산기가 증가하면 가시부의 극대흡수 파장은 장파장 측으로 옮겨가고 푸른색에서는 홍적색, 세 개의 시아니딘에서는 자적색을 나타낸다. 또한 안토시아닌의 색조는 안토시아닌진의 수산기(-OH) 수 뿐만 아니고, 메톡실기 (-OCH<sub>3</sub>)의 결합수나 당 유기산의 결합위치나 결합수에 의해서도 달라지게 된다. 안토시아닌은 구조이외에도 주위의 환경에 의하여 그 색조를 크게 변화시킨다. 특히 pH의 변화나 금속이온이나 플라보노이드와 같은 코피그먼트 화합물의 존재에서 안토시아닌의 색조가 크게 변화한다는 것은 잘 알려져 있다.

최근 합성색소는 식용 타르계 색소의 발암성 등이 문제가 되어 그 사용이 제한되고 있다. 이러한 상황 속에서 건강적인 측면에서 합성 착색료는 소비자들의 사용기피 현상으로 나타나 사용량이 현저한 감소를 하고 있다. 그에 비해 천연색소는 야채나 과실의 색이 신선함의 척도로서 보여지는 것과 같이 자연의 색조와 안전한 이미지가 정착되고 있다. 이와 같이 수요량은 증가하고, 색소의 품질이나 안정화 기술 등도 진보해왔으나 안토시아닌은 합성색소에 비하여 안정성이 떨어지고 식품에 이용할 때의 장애가 되어 이용확대에 걸림돌이 되고 있다. 안토시아닌은 불안정하기 때문에 신선한 천연원료에서 완전한 상태에서 추출, 정제하는 일은 곤란하며 결합하고 있는 유기산이나 당의 일부가 분해되는 등의 손실은 각오하지 않으면 안된다. 더구나 조리, 가공이나, 발효 등 조건하에서는 안토시아닌의 종류에 따라서 분해의 비율이 높아지게 되는 것은 면할 수 없다. 이와 같은 안토시아닌의 퇴색이나 변색 등의 변화에는 열, 광, pH, 산소, 무기염, 유기산, 당, 페놀, 과산화수소 등의 다양한 요인들이 관여하고 있다.

자색고구마 품종 “신자미”는 농촌진흥청 산하의 국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 단위생산량이 높은 신미를 모본으로 하고 일본의 재래종 자색고구마인 산천자(Yamakawa-murasaki)를 부분으로 교배한 육종 연구를 통하여 개발되었다.

고구마류의 안토시아닌의 색소 잔존률은 가열의 경우 63~77%, 자외선 조사의 경우 6~80%로 알려져 있으며 다른 과실류의 안토시아닌에 비하여 매우 안정하다고 알려져 있다. 서류의 안토시아닌은 종류가 9~13개로 다양하고 그 중 2/3 이상이 아실화안토시아닌이라고 한다. 안토시아닌의 식품으로 고도의 이용기술을 확립하는 것은 식품제조의 실용면에 있어

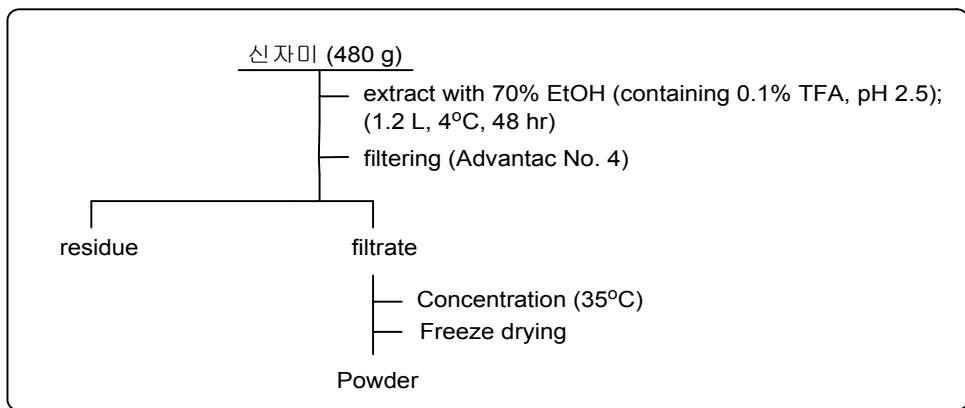
서 매우 중요한 측면이라 할 수 있다. 이에 자색고구마의 원료의 표준화에 관한 연구로서 국내 자색고구마의 품종별, 추출별에 따른 색소의 분자구조적 변화 및 안토시아닌 구조확인 등에 관한 연구는 전무한 상태이므로 이에 대한 연구를 하고자 한다.

### 1. 신자미의 계통별 안토시아닌 조성 비교

국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 1994년에 일본 큐슈의 가고시마현에서 재배되어진 일본재래종 품종인 “Yamakawamurasaki (산천자)”와 국내품종 “신미”를 교배하여 얻어진 실생으로부터 2001년까지 8개년에 걸쳐 일련의 시험 및 선발과정을 거쳐 자색을 띠는 “신자미”라는 품종의 자색고구마가 국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 개발되었다 (아래사진 참고).



본 실험에서는 신자미의 부분인 산천자와 모본인 신미 그리고 그로부터 얻어진 신자미 각각에 함유된 안토시아닌 조성을 비교하고자 하였다. 먼저 각각의 고구마를 일정량씩 취하여 일정한 크기로 slicing 한 후 이들 각각을 0.1% Trifloroacetic acid가 함유된 70% EtOH로 추출한 후 여과하여 농축하고 이를 동결건조를 실시하여 분말형태의 추출물을 얻었다.





얻어진 각각의 추출물을 소량씩 취하여 MeOH에 녹여 520 nm에서 HPLC 분석을 실시하여 얻어진 크로마토그램을 비교하여 각각의 고구마에 함유된 안토시아닌 조성을 비교하였다. 본 실험에 사용된 HPLC 분석조건은 아래와 같다.

▶ HPLC 분석조건

- 기기: Waters 2695 pump
- Detector: 520 nm (Waters 2996 PDA detector)
- Column: Waters Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×150 mm)
- 이동상: Solvent A; H<sub>2</sub>O (0.1% TFA 함유)

Solvent B; 50% Acetonitrile (0.1% TFA 함유)

Time (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
45	60	40

HPLC 분석 결과, 자색을 전혀 보이지 않는 신미의 경우에는 역시나 520 nm에서 전혀 peak를 보이지 않았으나, 산천자와 신자미는 520 nm에서 흡광도를 나타내는 peak가 수종 확인되었다. 산천자의 경우에는 국내품종이 아닌 일본 큐슈지방에서 자생하는 고구마로서 일본에서는 이에 대한 연구가 상당히 많이 이루어져서 산천자에 함유된 안토시아닌 화합물에 대한 구조 동정이 많이 이루어진 상태로 산천자에 함유된 안토시아닌은 peonidin이 대부분이며 그 외에 cyanidin이 소량 존재한다고 알려져 있으며, 이들 anthocyanidin 골격의 3번 또는 5번 위치에 당과 다른 phenolic 화합물이 결합되어 있다는 많은 보고들이 있다. 이에 이 산천자를 부분으로 하여 개발된 신자미도 산천자와 유사한 화합물들이 함유되어 있을 것이라 생각되어지며, 이를 산천자와 동일한 방법으로 추출하여 같은 조건에서 HPLC 분석을 실시해 본 결과 이들의 chromatogram이 거의 유사함을 확인할 수 있었다. 이에 신자미에 함유된 안토시아닌을 단리 정제하여 그 구조를 확인해 보고자 하였다.

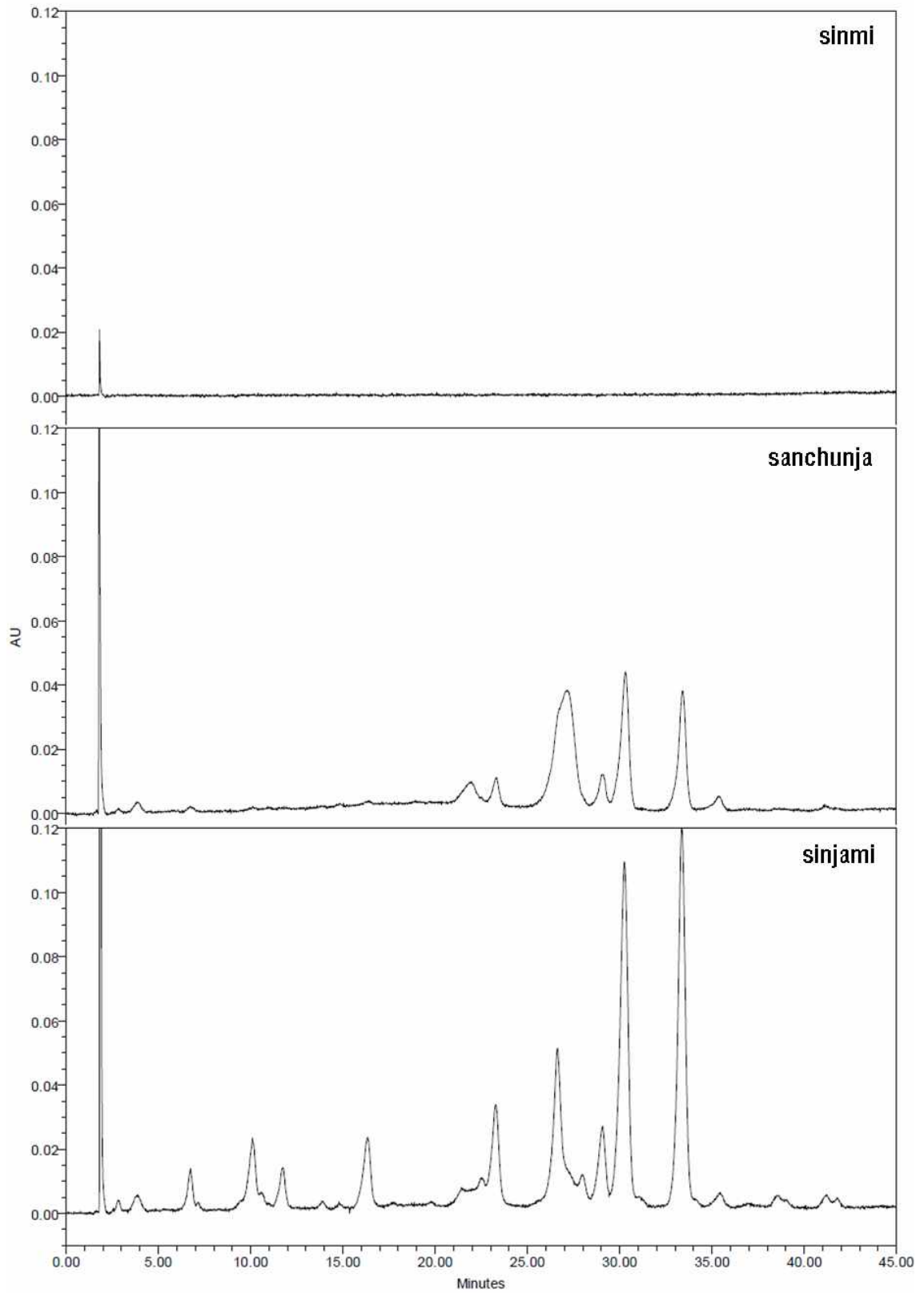


Fig. 1-1. HPLC chromatogram of each species potato at 520 nm.

## 2. 자색고구마 품종별 안토시아닌 조성 비교

### 가. 국내 자색고구마 품종별 안토시아닌 조성 비교

국내에 보급되어지는 자색고구마는 대부분이 농촌진흥청 산하의 국립식량과학원 바이오 에너지작물센터에서 품종개발된 것이다. 현재 국내에 보급된 자색고구마 품종은 신자미와 연자미, 보라미이다. 신자미는 색소성분은 다른 자색고구마 품종보다 훨씬 많이 함유되어 색소가공을 목적으로 개발된 것이며, 연자미와 보라미는 총 안토시아닌 함량이 신자미 보다는 낮아서 튀김용이나 생식용에 적합한 품종이다(아래 사진 참고).



위의 사진에서 보이는 것처럼 각각의 품종에 따른 육색이 현저하게 다름이 쉽게 확인되어 질 수 있으나 아직까지 국내에서는 이들 품종간의 안토시아닌 조성의 차이와 각각의 품종에 함유된 안토시아닌의 구조에 관한 연구가 이루어지지 않은 실정이다. 이에 본 실험에서는 국내 자색고구마 품종별 안토시아닌의 조성을 비교해 보고자 자색고구마를 품종별로 0.1% TFA가 함유된 70% EtOH로 추출하여 얻어진 추출물을 동결건조한 후 얻어진 분말(Fig. 2-1)을 가지고 지금까지 분석했던 조건과 동일한 조건에서 HPLC 분석(520 nm)을 실시하여 각각의 품종에 함유된 안토시아닌을 비교 확인해 보았다 (Fig. 2-5).

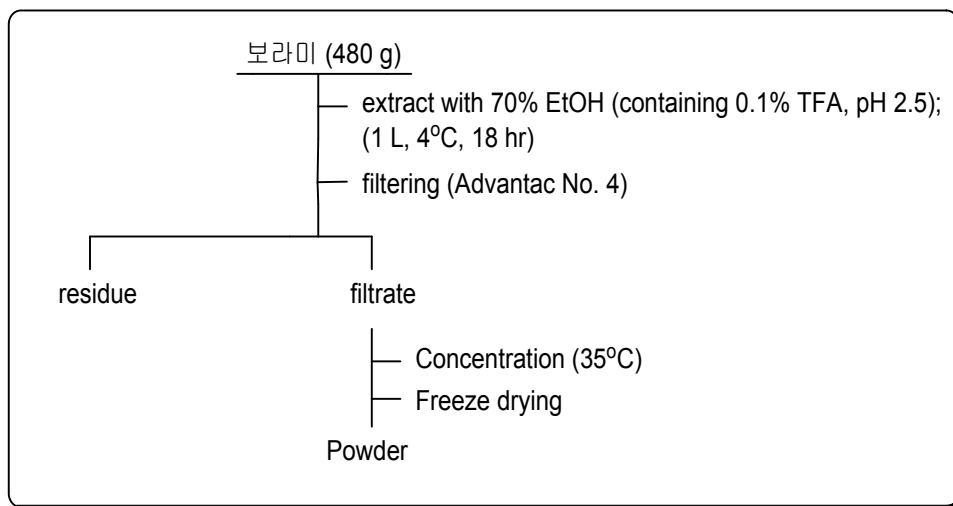


Fig. 2-4. 추출방법

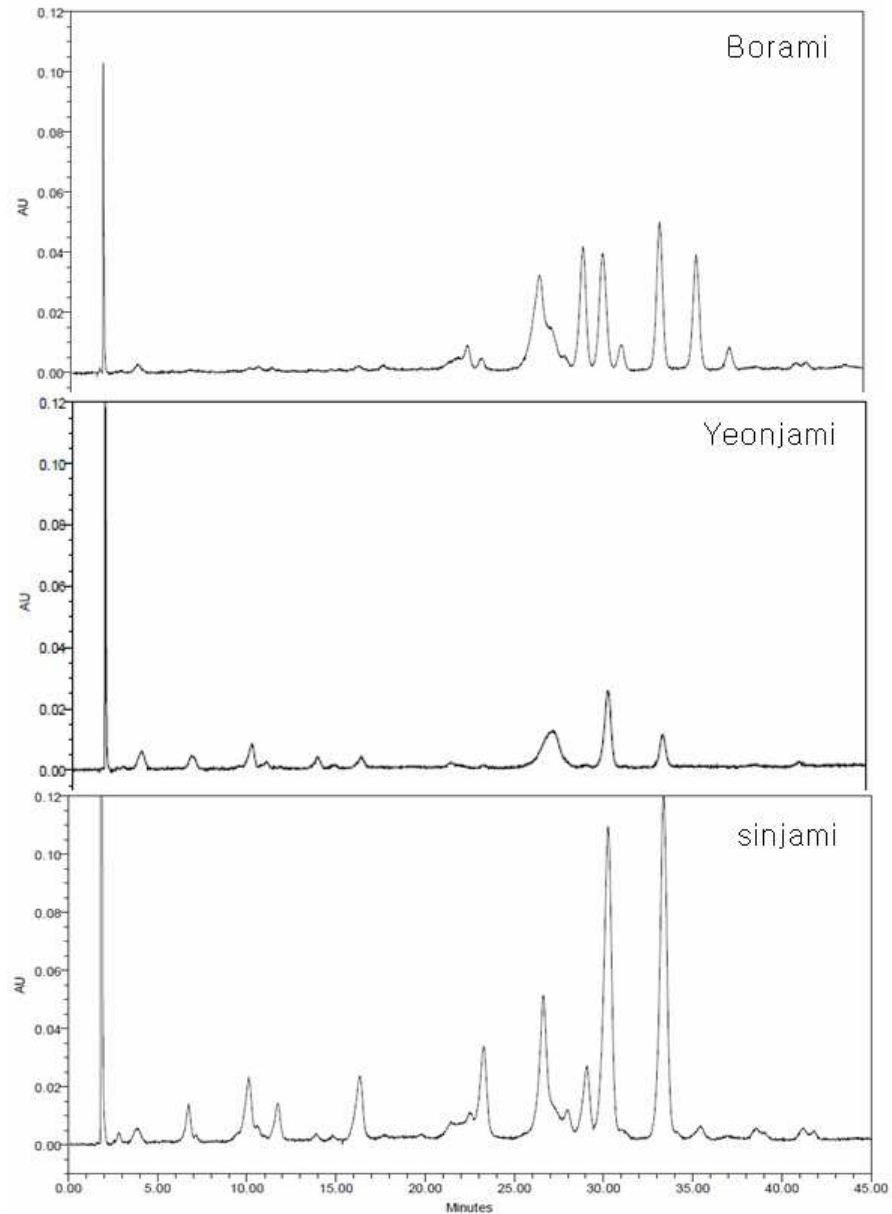


Fig. 2-5. HPLC chromatogram of each species purple sweet potato at 520 nm.

그 결과, 자색고구마 각각의 품종에 따라 함유된 안토시아닌 조성 및 화합물의 종류도 서로 다름을 확인할 수 있었다. 즉, 신자미의 경우에는 HPLC retention time 전반에 걸쳐 다양한 안토시아닌이 함유되어 있으며 보라미는 retention time 25-35분 사이에 대부분의 peak가 나타나며 신자미에서는 거의 함유되어 있지 않는 화합물(retention time 29분, 36분)이 많이 함유되어 있음을 확인할 수 있었고, 또한 연자미의 경우에는 다른 품종들 보다는 더 적은 종류의 안토시아닌이 존재함이 확인되었다. 즉, 같은 자색을 나타내는 고구마라 할지라도 이들 품종에 따라 함유된 안토시아닌의 종류 및 함량이 약간 상이함을 알 수 있었다.

## 나. 국내의 자색고구마 품종별 안토시아닌 조성 비교 확인

자색고구마에 대해 비교적 많은 연구가 이루어진 일본의 경우에는 자색고구마에 함유된 안토시아닌의 구조가 많은 연구자들에 의하여 이미 논문 등으로 보고되어져 있는 상태이다. 하지만 국내에서 개발된 품종인 신자미에 함유된 안토시아닌의 조성에 대해서는 연구가 많이 이루어지지 않은 상태이기 때문에 이미 안토시아닌의 조성이 확인된 일본의 자색고구마와 국내 품종인 신자미의 안토시아닌 조성을 서로 비교하여 국내 품종인 신자미의 안토시아닌 조성이 일본품종과 어떠한 차이가 있는지를 확인해 보고자 하였다.

국내에서 많이 재배되어지고 있는 신자미와 일본에서 육종 연구를 통해 널리 재배, 보급되어지고 있으며, 안토시아닌의 구조가 확인되어진 아야무라사끼 품종을 일본에서 직접 구입하여 각각의 자색고구마를 품종별로 70% EtOH로 추출한 후 얻어진 추출물을 대상으로 상기의 분석조건과 동일한 조건에서 HPLC 분석 (520 nm)을 실시하여 일본품종과 국내 품종간의 안토시아닌 구조 및 함량의 차이 유무를 비교 확인해 보았다.

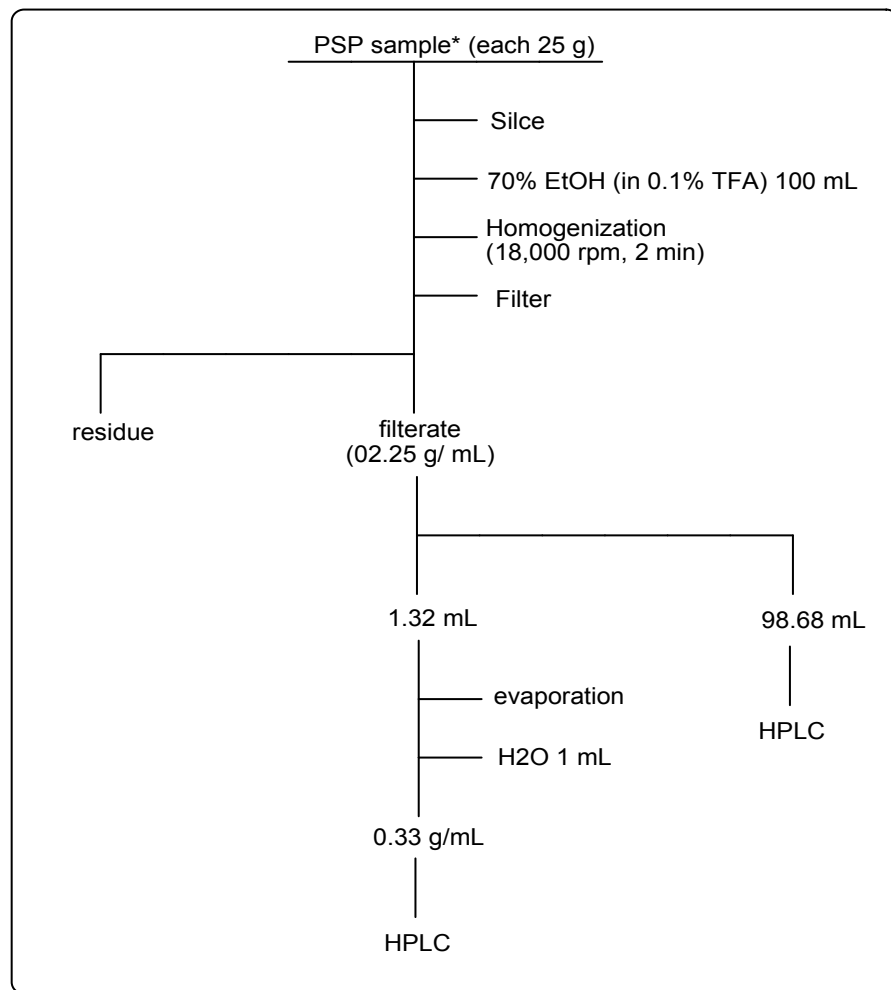


Fig. 2-1. 품종별 자색고구마 추출방법

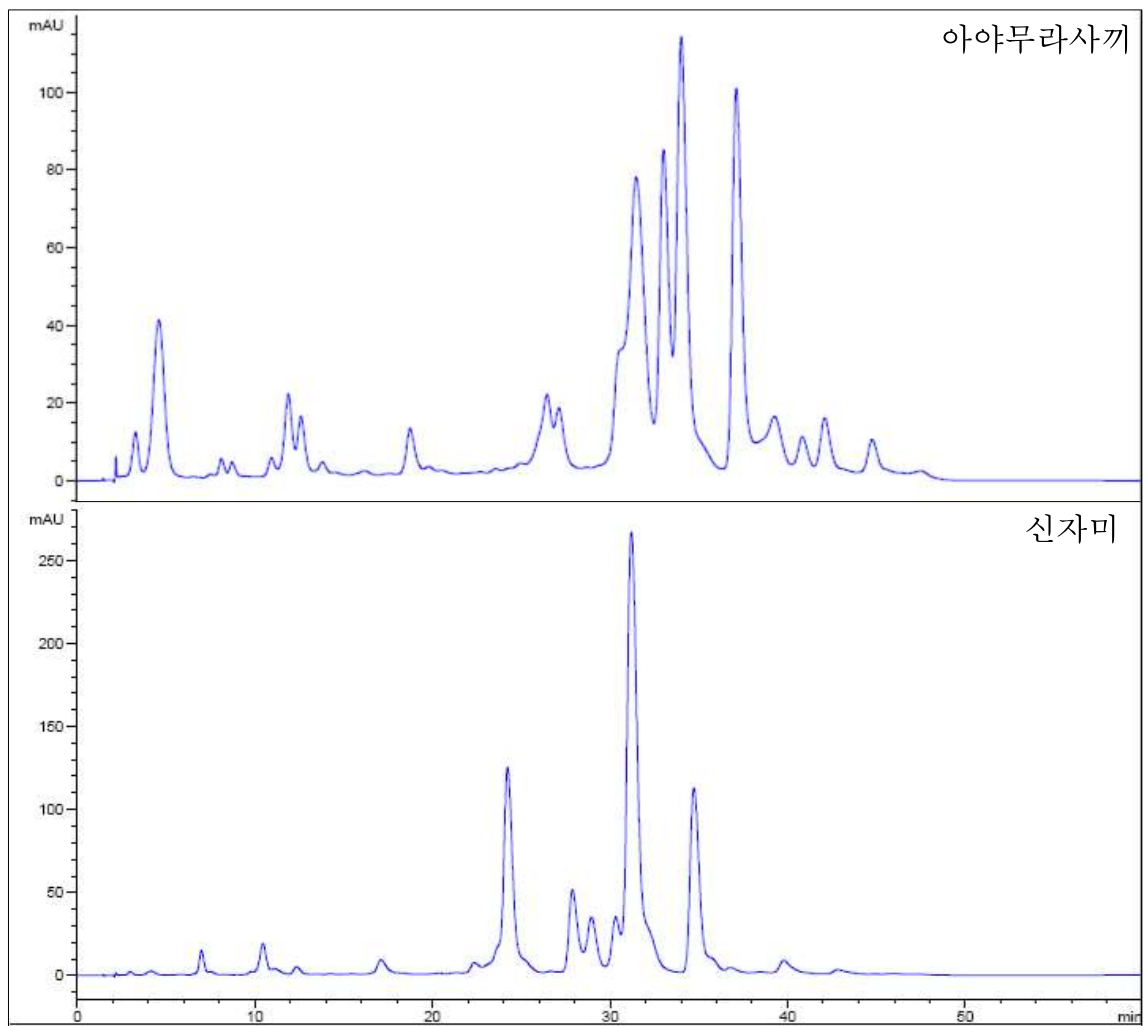


Fig. 2-2. 신자미, 아야무라사끼의 Chromatogram

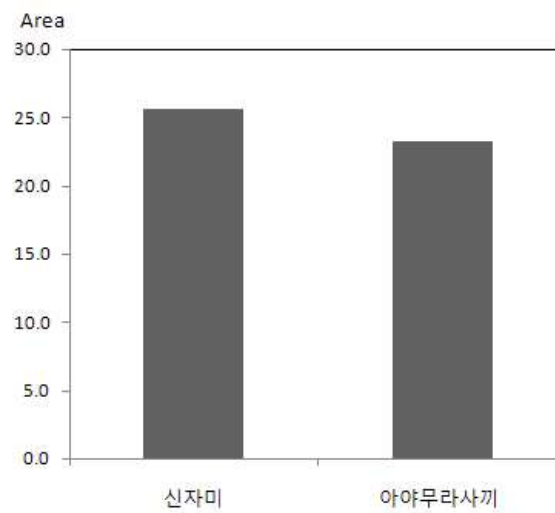


Fig. 2-3. 신자미, 아야무라사끼의 total peak area(HPLC 520 nm)

각각의 자색고구마를 추출한 추출물을 서로 동일한 농도로 HPLC 분석을 실시해 본 결과, 일본의 아야무라사끼와 국내 신자미는 서로 다른 안토시아닌으로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig 2-2). 즉, 아야무라사끼에는 신자미에 함유되어 있지 않는 다른 안토시아닌 화합물이 더 많이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 그렇지만 아야무라사끼와 신자미를 동일한 농도로 분석하여 HPLC에서 검출된 peak의 total area를 비교해 보면 아야무라사끼보다 신자미의 total peak area가 더 높음을 알 수 있다. 이는 좀 더 확인해 보아야 하겠지만, 신자미에 함유된 안토시아닌의 총량이 아야무라사끼보다 더 많은 것이 아닐까 추측되어 진다.

즉, 신자미는 일본의 대표적인 자색고구마 품종인 아야무라사끼와 비교해 볼때 안토시아닌 화합물의 종류는 좀 더 적게 함유되어 있으나 전체적인 안토시아닌의 총량으로 볼 때는 더 많은량의 안토시아닌인 함유되어 있을 것으로 예상되어 진다.

### 3. 자색고구마(신자미) 성장 단계에 따른 안토시아닌 조성 변화

생육단계별 자색고구마에 함유된 안토시아닌 조성변화를 확인하기 위하여 자색고구마의 실제 size를 측정하고, 각 단계별로 고구마 25 g 을 취하여 0.1% TFA가 함유된 70% EtOH 100 mL에 넣고 균질화 후 1시간 동안 추출한 추출물(Fig. 4-4)을 대상으로 UV 및 HPLC분석을 통해 total 안토시아닌 및 개별 안토시아닌 peak의 함량을 분석하였다.



Fig. 4-3. 생육단계별 신자미

Table 4-1. 생육단계별 신자미 size (중량 및 길이)

	1단계	2단계	3단계
고구마의 실측 size (g, cm)	57.5 g / 9*3.5 cm	159.5 g / 11.5*5cm	409.5 g / 16*6.5 cm
	76 g / 7*4.5 cm	120 g / 9*5 cm	311 g / 12*7 cm
	68.5 g / 7*3.5 cm	120 g / 10*5 cm	441 g / 18.5*7 cm



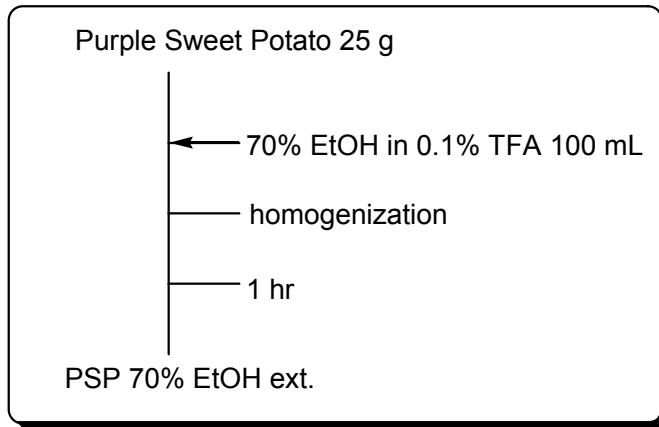


Fig. 4-4. 자색고구마 추출 과정

(1) UV spectrophotometer에 의한 총 안토시아닌 정량

검량선을 작성하기 위하여 자색고구마 추출물을 정제하여 얻은 색소(0~2 mg/ml)를 pH 1.0 buffer에 용해시켜 흡광도를 측정 한 후 검량선( $R^2=0.988$ )을 작성하였다(Fig. 6-5). 각 생육단계별 추출물의 흡광도 값을 측정한 후 검량선으로부터 자색고구마 100 g에 함유된 총 안토시아닌 함량 값을 확인하였다.

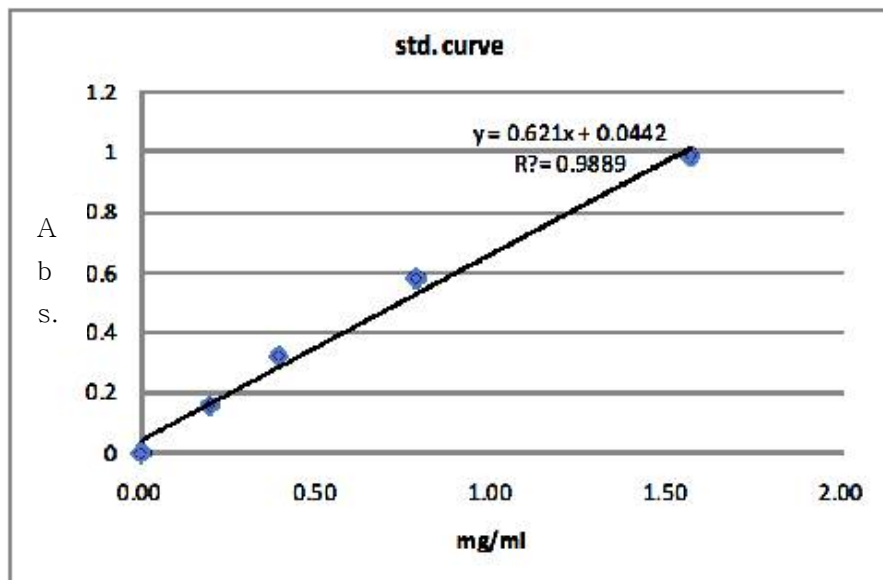


Fig. 4-5. 자색고구마 추출물을 정제하여 얻은 색소(0~2 mg/ml) 검량선

Table 4-2. 생육단계별 총안토시아닌 함량

생육단계		총안토시아닌 함량 (g/자색고구마 100 g)
1단계	n=1	3.46
	n=2	2.71
	n=3	3.52
	Ave.	3.2
2단계	n=1	4.08
	n=2	4.12
	n=3	4.36
	Ave.	4.2
3단계	n=1	3.21
	n=2	4.46
	n=3	4.33
	Ave.	4.0

그 결과, 자색고구마 100 g 중에 1단계의 총 안토시아닌 함량은 3.23 g, 2단계는 4.19 g, 3단계는 4.0 g이 함유되어 있는 것으로 확인되었다(Table 4-2). 2단계, 3단계에 있어서는 안토시아닌 함량이 약 4 g 정도로 거의 유사하지만, 1단계는 자색고구마 100 g 중에 약 3 g 정도의 안토시아닌이 함유되어 있는 것으로 확인되어 자색고구마가 성장이 진행되면서 자색고구마 내의 안토시아닌 함량이 증가하고, 일정 수준으로 성장하게 되면 그 이후에는 안토시아닌의 함량에 큰 영향을 보이지 않음을 확인 할 수 있었다.

#### (2) 자색고구마 생육단계별 총안토시아닌과 안토시아닌 개별 peak 별 함량 변화

자색고구마의 생육단계별로 각각의 안토시아닌의 조성이 어떻게 변화 되는지를 확인해 보기 위하여 자색고구마 추출물을 정제하여 얻어진 자색고구마 안토시아닌 색소를 표준품으로 하여 상기의 크로마토그램으로부터 각 안토시아닌 peak별 안토시아닌 함량을 정량분석을 실시하였다.

- Standard: 자색고구마 추출물을 정제한 것 사용
- 검량선 작성: 농도를 알고 있는 standard를 분석하여 동일한 조건으로 적분 후에 area %로 각 peak의 농도 계산 후 각 peak별로 검량선 작성.

#### ▶ HPLC 분석 조건

- Detector: UV detector (520, 320 nm)
- Column: SunFire™ C18, 5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm (Waters, Ireland)
- Column Oven: 30  $^{\circ}$ C
- Injection vol. 20  $\mu$ L
- Flow rate: 1 mL/min
- Mobile phase: Solvent A; H<sub>2</sub>O (0.1% TFA 함유)  
Solvent B; 50% Acetonitrile (0.1% TFA 함유)

min	A (%)	B (%)
0	75	25
45	60	40

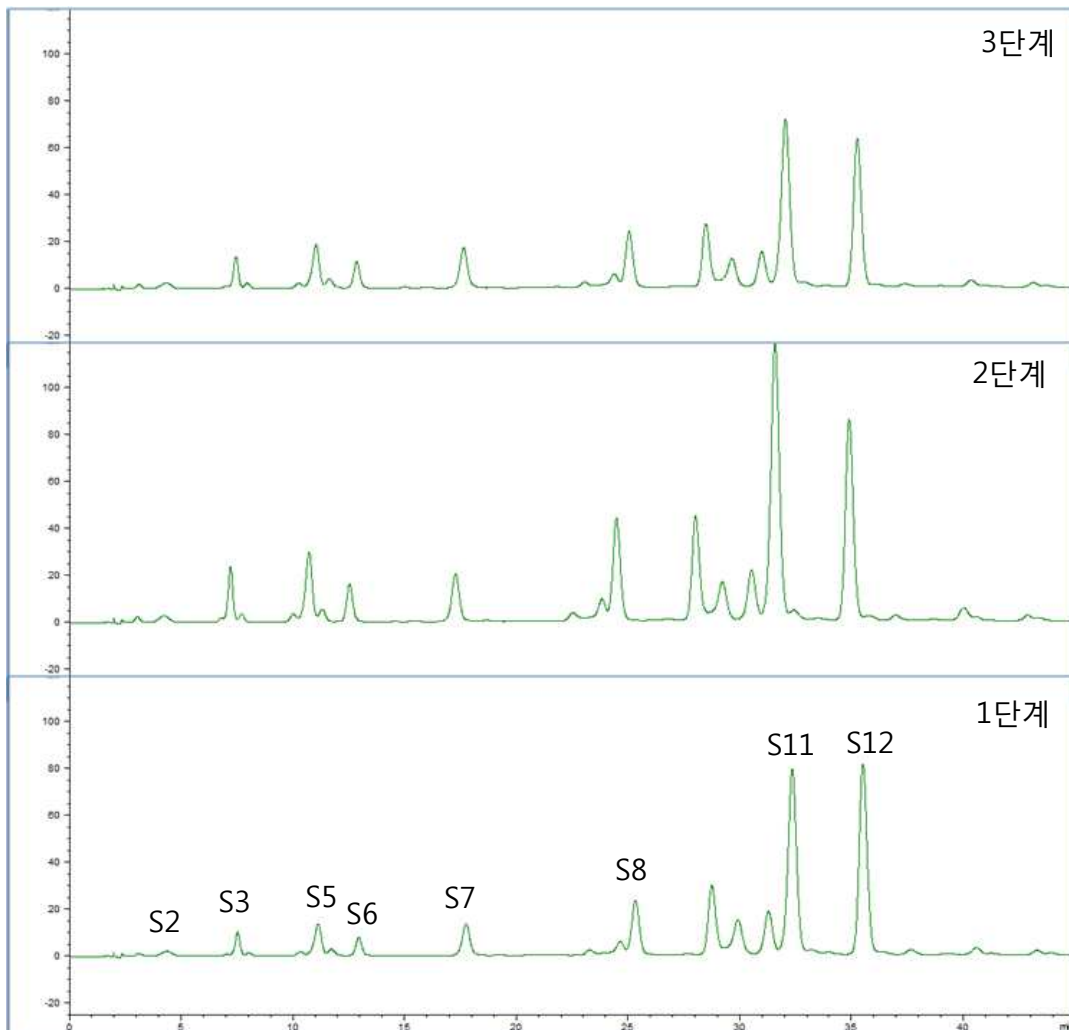


Fig. 4-6. 각 생육단계별 HPLC Chromatogram

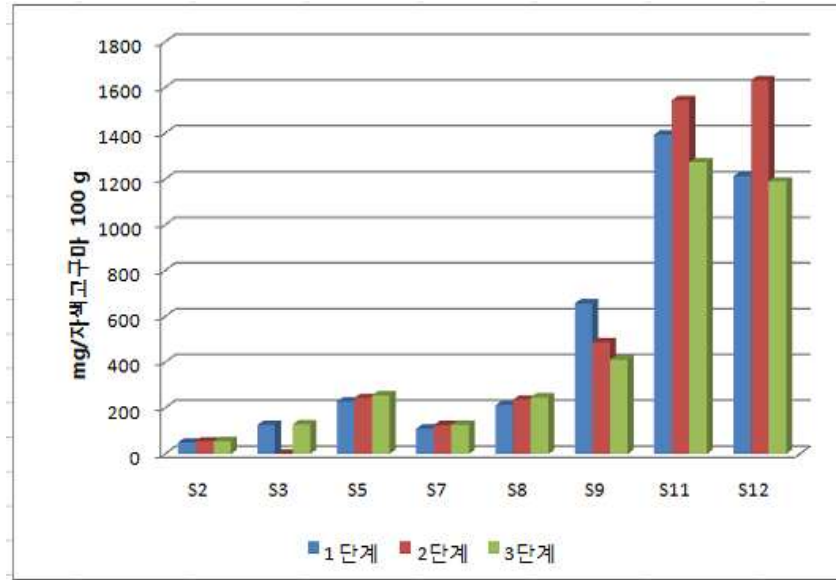


Fig 4-7. 자색고구마 생육 단계별 개별 안토시아닌 함량 분석결과

그 결과 각 생육단계별로 개별 안토시아닌의 조성은 유의적인 차이 없이 고구마가 성장하면서 각 안토시아닌 색소도 유사하게 함유되어 있음을 알 수 있었다.

#### 4. 자색고구마에 함유된 안토시아닌 구조 확인

##### 가. 신자미로부터 안토시아닌의 분리 정제

신자미(생물 약 1 kg)를 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 70% EtOH 4 L로 추출하여 안토시아닌 색소 추출물을 얻었다. Amberlite XAD-7 (20~60 mesh, sigma사)을 100% 증류수로 slurry를 만들어 column(3×19 cm)에 충전 시킨 후 자색고구마 추출물을 물에 녹여 Amberlite XAD-7 column에 charge 하여 물, EtOH 획분으로 분획하여 정제하였다. 얻어진 각각의 분획물을 대상으로 HPLC 분석을 실시하여 안토시아닌의 조성을 확인한 결과, EtOH 획분에 안토시아닌 화합물이 함유되어 있음이 확인되었다. 이 EtOH 획분에 함유된

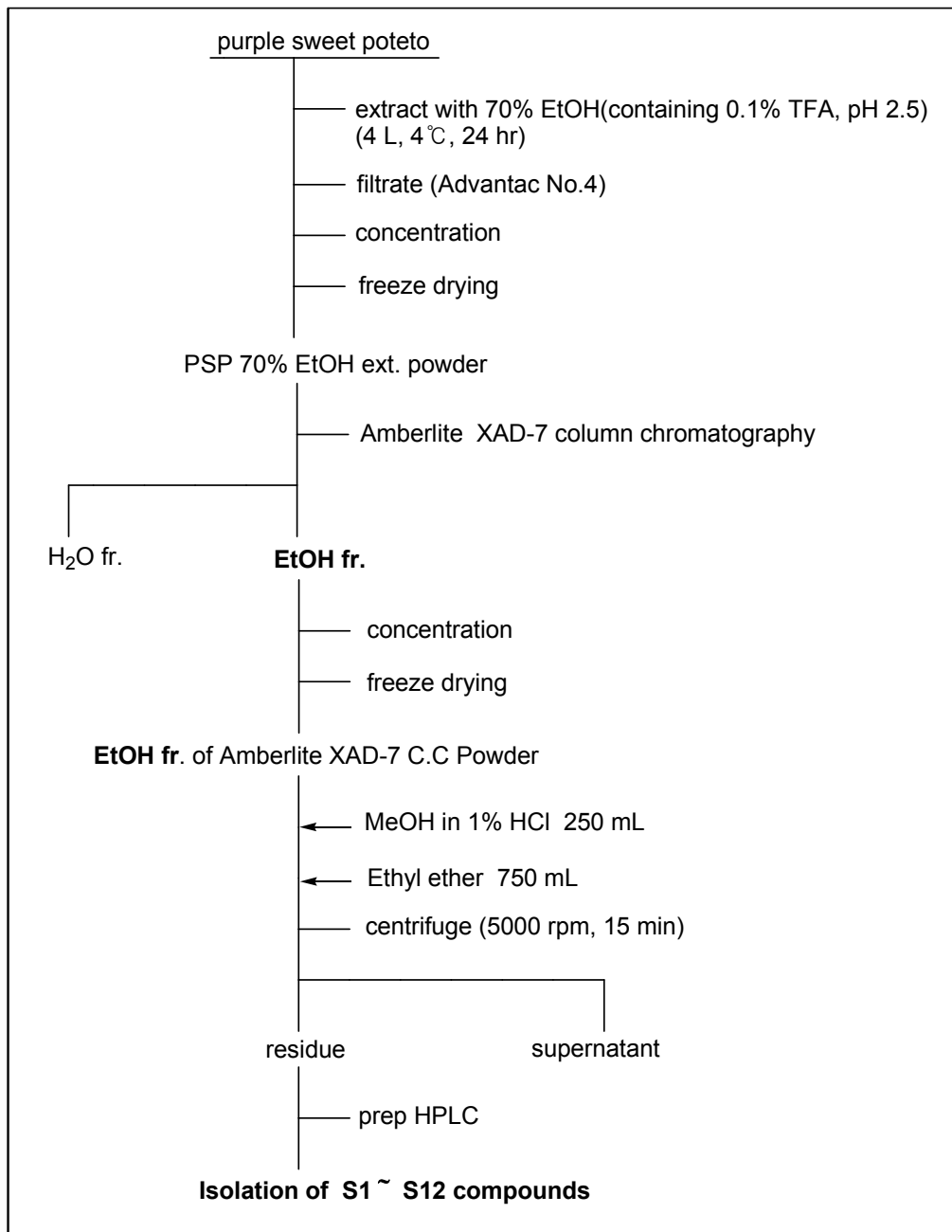
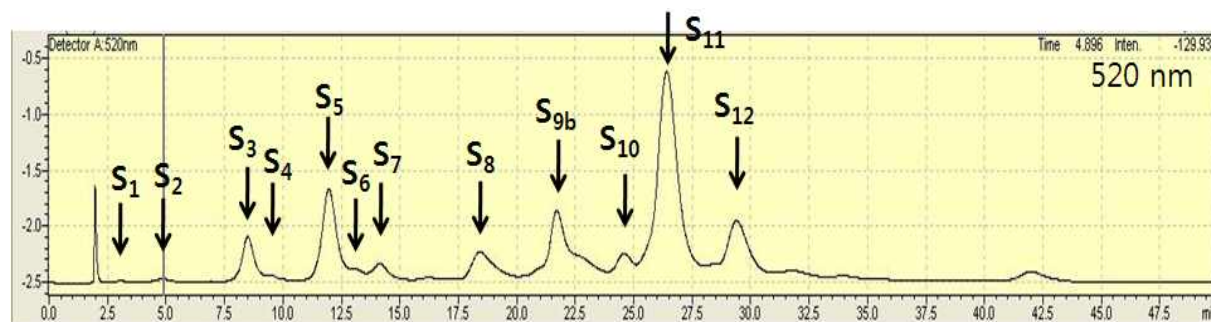


Fig 4-1 . 자색고구마 추출물의 분리 정제 흐름도

안토시아닌을 더 정제하기 위하여 이 등의 방법에 따라 에탄올과 에테르를 이용한 침전법을 사용하여 색소를 정제하였다. 즉, Amberlite XAD-7에서 얻어진 EtOH 획분을 1% HCl이 함유된 MeOH 용액(250 ml)에 용해 시킨 후 이 용액에 3배수의 ethylether (750 mL)을 첨가하면 안토시아닌 색소가 침전되어진다. 침전된 안토시아닌 색소를 원심분리를 실시하여 침전물을 분리하였다.

분리된 침전물을 대상으로 520 nm에서 HPLC 분석을 실시한 결과(아래 그림 참고), 총 12종의 안토시아닌 색소가 함유되어 있음을 알 수 있었다.



분리한 안토시아닌 침전물에 함유된 각각의 안토시아닌 색소를 분리하기 위하여 prep-HPLC를 이용하여 화합물을 분취하였다.

◎ Prep-HPLC 분취 조건

- Detector: PDA detector (520 nm)
- Column: SunFire™ Prep C18 5 um 10×150 mm column, waters, Ireland
- Oven temp.: 30 °C
- Injection vol. 약 400 µL정도 씩 injection
- Flow rate: 4.7 mL/min
- Mobile phase

min	A H2O (0.1% TFA)	B 50% MeCN (0.1% TFA)
0	75	25
45	60	40

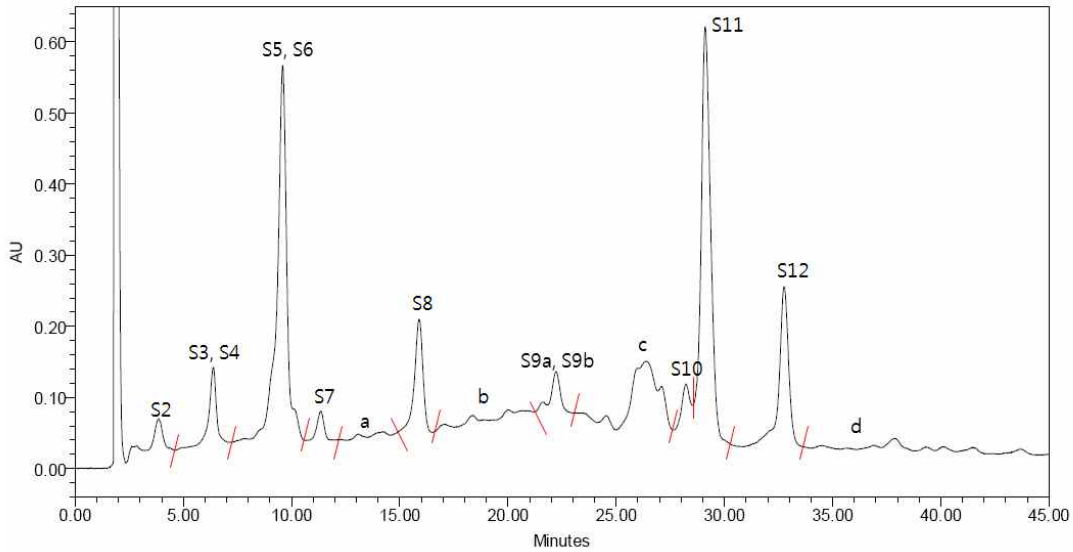


Fig 4-2. 분취한 HPLC chromatogram

#### 나. 분리된 안토시아닌의 구조 확인

Prep-HPLC에 의해 분취한 자색고구마 안토시아닌 색소 각각의 구조를 확인하기 위하여 단리된 각각의 화합물을 대상으로 HPLC-MS/MS 및 NMR 분석을 실시하여 화합물 구조를 확인하였다.

##### (1) HPLC/MS/MS를 이용한 안토시아닌 분자량 확인

###### ◎ LC/MS/MS 분석 조건

- Wavelength: UV detector 520 nm
- Column: Shimpack XR-ODS 3.0×50 mm
- Column Oven temp.: 30 °C
- Injection vol.: 4 µL
- Flow rate: 0.25 mL/min
- Mobile phase:

min	A H <sub>2</sub> O (0.1% formic acid)	B 50% MeCN (0.1% formic acid)
0	85	15
25	60	40
40	30	70
42	85	15
50	85	15

Prep-HPLC를 분석을 실시하여 메인 peak인 S<sub>3</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>9b</sub>, S<sub>11</sub>, S<sub>12</sub>에 대해 LC-MS/MS 분석 및 <sup>1</sup>H-NMR 분석을 행하여 그 구조를 확인하였다.

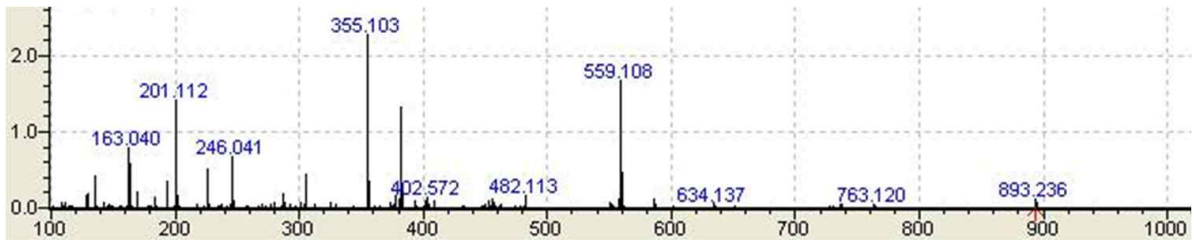


Fig 4-4. S<sub>3</sub> (m/z 893) peak에 대한 fragment ion을 나타낸 spectrum

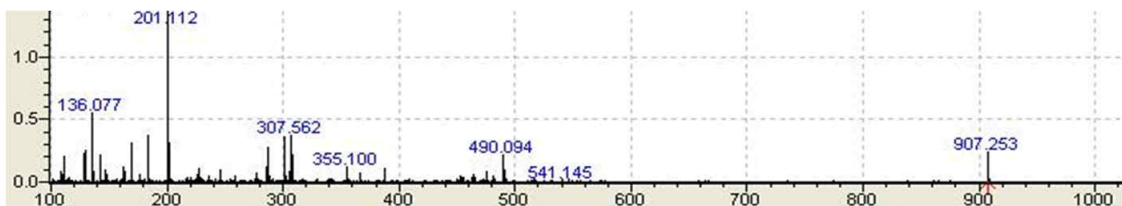


Fig 4-5. S<sub>5</sub> (m/z 907) peak에 대한 fragment ion을 나타낸 spectrum

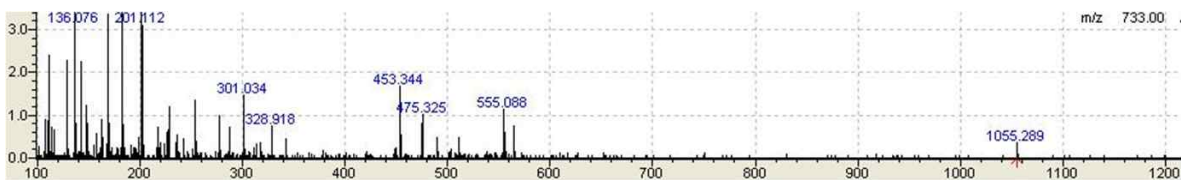


Fig 4-6. S<sub>9</sub> (m/z 1055) peak에 대한 fragment ion을 나타낸 spectrum

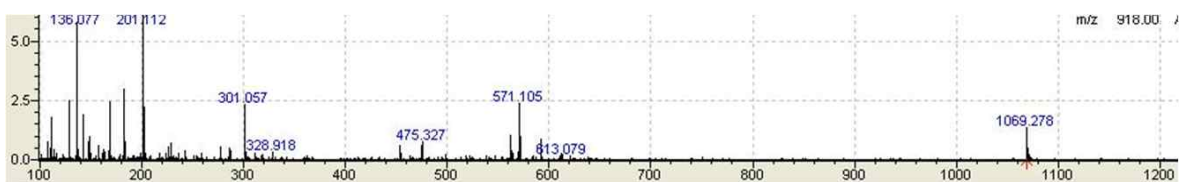


Fig 4-7. S<sub>11</sub> (m/z 1069) peak에 대한 fragment ion을 나타낸 spectrum

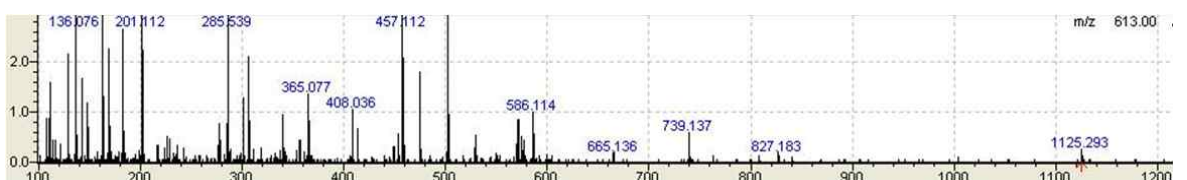


Fig 4-8. S<sub>12</sub> (m/z 1125) peak에 대한 fragment ion을 나타낸 spectrum



일본에서 널리 보급되어 재배되고 있는 대표적인 자색고구마 아야무라사끼 품종에 함유된 안토시아닌은 지금까지 총 8종인 것으로 알려져 있으며 그 구조는 아래와 같다.

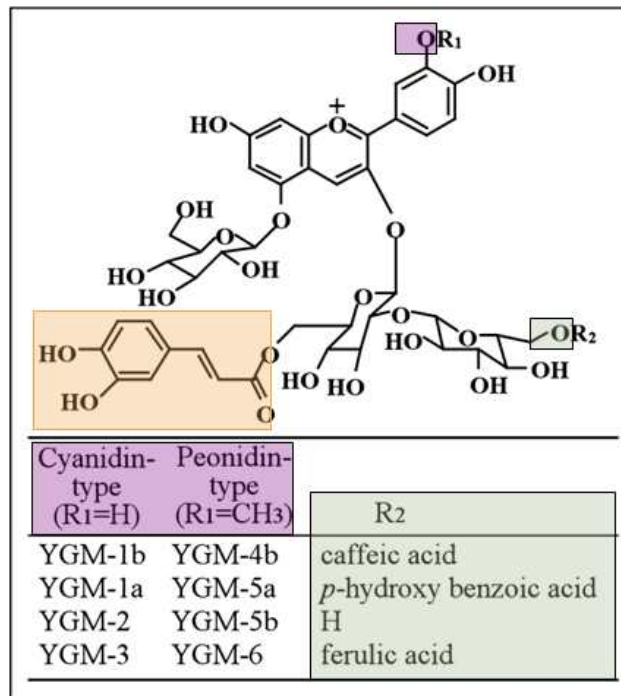
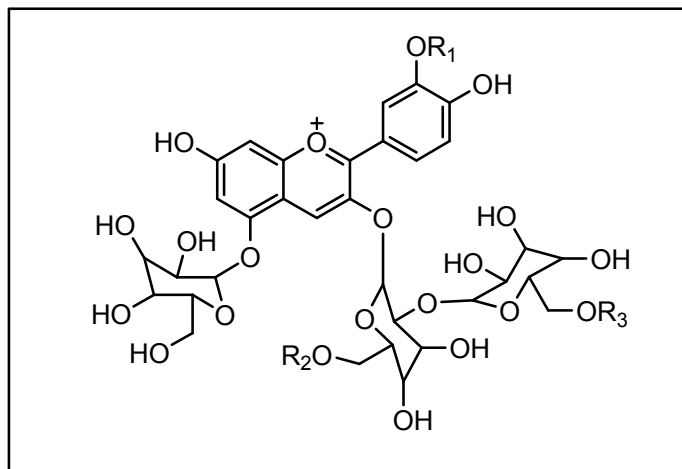


Fig 4-9. 아야무라사끼에 함유된 안토시아닌의 구조

(Ref.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(8), 1420-4, 1999 & *Phytochemistry*, **44**(1), 186-6, 1997)

신자미에 함유된 총 12종의 안토시아닌들 중에서 메인 peak인 S<sub>3</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>9b</sub>, S<sub>11</sub>, S<sub>12</sub> 안토시아닌에 대한 구조를 확인해 보기 위하여 LC-MS/MS 및 NMR 분석을 실시하였고, MS 및 NMR 분석에서 얻어진 결과를 일본 아야무라사끼의 구조를 동정하여 보고된 논문의 raw data와 그 결과를 서로 비교하여 최종 구조를 확인하고 동정하였다. 그 결과 신자미에서 분리된 안토시아닌 화합물은 아래 표에 나타난 것과 같이 일본에서 분리한 안토시아닌과 그 구조가 거의 유사함을 확인할 수 있었다.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Total M.W.
S <sub>3</sub>	H	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	H	893
S <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	H	907
S <sub>9b</sub>	H	Caffeic acid	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	1055
S <sub>11</sub>	CH <sub>3</sub>	Caffeic acid	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	1069
S <sub>12</sub>	CH <sub>3</sub>	Caffeic acid	Ferulic acid	1125

자색고구마에 함유된 총 12종의 안토시아닌 중에서 main peak라 할 수 있는 5종의 화합물에 대한 구조는 확인이 되었으나 아직 그 구조가 확인되지 않은 나머지 화합물에 대해서는 현재 그 구조를 확인하는 작업을 진행하고 있다.

## 5. 자색고구마 원재료의 저장기간에 따른 변화

원재료인 자색고구마는 재배 후 수확하는 시기가 10월에서 12월로 한정되어 있기 때문에 수확된 자색고구마를 일정한 장소에 장기간 보관하면서 관련 제품을 생산하고 있는 실정이다. 한번 수확 한 후 다음 수확시기까지 장기간 저장해야 하는 농산물의 특성 때문에 자색고구마를 일년간 저장고에 저장하였을 때 저장된 자색고구마의 안토시아닌 조성의 변화는 없는지를 확인해 보기 위하여 수확 한 자색고구마를 바로 slice하여 동결건조하여 1년간 보관한 후의 것과 수확 한 자색고구마를 온도와 습도가 조절된 저장 창고에서 1년간 보관한 자색고구마를 대상으로 안토시아닌 조성의 변화를 HPLC 분석을 실시하여 확인하였다.

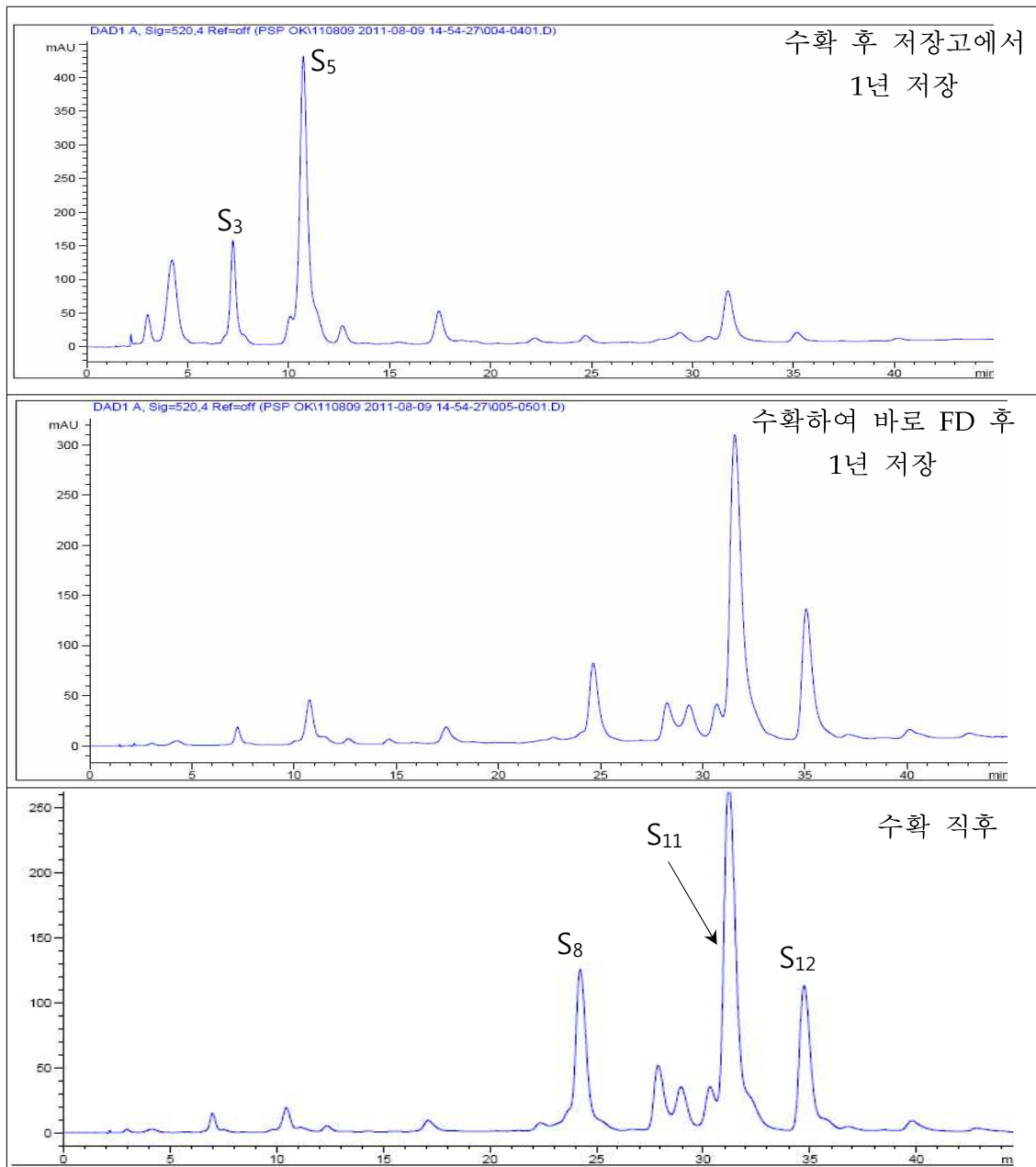


Fig. 5-1. 저장기간에 따른 안토시아닌 변화

위의 HPLC 결과 (Fig. 5-1)에서 보여지는 것과 같이 수확직후의 자색고구마를 바로 동결 건조하여 1년 동안 보관한 것은 수확직후의 자색고구마에 함유된 것과 동일한 안토시아닌의 조성을 보여주고 있다. 하지만 수확하여 1년 동안 온습도가 조절되는 저장고에 보관한 자색고구마의 경우에는 수확직후의 안토시아닌 조성과는 많은 차이가 나타남을 알 수 있다.

즉, 자색고구마를 수확하여 온습도가 조절되는 장소에 장기간 보관하게 될 경우에는 원래의 자색고구마에 함유된 안토시아닌의 조성이 아닌 안토시아닌의 구조자체가 변화된 형태로 존재하게 됨을 확인할 수 있는 것이다. 이는 아마도 자색고구마에 함유되어 있는 여러효소 또는 미생물들의 작용에 의하여 안토시아닌 본래의 구조가 degradation 되어서 나타나는 현상인 것으로 추측되어진다. 즉, 안토시아닌에 본래 함유되어 있는 S<sub>11</sub>, S<sub>12</sub>와 같이 안토시아닌의 기본골격 (cyanidin, peonidin)에 결합된 phenolic compound (caffeic acid)가 장기간 보관되는 과정에서 분해되어 S<sub>3</sub>, S<sub>5</sub> 등으로 전환되는 것으로 보인다(Table 5-1).

Table 5-1. 자색고구마에 함유된 안토시아닌의 화합물

	화합물명	분자량 (M.W.)
S <sub>3</sub>	Cyanidin-3- <i>p</i> -hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside	893
S <sub>5</sub>	Peonidin-3- <i>p</i> -hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside	907
S <sub>9b</sub>	Cyanidin-3-(2-(6- <i>p</i> -hydroxybenzoyl-gluco-pyranosyl)-6-caffeyl-gluco-pyranoside)-5-glucoside	1055
S <sub>11</sub>	Peonidin-3-(2-(6-caffeyl-gluco-pyranosyl)-6- <i>p</i> -hydroxybenzoyl-gluco-pyranoside)-5-glucoside	1069
S <sub>12</sub>	Peonidin-3-(2-(6-caffeyl-gluco-pyranosyl)-6-feruloylgluco-pyranoside)-5-glucoside	1125

## 6. 자색고구마 추출온도, 시간, 용매에 의한 안토시아닌 추출 수율 확인

### 가. 추출용매 및 온도조건에 따른 안토시아닌 조성 변화

신자미에 함유된 안토시아닌의 추출효율 비교를 위해 추출용매(EtOH, 물) 및 추출온도 (5°C, 95°C)와 pH에 의한 안토시아닌 조성의 변화를 Abs와 HPLC를 이용하여 확인하였다.

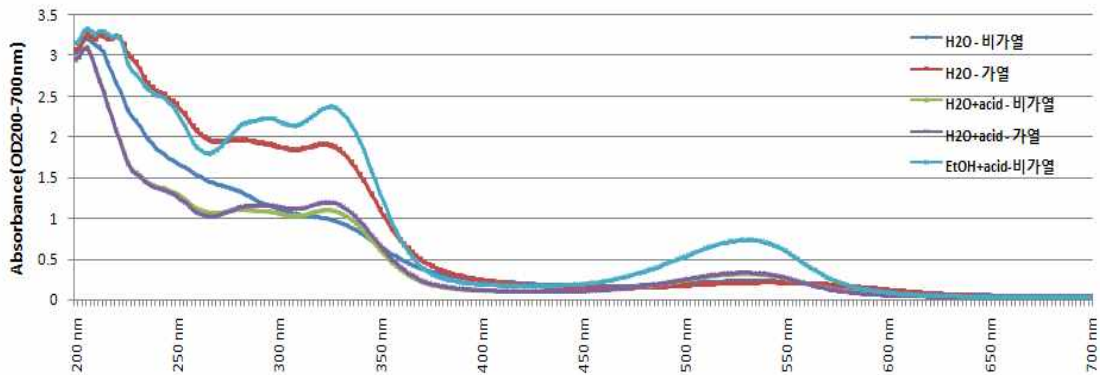
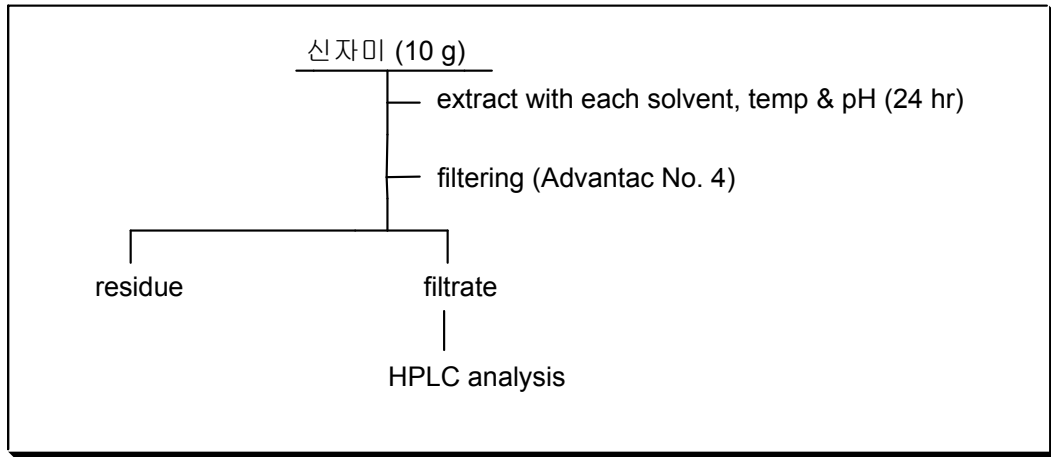


Fig. 3-1. 추출용매 및 가열에 따른 자색고구마 색소의 absorbance의 변화

#### ▶ HPLC 분석조건

- 기기: Waters 2695 pump
- Detector: 520 nm (Waters 2996 PDA detector)
- Column: Waters Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×150 mm)
- 이동상: Solvent A; H<sub>2</sub>O (0.1% TFA 함유)

Solvent B; 50% Acetonitrile (0.1% TFA 함유)

Time (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
45	60	40

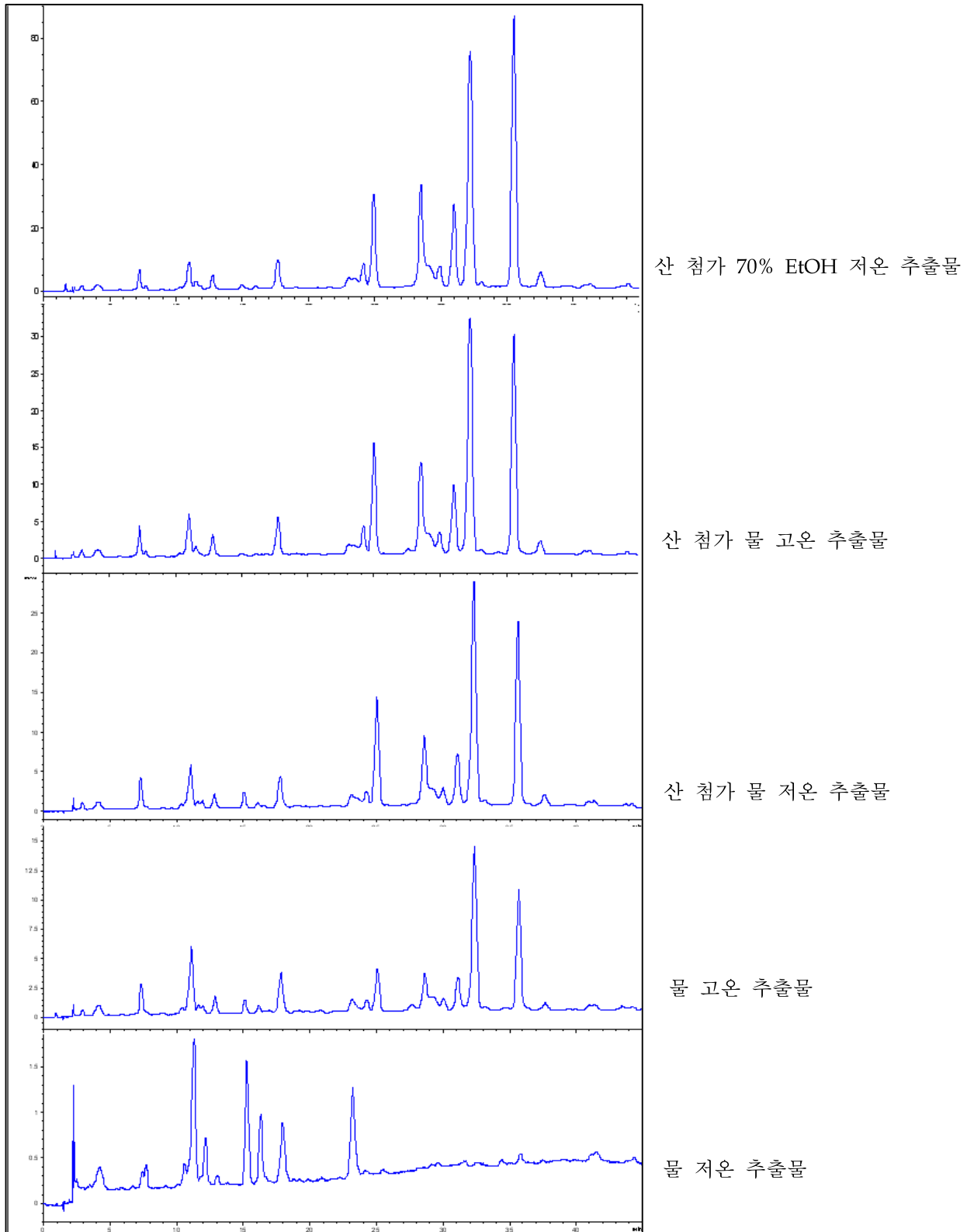


Fig 3-2. HPLC chromatogram of purple sweet potato (PSP) with various extract conditions.

상기의 실험 결과로부터 자색고구마 (신자미)를 물로 추출할 때 추출되는 안토시아닌 색소 (Fig. 3-1, 530 nm에서의 Abs 변화)는 물의 추출온도에 따라 많은 영향을 받는 것으로 확인되었다. 즉, 저온에서 추출하는 것보다는 95℃의 고온에서 추출할 때  $t_R$  27분 이후의 peak들이 수 종 추출되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 물로 추출할 때 산성의 조건에서 추출하는 것이 중성의 조건에서 추출하는 것보다 훨씬 높은 수율로 안토시아닌 색소를 추출할 수 있음을 각 chromatogram의 peak height로부터 예상 할 수 있었다.

또한 추출용매에 의한 차이에 있어서는 물로 추출하는 것보다 70%의 EtOH로 추출하는 것이 훨씬 높은 수율의 안토시아닌을 추출할 수 있음을 확인하였다.

이상의 결과로부터 자색고구마를 물로 추출할 때는 산을 첨가한 고온에서 추출하는 것이 많은 량의 안토시아닌 색소를 추출할 수 있으며 물보다는 70% EtOH에 산성 조건으로 추출하는 것이 안토시아닌의 추출수율을 향상시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

안토시아닌 색소의 추출에 관한 연구 논문은 대체적으로 산성의 조건에서 추출용매를 에탄올이나 메탄올로 하는 방법이 일반적이다. 과일이나 채소의 안토시아닌 색소의 산소, 햇빛, pH, ascorbic acid, 온도 등과 같은 여러 가지 요인에 의한 안정성 시험은 실제 식품의 가공중의 식품의 중요한 품질 인자라고 할 수 있는 색상의 변화에 대한 메카니즘을 찾기 위함이었으나, 이와 관련된 많은 논문에서도 안토시아닌의 색의 안정성에 관한 정보를 얻을 수 있었다. Ponting 등은 (Ponting, J.D., Sanshuck, D.W. and Brekke, J.E: Color measurement and deterioration in grape and berry juices and concentrates. Food Res., 25, 471 (1960)) 안토시아닌 함유식품의 가열 중 갈색이 증가하는 반응자체는 안토시아닌 색소의 파괴와는 독립적으로 일어나지만 이 반응이 안토시아닌 색소 파괴의 전후에 일어나므로 갈색의 증가가 안토시아닌 색소의 파괴와 관련이 있다고 보고하였다. Flora 등은 (Flora, L.F.: Tim-temperature influence on muscadin grape juice quality. J. Food Sci. 41, 1312 (1976)) 안토시아닌이 함유된 과일주스를 가열할 때 가열에 의한 첫 번째 효과는 안토시아닌 색소가 파괴되면서 붉은 색이 퇴색되어 500-535nm 부근에서 흡광도가 감소되고 더욱 가열하면 점차적인 갈색이 생성되어 400-460nm 부근에서 흡광도가 상승되어 두 영역에서 측정된 흡광도의 비  $A_{500-535}/A_{400-460}$  nm가 가열에 의한 색변화의 지표로 사용할 수 있음을 시사한 바 있다. 이 등은 (이란숙, 임종환: 자색고구마 Anthocyanin 색소의 가열에 대한 속도론적 연구, Korean J. Food Sci. Technol. 29(3): 497-501 (1997))연구에서 121℃로 가열한 상태에서 다양한 pH로 조절된 자색고구마 색소액의 browning index의 변화를 관찰한 결과, 변화속도는 pH가 높을수록 빨랐으며 pH가 낮을수록 변화속도가 낮았는데 이는 자색고구마 색소의 pH가 낮을수록 가열에 대한 안정성이 증가함을 의미하며 131℃와 141℃에서도 유사한 결과를 얻었다고 보고한 바 있다. 이러한 현상은 pH가 높아짐에 따라 안토시아닌의 구조가 유색의 flavylum ion 으로부터 무색의 pseudobase로 전이하기 때문인 것으로 생각되며 이상의 결과는 다양한 pH와 가공 온도에서의 안토시아닌의 구조와 결부되어 많은 보고가 있었다.

그러나 본 실험의 결과로는 pH가 조절되지 않은 상태에서의 온도의 영향만을 살펴보면 피크의 전체적인 프로파일은 저온 물 추출만을 제외하고 추출용매에 따른 변화가 없는 것으로 보인다. 특히 산을 첨가한 경우에는 높은 수준의 흡광도를 보이고 있는 것은 기존의 연구와 비슷한 결론을 보이고 있는 것으로, 산의 첨가는 안토시아닌의 분자적인 구조를 안정화 시키는 역할을 분명히 하고 있음을 알 수 있었다. 단지 저온 추출한 경우의 프로파일은 다른 경우의 추출방법에 비해 매우 다른 분자적 프로파일을 보이고 있다는 것은 흥미로운 사실이나, 본 실험의 추출 방법의 확립과는 다른 방향이므로, 단지 프로파일의 변화만을 제시하기로 하였다.

#### 나. 추출 온도, 시료의 분쇄정도 및 용매에 의한 영향 검토

자색고구마 추출 시 전처리 온도 및 자색고구마의 분쇄 정도, 그리고 전처리 후 추출온도의 차이에 의한 추출 효율을 확인하고자 자색고구마를 slice 하여 30℃, 60℃에서 1시간 동안 가열 추출한 것(C1, C2)과 그리고 자색고구마를 slice 한 후 100℃ 30분간 가열 한 후, 물 첨가하여 30℃, 60℃, 100℃에서 1시간 동안 추출한 것(C8, C9, C10)과, 자색고구마를 분쇄 후 상온에서 1시간 동안 물(C11)과 에탄올(C12)로 추출한 것들 간의 안토시아닌 색소의 추출 효율을 비교하였다.

	C1	C2	C8	C9	C10	C11	C12
전처리 조건			100도 가열	100도 가열	100도 가열	분쇄	분쇄
추출 온도	30℃	60℃	30℃	60℃	100℃	25℃	25℃
추출 용매	물	물	물	물	물	물	70% EtOH

##### (1) 추출 조건별 UV spectrum 변화

각 추출액을 300 ~ 600 nm에서 UV spectrum을 비교하여 안토시아닌의 최대 흡수 파장인 520 nm의 흡광도 값을 비교하여 추출 효율을 확인하였다.



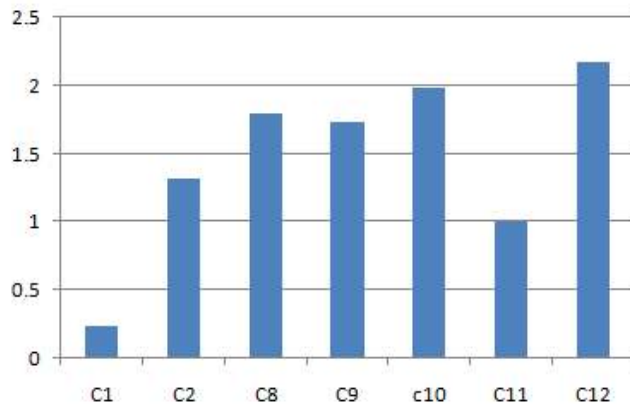
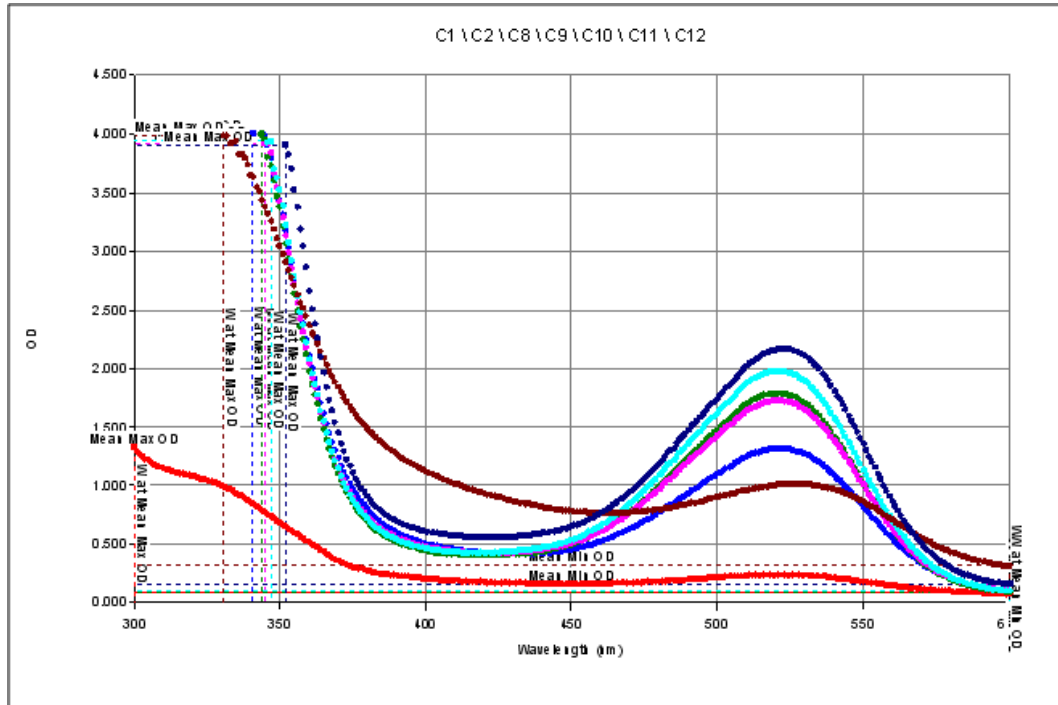
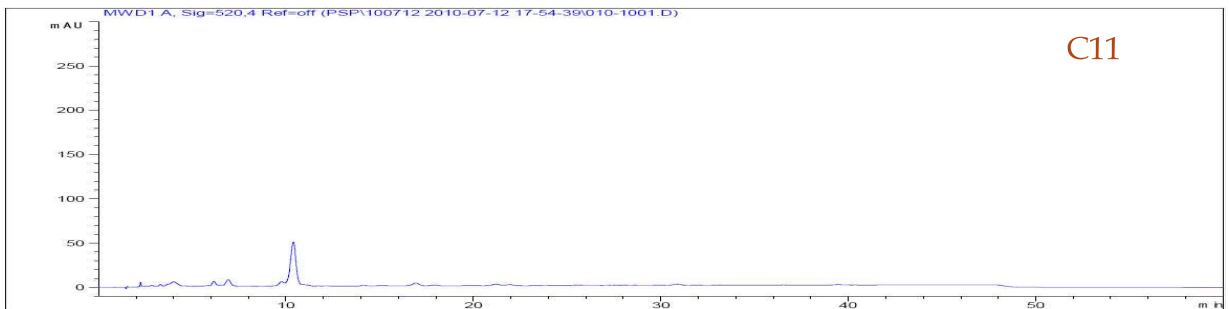
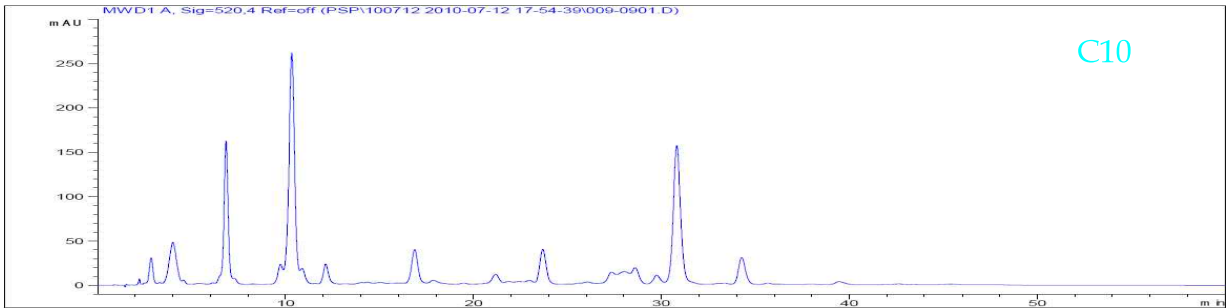
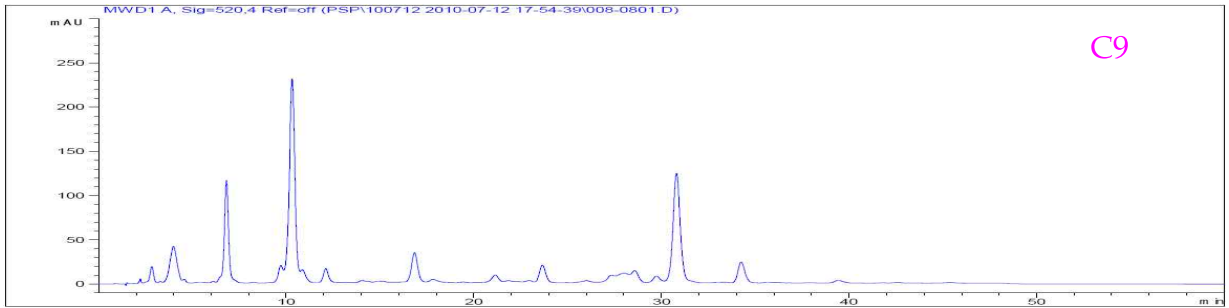
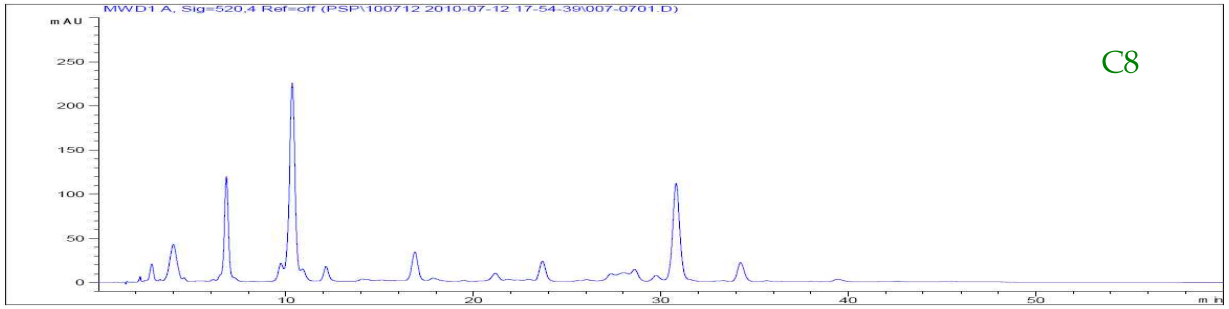
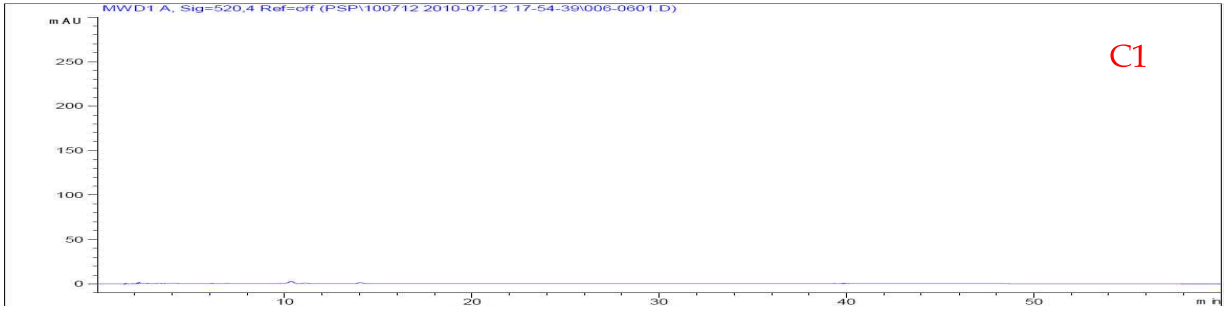


Fig. 6-1. 각 추출물의 Abs (520 nm)

그 결과, slice 하여 30℃에서 물로 추출한 C1은 520 nm에서 뿐만 아니라 대체적으로 낮은 흡광도 값을 보여 추출이 거의 이루어지지 않음이 확인되었다. 하지만 100℃에서 가열 처리 한 후 30℃, 60℃에서 물로 추출한 C8, C9는 높은 흡광도 값을 보이며 높은 추출 효율이 확인되었다. 또한 100℃ 가열 처리 후 100℃에서 물로 추출한 C10도 높은 추출 효율을 보였다. 가장 추출효율이 높은 조건은 분쇄 후 상온에서의 에탄올 추출물이다. 반면 같은 분쇄 후 상온에서의 물 추출물은 다소 낮은 추출 효율을 보였다. 이러한 온도 조건에 따른 추출 효율은 자색고구마를 100℃ 처리 후 60℃이상의 온도에서 추출하거나, 분쇄하여 에탄올로 추출하는 것이 효율적이라 판단되어진다.



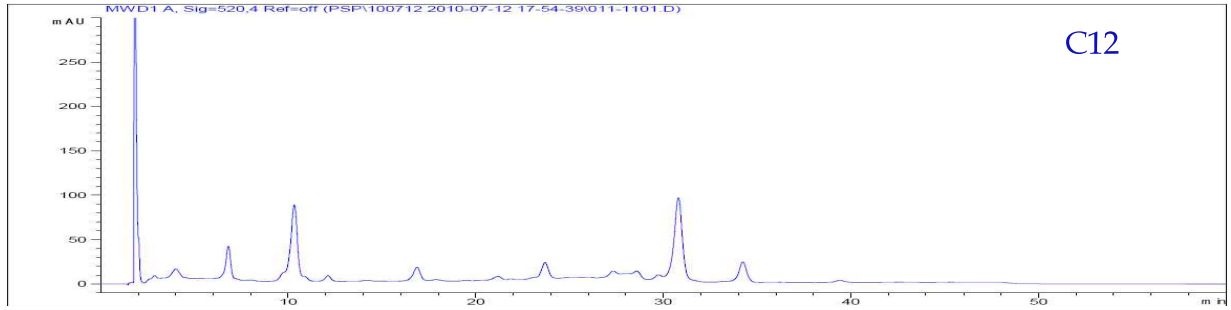


Fig. 6-2. 추출 조건별 HPLC 분석 결과

Fig. 6-2는 각각의 추출물을 동량으로 HPLC injection하여 520 nm에서 확인한 것으로 30°C에서 물로 추출한 **C1**은 UV spectrum에서 보여준 것과 마찬가지로 HPLC 상에서 안토시아닌 peak가 거의 확인되지 않은 것으로 나타나 자색고구마를 slice 한 후에 30°C의 물로 추출하는 것은 추출효율이 아주 좋지 않음을 다시 한번 확인 할 수 있었다.

한편, 100°C로 가열 처리 한 후 30°C, 60°C, 100°C에서 물로 추출한 추출물(**C8**, **C9**, **C10**)의 경우에는 100°C 전처리 이후에 물 추출의 온도에 의한 안토시아닌 색소의 영향은 크게 나타나지 않는 것으로 확인되어 자색고구마에 함유된 안토시아닌의 추출효율을 높이기 위해서는 자색고구마를 100°C의 고온에서 먼저 전처리를 한 뒤에 일정 온도의 물로 추출하는 것이 바람직 할 것으로 판단되어진다.

#### 다. 추출 온도 및 추출용매 첨가시기에 의한 영향 검토

앞의 실험결과에서 보면 자색고구마를 100°C의 고온에서 전처리를 하는 경우가 가열 전처리를 하지 않을 때 보다 더 안토시아닌의 추출효율이 높은 것을 확인 하였다. 이 결과에서 볼 때 자색고구마를 가열 전처리를 할 때 물을 첨가한 상태에서 가열 처리하는 것과 물을 첨가하지 않고 가열 처리 한 후에 물을 넣은 것과의 안토시아닌 추출 효율을 비교해 보고 또, 90°C에서 가열 하는 것과 100°C에서 가열 하는 것과의 차이도 비교해 보기로 하였다.

이에 본 실험에서는 자색고구마에 일정량의 물을 첨가한 후에 이를 100°C에서 가열한 후 60°C에서 3시간 추출한 시료(**G5**)와 자색고구마를 100°C에서 가열 한 후에 물을 넣고 60°C에서 3시간 추출한 시료(**G6**), 위의 G5와 같은데 가열 온도를 90°C로 하여 추출한 시료(**G7**), G6와 같은 조건에서 가열온도를 90°C로 하여 추출한 시료(**G8**)로 총 4개의 시료에 대한 안토시아닌 추출 효율을 실험해 보았다.

	G5	G6	G7	G8
전처리 온도	100℃	100℃	90℃	90℃
물 첨가 시기	가열 전 물 첨가	가열 후 물 첨가	가열 전 물 첨가	가열 후 물 첨가

(1) 추출 조건별 UV spectrum 변화

각 추출액을 300 ~ 600 nm에서 UV spectrum을 비교하여 안토시아닌의 최대 흡수 파장인 520 nm의 흡광도 값을 비교하여 추출 효율을 확인하였다.

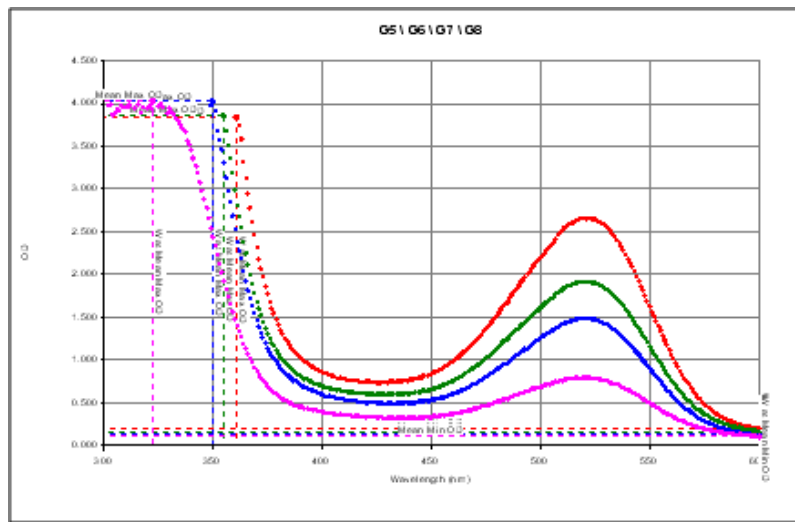


Fig. 6-3. 추출 조건별 UV spectrum 변화

그 결과, 자색고구마에 물을 첨가한 후에 100℃에서 가열한 시료가 520 nm에서 가장 높은 흡광도 값을 보임을 확인하였다. 하지만 100℃에서 가열한 후에 물을 첨가한 경우에는 흡광도 값이 감소하는 것을 보여 자색고구마를 추출하고자 할 때는 자색고구마에 물을 먼저 첨가한 후 가열 처리 하는 것이 안토시아닌의 추출 효율을 높일 수 있는 방법이라 생각되어진다. 한편 100℃가 아닌 90℃로 가열 추출하는 경우에도 100℃와 마찬가지로 가열 전에 물을 첨가하는 것이 더 높은 흡광도 값을 보이지만, 100℃와 달리 낮은 흡광도 값을 보이는 것을 보아 안토시아닌을 추출하고자 할 때는 100℃의 고온에서 전처리 하는 것이 효과적인 것으로 보인다.

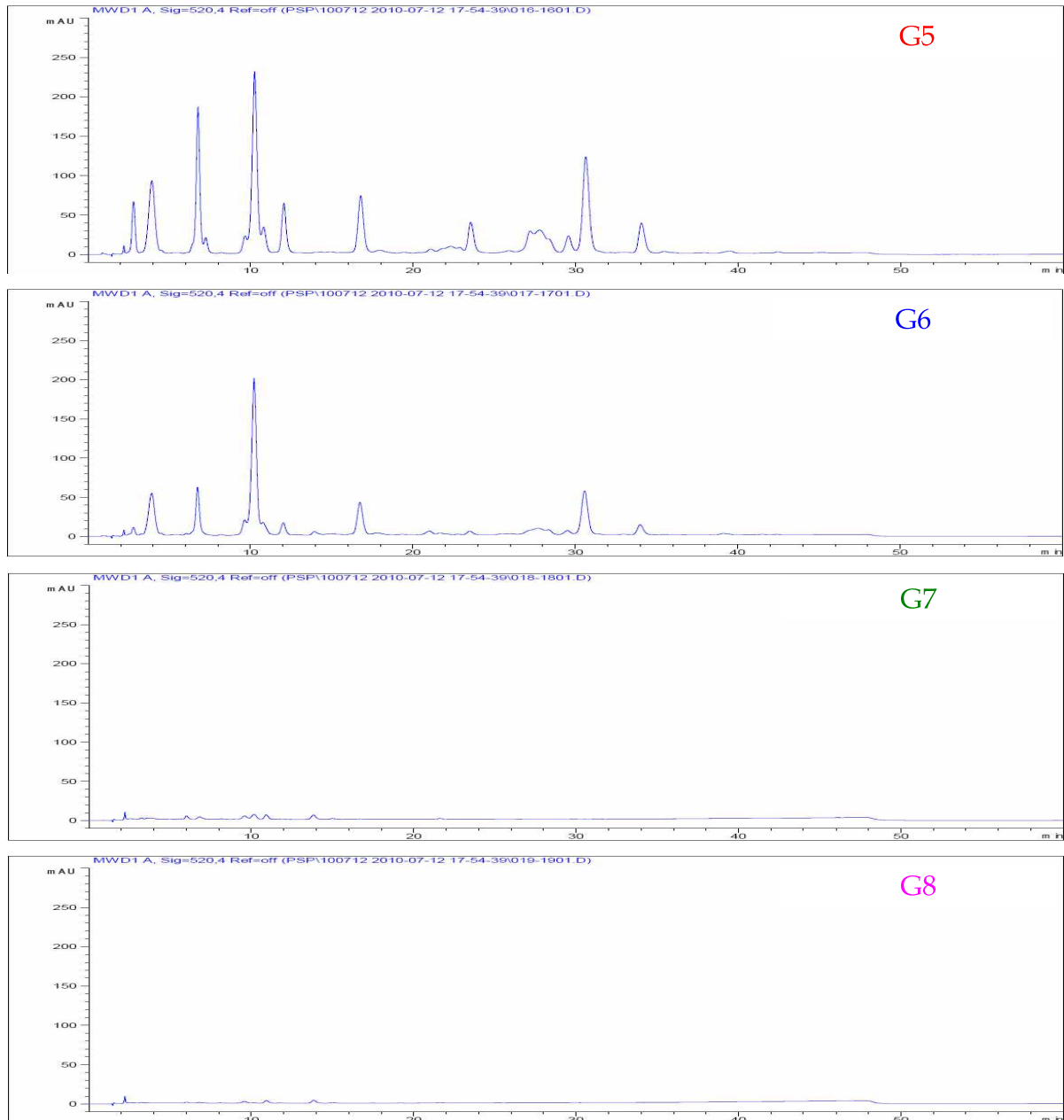


Fig. 6-4. 추출 조건별 HPLC 분석 결과

Fig. 6-4는 각각의 추출물을 동량으로 HPLC injection하여 520 nm에서 확인한 것으로 이는 UV spectrum에서와 마찬가지로 자색고구마에 물을 첨가 한 후에 100℃에서 가열 추출하는 것이 가장 효율적으로 안토시아닌을 추출할 수 있는 방법인 것으로 다시 확인되었다.

이에 본 실험에서는 자색고구마에 함유된 안토시아닌의 효율적인 추출을 위해서 자색고구마에 물을 첨가 한 후 100℃에서 가열 전처리를 실시한 후에 이를 일정한 온도에서 일정 시간 추출하는 방법을 사용하기로 하였다.

#### 라. 추출용매의 영향

추출용매에 의한 안토시아닌의 추출효율을 확인해 보기 위하여 자색고구마를 slice 한 후

에 상온에서 에탄올 0%, 25%, 50%, 70%, 100%로 추출한 것과 자색고구마를 분쇄 후 에탄올 70%로 추출하였다.

	C2	C3	C4	C5	C6	C12
절단 정도	Slice	Slice	Slice	Slice	Slice	분쇄
추출 용매	물	25% EtOH	50% EtOH	70% EtOH	100% EtOH	70% EtOH

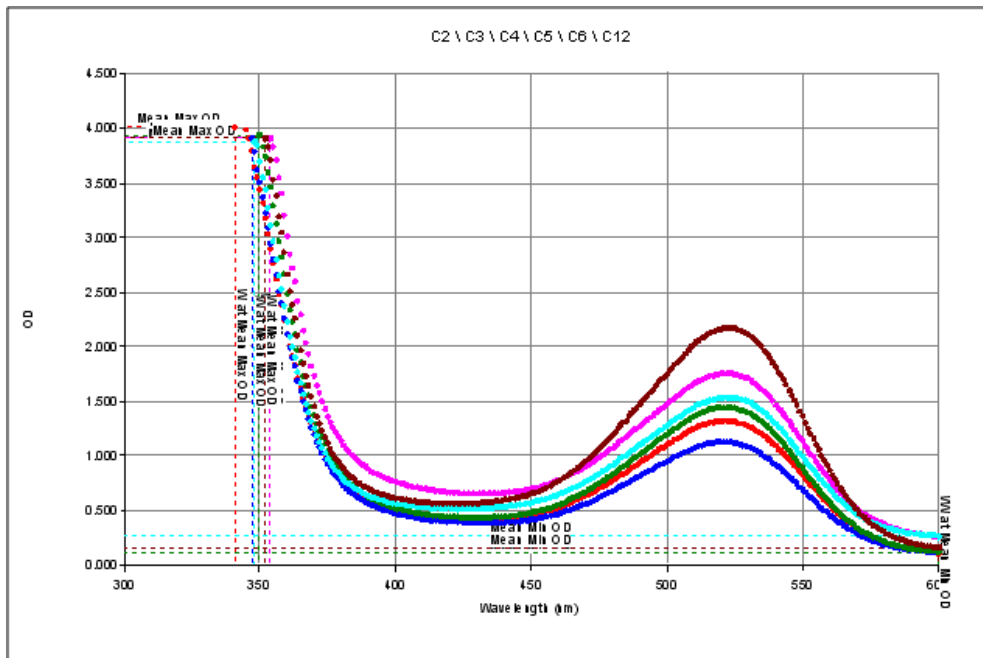


Fig. 6-5. 에탄올 농도별 추출 조건에 따른 spectrum 변화

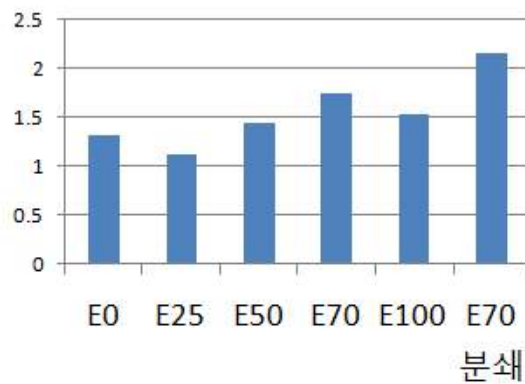


Fig. 6-6. 520 nm에서 각 추출물의 Abs 값

그 결과, 분쇄 후 에탄올 70% 추출(C12)이 520 nm에서 높은 흡광도 값을 보이며 추출 효율이 높음이 확인되었다. 같은 70% 에탄올로 추출한 C6는 C12보다 낮은 흡광도 값을 보였다. 이는 자색고구마 분쇄의 차이에 의한 것으로 시료의 표면적이 커짐으로써 추출효율이 높아지는 것을 의미하는 것으로 판단된다. 에탄올 농도에 있어서는 100% EtOH 추출물 또는 물로 추출한 것 보다 70% 에탄올 추출물이 높은 추출 효율을 보였다.

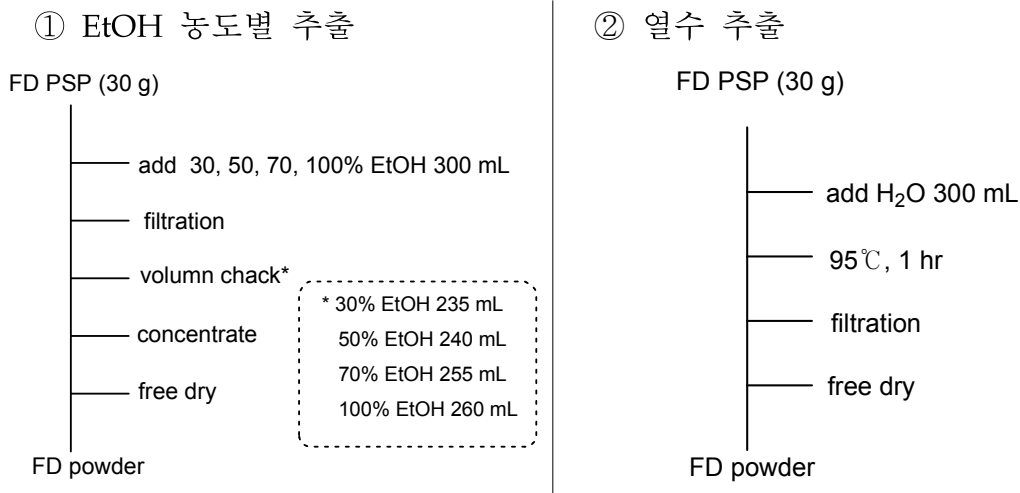
## 7. 자색고구마에 함유된 안토시아닌 정량분석

앞부분에 기술하였듯이 자색고구마는 가을에 수확하여 온습도가 조절되는 장소에 보관하면서 원재료로 사용하게 되는데, 자색고구마에는 다양한 종류의 안토시아닌 화합물이 함유되어 있음을 확인 하였으며, 이와 더불어 자색고구마를 장기간 보관하는 동안 원래 자색고구마에 함유된 안토시아닌 색소 화합물이 분해되어서 다른 안토시아닌 화합물로 분해 되는 것을 확인하였다. 이에 자색고구마에 함유된 안토시아닌 각각의 화합물을 분리하여 이를 정량분석 하는 것 보다는 자색고구마에 함유된 총 안토시아닌의 함량을 분석하는 것이 추후 자색고구마 관련 제품의 품질을 관리하는데 더 적합한 것으로 판단되었다.

자색고구마에 함유된 안토시아닌 색소는 현재 시판되어지는 안토시아닌 표준품인 cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside 등과 그 구조가 상이하여 이들을 표준품으로 사용하여 안토시아닌 함량을 정량분석 할 경우, 원래 자색고구마에 함유된 안토시아닌 함량과 분석값의 차이가 많이 나게 된다. 이에 본 연구자들은 자색고구마에 함유된 총 안토시아닌 색소를 분리, 정제하여 그 순도를 확인한 후, 순도 높게 정제된 총 안토시아닌 화합물을 표준품으로 사용하고자 하여 안토시아닌 함량을 정량분석 하고자 하였다.

### 가. 자색고구마로부터 안토시아닌 추출용매 조건 확립

자색고구마에 함유된 안토시아닌 색소를 추출할 수 있는 최적의 추출용매 조건을 확립하고자, 수확 후 바로 slice한 후 동결건조 시킨 자색고구마를 원재료로 하여 열수, 상온 물 추출 후 70% EtOH 추출 및 Ethanol 농도별로 추출(Fig. 7-1)하여 안토시아닌의 추출효율(수율)을 비교한 후 최적의 추출용매를 선정하였다. 즉, 동결건조된 자색고구마 일정량(30 g)을 취하여 각각의 용매 약 300 mL씩을 첨가한 후 적정시간 동안 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물을 여과한 후 얻어진 각각의 여액을 동결건조하여 분말을 만들어서 얻어진 분말의 수율 및 HPLC에서의 순도 등을 확인하였다.





③ 상온 물추출

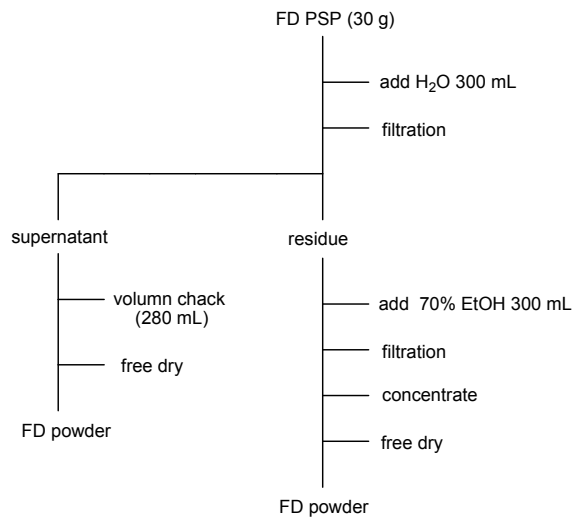


Fig. 7-1. 안토시아닌의 추출효율 확인을 위한 추출방법

이렇게 추출하여 얻어진 각 추출물의 수율은 아래 표(7-1)에 정리하였다. 추출물 분말의 수율을 비교해 보면, 열수로 추출한 것이 약 43% 정도로 가장 높은 수율을 나타냈으며, 100% EtOH 추출물과 상온에서 물로 추출한 후 이를 다시 70% EtOH로 추출한 것의 수율이 5%로 가장 낮았다.

Table 7-1. 각 추출물의 수율

구분	수율 (%)
상온 물 추출	18.3
상온 물 추출 후 70% EtOH 추출	5.0
열수 추출	43.3
30% EtOH	16.7
50% EtOH	15.0
70% EtOH	15.0
100% EtOH	5.0

이렇게 얻어진 각각의 추출물 분말을 대상으로 안토시아닌 추출효율을 확인해 보기 위해 이들 추출물 분말 각각의 UV spectrophotometer 및 HPLC 분석을 실시하여 안토시아닌을 비교해 보았으며 각 추출물 분말에 함유된 안토시아닌을 정량분석하여 비교해 보았다.

(1) UV-VIS spectrum 및 HPLC 분석을 통한 안토시아닌의 추출효율 확인

각 추출물 분말의 안토시아닌 추출 효율을 확인하기 위하여 각 추출물 분말은 모두 동결 건조한 자색고구마 1 g eq.의 량이 되도록 하여 분석하였다.

UV-VIS 장비를 이용하여 가시광선 영역에서 안토시아닌 색소가 최대 흡광도 값을 나타내는 520 nm에서의 흡광도값을 측정하여 비교하여 그 결과를 아래 표에 나타내었다. 모든 추출물 시료 각각을 동일한 량으로 분석한 결과 70% EtOH 추출물 분말이 가장 높은 흡광도 값을 나타내었으며 그다음이 열수 추출물 분말이며, 수율이 낮았던 100% EtOH 추출물은 안토시아닌 흡광도 값도 역시 낮았다. 이에 안토시아닌을 가장 효율적으로 추출해 내기 위해서는 70% EtOH을 사용하여 추출하는 것이 효과적일 것으로 판단된다. 이는 앞부분에 서술한 것과 동일한 결과이다.

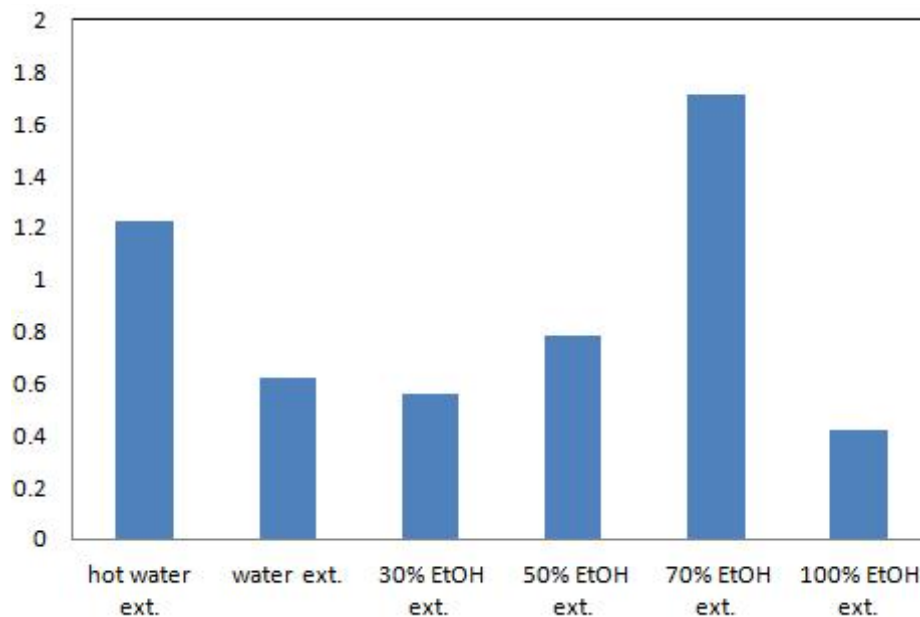
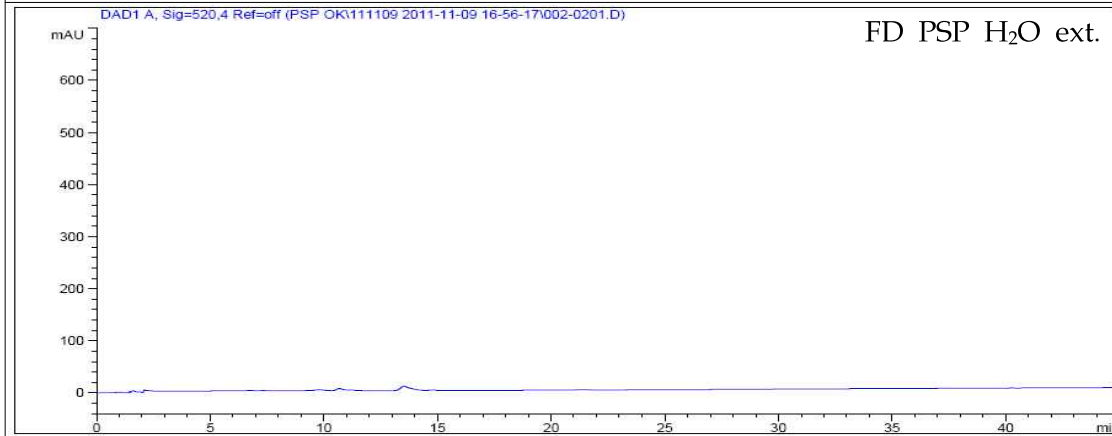
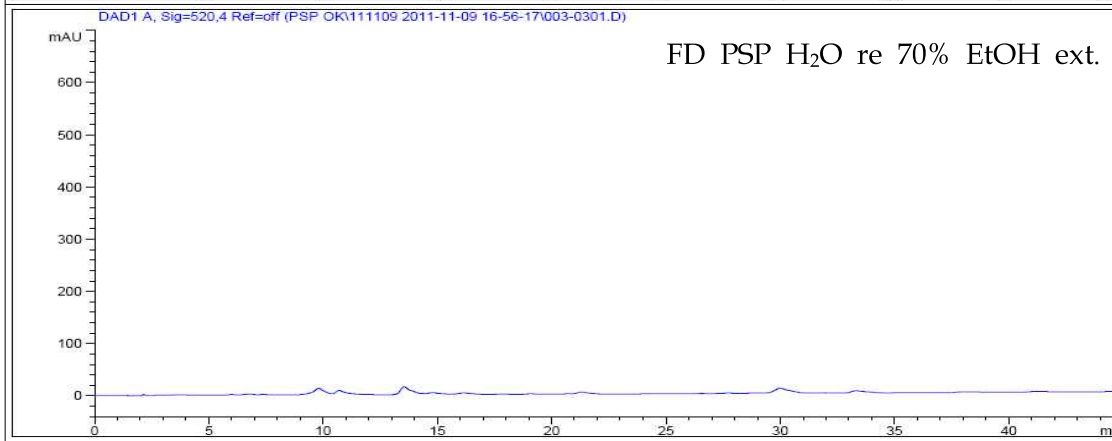
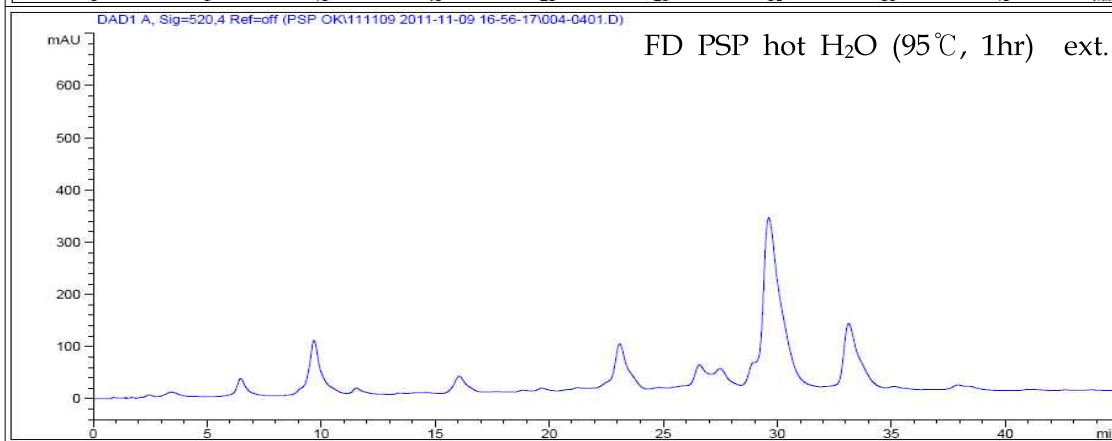
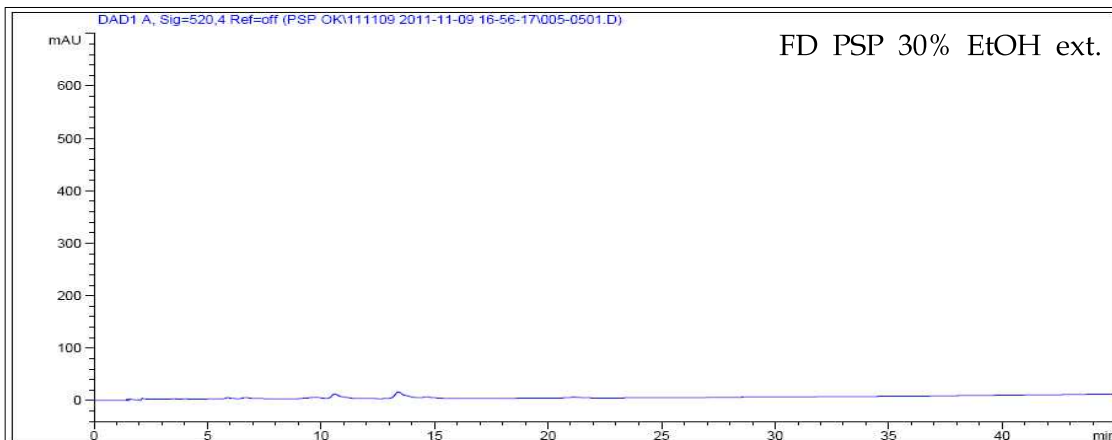


Fig. 7-2. 각 추출물의 520 nm에서의 흡광도 값

UV-VIS spectrophotometer 520 nm에서 각 시료의 흡광도 값을 비교한 결과 70% EtOH 추출물의 안토시아닌 색소 함량이 가장 높은 것으로 나타나, 이를 좀 더 확인해 보기 위해 각 추출물 분말을 동일한 양(동결건조한 자색고구마 1 g eq.)이 되도록 한 후 이들 각각을 HPLC를 이용하여 520 nm에서의 peak pattern, peak height와 area를 비교해 보았다(Fig. 7-3).



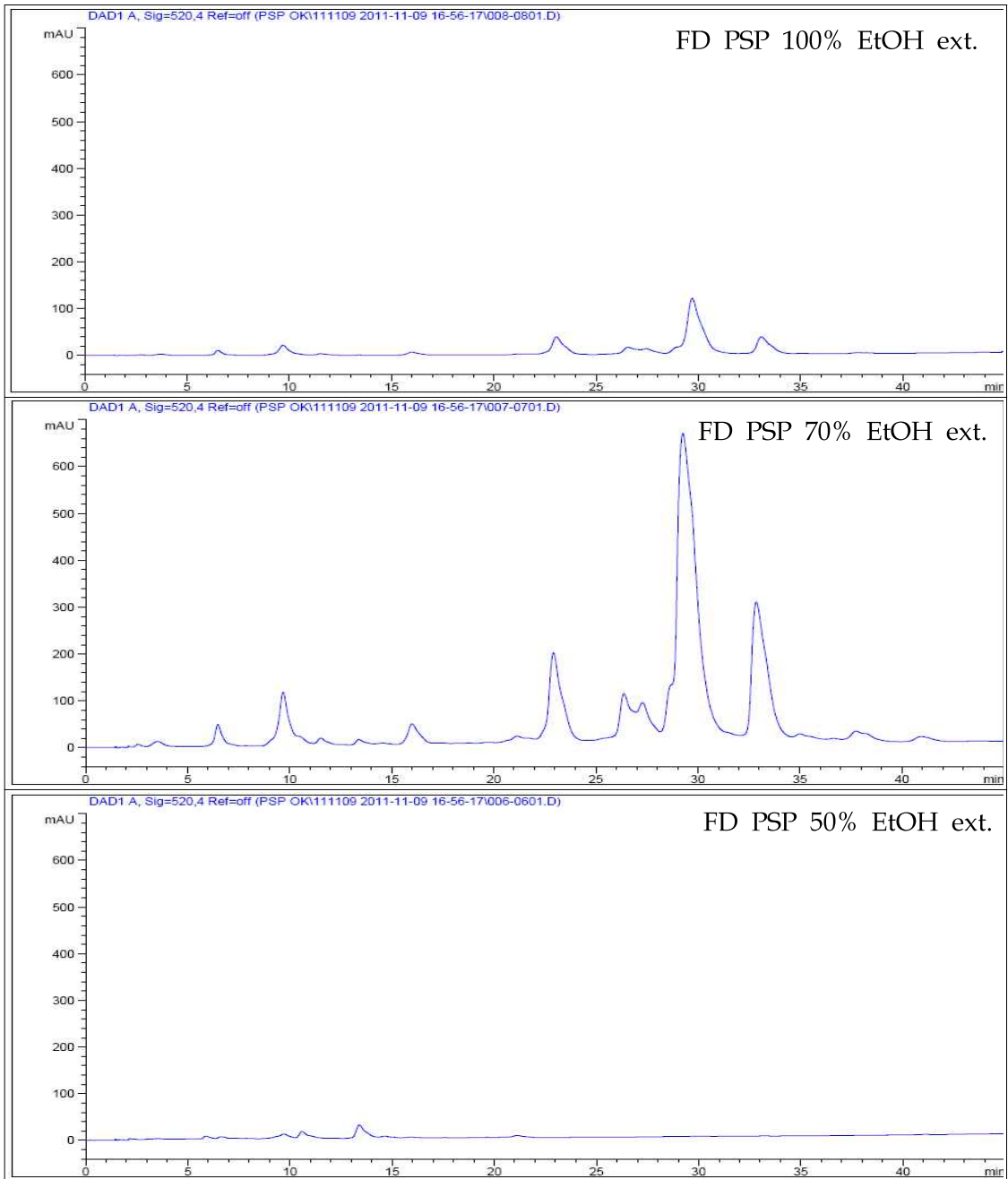


Fig. 7-3. 각 추출물의 HPLC Chromatogram (FD PSP 1 g eq.)

자색고구마 추출물 각각을 HPLC 분석한 결과 역시 UV-VIS에서의 흡광도 값을 비교한 결과와 마찬가지로 70% EtOH로 추출한 추출물 분말이 가장 peak height와 area가 높은 것으로 나타나 자색고구마에서 안토시아닌 표준품을 정제하기 위해서는 70% EtOH로 추출하는 것이 색소의 추출 수율을 최적화 할 수 있는 방법일 것으로 생각되었다.

(2) 자색고구마 추출물 분말에 함유된 총 안토시아닌 함량분석

상기의 방법에 의한 얻어진 각각의 자색고구마 추출물 분말에 함유된 총 안토시아닌 함량을 정량분석 하기 위하여 정제된 안토시아닌 표준품 색소를 사용하여 각 추출물분말의 안토시아닌 함량을 분석하였다. 분석에 사용된 시험법은 대한약전외의약품 등 기준개정(식품의약품안전청고시 제2007-25호) 제 2부 생약제제 “바키늄미르틸루스엑스”의 시험법 일부를 수정하여 진행하였다.

Table 7-2. 각 추출물의 안토시아닌 함량

구분	총안토시아닌 (%)
상온 water ext.	1.55
상온 물추출 후 70% EtOH 추출	2.35
95°C, 90 min, water ext.	1.73
30% EtOH	1.61
50% EtOH	1.99
70% EtOH	4.58
100% EtOH	4.02

각 추출물의 안토시아닌 정량한 결과, 자색고구마 70% EtOH 추출물분말에서 4.58%로 안토시아닌의 함량이 가장 높았으며, 상온 물 추출한 분말에는 1.55%로 안토시아닌이 가장 적게 함유되어 있었다. 따라서 자색고구마에서 안토시아닌 표준품을 정제하기 위해서는 70% EtOH로 추출하는 것이 색소의 추출효율 및 수율을 최적화 할 수 있는 방법일 것으로 생각되어 자색고구마로부터 안토시아닌 표준품 색소를 분리 정제하기 위해 70% EtOH을 사용하였다.

### (3) 자색고구마 각 추출물에 함유된 안토시아닌 함량의 비교

자색고구마 원물, 비발효추출물, 발효추출물에 대하여 정성적인 변화확인 및 흡광도를 통해 간접적인 안토시아닌의 변화를 확인하였다. 바키늄미르틸루스엑스의 안토시아닌 정량법을 통해 자색고구마 원물, 비발효추출물, 발효추출물 분석함으로써 자색고구마 중의 안토시아닌 함량의 변화를 정량적으로 확인하고자 한다.

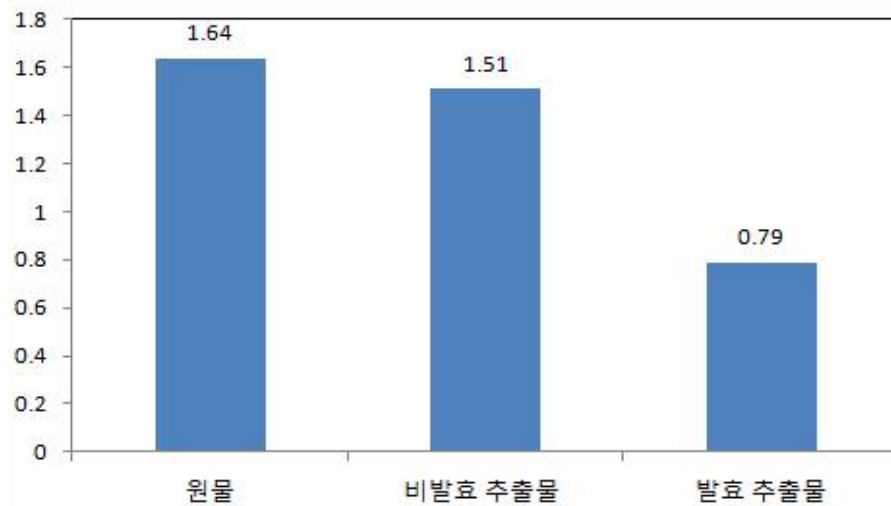


Fig. 7-13. 자색고구마 원물, 비발효추출물, 발효추출물의 안토시아닌 함량

자색고구마 원물에는 1.64%, 비발효 추출물은 1.51%의 안토시아닌이 함유되어 있으며, 발효추출물에는 그 보다 낮은 0.79%의 안토시아닌이 함유되어 있다. 발효추출물에서 미생물에 의한 안토시아닌의 분해로 인해 안토시아닌의 함량이 줄어든 것이라고 생각된다.

## 제 2절. 발효공정 최적화

본과제의 참여기업인 한아름영농조합법인은 자색고구마를 생산하는 생산자단체로 이루어진 영농조합법인으로 현재 전남 무안군 운남면 지역에서 자색고구마의 『신자미』라는 품종을 재배하여 이를 가공하여 음료로 판매하고 있는 영농조합법인단체이다.

수확한 자색고구마에 일정량의 물을 첨가한 후 자연에서 얻어진 발효 스타터인 혼합 균주를 첨가하여 약 3일정도 발효시켜 얻어진 발효추출물을 현재 자미원이라는 음료제품으로 품목신고하여 인터넷 등의 유통망을 이용하여 판매하고 있다.

즉, 신자미를 재배하여 이를 수확한 후 일정기간의 발효공정을 거친 후 최종적으로는 음료제품을 생산하여 판매하고 있는 상황이지만, 발효에 사용되는 스타터가 일정한 품질을 가지고 관리되어지는 균주가 아니라 자연발효된 상태의 것을 장기간 냉동보관하면서 발효의 스타터로 사용하고 있는 실정이기에 발효에 의한 품질관리가 일정하게 이루어지지 않아 일정한 품질을 갖춘 제품을 재현성 있게 생산해 내기가 어려운 문제점을 가지고 있었다. 이에 본 과제에서는 기업이 가지고 있는 발효공정상의 문제점을 해결하고 또, 자색고구마에 함유된 안토시아닌 색소가 발효공정을 거치면서 발효에 의한 화합물의 변화에 의해 신규 안토시아닌 색소의 형성 및 기능성이 향상되어지는 효과를 가지는지 등에 대한 연구를 실시하기로 하였다.

먼저 발효공정 최적화를 실시하기 위하여 신자미를 물로 추출한 물추출물과 이 물추출물에 한아름영농조합에서 제품의 생산 시 사용하는 종균(발효 스타터)을 접종하여 30℃에서 3일간 발효시킨 발효추출물, 그리고 발효에 이용되는 한아름영농조합의 혼합균주를 이용하여 발효공정의 표준화를 위한 실험을 진행하였다.

발효를 근거로 한 제품의 기능성을 규명하기 위해서 선결되어야하는 것은 발효공정의 사용되는 미생물의 동정, 주요 미생물의 첨가농도, 발효 온도, 기질의 조건들에 대한 공정의 표준화를 확립해야한다. 최종산물이 색소인 경우, 특히 기능성 색소라고 추정되는 안토시아닌의 경우는 pH에 대한 민감성이 매우 다르고, 발효에 따라 안토시아닌이 아닌 유사한 화합물이 발효조건에 따라 다르게 생성될 수 있다는 예상이 가능하므로 특히 발효에 대한 모든 공정을 표준화하는 것은 큰 의의가 있다.

본 실험은 기존의 자색 고구마의 발효 시제품을 근거로 그 모델을 공정화하고, 제품을 생산하는 생산자의 공정을 표준화하여 주는 동시에 본 실험의 기초적 자료를 삼고자 하였다.

현재 무안의 한아름영농조합법인에서는 자색고구마를 이용하여 “자미원” “자미향”이라는 이름으로 두 가지의 제품을 출시하고 있다.

자미원은 한아름영농조합에서 자체 개발한 발효 공정을 마친 이후의 제품이며, 자미향은

자색고구마를 물로만 추출하여 가미한 제품으로, 이를 단순하게 자미원을 발효추출물, 자미향을 물추출물로 편의상 명칭을 사용하기로 한다. 현재 시제품으로 생산되는 공정을 간단히 나타낸 그림이 Figure 1이다.

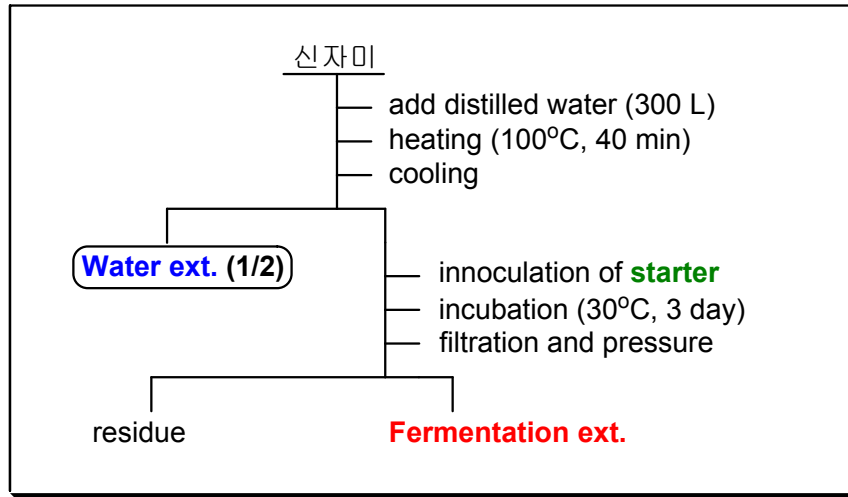


Fig. 1. 자색고구마 발효제품의 공정도

특히 발효추출물을 생산하기 위하여 시제품 생산자가 사용하고 있는 일종의 starter인 종균을 혼합균주라 명명하고 이를 물추출물, 발효추출물 시료에 추가하여 성분 분석, 색도 분석, 발효 중의 pH 등 여러 공정에 따른 변화를 관찰하였고, 이를 HPLC로 분석하여 색소의 분자적 변화추이를 관찰하였으며, 주요한 균주를 분리하여 동정하여, 과연 제품의 색소의 변화를 주도적으로 변화시키는 균주가 무엇인가에 대한 연구를 진행하여 전체적인 공정의 표준화를 위한 선행적인 연구를 시행하였다.

## 1. 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원) 및 혼합균주의 성분 및 HPLC 분석

### 가. 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원) 일반성분 함량 변화 분석

#### (1) 총질소 함량 측정

식품공전의 방법에 따라 시료 3 g을 킬달플라스크에 취하여, 분해촉진제 및 황산을 넣고 BUCHI Digestion Unit K-435 분해장치에서 분해한 후, 증류수와 NaOH를 첨가하여 BUCHI Distillation Unit B-324에서 증류 후 2% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>로 중화하여 0.1N HCl로 pH 4.22가 되는 지점까지 적정하여 총질소 함량을 구했다.

#### (2) 조지방 함량

식품공전의 방법에 따라 시료 약 2 g을 칭량하여 물, 암모니아수, 에탄올과 디에틸에테



르, 석유에테르를 분액여두에 넣고 혼합하여 층분리가 일어나면 상층액을 취하여 용매를 날려 보낸 후 무게를 측정하여 조지방량을 구했다.

(3) 수분 함량

식품공전의 방법에 따라 상압가열건조법에 의해 약 5 g 정도의 시료를 취하여 105℃의 건조기에 넣고 건조시킨 후 수분 함량을 측정하였다.

(4) 회분 함량

식품공전의 방법에 따라 시료를 도가니에 취하여 550℃의 회화로에서 백색의 회분이 얻어질 때 까지 회화시킨 후 데시게이터에서 방냉하여 무게를 측정하여 회분 함량을 구했다.

(5) 탄수화물 함량

식품공전의 방법에 따라 100에서 수분, 회분, 조지방, 조단백을 더한 총합을 뺀 값을 탄수화물 함량으로 하였다.

Table 1-1. 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원) 일반성분 함량

(단위: g/100 g)

	물추출물 (자미향)	발효추출물 (자미원)
총질소	0.03 ± 0.00006	0.03 ± 0.00005
조지방	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01
수분	95.1 ± 0.04	97.2 ± 0.01
회분	0.23 ± 0.00013	0.18 ± 0.00006
탄수화물	4.39 ± 0.00007	2.39 ± 0.00009

물추출물(자미향), 발효추출물(자미원)의 일반성분을 분석한 결과(Table 1-1), 회분, 지방, 그리고 탄수화물의 함량이 감소하는 것을 확인하였는데 이는 발효에 사용된 미생물들이 자색고구마 추출액에 함유된 무기질, 지방, 당 등을 영양원으로 사용하여 이들 성분이 분해되었기에 나타나는 현상으로 생각되어진다.

나. 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원), 혼합균주의 HPLC 분석 및 pH 확인

(1) 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원), 혼합균주의 HPLC 분석

신자미를 물로 추출한 물추출물과 이 물추출물에 한아름영농조합에서 제품의 생산시 사용하는 종균을 접종하여 30℃에서 3일간 발효시킨 발효추출물, 그리고 발효에 이용되는 종균인 혼합균주를 각각 HPLC를 이용하여 520 nm에서 발효에 의한 차이 유무를 확인해 보

고자 하였다.

▶ HPLC 분석조건

- 기기: Waters 2695 pump
- Detector: 520 nm (Waters 2996 PDA detector)
- Column: Waters Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×150 mm)
- 이동상: Solvent A; H<sub>2</sub>O (0.1% TFA 함유)  
Solvent B; 50% Acetonitrile (0.1% TFA 함유)

Time (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
45	60	40

(가) 물 추출물 (자미향)

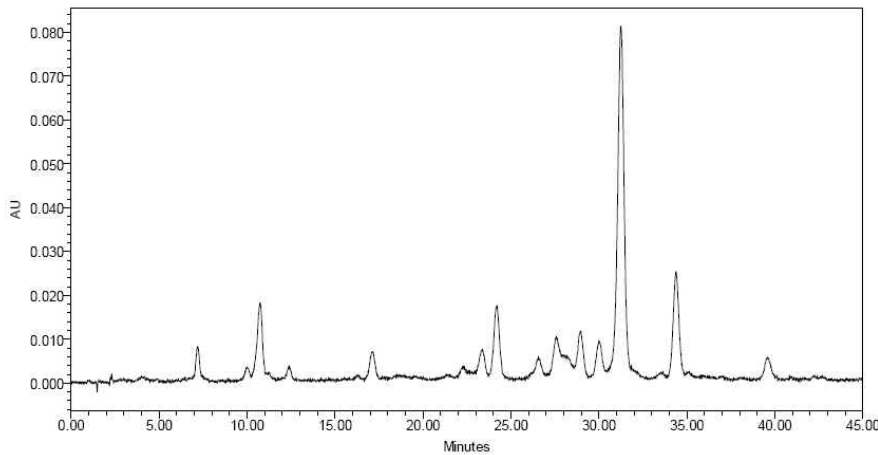


Fig 1-1. HPLC chromatogram of water extract of purple sweet potato (PSP).

(나) 발효 추출물 (자미원)

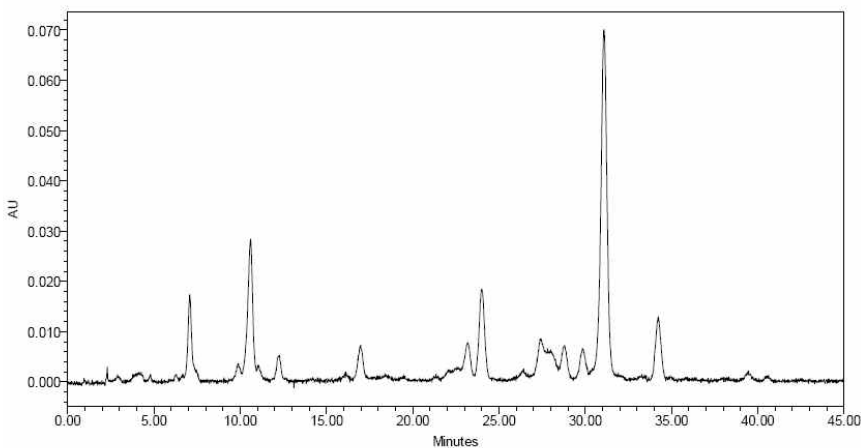


Fig 1-2. HPLC chromatogram of fermented by starter water extract of purple sweet potato (PSP).

(다) 혼합균주 (장기간 발효)

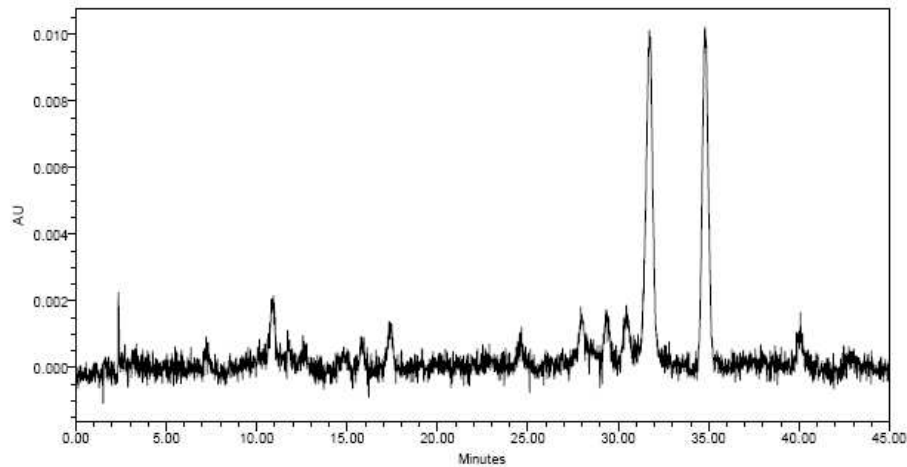


Fig 1-3. HPLC chromatogram of purple sweet potato starter.

(2) 물추출물(자미향), 발효추출물(자미원), 혼합균주의 pH 변화

물추출물, 발효추출물 및 혼합균주의 pH를 측정해 봄으로써 미생물에 의한 pH의 변화를 조사하여 발효의 진행속도 판단기준으로 활용하고자 하였다. 각각의 시료에 대한 pH는 pH meter (Seven Multi, Mettler-Toledo, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

그 결과, 발효 추출물은 발효하지 않은 물 추출물보다 pH가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 혼합균주의 경우에는 발효추출물보다 더 낮은 pH를 보이는 것이 확인되었다. 이는 발효가 진행되면서 미생물에 의해 생성된 유기산들에 의한 발효액의 pH가 감소하는 것으로 판단되어진다. 혼합균주의 경우에는 오랜 시간 동안 발효가 진행되어진 것으로 발효추출물보다 더 많은 종류의 미생물들이 장시간 배양되어짐으로써 더 많은 유기산이 생성되었기에 pH가 감소한 것으로 추측된다.

	pH
물추출물 (자미향)	4.97
발효추출물 (자미원)	4.00
혼합균주	3.03

2. 한아름영농조합에서 혼합균주 접종 후 발효 양상 비교실험

한아름영농조합에서 대형 발효조를 이용하여 자색고구마를 가열처리 후 종균을 접종하여 30°C에서 발효시키면서 발효에 의한 변화를 확인하기 위하여 대형 발효조에서 경시적으로 시료를 취하여 pH와 Abs 및 HPLC 분석을 통한 안토시아닌 화합물의 변화를 확인하였다.

(1) pH 및 Abs의 변화

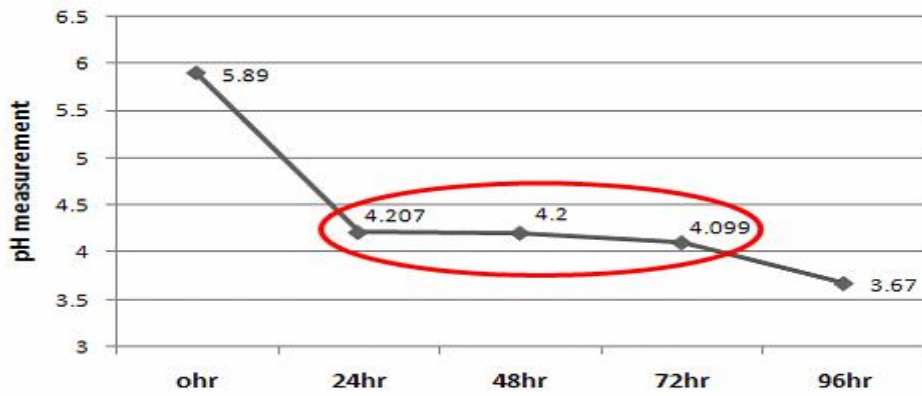


Fig. 2-1. 혼합균주 접종 후 발효 시간별 pH변화

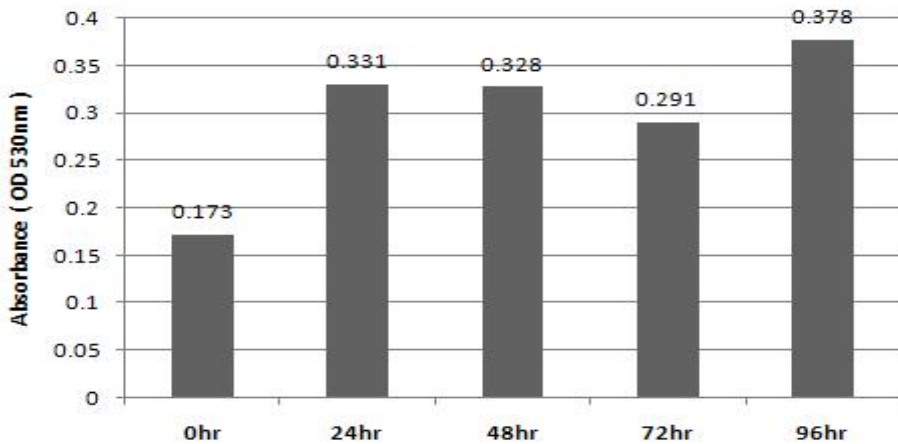


Fig. 2-2. 혼합균주 접종 후 발효 시간별 Absorbance 변화

혼합균주(종균)를 접종하여 경시적으로 pH와 530 nm에서의 Abs를 관찰한 결과, 균주 접종 24시간이 지나면 발효액의 pH가 초기 5.8에서 4.2로 감소하여 72시간까지 pH 4.0부근을 유지하다가 발효가 96시간까지 진행이 되면 3.7로 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 530 nm에서의 흡광도 값은 초기의 0.17에서 발효 후 24시간이 경과하면 0.3까지 증가하여 72시간까지 비슷한 흡광도 값을 유지하다가 pH가 감소하는 96시간이 되면 흡광도 값이 0.4부근까지 증가하는 것을 확인하였다. pH가 감소하면서 흡광도 값이 상승하는데 이는 최종제품의 색상에도 변화를 일으키는 것으로 확인되었다. 이처럼 발효진행 24시간에서 72시간까지 pH가 일정하게 유지되다가 96시간이 되면 급격한 pH의 감소와 흡광도값의 증가를 나타내는 것은 아마도 발효과정 중에 발효에 관여하는 미생물의 종류가 서로 다르기 때문에 나타나는 현상일 것으로 추측되어진다. 즉, 발효 초기에 어느 정도 일정기간 동안에는 pH를 감소시키지 않는 종류의 미생물이 우점종으로 존재하다가 발효진행 후 어느 정도의 시점이 되어지면 초기 우점종이었던 균보다는 발효액의 pH를 감소시키는 균이 발효액내에 많이 생

육되는 것으로 생각된다. 이러한 pH 및 흡광도 값의 변화는 업체에서 발효음료 제품을 생산할 때 30℃에서 72시간 정도 발효를 진행하여 최종제품의 색을 결정하는 품질지표로도 활용이 가능할 것으로 판단되어진다.

## (2) HPLC 분석결과

혼합균주(중균)를 접종하여 발효시킨 발효액의 시간에 따른 pH와 Abs의 변화를 관찰한 결과 72시간 이후에 pH 및 Abs의 변화가 확인되었기에 이들 시간별 시료를 520 nm에서 HPLC 분석을 실시하여 각 안토시안 색소 peak에 변화가 생기는지 관찰하였다. 그 결과, 520 nm에서 흡광도를 보이는 안토시안 화합물이라 추측되는 화합물들의 조성은 발효 후 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 모두 변화되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2-3). 이는 발효시간이 경과하면서 발효추출액의 pH 및 흡광도 값은 변화가 일어나더라도 발효추출물에 함유되어 있는 각각의 안토시안 화합물에는 큰 영향을 미치지 않음을 확인해 주는 결과로, 발효추출물에 함유된 안토시안 색소는 pH 변화에는 영향을 받지 않고 안정함을 확인할 수 있다.

### ▶ HPLC 분석조건

- 기기: Waters 2695 pump
- Detector: 520 nm (Waters 2996 PDA detector)
- Column: Waters Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×150 mm, )
- 이동상: Solvent A; H<sub>2</sub>O (0.1% TFA 함유)

Solvent B; 50% Acetonitrile (0.1% TFA 함유)

Time (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
45	60	40

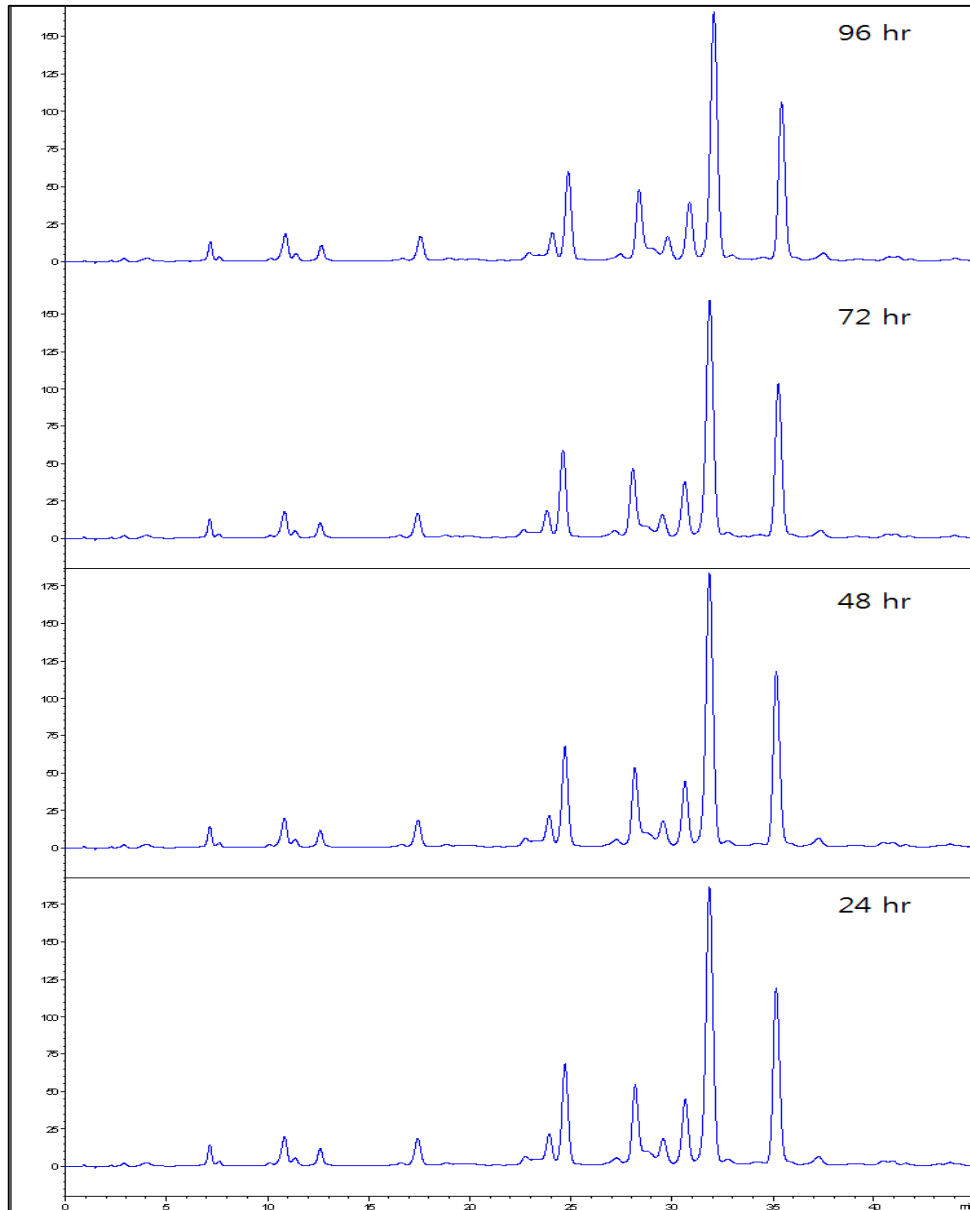


Fig. 2-3. HPLC chromatogram of fermented purple sweet potato extracts at 520 nm.

### 3. 혼합균주로부터 발효에 관여하는 미생물의 분리 동정

#### 가. 혼합균주의 현미경 관찰

- 한아름영농조합에서 발효 음료제품의 생산 시 종균으로 사용하고 있는 혼합균을 이용하여 발효의 주 원인균을 단리·동정하고자 현미경 관찰을 통한 균의 분포 및 형태 등을 확인하였다. 현미경 관찰 결과 bacteria 및 yeast 등 수종의 균들이 분포하고 있는 것이 확인되어 (Fig. 3-1) 이 균의 분리·동정을 실시하였다.

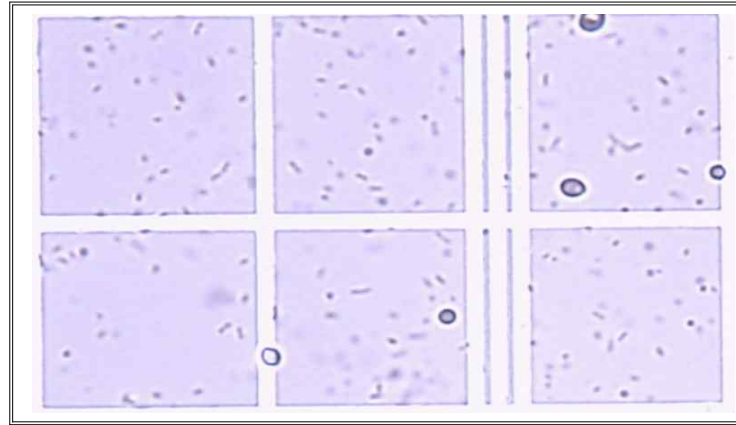


Fig. 3-1. 현미경 관찰(×40배) - 올림프스 BX41

- 발효 원인균의 분리·동정은 혼합균주를 0.85%생리식염수로 1/10로 단계 희석하여 YPD agar, Nutrient agar, MRS agar, Potato dextrose agar에 고르게 도말하여 YPD agar와 Potato dextrose agar는 25℃, Nutrient agar와 MRS agar는 30℃에서 각각 24 시간 이상 호기배양 후 colony를 관찰하였다.

#### 나. YPD Agar로부터 YL균의 분리 및 동정

- YPD agar에서 25℃, 24시간 호기배양 시킨 것으로부터는 수종의 colony가 확인되어, 이를 각각 YL, YS, YPD Large, YPD Small로 명명하였다.
- YPD agar에서 분리된 두 종의 colony (YL, YS)는 생육양상이 거의 유사하였으나 균의 활성에서는 YL이 우수하여, YL을 분리하였다. 확보된 1차 균주를 각각 멸균된 자색고구마에 접종 후 발효하여 최종 YL 균주를 선정하였다.  
선정된 YL 균주를 대상으로 본 센터에서 보유하고 있는 미생물 동정장치 (VITEK2-Biomeriux, France)를 이용하여 미생물 동정을 실시한 결과 *Saccharomyces*속으로 동정되었으나, 이를 더욱 명확하게 하기 위하여 한국미생물보존센터 (KCCM)에 동정을 의뢰하였다.
- YPD agar에서 분리된 또 다른 두 종의 colony (YPD Large, YPD Small)의 동정을 위해 한국미생물보존센터 (KCCM)에 동정을 의뢰한 결과, 이들 YPD Large균과 Small균은 동일 균주 (*Issatchenkia orientalis*)로 확인되었다.

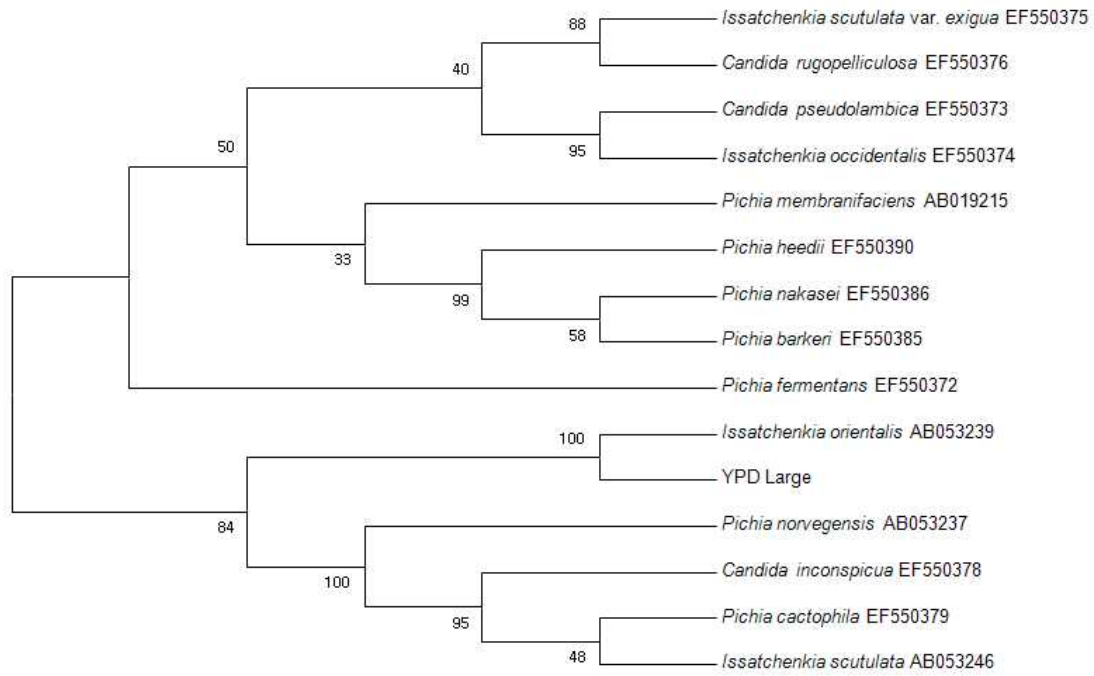


Fig. 3-2. YPD Large균의 18s rDNA partial sequencing 계통 분석표

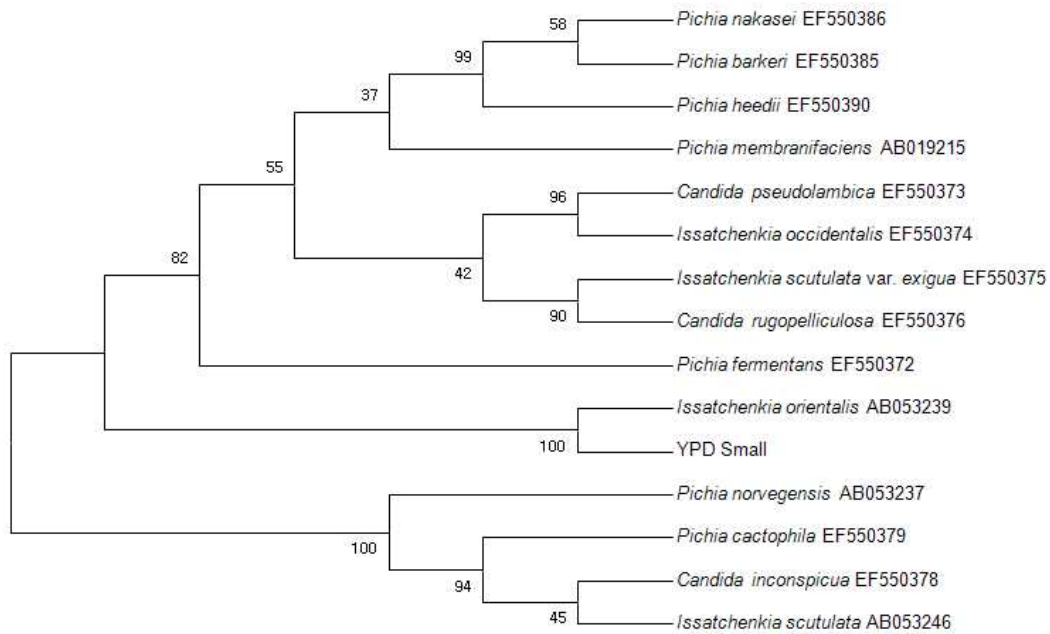


Fig. 3-3. YPD Small균의 18s rDNA partial sequencing 계통 분석표



- 동일 균주로 분석된 *Issatchenkia orientalis*는 와인에서 *Saccharomyces cerevisiae*와 co-fermentation시 malic acid의 함량을 낮추어 와인의 풍미를 높이는데 기여한다는 보고가 있다 (*Biotechnol Lett.* 2008, 30(9): 1633-8. Epub 2008 Apr 15). 이는 자색고구마의 발효에서도 유사한 영향을 미칠 것으로 예상되어진다.

#### 다. Nutrient Agar로부터 N1균의 분리

- Nutrient agar에서 30℃, 24시간 호기배양시킨 것으로부터는 한 개의 작은 colony가 확인되어 이를 N1균으로 명명하였다. 분리된 N1 균은 균의 활성화에 3일 이상의 시간이 소요되는 균으로 배양속도가 느리며, 발효액의 pH가 낮은 것으로 확인되어 중성인 조건에서는 배양이 어려운 균으로 판단되었다.
- 이는 한아름 영농조합에서 발효시키는 조건인 30℃, 3일 배양 시간을 초과하며, 배양액의 pH도 상이한 것 이여서 기업에서 발효에 사용되는 주 발효균은 아닌 것으로 판단되어 동정을 실시하지 않았으나, 발효공정의 표준화를 위해 추후 동정을 실시할 필요가 있을 것으로 생각되어져 현재 -80℃에서 냉동보관 중이다.

#### 라. MRS Agar로부터 M1균의 분리 및 동정

- MRS agar에서 30℃, 24시간 호기배양 시킨 것으로 부터는 한 개의 colony가 확인되어 이를 M1균으로 명명하였다.
- MRS agar에서 분리된 M1의 동정을 위해 한국미생물보존센터 (KCCM)에 동정을 의뢰한 결과, 이 M1균은 (*Lactobacillus fermentum*)로 확인되었다.

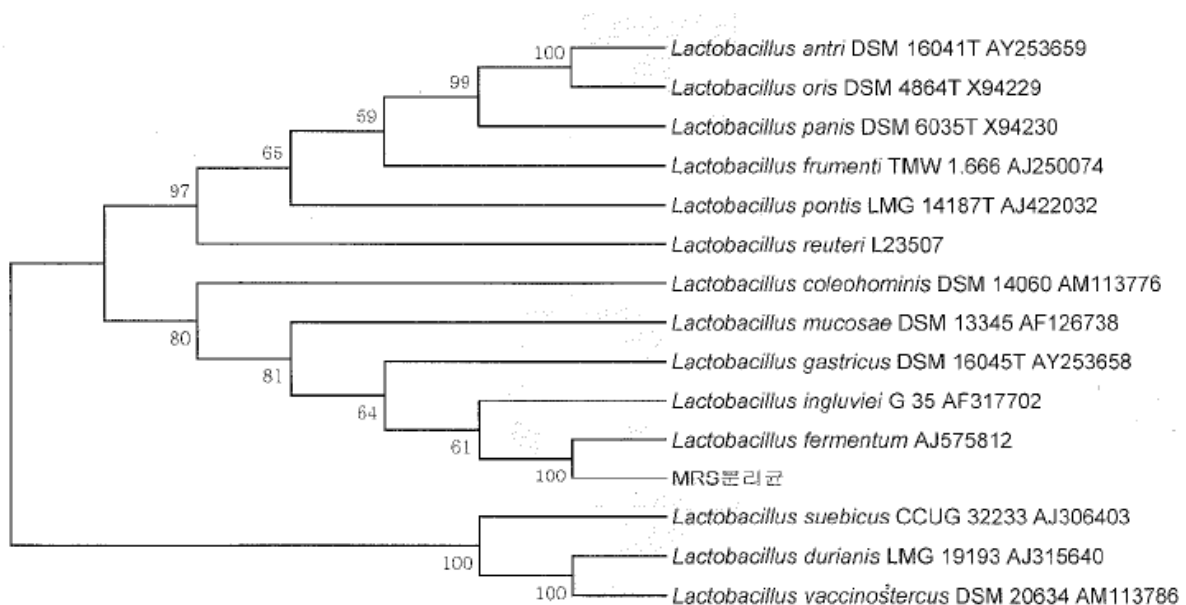


Fig. 3-3. M1균의 16s rDNA partial sequencing 계통 분석표

**마. Potato dextrose agar (PDA)로부터 균의 분리**

- PDA agar에서 30℃, 24시간 호기배양 시킨 것으로 부터는 colony나 그 밖의 fungi 균사의 형성을 전혀 확인할 수 없어서, 이 혼합균주에는 PDA 배지에서 생육하는 균주는 존재하지 않는 것으로 확인되었다.

#### 4. 분리된 각각의 균주를 자색고구마에 접종 후 실험실 발효 양상 비교실험

위에서 분리한 균주들 중에서 자색고구마의 발효에 직접적으로 관여하는 균주를 선발하고 이를 통한 색소의 안정성 및 순도 향상을 위해, 자색고구마에 존재하는 일반미생물을 사멸시킨 후 분리된 단일균주를 각각 자색고구마에 접종하여 발효에 따른 색소의 변화와 발효 진행 정도를 실험실 수준에서 확인하였다.

YPD 배지에서 분리된 YL균과 YPD Large/Small 균에서 분리한 *Issatchenkia orientalis* (Issa)균, MRS에서 분리한 *Lactobacillus fermentum* (M1)균을 가열조건 (온도: 100°C, 121°C, 시간: 15, 30, 45, 60 min)별로 처리한 자색고구마에 접종하여 30°C에서 배양하면서 경시적으로 pH와 색소의 변화를 UV spectrophotometer와 HPLC를 이용하여 비교하였다.

HPLC 분석 조건은 이전 실험과 동일한 조건에서 실험하였다.

##### ▶ HPLC 분석조건

- 기기: Waters 2695 pump
- Detector: 520 nm (Waters 2996 PDA detector)
- Column: Waters Sunfire C<sub>18</sub> (4.6×150 mm, )
- 이동상: Solvent A; H<sub>2</sub>O (0.1% TFA 함유)

Solvent B; 50% Acetonitrile (0.1% TFA 함유)

Time (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
45	60	40

#### 가. 자색고구마를 121°C에서 15분간 멸균 후 균주 및 배양시간에 따른 변화

##### (1) pH 및 Abs의 변화

- 냉동된 자색고구마를 잘게 slicing 하여 500ml 삼각플라스크에 고구마 200 g과 물 500ml 을 넣어 실험에 이용하였다.
- 자색고구마를 121°C에서 15분간 멸균 후 Issa, YL균, M1균 배양액을 1%로 seed culture 하여 30°C incubator에 배양하면서 0, 8, 24, 32, 48, 56, 72 hr별로 pH 와 Abs의 변화를 관찰하였다(Fig. 4-1, 4-2).

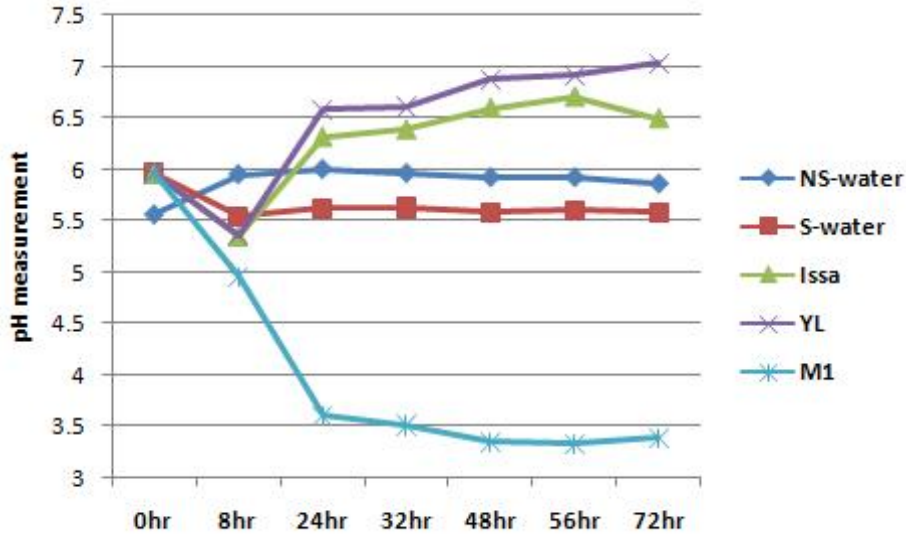


Fig. 4-1. 각 균주의 시간별 발효 시 pH의 변화

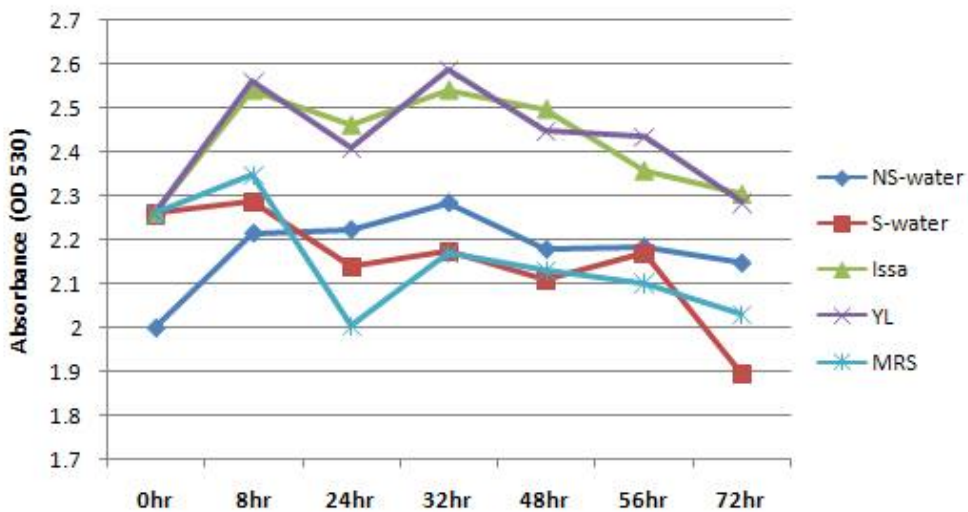


Fig. 4-2. 각 균주의 시간별 발효 시 OD 530 nm에서의 흡광도 변화

발효시간에 의한 균주별 pH 변화를 살펴보면, M1 (MRS) 균주를 접종한 경우에는 균 접종 전에 약 6.0정도 이었던 pH가 발효 8시간에는 5.0정도로 감소하며, 발효 24시간이 경과한 후에는 pH 3.5로 급격하게 낮아지는 현상을 나타내었다. 이는 업체에서 혼합균주를 이용하여 발효할 때 발효 72시간 후의 pH가 4.0인 것에 비하여 매우 낮은 수치이다. 이 결과로부터 M1의 발효경향은 다른 두 균주와는 전혀 다른 성격으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 530 nm에서 발효시간에 의한 흡광도를 측정하고 비교 할 때도 M1 (MRS) 균주를 접종한 경우에는 발효시간에 따라 OD값이 감소하는 경향을 나타내지만 Issa나 YL을 접종한 경우에는 두 균주가 거의 유사한 pattern으로 OD 값이 변화하는 것을 알 수 있었다.

하지만 본 실험에서 균주를 멸균하기 위해서는 121°C에서 15분간 가열 처리해야 했지만

이는 너무 높은 온도조건이기에 자색고구마 고유의 색이 유지되지 못하는 색을 나타내었다. 이에 이번에는 이보다 좀 더 낮은 조건인 100℃로 가열처리하면서 가열 시간을 서로 달리하여 자색고구마에 존재하는 일반미생물을 사멸시키고 단리한 균주만으로 발효가 진행 될 수 있는 조건을 확립하고자 100℃에서 15분, 30분, 45분, 60분 가열처리 한 후 단리된 균주(Issa, YL, M1)를 각각 접종하여 본 실험과 동일하게 pH 및 530 nm에서의 흡광도 값을 비교하고자 하였다.

#### 나. 자색고구마를 100℃에서 열처리 시간 및 배양시간별 pH 및 Abs 변화

##### (1) pH 및 Abs의 변화

- 냉동된 자색고구마를 잘게 slicing 하여 250ml 삼각플라스크에 자색고구마 20 g과 물 50 ml를 넣어 실험에 이용하였다.

- 121℃의 고온으로 가열함으로써 자색고구마 고유의 색소가 분해되는 양상을 나타내어, 이번에는 100℃의 온도에서 가열시간을 15, 30, 45, 60 min으로 한 후 각 균주를 접종하였을 때 pH와 Abs의 변화를 관찰하였다(Fig. 4-3, 4-4).

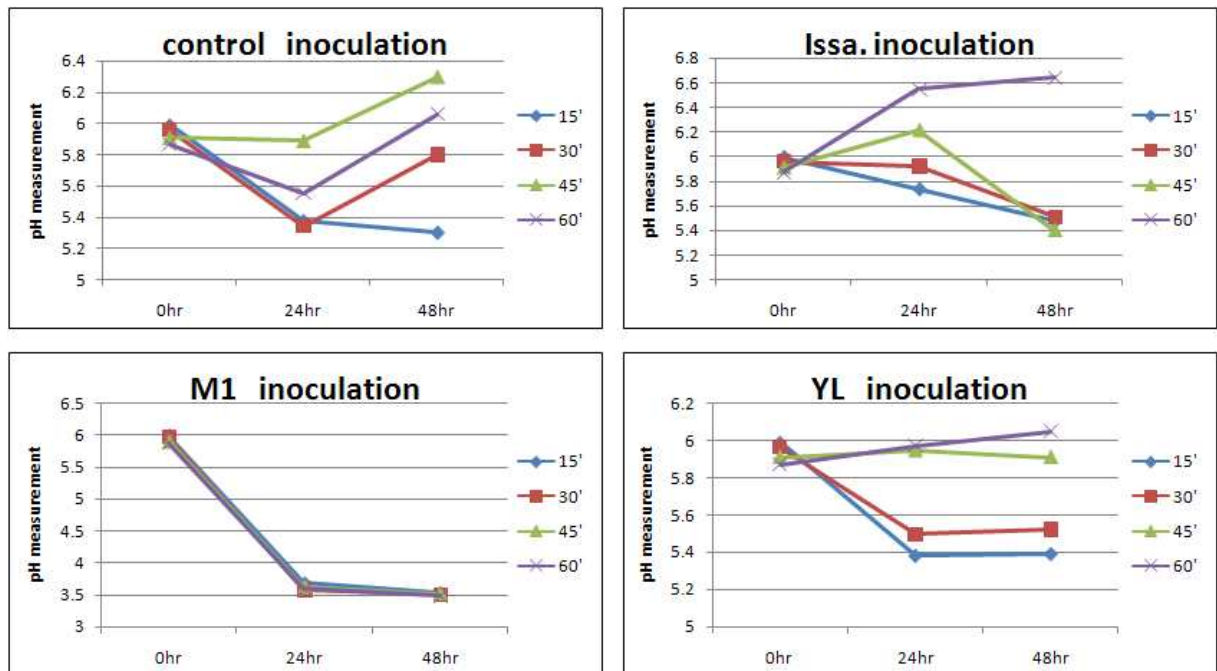


Fig. 4-3. 100℃에서 가열 처리 시간에 따른 각 균주의 pH 변화

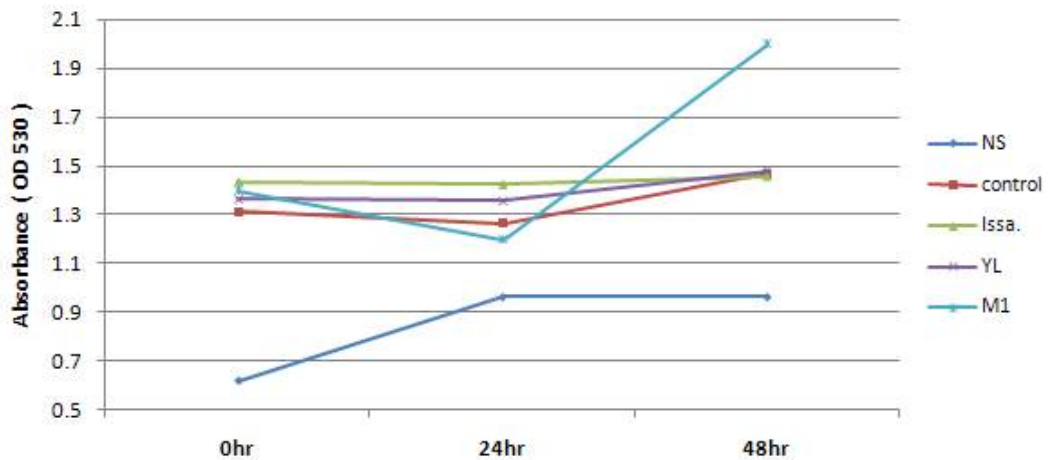


Fig. 4-4. 100°C 60분 가열처리 후 균주별 흡광도 변화 (OD 530 nm)

가열처리 시간별 각 균주의 pH 변화를 121°C에서 15분 멸균처리한 것의 pH와 비교해 보면 Issa를 접종한 경우 60분 가열처리 한 것이 121°C 15분 멸균한 후 접종했을때와 유사한 pH 값을 나타내었다. 이는 100°C에서 60분 정도 가열처리를 하여야만 자색고구마에 존재하는 일반 미생물들이 사멸되고 Issa 단일균주에 의한 발효가 진행되어지는 것으로 생각되어진다. Issa 뿐만이 아니라 그 이외의 다른 균주를 접종한 경우도 Issa와 마찬가지로 60분간 가열처리한 것이 가장 사멸의 효과가 큰 것으로 확인되어 자색고구마를 가열처리 함으로써 자색고구마에 존재하는 일반미생물에 의한 발효의 영향을 최소화 시킬 수 있는 조건이라 판단되어진다. 또한 100°C 60분 가열 처리한 것은 72시간 발효가 끝난 최종액의 색에 있어서도 121°C 15분 처리한 것보다 훨씬 자색고구마 고유의 색과 유사한 색을 유지하고 있음이 확인되었다.

#### 다. 단리된 균주와 혼합균주(종균)에 의한 발효 양상 비교

이에 본 실험에서는 자색고구마를 95°C에서 60분간 가열 처리한 후 단리한 3종의 균주 (YL, Issa, MRS)를 접종시킨 것과 동시에 한아름영농조합에서 자색고구마의 발효에 사용되는 혼합균주(종균)를 접종하여 발효 시켜보면서 발효 시간별로 발효액의 pH, Abs의 변화와 안토시안 색소의 정성/정량 분석 및 HPLC 분석을 통하여 발효 양상을 비교해 보기로 하였다.

##### (1) pH 및 Abs의 변화

- 잘게 slicing한 자색고구마 200 g과 물 200 ml을 넣어 실험에 이용하였다.
- 물과 혼합한 자색고구마를 100°C에서 60분 동안 가열한 후 각각의 균주를 1%의 농도로

접종하고 30°C에서 shaking incubation 하면서 경시적으로(24, 48, 72hr) pH와 Abs의 변화를 관찰하였다(Fig. 4-5, 4-6).

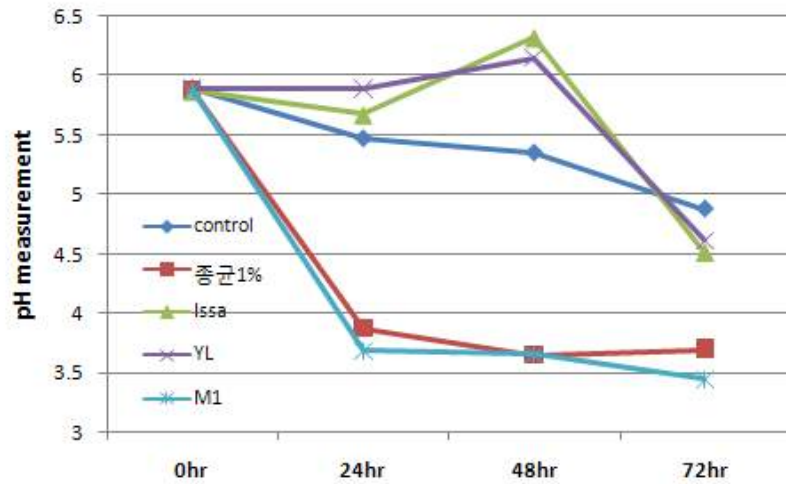


Fig. 4-5. 9월 수확고구마로 각 균주별 발효 시 pH 변화

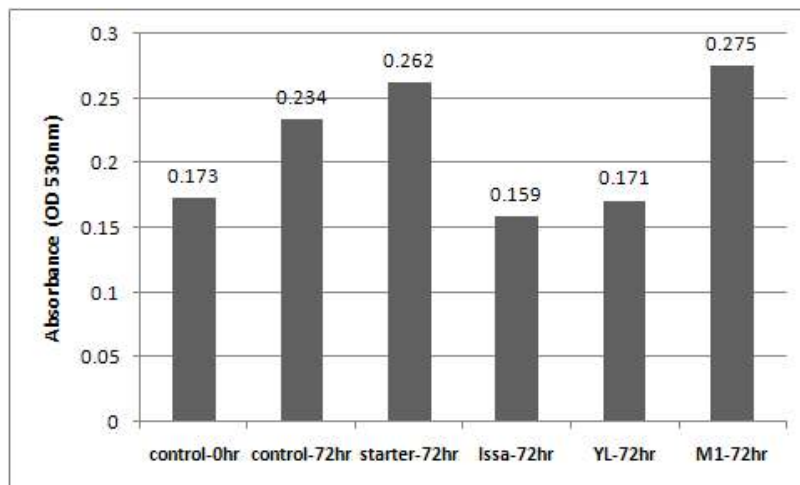


Fig. 4-6. 각 균주별 발효 시 OD 530nm에서의 흡광도 변화

각각 균주를 접종하여 발효한 발효액과 혼합균주 (종균)를 접종하여 발효시킨 발효액의 pH 변화를 조사한 결과 YL과 Issa를 접종 한 경우에는 pH가 상승하는 경향을 보이는 반면에 종균과 M1을 접종한 경우에는 발효시간의 경과에 의해 pH가 비례적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한 530 nm에서의 흡광도 값을 비교해 보면 pH가 많이 감소한 M1과 혼합균주(종균)의 경우에는 OD 값이 높은 반면에 pH가 높은 YL과 Issa는 OD 값이 더 낮음을 확인하였다. 이는 두 실험의 결과가 일치하는 내용으로 pH가 감소하면 더 선명한 적색으로 변화하기 때문에 530 nm에서의 OD 값이 증가하는 것으로 판단된다.

하지만 이는 혼합균주(종균)를 첨가했을 때 발효액의 pH가 M1 균주로 발효한 발효액의

pH가 동일한 pattern으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이는 한아름영농조합에서 진행하고 있는 발효가 특정균주에 의해 진행되는 것이 아니라 여러가지 다양한 균주가 복합적으로 발효에 관여를 하고 있기에 자색고구마를 멸균처리 하여 발효를 진행하였던 결과와 상이하게 나타나는 것으로 생각된다.

(2) 발효에 의한 자색고구마 Anthocyanin 색소의 정성/정량 분석

Anthocyanins의 정량 및 정성적 분석은 Francis, F., Food Colorants; Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 273-314 (1989)를 참고로 하여 진행하였다.

(가) Anthocyanin 색소의 정량 분석

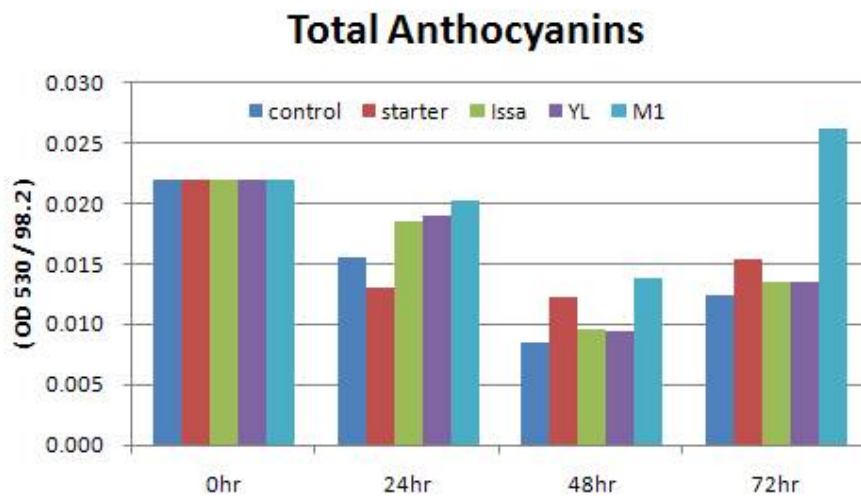


Fig. 4-7. 생물고구마 균주별 발효 샘플의 Total Anthocyanins 변화

- 발효 시간이 진행되면 anthocyanin 색소는 모두 그 양이 감소 하다가 발효 72시간이 되면 다시 색소의 양이 약간 증가되는 것을 알 수 있다(Fig. 4-7). 그 중에서도 M1 발효는 control보다 색소의 양이 더 증가하는데 이는 pH의 변화에 의한 것으로 보인다.

(나) Anthocyanins 색소의 정성적 분석



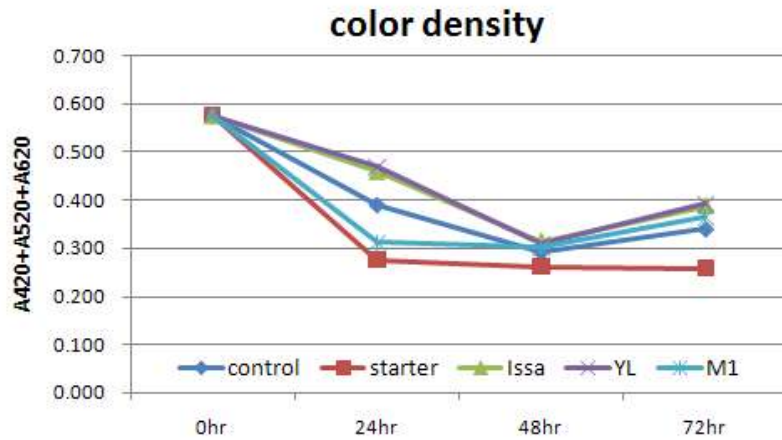


Fig. 4-8. 생물자색고구마 균주별 발효 샘플의 color density (CD) 변화

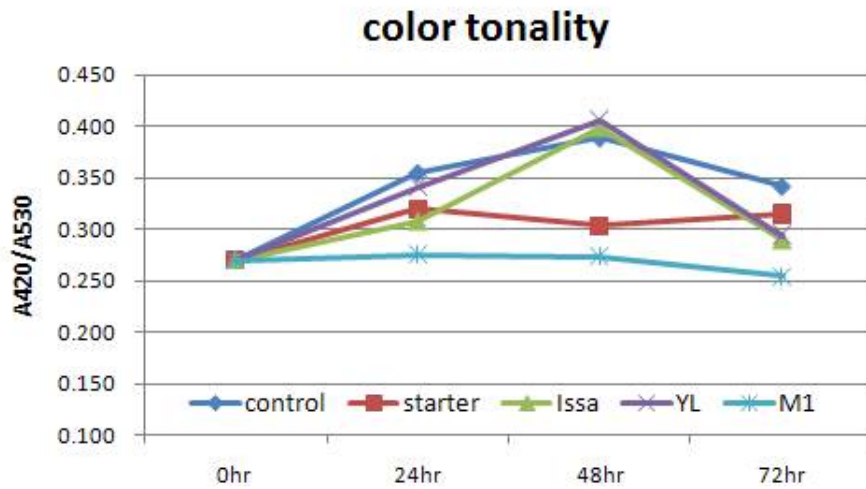


Fig. 4-9. 생물자색고구마 균주별 발효 샘플의 color tonality (CT) 변화

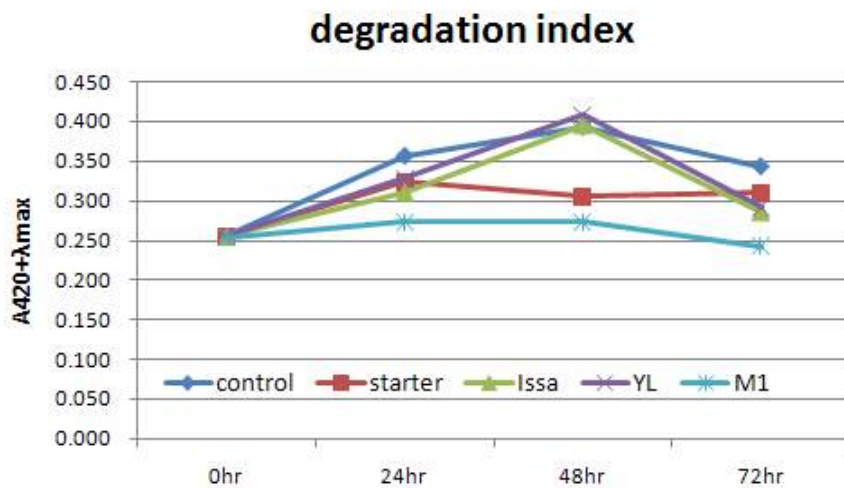


Fig. 4-10. 생물자색고구마 균주별 발효 샘플의 degradation index (DI) 변화

- 발효를 거친 모든 자색고구마의 색소는 발효 72시간에 대조군에 비하여 degradation index (DI)가 낮았다. 이는 발효에 의한 pH의 변화에 의한 것으로 Issa와 YL은 거의 유사한 경향을 보였고 M1은 가장 낮은 DI를 보여 pH가 낮은 acid 조건에서 anthocyanin 색소가 안정하다는 것을 보여주고 있다.

○ HPLC 분석결과

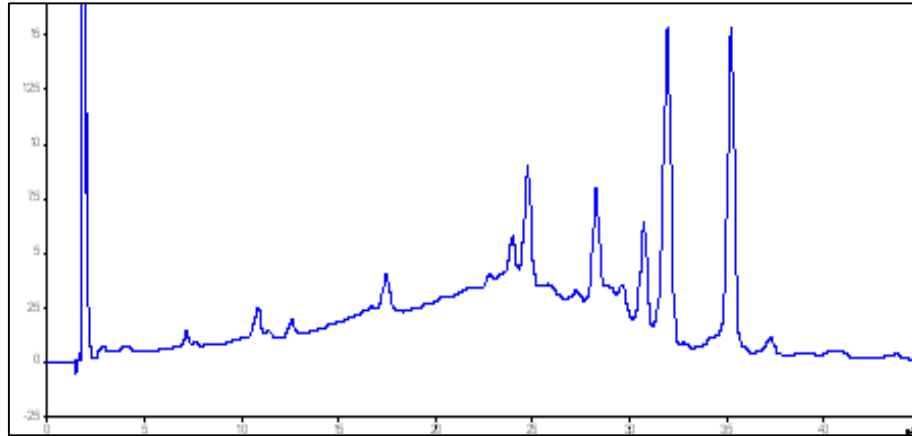


Fig. 4-11. 집중하지 않은 Control 0 hr의 HPLC chromatogram

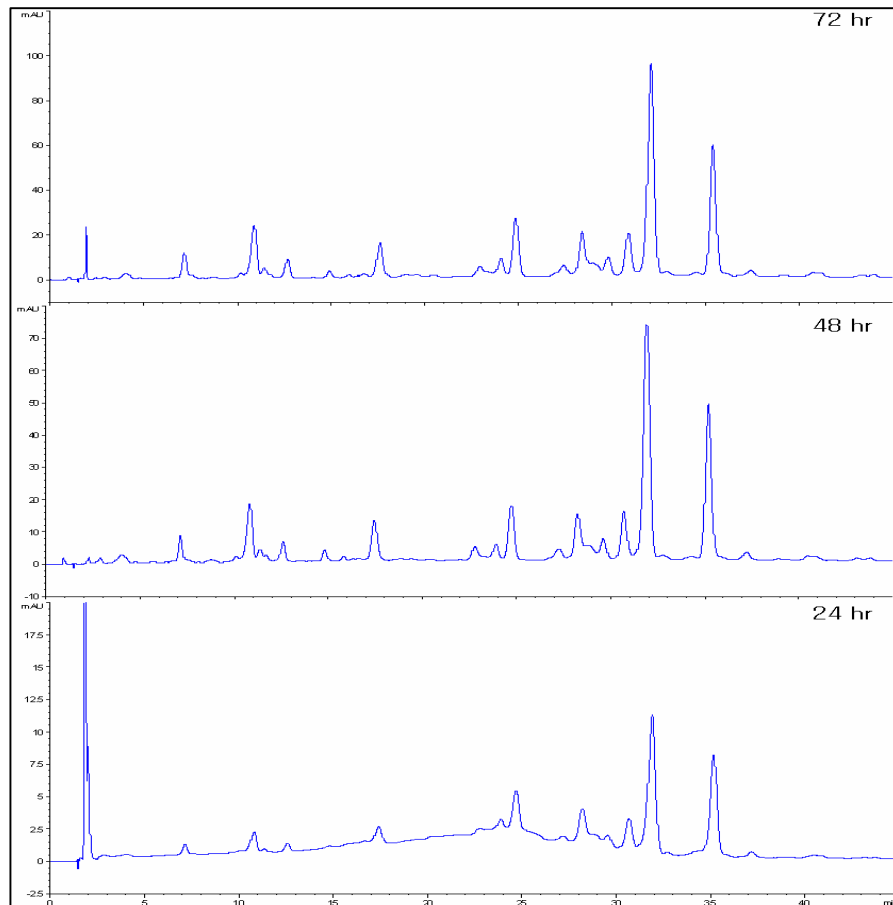


Fig. 4-12. 집중하지 않은 Control 24, 48, 72 hr의 HPLC chromatogram

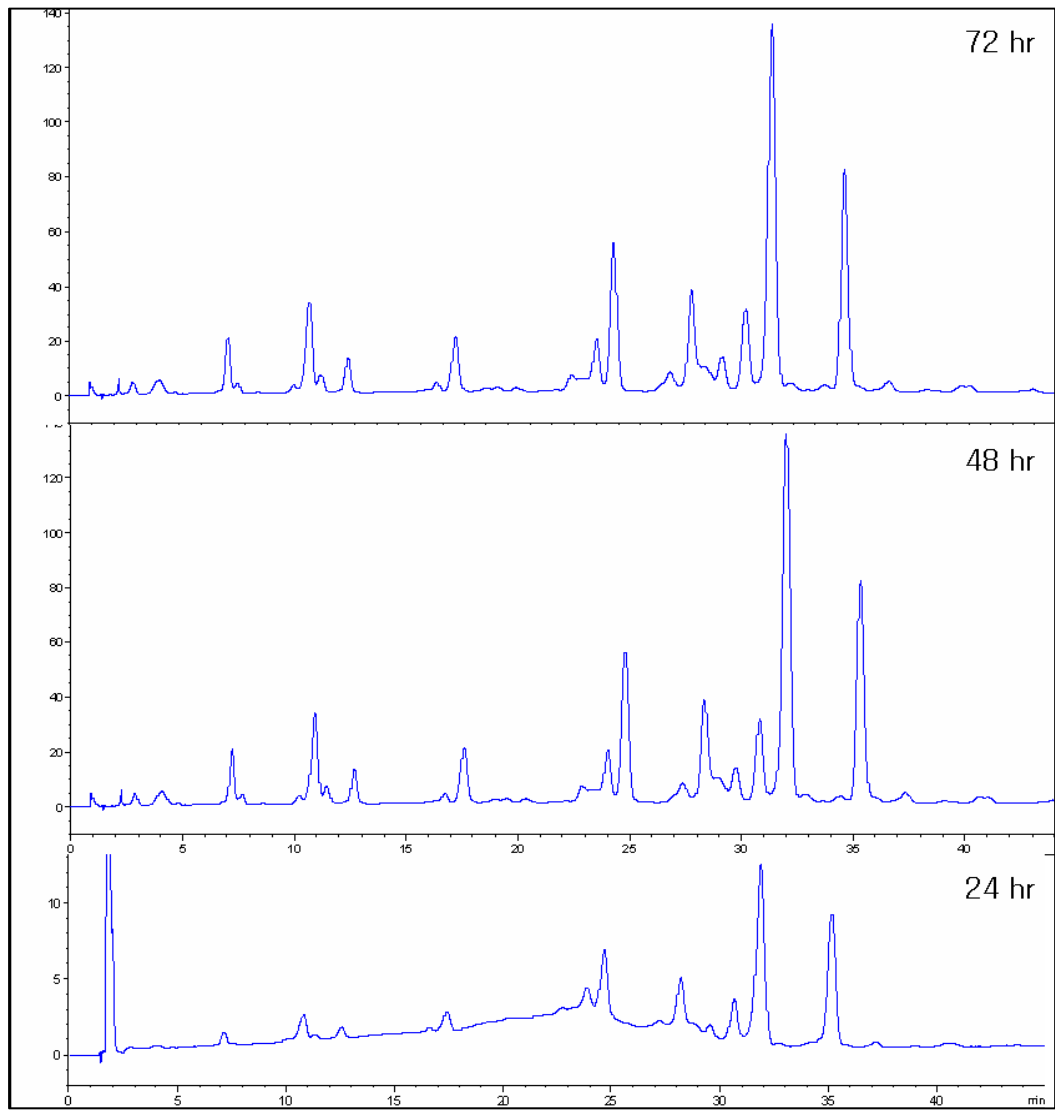


Fig. 4-13. Issa 접종 후 24, 48, 72 hr의 HPLC chromatogram

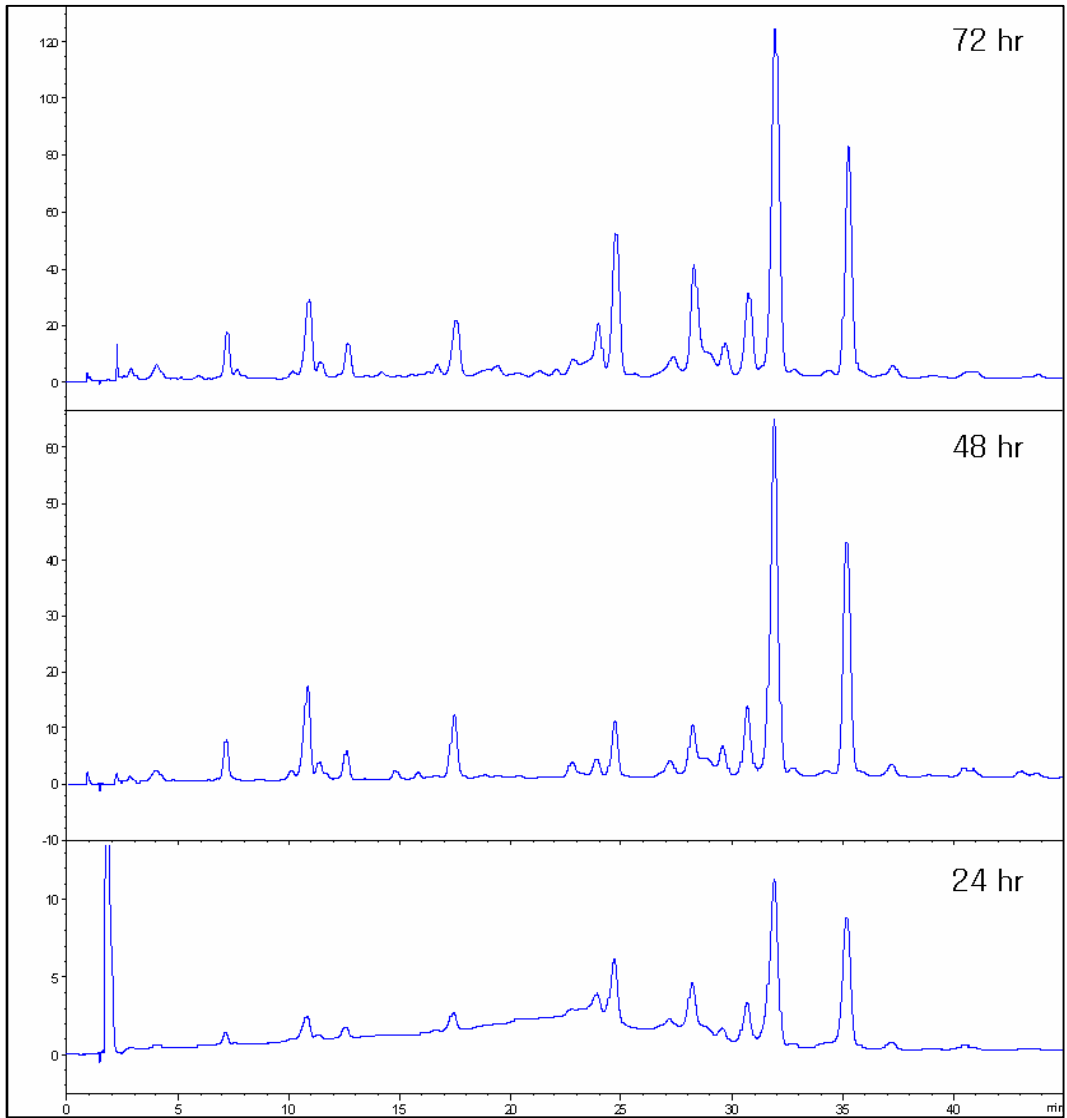


Fig. 4-14. YL 접종 후 24, 48, 72 hr의 HPLC chromatogram

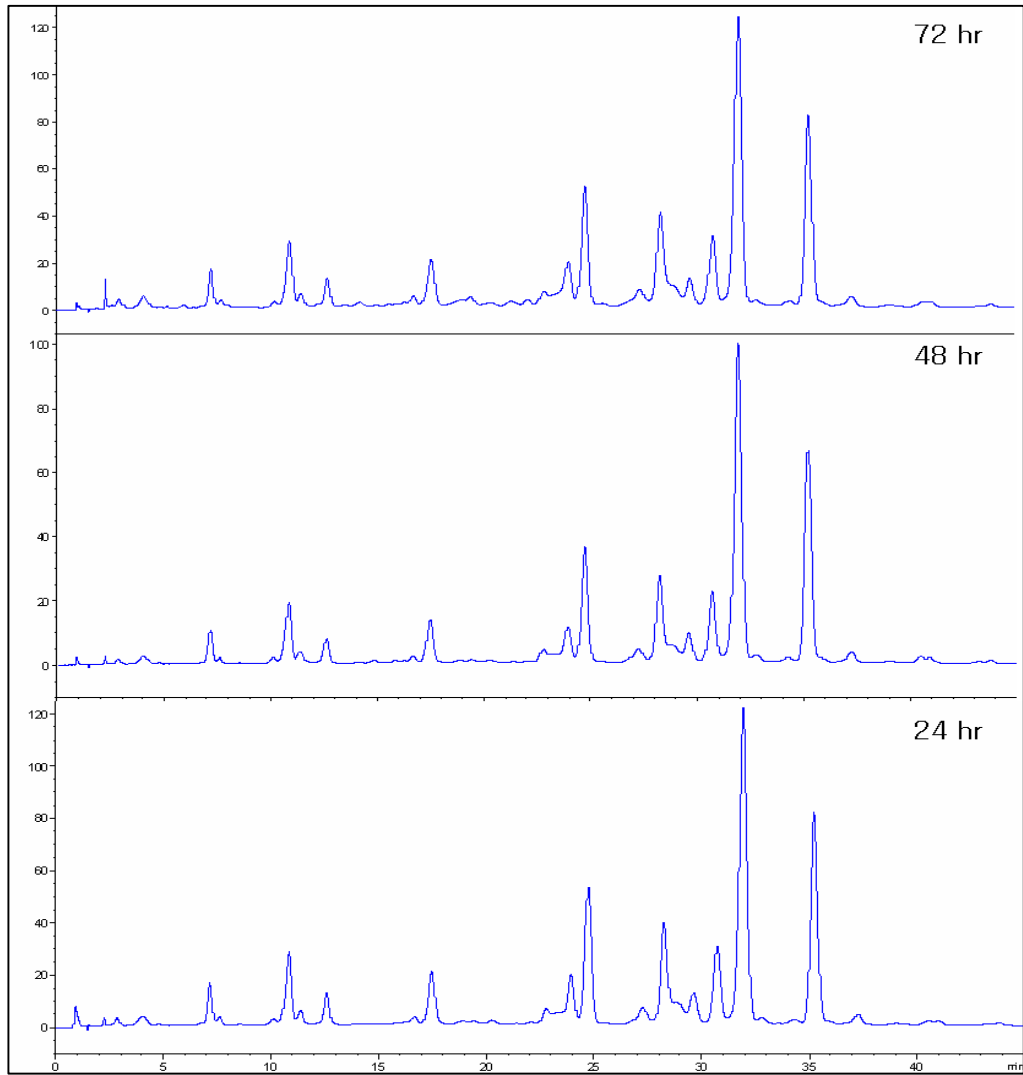


Fig. 4-15. M1 접종 후 24, 48, 72 hr의 HPLC chromatogram

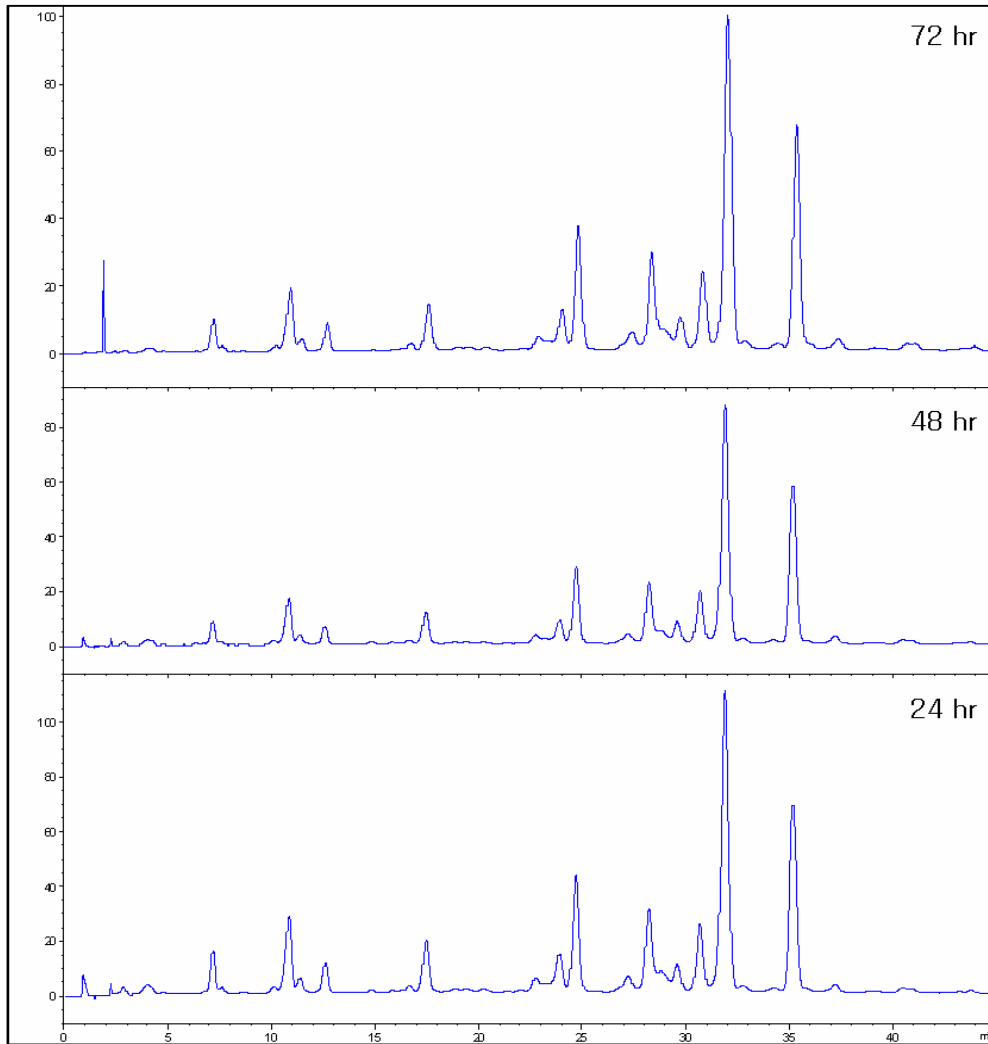


Fig. 4-16. 혼합균주 접종 (1%) 후 24, 48, 72 hr의 HPLC chromatogram

자색고구마 (신자미)를 95°C에서 60분간 가열 처리한 후 각각의 균주별로 접종하여 30°C에서 발효 시간별로 시료를 동량씩 sampling하여 안토시아닌 함량의 변화를 HPLC로 분석한 결과 각각의 균주별로 발효시간에 의한 안토시아닌 조성에 큰 변화가 나타나지는 않는 것으로 확인되었다.

아래의 graph (Fig. 4-17)는 균주별로 발효시켜 시간에 따른 안토시아닌 조성을 HPLC 분석하여 얻어진 chromatogram으로부터 주요 안토시아닌 peak ( $t_R$  10.8 min, 24.7 min, 28.2 min, 31.9 min, 35.2 min)의 height 변화를 나타낸 것이다. Issa를 접종한 후 72시간 발효를 진행 할 경우 31.9분  $t_R$  peak의 함량이 control이나 다른 균주 (YL, M1)를 접종했을 때보다 약간 증가하다가 감소하는 경향을 나타냈으며, M1을 접종한 경우에는 모든 peak에서 발효 시간이 길어지는 것에 대한 각 안토시아닌 peak height의 변화가 확인되지 않았다(48, 72 hr).

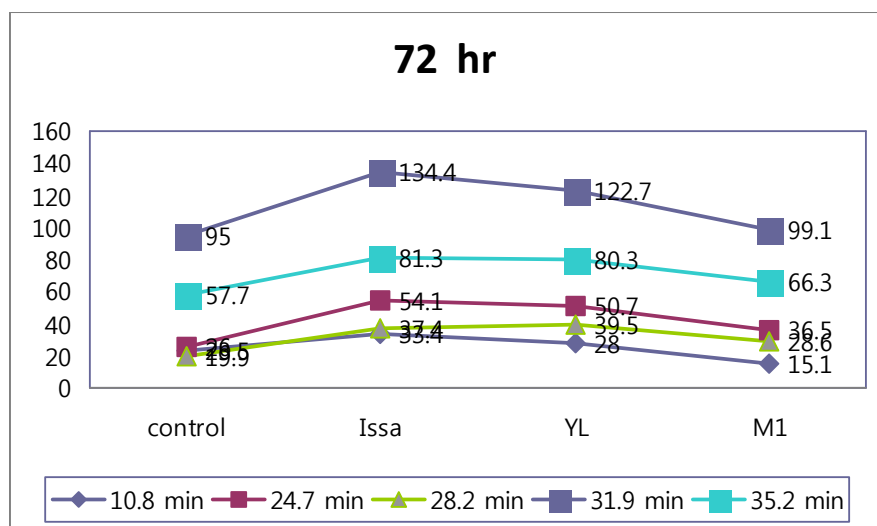
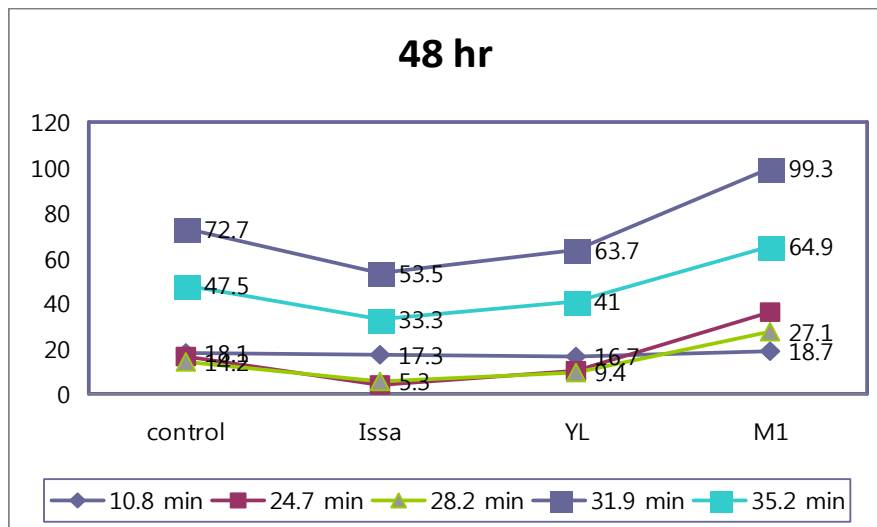
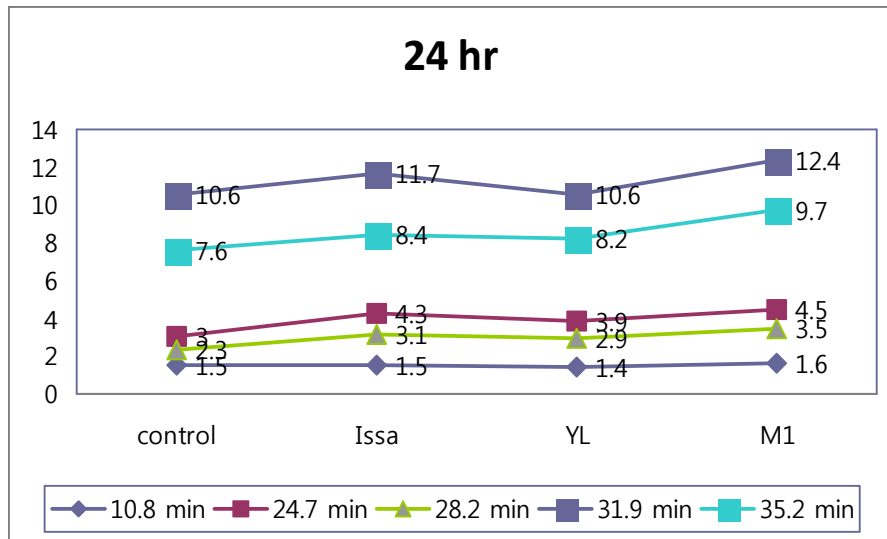


Fig. 4-17. Comparison of HPLC peak height of each microorganism by fermentation periods

라. 분리된 균주와 유사한 균주를 구입하여 각 균에 의한 발효 양상 비교

발효 조건을 다시 재 확인하기 위하여 혼합균주로부터 자체 분리 동정한 *Issatchenkia orientalis* (Issa 균주)와 MRS agar에서 분리 동정한 *Lactobacillus fermentum* (MRS균주)균주와 식품발효에 널리 이용되는 대표적인 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 효모와 대전 유성구 한국생명공학연구원 생명자원센터에서 구입한 *Issatchenkia orientalis* 17696 (Issa 17696 균주), *Issatchenkia orientalis* 17773 (Issa 17773 균주)의 발효양상을 비교하였다.

자색고구마 300 g을 슬라이스 하여 물 500 g을 가하여 100℃에서 90분간 가열처리 함으로서 균을 제거하고, 균주를 최종 volume의 0.5%가 되게끔 각각의 균주를 2.5 mL씩 접종하여 30℃에서 3일간 발효 시키면서 발효 양상을 비교 확인하였다.

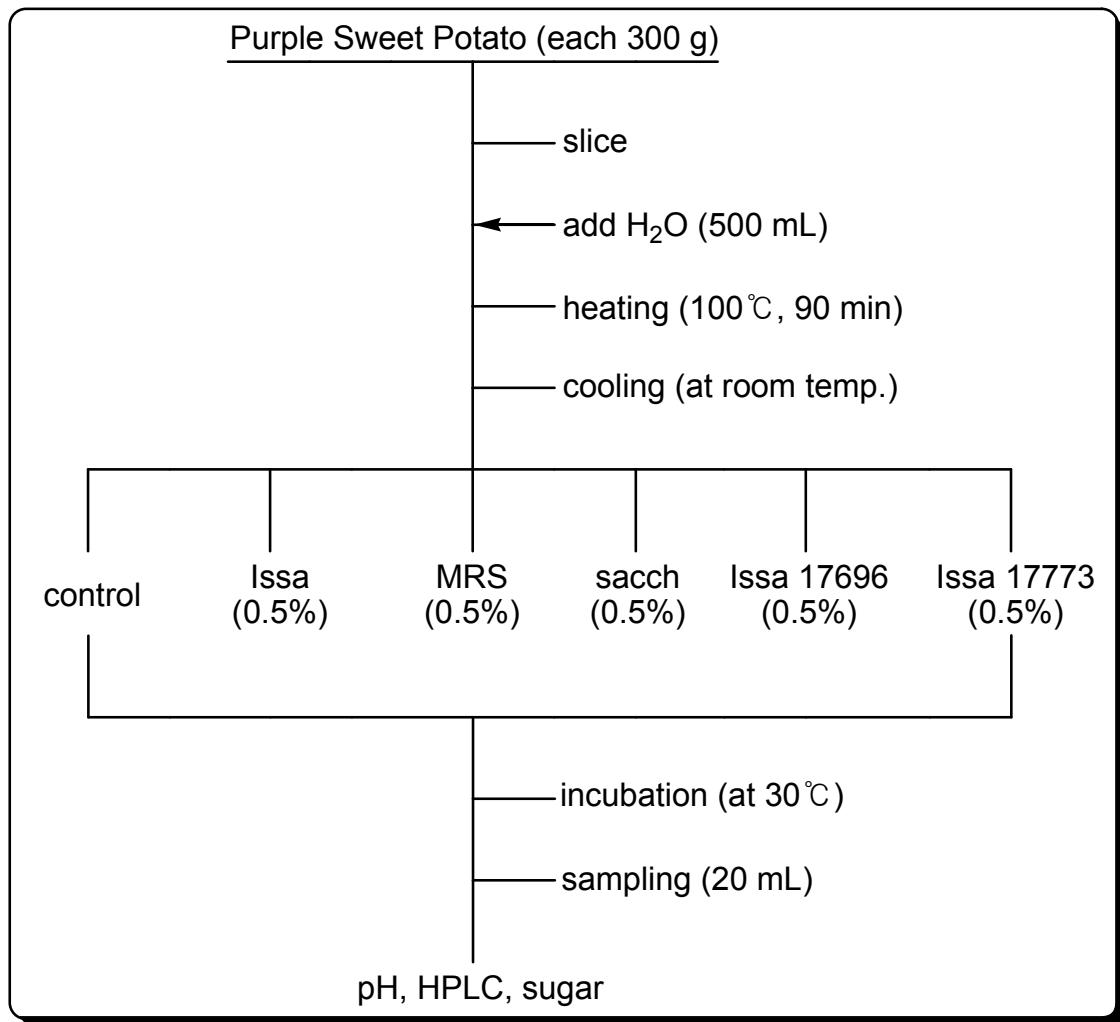


Fig. 균주별 발효



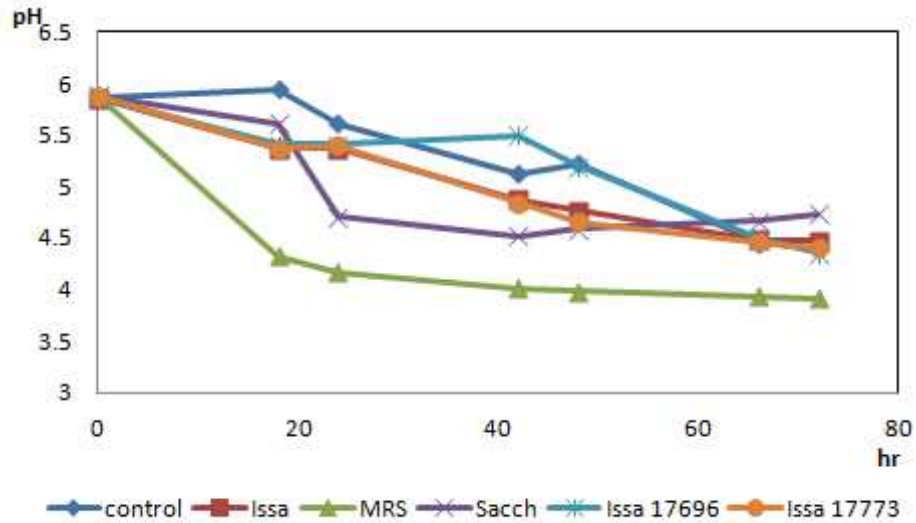


Fig. 균주 별 발효에 따른 pH변화

Issa 균주와 생명자원센터로부터 구입한 Issa1769, Issa 17773균주의 발효에 따른 pH의 변화는 거의 유사하였다. *Saccharomyces* 효모는 발효 1일째 pH가 4.5 까지 떨어졌다가 시간이 경과하면서 다시 pH가 증가하였다. MRS균주는 발효 전 pH 5.8에서 발효가 진행되면서 pH가 3.9까지 감소하였으며 발효에 따른 pH변화를 확인했을 때 Issa균주와 MRS 균주는 전혀 다른 양상의 발효가 일어남을 확인하였다.

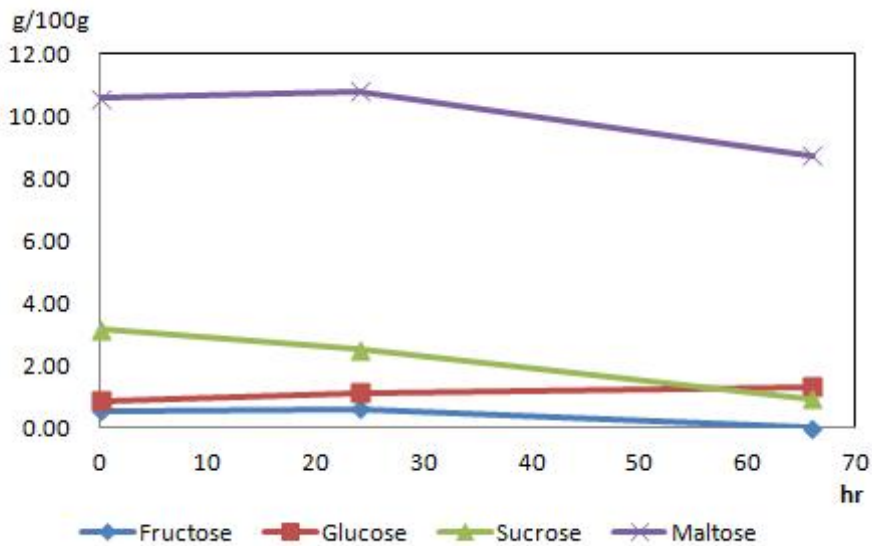


Fig. Control의 발효에 따른 당류변화

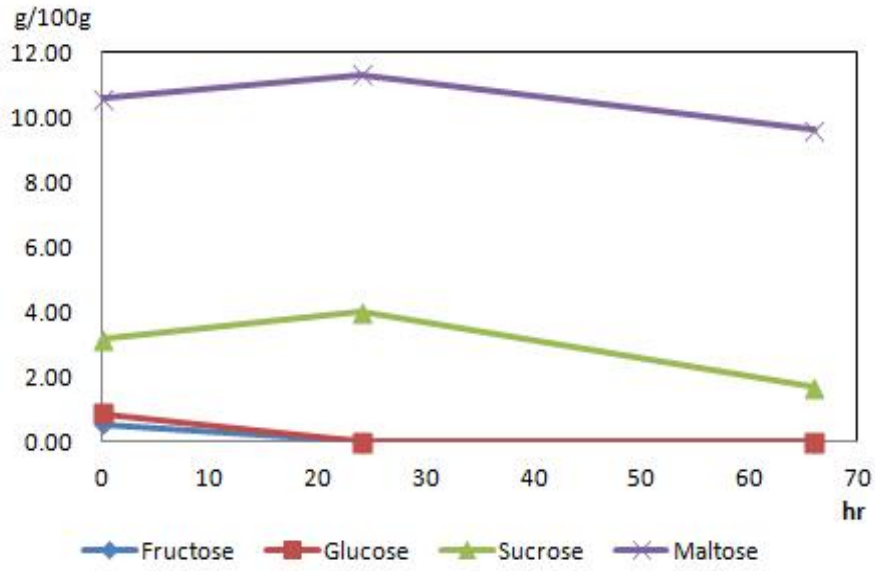


Fig. Issa 균주 접종 시 발효에 따른 당류변화

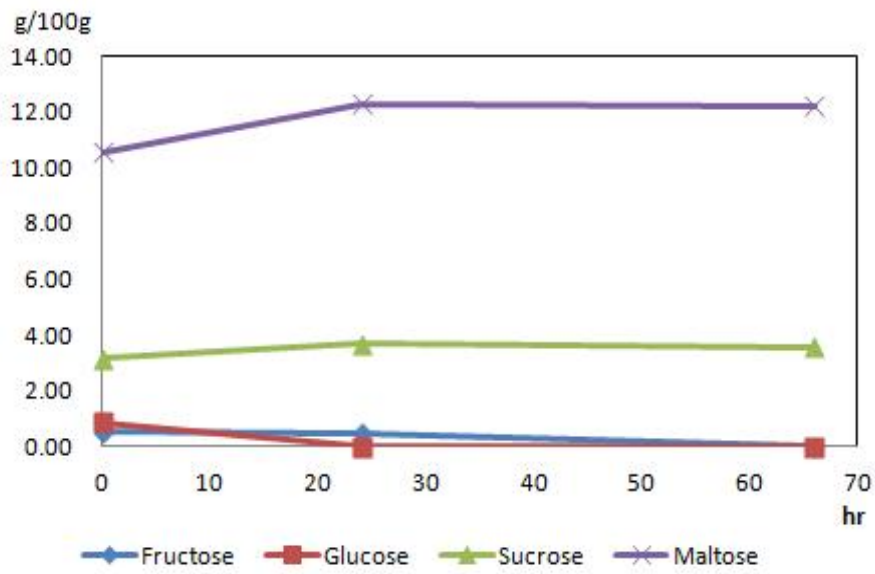


Fig. MRS 균주 접종 시 발효에 따른 당류변화

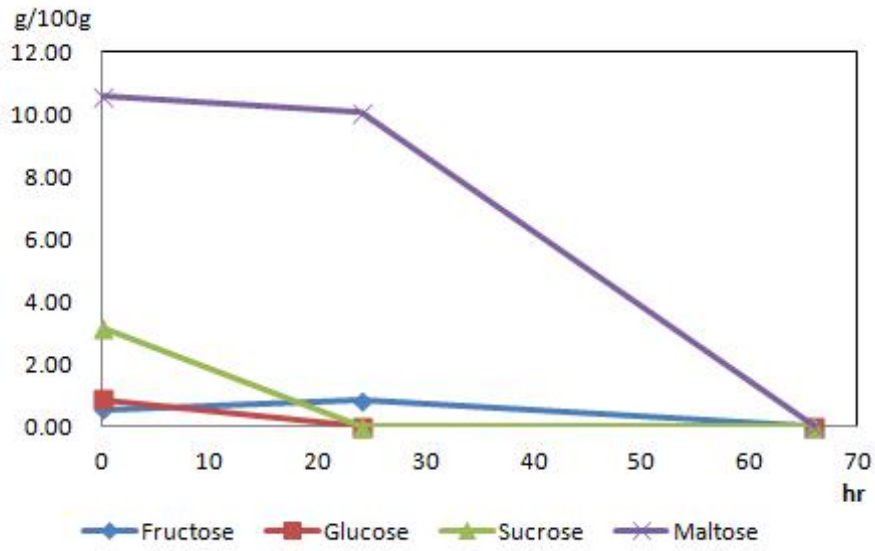


Fig. Saccharomyces 균주 접종 시 발효에 따른 당류변화

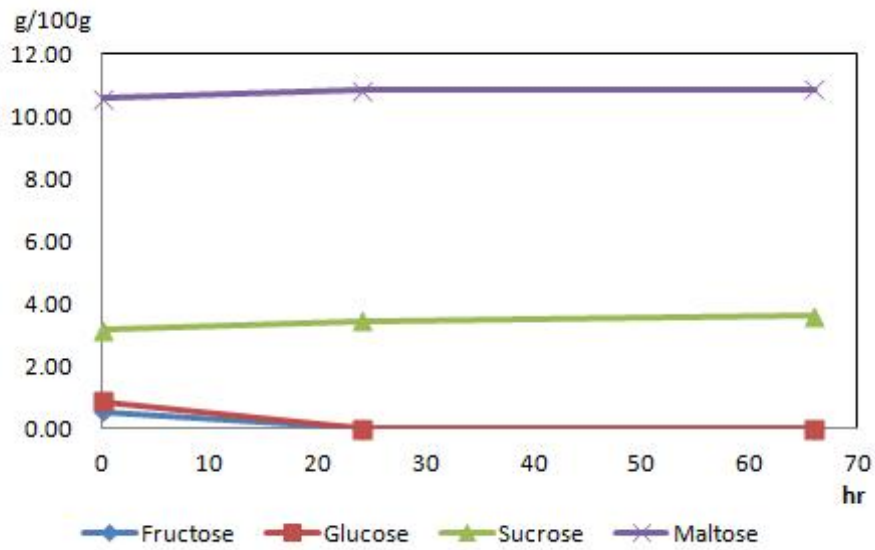


Fig. Issa 17696 균주 접종 시 발효에 따른 당류변화

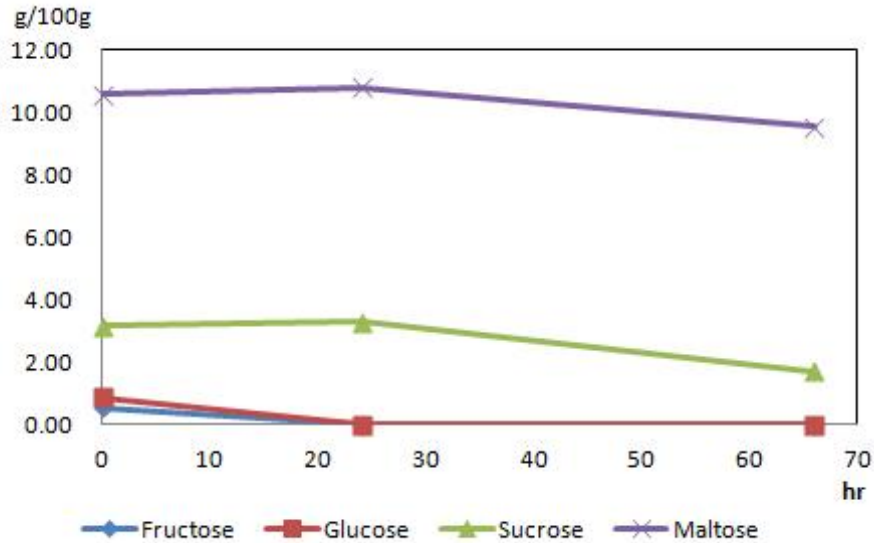


Fig. Issa 17773 균주 접종 시 발효에 따른 당류변화

서로 다른 균주를 사용하여 발효시켰을 때 자색고구마 발효 추출액의 당함량의 변화를 살펴본 결과, 균주를 접종하지 않은 control은 fructose, glucose, maltose의 함량이 감소하였으나 균을 접종한 균과 비교했을 때 당의 변화는 적었다. 한아름영농조합 발효에 사용하고 있는 혼합균주로부터 분리 동정한 Issa균주는 발효 1일째 fructose, glucose의 함량이 0 g/100g으로 감소했으며 sucrose와 maltose도 발효가 진행됨에 따라 함량이 감소하였다. MRS 균주는 fructose와 glucose의 함량이 0 g/100g으로 감소했으며 발효시간이 경과함에 따라 maltose의 함량이 증가하였다. *Saccharomyces*는 모든 당이 발효에 이용되어 발효 3일째 당함량이 0 g/100g으로 감소했다. Issa 17696 균주는 발효 1일째 fructose, glucose의 함량이 0 g/100g으로 감소했으며 sucrose와 maltose 함량의 변화는 거의 나타나지 않았다. Issa 17773 균주는 Issa균주와 가장 유사한 당함량의 변화를 나타냈다. 발효에 따른 당류의 변화를 측정에서도 MRS 균주는 다른 균주와 발효양상의 변화차이가 컸다.

서로 다른 균주를 사용하여 발효시켰을 때 자색고구마 발효 추출액의 안토시아닌 조성 변화를 확인하기 위하여 520 nm에서 HPLC 분석을 실시하였다.

그 결과, 발효에 따른 안토시아닌의 화합물이 다른 화합물로 전환되는 것은 확인하기 어려웠으며, 오히려 발효에 의해 안토시아닌 총량이 더 감소하는 것으로 확인되었다.

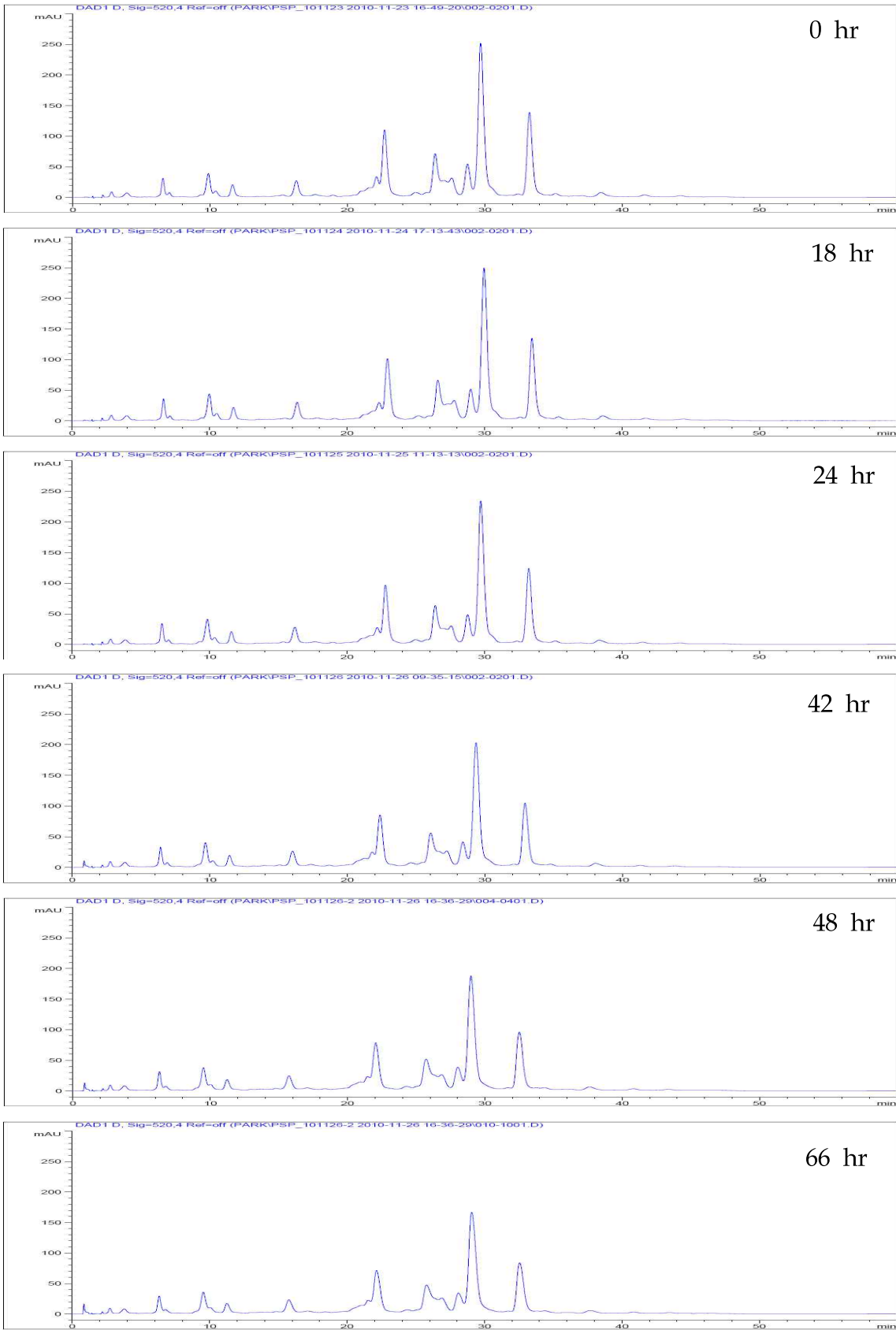


Fig. control 시간경과에 따른 HPLC chromatogram (520 nm)

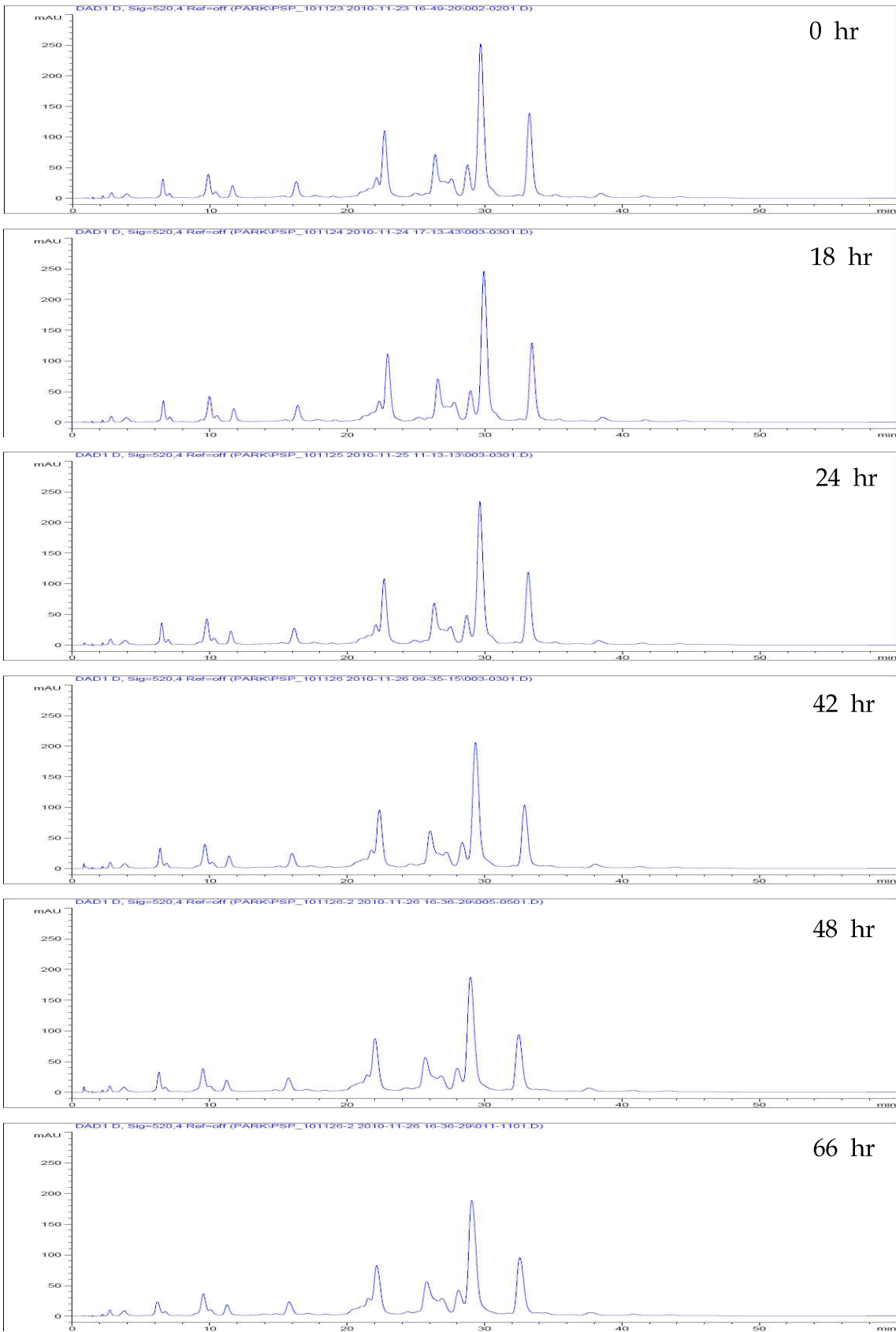


Fig. Issa-gunju의 발효에 따른 HPLC chromatogram (520 nm)

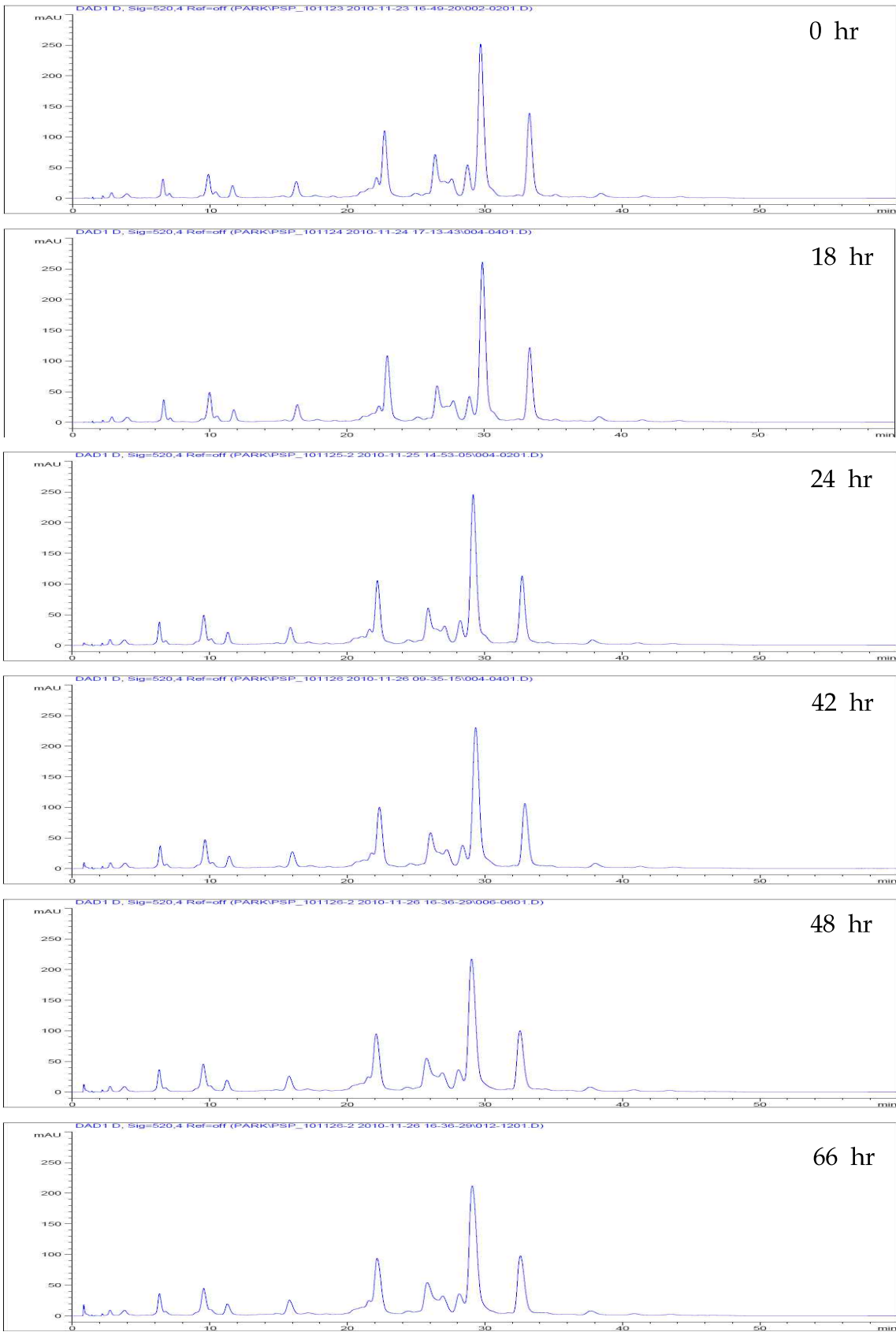


Fig. MRS균주의 발효에 따른 HPLC chromatogram (520 nm)

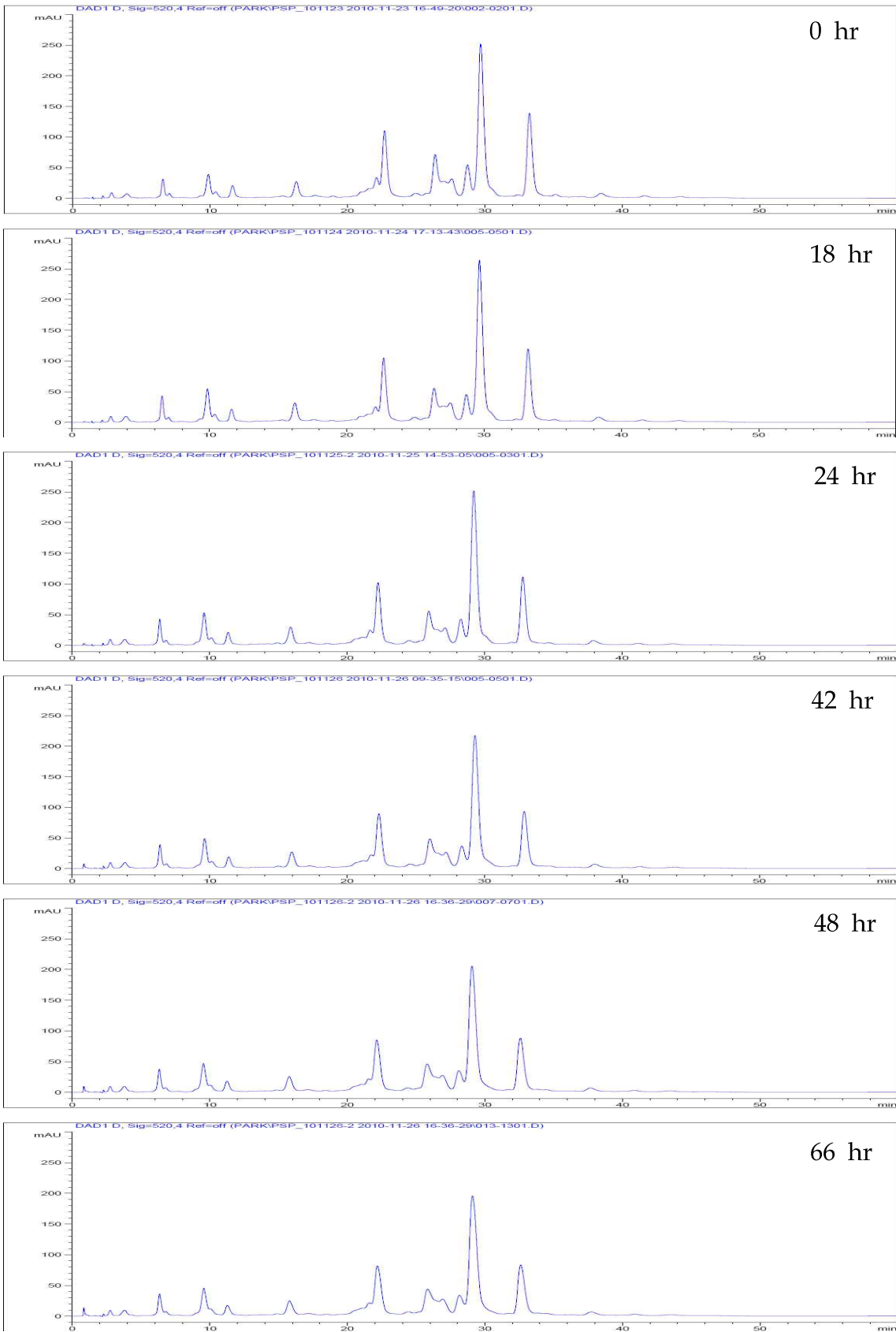


Fig. *Saccharomyces* 균주의 발효에 따른 HPLC chromatogram (520 nm)



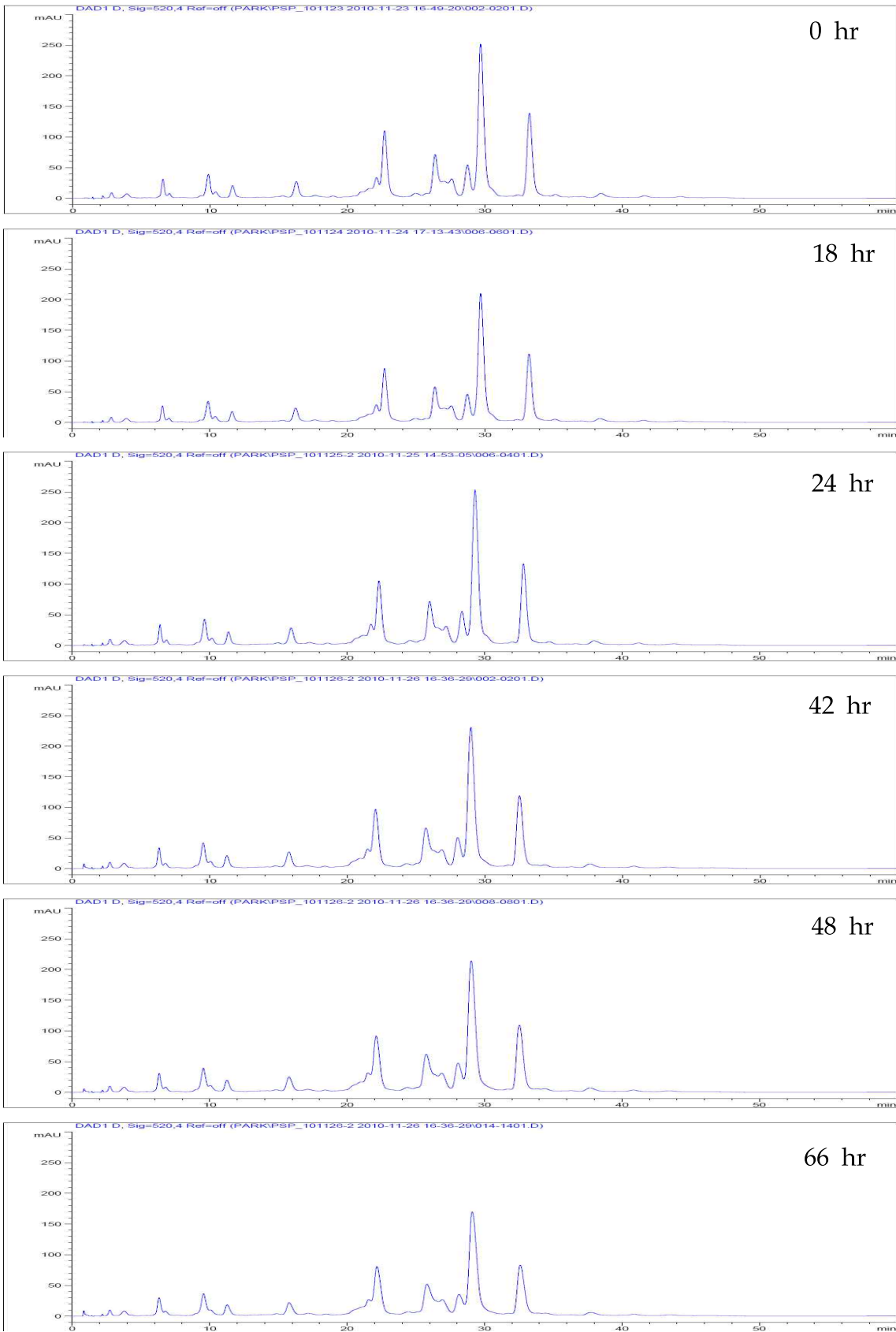


Fig. Issa 17696 균주의 발효에 따른 HPLC chromatogram (520 nm)

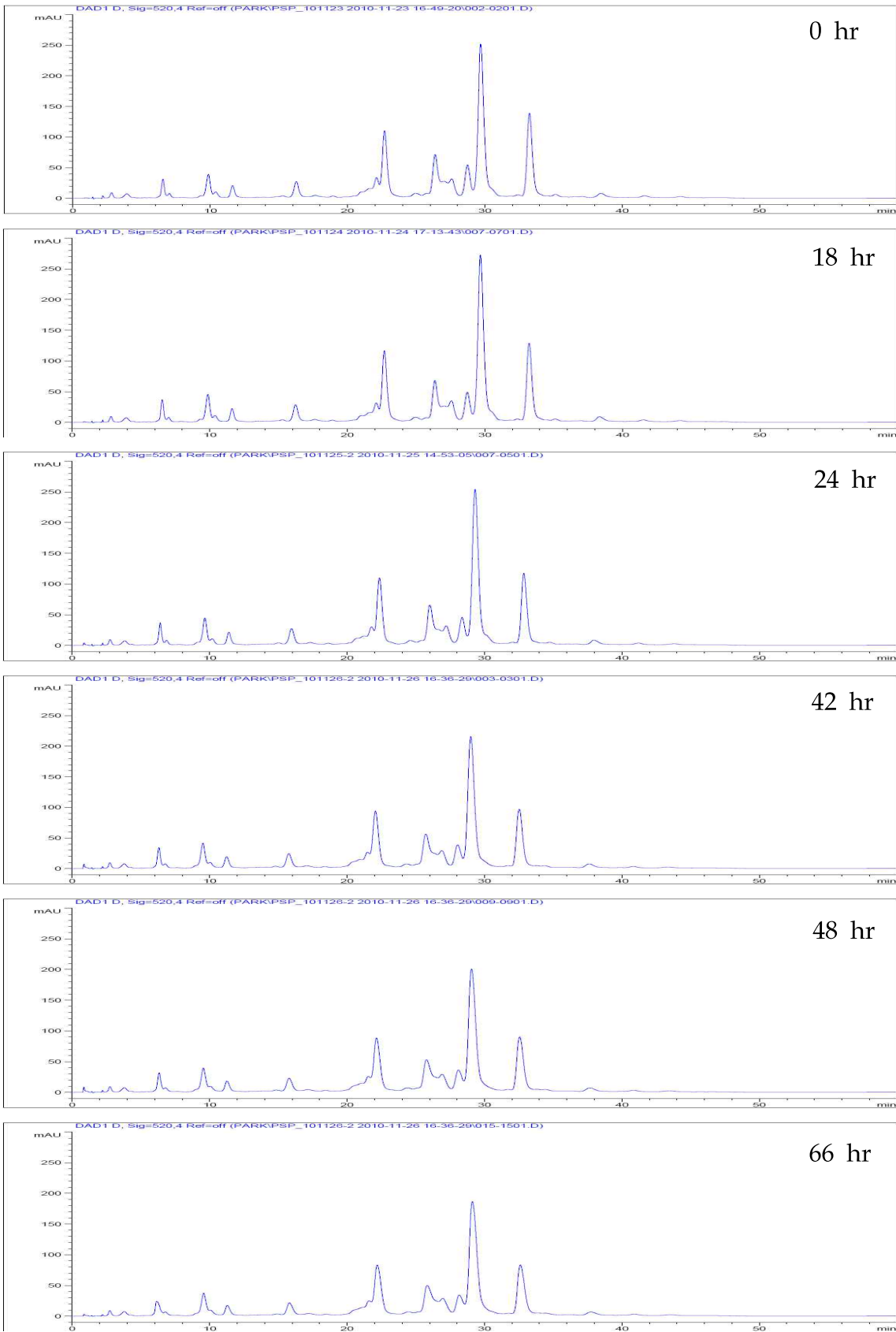


Fig. Issa 17773균주의 발효에 따른 HPLC chromatogram (520 nm)

## 5. 용존산소(산소 전달) 농도에 따른 색소의 변화

300 ml의 삼각 플라스크에 50, 100, 150, 250 ml의 자색고구마 발효액을 넣고 2일간 추가적으로 배양한 결과 배양액의 색도와 안토시아닌의 조성이 변화함을 알 수 있었다. 특히 산소의 전달이 되지 않는 250 ml의 경우 혐기 배양에 가까운 조건이었다. 산소의 전달량이 작은 경우 HPLC의 후반부에 나타나는 유효 안토시아닌 성분이 거의 다 사라진 것을 알 수 있었으며 이는 향후 발효조건의 규명에서 산소가 유효 안토시아닌의 안정성을 유지하는데 중요하게 고려해야 할 인자임을 보여주고 있다

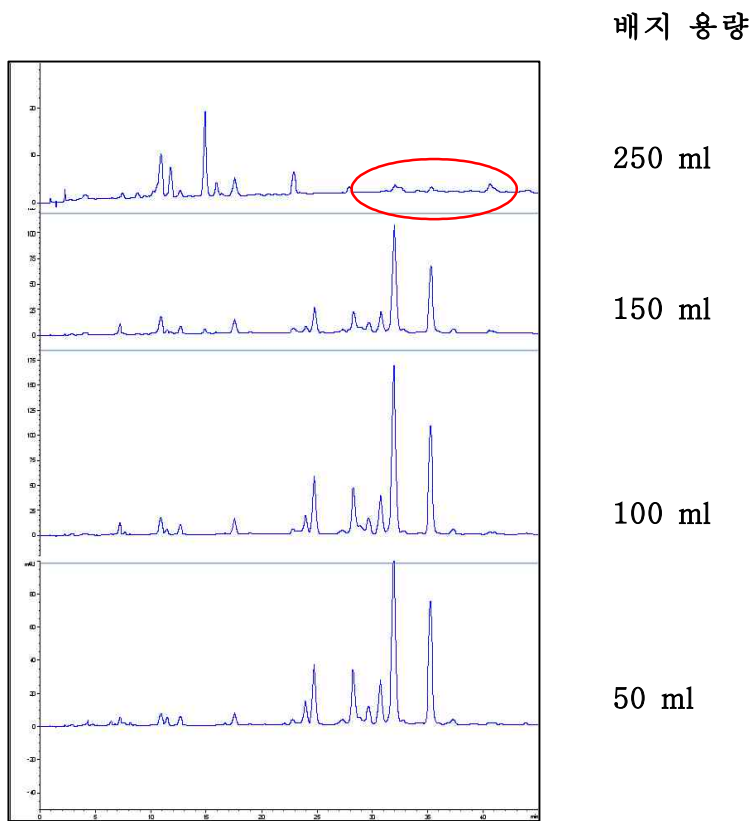


Fig. 5-1. Effect of aeration rate on the anthocyanin composition of purple sweet potato during fermentation.

## 6. 자색고구마 발효조건 확립

### 가. 자색고구마 추출물의 발효 조건 확립 - Lab 발효

#### (1) 자색고구마 발효 (Issa 0.5%) 추출물 제조

한아름영농조합에서 사용하고 있는 혼합균주로부터 단리한 균주와 이와 유사한 효모균 수종을 구입하여 발효 양상을 비교확인 해 본 결과, 지금까지 한아름영농조합에서 생산하여 판매하고 있는 제품과 가장 유사한 발효양상을 보이는 균주가 혼합균주로부터 단리한 Issa 균주이었고, 각 균주별 발효 추출물의 관능적인 성상을 비교한 결과 맛과 향에 있어서도 단리한 Issa 균주가 가장 높은 호감도를 나타내었기에 이후의 발효공정을 확립의 실험에는 Issa 균주를 이용하였다.

일정한 크기로 slicing 한 자색고구마 300 g에 물 500 mL를 첨가한 후 100℃에서 90분간 가열 처리 후 냉각시킨 가열 추출액에 발효균주 (Issa)를 0.5% 접종한 뒤 30℃ 인큐베이터에서 3일간 발효 추출하였다. 발효 시작으로부터 3일 후에 추출물을 원심분리한 후 상층액을 동결 건조시켜 분말형태의 추출물을 얻었다.

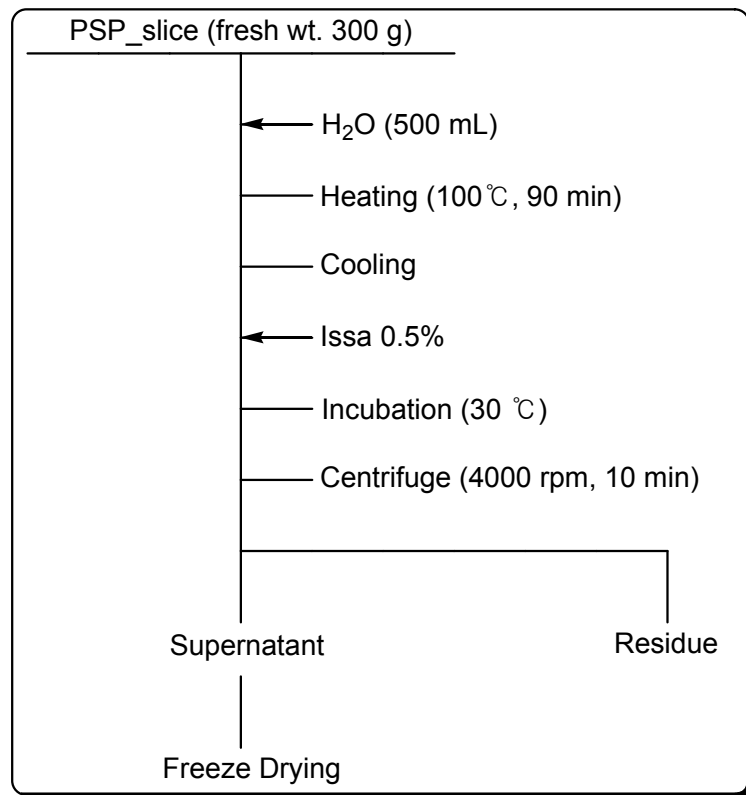


Fig. 6-1. 자색고구마 발효 추출물제조방법

## (2) 발효 추출물 pH 변화

발효가 진행 중인 자색고구마 발효 추출물을 일정 시간별로 샘플링하여 pH를 측정함으로써 발효의 진행 양상을 확인해 보았다.

Sampling Time	pH
0 hr	5.91
15 hr	4.27
24 hr	3.86
39 hr	4.20
47 hr	4.29
63 hr	4.34
70 hr	4.30

발효가 진행되면서 발효액의 pH가 일정 수준으로 감소하다가 더 이상 감소하지 않는 것으로 확인되어 1차년도에 각 균주별로 발효 했을 때 한아름 영농조합에서 사용하는 혼합균주로 정상적인 발효가 진행되었을 때 나타나는 현상과 동일한 것으로 확인되어 단일균주에 의한 발효가 정상적으로 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었다.

## (3) 발효 시간별 안토시아닌 조성 변화 확인

발효 시간별 발효 추출물을 소량씩 취하여 520 nm에서 HPLC 분석을 실시하여 얻어진 크로마토그램을 비교하여 발효 시간별 안토시아닌 조성을 비교하였다. 본 실험에 사용된 HPLC 분석조건은 아래와 같다.

- Wavelength: UV detector 520 nm
- Column: Shimpack XR-ODS 3.0×50 mm
- Oven: 30 °C
- Injection vol.: 20 µL
- Flow rate: 0.25 mL/min
- Mobile phase:

min	A	B
	H <sub>2</sub> O (0.1% formic acid)	50% MeCN (0.1% formic acid)
0	85	15
25	60	40
40	30	70
42	85	15
50	85	15

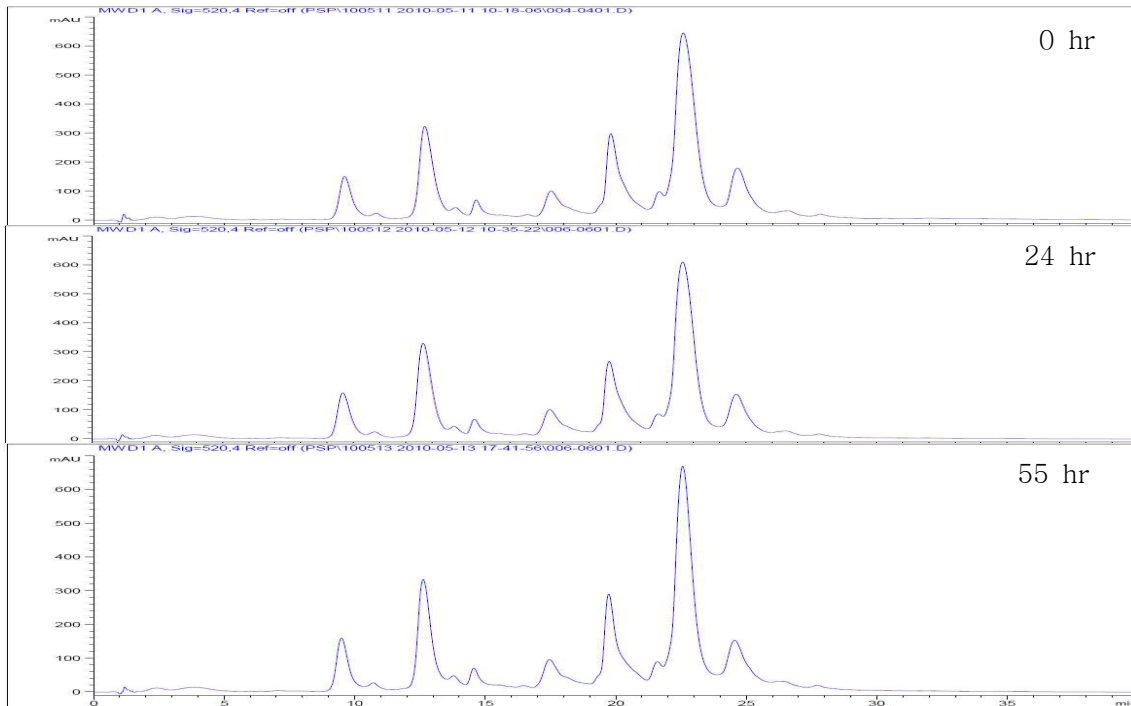


Fig. 6-2. Issa 접종 발효 추출물의 chromatogram

그 결과, 발효 추출물은 발효 시간의 경과에 따라 각 안토시아닌의 함량이 감소하지 않음을 확인하였다. 즉, 발효에 의해 개별 안토시아닌의 함량이 감소하거나 분해되지 않음을 확인할 수 있었다.

발효가 진행되면서 안토시아닌의 함량에 변화는 없으나 당 함량의 변화는 어떻게 진행되는지를 확인해 보기위해 발효 시간별로 얻어진 추출물을 대상으로 당 함량분석을 실시하였다.

#### (4) 발효 시간별 당 함량 변화 확인

- Detector: RI detector
- Column: 250 mm x 4.6 mm, Prevail Carbohydrate/Waters N92702
- Oven: 40 °C
- Injection vol. 20 µL
- Flow rate: 1 mL/min
- Mobile phase: 75% MeCN

(계산)

$$\text{당함량 (mg/100 g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{검체채취량 (g)}} \times \frac{100}{1000}$$

S : 시험용액 중의 당질의 농도 (ug/mL)

a : 시험용액의 전량 (mL)

b : 희석배수

(단위: g/100 mL)

		Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose
발효전		0.28	0.39	1.63	3.65
발효	1일	-	-	1.59	3.42
	2일	-	-	1.61	3.42
	3일	-	-	1.62	3.64
FD powder (g/100g)		-	-	17.9	52.3

발효전 Fructose 0.28 g/100 mL, Glucose 0.39 g/100 mL, Sucrose 1.63 g/100 mL, Maltose 3.65 g/100 mL 이었다. 발효 1일 Sucrose 1.59 g/100 mL, Maltose 3.42 g/100 mL, 발효 2일 Sucrose 1.61 g/100 mL, Maltose 3.42 g/100 mL, 발효 3일 Sucrose 1.62 g/100 mL, Maltose 3.64 g/100 mL으로 분석되었다. 발효기간 중 Sucrose와 Maltose만 존재하였으며 이들 당의 함량은 발효기간 동안 거의 변화가 없었다. 이 결과로 볼 때 Issa에 의해 발효가 진행되면 자색고구마에 함유되어있는 당류들 중에서 fructose와 glucose 만을 영양원으로 사용하는 것을 알 수 있었다. 이 결과로부터 자색고구마를 발효 추출하고자 할 때 발효 추출물의 당 함량 분석결과를 가지고도 발효가 진행되어지는 정도를 관리할 수 있는 품질 지표로 사용할 수 있을 것으로 생각되어진다.

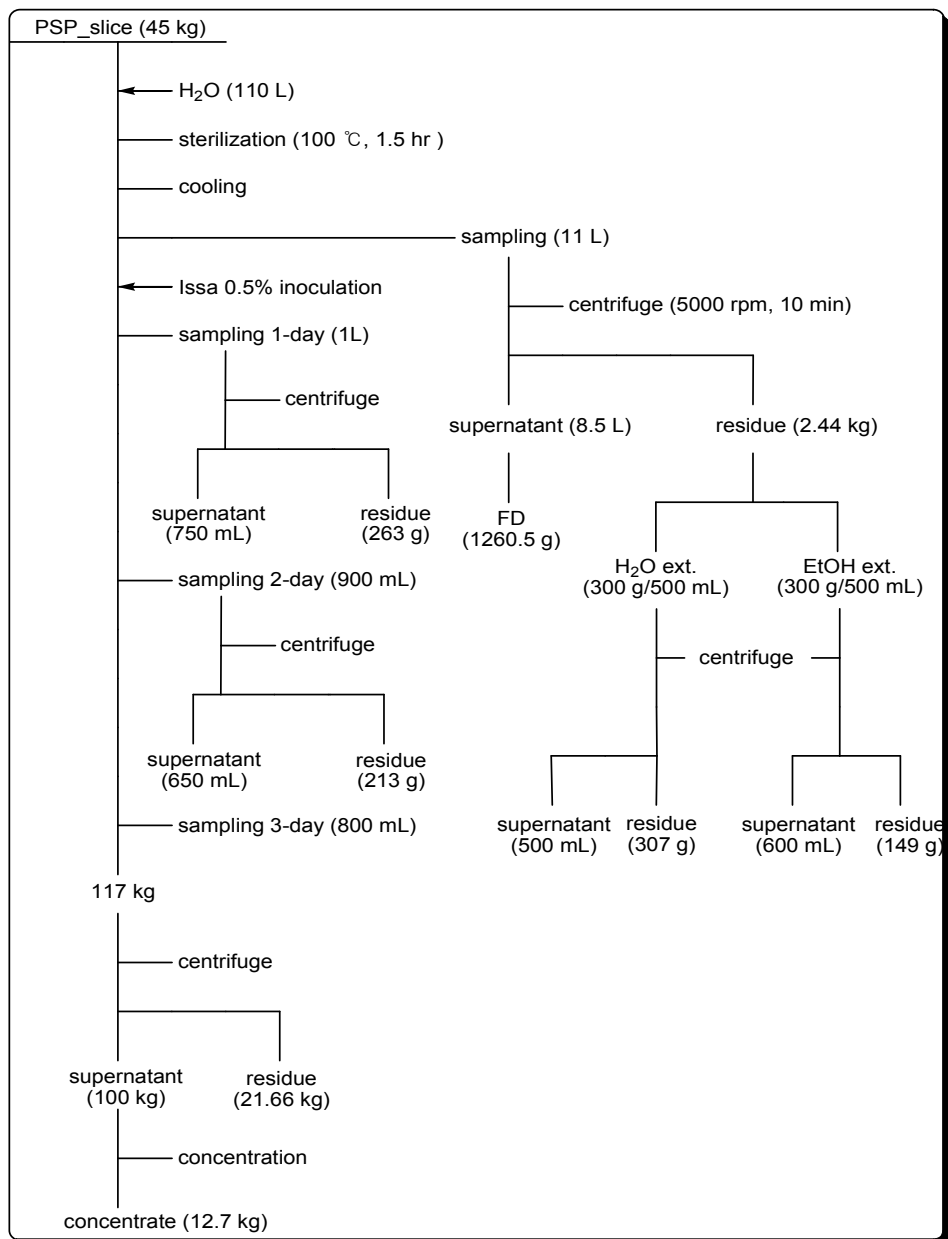
## 나. 자색고구마 추출물의 발효 조건 확립 - Pilot 발효

### (1) 1차 pilot 발효

#### (가) 자색고구마 pilot 발효 추출물 제조

Lab 발효에서 얻어진 결과를 토대로 이번에는 발효의 scale을 더 크게 하여 pilot 상태에서 자색고구마를 발효 추출해보기로 하였다.

Slice한 자색고구마 45 kg에 물 110 L를 첨가한 후 100℃에서 90분간 가열 처리 한 후 이를 30℃정도까지 냉각시킨 후 Issa 균주를 0.5% 접종하여 30℃에서 3일간 발효를 진행하였다. 추출 및 샘플링 과정은 다음과 같다.





(나) 발효 추출물 pH 변화

Sampling Time		pH
발효전		5.64
발효	1일	4.13
	2일	4.14
	3일	4.15

Lab 발효에서 얻어진 발효 추출액의 pH 변화와 거의 유사하게 1차 pilot 발효에서 pH 변화 양상을 보여 pH를 지표로 한 pilot 발효에서는 Lab 발효와 거의 유사함을 확인 하였다.

(다) 발효 시간별 안토시아닌 조성 변화 확인

발효 시간별 발효 추출물을 소량씩 취하여 520 nm에서 HPLC 분석을 실시하여 얻어진 크로마토그램을 비교하여 발효 시간별 안토시아닌 조성을 비교하였다. 본 실험에 사용된 HPLC 분석조건은 아래와 같다.

- Wavelength: 520 nm
- Column: Waters Sunfire (4.6×150 mm)
- Column Oven: 30℃
- Injection volume: 20 ul
- Flow rate: 1.0 ml/min
- Mobile phase:

time (min)	A	B
	H <sub>2</sub> O (0.1% TFA)	50% MeCN (0.1% TFA)
0	75	25
45	60	40
47	75	25
60	75	25

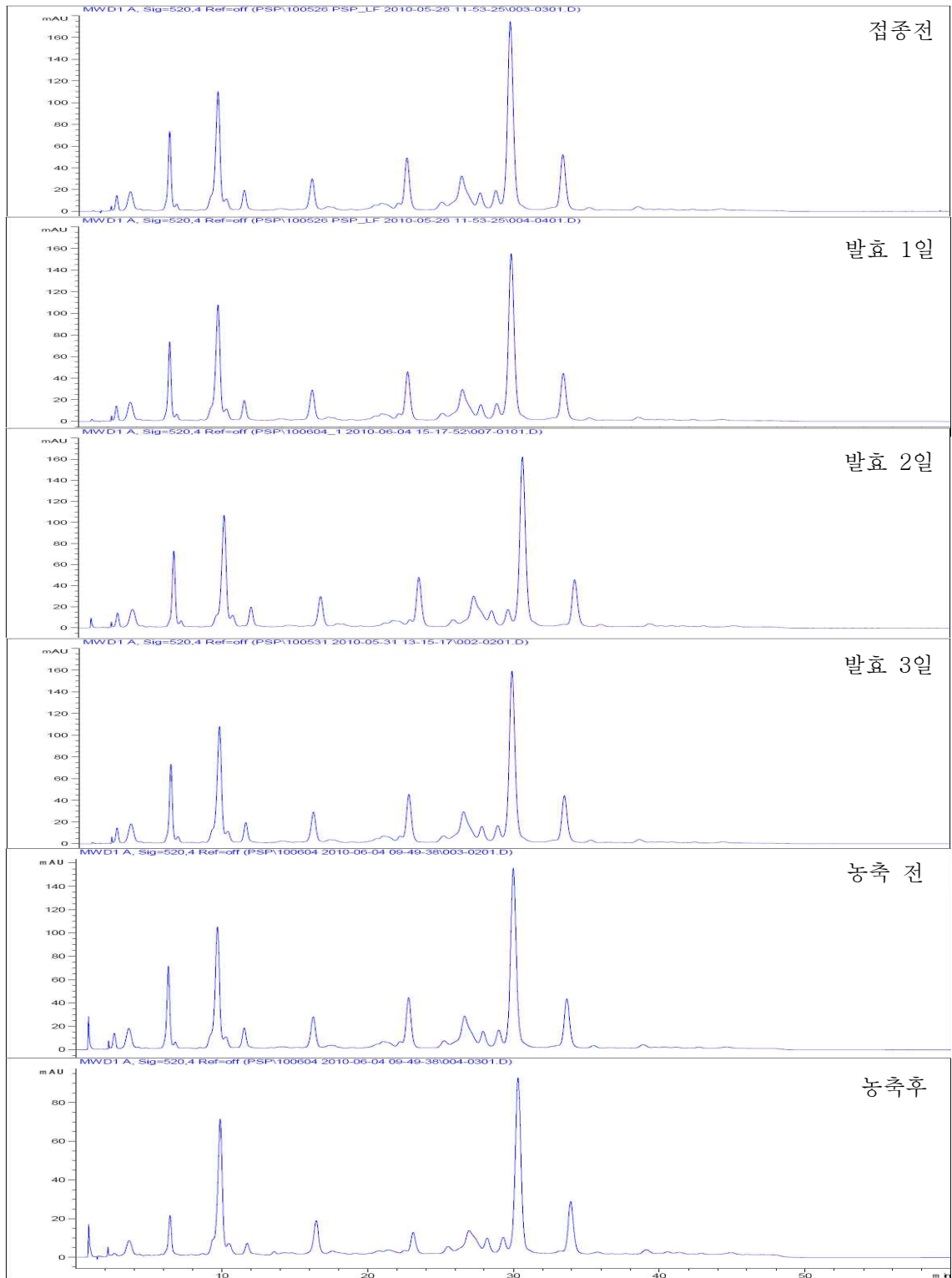


Fig. 6-3. 1차 pilot 발효 추출물 HPLC chromatogram

HPLC에 의한 안토시아닌 조성 변화에 있어서도 Lab 발효에서와 마찬가지로 발효가 진행되어도 안토시아닌 조성의 변화가 없는 것으로 확인되어 발효에 의한 안토시아닌의 분해나 함량 감소는 없는 것으로 확인되어 발효시간의 경과에 따른 당 함량 분석을 실시하였다.

(라) 발효 시간별 당 함량 변화 확인

(단위 g/100mL)

		Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose
발효전		0.29	0.40	1.27	2.29
발효	1일	-	-	-	0.98
	2일	-	-	-	-
	3일	-	-	-	-
FD powder (g/100g)		-	-	-	-

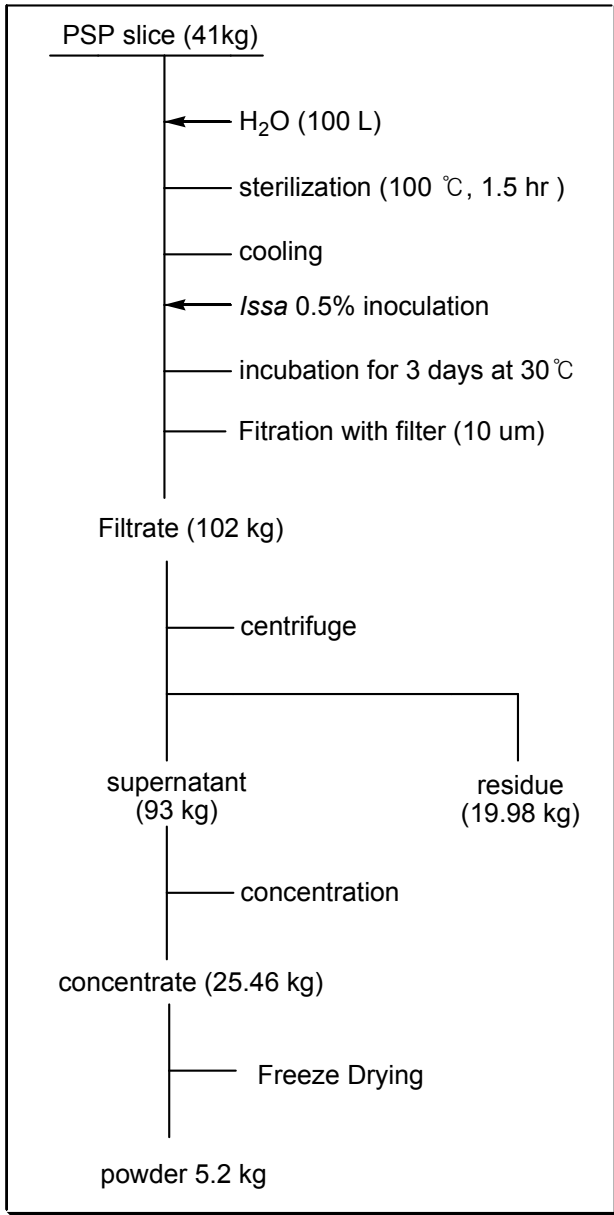
발효 전 Fructose 0.29 g/100 mL, Glucose 0.40 g/100 mL, Sucrose 1.27 g/100 mL, Maltose 2.29 g/100 mL이었다. 발효 1일 Maltose 0.98 g/100 mL으로 Maltose 이외의 다른 당은 확인되지 않았으며 발효 2일, 3일에는 당이 존재하지 않았으며 발효추출물을 동결건조하여 얻은 분말에도 단당이 전혀 확인되지 않았다.

발효기간 중 단당류의 함량변화를 볼 때 Lab 발효와 발효 양상이 전혀 다름을 확인할 수 있다. 안토시아닌 색소나 pH의 변화 양상은 Lab발효에서와 거의 유사하게 일어났지만 당 함량의 변화가 전혀 다른 양상을 보였으며 1차 pilot 발효추출액에서는 lab 발효와 달리 특유의 시큼한 냄새가 나서 관능적인 면에서 볼 때 상품성이 크게 떨어지는 상태이었다. 이 현상에 대한 원인을 사르펴본 결과, 발효가 진행되는 동안 발효조 내의 산소량이 충분하지 않아서 발효가 이상발효로 진행되어져서 나는 관능적인 부분에서의 품질저하로 판단되어 발효조 내의 산소량을 충분히 공급하여 다시 한 번 pilot에서 발효를 진행해 보기로 하였다.

(2) 2차 pilot 발효

(가) 자색고구마 pilot 발효 추출물 제조

1차 pilot 발효에서 얻어진 결과를 토대로 이번에는 발효조 내의 용존산소량을 증가하여 자색고구마 발효 추출을 진행하기로 하였다. 추출 및 샘플링 과정은 다음과 같다.



(나) 발효 추출물 pH 변화

Sampling Time		pH
발효 전		5.45
발효	1일	5.77
	2일	6.14
	3일	5.91

(다) 발효 시간별 안토시아닌 조성 변화 확인

발효 시간별 발효 추출물을 소량씩 취하여 520 nm에서 HPLC 분석을 실시하여 얻어진 크로마토그램을 비교하여 발효 시간별 안토시아닌 조성을 비교한 결과 발효에 의해 오히려 총안토시아닌의 함량은 감소함을 확인하였다.

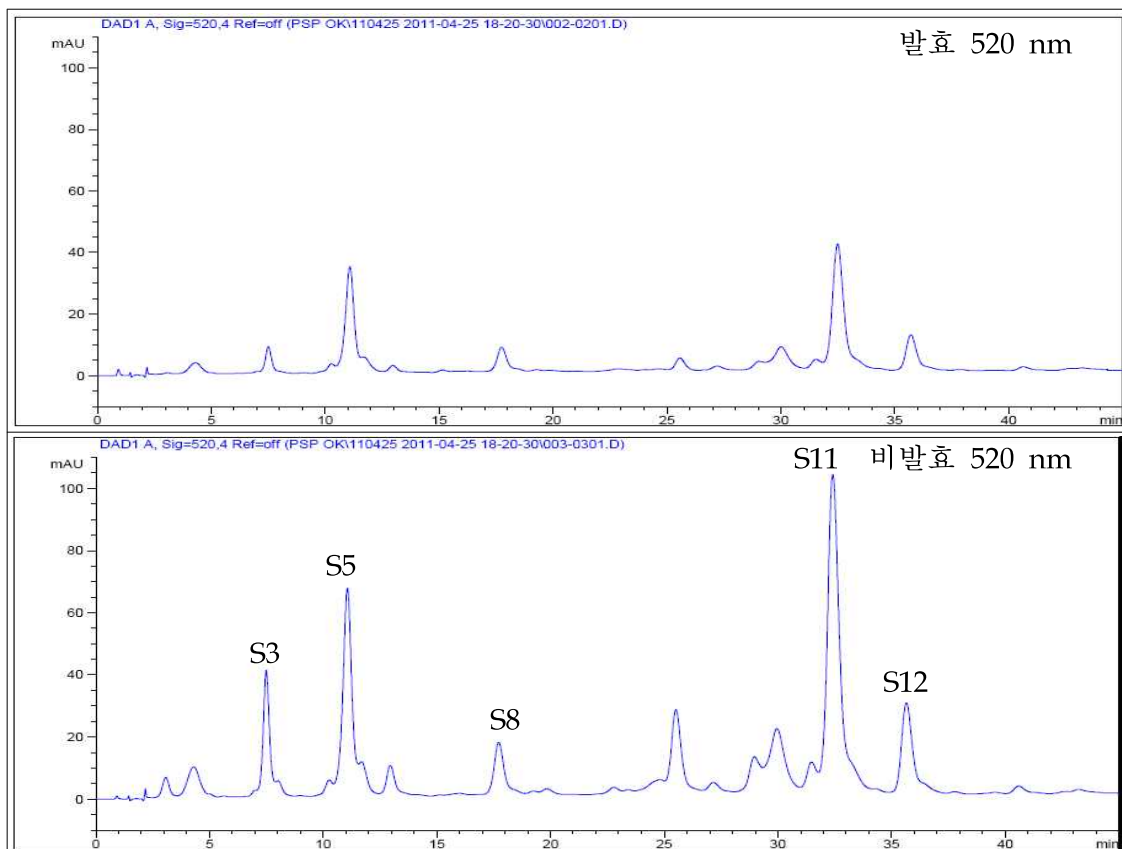
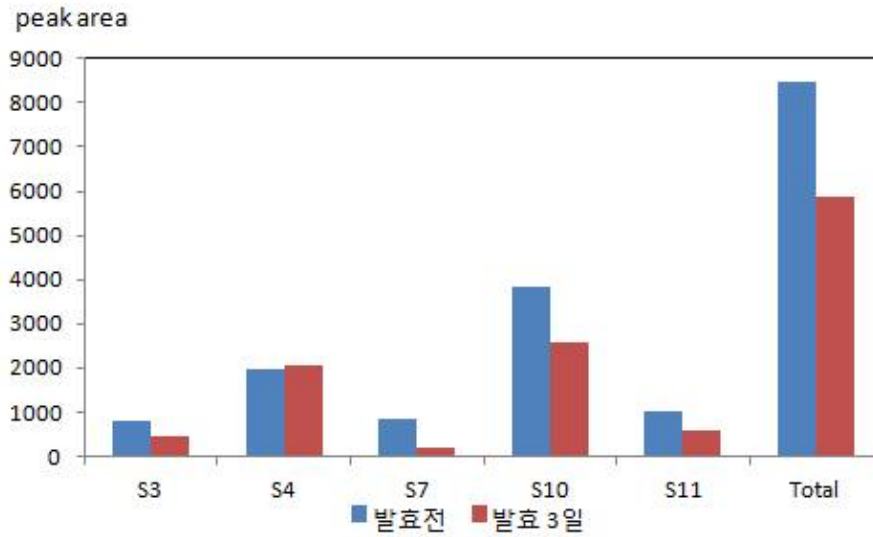


Fig. 6-6. 발효에 의한 차이 비교 (520 nm)



이에 안토시아닌이 아닌 다른 화합물의 발효에 의한 변화를 확인해 보기 위하여 520 nm가 아닌 다른 UV 영역에서의 화합물 변화를 관찰하였다.

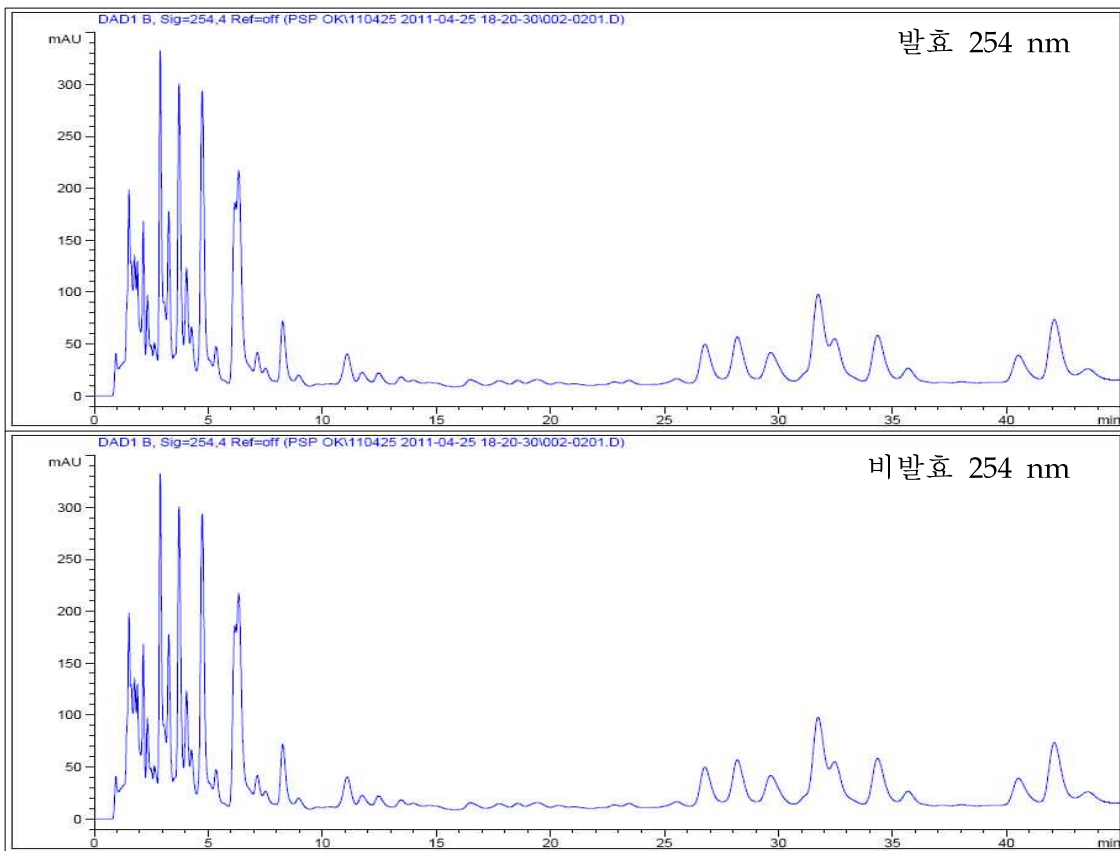


Fig. 6-6. 발효에 의한 차이 비교 (254 nm)

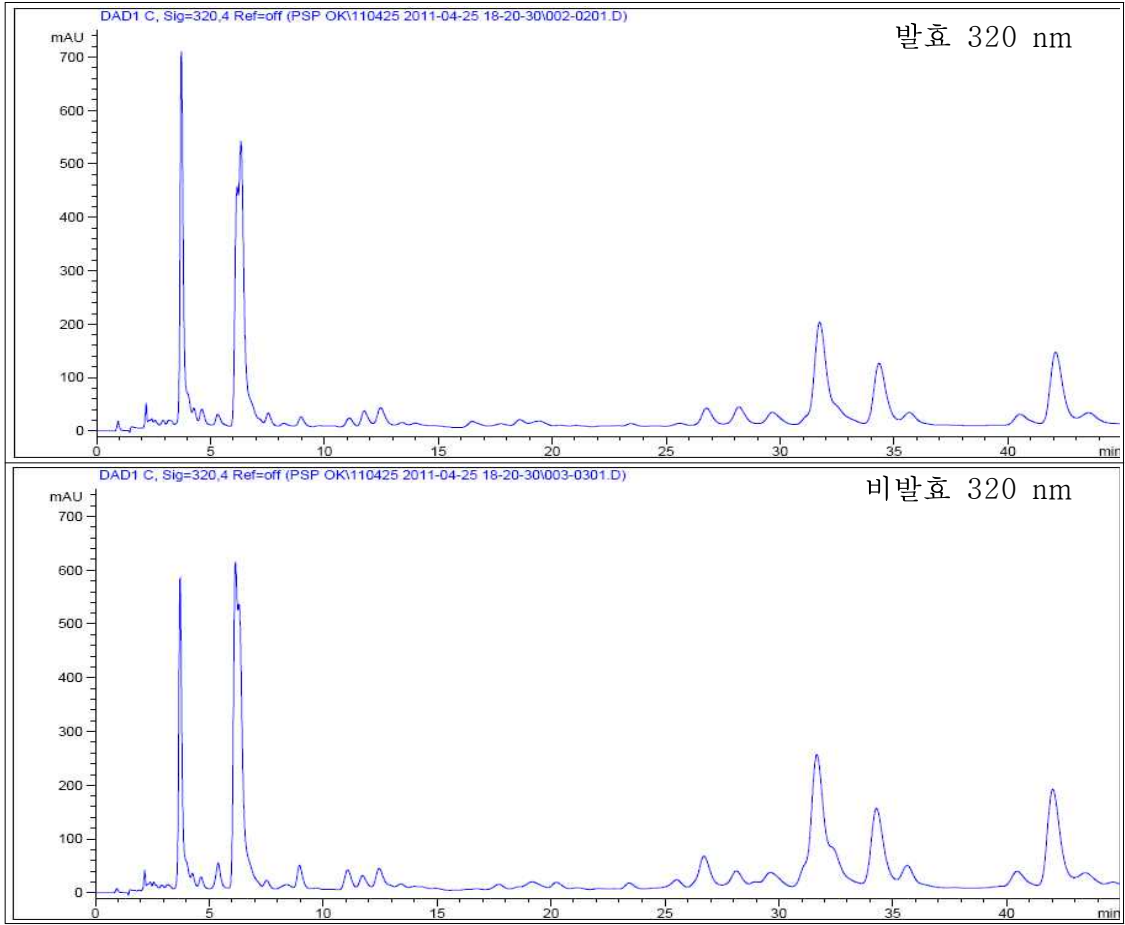
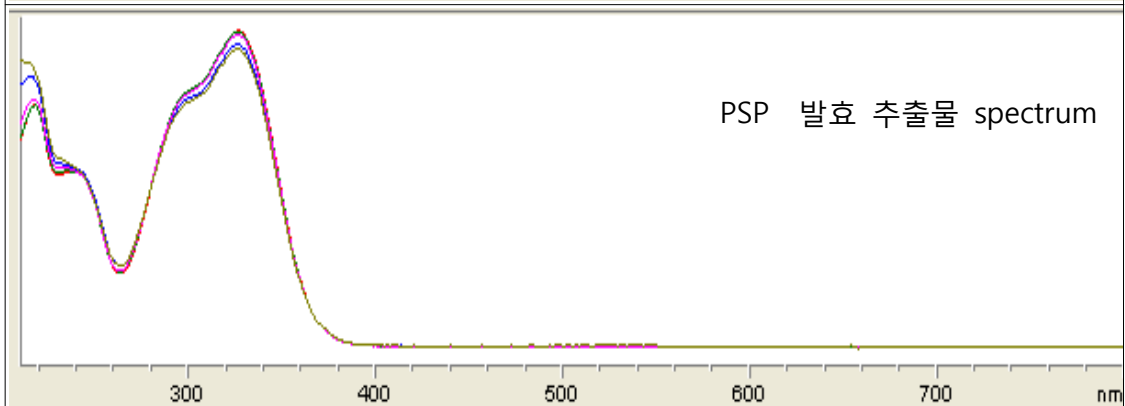
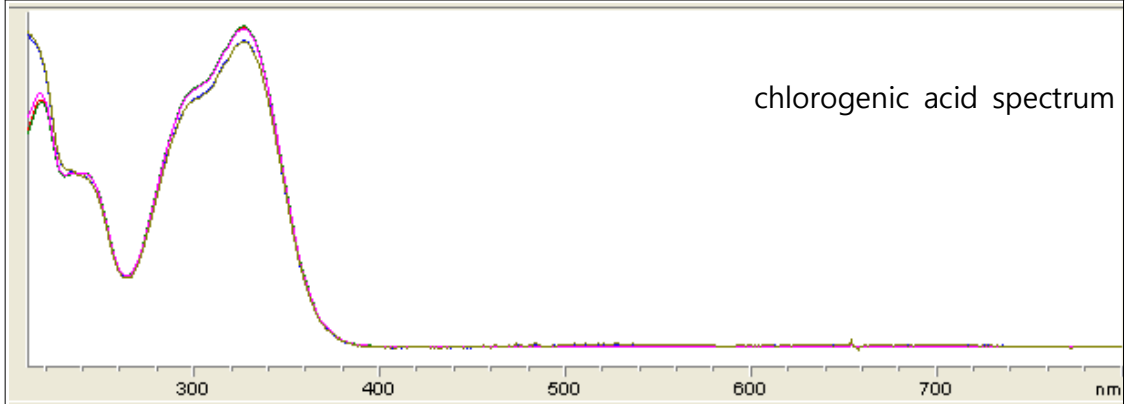
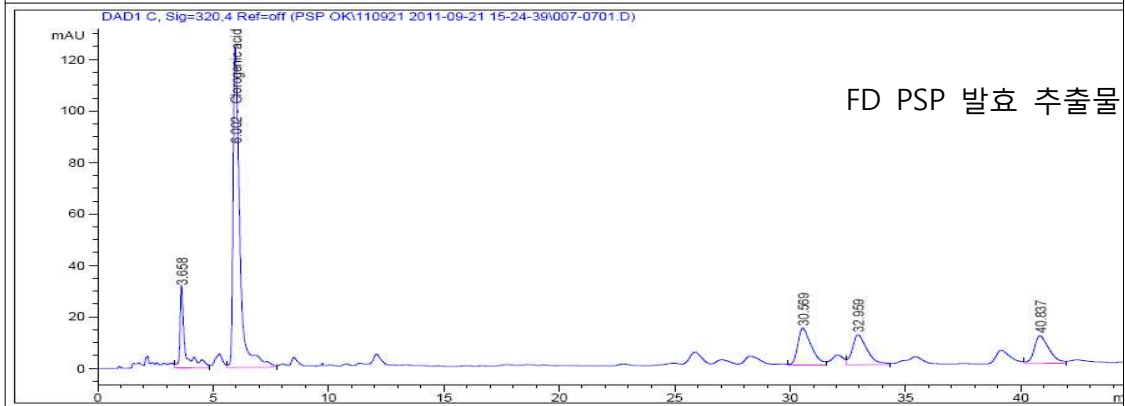
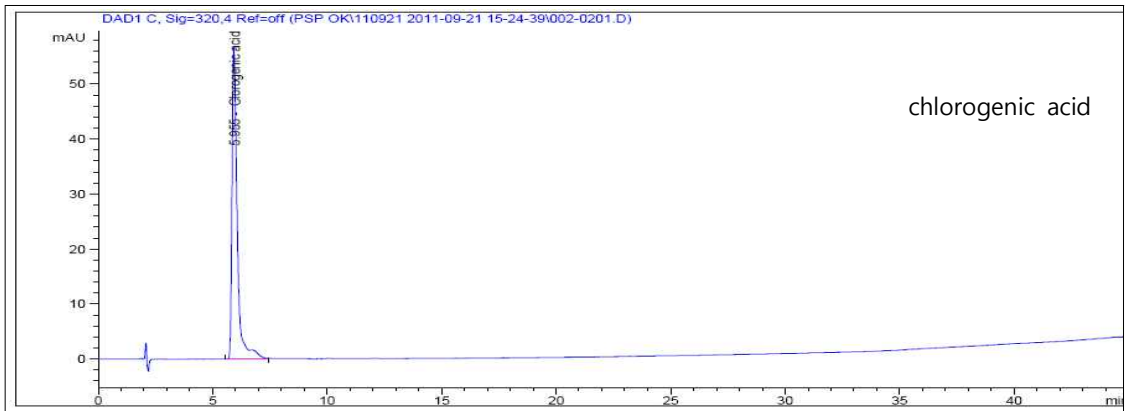


Fig. 6-7. 발효에 의한 차이 비교 (320 nm)

그 결과(Fig. 6-5 ~ 6-7), 254 nm에서는 발효에 의한 화합물의 변화는 없는 것으로 보이며, 320 nm에서 retention time ( $t_R$ ) 4 min 및 6 min에 있는 peak의 화합물은 증가한 반면 retention time ( $t_R$ ) 25 min 이후의 peak의 화합물은 감소함을 확인하였다. 320 nm에서  $t_R$  4 min 및 6 min의 peak는 phenolic compound인 것으로 추측 되었으며, 특히 6 min의 peak는 chlorogenic acid peak로 이 화합물에 대한 구조 확인은 PDA 분석을 실시하여 확인하였다(아래 그림 참고). 즉, 발효에 의해 자색고구마에 함유된 안토시아닌 색소 관련 화합물은 약간 감소하는 경향을 보이지만, 안토시아닌 색소가 아닌 다른 phenolic compound는 약간 그 함량이 증가하거나 거의 함량이 변화하지 않는 것을 확인할 수 있었다.





(라) 발효 시간별 당 함량 변화 확인

(단위 g/100mL)

		Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose
발효전		0.35	0.48	1.41	2.31
발효	1일	-	-	1.50	2.50
	2일	-	-	1.65	2.68
	3일	-	-	1.74	2.50
FD powder (g/100g)		-	-	21.8	28.6

발효 전 Fructose 0.35 g/100 mL, Glucose 0.48 g/100 mL, Sucrose 1.41 g/100 mL, Maltose 2.31 g/100 mL 이었다. 발효 1일 Sucrose 1.50 g/100 mL, Maltose 2.50 g/100 mL, 발효 2일 Sucrose 1.65 g/100 mL, Maltose 2.68 g/100 mL, 발효 3일 Sucrose 1.74 g/100 mL, Maltose 2.50 g/100 mL으로 분석되었다. 발효기간 중 Sucrose와 Maltose만 존재하였으며 함량이 발효기간 동안 거의 변화가 없었다. 발효추출물을 동결 건조하여 얻은 분말에 Sucrose 21.8 g/100g, Maltose 28.6 g/100g으로 분석 되었다. 발효기간 중 단당의 함량변화로만 볼 때 lab발효와 발효 양상이 동일함을 확인하였으며, 2차 pilot 발효추출물을 가지고 이후 기능성 효능 평가의 시료로 사용하였다.

### 제 3절. 자색고구마 발효 추출물의 안정성 실험

자색고구마 pilot 2차 발효 추출물의 저장기간에 따른 변화를 확인하기 위하여 추출물을 제조 하였을 때 520 nm에서의 chromatogram과 실온에서 약 1년 정도 보관된 추출물의 chromatogram을 비교함으로써 발효 추출물 안토시아닌의 변화를 확인하였다.

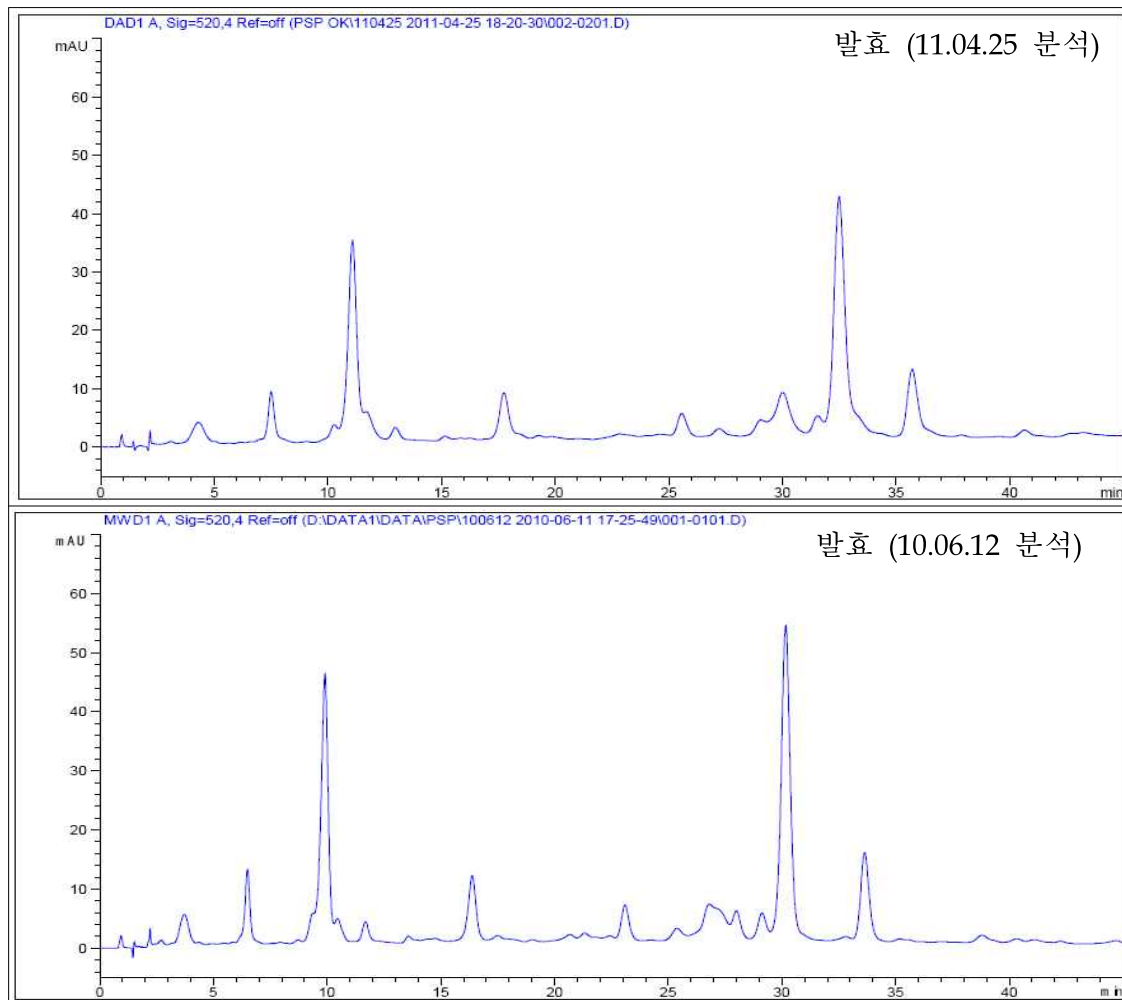


Fig. 자색고구마 발효추출물의 저장기간에 따른 변화 (520 nm)

자색고구마 발효추출물은 시간이 경과함에 따라 안토시아닌 함량의 감소를 확인하였다. 이에 자색고구마 추출물 분말의 온도, 빛, pH에 의한 안토시아닌의 안정성시험이 필요하다고 생각되어 이에 대한 실험을 실시하였다.

#### 1. 온도에 의한 안토시아닌 변화

온도에 의한 안토시아닌 변화를 확인하기 위하여 발효추출물 분말과 발효추출물 수용액

으로 나누어 각각 실온(25°C)과 95°C에 보관하면서 안토시아닌의 변화를 UV-VIS spectrum, 색차계, HPLC 분석을 통해 확인하였다.

**가. 시료의 조제**

- 발효추출물: 갈색병에 5 g씩 분주하여 실험에 사용 ⇒ **A**
- 발효추출물 수용액
  - ① 0.02% Sodium azide에 녹여(0.05 g/mL) 갈색병에 10 mL씩 분주하여 실험에 사용 ⇒ **B**
  - ② 0.02% Sodium azide에 녹인 후 (0.05 g/mL) pH 2로 조절(by 30% citric acid)하여 갈색병에 10 mL 분주하여 실험에 사용 ⇒ **C**

**나. 온도를 달리하여 저장 시 시간경과에 따른 안토시아닌의 변화 - UV spectrum**

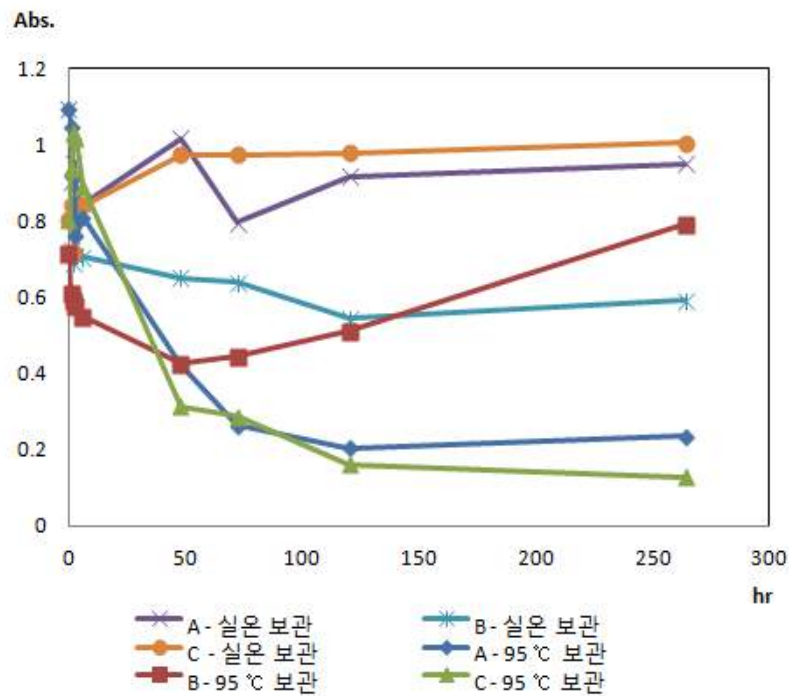


Fig. 1-1. 시간경과에 따른 안토시아닌의 변화 (530 nm)

발효추출물분말과 발효추출물 수용액을 실온(25°C)과 95°C에 저장하면서 일정 시간 간격으로 sampling하여 UV-VIS spectrum을 측정하였다. UV-VIS spectrum 결과 중 안토시아닌의 최대 흡수 파장인 530 nm의 흡광도 값을 비교하여 저장온도에 따른 안토시아닌의 변화를 확인하였다. 결과, 실온에서 보관 할 때 발효추출물 수용액 B를 제외한 나머지는 안토시아닌이 거의 변화하지 않았으나 발효추출물 수용액 C는 48 hr까지 Abs.값이 증가하는 현상을 관찰 할 수 있다. 발효추출물 수용액 B는 실온에서 시간이 경과함에 따라 안토시아닌의 함량이 감소함을 알 수 있다. 95°C에서 저장 할 경우 발효추출물 A, B, C 모두 안토시아닌

의 함량이 감소하였다.

고온에서 발효추출물을 저장하는 것은 바람직하지 않으며, 고온에서 안토시아닌이 불안정하다는 것을 시사하는 결과이다. 또한 발효추출물 수용액 B가 실온에서 Abs. 값이 감소하는 것으로 보아 온도 이외의 다른 인자들에 영향을 받을 것이라고 생각된다.

#### 다. 온도를 달리하여 저장 시 시간경과에 따른 색도 변화

발효추출물분말과 발효추출물 수용액을 실온(25℃)과 95℃에 저장하면서 일정 시간 간격으로 sampling하여 색차계로 색도를 측정하였다.



Fig. 1-2. 95℃에 저장 시 발효 추출 분말의 색 변화

Table 1-1. 발효추출분말(A)의 색차계 측정값

시간	(ΔE* <sub>ab</sub> )	
	실온보관	95 ℃ 보관
0	0.0	0.0
0.5	1.9	5.3
1	2.2	4.6
3	2.3	4.1
6	2.3	4.9
24	0.4	8.3
48	0.4	13.3
72	1.7	15.1
120	0.4	15.0
168	1.8	15.0
264	1.3	15.9

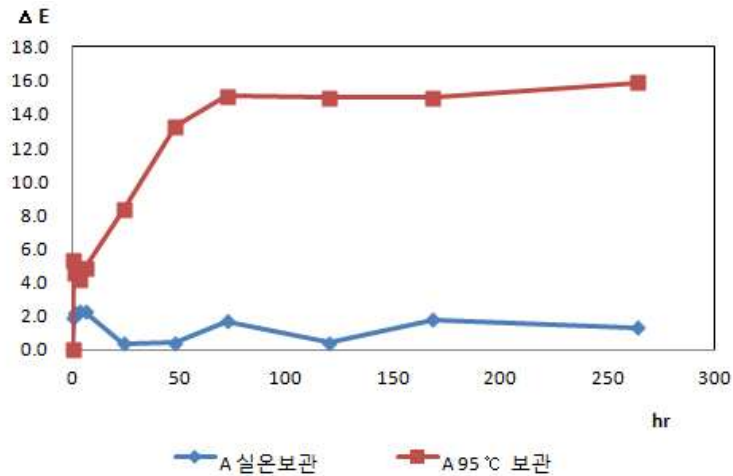


Fig. 1-3. 발효 추출 분말의 색도 변화

발효추출분말(A)의 경우 실온에서 저장 할 때  $\Delta E^*_{ab}$  값의 0.4 ~1.9로 동일한 계열의 색의 범위이지만 색도의 변화가 있으며 시료가 서로 떨어져 있을 때 육안으로 색의 변화를 관찰 할 수 없는 범위에 해당한다. 95°C 저장 시  $\Delta E^*_{ab}$  값 변화가 급속도로 일어나며  $\Delta E^*_{ab}$  값이 12이상으로 저장기간이 지남에 따라 색의 계통이 전혀 달라지고 있다. 95°C 저장 6 시간부터는 점점 갈색을 띄는 것을 육안으로 확인 할 수 있었으며, 딱딱해 성상의 변화가 일어나는 것을 확인하였다. 또한, 발효추출물분말이 본래의 부피 보다 감소함을 확인하였다. 자색 고구마 발효추출분말에 당이 고온에 노출되어 당의 중합과 당에 의한 갈변 현상이 일어난 것이라 생각된다(Table 1-1).

Table 1-2. 발효추출물 수용액 B (pH 7), C (pH 2) 색차계 측정값

( $\Delta E^*_{ab}$ )

시간	B		C	
	실온보관	95 °C 보관	실온보관	95 °C 보관
0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	2.3	5.8	27.0	31.2
1	2.7	9.4	27.0	32.7
3	2.3	12.5	27.0	33.7
6	2.0	15.7	27.1	31.3
24	2.4	17.0	29.8	47.4
48	5.3	32.9	27.3	50.7
72	6.2	32.6	26.2	52.1
120	8.6	17.5	28.4	64.7
168	11.3	14.4	28.9	69.4
264	14.6	18.4	29.3	87.5

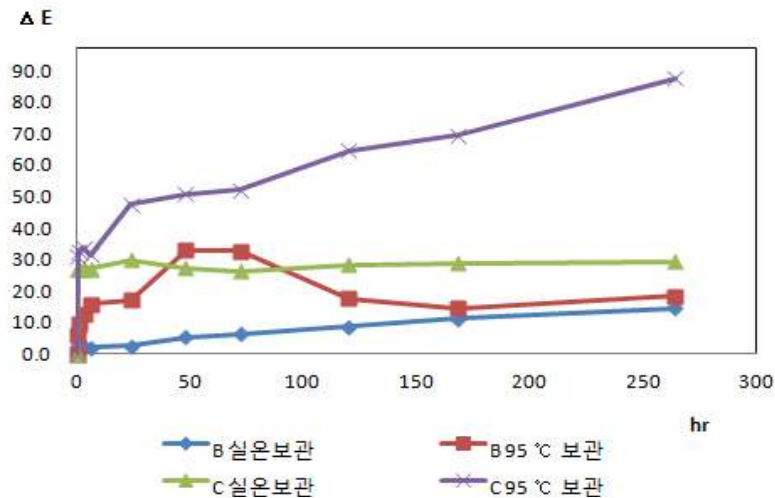


Fig. 1-4. 발효추출물 수용액 B (pH 7), C (pH 2)의 색도 변화

발효추출물 수용액 B는 실온 저장 및 95°C 저장 시 시간이 경과함에 따라  $\Delta E^*_{ab}$  값이 12 이상으로 저장기간이 지남에 따라 색의 계통이 전혀 달라지고 있다. 실온에서 보다 95°C 저장 시  $E^*_{ab}$  값의 변화가 크다. 발효추출물 수용액 C는 실온 저장 및 95°C 저장에 관계없이 30분 후  $E^*_{ab}$  값이 12 이상으로 색의 계통이 전혀 달라졌다. 시간이 경과함에 따라 실온에서 보다 95°C 저장 시  $E^*_{ab}$  값의 변화가 급격하게 크게 나타나며, 발효추출물 수용액 B 보다 색도의 변화가 크다. 따라서 온도의 의한 색차에서의 안정성은  $A > B > C$  순이다.

#### 라. 온도를 달리하여 저장 시 시간경과에 따른 안토시아닌의 변화 - HPLC 분석

발효추출물분말과 발효추출물 수용액을 실온(25°C)과 95°C에 저장하면서 일정 시간 간격으로 sampling하여 HPLC 분석을 통해 안토시아닌의 화합물변화를 측정하였다.

##### (1) HPLC chromatogram

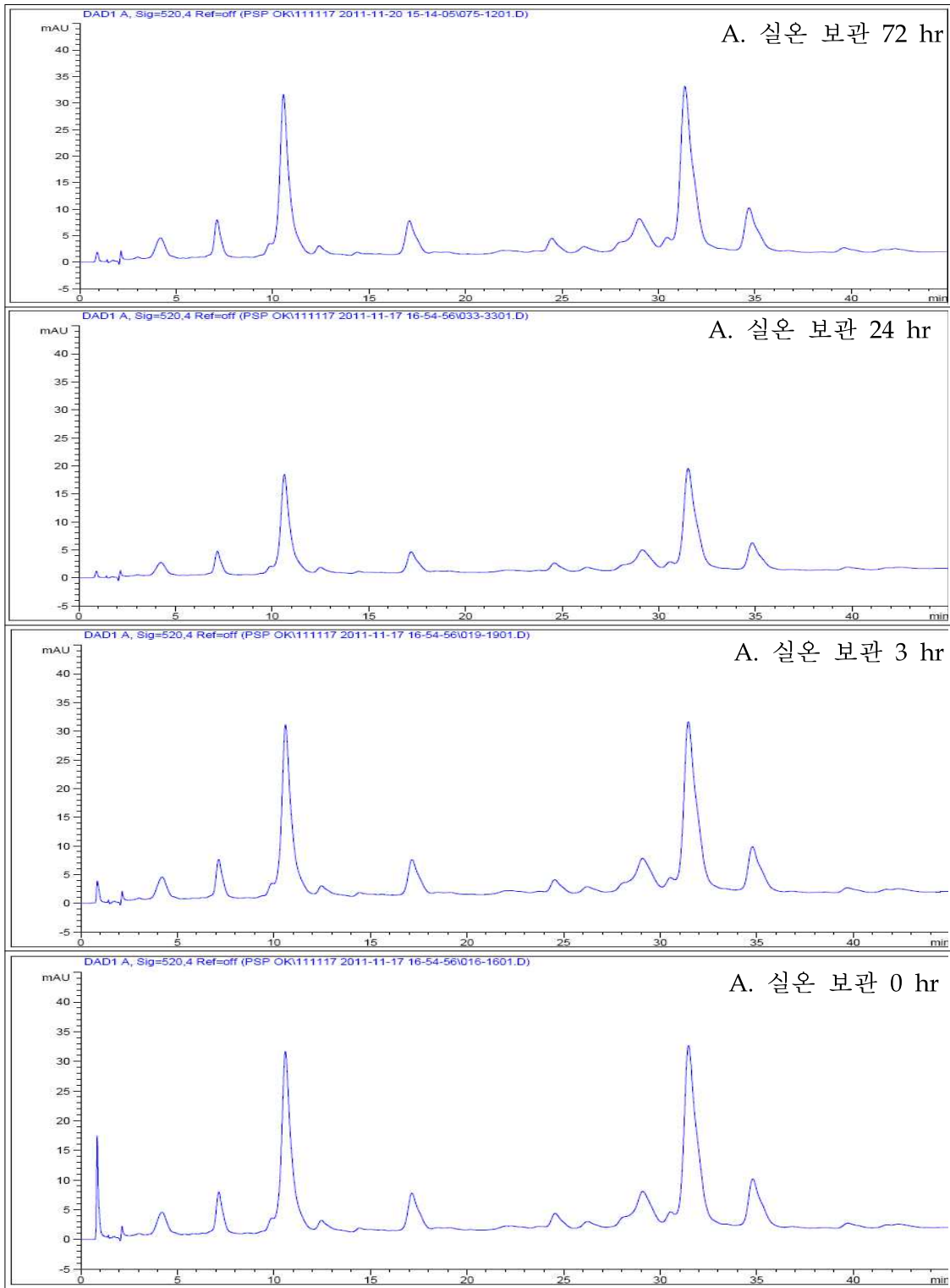


Fig. 1-5. 발효추출분말(A)의 실온 저장 시 chromatogram

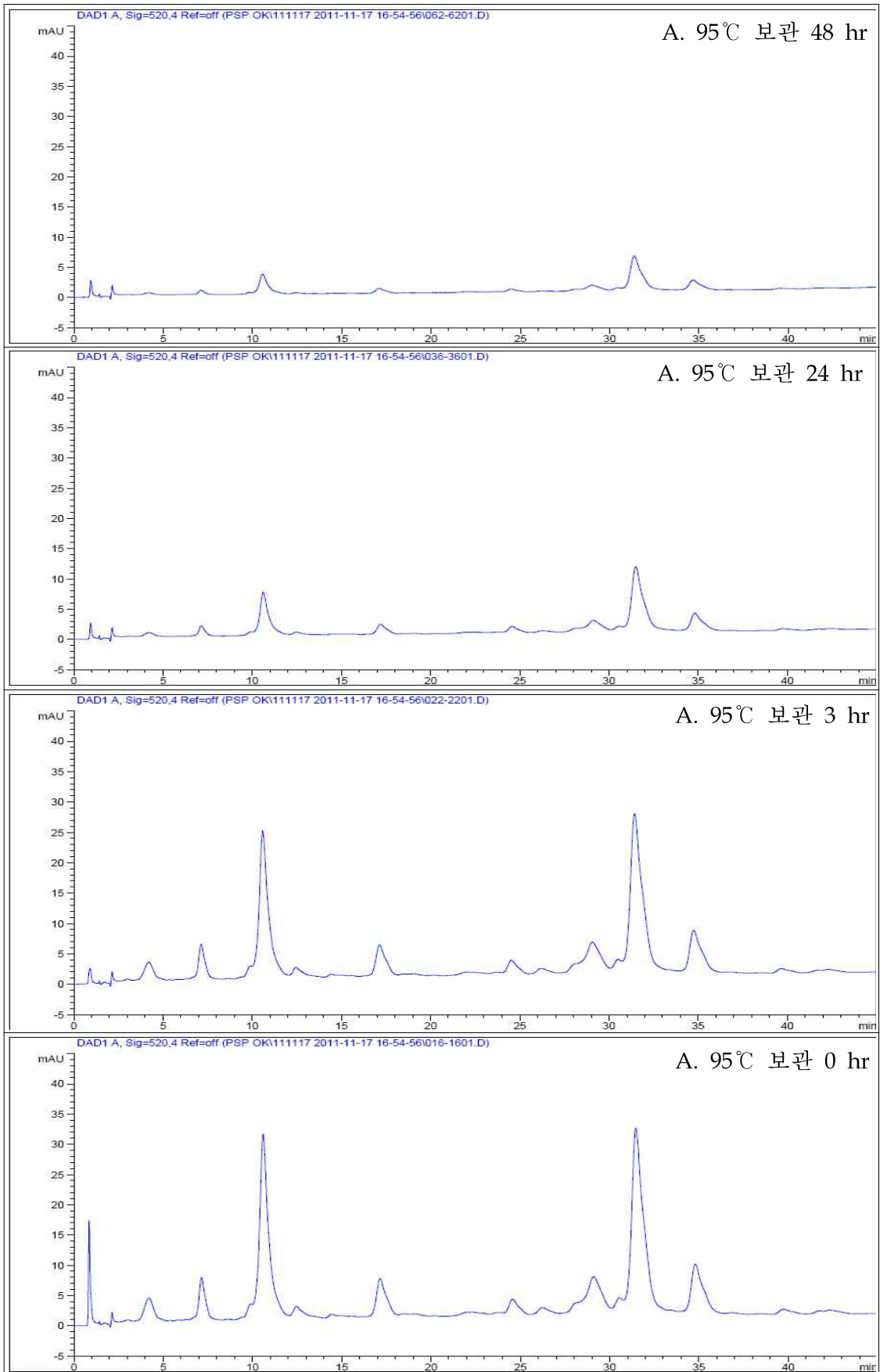


Fig. 1-6. 발효추출분말(A)의 95°C 저장 시 chromatogram



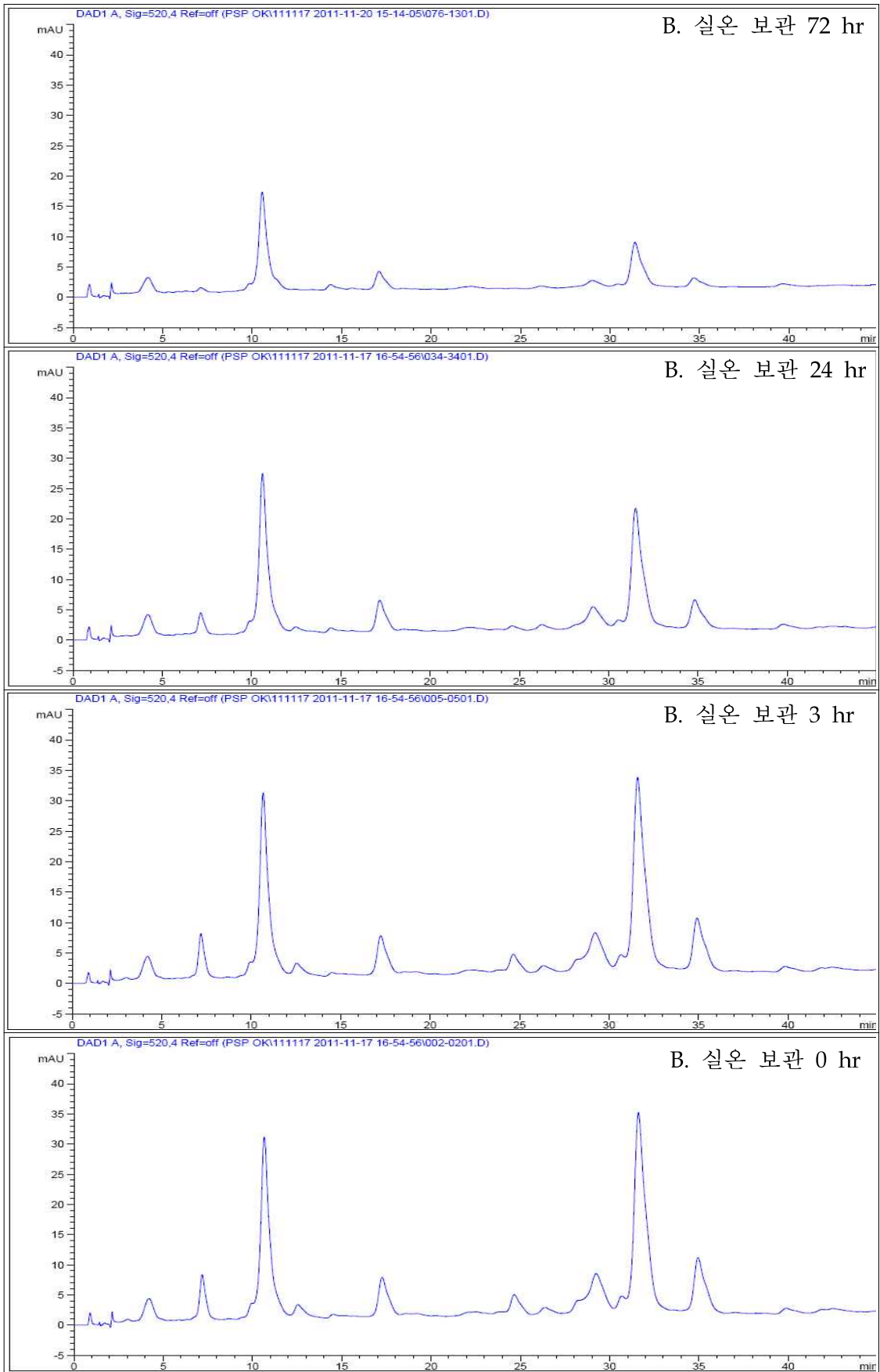


Fig. 1-7. 발효추출물 수용액 B의 실온 저장 시 chromatogram

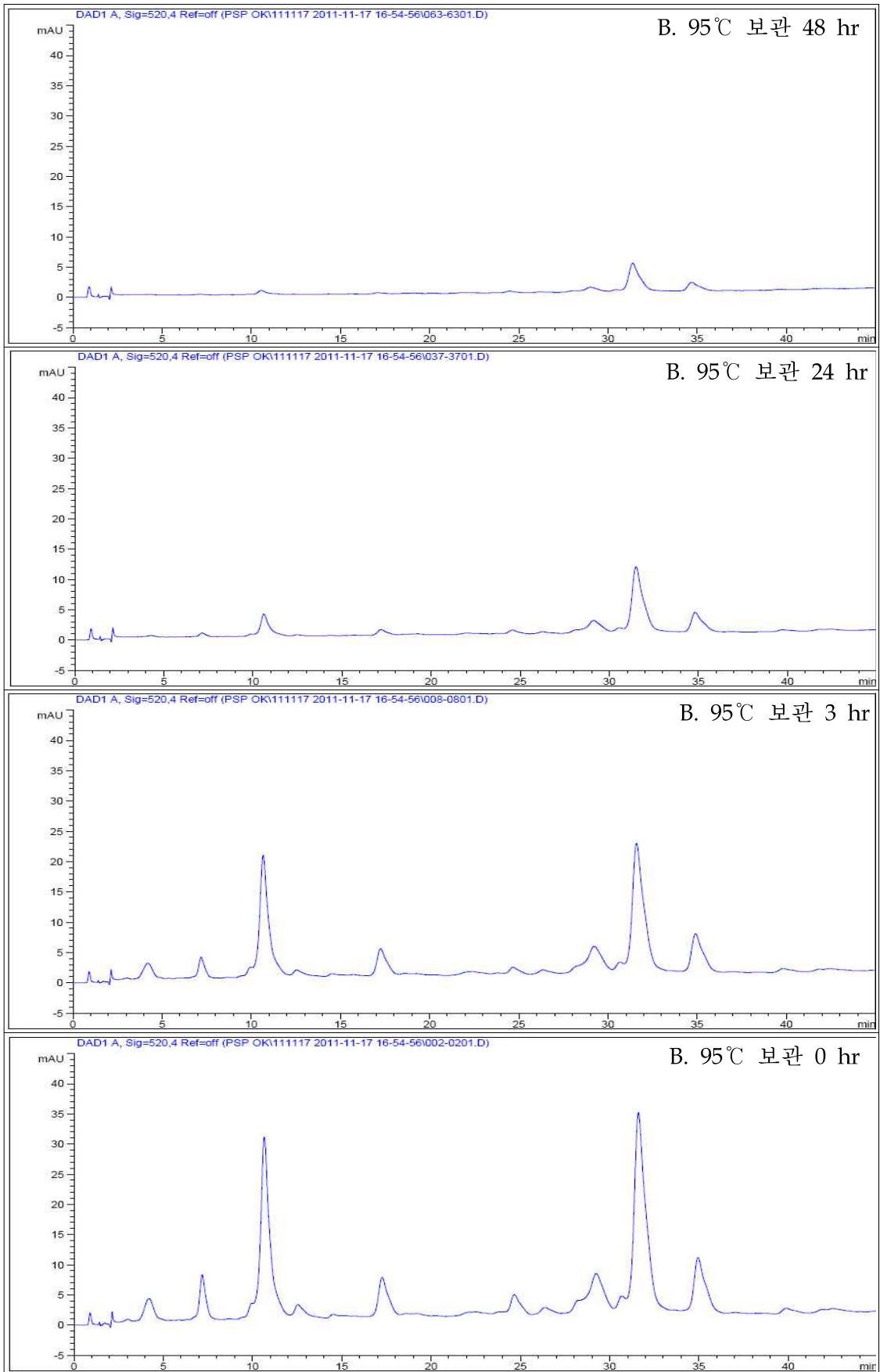


Fig. 1-8. 발효추출물 수용액 B의 95°C 저장 시 chromatogram

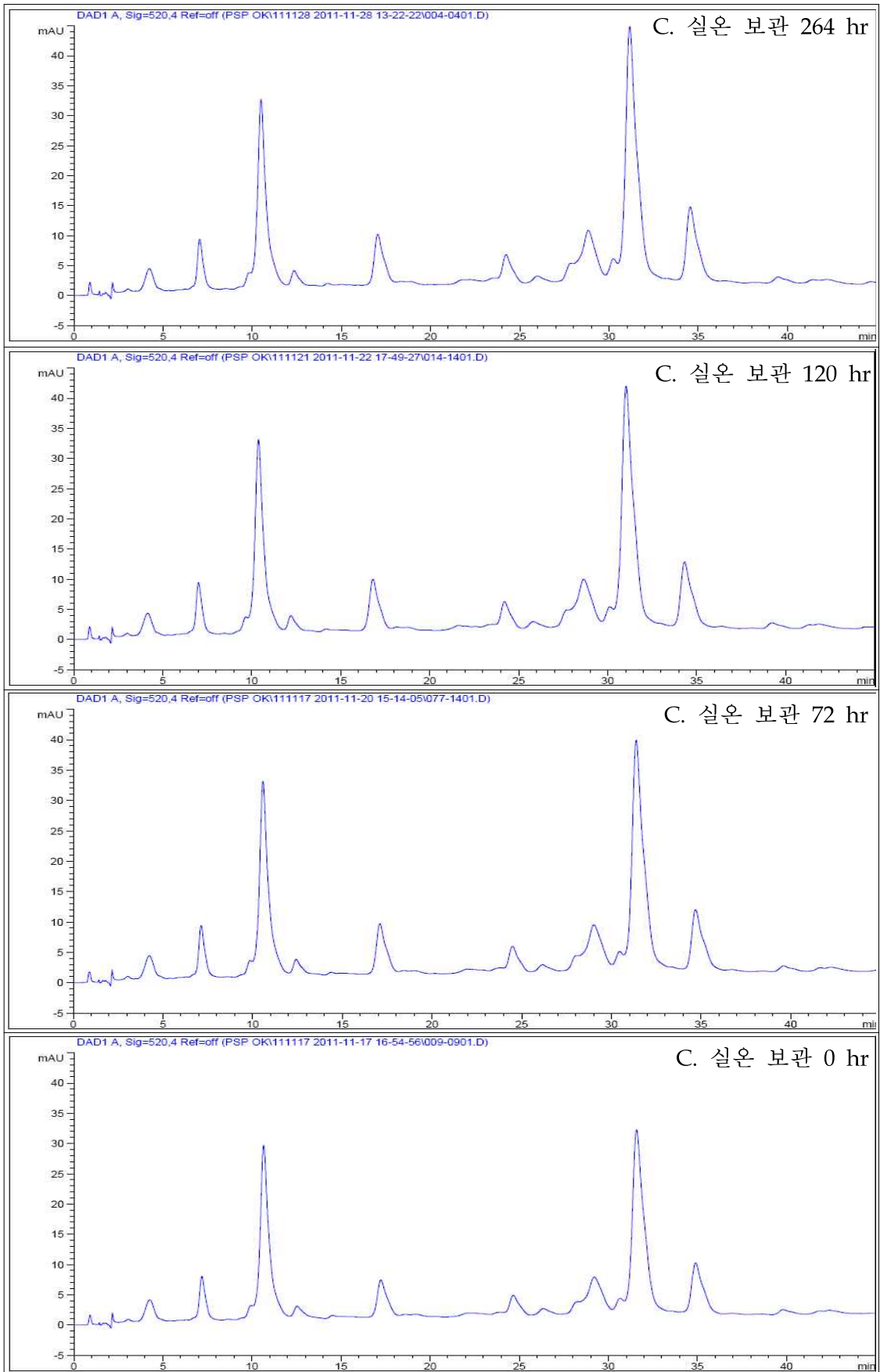


Fig. 1-9. 발효추출물 수용액 C의 실온 저장 시 chromatogram

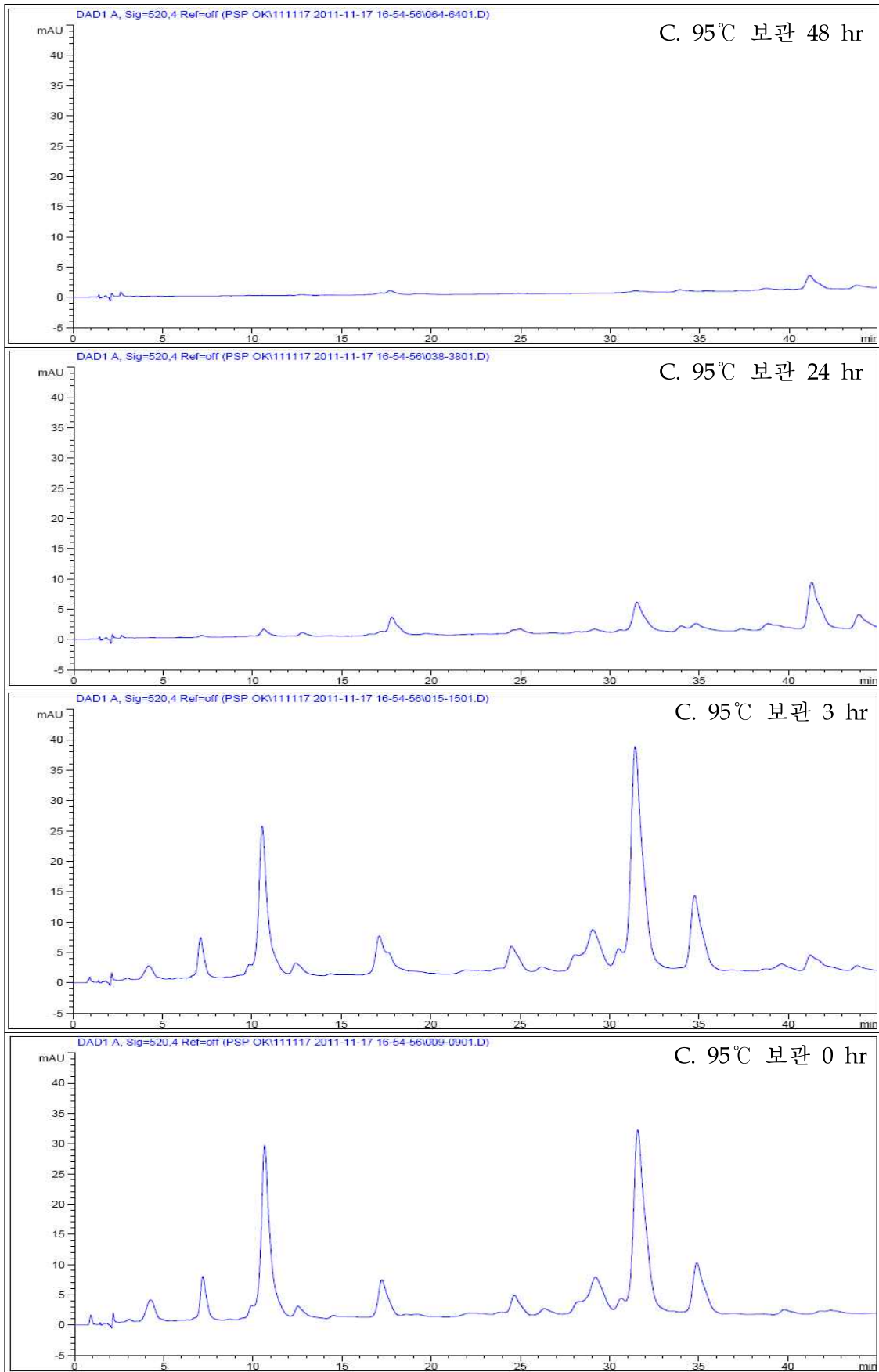


Fig. 1-10. 발효추출물 수용액 C의 95°C 저장 시 chromatogram

(2) total area 및 안토시아닌 main peak의 area 비교

HPLC chromatogram을 통해 온도를 달리하여 저장 시 안토시아닌의 변화를 확인하였다. total area 및 안토시아닌 main peak의 area를 비교함으로써 보다 쉽게 안토시아닌의 변화를 알아보고자 한다.

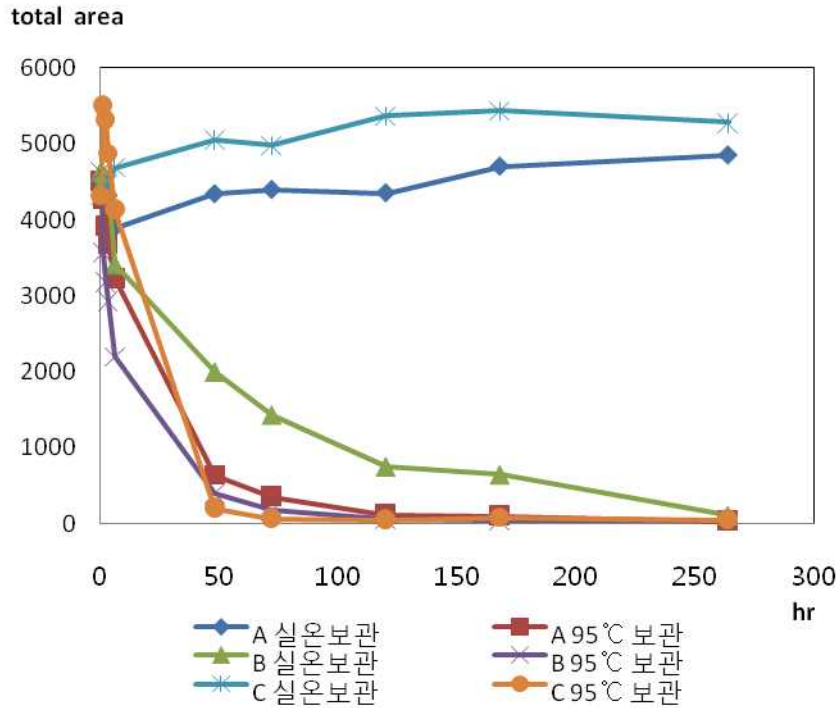


Fig. 1-11. 저장온도에 따른 안토시아닌의 total area 변화

안토시아닌 main peak는 Fig. 8-14과 같이 설정 하였으며 각각 Rt 10, Rt 32로 설정하였다. 발효추출물 A, B, C 시료를 95°C 저장 시에는 안토시아닌 main peak가 감소함을 확인하였다. 따라서 안토시아닌 main peak의 area 변화는 실온에 저장한 경우만 확인하였다.

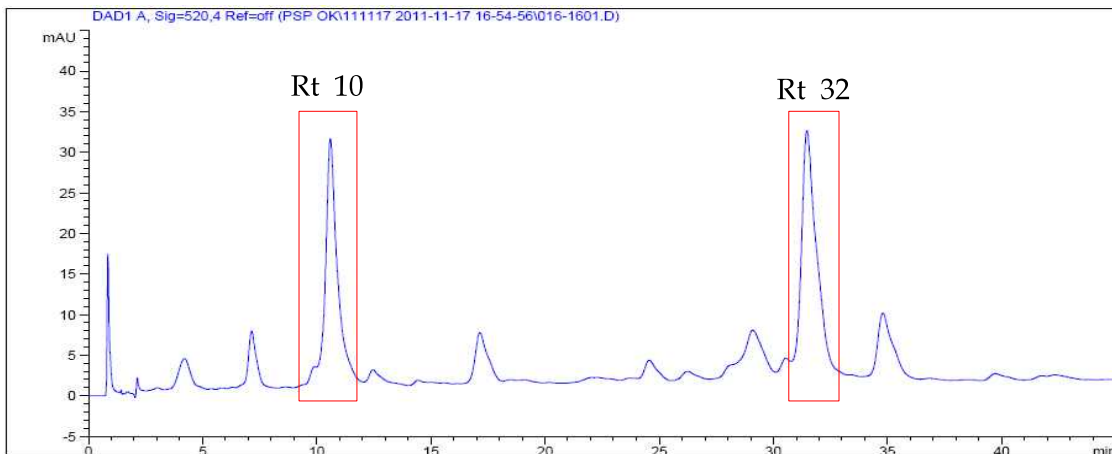


Fig. 1-12. 자색고구마 발효추출물에 함유된 안토시아닌 main peak

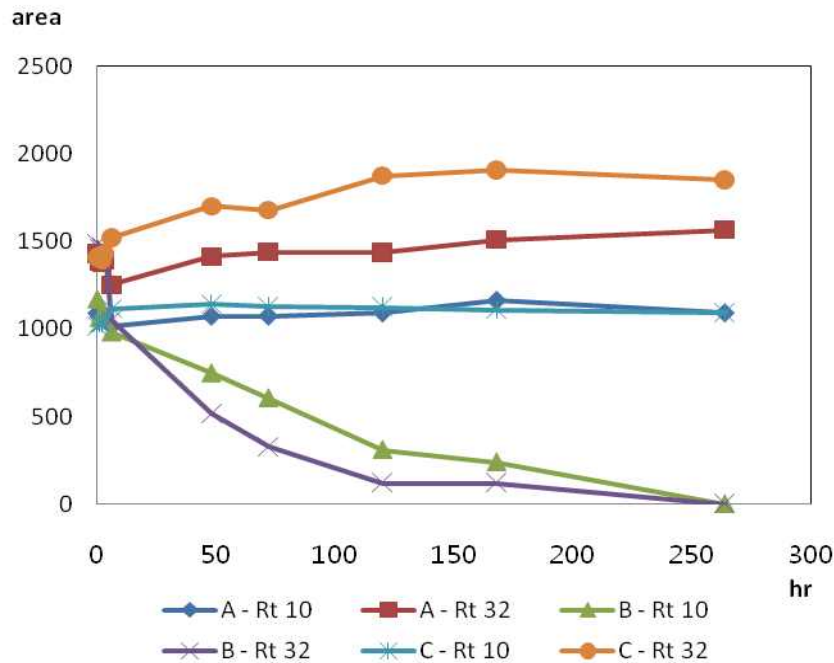


Fig. 1-13. 실온 저장 시 안토시아닌 main peak의 area 변화

발효추출분말 A는 실온에서 시간이 경과함에 따라 안토시아닌의 성분변화가 거의 일어남을 확인할 수 있으며, 95°C에서는 시간이 경과함에 따라 안토시아닌이 급격히 감소하며 120 시간부터 색소가 거의 없음을 확인할 수 있다. 발효추출물 수용액 B(pH 7)는 실온에서 시간이 경과함에 따라 안토시아닌이 점점 감소하다가 약 10일 이후 색소가 거의 없음을 확인할 수 있다. 95°C에서는 시간이 경과함에 따라 안토시아닌이 발효추출분말 A 보다 빠르게 감소하며 120 시간부터 색소가 거의 없음을 확인할 수 있다. 발효추출물 수용액 C(pH 2)는 실온에서 안토시아닌의 함량이 약간 증가되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 1-8, Fig. 1-11). 안토시아닌 main peak의 area 변화를 통해 확인한 결과(Fig. 8-15), Rt 10 peak는 거의 변화하지 않으나 Rt 32 peak가 증가됨을 확인하였다. 95°C에서는 시간이 경과함에 따라 안토시아닌이 발효추출물 수용액 B 보다 빠르게 감소하며 72 hr 부터 색소가 거의 없음을 확인할 수 있다.

고온에서 발효추출물 A > B > C 순으로 안토시아닌 색소가 빠르게 감소된다. 실온에서 발효추출물 C > A > B 순으로 안토시아닌 색소가 안정하다.

## 2. 빛에 의한 안토시아닌 변화

빛에 의한 안토시아닌 변화는 형광등 빛을 이용하여 발효추출물분말과 발효추출물 수용액을 각각 갈색병과 투명한 병에 나누어 실온(25°C)에 보관하면서 안토시아닌의 변화를 UV spectrum, 색차계, HPLC 분석을 통해 확인하였다.

가. 시료의 조제

- 발효추출물: 갈색병과 투명한 병에 각각 5 g씩 분주하여 실험에 사용 ⇒ A
- 발효추출물 수용액
  - ① 0.02% Sodium azide에 녹여(0.05 g/mL) 갈색병과 투명한 병에 각각 10 mL 씩 분주하여 실험에 사용 ⇒ B
  - ② 0.02% Sodium azide에 녹인 후 (0.05 g/mL) pH 2로 조절( by 30% citric acid)하여 갈색병과 투명한 빛에 각각 10mL 분주하여 실험에 사용 ⇒ C

나. 빛에 의한 안토시아닌의 변화 - UV spectrum

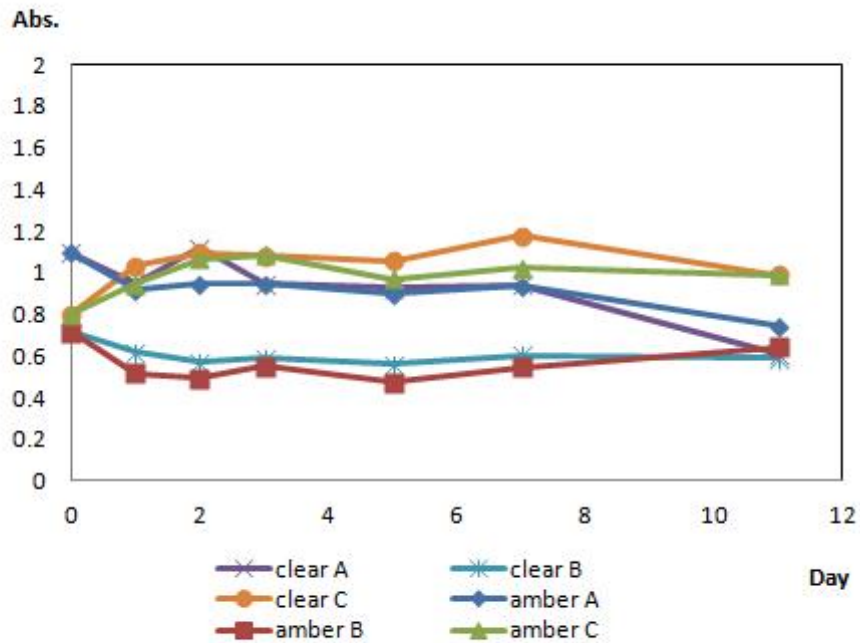


Fig. 2-1. 빛에 의한 안토시아닌의 변화 (530 nm)

빛에 노출 여부에 관계없이 발효추출물 A, B, C 모두 안토시아닌의 변화는 거의 일어나지 않은 것으로 판단된다.

### 다. 빛에 의한 색도 변화

발효 추출물분말과 수용액을 빛에 노출 여부에 따라 안토시아닌의 변화를 확인하기 위하여 일정 시간 간격으로 sampling하여 색도계로 색차를 측정하였다.

Table 2-1. 발효추출분말(A)의 색차계 측정값

시간	$(\Delta E^*_{ab})$	
	amber	clear
0	0.0	0.0
1	1.1	1.0
2	1.0	0.5
3	0.6	0.6
5	0.7	0.8
7	0.6	1.5
11	0.3	0.5

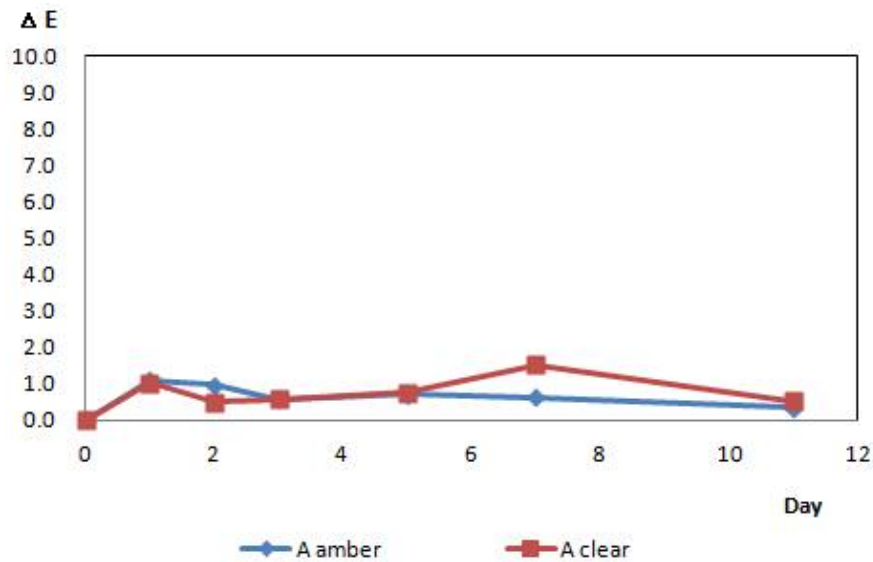


Fig. 2-2. 발효추출분말(A)의 색도 변화

발효추출물 분말(A)는  $E^*_{ab}$ 값이 0.8~1.5 내의 범위에 해당하며 이는 일반제품의 색 관리에 주로 사용되는 범위이다. 따라서 발효추출물 분말(A)는 빛 존재 하에 투명한 병과 갈색 병 저장에 따른 색도의 변화가 없다.



Table 2-2. 발효추출물 수용액 B (pH 7), C (pH 2) 색차계 측정값

( $\Delta E^*_{ab}$ )

시간	B		C	
	amber	clear	amber	clear
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	3.9	10.4	31.7	31.9
2	21.3	19.0	28.7	29.5
3	19.7	16.3	28.5	29.1
5	17.9	30.9	29.9	30.6
7	18.8	14.0	31.3	29.1
11	13.2	18.9	32.1	33.5

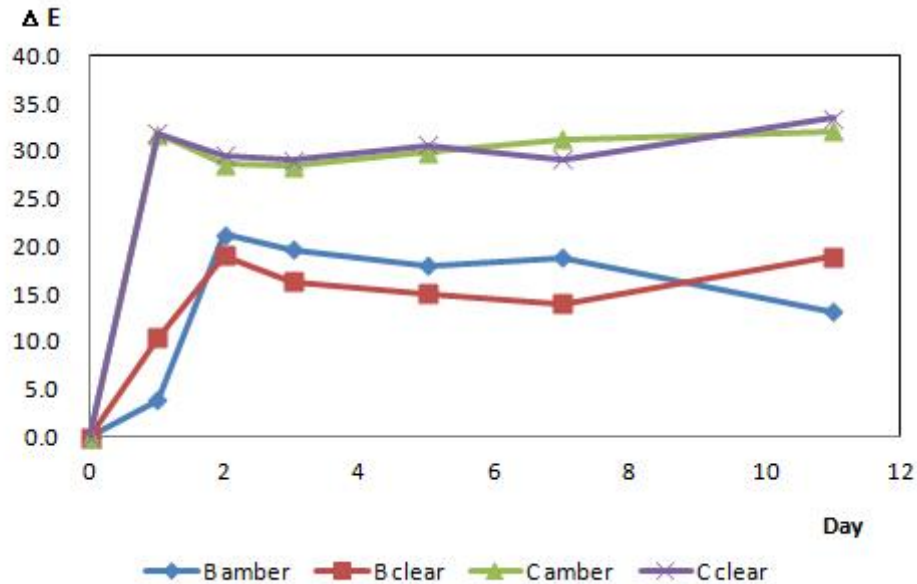


Fig. 2-3. 발효추출물 수용액 B (pH 7), C (pH 2)의 색도 변화

발효추출물 수용액 B는 실온에서 빛의 노출에 관계없이  $\Delta E^*_{ab}$ 값이 12이상으로 저장기간이 지남에 따라 색의 계통이 전혀 달라지고 있다. 발효추출물 수용액 C는 실온에서 빛의 노출에 관계없이 저장 1일 만에  $\Delta E^*_{ab}$ 값이 12이상으로 색의 계통이 전혀 달라지고 있다. 발효추출물 수용액 B와 C는 빛의 노출 여부에 따른 색도의 차이는 보여지지 않는다. 따라서 발효추출물 수용액 B와 C는 빛의 영향 보다는 온도에 더 민감하게 영향을 받는 것으로 생각된다.

### 라. 빛에 의한 안토시아닌의 변화 - HPLC 분석

발효추출물분말과 발효추출물 수용액을 빛 노출 여부에 따라 저장하면서(실온; 25°C) 일정 시간 간격으로 sampling하여 HPLC 분석을 통해 안토시아닌의 화합물변화를 측정하였다.

#### (1) HPLC chromatogram

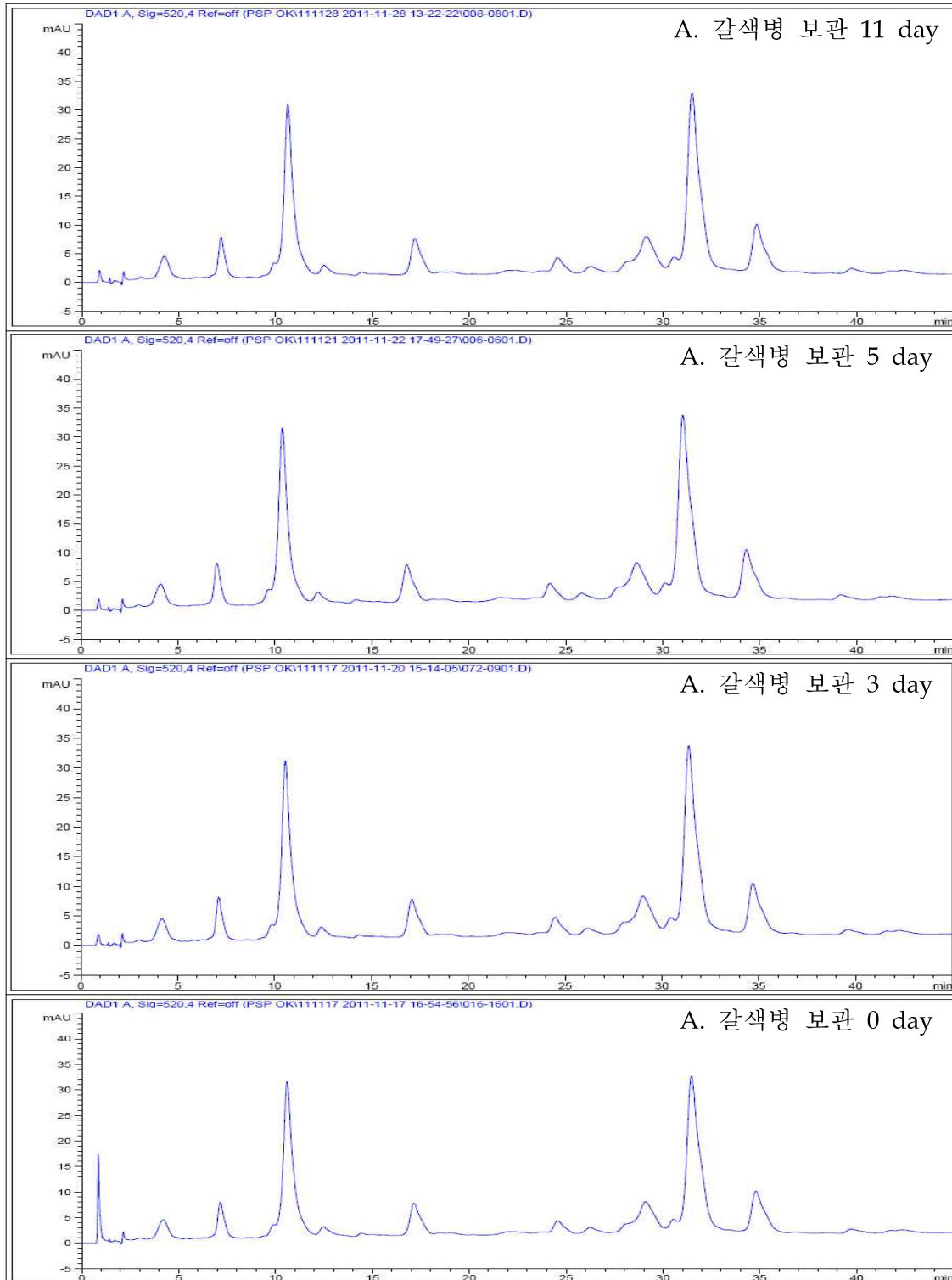


Fig. 2-4. 발효추출분말(A)의 갈색병 보관 시 chromatogram

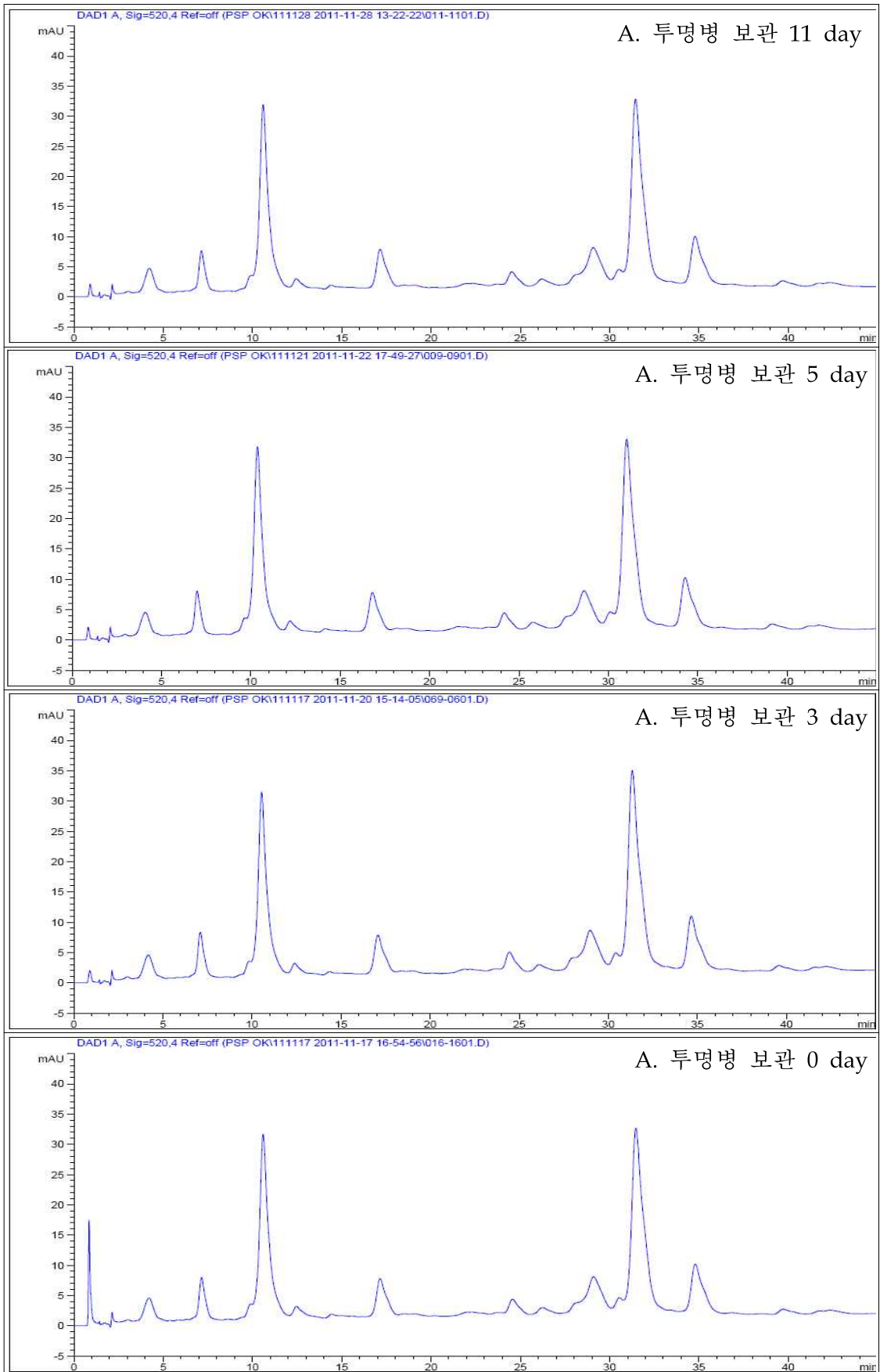


Fig. 2-5. 발효추출분말(A) 투명한 병 보관 시 chromatogram

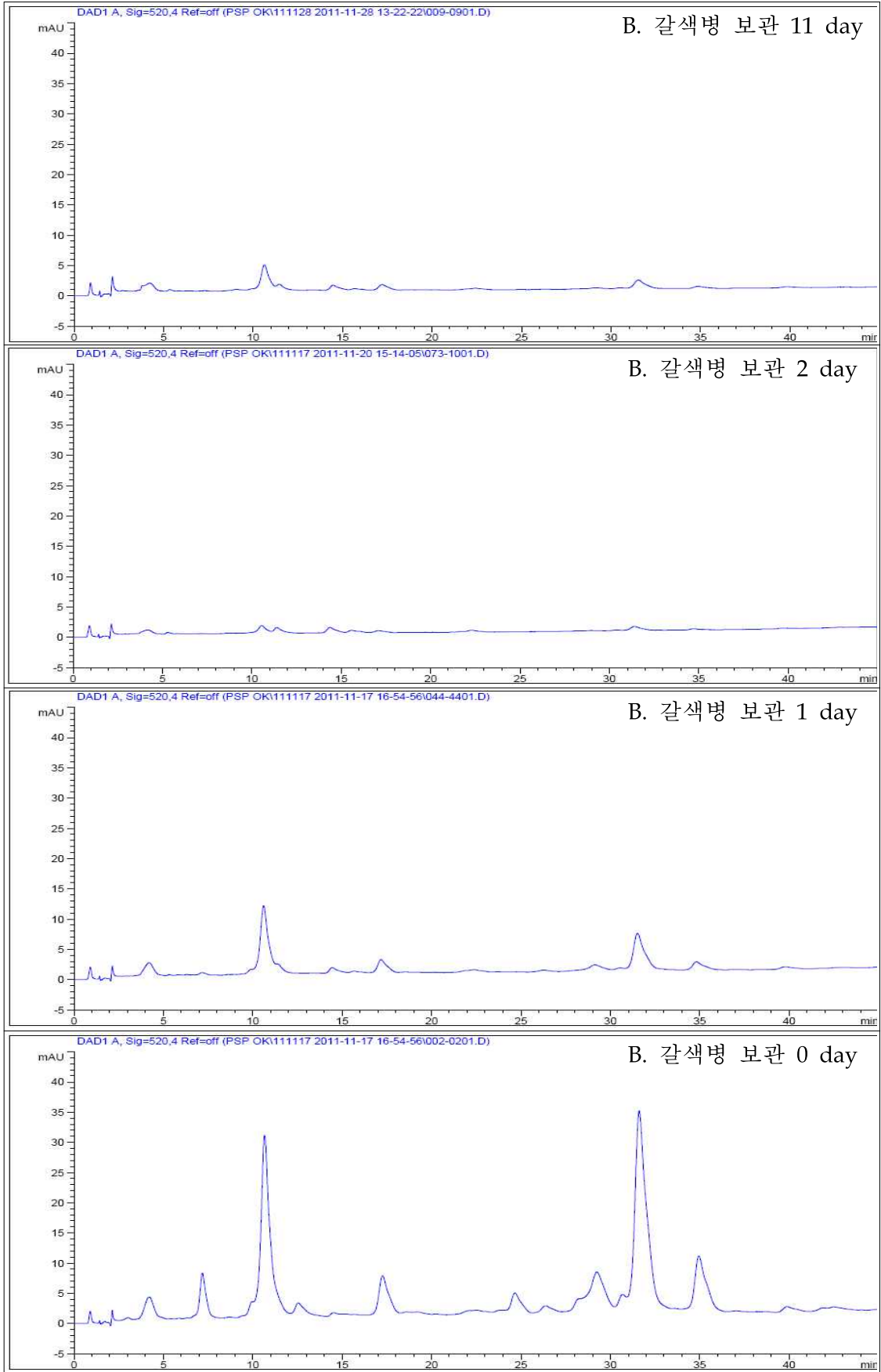


Fig. 2-6. 발효추출물 수용액 B 갈색 병 보관 시 chromatogram

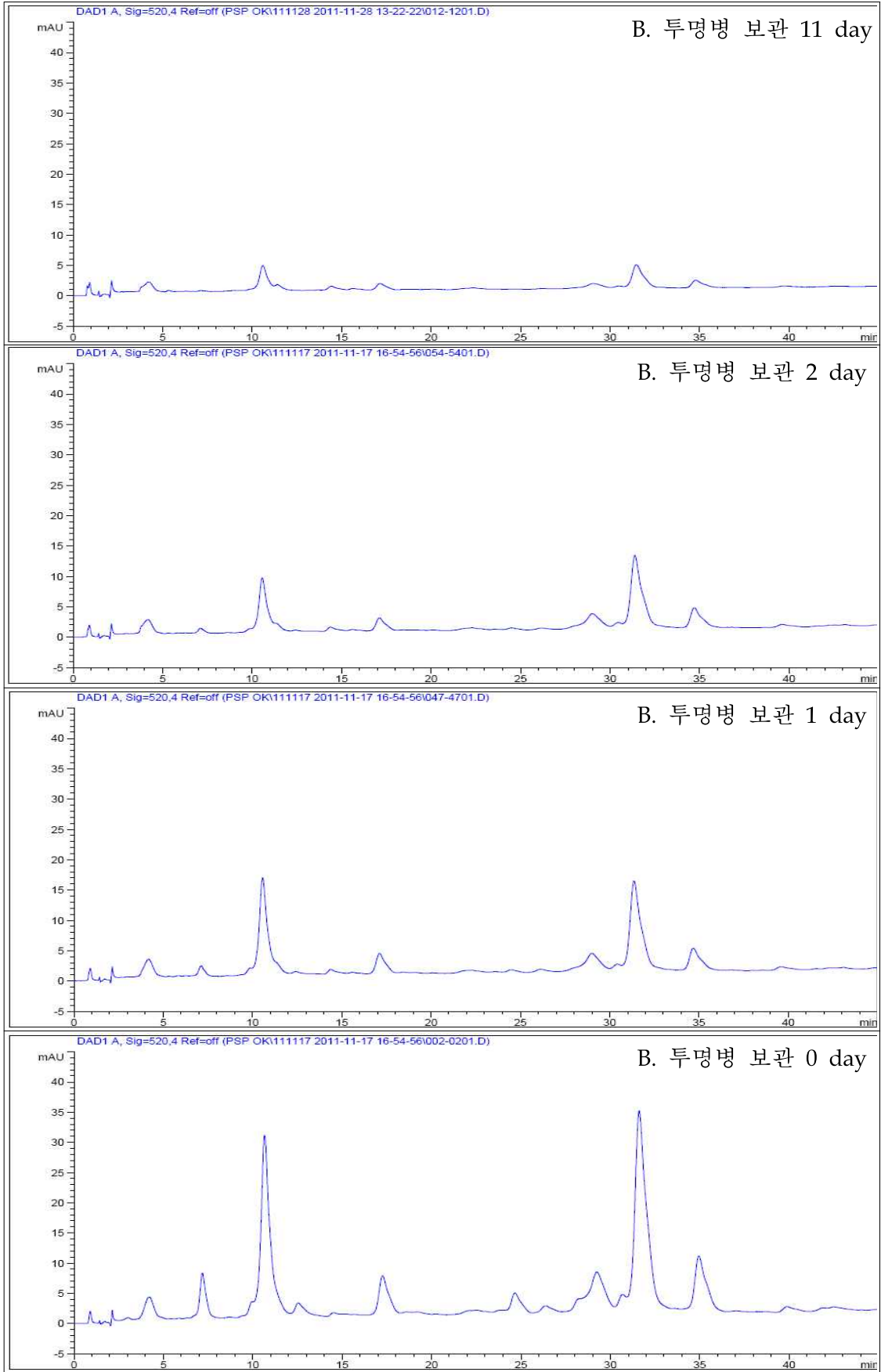


Fig. 2-7. 발효추출물 수용액 B 투명한 병 보관 시 chromatogram

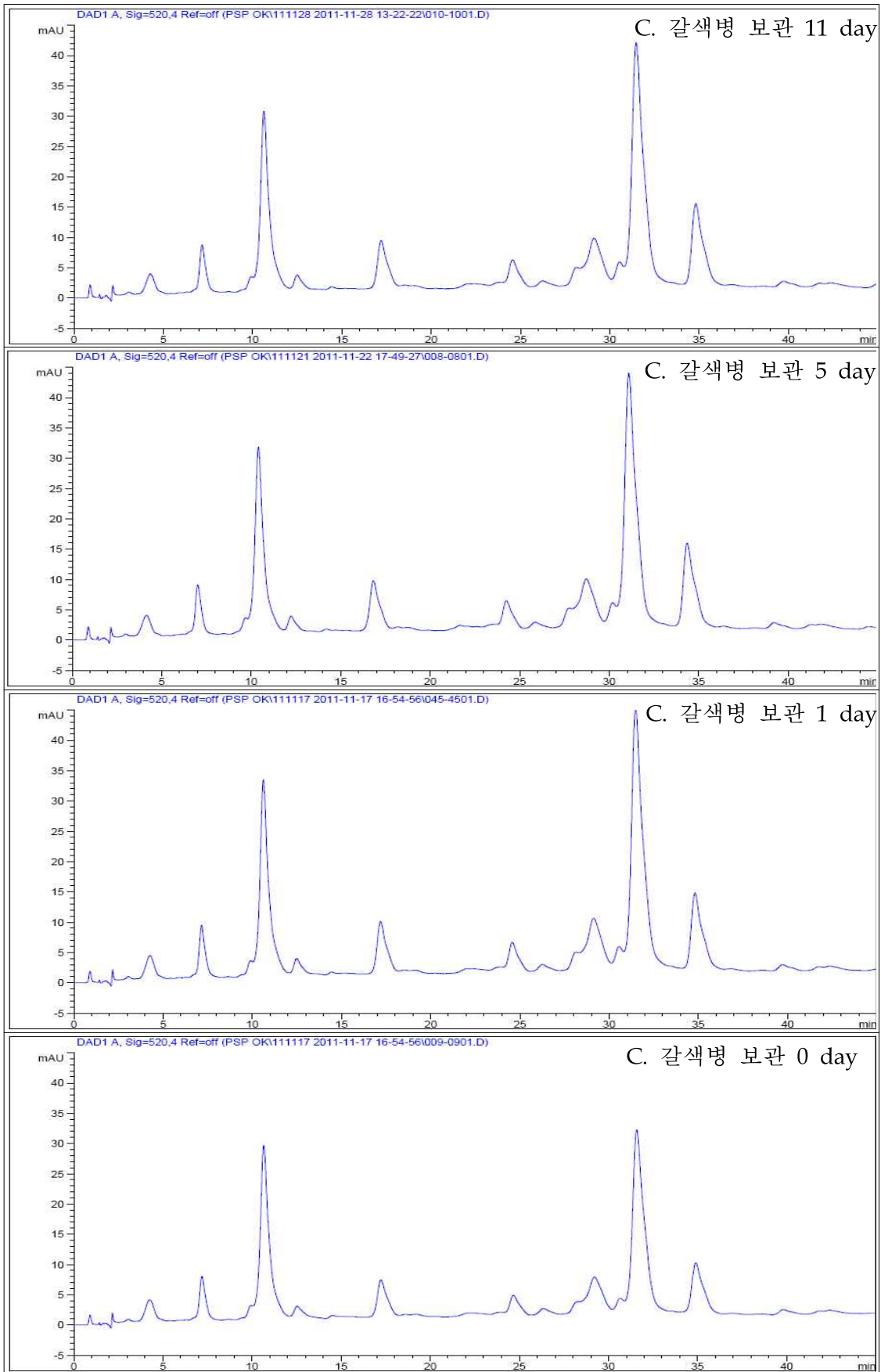


Fig. 2-8. 발효추출물 수용액 C 갈색 병 보관 시 chromatogram

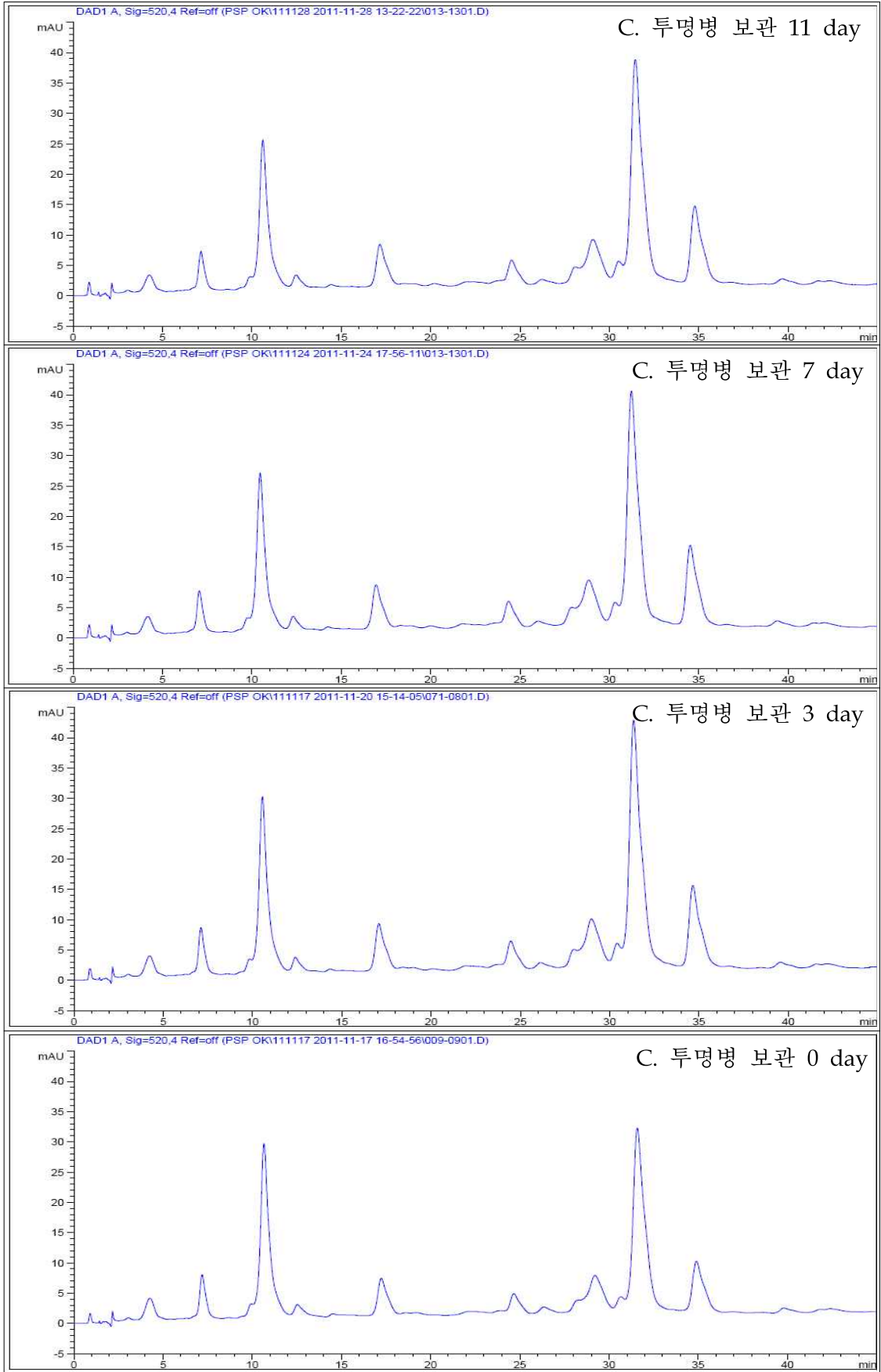


Fig. 2-9. 발효추출물 수용액 C 투명한 병 보관 시 chromatogram

(2) total area 및 안토시아닌 main peak의 area 비교

HPLC chromatogram을 통해 저장기간 동안 빛의 노출 여부에 따른 안토시아닌의 변화를 확인하였다. total area 및 안토시아닌 main peak의 area를 비교함으로써 보다 쉽게 안토시아닌의 변화를 알아보고자 한다.

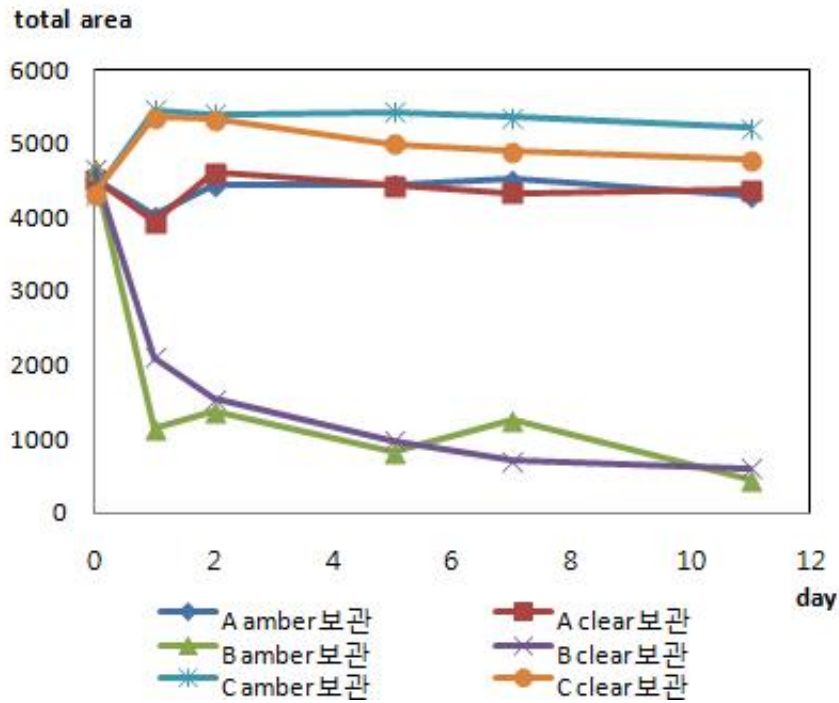


Fig. 2-10. 빛의 노출 여부에 따른 안토시아닌의 total area 변화

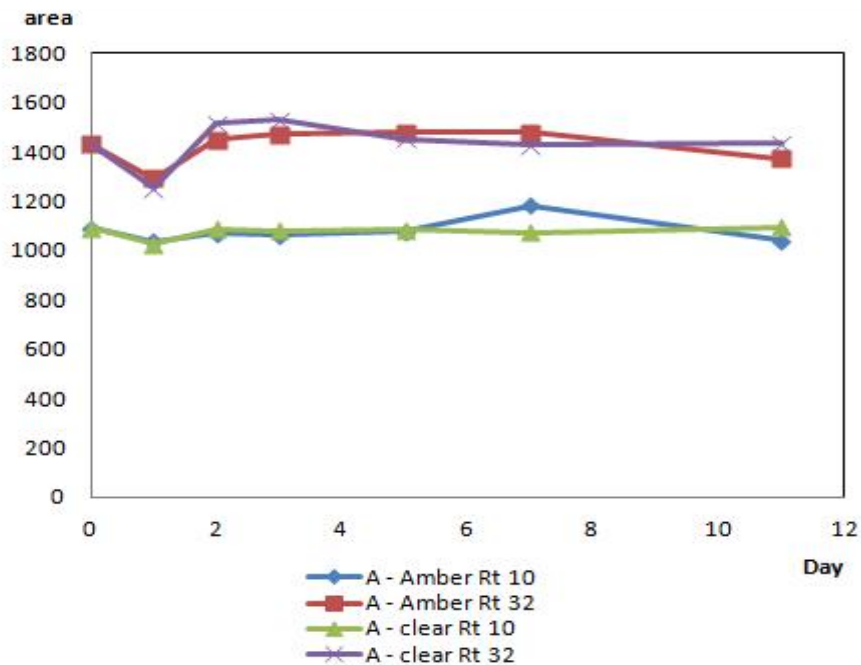


Fig. 2-11. 발효추출 분말(A)의 안토시아닌 main peak의 area 변화



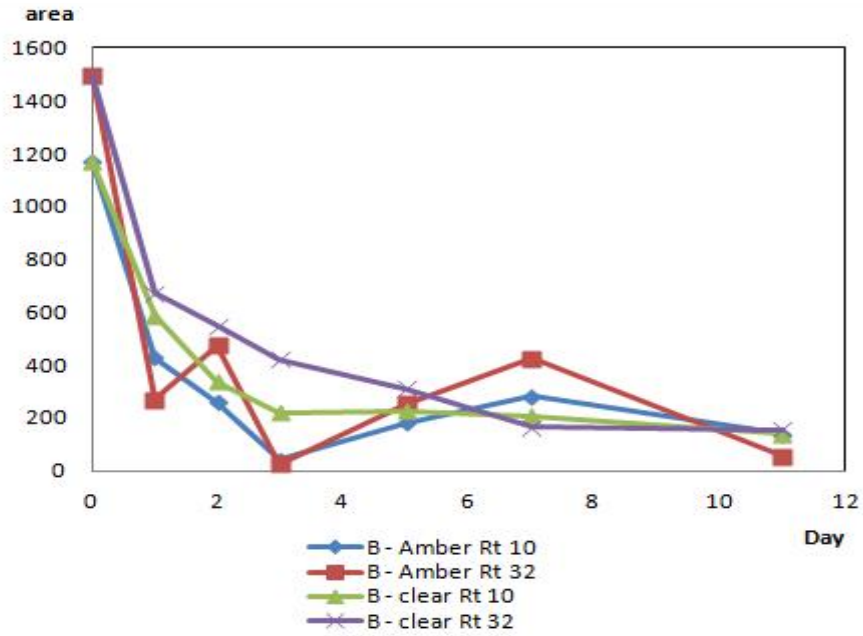


Fig. 2-12. 발효추출물 수용액 B의 안토시아닌 main peak의 area 변화

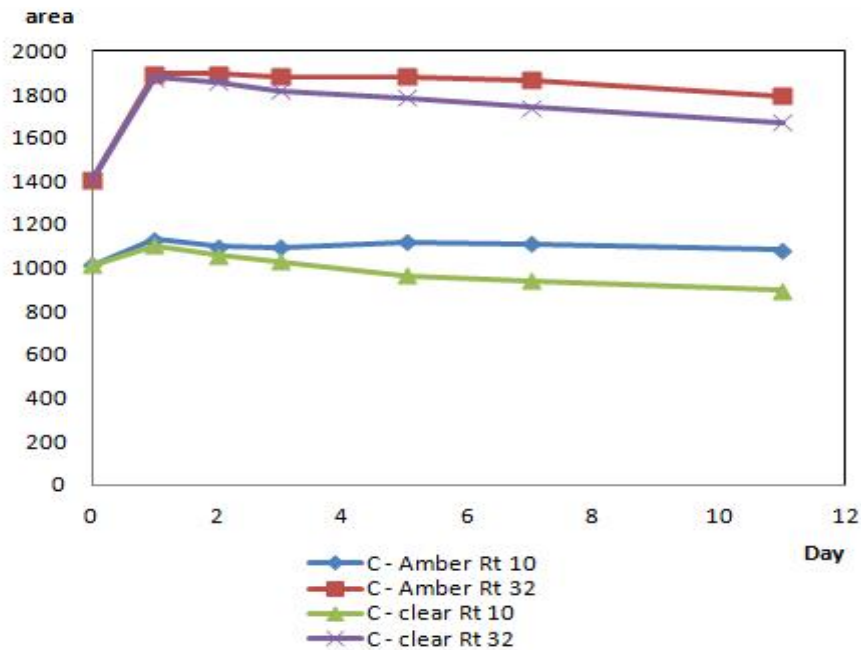


Fig. 2-13. 발효추출물 수용액 C의 안토시아닌 main peak의 area 변화

자색고구마 발효추출물의 빛에 대한 안정성을 11일 동안 확인해본 결과, 발효추출물(A)은 빛의 노출 여부에 따른 변화는 거의 일어나지 않았다. 그러나 발효추출물 수용액 B (pH 7)의 경우에는 빛의 노출 여부와는 관계없이 실온에서 안토시아닌의 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 저장온도에 따른 안토시아닌 변화 결과와 일하는 하는 것으로 발효추출물 수용액 B는 실온에서 매우 불안정한 것으로 생각된다. 발효추출물 수용액 C (pH 2 조절)은 특이하게도 안토시아닌의 함량이 약간 증가하는 것을 확인할 수 있으며, 안토시아

닌 main peak의 변화를 살펴보면 빛의 노출 여부에 관계없이 시간이 경과함에 따라 Rt 10은 약간 감소하는 반면 Rt 32이 증가하는 것을 확인 할 수 있다.

발효추출물 수용액 B를 제외한 나머지 발효추출물 분말(A)와 발효추출물수용액 C는 빛에 노출에 안정한 것으로 판단된다.

### 3. pH에 의한 안토시아닌 변화

#### 가. 시료의 조제

- pH 1, pH 4.5, pH 7, pH 10으로 buffer용액을 조제 후 발효추출 0.05 g/mL의 농도가 되게 시험용액을 조제하였다.

#### 나. 저장기간에 따른 pH변화 확인

pH가 서로 다른 buffer용액에 발효추출물분말을 녹인 후 실온(25°C)에 보관하면서 pH의 변화를 측정하였다.

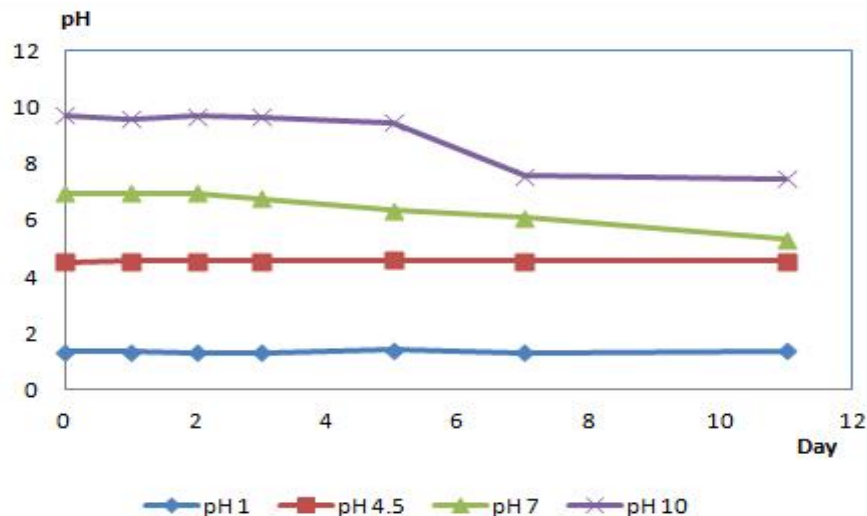
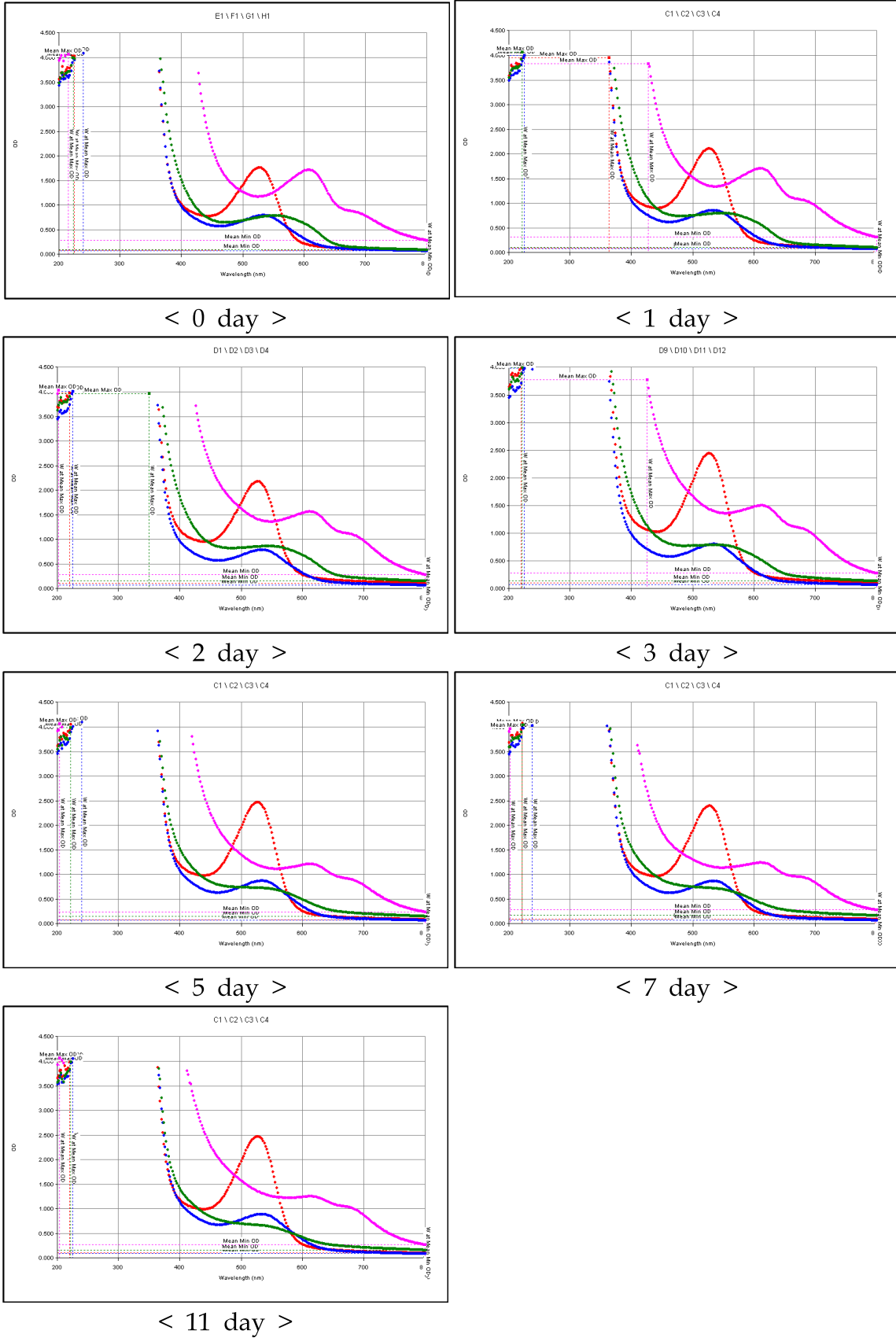


Fig. 3-1. 저장기간에 따른 pH 변화

pH가 서로 다른 buffer용액에 발효추출분말을 녹여 실온에 보관하는 동안의 pH 변화를 확인하였다. pH 10 buffer용액의 경우 보관 7일째부터 pH가 감소하는 것을 확인할 수 있다. pH 7 buffer용액의 경우 시간이 경과함에 따라 pH가 점차 감소하였다. 그러나 pH 1과 pH 4.5 buffer용액에서는 pH의 변화가 거의 일어나지 않았다. 따라서 자색고구마 발효추출물의 안토시아닌을 수용액 상태로 보관한다고 가정하면 산성조건에서 저장하는 것이 바람직하다.

#### 다. pH에 따른 안토시아닌의 변화 - UV spectrum

pH가 서로 다른 buffer용액에 발효추출물 분말을 녹인 후 실온(25°C)에 보관하면서 안토시아닌의 변화를 UV spectrum을 통해 확인하였다.



(※ pH 1: 빨간색, pH 4.5: 파란색, pH 7: 초록색, pH 10: 핑크색)

Fig. 3-2. pH에 따른 UV spectrum

Fig. 3-2의 0 day UV spectrum을 보면 pH 1 buffer 용액의 최대흡광도인 530 nm와 pH 10 buffer 용액의 최대흡광도인 610 nm에서 Shift가 일어난다. 따라서 최대 흡광도인 530 nm 와 610 nm에서 저장기간에 따른 안토시아닌의 변화를 관찰 하였다.

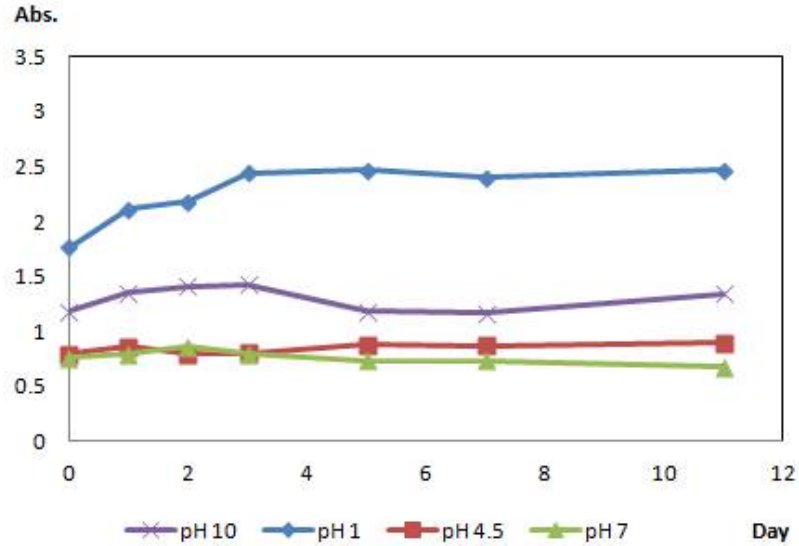


Fig. 3-3. 530 nm에서의 pH에 따른 변화

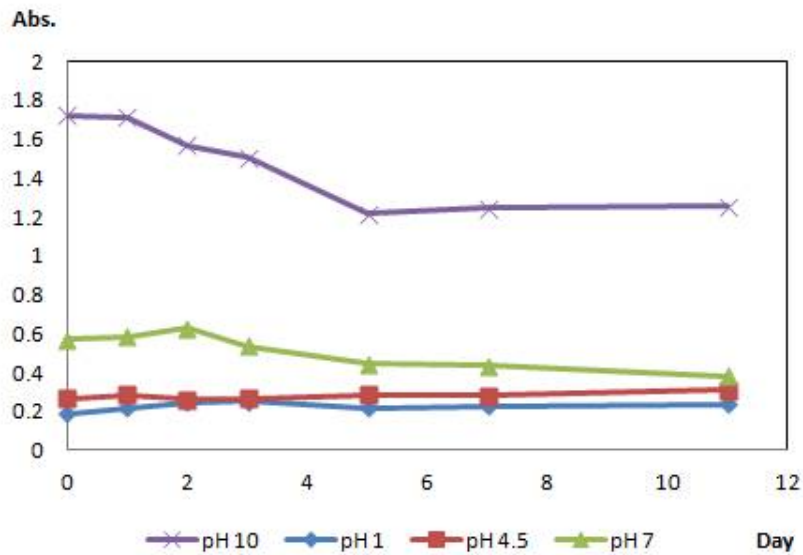


Fig. 3-4. 610 nm에서의 pH에 따른 변화

pH 1 buffer 용액의 최대흡광도인 530 nm에서 pH 1 buffer 용액은 시간이 경과함에 따라 Abs, 값이 증가하였으며 pH 4.5, pH 7, pH 10 buffer 용액은 Abs, 값의 변화가 거의 없다. pH 10 buffer 용액의 최대흡광도인 610 nm에서는 시간이 경과함에 따라 pH 7, pH 10 buffer 용액은 Abs, 값이 감소하였으며, pH 10 buffer 용액은 pH 7 buffer 보다 빠르게 감소한다.

라. pH에 의한 색도 변화

pH가 서로 다른 buffer용액에 발효추출물 분말을 녹인 후 실온(25℃)에 보관하면 색차계 분석을 통해 용액의 색도 변화를 확인하였다.

Table 3-1. 색차계 측정값

day	pH 1	pH 4.5	pH 7	pH 10
0	0	0	0	0
1	6.4	5.1	1.4	0.1
2	6.8	1.3	3.5	0.1
3	7.7	0.6	11.2	0.1
5	5.6	0.9	25.8	0.0
7	7.8	0.9	33.7	0.4
11	8.6	2.1	37.9	3.8

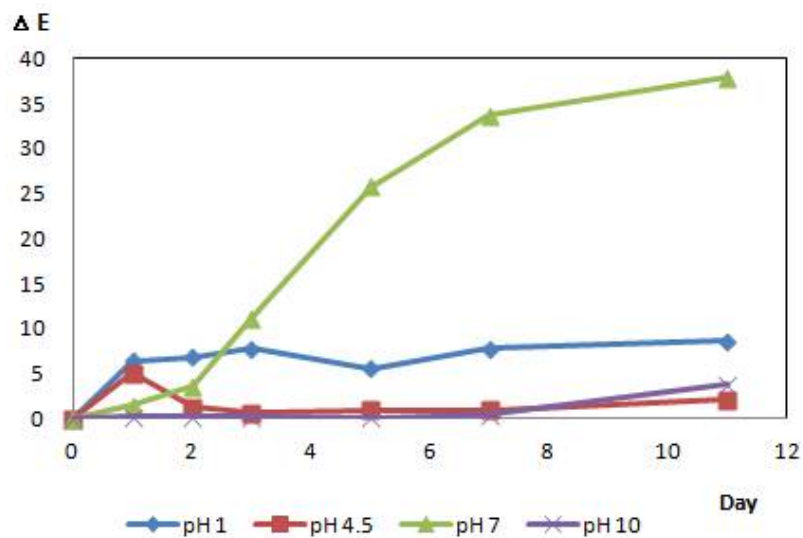


Fig. 3-5. pH에 따른 색도변화

pH 1 buffer 와 pH 4.5 buffer 용액은 저장 기간이 경과함에 따라  $\Delta E^*_{ab}$  값이 3이상으로 제품일 경우 색차와 관련된 claim이 제기 될 수 있는 범위에 해당하는 것으로 육안으로 색도의 변화를 확인할 수 있다. pH 7 buffer 용액은 시간이 경과함에 따라 급속도로  $\Delta E^*_{ab}$  값이 변화하고 있으며,  $\Delta E^*_{ab}$  값이 12이상으로 저장기간이 지남에 따라 색의 계통이 전혀 달라지고 있다. pH 10 buffer 용액은 저장 4일까지 색도의 변화가 거의 없다가 저장 11일째  $\Delta E^*_{ab}$  값이 3.8로 색차와 관련된 claim이 제기 될 수 있는 범위를 나타냈다.

pH에 의한 색도 변화를 확인한 결과, pH 10 > pH 4.5 > pH 1 > pH 7 의 순으로 색도에 대한 안정성을 나타냈다.

### 마. pH에 의한 안토시아닌의 변화 - HPLC 분석

pH가 서로 다른 buffer용액에 발효추출물분말을 녹인 후 실온(25°C)에 보관하면색차계 분석을 통해 용액의 색도 변화를 확인하였다.

#### (1) HPLC chromatogram

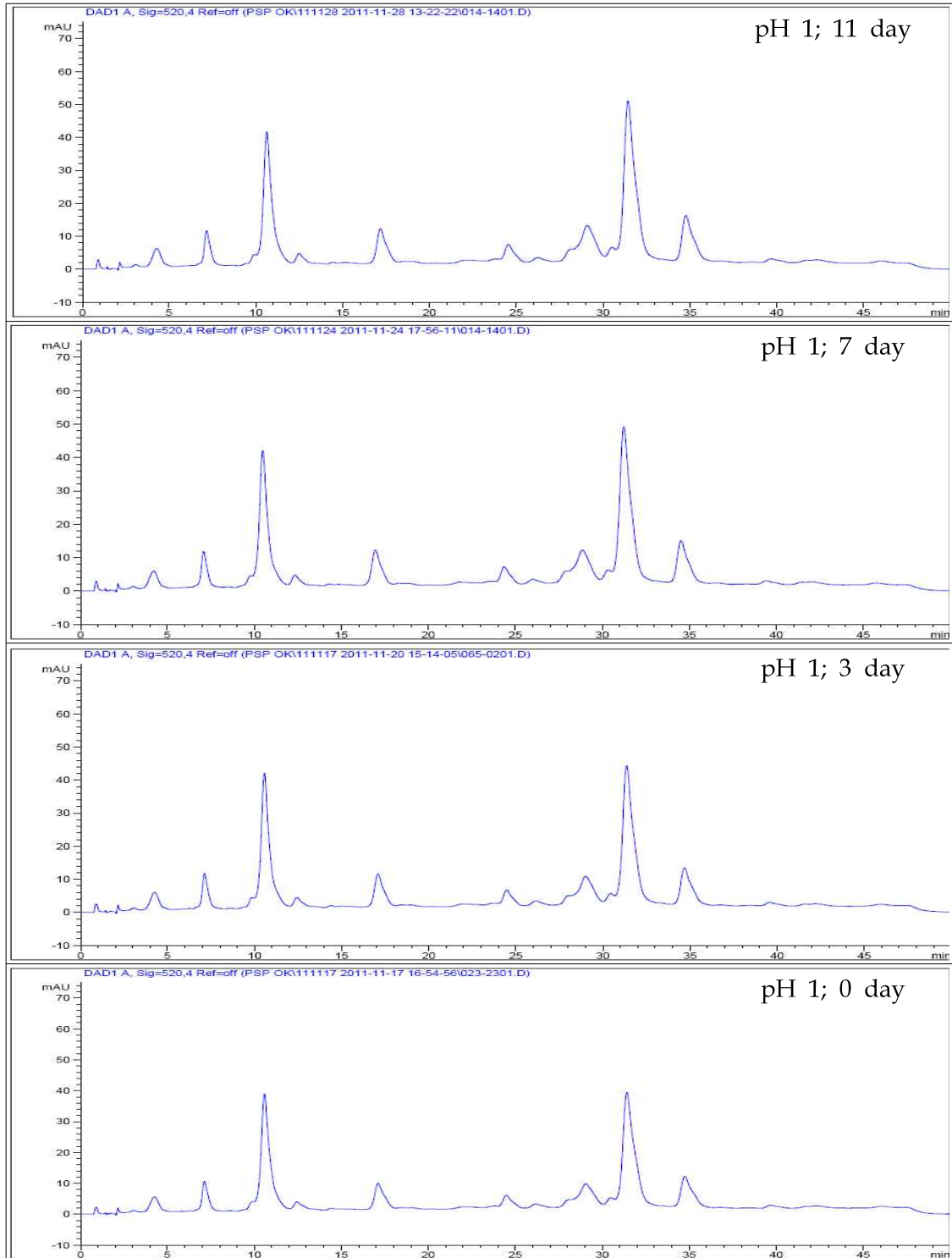


Fig. 3-6. 자색고구마 발효추출분말 pH 1 용액에 보관 시 HPLC chromatogram

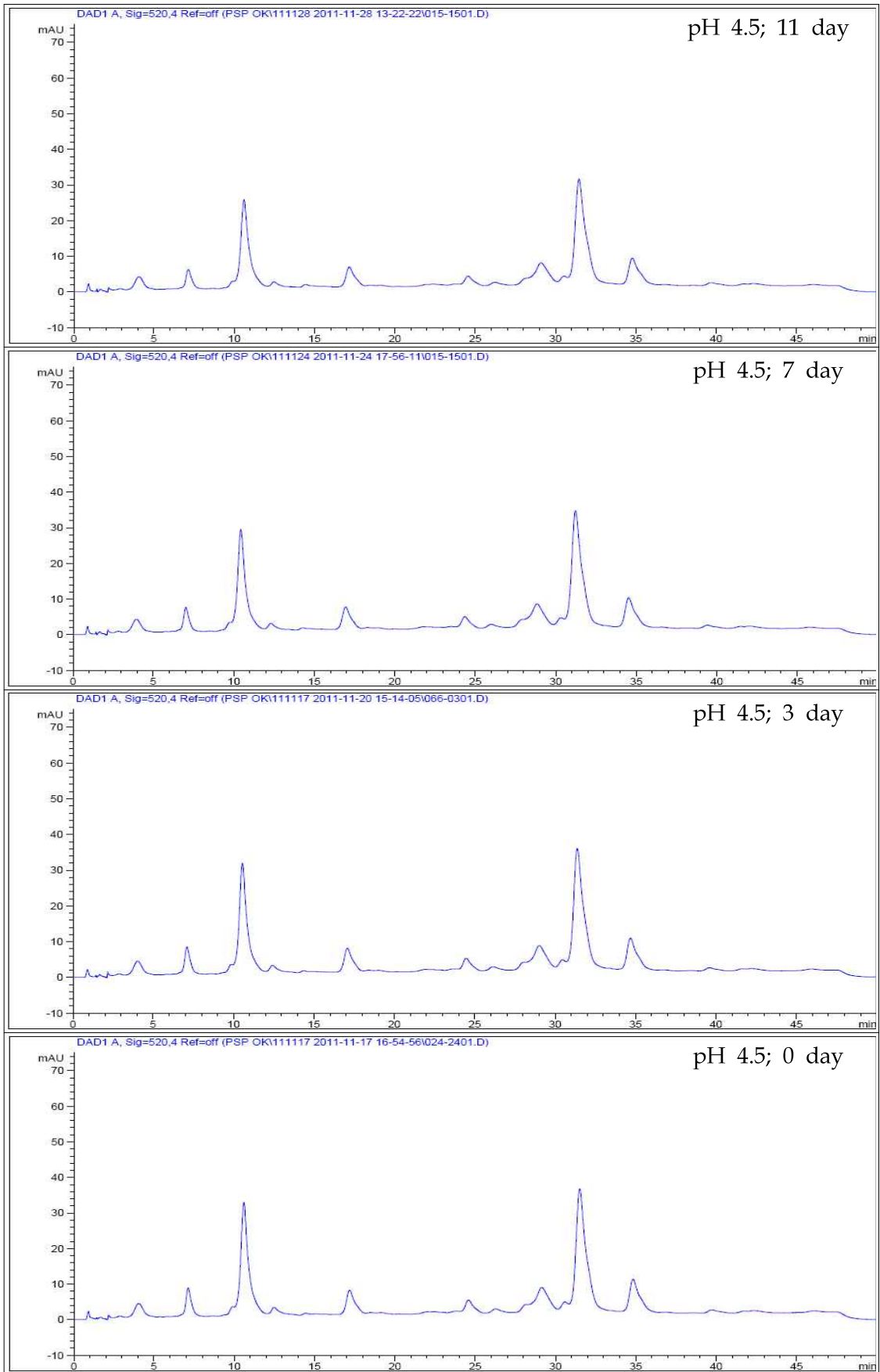


Fig. 3-7. 자색고구마 발효추출분말 pH 4.5 용액에 보관 시 chromatogram

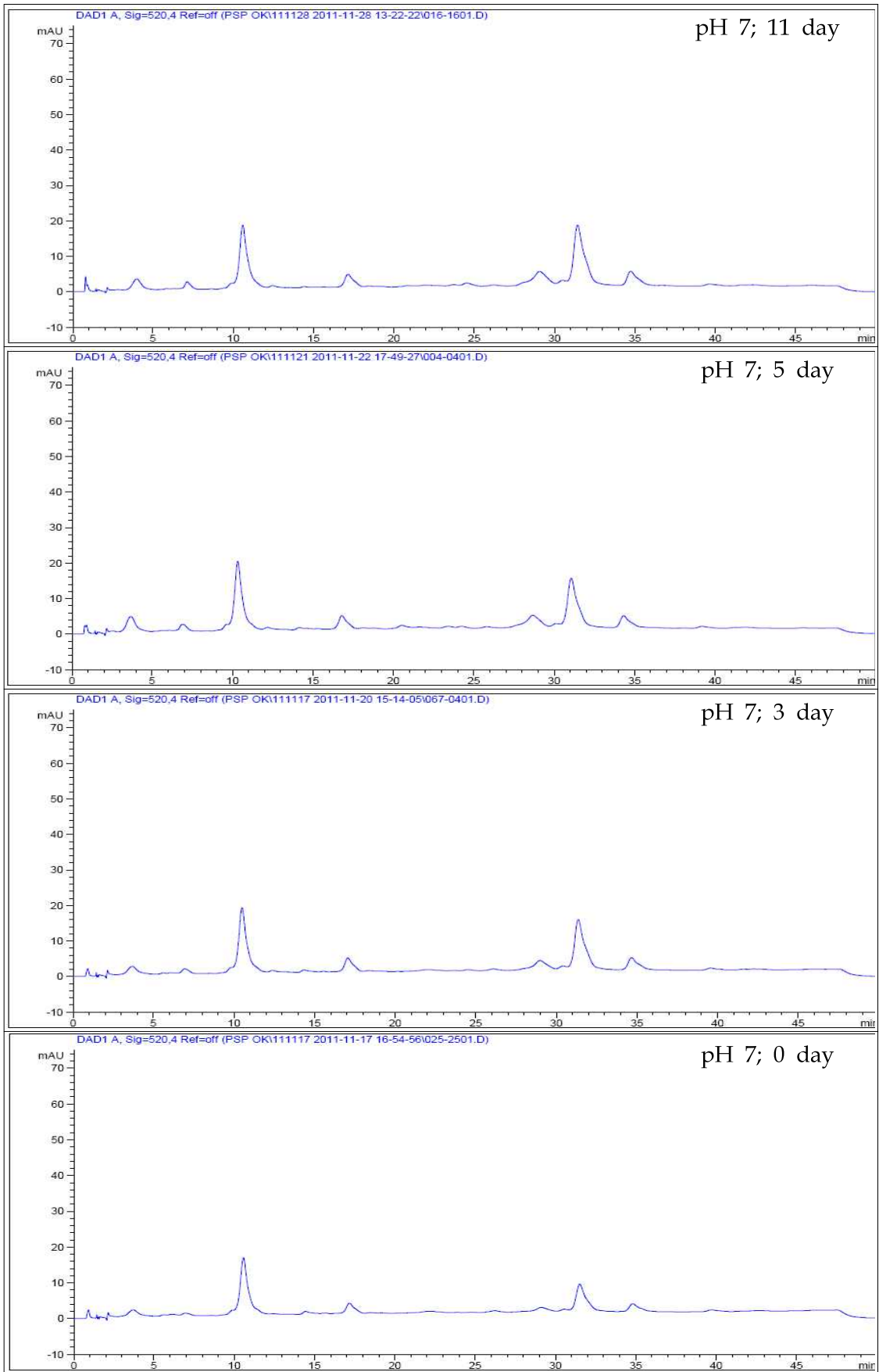


Fig. 3-8. 자색고구마 발효추출분말 pH 7 용액에 보관 시 chromatogram



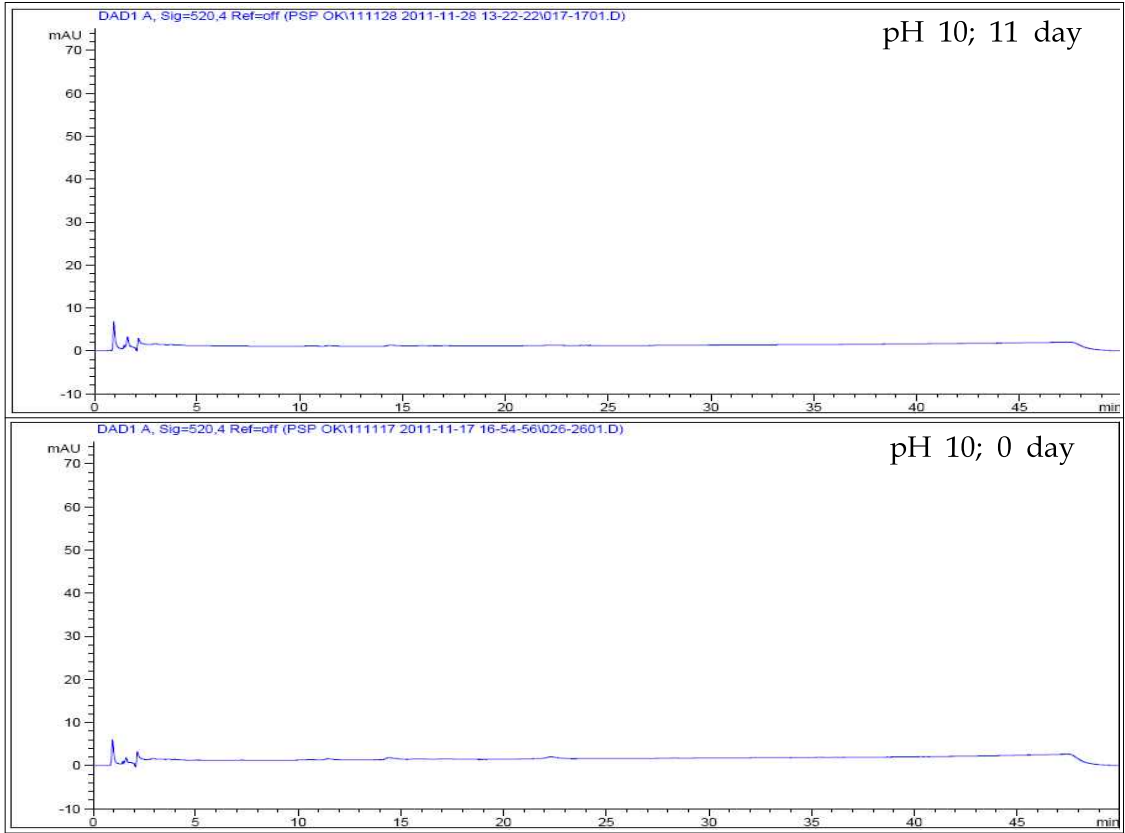


Fig. 3-9. 자색고구마 발효추출분말 pH 10 용액에 보관 시 chromatogram

(2) total area 및 안토시아닌 main peak의 area 비교

HPLC chromatogram을 통해 저장기간 동안 빛의 노출 여부에 따른 안토시아닌의 변화를 확인하였다. total area 및 안토시아닌 main peak의 area를 비교함으로써 보다 쉽게 안토시아닌의 변화를 알아보려고 한다.

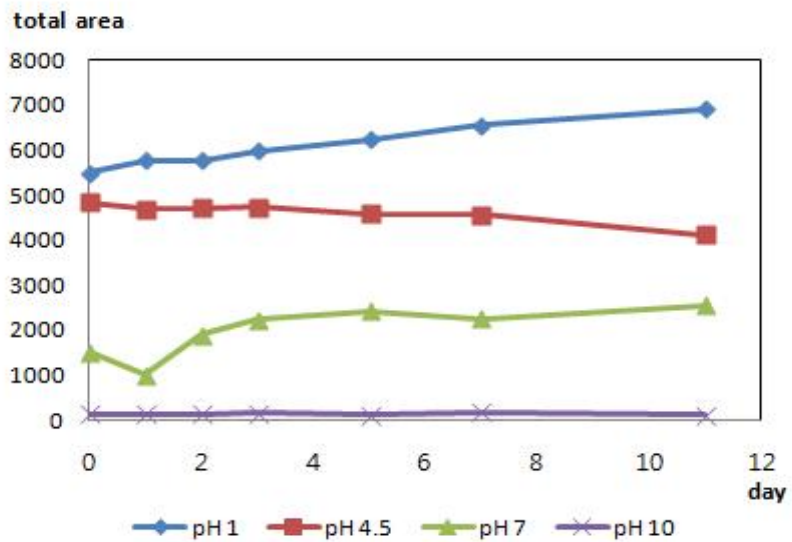


Fig. 3-10. pH에 따른 안토시아닌의 total area 변화

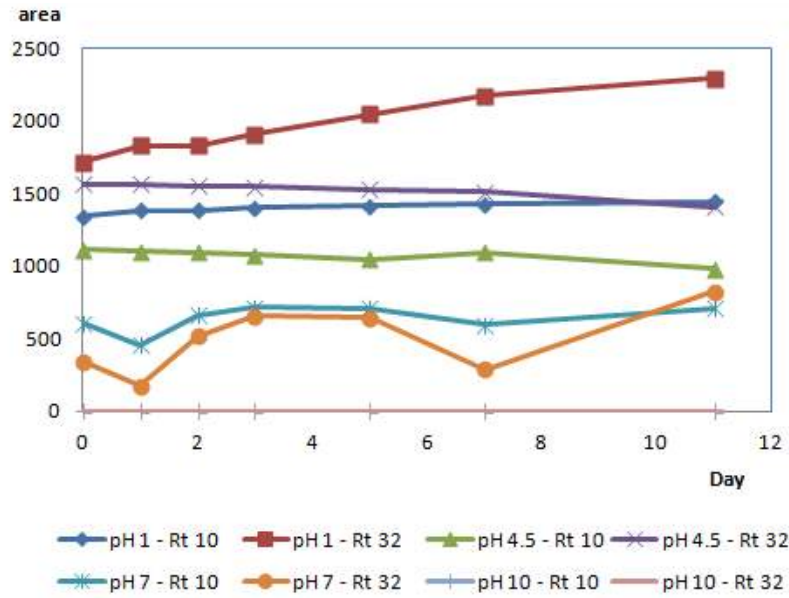


Fig. 3-11. pH에 따른 안토시아닌의 main peak의 area 변화

자색고구마 발효추출분말을 pH가 서로 다른 buffer 용액에 녹여 실온에 보관하면서 안토시아닌의 함량변화를 살펴보았다. pH 1 buffer 용액에 보관 할 때 시간이 경과함에 따라 안토시아닌의 main peak인 Rt 32가 증가하는 것을 확인 할 수 있다. 이는 발효추출물 수용액 C (pH 2)를 실온에 저장할 때와 동일한 결과로서 자색고구마 발효 추출물은 pH가 낮은 환경에서 Rt 32분의 peak가 증가하는 것으로 생각된다. pH 4.5 buffer 용액에 보관 할 때는 시간이 경과함에 따라 안토시아닌이 약간 감소하며, pH 7 buffer 용액에서는 시간이 경과함에 따라 안토시아닌의 main peak인 Rt 32가 증가하는 것을 확인 할 수 있다. pH 10 buffer 용액에서는 520 nm에서 화합물이 검출되지 않아 안토시아닌의 조성의 변화를 확인 할 수 없었다. pH 1과 pH 7 buffer 용액에서 아이러니하게 안토시아닌의 함량증가가 확인되었다.

## 제 4절. 자색고구마 추출물 분말에 대한 제형연구

제형연구에 앞서 자색고구마 추출물에 대한 최적의 건조 기술을 개발하고자 농축액을 대상으로 동결건조와 분무건조를 실시하여 건조에 적합한 기술을 확인하고자 하였다.

먼저 자색고구마 추출 후 농축액을 대상으로 분무건조(inlet temp. 190~200 °C, outlet temp. 80~90 °C, 120~200 mL/min)를 실시한 결과 자색고구마 농축액의 경우 분무건조 후 최종 분말의 회수율이 5% 정도로 아주 낮았으며, 농축액의 분사도 원활하지 못하였다. 이는 아마도 자색고구마 농축액의 유리전이 온도(Tg temp.)가 낮기 때문인 것으로 추측된다.

이에 자색고구마 농축액을 대상으로 동결건조를 실시하여 최종 분말화를 시켜서(아래 동결건조 분말 사진 참고) 제형연구에 사용하였다.



### 1. 캡셀 타입의 제형연구

자색고구마 2차 pilot 발효추출 후 HP 20 정제 후 얻은 분말 중 5 g에 부형제 Maltose 와 1:40의 비율(자색고구마 40 mg : Maltose 160 mg)로 혼합하여 캡셀에 200 mg씩 충전 하였다. 충전 시 캡셀은 대조군인 블루베리추출물과 자색고구마 추출물이 육안 상 구별하지 못하도록 하기 위해 초록색의 캡셀을 사용하였다. 만들어진 캡셀은 위탁기관인 동신대학교 의 시력보호관련 인체적용시험용 시료로 제공하였다.

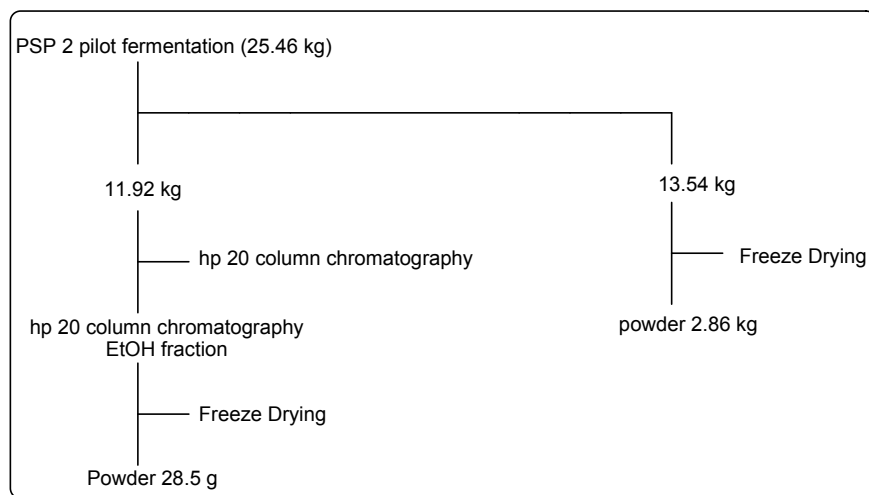


Fig. 1-1. 캡셀제형 연구에 이용한 자색고구마 발효추출물



[대조군]

[자색고구마 발효 추출물]

Fig. 1-2. 자색고구마 발효추출물 캡셀

## 2. Tablet 타입의 제형연구

자색고구마 발효 추출물을 대상으로 섭취하기 용이하면서 보관 및 취급에 적합한 tablet으로 제형 연구를 실시하였다.

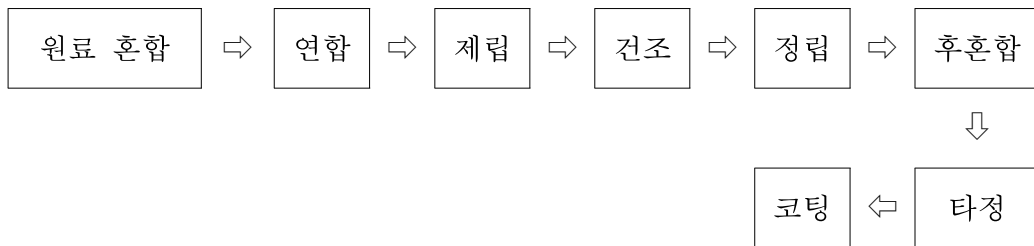


Fig. 2-1. Tablet의 습식과립 제조공정

Table 2-1. 자색고구마 발효추출물 tablet의 배합비율

Material	비율 (%)
발효추출 분말	53
이소말트	45
HPMC	1
Magnesium stearate	1
합계	100

자색고구마 발효 추출물을 대상으로 Table 2-1의 배합비율로 하여 550 mg의 장방형의 모양으로 경도 10.72 kg/cm<sup>2</sup>의 단단한 tablet을 조제하였다.



Fig. 2-1. 자색고구마 발효추출물 tablet

## 제5절 발효 자색고구마의 안전성 평가

### 1. 단회 독성

- 본 시험은 한국화학융합시험연구원(KTR) 헬스케어연구소에서 GLP 규정에 따라 수행되었다.



## 최 종 보 고 서(초안)

TBH-1131 (KG-2011-366)

자색고구마 발효 추출물 분말

SD 랫드에 대한 자색고구마 발효 추출물 분말의 단회 경구투여 독성시험

한국화학융합시험연구원장



### 1. 요약 (Summary)

자색고구마 발효 추출물 분말에 대한 단회 경구독성시험을 조사하기 위하여 SD계 암컷 랫드를 사용하여 시험물질을 투여용량인 2000 mg/kg B.W.로 1 step 및 2 step로 나누어 각 3마리씩 1회 경구 투여한 후 14일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 또한 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사하였다.

- 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰결과 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 보였다.
- 생존동물의 부검 소견 결과 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 자색고구마 발효 추출물 분말은 화학물질 분류 및 표지에 관한 세계조화시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System) Category 5(2000 mg/kg body weight < LD<sub>50</sub> < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

#### 가. 실험동물의 사육

- 암컷 rat을 (주)오리엔트바이오에서 구입 후 일주일간 조명시간을 아침 8시부터 저녁 8시까지 12시간으로, 실내온도 및 습도는 23±3℃, 50±20%로 조절된 사육실에 사육하였다. 실험동물은 5일간 본 사육환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사료는 (주)카길에 그리푸리나, 급수는 UV 조사된 여과수를 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

#### 나. 실험동물의 몸무게 변화

- 실험동물의 몸무게는 입수시, 군분리시, 시험물질 투여 개시 직전, 투여 개시 후 7일 및 14일 때 측정하였다. (2회반복, raw data 첨부 table. 2-1, 2-2)
- 생존동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 보였다.

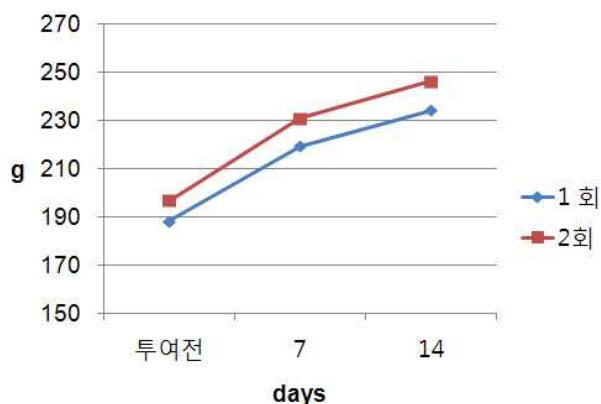


Fig. 4-1. Body weight.

Table. 4-1. 1, 2회 단회 독성 몸무게-1.

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days after administration			
			0	7	14	
1 step	2000	Female	Mean	188.2	219.4 (+31.3)	234.2(+14.7)
			S.D.	2.8	2.6	8.0
			N	3	3	3
2 step	2000	Female	Mean	196.8	230.8(+34.0)	246.3(+15.5)
			S.D.	5.5	5.5	6.4
			N	3	3	3

N : No. of animals, S.D. : Standard deviation

Table. 4-2. 1, 2회 단회 독성 몸무게-2.

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration		
			0	7	14
1 step	2000	F1	188.4	217.9(+29.5)	228.2(+10.3)
		F2	185.3	222.4(+37.1)	243.2(+20.8)
		F3	190.8	218.0(+27.2)	231.1(+13.1)
		Mean	188.2	219.4 (+31.3)	234.2(+14.7)
		S.D.	2.8	2.6	8.0
		2 step	2000	F4	194.4
F5	192.9			224.4(+31.5)	240.5(+16.1)
F6	203.1			234.1(+31.0)	253.2(+19.1)
Mean	196.8			230.8(+34.0)	246.3(+15.5)
S.D.	5.5			5.5	6.4

S.D. : Standard deviation



#### 다. 일반증상관찰 및 생존율

- 전 동물에 대해 매일 1회 이상 증상 관찰을 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 4시간까지는 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 후 14일 까지 실시하였다.
- 시험 기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다. 일반 증상 관찰결과 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. (table 2-3)

Table. 4-3. rat의 사망률

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality (dead / total)	
		Female	
1 step	2000	0% (0 / 3) <sup>a</sup>	
2 step	2000	0% (0 / 3)	

a : No. of dead animals / No. of tested animals

#### 라. 투여용량 및 투여방법

- 발효자색고구마 추출물 2 g/kg b.w./day 을 랫드용 경구 투여 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

Table. 4-4. 투여 용량 및 투여군

시험	시험물질	성	마리수	동물번호	투여량 (mg/kg B.W)	투여액량 (mL/kg B.W)
1 step	자색고구마 발효 추출물 분말	암컷	3	F1 ~ F3	2000	10
2 step	자색고구마 발효 추출물 분말	암컷	3	F4 ~ F6	2000	10

#### 마. 보검 및 부검소견

- 투여 후 14일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후, 부검하여 육안으로 장기를 검사하였다.

- 생존동물의 부건 소견 결과, 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

Table. 4-5. rat의 이상소견

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animal	Clinical signs
1 step	2000	Female	3	NAD
2 step	2000	Female	3	NAD

NAD: No abnormalities detected

## 2. 반복 독성

### 가. 실험동물의 사육

- 수컷 mouse를 (주)오리엔트바이오에서 구입한 후 일주일간 조명시간을 아침 7시부터 저녁 7시까지 12시간으로, 실내온도 및 습도는  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $55\pm 15\%$ 로 조절된 사육실에 사육하였다. 실험동물은 7일간 본 사육환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사료는 고품사료(삼양사료), 급수는 수돗물을 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

### 나. 실험동물의 몸무게 변화

- 실험동물의 몸무게는 경구투여 시작일과 경구투여 마지막 일에 측정하였다. 몸무게 증감(Weight gain; g)은 경구투여 마지막 일에 측정한 몸무게에서 시작일의 몸무게를 제외하여 환산하였다.
- 실험동물에 대한 체중측정 결과 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 보였다.
- 또한, 이는 체중변화량으로 발효 자색고구마 2 g/kg b.w./day 까지 독성이 없음을 확인하였다.

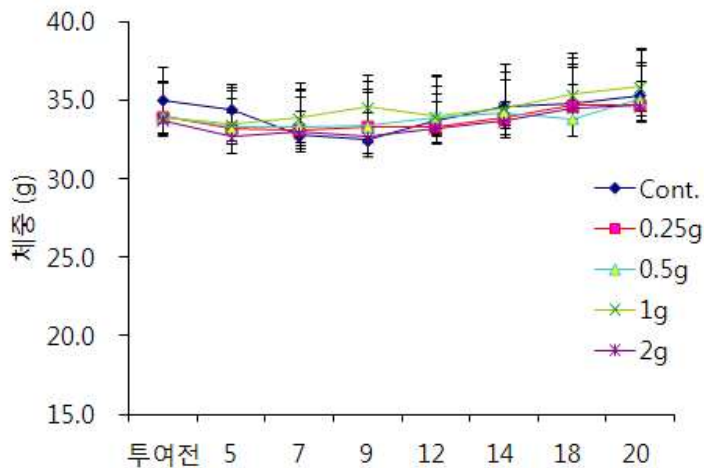


Fig. 4-2. Body weight. Data express the mean  $\pm$  SE.

### 다. 일반증상관찰 및 생존율

- 실험기간동안 1일 1회씩 일반증상 및 사망의 유무에 관하여 관찰·기록하였고, 생존율

은 실험완료 후 각 군에서 사망한 개체수를 생존한 개체수로 나누어 백분율로 환산하였다.

- 시험 기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.

Table. 4-6. 생존율 및 몸무게 변화.

Group(g/kg/day)	No. of Mouse	Initial Wt (g)	Final Wt (g)	No. of Mouse	Survival Rate (%)
0	8	35.0 ± 2.1 <sup>a</sup>	35.3 ± 3.0 <sup>a</sup>	8	100
0.25	8	34.0 ± 2.1 <sup>a</sup>	34.7 ± 2.6 <sup>a</sup>	8	100
0.5	8	34.0 ± 2.2 <sup>a</sup>	35.1 ± 2.1 <sup>a</sup>	8	100
1	8	33.9 ± 2.3 <sup>a</sup>	35.9 ± 2.4 <sup>a</sup>	8	100
2	8	33.7 ± 2.5 <sup>a</sup>	34.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	8	100

Data express the mean ± SD.

#### 라. 투여용량 및 투여방법

- 발효자색고구마 추출물 0, 0.25 0.5, 1, 2 g/kg b.w./day 을 물에 녹여 21일간 매일 경구투여 하였다.

#### 마. 실험동물의 조직무게

- 라와 같이 경구투여 한 쥐는 21일 경과 후 치사하여 간, 신장, 정소를 적출하여 각 장기중량 (g)을 측정하였다.

- 측정 결과 간, 신장, 정소의 조직 무게는 각 군들끼리 유의적인 차이를 보이지 않았다.

- 이 결과는 2 g/kg b.w./day 까지 독성을 보이지 않는 것을 확인하였다.

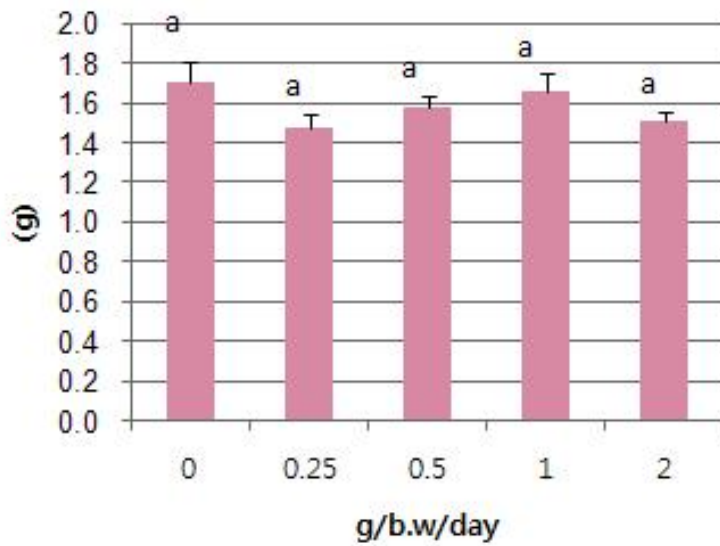


Fig. 4-3. Liver weight of experimental mice for toxicity test.

Data express the mean  $\pm$  SE.

0; Normal control

0.25; 0.25 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

0.5; 0.5 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

1; 1 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

2; 2 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

Different letters are statistically different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

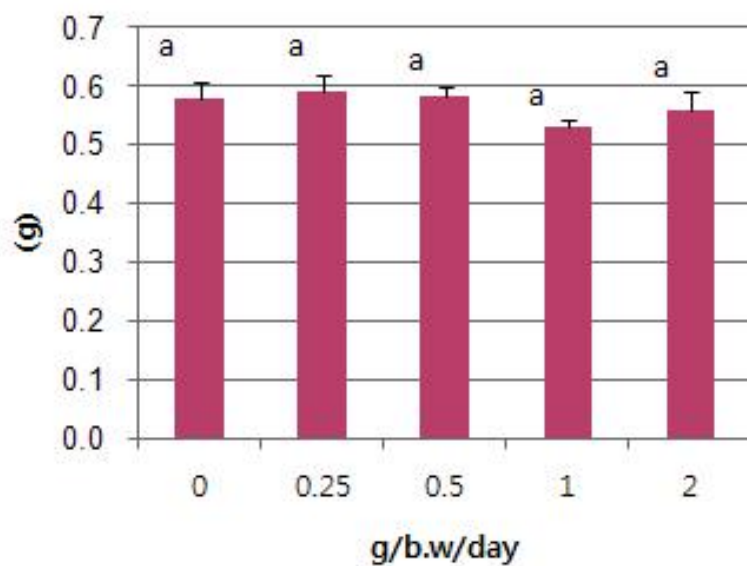


Fig. 4-4. Kidney weight of experimental mice for toxicity test..

Data express the mean  $\pm$  SE.

0; Normal control

0.25; 0.25 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

0.5; 0.5 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

1; 1 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

2; 2 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

Different letters are statistically different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

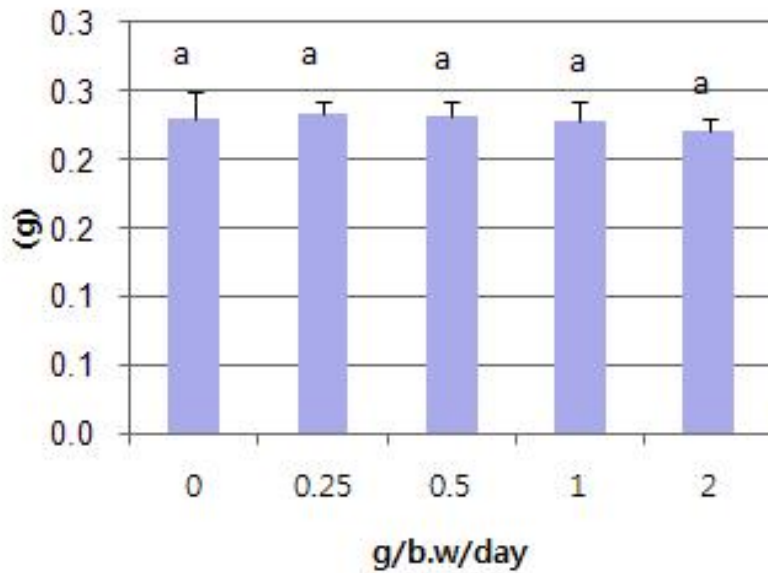


Fig. 4-5. Testis weight of experimental mice for toxicity test.

Data express the mean  $\pm$  SE.

0; Normal control

0.25; 0.25 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

0.5; 0.5 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

1; 1 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

2; 2 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

Different letters are statistically different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

바. 혈중 생화학적표지물질의 측정

- 실험 종료 후 24시간 동안 절식 시키고 혈액을 채취한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고, Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) 등 혈액생화학적 parameter를 측정하였다.
- 발효 자색고구마의 독성을 평가한 쥐의 혈청 AST, ALT, ALP는 2 g/kg b.w./day 군 까지 각 군별 통계적 유의차를 보이지 않으며 이 용량까지 안전한 용량범위임을 확인할 수 있었다.

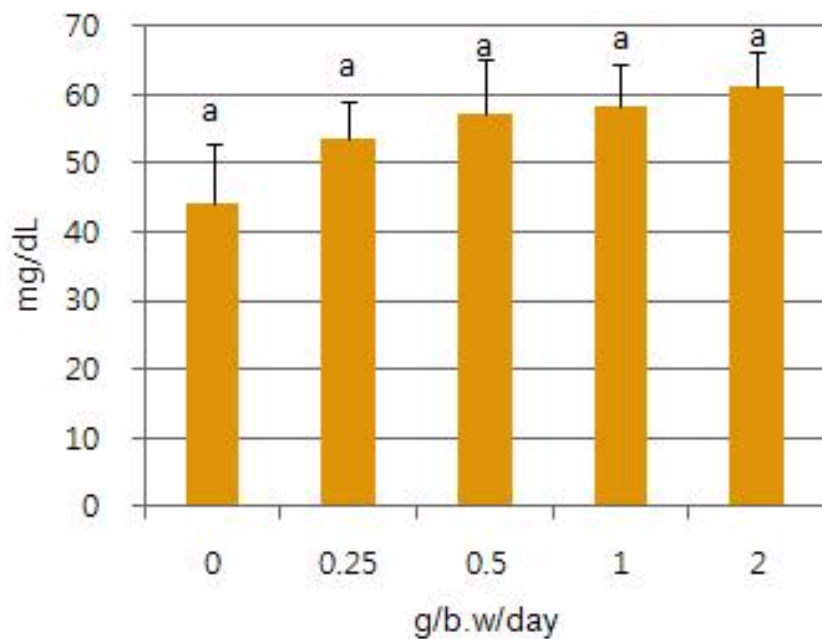


Fig. 4-6. AST in experimental mice for toxicity test.

Data express the mean  $\pm$  SE.

0; Normal control

0.25; 0.25 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

0.5; 0.5 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

1; 1 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

2; 2 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

Different letters are statistically different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

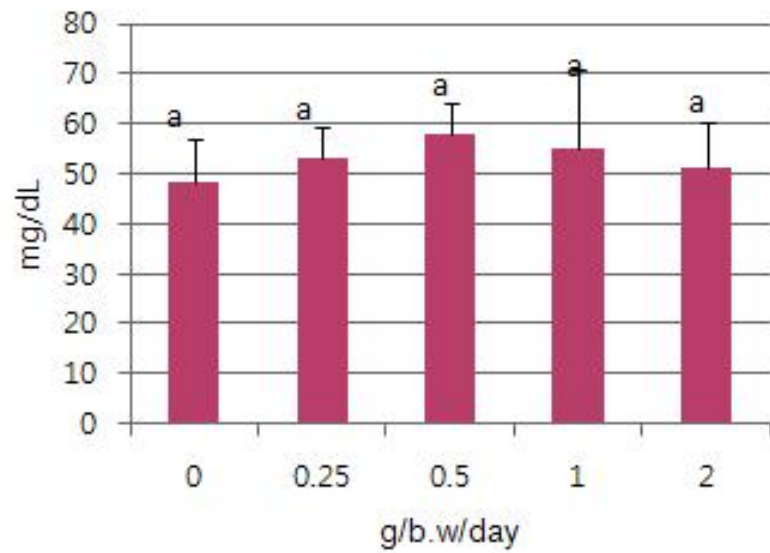


Fig. 4-7. ALT in experimental mice for toxicity test.

Data express the mean  $\pm$  SE.

0; Normal control

0.25; 0.25 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

0.5; 0.5 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

1; 1 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

2; 2 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

Different letters are statistically different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )



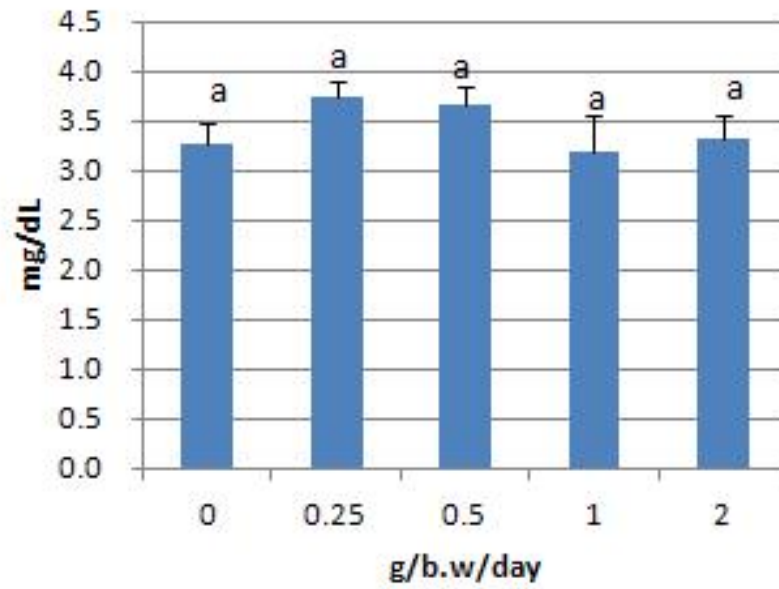


Fig. 4-8. ALP in experimental mice for toxicity test.

Data express the mean  $\pm$  SE.

0; Normal control

0.25; 0.25 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

0.5; 0.5 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

1; 1 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

2; 2 g/kg b.w./day of fermented purple sweet potato extracts

Different letters are statistically different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

## 제6절 자색고구마 추출물 분말의 기능성 효능평가

### 1. 자색고구마의 *in vitro* 기능성

#### 가. 항비만

##### (1) 3T3L1의 지방 축적 억제 효과

##### (가) 3T3-L1 아지방 세포 배양

- Mouse 배아에서 유래된 3T3-L1 아지방 세포는 4.5 g/L, 10% fetal bovine serum, Gibco 16170 , penicillin/streptomycin(100 $\mu$ g/mL penicillin, Gibco 15140 and 100 $\mu$ g/mL streptomycin in 0.85% saline), 1% 100uM sodium pyruvate을 함유한 DMEM, Lonza 12-604F 로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

##### (나) 세포독성

- 세포독성은 Rochem 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 24 wells plate에  $2 \times 10^5$  cells/well의 세포를 분주한 후 confluent 될 때까지 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 대상 시료가 용해된 serum이 3% 함유된 배지 1 mL을 분주하고 재 배양을 3, 6, 9일로 배지를 바꿔주며 배양 하였다. 9일 이후 각 well에 0.25 mL의 XTT-PMS 용액(1 mg XTT and 10 g PMS/mL of MEM without phenol red)을 첨가하고 다시 2시간 배양한다. 세포독성도는 formazan의 형성 정도를 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 향후 독성이 미치지 않는 범위 내에서 실험을 진행하였다 (Fig. 5-1).

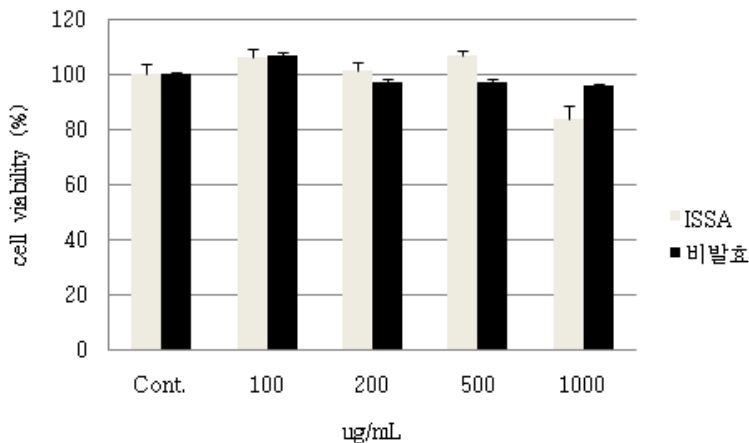


fig. 5-1. Toxicity test. Data express the mean  $\pm$  SD.

Cont.; Normal control

ISSA; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts

비발효; Purple fleshed-sweet potato extracts.

(다) Oil red O

- 3T3-L1 세포는 mouse fibroblast인 3T3 세포에서 유래된 세포주로서 적절한 조건하에서 배양하면 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있다.
- adipocyte로 분화 시 단백질들의 분비가 촉진되는 등 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는 모델로 많이 사용되고 있다.
- 따라서, 분화 촉진 인자들에 의해 분화된 3T3-L1 세포는 세포 내 지방이 축적되며 지방과 관련된 콜레스테롤, 중성지방 등 지방세포로서의 형태 및 특성을 나타나게 된다.
- 세포에 분화 촉진 후 완료 이후 세포내 지방구 생성을 확인하기 위해, 지방적(lipid droplets)의 지방에 특이적으로 반응하여 염색되는 Oil Red O 염색법을 수행하여 축적 중인 지방을 염색된 지방구를 흡광도를 이용하여 분석하였다.
- 3T3-L1 아지방 세포의 지방세포로의 유도는 세포 배양 well에 100% confluent 되고 이틀 후 100 uM 3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma I5879, 250 uM dexamethasone, Sigma D4902, 170 uM insulin (MDI), 을 함유한 배지로 지방세포로 유도하였으며 3일 후에 MDI 배지는 10% FBS와 170 nM insulin, Sigma I9278 을 함유한 DMEM 배지로 각 실험 날짜까지 이틀에 한번 교환하였다.
- 3T3-L1 세포배양 중 각각 3, 6, 9일에 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)로 2번 세정하고 0.6%의 Oil Red O 용액을 준비한 후 약 2시간 동안 염색하고, PBS로 3번 세정한 후 isopropanol 1.5 mL을 넣어 oil red를 용출시켰다.
- 용출시킨 용액을 500 nm에서 흡광도를 측정하였다 (fig. 5-2).

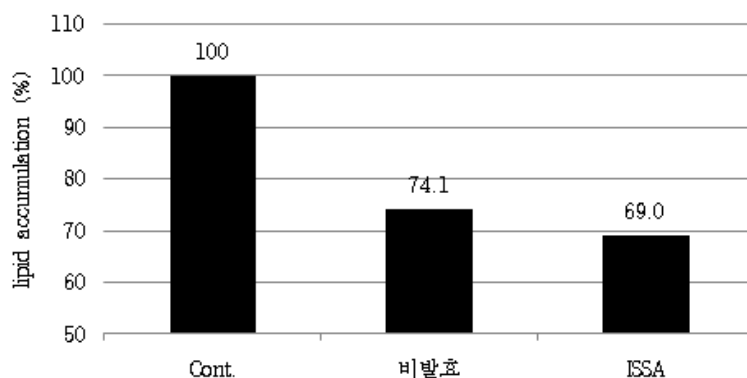


fig. 5-2. 자색고구마 추출물의 Oil red O.

Cont.; Normal control

비발효; Purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$

ISSA; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

- Oil red O 염색법을 통한 지방 축적 저해능을 평가 시에 자색고구마를 첨가한 군이 아무것도 첨가한 군에 비해 지방 축적 억제능을 현저히 증가 시켰다.
- 또한, 자색고구마의 비 발효 군에 비해 발효 군이 지방 축적 억제능이 더 높게 관찰 되어 발효로 인한 지방 축적 억제능을 평가 및 비교하기 위해 향후 지방 축적에 대한 추가 실험을 시행 하였다.

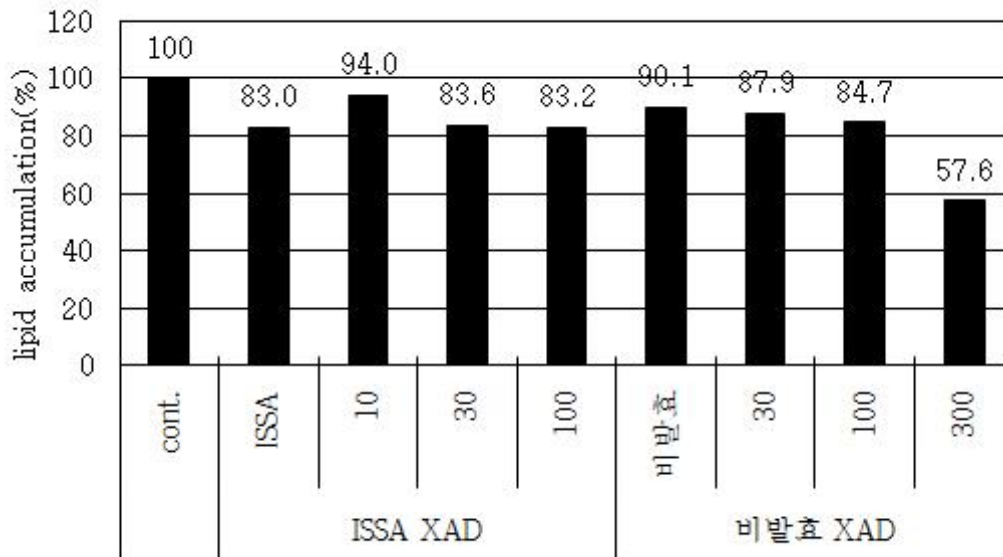


fig. 5-3. 자색고구마 XAD의 Oil red O.

Cont.; Normal control

ISSA; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$

ISSA XAD; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts of XAD column 10, 30, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 비발효; Purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$

비발효 XAD; Purple fleshed-sweet potato extracts of XAD column 30, 100, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- 지방 축적 및 지방 유도시에 자색고구마의 당 성분이 영향을 미치는 것을 배제하기 위해 당을 제거 하는 XAD의 정제 과정을 시행하였다.
- 정제 과정을 거친 XAD 자색고구마 샘플에서 자색고구마 추출물에 비해 더 낮은 농도에서 추출물과 비슷한 지방축적 저해능을 보였다.
- 이 실험을 통해 자색고구마의 붉은 색인 색소 성분에 지방축적 저해 물질이 있다고 추측된다.

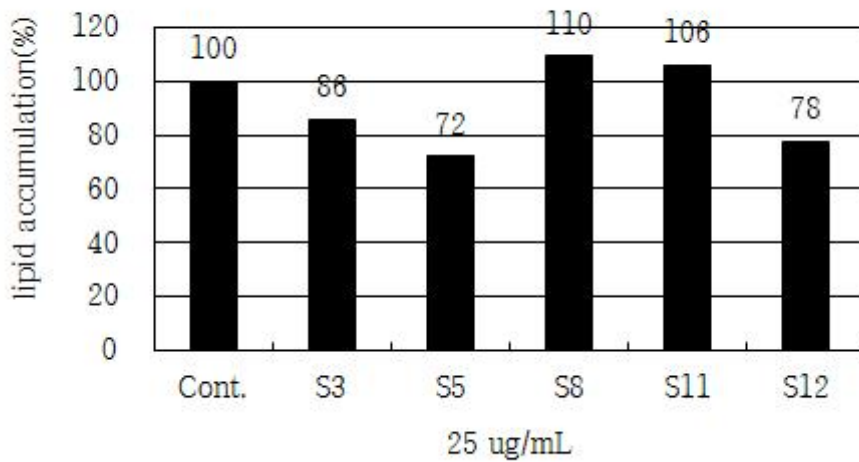
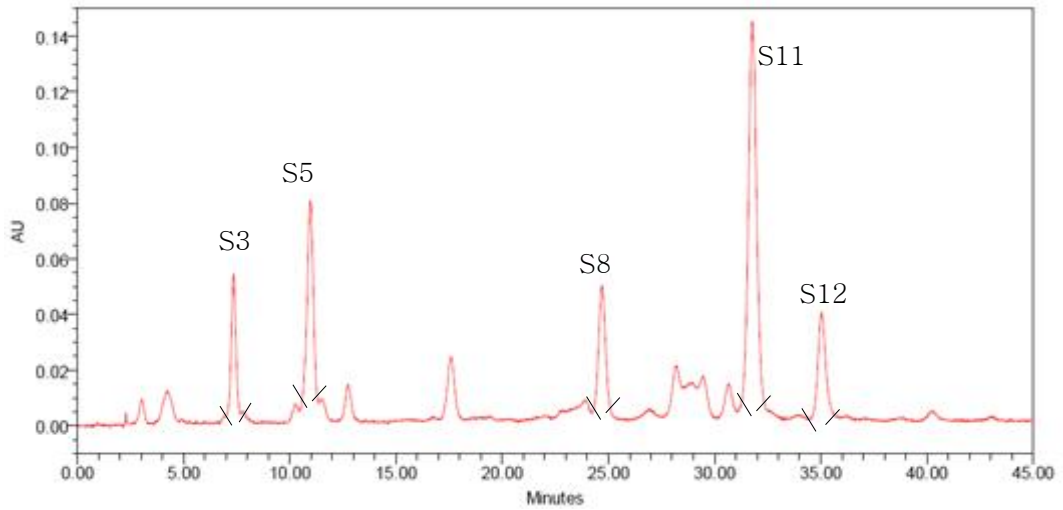


fig. 5-4. 비발효 자색고구마 HPLC 을 통한 분리물질의 Oil red O.

Cont; Normal control

S3, S5, S8, S11, S12; 비발효 자색고구마의 HPLC를 통한 분리 및 단리 물질

- 물질의 분리 및 단리하여 각 물질별 지방 축적 억제능을 평가하였다.
- 단리 물질 중 S5라고 명명한 화합물이 다른 화합물에 비해 가장 높은 지방 축적 저해능을 보였다.

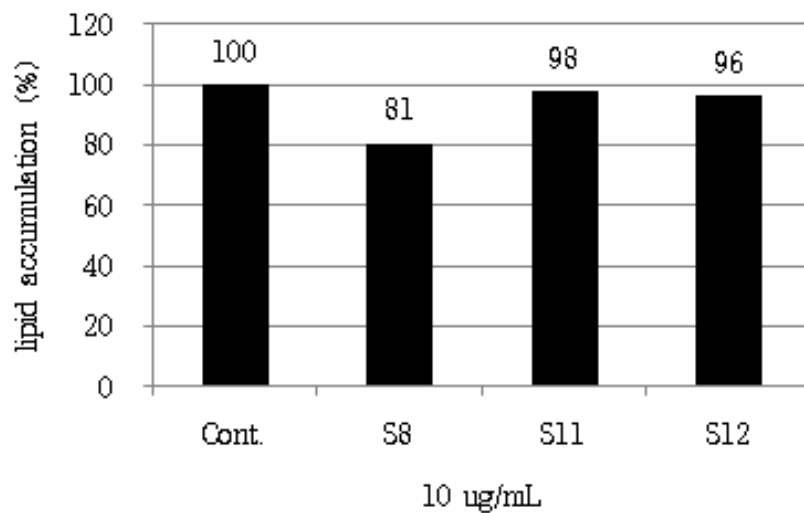
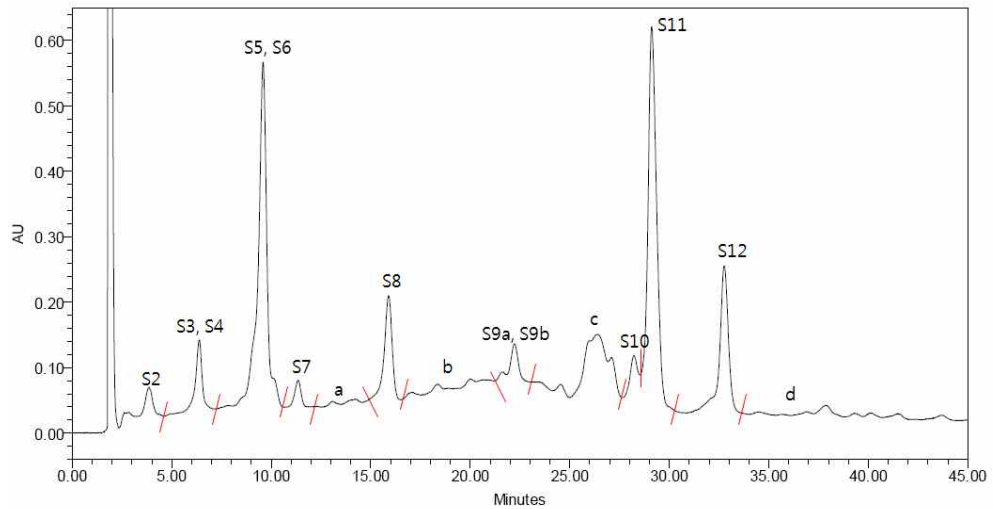


fig. 5-5. 발효 자색고구마 HPLC를 통한 분리물질의 Oil red O.

Cont; Normal control

S8, S11, S12; 발효 자색고구마의 HPLC를 통한 분리 및 단리 물질

- 물질의 분리 및 단리하여 각 물질별 지방 축적 억제능을 평가하였다.
- 단리 물질 중 S8번이라고 명명한 분리물이 지방 축적 저해능을 보였으며, 다른 단리 물질들은 지방 축적 저해능을 거의 보이지 않았다.

(라) 중성지방 함량 (triglyceride)

- 세포내에 지방 축적을 통한 대사 과정 중에 중성지방이 축적된다. 축적된 중성지방의 함량을 adipored 시약을 통해 확인하였다. adipored 시약은 중성지방을 선택적으로 염색한다.

- 분화가 완료된 지방세포의 배지를 제거 후 PBS로 씻어내어 제거 후 각 well 에 PBS 및

adipored 시약을 첨가하여 10분 37°C에서 반응 후 485 nm로 흡광도를 측정한다.

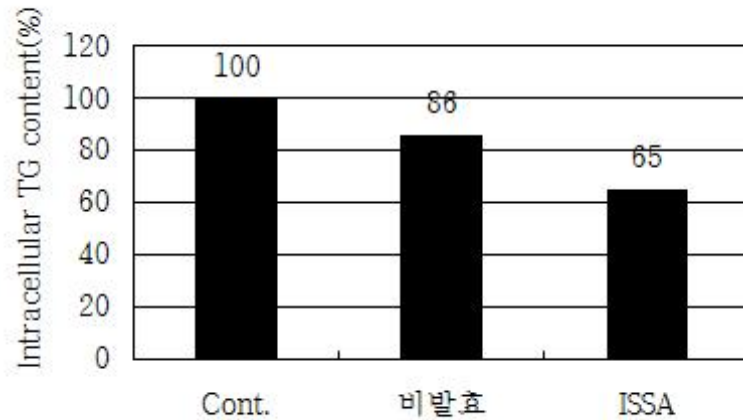


fig. 5-6. 자색고구마 추출물의 세포내 중성 지방 함량.

Cont. ; Normal control

비발효 ; Purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$

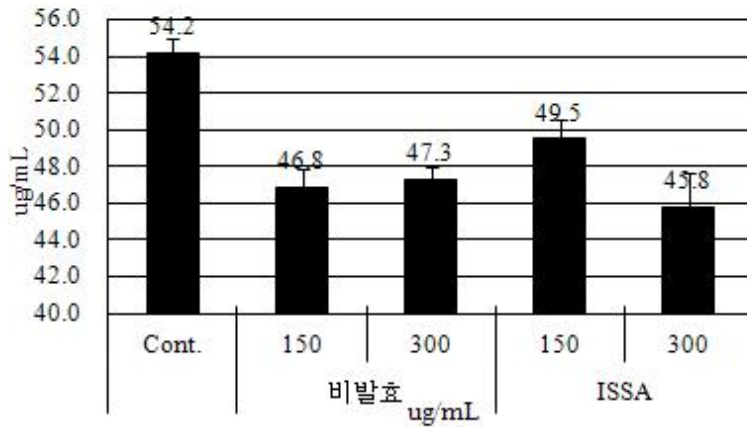
ISSA ; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

- 세포내에 지방축적을 통한 중성지방의 함량을 본 결과 아무것도 처리하지 않은 군 보다 자색고구마 처리 군의 중성지방 함량이 유의적으로 낮아졌으며, 비발효 군보다 발효 군이 중성지방 함량이 유의적으로 낮음을 볼 수 있다.

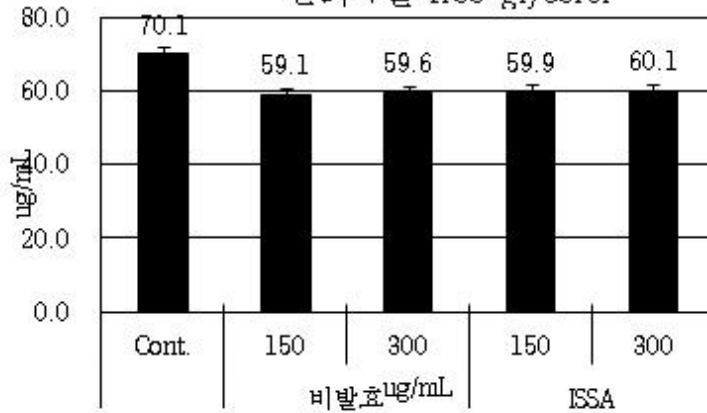
#### (마) Glycerol release

- Glycerol은 중성지방이 분해되는 대사 과정 중에 나오는 분해물이다. 세포의 분화 과정 및 완료 후에 배지내의 glycerol 양을 측정함으로써 자색고구마에 대한 세포 내 지방 및 중성지방의 축적 억제능을 알 수 있다.
- McGowan 등의 방법에 따라 중성지방의 분해물인 glycerol 함량을 측정함으로써 조사하였다.
- 방출된 glycerol은 ATP의 존재 하에서 glycerol kinase에 의해 glycerol-1-phosphate로 전환되며 이는 glycerol phosphate oxidase에 의해 dihydroxyacetone phosphate와 hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )로 산화된다. 생성된  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 4-aminoantipyrine과 sodium N-ethyl-N-(3-sulfo-propyl) m-anisidine 존재하에서 peroxidase에 의해 자주색을 띠는 quinoneimine로 전환된다. 따라서 생성된 quinoneimine에 의해 540 nm에서 흡광도의 증가는 배지 내에서 glycerol 농도 증가를 나타낸다.
- Glycerol 함량은 free glycerol을 표준시약으로 사용한 표준곡선을 작성함으로써 측정하였다.

분화 4일 free glycerol



분화 7일 free glycerol



분화 10일 free glycerol

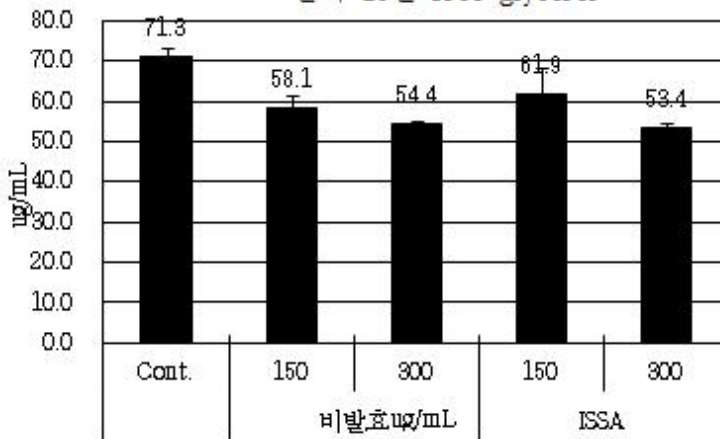


fig. 5-7. 자색고구마 추출물의 free glycerol 량.

Data express the mean  $\pm$  SD.

Cont. ; Normal control

비발효 ; Purple fleshed-sweet potato extracts 150, 300  $\mu$ g/mL

ISSA ; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts 150, 300  $\mu$ g/mL



- 본 실험을 통해 free glycerol 량으로 중성지방의 함량 및 분해능을 알 수 있다.
- 4, 7, 10 일 각각 분화 과정 동안 세포의 배지를 통해 glycerol 양을 측정한 실험 결과 아무것도 처리 하지 않은 군에 비해 자색고구마 처리군은 배지내에 free glycerol의 낮은 함량을 확인할 수 있었다.
- 이 결과는 분화 시작일인 4일부터 중성지방의 생성이 억제 됨을 확인 할 수 있었고, 분화 완료일인 10일 까지 중성지방 축적함량이 저해됨을 알 수 있었다.

#### (바) Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

- 자색고구마추출물 처리에 따른 lipid lipase 발현을 RT-PCR로 확인하였다.
- 본 실험에서 RT-PCR로 확인한 DNA는 PPAR $\gamma$ 로 지방 세포 분화 조절 중 지방을 생성 시키는 중요한 역할을 한다 (fig. 1-8). 주로 지방 조직과 대식세포에서 발현이 되며 번역 개시점에 따라 PPAR $\gamma$ 는 PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2로 나뉘는데 PPAR $\gamma$ 2가 주로 지방조직에서 발현이 된다.
- 이 발현과정 중 지방산을 중성지방의 형태로 저장하는 기능이 있으며, heterodimer를 형성하여 aP2, LPL, ACC 와 같은 지방 세포 유전자의 발현에 관여한다.
- 추출물을 6-well plate에서 키운 3T3-L1 세포에 4, 7, 10일을 처리한 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit로 제조사의 manual에 따라 세포내의 total RNA를 추출하였다.
- cDNA의 합성을 위해 1  $\mu$ g의 total RNA에 200 unit의 MLV-RT reverse transcriptase와 500 ng oligo-dT primer를 첨가하여 42°C에서 60분간 합성 작업을 수행하였다.
- Real-Time PCR은 DyNAmo<sup>TM</sup>HS SYBR Green qPCR kit(Finnzymes, Finland)를 사용하여 시행하였다. 각각의 cDNA 1 uL, forward primer(10 pmol/uL) 1 uL, DyNAmo<sup>TM</sup>HS SYBR Green qPCR kit(Finnzymes, Finland) Premix(X2) 용액 10 uL, 증류수 7 uL를 혼합한 후 PTC-200 Peltier Thermal Cycle(MJ Reserch)를 사용하여 유전자 조건에 맞는 PCR을 시행하였다.
- PCR을 위한 혼합액 최종농도는 2 ul의 cDNA, 1.25 unit의 Taq DNA polymerase, 10 pmol primers이 되도록 하였고 95°C에서 10분간 hot start 한 후 94°C에서 30초간, 55°C에서 1분, 72°C에서 30초간 35 cycling 으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 polishing step을 거쳐 PCR product를 얻었다. Melting Curve 분석은 65°C에서 95°C사이에서 하였다.

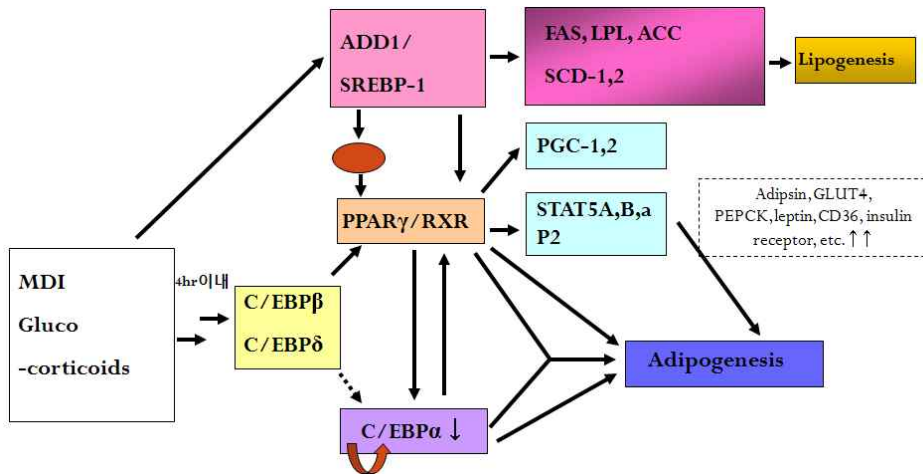


Fig. 5-8. A model of the transcriptional cascade leading to adipogenesis

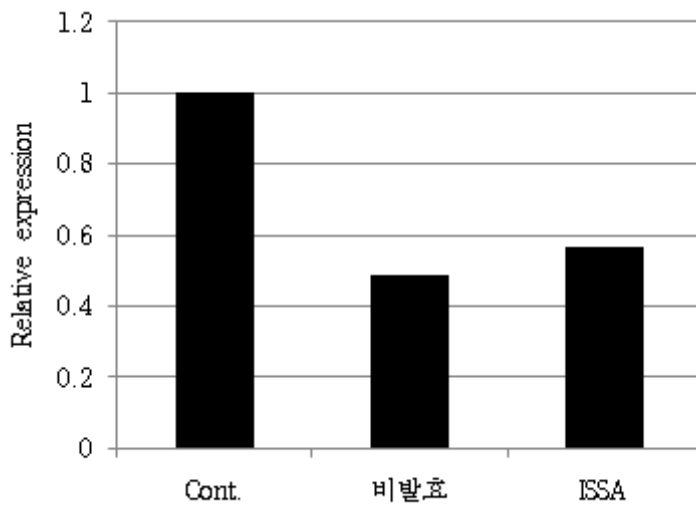


fig. 5-9. 자색고구마 추출물의 PPAR $\gamma$ .

Cont. ; Normal control

비발효 ; Purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu$ g/mL

ISSA ; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu$ g/mL

- 자색고구마 추출물 처리군이 비처리군 보다 지방 대사과정 시 관여되는 PPAR $\gamma$  전사 인자 발현 감소를 나타내며, 이는 DNA 수준에서 지방 축적 억제능을 확인한 것으로 자색고구마 추출물이 지방 저해 억제능이 있음을 확인하였다.

(2) HepG2의 지방축적 억제효과

(가) Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) 발병의 원인

- NASH 발병의 원인은 다양한 인자의 영향으로 발생하게 되는데 대표적인 원인으로는 최근 고콜레스테롤 섭취로 인해 지방산의 생성이 증가하게 되고 증가된 지방산은 체내에서 활성산소의 유발을 증가시켜 염증유발인자의 발현 및 활성을 증가시킨다 (Fig. 5-10). 따라서 지방산의 대사의 조절은 비만을 조절하는데 매우 중요한 역할을 한다.

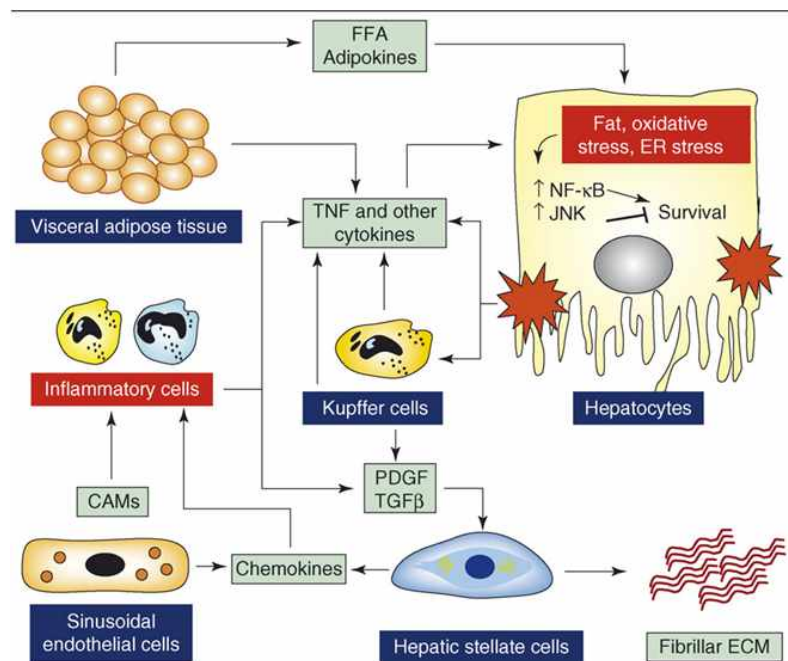


Fig. 5-10. Mechanisms of inflammation in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)(Trends in Molecular Medicine Vol.14 No.2).

- 1차년도 연구에서는 발효자색고구마 유용성분의 비만 및 당뇨 개선 활성 평가를 위하여 *in vitro* 세포에서 인슐린 저항성 조건을 확립하였다.
- 2차년도 에서는 1차년도의 연구 결과를 검증하기 위하여 고농도의 지방산 (Free fatty acids: FFAs)을 처리하여 고식이 동물 모델과 유사한 세포 배양조건을 확립하였으며 *in vitro* 지방산 조건을 확립하기 위하여 인체 간세포인 HepG2 세포에 고농도의 지방산 (oleate and palmitate, 1: 1)을 24시간 이상 처리하여 인지지방산으로 인한 steatosis 배양 조건을 확립하였다.
- 확립된 *in vitro* 지방산 steatosis 배양 조건에서 발효자색고구마 추출물의 지질생성 억제 효능을 평가한 결과 고농도 (200 µg/mL)에서 0.6 mM의 지방산 처리에 의해서 증

가한 지질의 생성이 억제 되었으며, triglycerides 함량도 감소하였다 (Fig. 5-11~13).

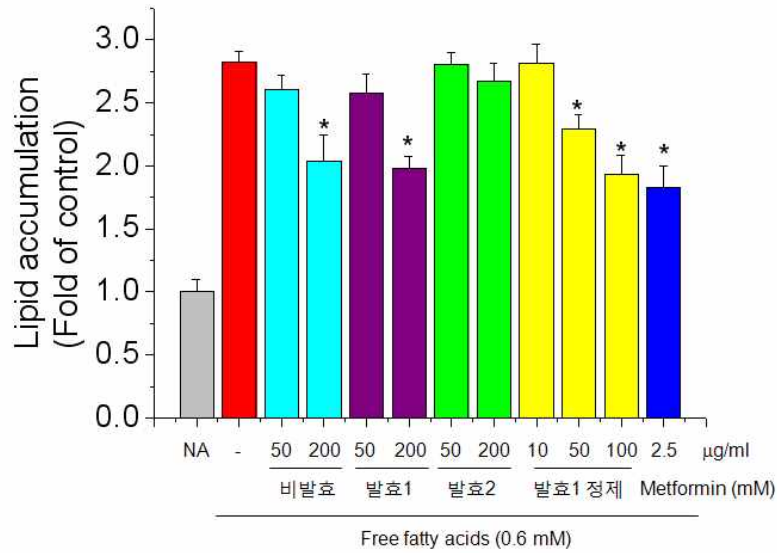


Fig. 5-11. Inhibition of high glucose-induced triglycerides by FPSP in HepG2 cells. Human HepG2 cells were treated with 5.5 or 30 mM glucose together with FPSP (50, 200 mg/mL) for 24 hours. Triglyceride contents in cell lysates were expressed as micrograms lipid per milligram protein. \*Significantly different from high glucose-treated cells ( $P < 0.0$ ).

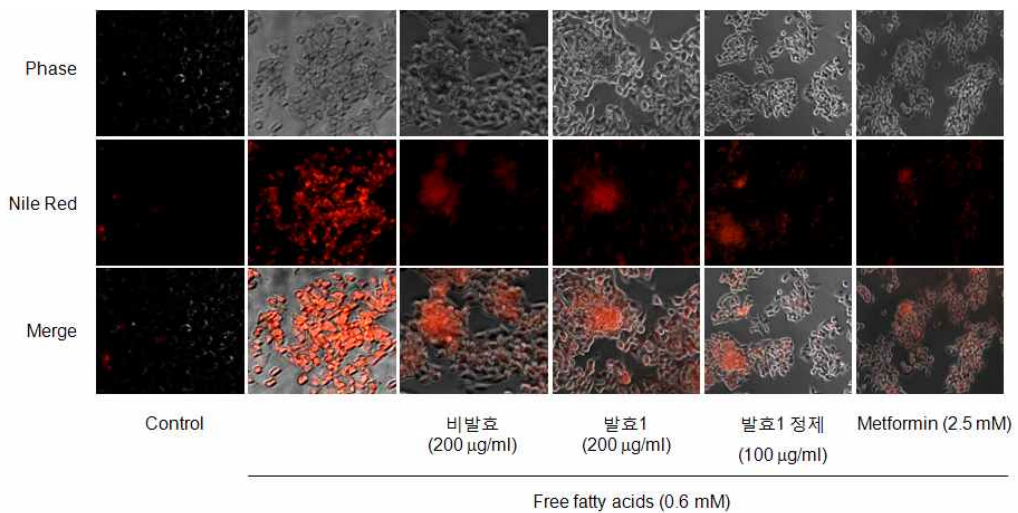


Fig. 5-12. Inhibition of FFAs-induced lipid accumulation by FPSP in HepG2 cells. Human HepG2 cells were treated with 0.6 mM FFAs together with FPSP (100 or 200 mg/mL) for 24 hours. Intracellular lipids were stained with Nile red and measured with fluorescence microscopy.

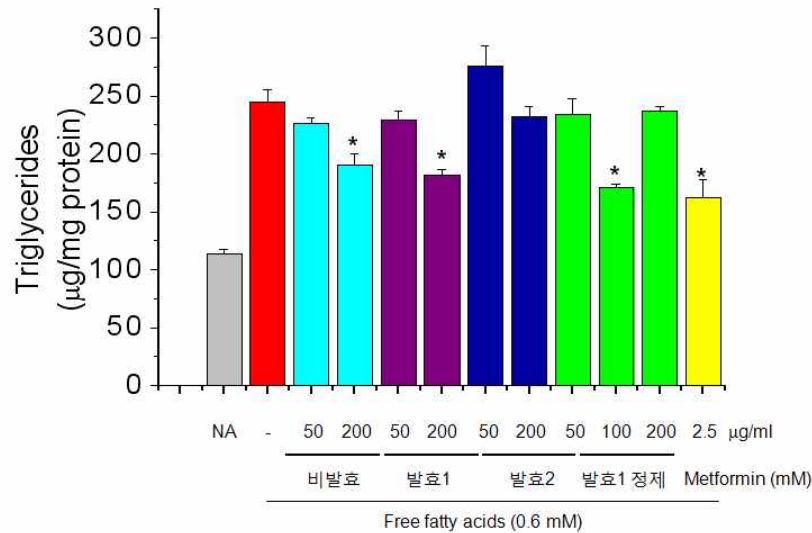


Fig. 5-13. Inhibition of FFAs-induced triglycerides by FPSP in HepG2 cells. Human HepG2 cells were treated with FFAs (0.6 mM) together with FPSP (50, 200, 400 mg/mL) for 24 hours. Triglyceride contents in cell lysates were expressed as micrograms lipid per milligram protein. \*Significantly different from high glucose-treated cells ( $P < 0.01$ ).

#### (나) 비만의 발생 및 대사 과정

- 지방세포 전구물질의 집합과 새로운 지방세포의 분화를 포함하는 일련의 과정에 의해 진행되며, 이러한 과정을 거쳐서 분화된 지방세포는 세포질 내에 중성지방을 저장하게 된다.
- AMP-activated protein kinase (AMPK)의 인산화 (활성화)는 glucose transport 및 지방 산산화와 같은 에너지 생산을 증가시키는 pathway를 촉진시키며, 이 pathway가 작동하지 않을 경우 lipogenesis, protein synthesis, gluconeogenesis가 초래된다.
- AMPK는 세포의 영양 상태나 운동, stress등에 반응하여 그 활성이 조절되는 인산화 효소로 세포의 에너지 대사에 관여하는 여러 가지 효소들의 인산화를 조절함으로써 glucose transport, fatty acid synthesis, cholesterol synthesis 등의 다양한 생리작용에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다.
- 운동스위치 역할을 하는 효소인 AMPK의 활성화는 지방 합성을 억제하고 지방의 연소를 촉진하는 효과를 갖고 있어 대사성 증후군의 여러 증상들에 좋은 효과를 나타낸다. 특히, 지금까지 오랫동안 경구용 당뇨병 치료용으로 사용하여 왔으나, 그 기전에 대한 명확한 이해가 부족하였던 metformin의 약물 목표점이 AMPK 활성화라는 사실이 밝혀졌다. 최근에는, AMPK 활성화 물질을 찾으려는 연구가 대사성 증후군의 치료후보물질 발굴이라는 목표로 활발히 진행되고 있다 (Fig. 5-14).

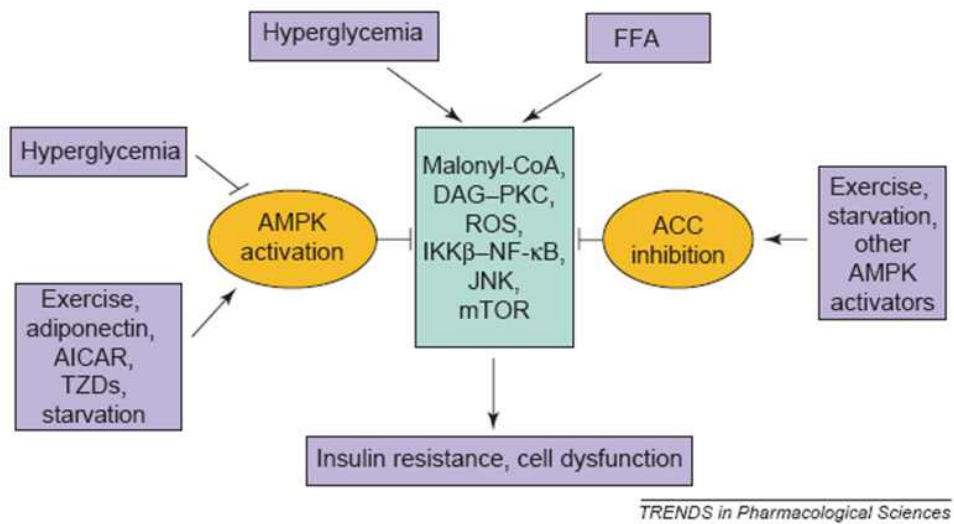


Fig. 5-14. The role of AMPK activation. Nutrient deprivation, exercise, hypoxia, AICAR and leptin lead to the activation of AMPK. In addition, depletion of glycogen content leads to a greater activation of AMPK. At least one AMPK Kinase (AMPKK) exists (LKB1), which is insensitive to AMP. AMPK activation stimulates ATP generating processes and inhibits ATP consuming processes.

- 본 연구에서는 발효자색고구마 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 활성억제 관여하는 신호전달체계를 조사한 결과 발효자색고구마 추출물에 의해서 지방합성효소의 활성을 억제하는 AMPK 및 ACC의 인산화가 증가하였으며(Fig. 5-15), 발효자색고구마 추출물의 지방합성 효소 발현에 대한 영향은 측정된 결과 발효자색고구마 추출물에 의해서 FAS의 발현이 감소하였다 (Fig. 5-16).
- 위의 결과에서 발효자색고구마 추출물의 FAS의 발현 억제는 AMPK 인산화 pathway를 통해 이루어짐을 알 수 있다 (Fig. 5-15 and 16).

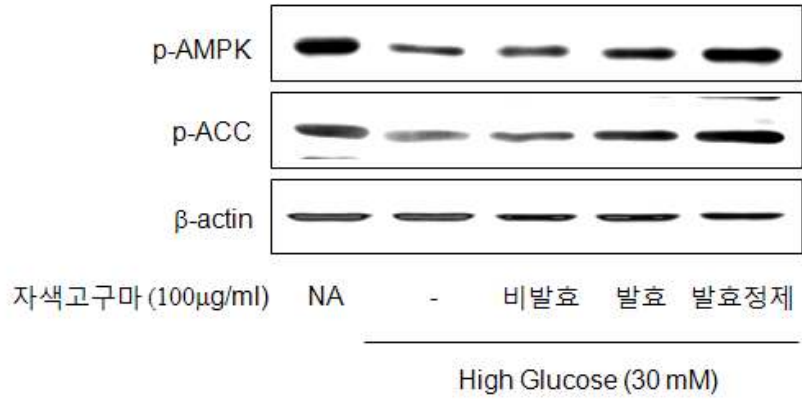


Fig. 5-15. Effect of FPSP on phosphorylation of AMPK and ACC in high glucose-induced HepG2 cells. Western blot analysis was performed for AMPK and ACC or b-actin, using total cell lysates.

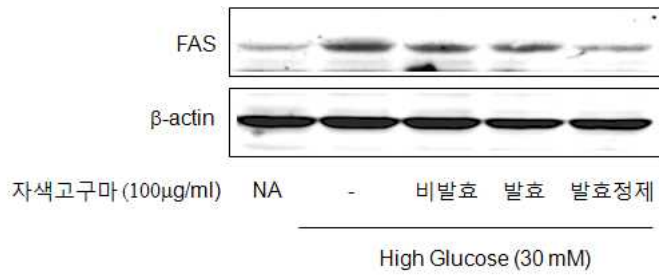


Fig. 5-16. Effect of FPSP on FAS expression in high glucose-induced HepG2 cells. Western blot analysis was performed for FAS or b-actin, using total cell lysates.

## 나. 항당뇨

### (1) α-glucosidase 활성 측정

- p-Nitrophenyl-α-D-glucoside가 기질로 α-glucosidase에 의해 alpha-D-glucose와 p-Nitrophenol로 전환되어지는 활성을 보는 것으로 최종 생성물이 노란색을 띤다. 샘플 5 uL와 α-glucosidase (1 unit) 20 uL, 기질 475 uL 넣고 37°C에서 20분 반응하였다. 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (fig. 5-17).

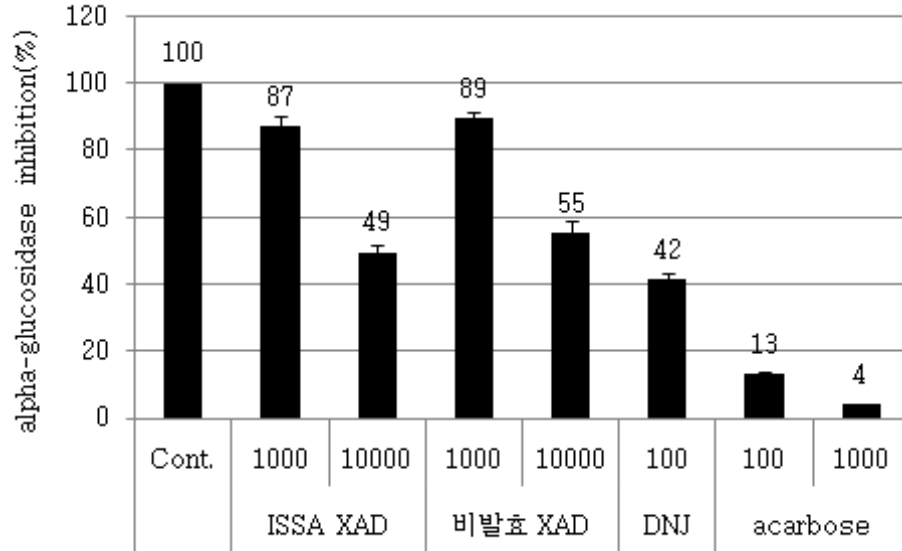


fig. 5-17.  $\alpha$ -glucosidase inhibition effect of purple fleshed-sweet potato extracts by XAD column. Data express the mean  $\pm$  SD.

Cont.; Normal control

ISSA XAD; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts of XAD column 1000, 10000  $\mu\text{g/mL}$

비발효 XAD; Purple fleshed-sweet potato extracts of XAD column 1000, 10000  $\mu\text{g/mL}$

DNJ; positive control 100  $\mu\text{g/mL}$ , acarbose; positive control 100, 1000  $\mu\text{g/mL}$

- 자색고구마 XAD 컬럼 추출물이 소장에서 탄수화물의 흡수를 지연시키는 대표적 물질인 acarbose에 비해  $\alpha$ -glucosidase 억제 효능이 떨어지지만 control에 비해서 자색고구마 추출물이  $\alpha$ -glucosidase 저해 효과가 저농도에 비해 고농도로 갈수록 유의적으로 증가됨을 볼 수 있다.

## (2) 발효자색고구마 추출물의 인슐린 저항성 측정

### (가) *In vitro* 인슐린 저항성 세포주 확립

- 인체 간세포 HepG2 세포에서 발효자색고구마 추출물의 세포독성을 실험한 결과 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 세포독성이 나타나지 않았다. (Fig. 5-18). 따라서 세포 독성이 나타나지 않는 농도 (400  $\mu\text{g/ml}$  이하)에서 발효자색고구마 추출물의 효능을 측정하였다 (Fig. 5-18 ~ 19).



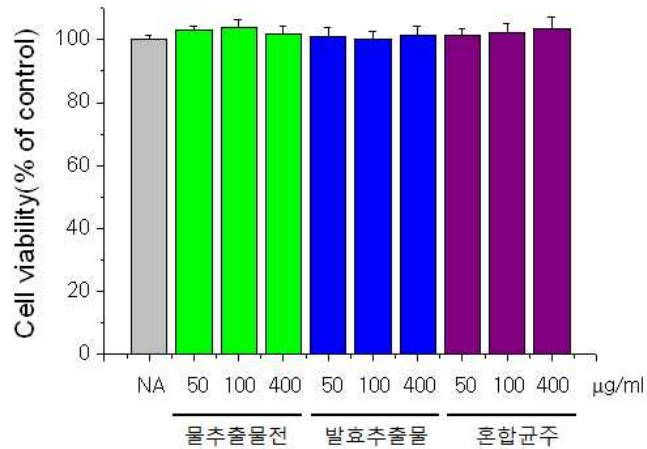


Fig.5-18. Effects of FPSP on MTT assay in human hepatocytes.

The HepG2 cells were treated with different concentrations of FPSP for 24h. Cellular cytotoxicity was measured by a MTT-based colorimetric assay kit. Abbreviation: Fermented Purple Sweet Potato : FPSP : 자색고구마 발효추출물

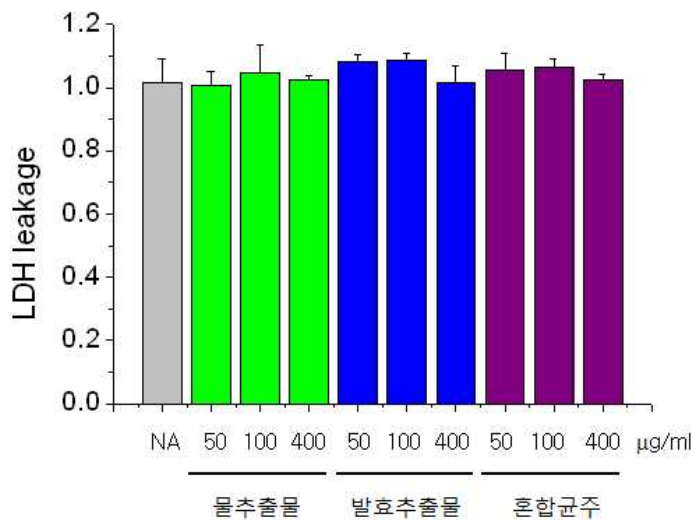


Fig. 5-19. Effects of FPSP on leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in hepatocytes. The cells were treated with different concentrations of FPSP for 24h. LDH activity were measured by a LDH kit. Abbreviation: Fermented Purple Sweet Potato : FPSP : 자색고구마 발효추출물

- 발효자색고구마 유용성분의 비만 및 당뇨 개선 활성 평가를 위하여 *in vitro* 세포에서 인슐린 저항성 세포주를 확립하였다.
- 인체 간세포인 HepG2 세포에 고농도의 glucose 30 mM을 24간 이상 처리하여 인슐린 저항성 세포주를 확립하였다. 세포주의 확립을 확인하기 위하여 확립된 세포주에서 지

지방의 생성량을 Nile red assay 법을 이용하여 확인하였다 (Fig. 5-20).

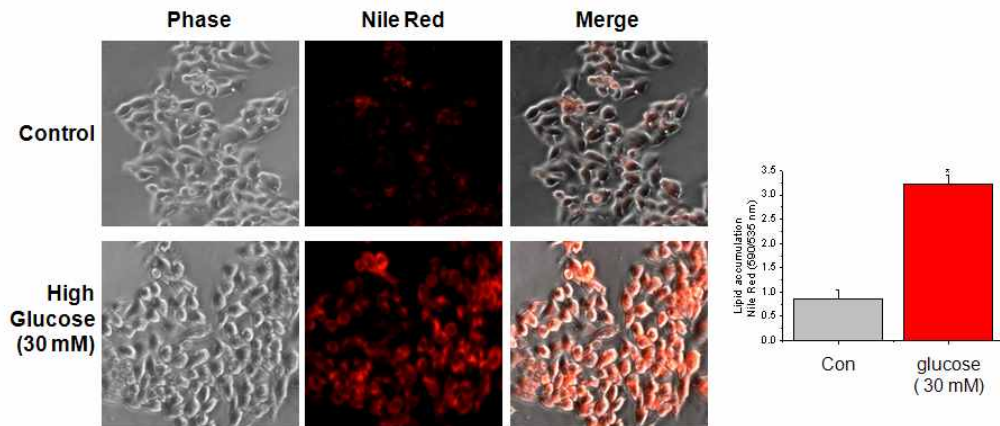


Fig. 5-20. Establishment of insulin-resistant cell line by high glucose treatment in HepG2 cells. HepG2 cells were quiesced in serum-free medium overnight and incubated in serum free medium containing either normal (5.5 mM) or high (30 mM) concentrations of D-glucose (high glucose) for an additional 24 h. Intracellular lipids were stained with Nile red and measured with fluorescence microscopy. Nile red 580/535 ratio related to the lipid droplets. \*significantly different from the control ( $P < 0.01$ ).

## (2) 발효자색 고구마 추출물의 지방축적 억제효과

- 확립된 인슐린 저항성 세포주에서 발효자색고구마 추출물의 지질생성 억제 효능을 평가한 결과 고농도 (400  $\mu\text{g/ml}$ )에서 30 mM의 glucose 처리에 의해서 증가한 지질의 생성이 억제 되었으며, triglycerides 및 total Cholesterol 함량도 감소하였다(Fig. 5-21~25).

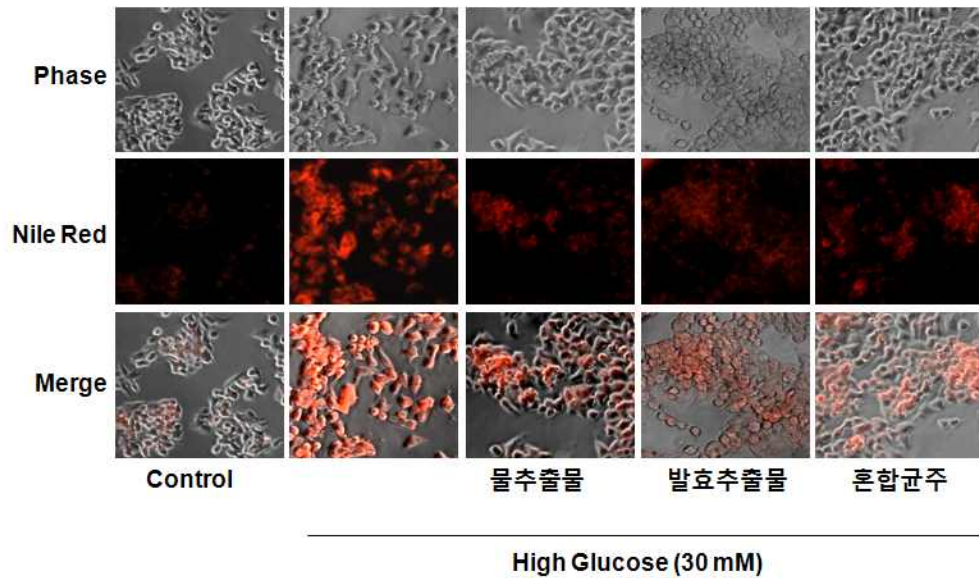


Fig. 5-21. Inhibition of high glucose-induced lipid accumulation by FPSP in HepG2 cells. Human HepG2 cells were treated with 5.5 or 30 mM glucose together with FPSP (50, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hours. Intracellular lipids were stained with Nile red and measured with fluorescence microscopy.

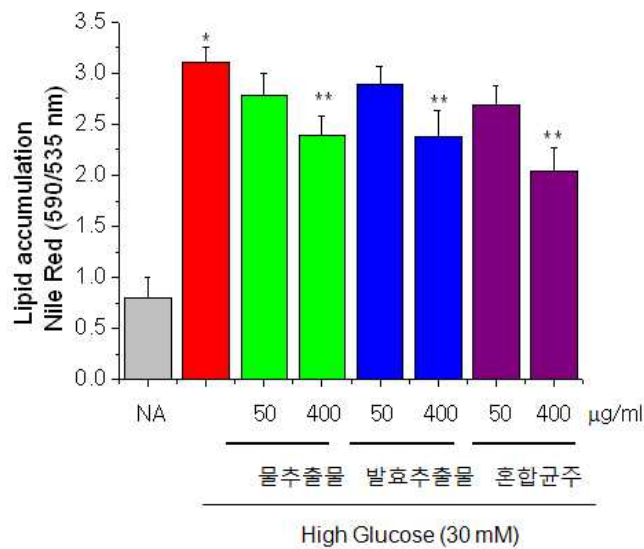


Fig. 5-22. Inhibition of high glucose-induced lipid accumulation by FPSP in HepG2 cells. Human HepG2 cells were treated with 5.5 or 30 mM glucose together with FPSP (50, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hours. Intracellular lipids were stained with Nile red and measured with fluorescence with fluorescence spectrophotometer. \*Significantly different from the control ( $P < 0.01$ ). \*\*Significantly different from high glucose-treated cells ( $P < 0.01$ ).

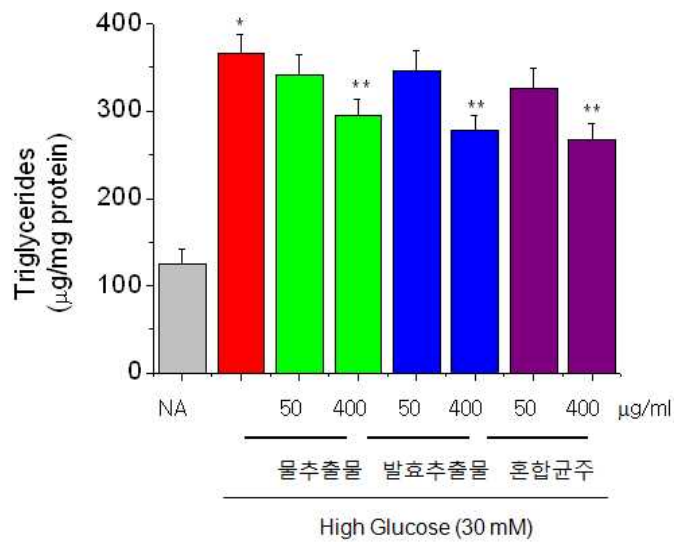


Fig. 5-23. Inhibition of high glucose-induced triglycerides by FPSP in HepG2 cells. Human HepG2 cells were treated with 5.5 or 30 mM glucose together with FPSP (50, 400 µg/ml) for 24 hours. Triglyceride contents in cell lysates were expressed as micrograms lipid per milligram protein. \*Significantly different from the control (P<0.01). \*\*Significantly different from high glucose-treated cells (P<0.01).

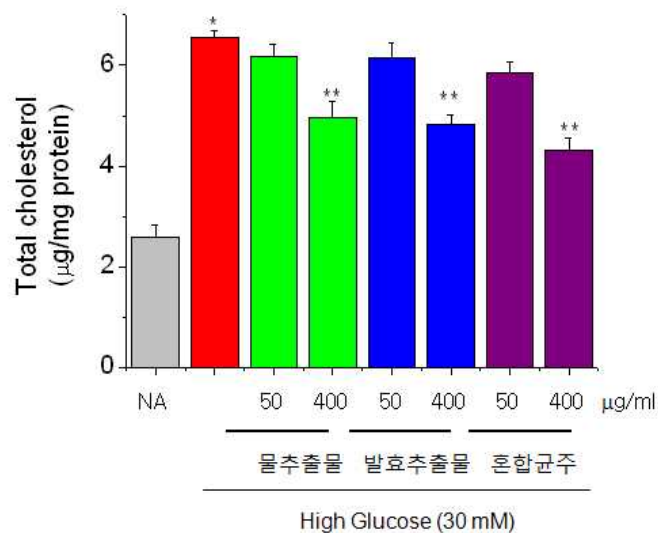


Fig. 5-24. Inhibition of high glucose-induced total Cholesterol by FPSP in HepG2 cells. Human HepG2 cells were treated with 5.5 or 30 mM glucose together with FPSP (50, 400 µg/ml) for 24 hours. Total cholesterol contents in cell lysates were expressed as micrograms lipid per milligram protein. \*Significantly different from the control (P<0.01).

\*Significantly different from high glucose-treated cells ( $P < 0.01$ ).

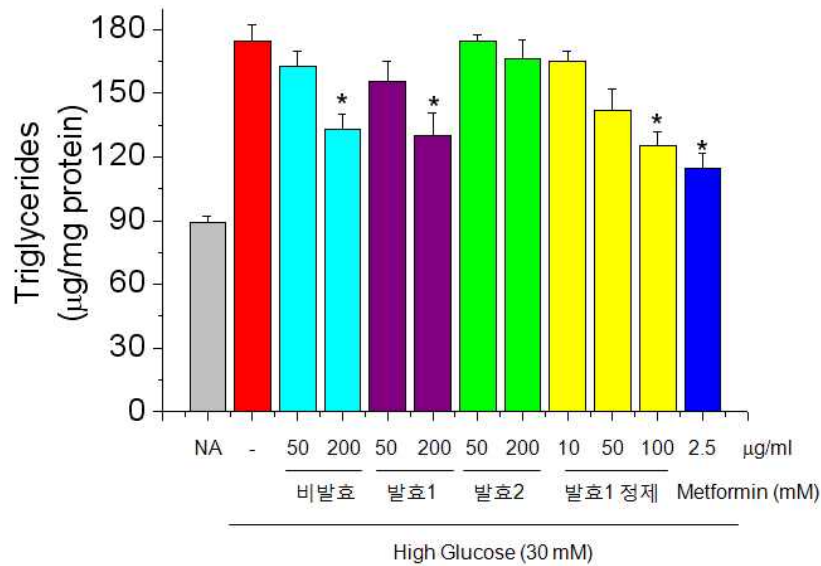


Fig. 5-25. Inhibition of high glucose-induced triglycerides by FPSP in HepG2 cells. Human HepG2 cells were treated with 5.5 or 30 mM glucose together with FPSP (50, 200 mg/mL) for 24 hours. Triglyceride contents in cell lysates were expressed as micrograms lipid per milligram protein. \*Significantly different from high glucose-treated cells ( $P < 0.0$ ).

#### 다. 항산화

##### (1) HepG2에서 항산화능 평가

##### (가) HepG2 세포주 배양

- HepG2 cell line의 배지는 10%(v/v) FBS, 0.5%(v/v), 50 g/mL streptomycin, 50 IU/mL penicillin, 0.125 g/mL fungizone, 3.024 g sodium bicarbonate를 함유한 MEM을 사용하였고, 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humid air로 조절된 배양기를 사용하였다. 배지는 2일마다 교환하였으며, confluent 가 80% 되었을 때 subculture를 실시하였다.

##### (나) 세포독성

- 세포독성은 Rochem 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 24 wells plate에  $2 \times 10^5$  cells/well의 세포를 분주한 후 confluent 될 때까지 배양하였다. 배양 후 배지를 제거

하고 대상 시료가 용해된 serum이 3% 함유된 배지 1 mL을 분주하고 재 배양 하였다. 24 시간 처리 이후 각 well에 0.25 mL의 XTT-PMS 용액(1 mg XTT and 10 g PMS/mL of MEM without phenol red)을 첨가하고 다시 2시간 배양한다. 세포독성도는 formazan의 형성 정도를 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 향후 독성이 미치지 않는 범위 내에서 실험을 진행하였다 (fig. 5-26).

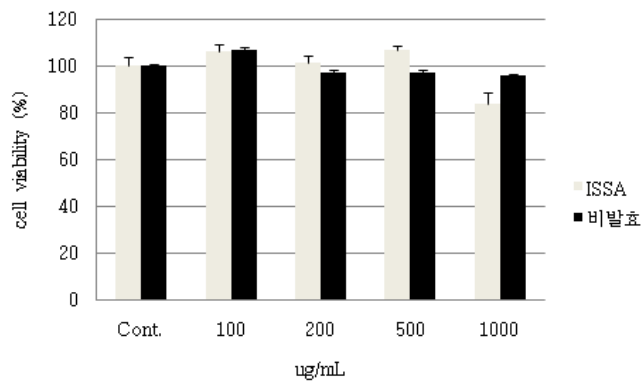


fig. 5-26. Toxicity test. Data express the mean  $\pm$  SD.

Cont. ; Normal control

ISSA ; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts

비발효 ; Purple fleshed-sweet potato extracts.

#### (다) HepG2의 항산화 효과

- 시료의 간 보호 활성은 HepG2 cell line을 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주한 후 배양하여 아래와 같이 실시하였다.
- 배양 후 배지를 제거하고 각 well에 시료와 serum이 3% 함유된 배지를 첨가하고 24시간 동안 배양기에서 반응시켰다. 반응 후 배지를 제거하고 각 well에 0.3 mM 과산화수소와 serum이 3% 함유된 배지를 첨가하고 24시간 동안 배양기에서 반응시켰다. 24 h 후 배지를 제거하고 XTT-PMS 용액을 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 생성된 formazan을 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- 음성 대조구는 시료대신 media만을 사용하였으며 양성 대조구로는 0.3 mM 과산화수소만을 처리하였다.

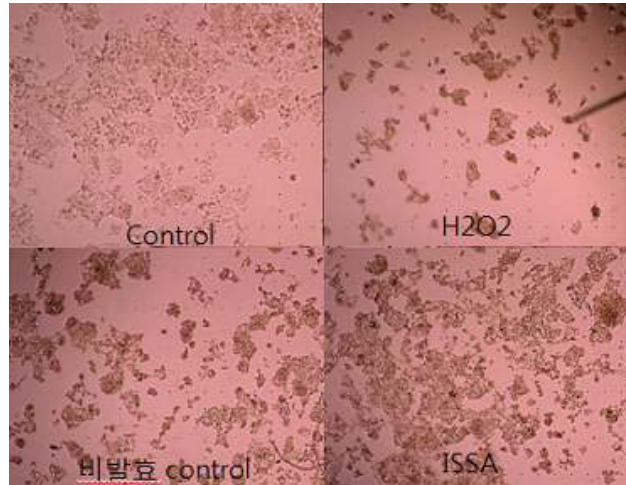


fig. 5-27. Cell morphology.

Control ; Normal control

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; 0.3 mM 과산화수소

ISSA ; 0.3 mM 과산화수소 + fermented purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu$ g/mL

비발효 control ; 0.3 mM 과산화수소 + purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu$ g/mL.

- 과산화수소를 처리하지 않은 control 군과 비교 시 과산화수소를 처리한 군의 세포 생존률이 현저히 감소한 모양을 보이며 과산화수소와 자색고구마 추출물을 함께 처리한 군이 과산화수소만 처리한 군에 비해 세포 생존률이 증가됨을 볼 수 있다.
- 이 증가된 생존율을 통해 자색고구마의 과산화수소에 대한 보호효과 능이 있음을 확인하였다.

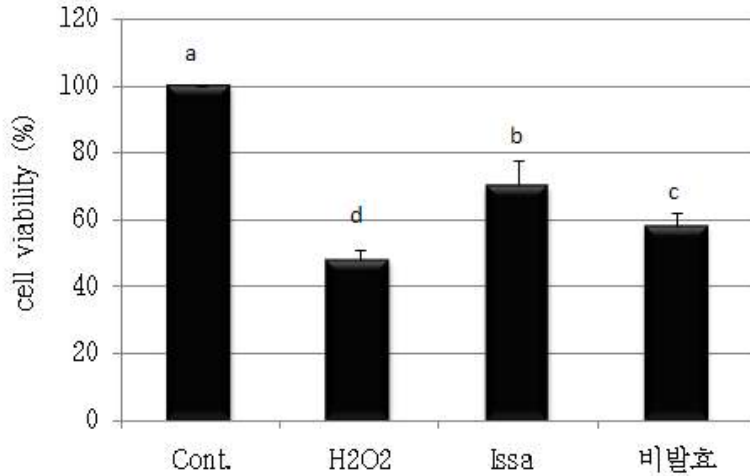


fig. 5-28. 자색고구마 추출물의 보호효과. Data express the mean  $\pm$  SD. Cont.; Normal control

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0.3 mM 과산화수소

ISSA; 0.3 mM 과산화수소 + fermented purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu$ g/mL

비발효; 0.3 mM 과산화수소 + purple fleshed-sweet potato extracts 300  $\mu$ g/mL.

-- 0.3 mM 과산화수소를 처리하여 세포에 손상을 주었을 때 자색고구마를 처리 한 군이 아무것도 처리하지 않고 과산화수소만 처리한 군에 비해 과산화수소에 대해 세포를 보호하여 생존율을 증가시켰으며, 비발효한 자색고구마 처리군보다 발효한 자색고구마 처리 군이 유의적이게 세포 생존율을 증가시키면서 보호효과를 보인다.

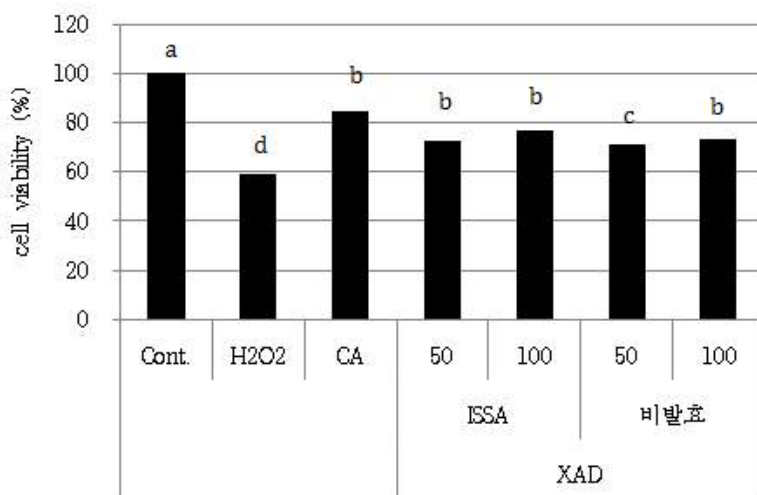


fig. 5-29. 자색고구마 XAD 정제물의 보호효과. Data express the mean  $\pm$  SD.

Cont.; Normal control



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0.3 mM 과산화수소

CA; 0.3 mM 과산화수소 + caffeic acid 20 µg/mL

ISSA; 0.3 mM 과산화수소 + fermented purple fleshed-sweet potato extracts of XAD column 50, 100 µg/mL

비발효; 0.3 mM 과산화수소 + purple fleshed-sweet potato extracts of XAD column 50, 100 µg/mL.

- 과산화수소에 대한 자색고구마의 보호효과 시험에서 자색고구마의 당 성분이 영향을 미치는 것을 배제하기 위해 당을 제거 하는 XAD의 정제 과정을 시행하였다.
- 0.3 mM 과산화수소를 처리하여 세포에 손상을 주었을 때 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 자색고구마를 처리 한 군이 과산화수소에 대해 세포를 보호하여 생존율을 증가시켰으며, 위에 fig. 3-3에서 보여준 자색고구마 추출물 샘플에 비해 XAD를 통한 정제 샘플이 더 낮은 농도에서 보호효과를 보였다.
- 이는 정제 과정을 통해 당이 제거됨에 따라 항산화 효과에 유용한 색소 성분이 추출되어 나와 보호효과 능이 더욱 증가 되었다고 추측된다.

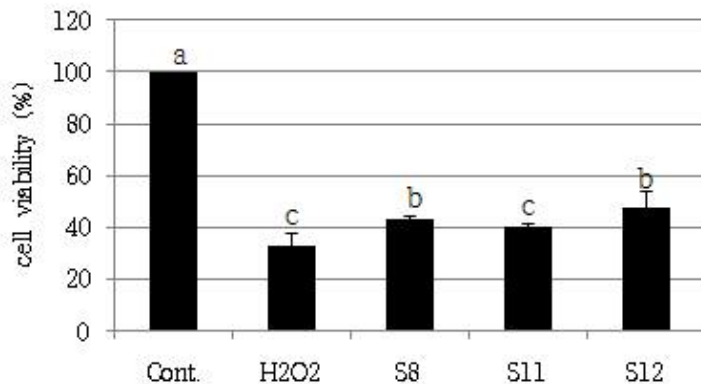
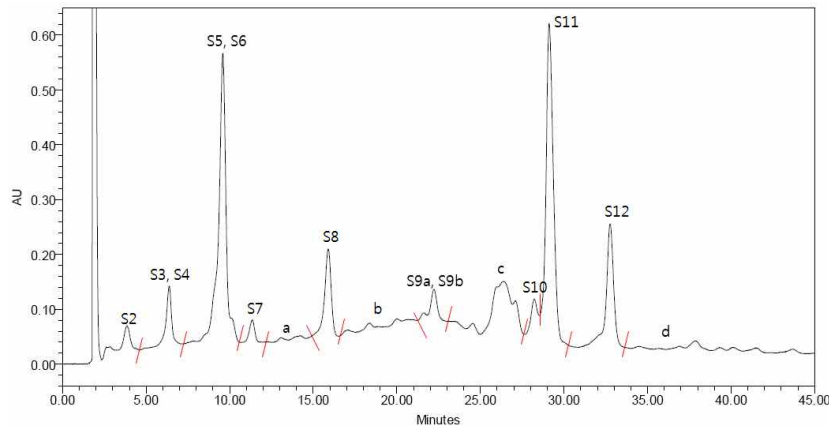


fig. 5-30. 자색고구마 HPLC를 통한 단리물질의 보호효과. Data express the mean ± SD.

Cont.; Normal control

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0.3 mM 과산화수소

S8, S11, S12; 0.3 mM 과산화수소 + 발효 자색고구마의 HPLC를 통한 분리 및  
단리 물질 20 µg/mL.

- 물질의 분리 및 단리하여 각 물질별 과산화수소에 대한 보호효과를 평가하였다.
- 단리 물질 중 S8, S12 가 과산화수소에 대해 세포를 보호하여 생존율을 증가시키는 보호효과를 보였다.

#### 라. 항고혈압

- 혈압에 대한 작용 기전은 아래 그림 fig. 5-47.에서 레닌-안지오텐신 시스템 그림에서 설명되어 있다. (angiotensinogen-**renin** → angiotensin I - converting enzyme → angiotensin II) 안지오텐신은 레닌과 전환효소에 의해서 활성화 물질인 angiotensin II로 전환된다.
- 안지오텐시노젠은 간에서 생성되며, 생성은 코르티코스테로이드, 에스트로젠, 갑상선 호르몬과 안지오텐신 II에 의해 증가한다. 안지오텐신 II의 작용은 혈관을 강력하게 수축하는 물질이다. 이를 통해 강력한 혈압의 상승 효과를 보인다. 안지오텐신에 대한 상승 반응은 대개 방사성 서맥이 거의 없거나 동반되지 않는다. 이는 안지오텐신이 뇌에도 작용하여 기준점을 재조정하기 때문이다. 또한 신장에서 작용하여 신혈관을 수축시키고 근위세뇨관에서 나트륨 재흡수를 증가시킨다.
- 이런 안지오텐시노젠의 대사과정에서 안지오텐시 converting 효소 억제제를 이용한 고혈압 기전이 밝혀져 있고, 본 실험은 효소의 억제능을 평가하였다.
- Cushman과 Cheung의 방법을 변형하여 측정하였다. sodium borate buffer (pH 8.3) 50 uL에 2.5 mM 기질 (N-Hippuryl-His-Leu hydrate) 150 uL, sample 50 uL를 합쳐 넣어 37°C에서 10분 반응 후 ACE (1U) 50 uL 첨가 후 37°C에서 30분 반응 후 1N HCl로 반응을 중지시켰다. ethyl acetate 1000 uL 첨가 10 min mixing 후 원심분리 후 상층액 ethyl acetate층을 800 uL 취하여 120°C, 30 min 건조 후 1 M NaCl 1 mL 가하여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

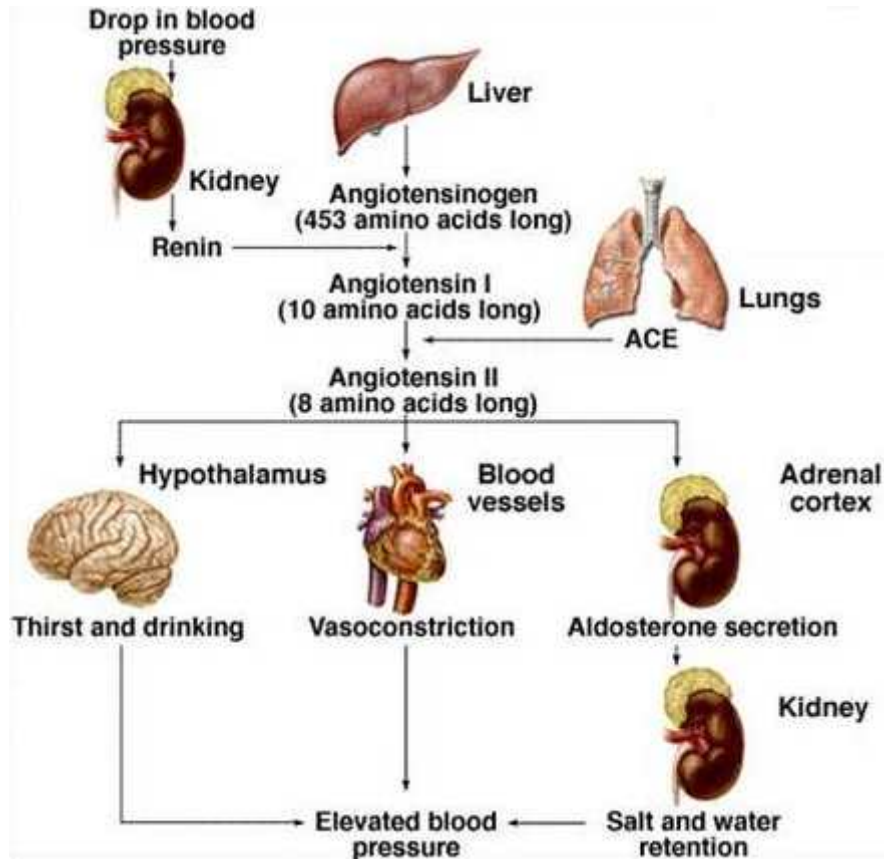


fig. 5-46. Renin-angiotensin-aldosterone mechanism.

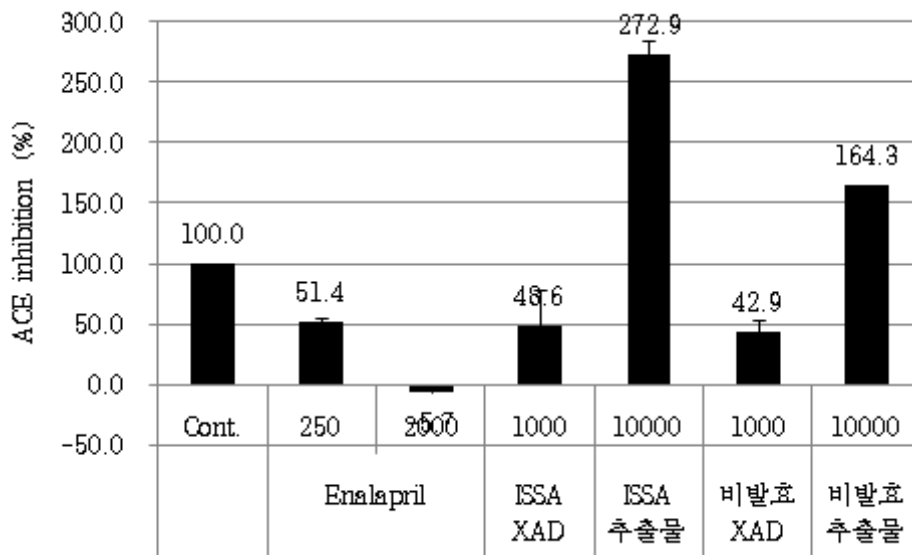


fig. 5-47. Angiotensin I converting enzyme inhibition Effect of purple fleshed-sweet potato extracts by XAD column. Data express the mean  $\pm$  SD.

Cont.; Normal control

ISSA XAD; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts of XAD column  
1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

ISSA 추출물; Fermented purple fleshed-sweet potato extracts 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

비발효 XAD; Purple fleshed-sweet potato extracts of XAD column 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

비발효 추출물; Purple fleshed-sweet potato extracts 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Enalapril;  
Positive control.

- 자색고구마 XAD 컬럼 추출물은 control에 비해서 고혈압을 유발시키는 대사 과정에 관여 angiotensin I converting enzyme에 대해 반응 억제 저해 효과가 유의적으로 증가함을 볼 수 있으며 이 결과 자색고구마 XAD 컬럼 추출물이 항고혈압에 효과가 있음을 알 수 있다.

#### 마. 시력보호

##### (1) 근세포주의 세포독성 측정

- 흰쥐의 근세포주인 A7r5 세포주를 ATCC에서 구입하여 DMEM 배지에서 배양하여, 세포의 형태학적으로 관찰하였음 (아래사진).

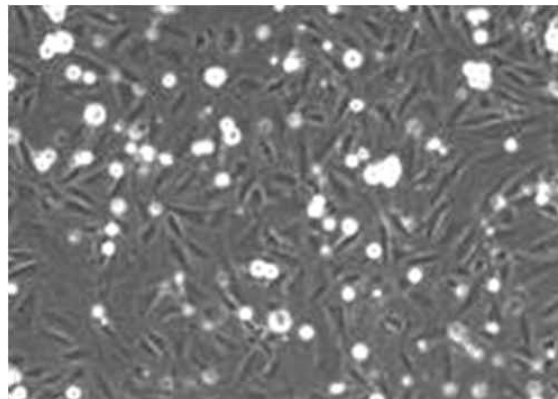


Fig. 5-48. 흰쥐 근세포주인 A7r5의 형태학적 관찰

- 흰쥐의 근세포주인 A7r5 세포주에 시료를 처리후 24시간 후에 세포 활성화도 및 독성 평가를 MTT, LDH assay법에 의해 조사하였음 (Fig. 5-48 ~ 50).
- 그 결과, 모든 시료의 고농도 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리 시 세포활성도를 저해하지 않았으며 (Fig. 5-49), 세포 독성도 나타나지 않았음 (Fig. 5-50)

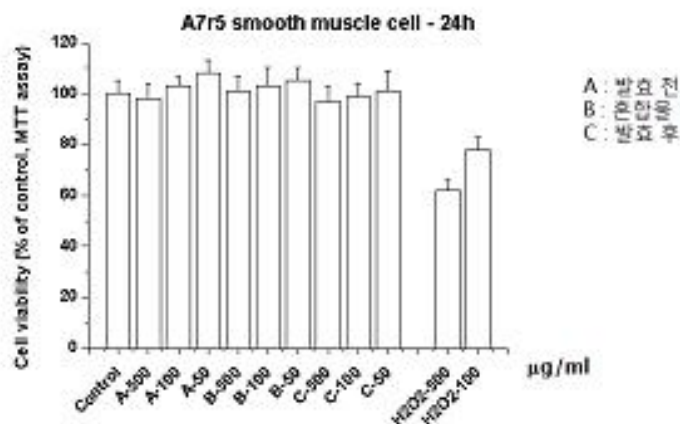


Fig. 5-49. Effect of anthocyanins on cell viability of A7r5cells. The cells( $5 \times 10^3$  cells/ml) were plated in a 24-well plate with DMEM supplemented with 10%FBS and various concentrations of anthocyanin (500, 100,  $50 \mu\text{g/ml}$ ) were treated for 24h. Cell viability were estimated by the MTT assay

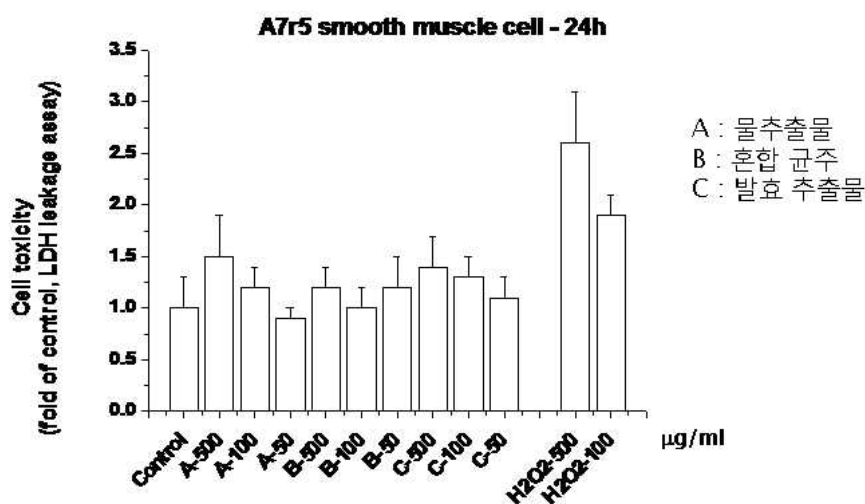


Fig. 5-50. Effect of anthocyanins on cytotoxicity of A7r5cells. The cells( $5 \times 10^3$  cells/ml) were plated in a 24-well plate with DMEM supplemented with 10%FBS and various concentrations of anthocyanin (500, 100,  $50 \mu\text{g/ml}$ ) were treated for 24h. Cell toxicity were estimated by the LDH assay

(2) 근세포주 배양 후 각 시료를 처리 후 Griess법에 의해 NO 양 측정

- 흰쥐의 근세포주인 A7r5 세포주에 시료를 처리후 24시간 후에 Griess법에 의해 Nitric Oxide양을 조사하였음.
- 그 결과, 모든 시료의 세포독성이 없는 모든 농도에서 Nitric Oxide양의 변화가 나타나지 않았으며(Fig. 5-50), 양성대조군인 SIN-1 처리 시 농도 의존적으로 증가하였음.

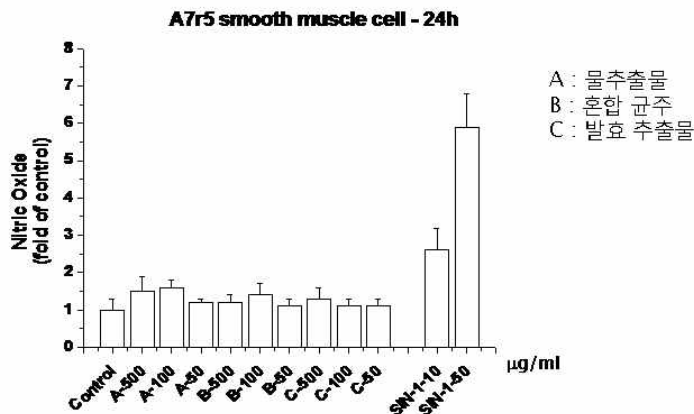


Fig. 5-51. Effects of anthocyanin on NO production in A7r5 cells. Cells were cultured for 24hr in the presence of the media alone, with the indicated concentrations of anthocyanin. The level of NO production was determined.

(3) 근세포주 배양 후 각 시료를 처리 후 cyclic GMP 양을 radioimmunoassay법으로 측정

- 흰쥐의 근세포주인 A7r5 세포주에 시료 처리 24시간 후에 Gilman's법에 의해 cGMP양을 조사 함.
- 그 결과, 모든 시료의 세포독성이 없는 모든 농도에서 cGMP양의 변화가 나타나지 않았으며, 음성대조군인 NOARG 처리시 cGMP양이 저해되었음 (Fig. 5-52).

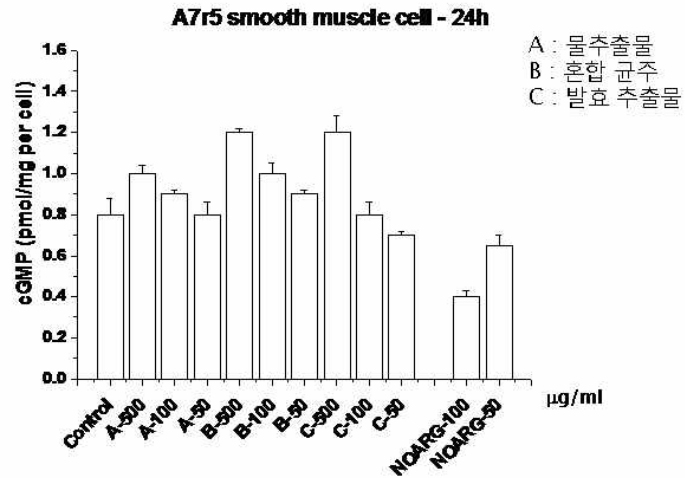


Fig. 5-52. Effects of anthocyanin on cyclic GMP levels in A7r5 cells. Cells were cultured for 24hr following treatment with various concentration of anthocyanins and NOARG (cGMP inhibitors) pre-treatment group. The level of cGMP production was determined.

## 2. 자색고구마 *in vivo* 기능성

### 가. ICR에서 항비만 평가

(1) 마우스 고지방식이 실험동물에서 지방 축적 억제 효과

- *In vivo*에서 발효자색고구마 추출물의 지질 개선 효능을 평가하기 위하여 고지방식이 (High Fat Diet: HFD) 동물 모델을 확립하였다. 4주령의 ICR mice에 고지방식이를 4주간 투여한 후, 몸무게를 측정하여 몸무게가 증가한 마우스를 선별하였다. 선별된 마우스를 4 group (음성대조군: normal diet, 양성 대조군: high fat diet (HFD), HFD+FPSP 50 mg/kg, HFD+ FPSP 200 mg/kg)으로 나눈 발효자색고구마 추출물을 4주 동안 구강 투여하였다. 각 group당 5마리를 사용하였다. 확립된 동물 모델을 이용하여 발효자색고구마 추출물의 지질개선 효능을 평가하였다 (Fig. 5-53).

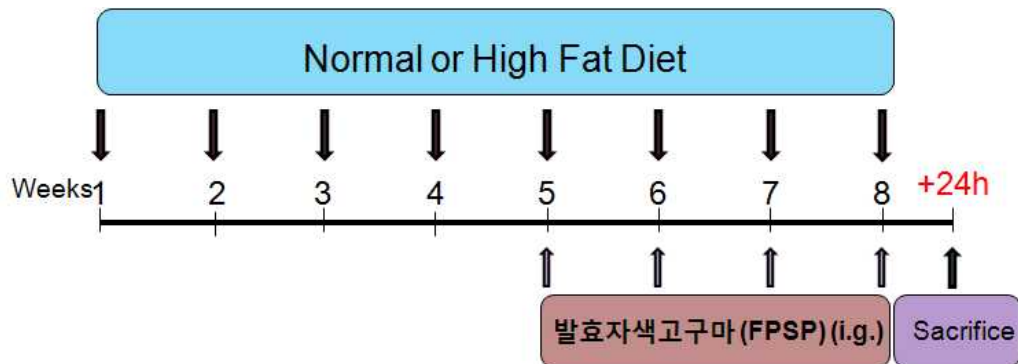


Fig. 5-53. Schematic diagram of the experimental protocol in mice. Male, 4 week-old ICR mice were used in these studies. Animals were acclimatized to the temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 5\%$ ) of controlled rooms with a 12-h light/dark cycle for at least 1 week prior to experimentation. All animal experiments were performed according to the rules and regulations of the Animal Ethics Committee, Chungnam National University. The mice were randomly divided into five groups: Control (normal diet), High-fat diet plus daily vehicle [0.5% carboxymethylcellulose (CMC)] as a control group and HFD plus the FPSP (50, 200 mg/kg). FPSP were administered daily by oral gavage for 4 weeks.

(2) 체중 및 간 무게 측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 간장 내 지질 억제 효과를 측정된 결과, 고지방 식이에 의해 증가된 마우스의 체중 및 간조직의 무게가 발효자색고구마 추출물에 의해서 감소하였다 (Fig. 5-54 ~ 55).



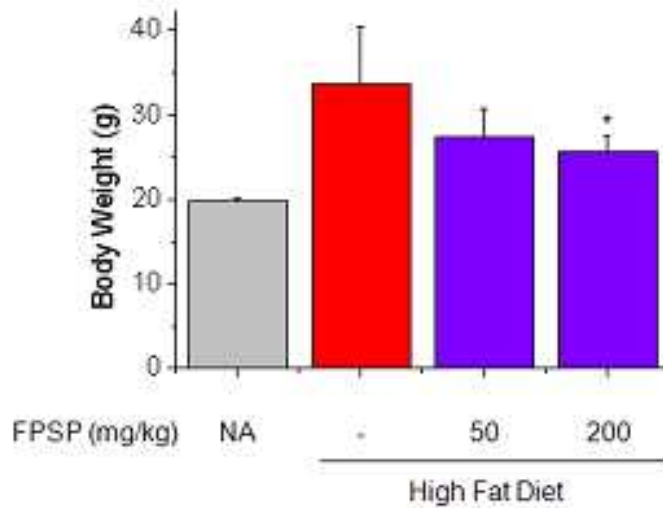


Fig. 5-54. Effect of FPSP on body weight. Data express the mean  $\pm$  SE.

NA; Normol control

-; High fat diet

50; High fat diet + 50 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

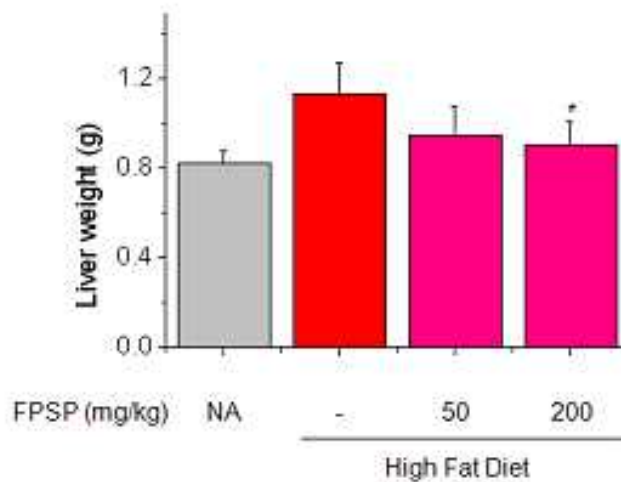


Fig. 5-55. Effect of FPSP on liver weight. Data express the mean  $\pm$  SE.

NA; Normol control

-; High fat diet

50; High fat diet + 50 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

(다) Hepatic triglyceride(TG) 함량 측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 간장내 지질 억제 효과를 측정하기 위해 Hepatic triglyceride(TG) 함량을 측정하였다. 실험결과, 발효자색고구마 추출물에 의해서 고지방 식이에 의해 증가된 TG의 함량이 감소하였다. 또한 조직내의 지방의 축적 정도를 측정한 결과 지방의 축적이 발효자색고구마 추출물에 의해서 감소함을 확인하였다 (Fig. 5-57).

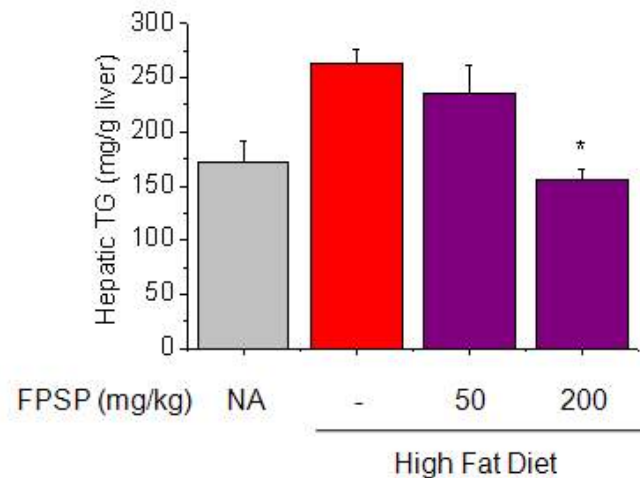


Fig. 5-57. Effects of FPSP on hepatic triglyceride content. Data express the mean  $\pm$  SE.

NA; Normol control

-; High fat diet

50; High fat diet + 50 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

(라) Total cholesterol 함량 측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 간장 내 지질 억제 효과를 측정하기 위해 Hepatic total cholesterol 함량을 측정하였다. 실험결과, 발효자색고구마 추출물에 의해서 고지방 식이에 의해 증가된 total cholesterol의 함량이 감소하였다 (Fig. 2-15).

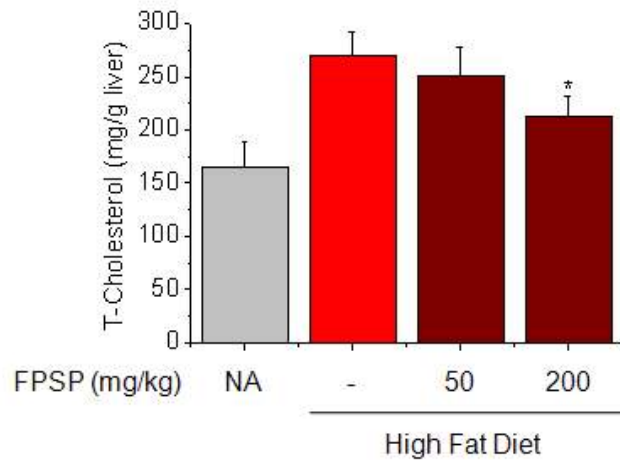


Fig. 5-58. Effects of FPSP on hepatic total cholesterol content. Data express the mean  $\pm$  SE.

NA; Normol control

-; High fat diet

50; High fat diet + 50 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

(마) FAS 및 AMPK 활성 측정

- 본 연구에서는 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 활성억제 및 관련 신호전달체계를 조사하기 위하여 간 조직에서 FAS 및 AMPK의 단백질 발현을 western blot 방법을 이용하여 확인하였다. 실험결과 발효자색고구마 추출물에 의해서 지방합성효소인 FAS의 발현은 감소하였으며, AMPK의 활성은 증가함을 확인하였다 (Fig. 5-59 ~ 60).

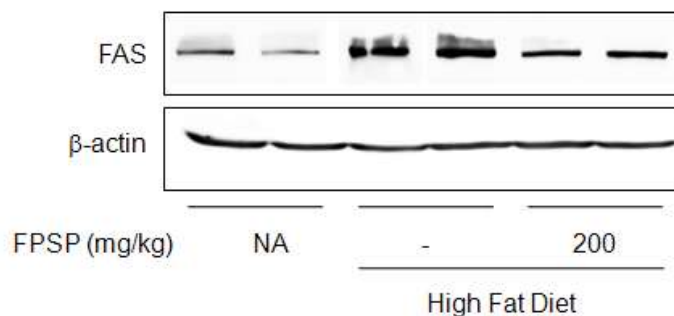


Fig. 5-59. Effect of FPSP on expression of FAS in HFD-induced mice liver. Western blot analysis was performed for FAS or  $\beta$ -actin, using total lysates.

NA; Normol control, -; High fat diet

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

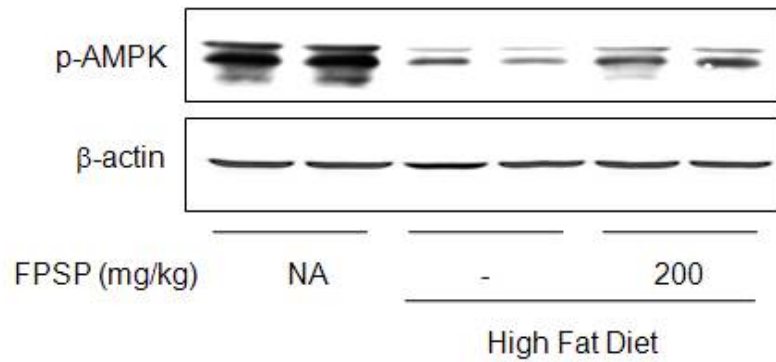


Fig. 5-60. Effect of FPSP on phosphorylation of AMPK in HFD-induced mice liver. Western blot analysis was performed for p-AMPK or  $\beta$ -actin, using total lysates.

NA; Normol control

-; High fat diet

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

(바) 발효자색고구마 추출물의 혈당 (혈중 Glucose) 측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 혈당 억제 효능을 측정한 결과, 고지방 식이에 의해서 증가한 혈중 glucose 농도가 발효자색고구마 추출물에 의해서 혈중 glucose의 농도가 감소하였다 (Fig. 5-61).

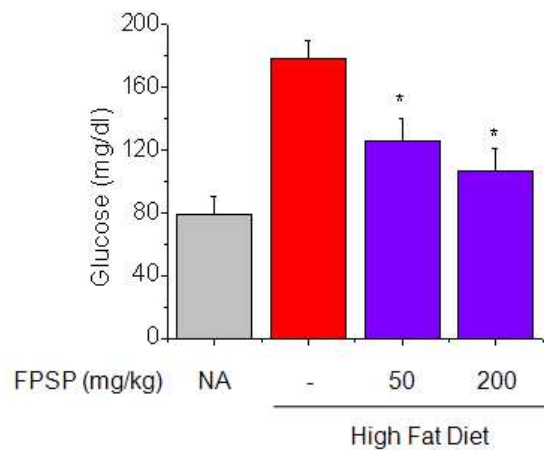


Fig. 5-61. Effect of FPSP on blood glucose levels in high fat diet mice. Data express the mean  $\pm$  SD.

NA; Normol control, -; High fat diet

50; High fat diet + 50 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

- Blood glucose levels were determined using a strip-operated blood glucose sensor (Medisense, Bedford, MA, USA).

(사) ALT 및 AST 측정

- *in vivo*에서 고지방식이에 의한 발효자색고구마 추출물의 간 손상 보호효과를 조사하기 위하여 간 손상의 지표인 ALT 및 AST 효소의 활성을 측정하였다. 실험결과 고지방식에 의해서 증가한 AST, ALT 효소의 활성이 발효자색고구마 추출물 투여에 의해서 감소하지 않았다 (Fig. 5-62). 또한 고지방식에 의해서 증가한 지질과산화가 발효자색고구마 추출물 투여에 의해서 감소하지 않았다 (Fig. 5-63).

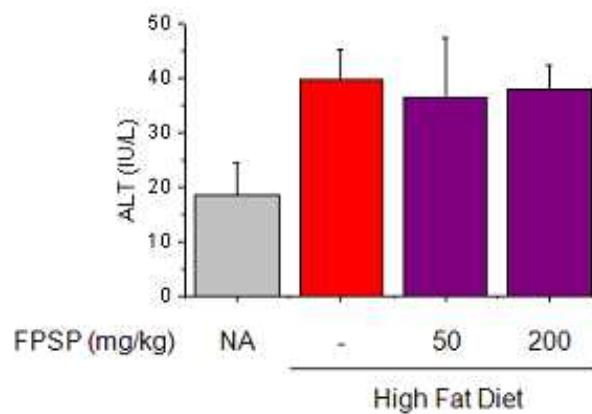


Fig. 5-62. Effects of FPSP on serum alanine aminotransferase in mice fed a high-fat diet. Data express the mean  $\pm$  SE.

NA; Normol control

-; High fat diet

50; High fat diet + 50 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

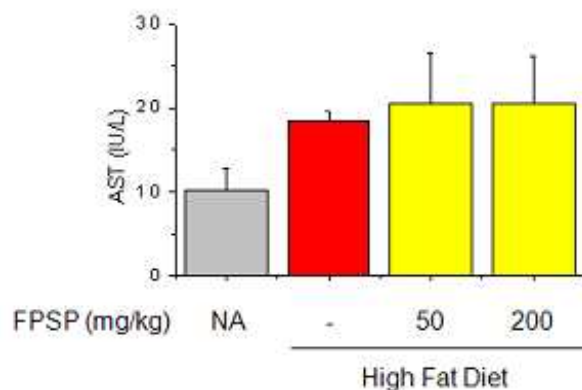


Fig. 5-63. Effects of FPSP on aspartate aminotransferase in mice fed a high-fat diet. Data express the mean  $\pm$  SE.

NA; Normol control

-; High fat diet

50; High fat diet + 50 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

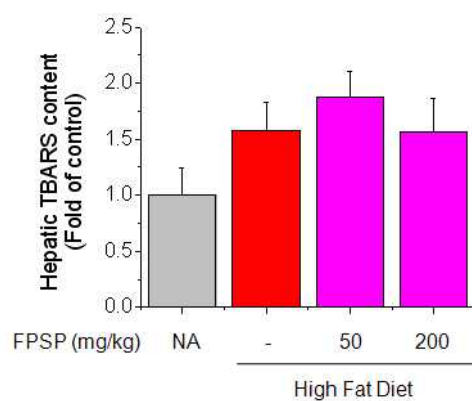


Fig. 5-64. Effects of FPSP on hepatic level of MDA in mice fed high-fat diet. Data express the mean  $\pm$  SE.

NA; Normol control

-; High fat diet

50; High fat diet + 50 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

200; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

- 본 실험을 통하여, 발효 자색고구마의 지방 축적 억제 효과를 확인하였으나, 발효 하지 않은 비 발효 자색고구마의 비만 축적 억제 효과를 확인하고, 비만유도의 방법을 달리 하여 더 확실한 지방 축적 억제 효과를 확인하고자 두 번째 동물에서 실험을 시행하였다.

#### 나. C57BL/6 에서 항비만 평가

(1) 마우스 고지방식이 실험동물에서 지방 축적 억제 효과

- *In vivo*에서 발효자색고구마 추출물의 지질 개선 효능을 평가하기 위하여 고지방식이 (High Fat Diet: PC) 동물 모델을 확립하였다. 5 주령의 C57BL/6 mice에 고지방식이를 8 주간 투여한 후, 몸무게를 측정하였다. 마우스를 5 group (음성대조군: normal diet(NC), 양성 대조군: high fat diet (PC), high fat diet+FPSP 200 mg/kg(1), high fat diet+FPSP 200 mg/kg(2), high fat diet+FPSP 400 mg/kg)으로 나눈 발효자색고구마 추출물을 8주 동안 구강 투여하였다. 각 group당 10마리를 사용하였다. 확립된 동물 모델을 이용하여 발효자색고구마 추출물의 지질개선 효능을 평가하였다.

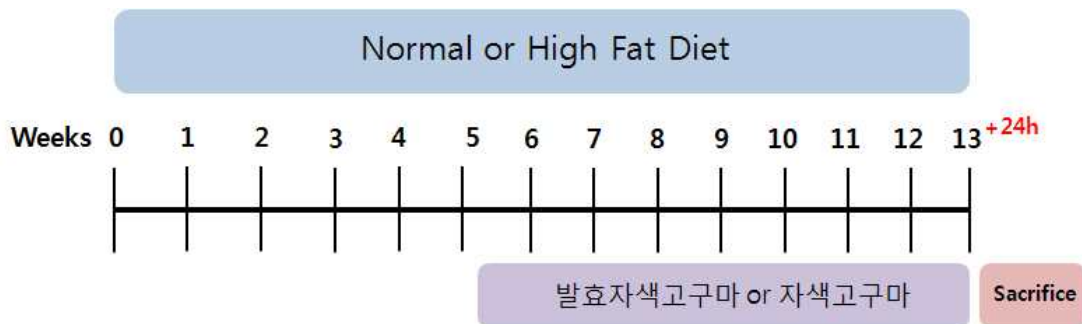


fig. 5-65. Schematic diagram of the experimental protocol in mice. Male, 5 week-old C57BL/6 mice were used in these studies. Animals were acclimatized to the temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 5\%$ ) of controlled rooms with a 12-h light/dark cycle for at least 1 week prior to experimentation. All animal experiments were performed according to the rules and regulations of the Animal Ethics Committee, Chungnam National University. The mice were randomly divided into five groups: Control (normal diet; 10% Kcal fat diet), High-fat diet plus daily vehicle (60% Kcal fat diet) as a control group, HFD plus the FPSP (fermented purple sweet potato 200, 400 mg/kg) or HFD plus the PSP (purple sweet potato 200 mg/kg). FPSP or PSP were administered daily by oral gavage for 8 weeks.

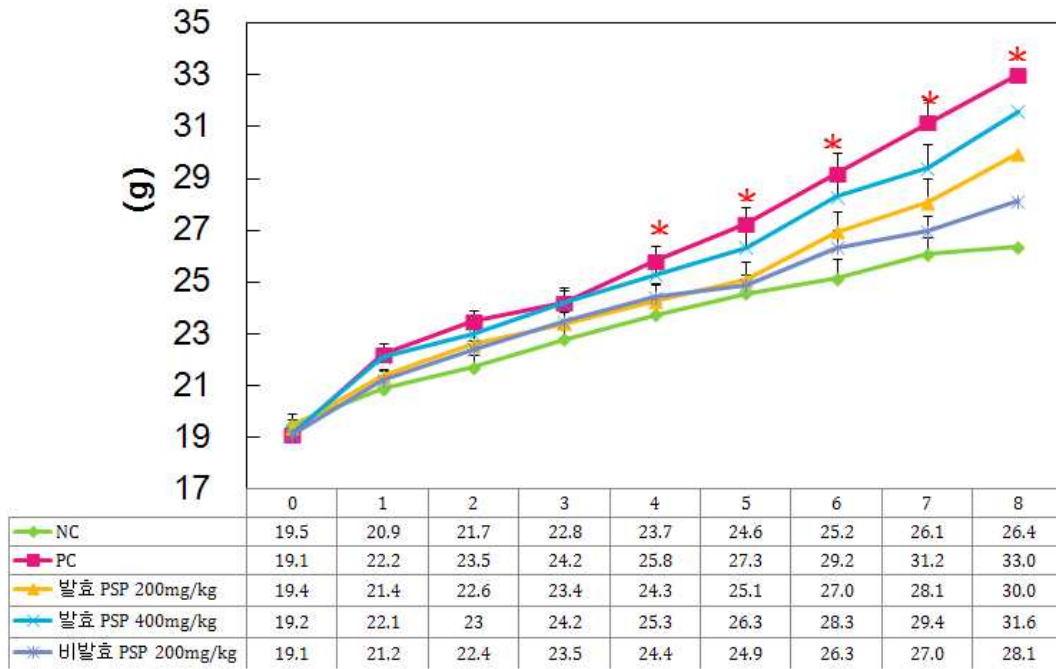


Fig. 5-66. Effect of FPSP or PSP on body weight change. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control

PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

- 그림과 같이 고지방 식이만 먹인 군에서 비 고지방식이 군에 비해 유의적으로 체중이 증가하였고, 발효 및 비발효 자색고구마 투여 군에서 고지방식이만 먹인 군과 비교 시 체중 증가량이 적음을 볼 수 있다. 또한 식이효율(Fig. 5-67)을 통해 발효 및 비발효 자색고구마 투여 군의 체중이 고지방식이 투여군보다 체중 증가율이 적은 것을 관찰 할 수 있다.



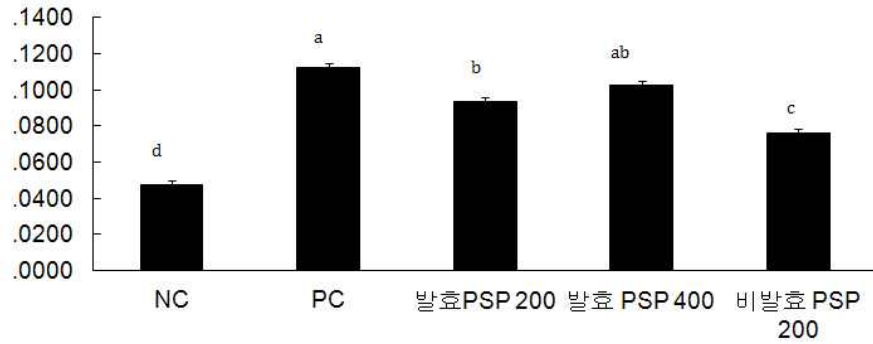


Fig. 5-67. Food efficiency ratio. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control

PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

## (2) 조직 무게

- 발효 및 비발효 자색고구마의 항비만 효과를 평가한 쥐의 신장, 내장 및 총 지방에서 고지방식이 투여 군의 조직이 유의적으로 증가하는것에 비해 자색고구마의 투여 군에서 조직의 지방이 유의적으로 감소함을 볼 수 있다 (fig. 5-68 ~ 70).
- 지방 관련 대사증후군 문제인, 내장지방에서 고지방 식이만 투여한 군에 비해 자색고구마와 함께 투여한 군에서 유의 감소를 보여 자색고구마의 향후 항비만 관련 기능성 식품으로 기대된다.

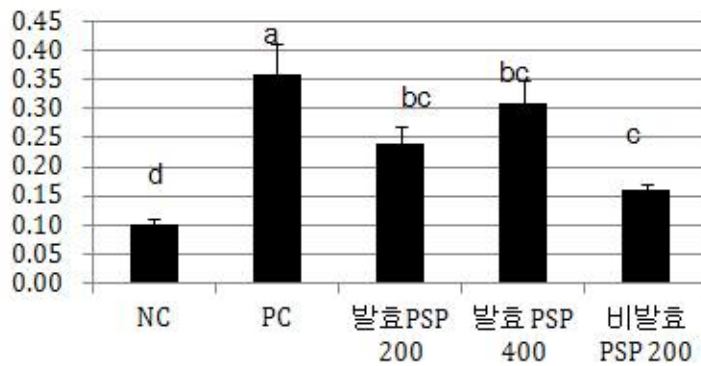


Fig. 5-68. Mesenteric fat. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control

PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

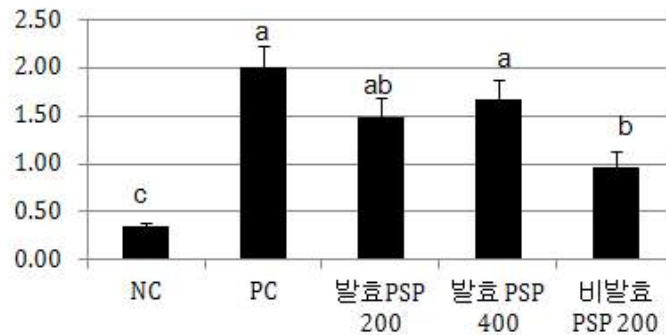


Fig. 5-69. Visceral fat. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control, PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

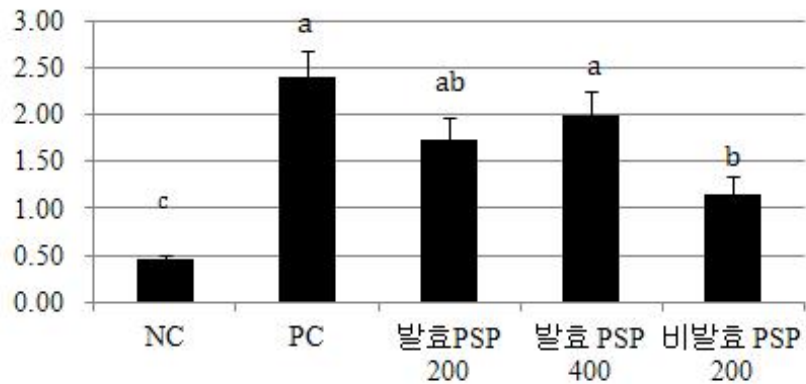


Fig. 5-70. Total fat. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control

PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

### (3) 혈중 생화학적표지물질의 측정

- 실험 종료 후 혈액을 채취한 후 원심분리 및 혈청 분리 후 TG, total cholesterol, LDL 측정

#### (가) Hepatic triglyceride(TG) 함량 측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 지질 억제 효과를 측정하기 위해 Hepatic triglyceride(TG) (아산제약, kit) 함량을 측정하였다. 실험결과, 고지방 식이만 투여한 (PC) 군보다 발효자색고구마 추출물 200 mg/kg 두 군에 의해서 고지방 식이에 의해 증가된 TG의 함량이 유의적으로 감소하였다.

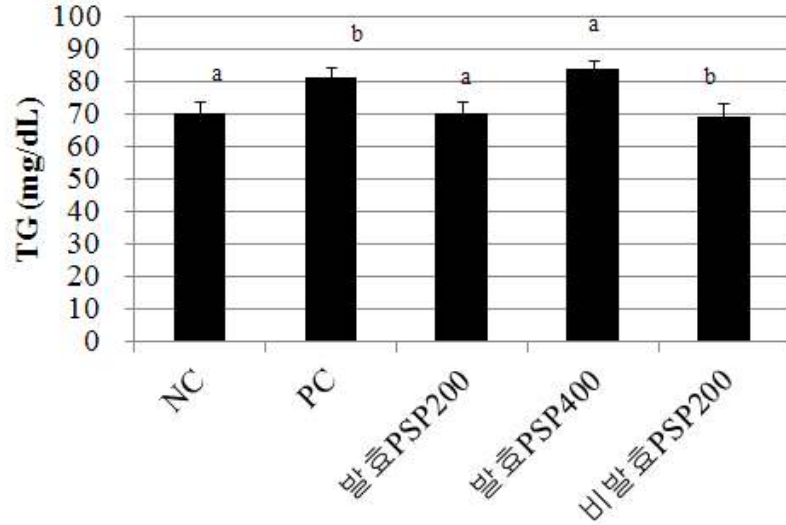


Fig. 5-71. Hepatic triglyceride content. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control

PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

#### (나) Total cholesterol 함량 측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 지질 억제 효과를 측정하기 위해 total cholesterol 함량을 측정하였다. 실험결과, 고지방 식이만 투여한 (PC) 군보다 발효자색고구마 추출물 200 mg/kg 두 군에 의해서 고지방 식이에 의해 증가된 total cholesterol 의 함량이 유의적으로 감소하였다.

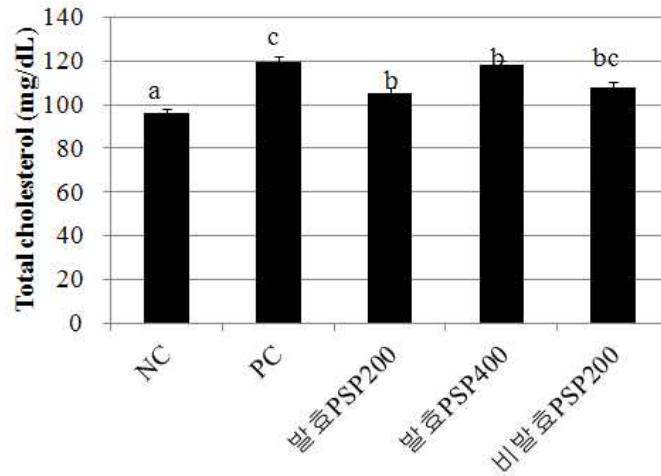


Fig. 5-72. Total cholesterol. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control

PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

(다) LDL 함량 측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 지질 억제 효과를 측정하기 위해 LDL 함량을 측정하였다. 실험결과, 고지방 식이만 투여한 (PC) 군보다 발효자색고구마 추출물 200 mg/kg 두 군에 의해서 고지방 식이에 의해 증가된 total cholesterol 의 함량이 유의적으로 감소하였다.

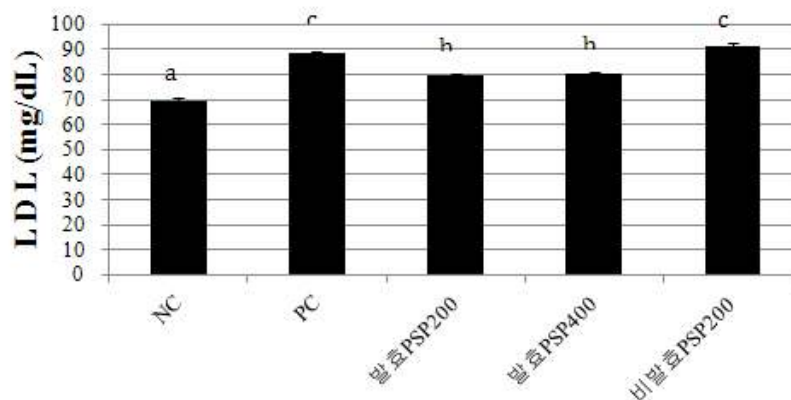


fig. 5-73. LDL contents. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control

PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

#### (4) 혈청 Leptin 함량 측정

- 본 연구에서는 고지방 식이 마우스 동물모델에서 발효자색고구마 추출물의 adipogenesis 활성억제 및 지방대사 조절과 포도당 대사 조절 관련 신호체계를 조사하기 위하여 혈청에서 leptin의 단백질 발현을 ELISA kit (Bio vender)를 이용하여 확인하였다.
- Leptin의 경우 자색고구마 투여군에서 고지방 식이 투여군에 비교하여 감소하였다. 이는, 지방세포내의 지방축적량이 증가할수록 leptin의 분비량이 증가하는 것으로 알려진 이론과 부합하는 결과를 보여주며, 본 연구에서는 이와 마찬가지로 체중의 감소를 보이는 자색고구마 투여군 모두 고지방식이 군에 비해 leptin의 감소를 보인다.

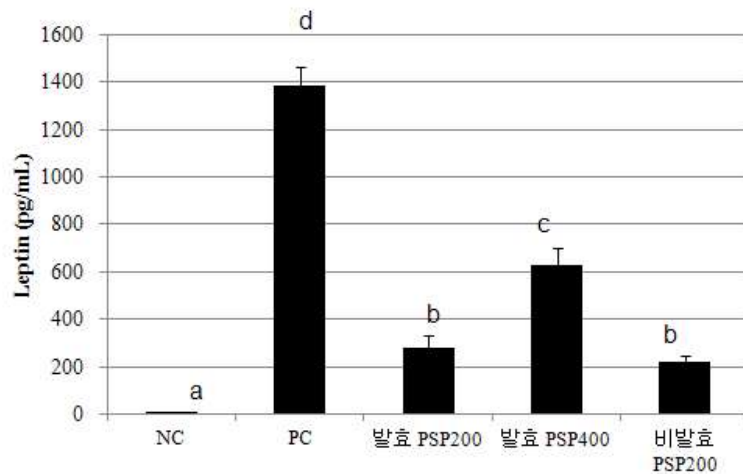


fig. 5-74. Leptin contents in serum. Data express the mean  $\pm$  SE.

NC; Normol control, PC; High fat diet

발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

발효 PSP 400 mg/kg; High fat diet + 400 mg/kg b.w./day of fermented purple sweet potato

비발효 PSP 200 mg/kg; High fat diet + 200 mg/kg b.w./day of purple sweet potato

\*  $P < 0.05$ , significantly different from the high fat diet group.

- 상기의 data를 보면 발효 추출물도 체중조절에 효과를 나타내고 있지만, 발효 추출물을 생산하기 위하여 소요되는 시간과 노동력을 최소화 하면서도 체지방 조절에 효능을 나타낼 수 있는 비발효 추출물을 대상으로 건강기능식품 개별인정을 받는 것이 효율적일 것이라고 판단하여 부득이하게 비발효 추출물을 최종 개별인정 후보소재로 선택하게 되었다. 또한 발효추출물로 제한하는 것보다 자색고구마 추출물 자체로 기능성인증을 받는 것이 원료의 사용범위를 넓힐 수 있는 장점이 있다. 이에 비발효 추출물을 대상으로 동물실험을 한 번 더 수행하였다.

#### 다. 비발효 항비만 실험

##### (1) 실험디자인

- *In vivo*에서 비발효 자색고구마 추출물의 지질 개선 효능을 평가하기 위하여 고지방식이 (High Fat Diet: HFD) 동물 모델을 확립하였다. 5 주령의 C57BL/6J mice에 고지방식이(45% 고지방식이)를 8 주간 투여하여 비만을 유도한 후, 몸무게를 측정하여 몸무게가 증가한 마우스를 선별하였다. 선별된 마우스를 6 group - 일반식이대조군 (Normal diet, NC), 고지방식이대조군(45% high fat diet, HF-C), 고지방식이에 자색고구마 고, 중,저용량 투여군(PSP 100, 250, 500mg/kg/day), 양성대조군으로 캄보지아-가르시니아 추출물 250 mg/kg/day(GK 250)-로 그룹을 나눈 후 8주 동안 vehicle 및 자색고구마 추출물을 구강투여하였다. 각 group당 10 마리의 마우스를 사용하였으며, 확립된 동물 모델을 이용하여 자색고구마 추출물의 체지방개선 및 지질개선 효능을 평가하였다.

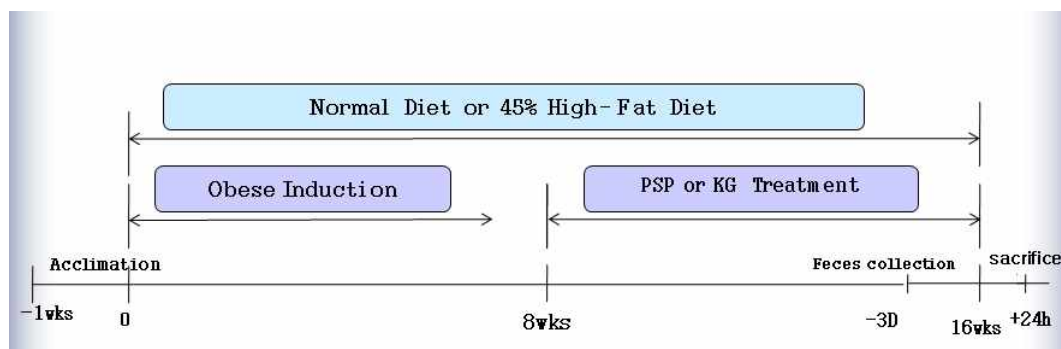
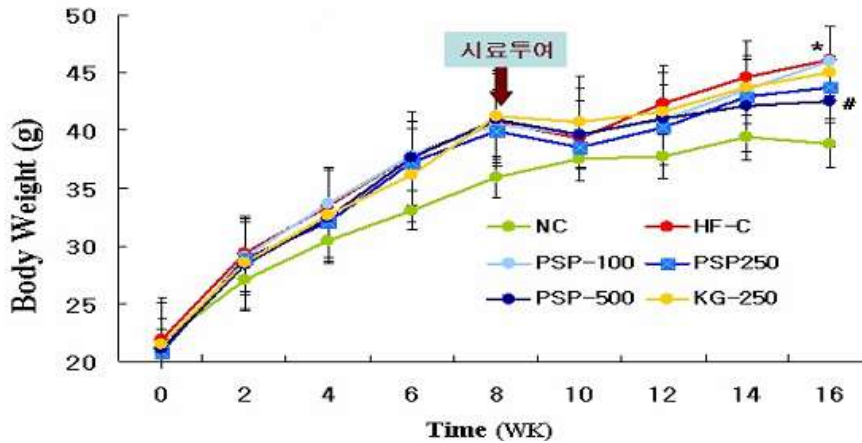


Fig. 5-75. Schematic diagram of the experimental protocol in mice. Male, 5 week-old C57BL/6 mice were used in these studies. Animals were acclimatized to the temperature ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 5\%$ ) of controlled rooms with a 12-h light/dark cycle for at least 1 week prior to experimentation. All animal experiments were performed according to the rules and regulations of the Animal Ethics Committee, Jeonbuk National University. The mice were randomly divided into six groups(n=10): Control (normal diet), High-fat diet plus daily vehicle [0.5% carboxymethylcellulose (CMC)] as a control group and HFD plus the PSP (100, 250 500

mg/kg/day). The mice fed with normal diet(NC) or high fat diets containing 45%w/w fat for 16 weeks. PSP were administered daily by oral gavage for 8 weeks after obese induction with high fat diet.

(2) 체중 변화 및 식이효율



5-76. Body weight changes of mice during the 16-week period.

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 자색고구마 추출물의 투여는 농도 의존적 체중감소 경향을 보였으며, PSP 500mg/kg/day의 경우는 HF-C 대조군에 비해 유의한 체중감소 효과를 보였다.(Fig 5-76)

Table 5-1. Effect of the PSP or KG on weight gain, food intake, and feed efficiency.

Group	Initial(g)	8wk(g)	Final(g)	weight gain (g/16week)	Food intake (g/16week)	Feed Efficiency (x 10 <sup>-2</sup> )
NC	21.7±0.6	33.1 ±1.8	38.8 ±2.8	17.1 ±1.6	322	5.31
HF-C	21.0 ±0.7	37.8 ±1.0	46.6 ±3.0	25.6 ±1.5*	349	7.34 *
PSP100	20.8 ±1.1	37.8 ±1.5	45.6 ±2.1	24.8±1.3	351	7.07
PSP250	20.8 ±1.7	37.2 ±1.8	43.7 ±3.1	22.9 ±2.3	338	6.78
PSP500	21.1 ±0.5	37.6 ±1.1	42.5 ±2.5*	21.4 ±1.4*	336	6.36 *
GK250	21.5 ±1.3	36.1 ±1.4	45.0 ±2.7	23.5 ±1.4	342	6.87

Values are means ± SE(n=10)

Feed efficiency=[weight gain(g/16wk)] / [ food intake(g/16wk)]

\*p < 0.05 compared to the NC (normal control).

#p < 0.05 compared to the HF-C (high-fat diet)

- 식이섭취량의 경우는 PSP 500 투여군에서 고지방식이만 투여한 대조군에 비해 유의한 식이효율감소를 보였다.



(3) 체지방을 변화

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 자색고구마 추출물의 투여는 PSP 500군과 PSP 250군에서 HF-C 대조군에 비해 체지방 축척율이 감소하였으며, 그 감소효과는 PSP 500 군에서 유의하였다.(Fig 5-77)

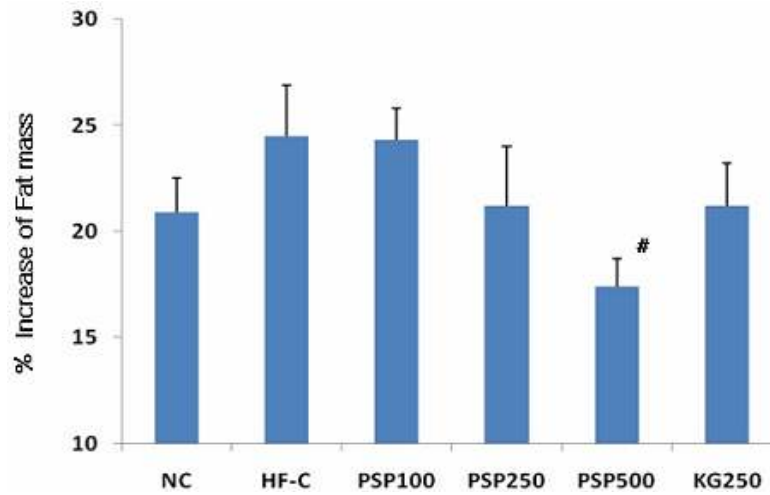


Fig. 5-77. Total fat mass changes of mice during the 16-week period.

Table 5-2. Effect of the PSP or KG on liver weight and adipose tissue accumulation.

Group	Liver weight(g)	liver wt /body wt ( $\times 10^3$ )	White adipose tissue(g)				Brown adipose tissue(g)
			epididymal	mesenterical	visceral	Total	
NC	1.36±0.17	3.5	0.07±0.03	0.74±0.08	1.61±0.17	2.41±0.08	0.46±0.08
HF-C	2.26±0.18 <sup>*</sup>	4.9	0.24±0.02 <sup>*</sup>	1.69±0.11 <sup>*</sup>	2.90±0.16 <sup>*</sup>	4.83±0.09 <sup>*</sup>	0.73±0.09 <sup>*</sup>
PSP100	2.05±0.32	4.4	0.25±0.02	1.40±0.11	2.02±0.29 <sup>#</sup>	3.67±0.07	0.82±0.07
PSP250	1.96±0.34	4.5	0.22±0.03	1.43±0.06	2.28±0.08	3.94±0.06	0.76±0.55
PSP500	1.84±0.19	4.3	0.22±0.01	1.16±0.05 <sup>#</sup>	1.83±0.06 <sup>#</sup>	3.22±0.11 <sup>#</sup>	0.60±0.11 <sup>#</sup>
KG250	1.97±0.38	4.3	0.24±0.03	1.23±0.11 <sup>#</sup>	2.09±0.24 <sup>#</sup>	3.57±0.06 <sup>#</sup>	0.64±0.10

- 간조직 중량은 일반식이군에 비해 고지방식이군에서 동일하게 간무게가 증가하였고 자색고구마추출물 투여군에서 다소 중량 감소 효과가 보이기는 하나 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Table 5-2).

(4) 혈청 내 lipid profiles 함량 변화

- 고지방식이 마우스 동물모델에서 자색고구마 추출물의 지질 억제 효과를 측정하기 위해 혈청내 중성지방, 총콜레스테롤, HDL, LDL 및 AI(동맥경화지수)Hepatic

triglyceride(TG) 와 총콜레스테롤(TC) 함량, 분변 내 배출되는 TG, TC 함량을 측정하였다. 실험결과, 자색고구마 추출물의 투여는 고지방 식이에 의해 증가된 혈중 총콜레스테롤, LDL 함량을 유의적으로 감소시켰을 뿐만 아니라 PSP500 군에서는 동맥경화지수를 유의하게 개선시켰다. 그러나 혈중 중성지방의 함량은 다소 감소된 경향을 보였다.(Table 5-3)

Table 5-3. Effect of the PSP or KG on plasma lipid levels and AI

Group	Total cholesterol (mg/dl)	LDL(mg/dl)	HDL(mg/dl)	HDL/LDL	TG
NC	180.3±9.0	22.3±1.2	159.3±6.7	6.30±2.6	61.3±5.6
HF-C	253.7±38.7*	63.7±15*	182.5±16.5	3.02±1.4*	79.0±2.6*
PSP100	120.4±16.1#	25.5±6.9#	91.1±13.6	3.17±0.8	75.3±4.0
PSP250	132.2±19.2#	32.8±10.3#	95.5±17.7	3.24±0.6	85.0±4.6
PSP500	114.5±18.2#	26.6±4.7#	86.7±12.8	3.54±0.5#	73.8±5.7
GK250	88.5±30.1#	21.4±2.0#	65.7±17.1	4.08±1.4#	80.3±8.1

The blood for plasma lipid levels was collected at the last day of the experiment.

Values represent the means ± SE (n=10)

\*  $p < 0.05$  compared to the NC (normal control).

#  $p < 0.05$  compared to the HF-C (high-fat diet)

(5) 혈청 glucose, 렙틴 및 인슐린 함량 비교

- 자색고구마 추출물의 투여는 고지방식으로 인해 증가된 혈청 내 렙틴과 인슐린 농도를 저하시켰다(Fig 5-78)

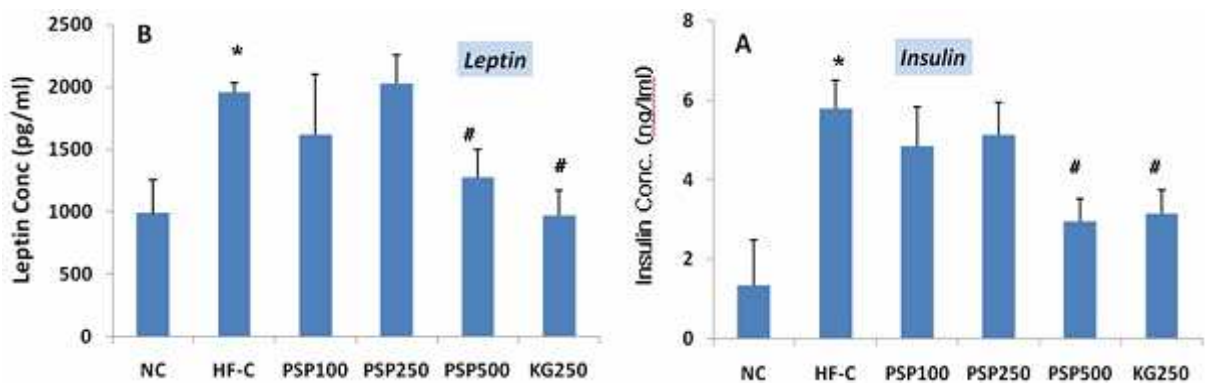


fig. 5-78. Leptin and insulin in serum. Values represent the means ± SE (n=10)

(6) 지방조직의 형태학적 변화

- 고지방식이군에서는 일반식에 비해 adipocyte의 hypertrophy가 유도 되었고, 자색고구마 추출물의 처리에 의해 hypertrophic adipocyte의 수 및 크기가 감소되는 경향을 보였다.

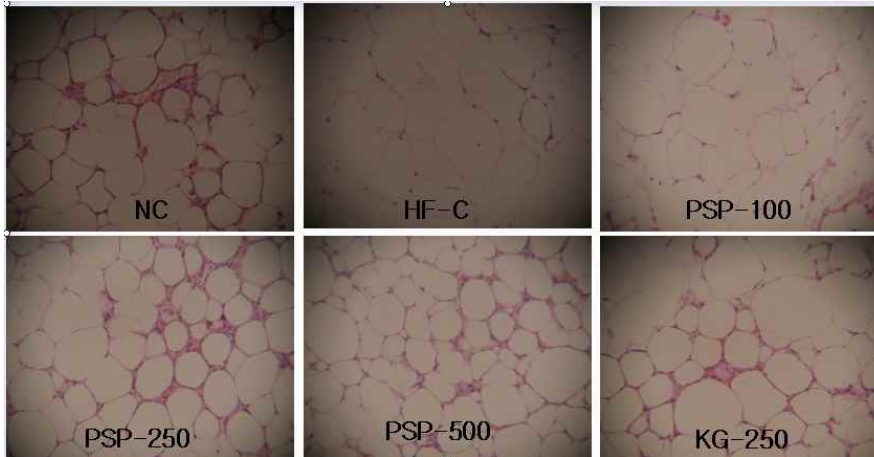


Fig 5-79. Histology of the visceral fat were fixed with formalin (200g/kg) neutral buffered solution and embedded in paraffin. Section(8 $\mu$ l)were cut stained hematoxylin and eosin. Images were captured using a CCD camera (Olympus Optical, Tokyo, Japan) at a magnification of x 200.

#### (7) Hepatic enzyme levels 변화

- 고지방식이 동물모델에서 자색고구마 추출물이 지방축적억제 효과를 측정하기 위하여 지질대사 관련 효소들의 활성 및 신호전달체계에 미치는 영향을 평가하기 위하여 western blotting 및 RT-PCR 방법을 이용하여 평가하였다. 그 결과 자색고구마 추출물은 지방 합성 관련 효소들의 활성 억제시켰으며, 특히 FSA와 ACS1, GPAT 에서는 농도 의존적 효과를 보였다.

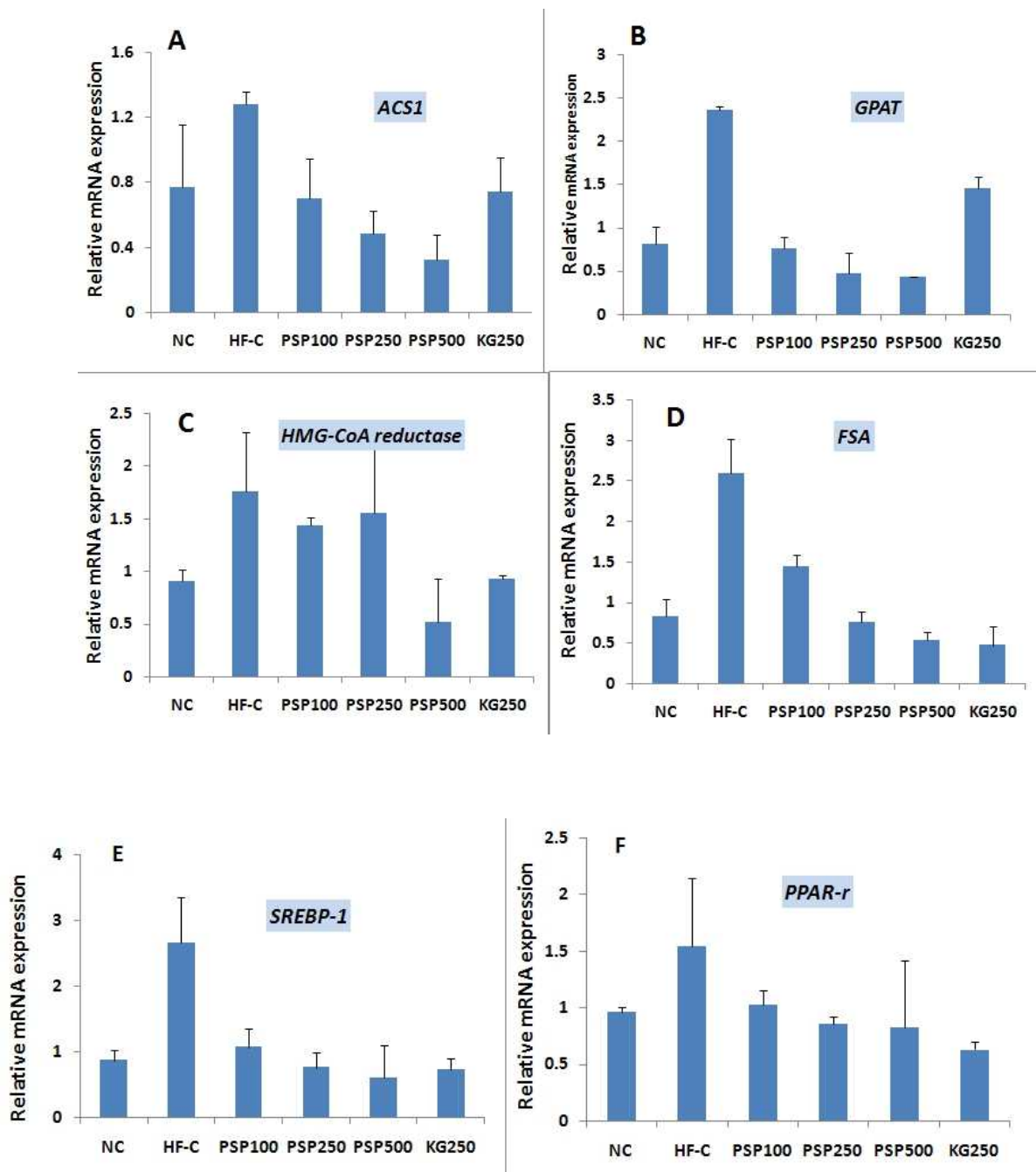


Fig. 5-80. Effect of the PSP or KG on the activities of hepatic enzymes related to lipid metabolism in mice fed control and high-fat diets for 16 weeks.

Values are means  $\pm$  SE (n=3). \*  $p < 0.05$  vs NC. #  $p < 0.05$  vs HF-C

### 3. 자색고구마의 인체적용 시험

#### 가. 발효자색고구마의 안토시아닌을 이용한 시력보호 효과

- 안토시아닌(anthocyanine)을 이용하여 VDT(visual display terminal) 증후군의 개선효과와 시력보호 효과에 대한 임상실험을 시행.
- 발효자색고구마에서 추출한 안토시아닌(anthocyanine)과 대조군으로 위약(placebo)과 블루베리(blueberry)에서 추출한 안토시아닌을 40 mg 씩 각각 복용하였고, 그로부터 2시간 후 근거리 작업(VDT)을 2시간 동안 실시하였다. 그 결과 VDT 증후군과 시력저하에 대한 시력보호 및 VDT 증후군 개선효과를 알아보았다.

##### (1) VDT 증후군 개선 효과

- 실험 시행 대상자는 안과질환 및 전신질환이 없고, 굴절이상  $-4.00D$  이상, 19~21세 남·여 18명을 대상으로 실시하였다.
- 영상표시단말기(Visual Display Terminal, VDT)증후군이란 VDT화면 앞에서 장시간 작업을 하고 난 후 발생하는 다수의 안증상과 누적외상성 장애, 피부증상, 정신신경계 증상 등을 통칭하여 말한다. 이 중 VDT작업자가 가장 많이 호소하는 증상을 살펴보면 눈의 피곤(안정피로), 시력의 저하, 눈이 무겁고 아픔, 화면을 오래보면 화면이 흐려짐, 가까운 사물이 잘 안보임, 목과 허리, 어깨 주위 통증 등의 증상이 나타난다. VDT작업은 문서, 키보드, 화면 간 광범위하게 시선을 이동시키고 이에 수반되는 시거리 차이에 의하여 조절과 폭주의 스트레스를 많이 받게 되며, 눈 깜박임 횟수가 현저하게 줄어 들고 눈을 크게 뜨게 된다. 이로 인해 안정피로가 나타나며, 눈이 건조해지며, 목과 어깨, 허리, 등 주위에 통증이 생기게 된다.
- 안정피로(asthenopia)란 근업(near work)을 하는 동안 눈의 사용으로 정상인 보다 빨리 눈의 피로를 느끼고, 앞이마 압박감, 두통, 시력장애, 심하면 구토까지 나타나는 자각적인 불편한 증상을 말한다. 안정피로와 관련된 불편함은 한 가지 요인이나 여러 가지 요인이 결합되어 발생하는데, 조절력 저하, 원시 미교정의 지속적인 근거리 시력사용, 부등상시, 난시, 사위, 안구염증, 히스테리성, 미교정 노안, 부적당한 조명, 망막질환 등에 의해 발생하며, 주로 근점 스트레스에 의해 나타난다.
- 본 실험은 근업 2시간 후 VDT 증후군으로 두통, 안통 및 안정피로(눈과 관련한 모든 피로), 목, 어깨, 허리 등의 자각증상의 정도를 심함, 보통, 약간, 없음 등으로 구분하여 문진하였다. 문진 결과 VDT 증후군에 대한 발효자색고구마에서 추출한 안토시아닌의 VDT 증후군의 개선효과(table 3-1)가 위약(table 3-2)과 비교하여 두통, 안통 및 증상이 개선되었으며, 블루베리 추출 안토시아닌과는 유사한 결과를 나타냈다(table 3-3).

Table 3-1. 발효자색고구마 추출 안토시아닌의 2시간 근업 후 VDT 증후군 (%)

자각증상	심함	보통	약간	없음
두통			6명 (33.3)	12명 (66.7)
안통 및 안정피로		2명 (11.1)	6명 (33.3)	10명 (55.6)
허리			6명 (33.3)	12명 (66.7)
어깨			4명 (22.2)	14명 (77.8)
목			4명 (22.2)	14명 (77.8)

Table 3-2. 위약(placebo)의 2시간 근업 후 VDT 증후군 (%)

자각증상	심함	보통	약간	없음
두통		4명 (22.2)	3명 (16.7)	11명 (61.6)
안통 및 안정피로		2명 (11.1)	6명 (33.3)	10명 (55.6)
허리		2명 (11.1)	3명 (16.7)	13명 (72.2)
어깨		1명 (5.6)	6명 (33.3)	11명 (61.6)
목		1명 (5.6)	6명 (33.3)	11명 (61.6)

Table 3-3. 블루베리 추출 안토시아닌의 2시간 근업 후 VDT 증후군 (%)

자각증상	심함	보통	약간	없음
두통			4명 (22.2)	14명 (77.8)
안통 및 안정피로		2명 (11.1)	6명 (33.3)	10명 (55.6)
허리			6명 (33.3)	12명 (66.7)
어깨			4명 (22.2)	14명 (77.8)
목		1명 (5.6)	3명 (16.7)	14명 (77.8)

## (2) 시력보호 효과

- 안과질환 및 전신질환이 없고, 굴절이상  $-4.00D$  이상, 19~21세 남·여 18명을 대상으로 발효자색고구마추출 안토시아닌과 위약(placebo) 그리고 대조군으로 블루베리 추출 안토시아닌을 각각 복용, 2시간 후에 근업(visual display terminal ;VDT)을 2시간 동안 실시하였다.
- 시력검사는 안토시아닌을 복용하기 전과 2시간 근업 후 각각 타각적 굴절검사 방법으로 측정하였으며, 발효자색고구마에서 추출한 안토시아닌과 대조군으로 위약과 블루베리에서 추출한 안토시아닌 40 mg 씩을 각각 복용 2시간 후 2시간 동안 근거리 작업(VDT)으로 발생하는 시력저하에 대한 시력보호 효과를 검사하였다.
- 2시간 동안 근업으로 나타날 수 있는 시력보호 효과는 우위안과 비우위안으로 구분하여 검사하였다. 우위안이란 사람의 두 눈 중 사물을 주시 할 때 주도적인 작용을 하는 눈을 말하며, 보통의 경우 우위안이 오른쪽 눈일 경우 오른손과 오른발을 주로 활발히 사용하게 된다. 근거리 작업(VDT)에 의한 시력저하(굴절이상 값의 증가)는 근거리를 주시하기 위해 모양체근의 수축으로 인한 조절긴장으로 나타날 수 있다. 따라서 모양체근의 긴장 완화를 통해 근거리 작업에 의한 굴절이상 값의 증가를 억제함으로써 시력저하를 막을 수 있다.
- 발효자색고구마 추출 안토시아닌의 시력보호 효과에 대한 실험결과 우위안의 경우 18명의 대상자 중 12명은 안토시아닌을 복용하기 전과 비교하여 굴절이상 값이 증가하지 않았으며, 6명은 0.25D~0.50D의 굴절이상 값이 증가하였다. 블루베리추출 안토시아닌의 경우 13명이 굴절이상 값이 증가하지 않았으며, 5명은 0.25D~0.50D의 굴절이상 값이 증가하였다. 그러나 위약의 경우 2명만이 굴절이상 값이 증가하지 않았다. 16명은 0.25D~1.00D의 굴절이상 값이 증가하였다. 위와 같은 결과에서 발효자색고구마

추출 안토시아닌의 경우 대상자의 66.7%, 블루베리 추출 안토시아닌의 경우 대상자의 72.2%에서 시력보호 효과가 있는 것으로 조사되었다.

- 비우위안의 경우 18명의 대상자 중 11명은 안토시아닌을 복용하기 전과 비교하여 굴절이상 값이 증가하지 않았으며, 7명은 0.25D~0.75D의 굴절이상 값이 증가하였다. 블루베리추출 안토시아닌 경우 10명이 굴절이상 값이 증가하지 않았으며, 8명은 0.25D~0.50D의 굴절이상 값이 증가하였다. 그러나 위약의 경우 4명만이 굴절이상 값이 증가하지 않았다. 14명은 0.25D~0.75D의 굴절이상 값이 증가하였다. 위와 같은 결과에서 발효자색고구추출 안토시아닌의 경우 대상자의 61.1%, 블루베리 추출 안토시아닌의 경우 대상자의 55.6%에서 시력보호 효과가 있는 것으로 조사되었다. 따라서 2시간 근무 후 발효자색고구마 추출 안토시아닌의 굴절이상 값의 증가를 억제함으로써 시력을 보호하는 것으로 조사되었으며, 비우위안 보다 우위안에서 시력보호 효과가 더 효과적인 것으로 조사되었다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### ◎ 1차년도 연구개발 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	자색고구마의 발효공정 최적 화에 의한 천연 기능성색소 개 발	원재료의 표준화	100	자색고구마 원료에 함유된 안토시아닌의 채취시기 및 보관방법에 따른 함량 변화
		지표물질확인	100	LC/MS/MS에 의한 안토시아닌 구조확인
		안토시아닌의 추출법 확립	100	추출용매 및 온도에 의한 색소 추출 비교
		발효균주의 분리동정	100	혼합균주에 함유된 주 발효균의 분리 동정
		과학적인 발효공정 확립	100	단리된 균주에 의한 자색고구마 추출물의 발효 현상 분석
		발효추출물의 안토시아닌 분리 및 구조 분석	100	발효에 의한 안토시아닌 화합물조성의 변화 확인
		지방세포분화억제	100	3T3-L1 지방세포전이 억제 확인
		당흡수 조절	100	$\alpha$ -glucosidase 억제 효과 확인
	발효자색고구마 추출물의 항비 만 및 항당뇨 기능성 평가 연 구 - 제1위탁	<i>In vitro</i> 세포수준 항비만 및 항당뇨 기능성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vitro</i> 인슐린 저항성 세포주 확립</li> <li>- Glucose uptake에 대한 영향조사</li> <li>- GLUT4 유전자 활성 변화</li> <li>- Triglyceride 및 Cholesterol 측정</li> <li>- Fatty acid synthase 발현조사</li> <li>- 관련 신호전달 체계 조사 (AKT, AMPK, ACC)</li> </ul>
	자색고구마의 천연색소에 의 한 골절기능 개 선 효과 - 제2위 탁	근세포의 시료에 대한 독성평가 및 근 세포 수축관련 NO 량 측정	100	- 자색고구마의 천연색소에 의한 근세포의 독성 및 NO 생성량 측정
근 수축과 이완관련 cGMP양 측정		100	- 자색고구마의 천연색소에 의한 근세포 cGMP 생성량 측정	

◎ 2차년도 연구개발 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	자색고구마의 발효공정 최적 화에 의한 천연 기능성색소 개 발	원재료 표준화	100	자색고구마의 크기별 안토시아닌 함량 비교
		안토시아닌 대량분리	100	개별 안토시아닌의 순수 분리
		안토시아닌 구조 확인	100	단리한 안토시아닌의 구조 확인 (MS, UV, IR, NMR)
		지표물질 분석법 확립	100	안토시아닌의 정량분석법 확립
		발효추출물 안전성	100	독성 실험을 통한 안전성 검증
		정제 안토시아닌의 생리활성 평가	100	- 항산화 활성 측정 - α-glucosidase 활성 측정 - 지방세포를 이용한 비만 저해 활성
	발효자색고구마 추출물의 항비 만 및 항당뇨 기능성 평가 연 구 - 제1위탁	<i>In vivo</i> 고지방식이 비만 쥐 모델을 활용한 발효자색고구마의 항비만 및 항당뇨 기능성 검증	100	- 고지방 식이를 통한 비만 쥐 모델 확립 - 쥐의 체중변화 측정 - total cholesterol, triglyceride 측정 - 혈액 내 혈당 측정 - ALT 및 AST 측정 - Fatty acid synthase 발현조사
	자색고구마의 천연색소에 의한 굴절기능 개선 효과 - 제2위탁	자색고구마추출 Anthocyanin의 시력개선 효능 평가	100	- VDT 증후군 개선 및 시력보호 효과 측정

◎ 3차년도 연구개발 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2011)	자색고구마의 발효공정 최적화에 의한 천연 기능성색소 개발	발효 추출물의 안전성 실험 실시	100	독성실험 실시 (GLP 기관에 의뢰)
		자색고구마 발효 추출물에서 지표(기능) 성분의 설정	100	- 발효추출물에 함유된 안토시아닌 중에서 기능성을 나타내면서 main compound인 기능(지표)성분 설정 - 기능(지표) 성분 분석법 MV 실시
		색소의 가공 및 저장 중 안정성 평가 보완	100	가공 및 저장 중 안토시아닌 색소의 열, 빛에 대한 stability test
		발효 추출물의 대량 생산공정 표준화	100	- 2차년까지 사용된 균주 이외의 다른 고효율 발효균주를 개발하여 발효추출물의 기능성 향상 - 설정된 지표성분을 활용하여 제품 생산공정 표준화 실시
		자색고구마 기능성식품 생산을 위한 제형연구	100	캡슐, tablet, 분말, 과립, 액상 등 제형연구
		<i>In vivo</i> 에서 자색고구마 발효 추출물의 지방축적 저해 관련 기능성 효능 평가	100	- 체중변화 측정 - Tissue weight 측정 - TG, total cholesterol, LDH, ALP, HDL 측정 - ALT, AST 측정 - PPAR $\gamma$ , CEBP/ $\alpha$ 측정
		대사성 증후군 관련 pilot 인 체 적용시험 실시	60	- 혈액중의 HDL, LDL cholesterol, TG 함량 분석 - GOT, GPT 활성 측정 - 체중 변화 측정 - BMI, Body fat 등 측정

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 학술 발표

발표일	제목	저자			학술회의명	국내외 구분
		주저자	교신저자	공동저자		
2009.11.	자색고구마 발효음료 생산을 위한 발효조건 표준화 연구	유은혜	정경희	위지향, 정경옥	한국저장유통학회	국내
2010.11.	Characterization of Anthocyanins from Fermented Purple Sweet Potato	Jung Kyung Hee	Jung Kyung Hee		Asia Sweet Potato Conference	국외 (중국)
2010.10.21-22	Dietary Anthocyanin-Rich Purple Sweet Potato Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Human HepG2 Cells	Yong Pil Hwang	Hye Gwang Jeong	Jae Ho Choi	대한약학회-추계	국내 (청주)
2011.03.6-10	AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of anthocyanins-rich purple sweet potato in insulin-resistant human HepG2 cells	Jin Young Kim	Hye Gwang Jeong	Yong Pil Hwang, Choi Jae Ho	The 50th Annual Meeting of Society of Toxicology	국외 (미국)
2011.06.8-10	Biological Activities of Fermented Purple Sweet Potato ( <i>Ipomoea batatas</i> ) Extracts	Heami Sung	Jung Kyung Hee	Kyungok Jung, Ji-hyang Wee, Ki Myong Kim	한국식품과학회	국내 (대구)

### 2. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010	지방축적 저해효과를 가지는 자색고구마 추출물	(재)전남 생물산업진흥재단	대한민국	10-2010-0001957					
2011	자색고구마 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물	(재)전남 생물산업진흥재단	대한민국	10-2011-0066885					

### 3. 추가연구 등

- 한국식품연구원의 『2012년 식품 기능성평가 인체적용시험 지원사업』에 선정됨.

본 연구과제에서 수행한 연구결과를 바탕으로 한국식품연구원에서 주최하고 농림부에서 지원하는 『2012년 식품 기능성평가 인체적용시험 지원사업』에 자색고구마의 체지방 감소 관련 인체효능평가 지원사업에 선정되었음.

- 사업기간: 2011년 12월 ~ 2013년 12월까지 (24개월)
- 사업내용: 자색고구마 추출물 문말의 체지방 조절과 관련된 인체에서의 기능성 효능평가.
- 총사업비: 200,000천원  
(국비: 140,000천원, 자부담: 60,000천원(현금 30,000천원, 현물: 30,000천원))

### 4. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 전남지역의 특산자원 중 하나인 자색고구마 추출물을 대상으로 체지방조절 관련한 개별 인정형 기타 II 등급의 건강기능식품으로 식약청으로부터 개별인정을 획득하여 고부가가치 식품으로 개발하여 산업화
- 전남지역 작물의 국가경쟁력 확보 및 이를 통한 지역 천원 자원의 고부가가치화

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

자색고구마 관련 논문

1. Norihiko Terahara, Toshiro Matsui, Kanako Minoda, Kanae Nasu, Risa Kikuchi Fukui, Hiroshi Ono, and Kiyoshi Matsumoto ; Functional new acylated sophoroses and deglycosylated anthocyanins in a fermented red vinegar. J. Agric. Food Chem., 57, 8331-8338, (2009)
2. Elyana Cuevas Momtilla, Silke Hillebrand, Daniela Butschbach, Susanine Baldermann, Naoharu Watanabe, and Peter Wimperhalter ; Preparative isolation of anthocyanins from japanese purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties by high-speed countercurrent chromatography. J. Agric. Food Chem., 58, 9899-9904, (2010)
3. Van-Den Truong, Nigel Deighton, Roger T. Thompson, Roger F. McFeeters, Lisa O. Dean, Kenneth V. Pecota, and G. Craig Yencho ; Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweet potatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. J. Agric. Food Chem., 58 (1), 404-410, (2010)
4. Zi-Feng Zhang, Shao-Hua Fan, Yuan-Lin Zheng, Jun Lu, Dong-Mei Wu, Qun Shan, Bin Hu ; Purple sweet potato color attenuates oxidative stress and inflammatory response induced by D-galactose in mouse liver. Food and Chemical Toxicology, 47, 496-501, (2009)
5. Junli Ye, Xiangjun Meng, Chunling Yan, Chungbo Wang ; Effect of Purple Sweet Potato Anthocyanins on  $\beta$ -Amyloid-Mediated PC-12 Cells Death by Inhibition of Oxidative Stress. Neurochem Tes, 35, 357-365, (2010)

- 일본야쿠르트사에서 자색고구마를 이용한 음료 개발



제품명: 아야무라사끼  
제조사: 일본 야쿠르트  
제형: 음료 (125 ml 종이팩 제품)  
가격: 132엔/음료 1ea

## 제 7 장    참고문헌

1. Norihiko Terahara, Toshiro Matsui, Kanako Minoda, Kanae Nasu, Risa Kikuchi Fukui, Hiroshi Ono, and Kiyoshi Matsumoto ; Functional new acylated sophoroses and deglycosylated anthocyanins in a fermented red vinegar. J. Agric. Food Chem., 57, 8331-8338, (2009)
2. Toshiro Matsui, Sumi Ebuchi, Keiichi Fukui, Kazusato Matsugano, Norihiko Terahara, and Kiyoshi Matsumoto ; Caffeoylsophorose, a new natural  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, from red vinegar by fermented purple-fleshed sweet potato. Biosci. Biotechnol. Biochem., 68(11), 2239-2246, (2004)
3. Norihiko Terahara, Toshiro Matsui, Kikuchi Fukui, Kazusato Matsugano, Koichi Sugita, and Kiyoshi Matsumoto ; Caffeoylsophorose in a red vinegar produced through fermentation with purple sweetpotato. J. Agric. Food Chem., 51, 2539-2543, (2003)
4. Akio Terahara, Tomoko Murakami, Ryujiro Shina and Kazuya Hayashi ; Effect of alcoholic fermentation on the stability of purple sweet potato anthocyanins. Food Sci. Technol. Res., 8 (1), 4-7, (2002)
5. Smita H. Panda and Ramesh C. Ray ; Lactic acid fermentation of  $\beta$ -carotene rich sweet potato (*Ipomoea batatas*) into Lacto-juice. Plant food for human nutrition, 62, 65-70, (2007)
6. Hector Rodriguez, Jose Antonio Curiel, Jose Maria Landete, Blanca de las rivas, Felix Lopez de Felipe, Carmen Gomez-Cordoves, Jose Miguel Mancheno, Rosario Munoz ; Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 132, 79-90, (2009)
7. Elyana Cuevas Momtilla, Silke Hillebrand, Daniela Butschbach, Susanine Baldermann, Naoharu Watanabe, and Peter Wimperhalter ; Preparative isolation of anthocyanins from japanese purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties by high-speed countercurrent chromatography. J. Agric. Food Chem., 58, 9899-9904, (2010)
8. Akio Tsukui, Atsuko Suzuki, Katsumi Komaki, Norihiko Terahara, Osamu Yamakawa and Kazuya Hayashi ; Stability and composition ratio of anthocyanin pigments from *Ipomoea batatas* Poir. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 46 (3), 148-154, (1999)
9. Yukihiro Goda, Takashige Shimizu, Yoshiaki Kato, Mikio Nakamura, Tamio Maitani, Takashi Yamada, Norihiko Terahara and Masaatu Yamaguchi ; Two acylated anthocyanins from sweet potato. Phytochemistry, 44 (1), 183-186, (1997)
10. Norihiko Terahara, Takashige Shimizu, Yoshiaki Kato, Mikio Nakamura, Tamio

- Maitani, Masa-atsu Yamaguchi, and Yukihiro Goda ; Six Diacylated anthocyanins from the storage roots of purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (8), 1240-1424, (1999)
11. Lan-Sook Lee, Eun-Ju Chang, Jung-Whan Rhim, Byoung-Seob Ko, and Sang-Won Choi ; Isolation and identification of anthocyanins from purple sweet potato. J. Food Sci. Nutr., 2 (2), 83-88, (1997)
  12. Kinoshita Odake, Norihiko Terahara, Norio Saito, Kenjiro Toki and Toshio Honda ; Chemical structures of two anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. Phytochemistry, 31 (6), 12127-2130, (1992)
  13. Norihiko Terahara, Tomoyuki Oki, Toshiro Matsui, Keiichi Fukui, Koichi Sugita, Kiyoshi Matsumoto and Ikuo Suda ; Simultaneous determination of major anthocyanins in purple sweet potato. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 54 (1), 33-38, (2007)
  14. Mio Kobayashi, Tomoyuki Oki, Mami Masuda, Saki Nagai, Keiichi Fukui, Kazusato Matsumoto and Ikuo Suda ; Hypotensive effect of anthocyanin-rich extract from purple-fleshed sweet potato cultivar "Ayamurasaki" in spontaneously hypertensive rats. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 52 (1), 41-44, (2005)
  15. Qingguo Tian, Izabela Konczak, and Steven J. Schwartz ; Probing anthocyanin profiles in purple sweet potato cell line (*Ipomoea batatas* L. Cv. Ayamurasaki) by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 53, 6503-6509, (2005)
  16. Ikuo Suda, Tomoyuki Oki, Yoichi Nishiba, Mami Masuda, Mio Kobayashi, Saki Nagai, Rie Hiyane and Toshikazu Miyashige ; Polyphenol contents and radical-scavenging activity of extracts from fruits and vegetables in cultivated in Okinawa, Japan. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 52 (10), 462-471, (2005)
  17. Keiichi Fukui, Kazusato Matsugano, Norihiko Terahara, Toshiro Matsui and Kiyoshi Matsumoto ; Production of 6-O-caffeoylsophorose from acylated anthocyanins derived from purple sweet potato through hydrolysis under weak acidic conditions. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 52 (7), 462-4306-310, (2005)
  18. Mitsuyoshi Kano, Tomomi Takayanagi, Katahisa Harada, Kumiko Makino, and Fumiyasu Ishikawa ; Antioxidative activity of Anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar ayamurasaki. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(5), 979-988, (2005)
  19. N. Terahara, I. Konczak, H. Ono, M. Yoshimoto, and O. Yamakawa ; Characterization of acylated anthocyanins in callus induced from storage root of purple-fleshed sweet



- potato, *Ipomoea batatas* L. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004(5), 279-286, (2004)
20. Gongjian Fan, Yongbin Han, Zhenxin Gu, Feirong Gu ; Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. LWT, 41, 1412-1416 (2008)
  21. Izabela Konczak-Islam, Makoto Yoshimoto, De-Xing Hou, Norihiko Terahara, and Osamu Yamakawa ; Potential chemopreventive properties of anthocyanin-rich aqueous extracts from in vitro produced tissue of sweet potato. J. Agric. Food Chem., 51, 5916-5922, (2003)
  22. Izabela Konczak-Islam, Shigenori Okuno, Makoto Yoshimoto, Osamu Yamakawa ; Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. Biochemical Engineering Journal, 14, 155-161, (2003)
  23. Toshiro Matsui, Sumi Ebuchi, Mio Kobayashi, Keiichi Fukui, Koichi Sugita, Norihiko Terahara, and Kiyoshi Matsumoto ; Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar ayamurasaki can be achieved through the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory action. J. Agric. Food Chem., 50, 7244-7248, (2002)
  24. Makoto Yoshimoto, Shigenori Okuno, Masaatu Yamaguchi, and Osamu Yamakawa ; Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. Biosci. Biotechnol. Biochem., 65(7), 1652-1655, (2001)
  25. Makoto Yoshimoto, Shigenori Okuno, Masaatu Yamakawa, Osamu Yamakawa, Masaatu Yamaguchi, and Jiro Yamada ; Antimutagenicity of sweetpotato(*Ipomoea batatas*) root. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(3), 537-541, (1999)
  26. Van-Den Truong, Nigel Deighton, Roger T. Thompson, Roger F. McFeeters, Lisa O. Dean, Kenneth V., Pecota, and G. Craig Yencho ; Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweet potatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. J. Agric. Food Chem., 58 (1), 404-410, (2010)
  27. Gongjian Fan, Yonbin Han, Zhenxin Gu, Deming Chen ; Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). LWT, 41, 155-160, (2008)
  28. FLORIAN C. STINTZING, ANGELA S. STINTZING, REINHOLD CARLE, BALZ FREI, AND RONALD E. WROLSTAD ; Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-Based Anthocyanin Pigments. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 50, 6172-6181, (2002)
  29. 이란숙, 김선재, 임종환 ; 자색고구마(자미) Anthocyanin 색소의 성분 분석. 한국식품영

- 양과학회지, 29(4), 555-560, (2000)
30. Virachnee Lohachoompol, George Srzednicki, and John Craske ; The Change of Total Anthocyanins in Blueberries and Their Antioxidant Effect After Drying and Freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004:5, 248-252, (2004)
  31. LUIS E. RODRIGUEZ-SAONA, M. MONICA GIUSTI, TONALD E. WROLSTAD ; Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 63(3), 458-465, (1998)
  32. Bolivar A. Cevallos-Casals, Luis Cisneros-Zevallos ; Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of andean purple corn and re-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, 86, 69-77, (2004)
  33. Gongjian Fan, Yongbin Han, Zhenxin Gu, Feirong Gu ; Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. *LWT*, 41, 1412-1416, (2008)
  34. L.E.Steed, V.-D.Truong, J.Simunoviv, K.P.Sandeep, P.Kumar, G.D.Cartwright, and K.R.Swartzel ; Continuous flow microwave-assisted processing and aseptic packaging of purple-fleshed sweetpotato purees. *E: Food Engineering and Physical Properties*, 73, 455-462, (2008)
  35. Kjell Torskangerpoll, Øyvind M. Andersen ; Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89, 427-440, (2005)
  36. Izabela Konczak-Islam, Shigenori Okuno, Makoto Yoshimoto, Osamu Yamakawa ; Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 155-161, (2003)
  37. L.E.Sted and V.-D.Truong ; Anthocyanin Content, Antioxidant Activity, and Selected Physical Properties of Flowable Purple-Fleshed Sweetpotato Purees. *S: Sensory and Food Quality*, 73, 215-221, (2008)
  38. Takanori Tsuda, Yuki Ueno, Hitoshi Kojom Toshikazu Yoshikawa, Toshihiko Osawa ; Gene expression profile of isolated rat adipocytes treated with anthocyanins. *Biochimica et biophysica*, 1773, 137-147, (2005)
  39. Takanori Tsuda, Fumihiko Horio, Koji Uchida, Hiromitsu Aoki and Toshihiko Osawa ; Dietary Cyanidin 3-O-β-D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. *JN THE JOURNAL OF NUTRITION*, 133, 2125-2130, (2003)
  40. Giuseppe (Joe) Mazza. ; Anthocyanins and heart health. *ANN I ST SUPER SANITA* , 43, 369-374, (2007)
  41. RONALD L. PRIOR & XIANLI WU ; Anthocyanins: Structural characteristics that

- result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014-1028, (2006)
42. Mary Ann Lila ; Anthocyanins and Human Health: An in Vitro Investigative Approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004:5, 306-313, (2004)
  43. Jin-Ming Kong, Lian-Sai Chia, Ngoh-Khang Goh, Tet-Fatt Chia, R. Brouillard ; Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64, 923-933, (2003)
  44. Cristina T. da Costa, Derek Horton, Sam A. Margolis ; Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A*, 881, 403-410, (2000)
  45. Yong Pil Hwang, Jae Ho Choi, Hyo Jeong Yun, Eun Hee Han, Hyung Gyun Kim, Jin Young Kim, Bong Hwan Park, Tilak Khanal, Jun Min Choi, Young Chul Chung, Hye Gwang Jeong ; Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 93-99, (2011)
  46. Zi-Feng Zhang, Shao-Hua Fan, Yuan-Lin Zheng, Jun Lu, Dong-Mei Wu, Qun Shan, Bin Hu ; Purple sweet potato color attenuates oxidative stress and inflammatory response induced by D-galactose in mouse liver. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 496-501, (2009)
  47. Junli Ye, Xiangjun Meng, Chunling Yan, Chungbo Wang ; Effect of Purple Sweet Potato Anthocyanins on  $\beta$ -Amyloid-Mediated PC-12 Cells Death by Inhibition of Oxidative Stress. *Neurochem Res*, 35, 357-365, (2010)
  48. Kouji Miyazaki, Kumiko Makino, Emi Iwadate, Yoriko Deguchi, and Fumiyasu Ishikawa ; Anthocyanins from Purple Sweet Potato Ipomoea batatas Cultivar Ayamurasaki Suppress the Development of Atherosclerotic Lesions and Both Enhancements of Oxidative Stress and Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J. Agric, Food Chem*, 56, 11485-11492, (2008)
  49. I Sudam F Ishikawa, M Hatakeyama, M Miyawaki, T Kudom K Hirano, A Ito, O Yamakawa and S Horiuchi ; Intake of purple sweet potato beverage affects on serum hepatic biomarker levels of healthy adult men with borderline hepatitis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, 6067, (2008)
  50. Shu Furuta Ikuo Sudam Yoichi Nishiba and Osamu Yamakawa ; High tert-Butylperoxyl Radical Scavenging Activities of Sweet Potato Cultivars with Purple Flesh.
  51. Ikuo Suda, Osamu Yamakawa, Kazusato Matsugano, Koichi Sugita, Yoshitaka

- Takeguma, Kouzo Irisa and Fumiyasu Tokumaru ; Changes of serum  $\gamma$ -GTP, GOT and GPT Levels in Hepatic Function-Weakling Subjects by Ingestion of High Anthocyanin Sweetpotato Juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* VOL. 45, No. 10, 611-617, (1998)
52. Ikuo Suda, Shu Furuta, Yoichi Nishiba, Osamu Yamakawa, Kazusato Matsugano and Koichi Sugita ; Reduction of Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats Administered Purple-Colored Sweetpotato Juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* Vol. 44, No. 4, 315-318, (1997)
  53. Kyu-Ho Han, Asami Matsumoto, Ken-ichiro Shimada, Mitsuo Sekikawa and Michihiro Fukushima ; Effects of anthocyanin-rich purple potato flakes on antioxidant status in F344 rats fed a cholesterol-rich diet. *British Journal of Nutrition*, 98, 914-921, (2007)
  54. Miki SAKATANI, Ikuo SUDA, Tomoyuki OKI, Shu-ichi KOBAYASHI, Shuji KOBAYASHI and Masashi TAKAHASHI ; Effects of Purple Sweet Potato Anthocyanins on Development and Intracellular Redox Status of Bovine Preimplantation Embryos Exposed to Heat Shock. *Journal of Reproduction and Development*, 53, 605-614, (2007)
  55. Mitsuyoshi KANO, Tomomi TAKAYANAGI, Katsuhisa HARADA, Kumiko MAKINO, and Fumiyasu ISHIKAWA ; Antioxidative Activity of Anthocyanins from Purple Sweet Potato, *Ipomoea batatas* Cultivar Ayamurasaki. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 979-988, (2005)
  56. Frederick Otunuya Obi, Ighorimoni Afonughe Usenu, Julie Osaretin Osayande ; Preention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat by *H. rosasinensis* anthocyanin extract administered in ethanol. *Toxicology*, 131, 93-98, (1998)
  57. Takanori Tsuda, Fumihiko Horio, Toshihiko Osawa ; Absorption and metavalism of cyandin 3-O- $\beta$ -D-glucoside in rats. *FEBS Letters*, 449, 179-182, (1999)
  58. IKUO SUDA, TOMOYUKI OKI, MAMI MASUDA, YOICHI NISHIBA, SHU FURUTA, KAZUSATO MATSUGANO, KOICHI SUGITA, AND NORIHKO TERAHARA ; Direct Absorption of Acylated Anthocyanin in Purple-Fleshed Sweet Potato into Rats. *J. Agric, Food Chem.* 50, 1672-1676, (2002)
  59. Katsuhisa HARADA, Mitsuyoshi KANO, Tomomi TAKAYANAGI, Osamu YAMAKAWA, and Fumiyasu ISHIKAWA ; Absorption of Acylated Anthocyanins in Rats and Humans after Ingesting an Extarct of *Ipomoea batatas* Purple Sweet Potato Tuber. *Biosci. Biorechnol. Biochem.*, 68, 1500-1507, (2004)
  60. Tomoyuki OKI, Ikuo SUDA, Norihiko TERAHARA, Maki SATO, and Minoru HATAKEYAMA ; Determination of Acylated Anthocyanin in Human Urine after

- Ingesting a Purple-Fleshed Sweet Potato Beverage with Various Contents of Anthocyanin by LC-ESI-MS/MS. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 7, 2540-2543, (2006)
61. Kyu-Heung Han, Ju-Chan Lee, Ga-Soon Lee, Jae-Ho Kim and Jong-Soo Lee ; Manufacture and Physiological Functionality of Korean Traditional Liquor by Using Purple-fleshed Sweet Potato. *KOREAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, Vol. 34, No. 4, 673-677, (2002)
  62. Takashi Kadowaki and Toshimasa Yamauchi ; Adiponectin and Adiponecin Receptors. *Endocrine Reviews*, 26, 439-451, (2005)
  63. Jin-Ying Lu, Kuo-Chin Huang, Lin-Chau Chang, Ying-Shing Huang, Yu-Chiao Chi, Ta-Chan Su, Chi-Ling Chen, Wei-Shiung Yang ; Adiponecin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond. *J Biomed Sci*, 15, 565-576, (2008)
  64. Ikuo Suda, Tomoyuki Oki Mami Masyda, Mio KOBAYASHI, Yoichi NISHIBA and Shu FURUTA ; Physiological Functionality of Purple-Fleshed Sweet Potatoes Containing Anthocyanins and Their Utilization in Foods. *JARQ*, 37, 167-173, (2003)
  65. Aurelie Mauray, Catherine Felgines, Christine Morand, Andrzej Mazur, Augustin Scalbert, Dragan Milenkovic ; Nutrigenomic analysis of the protective effects of bilberry anthocyanin-rich extract in apo E-deficient mice. *Genes Nutr*, 5, 343-353, (2010)