

발간물등록번호

11-1543000-002238-01

보안과제(), 일반과제() / 공개(), 비공개()

2016년 농식품 창업·벤처지원 R&D 마우처 시범사업 최종보고서

참옷나무의 무독화와 옷된장 및 옷칭국장 제조기술 개발 최종보고서

2018. 1. 15.

주관연구기관 / 까띠끌레웅바이오
참여기업 / 원바이오텍(주)

농림축산식품부
농림수산식품기획기술평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “참옷나무의 무독화와 옷된장 및 옷청국장 제조기술 개발”(개발기간 : 2016. 12. 05 ~ 2017. 12.04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 01. 15.

주관연구기관명 : 까띠끌레용바이오 정 남 철



협동연구기관명 :

참여기관명 : 원바이오텍(주) 정 하 나



주관연구책임자 : 정 남 철

협동연구책임자 :

참여기관책임자 : 정 하 나

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	2
3. 연구수행 내용 및 결과	3
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	75
5. 연구결과의 활용계획 등	75
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	75
7. 연구개발성과의 보안등급	76
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	76
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	76
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	77
11. 기타사항	77
12. 참고문헌	78

1. 연구개발과제의 개요

D-03

1-1. 연구개발 목적

○참옷나무의 장수버섯균 발효 의한 무독화, 초고압물추출법에 의한 기능성 플라보노이드 추출개발과 옷된장 및 옷청국장 제조기술 개발

1-2. 연구개발의 필요성

○옷나무는 산지면적 많은 강원 원주, 전북 남원, 순창, 경남 함양, 충북 옥천, 전남 곡성 농림가의 주요 소득작목이다.

○그러나, 식품공전상 옷담과 옷오리 조리용 첨가용으로만 물로 추출한 진액제품과 물추출을 위한 목재티백 제품밖에 사용할 수밖에 없어 옷가공업체의 원료소비가 줄어들어 재배자의 소득증대와 재배지 확대가 이루어지지 않고 있다.

○용매로 추출하여 얻은 Fisetin, Sufretin, Butein은 항암, 유방암, 항염증, 항당뇨, 고지혈증에 대한 효능이 각종 논문으로 입증되었다. 그러나 식품산업에서 이용하는 열수추출물은 밝혀진 효능과 식품 산업적 성능간에 괴리가 있다.

○식품공전상 장수버섯균으로 옷나무 원재료를 발효시켜 무독화 시킨 추출액은 장류, 식초류, 주류에 사용할 수 있지만, 발효를 위해서는 고가 재배사와 시설이 필요하므로 영세한 농림가와 가공업체에게는 장벽으로 작용한다.

○옷나무의 생리활성물질인 flavonoids와 독성물질인 Urushiol은 옷나무 수피에서는 두 화합물 모두 함유하고 있고, 목재부에는 Urushiol성분은 없고 flavonoid만 검출된다(산림청 임업연구원 2001). 결론적으로 옷나무의 무독화는 “어떻게 하면 형성층이하 수피와 내피가 포함된 수피를 완벽하게 제거할 수 있는가?”의 문제인 것이다. 인위적으로 수피를 완벽하게 대량으로 제거 할 수 없는 것이 옷 가공업체의 현실이다.

○그러므로, 옷나무 원료를 가장 경제적인 발효방법인 비닐하우스내에서 장수버섯균의 최적조건 발효에 의한 우루시올 함유 수피의 자연탈각과 미생물분비 효소에 의한 무독화 대량생산법 개발이 필요하며, 구명된 효능과 산업적 현실의 괴리를 좁히기위하여 생리활성이 우수한 비수용성 플라보노이드(피세틴, 설푸레틴 등)를 함유하는 초고압(UHP) 물추출법 공정을 개발하여 이를 이용한 청국장과 된장 상품개발을 통해 재배자와 가공업체간 소득증대에 기여하는 옷산업 발전의 선순환적체계가 필요함.

1-3. 연구개발 범위

○옷나무 원료에 대하여 장수버섯균의 최적조건 발효에 의한 우루시올 함유 수피의 자연탈각과 미생물분비 효소에 의한 무독화

-발효장소: 그린하우스 ▪온도범위 20-28 ▪습도 90%이상

-접종방법: 수침법, 산포법, 접종법 ▪적층법: 세우기, 위로쌓기 ▪발효기간: 10, 15, 30일

○플라보노이드(피세틴, 설푸레틴, 부테인 등) 초고압(UHP) 물추출법

-온도범위: 30,50,70℃ ▪기압범위:0,200,300,400,500MPa ▪시간:0,10,15,30min,

○참옷나무 초고압(UHP) 물추출물의 DPPH항산화와 헬리코박터균에 대한 활성 평가.

-DPPH소거 항산화능: 농도범위 10, 25, 50, 100, 200µg/ml

-Helicobacter pylori혐기배양 억제능 검정: 농도범위 100, 250, 500, 1000, 2000µg/ml

○참옷나무 초고압(UHP) 물추출물을 이용한 청국장과 된장 상품개발과 기능물질 안정성 평가.

-청국장 1g, 3g, 6g/100g 청국장 ▪된장 1g, 3g, 6g/100g 된장.

2. 국내외 기술개발 현황

D-04

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

-국내 옷나무 재배 본수는 거의 1,000만 그루 이상에 육박하고 있으며, 고조선시대부터 중국서안 지방에 도입된 옷나무는 평북 태천, 강원 원주, 전북 남원, 전남 곡성, 전남 나주등 10년생 이상만을 기준으로 할 때 1,000만 그루 이상 식재되어 있다.

-식품공전상 옷나무를 옷담과 옷오리 조리용 첨가물로 물추출물과 추출용 티백만이 이 용도로 밖에 사용할 수 없는 상황이다.

-옷나무의 뛰어난 항암, 혈행개선, 면역증강, 위장병 등에 대한 효능효과는 비수용성 플라보노이드이 나타내지만 산업적으로 이용하는 일반적인 열수추출방법으로는 극히 미량이 추출되는 것으로 밝혀졌다.

○ 시장현황

-장수버섯균으로 옷나무 원재료를 발효시켜 무독화 시킨 옷나무추출액은 장류, 식초류, 주류에 사용할 수 있어 시장을 다변화하고 옷제품의 매출신장을 위해서는 옷나무 플라보노이드 성분의 안정성을 유지하고 제품 고유의 맛을 유지하는 것이 관건이다.

-옷나무를 이용한 다양한 식품의 개발은 농가소득의 향상과 다양한 식품의 개발로 농산물의 고부가가치화, 세계시장에 한국의 전통발효식품 진출 등 1차산업, 2차산업을 연결하는 독특한 고부가가치 식품의 개발로 연결될 수 있다.

○ 경쟁기관현황

-옷담 및 옷오리, 조리용 참옷진액, 티백, 된장, 간장 제품은 참옷마을, 옷가네 등 전국에 약 37개의 옷가공 제조업체가 있다.

○ 지식재산권현황

-옷나무 관련 특허는 국내에서는 2,300여건에 이르고 주로 옷나무 식품에 관련되고, 최근에는 효소와 미생물배양을 통한 우루시올의 무독화에 관련된 특허가 대두 되고 있으며,

○ 표준화현황

-정남철(1998)의해 옷나무 목질부 플라보노이드 최초성분규명, 산림청 임업연구원(주관연구책임자 참여)에 의해 옷나무 수피와 목질부의 우루시올과 플라보노이드함량 표준화, (주)에이치아이의 옷나무 지역별, 시기별, 수령별 열수추출물에 대한 플라보노이드인 푸스틴, 피세틴, 갈릭산에 대한 표준화, 정남철(1998)의해 옷나무 우루시올 CC에 의한 단일성분 정제 표준화.

나. 해외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

-옷나무 추출물에 함유되어 있는 flavonoids인 fustin, fisetin, sulfuretin, butein, kaempferol, quercetin, genistin, genistein, myricetin이 발견되었으며 항바이러스, 항산화효과에 연구가 많고, 옷나무 함유 비수용성 플라보노이드에 대한 생리활성이 매우 우수한 것으로 평가 받고 있다.

○ 시장현황

-건강기능식품은 미국 시장의 경우 2007년을 기준으로 88조원 시장을 형성하고 있으며, 세계시장은 3,771억불의 규모를 형성하고 있다(NutritionBusinessJournal, 건강기능식품 신문). 일본 시장의 경우 2007년 15조원의 규모를 형성하고 있다.

○ 경쟁기관현황

-옷나무는 세계적으로 한국에서만 식품용으로 사용하기 때문에 해외 경쟁기관은 없다.

○ 지식재산권현황

-일본에서는 400여건의 옷나무 도료에 관한 특허가 주류를 이루고 있다.

○ 표준화현황

-일본 Yamauchi(1981, 1982)의 의하여 옷나무 수액내 우루시올의 성분규명과 표준화

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구개발의 이론적 배경

1) 옷나무의 식물학적 개요

옷나무(*Rhus verniciflua*)는 옷나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 낙엽교목이며 자웅이성주로 5아과 77속으로 나뉘어지며 약 600여종이 존재하고 옷나무속에 속하는 식물은 200여종이 있으며 이들 대부분은 온대지방에 분포하지만 일부는 아열대와 열대지방에도 분포한다. 한국에 존재하는 옷나무속 식물에는 옷나무(*Rhus verniciflua*), 개옷나무(*Rhus trichocarpa*), 붉나무(*Rhus chinensis*), 검양옷나무(*Rhus succedanea*), 산검양옷나무(*Rhus sylvestris*)등이 있다.⁽¹⁾⁽¹³⁾

동양에서는 수천 년 전부터 여러 가지 옷나무에서 칠액을 채취하여 왔는데 한국, 일본, 중국은 옷나무(*Rhus verniciflua*)에서, 베트남, 대만에서는 검양옷나무(*Rhus succedanea*)에서, 미얀마 등지에서는 버마옷나무(*Melanorrhoea usitate*)에서 칠액을 얻어 도료로 사용했다.⁽¹⁾ 그 중에서 옷나무는 중국, 한국, 일본 순으로 전래되었던 것으로 여겨지는데 중앙아시아 고원지대인 티벳 및 히말라야 지방이 원산지로 알려져 있으며 중국에서 약 4,000년 전부터 재배하여 왔다고 알려져 있으며 우리나라에서는 약 2,000년 전인 낙랑고분과 광주 신창동 발굴지에서 칠기가 발굴되어 선사시대부터 우리나라 전역에서 목기에 옷칠을 하여 사용하는 것이 보편화된 것으로 추정되며 근래에 와서는 천연도료로서의 이용가치가 줄어들어 따라 재배면적이 줄고 있어 현재는 강원도 원주, 충북 옥천, 경남 함양, 전남 장흥, 전북 장수 등에서 일부 재배되고 있다.⁽¹⁾⁽¹³⁾

한편, 옷나무는 우리나라의 민속의학 분야에서 항암, 항산화 등 건강 기능성을 기대하여 섭취해온 식품이며 그 효능이 뛰어나다고 알려져 약용하였고 오래전부터 민간에서는 옷순을 식용하고 옷순주, 옷담 등으로 조리하여 보양식으로 이용하였다.⁽¹⁾ 그러나 옷나무 칠액의 주성분인 우루시올이 알러지반응을 유발시킬 수 있어 식품으로 이용하는데 위험성을 내포하고 있다. 옷나무는 구조적으로 칠액구가 분포한 수피부와 목질부로 나눌 수 있으며 우루시올은 칠액구가 분포한 2차사부조직을 포함하는 수피부에 존재하고 목질부에는 다수의 플라보노이드가 존재한다.⁽¹⁾⁽²⁾

옷나무의 2차대사산물은 우루시올과 플라보노이드 계통과 페놀화합물인 갈산 등이 밝혀져 있는데 특히, 각 부위별 분포로 수피에는 우루시올과 플라보노이드가 존재하며 목질부에는 플라보노이드만 존재한다.⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁴⁾ 즉, 우루시올을 함유하는 칠액을 분비하는 칠액구는 옷나무 수피부의 2차 사부조직에 분포하여 외부환경에 대응하기 위한 수단으로 사용된다.⁽²⁾ 우루시올은 카테콜 화합물의 유도체로서 C₃ 위치에 탄소 15 또는 17개가 직쇄 상으로 결합된 지용성화합물

이다.⁽³⁾ 우루시올은 생합성의 경로가 완전히 파악되지 않았으며 유기화학반응을 통해 합성하고자 하는 시도가 있었으나 공기 중에 쉽게 산화하는 우루시올의 특성 때문에 인공적인 합성이 쉽지 않으며 현재 시판되는 우루시올의 표준물질이 없다.⁽⁴⁾ 옷나무의 유효물질이라고도 할 수 있는 우루시올은 강력한 항암 및 항산화작용과 AIDS환자에서의 면역증강작용도 있음이 알려져 있지만 단백질과 비특이적 결합과 피부에 대한 격심한 알레르기를 일으킬 수 있어 식품 및 의약품 개발에 제한사항이 된다.⁽¹⁾ 이 화합물은 인체에 직접적인 독성을 나타내지는 않지만 피부에 닿았을 경우 피부를 통해 세포 내부까지 이행하게 되고 세포에서는 외부 화학물질에 반응으로 면역체계를 활성화시켜 제4형 과민반응의 접촉성 피부염을 일으킨다. 이는 우루시올의 -OH기가 피부단백질의 NH₂기와 반응하여 생기는 것으로 옷으로 인한 피부염의 감수성은 개인에 따라 다르고 주로 동양인보다 서양인이 더 과민하다고 알려져 있다.⁽³⁾

따라서 옷나무를 식품으로 이용하기 위해서는 필연적으로 우루시올을 제거하여야 하는데 이를 위해 전자이온화 에너지를 사용하는 방법⁽¹²⁾, 유기용매 및 산화제를 이용하는 화학적 방법, 고온처리 방법⁽¹¹⁾ 등이 연구되었다. 이는 우루시올의 산화, 중합반응을 유도해 체내 자기단백질과의 활성부위가 감소하여 우루시올의 반응성을 약화시키는 것으로 추정된다. 최근에는 백색부후균류인 장수버섯을 이용하여 균사체가 형성하는 라케이스에 의해 우루시올을 제거하는 연구가 보고되었다.⁽³⁾ 그러나 이와 같은 물리·화학적 방법을 통해 우루시올이 완전히 제거된다고 볼 수 없으며 우루시올이 감소하면서 플라보노이드 등 다른 유용성분이 함께 감소될 우려가 있고 정제과정을 거쳐야 하므로 비용의 문제뿐만 아니라 식품에 적용하기 어려운 점이 있다.⁽¹²⁾

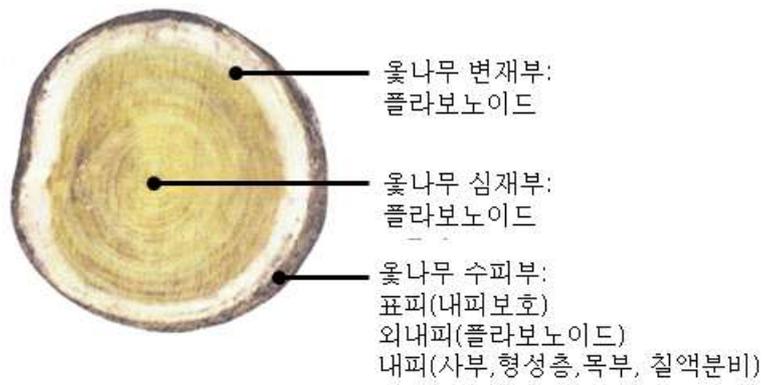
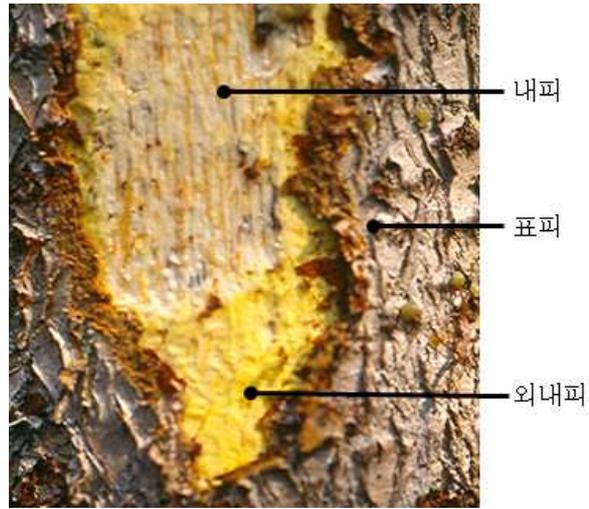
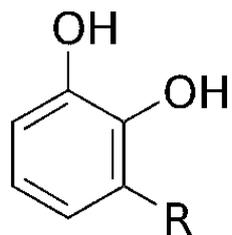
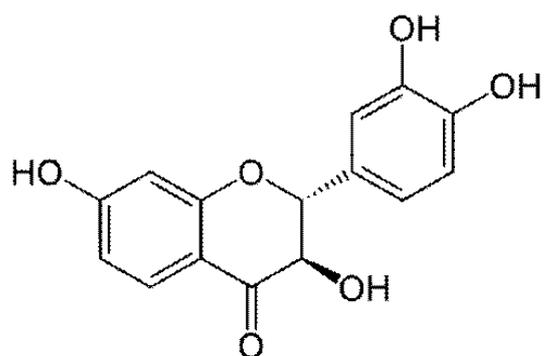


Fig. 1. Cross section diagram of *Rhus verniciflua* .

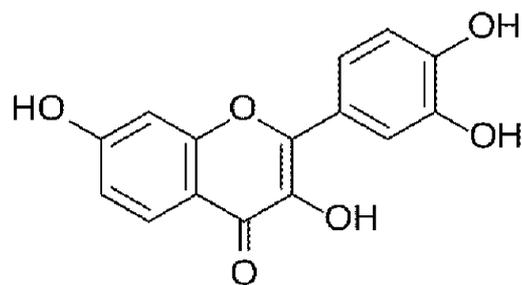


Compound	R	M.W
C15 saturated(C15:0)	$(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$	320
C15 monoene(C15:1)	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}$	318
C15 diene(C15:2)	$(\text{CH}_2)_7=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2$	316
C15 triene(C15:3)	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{C}$	314

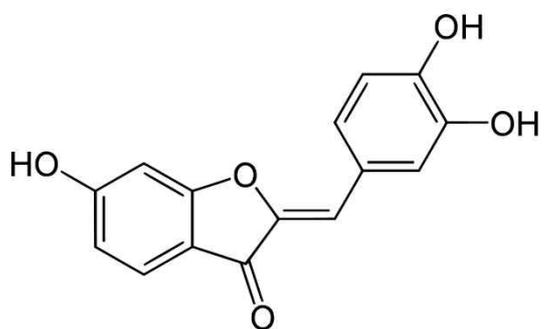
Fig. 2. Structure of urushiol analogues of *Rhus verniciflua* .



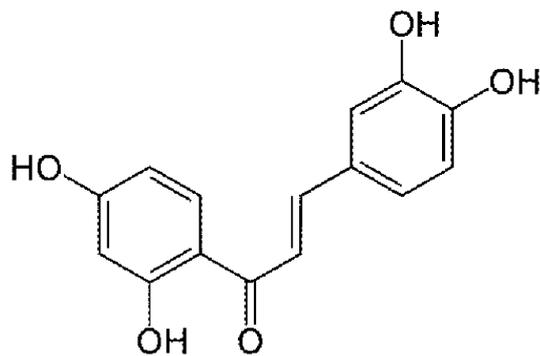
Fustin(M.W. 288.25)



Fisetin(M.W. 286.23)



Sulfuretin(M.W. 270.24)



Butein(M.W. 272.25)

Fig. 3. Structure of flavonoids isolated from *Rhus verniciflua* .

Table 1. Compounds discovered in genus *Rhus*⁽¹⁾

Compounds	Molecular weight	Molecular formula
Agathisflavone	538.466	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀
Butein	272.257	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀
Corilagin	634.460	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈
3'4'-dihydroxyflavone	254.242	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
Eicosanedioic acid	342.518	C ₂₀ H ₃₈ O ₄
Europetin	332.266	C ₁₆ H ₁₂ O ₈
Fisetin	286.240	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Fustin	288.256	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Lantabetulic acid	470.691	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
Myricetin	318.239	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
Palasitrin	594.525	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
Sulfuretin	270.241	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
3-pentadecyl-1,2-benzenediol	320.514	C ₁₂ H ₃₆ O ₂
Demethoxykanugin	326.305	C ₁₈ H ₁₄ O ₆
Ovalitenone	338.316	C ₁₉ H ₁₄ O ₆
Syringtin	346.293	C ₁₇ H ₁₄ O ₈
Semialatic acid	470.691	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
Semimoronic acid	470.691	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
2-(3,4-dihydroxybenzyl)-2,6-dihydroxy-3(2h)-benzofuranone	288.256	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Fisetin;7-O-β-D-glucopyranoside	448.382	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Mesuaferone A	542.498	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀
Resokaempferol	270.241	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Rhoifolin	578.526	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄
Rhusflavanone	542.498	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀
Succedaneaflavanone	542.498	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀
Bhilawanol	318.498	C ₂₁ H ₃₄ O ₂
Cynarine	516.457	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂
Hydrolaccol	348.568	C ₂₃ H ₄₀ O ₂
Quercetin	302.240	C ₁₅ H ₁₀ O ₇

2) 식품에 초고압반응의 이용

대부분의 식품은 가열처리에 의한 열수나 증기로 식품의 저장성을 확보하고 유해미생물의 생장을 억제한다.⁽¹⁸⁾ 근래에 이르러서는 기존 열처리로 인한 식품가공기술을 보완하여 품질을 향상시키고 새로운 물성을 기대할 수 있는 여러 가지 비전통적 방법들이 시도되고 있고 이 중에서 수백에서 수천 Mpa의 초고압 반응을 식품에 적용함으로써 열처리로 인한 식품의 품질저하를 막고 미생물 및 효소의 활성화 및 불활성화를 통해 고품질, 고기능성 제품에 대한 활용도가 높아지고 있다.⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾

압력용매로서 기체와 액체는 "기체의 양과 온도가 일정하면 압력과 부피는 서로 반비례한다."는 보일(boyle)의 법칙을 통해, 압력이 2배가 되면 체적이 1/2이 되지만 액체(물)는 500 Mpa의 압력을 가해도 체적은 86%밖에 감소하지 않는다.⁽¹⁸⁾ 또한, "밀폐된 유체(액체, 기체)의 일부에 압력을 가하면 그 압력이 유체 내의 모든 곳에 같은 크기로 전달된다."는 파스칼(pascal)의 원리를 적용하여, 반응이 진행되는 동안 압력, 즉 정수압(hydrostatic pressure)은 식품의 모든 방향에서 가해지므로 가압을 하여도 식품의 원래의 형태나 크기가 유지된다.⁽¹⁸⁾

$$[1 \text{ atm} \simeq 1.01325 \text{ bar} \simeq 760 \text{ Torr}, \approx 760 \text{ mmHg} \simeq 0.1013 \text{ Mpa}]$$

초고압 처리시스템(ultra high pressure reactor)은 수백 Mpa 이상을 견딜 수 있는 기밀성이 보장되는 압력용기(pressure vessel)와 가압펌프(intensifier pump), 온도조절시스템(thermoregulator system)으로 구성된다. 압력용기에 압력전달매체로 물 또는 물과 글리세롤 혼합액과 같이 압력이 고르게 전달될 수 있는 매체를 채우고 처리하고자 하는 식품을 넣어 펌프에 의해 용기 내에 원하는 압력이 형성되면 처리하고자 하는 시간동안 유지된다.

초고압반응의 메커니즘은 초고압에 의해 미생물의 세포막의 인지질층이 상전이를 일으켜 물리적 변형을 초래하고 세포막의 투과성이 달라진다고 알려져 있다. 예를 들어 효모세포에 300-600 Mpa으로 가압하면 세포질 내 아미노산 등 물질유출이 일어난다. 또한, 세포 외 물질이 세포 내로 침투할 수도 있는데 예를 들어 무를 0.5% 염수에 담아 400 Mpa에서 10분간 가압하면 소금이 무의 조직 내부로 침투한다고 한다. 또, 오렌지주스를 500 Mpa 이상에서 1분간 처리하면 펙틴에스터 가수분해효소에 영향을 주어 주스의 탁도가 안정하게 유지된다고 한다.⁽¹⁸⁾⁽²²⁾⁽²³⁾

한편, 약용식물의 유용성분 추출에는 전통적으로 물이나 수증기를 이용한 열처리 추출을 이용하여 왔는데 이 방법은 추출효율이 비교적 낮고 열로 인한 유용성분의 손실 등으로 개선의 필요성이 제기되어 왔다. 최근에는 초고압 반응을 이용하여 추출공정을 개선하고자 하는 노력이 시도되고 있으며 이는 초고압 조건이 세포막의 투과성을 개선하고 기체나 열을 사용하지

않고 물을 압력매개체로 물질의 질량수송을 용이하게 하여 추출수율을 높여 보다 더 효율적인 방법으로 제시되고 있다.

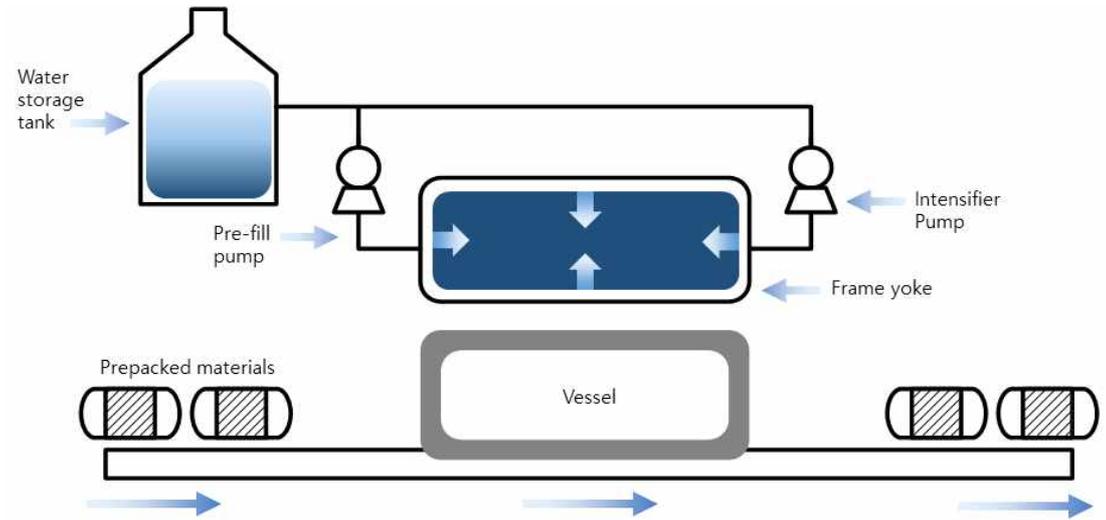


Fig. 4. Process scheme of high pressure reactor.

3) 실험계획법

공학적 실험의 목적은 공정의 특성을 파악하여 원하는 조건을 최적화하거나 제품을 설계 또는 개발하기 위하여 공정이나 시스템의 입력변수에 의도적으로 변화를 가한 일련의 방법을 설정하는데 있다. 반응표면 방법론(response surface methodology)은 관심영역 안에서 변수들의 수준에서 방정식을 도출하고 이를 통해 변수의 수준 변화에 따른 최적 반응값을 예측하는 것으로 어떤 생산공정을 개선하거나 최적화 하는데 이용되는 유용한 통계적 방법이다. 이 방법은 기존 제품이나 서비스의 품질을 개선할 뿐만 아니라 새로운 제품의 계획과 개발, 그리고 생산공정의 최적화에 응용할 수 있다.⁽³²⁾

최적조건을 추정하기 위해 미리 예상되는 최적조건을 실험구역을 탐색하는 예비실험을 통해 적합한 반응표면을 설계하는데 보통 실험구역의 모양에 따라 등근 모양의 구형설계와 육면체 모양의 입방형설계로 구분한다. 반응표면 방법론에서 가장 많이 사용되는 것은 중심합성설계(central composition design)로 실험구역이 구형이고 5수준인 실험설계이다. 이 때 축점의 값을 $\alpha = K$ 대신 $\alpha = 1$ 로 조정하면 5수준이 아닌 3수준 입방형 중심합성설계를 얻을 수 있다. 그러나 입방형 중심합성설계는 실험구역이 구형이 아니므로 회전성을 만족하지 못하는 문제가 있다.⁽³²⁾⁽³³⁾

이러한 이유로 변수들의 수준 수를 3으로 제한하면서 실험구역은 구형인 실험설계가 필요할 때가 있는데 이에 대한 대표적 실험설계가 바로 박스벤켄 실험설계(box behnken design)이다. 이 방법은 최소한의 실험횟수로 실험구역의 회전성과 직교성을 만족하는 2차 반응표면을 추정하기 위한 3수준 실험설계로 매우 효과적인 방법으로 알려져 있다.⁽³³⁾

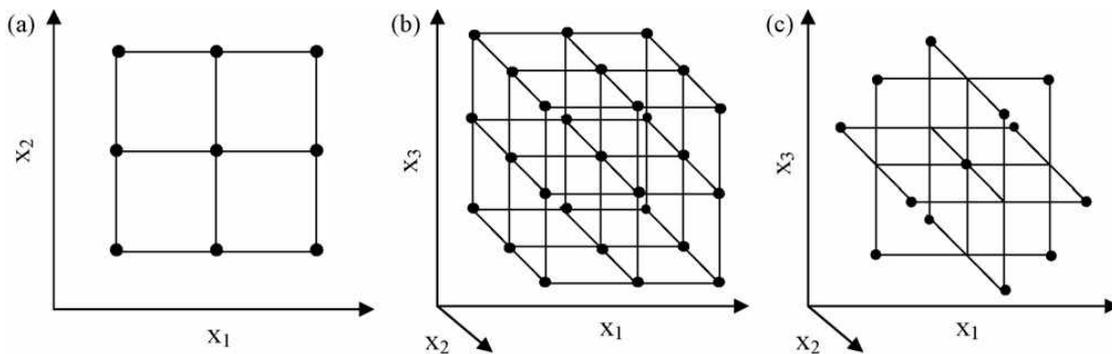


Fig. 5. Experimental designs based on the study of all variables in three levels: three-level factorial design for the optimization of (a) two variables and (b) three variables and (c) box-behnken design for the optimization of three variables.⁽⁴¹⁾

Table 2. Some experimental matrices for designs based on variables study in three levels: (a)three-level factorial design for two variables and (b) box-behnken design for three variables matrices⁽⁴¹⁾

(a)		(b)		
X_1	X_2	X_1	X_2	X_3
-1	-1	-1	-1	0
-1	0	1	-1	0
-1	1	-1	1	0
0	-1	1	1	0
0	0	-1	0	-1
0	1	1	0	-1
1	-1	-1	0	1
1	0	1	0	1
1	1	0	-1	-1
		0	1	-1
		0	-1	1
		0	1	1
		0	0	0

나. 연구수행내용

1) 기기 및 시약

실험에 사용한 옷나무는 충북 옥천산 6년생 옷나무 줄기를 구입하였고 장수버섯 종균은 맥아배지(brix 11°)에 접종 후 상온에서 배양하여 tween 20에 희석하여 사용하였다. 표준물질로 사용한 tannin acid, quercetin은 sigma aldrich사(St. Louis, Missouri, USA) 제품을 구입하였다. silica gel 60은 merck사(Darmstadt, Germany)를 사용하였고 celluclast[®] 1.5L과 viscozyme[®] L 은 novozyme사(Bagsvaerd, Denmark) 제품을 구입하였다. 기타 용매 및 시약은 모두 시판 1급을 구입해 사용하였다. GC/MS 기기분석은 shimadzu사(Kyoto, Japan), HPLC 기기분석은 agilent사(Santa clara, California, USA), 분광광도계는 Thermo사(Waltham, Massachusetts, USA)의 제품을 이용하였다. 실험에 사용한 초고압 반응기는 나노바이오연구센터에서 보유한 500MPa-INNOWAY(Anyang, Korea) 초고압반응기를 의뢰하여 사용하였고 열수추출은 120 L 살균탱크(Gwangju, Korea)를 이용하였다.

2) 옷나무로부터 우루시올의 탈리에 의한 무독화

가) 장수버섯균을 이용한 옷나무의 수피탈각

옷나무로부터 우루시올을 함유한 칠액구를 포함하는 수피부의 탈리를 위해 장수버섯을 이용한 발효옷의 방법⁽³⁾을 응용하여 실험하였다. 즉, 장수버섯배양액을 tween 20에 희석하여 균액을 흘뿌리는 산포법, 침지하는 수침법, 타공하여 접종하는 타공법 등 접종방법과 세워서 쌓기, 눕혀서 쌓기 등 쌓기방법을 달리한 7가지의 조건별로 15 x 60 cm의 옷나무 50개를 1 x 1 m의 암막상자에 처리하여 그린하우스 내에서 실험하였으며 6월부터 10월까지 장수버섯균의 미생물 활동과 비례하여 생성되는 CO₂량을 Licor-6400xt를 이용하여 측정하였다.

나) 옷나무 목질부의 GC/MS 분석

상기 방법으로 제조한 수피부를 탈각한 옷나무의 목질부를 음건하고 분쇄하여 99.9% 메탄올을 넣고 40℃에서 8시간 동안 환류 하에 3회 추출하여 얻어진 추출물을 여과하여 회전진공농축기에서 완전히 건조시켜 분말로 제조하고 이를 Table 3.의 조건으로 TMS 유도체화하고 GC/MS 기기분석하여 mass spectrum에서 우루시올중합체의 잔존여부를 확인하였다.

Table 3. Analysis condition of GC/MS for *Rhus verniciflua* extracts

Column	RTX-5MS, 60 m x0.25 mm, 0.25 μ m, RESTEK, USA
Injection	280 $^{\circ}$ C, mode ; split ; 20:1
Carrier gas	He, column flow ; 1 mL/min
Column Temp.	250 $^{\circ}$ C(2min holding)-10 $^{\circ}$ C/min-300 $^{\circ}$ C(30 min holding)
Ionization	EL(electron impact), 70 eV
Interface/ion source	300 $^{\circ}$ C/280 $^{\circ}$ C
Mass analyzer	Quadrupole
Data acquisition	Scan(41 to 500 m/z)

3) 옷나무 목질부 플라보노이드 표준품 분리 및 분석

가) 옷나무 목질부 조추출물의 제조

옷나무 플라보노이드 표준물질을 제조하기 위해 정남철(1998)의 방법에 의하여 즉, 수피부가 탈각한 옷나무 목질부는 음건하고 분쇄하여 시료 300 g에 99.9% 아세톤 1 L를 넣고 40 $^{\circ}$ C에서 8시간 동안 환류 하에 3회 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출물을 여과하여 진공농축하고 진공건조기로 완전히 건조시켜 분말로 제조하고 이를 조추출물이라 하였다.

나) 실리카겔 흡착 크로마토그래피

조추출물의 정제는 실리카겔 흡착 크로마토그래피법(silica gel absorption chromatography)을 이용하였다. 즉, 실리카겔(230-400 mesh) 40 g을 130 $^{\circ}$ C에서 3시간 활성화 시킨 후 헥산으로 슬러리를 만들어 컬럼(2.9 x 45 cm)에 충전하고 실리카겔의 안정화를 위해 황산칼슘(calcium sulfate)이나 황산나트륨(sodium sulfate) 6-8 g을 그 위에 충전하였다. 실리카겔 중량의 1/10에 해당하는 4 g의 조추출물은 수분을 완전히 제거하고 무수메탄올 4 mL에 녹여 로딩하고 클로로포름:메탄올 90:10(v/v), 80:20(v/v), 50:50(v/v), 0:100(v/v) 용매로 분획하였다.

다) 옷나무 목질부 플라보노이드 표준품의 HPLC 분석

조추출물을 클로로포름:메탄올(90:10)분획을 농축하여 완전히 진공건조하여 분말로 제조하고 메탄올에 용해한 후 Sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 0.2 μm syringe filter로 여과하여 Table 4.의 조건으로 HPLC 기기분석하였다. 옷나무 플라보노이드의 표준품은 정남철(1998)의 연구에서 밝혀진 HPLC피크를 옷나무 목질부의 주요 플라보노이드인 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 푸스틴로 확인 설정하였다.

Table 4. Analysis condition of HPLC for *Rhus verniciflua* extracts

Column	YMC PACK ODS-AM 4.6 x 250 mm, 5μm		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection	10 μL		
Column Temp.	30°C		
Wave length	254 nm		
Mobile phase	solvent 1: water solvent 2: methanol		
Time(min)	Solvent 1(%)	Solvent 2(%)	Curve
0.0	80	20	linear
0.5	80	20	linear
3.0	50	50	linear
12.8	20	80	linear
14.9	0	100	linear
16.7	0	100	linear
18.6	80	20	linear
20.0	80	20	linear

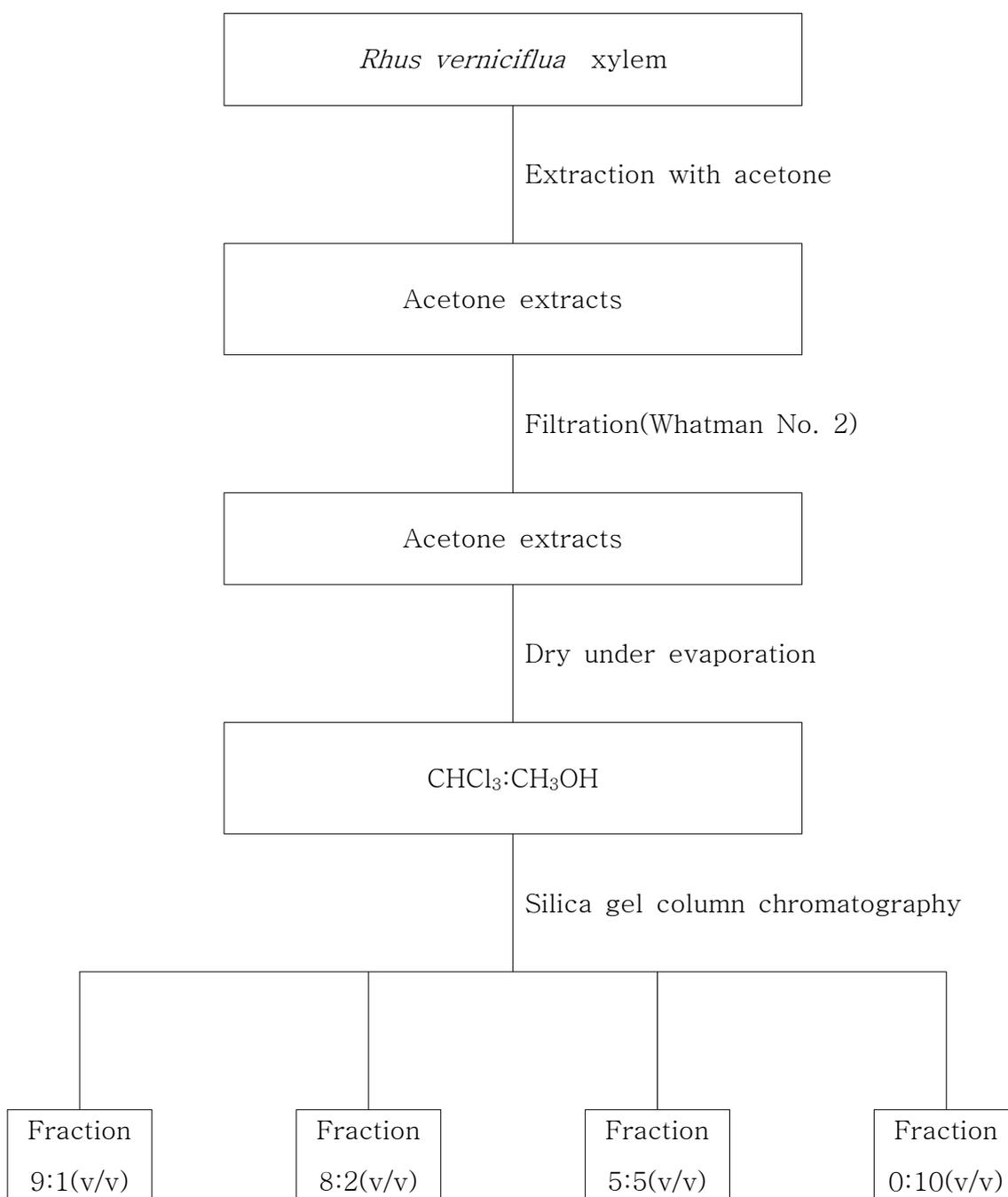


Fig. 6. Schematic diagram for fractionation of *Rhus verniciflua* crude extracts.

4) 옷나무 목질부 플라보노이드의 초고압 추출

가) 옷나무 목질부 열수추출물의 제조

열수추출의 실험계획은 추출공정에서 중요한 변수로 고려되는 인자, 즉, 추출온도(90–130°C), 추출시간(24–72시간), 입자크기(12–100 mesh)를 -1, 0, 1의 3단계로 부호화하여 박스벤켄 실험설계에 따라 13가지의 실험조건을 Table 5, 6.과 같이 설정하여 실시하였다.

$$2k(k-1) + C \quad (N: \text{experiments}, k: \text{factors}, C_0: \text{central points})$$

Table 5. Range of independent and coded variables for box behnken design with hot water extraction

Independent variables		Coded variables		
		-1	0	1
X ₁	Particle size(mesh)	0 > 12	12 > 20	20 > 100
X ₂	Extraction tiime(hr)	24	48	72
X ₃	Temperature(°C)	90	110	130

Table 6. Box bhenken design with hot water extraction condition

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Particle size	Extraction time	Temperature
				(mesh)	(hr)	(°C)
HWE1	-1	-1	0	0 > 12	24	110
HWE2	1	-1	0	20 > 100	24	110
HWE3	-1	1	0	0 > 12	72	110
HWE4	1	1	0	20 > 100	72	110
HWE5	-1	0	-1	0 > 12	48	90
HWE6	1	0	-1	20 > 100	48	90
HWE7	-1	0	1	0 > 12	48	130
HWE8	1	0	1	20 > 100	48	130
HWE9	0	-1	-1	12 > 20	24	90
HWE10	0	1	-1	12 > 20	72	90
HWE11	0	-1	1	12 > 20	24	130
HWE12	0	1	1	12 > 20	72	130
HWE13	0	0	0	12 > 20	48	110

나) 옷나무 목질부 초고압추출물의 제조

초고압추출과 초고압효소처리추출의 실험계획은 추출공정에서 중요한 변수로 고려되는 인자, 즉, 반응압력(100–400 Mpa), 반응시간(10–60분), 입자크기(12–100 mesh)를 -1, 0, 1의 3단계로 부호화하여 박스벤켄 실험설계에 따라 13가지의 실험조건을 Table 7, Table 8-1(초고압처리 UHP), Table 8-2(초고압+ 셀룰로스 가수분해효소(UHPE))와 같이 설정하여 실시하였다. 셀룰로스 가수분해 효소처리에는 상업효소로 널리 이용되고 있는 celluclast[®] 1.5L과

viscozyme[®] L을 옷나무 톱밥건중량 대비 0.1% 첨가하여 초고압반응 처리하였다. 초고압반응 후에 각 시료들은 100°C에서 72시간 가열 추출하여 실험에 이용하였다.

$$2k(k-1) + C \quad (N: \text{experiments}, k: \text{factors}, C_0: \text{centralpoints})$$

Table 7. Range of independent and coded variables for box behnken design with ultra high pressure extraction

Independent variables		Coded variables		
		-1	0	1
X ₁	Particle size(mesh)	0 > 12	12 > 20	20 > 100
X ₂	Time(min)	10	30	60
X ₃	Pressure(Mpa)	100	250	400

Table 8-1. Box behnken design for ultra high pressure((UHP) extraction.

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Particle size (mesh)	Time (min)	Pressure (Mpa)
UHP1	-1	-1	0	0 > 12	10	250
UHP2	1	-1	0	20 > 100	10	250
UHP3	-1	1	0	0 > 12	60	250
UHP4	1	1	0	20 > 100	60	250
UHP5	-1	0	-1	0 > 12	30	100
UHP6	1	0	-1	20 > 100	30	100
UHP7	-1	0	1	0 > 12	30	400
UHP8	1	0	1	20 > 100	30	400
UHP9	0	-1	-1	12 > 20	10	100
UHP10	0	1	-1	12 > 20	60	100
UHP11	0	-1	1	12 > 20	10	400
UHP12	0	1	1	12 > 20	60	400
UHP13	0	0	0	12 > 20	30	250

Table 8-2. Box behnken design for ultra high pressure+ cellulase enzymes extraction(UHPE)

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Particle size (mesh)	Time (min)	Pressure (Mpa)
UHPE1	-1	-1	0	0 > 12	10	250
UHPE2	1	-1	0	20 > 100	10	250
UHPE3	-1	1	0	0 > 12	60	250
UHPE4	1	1	0	20 > 100	60	250
UHPE5	-1	0	-1	0 > 12	30	100
UHPE6	1	0	-1	20 > 100	30	100
UHPE7	-1	0	1	0 > 12	30	400
UHPE8	1	0	1	20 > 100	30	400
UHPE9	0	-1	-1	12 > 20	10	100
UHPE10	0	1	-1	12 > 20	60	100
UHPE11	0	-1	1	12 > 20	10	400
UHPE12	0	1	1	12 > 20	60	400
UHPE13	0	0	0	12 > 20	30	250

다) 추출 수율 조사

열수추출(HWE), 초고압추출(UHP), 초고압효소(UHPE)처리추출 3가지 방법의 각 13가지의 박스벤켄 실험설계(box behnken design)조건에 따라 실험하기 위해 옷나무 톱밥을 100g/1000ml(1g/10ml)의 비율로 내열 PET병에 넣고 초순수를 가하였다. 초고압효소(UHPE)에서 효소처리는 옷나무 톱밥 건중량의 0.1%를 처리하였고, 얻어진 추출물을 회전진공농축기로 완전히 건조하여 무게를 측정하고 건조 옷나무톱밥 건중량에 대한 추출고형분 함량의 비로 계산 추출수율로 측정하였다.

라) 총 페놀성 화합물의 측정

열수추출(HWE), 초고압추출(UHP), 초고압효소(UHPE)처리추출 3가지 방법의 각 13가지의 실험조건 별 추출물의 총 페놀 함량은 Folin-ciocalteu's reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 암청색으로 환원되는 것을 원리로 분석하였다. 즉 각각의 시료를 완전 건조하고 50% 메탄올로 흡광도값이 1.0을 넘지 않도록 mg/mL 농도로 희석하여 시료 0.2 mL에 증류수 1.8 mL, 1 N Folin-ciocalteu's 0.2 mL을 넣고 30초간 혼합 후 5분간 정치하였다. 그 후, 20% 탄산나트륨(sodium carbonate) 0.4 mL을 첨가하고 증류수 1.4 mL을 더해 총 4 mL이

되게끔 양을 맞추고 상온에서 1시간 방치한 후 상징액을 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 tannin acid를 20–100 µg/mL 농도별로 희석하여 검량선을 작성하였고, 총 페놀 함량은 mg/g(TAE, tannin acid equivalent)로 나타내었다.

마) 총 플라보노이드 함량 측정

열수추출(HWE), 초고압추출(UHP), 초고압효소(UHPE)처리추출 3가지 방법의 각 13가지의 실험조건 별 추출물의 총 플라보노이드 함량은 흡광도법에 따라 측정하였다. 즉, 각각의 시료를 완전 건조하고 50% 메탄올로 흡광도값이 1.0을 넘지 않도록 mg/mL 농도로 희석하여 시료 0.5 mL에 에탄올 1.5 mL, 10% 염화알루미늄(aluminum chloride) 0.1 mL, 그리고 1 M 아세트산칼륨(potassium acetate) 0.1 mL 및 증류수 2.8 mL을 각각 혼합하고 30분간 충분히 반응시킨 다음 상징액을 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 quercetin을 20–100 µg/mL 농도별로 희석하여 검량선을 작성하였고, 총 플라보노이드 함량은 mg/g(QE, quercetin equivalent)로 나타내었다.

바) 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 부테인의 함량 측정

열수추출(HWE), 초고압추출(UHP), 초고압효소(UHPE)처리추출 등 추출조건에 따른 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 부테인의 함량변화를 알아보기 위해 Table 9.의 조건으로 HPLC 기기분석하여 옷나무 목질부의 주요 플라보노이드인 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 푸스틴을 확인하였다. 각 추출물을 메탄올과 1:1(v/v)로 혼합한 후 sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 0.2 µm syringe filter로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 컬럼은 RCM 8x10을 사용하였고 이동상은 water(A)와 methanol(B)을 초기 80:2 (% v/v)에서 0.5분에 80:20, 3.0분에 50:50, 12.8분에 20:80, 14.9분에 0:100, 16.7분에 0:100, 18.6분에 80:20, 20.0분에 80:20으로 설정하였으며 검출기는 UV 254 nm로 하였고 유속은 1.5 mL/min로 하였다. 표준물질은 실리카겔 흡착 크로마토그램으로 준비한 옷나무 목질부 조추출물 분획의 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 부테인의 HPLC 피크를 비교하였다.

사) 최적 추출방법 3D 모델식 작성

박스-벤켄 실험디자인에 의해서 얻어진 결과는 xlstat3Dplot(addinsoft, france) 을 이용하여 변수들간 linear-regression ANOVA분석을 통해 유의성이 인정되는 것들간에 다항식 모델식을 도출하고 3D plot을 만들었다.

Table 9. Analysis condition of HPLC for *Rhus verniciflua* extracts of hot water extracts, high pressure extracts, high pressure-enzyme extracts

Column	YMC PACK ODS-AM 4.6 x 250 mm, 5 μ m		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection	10 μ L		
Column Temp.	30 $^{\circ}$ C		
Wave length	254 nm		
Mobile phase	solvent 1: water solvent 2: methanol		
Time(min)	Solvent 1(%)	Solvent 2(%)	Curve
0.0	80	20	linear
0.5	80	20	linear
3.0	50	50	linear
12.8	20	80	linear
14.9	0	100	linear
16.7	0	100	linear
18.6	80	20	linear
20.0	80	20	linear

5) 옷나무 목질부 플라보노이드의 생리활성

가) DPPH 라디칼 소거능 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 자유라디칼 소거능 측정법은 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 전자 등을 제공받아 비가역적으로 안정한 라디칼을 형성하고 가시적으로 시약의 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용한 것으로 탈색된 정도에 따라 항산화물질의 전자공여능으로 측정하는 방법이다. 열수추출, 초고압추출, 초고압효소처리추출 각 13가지 조건에서 가장 추출수율이 높은 조건의 시료를 mg/mL 농도로 희석한 시료 0.1 mL에 메탄올에 용해한 0.1 mM DPPH 1.5 mL을 첨가하여 잘 혼합하고 암조건에서 30분간 반응시킨 후 상징액을 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값은 아래의 식을 이용하여 자유라디칼 소거능을 계산하였으며 항산화제로 잘 알려져 있는 토코페롤(α -tocopherol)을 대조구로 측정하여 항산화 활성을 비교하였다.

$$\text{Free radical scavenging effect(\%)} = (\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{DPPH}} * 100$$

Abs_{DPPH} : 공시료에 의한 흡광도 / $\text{Abs}_{\text{sample}}$: 시료에 의한 흡광도

나) 헬리코박터 파이로리 억제능 측정

옷나무 추출물별 헬리코박터 파이로리 억제효과를 시험하기 위해 옷나무 열수추출물(HWE8), 초고압추출물(UHP8), 초고압효소추출물(UHPE8)을 사용하였으며, 옷나무 플라보노이드 성분별 헬리코박터 파이로리 억제효과를 시험하기 위해 옷나무 플라보노이드(정제 표준품)를 Prep.-LC에 의해 푸스틴(Fustin), 피세틴(Fisetin), 설푸레틴(Sulfuretin), 부테인(Butein)로 분리 정제하여 사용하였다.

옷나무 플라보노이드의 헬리코박터 파이로리 억제능을 측정하기 위해 실험에 사용한 균주는 위·십이지장 궤양의 원인균인 *H. pylori* TV130을 사용하였다. *H. pylori*의 배양은 brucella broth(Difco, USA)에 0.4% *H. pylori* selective supplement와 10%(v/v)의 calf serum을 첨가한 액체배지를 준비하였고 columbia blood agar(Difco, USA)에 0.4% *H. pylori* selective supplement 10%(v/v)의 calf serum을 첨가한 고체배지를 사용하였다. 배양 시 미 호기성 조건을 유지하기 위해 10% CO₂ incubator를 사용하고 습도는 95%이상 유지하면서 37°C, 48-72시간 배양하였다.

옷나무 플라보노이드의 항균성실험은 paper disc법을 이용하였다. brucella broth에 72시간 배양된 *H. pylori*를 2,500 rpm으로 10분 간 원심분리하여 620 nm에서 현탁도 1.2가 되도록 현탁하고 현탁액 200 μ L을 취해 20 mL를 취해 제조된 columbia blood agar 배지에 도

말한 후, 여기에 멸균된 지름이 8 mm인 paper disc를 올려놓고 시료 용액을 4,000 µg/mL씩 가한 다음 10% CO₂ 조건 하에서 37°C, 72시간 배양 후 disc clear zone 생성유무로 항균활성을 확인하였다.

헬리코박터 파이로리 억제능의 측정은 brucella broth(Difco, USA)를 24 well plate에 넣고 *H. pylori* 균액을 well당 10⁷ cfu(colony forming unit)/mL를 가하고 옷나무 플라보노이드, 푸스틴, 피세틴, 설푸레틴, 부테인 등의 추출물을 각각 1,000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 0 µg/mL씩 가한 후, 37°C, 10% CO₂ incubator에서 4일간 배양하고 매 24시간마다 시료를 취하여 요소분해효소(urease) 활성검사를 하여 측정하였다. 요소분해효소활성(urease activity)의 측정은 urea와 phenol red를 포함한 urea broth(Difco, USA)를 이용하였다. urea broth와 배양액 또는 시료를 5:1 비율로 섞어 2시간 동안 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 요소분해효소활성을 측정하였다. 헬리코박터 파이로리 증식억제농도는 아래의 식으로 직선회귀식에 의해 IC₅₀값을 계산하였다.

$$IC_{50}(50\% \text{ inhibition concentration}) = (1 - \text{mean OD in test well} / \text{mean OD in control well}) * 100$$

6) 옷청국장, 옷된장 시제품제작과 발효중 플라보이드 성분변화 분석

가) 청국장 시제품 제작 및 발효중 플라보이드 성분변화 분석

노란콩(백태)를 3회 이상 깨끗한 물로 세척한다. 노란콩 100 g 을 냉수 300 mL 에 약 20 시간 불린다. 석두나 탈피콩 등을 선별해 건져내고 불린 콩에 물을 넣고 압력솥에서 1시간 삶는다. 잔불로 뜸들인 후 찌낸 콩이 손가락으로 가볍게 눌러 으깨질 정도면 적당하다. 청국장 종균(바실러스 등, 엔유씨 구입)을 멸균수(종균수)에 녹여 준비하고 익힌 콩을 식힌 후, 콩 100g 당 2~5ml 종균수를 잘 섞어준다. 옷나무 사용량은 장류의 경우 최종제품의 10% 이하이므로 콩 100 g 당 옷나무 사용량 10g에 해당하는 열수추출물(HWE), 초고압추출물(UHP), 초고압효소추출물(UHPE) 박스-벤헨켄 시험구중 가장 추출효율이 우수한 시험구를 선택하여 아래의 표와 같은 양으로 종균수에 녹여 섞어준다. 발효는 청국장발효기(엔유씨전자, 한국)를 이용하여 37°C에서 실시하였으며, 0, 12, 24, 36, 48, 60, 70시간 마다 발효의 정도와 성분의 변화를 분석하기 위해 미생물활력을 나타내는 CO₂ 방출량을 LI-6400xt(licor, 미국)로 측정하였고, 시료를 채취하여 옷나무 플라보노이드 성분변화를 알아보기 위해 HPLC분석을 Table 9와 같은 방법으로 실시하였다.

	Con.	HWE8	UHP8	UHPE8
옷나무톱밥100g의 추출물 (g)	0	1.14	5.71	5.95
옷나무사용량 10g에 대한 청국장 투여량(g)	0	0.11	0.57	0.60

나) 옷된장 시제품제작과 발효중 플라보이드 성분변화 분석

농가의 향아리에서 발효중인 된장을 구하여 옷나무 사용량은 장류의 경우 최종제품의 10% 이하이므로 된장 100 g 당 옷나무 사용량 10g에 해당하는 열수추출물(HWE8), 초고압추출물(UHP8), 초고압효소추출물(UHPE8) 박스-벤젠 시험구중 가장 추출효율이 우수한 시험구를 선택하여 위의 표와 같은 양으로 멸균수에 녹여 섞어준다. 발효는 실온에서 2개월간 실시하였으며, 시료를 채취하여 옷나무 플라보노이드 성분변화를 알아보기 위해 HPLC분석을 Table 9와 같은 방법으로 실시하였다.

다. 연구개발 결과 및 내용

1) 옷나무로부터 우루시올의 탈리를 통한 무독화

옷나무로부터 우루시올의 탈리는 장수버섯을 이용한 발효옷의 방법⁽³⁾을 응용하여 제조하였다. 즉, 칠액구가 분포한 2차사부 조직을 포함한 수피부의 자연탈각 조건을 규명하기 위해 실시한 장수버섯 배양액의 접종방법과 쌓기 방법을 달리하여 6월부터 10월까지 미생물의 활동에 비례하여 방출되는 CO₂량의 변화는 Table 10, Fig. 9과 같다. Fig 7과 같이 산포법, 수침법, 타공법 등 접종방법과 눕여서 쌓기, 세워서 쌓기 등 쌓기방법을 달리한 실험군 중 옷나무 수피부에 타공하여 Fig 8과 직접적으로 장수버섯 배양액을 접종하고 수직으로 세워쌓기에서 타 실험군보다 3-20배 이상 가장 왕성한 CO₂ 방출량을 보였으며 7월과 8월에 집중되는 경향을 보였다. 다른 실험군들 모두 7월과 8월에 CO₂ 방출량이 가장 왕성하였으며 수피부에 직접 타공하여 접종하는 방식 외에 균액을 흘뿌리는 산포법과 균액에 직접 침지하는 수침법은 큰 차이를 나타내지 않았고 옷나무를 눕여서 쌓는 방식보다 세워 쌓는 방식이 미생물의 활동에 더 유리한 것으로 보였다. 수피부에 직접적으로 타공하여 세워쌓는 방식은 일반적인 노지버섯 재배 방식과 유사한 것으로 옷나무로부터 수피부 자연탈각에 효율적인 적용방법이라 판단된다. 상기의 방법으로 제조한 옷나무 목질부를 GC/MS 기기분석한 결과, Fig. 8, 9, 10.에서 나타내는 바와 같이 mass spectrum 상 분자량이 320, 318, 316, 314 인 우루시올의 주요 중합체가 발견되지 않았다.

Table 10. Different ways of detoxification of *Rhus verniciflua* by *Fomitella fraxinea* and CO₂ measurement value measured by Licor-6400xt

Treat	Heap-up	Period				
		Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.
	Control	2.30	40.40	73.53	15.20	15.20
Spray	Horizontally	2.50	102.50	180.11	36.43	28.50
	Vertically	3.10	120.70	202.67	24.37	18.40
Soak	Horizontally	3.50	110.90	197.67	22.57	16.50
	Vertically	3.10	320.40	593.00	27.70	20.70
Inoculate	Horizontally	3.20	314.50	580.11	25.67	19.30
	Vertically	3.70	880.30	1746.67	92.77	50.80

▼암막상자(1x1x1m)의 제작



▼ 장수버섯 배양액 접종조건별 옷나무의 처리(뉘여쌓기 산포(상좌)와 뉘여쌓기 천공(상우), 세워쌓기 산포(하좌)와 세워쌓기 천공(하우))



Fig 7. *Rhus verniciflua* inoculated by *Fomitella fraxinea* strain via heap-up

▼장수버섯 배양액의 조건별 접종실험



works



Fig 8. Preparing and inoculation of fungal strain *Fomitella fraxinea*.

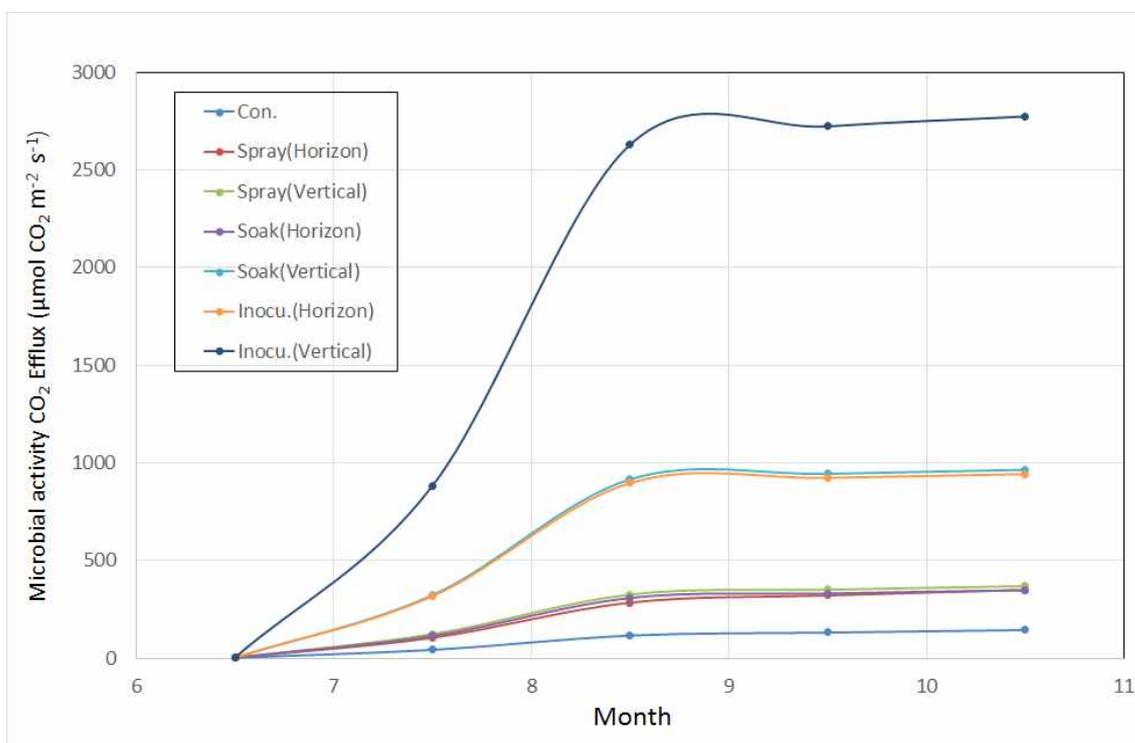


Fig. 9. Microbial activity via to CO₂ efflux of *Rhus verniciflua* inoculated by *Fomitella fraxinea*.

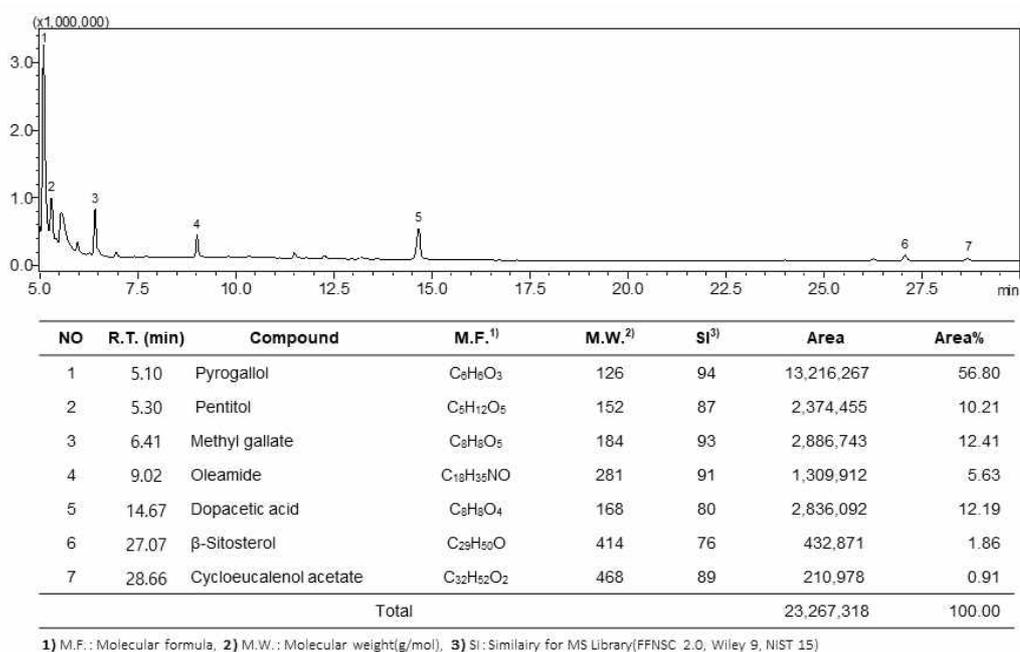


Fig. 10. GC/MS chromatogram of *Rhus verniciflua* inoculated by *Fomitella fraxinea*.

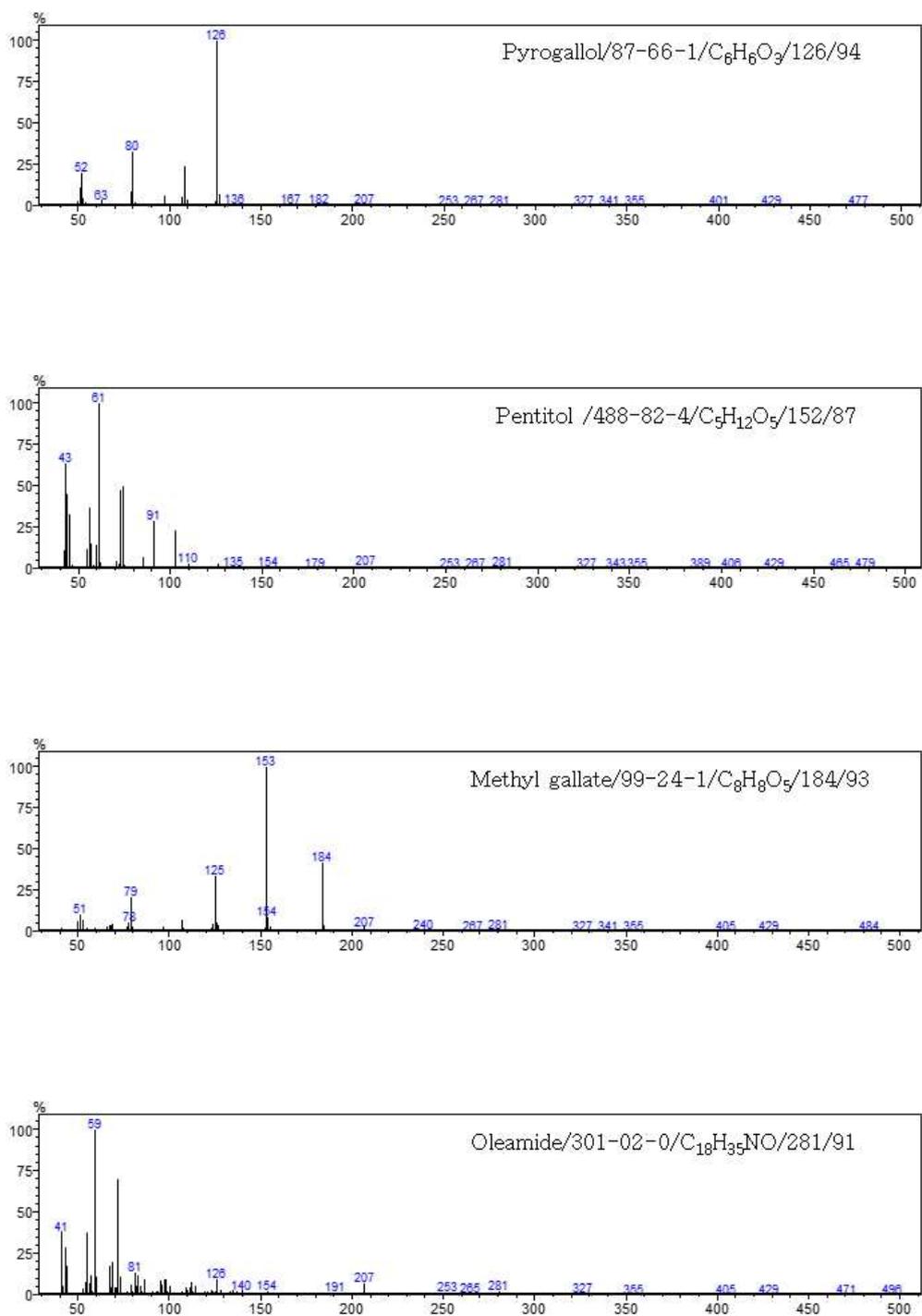


Fig. 11. GC/MS spectrum 1st of *Rhus verniciflua* treated *Fomitella fraxinea*.

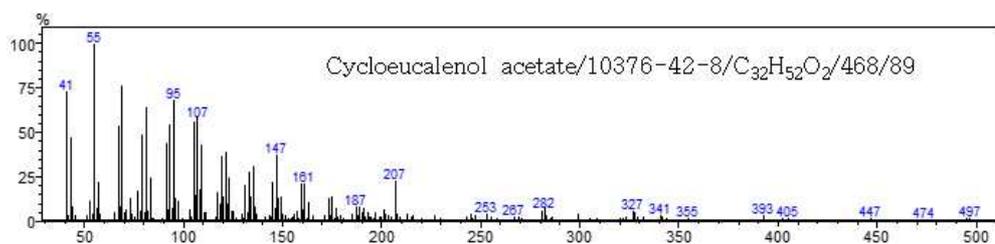
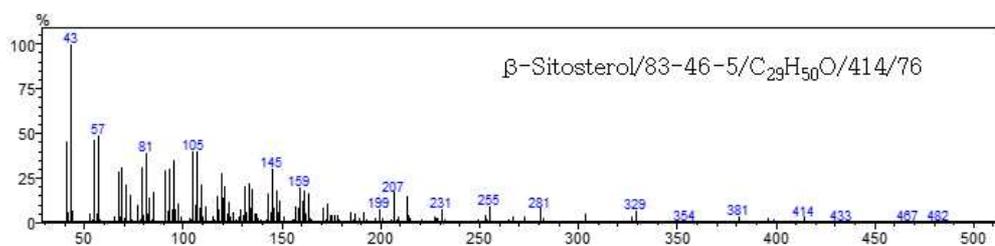
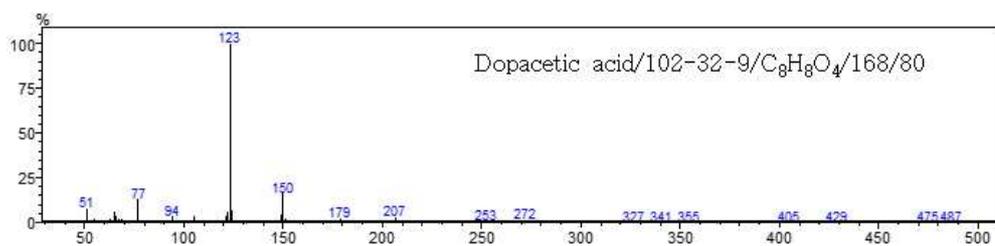


Fig. 12. GC/MS spectrum 2nd of *Rhus verniciflua* treated *Fomitella fraxinea*.

2) 옷나무 목질부 플라보노이드 표준품의 분석

옷나무 목질부 아세톤추출물을 실리카겔 흡착 크로마토그램으로 얻은 클로로포름:메탄올 (90:10) 분획을 분리·정제하여 얻은 노란색 분말을 HPLC 기기분석하여 Fig 11.과 같이 옷나무의 주요 플라보노이드인 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 부테인의 피크를 확인하였다.

푸스틴(fustin, 3,3',4',7-tetrahydroxyflavanone, $C_{15}H_{12}O_6$)은 옷나무 열수추출물의 주요 성분으로 항산화 활성이 있으며 알츠하이머 질환 및 류마티스 관절염에 효과가 있다고 보고되었다. 피세틴(fisetin, 3,3',4',7-tetrahydroxyflavanone, $C_{15}H_{10}O_6$)은 옷나무의 주요 플라보노이드 중 하나이며 물에 거의 녹지 않는다. 설퓨레틴(sulfuretin, 3',4',6-trihydroxyaurone, $C_{15}H_{10}O_5$)은 옷나무의 주요 플라보노이드 중 하나로 돌연변이 유발을 감소시키고 항염 효과가 있다는 연구가 보고되었다. 부테인(butein, 2',3,4,4'-tetrahydroxychalcone, $C_{15}H_{12}O_5$)은 옷나무의 주요 플라보노이드 중 항산화 효과가 보고되었다.⁽¹⁰⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

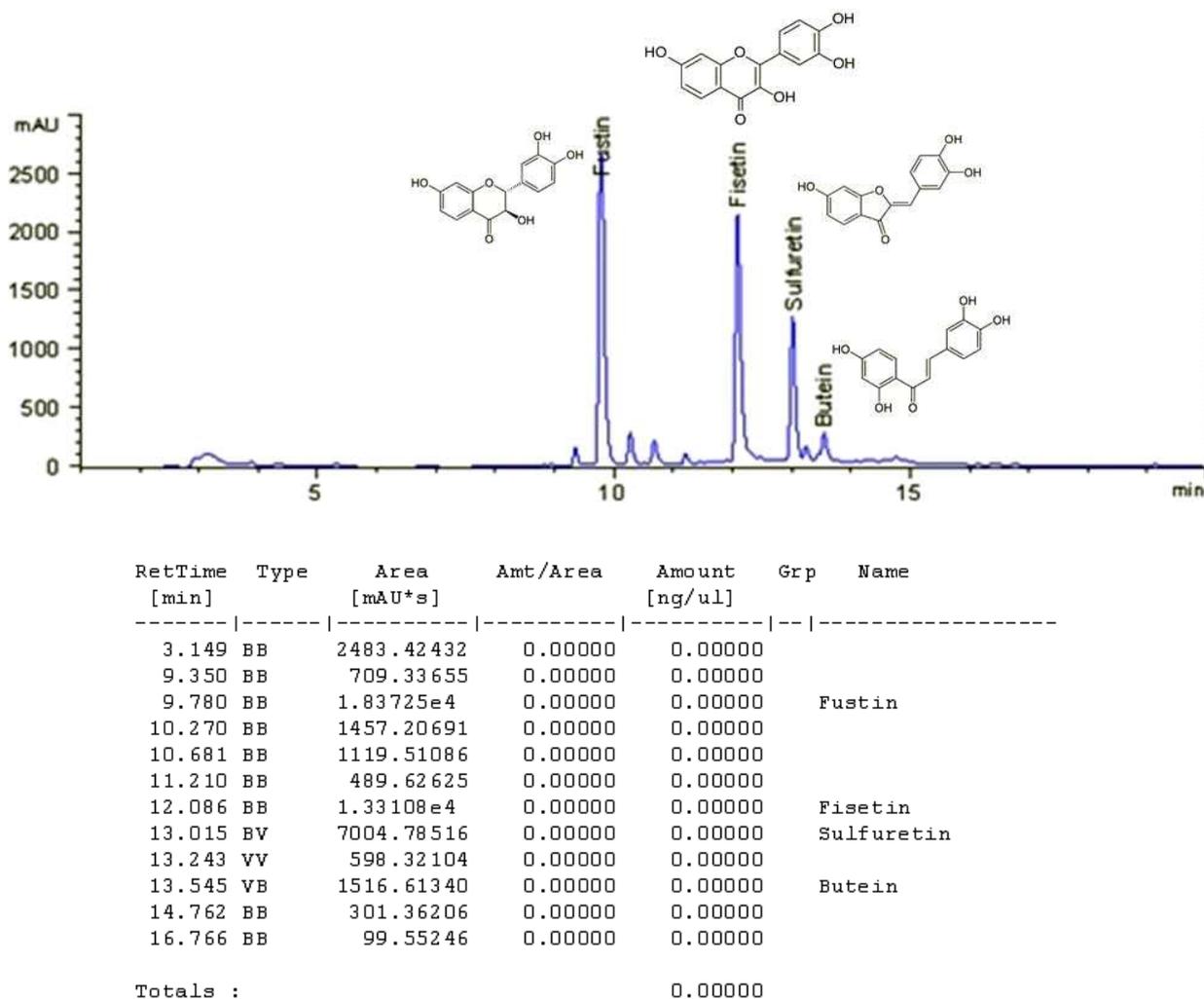


Fig. 13. HPLC chromatogram of $CHCl_3:CH_3OH(90:10-v/v)$ fraction on silica gel adsorption chromatography.

3) 옷나무 목질부 플라보노이드의 초고압 추출

가) 추출수율

열수(Hot water; HWE), 초고압(Ultra high pressure; UHP), 초고압효소(Ultra high pressure cellulase enzyme; UHPE)처리 등 추출조건에 따른 추출수율은 Table 11.과 같다. 옷나무의 열수추출에 요인변수로 적용한 온도, 시간, 입자크기 중에서 시료의 입자크기보다는 추출온도와 추출시간이 중요한 변수로 작용하는 것으로 나타났으며 추출온도와 추출시간이 증가함에 따라 추출수율이 증가하였다.

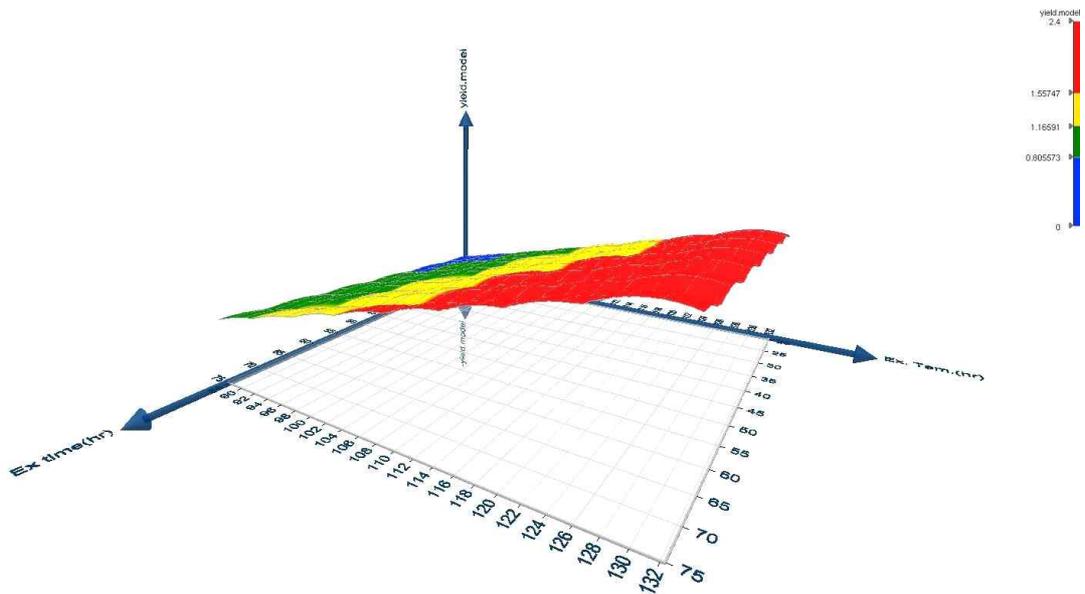
초고압 및 초고압효소처리의 추출수율은 Table 12.와 같으며 요인변수로 작용한 반응압력, 반응시간, 입자크기 중에서 반응시간보다 반응압력과 입자크기가 중요한 변수로 작용하는 것으로 보인다. 이는 초고압반응 하에서 세포벽 등에 물리적으로 막투과성이 개선되어 물질의 용출이 쉬워진 것으로 보이며 시료의 입자크기가 미세할수록 용매가 작용하는 용적이 넓어져 추출수율이 올라가는 것으로 추측되며 초고압추출보다 초고압효소처리추출의 수율이 다소 증가하여 시료의 성질에 따라 적절한 효소를 함께 처리하는 것이 효과적인 것으로 보인다.

Table 11. Extraction yield of hot water extraction with *Rhus verniciflua*

Run	Particle size (mesh)	Extraction time (hr)	Temperature (°C)	Extraction yield (%)
HWE1	0 > 12	24	110	1.25
HWE2	20 > 100	24	110	0.57
HWE3	0 > 12	72	110	1.55
HWE4	20 > 100	72	110	1.13
HWE5	0 > 12	48	90	0.26
HWE6	20 > 100	48	90	0.56
HWE7	0 > 12	48	130	1.02
HWE8	20 > 100	48	130	3.10
HWE9	12 > 20	24	90	0.95
HWE10	12 > 20	72	90	0.47
HWE11	12 > 20	24	130	1.04
HWE12	12 > 20	72	130	2.45
HWE13	12 > 20	48	110	0.50

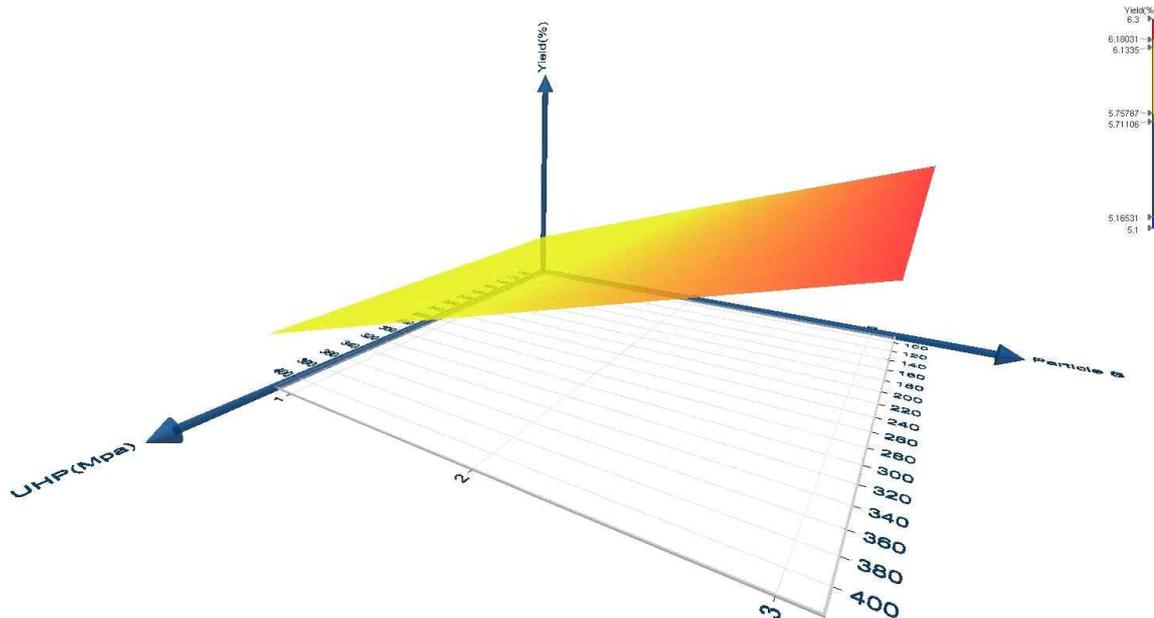
Table 12. Extraction yield of ultra high pressure(UHP) extraction and high pressure+cellulase enzyme extraction(UHPE) with *Rhus verniciflua*

Run	Particle size (mesh)	Time (min)	Pressure (Mpa)	Extraction yield (%)	
				UHP	UHPE
1	0 > 12	10	250	5.05	5.41
2	20 > 100	10	250	6.20	6.49
3	0 > 12	60	250	5.13	5.43
4	20 > 100	60	250	6.04	6.26
5	0 > 12	30	100	5.29	5.46
6	20 > 100	30	100	6.20	6.32
7	0 > 12	30	400	5.20	5.42
8	20 > 100	30	400	6.29	6.59
9	12 > 20	10	100	5.87	5.98
10	12 > 20	60	100	5.71	5.96
11	12 > 20	10	400	5.74	5.94
12	12 > 20	60	400	5.75	6.19
13	12 > 20	30	250	5.72	5.90



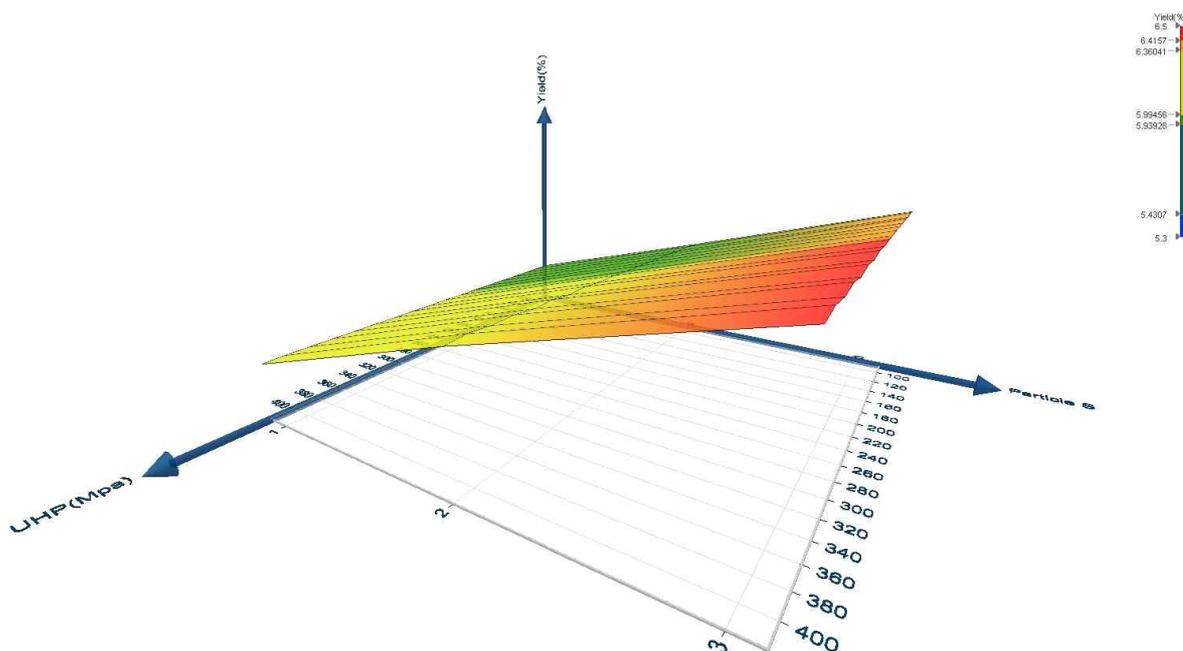
모델식; Extract yield(%) = $-2.799375 + 9.322916666666667E-03 * \text{Ex time}(\text{hr}) + 0.0335625 * \text{Ex. Tem.}(\text{hr}) - 0.32 * \text{Particle S}-0>12 - 0.258 * \text{Particle S}-12>20$

Fig. 12. Response surface plot of extraction yield of hot water extracts showing effects of temperature and time.



모델식; Extract yield(%) = 6.24586538461539 - 1.37278106508876E-03 * Time(hr) - 7.499E-05 * Temp.(°C) - 1.015 * Particle S-1 - 0. UHP822440828402367 * Particle S-2

Fig. 13. Response surface plot of extraction yield of high pressure extracts showing effects of particle size and pressure.



모델식; Extract yield(%) = 6.32448717948718 + 9.27021696252318E-05 * Time(hr) + 0.00035 * UHP(Mpa) - 0.984999999999999 * Particle S-1 - 0.421139053254437 * Particle S-2

Fig. 14. Response surface plot of extraction yield of high pressure-enzyme extracts showing effects of particle size and pressure.

나) 총 페놀성 화합물의 함량

열수, 초고압, 초고압효소처리 등 추출조건에 따른 총 페놀 함량은 Table 13.과 같다. 옷나무의 열수추출에 요인변수로 적용한 온도, 시간, 입자크기 중에서 시료의 입자크기보다는 추출 온도와 추출시간이 중요한 변수로 작용하는 것으로 나타났으며 특히, 추출온도가 증가함에 따라 추출수율이 증가한 것처럼 총 페놀성 화합물의 함량도 증가하였다.

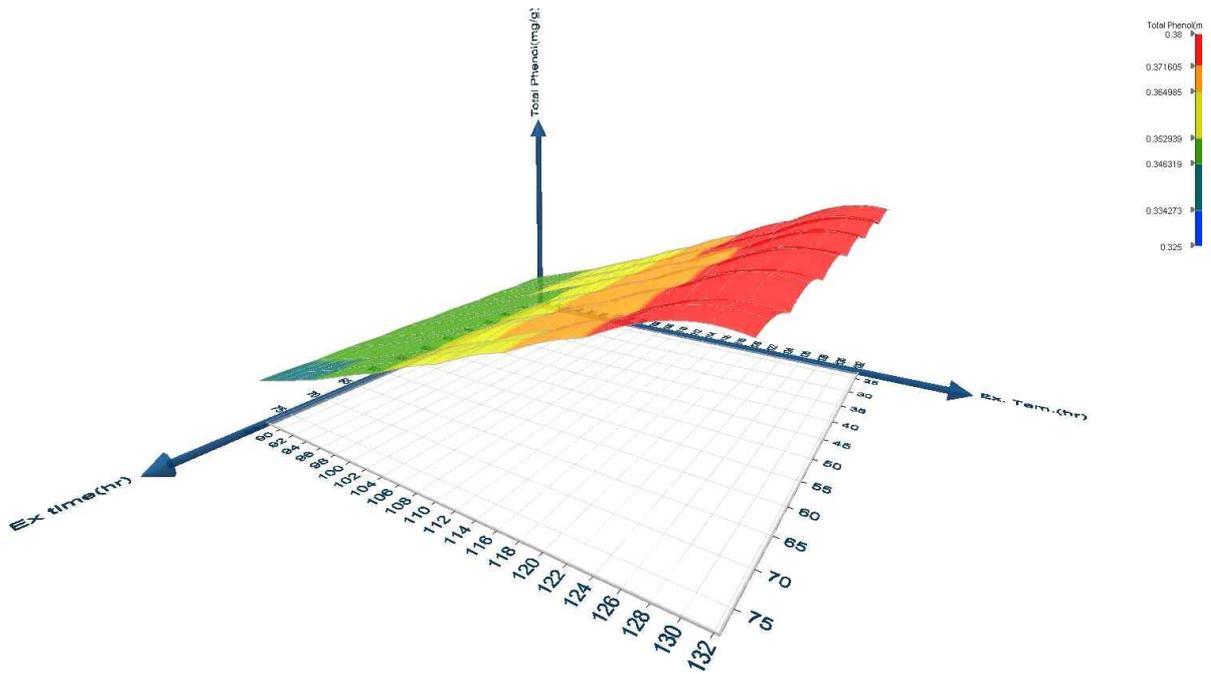
초고압 및 초고압효소처리를 한 총 페놀성 화합물 함량은 Table 14.와 같으며 요인변수로 작용한 반응압력, 반응시간, 입자크기 중에서 반응시간보다 반응압력과 입자크기가 중요한 변수로 작용하는 것으로 보인다. 이는 초고압반응 하에서 세포벽 등에 물리적으로 막투과성이 개선되어 물질의 용출이 쉬워진 것으로 보이며 시료의 입자크기가 미세할수록 용매가 작용하는 용적이 넓어져 추출수율이 올라가는 것과 마찬가지로 총 페놀성화합물 함량도 증가하는 것으로 보이며 시료의 성질에 따라 적절한 효소를 함께 처리하는 것이 효과적인 것으로 판단되었다.

Table 13. Total phenolic contents of hot water extraction with *Rhus verniciflua*

Run	Particle size (mesh)	Extraction time (hr)	Temperature (°C)	Total phenolic contents (mg/g)
HWE1	0 > 12	24	110	0.41
HWE2	20 > 100	24	110	0.30
HWE3	0 > 12	72	110	0.39
HWE4	20 > 100	72	110	0.39
HWE5	0 > 12	48	90	0.27
HWE6	20 > 100	48	90	0.34
HWE7	0 > 12	48	130	0.30
HWE8	20 > 100	48	130	0.45
HWE9	12 > 20	24	90	0.42
HWE10	12 > 20	72	90	0.31
HWE11	12 > 20	24	130	0.37
HWE12	12 > 20	72	130	0.41
HWE13	12 > 20	48	110	0.23

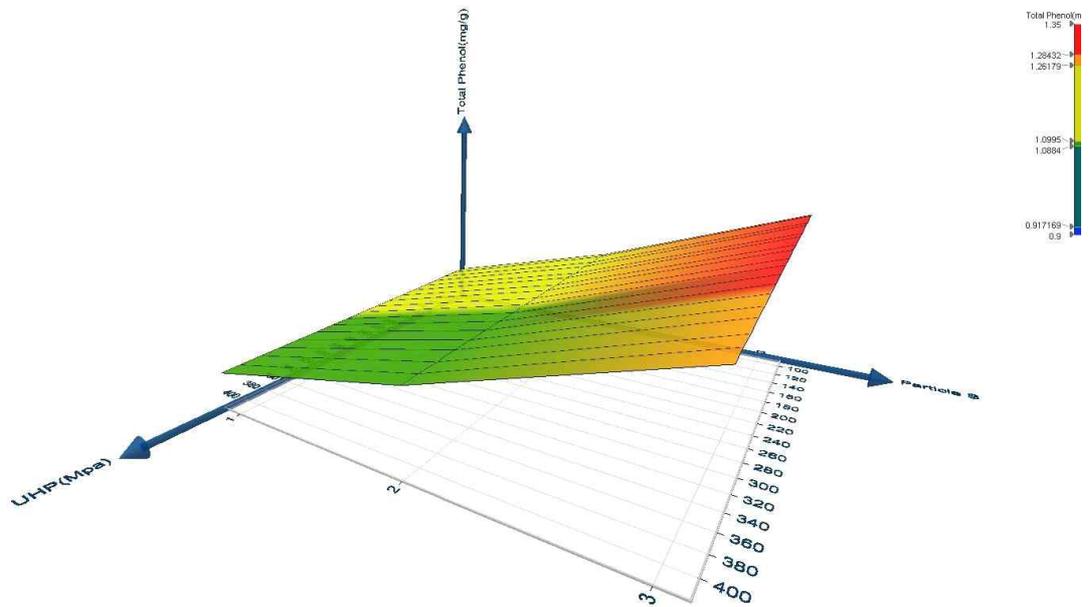
Table 14. Total phenolic contents of high pressure extraction and high pressure-enzyme extraction with *Rhus verniciflua*

Run	Particle size (mesh)	Time (min)	Pressure (Mpa)	Total phenolic contents (mg/g)	
				UHP	UHPE
1	0 > 12	10	250	0.89	0.98
2	20 > 100	10	250	1.25	1.34
3	0 > 12	60	250	0.90	1.01
4	20 > 100	60	250	1.27	1.38
5	0 > 12	30	100	0.96	1.02
6	20 > 100	30	100	1.30	1.32
7	0 > 12	30	400	0.92	1.05
8	20 > 100	30	400	1.32	1.31
9	12 > 20	10	100	1.18	1.05
10	12 > 20	60	100	1.09	1.20
11	12 > 20	10	400	1.08	1.19
12	12 > 20	60	400	1.11	1.20
13	12 > 20	30	250	1.04	1.08



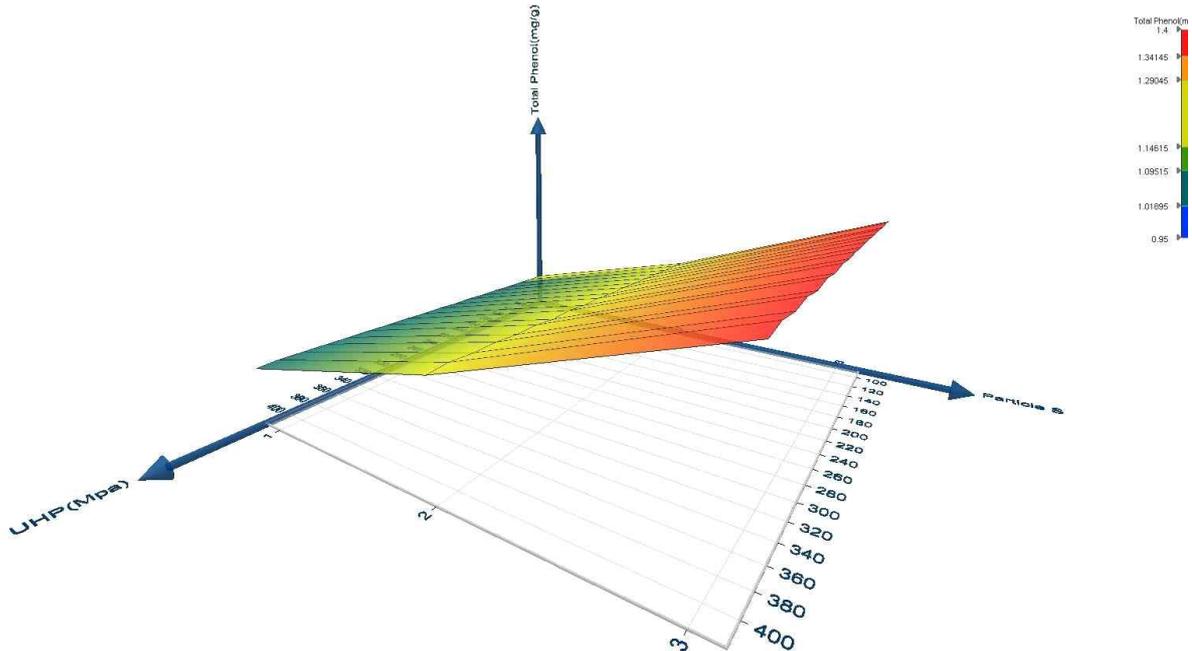
모델식; Total phenolic contents(mg/g) = $0.216651481424856 - 1.327530999E-05 * \text{Time}(\text{hr}) + 1.2444093973125E-03 * \text{Temp}.(\text{°C})$

Fig. 15. Response surface plot of total phenolic contents of hot water extracts showing effects of temperature and time.



모델식; Total phenolic contents(mg/g) =
 $1.31966894294103 - 3.015703496606E-04 * \text{Time}(\text{hr}) - 9.94716263082499E-05 * \text{Temp}.(^{\circ}\text{C}) - 0.371330520947041 * \text{Particle S-1} - 0.190668823539818 * \text{Particle S-2} + 4.7144873194346E-07 * \text{Time}(\text{hr}) * \text{Temp}.(^{\circ}\text{C}) * \text{Particle S-1} + 7.20138713448045E-07 * \text{Time}(\text{hr}) * \text{Temp}.(^{\circ}\text{C}) * \text{Particle S-2}$

Fig. 16. Response surface plot of total phenolic contents of high pressure extracts showing effects of particle size and pressure.



모델식; Total phenolic contents(mg/g) =
 $1.26509615384615 + 1.20216962524655E-03 * \text{Time}(\text{hr}) + 1.33333333333333E-04 * \text{UHP}(\text{Mpa}) - 0.3225 * \text{Particle S-1} - 0.19530325443787 * \text{Particle S-2}$

Fig. 17. Response surface plot of total phenolic contents of high pressure-enzyme extracts showing effects of particle size and pressure.

다) 총 플라보노이드 함량

열수, 초고압, 초고압효소처리 등 추출조건에 따른 총 플라보노이드 함량은 Table 15.와 같다. 옷나무의 열수추출에 요인변수로 적용한 온도, 시간, 입자크기 중에서 시료의 입자크기보다는 추출온도와 추출시간이 중요한 변수로 작용하는 것으로 나타났으며 특히, 추출온도가 증가함에 따라 추출수율이 증가한 것처럼 총 플라보노이드 함량도 증가하였다.

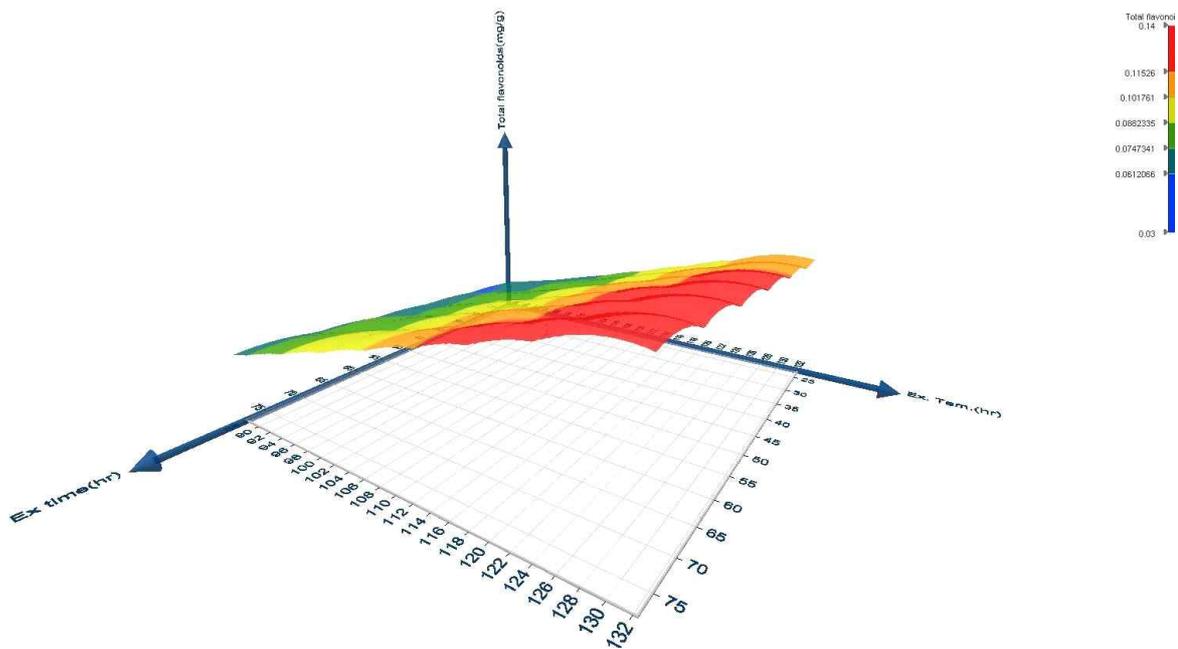
초고압 및 초고압효소처리를 한 총 플라보노이드 함량은 Table 16.과 같으며 요인변수로 작용한 반응압력, 반응시간, 입자크기 중에서 반응시간보다 반응압력과 입자크기가 중요한 변수로 작용하는 것으로 보인다. 이는 초고압반응 하에서 세포벽 등에 물리적으로 막투과성이 개선되어 물질의 용출이 쉬워진 것으로 보이며 시료의 입자크기가 미세할수록 용매가 작용하는 용적이 넓어져 추출수율이 올라가는 것과 같을 수 있으나 초고압반응에서는 오히려 입자크기가 미세한 경우나 반응압력이 일정수준 이상 증가할수록 총 플라보노이드 추출수율이 낮은 것으로 나타났다.

Table 15. Total flavonoids of hot water extraction with *Rhus verniciflua*

Run	Particle size (mesh)	Extraction time (hr)	Temperature (°C)	Total flavonoids (mg/g)
HWE1	0 > 12	24	110	0.09
HWE2	20 > 100	24	110	0.05
HWE3	0 > 12	72	110	0.11
HWE4	20 > 100	72	110	0.11
HWE5	0 > 12	48	90	0.04
HWE6	20 > 100	48	90	0.05
HWE7	0 > 12	48	130	0.08
HWE8	20 > 100	48	130	0.20
HWE9	12 > 20	24	90	0.07
HWE10	12 > 20	72	90	0.05
HWE11	12 > 20	24	130	0.09
HWE12	12 > 20	72	130	0.14
HWE13	12 > 20	48	110	0.04

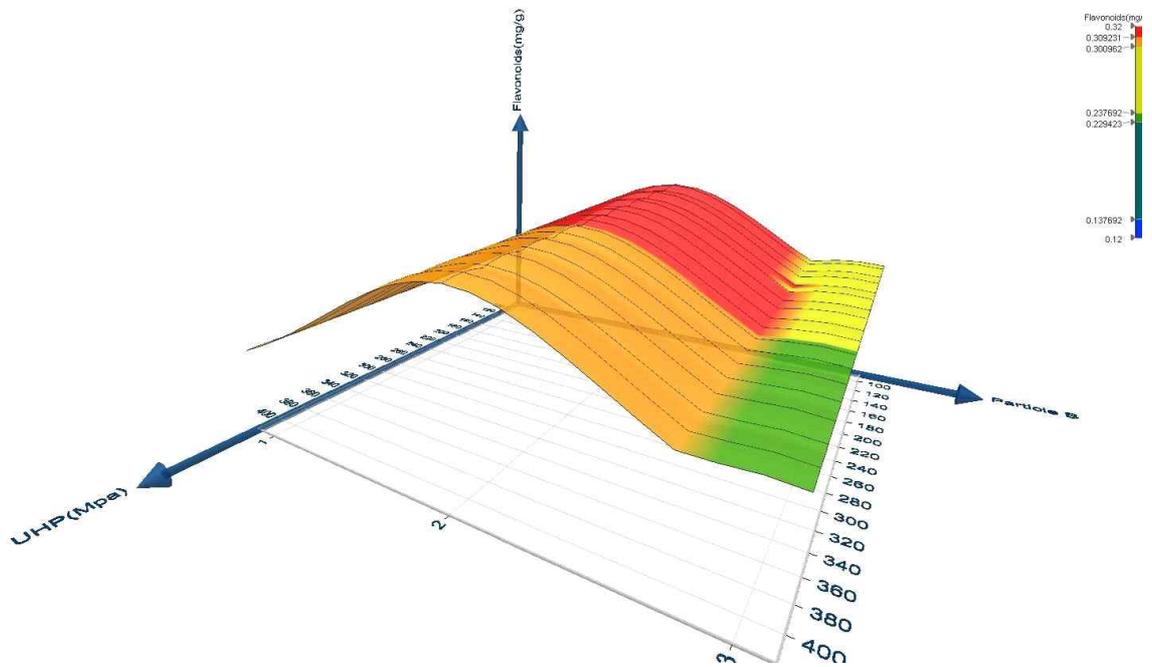
Table 16. Total flavonoids of high pressure and high pressure-enzyme extraction with *Rhus verniciflua*

Run	Particle size (mesh)	Time (min)	Pressure (Mpa)	Total flavonoids (mg/g)	
				UHP	UHPE
1	0 > 12	10	250	0.14	0.18
2	20 > 100	10	250	0.22	0.26
3	0 > 12	60	250	0.13	0.16
4	20 > 100	60	250	0.26	0.27
5	0 > 12	30	100	0.15	0.18
6	20 > 100	30	100	0.24	0.26
7	0 > 12	30	400	0.13	0.16
8	20 > 100	30	400	0.23	0.21
9	12 > 20	10	100	0.20	0.15
10	12 > 20	60	100	0.16	0.18
11	12 > 20	10	400	0.16	0.19
12	12 > 20	60	400	0.17	0.18
13	12 > 20	30	250	0.14	0.15



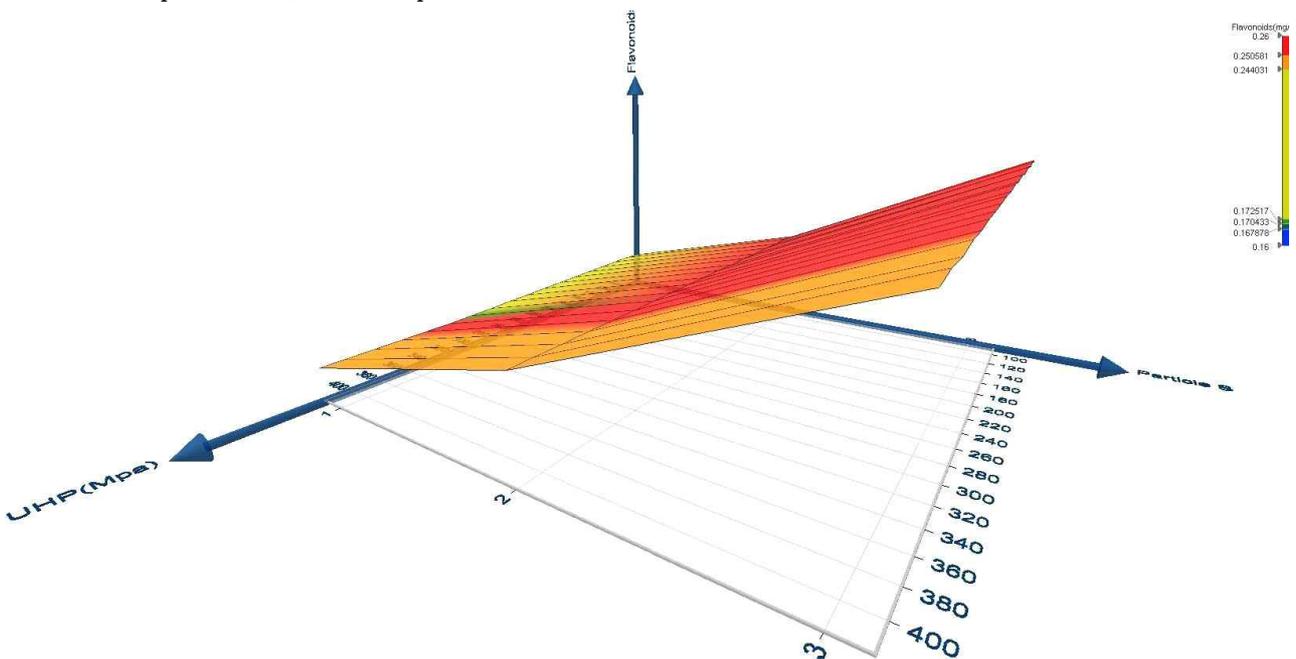
모델식; Total flavonoids(mg/g)= $-0.138691796995192 + 0.00056341171875 * \text{Time}(\text{hr}) + 0.00180179015625 * \text{Temp}.(^{\circ}\text{C})$

Fig. 18. Response surface plot of total flavonoids of hot water extracts showing effects of temperature and time.



모델식; Total flavonoids(mg/g)= 0.249166666666667+ 2.56410256410258E-05
 *Time(hr)-0.00005*Temp.(°C)-0.1*Particle S-1-7.15384615384616E-02* Particle S-2

Fig. 19. Response surface plot of total flavonoids of high pressure extracts showing effects of particle size and pressure.



모델식; Total flavonoids(mg/g) = 0.253044871794872+ 9.861932938856E-05*
 Time(hr)-0.000025*UHP(Mpa)-0.08*Particle S-1-8.01479289940828E- 02* Particle
 S-2

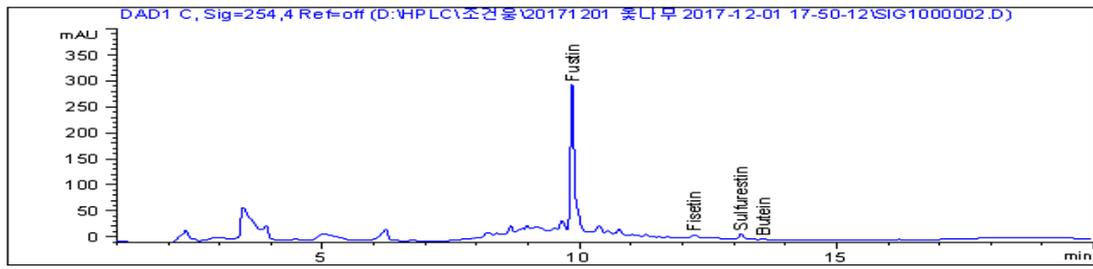
Fig. 20. Response surface plot of total flavonoids of high pressure-enzyme extracts showing effects of particle size and pressure.

라) 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 부테인의 함량

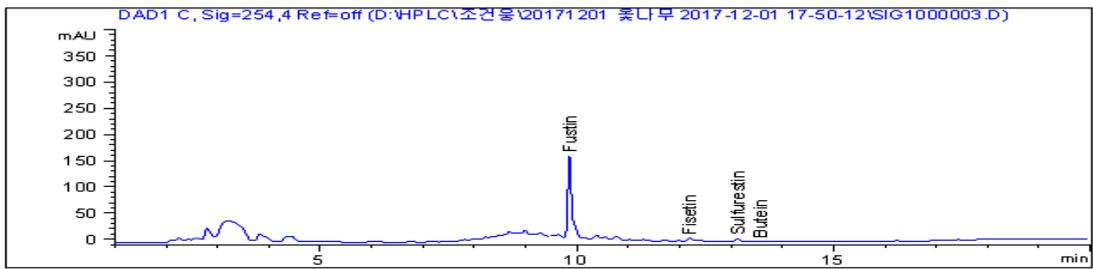
열수, 초고압, 초고압효소처리 등 추출조건에 따른 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 부테인의 함량 변화를 알아보기 위해 각 추출조건에서 가장 추출수율이 높은 조건을 선정하여 HPLC 기기분석하여 옷나무의 주요 플라보노이드인 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 푸스틴을 확인하였다.

Fig. 21, 22, 23.에서 나타내는 바와 같이 초고압반응과 초고압효소처리반응에서 열수추출에서보다 푸스틴, 피세틴, 설퓨레틴, 부테인 등 각 플라보노이드의 함량이 증가했다. 특히, 비수용성 플라보노이드인 피세틴의 함량이 약 3배 가까이 증가하였다. 효소처리한 초고압반응에서는 효소처리하지 않은 초고압반응에 비해 피세틴의 함량이 다소 증가하였고 푸스틴, 설퓨레틴, 부테인의 함량은 감소하였다. 열수추출에 비해서 초고압, 초고압효소처리에서 retention time 3, 9초 근처에서 피크가 발견되어 초고압반응으로 인해 배당체로 결합하거나 물질의 화학구조 변화에도 영향을 미치는 것으로 보인다.

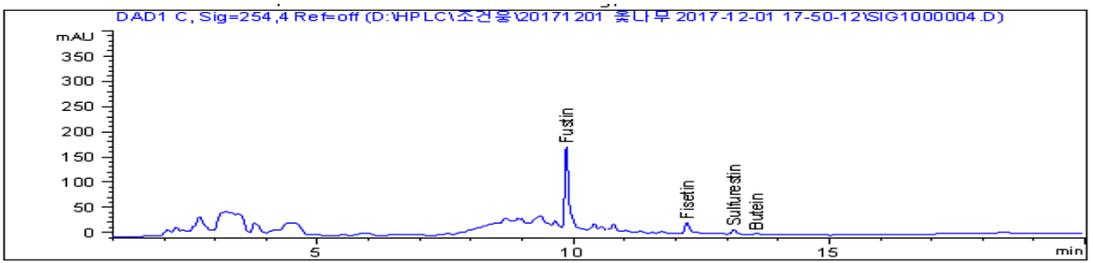
HWE1



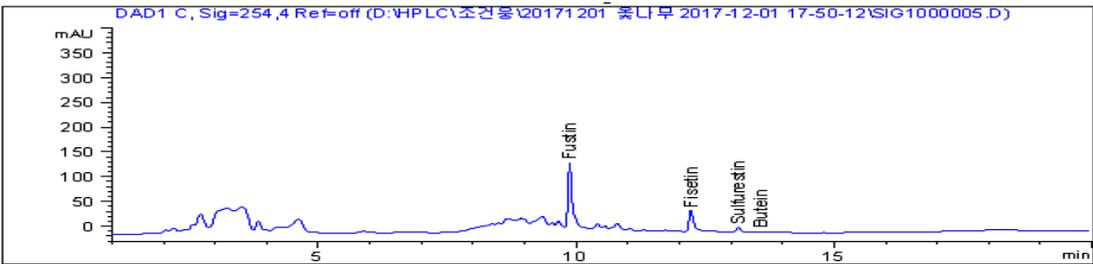
HWE2



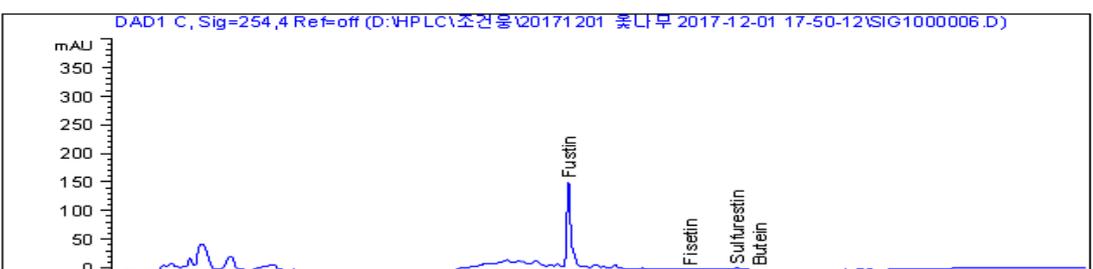
HWE3



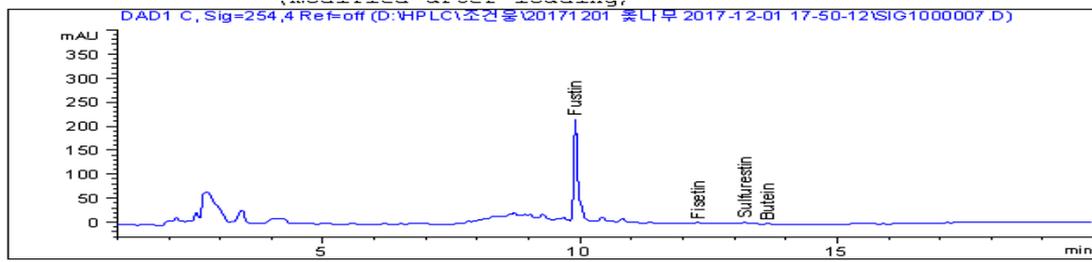
HWE4



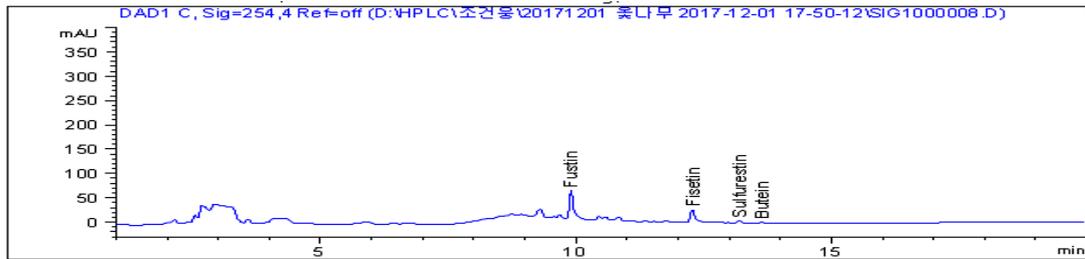
HWE5



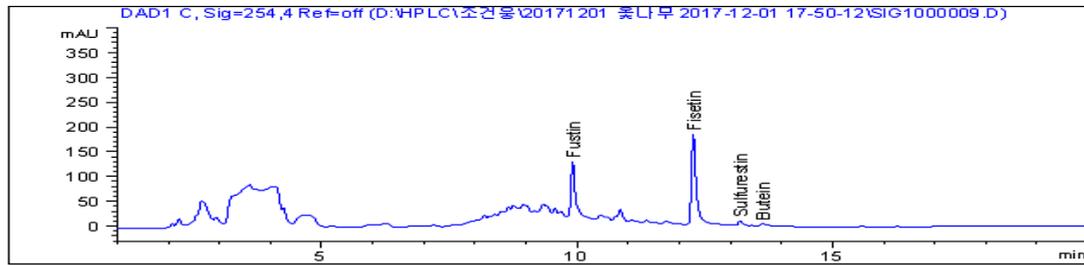
HWE6



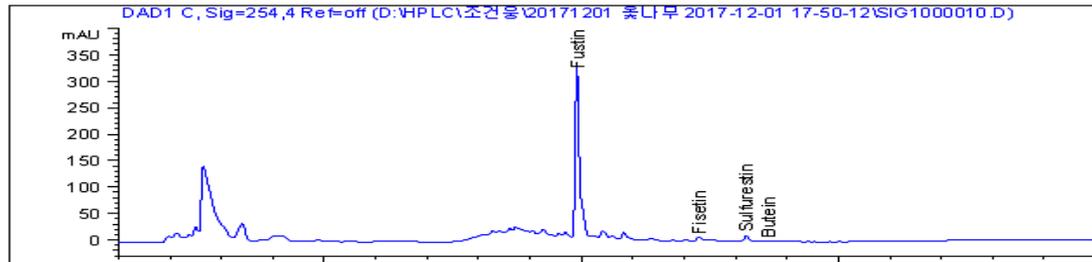
HWE7



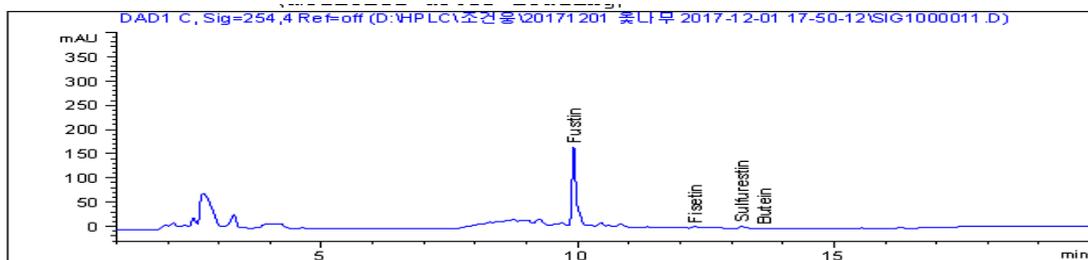
HWE8



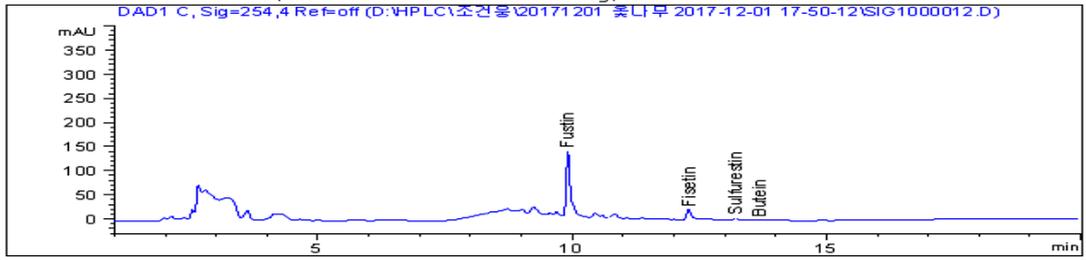
HWE9



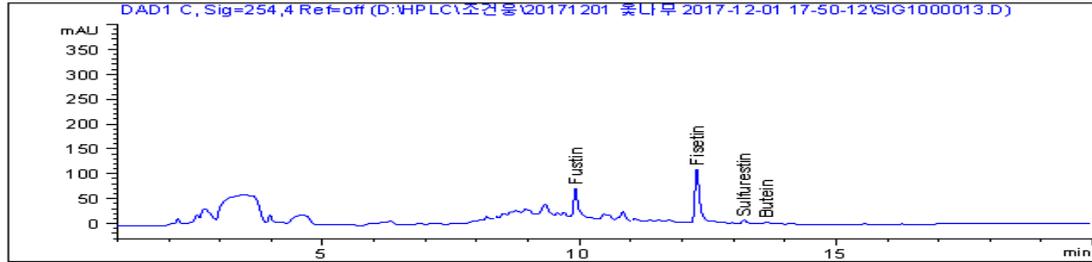
HWE10



HWE11



HWE12



HWE13

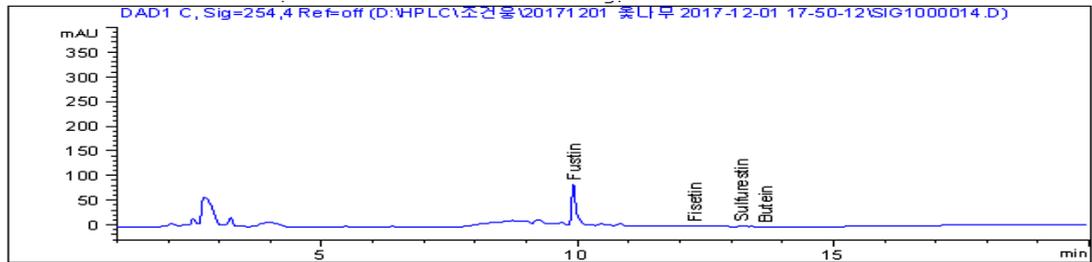
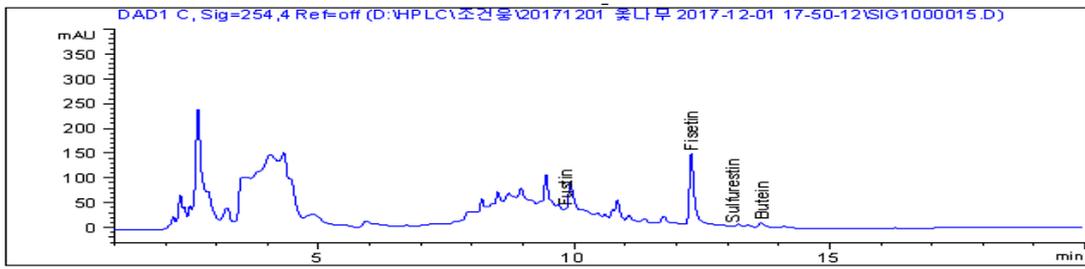


Fig. 21. HPLC Chromatogram of Hot water extract by box-behnken design.

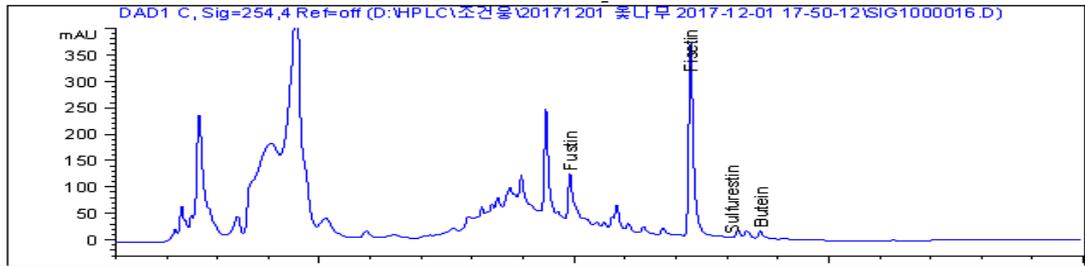
Table 17. HPLC Chromatogram peak area (mAU×sec.)of Hot water extract by box-behnken design.

No	Fustin	Fisetin	Sulfuretin	Butein	S+ B	Total
HWE-01	1,987.98	126.99	104.61	67.47	172.08	2,287.05
HWE-02	898.15	30.83	28.22	0	28.22	957.2
HWE-03	1,415.13	497.26	160.26	110.85	271.11	2,183.5
HWE-04	1,150.01	448.21	145.55	64.75	210.3	1,808.52
HWE-05	980.44	29.33	32.54	6.57	39.11	1,048.88
HWE-06	1,440.11	80.52	93.36	67.74	161.1	1,681.73
HWE-07	726.40	316.03	115.18	160.57	275.75	1,318.18
HWE-08	1,404.87	1,560.02	192.81	168.80	361.61	3,326.5
HWE-09	2,121.85	83.09	85.69	16.95	102.64	2,307.58
HWE-10	1,139.27	83.07	97.81	63.39	161.2	1,383.54
HWE-11	1,169.99	427.39	109.69	87.56	197.25	1,794.63
HWE-12	1,013.02	893.78	157.33	169.73	327.06	2,233.86
HWE-13	643.33	62.89	68.34	55.68	124.02	830.24

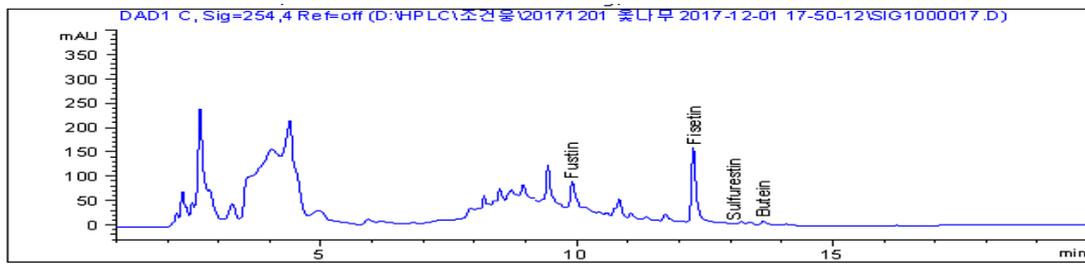
UHP1



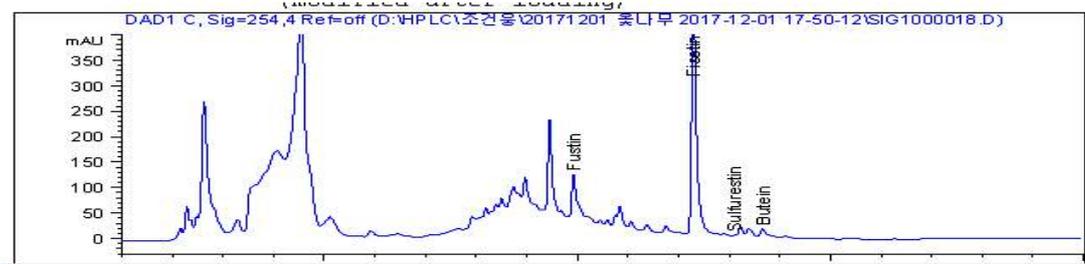
UHP2



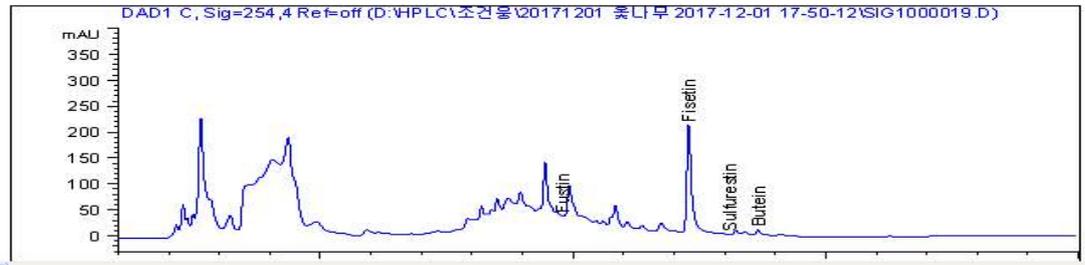
UHP3



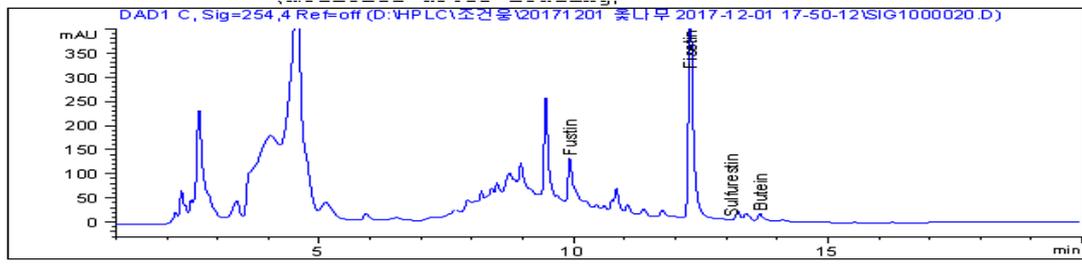
UHP4



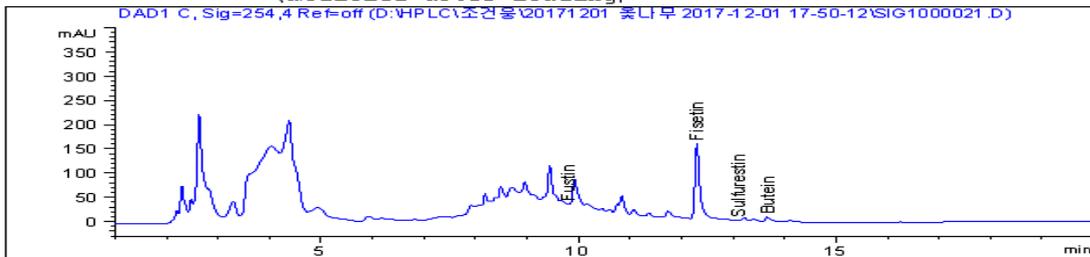
UHP5



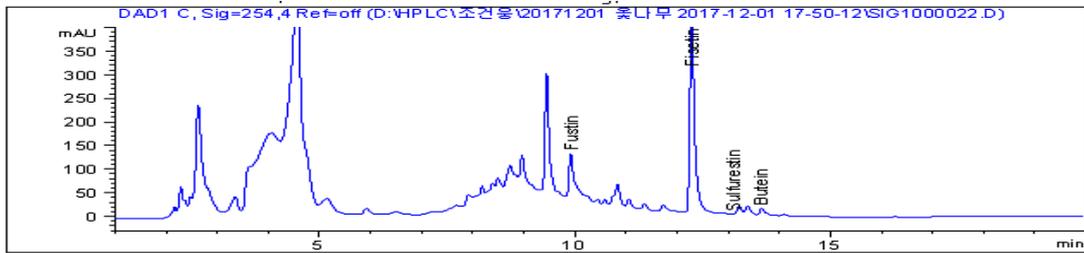
UHP6



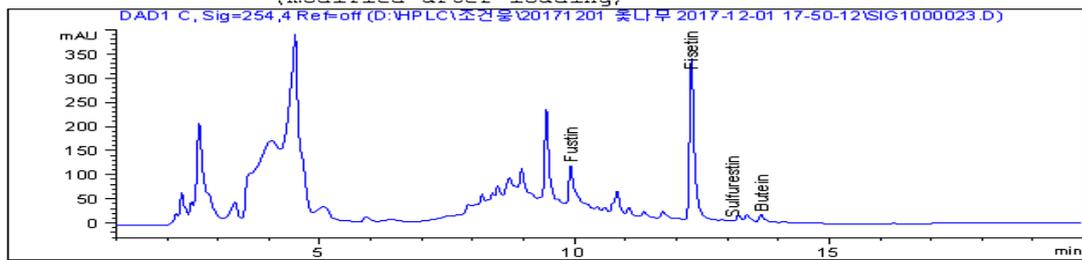
UHP7



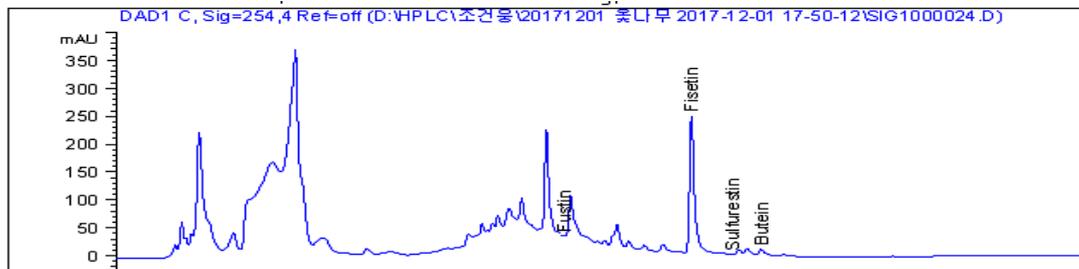
UHP8



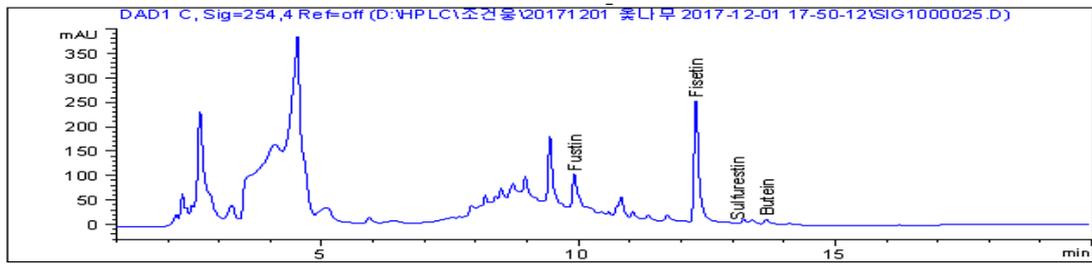
UHP9



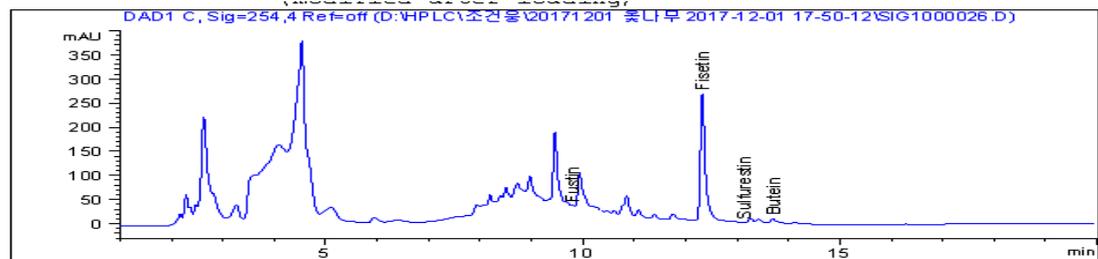
UHP10



UHP11



UHP12



UHP13

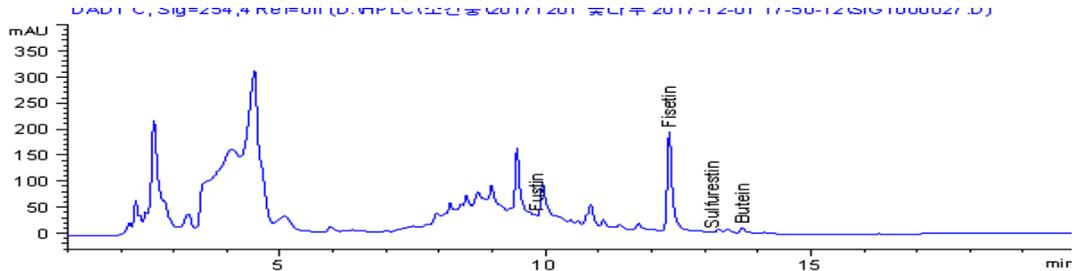
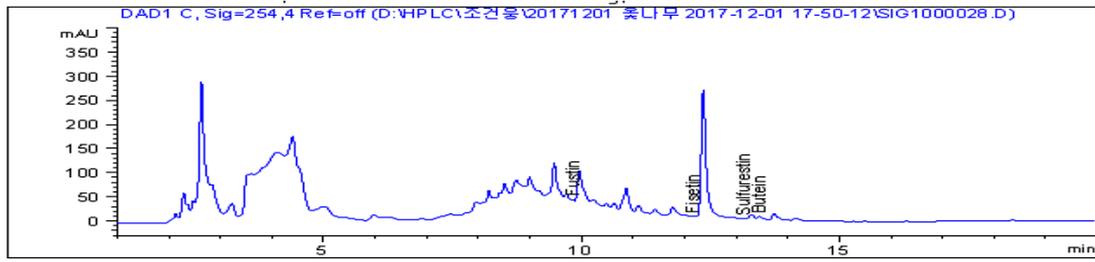


Fig. 22. HPLC Chromatogram of Ultra high pressure extract(UHP) by box-behnken design.

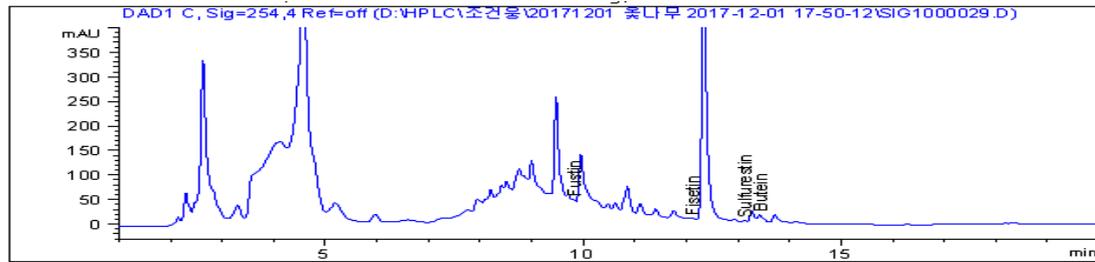
Table. 18. HPLC Chromatogram peak area (mAU×sec.)of Ultra high pressure extract by box-behnken design.

No	Fustin	Fisetin	Sulfuretin	Butein	S+ B	Total
UHP-01	115.18	1,455.54	46.96	251.94	298.9	1,869.62
UHP-02	2,068.00	2,956.81	67.06	337.90	404.96	5,429.77
UHP-03	1,097.65	1,493.36	48.81	241.59	290.4	2,881.41
UHP-04	2,117.16	3,726.87	73.96	380.48	454.44	6,298.47
UHP-05	135.58	1,906.11	57.95	278.85	336.8	2,378.49
UHP-06	2,032.88	3,298.36	39.64	192.79	232.43	5,563.67
UHP-07	156.01	1,522.35	52.64	250.81	303.45	1,981.81
UHP-08	2,196.55	3,295.06	74.52	344.37	418.89	5,910.5
UHP-09	1,480.27	2,761.09	69.77	335.28	405.05	4,646.41
UHP-10	153.96	2,102.15	61.78	274.50	336.28	2,592.39
UHP-11	1,226.73	2,122.20	59.25	265.26	324.51	3,673.44
UHP-12	167.87	2,264.48	64.17	272.46	336.63	2,768.98
UHP-13	176.58	1,747.16	61.81	259.94	321.75	2,245.49

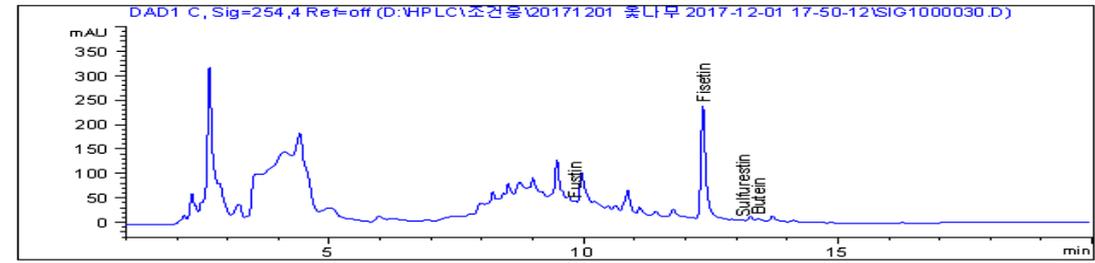
UHPE1



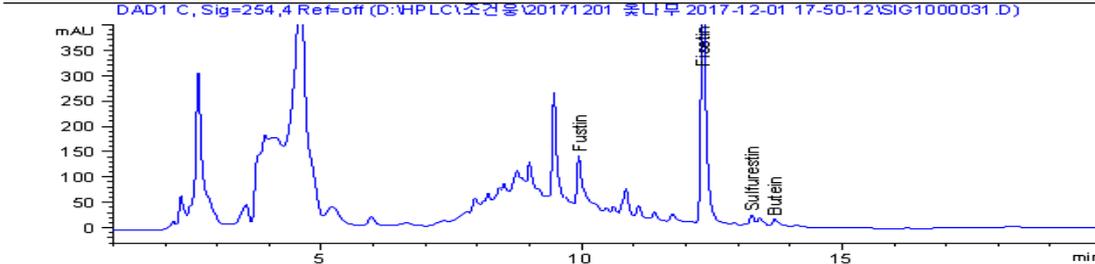
UHPE2



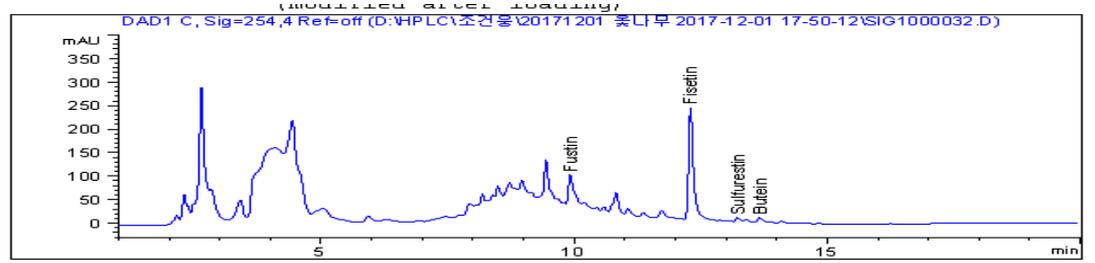
UHPE3



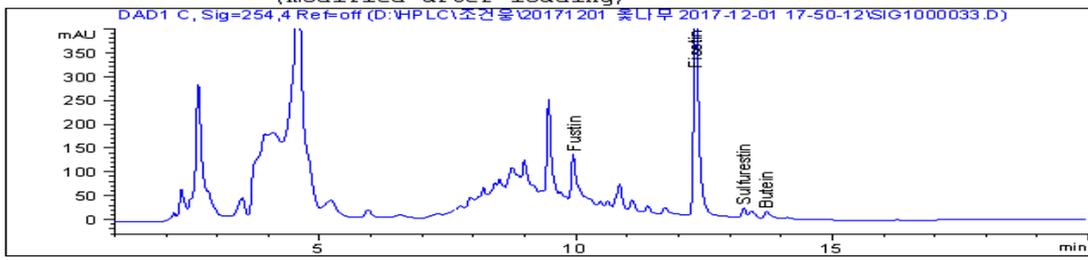
UHPE4



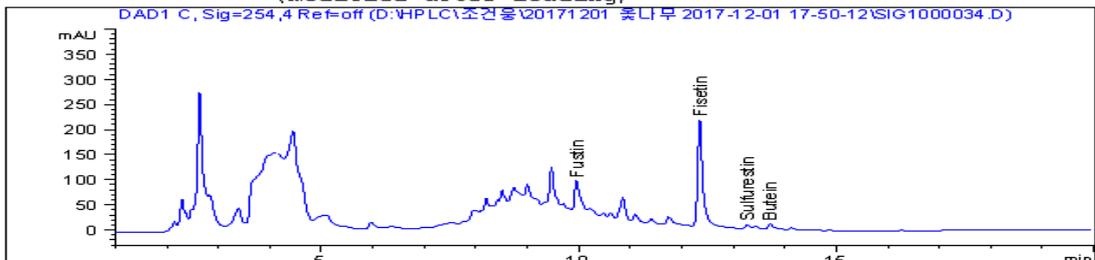
UHPE5



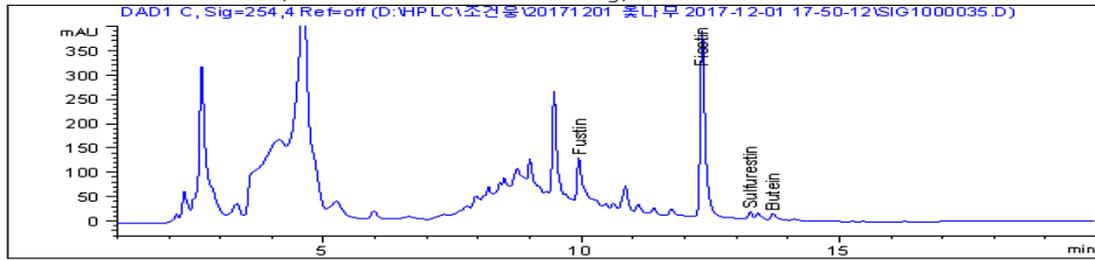
UHPE 06



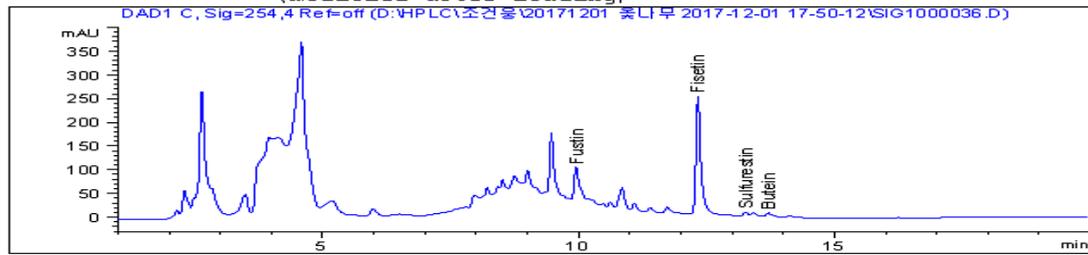
UHPE 07



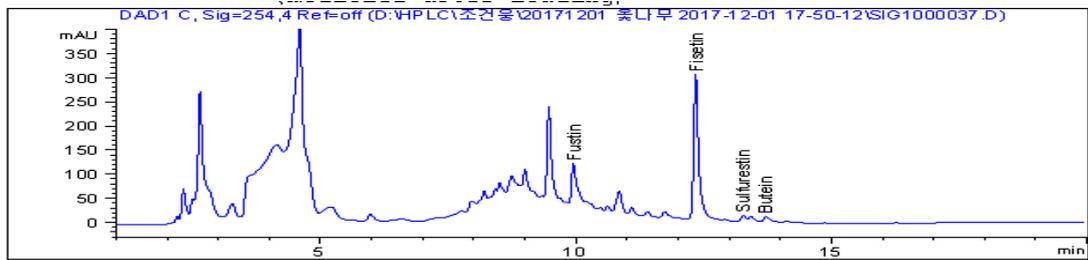
UHPE 08



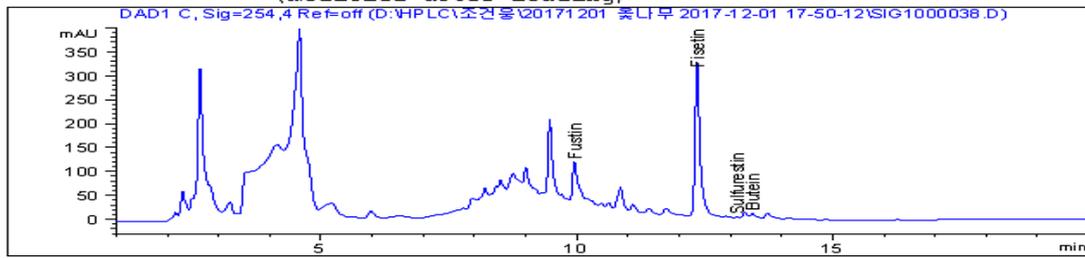
UHPE 09



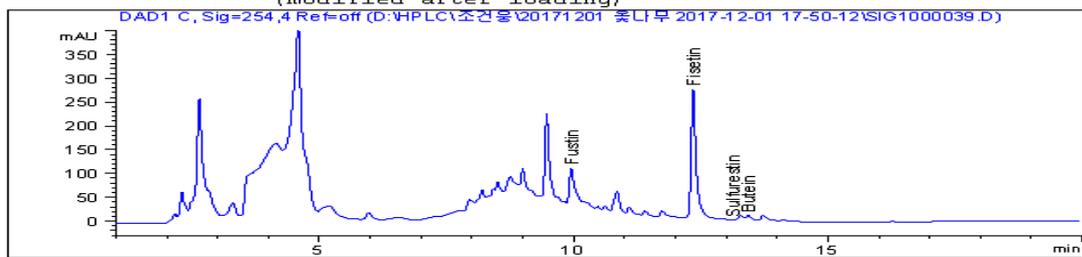
UHPE 10



UHPE 11



UHPE 12



UHPE 13

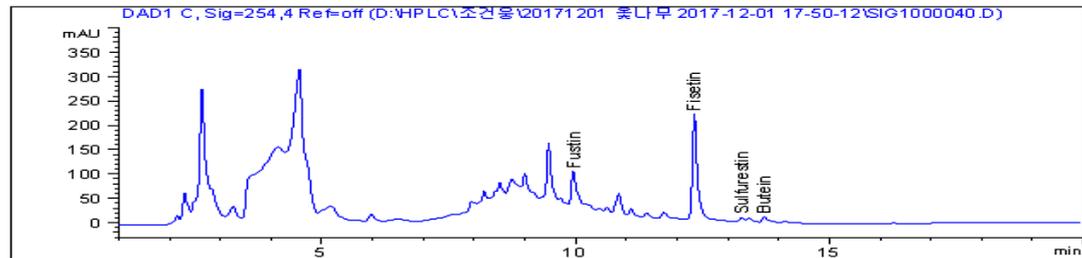


Fig. 23. HPLC Chromatogram of Ultra high pressure+cellulase enzyme extract(UHP) by box-behnken design.

Table 19. HPLC Chromatogram peak area (mAU×sec.) of Ultra high pressure+cellulase enzyme extract by box-behnken design.

No	Fustin	Fisetin	Sulfuretin	Butein	S+ B	Total
UHPE-01	219.77	75.26	76.69	175.68	252.37	547.4
UHPE-02	226.56	98.52	89.26	269.63	358.89	683.97
UHPE-03	224.00	2,119.31	71.67	169.52	241.19	2,584.5
UHPE-04	2,345.36	4,089.84	250.32	362.01	612.33	7,047.53
UHPE-05	1,291.19	2,168.61	158.61	291.55	450.16	3,909.96
UHPE-06	2,246.73	3,822.54	235.83	351.38	587.21	6,656.48
UHPE-07	1,166.98	1,876.14	110.27	186.08	296.35	3,339.47
UHPE-08	2,196.86	3,176.54	198.48	325.29	523.77	5,897.17
UHPE-09	1,259.20	2,191.06	146.30	255.69	401.99	3,852.25
UHPE-10	1,436.68	2,585.74	168.36	285.90	454.26	4,476.68
UHPE-11	1,416.00	2,750.47	78.25	211.15	289.4	4,455.87
UHPE-12	1,348.38	2,375.01	73.99	210.70	284.69	4,008.08
UHPE-13	1,242.44	1,995.70	146.77	279.87	426.64	3,664.78

4) 옷나무 목질부 플라보노이드의 생리활성

가) DPPH 라디칼 소거능

열수, 초고압, 초고압효소처리 등 추출조건에 따른 DPPH 라디칼 소거능은 각 조건 별로 가장 추출수율이 좋은 실험군으로 선정해서 진행하였다. Table 17.과 Fig. 24.에서 나타내는 바와 같이 열수, 초고압, 초고압효소처리 모두 농도 의존적으로 항산화능 증가를 보였으며 열수 추출은 토코페롤의 약 57% 항산화능을 나타냈으며 초고압, 초고압효소처리는 동일한 농도 조건에서 토코페롤의 약 73% 항산화능을 나타내었다. 열수추출보다 초고압반응을 이용한 추출이 약 30% 항산화능이 증진되었다.

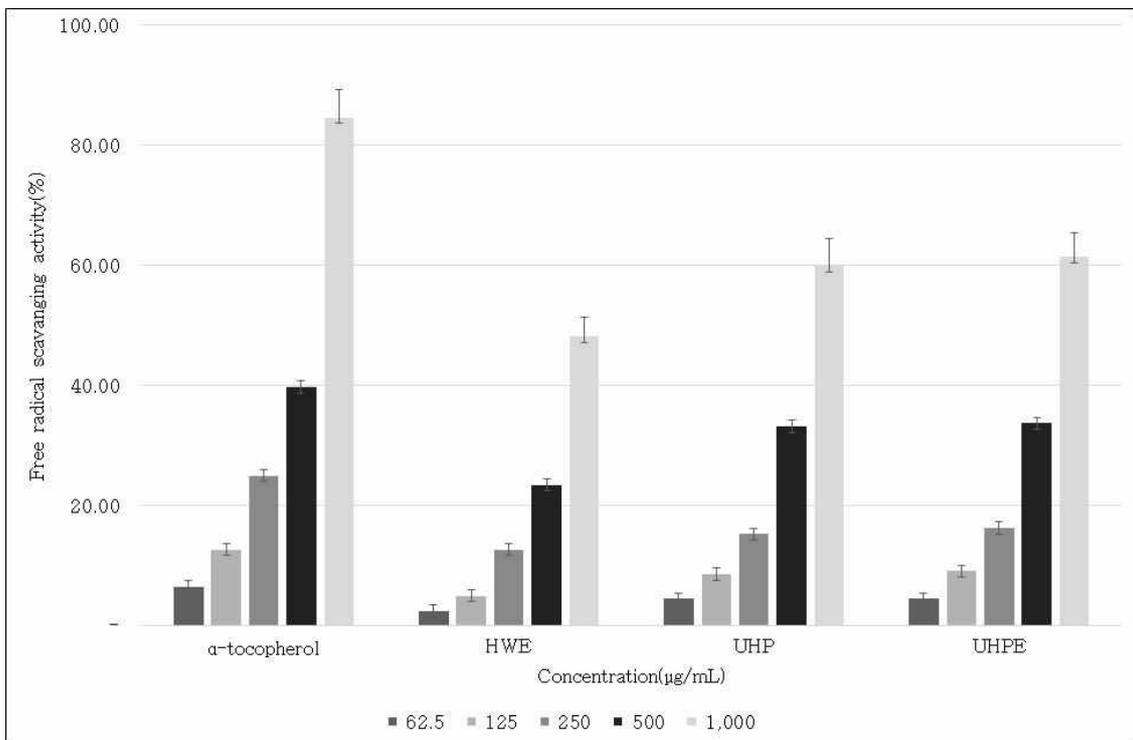


Fig. 24. DPPH free radical scavenging effect of hot water extraction and high pressure extraction and high pressure+ cellulase enzyme extraction.

나) 헬리코박터 파이로리 억제능

Fig. 26과 같이 열수(WHE), 초고압(UHP), 초고압효소(UHPE)처리 등 추출조건에 따른 헬리코박터 파이로리 억제능은 48시간 배양경과후 고농도(500 μ g, 1000 μ g/ml)에서는 일반 항생제 유사한 효과를 나타냈지만 저농도에서는 효능이 떨어졌다. 저농도(50,100 μ g/ml)에서는 초고압효소처리(UHPE)가장 우수하였다. Fig. 25와 같이 옷나무 플라보노이드(정제 표준품)는 헬리코박터 파이로리에 대해 14 \pm 0.5 mm정도의 뚜렷한 저해환을 나타내었다. 헬리코박터 파이로리에 옷나무 플라보노이드와 푸스틴, 피세틴, 설푸레틴, 부테인 등을 농도별로 각각 첨가하여 4일간 배양 후 요소분해효소활성을 측정된 결과는 Table 20~24, Fig. 27~31과 같다. 푸스틴, 피세틴, 설푸레틴, 부테인이 포함된 플라보노이드는 1,000 μ g/mL농도에서 1일째, 500 μ g/mL농도에서 2일째, 250 μ g/mL농도와 125 μ g/mL농도에서 4일째 완전증식 억제효과가 나타났다. 푸스틴은 1,000 μ g/mL농도와 500 μ g/mL농도에서 2일째 완전증식 억제효과가 나타났고, 250 μ g/mL농도에서 4일째 89%증식 억제효과가 나타났다. 피세틴은 1,000 μ g/mL농도와 500 μ g/mL농도에서 1일째, 250 μ g/mL농도에서 3일째 완전증식 억제효과가 나타났고, 125 μ g/mL농도에서 3일째 74%, 4일째 80%증식 억제효과가 나타났다. 설푸레틴은 1,000 μ g/mL농도 1일째, 500 μ g/mL농도에서 2일째 완전증식 억제효과가 나타났고, 250 μ g/mL농도에서 3일째 85.4%, 4일째 92.3%, 125 μ g/mL농도에서 4일째 70.8% 증식억제효과가 나타났다. 부테인은 1,000 μ g/mL농도와 500 μ g/mL농도에서 1일째, 250 μ g/mL농도에서 2일째,



Fig. 25. Inhibition activity of *Rhus verniciflua* flavonoids against *Helicobacter pylori*

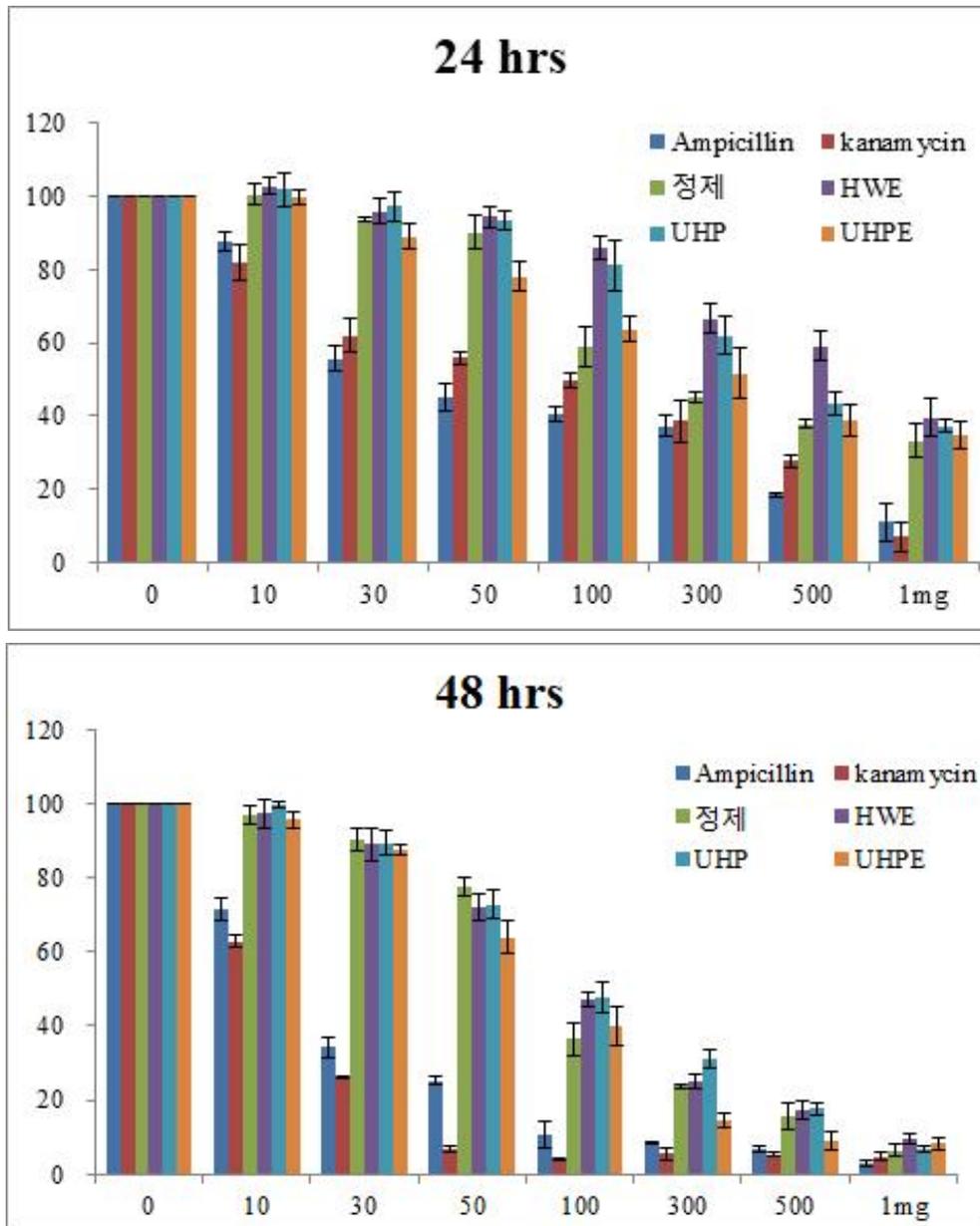


Fig. 26. Inhibition activity against *Helicobacter pylori* of hot water extraction and high pressure extraction and high pressure+cellulase enzyme extraction due to cultivation elapsed times(24hr & 48hr).

125 μ g/mL농도에서 3일째 완전증식 억제효과가 나타났고, 62.5 μ g/mL농도에서 3일째 45.8%, 4일째 67% 증식억제효과가 나타났다. 헬리코박터 파이로리 억제능 측정을 위해 IC₅₀ 값을 구하였으며 부테인>피세틴>옻나무 플라보노이드(정제 표준품)>푸스틴>설푸레틴의 순서로 억제능이 우수하였다.

Table 20. Antimicrobial effect of *Rhus verniciflua* flavonoids on *Helicobacter pylori*

(OD value)

Period (days)	Concentration(ppm)					
	1000	500	250	125	62.5	0
0	0.548 ±0.012	0.548 ±0.009	0.548 ±0.005	0.549 ±0.005	0.549 ±0.003	0.548 ±0.003
1	0.115 ±0.015	0.158 ±0.011	0.523 ±0.012	0.573 ±0.007	0.590 ±0.014	0.621 ±0.009
2	0.123 ±0.003	0.124 ±0.006	0.201 ±0.001	0.559 ±0.002	0.639 ±0.006	0.671 ±0.004
3	0.142 ±0.017	0.133 ±0.007	0.154 ±0.002	0.276 ±0.003	0.545 ±0.002	0.658 ±0.006
4	0.123 ±0.008	0.120 ±0.003	0.131 ±0.005	0.225 ±0.002	0.414 ±0.006	0.636 ±0.002

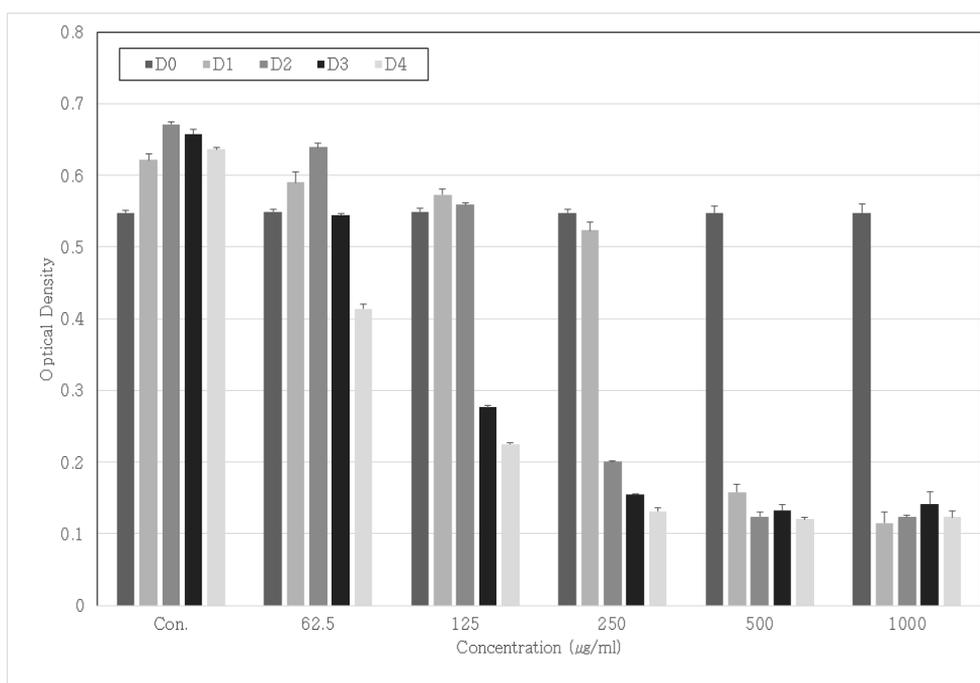


Fig. 26. Antimicrobial effect of *Rhus verniciflua* flavonoids against *Helicobacter pylori*.

Table 21. Antimicrobial effect of fustin on *Helicobacter pylori* (OD value)

Period (days)	Concentration(ppm)					
	1000	500	250	125	62.5	0
0	0.642 ±0.002	0.642 ±0.008	0.642 ±0.009	0.642 ±0.010	0.642 ±0.005	0.642 ±0.013
1	0.444 ±0.005	0.629 ±0.010	0.635 ±0.018	0.638 ±0.013	0.639 ±0.013	0.648 ±0.004
2	0.202 ±0.002	0.223 ±0.003	0.502 ±0.010	0.576 ±0.009	0.601 ±0.013	0.657 ±0.003
3	0.166 ±0.001	0.165 ±0.003	0.403 ±0.006	0.550 ±0.006	0.617 ±0.015	0.678 ±0.005
4	0.161 ±0.002	0.162 ±0.003	0.215 ±0.003	0.278 ±0.004	0.392 ±0.006	0.653 ±0.005

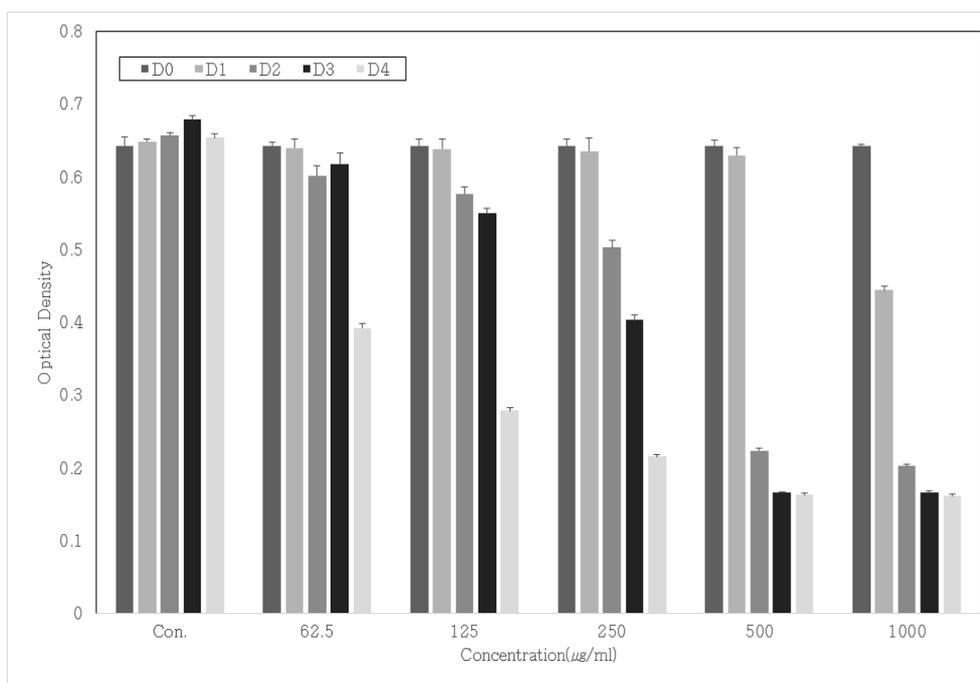


Fig. 27. Antimicrobial effect of fustin against *Helicobacter pylori*.

Table 22. Antimicrobial effect of fisetin on *Helicobacter pylori* (OD value)

Period (days)	Concentration(ppm)					
	1000	500	250	125	62.5	0
0	0.548 ±0.012	0.548 ±0.009	0.548 ±0.005	0.549 ±0.005	0.549 ±0.003	0.548 ±0.003
1	0.115 ±0.015	0.158 ±0.011	0.523 ±0.012	0.573 ±0.007	0.590 ±0.014	0.621 ±0.009
2	0.123 ±0.003	0.124 ±0.006	0.201 ±0.001	0.559 ±0.002	0.639 ±0.006	0.671 ±0.004
3	0.142 ±0.017	0.133 ±0.007	0.154 ±0.002	0.276 ±0.003	0.545 ±0.002	0.658 ±0.006
4	0.123 ±0.008	0.120 ±0.003	0.131 ±0.005	0.225 ±0.002	0.414 ±0.006	0.636 ±0.002

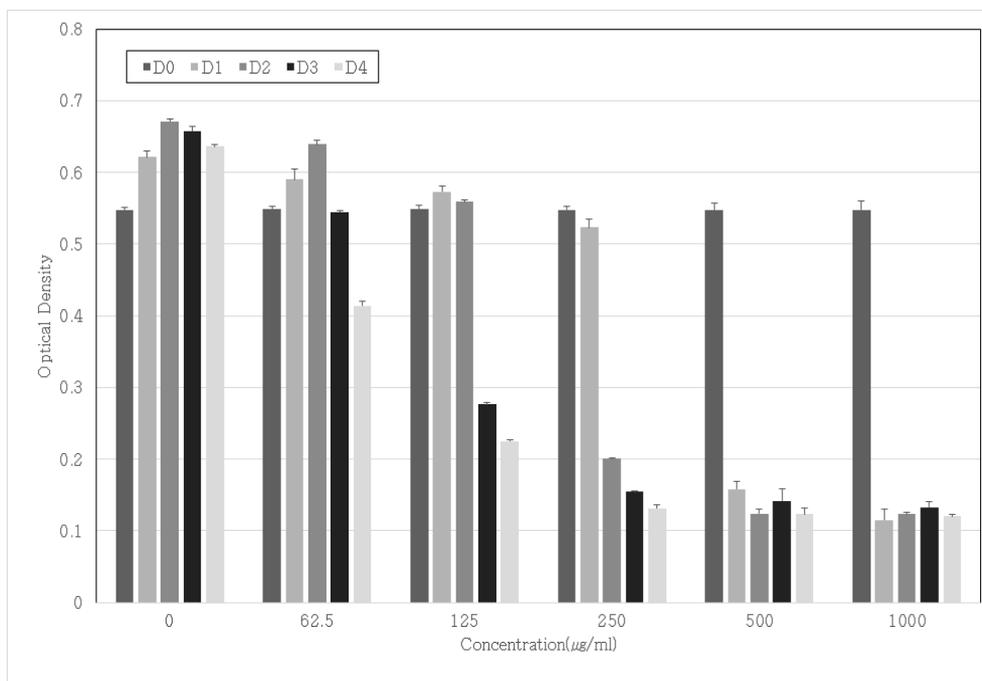


Fig. 28. Antimicrobial effect of fisetin against *Helicobacter pylori*.

Table 23. Antimicrobial effect of sulfuretin on *Helicobacter pylori*
(OD value)

Period (days)	Concentration(ppm)					
	1000	500	250	125	62.5	0
0	0.549 ±0.007	0.549 ±0.008	0.548 ±0.011	0.548 ±0.011	0.548 ±0.013	0.548 ±0.026
1	0.141 ±0.006	0.287 ±0.005	0.576 ±0.009	0.612 ±0.014	0.637 ±0.007	0.621 ±0.001
2	0.147 ±0.003	0.154 ±0.002	0.392 ±0.009	0.629 ±0.008	0.682 ±0.004	0.671 ±0.004
3	0.187 ±0.007	0.173 ±0.003	0.212 ±0.002	0.511 ±0.008	0.709 ±0.010	0.658 ±0.006
4	0.143 ±0.005	0.150 ±0.003	0.181 ±0.002	0.287 ±0.004	0.573 ±0.004	0.636 ±0.003

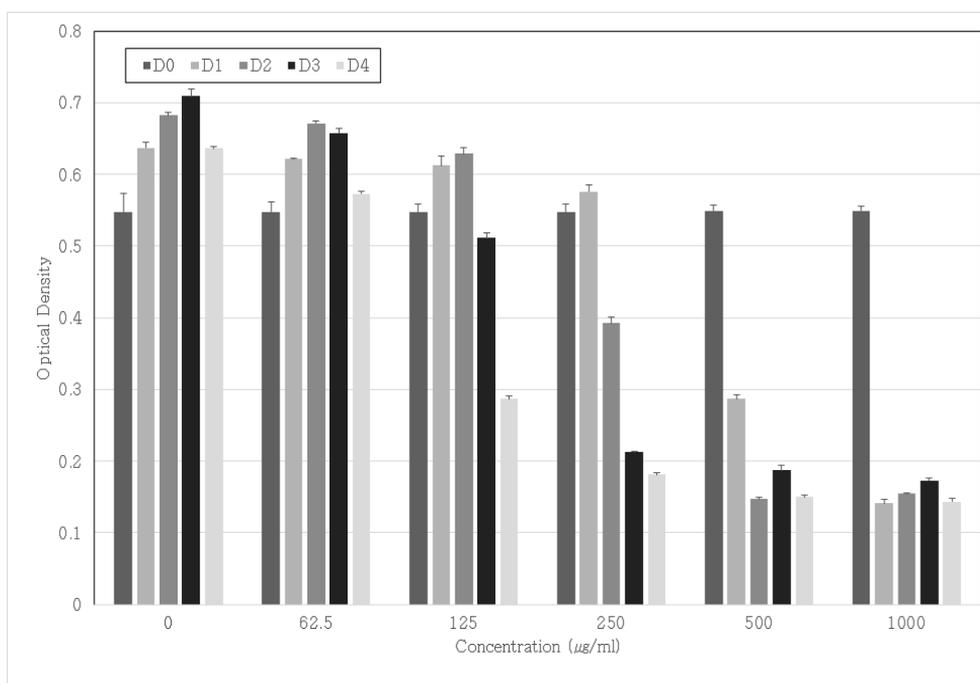


Fig. 29. Antimicrobial effect of sulfuretin against *Helicobacter pylori*

Table 24. Antimicrobial effect of butein on *Helicobacter pylori* (OD value)

Period (days)	Concentration(ppm)					
	1000	500	250	125	62.5	0
0	0.548 ±0.014	0.548 ±0.011	0.548 ±0.004	0.548 ±0.004	0.548 ±0.013	0.548 ±0.001
1	0.210 ±0.016	0.180 ±0.005	0.350 ±0.007	0.571 ±0.006	0.592 ±0.008	0.621 ±0.001
2	0.219 ±0.012	0.177 ±0.004	0.193 ±0.003	0.440 ±0.004	0.637 ±0.005	0.671 ±0.001
3	0.191 ±0.004	0.204 ±0.007	0.203 ±0.002	0.194 ±0.004	0.427 ±0.004	0.658 ±0.003
4	0.170 ±0.006	0.171 ±0.006	0.184 ±0.003	0.190 ±0.002	0.330 ±0.005	0.636 ±0.004

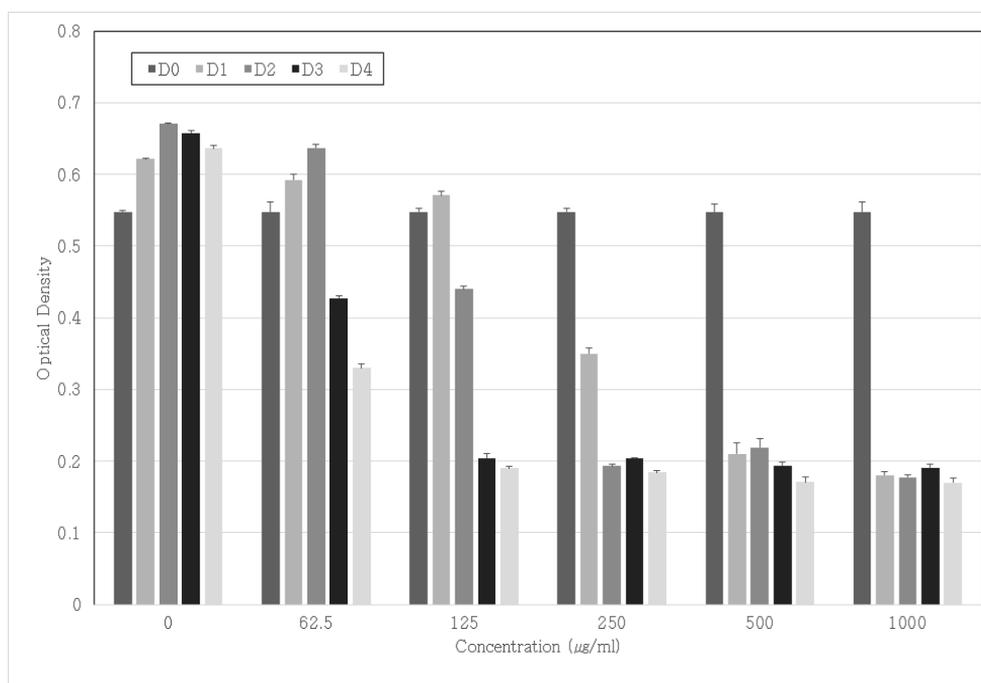


Fig. 30. Antimicrobial effect of butein against *Helicobacter pylori*.

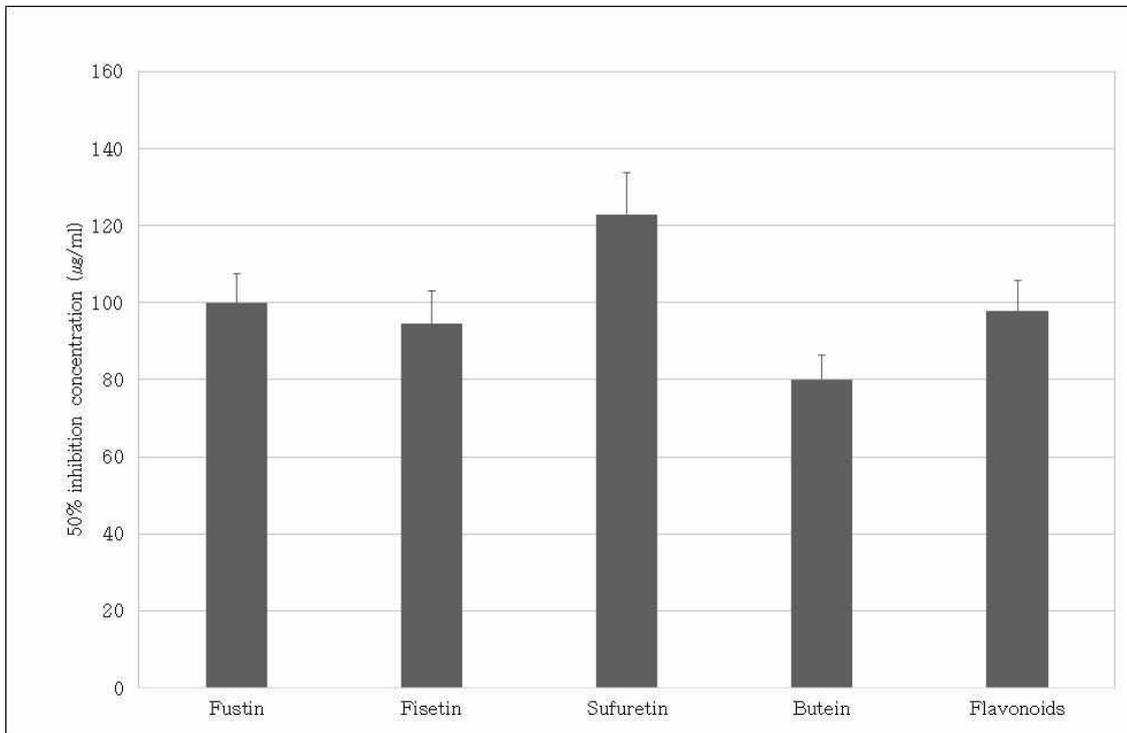


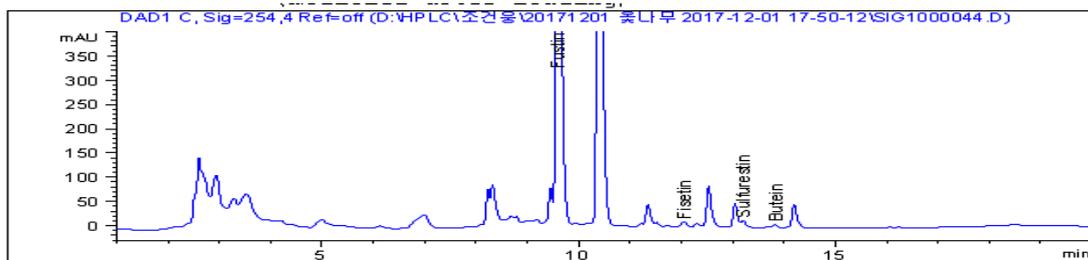
Fig. 31. 50% inhibition concentration of *Rhus verniciflua* , fustin, fisetin, sulfuretin, butein against *Helicobacter pylori*.

5) 옻청국장, 옻된장 시제품제작과 발효중 플라보이드 성분변화 분석

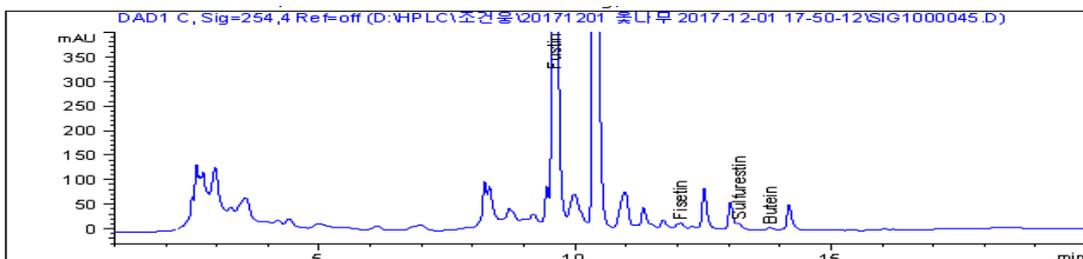
가) 청국장 시제품 제작 및 발효중 플라보이드 성분변화 분석

열수추출물(HWE8), 초고압추출물(UHP8), 초고압효소추출물(UHPE8) 녹여 발효 37℃에서 실시한 후 0, 12, 24, 36, 48, 60, 70시간 마다 추출물들이 발효에 미치는 영향을 알아보기 위해 미생물활력을 나타내는 CO₂ 방출량을 LI-6400xt(licor, 미국)로 측정하고, 청국장 발효 중 옻나무 플라보노이드 성분변화를 알아보기 위해 HPLC분석을 실시한 결과 Fig 32와 Table 25와 같이 분석 되었다. 발효시간이 오래될수록 Sulfuretin 피크와 Butein 피크가 증가하는 경향이 있었는데. 콩이 발효되는 과정에서 콩자체의 플라보노이드성분이 변형이 이루어져 Sulfuretin 피크와 Butein 피크가 증가하는 것으로 사료된다. 발효과정에서 미생물의 활동의 부산물인 CO₂가스 유출량은 Fig. 33에서와 같이 발효의 최적점에 이르는 시간은 초고압효소추출물(UHPE8), 초고압추출물(UHP8), 열수추출물(HWE8)이 대조구에 24시간 빠르게 이루어지는 것으로 나타났다. 초고압효소추출물(UHPE8)이 발효시간 단축과 CO₂가스 방출량이 가장 우수하였다. 이것은 옻나무 플라보노이드가 초기 Bacillus 균의 성장촉진 트리거로 작용하여 청국장 제조시 발효시간을 단축하여 청국장 제조 획기적 제조방법을 제공할 수 있을 것으로 사료 되며, 특히 발효과정 중에 기능성이 우수한 지용성인 Sulfuretin피크와 Butein피크가 증가하는 것으로 나타났다.

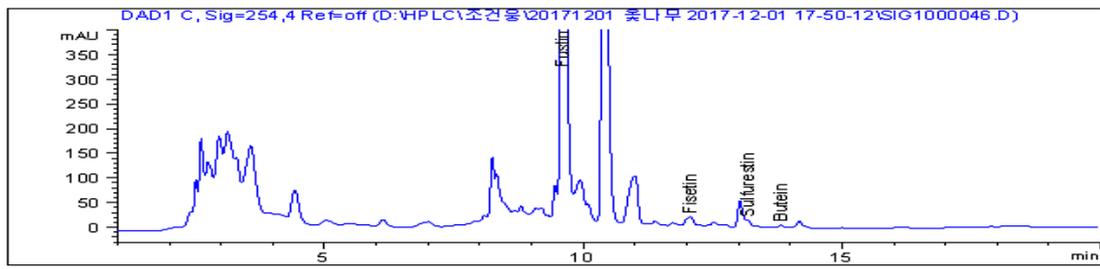
HWE 0hr



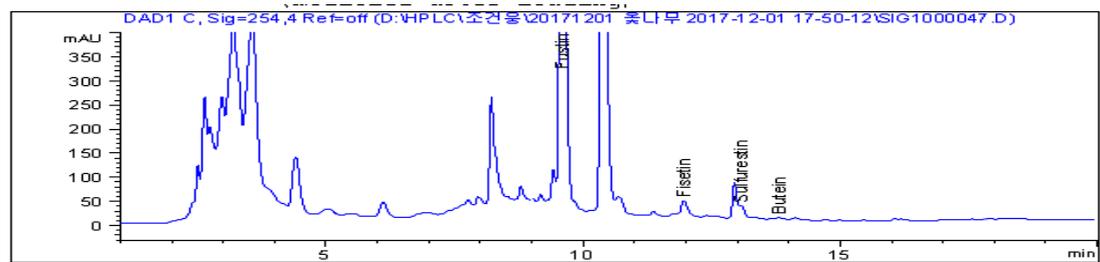
HWE 12hr



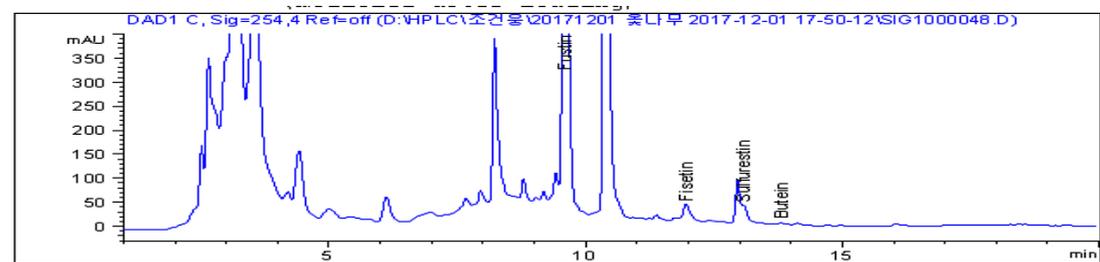
HWE 24hr



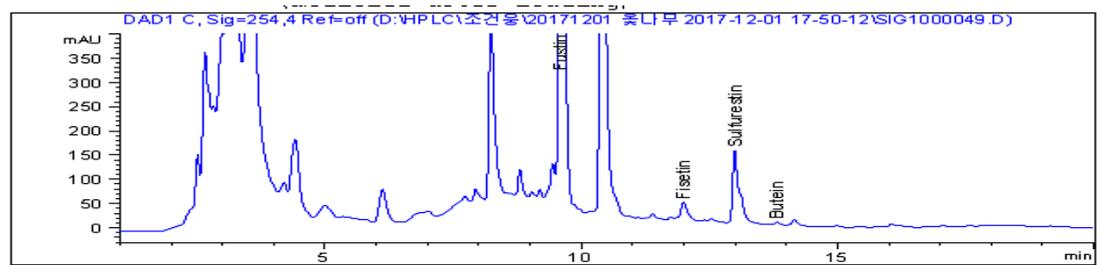
HWE 36hr



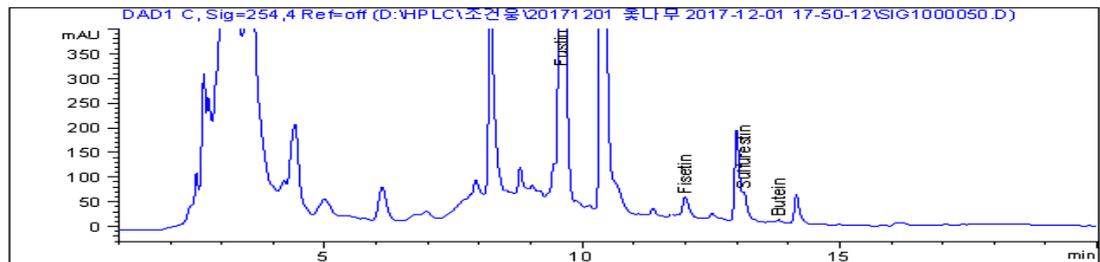
HWE 48hr



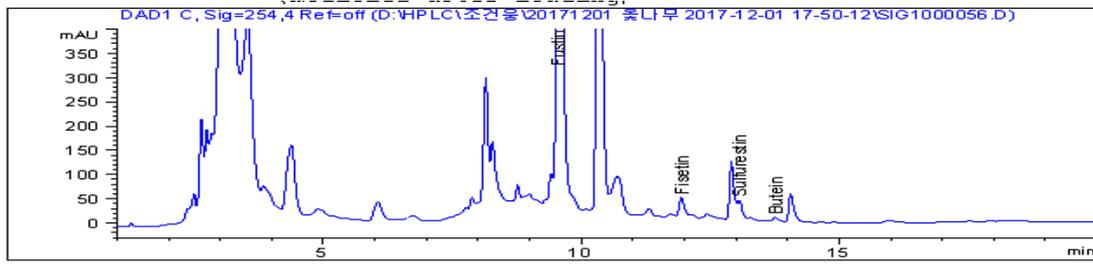
HWE 60hr



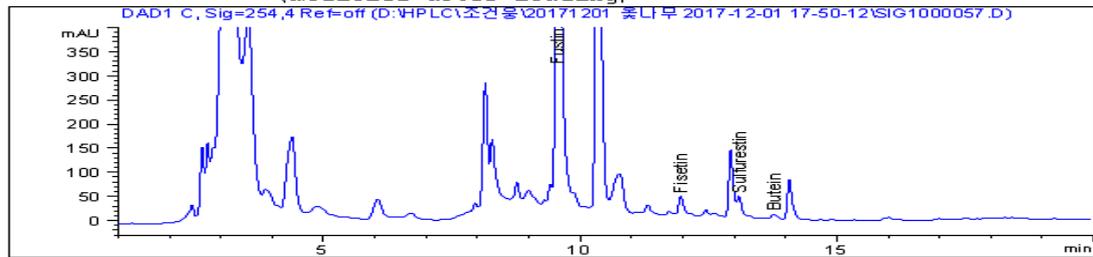
HWE 72hr



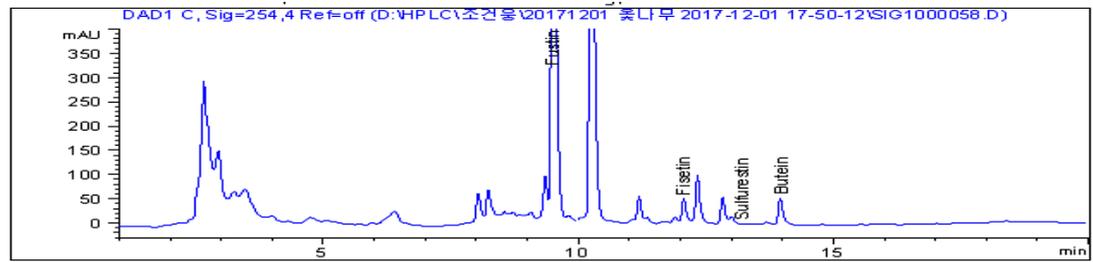
UHP 60hr



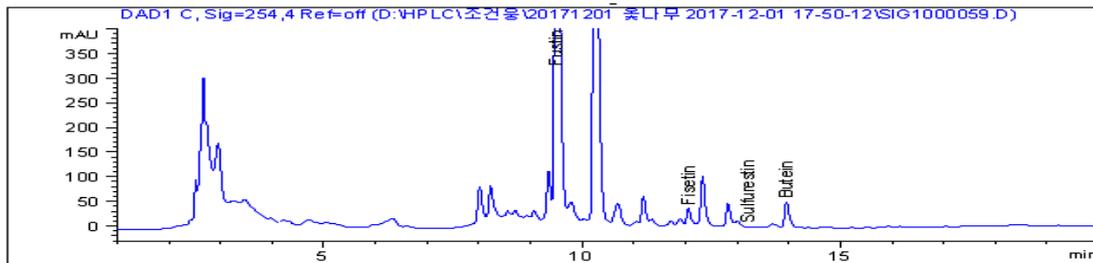
UHP 72hr



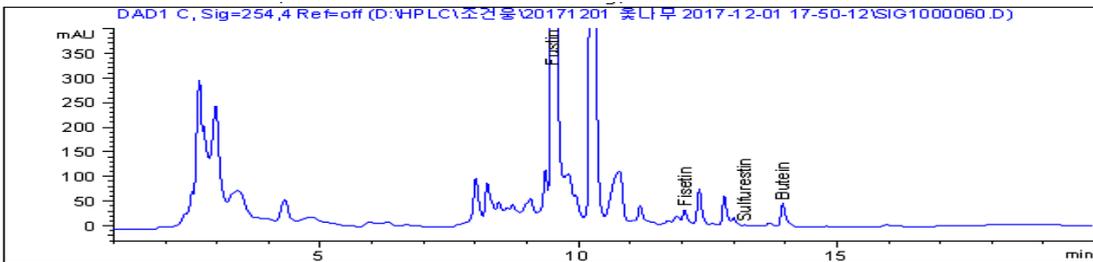
UHPE 0hr



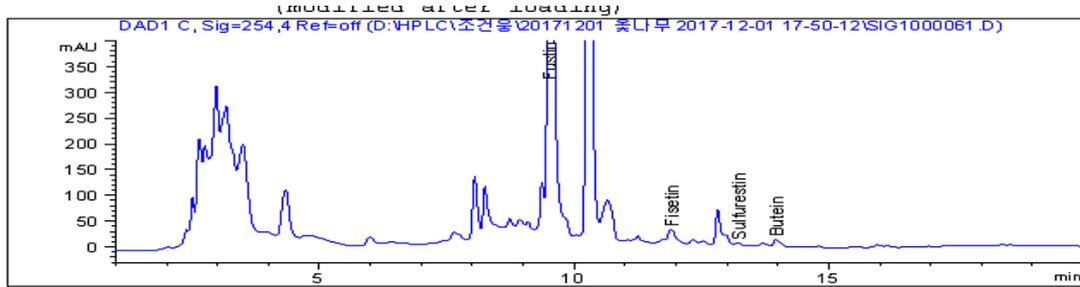
UHPE 12hr



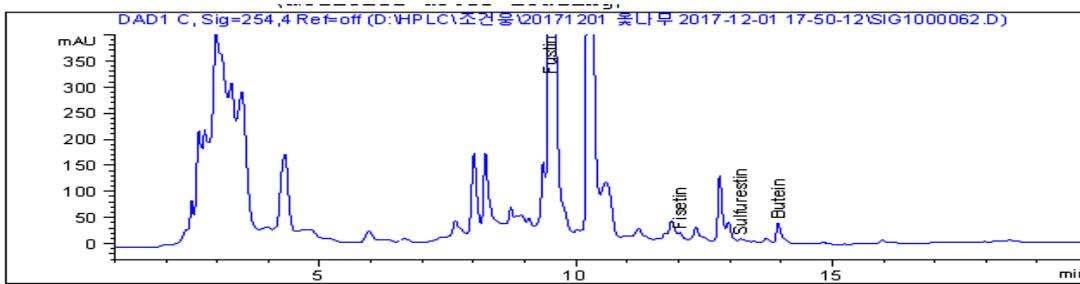
UHPE 24hr



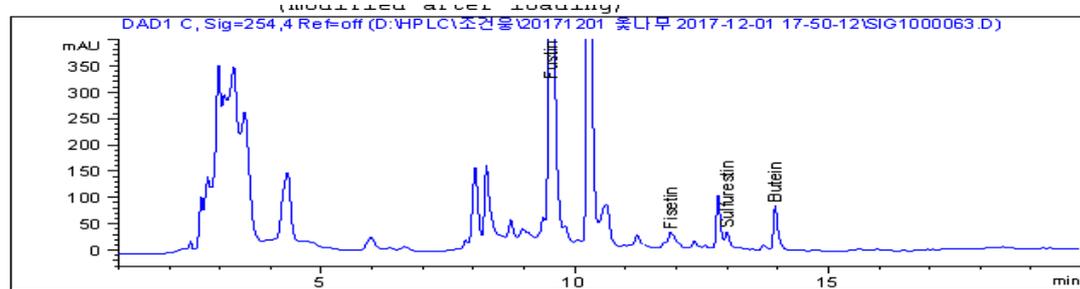
UHPE 36



UHPE 48hr



UHPE 60hr



UHPE 72hr

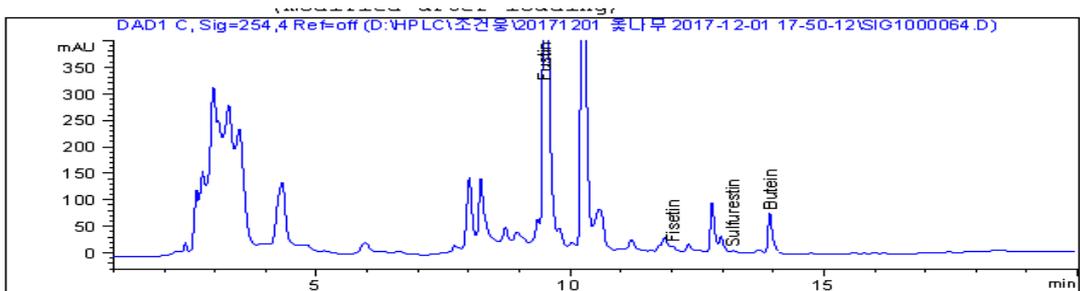


Fig. 32. HPLC Chromatogram by elapsed fermentation times of Chungkukjang fermented with hot water extract(HWE8) Ultra high pressure(UHP8), and Ultra high pressure+cellulase enzyme extract(UHP8).

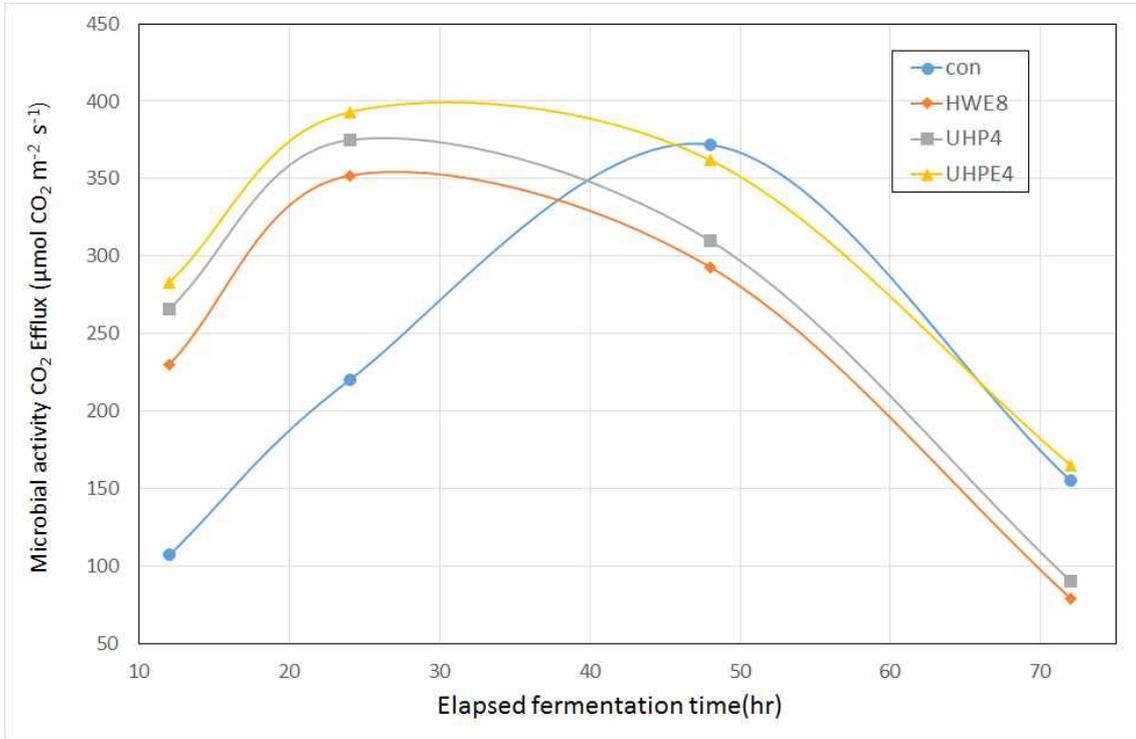
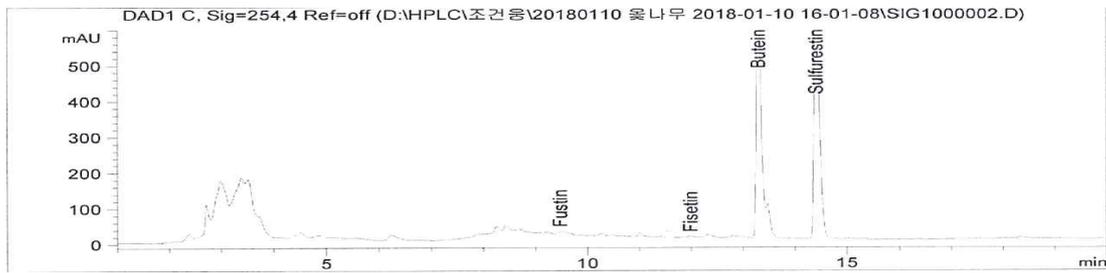


Fig. 33. Microbial activity via to CO₂ efflux by elapsed fermentation times of Chungkukjang fermented with hot water extract(HWE8) Ultra high pressure(UHP8), and Ultra high pressure+cellulase enzyme extract(UHPE8).

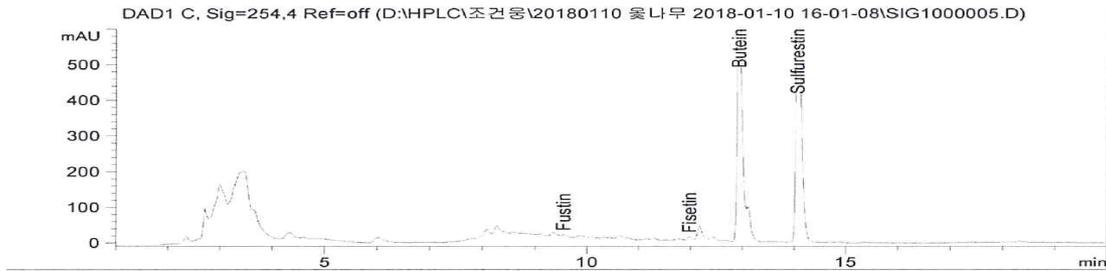
나) 옷된장 시제품제작과 발효중 플라보이드 성분변화 분석

농가의 향아리에서 발효 시작하기 전 된장 100g당 옷나무 사용량 10g에 해당하는 열수추출물(HWE8), 초고압추출물(UHP8), 초고압효소추출물(UHPE8)을 멸균수에 녹여 섞어 실온에서 2개월간 발효를 실행한 후 HPLC분석한 결과 Fig 32와 Table 25와 같이 옷나무 플라보노이드성분에 큰 변화가 없이 유지되는 것으로 나타났다. 이는 된장제조시 투여하는 옷나무 플라보노이드 성분들의 변화 없이 옷된장을 섭취 할수 있을 것으로 사료되면, 항산화, 항암, 항위염, 항균, 항고혈압, 항고지혈증 등 기능성을 갖는 옷나무 플라보노이드 성분을 옷된장으로 제조되었다고 하더라도 기능을 유지할 수 있는 기능성 된장제조를 할 수 있는 전기를 마련할 수 있는 결과라고 사료된다.

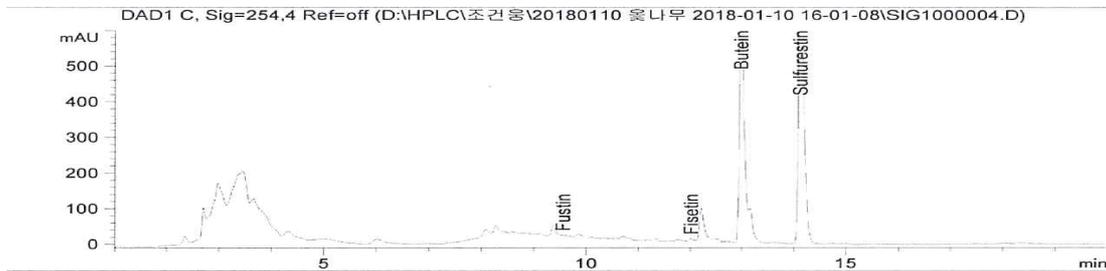
DJ Con.



DJ HWE8



DJ UHP4



DJ UHPE8

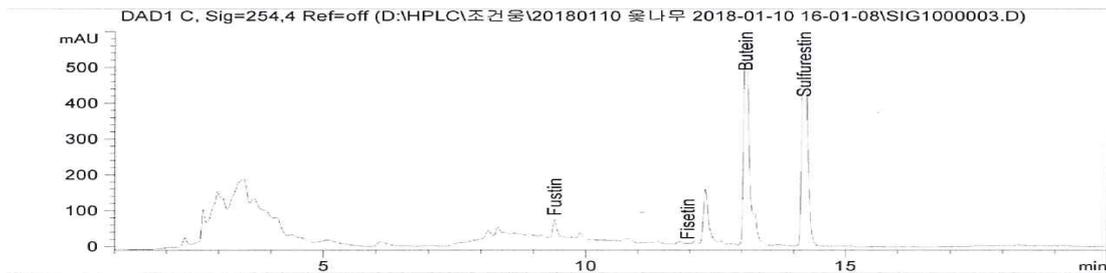


Fig. 32. HPLC Chromatogram of Doenjang fermented with hot water extract(HWE8) Ultra high pressure(UHP8), and Ultra high pressure+cellulase enzyme extract(UHP8) during 2 months.

Table 25. HPLC Chromatogram peak area (mAU×sec.) of Chungukjang and Deonjang due to the fermentation times of three extracts(HWE, UHP, UHPE)

No	Fustin	Fisetin	Sulfuretin	Butein	S+ B	Total
HWE 0hr	7,736.3	185.3	205.5	129.4	334.9	8,256.5
HWE 12hr	8,511.4	253.5	185.6	135.2	320.8	9,085.7
HWE 24hr	9,509.3	379.1	163.4	163.1	326.5	10,214.9
HWE 36hr	10,911.1	825.3	333.5	207.7	541.2	12,277.6
HWE 48hr	10,566.5	957.2	445.1	248.8	693.9	12,217.6
HWE 60hr	11,101.9	1,077.4	2,061.7	297.3	2,359.0	14,538.3
HWE 72hr	12,455.6	1,055.9	856.6	326.1	1,182.7	14,694.2
UHP 0hr	8,933.4	226.2	411.3	145.0	556.3	9,715.9
UHP 12hr	11,132.1	324.2	334.4	195.1	529.5	11,985.8
UHP 24hr	9,880.2	350.2	195.4	182.1	377.5	10,607.9
UHP 36hr	11,433.3	626.9	223.6	133.9	357.5	12,417.7
UHP 48hr	11,995.0	782.3	340.9	260.7	601.6	13,378.9
UHP 60hr	11,542.0	617.8	440.5	267.9	708.4	12,868.2
UHP 72hr	10,154.2	616.9	469.6	277.7	747.3	11,518.4
UHPE 0hr	7,347.4	443.0	69.8	506.5	576.3	8,366.7
UHPE 12hr	8,066.9	340.8	65.6	480.7	546.3	8,954
UHPE 24hr	9,885.9	332.2	93.3	502.4	595.7	10,813.8
UHPE 36hr	12,280.3	670.6	180.4	358.7	539.1	13,490
UHPE 48hr	14,717.5	299.1	256.5	495.9	752.4	15,769
UHPE 60hr	7,942.9	663.8	349.0	722.6	1,071.6	9,678.3
UHPE 72hr	7,543.7	215.0	124.8	629.9	754.7	8,513.4
Con. (DW)	727.9	264.3	4803.3	6504.5	11,307.8	12,300
DJ-HWE8	326.9	159.4	4632.8	6316.9	10,949.7	11,436
DJ-UHP8	482.0	191.3	4722.0	6470.7	11,192.7	11,866
DJ-UHPE8	712.6	69.9	4389.1	5954.6	10,343.7	11,126.2

나) 옷나무 초고압추출물을 활용한 옷청국장과 옷된장 제품화

발급번호 : 1103-Z634-FLUH-01VR-6RC1

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)		생년월일(법인번호)	
	주소		전화번호	
			휴대전화	
영업소	명칭(상호)		영업등록번호	
	(주)원바이오택		20120221640	
	소재지			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	요청하는 품목제조 보고번호	2012022164033
	제품명	황울청국장완		
	유통기한	제조일로부터 1년		
	품질유지기한	해당사항 없음		
	원재료 또는 성분명, 별첨비율	뽕장에 기재		
	용도 용법	뽕장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뽕장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	100 ~ 500g		
	성상	황갈색의 고형		
	품목의 특성 <input checked="" type="checkbox"/> 고열량 · 저영양 식품 해당 여부 []에 []아니오 [O]해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 알칼리성 식품 해당 여부 []에 [O]아니오			
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2018년 03월 22일

보고인

전라북도 부안군수 귀하

품목보고번호	20120221640-33			
처리부서	미래창조경제과	처리자성명	처리일자	2018년 03월 22일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 1103-Z634-FLUU-01VR-6RC1

원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	대두	85%
2	울나무	10%
3	올리고당	5%

용도용법	식품용 / 하루 1 ~ 3회 20 ~ 30환을 물과 함께 섭취
보관방법 및 포장재질	상온보관 PP/PE



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 1103-X6R4-AL7U-B1VR-XFEC

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호) 년 월 일	
	주소	전화번호	휴대전화
영업소	명칭(상호)	영업등록번호	
	(주)원바이오택 소재지	20120221640	
제품정보	식품의 유형	한식면장	요청하는 품목제조 보고번호
	제품명	잡곡면장	2012022164034
	유통기한	제조일로부터 1년	
	품질유지기한		
	원재료 또는 성분명, 별첨비율	뮷장에 기재	
	용도 용법	뮷장에 기재	
	보관방법 및 포장재질	뮷장에 기재	
	포장방법 및 포장단위	100 ~ 5,000g	
	성상	황갈색의 고형	
	품목의 특성	<input type="checkbox"/> 고열량·저영양 식품 해당 여부 []에 []아니오 [O]해당 없음 <input type="checkbox"/> 알칼리성 식품 해당 여부 []에 [O]아니오	
기타			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2018년 03월 22일

보고인

전라북도 부안군수 귀하

품목보고번호	20120221640-34		
처리부서	미래창조경제과	처리자성명	처리일자
			2018년 03월 22일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 1103-X6R4-AL7U-B1VR-XFEC

원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	한식메주	40%
2	염수	50%
3	옷나무	10%

용도용법	조리용
보관방법 및 포장재질	냉장보관 PET/PP/PE

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

옷나무 초고압추출물(UHP8)을 활용하여 옷청국장과 옷된장 제품화를 실시하였다.

라. 연구개발 결과요약

[옷나무 무독화]본 연구는 옷나무를 식품에 이용 시 유해물질로 취급되는 알리지 유발물질인 우루시올을 제거한 옷나무 목질부 플라보노이드의 초고압공정을 이용한 추출효율을 알아보고자 수행되었다. 먼저 식품으로 이용하기 위한 필수조건인 우루시올 제거를 위해 장수버섯을 이용하여 우루시올을 포함한 수피부의 자연탈각 조건을 확인한 결과, 배양균 액을 흩뿌리는 산포(Spray), 배양균 액에 담그는 수침(Soak), 배양균 액을 타공하여 접종(Inoculation)법과 눕혀 쌓기(Horizontal), 세워 쌓기(Vertical) 등 조건을 달리한 실험군 중 수피부에 타공하여 접종하고 세워 쌓는 방식(Inoculation + Vertical)이 가장 적합한 것으로 판단된다.

[초고압 추출법(Ultra High Pressure Extraction)] 수피부의 자연탈각이 완료된 옷나무 목질부 플라보노이드의 효율적인 추출을 위해 초고압공정을 이용하였으며 기존 열수추출(HWE)과 비교하기 위해, 초고압추출(UHP), 초고압효소처리추출(UHPE)을 진행하였다. 열수추출(HWE) 공정에서 가장 중요하다고 여겨지는 인자인 추출시간, 추출온도, 입자크기와 초고압(UHP) 공정에서는 온도 대신 반응압력을 인자로 고려하여 3수준 구형실험설계인 박스벤첸설계에 의해 실험을 설계하고 반응표면결과를 선형회귀분석과 ANOVA분석 등 통계적 분석한 결과, 열수추출(HWE)에서는 추출수율에 영향을 미치는 중요한 인자로 추출온도와 추출시간이 유의적인 상관관계를 나타냈고, 추출온도나 추출시간이 증가할수록 추출수율이나 총 페놀성 화합물의 함량 및 플라보노이드 함량이 증가했다. 초고압(UHP)과 초고압효소처리반응(UHPE)에서는 반응압력과 시료의 입자크기가 추출수율에 영향을 미치는 중요한 인자로 분석 되었으며, 기존의 열수추출(HWE)법보다 약 3배 증가한 추출수율을 보였다. 기존 열수추출(HWE) 조건보다 초고압추출(UHP, UHPE)에서 푸스틴, 피세틴, 설푸레틴, 부테인 등 플라보노이드가 증가하였고 특히, 비수용성 플라보노이드인 피세틴이 초고압(UHP) 조건하에서 크게 증가하였다. 이는 초고압(UHP)조건 하에서 추출용매인 H₂O(수분)의 세포벽의 막투과성이 개선되어 물질의 물리적인 수송현상이 용이해진 것으로 판단된다. 또한 초고압반응으로 인해 배당체로 결합하거나 물질의 화학구조 변화에도 영향을 미치는 것으로 보인다.

[헬리코박터파이로리 억제효과] 열수추출(WHE), 초고압추출(UHP), 초고압효소(UHPE)추출 등 추출조건에 따른 헬리코박터 파이로리 억제능은 48시간 배양경과후 고농도(500 μ g, 1000 μ g/ml)에서는 일반 항생제 유사한 효과를 나타냈지만 저농도에서는 효능이 떨어졌다. 저농도(50,100 μ g/ml)에서는 옷나무 추출방법중 초고압효소추출(UHPE)이 가장 우수하였다. 옷나무 플라보노이드(정제 표준품)를 Prep.-LC에 의해 푸스틴(Fustin), 피세틴(Fisetin), 설푸레틴(Sulfuretin), 부테인(Butein)로 분리 정제하여 헬리코박터 파이로리 억제능에 대한 50%억제농도(IC₅₀값)는 부테인>피세틴>옷나무 플라보노이드 표준품>푸스틴>설푸레틴의 순서로 저농도

억제능이 우수하였다.

[옷청국장, 옷된장 시제품개발] 옷청국장과 옷된장 시제품제작과 발효중 플라보이드 성분변화 분석한 결과 발효의 최정점에 이르는 시간은 초고압효소추출물(UHPE8), 초고압추출물(UHP8), 열수추출물(HWE8)이 대조구에 비해 24시간 빠르게 이루어지는 것으로 나타났다. 초고압효소추출물(UHPE8)이 발효시간 단축과 CO₂가스 방출량이 가장 우수하였다. 이것은 옷나무 플라보노이드가 초기 Bacillus균의 성장촉진 트리거로 작용하여 청국장 제조시 발효시간을 단축하는 경제적인 방법으로 판단되었다. 특히 발효과정 중에 기능성이 우수한 지용성인 Sulfuretin피크와 Butein피크가 증가하는 것으로 나타났다. 옷된장 발효시 옷나무 플라보노이드성분에 큰 변화가 없이 유지되었으며, 다양한 기능성을 나타내는 옷나무 플라보노이드성분들의 변화 없이 옷된장을 섭취 할 수 있을 것으로 사료된다. 참여기업이 옷청국장과 옷된장의 상품화를 위하여 품목제조보고를 실시하고 제품화를 실시함.

○연구개발성과

- 특허출원: 옷나무 장수버섯균 발효 무독화 원료 대량생산 기술, 초고압(UHP)물추출법에 의한 효능 성분추출공정 발명특허 출원 2건
- 산업화: 옷된장, 옷청국장 시제품화 2건 개발완료하고 품목제조보고 후 제품화 실시함
- 인력양성: 연구개발 참여 연구원인 석사 1, 박사 1의 인력양성
- 기타(타연구활용 등): Sweden SLU대학으로 부터 옷나무 무독화 장수버섯균 활성화 CO₂ 방출량 광합성측정장치 LI-6400xt의 CO₂방출량 측정기술 습득과 최소실험에 의한 박스-벤젠 실험설계를 통한 추출조건 최적화 모델식 도출.

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	2억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	2억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 3 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 15 % 국외 : 0 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 0 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			0위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			1위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		5년		
	소요예산(백만원)		400		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			1억원	2억원	5억원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	3	15	25
		국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		옷나무 무독화 신기술 적용 음료, 옷청국장, 옷된장			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	0	0	
	수 출	0	0	0	

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

	D-06
<p>4-1. 목표달성도</p> <p>○특허출원: 옷나무 장수버섯균 발효 무독화 원료 대량생산 기술, 초고압(UHP)물추출법에 의한 효능 성분추출공정 발명특허 출원 2건</p> <p>-산업화: 옷된장, 옷청국장 시제품화 2건 개발완료하고 품목제조보고 후 제품화 실시함.</p> <p>-인력양성: 연구개발 참여 연구원인 석사 1, 박사 1의 인력양성 달성</p> <p>-기타(타연구활용 등): Sweden SLU대학으로 부터 옷나무 무독화 장수버섯균 활성과 CO₂ 방출량 광합성측정장치 LI-6400xt의 CO₂방출량 측정기술 습득과 최소실험에 의한 추출조건 최적화 모델 실험 디자인인 박스-벤켄 실험설계를 통한 추출최적화 모델식 작성법 도출.</p>	
<p>4-2. 관련분야 기여도</p> <p>○ 기술적 측면</p> <p>-식품공전상 옷 추출액을 다양한 장류, 주류, 식초류 제품에 사용하기 위해서는 장수버섯균 발효에 의한 무독화방법 사용.</p> <p>-독성물질인 우루시올(수피)과 약효물질이 플라보노이드(목재)가 배양과정에서 모두 분해되는 문제발생.</p> <p>-과쇄하지 않고 균을 접종 우루시올을 포함하고 있는 수피만 완전히 제거한 기술이 개발 된다면 다양한 제품개발로 판로확대와 원료소비를 통한 옷산업 부흥에 기여할 수 있을 것으로 기대.</p> <p>-초고압(UHP)물추출물 공정을 개발하여 옷나무 물추출액의 성능개선효과 기대</p> <p>-효능효과 우수 옷나무 비수용성 플라보노이드 함유 장류(된장, 청국장)개발로 기능성 장류 개발의 발이 될 것으로 기대.</p> <p>○ 경제적·산업적 측면</p> <p>-경제적인 비닐하우스내 배양에 의한 무독화 방법으로 영세 농가와 가공업체의 용이한 옷제품 접근성 창생을 통한 옷산업의 패러다임을 혁신 할 것으로 기대.</p> <p>-옷나무 플라보노이드 추출물이 건강기능 식품원료로 사용하고 있으나 일반적인 열수 추출법으로 추출 되어 비수용성 플라보노이드함량이 낮아 효능이 떨어지는 단점을 초고압(UHP)물추출 공정을 적용하면 효능 우수 건강식품원료로 개발할 수 있을 것으로 기대.</p> <p>-옷나무 비수용성 플라보노이드 함유 장류(된장, 청국장, 간장 등), 식초류, 주류(막걸리, 맥주) 개발로 이어지는 옷산업의 외연확대를 추구할 수 있을 것 기대.</p>	

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<p>○기존 장수버섯균 발효에 의한 무독화방법은 옷나무를 수피가 부착된 상태인 목질부를 과쇄하여 병이나 봉지에 넣고 멸균처리한 후 균주를 접종하고 15일 정도 재배사에서 28℃, 95% 상대습도에서 발효시켜 건조과정을 거쳐 무독화 하였으나, 본 연구에서는 수피에 장수버섯균을 접종하고 비닐하우스에 적층식으로 쌓아올려 자연발효과정을 거쳐 수피를 자연탈각 시켜 무독화하는 매우 경제적으로 대량의 원료를 무독화 하는 방법으로서 옷담, 옷오리 조리용 첨가제외에 사용할 수 없는 옷 추출액을 다양한 장류, 주류, 식초류 제품개발에 활용할 수 있다.</p>		

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
------	------

○ 대부분의 식품은 가열처리에 의한 열수나 증기로 식품의 저장성을 확보하고 유해미생물의 생장을 억제한다. 근래에 이르러서는 기존 열처리로 인한 식품가공기술을 보완하여 품질을 향상시키고 새로운 물성을 기대할 수 있는 여러 가지 비전통적 방법들이 시도되고 있고 이 중에서 수백에서 수천 Mpa의 초고압 반응을 식품에 적용함으로써 열처리로 인한 식품의 품질저하를 막고 미생물 및 효소의 활성화 및 불활성화를 통해 고품질, 고기능성 제품에 대한 활용도가 높아지고 있다.

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
------	------

○일반 과제에 해당함

8. 등록된 연구시설·장비 현황

코드번호	D-10
------	------

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
------	------

- 1) 인력전문성 제고
- 안전(관리감독자 교육): 대한산업안전협회(년 1회)
 - 환경(환경실무자 교육): 환경보건협회(년 6회)
 - 가스(법정교육): 가스안전공사(년 1회)
 - 화학약품(법정교육): 소방안전협회(년1회)
 - 방사선발생장치(작업종사자 교육): 원자력안전아카데미(년1회)

2) 점검사항

구 분	점 검 분 야	중점 점검 사항	비 고
자 체	○담당자별 점검	○ 공조/ 유틸리티 장비 ○ 유틸리티배관, 폐수처리장	일일
	○안전관리팀 합동	○ 고압가스 사용 및 관리상태 ○ 화학약품 사용 및 관리상태	매월, 안전점검의 날 관련
	○야간 및 휴일	○ 시설운영상태 ○ 24시간 가동장비 운영상태	일일
	○방사선발생장치	○ 실험장비 운영상태	일일
	○비상대응 훈련	○ 안전시설 시험동작 및 대피훈련	년 2회
외부전문 기관	○위험시설 안전진단	○ 실험실 안전관리 상태 ○ 가스 및 약품 안전관리상태	년 2회
	○안전검사	○ 호이스트, 압력용기 안전검사	2년1회
	○정기 및 자율검사	○ 고압가스저장시설 안전관리상태 ○ 위험물옥내저장소 안전관리상태	년 5회 년 2회
	○검.교정	○ 방사선 서베이미터 검.교정	년 1회

3) 관련수칙

수 칙 명	주 요 내 용	비 고
○ 안전보건관리요령	- 안전관리 총괄, 고압가스, 전기, 화학약품 안전관리 세부사항	수질, 폐기물 장비명:xxx
○ 실험실 관리 수칙	- 관리자 편성 및 임무	
○ 전기관리 수칙	- 전기시설물 취급 및 구매설치 - 전기시설물 설치 등에 관한 규제	
○ 고압가스 취급 수칙	- 보관 및 운반, 사용 및 조작 - 누설 및 경보, 작업	
○ 화학약품 관리 수칙	- 안전관리자 임무, 조치 및 의무 - 취급, 통제구역, 비상재해	
○ 환경 관리 수칙	- 오염물질 배출 및 방지 준수사항 - 장비도입 및 폐기시 준수사항	
○ 방사선 관리 수칙	- 방사선발생장비 가동 준수사항 - 방사선발생장비 종사자 안전의무	

○ 연구실 안전점검 정기적 실시

연구실의 기능 및 안전을 유지 관리하기 위하여 안전점검지침에 따라 연구실에 관한 안전점검을 정기적으로 실시함.

○ 참여 연구원의 안전관련 교육훈련 시행

산업안전보건법 제31조 (안전보건교육) 및 연구실 안전환경조성에 관한 법률 제 18조에 의거, 전 직원에 대한 안전보건교육을 매달 실시함. 교육 방법은 모든 직원에 대한 자체교육(2시간)을 실시하고, 안전보건교육 일지를 작성하여 관리함.

○ 연구 내용 및 결과물 안전 확보

정기적으로 인원 및 시설 보안 항목, 문서보안 항목 그리고 정보보안 항목의 보안점검을 실시하여 연구 내용 및 결과물의 안전을 확보하고 있음. 참여 연구원들을 대상으로 연구 결과의 안전한 관리를 위한 안전교육 실시

○ 연구실 안전 확보 계획

참여 연구원들이 안전관련 각종 법규, 규정 및 지침을 준수하도록 하며, 요구되는 안전교육 및 훈련 실시
실험에 관련된 위험 정보를 숙지하고 적절한 개인 보호 장비 착용 실험실에 노출된 위험을 안전관리책임자에게 보고
연구실의 잠재되어 있는 위험성 발견 및 위험물질과 각종 실험장비 등 사용에 따른 안전수칙이 잘 이행될 수 있도록 지도점검 및 교육

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	옷나무 무독화	원바이오텍	참여기업	한국		2018.2.23	등록	
2	특허	옷나무 초고압추출	원바이오텍	참여기업	한국		2018.2.23	등록	
3	사업화	옷청국장	원바이오텍	참여기업	부안군		2018.3.22		
4	사업화	참옷된장	원바이오텍	참여기업	부안군		2018.3.22		
5							yyyy.mm.dd		

11. 기타사항

코드번호	D-13
○	

12. 참고문헌

	D-14
1. 정남철, 옷나무의 Urushiol과 Flavonoids의 생리활성, 박사학위논문, 전남대학교 (1998)	
1. Phil Woo Lee & Youn Jib Chung, Anatomical characteristics of secretory canal in <i>Rhus verniciflua</i> , Seoul Nat'l. Univ. J. Agric. Sci. 17(2):93-96 (1992)	
2. 최한석, 옷(<i>Rhus verniciflua</i> Stokes)에 함유된 Urushiol의 제거와 생리활성에 관한 연구, 박사학위논문, 전북대학교 (2007)	
3. 윤건목, 열처리 온도와 시간이 옷나무 추출물의 이화학적 특성과 항산화활성에 미치는 영향, 박사학위논문, 충북대학교 (2013)	
4. 김은희, <i>Rhus</i> 속으로부터 추출한 성분의 항산화 및 항미생물효과에 관한 연구, 박사학위논문, 안동대학교 (2000)	
5. 김보근, 옷나무추출물의 대식세포 활성화반응 및 항염효과, 박사학위논문, 경희대학교, (2017)	
6. Han Seok Choi, Bo Hyun Kim, Soo Hwan Yeo, et al., Physicochemical properties and physiological activities of <i>Rhus verniciflua</i> stem bark cultured with <i>Fomitella fraxinea</i> , Korean J. Mycology. 38(2): 172-178 (2010)	
7. Han Seok Choi, Ji Eun Kang, Seok Tae Jeong, et al., Changes observed in Doenjang(Soybean paste) containing fermented <i>Rhus verniciflua</i> extract during aging, Korean J. Food Sci. Technol. 47:599-607 (2015)	
8. Hye Jin Park, Gun Mook Yoon, Sang Hoon Lee, et al., Effects of extraction temperature and time on antioxidant activities of <i>Rhus verniciflua</i> extract, J Korean Soc Food Sci Nutr, 1776-1782 (2013)	
9. Hye Jin Park, Sang Hoon Lee, Gwi Yeong Jang, Meishan Li, et al., Phenolic contents of different parts of <i>Rhus verniciflua</i> Stokes according to extraction conditions, J Korean Soc Food Sci Nutr, 44(1),97~103 (2015)	
10. Niimura N, Miyakoshi T, Onodera J, et al., Characterization of <i>Rhus verniciflua</i> and <i>Rhus succedanea</i> lacquer films and their pyrolysis mechanisms studied using two stage pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry, J Anal, Appl, Pyrolysis 37:199-209 (1996)	
11. 김보현, 옷나무의 Urushiol 저감화를 위한 전자이온화에너지 처리 및 과초산 처리효과와 처리된 옷의 생리활성, 석사학위논문, 전북대학교 (2010)	

12. Hee Juhn Park, Sang Hyuk Kwon, Gap Tae Kim, et al., Physicochemical and biological characteristics of Flavonoids isolated from the heartwoods of *Rhus verniciflua*, Kor J. Pharmacogn. 31(3)345–350 (2000)
13. Hyeon Ju Jeong, Ju Hee Park, Myong Jo Kim, Optimization of the extraction process for fermented *Rhus verniciflua* Stokes using response surface methodology, Food Sci. Biotechnol. 25(1)179–184 (2016)
14. Eun Yeong Choi, Ki Tae Suk, Han Seok Choi, et al., Anti-inflammatory activities of fermented *Rhus verniciflua* stem bark extract and its growth inhibitory effect on *Helicobacter pylori*, Korean J. Food Sci. Technol., 502–507 (2016)
15. Ganesan Padmavathi, Nand Kishor Roy, Devivasha Bordoloi, et al., Butein in health and disease: a comprehensive review, Phytomedicine 25:118–127 (2017)
16. H. M. Jayaprakasha, Y. C. Yoon and H. Brueckneir, Critical aspect in adoption of ultra high pressure technology for food processing – an overview, Korean J. food SCI. vol 20. No 1. pp. 44–55 (2000)
17. 이아람, 반응표면분석법을 이용한 팽화 인삼의 초고압 추출조건 최적화, 석사학위논문, 경희대학교 (2012)
18. Arwa Mustafa, Charlotta Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review, Analytica Chimica Acta 703, 8–18 (2011)
19. K. Nagendra Prasad, En Yang, Chun Yi, et al., Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp, innovative food sci. and emerging tech. 10, 155–159 (2009)
20. K. Nagendra Prasad, Bao Yang, John Shi, et al., Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra high pressure assisted extraction, International journal of phamaceutics 51, 471–477, (2010)
21. 한기동, 정도영, 식품에 대한 초고압처리가공, 식품산업과 영양, 10(3): 30–36 (2005)
22. 노봉수, 김석신, 장판식 외, 식품저장학 초판 3쇄, 수학사 (2017)
23. 박성진, 박동식, 이수복, et al., 초고압 추출 처리에 의한 더덕 및 발효더덕의 항산화 증진, J Korean Soc Food Sci Nutr, 39(12), 1898–1902(2010)
24. Jin Ling, 하지혜, 최운용, et al., 초고압 및 초음파 추출공정을 이용한 매자나무 수피

의 향장활성 증진, Korean J. Medicinal Crop Sci. 19(1): 54–65(2011)

25. Zhang Shouqin, Zhu Junjie, Wang Changzhen, Novel high pressure extraction technology, International journal of phamaceutics 278, 471–474 (2004)
26. Jae–Sung Shin, Soon–Cheol Ahn, Sung–Won Choi, et al., Ultra high pressure extraction(UHPE) of Ginsenosides from Korean *Panax ginseng* powder, Food Sci. Biotechnol. 19(3): 743–748 (2010)
27. Chul Gue Joo, Keun Ha Lee, Chung Park, et al., Antioxidantive activities and composition analysis of *Pinus densiflora* root by ultra high pressure extraction, Journal of Industrial and Engineering Chemistry 17, 712–716 (2011)
28. Xue Tao, Yao Zhan, Qiuyan Zhou, et al., Optimization of ultra high pressure extraction process of polysaccharides from *Dendrobium candidum* by response surface method, Advanced Material Research, vol. 550–553, pp 1796–1800 (2012)
29. A–Ram Lee, Seung–Hyun Choi, Hyun–Wook Choi, et al., Optimization of ultra high pressure extraction(UHPE) condition for puffed ginseng using response surface methodology, Food Sci. Biotechnol, 23(4): 1151–1157 (2014)
30. Fracisco J. Barba, Zhenzhou Zhu, Mohamed Koubaa, et al., Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by product: a riew, Trends in Food Sci. & Technol. 49, 96–109 (2016)
31. 임용빈, 박성현, 안병진 외, 실용적인 실험계획법, 자유아카데미 (2008)
32. 김하얀, 확장된 구형실험구역을 이용한 3–수준 반응표면설계, 석사학위논문, 성신여자대학교 (2011)
33. Gan CY, Latiff AA. , Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chem. 93: 47–56 (2005)
34. Liu CS, Nam TG, Han MW, Ahn SM, Choi HS, Kim TY, Chun OK, Koo SI, Kim DO., Biological detoxification of lacquer tree (*Rhus verniciflua stokes*) stem bark by mushroom species. Food Sci. Biotechnol. 16: 935–942 (2007)
35. Prasad KN, Yang E, Yi C, Zhao M, Jiang Y. , Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. Bioresource Technol. 100: 6067–6082 (2009)

36. Sabzevari O, Galatic G, Moridania MY, Sirakia A, O'Brien PJ. , Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innov. Food Sci. Emerg.* 10: 155–159 (2009)
37. Shi J, Yu J, Pohorly J, Young JC, Bryan M, Wu Y. , Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innov. Food Sci. Emerg.* 11: 485–490 (2010)
38. Pompeu DR, Silva EM, Rogez H., et al., Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chem.* 124: 1277–1283 (2011)
39. Shin SH, Koo KH, Bae JS, et al., Preparation and characterization of urushiol free fermented *Rhus verniciflua* stem bark (FRVSB) extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 173–178 (2012)
40. Marcos Almeida Bezerra, Ricardo Erthal Santelli, Eliane Padua Oliveira, et al., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76:965–977 (2008)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.